

小鼠/兔特异性 HRP/DAB IHC 检测试剂盒说明书

【产品介绍】

KEL 小鼠/兔特异性 HRP/DAB IHC 检测试剂盒主要用于免疫组织化学染色中的显色反应。该试剂盒采用最新的两步法信号放大结合聚合物技术，具有极高的灵敏度。首先，一抗与切片中的靶抗原结合，形成抗原-抗体复合物。该复合物随后与二抗试剂 A（羊抗小鼠/兔 IgG）结合，再通过 HRP 酶标抗羊 IgG 聚合物（二抗试剂 B）与二抗试剂 A 结合。最后，HRP 催化 DAB 在抗原部位形成棕色沉淀，完成显色反应。

【储存条件及有效期】

2~8℃ 避光保存，不得冻存；产品有效期为 12 个月。

使用时即拿即放，单支试剂使用后应立即放回冰箱，开封后试剂有效期 6 个月。

【规格及组分】

Cat.No: KC006

组分名称	规格	产品货号
二抗-A液（增强型）	6ml	KC006-A
二抗-B液（增强型）	6ml	KC006-B
DAB-B液（稀释液）	6.0ml	KC006-C
DAB-A液（浓缩液）	0.24ml	KC006-D

【样本要求】

1. 标本类型：活检或手术切除标本。
2. 标本固定：所有组织标本离体后（1 小时内）尽快采用 10% 中性缓冲福尔马林固定，固定液与所浸泡组织的比例应足够。固定时间以 8~24 小时为宜。
3. 组织切片：未染色的切片应置于 2~8℃ 避光保存，不宜置于室温，以防抗原丢失。切片厚度 4~5μm 黏附在防脱玻片上，56~60℃ 烤片 0.5 小时。

【检验方法】

1. 检验所需仪器、设备：移液器、恒温箱、高压锅、免疫组化笔、计时器、孵育盒、染色架、盖玻片、光学显微镜、洗瓶等。
2. 试剂准备：DAB 显色液需要在使用前配制，DAB A 液和 B 液按 1:25 的比例搭配使用。

3. 操作程序：

3.1 手工染色

3.1.1 脱蜡、水化和抗原修复：

- 1) 脱蜡前，应将切片在烘片机上 60℃ 烘烤 30 min；
- 2) 切片置于二甲苯中浸泡，更换 2 次二甲苯，每次浸泡 10 min；
- 3) 切片置于无水乙醇中浸泡两次，每次 5 min，95℃ 乙醇中浸泡 5 min，75% 乙醇中浸泡 5 min；
- 4) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min；
- 5) 玻片置于 EDTA pH9.0 热修复 20 min 后自然冷却至室温；
- 6) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min。

3.1.2 手工染色步骤：

- 1) 内源性过氧化物酶屏蔽。使用 3% 的双氧水滴加在切片上室温静置 10 min，此步骤应避光操作；
 - 2) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min；
 - 3) 滴加 100ul 即用型一抗在切片上（需全面覆盖样本），室温孵育 30 min；
 - 4) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min；
 - 5) 除去 PBS 缓冲液，滴加 100ul 二抗-A 液于切片上，室温孵育 15 min；
 - 6) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min；
 - 7) 除去 PBS 缓冲液，滴加 100ul 二抗-B 液于切片上，室温孵育 15 min；
 - 8) PBS 缓冲液洗 3 次，每次 3 min；
 - 9) 应用 DAB 显色液显色，5-8 min。自来水冲洗终止反应；
 - 10) 应用苏木素复染，滴加苏木素于切片上，静置 10-30s，用自来水温柔冲洗结束染色；
 - 11) PBS 溶液或自来水冲洗返蓝；
 - 12) 自来水浸泡 1 次，75% 乙醇脱水处理 1 次，95% 乙醇脱水处理 1 次，100% 乙醇脱水处理 2 次，每次室温下静置 3 min；
 - 13) 用二甲苯透明 3 次，每次 3 min；
 - 14) 使用中性树胶加盖片，完成染色。
4. 结果判断每一批次检测样本应同时设立阳性/阴性对照，最终检验结果由具有临床资质的病理医生来判读以便确定检验结果能否用于相对应病人的辅助诊断。
- 阳性：检测组织目标细胞可观察到棕黄色细胞质，且无背景染色。
- 阴性：检测组织目标细胞未观察到棕黄色细胞质。

【检验方法局限性】

免疫组化是一种多步骤病理诊断的过程，试剂的选择，组织的选择，固定和处理，切片的准备，染色及结果的解释需要进行专门的培训。

任何阳性或阴性结果的解读，应由病理医生结合病理形态、临床表现及其他检测方法进行，不作为单独的诊断指标。

不恰当的染色前组织处理直接影响染色效果，造成假阳性、抗体定位不准或者假阴性。结果不一致可能是由样本固定和包埋方法不同或者组织样本内固有差异造成的。

复染过度或不足可能影响结果的判读。

阴性结果表示未检出抗原，不一定样本中无该抗原存在，目的抗原编码基因变异、抗原低表达、抗原修复不当或孵育时间不足等，都会造成该抗原无法检出。

假阳性的结果可能是由蛋白或底物反应产物的非免疫学结合造成的，也可能是由红蛋白和细胞色素 C 造成的。

【产品性能指标】

装量：试剂盒各组份的溶液装量应不少于标示装量。

符合性：取符合性组织片（包括阳性组织对照和阴性组织对照），经相应的免疫组化实验后，应阳性着色定位准确，且无背景染色；同时，空白对照和阴性对照染色结果为阴性。

批内重复性：取同一批次的试剂盒，检测组织片 3 片，染色强度和定位无明显差异。

【注意事项】

本染色液仅用于免疫组化，不做其他用途。

本染色液仅限专业人员使用。

应用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。

若将本染色液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。

超过有效期的试剂活性可能降低，因此不得使用过期的试剂盒。

脱蜡不彻底，容易影响染色效果，建议免疫组化切片脱蜡与常规 HE 脱蜡分开。

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。

实验中滴加试剂时，过多的 PBS 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。

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。

【说明书核准日期】

说明书核准日期为 2025/11/16