



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110687085 A

(43)申请公布日 2020.01.14

(21)申请号 201910935393.8

(22)申请日 2019.09.29

(71)申请人 广东工业大学

地址 510060 广东省广州市越秀区东风东  
路729号大院

(72)发明人 苗小敏 汤亚东 张焜 陈家盈  
周颖 梁大锡 李卓刚 罗峻仁

(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限  
公司 11227

代理人 许庆胜

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/541(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种固定液和固定细胞的方法与应用

(57)摘要

本发明涉及免疫荧光技术领域,尤其涉及一种固定液和固定细胞的方法与应用。本发明公开了一种固定液,A液为体积分数为90%冷甲醇,B液为体积分数为1%多聚甲醛。该固定液有利于细胞爬片,细胞不容易脱落,免疫组化时细胞数量多,该固定液多聚甲醛的用量少,还可以防止抗原丢失,维持细胞正常结构以及尽量使抗原保持能与抗体结合的状态,从而使得免疫荧光检测时荧光效应显著,荧光图像美观准确。另外,该固定液相对于其他固定液经济易得,且不存在易燃易爆的危险,在室温下即可操作,不要求特殊的实验环境。



1. 一种固定液,其特征在于,所述固定液由A液和B液组成;  
所述A液为体积分数为90%冷甲醇,所述B液为体积分数为1%多聚甲醛。
2. 一种固定液固定细胞的方法,其特征在于,向细胞中加入固定液中的冷甲醇进行固定;  
所述固定后,弃掉所述孔中的冷甲醇,再使用所述固定液中的多聚甲醛进行固定。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述甲醇与所述多聚甲醛的用量比为1:1~3:1。
4. 根据权利要求2的方法,其特征在于,所述冷甲醛的固定时间为15min~25min。
5. 根据权利要求2的方法,其特征在于,所述多聚甲醛的固定时间为10min~15min。
6. 根据权利要求2的方法,其特征在于,所述多聚甲醛进行固定后,还包括:弃去固定后的多聚甲醛。
7. 根据权利要求2的方法,其特征在于,所述细胞为3T3、HaCat或hiPSC。
8. 一种免疫荧光染色试剂盒,其特征在于,包括:权利要求1所述的固定液。
9. 一种流式细胞检测试剂盒,其特征在于,包括:权利要求1所述的固定液。
10. 一种蛋白免疫印迹试剂盒,其特征在于,包括:权利要求1所述的固定液。

## 一种固定液和固定细胞的方法与应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫荧光技术领域,尤其涉及一种固定液和固定细胞的方法与应用。

### 背景技术

[0002] 进行免疫荧光分析的预处理是将组织细胞固定。免疫组化技术的角度,固定的作用不仅是使细胞内蛋白质凝固,尽量减少或终止外源性酶和内源性酶的反应;防止细胞的自溶,以免使抗原扩散至组织间质;以保持组织的固有形态和结构;更重要的是保持组织或细胞的抗原性,不但要使抗原不导致失活,而且不使抗原发生弥散的现象,才能在免疫组化染色时,不产生过深的背景,影响对阳性物的判断,因此固定液的选择至关重要,决定了能否得到准确可用的免疫荧光分析结果。

[0003] 多聚甲醛固定蛋白质比用有机溶剂能更好地保持细胞结构,4%多聚甲醛固定液,温和,穿透力强,固定效果好,因而在实验室中较常使用。但4%多聚甲醛固定的细胞免疫荧光检测时出现的荧光效应还有待提高。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明提供了一种固定液和固定细胞的方法与应用,该固定液固定的细胞在免疫荧光检测的荧光效应高。

[0005] 其具体技术方案如下:

