

免疫显色试剂（双染 B 型）说明书

【产品名称】

免疫显色试剂（双染 B 型）

【包装规格】10 人份/盒、60 人份/盒、100 人份/盒

【预期用途】在免疫组化反应中与抗原抗体结合，通过染色，将靶点进行标记。

【检测原理】本产品基于免疫组化方法，免疫显色试剂（HRP 酶标记的羊抗兔聚合物或 AP 酶标记的羊抗鼠聚合物）识别连接组织切片上的一抗；再通过 DAB 显色系统及 AP-Red 显色系统进行显色，使组织切片中一抗结合的抗原位点出现特异性着色。本产品可在同一张组织切片上同时显示两种抗原的表达，以发现其定位、形态和功能上的相互关系。

【主要组成成分】由过氧化物酶封闭液、HRP 酶标羊抗兔 IgG 聚合物、AP 酶标羊抗鼠 IgG 聚合物、AP-Red 浓缩液、AP-Red 缓冲液、DAB 浓缩液、DAB 缓冲液及苏木素组成。

组份/规格	10 人份/盒	60 人份/盒	100 人份/盒
过氧化物酶封闭液	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1
HRP 酶标羊抗兔 IgG 聚合物	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1
AP 酶标羊抗鼠 IgG 聚合物	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1
AP-Red 浓缩液	0.04mL/瓶 x1	0.15mL/瓶 x1	0.3mL/瓶 x1
AP-Red 缓冲液	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1
DAB 浓缩液	0.1mL/瓶 x1	0.4mL/瓶 x1	0.6mL/瓶 x1
DAB 缓冲液	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1
苏木素	1mL/瓶 x1	6mL/瓶 x1	10mL/瓶 x1

本产品未提供如下试剂和耗材：乙醇（95%）、蒸馏水、中性树脂、阳性质控片、抗原修复液等。

【储存条件及有效期】本产品 2~8℃避光保存，产品有效期为 5 个月，不得冻存。使用时采取单支试剂即拿即用的原则，其余组份在 2~8℃的冰箱保存。按说明书配制成的 DAB 显色液、AP 显色液在 2~8℃避光条件下保存。（采用泡沫箱加冰袋密封的运输方式，时间不大于 7 天，开箱温度不超过 30℃，产品性能无影响。）

【适用范围】适用于人工手动操作。

【样本要求】新鲜活检或 10%中性福尔马林固定的病人组织，参照病理技术规范要求取材、固定（8-24 小时为宜）、脱水、石蜡包埋并制成蜡块。建议组织切片厚度为 3~5 μm，室温下保存并于 10 天内完成实验检测，以确保组织中抗原分布情况的良好重现。

【使用方法】

1. 准备工作：

- 1) 仪器设备：电磁炉，不锈钢高压锅，孵育盒，计时器，免疫组化笔，移液器，染色架，盖玻片，洗瓶，光学显微镜等；
- 2) 溶液配制：
DAB 显色液：将 DAB 浓缩液与 DAB 缓冲液按 1：20 的比例混匀。配制好的 DAB 显色液避光 2~8℃存放，6 小时内有效；
AP 显色液：将 AP-Red 浓缩液与 AP-Red 缓冲液按 1：50 的比例混匀。配制好的 AP 显色液避光 2~8℃存放，20 分钟内有效；
- 3) 反应温度：室温（18℃~37℃）；

2. 操作步骤：

- 1) 样本准备：将切片于 60℃恒温箱中烤片 2 小时，室温保存备用。
- 2) 脱蜡与水化：
 - a. 石蜡切片置于新鲜二甲苯中，浸泡 15 分钟 x2 次。
 - b. 石蜡切片依次置于梯度酒精中（100%，95%，85%，70%），每次 3 分钟。
 - c. 纯化水冲洗 1 次，PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 3) 抗原修复：推荐使用 EDTA/柠檬酸高压热修复法（具体修复液 pH 值请参考一抗说明书），将水化后的组织切片置于抗原修复盒内，放入提前加热的高压锅中，盖上锅盖继续加热从高压锅喷气开始计时 3 分钟，计时结束后取下高压锅用自来水冲淋降压，自然冷却至室温。PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 4) 内源性过氧化物酶灭活：甩掉多余液体，用免疫组化笔将组织圈住，加入 1-3 滴过氧化物酶封闭液完全覆盖组织，室温孵育 10 分钟，PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。

