



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112305213 A

(43)申请公布日 2021.02.02

(21)申请号 201910682378.7

(22)申请日 2019.07.26

(71)申请人 项征

地址 100006 北京市东城区东后河沿一号
院三号楼二门102室

(72)发明人 项征

(74)专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

代理人 张伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

权利要求书2页 说明书8页 附图3页

(54)发明名称

富兮双染染色试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明提供一种用于所有病理组织切片(特别是肺癌TNM分期)的染色试剂盒及其使用方法。本发明提供的染色试剂盒及其使用方法将免疫组化染色与特殊染色联合应用,可以在同一张切片上完成两种染色方式,缩短了染色时间,且展示出的信息量远比传统分别单染提供的信号与信息量大,避免了微小浸润的漏诊,可以为临床后期治疗提供行之有效的帮助,为明确病人的临床分期提供了重要的诊断依据,还能够准确判断出其他类型肿瘤是否存在脉管瘤栓。若选择其他类型的标志物,也可以作为心血管疾病判别的一种指标。

1. 一种用于病理组织切片的双染试剂盒,其包括以下试剂:

- 1) 针对肿瘤标志物的第一抗体;
- 2) 能够与第一抗体结合的第二抗体;
- 3) 卢戈氏碘液,硫代硫酸钠溶液,醛复红溶液。

2. 根据权利要求1所述的染色试剂盒,其特征在于,所述第一抗体为鼠抗人或兔抗人的单克隆抗体;所述肿瘤标志物选自TTF-1、细胞角蛋白AE1/AE3、P40和P63;所述第一抗体在抗体保护液或抗体稀释液中,使用浓度为3mg/mL;

优选地,所述第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或羊抗兔IgG多克隆抗体;所述第二抗体在抗体保护液或抗体稀释液中,使用浓度为3mg/mL。

3. 根据权利要求1或2所述的染色试剂盒,其特征在于,所述卢戈氏碘液含有0.01g/mL的碘和0.02g/mL的碘化钾;所述硫代硫酸钠溶液含有0.05g/mL的硫代硫酸钠;所述醛复红溶液含有0.0001g/mL的碱性复红、0.119mol/mL HCl和1%的三聚乙醛。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的染色试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:

- 4) DAB显色剂;
- 5) EDTA抗原修复液,pH9.0,浓度为1mM;
- 6) 过氧化氢水溶液,浓度为3%。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的染色试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:

- 7) 乙醇;
- 8) 二甲苯;

所述乙醇包括100%乙醇和浓度分别为95%、85%、70%的乙醇水溶液。

6. 使用权利要求1至5中任一项所述的双染试剂盒对病理组织切片进行染色的双染方法,所述双染方法包括:

- A) 将石蜡组织切片经脱蜡、水化处理、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断;
- B) 滴加第一抗体,孵育,PBS洗涤;滴加第二抗体,孵育,PBS洗涤;然后加入DAB显色剂,适时终止反应,水洗;
- C) 加入卢戈氏碘液,水洗;加入硫代硫酸钠溶液,水洗,乙醇洗涤;加入醛复红溶液,乙醇分化,水洗;
- D) 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

7. 根据权利要求6所述的双染方法,其特征在于,在步骤A)中,石蜡组织切片的厚度为3-5 μ m,并且在70℃下烘烤2h;

所述脱蜡包括二甲苯脱蜡2 $\times$ 10min;

所述水化处理包括经100%乙醇2 $\times$ 3min、95%乙醇水溶液2 $\times$ 3min、85%乙醇水溶液1 $\times$ 3min的梯度乙醇水化,然后用水充分洗涤;

所述抗原修复包括将切片在pH9.0、1mM的EDTA抗原修复液中加热到100℃保持1-5min,自然冷却至室温,水洗3 $\times$ 3min;

所述内源性过氧化物酶阻断包括将切片在3%的过氧化氢中在室温下孵育10min以去除内源性过氧化物酶,然后水洗3 $\times$ 3min,PBS洗3 $\times$ 3min。

8. 根据权利要求6或7所述的双染方法,其特征在于,所述步骤B)包括:滴加第一抗体,在湿盒中在室温下孵育40-60min或者在4℃下过夜,PBS洗涤3 $\times$ 3min;然后滴加第二抗体,

在湿盒中在室温下孵育10-15min, PBS洗涤 3×3 min; 之后加入DAB显色剂200 μ L, 镜下控制, 适时终止反应, 水洗 3×3 min。

9. 根据权利要求6至8中任一项所述的双染方法, 其特征在于, 所述步骤C) 包括:

加入卢戈氏碘液处理5-15min, 水洗; 然后加入硫代硫酸钠溶液处理5-15min, 水洗, 70%乙醇水溶液稍洗; 之后加入醛复红溶液处理5-20min, 加入70%乙醇水溶液分化至切片不脱色为止, 水洗;

任选地, 在最后水洗之前, 根据信号结果的需求做相应的复染。

10. 根据权利要求6至9中任一项所述的双染方法, 其特征在于, 在步骤D) 中, 所述乙醇脱水包括:

经70%乙醇水溶液 $1 \times 1-2$ min、85%乙醇水溶液 $1 \times 1-2$ min、95%乙醇水溶液 $2 \times 1-2$ min、100%乙醇 $2 \times 1-2$ min依次梯度乙醇脱水;

