

## TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒

**主要成分：**荧光素酪胺（Fluorescein Tyramide）、Cy系列弱碱性化合物。

**用途：**用于石蜡组织切片的多重荧光染色。

**TSA染色原理：**TSA是高稳定性高表达的新一代酪胺信号放大技（Tyramide Signal Amplification）的简称。利用基于IHC免疫组化的“<一抗-二抗-HRP>底物”原理及步骤，TSA荧光化合物在HRP催化下与靶点附近的酪氨酸残基共价结合，生成稳定荧光化合物。

### 与普通免疫荧光相比，TSA技术优势：

- 可将信号放大10-1000倍。
- 荧光化合物具有理想的光、热、PH稳定性。
- 多色荧光标记不受一抗种属限制。

### 产品介绍：

#### 抗体速除体系

如何快速、有效地去除上一轮标记的<一抗-二抗-HRP>复合物是TSA多色荧光标记成功之关键。我们定向、精准研发抗体速除体系，显著提高FFPE（石蜡切片）染色成功率和效率，成功扩展TSA多色荧光标记应用领域。

#### 修复/速除二合一缓冲液

传统FFPE多色荧光标记利用枸橼酸盐缓冲液微波加热沸腾10-20min去除抗体复合物，可能存在如下问题：

对于CD3、Keratin 19等高表达的抗原，20min可能不足以完全去除抗体，从而造成下一轮染色“串染”。累积多次微波加热（例如20min×6=120min）可能“过修复”抗原，产生异常抗原表位，造成假阳性染色，尤以最后一轮染色为甚。

与普通修复液相比：

- 微波加热至沸腾即可关火冷却，去除效果远胜普通方法沸腾20min!
- 显著杜绝“串染”、“过修复”。
- 大大节省您宝贵的实验时间。
- 详细使用方法请参照“应用Protocol”。

#### 快速反应缓冲液

与普通反应缓冲液相比：

- 反应时间从5~20min缩短至10sec~10min。
- 反应体系不依赖H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，有效期更长。
- 1:100-1000加入高能TSA染料（现用现配）。

#### 水晶封片剂与普通封片剂相比

- 抑制气泡配方，吸取式滴瓶，防止封片过程产生泡。
- 增强型防淬灭配方，TSA荧光可保存6个月~2年。
- Type 1适应绝大部分化学荧光染料和内源性荧光蛋白。
- Type 2专为包含核染料TG470SN的多色荧光标记使用。
- 快干可固化配方，RI值1.38-1.41。

