mIHC 专用抗体洗脱液

Antibody Stripping Buffer (For mIHC Fluorescence Kit)

产品编号：C2208

产品规格：30mL

保存条件：RT，有效期 12 个月。

产品应用：适用于石蜡切片、冰冻切片、细胞爬片及细胞涂片等样本中，TSA 染色过程中的抗体洗脱。

实验步骤：

1. 样本准备：

1）石蜡切片：切片依次放入二甲苯Ⅰ 15min-二甲苯Ⅱ 15min-无水乙醇Ⅰ 5min-无水乙醇Ⅱ 5min-95%乙醇 5min-85%乙醇 5min-75%乙醇 5min，蒸馏水洗。

2）冰冻切片：冰冻切片固定 10-30min，PBS 洗 5min，重复 3 次，滴加 0.3% Triton-X100 破膜液通透 20min，PBS 洗 5min，重复 3 次。

3）细胞爬片或者细胞涂片：细胞样本固定 10-30min，PBS 洗 5min，重复 3 次，滴加 0.3% Triton-X100 破膜液通透 20min，PBS 洗 5min，重复 3 次。

2. 抗原修复：

组织切片置于盛满 pH 9.0 的 EDTA 碱性抗原修复液或者 pH 6.0 的柠檬酸修复缓冲液的修复盒中，于微波炉内进行抗原修复（也可以用高压 1-2min，100℃水煮 15min，95℃水浴 20min 等其他热修复方法）。中火 8min，停火 8min，转中低火 7min，此过程中应防止缓冲液过度蒸发，切勿干片。自然冷却后将玻片置于 pH 7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。修复液和修复条件根据组织类型、固定方法以及抗原类型来确定，冰冻切片和细胞样本可省略此步骤。

3. 阻断内源性过氧化物酶：

切片放入 3%的 H_2O_2 溶液中，室温避光孵育 15min，将玻片置于 pH 7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。

4. 非特异性靶点封闭：

切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈，在圈内滴加用抗体稀释液（或者其他封闭液，如 3%的 BSA 或者山羊血清等）均匀覆盖组织，室温封闭 30min。注：抗体稀释液内含有各种保护剂以及防腐剂，可以用来封闭或者稀释一抗，稀释后的一抗可以长期 4℃保存（在常温下可以保存一个月）。

5. 一抗孵育：

轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加已稀释到适当浓度的一抗工作液，平放于避光湿盒内 4℃孵育过夜或者 37℃孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）。

6. 二抗孵育：

玻片置于 pH 7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加与一抗相应种属的 HRP 二抗覆盖组织，避光室温孵育 50min，PBS 洗 5min，重复 3 次。注：本试剂盒内自带的 HRP 山羊抗兔/鼠通用二抗为即用型，具有超高灵敏度，随时可用，无需配置。

7. 荧光染色：

滴加稀释好的 TSA 荧光染料反应液均匀覆盖组织，室温反应 1-15min（反应最佳时间：5-10min），PBS 洗 5min，重复 3 次。注：预实验可先染 1min，洗涤后观察染色效果，如果阳性弱则继续滴加荧光染料反应液加强染色强度，直至合适强度后继续进行下一步。

8. 抗体洗脱：

滴加适量 37℃预热至完全溶解的 mIHC 专用抗体洗脱液（细胞爬片及细胞涂片/冰冻切片/易脱片的骨组织建议使用）覆盖样本，37℃放置 5-20min，弃去洗脱液，再次滴加适量抗体洗脱液覆盖样本，37℃放置 5-20min，弃去洗脱

Important Note: This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications.

液，PBS 洗 5min，重复 3 次。注：石蜡切片可用热修复洗脱或者抗体洗脱液洗脱，细胞及冰冻切片需用 mIHC 专用抗体洗脱液洗脱。

9. 第二轮标记：

换用另外一种 TSA 荧光染料反应液，重复步骤 3-7。

10. DAPI 复染细胞核：

玻片置于 pH 7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 即用型染液，避光室温孵育 5-20min。

11. 封片：

玻片置于 pH 7.4 的 PBS 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次，每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。

12. 镜检拍照：

切片于荧光显微镜/共聚焦/多通道荧光扫描仪/多光谱成像系统下观察并采集图像。

注意事项：

1. 抗体洗脱效果取决于切片厚度、洗脱温度和时间、一抗种类，具体洗脱时间需要根据情况调整。
2. 如果抗体洗脱有问题，可适当降低一抗的稀释比例，或者将这些抗体放在最后一轮做。
3. 抗体洗脱液容易流出，如果发现流出需及时补充。
4. 每次使用前确保试剂完全溶解无沉淀，如果有沉淀析出需放入 37℃充分溶解后方可使用。
5. mIHC 专用抗体洗脱液优先应用于细胞爬片及细胞涂片/冰冻切片/易脱片的骨组织等，石蜡切片优先应用 EDTA 或者柠檬酸修复液洗脱抗体。
6. mIHC 专用抗体洗脱液偏酸性，过度洗脱（时间过长或者温度过高）会导致抗原识别降低/DAPI 核染弱。
7. 没有固定的切片不适用 mIHC 专用抗体洗脱液。

Important Note: This product as supplied is intended for research use only, not for use in human, therapeutic or diagnostic applications.