

五色多重荧光染色试剂盒 Plus（四标五色）

产品编号：PTSA-45(适用于标本为石蜡切片的免疫荧光染色)

产品规格：50T、100T

保存条件：4℃可保存一年，应避免冷冻。

试剂盒组份	体积	稀释比	用途
3% H ₂ O ₂	20ml/40ml	即用型	去除内源性过氧化物酶
EDTA 抗原修复液（粉剂）	2 包/4 包	单包粉剂蒸馏水溶解定容至 2L	用于免疫荧光实验中的抗原修复
5% BSA 封闭液	20ml/40ml	即用型	用于组织切片的封闭
HRP 羊抗兔/鼠 IgG	12ml/24ml	即用型	过氧化物酶标记羊抗兔/鼠 IgG
TSA-520Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	荧光标记的酪氨酸盐经活化后与靶标周围的蛋白酪氨酸残基共价结合
TSA-570Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	荧光标记的酪氨酸盐经活化后与靶标周围的蛋白酪氨酸残基共价结合
TSA-620Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	荧光标记的酪氨酸盐经活化后与靶标周围的蛋白酪氨酸残基共价结合
TSA-690Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	荧光标记的酪氨酸盐经活化后与靶标周围的蛋白酪氨酸残基共价结合
TSA buffer	12ml/24ml	即用型	用于荧光染料稀释，维持反应体系稳定
DAPI 染液	5ml/10ml	即用型	组织的细胞核染色
抗荧光淬灭封片剂	5ml/10ml	即用型	免疫荧光组织化学染色样品封片

工作原理：

酪氨酸信号放大 (Tyramide signal amplification, TSA) 技术，是一类利用辣根过氧化物酶 (Horseradish Peroxidase, HRP) 对靶蛋白或核酸进行高密度原位标记的酶学检测方法。TSA 技术采用 HRP 标记的二抗，HRP 催化加入体系的 TSA 衍生荧光染料，生成活化荧光底物，活化底物可与抗原上的酪氨酸共价结合，将信号共价结合到抗原上。之后用热修复洗去非共价结合的抗体，再换下一种一抗

来第二轮孵育，换另一种荧光素底物，如此往复就可实现多重标记。

石蜡片染色步骤

- 1.石蜡切片，常规脱蜡至水。
2. 3% H₂O₂ 去离子水室温孵育 5-10min，以消除内源性过氧化物酶活性。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 3.EDTA 抗原修复液粉剂经蒸馏水溶解定容至 2L 可配制成柠檬酸盐修复工作液（PH6.0），将切片浸入到柠檬酸盐修复液中，微波炉加热到沸腾后断电，间隔 5-10min 再修复 1-2 次，冷却至室温。
- 4.根据需要进行抗原修复方式及强度。可热修复、酶修复或不修复。
- 5.切片甩干后，免疫组化笔在组织周围画圈，滴加 5%BSA 封闭液 37℃孵育 30min，甩干，勿洗。
- 6.滴加适当稀释的一抗，37℃孵育 1-2 小时或 4℃过夜。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 7.滴加 HRP 标记二抗，37℃孵育 30min。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 8.浓缩型荧光染料经 TSA buffer 进行稀释，稀释比例可依据具体情况灵活调整优化，一般稀释范围在 1:50-500，圈内滴加相应的 TSA 荧光染料反应液，避光室温孵育 1-15min。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 9.将切片浸入到抗原修复液中 37℃水浴 25-40min。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 10.重复步骤 5-9 步骤——第二轮标记。
- 11.重复步骤 5-9 步骤——第三轮标记。
- 12.重复步骤 5-8 步骤——第四轮标记。
- 13.滴加 DAPI 染色液，室温孵育 5-10min。PBS 冲洗，5min×3 次。
- 14.切片甩干后，用抗荧光衰减封片剂封片。
- 15.荧光显微镜观察。



染料	激发波长	发射波长
DAPI	350	420
480Plus	450	480
520Plus	490	520
570Plus	550	570
620Plus	590	620
690Plus	630	690
780Plus	750	780