

**Claudin18.2 检测试剂盒(免疫组织化学法)**  
说明书

**【产品名称】**

通用名称：Claudin18.2 检测试剂盒(免疫组织化学法)

英文名称：Claudin18.2 IHC 3B10 Kit

**【包装规格】**

2ml

**【预期用途】**

本试剂盒用于体外半定量检测中性福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)的胃癌、胰腺癌、结直肠癌和卵巢癌组织切片中 Claudin18.2 蛋白的状态，用于组织学评价。

**【检测原理】**

Claudin18.2 免疫组化法检测福尔马林固定石蜡切片组织样本，使用即用型 Claudin18.2 一抗（克隆 3B10）孵育后，采用即用型显色技术进行显色。对后续添加色原的酶反应，会在抗原部位上形成可见的反应产物。然后对该组织切片进行复染、脱水、透明和固定。并在光学显微镜下观察结果。

**【组成成分】**

由重组 Claudin18.2 鼠单克隆抗体和抗体稀释液组成

**【生产日期】**

见标签

**【有效期】**

2~8℃下储存，有效期为 12 个月。生产日期和失效期见标签。避免冷冻。使用后请立即放回 2-8℃。任何偏离该温度的储存条件都可能导致试验无效。请确保在指定有效期内使用本试剂盒。如果出现溶液浑浊、发出臭味及出现沉淀物的现象，表明试剂盒受到了污染。

**【适用仪器】**

LEICA BOND III、DAKO Link 48

**【样本要求】**

所有样本必须经过处理从而保存组织用于免疫组化染色。应当对所有样本采用标准的组织处理方法。建议在福尔马林固定剂中制备组织，然后进行常规组织处理并用石蜡包埋。例如，样本应制成 3mm-4mm 的厚度，然后在 10%的中性福尔马林缓冲液中固定 18-24 小时。随后应当使用梯度酒精脱水并使用二甲苯透明，紧接着在温度不超过 60℃的熔化石蜡中浸蜡。组织样本应切成 4μm -5μm，供 Claudin18.2 癌蛋白评估和肿瘤验证的玻片，应当在相同时间制备。为了保存抗原活性，一旦将组织置于载玻片上制成切片，切片应于 2~8℃（首选）或室温（不超过 25℃）下避光保存。

本试剂盒不包含，但需要配套使用的材料如下：

LEICA BOND III 平台

设备	LEICA Bond III 全自动 IHC 和 ISH 染色系统
试剂	BOND Epitope Retrieval Solution 2（修复液）
	BOND Wash Solution 10X(清洗缓冲液)
	BOND Polymer Refine Detection DAB（DAB 聚合物检测试剂）
	蒸馏水或去离子水（试剂水）
耗材	防脱载玻片
	盖玻片
	永久性封片剂和封片所需的辅助试剂

## DAKO Link 48 平台

设备	DAKO Autostainer Link 48 组织染色机
	DAKO PT Link 全自动脱蜡抗原修复仪
试剂	EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution ,low pH (抗原修复液)
	EnVision FLEX Wash Buffer 20X(清洗缓冲液)
	EnVision™ FLEX+(Link) Kit
	DAB+Substrate-Chromogen Solutino (底物-色原溶液)
	EnVision™ FLEX Hematoxylin
	蒸馏水或去离子水
耗材	防脱载玻片
	盖玻片
	永久性封片剂和封片所需的辅助试剂

### 【检测方法】

#### LEICA BOND III 平台

##### 试剂准备:

清洗缓冲液 BOND Wash Solution Concentrate (10X)

使用蒸馏水或去离子水, 按照 1:10 比例稀释清洗缓冲液 (10X), 配置足量的试剂用于检测使用。

##### 染色前准备及说明:

- 1.免疫染色前, 所需试剂应提前复温到室温 (18°C~27°C)。
- 2.所有孵育需要在室温 (18°C~27°C) 下进行。
- 3.染色过程中请注意不要干片, 否则可能增加非特异性染色。

