

SABC(小鼠 IgG)- FITC (POD) 双标试剂盒说明书

货号：AC15835

产品内容：

封闭液 (5% BSA)	10ml
Bio-羊抗小鼠 IgG 浓缩液	100ul
SABC-FITC 浓缩液	100ul
SABC-POD 浓缩液	100ul
稀释液	30ml
20×DAB 显色液 A	1ml
20×DAB 显色液 B	1ml
抗荧光衰减封片剂	10ml

保存：

如果长时间不使用，请将所有试剂存放于-20℃，如经常使用，可将封闭液，稀释液，20×DAB 显色液 B 和抗荧光衰减封片剂存放于 2-8℃ 以方便使用。

产品简介：

本试剂盒适合于一抗为小鼠 IgG 来源的免疫组化实验. DAB 及 FITC 显色。

SABC 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 (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，基于链霉亲和素的免疫组化方法背景很低。SABC 即 StreptAvidin—Biotin Complex，SABC 大约可形成一百个左右的过氧化物酶或者 FITC 和五十个左右的链霉亲和素所构成的复合物。大量的酶与 FITC 将保证 SABC 具有很高的敏感性。

操作步骤：(以石蜡切片热修复为例)

1. 切片常规脱蜡至水。3% H_2O_2 室温 5-10 分钟以灭活内源性酶(如果 FITC，可省掉此步)。蒸馏水洗 3 次。
2. 热修复抗原：将切片浸入 0.01M 枸橼酸盐缓冲液 (PH6.0)，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 (pH7.2-7.6) 洗涤 1-2 次。
3. 滴加 5%BSA 封闭液，室温 20 分钟。甩去多余液体，免洗。
4. 用稀释液将一抗按一定比例稀释(稀释后的一抗 4℃ 可保存一周)，也可另行购买抗体稀释液。滴加稀释的一抗，37℃ 1 小时孵育左右或 20℃ 2 小时左右，也可 4℃ 过夜。PBS (pH7.2-7.4) 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)。
5. 根据使用量，用稀释液将 bio-羊抗小鼠 IgG 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10ul bio-羊抗小鼠 IgG 浓缩液，混匀即成工作液，此工作液 4℃ 可保存一周)。滴加生物素化羊抗小鼠 IgG 工作液，20-37℃ 处理 30 分钟。PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 3 次，每次 2 分钟。

如果用荧光观察，请接步骤 6、7，如果用 DAB 显色，请直接转至步骤 8。

6. 根据使用量，用稀释液将 SABC-FITC 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10ul SABC-FITC 浓缩液，

混匀即成 SABC-FITC 工作液。此工作液 4℃可保存一周).滴加 SABC-FITC 工作液, 20-37℃, 30 分钟(避光)。PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 4 次, 每次 5 分钟。

7. 滴加抗荧光衰减封片剂封片。荧光显微镜观察。

8. 根据使用量, 用稀释液将 SABC-POD 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10ul SABC-POD 浓缩液, 混匀即成 SABC-POD 工作液。此工作液 4℃可保存一周)。滴加 SABC-POD 工作液, 20-37℃, 30 分钟。PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 4 次, 每次 5 分钟。

9. DAB 显色: 根据用量, 用 PBS (pH7.2-7.4) 配制, 按 1ml PBS 加入 50ul 20×DAB 显色液 A, 加入 50ul 20×DAB 显色液 B, 混匀后加至切片。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。

10. 苏木素轻度复染。脱水, 透明, 封片。显微镜观察。

对于细胞爬片:

常规固定后, PBS 漂洗两次, 再用 0.5%Txiton X-100 室温 20 分钟, PBS 漂洗两次, 3%H₂O₂ (如果用 FITC, 刚可省掉此步) 处理 15 分钟; PBS 漂洗两次, 下接上面第 4 步。

对于冰冻切片:

固定后, 可用 PBS 漂洗两次, 再接上面第二步。

注意事项:

如果用 DAB 染色背景过高, 在 SABC 反应之后, DAB 显色之前, 用加有 0.01-0.02% TWEEN-20 的 PBST (pH7.2-7.4) 洗涤切片 4 次, PBS 洗 2 次, 然后 DAB 显色。

如果用 FITC 观察背景过高, 在 SABC 反应之后, 用加有 0.01—0.02% TWEEN-20 的 PBST (pH7.2-7.4) 洗涤切片 4 次, PBS 洗涤 2 次, 然后封片观察。

因为免疫组化指标众多, 标本不一, 此步骤仅作参考。