



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108680419 A

(43)申请公布日 2018. 10. 19

(21)申请号 201810791666.1

(22)申请日 2018.07.18

(71)申请人 杭州依美洛克医学科技有限公司

地址 311200 浙江省杭州市萧山区萧山经
济技术开发区建设四路1368号2号楼3
楼

(72)发明人 袁淦英 李思勇 余向东

(74)专利代理机构 浙江英普律师事务所 33238
代理人 陈俊志

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

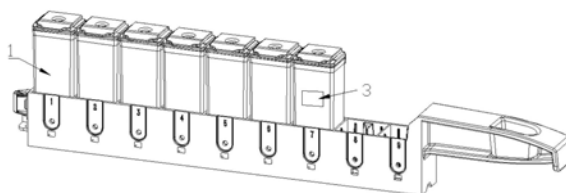
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法

(57)摘要

本发明涉及一种二抗染色方法,尤其涉及一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法。该方法包括以下步骤:S1、在组织切片中加入封阻液,使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活;S2、在组织切片中加入相应的一抗,与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合;S3、在组织切片中加入反应增强液;S4、在组织切片中加入聚合物二抗,与一抗特异性的结合;S5、在组织切片中加入DAB浓缩液和DAB buffer的混合液,DAB沉淀着色;S6、在组织切片中加入苏木素复染液,与染色质结合显蓝色。本发明优化了常规免疫组化实验中所需的试剂成分,提高了免疫组化的染色强度,降低了可能产生的非特异性染色背景,极大的提高了染色质量。



1. 一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于:包括以下步骤:
S1、在组织切片中加入封阻液,使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活;
S2、在组织切片中加入相应的一抗,与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合;
S3、在组织切片中加入反应增强液;
S4、在组织切片中加入聚合物二抗,与一抗特异性的结合;
S5、在组织切片中加入DAB浓缩液和DAB buffer的混合液,DAB沉淀着色;
S6、在组织切片中加入苏木素复染液,与染色质结合显蓝色。
2. 根据权利要求1所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,所述封阻液为过氧化氢溶液,所述过氧化氢溶液的浓度为3%~4%。
3. 根据权利要求1所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,所述反应增强液为兔抗鼠IgG溶液,所述兔抗鼠IgG溶液的浓度为5~10 μ g/mL。
4. 根据权利要求1所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,所述DAB浓缩液为3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液,所述3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液的浓度为55~70mmol/L。
5. 根据权利要求1所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,所述DAB Buffer为0.05~0.15%过氧化氢溶液。
6. 根据权利要求1所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,所述苏木素复染液的浓度为0.05~0.15%。
7. 根据权利要求1-6任一权利要求所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,在步骤S1之前还包括步骤S0组织切片玻片的制作,步骤为:
步骤一、烤片,烘干玻片上的水分;
步骤二、脱蜡,溶解包埋组织的石蜡,使得组织切片完全暴露;
步骤三、水化,酒精洗去脱蜡液,并使组织切片细胞内充满水;
步骤四、抗原修复,在组织切片中加入抗原修复液,暴露抗原决定簇。
8. 根据权利要求1-6任一权利要求所述的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,其特征在于,在步骤S6之后还包括步骤S7染色玻片的处理,包括以下步骤:
步骤一、脱水,在染色玻片上先后分别加入80%酒精、90%酒精、95%酒精和100%酒精,进行梯度脱水;
步骤二、透明,在染色玻片上加入脱蜡液;
步骤三、封片,在染色玻片上加入中性树胶进行封片。

一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种二抗染色方法,尤其涉及一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法。

背景技术

[0002] 在临床病理诊断和形态学研究中,免疫组织化学(简称免疫组化)染色是一种很重要的技术和手段。免疫组化技术于上世纪70年代应用于病理诊断始,目前在全球病理界已经得到广泛应用,它已成为病理医生常规工作中不可缺少的部分。免疫组化技术拥有特异性、敏感性强及操作简便等优点,使得免疫组化技术在疾病诊断领域得到了广泛的推广和应用,特别是临床病理诊断和肿瘤转化诊断。免疫组化技术不仅能提高病理诊断的准确性,同时也渗透到了临床和基础学科,在探讨疾病的病因学、发病机制及科研工作中起到了不可估量的作用。

