



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103777001 A

(43) 申请公布日 2014. 05. 07

(21) 申请号 201410036229. 0

(22) 申请日 2014. 01. 24

(71) 申请人 东南大学

地址 211189 江苏省南京市玄武区四牌楼 2 号

(72) 发明人 甘光明

(74) 专利代理机构 南京苏高专利商标事务所

(普通合伙) 32204

代理人 沈振涛

(51) Int. Cl.

G01N 33/532 (2006. 01)

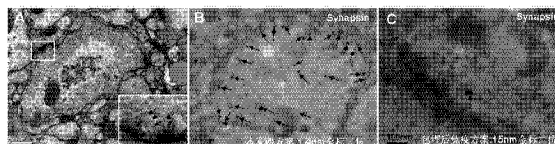
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54) 发明名称

一种超敏的免疫电镜标记方法

(57) 摘要

本发明公开了一种超敏的免疫电镜标记方法,包括以下步骤:把生物样品待测抗原用体积百分比为 0. 1-2. 5% 的戊二醛溶液和质量百分比为 1. 5-5% 多聚甲醛溶液固定后,经过脱水程序后,经过亲水性树脂包埋,切成超薄切片后,分别用特定的第一抗体标记生物样品待测抗原,再以吸附超微金颗粒的第二抗体标记第一抗体,然后利用银加强放大试剂在超微金颗粒周围形成直径较大的银颗粒,然后在电镜下即可敏感地检测待测抗原在生物样品中的表位。本发明具有灵敏高的优势,兼有阳性信号颗粒相对均匀,便于研判的优势,也同时具有可以检测生物样品内部抗原的优势。本发明适合检测位于生物医学标本内部的微量抗原的检测。



1. 一种超敏的免疫电镜标记方法,其特征在于,包括以下步骤:把生物样品待测抗原用体积百分比为 0.1-2.5% 的戊二醛溶液和质量百分比为 1.5-5% 多聚甲醛溶液固定后,经过脱水程序后,经过亲水性树脂包埋,切成超薄切片后,分别用特定的第一抗体标记生物样品待测抗原,再以吸附超微金颗粒的第二抗体标记第一抗体,然后利用银加强放大试剂在超微金颗粒周围形成直径较大的银颗粒,然后在电镜下即可敏感地检测待测抗原在生物样品中的表位。

2. 根据权利要求 1 所述的一种超敏的免疫电镜标记方法,其特征在于,所述亲水性树脂为 K4M 或 L. R. White。

3. 根据权利要求 1 所述的一种超敏的免疫电镜标记方法,其特征在于,所述超薄切片厚度为 60-100nm。

4. 根据权利要求 1 所述的一种超敏的免疫电镜标记方法,其特征在于,超微金颗粒直径为 0.8nm-1.4nm。

一种超敏的免疫电镜标记方法

技术领域

[0001] 本发明属于现代生物医学技术领域,特别涉及一种超敏的免疫电镜标记方法。

背景技术

[0002] 免疫电镜是利用免疫组织化学技术和电镜技术在超微结构水平上观察待测抗原在生物学样品中的精确定位的方法。早年的免疫电镜技术使用的是酶标法,现在的免疫电镜技术往往使用的是金标二抗的方法。二抗也称为第二抗体,是一种蛋白质,可以与直径不同的金颗粒通过静电作用形成金标二抗,如果这种金标二抗与一抗结合,一抗再与其相应的抗原发生特异性偶联作用,在电镜下就会形成代表相应抗原表位的致密颗粒。目前使用金标二抗的免疫电镜技术分为包埋前免疫电镜和包埋后免疫电镜两大类。

