



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 112485416 A

(43)申请公布日 2021.03.12

(21)申请号 201911157603.1

(22)申请日 2019.11.22

(66)本国优先权数据

201910859753.0 2019.09.11 CN

(71)申请人 广州江元医疗科技有限公司

地址 510000 广东省广州市高新技术产业
开发区科学城科丰路31号华南新材料
创新园G7栋601

(72)发明人 苏仲春 段天雄 骆伟明

(74)专利代理机构 广东翰锐律师事务所 44442

代理人 陈业胜 苏少华

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

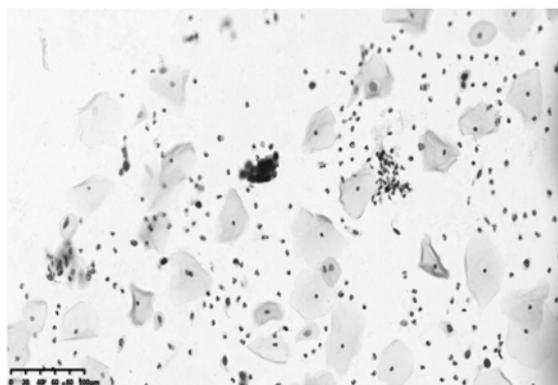
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法

(57)摘要

本发明提供一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,包括如下步骤:采集细胞样本的步骤;加入样本密度分离液的步骤,将细胞样本转移至离心管中,并往离心管中加入样本密度分离液;重力离心操作步骤,完毕后,弃去上层废液,得到含有样本细胞的沉淀物;制备细胞悬液步骤,往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入缓冲液,用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散,制成细胞悬液。本发明创新性地使用密度梯度分层离心法进行抗原修复,在不需要高温高压的条件下,也能达到与热修复法同样的抗原修复效果,避免了抗原修复要采用热修复而使用到的具有安全风险的加热仪器设备,且使得整个实验过程比较高效快捷。



1. 一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,包括如下步骤,采集细胞样本的步骤;

加入样本密度分离液的步骤:将细胞样本转移至离心管中,并往离心管中加入样本密度分离液,所述样本密度分离液是丙三醇与乙醇的混合溶液,丙三醇与乙醇的体积比为(1-2):(2-1);

重力离心步骤:离心管在800g~1000g离心力作用下离心1min~10min,完毕后,弃去上层废液,得到含有细胞样本的沉淀物;

制备细胞悬液步骤:往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入缓冲液,用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散,制成细胞悬液。

2. 根据权利要求1所述的使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,所述丙三醇与乙醇的体积比为(1-2):1,所述重力离心步骤为在800g离心力作用下离心5min。

3. 根据权利要求1所述的使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,还包括微重力离心步骤,加入样本密度分离液后先进行微重力离心步骤,再进行重力离心步骤,所述微重力离心步骤为:离心管在150g~200g离心力作用下离心1min~5min,完毕后将上层液体吸走。

4. 根据权利要求3所述的使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,所述丙三醇与乙醇的体积比为1:(2-1),所述微重力离心步骤为在200g离心力作用下离心2min。

5. 根据权利要求1-4所述使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,所述细胞样本为宫颈细胞样本,所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为(3-7):(7-3),所述细胞沉淀物与缓冲液的体积比为1:1。

6. 根据权利要求5所述使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,所述细胞样本采集操作为:将宫颈标本采集刷刷头毛尖插入宫颈口,轻轻用力使刷头上的刷毛紧贴子宫颈口,用手捏住刷杆尾部,顺时针方向旋转五圈;取出采集刷,卸下刷头放入细胞保存液瓶中,封盖。

7. 根据权利要求5所述使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,其特征在于,所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为4:6。

8. 权利要求1-7任一所述使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法最终获得的细胞悬液。

9. 一种免疫细胞染色方法,其特征在于,包括如下步骤:

将权利要求8所述的细胞悬液滴加到制片仓的载玻片上静止沉降,完成制片;

将上述载玻片用磷酸缓冲液冲洗,然后滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育;再用磷酸缓冲液冲洗,之后滴加封闭液,室温下孵育;

