



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103344760 B

(45) 授权公告日 2015. 08. 26

(21) 申请号 201310311757. 8

(22) 申请日 2013. 07. 23

(73) 专利权人 成都安铂奥金生物科技有限公司
地址 610041 四川省成都市高新区紫瑞大道
188 号 2 栋 8 单元 1 层 1 号

(72) 发明人 陈柏华 李平 韩星

(74) 专利代理机构 成都高远知识产权代理事务
所(普通合伙) 51222
代理人 李高峡 张娟

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 203337665 U, 2013. 12. 11, 权利要求 1.

CN 203337660 U, 2013. 12. 11, 权利要求 1、
7、9.

CN 201368876 Y, 2009. 12. 23,

CN 101738466 A, 2010. 06. 16,

CN 1439878 A, 2003. 09. 03, 权利要求 8, 图
1-7.

CN 101532009 A, 2009. 09. 16, 全文.

CN 101200708 A, 2008. 06. 18, 全文.

CN 101285822 A, 2008. 10. 15, 全文.

CA 2523745 A1, 2006. 05. 15, 全文.

郑晖等. 培养细胞免疫组化方法的改进.《细
胞生物学杂志》. 2003,

审查员 刘彦宁

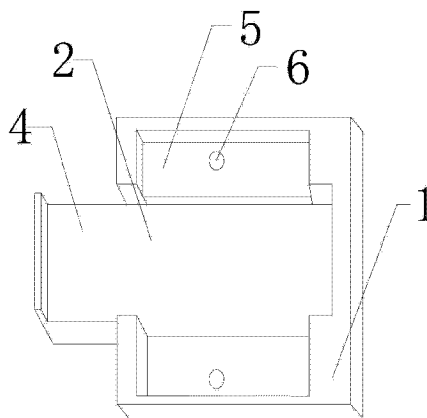
权利要求书2页 说明书6页 附图2页

(54) 发明名称

一种高通量免疫组化检测方法及多样品免疫
组化检测板

(57) 摘要

本发明公开了一种多样品免疫组化检测板,
还公开了利用所述检测板进行高通量免疫组化检
测的方法,包括如下步骤:(1)待检组织切片的制
备;(2)将步骤(1)待检组织切片经脱蜡、水化、抗
原修复、封闭处理后,平放入横向凹槽(2)中;(3)
将多孔板(3)放入纵向凹槽(5)中,覆盖有柔性防
水衬层一面朝下,固定;(4)将多种待测抗体溶液
加入不同的通孔(7)中,孵育;(5)取出待检组织
切片,显色,封片,观察即可。本发明还公开了一种
细胞组织块制备模具。本发明高通量免疫组化检
测方法,可以在同一载玻片上同时进行多种抗体
检测,应用前景良好。



1. 多样品免疫组化检测板,其特征在于,包括固定底座(1)、多孔板(3);所述固定底座(1)上表面开设有放置载玻片的横向凹槽(2);固定底座(1)上表面还开设有纵向凹槽(5),所述纵向凹槽(5)与横向凹槽(2)部分重叠,纵向凹槽(5)的尺寸与多孔板(3)的外形相适配,横向凹槽(2)的深度大于纵向凹槽(5)的深度,所述多孔板(3)设置有通孔(7),多孔板(3)的一面覆盖有柔性防水衬层;通孔(7)穿过上述柔性防水衬层。

2. 根据权利要求1所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:所述通孔(7)的数量为2至96个;

所述通孔(7)的形状为圆形或椭圆形或多边形;

所述通孔(7)的孔径为1毫米至5毫米,同组中相邻通孔(7)之间的距离为0.5毫米至3毫米。

3. 根据权利要求2所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:所述通孔(7)的数量为24个、36个、48个或96个。

4. 根据权利要求1所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:所述通孔(7)分为二组,每组24个并且呈矩阵排布。

5. 根据权利要求1所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:在纵向凹槽(5)两端与横向凹槽(2)不重叠的部分分别设置有安装孔(6),在多孔板(3)上设置有与安装孔(6)位置相重叠的固定孔(8)。

6. 根据权利要求1所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:所述横向凹槽(2)、纵向凹槽(5)均为矩形,横向凹槽(2)相对于固定底座(1)的侧面一端通透并形成向外的突出部(4)。

7. 根据权利要求6所述的多样品免疫组化检测板,其特征在於:所述突出部(4)的横向尺寸为15毫米。

8. 一种高通量免疫组化检测方法,其特征在於:采用权利要求1~4任意一项所述检测板检测;包括如下步骤:

(1) 待检组织切片的制备:取待检组织,用组织芯片技术制备待检组织切片,切片上各组织的直径、间距和分布位置与多孔板的通孔(7)匹配;

