

TSA Colors Multiplex Detection Kits(with HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG)

超百倍信号放大 即用鼠兔通用二抗 简化 TSA 配液 可多轮复染

产品货号：P31209、P31210、P31211

产品规格：20 slides、50 slides、100 slides

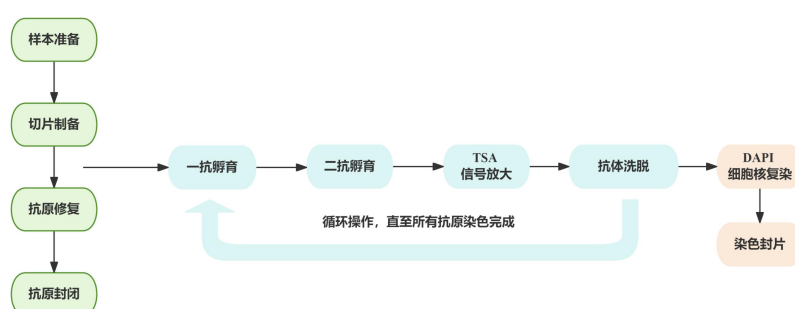
储运条件：试剂盒 4℃避光，冰袋运输；收货后各组分可按照瓶身储存条件和 Exp（效期）分别保存

产品简介：

本系列TSA Colors Multiplex Detection Kits可简称多重免疫组化染色(mIHC)、多重荧光组化、多色免疫荧光(mIF)、荧光多色标记或多重染色，是一种基于酪酰胺信号放大技术(TSA, Tyramide Signal Amplification)，针对细胞或组织样品（如石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片/涂片、多孔板中培养的细胞等）开展多重荧光染色的检测试剂盒，尤其是极低丰度靶标和复杂样本。该技术具备优异的信号放大性能与多重染色能力，可实现超百倍信号放大，显著提升检测灵敏度，有效弥补传统染色技术的短板。

TSA技术核心原理是采用多聚HRP标记二抗，在过氧化氢协同作用下催化体系内荧光酪胺底物活化为高活性自由基中间体。活化荧光酪胺仅可与组织蛋白分子上的酪氨酸残基形成稳定共价键，本身不具备抗原特异性；信号精准定位依赖一抗特异性识别靶抗原，使荧光信号仅富集于抗原所在原位，完成超 100 倍信号放大。单轮染色结束后，通过热修复处理可彻底洗脱切片上非共价结合的一抗、二抗及HRP复合物，而共价锚定在组织上的荧光信号不受影响、稳定保留。基于该特性，可依次更换不同靶标一抗及不同波段荧光酪胺底物，多轮循环完成连续多重染色，最终实现单张组织切片多靶点同步原位检测。

TSA技术突破了传统直接荧光标记信号微弱、多重染色易受抗体种属交叉反应干扰的技术瓶颈，广泛适配石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片/涂片等各类生物样本，同时兼容免疫荧光(IF)、原位杂交(ISH)配套蛋白共定位检测，是低表达转录因子、膜表面标志物、细胞因子等微量靶标精准定位的核心工具。试剂盒依托极简配液流程、高亮度稳定荧光酪胺、跨物种通用二抗等核心优势，完整解决多重染色实验操作复杂、信号不均、种属限制、耗材采购分散等关键痛点，同时提升实验数据可靠性与重复性。



注：效能等同于AKOYA Opal™ Color Manual IHC Kit。

注：本文中 Opal™为 AKOYA 的商标及注册商标。

应用范围：石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片/涂片、多孔板中培养的细胞等多重免疫荧光染色、核酸蛋白共定位(TSA+ISH)、低丰度蛋白原位表达检测等

产品特点：

- **超高灵敏信号放大：**依托 TSA 酪酰胺催化沉积技术，HRP 协同过氧化氢酶促反应实现靶标信号超 100 倍放大，极低丰度抗原和复杂样本亦可呈现清晰特异性荧光；



