

CD3 小鼠单克隆抗体试剂浓缩液（免疫组织化学法）说明书

【产品名称】

通用名称：CD3 小鼠单克隆抗体试剂浓缩液（免疫组织化学法）

英文名称：Novocastra™ Liquid Mouse Monoclonal Antibody CD3

【包装规格】

1ml/支

【预期用途】

用于体外诊断。

旨在通过光学显微镜技术对石蜡切片内的 CD3 抗原进行定性鉴别。任何染色与否的临床解释应通过使用适当对照的形态学研究，并由具有资质的病理医生根据患者的临床病史及其它诊断检测进行评价，不作为单独的诊断指标。

【检测原理】

免疫组织化学(IHC)染色技术通过加入针对抗原的特异性抗体(一抗)、二抗以及带有显色底物的酶复合物,实现抗原的可视化,其间穿插多个清洗步骤。生色原经酶激活后在抗原位点产生可目视观测到的反应产物。然后标本经复染并盖上盖玻片,在光镜下判读结果,辅助病理生理的鉴别诊断，染色结果可能与特定抗原相关或不相关。

【主要组成成份】

本品含有叠氮化钠作为防腐剂的液态组织培养上清液。

经酶联免疫吸附测定（ELISA）大于或等于 32 mg/L。各批次特定的免疫球蛋白浓度，请参阅试剂瓶标签。

克隆号

LN10

免疫原

与人 CD3 分子 C-末端区相对应的原核重组蛋白。

特异性

人 CD3 抗原。

免疫球蛋白种类

IgG1

【储存条件及有效期】

效期稳定性：2℃-8℃条件下贮存。有效期 36 个月。禁止冷冻。不要在试剂瓶标签上的有效期后使用。

稀释后稳定性：2℃-8℃条件下闭盖贮存 3 个月。

车载稳定性：在 Bond 仪器上可稳定 64 小时。

【适用仪器】

适用于全自动组织染色机（Bond-III, Bond-maX）及手工染色

【样本要求】

石蜡切片制作过程对组织内抗原显现有一定的影响，但可通过某些措施予以改善，因而它是大多数免疫组化中首选的组织标本制作方法。

1. 取材的特殊要求及注意事项

标本新鲜：一般在 2h 以内进行，超过 2h，组织将有不同程度的自溶，其抗原或变性消失，或严重弥散。

取材部位：除取病灶或含待检抗原部位外，还应取病灶与正常交界处，即所取组织切片中同时应有抗原阳性和阴性区，以形成自身对照。

细胞坏死后，不仅抗原弥散或消失，而且常引起非特异着色，干扰观察，因此取材时应尽可能避开坏死区。

避免挤压：取材时组织受挤压可使边缘部细胞形态改变并加深非特异着色，因而取材时应使用锋利的刀刃，镊取组织动作要轻；经窥镜直接钳取的组织往往有过度挤压，观察结果时应有所考虑。

2. 固定

取材后的组织需立刻投于固定剂中。固定使组织和细胞的蛋白质凝固，终止内源性或外源性酶反应，防止组织自溶或异溶，以保持原有结构和形态；对免疫组化而言更有原位保存抗原的作用，避免抗原失活或弥散。

建议使用 10% 中性福尔马林（甲醛）缓冲液固定，甲醛固定是一个渐进的、时间及温度依赖性的过程。过度固定会产生因交联过度而导致的免疫组化假阴性结果，但固定不足也会产生非预期的结果，没有一个最适的固定时间适用于每一种抗原的固定。

3. 包埋

将组织包埋在石蜡中首先要先在盒中装入蜡；为了制作平整的石蜡块，首先需要将石蜡熔化，然后将盒放置在 58 °C 石蜡浴中 15 分钟。在放入组织盒前一小时，打开加热块熔化石蜡。