##### 操作步骤:

- 1.脱蜡、水化和抗原修复: 脱蜡水化后, 将插有 FFPE 组织切片的切片架浸入含 BOND Epitope Retrieval Solution 2 1x 抗原修复液中, 100°C 孵育 25 分钟后, 组织切片于抗原修复液中自然冷却至室温, 使用 BOND Wash Solution 1x 清洗缓冲液洗 5 次, 室温孵育 3 分钟。
- 2.灭活内源性过氧化物酶: 用 Peroxide Block 于室温孵育 5 分钟, 使用 BOND Wash Solution 1x 清洗缓冲液洗 3 次。
- 3.一抗孵育: Claudin18.2 抗体试剂, 室温孵育 35 分钟, 使用 BOND Wash Solution 1x 清洗缓冲液洗 3 次。
- 4.二抗孵育: Post Primary (BOND Polymer Refine Detection DAB) 室温孵育 8 分钟, BOND Wash Solution 1x 清洗缓冲液洗 2 分钟×3 次; Polymer (BOND Polymer Refine Detection DAB) 孵育 8 分钟, BOND Wash Solution 1x 清洗缓冲液洗 2 分钟×2 次, 去离子水洗 1 次。
- 5.DAB 显色: Mixed DAB Refine (BOND Polymer Refine Detection DAB) 室温反应 10 分钟, 去离子水洗 3 次。
- 6.复染: 使用苏木素室温染色 5 分钟, 去离子水洗 1 次, BOND Wash Solution 1X 清洗缓冲液洗 1 次, 去离子水洗 1 次。
- 7.封片: 脱水透明后, 使用适量封片剂封片, 显微镜下观察并进行结果判读。

## DAKO Link 48 平台

### 试剂准备:

免疫组化抗原修复缓冲液 EnVision FLEX Target Retrieval Solution ,Low pH (50X)

使用蒸馏水或去离子水(试剂级水),按 1:50 比例稀释低 pH 值的抗原修复液 (50x), pH 值为 6.1±0.2, 该 1X 免疫组化抗原修复液可在 5 天之内使用三次。

清洗缓冲液 EnVision FLEX wash Buffer (20X)

使用蒸馏水或去离子水 (试剂级水),按照 1:20 比例稀释清洗缓冲液 (20X), 1X 清洗缓冲液在 2-8°C 有效期为 1 个月。

DAB+底物—色原溶液 DAB+Substrate-Chromogen Solution

每毫升的 DAB+底物缓冲液添加 1 滴液态 DAB+色原,并混匀。配置的底物-色原溶液 2-8°C 避光保持,稳定期为 5 天。

### 染色前准备及说明:

- 1.免疫染色前,所需试剂应提前复温到室温 (18°C~27°C)。
- 2.所有孵育需要在室温 (18°C~27°C) 下进行。
- 3.染色过程中请注意不要干片,否则可能增加非特异性染色。

### 操作步骤:

- 1.脱蜡、水化和抗原修复:脱蜡水化后,将插有 FFPE 组织切片的切片架浸入含 1x 抗原修复液 PT Link 缸中,97°C 孵育 25 分钟后,组织切片于抗原修复液中自然冷却至 65°C 后,从 PT Link 缸中取出插有切片的切片架,并立即放入含有 1x 室温缓冲冲洗液的缸中,切片在室温缓冲冲洗液中孵育 5 分钟。
- 2.灭活内源性过氧化物酶:用 FLEX Peroxide Block 于室温孵育 5 分钟,使用清洗缓冲液洗 1 次。
- 3.一抗孵育: Claudin18.2 抗体试剂,室温孵育 30 分钟,使用清洗缓冲液洗 1 次。
- 4.二抗孵育: FLEX/HRP 二抗试剂,室温孵育 20 分钟,使用清洗缓冲液洗 1 次,切片在室温缓冲冲洗液中孵育 5 分钟。
- 5.DAB 显色: FLEX DAB+ Sub-Chromo 室温孵育 5 分钟,使用清洗缓冲液洗 1 次, DAB ENHANCER 室温孵育 5 分钟,使用清洗缓冲液洗 1 次。
- 6.复染:使用苏木素室温染色 5 分钟,去离子水洗 1 次,缓冲冲洗液中孵育 5 分钟,去离子水洗 1 次。
- 7.封片:脱水透明后,使用适量封片剂封片,显微镜下观察并进行结果判读。

### 【检测方法的局限性】

#### A. 普通局限性

免疫组化是一项以实验室为基础的多步骤技术,用以协助解释和确定组织病理特性。这是一门要求在程序(包括选择适当的试剂、组织、固定、处理和 IHC 玻片制备)和判读各个方面进行专门培训的技术。

组织染色取决于组织染色前处理和操作情况。不恰当的固定、冰冻、溶解,冲洗、干燥、加热、切片或者其他组织或者液体的污染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。过度的或者不充分的复染可能会影响正确的结果判读。

