



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110376044 A

(43)申请公布日 2019.10.25

(21)申请号 201910808706.3

(22)申请日 2019.08.29

(71)申请人 北京银丰鼎诚生物工程技术有限公司

地址 100176 北京市大兴区北京经济技术开发区中和街14号

申请人 银丰生物工程集团有限公司

(72)发明人 和会娟 杨敏 闫红 张俊利  
曹晓红 曹启龙

(74)专利代理机构 山东舜天律师事务所 37226  
代理人 李新海

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

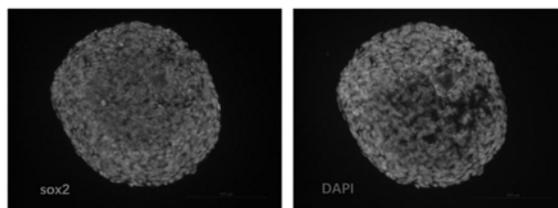
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种神经球免疫荧光染色的方法

(57)摘要

本发明公开了一种神经球免疫荧光染色的方法:(1)神经球清洗:取悬浮培养的神神经球,离心,弃上清,重悬神经球,再次离心,弃上清;(2)固定;(3)通透及封闭;(4)一抗孵育;(5)漂洗;(6)二抗孵育;(7)漂洗;(8)封片:加入PBS缓冲液,重悬,滴加于载玻片上,滴加抗荧光淬灭剂,加盖盖玻片,将神经球压平封片,用于荧光显微镜观察。本发明利用神经球直径大、肉眼可见的特性,直接采用低速离心将细胞收集管底,避免神经球在染色过程中丢失,能够保持神经球原有细胞形态及内部结构,有效避免细胞爬片过程中造成的抗原特性改变;采用物理挤压法直接对神经球进行压片,将神经球挤压成薄膜状,无需进行切片,对设备要求低。



1. 一种神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:包括以下步骤:
  - (1) 神经球清洗:取悬浮培养的神经球,离心,弃上清,重悬神经球,再次离心,弃上清;
  - (2) 固定:加入固定剂,轻柔混匀,室温静置30分钟,每5分钟轻弹管底,使神经球与固定液充分接触,离心,弃上清;
  - (3) 神经球通透及封闭:加入通透及封闭液,摇床上孵育30~60分钟,然后离心,弃上清;所述通透及封闭液,是由6%BSA溶液与1%Triton X-100溶液等体积混合而成;
  - (4) 一抗孵育:加入适当稀释的一抗,并轻柔混匀,4℃环境下孵育8~12小时,离心,弃上清;
  - (5) 漂洗:加入PBST重悬神经球,摇床清洗,离心,弃上清;重复若干次;
  - (6) 二抗孵育:加入适当稀释的二抗,轻柔混匀,摇床孵育3小时,离心,弃上清;
  - (7) 漂洗:加入PBST重悬神经球,摇床清洗,离心,弃上清;重复若干次;
  - (8) 封片:加入PBS缓冲液,轻弹使神经球重悬,将重悬的神经球滴加于洁净的载玻片上,置于超净台中避光风干;于神经球处滴加一滴含DAPI的抗荧光淬灭剂,再加盖一张盖玻片,轻轻将神经球压平封片,用于荧光显微镜观察。
2. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述神经球的直径在200um以内。
3. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述离心的具体参数为:400g,离心5分钟。
4. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述步骤(1)中,加入PBS缓冲液重悬神经球。
5. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述步骤(2)中,固定剂为4%多聚甲醛溶液。
6. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述摇床的转速为50转/分钟。
7. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述轻柔混匀的具体方式为:轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次。
8. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述抗体孵育的具体方式为:用3%BSA溶液进行抗体稀释,离心管斜放,保证神经球与抗体充分接触。
9. 根据权利要求1所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述摇床清洗的具体方式为:向离心管中加入PBST,轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次,然后斜放至摇床。
10. 根据权利要求1或9所述的神经球免疫荧光染色的方法,其特征在于:所述PBST,为含有0.5%Triton X-100的PBS溶液。

