



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 109187146 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810978362.6

(22)申请日 2018.08.27

(71)申请人 青岛北大新世纪言鼎生物医学科技
有限公司

地址 266600 山东省青岛市莱西市水集街
道办事处黄海路1号

(72)发明人 肖乐义 刘元柱 米明仁 杨勤英
李娟

(74)专利代理机构 北京迎硕知识产权代理事务
所(普通合伙) 11512

代理人 钱扬保 张群峰

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒,应用细胞核抗原、细胞核仁抗原和细胞核浆抗原的抗体及细胞膜与细胞浆中相关抗原的抗体,采用直接免疫荧光法或间接免疫荧光法,对人体细胞进行全形态染色。能清晰完整的显示细胞核尤其是能标定细胞核的核仁,清晰可见核仁的数量、形态、体积大小和分布。再加上免疫荧光染色法特征性显示细胞的抗原,从而可以对人体细胞进行全形态观察和分析。

1. 一种人体细胞全形态直接免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

(1) 提供和/或制备细胞特征性的荧光细胞学检测试剂,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、细胞核仁标志物的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物、细胞核荧光染料;

(2) 配置抗体结合反应液:用稀释液分别稀释细胞核仁标志物的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物,形成各抗体结合反应液;

(3) 制备人体细胞标本检测片;

(4) 用细胞固定液固定细胞,10-50分钟;用洗涤液清洗1-3次;

(5) 用细胞膜与细胞核膜通透液与细胞标本检测片温育5-60分钟,弃净液体;

(6) 用细胞封闭液封闭10-120分钟,弃净液体;

(7) 加入步骤(2)中的各抗体结合反应液,染色30-90分钟、弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;

(8) 用细胞核荧光染料复染5-30分钟;

(9) 用洗涤液轻微清洗细胞样本检测片2-5次;

(10) 晾干待检。

2. 一种人体细胞全形态间接免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

(1) 提供和/或制备细胞特征性的荧光细胞学检测试剂,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体、荧光标记的第二抗体、细胞核荧光染料;

(2) 配制抗体结合反应液:用稀释液分别稀释非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体、荧光标记的第二抗体,形成各抗体结合反应液;

(3) 制备人体细胞标本检测片;

(4) 用细胞固定液固定细胞,10-50分钟;用洗涤液清洗1-3次;

(5) 用细胞膜与细胞核膜通透液与细胞标本检测片温育5-60分钟,弃净液体;

(6) 用细胞封闭液封闭10-120分钟,弃净液体;

(7) 先加入步骤(2)中的非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体结合反应液,染色30-90分钟、弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;再加入步骤(2)中的荧光标记的第二抗体结合反应液,染色20-60分钟,弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;

(8) 用细胞核荧光染料复染5-30分钟;

(9) 用洗涤液轻微清洗细胞样本检测片2-5次;

(10) 晾干待检。

3. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中细胞固定液为甲醇、丙酮或多聚甲醛。

4. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中细胞封闭液为含0.5-10.0%BSA

或小牛血清的pH7.2-7.4PBS。

5. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中洗涤液为含0.1-1.0%吐温-20的pH7.2-7.4PBS。

6. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中稀释液为含0.1-1.5%BSA或小牛血清的pH7.2-7.4PBS。

7. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中细胞膜与细胞核膜通透液为曲拉通X-100。

8. 根据权利要求1或2所述的免疫荧光染色方法,其中细胞核荧光染料为DAPI。

9. 一种人体细胞全形态直接免疫荧光染色试剂盒,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、细胞核仁标志物的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物和细胞核荧光染料。

10. 一种人体细胞全形态间接免疫荧光染色试剂盒,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、非标记的细胞核仁标志物的抗体;非标记的细胞核浆标志物的抗体;非标记细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体、荧光标记的第二抗体、细胞核荧光染料。

