



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106370835 A

(43)申请公布日 2017.02.01

(21)申请号 201610750965.1

(22)申请日 2016.08.29

(71)申请人 中山大学孙逸仙纪念医院

地址 510120 广东省广州市越秀区沿江西路107号孙逸仙纪念医院

(72)发明人 王亮春

(74)专利代理机构 广州市越秀区海心联合专利代理事务所(普通合伙)
44295

代理人 蔡国

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

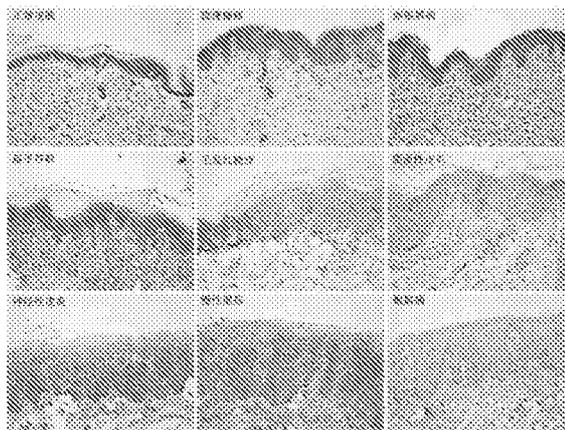
权利要求书2页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测 galectin-3 辅助诊断银屑病的方法

(57)摘要

本发明公开了一种皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测 galectin-3 辅助诊断银屑病的方法,所述的方法为将患者的离体皮肤经过一抗和二抗孵育后经染色处理后判断染色后的离体皮肤是否为阴性来辅助判断是否为银屑病;所述的一抗为兔源抗人 Galectin-3 单抗,所述的二抗为 HRP 标记山羊抗兔抗体,本发明的目的在于提供一种辅助银屑病诊断的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测 galectin-3 辅助诊断银屑病的方法。



1. 一种皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的方法为将患者的离体皮肤经过一抗和二抗孵育,再经染色处理,判断染色后的离体皮肤是否为阴性来辅助诊断是否为银屑病;所述的一抗为兔源抗人Galecitn-3单抗,所述的二抗为HRP标记山羊抗兔抗体。

2. 根据权利要求1所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,具体包括以下步骤:

步骤1:取银屑病患者全层皮肤组织制成蜡块后切片;然后脱蜡,水化处理;

步骤2:去除步骤1得到皮肤切片中的内源性过氧化物酶活性;

步骤3:将步骤2得到的皮肤切片柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复;

步骤4:将步骤3得到的皮肤切片采用稀释比例1:10000的兔源抗人Galecitn-3单抗在4℃条件下孵育过夜;

步骤5:将步骤4得到的皮肤切片采用HRP标记山羊抗兔抗体室温孵育45分钟;

步骤6:将步骤5得到的皮肤切片采用DAB染色;

步骤7:将步骤6得到的皮肤切片依次采用苏木素复染、盐酸酒精分化、自来水返蓝操作;

步骤8:将步骤7得到的皮肤切片脱水,并在二甲苯中浸泡使切片透明;

步骤9:将步骤8得到的皮肤切片进行烤片、封片后在显微镜下观察。

3. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤1具体为:取银屑病患者全层皮肤组织,制成蜡块后切片,然后将得到的皮肤切片在常温下置于二甲苯中浸泡14分钟,更换二甲苯后再浸泡14分钟;100%,95%,70%体积百分比浓度乙醇,浓度由高到低依次浸泡6分钟,其后双蒸水浸泡5分钟,PBS(磷酸盐缓冲液)清洗3次,每次2分钟。

4. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤2具体为:室温条件下用双氧水孵育一段时间以除去内源性过氧化物酶活性。

5. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤3具体为:将切片置于柠檬酸盐缓冲液中微波炉煮沸后使液体温度保持在92-98℃并持续8分钟,停止4分钟,继续92-98℃加热8分钟,其后,将溶液室温冷却30min。

6. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤4具体为:每张切片滴加40u1左右采用稀释比例1:10000的兔源抗Galecitn-3单抗,4℃条件下孵育过夜。

7. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤5中孵育时间为45分钟,所述的HRP标记山羊抗兔二抗是指辣根过氧化物酶标记的山羊来源抗兔IgG抗体。

8. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤6中,所述的DAB为购自中杉金桥公司的DAB试剂盒,使用时,每个样本中加入20u1体积比为1:20的DAB原液和DAB稀释液的混合溶液。

9. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断

银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤7具体为:在皮肤切片上滴加40 μ l苏木素,静置2分钟;然后将皮肤切片置于1ml的酒精盐酸溶液中,其中酒精盐酸溶液由75%体积百分比的乙醇99ml+浓盐酸1ml混合形成;最后将皮肤切片置于自来水中。

10. 根据权利要求2所述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法,其特征在于,所述的步骤8具体为:将皮肤切片依次置于70,95,100%体积百分比浓度的酒精中分别浸泡1min,2min,4min;然后将皮肤切片置于二甲苯中浸泡2分钟,更换二甲苯后再浸泡2分钟;

所述的步骤9具体为:将皮肤切片在60 $^{\circ}$ C的环境中静置15分钟,然后采用中性树脂封片后通过显微镜观查,若结果为阴性,则提示皮肤组织为银屑病。

皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断 银屑病的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗领域,具体地说是一种皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法。

背景技术

[0002] 银屑病是最常见的慢性增生性炎症性皮肤病之一,在我国发病率约为0.123%,在欧美国家发病率可高达2-3%。本病虽不直接危机生命,但病情迁延反复,尤以侵犯青壮年为主,对患者的身体健康和精神影响巨大。目前银屑病的诊断主要基于典型的临床表现和组织病理学改变,然而大多数银屑病患者由于用药、病程、搔抓等多种因素,临床和实验室检查的特征往往不够典型,与多种皮肤疾病如慢性湿疹、神经性皮炎、脂溢性皮炎等难以相鉴别,迫使临床医生和皮肤病理医生给出“慢性皮炎”、“银屑病样皮炎”一类的非特异性诊断,从而延误患者诊治。就申请人所知,除上述的组织病理检查之外,目前尚无一种直观可靠的实验室指标可以辅助银屑病的诊断。

发明内容

[0003] 本发明的目的在于提供一种辅助银屑病诊断的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法。

[0004] 本发明的具体的技术方案为:一种银屑病患者离体样本免疫组化染色处理,判断染色后的离体皮肤是否为阴性来辅助诊断是否为银屑病;所述的一抗为免疫组织化学染色检测方法,所述的方法为将患者的离体皮肤经过一抗和二抗孵育,再经源抗人Galectin-3单抗,所述的二抗为HRP标记山羊抗兔抗体。

[0005] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,具体包括以下步骤:

[0006] 步骤1:取银屑病患者全层皮肤组织制成蜡块后切片;然后脱蜡,水化处理;

[0007] 步骤2:去除步骤1得到皮肤切片中的内源性过氧化物酶活性;

[0008] 步骤3:将步骤2得到的皮肤切片柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复;

[0009] 步骤4:将步骤3得到的皮肤切片采用稀释比例1:10000的兔源抗人Galectin-3单抗在4℃条件下孵育过夜;

[0010] 步骤5:将步骤4得到的皮肤切片采用HRP标记山羊抗兔抗体室温孵育一段时间;

[0011] 步骤6:将步骤5得到的皮肤切片采用DAB染色;

[0012] 步骤7:将步骤6得到的皮肤切片依次采用苏木素复染、盐酸酒精分化、自来水返蓝操作;

[0013] 步骤8:将步骤7得到的皮肤切片脱水,并在二甲苯中浸泡使切片透明;