继续滴加稀释后的一抗溶液,32℃恒温水浴30~60min;然后用磷酸缓冲液冲洗,再滴加二抗溶液,32℃恒温水浴10~20min;再用磷酸缓冲液冲洗;最后滴加DAB显色液。

10. 根据权利要求9所述的免疫细胞染色方法,其特征在于,所述静止沉降时间为10min,所述磷酸缓冲液冲洗为用磷酸缓冲液冲洗3次,每次1~2分钟;所述室温下孵育时间为10~20min。

一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学生物技术领域,具体涉及一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法。

背景技术

[0002] P16过表达已被证明为细胞周期调控失调的生物标记物,免疫细胞化学染色技术(ICC)是细胞化学技术和免疫学技术相结合的一种检测技术,是以抗原和抗体特异性识别为基础,结合特定的化学显色物质或荧光物质,特异性地检测细胞内或膜表面的多肽、蛋白质等的存在和分布。免疫细胞化学染色技术在病理诊断中是一项重要的参考,被广泛应用于诊断与鉴别诊断中。免疫细胞化学染色是一项由多步骤组成的实验技术,具体为:细胞固定、切片制备、抗原修复、抗原抗体反应、目标抗原显色等。免疫细胞化学染色技术的染色质量及效果受多种因素影响,在众多因素中抗原修复这一步骤最为重要,因为不恰当的抗原修复可能导致假阴性结果。原因是细胞固定液会封闭细胞的抗原决定簇的表达,所以在切片制备完成后需要进行抗原修复。细胞固定液在固定标本期间,能有效增加组织内的蛋白质分子交联,抗原被封闭,在一定程度上能够对免疫细胞化学染色结果产生影响。目前,抗原修复常用的方法有酶修复法和热修复法。相比热修复法的抗原免疫细胞染色效果,酶消化修复法修复效果相对较差。酶消化法修复的抗原片染色后,不但具有较弱的阳性程度,还会加深非特异性着色,影响阳性定位。加剧抗原性物质分子运动是广泛接受热修复抗原的主要因素,从而打破封闭的抗原决定簇的蛋白质分子与化学键间的交联,暴露抗原,实现抗原修复效果。在热修复法中,相比微波炉加热法,压力锅加压法的效果更为显著。但是这些加热修复法都需要额外的加热设备,这使得原本较为复杂的步骤增加不确定和不稳定因素,同时高温设备会增加实验安全意外风险,特别是在免疫细胞化学染色中经常使用易燃易爆的化学物质。所以,近几年不断涌现新的无需加热的修复试剂,但效果都差强人意。

[0003] 密度梯度分层离心法亦称平衡密度梯度离心法。用超离心机对小分子物质溶液,长时间加一个离心力场达到沉降平衡,在沉降池内从液面到底部出现一定的密度梯度。若在该溶液里加入少量大分子溶液,则溶液内比溶剂密度大的部分就产生大分子沉降,比溶剂密度小的部分就会上浮,最后在离心力和浮力平衡的位置,集聚形成大分子带状物。利用这持细胞活性,且加入的抗生素可加强细胞保存固定液所固定的细胞抗感染能力,且本发明细胞保存液不含有传统细胞固定保存液中的福尔马林等醛类物质,可以避免传统细胞固定保存液的福尔马林等醛类化合物特定地结合到某些氨基酸残基上,最终形成交联蛋白,使蛋白质的三级或四级结构被破坏从而导致抗原不能很好的被抗体识别,在进行免疫细胞种现象,测定核酸或蛋白质等的浮游密度,或根据其差别进行分析的一种沉降平衡法。

[0004] 现有技术中还没有利用密度梯度分层离心法进行抗原修复的尝试,研究密度梯度分层离心法的具体操作步骤,使其能够很好地适配P16抗原修复,且修复效果优良,具有很大的社会经济效益。

发明内容

[0005] 针对上述现有技术存在的问题,本发明的目的在于提供一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,利用密度梯度分层离心法达到抗原修复的效果,代替常规的高温抗原修复的方法,使用过程更加快捷简便,同时避免高温设备的使用风险。