(2) 将步骤(1)待检组织切片经脱蜡、水化、抗原修复、封闭处理后,平放入横向凹槽(2)中;

(3) 将多孔板(3)放入纵向凹槽(5)中,覆盖有柔性防水衬层一面朝下,固定;

(4) 将多种待测抗体溶液加入不同的通孔(7)中,孵育;

(5) 取出待检组织切片,二抗反应,显色,封片,观察即可。

9. 根据权利要求8所述的方法,其特征在於:步骤(1)中,待检组织切片为细胞组织块切片时,用如下方法制备:将细胞与琼脂糖凝胶混悬液混匀,加入细胞组织块制备模具中,待琼脂糖细胞液冷凝,取出,即得细胞组织块,再采用组织芯片技术制备组织块切片;

所述细胞组织块制备模具,包括由上到下依次连接的模具框板(2-1)、防水垫层(2-2)、模具底板(2-3);所述模具框板(2-1)中央区域为上下通透的通槽(2-12),所述防水垫层(2-2)的形状、尺寸与模具框板(2-1)相同,所述模具底板(2-3)的外形尺寸与模具框板(2-1)的外形尺寸相同。

10. 根据权利要求9所述的方法,其特征在於:所述冷凝是通过离心3~8分钟的方式

使琼脂糖细胞液冷凝。

11. 根据权利要求 10 所述的方法,其特征在于:所述离心时间为 5 分钟。

12. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述模具框板(2-1)外形为矩形,所述通槽(2-12)为矩形;

所述模具框板(2-1)、防水垫层(2-2)、模具底板(2-3)通过位于四角的螺孔、螺杆连接;所述螺杆直径为 3 毫米至 5 毫米;

所述模具框板(2-1)的厚度为 2 至 10 毫米,所述通槽(2-12)的一边边长为 5 毫米至 50 毫米,另一边边长为 5 毫米至 25 毫米;所述模具底板(2-3)的厚度与模具框板(2-1)的厚度相同。

13. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:

所述模具框板(2-1)、模具底板(2-3)的材料均为工程塑料、胶木、硬木或金属;

所述防水垫层(2-2)为硅胶、橡胶、软木或塑料制成。

14. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述防水垫层(2-2)为模具框板(2-1)表面喷涂或刷涂的永久性粘胶。

15. 根据权利要求 9 所述的方法,其特征在于:所述模具框板(2-1)、模具底板(2-3)均为有机玻璃。

16. 权利要求 8~15 任意一项所述方法在高通量筛选免疫组化检测用单克隆抗体中的用途。

一种高通量免疫组化检测方法及多样品免疫组化检测板

技术领域

[0001] 本发明涉及一种高通量免疫组化检测方法及多样品免疫组化检测板,属于免疫领域。

背景技术

[0002] 众所周知,病理诊断是临床疾病诊断的金指标。现代常规病理诊断方法是通过特异性单克隆抗体对固定在载玻片上的病理组织切片染色实现的,即免疫组化技术(免疫组织化学染色技术)。

[0003] 常规免疫组化技术,是在经典病理切片技术的基础上发展而来,通常一张片子只载有一种病理组织切片。最近发展起来的组织芯片技术,可以上载多种病理组织切片到一张标准载玻片上,解决了一张片子上只能载一种病理组织的问题,达到了用同一种特异性单抗同步免疫组化检测多种不同病理组织的目的。

[0004] 然而,在临床和研究实践中,经常需要用多种针对不同致病抗原的特异性单抗同步对同一种病理组织进行免疫组化检测,通常至少用 500 至 1,000 种单抗样品对同一种病理组织切片同步进行免疫组化检测。因不同抗体存在交叉反应,一张病理组织切片只能用一种特异性单抗进行免疫组化检测,因此需要用多种抗体进行检测时,有多少种抗体,就需要用至少相同数量的病理组织切片分别进行免疫组化检测。

[0005] 另外,目前筛选用于免疫组化检测的同一致病抗原靶点的多种抗体(杂交瘤)时,均采用 ELISA,Western Blot,免疫沉淀及细胞化学免疫学技术,然而,这些技术筛选得到的单抗往往难以应用于免疫组化检测。根据终端应用原则,用免疫组化检测方法筛选抗体是比较合适的。然而,现有免疫组化检测方法仅适合一种抗体的检测,因而有多少种备选抗体(杂交瘤),就需要至少相同数量病理组织切片进行免疫组化检测,费时费力,成本极高。

