



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110333353 A

(43)申请公布日 2019.10.15

(21)申请号 201910650039.0

(22)申请日 2019.07.18

(71)申请人 武汉原谷生物科技有限责任公司

地址 430000 湖北省武汉市东湖新技术开
发区高新大道666号武汉国家生物产
业(九峰创新)基地B6栋2楼B111室

(72)发明人 熊雨胜 张薇 郭高升

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限
公司 31253

代理人 安曼

(51)Int.Cl.

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

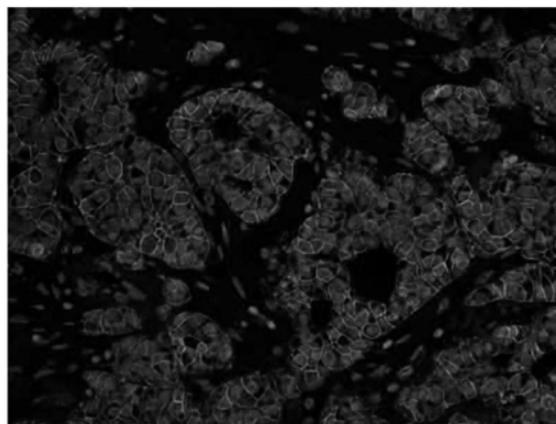
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种基于量子点标记的多重免疫组化分析
试剂盒及分析方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法。该试剂盒包括一种或多种抗体、荧光封闭剂、洗涤剂,所述抗体采用不同颜色量子点标记;该方法以量子点为信号系统,依次对同一待检标本进行封闭、一抗孵育、切片洗涤、封片和镜检;所述一抗为包含一种或多种抗体的混合抗体,所述抗体采用不同颜色量子点标记。该方法使用量子点直接标记一抗,不同抗体标记不同颜色的量子点,最大程度解决了在同一待检组织或细胞切片上进行免疫组化检测时颜色数量受限于抗体种属的问题。该方法一次孵育,无需使用二抗,大大节约了时间成本;只需使用单一激发光源便可同时观察多种荧光信号,荧光量子不易淬灭,结果可长期保存,方便复诊和回溯研究。



1. 一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,包括一种或多种抗体、荧光封闭剂、洗涤剂,所述抗体采用不同颜色量子点标记。

2. 根据权利要求1所述的一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述洗涤剂为PBST或TBST缓冲液。

3. 根据权利要求1所述的一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括DIP1核染色剂。

4. 一种基于权利要求1-3任一项所述试剂盒的量子点标记的多重免疫组化方法,其特征在于,所述方法以量子点为信号点,所述方法包括以下步骤:依次对同一待检标本进行封闭、一抗避光孵育、切片洗涤、封片和镜检;所述一抗为包含一种或多种抗体的混合抗体,所述抗体采用不同颜色量子点标记。

5. 根据权利要求4所述的一种量子点标记的多重免疫组化方法,其特征在于,所述待检标本选自组织切片、细胞爬片和细胞涂片中任一种。

6. 根据权利要求5所述的一种量子点标记的多重免疫组化方法,其特征在于,所述组织切片在进行封闭步骤之前依次进行烤片、脱蜡、水化、抗原修复步骤。

7. 根据权利要求4所述的一种量子点标记的多重免疫组化方法,其特征在于,所述一抗避光孵育的条件为37℃孵育1小时或4℃孵育过夜。

8. 根据权利要求4所述的一种量子点标记的多重免疫组化方法,其特征在于,所述方法在切片洗涤和封片步骤中间还包括复染步骤。

一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,更具体地,涉及一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法。

背景技术

[0002] 免疫组化技术是指用标记的特异性抗体对组织切片或细胞标本中某些化学成分的分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究。该方法已成为病理学在基础医学和临床医学领域广泛应用的实验诊断技术。

[0003] 随着抗原热修复技术的革命性突破,免疫组化染色已由执行单一免疫组化法发展到双重乃至多重免疫组织化学法。双重和多重免疫组化技术对于在原位了解不同抗原的关系、将形态与功能相结合极为有用。双重乃至多重免疫组化技术的原理是:

[0004] (1) 利用不同酶标的抗体和其化学底物的不同显色,从而达到在一张组织切片上同时显现两种靶抗原甚至两种以上靶抗原的目的。此改良法虽解决了经典免疫组织化学的靶抗原单一显色的缺点,但却无法完全确保消除两种以上靶抗原之间的交叉免疫反应的影响,故其染色结果缺乏一定的可信性;

[0005] (2) 在同一张组织切片上,先进行第一种抗体染色,经观察后再去除其显色剂,并破坏抗原和抗体的结合,然后用另一种抗体进行下一轮免疫组织化学染色;此技术方法以单一的免疫组织化学染色为基础,可多次重复,但存在经一定批次染色后特异性抗原的免疫反应减弱或消失,切片组织结构变差或完全脱落的缺点。

[0006] 然而现有的双重乃至多重免疫荧光染色技术存在诸多缺陷,如(1)需要不同种属的单抗(一抗)、以及对应的二抗,但这些单抗种属数量极其有限,几乎无法实现三重以上染色;(2)普通的荧光染料信号较弱,容易形成光晕,影响结果观察;(3)荧光颜色的多样性受荧光剂种类(有限)限制;(4)染色结果保存周期较短;(5)需要对应激发光激发对应信号,无法在单一视野同时观察不同的信号,需要后期经图形软件处理才能同时观察不同的信号,这些问题都严重阻碍了研究的发展。

发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的技术问题,本发明提出了一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法,该方法不受抗体种属的限制,不受目前荧光剂的种类限制,能够实现双重以上免疫荧光染色;不易产生光晕,灵敏度高;该方法的检测结果可以长期保存,方便复诊和回溯研究使用。

[0008] 为实现上述目的,本发明是通过以下技术方案实现的:

[0009] 本发明的第一个目的是提供一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒,包括一种或多种抗体、荧光封闭剂、洗涤剂,所述抗体采用不同颜色量子点标记。

[0010] 进一步地,所述洗涤剂为PBST或TBST缓冲液。

[0011] 进一步地,所述试剂盒还包括DAPI核染色剂。

[0012] 本发明的第二个目的是提供一种基于上述任一项所述试剂盒的量子点标记的多重免疫组化方法,所述方法以量子点为信号点,所述方法包括以下步骤:依次对同一待检标本进行封闭、一抗避光孵育、切片洗涤、封片和镜检;所述一抗为包含一种或多种抗体的混合抗体,所述抗体采用不同颜色量子点标记。

[0013] 进一步地,所述待检标本选自组织切片、细胞爬片和细胞涂片中任一种。

[0014] 更进一步地,所述组织切片在进行封闭步骤之前依次进行烤片、脱蜡、水化、抗原修复步骤。

[0015] 进一步地,所述一抗避光孵育的条件为37℃孵育1小时或4℃孵育过夜。

[0016] 进一步地,所述方法在切片洗涤和封片步骤中间还包括复染步骤。

[0017] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0018] (1) 本申请的方法通过一种或多种颜色量子点直接标记一抗(多重染色时不用区别种属来源),使不同抗体标记不同颜色的量子点,突破了传统标记方法导致的抗体种属限制的,最大程度解决了在同一待检组织或细胞切片上进行免疫组化检测时颜色数量受限于抗体种属的问题。本申请的方法只需要一次孵育无需再次使用二抗,与传统的链霉亲和素-生物素标记荧光染料的三步法相比,本申请大大节约了时间成本。本申请的方法能实现双重以上免疫荧光染色。

[0019] (2) 传统的有机染料发射谱很宽,在同时检测多个染料标记不同生物分子时,多染料的发射光谱可能会重叠,从而限制了其在多重染色中的应用;而本申请的方法以量子点作为信号系统,基于量子点宽吸收光谱和窄发射光谱的特点,通过改变量子点核心大小、核心化学组成来改变的发射光波长,从而在光亮度和量子点大小保持不变的条件下,改变发射光的范围,即通过控制QDs合成时的粒径大小和材料组分,对QDs荧光发射波长进行调节可获得发射不同颜色荧光的QDs,在多种成分同时成像中发射光谱不会重叠,并且可以在同一激发光下多色激发,即只需使用单一激发光源的荧光显微镜便可同时观察多种荧光信号;荧光量子产率高,稳定性好不易淬灭,结果可以长期保存方便复诊和回溯研究使用。