[0014] 步骤9:将步骤8得到的皮肤切片进行烤片、封片后在显微镜下观察。

[0015] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法

方法中,所述的步骤1具体为:取银屑病患者全层皮肤组织,制成蜡块后切片,然后将得到的皮肤切片在常温下置于二甲苯中浸泡14分钟,更换二甲苯后再浸泡14分钟;100%,95%,70%体积百分比浓度乙醇,浓度由高到低依次浸泡6分钟,其后双蒸水浸泡5分钟,PBS(磷酸盐缓冲液)清洗3次,每次2分钟。

[0016] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤2具体为:室温条件下用双氧水孵育一段时间以除去内源性过氧化物酶活性。

[0017] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤3具体为:将切片置于柠檬酸盐缓冲液中微波炉煮沸后使液体温度保持在92-98℃并持续8分钟,停止4分钟,继续92-98℃加热8分钟,其后,将溶液室温冷却30min。

[0018] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤4具体为:每张切片滴加40u1左右采用稀释比例1:10000的兔源抗Galecitn-3单抗,4℃条件下孵育过夜

[0019] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤5中孵育时间为45分钟,所述的HRP标记山羊抗兔二抗是指辣根过氧化物酶标记的山羊来源抗兔IgG抗体。

[0020] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤6中,所述的DAB为购自中杉金桥公司的DAB试剂盒,使用时,每个样本中加入20u1体积比为1:20的DAB原液和DAB稀释液的混合溶液。

[0021] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤7具体为:在皮肤切片上滴加40u1苏木素,静置2分钟;然后将皮肤切片置于1ml的酒精盐酸溶液中,其中酒精盐酸溶液由75%体积百分比的乙醇99ml+浓盐酸1ml混合形成;最后将皮肤切片置于自来水中。

[0022] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤8具体为:将皮肤切片依次置于70,95,100%体积百分比浓度的酒精中分别浸泡1min,2min,4min;然后将皮肤切片置于二甲苯中浸泡2分钟,更换二甲苯后再浸泡2分钟。

[0023] 在上述的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,所述的步骤9具体为:将皮肤切片在60℃的环境中静置15分钟,然后采用中性树脂封片后通过显微镜观查,若结果为阴性,则为提示为皮肤组织为银屑病。

[0024] 免疫组织化学染色是应用免疫学基本的原理—抗原抗体反应,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显色来确定组织细胞内抗原,对其进行定位、定性及定量的研究,其大体基本流程目前已十分成熟,但对于不同的抗原在不同组织的检测具体实验条件尚需具体摸索,本专利的特色主要在于(1)明确Galectin-3在皮肤中的丰度可以用于鉴别诊断银屑病(2)确定利用免疫组织化学染色方案检测皮肤组织石蜡切片中Galectin-3的具体实验条件。在制作样本中,有两种切片方式,石蜡切片和冰冻切片,其目的就是让组织更容易切成薄片。本专利取银屑病患者皮肤组织,按照常规方案制成蜡块后切片,制作成石蜡切片用于后续免疫组织化学染色。

[0025] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0026] 通过Galectin-3染色在表皮中的“无”和“有”可以一目了然,直观可靠对银屑病和其它银屑病样皮炎进行鉴别。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例1中各种皮肤在免疫组化染色提示Galectin-3中特异性表现;

[0028] 图2是本发明实施例1的不同疾病阶段同一银屑病患者临床表现、组织病理和Galectin-3免疫组化染色结果。

具体实施方式

[0029] 下面结合具体实施方式,对本发明的技术方案作进一步的详细说明,但不构成对本发明的任何限制。

[0030] 实施例

[0031] 一种皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法中,具体包括以下步骤:

[0032] 步骤1:取银屑病患者全层皮肤组织按照常规方法制成蜡块后切片用于后续免疫组织化学染色;凡是石蜡切片均需要脱蜡和水化,其目的是为了去除切片中的石蜡,让抗原抗体更好的接触反应。若脱蜡和水化不全易出现局灶性反应和浸洗不全,而产生非特异性背景着色。因此需要脱蜡,水化处理;具体来说,取银屑病患者全层皮肤组织,制成蜡块后切片,然后将得到的皮肤切片在常温下置于二甲苯中浸泡14分钟,更换二甲苯后再浸泡14分钟;100%,95%,70%体积百分比浓度乙醇,浓度由高到低依次浸泡6分钟,其后双蒸水浸泡5分钟,PBS(磷酸盐缓冲液)清洗3次,每次2分钟。