- **突破抗体种属限制：**TSA 技术几乎完美解决抗体种属选择的限制，同时配套即用型羊抗鼠/兔通用二抗，可按需直接使用；
- **配液流程简化：**预配制 TSA 缓冲液，BF™ 荧光酪胺仅需 1：200 稀释即可配置，省去缓冲液复溶、多试剂配比换算等繁琐操作；
- **自研高性能荧光底物：**BF™ 系列荧光酪胺相较于市面同类产品，在同等稀释倍数下有效浓度更高，荧光信号更强，成像具备更优异的信噪比；
- **同切片多轮复染：**洗脱可清除一抗、二抗及 HRP 复合物，共价结合荧光信号稳定保留，更换不同波段荧光底物，单张切片完成多靶点原位共定位；
- **多样本适配：**兼容石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片/涂片、多孔板中培养的细胞，可配套免疫荧光(IF)、原位杂交(ISH)共定位实验。

产品参数：

- BF™ 520 Tyramide Ex/Em: 495/519 nm
- BF™ 570 Tyramide Ex/Em: 555/565 nm
- BF™ 620 Tyramide Ex/Em: 590/617 nm
- BF™ 660 Tyramide Ex/Em: 642/662 nm

产品组分：

TSA Three-Colors Multiplex Detection Kits(520/570/DAPI, with HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG)(P31209)				保存条件
规格 组分	20 slides	50 slides	100 slides	
P31401 Ready-to-use Tyramide Amplification Buffer(1×)	4 mL	10 mL	20 mL	(1) 试剂盒可 4℃避光保存，组分性能满足质量标准。 (2) 组分标签为独立长期存放的最优条件，可按各瓶身条件分别保存。 (3) 收货后各组分可按照瓶身 Exp（效期）分别保存。
C22206 Ready-to-use DAPI	2 mL	5 mL	10 mL	
C23006 Plus Diamond Antifade Reagent	400 μL	1 mL	2 mL	
P30503 Ready-to-use Polymer HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG	4 mL	10 mL	20 mL	
B41102 Ready-to-use BF™ 520 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	
B41105 Ready-to-use BF™ 570 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	

TSA Three-Colors Multiplex Detection Kits(520/620/DAPI, with HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG)(P31210)				保存条件
规格 组分	20 slides	50 slides	100 slides	
P31401 Ready-to-use Tyramide Amplification Buffer(1×)	4 mL	10 mL	20 mL	(1) 试剂盒可 4℃避光保存，组分性能满足质量标准。 (2) 组分标签为独立长期存放的最优条件，可按各瓶身条件分别保存。 (3) 收货后各组分可按照瓶身 Exp（效期）分别保存。
C22206 Ready-to-use DAPI	2 mL	5 mL	10 mL	
C23006 Plus Diamond Antifade Reagent	400 μL	1 mL	2 mL	
P30503 Ready-to-use Polymer HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG	4 mL	10 mL	20 mL	
B41102 Ready-to-use BF™ 520 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	



B41106 Ready-to-use BF™ 620 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	
--	-------	-------	-------	--

TSA Four-Colors Multiplex Detection Kits(520/570/660/DAPI, with HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG)(P31211)				保存条件
规格	20 slides	50 slides	100 slides	
组分				
P31401 Ready-to-use Tyramide Amplification Buffer(1×)	6 mL	15 mL	30 mL	(1) 试剂盒可 4℃避光保存，组分性能满足质量标准。 (2) 组分标签为独立长期存放的最优条件，可按各瓶身条件分别保存。 (3) 收货后各组分可按照瓶身 Exp（效期）分别保存。
C22206 Ready-to-use DAPI	2 mL	5 mL	10 mL	
C23006 Plus Diamond Antifade Reagent	400 μL	1 mL	2 mL	
P30503 Ready-to-use Polymer HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG	6 mL	15 mL	30 mL	
B41102 Ready-to-use BF™ 520 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	
B41105 Ready-to-use BF™ 570 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	
B41110 Ready-to-use BF™ 660 Tyramide(200×)	10 μL	25 μL	50 μL	