如果存在非特异性染色,通常会出现一种浸润性的现象。也可能在用福尔马林过度固定的组织切片中,观察到结缔组织的零星染色。需使用完好无损的细胞进行染色结果判读。坏死或退化细胞常常会发生非特异性染色。还会因为蛋白质或底物反应产物的非免疫性结合,观察到假阳性结果。也会因诸如假过氧化物酶(红血球)或内源性过氧化物酶(细胞色素

C) 之类的内源性酶导致上述情况，这取决于所使用的免疫组化染色类型。未曾预料的免疫组化染色或染色变异，可能是编码基因或抗原表达水平发生改变的结果。预期染色模式的任何改变，都应结合所有其他诊断调查进行判读。应当通过形态学研究和使用适当的对照材料，对免疫组化染色的解释加以补充，并且应当接合患者的临床病史和具有资质的病理医生进行的其他诊断试验，对解释进行评估。必须在适当认证/具有执照的实验室内、在具有资质且经验丰富的病理医生监督下，进行试验（即评估阳性和阴性对照的充分性）及对免疫组化染色与否进行解释，上述病理医生对免疫组化试验及其解释的总体评估负有责任

#### B. 产品特定局限性

本产品并非设计用于流式细胞仪。还未就流式细胞仪确定其性能特点。假阴性结果可视为组织切片中抗原衰变的结果。供 Claudin18.2 蛋白评估和肿瘤检测的玻片，应当在相同时间制备。为保持抗原性，当在室温（20°C-25°C）下保存时，应当在切片后的 4-6 周内，对粘附在玻片中的组织切片进行染色。切片后，建议在 37°C 温度下对玻片进行 12-18 小时的孵育。需要额外粘附的切片，可在 60°C 温度下再多孵育一小时。应当按照规定的顺序进行所有的试验步骤。与该顺序的任何偏差可致试验失效。仅可使用福尔马林固定剂来固定组织。使用任何其他类型固定剂可致试验无效。组织切片的厚度应在建议的厚度范围内，使用任何其他切片厚度可致试验无效。

#### 【产品性能指标】

1 外观：试剂组分应该齐全、完整、液体无渗漏；文字符号标识清晰；包装完整，无破损。

2 符合性：

a) 阳性对照染色结果为阳性，阳性着色的定位应准确，无背景着色。

b) 空白对照和阴性对照染色结果为阴性。

3 批内重复性

对阳性对照片进行检测，检测结果均为阳性，且染色强度及定位无明显差异；对阴性对照片进行检测，检测结果均为阴性。

4 批间重复性

对阳性对照片进行检测，检测结果均为阳性，且染色强度及定位无明显差异；对阴性对照片进行检测，检测结果应均为阴性。

5 稳定性

试剂在规定的储存条件下，保存至有效末期，产品的性能应符合上述第 2 项符合性的要求。

#### 故障排查(LEICA BOND III)

问题	可能原因	修复措施
无特异性免疫组织化学染色	完成前运行中止	使用 BOND 软件，确认是否有任何染色运行期间报告的错误以及 BOND 软件中所说明的地址
	程序选择错误	确保添加玻片对话框的染色程序区域中 IHC 程序为合适的默认值
	玻片脱蜡不足	确保添加玻片对话框的准备区域中选择了脱蜡模式
	试剂分配量不当	确保所有 BOND 试剂都已分配到合适的容器中且放置在仪器上合适的位置
	受到含叠氮化钠 BOND 溶液污染	使用新的 BOND 溶液，制备至合适的工作浓度
特异性免疫组织化学染色弱	抗原决定簇修复不当	确保 BOND 抗原决定簇修复试剂已分配到正确的容器中，且 BOND 软

		件默认到合适的抗原决定簇修复程序
	样本固定或处理不当	确保使用了福尔马林固定，且组织处理程序与检测样本相适应
	试剂盒过期	确保试剂盒在有效日期内使用
特异性免疫组织化学染色过度	抗原决定簇修复不当	确保 BOND 抗原决定簇修复试剂已分配到正确的容器中，且 BOND 软件默认到合适的抗原决定簇修复程序
	固定时有变化	确保使用了福尔马林固定，且组织处理程序与检测样本相适应。如果可以，使用其它蜡块重新试验病例。如果不可以，结合相应的 H&E 染色切片试验评价显示固定最佳的区域
非特异性背景染色	试剂分配量不当	确保所有 BOND 试剂都已分配到合适的容器中且放置在仪器上合适的位置
	玻片脱蜡不足	确保添加玻片对话框的准备区域中选择了脱蜡模式
	与组织坏死区域发生非特异性免疫组织化学交叉反应	确保使用了福尔马林固定，且处理计划与检测样本适应。如果可以，使用其他蜡块重新试验病例。如果不可以，结合相应的 H&E 染色切片试验评价显示固定最佳的区域
	染色批次完成后样本干燥	如果玻片放在过夜的批次上，建议使用 BOND 延时启动功能。确保在此期间有足量的蒸馏水或去离子水可分配在玻片上，以保证玻片不干燥
组织从样本玻片脱片	玻片选择错误或切片晾干不足	确保病人/对照切片所用的玻片合适。确保玻片充分晾干，且在 37°C 下孵育 12-18 小时（过夜）。需要更强粘着性的切片可以在 60°C 再孵育一小时

