TSA Plus 荧光双重染色试剂盒

TSA Plus Fluorescent Double Staining Kit

使 用 说 明 书

货号及规格：

目录编号	包装规格
M399-01	50T/25uL
M399-01	100T/50uL

试剂盒组成：

Component NO.	Component	M399-01	M399-02	Storage
M399-1	iF488-Tyramide	25μL	50 μL	-20℃
M399-2	iF555-Tyramide	25μL	50 μL	-20℃
M399-3	Tyramide 稀释液	100 mL	2×100 mL	4℃
M399-4	DAPI(即用型)	10 mL	20 mL	4℃
M399-5	组织自发荧光淬灭剂(苏丹黑)	10 mL	20 mL	RT
M399-6	抗荧光淬灭封片剂	5 mL	10 mL	-20℃

储存条件：试剂盒内各组分按各自所需条件保存，冰袋运输，保质期 12 个月。

产品概述：本产品 TSA Plus 荧光双重染色试剂盒，适用于石蜡切片免疫荧光双重染色，尤其适用于相同来源一抗的双重荧光免疫标记，也可用于不同来源抗体的双重荧光免疫标记。主要原理是基于酪胺信号放大(TSA，Tyramide signal amplification)，以下简称 TSA 技术。TSA 技术主要原理是利用酪胺 Tyramide 的过氧化物酶反应(即荧光标记的酪胺盐在 HRP 催化 H2O2 下形成共价键结合位点)，产生大量的酶促反应，该产物能与周围的蛋白残基(包括色氨酸、组氨酸、酪氨酸残基)结合，在抗原-抗体结合部位形成大量的荧光素沉积，实现信号放大。还可以通过多次重复免疫标记，使用不同的荧光酪胺实现多重荧光染色。相较于本公司另一款 TSA 荧光双重染色试剂盒(货号：M398)，本试剂盒分别用荧光信号更强更稳定的 iF488-Tyramide、iF555-Tyramide 代替了 FITC-Tyramide 和 CY3-Tyramide，是货号：M398 的升级版。

TSA 系列荧光染色试剂盒相关荧光染料的荧光光谱数据如下：

荧光染料类型	Ex/Em
FITC-Tyramide	492/518
CY3-Tyramide	555/569
iF488-Tyramide	491/516
iF555-Tyramide	557/570
iF647-Tyramide	656/670

实验前准备：

1. 自备 0.01 mol/L PBS 缓冲液(pH7.0-7.4，可购买 C511 或 C513)，3% H_2O_2 和 0.3% H_2O_2。
2. 自备一抗及相应 HRP 标记二抗，抗原修复液(根据抗体及组织类型选择合适的抗原修复液)。
3. 根据用量，按照下表比例配制 TSA 染色工作液。

TSA 染色工作液	试剂名称	体积
TSA-488 染色工作液	Tyramide 稀释液	1 mL
	0.3% H2O2	10 μL
	iF488-Tyramide	2 μL
TSA-555 染色工作液	Tyramide 稀释液	1 mL
	0.3% H2O2	10 μL
	iF555-Tyramide	2 μL

注：荧光 Tyramide 融化后离心机短时离心，干净吸头吹吸混匀后取用。TSA 染色工作液建议现配现用，需 4℃避光保存，24h 内有效。

操作步骤：(以组织切片为例，以下实验步骤中的实验用水均为纯水)

1. 组织切片脱蜡至水。
2. 抗原修复：根据所使用的一抗及样本类型，采用合适方式对组织切片进行抗原修复。
3. PBS 清洗 3 次，每次 5 min，然后用免疫组化笔对组织画圈标记。
4. 灭活内源性过氧化物酶：向切片上滴加 3% H_2O_2 覆盖组织，室温避光孵育 25 min，阻断内源性过氧化物酶，以减少非特异性背景染色。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
5. 封闭：切片水分稍微甩干后，向组织上滴加 3% BSA 或血清封闭 30 min，具体根据一抗及二抗种属决定封闭试剂。
6. 一抗孵育：用 PBS(或其他抗体稀释液)将一抗稀释至适当浓度。轻轻甩掉切片上的液体，滴加稀释好的一抗覆盖组织，切片平放于加水的湿盒内 4℃孵育过夜。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
7. 对应 HRP 二抗孵育：用 PBS(或其他抗体稀释液)将二抗稀释至适当浓度，向组织上滴加二抗，室温孵育 50 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
8. 向组织上滴加 50-100μL TSA-488 染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育 10 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
9. 微波处理：组织切片置于盛满抗原修复液(根据组织类型及抗体选择合适的抗原修复液)的修复盒中进行微波加热处理，去除已经结合的一抗二抗。(微波建议的时间和温度：加热到 95℃以上，维持 15 min)此步骤中需防止液体过度蒸发导致的干片。
10. 重复步骤 6，进行第二个一抗的孵育：用 PBS(或其他抗体稀释液)将需检测的第二个抗体(一抗)稀释至适当浓度。轻轻甩掉切片上的液体，滴加稀释好的抗体覆盖组织，切片平放于加水的湿盒内 4℃孵育过夜。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
11. 重复步骤 7，进行对应 HRP 二抗孵育：用 PBS(或其他抗体稀释液)将二抗稀释至适当浓度，向组织上滴加二抗，室温孵育 50 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
12. 向组织上滴加 50-100μL TSA-555 染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育 10 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
13. 细胞核复染 DAPI：切片稍甩干后在组织上滴加 DAPI(即用型)染色液，避光室温孵育 10 min。PBS 清洗 3 次，每次 5 min。
14. 组织自发荧光淬灭(可选)：向组织上滴加组织自发荧光淬灭剂(苏丹黑)，室温孵育 5 min，流水冲洗 3 min。
15. 封片及镜检：切片稍甩干后滴加抗荧光淬灭封片剂封片。荧光显微镜或激光共聚焦显微镜观察并采集图像。切片置于避光切片盒内 4℃可保存 15 天。

注意事项：

1. 与荧光二抗相比，TSA 试剂盒有更高的灵敏度和更强的信号。因此一抗使用浓度需降低，一般在抗体说明书建议的稀释比基础上再扩大 5-10 倍，以减少非特异性结合导致的背景荧光。建议设置一抗梯度浓度获得最佳效果。
2. 如背景荧光较强，建议增加组织自发荧光淬灭步骤。
3. 荧光 Tyramide 的建议稀释比是 1:500，可根据实验结果调整稀释比例(调整范围 1:200 - 1:1000)。
4. 如进行多重荧光标记，建议先孵育多抗，后孵育单抗；先孵育低丰度目的蛋白对应的抗体，再孵育高丰度目的蛋白对应的抗体。
5. 为了您的健康和安全，操作时请穿好实验服、戴好手套。
6. 本产品仅供科研使用，不得用于临床和诊断。

==========

扫码关注我们