[0003] 免疫组化是利用抗原抗体的特异性结合,通过标记物的显色,来检测和定位组织或细胞中的抗原蛋白。在免疫组化实验中需要多种试剂配合使用,常规的免疫组化染色通常是通过手工操作进行,过程繁琐耗时又长,而且稳定性较差,重复性较低。手工染色所用试剂的灵敏度、亲和性、稳定性和质量都有所不足,这也导致了手工染色质量参差不齐,很难完全满足临床病理诊断的要求。而全自动免疫组化染色仪的出现极大的提高了染色效率,运行过程中无需人工干预,操作便捷。但是一般的免疫组化试剂仅适用于手工操作的染色要求,而无法应用于全自动免疫组化染色仪,使得染色灵敏度较低。

发明内容

[0004] 本发明为解决上述技术问题,提供设计合理、显著提高染色效果的一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法。

[0005] 本发明解决上述技术问题所采用的技术方案是:

[0006] 一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,包括以下步骤:

[0007] S1、在组织切片中加入封阻液,使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活;

[0008] S2、在组织切片中加入相应的一抗,与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合;

[0009] S3、在组织切片中加入反应增强液;

[0010] S4、在组织切片中加入聚合物二抗,与一抗特异性的结合;

[0011] S5、在组织切片中加入DAB浓缩液和DAB buffer的混合液,DAB沉淀着色;

[0012] S6、在组织切片中加入苏木素复染液,与染色质结合显蓝色。

[0013] 本发明优化了常规免疫组化实验中所需的试剂成分,提高了免疫组化的染色强度,降低了可能产生的非特异性染色背景,极大的提高了染色质量。

[0014] 进一步,所述封阻液为过氧化氢溶液,所述过氧化氢溶液的浓度为3%-4%。

[0015] 进一步,所述反应增强液为兔抗鼠IgG溶液,所述兔抗鼠IgG溶液的浓度为5~10μg/mL。

- [0016] 进一步,所述DAB浓缩液为3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液,所述3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液的浓度为55~70mmol/L。
- [0017] 进一步,所述DAB Buffer为0.05~0.15%过氧化氢溶液。
- [0018] 进一步,所述苏木素复染液的浓度为0.05~0.15%。
- [0019] 更进一步,在步骤S1之前还包括步骤S0组织切片玻片的制作,步骤为:
- [0020] 步骤一、烤片,烘干玻片上的水分;
- [0021] 步骤二、脱蜡,溶解包埋组织的石蜡,使得组织切片完全暴露;
- [0022] 步骤三、水化,酒精洗去脱蜡液,并使组织切片细胞内充满水;
- [0023] 步骤四、抗原修复,在组织切片中加入抗原修复液,暴露抗原决定簇。
- [0024] 更进一步,在步骤S6之后还包括步骤S7染色玻片的处理,包括以下步骤:
- [0025] 步骤一、脱水,在染色玻片上先后分别加入80%酒精、90%酒精、95%酒精和100%酒精,进行梯度脱水;
- [0026] 步骤二、透明,在染色玻片上加入脱蜡液;
- [0027] 步骤三、封片,在染色玻片上加入中性树胶进行封片。
- [0028] 本发明同现有技术相比具有以下优点及效果:
- [0029] 1、本发明优化了常规免疫组化实验中所需的试剂成分,提高了免疫组化的染色强度,降低了可能产生的非特异性染色背景,极大的提高了染色质量;
- [0030] 2、本发明包括了免疫组化染色的必要试剂,配套使用于全自动免疫组化染色仪,具有极高的灵敏度和亲和力;能够封闭内源性的过氧化物酶和非特异性的蛋白结合位点,减少了可能存在的染色背景,使背景着色更加清晰干净无杂质无残留,解决了长期以来影响染色质量的背景着色问题,能够完全满足仪器染色的病理诊断要求;
- [0031] 3、本发明在不同组织不同抗体的仪器染色效果明显。

附图说明

[0032] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0033] 图1为本发明试剂盛放装置的结构示意图。

[0034] 标号说明:

[0035] 1、试剂瓶,3、试剂瓶标签。

具体实施方式

[0036] 下面结合实施例对本发明做进一步的详细说明,以下实施例是对本发明的解释而本发明并不局限于以下实施例。

[0037] 本发明中的全自动免疫组化染色仪属于现有技术,该全自动免疫组化染色仪适用于石蜡、冰冻、穿刺、细胞涂片、骨髓片等多种标本;全自动免疫组化染色仪上设置有控制软件,可编程百余种标准化免疫组化和快速特殊染色程序,且程序可根据要求随时更改、定制特性,在全自动免疫组化染色仪上设置合适的孵育时间即可完成免疫组化染色。全自动免

疫组化染色仪的上市极大地提高了病理诊断的工作效率,完全代替了繁琐复杂耗时冗长的手工染色。

[0038] 另有试剂盛放装置与全自动免疫组化染色仪配合使用。

[0039] 实施例1:

[0040] 一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,包括以下方法:

[0041] S1、在组织切片中加入封阻液150u1,使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活;

[0042] S2、在组织切片中加入相应的一抗150u1,与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合;

[0043] S3、在组织切片中加入反应增强液150u1;

[0044] S4、在组织切片中加入聚合物二抗150u1,与一抗特异性的结合;

[0045] S5、在组织切片中加入由7.5u1的DAB浓缩液和150u1的DAB buffer混合而成的混合液,DAB沉淀着色;

[0046] S6、在组织切片中加入苏木素复染液150u1,与染色质结合显蓝色。

[0047] 另一种方案,一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法,包括以下方法:

[0048] S1、在组织切片中加入封阻液100u1,使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活;

[0049] S2、在组织切片中加入相应的一抗100u1,与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合;

[0050] S3、在组织切片中加入反应增强液100u1;

[0051] S4、在组织切片中加入聚合物二抗100u1,与一抗特异性的结合;

[0052] S5、在组织切片中加入由5u1的DAB浓缩液和100u1的DAB buffer混合而成的混合液,DAB沉淀着色;

[0053] S6、在组织切片中加入苏木素复染液100u1,与染色质结合显蓝色。

[0054] 染色质是遗传物质的载体。染色质是指间期细胞核内由DNA、组蛋白、非组蛋白及少量RNA组成的线性复合结构,是间期细胞遗传物质存在的形式。

[0055] 本发明中,封阻液用于封闭失活内源性的过氧化物酶。

[0056] 本发明中,聚合物二抗用于特异性的结合与抗原蛋白反应的一抗。

[0057] 本发明中,反应增强液用于增强聚合物二抗与一抗的结合能力,提高了二抗的结合数量,加大了抗原抗体的反应灵敏度,使某些低丰度的蛋白染色也能较为理想,颜色更加鲜亮,这解决了某些免疫组化试剂DAB着色偏暗,颜色不够鲜艳,对于低表达的蛋白染色偏浅,无法达到理想的染色效果。

[0058] 本发明中,DAB浓缩液用于HRP催化的目的蛋白的显色。DAB为Diaminobenzidine的缩写,中文名称为二氨基联苯胺,是辣根过氧化物酶最敏感、最常用的显色底物,反应产物因不溶于水、二甲苯和醇的棕色沉淀物而被广泛地用于蛋白印迹(Western Blot, WB)、免疫组织化学(Immunohistochemistry, IHC)和免疫细胞化学(Immunocytochemistry, ICC)、斑点印迹(Dot blot)和生物芯片(Biochip)等的染色和显色反应。其中HRP是horse radish peroxidase的缩写,中文名称辣根过氧化物酶,是植物中研究得最深入的一种过氧化物酶。

[0059] 本发明中,DAB buffer用于稀释DAB浓缩液与HRP催化的目的蛋白的显色。

[0060] 本发明中,苏木素复染液用于染色质的着色,是由硫酸铝钾、苏木精、碘酸钠、和冰醋酸加入到去离子水中,混合均匀而成。

[0061] 一抗是第一抗体的简称,是能和非抗体性抗原(特异性抗原)特异性结合的蛋白。本发明中,使用鼠源或兔源一抗,并将其盛放在其他容器内,通过全自动免疫组化染色仪自动添加到组织切片上。

[0062] 如图1所示,该试剂盛放装置2上设置有7个试剂瓶1,按照染色先后顺序,即将封阻液、反应增强液、聚合物二抗、DAB浓缩液、DAB buffer和苏木素复染液按照此顺序放置在试剂瓶1中,其中DAB buffer使用量大,所以用两个试剂瓶1均盛放DAB buffer。在使用全自动免疫组化染色仪时,全自动免疫组化染色仪扫描试剂瓶标签3读取试剂瓶1信息,识别试剂瓶1内盛放的试剂信息,并自动进行试剂的吸取和将试剂添加到玻片上。在全自动免疫组化染色仪运行中,全自动免疫组化染色仪自动混合DAB浓缩液及DAB buffer,无需人工操作,避免了致癌物质的直接接触。