## 一种神经球免疫荧光染色的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种神经球免疫荧光染色的方法,属于分子生物学技术领域。

### 背景技术

[0002] 神经干细胞是指具有分化为神经元、星形胶质细胞和少突胶质细胞的能力,能自我更新并能提供大量脑组织细胞的细胞群。神经干细胞多采用悬浮神经球培养的方法来获得和研究。

[0003] 免疫荧光技术是将不影响抗原抗体活性的荧光色素标记在抗体(或抗原)上,与其相应的抗原(或抗体)结合后,在荧光显微镜下呈现一种特异性荧光反应,从而进行组织或细胞内抗原物质的定位。

[0004] 神经球的免疫荧光染色通常先对神经球进行细胞爬片或冰冻切片,使神经球固定在玻璃载体上,再进行染色,步骤复杂,成本高,对人员的专业要求高。且细胞爬片制作过程中存在细胞贴壁困难,易改变抗原特性干扰实验结果等缺点;冰冻切片制作存在设备要求高、容易卷片、脱片等缺点。

[0005] 中国发明专利CN 102288471 A公开了一种悬浮细胞的免疫荧光染色方法,该方法适用于悬浮细胞,但对神经球的免疫荧光染色存在不足,原因:首先,神经球直径比较大,用该方法进行染色时仅能染神经球表层细胞,神经球内部细胞无法成功染色;其次,该方法容易造成细胞裂解,对于神经球而言,破坏了原有细胞形态及内部结构,从而影响染色结果,实际应用价值不高。中国发明专利CN 105424450 A公开了一种悬浮细胞球免疫荧光染色方法及染色装置,该方法适用于悬浮细胞球,该方法对细胞球免疫荧光染色需要借助特殊的染色装置,一般实验室较难满足;该方法通透和封闭分别进行,耗费时间;该方法的封闭液为山羊血清,封闭效果较差,容易造成非特异。

### 发明内容

[0006] 针对上述现有技术的不足之处,本发明提供了一种神经球免疫荧光染色方法,该方法不用进行神经球细胞爬片或者冰冻切片,可以直接对培养中的神经球进行染色,染色过程中不易造成细胞裂解,能很好地保持原有神经球的完整性及抗原特性,无需特殊装置,节省时间,染色效果好,特异性强。

[0007] 本发明是通过以下技术方案实现的:

[0008] 一种神经球免疫荧光染色的方法,包括以下步骤:

[0009] (1) 神经球清洗:取悬浮培养的神经球,置于1.5ml离心管中,离心,弃上清,加入PBS缓冲液重悬神经球,再次离心,弃上清;

[0010] (2) 固定:加入固定剂,轻柔混匀,室温静置30分钟,每5分钟轻弹管底,使神经球与固定液充分接触,离心,弃上清;

[0011] (3) 神经球通透及封闭:加入通透及封闭液,摇床上孵育30~60分钟,然后离心,弃上清;所述通透及封闭液,是由6%BSA溶液与1%Triton X-100溶液等体积混合而成;

