ICS 11.040.55
C 30

YY

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 0639—2008/ISO 19001:2002

体外诊断医疗器械　制造商为生物学染色用体外诊断试剂提供的信息

In vitro diagnostic medical devices—Information supplied by the manufacturer with in vitro diagnostic reagents for staining in biology

(ISO 19001:2002,IDT)

2008-04-25 发布　　　　2009-06-01 实施

国家食品药品监督管理局　发布

中华人民共和国医药
行业标准
体外诊断医疗器械　制造商为生物学染色
用体外诊断试剂提供的信息
YY/T 0639—2008/ISO 19001:2002
*
中国标准出版社出版发行
北京复兴门外三里河北街16号
邮政编码:100045
网址 www.spc.net.cn
电话:68523946　68517548
中国标准出版社秦皇岛印刷厂印刷
各地新华书店经销
*
开本 880×1230　1/16　印张 1　字数 25 千字
2008年8月第一版　2008年8月第一次印刷
*
书号:155066·2-18978　定价 16.00 元

如有印装差错　由本社发行中心调换
版权专有　侵权必究
举报电话:(010)68533533

前　　言

本标准等同采用 ISO 19001:2002《体外诊断医疗器械　制造商为生物学染色用体外诊断试剂提供的信息》(英文版)。

本标准等同翻译 ISO 19001:2002。

为便于使用,本标准做了下列编辑性修改:

——“本国际标准”一词改为“本标准”;

——用小数点“.”代替作为小数点的逗号“,”;

——将“大写字母或粗体字”改为“黑体字”;

——删除国际标准的前言。

本标准的附录 A 为资料性附录。

本标准由国家食品药品监督管理局提出。

本标准由全国医用临床检验实验室和体外诊断系统标准化技术委员会归口。

本标准起草单位:北京市医疗器械检验所。

本标准主要起草人:杜海鸥、张宏、刘毅。

引　　言

本标准与 EN 375 和 EN 376 相关,应该与 EN 375 和 EN 376 联合使用。

生物染色所需要使用的试剂以及附录 A 中制造商所提供的四种染色过程具体实例是以欧洲一致通过的意见为依据的;欧洲方面对于第 4 章所列出的要求给出了科学、合理的解释。此信息可帮助染色剂、染液、发光试剂和用于生物学染色的其他试剂的制造商、供应商以及零售商遵从所要求的特定的产品信息。

体外诊断医疗器械　制造商为生物学染色用体外诊断试剂提供的信息

1　范围

本标准规定了制造商为生物学染色用试剂所提供信息的要求。本标准适用于染料、染色剂、发光试剂和用于生物学染色的其他试剂的生产商、供应商和零售商。在生物染色所有领域中，本标准所规定的制造商提供信息的要求，是获得可参照和可复现结果的先决条件。

2　规范性引用文件

下列文件中的条款通过在本标准中引用而构成为本标准的条款。凡是注日期的引用文件，其随后所有的修改单(不包括勘误的内容)或修订版不适用于本标准，然而，鼓励根据本标准达成协议的各方研究是否可使用这些文件的最新版本。凡是不注日期的引用文件，其最新版本适用于本标准。

GB 3102.8—1993　物理化学和分子物理学的量和单位(eqv ISO 31-8:1992)

GB 3100—1993　国际单位制及其应用(eqv ISO 1000:1992)

EN 375　制造商提供的关于专业使用的体外诊断试剂的信息

EN 376　制造商提供的关于自测使用的体外诊断试剂的信息

3　术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1

制造商提供的信息　information supplied by the manufacturer

体外诊断试剂附加或随货同行的所有打印、书写、图解或其他的信息。

3.2

标签　label

标贴在容器上的任何打印、书写或图解的信息。

[EN 375]

3.3

体外诊断试剂　in virto diagnostic reagent

可以单独使用或与其他体外诊断医疗器械联合使用的试剂，制造商计划用于人源性、动物源性、植物源性的物质进行体外检测，用来提供与生理状态、健康或疾病状态或先天畸形相关的检测、诊断、监控或治疗的信息。

3.4

染色　staining

通过与染色或化学发光试剂反应的方式给某物质着色。

3.5

染色剂　dye

有色的有机化合物，当其溶于适当的溶剂时，能使某物质着色。

注：显色的物理学基础是靠电磁波光谱在 400 nm～800 nm 的可见区内有选择性吸收(和/或发射)。染色剂是带有大量离域电子(共轭 π 电子系统)的分子。染色剂光吸收特性以吸收光谱表示，用光波长吸收曲线显示结果。光谱的形状和最大吸收波长决定于染色剂的化学结构、溶剂以及测量光谱的条件。