[0033] 步骤2:去除步骤1得到皮肤切片中的内源性过氧化物酶活性;具体来说,室温条件下用双氧水孵育一段时间以除去内源性过氧化物酶活性。双氧水的用量不限,将皮肤切片浸泡在其中即可。

[0034] 步骤3:将步骤2得到的皮肤切片柠檬酸盐缓冲液进行抗原修复;具体来说,将皮肤切片置于柠檬酸盐缓冲液中微波炉煮沸后使液体温度保持在92-98℃并持续8分钟,停止4分钟,继续92-98℃加热8分钟,其后,将溶液室温冷却30min。该柠檬酸盐缓冲液为0.01mol/L柠檬酸盐缓冲液(pH6.0,0.51g柠檬酸钠+0.095g柠檬酸+250ml双蒸水),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,为了解决上述的问题,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称为抗原修复,抗原修复的方法和抗原修复液有很多种,经我们反复试验,认为微波法+枸橼酸钠修复液效果最佳。

[0035] 步骤4:将步骤3得到的皮肤切片采用稀释比例1:10000的兔源单抗在4℃条件下孵育;所述的兔源单抗是指兔源单克隆抗体,具体是指兔来源抗Galectin-3的单克隆抗体,其克隆号为EP2775Y,浓度约0.46mg/ml,该种抗体是我们从多种抗体中选择的一种效价最优,性质最稳定的抗体;

[0036] 1:10000的稀释比例即使用时1ul抗体原液需加入10ml抗体稀释液,抗体稀释液配方为100ml PBS中加入1g牛血清白蛋白、TritonX-100 0.5ml。

[0037] 步骤5:将步骤4得到的皮肤切片采用山羊抗兔HRP二抗室温孵育一段时间;山羊抗

兔HRP二抗是指辣根过氧化物酶标记的山羊来源抗兔IgG抗体。免疫组织化学技术是根据抗原与抗体特异性结合的原理,检测组织中的肽和蛋白质的一种技术。一般过程为:一抗→生物素标记二抗+辣根酶标记链霉卵白素→辣根酶底物显色。本步骤赋予条件为室温,45分钟。

[0038] 步骤6:将步骤5得到的皮肤切片采用DAB染色;二氨基联苯胺(3,3'-diaminobenzidine,DAB)是过氧化物酶(Peroxidase)的生色底物,在过氧化氢的存在下失去电子而呈现出颜色变化和积累,形成棕褐色不溶性产物。用于检测过氧化物酶的活性,灵敏度高,特异性好。DAB染色试剂盒易于购买,本专利DAB试剂盒购自中杉金桥公司。使用时DAB原液+DAB稀释液(1:20),每个样本加20ul。

[0039] 步骤7:将步骤6得到的皮肤切片依次采用苏木素复染、盐酸酒精分化、自来水返蓝操作;具体来说,在皮肤切片上滴加40ul苏木素,静置2分钟;然后将皮肤切片置于1ml的酒精盐酸溶液中,其中酒精盐酸溶液由75%体积百分比的乙醇99ml+浓盐酸1ml混合形成;最后将皮肤切片置于自来水中。

[0040] 步骤8:将步骤7得到的皮肤切片脱水,并在二甲苯中浸泡使切片透明;具体来说,将皮肤切片依次置于70,95,100%体积百分比浓度的酒精中分别浸泡1min,2min,4min;然后将皮肤切片置于二甲苯中浸泡2分钟,更换二甲苯后再浸泡2分钟。

[0041] 步骤9:将步骤8得到的皮肤切片进行烤片、封片后在显微镜下观察。具体来说,将皮肤切片在60℃的环境中静置15分钟,然后采用中性树脂封片后通过显微镜观查,若结果为阴性,则为银屑病患者皮肤组织。

