



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102435728 B

(45) 授权公告日 2014. 06. 25

(21) 申请号 201110263731. 1

审查员 周洋

(22) 申请日 2011. 09. 07

(73) 专利权人 福州大学

地址 350001 福建省福州市鼓楼区工业路  
523 号

(72) 发明人 孟春 黄以鹏 王航 郭养浩

(74) 专利代理机构 福州元创专利商标代理有限  
公司 35100

代理人 蔡学俊

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2011195021 A1, 2011. 08. 11,

CN 101319215 A, 2008. 12. 10,

EP 1156060 A1, 2001. 11. 21,

CN 101799926 A, 2010. 08. 11,

权利要求书2页 说明书8页

序列表4页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法

(57) 摘要

本发明提供了一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法, 该方法将能够与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白, 设置不同浓度预先吸附在玻片上, 或是将经过包埋的不同浓度的多肽或蛋白石蜡切片预先放置在玻片上, 与病理组织切片同时经历常规免疫组化步骤, 多肽或蛋白的染色结果作为免疫组化过程的阳性参照。本发明采用在玻片上设置阳性对照蛋白或多肽的方法, 实现阳性对照和指控标准, 本发明是对现存质量保证程序的重要补充, 是一种对免疫组化测试进行质量控制的新方法。

1. 一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法,其特征在于:所述的阳性参照物为能够与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白,包括 Ki67 多肽或蛋白,具体步骤如下:

采用 PCR 方式构建 Ki67 噬菌体多肽文库:从胃癌细胞 HepG2 细胞中提取总 RNA,逆转录后,根据 mRNA 序列设计引物,采用 PCR 扩增 Ki67 的 cDNA 序列,然后以获得的 cDNA 序列为模板,再用半巢式 PCR 扩增,扩增后的引物用 *EcoR*I 和 *Hind* III 内切酶酶切,连入到噬菌体中,进行多肽的表达;

其中,引物序列如下:

Forward :5' TGGCAGGAACTTTACC 3' ;

Reverse :5' CTCCTCTACATCTGCTTTCCTGAT 3' ;

Forward :5' CGCCTGGTTACTATCA 3' ;

Reverse :5' GTGCCACCAAAGGAC 3' ;

Forward :5' AGCGTCACGGGAACCA 3' ;

Reverse :5' GACCTCAAGCACCTTT 3' ;

Forward :5' TGGCAGGAACTTTACC 3' ;

Reverse :5' TCTGGAAGAGCTCTTTAAAGCCAGT 3' ;

Forward :5' CGCCTGGTTACTATCA 3' ;

Reverse :5' GCCGCCTCCTTGIGCT 3' ;

Forward :5' CCGCAGTTGACAAGCACA 3' ;

Reverse :5' GCCGCCTCCTTGIGCTTG 3' ;

Forward :5' GCAGGAGATGGCAAGAGC 3' ;

Reverse :5' ACCGCTTGCTGGTTCTTT 3' ;

Forward 在 5' 加 *EcoR*I 酶切位点序列 ACGAATTC,Reverse 在 5' 加 *Hind* III 酶切位点序列 CGAAGCTT ;

用 PBS 稀释商业获得的 Ki67 抗体 100-200 倍,96 孔微孔板板上,每孔加入 100  $\mu$  L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,吸出包被液,PBS 洗板 3 次,3% 牛白蛋白溶液在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,PBS 洗板 3 次,分别加入不同克隆噬菌体抗体库 100  $\mu$  L,约含  $2 \times 10^{11}$  CFU,37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h,用含 0.5% 吐温-20 的 PBS 洗板 3 次;以 100  $\mu$  L pH2.2 的甘氨酸-盐酸洗脱液洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用 50  $\mu$  L 1mol/L pH8.0 的 Tris-HCl 中和洗脱物,取 10  $\mu$  L 用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选;当洗脱下的噬菌体滴度达到  $1 \times 10^7$  CFU,该克隆的多肽序列作为目标序列,经测序后,合成该多肽;

Ki67 蛋白或者多肽用 PBS 稀释成不同浓度,然后在玻片上部靠近贴标签的部位,阴性斑点用 1 mg/mL 的牛血清白蛋白代替多肽作为阴性对照,第一排点四个点,第二排和第三排按多肽浓度从低到高的顺序依次点样,每个点上样 0.1mL,每种浓度两个点,点完后得到三排每排四个点的阵列,最上面一排作为阴性对照,第二排和第三排作为阳性对照;

取临床上疑似淋巴瘤组织石蜡标本,采用组织切片机对石蜡组织块进行切片,水化展片后用多肽标记的玻片捞片,将组织切片放置在玻片的中下部;

