



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102620979 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 18

(21) 申请号 201110034251. 8

(22) 申请日 2011. 01. 31

(73) 专利权人 上海舜百生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区蔡伦路 720 弄 1 号楼 214 室

(72) 发明人 陈海清 田鸣

(74) 专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 许亦琳 余明伟

(51) Int. Cl.

G01N 1/44 (2006. 01)

G01N 1/34 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2005/0227297 A1, 2005. 10. 13, 全文.

WO 2006/007841 A2, 2006. 01. 26, 全文.

CN 1928563 A, 2007. 03. 14, 全文.

CN 101551387 A, 2009. 10. 07, 全文.

CN 1260491 A, 2000. 07. 19, 全文.

张富军等. 一种新的抗原修复方法的应用. 《临床与实验病理学杂志》. 2010, 第 26 卷 (第 3 期), 375-376.

Daniel Toben 等. Fracture Healing Is Accelerated in the Absence of the Adaptive Immune System. 《Journal of Bone and Mineral Research》. 2010, 第 26 卷 (第 1 期), 第 114-115 页.

审查员 李鹏飞

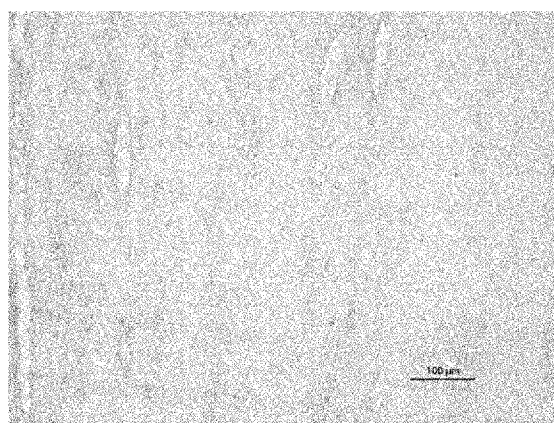
权利要求书1页 说明书8页 附图5页

(54) 发明名称

骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒

(57) 摘要

本发明属于生物科学领域, 具体涉及一种骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒。所述方法包括如下步骤: 取透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上, 消化处理后清洗; 然后取胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上, 消化处理 20 ~ 60 分钟后清洗。本发明还公开了一种骨组织免疫组化抗原修复试剂盒及其制备方法与应用。本发明的抗原修复方法能够将骨组织免疫组化样本在抗原修复后的掉片率降低至 5% 以下, 组织破损面积不超过该样品总面积的 5%, 样品抗原暴露效果更好。本发明的抗原修复方法及相关试剂盒解决了骨组织免疫组化的严重掉片和抗原暴露不充分的问题, 可以广泛适应各种骨组织的免疫组化实验。



1. 一种用于骨组织免疫组化抗原修复的方法,包括如下步骤:

取预热至 18 ~ 37℃ 的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 10 ~ 60 分钟后清洗;然后取预热至 18 ~ 37℃ 的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 20 ~ 60 分钟后清洗,即可完成抗原修复;所述透明质酸酶溶液中,透明质酸酶的浓度为 1.5 ~ 2.5mg/ml, pH 值为 4.5 ~ 6.0;所述胃蛋白酶溶液中,胃蛋白酶的质量体积比浓度为 0.3 ~ 0.5%, pH 值为 1.0 ~ 2.5。

2. 如权利要求 1 中所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的方法,其特征在于,所述透明质酸酶消化处理的温度为 23 ~ 28℃,所述胃蛋白酶消化处理的温度为 23 ~ 28℃。

3. 如权利要求 1 中所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的方法,其特征在于,所述透明质酸酶溶液的溶剂为去离子水;所述胃蛋白酶溶液的溶剂为 HCl 水溶液。

4. 如权利要求 1 ~ 3 中任一所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的方法,其特征在于,针对每一片骨组织切片样本,每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 50 ~ 100ul,每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 50 ~ 100ul。

5. 一种用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒,该试剂盒中包括透明质酸酶溶液和胃蛋白酶溶液,且所述透明质酸酶溶液中,透明质酸酶的浓度为 1.5 ~ 2.5mg/ml, pH 值为 4.5 ~ 6.0;所述胃蛋白酶溶液中,胃蛋白酶的质量体积比浓度为 0.3 ~ 0.5%, pH 值为 1.0 ~ 2.5。

6. 如权利要求 5 中所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还含有 PBS 洗涤液。

7. 如权利要求 5 中所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒,其特征在于,所述透明质酸酶溶液的溶剂为去离子水;所述胃蛋白酶溶液的溶剂为 HCl 水溶液。

8. 如权利要求 5-7 中任一所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:取预热至 18 ~ 37℃ 的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 10 ~ 60 分钟后清洗;然后取预热至 18 ~ 37℃ 的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 20 ~ 60 分钟后清洗,即可完成抗原修复。

9. 如权利要求 8 中所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒的使用方法,其特征在于,所述透明质酸酶溶液消化处理后需用 PBS 洗涤液洗涤骨组织切片样本,且在胃蛋白酶溶液消化处理后需用 PBS 洗涤液洗涤骨组织切片样本。

10. 权利要求 5-7 中任一所述的用于骨组织免疫组化抗原修复的试剂盒在骨组织免疫组化领域的应用。

## 骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于生物科学领域,具体涉及一种骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒。

### 背景技术

[0002] 免疫组织化学又称免疫细胞化学,是指带显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和组织化学的呈色反应,对相应抗原进行定性、定位、定量测定的技术,它把免疫反应的特异性、组织化学的可见性巧妙地结合起来,借助显微镜(包括荧光显微镜、电子显微镜)中的显像和放大作用,在细胞、亚细胞水平检测各种抗原物质(如蛋白质、多肽、酶、激素、病原体以及受体等)。