[0063] 在本实施例中的步骤S1中,组织切片加入封阻液后,室温孵育10min,然后用现有技术中的TBS(中文名称为叔丁基二甲基硅基)清洗三次。

[0064] 在本实施例的步骤S2中,组织切片加入一抗后,37摄氏度的环境下孵育30min,然后用TBS清洗三次。

[0065] 在本实施例的步骤S3中,组织切片加入反应增强液后,室温孵育15min,然后TBS清洗三次。

[0066] 在本实施例的步骤S4中,组织切片加入鼠兔通用型聚合物二抗,在37摄氏度的环境下孵育20min,TBS清洗三次。

[0067] 在本实施例的步骤S5中,组织切片加入提前混合好的DAB浓缩液和DAB buffer的混合液,室温染色3-10min,然后去离子水清洗三次。室温染色时间由与一抗结合的抗原的量以及DAB浓缩液及DAB buffer的混合液的浓度决定,属于现有技术,在此不再展开描述。

[0068] 在本实施例的步骤S6中,组织切片加入苏木素复染液,室温复染30s,然后用去离子水清洗三次。

[0069] 实施例2:

[0070] 如实施例1所示,其区别仅在于封阻液为过氧化氢溶液,且过氧化氢溶液的浓度为3%。

[0071] 实施例3:

[0072] 如实施例1所示,其区别仅在于封阻液为过氧化氢溶液,且过氧化氢溶液的浓度为3.5%。

[0073] 实施例4:

[0074] 如实施例1所示,其区别仅在于封阻液为过氧化氢溶液,且过氧化氢溶液的浓度为4%。

[0075] 实施例5:

[0076] 如实施例1所示,其区别仅在于反应增强液为兔抗鼠IgG溶液,兔抗鼠IgG溶液的浓度为5 μ g/mL;溶液PH为7.4。其中用于防腐的Proclin 950溶液的浓度为0.05%。

[0077] 鼠的某种蛋白质(比如某种细胞因子或者膜蛋白)对于兔来说是异物,所以当将鼠的这种蛋白质注入兔体内的时候,兔就会产生针对该抗原的抗体,当然抗体有好几种,其中

IgG是最主要的抗体。

[0078] 实施例6:

[0079] 如实施例1所示,其区别仅在于反应增强液为兔抗鼠IgG溶液,兔抗鼠IgG溶液的浓度为7.5 μ g/mL;溶液PH为7.4。

[0080] 实施例7:

[0081] 如实施例1所示,其区别仅在于反应增强液为兔抗鼠IgG溶液,兔抗鼠IgG溶液的浓度为10 μ g/mL;溶液PH为7.4。

[0082] 实施例8:

[0083] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB浓缩液为3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液,3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液的浓度为55mmol/L。

[0084] 实施例9:

[0085] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB浓缩液为3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液,3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液的浓度为62mmol/L。

[0086] 实施例10:

[0087] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB浓缩液为3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液,3,3-二氨基联苯胺四氯化氢溶液的浓度为70mmol/L。

[0088] 实施例11:

[0089] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB Buffer为浓度为0.05%的过氧化氢溶液。

[0090] 实施例12:

[0091] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB Buffer为浓度为0.10%的过氧化氢溶液。

[0092] 实施例13:

[0093] 如实施例1所示,其区别仅在于DAB Buffer为浓度为0.15%的过氧化氢溶液。

[0094] 实施例14:

[0095] 如实施例1所示,其区别仅在于苏木素复染液的浓度为0.05%。

[0096] 实施例15:

[0097] 如实施例1所示,其区别仅在于苏木素复染液的浓度为0.10%。

[0098] 实施例16:

[0099] 如实施例1所示,其区别仅在于苏木素复染液的浓度为0.15%。

[0100] 实施例17:

[0101] 如实施例1-16任一实施例所示,其区别仅在于在步骤S1之前还包括步骤S0组织切片玻片的制作,步骤为:

[0102] 步骤一、烤片,烘干玻片上的水分;

[0103] 步骤二、脱蜡,用现有技术中的脱蜡液溶解包埋组织的石蜡,使得组织切片完全暴露;

[0104] 步骤三、水化,酒精洗去脱蜡液,并使组织切片细胞内充满水;

[0105] 步骤四、抗原修复,在组织切片中加入抗原修复液,暴露抗原决定簇。

[0106] 抗原修复液可以是现有技术中的柠檬酸抗原修复液或EDTA抗原修复液。

[0107] 抗原决定簇可以由连续序列(蛋白质一级结构)组成或由不连续的蛋白质三维结构组成,决定抗原性的特殊化学基团,又称抗原表位。抗原决定簇大多存在于抗原物质的

表面,有些存在于抗原物质的内部,须经酶或其他方式处理后才暴露出来。一个天然抗原物质可有多种和多个决定簇。抗原分子越大,决定簇的数目越多。

[0108] 在本实施例中,组织切片在60摄氏度的环境中烘烤30min,烘干玻片上的水分,使得组织切片完全附着在载玻片上。

[0109] 在本实施例中,将脱蜡液加热到72摄氏度对组织切片进行2次脱蜡,溶解包埋组织的石蜡,使得组织切片完全暴露。

[0110] 在本实施例中,在组织切片中加入抗原修复液以后,在100摄氏度的环境下静置20min。

[0111] 实施例18:

[0112] 如实施例1-16任一实施例所示,其区别仅在于在步骤S6之后还包括步骤S7染色玻片的处理,包括以下步骤:

[0113] 步骤一、脱水,在染色玻片上先后分别加入80%酒精、90%酒精、95%酒精和100%酒精,进行梯度脱水;

[0114] 步骤二、透明,在染色玻片上加入脱蜡液;

[0115] 步骤三、封片,在染色玻片上加入中性树胶进行封片。

[0116] 中性树胶,是一种粘合剂,用于将载玻片和盖玻片粘合在一起,把生物组织切片封起来长久保留,属于现有技术。

[0117] 在本实施例中,脱水时将玻片浸泡在80%酒精中3分钟,然后浸泡在90%酒精中3分钟,随后浸泡在95%酒精中3分钟,再浸泡在100%酒精中5分钟,最后再次浸泡在100%酒精中5分钟,完成梯度脱水。

[0118] 在本实施例中,在进行透明处理时,脱蜡液浸泡5分钟,然后再次脱蜡液浸泡5分钟。

[0119] 在本实施例中,封片结束后,在显微镜下观察染色效果并拍照。

[0120] 此外,需要说明的是,根据现有技术可知组织切片放置在玻片和载玻片之间。本说明书中所描述的具体实施例,其零、部件的形状、所取名称等可以不同。凡依本发明专利构思所述的构造、特征及原理所做的等效或简单变化,均包括于本发明专利的保护范围内。本发明所属技术领域的技术人员可以对所描述的具体实施例做各种各样的修改或补充或采用类似的方式替代,只要不偏离本发明的结构或者超越本权利要求书所定义的范围,均应属于本发明的保护范围。

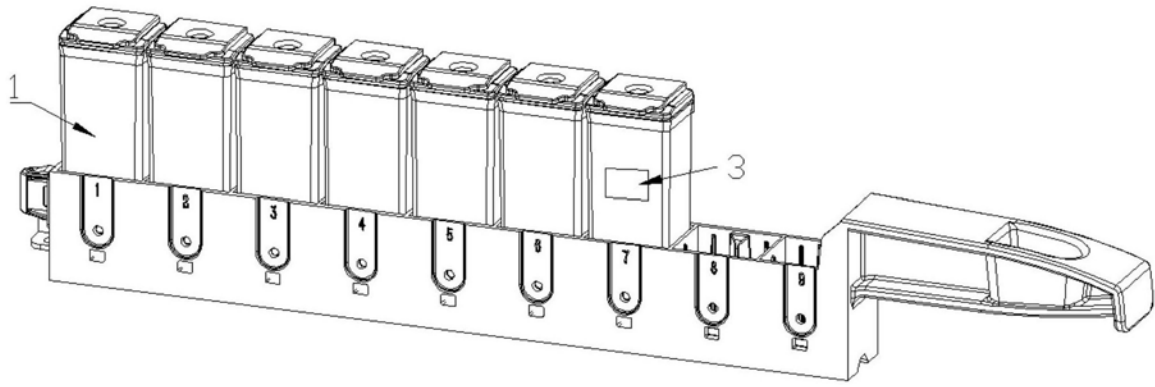


图1

专利名称(译)	一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法		
公开(公告)号	CN108680419A	公开(公告)日	2018-10-19
申请号	CN201810791666.1	申请日	2018-07-18
[标]发明人	袁淦英		
发明人	袁淦英 李思勇 余向东		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/532		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/532		
代理人(译)	陈俊志		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种二抗染色方法，尤其涉及一种用于全自动免疫组化染色仪的二抗染色方法。该方法包括以下步骤：S1、在组织切片中加入封阻液，使组织切片细胞中内源性的过氧化物酶失活；S2、在组织切片中加入相应的一抗，与组织切片细胞内的抗原蛋白反应结合；S3、在组织切片中加入反应增强液；S4、在组织切片中加入聚合物二抗，与一抗特异性的结合；S5、在组织切片中加入DAB浓缩液和DAB buffer的混合液，DAB沉淀着色；S6、在组织切片中加入苏木素复染液，与染色质结合显蓝色。本发明优化了常规免疫组化实验中所需的试剂成分，提高了免疫组化的染色强度，降低了可能产生的非特异性染色背景，极大的提高了染色质量。