抗原修复:将玻片浸入 pH9.0 的 EDTA 缓冲溶液中,放置在添加水的高压锅中,盖上不锈钢锅盖,高压 10 分钟后,待压力恢复至常压,取出自然冷却;将冷却后的玻片用 PBS 洗 2-3

次各 5 分钟,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,滴加一抗 50  $\mu$  l, 4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 1 小时; PBS 洗 3 次每次 2 分钟;滴加羊抗兔二抗 45-50  $\mu$  l, 37 $^{\circ}$ C 1 小时;PBS 洗 3 次各 5 分钟,然后滴加 DAB 显色液,室温下 DAB 显色 5-10 分钟,在显微镜下掌握染色程度;PBS 或自来水冲洗 10 分钟,脱水、透明、封片、镜检;

结果判定:a. 根据多肽斑点显色差异,判断是否有假阳性反应和操作失误:如第一排斑点无明显的显色反应,且下两排斑点颜色显著高于第一排,颜色根据多肽浓度由低到高呈现出由浅到深的变化,则表明实验操作过程无误;如果第一排颜色反应与第二排一致,则说明操作过程有假阳性出现,结果不可靠;若第二排、第三排不显色或显色过浅,则表明操作或试剂可能出现差错;如果斑点显示正常,可作为参比,对病例组织的染色进行分析;b. 若组织上无明显着色,则可判断为阴性组织,无淋巴瘤生成,记为(-);若组织上的染色颜色弱于第二排,则可判断为低度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+);如果颜色高于第三排,则可判断为高度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+++);如果介于二者之间,可判断为由底到高的发生阶段,记为(++)。

## 一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于病理学领域,具体地,本发明涉及一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法。

### 背景技术

[0002] 免疫组织化学在生物医学研究和诊断病例学中起着日益重要的作用。特别是从在上世纪 90 年代开始,随着高温抗原修复技术的出现,免疫组织化学在外科病理学以及其他形态学领域的应用越来越广泛。在过去的几十年里,基于抗原修复、石蜡组织切片技术、抗体识别的免疫组化技术,已成为病理学中疾病诊断不可或缺的工具。特别对癌症的诊断,免疫组化技术已经成为必须的手段,是目前临床上诊断出各种各样不同癌症主要方法。

[0003] 质量控制是检验一项产品或服务的质量的必备程序,在免疫组化的结果分析中,最关键的是如何确定阳性对照。阳性对照是整个过程中最重要的检验标准之一,通过能产生一种可测量的信号来实现,而这种信号受免疫组化过程几乎所有的组成部分、及工艺的影响。本发明涉及的内容,是对现存质量保证程序的重要补充,是一种对免疫组化测试进行质量控制的新方法。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于免疫组化过程进行质量的阳性参照物的制备方法。

[0005] 随着免疫组化技术在临床诊断和肿瘤转化研究中,尤其是在当前癌症定向治疗方法的研发中的广泛应用,医务工作者对 IHC 的要求越来越强烈。肿瘤标记物和作为治疗指示剂的参照物已经成为 IHC 标准化涉及的两个主要指标。其中,参照物的选择,需要针对每一个肿瘤标记物,创建相应的标准参照物,解决由于不一致福尔马林固定、修复条件、免疫反应引起的多变 IHC 染色结果的统一化,同时作为评估标本制备的质量标准。本发明中,采用多肽玻片点样矩阵模型作为参考标准,进行免疫组化质量控制标准的研究。

[0006] 将可以与一抗发生特异性免疫反应的不同浓度的多肽预先共价吸附在玻片上,或是经过包埋的不同浓度的多肽石蜡切片预先放置在玻片上,用于后续放置病人的组织标本。吸附在玻片的多肽与病理组织切片,同时经历烤片、脱蜡、抗原修复、内源性过氧化物酶的消除、封闭、一抗反应、二抗反应、显色等步骤。

[0007] 特异性标记或有或无,是目前肿瘤谱鉴定的主要特征。依赖免疫组化染色结果的个性化治疗的出现,增加了阳性对照的需求。阳性对照和阴性对照物的设置,使得检测不一致性的影响最小化。在每张玻片上进行对照,可以应对虚假错误(如错误的试剂配置、试剂实效、操作失误等)发生的风险,也可有效判断由于试剂灵敏度过高引起的假阳性结果。

[0008] 对同一种疾病靶位的阳性参照物(多肽),建立标准化可重复的免疫组化多肽对照,需要对已经在临床上应用的商业选定的抗体结合的靶位进行鉴别。选择的多肽表位具有与天然抗原(抗原表位)的多肽一样的结构和特性,且与抗体结合具有抗体与天然抗原结

