



## TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号：ABC1254

### 产品信息

产品名称 产品编号 规格

TSAPLus荧光三重染色试剂盒 ABC1254 50T

### 产品简介

本产品TSAPLus荧光三重染色试剂盒，适用于石蜡切片免疫荧光多重染色，尤其适用于相同来源一抗的多重荧光免疫标记，也可用于不同来源抗体的多重荧光免疫标记。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H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>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。本试剂盒使用荧光染料488/555/647对酪胺进行标记，得到的荧光酪胺荧光强，信号稳定，应用于多次重复免疫标记实现多重荧光染色。

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

### 储存与运输

试剂盒内各组分按各自所需条件保存，冰袋（wet ice）运输。12个月有效。

### 组成

Component Number	Component	ABC1254-50T	ABC1254-100T	Storage
ABC1254-1	iF488-Tyramide	25μL	50μL	-20°C
ABC1254-2	iF555-Tyramide	25μL	50μL	-20°C
ABC1254-3	iF647-Tyramide	25μL	50μL	-20°C
ABC1254-4	Tyramide稀释液	100 mL	2×100 mL	4°C
ABC1254-5	DAPI（即用型）	10 mL	20 mL	4°C
ABC1254-6	组织自发荧光淬灭剂（苏丹黑）	10mL	20mL	室温
ABC1254-7	抗荧光淬灭封片剂	5mL	10mL	-20°C
说明书			1份	

### 实验前准备：

1. 自备0.01 mol/L PBS缓冲液（pH7.0-7.4，推荐ABC4220或ABC0020），3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>；
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

Aibisheng Biotechnology  
(Dongguan) Co., LTD

Address: Room 101, Building 4, Changping Jewelry Cultural Industry Center, No. 568,  
Huanchang North Road, Changping Town, Dongguan City, Guangdong Province  
Website: <http://www.abcbio.top> Tel: 400-8309659



## TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号：ABC1254

	Tyramide稀释液	1 mL
TSA-488染色工作液	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 μL
	iF488-Tyramide	2 μL
	Tyramide稀释液	1 mL
TSA-555染色工作液	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 μL
	iF555-Tyramide	2 μL
	Tyramide稀释液	1 mL
TSA-647染色工作液	0.3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10 μL
	iF647-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°C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。PBS清洗3次，每次5min；
- 3.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<sub>2</sub>O<sub>2</sub>覆盖组织，室温避光孵育25min，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5min；
- 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°C孵育过夜。PBS清洗3次，每次5min；
- 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5min；
- 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10min。PBS清洗3次，每次5min；
- 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。（微波建议的温度和时间；加热到95摄氏度，维持15分钟）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°C孵育过夜。PBS清洗3次，每次5min；



## TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号：ABC1254

- 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5min；
- 12.向组织上滴加50-100 $\mu$ L TSA-555染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育10min。PBS清洗3次，每次5min；
- 13.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。（微波建议的温度和时间；加热到95摄氏度，维持15分钟）此步骤中需防止液体过度蒸发导致的干片。
- 14.重复步骤6，进行第三个一抗的孵育：用PBS（或其他抗体稀释液）将需检测的第三个抗体（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 $^{\circ}$ C孵育过夜。PBS清洗3次，每次5min；
- 15.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5min；
- 16.向组织上滴加50-100 $\mu$ L TSA-647染色工作液确保完全覆盖组织，室温避光孵育10min。PBS清洗3次，每次5min；
- 17.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5min；
- 18.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5min，流水冲洗3min；
- 19.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 $^{\circ}$ C可保存15天。