[0042] 检测结果

[0043] 用上述实验条件,对健康皮肤(20例),7种临床常见、需与银屑病相鉴别的皮肤疾病(玫瑰糠疹、副银屑病、扁平苔藓、毛发红糠疹、脂溢性皮炎、神经性皮炎、慢性湿疹,每种疾病检测数15-20例),银屑病(20例)进行Galectin-3的免疫组化染色,银屑病患者表皮中Galectin-3均为阴性,而在其它皮肤疾病和正常皮肤中,Galectin-3均有丰富表达,染色为阳性,详见附图1;阳性为棕黄色染色。

[0044] 图2示出了.不同疾病阶段同一银屑病患者临床表现、组织病理和Galectin-3免疫组化染色结果,A-F均为同一患者,A、B为该患者初诊时临床表现以及组织病理结果,临床上表现为丘疹、斑块、糜烂伴渗出,难以与湿疹样皮炎鉴别,组织病理回报亚急性皮炎。D、E为该患者复诊时临床表现以及组织病理结果,临床表现为典型银屑病,边界清晰的鳞屑性斑块,组织病理符合银屑病。C、E为该银屑病患者初诊、复诊时Galectin-3组化染色,结果均为阴性。

[0045] 以上所述的仅为本发明的较佳实施例,凡在本发明的精神和原则范围内所作的任何修改、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