[0003] 免疫组化技术是一种综合定性、定位和定量;形态、机能和代谢密切结合为一体的研究和检测技术。在原位检测出病原的同时,还能观察到组织病变与该病原的关系,确认感染细胞类型,从而有助于了解疾病的发病机理和病理过程。

[0004] 组织在制作过程中,由于化学试剂的作用封闭了抗原,又由于热的作用致使部分抗原的肽链发生扭曲,致使在免疫组化的染色过程中不能将其显示出来,因此在免疫组化染色后的镜下观察过程中,有可能出现下面一些问题:阳性物反应不强,时隐时现,表达不均匀,有时可出现假阴性等。之所以会出现这些不利于观察的现象,原因主要有如下几个方面:首先,组织在用甲醛固定的过程中所形成的醛键可封闭抗原的决定簇;其次,甲醛在保存进程中会形成羟甲基,也可封闭抗原决定簇;在组织固定过程中,甲醛与蛋白质发生交联,形成醛交联蛋白,这种化合物封闭了抗原,使之无法表达出来。

[0005] 由于上面这些原因存在,因此极大地影响了免疫组化技术中对组织切片的观察,为了解决上述存在的问题,更好地暴露出抗原,将其很好地显示出来,目前世界上公认的方法就是必须进行抗原修复(Antigen retrieval)。Shi SR等在1991年发表的文章(参见Shi SR, Key ME, Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. J Histochem Cytochem, 1991, 39(6): 741-748)中首次提出抗原修复(Antigen retrieval)的概念。所谓抗原修复即利用化学试剂和热的作用将这些抗原重新暴露出来或修正过来的过程。至今为止,抗原修复有许多种方法,主要分为物理化学试剂抗原修复法及化学试剂抗原修复法这两种主要的修复方法。上述方法中,需要根据抗体种类不同,或者根据抗原的表达程度,或者根据组织不同来进行选择,不同的修复方法对于不同的组织也会产生不同的修复效果。

[0006] 骨组织不同于一般的软组织,其是一种坚硬的结缔组织,骨组织由粘多糖和一些胶原纤维样骨胶纤维构成的骨样组织和沉着于其中的无机盐(骨盐)形成的。无机盐以羟基磷灰石结晶的形式存在,其中绝大部分为水合磷酸钙,此外还包括微量碳酸盐和柠檬酸盐等。因此骨组织和其他一些已经钙化的组织在脱水、透明等制片过程前用单纯酸类、混合酸类、螯合剂、离子交换树脂和电解脱钙等方法,将组织中的钙盐用脱钙剂出去,才能够制

成切片。骨组织的免疫组化是病理技术中的一大难题。由于骨组织中 60% 以上为钙盐组成的羟基磷灰石结晶,因而骨组织固定、脱钙都是制备标本的重要环节。一些强酸如盐酸、硝酸等虽能快速有效除去骨组织中的钙盐,但对其中的抗原蛋白也产生了致命性破坏。抗原的破坏会严重影响免疫组化的效果,因此除了需要在组织制片过程中将抗原最大程度地保护好以外,在骨组织免疫组化过程中,还必须进行有效的抗原修复。即在免疫组织化学前用物理或化学方法,使被掩盖的抗原决定簇或变性的抗原重新暴露或抗原性得到一定程度的恢复。

[0007] 然而,现有技术中,常规使用的骨组织抗原修复方法,如热抗原修复等物理法,容易造成骨组织掉片,掉片率甚至高于 80% 以上,并产生大量褶皱,影响抗原的观察;即使使用酶修复的方法,掉片率也高达 70% 以上,且产生大量褶皱,而且抗原暴露较差,显色很弱。即使在将载玻片换为硅化载玻片或氨基基片或后仍然存在上述现象。因此,本领域急需一种不容易造成脱片,且能够使得抗原暴露更充分的针对骨组织免疫组化的抗原修复方法。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于克服现有技术中存在的骨组织免疫组化中存在容易掉片以及骨组织抗原无法充分暴露等问题,提供一种用于骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒。

[0009] 本发明采用如下技术方案解决上述技术问题:

[0010] 一种用于骨组织免疫组化抗原修复的方法,包括如下步骤:

[0011] 取预热至 18 ~ 37℃ 的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 10 ~ 60 分钟后清洗;然后取预热至 18 ~ 37℃ 的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 20 ~ 60 分钟后清洗,即可完成抗原修复。

[0012] 优选的,所述透明质酸酶溶液中,透明质酸酶的使用浓度为 1.5 ~ 2.5mg/ml,工作 pH 值为 4.5 ~ 6.0。

[0013] 优选的,所述胃蛋白酶溶液中,胃蛋白酶的质量体积比浓度为 0.3 ~ 0.5%,工作 pH 值为 1.0 ~ 2.5。

[0014] 这里所述的“质量体积比浓度”为溶质的质量与溶液体积的比例,表示每 100ml 溶液中含有溶质的质量(单位以 g 计),即 1% = 1g/100ml。

[0015] 优选的,所述透明质酸酶溶液消化处理的温度为 23 ~ 28℃,所述胃蛋白酶溶液消化处理的温度为 23 ~ 28℃。

[0016] 进一步优选的,针对每一片骨组织切片样本,每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 50 ~ 100ul,每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 50 ~ 100ul。

[0017] 所述胃蛋白酶溶液和透明质酸酶溶液的溶剂可以使用本领域技术人员所公知的溶剂,如:去离子水、生理盐水等。优选的,所述透明质酸酶的溶剂为灭菌后的去离子水,并使用 HCl 水溶液来调节至所需要的 pH 值,进一步优选使用 0.1mol/L 的 HCl 水溶液来调节 pH 值;所述胃蛋白酶溶液的溶剂为 HCl 水溶液,进一步优选为 0.08 ~ 0.12mol/L 的 HCl 水溶液,最优选为 0.1mol/L 的 HCl 水溶液。所述的胃蛋白酶及透明质酸酶均可由本领域技术人员通过市售途径获得。

