

荧光双标超敏信号放大试剂盒

（冰冻切片、细胞爬片适用）

货号：HKI0000-2SA

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
Flare520超敏浓缩型	HKI0014S	50uL/200T	12个月
Flare570超敏浓缩型	HKI0015S		
POLY-HRP羊抗兔二抗（可选）	HKI0026	5mL	
DAPI染色液（即用型）	HKI0005	10mL	
抗荧光淬灭封片剂	HKI0007	10mL	
超敏染料稀释液	HKI0000	20mL*2	
内源性过氧化物酶阻断剂	HKI0047	20mL	
抗体洗脱液	HKI0045	10mL	

（注：荧光染料可查询荧光染料资料选择，本试剂盒荧光染料为默认选择，若选择Flare480超敏或Flare780超敏需要补差价）

【产品简介】

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）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，形成永久性共价键结合。在运用HRP二抗及一抗在微波热修复条件下脱离掉抗原失活的原理，重复此过程，即可实现同种属荧光双标及荧光三标以及多标（注：此过程仅适用于石蜡切片的荧光多标）。

此试剂盒中的荧光探针可单独或配合使用。超敏型Flare荧光染料的亮度比普通型Flare荧光染料高10倍以上，不再需要增强剂辅助，即可获得高亮度的荧光标记。

【储存与运输】

冰袋（wet ice）运输；4℃保存，有效期 12 个月。

【使用方法】

细胞爬片

1. 固定通透

在培养板中将已爬好细胞的玻片用PBS浸洗3次，每次3min，用4%多聚甲醛固定15min，PBS浸洗3次，每次3min。**细胞通透剂（货号：HKI0048）**室温通透20min（**细胞膜上表达的抗原可省略**）。

2. 封闭处理

PBS浸洗3次，每次3min，吸水纸吸干PBS，滴入**封闭液（货号：HKI0009R/B/S）**完全覆盖细胞，室温封闭30min。

3. 一抗孵育

弃掉封闭液，滴加用**通用抗体稀释液（货号：HKW2083）**按一定比例稀释的一抗并放入湿盒，4℃孵育过夜（**或37℃湿盒孵育2h**）。

4. 二抗孵育

PBST浸洗3次，每次3min，吸干多余液体滴加稀释好的与一抗相应种属的HRP标记二抗，湿盒中37℃孵育1h，PBST浸洗3次，每次3min。

5. 加TSA 信号放大试剂

根据需要标记的荧光颜色加对应的TSA 放大试剂（**Flare超敏浓缩型：超敏染料稀释液=1:400**），孵育3-10min（**具体根据预实验条件确定**）。如遇标记效果差的可适当调整荧光试剂稀释比，正常孵育。

6. 荧光多色实现

抗体洗脱液37℃预热至完全溶解，滴加足量抗体洗脱液完全覆盖细胞，37℃放置8分钟，弃去洗脱液，再次滴加足量抗体洗脱液完全覆盖细胞，37℃放置8分钟，弃洗脱液，PBS浸洗3次，每次5min，洗脱掉一抗及相应二抗，再重复步骤3-5，实现荧光多色。

7. DAPI复染细胞核

8. 抗荧光淬灭封片剂封片

9. 相应荧光通道拍照或扫描

（注：上述1-8步骤之间，除血清封闭后不用清洗外，各步骤之间都需用纯水或PBS充分浸洗）

冰冻切片

1. 复温固定

冰冻切片室温放置30min后，入纯甲醇固定10min。（若采用甲醛固定液固定组织，需要进行**抗原修复**）

2. 阻断内源性过氧化物酶和血清封闭

PBS浸洗切片3次，每次5min，用**过氧化物酶阻断剂（货号：HKI0047）**孵育25min，阻断内源性过氧化物酶，滴入**封闭液（货号：HKI0009R/B/S）**37℃孵育20min。

3. 一抗孵育

弃掉封闭液，滴加适当比例稀释的一抗并放入湿盒，4℃孵育过夜。

4. 二抗孵育

PBST浸洗3次，每次3min，吸干多余液体滴加稀释好的与一抗相应种属的HRP标记二抗，湿盒中37℃孵育1h，PBST浸洗3次，每次3min。

5. 加TSA 信号放大试剂

根据需要标记的荧光颜色加对应的TSA 放大试剂（**Flare超敏浓缩型：超敏染料稀释液=1:400**），孵育3-10min（**具体根据预实验条件确定**）。如遇标记效果差的可适当调整荧光试剂稀释比，正常孵育。

6. 荧光多色实现

抗体洗脱液37℃预热至完全溶解，滴加足量抗体洗脱液完全覆盖组织，37℃放置8分钟，弃去洗脱液，再次滴加足量抗体洗脱液完全覆盖组织，37℃放置8分钟，弃洗脱液，PBS浸洗3次，每次5min，洗脱掉一抗及相应二抗，再重复步骤3-5，实现荧光多色。

7. DAPI复染细胞核

8. 抗荧光淬灭封片剂封片

9. 相应荧光通道拍照或扫描

（注：上述1-8步骤之间，除血清封闭后不用清洗外，各步骤之间都需用纯水或PBS充分浸洗）

【注意事项】

1. 本产品仅作科研用途。
2. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。
3. POLY-HRP羊抗兔二抗属于附赠试剂，不足200T剂量，可根据需要回购。
4. 样本来源为兔（或小鼠），若出现较高非特异性荧光着色，一抗为兔抗（或鼠抗）时，可采用POLY-HRP羊抗兔鼠通用二抗（货号：HKI0029）或POLY-HRP羊抗鼠二抗（货号：HKI0027）。



扫描二维码查看荧光染料资料