合一样的效果。使用的多肽,从结构而言,必须是天然抗原的表位,鉴别抗原表位有两个通用方法:(1)对基于天然蛋白质序列而组成的多肽进行评估;(2)对从随机组合的多肽库筛选得到的多肽进行评估。

[0009] 多肽在玻片上的放置方式见图 1 或图 2 所示。将能与一抗发生免疫反应的多肽打印或手工点样在玻片上,一个浓度的多肽在玻片上经上样后形成一个小圆斑。图中的多肽,可以是相同多肽的各种不同浓度的集合组成,也可以是几种多肽不同方式的组合。

[0010] 本发明的技术方案包括下列工艺步骤:

[0011] 将能够与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白,设置不同浓度预先吸附在玻片上,或是将经过包埋的不同浓度的多肽或蛋白石蜡切片预先放置在玻片上,与病理组织切片同时经历常规免疫组化步骤,多肽或蛋白的染色结果作为免疫组化过程的阳性参照物。

[0012] 所述的多肽或蛋白,为病理组织切片中组织抗原的表位。

[0013] 所述的多肽或蛋白预先吸附在玻片上,是以共价或物理吸附的方式,吸附在免疫组化用的玻片上。

[0014] 所述的染色结果,多肽或蛋白的斑点颜色从浓度由低到高表现逐渐加深;再通过显微镜对病理组织切片进行观察,根据病理组织切片上靶位颜色与多肽或蛋白的斑点颜色的对比进行判定。

[0015] 质量控制技术在临床检测应用方面十分重要,对于每种检测物的分析,至少需要一种可进行测定的对照物。对照物的对照值偏离预订的结果,意味着测定结果可能出现了错误,需要对检测结果进行重新评估。在免疫组化实验中,对于如何设定参照物,保证参照物与待测组织至于同一时间和空间范围进行检测流程,是参照物能否最大程度保证实验正确的前提条件。用可与抗体发生特异性反应的多肽作为阳性对照,在同一张玻片上与待测组织同时进行反应,可以有效应对虚假错误(如错误的试剂配置、试剂实效、操作错误)发生的风险。

[0016] 能与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白作为阳性对照,具有以下的几个优点:(1)可重复,(2)可无限量供应,(3)抗原特异性,(4)廉价,可以大量生产,(5)长久保持稳定。

### 附图说明

[0017] 图 1 为多肽点样示意图;1 表示标签,其中第一排为阴性斑点,均为 1 mg/mL 的牛血清白蛋白;第二排为阳性斑点,从左至右分别为 0.001 mg/mL、0.001 mg/mL、0.01 mg/mL, 0.01 mg/mL 浓度多肽;第三排为阳性斑点,从左至右分别为 0.1 mg/mL、0.1 mg/mL、1 mg/mL, 1 mg/mL 浓度多肽。

[0018] 图 2 为多肽上样示意图;1 表示标签,其中第一排为阴性斑点,均为 1 mg/mL 的牛血清白蛋白;第二排为阳性斑点,从左至右分别为 0.001 mg/mL、0.001 mg/mL 浓度多肽;第三排为阳性斑点,从左至右分别为 0.01 mg/mL、0.01 mg/mL 浓度多肽。

### 具体实施方式

[0019] 本发明的一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法,包括以下步骤:

[0020] 1) 多肽标记:选择可与目标抗体特异性反应的多肽片段,采用磷酸盐缓冲液(PBS)配置成系列的不同稀释度的溶液,分别采用自动点样仪或手工将多肽打印到玻片的上部,或采用将多肽包埋于石蜡块切片的方式置于玻片上部,其中阴性斑点用1 mg/mL的牛血清白蛋白代替多肽。具体的多肽浓度根据不同的选用抗体进行调整;

[0021] 2) 脱蜡和水化:用上一步标记好多肽的玻片,捞取展好片的组织切片,至于玻片的中下部。将玻片在室温中放置60分钟或60℃恒温箱中烘烤20分钟。整个玻片置于二甲苯中浸泡10分钟,更换二甲苯后再浸泡10分钟;无水乙醇中浸泡5分钟,95%乙醇中浸泡5分钟,75%乙醇中浸泡5分钟。用PBS洗2-3次各5分钟,用3% $H_2O_2$ (80%甲醇)滴加在玻片上,室温静置10分钟,灭活内源性氧化酶,PBS洗2-3次各5分钟。注意:除特别指出,以下步骤中的浸泡过程,需要将组织切片和多肽同时浸入液体中;(如果采用细胞涂片或细胞爬片,不采用石蜡切片方式,省略步骤2));

