



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109946139 A

(43)申请公布日 2019.06.28

(21)申请号 201910155479.9

(22)申请日 2019.02.28

(71)申请人 东南大学

地址 211102 江苏省南京市江宁区东南大学路2号

(72)发明人 弓玉祥 陈平圣 鲁荐

(74)专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 孙斌

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用

(57)摘要

本发明公开了一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用,该试剂盒包括如下组分:二甲苯、无水乙醇、PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、胰酶、内源性过氧化物酶阻断剂、兔抗人IgG多克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体、酶标羊抗兔第二抗体、DAB显色剂、过碘酸、硫酸、PAS染液、苏木素染色液、盐酸酒精,氨水酒精。本发明的试剂盒染色过程中简便快捷,可以用于在同一张切片上染色显示肾组织结构、免疫复合物沉积方式和部位。本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS减少组织制备过程,染色步骤少,实验时间缩短,稳定性高,实验结果直观对比,所提供的信息量远远比传统单染高等优点。

1. 一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒,其特征在于,包括如下组分:二甲苯、无水乙醇、PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、胰酶、内源性过氧化物酶阻断剂、兔抗人IgG多克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体、酶标羊抗兔第二抗体、DAB显色剂、过碘酸、硫酸、PAS染液、苏木素染色液、盐酸酒精、氨水酒精。

2. 一种利用权利要求1所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 脱蜡至水:将组织制成石蜡切片,石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡,然后将切片浸泡在乙醇中;

(2) 微波热修复抗原:将步骤(1)浸泡后的切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中,微波加热,然后将切片取出,自然冷却至室温;

(3) 抗原修复:将切片上组织滴加胰酶,孵育后,进一步暴露抗原,再用PBS冲洗;

(4) 内源性过氧化物酶阻断:冲洗后切片上每个组织滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育,再用PBS冲洗;

(5) 孵育IgA或IgG第一抗体:冲洗后切片上组织滴加兔抗人IgA多克隆抗体或兔抗人IgG多克隆抗体,孵育,再用PBS冲洗;

(6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:冲洗后切片上组织滴加酶标羊抗兔第二抗体室温孵育,再用PBS冲洗;

(7) DAB显色:切片上组织滴加DAB显色剂,自来水冲洗;

(8) PAS染色:加入过碘酸后自来水洗,自来水浸泡后,切片上组织滴加PAS染液,再用自来水洗;

(9) 苏木素显色:切片上组织滴加苏木素染色液后,自来水洗,再加入盐酸酒精,自来水洗,再加入氨水酒精,自来水洗;

(10) 用乙醇梯度脱水,直至二甲苯透明,封片。

3. 根据权利要求2所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,其特征在于,步骤(1)所述蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中优选进行脱蜡4-6次,每次20-25分钟。

4. 根据权利要求2所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,其特征在于,步骤(1)所述切片浸泡在乙醇中为依次浸泡在体积分数为100%、100%、95%、95%、80%、80%的乙醇中,每次5-6min。

5. 根据权利要求2所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,其特征在于,步骤(8)所述PAS染液,再用自来水洗后再用浸泡蒸馏水中,在接着H₂SO₄中浸泡,水洗。

6. 根据权利要求2所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,其特征在于,步骤(10)所述用乙醇梯度脱水为依次使用体积分数为80%、80%、95%、95%、100%、100%的乙醇梯度脱水,直至二甲苯透明。

7. 一种权利要求1所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法在组织染色中的应用。

8. 根据权利要求7的应用,其特征在于,所述蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法在肾脏组织染色中的应用。

一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于免疫组织化学技术领域,具体涉及一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用。