[0006] 为达到上述目的,本发明所采用的技术方案如下:

[0007] 一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,包括如下步骤:

[0008] 细胞样本的采集步骤;

[0009] 加入样本密度分离液的步骤:将细胞样本转移至离心管中,并往离心管中加入样本密度分离液,所述样本密度分离液是丙三醇与乙醇的混合溶液,丙三醇与乙醇的体积比为(1-2):(2-1);

[0010] 重力离心步骤:离心管在800g~1000g离心力作用下离心1min~10min,完毕后,弃去上层废液,得到含有细胞样本的沉淀物;

[0011] 制备细胞悬液步骤:往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入缓冲液,用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散,制成细胞悬液。

[0012] 在抗原修复方法中,微波加热与高压加热均是经高温破坏蛋白分子和固定剂的交联,使其将抗原决定簇暴露,所以需要使用到具有安全风险的高温设备。而采用酶消化法对于打破封闭的抗原决定簇的蛋白质分子与化学键间的交联的效果还是没有物理加热的方法更有效。本发明创新性地使用密度梯度分层离心法来进行抗原修复,在不需要高温高压的条件下,液基脱落细胞样本使用密度梯度分层离心法达到抗原修复的效果。密度梯度分层离心法也属于物理方法,能够打破封闭的抗原决定簇的蛋白质分子与化学键间的交联起到洗脱细胞固定液的效果,从而暴露抗原,达到抗原修复的作用。本发明通过研究密度梯度分层离心法的具体操作步骤,通过离心操作以及离心力和离心时间的调控,能够很好地打破封闭的抗原决定簇的蛋白质分子与化学键间的交联,同时又不破坏细胞本身的结构抗原修复效果显著。

[0013] 优选地,所述丙三醇与乙醇的体积比为(1-2):1,所述重力离心步骤为在800g离心力作用下离心5min。

[0014] 优选地,还包括微重力离心步骤,加入样本密度分离液后先进行微重力离心步骤,再进行重力离心步骤,所述微重力离心步骤为:离心管在150g~200g离心力作用下离心1min~5min,完毕后将上层液体吸走。由于丙三醇的质量较大,可吸附质量较大的细胞样本沉积,而对于中等以及小质量的样本细胞,则需通过两次离心以及离心力和离心时间的调控,将其充分分离,以得到高纯度的细胞样本沉淀。

[0015] 优选地,所述丙三醇与乙醇的体积比为1:(2-1),所述微重力离心步骤为在200g离心力作用下离心2min。

[0016] 优选地,所述细胞样本为宫颈细胞样本,所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为(3-7):(7-3),所述细胞沉淀物与缓冲液的体积比为1:1。

[0017] 具体地,宫颈细胞样本采集可采用本领域技术常规操作。优选地,宫颈细胞样本采集操作为:将宫颈标本采集刷刷头毛尖插入宫颈口,轻轻用力使刷头上的刷毛紧贴子宫颈口,用手捏住刷杆尾部,顺时针方向旋转五圈;取出采集刷,卸下刷头放入细胞保存液瓶中,封盖。

[0018] 进一步优选地,所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为4:6。发明人经过实验研究发现,在上述样本密度分离液与细胞样本的体积比条件下,可以很好的将细胞样本中的各种细胞加以分离。

[0019] 具体地,本发明还提供一种免疫细胞染色方法,包括如下步骤:

[0020] 将权利要求8所述的细胞悬液滴加到制片仓的载玻片上静止沉降10min,完成制片;

[0021] 将上述载玻片用磷酸缓冲液冲洗,然后滴加内源性过氧化物酶阻断剂,室温下孵育;再用磷酸缓冲液冲洗,之后滴加封闭液,室温下孵育;

[0022] 继续滴加稀释后的一抗溶液,32℃恒温水浴30-60min;然后用磷酸缓冲液冲洗,再滴加二抗溶液,32℃恒温水浴10-20min;再用磷酸缓冲液冲洗;最后滴加DAB显色液。

