

免疫荧光多标试剂盒说明书（2 标 3 色）

一、实验原理

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 H_2O_2 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。

二、实验试剂

实验试剂	规格	储存条件	稀释比例
TSA-594	25uL×1 支	-20℃	1/200
TSA-FITC	25uL×1 支	-20℃	1/200
DAPI 染液	5mL×1 瓶	4℃	即用型
抗体洗脱剂	5mL×1 瓶	4℃	即用型
一抗稀释液	10mL×1 瓶	4℃	即用型
封闭液	10mL×1 瓶	4℃	即用型
HRP-山羊抗兔 IgG	10uL×1 支	-20℃	1/500
HRP-山羊抗小鼠 IgG	10uL×1 支	-20℃	1/500

实验试剂及耗材	品牌	货号
抗荧光淬灭封片剂	SouthernBiotech	0100-01
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	10009228
组化笔		
盖玻片(24mm×40mm)		
柠檬酸修复液(PH6.0)20×		
EDTA 抗原修复液(PH9.0)20×		

自备试剂耗材：（推荐使用，仅供参考）

三、实验流程

A.石蜡切片

1. 脱蜡：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. 抗原修复：抗原修复通常使用 1×柠檬酸（PH6.0）作为修复液，高温高压修复，将切片至于高压锅中，加入适量的修复液，关上高压锅，待冒起后计时，计时 2min，冷却至室温，修复完毕。如遇表达较弱的指标，则可用 EDTA（PH9.0）作为修复液进行抗原修复。如遇骨组织、脑组织等易掉片组织，则采用微波修复，修复温度控制在 80℃以下，修复液可用 2×柠檬酸（PH6.0）。
3. 内源性酶阻断：用水配制 3% H_2O_2 配制，将切片放于溶液中，室温孵育 20min。如遇易掉片组织，可适当降低 H_2O_2 浓度和孵育时间。
4. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
5. 一抗孵育：使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 2h。
6. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
7. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-594，37℃孵育 30min，再用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。
8. 抗原洗脱：在组织上滴加蛋白洗脱液，室温孵育 60min（37℃孵育更佳）。
9. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
10. 一抗孵育：使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗，4℃过夜孵育，或者 37℃孵育 2h。
11. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
12. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-FITC，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
13. DAPI 染核：将 DAPI 工作液滴加到组织上，室温孵育 5min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。将液体甩干，在组织上滴加抗荧光封片剂，盖上盖玻片。将做好的荧光片子至于 4℃避光保存。

B. 冰冻切片

1. 复温：将冰冻切片，放于室温，恢复至室温状态，备用。

2. 抗原修复:

(1)固定样本制作的冰冻切片:

将切片至于装有修复液的修复盒中, 用微波炉加热至 60-70℃, 维持该温度约 5-10min, 冷却至室温, 即完成抗原修复。

(2)新鲜组织制作的冰冻切片:

将切片置于固定液, 室温固定 10-15min, 用 PBS 洗片子 2-3 次, 后续实验可不用进行抗原修复。

3. 内源性酶阻断: 用水配制 3% H_2O_2 配制, 将切片放于溶液中, 室温孵育 20min。如遇易掉片组织, 可适当降低 H_2O_2 浓度和孵育时间。
4. 封闭: 在组织上滴加抗原封闭液, 37℃孵育 30min。
5. 一抗孵育: 使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗, 4℃过夜孵育, 或者 37℃孵育 2h。
6. 二抗孵育: 用 PBST (或者 TBST) 配制二抗, 37℃孵育 1h。
7. 孵育 TSA 试剂: 在组织上滴加 TSA-594, 37℃孵育 30min, 再用 PBST 洗涤 3 次, 每次 5min。
8. 抗原洗脱: 在组织上滴加蛋白洗脱液, 室温孵育 60min (37℃孵育更佳)。
9. 封闭: 在组织上滴加抗原封闭液, 37℃孵育 30min。
10. 一抗孵育: 使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗, 4℃过夜孵育, 或者 37℃孵育 2h。
11. 二抗孵育: 用 PBST (或者 TBST) 配制二抗, 37℃孵育 1h。
12. 孵育 TSA 试剂: 在组织上滴加 TSA-FITC, 37℃孵育 30min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。
13. DAPI 染核: 将 DAPI 工作液滴加到组织上, 室温孵育 5min, 再用 PBS 洗涤 3 次, 每次 5min。将液体甩干, 在组织上滴加抗荧光封片剂, 盖上盖玻片。将做好的荧光片子至于 4℃避光保存。

C. 细胞爬片

1. 抗原修复 (选择性使用, 如果细胞固定时间过长, 可选择抗原修复)

将修复液加热至 60-70℃, 然后将加热后的修复液, 滴加到爬片上, 然后冷却至室温。

2. 细胞通透: 细胞爬片, 需用 0.5%Triton-100, 进行破膜, 室温处理 20min。
3. 封闭: 在爬片上滴加抗原封闭液, 37℃孵育 30min。
4. 一抗孵育: 使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗, 滴加在爬片上, 4℃过夜孵育, 或

者 37℃ 孵育 2h。

5. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃ 孵育 1h。
6. 孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-594，37℃ 孵育 30min，再用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。
7. 抗原洗脱：在爬片上滴加蛋白洗脱液，室温孵育 60min（37℃ 孵育更佳）。
8. 封闭：在爬片上滴加抗原封闭液，37℃ 孵育 30min。
9. 一抗孵育：使用抗体稀释液按照一定浓度稀释一抗，滴加在爬片上，4℃ 过夜孵育，或者 37℃ 孵育 2h。
10. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃ 孵育 1h。
11. 孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-FITC，37℃ 孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
12. DAPI 染核：将 DAPI 工作液滴加到爬片上，室温孵育 5min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。在载玻片上，滴加抗荧光封片剂，将爬片倒扣到载玻片上，适当凉干，将做好的荧光片子至于 4℃ 避光保存。

四、荧光素信息

荧光素名称	最大激发波长(nm)	最大发射波长(nm)	显微镜下颜色	滤光片
TSA-FITC	490	520	绿色	FITC 通道
TSA-594	550	570	橙红色	594 通道

TSA 试剂均使用含 0.003% H_2O_2 的 PBST 配制，稀释比例均为 1/1000。

五、注意事项

1. 一抗的选择
 - (1) 一抗优先选择单克隆抗体，其次选择多克隆抗体；
 - (2) 如果是小鼠样本，尽量避开选择小鼠来源一抗，如果选择小鼠一抗，二抗除了与一抗结合，也会结合组织内源性的 IgG，产生非特异性着色；
 - (3) 选择能够做 IHC-P（或者 IHC）的一抗做实验，通常 IF 指的是细胞的免疫荧光。
2. 如果为容易掉片组织，修复时可采用 60℃ 水域修复方式进行。