

九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-89R

【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
THR001	TYR480荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR002	TYR520荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR003	TYR540荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR004	TYR570荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR005	TYR620荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR006	TYR650荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR007	TYR700荧光染料	10ul	50ul	4℃，避日光
THR008	TYR780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
TYR480	450	480
TYR520	490	520
TYR540	515	540
TYR570	550	570
TYR620	590	620
TYR650	630	650
TYR700	680	700
TYR780	750	780

◆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；