[0023] 具体地,所述磷酸缓冲液冲洗为用磷酸缓冲液冲洗3次,每次1-2分钟;所述室温下孵育时间为10-20min。

[0024] 与现有技术相比,本发明的有益效果:

[0025] 针对现有抗原修复操作中的酶修复法和热修复法存在的不足,本发明创新性地使用密度梯度分层离心法进行抗原修复,在不需高温高压的条件下,液基脱落细胞样本使用密度梯度分层离心法也能达到与热修复法同样的抗原修复效果。本发明避免了抗原修复过程中需要热修复而使用到的具有安全风险的加热仪器设备,且使得整个实验过程比较高效快捷。

附图说明

[0026] 图1为第一组实验中的染色结果图;

[0027] 图2为第二组实验中的染色结果图;

[0028] 图3为第三组实验中的染色结果图;

[0029] 图4为第四组实验中的染色结果图。

具体实施方式

[0030] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0031] 实施例1:

[0032] 一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法,步骤如下:

[0033] 采集细胞样本的步骤,所述细胞样本优选为宫颈细胞;

[0034] 加入样本密度分离液的步骤:将细胞样本转移至离心管中,并往离心管中加入样本密度分离液,所述样本密度分离液是丙三醇与乙醇的混合溶液,丙三醇与乙醇的体积比为1:2;所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为3:7;

[0035] 进行微重力离心步骤:在150g低速离心力作用下离心5min,然后将上层液体吸走;

[0036] 进行重力离心步骤:剩余液体第二次离心在800g离心力作用下离心10min,最后缓慢倒掉上清液;

[0037] 制备细胞悬液步骤:往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入与细胞样本沉淀物

体积相同的缓冲液；最后用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散，制成细胞悬液。

[0038] 实施例2:

[0039] 一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法，步骤如下：

[0040] 采集细胞样本的步骤，所述细胞样本优选为宫颈细胞；

[0041] 加入样本密度分离液的步骤：将细胞样本转移至离心管中，并往离心管中加入样本密度分离液，所述样本密度分离液是丙三醇与乙醇的混合溶液，丙三醇与乙醇的体积比为2:1；所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为7:3；

[0042] 进行重力离心步骤：在800g离心力作用下离心1min，最后缓慢倒掉上清液；

[0043] 制备细胞悬液步骤：往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入与细胞样本沉淀物体积相同的缓冲液，最后用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散，制成细胞悬液。

[0044] 实施例3:

[0045] 一种使用密度梯度分层离心法进行抗原修复的方法，步骤如下：

[0046] 采集细胞样本的步骤，所述细胞样本优选为宫颈细胞；

[0047] 加入样本密度分离液的步骤：将细胞样本转移至离心管中，并往离心管中加入样本密度分离液，所述样本密度分离液是丙三醇与乙醇的混合溶液，丙三醇与乙醇的体积比为1:1；所述样本密度分离液与细胞样本的体积比为4:6；

[0048] 进行微重力离心步骤：在200g低速离心力作用下离心2min，然后将上层液体吸走；

[0049] 进行重力离心步骤：剩余液体在800g离心力作用下离心5min，最后缓慢倒掉上清液；

[0050] 制备细胞悬液步骤：往含有细胞样本的沉淀物的离心管中加入与细胞样本沉淀物体积相同的缓冲液，最后用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散，制成细胞悬液。

[0051] 效果实施例染色效果验证

[0052] 设计4组实验：第一组：膜式制片方式(非离心法)+高温抗原修复；第二组：膜式制片方式(非离心法)+不进行高温抗原修复；第三组：密度梯度分层离心法制片方式+高温抗原修复；第四组：密度梯度分层离心法制片方式+不进行高温抗原修复。

[0053] 实验步骤如下：

[0054] (1) 宫颈细胞样本采集：将宫颈标本采集刷刷头毛尖插入确诊为宫颈癌的志愿者的宫颈口。轻轻用力使刷头上的刷毛紧贴子宫颈口。用手捏住刷杆尾部，顺时针方向旋转五圈。取出采集刷，卸下刷头放入细胞保存液瓶中，封盖。

