



(21)申请号 201910678781.2

(22)申请日 2019.07.25

(71)申请人 深圳祺氏生物医疗电子有限公司

地址 518000 广东省深圳市坪山区坪山街
道大工业区青松路56号友利通科技工
业厂区A栋903B

(72)发明人 祁晖 张海华 廉正鑫

(74)专利代理机构 北京联瑞联丰知识产权代理
事务所(普通合伙) 11411

代理人 郭堃

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 1/44(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

(54)发明名称

一种通用型抗原修复缓冲液

(57)摘要

本发明公开了一种通用型抗原修复缓冲液,其特征在于,其包括柠康酞0.5g/L;非离子型表面活性剂5ml/L;其制作方法为:以配制一升缓冲液为例:称取柠康酞0.5g,取1000ml烧杯,将称取的0.5g柠康酞,溶解在800ml的蒸馏水中,搅拌混匀;在混匀后的溶液中加入5ml的非离子型表面活性剂,搅拌混匀;用当量浓度为1N的NaOH溶液调整pH值至7.4;然后取1000ml量筒,将PH值为7.4的溶液倒入量筒中,用蒸馏水定容至1000ml。本发明所提供的通用型的抗体修复液,则可以应用于绝大部分的使用热修复进行抗原修复的抗体,可极大的方便病理及科学研究免疫组化抗原修复方法的准确应用。

1. 一种通用型抗原修复缓冲液, 其特征在于, 其包括柠康酞0.5g/L; 非离子型表面活性剂5ml/L; 其制作方法为: 以配制一升缓冲液为例: 称取柠康酞0.5g, 取1000ml烧杯, 将称取的0.5g柠康酞, 溶解在800ml的蒸馏水中, 搅拌混匀; 在混匀后的溶液中加入5ml的非离子型表面活性剂, 搅拌混匀; 用当量浓度为1N的NaOH溶液调整pH值至7.4; 然后取1000ml量筒, 将PH值为7.4的溶液倒入量筒中, 用蒸馏水定容至1000ml。

2. 根据权利要求1所述的通用型抗原修复缓冲液, 其特征在于: 所述非离子型表面活性剂为吐温20。

3. 一种权利要求1所述的通用型抗原修复缓冲液修复方法, 其特征在于, 包括以下步骤:

步骤1: 将组织切片取出, 用铅笔在切片的磨砂面做好检测对应标记; 将切片放入塑料染色架中置于电热恒温干燥箱, 在60℃的条件下烤片1小时。

步骤2: 将组织切片依次置于脱蜡液I、II、III内分别浸泡5分钟; 梯度酒精(浓度由高到低100%~100%~95%~75%)各浸泡2分钟, 纯水冲洗30秒。

步骤3: 将组织切片置于3%的过氧化氢水溶液(现配现用)中浸泡5分钟, 纯水冲洗30秒。

步骤4: 将切片放入装有抗原修复缓冲液的修复盒中, 再把修复盒放入水浴锅中, 盖上有水浴锅盖子, 开始加热; 待水沸腾后, 开始计时, 20分钟后, 停止加热, 从水浴锅中取出修复盒, 自然降温30分钟。划出阻水区域; 清洗液冲洗2×3分钟。甩去玻片上的液体, 再用吸水纸吸干组织块边缘的液体, 用免疫组化笔沿组织切片边缘划出阻水区域。

步骤5: 按切片上的标记, 滴加一抗工作液适量使之完全覆盖标本, 湿盒中室温下孵育30分钟。

步骤6: 清洗液浸泡2×5分钟; 甩去清洗液, 滴加免疫显色试剂, 室温下(20~30℃)孵育20分钟。

步骤7: 清洗液浸泡2×5分钟; 甩去清洗液, 滴加DAB染色液适量使之完全覆盖标本, 显色5分钟; 纯水冲洗终止显色。

步骤8: 甩去切片表面多余的液体, 滴加苏木素染色液适量使之完全覆盖标本, 室温下染色3分钟, 用酸洗液提拉8~10次去除多余苏木素, 纯水冲洗30秒, PBS浸泡3分钟返蓝。