[0022] 3) 抗原修复:根据不同组织抗原的要求,选择下列之一的方法进行抗原修复(组织、细胞用甲醛或福尔马林固定,采用抗原修复步骤):

[0023] A、抗原热修复 在将玻片浸入EDTA(pH9.0)或0.01m枸橼酸钠缓冲溶液(pH6.0)中,放置在添加水的高压锅中,盖上不锈钢锅盖,高压10分钟后,待压力恢复至常压,取出自然冷却。或采用微波炉加热方法,在微波炉里加热0.01枸橼酸钠缓冲液(pH6.0)至沸腾后将组织芯片放入,断电,间隔5-10分钟,反复1-2次。

[0024] B、酶消化方法 常用0.1%胰蛋白酶和0.4%胃蛋白酶液。胰蛋白酶使用前预热37℃,将玻片浸入酶液,消化时间约为5-30分钟。适用于被固定遮蔽的抗原:包括Collagen、GFAP、Complement、Cytokeratin、CerB-2、LCA、LN等。

[0025] 4) 将冷却后的玻片用PBS洗2-3次各5分钟,滴加正常山羊血清封闭液,室温20分钟,甩去多余液体,滴加一抗 $50\mu l$ ,4℃过夜或37℃1小时;PBS洗3次每次2分钟;滴加二抗 $45-50\mu l$ ,37℃1小时;PBS洗3次各5分钟,然后滴加DAB显色液,室温下DAB显色5-10分钟,在显微镜下掌握染色程度。PBS或自来水冲洗10分钟,脱水、透明、封片、镜检。

[0026] 5) 根据标记多肽斑点不同浓度的颜色变化,作为判断操作流程及试剂的标准;若斑点显示颜色与多肽从浓度由低到高表现出逐渐加深的趋势,说明操作流程与试剂合格;再通过显微镜对组织切片进行观察,根据组织切片上靶位颜色与多肽斑点颜色的对比,进行判定。

[0027] 所述的各种溶液的配比为:

[0028] 1. PBS缓冲液(pH7.2-7.4): $NaCl$ 137mmol/L,  $KCl$  2.7mmol/L,  $Na_2HPO_4$  4.3mmol/L,  $KH_2PO_4$  1.4 mmol/L;

[0029] 2. 0.01mol/L柠檬酸钠缓冲液(pH6.0,1000ml):柠檬酸三钠3g,柠檬酸0.4g;

[0030] 3. 0.5mol/L EDTA缓冲液(pH9.0):700ml水中溶解186.1g  $EDTA \times 2H_2O$ ,用10mmol/L  $NaOH$ 调至pH 9.0,加去离子水至1000ml;

[0031] 4. 酶消化液:a. 0.1%胰蛋白酶:用0.1% $CaCl_2$ (pH 7.8)配制。b. 0.4%胃蛋白酶液:用0.1mol/L的HCl配制;

[0032] 5. 3%甲醇- $H_2O_2$ 溶液:用30%  $H_2O_2$ 和80%甲醇溶液配制。

[0033] 所述的多肽配置成系列的不同稀释度的溶液,是指根据不同的抗体反应的亲和

力,配置出能在玻片上显出系列由浅到浓的颜色浓度范围。由于不同的抗体反应效果有差异,因此针对不同的抗体,需要配置不同系列的多肽浓度;

[0034] 所述的多肽,是通过筛选得到的能与检测组织所用的特异性一抗能发生特异性反应的氨基酸聚合物,与组织中靶位蛋白或靶位蛋白中的一段序列一致。

[0035] 下面结合具体实施例对本发明进行详细的说明,以下的实施例是为了进一步说明本发明,但不应视为限制本发明。以下所用生化试剂除特别标明外均购自生工生物工程(上海)有限公司,抗体均购自福州迈新生物科技开发公司。实施例中的临床组织石蜡切片,为福州迈新生物科技开发公司提供。

[0036] 实施例 1:

[0037] Ki67 噬菌体多肽文库,采用 PCR 方式构建。从胃癌细胞 HepG2 细胞中提取总 RNA,逆转录后,从 NCBI 网站获取人 Ki67 蛋白的 mRNA 序列,根据序列设计引物,采用 PCR 扩增 Ki67 的 cDNA 序列,然后以获得的 cDNA 序列为模板,再用半巢式 PCR 扩增。扩增后的引物用 *EcoR1* 和 *Hind III* 内切酶(购自生工生物工程(上海)有限公司)酶切,按照 NewEnglandBiolabs 公司噬菌体展示肽库试剂盒中指导书的指导,连入到噬菌体中,进行多肽的表达(所有的步骤均按 New England Biolabs 公司噬菌体展示肽库试剂盒中指导书进行,试剂盒购自美国 New England Biolabs 公司)

