

## 细胞角蛋白 5&6 抗体试剂说明书

### APA169

#### 【产品名称】

通用名称：细胞角蛋白 5&6 抗体试剂

英文名称：Mouse Anti Human Cytokeratin 5&6 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】**细胞角蛋白 5 鼠源性单克隆抗体、缓冲液；细胞角蛋白 6 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 $\mu$ 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. 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. 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.
3. Moll, R. et al. (1982) Cell 31, 11-24.
4. Chang, L. and Goldman, R.D. (2004) Nat Rev Mol Cell Biol 5, 601-13.