[0020] (3) 本申请的方法灵敏度高,不易形成光晕,便于观察。

附图说明

[0021] 图1为实施例1中红色量子点标记的her-2单抗和绿色量子点标记的MSH6单抗在乳腺癌组织的染色结果示意图,其中不规则圆圈形信号为her-2呈红色,红色信号内部为MSH6绿色信号,之外的散漫分布的为DAPI蓝色信号(DAPI视需要情况使用)。

[0022] 图2为实施例2中红色量子点标记的CD34单抗和绿色量子点标记的ki67单抗在肝癌组织的染色结果示意图,其中不规则圈状信号为CD34红色信号,点状为ki67绿色染色。

具体实施方式

[0023] 展示一下实例来具体说明本发明的某些实施例,且不应解释为限制本发明的范围。对本发明公开的内容可以同时从材料、方法和反应条件进行改进,所有这些改进,均应落入本发明的精神和范围之内。本发明所用试剂和原料均市售可得或可按文献方法制备。

[0024] 实施例1:

[0025] 本实施例以红色量子点标记的her-2单抗和绿色量子点标记的MSH6单抗作为一抗,对乳腺癌组织切片进行多重免疫荧光实验。其中量子点标记抗体的方法以红色量子点标记的her-2单抗为例。

[0026] 一、量子点标记抗体的制备

[0027] 1、量子点标记抗体试剂为:

[0028] (1) 量子点标记试剂盒为商品化试剂盒,所含组分a) 量子点 $5\mu\text{M}\times 50\mu\text{l}$ (以红色为例); b) 活化剂 $10\text{mM}\times 10\mu\text{l}$; c) $10\times$ 反应液 1mL ; d) 封闭试剂 $20\mu\text{l}$ 。

[0029] (2) 抗体her-2、KI67、CD34等抗体。

[0030] 2、下面以红色量子点标记的her-2单抗为例进行描述,具体方法为:

[0031] 步骤1、用去离子水将 $10\times$ 反应液稀释为 $1\times$ 反应工作液,将抗体her-2浓度稀释至 2mg/mL 待用;

[0032] 步骤2、按活化试剂:抗体=20:1的摩尔比(抗体分子量按 150KDa 计算),即将 $0.81\mu\text{l}$ 10mM 活化试剂加入到 $30\mu\text{l}$ 稀释好的her-2抗体中,混匀,室温孵育30分钟;

[0033] 步骤3、按抗体:量子点=2:1的摩尔比,即将QDs610S量子点溶液 $39.9\mu\text{l}$ 加入到步骤2的反应混合液中,混匀,室温孵育30分钟,标记完成;

[0034] 步骤4、将封闭试剂 $1.62\mu\text{l}$ 加入到步骤3的反应混合液中,室温孵育30分钟,封闭完成,即可用于后续试验。

[0035] 其它颜色量子点标记抗体的制备方法同上述红色量子点标记的her-2单抗的方法,只需换抗体和想要标记的不同颜色量子点。

[0036] 二、免疫荧光实验

[0037] 1、将乳腺癌组织切片放入 60°C 恒温箱中烘烤35分钟(冰冻切片、细胞爬片及其它待检物涂片无需步骤1、2、3)。

[0038] 2、常规二甲苯脱蜡2次,每次10分钟; 100% 、 95% 、 85% 、 75% 梯度乙醇中水化,最后纯水中复水5分钟。

[0039] 3、在柠檬酸或EDTA修复液中高压修复1.5-2分钟(其他修复方式也可以),自然冷却至室温,PBST洗涤3次,每次5分钟。

[0040] 4、使用封闭剂封闭10-30分钟,甩去多余封闭剂,滴加不同颜色量子点标记的MSH6、HER-2混合单抗避光孵育 37°C 1小时(或 4°C 过夜)。

