(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105784991 A
(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610350140.0

(22)申请日 2016.05.25

(71)申请人 南昌德漫多科技有限公司
地址 330001 江西省南昌市青云谱区万科润园39号住宅楼一单元202室

(72)发明人 不公告发明人

(51)Int.Cl.
G01N 33/533(2006.01)

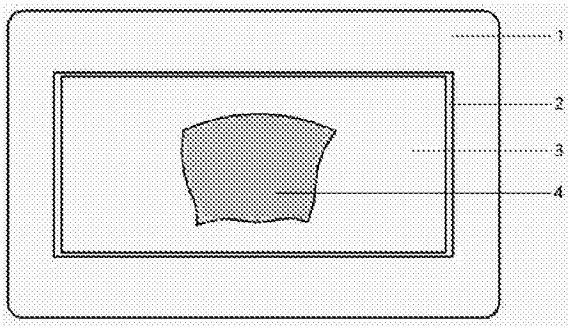
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法

(57)摘要

为了实现对同一组织切片进行多次免疫染色，以节约组织标本并满足诊断需要，本发明公开一种用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，包括组织切片承载装置及其使用方法。所述组织切片承载装置，包括带凹槽载玻片和盖玻片两部分。通过使用组织切片承载装置对同一组织切片进行依次循环的染色、拍照、清洗、再染色、再拍照、再清洗的多次染色，将多次染色后拍摄的照片进行比对分析，可获得组织切片上每一个细胞的抗原表达谱。



CN 105784991 A

1.用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，包括组织切片承载装置和多次染色法，其特征在于：

所述组织切片承载装置，包括带凹槽载玻片和盖玻片两部分，所述带凹槽载玻片由高透明性的无色玻璃制成，中央有一个凹槽，凹槽底光滑平整，根据拟匹配的所述盖玻片大小，将凹槽制作成能水平放入盖玻片，所述盖玻片为市售常规盖玻片；

所述多次染色法，先进行常规的染色前准备，包括石蜡包埋组织的切片、漂片，将组织切片置于带凹槽载玻片的凹槽底部中央，烤片、脱蜡、水化、抗原修复等一系列常规步骤(冰冻切片则切片后即可进行染色)，将盖玻片置于组织切片上方，然后对组织切片进行依次循环的染色、拍照、清洗、再染色、再拍照、再清洗的多次染色。

2.根据权利要求1所述的用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，其特征在于：所述组织切片承载装置，在多次染色法实施过程中，盖玻片持续覆盖组织切片。

3.根据权利要求1所述的用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，其特征在于：所述多次染色法，通过将多次染色后所获得的照片进行比对分析，从而获得组织切片上每一个细胞的相应抗原表达谱。

4.根据权利要求1所述的用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，其特征在于：所述多次染色法，采用热的磷酸盐缓冲液(约60℃)去除结合到组织切片的第一抗体和第二抗体。

5.根据权利要求1所述的用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，其特征在于：所述多次染色法，在以3－氨基－9－乙基咔唑(3-amino－9－ethylcarbazole；AEC)作为显色试剂时，用无水乙醇和二甲苯洗去显色产物。

用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物实验装置和方法，尤其涉及一种用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法。

背景技术

[0002] 免疫染色是利用抗原与抗体特异性结合的原理，检测特定蛋白(抗原)的表达情况，是发现机体在生理或病理状态下功能变化最常用的检测方法之一，最常用的是免疫组织化学染色和免疫荧光染色。常规方法是对一张组织切片进行一种抗原标记的染色方法，要研究多种抗原的表达情况则需要多张组织切片。如果对极少量的组织标本(如细针穿刺标本)进行多种抗原表达情况的研究，常规免疫染色方法由于受标本量的限制而难以实现。因此，有必要开发一种能对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，以节约组织标本，满足诊断需要。

发明内容

[0003] 本发明所要解决的技术问题是针对现有技术难以对极少量的组织标本进行多种抗原表达状况研究，提供一种用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法。