人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明总体涉及医学检测和分析领域,具体涉及人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 人体细胞一般分为细胞膜、细胞浆(细胞质)和细胞核三部分,但在恶性细胞病理学检验时特别注重恶性细胞的细胞核和细胞核内的核仁之病理形态学变化。细胞核中的核仁是细胞核内的一个至关重要的细胞器,是细胞一切活动的枢纽。细胞核的变化尤其关键的是其核仁的变化是鉴定恶性细胞的病理形态学基础和核心证据。

[0003] 在电子显微镜下,细胞核中的核仁的结构分为:(1)纤维中心:纤维中心是核仁的最内层结构,占核仁总体积的5%。是核仁标志物的核仁纤维蛋白、核仁蛋白、核仁磷酸蛋白、RNA聚合酶I等的分布区域和所在地。纤维中心的数量、面积大小、形态等与细胞代谢活动、生长速度等密切相关,纤维中心实际上等同于细胞核的核仁中心,因而其数量、面积大小、形态及分布与细胞的恶性病理变化密切相关。(2)纤维组份:由4-10nm的纤维细丝构成,大约占核仁总体积的15%。它在核仁发生时首先形成与纤维中心紧密相连并环绕纤维中心。(3)颗粒组份:围绕着纤维组份,在致密型核仁中占75%左右。

[0004] 目前,检测恶性细胞或组织的方法或技术大致分为组织病理学检查、骨髓细胞学检查、脱落细胞检查和外周血循环肿瘤细胞(CTC)液相活检4种方法。

[0005] 组织病理学检查:主要用HE及组织化学染色检测和鉴定恶性细胞,可见整个细胞的基本结构如细胞膜、细胞浆和细胞核的细胞形态学结构,显现恶性细胞的核大、核畸形和核浆比失调的癌细胞之部分细胞病理学特征;其组织化学染色只能显示细胞膜和细胞中的某些抗原,用于病理学检查。它的主要技术缺点是不能清晰的显现核仁的形态与结构,不能明确标定核仁、不能分辨核仁与核浆;脱落细胞(包括宫颈脱落细胞)采用的化学染色法与组织学检查方法基本一样,可显现细胞的基本结构,能显示细胞核,但不能清晰的显示核仁的形态结构、不能标定核仁、不能分辨核仁与核浆。

[0006] 骨髓细胞学检查采用化学染色,可显现细胞的整体结构,显示细胞核和核仁,但骨髓细胞学采用的是一般的化学染色,对核仁显色的灵敏度较低,还不能分辨核仁与核浆,给血液病的细胞学诊断带来一定的不确定度

[0007] 目前的CTC细胞学检测的化学染色,染色结果重复性较差,灵敏度较低,基本不能清晰的显现核仁的形态结构;主流的免疫荧光染色法重点在于显示细胞表面的抗原,不能显示细胞核仁的形态与结构,通过抗原或DAPI衬染的细胞核来判断是否为CTC细胞,由于抗原的变化或抗原非法编辑可出现假阳性或假阴性。不能从细胞病理学特征检查和鉴定CTC。

发明内容

[0008] 本发明的目的是提供一种人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒。采用细胞特征性的荧光细胞学检测试剂,对细胞核仁、细胞核浆、细胞膜及细胞浆进行全形态荧光染

色,从而为人体细胞的结构演变分析以及药物开发提供基础。

[0009] 根据本发明的第一方面,提供一种人体细胞全形态直接免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0010] (1) 提供和/或制备细胞特征性的荧光细胞学检测试剂,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、细胞核仁标志物(抗原)的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物(抗原)的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物、细胞核荧光染料;

[0011] (2) 配置抗体结合反应液:用稀释液分别稀释细胞核仁标志物的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物,形成各抗体结合反应液;

[0012] (3) 制备人体细胞标本检测片;

[0013] (4) 用细胞固定液固定细胞,10-50分钟;用洗涤液清洗1-3次;

[0014] (5) 用细胞膜与细胞核膜通透液与细胞标本检测片温育5-60分钟,弃净液体;

[0015] (6) 用细胞封闭液封闭10-120分钟,弃净液体;

[0016] (7) 加入步骤(2)中的各抗体结合反应液,染色30-90分钟、弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;

