



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956241 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201710424207.5

(22)申请日 2017.06.07

(66)本国优先权数据

201710382849.3 2017.05.26 CN

(71)申请人 深圳大学

地址 518000 广东省深圳市南山区深圳大学

申请人 深圳华因康基因科技有限公司

(72)发明人 王筠 盛司潼 李延鹏 钟珊

谭辉彪 朱民

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 1/31(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图8页

(54)发明名称

组织芯片的多重染色方法

(57)摘要

本发明涉及一种组织芯片的多重染色方法,其包括依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行免疫组化染色,其特征在于,在每次免疫组化染色过程中使用柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复,在每次染色过程中和显色后均用明胶甘油封片。本发明的组织芯片多重染色方法由于使用柠康酸酐水溶液在进行多次抗原修复时染色效果较好,且对组织切片的损伤程度也优于商品化的抗原修复液。

1. 一种组织芯片的多重染色方法包括：依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行免疫组化染色，其特征在于，在每次免疫组化染色过程中使用柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复。

2. 根据权利要求1所述的组织芯片多重染色方法，其特征在于，所述抗原修复采用封装水浴法进行，具体步骤为：

封装组织芯片上的组织切片，所述封装定义具有渗水结构的收容空间；

将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热；以及

冷却组织切片。

3. 根据权利要求2所述的组织芯片多重染色方法，其特征在于，在对组织切片进行水浴加热前，将封装后的组织芯片放入室温抗原修复液中，使抗原修复液渗透至收容空间中对组织切片进行预处理。

4. 根据权利要求2所述的抗原修复方法，其特征在于，所述预设温度为95-100°C，所述预定时间为15-30分钟。

5. 根据权利要求2所述的组织芯片多重染色方法，其特征在于，在冷却组织切片后进一步包括去除对组织芯片上的组织切片的封装。

6. 根据权利要求2所述的组织芯片多重染色方法，其特征在于，所述封装的结构包括：

固定有组织切片的组织芯片；

朝向组织切片并且和组织芯片间隔设置的玻片；以及

环绕组织切片设在组织芯片和玻片之间的间隔层，所述组织芯片、玻片和间隔层共同定义具有渗水结构的收容空间。

7. 根据权利要求6所述的组织芯片多重染色方法，其特征在于，所述间隔层为单层或多层滤纸。

8. 一种组织芯片的多重染色方法，其特征在于，所述方法包括以下步骤：依次对同一组织芯片进行RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交；

在所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程中，使用柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复。

9. 根据权利要求8所述的组织芯片的多重染色方法，其特征在于，所述抗原修复采用封装水浴法进行，具体步骤为：

封装组织芯片上的组织切片，所述封装定义具有渗水结构的收容空间；

将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热；以及

冷却组织切片。

10. 根据权利要求9所述的组织芯片的多重染色方法，其特征在于，所述预设温度为95-100°C，所述预定时间为15-30分钟。

11. 根据权利要求9所述的组织芯片的多重染色方法，其特征在于，所述封装的结构包括：

固定有组织切片的组织芯片；

朝向组织切片并且和组织芯片间隔设置的玻片；以及

环绕组织切片设在组织芯片和玻片之间的间隔层,所述组织芯片、玻片和间隔层共同定义具有渗水结构的收容空间。

12.根据权利要求11所述的组织芯片的多重染色方法,其特征在于,所述间隔层为单层或多层滤纸。

13.根据权利要求8所述的组织芯片的多重染色方法,其特征在于,所述免疫组化染色步骤包括对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色。

14.根据权利要求13所述的组织芯片的多重染色方法,其特征在于,在所述对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色过程中采用AEC显色液进行显色。

15.根据权利要求8所述的组织芯片的多重染色方法,其特征在于,所述DNA原位杂交为TUNEL原位杂交。

16.根据权利要求8所述的组织芯片的多重染色方法,其特征在于,对组织芯片采用环保型生物制片透明剂进行脱蜡。

组织芯片的多重染色方法

技术领域

[0001] 本发明涉及分子生物学领域,更具体地说,涉及一种组织芯片的多重染色方法。

背景技术

[0002] 经典的免疫组织化学法是指在单张组织切片上运用一种已知的第一抗体(一抗)与针对性靶抗原进行特异性结合,然后利用加酶标的第二抗体(二抗)与一抗的多价结合和酶底物显色来实现放大免疫反应,使得在显微镜下可清晰观察到被检抗原/蛋白在组织细胞的分布和表达情况。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一个最重要和最具有影响力的实验诊断技术。

发明内容

[0003] 随着抗原修复技术的革命性突破,近年来免疫组织化学法已由执行单一染色发展至多重染色。多重免疫组织化学技术的进步,首先是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,得以一材多用。但此法不能彻底消除两种以上靶抗原之间可能存在的交叉免疫反应,故其染色结果在某种程度缺乏科学性和可信性。于是,科学家们又尝试在同一张组织切片上,以单一的免疫组织化学染色为基础,进行多次重复染色。即进行第一种抗体染色并观察记录结果后,先去除其显色剂和通过抗原修复解除抗原和抗体的特异结合,然后,再用另一种抗体进行下一轮的特殊染色,以致重复脱染-再染2-5次(据Dr.Li的最新报道),此法虽增强了有限资源的合理利用,但存在可重复次数并不多,且染色效果不稳定。皆因多次染色后特异性抗原的免疫反应可逐渐减弱或消失,组织切片也可呈现结构变差或脱落的缺点。

[0004] 1998年Dr.Kononen等发明了微型组织芯片,将数十乃至数千个微小组织切片样本,整齐有序地排列固定在一张载玻片上,使之在同一张玻片上的同一次染色能够获得对不同部位、不同病期,甚至不同疾病组织切片的大量相关信息,极大利用了组织资源和明显提高了实验效率。但是,因组织芯片的制备成本较高,一些疾病的组织来源稀少和珍贵,在很大程度上限制了对此法的推广应用。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种组织芯片的多重染色方法,旨在提高现有技术组织芯片多重染色中抗原修复的效果,解决多次抗原修复后组织切片结构容易变差的缺点。

[0006] 一种组织芯片的多重染色方法包括:依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行免疫组化染色,在每次免疫组化染色过程中使用柠檬酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复。

[0007] 作为改进,所述抗原修复采用封装水浴法进行,具体步骤为:封装组织芯片上的组织切片,所述封装定义具有渗水结构的收容空间;将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热;以及冷却组织切片。

[0008] 作为改进,在对组织切片进行水浴加热前,将封装后的组织芯片放入室温抗原修复液中,使抗原修复液渗透至收容空间中对组织切片进行预处理。

[0009] 作为改进,所述预设温度为95-100℃,所述预定时间为15-30分钟。

[0010] 作为改进,在冷却组织切片后进一步包括去除对组织芯片上的组织切片的封装。

[0011] 作为改进,所述封装的结构包括:固定有组织切片的组织芯片;朝向组织切片并且和组织芯片间隔设置的玻片;以及环绕组织切片设在组织芯片和玻片之间的间隔层,所述组织芯片、玻片和间隔层共同定义具有渗水结构的收容空间。

[0012] 作为改进,所述间隔层为单层或多层滤纸。

[0013] 一种组织芯片的多重染色方法包括:依次对同一组织芯片进行RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交;在所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程中,使用柠檬酸酐水溶液作为抗原修复液抗原修复对组织芯片进行抗原修复。

[0014] 作为改进,所述抗原修复采用封装水浴法进行,具体步骤为:封装组织芯片上的组织切片,所述封装定义具有渗水结构的收容空间;将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热;以及冷却组织切片。

[0015] 作为改进,所述预设温度为95-100℃,所述预定时间为15-30分钟。

[0016] 作为改进,所述封装的结构包括:固定有组织切片的组织芯片;朝向组织切片并且和组织芯片间隔设置的玻片;以及环绕组织切片设在组织芯片和玻片之间的间隔层,所述组织芯片、玻片和间隔层共同定义具有渗水结构的收容空间。

[0017] 作为改进,所述间隔层为滤纸。

[0018] 作为改进,所述免疫组化染色步骤包括对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色。

[0019] 作为改进,在所述对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色过程中采用AEC显色液进行显色。

[0020] 作为改进,所述DNA原位杂交为TUNEL原位杂交。

[0021] 作为改进,对组织芯片采用环保型生物制片透明剂进行脱蜡。

[0022] 相对于现有技术,本发明的多重染色方法具有以下优点:

1. 使用柠檬酸酐水溶液对组织芯片依序多次进行抗原修复时染色效果较好且稳定。另外,对组织切片的损伤程度也小于商品化抗原修复液。

[0023] 2. 本发明组织芯片的多重染色方法采用封装水浴法进行抗原修复,对需要抗原修复的组织芯片的组织切片进行预先封装,然后放入抗原修复液中进行水浴加热,由于封装后形成的抗原修复结构具有可以渗水的收容空间,因此既可以保证组织切片组织在每次抗原修复过程中浸泡在具有预设温度的抗原修复液中进行水浴加热,又可以降低被加热的抗原修复液在组织切片表面的流动性,减少组织切片受到的损伤。

[0024] 3. 由于本发明的抗原修复方法采用具有收容空间的封装对组织切片进行保护,因此,即可对抗原修复液进行直接高温加热,以有效去除由多聚甲醛固定所致的组织切片内形成的“分子面罩”,使抗原决定簇充分暴露,还可大量减少每次所需抗原修复液的量,以及显著缩短抗原修复所需时间。与其它抗原修复方法(例如:微波修复、酶消化修复、高压水浴修复)相比,封装水浴法对组织切片的多重染色特点是质优价廉。