[0004] 本发明解决上述技术问题采用的技术方案是：对同一组织切片进行多次免疫染色采用组织切片承载装置和多次染色法。

[0005] 所述组织切片承载装置，包括带凹槽载玻片和盖玻片两部分，所述带凹槽载玻片由高透明性的无色玻璃制成，中央有至少一个凹槽，凹槽的形状优选于立方形，凹槽底光滑平整，凹槽底厚度为(1.0±0.2mm)，凹槽深度为0.5mm至3mm，根据拟匹配的所述盖玻片大小，将凹槽制作成能水平放入盖玻片，并使盖玻片与凹槽四周侧壁间有约1mm宽的缝隙为宜。所述盖玻片为市售常规盖玻片，厚度为0.13-0.17mm，有多种不同规格，由高透明玻璃制成。带凹槽载玻片的凹槽需要采用目前常规的方法，如涂抹多聚赖氨酸等增加组织与载玻片凹槽底的粘附性，以避免组织切片脱离载玻片。组织切片置于带凹槽载玻片的凹槽内底部中央，盖玻片置于组织切片上方。

[0006] 执行所述多次染色法前，先进行常规的染色前准备，包括石蜡包埋组织的切片(厚度为4~6μm)、漂片，将组织切片置于带凹槽载玻片的凹槽底部中央，烤片、脱蜡、水化、抗原修复等一系列常规步骤(冰冻切片则切片后即可进行染色)，将盖玻片置于组织切片上方，然后对组织切片进行依次循环的染色、拍照、清洗、再染色、再拍照、再清洗的多次染色。所述染色，即依次将试剂添加到盖玻片与带凹槽载玻片的凹槽壁之间的缝隙处，使试剂通过表面张力的作用扩散而浸没组织切片，在试剂作用组织切片一段时间后，将载玻片竖直放置，凹槽内的试剂则流出，用吸水纸吸取而大部分清除。按试剂盒说明书操作，依次添加第一种第一抗体及相应的第二抗体等，至显色完成后(不进行苏木精复染细胞核和封片)，用缓冲液终止显色，将载玻片竖直放置，用吸水纸吸去大部分残留缓冲液，即可在显微镜下进行所述拍照。所述拍照，即将带有组织切片的组织切片承载装置放到显微镜下，使用图像采

集装置采集组织切片染色后的完整照片(放大200~400倍)。所述拍照完成后,进行所述清洗,即添加试剂将显色产物完全清除,可用热的磷酸盐缓冲液(约60℃)去除结合到组织切片的第一抗体和第二抗体,根据显色系统的不同,用相应的试剂溶解并清除结合于组织切片的显色产物。在成功完成所述清洗后,组织切片恢复至染色前的颜色,即可进行所述再染色。所述再染色,即按照说明书操作,依次添加第二种第一抗体及相应的第二抗体等,至显色完成后,重复与所述染色相同的操作,进行所述再拍照、所述再清洗,再按上述循环添加第三种第一抗体、第四种第一抗体等,直至完成拟研究的全部抗原表达的研究。按照所述多次染色法能对同一组织切片进行3次至20次染色。然后,作为染色质量控制方法,重复第一种第一抗体的染色(目的是评价在多次染色过程中是否存在抗原丢失现象,若抗原丢失超过20%,需考虑减少染色次数,即减少对同一组织切片的染色次数),拍照后,进行常规苏木素-伊红染色,封片并进行拍照。在整个染色过程中,始终保持盖玻片覆盖于组织切片表面,不能中途移开。若组织切片在整个操作过程中的任何时候离开最初所在位置,则可能导致实验失败。将多次染色后所获得的照片通过计算机软件系统进行比对分析,可获得组织切片上每一个细胞的相应抗原表达谱。

[0007] 所述用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法,其优势在于:① 抗原修复完成后的所有操作步骤,盖玻片保持覆盖组织切片,有效避免试剂冲击导致组织切片脱离载玻片,并有利于每一种抗体染色完成后的拍照;② 有效的清除结合到组织切片的第一抗体、第二抗体及显色产物,减少前一抗原的染色对后续抗原染色的影响;③ 在拟研究的抗原染色完成后,再次标记第一种抗原,作为质量控制措施;④ 在完成所有免疫染色后,进行常规苏木素-伊红染色,充分利用组织切片,并更有利于分析诊断;⑤ 多次染色图片通过计算机软件系统进行分析处理,可获得组织切片中每一个细胞的相应抗原表达谱。

附图说明

[0008] 图1是组织切片承载装置的平面视图;

图2是组织切片承载装置的纵切面视图;