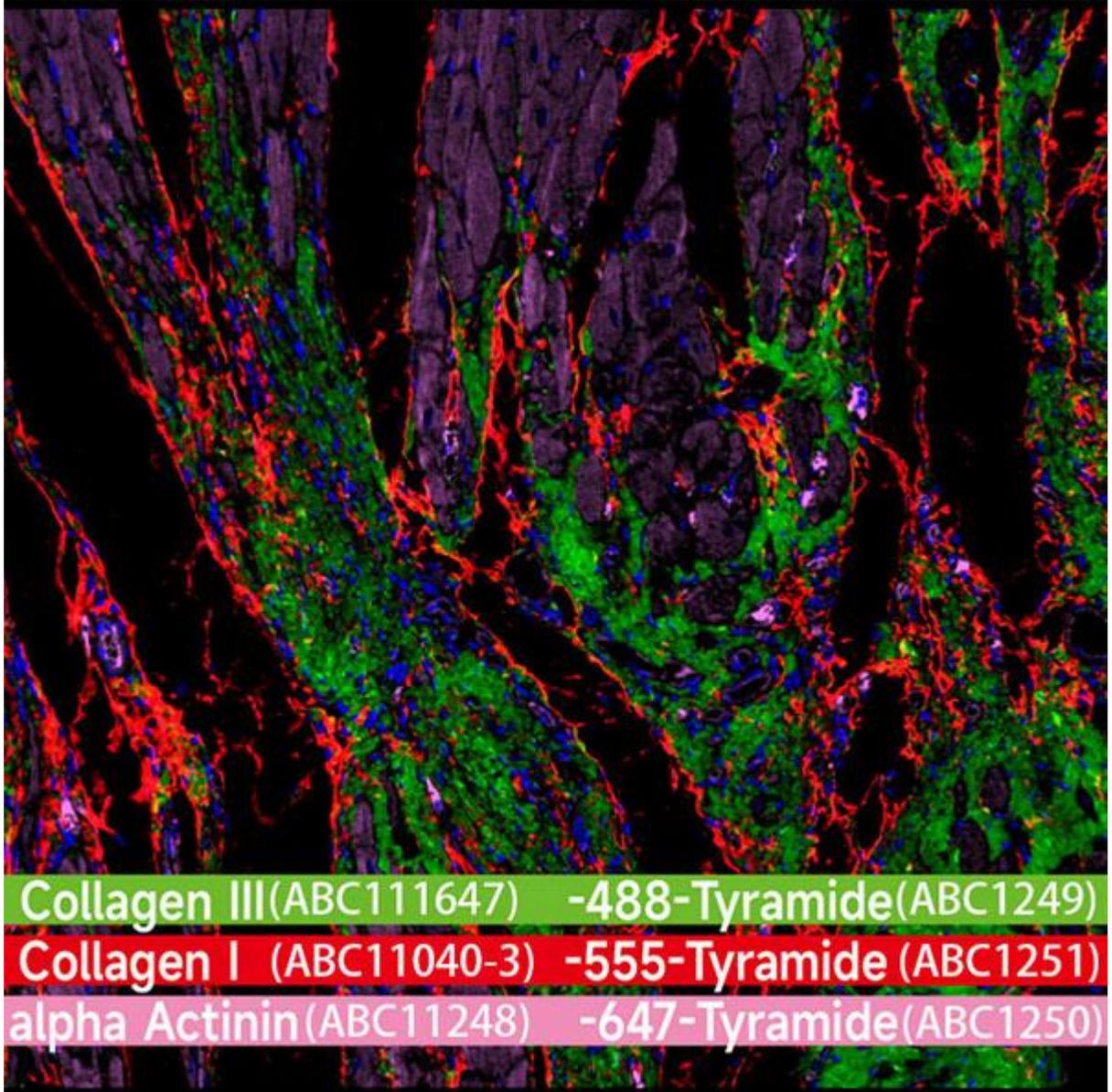
### 注意事项

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。



TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号 : ABC1254