1) 打开盒查看组织样品，然后选取一个最适合组织尺寸的模具。组织各边留至少 2 mm 的石蜡余边能获得最好的切割支持。弃去盒盖。

2) 从石蜡容器内取少量熔化石蜡放入模具内。

3) 用温热镊子，将组织转入模具内，使切割面朝下，如同其在盒中的放置状况。

4) 将模块放在冷却板上，将组织轻柔压平。石蜡将凝固成一层薄膜，将组织固定在位。

5) 当组织处于理想方向时，将加标记的盒盖在模具上方，作为背板。压牢。

6) 用石蜡灌注器在模具中加入热石蜡。确保有足量石蜡覆盖塑料盒面。

7) 必要时，冷却时在盒中灌入石蜡，让模具充满直至凝固。

8) 石蜡应在 30 分钟内凝固。石蜡完全冷却和变硬时（30 分钟），石蜡块很容易敲出；蜡块不得粘接。如果石蜡破碎或组织对得不齐，只需再次熔化，再做一次。

组织和石蜡在盒中形成一个块，可进行切片。组织块可在室温下长期保存。

4. 组织切片

用切片机进行组织切片。打开水浴，检查温度是 35~37 °C。使用新制去离子水（如果对切片应用原位杂交，则必须使用 DEPC 处理的水）。拟进行切片的块让其面朝下在冰块上放置 10 分钟。在切片机上换上一把新刀片；切片最多可进行 10 块石蜡块的切片，但如果切片出现问题时应更换。将石蜡块插入切片卡盘，使石蜡块面向刀片，并在垂直面上对齐。

将标度盘设置为 10 μm 切片，以刨平石蜡块；一旦石蜡块被切平后，设置为 4 μm 切片。刀片应倾斜 5°。通过切至理想的组织平面使块呈现，弃去石蜡带。如果石蜡块成带良好，切取更多切片，用镊子或细毛刷拾起，然后将其漂浮在 37 °C 水浴面上。将切片漂浮在干净玻璃片上。如果石蜡块成带不好，将其重新放在湿冰块上冷却，使蜡坚实。如果标本在放置

在水浴中时碎裂，那可能是温度太高。

将放有石蜡切片的玻片在 60 °C 烘箱放置 60 分钟（蜡刚好开始熔化），使组织粘合在玻璃上。玻片在室温下可过夜存放。如需存放更长时间，建议在 4 °C 或 -20 °C 保存，以保留组织抗原活性。

【检测方法】

A. 自动染色操作建议：

A.1 需要而未提供的试剂：

- a) Bond 脱蜡液
- b) Bond 洗液
- c) Bond ER 溶液 2
- d) Bond 一抗稀释液
- e) DAB 染色液
- f) 无水乙醇
- g) 去离子水或蒸馏水

A.2 操作规程：具体操作描述见 Bond-III, Bond-maX 仪器说明书。

Bond 全自动染色系统配备了一组预定义的操作规程，这些操作规程不能被编辑或删除，但您可以通过复制和编辑现有的操作规程来创建自己的操作规程。

预定义操作规程已经过严格检测和验证，正确使用它们可以得到极好的染色效果。对于您自己创建或编辑的任何用户操作规程，您必须自己负责检测和验证。有能力创建和保存操作规程并不能说明这些操作规程适合于拟定任务。

