

酪酰胺信号放大（TSA）系列产品说明书

产品描述

APEX BIO公司的酪酰胺信号放大（TSA）系统可用于检测荧光免疫细胞化学（ICC）、免疫组织化学（IHC）和原位杂交（ISH）技术中的低丰度靶点，可将信号灵敏度提高100倍。TSA荧光试剂盒使用辣根过氧化物酶（HRP）直接催化固定化酶周围的荧光基团共价沉积，该标记过程迅速（少于10min），沉积标记可直接在标准或共聚焦显微镜下观察。TSA试剂盒可与传统染色方法结合使用用于多色成像，也可以顺序进行两个或更多个酪酰胺反应以标记一个样品上的不同靶标。

TSA技术可用于酶缀合物和合适的生色底物的明场显微镜检查，也可以与抗荧光素酶结合物组合使用。与普通实验相比，使用TSA试剂可显著提高信号灵敏度，同时保持稳定的特异性和分辨率。此外，TSA试剂盒可以显著减少一抗或探针的消耗量。

酪酰胺信号放大（TSA）系列产品包括三款试剂盒：试剂盒K1050荧光标记信号为fluorescein，可在激发和发射波长494 nm/517 nm下显微检测信号；试剂盒K1051荧光标记信号为Cyanine 3，可在激发和发射波长550 nm/570 nm下显微检测信号；试剂盒K1052荧光标记信号为Cyanine 5，可在激发和发射波长648 nm/667 nm下显微检测信号。不同的荧光试剂盒请按照对应建议波长进行操作。

试剂

1. 产品组分及储存条件

货号	产品	规格	组分
K1050	Fluorescein TSA Fluorescence System Kit	100-300 sides	1X Amplification Diluent (30 mL) Fluorescein Tyramide (dry, dissolve in 60 µL DMSO) Blocking Reagent (6g)
		200-600 slides	1X Amplification Diluent (60 mL) Fluorescein Tyramide (2 tubes, dry, dissolve in 60 µL DMSO/tube) Blocking Reagent (12g)
K1051	Cy3 TSA Fluorescence System Kit	100-300 sides	1X Amplification Diluent (30 mL) Cyanine 3 Tyramide (dry, dissolve in 60 µL DMSO) Blocking Reagent (6g)
		200-600 slides	1X Amplification Diluent (60 mL) Cyanine 3 Tyramide (2 tubes, dry, dissolve in 60 µL DMSO/tube) Blocking Reagent (12g)
K1052	Cy5 TSA Fluorescence System Kit	100-300 sides	1X Amplification Diluent (30 mL) Cyanine 5 Tyramide (dry, dissolve in 60 µL DMSO) Blocking Reagent (6g)
		200-600 slides	1X Amplification Diluent (60 mL) Cyanine 5 Tyramide (2 tubes, dry, dissolve in 60 µL DMSO/tube) Blocking Reagent (12g)
A8011	Biotin-tyramide	100 mg/1 g	Biotin-tyramide
A8012	Biotin-XX Tyramide Reagent	10 mg/ 100 mg/ 1g	Biotin-XX Tyramide Reagent
K1079	Streptavidin-Cy3	1 mL/2 mL	Streptavidin-Cy3 is supplied in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% BSA, 0.1% sodium azide.
K1080	Streptavidin-Cy5	1 mL/2 mL	Streptavidin-Cy5 is supplied in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% BSA, 0.1% sodium azide.
K1081	Streptavidin-FITC	1 mL/2 mL	Streptavidin-FITC is supplied in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.4, containing 1% BSA, 0.1% sodium azide.