[0006] 本发明提供了一种固定液,

[0007] 所述固定液由A液和B液组成;所述A液为体积分数为90%冷甲醇,B液为体积分数为1%多聚甲醛。

[0008] 本发明中,冷甲醇的温度为-20℃。

[0009] 本发明中,多聚甲醛固定蛋白质比用有机溶剂能更好地保持细胞结构,但可能降低某些细胞组分的抗原性,一般需要进行抗原修复。经多聚甲醛固定后,与胞内自由氨基结合的抗体也许不再识别这些抗原,这会导致免疫荧光检测时无法出现荧光效应。且多聚甲醛的固定是不稳定的,标本经多聚甲醛固定后应再经去污剂处理,如果标本在水溶液中浸泡的时间过长,则会使交联结构解体。而本发明固定液多聚甲醛的用量少,可以防止抗原丢失,维持细胞正常结构以及尽量使抗原保持能与抗体结合的状态,从而使得免疫荧光检测时荧光效应显著。

[0010] 本发明还提供了一种固定液固定细胞的方法,向细胞中加入固定液中的冷甲醇进行固定;

[0011] 所述固定后,弃掉所述孔中的冷甲醇,再使用所述固定液中的多聚甲醛进行固定。

[0012] 本发明中,所述细胞优选培养在六孔板中,冷甲醇和多聚甲醛分别向每个孔中加入。

[0013] 优选地,所述甲醇与所述多聚甲醛的用量比为1:1~3:1,更优选为1:1。

[0014] 优选地,所述冷甲醛的固定时间为15min~25min,更优选为15min。

- [0015] 优选地,所述多聚甲醛的固定时间为10min~15min,更优选为15min。
- [0016] 优选地,所述多聚甲醛进行固定后,还包括:弃去固定后的多聚甲醛。
- [0017] 优选地,所述弃去固定后的多聚甲醛后,还包括:每孔加入PBS清洗。
- [0018] 本发明中,所述清洗的次数优选为5次,每次优选5min。
- [0019] 优选地,所述细胞为3T3、HaCat或hiPSC。
- [0020] 本发明还提供了一种免疫荧光染色试剂盒,包括:上述固定液。
- [0021] 本发明免疫荧光染色试剂盒封闭液、心肌细胞的单克隆抗体和荧光标记的羊抗鼠IgG。
- [0022] 本发明还提供了一种流式细胞检测试剂盒,包括:上述固定液。
- [0023] 还提供了一种蛋白免疫印迹试剂盒,包括:上述固定液。
- [0024] 本发明提供的免疫荧光染色试剂盒、流式细胞检测试剂盒和蛋白免疫印迹试剂盒除固定液以外的试剂均为本领域技术人员熟知的试剂,本发明不做特殊限定。
- [0025] 从以上技术方案可以看出,本发明具有以下优点:
- [0026] 本发明提供了一种固定液,所述固定液由A液和B液组成;
- [0027] 所述A液为体积分数为90%冷甲醇,B液为体积分数为1%多聚甲醛。该固定液有利于细胞爬片,细胞不容易脱落,免疫组化时细胞数量多,该固定液多聚甲醛的用量少,还可以防止抗原丢失,维持细胞正常结构以及尽量使抗原保持能与抗体结合的状态,从而使得免疫荧光检测时荧光效应显著,荧光图像美观准确。另外,该固定液相对于其他固定液经济易得,且不存在易燃易爆的危险,在室温下即可操作,不要求特殊的实验环境。

## 附图说明

- [0028] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图。
- [0029] 图1为本发明对比例1提供的心肌细胞免疫荧光40X光学显微镜图;
- [0030] 图2为本发明实施例2提供的心肌细胞的免疫荧光40X光学显微镜图。

## 具体实施方式

- [0031] 为使得本发明的发明目的、特征、优点能够更加的明显和易懂,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,下面所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而非全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。
- [0032] 本发明实施例中,RPMI 1640基础培养基、2%的不含胰岛素的细胞培养添加剂B27,简称为RPMI1640+B27minus insulin。
- [0033] 本发明实施例中,hiPSC具体为hiPSC-U1,购自北京赛贝有限公司,CA4002106;TeSR-E8培养基购自Stem Cell,cat.05990;RPMI 1640购自Gibco,11875;B 27minus insulin购自Gibco,A18956;B 27supplement购自Gibco,17504;甲醇购自天津市大茂化学试剂厂,2305;多聚甲醛购自meilunbio,MA0192;0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA购自Gibco,