[0003] 包埋前免疫电镜,顾名思义就是在经过电镜技术的包埋程序之前就对待测生物样品进行免疫标记。一般而言,普通抗体的直径是 10nm,在与金颗粒发生静电结合时,金颗粒的直径越小,附着在抗体周围的金颗粒也就越多,在标记、洗脱过程中也越不容易使金颗粒丢失,在电镜下显示的代表待测抗原表位的颗粒也就越多。也就是说,和二抗发生静电结合的金颗粒直径越小,在检测待测抗原时敏感性越高。但是如果直径太小,如金颗粒直径在 0.8nm-1.4nm 时,即使在电镜的高倍模式下也不容易观察到金颗粒,因此,包埋前免疫电镜技术往往需要利用银加强试剂,使以金颗粒为核心的位置再富集上直径 5-50nm 的银颗粒,从而间接显示出生物样品待测抗原的表位。

[0004] 包埋前免疫电镜的优点:检测的敏感性高。因为包埋前免疫电镜使用的是直径是 0.8nm-1.4nm 的超微金颗粒,直径 10-15nm 的二抗很容易吸附如此细小的超微金颗粒,并且可以抵抗严格的漂洗条件。经过银加强步骤后,可以很敏感地显示待测抗原的精确表位,并且可以根据需要通过延长银加强试剂的孵育时间来控制超微金颗粒周围的富集的银颗粒直径,使其达到放大 5-50 倍的效果而不影响标记的敏感性。

[0005] 包埋前免疫电镜的缺点。首先,只能标记样品浅层的样品(如实施例 1)。吸附有直径是 0.8nm-1.4nm 的金标二抗,即使在加入穿透剂的情况下,其穿透能力非常有限,一般都会低于 10 μ m,不能标记生物样品深层的抗原,对于大块的生物样品如脑片可以通过振动切片完成,如果是很小的生物样品如果蝇的胚胎、脑等器官,就很难达到标记效果。其次,为了增加待测样品的深度,包埋前免疫电镜操作程序中往往会使用一定浓度的非离子型去污剂 Tween-20 或者表面活性剂 Triton X-100,这两类化学物质往往会造成生物样品超微结构损坏或者丢失,从而可能影响待测抗原的检测。再次,包埋前免疫电镜在使用银加强放大步骤时,由于生物样品的细胞内部结构和组分分布高度不均匀,银颗粒在金颗粒周围富集形成致密核心时,其穿透待测生物样品所进入的距离和路径不一致,将导致最后形成的银颗粒核心直径大小不一(如实施例 1),如果这些直径相差较大,将会干扰对检测结构的判断,而且不能做定量分析。

[0006] 包埋后免疫电镜,顾名思义就是在经过电镜技术的包埋程序之后才对待测生物样品进行免疫标记。

[0007] 包埋后免疫电镜的优点。首先,可以检测生物样品内部的待测抗原。其次,包埋后免疫电镜不使用穿透剂,可以使待测生物样品的超微结构和待测抗原得到较好的保存;再次,根据金颗粒的数量,可以对待测样品作半定量分析。

[0008] 包埋后免疫电镜的缺点。由于包埋后免疫电镜使用的金标二抗的金颗粒直径达到 5-50nm,而与金颗粒结合的二抗直径大约为 10-15nm,与之结合的金颗粒数量比包埋前免疫电镜使用的 0.8-1.4nm 的超微金颗粒数量低得多,而且在标记、洗脱过程中金颗粒容易丢失,因此包埋后免疫电镜标记的敏感性低(如实施例 2),而且金颗粒越大,敏感性越低。另一方面,生物样品的超薄切片一般厚度为 100nm 左右,如果利用直径较大的金标二抗,其穿透样品的能力也会受到影响。因此,以包埋后免疫电镜技术检测生物样品的待测抗原,敏感性将降低。

发明内容

[0009] 发明目的:针对上述现有技术存在的问题和不足,本发明充分结合了包埋前免疫电镜和包埋后免疫电镜的优点,提供了一种超敏感的免疫电镜标记方法。

[0010] 技术方案:为了解决上述技术问题,本发明提供的技术方案如下:一种超敏的免疫电镜标记方法,包括以下步骤:把生物样品待测抗原体积百分比为 0.1-2.5% 的戊二醛溶液和质量百分比为 1.5-5% 多聚甲醛溶液固定后,经过脱水程序后,经过亲水性树脂包埋,切成超薄切片后,分别用特定的第一抗体标记生物样品待测抗原,再以吸附超微金颗粒的第二抗体标记第一抗体,然后利用银加强放大试剂在超微金颗粒周围形成直径较大的银颗粒,然后在电镜下即可敏感地检测待测抗原在生物样品中的表位。

