

免疫组化试剂盒（抗兔）

IHC kit (for Rabbit Primary Antibody)

产品货号：IHC001

产品规格：60T/100T

产品描述：Bioss 免疫组化（IHC）试剂盒为免疫组化检测提供一站式解决方案，方便快捷。用于检测以兔单克隆或多克隆抗体为一抗的免疫组化实验（一抗是小鼠源的请选择：IHC003）。抗原与一抗形成抗原抗体复合物，生物素化二抗特异性结合上述复合物，经辣根酶标记的链酶卵白素特异性识别生物素，最后经辣根酶底物显色即可检测相应抗原。

保存条件：参考下表。

产品规格及组成成分：

试剂盒成分	60Tests	100 Tests	保存条件
试剂 1：1×PBS 缓冲液（干粉，2L）	2L×1 袋	2L×2 袋	室温
试剂 2：100×柠檬酸钠抗原修复液	16ml	32ml	2-8℃
试剂 3：内源性过氧化物酶阻断剂（即用型）	3ml	5ml	2-8℃
试剂 4：抗体稀释液（即用型）	3ml	5ml	2-8℃
试剂 5：封闭用正常山羊血清工作液（即用型）	3ml	5ml	2-8℃
试剂 6：生物素标记羊抗兔 IgG（即用型）	3ml	5ml	2-8℃
试剂 7：辣根酶标记链酶卵白素工作液（即用型）	3ml	5ml	2-8℃
试剂 8：DAB kit (20×)显色液	0.3ml	0.5ml	-20℃
试剂 9：DAB kit (20×)稀释液	0.3ml	0.5ml	-20℃
试剂 10：苏木素染液（即用型）	4ml	6ml	室温
说明书	1 份	1 份	-

样本要求：新鲜活检样本组织，中性福尔马林或多聚甲醛，固定时间 12-48h，参照病理技术规范要求取材、脱水、石蜡包埋并制成蜡块，蜡块在常温条件下保存有效期有 5 年。组织切片厚度为 3-5 μm 并黏附在防脱玻片上，轻拍切片架并用吸水纸吸干组织切片中的水滴，再放入 56-60℃恒温箱中烘烤 2h 后，从恒温箱中移出玻片放在温室下冷却。如果切片在室温下（15-28℃）保存，为了更好的重现组织中的抗原分布情况，请于切片制作后 7 天内完成检测。

实验操作步骤（以石蜡切片为例）

仪器、设备：

移液枪、免疫组化笔、水浴锅、计时器、孵育湿盒、切片架、盖玻片、光学显微镜、洗瓶等。

操作步骤

1. **脱蜡水化**。将石蜡切片置于新鲜二甲苯脱中浸泡 15 分钟，重复三次。去除多余的液体后，依次置于无水乙醇、95%乙醇、90%乙醇、80%乙醇、70%乙醇，各浸泡 5 分钟，蒸馏水（或自来水）冲洗 5 分钟。用 PBS 缓冲液（试剂 1，将干粉溶解于 2L 去离子水中）冲洗切片 5 分钟，重复三次。

2. **抗原修复**。将脱蜡水化后的组织切片置于烧杯（或修复盒）中的耐高温塑料切片架上，加适量修复液 1×柠檬酸钠抗原修复液（试剂 2，将 100×柠檬酸钠抗原修复液加去离子水稀释成 1×柠檬酸钠抗原修复液），液面要浸过切片组织一定高度，将修复盒置于沸水中煮沸修复 15 分钟后取出玻片，自然凉至室温。用 PBS 缓冲液冲洗切片 5 分钟，重复三次。

注意：抗原修复时，修复液务必保证切片始终浸泡在液体内，一般情况：修复液的量约为 800mL/1 架。

3. **阻断内源性过氧化物酶**。用吸水纸擦干玻片，免疫组化笔在组织周围画圈，滴加 50μL 内源性过氧化物酶阻断剂（试剂 3）到切片组织上以阻断内源性过氧化物酶，室温孵育 30 分钟，用 PBS 缓冲液冲洗切片 5 分钟，重复三次。

4. **血清封闭**。用吸水纸擦干玻片，滴加 50μL 正常山羊血清工作液（试剂 5），37°C 封闭 20 分钟，以减少非特异性染色。

5. **一抗孵育**。用抗体稀释液（试剂 4）将一抗原液稀释成工作液，用吸水纸擦干玻片组织周围的液体，滴加适量抗体工作液，置于湿盒 4°C 孵育过夜或 37°C 孵育 1h-2h。

6. **复温**。4°C 过夜后从冰箱拿出样本，在室温下孵育 15min 复温（抗体孵育为 4°C 过夜选用此步骤，如室温孵育直接进入下一步清洗）。用 PBS 缓冲液冲洗切片 5 分钟，重复三次。

7. **二抗孵育**。吸水纸擦干切片后滴加 50μL 生物素标记的羊抗兔 IgG（试剂 6），37°C 孵育 20 分钟，用 PBS 缓冲液冲洗切片 5 分钟，重复三次。

8. **三抗孵育**。吸水纸擦干切片后滴加 50μL 辣根酶标记的链酶卵白素孵育（试剂 7），37°C 孵育 20 分钟，用 PBS 缓冲液冲洗切片 5 分钟，重复三次。

9. **显色**。甩去 PBS 缓冲液，吸水纸擦干切片；每张切片滴加新鲜配制的 DAB 工作液 50μL（试剂 8：试剂 9：试剂 1=1:1:18 比例配置），孵育 3-5min，光学显微镜下观察染色结果，切勿显色过深；显色后用自来水冲洗切片终止显色。

10. **复染**。滴加适量苏木素染液（试剂 10）复染，孵育 1-5 分钟，自来水冲洗 5 分钟，滴加盐酸酒精分化液分化 30 秒，自来水冲洗。

11. **脱水封片。**将玻片依次置于 70%乙醇、80%乙醇、90%乙醇、95%乙醇、无水乙醇，各浸泡 5 分钟，再将玻片放入二甲苯中浸泡 15 分钟，重复三次。玻片取出来稍晾干，用中性树脂封片。

结果判断

在光学显微镜下对染色的切片观察并判断。苏木素染细胞核为蓝色，DAB 显色的阳性表达为棕黄色。

注意事项

1. 检测样本时需同时做阴性对照和阳性对照，否则结果不可取。
2. 本品中的配套试剂，请不要用其他生产商产品替换使用。
3. DAB 为致癌物质，请采取必要的防范措施，现用现配。
4. 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗。
5. 此试剂是否可用于除中性福尔马林或多聚甲醛之外固定的组织未得到验证。

相关辅助试剂：

编号	中文名称
C0103	1×PBS 缓冲液（干粉，2L）
C01-06001	1%组织细胞固定液
C03-03002	0.3%细胞穿膜剂
C02-04002	DAPI 染色液(即用型)
C02-04003	抗荧光淬灭封片液
C02-04004	苏木素-伊红染色试剂盒
PV-0023	超敏二步法免疫组化检测试剂盒（兔）
PV-0024	超敏二步法免疫组化检测试剂盒（小鼠）