



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105628913 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201610023286. 4

(22) 申请日 2016. 01. 13

(71) 申请人 深圳中山生殖与遗传研究所

地址 518000 广东省深圳市福田区福强路
1001 号

(72) 发明人 刁梁辉 黄春宇 李玉叶 陈现
张涛 林升来

(74) 专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨伦

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

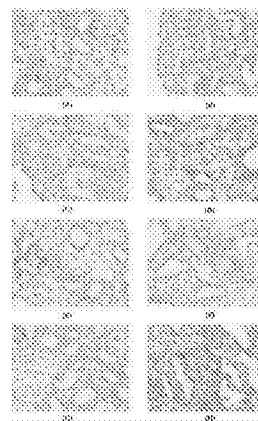
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法,属于医学和生物学检测领域。其包括如下组份:阳性对照、阴性对照、一抗、二抗、洗液、固定剂、脱水剂、水化剂、包埋剂、脱蜡和透明剂、缓冲液 A、缓冲液 B、抗原修复剂、过氧化物酶失活剂、非特异性蛋白阻断剂、显色液、复染液、分化液、返蓝液和封片剂。本发明还公开了上述试剂盒的使用方法。本发明的试剂盒,具有稳定好、准确度高的特点,为子宫内膜容受性评估提供了新的评估指标,可全面评估生殖障碍患者的子宫内膜容受性,为个体化治疗提供可靠依据,解决现有检测指标单一、检测手段稳定性差的缺点,提高了生殖障碍患者的成功妊娠率,具有较高的临床应用价值和社会效益。



1. 一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,包括如下组份:阳性对照、阴性对照、一抗、二抗、洗液、固定剂、脱水剂、水化剂、包埋剂、脱蜡和透明剂、缓冲液A、缓冲液B、抗原修复剂、过氧化物酶失活剂、非特异性蛋白阻断剂、显色液、复染液、分化液、返蓝液和封片剂。

2. 根据权利要求1所述的一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述阳性对照为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照为不含一抗的5%BSA孵育的子宫内膜组织石蜡块。

3. 根据权利要求1或2所述的一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述一抗为抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体中的一种,所述二抗为辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述洗液为生理盐水,所述固定剂为福尔马林,所述脱水剂为浓度为70%v/v、80%v/v、95%v/v、100%v/v的梯度酒精,所述水化剂为浓度为100%v/v、95%v/v、95%v/v、80%v/v的梯度酒精,所述包埋剂为石蜡,所述脱蜡和透明剂为二甲苯,所述缓冲液A为PBS,所述缓冲液B为PBST,所述抗原修复剂为pH 9.0的1mM Tris/EDTA溶液,所述过氧化物酶失活剂为3% H_2O_2 溶液,所述非特异性蛋白阻断剂为5%BSA,所述显色液为DAB,所述复染剂为苏木精,所述分化液为1%v/v盐酸酒精,所述返蓝液为1%v/v氨水,所述封片剂为中性树胶。

4. 一种如权利要求1至3任一项所述用于评估子宫内膜容受性的试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 取待测样品、阳性对照和阴性对照,放入生理盐水中,分别除去待测样品、阳性对照和阴性对照上的血块,然后放入8mL的10%福尔马林中固定24h,分别到固定标本;

(2) 将步骤(1)所得固定标本,进行脱水处理、二甲苯透明化和石蜡包埋后,置于冷台,待石蜡凝固后,分别形成待测样本组织块、阳性对照组织块以及阴性对照组织块;

(3) 将步骤(2)所得待测样本组织块、阳性对照组织块和阴性对照组织块,置于切片机上进行连续切片,每个组织块切得8张切片,共24张切片,置于37℃水中摊开,然后分别平铺于载玻片上,置于60℃干燥1小时,得到干燥后的切片;

(4) 将步骤(3)所得干燥后的切片,用脱蜡剂进行脱蜡,然后用水化剂进行水化,并用缓冲液A进行冲洗,得到水化后的切片;

(5) 将步骤(4)所得水化后的切片,甩去多余的液体,用内源性过氧化物酶灭活剂孵育,然后用缓冲液A进行冲洗,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

(6) 将步骤(5)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片,放入抗原修复液中进行微波修复15min,放置室温冷却,然后用缓冲液A进行冲洗,得到抗原修复后切片;