- 5) 兔单抗抗体/亚型对照抗体孵育：加入 1-3 滴即用型抗体或相应的亚型对照抗体完全覆盖组织，37℃湿盒孵育 60 分钟。PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 6) 二抗孵育：加入 1-3 滴 HRP 酶标羊抗兔 IgG 聚合物试剂完全覆盖组织，37℃湿盒孵育 30 分钟，PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 7) DAB 显色：加入 1-3 滴新鲜配制的 DAB 显色液完全覆盖组织，依据颜色变化显色 1-3 分钟，蒸馏水冲洗终止显色。
- 8) 洗脱修复：推荐使用 EDTA/柠檬酸高压热修复法（具体修复液 pH 值请参考一抗说明书），将水化后的组织切片置于抗原修复盒中，放入提前加热的高压锅中，盖上锅盖继续加热从高压锅喷气开始计时 3 分钟，计时结束后取下高压锅用自来水冲淋降压，自然冷却至室温。PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 9) 内源性过氧化物酶灭活：甩掉多余液体，用免疫组化笔将组织圈住，加入 1-3 滴过氧化物酶封闭液完全覆盖组织，室温孵育 10 分钟，PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 10) 鼠单抗抗体/亚型对照抗体孵育：加入 1-3 滴即用型抗体或相应的亚型对照抗体完全覆盖组织，37℃湿盒孵育 60 分钟。PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 11) 二抗孵育：加入 1-3 滴 AP 酶标羊抗鼠 IgG 聚合物试剂完全覆盖组织，37℃湿盒孵育 30 分钟，PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 12) AP 显色：加入 1-3 滴新鲜配制的 AP 显色液完全覆盖组织，依据颜色变化显色 10-15 分钟，蒸馏水冲洗终止显色。
- 13) 苏木素衬染：苏木素染色 1-2 分钟，PBS 冲洗返蓝。
- 14) 封片：用蒸馏水冲洗后，风干；中性树胶对样品进行封片。
- 15) 结果分析：光学显微镜下观察免疫组化染色结果，结果分析应由有资质的病理医师判断。

【检测结果的解释】

1. 抗原修复条件、抗体孵育时间及温度、二抗孵育间及温度以及显色时间不合适均有可能得出错误的结果。
2. 在每一次染色过程中，必须有对照实验同时进行。
3. 实验操作正常情况下，若阴性对照出现阳性染色结果，则判为假阳性，该批实验数据无效。建议重新实验或联系试剂生产厂家排查原因。
4. 如果阳性组织对照不能显示适当的阳性染色，使用者应认为该批次测试样本的结果无效。

【检测方法的局限性】

本试剂仅供体外诊断使用，免疫组化作为一种多步骤的实验技术手段，组织的固定处理方式，切片厚度，试剂的选择中的任一环节的不当操作都有可能影响染色结果。

【产品性能指标】

产品性能符合本公司制定的相关技术要求。

【注意事项】

1. 本产品仅用于免疫组织化学法，不做其他用途。
2. 本产品仅限专业人员使用，应用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
3. 产品中的 DAB 底物液为致癌物质，操作中应采用合理的防护措施。
4. 若将本产品中的组分与其他公司的产品混合使用，在染色过程中可能出现异常情况。
5. 超过有效期的试剂活性可能降低，因此不得使用过期的产品。
6. 为防止可能出现的假阳性、假阴性结果，在实验过程中需设置阳性与阴性对照。
7. 实验中滴加试剂时，过多的缓冲液会导致试剂被稀释，将引起染色强度变弱，因此，滴加试剂前应除去多余的缓冲液。
8. 使用中所产生的各种废弃物都应按《医疗废物管理条例》处理。

【参考文献】

1. 中华医学会.《临床技术操作规范病理学分册》.人民军医出版社,2004.
2. (美)戴博斯(Dabbs,D.J.),《诊断免疫组织化学》.北京大学医学出版社,2008.
3. 刘洪博,刘艳彩,刘铁刚,王文智,邱雷.免疫组化双染技术在肿瘤分析中的应用.《临床与实验病理学杂志》,2016.