

AlphaTSA[®] Automation Multiplex IHC Kit

AlphaTSA[®]全自动多靶点免疫组化染色试剂盒

说明书

【产品名称】

AlphaTSA[®]全自动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，在抗体洗脱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】

全自动染色机操作

【所需实验设备及耗材】

实验设备：

离心机、漩涡混匀器，全自动染色机

实验耗材：

晾片板、防脱载玻片、盖玻片、量筒、移液器、EP 管、移液器吸头、蓝盖瓶

【其它实验试剂】

灭菌去离子水、防荧光淬灭封片剂、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 570	550	570	溶液	红
XTSA 620	588	616	溶液	棕
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 (XTSA 780 除外)

试剂盒中染料为溶液，使用前室温放置 10min，再用 XTSA 信号放大液按照 1:150 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 TBST 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

滴加一滴 DAPI 浓缩液，用 500 μ l TBST 混匀后即为 DAPI 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（如需要）

***建议每张切片单次加液为工作液 150 μ l**

【实验操作】

注意：开始实验前请确认实验所需设备、耗材、其它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。不同染色机设置不同，下面设置以 Leica BOND RX 为例说明。

1. 样本预处理

可选择手动烤片和脱蜡水化流程或在设置 Study protocol 时选择“Bake and Dewax”进行自动预处理

2. 抗原修复

2.1 Bond ER Solution 150 μ l，20 分钟，98 $^{\circ}$ C

2.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3

3. 封闭

3.1 XTSA 一抗稀释液/封闭液 150 μ l，15 分钟，室温

3.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3

4. 一抗孵育

4.1 一抗工作液 150 μ l，30 分钟，37 $^{\circ}$ C

4.2 Bond Wash Solution * 3

5. 二抗孵育

5.1 兔二抗工作液 150 μ l，10 分钟，37 $^{\circ}$ C

5.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3

6. XTSA 显色

6.1 XTSA 染料工作液 150 μ l，5 分钟，室温

6.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3

7. 抗体洗脱

7.1 Bond ER Solution 150 μ l，20 分钟，98 $^{\circ}$ C

7.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3

*** 重复步骤 3-7，直至完成最后一轮染色，若无需 XTSA 780 染色，直接进行步骤 13**

8. 一抗孵育
 - 8.1 一抗工作液 150 μ l, 30 分钟, 37°C
 - 8.2 Bond Wash Solution * 3
 9. 二抗孵育
 - 9.1 兔二抗工作液 150 μ l, 10 分钟, 37°C
 - 9.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3
 10. XTSA BIOTIN 标记
 - 10.1 XTSA BIOTIN 工作液 150 μ l, 10 分钟, 室温
 - 10.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3
 11. XTSA BIOTIN 洗脱
 - 11.1 Bond ER Solution 150 μ l, 20 分钟, 98°C
 - 11.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3
 12. XTSA 780 显色
 - 12.1 XTSA780 染料工作液 150 μ l, 60 分钟, 室温
 - 12.2 Bond Wash Solution 150 μ l * 3
 13. DAPI 染细胞核
 - 13.1 去离子水 150 μ l*3
 - 13.2 DAPI 工作液 150 μ l, 5 分钟, 室温
 - 13.3 Bond Wash Solution 150 μ l * 3
 14. 将玻片取出, 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。