注：本试剂盒使用次数以石蜡切片每次使用 100 μL Tyramide 染色工作液计算。

注意事项：

- 如需增强型免疫染色抗体洗脱液，可单独在我司订购，货号 P31402(Enhanced Antibody Stripping Buffer for Immunostaining)，室温单次即可彻底剥离抗体。
- 其中 Plus Diamond Antifade Reagent 抗荧光淬灭性能优异，可无需解冻直接取用，可避免反复冻融，使用指甲油或密封胶密封后可长期保存。
- 若组织样本量大、试剂消耗较多，组分表中配套试剂均可单独向我司采购。
- 全程实验操作需注意避免切片风干干片，请小心操作。
- 请按设备荧光通道参数选用酪酰胺底物；BF™ Tyramide 底物光谱见产品参数，本品按发射波长命名，请注意区分。
- 微波抗原修复时缓冲液需足量，若不足中途及时补液，防止蒸干导致干片。
- 一抗选型参考：石蜡、冰冻切片请选用适配 IHC 检测的一抗；细胞爬片实验需使用匹配 ICC/IF 的一抗。
- 如染色反应后需充分洗涤，以减少背景荧光干扰，洗涤时长与次数可根据样本染色背景效果酌情优化调整。
- 荧光染料均存在淬灭问题，请尽量注意避光，以减缓荧光淬灭。
- 本产品仅限于科研用途并且不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请遵循您所在常规实验室安全规定。

使用说明：

一、实验前准备

1. 试剂准备：

- 将试剂取出，并平衡到室温。

另准备如下自备试剂：

- 抗体洗脱液：免疫染色专用抗体洗脱缓冲液；
- 脱蜡梯度试剂：二甲苯、无水乙醇、纯水；
- 洗涤液：1×PBS(pH 7.4)；
- 抗原修复液：柠檬酸钠抗原修复缓冲液(pH 6.0)；
- 内源过氧化物酶封闭试剂：3%过氧化氢溶液(H₂O₂)；



- 抗原封闭试剂：免疫染色封闭液；
- 所需特异性一抗；
- 组化笔；
- （可选）固定通透试剂：4%多聚甲醛固定液或免疫染色固定液；
- （可选）组织自发荧光淬灭剂。

注：如需增强型抗体洗脱液，可单独在我司订购，货号 P31402(Enhanced Antibody Stripping Buffer for Immunostaining)。

2. 仪器准备：

- 切片扫描仪、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜等。

3. Tyramide 染色工作液配置：

- Tyramide染色工作液：将BFTTM Tyramide荧光染料：Ready-to-use Tyramide Amplification Buffer (1×)=1：200按比例避光混匀，现配现用。

样品数量	1	10	20
Ready-to-use BFT TM Tyramide(200×)	0.5 μL	5 μL	10 μL
Ready-to-use Tyramide Amplification Buffer(1×)	100 μL	1000 μL	2000 μL
Working Solution	~100 μL	~1000 μL	~2000 μL

注：常规样本染色工作液(Working Solution)参考体积为 100 μL；具体可根据样本实际面积进行调整，适用体积范围 50~200 μL，注意试剂需完全覆盖样本，防止孵育过程干片。

注：常规实验条件下采用 1：200 稀释 BFTTM Tyramide 荧光染料，可获得最优荧光成像效果；因信号强度受靶标表达丰度、样本类型等影响，推荐稀释比例区间 1：50~1：400 摸索。

