



## 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°C 水煮 15min, 95°C 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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°C 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°C 孵育过夜或者 37°C 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°C 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°C 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°C 放置 5-20min, 弃去洗脱

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°C 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。