发明内容

[0006] 为了解决上述问题,本发明的技术方案是提供了一种高通量免疫组化检测方法,以及高通量免疫组化检测板及与之配套的细胞组织块制作模具。

[0007] 本发明公开的多样品免疫组化检测板,包括固定底座、多孔板;所述固定底座上表面开设有放置载玻片的横向凹槽,固定底座上表面还开设有纵向凹槽,所述纵向凹槽与横向凹槽部分重叠,纵向凹槽的尺寸与多孔板的外形相适配,横向凹槽的深度大于纵向凹槽的深度,所述多孔板设置有通孔,多孔板的一面覆盖有柔性防水衬层。

[0008] 优选的,所述通孔的数量为 2 至 96 个。

[0009] 优选的,所述通孔的数量为 24 个或 36 个或 48 个或 96 个。

[0010] 优选的,所述通孔分为二组,每组 24 个并且呈矩阵排布。

[0011] 优选的,所述通孔的形状为圆形或椭圆形或多边形。

[0012] 进一步的,所述通孔的孔径为 1 毫米至 5 毫米,同组中相邻通孔之间的距离为 0.5 毫米至 3 毫米。

[0013] 进一步的,在纵向凹槽两端与横向凹槽不重叠的部分分别设置有安装孔,在多孔板上设置有与安装孔位置相重叠的固定孔。

[0014] 进一步的,所述横向凹槽、纵向凹槽均为矩形,横向凹槽相对于固定底座的侧面一端通透并形成向外的突出部。

[0015] 优选的,所述突出部的横向尺寸为 15 毫米。

[0016] 本发明细胞组织块制备模具,细胞组织块制备模具,包括由上到下依次连接的模具框板、防水垫层、模具底板;所述模具框板中央区域为上下通透的通槽,所述防水垫层的形状、尺寸与模具框板相同,所述模具底板的外形尺寸与模具框板的外形尺寸相同。

[0017] 优选的,所述模具框板外形为矩形,所述通槽为矩形。

[0018] 优选的,所述模具框板、防水垫层、模具底板通过位于四角的螺孔、螺杆连接。

[0019] 优选的,所述模具框板的厚度为 2 至 10 毫米,所述通槽的一边边长为 5 毫米至 50 毫米,另一边边长为 5 毫米至 25 毫米;所述模具底板的厚度与模具框板的厚度相同。

[0020] 优选的,所述模具框板、模具底板的材料均为工程塑料、胶木、硬木或金属。

[0021] 优选的,所述模具框板、模具底板均为有机玻璃。

[0022] 优选的,所述防水垫层为硅胶、橡胶、软木或塑料制成。

[0023] 优选的,所述防水垫层为模具框板表面喷涂或刷涂的永久性粘胶。

[0024] 优选的,所述螺杆直径为 3 毫米至 5 毫米。

[0025] 本发明高通量免疫组化检测方法,其特征在于:采用前述检测板检测;包括如下步骤:

[0026] (1) 待检组织切片的制备:取待检组织,在载玻片上制备组织切片,组织切片上各组织的直径、间距和分布位置与多孔板的通孔(7)匹配,得待检组织切片;

[0027] (2) 将步骤(1)待检组织切片经脱蜡、水化、抗原修复、封闭处理后,平放入横向凹槽(2)中;

[0028] (3) 将多孔板(3)放入纵向凹槽(5)中,覆盖有柔性防水衬层一面朝下,固定;

[0029] (4) 将多种待测抗体溶液加入不同的通孔(7)中,孵育;

[0030] (5) 取出待检组织切片,二抗反应,显色,封片,观察即可。

[0031] 组织芯片技术,也称组织微阵列(tissue microarrays),是将许多组织标本以规则阵列方式排布于同一载玻片上,具体是将待检组织用石蜡包埋、切片机切片后,再采用组织打孔/阵列仪在受体蜡块上打孔,并在载玻片上排列成微孔阵列。

[0032] 步骤(1)中,待检组织切片为细胞组织块切片时,用如下方法制备:将细胞与琼脂糖凝胶混悬液混匀,加入前述细胞组织块制备模具中,待琼脂糖细胞液冷凝,取出,即得细胞组织块,再采用组织芯片技术制备组织块切片;

[0033] 优选地,通过离心 3~8 分钟的方式使琼脂糖细胞液冷凝,所述离心时间进一步优选为 5 分钟。

[0034] 前述方法在高通量筛选免疫组化检测用单克隆抗体中的用途。

[0035] 采用本发明高通量方法可以在同一载玻片上同时进行多种抗体检测,实现了高通量免疫组化检测,彻底改善了免疫组化体外诊断试剂型单克隆抗体研发成功率极低的现状,应用前景良好。