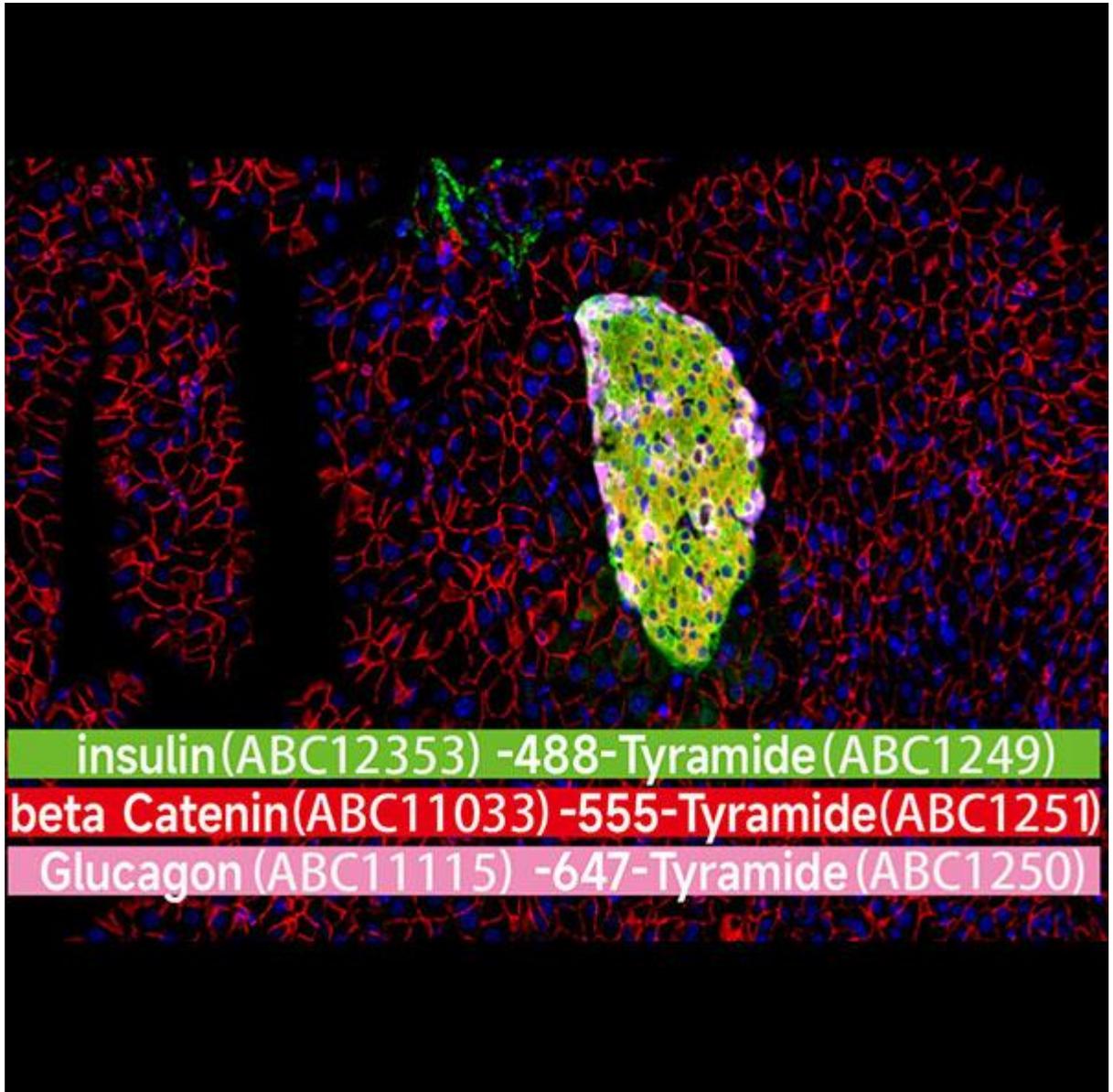
Collagen III(ABC111647) -488-Tyramide(ABC1249)

Collagen I (ABC11040-3) -555-Tyramide (ABC1251)

alpha Actinin(ABC11248) -647-Tyramide(ABC1250)

