



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110361245 A

(43)申请公布日 2019.10.22

(21)申请号 201910695516.5

(22)申请日 2019.07.30

(71)申请人 河南赛诺特生物技术有限公司

地址 450001 河南省郑州市高新技术产业  
开发区翠竹街1号109号

(72)发明人 刘玲玲 梁永波 刘畅 张会娟  
陈玲 瞿素芳 牛银银 李莉  
齐华 刘文弟

(74)专利代理机构 郑州睿信知识产权代理有限  
公司 41119

代理人 牛爱周 吴晓亭

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

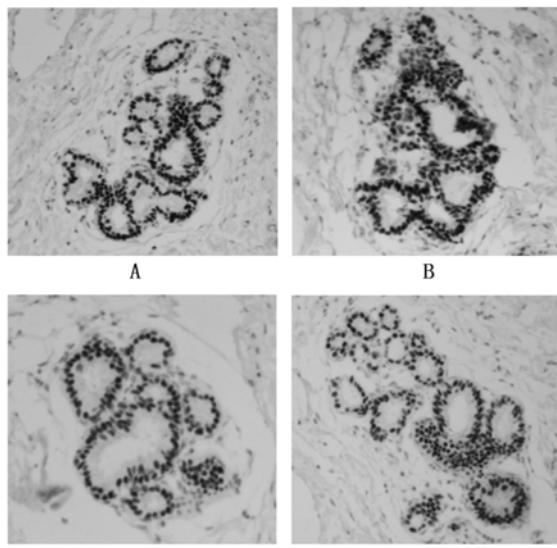
权利要求书1页 说明书7页 附图4页

(54)发明名称

一种DAB免疫显色试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种DAB免疫显色试剂盒及其应用，属于DAB免疫显色技术领域。本发明中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液；其中A液为包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris-HCl；B液中包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris-HCl。本发明中DAB免疫显色试剂盒中加入了牛血清白蛋白，能够维持DAB显色底物的颜色；加入的焦磷酸二氢二钠可以在缓冲液体系中非常好的保护过氧化氢；两者配合得到的A液和B液混合后室温放置24小时后，仍然具有较好的显色效果。



1. 一种DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:包括A液和B液;其中A液包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3' -二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris;B液包括Triton X-100、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、焦磷酸二氢二钠和Tris。

2. 根据权利要求1所述的DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:所述A液中聚乙二醇的体积比为85-95%。

3. 根据权利要求2所述的DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:所述A液中牛血清白蛋白、3,3' -二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris的质量-摩尔比为:0.5-2g:10-50g:4-6mmol。

4. 根据权利要求1所述的DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:所述A液的pH为7.5-8.0。

5. 根据权利要求1所述的DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:所述B液中Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris的体积-质量-摩尔比为:0.5-1.5mL:1-5g:0.98-4.9mmol:45-55mmol。

6. 根据权利要求1所述的DAB免疫显色试剂盒,其特征在于:所述B液的pH为7.5-8.0。

7. 如权利要求1所述的DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用,其特征在于:包括:取二抗孵育后的样品加入DAB显色液,孵育3-7min;所述DAB显色液由A液和B液混合而成;A液包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3' -二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris;B液包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和Tris;所述牛血清白蛋白的使用质量浓度为0.0025-0.01%;所述焦磷酸二氢二钠的使用质量浓度为0.1-0.5%。

8. 根据权利要求7所述的DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用,其特征在于:所述A液中聚乙二醇的体积比为85-95%;所述A液中牛血清白蛋白、3,3' -二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris的质量-摩尔比为:0.5-2g:10-50g:4-6mmol;所述A液的pH为7.5-8.0。

9. 根据权利要求7所述的DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用,其特征在于:所述B液中Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris的体积-质量-摩尔比为:0.5-1.5mL:1-5g:0.98-4.9mmol:45-55mmol;所述B液的pH为7.5-8.0。

10. 根据权利要求7所述的DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用,其特征在于:所述A液和B液的体积比为1:18-22;A液中牛血清白蛋白的质量浓度为0.05-0.2%;B液中焦磷酸二氢二钠的使用质量浓度为0.1-0.5%。

## 一种DAB免疫显色试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种DAB免疫显色试剂盒及其应用，属于DAB免疫显色技术领域。

### 背景技术

[0002] DAB免疫显色试剂系统是免疫学、免疫组织化学等研究及检测领域常用的显色系统，在临床和科研方面有着广泛应用。其显色原理是：过氧化物在过氧化物酶催化条件下发生化学反应，释放氧化状态氧，继而与显色系统的无色供氢体发生氧化还原反应，生色物被氧化，生成带颜色的产物。在这个生化反应过程中，由于把过氧化物和生色物之间存在较高的标准电势差，同时过氧化物本身理化性质的不稳定性，即使没有过氧化物酶的条件下，过氧化物与生色物之间都会发生反应，因此必须把两者分开保存，在使用时才混合使用。因此目前DAB免疫显色试剂分为DAB显色底物溶液（包含DAB显色底物）和DAB底物缓冲液（包含过氧化氢）。