[0036] 显然,根据本发明的上述内容,按照本领域的普通技术知识和惯用手段,在不脱离

本发明上述基本技术思想前提下,还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0037] 以下通过实施例形式的具体实施方式,对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0038] 图 1 为固定底座的结构示意图;

[0039] 图 2 为多孔板的结构示意图;

[0040] 图中:1-固定底座、2-横向凹槽、3-多孔板、4-突出部、5-纵向凹槽、6-安装孔、7-通孔、8-固定孔。

[0041] 图 3 为本发明的分拆示意图;图中:2-1:模具框板、2-2:防水垫层、2-3:模具底板、2-12:通槽。

具体实施方式

[0042] 实验仪器和试剂:

[0043] 1、本发明免疫组化检测板:如图 1、图 2 所示,本发明公开的多样品免疫组化检测板,包括固定底座 1、多孔板 3;固定底座 1 长 80 毫米,宽 35 毫米至 45 毫米,厚为 8 毫米至 10 毫米,采用包括有机玻璃板在内的工程塑料、胶木、硬木或金属等材料制成;固定底座 1 上表面开设有放置载玻片的横向凹槽 2,固定底座 1 上表面还开设有纵向凹槽 5,纵向凹槽 5 与横向凹槽 2 部分重叠,纵向凹槽 5 的尺寸与多孔板 3 的外形相适配,横向凹槽 2 的深度大于纵向凹槽 5 的深度,多孔板 3 设置有通孔 7,通孔 7 为圆形并分为二组,每组 24 个并且呈矩阵排布,通孔 7 的孔径为 1 毫米至 5 毫米,同组中相邻通孔 7 之间的距离为 0.5 毫米至 3 毫米;多孔板 3 的一面覆盖有柔性防水衬层,通孔 7 穿过上述柔性防水衬层。

[0044] 载玻片采用国际病理学和分子细胞生物学领域通用的组织切片载玻片,其尺寸为:长 75 ± 0.5 毫米,宽 25 ± 0.5 毫米,厚 1.0 ± 0.1 毫米。

[0045] 在纵向凹槽 5 两端与横向凹槽 2 不重叠的部分分别设置有安装孔 6,在多孔板 3 上设置有与安装孔 6 位置相重叠的固定孔 8;可采用螺栓通过安装孔 6、固定孔 8 将多孔板 3 固定在纵向凹槽 5 内。

[0046] 多孔板 3 为矩形,厚度在 3 毫米以上,采用包括有机玻璃在内的任何透明和不透明板材制成,多孔板 3 与载玻片短边平行的边长为 35 ± 5 毫米,与载玻片长边平行的边长为 5 至 78 毫米。

[0047] 横向凹槽 2、纵向凹槽 5 均为矩形,横向凹槽 2 相对于固定底座 1 的侧面一端通透并形成向外的突出部 4,突出部 4 的横向尺寸为 15 毫米;便于实际操作时载玻片的安装与拆卸。

[0048] 多孔板 3 的一面覆盖有柔性防水衬层,柔性防水衬层可由任何软性薄片状硅胶,橡胶,软木或塑料冲孔而成,也可通过在多孔板 3 表面喷涂或刷涂永久粘胶而成。

[0049] 本发明公开的多样品免疫组化检测板的组装:将载玻片组织切片面朝上平放入横向凹槽 2 内,再将多孔板 3 覆盖有柔性防水衬层的一面朝向载玻片平放入纵向凹槽 5 中,采用 5 毫米螺杆、螺帽和垫片通过安装孔 6 和固定孔 8 将多孔板 3 和待测组织切片载玻片固

定在固定底座 1 上,所有通孔 7 从上到下的正投影均位于载玻片内;组装完毕后,形成多个底部为组织切片相互隔离的圆形小室,即可用于多种不同抗体溶液的检测。

[0050] 2、细胞组织块制备模具:如图 3 所示,细胞组织块制备模具,包括由上到下依次连接的模具框板 2-1、防水垫层 2-2、模具底板 2-3;模具框板 2-1 为矩形,厚度为 2 至 10 毫米,其中央区域为上下通透的矩形通槽 2-12,通槽 2-12 的一边边长为 5 毫米至 50 毫米,另一边边长为 5 毫米至 25 毫米,防水垫层 2-2 的形状、尺寸与模具框板 2-1 相同,模具底板 2-3 的外形尺寸与模具框板 2-1 的外形尺寸相同;模具框板 2-1、防水垫层 2-2、模具底板 2-3 通过位于四角的螺孔、螺杆连接,连接用螺杆的直接为 3 毫米至 5 毫米。