[0018] 本发明的第二方面,是提供了一种试剂盒,该试剂盒中包括透明质酸酶溶液和胃蛋白酶溶液,且所述透明质酸酶溶液的浓度为  $1.5 \sim 2.5\text{mg/ml}$ ,所述胃蛋白酶溶液的质量体积比浓度为  $0.3 \sim 0.5\%$ 。

[0019] 优选的,所述透明质酸酶溶液的 pH 值为  $4.5 \sim 6.0$ ,所述胃蛋白酶的 pH 值为  $1.0 \sim 2.5$ 。

[0020] 优选的,所述透明质酸酶的溶剂为灭菌后的去离子水,使用  $0.08 \sim 0.12\text{mol/L}$  的 HCl 溶液来调节至所需要的 pH 值;所述胃蛋白酶溶液的溶剂为 HCl 溶液,进一步优选为  $0.08 \sim 0.12\text{mol/L}$  的 HCl 溶液,最优选为  $0.1\text{mol/L}$  的 HCl 溶液。

[0021] 进一步优选的,所述试剂盒中,还含有磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 作为洗涤液,最优选的,所述洗涤液为含  $0.05\%$  吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0022] 本发明的第三方面,提供了上述试剂盒的使用方法,包括如下步骤:取预热至  $18 \sim 37^\circ\text{C}$  的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在  $18 \sim 37^\circ\text{C}$  的温度条件下消化处理  $10 \sim 60$  分钟后清洗;然后取预热至  $18 \sim 37^\circ\text{C}$  的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在  $18 \sim 37^\circ\text{C}$  的温度条件下消化处理  $20 \sim 60$  分钟后清洗,即可完成抗原修复。

[0023] 较佳的,所述透明质酸酶溶液消化处理后需用 PBS 洗涤液洗涤骨组织切片,且在胃蛋白酶溶液消化处理后需用 PBS 洗涤液洗涤骨组织切片。

[0024] 优选的,所述 PBS 洗涤的步骤为洗涤 3 次,每次洗涤 2 分钟。

[0025] 使用本发明的抗原修复试剂盒来针对骨组织切片进行抗原修复处理,能够克服传统抗原修复方法(物理法及单一化学法)具有的掉片率高、抗原暴露不充分的问题。传统的抗原修复方法处理后的骨组织切片一般掉片率高达  $90\%$ ,而采用本发明的抗原修复方法处理后的骨组织切片掉片率可以被极大程度地降低,解决了本领域技术人员长期以来难以解决的技术问题。同时,经本发明中所述的抗原修复方法处理后的骨组织切片与传统的抗原修复方法相比较,组织破损面积不超过该样品总面积的  $5\%$ ,且具有抗原暴露更加充分、显色效果好等特性。本发明中的试剂盒具有成本低、效果好等特点。

## 附图说明

[0026] 图 1 为实施例 1 中经过抗原修复处理后的骨组织切片染色结果示意图。

[0027] 图 2 为实施例 2 中经过抗原修复处理后的骨组织切片染色结果示意图。

[0028] 图 3 为实施例 3 中经过抗原修复处理后的骨组织切片染色结果示意图。

[0029] 图 4 为实施例 4 中经过抗原修复处理后的骨组织切片染色结果示意图。

[0030] 图 5 为实施例 1 中的阴性对照组的染色结果示意图。

[0031] 具体实施方式

[0032] 下面通过具体实施例进一步描述本发明的技术方案。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

[0033] 本发明实施例中使用的试剂名称及其购买途径如下表中所示。

[0034]

试剂名称	英文名称	产品来源
二甲苯	dimethylbenzene	国药
酒精	Alcohol	
柠檬酸	citric acid	
柠檬酸三钠	1,2,3-Propanetricarboxylic acid	
胃蛋白酶	Pepsin	福州迈新
透明质酸酶	hyaluronidase,HAase	
多聚赖氨酸	Poly-L-Lysine	
一抗	Mouse monoclonal to collagen 1	Abcam
二抗试剂盒	KIT-9901	中杉金桥
显色液	DAB	基因科技
苏木精	bematoxylin;h(a)ematine	国药
盐酸	Hydrochloric acid	

[0035] 本发明中骨组织来源：鼠骨组织（来源于不同小鼠个体的组织 1、组织 2、组织 3），每种组织取样本 10 个，共计样本 30 个。

[0036] 本实施例中骨组织切片的制备过程：

[0037] 1、载玻片经去离子水清洗及酒精清洗，烘干；

[0038] 2、在载玻片表面涂多聚赖氨酸，烘干备用；

[0039] 3、标本切片（切片厚度为 3  $\mu$ m），烘箱过夜；

[0040] 4、从烘箱中取出的切片置于二甲苯中进行脱蜡，然后经梯度浓度的酒精（浓度大到小，其体积百分比依次为 100%，95%，75%）清洗，最后再经自来水冲洗。

[0041] 本实施例中，试剂盒的组成为：浓度为 1.5 ~ 2.5mg/ml，pH 值为 4.5 ~ 6.0 的透明质酸酶溶液（试剂 A）和浓度为 0.3 ~ 0.5%，pH 值为 1.0 ~ 2.5 的胃蛋白酶溶液（试剂 B），以及 PBS 洗涤液（含 0.05% 吐温-20 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液）。

