TSA Fluorescence Double Staining Plus Kit （Rabbit secondary antibody）{多重荧光免疫组化染色，双标三色，兔二抗}

货号：RK50025P

规格：10 T / 50 T

◆ 产品简介

本产品主要原理是基于酪胺信号放大（TSA，Tyramide signal amplification）技术，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 H_2O_2 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、酪氨酸残基等）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。同时，通过抗体洗脱，使用不同的荧光酪胺实现多重荧光染色标记。

荧光光谱数据如下：

荧光染料	Ex/Em（nm）	检测的激光器（nm）	效能等同检测通道
TYR-520	490/520	488	Alexa Fluor 488，DyLight 488，FITC，FAM，Cy2
TYR-570	550/570	552/561	Alexa Fluor 555，Cy3，Tetramethylrhodamine
TYR-620	590/620	594	Alexa FLuor 594，mCherry，Texas Red Dye，DyLight 594
TYR-690	630/690	638/640	Alexa Fluor 647，APC，Cy5
TYR-480	450/480	436	CFP ，Cerulean，BV480

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格（10 T）	规格（50 T）	保存条件
RK50025P-1	TYR-520 plus fluorochrome (200 ×)	5 μL（Concentrated type）	25 μL（Concentrated type）	2-8℃ ，Protect from Light
RK50025P-2	TYR-570 plus fluorochrome (200 ×)	5 μL（Concentrated type）	25 μL（Concentrated type）	2-8℃, Protect from Light
RK50025P-3	TSA buffer	1.6 mL	8 mL	2-8℃
RK50025P-4	Polymer-HRP goat anti-rabbit secondary antibody（Ready-to-use）	1.6 mL	8 mL	2-8℃
RK50025P-5	DAPI staining solution（Ready-to-use）	1 mL	5 mL	2-8℃, Protect from Light
RK50025P-6	Antibody diluent	2 mL	10 mL	2-8℃
RK50025P-7	Peroxidase inhibitor solution	2 mL	10 mL	2-8℃, Protect from Light
RK50025P-8	Antifade mounting medium	1 mL	5 mL	2-8℃

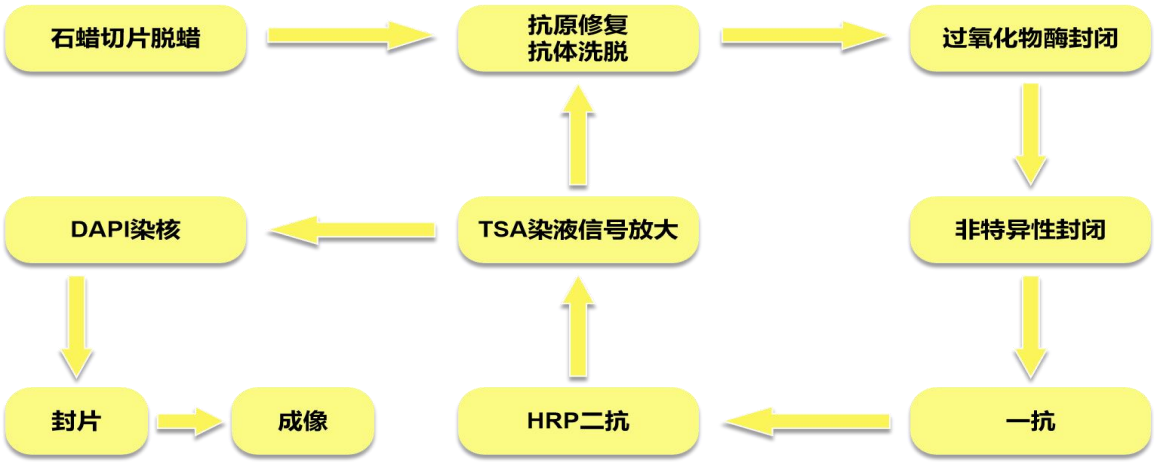
样本要求：石蜡组织切片、冰冻组织切片、细胞爬片（冰冻切片、细胞爬片需要配合 RM02984P Antibody Stripping Buffer (for multiplex fluorescent staining){抗体洗脱液，多重荧光染色专用}使用）。

