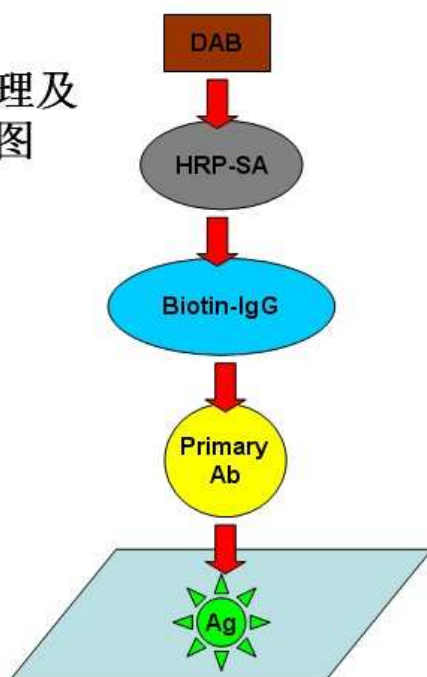


## 人 TNF- $\alpha$ 免疫组化试剂盒

该试剂盒以 HRP 标记的链霉亲和素复合物（HRP Streptavidin Conjugate, HRP-SA）为基础，可用于检测细胞、组织内的特异性 TNF- $\alpha$  抗原。该试剂盒具有灵敏度高、特异性强、定性定位准确、背景清晰。在所用的 TNF- $\alpha$  一抗与相应靶抗原结合后，用生物素化二抗与一抗特异性结合，最后加入 HRP-SA，形成抗原—特异一抗—生物素化二抗—HRP-SA 复合物，显微镜下观察成像。

### 试剂盒原理及主要步骤图



### 试剂盒所含试剂:

- 试剂 A 通透液: 0.1% Triton-X 100 10 mL (选用)
- 试剂 B 封闭缓冲液 (封闭用) 20 mL
- 试剂 C (原装进口分装) 已稀释的即用型 TNF- $\alpha$  一抗 (2.5ml)
- 试剂 D (原装进口分装) 生物素化羊抗兔 IgG 1 支  
(浓度 1.5 mg/mL, 稀释比为 1:300~1:500) 50  $\mu$ L+抗体稀释液 20ml
- 试剂 E HRP-SA 复合物 1 支 (浓度 1  $\mu$ M, 稀释比 1:50~1:200) 100  $\mu$ L
- 试剂 F DAB 显色液 5ml

### 用户自备试剂:

- 10mM TBS (pH7.2~7.4)  
三羟基氨基甲烷 1.21g  
氯化钠 7.6g

加蒸馏水 800mL, 浓盐酸调 pH 值至 7.2~7.4, 最后定容至 1000mL

TBS-T: TBS+Tween 20 (0.05%体积比)

2. 抗原修复液 (依检测抗原不同而选择不同的修复液)

10mM pH6.0 柠檬酸缓冲液

柠檬酸 0.38g

柠檬酸三钠 2.45g

加蒸馏水 900mL, 浓盐酸调 pH 值至 6.0, 最后定容至 1000mL

或: 0.5M EDTA 修复液 (pH8.0)