(7) 将步骤(6)所得抗原修复后的切片,甩去多余的液体,加入非特异性蛋白阻断剂室温孵育20min,得到封闭后的切片;

(8) 将步骤(7)所得封闭后的切片,除阴性对照的8张切片外,其余切片均甩去非特异蛋白阻断剂,分别加入抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性

T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,均于37℃水浴敷育60min,然后用缓冲液A冲洗,每次3min,洗3次,缓冲液B冲洗,每次3min,洗1次,得到一抗后的切片;

(9)将步骤(8)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,加入二抗,37℃水浴敷育30min,甩去二抗,然后使用缓冲液A冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

(10)将步骤(9)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,用显色液进行显色,得到显色后的切片;

(11)将步骤(10)所得显色后的切片,甩去显色液,加入复染液复染4min、分化液分化20s、返蓝剂返蓝30s,得到返蓝后的切片;

(12)将步骤(11)所得返蓝后的切片,甩去多余的液体,用脱水剂和透明剂处理,得到透明化后的切片;

(13)将步骤(12)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,用封片剂进行封片,得到免疫组织化学染色切片;

(14)将步骤(13)所得免疫组织化学染色切片,置于成像显微镜的载物台上采集图片,利用病理图片分析软件分析组织染色程度、统计阳性细胞数、总细胞数以及阳性细胞占总细胞数的百分比,评估待测样本的子宫内膜容受性。

5.根据权利要求4所述的一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒的使用方法,其特征在于,步骤(1)所述待测样品取自活体的人体的子宫内膜。

一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法,属于医学和生物学检测领域。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织评估,目前每7对夫妇中约有1对夫妇存在生殖障碍问题,主要表现为流产或不孕。关注生殖健康是国家发展的重要部分。研究表明,子宫内膜容受性的改变可能是导致生殖障碍的主要因素之一。子宫内膜容受性是指子宫内膜接受胚胎的能力,指子宫内膜处于一种允许胚胎定位、黏附和侵入的状态。该时期又被称为子宫内膜的种植窗期。如果种植窗期子宫内膜对胚胎的容受性发生异常,其对胚胎发生排斥反应,进而不允许胚胎正常着床发育,这一状态将会导致流产或不孕等不良妊娠结局。因此,子宫内膜容受性的评估对于生殖障碍患者的诊治具有重要意义。

[0003] 目前,临床中子宫内膜容受性的评估手段主要是形态学评估。其评估指标包括三大类:(1)子宫内膜厚度、回声和血流等超声形态;(2)腺体大小、间质疏密和血管丰度等组织活检形态;(3)子宫内膜胞饮突。然而,形态学评估子宫内膜容受性存在一定争议。因为,子宫内膜容受性由一系列细胞和细胞因子相互作用调控,细胞及其分泌的细胞因子在与胚胎接触过程中发挥重要作用。但是,子宫内膜的形态学表征并不能准确反映其细胞和细胞因子的表达情况。

[0004] 在此背景下,子宫内膜活检结合分子检测等新的评估手段开始发展。因此,子宫内膜容受性生物标记物的研究越来越受到重视。研究表明,子宫内膜免疫细胞在其容受性调控中发挥重要作用。子宫内膜免疫细胞主要包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、T细胞和树突状细胞等四大类。并且,各类免疫细胞又分为不同的亚群,在子宫内膜容受性调节中发挥不同的作用。自然杀伤细胞作为子宫内膜中主要的免疫细胞,通过促进滋养层细胞侵入、支持螺旋动脉重构以及调控自身杀伤能力等途径调节子宫内膜容受性,参与胚胎种植。巨噬细胞在子宫内膜局部及系统激素的调节下可以进行亚群的转换,在种植过程中既可以清除病原体,又可以诱导子宫内膜对胚胎的免疫耐受,进而维持成功妊娠。T细胞主要包括辅助性T细胞、杀伤性T细胞以及调节性T细胞。其中,辅助性T细胞主要通过分泌细胞因子,调控子宫内膜的分化,为胚胎种植做好准备;杀伤性T细胞主要通过调控滋养层细胞侵入与分泌毒性颗粒的平衡参与种植过程;而调节性T细胞发挥免疫抑制作用,其通过抑制子宫内膜对胚胎的过度炎症反应,进而维持继续妊娠。树突状细胞作为重要的抗原提呈细胞,根据其成熟程度可以分为两类:未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞。未成熟树突状细胞在妊娠中发挥免疫耐受作用,而成熟树突状细胞在妊娠中发挥免疫排斥作用,因此,两者的平衡在子宫内膜接受胚胎过程中同样发挥着必不可少的作用。以上研究结果表明,子宫内膜容受性的调控因素并不是单一的,而是各种免疫细胞相互作用,相互平衡的结果。