[0042] 使用上述试剂盒，按下列方法进行抗原修复，并且设置两组对照组，进行平行实验：

[0043] 1、抗原修复：

[0044] 1) 对照组 1（物理法）：热抗原修复 ---- 修复液配方（柠檬酸三钠 3.0g、柠檬酸 0.4g，溶解，定容至 1L，调 PH 为 6.0）；

[0045] 2) 对照组 2（化学法）：胃蛋白酶抗原修复；（这里使用的胃蛋白酶的浓度为 2.0%，pH4.5）；

[0046] 3) 试剂盒处理法：试剂 A--- 透明质酸酶溶液；试剂 B- 胃蛋白酶溶液（透明质酸酶溶液的浓度为 2.5mg/ml，pH 值为 4.5；胃蛋白酶溶液的浓度为 0.5%，pH 值为 1.0）；处理步骤为：取预热至 18 ~ 37℃ 的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上，覆盖整个骨组织切片样本，在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 10 ~ 60 分钟；然后取预热至 18 ~ 37℃ 的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上，覆盖整个组织样本，在 18 ~ 37℃ 的温度条件下消化处理 20 ~ 60 分钟，即可完成抗原修复。针对每一片骨组织切片样本，每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 50 ~ 100  $\mu$ l，每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 50 ~ 100  $\mu$ l。

[0047] 2、加一抗，二抗，显色，封片，观察拍照。具体步骤参见具体实施例。

[0048] 实施例 1

[0049] 第一步、骨组织切片的制备过程：

[0050] 1、自来水充分冲洗载玻片过夜，然后经双蒸馏水清洗载玻片 2 遍；

[0051] 2、体积浓度为 95% 的乙醇中浸泡 1 小时后取出沥干；

[0052] 3、用注射器抽取多聚赖氨酸 1ml，蒸馏水 9ml，放入 10ml 量器中混匀，配成 1 : 9 的多聚赖氨酸溶液；使用该多聚赖氨酸溶液涂布载玻片，在 60℃ 的烤箱内烘干后，置盒中于 4℃ 冰箱内保存备用；

[0053] 4、切片：取组织 1，切片，每样本切 3 张，厚度 3 μm，放置烘箱中 60℃ 放置 2h；

[0054] 5、常规脱蜡至水：二甲苯，酒精梯度（浓度大到小），然后用自来水冲洗。

[0055] 第二步、抗原修复：

[0056] 1、对照组 1（物理法）：热抗原修复——修复液配方（柠檬酸三钠 3.0g、柠檬酸 0.4g，溶解，定容至 1L，调 PH 为 6.0），具体步骤为：将切片置于煮沸的抗原修复液中维持 10min，保温 10min，将盒取出，室温下自然冷却，待温度降到室温时，用 PBS 清洗 1 次，清洗 5min。

[0057] 2、对照组 2（化学法）：胃蛋白酶抗原修复；（这里使用的胃蛋白酶的质量体积比浓度为 2.0%，pH 值 4.5）；具体步骤为：将骨组织切片置于胃蛋白酶溶液中，在 37℃ 的温度条件下消化 40 分钟，然后 PBS 洗涤 3 次，每次洗涤 2min。

[0058] 3、试剂盒处理法：所使用的试剂 A 为透明质酸酶；试剂 B 为胃蛋白酶，使用上述试剂盒；具体处理步骤为：取预热至 37℃ 的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上，覆盖整个骨组织切片样本，在 37℃ 的温度条件下消化处理 30 分钟，经 PBS 洗涤液洗涤 3 次，每次洗涤 2 分钟；然后取预热至 37℃ 的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上，覆盖整个组织样本，在 37℃ 的温度条件下消化处理 30 分钟，然后经 PBS 洗涤液洗涤 3 次，每次洗涤 2 分钟，即可完成抗原修复。针对每一片骨组织切片样本，每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 100ul，每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 100ul。

[0059] 4、阴性对照组：阴性对照一组，阴性对照中不加一抗，具体处理方法同对照组 2。

[0060] 第三步、加入抗体及显色过程：

[0061] 1、将进行过抗原修复的骨组织切片置于二抗试剂盒（购自中杉金桥的 KIT-9901 二抗试剂盒）中配套的双氧水去离子水中孵育 10min。

[0062] 2、PBS 清洗 3 次，每次清洗 2min。

[0063] 3、滴加一抗（Mouse monoclonal to collagen 1）约 50 ~ 60 μl，然后在 4℃ 的温度条件下过夜。

[0064] 4、PBS 清洗 3 次，每次清洗 2min。

[0065] 5、滴加二抗试剂盒（购自中杉金桥的 KIT-9901 二抗试剂盒）中配套的试剂 1（聚合物多聚体试剂），然后在 37℃ 下放置 15min，接下来用 PBS 清洗 3 次，每次清洗 2min。

[0066] 6、滴加试剂 2 辣根酶标记（抗小鼠 IgG 多聚体），然后在 37℃ 的温度条件下放置 15min，接下来用 PBS 清洗 3 次，每次清洗 2min。

[0067] 7、DAB 显色：按试剂盒 1 : 50 稀释，每片滴加约 50ul，室温显色，并在显微镜下观察，待到颜色变化时，蒸馏水洗涤终止，蒸馏水清洗 5 ~ 10min。

[0068] 8、苏木精复染，蒸馏水清洗，然后用 1% 盐酸酒精分化，流水冲洗。

[0069] 9、脱水透明：酒精梯度（浓度小到大），二甲苯。

[0070] 10、中性树脂封片。

[0071] 11、显微镜下观察,拍照。

[0072] 第四步、染色结果分析

[0073] 参见图 1,图 1a 为使用传统的物理法,即热抗原修复处理后得到的染色结果;图 1b 为使用传统的化学法,即胃蛋白酶抗原修复处理后得到的染色结果;图 1c 为使用本发明的试剂盒的试剂进行抗原修复处理后得到的染色结果。其中,第一种处理方法(传统物理法抗原修复)的掉片率为 80%,第二种处理方法(传统的化学法抗原修复)的掉片率为 70%,第三种处理方法的掉片率为 0。其中,阴性对照组的染色结果示意图如图 5 中所示。