背景技术

[0002] 肾脏病的诊断金标准是“肾穿刺活检术”取得肾脏组织行病理检查,不同病理类型及损伤程度的治疗策略不同,因此,肾脏病理分期对临床治疗和预后具有重要意义。

[0003] 在肾穿刺组织的病理诊断中,常规采用冰冻切片免疫荧光染色、石蜡切片苏木精-伊红(HE)染色、过碘酸雪夫染色(PAS)、马松染色(Masson)、六胺银马松套染(PASM)以及电镜观察等,具体而言,石蜡切片HE染色用于观察肾组织的基本结构,分辨细胞种类;PAS染色可用于观察肾小球和肾小管基底膜以及系膜基质的多寡;Masson染色可显示基底膜及细胞外基质增多,用于观察肾间质纤维化及某些特殊蛋白沉积,如免疫复合物。冰冻切片免疫荧光染色用于检测沉积于肾组织内免疫球蛋白、补体、纤维蛋白以及病毒抗原等。借助电镜可观察肾脏超微结构改变,如肾小球基底膜厚度和结构、肾脏固有细胞形态、电子致密物及其沉积部位、特殊的纤维素样物质和病毒样颗粒等。上述染色结果再结合临床资料,最终确定临床肾脏病理分型。因此,穿刺获取的肾组织必须制备成冰冻切片、石蜡切片和电镜超薄切片,再进行各种染色以备观察。然而,因肾穿刺为有创性检查且穿刺医生技术精疏有别以及患者个体差异,获取肾组织材料往往较少,标本质量亦常不尽人意,难以做全上述各种检查;另外,超微电镜价格昂贵,很多单位尚未购置,难以做超微结构判读和诊断,增加了病理诊断的不确定性。

发明内容

[0004] 发明目的:针对现有技术存在的问题,本发明提供一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法,该试剂盒染色过程中简便快捷,可以用于在同一张切片上染色显示肾组织结构、免疫复合物沉积方式和部位。本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS减少组织制备过程,染色步骤少,实验时间缩短,稳定性高,实验结果直观对比,所提供的信息量远远比传统单染高等优点,尤其适用于缺少电镜和荧光显微镜的基层单位开展肾活检染色技术。

[0005] 本发明还提供一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法的应用。

[0006] 技术方案:为了实现上述目的,如本发明的所述的一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒,其特征在于,包括如下组分:二甲苯、无水乙醇、PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、胰酶、内源性过氧化物酶阻断剂、兔抗人IgG多克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体、酶标羊抗兔第二抗体、DAB显色剂、PAS染液、过碘酸、硫酸、苏木素染色液、盐酸酒精,氨水酒精。

[0007] 本发明所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,包括如下步骤:

[0008] (1) 脱蜡至水:将组织制成石蜡切片,石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡,然后将切片浸泡在乙醇中;

[0009] (2) 微波热修复抗原:将步骤(1)浸泡后的切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中,微波

加热,然后将切片取出,自然冷却至室温;

[0010] (3) 胰酶修复抗原:将切片上组织滴加胰酶,孵育后进一步暴露抗原,再用PBS冲洗;

[0011] (4) 内源性过氧化物酶阻断:冲洗后切片上组织滴加内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育,再用PBS冲洗;

[0012] (5) 孵育IgA或IgG第一抗体:冲洗后切片上组织滴加兔抗人IgA多克隆抗体或兔抗人IgG多克隆抗体,孵育,再用PBS冲洗;

[0013] (6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:冲洗后切片上组织滴加酶标羊抗兔第二抗体室温孵育,再用PBS冲洗;

[0014] (7) DAB显色:切片上组织滴加DAB显色剂,自来水冲洗;

[0015] (8) PAS染色:加入过碘酸后自来水洗,自来水浸泡后,切片上组织滴加PAS染液,再用自来水洗,浸泡蒸馏水中,加入硫酸,水洗。

[0016] (9) 苏木素显色:切片上组织滴加苏木素染色液后,自来水洗,再加入盐酸酒精,自来水洗,再加入氨水酒精,自来水洗;

[0017] (10) 用乙醇梯度脱水,直至二甲苯透明,封片。

[0018] 其中,步骤(1)所述蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡4-6次,每次20-25分钟。一般优选,脱蜡4次,每次20分钟。

[0019] 其中,步骤(1)所述切片浸泡在乙醇中为依次浸泡在体积分数为100%、100%、95%、95%、80%、80%的乙醇中,每次5-6min。一般每次浸泡5min即可。

[0020] 其中,步骤(8)所述PAS染液,再用自来水洗后再用浸泡蒸馏水中,在接着H2S04中浸泡,水洗。

[0021] 其中,步骤(10)所述用乙醇梯度脱水为依次使用体积分数为80%、80%、95%、95%、100%、100%的乙醇梯度脱水,直至二甲苯透明。

[0022] 作为优选,石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法,包括如下步骤:

[0023] (1) 脱蜡至水:石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡2次,每次20分钟,然后将切片浸泡在100%、100%、95%、95%、80%、80%乙醇中,每次均为5min;