[0025] 本发明能够有效的实现对同一组织芯片进行RNA、蛋白质和DNA等三个分子层面的

检测并获取海量的生物信息,并通过相关图形软件分析,可将这三个分子层面的检测信息进行共定位分析及互作关系分析,这就大大提高了实验数据的有效利用和分析结果的准确性及实用性。

[0026]

附图说明

[0027] 图1是本发明第一实施例组织芯片的多重染色方法的流程图。

[0028] 图2为本发明组织芯片的多重染色方法分别使用柠康酸酐、柠檬酸钠、Tris-HCl依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行多次抗原修复的效果比较图。

[0029] 图3是本发明采用封装水浴法进行抗原修复的方法流程图。

[0030] 图4是本发明第一实施例抗原修复结构爆炸结构示意图。

[0031] 图5是图4所示原修复结构的组装结构示意图。

[0032] 图6是图5沿A-A线的剖面示意图。

[0033] 图7为替代实施例中间隔层的立体结构示意图。

[0034] 图8为另一替代实施例中间隔层的结构示意图。

[0035] 图9为图8实施例中间隔层的剖面结构示意图。

[0036] 图10为本发明一替代实施例提供一种抗原修复方法的示意图。

[0037] 图11本发明第二实施例提出另一种组织芯片的多重染色方法的流程示意图。

[0038] 图12为第二实施例对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色之前进行预实验的流程示意图。

[0039] 图13为同一组织芯片依次进行mRNA原位杂交实验、单色多重免疫组化染色实验和TUNEL原位杂交染色实验的流程示意图。

[0040] 图14是本发明一个具体实施例中的组织芯片经RNA原位杂交染色后的部分实验结果图。

[0041] 图15是本发明一个具体实施例中的组织芯片经多重免疫组化染色后的部分实验结果图。

[0042] 图16是本发明一个具体实施例中的组织芯片经TUNEL原位杂交染色后的部分实验结果图。

[0043]

具体实施方式

[0044] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。

[0045] 参阅图1,本发明第一实施例提出一种组织芯片的多重染色方法,所述方法包括如下步骤:S11,依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行免疫组化染色;S12,在每次免疫组化染色过程中使用柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复。替代实施例中,在每次染色过程中和显色后均用明胶甘油封片。本实施例中,柠康酸酐中文别名为柠康酐,英文名称为Citraconic anhydride,英文别名为Methylmaleic anhydride; 3-Methyl-2,5-pentanedione; 3-methylfuran -2,5-dione,分子式为 $C_{10}H_{10}O_7$,分子量为

242.1822。

[0046] 参阅图2,为本发明组织芯片的多重染色方法分别使用柠康酸酐、柠檬酸钠、Tris-HCl依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行多次抗原修复的效果比较图,可以看出使用柠康酸酐水溶液在进行多次抗原修复时染色效果明显优于使用柠檬酸钠、Tris-HCl进行多次抗原修复时的染色效果,本实施例使用的抗体1-5分别为AKT抗体、p53抗体、Estrogen Receptor- α 抗体、cleaved caspase-3抗体和(Erk1+Erk2)抗体。

[0047] 相对于现有技术其他抗原修复液例如柠檬酸钠修复液(pH6.0)或Tris-HCl(pH9.0),本发明使用柠康酸酐水溶液在进行多次抗原修复时染色效果较好且组织切片的损伤程度较小,较佳地,依序进行多次抗原修复的过程中所使用的抗体包括AKT抗体、p53抗体、Estrogen Receptor- α 抗体、cleaved caspase-3抗体、(Erk1+Erk2)中的两种或两种以上的抗体组合时,柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片依序进行多次抗原修复的效果更好。

[0048] 一实施例中,请参阅图3,所述抗原修复采用封装水浴法进行,本实施例中所述封装水浴法的具体步骤包括:S31,封装组织芯片上的组织切片,所述封装定义具有渗水结构的收容空间;S32,将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热;以及S33,冷却组织切片。替代实施例中,在冷却组织切片后进一步包括去除对组织芯片上组织切片的封装的步骤,以方便进行后续实验操作。

[0049] 较佳实施例中,请参阅图4-6,封装组织芯片后形成的结构100包括:固定有组织切片112的组织芯片110;朝向组织切片112并且和组织芯片110间隔设置的玻片120;以及环绕组织切片112设在组织芯片110和玻片120之间的间隔层130,所述组织芯片110、玻片120和间隔层130共同定义具有渗水结构的收容空间。

[0050] 本实施方式中,所述间隔层130的厚度大于所述组织切片112的厚度,所述组织切片的厚度h1可以为3-8微米,所述间隔层130的厚度h2大于10微米,较佳地,所述间隔层130厚度h2为10-30微米。一实施例中,所述间隔层130可以为单层或多层滤纸。参阅图7,替代实施例中,所述间隔层130还可以为多个与玻片固定连接的多个间隔柱131或凸起131,较佳地,所述多个间隔柱131或凸起131与玻片120为一体成型结构。参阅图8-9,其他替代实施例中,所述间隔层130为垂直玻片120设置的环状侧壁结构,所述侧壁结构包括多个的间隔设置的可以渗水的微通孔133,所述微通孔133平行玻片120所在平面朝向玻片120中心设置。

[0051] 本实施例中,采用弹力夹具140夹持固定所述组织芯片110、玻片120和间隔层130。较佳地,所述间隔层130设有夹持部135,所述夹持部135的宽度比间隔层130其他部分的宽度更大,用于支撑弹力夹具140的夹持力,以防止玻片120受力翘曲。较佳实施例中,所述夹持部135的宽度W1大致为10毫米,间隔层非夹持部的宽度W2可以为2毫米左右。本实施例中,所述夹持部135设置在组织芯片110或玻片120设置标签的一侧,所述弹力夹具140可以为金属或塑料的曲别针或长尾票夹,例如1/2"或15mm的长尾票夹。较佳实施例中,弹力夹具140为长尾票夹时,长尾141翻向玻片中央,对第一玻片110、第二玻片120和间隔层130实施辅助夹持。。

[0052] 本实施例中蒸锅加热法为:组织芯片置于预热20分钟的抗原修复液中,再置于表位抗原修复蒸锅中持续25分钟,自然冷却约20分钟至室温。所述微波炉加热法为:组织芯片置于适量(约200mL)0.01M柠檬酸盐缓冲液(pH6.0)中,微波加热3分钟。然后每间隔2分钟加

热20秒,持续加热15-20分钟(约6-7次),自然冷却约1小时到室温,即完成抗原修复。相对于现有技术,本发明组织芯片的多重染色方法采用封装水浴法进行抗原修复,对需要抗原修复的组织芯片的组织切片进行预先封装,然后放入抗原修复液中进行水浴加热,由于封装后形成的抗原修复结构具有可以渗水的收容空间,因此既可以保证组织切片在每次抗原修复过程中浸泡在具有预设温度的抗原修复液中进行水浴加热,又可以降低被加热的抗原修复液在组织切片表面的流动性,减少组织切片受到的损伤。另外,由于本发明的抗原修复方法采用具有收容空间的封装对组织切片进行保护,因此即使对抗原修复液进行直接高温加热也不影响对组织切片的抗原修复效果,因此不仅可以保证多次抗原修复的效果,有效修复经多聚甲醛固定过的组织芯片上的组织切片内形成的“分子面罩”,充分暴露抗原决定簇,还可以缩短修复所需的时间。与其他抗原修复方法(例如:微波修复、酶消化法、高温高压法)相比,封装水浴法对组织切片中组织形态的影响更小,有利于实验结果的观察、比较和分析。本发明的组织芯片的多重染色方法不仅可以保持多次染色的最佳效果,减少抗原修复液的大量损耗,省略预热时间,还可以保持多次脱染后复染的最佳效果,尤其是可以减少组织样本在多重抗原修复过程中的组织切片从第一张玻片的剥脱及擦伤,以及高压锅处理的不安全性。

[0053] 较佳地,使用的第一抗体将按抗原表达强弱依次为抗体-1(弱抗原表达)、抗体-2(稍弱抗原表达)、抗体-3(中度抗原表达)、抗体-4(稍强抗原表达)、抗体-5(强抗原表达)和抗体-6(极强抗原表达)

一实施例中,所述组织切片为石蜡组织切片,第一次封装组织芯片前,使用保型生物制片透明剂对组织切片进行脱蜡。与目前常见的采用苯类试剂脱蜡的方案相比,本方案的脱蜡效果无明显差异,但是能够有效防止实验操作者苯类中毒,减少对实验操作者的危害。本实施例中,所述环保型生物制片透明剂包括但不限于:T0型生物制片透明剂、康柏氏ETC环保组织透明剂(长沙康伯恩医疗科技有限公司)、Van-Clear环保透明剂(上海宏兹实业有限公司)、GS环保试剂(哈尔滨格林标本技术开发有限公司)、环保透明剂(珠海贝索生物技术有限公司)、环保型BT生物组织透明剂(佛山市南海钧镒医疗设备有限公司)、Y透明剂(籁盾公司)、环保透明剂(广州市秀威贸易有限公司)、竹叶提取物(四川自贡雷扁村村委会)、西奈山环保组织透明液(杭州西奈山生物科技有限公司)。

