

Immunohistochemistry (IHC) Detection Kit

{免疫组化检测试剂盒, 兔鼠二抗, 通用型}

货号: RK05872

规格: 50 T

◆ 产品简介

免疫组织化学, 是应用免疫学中抗原与抗体特异性结合的原理, 通过化学反应使标记抗体的显色剂 (荧光素、酶、金属离子、同位素) 显色来确定组织细胞内抗原 (多肽和蛋白质), 对其进行定位、定性及相对定量的研究, 称为免疫组织化学技术 (immunohistochemistry, IHC)。本试剂盒适用于免疫组织化学方法的石蜡切片、冰冻切片样本。

◆ 产品组成

产品编号	名称	规格
RK05872-1	缓冲液 PBS (粉剂)	1L/袋*2
RK05872-2	封闭液	5 ml
RK05872-3	抗体稀释液	5 ml
RK05872-4	酶标羊抗鼠/兔聚合物二抗工作液	5 ml
RK05872-5	DAB 显色液 B 液	5 ml
RK05872-6	DAB 显色液 C 液	250 μ l
RK05872-7	复染试剂 (苏木素)	5 ml
RK05872-8	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	1 g
RK05872-9	$NaC_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	6 g

◆ 保存条件

冰袋运输, 2~8°C保存, 有效期 10 个月

◆ 操作说明

1. 实验仪器及试剂

(1) 实验器材

微波炉、4°C冰箱、恒温恒湿箱、烘箱、光学显微镜、移液器、孵育湿盒、抗原修复盒

(2) 实验试剂

a. 缓冲液: 0.01M PBS, pH 7.2 $\pm$ 0.2: 取 1L 1 $\times$ PBS 缓冲液粉剂, 倒入洁净的烧杯中, 加入超纯水约 700mL 溶解。用 HCl 调节 pH 至 7.4, 在量筒中用去离子水定容到 1L。混匀后即可使用, 配置完成的 PBS 缓冲液可放 4°C存放。

b. 缓冲液: 0.01M, pH 7.2 PBST

1 $\times$ PBST/L 配制见下表

试剂名称	剂量
1×PBS 溶液	1 L
Tween-20 溶液	0.001 L
用稀 HCl 溶液和 2 M 的 NaOH 溶液调 pH 值至 7.2	

c. 修复液:

pH 6.0, 0.01 M 的柠檬酸修复液 (1 L) 的配制: 准确称取 $C_6H_8O_7 \cdot H_2O$, 0.4 g; $NaC_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$, 3 g 倒入洁净的烧杯中, 加入超纯水定容至 1 L, 调节溶液 pH 至 6.0。

d. 3%过氧化氢 (需新鲜配制): 30%的 H_2O_2 与 dH_2O 体积比 1:9, 混合均匀。

e. 脱蜡液、无水乙醇 (分析纯)、去离子水 (dH_2O)、中性树胶封片剂。

2. 实验步骤

(1) 样本的准备:

a. 石蜡切片: 依次将切片放入二甲苯 I 15 min、二甲苯 II 15 min、无水乙醇 I 5 min、无水乙醇 II 5 min、95%乙醇 5 min、85%乙醇 5 min、75%乙醇 5 min, 超纯水 5 min。

b. 冰冻切片: 4%多聚甲醛溶液固定 10-30 min, TBST 洗 5 min 重复 3 次, 滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 20 min, TBST 洗 5 min, 重复 3 次。

(2) 抗原修复

石蜡组织切片置于盛满 pH 6.0 柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内中火 8 min, 停火 8 min, 转中低火 7 min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片 (也可以用高温高压蒸汽 1-2 min 或者 100℃水浴 20 min 等其他热修复方法)。自然冷却后将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

注: 冰冻组织切片为避免脱片, 一般情况下不进行抗原修复步骤。

(3) 阻断内源性过氧化物酶

切片稍甩干后用免疫组化笔在组织周围画圈, 在圈内滴加 3%过氧化氢, 室温避光孵育 15 min, 将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

(4) 染色

a. 非特异性靶点封闭: 滴加适量的封闭液, 以均匀覆盖组织为宜, 室温封闭 30 min。

b. 孵育一抗: 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗, 切片平放于避光湿盒内 4℃孵育过夜或者 37℃孵育 1-2 h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。

c. 孵育二抗: 玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加适量的二抗工作液, 以均匀覆盖组织为宜, 避光室温孵育 60 min, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。

d. 显色: 显色前 5 min, 配置 DAB 显色工作液, C 液: B 液体积比为 1:20, 充分混匀; 在组织切片上滴加显色工作液, 显微镜下密切观察颜色变化情况, 通常 10-60 秒即可得到合适的染色强度; 显色完成后, 将切片浸入大量 dH_2O 中即可终止显色。

e. 复染、返蓝: 将稍沥干的切片浸入复染试剂 (苏木素) 中复染切片 3-5 min 后, 用流水清洗 10 min。注意: 染色过程中需一直保持切片处于湿润状态; 染色过程中所有试剂使用过程中均需保证完全覆盖切片上组织; 流水清洗时需避免流水直接对着组织, 或水流过大, 会造成切片掉片。

(5) 脱水、封片

- a. 脱水：将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡 1 次，10 秒；高温（55℃-60℃）下完全干燥。
- b. 封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片，避免产生气泡。

◆ 注意事项

1. 为了您的健康和安全，操作时请穿实验服并佩戴一次性手套。
2. 本品为酶标羊抗鼠/兔聚合物二抗工作液，对于种属来源为鼠的切片样本，可能会存在一定的种属交叉反应带来的局部非特异性染色。