3.6

染液　stain

在规定溶剂中，规定浓度条件下用于染色的一种或多种染色剂的溶液。

注：染液可以直接把染色剂溶解到溶剂中而获得；或者可以适当稀释储存液而获得。

3.6.1

染液储存液　stock solution of stain

高于应用液浓度的一种或多种染色剂的稳定溶液。

注：稳定性指即使在有其他染液共存时也具有恒定的特性。

3.7

化学发光试剂　chromogenic reagent

与细胞和组织中已有的或诱导产生的特定化学基团反应，在原位产生有色复合物的试剂。

示例：一个典型的化学发光试剂是：

a)　重氮盐；

b)　雪夫(Schiff)试剂。

3.8

荧光染料　fluorochrome

由短波长激发光激发，释放出可见光的试剂。

3.9

抗体　antibody

由免疫原性物质刺激 B-淋巴细胞产生，并能与其结合的特异性免疫球蛋白。

注：免疫原性物质的分子包含一种或多种带有独特化学成分的部分，即表位。

3.9.1

多克隆抗体　polyclonal antibody

能够与某类免疫原性物质发生特异性反应的抗体混合物。

3.9.2

单克隆抗体　monoclonal antibody

能够与某种免疫原性物质的单一表位发生特异性反应的抗体。

3.10

核酸探针　nucleic acid probe

有特定长度的，可以和核酸中的核苷特异序列互补结合的单链寡聚核苷或多聚核苷。

3.11

凝集素　lectin

具有两个或更多的能识别并结合特异糖类残基位点的非免疫原性蛋白质。

4　制造商提供信息的要求

4.1　通用要求

4.1.1　制造商为生物学染色用体外诊断试剂提供的信息

制造商提供的关于生物学染色中使用的试剂的信息应与 GB 3102.8、GB 3100、EN 375 和 EN 376 相符。应特别注意 EN 375 中给出警示。此外，对于在生物学染色中使用的各种试剂，相关的地方应满足 4.1.2、4.1.3、4.1.4 中规定的要求。

4.1.2　产品名称

适用时，产品名称应包括 CAS 注册号和颜色索引名称和编号。

注 1：CAS——注册号是化学摘要服务注册号。是用来在化学摘要中检索化学物质特异性的唯一的数字编码。

注 2：颜色索引包含 5 位数，对于大多数的染色剂来说，有一个 C.I 编码和一个特殊结构的名称。

4.1.3 试剂的说明

试剂的说明应包含适当的物理化学的数据，并随附每批的相关数据单表。

数据至少应包含下列信息：

a) 包括平衡离子的分子式；

b) 摩尔质量(g/mol)，明确阐述是否含有平衡离子；

c) 干扰物质的可允许限；

对于有色的有机化合物，数据还应包含：

d) 摩尔吸收度(此可以用纯染色剂分子浓度而非总染色剂替代)；

e) 处于最大吸收峰的波长或波数；

f) 薄层色谱，高效液相色谱或高效薄层色谱数据。

4.1.4 预期用途

应提供生物学染色指南和定性与定量的步骤(如适用)，应包括如下信息：

a) 生物原料的类型和染色前的操作和处理等；

  1) 细胞样品还是组织样品或两者都可用；

  2) 冰冻物质还是化学固定物质或两者都可用；

  3) 组织样品处理方法；

  4) 可以使用包埋介质。

b) 制造商使用的适当的反应程序详细说明，该程序是用于检测生物学染色过程中使用的染色剂、染液、化学发光试剂、荧光染料、抗体、核酸探针或凝集素的反应性；

c) 按照制造商推荐的材料、反应程序，所预期的结果；

d) 合适的阳性和阴性质控组织的注解以及结果的解释；

e) 使用制造商推荐的产品，获得公开成果的参考文献。

4.2 对特殊试剂的附加要求

4.2.1 荧光染料

无论应用类型如何，用于生物学染色过程中的荧光染料应附有下列信息：

a) 选择性，也就是对在规定条件下论证对象的描述；

b) 激发光与发射光的波长；

c) 对于结合抗体的荧光染料，荧光染料/蛋白质(F/P)的比率。

4.2.2 金属盐

生物学染色中，金属吸收过程中所使用的金属复合物，应包含下面的附加信息：

a) 学名；

b) 纯度。

4.2.3 抗体

用于生物学染色中的抗体，应包含以下信息：

a) 抗体所针对抗原(免疫原性物质)的描述，如果抗原是由抗原决定簇系统(一个CD代码)来定义的话，此描述应包含：检测(大)分子的类型、这些分子中被检出的部分、细胞定位、其所在的细胞和/或组织，和与其他表位的交叉反应性；