25200;FBS购自Gibco,A3160901;0.22 $\mu$ m滤膜购自MILLEX,SLGP033RB;Matrigel购自CORNING,354277;Triton X-100购自SLBW6818,SIGMA;一抗为心肌肌钙蛋白(cTnT)和 $\alpha$ Atinin,购自Abcam;二抗为Goat Anti-Mouse IgG H&L,购自Abcam;驴血清(donkey serum)购自北京索莱宝科技有限责任公司,SL050。

[0034] 本发明实施例中,试剂的配制如下:

[0035] (1) 0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA

[0036] (2) 配置RPMI 20培养基(250ml):在无菌环境中,混合200ml RPMI1640和50ml FBS;接下来,通过0.22 $\mu$ m过滤系统过滤溶液。

[0037] 实际配比:RPMI 1640:FBS=32ml:8ml,通过0.22 $\mu$ m过滤系统过滤溶液。

[0038] (3) Matrigel基质胶的爬片:六孔板内每孔加入一个爬片,将1ml稀释好的Matrigel(Matrigel:DMEM/F-12=1:100),37 $^{\circ}$ C孵育过夜。

[0039] (4) 配置RPMI1640/B-27培养基(50ml):在无菌环境中,混合49mlRPMI 1640和1ml B-27。

[0040] (5) 固定液1:A液:90% (vol/vol) 冷甲醇,

[0041] B液:1% (vol/vol) 多聚甲醛;

[0042] 固定液2:4% (vol/vol) 多聚甲醛。

[0043] (6) 0.4% (vol/vol) Triton X-100:

[0044] 1) 10%Triton X-100:将1ml Triton X-100加入到9ml PBS,室温超声5min充分混匀,得到10%Triton X-100;

[0045] 2) 0.4%Triton X-100:取1ml 10%Triton X-100加入25ml PBS内室温超声5min充分混匀,得到0.4%Triton X-100。

[0046] (7) 0.1% (wt/vol) 封闭液:按照0.1%吐温-20、5%正常山羊血清、5%正常驴血清、3%牛血清白蛋白的比例配比10ml封闭液,并将溶液在4 $^{\circ}$ C保存。

[0047] 实施例1

[0048] 本实施例为人诱导多能干细胞(hiPSCs)诱导分化为心肌细胞

[0049] 1.hiPSC-U1的培养方法:将Matrigel基质胶从-80 $^{\circ}$ C放入4 $^{\circ}$ C隔夜冻融,第二天将Matrigel分装并取100 $\mu$ l Matrigel加入10ml DMEM/F-12培养基于15ml离心管,存于4 $^{\circ}$ C冰箱内留以备用。每天,每孔换新培养基:4mlTeSR-E8培养基,直到hiPSCs数量达到75%左右。

[0050] 2.分化第0天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml (12 $\mu$ MCHIR99021+RPMI/B-27minus insulin)培养基,将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h。

[0051] 3.分化第1天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml RPMI/B-27培养基(不含胰岛素),将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h。

[0052] 4.分化第3天,加入CHIR 99021后72h。以一个孔为例,用15ml移液管从孔中收集2ml旧的培养基制备组合培养基配置方法:将2ml旧的培养基与2ml (RPMI/B-27minus insulin)混合。将4 $\mu$ l (5mM IWP 2)加入4ml组合培养基中。在弃掉剩余2ml培养基之前,轻轻地来回摇动平板以使细胞碎片悬浮,确保通过抽吸丢弃细胞碎片。每孔加入4ml含有IWP 2的组合培养基。重复操作以更换其他几个孔的培养基。

