

SABC-AP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)

产品编号	产品名称	包装
P0606	SABC-AP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)	1000次

产品简介:

- 碧云天生产的SABC-AP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)是基于Streptavidin-Biotin Complex (SABC)信号放大系统而研制的用于免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)、免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC)、Western、Northern、Southern、EMSA等印迹(blotting)检测以及ELISA等基于生物素标记的各种高灵敏度检测。
- 本试剂盒检测灵敏度高。**与常规的检测方法相比,由于本试剂盒采用了SABC信号放大系统,检测灵敏度显著提高,通常检测灵敏度比常规方法可以提高约5-10倍。常规方法检测信号过弱时,强烈推荐尝试本试剂盒。
- 本试剂盒特异性强、背景低。**本试剂盒采用了比Avidin特异性更强、背景更低、灵敏度更高的Streptavidin。Streptavidin (链霉亲和素)是从*Streptomyces avidinii*中纯化获得的一种分子量为66kD的四聚体蛋白,可以同时结合4个生物素分子,其对生物素的解离常数(Kd, dissociation constant)可达10-15M,比通常抗原抗体的亲和力高约100万倍,可以确保与生物素高度专一地结合。Streptavidin与鸡蛋清来源的Avidin (亲和素)在空间结构以及与生物素的亲和力方面具有高度的相似性,但Streptavidin等电点几乎为中性(pI=6.0-6.5),其中性条件下几乎不带电荷。而Avidin的pI=10.5,在中性条件下带正电荷。因此Streptavidin比Avidin的非特异性结合更低,检测灵敏度更高。
- 检测原理:**参考图1,组织、细胞、转移到膜上的或者结合于多孔细胞培养板上的抗原先与一抗结合,后者再与生物素标记的二抗结合;按照适当比例将Streptavidin和生物素标记的碱性磷酸酶(Biotin-labeled Alkaline Phosphatase, Biotin-AP)混合,形成网络状的SABC-AP (Streptavidin-Biotin Complex containing AP)复合物;接着二抗上标记的生物素再与SABC-AP结合,加入AP底物进行显色即可检测到相应的信号。其中Streptavidin和Biotin-AP混合后形成网络状复合物是信号能被放大的关键,相当于一个待检测的生物素分子通过SABC-AP复合物的识别最终可以由很多个AP分子来显示其信号,从而达到了信号放大的效果。

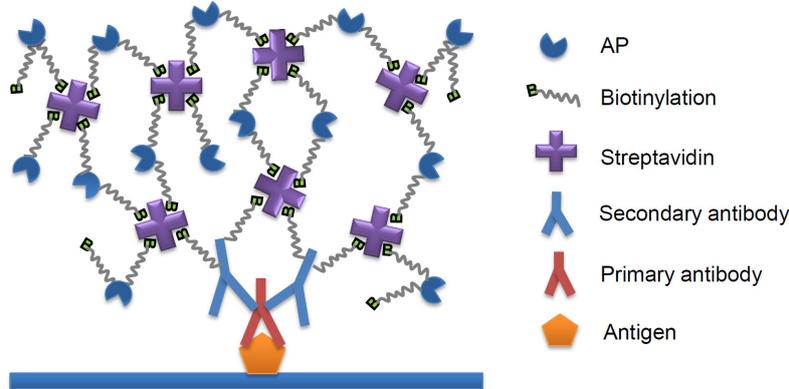


图1. 本试剂盒的检测原理图。

- 本试剂盒用于IHC、ICC或Blotting时,可以配制成100ml的SABC工作液。按照IHC和ICC每个样品需要使用100 μ l的SABC工作液计算,本试剂盒可用于1000个样品的检测。按照每张膜需10ml SABC工作液计算,本试剂盒可用于10次的Blotting检测。本试剂盒用于ELISA检测时,可以配制成500ml SABC工作液。按照ELISA检测每个样品需要使用100 μ l的SABC工作液计算,本试剂盒可用于5000个样品的检测。