[0011] 其中,上述亲水性树脂为 K4M 或 L. R. White。

[0012] 其中,上述超薄切片厚度为 60-100nm。

[0013] 其中,超微金颗粒直径为 0.8nm-1.4nm。

[0014] 本发明的具体步骤如下:利用包埋后免疫电镜程序,将待测生物样品经过溶解在 0.1M 的磷酸盐缓冲液或二甲胂酸钠缓冲液的 1.5-5% 多聚甲醛溶液和 0.1-2.5% 戊二醛双固定(PH7.0-7.6)、经过 0.1M 的磷酸盐漂洗和脱水后,包埋在亲水性树脂 K4M 或 L. R. White 中,并使样品在树脂中聚合成坚硬的块状;把包埋于亲水性树脂 K4M 或 L. R. White 中待测生物样品在超薄切片机中切成 60-100nm 的超薄切片,并收集于金网或者镍网中;将载有待测生物样品的金网或者镍网以去离子水孵育 5 分钟后,再以含有 BSA 的封闭液中封闭 30 分钟,然后以第一抗体孵育 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第一抗体;将 0.8nm 或者 1.4nm 的超微金标记的第二抗体标记第一抗体 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第二抗体;以银加强试剂使镍网中的第二抗体的超微金颗粒放大,放大的时间根据需要控制在 10-30 分钟,时间越长,在超微金颗粒表面形成的银颗粒结晶越大,越容易观察。将经银加强放大的载有待测生物样品的镍网经过 0.1MPBS (PH=7.4) 洗涤三次,1% 的戊二醛后固定,再经常规的柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色后,在透射电镜下观察、拍照。

[0015] 有益效果:与现有技术相比,本发明克服了包埋前免疫电镜技术穿透生物样品能力弱的弊端,保留了其灵敏高的优势,克服了包埋后免疫电镜技术灵敏低,但是无需抗体穿透生物样品内部(包埋后免疫电镜技术使用的超薄切片是 60-100nm)的优点。本发明适合检

测位于生物医学标本内部的微量抗原的检测,而且所出现的阳性信号相对均匀,便于判断。利用本发明的方法,以突触囊泡标记分子突触素(Synapsin)标记突触囊泡为例,利用直径为 1.4 纳米的金标二抗标记突触素,再以银加强试剂放大,对比直接以直径为 15 纳米的金标二抗标记突触素,其灵敏度可以提高 10 倍以上(见具体实施方案 2),而且阳性信号相对均匀,便于判断。如果采用直径更小的,如 0.8 纳米的金标二抗标记相应抗原,其灵敏度还将大幅增加。

附图说明

[0016] 图 1A 显示利用包埋前免疫电镜程序以果蝇的 DLG 抗体标记的果蝇神经肌肉接头,因果蝇外周的神经肌肉接头在组织浅层,标记结果可在光镜下观察(白色方框所示的球状物即为标记的果蝇幼虫神经肌肉接头);

[0017] 图 1B 显示在图 1A 中方框区域的以果蝇的 DLG 抗体标记的果蝇神经肌肉接头在电镜下的表达位点,DLG 表达在突触后的广阔区域,而非表达在突触后膜,与人所述一致。DLG 抗体在电镜下的阳性检测率很高,阳性的信号很密集,黑色小颗粒示阳性信号,黑色箭头示和外界环境相通的肌肉细胞的细胞膜,示通过包埋前免疫程序,抗体只能穿过 10 微米左右的区域;

[0018] 图 1C 中的黑点均是阳性信号,但是大、中、小箭头所示阳性信号出现的直径相差巨大;

[0019] 图 1D 显示果蝇的中枢神经系统,白线显示的是腹神经索的一个切面;