[0041] 5、PBST洗涤3次,每次5分钟。

[0042] 6、滴加DAPI复染(视需要进行复染)10min后PBST洗涤3次每次5分钟。

[0043] 7、荧光封片剂封固,利用显微拍照。

[0044] 本实施例拍片结果如图1所示,细胞膜结合HER-2的位置呈绿色(不规则圆形信号),结合了MSH6的细胞核呈绿色(HER-2不规则圆形信号内部),未结合任何抗体的细胞核结合DAPI为蓝色,散漫分布的癌细胞周围的信号。

[0045] 图1结果说明此方法可以通过使用不同颜色量子点标记抗体,在同一激发光(紫外激发光波长在 $380-400\text{nm}$ 左右)下观察组织不同位置显示的不同颜色信号。

[0046] 实施例2:

[0047] 本实施例以红色量子点标记的CD34单抗和绿色量子点标记的ki67单抗作为一抗,对肝癌组织切片进行多重免疫荧光实验。其中量子点标记抗体的方法同实施例1。

[0048] 免疫荧光实验步骤如下：

[0049] 1、将肝癌组织切片放入60℃恒温箱中烘烤35分钟(冰冻切片、细胞爬片及其它待检物涂片无需步骤1、2、3)。

[0050] 2、常规二甲苯脱蜡2次,每次10分钟,100%、95%、85%、75%梯度乙醇中水化,最后纯水中复水5分钟。

[0051] 3、在柠檬酸或EDTA修复液中高压修复1.5-2分钟(其他修复方式也可以),自然冷却至室温,TBST洗涤3次,每次5分钟。

[0052] 4、使用封闭剂封闭10-30分钟,甩去多余封闭剂,滴加不同颜色量子点标记的CD34、KI67混合单抗避光孵育37℃1小时(或4℃过夜)。

[0053] 5、TBST洗涤3次,每次5分钟。

[0054] 6、荧光封片剂封固,利用显微拍照。

[0055] 本实施例拍片结果如图2所示,结合了ki67的细胞核显绿色,呈点状信号分布,细胞膜结合CD34的位置呈不规则圈状红色信号。

[0056] 图2结果说明此方法能够说明此方法可以通过使用不同颜色量子点标记抗体,在同一激发光(紫外激发光波长在380-400nm左右)下观察组织不同位置显示的不同颜色。

[0057] 从实施例1和实施例2结果可以看出,本发明的方法荧光颜色清晰,对比鲜明,并且使用简便,同视野观察更直接。

[0058] 综上所述,本发明基于量子点标记的多重免疫组化方以量子点作为信号系统、以量子点直接标记的一抗作为反应系统,操作简便,信号清晰,不受抗体来源及荧光剂种类限制,同一视野观察效果好,可以作为新型多重染色方法。