[0055] (2) 第一组和第二组使用TCT膜式机(原理是通过负压和正压将附在TCT膜管上的细胞吹在载玻片上)的制片方式制片。一个样本制备两个片子进行对照，一张进行高温修复(第一组)，另一张不进行高温修复(第二组)。第三组和第四组则用本发明的密度梯度分层离心法制片方式：在进行宫颈细胞样本采集后，在离心管加入4ml样本密度分离液(2ml丙三醇和2ml乙醇混合均匀)，一次性吸管吸取细胞样本6ml，沿离心管壁缓慢转移至离心管中；离心管在200g离心力，离心2min，完毕后将上层液体吸走，剩余约3-3.5ml左右；剩余液体在800g离心力，离心5min，最后缓慢倒掉上清液；观察离心管底部的细胞沉淀量，根据沉淀量的体积加入相同体积的缓冲液。用漩涡混匀器将离心管底部的细胞打散，制成细胞悬液。滴加800ul细胞悬液到制片仓的载玻片上静止沉降10min，即可完成制片。该方案同一样本制备两张进行对照，一张进行高温修复(第三组)，另一张不进行高温修复(第四组)。高温修复

的方法为放置于高压锅中高压高温处理10min。

[0056] (3) 每张玻片磷酸缓冲液冲洗3次,每次1-2分钟。

[0057] (4) 每张玻片滴加2-3滴内源性过氧化物酶阻断剂(H2O2),室温下孵育10-20min。

[0058] (5) 每张玻片磷酸缓冲液冲洗3次,每次1-2分钟。

[0059] (6) 每张玻片滴加2-3滴或50-80ul封闭液,室温下孵育10-20min。

[0060] (7) 每张玻片滴加1-2滴稀释后的一抗溶液,32℃恒温水浴30-60min。

[0061] (8) 每张玻片磷酸缓冲液冲洗3次,每次1-2分钟。

[0062] (9) 每张玻片滴加1-2滴二抗溶液,32℃恒温水浴10-20min。

[0063] (10) 每张玻片磷酸缓冲液冲洗3次,每次1-2分钟。

[0064] (11) 每张玻片滴加2滴配置后的DAB显色液(在小试管中先加入试剂A 100ul,再按B、C顺序加入试剂各5ul,混匀后即成100ul显色液。显色液配置后需在30min内使用完毕,如一次染多片可按比例增加配制量),根据颜色发展情况掌握染色时间,一般室温下染色时间约为5-10分钟或显微镜下观察5-10分钟,染色结果为棕黄色。

[0065] 上述4组实验结果显示如下表:第一组进行高温修复与第二组不进行高温修复的染色效果差别很大,进行高温修复的样本片子有很深的棕黄色染色,不进行高温修复的样本片子几乎不染色。而用本发明密度梯度分层离心法的制片方式(第三组和第四组),在不进行高温抗原修复的操作下,染色效果仍然是棕黄色。

[0066] 表1

实验组别	染色情况
第一组:膜式制片方式(非离心法)+高温抗原修复	显棕色
第二组:膜式制片方式(非离心法)+不进行高温抗原修复	不显色
第三组:密度梯度分层离心法制片方式+高温抗原修复	显棕色
第四组:密度梯度分层离心法制片方式+不进行高温抗原修复	显棕色

[0068] 综合上述染色实验的结果可知,在不需要高温高压的条件下,对液基脱落细胞样本使用密度梯度分层离心法也能达到与热修复法同样的抗原修复效果,其不经高温修复直接用于化学染色实验的染色效果和经高温修复的染色效果基本无差别。

[0069] 根据上述说明书的揭示和教导,本发明所属领域的技术人员还可以对上述实施方式进行变更和修改。因此,本发明并不局限于上面揭示和描述的具体实施方式,对本发明的一些修改和变更也应当落入本发明的权利要求的保护范围内。此外,尽管本说明书中使用了一些特定的术语,但这些术语只是为了方便说明,并不对本发明构成任何限制。

