

RC780二步法试剂盒

原理介绍:一抗与组织上的抗原特异性结合后，加入多聚辣根过氧化物酶 (HRP) 二抗，HRP 将带标记的 Tyramide 活化，后者与相邻的蛋白上的酪氨酸残基生成稳定的共价结合，目的蛋白上会富集大量带有标记的酪胺，加入 780 二抗显色并使信号进一步放大，此试剂盒中的荧光染料可单独或配合本司多重免疫荧光试剂盒使用。可以实现单标、双标、三标以及更多重荧光放大/多重同源抗体荧光标记等功能。

试剂盒规格: 100T

试剂盒货号: RC0086plus-B05RM

有效期: 一年有效

试剂盒组成:

名称	货号	规格	保存条件
多聚 HRP-山羊抗兔鼠通用二抗	RCB054	5mL 即用型	4℃
RC780 染色 A 液	RCB05-A	50 μ l 浓缩型, 200X	4℃
RC780 染色 B 液	RCB05-B	6mL 工作液	4℃
RC780 染色 C 液	RCB05-C	60 μ l 浓缩型, 100X	4℃
3%过氧化氢	RC012	6mL 即用型	4℃

注: RC780染色A液用RC780染色B液按1: 200比例稀释 (若一抗孵育时间常温 1h-3h内, 建议稀释比例 1:100-1:200, 若一抗孵育时间4 度过夜 (12h 或以上), 建议稀释比例 1:200-1:400 或更高), RC780染色C液用抗体稀释液或者PBS按1: 100比例稀释。

详细操作步骤

1、样本准备:

1) 石蜡切片: 依次将切片放入二甲苯 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0.1-0.5% 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0.1-0.5% 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 EDTA碱性抗原修复液或者PH6.0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度水煮15min 95度水浴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PBS (PH7.4) 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%过氧化氢溶液, 室温避光孵育15 min, 将玻片置于PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5min。
- 4、BSA封闭:** 切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈 (防止抗体流走), 在圈内滴加用3% BSA-PBS (或者其他封闭液) 均匀覆盖组织, 室温封闭30min。
- 5、加一抗:** 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的的一抗X, 切片平放于避光湿盒内4° C孵育过夜或者37度2h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- 6、加多聚HRP二抗:** 玻片置于PBS (PH7.4) 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多聚HRP二抗覆盖组织, 避光室温孵1h, PBS洗三次, 每次5min。
- 7、加RC780染色A液:** 切片稍甩干后在圈内滴加50-100ul RC780染色A液工作液 (用RC780染色液B 200倍稀释, 稀释倍数可根据实际情况调整) 室温孵育10min, PBS洗三次, 每次5min。
- 8、热修复去降低非特异性:** 组织切片置于盛满PH 9.0 EDTA碱性抗原修复液或者PH6.0柠檬酸修复缓冲液的修复盒中于微波炉内中火8min, 停火8min, 转中低火7min (也可以用高压1-2min 100度水煮15min 95度水浴20min等其他热修复方法), 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PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤3次, 每次5min (此步骤选做, 非必须进行, 如果有非特异性染色建议进行此操作)。
- 9、加RC780染色C液:** 切片稍甩干后在圈内滴加50-100ul RC780染色C液 (用PBS或者抗体稀释液100倍稀释) 室温孵育10-30min (染色时间需摸索), PBS洗三次, 每次5min。
- 10、DAPI 复染细胞核:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 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 5min-20min。
- 11、封片:** 玻片置于 PBS (PH7.4) 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 (推荐使用我司抗荧光淬灭封片剂, 货号: RC07/RC06)。
- 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、多聚HRP二抗为即用型, 无需稀释直接试用。
- 2、进行多轮荧光染色的时候, RC780试剂盒建议在最后一轮染色中使用。
- 3、RC780试剂盒灵敏度较高, RC780染色A液稀释比例和RC780染色C液染色时间需根据预实验摸索合适的条件。