b) 对于单克隆抗体，克隆产生(组织培养上层液或腹水)方法，免疫球蛋白亚型和轻链的特性；

c) 对于多克隆抗体来说，动物宿主以及是否使用了整个血清或丙种球蛋白片段；

d) 形态(溶液或冻干粉末)以及总蛋白和特异抗体的量的描述，若是溶液，则应包括稀释液或介质的性质和浓度的描述；

e) 适用时，应有任何添加到抗体上的分子连接体或分子延伸体的描述；

f) 关于纯度的描述，应包括对于杂质的提纯技术和检测方法(例如，免疫印迹、免疫组织化学)；

g) 已出版的关于抗体应用的适用参考文献。

4.2.4 核酸探针

在生物学染色中使用的核酸探针应符合下列信息：

a) 碱基序列以及探针是单链还是双链；

b) 探针的摩尔质量或碱基数，如适用，提供鸟嘌呤-胞嘧啶碱基对的百分数；

c) 使用的标记物（放射性同位素或非放射性分子）；对于非放射性标记物来说，应注明探针标记端点（3’端和/或5’端）和标记率；

d) 被检测的目标基因（DNA或RNA序列）；

e) 形态（溶液或冻干粉末）和量（pg或pmol）或浓度（pg/mL或pmol/mL）的描述，以及溶液中稀释液和介质的种类和浓度；

f) 对纯度的声明，包括杂质提纯技术和检测方法，例如：HPLC（高效液相色谱法）；

g) 关于DNA序列来源描述的出版参考文献，有关核酸探针应用的信息和任何已知专利权的现状。

附 录 A
（资料性附录）
制造商常用的（生物染色）试剂所提供的信息举例

A.1 概要

下面所提供的信息是染色过程中的样例，不应认为是染色过程中唯一可行的方法。制造商可以依据这些程序是来检测染色剂的反应性，举例说明制造商如何依据本标准提供信息。

A.2 甲基绿-吡啰红 Y 染色

A.2.1 甲基绿

关于甲基绿染色的信息如下：

a) 产品一致性：

——甲基绿（同义词：double green，双绿 SF，light green，亮绿）；

——CAS 注册号：22383-16-0；

——颜色索引名称和编号：碱性蓝 20，42585。

b) 组成

——分子式包括负离子：$C_{26}H_{33}N_3{}^{2+}2BF_4{}^{-}$；

——有（和无）平衡离子摩尔质量：561.17 g/mol，（387.56 g/mol）；

——甲基绿阳离子的质量分数（浓度）：85%，由吸收光谱决定；

——以下给出所有的干扰物质的可允限的质量分数：

1) 水：少于 1%；

2) 无机盐：少于 0.1%；

3) 清洁剂：不存在；

4) 有颜色的杂质包括结晶紫：用薄层色谱检测不到；

5) 中性复合物：14%可溶性的淀粉。

c) 染液最大吸收峰波长：633 nm。

d) 薄层色谱：仅有一个与甲基绿成分一致的主要成分。

e) 处理及储存：室温（18℃～28℃）密闭避光于褐色玻璃瓶中稳定保存。

A.2.2 乙基绿

关于乙基绿染色的信息如下：

a) 产品一致性

1) 乙基绿（同义词：甲基绿）；

2) CAS 注册号：（7114-03-6）；

3) 颜色索引名称和编号：无颜色索引名称，42590。

b) 组成

1) 分子式包括负离子：$C_{27}H_{35}N_3{}^{2+}2BF_4{}^{-}$；

2) 有（和无）平衡离子摩尔质量：575.19 g/mol，（401.58 g/mol）；

3) 乙基绿阳离子的质量分数（浓度）：85%，由吸收光谱决定；

4) 以下给出所有的干扰物质的可允限的质量分数：

——水：少于 1%；

——无机盐：少于 0.1%；

——清洁剂:不存在;

——有颜色的杂质包括结晶紫:用薄层色谱检测不到;

——中性复合物:14%可溶性的淀粉。

c) 染液最大吸收峰波长:633 nm。

d) 薄层色谱:仅有一个与乙基绿成分一致的主要成分。

e) 处理及储存:室温(18℃~28℃)密闭避光于褐色玻璃瓶中稳定保存。

A.2.3 吡啰红 Y

关于吡啰红 Y 染色的信息如下:

a) 产品一致性:

1) 吡啰红 Y(同义词:pyronine Y,吡啰红 Y,pyronin G,吡啰红 G,pyronine G,吡罗红 G,派若/罗/洛宁,焦宁);

2) CAS 注册号:92-32-0;

3) 颜色索引名称和编号:无颜色索引名称,45005。

b) 组成:

1) 分子式包括负离子:$C_{17}H_{19}N_2O^+Cl^-$;

2) 有(和无)平衡离子摩尔质量:302.75 g/mol,(267.30 g/mol);

3) 吡啰红 Y 阳离子的质量分数:85%,由吸收光谱决定;

4) 以下给出所有的干扰物质的可允限的质量分数:

——水:少于 1%;

——无机盐:少于 0.1%;

——清洁剂:不存在;

——有颜色的杂质:用薄层色谱检测不到;

——中性复合物:19%可溶性的淀粉。

c) 染液最大吸收峰波长:550 nm。

d) 薄层色谱:现仅有一个与吡啰红 Y 成分相符的主要成分。

e) 处理及储存:室温(18℃~28℃)密闭避光于褐色玻璃瓶中稳定保存。

A.2.4 甲基绿-吡啰红 Y 染色方法的预期用途

A.2.4.1 物质类型

甲基绿-吡啰红 Y 染色用于不同组织新鲜的低温冰冻切片、石蜡切片或塑料切片。

A.2.4.2 染色前的处理

建议的固定液包括:

——Carnoy's 液[(体积分数为 99%的乙醇)+三氯甲烷+乙酸(质量分数为 99%)混合比例(60+30+10)mL];或

——(pH=7.0 的)甲醛(质量分数 3.6%)磷酸缓冲溶液;常规脱水,清洗,石蜡渗透和包埋;常规显微镜用薄片切片机切成的切片的制备。

A.2.4.3 工作液

用相当于质量 0.15 g 纯染色剂溶解于乙基绿或甲基绿的溶液中,作为染色用的阳离子(上文中的例子每样各用 0.176 g)置于 90 mL 温(50℃)蒸馏水中。

用相当于质量 0.03 g 吡啰红 Y 溶液,作为染色用的阳离子(上文中的例子每样各用 0.038 g)置于 10 mL,0.1 mol/L 的邻苯二甲酸盐缓冲液中(pH=4.0)。该溶液与乙基绿或甲基绿溶液混合。

A.2.4.4 稳定性

工作液在室温(18℃~28℃)下密闭褐色玻璃瓶中至少稳定一周。

A.2.4.5 染色程序

A.2.4.5.1 石蜡切片脱蜡。

A.2.4.5.2 切片水化。

A.2.4.5.3 在工作液中室温(大约22℃)条件下染色5 min。

A.2.4.5.4 用蒸馏水冲洗两次,每次2 s~3 s。

A.2.4.5.5 甩掉多余的水。

A.2.4.5.6 用1-丁醇搅动三次。

A.2.4.5.7 从1-丁醇中取出放到不亲水的合成树脂中直接制作标本。

A.2.4.6 预期结果

列于A.2.4.1的不同种类的物质预期的结果如下:

a) 核染色质:绿色(Carnoy固定)或蓝色(甲醛固定);

b) 核仁与核糖体富集的细胞质:红色(Carnoy固定)或(淡紫色)红色(甲醛固定);

c) 软骨基质和肥大细胞颗粒:橘黄色;

d) 肌肉、胶原和红细胞:不着色。

A.3 福尔根-雪夫(Schiff)反应

A.3.1 副品红

注意:R40可能存在不可挽回的潜在风险;

S36/37穿戴适宜的保护性的衣服和手套。

关于副品红染色的信息如下:

a) 产品一致性:

1) 副品红(同义词:basic rubin,碱性品红,parafuchsin,paramagenta,副品红,magenta 洋红0,pararosanlline,副玫瑰/蔷薇苯胺);

2) CAS注册号:569-61-9;

3) 颜色索引名称和号码:基红9,42500。

b) 组成:

1) 分子式包括负离子:$C_{19}H_{18}N_3^+Cl^-$;

2) 摩尔质量有(和无)负离子:323.73 g/mol,(288.28 g/mol);

3) 副品红阳离子的质量分数:85%,有吸收光谱决定;

4) 以下给出所有的干扰物质的可允限的质量分数:

——水:少于1%;

——无机盐:少于0.1%;

——清洁剂:不存在;