[0020] 图 1E 显示图 1D 沿着白线采取的断面,在电镜下,果蝇的突触囊泡位于断面的中央区域,利用传统的包埋前免疫电镜程序不能使该断面的中央区域标记上信号;要达到标记的目的,目前只有借助于包埋后免疫电镜程序(注意 E 图的标尺是 5 微米);

[0021] 图 2A 示正常突触小体和突触囊泡在电镜下的结构和位置,突触小体成球状,突触囊泡分布在突触小体外周;

[0022] 图 2B 显示本发明标记的突触素 Synapsin 的信号,代表了突触囊泡在突触小体内的分布模式,结果显示,阳性信号分布在突触小体外周,这种分布模式和图 2A 展示的突触囊泡在突触小体上的分布模式完全一致;

[0023] 图 2C 显示传统的包埋后免疫电镜程序标记的突触素 Synapsin 的信号,这些信号非常稀疏,甚至在很多样品上观察不到。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例,进一步阐明本发明。

[0025] 本发明中的 DLG、synapsin 一抗和 15nm 金标二抗购自 Sigma 公司,1.4nm 的鼠源金标二抗和银加强试剂购自 Nanogold 分子探针公司,0.8nm 的鼠源金标二抗购自 AURION 公司。

[0026] 实施例 1

[0027] DLG 是表达在果蝇幼虫神经肌肉接头突触后的半突触网状组织,在神经生物学研究中,DLG 是显示果蝇幼虫神经肌肉接头突触后区域的常用标记分子之一(不是在突触后膜)。因果蝇幼虫神经肌肉接头位于肌肉的表层,利用包埋前免疫电镜程序,以果蝇的抗 DLG

鼠源单抗为一抗(工作浓度 1:20),再以抗鼠的以 1.4 纳米金颗粒标记的二抗处理(工作浓度 1:50),然后进行银加强放大(放大条件为 25℃下 10 分钟),可以在突触后的区域检测到大量的 DLG 的阳性信号,而在突触后膜则检测不到信号(图 1B-C),这与人们的认识一致,说明本案例在操作上没问题。但是这些信号的直径大小相差比较大(图 1C),会给检测带来误判的可能。而且包埋前免疫程序只能检测位于样品表面 10 微米左右的样品,如果面对位于组织深层的抗原,如图 1D-E 所示,利用包埋前免疫电镜程序就无能为力。

[0028] 实施例 2

[0029] 突触素(Synapsin)是一种位于突触囊泡上的蛋白,是突触囊泡的标识蛋白之一。在本发明的具体实施例 2 的过程中,所用的免疫标记实验程序和本发明的内容完全一样。所用的固定剂为 0.5% 戊二醛 +4% 多聚甲醛的 0.1M PBS 溶液(PH=7.4),所用动物组织为果蝇的腹神经索,其内密集分布有突触小体,突触囊泡环绕在突触小体周围(图 2A)。所用的一抗均为特异识别果蝇突触囊泡的鼠源单抗突触素,工作浓度为 1:20。所用二抗有两种,一种是直径为 1.4 纳米的金标鼠的二抗,标记完成后,用银加强试剂放大金颗粒直径,银加强放大的条件为 25℃下 10 分钟;另一种二抗是直径为 15 纳米的金标抗鼠的二抗,直接标记第一抗体;两种第二抗体的工作浓度均为 1:50。实验表明,在完全一样的实验条件下,利用本发明的方案,以直径为 1.4 纳米的金标二抗标记,再在以银加强试剂放大信号,突触素 Synapsin 的出现的频率(图 2B)远远大于直接用 15nm 直接标记后突触素 Synapsin 出现的频率(图 2C),在实验中选择两个典型样品中,以本发明的程序最多观察到了 26 个阳性信号(图 2B,箭头所示),而用传统的包埋后免疫程序最多只能观察到两个阳性信号甚至是观察不到阳性信号(图 2C,箭头所示)。与传统的包埋前免疫程序相比(图 1C,箭头所示),本发明出现阳性信号直径相对均匀(图 2B,箭头所示),便于判断。

