

组化双染试剂盒

货号: HKI0049

【产品信息】

产品名称	产品货号	规格	有效期
组化双染试剂盒	HKI0049-50T	50T	一年
	HKI0049-100T	100T	

【产品简介】

一抗识别抗原，hrp标记二抗识别一抗，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。配合常规免疫组化用DAB，形成棕色物质，棕色与红色，形成特异的组化双染颜色。

【产品组成】

产品组分		50T	100T
试剂 A	TY	4mL	8mL
试剂 B	PB	4mL	8mL
试剂 C	AC	2mL	4mL
试剂 D	CU	300uL	600uL
试剂 E	红色	15uL	30uL
试剂 F	DAB 色原	0.3mL	0.5mL
试剂 G	DAB 缓冲液	10mL	10mL

【储存与运输】

本试剂需低温运输，贮存于-20℃低温环境，有效期一年。

【使用方法】

使用方法: hrp 二抗孵育完成后，加入即用型 TY 反应 20min 左右，然后 PBS 洗三次，之后加入红色显色液工作液 (PB:CU:红色色原: AC=860:40:1:100)，反应 15 分钟以上（以上试剂

使用前注意解冻为液体状态，必要时混匀离心）。

其他自备试剂：高敏多聚 HRP 组化二抗，一抗，3%过氧化氢，等。

石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯 I 15min-二甲苯 II 15min-无水乙醇 I 5min-无水乙醇 II 5min-85%酒精 5min-75%酒精 5min-蒸馏水洗。

抗原修复：组织切片置于盛满抗原修复缓冲液的修复盒中于微波炉内进行抗原修复，中火 8min 至沸，停火 8min 保温再转中低火 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。

阻断内源性过氧化物酶：切片放入 3%过氧化氢溶液（30%双氧水：纯水=1:9），室温避光孵育 25 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。

BSA 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 3%BSA 均匀覆盖组织，室温封闭 30min。

加一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 BSA 按一定比例配好的第一指标一抗，切片平放于湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

加二抗：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二抗（HRP 标记）覆盖组织，室温孵育 50min。

DAB 显色：将 DAB 色原与 DAB 缓冲液按 1：100 配制成工作液，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 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。

抗原修复：组织切片置于盛满抗原修复缓冲液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）

BSA 封闭：切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈（加固防止抗体流走），在圈内滴加用 3%BSA 均匀覆盖组织，室温封闭 30min。

加一抗：轻轻甩掉封闭液，在切片上滴加 PBS 按一定比例配好的第二指标一抗，切片平放于避光湿盒内 4° C 孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

加二抗: 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二抗 (HRP 标记) 覆盖组织, 室温孵育 50min。

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预解冻的 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:CU:红色色原: AC=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。

复染细胞核: Harris 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。

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 中脱水透明, 将切片从二甲苯拿出来稍晾干, 中性树胶封片。

显微镜镜检, 图像采集分析。

石蜡切片免疫组化结果判读:

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。

【注意事项】

1. DAB 显色尽量不要过深, 过深会影响红色显色效果
2. 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 (不同于荧光的共定位)
- 3 红色显色抗原所对应的一抗抗体浓度适当提高一些, 组化二抗应使用高敏多聚二抗。

【金山文档 | WPS 云文档】 组化双染试剂盒 HKI0048 说明书 20230906

<https://kdocs.cn/l/c1Nsd8XI204y>