[0059] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

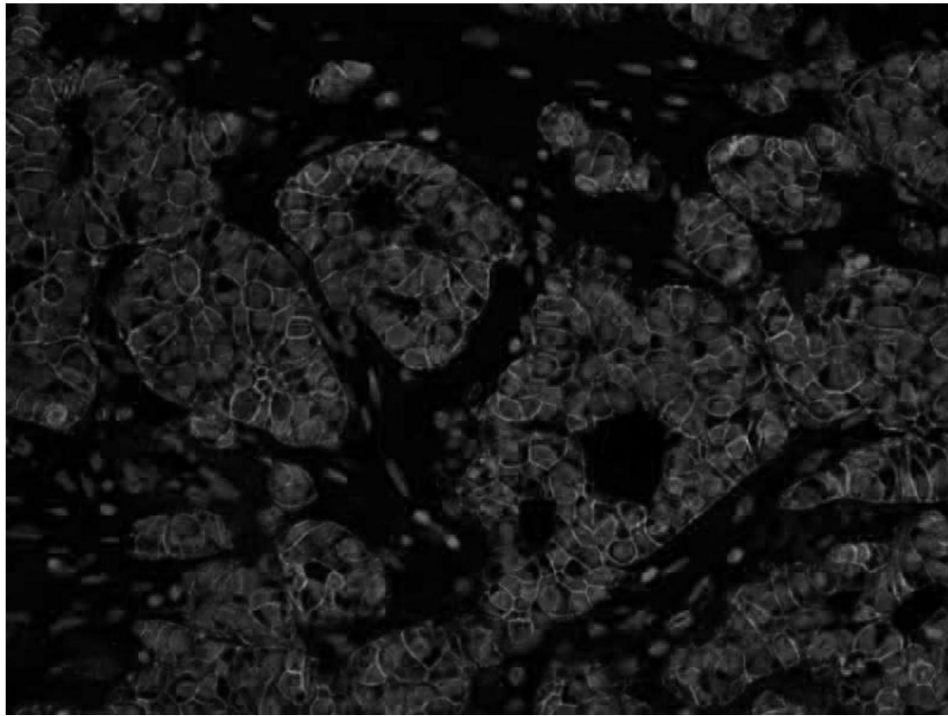


图1

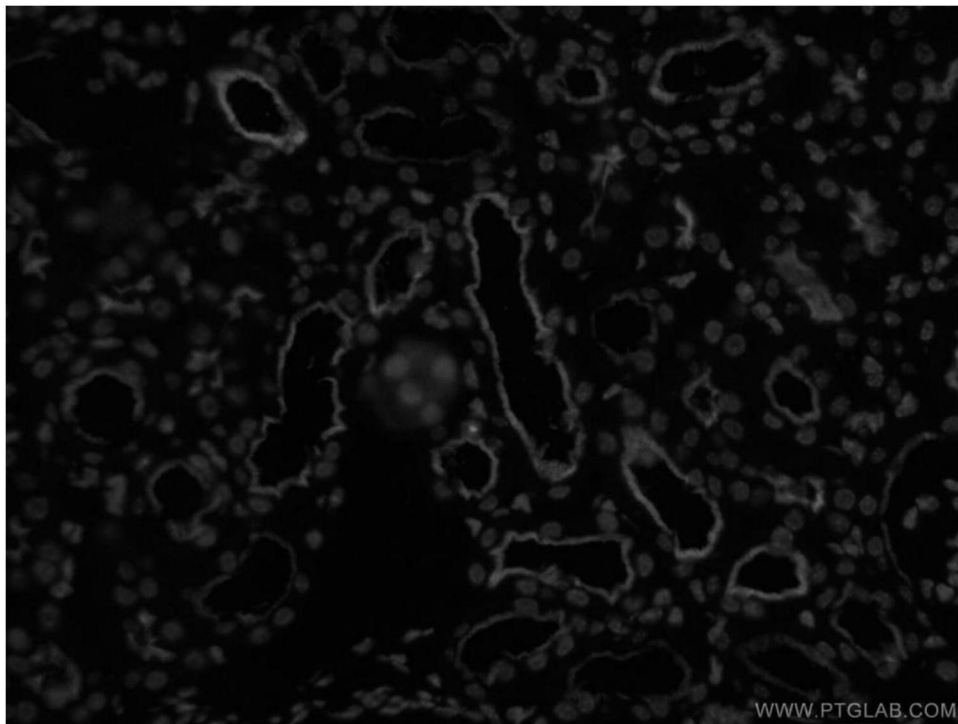


图2

专利名称(译)	一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法		
公开(公告)号	CN110333353A	公开(公告)日	2019-10-15
申请号	CN201910650039.0	申请日	2019-07-18
[标]发明人	张薇 郭高升		
发明人	熊雨胜 张薇 郭高升		
IPC分类号	G01N33/58 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/582 G01N33/588		
代理人(译)	安曼		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于量子点标记的多重免疫组化分析试剂盒及分析方法。该试剂盒包括一种或多种抗体、荧光封闭剂、洗涤剂，所述抗体采用不同颜色量子点标记；该方法以量子点为信号系统，依次对同一待检标本进行封闭、一抗孵育、切片洗涤、封片和镜检；所述一抗为包含一种或多种抗体的混合抗体，所述抗体采用不同颜色量子点标记。该方法使用量子点直接标记一抗，不同抗体标记不同颜色的量子点，最大程度解决了在同一待检组织或细胞切片上进行免疫组化检测时颜色数量受限于抗体种属的问题。该方法一次孵育，无需使用二抗，大大节约了时间成本；只需使用单一激发光源便可同时观察多种荧光信号，荧光量子不易淬灭，结果可长期保存，方便复诊和回溯研究。