[0017] (8) 用细胞核荧光染料复染5-30分钟;

[0018] (9) 用洗涤液轻微清洗细胞样本检测片2-5次;

[0019] (10) 晾干待检。

[0020] 优选情况下,步骤(7)中各抗体结合反应液的加入顺序为:依次加入细胞核仁标志物的抗体荧光标记物、细胞核浆标志物的抗体荧光标记物、细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物,每种结合反应液加入间隔时间为5-10分钟,形成从内到外的染色过程。

[0021] 根据本发明的第二方面,提供一种人体细胞全形态间接免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0022] (1) 提供和/或制备细胞特征性的荧光细胞学检测试剂,包括细胞固定液、细胞封闭液、洗涤液、稀释液、细胞膜与细胞核膜通透液、非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体、荧光标记的第二抗体、细胞核荧光染料;其中,荧光标记的第二抗体能与非标记的细胞核仁标志物的抗体进行结合。

[0023] (2) 配制抗体结合反应液:用稀释液分别稀释非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体、荧光标记的第二抗体,形成各抗体结合反应液;

[0024] (3) 制备人体细胞标本检测片;

[0025] (4) 用细胞固定液固定细胞,10-50分钟;用洗涤液清洗1-3次;

[0026] (5) 用细胞膜与细胞核膜通透液与细胞标本检测片温育5-60分钟,弃净液体;

[0027] (6) 用细胞封闭液封闭10-120分钟,弃净液体;

[0028] (7) 先加入步骤(2)中的非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体结合反应液,染色30-90分钟、弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;再加入步骤(2)中的荧光标记的第二抗体结合反应液,染色20-60分

钟,弃净液体,用洗涤液清洗1-3次;

[0029] (8)用细胞核荧光染料复染5-30分钟;

[0030] (9)用洗涤液轻微清洗细胞样本检测片2-5次;

[0031] (10)晾干待检。

[0032] 优选情况下,步骤(7)中各抗体结合反应液的加入顺序为:依次加入非标记的细胞核仁标志物的抗体、标记的细胞核浆标志物的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体结合反应液,每种结合反应液加入间隔时间为5-10分钟,形成从内到外的染色过程。

[0033] 本发明的基本原理和关键技术如下:

[0034] ①细胞核的形态结构:可以通过细胞核染色剂DAPI、Hoechst等荧光物质染色等细胞核进行染色,可整体显示细胞核的结构与形态。

[0035] ②细胞核中的核仁形态与结构:细胞核内的核仁标志物(核仁内物质)如核仁纤维蛋白、核仁蛋白、核仁磷酸蛋白、RNA聚合酶I等核仁蛋白。将这些核仁蛋白的抗体用荧光物质标记,对核仁进行荧光染色,可以直接显示并标定核仁,显示核仁的形态与结构,确定核仁的数量、形态、大小与分布。

[0036] ③细胞核中的核浆(核质)形态与结构:核浆标志物如细胞凋亡易感蛋白、人抗原R蛋白、RNA聚合酶II等核浆蛋白。用这些核浆蛋白的抗体用荧光物质标记,对核浆进行荧光染色,可显示核浆的形态结构,并可作为核仁负性衬染标志物,可以辅助标定核仁,更清晰的显示核仁、显示细胞核的形态与结构。

[0037] ④细胞膜或细胞中某些抗原的检测:如CD45、CD33、CD34、CD3和CD19,CK抗原如CK7、18、19、EpCAM、波形蛋白(vimentin)等。这些抗原物质的抗体用荧光物质标记,进行荧光染色,在荧光显微镜(共聚焦显微镜)下,可检测到细胞表面或细胞中的这些抗原物质,用于细胞的抗原鉴定。

[0038] 本发明的染色方法不仅可以鉴定人体细胞的细胞病理学形态结构,而且实际上可以观察到的是细胞核特别是细胞核仁及核浆蛋白标志物的变化,从细胞病理形态学和核仁及核浆蛋白及细胞中抗原四个方面识别鉴定人体细胞。