步骤9: 切片依次在梯度酒精(浓度由低到高75%~95%~100%)中各浸泡2分钟; 使用封片剂进行封片, 封片后的切片置于晾片板中。

4. 根据权利要求3所述的通用型抗原修复缓冲液修复方法, 其特征在于, 所述脱蜡液为二甲苯。

5. 根据权利要求3所述的通用型抗原修复缓冲液修复方法, 其特征在于, 所述清洗液为磷酸盐缓冲液。

6. 根据权利要求3所述的通用型抗原修复缓冲液修复方法, 其特征在于, 所述酸洗液为1%的盐酸酒精溶液。

7. 根据权利要求3所述的通用型抗原修复缓冲液修复方法, 其特征在于, 所述免疫显色试剂为HRP标记山羊抗鼠/兔二抗聚合物。

一种通用型抗原修复缓冲液

技术领域

[0001] 本发明涉及生物大分子免疫检测领域,应用于免疫组织化学检测技术中,特别涉及一种通用型抗原修复缓冲液。

背景技术

[0002] 目前临床病理科或生物医学基础科研单位,多采用甲醛为常规标本固定剂。甲醛固定虽然可以防止组织离体后的腐败自溶,保持组织细胞原有的形态,并较好的保存组织内部的生物大分子物质的抗原性;然而,甲醛的醛基与组织蛋白质中的氨基形成交联会使大多数的抗原决定簇被遮蔽,导致抗体不能有效的和目标抗原相结合,从而影响免疫组织化学的检测结果,这种遮蔽作用随着固定时间增长而加重。固定引起的组织抗原决定簇的封闭与交联可以通过抗原修复的方法来修正。抗原修复方法大体可以分为加热修复和酶消化修复。

[0003] I. 酶消化抗原修复。

[0004] 免疫组化抗原修复技术发展早期常用的一种方法,一般操作是使用蛋白酶工作液37℃下消化组织切片5~20min。常用的蛋白酶主要是胰蛋白酶、胃蛋白酶、蛋白酶K等。胰蛋白酶和蛋白酶K多用于细胞内抗原;胃蛋白酶则多用于细胞间质抗原的修复。

[0005] II. 加热修复

[0006] 1. 根据加热的方式的不同,又可分为水浴法、微波加热法、高压加热法。

[0007] 2. 修复缓冲液:修复缓冲液根据pH值的不同可分为酸性、中性和碱性缓冲液。目前常用缓冲液有以下几种:柠檬酸缓冲液(pH6.0)、EDTA缓冲液(pH8.0)、Tris-Hcl缓冲液(pH10.0)、Tris-EDTA缓冲液(pH9.0)等。一般在可用做石蜡切片免疫组化的一抗说明书上,会标明推荐的抗原修复缓冲液。对现今的抗原修复缓冲液中,不同的抗体需使用不同的抗原修复缓冲液。临床病理科使用的免疫组化抗体种类很多,国内外不同的供应商也很多,这样不同抗原修复液和种类繁多的抗体的配对应用极大的增加了临床病理科的工作量,而且如果应用错了抗原修复液,还将导致检测失败的风险。

[0008] 由于针对不同抗体使用不同的多种的抗原修复液使临床病理免疫组化检测工作非常不便,并有相当大的应用错误带来检测失败的风险。现存的多种抗原修复液中,都只能应用于部分抗体。本发明所提供的通用型的抗体修复液,则可以应用于绝大部分的使用热修复进行抗原修复的抗体,可极大的方便病理及科学研究免疫组化抗原修复方法的准确应用。

发明内容

[0009] 为了克服现有技术的上述缺陷,本发明提供一种通用型抗原修复缓冲液。其特征在于,其包括柠檬酞0.5g/L;非离子型表面活性剂5ml/L;其制作方法为:以配制一升缓冲液为例:称取柠檬酞0.5g,取1000ml烧杯,将称取的0.5g柠檬酞,溶解在800ml的蒸馏水中,搅拌均匀;在混匀后的溶液中加入5ml的非离子型表面活性剂,搅拌均匀;用当量浓度为1N的