[0024] (2) 微波热修复抗原:切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中,微波加热,加热模式为中火档(375瓦)5分钟,停5分钟后再低火档(75瓦)5分钟,然后将切片取出,自然冷却至室温,置于PBS缓冲液中,3分钟×2次;

[0025] (3) 胰酶修复抗原:将切片上每个组织滴加50μL胰酶(覆盖组织即可),37℃孵育15分钟,进一步暴露抗原,PBS冲洗3分钟×3次;

[0026] (4) 内源性过氧化物酶阻断:切片上每个组织滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂(覆盖组织即可)室温孵育10分钟,PBS冲洗3分钟×3次;

[0027] (5) 孵育IgA或IgG第一抗体:切片上每个组织滴加50μL兔抗人IgA或IgG抗体多克隆抗体(覆盖组织即可),37℃孵育1小时,PBS冲洗3分钟×3次;

[0028] (6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:切片上每个组织滴加50μL酶标羊抗兔第二抗体(覆盖组织即可)室温孵育20分钟,PBS冲洗3分钟×3次;

[0029] (7) DAB显色:切片上每个组织滴加50μLDAB显色剂(覆盖组织即可),2~5分钟(镜下观察显色效果),自来水洗DAB显色剂;

[0030] (8) PAS染色:加入质量分数0.5%过碘酸50 μ L(覆盖组织即可)后自来水洗,反应10分钟,自来水浸泡5分钟后,切片上每个组织滴加50 μ L PAS染液,PAS染液浸泡20分钟,再用自来水洗,浸泡蒸馏水中10分钟,在2mol/L硫酸浸泡2分钟,水洗。

[0031] (9) 苏木素显色:切片上每个组织滴加50 μ L苏木素染色液15分钟后,自来水洗,再加入50 μ L盐酸酒精1~2分钟,自来水洗,再加入50 μ L氨水酒精1~2分钟,自来水洗;

[0032] (10) 80%、80%、95%、95%、100%、100%乙醇梯度脱水,二甲苯透明,封片。

[0033] 本发明所述的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法在组织染色中的应用。

[0034] 进一步地,所述石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒的染色方法在肾脏组织染色中的应用。

[0035] 本发明中采用的原料均由市售可得:二甲苯(国药化学试剂公司)、100%无水乙醇(国药化学试剂公司)、PBS缓冲液(pH为7.4)(凯基生物公司)、柠檬酸抗原修复液(福州迈新生物公司)、胰酶(福州迈新生物公司)、内源性过氧化物酶阻断剂(福州迈新生物公司)、兔抗人IgG多克隆抗体(abcam公司)、兔抗人IgA多克隆抗体(abcam公司)、酶标羊抗兔第二抗体(福州迈新生物公司)、DAB显色剂(福州迈新生物公司)、过碘酸(国药化学试剂公司)、硫酸(国药化学试剂公司)、PAS染液(凯基生物公司)、苏木素染色液(凯基生物公司)、盐酸酒精(国药化学试剂公司),氨水酒精(国药化学试剂公司)。

[0036] 原理:免疫组化染色技术,是应用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的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对抗原进行定位、定性及相对定量。

[0037] 过碘酸希夫反应,简称为PAS反应(periodic acid Schiff reaction)。其化学反应的基本过程多糖分子一般含有醛基,通过过碘酸的氧化作用,使多糖暴露出醛基,醛基与无色碱性品红结合反应,于多糖存在的部位形成新的紫红色复合物,通过显微镜观察而对组织细胞内的糖原、糖蛋白或粘多糖等化学成分进行定位、定性和定量的研究。

[0038] 通常情况下直接将两种染色直接结合,会导致组织中细胞核染色较浅,PAS染色不易着色,造成结果不稳定,且免疫组化染色常出现阴性。本发明的试剂盒中包含了常规免疫组化染色和PAS染色的试剂组分,还增加了胰酶和硫酸,原料易获得。本发明染色过程中通过优化石蜡切片抗原修复方式,利用柠檬酸修复液微波热修复和胰酶修复相结合,使抗原充分暴露,进行IgA或IgG免疫组化染色后再进行PAS染色,使染色过程更稳定,并巧妙的加入了2mol/L H₂SO₄浸泡酸化步骤,使细胞核染色更清晰,染色稳定,染色结果易于分析辨认。

