



五色酪酰胺信号放大试剂盒（抗兔二抗）

货号：EX6070

规格：20 slides, 50 slides

保存：-20°C避光保存，**有效期见外包装。**

产品内容：

组分	20 slides	50 slides
SF488 Tyramide (200×)	10μL	25μL
SF555 Tyramide (200×)	10μL	25μL
SF594 Tyramide (200×)	10μL	25μL
SF680Tyramide (200×)	10μL	25μL
HRP-羊抗兔 IgG	40μL	100μL
BSA	0.28g	0.7g
1× Tyramide Amplification Buffer	8mL	20mL
DAPI 染色液（即用型）	2×1mL	5mL
抗荧光淬灭封片剂	0.4mL	1mL

荧光光谱数据：SF488: 490/515nm; SF555: 555/565nm; SF594: 590/617nm; SF680: 681/698nm

产品介绍：

酪胺信号放大（TSA）是一种基于辣根过氧化物酶（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。多重标记仅需在热修复法去除非共价结合的抗体后换另一种一抗、荧光素酪胺，如此往复即可。

使用方法：

自备试剂：

- 1× PBS
- 二甲苯
- 乙醇
- 0.1M 柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）
- 30%过氧化氢
- 封闭缓冲液：1g BSA 溶于 100mL 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中，或选择市面上在售封闭缓冲液

1. 样本准备：

- (1) 将石蜡切片放置在 60°C 的烘箱中 30 min。
- (2) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次，每次 5min，以彻底脱掉石蜡。
注：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。
- (3) 室温下，将切片浸没于无水乙醇中漂洗 2 次，每次 5min。
- (4) 室温下，将样本连续浸没在不同浓度的乙醇（95%、90%、80%、70%）中，每种浓度漂洗 1 次，每次 5min。
- (5) 室温下，将切片浸没于纯水中 3 min，再将切片浸没于 1×PBS 中 3 min，用滤纸吸干多余液体。
- (6) 用免疫组化笔描绘样品轮廓，以便下游通透与标记。
- (7) 抗原修复：将 0.1M 柠檬酸钠缓冲液（PH 6.0），用微波炉加热至沸腾，将切片置于缓冲液中，间断煮沸 10 min。

注：①此过程中，组织要一直浸没于缓冲液中，以保证组织的抗原修复效果。抗原修复后，取出切片于室温中逐渐降温。② 需根据不同的样本选择不同的抗原修复方法。

- (8) 1×PBS 清洗两次。

2. （可选）内源性过氧化物酶灭活

如需要，可加入足够量的 3%过氧化氢覆盖样品并在室温孵育 60 min，淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

3. 免疫标记

- (1) 封闭：用封闭缓冲液室温封闭 1 h。
- (2) 用封闭缓冲液将一抗稀释至适当浓度。将样品与一抗在室温下孵育 1h 或 4°C 过夜。
- (3) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (4) 用封闭缓冲液将 HRP-羊抗兔 IgG 以 1:200 稀释，室温孵育 1h。
- (5) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (6) 用 1×Tyramide Amplification Buffer 将 SF Tyramide (200×) 以 1:200 稀释，每个样品加 100μL，室温孵育 10 min。稀释后的染色液可在室温下避光保存 24 h。
- (7) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (8) 微波修复，自然冷却至室温（步骤同抗原修复）。
- (9) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (10) 单染结束，封片观察或继续标记（建议从步骤（1）封闭开始）。

注：每一轮染色结束后可通过荧光显微镜确认染色情况。

4. 复染、封片

- (1) 滴加适量 DAPI 染色液（即用型）于组织上，浸没样本，室温孵育 5 min。
- (2) 室温下 1×PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
- (3) 滴加适量抗荧光淬灭封片剂，盖玻片封片。
- (4) 显微镜成像。

注意事项:

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。
2. 1×Tyramide Amplification Buffer 首次使用后，建议小量分装，-20°C保存，避免反复冻融。
3. 为了防止出现假阴性、假阳性的结果，实验过程中需设置阴性对照和阳性对照。对于组织样品，建议对未染色的对照（不添加抗体或酪酰胺）进行成像，确定组织是否有自发荧光，排除对背景的影响。
4. 建议1:200稀释SF Tyramide。较高的浓度可能会导致信号过强或背景高，建议从1:100到1:1000梯度稀释。
5. 可依次使用多个SF Tyramide 来标记同一样品的不同靶标，每次酪酰胺反应后需进行抗体剥离。
6. 多色标记时，依据抗原密度不同选择不同荧光素（低密度抗原选择强染料；高密度抗原选择较弱染料）。标记顺序对最终标记效果有一定影响，需自行摸索。
7. 如若做细胞样本/冰冻切片的TSA多色实验，需进行预实验判断试剂是否可用，具体步骤请参考相关文献。