——有颜色的杂质:副品红的甲基化物同族体可微量存在,此量可被薄层色谱检测出来,但是吖啶不存在;

——无关紧要的复合物:14%可溶性的淀粉。

c) 染液最大吸收峰波长:542 nm。

d) 薄层色谱:与副品红相似的主要成分:微量甲基化物同族体。

e) 处理及储存:室温(18℃~28℃)密闭避光于褐色玻璃瓶中稳定保存。

A.3.2 福尔根-席夫反应的预期用途

A.3.2.1 物质类型

福尔根-席夫反应用于不同组织或细胞物质(涂片、组织胚胎、细胞培养、单层细胞)的石蜡切片或塑料切片。

A.3.2.2 染色前的处理

A.3.2.2.1 建议的固定液

建议的固定液包括：

a) 组织学：用(pH=7.0的)甲醛(质量分数3.6%)磷酸缓冲溶液；

b) 细胞学：

1) 液体固定物质：乙醇(体积分数96%)；

2) 挥干物质：

——用甲醛(质量分数3.6%)磷酸缓冲溶液；

——甲醇+甲醛(质量分数37%)+乙酸(质量分数100%)混合(体积比为85+10+5)mL。

在Bouin固定法中的固定物质不适用与此反应。

制造商检测化学发光试剂的反应性所采用的详细步骤来如下：

A.3.2.2.2 副品红-席夫试剂

把0.5 g的副品红溶解到15 mL 1 mol/L的盐酸中，再加到85 mL的$K_2S_2O_5$(质量分数0.5%)的水溶液中，静置24 h。加0.3 g的炭粉到100 mL的此溶液中振摇2 min后过滤。在不低于5℃的温度下保存此无色溶液。此溶液在密闭的容器中至少可以稳定12个月。

A.3.2.2.3 清洗溶液

溶解0.5 g的$K_2S_2O_5$到85 mL的蒸馏水中，再加入15 mL，1 mol/L的盐酸中，该溶液可立即使用，直到12 h后。

A.3.2.3 染色程序

A.3.2.3.1 在二甲苯中脱蜡石蜡切片5 min，然后在体积分数99%乙醇中放置1 min，再在体积分数为50%乙醇中放置1 min。

A.3.2.3.2 将塑料切片脱水，将石蜡切片和细胞物质放蒸馏水中脱蜡2 min。

A.3.2.3.3 将物质在5 mol/L的盐酸22℃条件下放置30 min～60 min水解(确切时间由物质类型决定)。

A.3.2.3.4 在蒸馏水中清洗2 min。

A.3.2.3.5 在副品红-席夫试剂中染色1 h。

A.3.2.3.6 在清洗溶液中连续洗3次，每次5 min。

A.3.2.3.7 在蒸馏水中连续洗2次，每次5 min。

A.3.2.3.8 在体积分数50%的乙醇中脱水3 min，然后在70%，99%乙醇中脱水3 min。

A.3.2.3.9 在二甲苯中洗2次，每次5 min。

A.3.2.3.10 在合成不亲水树脂上制作标本。

A.3.2.4 预期结果

列在A.3.2.1表中的物质类型预期结果如下：

细胞核(DNA)：红色。

A.4 雌激素受体的免疫组化示范

注意：此试剂包含叠氮钠(15 mmol/L)，叠氮钠会和铅或铜反应生成高爆炸性的叠氮金属。在操作过程中应用大量水冲。

A.4.1 单克隆鼠抗人雌激素受体

关于单克隆鼠抗人雌激素受体信息如下：

a) 产品一致性：单克隆鼠抗人雌激素受体，1D5；

b) 克隆：1D5；

c) 免疫原:重组人雌激素受体蛋白质;

d) 抗体来源:单克隆鼠抗体由组织培养液的上层液来提供;

e) 特异性:抗体与受体的N-端结构域(A/B区域)反应,在免疫印迹过程中,抗体与67KD多肽链反应,此多肽链由表达雌激素受体的质粒载体上与大肠杆菌转化和与COS细胞转染而得。此外,抗体与黄体的子宫内膜的细胞提取物和人乳腺癌细胞MCF-7反应;

f) 交叉反应:抗体与大鼠的雌激素受体结合;

g) 组成:用0.05 mmol/L,pH=7.2,含有15 mmol/L叠氮钠的TRIS/HCl分离的组织培养液的上层液(含有胎牛血清的细胞培养液1640介质);

——免疫球蛋白浓度:245 mg/L;

——免疫球蛋白亚型:IgG1;

——轻链一致性:K(kappa)链;