包装清单:

产品编号	产品名称	包装
P0606-1	Reagent A (Streptavidin)	1ml
P0606-2	Reagent B (Biotin-AP)	1ml
—	说明书	1份

保存条件:

-20 $^{\circ}$ C保存,一年有效。4 $^{\circ}$ C保存,一个月有效。

注意事项:

- 本试剂盒使用过程中所需的溶液不能含有碱性磷酸酶抑制剂,也不能加入可能含有生物素的溶液,如常规血清、脱脂奶粉、

细胞培养液等，否则会降低本试剂盒的检测灵敏度。

- 任何与液体孵育有关的步骤都需要确保液体能很好地覆盖样品。样品没有被液体充分覆盖而最终出现发干的情况，会导致染色不能正常进行。
- 实验所需缓冲液宜新鲜配制。长期放置的缓冲液可能会因为微生物污染，而导致检测效果的下降。
- 本试剂盒中的两种试剂需配套使用，切勿与其它试剂混用。
- 本产品仅限于专业人员的科学研究用，不得用于临床诊断或治疗，不得用于食品或药品，不得存放于普通住宅内。
- 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

使用说明：

1. 参考表1配制SABC工作液

表 1. SABC 工作液配制表

用途	IHC/ICC	Blotting	ELISA
SABC稀释液	10ml	10ml	10ml
Reagent A (Streptavidin)	100µl	100µl	20µl
Reagent B (Biotin-AP)	100µl	100µl	20µl

按照上述比例依次加入各溶液，混匀后室温放置30min，即为SABC工作液。

注 1：为确保充分形成 Streptavidin-Biotin Complex，刚配制后必须室温至少放置 30min 后才能使用。

注 2：配制好的 SABC 工作液必须在 24h 内使用完毕。

注 3：SABC 稀释液：除 ELISA 检测外，推荐使用碧云天的 P0267 QuickBlock™免疫组化染色二抗稀释液或 P0110 免疫染色(非荧光)二抗稀释液；ELISA 检测推荐使用 P0110 免疫染色(非荧光)二抗稀释液。通常宜选择有一定封闭能力的 SABC 稀释液，这样检测结果的背景通常会更低。

2. 免疫组化染色(IHC)

a. 需用户自行准备的试剂

- 洗涤液(推荐使用碧云天的P0106/P0106C/P0106L免疫染色洗涤液)。
- 固定液：4%多聚甲醛(推荐使用碧云天的P0098免疫染色固定液)。
- 封闭液(推荐使用碧云天的P0260 QuickBlock™免疫染色封闭液或P0102免疫染色封闭液)。
- 一抗。
- 一抗稀释液(推荐使用碧云天的P0262 QuickBlock™免疫染色一抗稀释液或P0103免疫染色一抗稀释液)。
- 二抗(推荐根据样品的种属特异性选购碧云天的A0279/A0288生物素高效标记二抗，其推荐的稀释比例均为1:100)。
- 二抗稀释液(推荐使用碧云天的P0267 QuickBlock™免疫组化染色二抗稀释液或P0110免疫染色(非荧光)二抗稀释液)。
- BCIP/NBT显色液(推荐使用碧云天的C3206 BCIP/NBT显色试剂盒)。