[0003] DAB免疫显色试剂中存在的问题有：1) DAB底物缓冲液中过氧化氢稳定性差；2) DAB显色底物的颜色易发生变化；3) 两者混合后，不能长时间保存，时间稍长染色强度就较弱甚至阴性。目前，已经存在一些解决上述问题的技术方案，如公开号为CN101354354A的中国发明专利申请中采用丙酮溶解显色底物TMB，即3,3,5,5-四甲基联苯胺；使用过氧化脲、重金属离子络合剂、复配4-叔丁基-4'-甲氧基二苯酰甲烷加入到底物缓冲液中来保护其中的过氧化氢的稳定性；如公开号为CN1202622A的中国发明专利申请中采用丙酮或二甲基亚砜溶解显色底物TMB，即3,3,5,5-四甲基联苯胺；底物缓冲液中加入青霉素来保护过氧化氢。

[0004] 但是，上述方法中使用的过氧化氢保护剂种类复杂，价格昂贵，且对于过氧化氢的保护程度有限。而且，目前尚不存在较好的能够延长混合后的DAB免疫显色试剂保存时长的有效方法。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种DAB免疫显色试剂盒，其中使用的过氧化氢保护剂配方简单，价格便宜，并且DAB显色底物的颜色不会发生变化，混合后的DAB免疫显色试剂能够较长时间保存。

[0006] 本发明还提供了上述DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用。

[0007] 为了实现上述目的，本发明所采用的技术方案是：

[0008] 一种DAB免疫显色试剂盒，包括A液和B液；其中A液包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris；B液包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris。

[0009] 本发明中DAB免疫显色试剂盒中加入了牛血清白蛋白，能够维持DAB显色底物的颜色；加入的焦磷酸二氢二钠可以在缓冲液体系中非常好的保护过氧化氢；将A液和B液两者按一定比例混合后，室温放置24小时后，仍然具有较好的染色效果；或者将A液和B液两者混合后，2-8℃冰箱放置3天后，也仍然具有较好的染色效果。

[0010] 本发明试剂盒A液中的DAB为3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐，易于被氧化（在空气中

可被氧化),使用Tris缓冲液易于溶解DAB;加入的聚乙二醇200,可以改变DAB溶解后的颜色,聚乙二醇为多羟基非极性化学试剂,加入的聚乙二醇可以改变Tris缓冲液体系的极性(从极性-非极性),改变DAB分子表面的亲、疏水性环境,从而影响DAB分子内部的电子云排布,最终表现在外观颜色上的变化;加入的牛血清白蛋白能够保持由聚乙二醇200和Tris缓冲液系统配制出来的DAB的淡紫色或微粉色的色彩,不会变成黄色。

[0011] 本发明试剂盒B液中的Tris能形成缓冲体系,其作用是与DAB显色底物(A液)混合成最终的工作液后,保持最终染色液的pH值稳定,以利于后续的免疫组化反应的正常进行;加入的焦磷酸二氢二钠可以在缓冲液体系中非常好的保护过氧化氢,提高其长期保存的稳定性,同时对后续免疫组化反应无负面影响;加入的Triton X-100,一方面可以提高细胞膜的通透性,另一方面可以起到很好的试剂延展性,增强试剂的渗透性。

[0012] 优选的,所述A液中聚乙二醇的体积比为85-95%。该体积的聚乙二醇能够起到较好的效果。

[0013] 优选的,所述A液中牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris的质量-摩尔比为:0.5-2g:10-50g:4-6mmol。该比例的牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris配成的A液具有较好的配合作用。

[0014] 优选的,所述A液的pH为7.5-8.0。该pH为显色最优pH。

[0015] 优选的,所述B液中Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris的体积-质量-摩尔比为:0.5-1.5mL:1-5g:0.98-4.9mmol:45-55mmol。该比例的Triton X-100、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、焦磷酸二氢二钠和Tris配成的B液具有较好的配合作用。

[0016] 优选的,所述B液的pH为7.5-8.0。该pH为显色最优pH。

[0017] 上述的DAB免疫显色试剂盒在免疫染色领域的应用,包括:取二抗孵育后的样品加入DAB显色液,孵育3-7min;所述DAB显色液由A液和B液混合而成;A液为包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris;B液中包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris;所述牛血清白蛋白的使用质量浓度为0.0025-0.01%;所述焦磷酸二氢二钠的使用质量浓度为0.1-0.5%。

