

# 免疫组化试剂盒（抗小鼠二抗）

货号：ZY-IHC001

## 产品简介

在免疫学中，抗原抗体分子由于结构的互补和彼此亲和性会发生特异性结合，基于此原理，抗体将会与待测组织及细胞中特异的抗原/蛋白结合。随后通过氧化还原化学反应使标记抗体的酶显色剂显色，从而显示组织及细胞内的抗原分布。首先，一抗与待测组织上的抗原特异性结合；其次，HRP 标记二抗聚合物识别已经连接上抗原的抗体；再次，加入显色底物，聚合物上的辣根过氧化物酶可以催化 $H_2O_2$  与 DAB（或 AEC）反应，从而使组织切片中抗原位点处出现黄色/棕黄色（或红色）着色；最后对样本进行复染和封片。通过显微镜观测显色情况，推断组织切片上抗原的存在位置和表达情况。

## 基本属性

产品名称	BL1658A	BL1658B	BL1658C	BL1658D	BL1658E
内源性过氧化物酶阻断剂	3 ml	6 ml	18 ml	55 ml	110 ml
HRP 酶标记的二抗聚合物	3 ml	6 ml	18 ml	55 ml	110 ml



## 样本要求

新鲜活检或手术样本组织，经 10%中性福尔马林溶液固定 6-24 小时，按技术规范要求进行取材、脱水、石蜡包埋制成蜡块。对标本蜡块进行切片，厚度 3-5 $\mu$ m，粘附在防脱载玻片上，65 $^{\circ}$ C 恒温箱烤片 1 小时。暂不使用的白片在室温（15-25 $^{\circ}$ C）下保存（最好防氧化处理），为了良好地重现组织切片中的抗原分布情况，建议在 7 日内完成免疫组化染色。

## 使用方法（仅供参考）

以下为针对手工免疫组化法步骤。一次完整的免疫组化实验应设立阳性组织对照、阴性组织对照以及空白(或阴性)试剂对照。

### 一、实验准备

- 1、所需仪器、设备：修复仪、恒温箱、计时器、孵育盒、染色架、光学显微镜(4 $\times$ -40 $\times$ )、洗瓶、移液器等。
- 2、所需试剂、耗材：TBS 缓冲液、EDTA 抗原修复液 pH9.0、显色液、空白(或阴性)对照试剂、阳性及阴性对照组织切片、二甲苯或二甲苯替代品、乙醇(无水、95%、85%)、蒸馏水或去离子水、封片剂(如中性树胶)、防脱载玻片、盖玻片等。
- 3、实验温度条件：室温 18 $^{\circ}$ C-28 $^{\circ}$ C。



## 二、操作步骤

1、脱蜡和水化：将切片置于新鲜二甲苯或脱蜡液中，浸泡 3 分钟×2 次；去除多余液体，置于无水乙醇中，浸泡3分钟×2 次；去除多余液体，置于 95%乙醇中，浸泡 3 分钟；去除多余液体后，置于85%乙醇中，浸泡3分钟；蒸馏水或去离子水轻柔冲洗 1 分钟；TBS 缓冲液轻柔冲洗 3 分钟×3 次。

2、抗原修复：参考一抗说明书。

3、阻断内源性过氧化物酶：去除多余的液体，滴加 100μl 内源性过氧化物酶阻断剂在切片上，将切片置于湿盒内，室温孵育10分钟，TBS 缓冲液轻柔冲洗 3 分钟×3 次。

4、滴加一抗或空白(或阴性)对照试剂：去除多余的液体，滴加 100μl 的抗体试剂或空白(或阴性)对照试剂。盖上湿盒盖子，将湿盒放入恒温箱，37℃下孵育 1 小时，结束后用 TBS 缓冲液轻柔冲洗 3 分钟×3 次。

5、滴加 HRP 酶标记的二抗聚合物：去除多余的液体，滴加 100μl 的 HRP 酶标记的二抗聚合物，将切片置于湿盒内，室温孵育35分钟，TBS 缓冲液轻柔冲洗 3 分钟×3 次。

6、显色：去除多余的液体，滴加 100-200μl 新鲜配制的 DAB 显色液（或 AEC 显色液），室温孵育5 分钟，洗去显色液，终止显色过程。

7、苏木素复染：自来水轻柔冲洗切片，加 100-200μl 苏木素染色液孵育 10-60 秒；分化、冲洗返蓝。（依据不同苏木素染色液的强度调整孵育时间，以最终细胞核呈现淡蓝到深蓝颜色，能为 DAB 显色提供清晰对比背景为宜，过染或不足染色都有可能影响正确结果的判断。）



## 二、操作步骤

8、封片：DAB显色后，将切片置于 85%乙醇中，浸泡 3 分钟；将切片置于 95%乙醇中，浸泡3 分钟；将切片置于无水乙醇中，浸泡 3 分钟；将切片依次置于三缸二甲苯中，每缸浸泡 3 分钟；将组织切片从最后一缸二甲苯中取出后，滴加中性树胶，再用盖玻片贴合载玻片，使中性树胶充盈组织表面，完成封片。AEC显色后用水溶性封片剂封片。

9、结果判读：免疫组化染色结果在光学显微镜下对染色后的切片进行观察并进行判读。

## 染色结果的解释

A、免疫组化染色结果应该建立在一系列对照染色结果都正常的基础上，否则该次染色结果应该被认为是无效的。

B、染色结果阳性（+）：在一系列对照染色结果都正常的基础上，受检组织切片中特定细胞的特定部位见有棕黄色（DAB 显色）或红色（AEC 显色）着色，且无背景染色，表示被测抗原存在表达。

C、染色结果阴性（-）：在一系列对照染色结果都正常的基础上，受检组织切片中特定细胞中未见棕黄色（DAB 显色）或红色（AEC 显色）着色，表示被测抗原无表达或表达量极低。



## 染色方法的局限性

1、标本的固定和前处理、组织的抗原修复、抗体孵育温度及时间或其他实验条件的改变都有可能影响染色结果的正确性。

2、在每一次染色过程中，应该设立空白(或阴性)试剂对照、阳性组织对照及阴性组织对照，且所有对照染色结果都应正常，否则该次实验被认为是无效的。

3、完整的免疫组化实验过程有多个步骤，包括试剂的选择，组织的选择，固定和处理，切片的准备，染色及结果解释。染色前组织的处理方式能直接影响染色效果。不恰当的固定、冰冻、融化、清洗、烘干、切片或被其他组织或液体污染都可能造成假阳性，抗体定位不准确或假阴性结果。固定和包埋方法的不同或是组织内部的不规则也可能造成异常的染色结果。同时，过度或不充分的复染也可能影响结果的正确解释。

4、对免疫组化染色结果的解读应结合病理形态学及其它资料进行。任何染色或其缺失的解释都应以形态学、正确的对照以及其他试验作为补充。

5、试剂可能在未经测试的组织中出现非预期的反应。由于肿瘤或其他病态组织中的抗原表达具有生物变异性，因此无法完全消除被测组织出现非预期反应的可能性。

6、假阳性的结果可能会由于蛋白或底物反应产物的非免疫学结合造成的。它们也可能会由红血球和细胞色素 C 造成的。



## 注意事项

1. 本产品含有生物来源材料，对其进行处理应符合相关要求。
2. 应用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
3. 本产品是否适用于非福尔马林固定组织还未得到证实。
4. 本产品仅限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。
5. 为了您的安全和健康，请穿实验服并戴一次性手套操作。

## 保存条件

2-8℃避光保存，有效期 18 个月。每次使用后应立即放回2-8℃冰箱保存。

