



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108254547 A

(43)申请公布日 2018.07.06

(21)申请号 201810003599.2

(22)申请日 2018.01.03

(71)申请人 安徽科技学院

地址 233100 安徽省滁州市凤阳县东华路9号

(72)发明人 王淑娟 刘文举 庞训胜 闻爱友
刘晓丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法

(57)摘要

本发明公开了一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法,属于动物生物技术领域。主要步骤包括胚胎清洗、固定、通透、去除内源性过氧化物酶、封闭、一抗孵育、二抗孵育及封片。本发明所采用的技术方案具有一定的针对性,主要针对早期胚胎组织,并在常规免疫组化步骤基础上进行了调整和改进。调整了组织处理方法和部分使用试剂,改变了操作方式、操作时间。本发明操作步骤简单,能有效解决实验室检验分析中一些技术问题,利于实验室规范操作,弥补了现有试验技术的不全面性,实际应用价值高。

1. 一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法,包括以下步骤:

1) 溶液配制:4%多聚甲醛,0.5%Triton X-100,20%聚乙烯吡咯烷酮储存溶液和0.1μg/mL4',6-二脒基-2-苯基吡啶均用PH范围为7.2-7.4的0.01mol/L磷酸盐溶液稀释;

2) 胚胎清洗:在显微镜下,将体外培育的2细胞期、4细胞期、8细胞期和16细胞期早期胚胎从培养液中捞出,用38.5℃下预热的加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

3) 胚胎固定:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮溶液的4%的多聚甲醛在室温下固定胚胎1h,然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

4) 通透:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.5%Triton X-100室温透化30min,然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

5) 去除内源性过氧化物酶:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液配置新鲜的3%H₂O₂,室温封闭5-10min,用预热的含聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

6) 封闭:滴血清(与二抗同一起来源)孵育,37℃封闭30min;

7) 一抗孵育:轻轻吸除封闭液,加按抗体说明用磷酸缓冲液稀释的一抗覆盖于胚胎中,将其放在湿盒中,4℃过夜;

8) 二抗孵育:用预热的含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,加按抗体说明用磷酸缓冲液稀释的荧光标记二抗,37℃中避光孵育30min;

9) 4',6-二脒基-2-苯基吡啶染核:二抗孵育后的胚胎用含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,取10μL 0.1μg/mL4',6-二脒基-2-苯基吡啶溶液于胚胎上,室温5min;

10) 封片:用含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,95%甘油封片,盖上盖玻片;

11) 荧光观察:在共聚焦显微镜下观察荧光分布。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述早期胚胎为体外培养的孤雌胚胎、孤雄胚胎和体外受精胚胎。

一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法

一、技术领域

[0001] 本发明涉及一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法,属于动物生物技术领域。

二、背景技术

[0002] 哺乳动物生命起源于具有全能的受精卵,受精卵经过卵裂形成不同卵裂期胚胎,其继续增殖和分化,最终形成个体。早期胚胎发育是哺乳动物特有的发育过程,包括从受精卵到囊胚等多个发育时期,着床前各期胚胎中的卵裂球具有很强的可塑性和异质性。目前,人们对早期胚胎发育认知非常有限,开展早期胚胎研究对生命研究领域具有重要意义。体外胚胎生产包括孤雌胚胎、孤雄胚胎和体外受精胚胎为探究早期胚胎发育提供了必要的材料,是一种生殖生物技术,其加快了畜禽遗传改良,在动物育种中有着重要意义。这一技术也是哺乳动物胚胎工程研究中的一个重要工具,其为探究体内胚胎发育机制、改良胚胎发育质量奠定了良好的基础,是体内胚胎系统的一个有效的反映,也是发育生物学和新兴生物技术中一个重要的研究技术。早期胚胎发育机制的研究离不开免疫组化技术,免疫组化技术是应用免疫学基础原理,即抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体显色剂显色来确定组织细胞内抗原蛋白,对其进行定位、定性及相对定量的研究,对蛋白质定位直接准确、定性灵敏度高,该技术应用广泛,已成为当今生物医学中形态、功能代谢综合研究的一项有力工具,是目前生命科学研究中最重要的技术之一。这一技术在胚胎发育中的应用将为胚胎发育机制、胚胎干细胞调控等研究提供理论参考。

三、发明内容

[0003] 技术问题本发明的目的在于提供一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法。

[0004] 技术方案

[0005] 1、一种早期胚胎组织的荧光免疫方法,包括以下步骤:

[0006] 1) 溶液配制:4%多聚甲醛,0.5%Triton X-100,20%聚乙烯吡咯烷酮储存溶液和0.1 μ g/mL4',6-二脒基-2-苯基吡啶均用PH范围为7.2-7.4的0.01mol/L磷酸盐溶液稀释;

[0007] 2) 胚胎清洗:在显微镜下,将体外培育的2细胞期、4细胞期、8细胞期和16细胞期的孤雌胚胎、孤雄胚胎或体外受精胚胎从培养液中捞出,用38.5℃下预热的加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

[0008] 3) 胚胎固定:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮溶液的4%的多聚甲醛在室温下固定胚胎1h,然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

[0009] 4) 通透:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.5%Triton X-100室温透化30 min,然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5 min;

[0010] 5) 去除内源性过氧化物酶:用加入6-10%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液配置新鲜的3%H₂O₂,室温封闭5~10min,用预热的含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;

- [0011] 6) 封闭:滴血清(与二抗同来源)孵育,37℃封闭30min;
- [0012] 7) 一抗孵育:轻轻吸除封闭液,加按抗体说明用磷酸缓冲液稀释的一抗覆盖于胚胎中,将其放在湿盒中,4℃过夜;
- [0013] 8) 二抗孵育:用预热的含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,加按抗体说明用磷酸缓冲液稀释的荧光标记二抗,37℃中避光孵育 30min;
- [0014] 9) 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染核:二抗孵育后的胚胎用含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,取10μL 0.1μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 溶液于胚胎上,室温5min;
- [0015] 10) 封片:用含6-10%聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min, 95%甘油封片,盖上盖玻片;
- [0016] 11) 荧光观察:在共聚焦显微镜下观察荧光分布。
- [0017] 有益效果
- [0018] 本发明提供了一种早期胚胎组织荧光免疫组化方法。本发明早期胚胎组织荧光免疫组化方法具有以下优点:1) 操作简单,效果好;2) 定位直接准确、定性 灵敏度高;3) 具有一定的针对性。本发明方法和结果为开展与早期孤雌、孤雄 或体外受精胚胎有关的生物学研究提供了新的研究技术。

附图说明

- [0019] 图1为孤雌胚胎发育过程;其中图a为2-4细胞期卵裂球;图b为4-16细胞期卵裂球;

具体实施方式

- [0020] 1、实施材料
- [0021] 体外构建的早期孤雌胚胎,包括卵裂前、2细胞胚胎、8细胞胚胎和16细胞 胚胎。
- [0022] 2、实施方法
- [0023] 1) 溶液配制:4%多聚甲醛,0.5%Triton X-100,20%聚乙烯吡咯烷酮储存 溶液和0.1μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚均用PH范围为7.2-7.4的0.01mol/L磷酸 盐溶液稀释;
- [0024] 2) 胚胎清洗:在显微镜下,将体外培育的2细胞期、4细胞期、8细胞期和 16细胞期的孤雌胚胎、孤雄胚胎或体外受精胚胎从培养液中捞出,用38.5℃下 预热的加入8%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次 5min;
- [0025] 3) 胚胎固定:用加入8%的聚乙烯吡咯烷酮溶液的4%的多聚甲醛在室温下 固定胚胎1h,然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次, 每次5min;
- [0026] 4) 通透:用加入8%的聚乙烯吡咯烷酮的0.5%Triton X-100室温透化30min, 然后用预热的加入聚乙烯吡咯烷酮溶液的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;
- [0027] 5) 去除内源性过氧化物酶:用加入8%的聚乙烯吡咯烷酮的0.01mol/L磷酸 盐缓冲液配置新鲜的3%H₂O₂,室温封闭5~10min,用预热的含聚乙烯吡咯烷 酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min;
- [0028] 6) 封闭:滴血清(与二抗同来源)孵育,37℃封闭30min;
- [0029] 7) 一抗孵育:轻轻吸除封闭液,加1:100磷酸盐缓冲液稀释的抗MT1多克 隆抗体覆

盖于胚胎中,将其放在湿盒中,4℃过夜;

[0030] 8) 二抗孵育:用含聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,加1:100磷酸盐缓冲液稀释的CY3标记羊抗兔荧光二抗,37℃中避光孵育30min;

[0031] 9) 4',6-二脒基-2-苯基吲哚染核:二抗孵育后的胚胎用含聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,取适量0.1μg/mL 4',6-二脒基-2-苯基吲哚于胚胎上,室温5min;