[0018] 本发明的应用中使用了牛血清白蛋白,能够维持DAB显色底物的颜色;加入的焦磷酸二氢二钠可以在缓冲液体系中保护过氧化氢;两者配合得到的A液和B液混合后室温放置24小时后,仍然具有较好的显色效果。

[0019] 优选的,所述A液中聚乙二醇的体积比为85-95%;所述A液中牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris的质量-摩尔比为:0.5-2g:10-50g:4-6mmol;所述A液的pH为7.5-8.0。该体系的A液各组分具有较好的配合作用,具有较好的溶解、稳定DAB的作用。

[0020] 优选的,所述B液中Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris的体积-质量-摩尔比为:0.5-1.5mL:1-5g:0.98-4.9mmol:45-55mmol;所述B液的pH为7.5-8.0。该体系中B液各组分具有较好的配合作用,具有较好的稳定H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的作用。

[0021] 进一步优选的,所述A液和B液的体积比为1:18-22;A液中牛血清白蛋白的质量浓度为0.05-0.2%;B液中焦磷酸二氢二钠的使用质量浓度为0.1-0.5%。该体系中A液为浓缩液,B液为使用浓度,使用时将一定量的A液加入B液中即得到DAB显色液。

## 附图说明

- [0022] 图1为本发明DAB免疫显色试剂盒实施例1和对比例2中配制得到的A液对比图；
- [0023] 图2为本发明实验例1中各组DAB免疫显色试剂盒胰腺(CK7抗体)组织染色结果对比图；
- [0024] 图3为本发明实验例2中各组DAB免疫显色试剂盒乳腺(HER2抗体)组织染色结果对比图；
- [0025] 图4为本发明实验例2中各组DAB免疫显色试剂盒扁桃体(CD10抗体)组织染色结果对比图；
- [0026] 图5为本发明实验例3中各组DAB免疫显色试剂盒扁桃体(CD3抗体)组织染色结果对比图；
- [0027] 图6为本发明实验例3中各组DAB免疫显色试剂盒乳腺(ER抗体)组织染色结果对比图。

## 具体实施方式

[0028] 下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细说明。除特殊说明的之外，各实施例及实验例中所用的设备和试剂均可从商业途径得到。其中Tris购自国药集团化学试剂有限公司，货号30188216；聚乙二醇200国药集团化学试剂有限公司，货号30150628；DAB(3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐)，购自Sigma-Aldrich Co.LLC，货号D5637；BSA(牛血清白蛋白)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司。30%的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液，购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司，摩尔浓度为9.79mol/L。

[0029] DAB免疫显色试剂盒实施例1

[0030] 本实施例中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液，A液：DAB显色底物溶液(20×)；B液：DAB底物缓冲液(1×)。

[0031] A液的制备包括：

[0032] 1) 配置50mmol/L的Tris水溶液，使用盐酸调节pH至7.8；取10mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的的Tris-HCl水溶液与90mL聚乙二醇200混合；

[0033] 2) 加入0.1g的BSA混溶；然后加入2.0g的DAB，即得。

[0034] B液的制备包括：

[0035] 取100mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的Tris-HCl水溶液，加入0.1mL的Triton X-100，然后加入0.1g焦磷酸二氢二钠，再加入0.05mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液，即得。所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的浓度为30%。

[0036] DAB免疫显色试剂盒实施例2

[0037] 本实施例中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液，A液：DAB显色底物溶液(20×)；B液：DAB底物缓冲液(1×)。

[0038] A液的制备包括：

[0039] 1) 配置50mmol/L的Tris水溶液，使用盐酸调节pH至7.8；取10mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的的Tris-HCl水溶液与90mL聚乙二醇200混合；

[0040] 2) 加入0.1g的BSA混溶；然后加入2.0g的DAB，即得。

[0041] B液的制备包括：

[0042] 取100mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的Tris-HCl水溶液,加入0.1mL的Triton X-100,然后加入0.2g焦磷酸二氢二钠,再加入0.05mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,即得。所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的浓度为30%。

[0043] DAB免疫显色试剂盒实施例3

[0044] 本实施例中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液,A液:DAB显色底物溶液(20×);B液:DAB底物缓冲液(1×)。

[0045] A液的制备包括:

[0046] 1) 配置50mmol/L的Tris水溶液,使用盐酸调节pH至7.8;取10mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的的Tris-HCl水溶液与90mL聚乙二醇200混合;

[0047] 2) 加入0.1g的BSA混溶;然后加入2.0g的DAB,即得。

[0048] B液的制备包括:

[0049] 取100mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的Tris-HCl水溶液,加入0.1mL的Triton X-100,然后加入0.5g焦磷酸二氢二钠,再加入0.05mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,即得。所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的浓度为30%。

[0050] DAB免疫显色试剂盒对比例1

[0051] 本对比例中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液,A液:DAB显色底物溶液(20×);B液:DAB底物缓冲液(1×)。

[0052] A液的制备包括:

[0053] 1) 配置50mmol/L的Tris水溶液,使用盐酸调节pH至7.8;取10mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的的Tris-HCl水溶液与90mL聚乙二醇200混合;

[0054] 2) 然后加入2.0g的DAB,即得。

[0055] B液的制备包括:

[0056] 取100mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的Tris-HCl水溶液,加入0.05mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,即得。所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的浓度为30%。

[0057] DAB免疫显色试剂盒对比例2

[0058] 本对比例中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液,A液:DAB显色底物溶液(20×);B液:DAB底物缓冲液(1×)。

[0059] A液的制备包括:

[0060] 1) 配置50mmol/L的Tris水溶液,使用盐酸调节pH至7.8;取10mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的的Tris-HCl水溶液与90mL聚乙二醇200混合;

[0061] 2) 然后加入2.0g的DAB,即得。

[0062] B液的制备包括:

[0063] 取100mL浓度为50mmol/L、pH为7.8的Tris-HCl水溶液,加入0.1mL的Triton X-100,再加入0.05mL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液,即得。所述H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>溶液的浓度为30%。

[0064] DAB免疫显色试剂盒对比例3

[0065] 本对比例中DAB免疫显色试剂盒为Leica DAB免疫显色试剂盒,购自徕卡显微系统(上海)贸易有限公司,货号RE7270。

[0066] 本发明中将DAB免疫显色试剂盒实施例1和对比例2中配制得到的A液进行了对比,发现未加BSA试剂配制的对比例2中的A液会慢慢变成黄色;实施例1的A液为粉色,且颜色

可长期保持一年半不变色；如图1所示，A为DAB免疫显色试剂盒实施例1；B为DAB免疫显色试剂盒对比例2。

[0067] 本发明中对于DAB免疫显色试剂盒实施例1-3和DAB免疫显色试剂盒对比例1-2中配制得到的B液中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>进行了检测；DAB缓冲液中过氧化氢含量，采用高锰酸钾滴定法检测。结果如表1所示，从表1中可以看出，DAB免疫显色试剂盒实施例1-3中的B液在放置了9天后，其中仍然具有较多的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，而对比例中的B液在放置了9天后，其中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量很少。

[0068] 表1 DAB免疫显色试剂盒B液中的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>含量

[0069]

编号	0 天		放置 3 天		放置 5 天		放置 7 天		放置 9 天	
	室温	4℃	37℃	4℃	37℃	4℃	37℃	4℃	37℃	
对比例 1	170	170	130	150	100	130	80	100	40	
对比例 2	170	170	130	150	100	125	80	100	40	
实施例 1	170	170	170	175	170	175	165	170	165	
实施例 2	170	170	170	170	170	170	170	170	165	
实施例 3	170	170	170	170	170	170	165	170	165	

[0070] 以下实验例中使用的组织样品先经过二抗孵育，具体包括如下步骤：

[0071] (1) 分别取扁桃体、乳腺、胰腺组织切片脱蜡和水化。

[0072] (2) 抗原修复：高压锅法抗原修复法，修复2.5min；用自来水冲淋使之冷却，待锅中液体自然冷却至室温后取出切片；蒸馏水浸泡2次，5min/次。

[0073] (3) 加过氧化物酶封闭剂：加100μL内源性过氧化物酶阻断剂（河南赛诺特生物技术有限公司，货号SN640501），室温下孵育5min。然后PBS溶液冲洗并浸泡2次，5min/次。

[0074] (4) 一抗孵育：除去PBS溶液，滴加100μL的抗体试剂，室温30min，PBS溶液冲洗并浸泡2次，5min/次。

[0075] 一抗均来自河南赛诺特生物技术有限公司，CK7抗体货号CCM-0991；HER2抗体货号CCR-0843；CD10抗体货号CCM-0390；CD3抗体货号CCM-0330；ER抗体货号CEM-0081。

[0076] (5) 二抗孵育：滴加聚合物试剂（河南赛诺特生物技术有限公司，货号SN640502），37℃孵育30min，PBS溶液冲洗并浸泡2次，5min/次。

