



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374883 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201810978222.9

(22)申请日 2018.08.27

(71)申请人 曾小敏

地址 564500 贵州省遵义市仁怀市龙井复兴村五马石组001号

(72)发明人 曾小敏

(74)专利代理机构 北京国翰知识产权代理事务所(普通合伙) 11696

代理人 吕彩霞

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

(54)发明名称

一种基于细胞爬片的快速经济的免疫荧光方法

(57)摘要

本发明提供一种基于细胞爬片的快速经济的免疫荧光方法,属于细胞分子生物学技术领域,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,其中制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片;免疫荧光染色步骤为:将爬片正面向下盖于封闭液上封闭;滴加抗体,孵育,洗涤;将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照。本发明免疫荧光方法操作简便,容易掌握,能准确地定位抗原的位置和显示相对量,所用细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。

1. 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,所述制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片。

2. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含草酸和D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理。

3. 根据权利要求2所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述食人鱼溶液中含有0.25-0.30%的草酸和0.12-0.15%的D-纤维二糖。

4. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为1:2.0-2.5。

5. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述固定的具体步骤为:将洗涤过的PGCs细胞置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片。

6. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:2.8-4.2。

7. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述免疫荧光染色步骤为:

1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭1-2h;

2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用 $1 \times$ PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照。

8. 根据权利要求1所述的一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其特征在于:所述抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml甘油混合,配制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

一种基于细胞爬片的快速经济的免疫荧光方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞分子生物学技术领域,具体涉及一种基于细胞爬片的免疫荧光方法。

背景技术

[0002] 鸭病毒性肝炎(Duck Virus Hepatitis,DVH)是由鸭肝炎病毒引起雏鸭的一种急性、高度致死性传染病,发病急、传播迅速、病程短和死亡率高为主要特征,临床表现为角弓反张,剖检可见肝肿大和大量的出血性斑点,是危害养鸭业的主要疾病之一。本病可根据流行病学、典型症状及病变,即小鸭发病死亡、发病急、死亡快、死亡时间集中以及肝脏肿胀有明显的出血点或出血斑等即可做出初步诊断。确诊尚需进行实验室检验,目前实验室检测主要包括病毒的分离和初步鉴定、中和试验、琼脂免疫扩散试验、间接血凝试验、斑点免疫金渗滤法、酶联免疫吸附试验、荧光抗体检测等方法。方法在用于的诊断与检测时有其各自的优点,但却不能用于感染的组织器官和细胞的抗原定位检测和直观判断。病毒初代分离一般使用鸭胚,在鸭胚中连续传几代后,很容易在鸭胚中增殖。所以对原始生殖细胞进行检测显得尤为重要。

[0003] 免疫荧光技术是在组织化学及蛋白质技术基础上发展起来的一项新技术,是免疫学技术和荧光染色法结合在一起的新方法。具体来说,免疫荧光技术也是一种血清学反应,其原理与普通血清学反应基本相同。该技术是用已标记了荧光素的荧光抗体(抗原)作为探针检查组织或细胞内相应的抗原(抗体),在组织或细胞中所形成的抗原-抗体复合物上沉着有荧光素,在荧光显微镜下观察样品,荧光素受激发光的照射而发出荧光,通过荧光所在的细胞或组织,实现对抗原或抗体的定位,同时还可利用定量技术对样本进行定量。荧光素既能标记抗体,也能标记抗原,但由于抗原结构和理化性质较复杂,荧光素标记的条件不易控制,通常用荧光素标记抗体,因此也称为荧光抗体技术。按照抗体的使用,免疫荧光分析分为间接免疫荧光分析和直接免疫荧光分析2种。间接免疫荧光分析方法通过抗原特异性第一抗体(一抗)标记抗原,再用荧光分子耦联的第二抗体(二抗)特异性标记一抗,从而使抗原所在位点发出荧光。而直接免疫荧光分析是用荧光分子耦联的抗原特异性的抗体直接标记抗原的方法。无论是间接免疫荧光分析还是直接免疫荧光分析,基于细胞爬片的免疫荧光方法均适用。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,该免疫荧光方法操作简便,容易掌握,能准确地定位抗原的位置和显示相对量,所用细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点;

[0005] 本发明为实现上述目的所采取的技术方案为:

[0006] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,其中制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片。

