

三色多重免疫荧光试剂盒（兔二抗）

【产品简介】 酪酰胺信号放大（TSA）是一种基于辣根过氧化物酶（HRP）的催化活性对靶蛋白或核酸进行高密度原位标记的酶学检测方法。原理为酪胺Tyramide的过氧化物酶反应（已标记荧光的酪胺盐在HRP催化H₂O₂下形成共价键结合位点）产生的大量酶促产物，该产物与目标蛋白残基（色氨酸、组氨酸和酪氨酸残基）共价结合，从而使目标蛋白（抗原抗体结合部位）标记上特异的荧光或生物素，使其检测信号得到增强。

【货号】 THC-23R

【规格】 20T/100T

【包装清单】

产品编号	产品名称	规格 (20T)	规格 (100T)	保存条件
THR002	TYR520荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR004	TYR570荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THRS002	TSA buffer	12ml	60ml	4℃
THRS003	DAPI 即用型染料	2ml	10ml	4℃，避光
THRS004	即用型HRP山羊抗兔二抗	12ml	60ml	4℃，避光
THRS006	一抗稀释液	15ml	80ml	4℃
THRS007	抗荧光淬灭封片剂	2ml	10ml	4℃

【保存条件】 4℃保存，有效期一年。

需要其他的试剂：

3%H₂O₂ (THR009)；

抗体洗脱液（THRS008），洗脱液也可用抗原修复液代替；

二甲苯

无水乙醇

柠檬酸修复液（PH6.0）（TIH0001）

EDTA 抗原修复液（PH 9.0）（TIH0003）

盖玻片

免疫组化笔

【操作步骤】 1、样本准备

1) 石蜡切片:

将切片依次浸泡于二甲苯 I (15min)、二甲苯 II (15min)、无水乙醇 I (5min)、无水乙醇 II (5min)、95%乙醇 (5min)、85%乙醇 (5min)、75%乙醇 (5min), 最后 水漂洗片子。

2) 冰冻切片:

冰冻切片固定10-30min, PBS洗5min, 重复3次, 滴加 0.3% triton-X100破膜液通透 20min, PBS 洗 5min, 重复3次。

3) 细胞爬片:

细胞样本固定10-30min, PBS洗5min重复3次, 滴加 0.3% triton-X100 破膜液通透 20min, PBS洗5min, 重复3次。

2、抗原修复

组织切片置于盛满PH9.0 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。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。(也可以用高压1-2min100度水煮15min95度水浴20min等其他热修复方法), 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5min。(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酶:

切片放入3% H_2O_2 溶液, 室温避光孵育15min, 将玻片置于 PBS (PH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

4. 封闭液封闭:

甩干切片, 用组化笔化圈, 在圈内滴加封闭液覆盖组织, 室温封闭30min。封闭液可以使用该盒子的一抗稀释液, 也可以选用3%BSA 或者山羊血清。切片放入3% H_2O_2 溶液, 室温避光孵育15min, 将玻片置于 PBS (PH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

5. 一抗孵育:

使用抗体稀释液按照比例稀释一抗, 37℃ 2h 或者4℃过夜孵育(湿盒内) 将玻片置于 PBS (PH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5min。

6. 二抗孵育:

即用型HRP二抗, 直接滴加覆盖组织, 避光室温孵育1h。

7. 孵育TSA染料:

将所需的第一轮荧光染料与TSA buffer按照所需体积1:50- 1:200 的比例混合均匀, 均匀滴加配好的 TSA 荧光染料反应液覆盖组织, 室温反应 1-15min (最佳时间 5min- 10min), PBS 洗3 次(预实验 可先染 1min洗干

净荧光染料后显微镜下观察染色效果，如果阳性弱继续滴加荧光染料加强染色 强度直至合适强度后继续进行下一步)

8. 抗原洗脱:

石蜡切片置于抗原修复液中95度水浴 25-40min (根据不同抗体亲和力 灵活调整时间) 或者 滴加适量 37 °C 预热的mIHC 专用抗体洗脱液覆盖样本，5-20 分钟，弃去洗脱液，PBS 洗3次，每次 5 分钟。(石蜡切片可用热修复洗脱或者抗体洗脱液洗脱，细胞及冰切切片需用抗体洗脱液 进行洗脱)

9. 多重染色:

- 1) 如果是单色，请跳至第10步
- 2) 多色，重复第3-8步，依次完成多轮抗原洗脱-封闭-一抗-二抗-TSA染色;
- 3) 最后一轮荧光染色，重复3-7步，不需要第8步抗原洗脱，按照顺序操作;

10. DAPI复染细胞核:

将玻片置于 PBS (PH 7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。
滴加即用型DAPI 染色液，孵育5min

11. 封片和镜检:

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，然后在荧光显微镜或者扫描仪上面进行重复3-8步骤。

【注意事项】 ◆本产品中提供的二抗为兔二抗，如果您计划仅使用鼠源一抗对小鼠组织样本进行染色，建议您使用 兔鼠通用二抗的试剂盒。

◆荧光素信息

荧光染料名称	激发波长	发射波长
DAPI	350	420
TYR520	490	520
TYR570	550	570

◆做多标时，指标/抗体选择顺序:

难以洗脱的指标，一般放在最后面做；

先染低丰度蛋白/弱靶标，且配强荧光或者长波长；

◆抗体最好选单克隆抗体，石蜡切片选择 IHC/mIHC/ IHC-P 实验验证过的抗体；