[0054] 另外,针对采用甘油明胶封片的组织芯片,脱片时,仅需将其浸泡于60-80℃的水中,待甘油明胶溶解后,盖玻片会自然脱落;因此,采用甘油明胶封片,有利于简化后续的实验过程中的脱片步骤,并减少脱片步骤对组织芯片上的组织切片中组织形态的影响。

[0055] 参考图10,一替代实施例中,使用第一容器1001装入抗原修复液,将封装后的组织芯片放入第一容器1001内的抗原修复液中进行预处理,然后将第一容器1001放入蒸锅1002中持续加热至95-100℃持续15-30分钟后自然冷却至室温。替代实施例中,使用第一容器1001装入室温抗原修复液,将封装后的组织芯片放入抗原修复液中,直接将第一容器1001放在蒸锅中加热升温,在95-100℃持续15-30分钟,最后自然冷却至室温。另一具体实施例中,使用烧杯装入室温抗原修复液后,将封装后的组织芯片放入烧杯内的抗原修复液中淹没进行预处理,然后将烧杯在加热器上直接进行95-100℃的水浴加热15-30分钟,然后自然冷却。

[0056] 参阅图11,本发明第二实施例提出另一种组织芯片的多重染色方法,所述方法包

括以下步骤：S121，依次对同一组织芯片进行RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交；S122，在所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程中，使用柠康酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行分子交联解链或抗原修复。

[0057] 替代实施例中，在RNA原位杂交、免疫组化染色过程中，在显色后均用明胶甘油封片。本实施例中，柠康酸酐中文别名为柠康酐，英文名称为Citraconic anhydride，英文别名为Methylmaleic anhydride；3-Methyl-2,5-pentanedione；3-methylfuran-2,5-dione，分子式为 $C_{10}H_{10}O_7$ ，分子量为242.1822。

[0058] 相对于现有技术，本发明第二实施例中的方法能够有效的实现对同一组织芯片进行RNA、蛋白质和DNA等三个分子层面的检测并获取相应的生物信息。另外，通过相关图形软件（例如photoshop），可将这三个分子层面的检测结果放在同一张图片中进行分析，即共定位分析，这可大大提高实验结果分析效率和准确性。另外，相对于现有技术，本发明使用柠康酸酐水溶液的在进行分子交联解链或抗原修复时染色效果较好且组织切片的损伤程度较小，较佳地，对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色所使用的第一抗体将按抗原表达强弱依次为抗体-1（弱抗原表达）、抗体-2（稍弱抗原表达）、抗体-3（中度抗原表达）、抗体-4（稍强抗原表达）、抗体-5（强抗原表达）和抗体-6（极强抗原表达），例如依序进行多次抗原修复的过程中所使用的抗体包括AKT抗体、p53抗体、Estrogen Receptor- α 抗体、cleaved caspase-3抗体、(Erk1+Erk2)。

[0059] 本实施例中，请再次参阅图3，所述分子交联解链或抗原修复采用封装水浴法进行，本实施例中所述封装水浴法的具体步骤包括：S31，封装组织芯片上的组织切片，所述封装定义具有渗水结构的收容空间；S32，将封装后的组织芯片在具有预设温度的抗原修复液中对组织切片进行预定时间的水浴加热；以及S33，冷却组织切片。替代实施例中，在冷却组织切片后进一步包括去除对组织芯片上组织切片的封装的步骤，以方便进行后续实验操作。

[0060] 本实施例中，请再次参阅图4-6，封装组织芯片后形成的结构包括：用于固定组织切片112的组织芯片110；朝向组织切片112并且和组织芯片110间隔设置的玻片120；以及环绕组织切片112设在组织芯片110和玻片120之间的间隔层130，所述组织芯片110、玻片120和间隔层130共同定义具有渗水结构的收容空间。

[0061] 本实施方式中，所述间隔层130的厚度大于所述组织切片112的厚度，所述组织切片的厚度 h_1 可以为3-8微米，所述间隔层130的厚度 h_2 大于10微米，较佳地，所述间隔层130厚度 h_2 为0.3-0.5毫米。一实施例中，所述间隔层130可以为单层或多层滤纸。再次参阅图7，替代实施例中，所述间隔层130还可以为多个与玻片固定连接的多个间隔柱131或凸起131，较佳地，所述多个间隔柱131或凸起131与玻片120为一体成型结构。参阅图8-9，其他替代实施例中，所述间隔层130为垂直玻片120设置的环状侧壁结构，所述侧壁结构包括多个的间隔设置的可以渗水的微通孔133，所述微通孔133平行玻片120所在平面朝向玻片120中心设置。

[0062] 本实施例中，采用弹力夹具140夹持固定所述组织芯片110、玻片120和间隔层130。较佳地，所述间隔层130设有夹持部135，所述夹持部135的宽度比间隔层130其他部分的宽度更大，用于支撑弹力夹具140的夹持力，以防止玻片120受力翘曲。较佳实施例中，所述夹持部135的宽度 W_1 大致为10毫米，间隔层非夹持部的宽度 W_2 可以为2毫米左右。本实施例中，

所述夹持部135设置在组织芯片110或玻片120设置标签的一侧,所述弹力夹具140可以为金属或塑料的曲别针或长尾票夹,例如1/2”或15mm的长尾票夹。较佳实施例中,弹力夹具140为长尾票夹时,长尾141翻向玻片中央,对第一玻片110、第二玻片120和间隔层130实施辅助夹持。

[0063] 相对于现有技术,本发明组织芯片的多重染色方法采用封装水浴法进行分子交联解链或抗原修复,由于封装水浴法可以对需要分子交联解链或抗原修复的组织芯片的组织切片进行预先封装,然后放入抗原修复液中进行水浴加热,然后冷却,以完成组织切片的分子交联解链或抗原修复。由于封装后形成的抗原修复结构具有可以渗水的收容空间,因此既可以保证组织切片组织在在分子交联解链或抗原修复过程中浸泡在具有预设温度的抗原修复液中进行水浴加热,又可以降低被加热的抗原修复液在组织切片表面的流动性,减少组织切片受到的损伤。另外,由于本发明采用具有收容空间的封装对组织切片有保护作用,因此即使对抗原修复液进行直接高温加热也不影响对组织切片的分子交联解链或抗原修复效果,因此不仅可以保证多次分子交联解链或抗原修复的效果,有效修复经多聚甲醛固定过的组织芯片上的组织切片内形成的“分子面罩”,充分暴露抗原决定簇,还可以缩短分子交联解链或抗原修复所需的时间。与其他的分子交联解链或抗原修复方法(例如:微波修复、酶消化法、高温高压法)相比,本发明采用的封装水浴法对组织切片中组织形态的影响更小,有利于实验结果的观察、比较和分析,不仅可以保持多次染色的最佳效果,减少抗原修复液的大量损耗,省略预热时间,还可以保持多次脱染后复染的最佳效果,尤其是可以减少组织样本在多重抗原修复过程中的组织切片从第一张玻片的剥脱及擦伤,以及高压锅处理的不安全性。

[0064] 参阅图12,替代实施例中,在所述对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色之前,可进行预实验,确定每一次免疫组化染色所用抗体的最佳浓度和反应程度。所述预实验包括以下步骤:S131,确定各待检测蛋白是否在该类型组织切片中表达;S132,确定各待检测蛋白对应的最佳抗体稀释比,及比较各待检测蛋白的阳性信号表达强弱;S133,确定待检测组织芯片质量是否符合要求。本方案可保证免疫组化染色实验过程中每一次显色的实验效果。较佳地,所述对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色根据所述多种蛋白质/抗原对应抗体的信号,由弱到强的顺序依次进行。

[0065] 在本发明一个具体实施例中,所述步骤S132具体为:取与组织芯片上的组织切片同一类型的石蜡包埋组织块(1~3个),进行连续切片,按照抗体说明书给予的抗体稀释度范围选取2~3个的稀释比,在两张连续组织切片片,同时同条件进行免疫组化染色(还需设置阳性对照及阴性对照),以确定最佳的抗体稀释比,同时根据其染色可得出待检测蛋白的阳性信号表达强弱。

[0066] 在本发明另一个具体实施例中,所述步骤S133具体可为:用上述步骤S132所确定的最佳条件,对待检测组织芯片按照上述条件进行一次上述免疫组化染色实验,只要其脱片率低于5%,组织平整无气泡,即可认为该待检测组织芯片质量合格。

[0067] 在本发明另一个具体实施例中,所述步骤S133具体可为:对待检测组织芯片按照上述条件进行一次RNA原位杂交实验,只要其脱片率低于5%,组织平整无气泡,即可认为该待检测组织芯片质量合格。

[0068] 在本发明的一个实施例中,所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程

中所使用的二抗含有辣根过氧化物酶标记,相应的显色剂可为AEC,相应的脱色剂为80%乙醇。当然,二抗含有辣根过氧化物酶标记时,相应的显色剂可为DAB,不过DAB无法脱色,因此仅能使用在DNA原位杂交过程中。在本发明的另一个实施例中,所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程中所使用的二抗含有碱性磷酸酶标记,相应的显色剂可为NBT-BCIP,相应的脱色剂为二甲基甲酰胺。以上,脱色剂的选择取决于酶标二抗及相应的显色剂。本发明选用的显色剂不仅有较好的显色效果,而且在显色观察之后,能够被有效的洗去。