4. 对照组设置：

- 阳性对照：
 - (1) 选用已知稳定表达靶蛋白的组织切片，完整走完全部染色流程；若阳性对照切片无特异性荧光显色，证明抗原修复、一抗、TSA 信号放大等任一环节存在失效问题，需重新检测阳性实验。
- 阴性对照（无一抗对照）：
 - (1) 操作流程与待测样本完全一致，仅在一抗孵育步骤用等量 PBS/一抗稀释液替换特异性一抗，其余二抗、酪胺荧光底物、DAPI 等试剂正常孵育；用于排除二抗、荧光底物、缓冲液带来的非特异性背景荧光，区分真实阳性信号与试剂杂染。

二、操作步骤

1. 样本准备：

- (1) 石蜡切片（切片脱蜡水化）：
 - a. 石蜡切片置于 60 °C 烘箱烤片 60 min。
 - b. 将切片冷却至室温，用二甲苯浸泡脱蜡 2 次，每次 5~15 min。

注：每次二甲苯脱蜡步骤均需更换全新二甲苯；二甲苯具备刺激性与毒性，全程务必在通风橱内完成操作，做好安全防护。

 - c. 无水乙醇漂洗 2 次，每次 5 min。
 - d. 梯度乙醇依次浸泡：95%、90%、80%、70%乙醇各漂洗 1 次，每次 2~5 min。

注：若实验时间紧张，切片可置于 70%乙醇中浸泡过夜，次日再继续后续实验步骤。

 - e. PBS 漂洗 1 次，每次 5 min。
- (2) 冰冻切片/细胞爬片/涂片/多孔板中培养的细胞：
 - a. 样本用 4%多聚甲醛固定 10~30 min。
 - b. PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。
 - c. 滴加 0.3% Triton X-100 通透液室温通透 5~20 min（检测细胞膜表达蛋白可省略通透步骤）。
 - d. PBS 洗涤 3 次，每次 5 min。

2. 抗原修复：

- (1) 将切片完全浸没于柠檬酸钠抗原修复缓冲液的修复盒，放于微波炉进行抗原修复。

注：抗原修复有关具体步骤可参考对应说明书；微波炉抗原修复过程中需留意缓冲液液面，避免液体蒸干造成切片干片，



影响实验效果。

(2) 自然冷却后，将玻片放于 PBS 中，脱色摇床洗涤 3 次，每次 5 min。

注：石蜡切片实验必须进行抗原修复；冰冻切片、细胞爬片常规检测无需抗原修复，仅针对核内低丰度抗原、久存固定样本可酌情增加温和抗原修复步骤。

3. 内源性过氧化物酶封闭：

(1) 小心擦掉切片的水，使用组化笔沿组织边缘画圈，防止抗体流失。

(2) 圈内滴加适量 3% 过氧化氢溶液，室温避光孵育 10~15 min，封闭组织内源性过氧化物酶。

注：组织中存在内源性过氧化物酶，在酪胺信号放大体系下可催化酪胺发生非特异性沉积，引发背景荧光与假阳性。3% 过氧化氢可有效灭活内源性过氧化物酶，减少非特异背景干扰，提高染色信噪比。

(3) 使用 PBS 脱色摇床洗涤 3 次，每次 5 min。

4. 背景封闭：

(1) 小心擦掉切片的水，取免疫染色封闭液、或含 BSA 或血清的自制适当封闭液，直接滴加在圈内样本上。

(2) 在湿盒中室温孵育 60 min。

注：封闭液需足量滴加完全覆盖组织，具体用量与孵育时长请参照所用封闭液原厂说明书。

注：二抗孵育时湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发。

(3) 孵育结束后，用 PBS 在脱色摇床中洗涤 3 次，每次 5 min。

5. 一抗孵育：

(1) 小心擦掉切片的水，圈内滴加按合适比例稀释的一抗。

(2) 切片平放于加有保湿水的湿盒内，在湿盒中 37 °C 孵育 1~3 h，或 4 °C 孵育过夜。

注：一抗孵育时湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发。

注：各类一抗效价各不相同，初次检测建议设置稀释梯度以筛选最佳工作浓度。孵育条件可参考：37 °C 孵育 1~3 h，推荐稀释 1 : 50~1 : 200；4 °C 过夜孵育建议稀释 1 : 200~1 : 400 甚至更高，避免背景偏高、信号过载。