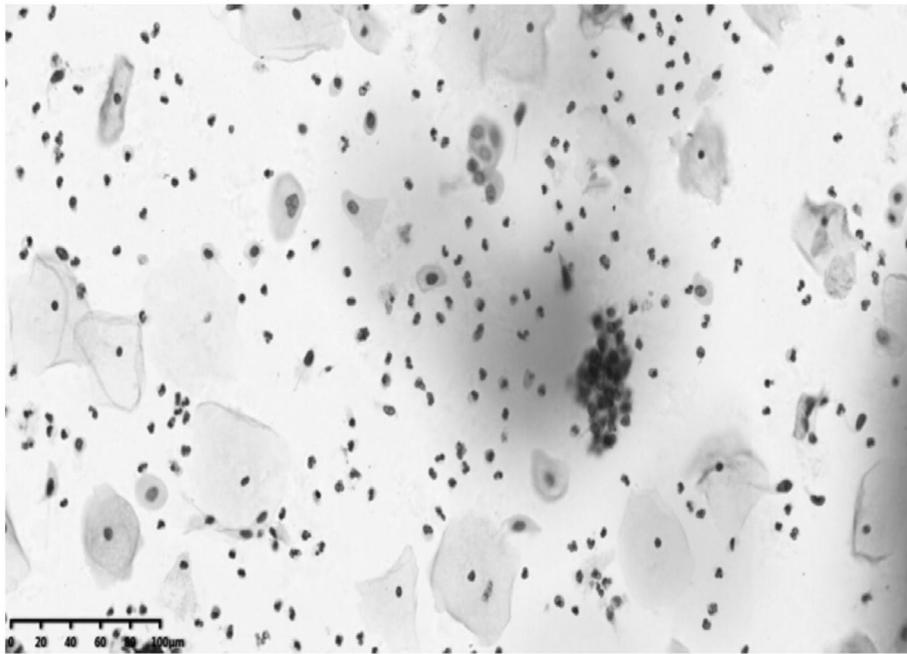


图1

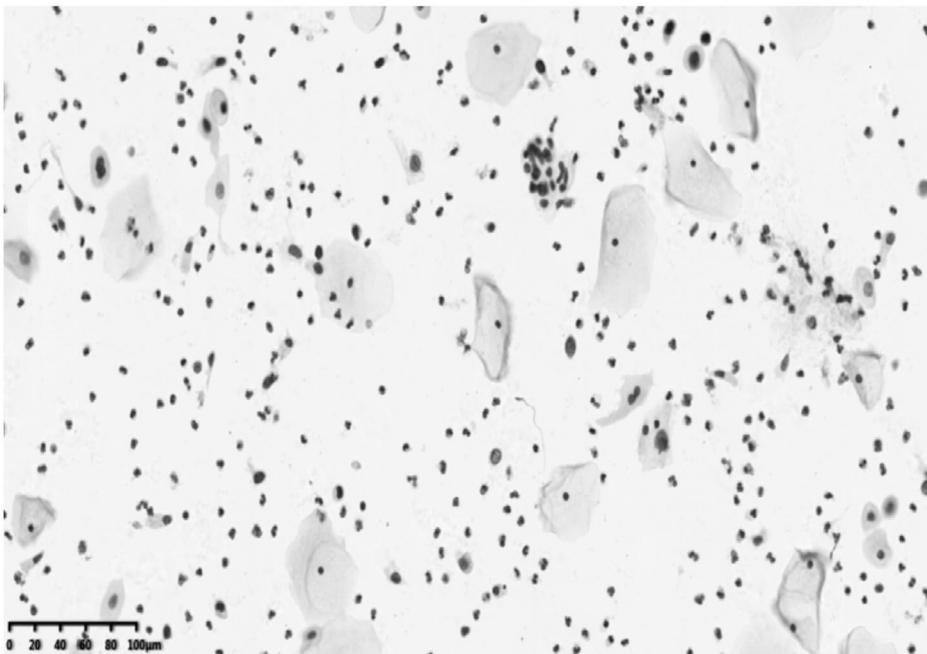


图2