b. 染色方法

- 按照常规方法制备石蜡或冰冻切片并灭活内源性碱性磷酸酶(推荐使用碧云天的P0100C内源性碱性磷酸酶封闭液(20X)，需参考产品说明书将其加入到碱性磷酸酶底物溶液中进行封闭)。
- 抗原的修复：根据不同的抗原和切片的种类，选择把切片放置在适当的抗原修复液中进行抗原修复(推荐使用碧云天的P0081/P0083/P0085/P0086/P0088/P0090/P0092相关抗原修复液)。
- 洗涤液洗涤组织切片5min×4次。
- 滴加封闭液封闭组织切片10-60min。使用P0260 QuickBlock™免疫染色封闭液仅需封闭10min，普通封闭液封闭60min。
- 滴加一抗工作液，室温缓慢摇动孵育1h或静止孵育1-2h(为改善染色效果，可以4℃孵育过夜)。
- 洗涤液洗涤组织切片5min×4次。
- 滴加生物素标记二抗工作液，室温缓慢摇动孵育30-60min或静止孵育1-2h。孵育期间，参考表1配制SABC工作液，配制后应室温至少放置30min后才可以使
- 用。
- 用洗涤液洗涤组织切片5min×4次。
- 滴加100µl的SABC工作液，室温缓慢摇动孵育30min或静止孵育1h。
- 洗涤液洗涤组织切片5min×4次。
- 滴加约100µl BCIP/NBT显色工作液，确保能充分覆盖样品。室温(约25℃)避光孵育约3-15min，至显色达到预期效果即可去除BCIP/NBT显色工作液，用蒸馏水洗涤1-2次以终止显色反应。

3. 免疫细胞化学染色(ICC)

a. 需用户自行准备的试剂

- 洗涤液(推荐使用碧云天的 P0106/P0106C/P0106L 免疫染色洗涤液)。
- 固定液：4%多聚甲醛(推荐使用碧云天的 P0098 免疫染色固定液)。
- 封闭液(推荐使用碧云天的 P0260 QuickBlock™免疫染色封闭液或 P0102 免疫染色封闭液)。
- 一抗。
- 一抗稀释液(推荐使用碧云天的 P0262 QuickBlock™免疫染色一抗稀释液或 P0103 免疫染色一抗稀释液)。
- 二抗(推荐根据样品的种属特异性选购碧云天的 A0279/A0288 生物素高效标记二抗，其推荐的稀释比例均为 1:100)。
- 二抗稀释液(推荐使用碧云天的 P0267 QuickBlock™免疫组化染色二抗稀释液或 P0110 免疫染色(非荧光)二抗稀释液)。
- BCIP/NBT 显色液(推荐使用碧云天的 C3206 BCIP/NBT 显色试剂盒)。

b. 染色方法(以6孔板为例)

- 细胞固定: 去除培养液, 用PBS洗涤细胞1次。每孔加入1ml固定液。固定10min后去除固定液, 用洗涤液洗涤3次。
- 细胞打孔: 如果上一步的洗涤使用的是碧云天的P0106免疫染色洗涤液等或其它含有0.1% Triton X-100的洗涤液可以忽略本步骤。否则每孔加入1ml含0.1%的Triton X-100的适当洗涤液, 室温静置5min后去除洗涤液。
- 内源性碱性磷酸酶的灭活: 按照常规方法灭活内源性碱性磷酸酶(推荐使用碧云天的P0100C内源性碱性磷酸酶封闭液(20X), 需参考产品说明书将其加入到碱性磷酸酶底物溶液中进行封闭)。
- 加入1ml封闭液, 室温封闭10-60min。使用P0260 QuickBlock™免疫染色封闭液仅需封闭10min, 普通封闭液封闭60min。
- 去除封闭液, 每孔加入0.5-1ml一抗工作液, 室温缓慢摇动孵育1h或静止孵育1-2h (为改善染色效果, 可以4°C孵育过夜)。
- 每孔加入1ml洗涤液, 室温缓慢摇动或静止放置洗涤5min×4次。
- 吸尽洗涤液, 每孔加入0.5-1ml生物素标记二抗工作液, 室温缓慢摇动孵育30-60min或静止孵育1-2h。孵育期间, 参考表1配制SABC工作液, 配制后应室温至少放置30min后才可以使⽤。
- 每孔加入1ml洗涤液, 室温缓慢摇动或室温静止放置洗涤5min×4次。
- 每孔加入500μl SABC工作液, 室温孵育30min。
- 每孔加入1ml洗涤液, 室温缓慢摇动或室温静止放置洗涤5min×4次。
- 每孔加入500μl BCIP/NBT工作液, 室温(约25°C)避光孵育约3-15min, 至显色达到预期效果即可去除BCIP/NBT显色工作液, 用蒸馏水洗涤1-2次以终止显色反应。显色期间, 可以在显微镜下观察显色情况, 以确定继续显色还是终止显色反应。

