



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102072959 A

(43) 申请公布日 2011. 05. 25

(21) 申请号 201010546038. 0

(22) 申请日 2010. 11. 16

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

(72) 发明人 彭春伟 李雁 庞代文 朱小波

(74) 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所 42001

代理人 王敏锋

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

### (54) 发明名称

一种同时标记肿瘤 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法

### (57) 摘要

本发明公开了一种同时标记肿瘤 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法,其步骤:1、组织切片,固定于经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上;2、将组织切片放入二甲苯中脱蜡;3、抗原修复;4、洗涤切片;5、封闭;6、加一抗;7、洗涤切片;8 封闭,同步骤 4;9、用二抗为量子点 QDs525 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 的抗原结合片段  $F(ab')_2$ -QDs525、量子点 QDs585 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 的抗原结合片段  $F(ab')_2$ -QDs585、量子点 QDs655 标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G 的抗原结合片段  $F(ab')_2$ -QDs655,去除封闭液后,滴加混合物;10、洗涤切片;11、封片,用甘油和 TBS10ml 配成缓冲甘油,缓冲甘油封片后保存。本发明用于肿瘤组织微环境多种成分的高效、准确、快速、同时检测。

1. 一种同时标记肿瘤 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法,其步骤是:

A、福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织 4  $\mu$ m 厚切片,固定于经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上;

B、组织切片的准备,将组织切片放入二甲苯中脱蜡三次,每次 4-6 分钟,脱蜡后将组织切片依次放入无水乙醇 4-6 分钟、95% 体积比酒精 1-3 分钟、95% 体积比酒精 1-3 分钟和 80% 体积比酒精 1-3 分钟,流水冲洗 3~5 分钟;

C、抗原修复,用柠檬酸三钠 29.41g,双蒸水 1000ml 配制柠檬酸三钠缓冲液,柠檬酸 10.5g,双蒸水 500 ml 配制柠檬酸缓冲液,分别取柠檬酸三钠缓冲液 20.25ml、柠檬酸缓冲液 4.75ml 和 225ml 双蒸水配制成柠檬酸抗原修复液:0.01mol, pH 6.0, 250ml,将组织切片置于加入了 250ml 抗原修复液的抗原修复盒中微波修复,低火修复 4-6 分钟后转至中火修复 9-11 分钟,然后室温放置待玻片自然冷却;

D、自来水冲洗后取出切片,洗涤切片,用三羟基氨基甲烷 6.05g 和氯化钠 38.0g 及双蒸水 5000ml,配制 0.01M/L、pH7.2-7.4 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水作为洗涤液,洗涤 3 次,每次 3 分钟;

E、封闭,封闭液位含有 2%wt/vol 牛血清白蛋白的 TBS,封闭条件为:湿盒孵育,37°C, 30min;

F、加一抗,去除上述封闭液后,滴加鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体、兔抗人 IV 型胶原多克隆抗体、山羊抗人 CD105 多克隆抗体的一抗混合物,37°C 湿盒内孵育 3~4h 或 4°C 冰箱过夜;

G、洗涤切片,清洗液为含 0.5%/vol/vol 吐温 #20 的 TBS,洗涤 3 次,每次 3min;

H、封闭,同步骤(D);

I、用二抗为量子点 QDs525 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G 的抗原结合片段量子点 QDs525、量子点 QDs585 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G 的抗原结合片段量子点 QDs585、量子点 QDs655 标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G 的抗原结合片段 F(ab')<sub>2</sub>-QDs655,去除上述封闭液后,滴加量子点 QDs525、量子点 QDs585 和量子点 QDs655 混合物,稀释液为含 2%wt/vol 牛血清白蛋白的 TBS,湿盒孵育,37°C, 2~3h;

J、洗涤切片,清洗液与步骤(G)所用清洗液相同,TBS 按步骤(D)的配方制备,洗涤 2 次,每次 2min,再用 TBS 洗涤一次,3min;

K、封片,用甘油 90ml 和 TBS10ml 配成 90% 体积比缓冲甘油,缓冲甘油封片后 4°C 保存,在荧光显微镜下用紫外光 330~385nm 激发观察到显示绿色荧光的巨噬细胞、显示橙黄色荧光的 IV 型胶原和显示红色荧光的肿瘤新生血管。

## 一种同时标记肿瘤 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于组织免疫荧光技术领域,更具体涉及一种检测肿瘤间质 IV 型胶原、巨噬细胞和肿瘤新生血管的量子点三色荧光标记方法,适用于人肿瘤组织微环境成分变化的准确、定量检测。

### 背景技术

[0002] 肿瘤的发生、发展不仅涉及肿瘤细胞本身,而且还与肿瘤细胞周围的微环境有密切关系。恶性肿瘤(肿瘤)微环境由肿瘤细胞及其周围纤维母细胞、上皮细胞、固有及特异性免疫细胞、肿瘤血管、间叶细胞及其表达产物、代谢产物。肿瘤微环境内成分众多,因缺乏有效地技术,当前对肿瘤微环境的研究仍然以单一成分为主,无法同时显示肿瘤微环境内的多种改变,如肿瘤间质的重塑、巨噬细胞浸润和肿瘤血管发生。