优选地, 采用的PBS为pH7.2的磷酸二氢钠/磷酸氢二钠。

富兮双染染色试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域的病理染色方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤的发病率和死亡率逐年上升,严重威胁着患者健康。肿瘤准确分期是精准治疗的前提条件,比如肺癌胸膜受侵与否是肿瘤分期及术后辅助化疗的关键指标之一。

[0003] 关于肺癌胸膜受侵与预后及治疗的关系,早在1958年即有学者观察到肺癌胸膜受侵是不良预后因素,1975年脏层胸膜侵犯作为了TNM分期(T:原发肿瘤;N:区域淋巴结;M:远处转移)中的一个独立概念。1988年,Hammar首先提出肺癌胸膜侵犯的分级方法:P0-没有胸膜侵犯,肿瘤未超出脏层胸膜弹力层;P1-肿瘤侵犯超过弹力层;P2-肿瘤侵犯脏层胸膜表面;P3-肿瘤侵犯壁层胸膜和/或胸壁;Px-肺实质内与胸膜没有任何关系的肿瘤。2000年,日本肺癌学会基本认同Hammar分级法(除了Px),但在伴脏层胸膜侵犯肿瘤T分期的划分上有所差异。还有学者将脏层胸膜受累定义为肿瘤浸润至距脏层胸膜边缘1mm以内或累及脏层胸膜边缘。2009年AJCC 7th TNM分期系统正式采用了改良的Hammar分级法,即根据肿瘤组织与胸膜外弹力层之间的位置关系来判断是否存在胸膜受侵,如果明确癌组织穿透了外弹力层,则明确诊断为胸膜受侵,患者肿瘤分期至少为p T2a,是术后需要辅助化疗的指征。

[0004] 世界卫生组织推荐肺癌诊断常规技术中,关于胸膜受侵的判断方法是普通弹力纤维染色,即采用特殊染色方法,将弹力纤维勾勒出来,再由病理医师显微镜下观察判读。其缺点是弹力纤维是黑色,与肿瘤细胞颜色一样,并且还常与胸膜碳沫混杂,难以准确辨别肿瘤细胞与弹力纤维的位置关系,造成胸膜受侵判读困难,医师间主观意见相左。另外可采用免疫组织化学染色,但是,单独免疫组织化学染色虽然可以借助抗原抗体复合物反应显示出肿瘤细胞,却无法显示弹力纤维,同样也难以准确显示肿瘤细胞与胸膜弹力纤维层的关系,造成肺癌胸膜受侵判读困难,从而难以准确分期,进而影响术后患者下一步治疗方案的选择。

发明内容

[0005] 鉴于免疫组化染色与特殊染色(即普通弹力纤维染色)各自的步骤,联合二者进行套染尤为重要。因此,本发明的目的是提供一种联合免疫组化与特殊染色应用于病理组织切片的套染试剂盒及其使用方法,从而使染色过程简便快捷,方便在同一张切片上得到丰富对比性强的信号与信息,使诊断分期一目了然,准确性大幅提高。

[0006] 本发明所涉及到的全部实验由贵州富兮生物科技有限公司合作支持。

[0007] 具体而言,本发明的技术方案如下。

[0008] 一方面,本发明提供一种用于病理组织切片的双染试剂盒,其包括以下试剂:

[0009] 1) 针对肿瘤标志物的第一抗体;

[0010] 2) 能够与第一抗体结合的第二抗体;

[0011] 3) 卢戈氏碘液,硫代硫酸钠溶液,醛复红溶液。

[0012] 其中,所述第一抗体为鼠抗人或兔抗人的单克隆抗体;肿瘤标志物选自TTF-1、细胞角蛋白AE1/AE3、P40和P63等。并且,第一抗体在抗体保护液或抗体稀释液中,使用总蛋白浓度为3mg/mL。

[0013] 所述第二抗体为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠或羊抗兔IgG多克隆抗体。并且,第二抗体在抗体保护液或抗体稀释液中,使用总蛋白浓度为3mg/mL。

[0014] 所述抗体保护液或抗体稀释液为本领域用于储存抗体的常规试剂,例如pH7.5并含有载体蛋白、非离子型去污剂以及作为防腐剂的0.09%叠氮化钠等的Tris缓冲液。

[0015] 所述卢戈氏碘液含有0.01g/mL的碘和0.02g/mL的碘化钾。例如,1瓶5mL液体内含含有0.05克的碘,0.1克的碘化钾。

[0016] 所述硫代硫酸钠溶液含有0.05g/mL的硫代硫酸钠。例如,1瓶5mL液体内含含有0.25克硫代硫酸钠。

[0017] 所述醛复红溶液含有0.0001g/mL的碱性复红、0.119mol/mL HCl和1% (体积百分比) 的三聚乙醛。例如,1瓶5mL液体内含含有0.0005克碱性复红,0.119mol/mL HCl,0.05mL三聚乙醛。

[0018] 卢戈氏碘液、硫代硫酸钠溶液、醛复红溶液可通过厂家直销或经销商途径购买。

[0019] 除此之外,本发明提供的双染试剂盒还包括以下试剂:

[0020] 4) DAB显色剂;

