

AlphaTSA[®] Multiplex IHC Kit
AlphaTSA[®] 多靶点免疫组化染色试剂盒
说明书

【产品名称】

AlphaTSA[®]多靶点免疫组化染色试剂盒

【产品货号】

见外包装

【产品规格】

见外包装

【储存条件】

长期-20℃储存，开封后 2-8℃储存，密封避光

【生产日期】

见外包装

【有效期】

有效期 12 个月

【用途】

用于石蜡组织切片的多靶点免疫组化染色

【染色原理】

AlphaTSA[®]多靶点免疫组化染色试剂盒采用酪胺信号放大技术（TSA, Tyramide Signal Amplification），利用辣根过氧化物酶（HRP）介导的酶促反应对靶蛋白进行高密度原位标记，大幅提高检测的灵敏度和信噪比。TSA 标记是共价键结合，非常稳定，在微波修复时抗体复合物被去除而 TSA 染料结合不受影响，从而解除了抗体种属对染色的限制。因此可以使用同一种属来源的一抗进行多靶点标记。通过采用不同荧光标记的 TSA 染料实现对组织样本的多靶点染色。

【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 8-48 h 最佳；

3. 建议组织切片厚度 3-4 μm , 使用防脱载玻片。

【操作模式】

手动或全自动染色机操作

【所需实验设备及耗材】

实验设备:

恒温箱、微波炉、离心机、漩涡混匀器

实验耗材:

染色缸、孵育湿盒、晾片板、防脱载玻片、盖玻片、洗瓶、量筒、移液器、免疫组化疏水笔、计时器、EP 管、移液器吸头、蓝盖瓶

【其它实验试剂】

灭菌去离子水、二甲苯、乙醇 (100%、95%、75%)、10%中性福尔马林、荧光淬灭封片剂、吐温-20, Triton

【荧光染料光谱及包装信息】

荧光染料	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)	储存状态	瓶盖颜色
DAPI	358	461	溶液	蓝
XTSA 480	426	485	溶液	紫
XTSA 520	494	525	溶液	绿
XTSA 540	523	536	溶液	黄
XTSA 570	550	570	溶液	红
XTSA 620	588	616	溶液	棕
XTSA 650	627	650	溶液	橙
XTSA 690	676	694	溶液	白
XTSA 780	750	773	溶液	粉

【工作液配制】

荧光染料工作液

试剂盒中染料为 100X 母液, 使用前室温放置 10min, 再用 XTSA 信号放大液

按照 1:100 稀释使用（使用前半小时内配置，请勿提前配置）

XTSA-BIOTIN 工作液

使用前将 XTSA-BIOTIN 浓缩液室温放置 10min，再用 XTSA 信号放大液按照 1:200 稀释使用（使用前半小时内配置，请勿提前配置）

XTSA 780 染料工作液

用缓冲液（TBS、PBS、TBST、PBST 均可）将 XTSA 780 染料浓缩液按照 1:100 稀释配置为 XTSA 780 染料工作液（使用前半小时内配置，请勿提前配置）

HRP 酶标抗兔 IgG 聚合物二抗工作液

用缓冲液（TBS、PBS、TBST、PBST 均可）将酶标抗兔 IgG 聚合物二抗浓缩液按照 1:10 稀释配置为二抗工作液（使用前半小时内配置，请勿提前配置）

DAPI 工作液

取 500 μ l TBS，滴加一滴 DAPI 浓缩液，混匀后即为 DAPI 工作液

抗原修复液工作液

用去离子水将 50X 浓缩液按照 1:50 稀释配置为抗原修复工作液

TBST

在 TBS 中加入 0.1%的吐温-20 和 0.03%的 Triton 配置为工作液

【实验操作】

注意：开始实验前请确认实验所需其它设备、耗材、试剂等均已准备完毕，仔细阅读【工作液配制】部分并按照要求配制工作液。

1. 石蜡切片放置在 60 $^{\circ}$ C 恒温箱中烘烤 60 min；
2. 脱蜡和水化：二甲苯(10 min)→二甲苯(10 min) → 二甲苯(10 min)→无水乙醇(5 min×2 次)→95%乙醇(5 min×1)→75%乙醇(5 min)（也可选择环保型组织透明液，具体操作参考其说明书）；
3. 蒸馏水冲洗 5 min×2 次；
4. 抗原修复：将切片浸入抗原修复液工作液中微波修复，预热 5 min，高火 2 min，低火 15 min；
5. 室温自然冷却；
6. 洗涤：使用 TBST 洗 3 次, 5 min/次；
7. 封闭：封闭液室温封闭 15 min；
8. 一抗孵育：滴加一抗工作液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h（或者 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育）；
9. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；
10. 二抗孵育：滴加二抗 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min；
11. 洗涤：TBST 洗 3 次, 5 min/次；
12. 荧光显色：滴加荧光染料工作液 100 μ l，室温 5 min；

13. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；
14. 微波处理：重复步骤 4-6；
15. 抗体依次染色：第一个抗体染色结束，后续每个抗体均需重复步骤 7-14，依次完成所有抗体染色；

***若无需 XTSA 780 染色，直接进行步骤 25；**

16. 一抗孵育：滴加一抗工作液 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h（或者 4 $^{\circ}$ C 过夜孵育）；
17. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；
18. 二抗孵育：滴加二抗 100 μ l，37 $^{\circ}$ C 孵育 10 min；
19. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；
20. 滴加 XTSA-BIOTIN 工作液 100 μ l，室温孵育 10 min；
21. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；
22. 微波处理：重复步骤 4-6；
23. 滴加 XTSA 780 工作液 100 μ l，室温孵育 1 h；
24. 洗涤：TBST 洗 3 次，5 min/次；

25. 滴加 DAPI 工作液 100 μ l 染色，室温 5 min；
26. 洗涤：蒸馏水洗 3 次，5 min/次；
27. 滴加抗荧光淬灭封片剂 100 μ l，盖玻片封片。

***实验步骤中所有条件均为建议条件，具体实验条件根据实际情况进行调整。**

【注意事项】

1. PH 值对染色有影响，载玻片应清洁、无酸碱污染，否则影响染色效果；
2. 组织染色后及时成像，如需储存请避光。

