



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107621542 A

(43)申请公布日 2018.01.23

(21)申请号 201710701913.X

(22)申请日 2017.08.16

(71)申请人 上海芯超生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试验区李冰路151号5号楼4楼

(72)发明人 郁恒骏 谭娟 张可浩

(74)专利代理机构 上海浦一知识产权代理有限公司 31211

代理人 郑权

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

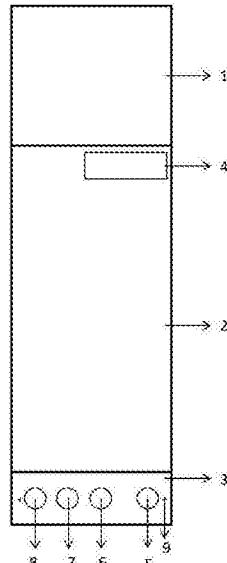
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54)发明名称

具有内参照的免疫组化载玻片及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明公开一种具有内参照的免疫组化载玻片，包括标签标记区、待测样本贴片区和内参照贴片区；其中，所述内参照贴片区固定有含有至少三种阳性表达内参照和一种阴性表达内参照的细胞免疫芯片，所述至少三种阳性表达内参照包括稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色、中等阳性染色以及强阳性染色的细胞株，所述阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株。本发明能够对现有免疫组化技术中存在的客观性的操作误差、组内实验误差及判读的主观性缺陷等进行校正，并能够甄别染色强度的差异，在实验检测及结果报告全过程进行质量控制，保障了免疫组化实验检测的正确性和精准性。本发明还提供该具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法及应用。



1. 一种具有内参照的免疫组化载玻片，其特征在于，包括：标签标记区、待测样本贴片区和内参照贴片区；

其中，所述内参照贴片区固定有含有阳性表达内参照和阴性表达内参照的细胞免疫芯片；

所述细胞免疫芯片含有至少三种阳性表达内参照，所述至少三种阳性表达内参照至少包括稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色、中等阳性染色以及强阳性染色的细胞株；

所述细胞免疫芯片含有至少一种阴性表达内参照，所述阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株。

2. 如权利要求1所述的具有内参照的免疫组化载玻片，其特征在于，所述细胞免疫芯片含有三种阳性表达内参照和一种阴性表达内参照，所述三种阳性表达内参照分别为稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色、中等阳性染色以及强阳性染色的细胞株；所述阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株。

3. 如权利要求1或2所述的具有内参照的免疫组化载玻片，其特征在于，所述弱阳性染色的显色为淡黄色，所述中等阳性染色的显色为棕黄色，所述强阳性染色的显色为棕褐色，所述稳定不表达目标抗体抗原则无显色。

4. 如权利要求1所述的具有内参照的免疫组化载玻片，其特征在于，所述具有内参照的免疫组化载玻片还具有名称标记区，用于标识该具有内参照的免疫组化载玻片所对应的目标抗体的名称。

5. 如权利要求1所述的具有内参照的免疫组化载玻片，其特征在于，所述稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株和稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株均选自国内外细胞库。

6. 一种如权利要求1所述的具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法，其特征在于，包括如下步骤：

第一步，细胞株的筛选：针对目标抗体选择合适的细胞株，所述合适的细胞株为稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株和稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株；

第二步，细胞免疫芯片的制备：将第一步所筛选出的合适的细胞株制备成细胞免疫芯片；

第三步，具有内参照的免疫组化载玻片的制备：将第二步制得的细胞免疫芯片平铺于免疫组化载玻片的内参照贴片区，并固定成品；

其中，所述细胞免疫芯片中含有的稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株作为阳性表达内参照，所述细胞免疫芯片中含有的稳定不表达目标抗体抗原的细胞株作为阴性表达内参照。

7. 如权利要求6所述的制备方法，其特征在于，第一步中所述合适的细胞株为三种稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株和一种稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株，三种稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株分别为稳定表达强度为弱阳性染色、中等阳性染色以及强阳性染色的细胞株；稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株为表达强度为阴性无显色的细胞株。

8. 如权利要求6所述的制备方法，其特征在于，第一步还包括通过常规免疫组化实验进行验证，目标抗体相应抗原表达强度符合要求的细胞株可以确定为内参照。

9. 如权利要求6所述的制备方法,其特征在于,第二步中,利用细胞免疫芯片技术,制备含有所述合适的细胞株的细胞芯片阵列石蜡块,经过常规石蜡切片制备成细胞免疫芯片。

10. 如权利要求1所述的具有内参照的免疫组化载玻片用于免疫组化检测的应用,包括用于临床肿瘤分子病理诊断、鉴别诊断、临床靶向治疗药物的筛选以及预后评估。

具有内参照的免疫组化载玻片及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学领域,具体涉及一种有内参照的免疫组化载玻片及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 免疫组化(Immunohistochemistry, IHC)是利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记于抗体的显色剂显色来确定组织细胞中是否存在目的抗原,对其进行定位、定性及定量研究的实验检测技术,其染色结果是临床病理医师做出正确诊断的重要依据,尤其在肿瘤病理诊断、鉴别诊断、肿瘤靶向治疗药物的筛选以及预后评估等方面,具有重要的意义。同时也在科研工作中提供重要的依据和极大的便捷。