[0021] 可采用DAB染液浓缩型(二氨基联苯胺(DAB)溶于有机溶液中的二氨基联苯胺盐酸盐)和DAB底物缓冲液(内含氧化氢与防腐剂缓冲液)染色时1:10配制得到;

[0022] 5) EDTA抗原修复液;

[0023] 6) 过氧化氢水溶液。

[0024] 所述EDTA抗原修复液具有pH 9.0,浓度为1mM。例如,选用丹麦DAKO公司、货号为DM828的EDTA抗原修复液。

[0025] 所述过氧化氢水溶液的浓度为3%。

[0026] 进一步地,本发明提供的双染试剂盒还包括以下试剂:

[0027] 7) 乙醇;

[0028] 8) 二甲苯。

[0029] 所述乙醇包括100%乙醇和浓度分别为95%、85%、70%的乙醇水溶液。

[0030] 另一方面,本发明还提供使用本发明的染色试剂盒对病理组织切片进行染色的双染方法,该双染方法包括:

[0031] A) 将石蜡组织切片经脱蜡、水化处理、抗原修复、内源性过氧化物酶阻断;

[0032] B) 滴加第一抗体,孵育,PBS洗涤;滴加第二抗体,孵育,PBS洗涤;然后加入DAB显色剂,适时终止反应,水洗;

[0033] C) 加入卢戈氏碘液,水洗;加入硫代硫酸钠溶液,水洗,乙醇洗涤;加入醛复红溶液,乙醇分化,水洗;

[0034] D) 乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

[0035] 在步骤A)中,石蜡组织切片的厚度为3-5 μ m,并且在70℃下烘烤2h;所述脱蜡包括二甲苯脱蜡2 $\times$ 10min;

[0036] 所述水化处理包括经100%乙醇2 $\times$ 3min、95%乙醇水溶液2 $\times$ 3min、85%乙醇水溶

液1×3min的梯度乙醇水化,然后用水充分洗涤;

[0037] 所述抗原修复包括将切片在pH 9.0、1mM的EDTA抗原修复液中加热到100℃保持1-5min,自然冷却至室温,水洗3×3min;

[0038] 所述内源性过氧化物酶阻断包括将切片在3%的过氧化氢水溶液中在室温下孵育10min以去除内源性过氧化物酶,然后水洗3×3min,PBS洗3×3min。

[0039] 关于步骤B),其包括:滴加第一抗体,在湿盒中在室温下孵育40-60min或者在4℃下孵育过夜,PBS洗涤3×3min;然后滴加第二抗体,在湿盒中在室温下孵育10-15min,PBS洗涤3×3min;之后加入DAB显色剂,镜下控制,适时终止反应,水洗3×3min。

[0040] 关于步骤C),其包括:

[0041] 加入卢戈氏碘液处理5-15min,水洗;然后加入硫代硫酸钠溶液处理5-15min,水洗,70%乙醇水溶液稍洗;之后加入醛复红溶液处理5-20min,加入70%乙醇水溶液分化至切片不脱色为止,水洗。

[0042] 在最后水洗之前,可以根据需要做相应的复染。

[0043] 在步骤D)中,所述乙醇脱水包括:

[0044] 经70%乙醇水溶液1×1-2min、85%乙醇水溶液1×1-2min、95%乙醇水溶液2×1-2min、100%乙醇2×1-2min依次梯度乙醇脱水。

[0045] 上述方法中采用的PBS为pH 7.2的磷酸二氢钠/磷酸氢二钠。

[0046] 根据本发明的具体实施方式,本发明提供的病理组织切片染色方法包括:

[0047] 常规规范化处理的石蜡组织,择取需要进行染色的组织块,切片3-5μm,然后入70℃温箱烘烤2h;常规二甲苯脱蜡2次,每次10min;然后100%乙醇2次每次3min、95%乙醇水溶液2次每次3min、85%乙醇水溶液1次每次3min依次梯度乙醇水化10s,自来水充分冲洗,蒸馏水漂洗3次;将切片入pH 9.0、1mM EDTA抗原修复液中在压力锅中加热到100℃修复1-5min(冒气后持续2-3min),自然冷却至室温,蒸馏水洗3次,每次3min;然后将切片在3%的过氧化氢水溶液中,在室温下孵育10min以去除内源性过氧化物酶,然后蒸馏水洗3次,每次3min,PBS冲洗3次,每次3min;

[0048] 滴加第一抗体200μL,在湿盒中在室温下孵育40-60min或者在4℃下孵育过夜,之后PBS冲洗3次,每次3min;然后滴加第二抗体200μL,在湿盒中在室温下孵育10-15min,之后PBS冲洗3次,每次3min;加入新鲜配制的DAB显色剂200μL,镜下控制,适时终止反应(例如,切片呈棕色,信号强度适中),蒸馏水洗3次,每次3min;

[0049] 加入卢戈氏碘液200μL处理5-15min,蒸馏水洗;加入硫代硫酸钠溶液200μL处理5-15min,蒸馏水洗,然后70%乙醇水溶液洗涤10s;之后加入醛复红溶液200μL处理5-20min;加入70%乙醇水溶液分化至切片不脱色为止,蒸馏水洗,任选地根据需求做相应的复染再最后蒸馏水洗;

