

## SABC(兔 IgG)-POD Kit 说明书

货号：AC15836

产品内容：

封闭液（5% BSA）	10mL
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10mL
Bio-羊抗兔 IgG 浓缩液	100μL
SABC-POD 浓缩液	100μL
稀释液	30mL
20×DAB 显色液 A	1mL
20×DAB 显色液 B	1mL

**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、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 20×DAB 显色液 B 存放于 2-8℃ 以方便使用。

**产品说明：**

本试剂盒适合于一抗为兔 IgG 的免疫组化实验，DAB 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和五十个左右的链霉亲和素所构成的复合物，大量的酶将保证 SABC 具有很高的敏感性。

**操作步骤: (以石蜡切片为例)**

- 1、切片常规脱蜡至水(三次二甲苯，三次乙醇)。
- 2、3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 室温处理 5-10 分钟以灭活内源性过氧化物酶，蒸馏水洗 3 次。
- 3、可选步骤：
  - a、热修复抗原，将切片浸入 0.01M 柠檬酸钠缓冲液 (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 (pH 7.2-7.6) 洗涤 1-2 次。
  - b、酶消化，滴加消化液，37℃ 放置 10 分钟，PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 2-3 次。
  - c、跳过此步，直接进入下一步。
- 4、滴加 5% BSA 封闭液，室温 20 分钟，甩去多余液体，免洗。
- 5、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℃ 孵育 1 小时左右或 20℃ 孵育 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）。

6、根据用量，用稀释液将 Bio-羊抗兔 IgG 浓缩液按 1:50-100 稀释成工作液(1mL 稀释液加入 10-20 $\mu$ L Bio-羊抗兔 IgG 浓缩液混匀，此工作液 4 $^{\circ}$ C 可保存一周)。滴加 Bio-羊抗兔 IgG 工作液，20-37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟。PBS (pH7.2-7.4) 洗涤 3 次，每次 2 分钟。

7、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 10 $\mu$ L SABC-POD 浓缩液混匀，此工作液 4 $^{\circ}$ C 可保存一周)。滴加 SABC-POD 工作液，20-37 $^{\circ}$ C 孵育 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 $\mu$ L 20 $\times$ DAB 显色液 A，加入 50 $\mu$ 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% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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。

#### **注意事项：**

如果染色背景过高，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。