[0003] 由于免疫组化技术自身的特点,现有的免疫组化实验检测及结果报告存在较为严重的缺陷,主要表现在实验的客观性和结果判读的主观性缺陷两个方面。

[0004] 1) 实验的客观性缺陷。长期以来,针对生物样本的免疫组织化学实验操作,尚缺乏切实有效的质量控制。目前,免疫组化实验的质量控制,主要聚焦于:①免疫组化实验操作规范化培训,即选取某经过实验反复验证过的生物组织样本作为“内参照”,由实验技术人员按照标准化操作流程进行实验操作。目的是根据实验结果判断实验者的操作技术是否合格、能否胜任免疫组化实验技术工作。②设置实验组内参照片,即在同一批次的免疫组化实验片中,另外增加两张实验参照片,其中一张为阳性对照片、另外一张为阴性对照片。如此,能起到一定的免疫组化实验操作质量控制的作用。

[0005] 上述免疫组化实验的客观性缺陷在于:①即使经过培训合格,不同的实验技术人员之间,具体的操作客观存在差异。即使是同一个人,在不同的时间重复做同一免疫组化实验,也存在客观的差异。②在客观上,任何两次重复做同一个实验的实验条件,难以做到完全一致。因为,尽管严格遵照同一标准化操作流程(SOP),具体实验操作的时间、温度、甚至是同一份实验试剂经过一段时间的存放等等细微的因素,都有可能导致免疫组化实验结果的差异。③设置免疫组化实验组内阳性和阴性对照,对于免疫组化实验操作质量的控制,意义非常重大。但这样的组内参照的设置,仍然无法消除组内实验差异,更重要的是,这样的定性内参照的设置,对于由实验操作等引起的免疫组化实验染色强度量的差别的甄别,无明确的指导价值。

[0006] 2) 判读的主观性缺陷。①长久以来,免疫组化结果尚由临床病理医师在显微镜下主观阅片判读,不同病理医师对于免疫组化染色强度的判断尺度,现实中存在主观上的不完全的一致性;即使同一位病理医师在相隔较长的时间后就同一张免疫组化染色片进行判读,也可能会存在一定的差异。②如果是由实验系统误差导致的免疫组化染色强度有所增减,临床病理医师在阅片判读时更是无从识别。

[0007] 有鉴于此,本领域亟需要一种能够校正上述客观性的操作误差、组内实验误差及主观性缺陷,并能够甄别染色强度量的差异的免疫组化产品、其制备方法以及免疫组化检测方法。

发明内容

[0008] 本发明所要解决的技术问题之一在于，提供一种能够校正客观性的操作误差、组内实验误差及判读主观性缺陷并能够甄别染色强度的差异的具有内参照的免疫组化载玻片。

[0009] 本发明所要解决的技术问题之二在于，提供一种所述具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法。

[0010] 本发明所要解决的技术问题之三在于，提供一种所述具有内参照的免疫组化载玻片用于免疫组化检测的应用。

[0011] 为解决上述技术问题之一，本发明提供的具有内参照的免疫组化载玻片，包括：

[0012] 标签标记区、待测样本贴片区和内参照贴片区，其中，所述内参照贴片区固定有含有阳性表达内参照和阴性表达内参照的细胞免疫芯片，所述阳性表达内参照为稳定表达目标抗体相应抗原的细胞株，所述阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株。

[0013] 具体的，所述细胞免疫芯片可以含有多种阳性表达内参照。一种优选的方式是，细胞免疫芯片至少含有三种阳性表达内参照，所述至少三种阳性表达内参照至少包括稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色(淡黄色)、中等阳性染色(棕黄色)以及强阳性染色(棕褐色)的细胞株。

[0014] 具体的，所述细胞免疫芯片可以含有至少一种阴性表达内参照。一种优选的方式是，细胞免疫芯片只含有一种阴性表达内参照，该阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株(抗体无显色)。

[0015] 具体的，所述具有内参照的免疫组化载玻片还具有名称标记区，用于标识该具有内参照的免疫组化载玻片所对应的目标抗体的名称。

[0016] 具体的，所述稳定表达目标抗体抗原的细胞株和稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株均选自国内外细胞库标准品。

[0017] 为解决上述技术问题之二，本发明提供一种上述具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法，包括如下步骤：