2. 储存条件

- (1) 对于 Kit 系列，请将 Tyramide 荧光染料于-20°C 避光保存，1 X Amplification Diluent 和 Blocking Reagent 于4°C 保存，可保存 6 个月。
- (2) 对于 Biotin-tyramide 系列，请置于-20°C 保存。
- (3) 对于 Streptavidin 系列，请置于 2-8°C 避光保存。

3. 自备试剂

- (1) 1× PBS
- (2) DMSO（分子生物学或 HPLC 级别）
- (3) 多聚甲醛固定液（4%多聚甲醛 in PBS）
- (4) 促渗试剂（0.5% Triton X-100 in PBS）
- (5) 0.1 M 柠檬酸钠缓冲液（pH 6.0）
- (6) 30% H₂O₂
- (7) 一抗和 HRP 偶联的二抗
- (8) 封闭缓冲液：可将 1 g BSA 溶于 100 mL 含 0.5% Triton X-100 的 PBS 中配置成封闭缓冲液
- (9) 下列试剂仅用于 Biotin-Tyramide 系列实验
 - 生物素封闭清洗缓冲液：含 1% BSA 和 0.05% Tween 20 的 PBS
 - 未标记的链霉亲和素溶液：含 0.1 mg/mL 链霉亲和素的生物素封闭清洗缓冲液
 - 生物素溶液：含 0.5 mg/mL 生物素的生物素封闭清洗缓冲液。

以下参考步骤，可用于细胞或组织切片的酪酰胺染色，每个样品使用 100 μL-300 μL 酪酰胺染色液（足以覆盖 96 孔板的一个孔或约 1 cm² 的组织部分），可以根据不同的样本尺寸增加或减少酪酰胺染色液的量。

操作流程

1. 准备工作

- 酪酰胺荧光储存液

对于 TSA Kit 系列，本公司提供的酪酰胺荧光是固体形式，使用之前需按照建议加入适量的 DMSO，配成酪酰胺荧光储存液，配置好的酪酰胺荧光储存液置于 4°C 避光保存。下表是配置酪酰胺荧光储存液时建议添加的 DMSO 量。

货号	产品	配置酪酰胺荧光储存液
K1050	Fluorescein TSA Fluorescence System Kit	每管 Fluorescein Tyramide 加入 60 μ L 的 DMSO 配置成 Fluorescein Tyramide 储存液
K1051	Cy3 TSA Fluorescence System Kit	每管 Cyanine 3 Tyramide 加入 60 μ L 的 DMSO 配置成 Cyanine 3 Tyramide 储存液
K1052	Cy5 TSA Fluorescence System Kit	每管 Cyanine 5 Tyramide 加入 60 μ L 的 DMSO 配置成 Cyanine 5 Tyramide 储存液

● 酪酰胺荧光工作液

每次实验前，需要用 1 X Amplification Diluent 按照 1:50-1:500 的比例稀释酪酰胺荧光储存液，配置成含有 0.3% 的 H_2O_2 的酪酰胺荧光工作液（不同的实验目的，稀释比例需要调整以达到最优的结果）。每个载玻片大约需要 100-300 μ L 的酪酰胺荧光工作液。

注意：保证配置酪酰胺荧光工作液用到的 H_2O_2 新鲜有效。每次实验操作结束以后，请丢弃未用完的酪酰胺荧光工作液。

2. 操作流程

2.1 样本处理

2.1.1 细胞样品

- (1) 可选：准备一份阴性对照样本（不孵育一抗的样本）。
- (2) 1×PBS 清洗细胞两次。
- (3) 细胞固定：加入适量 4% 多聚甲醛固定液（pH 7.4），4°C 放置 15min。
- (4) 1×PBS 清洗细胞两次。
- (5) 通透细胞：用配制于 PBS 中的 0.5% TritonX-100 溶液通透，室温放置 10min。或者加入冰上预冷的 70% 乙醇，在 -20°C 孵育 4h。细胞能在 70% 乙醇中 -20°C 的条件下保存一周。
- (6) 1×PBS 清洗细胞两次。

