

GLUT-1 抗体试剂说明书

APA133

【产品名称】

通用名称：GLUT-1 抗体试剂

英文名称：Mouse Anti Human GLUT-1 Monoclonal Antibody

【检测原理】本抗体试剂基于抗原抗体特异性结合原理，样品组织经过抗原修复后，暴露抗原决定簇的目标靶蛋白与一抗结合，形成抗原与一抗的复合物。然后加入 HRP 酶标多聚物二抗与一抗结合，最后二抗上的 HRP 催化 DAB 显色液中的 H_2O_2 分解，使联苯胺氧化变成联苯亚胺，使组织切片中抗原位点上出现棕色或棕褐色沉积物。借助光学显微镜，通过观察颜色的变化以此判定目标抗原的表达情况。

【主要组成成分】GLUT-1 鼠源性单克隆抗体、缓冲液。

【储存条件及有效期】本产品 2~8℃ 储存，有效期为 12 个月。

【适用范围】适用于人工手动操作或全自动免疫组化染色机自动操作。

【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 μ m，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：PBS 溶液（7.2-7.6），EDTA 抗原修复液，DAB 显色液，各溶液的配制可参见相关说明书；
- 3) 反应温度：室温（18℃~28℃）；
- 4) 抗体工作液：浓缩型抗体建议稀释比例 1：100-400（注：该稀释比例为建议参数，实际使用时会由于实验室差异而有所不同，建议客户在使用前对该浓缩抗体进行检测，以确定最佳稀释度。）；

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. 蒸馏水冲洗 1 次，PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 3) 抗原修复：推荐使用 pH9.0 EDTA 高压热修复法。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，盖上锅盖从高压锅喷气开始计时 3 分钟，自然冷却 10 分钟后，用自来水冲淋使之冷却至室温。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，应用 3% H_2O_2 溶液对切片进行室温孵育 15 分钟，PBS 冲洗 2 次，每次 3 分钟。
- 5) 一抗及亚型对照抗体孵育：加入 1-3 滴抗体工作液或相应的亚型对照抗体完全覆盖组织，室温湿盒孵育 60 分钟。PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 6) 二抗孵育：加入 1-3 滴抗 HRP 羊抗兔/小鼠多聚物标记二抗(即用型)完全覆盖组织，室温湿盒孵育 30 分钟，PBS 冲洗 3 次，每次 3 分钟。
- 7) DAB 显色：加 1 滴 DAB 显色原到 1mLDAB 缓冲液（高对比度）中，依据颜色变化显色 1-3 分钟，蒸馏水冲洗终止显色。

注意：配制好的 DAB 显色液需在 6 小时内使用，否则会影响显色效果。

- 8) 苏木素衬染：苏木素染色 5 分钟，PBS 冲洗返蓝。
- 9) 脱水透明：依次浸泡梯度酒精 70%，85%，95%，100%，每次 3 分钟。二甲苯透明 10 分钟。
- 10) 封片：用中性树胶对样品进行封片。
- 11) 结果分析：光学显微镜下观察免疫组化染色结果。

【检测结果的解释】

1. 染色过程需设立阳性对照片和空白对照试剂，在阳性对照和空白对照显色正常的情况下，结果判读方有意义：
 - a) 阳性结果：组织切片中预期细胞的细胞膜/浆呈棕色或棕褐色着色，无背景染色。
 - b) 阴性结果：组织切片中预期细胞的细胞膜/浆无着色。
2. 实验操作正常情况下，若阳性对照切片不能显示适当的阳性染色，则说明操作错误，该批实验结果无效。建议重新实验或联系试剂生产厂家排查原因。
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. 抗原修复条件，抗体孵育时间，抗体孵育温度及显色时间不合适均有可能得出错误的结果。

【检测方法的局限性】

本抗体试剂仅供科研使用，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，试剂的选择都会影响染色结果。同时，细胞核的不恰当的衬染强度也会影响结果的判读任何结果的判读都必须结合组织形态学结果加以综合分析。

【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. 本产品仅用于科研。
2. 本产品试剂含有叠氮钠作为防腐剂，操作过程中应佩戴合适的个人防护措施，一旦接触皮肤与眼睛应用大量清水冲洗，并及时就医。
3. 实验过程中产生的所有废弃物及废液应严格按照 EHS 及国家相关法规进行处理，避免对人体及环境造成伤害。
4. 高压锅属于特种设备，需严格按照使用说明书注意事项进行操作。

【参考文献】

- 1.Ferrer, C.M. et al. (2014) Mol Cell 54, 820-31.
- 2.Deng, D. et al. (2014) Nature 510, 121-5.
- 3.Agus, D.B. et al. (1997) J Clin Invest 100, 2842-8.
- 4.Macintyre, A.N. et al. (2014) Cell Metab 20, 61-72.
- 5.吴秉铨，刘彦仿.《免疫组织化学病理诊断》第 2 版.北京科学技术出版社,2013.