

TSAPlus型四标五色染色试剂盒说明书

货号: P019301

实验原理

酪酰胺信号放大技术 (TSA) 是一种基于辣根过氧化酶 (HRP) 的催化活性对靶蛋白或核酸进行高密度原位标记的酶学检测方法。原理为酪胺Tyramide的过氧化物酶反应 (已标记荧光的酪胺在HRP催化H₂O₂下形成共价键结合位点) 产生的大量酶促产物与目标蛋白的酪氨酸残基共价结合, 从而使目标蛋白标记上特异的荧光或生物素。

本公司开发的试剂盒具体酪胺荧光染料为以下其中一种或者多种: TYR-488 Plus, TYR-555 (CY3) Plus, TYR-651/647 (CY5) Plus, TYR-680 Plus, TYR-594 Plus, TYR-430 Plus, TYR-750 Plus。此试剂盒的荧光染料可单独或配合使用。可以实现单标、双标、三标以及更多重荧光放大/多重同源抗体荧光标记等功能, 极大丰富了此试剂盒的内容。

储存与运输

冰袋 (wet ice) 运输; 本试剂盒储存在-20°C, 有效期12个月。

武汉总部实验中心 感谢您选择本公司, 使用前请仔细阅读使用说明书。

地址: 武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号国英种业A区14楼
联系电话15392937510



试剂组成

试剂名称	规格-50T/100T	储存条件	备注
修复液 (20*)	100ml/200ml	2-8°C	请按说明书进行稀释后使用
3%过氧化氢	6ml/12ml	2-8°C	即用型
血清封闭液	6ml/12ml	2-8°C	即用型
HRP 标记抗兔/鼠IgG通用型二抗	8ml/16ml	2-8°C	即用型
TYR-430	5ml/10ml	2-8°C	即用型
TYR-488	5ml/10ml	2-8°C	即用型
TYR-555	5ml/10ml	2-8°C	即用型
TYR-651	5ml/10ml	2-8°C	即用型
封片剂 (含DAPI)	5ml	-20°C	即用型

实验步骤

实验前准备&需自备试剂

自备: 二甲苯, 酒精, 固定液, 吐温20, PBS, PBST, 一抗, 一抗稀释液。

PBS: 购买或者自行配制0.01mol的PBS缓冲液;

PBST: 取上述配制好的PBS缓冲液, 每1L加入1ml吐温20, 混匀后即可使用, 现配现用;

1*修复液配制: 用纯水稀释20倍后使用, 例如: 精准量取纯水190ml, 加入修复液 (20*) 10ml, 混匀后即可使用;

备注: 开始实验前请仔细阅读该说明。

武汉总部实验中心 感谢您选择本公司, 使用前请仔细阅读使用说明书。

地址: 武汉市东湖新技术开发区神墩四路666号国英种业A区14楼
联系电话15392937510



1. 脱蜡（石蜡切片）

将切片依次浸泡于二甲苯1（15min）、二甲苯2（15min）、无水乙醇1（5min）、无水乙醇2（5min）、95%乙醇（5min）、85%乙醇（5min）、75%乙醇（5min），最后用水漂洗片子。

2. 固定（冰切）

切片稍晾干，用通用组织固定液固定15min，取出切片后纯水洗5min。

3. 抗原修复（3.1和3.2修复方式选择其中一种即可）

3.1热修复仪修复（适用于常规组织）：将切片置于染色架上，入盛装适量的修复液的修复仪内（确保切片完全浸没，防止干片），100℃维持修复15min以上；如遇例如骨组织、脑组织等易掉片组织，则采用水浴温度80-85℃条件下，维持修复10min，自然冷却后用PBS（PH=7.4）浸洗3次，每次2min。

3.2免疫染色抗体洗脱液处理（本试剂盒未提供，需另行购买）：切片稍甩干后将恢复至室温的抗体洗脱液铺满整个组织，室温孵育5min后去除抗体洗脱液，再次滴加足量的抗体洗脱液完全覆盖组织，37℃孵育30min，孵育完成后将玻片置于PBS内浸泡洗涤3次，每次2min。