### 注意事项及经验 1

#### 抗体的选择

- **一抗选择：**  
选择好用的一抗及其组合，TSA多色荧光标记成功了一半！  
选择用于临床病理诊断的抗体。



扫一扫 加微信

上海尚宝生物科技有限公司  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

选择文献报道的抗体。

尽量选择单抗，谨慎选择多抗。

小鼠标本不要选择小鼠来源的一抗（细胞染色除外）。

石蜡样本推荐Abcam标注IHC-P的抗体，尤以KO-VALIDATED（敲除验证）为佳。

#### ➤ 二抗选择：

好的二抗也很重要！使用经过预吸附（也称交叉吸附）的二抗，以降低潜在物种交叉反应导致的非特异性背景，这对免疫细胞丰富的样本尤其重要。

尽量选择HRP直接标记的二抗：节省实验流程，提高特异性。

选择HRP多聚体二抗，可显著提高信噪比。

#### ➤ 利用阳性样本进行抗体特异性验证：具有专业知识背景很重要！

阅发表文献，获知抗原表达及抗体特异性的关键信息。

建议从DAB显色的IHC开始。

根据信号的组织定位、细胞定位、胞膜/胞核/胞浆/细胞器定位，综合验证抗体特异性。

记录获得最佳信号的一抗浓度、孵育时间和温度，二抗孵育时间，显色时间等关键信息。

### 注意事项及经验 2

#### TSA与IHC、IF的区别

##### ➤ TSA vs. IHC：注意样本自发荧光

都依靠HRP的催化作用：IHC形成DAB沉淀，TSA形成活性荧光化合物。

TSA信号放大作用显著强于DAB，特别是枝杈荧光TSA。请适量降低根据IHC确定的一抗浓度。

TSA荧光多标需考虑样本自发荧光的影响，如角蛋白丰富的样本、脂褐质丰富的脑组织和淋巴瘤样本、骨组织及骨髓样本、过固定样本等。请在开始标记前确定样本是否有自发荧光。可利用TissueGnostics的光谱拆分功能对背景荧光进行扣除，或在标记时避免使用和自发荧光同一通道的TSA染料。

##### ➤ TSA vs. IF：防止信号放大过度

TSA信号放大过度现象在以IF为经验的用户中比较突出，特别是细胞TSA荧光标记。

TSA和IF虽然都属于荧光信号放大，但原理不尽相同。IF流程无需去除内源性过氧化物酶；TSA标记请务必去除组织或细胞中的内源性过氧化物酶，特别是肝脏、肾脏、骨、免疫器官来源的组织和细胞，否则会造成较强的背景染色。

IF:信号等比放大；TSA:信号非线性放大。

IF:1-2个二抗可结合1个一抗，1个二抗可标记1-3个荧光分子>信号最多放大 $2 \times 3 = 6$ 倍。放大效应不会随着时间延长。

### 注意事项及经验 3

#### TSA的占位效应

TSA荧光化合物在HRP催化下发生活化，与靶点附近的酪氨酸残基结合生成稳定的荧光化合物。在多色标记过程中，当两个靶点抗原距离接近时，上一轮反应将抗原附近的酪氨酸耗竭，导致下一轮荧光结合不上的问题，称为占位效应。

➤ TSA荧光化合物的作用半径为5~10nm，半径外的占位效应不会发生。

➤ 组织中的酪氨酸位点较为丰富，占位效应并不经常发生。

➤ 占位效应通常发生在距离接近且表达差异较大的靶点之间，例如

PD1和CD3，如果先做CD3并且信号放大过度，确实会导致PD1染色弱甚至染不上的问题；某些表达广泛且丰度高的靶点，例如外源性表达的GFP分子，在信号放大过度时也可能耗竭整个细胞的酪氨酸位点。

解决办法：“先低后高”、“先少后多”和适度原则：先染丰度低、表达范围少的靶点，后染丰度高、表达范围广的靶点。

### 注意事项及经验 4

#### 染色先后顺序的确立

➤ 在TSA多色荧光标记中，每种荧光都与样本牢牢结合，一旦某个靶点标记失败则无法回头导致前功尽弃。科学设置染色先后顺序，有助于顺利获得理想结果。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

- 抗体必须逐个验证  
在熟悉每个靶点及对应抗体的情况之前，不要贸然做多色标记。
- 靶点先后顺序的选择  
不能长时间修复的抗原，安排到第一轮；需长时间修复的则安排到最后一轮。遵循上述“先低后高”、“先少后多”原则。如果存在难以去除的抗体，请安排到最后一轮。
- 荧光先后顺序的选择  
对于工业用户或者染色工作量大的用户，工作流程可能不包括镜下观察每轮染色效果，因此通常不考虑荧光先后顺序（俗称“盲染”）。请遵循平衡原则。  
对于科研用户，边染边观察是值得鼓励的流程。  
以下为一般配置荧光显微镜通道可观察到的荧光，同一通道内有肉眼可见的光谱差别（例如橘红和深红）：  
DAPI 通道：DAPI/TG420N/TG440N,以 TG460SN/TG520SN/TG540S（需长通）  
FITC 通道：TG520N/TG470SN,以及 TG660S（需长通）  
Cy3 通道：TG560N/TG570N/TGN600N/TG620N/TG640N  
Cy5 通道：TG640N/TG650N/TG670N/TG700N  
通道之间无先后顺序考量，但在同一通道内，建议先染低丰度靶点荧光，后染高丰度靶点；尽量先染短波长荧光，后染长波长荧光。