[0038] 实验中引物(生工生物工程(上海)有限公司合成)序列如下表所示:

[0039] 表 1 PCR 所用引物

[0040]

Primers	Sequences (5'→3')
Forward	5' TGGCAGGAACTTTACC 3'
Reverse	5' CTCCCTCTACATCTGCTTTCCTGAT 3'
Forward	5' CGCCTGGTTACTATCA 3'
Reverse	5' GTGCCACCAAAGGAC 3'
Forward	5' AGCGTCACGGGAACCA 3'
Reverse	5' GACCTCAAGCACCTTT 3'
Forward	5' TGGCAGGAACTTTACC 3'
Reverse	5' TCTGGAAGAGCTCTTTAAAGCCAGT 3'
Forward	5' CGCCTGGTTACTATCA 3'
Reverse	5' GCCGCCTCCTTGTGCT 3'
Forward	5' CCGCAGTTGACAAGCACA 3'
Reverse	5' GCCGCCTCCTTGTGCTTG 3'
Forward	5' GCAGGAGATGGCAAGAGC 3'
Reverse	5' ACCGCTTGCTGGTTCTTT 3'

[0041] 注:上述表 1 引物中,Forward 在 5' 加 *EcoR1* 酶切位点序列(ACGAATTC),Reverse

在 5' 加 *Hind* III 酶切位点序列(CGAAGCTT)。

[0042] 用 PBS 稀释商业获得的 Ki67 抗体 100-200 倍,96 孔微孔板板上,每孔加入 100  $\mu$  L,4 $^{\circ}$ C 包被过夜,吸出包被液,PBS 洗板 3 次,3% 牛白蛋白溶液在 37 $^{\circ}$ C 封闭 2h,PBS 洗板 3 次,分别加入不同克隆噬菌体抗体库 100  $\mu$  L(约含  $2 \times 10^{11}$ CFU),37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h,用 PBS(含 0.5% 吐温-20 的 PBS)洗板 3 次(逐轮增加 1 次)。以 100  $\mu$  L 洗脱液(甘氨酸-盐酸,pH2.2)洗脱吸附在酶标孔中的噬菌体,用 50  $\mu$  L Tris-HCl(1mol/L,pH8.0)中和洗脱物,取 10  $\mu$  L 用于滴度测定,其余洗脱物扩增后用于下一轮淘选。当洗脱下的噬菌体滴度达到  $1 \times 10^7$ CFU,该克隆的多肽序列作为目标序列,经测序后,合成该多肽。

[0043] 多肽用 PBS 分别稀释成 1mg/mL、0.1mg/mL、0.01 mg/mL、0.001 mg/mL 的浓度,然后在玻片上部靠近贴标签的部位,采用其中阴性斑点用 1 mg/mL 的牛血清白蛋白代替多肽作为阴性对照,第一排点四个点;第二排和第三排,按多肽浓度从低到高的顺序依次点样,每个点上样 0.1mL,每种浓度两个点。点完后得到三排每排四个点的阵列,最上面一排作为阴性对照,第二排和第三排作为阳性对照。如图 1 所示。

[0044] 采用组织切片机对石蜡组织块进行切片,水化展片后用多肽标记的玻片捞片,将组织切片放置在玻片的中下部。根据 Ki67 第一抗体的要求(兔单抗,以下相同),进行抗原修复。本项操作采用的 Ki67 一抗热修复的要求,将玻片浸入 EDTA(pH9.0)缓冲溶液中,放置在添加水的高压锅中,盖上不锈钢锅盖,高压 10 分钟后,待压力恢复至常压,取出自然冷却。将冷却后的玻片用 PBS 洗 2-3 次各 5 分钟,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,滴加一抗 50  $\mu$  l,4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 1 小时;PBS 洗 3 次每次 2 分钟;滴加羊抗兔二抗 45-50  $\mu$  l,37 $^{\circ}$ C 1 小时;PBS 洗 3 次各 5 分钟,然后滴加 DAB 显色液,室温下 DAB 显色 5-10 分钟,在显微镜下掌握染色程度。PBS 或自来水冲洗 10 分钟,脱水、透明、封片、镜检。根据多肽斑点显色差异,判断是否有假阳性反应和操作失误。如第一排斑点无明显的显色反应,且下两排斑点颜色显著高于第一排,颜色根据多肽浓度由低到高呈现出由浅到深的变化,则表明实验操作过程无误。如果第一排颜色反应与第二排一致,则说明操作过程有假阳性出现,结果不可靠;若第二排、第三排不显色或显色过浅,则表明操作或试剂可能出现差错。如果斑点显示正常,可作为参比,对病例组织的染色进行分析。