[0005] 但是,目前国内外以子宫内膜免疫细胞作为其容受性评估指标时,多是检测其中一种免疫细胞,并且检测方法各异,分析结果不统一、波动性大。根据这些结果,临床医生不

能对患者子宫内膜容受性进行准确评估,故而无法制定完善的治疗方案。因此,开发稳定可靠的子宫内膜多种免疫细胞检测试剂盒可以对子宫内膜容受性进行准确评估,为患者的诊疗提供可靠依据。

[0006] 目前针对子宫内膜免疫细胞数量的检测方法主要有流式细胞术和免疫组织化学检测两种方法。但是,流式细胞术不能对子宫内膜细胞的定位情况进行分析,并且在制备细胞悬液的过程中存在细胞和抗原丢失等问题。因此,免疫组织化学染色方法成为了更好的选择。在临床上,免疫组织化学染色已经在肿瘤病理诊断中得到了广泛应用,涉及领域包括肿瘤组织起源的鉴别、未分化恶性肿瘤性质的判定、各种形态系统肿瘤鉴别、确定肿瘤原发部位等。其原理是用标记的抗体对细胞或组织内的相应抗原进行定位、定性或定量检测,经过组织化学的呈色反应而呈现醒目的阳性色彩,在光学显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下进行人工计数,或者采用显微镜采集图像并结合病理图片分析软件对其进行定量分析。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一,是提供一种用于子宫内膜容受性评估的试剂盒。本发明的试剂盒可全面评估生殖障碍患者的子宫内膜容受性,为生殖障碍患者的病因诊断提供新的检测指标,为其个体化诊疗方案的制定提供可靠依据。

[0008] 本发明解决上述第一个技术问题的技术方案如下:一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括如下组份:阳性对照、阴性对照、一抗、二抗、洗液、固定剂、脱水剂、水化剂、包埋剂、脱蜡和透明剂、缓冲液A、缓冲液B、抗原修复剂、过氧化物酶失活剂、非特异性蛋白阻断剂、显色液、复染液、分化液、返蓝液和封片剂。

[0009] 进一步,所述阳性对照为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照为不含一抗的5%BSA敷育的子宫内膜组织石蜡块。

[0010] 进一步,所述一抗为抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体中的一种,所述二抗为辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述洗液为生理盐水,所述固定剂为福尔马林,所述脱水剂为浓度为70%v/v、80%v/v、95%v/v、100%v/v的梯度酒精,所述水化剂为浓度为100%v/v、95%v/v、95%v/v、80%v/v的梯度酒精,所述包埋剂为石蜡,所述脱蜡和透明剂为二甲苯,所述缓冲液A为PBS,所述缓冲液B为PBST,所述抗原修复剂为pH 9.0的1mM Tris/EDTA溶液,所述过氧化物酶失活剂为3% H_2O_2 溶液,所述非特异性蛋白阻断剂为5%BSA,所述显色液为DAB,所述复染剂为苏木精,所述分化液为1%v/v盐酸酒精,所述返蓝液为1%v/v氨水,所述封片剂为中性树胶。

[0011] 本发明的目的之二,是提供上述试剂盒的使用方法。本发明的试剂盒的使用方法,能得出稳定、准确的子宫内膜8种免疫细胞的定量结果,可用于子宫内膜容受性的评估。

[0012] 本发明解决上述第二个技术问题的技术方案如下:一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0013] (1)取待测样品、阳性对照和阴性对照,放入生理盐水中,分别除去待测样品、阳性对照和阴性对照上的血块,然后放入8mL的10%福尔马林中固定24h,分别到固定标本;

[0014] (2)将步骤(1)所得固定标本,进行脱水处理、二甲苯透明化和石蜡包埋后,置于冷台,待石蜡凝固后,分别形成待测样本组织块、阳性对照组织块和阴性对照组织块;

[0015] (3)将步骤(2)所得待测样本组织块、阳性对照组织块和阴性对照组织块,置于切片机上进行连续切片,每个组织块切得8张切片,共24张切片,置于37℃水中摊开,然后分别平铺于载玻片上,置于60℃干燥1小时,得到干燥后的切片;