[0074] 本实施例中,与现有技术中使用的传统化学法或热处理法相比较,使用本发明的试剂盒进行骨组织切片的抗原修复,可以非常显著地降低掉片率,同时,由图 1 中的三幅图的对比可以看出,使用本发明的试剂盒进行抗原修复处理,可以使得抗原得以充分暴露,同时染色效果更好。

[0075] 实施例 2

[0076] 第一步、骨组织切片的制备过程:取组织 2 进行切片,其余步骤与实施例 1 相同。

[0077] 第二步、抗原修复:其中,对照组 1(物理法)及对照组 2(化学法)的抗原修复处理步骤与实施例 1 相同。试剂盒处理法中使用的试剂组成如下:试剂 A——透明质酸酶溶液;试剂 B—胃蛋白酶溶液(透明质酸酶溶液的浓度为 1.5mg/ml, pH 值为 6.0;胃蛋白酶溶液的浓度为 0.3%, pH 值为 2.5),其具体处理步骤如下所示:所使用的试剂 A 为透明质酸酶;试剂 B 为胃蛋白酶,使用上述试剂盒;具体处理步骤为:取预热至 20℃的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在 20℃的温度条件下消化处理 40 分钟,经 PBS 洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤 2 分钟;然后取预热至 28℃的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在 28℃的温度条件下消化处理 20 分钟,然后经 PBS 洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤 2 分钟,即可完成抗原修复。针对每一片骨组织切片样本,每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 100u1,每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 100u1。

[0078] 第三步、加入抗体及显色过程:与实施例 1 中步骤相同。

[0079] 第四步、染色结果分析

[0080] 参见图 2,图 2a 为使用传统的物理法,即热抗原修复处理后得到的染色结果;图 2b 为使用传统的化学法,即胃蛋白酶抗原修复处理后得到的染色结果;图 2c 为使用本发明的试剂盒的试剂进行抗原修复处理后得到的染色结果。其中,第一种处理方法(传统物理法抗原修复)的掉片率为 90%,第二种处理方法(传统的化学法抗原修复)的掉片率为 60%,第三种处理方法的掉片率为 10%。

[0081] 本实施例中,与现有技术中使用的传统化学法或热处理法相比较,使用本发明的试剂盒进行骨组织切片的抗原修复,可以非常显著地降低掉片率,同时,由图 2 中的三幅图的对比可以看出,使用本发明的试剂盒进行抗原修复处理,可以使得抗原得以充分暴露,同时染色效果更好。

[0082] 实施例 3

[0083] 第一步、骨组织切片的制备过程:取组织 3 进行切片,其余步骤与实施例 1 相同。

[0084] 第二步、抗原修复:其中,对照组 1(物理法)及对照组 2(化学法)的抗原修复处理步骤与实施例 1 相同。试剂盒处理法中使用的试剂组成如下:试剂 A——透明质酸酶溶

液 ;试剂 B- 胃蛋白酶溶液 ( 透明质酸酶溶液的浓度为 2.0mg/ml, pH 值为 5.0 ;胃蛋白酶溶液的浓度为 0.4%, pH 值为 2.0), 其具体处理步骤如下所示 :所使用的试剂 A 为透明质酸酶 ;试剂 B 为胃蛋白酶,使用上述试剂盒 ;具体处理步骤为 :取预热至 18℃的透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个骨组织切片样本,在 18℃的温度条件下消化处理 10 分钟,经 PBS 洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤 2 分钟 ;然后取预热至 18℃的胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上,覆盖整个组织样本,在 18℃的温度条件下消化处理 60 分钟,然后经 PBS 洗涤液洗涤 3 次,每次洗涤 2 分钟,即可完成抗原修复。针对每一片骨组织切片样本,每次使用的透明质酸酶溶液的体积为 100u1,每次使用的胃蛋白酶溶液的体积为 100u1。

[0085] 第三步、加入抗体及显色过程 :与实施例 1 中步骤相同。

[0086] 第四步、染色结果分析

[0087] 参见图 3,图 3a 为使用传统的物理法,即热抗原修复处理后得到的染色结果 ;图 3b 为使用传统的化学法,即胃蛋白酶抗原修复处理后得到的染色结果 ;图 3c 为使用本发明的试剂盒的试剂进行抗原修复处理后得到的染色结果。其中,第一种处理方法 ( 传统物理法抗原修复) 的掉片率为 80%,第二种处理方法 ( 传统的化学法抗原修复) 的掉片率为 80%,第三种处理方法的掉片率为 0。

[0088] 本实施例中,与现有技术中使用的传统化学法或热处理法相比较,使用本发明的试剂盒进行骨组织切片的抗原修复,可以非常显著地降低掉片率,同时,由图 3 中的三幅图的对比可以看出,使用本发明的试剂盒进行抗原修复处理,可以使得抗原得以充分暴露,同时染色效果更好。

[0089] 实施例 4 透明质酸酶的最适 PH、浓度探索实验 :

[0090] 实验所用的试剂组成和结果图编号如下表中所述。( 试剂 A—— 透明质酸酶溶液 ;试剂 B- 胃蛋白酶溶液 )