(3) 孵育结束后，用 PBS 在脱色摇床中洗涤 3 次，每次 5 min。

6. 二抗孵育：

(1) 小心擦掉切片的水，取 100 μL Ready-to-use Polymer HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG，直接滴加在圈内样本上。

注：若组织样本面积较大，可酌情增加二抗滴加量，保证组织完全被液体覆盖。

注：试剂盒配套 Polymer HRP Goat Anti-Mouse/Rabbit IgG，若检测小鼠组织样本，为避免小鼠内源 IgG 与二抗交叉结合产生非特异性荧光背景，推荐选用非鼠抗（如兔抗）进行配对实验。同时，若靶标信号微弱时，可提升试剂覆盖体积、延长孵育时间；染色背景过强时，可减少滴加量或缩短孵育时长优化结果。

(2) 在湿盒中室温孵育 30~60 min。

注：二抗孵育时湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发；孵育时间可依据抗原丰度、切片类型进行调整。

(3) 孵育结束后，用 PBS 在脱色摇床中洗涤 3 次，每次 5 min。

7. Tyramide 信号放大染色：

(1) 小心擦掉切片的水，取 100 μL 配置好的 Tyramide 染色工作液，直接滴加在圈内样本上。

注：若组织样本面积较大，可酌情增加 Tyramide 染色工作液滴加量，保证组织完全被液体覆盖。

(2) 在湿盒中室温孵育 10 min。

注：湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发。

(3) 孵育结束后，用 PBS 在脱色摇床中洗涤 3 次，每次 5 min。

注：染色完成后可通过荧光显微镜评估效果，镜检时以洗涤液浸润样本，防止切片风干干片。多重循环染色液可待全部抗体及 TSA 染色结束后统一成像。

8. 抗体洗脱：（如下两种方法二选一，推荐首选我司增强型抗体洗脱液-货号 P31402 进行洗脱）

方案一：抗体洗脱液洗脱：

(1) 小心擦掉切片的水，滴加 100 μL 的抗体洗脱液，直接滴加在圈内样本上，覆盖整个样本。

注：若组织样本面积较大，可酌情增加抗体洗脱液滴加量，保证组织完全被液体覆盖。

(2) 在湿盒中室温孵育 10 min（以货号 P31402(Enhanced Antibody Stripping Buffer for Immunostaining) 为例）。