## 注意事项及经验 5

### 染色先后顺序的确立

- 在TSA多色标记中，荧光种类越多，通道串扰的可能性就越大。下面举例“串色”发生的可能情形。
- 当D570K和D620K在同一通道激发,当两者强度相当时，光谱拆分可有效拆分两者。
- 当D620K强度显著弱于D570K, D570K近红端鼓起的“小尾巴”会被误判为D620K信号。
- 当串色经常发生时，可将D570K换为没有“小尾巴”且Em间隔更远的D560K，可显著减少串色发生。
- 多色标记的荧光种类越多，越要求各荧光强度达到均衡。
- 荧光强度取决于一抗浓度、孵育时间和温度，二抗孵育时间，TSA稀释比例、显色时间乃至当天室温，务必详细记录。
- 请将各一抗与TSA荧光一一对应，测试并汇总达到荧光均衡的实验条件。
- 对于没有条件测试某些TSA荧光（如缺少显微镜Cy5通道）的用户，可用520N等可观测荧光代替测试，获得近似条件。
- 同激发通道之间的串色现象很少见，例如D520K与D570K之间几乎不串色；但同一激发通道内，例如D570K/D620K、D650K/D700K，前者因保持一段特征光谱供识别，因此很少被后者干扰，但前者常常因染色过强而干扰后者。
- 经验是：低丰度靶点选择较短波长荧光先染；高丰度靶点选择较长波长荧光后染。
- D440K替代，以消除对520N/570K的经常性干扰。
- 核染料NU470（大斯托克司频移特性）代替DAPI。
- 优化染料结构，微调EM峰值并缩窄其分布宽度，荧光分布更均衡。

注意：D440K所属通道样本自发荧光较强，请选择丰度高且特异的靶点如CD3、Keratin 19、Vimentin等，建议最后一轮染色并且强染，提高信噪比利于识别和拆分。通常不适用于PD1、PD-L1等中低丰度且指标重要的靶点。

## 实验准备

### 查阅参考文章

### 制定实验Panel

### 准备实验使用的一抗/二抗/荧光染色试剂盒等配套试剂

### 准备检测样本：

1. 不同物种的活检或手术切除样本。
2. 组织离体后使用10%中性福尔马林固定，固定时间8-48h最佳。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>

3. 建议组织切片厚度3-4 $\mu$ m, 使用防脱载玻片。

#### 实验设备 (建议):

取材设备、切片机、脱水机、包埋机、摊烤片机、染色机、恒温箱、微波炉、漩涡混匀器、离心机。

#### 实验耗材 (建议):

脱载玻片、修复盒、晾片架、免疫组化疏水笔、避光孵育湿盒、计时器、离心管、移液器、移液器吸头、量筒、试剂配制瓶、洗瓶、盖玻片。

#### 实验步骤:

1. 石蜡切片复水: 切片置于玻片架放入二甲苯10min $\times$ 3, 乙醇100% > 100% > 95% > 95% > 85% > 75%各5min。

2. 切片置于玻片架放入ddH<sub>2</sub>O, 5min。

3. 玻片架放入修复盒, 修复液没过切片上沿, 微波或高压修复。

请务必根据经验选择修复液及修复条件。

Option: 修复/速除二合一缓冲液修复条件: 【修复速出缓冲液配置: 直接向瓶中加入92ml ddH<sub>2</sub>O溶解粉末即可配置出50 $\times$ 储液】50 $\times$ 浓缩液用ddH<sub>2</sub>O稀释至工作液, 微波炉高功率至沸腾, 维持20sec, 转低功率维持低沸状态5min, 关火自然冷却。