[0077] DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用的实施例1

[0078] 本实施例中DAB免疫显色试剂盒的在免疫染色领域的应用，包括：

[0079] 取二抗孵育后的样品加入DAB显色液，孵育3-7min；所述DAB显色液由A液和B液混合而成；A液包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris；B液包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和Tris；所述牛血清白蛋白的使用质量浓度为0.0025-0.01%；所述焦磷酸二氢二钠的使用质量浓度为0.1-0.5%。

[0080] 上述中的A液和B液为DAB免疫显色试剂盒实施例1、实施例2或实施例3中的A液和B液。

[0081] 实验例1

[0082] 取二抗孵育后的胰腺(CK7抗体)组织,使用配制完成后37℃放置7天的DAB免疫显色试剂盒的对比例1-2、DAB免疫显色试剂盒的实施例进行染色,具体是:

[0083] 1) 显色:取二抗孵育后的样品除去PBS溶液,滴加100μL DAB显色液,孵育5min。DAB显色液为各组中A液和B液以1:20的体积比进行混合,使用时现配。

[0084] 2) 复染:自来水冲洗,1%苏木素复染液孵育10min,再用自来水冲洗。

[0085] 3) 脱水透明:常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明。

[0086] 4) 中性树胶封片。

[0087] 结果判读:免疫阳性结果为棕黄色着色,细胞核为蓝色。胰腺(CK7抗体)染色结果如图2所示,其中A为DAB免疫显色试剂盒对比例1;B为DAB免疫显色试剂盒对比例2;C为DAB免疫显色试剂盒实施例1。从图中可以看出,对比例1-2中的DAB免疫染色强度极弱,甚至于本来应该染色阳性的组织,近乎染色成阴性;而实施例1中DAB免疫显色试剂盒的在37℃放置7天后免疫组化染色效果非常好,染色清晰。

[0088] 实验例2

[0089] 取二抗孵育后的乳腺(HER2抗体)、扁桃体(CD10抗体)组织,使用DAB免疫显色试剂盒对比例3,4℃放置7天、37℃放置7天的DAB免疫显色试剂盒实施例1进行染色,具体是:

[0090] 1) 显色:取二抗孵育后的样品除去PBS溶液,滴加100μL DAB显色液,孵育5min。实施例1中DAB显色液为A液和B液以1:20的体积比进行混合,使用时现配;对比例3中的使用方法按照说明书进行。

[0091] 2) 复染:自来水冲洗,1%苏木素复染液孵育10min,再用自来水冲洗。

[0092] 3) 脱水透明:常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明。

[0093] 4) 中性树胶封片。

[0094] 结果判读:免疫阳性结果为棕黄色着色,细胞核为蓝色。

[0095] 乳腺(HER2抗体)组织的染色结果如图3所示,其中A为DAB免疫显色试剂盒对比例3;B为4℃放置7天DAB免疫显色试剂盒实施例1;C为37℃放置7天的DAB免疫显色试剂盒实施例1。

[0096] 扁桃体(CD10抗体)组织的染色结果如图4所示,其中A为DAB免疫显色试剂盒对比例3;B为4℃放置7天DAB免疫显色试剂盒实施例1;C为37℃放置7天的DAB免疫显色试剂盒实施例1。

[0097] 从图3、图4中可以看出,实施例1中DAB免疫显色试剂盒的在4℃和37℃放置7天后免疫组化染色效果较好,染色清晰;达到与对比例3相当的水平。

[0098] 实验例3

[0099] 取二抗孵育后的扁桃体(CD3抗体)、乳腺组织(ER抗体),使用DAB免疫显色试剂盒对比例3,未放置的DAB免疫显色试剂盒实施例1,以及A液与B液混合后的放置24h的DAB免疫显色试剂盒实施例1进行染色,具体是:

[0100] 1) 显色:取二抗孵育后的样品除去PBS溶液,滴加100μL DAB显色液,孵育5min。

[0101] A组:对比例3中的使用方法按照说明书进行;

[0102] B组:实施例1中DAB显色液为A液和B液以1:20的体积比进行混合,使用时现配;

[0103] C组:实施例1中的DAB显色液为A液和B液以1:20的体积比进行混合后室温放置24h

进行染色；

[0104] D组：实施例1中的DAB显色液为A液和B液以1:20的体积比进行混合后2-8℃冰箱放置3天进行染色。

[0105] 2) 复染：自来水冲洗，1%苏木素复染液孵育10min，再用自来水冲洗。

[0106] 3) 脱水透明：常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明。

[0107] 4) 中性树胶封片。

[0108] 结果判读：免疫阳性结果为棕黄色着色，细胞核为蓝色。

[0109] 扁桃体(CD3抗体)组织的染色结果如图5所示，其中A为DAB免疫显色试剂盒对比例3；B为未放置DAB免疫显色试剂盒实施例1；C为A液与B液混合后的放置24h的DAB染色结果；D为A液与B液混合后的2-8℃冰箱放置3天的DAB染色结果。

