



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108646016 A

(43)申请公布日 2018.10.12

(21)申请号 201810512875.8

(22)申请日 2018.05.25

(71)申请人 福州迈新生物技术开发有限公司

地址 350108 福建省福州市闽侯县科技东路3号福州高新区海西高新技术产业园创新园12号楼

(72)发明人 杨清海 史永勤 陈惠玲 陈泳

(74)专利代理机构 福州市景弘专利代理事务所
(普通合伙) 35219

代理人 林祥翔 黄以琳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

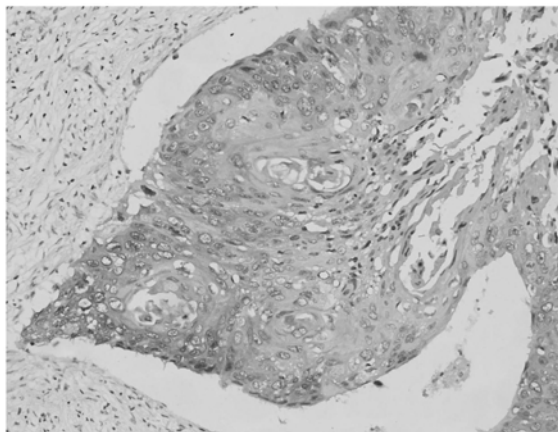
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种AP-Red染色液及其制备方法

(57)摘要

发明人提供了一种AP-Red染色液的制备方法,包括色原制备、底物制备、染色液制备。上述技术方案提供了一种新型的AP-Red及其制备方法,可能是由于该配方中AP-Red中的色原具有多个反应基团,这些基团可以和组织上的基团进行反应并形成共价键,使得AP-Red染色液与组织的连接力增强,使得AP-Red染色液可在染色后直接过有机试剂,不需使用水性封片剂封片,避免产生气泡,厚度得到控制,节约了时间和人力成本,避免影响染色结果的观察。



1. 一种AP-Red染色液的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

色原制备:3.5-3.7g新品红溶于45-55ml质量百分比为1.5%-2%的盐酸溶液中,制得第一混合溶液;向第一混合溶液中加入2-2.2g亚硝酸钠进行重氮化反应,反应温度控制在0-5℃,得到含有重氮化新品红的第一悬浊液,将第一悬浊液进行固液分离,得到含有重氮化新品红的AP-Red色原溶液;

底物制备:0.2-0.4g萘酚AS-BI磷酸盐溶解于40-60ml pH8.2-8.6的Tris缓冲液中,得到第二混合溶液,将第二混合溶液与0.4-0.6ml二甲基甲酰胺混合,得到AP-Red底物;

染色液制备:将AP-Red色原溶液与等体积的AP-Red底物进行混合,得到AP-Red染色液。

2. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述色原制备步骤中,所述重氮化反应在冰水浴中进行。

3. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述色原制备步骤中,所述亚硝酸钠在25-35min内缓慢加入。

4. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,所述底物制备步骤中,Tris缓冲液的质量百分比浓度为18%-25%。

5. 根据权利要求1所述的制备方法,其特征在于,还包括加入Tween-20,在所述底物制备步骤中,向第二混合溶液中加入0.14-0.16ml的Tween-20。

6. 一种AP-Red染色液,其特征在于,所述染色液由权利要求1-5任一所述的制备方法所生产。

7. 根据权利要求6所述的染色液,其特征在于,所述AP-Red染色液用于免疫染色中,AP-Red染色液与抗体连接的碱性磷酸酶反应。

8. 根据权利要求7所述的染色液,其特征在于,所述染色液在使用前避光存放,所述染色液的有效时间为30分钟。

一种AP-Red染色液及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域,特征涉及一种AP-Red染色液及其制备方法。

背景技术

[0002] AP-Red染色液是免疫组织化学或免疫细胞化学中常用的染色液。免疫反应中,抗体所带的碱性磷酸酶与AP-Red染色液起反应,最终使组织切片中抗原位点上呈现红色着色。在显色完成后,要对组织切片进行封片保存。由于目前普通的AP-Red遇到有机溶剂(乙醇、二甲苯)会褪色,因此需要用水性封片剂封片,若要让染色结果长期保存,待水性封片剂干片后再用中性树胶封片。水性封片剂封片容易产生气泡,有一定厚度,存在折光度问题,一定程度影响染色结果的观察,同时水性封片剂耗时费力,给操作人员增加负担。另外,水性封片剂封片后如果没有再次用中性树胶封片,AP-Red的所染红色会在3-5个月后逐渐褪色。

