

(19)中华人民共和国国家知识产权局



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108051582 A

(43)申请公布日 2018.05.18

(21)申请号 201711286273.7

(22)申请日 2017.12.07

(71)申请人 珠海霍普金斯医药研究院股份有限公司

地址 519000 广东省珠海市横琴新区宝华路6号105室-1791

申请人 霍普金斯医药研究院(北京)有限责任公司

(72)发明人 刘天赫 王重庆 赵柏松

(74)专利代理机构 北京力量专利代理事务所
(特殊普通合伙) 11504

代理人 张晓俊

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 1/28(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种改良的免疫组化修复液

(57)摘要

本发明涉及一种改良的免疫组化修复液，包括：柠檬酸三钠、NP-40与乳化剂。本发明的改良的免疫组化修复液湿润，修复效果较好，能够在较少的用量下对组织切片进行修复；本发明的改良的免疫组化修复液适用于很多临床较难检测的抗原，例如Fas，Bax，FVIII，Lamnin，CoIV，Keratin，CEA，GFAP等；采用本发明的改良的免疫组化修复液修复后组织切片容易染色，染色效果较好。

1. 一种改良的免疫组化修复液,其特征在于:包括:柠檬酸三钠、NP-40和乳化剂。
2. 根据权利要求1所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,包括以下重量份的组分:20-40份柠檬酸三钠、0.1-4份NP-40、2-20份乳化剂。
3. 根据权利要求2所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,包括以下重量份的组分:25-35份柠檬酸三钠、0.5-2份NP-40、5-15份乳化剂。
4. 根据权利要求3所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,包括以下重量份的组分:30份柠檬酸三钠、0.75份NP-40、7.5份乳化剂。
5. 根据权利要求1所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,所述乳化剂为吐温-20或甘油。
6. 根据权利要求1所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,所述免疫组化修复液的制备方法包括步骤:
采用H₂O溶解柠檬酸三钠,加入NP-40;待完全溶解后,加入乳化剂。
7. 根据权利要求6所述改良的免疫组化修复液,其特征在于,所述乳化剂为吐温-20或甘油。

一种改良的免疫组化修复液

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫学领域,尤其涉及一种改良的免疫组化修复液。

背景技术

[0002] 抗原,是指能够刺激机体产生(特异性)免疫应答,并能与免疫应答产物抗体和致敏淋巴细胞在体内外结合,发生免疫效应(特异性反应)的物质。抗原的基本性质具有异物性、大分子性和特异性。异物性是指进入机体组织内的抗原物质,必须与该机体组织细胞的成分不相同。抗原一般是指进入机体内的外来物质,如细菌、病毒、花粉等;抗原也可以是不同物种间的物质,如马的血清进入兔子的体内,马血清中的许多蛋白质就成为兔子的抗原物质;同种异体间的物质也可以成为抗原,如血型、移植免疫等;自体内的某些隔绝成分也可以成为抗原,如眼睛水晶体蛋白质、精细胞、甲状腺球蛋白等,在正常情况下,是固定在机体的某一部位,与产生抗体的细胞相隔绝,因此不会引起自体产生抗体。免疫组化是临床病理诊断中最为常用的方法,其原理是利用抗原与抗体特异性结合,通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究。免疫组化实验所用主要为组织标本和细胞标本两大类,石蜡切片是制作组织标本最常用、最基本的首选方法,石蜡切片制作过程对组织内抗原暴露有一定的影响,但可进行抗原修复。

[0003] 石蜡切片标本均用甲醛固定,使得细胞内抗原形成醛键、羧甲键而被封闭了部分抗原决定簇,同时蛋白之间发生交联而使抗原决定簇隐蔽。所以进行免疫组化染色时,需先进行抗原修复。抗原修复在免疫组化染色中最重要,直接决定染色结果以及诊断结果。

[0004] 目前的免疫组化修复液有很多种,如DAKO DENMARK A/S公司的免疫组化修复液、上海长岛抗体诊断试剂有限公司、上海长岛生物技术有限公司、福州迈新生物技术开发有限公司所产柠檬酸盐免疫组化修复液等。免疫组化修复液成分为:柠檬酸、柠檬酸三钠、防腐剂等。

[0005] 上述免疫组化修复液以柠檬酸为主,也是临床免疫组化的常用主要溶剂,但仅适用于一般的抗原修复。临床很多抗原较难检测,常规的免疫组化修复液的修复效果不佳,直接影响后续染色及诊断。