注：湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发。

注：抗体洗脱液的具体孵育温度与使用量，请参照配套操作说明书执行。

注：若所需增强型抗体洗脱液可单独在我司订购，此产品无需 37 °C 孵育，通常仅需室温孵育 10 min 即可高效解离抗原-



抗体复合物，货号 P31402(Enhanced Antibody Stripping Buffer for Immunostaining)。

(3) 孵育结束后，用PBS在脱色摇床中洗涤3次，每次5 min。

注：若抗原洗脱效果不佳，可重复本轮抗体洗脱操作，提升剥离效果。

方案二：抗高温热修复洗脱法（热洗脱）

(1) 将组织切片放入装有适配抗原修复液（依据样品类型、抗体选择）的染缸内，95 °C水浴5~20 min。

注：请依据样品类型、目标抗体选择合适的抗原修复液。

注：最优水浴时长需结合样本、靶标蛋白实验摸索，全程避免缓冲液蒸发，严禁干片。

(2) 在切片自然冷却至室温，用PBS在脱色摇床中洗涤3次，每次5 min。

注：由于冰冻切片易脱片，本方法（方案二）更适用于石蜡切片。

注：多重染色流程中，最后一轮 TSA 信号放大染色完成后，无需进行抗体洗脱。

9. 第 N 轮标记：

(1) 重复步骤4至步骤8，更换与前序轮次完全不同的一抗及对应荧光染料，即可开展下一轮多色标记。

10. 末轮标记：

(1) 重复步骤4至步骤7，更换与前序轮次完全不同的一抗及对应荧光染料，末次标记可省略步骤8。

11. DAPI 复染细胞核：

(1) 小心擦掉切片的水，滴加100 μL的Ready-to-use DAPI，直接滴加在圈内样本上，覆盖整个样本。

注：若组织样本面积较大，可酌情增加 Ready-to-use DAPI 滴加量，保证组织完全被液体覆盖。

(2) 在湿盒中室温孵育10 min。

注：湿盒内需添加少量水保湿，防止孵育过程中抗体蒸发。

(3) 孵育结束后，用PBS在脱色摇床中洗涤3次，每次5 min。

12. （可选）自发荧光淬灭：

(1) 小心吸除PBS洗涤液，蒸馏水短暂冲洗切片。

(2) 每片滴加组织自发荧光淬灭剂，用量以完全覆盖组织为准，可根据切片大小调整。

(3) 小心吸除自发荧光淬灭剂，用蒸馏水短暂冲洗。

注：组织内若产生自发荧光，干扰目标信号，可使用自发荧光淬灭剂淬灭内源自发荧光，不同组织需参考相关文献和厂家说明书优化孵育时间和用量。

注：组织自发荧光淬灭剂具有一定危害性，操作过程中务必做好防护措施，避免直接接触皮肤，同时防止吸入。

13. 封片：

(1) 小心擦掉切片的水，向样本滴加10~20 μL Plus Diamond Antifade Reagent，轻轻盖上盖玻片，尽量避免气泡，完成封片。

注：用滤纸充分吸除爬片、载玻片残留 PBS 及水渍，防止产生气泡；吸取试剂时枪头最后一滴不要打出，降低气泡产生概率；若需长期保存，使用指甲油或密封胶密封。

注：封片剂添加量结合组织面积、样本类型、盖玻片尺寸调整。用量不足易干片加速荧光淬灭；过量易导致盖玻片移位。

注：若所需增强型抗荧光淬灭可单独在我司订购，此产品抗荧光淬灭性能优异，货号 C23006(Plus Diamond Antifade Reagent)。

14. 镜检拍照：

(1) 将封片完成的切片置于切片扫描仪、荧光显微镜、激光共聚焦扫描显微镜等观察，采集荧光成像图片。BFTTM 520 Tyramide Ex/Em: 495/519 nm; BFTTM 570 Tyramide Ex/Em: 555/565 nm; BFTTM 620 Tyramide Ex/Em: 590/617 nm; BFTTM 660 Tyramide Ex/Em: 642/662 nm。

三、结果判读



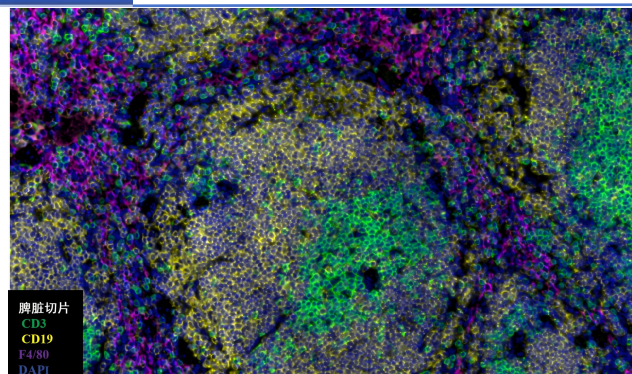


图 1.TSA 染色全视野图

本图为脾脏多重 TSA 荧光染色石蜡切片，使用切片扫描机实测。本多重染色体系采用 CD3、CD19、F4/80 特异性一抗孵育，搭配二抗，分别结合 BF™ 520 Tyramide、BF™ 570 Tyramide、BF™ 660 Tyramide 酪酰胺底物实现多靶标荧光显色，最后使用 DAPI 完成细胞核复染，实现四通道同步成像。