图中:1为带凹槽载玻片;2为凹槽;3为盖玻片;4为组织切片。

[0009] 具体实施方法

下面结合附图和具体实例对本发明进行详细说明。

[0010] 如图1和图2所示,组织切片承载装置,包括带凹槽载玻片1和盖玻片3,所述带凹槽载玻片1长度为60mm,宽度为40mm,除凹槽2以外部分的厚度为2.5mm,凹槽2底部厚度为1.0mm;所述凹槽2长度为42mm,宽度为26mm,深度为1.5mm,凹槽内壁涂有多聚赖氨酸;所述盖玻片3长度为40mm,宽度为24mm,厚度为0.13mm。

[0011] 使用所述组织切片承载装置实现多次免疫染色,可采用下述两种方法:

方法一:来自淋巴结穿刺标本的石蜡包埋组织常规切片(厚度4 μm)、漂片,用带凹槽载玻片1捞起一张组织切片4放置于凹槽2中央,按常规烤片、脱蜡、水化、抗原修复、封闭内源性过氧化氢酶,每步完成后用磷酸盐缓冲液(pH值7.3-7.4,下同)浸泡,将盖玻片3置于凹槽2内覆盖组织切片4。下述每一步操作完成后,竖立组织切片承载装置,用吸水纸吸去大部分残留试剂。将单克隆CD3抗体工作液100微升添加至盖玻片3与凹槽2之间的缝隙处,37℃孵育60分钟,磷酸盐缓冲液洗三遍,每遍5分钟,加相应辣根过氧化酶(HRP)标记的第二抗体37

℃孵育30分钟，磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，添加3－氨基－9－乙基咔唑(3-amino－9－ethylcarbazole;AEC)显色8分钟，磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，普通光学显微镜下扫描组织切片4，依次用无水乙醇和二甲苯各作用1分钟以洗去红色显色产物，60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片5分钟，磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，在普通光学显微镜下复查，若发现红色显色产物残留，可重复60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片5分钟，复查发现组织切片无红色显色产物残留后进行下一种抗原的染色；将单克隆CD4抗体工作液100微升添加至盖玻片与凹槽之间的缝隙处，重复添加单克隆CD3抗体后的步骤，至60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片并复查发现组织切片无红色显色产物残留后，再重复上述步骤进行CD5、CD7、CD8、CD10、CD15、CD30、CD56、CD20这几种抗原标记染色，完成后，再重复上述步骤进行CD3的抗原标记，然后，进行常规苏木素-伊红染色，中性树脂封片，普通光学显微镜下扫描组织切片。对比分析上述组织切片的扫描图片，显示阳性表达显示为红色，第一次进行CD3标记染色的强度与最后一次CD3标记染色的强度相似，分析所有图片信息，阐明该组织切片上的每一个细胞CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD15、CD30、CD56、CD20这10种抗原的表达情况。

[0012] 方法二：将淋巴结穿刺的新鲜组织标本，常规OCT包埋、冰冻切片机切片，用带凹槽载玻片1捞起一张组织切片4(厚度为4 μm)放置于凹槽中央，将盖玻片3置于凹槽2内覆盖组织切片4。磷酸盐缓冲液洗一遍，将单克隆CD3抗体工作液100微升添加至盖玻片与凹槽之间的缝隙处，37℃孵育60分钟，磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，添加荧光标记的第二抗体，37℃孵育30分钟，磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，荧光显微镜下扫描组织切片，60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片5分钟，室温磷酸盐缓冲液洗三遍，每遍5分钟，在荧光显微镜下复查，若发现荧光残留，可重复60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片5分钟，复查发现组织切片无荧光残留后进行下一种抗原标记染色；将单克隆CD4抗体工作液100微升添加至盖玻片与凹槽之间的缝隙处，重复添加单克隆CD3抗体后的步骤，至60℃磷酸盐缓冲液作用组织切片并复查发现组织切片无荧光残留后，再重复上述步骤进行CD5、CD7、CD8、CD10、CD15、CD30、CD56、CD20这几种抗原标记染色，完成后，再重复进行CD3的抗原标记染色，然后，进行常规苏木素-伊红染色，中性树脂封片，普通光学显微镜下扫描组织切片。对比分析上述组织切片的扫描图片，显示阳性表达细胞有荧光物质附着，第一次进行CD3标记染色的强度与最后一次CD3标记染色的强度相似，分析所有图片信息，可阐明该组织切片上的每一个细胞CD3、CD4、CD5、CD7、CD8、CD10、CD15、CD30、CD56、CD20这10种抗原的表达情况。