提示：请根据实际组织摸索合适的修复方式。

4. 内源性酶阻断（可选）

组化笔画圈圈住组织，PBST稍润洗组织3-5s，将3%过氧化氢溶液滴加在切片上，一片组织约50ul染液，于室温孵育20min，PBS洗涤切片3次，每次2min。

5. 血清封闭

PBST稍润洗组织3-5s，甩干切片，每张切片滴加50-100ul血清，37℃孵育30min。

6. 孵育第一支一抗

使用PBS或者血清按照一定浓度稀释一抗（参考抗体官网），4℃过夜孵育或者37℃孵育2h

7. 二抗孵育（使用与一抗同来源标记的二抗：本试剂盒内提供的是鼠兔通用型二抗，如遇其他特殊种类，需另行购买）

PBS润洗切片3次，每次2min，PBST润洗切片3-5S，甩掉多余液体，每张切片滴加HRP 标记抗兔/鼠IgG通用型二抗约50ul，室温孵育30min。

8. 孵育TSA试剂

PBS润洗切片3次，每次2min，PBST润洗切片3-5S，甩掉多余液体，滴加TYR-430试剂，室温孵育5-15min。再用PBS洗涤3次，每次5min。

9. 抗原修复

重复步骤3，根据组织状态，选择一种合适的修复方式。

10. 孵育第二支一抗

使用PBS或者血清按照一定浓度稀释一抗（参考抗体官网），4℃过夜孵育或者37℃孵育2h。

11. 二抗孵育（使用与一抗同来源标记的二抗：本试剂盒内提供的是鼠兔通用型二抗，如遇其他特殊种类，需另行购买）

PBS润洗切片3次，每次2min，PBST润洗切片3-5S，甩掉多余液体，每张切片滴加HRP 标记抗兔/鼠IgG通用型二抗约50ul，室温孵育30min。



12. 孵育TSA试剂

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 滴加TYR-647试剂, 室温孵育5-15min. 再用PBS洗涤3次, 每次5min。

13. 抗原修复

重复步骤3, 根据组织状态, 选择一种合适的修复方式。

14. 孵育第三支一抗

使用PBS或者血清按照一定浓度稀释一抗(参考抗体官网), 4°C过夜孵育或者37°C孵育2h。

15. 二抗孵育(使用与一抗同来源标记的二抗: 本试剂盒内提供的是鼠兔通用型二抗, 如遇其他特殊种类, 需另行购买)

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 每张切片滴加HRP标记抗兔/鼠IgG通用型二抗约50ul, 室温孵育30min。

16. 孵育TSA试剂

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 滴加TYR-488试剂, 室温孵育5-15min. 再用PBS洗涤3次, 每次5min。

17. 抗原修复

重复步骤3, 根据组织状态, 选择一种合适的修复方式。

18. 孵育第四支一抗

使用PBS或者血清按照一定浓度稀释一抗(参考抗体官网), 4°C过夜孵育或者37°C孵育2h。

19. 二抗孵育(使用与一抗同来源标记的二抗)

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 每张切片滴加HRP标记抗兔/鼠IgG通用型二抗约50ul, 室温孵育30min。

20. 孵育TSA试剂

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 滴加TYR-555试剂, 室温孵育5-15min. 再用PBS洗涤3次, 每次5min。

21. 抗原修复

重复步骤3, 根据组织状态, 选择一种合适的修复方式。

18. 孵育第四支一抗

使用PBS或者血清按照一定浓度稀释一抗(参考抗体官网), 4°C过夜孵育或者37°C孵育2h。

22. 二抗孵育(使用与一抗同来源标记的二抗)

PBS润洗切片3次, 每次2min, PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体, 每张切片滴加HRP标记抗兔/鼠IgG通用型二抗约50ul, 室温孵育30min。



23. 孵育TSA试剂

PBS润洗切片3次，每次2min，PBST润洗切片3-5S, 甩掉多余液体，滴加TYR-555试剂，室温孵育5-15min，再用PBS洗涤3次，每次5min。

24. DAPI 染核封片

在组织上滴加抗荧光封片剂（含DAPI），盖上盖玻片。将做好的荧光片子于4℃避光保存。

结果说明:

荧光素名称	最大激发波长 (nm)	最大发射波长 (nm)	建议图片颜色
TYR-350	345	442	蓝色
TYR-430	434	480	青色
TYR-488	490	520	绿色
TYR-555	550	570	红色
TYR-651	640	670	粉色

注意事项:

1. 抗原修复时间和条件要依组织来调整，修复过度，组织易脱片。
2. 孵育后的每一步均必须清洗干净，避免出现杂点影响表达的观察。
3. 一抗的稀释比参考官网调整，浓度高了容易造成高背景，影响观察；浓度低了易产生阴性结果。
4. 孵育温度保持稳定，切片水平且孵育均匀，否则易产生结果不均匀的现象。
5. 修复完后一定要自然冷却，否则易造成组织干片，表达背景高且表达不均匀。
6. 微量的产品使用移液枪时请尽量精准，离心之后使用。