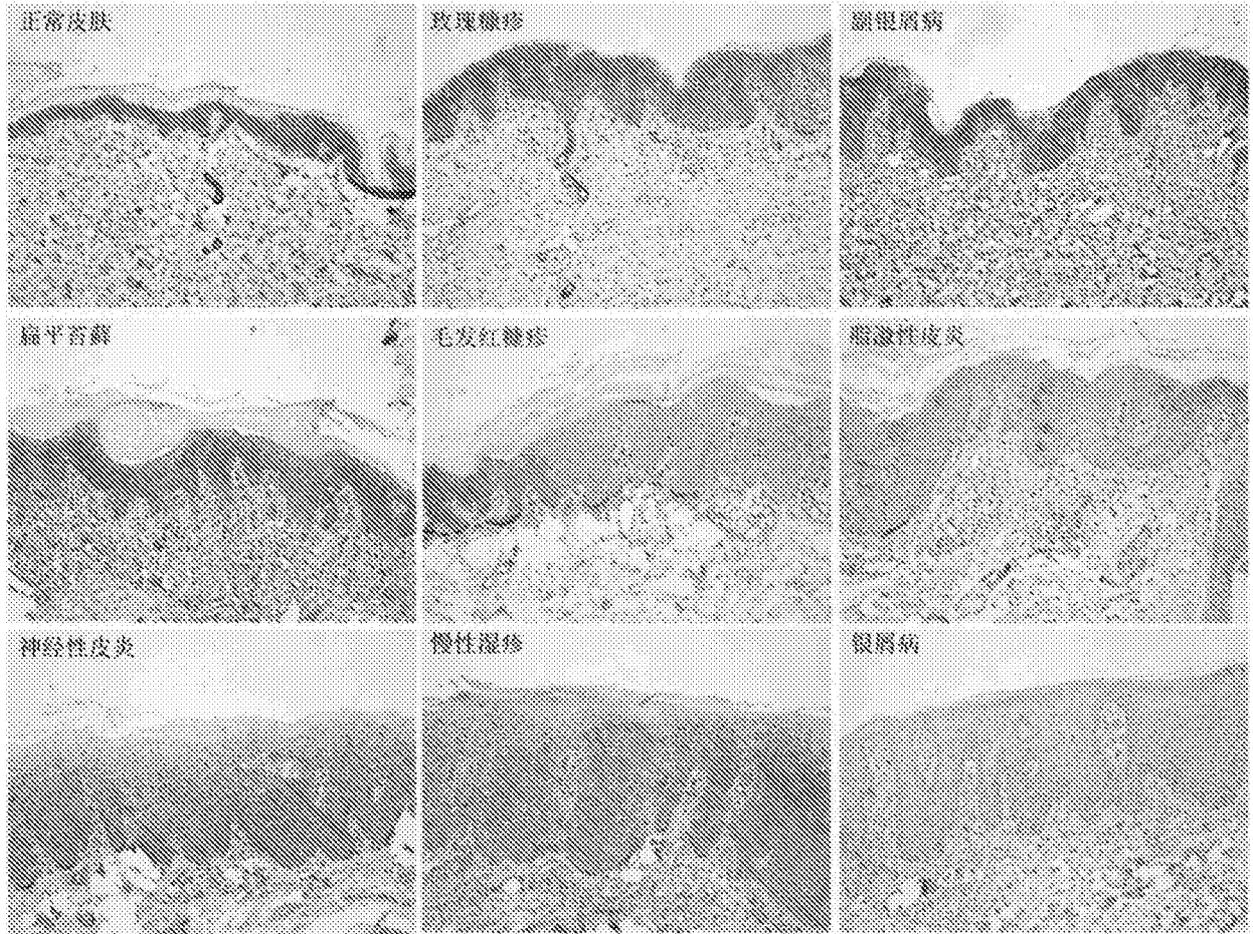


图1

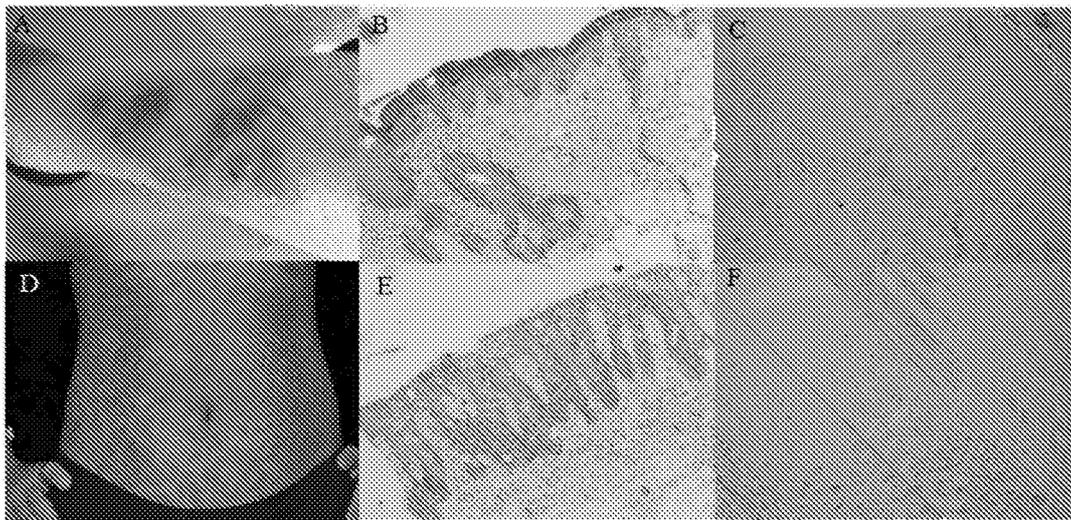


图2

专利名称(译)	皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3 辅助诊断银屑病的方法		
公开(公告)号	CN106370835A	公开(公告)日	2017-02-01
申请号	CN201610750965.1	申请日	2016-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
当前申请(专利权)人(译)	中山大学孙逸仙纪念医院		
[标]发明人	王亮春		
发明人	王亮春		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N2800/20		
代理人(译)	蔡国		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法，所述的方法为将患者的离体皮肤经过一抗和二抗孵育后经染色处理后判断染色后的离体皮肤是否为阴性来辅助判断是否为银屑病；所述的一抗为兔源抗人Galectin-3单抗，所述的二抗为HRP标记山羊抗兔抗体，本发明的目的在于提供一种辅助银屑病诊断的皮肤离体样本的免疫组织化学染色检测galectin-3辅助诊断银屑病的方法。

