

Immunohistochemistry (IHC) Detection kit

{免疫组化检测试剂盒，兔鼠二抗，即用型}

货号：RK50015

规格：300 T / 1000 T

◆ 产品简介

免疫显色试剂是利用抗体与切片中的靶抗原形成抗原抗体复合物，再通过多聚酶标羊抗鼠/免聚合物与抗原抗体复合物中的抗体结合，最后辣根过氧化物酶催化二氨基联苯胺（DAB）在抗原部位形成棕色沉淀，并可借助显微镜观察其颜色变化，从而在抗原抗体结合部位确定组织、细胞的结构。苏木素复染使组织结构更加清晰明了，利于病理结果判读，本产品主要适用于石蜡切片样本的检测。

◆ 产品组成

产品编号	组分名称	规格（300 T）	规格（1000 T）
RK50015-1	酶标羊抗鼠/免聚合物	30 ml	100 ml
RK50015-2	DAB 底物（20×）	2 ml	6 ml
RK50015-3	底物缓冲液	30 ml	100 ml

◆ 保存条件

冰袋运输，2~8℃保存，有效期 12 个月

◆ 自备材料

抗原修复液，内源性过氧化物酶封闭液，抗体稀释液，二甲苯，乙醇，苏木素，中性树脂封片剂，免疫组化笔

◆ 样本要求

新鲜活检或外科样本组织，10%中性缓冲福尔马林固定，固定时间为 8~24h，参照病理技术规范要求取材、脱水、石蜡包埋并制成蜡块，蜡块应在通风、干燥的专用蜡块柜中储存。蜡块在室温条件下保存有效期为 5 年。组织切片厚度为 3~5 μm 摊片在粘附载玻片上，轻拍切片架并用吸湿纸吸取组织切片中的多余水滴，再放入 60℃（±5℃）的干燥箱中 30~60 min 或在 37℃下放置过夜，从恒温箱中移出，放置室温下冷却。若组织切片室温保存时，为了良好地重现组织中抗原的分布情况，应在 7 天内完成检测；组织切片冷藏（2~8℃）保存时，为了良好地重现组织中抗原的分布情况，应在 3 个月内完成检测。

◆ 操作说明

1. 实验步骤

（1）样本的准备：

- 石蜡切片：依次将切片放入二甲苯I15 min、二甲苯II15min、无水乙醇I5 min、无水乙醇II5 min、95%乙醇 5 min、85%乙醇 5 min、75%乙醇 5 min，超纯水 5 min。
- 冰冻切片：4%多聚甲醛溶液固定 10-30 min，TBST 洗 5 min 重复 3 次，滴加 0.3% Triton X-100 破膜液通透 20 min，TBST 洗 5 min，重复 3 次。

(2) 抗原修复

石蜡组织切片置于盛满 pH 9.0 EDTA 碱性抗原修复液或者 pH 6.0 柠檬酸修复缓冲液修复盒中于微波炉内中火 8 min, 停火 8 min, 转中低火 7 min, 此过程中应防止缓冲液过度蒸发, 切勿干片 (也可以用高温高压蒸汽 1-2 min 或者 100°C 水浴 20 min 等其他热修复方法)。自然冷却后将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

注: 冰冻组织切片为避免脱片, 一般情况下不进行抗原修复步骤。

(3) 阻断内源性过氧化物酶

切片稍甩干后用免疫组化笔在组织周围画圈, 在圈内滴加内源性过氧化物酶封闭液, 以均匀覆盖组织为宜。室温避光孵育 15 min, 将玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。

(4) 染色

- a. 非特异性靶点封闭: 滴加适量的封闭液 (3% 的 BSA 或山羊血清), 以均匀覆盖组织为宜, 室温封闭 30 min。
- b. 孵育一抗: 轻轻甩掉封闭液, 在切片上滴加用抗体稀释液稀释好的一抗, 切片平放于避光湿盒内 4°C 孵育过夜或者 37°C 孵育 1-2 h (湿盒内加少量水防止抗体蒸发)。
- c. 孵育二抗 (羊抗鼠/兔聚合物二抗为即用型, 无需稀释): 玻片置于 TBST 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加适量的酶标羊抗鼠/兔聚合物二抗, 以均匀覆盖组织为宜, 避光室温孵育 60 min, TBST 洗 3 次, 每次 5 min。
- d. 显色: DAB 底物和底物缓冲液按 1:20 比例配制 DAB 工作液, 在组织切片上滴加 DAB 显色工作液, 以均匀覆盖组织为宜, 室温孵育 5 min。
- e. 复染、返蓝: 将稍沥干的切片浸入复染试剂 (苏木素) 中复染切片 3-5 min 后, 用流水清洗 10 min。注意: 染色过程中需一直保持切片处于湿润状态; 染色过程中所有试剂使用过程中均需保证完全覆盖切片上组织; 流水清洗时需避免流水直接对着组织, 或水流过大, 会造成切片掉片。

(5) 脱水、透明和封片

- a. 脱水: 将切片置于 70% 乙醇中, 浸泡 2 min; 置于 85% 乙醇中, 浸泡 2 min; 置于 95% 乙醇中, 浸泡 2 min; 置于无水乙醇中, 浸泡 2 次, 每次 2 min。
- b. 透明: 二甲苯透明, 浸泡 2 次, 每次 2 min。
- c. 封片: 在切片中心滴加适量中性树胶, 并加盖盖玻片, 避免产生气泡。

2. 质量控制

(1) 阳性对照

阳性对照可作为正确组织准备和适当染色技术的指示。每次染色都要包含同一测试条件下的阳性对照片进行比较。已知的阳性组织对照只能用于监控步骤的正确执行和试剂的测试。如果阳性组织对照不能显示适当的阳性染色, 此批实验测试样本的结果应认为是无效的。

(2) 空白对照

每次染色都要包含同一测试条件下的空白对照试剂进行对比。空白对照试剂来代替抗体对组织切片进行染色, 用来判断非特异性着色, 并对抗原部位特异性染色提供更好的解释。

◆ 注意事项

1. 为了您的健康和 safety, 操作时请穿实验服并佩戴一次性手套。
2. 该试剂盒属于科研试剂, 不做其他用途。

3. 实验开始前，应仔细阅读说明书。
4. 该试剂必须是经过严格培训的专业人员在有效期内使用，如发现漏液、污染或变质，请勿使用。
5. 若将该试剂盒中组分和其他公司的产品混合使用，可能会出现染色异常情况。
6. 该试剂使用应采取适当的防护措施，避免试剂同皮肤和眼睛接触，禁止口吸试剂，若皮肤、粘膜等身体部位接触该试剂，及时使用大量水冲洗。
7. 每次染色过程中，必须使用阳性对照片和空白对照试剂，否则结果不可采用。
8. 抗原修复、孵育时间、温度条件或应用其他方法均可能导致错误结果。
9. 样本室温保存时，应在封存7天内染色。否则会因时间长久，导致组织中抗原退变产生假阴性结果。
10. 若阳性组织对照不能显示适当的阳性染色，则说明操作失误，此批测试样本结果应是无效的。
11. DAB 有潜在致突变作用，在使用过程中应特别注意安全防护措施外，对其使用后的废液存放和去毒性处理也应符合相关法律法规要求。
12. 该试剂是否应用于非福尔马林固定组织还未得到证实。