

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: 20T/100T

试剂盒货号: RC0086plus-B05R

有效期: 一年有效

试剂盒组成:

名称	货号	规格(20T)	规格(100T)	保存条件
多聚 HRP-山羊抗兔二抗	RCA054	即用型, 1.6mL	即用型, 8mL	4°C
RC780 染色 A 液	RCB05-A	浓缩型, 10 μ l, 200x	浓缩型, 50 μ l, 200x	4°C
RC780 染色 B 液	RCB05-B	工作液, 1.6mL	工作液, 8mL	4°C
RC780 染色 C 液	RCB05-C	浓缩型, 16 μ l, 100x	浓缩型, 80 μ l, 100x	4°C
3%过氧化氢	RC012	即用型, 2mL	即用型, 10mL	4°C
抗荧光淬灭封片剂 (干固型)	RC06	2mL	10mL	4°C

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

慧蓝生物 竭诚为您服务

地址: 上海市浦东新区周浦镇天雄路588弄, 电话: 19101712317, 邮箱: 469340997@qq.com

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。