[0030] 实施例 3

[0031] 将待测生物样品经过溶解在 0.1M 的磷酸盐缓冲液的 2% 多聚甲醛和 0.1% 戊二醛双固定(PH7.0-7.6)、经过 0.1M 的磷酸盐漂洗和脱水后,包埋在亲水性树脂 K4M;把包埋于亲水性树脂 K4M 中待测生物样品在超薄切片机中切成 60nm 的超薄切片,并收集于金网或者镍网中;将载有待测生物样品的金网或者镍网以去离子水孵育 5 分钟后,再以含有 BSA 的封闭液中封闭 30 分钟,然后以第一抗体孵育 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第一抗体;将 0.8nm 胶体金标记的第二抗体标记第一抗体 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第二抗体;以银加强试剂盒使镍网中的第二抗体的超微金颗粒放大,放大的时间根据需要控制在 30 分钟,将经银加强放大的载有待测生物样品的镍网经过 0.1MPBS (PH=7.4)洗涤三次,1% 的戊二醛后固定,再经常规的柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色后,在透射电镜下观察、拍照。所用动物组织为果蝇的腹神经索,其内密集分布有突触小体,突触囊泡环绕在突触小体周围。所用的一抗均为特异识别果蝇突触囊泡的鼠源单抗突触素,工作浓度为 1:20。所用二抗有两种,一种是直径为 0.8nm 纳米的金标鼠的二抗,标记完成后,用银加强试剂盒放大金颗粒直径,银加强放大的条件为 25℃下 10 分钟;另一种二抗是直径为 15 纳米的金标抗鼠的二抗,直接标记第一抗体;两种第二抗体的工作浓度均为 1:50。实验表明,在完全一样的实验条件下,利用本发明的方案,以直径为 0.8nm 纳米的金标二抗标记,在以银加强放大信号,突触素 Synapsin 的出现的频率远远大于直接用 15nm 直接标记后突触素 Synapsin 出现的频率,在实验中选择两个典

型样品中,以本发明的程序最多观察到了 26 个阳性信号,而用传统的包埋后免疫程序最多只能观察到两个阳性甚至是观察不到阳性信号。

[0032] 实施例 4

[0033] 将待测生物样品经过溶解在 0.1M 的二甲胍酸钠缓冲液的 5% 多聚甲醛和 0.25% 戊二醛双固定(PH7.0-7.6)、经过 0.1M 的磷酸盐漂洗和脱水后,包埋在亲水性树脂 L. R. White ;把包埋于亲水性树脂 L. R. White 中待测生物样品在超薄切片机中切成 10nm 的超薄切片,并收集于金网或者镍网中 ;将载有待测生物样品的金网或者镍网以去离子水孵育 5 分钟后,再以含有 BSA 的封闭液中封闭 30 分钟,然后以第一抗体孵育 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第一抗体 ;将 0.8nm 胶体金标记的第二抗体标记第一抗体 30 分钟,再以含有 BSA 的封闭液洗涤三次,以洗去没有特异性结合的第二抗体 ;以银加强试剂盒使镍网中的第二抗体的超微金颗粒放大,放大的时间根据需要控制在 30 分钟,将经银加强放大的载有待测生物样品的镍网经过 0.1MPBS (PH=7.4) 洗涤三次,1% 的戊二醛后固定,再经常规的柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色后,在透射电镜下观察、拍照。所用动物组织为果蝇的腹神经索,其内密集分布有突触小体,突触囊泡环绕在突触小体周围。所用的一抗均为特异识别果蝇突触囊泡的鼠源单抗突触素,工作浓度为 1 :20。所用二抗有两种,一种是直径为 1.4nm 纳米的金标鼠的二抗,标记完成后,用银加强试剂盒放大金颗粒直径,银加强放大的条件为 25℃ 下 10 分钟 ;另一种二抗是直径为 15 纳米的金标抗鼠的二抗,直接标记第一抗体 ;两种第二抗体的工作浓度均为 1 :50。实验表明,在完全一样的实验条件下,利用本发明的方案,以直径为 0.8nm 纳米的金标二抗标记,在以银加强放大信号,突触素 Synapsin 的出现的频率远远大于直接用 15nm 直接标记后突触素 Synapsin 出现的频率,在实验中选择两个典型样品中,以本发明的程序最多观察到了 35 个阳性信号,而用传统的包埋后免疫程序最多只能观察到两个阳性甚至是观察不到阳性信号。