400-999-6126 cn.market@abclonal.com www.abclonal.com.cn

◆ **保存条件**

本产品冰袋（wet ice）运输，2-8℃保存，有效期 12 个月，避免强光照射。

◆ **操作流程图示**



◆ **操作步骤**

1、样本准备:

1) 石蜡切片: 依次将切片放入二甲苯I 15 min、二甲苯II 15min、无水乙醇I 5 min、无水乙醇II 5 min、95%乙醇 5 min、85%乙醇 5 min、75%乙醇 5 min，蒸馏水洗。

2）冰冻切片：冰冻切片固定 10-30 min，TBST 洗 5 min 重复 3 次，滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 20 min（检测膜蛋白表达可省略此步），TBST 洗 5 min，重复 3 次。

3）细胞爬片或者细胞涂片：细胞样本固定 15 min，TBST 洗 5 min 重复 3 次，滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 10 min（检测膜蛋白表达可省略此步），TBST 洗 5 min，重复 3 次。

2、抗原修复: 组织切片置于盛满 pH 9.0 EDTA 碱性抗原修复液或者 pH 6.0 柠檬酸修复缓冲液**（推荐首次抗原修复使用 EDTA (pH9.0)，后续第 8 步中，石蜡切片的抗体洗脱统一都改用柠檬酸修复液）**的修复盒中于微波炉内中火 8 min，停火 8 min，转中低火 7 min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片（也可以用高温高压冒大气 1-2 min 或者 100℃水浴 20 min 等其他热修复方法）。自然冷却后将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。注：修复液和修复条件根据组织类型以及抗原类型来确定，冰冻切片/细胞爬片可省略此步，骨组织等容易脱片的样本建议用酶修复或者水浴修复等温和的修复方法。

3、阻断内源性过氧化物酶: 切片滴加 RK50025P-7 Peroxidase inhibitor solution，室温避光孵育 15 min，将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。

4、非特异性靶点封闭: 切片稍甩干后用免疫组化笔在组织周围画圈（防止封闭液及抗体流走），在圈内滴加 3% BSA 溶液（或者其他封闭液，也可直接用试剂盒中的 RK50025P-6 Antibody diluent）均匀覆盖组织，室温封闭 30 min。

5、孵育特异性一抗: 轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用 Antibody diluent 稀释好的的一抗 X，切片平放于避光湿盒内 4℃孵育过夜或者 37℃孵育 1-2 h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

6、孵育 Polymer-HRP 二抗: 玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 二抗覆盖组织，避光室温孵育 50 min，TBST 洗 3 次，每次 5 min。

7、Fluorochrome 染色：Concentrated type fluorochrome 与 RK50025P-3 TSA buffer 按照 1:200 的稀释比例混合均匀**（Concentrated type fluorochrome 与 TSA buffer 的稀释比例可以根据具体情况灵活调整优化，稀释比例范围为 1:50-1:400。一般地，1:200 的稀释比例能满足绝大多数实验的需求）**，在切片上滴加 50 μL 的 fluorochrome 工作液，以均匀覆盖组织为宜，室温反应 2-15 min（最佳孵育时间为 5-10 min），TBST 洗 3 次，每次 5 min。

注：预实验可先染 1 min，洗干净 fluorochrome 后显微镜下观察染色效果，如果阳性弱继续滴加 fluorochrome 加强染色强度，直至合适后继续进行下一步。

8、抗体洗脱：

1）石蜡切片：置于抗原修复液**（柠檬酸修复液）**中 95℃水浴 25-40 min（根据不同抗体亲和力灵活调整时间）；弃洗脱液，TBST 洗三次，每次 5 min。