NaOH溶液调整pH值至7.4;然后取1000ml量筒,将PH值为7.4的溶液倒入量筒中,用蒸馏水定容至1000ml。

[0010] 优选的,所述所述非离子型表面活性剂为吐温20。

[0011] 一种通用型抗原修复缓冲液修复方法,其特征在于,包括以下步骤:

[0012] 步骤1:将组织切片取出,用铅笔在切片的磨砂面做好检测对应标记;将切片放入塑料染色架中置于电热恒温干燥箱,在60℃的条件下烤片1小时。

[0013] 步骤2:将组织切片依次置于脱蜡液I、II、III内分别浸泡5分钟;梯度酒精(浓度由高到低100%~100%~95%~75%)各浸泡2分钟,纯水冲洗30秒。

[0014] 步骤3:将组织切片置于3%的过氧化氢水溶液(现配现用)中浸泡5分钟,纯水冲洗30秒。

[0015] 步骤4:将切片放入装有抗原修复缓冲液的修复盒中,再把修复盒放入水浴锅中,盖上水浴锅盖子,开始加热;待水沸腾后,开始计时,20分钟后,停止加热,从水浴锅中取出修复盒,自然降温30分钟。划出阻水区域:清洗液冲洗2×3分钟。甩去玻片上的液体,再用吸水纸吸干组织块边缘的液体,用免疫组化笔沿组织切片边缘划出阻水区域。

[0016] 步骤5:按切片上的标记,滴加一抗工作液适量使之完全覆盖标本,湿盒中室温下孵育30分钟。

[0017] 步骤6:清洗液浸泡2×5分钟;甩去清洗液,滴加免疫显色试剂,室温下(20~30℃)孵育20分钟。

[0018] 步骤7:清洗液浸泡2×5分钟;甩去清洗液,滴加DAB染色液适量使之完全覆盖标本,显色5分钟;纯水冲洗终止显色。

[0019] 步骤8:甩去切片表面多余的液体,滴加苏木素染色液适量使之完全覆盖标本,室温下染色3分钟,用酸洗液提拉8~10次去除多余苏木素,纯水冲洗30秒,PBS浸泡3分钟返蓝。

[0020] 步骤9:切片依次在梯度酒精(浓度由低到高75%~95%~100%)中各浸泡2分钟;使用封片剂进行封片,封片后的切片置于晾片板中。

[0021] 步骤10:显微镜下观察切片的染色结果。

[0022] 优选的,所述脱蜡液为二甲苯。

[0023] 优选的,所述清洗液为磷酸盐缓冲液。

[0024] 优选的,所述酸洗液为1%的盐酸酒精溶液。

[0025] 优选的,所述免疫显色试剂为HRP标记山羊抗鼠/兔二抗聚合物。

[0026] 本发明的抗原修复缓冲液,经过抗原修复效果和目前常用的集中抗原修复缓冲液的对比实验,证明本发明的抗原修复液对于多种抗原的修复有着比较好的效果。

[0027] 测试的抗原修复效果的指标主要选择分别为胞核、胞浆、胞膜阳性的蛋白(抗原)各5种,对应的抗体的选择细节如表1:表1:抗体选择细节表

[0028]

抗体	克隆号	供应商	稀释度	阳性定位
ki67	MIB1	Dako	500	胞核
ER	SP1	Dako	100	胞核
PR	SP2	Dako	100	胞核

TTF-1	8G7G311	Dako	100	胞核
p53	D0-7	Dako	300	胞核
CD4	1F6	Leica	20	胞膜
CD5	4C7	Leica	50	胞膜
CD10	56C6	Leica	50	胞膜
CD20	L26	Dako	4000	胞膜
CK5/6	D5/16B4	Dako	200	胞浆
CK20	Ks20.8	Leica	40	胞浆
Melan-A	A103	Dako	20	胞浆
CK-pan	AE1/AE3	Dako	400	胞浆
SP-A	PE-10	Dako	100	胞浆

[0029] 表2:修复效果对比表

[0030]