[0039] 有益效果:与现有技术相比,本发明具有如下优点:

[0040] 1、一张切片显示多种信息

[0041] 本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法通过技术优化首次将免疫组化染色和PAS染色相结合,应用于肾脏组织结构和免疫复合物沉积情况的判别。与单纯石蜡切片PAS染色、冰冻切片免疫荧光染色和肾组织电镜观察相比,无论组织结构、免疫复合物沉积的方式、部位等方面效果更好,染色更清晰。

[0042] 2、结果稳定,易推广

[0043] 本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法减少组织制备过程,染色步骤少,实验时间缩短,稳定性高,实验结果直观,对比鲜明,所提供的信息量远远比传统

单染高等优点。

[0044] 3、扩大了石蜡切片应用范围,节省资源和时间

[0045] 本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒可以在缺少免疫荧光和电镜标本或两种样品缺少肾小球的情况下使用,兼具PAS染色、免疫荧光染色和电镜检查的部分功能,克服了PAS只能显示组织的显微结构、免疫荧光只检测抗原沉积、电镜观察范围太小等不足之处,能起到辅助判断肾脏组织病理损伤的作用,同时还节约了检材和制样及观察时间。

[0046] 4、为基层医院开展肾活检染色技术提供了可能

[0047] 本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒可以在没有财力购买电镜、荧光显微镜、冰冻切片机的普通医院病理科使用,能有效促进开展肾活检染色技术,提高在基层医院的适用性。

附图说明

[0048] 图1为正常肾组织石蜡切片免疫组化套染PAS示意图;

[0049] 图2为膜性肾病肾组织染色方法比较示意图;A.冰冻切片免疫荧光染色(×400);B.单纯PAS染色(×400);C.电镜(×2000);D.免疫组化套染PAS(×400);

[0050] 图3为膜性肾病肾组织免疫组化+PAS染色直接结合染色(×400)结果示意图;

[0051] 图4为IgA肾病肾组织染色方法比较示意图;A.冰冻切片免疫荧光染色(×400);B.单纯PAS染色(×400);C.电镜(×2000);D.免疫组化套染PAS(×400)。

[0052] 图5IgA肾病肾组织免疫组化+PAS染色直接结合染色(×400)结果示意图。

具体实施方式

[0053] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0054] 实施例1

[0055] 石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒

[0056] 包括如下组分:二甲苯、无水乙醇、PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、胰酶、内源性过氧化物酶阻断剂、兔抗人IgG多克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体、酶标羊抗兔第二抗体、DAB显色剂、过碘酸、硫酸、PAS染液、苏木素染色液、盐酸酒精,氨水酒精。

[0057] 实施例2

[0058] 多聚甲醛固定-石蜡包埋的正常肾组织,石蜡切片免疫组化套染PAS步骤如下:

[0059] 脱蜡至水:采用常规方法制备正常肾组织石蜡切片,石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡2次,每次20分钟,然后将切片依次浸泡在体积分数100%、100%、95%、95%、80%、80%乙醇中,每次均为5min;

[0060] (2)微波热修复抗原:切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中,微波加热,加热模式为中火档(375瓦)5分钟,停5分钟后再低火档(75瓦)5分钟,然后将切片取出,自然冷却至室温;

[0061] (3)抗原修复:将切片上组织滴加50μL胰酶,37℃孵育15分钟,进一步暴露抗原,PBS冲洗3分钟×3次;

[0062] (4)内源性过氧化物酶阻断:切片上组织滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10分钟,PBS冲洗3分钟×3次;

[0063] (5)孵育IgG第一抗体:切片上组织滴加50μL兔抗人IgG抗体多克隆抗体,37℃孵育

1小时, PBS冲洗3分钟×3次;

[0064] (6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:切片上组织滴加50μL酶标羊抗兔第二抗体室温孵育20分钟, PBS冲洗3分钟×3次;

[0065] (7) DAB显色:切片上组织滴加50μLDAB显色剂, 2~5分钟(镜下观察显色效果), 自来水洗DAB显色剂;

[0066] (8) PAS染色:切片上组织加入质量分数0.5%过碘酸50μL后反应10分钟, 自来水浸泡5分钟后, 切片上组织滴加50μL PAS染液, 再用自来水洗, 浸泡蒸馏水中2分钟, 2mol/L硫酸浸泡2分钟, 水洗。

