



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104865377 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201510289582. 4

(22) 申请日 2015. 05. 29

(71) 申请人 北京海思特临床检验所有限公司

地址 100176 北京市大兴区亦庄经济技术开发区地盛北街 1 号 A-3, A-4

(72) 发明人 刘建勇 刘佳 张鑫 王绪华
梁超 陈忠 方国伟 黄士昂

(74) 专利代理机构 北京天奇智新知识产权代理有限公司 11340

代理人 陆军

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

权利要求书1页 说明书3页

(54) 发明名称

骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法

(57) 摘要

本发明提供了骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法,所述试剂盒包括:装有 Polymer Helper 试剂的试剂管、装有 PBS 磷酸盐缓冲液的试剂管、装有抗原修复液的试剂管、装有过氧化氢溶液的试剂管、装有二氨基联苯胺染色液的试剂管、装有苏木素染色液的试剂管、装有 1% 酸酒精的试剂管、装有 1% 氨水的试剂管、装有二甲苯的试剂管、装有酒精的试剂管、装有 CD41 单克隆抗体的试剂管、装有 CD61 单克隆抗体的试剂管、装有通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体的试剂管,分隔并集中包装这些试剂管的包装盒。本发明既克服了形态细胞涂片以主观经验评判的缺点,又避免了以往单个 CD41 抗体染色假阳性对结果的干扰,提高了检测的准确性。

1. 一种用 CD41 与 CD61 抗体联合标记的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒,其特征在于,该试剂盒包括:

装有 Polymer Helper 试剂的试剂管、装有 PBS 磷酸盐缓冲液的试剂管、装有抗原修复液的试剂管、装有过氧化氢溶液的试剂管、装有二氨基联苯胺染色液的试剂管、装有苏木素染色液的试剂管、装有 1% 酸酒精的试剂管、装有 1% 氨水的试剂管、装有二甲苯的试剂管、装有酒精的试剂管、装有 CD41 单克隆抗体的试剂管、装有 CD61 单克隆抗体的试剂管、装有通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体的试剂管;

分隔并集中包装这些试剂管的包装盒。

2. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述 Polymer Helper 试剂为北京中杉金桥生物技术有限公司的 Polymer Helper 试剂。

3. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述酸酒精为盐酸酒精。

4. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述 PBS 磷酸盐缓冲液的浓度为 0.01M, pH 值为 7.2 ~ 7.4。

5. 按照权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述过氧化氢溶液的浓度为 3 ~ 3.5%。

6. 权利要求 1 所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤 1、使用抗原修复液对骨髓涂片进行抗原修复后,再用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

步骤 2、使用过氧化氢溶液对骨髓涂片进行封闭,然后使用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤骨髓涂片;

步骤 3、滴加第一抗体,室温孵育 25 ~ 35 分钟,用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后,再滴加 Polymer Helper 试剂,室温孵育 15 ~ 25 分钟,用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后,再滴加第二抗体,室温孵育 15 ~ 25 分钟,再用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤;

步骤 4、使用二氨基联苯胺染色液显色,再用苏木素染色,使用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

步骤 5、在 1% 酸酒精中涮 2 次,用蒸馏水洗涤玻片,然后再用 1% 氨水涮 2 次,用蒸馏水洗涤玻片;

步骤 6、将骨髓涂片在 75% ~ 100% 梯度稀释的酒精中脱水,每个梯度脱水 30s,再在二甲苯中做 2min 透明处理后,通过显微镜判读结果。

7. 按照权利要求 6 所述的使用方法,其特征在于:步骤 3 所述的第一抗体为 CD41 单克隆抗体和 CD61 单克隆抗体;第二抗体为通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体。

8. 按照权利要求 6 所述的使用方法,其特征在于:步骤 3 中,滴加第一抗体后孵育 30 分钟,滴加 Polymer Helper 试剂后孵育 20 分钟,滴加第二抗体后孵育 20 分钟。

