

SABC(兔 IgG)- FITC (POD) 双标试剂盒说明书

货号：SA0025

产品内容： 封闭液（5% BSA）	10ml
Bio-羊抗兔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兔 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%H₂O₂ 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，混匀即成工作液，此工作液 4℃可保存一周)。滴加生物素化羊抗兔 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。