[0053] 5.分化第5天,弃掉旧的培养基,每孔更换加入4ml (RPMI/B-27minus insulin)培养基,将多孔板放回37 $^{\circ}$ C,5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h。

[0054] 6. 在分化的第7天和之后的每3天, 弃掉旧的培养基, 每孔更换加入4ml RPMI/B-27培养基, 将多孔板放回37℃, 5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育24h。

[0055] 实施例2

[0056] 本实施例为实施例1心肌细胞的免疫荧光染色

[0057] (1) 消化:

[0058] 吸掉旧的培养基, 每孔用2ml PBS清洗分化细胞, 清洗两次。吸去PBS, 加2ml的(0.25% (wt/vol) trypsin-EDTA) 解离酶解离细胞, 在37℃、5%培养箱消化5min。

[0059] (2) 吹打:

[0060] 利用1ml移液枪吹打5-10次, 以使细胞单一化。然后将吹打单一的细胞悬液转移到一个含有4ml RPMI 20的15ml离心管。

[0061] (3) 计数:

[0062] 取10 $\mu$ l的细胞悬液用血球计数器计数细胞; 并将细胞悬液以1000r/min的速度, 室温下离心4min。离心后, 利用1ml移液枪弃掉上清液。

[0063] (4) 孵育细胞:

[0064] 将2ml/孔的细胞悬液( $1 \times 10^4$ 个细胞/ml) 种于含有(Matrigel的盖玻片)的6孔培养皿中。在37℃, 5%CO<sub>2</sub>的培养皿中培养2天, 不改变培养基, 使细胞附着。

[0065] (5) 2天后, 弃掉培养基, 加入2ml室温(RPMI/B-27)培养基, 每3天换一次液。当达到免疫染色所需的密度(即细胞在爬片上的密度约为70%)时, 弃掉RPMI/B-27培养基, 每孔加入2ml PBS清洗细胞, 重复清洗2次。

[0066] (6) 细胞固定:

[0067] 清洗后, 往每个孔内加入1ml 90% (vol/vol) 冷甲醇, 室温固定15min。弃掉冷甲醇溶液, 往每个孔内加入1ml 1%多聚甲醛, 室温固定15min。弃掉多聚甲醛溶液, 每孔加入2ml PBS, 每次5min, 重复清洗3次。

[0068] (7) 细胞通透:

[0069] 清洗后, 往每个孔内加入1ml 0.4% (vol/vol) Triton X-100, 室温通透20min。弃掉Triton X-100溶液, 每孔加入2ml PBS, 每次5min, 重复清洗3次。

[0070] (8) 细胞封闭:

[0071] 加入1ml的1% (m/v) 封闭液, 室温封闭1h。弃掉封闭液, 每孔加入2ml PBS, 每次5min, 重复清洗3次。

[0072] (9) 孵育一抗抗体:

[0073] 加入稀释好的一抗: 4℃过夜孵育或室温1h孵育。

[0074] (10) 孵育二抗抗体:

[0075] 用1.5ml EP管收集孵育好的一抗抗体溶液, 可重复使用一次。每孔加入2ml PBS清洗3次, 每次5min。清洗之后, 在避光条件下, 加入稀释好的二抗抗体4℃过夜孵育或室温1h孵育。

[0076] (11) 孵育DAPI:

[0077] 在避光条件下, 用1.5ml EP管收集孵育好的二抗抗体溶液, 可重复使用一次。每孔加入2ml PBS, 每次5min, 重复清洗3次。加入1:1000封闭液稀释的DAPI溶液, 避光孵育20min。每孔加入2ml PBS, 每次5min, 重复清洗3次。

[0078] (12) 样品储存:

[0079] 将少量约250 $\mu$ l PBS溶液加入孔内覆盖样品,封口胶封闭,避光保存于4 $^{\circ}$ C,可存放1个月。

[0080] 对比例1

[0081] 实施例1心肌细胞的免疫荧光染色

[0082] 本对比例与实施例2的区别在于:细胞固定:清洗后,往每个孔内加入1ml 4%多聚甲醛,室温固定15min。弃掉多聚甲醛溶液,每孔加入2mlPBS,每次5min,重复清洗3次。

[0083] 实施例3

[0084] 将实施例2和对比例1的免疫荧光染色后的样品置于倒置荧光显微镜下观察采集图像。

[0085] 图1为本发明对比例1提供的心肌细胞免疫荧光40X光学显微镜图;

[0086] 图2为本发明对比例1提供的心肌细胞免疫荧光40X光学显微镜图。由图1可看出:图1荧光能够准确定位细胞核(DAPI)的情况,但细胞结构不清晰,不能够准确看出心肌细胞相应特异性蛋白(cTnT、 $\alpha$ Atinin)的肌节结构,而且图片在对好焦的条件下,背景模糊不清,影响整体效果;图2在新的固定液作用下,对准好焦距,可以准确定位细胞核(DAPI),还能够准确看出心肌细胞相应特异性蛋白(cTnT、 $\alpha$ Atinin)的肌节结构。

[0087] 以上所述,以上实施例仅用以说明本发明的技术方案,而非对其限制;尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,本领域的普通技术人员应当理解:其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换;而这些修改或者替换,并不使相应技术方案的本质脱离本发明各实施例技术方案的精神和范围。



图1

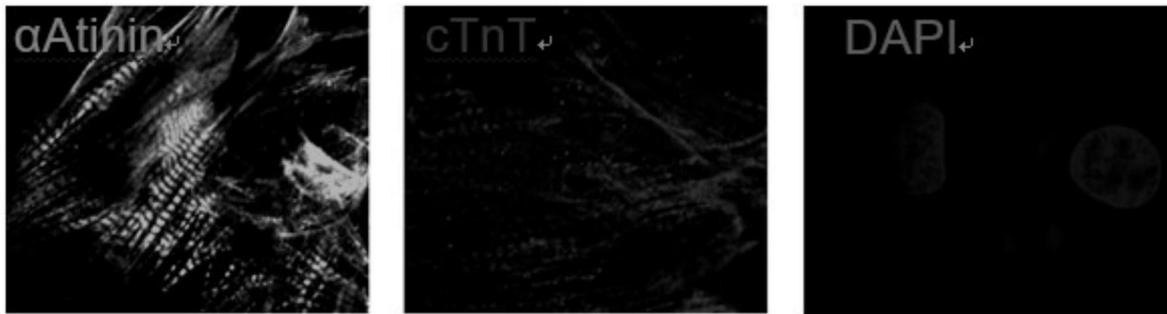


图2

专利名称(译)	一种固定液和固定细胞的方法与应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN110687085A</a>	公开(公告)日	2020-01-14
申请号	CN201910935393.8	申请日	2019-09-29
[标]申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
当前申请(专利权)人(译)	广东工业大学		
[标]发明人	苗小敏 汤亚东 张焜 周颖		
发明人	苗小敏 汤亚东 张焜 陈家盈 周颖 梁大锡 李卓刚 罗峻仁		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533 G01N33/541		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N21/6458 G01N33/533 G01N33/541 G01N2021/6439		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及免疫荧光技术领域，尤其涉及一种固定液和固定细胞的方法与应用。本发明公开了一种固定液，A液为体积分数为90%冷甲醇，B液为体积分数为1%多聚甲醛。该固定液有利于细胞爬片，细胞不容易脱落，免疫组化时细胞数量多，该固定液多聚甲醛的用量少，还可以防止抗原丢失，维持细胞正常结构以及尽量使抗原保持能与抗体结合的状态，从而使得免疫荧光检测时荧光效应显著，荧光图像美观准确。另外，该固定液相对于其他固定液经济易得，且不存在易燃易爆的危险，在室温下即可操作，不要求特殊的实验环境。