#### 故障排查(DAKO Link 48)

问题	可能原因	修复措施
切片无染色	程序错误	确认 Claudin18.2 检测试剂盒（免疫组织化学法）程序被用于切片
	与 DAB+底物-色原溶液（DAB）反应不足	确认 DAB+底物-色原溶液制备正确
	缓冲清洗液中有叠氮钠	使用 Dako 缓冲液清洗液
样本切片染色弱	固定方法不当	确保只使用中性缓冲福尔马林固定剂
	试剂添加不足	检测组织切片大小和试剂用量
	缓冲液冲洗液不合适	使用 Dako 缓冲液清洗液
样本染色弱	抗原修复不足	检测是否正确使用了预处理操作
	缓冲清洗液不合适	使用 Dako 缓冲液清洗液
切片背景染色过强	脱蜡不尽	检测是否正确进行了预处理操作
	切片上载至组织染色机时干片	确保上载拨片时，以及开始染色前，切片湿润

	试剂与组织切片的非特异性结合	检测样本固定是否合适和/或是否有坏死
	固定方法不对	确保只使用中性缓冲福尔马林固定剂，选用推荐的固定方法。
掉片	载玻片选用不当	使用 Dako FLEX IHC 显微载玻片或 Fisherbrand 阳离子防脱载玻片
	样本制备不当	染色前，切片应于 $58\pm 2^{\circ}\text{C}$ 烤箱中烤片 1 小时

**【基本信息】**

生产企业名称：北京百普赛斯生物科技股份有限公司

全国：+86 400-682-2521

北京：010-53681107

上海：021-50850665

海外：+1 800-810-0816

邮箱：（产品订购）order.cn@acrobiosystems.com

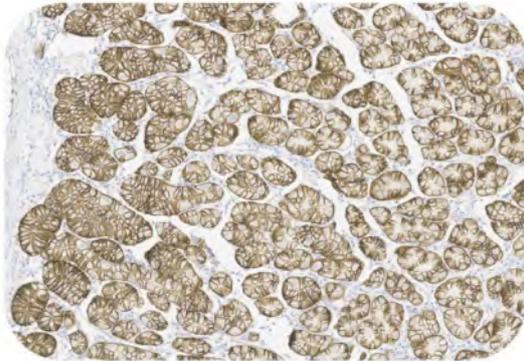
邮箱：（技术支持）tech.cn@acrobiosystems.com

地址：北京经济技术开发区宏达北路 8 号 5 号楼 4 层

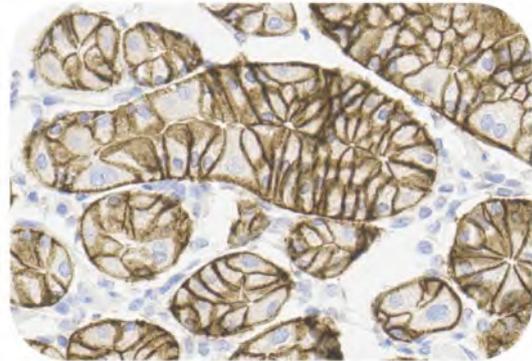
**【说明书核准及修改日期】** 2023 年 08 月

### 染色示例

交叉反应性示例：根据 Claudin-18.2 免疫组织化学交叉反应实验，Claudin-18.2 抗体与 Claudin-18.1 蛋白无任何交叉反应性染色结果。

