小鼠一抗自主全应用免疫组化试剂盒

用户手册

货号: PK10018

简介:

PK10018 是针对小鼠源一抗设计的用于开发免疫组化应用的试剂盒。该试剂盒包含适用于小鼠来源一抗的 IHC 应用所需的所有基本试剂，从抗原修复缓冲液直到最后的封片剂。用户使用该试剂盒只需要通过简单地优化一抗浓度和少数实验操作参数，可以针对手头小鼠源一抗轻松建立完整的 IHC 工作体系。

本试剂盒包含:

部件号	组份	规格
HC001	Antigen Retrieval Buffer (50×)	100mL
HC002	Washing Buffer (30×)	120mL
HC003	Blocking Buffer	5mL
HC000	Quenching buffer (RTU)	5mL
HC004	Primary Antibody Diluent (RTU)	100mL
HC005M	Polymer HRP-Goat anti-Mouse Secondary Antibody	5mL
HC006	Chromogen Component A	0.2mL
HC007	Chromogen Component B	4mL
HC008	Signal Enhancer	5mL
HC009	Counter Staining Reagent	5mL
HC0010	Mounting Media	5mL

本试剂盒不包含:

小鼠源一抗试剂

二甲苯

乙醇

超纯水（ddH$_2$O）

切片染色缸或烧杯

切片篮

锡纸或烧杯盖

热修复加热仪器（电炉）

切片洗涤盒

免疫组化笔（可选）

温度计

洗瓶

孵育湿盒

微量离心管

移液器和吸头

盖玻片

警告:

使用二甲苯时，请采取合适的防护措施。吸入或接触二甲苯对身体有害。

- 直接接触会刺激皮肤和眼睛。
- 吸入会刺激鼻喉并引起咳嗽或气喘。
- 曝露可能导致头痛、头晕、眩晕或休克。

反复曝露会影响注意力、记忆力、视觉和肌肉协调性。

- 操作二甲苯时请采取个人防护装备，如手套、防护服、护目镜并使用通风设备。
- 妥善处理使用完的二甲苯和试剂盒废弃物。

试剂盒使用技巧:

为了达到最佳的使用效果，我们建议:

使用滴瓶滴加液体时，可以用瓶尖引导液体分散开关均匀盖在组织上，如果组织面积较大无法完全覆盖，可以额外多加 1-2 滴液体。

如果实验中没有使用免疫组化笔，建议滴加试剂时尽可能平放切片防止液体流走。

IHC 体系的建立

Step 0: 脱蜡和水化

1. 按照常规方法备制组织切片样本。将组织切片样本用不溶于二甲苯和乙醇的笔做好标记，并将切片放进切片篮或染缸架上。

   * 务必使用不溶于二甲苯和乙醇的笔作标记，石墨芯铅笔也可。

2. 将组织切片浸泡在二甲苯中 20 分钟，然后在另一缸中重复一次。两次二甲苯都用新鲜的。
3. 将组织切片浸泡在 100% 乙醇中 5 分钟，然后在另一缸中重复一次。两次乙醇都用新鲜的。
4. 将组织切片依次在下列缸中浸泡 5 分钟：
   - 95% 乙醇
   - 80% 乙醇
   - 60% 乙醇
5. 将组织切片用新鲜 ddH_2O 润洗两次，每次一分钟。

Step 1: 抗原修复

该试剂盒默认包含基于 Tris-EDTA 的抗原修复缓冲液，根据我们的经验，该缓冲液适用于 90% 以上的靶标。但是，如果使用此缓冲液没能获得理想结果，我们建议尝试下列替代缓冲液。

PR30001 柠檬酸钠抗原修复液 (50×)

PR30014 蛋白酶K抗原修复液（无需高温加热）

1. 用 ddH_2O 将试剂盒中 50x Antigen Retrieval Buffer (HC001) 稀释至 1x 修复液。例如，要制备 500mL 1x 修复液，用 490mL ddH_2O 稀释 10mL HC001。

* 1L 烧杯中 500mL 的 1x 抗原修复液可以够 1-2 个切片篮的用量。每次实验前计算或大致估计需要的量进行取用，剩下的以母液状态保存。请注意工作液的保存期比母液短。（下同）