[0091] 表 1 透明质酸酶最适合 pH 值以及浓度探索实验列表

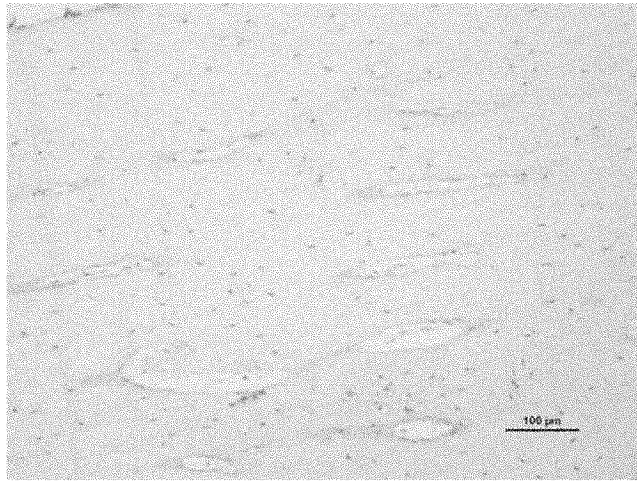
[0092]

序号	组织切片编号	试剂 A		试剂 B		染色结果图 示编号
		浓度 (mg/ml)	pH 值	浓度 (%)	pH 值	
1	组织 1	0.5~1.5	2.0~3.5	0.1~0.3	1.0~2.5	图 4a
2	组织 1	1.5~2.5	2.0~3.5	0.1~0.3	2.5~4.0	图 4b
3	组织 1	2.5~3.5	2.0~3.5	0.1~0.3	4.0~5.5	图 4c
4	组织 1	0.5~1.5	3.5~5	0.5~0.7	1.0~2.5	图 4d
5	组织 1	1.5~2.5	3.5~5	0.5~0.7	2.5~4.0	图 4e
6	组织 1	2.5~3.5	3.5~5	0.5~0.7	4.0~5.5	图 4f
7	组织 1	0.5~1.5	4.5~6.0	0.3~0.5	2.5~4.0	图 4g
8	组织 1	1.5~2.5	4.5~6.0	0.3~0.5	1.0~2.5	图 4h
9	组织 1	2.5~3.5	4.5~6.0	0.3~0.5	4.0~5.5	图 4i

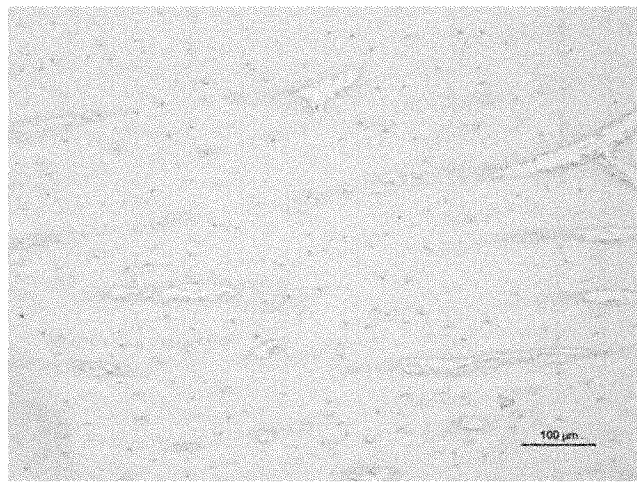
[0093] 结果分析 :从图 4 中对比可以看出,序号为 8 的条件下进行抗原修复处理的效果最好,显色效果最为清晰。因此可以得出 :试剂 A 的最适浓度为 1.5 ~ 2.5mg/ml ;pH 值为 4.5 ~ 6.0 ;试剂 B 的最适浓度为 0.3 ~ 0.5% ;pH 值为 1.0 ~ 2.5。

[0094] 结论 :

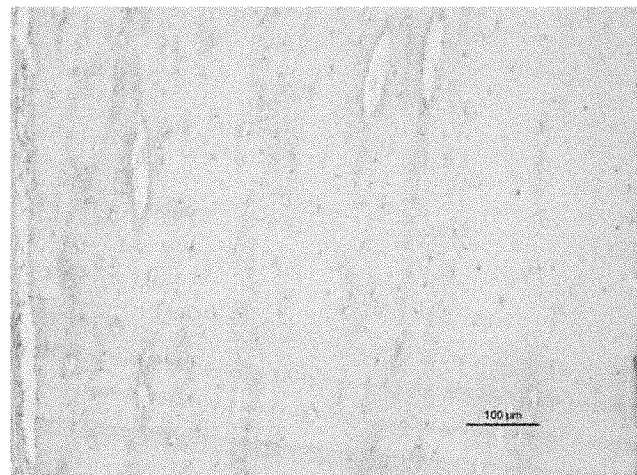
[0095] 本发明针对骨组织切片容易掉片及抗原无法充分暴露的缺陷,提供了一种新的抗原修复方法及相关试剂盒。通过本发明的抗原修复方法的处理,可以极大程度地降低骨组织切片掉片率(掉片率低于3%),解决了本领域技术人员长期以来难以解决的技术问题。同时,经本发明中所述的抗原修复方法处理后的骨组织切片与传统的抗原修复方法相比较,具有抗原暴露更加充分、显色效果好等特性。本发明中的试剂盒具有成本低、效果好等特点。