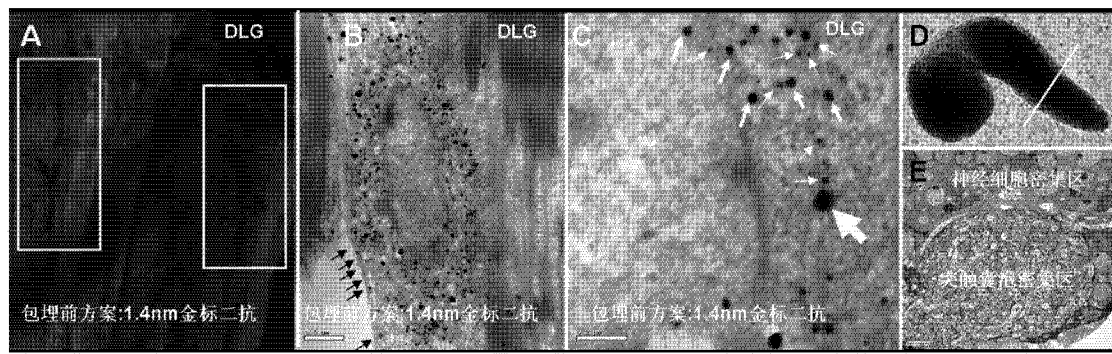


图 1

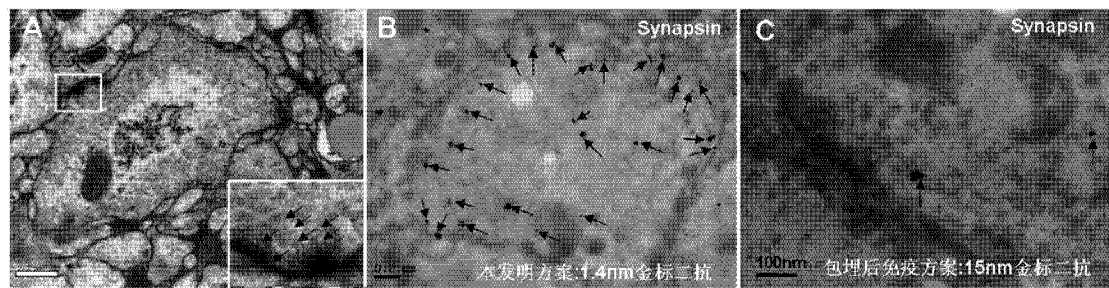


图 2

专利名称(译)	一种超敏的免疫电镜标记方法		
公开(公告)号	CN103777001A	公开(公告)日	2014-05-07
申请号	CN201410036229.0	申请日	2014-01-24
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
当前申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	甘光明		
发明人	甘光明		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/53 G01Q30/20		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种超敏的免疫电镜标记方法，包括以下步骤：把生物样品待测抗原用体积百分比为0.1-2.5%的戊二醛溶液和质量百分比为1.5-5%多聚甲醛溶液固定后，经过脱水程序后，经过亲水性树脂包埋，切成超薄切片后，分别用特定的第一抗体标记生物样品待测抗原，再以吸附超微金颗粒的第二抗体标记第一抗体，然后利用银加强放大试剂在超微金颗粒周围形成直径较大的银颗粒，然后在电镜下即可敏感地检测待测抗原在生物样品中的表位。本发明具有灵敏高的优势，兼有阳性信号颗粒相对均匀，便于研判的优势，也同时具有可以检测生物样品内部抗原的优势。本发明适合检测位于生物医学标本内部的微量抗原的检测。

