



Perforin 说明书

说明书编号: MyM1-PRF253

(本抗体仅供研究使用, 不用于临床诊断)

【产品名称】

通用名称: Perforin
抗体类型: 单克隆鼠抗人抗体
克隆号: MyM1-PRF
同种型: IgG
染色定位: 细胞质
阳性对照: 脾脏
反应种属: 人体组织, 其余种属未测试

【产品编号及包装规格】

浓缩液:	MYG052-2	0.2ml/瓶
工作液:	MYG052-3	3.0ml/瓶
工作液:	MYG052-6	6.0ml/瓶

【预期用途】

本抗体试剂适用于福尔马林固定、石蜡包埋的人体组织切片的**免疫组织化学染色**, 用于标识 Perforin 蛋白在组织中的表达。

Perforin 是一种细胞毒性 T 淋巴细胞胞浆内的小孔形成蛋白, 可破坏相应的靶细胞膜而使该细胞发生凋亡。在 CD8 阳性的活性 T 细胞中增量表达, 在 K 细胞中存在稳定的高表达, 在某些 CD4 阳性的 T 细胞也存在表达。主要用于有宿主传播的疾病、慢性肾排斥和外周 T 细胞瘤以及 NK 细胞淋巴瘤的研究。

(注: 对免疫组化染色结果的解读应结合病理形态学及其它资料进行, 本染色结果不作为诊断指标。)

【主要组成成分】

单克隆鼠抗人 Perforin 蛋白抗体, 克隆号: MyM1-PRF, 免疫球蛋白分型: IgG。本产品为组织培养上清, 含有 0.05 mol/L Tris-HCl (pH 7.2)、0.015 mol/L 叠氮钠 (N_3Na) 及蛋白稳定剂。

【储存条件及有效期】

试剂需在 2-8℃ (不可低于 0℃) 避光保存。每次使用后应立即放回 2-8℃ 冰箱保存。有效期见产品外包装。(注: 如果试剂未按上述条件储存, 可能影响其使用效果。)

【免疫组化染色原理】

在免疫学中, 抗原抗体分子由于结构的互补和彼此亲和性会发生特异性结合, 基于此原理, 抗体将会与待测人体组织及细胞中特异的抗原/蛋白结合。随后通过氧化还原化学反应使标记抗体的酶显色剂显色, 从而显示组织及细胞内的抗原分布。

首先, 本抗体与待测组织上的抗原特异性结合; 其次, 酶标抗小鼠/兔 IgG 聚合物识别已经连接上抗原的抗体; 再次, 加入显色底物, 聚合物上的辣根过氧化物酶可以催化 DAB 显色液中的 H_2O_2 分解, 使联苯胺氧化变成联苯亚胺, 从而使组织切片中抗原位点处出现黄色或棕黄色着色; 最后对样本进行复染和封片。通过显微镜观测显色情况, 推断组织切片上该抗原的存在位置和表达情况。

【样本要求】

新鲜活检或手术样本组织, 经 10% 中性福尔马林溶液固定 6-24 小时, 按技术规范要求进行取材、脱水、石蜡包埋制成蜡块。蜡块在常温条件下保存有效期 5 年。

对本蜡块进行切片, 厚度 3-5 μm , 粘附在经防脱处理的载玻片上, 在 58-60℃ 恒温箱中烤片 1 小时, 以备染色。暂不使用的白片在室温 (15-25℃) 下保存 (最好抗氧化处理), 为了良好地重现组织切片中的抗原分布情况, 建议在 7 日内完成免疫组化染色。

【染色方法】

以下针对手工免疫组化法推荐的配置及步骤, 如果采用自动化免疫组化仪器进行染色, 请根据不同的仪器及显色试剂盒进行调整。一次完整的免疫组化实验应设立阳性组织对照、阴性组织对照以及空白 (或阴性) 试剂对照, 对实验结果的评估及验证请参照【质量控制】和【染色结果的解释】。

1) 所需仪器、设备:

电磁炉、不锈钢锅、计时器、孵育湿盒、染色架、染色缸、盖玻片、光学显微镜 (40×-200×)、洗瓶、抽纸、移液器等。

2) 试剂、材料准备:

本抗体试剂工作液使用前无需稀释, 如为浓缩液, 使用前推荐用 PBS 缓冲液或抗体稀释液按 1:100-1:200 稀释成工作液。PBS 缓冲液、抗原修复液、二抗以及 DAB 显色液等试剂的配制请参见各产品说明书。

实验所需的其它材料如下所示:

PBS 缓冲液 (pH7.2-7.4)、Tris-EDTA 抗原修复液 (pH9.0)、内源性过氧化物酶阻断剂、HRP 酶标记的抗小鼠/兔 IgG 聚合物、DAB 显色液、苏木素染色液、空白 (或阴性) 对照试剂、阳性及阴性对照组织切片、二甲苯或二甲苯替代品、乙醇 (无水、95%、85%)、蒸馏水或去离子水、封片剂 (如中性树胶)、防脱载玻片、盖玻片等。

3) 实验温度条件: 室温 18℃-28℃。

4) 实验步骤:

A、脱蜡和水化

(1) 将组织切片依次置于 2 缸新鲜二甲苯中, 各浸泡 10 分钟;

(2) 将组织切片依次置于无水乙醇、95%乙醇、85%乙醇中, 各浸泡 5 分钟;

(3) 蒸馏水轻柔冲洗 1 分钟, 冲洗后浸泡在蒸馏水中准备修复。

B、抗原修复 (高压修复)

(1) 取配制好的 Tris-EDTA 抗原修复液 (pH9.0) 于高压锅中, 将脱蜡水化后的组织切片置于耐高温塑料切片架上, 放入修复液中, 确保组织切片完全浸入修复液;

(2) 盖上锅盖, 扣上压力阀, 大火 (1600W/210℃) 加热至喷气, 从喷气开始计时 2 分钟并调至中火 (800W/130℃), 计时结束后, 关闭电磁炉, 将高压锅平稳移离热源, 自然冷却 5 分钟;

(3) 将高压锅平稳转移至水槽中, 打开流水浇至锅盖, 使锅盖降温, 直至自动锁芯落到原位, 关闭流水, 取下限压阀, 小心打开锅盖 (注意蒸汽烫伤), 再向锅内缓慢注入流水 (避免流水直接冲向组织切片);

(4) 待温度降至 40℃ 以下时 (水温不烫手), 取出切片架并快速浸入蒸馏水中 (避免干片), 用蒸馏水轻柔冲洗 3 分钟×2 次, 冲洗后浸泡在蒸馏水中准备画圈。

(注: 修复后组织切片易干片, 后续操作中“甩去组织切片多余液体”皆需注意不能让组织干片, 否则会影响染色效果。)

C、阻断内源性过氧化物酶

(1) 甩去组织切片多余液体, 将玻片快速置于过氧化物酶阻断剂 (3% H_2O_2) 中浸泡 10 分钟;

(2) 阻断结束, 用蒸馏水轻柔冲洗 3 分钟×2 次, 冲洗后浸泡在蒸馏水中准备画圈。

D、画圈

甩去或小心拭去组织切片周围多余液体, 用免疫组化油笔围绕组织画圈, 画圈位置应距组织边缘 2-3mm 处, 确保整个圈包围全部组织后用蒸馏水轻柔冲洗 3 分钟×2 次, 冲洗掉多余油液后浸泡在 PBS 缓冲液中准备一抗孵育。

E、滴加一抗或对照试剂

(1) 甩去组织切片多余液体, 待油笔画的圈完全显现后滴加一抗工作液使其完全覆盖组织, 在湿盒中室温孵育 30 分钟;

(2) 一抗孵育结束, 用 PBS 缓冲液冲洗 2-3 次, 再转移到 PBS 缸中浸洗 2 分钟×3 次。

(注: 实验过程中, 使用 PBS 缓冲液冲洗组织切片时, 勿直接冲洗组织表面, 否则可能导致掉片。)

F、滴加 HRP 酶标记的二抗聚合物

(1) 甩去组织切片多余液体, 待油笔画的圈完全显现后滴加一步法二抗试剂使其完全覆盖组织, 在湿盒中室温孵育 20 分钟;

(2) 二抗孵育结束, 用 PBS 缓冲液冲洗 2-3 次, 再转移到 PBS 缸中浸洗 2 分钟×3 次。

G、滴加 DAB 显色剂

(1) 甩去组织切片多余液体, 滴加新鲜配制的 DAB 显色剂使其完全覆盖组织, 在湿盒中室温孵育 5 分钟;

(2) DAB 孵育结束, 将玻片上的 DAB 震落于纸巾上, 再放入蒸馏水中充分冲洗 3 分钟×2 次, 终止染色。

H、复染、返蓝

(1) 蒸馏水充分冲洗后, 置于苏木素染色液中复染 8-10 秒, 复染后用蒸馏水冲洗干净;

(2) 复染后, 置于 1% 碳酸锂溶液中返蓝 8-15 秒, 返蓝后用蒸馏水冲洗干净。

(注: 依据不同苏木素染色液的强度调整复染时间, 以细胞核呈现淡蓝到深蓝颜色为宜, 过染或不足染色都有可能影响结果的判断。)

I、脱水、透明、封片

(1) 甩去组织切片多余液体, 将组织切片依次置于 85%乙醇、95%乙醇、无水乙醇中, 各浸泡 3 分钟;

(2) 脱水结束, 将组织切片置于新鲜二甲苯中, 浸泡 5-10 分钟;

(3) 待组织切片呈透亮状态后即可使用中性树胶和盖玻片封片。

5) 结果判读:

免疫组化染色结果要由有经验的专业人员在光学显微镜下对染色后的切片进行观察并进行判读。

【质量控制】

在开始解读待检标本的染色结果前, 应该先对试剂对照及组织对照等一系列质控的染色结果进行分析确认, 与已知的阳性和阴性结果对比, 并参考既往质控的染色结果。只有一系列对照都显示了与已知相符的染色结果, 待检标本的染色结果才被认为是有效的。一次完整的免疫组化实验应设立阳性组织对照、阴性组织对照以及空白 (或阴性) 试剂对照, 以确保整个实验过程是准确可控的。