[0051] 模具框板 2-1、模具底板 2-3 均采用有机玻璃制成,防水垫层 2-2 为硅胶、橡胶、软木或塑料制成,防水垫层 2-2 还可以用模具框板 2-1 表面喷涂或刷涂的永久性粘胶制成。

[0052] 试剂均为市售品。

[0053] 实施例 1:手术切除或活检组织高通量免疫组化检测

[0054] (1) 制备待检组织切片:常规组织芯片技术制备点矩阵型组织切片,各组织的直径、间距和分布位置与多孔矩阵板完全匹配。

[0055] (2) 安装载玻片:将经除蜡,水化,抗原修复和非特异性抗原封闭处理的组织芯片载玻片,放入底座的载玻片固定槽中,确认组织切片面向上。

[0056] (3) 安装多孔矩阵板:将多孔矩阵板防水垫一侧朝下放入多孔板固定槽中,调节将每一组织切片点完全被套入多孔矩阵板相对应的小孔中并紧固镙拴。

[0057] (4) 将原始杂交瘤培养液上清有序地加入相对应的小孔中,注意去除每一小孔中的气泡。室温,4℃或 37℃孵育规定时间。

[0058] (5) 真空吸除小孔中培养液后,分解免疫组化检测板,将载玻片置于磷酸缓冲液中,室温浸泡 5~10 分钟以清洗载玻片,重复清洗 3 次。

[0059] (6) 二抗反应,显色、封片,观察即可。

[0060] 实施例 2:原代培养细胞系或转染细胞制组织芯片免疫组化检测

[0061] (1) 石蜡包埋细胞组织块制备:

[0062] 1) 收获培养物,磷酸缓冲液离心洗涤细胞 2 次;

[0063] 2) 将细胞混悬于 4% 福尔马林固定液,4℃孵育 1-2 小时后离心弃上清;

[0064] 3) 将细胞混悬于磷酸缓冲液中,37℃孵育 10 分钟;

[0065] 4) 将细胞混悬液与等量于 50℃ 3% 琼脂糖凝胶溶液混匀;

[0066] 5) 立即将新的细胞与琼脂糖凝胶混悬液加入组织块制备模具中,立即离心 5 分钟后,分解组织块制备模具,取出制好的细胞系组织块;

[0067] 6) 将获得的细胞组织块切成 1.0 毫米厚后,进行脱水及石蜡包埋处理。

[0068] (2) 常规细胞组织块切片制备:常规组织芯片技术制备组织切片,各组织的直径、间距和分布位置与多孔矩阵覆盖区基本对齐。

[0069] (3) 安装载玻片:将经除蜡,水化,抗原修复和非特异性抗原封闭处理的组织芯片载玻片,放入固定板的载玻片固定槽中,确认组织切片面向上。

[0070] (4) 安装多孔矩阵板:将多孔矩阵板防水垫一侧朝下放入多孔板固定槽中,调节将每一组织切片点完全被套入多孔矩阵板相对应的小孔中并紧固镙拴。

[0071] (5) 将原始杂交瘤培养液上清有序地加入相对应的小孔中,注意去除每一小孔中

的气泡,室温,4℃或 37℃孵育规定时间。

[0072] (6) 真空吸除小孔中培养液后,分解免疫组化检测板,将载玻片置于磷酸缓冲液中,室温浸泡 5—10 分钟以清洗载玻片,重复清洗 3 次。

[0073] (7) 二抗反应,显色、封片,观察即可。

[0074] 以下采用实施例的方式说明本发明的有益效果:

[0075] 实验例 1:Napsin A 免疫组化单克隆抗体的筛选

[0076] Napsin A 是一种天冬氨酸蛋白酶。在肺的恶性肿瘤中,80% 以上的肺腺癌病人活检病理检查表现为 Napsin A 阳性,而所有肺鳞状细胞癌和小细胞肺癌病人病理检查均为 Napsin A 阴性。因而 Napsin A 免疫组化单克隆抗体成为肺癌的鉴别诊断和肺腺癌转移诊断的重要试剂。然而,用于免疫组化诊断的 Napsin A 单抗极难制备。直到目前为止,在国际市场仍未出现一个被普遍认可的免疫组化 Napsin A 单抗。

[0077] 如下采用本发明方法筛选 Napsin A 单克隆抗体:

[0078] 1、实验准备

[0079] (1) 动物免疫:多肽抗原偶联物(由客户提供)与等容弗氏佐剂混匀成乳状;选 5 只健康 6—8 周龄雌性腹腔注射;每二周一次,每只小鼠每次注射 0.2 毫升/50 微克;第 35 天尾静脉取血清 50 微升,送客户做免疫组化检测免疫效果。