[0050] 70%乙醇水溶液1次每次1-2min、85%乙醇水溶液1次每次1-2min、95%乙醇水溶液2次每次1-2min、100%乙醇2次每次1-2min依次梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

[0051] 肿瘤准确分期是精准治疗的前提条件,比如肺癌胸膜受侵与否是肿瘤分期及术后辅助化疗的关键指标之一。本发明的技术即是针对此临床问题设计出的一套特殊染色和免疫组化染色套染的染色方法及相关试剂盒,例如用于辅助肺癌胸膜受侵的判读,对肺癌患

者的明确诊断、临床的准确分期,对于患者获取最佳的临床治疗手段具有重要意义。

[0052] 相对于现有技术而言,本发明提供了一种可用于所有类型病理切片的结合免疫组化与特殊染色的双染试剂盒和双染方法,其中涉及了用于免疫组化染色的第一组试剂、用于特殊染色的第二组试剂以及相应的染色操作。该双染试剂盒和双染方法在本发明中命名为富亨双染染色试剂盒和方法,特别适用于病理组织切片的染色。

[0053] 具体而言,本发明的试剂盒与方法中采用的第一组试剂针对肿瘤标志物,利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过抗体标记的显色来确定组织内特异肿瘤标志物的存在与否。根据肿瘤诊断或分期方向可选用不同免疫标志物。例如,本发明的发明人从已知常用免疫标志物中选择了TTF-1、细胞角蛋白、P40和P63等。其中TTF-1是肺腺癌最常用的免疫标志物之一,75%-85%的肺腺癌表达TTF-1,且常呈弥漫一致性的强阳性,是肺腺癌非常有用的表达标志物。采用抗TTF-1对TTF-1免疫标志物进行特异性染色,可非常有效地显示出胸膜外弹力层外或胸膜表面的腺癌细胞,从而清楚观察肺腺癌与胸膜的关系,特别可用于肺癌TNM分期。此外,本发明的一抗还示例性选用了AE1/AE3,其是针对多种细胞角蛋白(CK)亚型的单克隆抗体,对骨髓、外周血、淋巴结和淋巴瘤的组织 and 细胞基本无交叉反应,而对上述癌组织和细胞具有特异性反应,可用于鉴别TTF-1阴性的肺癌如鳞状细胞癌,同样可借助本双染试剂盒同步观察肿瘤组织与弹力纤维的位置关系,进而准确辨别肺癌分期或鉴别其它上皮源性肿瘤。

[0054] 本发明的双染试剂盒与方法中采用的第二组试剂为富亨弹力纤维染液(卢戈氏碘液、硫代硫酸钠溶液、醛复红溶液),针对弹力纤维进行组织化学染色。弹力纤维分布广泛,特别是皮肤、血管壁、韧带、气管、肺泡、腺体的胆管处等,在常规HE染色中难以与其他纤维区别。而且,弹力纤维系统由弹力纤维、前弹力纤维和耐酸纤维三种纤维构成,三种纤维的分布、走行和组织化学均不相同。采用富亨弹力纤维染液可以把弹力纤维系统中的三种纤维同时显示出来。

[0055] 由此,采用本发明的双染试剂盒及其方法将两种各自独立的染色方法结合起来,创造一种独特的双染染色方法,将弹力纤维和肿瘤细胞分别用不同的显色方式标记在同一张切片上可以在同一张切片上完成两种染色方式,不但大大缩短了染色时间,而且稳定性强,检测信号结果性质稳定(染色后,免疫组化阳性信号为棕黄色,弹力纤维为紫色,其他为复染色),直观,对比性强,展示出的信息量远比传统分别单染提供的信号与信息量大;临床观察一目了然,避免漏诊,也减少了医师之间的不一致性,为临床后期治疗提供了行之有效的帮助,因此必将极大方便病理医师观察判读肿瘤细胞与胸膜的关系,准确无误地对肺癌手术标本进行肿瘤分期,以精准指导术后患者下一步治疗方案。

[0056] 此外,随着病理诊断数字化的发展趋势,这一发明更重要的地方在于,可在同一张切片上显示双倍染色信息,便于数字化细胞显微分割和多通道信息判读。通过本发明的染色方法,分辨率增加,胸膜微小浸润都可充分展示,为明确病人的临床分期提供了重要的诊断依据。由于血管壁也富含弹力纤维,若为其他类型的肿瘤,此方法还可分辨血管内有否瘤栓或肿瘤细胞是否浸润到血管壁,这些发现都将丰富肿瘤病理诊断信息,为预后判断及后续治疗提供准确依据。

附图说明

[0057] 以下,结合附图来详细说明本发明的实施方案,其中:

[0058] 图1分别示出了采用普通HE染色、普通弹力纤维染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富亨双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富亨双染染色的预实验结果。

[0059] 图2分别示出了采用普通HE染色、普通弹力纤维染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富亨双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富亨双染染色的预实验2结果。

[0060] 图3分别示出了肺组织采用普通HE染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富亨双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富亨双染染色的验证实验1结果。

[0061] 图4分别示出了肺腺癌采用普通HE染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富亨双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富亨双染染色的验证实验2结果。

具体实施方式

[0062] 以下参照具体的实施例来说明本发明。本领域技术人员能够理解,这些实施例仅用于说明本发明,其不以任何方式限制本发明的范围。

[0063] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的药材原料、试剂材料等,如无特殊说明,均为市售购买产品。