2. 用电炉将 1x 抗原修复液加热至 95–98˚C。

* 烧杯上请加盖或用锡箔盖住，减少液体蒸发。

3. 将切片篮放入加热好的抗原修液中，保持温度不变加热 15-20 分钟。

4. 关闭电炉，将烧杯从电炉上取下冷却至室温（约35-40分钟）。

Step 2: 灭活和封闭

根据我们的经验，大多数情况下不需要对内源性过氧化物酶进行灭活，灭活有时甚至会对染色产生不利影响。然而该步骤在文献中有广泛提及，因此我们依然在该试剂盒中提供了内源性过氧化物酶灭活试剂。

1. 用 ddH_2O 将试剂盒中的 30x Washing Buffer (HC002)稀释至 1x。

要制备 XmL 的 1x 工作溶液，请用 X-X/30 mL 或 29X/30 mL 的 ddH2O 稀释 X/30 mL 的HC002。例如，要制备 600mL 的 1x 工作溶液，用 580mL ddH_2O 稀释 20mL HC002。

2. 将切片用 ddH_2O 润洗再浸泡于 100mL 1x 洗涤缓冲液。

3. 沥去载玻片上的液体并用吸水纸吸干组织切片周围残留的缓冲液（使载玻片玻璃面尽可能干燥）。使用组化笔在载玻片上围绕组织切片画一个圆圈（可选）。

4. 灭活（可选）：滴加2-4 滴Quenching Buffer (HC000)至组织切片上，使液体完全覆盖组织。将切片置于湿盒中室温孵育 10 分钟。阻断完成后用 1x 洗涤缓冲液清洗载玻片。

5. 封闭：沥去载玻片上的液体，并用吸水纸吸干组织切片周围残留的液体，将 2-4 滴Blocking Buffer (HC003) 直接加到载玻片上，覆盖整个组织切片，然后在湿盒中室温封闭 30 分钟。

* 确保载玻片上的封闭缓冲液中没有气泡。

* 提示：使用滴瓶的尖端将液体均匀涂抹在整个组织切片上，同时注意避免刮擦组织。

* 注意组织切片不可变干。

6. 封闭完成后沥去载玻片上的封闭液，并用吸水纸吸干组织切片周围残留的多余液体。

Step 3: 一抗

1. 使用试剂盒中 Primary Antibody Diluent (HC004) 稀释您的一抗试剂（本试剂盒仅适用于小鼠来源的一抗）。初次实验，建议一抗测试几个不同稀释度，摸索时可在一抗浓度为 1~10μg/ml 附近设置梯度。将 80-200μL（体积取决于组织的大小）稀释的一抗涂在载玻片上，覆盖整个组织。

* 计算一抗工作液的体积，用抗体稀释液稀释一抗。在获得最佳的一抗稀释倍数之前，不建议制备过多的一抗工作液。稀释后的工作液在 4˚C 下可稳定保存至少 3 个月。

2. 在密闭的湿盒中室温孵育 1 小时。

* 注意组织切片不可变干。

3. 使用 30x Washing Buffer (HC002) 和 ddH_2O 制备 1x 洗涤缓冲液。将准备好的缓冲液添加到洗瓶和切片染色缸或烧杯中。

4. 使用洗瓶冲洗载玻片上的一抗。然后将载玻片浸入 1x 洗涤缓冲液中漂洗 1 分钟。再重复一次漂洗和洗涤步骤；沥去多余的缓冲液并用吸水纸吸干组织切片周围残留的缓冲液。

* 如果在同一实验中使用不同的一抗，请在单独的洗涤缓冲液容器中分别漂洗。

* 每次洗涤使用新鲜的洗涤缓冲液。

Step 4: 二抗

1. 使用 Polymer HRP-Goat anti-Mouse Secondary Antibody (HC005M) 滴瓶直接在载玻片上添加 2-4 滴二抗试剂，覆盖整个组织。