[0032] 10) 封片:用含聚乙烯吡咯烷酮的磷酸盐缓冲液漂洗3次,每次5min,95% 甘油封片,盖上盖玻片;

[0033] 11) 荧光观察:在共聚焦显微镜下观察荧光分布。

[0034] 3、处理效果

[0035] 图2显示,MT1蛋白的表达随着胚胎发育而变化;当胚胎退化时,受体表达逐渐减弱(图A,B,C);而在未卵裂的卵母细胞中其主要在卵母细胞膜上表达(图D,E,F);随着胚胎卵裂,受体表达逐渐增加,主要集中在外缘细胞膜上(图G,H,I);当胚胎继续卵裂,其内部开始有受体的表达(图J,K,L;图 M,N,O)。

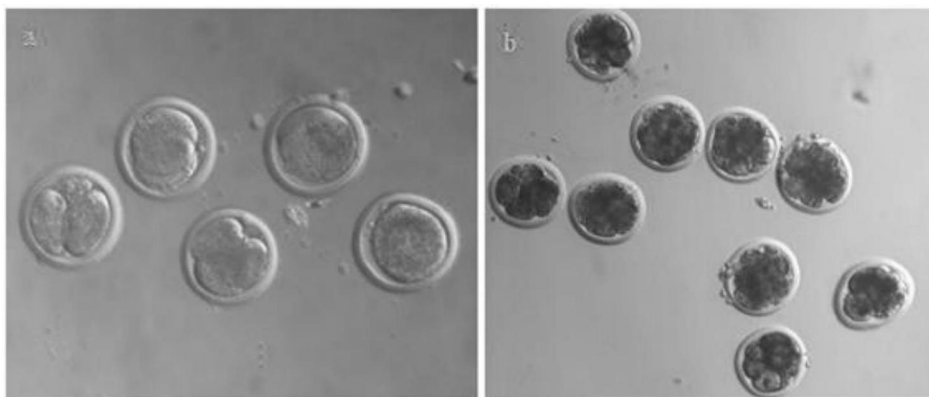


图1

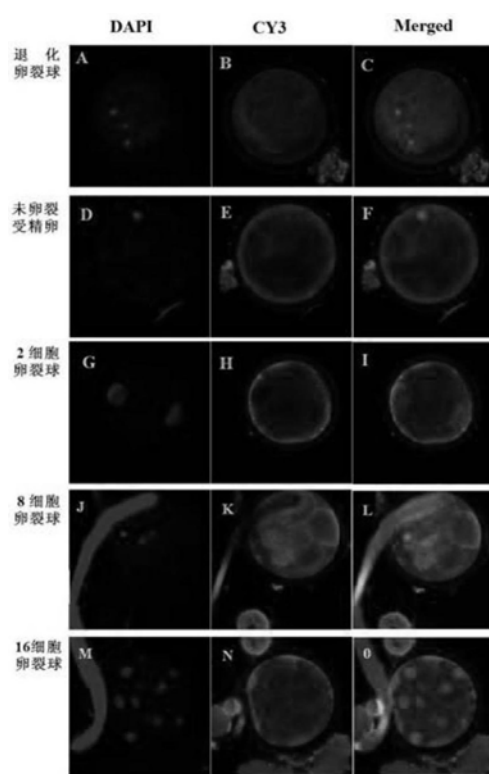


图2

专利名称(译)	一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法		
公开(公告)号	CN108254547A	公开(公告)日	2018-07-06
申请号	CN201810003599.2	申请日	2018-01-03
[标]申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
当前申请(专利权)人(译)	安徽科技学院		
[标]发明人	王淑娟 刘文举 庞训胜 闻爱友 刘晓丽		
发明人	王淑娟 刘文举 庞训胜 闻爱友 刘晓丽		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种早期胚胎组织的荧光免疫组化方法，属于动物生物技术领域。主要步骤包括胚胎清洗、固定、通透、去除内源性过氧化物酶、封闭、一抗孵育、二抗孵育及封片。本发明所采用的技术方案具有一定的针对性，主要针对早期胚胎组织，并在常规免疫组化步骤基础上进行了调整和改进。调整了组织处理方法和部分使用试剂，改变了操作方式、操作时间。本发明操作步骤简单，能有效解决实验室检验分析中一些技术问题，利于实验室规范操作，弥补了现有试验技术的不全面性，实际应用价值高。