[0064] 在以下实施例中,采用的组织切片来自同一组织块。

[0065] 一抗为迈新Kit-0009广谱型细胞角蛋白(AE1/AE3)或MAB-0266甲状腺转录因子(TTF-1);

[0066] 二抗为EnVision™FLEX/HRP检测试剂(SM802)。

[0067] 实施例1普通弹力纤维染色方法

[0068] 本实施例采用购自益利公司的弹力纤维染色试剂盒,参考说明书,按照以下操作进行:

[0069] 1) 常规规范化处理的石蜡组织,切片3-5 μ m;

[0070] 2) 入70℃温箱烘烤2个小时;

[0071] 3) 常规二甲苯脱蜡2次,每次10min,然后经100%乙醇2次、95%乙醇水溶液2次、85%乙醇水溶液1次梯度乙醇水化数秒,自来水充分冲洗,蒸馏水漂洗3次;

[0072] 4) 入铁碘苏木素10-15min,水洗;

[0073] 5) 分化液分化数秒,至多余液体褪去;

[0074] 6) 水洗,入95%的乙醇退碘1min;

[0075] 7) 入VG液复染1min;

[0076] 8) 95%乙醇水溶液分化数秒;

[0077] 9) 100%乙醇脱水两次;

[0078] 10) 二甲苯透明;

[0079] 11) 中性树胶封固。

[0080] 实施例2本发明以抗TTF-1抗体为一抗的双染方法

[0081] 常规规范化处理的石蜡组织,择取需要进行染色的组织块,切片3-5 μ m,然后入70℃温箱烘烤2h;常规二甲苯脱蜡2次,每次10min;然后100%乙醇2次每次3min、95%乙醇水溶液2次每次3min、85%乙醇水溶液1次每次3min依次梯度乙醇水化10s,自来水充分冲洗,

蒸馏水漂洗3次;将切片入pH 9.0、1mM EDTA抗原修复液中在压力锅中加热到100℃修复1-5min(冒气后持续2-3min),自然冷却至室温,蒸馏水洗3次,每次3min;然后将切片在3%的过氧化氢水溶液中,在室温下孵育10min以去除内源性过氧化物酶,然后蒸馏水洗3次,每次3min,PBS冲洗3次,每次3min;

[0082] 滴加第一抗体(TTF-1) 200μL,在湿盒中在室温下孵育40-60min或者在4℃下孵育过夜,之后PBS冲洗3次,每次3min;然后滴加第二抗体200μL,在湿盒中在室温下孵育10-15min,之后PBS冲洗3次,每次3min;加入1:10配制的DAB显色剂(DAB染液+DAB底物缓冲液) 200μL,镜下控制,适时终止反应(例如,切片呈棕色,信号强度适中),蒸馏水洗3次,每次3min;

[0083] 加入卢戈氏碘液200μL处理5-15min,蒸馏水洗;加入硫代硫酸钠溶液200μL处理5-15min,蒸馏水洗,然后70%乙醇水溶液洗涤10s;之后加入醛复红溶液200μL处理5-20min;加入70%乙醇水溶液分化至切片不脱色为止,蒸馏水洗,任选地根据需求做相应的复染再最后蒸馏水洗;

[0084] 70%乙醇水溶液1次每次1-2min、85%乙醇水溶液1次每次1-2min、95%乙醇水溶液2次每次1-2min、100%乙醇2次每次1-2min依次梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

[0085] 实施例3本发明以AE1/AE3为一抗的双染方法

[0086] 常规规范化处理的石蜡组织,择取需要进行染色的组织块,切片3-5μm,然后入70℃温箱烘烤2h;常规二甲苯脱蜡2次,每次10min;然后在100%乙醇2次每次3min、95%乙醇水溶液2次每次3min、85%乙醇水溶液1次每次3min依次梯度乙醇水化10s,自来水充分冲洗,蒸馏水漂洗3次;将切片入pH 9.0、1mM EDTA抗原修复液中在压力锅中加热到100℃修复1-5min(冒气后持续2-3min),自然冷却至室温,蒸馏水洗3次,每次3min;然后将切片在3%的过氧化氢水溶液中,在室温下孵育10min以去除内源性过氧化物酶,然后蒸馏水洗3次,每次3min,PBS冲洗3次,每次3min;

[0087] 滴加第一抗体(AE 1/AE 3) 200μL,在湿盒中在室温下孵育40-60min或者在4℃下孵育过夜,之后PBS冲洗3次,每次3min;然后滴加第二抗体200μL,在湿盒中在室温下孵育10-15min,之后PBS冲洗3次,每次3min;加入1:10配制的DAB显色剂(DAB染液+DAB底物缓冲液) 200μL,镜下控制,适时终止反应(例如,切片呈棕色,信号强度适中),蒸馏水洗3次,每次3min;

[0088] 加入卢戈氏碘液200μL处理5-15min,蒸馏水洗;加入硫代硫酸钠溶液200μL处理5-15min,蒸馏水洗,然后70%乙醇水溶液洗涤10s;之后加入醛复红溶液200μL处理5-20min;加入70%乙醇水溶液分化至切片不脱色为止,蒸馏水洗,任选地根据需求做相应的复染再最后蒸馏水洗;