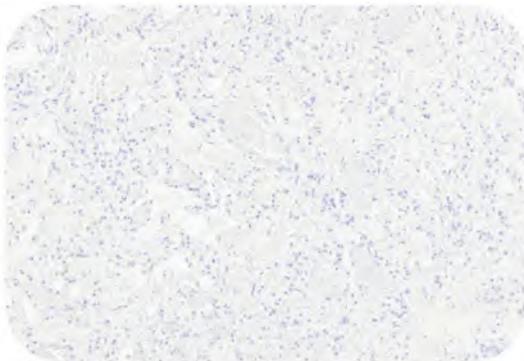


正常胃组织-10X

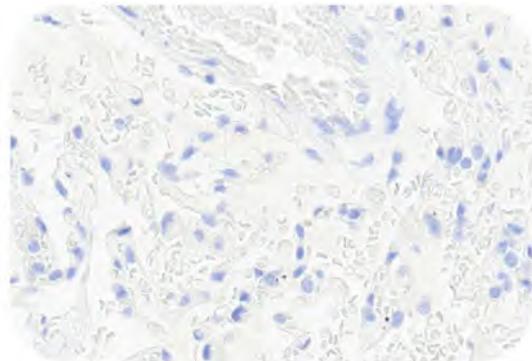


正常胃组织-40X

> 使用 Claudin18.2 IHC 3B10 Kit 对正常胃组织染色，胃腺细胞细胞质和/或细胞膜强阳性染色，其他组织细胞阴性染色



正常肺组织-10X



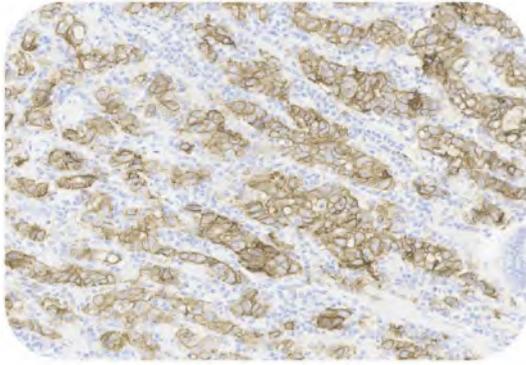
正常肺组织-40X

> 使用 Claudin18.2 IHC 3B10 染色正常肺组织，肺组织细胞阴性着色

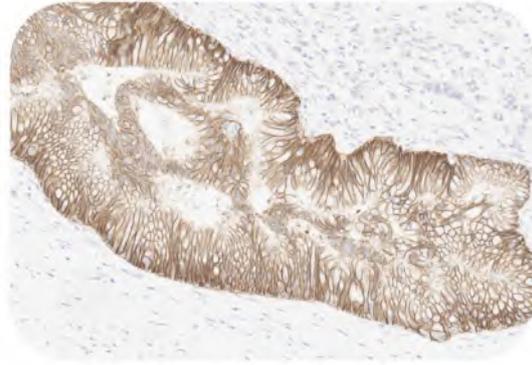
\* 人类基因 Claudin-18 有两种蛋白质亚型，Claudin-18.1 和 Claudin-18.2，这两种亚型在 N 末端 69 氨基酸内不同。Claudin-18.1 表达仅限于肺部，而 Claudin-18.2 的表达仅限于胃。

> 使用 Claudin18.2 IHC 3B10 Kit 分别染色肿瘤组织样本，阳性细胞细胞质和/或细胞膜特异性阳性着色 (染色强度 $\geq 1$ )，无非特异性着色 (染色强度 $< 1$ )，无背景染色 (染色强度 $< 1$ )。