注意: 修复/速除二合一缓冲液可能不适用于高压修复。

4. PBS 5min $\times$ 3。

5. 用免疫组化疏水笔将组织圈出。

6. 加3%双氧水去除内源性过氧化物酶, 室温10min。

7. PBS 5min $\times$ 3。

8. 滴加封闭液, 室温30min。

9. 一抗稀释液稀释抗体 (稀释比例需自行测试或参考官网抗体说明书), 滴加样本, 湿盒内4 $^{\circ}$ C过夜或恒温箱内37 $^{\circ}$ C孵育1hr (根据经验及实验安排决定)。

10. PBS 5min $\times$ 3。

11. 根据一抗种属滴加HRP二抗, 室温30min。

12. PBS 5min $\times$ 3。

13. 显色反应及信号放大:

TSA染料与快速反应缓冲液稀释染料1:99~199 (具体稀释条件参照荧光染料光谱信息) 稀释成工作液, 视样本类型和样本大小, 大约50-200 $\mu$ L/张样本, 混匀并滴加, 初始反应室温60sec。(注: 染料为共价结合, 微波不可去除, 注意染料添加顺序)

PBS 2min中止反应, 科研实验时建议镜检, 在显微镜下观察每轮染色效果; 多张样本同时实验时为了减少因镜检时间较长造成同批次间的差异化, 建议进行抽检, 染色效果理想情况下, 可考虑不全部镜检。镜检过程中如果出现背景荧光较强, 可于PBS中静置一段时间再观察; 如果觉得信号强度不够, 可以继续滴加1:20-1:50稀释的工作液, 室温反应足够长的时间。显色时间根据抗体的种类和稀释的比例不同, 推荐在60sec左右, 最好不要超过20min。

14. 抗体复合物的去除:

方法: 修复/速除二合一缓冲液: 50 $\times$ 浓缩液用ddH<sub>2</sub>O稀释至工作液, 微波炉高功率至修复液沸腾, 维持10sec关火, 5min 后即可将烧杯置于盆中水浴, 降至室温, 轻松为您节省至少20min! (用过的缓冲液不建议重复使用)

·Option: 切片置于盛满PH6.0柠檬酸盐修复液中或PH9.0 EDTA碱性抗原修复液中, 微波炉高火加热至沸腾, 2min10sec, 在微波炉内静置5min后取出, 将修复盒置于冰水中冷却15min。

15. PBS 5min。

16. 避光湿盒内室温孵育5min。核染料PBS洗三次 (若使用DAPI则需要PBS清洗, 若使用NU47则不需要PBS清洗, 具体稀释条件参照荧光染料光谱信息)。

17. 防荧光淬灭封片剂滴加1-2滴, 盖玻片封片。

18. 置于37 $^{\circ}$ C恒温箱固化干片30min~1h (切勿放入湿盒)。

19. 拍照。

20. 切片保存: 放置于片盒, 于-20 $^{\circ}$ C冰箱长期保存 (可防止核染料扩散)。如果保存于室温, 请避光并于1个月之内完



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址: 上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com



成拍照。

备注：实验步骤中6-14步骤进入多轮循环染色步骤，重复多轮染色直至完成。

#### 荧光染料光谱信息：

名称	Ex.(nm)激发峰波长/ Em.(nm)发射峰波长	参考荧光	建议稀释比例	稀释条件
D440K	362/436	AF350	1:99~199	与TSA Buffer快速反应缓冲液配比稀释， 稀释后避光湿盒内 室温孵育5min
D520K	488/519	AF488/Opal520	1:99~199	
D570K	555/570	AF555/Opal570	1:99~199	
D620K	594/615	AF594/Opal620	1:99~199	
D650K	633/655	Opal650	1:99~199	
D670K	650/670	AF647/Opal670	1:99~199	
D700K	682/702	Opal690	1:99~199	
D770K	750/780	Cy7	1:99~199	与PBS配比稀释
NU470	450/470	/	1:99~199	
DAPI	360/460	/	1:99~199	与纯水配比稀释
修复/速除二合一 缓冲液	/	/	1:49	与纯水配比稀释