推荐采用全自动染色编辑程序 Protocol F。

推荐一抗稀释度为 1:100，用户应自行建立本实验室的最佳一抗稀释度。

自动染色完毕后进行常规封片。

B. 手工染色操作建议：

如果没特殊说明，所有步骤在室温条件下进行。推荐手工染色一抗稀释度为 1:100-1:500。用户应自行建立本实验室的最佳一抗稀释度。

具体操作过程如下：

- | | |
|-----------------------------|-------|
| 1) 二甲苯或二甲苯替代品 | 10 分钟 |
| 2) 无水酒精 | 30 秒 |
| 3) 无水酒精 | 30 秒 |
| 4) 90% 酒精 | 30 秒 |
| 5) 70% 酒精 | 30 秒 |
| 6) 流水冲洗 | 5 分钟 |
| 7) 抗原修复液 pH6.0 全压力不锈钢高压锅中修复 | 8 分钟. |
| 8) 去离子水冲洗 | 5 分钟 |
| 9) 过氧化氢封闭 | 5 分钟 |
| 10) TBS 冲洗 | 5 分钟 |
| 11) TBS 冲洗 | 5 分钟 |
| 12) 蛋白质封闭 | 5 分钟 |
| 13) TBS 冲洗 | 5 分钟 |
| 14) TBS 冲洗 | 5 分钟 |

15) 一抗孵育	30 分钟
16) TBS 冲洗	5 分钟
17) TBS 冲洗	5 分钟
18) 一抗后溶液孵育	30 分钟
19) TBS 冲洗	5 分钟
20) TBS 冲洗	5 分钟
21) 聚合物孵育	30 分钟
22) TBS 冲洗	5 分钟
23) TBS 冲洗	5 分钟
24) DAB 工作液	5 分钟
25) 流水冲洗	5 分钟
26) 苏木素	5 分钟

当使用其他手工或自动染色平台时，请验证本抗体的性能。

了解更多的产品信息或者需要支持，可以联系 Leica Biosystems 当地分销商或者区域办公室，或者访问 Leica 网站 www.LeicaBiosystems.com

质量控制

使用者实验室中组织处理和技术方法的差异会导致测定结果的显著差异，因此需要使用以下方法进行常规内部控制对照。

对照必须使用新鲜的尸体解剖/活组织检查/外科样品，并尽快按照与患者样品相同的方式进行福尔马林固定、组织处理及石蜡包埋。

阳性组织对照

用于说明正确的组织制备和合适的染色技术。

在每一轮染色中，应当针对每组试验条件，包括一组阳性组织对照组。

在最优的质量控制中弱阳性染色的组织比强阳性染色的组织稳定，并且可以检测小程度的试剂变性²。

推荐的阳性对照组织为扁桃体。

如果阳性组织对照不能出现阳性染色，检测样本的结果应该被认为是无效的。

阴性组织对照

应该在阳性组织对照后进行，来验证一级抗体标记后靶抗原的特异性。建议的阴性对照组织为小脑。

另外，大多数组织切片中不同细胞类型提供阴性对照部位，但是这个应该由使用者验证。

如果出现非特异性染色，经常为弥漫性表现。结缔组织切片如果福尔马林过度固定也可以出现分散染色情况。使用完整的细胞来进行解释染色结果。坏死的或者变性的细胞经常出现非特异性染色³。结果假阳性可能是由于非免疫性结合蛋白质或者基底反应物造成的。按照使用的免疫标记类型，假阳性也可能是内源酶，例如，假过氧化物酶（红细胞）、内源性过氧化物酶（细胞色素 C）或内源性生物素（例如，肝脏、乳房、大脑和肾脏）所导致。为了从特异免疫反应性中区别内源酶活性或酶的非特异结合，可用底物色原或酶复合物（亲和素-生物素、链霉亲和素、带标记的聚合物）和底物-色原分别对额外的患者组织进行单独染色。如果在阴性组织对照中出现特异性染色，患者样本的结果应该被认为是无效的。

阴性试剂对照

用非特异阴性试剂对照组，代替具有患者试样切片的一级抗体，以评价非特异染色，并更好地判读抗原位置的特异性染色。

【检测结果的解释】

用本试剂检验患者样本。阳性染色强度应该根据阴性试剂对照组在任何非特异性背景染色下进行评估。对于任何免疫组织化学试验，阴性结果意味着没有检测出抗原，而不是细胞/组织中没有抗原。需要时，使用一组抗体组合来鉴别假阴性反应。