[0110] 乳腺(ER抗体)组织的染色结果如图6所示，其中A为DAB免疫显色试剂盒对比例3；B为未放置DAB免疫显色试剂盒实施例1；C为A液与B液混合后的放置24h的的DAB染色结果；D为A液与B液混合后的2-8℃冰箱放置3天的DAB染色结果。

[0111] 从图5、图6中可以看出，实施例1中DAB免疫显色试剂盒的在A液和B液混合室温放置24小时后，仍然具有较好的染色效果；或是将A液和B液两者混合后，2-8℃冰箱放置3天后，也仍然具有较好的染色效果。

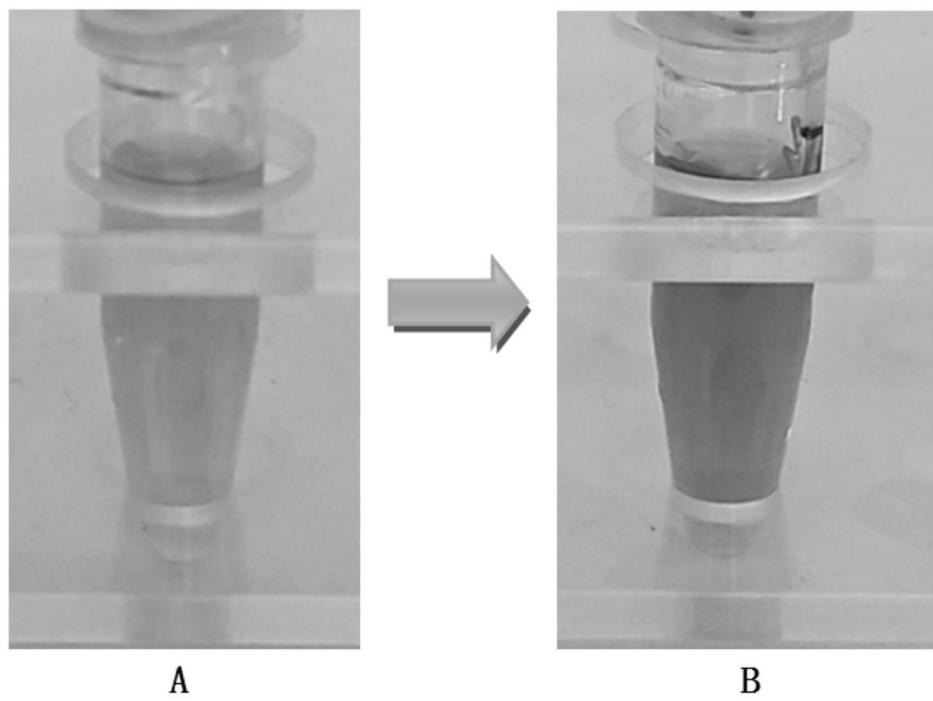


图1

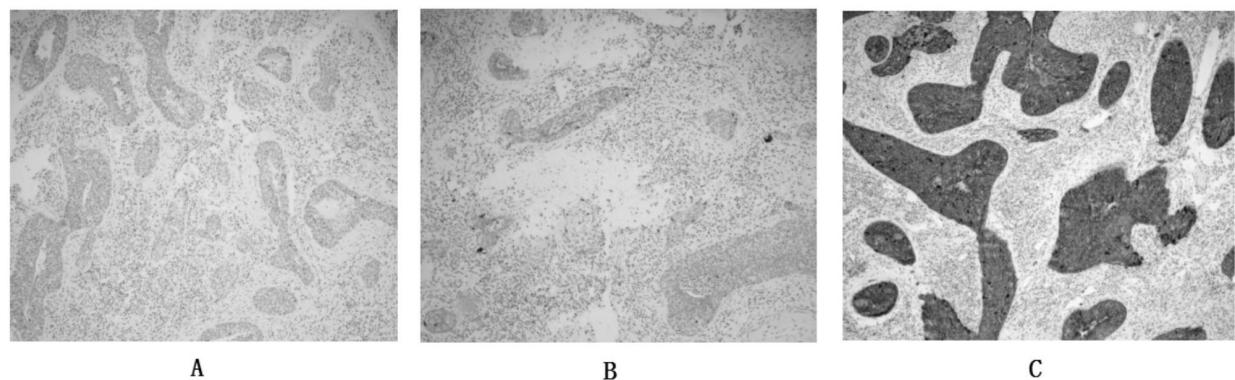
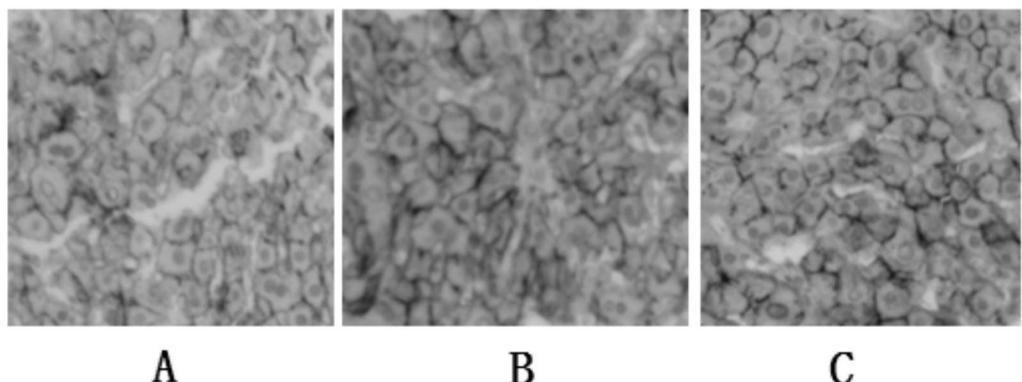
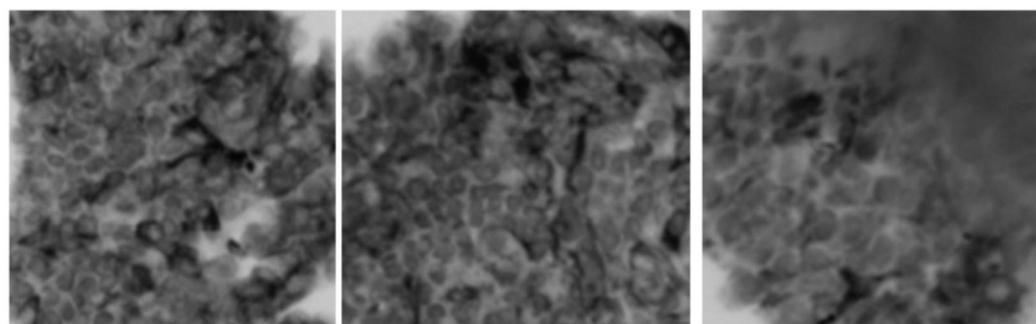