——总蛋白浓度:14.9 g/L。

h) 处理与储存:在2℃~8℃下稳定保存3年。

A.4.2 预期用途

A.4.2.1 概述

此抗体用来定性或半定量检测雌激素受体表达(如乳腺癌)。

A.4.2.2 物质类型

此抗体可用于福尔马林固定,石蜡包埋的组织切片,丙酮固定的低温切片和细胞涂片。此外,抗体可用作为ELISA(酶联免疫吸附试验)的检测抗体。

A.4.2.3 免疫组化的染色过程

A.4.2.3.1 概述

对于福尔马林固定,石蜡包埋的组织切片来说,一系列敏感染色技术是可行的,包括免疫过氧化物酶方法,APPAP(碱磷酶抗碱磷酶)技术和亲和素-生物素技术例如LSAB(酶标链霉亲和素-生物素)方法。抗原修复,例如在pH6.0,10 mmol/L的柠檬酸缓冲液中加热是强制执行的。此切片在处置过程和以下的免疫组化染色过程中不应干透。对于细胞涂片染色,APPAP方法是建议方法。

制造商采用的关于福尔马林固定,石蜡包埋的组织切片检测免疫组化抗体的反应性的详细步骤在A.4.2.3.2和A.4.2.3.4中给出。

A.4.2.3.2 试剂

A.4.2.3.2.1 过氧化氢 蒸馏中3%(质量分数)。

A.4.2.3.2.2 TRIS缓冲液(TBS),包含0.05 mol/L TRIS/HCl和pH7.6,0.15 mol/L氯化钠。

A.4.2.3.2.3 原级抗体:最理想状况下被TBS稀释后的单克隆鼠抗人雌激素受体(见A.4.2.3.4)。

A.4.2.3.2.4 标记的羊抗鼠/兔免疫球蛋白,工作液

准备此工作液至少30 min,但用以前不得超过12 h:

——5 mL TBS,pH=7.6;

——在0.01 mol/L,15 mol/L叠氮钠磷酸盐缓冲液中加入50 μL标记的羊抗鼠/兔免疫球蛋白,终浓度要达到10 mg/mL~20 mg/mL。

A.4.2.3.2.5 链霉ABC复合物/辣根过氧化物酶(-生物素复合体/辣根过氧化物酶),工作液。

按如下方法制备溶液:

——5 mL TBS,pH=7.6;

——含有50 μL链霉亲和素(1 mg/L)的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液,15 mmol/L NaN_3;

