



即用型 SABC-AP 免疫组化试剂盒说明书（简化版）

（适于—抗为人IgG类抗体，可以做160张左右的切片）

【试剂组成】

编号	试剂组成	装量	用途说明	保存条件
R1	正常兔血清封闭液	12ml	为二抗同种动物血清，用于组织切片的封闭	4℃保存 有效期一年 应避免冷冻
R2	二抗	12ml	生物素标记兔抗人 IgG	
R3	SABC-AP	12ml	链霉亲和素-碱性磷酸酶	
R4	BCIP/NBT (×20)	1ml	显色剂	
R5	水溶性封片剂	12ml	封片剂	
R6	中性核固红	12ml	复染	

【工作原理】

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。链霉亲和素是一种从链霉菌中提取的蛋白质，分子量 60000。同亲和素一样，对生物素分子有极高的亲和力，是一般抗原抗体亲和力的一百万倍。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， $pI=6.0\sim6.5$ ，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 兼具高敏感性，低背景和操作简便的优点。

【用户自备试剂】

- 1、粘片剂 APES 或 POLY-L-LYSINE（南京建成有售）。
- 2、0.01M TBS（ $pH7.2-7.6$ ）配法：1000ml 蒸馏水中加氯化钠 9g，Tris 1.2g，乙酸 450 μ l
- 3、0.01M TBS（ $pH9.0-9.5$ ）配法：1000ml 蒸馏水中加氯化钠 9g，Tris 1.2g
- 4、0.01M 枸橼酸盐缓冲液：1000ml 蒸馏水中加枸橼酸三钠（ $C_6H_5Na_3O_7\cdot2H_2O$ ）3g，枸橼酸（ $C_6H_8O_7\cdot H_2O$ ）0.4g。

【免疫组化染色程序的选择】

用户需根据抗原 / 抗体的特点确定程序，多数情况下要先比较各程序染色结果。

- A 程序：石蜡切片热修复抗原程序。促进某些位于蛋白质内部的位点暴露。
- B 程序：石蜡切片酶消化程序。促进某些被固定遮蔽的抗原位点暴露。
- C 程序：石蜡切片不消化 / 不修复程序。适于稳定的抗原。
- D 程序：细胞涂片，冰冻切片染色程序。



A、石蜡切片热修复抗原染色程序：

- 1、载玻片防脱片剂处理：可选择 APES 或 Poly-Lysine。捞片后置烤箱 58-60℃ 30-60 分以使切片紧密粘附。
- 2、切片常规脱蜡至水。
- 3、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。
- 5、滴加正常兔血清封闭液，室温 20 分钟。甩去多余液体，不洗。
- 6、滴加适当稀释的一抗（兔 IgG），37℃ 1 小时左右或 20℃ 时 2 小时左右，也可 4℃ 过夜。0.01M PBS（pH7.2-7.6）洗 2 分钟×3 次。（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。）
- 7、滴加生物素化山羊抗人 IgG，37℃ 20 分钟。0.01M PBS（pH7.2-7.6）洗 2 分钟×3 次。
- 8、滴加试剂 SABC-AP，20-37℃ 20 分钟。0.01M PBS（pH7.2-7.6）洗 5 分钟×4 次。水洗 1 次。
- 9、显色：BCIP/NBT 用 0.01M TBS（pH9.0-9.5）按 1：20 的比例稀释，混匀后加至切片。20-37℃ 显色 10-30 分钟，镜下控制反应时间。蒸馏水洗涤。
- 10、核固红轻度复染。水洗，干燥后水溶性封片剂封片（水溶性封片剂应加温至 60℃ 左右），显微镜观察。

B、石蜡切片酶消化程序：

以下面的步骤代替 A 程序中的第 3 步：滴加复合消化液（南京建成有售）5-10 分钟。蒸馏水洗 3 次。也可以使用 0.1% 的胰蛋白酶作消化液。

C、石蜡切片不消化/不修复程序：

对于不需要微波修复或消化的抗原，省略 A 程序中的第 3 步即可。

D、血涂片，细胞和冰冻切片染色程序：

- 1、载玻片经防脱片剂处理（Poly-L-Lysine）。抗凝血经分层离心后涂片；培养细胞也可涂片或贴片生长；冰冻切片室温风扇吹干。
- 2、固定方案首选 4% 多聚甲醛或 10% 福尔马林固定 30 分钟。
- 3、3% 冰乙酸室温浸泡 20 分钟，以灭活内源性过氧化物酶。蒸馏水洗 1-2 次。其余步骤和石蜡切片 4-9 步相同。如果冰冻切片直接染色结果不理想时，可以参照石蜡切片对切片进行热修复，方法和石蜡切片 3-9 步相同。