[0016] (4)将步骤(3)所得干燥后的切片,用脱蜡剂进行脱蜡,然后用水化剂进行水化,并用缓冲液A进行冲洗,得到水化后的切片;

[0017] (5)将步骤(4)所得水化后的切片,甩去多余的液体,用内源性过氧化物酶灭活剂敷育,然后用缓冲液A进行冲洗,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

[0018] (6)将步骤(5)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片,放入抗原修复液中进行微波修复15min,放置室温冷却,然后用缓冲液A进行冲洗,得到抗原修复后切片;

[0019] (7)将步骤(6)所得抗原修复后的切片,甩去多余的液体,加入非特异性蛋白阻断剂室温敷育20min,得到封闭后的切片;

[0020] (8)将步骤(7)所得封闭后的切片,除阴性对照的8张切片外,其余切片均甩去非特异蛋白阻断剂,分别加入抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,均于37℃水浴敷育60min,然后用缓冲液A冲洗,每次3min,洗3次,缓冲液B冲洗,每次3min,洗1次,得到一抗后的切片;

[0021] (9)将步骤(8)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,加入二抗,37℃水浴敷育30min,甩去二抗,然后使用缓冲液A冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

[0022] (10)将步骤(9)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,用显色液进行显色,得到显色后的切片;

[0023] (11)将步骤(10)所得显色后的切片,甩去显色液,加入复染液复染4min、分化液分化20s、返蓝剂返蓝30s,得到返蓝后的切片;

[0024] (12)将步骤(11)所得返蓝后的切片,甩去多余的液体,用脱水剂和透明剂处理,得到透明化后的切片;

[0025] (13)将步骤(12)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,用封片剂进行封片,得到免疫组织化学染色切片;

[0026] (14)将步骤(13)所得免疫组织化学染色切片,置于成像显微镜的载物台上采集图片,利用病理图片分析软件分析组织染色程度、统计阳性细胞数、总细胞数以及阳性细胞占总细胞数的百分比,评估待测样本的子宫内膜容受性。

[0027] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0028] 进一步,步骤(1)所述待测样品取自活体的人体的子宫内膜。

[0029] 进一步,步骤(14)所述成像显微镜和病理图片分析软件评估子宫内膜容受性的具体操作如下:成像显微镜采集不重叠的20个视野的200倍图片;将所得8种免疫细胞的图片导入病理图片定量分析系统中进行分析。在病理图片定量分析系统中,设定细胞的大小为55~400像素,细胞核的苏木素染色强度需大于0.15,系统综合两个指标对所采集图片中总

细胞进行识别并计数;组织中阳性细胞呈现醒目的棕黄色,系统将显示阳性细胞棕黄色的光密度值,系统将大于此值的所有细胞识别为阳性细胞并计数;根据阳性细胞数和总细胞数计算阳性细胞率。将待测样本的8种免疫细胞率与参考范围进行比较,进而判断待测样本的子宫内膜容受性。

[0030] 其中,自然杀伤细胞率参考范围为0.97~21.15%;巨噬细胞率参考范围为0.5~2.65%,T细胞率参考范围为1.12~9.10%,辅助性T细胞率参考范围为0.10~0.50%,杀伤性T细胞率参考范围为0.81~5.45%,调节性T细胞率参考范围为0.05~0.26%,未成熟树突状细胞率参考范围为0.006~0.140%,成熟树突状细胞率参考范围为0.07~4.01%。当待测样本的任一免疫细胞率超过其参考范围时,提示该待测样本的子宫内膜容受性异常。

[0031] 本发明的有益效果是:

[0032] 1.本发明的试剂盒,为子宫内膜容受性的评估提供更优的指标,为生殖障碍患者的分类诊断提供了依据。

[0033] 2.本发明的试剂盒的使用方法,为子宫内膜多种免疫细胞的检测提供了稳定、准确的定量分析方法。

[0034] 3.本发明的试剂盒,为临床医生准确全面评估患者子宫内膜容受性提供可靠依据,为制定个体化的治疗方案提供了有力保障,为提高生殖障碍患者的成功妊娠率作出巨大贡献,具有较高的临床应用价值和社会效益。

