



## 免疫组化通用试剂盒

### (生物素/ (链) 亲合素-ALP 系统)

产品编号: 5022-1 抗兔, 5022-2 抗鼠

生物素/亲合素-ALP 系统提供在冰冻切片、石蜡包埋组织和细胞涂片中细胞表面抗原和胞内抗原快速和精确定位的方法。用正常山羊血清或兔血清封闭, 降低非特异性背景染色, 切片与未标记的一抗孵育后, 洗去未结合的抗体, 加生物素标记的二抗孵育, 然后洗去未结合的生物上标记二抗, 再与亲合素-ALP 反应, 洗涤后加 ALP 的底物显色。

#### 1. 试剂盒组份

1.1. 洗涤液 (10×浓缩) 100ml×2

1.2. 血清封闭液: 含 10%灭活正常山羊或兔血清, 含防腐剂: 正常山羊血清(10%) 50 MI/ 正常兔血清(10%) 50 MI

1.3. 生物素标记的二抗, 含 2.0 μg/mL, 100mM Tris-HCl, pH7.6, 稳定剂和防腐剂, 工作液, 直接使用: 羊抗鼠 50ml/羊抗兔 50ml/羊抗大鼠 50ml/兔抗羊 50ml

1.4. 亲合素-ALP, 含 2.0 μg/mL, 100mM Tris-HCl, pH7.6, 稳定剂和防腐剂, 工作液, 直接使用: 亲合素-ALP 50ml

#### 2. 本试剂盒不提供的试剂

2.1. 一抗

2.2. 碱性磷酸酶底物

2.3. 去离子水或蒸馏水

2.4. 内源性过氧化物酶抑制剂

2.5. 封固剂

2.6. 其它: 显微镜、玻片、盖玻片、加样器、试管、湿盒

#### 3. 储存条件及稳定性:

2-8°C 自收到之日起, 稳定至少 1 年。

#### 4. 溶液配制

4.1. 1×洗涤液: 将 10X 洗涤缓冲液用蒸馏水进行 10 倍稀释(例如 5 mL 浓缩洗涤液 + 45 mL 蒸馏水)

4.2. 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 无水甲醇: 加 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 无水甲醇于组织切片上, 室温孵育 30 分钟, 在洗涤液中润洗 10~15 分钟。

#### 5. 操作步骤

##### 5.1 石蜡切片

5.1.1. 脱蜡: 二甲苯, 室温, 2 次, 每次 5~10 分钟。

5.1.2. 水合: 乙醇 100%、80%、40%、20%、蒸馏水, 每级 3 分钟。

5.1.3. 在洗涤液中润洗 5 分钟。

5.1.4. 如有必要, 封闭内源性过氧化物酶 (含 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 无水甲醇)

5.1.5. 继续通用步骤。

##### 5.2 冰冻切片

5.2.1. 空气中干燥切片, 至少 1 小时

5.2.2. 用前用合适的固定液固定, 如果要延长保存时间, 固定后在空气中干燥 1 小时。单独包装在铝箔袋中, -70°C 干燥保存, 用前从冰箱取出, 室温放置至少 1 小时。

5.2.3. 浸入洗涤液中 10~15 分钟。

5.2.4. 继续通用步骤。

### 5.3 通用步骤

#### 5.3.1 加血清封闭液

5.3.1.1. 去掉片子上多余洗涤液。

5.3.1.2. 用正常山羊血清或兔血清（依据二抗来源动物种类选择）完全覆盖切片。

5.3.1.3. 在湿盒中室温孵育 15 分钟。

5.3.1.4. 浸入洗涤液中 5 分钟。

#### 5.3.2 加一抗

5.3.2.1. 去掉切片上的多余洗涤液。

5.3.2.2. 将稀释的一抗加到切片上，完全覆盖组织细胞。

5.3.2.3. 在湿盒中室温孵育 30 分钟。

5.3.2.4. 用洗涤液洗去一抗，在洗液中润洗 5 分钟。

注 如果显色速度过快，建议进一步稀释一抗，将一抗稀释度以 1/50, 1/100, 1/200, 1/400 和 1/800，最佳稀释度的选择是显色 10 分钟后阳性显色效果满意而没有背景显色。

#### 5.3.3 加生物素化抗体

5.3.3.1. 去掉缓冲液，擦掉切片周围的液体。

5.3.3.2. 加生物素化抗体，完全覆盖切片。

5.3.3.3. 室温孵育 30 分钟。

5.3.3.4. 用洗涤液洗去抗体，用洗涤液润洗 5 分钟。

#### 5.3.4 加亲合素-ALP

5.3.4.1. 去掉缓冲液，擦掉切片周围的液体。

5.3.4.2. 加亲合素-ALP，完全覆盖切片。

5.3.4.3. 室温孵育 30 分钟。

5.3.4.4. 用洗涤液洗去亲合素-ALP，用洗涤液润洗 5 分钟。

#### 5.3.5 显色

加 HRP 底物液显色

## 6. 可能出现的问题和解决方法

### 6.1 过度染色

6.1.1. 不完全脱蜡。

6.1.2. 过度组织粘附。

6.1.3. 用卵清蛋白作为粘合剂

6.1.4. 一抗稀释度不当。

6.1.5. 蛋白质非特异性结合。

### 6.2 不染色

6.2.1. 忘记加一抗、生物素化二抗或亲合素-ALP

6.2.2. 处理过程中抗原破坏

6.2.3. 固定不当

6.2.4. 操作过程中样品彻底干燥

6.2.5. 未按操作程序操作。

6.2.6. 使用了磷酸盐缓冲液。

### 6.3 染色较弱

6.3.1. 加免疫试剂前没有将洗涤液去掉



- 6.3.2. 抗体稀释不当
- 6.3.3. 显色前底物放置时间过长
- 6.3.4. 使用了磷酸盐缓冲液。
- 6.3.5. 未按规程操作。

## 7 注意事项

- 7.1. 不要使用磷酸盐缓冲液，无机磷酸盐会抑制磷酸酶的活性。
- 7.2. 一抗的最佳工作浓度预先摸索确定。
- 7.3. 小肠来说的切片不要使用碱性磷酸酶系统，除使用亲合素-ALP 前对磷酸酶活性进行封闭。
- 7.4. 设阳性对照、阴性对照和试剂对照
- 7.5. 不要使用卵清蛋白作为切片粘连剂，使用明胶或多聚赖氨酸。
- 7.6. 孵育过程中不要使片子干掉。
- 7.7. 洗涤后洗涤液尽量去净。
- 7.8. 用低熔点石蜡以减少抗原变性(> 60°C)
- 7.9. 用新鲜配制的 4%缓冲多聚甲醛可更好保存抗原活性。