[0067] (9) 苏木素显色:切片上每个组织滴加50μL苏木素染色液15分钟后, 自来水洗, 再加入50μL盐酸酒精1~2分钟, 自来水洗, 再加入50μL氨水酒精1~2分钟;

[0068] (10) 分别用体积分数80%、80%、95%、95%、100%、100%乙醇梯度脱水, 直至二甲苯透明, 封片。

[0069] 正常肾组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果:

[0070] 正常肾组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果显示如图1所示, 组织结构清晰, 无棕黄色着色区域, 说明无免疫复合物沉积部位, 红色部位为系膜基质和基底膜。

[0071] 实施例3

[0072] 多聚甲醛固定-石蜡包埋的膜性肾病组织, 石蜡切片免疫组化套染PAS步骤如下:

[0073] 1. 脱蜡至水:采用常规方法制备膜性肾病组织石蜡切片, 石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡2次, 每次20分钟, 然后将切片依次浸泡在体积分数100%、100%、95%、95%、80%、80%乙醇中, 每次均为5min;

[0074] (2) 微波热修复抗原:切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中, 微波加热, 加热模式为中火档(375瓦)5分钟, 停5分钟后再低火档(75瓦)5分钟, 然后将切片取出, 自然冷却至室温;

[0075] (3) 抗原修复:将切片上组织滴加50μL胰酶, 37℃孵育15分钟, 进一步暴露抗原, PBS冲洗3分钟×3次;

[0076] (4) 内源性过氧化物酶阻断:切片上组织滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10分钟, PBS冲洗3分钟×3次;

[0077] (5) 孵育IgG第一抗体:切片上组织滴加50μL兔抗人IgG抗体多克隆抗体, 37℃孵育1小时, PBS冲洗3分钟×3次;

[0078] (6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:切片上组织滴加50μL酶标羊抗兔第二抗体室温孵育20分钟, PBS冲洗3分钟×3次;

[0079] (7) DAB显色:切片上组织滴加50μLDAB显色剂, 2~5分钟(镜下观察显色效果), 自来水洗DAB显色剂;

[0080] (8) PAS染色:切片上组织加入质量分数0.5%过碘酸50μL后反应10分钟, 自来水浸泡5分钟后, 切片上组织滴加50μL PAS染液, 再用自来水洗, 浸泡蒸馏水中2分钟, 2mol/L硫酸浸泡2分钟, 水洗。

[0081] (9) 苏木素显色:切片上每个组织滴加50μL苏木素染色液15分钟后, 自来水洗, 再加入50μL盐酸酒精1~2分钟, 自来水洗, 再加入50μL氨水酒精1~2分钟;

[0082] (10) 分别用体积分数80%、80%、95%、95%、100%、100%乙醇梯度脱水, 直至二甲苯透明, 封片。

[0083] 膜性肾病患者石蜡切片免疫组化套染PAS结果与单染比较：

[0084] 采用膜性肾病患者肾活检组织单纯免疫荧光染色显示翠绿色颗粒状荧光沿肾小球毛细血管壁分布(图2-A),但不能显示组织结构;单纯PAS染色显示红色部位为系膜基质和基底膜,但不能显示免疫复合物沉积部位(图2-B)。单纯电镜观察见肾小球毛细血管基底膜外上皮下团块状电子致密物沉积(图2-C),但显示范围十分有限。

[0085] 本实施例膜性肾病患者肾组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果的显微视图如图2-D所示,图2-D可以同时显示组织结构和免疫复合物沉积部位,显示红色部位为系膜基质,棕黄色部位为IgG染色阳性区。PAS染色显示红色部位为系膜基质,蓝色部位为细胞核,显示出整体脏结构,棕黄色部位为IgG染色阳性区,IgG染色分布于肾小球毛细血管,染色结果与单纯免疫组化染色和单纯PAS染色结果得出的结论相一致,说明本发明的试剂盒和染色方法通过一次染色就可以得到两种染色的全部信息,并且不会出现导致染色不稳定,且免疫组化染色常出现阴性的问题。

[0086] 膜性肾病组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果与膜性肾病组织免疫组化PAS染色直接结合比较：

[0087] 免疫组化染色和PAS染色直接结合,结果显示细胞核着色浅淡由图3所示。本实施例中免疫组化套染PAS,细胞核着色深,组织色彩分明(图2-D)。

[0088] 实施例4

[0089] 多聚甲醛固定-石蜡包埋的IgA肾病组织,石蜡切片免疫组化套染PAS步骤如下:

[0090] 1. 脱蜡至水:采用常规方法制备IgA肾病组织石蜡切片,石蜡切片浸泡于二甲苯脱蜡缸中进行脱蜡2次,每次20分钟,然后将切片依次浸泡在体积分数100%、100%、95%、95%、80%、80%乙醇中,每次均为5min;

[0091] (2) 微波热修复抗原:切片浸泡于柠檬酸抗原修复液中,微波加热,加热模式为中火档(375瓦)5分钟,停5分钟后再低火档(75瓦)5分钟,然后将切片取出,自然冷却至室温;

[0092] (3) 抗原修复:将切片上组织滴加50μL胰酶,37℃孵育15分钟,进一步暴露抗原,PBS冲洗3分钟×3次;

[0093] (4) 内源性过氧化物酶阻断:切片上组织滴加50μL内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10分钟,PBS冲洗3分钟×3次;

[0094] (5) 孵育IgG第一抗体:切片上组织滴加50μL兔抗人IgA抗体多克隆抗体,37℃孵育1小时,PBS冲洗3分钟×3次;

[0095] (6) 孵育酶标羊抗兔第二抗体:切片上组织滴加50μL酶标羊抗兔第二抗体室温孵育20分钟,PBS冲洗3分钟×3次;

[0096] (7) DAB显色:切片上组织滴加50μL DAB显色剂,2~5分钟(镜下观察显色效果),自来水洗DAB显色剂;

[0097] (8) PAS染色:切片上组织加入质量分数0.5%过碘酸50μL后反应10分钟,自来水浸泡5分钟后,切片上组织滴加50μL PAS染液,再用自来水洗,浸泡蒸馏水中2分钟,2mol/L硫酸浸泡2分钟,水洗。

[0098] (9) 苏木素显色:切片上每个组织滴加50μL苏木素染色液15分钟后,自来水洗,再加入盐酸酒精,自来水洗,再加入50μL盐酸酒精1~2分钟,自来水洗,再加入50μL氨水酒精1~2分钟;

[0099] (10) 分别用体积分数80%、80%、95%、95%、100%、100%乙醇梯度脱水,直至二甲苯透明,封片。

[0100] IgA肾病患者石蜡切片免疫组化套染PAS结果与单染比较:

[0101] 图4A-C显示:IgA肾病患者肾活检组织IgA单纯免疫荧光染色显示翠绿色团块状荧光分布于肾小球系膜区,但不能显示组织结构(图4-A);单纯PAS染色显示红色部位为系膜基质和基底膜,但不能显示免疫复合物沉积部位(图4-B)。单纯电镜观察见单纯电镜观察见肾小球系膜区团块状电子致密物沉积,但显示肾脏组织范围十分有限,限制观察判断(图4-C)。上述结果综合分析,IgA相关免疫复合物沉积于肾小球系膜区,电镜也同样显示肾小球系膜区团块状电子致密物沉积,符合IgA肾病的病理变化。

[0102] 本实施例IgA肾病患者肾组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果的显微视图如图4-D所示,图4-D可以显示组织结构和免疫复合物沉积部位,PAS染色显示红色部位为系膜基质,显示出整体肾小球结构,棕黄色部位为IgA染色阳性区,可见IgA染色分布于与部分红色区域重叠,说明IgA相关免疫复合物位于肾小球系膜区,染色结果与单纯免疫荧光染色和单纯PAS染色结果得出的结论相一致,本发明的试剂盒和染色方法通过一次染色就可以得到两种染色的全部信息,并且不会出现导致染色不稳定,且免疫组化染色常出现阴性的问题。

[0103] IgA肾病组织石蜡切片免疫组化套染PAS结果与免疫组化+PAS染色直接结合比较:

[0104] 免疫组化染色和PAS染色直接结合染色,结果显示抗原暴露欠佳,阳性部位隐约可见淡棕色沉积物,由图5所示。本实施例中免疫组化套染PAS,阳性部位醒目,局部可见深棕色沉积物,图4-D。