9. 按照权利要求 6 所述的使用方法,其特征在于:步骤 6 中,酒精稀释的梯度为 75% → 85% → 100%。

10. 按照权利要求 1 ~ 5 任一所述的试剂盒在骨髓涂片异常淋巴细胞染色检测中的应用。

骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及骨髓涂片染色技术,尤其涉及一种用 CD41 与 CD61 抗体联合标记的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 微小巨核通常是一种病态的巨核细胞,微小巨核细胞直径小于 $15\ \mu\text{m}$,该细胞与淋巴细胞大小相当,细胞质内容物较少,常伴有血小板的生成。微小聚合细胞见于多种血液病,是骨髓病态造血的特征之一。临床常用瑞氏-姬姆萨染色法对微小巨核细胞进行染色鉴定,但是该染色方法通过形态细胞涂片以主观经验评判,很容易将微小巨核细胞和原始巨核细胞以及淋巴细胞发生混淆,所以临床检出的准确性较低。目前,也有 CD41 单抗体骨髓细胞学的检测技术,但是该技术存在假阳性的弊端,使检测结果的准确度也较低。

发明内容

[0003] 为了解决上述技术问题,本发明的目的在于提供一种用 CD41 与 CD61 抗体联合标记的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒,本发明还公开了该试剂盒的使用方法。

[0004] 本申请的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒,通过合理的 CD41 与 CD61 抗体组合联合标记,克服了单个抗体染色假阳性的干扰,还可进一步区分出小巨核细胞、多圆小巨核细胞及大单圆核巨核细胞,极大的提高了临床诊断及鉴别诊断。

[0005] 根据本发明的实施例,提供了用 CD41 与 CD61 抗体联合标记的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒,其主要包括:装有 Polymer Helper 试剂的试剂管、装有 PBS 磷酸盐缓冲液的试剂管、装有抗原修复液的试剂管、装有过氧化氢溶液的试剂管、装有二氨基联苯胺染色液的试剂管、装有苏木素染色液的试剂管、装有 1% 酸酒精的试剂管、装有 1% 氨水的试剂管、装有二甲苯的试剂管、装有酒精的试剂管、装有 CD41 单克隆抗体的试剂管、装有 CD61 单克隆抗体的试剂管、装有通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体的试剂管;分隔并集中包装这些试剂管的包装盒。

[0006] 其中,所述 Polymer Helper 试剂为北京中杉金桥生物技术有限公司的 Polymer Helper 试剂。

[0007] 其中,所述酸酒精为盐酸酒精。

[0008] 其中,PBS 磷酸缓冲液浓度为 0.01M, pH 值为 7.2 ~ 7.4。

[0009] 其中,过氧化氢溶液浓度为 3 ~ 3.5%,进一步地,所述过氧化氢溶液浓度为 3%。

[0010] 本发明的试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0011] 1) 使用抗原修复液对骨髓涂片进行抗原修复后,使用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

[0012] 2) 使用过氧化氢溶液对骨髓涂片进行封闭,然后使用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤骨髓涂片;

[0013] 3) 滴加第一抗体,室温孵育 25 ~ 35 分钟,用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后,再滴加 Polymer Helper 试剂,室温孵育 15 ~ 25 分钟,用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后,再滴加第二抗

体,室温孵育 15 ~ 25 分钟,再用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤;

[0014] 4) 使用二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 染色液显色,再用苏木素染色,使用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

[0015] 5) 在 1% 酸酒精中涮 2 次,用蒸馏水洗涤玻片,然后再用 1% 氨水涮 2 次,用蒸馏水洗涤玻片;

[0016] 6) 在梯度稀释的酒精 (75% ~ 100%) 中 (各 30s) 脱水并在二甲苯中 (2min) 做透明处理后,就可以通过显微镜判读结果。

[0017] 其中,步骤 3) 所述的第一抗体为 CD41 单克隆抗体和 CD61 单克隆抗体;第二抗体为通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体。

[0018] 其中,步骤 3) 中,滴加第一抗体后孵育 30 分钟,滴加 Polymer Helper 试剂后孵育 20 分钟,滴加第二抗体后孵育 20 分钟。

[0019] 其中,步骤 6) 中,梯度稀释的酒精浓度为 75% → 85% → 100%。

[0020] 通过以上技术方案,本发明的有益效果如下:

[0021] 本发明进行技术创新,通过长期的摸索、试验,探讨出了一种全新的 CD41 及 CD61 联合免疫组化染色方法,既克服了形态细胞涂片以主观经验评判的缺点,以抗原抗体结合再显色寻找阳性细胞为诊断依据达到了同组织切片免疫组化相类似的效果,又避免了以往单个 CD41 抗体染色假阳性对结果的干扰,提高了检测的准确性,且标本易于获得,收集到的有核细胞多,大大提高了阳性检出率,具有自己独特的优点,满足了临床的需求。