[0045] 实施例 2:通过商业途径购买获得的人源 Ki67 蛋白(购自 Sigma 公司),用 PBS 分别稀释成 0.5mg/mL、0.05mg/mL、0.005 mg/mL、0.0005 mg/mL 的浓度,然后在玻片上部靠近贴标签的部位,采用 1mg/mL 牛血清白蛋白作为阴性对照,第一排点四个点;第二排和第三排,按多肽浓度从低到高的顺序依次点样,每个点上样 0.1mL,每种浓度两个点。点完后得到三排每排四个点的阵列,最上面一排作为阴性对照,第二排和第三排作为阳性对照。(点样方式如实施例 2)

[0046] 取临床上 10 例疑似淋巴瘤组织石蜡标本,采用组织切片机对石蜡组织块进行切片,水化展片后用多肽标记的玻片捞片,将组织切片放置在玻片的中下部。根据第一抗体的要求(临床用商业化抗体提供),进行抗原修复。本项操作采用的 Ki67 一抗热修复的要求,将玻片浸入 EDTA(pH9.0)缓冲溶液中,放置在添加水的高压锅中,盖上不锈钢锅盖,高压 10 分钟后,待压力恢复至常压,取出自然冷却。将冷却后的玻片用 PBS 洗 2-3 次各 5 分钟,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,滴加一抗 50  $\mu$  l,4 $^{\circ}$ C 过夜或 37 $^{\circ}$ C 1 小时;PBS 洗 3 次每次 2 分钟;滴加二抗 45-50  $\mu$  l,37 $^{\circ}$ C 1 小时;PBS 洗 3 次各 5 分钟,然

后滴加 DAB 显色液,室温下 DAB 显色 5-10 分钟,在显微镜下掌握染色程度。PBS 或自来水冲洗 10 分钟,脱水、透明、封片、镜检。根据多肽斑点显色差异,判断是否有假阳性反应和操作失误。如第一排斑点无明显的显色反应,且下两排斑点颜色显著高于第一排,颜色根据多肽浓度由低到高呈现出由浅到深的变化,则表明实验操作过程无误。如果第一排颜色反应与第二排一致,则说明操作过程有假阳性出现,结果不可靠;若第二排、第三排不显色或显色过浅,则表明操作或试剂可能出现差错。如果斑点显示正常,可作为参比,对病例组织的染色进行分析。若组织上无明显着色,则可判断为阴性组织,无淋巴瘤生成,记为(-);若组织上的染色颜色弱于第二排,则可判断为低度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+);如果颜色高于第三排,则可判断为高度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+++);如果介于二者之间,可判断为由底到高的发生阶段,记为(++)。10 例病理组织的染色结果与玻片上三排的染色结果进行对比,结果与病理医师判定结果一致。

[0047] 表 2 病理组织染色诊断结果

[0048]

组织编号	玻片参比判定结果	医师判定结果	是否一致
1	-	-	是
2	-	-	是
3	++	++	是
4	-	-	是
5	+++	+++	是
6	+	+	是
7	++	++	是
8	+++	+++	是
9	-	-	是
10	+++	+++	是

[0049] 实施例 3

[0050] 采用实施例 1 中制备方式制备 Ki67 多肽,多肽用 PBS 分别稀释 0.01 mg/mL、0.001 mg/mL 的浓度,采用 1mg/mL 牛血清白蛋白作为阴性对照,不同浓度的多肽溶液和牛血清白蛋白溶液中,加入终浓度为 30g/L 的琼脂糖,加热至 70° C 融化完全后,吸入在 1mL 塑料注射器里,室温下凝固成凝胶柱,用锋利的刀片将注射器的尖端部分切下取出凝胶柱,将其当做组织处理,经过免疫组化常规操作后放在蜡里面,然后将蜡切成合适大小并包埋在石蜡块中用于切片。

[0051] 作为阴性对照,第一排点两个点;第二排和第三排,按多肽浓度从低到高的顺序依次加上切片,每种浓度两个点。点完后得到三排每排两个点的阵列,最上面一排作为阴性对照,第二排和第三排作为阳性对照。如图 2 所示。