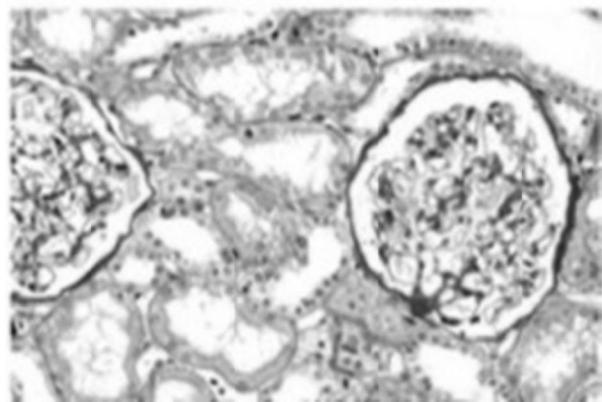


图1

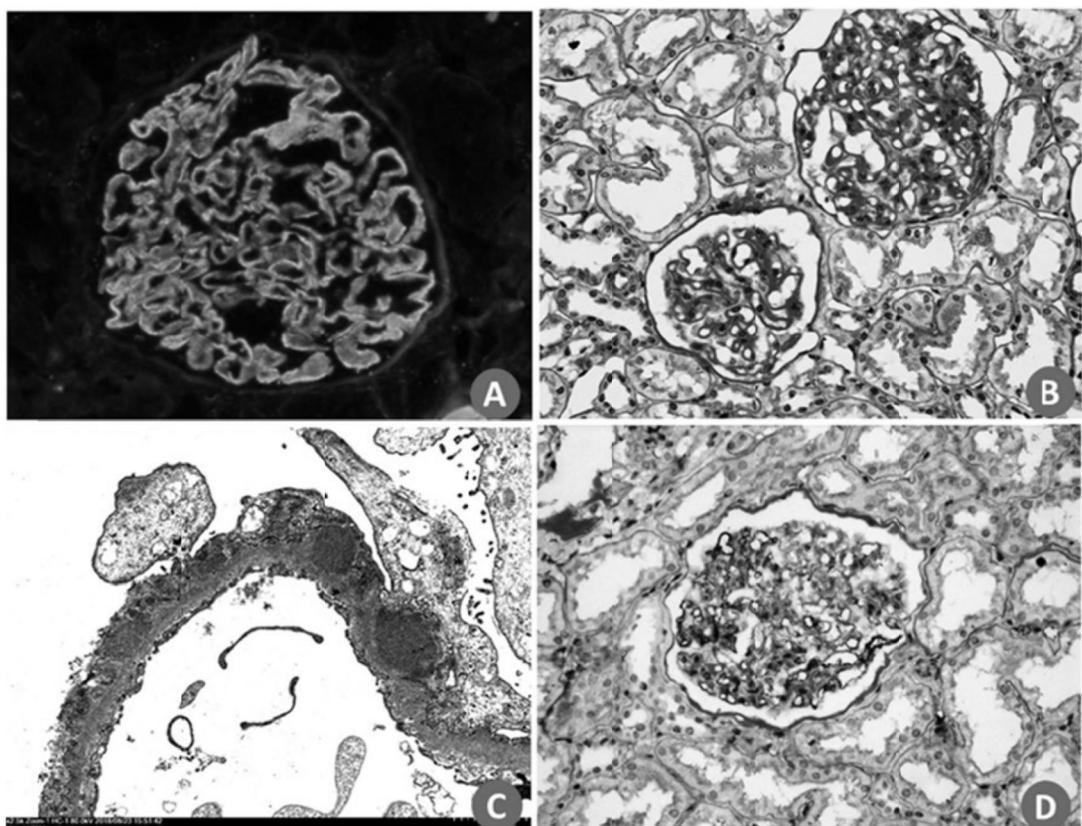


图2

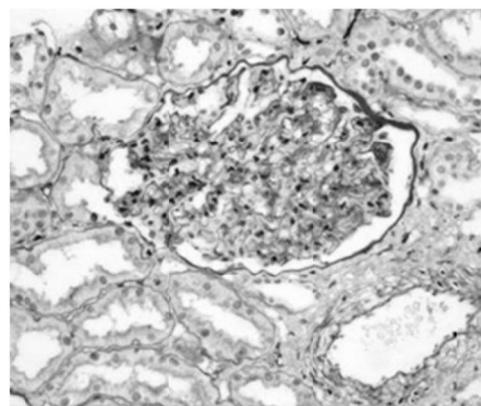


图3

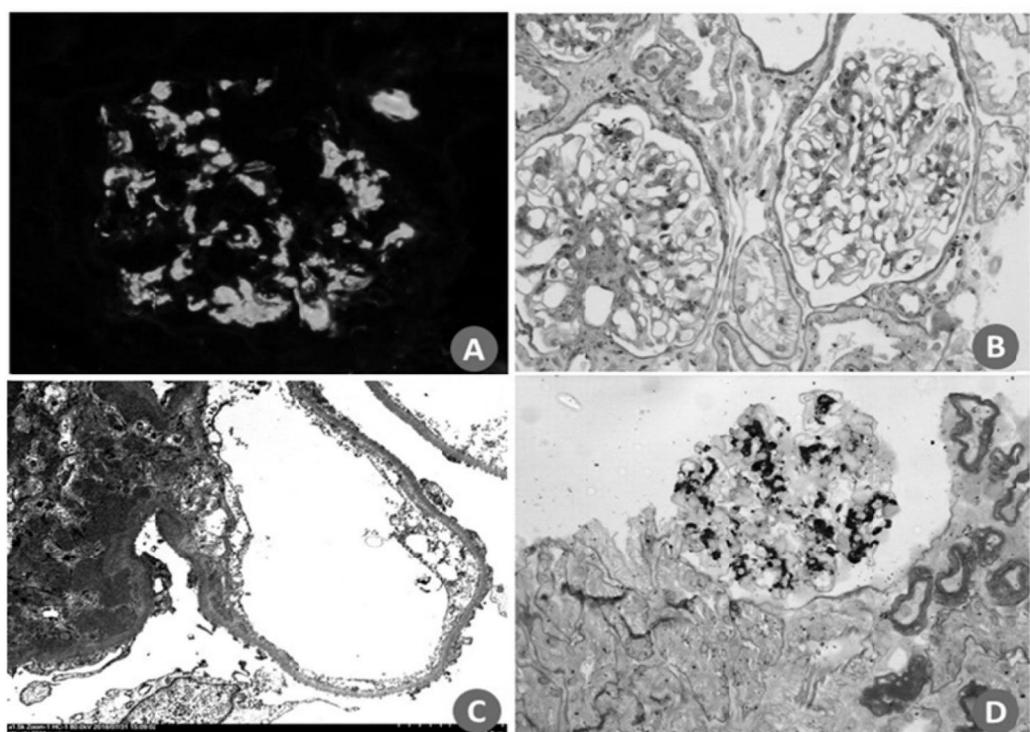


图4

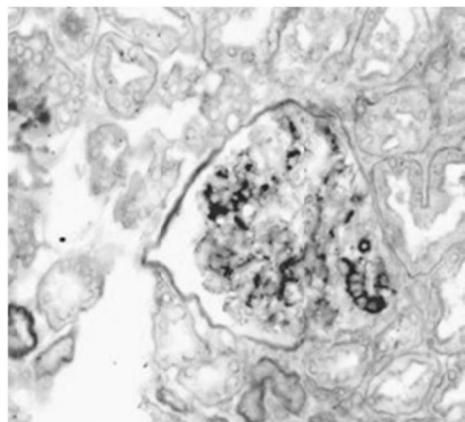


图5

专利名称(译)	一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用		
公开(公告)号	CN109946139A	公开(公告)日	2019-06-28
申请号	CN201910155479.9	申请日	2019-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	陈平圣 鲁荐		
发明人	弓玉祥 陈平圣 鲁荐		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
代理人(译)	孙斌		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开了一种石蜡切片免疫组化套染PAS试剂盒及其染色方法和应用，该试剂盒包括如下组分：二甲苯、无水乙醇、PBS缓冲液、柠檬酸抗原修复液、胰酶、内源性过氧化物酶阻断剂、兔抗人IgG多克隆抗体、兔抗人IgA多克隆抗体、酶标羊抗兔第二抗体、DAB显色剂、过碘酸、硫酸、PAS染液、苏木素染色液、盐酸酒精、氨水酒精。本发明的试剂盒染色过程中简便快捷，可以用于在同一张切片上染色显示肾组织结构、免疫复合物沉积方式和部位。本发明的石蜡切片免疫组化套染PAS减少组织制备过程，染色步骤少，实验时间缩短，稳定性高，实验结果直观对比，所提供的信息量远远比传统单染高等优点。