[0089] 70%乙醇水溶液1次每次1-2min、85%乙醇水溶液1次每次1-2min、95%乙醇水溶液2次每次1-2min、100%乙醇2次每次1-2min依次梯度乙醇脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

[0090] 实验结果分别见图1至图4。

[0091] 图1分别示出了就肺腺癌采用普通HE染色、普通弹力纤维染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富亨双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富亨双染染色的预实验1结果。其

中,图1A为常规HE染色结果,由图中可见胸膜,但无法清楚观察到弹力纤维。箭头示胸膜间皮细胞增生,伴较多碳沫沉着。图1B为普通弹力纤维染色结果,由图中可见胸膜弹力层显示为黑色(图下部左边黄色箭头),肿瘤细胞(图下部右边黑色箭头)及胸膜间皮表面细胞均显示为黑色(图上部蓝色箭头),难以准确辨别肿瘤是否侵犯弹力层。图1C为AE1/AE3富兮染色结果,由图中可见弹力纤维显示为紫色(图下部左边三个黄色箭头),肿瘤细胞为AE1/AE3胞浆内棕色颗粒(图上部左边和下部右边各一个黑色箭头);胸膜表面间皮细胞呈棕色(图上部右边一个蓝色箭头);此镜下形态可清晰判断弹力纤维未被穿透(PL0)。图1D为TTF1富兮染色结果,由图中可见弹力纤维显示为紫色(图下部三个黄色箭头),肿瘤细胞为TTF-1胞核棕色颗粒(图上部左右各一个黑色箭头);胸膜表面细胞呈TTF-1阴性(图上部中间一个蓝色箭头),证实为增生的间皮细胞,此镜下形态可清晰判断弹力纤维未被肿瘤穿透(PL0)。

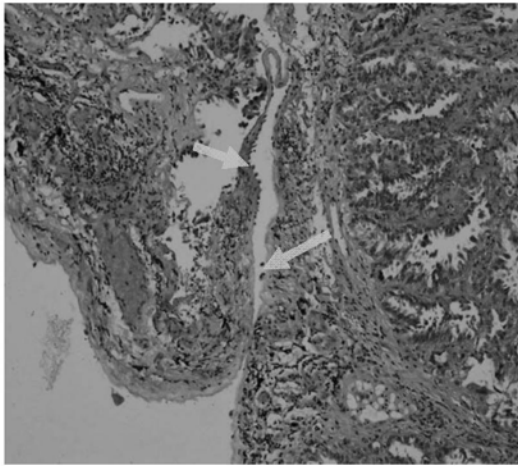
[0092] 图2分别示出了就肺腺癌采用普通HE染色、普通弹力纤维染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富兮双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富兮双染染色的预实验2结果。其中,图2A为普通HE染色结果,由图中可见可观察胸膜表面(图下部左边两个黄色箭头)及肿瘤组织(图下部右边一个和上部左边一个黑色箭头),但无法明辨胸膜外弹力层,故无法准确判断胸膜是否受侵。图2B为普通弹力纤维染色结果,由图中可见弹力纤维(图下部左边三个黄色箭头)及肿瘤组织均显示为黑色(图下部右边一个黑色箭头);虽可见弹力纤维未被肿瘤组织穿透(PL0),但单一黑色着色,肿瘤组织与弹力纤维对比不清晰,也难与胸膜碳沫颗粒及小血管鉴别。图2C为AE1/AE3富兮染色结果,由图中可见同时清晰显示胸膜弹力纤维层(图下部左边两个和上部左边一个黄色箭头)及肿瘤组织(图下部右边一个和上部右边一个黑色箭头),两者色彩对比鲜明,与传统弹力纤维染色相比,能更好地区分胸膜及肿瘤的位置关系,从而明确胸膜未受侵(PL0)。图2D为TTF1富兮染色结果,由图中可见胸膜弹力纤维(图下部较下一个黄色箭头)及血管弹力纤维(图上部右边一个红色箭头)显示为明确紫色,在弹力纤维复制区域(图下部较上一个蓝色箭头)可见TTF-1阳性细胞团(图上部左边一个黑色箭头,传统弹力纤维很难显示),明确提示为胸膜受侵(PL1)。

[0093] 图3分别示出了就肺腺癌采用普通HE染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富兮双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富兮双染染色的验证实验1结果。其中,图3A为普通HE染色结果,由图中可见胸膜小血管增生(图上部中间一个黄色箭头)、间皮细胞增生(图上部右边一个红色箭头)伴碳沫沉着及淋巴细胞浸润(图上部左边一个绿色箭头)。难以直观观察胸膜弹力纤维层。图3B为AE1/AE3富兮染色结果,由图中可见清楚显示肺泡上皮(图上部较下一个黑色箭头)与胸膜弹力层(图上部较上两个黄色箭头)的位置关系。HE所见胸膜小血管、碳沫颗粒被淡化,消除了观察干扰。图3C为TTF1富兮染色结果,由图中可见清楚显示肺泡上皮(图上部较下一个黑色箭头)与胸膜弹力层(图上部较上两个黄色箭头)的位置关系。HE所见胸膜小血管、碳沫颗粒被淡化,消除了观察干扰。