本发明细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。

[0007] 作为优选,氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含草酸和D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理。所用食人鱼溶液有很强的氧化性,可以彻底的清除玻璃爬片上的几乎所有有机质,而且用它处理过的玻片表面会带羟基,利于后续修饰,得到氨基改性玻璃爬片,进而使得玻璃爬片具有高度亲水的性能,提高玻璃爬片和固定液之间的粘结性,进而提高PGCs细胞在爬片上的固定性,解决纯化的PGCs细胞在玻璃爬片上难以爬片的问题,同时能够提高PGCs细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀,没有明显的脱片情况。

[0008] 进一步优选,食人鱼溶液中含有0.25-0.30%的草酸和0.12-0.15%的D-纤维二糖。食人鱼溶液的清洗效果很好,作用迅速,但因腐蚀性极强,而草酸和D-纤维二糖的加入能够缓解食人鱼溶液的腐蚀性,降低玻璃爬片的损伤,同时草酸分子和D-纤维二糖分子能与水分子形成氢键网络结构,能够提高玻璃爬片表面羟基的数量,进而能够提高玻璃爬片的氨基改性率,得到更多的氨基改性玻璃爬片,降低其表面的摩擦系数,进而提高后续PGCs细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀,没有明显的脱片情况。

[0009] 进一步优选,食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为1:2.0-2.5。该配比的食人鱼溶液浸泡处理的玻璃爬片的前进角最小,可低至 9.2° ,且后退角为 7.6° ,更有利于玻璃爬片表面羟基的形成,进而改性玻璃爬片的亲水性。

[0010] 作为优选,固定的具体步骤为:将洗涤过的PGCs细胞置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除 PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片。与传统爬片方法相比,本发明细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。

[0011] 进一步优选,半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:2.8-4.2。半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的合理存在使得含有半胱氨酸的PFA-PBS 溶液对原始生殖细胞的固定渗透效果较佳,可使得细胞膜的蛋白质发生变性,增强细胞膜的透过性,提高了固定剂对原始生殖细胞的固定渗透效果,能得到组织形态完整、具有合适硬度的爬片,便于后续显色的进行,使得细胞固定的同时完成细胞的爬片,节约用时,节约成本,省去现有技术中培养及处理细胞过程中产生的相关费用。

[0012] 作为优选,免疫荧光染色步骤为:

[0013] 1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭 1-2h;

[0014] 2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用 $1\times$ PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

[0015] 3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照。本发明免疫荧光方法操作简便,容易掌握,能准确地定位抗原的位置和显示相对量,所标记靶分子的荧光清晰而背景荧光很低,荧光激发光经相应的荧光滤光片后看到目的分子显示清晰、特异的红色、绿色、蓝色荧光。荧光染色的靶分子特异荧光强,而且染色不同的靶分子(UL44与细胞核,IE-1、actin与细胞核)的荧光无明显相互干扰现象,结构、图像清晰,定位准确。

[0016] 进一步优选,抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml甘油混合,配

制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0018] 1) 本发明免疫荧光方法操作简便,容易掌握,能准确地定位抗原的位置和显示相对量,所标记靶分子的荧光清晰而背景荧光很低,且染色不同的靶分子的荧光无明显相互干扰现象,结构、图像清晰,定位准确;

[0019] 2) 本发明用细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点;

[0020] 3) 本发明的固定方法对细胞的固定渗透效果较佳,能得到组织形态完整、具有合适硬度的爬片,便于后续显色的进行,使得细胞固定的同时完成细胞的爬片,节约用时,节约成本,省去现有技术中培养及处理细胞过程中产生的相关费用;

[0021] 4) 本发明用玻璃爬片为氨基改性玻璃爬片,具有高度亲水的性能,能提高细胞在爬片上的固定性,解决纯化的细胞在玻璃爬片上难以爬片的问题,同时能够提高细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀。

[0022] 本发明采用了上述技术方案提供一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,弥补了现有技术的不足,设计合理,操作方便。

具体实施方式

[0023] 以下结合实施例对本发明作进一步详细描述:

[0024] 本发明实施例提供了一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,其中制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片。本实施例中细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。

[0025] 上述氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含草酸和D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理。所用食人鱼溶液有很强的氧化性,可以彻底的清除玻璃爬片上的几乎所有有机质,而且用它处理过的玻片表面会带羟基,利于后续修饰,得到氨基改性玻璃爬片,进而使得玻璃爬片具有高度亲水的性能,提高玻璃爬片和固定液之间的粘结性,进而提高PGCs细胞在爬片上的固定性,解决纯化的 PGCs细胞在玻璃爬片上难以爬片的问题,同时能够提高PGCs细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀,没有明显的脱片情况。