发明内容

[0003] 为此,需要提供一种可在染色后直接过有机试剂,不需使用水性封片的AP-Red染色液。

[0004] 为实现上述目的,发明人提供了一种AP-Red染色液的制备方法,包括以下步骤:

[0005] 色原制备:3.5-3.7g新品红溶于45-55ml质量百分比为1.5%-2%的盐酸溶液中,制得第一混合溶液;向第一混合溶液中加入的2-2.2g亚硝酸钠进行重氮化反应,反应温度控制在0-5℃,得到含有重氮化新品红的第一悬浊液,将第一悬浊液进行固液分离,得到含有重氮化新品红的AP-Red色原溶液;

[0006] 底物制备:0.2-0.4g萘酚AS-BI磷酸盐溶解于40-60ml pH8.2-8.6的Tris缓冲液中,得到第二混合溶液,将第二混合溶液与0.4-0.6ml二甲基甲酰胺混合,得到AP-Red底物;

[0007] 染色液制备:将AP-Red色原溶液与等体积的AP-Red底物进行混合,得到AP-Red染色液。

[0008] 进一步地,所述色原制备步骤中,所述重氮化反应在冰水浴中进行。

[0009] 进一步地,所述色原制备步骤中,所述亚硝酸钠在25-35min内缓慢加入。

[0010] 进一步地,所述底物制备步骤中,Tris缓冲液的质量百分比浓度为18%-25%。

[0011] 进一步地,还包括加入Tween-20,在所述底物制备步骤中,向第二混合溶液中加入0.14-0.16ml Tween-20。

[0012] 发明人还提供了一种AP-Red染色液,所述染色液由以上任一所述的制备方法所生产。

[0013] 进一步地,所述AP-Red染色液用于免疫组化染色中,AP-Red染色液与抗体连接的碱性磷酸酶反应。

[0014] 碱性磷酸酶与萘酚AS-BI磷酸盐起反应,反应后的物质与AP-Red色原(主要为重氮盐)起反应,最终使组织或细胞切片中抗原位点上呈现红色着色

[0015] 进一步地,所述染色液在使用前避光存放,所述染色液的有效时间为30分钟。

[0016] 区别于现有技术,上述技术方案提供了一种新型的AP-Red染色液及其制备方法,可能是由于该配方中AP-Red中的色原具有多个反应基团,这些基团可以和组织上的基团进行反应并形成共价键,使得AP-Red染色液与组织的连接力增强,使得AP-Red染色液可在染色后直接过有机试剂,不需使用水性封片剂封片,避免产生气泡,厚度得到控制,节约了时间和人力成本,避免影响染色结果的观察。

附图说明

[0017] 图1为宫颈组织使用市售AP-Red染色液的染色结果图。

[0018] 图2为宫颈组织使用新型AP-Red染色液的免疫组织化学染色结果图。

[0019] 图3为使用新型AP-Red染色液的宫颈鳞状上皮高度病变染色结果图,细胞片内见同一细胞细胞质呈红色着色、细胞核呈棕黄色或红褐色着色。

具体实施方式

[0020] 为详细说明技术方案的技术内容、构造特征、所实现目的及效果,以下结合具体实施例并配合附图详予说明。

[0021] 本实施方式中所述新品红CAS号:3248-91-7,分子式为 $C_{22}H_{24}C_1N_3$ 。

[0022] 实施例1:AP-Red染色液的制备

[0023] 色原制备:将3.65g的新品红溶解于50ml质量百分比为1.9%的盐酸溶液中制得第一混合溶液,将第一混合溶液置于0℃冰水浴中,并在30分钟内缓慢加入2.07g的亚硝酸钠,得到第一悬浊液,将第一悬浊液进行固液分离,去除固体后,得到AP-Red色原溶液;

[0024] 底物制备:将0.3g的萘酚AS-BI磷酸盐加入50ml pH值为8.4的21%的Tris缓冲液中,混合得到第二混合溶液,将第二混合溶液与0.5ml的二甲基甲酰胺、0.15ml的Tween-20混合,得到AP-Red底物。

[0025] 染色液制备:将AP-Red色原溶液与同体积的AP-Red底物溶液进行混合,得到AP-Red染色液。

[0026] 配置好的AP-Red染色液避光存放,30分钟内有效。

[0027] 免疫组化反应中,抗体所带的碱性磷酸酶与AP-Red底物中的萘酚AS-BI磷酸盐起反应,反应后的物质与AP-Red色原(主要为重氮盐)起反应,最终使织切片中抗原位点上呈现红色着色。

[0028] 实施例2:

[0029] 将实施例1配置好的AP-Red染色液与市售的AP-Red染色液配合p16抗体和碱性磷酸酶标二抗,进行宫颈组织的免疫组织化学染色。

[0030] 试验步骤如下:

[0031] a) 脱蜡水化

[0032] 二甲苯脱蜡、梯度乙醇水化,自来水冲洗;

[0033] b) 抗原修复

[0034] 取适量已稀释成工作液的抗原修复液于不锈钢锅中,将不锈钢锅放置于

[0035] 电磁炉上,大功率加热至沸腾;

- [0036] 将功率调至最小(处于保温状态),将宫颈组织切片置于耐高温染色架上,
- [0037] 放入已沸腾的修复液中,盖上锅盖,继续加热20分钟,自然冷却至室温;
- [0038] 流水冲洗1分钟;
- [0039] 用PBS溶液冲洗3分钟×2次。
- [0040] c) 阻断内源性过氧化物酶
- [0041] 除去PBS液,加100μl内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育10分钟;
- [0042] PBS冲洗3分钟×3次。
- [0043] d) 加一抗
- [0044] 除去PBS液,加100μl一抗,室温下孵育60分钟;
- [0045] PBS冲洗3分钟×3次。
- [0046] e) 加AP酶标第二抗体
- [0047] 除去PBS液,加100μlAP酶标第二抗体,室温下孵育15分钟;
- [0048] PBS冲洗3分钟×3次。
- [0049] f) 加AP-Red染色液
- [0050] 除去PBS液,加100-200μl不同的AP-Red染色液,显色10-15分钟,阳性染色为红色;
- [0051] PBS冲洗3分钟×3次。
- [0052] g) 复染
- [0053] 除去水分,加100-200μl苏木素染色液浅染15-30秒,流水冲洗干净;
- [0054] PBS冲洗返蓝,流水冲洗干净。
- [0055] h) 脱水、透明、封片
- [0056] 85%乙醇中,浸泡1分钟;
- [0057] 95%乙醇中,浸泡1分钟;
- [0058] 无水乙醇中,浸泡1分钟;
- [0059] 二甲苯透明;
- [0060] 中性树胶和盖玻片封片。
- [0061] 使用了市售AP-Red染色液的组织切片在h)脱水、透明步骤后(没有使用水性封片剂封片,直接过有机试剂),红色的染色部位出现了晕色和褪色的情况,具体见图1宫颈组织使用市售AP-Red染色液(进行脱水、透明后)的染色图。
- [0062] 而使用了本发明实施例1中配置的AP-Red染色液的组织切片则在脱水透明后,红色染色部位则定位清晰、没有出现晕色和褪色情况,具体可见图2。以上染色片在常温下进行保存,染色片在保存3年后色泽依然鲜艳没有出现褪色的情况。
- [0063] 实施例3:
- [0064] 将实施例1配制好的AP-Red染色液配合进行p16、Ki-67混合抗体进行宫颈细胞薄片的免疫细胞化学染色,试验步骤如下:
- [0065] a) 细胞固定
- [0066] 宫颈细胞薄片置于95%乙醇中,浸泡30分钟;
- [0067] 风干。
- [0068] b) 抗原修复
- [0069] 抗原修复液隔水加热至95℃;

[0070] 将固定后的细胞薄片置于耐高温染色架上,蒸馏水浸泡湿润,放入95℃抗原修复液中修复20分钟后,自然冷却至室温;

[0071] 流水冲洗1分钟;

[0072] 用PBS溶液冲洗3分钟×2次。

[0073] c) 阻断内源性过氧化物酶

[0074] 除去PBS液,加100μl内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育10分钟;

[0075] PBS冲洗3分钟×3次。

[0076] d) 加(p16+Ki-67)组合一抗

[0077] 除去PBS液,加100μl(p16+Ki-67)组合一抗,室温下孵育60分钟;

[0078] PBS冲洗3分钟×3次。

[0079] e) 加HPR+AP酶标第二抗体(混合抗体)

[0080] 除去PBS液,加100μlHPR+AP酶标第二抗体,室温下孵育15分钟;

[0081] PBS冲洗3分钟×3次。

[0082] f) 加AP-Red染色液

[0083] 除去PBS液,加100-200μl实施例1配制好的AP-Red染色液,显色10-15分钟,必要时可在显微镜下观察掌握染色时间,阳性染色为红色;

[0084] PBS冲洗3分钟×3次。

[0085] g) 加DAB显色液

[0086] 除去PBS液,加100-200μl配制好的DAB显色剂,显色5分钟,可在显微镜下观察掌握染色时间,阳性染色为棕黄(褐)色;