[0080] (2) 细胞融合操作:融合前三天尾静脉注射抗原,细胞融合前一天传代处于对数生长期的骨髓瘤细胞 SP2/0。细胞融合当天拉颈处死动物,无菌操作下分离脾脏及脾脏淋巴细胞。采用 PEG 化学融合方法,动物淋巴细胞与 SP2/0 细胞比例为 1:5。共产生 5 个 96 孔融合细胞培养板。继续在 5%CO₂和 37℃培养,融合第二天加入一倍的 HAT 选择剂。第 12—14 天开始原始杂交瘤筛选。

[0081] 2、筛选方法

[0082] 本发明筛选方法:

[0083] (1) 肺腺癌细胞组织块病理切片的制作:

[0084] 石蜡包埋细胞组织块制备:1). 收获培养物,磷酸缓冲液离心洗涤细胞 2 次;2). 将细胞混悬于 4% 福尔马林固定液,4℃孵育 1-2 小时后离心弃上清;3). 将细胞混悬于磷酸缓冲液中,37℃孵育 10 分钟;4). 将细胞混悬液与等量于 50℃ 3% 琼脂糖凝胶溶液混匀;5). 立即将新的细胞与琼脂糖凝胶混悬液加入组织块制备模具中,立即离心 5 分钟后,分解组织块制备模具,取出制好的细胞系组织块。6). 将获得的细胞组织块切成 1.0 毫米厚后,进行脱水及石蜡包埋处理。

[0085] (2) 常规细胞组织块切片制备:采用常规方法制备组织切片,组织切片在载玻片上的位置,与多孔矩阵覆盖区基本对齐。

[0086] (3) 安装载玻片:将经除蜡,水化,抗原修复和非特异性抗原封闭处理的组织芯片载玻片,放入固定板的载玻片固定槽中,确认组织切片面向上。

[0087] (4) 安装多孔矩阵板:将多孔矩阵板防水垫一侧朝下放入多孔板固定槽中,调节将每一组织切片点完全被套入多孔矩阵板相对应的小孔中并紧固镙栓。

[0088] (4) 将 480 种原始杂交瘤培养液上清有序地加入相对应的小孔中,注意去除每一小孔中的气泡。室温,4℃或 37℃孵育规定时间。

[0089] (5) 真空吸除小孔中培养液后,分解免疫组化检测板,将载玻片置于磷酸缓冲液

中,室温浸泡 5 — 10 分钟以清洗载玻片,重复清洗 3 次。

[0090] (6) 二抗反应,显色、封片,观察即可。

[0091] 现有 ELISA 筛选方法:采用常规双夹心 ELISA 方法筛选 Napsin A 单抗,二抗同前述步骤(6)使用的二抗。

[0092] 3、检测

[0093] 将步骤 2 筛选所获得的阳性原始杂交瘤经常规免疫组化病理诊断技术进一步验证,以确认所得单抗杂交瘤科隆分泌可用于免疫组化检测的 Napsin A 单克隆抗体。原始阳性单抗杂交瘤免疫组化鉴定分析实验步骤鉴定如下:

[0094] (1) 常规肺腺癌组织石蜡切片免疫组化检测:将所得样品经常规免疫组化检测,结果阳性者进行下一步鉴定分析;

[0095] (2) 用所获阳性 Napsin A 单抗样品对包括肺组织在内的 15 种正常人体组织和器官,以及肺腺癌,鳞状细胞癌和小细胞肺癌在内的 10 种人类恶性肿瘤的石蜡切片进行免疫组化检测分析。

[0096] (3) 采用常规免疫组化检测的方法,采用的二抗和其他试剂同步骤 2 本发明方法。

[0097] 4、实验结果

[0098] 实验结果如表 1 所示:

[0099] 表 1 本发明高通量免疫组化原始杂交瘤筛选方法与常规经典 ELISA 杂交瘤筛选方法结果比较

[0100]

筛选方法	原始克隆筛选数量 (96 孔板数)	初选阳性原始克隆数及信号强度	免疫组化验证结果	客户亚克隆杂交瘤获得结果
常规 ELISA 方法	5	14 个克隆, 所有克隆为强阳性。	无免疫组化阳性克隆。	未获得任何阳性亚克隆。
本发明免疫组化方法	5	3 个克隆, 1 个强阳性, 2 个中度阳性。	与多样品免疫组化检测结果一致。	由强阳性原始克隆获得 3 个强阳性亚克隆。

[0101]

		性。		性亚克隆。
--	--	----	--	-------

[0102] 如表 1 所示,本发明方法从 480 种抗体中筛选到了适于免疫组化诊断用的特异性 Napsin A 单抗,而现有 ELISA 方法筛选的克隆抗体虽然多,但均不适于免疫组化诊断。