附图说明

[0035] 图1为本发明的评估子宫内膜容受性试剂盒的检测应用。

[0036] 图中,(A)为子宫内膜自然杀伤细胞染色图片,(B)为子宫内膜巨噬细胞染色图片,(C)为子宫内膜T细胞染色图片,(D)为子宫内膜辅助性T细胞染色图片,(E)为子宫内膜杀伤性T细胞染色图片,(F)为子宫内膜调节性T细胞染色图片,(G)为子宫内膜未成熟树突状细胞染色图片,(H)为子宫内膜成熟树突状细胞染色图片。

具体实施方式

[0037] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0038] 一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括如下组份:阳性对照、阴性对照、一抗、二抗、洗液、固定剂、脱水剂、水化剂、包埋剂、脱蜡和透明剂、缓冲液A、缓冲液B、抗原修复剂、过氧化物酶失活剂、非特异性蛋白阻断剂、显色液、复染液、分化液、返蓝液和封片剂。

[0039] 所述阳性对照为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照为不含一抗的5%BSA孵育的子宫内膜组织石蜡块。

[0040] 所述一抗为抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体中的一种,所述二抗为辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述洗液为生理盐水,所述固定剂为福尔马林,所述脱水剂为浓度为70%v/v、80%v/v、95%v/v、100%v/v的梯度酒精,所述水化剂为浓度为

100% v/v、95% v/v、95% v/v、80% v/v的梯度酒精,所述包埋剂为石蜡,所述脱蜡和透明剂为二甲苯,所述缓冲液A为PBS,所述缓冲液B为PBST,所述抗原修复剂为pH 9.0的1mM Tris/EDTA溶液,所述过氧化物酶失活剂为3% H₂O₂溶液,所述非特异性蛋白阻断剂为5% BSA,所述显色液为DAB,所述复染剂为苏木精,所述分化液为1% v/v盐酸酒精,所述返蓝液为1% v/v氨水,所述封片剂为中性树胶。

[0041] 一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0042] (1)将取自活体的人体的子宫内膜作为待测样品、阳性对照和阴性对照,放入20mL生理盐水中,分别除去待测样品、阳性对照和阴性对照上的血块,然后放入8mL的10% 福尔马林中固定24h,分别到固定标本;

[0043] (2)将步骤(1)所得固定标本,用去离子水清洗,依次放入250mL的75%酒精浸泡2h、80%酒精浸泡2h、95%酒精浸泡1.5h、100%酒精浸泡1h进行脱水,然后依次放入250mL的二甲苯溶液浸泡20min,另一份二甲苯溶液浸泡20min,再转入另一份二甲苯溶液浸泡20min进行透明化,然后转入石蜡中进行包埋,包埋后置于冷台,待石蜡凝固后,分别形成待测样本组织块、阳性对照组织块和阴性对照组织块;

[0044] (3)将步骤(2)所得待测样本组织块、阳性对照组织块和阴性对照组织块,置于切片机上进行连续切片,切片厚度为4μm,每个组织块切得8张切片,共24张切片,置于37℃水中摊开,然后分别平铺于载玻片上,置于60℃干燥1小时,得到干燥后的切片;

[0045] (4)将步骤(3)所得干燥后的切片,放入染色缸中按照以下顺序进行脱蜡:250mL二甲苯中浸泡10min,另一份250mL二甲苯中浸泡5min,无水酒精与二甲苯等体积混合溶液中浸泡3min,脱蜡后按以下步骤进行水化:100%酒精浸泡2min,95%酒精浸泡2min,另一份95%酒精浸泡2min,80%酒精浸泡2min,然后PBS冲洗3min,得到水化后的切片;

[0046] (5)将步骤(4)所得水化后的切片,甩去多余的液体,用100μL的3% H₂O₂敷育15min,然后用PBS进行冲洗,每次3min,洗3次,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

[0047] (6)将步骤(5)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片,放入550mL抗原修复液中进行微波修复15min,室温放置冷却,然后用PBS进行冲洗,每次3min,洗3次,得到抗原修复后切片;

[0048] (7)将步骤(6)所得抗原修复后的切片,甩去多余的液体,加入100μL的5% BSA室温敷育20min,得到封闭后的切片;

[0049] (8)将步骤(7)所得封闭后的切片,除了阴性对照8张切片外,其余切片均甩去5% BSA,分别加入各60μL抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、抗人T细胞表面分子CD3的抗体、抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体中的一种,均于37℃水浴敷育60min,然后用PBS冲洗,每次3min,洗3次,PBST冲洗,每次3min,洗1次,得到一抗后的切片;

