

产品简介

该免疫组化试剂盒适用范围为石蜡包埋组织切片，也可适用于冰冻切片。

产品特点

- 1.操作简便：无需太多准备，拿到试剂盒既能开展试验。
- 2.重现性好：实验结果重复性高。

| 成份 | 20 片 | 50 片 |
|------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 复性剂（溶解前请混匀） | 6 g （溶于 2 L ddH ₂ O） | 15 g （溶于 5 L ddH ₂ O） |
| HRP 标记的二抗（抗兔/小鼠） | 500 μl | 1.25 ml |
| DAB 缓冲液（20X） | 50 μl | 125 μl |
| DAB 底物（20X） | 50 μl | 125 μl |
| DAB 色原（20X） | 50 μl | 125 μl |
| 苏木素体细胞快速染色液 | 1 ml | 2.5 ml |

1.二甲苯（2~3 个月更换）

2.100%乙醇，95%乙醇，85%乙醇，75%乙醇

3.灭活酶试剂：3% H₂O₂~甲醇 1 ml 30% H₂O₂ 加入到 9 ml 甲醇中

4.PBST 洗涤液：500 ml 10X PBS+4500 ml ddH₂O+5 ml Tween~20，混匀，PH 7.2~7.4

5.一抗：根据所购买一抗说明书稀释

6.一抗稀释液（封闭液）：3% BSA ~PBST 溶液 0.03 g BSA 溶于 1 ml PBST

7.1%盐酸~乙醇：1 ml 盐酸溶于 99 ml 乙醇中

运输和保存条件

本试剂盒 4°C 运输，复性剂和苏木素体细胞快速染色液可常温保存，其他试剂 4°C 保存。

操作步骤

1、组织固定：在脱蜡之前，将切片 60°C 恒温箱中烘烤 60 分钟。

2、脱蜡：将切片用二甲苯浸泡 10 分钟，更换二甲苯后再浸泡 10 分钟。

3、水化：分别用无水乙醇浸泡 5 分钟；95%乙醇中浸泡 5 分钟；85%乙醇中浸泡 5 分钟；75%乙醇中浸泡 5 分钟。

4、洗涤：ddH₂O 浸泡 5 分钟，清洗 3 次。

5、抗原修复（煮沸法）：压力锅中加入足以淹没切片的 10 mmol/L 的枸橼酸盐缓冲液（pH 6.0）（配制：将复性剂溶于相应体积 ddH₂O 中，混匀），加热至沸腾，切片置耐热塑料切片架上，放入锅中，盖好锅盖，扣上压力阀，继续加热，设置保压 3 分钟，时间到后打开放气阀放气，压力归零后开锅盖将内锅取出放置室温冷却，待溶液冷却至室温后取出切片（约 30 分钟）。

6、洗涤：ddH₂O 浸泡 5 分钟，清洗 2 次，PBST 浸泡 5 分钟，清洗 2 次。

- 7、灭活酶：每张切片滴加 50 μ l 灭活酶试剂，室温避光处理 15 分钟。
- 8、洗涤：PBST 浸泡 5 分钟，清洗 3 次。（第一次迅速倒掉）
- 9、封闭：每张切片滴加 3% BSA-PBST 50 μ l，湿盒中室温封闭 30 分钟。
- 10、加一抗：弃去封闭液，每张切片滴加 50 μ l 一抗，4 $^{\circ}$ C 湿盒中孵育过夜或 37 $^{\circ}$ C 1 小时。
- 11、复温：次日取出切片，室温复温 40 分钟。（复温仅针对一抗 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜，37 $^{\circ}$ C 孵育直接进行下一步）
- 12、洗涤：PBST 浸泡 5 分钟，清洗 3 次。（第一次迅速倒掉）
- 13、加酶标二抗：每张切片滴加 HRP 标记的二抗（抗兔/小鼠）25 μ l，室温或 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。
- 14、洗涤：PBST 浸泡 5 分钟，清洗 3 次。（第一次迅速倒掉）
- 15、显色（DAB 法）：每张切片滴加 50 μ l 显色液（显色液配制：85% ddH₂O+ 5% DAB 缓冲液+5% DAB 底物+5% DAB 色原，避光现配现用，按需要量配制），湿盒中显色 5 分钟。
- 16、终止显色：用蒸馏水终止显色反应。
- 17、复染：每张切片滴加 50 μ l 苏木素体细胞快速染色液，染色 5 分钟，用蒸馏水冲洗干净。
- 18、脱色反蓝：将切片放入 1%盐酸~乙醇中脱色 3~5 秒后迅速取出放入蒸馏水中终止，再放入 PBST 中反蓝 5 分钟。
- 19、封片：分别在 75%乙醇中浸泡 5 分钟；85%乙醇中浸泡 5 分钟；95%乙醇中浸泡 5 分钟；无水乙醇中浸泡 5 分钟。用二甲苯浸泡 10 分钟，更换二甲苯后再浸泡 10 分钟。之后在切片上加中性树胶，加盖玻片。
- 20、观察：显微镜。

注意事项

- 抗原修复后需冷却，避免洗涤时脱片。
- 加抗体时避免交叉污染，导致假阳性。
- 显色时间可根据实际染色效果来确定，不一定遵循规定的时间。
- 封片时不要产生气泡，以免影响观察。
- 显微镜观察时可在低倍镜下先找好视野，再换高倍镜拍照。
- 如应用于冰冻切片，请用 4 $^{\circ}$ C 丙酮固定 10 分钟，然后从第 6 步开始操作。