Aibisheng Biotechnology  
(Dongguan) Co., LTD

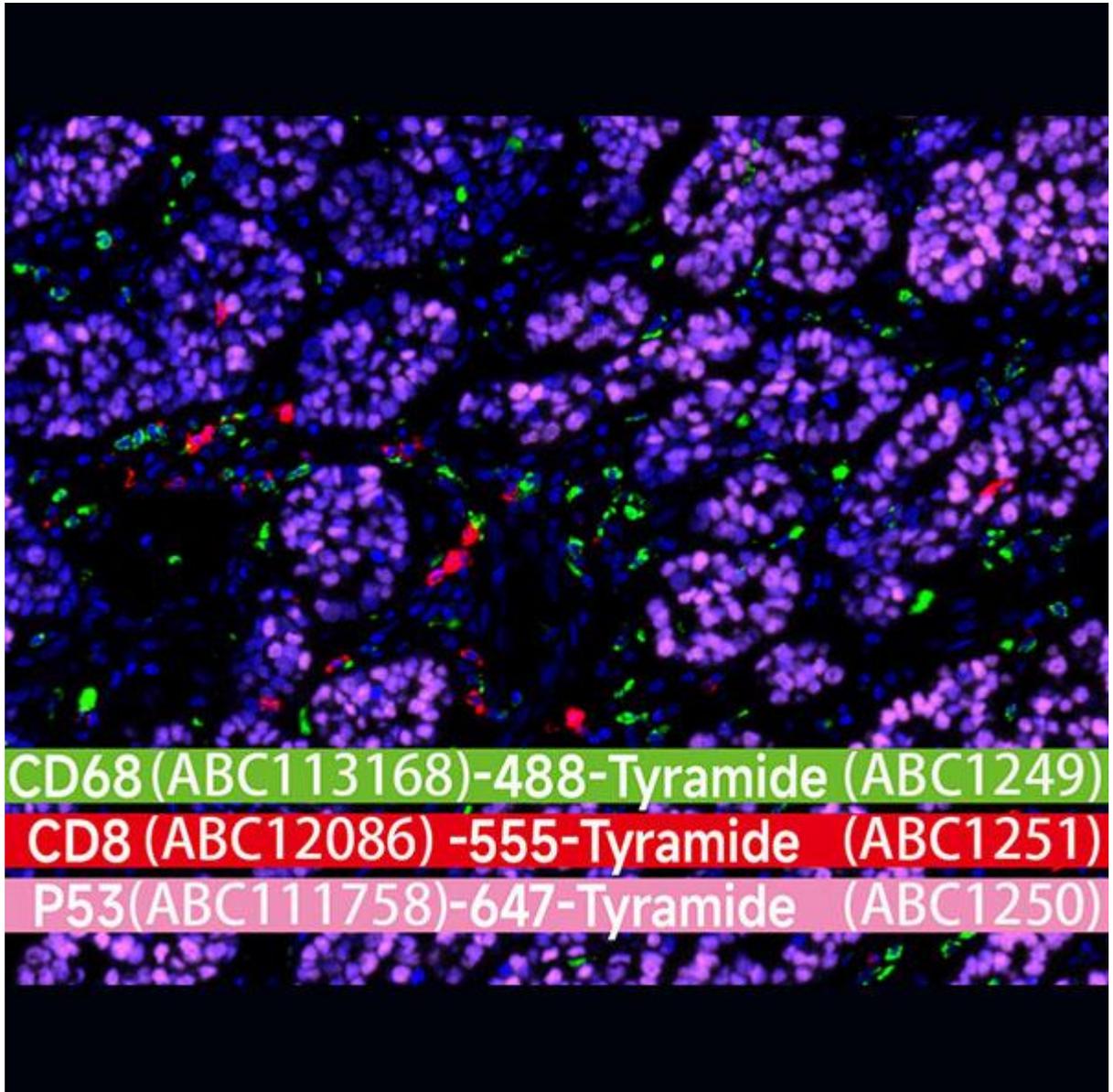
Address: Room 101, Building 4, Changping Jewelry Cultural Industry Center, No. 568,  
Huanchang North Road, Changping Town, Dongguan City, Guangdong Province  
Website: <https://www.abcbio.top> Tel: 400-8309659





TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号：ABC1254



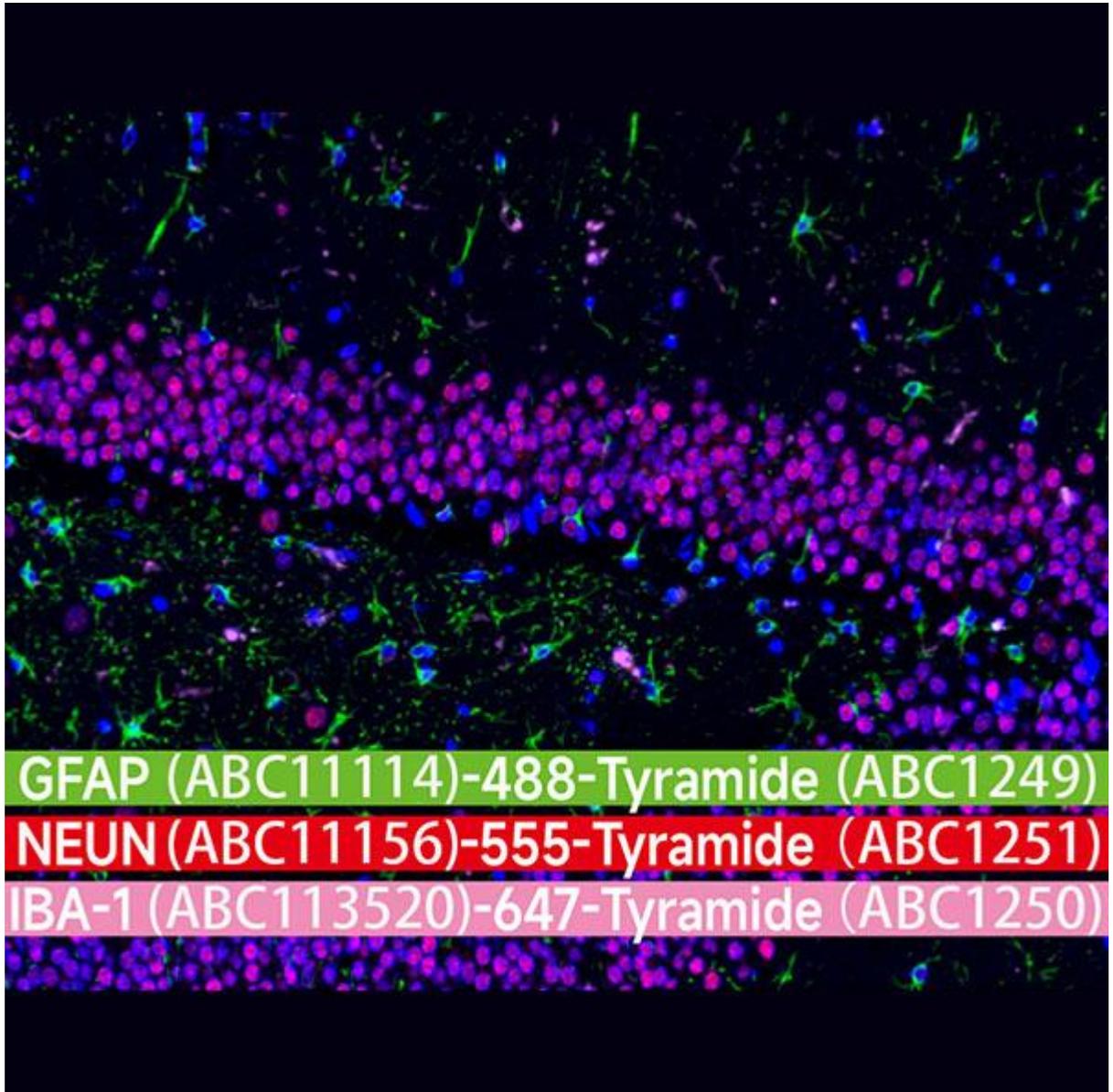
Aibisheng Biotechnology  
(Dongguan) Co., LTD

Address: Room 101, Building 4, Changping Jewelry Cultural Industry Center, No. 568,  
Huanchang North Road, Changping Town, Dongguan City, Guangdong Province  
Website: <https://www.abcbio.top> Tel: 400-8309659



TSAPLus荧光三重染色试剂盒100T

目录号：ABC1254



GFAP (ABC11114)-488-Tyramide (ABC1249)

NEUN (ABC11156)-555-Tyramide (ABC1251)

IBA-1 (ABC113520)-647-Tyramide (ABC1250)

本产品仅供科研用途，不用于临床诊断！

（产品包装升级中，以实物为准。）

Aibisheng Biotechnology  
(Dongguan) Co., LTD

Address: Room 101, Building 4, Changping Jewelry Cultural Industry Center, No. 568,  
Huanchang North Road, Changping Town, Dongguan City, Guangdong Province  
Website: <https://www.abcbio.top> Tel: 400-8309659