具体实施方式

[0022] 下面结合实施例对本发明的具体实施方式作进一步描述,本发明的优点和特点将会随着描述而更为清楚。但这些实施例仅是示范性的,并不对本发明的范围构成任何限制。

[0023] 下述实施例中所使用的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0024] 下述实施例中所使用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0025] 实施例

[0026] 用 CD41 与 CD61 抗体联合标记的骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法

[0027] 1、该试剂盒中装有:

[0028] 装有 Polymer Helper 试剂的试剂管、装有 PBS 磷酸盐缓冲液的试剂管、装有抗原修复液的试剂管、装有过氧化氢溶液的试剂管、装有二氨基联苯胺染色液的试剂管、装有苏木素染色液的试剂管、装有 1% 酸酒精的试剂管、装有 1% 氨水的试剂管、装有二甲苯的试剂管、装有酒精的试剂管、装有 CD41 单克隆抗体的试剂管、装有 CD61 单克隆抗体的试剂管、装有通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体的试剂管;分隔并集中包装这些试剂管的包装盒。

[0029] 上述 Polymer Helper 试剂、抗原修复液、二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 染色液、PBS 磷酸盐缓冲液、抗体等试剂均购买自北京中杉金桥生物技术有限公司。它们的产品目录号分别为: Polymer Helper 试剂 (PV-6000)、抗原修复液 (TA-999-DHBH)、二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 染色液 (ZLI-9032)、PBS 磷酸盐缓冲液 (ZLI-9062)。

[0030] 2、试剂盒的使用方法如下:

[0031] (1) 准备好待检测的骨髓涂片,使用抗原修复液对骨髓涂片进行抗原修复后,使用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

[0032] (2) 使用过氧化氢溶液对骨髓涂片进行封闭, 然后使用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤骨髓涂片;

[0033] (3) 滴加第一抗体 (CD41 单克隆抗体和 CD61 单克隆抗体), 室温孵育 30 分钟, 用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后, 再滴加 Polymer Helper 试剂, 室温孵育 20 分钟, 用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤后, 再滴加第二抗体 (通用型 CD41 和 CD61 免疫组化抗体), 室温孵育 20 分钟, 再用 PBS 磷酸盐缓冲液洗涤;

[0034] (4) 使用二氨基联苯胺 (Diaminobenzidine, DAB) 染色液显色, 再用苏木素染色, 使用蒸馏水洗涤骨髓涂片;

[0035] (5) 在 1% 盐酸酒精中涮 2 次, 用蒸馏水洗涤玻片, 然后再用 1% 氨水涮 2 次, 用蒸馏水洗涤玻片;

[0036] (6) 在梯度稀释的酒精 (75% → 85% → 100%) 中 (各 30s) 脱水并在二甲苯中 (2min) 做透明处理后, 就可以通过显微镜判读结果。

[0037] 本领域的技术人员应该理解的是, 在不偏离本发明的精神和范围下可以对本发明技术方案的细节和形式进行修改或替换, 但这些修改和替换均落入本发明的保护范围内。

专利名称(译)	骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN104865377A	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201510289582.4	申请日	2015-05-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京海思特临床检验所有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京海思特临床检验所有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京海思特临床检验所有限公司		
[标]发明人	刘建勇 刘佳 张鑫 王绪华 梁超 陈忠 方国伟 黄土昂		
发明人	刘建勇 刘佳 张鑫 王绪华 梁超 陈忠 方国伟 黄土昂		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532		
代理人(译)	陆军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了骨髓涂片微小巨核细胞染色试剂盒及其使用方法，所述试剂盒包括：装有Polymer Helper试剂的试剂管、装有PBS磷酸盐缓冲液的试剂管、装有抗原修复液的试剂管、装有过氧化氢溶液的试剂管、装有二氨基联苯胺染色液的试剂管、装有苏木素染色液的试剂管、装有1%酸酒精的试剂管、装有1%氨水的试剂管、装有二甲苯的试剂管、装有酒精的试剂管、装有CD41单克隆抗体的试剂管、装有CD61单克隆抗体的试剂管、装有通用型CD41和CD61免疫组化抗体的试剂管，分隔并集中包装这些试剂管的包装盒。本发明既克服了形态细胞涂片以主观经验评判的缺点，又避免了以往单个CD41抗体染色假阳性对结果的干扰，提高了检测的准确性。