2）冰冻切片/细胞爬片/骨组织等容易脱片的样本：滴加适量 37℃预热至完全溶解的 **Antibody Stripping Buffer (for multiplex fluorescent staining){抗体洗脱液，多重荧光染色专用}（货号 RM02984P）**覆盖样本，37℃放置 5-20 min，弃洗脱液；再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本 37℃放置 5-20 min，弃洗脱液；TBST 洗 3 次，每次 5 min。（温度较低时抗体洗脱液容易析出，需 37℃ 预热至完全溶解后再使用）

注：石蜡切片可用热修复洗脱，不建议使用抗体洗脱液洗脱；冰冻切片/细胞爬片/骨组织等容易脱片的样本需用抗体洗脱液进行洗脱。

9、重复 3-7 步骤（换用另外一种 TYR fluorochrome）---第二轮标记。

10、DAPI 复染细胞核：切片甩干后，在圈内滴加 50-100 μL 的 RK50025P-5 DAPI staining solution（Ready-to-use）染液，以均匀覆盖组织为宜，避光室温孵育 5-20 min。

11、封片：切片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min。切片稍甩干后，用 RK50025P-8 Antifade mounting medium 封片，尽量避免产生气泡。

12、镜检拍照：切片于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。

◆ 注意事项

1. 本产品仅限科研使用，不用于临床诊断。
2. 开始实验前，应仔细阅读说明书。

3. TYR-xxxPlus fluorochrome 稀释比例的优化：本试剂盒标配的 TYR-xxxPlus fluorochrome 的灵敏度比较高，是常规普通 TSA 试剂盒的 10-50 倍。因此，需要注意检测的荧光信号不要过强。如果信号过强，则需要降低 fluorochrome 的浓度/反应时间/一抗浓度；如果信号过低，则需要提高 fluorochrome 的浓度/反应时间/一抗浓度。fluorochrome 的浓度越高，检测的荧光信号将成指数倍增长。一般地，1:200 的稀释比例能满足绝大多数实验的需求，1:50 的稀释比例能获得最强的检测信号，1:500 的稀释比例相当于常规普通 TSA 的检测信号。

4. TYR-xxxPlus fluorochrome 稀释后的有效期：TYR-xxxPlus fluorochrome 建议现配现用，如果一次使用不完，则剩余稀释后的染料工作液可在-20℃避光保存两周。

5. 一抗的选择：①特异性：选择特异性高的一抗，尽量选择单克隆抗体，而非多克隆抗体（容易产生非特异性的结合）；②不同样本类型：石蜡切片样本（一抗需经过 IHC-P 的验证）、冰冻切片样本（一抗需经过 IHC-Fr 的验证）、细胞爬片/细胞涂片样本（一抗需经过 ICC/IF 的验证）。特别地，若一抗说明书只标注了 IHC，通常认为均适用于石蜡/冰冻切片的使用场景；③种属：一抗的种属需要远离检测样本的实际种属（如检测鼠样本，则一抗需要使用兔单克隆抗

体而非鼠单克隆抗体），避免二抗带来的非特异性结合；④稀释比例：由于 TSA 试剂盒有更高的灵敏度和更强的信号放大，因此，一抗在满足 IHC 的应用场景后，一抗的稀释比例在 IHC 推荐的稀释比例的基础上再扩大 5-10 倍。