[0039] 本发明的关键点和核心技术核心在于能清晰完整的显示细胞核尤其是能标定细胞核的核仁,清晰可见核仁的数量、形态、体积大小和分布。这是分析人体细胞之细胞病理学的关键特征,再加上免疫荧光染色法特征性显示细胞的抗原,从而可以对人体细胞进行全形态观察和分析。

附图说明

[0040] 图1为具体实施例3的人体细胞染色结果照片。

具体实施方式

[0041] 一、人体细胞全形态直接免疫荧光染色试剂盒及方法

[0042] (1)直接免疫荧光染色试剂盒包括:

[0043] 恶性细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。

[0044] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS(含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。

[0045] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS(含吐温-20)。

- [0046] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清)。
- [0047] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100。
- [0048] 细胞核仁标志物(抗原)的抗体荧光标记物。
- [0049] 细胞核浆标志物(抗原)的抗体荧光标记物。
- [0050] 细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体荧光标记物。
- [0051] 细胞核荧光染料:DAPI。
- [0052] 其它试剂:磷酸缓冲液(PBS)、小牛血清白蛋白(BSA)、驴血浆(清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0053] (2) 荧光抗体直接染色法:
- [0054] ①用甲醇或4%多聚甲醛固定细胞,10-50分钟。
- [0055] ②用洗涤液(pH7.2-7.4PBS (含吐温-20))清洗1-3次。
- [0056] ③用0.05-3%曲拉通与细胞片温育(37℃)5-60分钟,弃净液体。
- [0057] ④用含0.5-10%BSA封闭10-120分钟(37℃),弃净液体。
- [0058] ⑤加荧光抗体直接染色试剂,37℃染色30-90分钟。弃净液体,用洗涤液(pH7.2-7.4PBS (含吐温-20))清洗1-3次。
- [0059] ⑥用DAPI复染5-30分钟。
- [0060] ⑦用洗涤液pH7.2-7.4PBS (含吐温-20),轻微清洗细胞片2-5次。
- [0061] ⑧待干,细胞镜检(荧光共聚焦显微镜或荧光显微镜)。
- [0062] 二、人体细胞全形态间接免疫荧光染色试剂盒及方法
- [0063] (1) 间接免疫荧光染色试剂盒包括:
- [0064] 恶性细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。
- [0065] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。
- [0066] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS (含吐温-20)。
- [0067] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清),加入适宜浓度的荧光标记抗体或非标记抗体,构成抗体结合反应液。
- [0068] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100。
- [0069] 非标记的细胞核仁标志物(抗原)的抗体。
- [0070] 标记的细胞核浆标志物(抗原)的抗体。
- [0071] 标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体。
- [0072] 细胞核荧光染料:DAPI。
- [0073] 荧光标记的第二抗体。
- [0074] 其它试剂:磷酸缓冲液(PBS)、小牛血清白蛋白(BSA)、驴血浆(清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0075] (2) 荧光抗体间接染色法:
- [0076] ①用甲醇或4%多聚甲醛固定细胞,10-50分钟。
- [0077] ②用洗涤液(pH7.2-7.4PBS (含吐温-20))清洗1-3次。
- [0078] ③用0.05-3%曲拉通与细胞片温育(37℃)5-60分钟。弃净液体。
- [0079] ④用含0.5-10%BSA封闭10-120分钟(37℃)。弃净液体。
- [0080] ⑤加荧光抗体间接染色试剂,先用非标记的细胞核仁标志物(抗原)的抗体、标记

的细胞核浆标志物(抗原)的抗体、标记的细胞膜和细胞浆抗原标志物的抗体的结合反应液,37℃染色30-90分钟,弃净液体,用洗涤液(pH7.2-7.4PBS(含吐温-20))清洗1-3次;再用荧光标记的第二抗体37℃染色20-60分钟,弃净液体,用洗涤液(pH7.2-7.4PBS(含吐温-20))清洗1-3次。