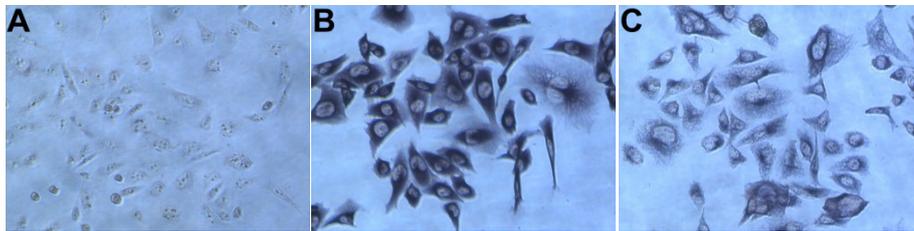


图2. HeLa细胞Tubulin免疫染色效果图。A. 阴性对照组(不加一抗)。B. SABC-AP实验组。C. AP标记二抗对照组。

4. Western Blot

a. 需用户自行准备的试剂

- 封闭液(推荐使用碧云天的P0252 QuickBlock™ Western封闭液或P0023B Western封闭液)。
- 洗涤液(推荐使用碧云天的P0023C/P0023C3/P0023C6 Western洗涤液)。
- 一抗。
- 一抗稀释液(推荐使用碧云天的P0256 QuickBlock™ Western一抗稀释液或P0023A Western一抗稀释液)。
- 二抗(推荐根据样品的种属特异性选购碧云天的A0279/A0288生物素高效标记二抗, 其推荐的稀释比例均为1:100)。
- 二抗稀释液(推荐使用碧云天的P0258 QuickBlock™ Western二抗稀释液或P0023D Western二抗稀释液)。
- BCIP/NBT显色液(推荐使用碧云天的C3206 BCIP/NBT显色试剂盒)。

b. 检测方法

- SDS-PAGE电泳、转膜后, 用封闭液室温缓慢摇动封闭10-60min。使用P0252 QuickBlock™ Western封闭液仅需封闭10min, 普通封闭液封闭60min。
- 将膜置于一抗工作液中, 室温缓慢摇动孵育1h (为提高检测灵敏度, 可以考虑4°C缓慢摇动孵育过夜)。
- 洗涤液洗涤5min×4次。
- 将膜置于生物素标记二抗工作液中, 室温缓慢摇动孵育1h。孵育期间, 参考表1配制SABC工作液, 配制后应室温至少放置30min后才可以使⽤。
- 洗涤液洗涤5min×4次。
- 将膜置于SABC工作液中, 室温缓慢摇动孵育30min。
- 洗涤液洗涤5min×4次。
- 如果进行BCIP/NBT显色: 将膜置于适量的BCIP/NBT工作液中, 一般室温避光孵育3-15min即可, 去除BCIP/NBT显色工作液, 用蒸馏水洗涤1-2次即可终止显色反应; 将膜自然风干后避光保存。BCIP/NBT显色的检测效果参考图3。

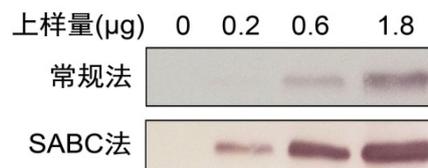


图3. SABC法BCIP/NBT显色检测效果图。常规法采用AP标记二抗, SABC法采用本试剂盒。样品为HeLa细胞总蛋白, 上样量如图中所示。一抗是AT819 Tubulin抗体, 稀释比例为1:1000。注: SABC法可以达到普通ECL发光试剂的检测灵敏度。但除非条件所限, 否则我们更推荐使用碧云天的P0018A BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒)和HRP标记二抗进行Western检测。使用BeyoECL Star检测时的灵敏度比用本试剂盒方法还要高约5倍或更多。