[0003] 肿瘤微环境成分众多且相互作用的特性提示研究肿瘤微环境必须有良好的标记技术能同时研究多种成分。石蜡切片免疫组织化学染色在一定程度上标记特定分子,在肿瘤病理研究中有重要意义。但该方法染色背景高、特异性差,而且传统的酶-底物显色系统依赖于色原的沉积,在组织上非常近似,难以同时观察一张切片同一部位两种抗原的共表达定位。这种局限性使其无法满足肿瘤多成分标记的需要。虽然免疫荧光标记抗原也是研究肿瘤的常用方法,且比酶-底物显示系统更有优势,但异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate, FITC)、罗丹明(rhodamine)等普通有机荧光基团敏感度低,发生光谱宽而重叠,抗光漂白能力差,且与组织的高自发荧光难以区分。此外,在传统的免疫荧光双标染色法中,有机染料必须在不同波长下激发,然后利用图像处理软件进行图像叠加,才能获得合成的最后的荧光双标染色结果。因此,普通有机荧光染料也不能满足多重染色的需要。

[0004] 量子点是直径  $2\sim 10\text{nm}$  的近球形纳米颗粒,半径小于或接近于激子玻尔半径的新型半导体纳米晶粒,与传统有机荧光染料、荧光蛋白和稀土元素螯合物相比,量子点有诸多优势,激发光谱宽、连续,紫外光可以激发任何大小的量子点,发射光谱窄而对称;光稳定性好。这些特性使量子点在生物成像领域具有独特的优势,在肿瘤研究中具有广阔的应用前景。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供了一种同时标记肿瘤间质 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法,本发明中提供的量子点多重染色方法可用于肿瘤组织微环境多种成分的高效、准确、快速、同时检测,该方法可推广用于一种操作步骤简单、快速、灵敏、高效、经济实用的通用肿瘤微环境分子病理学检测技术。

[0006] 一种同时标记肿瘤间质 IV 型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法,其步骤是:

A、福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织  $4\mu\text{m}$  厚切片,固定于经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上。

[0007] B、组织切片的准备,将组织切片放入二甲苯中脱蜡三次(不同的器皿中),每次

4-6 分钟,脱蜡后将组织切片依次放入无水乙醇 4-6 分钟、95% (体积比,以下相同)酒精 1-3 分钟、95% 酒精 1-3 分钟和 80% 酒精 1-3 分钟,流水冲洗 3~5 分钟。

[0008] C、抗原修复,用柠檬酸三钠 29.41g,双蒸水 1000ml 配制柠檬酸三钠缓冲液,柠檬酸 10.5g,双蒸水 500 ml 配制柠檬酸缓冲液,分别取柠檬酸三钠缓冲液 20.25ml、柠檬酸缓冲液 4.75ml 和 225ml 双蒸水配制成柠檬酸抗原修复液(0.01mol, pH 6.0, 250ml)。将组织切片置于加入了 250ml 抗原修复液的抗原修复盒中微波修复,即低火(微波功率:136W)修复 4-6 分钟后转至中火(微波功率:440W)修复 9-11 分钟,然后室温(20~25℃以下相同)放置待玻片自然冷却至 36-38℃。

[0009] D、自来水冲洗后取出切片,洗涤切片,用三羟基氨基甲烷(tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris)6.05g 和氯化钠 38.0g 及双蒸水 5000ml,配制 0.01M/L、pH7.2-7.4 的三羟甲基氨基甲烷缓冲盐水(tris buffered saline, TBS)作为洗涤液,洗涤 3 次,每次 3 分钟;

E、封闭,封闭液位含有 2%wt/vol 牛血清白蛋白的 TBS,封闭条件为:湿盒孵育,37℃, 30min;

F、加一抗,去除上述封闭液后,滴加鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体、兔抗人 IV 型胶原多克隆抗体、山羊抗人 CD105 多克隆抗体的一抗混合物,37℃湿盒内孵育 3~4h 或 4℃冰箱过夜(不少于 12h);所述的一抗为对应的免疫球蛋白 G (Ig G) 抗原结合片段。

[0010] G、洗涤切片,清洗液为(含 0.5%/vol/vol 吐温 #20 的 TBS(TBST)),洗涤 3 次,每次 3min;

H、封闭,同步骤 4;