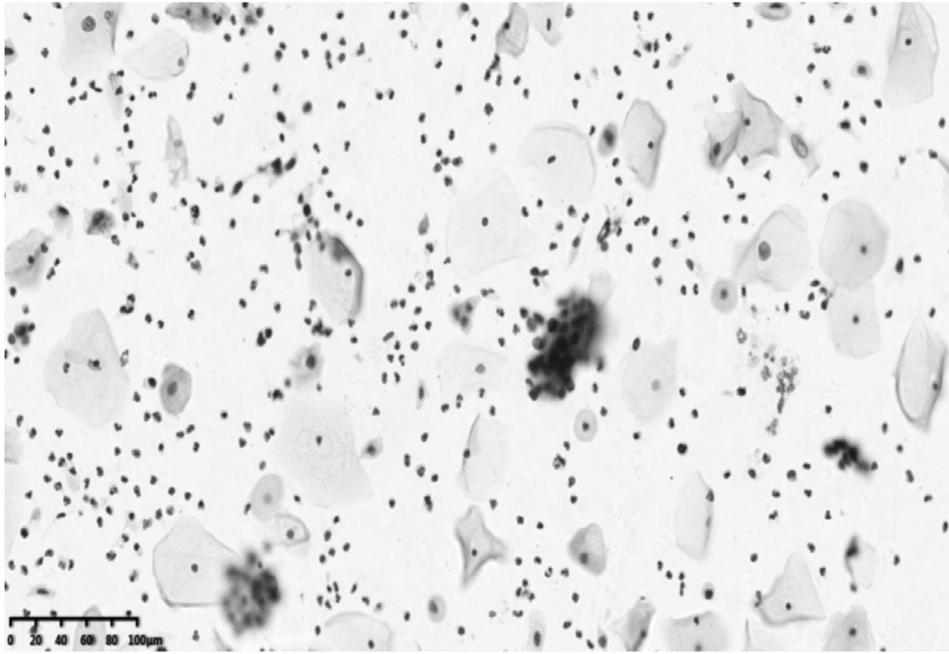


图3

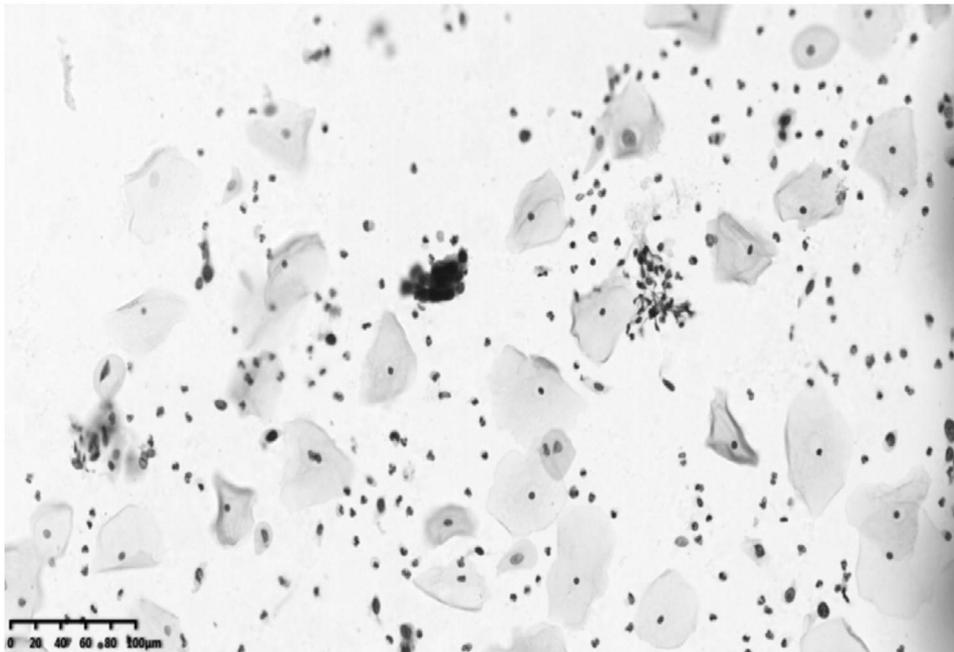


图4