发明内容

[0006] 为解决上述问题,本发明提供了一种改良的免疫组化修复液。本发明的改良的免疫组化修复液修复效果较好,能够对很多较难检测的抗原起到良好的修复作用。

[0007] 根据本发明的一个方面,本发明提供的一种改良的免疫组化修复液,包括:柠檬酸三钠、NP-40与乳化剂。

[0008] 进一步地,包括以下重量份的组分:20-40份柠檬酸三钠、0.1-4份NP-40、2-20份乳化剂。

[0009] 进一步地,包括以下重量份的组分:25-35份柠檬酸三钠、0.5-2份NP-40、5-15份乳

化剂。

- [0010] 进一步地,包括以下重量份的组分:30份柠檬酸三钠、0.75份NP-40、7.5份乳化剂。
- [0011] 进一步地,所述乳化剂为吐温-20或甘油。
- [0012] 进一步地,所述免疫组化修复液的制备方法包括以下步骤:采用H₂O溶解柠檬酸三钠,加入NP-40;待完全溶解后,加入乳化剂。
- [0013] 进一步地,所述乳化剂为吐温-20或甘油。
- [0014] 本发明与现有技术相比,具有以下优点:
- [0015] 1.本发明的改良的免疫组化修复液湿润,修复效果较好,能够在较少的用量下对组织切片进行修复;
- [0016] 2.本发明的改良的免疫组化修复液适用于很多临床较难检测的抗原,例如Fas, Bax,FVIII,Lamnin,CoIV,Keratin,CEA,GFAP等;
- [0017] 3.采用本发明的改良的免疫组化修复液修复后组织切片容易染色,染色效果较好;
- [0018] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,而可依照说明书的内容予以实施,并且为了让本发明的上述和其它目的、特征和优点能够更明显易懂,以下特举本发明的具体实施方式。

具体实施方式

[0019] 下面将结合实施例对本发明的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 本实施例中提供的一种改良的免疫组化修复液,包括:柠檬酸三钠、NP-40与乳化剂。本发明的改良的免疫组化修复液以柠檬酸三钠作为主要的修复活性成分,并以NP-40、吐温-20与H₂O作为混合溶剂。

[0021] 如上所述,乳化剂起到乳化作用,能够提高修复液中各物质的相容性,且对修复液中的活性成分的影响较小,不会对组织切片的修复造成过多影响。其中,所述乳化剂为吐温-20或甘油。

[0022] 吐温20是一种表面活性剂,它是一类大分子,分子上既有亲水的部分,又有亲油的部分。所以能促进植物吸收在水中不能溶解的大分子,也能帮助水分透过一些含脂高的生物膜。

[0023] 甘油,即丙三醇,无色无臭有甜味的粘稠液体,具高渗性,可与水以任何比例混溶,有极大的吸湿性,用于快速去除细胞内水分,起到保护抗原的作用。

[0024] NP-40 (Nonidet P 40),中文译为乙基苯基聚乙二醇,是一种温和的非离子型去垢剂;NP-40是一种很温和的非离子型去垢剂,1%浓度基本可以破坏掉细胞膜,而对核膜的破坏作用较弱,结合特定的缓冲液可以获得胞浆蛋白。与蛋白结合力强,用于防止物质分子疏水间相互作用,确保蛋白的充分溶解和结构稳定。尤其用于膜蛋白的非变性条件下的溶解。NP-4对细胞内抗原起到显示作用,能够提高较难检测抗原的暴露程度。

[0025] 本发明的改良的免疫组化修复液中的H₂O可以为双蒸水,也可以为三蒸水;双蒸水

是重蒸水的一种,是将经过一次蒸馏后的水,再次蒸馏所得到的水;三蒸水是经过三次蒸馏的水。

[0026] 实施例1

[0027] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:30g柠檬酸三钠,0.75mLNp-40,7.5mL吐温-20和余量的双蒸水。

[0028] 制备方法如下:称取柠檬酸三钠,用双蒸水溶解后;加入NP-40,完全溶解后再添加吐温-20,待吐温-20溶解后用双蒸水定容至额定容量。

[0029] 实施例2

[0030] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:20g柠檬酸三钠,4mL NP-40,2mL甘油和余量的双蒸水。

[0031] 制备方法如下:称取柠檬酸三钠,用三蒸水溶解后;加入NP-40,完全溶解后再添加甘油,待甘油溶解后用双蒸水定容至额定容量。

[0032] 实施例3

[0033] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:40g柠檬酸三钠,0.1mL NP-40,20mL吐温-20和余量的双蒸水。