[0103] 实验结果说明,本发明方法实现了在同一载玻片上同时进行了多种抗体检测,高效准确。

[0104] 综上,本发明装置简单实用,操作简捷可靠,勿须精密复杂的常规组织芯片制作器械和技术,检测速度也远远超过了当前所有的自动化免疫组化检测仪器设备:用本发明的多样品免疫组化检测板一个人可以轻松完成 500 个原始克隆的检测,而当前自动化免疫组化检测仪每天最多可检测 30 — 100 个载玻片(样品)。

[0105] 本发明方法可以在同一载玻片上同时进行多种抗体检测,实现了高通量免疫组化检测和筛选,应用前景良好。

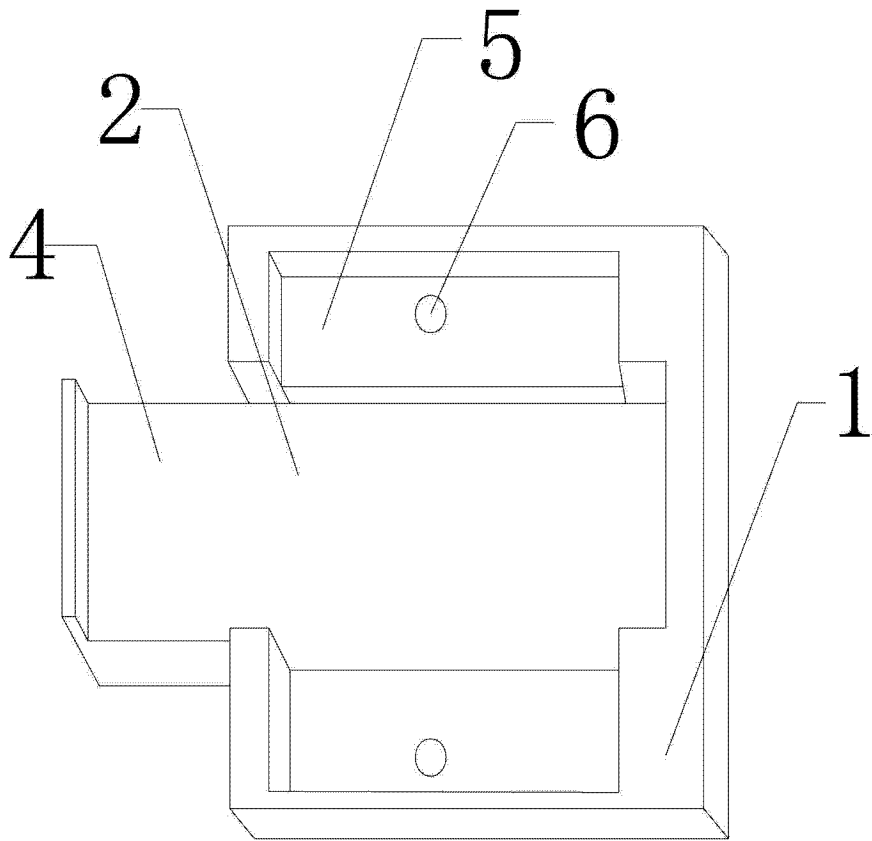


图 1

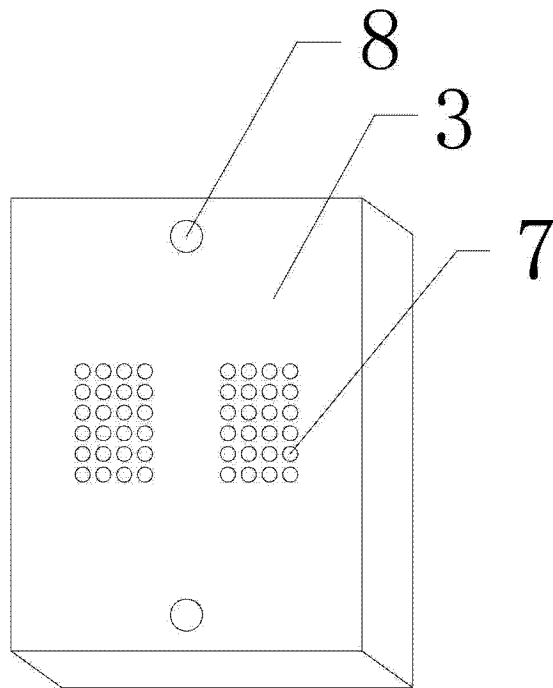


图 2

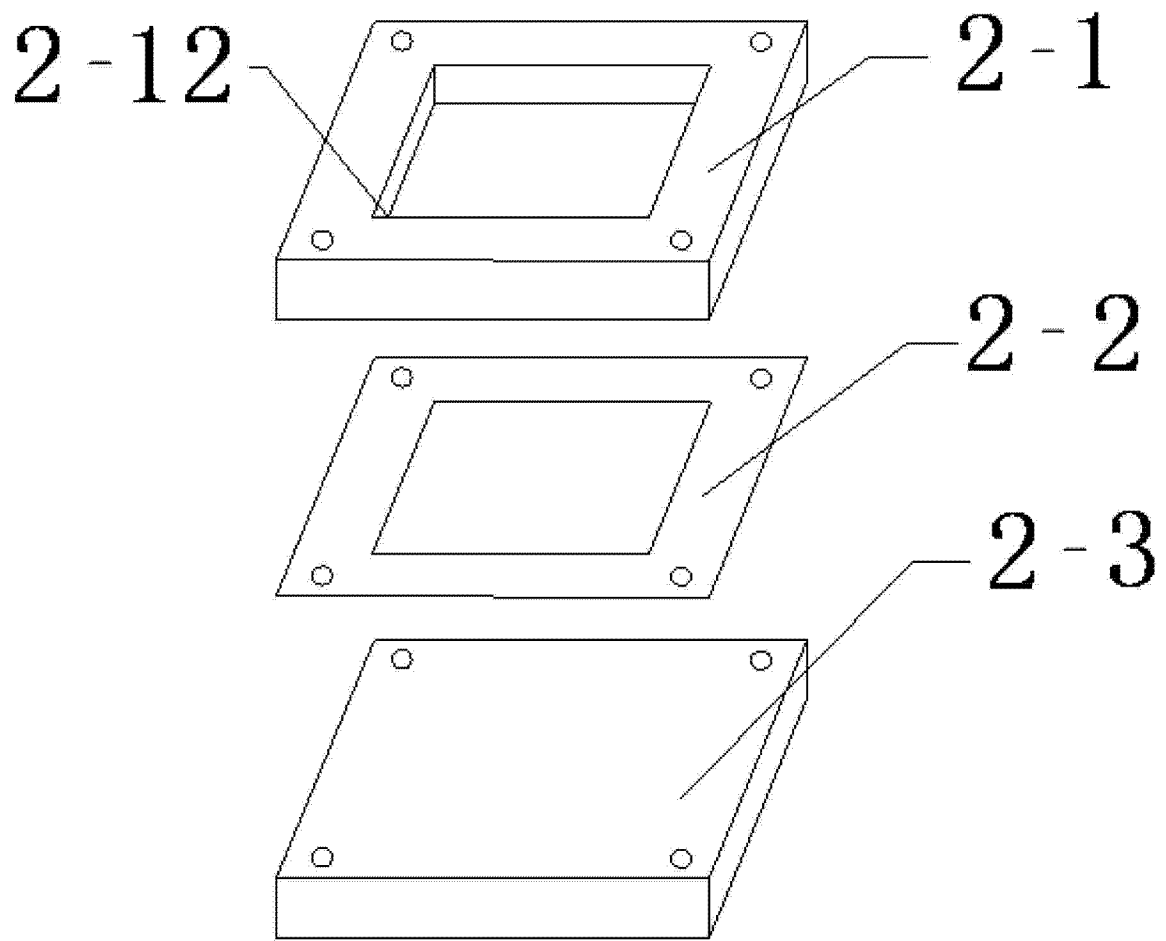


图 3

专利名称(译)	一种高通量免疫组化检测方法及多样品免疫组化检测板		
公开(公告)号	CN103344760B	公开(公告)日	2015-08-26
申请号	CN201310311757.8	申请日	2013-07-23
[标]申请(专利权)人(译)	成都安铂奥金生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	成都安铂奥金生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	成都安铂奥金生物科技有限公司		
[标]发明人	陈柏华 李平 韩星		
发明人	陈柏华 李平 韩星		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
代理人(译)	张娟		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN103344760A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多样品免疫组化检测板，还公开了利用所述检测板进行高通量免疫组化检测的方法，包括如下步骤：(1)待检组织切片的制备；(2)将步骤(1)待检组织切片经脱蜡、水化、抗原修复、封闭处理后，平放入横向凹槽(2)中；(3)将多孔板(3)放入纵向凹槽(5)中，覆盖有柔性防水衬层一面朝下，固定；(4)将多种待测抗体溶液加入不同的通孔(7)中，孵育；(5)取出待检组织切片，显色，封片，观察即可。本发明还公开了一种细胞组织块制备模具。本发明高通量免疫组化检测方法，可以在同一载玻片上同时进行多种抗体检测，应用前景良好。

