

免疫组织化学(IHC)检测试剂盒

货号：RK05872

规格：50T

产品介绍

免疫组织化学，是应用免疫学中抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质)，对其进行定位、定性及相对定量的研究，称为免疫组织化学技术(immunohistochemistry,IHC)。本试剂盒适用于免疫组织化学方法的石蜡包埋、冰冻切片、培养细胞涂片及血液标本。

试剂盒包装清单

产品编号	名称	规格
RK05872-1	缓冲液 PBS	1L/袋*2
RK05872-2	封闭液	5mL
RK05872-3	抗体稀释液	5mL
RK05872-4	HRP RABBIT/MOUSE 二抗工作液	5mL
RK05872-5	DAB 显色液 B 液	5mL
RK05872-6	DAB 显色液 C 液	50μL
RK05872-7	复染试剂（苏木素）	5mL

RK05872-8	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	1g
RK05872-9	$NaC_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$	6g
	说明书	1 份

保存条件

2-8℃保存，10 个月有效。

使用方法

一、实验仪器及试剂

1、实验器材

微波炉、4℃冰箱、恒温恒湿箱、烘箱、光学显微镜、移液器、孵育湿盒、抗原修复盒。

2、实验试剂

(1) 缓冲液：0.01M PBS pH7.2±0.2

取 1 L 1×PBS 缓冲液粉剂，倒入到一洁净的烧杯中，加入蒸馏水到约 700mL，溶解。用 HCL 调节 PH 至 7.4,在量筒中用去离子水定容到 1L 。混匀后即可使用,配置完成的 PBS 缓冲液可放 4℃ 存放。

(2) 缓冲液：0.01M pH7.2 PBST

试剂名称	1*PBST/L
1*PBS 溶液	1L
Tween 20 溶液	0.001L
用稀 HCl 溶液和 2M NaOH 溶液调 pH 值	

(3) 修复液：

pH6.0 0.01M 柠檬酸修复液 (1L) :

$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$ 0.4g; $NaC_6H_5O_7 \cdot 2H_2O$ 3g; pH6.0。

(4) 3%过氧化氢 (需新鲜配制, 30% H_2O_2 与 dH_2O 体积比 1:9)。

(5) 脱蜡液、无水乙醇 (分析纯)、去离子水 (dH_2O)、中性树胶封片剂。

二、实验步骤

1. 水化/脱蜡:

(1) 烤片: 将石蜡切片按同一朝向放置在切片架上, 将其放入 55°C 的恒温箱中烤片 30min;

同时将脱蜡液 1 缸一起放入 55°C 的恒温箱中;

(2) 脱蜡至水: 将石蜡切片连同切片架一起放入脱蜡液 1 缸中, 再一起从恒温箱中取出置于常温, 5min 后, 将切片取出浸入到常温脱蜡液 2 缸中, 并按照脱蜡液 2、脱蜡液 3、无水乙醇 1、无水乙醇 2、无水乙醇 3 的顺序依次将石蜡切片放入缸中, 每缸 5min; 用流水清洗切片 5min。

注意: 流水清洗时水流不能直接对着切片; 操作过程中需一直保持切片处于湿润状态。

2. 内源性过氧化物酶灭活:

将切片完全浸入到 3% 双氧水溶液中, 室温, 孵育 10min; 完成后流水清洗 5min。

注意: 内源性酶含量高的组织, 可以延长灭活时间至 15-20min; 双氧水需新鲜配制, 可提前 5-10min 配制 3% 的双氧水。

3. 抗原修复 (可选):

3.1 方法一, 微波热修复: 将切片浸入盛有修复液的修复盒中, 将抗原修复盒盖斜盖在修复盒上; 整体放入微波炉中, 高火加热 3min 后停火, 微波炉内静置 5min; 再高火加热 3min 后停火, 微波炉内静置 5min; 随后中低火加热 1min 后停火, 微波炉内静置 5min, 然后将切片连同抗原修复盒拿出缓慢冷却至室温。待修复液温度降至室温后, 用缓冲液 PBS 洗涤 3 次, 每次 1min。

3.2 方法二，高压热修复：在高压锅中，加入抗原修复液，高火预热；待修复液沸腾后将切片置于其中，并完全浸泡组织，盖好锅盖，扣上压力阀，高火继续加热；待限压阀开始转动喷气后调至中火，同时开始计时 2min；计时结束后离开热源，自然降压后将高压锅移入冷水中缓慢冷却。待修复液温度降至室温后，用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次 1min。

注意：修复液需完全浸没切片上组织；修复过程中严禁打开仪器或中断运行程序；修复完成后避免快速冷却；修复液可根据实验需求自行选用修复液。

4. 染色：

- (1) 封闭：待修复液温度降至室温后，从修复盒中取出切片；用缓冲液 PBS 清洗切片 2 次，每次 3min；去除切片上的缓冲液；在组织切片上滴加封闭液；将切片水平放置在底部呈有水的孵育湿盒中，于 37°C 恒温孵育 30min；
- (2) 一抗孵育：去除封闭液，在组织切片上滴加用抗体稀释液稀释的一抗，水平放置于孵育湿盒中，于 4°C 孵育过夜；
- (3) 复温：将孵育湿盒取出室温复温 15-30min，去除抗体工作液，用缓冲液 PBST 洗涤 1 次，5min；用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次 5min；
- (4) 二抗孵育：在组织切片上滴加二抗工作液后水平放置于孵育湿盒中，于 37°C 恒温孵育 1h；
- (5) 去除切片上的溶液，用缓冲液 PBST 洗涤 1 次，5min；用缓冲液 PBS 洗涤 3 次，每次 5min；
- (6) 显色：显色前 5min，配置 DAB 显色工作液，C 液:B 液体积比 1:100，充分混匀；在组织切片上滴加显色工作液，显微镜下密切观察颜色变化情况，通常 10-60 秒即可得到合适的染色强度；将切片浸入大量 dH₂O 中即可终止显色；
- (7) 复染、返蓝：将稍沥干的切片浸入复染试剂（苏木素）中复染切片，用流水清洗 10min。

注意：染色过程中需一直保持切片处于湿润状态；染色过程中所有试剂使用过程中均需保证完全覆盖切片上组织；流水清洗时需避免流水直接对着组织，或水流过大，会造成切片掉片。

5. 脱水、封片：

- (1) 脱水：将清洗后的切片于无水乙醇中浸泡 1 次，10 秒；高温（55℃-60℃）下完全干燥；
- (2) 封片：在切片中心滴加适量中性树胶，并加盖盖玻片。