

组化双染试剂盒

原理介绍：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。常规免疫组化染色用DAB，形成棕色物质。DAB棕色+红色，形成了独特的组化双染颜色，该组化双染信号可以中性树胶封片，不同于传统的碱性磷酸酶 AEC或AP-red等红色信号（不能中性树胶封片）。

试剂盒规格：100T

试剂盒货号：RCF040R

储存温度：4度/-20度，一年有效

试剂盒组成：

名称	货号	规格	保存条件
TY原液(100x)	RCF040-1A	60 μ l	4℃
TY稀释液	RCF040-1B	6mL	4℃
PB	RCF040-2	10mL	-20℃
AC	RCF040-3	1.2mL	-20℃
CU	RCF040-4	500 μ l	-20℃
红色色原	RCF040-5	100 μ l	-20℃
DAB原液(100x)	RCD002-A	60 μ l	4℃
DAB稀释液	RCD002-B	6mL	4℃
高敏多聚体hrp抗兔二抗	RCA054	10mL	4℃
抗体稀释液	RCT002	20mL	4℃
3%过氧化氢	RC012	20mL	4℃

***红色显色使用方法：** hrp二抗孵育完了之后，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:AC:红色色原=86:4:10:1)，反应15分钟以上（以上试剂使用之前注意解冻恢复为液体状态，使用前混匀离心）

其他自备试剂： PBS，修复液，苏木素等

操作流程如下：

1、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。

2、抗原修复：组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液（PH8.0）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；也可以用其他抗原修复方式，比如：95度水浴25min 或者高压等。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。

3、阻断内源性过氧化物酶：切片放入3%过氧化氢溶液（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。

4、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。

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

6、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。

7、DAB显色：将DAB与DAB 稀释液按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。

8、抗原修复：组织切片置于盛满EDTA抗原修复缓冲液（PH8.0）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。也可以用其他抗原修复方式，比如95度水浴25min 或者高压等。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）

9、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。

10、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℃孵育过夜。（湿盒内加少量水防止抗体蒸发）

11、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。

12、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TY反应液（TY原液：TY稀释液=1:100）反应20min，然后PBS洗三次，之后加入红色显色液工作液（PB:CU:AC:红色色原=86:4:10:1）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（染色时间可延长，以具体染色强度为准）。

13、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。

14、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 -二甲苯 II 5min中脱水透明，将切片从二甲苯拿出来稍晾干，中性树脂胶封片。

15、镜检成像：显微镜镜检，图像采集分析。

石蜡切片免疫组化双染结果判读：

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。

组化双染注意事项：

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。
4. 可以第一标染红色，第二标染DAB棕色