

## AlphaTSA<sup>®</sup> Multiplex IHC Kit

# AlphaTSA<sup>®</sup>多靶点免疫组化染色试剂盒

## 说明书

### 【产品名称】

AlphaTSA<sup>®</sup>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<sup>®</sup>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  $\mu\text{m}$ , 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<br>(nm) | 发射波长<br>(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 酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物二抗工作液

用缓冲液（TBS、PBS、TBST、PBST 均可）将酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物二抗浓缩液按照 1:3 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  $\mu$ 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°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  $\mu$ l，37°C 孵育 1 h（或者 4°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  $\mu$ l, 37°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  $\mu$ 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  $\mu$ l, 37°C孵育 1 h (或者 4°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  $\mu$ l, 37°C孵育 10 min;
19. 洗涤：TBST 洗 3 次, 5 min/次;
20. 滴加 XTSA-BIOTIN 工作液 100 $\mu$ 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 $\mu$ 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  $\mu$ 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  $\mu$ 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。