6. 做多标染色时，指标/抗体顺序选择的一般原则：①fluorochrome 光谱分离：优先选择发射光谱不重叠的 fluorochrome（如 520、570、620 和 690 等），避免出现 fluorochrome 检测通道重叠而出现检测结果串色的现象。一般地，短波长的染料（如 520）先标记，而长波长的染料（如 690）后标记，减少光漂白对荧光信号强度的干扰；②目标抗原表达丰度：优先标记低丰度/弱表达的抗原，后标记高丰度/高表达的抗原，避免强信号掩盖弱信号。若检测的不同抗原之间的抗原表位邻近，则优先标记空间位阻较大的抗体；③一抗的亲和力：优先标记使用亲和力相对较弱的抗体（相对容易洗脱），避免因洗脱不彻底，干扰下一轮的标记染色。最后标记使用亲和力相对较高的抗体（较难洗脱）；④抗原特性与修复需求：优先标记对热修复敏感的抗原（如膜蛋白），避免多次热修复破坏抗原表位。冰冻切片/细胞爬片/细胞涂片，先固定而不进行通透，标记膜蛋白抗原。然后再进行通透，标记细胞质/细胞核蛋白抗原；⑤一抗宿主来源与交叉反应：优先使用不同宿主来源的一抗（如兔、小鼠，同时避免与检测样本同种属），并确保对应种属的二抗无种属交叉反应。若一抗宿主相同，需分轮标记并彻底洗脱前一轮抗体（如第一轮用兔抗 A，第二轮用兔抗 B 时，需彻底洗脱兔抗 A 后再标记下一轮）。

7. 切片样本制备的厚度问题:①石蜡切片:切片厚度一般为 3-5 μm 左右,在一般情况下,经抗原修复后,Polymer-HRP goat anti-rabbit secondary 能够有效渗透组织；②冰冻切片：切片厚度一般为 10 μm 左右，但对于厚切片（20-40 μm，如小鼠脑等部位），可能会阻碍 Polymer-HRP goat anti-rabbit secondary 组织的有效渗透。因此，对于厚切片可适当延长通透破膜时间、延长 Polymer-HRP goat anti-rabbit secondary 的孵育时间（必要时可 4℃过夜避光孵育二抗，确保 Polymer-HRP goat anti-rabbit secondary 的有效组织渗透）。特别地，冰冻切片厚度越大，脱片的风险越高。因此，对于冰冻切片，建议不超过三标四色的检测。

8. 导致串色的可能原因：串色通常是指不同 fluorochrome 的发射光谱重叠，导致检测时信号干扰，串色与很多因素有关，如：①成像设备：滤光片波长范围较宽，可能导致相邻荧光通道的信号重叠。过长的曝光时间可能导致荧光信号过曝；②抗体洗脱不彻底：高亲和力抗体残留，如细胞角蛋白（CK）、FoxP3 等抗体因结合紧密，需延长洗脱时间或提高温度（如 37℃洗脱液处理 15-20 分钟）。洗脱条件选择不当，一轮使用 EDTA（pH9.0）修复，后续轮次应改用柠檬酸（pH6.0）或专用抗体洗脱液，避免抗原表位破坏；③信号强度不平衡：fluorochrome 浓度过高或反应时间过长，一抗浓度过高或修复强度不当；④抗体顺序与染色流程：抗体顺序设计不合理，难洗脱的抗体（如 FoxP3）应安排在最后一轮染色，避免残留影响后续结果。首轮建议选择适合 EDTA 修复的靶标，后续轮次改用柠檬酸修复。人为操作失误，如未彻底洗脱前一轮抗体、混淆抗体顺序或忘记修复步骤；⑤样本的质量：组织坏死或污染，坏死区域或未清洗干净的组织易吸附 fluorochrome，导致非特异性信号。石蜡切片脱蜡不彻底或冰冻切片固定不良可能导致染色背景升高；⑥fluorochrome 与抗体选择：fluorochrome 发射光谱相近会导致串色，应选择光谱间隔较远的染料组合。多克隆抗体易产生非特异性结合，建议优先使用经敲除验证的单克隆抗体，并选择标注适用于 IHC/mIHC 的抗体。

9. 实验组别设置：建议设置空白对照组别（即不孵育一抗的组别），以排除非特异的染色问题。

10. 10 T/50 T 规格对应使用量为 50 μL/1 T，需注意：若实验条件差异，导致用量过多则无法满足使用 50 次的需求，例如细胞爬片 6 孔板和 12 孔板，使用量较大，则无法满足 50 次使用次数。

11. 如背景荧光较强，建议增加组织自发荧光淬灭步骤。