# 产 品 说 明 书

## 五色酪酰胺信号放大试剂盒（抗兔二抗）

产品规格：20 slides, 50 slides

产品货号：Y6116S, Y6116L

产品内容：

| 规格 / 组分 | 20 slides | 50 slides |
|---|---|---|
| YF®488 Tyramide（200×） | 10 μL | 25 μL |
| YF®555 Tyramide（200×） | 10 μL | 25 μL |
| YF®594 Tyramide（200×） | 10 μL | 25 μL |
| YF®680 Tyramide（200×） | 10 μL | 25 μL |
| HRP-羊抗兔 IgG | 40 μL | 100 μL |
| BSA | 0.28 g | 0.7 g |
| 1× Tyramide Amplification Buffer | 8 mL | 20 mL |
| DAPI 染色液（即用型） | 2×1 mL | 5 mL |
| 抗荧光淬灭封片剂 | 0.4 mL | 1 mL |

荧光光谱数据：YF®488: 490/515 nm; YF®555: 555/565 nm; YF®594: 590/617 nm; YF®680: 681/698 nm

## 储存条件

-20℃避光保存，有效期见外包装。

## 产品介绍

酪胺信号放大（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（已标记荧光的酪胺在 HRP 催化 $H_2O_2$下形成共价键结合位点）产生的大量酶促产物与目标蛋白的酪氨酸残基共价结合，从而使目标蛋白标记上特异的荧光。多重标记仅需在热修复法去除非共价结合的抗体后换另一种一抗、荧光素酪胺，如此往复即可。

## 使用方法

**自备试剂：**

- 1× PBS
- 二甲苯
- 乙醇



本产品仅用于科研

UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com

● 0.1 M柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）

● 30%过氧化氢

● 封闭缓冲液：1 g BSA溶于100 mL含0.5% Triton X-100的PBS中，或选择市面上在售封闭缓冲液

**1. 样本准备**

（1）将石蜡切片放置在 60℃的烘箱中 30 min。

（2）室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次，每次 5 min，以彻底脱掉石蜡。

注：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中进行此操作。

（3）室温下，将切片浸没于无水乙醇中漂洗 2 次，每次 5 min。

（4）室温下，将样本连续浸没在不同浓度的乙醇（95%、90%、80%、70%）中，每种浓度漂洗 1 次，每次 5 min。

（5）室温下，将切片浸没于纯水中 3 min，再将切片浸没于 1× PBS 中 3 min，用滤纸吸干多余液体。

（6）用免疫组化笔描绘样品轮廓，以便下游通透与标记。

（7）抗原修复：将 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液（PH 6.0），用微波炉加热至沸腾，将切片置于缓冲液中，间断煮沸 10 min。

注：①此过程中，组织要一直浸没于缓冲液中，以保证组织的抗原修复效果。抗原修复后，取出切片于室温中逐渐降温。②需根据不同的样本选择不同的抗原修复方法。

（8）1× PBS 清洗两次。

**2.（可选）内源性过氧化物酶灭活**

如需要，可加入足够量的 3%过氧化氢覆盖样品并在室温孵育 60 min，淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

**3. 免疫标记**

（1）封闭：用封闭缓冲液室温封闭 1 h。

（2）用封闭缓冲液将一抗稀释至适当浓度。将样品与一抗在室温下孵育 1 h 或 4℃过夜。

（3）室温下 1× PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

（4）用封闭缓冲液将 HRP-羊抗兔 IgG 以 1:200 稀释，室温孵育 1 h。

（5）室温下 1× PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

（6）用 1× Tyramide Amplification Buffer 将 YF® Tyramide（200×）以 1:200 稀释，每个样品加 100 μL，室温孵育 10 min。稀释后的染色液可在室温下避光保存 24 h。

（7）室温下 1× PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

（8）微波修复，自然冷却至室温（步骤同抗原修复）。

（9）室温下 1× PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

（10）单染结束，封片观察或继续标记（建议从步骤（1）封闭开始）。

注：每一轮染色结束后可通过荧光显微镜确认染色情况。

**4. 复染、封片**

（1）滴加适量 DAPI 染色液（即用型）于组织上，浸没样本，室温孵育 5 min。

（2）室温下 1× PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

（3）滴加适量抗荧光淬灭封片剂，盖玻片封片。

（4）显微镜成像。

## 注意事项

1. 使用前请将产品瞬时离心至管底，再进行后续实验。

2. 1× Tyramide Amplification Buffer 首次使用后，建议小量分装，-20℃保存，避免反复冻融。

3. 为了防止出现假阴性、假阳性的结果，实验过程中需设置阴性对照和阳性对照。对于组织样品，建议对未染色的对照（不添加抗体或酪酰胺）进行成像，确定组织是否有自发荧光，排除对背景的影响。

4. 建议 1:200 稀释 YF® Tyramide。较高的浓度可能会导致信号过强或背景高，建议从 1:100 到 1:1000 梯度稀释。

5. 可依次使用多个 YF® Tyramide 来标记同一样品的不同靶标，每次酪酰胺反应后需进行抗体剥离。

6. 多色标记时，依据抗原密度不同选择不同荧光素（低密度抗原选择强染料；高密度抗原选择较弱染料）。标记顺序对最终标记效果有一定影响，需自行摸索。

7. 如若做细胞样本/冰冻切片的 TSA 多色实验，需进行预实验判断试剂是否可用，具体步骤请参考相关文献。





UElandy Inc.
Tel:0512-88965152
Web:www. uelandy.com