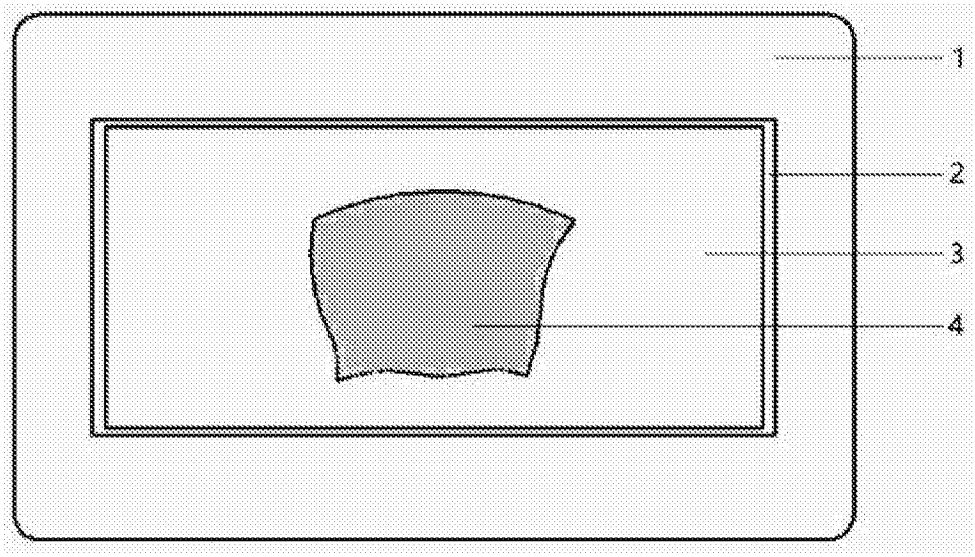


图1

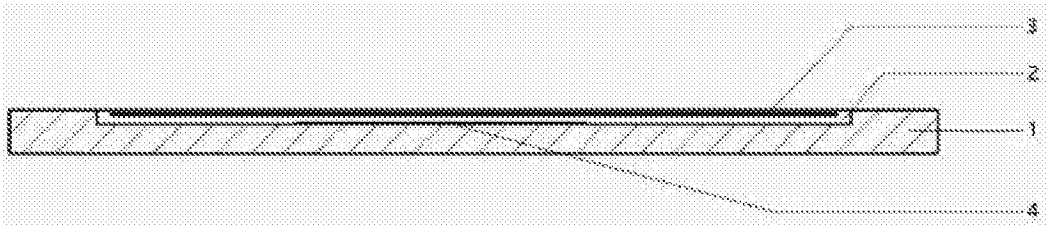
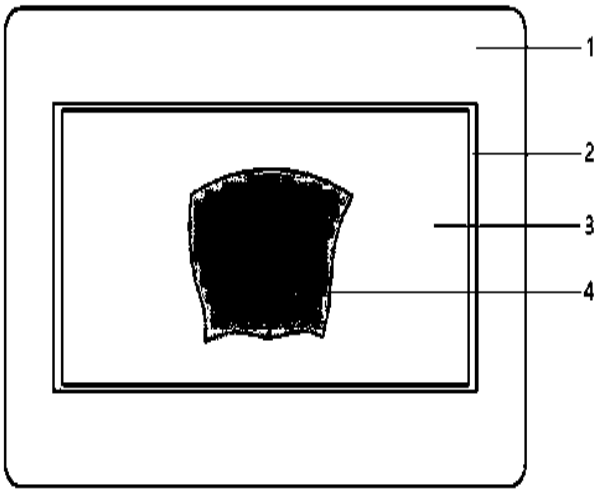


图2

专利名称(译)	用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法		
公开(公告)号	CN105784991A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610350140.0	申请日	2016-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	南昌德漫多科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	南昌德漫多科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南昌德漫多科技有限公司		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

为了实现对同一组织切片进行多次免疫染色，以节约组织标本并满足诊断需要，本发明公开一种用于对同一组织切片进行多次免疫染色的装置和方法，包括组织切片承载装置及其使用方法。所述组织切片承载装置，包括带凹槽载玻片和盖玻片两部分。通过使用组织切片承载装置对同一组织切片进行依次循环的染色、拍照、清洗、再染色、再拍照、再清洗的多次染色，将多次染色后拍摄的照片进行比对分析，可获得组织切片上每一个细胞的抗原表达谱。