

Ki-67 抗体试剂（免疫组织化学法）说明书

说明书编号：40005b
产品编号：Kit-0005

【产品名称】

通用名称：Ki-67 抗体试剂（免疫组织化学法）

英文名称：Ki-67（MIB-1）

【包装规格】

3ml/瓶、6ml/瓶。

【预期用途】

本抗体试剂用于福尔马林固定、石蜡包埋的人体组织切片，细胞中 Ki-67 抗原的定性检测。

本抗体试剂用以辅助食道癌、胃癌、肠癌、肺癌（恶性肿瘤）和良性肿瘤的鉴别诊断。阳性细胞中抗原定位为细胞核。对任何阳性或阴性结果的解读，应由病理医生结合病理形态学、临床表现及其它检测方法进行，不作为单独的诊断指标。

【检测原理】

利用免疫学抗原抗体分子由于结构的互补和彼此亲和性所发生特异性结合原理，并通过氧化还原化学反应使标记抗体的酶显色剂显色来确定组织细胞内抗原，对其进行定位、定性。首先是联结鼠抗人 Ki-67 免疫组化单克隆抗体和组织上的 Ki-67 抗原；第二是酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物识别已经连接上的 Ki-67 抗体；第三，加入底物，聚合物上的辣根过氧化物酶部分可以催化 DAB 显色液中的 H₂O₂ 分解，使联苯胺氧化变成联苯亚胺，使组织切片中抗原位点上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 Ki-67 的存在位点和情况。为了质量控制，建议使用福尔马林固定石蜡包埋的人类食道鳞癌组织切片作为阳性对照。

本抗体试剂克隆号为：MIB-1；细胞染色定位为细胞核，间或少量细胞质；抗原修复必须采用柠檬酸缓冲液高压法。

【主要组成成份】

鼠抗人 Ki-67 免疫组化单克隆抗体（IgG1/kappa；来源：小鼠细胞培养上清液；克隆号：MIB-1）

未提供的迈新配套材料如下：

迈新 DAB 染色液（聚合物法）（迈新产品编号：Kit-0014，内含：内源性过氧化物酶阻断剂、酶标羊抗小鼠/兔 IgG 聚合物、稳定型 DAB 缓冲液、稳定型 DAB 底物、稳定型 DAB 色原、DAB 显色液配制管）；

PBS 磷酸盐缓冲液（粉剂）（迈新产品编号：PBS-0060/0061）；

柠檬酸组织抗原修复液（100×）（迈新产品编号：MVS-0100/0101）；

苏木素体细胞染色液（迈新产品编号：CTS-1099/1097/1090/1091）；

空白对照试剂（可采用迈新抗体稀释液，迈新产品编号：ABD-0030）

其他未提供材料：

阳性对照片（食道鳞癌）、二甲苯、乙醇（无水、95%、85%）、蒸馏水、中性树胶。

【储存条件及有效期】

2~8℃避光保存，禁止冻存。有效期为 12 个月。

使用时，采取即拿即用的原则，在每次使用后，应立即放回 2~8℃的冰柜中进行保存。

【样本要求】

新鲜活检或外科样本组织，中性福尔马林固定，固定时间8~24小时，参照病理技术规范要求取材、脱水、石蜡包埋并制成蜡块。蜡块在常温条件下保存有效期5年。

组织切片厚度为 3~5 μm 黏附在聚赖氨酸玻片上，轻拍切片架并用吸湿纸吸取组织切片中的水滴，再放入 56~60℃ 恒温箱中加热两个小时后，从恒温箱中移出放置在室温下冷却。