[0069] 一实施例中,本发明在所述RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交过程中,采用相同的显色剂显色,以便能有效的简化整个方法过程中的实验种类,使操作更为简单,实验稳定性更高。在对多种蛋白质/抗原依次进行免疫组化染色过程中,采用相同的显色剂,不仅可以简化操作流程,还能使对多种蛋白质/抗原的免疫组化实验结果相互之间具有更好的对比性,避免因显色剂显色特性的不同,干扰实验结果的分析。

[0070] 对于DNA原位杂交,本发明优选采用TUNEL(细胞凋亡)的原位杂交。

[0071] 在本发明的一个实施例中,所述RNA原位杂交步骤中采用环保型生物制片透明剂脱蜡。与目前常见的采用苯类试剂脱蜡的方案相比,本方案的脱蜡效果无明显差异,但是能够有效防止实验操作者苯类中毒,减少对实验操作者的危害。所述环保型生物制片透明剂包括但不限于:T0型生物制片透明剂、康柏氏ETC环保组织透明剂(长沙康伯恩医疗科技有限公司)、Van-Clear环保透明剂(上海宏兹实业有限公司)、GS环保试剂(哈尔滨格林标本技术开发有限公司)、环保透明剂(珠海贝索生物技术有限公司)、环保型BT生物组织透明剂(佛山市南海钧镒医疗设备有限公司)、Y透明剂(籁盾公司)、环保透明剂(广州市秀威贸易有限公司)、竹叶提取物(四川自贡雷扁村村委会)、西奈山环保组织透明液(杭州西奈山生物科技有限公司)。

[0072] 在本发明的一个实施例中,在所述依次进行RNA原位杂交、免疫组化染色和DNA原位杂交之前还包括一验证组织芯片质量的步骤。该步骤可采用上述预实验中所述步骤S133的任一种方法。

[0073] 经本发明人多次实验验证发现,待检测组织芯片按上述方法进行一次上述免疫组化染色实验后,或按上述方法进行一次RNA原位杂交实验后,在上述第一次实验中未发生脱片的,可按上述方案至少重复进行9次显色-脱色实验,且不再发生脱片。上述显色-脱色实验可为按上述条件依次进行的RNA原位杂交实验、免疫组化染色实验、DNA原位杂交实验的总次数。

[0074] 以下本发明通过数个具体实施例,进一步说明本发明所记载技术方案的技术效果及优越性。

[0075] 在本发明的一个具体实施例中,对同一组织芯片依次进行mRNA原位杂交实验、单色多重免疫组化染色实验和TUNEL(细胞凋亡)的原位杂交染色实验,该实验的技术流程图如图13所示。具体步骤如下。

[0076] 一、mRNA原位杂交实验。

[0077] 1、组织芯片置于T0型生物制片透明剂中脱蜡3遍,10分钟/遍;100%乙醇水化2遍,5分钟/遍;95%乙醇水化1遍,5分钟;90%乙醇水化1遍,5分钟;70%乙醇水化1遍,5分钟;其中,梯度乙醇用DEPC水配制。

- [0078] 2、TBST (DEPC处理水配制,含0.1% 吐温-20)洗3遍,5分钟/遍。
- [0079] 3、组织芯片置0.2M HCl (DEPC处理水配制)中酸处理,室温孵育15分钟。
- [0080] 4、1×蛋白酶 K处理组织芯片消化碱性蛋白,37℃孵育30分钟。
- [0081] 5、TBST洗3遍,5分钟/遍;终止酶反应。
- [0082] 6、组织芯片置于已预热20分钟的表位抗原修复蒸锅进行分子交联解链25分钟,然后自然冷却至室温(约20分钟)。
- [0083] 7、TBST洗3遍,5分钟/遍。
- [0084] 8、4%多聚甲醛后固定组织,室温20分钟。
- [0085] 9、TBST洗3遍,5分钟/遍。
- [0086] 10、滴加预杂交液,55℃2小时,以封闭组织上探针的非特异性结合位点。
- [0087] 11、U6寡核苷酸探针(广州外显子生物公司)置85℃变性5分钟,37℃保持2分钟。
- [0088] 12、去除预杂交液,滴加含探针的杂交液(阴性对照滴加不含探针杂交液),加盖盖玻片,在ThermoBrite原位杂交仪中42℃杂交16小时。
- [0089] 13、5×SSC (DEPC处理水配制),37℃,洗10分钟;然后2×SSC(含50%去离子甲酰胺,DEPC处理水配制),37℃,洗3遍,5分钟/遍;再用TBST洗5分钟。
- [0090] 14、滴加封闭液(含1%羊血清,3%BSA,TBST配),37℃封闭1小时;以封闭组织上二抗的非特异性结合位点。
- [0091] 15、去除封闭液,滴加Anti-Dig-AP-Conjugate二抗(1:1000,TEST配制),37℃孵育2小时。
- [0092] 16、TBST洗3遍,5分钟/遍。
- [0093] 17、根据NBT-BCIP显色试剂盒(索莱宝)配制显色液,根据组织芯片大小滴加显色液,37℃避光孵育,显微镜观察出现蓝紫(黑)色阳性信号即可终止显色,自来水洗2-5分钟。
- [0094] 18、用甘油明胶封片。
- [0095] 19、显微镜下观察,并运用Leica LAS V4.2软件选采组织切片中阳性区域照相,或用全自动数字切片扫描系统对组织芯片进行高通量扫描照相分析。
- [0096] 需要说明的是,上述mRNA原位杂交实验的步骤3中,通过稀酸处理组织能使碱性蛋白变性,防止探针与碱性蛋白的静电结合导致非特异性染色。步骤4用于膜打孔,使核酸暴露,使探针易于结合至靶位点。步骤6中的分子交链解链步骤能够有效的对多聚甲醛固定后的组织中形成分子交联进行解链,便于探针的结合,同时保证组织芯片上各切片的组织结构,不易使切片脱片。步骤11能够有效破坏单链探针自身形成的二聚体或发卡结构。步骤17中,若进行核染可自选核固红或甲基绿,当RNA表达为胞核时也可选择不核染。
- [0097] 部分实验结果如图14所示。图14中,NBT-BCIP显蓝紫(黑)色阳性信号,RISH组A图(放大倍数400×)为a图(放大倍数200×)框中的放大区域,PC与NC为同批另张阳性对照与阴性对照组织切片染色(放大倍数为400×)。
- [0098] 二、单色多重免疫组化染色实验。
- [0099] 按下述步骤依次对Ab1-Ab6这种抗体所对应的蛋白进行检测。
- [0100] 1、将组织芯片浸泡于预热至60℃~80℃双蒸水中,待甘油明胶溶解,盖玻片自然脱落。
- [0101] 2、置组织芯片于二甲基甲酰胺中,50℃水浴浸泡5-10分钟,显微镜下检查,待蓝紫

(黑)色阳性信号完全褪色;1×PBS洗3遍,共15分钟。

[0102] 3、组织芯片置于预热20分钟的抗原修复液中,再置于表位抗原修复蒸锅中持续25分钟,自然冷却至室温(约20分钟);然后1×PBS洗3遍,共15分钟。

[0103] 4、组织芯片置于3% H_2O_2 (1×PBS配制) 30分钟;以封闭内源性过氧化氢酶造成的非特异性背景染色;然后1×PBS洗3遍,共15分钟。

[0104] 5、用一抗稀释液适度稀释一抗加到组织芯片上,即先做免疫组化染色第一轮的一抗孵育。4℃湿盒过夜;1×PBS洗3遍,共15分钟。

[0105] 6、PV9000 (或PV9003) 试剂盒 (中杉金桥) 的试剂一加到组织芯片上 (二抗孵育), 室温20分钟;1×PBS洗3遍,共15分钟;PV9000 (或PV9003) 试剂盒的试剂二再加到组织芯片上, 室温30分钟;1×PBS洗3遍,共15分钟;(Streptavidin-HRP根据不同公司抗体说明书决定二抗孵育的时间和温度)。

[0106] 7、按试剂盒说明配制AEC显色液 (中杉金桥), 加到组织芯片上, 室温避光孵育, 显微镜下观察 (视抗体显色红色阳性信号, 决定终止显色时间, 5~20分钟)。自来水洗5-10分钟终止显色。

[0107] 8、组织芯片置于苏木素液中核染, 室温5~8秒, 自来水洗5-10分钟终止显色。

[0108] 9、用甘油明胶封片。

[0109] 10、显微镜下观察, 在组织芯片上运用Leica LAS V4.2软件选采组织切片中阳性区域照相, 或用全自动数字切片扫描系统对组织芯片进行高通量扫描照相分析。

[0110] 以上完成第一轮免疫组化染色, 更换实验过程中所使用的一抗、二抗, 按上述1-10步骤进行后续5轮的免疫组化染色实验。其中, 后续5轮中, 第2步因为需要脱色的对象与第1轮不同, 第2步需进行适应性调整, 具体可为: 置组织芯片于80%乙醇中浸泡, 显微镜下检查, 红色阳性信号需完全消失, 然后1×PBS洗3遍, 共15分钟。