[0087] 流水冲洗终止显色。

[0088] h) 复染

[0089] 除去水分,加100-200μl苏木素染色液浅染15-30秒,流水冲洗干净;

[0090] PBS冲洗返蓝,流水冲洗干净。

[0091] i) 脱水、透明、封片

[0092] 85%乙醇中,浸泡1分钟;

[0093] 95%乙醇中,浸泡1分钟;

[0094] 无水乙醇中,浸泡1分钟;

[0095] 二甲苯透明;

[0096] 中性树胶和盖玻片封片。

[0097] 使用了本发明实施例1中配置的AP-Red染色液的宫颈鳞状上皮高度病变细胞薄片的红色染色部位则定位清晰、细胞片内见同一细胞细胞质呈红色着色,细胞核呈棕黄色或红褐色着色,细胞质没有出现晕色和褪色情况。具体可见图3。以上染色片在常温下进行保存,在保存3年后色泽依然鲜艳没有出现褪色的情况。

[0098] 实施例4:AP-Red染色液的制备

[0099] 色原制备:将3.5g的新品红溶解于45ml质量百分比为1.5%的盐酸溶液中制得第一混合溶液,将第一混合溶液置于0℃冰水浴中,并在25分钟内缓慢加入2g的亚硝酸钠,得到第一悬浊液,将第一悬浊液进行固液分离,得到AP-Red色原溶液;

[0100] 底物制备:将0.2g的萘酚AS-BI磷酸盐加入40ml质量百分比浓度为18%的Tris缓

冲液pH8.2中,混合得到第二混合溶液,将第二混合溶液与0.4ml的二甲基甲酰胺、0.14ml的Tween-20混合,得到AP-Red底物;

[0101] 染色液制备:将AP-Red色原与同体积AP-Red底物进行混合,得到AP-Red染色液。

[0102] 实施例5:AP-Red染色液的制备

[0103] 色原制备:将3.7g的新品红溶解于55ml质量百分比为2%的盐酸溶液中制得第一混合溶液,将第一混合溶液置于冰水浴中,35分钟内加入2.2g亚硝酸钠,得到第一悬浊液,将第一悬浊液进行固液分离,得到AP-Red色原溶液;

[0104] 底物制备:将0.4g的萘酚AS-BI磷酸盐加入60ml质量百分比浓度为25%的Tris缓冲液pH8.6中,混合得到第二混合溶液,将第二混合溶液与0.6ml的二甲基甲酰胺、0.16ml的Tween-20混合,得到AP-Red底物;

[0105] 染色液制备:将AP-Red色原与同体积AP-Red底物进行混合,得到AP-Red染色液。

[0106] 需要说明的是,在本文中,诸如第一和第二等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来,而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且,术语“包括”、“包含”或者其任何其他变体意在涵盖非排他性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者终端设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者终端设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括……”或“包含……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者终端设备中还存在另外的要素。此外,在本文中,“大于”、“小于”、“超过”等理解为不包括本数;“以上”、“以下”、“以内”等理解为包括本数。

[0107] 需要说明的是,尽管在本文中已经对上述各实施例进行了描述,但并非因此限制本发明的专利保护范围。因此,基于本发明的创新理念,对本文所述实施例进行的变更和修改,或利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,直接或间接地将以上技术方案运用在其他相关的技术领域,均包括在本发明的专利保护范围之内。

