

## SP(兔 IgG)-POD Kit 说明书

货号：AC17075

### 产品内容：

封闭液（正常山羊血清）	3ml	6ml	18ml
3% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	3ml	6ml	18ml
Bio-羊抗兔 IgG 浓缩液	30ul	60ul	180 ul
链霉亲和素-POD 浓缩液	30ul	60ul	180 ul
稀释液	10ml	20ml	60ml
20×DAB 显色液 A	0.3ml	0.6ml	1.8ml
20×DAB 显色液 B	0.3ml	0.6ml	1.8ml

### 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。

SP 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 (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。

### 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 (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。
  - b、酶消化，滴加消化液，37℃ 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℃ 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 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10ul Bio-

羊抗兔 IgG 浓缩液混匀，此工作液 4℃可保存一周)。滴加 Bio-羊抗兔 IgG 工作液，20-37℃ 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，用稀释液将链酶亲和素-POD 浓缩液按 1:100 稀释成工作液(1ml 稀释液加入 10ul 链酶亲和素-POD 浓缩液混匀，此工作液 4℃可保存一周)。滴加链酶亲和素-POD 工作液，20-37℃，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 50ul 20×DAB 显色液 A，加入 50ul 20×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 SP 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。