I、本实验中所用二抗为量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs525 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs525、量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs585 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs585、量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs655 标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)(F(ab')<sub>2</sub>-QDs655), (F(ab')<sub>2</sub>-QDs525)、(F(ab')<sub>2</sub>-QDs585)和(F(ab')<sub>2</sub>-QDs655)均购自美国 Invitrogen 公司。去除上述封闭液后,滴加 F(ab')<sub>2</sub>-QDs525、F(ab')<sub>2</sub>-QDs585 和 F(ab')<sub>2</sub>-QDs655 混合物,稀释液为含 2%wt/vol 牛血清白蛋白的 TBS,湿盒孵育,37℃, 2~3h。所述的二抗为量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs525 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs525、量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs585 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs585、量子点(F(ab')<sub>2</sub>-)QDs655 标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G (IgG)的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段)(F(ab')<sub>2</sub>-QDs655)。

[0011] J、洗涤切片,清洗液与上述步骤 7 所用清洗液相同,TBS 按上述步骤 4 的配方制备,洗涤 2 次,每次 2min,再用 TBS 洗涤一次,3min。

[0012] K、封片,用甘油 90ml 和 TBS10ml 配成 90%(体积比)缓冲甘油,缓冲甘油封片后 4℃保存。在荧光显微镜下用紫外光(330~385nm)激发即可观察到显示绿色荧光的巨噬细胞、显示橙黄色荧光的 IV 型胶原和显示红色荧光的肿瘤新生血管。

[0013] 为了检测此技术能否进行量化分析,做了以下实验:

按照上述的步骤,通过荧光显微镜,在紫外光(波长 330~385nm)激发下,得到了 IV 型胶原、巨噬细胞和肿瘤新生血管的三色标记成像(图 5A),组织结构和抗原分布部位清晰、易于分布。采用 CRi Nuance 多光谱成像系统(Cabridge Research & Instrumentation, Inc, Woburn, MA, USA)采集光谱信号(图 5B),既能得到更清楚地三色图像(图 5C),也能对不同的荧光信号定量(图 5D-E)。巨噬细胞既可以直接记数,在图 5 中有 13 个巨噬细胞。IV 型胶原可观察其分布趋势,并根据荧光强度定量,在图 5 中将其划分为 186 个连续的区域定量计算其表达量。肿瘤新生血管也可以直接计数,在图 5 中有 14 个新生血管。

[0014] 本发明中提供的量子点多重染色方法可用于肿瘤组织微环境多种成分的高效、准确、快速、同时检测,该方法可推广用于一种操作步骤简单、快速、灵敏、高效、经济实用的通用肿瘤微环境分子病理学检测技术。

[0015] 本发明与现有技术相比具有以下优点和效果:

1. 检测特异性强,背景清晰,便于组织形态学分析(图 1)。

[0016] 2. 方法简便、快速,易于标准化及大量检测,重复性较好。从切片脱蜡至观察结果,实验全程约 7~8h,可同时有多张组织切片进行染色。

[0017] 3. 要观察肿瘤微环境内的多种成分,采用传统的免疫组织化学染色时只能单独染色,无法实现同一切片上的共表达定位(图 4)。本发明有效地解决了次难题,能同时观察到多种成分,综合分析微环境变化。

[0018] 4. 检测灵敏度高、便于量化。量子点荧光亮度强、稳定而持久,可采用光谱分析量化结果(图 5)。

[0019] 5. 无需后期图片合成等复杂分析步骤,封片后即能直接观察。

[0020] 6. 荧光亮度高,持续时间长,结果容易保存及反复观察。

## 附图说明

[0021] 图 1 为一种量子点单色标记法显示肿瘤微环境内重要成分示意图。

[0022] 图 1 中 A 为用特异性兔抗人 IV 型胶原抗体作为一抗,量子点 QDs585 标记的山羊抗兔 IgG Fab 段( $F(ab')_2$ -QDs585)作为二抗的标记结果,显示肿瘤微环境间质的重塑。

[0023] 图 1 中 B 为用特异性山羊抗人 CD105 抗体作为一抗,量子点 QDs655 标记的兔抗山羊 IgG Fab 段( $F(ab')_2$ -QDs655)作为二抗的标记结果,显示肿瘤新生血管。

[0024] 图 1 中 C 为用鼠抗人巨噬细胞作为一抗,量子点 QDs525 标记的山羊抗鼠 IgG Fab 段( $F(ab')_2$ -QDs525)作为二抗的标记结果,显示浸润巨噬细胞。

[0025] 图 1 中 D 为用 TBS 作为一抗,量子点 QDs655 标记的兔抗山羊 IgG Fab 段( $F(ab')_2$ -QDs655)作为二抗的标记结果,证明基于量子点探针的标记技术特异性强。

[0026] 【放大倍数: 200× (A, B), 400× (C, D); 标尺: 50 μm (A, B), 20 μm (C, D). 量子点图象由紫外光(波长 330~385 nm)激发下,通过 Olympus DP72 成像系统采集图象】

图 2 为一种量子点三色标记同时显示肿瘤微环境内三种成分的结果示意图。

[0027] 图 3 为一种量子点三色标记同时显示肿瘤微环境内三种成分的结果示意图。

[0028] 实验中采用鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体、兔抗人 IV 型胶原多克隆抗体、山羊抗