阳性组织对照应该是新鲜的活检或手术标本, 按照与待检标本相同的方法进行固定、前处理及石蜡包埋制片的。理想的阳性组织对照应该已知含有被测抗原**高表达**及**低表达**二种情况, 以确保实验结果能体现出不同待检标本中的不同抗原表达水平, 尤其可避免漏检低表达的病例。正常的阳性组织对照染色结果表明待检标本组织制备正确, 染色方法适当。每次染色实验均需要设立阳性组织对照。如果阳性组织对照未能显示正确的阳性染色, 则该次待检标本的染色结果应该被认为是无效的。(注: 阳性组织对照染色结果正常仅能表明实验流程及试剂的性能符合要求, 并不能作为待检标本染色结果特异性的评价标准。)

阴性组织对照也应是按照与待检标本相同的方法进行固定、前处理及石蜡包埋制片的, 并且已知其中没有被测抗原的表达。每次染色实验均需要设立阴性组织对照, 以确认抗体的性能, 并能够提供特异性染色的背景。大多数时候待检标本组织切片内会含有不同的细胞类型, 那些阴性的细胞可作为内部的阴性组织对照。如果阴性组织对照出现了特异性阳性染色, 则该次待检标本的染色结果应该被认为是无效的。

空白(或阴性)试剂对照可选择用 PBS 缓冲液或与一抗同源的 IgG 替代一抗进行实验，目的是评估一抗的特异性染色，判断是否存在非特异性着色，并对抗原部位特异性染色提供更好的解释。空白(或阴性)对照试剂的孵育时间和温度应与一抗一致。

【染色结果的解释】

免疫组化染色结果要由有经验的专业人员在光学显微镜下对染色后的切片进行观察并进行判读。

- A、 免疫组化染色结果应该建立在一系列对照染色结果都正常的基础上，否则该次染色结果应该被认为是无效的。
- B、 染色结果阳性（+）：在一系列对照染色结果都正常的基础上，受检组织切片中特定细胞的特定部位见有棕黄色着色，且无背景染色，表示被测抗原存在表达。
- C、 染色结果阴性（-）：在一系列对照染色结果都正常的基础上，受检组织切片中特定细胞中未见棕黄色着色，表示被测抗原无表达或表达量极低。

【染色方法的局限性】

- 1) 标本的固定和前处理、组织的抗原修复、抗体孵育温度及时间或其他实验条件的改变都有可能影响染色结果的正确性。
- 2) 在每一次染色过程中，应该设立空白(或阴性)试剂对照、阳性组织对照及阴性组织对照，且所有对照染色结果都应正常，否则该次实验被认为是无效的。
- 3) 完整的免疫组化实验过程有多个步骤，包括试剂的选择，组织的选择，固定和处理，切片的准备，染色及结果解释。染色前组织的处理方式能直接影响染色效果。不恰当的固定、冰冻、融化、清洗、烘干、切片或被其他组织或液体污染都可能造成假阳性，抗体定位不准确或假阴性结果。固定和包埋方法的不同或是组织内部的不规则也可能造成异常的染色结果。同时，过度或不充分的复染也可能影响结果的正确解释。
- 4) 对免疫组化染色结果的解读应结合病理形态学及其它资料进行。任何染色或其缺失的解释都应以形态学、正确的对照以及其他试验作为补充。
- 5) 试剂可能在未经测试的组织中出现非预期的反应。由于肿瘤或其他病态组织中的抗原表达具有生物变异性，因此无法完全消除被测组织出现非预期反应的可能性。
- 6) 假阳性的结果可能会由于蛋白或底物反应产物的非免疫学结合造成的。它们也可能会由红血球和细胞色素 C 造成的。

【注意事项】

- 1) 本产品仅用于研究，不做其它用途。
- 2) 本产品需由专业人员使用。
- 3) 本产品含有生物来源材料，对其进行处理应符合相关要求。
- 4) 应用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
- 5) 本产品是否适用于非福尔马林固定组织还未得到证实。
- 6) 本产品含有叠氮钠作为防腐剂，叠氮钠可以和铅铜反应而形成易爆炸的金属叠氮化合物。为防止金属叠氮化合物的形成，应用大量的水冲洗以免其堆积。

【参考文献】

[1] Bittmann I, et al. Fas/FasL and perforin/granzyme pathway in acute rejection and diffuse alveolar damage after allogeneic lung transplantation- a human biopsy study. Virchows Arch. 2004; 445:375-81.

[2] d’Amore ES, et al. Anaplastic large cell lymphomas: a study of 75 pediatric patients. Pediatr Dev Pathol. 2007; 10:181-91.

【生产企业】

广州勉易生物科技有限公司
Myabtech Biological Inc.

地 址:	广州市黄埔区神舟路 18 号润慧科技园 5 栋（自编号 C-3）1402 房
电话号码:	020-89858157
Address	Room 1402, Building F (Self-designated C-3), No. 18 Shenzhou Road, Huangpu District, Guangzhou City
Telephone	020-89858157