5. ELISA

- a. 需用户准备的试剂
 - (a) 包被缓冲液: 0.2M碳酸氢盐缓冲液, pH 9.4。
 - (b) 洗涤液: PBS, pH7.4, 0.05% Tween-20, 0.1% BSA (推荐使用碧云天的P0106/P0106C/P0106L免疫染色洗涤液)。
 - (c) 封闭液: PBS, 1% BSA (推荐使用碧云天的P0260 QuickBlock™免疫染色封闭液或P0102免疫染色封闭液)。
 - (d) 抗原溶液: 溶于包被缓冲液。
 - (e) 一抗。
 - (f) 一抗稀释液(推荐使用碧云天的P0103免疫染色一抗稀释液)。
 - (g) 二抗(推荐根据样品的种属特异性选购碧云天的A0279/A0288生物素高效标记二抗, 其推荐的稀释比例均为1:100)。
 - (h) 二抗稀释液(推荐使用碧云天的P0267 QuickBlock™免疫组化染色二抗稀释液或P0110免疫染色(非荧光)二抗稀释液)。
 - (i) 酶反应底物: 2mg/ml对硝基苯磷酸盐(p-nitropheny phosate, pNPP)溶于100mM NaHCO₃, pH 9.5, 10mM MgCl₂。推荐使用碧云天的P0321 碱性磷酸酶检测试剂盒。
- b. 检测方法(以96孔板为例)
 - (a) 每孔中加入50-200μl的抗原溶液, 室温孵育1h或4°C过夜。
 - (b) 去除孔中液体并在吸水纸上拍干残余液体, 每孔用200μl洗涤液洗涤3次, 去除孔中的液体并在吸水纸上拍干。
 - (c) 每孔加入200μl的封闭液室温孵育60min。
 - (d) 去除孔中液体并在吸水纸上拍干残余液体, 加入100μl的一抗工作液, 室温孵育30min。
 - (e) 每孔用200μl洗涤液洗涤3次, 去除孔中的液体并在吸水纸上拍干残余液体。
 - (f) 每孔加入100μl生物素标记二抗工作液, 室温孵育30min(此时应配制SABC工作液, 配制方法参考表1)。
 - (g) 每孔用200μl洗涤液洗涤3次, 然后加入200μl洗涤液孵育5min。
 - (h) 去除孔中的液体并在吸水纸上拍干, 每孔加入100μl SABC工作液, 室温孵育30min。
 - (i) 每孔用200μl洗涤液洗涤3次, 然后加入200μl洗涤液孵育5min, 去除孔中的液体并在吸水纸上拍干。
 - (j) 每孔加入200μl酶反应底物(推荐使用碧云天的P0321碱性磷酸酶检测试剂盒), 室温避光孵育3-30min或更长时间, 直至显色至预期深浅, 测定吸光度。可以根据实验需要考虑加入显色终止试剂, 例如0.5M Na₂CO₃, 并在400-415nm测定吸光度。

常见问题:

1. 背景太深

- a. 考虑使用适当的封闭液进行封闭, 例如选择碧云天推荐的封闭液进行封闭。
- b. 内源性蛋白结合的生物素, 内源性凝集素以及离子间的相互作用都会使背景显色加深。针对内源性蛋白结合的生物素可采用生物素检测封闭液进行封闭(推荐使用碧云天的P0101生物素检测封闭试剂盒); 对于内源性凝集素可在SABC稀释液中加入0.2M的α-甲基甘露糖进行封闭; 而对于离子间的相互作用带来的干扰, 可以通过把SABC试剂溶于含有0.5M NaCl的缓冲液中来消除。
- c. 对于免疫染色, 需注意用适当方法灭活内源性碱性磷酸酶。
- d. 考虑适当降低一抗或二抗浓度。另外, 选择适当强度的洗涤液, 或适当延长洗涤时间也会有所帮助。