* 本试剂盒中提供的二抗仅在上一步中使用小鼠来源一抗时才有效。

* 提示：使用滴瓶的尖端将液体均匀涂抹在整个组织切片上，同时注意避免刮擦组织。

2. 湿盒中室温孵育 30 分钟。

* 注意组织切片不可变干。

3. 将载玻片浸入洗涤缓冲液中漂洗 1 分钟。使用新鲜的洗涤缓冲液再重复漂洗两次。

4. 沥去多余的缓冲液并用吸水纸吸干组织切片周围残留的缓冲液。

Step 5: 显色

* 在复染前将复染液从盒内取出平衡至室温

1. 使用移液器在微量离心管中制备适当体积的显色液。Chromogen Component A (HC006) 与 Chromogen Component B (HC007) 的体积比为 1:20。

* 根据组织切片的大小，每张切片所需工作液约为 30-80µl。

2. 用移液器取配好的工作液加至组织上，确保完全覆盖住组织，将切片水平放置在实验台上，室温静置 5 分钟或至肉眼可见棕色产生。如果颜色显著则可提前用 1x 洗涤缓冲液终止反应。

3. 用洗瓶盛装 1x 洗涤液冲洗组织切片，然后将切片放入纯水中浸泡 30 秒，再换水重复浸泡 3-4 次。沥去多余的缓冲液并用吸水纸吸干组织切片周围残留的液体。

Step 6: 信号增强

1.将 2-4 滴 Signal Enhancer (HC008) 直接添加到载玻片上，覆盖整个组织。在室温下孵育 5 分钟。

* 提示：使用滴瓶的尖端将液体均匀涂抹在整个组织切片上，同时注意避免刮擦组织。

2. 将切片用 1x 洗涤液简单润洗，沥去多余的缓冲液。

Step 7:复染

1. 在载玻片上添加 2-4 滴 Counter Staining Reagent (HC009)，覆盖整个组织。在室温下孵育 2-3 分钟。

* 提示：使用滴瓶的尖端将液体均匀涂抹在整个组织切片上，同时注意避免刮擦组织。

2. 将载玻片浸入洗涤缓冲液中 1 分钟，然后浸入 ddH_2O 中 1 分钟。每次洗涤使用新鲜的 ddH_2O再重复洗涤步骤两次。

Step 8: 封片

1. 将载玻片依次浸入下列乙醇溶液中各 5 分钟：
    - 60% 乙醇
    - 80% 乙醇
    - 95% 乙醇
    - 100% 乙醇
2. 将载玻片浸入新鲜二甲苯中两次，每次 5 分钟。沥干载玻片上多余的液体，并将载玻片放在安全通风的区域（如通风橱），以使残留液体蒸发。
3. 将 1-2 滴Mounting Media (HC0010) 直接滴加到组织切片上。

    * 在覆上盖玻片之前，您可以使用干净的玻璃棒蘸取封片剂均匀地点涂在组织切片上。
4. 小心地将一张盖玻片盖在组织和封片剂上。确保组织被封片剂覆盖完全。

    * 小心操作防止盖玻片与组织之间产生气泡。
5. 水平静置载玻片 30-40 分钟，使其完全干燥。

Step 9: 结果分析与优化

1. 用光学显微镜观察分析染色结果。
2. 如果对结果不满意，可按照以下指南进行进一步优化：

    2.1 如果观察到染色较弱或没有染色：
    - 确保您的一抗为小鼠源。
    - 确保目的蛋白是否在被分析的组织中以中到高水平表达。如果不确定表达水平，请参阅文献以在您的实验中设立阳性对照组。
    - 增加一抗浓度（最高提高至 100 μg/mL）。
    - 延长抗原修复时间（最高延长至 60 分钟）。
    - 尝试使用其他可替代的抗原修复缓冲液。

    如果推荐的方法都不起作用，则一抗可能不适合 IHC。

    2.2 如果观察到中等到强烈的非特异性信号：
    - 考虑组织在实验过程中是否被微生物污染。切片前确认组织样本中去除血液成分残留。

- 尝试降低一抗浓度或缩短一抗孵育时间（最短可减少至 30 分钟）。
- 尝试缩短抗原修复时间（最短可减少至 15 分钟）。
- 跳过灭活和/或信号增强步骤。
- 尝试使用其他可替代的抗原修复缓冲液。

如果推荐的方法都不起作用，则一抗可能不适合 IHC。

* **重要提示：请勿**使用本试剂盒中提供的 Primary Antibody Diluent (HC004) 稀释二抗。