——含有50 μL标记的辣根过氧化物酶(0.25 mg/L)的0.01 mol/L磷酸盐缓冲液,15 mmol/L NaN_3。

A.4.2.3.2.6 DAB液

在0.05 mol/L,pH=7.6的10mL TBS中加入6 mg的3,3'-二氨基联苯胺,然后再在蒸馏水中加

入 0.1 mL 的过氧化氢。若实验仓促则需要过滤。

A.4.2.3.2.7 苏木素

溶解 1 g 苏木素，50 g 硫酸钾铝，0.1 g 碘酸钠和 1 g 柠檬酸到 750 mL 的蒸馏水中，用蒸馏水补足 1 000 mL。

A.4.2.3.3 **染色过程**

A.4.2.3.3.1 使组织切片脱蜡和再水化；使抗原修复(见上面染色过程)。

A.4.2.3.3.2 用质量分数 3%过氧化氢水溶液孵育 5 min。

A.4.2.3.3.3 用蒸馏水清洗然后放在 TBS 中 5 min。

A.4.2.3.3.4 最好用 TBS(见 A.4.2.3)稀释的单克隆鼠抗人雌激素受体孵育 20 min～30 min。

A.4.2.3.3.5 用 TBS 冲洗，并放在 TBS 中泡 5 min。

A.4.2.3.3.6 用标记羊抗鼠/兔免疫球蛋白工作液孵育 20 min～30 min。

A.4.2.3.3.7 用 TBS 冲洗，并放在 TBS 中泡 5 min。

A.4.2.3.3.8 用链霉 ABC 复合物/辣根过氧化物酶(链霉亲和素-生物素复合体/辣根过氧化物酶)工作液孵育 20 min～30 min。

A.4.2.3.3.9 用 TBS 冲洗，并放在 TBS 中泡 5 min。

A.4.2.3.3.10 用 DAB 溶液孵育 5 min～15 min(当接触 DAB 时要戴手套)。

A.4.2.3.3.11 用蒸馏水洗净。

A.4.2.3.3.12 用苏木素溶液复染 30 s。

A.4.2.3.3.13 自来水冲洗 3 min。

A.4.2.3.3.14 用蒸馏水洗 5 min。

A.4.2.3.3.15 体积分数 50%乙醇中脱水 3 min，然后 70%脱水 3 min，最后 99%脱水 3 min。

A.4.2.3.3.16 用二甲苯洗 2 次，每次 5 min。

A.4.2.3.3.17 在合成不透水树脂上制作标本。

A.4.2.3.4 **建议稀释法**

当检测人乳腺癌细胞时用福尔马林固定，石蜡包埋切片，最好用 pH=7.6 的 TBS 稀释抗体，混成 (1+50) μL～(1+75) μL。当检测乳腺癌的丙酮固定低温切片时，可用 TBS 稀释抗体，混成 (1+50)μL～(1+100)μL，此法适用于 APPAP 法和亲和素-生物素法。

A.4.2.3.5 **预期结果**

抗体标记细胞核的能力很强，众所周知细胞核包含大量的雌激素的受体，如子宫的上皮细胞和平滑肌细胞，和在哺乳细胞腺体的正常和增生的上皮细胞染色绝大部分定位于细胞核，细胞质则没有。但在低温切片的雌激素受体阳性染色中，细胞核和细胞质均染色。众所周知组织包含有少量的或检测不出来的雌激素受体(如克隆上皮细胞、心肌细胞、脑和结缔组织细胞)，但用抗体检测是阴性的。抗体标记乳腺癌的上皮细胞，此细胞表达雌激素受体。

组织染色依赖于组织的处理和加工而非染色本身，不正确的固定、冰冻、消化、洗涤、甩干、加热、切片或与其他组织和液体污染可造成假象或假阴性结果。

A.5 T 淋巴细胞流式细胞术示范

注意：此试剂包含叠氮钠(15 mmol/L)，叠氮钠会和铅或铜反应生成高爆炸性的叠氮化金属。在操作过程中应大量水冲。

A.5.1 **单克隆鼠抗人 T 细胞抗体**

有关单克隆鼠抗人 T 细胞抗体的信息如下：

a) 产品一致性：单克隆鼠抗人雌激素受体，CD3；

b) 克隆：UCHT1；

c) 免疫原:sezary 病人的幼稚的胸腺细胞和淋巴细胞;

d) 抗体来源:纯化的单克隆鼠抗体;

e) 特异性:抗体与胸腺、骨髓、外周血组织和血中的 T 淋巴细胞反应。大部分的 T 淋巴细胞肿瘤也表达 CD3 抗原,但是不是非 T 淋巴细胞恶性肿瘤。与在正常胸腺中的抗原的合成模式相一致,在瘤细胞内最早可检测出的是细胞质;

f) 组成:

——0.05 mmol/LTRIS/HCl 缓冲液,15 mmol/L 叠氮钠,pH7.2 质量分数 1%小牛血清白蛋白;

——免疫球蛋白亚型:IgG1;

——轻链一致性:K(kappa)链;

——总蛋白浓度:14.9 g/L;

——免疫球蛋白纯化:琼脂糖凝胶柱蛋白 A;

——纯度:质量分数大约 95%;

——结合分子:异硫氰酸荧光素(FITC);

——(F/P)比值:$E_{495/278}=1.0\pm0.1$,相应的 FITC/蛋白的摩尔比值大约为 5;

g) 保存与搬运:在 2℃～8℃下稳定保存 3 年。

A.5.2 预期用途

A.5.2.1 概述

抗体预期用于流式细胞术,抗体用于定性和定量检测 T 淋巴细胞。

A.5.2.2 物质类型

抗体用于新鲜的混匀的细胞悬液,丙酮固定的低温切片和细胞涂片。

A.5.2.3 用流式细胞术检测抗体反应性的过程

制造商使用的程序详细情况如下:

a) 收集静脉血到含有抗凝剂的试管中;

b) 方法一,在分离介质中离心把单个核细胞分离出来;方法二,在孵育阶段[见 d)]溶解红细胞;

c) 用 RPMI1640 或磷酸盐缓冲液(PBS)(0.1 mol/L 磷酸,0.15 mol/lmol/L 氯化钠,pH7.4)洗单个核细胞,2 次;

d) 把 10 μL FITC 结合单克隆鼠抗人 T 细胞抗体,CD3 试剂加到包含 1×10^6 细胞(大约 100 μL)和基质的细胞悬液。4℃暗室孵育 30 min(对于双染,R-藻红蛋白结合抗体同时加到此悬液中);