备注：稀释比列为建议参数值，实际使用比例会依据样本类型、成像设备、实验室温度、一抗浓度、孵育时间和温度、二抗孵育时间等因素的不同而不同，建议使用时做预实验并务必详细记录实验条件。

#### 订购信息：

##### 多重荧光染色试剂盒套装

产品名称	货号	规格	产品说明
三色TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒	G1136	30T(15μL) 100T(50μL) 200T(100μL)	包含TSA2支和核染料1支（包含520、570、DAPI）、TSA Buffer快速反应缓冲液1瓶。
四色TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒	G1137	30T(15μL) 100T(50μL) 200T(100μL)	包含TSA3支和核染料1支（包含520、570、650、DAPI）、TSA Buffer快速反应缓冲液1瓶。
五色TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒	G1138	30T(15μL) 100T(50μL) 200T(100μL)	包含TSA 4支和核染料1支（包含520、570、650、700、DAPI）、TSA Buffer快速反应缓冲液1瓶。
六色TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒	G1134	30T(15μL) 100T(50μL) 200T(100μL)	包含TSA5支和核染料1支（包含440、520、570、650、700、NU470并搭配封片剂2型）、TSA Buffer快速反应缓冲液2瓶。
七色TSA多重荧光染色染料组合装试剂盒	G1135	30T(15μL) 100T(50μL) 200T(100μL)	包含TSA 6支和核染料1支（包含440、520、570、650、700、770、NU470并搭配封片剂2型）、TSA Buffer快速反应缓冲液2瓶。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址：上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话：400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱：saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

序号	问题	解答
1	所有操作要避光吗?	不需要, 在常规环境下操作就可以, TSA染料的荧光强度及稳定性很高。
2	抗体修复液每一轮修复都要更换吗?	是的, 每一轮都要根据抗体选择相应的修复液。
3	染料的选择会影响后染色吗, 有共定位的话怎么办?	共定位的情况, 我们可以通过单一通道观察来更好的检测各指标的分布情况, 染料不会对染色有影响串色的情况需要预实验做充足, 包括抗体稀释比例, 染料与放大液比例, 修复条件的确定。
4	TSA用的一抗、二抗各是什么种属?	TSA的优势在于一二抗种属无需特别要求, 一抗根据样本种属选择既可, 二抗根据一抗选择即可, 多个抗体组合, 种属不会有影响。
5	抗体洗脱和微波修复哪种方式洗脱效果更好?	微波修复洗脱更稳定, 抗体洗脱液对大多数抗体都管用, 难洗的抗体需要延长洗脱时间。
6	多色TSA样本的运输保存有条件限制吗?	正常的石蜡切片和组织芯片很稳定, 只要4度保存及运输即可, 冰冻切片的话, 需要干冰低温运输。
7	我的组织本身含有GFP蛋白, TSA染色是否会造成干扰?	染色的时候可以选择除发射波段500左右的染料, 扫描成像为灰度图, 赋予的颜色是伪彩色, 可以更换其他颜色。
8	选择TSA实验的抗体, 抗体需要满足什么条件吗?	抗体最起码要满足IHC/IF的实验应用, 各品牌供应商都会提供相应的实验验证及抗体使用浓度推荐。
9	在指标与染料的搭配以及染色顺序上, 有什么规律吗?	并没有一个特别的线性关系, 和蛋白的种类、表达量以及修复条件都有关系, 所以会多因素考虑, 多尝试, 仔细阅读说明书中的注意事项, 预实验很重要。
10	TSA技术中有抗原修复与抗体洗脱步骤有何不同?	抗体洗脱步骤与该抗体的修复条件大致相同, 只不过不需要抗原修复那么大的强度, 洗脱比抗原修复时间更短。
11	B细胞、T细胞、DC细胞常用marker能推荐下吗?	T细胞:CD3\CD4、CD8、FoxP3(再细化还有:GranzymeB、PD-1、TIM-3、CD45; B 细胞:CD19; DC细胞:CD8α、CD11b.
12	肿瘤微环境分析常用marker能推荐下吗?	肿瘤上皮标记 marker(如:CK1 9等), 间质标记 marker(如:α-SMA等), 免疫细胞标记 marker(T细胞:CD3,CD4,CD8;B细胞:CD20,NK细胞:CD56,巨细胞:CD68等)
13	一抗浓度如何选择?	可以根据购买一抗的抗体说明书上IHC实验验证过的推荐最高浓度进行单染梯度测试, 每种抗体使用3个梯度浓度, 固定染料稀释比(1:1 0-1:20)进行染色, 固定扫描成像条件, 观察信号强度之间的差别, 选择最合适抗体浓度。