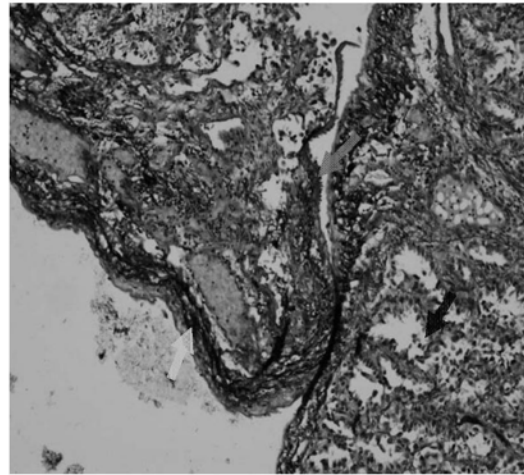
[0094] 图4分别示出了就肺腺癌采用普通HE染色、根据本发明以AE1/AE3为一抗的富兮双染染色、根据本发明以TTF1为一抗的富兮双染染色的验证实验2结果。其中,图4A为普通HE染色结果,由图中可见胸膜增厚(图上部右边一个黄色箭头),伴小血管增生(图上部中间一个红色箭头)及碳沫沉着(图上部左边一个绿色箭头)。无法观察弹力纤维位置。图4B为AE1/AE3富兮染色结果,由图中可见清楚显示肿瘤组织(图下部两个黑色)侵出弹力纤维层(图上部左边一个黄色箭头)。肿瘤细胞胞浆棕色颗粒与胸膜黑色碳沫(图上部一个和右边一个绿

色箭头)形成鲜明对比。图4C为TTF1富兮染色结果,由图中可见清楚显示肿瘤组织(图下部两个黑色箭头)侵出弹力纤维层(图上部左边一个黄色箭头)。肿瘤细胞核棕色颗粒着色与胸膜黑色碳沫沉着形成鲜明对比。传统弹力纤维染色呈均一黑色,极难与碳沫颗粒鉴别。

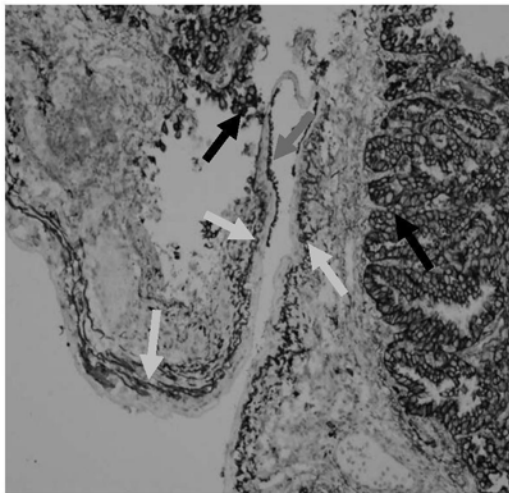
[0095] 以上对本发明具体实施方式的描述并不限制本发明,本领域技术人员可以根据本发明作出各种改变或变形,只要不脱离本发明的精神,均应属于本发明所附权利要求的范围。