如果切片在室温下（15~28℃）保存，为了良好地重现组织中抗原分布情况，要在7天内完成检测。

【检测方法】

1 检测所需仪器、设备：

移液器、免疫组化油笔、1000w 可调电磁炉、计时器、孵育盒、染色架、盖玻片、不锈钢压力锅、光学显微镜（40×~200×）、洗瓶。

2 溶液配制：

PBS溶液、柠檬酸组织抗原修复液以及DAB显色液的配制参见各产品说明书。

3 试验温度条件：15℃~28℃

4 试验步骤：

a) 脱蜡和水化

石蜡切片置于新鲜的二甲苯中，浸泡15分钟×2次；

去除多余的液体后，置无水乙醇中，浸泡3分钟×2次；

去除多余的液体后，置95%乙醇中，浸泡3分钟；

去除多余的液体后，置85%乙醇中，浸泡3分钟；

自来水冲洗1分钟；

PBS溶液冲洗3分钟×3次。

b) 高压加热柠檬酸组织抗原修复液

压力锅开盖在电磁炉上大功率加热柠檬酸组织抗原修复液至沸腾；

将脱蜡水化后的切片置于耐高温染色架上，放入压力锅中；

盖上锅盖，扣上压力阀，继续加热至喷汽，开始计时2分钟后，压力锅离开热源，自然冷却5分钟；

用自来水冲淋使之冷却，去阀开盖，待锅中液体自然冷却至室温后取出切片；

蒸馏水冲洗3分钟×2次；

用PBS溶液冲洗3分钟×3次。

注意：抗原修复时，修复液的量必须保证切片始终能浸泡在液体中，一般情况：修复液的量为800ml/1架—1500ml/3架。

c) 阻断内源性过氧化物酶

除去PBS溶液，在油笔圈定的待测组织区域内加100μl内源性过氧化物酶阻断剂，室温下孵育10分钟。

PBS溶液冲洗3分钟×3次。

d) 加Ki-67抗体或空白对照试剂

除去PBS溶液，加100μl的Ki-67抗体或空白对照试剂，室温下孵育60分钟。

PBS溶液冲洗3分钟×3次。

e) 加酶标聚合物

除去PBS溶液，加100μl 酶标羊抗小鼠/兔IgG聚合物，室温下孵育15分钟。

PBS溶液冲洗3分钟×3次。

f) 显色

除去PBS溶液，加100~200μl新鲜配制的DAB显色液，孵育3~5分钟，光镜观察染色结果一般不超过10分钟。

g) 复染

自来水冲洗，加100~200μl苏木素体细胞染色液孵育10~30秒。

PBS溶液或自来水冲洗返蓝。

注意：依据作用的苏木素染色液的强度和孵育时间的长短，对比染色结果导致细胞核呈现淡蓝到深蓝颜色的反应，而过染或是不足染色都有可能危及正确结果的判断。

h) 脱水、透明、封片

85%乙醇中，浸泡3分钟；
95%乙醇中，浸泡3分钟；
无水乙醇，浸泡3分钟；
二甲苯透明；
中性树胶和盖玻片封片。

5 结果判断：

免疫组化检测结果要由有资格的病理医生在光学显微镜下对染色后切片进行观察并进行判断。

5.1 免疫组化染色结果必须建立在组织阳性对照、试剂阴性对照实验成立的基础上，染色结果的判读：阳性（+）/阴性（-）；但是由于正常细胞也会出现少量的染色情况，因此我们根据大量的实验和文献报道规定了：随机选择至少 5 个 10-40×或 10-100×高倍视野下数 1000 个细胞进行观察免疫组化染色结果。根据阳性肿瘤细胞占全部肿瘤细胞的比例将阳性结果分为 3 级，阳性细胞<10%；阳性细胞介于 10%~40%；阳性细胞>40%。

5.1.1 染色阳性结果是指组织切片中特定细胞的细胞核上见有棕黄色着色，阳性细胞>40%，且无背景染色。

5.1.2 阴性染色结果是组织内预期细胞中未见棕黄色着色或者阳性细胞<40%。

注意：在每一次染色过程中，必须使用阳性对照片和空白对照试剂，否则结果不可采用。

5.2 组织阳性对照和试剂阴性对照实验成立的基础上，受检组织片中出现阳性染色表示组织切片上存有 Ki-67 抗原。

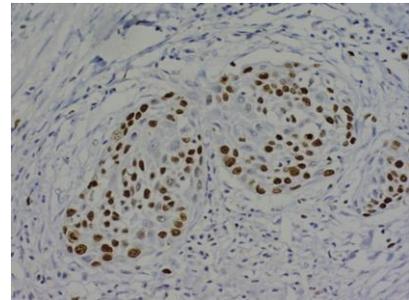
5.3 组织阳性对照和试剂阴性对照实验成立的基础上，受检组织片中出现阴性染色表示组织切片上存有Ki-67抗原少或者可能性比较低。

5.4 如果组织阳性对照和试剂阴性对照实验均为阴性结果，表明试剂失效或实验操作错误，应重新实验。

过程与结果质控

阳性对照：

阳性对照可作为正确组织准备和适当染色技术的指示。每次染色都要包含同一测试条件下的阳性对照片进行比较。已知的阳性组织对照只能用于监控步骤的正确执行和试剂的测试，并不用于帮助叙述病人样本的明确诊断。如果阳性组织对照不能显示适当的阳性染色，此批实验测试样本的结果应认为是无效的。



福尔马林固定、石蜡包埋食道鳞癌组织切片，Ki-67 抗体试剂染色，细胞核阳性。

空白对照：

每次染色都要包含同一测试条件下的空白对照试剂进行对比。空白对照试剂来代替抗体对组织切片进行染色，用来判断非特异性着色，并对抗原部位特异性染色提供更好的解释。空白对照试剂的孵育时间必须与抗体一致。

【检测结果的解释】

- 1 抗原修复、孵育时间、温度的修改或应用其他方法均有可能得出错误结果。
- 2 在每一次染色过程中，必须使用阳性对照片和空白对照试剂，否则结果不可采用。
- 3 当在室温下保存时，样本应该在组织封存到载玻片上 7 天内染色。避免组织中抗原的退变产生假阴性结果。
- 4 如果阳性组织对照不能显示适当的阳性染色，则说明操作错误，此批实验测试样本的结果应认为是无效的。

【检测方法的局限性】

免疫组化是一种多步骤病理诊断过程，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。

任何阳性染色或阳性染色缺失的临床解释都必须参考其临床病史、细胞形态学和其他组织病理学背景进行评估。任何染色或其缺失的临床解释都必须以形态学研究和正确的对照以及其他诊断试验作为补充。测试结果及诊断价值也应由病理医生结合临床及其他检查结果加以综合分析和判断。

