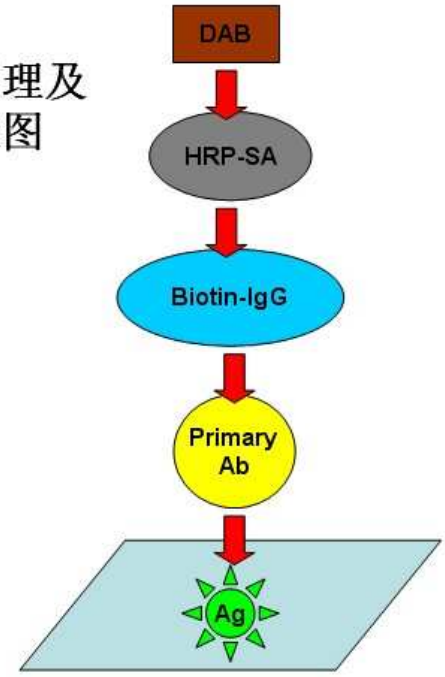
牛 VIM 免疫组化试剂盒

该试剂盒以 HRP 标记的链霉亲和素复合物（HRP Streptavidin Conjugate，HRP-SA）为基础，可用于检测细胞、组织内的特异性 VIM 抗原。该试剂盒具有灵敏度高、特异性强、定性定位准确、背景清晰。在所用的 VIM 一抗与相应靶抗原结合后，用生物化二抗与一抗特异性结合，最后加入 HRP-SA，形成抗原—特异一抗—生物素化二抗—HRP-SA 复合物，显微镜下观察成像。

试剂盒原理及主要步骤图



试剂盒所含试剂：

试剂 A 通透液：0.1% Triton-X 100　10 mL（选用）
试剂 B 封闭缓冲液（封闭用） 20 mL
试剂 C （原装进口分装）已稀释的即用型 VIM 一抗（2.5ml）
试剂 D （原装进口分装）生物素化羊抗兔 IgG 1 支
（浓度 1.5 mg/mL，稀释比为 1:300~1:500）50 μL+抗体稀释液 20ml
试剂 E HRP-SA 复合物 1 支（浓度 1 μM，稀释比 1:50~1:200）100 μL
试剂 F DAB 显色液 5ml

用户自备试剂：

1. 10mM TBS（pH7.2~7.4）
三羟基氨基甲烷 1.21g
氯化钠 7.6g
加蒸馏水 800mL，浓盐酸调 pH 值至 7.2~7.4，最后定容至 1000mL
TBS-T：TBS+Tween 20（0.05%体积比）

2．抗原修复液（依检测抗原不同而选择不同的修复液）
10mM pH6.0 柠檬酸缓冲液
柠檬酸 0.38g
柠檬酸三钠 2.45g
加蒸馏水 900mL，浓盐酸调 pH 值至 6.0，最后定容至 1000mL
或：0.5M EDTA 修复液（pH8.0）
EDTA·2H2O 186.1g
柠檬酸三钠 2.45g
加蒸馏水 700mL，用 10mM NaOH 调 pH 值至 8.0，最后定容至 1000Ml
3. 缓冲甘油封固剂 10 mL
4. Tween 20 5 mL

石蜡包埋组织切片免疫染色

实验步骤（建议方案）：

石蜡包埋组织切片 3~4μm 厚度
1.烤片： 将待做切片置于切片架上，于 60℃恒温烤箱中至少烤 1 hr；
2.脱蜡： 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡 3 次（即二甲苯Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ），每次 10 min；
3.水化： 切片经下行酒精水化，无水乙醇 5min，95%乙醇 2 次（每次 2min），85%乙醇 2 min；75%乙醇 2min，自来水冲洗，ddH2O 洗 2×2min；
4.抗原修复： 根据抗体说明书推荐方法进行抗原修复，常采用高压、微波（温度达到 98~100℃）或酶消化修复法，室温自然冷却，自来水冲洗，ddH2O 洗 2×2min，TBS 洗涤（2×2min）（具体修复方法见附 1）* 注：有些抗原勿需修复，直接进入第 5 步封闭。
5.封闭： 滴加试剂 B，37℃湿盒孵育 30 min；
6.加一抗：滴加用试剂 C（即用型一抗），37℃湿盒孵育 2 hr 或 4℃过夜；
7.洗涤： TBS-T 洗涤（3×5 min）；
8.封闭： 滴加试剂 B，37℃湿盒孵育 10 min；
9.加二抗： 滴加用抗体稀释液稀释的生物素化二抗（试剂 D），37℃湿盒中孵育 30 min；
10.洗涤： TBS-T 洗涤（3×5 min）；
11.封闭： 滴加试剂 Tween 20，37℃湿盒孵育封闭 20 min；
12.加 HRP-SA： 滴加用试剂 C 稀释的试剂 E（1：50~200，终浓度 5~20 nM），37℃湿盒中孵育 30 min；
13.洗涤： TBS-T 洗涤（3×5 min），TBS 洗涤（2×5 min）；
14.显色：应用 DAB 溶液（试剂 F）显色；
15.复染：自来水充分冲洗，复染，脱水，透明；
16.封片： 待组织标本干后，用试剂缓冲甘油封固剂封片；
17.观察成像： 显微镜下观察成像。

注意事项：

1. 修复后缓冲液须自然冷却，自来水冲洗后方能把切片取出，骤冷有可能导致结晶或抗原封闭。
2. 缓冲液的量必须保证所有切片都能浸泡到，用过的柠檬酸缓冲液不能反复使用。
3. 若试剂为微量浓缩液，用前应低速离心，将内盖和管壁附着的溶液离到底部。
4. 封片前一定要换用 TBS 充分洗涤，以便洗去组织上残留的 Tween 20，否则会影响结果观察。
5. 如须复染细胞核，则在封片前复染或直接采用含有染核试剂的封片剂进行封片。

附 1：

抗原修复方法

常用抗原修复液：柠檬酸缓冲液（0.01M pH6.0）、EDTA 抗原修复液（pH8.0 或 9.0）等等。

一、酶消化修复法

切片脱蜡水化处理，TBS 冲洗，在组织上滴加胃蛋白酶或胰蛋白酶，37℃孵育 20~30min 后 TBS 冲洗即可。

二、微波抗原修复法

微波盒中加入抗原修复液微波加热至沸腾，将脱蜡水化后的切片置于耐高温塑料切片架上，放入已沸腾的缓冲液中，中档或高档继续微波 10~15min，取出微波盒冷却至室温后，自来水冲洗，取出切片。因不同微波炉微波处理时间存在差异，须自行调整。

三、直接高压抗原修复法

取修复液于不锈钢高压锅中加热至沸腾，将组织切片置于耐高温切片架上，修复液沸腾后放入切片架，盖上锅盖，待喷气后计时 1.5~2.5min 即可脱离热源，自然冷却至室温后自来水冲洗，取出切片。此方法适用于较难检测或核抗原的修复。

四、隔水式高压抗原修复法

不锈钢高压锅中加自来水加热至沸腾，微波盒中加入修复液于微波炉中加热至沸腾，将切片放入微波盒中，再将微波盒放入高压锅中盖上锅盖，待喷气后计时 4~8 min 即可关闭热源，自然冷却至室温后自来水冲洗，取出切片。此方法适用于较难检测或核抗原的修复。