[0081] ⑥用DAPI复染5-30分钟。

[0082] ⑦用洗涤液pH7.2-7.4PBS(含吐温-20),轻微清洗细胞片2-5次。

[0083] ⑧待干,细胞镜检(荧光共聚焦显微镜或荧光显微镜)。

[0084] 实施例1:细胞特征性直接免疫荧光法细胞染色过程

[0085] 主要试剂:

[0086] ①荧光染料(Alexa**Fluor**®647)标记核仁蛋白(Nucleolin),橙红色;

[0087] ②荧光染料(Alexa**Fluor**®594)标记核仁纤维蛋白(fibrillarin),红色;

[0088] ③细胞核荧光染料:DAPI,蓝紫色;

[0089] ④荧光染料(Alexa**Fluor**®488)标记抗CK7、CK18、CK19单克隆抗体,绿色;

[0090] 注意各荧光染料的波长与颜色搭配。

[0091] 细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。

[0092] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS(含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。

[0093] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS(含吐温-20)。

[0094] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS(含0.1-1.5%BSA或小牛血清),加入适宜浓度的荧光标记抗体或非标记抗体,构成抗体结合反应液。

[0095] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100;

[0096] 其它试剂:磷酸缓冲液(PBS)、小牛血清白蛋白(BSA)、驴血浆(清)、吐温-20、Tris-Hcl等。

[0097] 染色程序:

[0098] (1)制备人体细胞标本检测片。

[0099] (2)用甲醇固定细胞10-30分钟;

[0100] (3)用0.05-3%曲拉通X-100,10-50分钟,通透细胞膜和细胞核膜;

[0101] (4)用pH7.2-7.4PBS(含0.5-10.0%BSA或小牛血清)封闭细胞片;

[0102] (5)加荧光染料标记抗体①、②、④,37℃染色30-60分钟。

[0103] (6) pH7.2-7.4PBS(含0.1%吐温-20)洗涤3次。

[0104] (7)用细胞核荧光染料③(DAPI)复染(衬染)细胞核5-10分钟。

[0105] (8) pH7.2-7.4PBS(含0.1%吐温-20)洗涤2次。

[0106] (9)洗涤干燥后,荧光显微镜或共聚焦显微镜观察结果。

[0107] 实施例2:细胞特征性间接免疫荧光法细胞染色过程

[0108] 主要试剂:

[0109] ①核仁蛋白(Nucleolin)抗体。

[0110] ②核仁纤维蛋白(fibrillarin)抗体。

[0111] ③细胞核荧光染料:DAPI,蓝紫色。

[0112] ④荧光染料(Alexa**Fluor**®488)标记抗CK7、CK18、CK19单克隆抗体,绿色。

[0113] ⑤细胞凋亡易感蛋白抗体—山羊抗兔(Alexa**Fluor**®488)荧光标记抗体。

- [0114] ⑥山羊抗兔IgG (Alexa**Fluor**®594) 标记荧光第二抗体。
- [0115] 注意各荧光染料的波长与颜色搭配。
- [0116] 细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。
- [0117] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。
- [0118] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS (含吐温-20)。
- [0119] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清), 加入适宜浓度的荧光标记抗体或非标记抗体, 构成抗体结合反应液。
- [0120] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100;
- [0121] 其它试剂:磷酸缓冲液 (PBS)、小牛血清白蛋白 (BSA)、驴血浆 (清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0122] 染色程序:
- [0123] (1) 制备人体细胞标本检测片。
- [0124] (2) 用甲醇固定细胞10-30分钟。
- [0125] (3) 用0.05-3%曲拉通X-100, 10-50分钟, 通透细胞膜和细胞核膜;
- [0126] (4) 用pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清) 封闭细胞片;
- [0127] (5) 加抗体①、②、⑤, 37℃染色30-60分钟。
- [0128] (6) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤3次。
- [0129] (7) 加④、⑥, 37℃染色30-60分钟。
- [0130] (8) 用细胞核荧光染料③ (DAPI) 复染 (衬染) 细胞核5-10分钟。
- [0131] (9) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤2次。
- [0132] (10) 洗涤干燥后, 荧光显微镜或共聚焦显微镜观察结果。
- [0133] 实施例3: 人体血液细胞染色
- [0134] 主要试剂:
- [0135] ①荧光染料 (Alexa**Fluor**®647) 标记核仁蛋白 (Nucleolin), 橙红色。
- [0136] ②荧光染料 (Alexa**Fluor**®594) 标记核仁纤维蛋白 (fibrillarin), 红色。
- [0137] ③细胞核荧光染料:DAPI, 蓝紫色。
- [0138] ④荧光染料 (Alexa**Fluor**®488) 标记CD45的单克隆抗体, (白细胞) 为绿色。
- [0139] 注意各荧光染料的波长与颜色搭配。
- [0140] 细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。
- [0141] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。
- [0142] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS (含吐温-20)。
- [0143] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清), 加入适宜浓度的荧光标记抗体或非标记抗体, 构成抗体结合反应液。
- [0144] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100。
- [0145] 其它试剂:磷酸缓冲液 (PBS)、小牛血清白蛋白 (BSA)、驴血浆 (清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0146] 主要仪器:荧光显微镜、共聚焦显微镜。
- [0147] 染色程序:
- [0148] (1) 制备血液细胞标本检测片。

