

免疫组化双染显色试剂盒产品说明书

产品名称	免疫组化双染显色试剂盒
产品货号	AFIHC028
产品规格	50T
预期用途	在石蜡组织切片进行免疫组化双染染色，为医师提供诊断的辅助信息。

检测原理 应用免疫学基本原理抗原抗体反应，即抗原与抗体特异性结合的原理，通过化学反应使标记抗体的多聚 HRP 酶分别催化 DAB（棕色产物）和 TY（红色色原特异性结合物）显色来确定组织细胞内抗原（多肽和蛋白质），对其进行定位、定性及定量的研究。HRP 催化二氨基联苯胺（DAB）在抗原部位形成棕色沉积物。HRP 催化中间体 TY 永久性标记抗原且实现信号放大，红色色原特异性识别 TY 产物（共价结合），从而实现了红色信号的累积，完成了红色显色。

主要组分

名称	规格	保存条件
PB 试剂	4ml	-20℃
AC 试剂	2ml	-20℃
CU 试剂	300 μl	-20℃
红色色原	8 μl	-20℃
TY 试剂（100×）	50 μl	2-8℃
TY 缓冲液	4ml	2-8℃
内源性过氧化物酶阻断剂	3ml	2-8℃
Polymer-HRP 羊抗鼠/兔二抗试剂	3ml	2-8℃
DAB 底物（20×）	500 μl	2-8℃
DAB 缓冲液	10ml	2-8℃

使用方法 **DAB 显色工作液配制（即配即用）**：根据需要量，将试剂 A 和试剂 B 以 1:19 的体积比混匀后即为 DAB 显色工作液。也可选择每毫升试剂 B 中滴加 1 滴（约 50μl）试剂 A，混匀即可。

红色显色工作液配制（即配即用）及使用：多聚 HRP 免疫组化二抗试剂孵育完了之后，加入 TY 工作液（TY 试剂（100×）：TY 稀释液=1: 99）反应 20min 左右，然后 PBS 洗三次，之后加入红色显色液工作液（PB 试剂:CU 试剂:红色色原: AC 试剂=860:40:1:100），反应 15 分钟以上（以上试剂使用之前注意解冻恢复为液体状态，必要时混匀离心）

储存条件 各组分按各自条件保存，期限一年。

运输条件 在泡沫箱中放入冰袋，箱体密封后，可在常温下运输且时间不超过一周。



有效期

12个月

检测方法

- 1、样本准备：**石蜡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，蒸馏水中 5min 待用。
- 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℃水煮 15min；100℃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 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）。
- 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、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（防止抗体流走），在圈内滴加用**封闭用正常山羊血清**（或者其他封闭液 3%BSA 溶液）均匀覆盖组织，室温封闭 30min。**额外说明：**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四度保存（在常温下也可以保存一个月之久）
- 5、孵育一抗：**轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用**抗体稀释液**稀释好的的一抗 X，切片平放于避光湿盒内 4℃ 孵育过夜或者 37℃ 孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）；
- 6、孵育多聚 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，避光室温孵育 50min，PBS 洗三次。**额外说明：**本公司可提供**多聚 HRP 山羊抗鼠/兔通用二抗为即用型 (AFIHC001)**，具有超高灵敏度，无需配置。
- 7、DAB 显色：**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新鲜配制的 **DAB 显色工作液**，显微镜下控制显色时间，阳性为棕黄色，自来水冲洗切片终止显色。
- 8、抗体洗脱：**组织切片置于盛满 EDTA 抗原修复缓冲液 (PH9.0) 或者柠檬酸修复缓冲液 (PH6.0) 的修复盒中于微波炉内进行抗原第二次修复。中火 8min，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。（修复液和修复条件根据组织来确定）
- 9、非特异性靶点封闭：**在圈内滴加用**封闭用正常山羊血清**（或者其他封闭液 3%BSA 溶液）均匀覆盖组织，室温封闭 30min。**额外说明：**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



以长期四度保存（在常温下也可以保存一个月之久）

- 10、**孵育一抗**：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加用**抗体稀释液**稀释好的的一抗 X，切片平放于避光湿盒内 4℃ 孵育过夜或者 37℃ 孵育 1-2h（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）
- 11、**孵育多聚 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，避光室温孵育 50min，PBS 洗三次。**额外说明**：本公司可提供**多聚 HRP 山羊抗鼠/兔通用二抗**为即用型（AFIHC001），具有超高灵敏度，随时可用，无需配置。
- 12、**红色显色**：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解冻的 TY 反应液反应 20min，然后 PBS 洗三次，之后加入**红色显色液工作液（PB 试剂:CU 试剂:红色色原: AC 试剂 =860:40:1:100）**反应 15min，显微镜下可控制显色时间，阳性为红色，自来水冲洗切片终止显色。
- 13、**复染细胞核**：苏木素复染 3min 左右，自来水洗，1%的盐酸酒精分化数秒，自来水冲洗，氨水返蓝，流水冲洗。
- 14、**脱水封片**：将切片依次放入 75%酒精 6min-85%酒精 6min -无水乙醇I 6min -无水乙醇II 6min -二甲苯I 5min-二甲苯II 5min 中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树胶封片。
- 15、**镜检拍照**：切片于白光显微镜/数字切片扫描仪系统下观察并采集图像。**苏木素染细胞核为蓝色，第一指标 DAB 显出的阳性表达为棕黄色，第二指标红色显色的阳性表达为红色或粉红色。**

结果判读

注意事项

- 本试剂仅用于科学研究，不作其他用途。
- 开始实验前，应仔细阅读此说明书。
- DAB 显色尽量不要过深，过深会影响红色显色效果
- 双染的两个抗原尽量表达位置不同（如标记不同细胞或者不同表达位置），不适用于两个抗原的共定位（可选择荧光双标的共定位）
- 红色显色抗原所对应的一抗抗体浓度适当提高一些，便于红色显色明显。

基本信息

注册企业	湖南艾方生物科技有限公司
注册地址	长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
生产地址	长沙高新开发区麓云路 100 号兴工国际产业园 11 栋 303B
电 话	073185584686
网 址	www.afantibody.cn



说明书版本

编制日期：2022.2.1