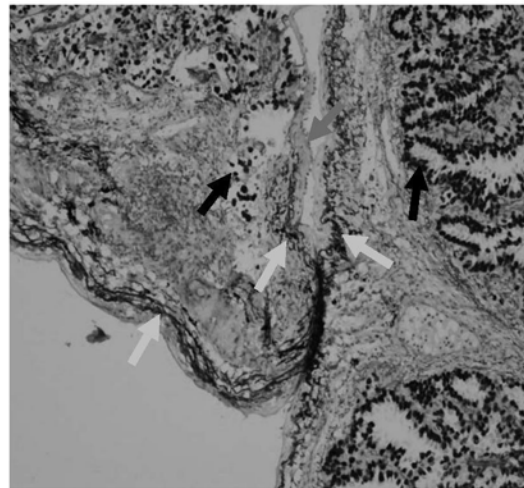
1A



1B

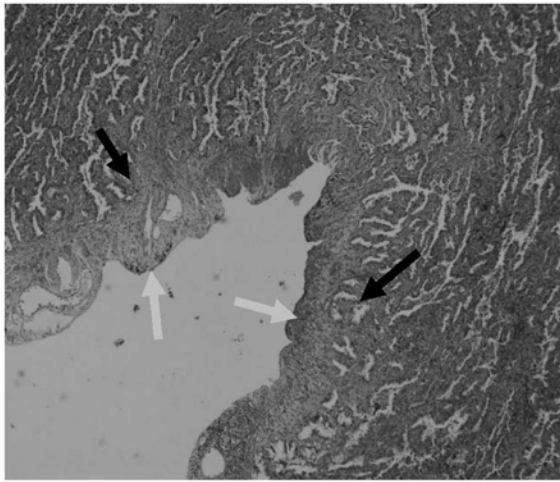


1C

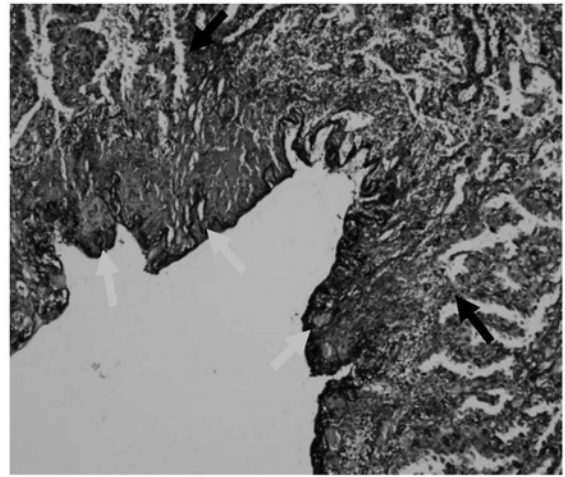


1D

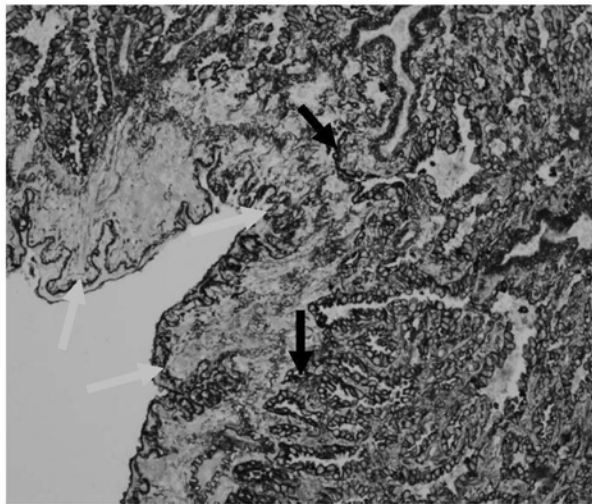
图1



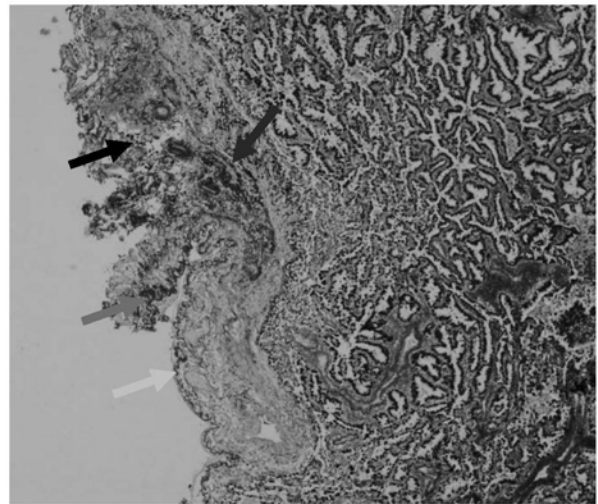
2A



2B

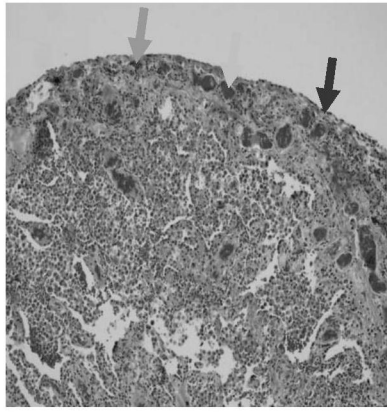


2C

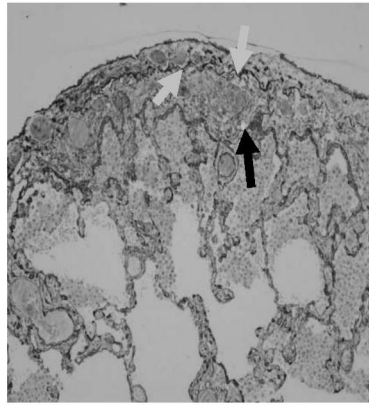


2D

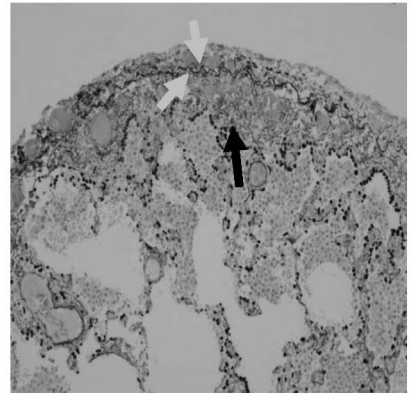
图2



3A



3B

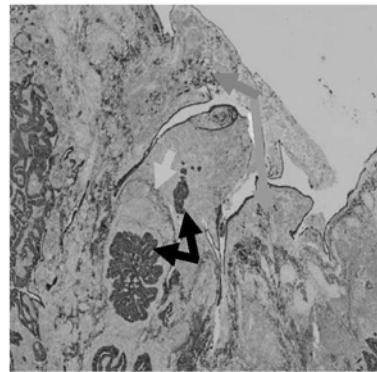


3C

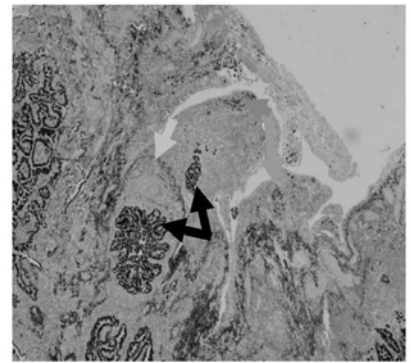
图3



4A



4B



4C

图4