

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



- 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°C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°C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。