抗体	阳性定位	检测组织	柠檬酸缓冲液 0.01M pH6.0	EDTA 缓冲液 1mM pH8.0	Tris-Hcl 缓冲液 0.05M pH10.0	抗原修复溶液 0.05% pH7.4
ki67	胞核	扁桃体	+	+++	++	+++
ER	胞核	乳腺癌	++	+++	++	+++
PR	胞核	乳腺癌	++	+++	++	+++
TTF-1	胞核	甲状腺	+	++	++	+++
p53	胞核	皮肤癌	++	+++	++	+++
CD4	胞膜	扁桃体	+	++	-	++
CD5	胞膜	套细胞瘤	++	+++	++	+++
CD10	胞膜	扁桃体	+	++	++	++
CD20	胞膜	阑尾	+++	+++	++	+++
CK5/6	胞浆	肺鳞癌	+	++	+++	+++
CK20	胞浆	结肠	+	++	++	++
Melan-A	胞浆	黑色素瘤	+	++	+++	+++
CK-pan	胞浆	子宫颈	+++	+++	+++	+++
SP-A	胞浆	肺腺癌	-	++	+++	+++

[0031] 染色结果通过评估阳性着色强度而获得:-表示阴性;+表示弱阳性;++表示中等阳性;+++表示强阳性。综合表格中的结果资料,抗原修复溶液热抗原修复方法,对于这些代表

性的定位为胞核、胞膜、胞浆的抗原(各五种),都具有良好的修复效果,染色结果显示,其效果不弱于柠檬酸缓冲液、EDTA缓冲液、Tris-Hcl缓冲液中的任何一种,可作为一个通用的热抗原修复方法的抗原修复溶液。

[0032] 本发明提出的通用型抗原修复缓冲液经过实验验证,可以有效的完成绝大部分免疫组化应用抗体的抗原修复操作,并且配置容易,成本低,方便使用,有利于免疫组化技术的标准化操作,给使用者带来便利同时降低现有各种抗原修复缓冲液错用而带来的风险。

[0033] 下面结合具体的实施方式对本发明进行详细描述。

具体实施方式

[0034] 选取测试组织为扁桃体,(测试对象为Ki67,Dako,1:500)

[0035] 1.配置不同浓度的柠檬醛溶液,具体浓度如下:

[0036] 1%,0.5%,0.1%,0.05%,0.01%,0.001%,溶剂为蒸馏水。

[0037] 2.各浓度下的柠檬醛溶液分别用盐酸及氢氧化钠调至不同的pH值,如下:pH 2.0,pH 7.4,pH 10,形成不同浓度及不同PH的抗原修复缓冲溶液。

[0038] 经历如下步骤,完成抗原修复的过程。

[0039] 步骤1:将组织切片取出,用铅笔在切片的磨砂面做好检测对应标记;将切片放入塑料染色架中置于电热恒温干燥箱,在60℃的条件下烤片1小时。

[0040] 步骤2:将组织切片依次置于脱蜡液I、II、III内分别浸泡5分钟;梯度酒精(浓度由高到低100%~100%~95%~75%)各浸泡2分钟,纯水冲洗30秒。

[0041] 步骤3:将组织切片置于3%的过氧化氢水溶液(现配现用)中浸泡5分钟,纯水冲洗30秒。

[0042] 步骤4:将切片放入装有抗原修复缓冲液的修复盒中,再把修复盒放入水浴锅中,盖水上浴锅盖子,开始加热;待水沸腾后,开始计时,20分钟后,停止加热,从水浴锅中取出修复盒,自然降温30分钟。划出阻水区域:清洗液冲洗2×3分钟。甩去玻片上的液体,再用吸水纸吸干组织块边缘的液体,用免疫组化笔沿组织切片边缘划出阻水区域。