- [0149] (2) 用甲醇固定细胞10-30分钟。
- [0150] (3) 用0.05-3%曲拉通X-100,10-50分钟,通透细胞膜和细胞核膜;
- [0151] (4) 用pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清) 封闭细胞片;
- [0152] (5) 加荧光染料标记抗体①、②、④,37℃染色30-60分钟。
- [0153] (6) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤3次。
- [0154] (7) 用细胞核荧光染料③ (DAPI) 复染 (衬染) 细胞核5-10分钟。
- [0155] (8) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤2次。
- [0156] (9) 洗涤干燥后,荧光显微镜或共聚焦显微镜观察结果。
- [0157] (10) 结果:细胞核发蓝紫色荧光、细胞核仁发红色 (橙红色) 荧光,细胞膜 (细胞浆) 发绿色荧光,照片如图1所示。
- [0158] 实施例4:肝脏细胞的染色
- [0159] 主要试剂:
- [0160] ①荧光染料 (Alexa**Fluor**®647) 标记核仁蛋白 (Nucleolin),橙红色。
- [0161] ②荧光染料 (Alexa**Fluor**®594) 标记核仁纤维蛋白 (fibrillarin),红色。
- [0162] ③细胞核荧光染料:DAPI,蓝紫色。
- [0163] ④荧光染料 (Alexa**Fluor**®488) 标记AFP和白蛋白单克隆抗体,干细胞为绿色。
- [0164] 注意各荧光染料的波长与颜色搭配。
- [0165] 细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。
- [0166] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。
- [0167] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS (含吐温-20)。
- [0168] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清),加入适宜浓度的荧光标记抗体,构成抗体结合反应液。
- [0169] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100。
- [0170] 其它试剂:磷酸缓冲液 (PBS)、小牛血清白蛋白 (BSA)、驴血浆 (清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0171] 主要仪器:荧光显微镜、共聚焦显微镜。
- [0172] 染色程序:
- [0173] (1) 制备肝脏细胞标本检测片。
- [0174] (2) 用甲醇固定细胞10-30分钟。
- [0175] (3) 用0.05-3%曲拉通X-100,10-50分钟,通透细胞膜和细胞核膜。
- [0176] (4) 用pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清) 封闭细胞片;
- [0177] (5) 加荧光染料标记抗体①、②、④,37℃染色30-60分钟。
- [0178] (6) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤3次。
- [0179] (7) 用细胞核荧光染料③ (DAPI) 复染 (衬染) 细胞核5-10分钟。
- [0180] (8) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤2次。
- [0181] (9) 洗涤干燥后,荧光显微镜或共聚焦显微镜观察结果。
- [0182] (10) 结果:细胞核发蓝紫色荧光、细胞核仁发红色 (橙红色) 荧光,加上细胞膜 (细胞浆) 发绿色荧光。
- [0183] 实施例5:宫颈拭子或宫颈刮片细胞的染色