[0052] 取临床上 10 例疑似淋巴瘤组织石蜡标本,采用组织切片机对石蜡组织块进行切片,水化展片后用多肽标记的玻片捞片,将组织切片放置在玻片的中下部。根据第一抗体的要求(临床用商业化抗体提供),进行抗原修复。本项操作采用的 Ki67 一抗热修复的要求,将玻片浸入 EDTA (pH9.0) 缓冲溶液中,放置在添加水的高压锅中,盖上不锈钢锅盖,高压 10 分钟后,待压力恢复至常压,取出自然冷却。将冷却后的玻片用 PBS 洗 2-3 次各 5 分钟,滴加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,滴加一抗 50  $\mu$  l, 4°C 过夜或 37°C 1

小时；PBS 洗 3 次每次 2 分钟；滴加二抗 45-50  $\mu$  l，37 $^{\circ}$ C 1 小时；PBS 洗 3 次各 5 分钟，然后滴加 DAB 显色液，室温下 DAB 显色 5-10 分钟，在显微镜下掌握染色程度。PBS 或自来水冲洗 10 分钟，脱水、透明、封片、镜检。根据多肽斑点显色差异，判断是否有假阳性反应和操作失误。如第一排斑点无明显的显色反应，且下两排斑点颜色显著高于第一排，颜色根据多肽浓度由低到高呈现出由浅到深的变化，则表明实验操作过程无误。如果第一排颜色反应与第二排一致，则说明操作过程有假阳性出现，结果不可靠；若第二排、第三排不显色或显色过浅，则表明操作或试剂可能出现差错。如果斑点显示正常，可作为参比，对病例组织的染色进行分析。若组织上无明显着色，则可判断为阴性组织，无淋巴瘤生成，记为(-)；若组织上的染色颜色弱于第二排，则可判断为低度恶性非霍奇金氏淋巴瘤，记为(+);如果颜色高于第三排，则可判断为高度恶性非霍奇金氏淋巴瘤，记为(+++);如果介于二者之间，可判断为由底到高的发生阶段，记为(++)。10 例病理组织的染色结果与玻片上三排的染色结果进行对比，结果与病理医师判定结果一致。

[0053] 表 3 病理组织染色诊断结果

[0054]

组织编号	玻片参比判定结果	医师判定结果	是否一致
1	++	++	是
2	+++	+++	是
3	-	-	是
4	-	-	是
5	+++	+++	是
6	+	+	是
7	++	++	是
8	+++	+++	是
9	-	-	是
10	+++	+++	是

[0055] 实施例 4：

[0056] 通过商业途径购买的人源 Ki67 蛋白(购自 Sigma 公司)，用 PBS 分别稀释 0.005 mg/mL、0.0005 mg/mL 的浓度，采用 1mg/mL 山羊血清作为阴性对照，不同浓度的多肽溶液和牛血清白蛋白溶液中，加入终浓度为 30g/L 的琼脂糖，加热至 70 $^{\circ}$  C 融化完全后，吸入在 1mL 塑料注射器里，室温下凝固成凝胶柱，用锋利的刀片将注射器的尖端部分切下取出凝胶柱，将其当做组织处理，经过免疫组化常规操作后放在蜡里面，然后将蜡切成合适大小并包埋在石蜡块中用于切片机切片。

[0057] 作为阴性对照，第一排点两个点；第二排和第三排，按多肽浓度从低到高的顺序依次加上切片，每种浓度两个点。点完后得到三排每排两个点的阵列，最上面一排作为阴性对照，第二排和第三排作为阳性对照。点样方式如实施例 3。

[0058] 取临床上 10 例疑似淋巴瘤组织石蜡标本，采用组织切片机对石蜡组织块进行切片，水化展片后用多肽标记的玻片捞片，将组织切片放置在玻片的中下部。根据第一抗体的要求(临床用商业化抗体提供)，进行抗原修复。本项操作采用的 Ki67 一抗热修复的要求，将玻片浸入 EDTA (pH9.0) 缓冲溶液中，放置在添加水的高压锅中，盖上不锈钢锅盖，高压 10 分钟后，待压力恢复至常压，取出自然冷却。将冷却后的玻片用 PBS 洗 2-3 次各 5 分钟，滴