EDTA • 2H<sub>2</sub>O 186.1g

柠檬酸三钠 2.45g

加蒸馏水 700mL, 用 10mM NaOH 调 pH 值至 8.0, 最后定容至 1000mL

3. 缓冲甘油封固剂 10 mL

4. Tween 20 5 mL

## 石蜡包埋组织切片免疫染色

### 实验步骤 (建议方案):

石蜡包埋组织切片 3~4 μm 厚度

1. 烤片: 将待做切片置于切片架上, 于 60°C 恒温烤箱中至少烤 1 hr;
2. 脱蜡: 切片放入盛有二甲苯的容器中脱蜡 3 次 (即二甲苯 I、II、III), 每次 10 min;
3. 水化: 切片经下行酒精水化, 无水乙醇 5min, 95%乙醇 2 次 (每次 2min), 85%乙醇 2 min; 75%乙醇 2min, 自来水冲洗, ddH<sub>2</sub>O 洗 2×2min;
4. 抗原修复: 根据抗体说明书推荐方法进行抗原修复, 常采用高压、微波 (温度达到 98~100°C) 或酶消化修复法, 室温自然冷却, 自来水冲洗, ddH<sub>2</sub>O 洗 2×2min, TBS 洗涤 (2×2min) (具体修复方法见附 1) \* 注: 有些抗原勿需修复, 直接进入第 5 步封闭。
5. 封闭: 滴加试剂 B, 37°C 湿盒孵育 30 min;
6. 加一抗: 滴加用试剂 C (即用型一抗), 37°C 湿盒孵育 2 hr 或 4°C 过夜;
7. 洗涤: TBS-T 洗涤 (3×5 min);
8. 封闭: 滴加试剂 B, 37°C 湿盒孵育 10 min;
9. 加二抗: 滴加用抗体稀释液稀释的生物素化二抗 (试剂 D), 37°C 湿盒中孵育 30 min;
10. 洗涤: TBS-T 洗涤 (3×5 min);
11. 封闭: 滴加试剂 Tween 20, 37°C 湿盒孵育封闭 20 min;
12. 加 HRP-SA: 滴加用试剂 C 稀释的试剂 E (1: 50~200, 终浓度 5~20 nM), 37°C 湿盒中孵育 30 min;
13. 洗涤: TBS-T 洗涤 (3×5 min), TBS 洗涤 (2×5 min);
14. 显色: 应用 DAB 溶液 (试剂 F) 显色;
15. 复染: 自来水充分冲洗, 复染, 脱水, 透明;

16. 封片：待组织标本干后，用试剂缓冲甘油封固剂封片；

17. 观察成像：显微镜下观察成像。

### **注意事项：**

1. 修复后缓冲液须自然冷却，自来水冲洗后方能把切片取出，骤冷有可能导致结晶或抗原封闭。
2. 缓冲液的量必须保证所有切片都能浸泡到，用过的柠檬酸缓冲液不能反复使用。
3. 若试剂为微量浓缩液，用前应低速离心，将内盖和管壁附着的溶液离到底部。
4. 封片前一定要换用 TBS 充分洗涤，以便洗去组织上残留的 Tween 20，否则会影响结果观察。
5. 如须复染细胞核，则在封片前复染或直接采用含有染核试剂的封片剂进行封片。

### **附 1：**

### **抗原修复方法**

常用抗原修复液：柠檬酸缓冲液（0.01M pH6.0）、EDTA 抗原修复液（pH8.0 或 9.0）等等。

#### **一、酶消化修复法**

切片脱蜡水化处理，TBS 冲洗，在组织上滴加胃蛋白酶或胰蛋白酶，37℃ 孵育 20~30min 后 TBS 冲洗即可。

#### **二、微波抗原修复法**

微波盒中加入抗原修复液微波加热至沸腾，将脱蜡水化后的切片置于耐高温塑料切片架上，放入已沸腾的缓冲液中，中档或高档继续微波 10~15min，取出微波盒冷却至室温后，自来水冲洗，取出切片。因不同微波炉微波处理时间存在差异，须自行调整。

#### **三、直接高压抗原修复法**

取修复液于不锈钢高压锅中加热至沸腾，将组织切片置于耐高温切片架上，修复液沸腾后放入切片架，盖上锅盖，待喷气后计时 1.5~2.5min 即可脱离热源，自然冷却至室温后自来水冲洗，取出切片。此方法适用于较难检测或核抗原的修复。

#### **四、隔水式高压抗原修复法**

不锈钢高压锅中加自来水加热至沸腾，微波盒中加入修复液于微波炉中加热至沸腾，将切片放入微波盒中，再将微波盒放入高压锅中盖上锅盖，待喷气后计时 4~8 min 即可关闭热源，自然冷却至室温后自来水冲洗，取出切片。此方法适用于较难检测或核抗原的修复。