



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105987840 B

(45)授权公告日 2018.09.28

(21)申请号 201610385942.5

(22)申请日 2016.06.03

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105987840 A

(43)申请公布日 2016.10.05

(73)专利权人 浙江世纪康大医疗科技股份有限公司

地址 311215 浙江省杭州市萧山区萧山经济技术开发区建设四路1368号

(72)发明人 李思勇 余向东

(74)专利代理机构 杭州杭诚专利事务所有限公司 33109

代理人 尉伟敏

(51)Int.Cl.

G01N 1/30(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(54)发明名称

一种柠檬酸抗原修复液

(57)摘要

本发明涉及免疫组织化学技术领域,公开了一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.35-0.40g,二水合柠檬酸钠2.40-2.42g,吐温-20 400-600微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇50-500mL和余量的单蒸水。本发明的柠檬酸抗原修复液湿润、修复效果好,能够在较少的用量下对组织切片进行修复,修复后组织切片容易染色,染色效果好。并且修复液不易挥发,能够配合全自动免疫组化仪使用。

(56)对比文件

WO 2009085574 A2,2009.07.09,  
CN 104644511 A,2015.05.27,  
CN 1751742 A,2006.03.29,  
CN 101228429 A,2008.07.23,  
CN 101836117 A,2010.09.15,  
CN 103405783 A,2013.11.27,  
CN 104994912 A,2015.10.21,  
CN 104744588 A,2015.07.01,  
US 2006134793 A1,2006.06.22,  
丰平等.热丙三醇水溶液抗原修复方法.《实验技术与管理》.2010,第27卷(第10期),  
姚梅宏等.免疫组化抗原修复技术新进展.  
《临床与实验病理学杂志》.2013,第29卷(第5期),

审查员 张银平

权利要求书1页 说明书5页

1. 一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.35-0.40g,二水合柠檬酸钠2.40-2.42g,吐温-20 400-600微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇50-500mL,海藻提取物0.5-1.5g和余量的单蒸水。

2. 如权利要求1所述的一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

3. 如权利要求2所述的一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

4. 如权利要求1-3之一所述的一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的三乙醇胺或乙二醇或三元醇,完全溶解后添加海藻提取物以及吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

5. 如权利要求1-3之一所述的一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于,所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比2-4:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为3-5的盐酸溶液按体积比1:1-2混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在100-110℃,4-8MPa的环境下熟化灭菌0.5-1.5h;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。

6. 如权利要求5所述的一种柠檬酸抗原修复液,其特征在于,所述微波辅助提取的条件为:温度70-90℃,时间5-10min,微波功率800-1000W,微波频率2450MHZ。

## 一种柠檬酸抗原修复液

### 技术领域

[0001] 本发明涉及免疫组织化学技术领域,尤其涉及一种柠檬酸抗原修复液。

### 背景技术

[0002] 免疫组织化学技术是近年来病理诊断迅速发展的检测技术,作为一种重要的病理辅助诊断方法,在临床的应用中日益受到重视。随着全自动免疫组化染色仪的应用推广,对于染色质量的要求也日益提高。其中,抗原修复在整个免疫组化染色过程中有着极其重要的作用,修复条件的好坏直接决定着最终染色结果的质量。全自动染色仪因为其自身的结构特点,其用于盛放修复液的容器体积较小,不能像手工修复那样把组织切片完全浸泡在修复液中的条件,并且全自动免疫组化染色仪在抗原修复时需要在较高的温度(100℃左右)下进行,因此修复液容易挥发,进一步减少了修复液的体积。因而,如何在全自动免疫组化染色仪上完成正常的抗原修复是全自动免疫组化染色仪必须解决的一个难题。

[0003] 但是由于目前全自动免疫组化染色仪国内还不普及,很少有人使用,因此没有人注意到上述技术问题。目前国外解决上述技术问题的方法通常是控制抗原修复的环境,如控制大气压、环境温度等等,这些解决方法条件复杂,很难实际应用。目前还未发现通过改进抗原修复液来解决上述技术问题的报道。

[0004] 目前的抗原修复液有很多品种,如EDTA抗原修复液、柠檬酸抗原修复液以及EDTA-柠檬酸复配抗原修复液等等。申请号为201180024136.0的中国专利公开了一种抗原修复液和抗原修复方法,用于免疫组织和细胞的化学染色过程中的抗原修复。所述抗原修复液为衣康酸、衣康酸酐或柠檬酸水溶液。所述抗原修复方法为采用上述抗原修复液对组织切片进行高温或高温高压修复。提供的抗原修复液和抗原修复方法具有染色质量高,可重现性、安全性、稳定性好的优点。