[0043] 步骤5:按切片上的标记,滴加一抗工作液适量使之完全覆盖标本,湿盒中室温下孵育30分钟。

[0044] 步骤6:清洗液浸泡2×5分钟;甩去清洗液,滴加免疫显色试剂,室温下(20~30℃)孵育20分钟。

[0045] 步骤7:清洗液浸泡2×5分钟;甩去清洗液,滴加DAB染色液适量使之完全覆盖标本,显色5分钟;纯水冲洗终止显色。

[0046] 步骤8:甩去切片表面多余的液体,滴加苏木素染色液适量使之完全覆盖标本,室温下染色3分钟,用酸洗液提拉8~10次去除多余苏木素,纯水冲洗30秒,PBS浸泡3分钟返蓝。

[0047] 步骤9:切片依次在梯度酒精(浓度由低到高75%~95%~100%)中各浸泡2分钟;使用封片剂进行封片,封片后的切片置于晾片板中。

[0048] 将经过处理后的切片进行观察,得到如下结果,如表3:

[0049] 表3:

[0050]

	1%	0.50%	0.10%	0.05%	0.01%	0.001%	柠康酞溶液浓度
pH 2.0	+	+	++	++	+	+	
pH 7.4	++	++	+++	+++	+++	+	
pH 10.0	++	+++	++	++	+	+	
PH 值							

[0051] 染色结果通过评估阳性着色强度而获得：

[0052] -表示阴性；+表示弱阳性；++表示中等阳性；+++表示强阳性

[0053] 综合表格中的不同浓度以及不同PH对比的结果得出，优选的柠康酞溶液的浓度为0.05%即0.5g/L；优选的pH值为7.4。

[0054] 虽然以上结合了较佳实施例对本发明进行了说明，但是本技术领域中的普通技术人员应当认识到，上述示例仅是用来说明的，而不能作为对本发明的限制。因此，可以在权利要求书的实质精神范围内对本发明进行修改和变型，这些修改和变型都将落在本发明的权利要求书所要求的范围之内。

专利名称(译)	一种通用型抗原修复缓冲液		
公开(公告)号	CN110346552A	公开(公告)日	2019-10-18
申请号	CN201910678781.2	申请日	2019-07-25
[标]发明人	祁晖 张海华		
发明人	祁晖 张海华 廉正鑫		
IPC分类号	G01N33/531 G01N1/44 G01N1/30		
代理人(译)	郭堃		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种通用型抗原修复缓冲液，其特征在于，其包括柠康酞0.5g/L；非离子型表面活性剂5ml/L；其制作方法为：以配制一升缓冲液为例：称取柠康酞0.5g，取1000ml烧杯，将称取的0.5g柠康酞，溶解在800ml的蒸馏水中，搅拌混匀；在混匀后的溶液中加入5ml的非离子型表面活性剂，搅拌混匀；用当量浓度为1N的NaOH溶液调整pH值至7.4；然后取1000ml量筒，将PH值为7.4的溶液倒入量筒中，用蒸馏水定容至1000ml。本发明所提供的通用型的抗体修复液，则可以应用于绝大部分的使用热修复进行抗原修复的抗体，可极大的方便病理及科学研究免疫组化抗原修复方法的准确应用。

抗体	阳性定位	检测组织	柠檬酸缓冲液 0.01M pH6.0	EDTA 缓冲液 1mM pH8.0	Tris-Hcl 缓冲液 0.05M pH10.0	抗原修复溶液 0.05% pH7.4
ki67	胞核	扁桃体	+	+++	++	+++
ER	胞核	乳腺癌	++	+++	++	+++
PR	胞核	乳腺癌	++	+++	++	+++
TTF-1	胞核	甲状腺	+	++	++	+++
p53	胞核	皮肤癌	++	+++	++	+++
CD4	胞膜	扁桃体	+	++	-	++
CD5	胞膜	套细胞瘤	++	+++	++	+++
CD10	胞膜	扁桃体	+	++	++	++
CD20	胞膜	阑尾	+++	+++	++	+++
CK5/6	胞浆	肺鳞癌	+	++	+++	+++
CK20	胞浆	结肠	+	++	++	++
Melan-A	胞浆	黑色素瘤	+	++	+++	+++
CK-pan	胞浆	子宫颈	+++	+++	+++	+++
SP-A	胞浆	肺腺癌	-	++	+++	+++