[0050] (9)将步骤(8)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,每张切片上加入60μL二抗,37℃水浴敷育30min,甩去二抗,然后使用PBS冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

[0051] (10)将步骤(9)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,每张切片上加入60μL DAB显色液进行显色,得到显色后的切片;

[0052] (11)将步骤(10)所得显色后的切片,甩去显色液,滴加60uL苏木素复染4min、60uL的1%盐酸酒精分化20s、60uL的1%氨水中返蓝30s,得到返蓝后的切片;

[0053] (12)将步骤(11)所得返蓝后的切片,甩去多余的液体,依次转入250mL的70%酒精浸泡2min、80%酒精浸泡2min、95%酒精浸泡2min、100%酒精浸泡2min进行脱水,然后转入250mL的二甲苯溶液浸泡3min,另一份二甲苯溶液10min,另一份二甲苯溶液5min进行透明化处理,得到透明化后的切片;

[0054] (13)将步骤(12)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,加入10μL中性树胶进行封片,得到免疫组织化学染色切片;

[0055] (14)将步骤(13)所得免疫组织化学染色切片,置于成像显微镜的载物台上采集图片,并用病理图片分析软件分析组织染色程度、统计阳性细胞数、总细胞数以及阳性细胞占总细胞数的百分比,评估待测样本的子宫内膜容受性。

[0056] 采用成像显微镜和病理图片分析软件评估子宫内膜容受性的具体操作如下:采用成像显微镜采集不重叠的20个视野的200倍图片;将所得8种免疫细胞的图片导入病理图片定量分析系统中进行分析。在病理图片定量分析系统中,设定细胞的大小为55~400像素,细胞核的苏木素染色强度需大于0.15,系统综合两个指标对所采集图片中总细胞进行识别并计数;组织中阳性细胞呈现醒目的棕黄色,系统将显示阳性细胞棕黄色的光密度值,系统将大于此值的所有细胞识别为阳性细胞并计数;根据阳性细胞数和总细胞数计算阳性细胞率。将待测样本的8种免疫细胞率与参考范围进行比较,进而判断待测样本的子宫内膜容受性。

[0057] 其中,自然杀伤细胞率参考范围为0.97~21.15%;巨噬细胞率参考范围为0.5~2.65%,T细胞率参考范围为1.12~9.10%,辅助性T细胞率参考范围为0.10~0.50%,杀伤性T细胞率参考范围为0.81~5.45%,调节性T细胞率参考范围为0.05~0.26%,未成熟树突状细胞率参考范围为0.006~0.140%,成熟树突状细胞率参考范围为0.07~4.01%。当待测样本的任一免疫细胞率超过其参考范围时,提示该待测样本的子宫内膜容受性异常。

[0058] 如图1所示,子宫内膜免疫细胞定量检测试剂盒在子宫内膜容受性评估中的应用,其中,(A)为自然杀伤细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为5.82%;(B)为巨噬细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.7%;(C)为T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为2.19%;(D)为辅助性T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.3%;(E)为杀伤性T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为1.64%;(F)为调节性T细胞,其细胞核内呈现棕黄色,零星分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.02%;(G)为未成熟树突状细胞的,其细胞核周围呈现棕黄色,分布于靠近腺体的位置,细胞率为0.044%;(H)为成熟树突状细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,并且细胞呈现两种分布方式,即单个细胞分布以及成簇分布,细胞率为3.04%。其中,调节性T细胞率为0.02%,低于参考范围0.05~0.26%,提示该样本的子宫内膜容受性异常。