e) 用加有 2%小牛血清白蛋白的 PBS 冲洗 2 次,在适当的流体中重新使细胞悬浮,以供流式细胞分析之用;

f) 用不相关 FITC 结合用亚型单克隆抗体,作为阴性质量控制;

g) 用含有 0.3 mL 质量分数 1%的多聚甲醛的 PBS 混匀沉淀的细胞,若 4℃暗室放置,制备好的细胞可以保存 2 周;

h) 用流式细胞仪分析。

A.5.2.4 建议稀释

在流式细胞仪中使用抗体浓度为 10 μL/每个测试,对于用于低温切片和细胞涂片,抗体应用适当的稀释液稀释(1+50)μL。

A.5.2.5 预期结果

抗体检测 T 淋巴细胞表面的 CD3 分子,当评价低温切片和细胞涂片的染色时,反应产物应定位于胞膜。

组织染色依赖于组织的处理和加工而非染色本身。不正确的固定、冰冻、消化、洗涤、甩干、加热、切片或与其他组织和液体污染可造成假象或假阴性结果。

参 考 文 献

[1] The coulour index ,3rd ed. The Society of dyers and colourists ,U. K. ,1971.

[2] Council directive of 27th June 1967 on the approximation of laws,regulations and administrative provisions relating to the classification,packaging and labeling of dangerous substances(67/548/EEC).

[3] ECCLS: Dye standards, Part Ⅱ. 5: Pararosaniline(CI 42500) Histochem J. (1992) 24, pp 233-235.

[4] Al SAATI, T. , CLAMENS, S. , COHEN-KNAFO, E. , FAYE, J. C. , PRATS, H. and COINDRE, J. M. , *Production of monoclonal antibodies to human oestrogen receptor protein* (*ER*) *using recombinant ER*(*RER*), Int J Cancer(1993) 55,pp 651-654.

[5] BEVERLEY, P. C. L. and CALLARD, R. E. , *Distinctive functional characteristics of human T lymphocytes defined by E rosetting or a monoclonal anti-T cell antibody*, Eur J Immunol (1981) 11,pp 329-34.

[6] CAMPANA, D. , THOMPSON, J. S. , AMLOT, P. , BROWN, S. and JANOSSY, G. , *The cytoplasmic expression of CD*3 *antigens in normal and malignant cells of the T lymphoid lineage*, J Immunol(1987) 138,pp 648-55.

[7] EC Commission Directive 1976-07-14 76/907/EEC. Off J Eur Comm(1996:no L)360: pp1-18 and 405-424.

[8] EC Commission Directive 1983-07-29 83/467/EEC. Off J Eur Comm(1983:no L)257,pp 1-33.

[9] ERBER, W. N. , PINCHING, A. J. and MANSON, D. Y. , *Immunocytochemical detection of T cell and B cell populations in routine blood smears*,lancet(1984) 1,pp 1042-5.

[10] ERBER,W. N. ,MYNHEER,L. C. and MASON, D. Y. , APAAP *Labelling of blood and bone-marrow samples for phenotyping leukaemia*, Lancet(1986) 1,pp 761-5.

[11] HOYER, P. E. , LYON, H. , JAKOBSEN, P. and ANDERSEN, A. P. , *Standardized Methyl Green-Pyronnin Y procedures using pure dyes*, Histochem J(1986)18,pp 90-94.

[12] JAKOBSEN, P. , ANDERSEN, A. P. and LYON, H. , *Preparation and characterization of methyl green tetrafluoroborate*, HIstochemistry(1984)81,pp 177-179.

[13] JAKOBSEN,P. , LYON, H. and TREPPENDAHL, S. , *Spectrophotometric characteristics and assay of pure pyronin Y*,Histochemistry(1984) 81,pp 99-101.

[14] KUMAR,V. , GREEN,S. , STACK, G. , BERRY, M. , JIN, J. R. and CHAMBON, P. , *Functional domains of the human oestrogen receptor*,Cell(1987) 51,pp 941-951.

[15] LAL,R. B. ,EDISON L. J. and CHUSED TM. *Fixation and long-term storage of human lymohocytes for surface marker analysis by flow cytometry*,Cytometry(1988) 9,-9.

[16] SWERDLOW, S. H. , ANGERMEIER P. A and HARTMAN A. L, *Intrathymic ontogeny of the T-cell receptor associated CD*3(*T*3) *antigen*, Lab Invest(1988)58,pp 421-7.

YY/T 0639-2008

版权专有 侵权必究

*

书号:155066 · 2-18978

定价: 16.00 元