常见问题	可能原因	解决办法
信号弱/或者无信号	组织中靶蛋白本身表达量低或者无表达	查阅相关参考文献, 了解靶蛋白的表达情况, 实验过程可设置阳性对照。
	抗原未充分暴露	可适当延长抗原修复时间。
	一抗不适合	选用IHC/IF应用抗体, 并注意是否具有组织特异性。
	一抗孵育浓度或者时间不合适	提高抗体浓度比例, 条件允许情况下可4°过夜孵育。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co.,Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话:400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

http://www.saint-bio.com

	荧光染料比例与孵育时间不合适	可提高染料稀释比例与孵育时间。
	荧光发生淬灭	选用抗荧光淬灭封片剂，并避光保存。
	成像设备通道与染料不匹配	了解染料的激发/发射波长，选用合适的成像设备进行拍摄。
信号过强	一抗/二抗稀释比例不合适	降低一抗/二抗稀释比例。
	荧光染料比例与孵育时间不合适	可降低染料稀释比例与孵育时间。
	成像设备曝光时间不合适	选用合适的曝光时间成像。
高背景信号	内源性过氧化物酶未完全去除	确保去除内源性过氧化物酶，可延长反应时间。
	洗涤过程不充分	确保每步骤的次数与时间足够，可适当延长时间。
	未封闭或者封闭不充分	建议每一轮开始之前都进行封闭足够时间。
	实验试剂有污染	建议实验试剂现配现用，并使用双蒸水进行溶液配比。
	实验过程中样本变干	确保整个实验过程是组织样本保持湿润。
	样本自发荧光	设置空白对照，使用自发荧光淬灭剂，或者更换荧光基团，避开会产生自发荧光的激发光波段。
<p>温馨提示:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 在出现染色效果不佳情况下，研究人员需要考虑不同组织，不同抗体的染色条件不完全一致，适当调整相关染色条件，已达到最佳染色效果。</li> <li>2. 实验过程中时刻做好相应的阴性与阳性对照对分析实验问题会有极大的帮助。</li> <li>3. 在进行多色染色之前一定要进行每个抗体单染条件的摸索，对于需要进行7色及其以上的多色标记，单染条件尤为重要，是一张好的多色样本的先提条件。</li> </ol>		

#### 注意事项:

1. 收到产品后请立即按照说明书推荐的条件保存。在打开管盖前，请适当离心，使附着在管盖或管壁上的染料或试剂聚集于管底。
2. 具体的最佳工作浓度请自行参考相关文献，或者根据实验目的，通过实验进行摸索和优化。
3. 本产品仅供科研使用。请勿用于医药、临床诊断或治疗，食品及化妆品等用途。请勿存放于普通住宅区。
4. 为了您的安全和健康，请穿好实验服并佩戴一次性手套和口罩操作。

#### 储存条件:

长期-20℃储存；开封后2-8℃储存，需避光保存，12个月有效。



扫一扫 加微信

**上海尚宝生物科技有限公司**  
Shanghai Saint-Bio Biotechnology Co., Ltd

地址:上海市徐汇区龙华路2518弄14号

电话: 400-611-0007 13671551480

Q Q: 807961520

邮箱: saintbio@126.com

<http://www.saint-bio.com>