2. 没有信号或信号太弱

- a. 评估样品中待检测的蛋白的表达水平是否足够高, 最好能选择高表达的样品作为阳性对照。
- b. 考虑适当提高一抗或二抗的浓度。
- c. 适当延长显色或发光时间, 另外须确定抗原修复对于所使用的一抗是否是必需或有效的。

相关产品:

产品编号	产品名称	包装
P0603	SABC-HRP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)	1000次
P0606	SABC-AP Kit (IHC, ICC, Blotting & ELISA)	1000次
P0612	SABC-HRP Kit with Anti-Mouse IgG (IHC & ICC)	500次
P0615	SABC-HRP Kit with Anti-Rabbit IgG (IHC & ICC)	500次
P0625	SABC-AP Kit with Anti-Mouse IgG (IHC & ICC)	500次
P0628	SABC-AP Kit with Anti-Rabbit IgG (IHC & ICC)	500次
A0279	生物素高效标记山羊抗兔IgG(H+L)	0.5ml
A0288	生物素高效标记山羊抗小鼠IgG(H+L)	0.5ml
P0021A	Western转膜液	1L
P0021B	Western转膜液	10×1L
P0021S	PVDF膜浸润活化液	250ml
P0023A	Western一抗稀释液	100ml
P0023B	Western封闭液	100ml
P0023C	Western洗涤液	250ml

P0023C3	Western洗涤液(10X)	100ml
P0023C6	Western洗涤液(10X)	10×100ml
P0023D	Western二抗稀释液	100ml
P0081	柠檬酸钠抗原修复液(50X)	100ml
P0083	改进型柠檬酸钠抗原修复液(50X)	100ml
P0085	EDTA抗原修复液(50X)	100ml
P0086	柠檬酸钠-EDTA抗原修复液(40X)	125ml
P0088	通用型强力抗原修复液(10X)	100ml
P0090	冰冻切片快速抗原修复液(5X)	100ml
P0092	漂片抗原修复液(10X)	100ml
P0098	免疫染色固定液	100ml
P0100A	内源性过氧化物酶封闭液	100ml
P0100B	内源性过氧化物酶强力封闭液	100ml
P0100C	内源性碱性磷酸酶封闭液(20X)	6ml
P0101	生物素检测封闭试剂盒	200次
P0102	免疫染色封闭液	100ml
P0103	免疫染色一抗稀释液	100ml
P0106	免疫染色洗涤液	250ml
P0106C	免疫染色洗涤液(10X)	100ml
P0106L	免疫染色洗涤液(10X)	10×100ml
P0110	免疫染色(非荧光)二抗稀释液	100ml
P0252	QuickBlock™ Western封闭液	100ml
P0256	QuickBlock™ Western一抗稀释液	100ml
P0258	QuickBlock™ Western二抗稀释液	100ml
P0260	QuickBlock™免疫染色封闭液	100ml
P0262	QuickBlock™免疫染色一抗稀释液	100ml
P0265	QuickBlock™免疫荧光染色二抗稀释液	100ml
P0267	QuickBlock™免疫组化染色二抗稀释液	100ml
P0018	BeyoECL Plus (超敏ECL化学发光试剂盒)	共100ml
P0018A	BeyoECL Star (特超敏ECL化学发光试剂盒)	共100ml
P0202	DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒	共20ml
P0203	DAB辣根过氧化物酶显色试剂盒	共100ml
P0209	TMB显色液(ELISA HRP显色用)	100ml
P0211	TMB显色液(组化或膜HRP显色用)	100ml
C3206	BCIP/NBT碱性磷酸酯酶显色试剂盒	共100ml
FFP24	PVDF膜(进口分装, 6.6×8.5cm, 0.2μm)	20张/包装
FFP32	PVDF膜(进口分装, 6.6×8.5cm, 0.45μm)	20张/包装
FFP51	转印滤纸(7.5×10cm)	100张/包装
ST476	PBS (10X)	500ml

Version 2018.02.28