- [0184] 主要试剂:
- [0185] ①荧光染料(Alexa **Fluor**®647) 标记核仁蛋白(Nucleolin), 橙红色。
- [0186] ②荧光染料(Alexa **Fluor**®594) 标记核仁纤维蛋白(fibrillarin), 红色。
- [0187] ③细胞核荧光染料:DAPI, 蓝紫色。
- [0188] ④荧光染料(Alexa **Fluor**®488) 标记抗CK7、CK18、CK19单克隆抗体, 绿色。
- [0189] 注意各荧光染料的波长与颜色搭配。
- [0190] 细胞固定液:甲醇、丙酮、多聚甲醛。
- [0191] 细胞封闭液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清)。
- [0192] 洗涤液包括:pH7.2-7.4PBS (含吐温-20)。
- [0193] 稀释液包括:pH7.2-7.4PBS (含0.1-1.5%BSA或小牛血清), 加入适宜浓度的荧光标记抗体或非标记抗体, 构成抗体结合反应液。
- [0194] 细胞膜与细胞核膜通透液包括:曲拉通X-100。
- [0195] 其它试剂:磷酸缓冲液(PBS)、小牛血清白蛋白(BSA)、驴血浆(清)、吐温-20、Tris-Hcl等。
- [0196] 主要仪器:荧光显微镜、共聚焦显微镜。
- [0197] 染色程序:
- [0198] (1) 将采集的宫颈拭子或宫颈刮片, 经适当处理, 制成细胞片。
- [0199] (2) 用甲醇固定细胞10-30分钟。
- [0200] (3) 用0.05-3%曲拉通X-100, 10-50分钟, 通透细胞膜和细胞核膜。
- [0201] (4) 用pH7.2-7.4PBS (含0.5-10.0%BSA或小牛血清) 封闭细胞片。
- [0202] (5) 加荧光染料标记抗体①、②、④, 37℃染色30-60分钟。
- [0203] (6) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤3次。
- [0204] (7) 用细胞核荧光染料③(DAPI) 复染(衬染) 细胞核5-10分钟。
- [0205] (8) pH7.2-7.4PBS (含0.1%吐温-20) 洗涤2次。
- [0206] (9) 洗涤干燥后, 荧光显微镜或共聚焦显微镜观察结果。
- [0207] (10) 结果:细胞核(包括核浆) 发蓝紫色荧光、细胞核仁发红色(橙红色) 荧光、细胞膜(细胞浆) 发绿色荧光。

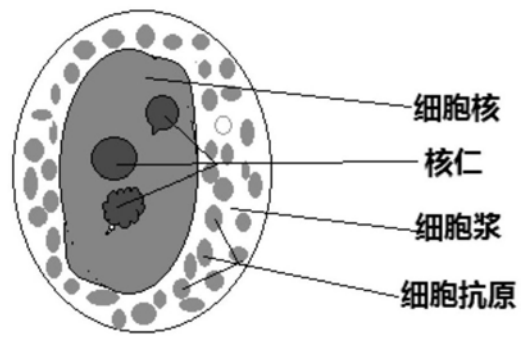


图1

专利名称(译)	人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN109187146A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810978362.6	申请日	2018-08-27
[标]发明人	肖乐义 刘元柱 米明仁 杨勤英 李娟		
发明人	肖乐义 刘元柱 米明仁 杨勤英 李娟		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/533 G01N33/582 G01N2001/302		
代理人(译)	张群峰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人体细胞全形态免疫荧光染色方法及试剂盒，应用细胞核抗原、细胞核仁抗原和细胞核浆抗原的抗体及细胞膜与细胞浆中相关抗原的抗体，采用直接免疫荧光法或间接免疫荧光法，对人体细胞进行全形态染色。能清晰完整的显示细胞核尤其是能标定细胞核的核仁，清晰可见核仁的数量、形态、体积大小和分布。再加上免疫荧光染色法特征性显示细胞的抗原，从而可以对人体细胞进行全形态观察和分析。