人 CD105 多克隆抗体的混合物为一抗,  $F(ab')_2$ -QDs525、 $F(ab')_2$ -QDs585 和  $F(ab')_2$ -QDs655 的混合物为二抗。图 2 显示, 两个癌巢之间有丰富的新生血管和浸润巨噬细胞, 而间质的重要成分 IV 型胶原则被降解, 发生间质重塑。图 3 显示, 随着肿瘤细胞的扩增, 间质屏障逐渐消失, 在此过程中可见巨噬细胞在癌巢周边聚集, 癌巢周边新生血管丰富。

**[0029] 【放大倍数: 400× (图 2, 图 3); 标尺: 20 μm (图 2, 图 3)。在紫外光(波长 330~385 nm) 激发下, 通过 Olympus DP72 成像系统采集图象】**

图 4 为一种传统免疫组织化学染色分别显示肿瘤微环境内三种成分的结果示意图。

**[0030]** 因无法实现在同一切片上对这三张成分同时染色, 因此只能分别染色后再综合分析肿瘤微环境成分的变化。

**[0031]** 图 4 中 A 为用特异性兔抗人 IV 型胶原抗体作为一抗, 生物素化的山羊抗兔 IgG 为二抗, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶为反应剂, 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB) 为显色底物的记结果, 显示肿瘤微环境间质成分。

**[0032]** 图 4 中 B 为用特异性山羊抗人 CD105 抗体作为一抗, 生物素化的兔抗山羊 IgG 为二抗, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶为反应剂, 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB) 为显色底物的记结果, 显示肿瘤新生血管。

**[0033]** 图 4 中 C 为用鼠抗人巨噬细胞作为一抗, 生物素化的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶为反应剂, 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB) 为显色底物的记结果, 显示浸润巨噬细胞。

**[0034]** 图 4 中 D 为用 TBS 作为一抗, 生物素化的山羊抗鼠 IgG 为二抗, 链霉素抗生物素蛋白-过氧化物酶为反应剂, 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB) 为显色底物的记结果, 作为对照组。

**[0035] 【放大倍数: 400× (A, B, C, D); 标尺: 20 μm (A, B, C, D)。在紫外光(波长 330~385 nm) 激发下, 通过 Olympus DP72 成像系统采集图象】**

图 5 为一种光谱定量分析三色标记结果的示意图

图 5 中 A 为一种量子点三色标记同时显示肿瘤微环境内三种成分的结果示意图。实验中采用鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体、兔抗人 IV 型胶原多克隆抗体、山羊抗人 CD105 多克隆抗体的混合物为一抗,  $F(ab')_2$ -QDs525、 $F(ab')_2$ -QDs585 和  $F(ab')_2$ -QDs655 的混合物为二抗。

**[0036]** 图 5 中 B 为采用光谱定量分析时所分离的  $F(ab')_2$ -QDs525、 $F(ab')_2$ -QDs585 和  $F(ab')_2$ -QDs655 光谱信号。

**[0037]** 图 5 中 C 为根据 B 所分离的信号重新赋色后的合成图片。

**[0038]** 图 5 中 D 为对分离出的  $F(ab')_2$ -QDs525 信号进行定量检测的结果示意图。

**[0039]** 图 5 中 E 为对分离出的  $F(ab')_2$ -QDs585 信号进行定量检测的结果示意图。

**[0040]** 图 5 中 F 为对分离出的  $F(ab')_2$ -QDs655 信号进行定量检测的结果示意图。

**[0041] 【放大倍数: 400× (A, B, C, D), 在紫外光(波长 330~385 nm) 激发下, 通过 Olympus DP72 成像系统及 CRi Nuance 多光谱成像系统采集图象。】**

## 具体实施方式

实施例 1:

一种同时标记肿瘤间质 IV 型胶原、巨噬细胞和生血管的方法,其步骤是:

1. 福尔马林固定石蜡包埋的胃癌组织 4  $\mu$ m 厚切片,固定于经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上。

[0042] 2. 组织切片的准备,将组织切片放入二甲苯中脱蜡三次(不同的器皿中),每次 5 分钟,脱蜡后将组织切片依次放入无水乙醇 5 分钟、95% 酒精 2 分钟、95% 酒精 2 分钟和 80% 酒精 2 分钟,流水冲洗 3~5 分钟。

[0043] 3. 抗原修复,用柠檬酸三钠 29.41g(国药集团化学试剂有限公司),双蒸水 1000ml 配制柠檬酸三钠缓冲液,柠檬酸 10.5g(国药集团化学试剂有限公司),双蒸水 500 ml 配制柠檬酸缓冲液,分别取柠檬酸三钠缓冲液 20.25ml、柠檬酸缓冲液 4.75ml 和 225ml 双蒸水配制成柠檬酸抗原修复液(0.01mol, pH 6.0, 250ml)。将组织切片置于加入了 250ml 抗原修复液的抗原修复盒(北京中杉金桥生物技术有限公司)中微波(美的微波炉 -MK823ESJ-PA)修复(低火修复 5 分钟后转至中火修复 10 分钟),然后室温放置待玻片自然冷却。