[0034] 制备方法同实施例1

[0035] 实施例4

[0036] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:25g柠檬酸三钠,2mL NP-40,5mL甘油和余量的双蒸水。

[0037] 制备方法同实施例2

[0038] 实施例5

[0039] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:35g柠檬酸三钠,0.5mL NP-40,15mL吐温-20和余量的双蒸水。

[0040] 制备方法同实施例1

[0041] 实施例6

[0042] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:23g柠檬酸三钠,3mL NP-40,4mL吐温-20和余量的双蒸水。

[0043] 制备方法同实施例1

[0044] 实施例7

[0045] 每1000mL改良的免疫组化修复液中包括:38g柠檬酸三钠,0.2mL NP-40,17mL甘油和余量的双蒸水。

[0046] 制备方法同实施例2

[0047] 试验例1含有GEA抗原的组织切片的抗原修复

[0048] 实验A:使用本发明所述的改良的免疫组化修复液

[0049] 1) 将组织切片放入二甲苯中脱蜡5分钟;脱蜡后将切片依次放入100%体积比酒精2分钟,90%体积比酒精2分钟,80%体积比酒精2分钟和70%体积比酒精2分钟;Buffer(0.025moI/L柠檬酸三钠)冲洗5分钟;

[0050] 2) 将实施例1的改良的免疫组化修复液高温加热至92℃,将切片放置修复液内,盖上盖子开始计时,2分钟后在室温下自然冷却30分钟;Buffer冲洗5分钟;

- [0051] 3) 过氧化物酶阻断剂5分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0052] 4) 一抗(市售鼠抗人单克隆抗体) 孵育20分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0053] 5) 二抗(市售酶标羊抗鼠 IgG聚合物) 孵育20分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0054] 6) 经DAB显色10分钟; 自来水冲洗;
- [0055] 7) 经苏木素复染5分钟; 自来水冲洗;
- [0056] 8) 将切片依次放入70%体积比酒精2分钟, 80%体积比酒精2分钟, 90%体积比酒精2分钟, 100%体积比酒精各2分钟; 二甲苯透明5分钟, 封片。
- [0057] 实验B: 使用其他非本发明所述的抗原修复液
- [0058] 抗原修复液选自: 福州迈新生物技术开发有限公司所产柠檬酸盐抗原修复液。
- [0059] 试验步骤:
- [0060] a) 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。
- [0061] b) 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。
- [0062] c) 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。
- [0063] d) 除去PBS溶液, 加100μl的一抗或空白对照试剂, 室温下孵育60分钟。PBS溶液冲洗3分钟×3次。
- [0064] e) 除去PBS溶液, 加100μl酶标羊抗鼠 IgG聚合物, 室温下孵育15分钟。PBS溶液冲洗3分钟×3次。
- [0065] f) 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。
- [0066] g) 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。
- [0067] 试验例1的实验结论: 上述两种方法相比, 实验A修复的切片, GEA阳性定位明确, 背景干净, 染色后显深棕色, 对比度好, 几无脱片; 实验B修复的切片, GEA阳性基本完成定位, 但染色后显浅棕色, 脱片率较高, 所以在含有GEA抗原的组织切片的抗原修复对比实验中, 本发明所述的改良的免疫组化修复液的效果优于实验B所述的抗原修复液的效果。
- [0068] 试验例2含有GFAP抗原的组织切片抗原修复
- [0069] 实验C: 使用本发明所述的改良的免疫组化修复液
- [0070] 1) 将组织切片放入二甲苯脱蜡, 5分钟; 100%酒精, 90%酒精, 80%酒精, 70%酒精梯度各2分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0071] 2) 先将本发明所述的改良的免疫组化修复液高温加热至92℃, 将切片放置修复液内, 盖上盖子加温加热至冒气开始计时2分钟, 自然冷却30分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0072] 3) 过氧化物酶阻断剂5分钟; Buffer冲洗5分钟;
- [0073] 4) 一抗(市售鼠抗人单克隆抗体) 孵育20分钟; Buffer冲洗5分钟;