[0111] 需要说明的是, 步骤5中一抗的稀释度可通过预实验获得, 所述预实验的具体步骤方法可采用上述的预实验方法进行。

[0112] 其中, 部分实验结果如图15所示。图15中AEC显红色阳性信号, Ab1-Ab6为6种不同抗体染色, NC为同批次另张阴性对照组织切片染色 (放大倍数均为200×)。注: Ab1: HIF-2 α 抗体, Ab2: LT-IgG-1 (人肺癌组织来源IgG抗体1), Ab3: OS-IgG-2 (人宫颈癌组织来源IgG抗体2), Ab4: IgG抗体; Ab5: CT-IgG-1 (人结肠癌组织来源IgG抗体1), Ab6: MTC02抗体。

[0113] 三、组织芯片上TUNEL (细胞凋亡) 的原位杂交实验。

[0114] 1、将组织芯片置于预热至60℃~80℃双蒸水中, 待甘油明胶完全溶解, 盖玻片自然脱落。

[0115] 2、置组织芯片于80%乙醇中浸泡, 然后显微镜下检查, 待红色阳性信号完全褪色; 1×PBS洗3遍, 共15分钟。

[0116] 3、组织芯片置于预热20分钟的表位抗原修复蒸锅, 持续25分钟, 自然冷却至室温 (约20分钟); 1×PBS洗3遍, 共15分钟。

[0117] 4、内源性过氧化氢酶封闭: 组织芯片置于3% H_2O_2 20分钟; 1×PBS洗3遍, 共15分钟。

[0118] 5、根据TUNEL (细胞凋亡) 的试剂盒 (南京凯基) 说明书配制TdT酶反应液: 45 μ L Equilibration buffer加入1 μ L Biotin-11-dUTP和4 μ L TdT Enzyme; 根据组织芯片组织切片大小滴加TdT酶反应液产生连接反应, 湿盒中37℃避光60分钟; 1×PBS洗3遍, 共15分钟;

(Biotin-11-dUTP在TdT酶的催化下与断裂DNA片段的3' OH结合)

6、根据TUNEL(细胞凋亡)的试剂盒(南京凯基)说明书配制Streptavidin-HRP反应液: 49.5μL 1×PBS加入0.5μL Streptavidin-HRP 湿盒中37℃避光反应30分钟;1×PBS洗3遍, 共15分钟。

[0119] 7、显色液按TUNEL(细胞凋亡)的试剂盒(南京凯基)说明书配制DAB新鲜混合试剂, 加到组织芯片上,室温显色反应0.5-5分钟;1×PBS洗3遍,共15分钟。

[0120] 8、组织芯片置于苏木素液中,室温5-8秒,自来水洗5-10分钟终止显色。

[0121] 9、用甘油明胶封片。

[0122] 10、显微镜下观察,在组织芯片上运用Leica LAS V4.2软件选采组织切片中阳性区域照相,或用全自动数字切片扫描系统对组织芯片进行高通量扫描照相分析。

[0123] 部分实验结果如图17所示,图17示出了在同一组织芯片上进行1次RNA原位杂交、6次免疫组化重染后,再进行TUNEL(细胞凋亡)的原位杂交染色的部分结果。其中,NBT-BCIP显棕色阳性信号,TUNEL(细胞凋亡)的组A图(放大倍数400×)为a图(放大倍数100×)框中的放大区域,PC与NC为同批另张阳性对照与阴性对照的组织切片染色结果(放大倍数400×)。

[0124] 如图13-17所示,本发明成功的对同一组织芯片进行了mRNA原位杂交实验、单色多重免疫组化染色实验和DNA原位杂交实验。

[0125] 其中,在步骤二、三中的内源性过氧化氢酶封闭步骤可不用每一次都进行,只要之前进行过一次内源性过氧化氢酶封闭步骤,后续的免疫组化染色或DNA原位杂交实验中,均可不在进行此步骤。在步骤二、三中重复进行内源性过氧化氢酶封闭步骤,可有效保证每一次染色实验的背景值处于较低的水平。

[0126] 另外,上述具体实施例中的二抗、显色剂和脱色剂,以及相关的实验步骤,均可能根据需要进行调整。

[0127] 以上所述仅为本发明的较佳实施例而已,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、等同替换和改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