评分标准如下：

正常组织：淋巴结中 T 细胞出现细胞膜染色，判定为阳性；细胞膜未染色，判定为阴性；外周循环的 T 淋巴细胞膜染色视为阴性。

肿瘤组织：肿瘤细胞膜出现染色，均判定为阳性。细胞膜未染色，判定为阴性。

预期结果

正常组织

克隆 LN10 检测脾、淋巴结、胸腺、扁桃体内的 T 细胞和各种其他组织中的浸润 T 细胞的 CD3 抗原。（评价的正常病例总数= 55）。

异常组织

克隆 LN10 使 16/280 评价的异常组织染色，包括血液恶性肿瘤（16/130，包括 4/4 T 淋巴瘤胚芽淋巴瘤，4/5 外周 T 淋巴瘤细胞瘤，2/8 间变性大细胞淋巴瘤，2/2 NK/T 细胞淋巴瘤，1/1 恶性 T 细胞淋巴瘤，1/1 弥漫性大 T 细胞淋巴瘤，1/1 血管免疫母细胞 T 细胞淋巴瘤，1/1 胸腺瘤，0/50 弥漫性 B 细胞淋巴瘤，0/15 Hodgkin's 淋巴瘤，0/11 小囊淋巴瘤，0/9 弥漫性大 B 细胞淋巴瘤，0/5 MALToma，0/3 mantle 细胞淋巴瘤，0/3 弥漫性大细胞淋巴瘤，0/2 边缘区淋巴瘤，0/2 Burkitt's 淋巴瘤，0/2 淋巴细胞浆淋巴瘤，0/2 非特定 T 细胞淋巴瘤，0/1 弥漫性 T 细胞淋巴瘤，0/1 非 Hodgkin 淋巴瘤和 0/1 Burkitt 式淋巴瘤），皮肤癌（0/81，包括 0/18 黑色素瘤，0/15 鳞状细胞癌，0/15 基底细胞癌，0/10 汗腺癌，0/9 皮肤纤维肉瘤，0/3 转移性腺癌，0/3 恶性神经鞘瘤，0/2 腺样囊性癌，0/1 皮脂腺癌，0/1 纤维肉瘤，0/1 多形性未分化肉瘤，0/1 平滑肌肉瘤，0/1 非典型纤维性黄色瘤和 0/1 Merkel 细胞瘤），软组织肿瘤（0/8），乳腺癌（0/7），卵巢肿瘤（0/7），肺肿瘤（0/7），肝肿瘤（0/5），神经内分泌肿瘤（0/4），肾癌（0/4），胃肿瘤（0/3），膀胱癌（0/3），生殖细胞瘤（0/3），肾上腺肿瘤（0/3），子宫内膜肿瘤（0/3），胰腺肿瘤（0/2），甲状腺肿瘤（0/2），前列腺腺癌（0/2），结肠癌（0/1），小肠癌（0/1），阴茎鳞状细胞癌（0/1），宫颈鳞状细胞癌（0/1），神经节瘤（0/1）和前列腺增生（0/1）。（评价的异常病例总数= 280）。

推荐使用 NCL-L-CD3-565 作为一组抗体的一部分以指示 T 细胞处于淋巴细胞增殖紊乱。

染色图片示例见附录。

【检测方法的局限性】

免疫组织化学是一项多步骤的诊断操作，包括选择合适试剂的特殊培训；组织选择、固定、处理；IHC 切片的制备；染色结果的解释。

组织染色取决于组织染色前的处理和操作情况。不恰当的固定、冰冻、解冻、冲洗、干燥、加热、切片或者同其他组织或者液体混合都可能产生人为误差、抗体捕获或者假阴性结

果。前后矛盾的结果可能与固定和包埋方法有关，或者是组织内部本身的不一致性导致。* 过度的或者不完全的复染可能会影响正确的结果解释。

染色与否的临床解释应该通过合适的对照组完善形态学，并且应该在患者病史基础上和由有资格的病理学家通过其他检测方法对其进行评价。

如上所述，Leica Biosystems Newcastle Ltd 的抗体，适用于有特定固定要求的冷冻或石蜡包埋切片。可能会发生意外的抗原表达，尤其是在肿瘤细胞中。组织切片染色的临床解释应该包括形态学分析和合适对照的评价。