- [0012] (4) 一抗孵育:加入适当稀释的一抗,并轻柔混匀,4℃环境下孵育8~12小时,离心,弃上清;
- [0013] (5) 漂洗:加入PBST(即:含有0.5%Triton X-100的PBS溶液)重悬神经球,摇床清洗10分钟,离心,弃上清;重复若干次,比如3次;
- [0014] (6) 二抗孵育:加入适当稀释的二抗,轻柔混匀,摇床孵育3小时,离心,弃上清;
- [0015] (7) 漂洗:加入PBST重悬神经球,摇床清洗10分钟,离心,弃上清;重复若干次,比如3次;
- [0016] (8) 封片:加入PBS缓冲液,轻弹使神经球重悬,将重悬的神经球滴加于洁净的载玻片上,置于超净台中避光风干;于神经球处滴加一滴含DAPI的抗荧光淬灭剂,再加盖一张盖玻片,轻轻将神经球压平封片,用于荧光显微镜观察。
- [0017] 进一步地,所述神经球的直径在200um以内。
- [0018] 进一步地,所述离心的具体参数为:400g,离心5分钟。
- [0019] 进一步地,所述固定剂为4%多聚甲醛溶液。
- [0020] 进一步地,所述摇床的转速为50转/分钟。
- [0021] 进一步地,所述轻柔混匀的具体方式为:轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次。
- [0022] 进一步地,所述抗体孵育的具体方式为:用3%BSA溶液按抗体说明书进行抗体稀释,离心管斜放,保证神经球与抗体充分接触。
- [0023] 进一步地,所述摇床清洗的具体方式为:向离心管中加入PBST,轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次,然后斜放至摇床。
- [0024] 本发明中所涉及的溶液的百分比均为常规含义,溶质为固体时指重量体积比(单位为g/ml),溶质为液体时指体积比。
- [0025] 本发明的神经球免疫荧光染色方法,是为了克服现有技术中存在的不足提出的。本发明采用低速离心的方法将神经球收集管底,能够保持神经球原有细胞形态及内部结构,有效避免细胞爬片过程中造成的抗原特性改变;在摇床震荡条件下同时进行高效通透和封闭,破膜液和封闭液能更有效地接触神经球内部细胞,能有效地克服常规方法中神经球内部通透不足造成的染色弱、非特异现象;采用物理挤压法,直接对神经球进行压片,将神经球挤压成薄膜状,保证神经球的完整性,有利于免疫荧光染色结果的全面分析;无需进行切片,对设备及人员要求低,无需特殊装置,一般实验室就能满足。
- [0026] 本发明的神经球免疫荧光染色方法,操作简单,对操作人员的专业要求低;不需要特殊设备和装置,不改变免疫染色基本步骤,便于操作人员掌握;可以有效保证神经球的抗原特性;结果特异,节省成本,应用价值高。
- [0027] 本发明使用的各种术语和短语具有本领域技术人员公知的一般含义。提及的术语和短语如有与公知含义不一致的,以本发明所表述的含义为准。

## 附图说明

- [0028] 图1:人神经球细胞核抗原sox2免疫荧光染色结果示意图。

## 具体实施方式

[0029] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明。然而,本发明的范围并不限于下述实施例。本领域的专业人员能够理解,在不背离本发明的精神和范围的前提下,可以对本发明进行各种变化和修饰。

[0030] 本发明对试验中所使用到的材料以及试验方法进行一般性和/或具体的描述。虽然为实现本发明目的所使用的许多材料和操作方法是本领域公知的,但是本发明仍然在此作尽可能详细描述。

[0031] 下述实施例中所涉及的仪器、试剂、材料等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规仪器、试剂、材料等,可通过正规商业途径获得。下述实施例中所涉及的实验方法,检测方法等,若无特别说明,均为现有技术中已有的常规实验方法,检测方法等。

[0032] 实施例1:神经球的免疫荧光染色

[0033] 神经球为人神经球,目的抗原为细胞核抗原sox2,具体步骤如下:

[0034] (1) 神经球清洗:取3个悬浮培养的神神经球,直径为170~200um,至1.5ml离心管中,400g离心5分钟,弃上清,然后加入1ml PBS缓冲液,轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次,400g离心5分钟,弃上清。

[0035] (2) 固定:加入1ml 4%多聚甲醛溶液,室温静置30分钟,每5分钟轻弹管底,使神经球与固定液充分接触,400g离心5分钟,弃上清。

[0036] (3) 神经球通透及封闭:加入通透及封闭液3%BSA(含0.5%Triton X-100),摇床上孵育60分钟,摇床转速为50转/分钟。然后400g离心5分钟,弃上清。

[0037] 所述通透及封闭液,是由6%BSA溶液与1%Triton X-100溶液等体积混合而成。

[0038] (4) 一抗孵育:加入300ul 3%BSA溶液稀释的一抗(sox2,兔源,1/200稀释)并轻柔混匀,然后离心管斜放至4℃冰箱,孵育过夜。400g离心5分钟,弃上清。

[0039] (5) 漂洗:加入1ml PBST(含0.5%Triton X-100的PBS溶液)轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次,然后斜放至摇床漂洗10分钟,摇床转速为50转/分钟。400g离心5分钟,弃上清。重复3次。

