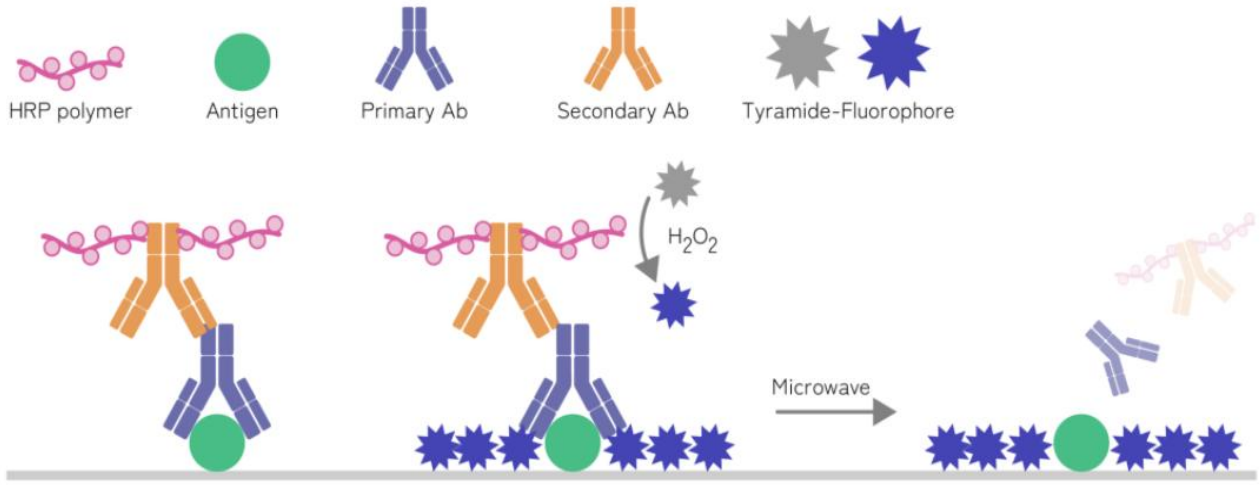
AWI0692

双标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)

产品介绍

酪酰胺信号放大技术（Tyramide Signal Amplification, TSA）主要是利用酪胺的过氧化物酶反应。酪胺非活性荧光素底物在HRP和过氧化氢的作用下，会被激活产生活化荧光底物，同时形成共价键结合位点，共价结合在蛋白抗原表面或附近的酪氨酸残基上，抗原和抗体的结合部位就会有大量的酪胺荧光素沉积，使抗原位点处的荧光信号增强。

酪胺荧光素底物-抗原酪氨酸共价稳定结合，故TSA信号不会受微波影响，可用热修复法清除第一轮与抗原非共价结合的抗体复合物，并能在抗体去除后保留与抗原相关的荧光信号。然后，再用第二种一抗进行第二轮孵育，同时更换另一种酪胺荧光素底物，多次循环反复，不同的酪胺荧光素进行标记就可实现多重免疫组化染色。



TSA原理示意图

产品组成成分

名称	AWI0692-20T	AWI0692-100T	保存条件
TSA-520 荧光染料	1 ml	5 ml	-20℃，避光
TSA-570 荧光染料	1 ml	5 ml	-20℃，避光
内源性过氧化物酶阻断剂	4 ml	15 ml	4℃，避光
超敏酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物	2 ml	10 ml	4℃，避光

保存条件

荧光染料 -20℃避光保存，12个月

内源性过氧化物酶阻断剂、超敏酶标山羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物 4℃避光保存，12个月

实验前材料准备

1、PBS缓冲液、5% BSA-PBS（或者其他封闭液）、柠檬酸钠抗原修复液（或其他修复液）；
2、推荐可用于IHC / IHC-P的单克隆抗体；
3、DAPI染色液（推荐浓度：5μg/mL 货号：AWC0293）

操作步骤

1、操作流程简图

2、详细操作步骤

(1) 石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯Ⅰ 15min→二甲苯Ⅱ 15min→无水乙醇Ⅰ10min→无水乙醇Ⅱ10min→95%乙醇 5min→85%乙醇 5min→75%乙醇 5min→蒸馏水洗。

(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 PH6.0 柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复（也可以用高压 1-2min 100℃水煮 15min 95℃水浴 20min 等其他热修复方法）。中火 8min，停火 8min，转中低火 7min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5 min (修复液和修复条件根据组织类型以及抗原类型来确定）。

(3) 阻断内源性过氧化物：切片放入内源性过氧化物酶阻断剂，室温避光孵育 15 min，将玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

(4) BSA 封闭：切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（防止抗体流走），在圈内滴加用 5% BSA-PBS（或者其他封闭液）均匀覆盖组织，37℃恒温孵育 60 min（此步骤也可以使用山羊血清等封闭液进行封闭）。

(5) 加一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗 X，切片平放于避光湿盒内 4℃孵育过夜或者 37℃ 1-2h。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

(6) 加免疫组化 HRP 二抗：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的免疫组化 HRP 二抗覆盖组织（注：试剂盒标配为山羊抗小鼠/兔二抗，如果实验样本为小鼠，建议一抗选用兔来源的抗体搭配抗兔二抗（AWI0722）使用，以避免小鼠组织样本自身的免疫球蛋白结合二抗所造成的非特异性背景染色），避光室温孵育 30-50min，PBS 洗三次。

(7) 荧光染料反应：TSA-520 荧光染料反应 10-15 min，PBS 洗三次。

(8) 重复 2-7 步骤（换用另外一种 TSA-XXX 荧光染料）。

(9) DAPI 复染细胞核：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液，避光室温孵育 10min。

(10)封片：玻片置于 PBS（PH7.4）中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

(11)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。

染料	激发波长	发射波长	荧光强度
DAPI	350nm	420nm	
TSA-480	450nm	480nm	+
TSA-520	490nm	520nm	++
TSA-570	550nm	570nm	+++
TSA-620	590nm	620nm	+
TSA-690	630nm	690nm	+++
TSA-780	750nm	780nm	++++

注意事项

1、试剂初次使用前请置于4℃解冻，解冻后于4℃短期保存，避免反复冻融，请尽快使用。
2、为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。
3、本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品。

相关产品

货号	名称
AWC0293	DAPI染色液(5 μg/mL)
AWI0693	三标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0694	四标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0695	五标多重免疫荧光试剂盒(石蜡切片)
AWI0697	双标多重免疫荧光试剂盒(冰冻切片)
AWI0698	三标多重免疫荧光试剂盒(冰冻切片)
AWI0702	双标多重免疫荧光试剂盒(细胞爬片)
AWI0703	三标多重免疫荧光试剂盒(细胞爬片)
AWC0215	磷酸缓冲盐溶液(1×PBS,无钙镁)
AWI0206	柠檬酸钠抗原修复液(50×)
AWI0117	EDTA抗原修复液