[0026] 具体地,氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片分别用水和盐酸乙醇超声清洗2-4次,每次8-12min,然后将玻璃爬片置于食人鱼溶液中,70-90℃下反应20-30min,再用水和乙醇各超声清洗2-4次,然后置于3-氨基丙基三甲氧基硅烷溶液中反应15-20h,再用乙醇超声清洗2-4次,至于110-130℃下交联反应3-5h,即得原始生殖细胞爬片,盐酸乙醇液能除去霉斑,有杀菌作用,操作简便,成本低廉,腐蚀性、环境污染都小,高效率低损耗。

[0027] 为了能有效地对玻璃爬片进行氨基改性,食人鱼溶液中含有0.25-0.30%的草酸和0.12-0.15%的D-纤维二糖。食人鱼溶液的清洗效果很好,作用迅速,但因腐蚀性极强,而草酸和D-纤维二糖的加入能够缓解食人鱼溶液的腐蚀性,降低玻璃爬片的损伤,同时草酸分子和D-纤维二糖分子能与水分子形成氢键网络结构,能够提高玻璃爬片表面羟基的数量,进而能够提高玻璃爬片的氨基改性率,得到更多的氨基改性玻璃爬片,降低其表面的摩擦系数,进而提高后续PGCs细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀,没有明

显的脱片情况。

[0028] 其中,食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为1:2.0-2.5。该配比的食人鱼溶液浸泡处理的玻璃爬片的前进角最小,可低至 9.2° ,且后退角为 7.6° ,更有利于玻璃爬片表面羟基的形成,进而改性玻璃爬片的亲水性。

[0029] 上述固定的具体步骤为:将洗涤过的PGCs细胞置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片。与传统爬片方法相比,本实施例细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。

[0030] 具体地,固定的步骤为:

[0031] S01:PGCs细胞采用Nycodenz密度梯度离心或Percoll密度梯度离心或流式分选方法进行纯化,然后采用PBS洗涤2-4次,在4000-6000rpm下离心3-5min,收集PGCs细胞,备用;

[0032] S02:显微镜下拣取100-200个PGCs细胞置于氨基改性玻璃爬片上的PBS液滴中洗涤,然后拣取细胞,置于氨基改性玻璃爬片上浓度4%的PFA溶液中洗涤,备用;

[0033] S03:将洗涤过的PGCs细胞置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片。

[0034] 为了能有效地优化固定效果,S03步骤中半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:2.8-4.2。半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的合理存在使得含有半胱氨酸的PFA-PBS溶液对原始生殖细胞的固定渗透效果较佳,可使得细胞膜的蛋白质发生变性,增强细胞膜的透过性,提高了固定剂对原始生殖细胞的固定渗透效果,能得到组织形态完整、具有合适硬度的爬片,便于后续显色的进行,使得细胞固定的同时完成细胞的爬片,节约用时,节约成本,省去现有技术中培养及处理细胞过程中产生的相关费用。

[0035] 上述免疫荧光染色步骤为:

[0036] 1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭 1-2h;

[0037] 2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用 $1 \times$ PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

[0038] 3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照。本发明免疫荧光方法操作简便,容易掌握,能准确地定位抗原的位置和显示相对量,所标记靶分子的荧光清晰而背景荧光很低,荧光激发光经相应的荧光滤光片后看到目的分子显示清晰、特异的红色、绿色、蓝色荧光。荧光染色的靶分子特异荧光强,而且染色不同的靶分子(UL44与细胞核,IE-1、actin与细胞核)的荧光无明显相互干扰现象,结构、图像清晰,定位准确。

[0039] 本发明实施例中抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml 甘油混合,配制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

[0040] 实施例1:

[0041] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,具体为:

[0042] 一、制备细胞爬片:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片,其中氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含有0.25%的草酸和0.12%的D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理,食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为

1:2.0;半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:2.8;

[0043] 二、免疫荧光染色:

[0044] 1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭 1-2h;

[0045] 2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用1×PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

[0046] 3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照,其中抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml甘油混合,配制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

[0047] 实施例2:

[0048] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,具体为:

[0049] 一、制备细胞爬片:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片,其中氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含有0.28%的草酸和0.135%的D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理,食人鱼溶液中浓H₂SO₄和H₂O₂的体积比为1:2.2;半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:3.5;