注：实际检测结果可能因检测仪器、操作条件、样本类型等差异产生不同，本示例仅供参考。

常见疑问与解答：

● 问：多种一抗能否共孵育搭配酪胺放大染色？

答：试剂盒适配多色荧光成像，可联用荧光标记抗体；多酪酰胺同片染色需序贯染色，每轮染色完成后洗脱抗体，避免信号交叉干扰。

● 问：不同品牌酪胺底物命名规则有区别吗？通道该怎么选？

答：本产品酪胺底物按发射波长命名，请根据成像设备荧光通道参数匹配对应底物，光谱参数详见产品参数。

● 问：多轮多重染色时，抗体洗脱效果差怎么办？

答：可重复抗体洗脱步骤提升剥离效果；配套增强型免疫染色抗体洗脱液可向我司单独订购。

● 问：对于组织面积偏大时试剂用量怎么控制？

答：组织面积较大时，可适当增加二抗、酪酰胺底物等滴加量，保证样本组织完全被覆盖。

● 问：成像出现荧光通道串色，是什么原因？如何解决？

答：串色由多重因素引发，对应优化方案如下：

a. 成像硬件因素：设备滤光片波长带宽过宽；建议更换窄带宽专用滤光片，减少通道光谱重叠；

b. 抗体洗脱不彻底：上一轮一抗、二抗未完全剥离，高亲和力靶标（如 CK 系列蛋白）更易残留；可延长抗体洗脱时长、适当提升洗脱温度，强化剥离效果；

c. 信号强度失衡：相邻荧光通道信号亮度差距过大，强信号发生光谱外溢；调整酪胺孵育时间或一抗稀释比例，平衡各通道荧光强度；

d. 人为操作失误：抗体混用、多轮染色后遗漏抗体洗脱/抗原修复步骤，严格规范每轮染色操作流程即可规避。

● 问：BF™ 荧光酪胺底物与 TSA 扩增缓冲液稀释比例该如何优化？

答：本试剂盒 TSA 信号放大灵敏度显著高于常规 TSA 体系，信号易过度饱和，需按需调整：

a. 荧光信号过强、背景偏高：降低酪胺染料稀释浓度、缩短 TSA 孵育时间、适度提高一抗稀释倍数；

b. 荧光信号微弱、特异性显色浅：提升酪胺染料浓度、延长孵育时长、降低一抗稀释比例；

本底物信号随浓度呈指数级放大，1：50 稀释可获得极强荧光信号，1：500 稀释亮度等同于普通 TSA 试剂盒显色水平，推荐常规实验 1：200 稀释使用。

● 问：BF™ 荧光酪胺染料操作全程是否需要避光？

答：本系列荧光底物抗光淬灭性能优异，常规室内白光操作无需避光，无需全程暗室处理；仅需避免样品、染料长时间直接暴露于强光或太阳光下。

● 问：多重靶标染色时，抗原指标、一抗孵育顺序如何规划？

答：

a. 难洗脱、易残留的对应一抗放在最后一轮染色，避免前序残留造成通道串色；

b. 染色难度高、表达量极低的靶标优先在前几轮完成染色（如 Foxp3 核转录因子）；

c. 修复方案参考：可选择首轮优先采用 pH 9.0 EDTA 水浴修复；第二轮及后续循环统一使用 pH 6.0 柠檬酸钠高温修复。



● 问：切片出现非特异性荧光背景，产生原因与优化方案？

答：非特异背景主要来源及对应解决办法：

- a. 一抗为多克隆抗体，天然存在非特异结合；可更换单克隆一抗，或提高一抗稀释比例、降低抗原修复强度；
- b. TSA 信号放大过度；缩短酪胺底物孵育时间、降低荧光酪胺工作液浓度；
- c. 内源过氧化物酶封闭不完全；延长 3% H₂O₂ 避光封闭孵育时间；
- d. 封闭不充分；延长封闭液孵育时长，更换含血清/BSA 的高效封闭液。

