

M5 超敏免疫组化试剂盒使用说明书

产品名称	单位	货号
M5 超敏免疫组化试剂盒	3ml	MF501-01

【储存条件】

如果长时间不使用, 请将所有试剂存放于 -20°C , 如经常使用, 可将封闭液, 3% H_2O_2 和 $20\times$ DAB 显色液 B 存放于 $2-8^{\circ}\text{C}$ 以方便使用。

【产品简介】

本试剂盒适合于一抗为小鼠/兔 IgG 的免疫组化实验 DAB 显色。本试剂盒是专为免疫组化和其他免疫检测而设计的, 用以显示组织和细胞中抗原分布。链霉亲和素(StreptAvidin)是一种从链霉菌中提取的蛋白质, 同亲和素一样, 对生物素有极高的亲和力, 亲和素是一个碱性蛋白质 ($\text{PI}=10$), 经改造后可以转变成中性蛋白质。链霉亲和素等电点接近中性, 对组织和细胞的非特异吸附很低, 因此基于链霉亲和素的免疫组化方法背景很低。

【产品组份】

封闭液 (正常山羊血清)	3ml
3% H_2O_2	3ml
Bio-羊抗小鼠/兔 IgG 浓缩液	60 μl
链霉亲和素-POD 浓缩液	30 μl
稀释液	10ml
$20\times$ DAB 显色液 A	0.3ml
$20\times$ DAB 显色液 B	0.3ml

【注意事项】

如果染色背景过高, 在 SP 反应之后, DAB 显色之前, 用加有 0.01-0.02% TWEEN-20 的 PBST ($\text{pH}7.2-7.4$) 洗涤切片 4 次, PBS 洗 2 次, 然后 DAB 显色。

【操作步骤】

- 切片常规脱蜡至水(三次二甲苯, 三次乙醇)。
- 3% H_2O_2 室温处理 5-10 分钟以灭活内源性酶。蒸馏水洗 3 次。
- 可选步骤: a、热修复抗原, 将切片浸入 0.01M 柠檬酸钠缓冲液 ($\text{pH}6.0$), 电炉或微波炉加热至沸腾后断电, 间隔 5-10 分钟后, 反复 1-2 次。冷却后 PBS ($\text{pH}7.2-7.6$) 洗涤 1-2 次。
b、酶消化, 滴加消化液, 37°C 10 分钟, PBS ($\text{pH}7.2-7.4$) 洗涤 2-3 次。
c、跳过此步, 直接进入下一步。
- 滴加封闭液, 室温 20 分钟。甩去多余液体, 免洗。
- 用稀释液将一抗按一定比例稀释 (稀释后的一抗 4°C 可保存一周), 也可另行购买抗体稀释液。滴加稀释的一抗 37°C 孵育 1 小时左右或 20°C 2 小时左右, 也可 4°C 过夜。PBS ($\text{pH}7.2-7.4$) 洗涤 3 次, 每次 2 分钟。(一抗的稀释度、孵育时间和温度与染色强度、背景有直接关系。一般来说, 阳性染色强度不够时, 可提高一抗浓度和延长孵育时间; 背景过高时, 可降低一抗浓度和缩短孵育时间。)
- 根据用量, 用稀释液将 Bio-羊抗小鼠/兔 IgG 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10 μl Bio-羊抗小鼠/兔 IgG 浓缩液混匀, 此工作液 4°C 可保存一周)。滴加 Bio-羊抗小鼠/兔 IgG 工作液, $20-37^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分钟。PBS ($\text{pH}7.2-7.4$) 洗涤 3 次, 每次 2 分钟。

7. 根据使用量，用稀释液将链酶亲和素-POD 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10 μ l 链酶亲和素-POD 浓缩液混匀，此工作液 4 $^{\circ}$ C 可保存一周)。滴加链酶亲和素-POD 工作液，20-37 $^{\circ}$ C，30 分钟。PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 4 次，每次 5 分钟。
8. DAB 显色：根据用量，用 PBS (pH7.2-7.4) 配制，按 1ml PBS 加入 50 μ l 20 \times DAB 显色液 A，加入 50 μ l 20 \times DAB 显色液 B。充分混匀后滴加到切片上。室温显色，镜下控制反应时间，一般在 5-30 分钟之间。蒸馏水洗涤终止反应。
9. 苏木素轻度复染。脱水，透明，封片。显微镜观察。对于细胞爬片，固定后，PBS 漂洗两次，再用 0.5% Triton X-100 室温孵育 20 分钟，PBS 漂洗两次，3% H₂O₂ 处理 15 分钟；PBS 漂洗两次，接上述第 4 步。对于冰冻切片，固定后，PBS 漂洗两次，接上述第二步。

**【备注】**

本产品仅供科研使用。在确认产品质量出现问题时，本公司承诺为客户免费更换等量的质量合格产品。