图2



A                    B                    C

图3



A                    B                    C

图4

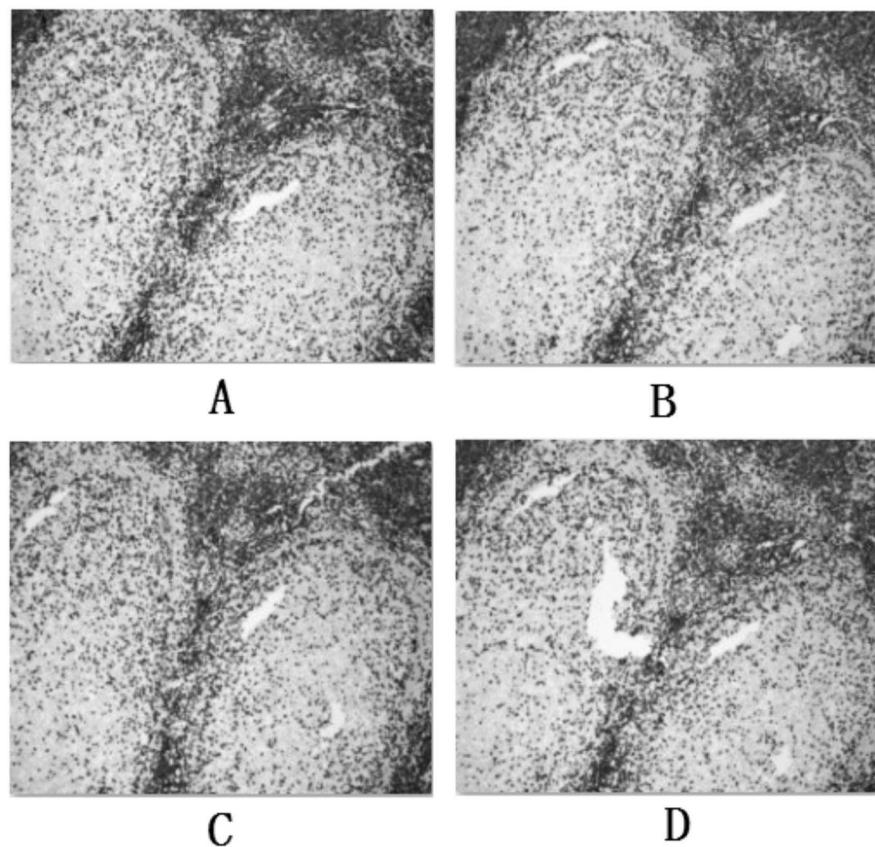


图5

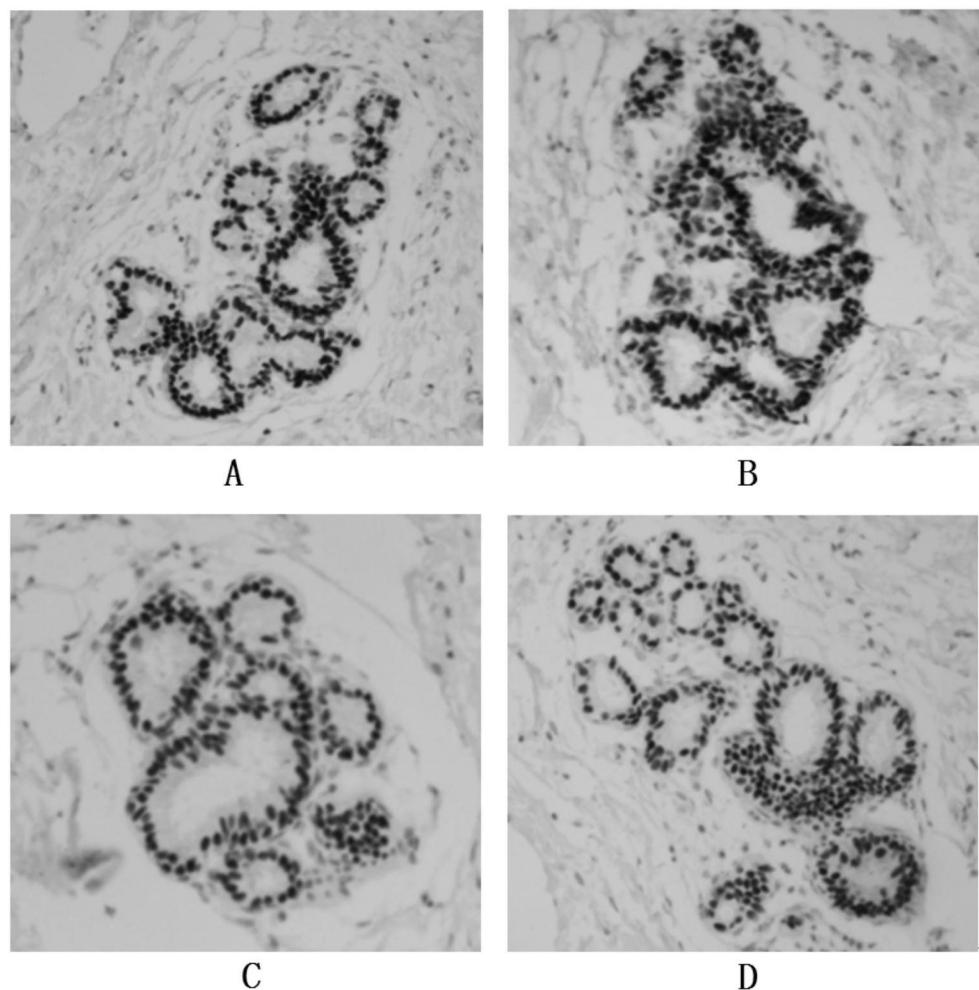


图6

专利名称(译)	一种DAB免疫显色试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110361245A</a>	公开(公告)日	2019-10-22
申请号	CN201910695516.5	申请日	2019-07-30
[标]申请(专利权)人(译)	河南赛诺特生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	河南赛诺特生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	河南赛诺特生物技术有限公司		
[标]发明人	刘玲玲 梁永波 刘畅 张会娟 陈玲 臧素芳 牛银银 李莉 齐华 刘文弟		
发明人	刘玲玲 梁永波 刘畅 张会娟 陈玲 臧素芳 牛银银 李莉 齐华 刘文弟		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/532		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/532 G01N2001/302		
代理人(译)	吴晓亭		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明涉及一种DAB免疫显色试剂盒及其应用，属于DAB免疫显色技术领域。本发明中DAB免疫显色试剂盒包括A液和B液；其中A液为包括聚乙二醇、牛血清白蛋白、3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐和Tris-HCl；B液中包括Triton X-100、焦磷酸二氢二钠、H2O2和Tris-HCl。本发明中DAB免疫显色试剂盒中加入了牛血清白蛋白，能够维持DAB显色底物的颜色；加入的焦磷酸二氢二钠可以在缓冲液体系中非常好的保护过氧化氢；两者配合得到的A液和B液混合后室温放置24小时后，仍然具有较好的显色效果。