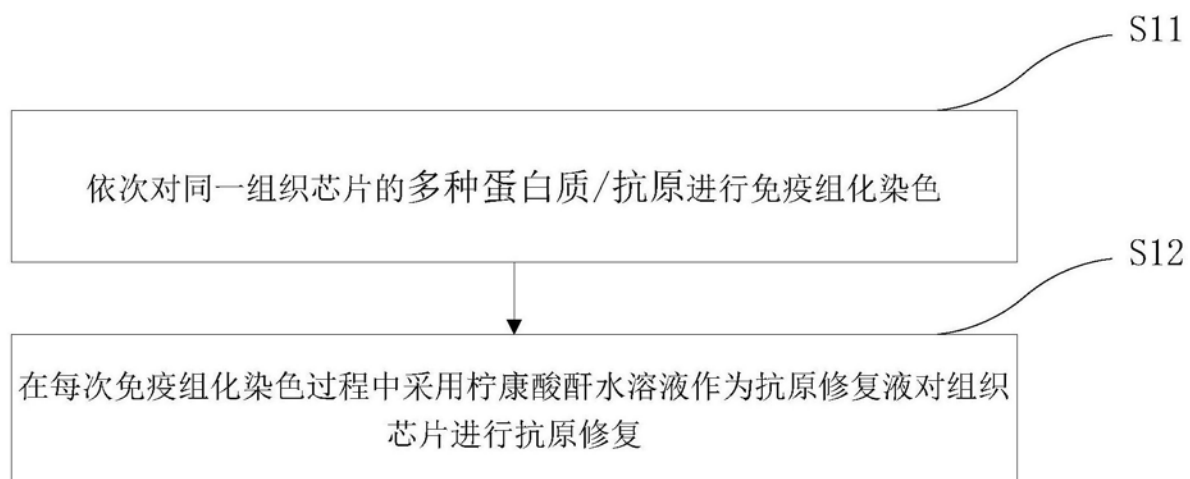


图1

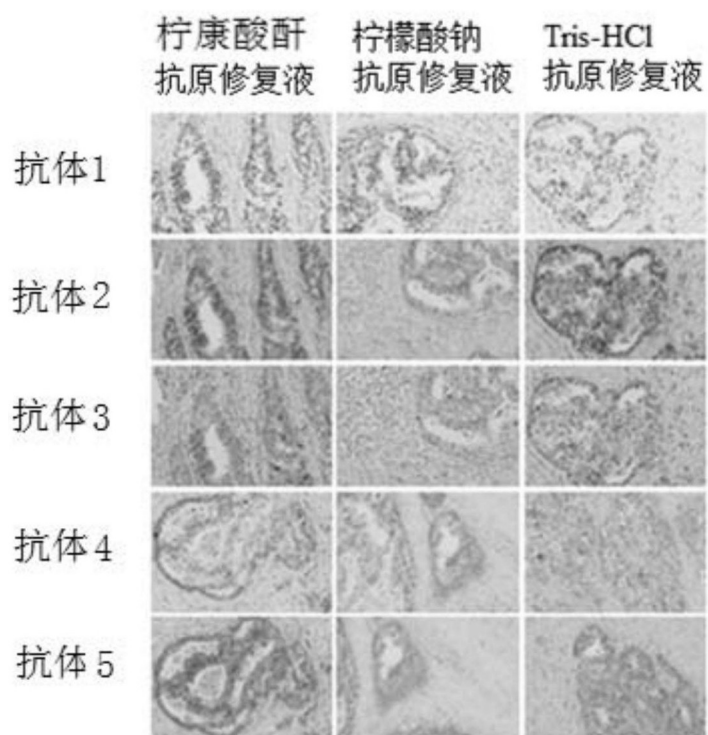


图2

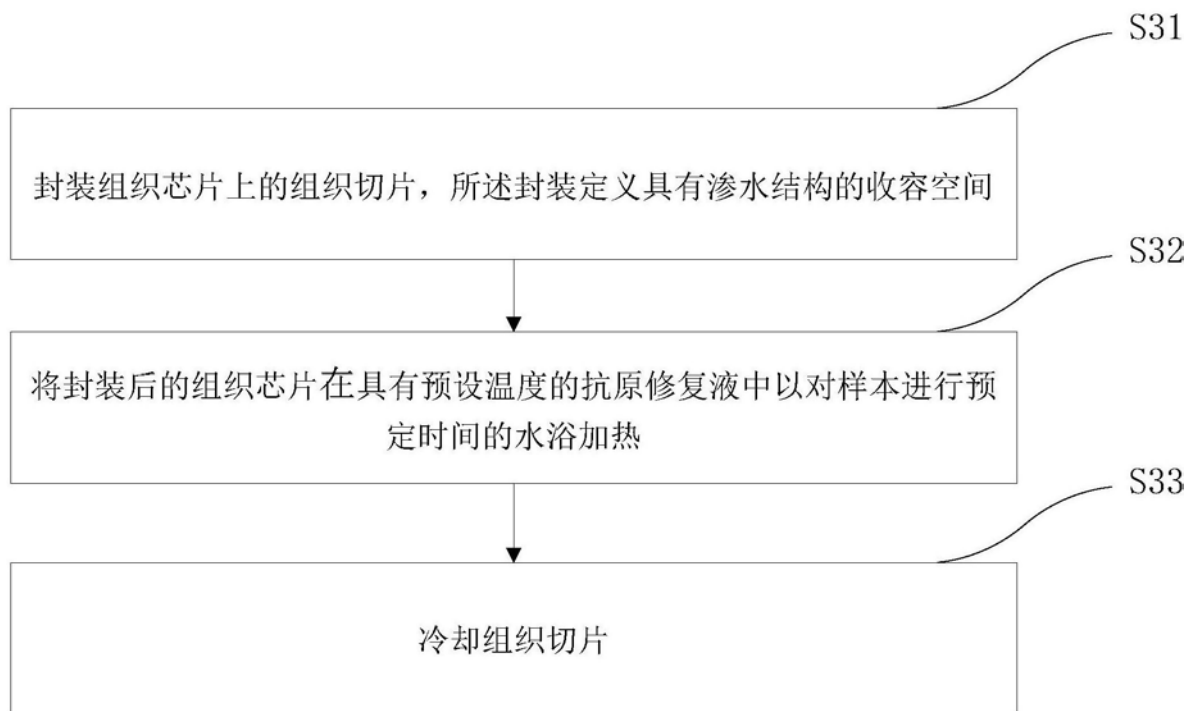


图3

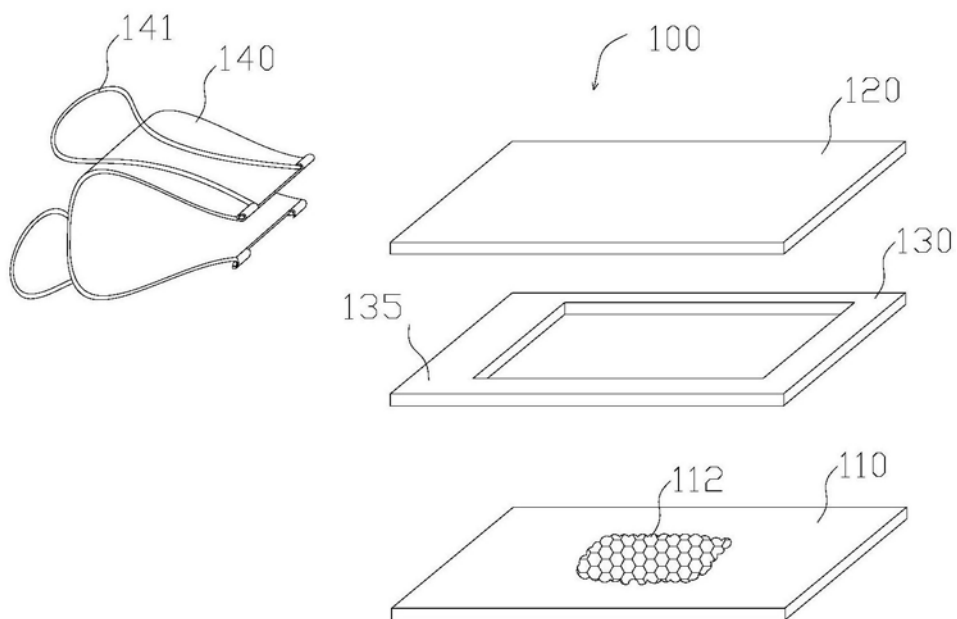


图4

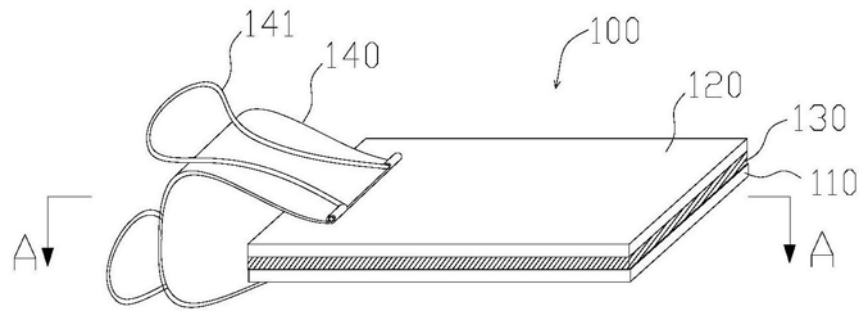


图5

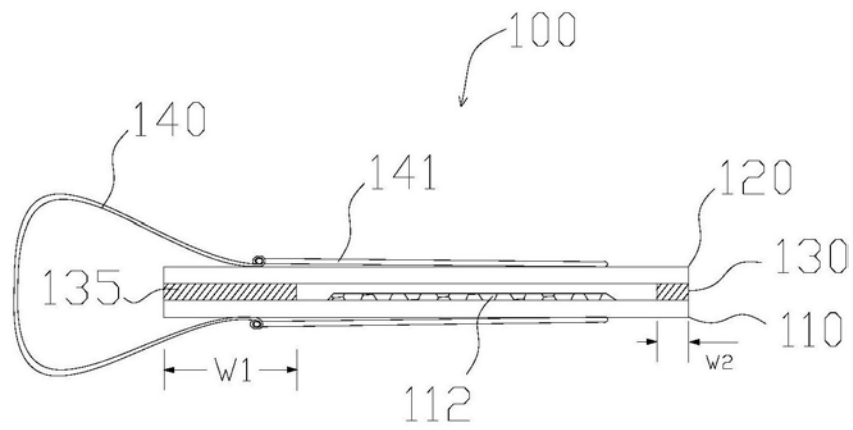


图6

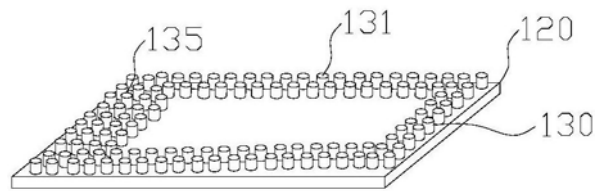


图7

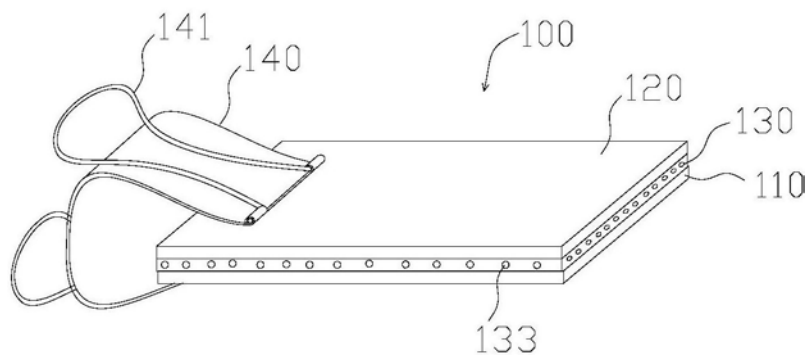


图8

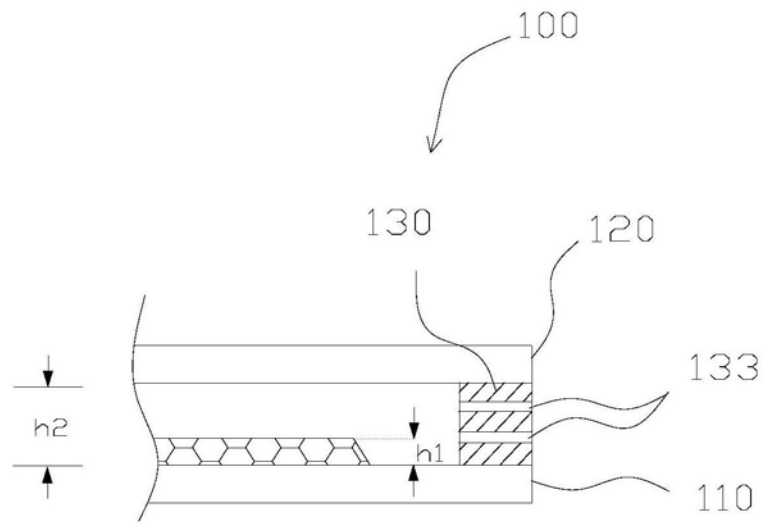


图9

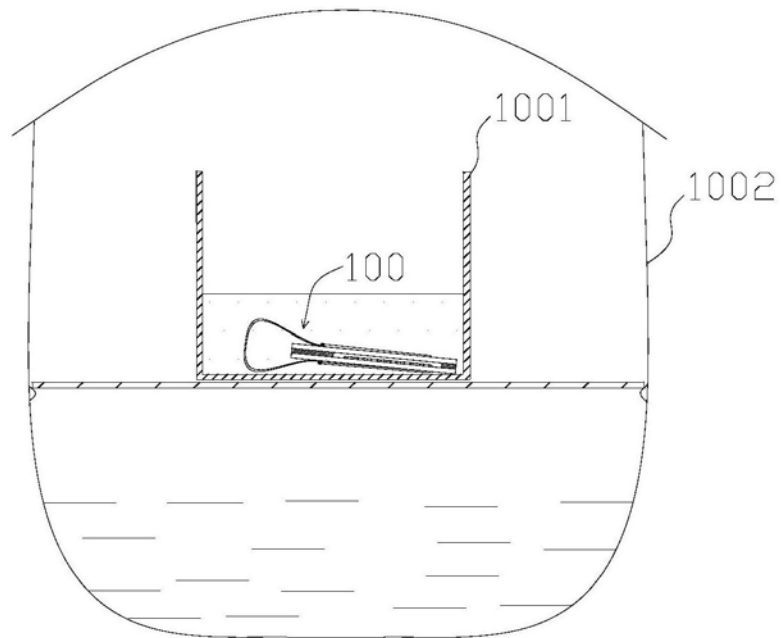


图10

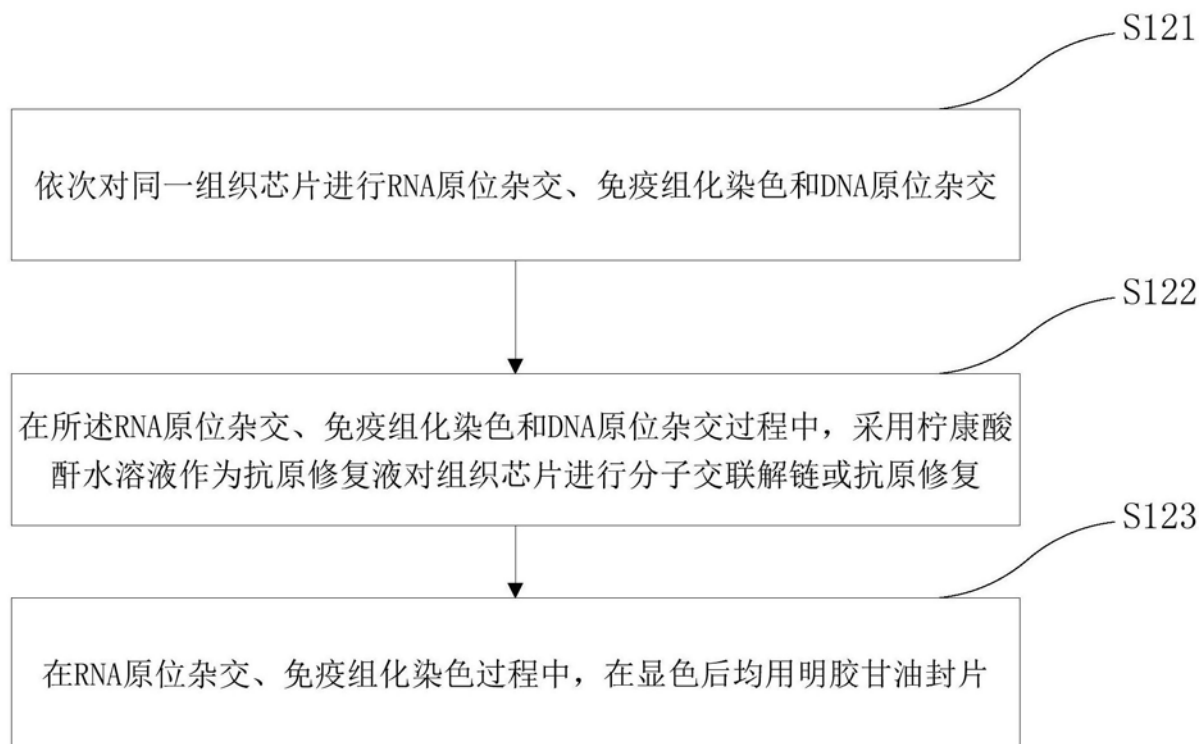