- [0074] 5) 二抗(市售酶标羊抗鼠 IgG聚合物)孵育20分钟;Buffer冲洗5分钟;
- [0075] 6) DAB显色10分钟;自来水冲洗;
- [0076] 7) 苏木素复染5分钟;自来水冲洗;
- [0077] 8) 将切片依次放入70%酒精,80%酒精,90%酒精,100%酒精梯度各2分钟;二甲苯透明5分钟,封片。
- [0078] 实验D:使用其他非本发明所述的抗原修复液
- [0079] 抗原修复液选自:福州迈新生物技术开发有限公司所产柠檬酸盐抗原修复液。
- [0080] 试验步骤:
- [0081] a) 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。
- [0082] b) 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。
- [0083] c) 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。
- [0084] d) 除去PBS溶液,加100μl的一抗或空白对照试剂,室温下孵育60分钟。PBS溶液冲洗3分钟×3次。
- [0085] e) 除去PBS溶液,加100μl酶标羊抗鼠 IgG聚合物,室温下孵育15分钟。PBS溶液冲洗3分钟×3次。
- [0086] f) 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。
- [0087] g) 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。
- [0088] 试验例2的实验结论:上述两种方法相比,实验A修复的切片,GFAP阳性定位明确,背景干净,染色后显深棕色,对比度好,几无脱片;实验B修复的切片,GFAP阳性定位不清楚,非特异性着色较多,染色后比较模糊,略有脱片,所以在含有GFAP抗原的组织切片抗原修复的对比实验中,本发明所述的改良的免疫组化修复液的效果优于实验D所述的抗原修复液的效果。
- [0089] 试验例3本发明改良的免疫组化修复液的成分筛选
- [0090] 表1试验例中各组分的添加量

	柠檬酸三钠 (g)	NP40 (ml)	吐温-20 (ml)	甘油 (ml)
[0091]	试验 3-1	20	0.25	5
	试验 3-2	25	0.5	5
	试验 3-3	30	0.75	7.5
	试验 3-4	35	1	7.5
	试验 3-5	40	3	15

[0092] 试验3-1至试验3-5按照表格中所述的各组分含量称取，并按照实施例1所述方法制备成5种改良的免疫组化修复液，将5种改良的免疫组化修复液按照试验例1实验A方法进行实验。

[0093] 试验3的实验结果：试验3-1至试验3-5都实现较好的阳性定位，试验3-1染色后显浅棕色，有脱片；试验3-2染色后显浅褐色，有脱片；试验3-3染色后显深棕色，背景清晰，无脱片；试验3-4染色后显深棕色，背景清晰，略有脱片；试验3-5染色后显浅棕色，背景偶有干扰色，无脱片；所以在含有GFAP抗原的组织切片抗原修复的对比实验中，试验3-3所述改良的免疫组化修复液的效果优于其他组的改良的免疫组化修复液的效果。

[0094] 最后应说明的是：以上各实施例仅用以说明本发明的技术方案，而非对其限制；尽管参照前述各实施例对本发明进行了详细的说明，本领域的普通技术人员应当理解：其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改，或者对其中部分或者全部技术特征进行等同替换；而这些修改或者替换，并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的范围。

专利名称(译)	一种改良的免疫组化修复液		
公开(公告)号	CN108051582A	公开(公告)日	2018-05-18
申请号	CN201711286273.7	申请日	2017-12-07
[标]申请(专利权)人(译)	珠海霍普金斯医药研究院股份有限公司 霍普金斯医药研究院(北京)有限责任公司		
申请(专利权)人(译)	珠海霍普金斯医药研究院股份有限公司 霍普金斯医药研究院(北京)有限责任公司		
当前申请(专利权)人(译)	珠海霍普金斯医药研究院股份有限公司 霍普金斯医药研究院(北京)有限责任公司		
[标]发明人	刘天赫 王重庆 赵柏松		
发明人	刘天赫 王重庆 赵柏松		
IPC分类号	G01N33/531 G01N1/28		
CPC分类号	G01N33/531 G01N1/28		
代理人(译)	张晓俊		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种改良的免疫组化修复液，包括：柠檬酸三钠、NP-40与乳化剂。本发明的改良的免疫组化修复液湿润，修复效果较好，能够在较少的用量下对组织切片进行修复；本发明的改良的免疫组化修复液适用于很多临床较难检测的抗原，例如Fas，Bax，FVIII，Lamnin，ColV，Keratin，CEA，GFAP等；采用本发明的改良的免疫组化修复液修复后组织切片容易染色，染色效果较好。

	柠檬酸三钠 (g)	NP40 (ml)	吐温-20 (ml)	甘油 (ml)
试验 3-1	20	0.25	5	
试验 3-2	25	0.5		5
试验 3-3	30	0.75	7.5	
试验 3-4	35	1		7.5
试验 3-5	40	3	15	