[0050] 二、免疫荧光染色:

[0051] 1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭 1-2h;

[0052] 2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用1×PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

[0053] 3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照,其中抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml甘油混合,配制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

[0054] 实施例3:

[0055] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,包括制备细胞爬片和免疫荧光染色,具体为:

[0056] 一、制备细胞爬片:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片,其中氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含有0.30%的草酸和0.15%的D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理,食人鱼溶液中浓H₂SO₄和H₂O₂的体积比为1:2.5;半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:4.2;

[0057] 二、免疫荧光染色:

[0058] 1) 封闭:将爬片正面向下盖于封闭液上,用2%抗体封闭液,于室温下封闭 1-2h;

[0059] 2) 抗体:将封闭的爬片上滴加按照1:1000稀释的2%抗体,室温下孵育2h,然后用1×PBST洗涤6次、每次洗涤10min,再用NTMT平衡处理10min;

[0060] 3) 显色:将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂,吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂,然后荧光显微镜下观察荧光及拍照,其中抗荧光衰退剂为10mg对苯二胺溶解入1ml PBS,再与9ml甘油混合,配制成含1mg/ml对苯二胺和90% (V/V) 甘油的溶液。

[0061] 对比例1:

[0062] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,其中制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,

细胞固定的同时完成细胞的爬片,其中氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于含有0.28%的草酸和0.135%的D-纤维二糖的食人鱼溶液中处理,食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为1:2.2;其余步骤和实施例2完全一致。

[0063] 对比例2:

[0064] 一种基于细胞爬片的免疫荧光方法,制备细胞爬片步骤为:将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片的含有0.01%的半胱氨酸的4%PFA-PBS溶液中,室温固定,然后吸除PFA-PBS溶液,细胞固定的同时完成细胞的爬片,其中氨基改性玻璃爬片的改性方法为:将玻璃爬片置于食人鱼溶液中处理,食人鱼溶液中浓 H_2SO_4 和 H_2O_2 的体积比为1:2.2;半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的比例为100:3.5;其余步骤和实施例2完全一致。

[0065] 实施例4:

[0066] 一种基于细胞爬片的免疫荧光染色:

[0067] 选择实施例2爬片为试验组,对比例1爬片为对照组1,对比例2爬片为对照组2。

[0068] 试验组上的细胞数量远多于对比例1,说明半胱氨酸中L-半胱氨酸和D-半胱氨酸的合理存在使得含有半胱氨酸的PFA-PBS溶液对原始生殖细胞的固定渗透效果较佳,且便于后续显色的进行;试验组上的细胞分布均匀性好于对比例2,说明食人鱼溶液中草酸和D-纤维二糖的加入能够提高后续PGCs细胞在玻璃爬片上的分散性,使爬片后的细胞分布均匀。

[0069] 上述实施例中的常规技术为本领域技术人员所知晓的现有技术,故在此不再详细赘述。

[0070] 以上实施方式仅用于说明本发明,而并非对本发明的限制,本领域的普通技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,还可以做出各种变化和变型。因此,所有等同的技术方案也属于本发明的范畴,本发明的专利保护范围应由权利要求限定。

专利名称(译)	一种基于细胞爬片的快速经济的免疫荧光方法		
公开(公告)号	CN109374883A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201810978222.9	申请日	2018-08-27
[标]申请(专利权)人(译)	曾小敏		
申请(专利权)人(译)	曾小敏		
当前申请(专利权)人(译)	曾小敏		
[标]发明人	曾小敏		
发明人	曾小敏		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/56983		
代理人(译)	吕彩霞		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于细胞爬片的快速经济的免疫荧光方法，属于细胞分子生物学技术领域，包括制备细胞爬片和免疫荧光染色，其中制备细胞爬片步骤为：将PGCs细胞纯化、洗涤后置于氨基改性玻璃爬片上固定即得细胞爬片；免疫荧光染色步骤为：将爬片正面向下盖于封闭液上封闭；滴加抗体，孵育，洗涤；将抗体标记的爬片上滴加抗荧光衰退剂，吸除爬片周围多余的抗荧光衰退剂，然后荧光显微镜下观察荧光及拍照。本发明免疫荧光方法操作简便，容易掌握，能准确地定位抗原的位置和显示相对量，所用细胞爬片的制备方法具有用材简单、节约成本、爬片效果好、爬片后的细胞分布均匀、操作方便、节约用时等优点。