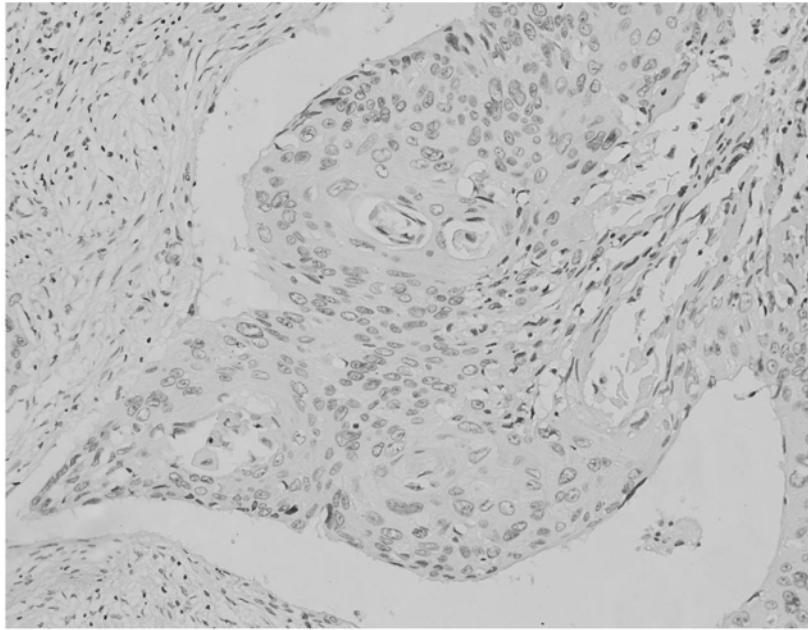


图1

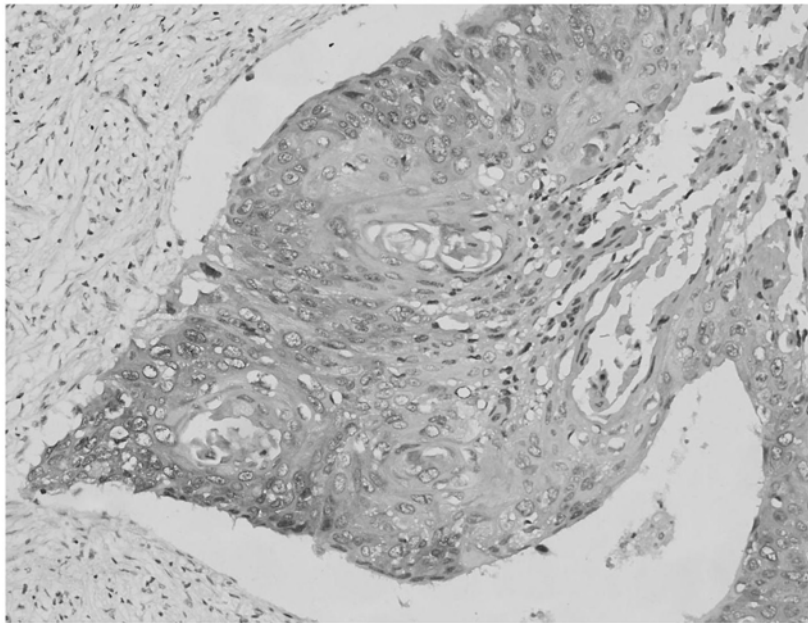


图2

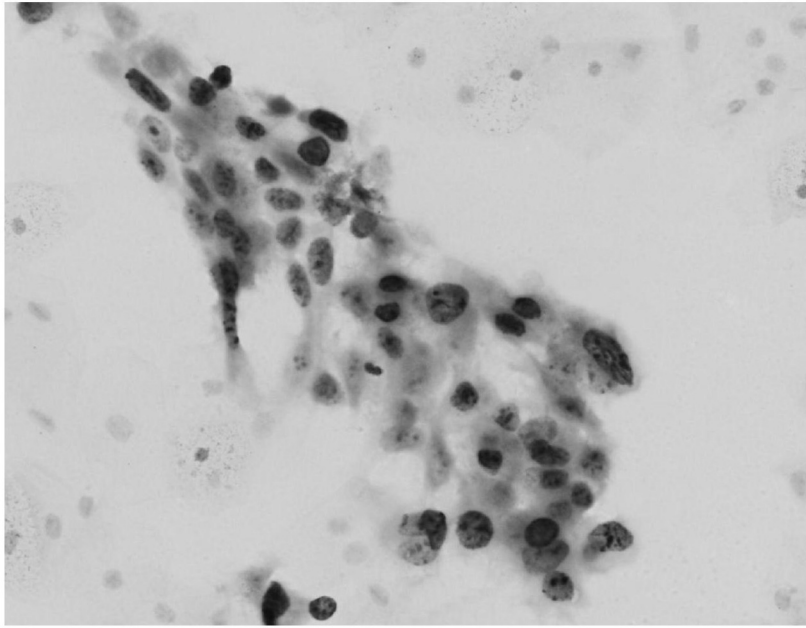


图3

专利名称(译)	一种AP-Red染色液及其制备方法		
公开(公告)号	CN108646016A	公开(公告)日	2018-10-12
申请号	CN201810512875.8	申请日	2018-05-25
[标]发明人	杨清海 史永勤 陈惠玲 陈泳		
发明人	杨清海 史永勤 陈惠玲 陈泳		
IPC分类号	G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

发明人提供了一种AP-Red染色液的制备方法，包括色原制备、底物制备、染色液制备。上述技术方案提供了一种新型的AP-Red及其制备方法，可能是由于该配方中AP-Red中的色原具有多个反应基团，这些基团可以和组织上的基团进行反应并形成共价键，使得AP-Red染色液与组织的连接力增强，使得AP-Red染色液可在染色后直接过有机试剂，不需使用水性封片剂封片，避免产生气泡，厚度得到控制，节约了时间和人力成本，避免影响染色结果的观察。