2.1.2 石蜡组织切片

- (1) 将石蜡切片放置在 60°C 的烘箱中 30min。
- (2) 室温下用二甲苯浸泡石蜡组织切片 2 次，每次 5min，以彻底脱蜡。

注意：二甲苯有毒，易挥发，请在通风橱中操作。

- (3) 室温下，将切片样本浸没于无水乙醇中漂洗 2 次，每次 5min。

(4) 室温下，将切片样本按照顺序依次浸没在不同浓度梯度的乙醇（95%、90%、80%、70%）中，每种浓度各漂洗1次，每次5min。

(5) 室温下，将切片浸没于纯水中漂洗1次，每次3min，再将切片浸没于1×PBS中漂洗1次，每次3min，用滤纸小心吸干切片样本周围多余液体。

(6) 用铅笔在切片样本周围描绘样品轮廓，以便后续进行通透与标记。

(7) 抗原修复：将0.1M柠檬酸盐缓冲液（pH 6.0）用微波炉加热至沸腾，将脱完蜡及复水好的片子置于缓冲液中，间断煮沸10min。抗原修复后取出于室温中缓慢降温。

注意：此过程中，玻片上组织要一直浸没于缓冲液中，以保证组织的抗原修复效果。不同的样本选择不同的抗原修复方法。

(8) 1×PBS清洗两次。

2.2 内源性过氧化物酶灭活（可选）

加入3%过氧化氢覆盖样品并在室温下孵育60min，淬灭样品的内源性过氧化物酶活性。

2.3 内源性生物素阻断（可选）

进行Biotin-tyramide/Streptavidin检测时，建议阻断样品中的内源性生物素以减少背景。对于Fluorescein/Cyanine 3/Cyanine 5 -Tyramide的试剂盒来说，可省略此步骤。

(1) 在室温下，将样品与未标记的链霉亲和素溶液一起孵育15min。之后使用生物素封闭清洗缓冲液将样品在室温下洗涤3次，每次5min。

(2) 在室温下将样品与生物素溶液孵育30min，以封闭链霉亲和素上多余的生物素结合位点。之后用生物素封闭清洗缓冲液洗涤样品3次，每次5min。

2.4 免疫标记

(1) 封闭：用封闭缓冲液室温封闭1h。

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

(3) 室温下1×PBS洗涤3次，每次5min。

(4) 在封闭缓冲液中将HRP偶连的二抗稀释。用该溶液在室温下孵育上述样品1h。

(5) 室温下1×PBS洗涤3次，每次5min。

(6) 每个样品准备100μL-300μL酪酰胺荧光工作液。染色液在室温下避光保存，最长可保存24h。

(7) 将样品与染色液在室温下孵育10min。

(8) 在室温下用1×PBS洗涤3次，每次5min。

(9) 可选：如果使用Biotin-tyramide进行标记，可使用荧光标记的Streptavidin进行荧光显色

(10) 显微镜成像。对于载玻片上的组织样本，请盖上盖玻片并密封后，再显微镜成像。

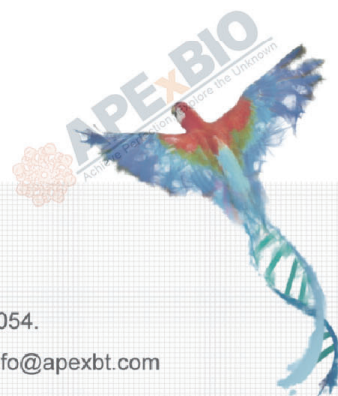
■ 注意事项

(1) 与荧光二抗相比，TSA试剂盒显示出更高的灵敏度和信号。因此，实验时一抗的使用浓度较低，可以降低非特异性结合带来的背景荧光，我们建议设置一抗浓度梯度以找到最佳浓度。

(2) 如需考虑背景荧光，建议设置未与一抗孵育的阴性对照。确保该阴性对照在孵育和洗涤过程中没有被阳性样品中的试剂交叉污染。对于组织样品，我们还建议对未染色的对照（不添加抗体或酪酰胺）进行成像，以确定组织自发荧光对背景的影响。

(3) 较高的浓度可能会导致信号过强或背景高，可以从1:50到1:500摸索以找到最佳浓度。

(4) 可以在每个酪酰胺反应后通过进行HRP淬灭或抗体剥离，依次使用多个酪酰胺扩增试剂盒来标记同一样品上的不同靶标。



APExBIO Technology

www.apexbt.com

7505 Fannin street, Suite 410, Houston, TX 77054.

Tel: +1-832-696-8203 | Fax: +1-832-641-3177 | Email: info@apexbt.com