加正常山羊血清封闭液,室温 20 分钟,甩去多余液体,滴加一抗  $50 \mu\text{l}$ ,  $4^\circ\text{C}$  过夜或  $37^\circ\text{C}$  1 小时; PBS 洗 3 次每次 2 分钟;滴加二抗  $45\text{--}50 \mu\text{l}$ ,  $37^\circ\text{C}$  1 小时; PBS 洗 3 次各 5 分钟,然后滴加 DAB 显色液,室温下 DAB 显色 5-10 分钟,在显微镜下掌握染色程度。PBS 或自来水冲洗 10 分钟,脱水、透明、封片、镜检。根据多肽斑点显色差异,判断是否有假阳性反应和操作失误。如第一排斑点无明显的显色反应,且下两排斑点颜色显著高于第一排,颜色根据多肽浓度由低到高呈现出由浅到深的变化,则表明实验操作过程无误。如果第一排颜色反应与第二排一致,则说明操作过程有假阳性出现,结果不可靠;若第二排、第三排不显色或显色过浅,则表明操作或试剂可能出现差错。如果斑点显示正常,可作为参比,对病例组织的染色进行分析。若组织上无明显着色,则可判断为阴性组织,无淋巴瘤生成,记为(-);若组织上的染色颜色弱于第二排,则可判断为低度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+);如果颜色高于第三排,则可判断为高度恶性非霍奇金氏淋巴瘤,记为(+++);如果介于二者之间,可判断为由底到高的发生阶段,记为(++)。10 例病理组织的染色结果与玻片上三排的染色结果进行对比,结果与病理医师判定结果一致。

[0059] 表 4 病理组织染色诊断结果

[0060]

组织编号	玻片参比判定结果	医师判定结果	是否一致
1	++	++	是
2	+++	+++	是
3	-	-	是
4	+++	+++	是
5	++	++	是
6	+	+	是
7	++	++	是
8	+++	+++	是
9	-	-	是
10	+++	+++	是

- <110> 福州大学
- <120> 一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法
- <160> 14
- <170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 1  
tggcaggaac tttacc 16
- <210> 2
- <211> 25
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 2  
ctccctctac atctgctttc ctgat 25
- <210> 3
- <211> 16
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <400> 3  
cgcctggtta ctatca 16
- <210> 4
- <211> 16
- <212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gtgcccacca aaggac

16

<210> 5

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

agcgtcacgg gaacca

16

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6

gacctcaage accttt

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 7

tggcaggaac tttacc

16

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 8

tctggaagag ctctttaaag ccagt 25

<210> 9

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 9

cgcctgggta ctatca 16

<210> 10

<211> 16

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 10

gccgcctcct tgtgct 16

<210> 11

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 11

ccgcagttga caagcaca 18

<210> 12

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 12

gccgcctcct tgtgcttg 18

<210> 13

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 13

gcaggagatg gcaagagc

18

<210> 14

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 14

accgcttgct ggttcttt

18

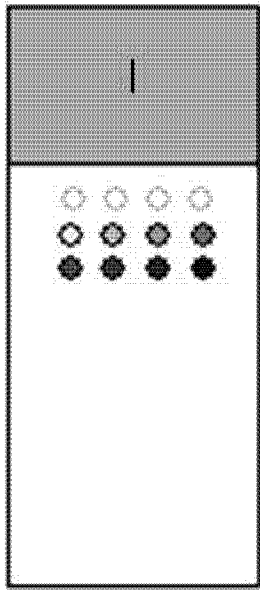


图 1

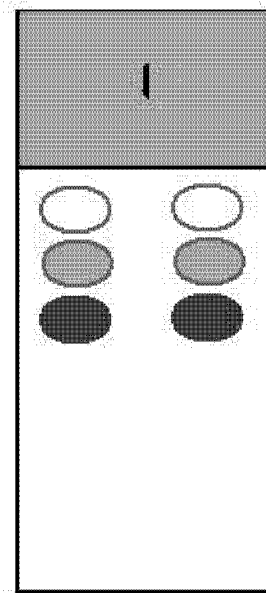


图 2

专利名称(译)	一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN102435728B</a>	公开(公告)日	2014-06-25
申请号	CN201110263731.1	申请日	2011-09-07
[标]申请(专利权)人(译)	福州大学		
申请(专利权)人(译)	福州大学		
当前申请(专利权)人(译)	福州大学		
[标]发明人	孟春 黄以鹏 王航 郭养浩		
发明人	孟春 黄以鹏 王航 郭养浩		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	蔡学俊		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN102435728A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种用于免疫组化过程质量检控的阳性参照物的制备方法，该方法将能够与抗体发生特异性反应的多肽或蛋白，设置不同浓度预先吸附在玻片上，或是将经过包埋的不同浓度的多肽或蛋白石蜡切片预先放置在玻片上，与病理组织切片同时经历常规免疫组化步骤，多肽或蛋白的染色结果作为免疫组化过程的阳性参照。本发明采用在玻片上设置阳性对照蛋白或多肽的方法，实现阳性对照和指控标准，本发明是对现存质量保证程序的重要补充，是一种对免疫组化测试进行质量控制的新方法。