图11

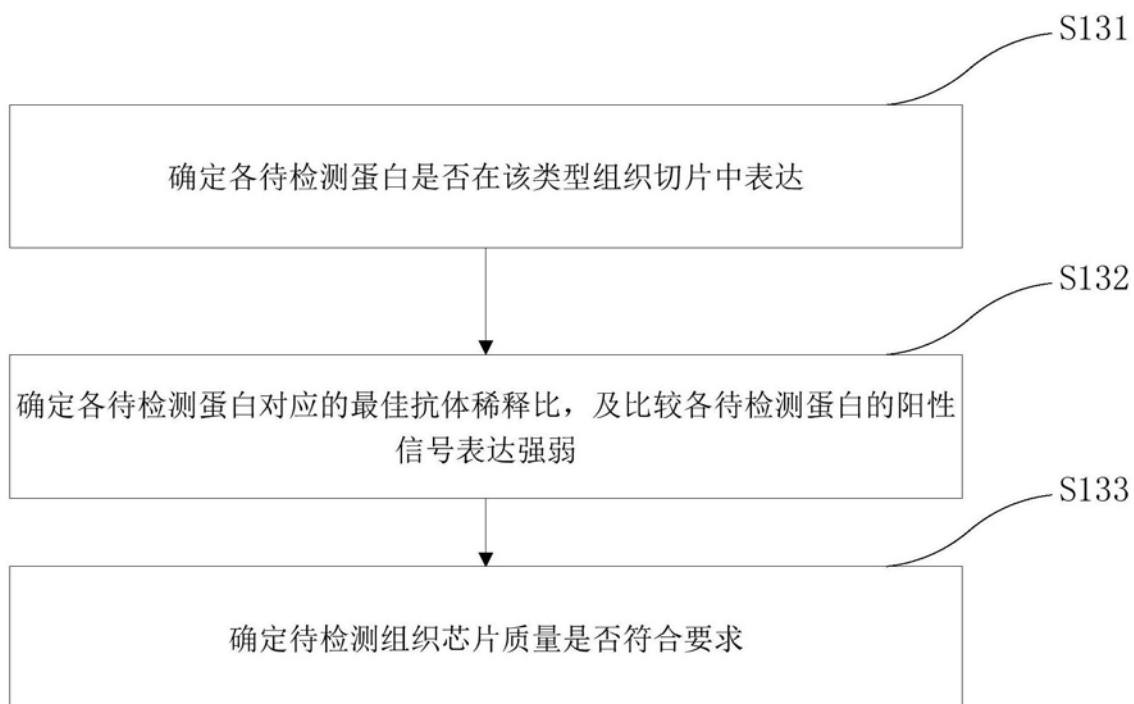


图12

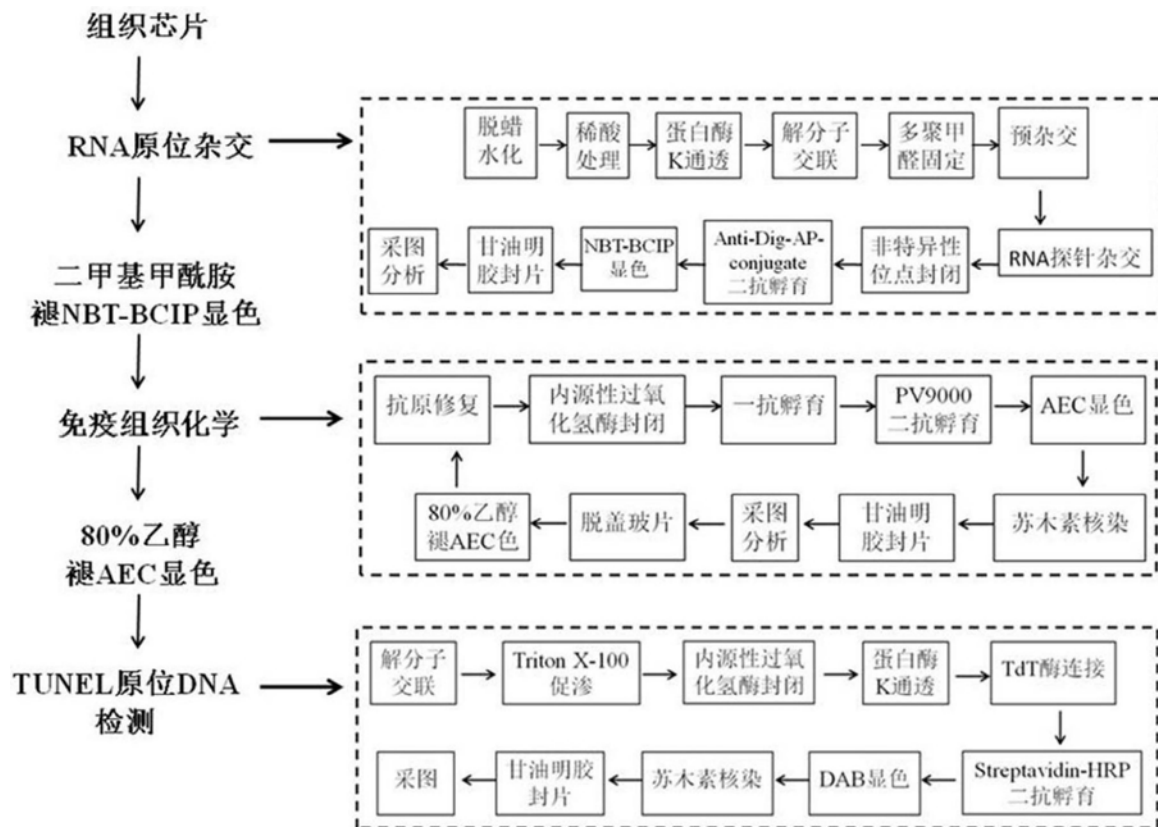


图13

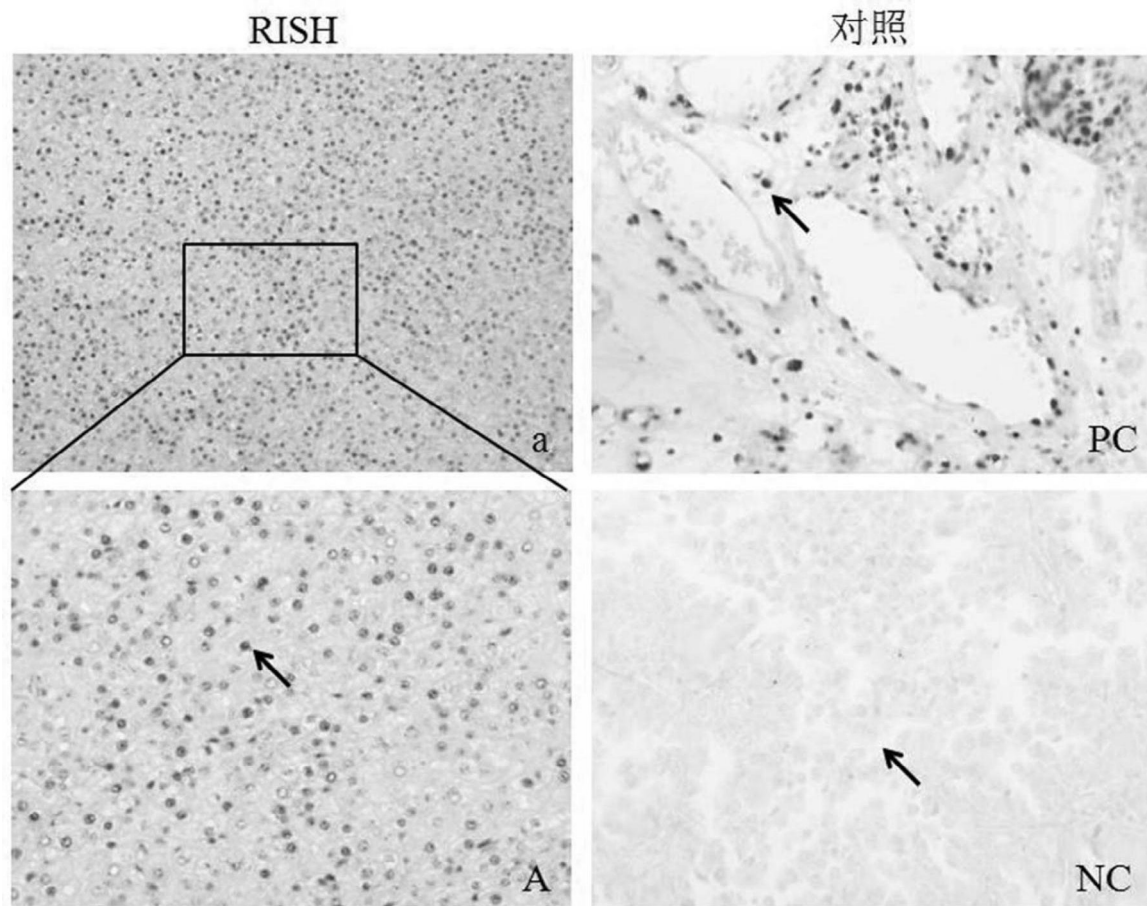


图14

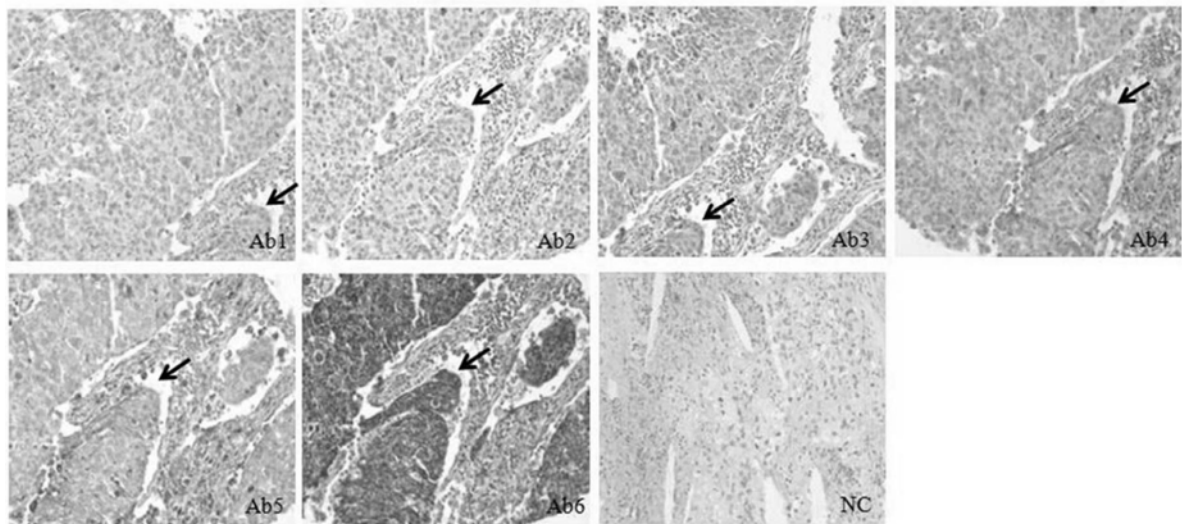


图15

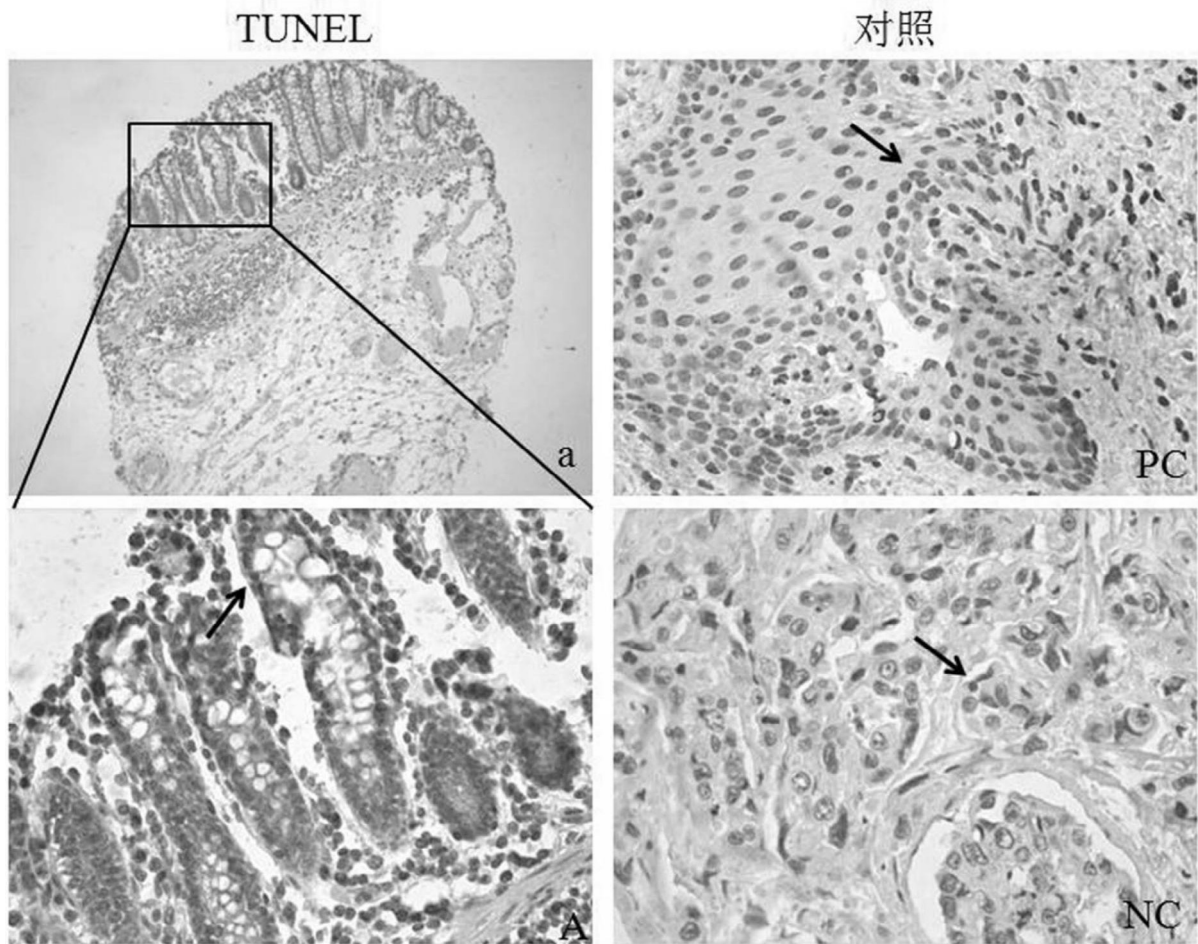


图16

专利名称(译)	组织芯片的多重染色方法		
公开(公告)号	CN108956241A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN2017110424207.5	申请日	2017-06-07
[标]申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳华因康基因科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳华因康基因科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	深圳大学 深圳华因康基因科技有限公司		
[标]发明人	王筠 盛司潼 李延鹏 钟珊 谭辉彪 朱民		
发明人	王筠 盛司潼 李延鹏 钟珊 谭辉彪 朱民		
IPC分类号	G01N1/30 G01N1/31 G01N33/535		
CPC分类号	G01N1/30 G01N1/31 G01N33/535		
优先权	201710382849.3 2017-05-26 CN		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种组织芯片的多重染色方法，其包括依次对同一组织芯片的多种蛋白质/抗原进行免疫组化染色，其特征在于，在每次免疫组化染色过程中使用柠檬酸酐水溶液作为抗原修复液对组织芯片进行抗原修复，在每次染色过程中和显色后均用明胶甘油封片。本发明的组织芯片多重染色方法由于使用柠檬酸酐水溶液在进行多次抗原修复时染色效果较好，且对组织切片的损伤程度也优于商品化的抗原修复液。