[0005] 上述抗原修复液的溶剂为水,如果应用于全自动免疫组化染色仪上,一方面,该抗原修复液需要在用量大的情况下修复效果才好,无法在较少用量无法将组织切片完全浸渍的情况下完成较好的修复;另一方面,其沸点低,在较高温度下容易挥发,容易导致组织切片发生干化情况,而一旦发生干化,组织切片的抗原就会变为不可逆转的破坏而无法修复。

### 发明内容

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明提供了一种柠檬酸抗原修复液。本发明的柠檬酸抗原修复液浸润、修复效果好,能够在较少的用量下对组织切片进行修复,修复后组织切片容易染色,染色效果好。并且修复液不易挥发,能够配合全自动免疫组化仪使用。

[0007] 本发明的具体技术方案为:一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.35-0.40g,二水合柠檬酸钠2.40-2.42g,吐温-20 400-600微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇50-500mL和余量的单蒸水。

[0008] 在本发明的抗原修复液中,以一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠作为主要的修复活性成分,并且以三乙醇胺或乙二醇或三元醇与单蒸水作为混合溶剂。其中,三乙醇胺或乙二

醇或三元醇的加入,能够提高抗原修复液的沸点,防止其过度挥发。并且三乙醇胺或乙二醇或三元醇与其他高点的溶剂相比,其优势是对抗原修复液中的活性成分的影响较小,且与组织切片的亲和性较好,毒性低,不会对组织切片的修复造成过多影响,其中三元醇、三乙醇胺的效果优于乙二醇。吐温-20起到乳化作用,能够提高抗原修复液中各物质的相容性。

[0009] 作为优选,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇150mL和余量的单蒸水。

[0010] 作为优选,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL和余量的单蒸水。

[0011] 作为优选,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.35-0.40g,二水合柠檬酸钠2.40-2.42g,吐温-20 400-600微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇50-500mL,海藻提取物0.5-1.5g和余量的单蒸水。

[0012] 作为优选,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺或乙二醇或三元醇150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

[0013] 作为优选,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

[0014] 作为优选,所述柠檬酸抗原修复液制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的三乙醇胺或乙二醇或三元醇,完全溶解后添加吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0015] 作为优选,所述柠檬酸抗原修复液制备方法也可如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的三乙醇胺或乙二醇或三元醇,完全溶解后添加海藻提取物以及吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0016] 作为优选,所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比2-4:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为3-5的盐酸溶液按体积比1:1-2混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在100-110℃,4-8MPa的环境下熟化灭菌0.5-1.5h,在熟化过程中能够使部分多糖降解;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除已变性的粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。

[0017] 为了进一步的优化,本发明的抗原修复液中也加入海藻提取物。本发明中制得的海藻提取物含有天然的海藻酸盐以及天然多糖等物质,生物温和性好,与组织切片亲和性好。少量的海藻提取物溶于水中能够使液体一定的粘度,锁水效果好,能够进一步防止抗原修复液中溶剂挥发。此外,海藻提取物对抗原修复液中的修复活性成分能够物理结合,海藻提取物与组织切片接触后,能够在组织切片表面形成一层薄的黏膜,从而使得与其结合的修复活性成分能够充分与组织切片接触,在较少用量抗原修复液的情况下,提高修复效果。但是海藻提取物的用量需要严格把控,如果用量过多,会导致抗原修复液粘度过高,流动性太差,且与组织切片结合过度,不易后续的清洗。

[0018] 作为优选,所述微波辅助提取的条件为:温度70-90℃,时间5-10min,微波功率

800-1000W,微波频率2450MHZ。

[0019] 作为优选,所述三元醇可以为甘油。

[0020] 与现有技术对比,本发明的有益效果是:

[0021] 本发明的柠檬酸抗原修复液浸润、修复效果好,能够在较少的用量下对组织切片进行修复。平均每张组织切片所需的修复液只需100-150uL。

[0022] 修复后组织切片容易染色,染色效果好。

[0023] 并且修复液不易挥发,能够配合全自动免疫组化仪使用。

## 具体实施方式

[0024] 下面结合实施例对本发明作进一步的描述。

[0025] 实施例1

[0026] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL和余量的单蒸水。

[0027] 制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的三乙醇胺,完全溶解后添加吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0028] 实施例2