[0044] 4. 洗涤切片,用三羟基氨基甲烷(Tris) 6.05g 和氯化钠 38.0g(均为国药集团化学试剂有限公司)及双蒸水 5000,配制 0.01M/L、pH7.2-7.4 的 TBS 作为洗涤液,洗涤 3 次,每次 3min;

5. 封闭,封闭液位含有 2%wt/vol 牛血清白蛋白(上海如吉科技发展有限公司)的 TBS,封闭条件为:湿盒孵育,37 $^{\circ}$ C (GNP-9080 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司), 30min;

6. 传统的加一抗,去除上述封闭液后,滴加鼠抗人巨噬细胞单克隆抗体(MA1-38069, ABR, USA)、兔抗人 IV 型胶原多克隆抗体(ab-6586, Abcam, England)、山羊抗人 CD105 多克隆抗体(sc-13595, Santa Cruz, USA)的一抗混合物(三种抗体的稀释比分别为 1:200, 1:50 和 1:50, 稀释液为 TBS),湿盒孵育,37 $^{\circ}$ C (GNP-9080 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司) 3~4h 或 4 $^{\circ}$ C 冰箱过夜(不少于 12h);

7. 洗涤切片,清洗液为 TBST(含 0.5%/vol/vol 吐温 #20 的 TBS),洗涤 3 次,每次 3min;

8. 封闭,同步骤 4;

9. 免疫组织化学染色方法染色背景高、特异性差,为解决此问题,本实验采用与一抗种属相对应的免疫球蛋白 G (IgG) 抗原结合片段(Fragment antibody binding, F(ab')<sub>2</sub> 段)作为二抗及显示剂(见后述),减少了 IgG 可结晶片段(Fragment crystallizable, Fc 段)在组织染色过程中的非特异性吸附及交叉反应。本实验中所用二抗为量子点 QDs525 标记的山羊抗鼠免疫球蛋白 G (IgG) 的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段) (F(ab')<sub>2</sub>-QDs525)、量子点 QDs585 标记的山羊抗兔免疫球蛋白 G (IgG) 的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段) (F(ab')<sub>2</sub>-QDs585)、量子点 QDs655 标记的兔抗山羊免疫球蛋白 G (IgG) 的抗原结合片段(Fragment antigen-binding, Fab 段) (F(ab')<sub>2</sub>-QDs655),均购自 Invitrogen 公司。去除上述封闭液后,滴加 F(ab')<sub>2</sub>-QDs525、F(ab')<sub>2</sub>-QDs585 和 F(ab')<sub>2</sub>-QDs655 混合物(三种二抗稀释比均为 1:100, 稀释液为含 2%wt/vol 牛血清白蛋白的 TBS),湿盒孵育,37 $^{\circ}$ C (GNP-9080 型隔水式恒温培养箱,上海精宏实验设备有限公司), 2~3h。

[0045] 10. 洗涤切片, TBST 洗涤 2 次,每次 2min,再用 TBS 洗涤一次, 3min。

[0046] 11. 封片,用甘油 90ml 和 TBS10ml 配成 90% 缓冲甘油,缓冲甘油封片后即可观察

结果。传统的酶-底物显色系统依赖于色原的沉积,在组织上非常近似,难以同时观察一张切片同一部位两种抗原的共表达定位。而在传统的免疫荧光双标染色法中,有机染料必须在不同波长下激发,然后利用图像处理软件进行图像叠加,才能获得合成的最后的荧光双标染色结果。但本技术采用新型纳米荧光材料量子点显色,在荧光显微镜下经紫外光(330~385nm)激发后即可观察到显示绿色荧光的巨噬细胞、显示橙黄色荧光的 IV 型胶原和显示红色荧光的肿瘤新生血管。实现了对多种抗原(IV 型胶原、巨噬细胞、CD105)进行多种颜色(绿色 F(ab')<sub>2</sub>-QDs525、橙黄色 F(ab')<sub>2</sub>-QDs585 和 红色 F(ab')<sub>2</sub>-QDs655)标记,无需图像叠加及处理,实现了实验结果的所见即所得,简化了多色标记结果的获取途径,减少了图像处理引起的偏倚。

[0047] 用量子点进行免疫荧光多重染色,在敏感度高、特异性强的前提下,同时显示肿瘤微环境中多种成分的变化特点,并具有石蜡切片免疫组化染色组织细胞结构清晰、抗原定位准确的特点。通过量子点免疫荧光三标法,同时显示了肿瘤微环境中间质重塑,巨噬细胞浸润、肿瘤血管发生的过程。该方法适用于石蜡包埋的任何肿瘤组织,更重要的是,采用该方法能够简便、快捷、灵敏而准确地对肿瘤微环境进行分析,无需图片合成等后期步骤。