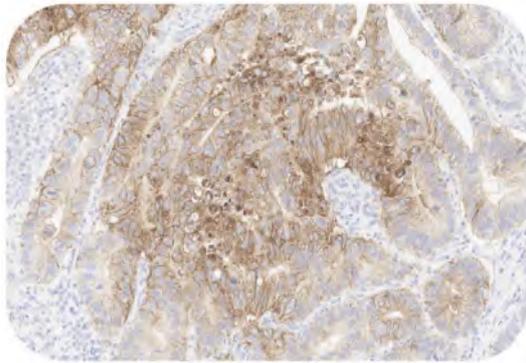
应用范围广：可拓展检测胃癌、胰腺癌、结直肠癌、卵巢癌等其他适应症。



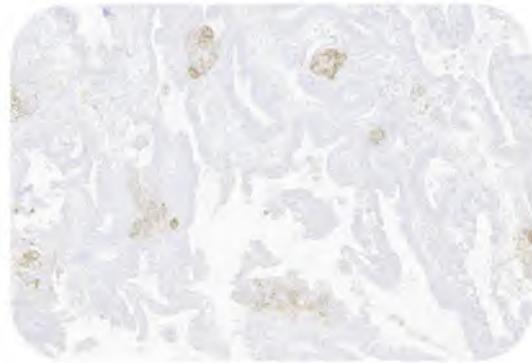
胃癌-20X



胰腺癌-20X



结直肠癌-20X



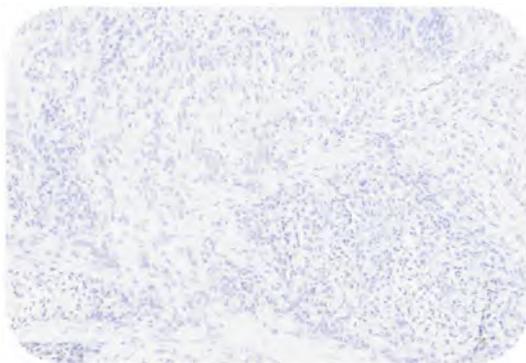
卵巢癌-20X

> 使用 Claudin18.2 IHC 3B10 分别染色胃癌、胰腺癌、结直肠癌和卵巢癌，结果显示：  
染色强度高，特异性强  
平台适用性强：可灵活运用于 LEICA BOND III/DAKO link 48 检测平台，满足更多应用需求

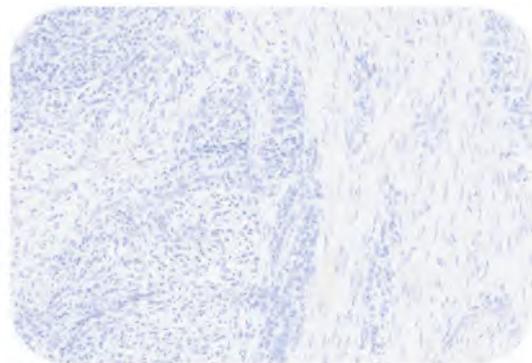
**LEICA BOND III**

**DAKO link 48**

Negative

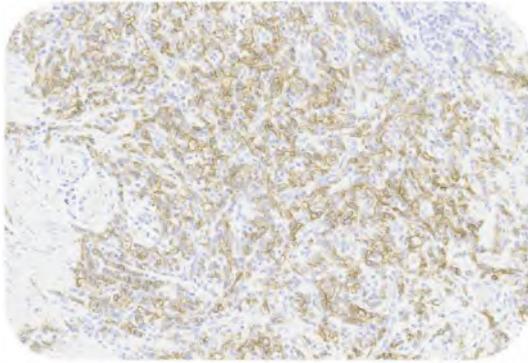


LEICA BOND III NSCLC-Negative

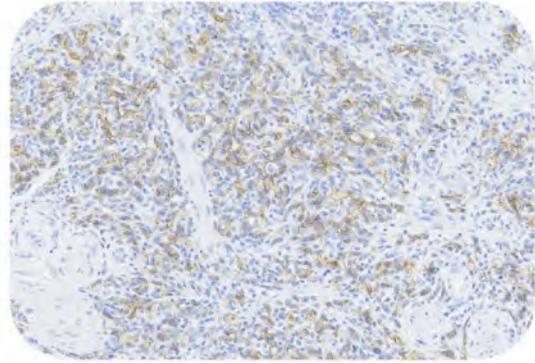


DAKO Link 48 NSCLC-Negative

$1\% \leq TC < 50\%$



LEICA BOND III NSCLC-1%≤TC<50%

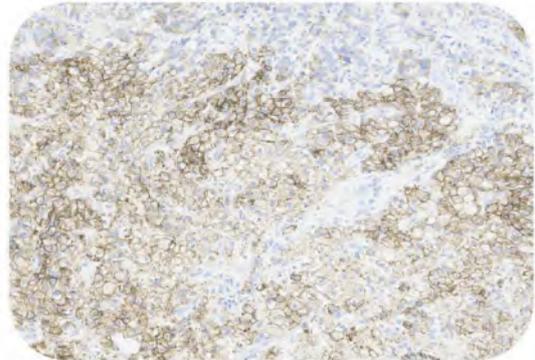


DAKO Link 48 NSCLC -1%≤TC<50%

50%≤TC≤100%



LEICA BOND III NSCLC-50%≤TC≤100%



DAKO Link 48 NSCLC-50%≤TC≤100%

> 使用 ACRO Claudin18.2 3B10 分别在 LEICA BOND III/DAKO link 48 检测平台染色，结果显示：两者的染色评分具有高度一致性。