六色多重荧光染色试剂盒 Plus（五标六色）

产品编号：PTSA-56(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_2O_2	25ml/50ml	即用型	去除内源性过氧化物酶
EDTA 抗原修复液（粉剂）	3 包/5 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	25ml/50ml	即用型	用于组织切片的封闭
HRP 羊抗兔/鼠 IgG	15ml/30ml	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	用于与抗原上的酪氨酸共价结合
TSA-570Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	用于与抗原上的酪氨酸共价结合
TSA-620Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	用于与抗原上的酪氨酸共价结合
TSA-690Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	用于与抗原上的酪氨酸共价结合
TSA-780Plus 荧光染料	25ul/50ul	1:200，浓缩型	用于与抗原上的酪氨酸共价结合
TSA buffer	15ml/30ml	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 dignal amplification，TSA) 技术，是一类利用辣根过氧化酶 (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% H_2O_2 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 EDTA 修复工作液（PH9.0），将切片浸入到 EDTA 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.根据需要选择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 1:50-400，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 5-9 步骤——第四轮标记。

13.重复步骤 5-8 步骤——第五轮标记。

14.滴加 DAPI 染色液，室温孵育 5-10min。PBS 冲洗，5min×3 次。

15.切片甩干后，用抗荧光衰减封片剂封片。

16.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