[0040] (6) 二抗孵育:加入300ul 3%BSA稀释的二抗(山羊抗兔AF488,1/1500稀释)并轻柔混匀,摇床孵育3小时,摇床转速为50转/分钟。400g离心5分钟,弃上清。

[0041] (7) 漂洗:加入1ml PBST(含0.5%Triton X-100的PBS溶液)轻弹管底使神经球悬浮并轻柔颠倒混匀2~3次,然后斜放至摇床漂洗10分钟,摇床转速为50转/分钟。400g离心5分钟,弃上清。重复3次。

[0042] (8) 封片:加入100ul PBS轻弹使神经球重悬,将重悬的神经球滴加于洁净的载玻片上,置于超净台中避光风干。于神经球处滴加一滴含DAPI的抗荧光淬灭剂,再加盖一张盖玻片,轻轻将神经球压平封片。

[0043] (9) 荧光显微镜观察,如图1所示,图1可以看出,本实施例染色sox2定位细胞核,结果特异。

[0044] 给本领域技术人员提供上述实施例,以完全公开和描述如何实施和使用所主张的实施方案,而不是用于限制本文公开的范围。对于本领域技术人员而言显而易见的修饰将在所附权利要求的范围内。

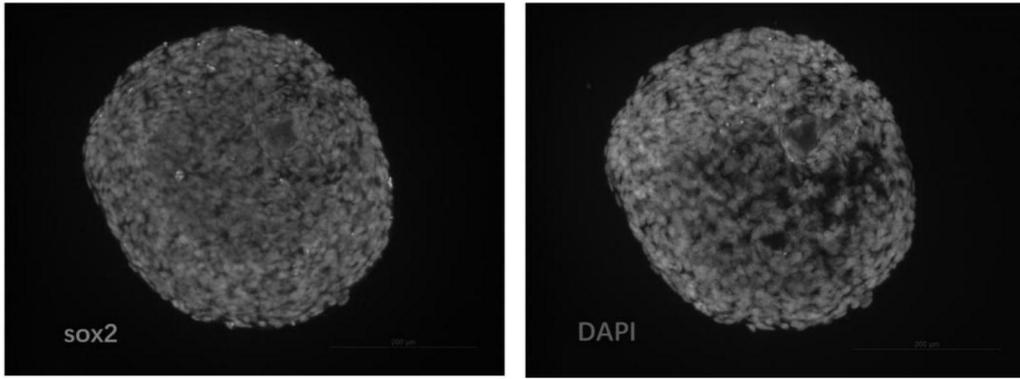


图1

专利名称(译)	一种神经球免疫荧光染色的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110376044A</a>	公开(公告)日	2019-10-25
申请号	CN201910808706.3	申请日	2019-08-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京银丰鼎诚生物工程技术有限公司 银丰生物工程集团有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京银丰鼎诚生物工程技术有限公司 银丰生物工程集团有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京银丰鼎诚生物工程技术有限公司 银丰生物工程集团有限公司		
[标]发明人	和会娟 杨敏 闫红 张俊利 曹晓红 曹启龙		
发明人	和会娟 杨敏 闫红 张俊利 曹晓红 曹启龙		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
代理人(译)	李新海		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种神经球免疫荧光染色的方法：(1)神经球清洗：取悬浮培养的神经球，离心，弃上清，重悬神经球，再次离心，弃上清；(2)固定；(3)通透及封闭；(4)一抗孵育；(5)漂洗；(6)二抗孵育；(7)漂洗；(8)封片：加入PBS缓冲液，重悬，滴加于载玻片上，滴加抗荧光淬灭剂，加盖盖玻片，将神经球压平封片，用于荧光显微镜观察。本发明利用神经球直径大、肉眼可见的特性，直接采用低速离心将细胞收集管底，避免神经球在染色过程中丢失，能够保持神经球原有细胞形态及内部结构，有效避免细胞爬片过程中造成的抗原特性改变；采用物理挤压法直接对神经球进行压片，将神经球挤压成薄膜状，无需进行切片，对设备要求低。