a

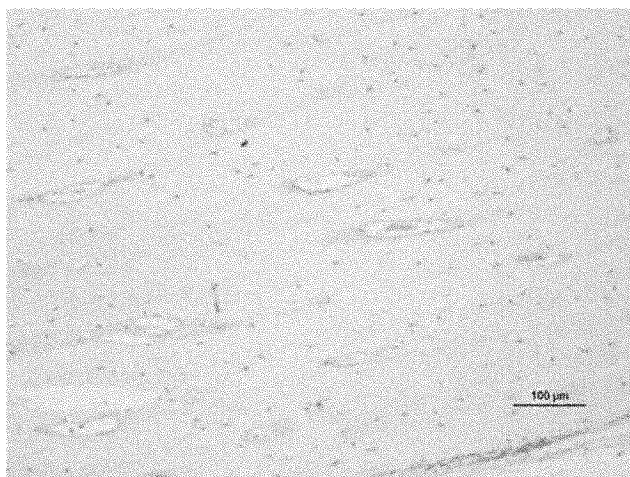


b

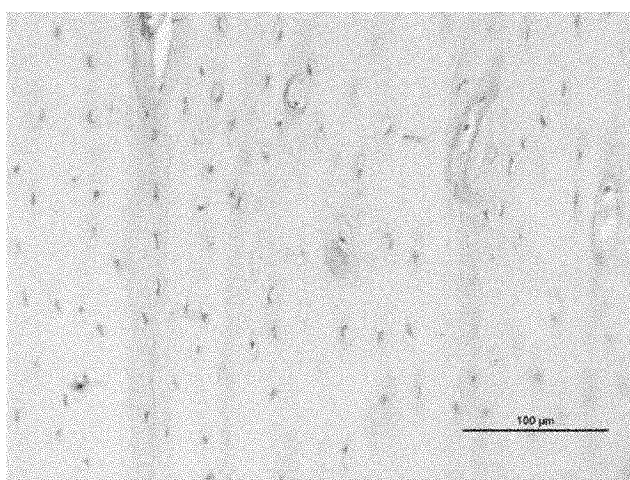


c

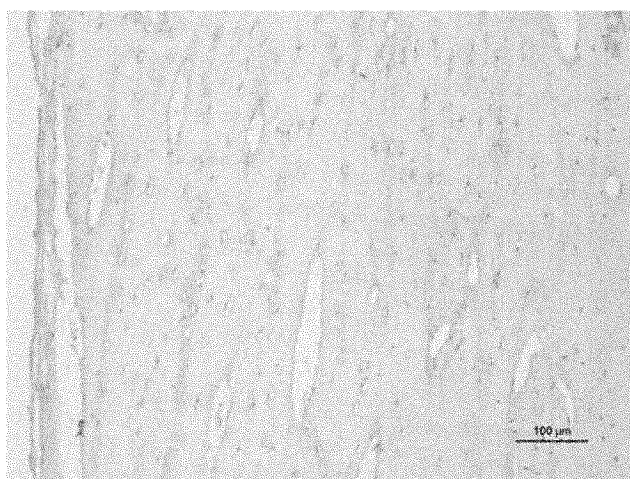
图 1



a

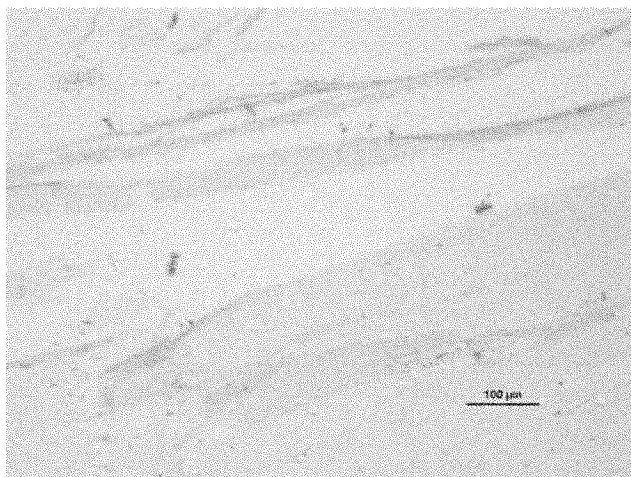


b



c

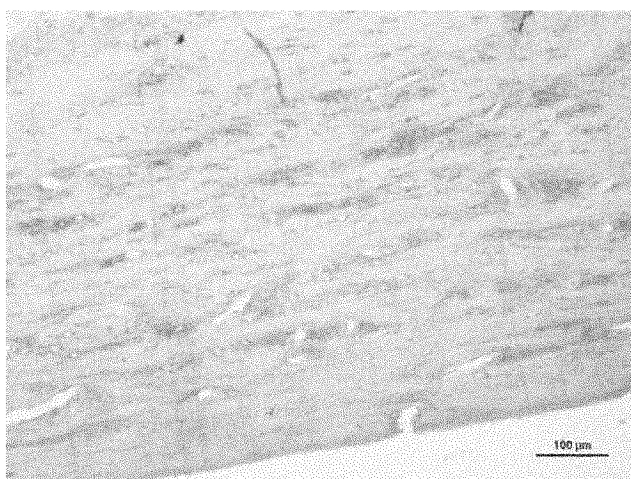
图 2



a



b



c

图 3

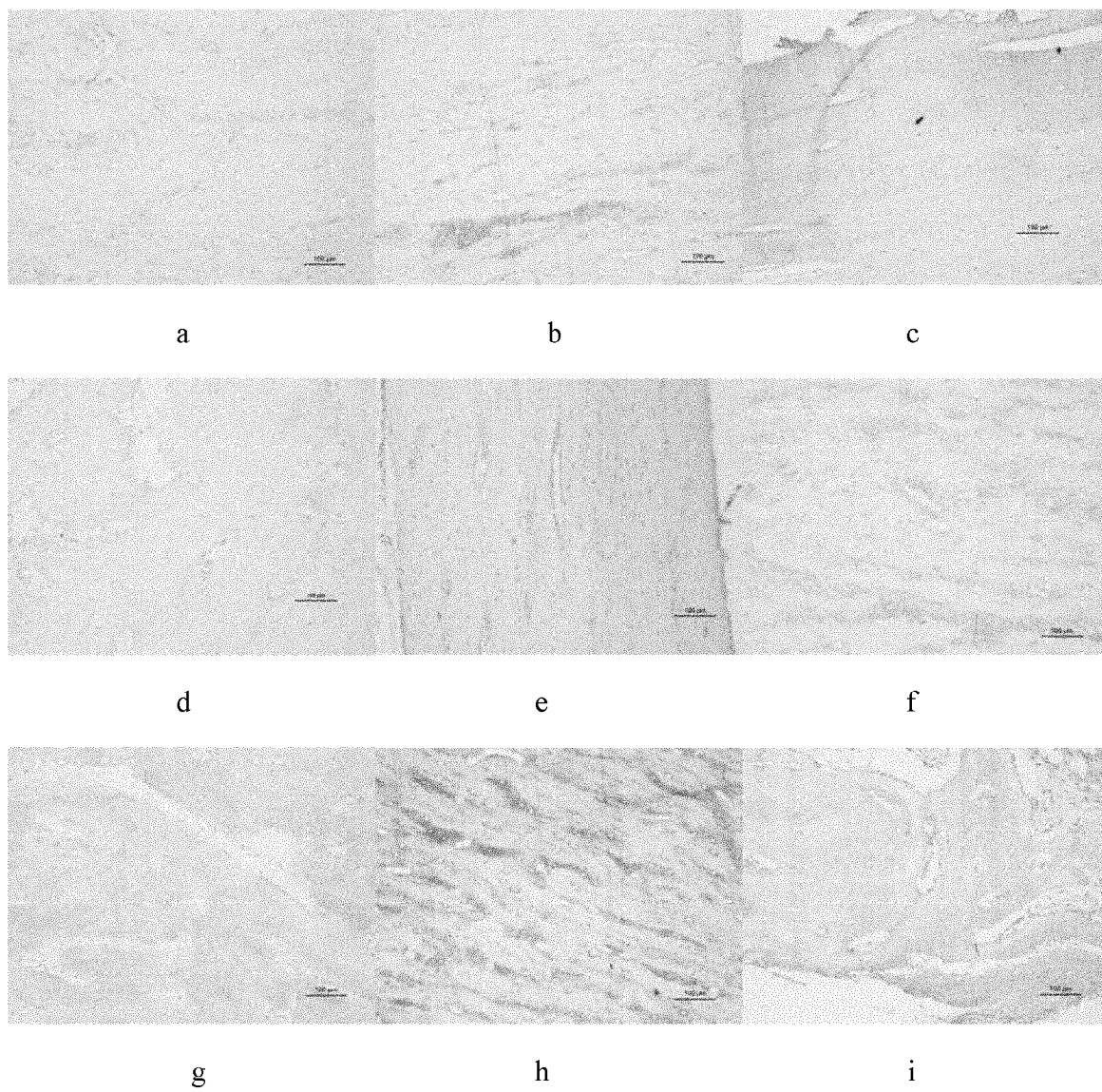


图 4

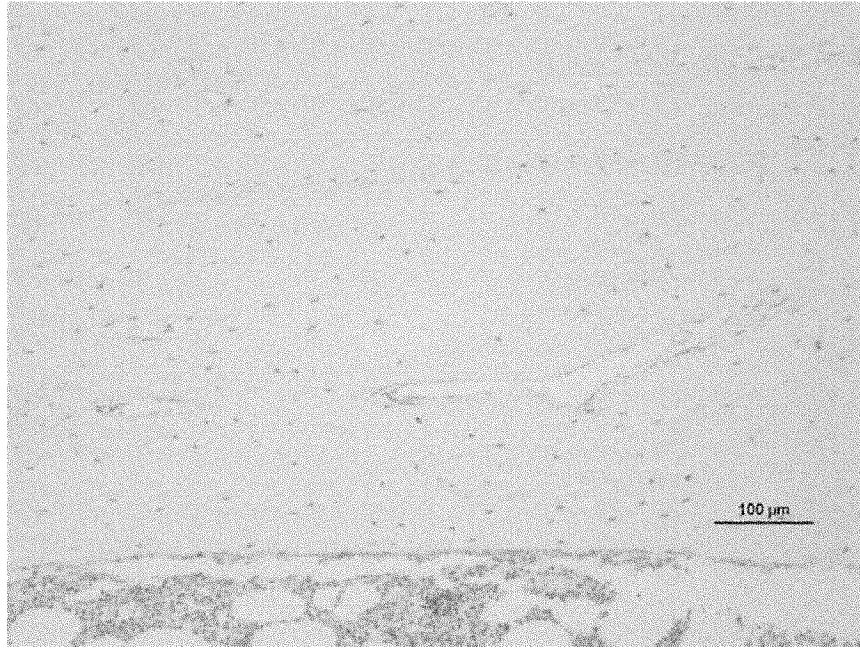


图 5

专利名称(译)	骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN102620979B</a>	公开(公告)日	2014-06-18
申请号	CN201110034251.8	申请日	2011-01-31
[标]发明人	陈海清 田鸣		
发明人	陈海清 田鸣		
IPC分类号	G01N1/44 G01N1/34 G01N33/53		
代理人(译)	余明伟		
审查员(译)	李鹏飞		
其他公开文献	CN102620979A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于生物科学领域，具体涉及一种骨组织免疫组化抗原修复的方法以及相关的试剂盒。所述方法包括如下步骤：取透明质酸酶溶液加到骨组织切片样本上，消化处理后清洗；然后取胃蛋白酶溶液加到骨组织切片样本上，消化处理20～60分钟后清洗。本发明还公开了一种骨组织免疫组化抗原修复试剂盒及其制备方法与应用。本发明的抗原修复方法能够将骨组织免疫组化样本在抗原修复后的掉片率降低至5%以下，组织破损面积不超过该样品总面积的5%，样品抗原暴露效果更好。本发明的抗原修复方法及相关试剂盒解决了骨组织免疫组化的严重掉片和抗原暴露不充分的问题，可以广泛适应各种骨组织的免疫组化实验。