【产品性能指标】

1. 免疫反应性：

1.1 正常组织免疫反应性：见表 1。

表 1 CD3 克隆 LN10 在正常组织的免疫反应性

系统	组织	阳性
中枢神经系统	脑、大脑（灰质与白质神经元、胶质等）	0/6
	脑、小脑	0/3
内分泌系统	肾上腺	0/3
	卵巢	0/3
	胰腺（胰岛与外分泌腺）	0/3
	甲状旁腺	0/3
	垂体（腺垂体与神经垂体）	0/3
	睾丸	0/3
	甲状腺（滤泡上皮、滤泡旁细胞、胶体等）	0/3
乳 腺	乳腺	0/3
造血组织	脾	3/3
	扁桃体	3/3
	胸腺（幼儿）	3/3
	淋巴结	11/11
	骨髓	0/3
呼吸系统	肺（支气管、细支气管、肺泡等）	0/3
心 血 管	心脏	0/3
消化系统	食管	0/3
	胃	2/3
	小肠（回肠、空肠或十二指肠）	3/3
	结直肠	3/3
	肝脏（门静脉、肝细胞等）	0/3
	唾液腺	0/3
泌尿生殖系统	肾	0/3
	前列腺	0/3
	子宫（宫体、宫颈）	0/3
	膀胱	0/3
骨骼肌肉	骨骼肌	0/3

皮 肤	皮肤（表皮、附件、真皮）	0/3
外周神经系统	外周神经	0/3
间皮细胞	胸壁、腹壁、心包膜或胃肠、心脏与/或肺样本表面内层细胞	0/3

1.2 肿瘤组织中 CD3 克隆 LN10 免疫反应性：见表 2。

表 2 肿瘤组织 CD3 免疫反应性

系统肿瘤		阳性
消化系统肿瘤		0/7
内分泌系统肿瘤		0/6
呼吸系统肿瘤		0/5
泌尿生殖系统肿瘤		0/3
脑和软组织肿瘤		0/5
其他部位肿瘤		0/6
造血组织肿瘤	弥漫性大 B 细胞淋巴瘤	0/108
	慢性淋巴细胞性淋巴瘤	0/11
	B 细胞淋巴瘤	0/8
	套细胞淋巴瘤	0/7
	滤泡性淋巴瘤	0/11
	滤泡性淋巴瘤	5/7
	霍奇金病	0/11
	T 细胞淋巴瘤	4/5
	免疫母细胞性 T 细胞淋巴瘤	4/4

2. 重复性

在三个不同的时间，采用三个不同批次的 NCL-L-CD3-565，分别对三张组织切片 CD3-阳性组织和三张 CD3-阴性组织进行染色。结果见表 3

表 3 重复性结果

批号	染色	时间点								
		1			2			3		
		载玻片 A	载玻片 B	载玻片 C	载玻片 A	载玻片 B	载玻片 C	载玻片 A	载玻片 B	载玻片 C
6017957	扁桃体 (阳性)	3+	3+	3+	3+	3+	3+	4/3+	4/3+	4/3+
6015960		4/3+	4/3+	4/3+	3+	3+	3+	4/3+	4/3+	4/3+
6011865		3+	3+	3/2+	3+	3+	3+	4/3+	4/3+	4/3+
6017957	小脑 (阴性)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6015960		0	0	0	0	0	0	0	0	0
6011865		0	0	0	0	0	0	0	0	0

3. 手工和自动染色方法的相关性:

3.1 手工染色和 Bond-maX 仪器自动染色相关性, 结果见表 4。

表 4 手工和 Bond-maX 仪器染色结果

		NCL-L-CD3-565 Bond-maX 自动化染色		
		阴性	阳性	合计
NCL-L-CD3-565 手工染色	阴性	289 (A)	0 (C)	289
	阳性	2 (B)	39 (D)	41
	合计	291	39	330

阳性一致性水平= $D / (B+D) * 100\% = 39/41 * 100\% = 95.1\%$

阴性一致性水平= $A / (A+C) * 100\% = 289/289 * 100\% = 100\%$

总体一致性= $(A+D) / (A+B+C+D) * 100\% = (289+39)/330 * 100\% = 99.4\%$

3.2 手工染色和 Bond-III 仪器自动染色相关性, 结果见表 5。

表 5 手工和 Bond-III 仪器染色结果

		NCL-L-CD3-565 Bond-III 自动化染色		
		阴性	阳性	合计
NCL-L-CD3-565 手工染色	阴性	288 (A)	1 (C)	289
	阳性	3 (B)	38 (D)	41
	合计	291	39	330

阳性一致性水平= $D / (B+D) * 100\% = 38/41 * 100\% = 92.7\%$

阴性一致性水平= $A / (A+C) * 100\% = 288/289 * 100\% = 99.7\%$

总体一致性= $(A+D) / (A+B+C+D) * 100\% = (288+38)/330 * 100\% = 98.8\%$

【注意事项】

本产品仅供体外诊断使用。

该试剂使用细胞培养物上清液进行制备。由于是生物产品, 操作时请给予适当的注意。

试剂中含有叠氮化钠。材料安全数据表根据要求可从以下网址获取:

www.LeicaBiosystems.com

固定前后的样本以及暴露于样本的所有材料, 操作时应看作有传播感染的可能并且在处理时应采取适当的预防措施。1 不要用嘴吸取试剂, 避免试剂、样本接触到皮肤、粘膜。如果试剂或者样本接触到敏感区, 需立刻用大量流水冲洗。必要时寻求治疗。

将试剂微生物感染或者可能发生的非特异性染色可能降至最小。

除了上述的条件外的孵育时间或者温度都可能造成错误的结果。使用者必须自行验证任何类似改变。

请在使用前检查包装的完整性。

标识与解释

标识	解释
	批号
	到效日期
	储存条件：2-8℃
	可循环回收
	参阅使用说明
	体外诊断试剂

【参考文献】

1. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). Protection of laboratory workers from infectious diseases transmitted by blood and tissue; proposed guideline. Villanova, P.A. 1991; 7(9). Order code M29-P.
2. Battifora H. Diagnostic uses of antibodies to keratins: a review and immunohistochemical comparison of seven monoclonal and three polyclonal antibodies. Progress in Surgical Pathology. 6:1-15. eds. Fenoglio-Preiser C, Wolff CM, Rilke F. Field & Wood, Inc., Philadelphia.
3. Nadji M, Morales AR. Immunoperoxidase, part I: the techniques and pitfalls. Laboratory Medicine. 1983; 14:767.
4. Omata M, Liew CT, Ashcavai M, Peters RL. Nonimmunologic binding of horseradish peroxidase to hepatitis B surface antigen: a possible source of error in immunohistochemistry. American Journal of Clinical Pathology. 1980; 73:626.
5. Krynitz B, Rozell B and Lindelof B. Differences in peritumoral inflammatory skin infiltrate between squamous cell carcinomas in organ transplant recipients and immunocompetent patients. Acta Dermato Venerologica. 2010; 90:379-385.