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。

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。

【产品性能指标】

特异性

对一系列正常组织和相关恶性病变组织进行特异性细胞核染色研究，正常组织结果如下：大脑 (0/3)、小脑 (0/3)、肾上腺 (3/3)、卵巢 (3/3)、胰腺 (1/3)、甲状旁腺 (3/3)、垂体 (3/3)、睾丸 (3/3)、甲状腺 (3/3)、乳腺 (3/3)、脾 (3/3)、扁桃体 (3/3)、胸腺 (3/3)、骨髓 (3/3)、肺 (7/7)、心脏 (1/3)、食管 (3/3)、胃 (3/3)、小肠 (5/5)、结肠 (3/3)、肝脏 (1/3)、唾液腺 (2/3)、肾 (2/3)、前列腺 (3/3)、子宫 (6/6)、膀胱 (3/3)、骨骼肌 (0/3)、皮肤 (3/3)、外周神经 (3/3)、间皮细胞 (1/3)。相关恶性病变组织结果如下：胃癌 (5/5)、食道癌 (5/5)、乳腺癌 (4/5)、肠癌 (5/5)、前列腺癌 (5/5)、伯基特淋巴瘤 (5/5)、神经纤维瘤 (0/5)、肺非典型类癌 (0/5)、肝细胞腺癌 (1/5)、平滑肌瘤 (0/5)。

用 Ki-67 阳性对照片（食道鳞癌）进行检测，三份 Ki-67 阳性对照片（食道鳞癌）中皮肤基底细胞、淋巴细胞等增殖期细胞细胞核上观察到黄色或棕黄色着色；而组织内的间质细胞、平滑肌细胞等非增殖期细胞上未观察到任何黄色或棕黄色着色。用空白对照试剂取代鼠抗人 Ki-67 免疫组化单克隆抗体配合 Ki-67 阳性对照片（食道鳞癌）进行检测，三份 Ki-67 阳性对照片（食道鳞癌）中皮肤基底细胞、淋巴细胞等增殖期细胞细胞核上应显示阴性结果。

敏感度

用 Ki-67 弱阳性对照片（食道鳞癌）进行检测，三份 Ki-67 弱阳性对照片（食道鳞癌）中皮肤基底细胞、淋巴细胞等增殖期细胞细胞核上观察到浅黄色着色，且颜色无明显差异。

批内差

在同一批次的产品随机抽取 20 盒样本采用阳性质控品进行检测，然后在上述 20 盒的样本随机抽取一盒，对相同质控品连续检测 20 次，检测结果均为阳性。

批间差

随机抽取3批抗体试剂的样本，每批抗体试剂抽样数3盒，对每份样本采用阳性内部质控物进行检测，检测结果均为阳性。

【注意事项】

- 1 本品仅用于体外诊断，不做其它用途。
- 2 本抗体需配合使用迈新 DAB 染色液（聚合物法）等配套产品进行检测，不得使用其它生产商产品代替使用。
- 3 需专业人员使用。
- 4 鼠抗人 Ki-67 免疫组化单克隆抗体来自生物资源，对其处理应符合相关要求。
- 5 应用适当的防护措施，以避免试剂同皮肤和眼睛接触。
- 6 此抗体试剂是否应用于非福尔马林固定组织还未得到证实。
- 7 试剂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 应建明,张晓华,李敏,李宁,潘增刚,高子芬.端粒酶基因和 Ki-67 蛋白在 Hodgkin 淋巴瘤肿瘤细胞中的表达[J].北京大学学报,2001,33(05):407—410.
- 2 郭学良,傅丽娜,林庚金,郭宗林,主余华,李开智. Ki-67、端粒酶在结直肠良、恶性病变中的表达及其意义[J].肿瘤杂志,2002,22(01):50-53.
- 3 王淑琴,黄凤昌,李红芬,纪小龙.免疫组化在常规病理诊断中的应用[J].中国试验诊断学,1998,2(6):315-316.
- 4 智俐,贾军乐.免疫组化技术中抗原修复的应用[J].包头医学院学,2006,22(02):204-205 .
- 5 唐伟国主编.医学检验诊断试剂的制备与应用[M].上海:上海科学技术文献出版社,1996.12-14.
- 6 许良中,杨文涛.免疫组织化学反应结果的判断标准[J].中国癌症杂志,1996,6(04):290-231.

【生产企业】福州迈新生物技术开发有限公司

注册地址：福建省福州市闽侯县科技东路 3 号福州高新区海西高新技术产业园创新园 12 号楼 邮编：350108

生产地址：福州高新区海西高新技术产业园创新园 12 号楼 1-3 层、5-6 层 邮编：350108

电话：0591-83732741 传真：0591-87641987 网址：www.maxim.com.cn

【医疗器械生产企业许可证编号】闽食药监械生产许第 20100169 号

【医疗器械注册证书编号】国械注准 20143402175

【产品标准编号】YZB/国 7314-2014

【说明书批准及修改日期】2014 年 12 月 12 日