[0059] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

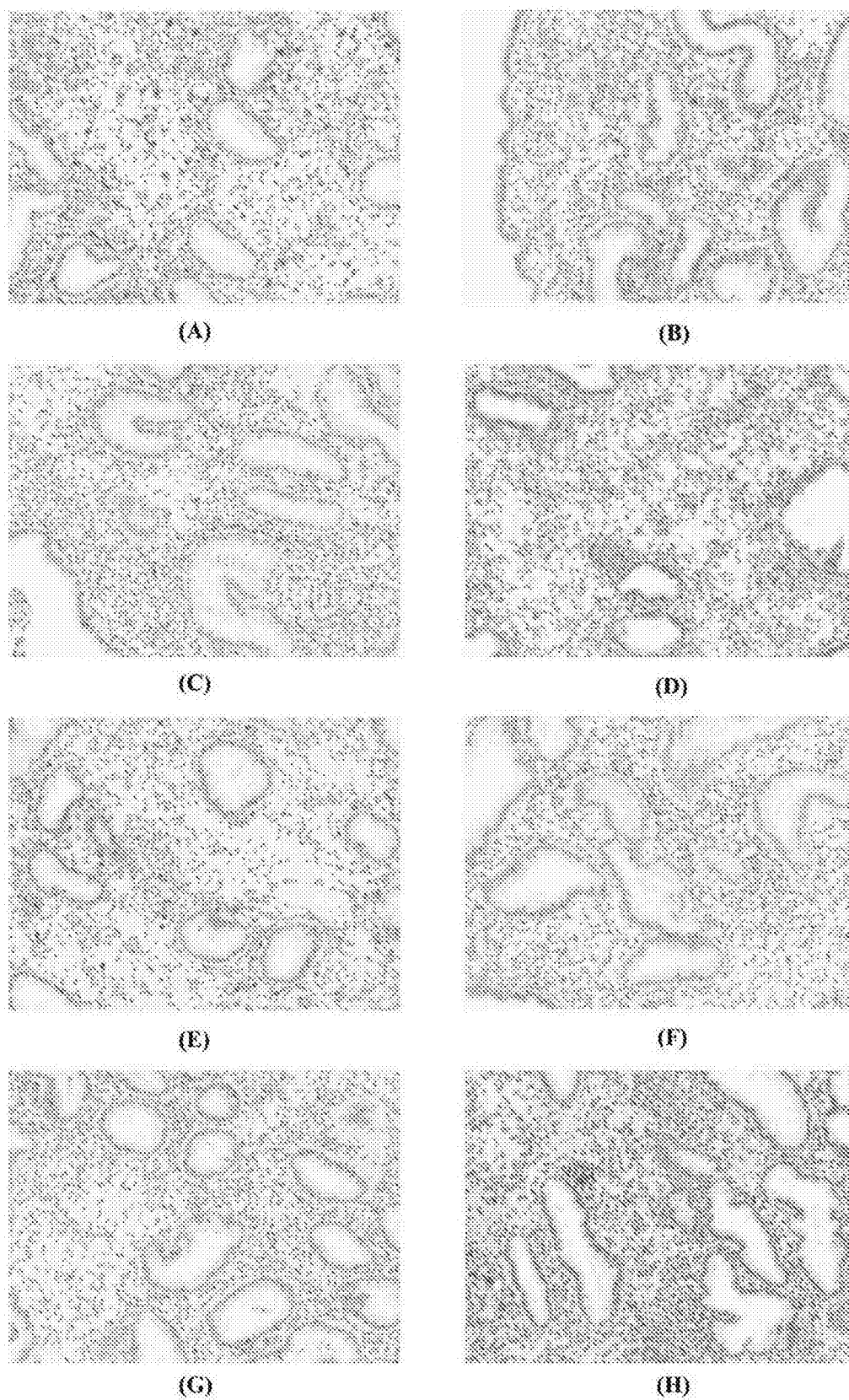


图1

专利名称(译)	一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN105628913A	公开(公告)日	2016-06-01
申请号	CN201610023286.4	申请日	2016-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
当前申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
[标]发明人	刁梁辉 黄春宇 李玉叶 陈现 张涛 林升来		
发明人	刁梁辉 黄春宇 李玉叶 陈现 张涛 林升来		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2800/367 G01N2800/368		
代理人(译)	杨伦		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法，属于医学和生物学检测领域。其包括如下组份：阳性对照、阴性对照、一抗、二抗、洗液、固定剂、脱水剂、水化剂、包埋剂、脱蜡和透明剂、缓冲液A、缓冲液B、抗原修复剂、过氧化物酶失活剂、非特异性蛋白阻断剂、显色液、复染液、分化液、返蓝液和封片剂。本发明还公开了上述试剂盒的使用方法。本发明的试剂盒，具有稳定好、准确度高的特点，为子宫内膜容受性评估提供了新的评估指标，可全面评估生殖障碍患者的子宫内膜容受性，为个体化治疗提供可靠依据，解决现有检测指标单一、检测手段稳定性差的缺点，提高了生殖障碍患者的成功妊娠率，具有较高的临床应用价值和社会效益。