【生产企业】

企业名称：Leica Biosystems Newcastle Ltd

地址：Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle Upon Tyne, NE12 8EW, United Kingdom. 邮政编码：NE12 8EW

电话和传真号码：+44 191 215 4242

代理人和售后服务单位：徕卡显微系统（上海）贸易有限公司

地址：上海市外高桥保税区富特北路 127 号 3 楼 C 部位

联系方式：电话：021-63876606 传真：021-63876698

【医疗器械注册证书编号】

国食药监械（进）字 2014 第 3404353 号

【产品标准编号】

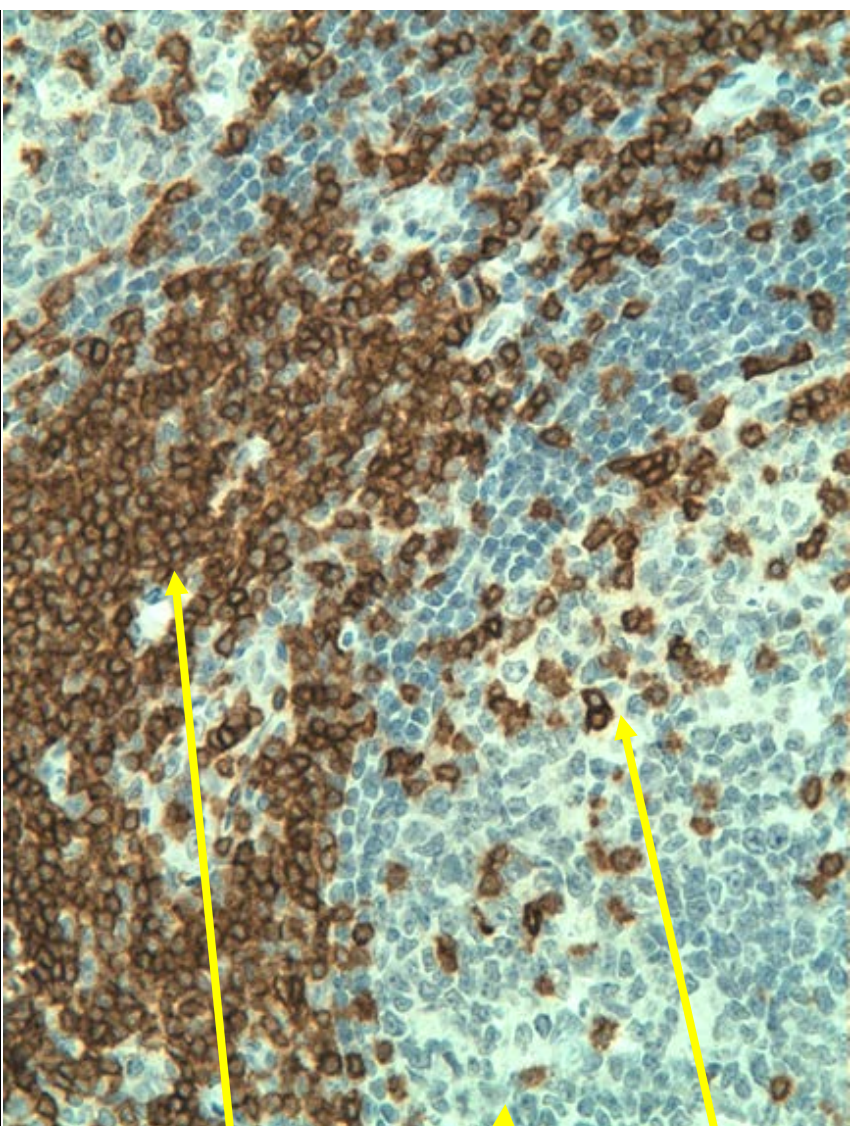
YZB/UK 5138-2014

【说明书批准及修改日期】

2014 年 9 月 15 日

附录

染色示例：



生发中心 T 淋巴细胞
浸润细胞膜染色

生发中心 B 细胞染色阴性
(内对照)

滤泡中 T 细胞膜染色
阳性

图 1. 扁桃体增殖细胞 NCL-L-CD3-565 阳性染色图 (放大倍数 x40 物镜)。

阳性染色：T 细胞膜呈棕染。