[0029] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,乙二醇325mL和余量的单蒸水。

[0030] 制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的乙二醇,完全溶解后添加吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0031] 实施例3

[0032] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.35g,二水合柠檬酸钠2.40g,吐温-20 400微升,三乙醇胺50mL和余量的单蒸水。

[0033] 实施例4

[0034] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.40g,二水合柠檬酸钠2.42g,吐温-20 600微升,三乙醇胺500mL和余量的单蒸水。

[0035] 实施例5

[0036] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,甘油300mL和余量的单蒸水。

[0037] 实施例6

[0038] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

[0039] 制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的三乙醇胺,完全溶解后添加海藻提取物以及吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0040] 所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比3:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为4的盐酸溶液按体积比1:1.5混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,其中提取条件为:温度80℃,时间7.5min,微波功率900W,微波频率2450MHZ。提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在105℃,6MPa的环境下熟化灭菌1h;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。

[0041] 实施例7

[0042] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL,海藻提取物0.5g和余量的单蒸水。

[0043] 所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比2:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为3-5的盐酸溶液按体积比1:1混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,其中提取条件为:温度70℃,时间10min,微波功率800W,微波频率2450MHZ。提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在100℃,8MPa的环境下熟化灭菌0.5h;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。

[0044] 实施例8

[0045] 每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,三乙醇胺150mL,海藻提取物1.5g和余量的单蒸水。

[0046] 所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比4:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为3-5的盐酸溶液按体积比1: 2混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,其中提取条件为:温度90℃,时间5min,微波功率1000W,微波频率2450MHZ。提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在110℃,4MPa的环境下熟化灭菌1.5h;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。

[0047] 实施例9

[0048] 一种柠檬酸抗原修复液,每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括:一水合柠檬酸0.378252g,二水合柠檬酸钠2.411784g,吐温-20 500微升,甘油150mL,海藻提取物1g和余量的单蒸水。

[0049] 制备方法如下:按配比称取一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠,用单蒸水溶解一水合柠檬酸和二水合柠檬酸钠后,加入配方量的甘油,完全溶解后添加海藻提取物以及吐温-20,最后用单蒸水定容至额定容量。

[0050] 所述海藻提取物的制备方法为:将洗净后的海藻与水按质量比3:10混合,并用打浆机制成海藻浆料;将海藻浆料与pH值为4的盐酸溶液按体积比1:1.5混合,得到混合浆料,对混合浆料进行微波辅助提取,其中提取条件为:温度80℃,时间7.5min,微波功率900W,微波频率2450MHZ。提取后过滤除去固态物得到海藻提取液,对海藻提取液在105℃,6MPa的环境下熟化灭菌1h;对熟化灭菌后的海藻提取液进行过滤去除粗蛋白;将过滤后的海藻提取液pH调节至中性,最后冷冻干燥后制得海藻提取物。本发明中所用原料、设备,若无特别说明,均为本领域的常用原料、设备;本发明中所用方法,若无特别说明,均为本领域的常规方

法。

[0051] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明作任何限制,凡是根据本发明技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、变更以及等效变换,均仍属于本发明技术方案的保护范围。

专利名称(译)	一种柠檬酸抗原修复液		
公开(公告)号	<a href="#">CN105987840B</a>	公开(公告)日	2018-09-28
申请号	CN201610385942.5	申请日	2016-06-03
[标]申请(专利权)人(译)	浙江世纪康大医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江世纪康大医疗科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江世纪康大医疗科技股份有限公司		
[标]发明人	李思勇 余向东		
发明人	李思勇 余向东		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/532		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/532		
审查员(译)	张银平		
其他公开文献	CN105987840A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及免疫组织化学技术领域，公开了一种柠檬酸抗原修复液，每1000mL的柠檬酸抗原修复液中包括：一水合柠檬酸0.35-0.40g，二水合柠檬酸钠2.40-2.42g，吐温-20 400-600微升，三乙醇胺或乙二醇或三元醇50-500mL和余量的单蒸水。本发明的柠檬酸抗原修复液湿润、修复效果好，能够在较少的用量下对组织切片进行修复，修复后组织切片容易染色，染色效果好。并且修复液不易挥发，能够配合全自动免疫组化仪使用。