

免疫荧光多标试剂盒说明书（2 标 3 色）

一、实验原理

酪酰胺信号放大（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-CY3	25uL×1 支	-20℃	1/200
TSA-FITC	25uL×1 支	-20℃	1/200
TSA-680	25uL×1 支	-20℃	1/200
TSA-430	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-CY3，37℃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. 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）。
14. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
15. 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。

16. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
17. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
18. 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）。
19. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
20. 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。
21. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
22. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
23. 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。
24. 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。
25. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
26. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-CY3，37℃孵育 30min，再用 PBST 洗涤 3 次，每次 5min。
27. 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）。
28. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。

29. 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。
30. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
31. 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。
32. 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）。
33. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
34. 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。
35. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
36. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
37. 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）。
38. 封闭：在组织上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
39. 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。
40. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
41. 孵育 TSA 试剂：在组织上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
5. 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-CY3，37℃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. 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）。
13. 封闭：在爬片上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
14. 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。
15. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
16. 孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-680，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
17. 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）。
18. 封闭：在爬片上滴加抗原封闭液，37℃孵育 30min。
19. 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。
20. 二抗孵育：用 PBST（或者 TBST）配制二抗，37℃孵育 1h。
21. 孵育 TSA 试剂：在爬片上滴加 TSA-430，37℃孵育 30min，再用 PBS 洗涤 3 次，每次 5min。
22. 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-CY3	550	570	橙红色	CY3 通道

TSA-680	680	700	深红色	CY5/CY5.5通道
TSA-430	430	480	青色	Aqua 通道

TSA 试剂均使用含 0.003% H_2O_2 的 PBST 配制。

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。