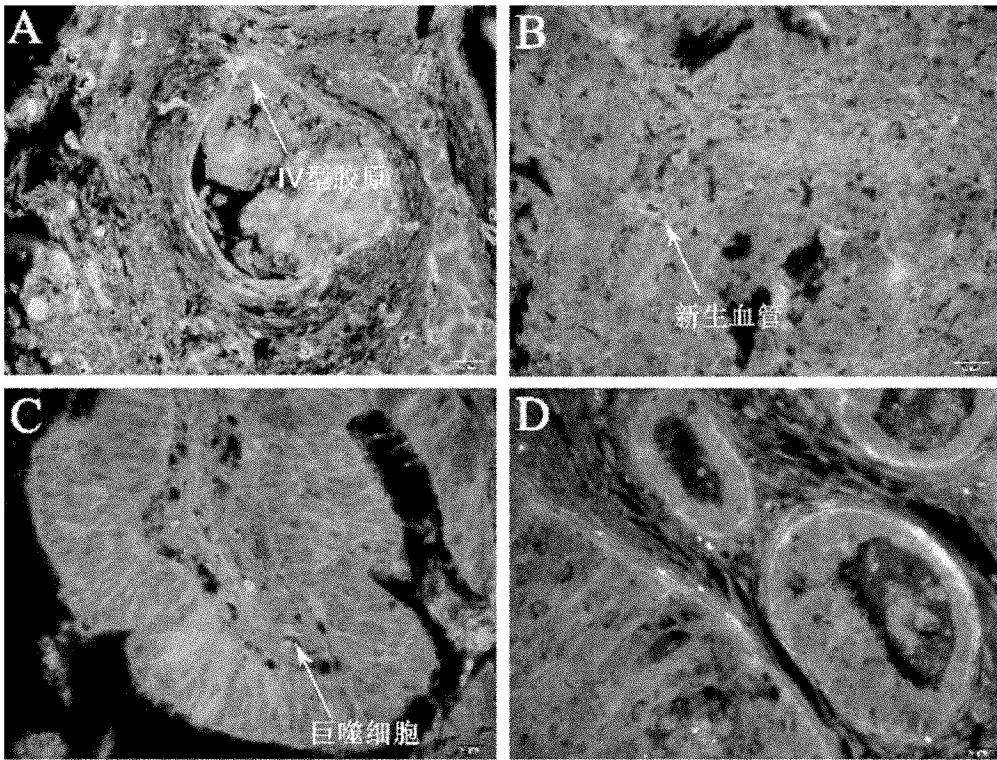


图 1

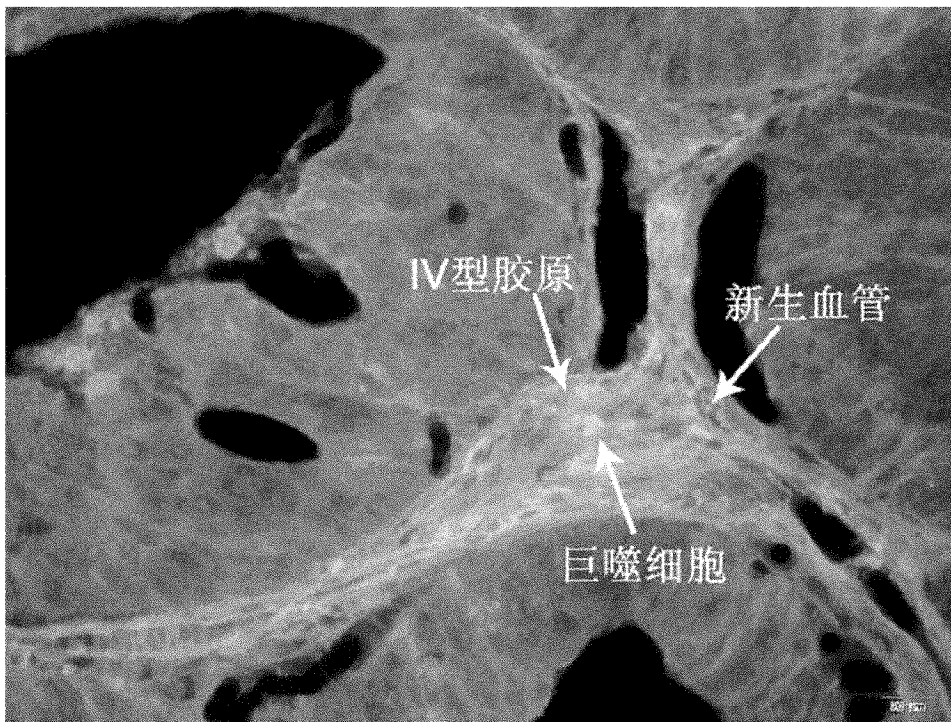


图 2

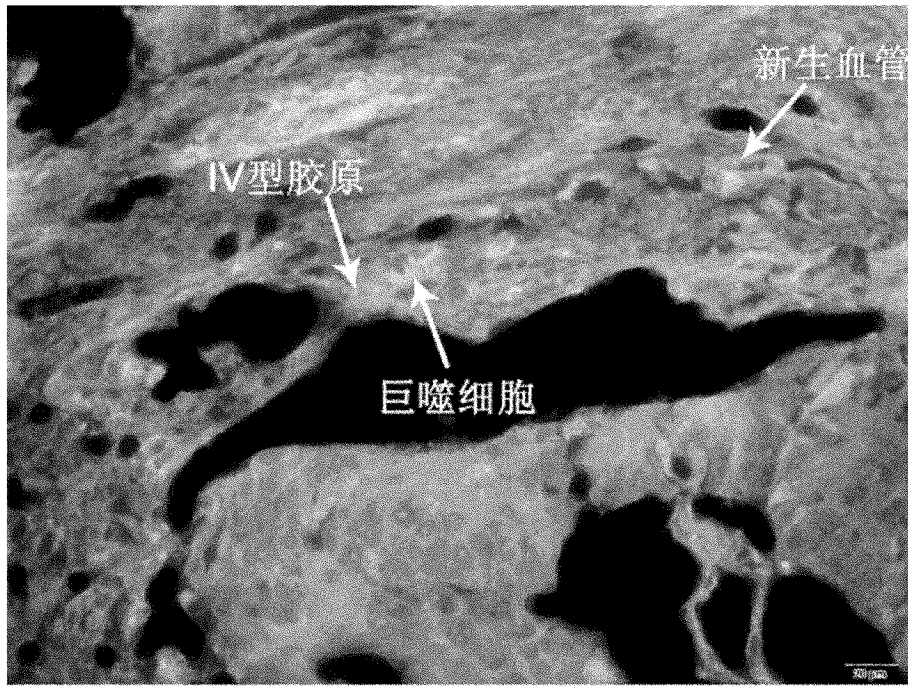


图 3

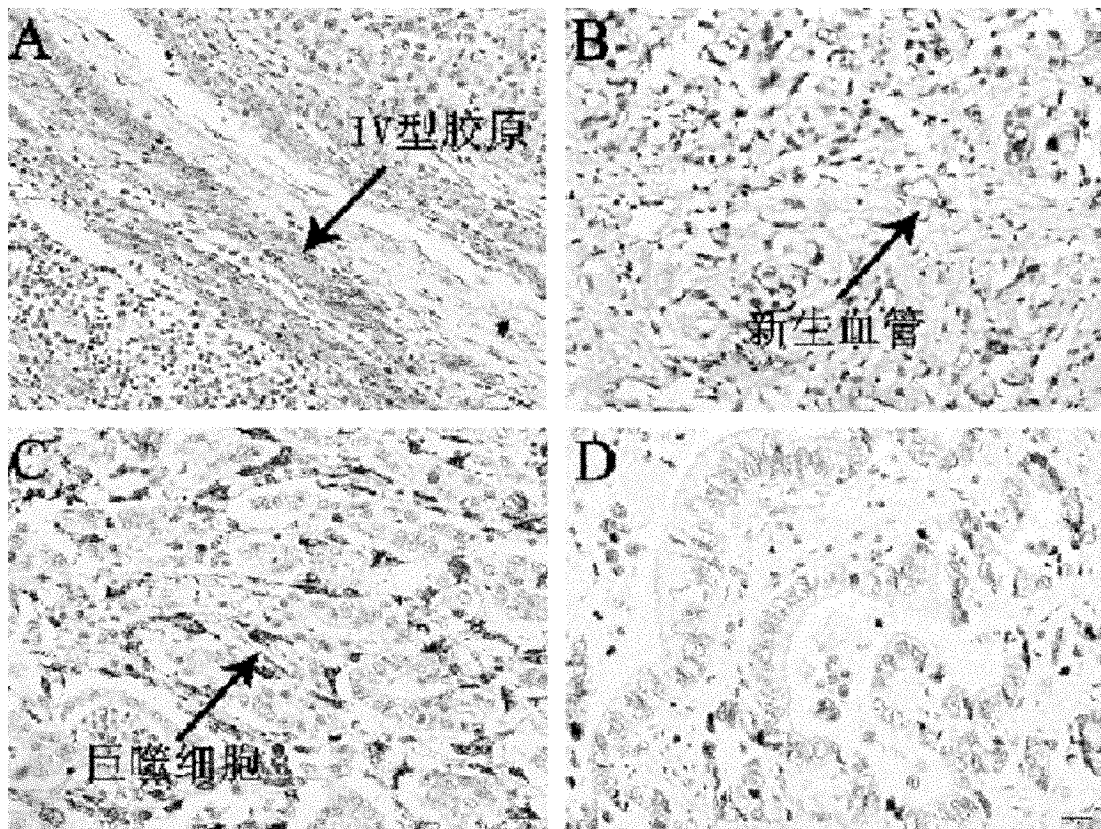


图 4

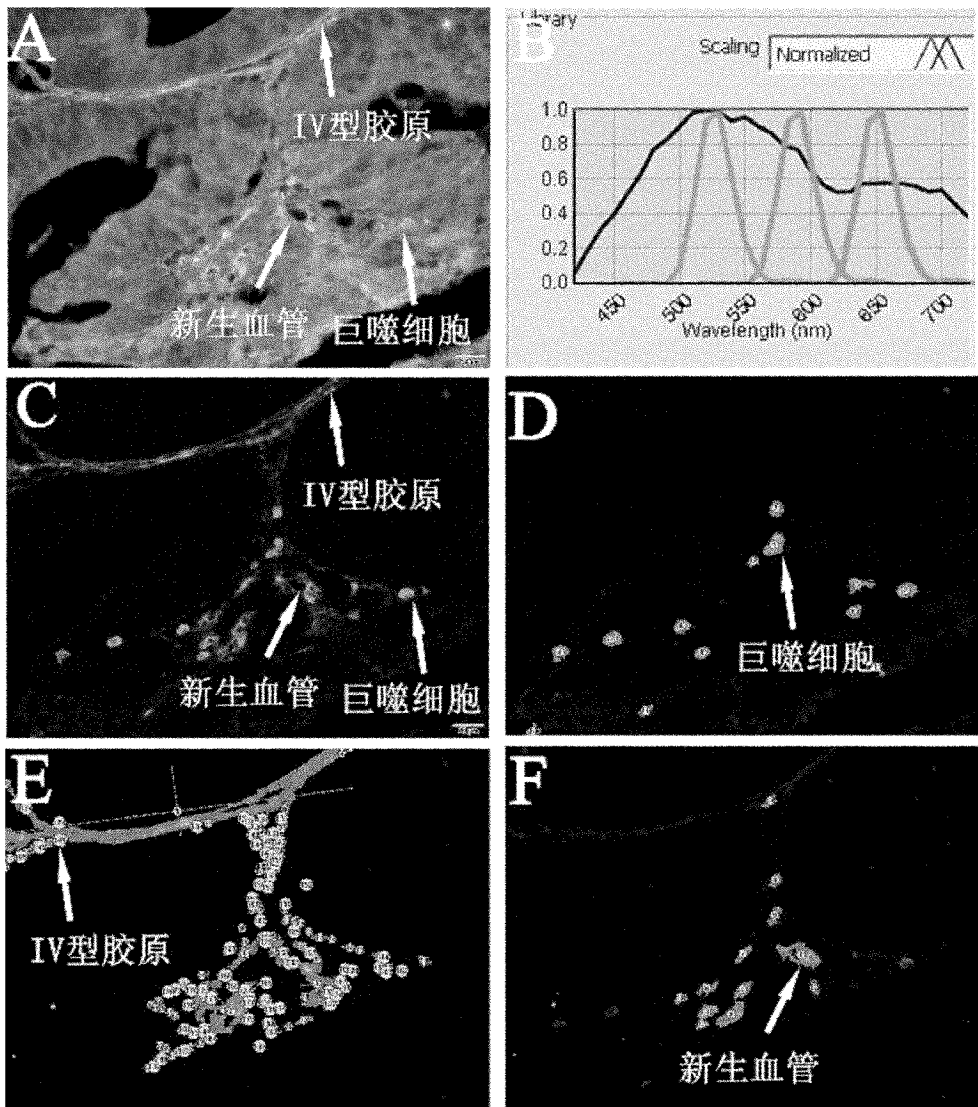


图 5

专利名称(译)	一种同时标记肿瘤IV型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102072959A</a>	公开(公告)日	2011-05-25
申请号	CN201010546038.0	申请日	2010-11-16
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	彭春伟 李雁 庞代文 朱小波		
发明人	彭春伟 李雁 庞代文 朱小波		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	王敏锋		
其他公开文献	CN102072959B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种同时标记肿瘤IV型胶原、巨噬细胞和新生血管的方法，其步骤：1、组织切片，固定于经多聚赖氨酸处理的防脱载玻片上；2、将组织切片放入二甲苯中脱蜡；3、抗原修复；4、洗涤切片；5、封闭；6、加一抗；7、洗涤切片；8封闭，同步骤4；9、用二抗为量子点QDs525标记的山羊抗鼠免疫球蛋白G的抗原结合片段F(ab')<sub>2</sub>-QDs525、量子点QDs585标记的山羊抗兔免疫球蛋白G的抗原结合片段F(ab')<sub>2</sub>-QDs585、量子点QDs655标记的兔抗山羊免疫球蛋白G的抗原结合片段F(ab')<sub>2</sub>-QDs655，去除封闭液后，滴加混合物；10、洗涤切片；11、封片，用甘油和TBS10ml配成缓冲甘油，缓冲甘油封片后保存。本发明用于肿瘤组织微环境多种成分的高效、准确、快速、同时检测。