[0018] 第一步，细胞株的筛选。针对目标抗体选择合适的细胞株，所述合适的细胞株为稳定表达目标抗体抗原的细胞株和稳定不表达目标抗体抗原的细胞株。

[0019] 第二步，细胞免疫芯片的制备。利用细胞免疫芯片技术，将第一步所筛选出的合适的细胞株制备成细胞免疫芯片。

[0020] 第三步，具有内参照的免疫组化载玻片的制备。将第二步制得的细胞免疫芯片平铺于免疫组化载玻片的内参照贴片区，并固定成品。其中，所述细胞免疫芯片中含有的稳定表达目标抗体抗原的细胞株作为阳性表达内参照，所述细胞免疫芯片中含有的稳定不表达目标抗体抗原的细胞株作为阴性表达内参照。

[0021] 优选的，第一步中所述合适的细胞株为三种稳定表达目标抗体抗原的细胞株和一种稳定不表达目标抗体抗原的细胞株，三种稳定表达目标抗体抗原的细胞株分别为稳定表达强度及染色为弱阳性(淡黄色)、中等阳性(棕黄色)以及强阳性(棕褐色)的细胞株；稳定不表达目标抗体抗原的细胞株为表达强度为阴性(抗体无显色)的细胞株。通过常规免疫组

化实验进行验证,目标抗体抗原表达强度符合要求的细胞株可以确定为内参照。

[0022] 具体的,第二步中,利用细胞免疫芯片技术,制备含有所述合适的细胞株的细胞芯片阵列石蜡块,经过常规石蜡切片制备成细胞免疫芯片。

[0023] 为解决上述技术问题之三,本发明还提供上述具有内参照的免疫组化载玻片用于免疫组化检测的应用,可用于临床肿瘤分子病理诊断、鉴别诊断、临床靶向治疗药物的筛选以及预后评估等。采用本发明的具有内参照的免疫组化载玻片用于免疫组化检测时,可以将比较样品染色程度与阳性表达内参照及阴性表达内参照进行观察比对,可以识别因操作误差等原因带来的染色强度差异,避免该差异对阅片判断带来不利影响。

[0024] 本发明提供的具有内参照的免疫组化载玻片,采用创新性的实验内参照设计,能够对现有免疫组化技术中存在的客观性的操作误差、组内实验误差及主观性缺陷等进行校正,并能够甄别染色强度量的差异,在实验检测及结果报告全过程进行质量控制,保障了免疫组化实验检测正确性和精准性。

[0025] 本发明提供的具有内参照的免疫组化载玻片,是基于每一种抗体的自带内参照质量控制的免疫组化实验载玻片,只针对该目标抗体的特定相应抗原进行检测。而且,在实验操作中只有使用了该抗体,载玻片上的四个内参照染色强度才会出现预期的梯度结果,从而能通过内参照的实验结果即可验证抗体的使用是否准确无误。

[0026] 当各种客观因素导致免疫组化实验染色强度出现偏差(颜色偏深或偏浅)时,由于同一张免疫组化载玻片上的待测样本与各内参照的染色程度会同步变化,因此,可根据待测样本与各内参照的染色强度的比对,对实际染色结果进行修正,使实验检测结果报告更能接近真实地反映待测样本特定抗原的实际表达水平,从而更好地指导临床实践等工作。

[0027] 本发明提供的具有内参照的免疫组化载玻片,可以克服实验人员阅片的主观性差异。通过比对三种阳性表达内参及阴性表达内参的染色强度,不同实验人员对于免疫组化染色强度的判断尺度可以达到相对一致,同一位实验人员在相隔较长的时间后就同一张免疫组化染色片进行判读的尺度也可以达到相对一致,降低主观性差异。

[0028] 本发明提供的具有内参照的免疫组化载玻片,可用于临床肿瘤分子病理诊断、鉴别诊断、临床靶向治疗药物的筛选以及预后评估等。

附图说明

[0029] 图1为本发明的具有内参照的免疫组化载玻片的结构示意图。

[0030] 附图中符号标记说明:

[0031] 1为标签标记区;2为待测样本贴片区;3为内参照贴片区;4为名称标记区;5为细胞免疫芯片中的阴性表达内参照;6为细胞免疫芯片中的弱阳性表达内参照;7为细胞免疫芯片中的中等阳性表达内参照;8为细胞免疫芯片中的强阳性表达内参照;9为免疫组化粘附片标记符号。

具体实施方式

[0032] 下面将结合附图对本发明的技术方案进行清楚、完整的描述,显然,所描述的实施例是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范

围。

[0033] 如图1所示,为本发明具有内参照的免疫组化载玻片的一种具体实施方式的平面结构示意图。该具有内参照的免疫组化载玻片,主要包括标签标记区1、待测样本贴片区2和内参照贴片区3三个区域,其中,标签标记区1用于固定载玻片的标签纸,便于对载玻片及待测样本进行标记;待测样本贴片区2用于固定待测样本;内参照贴片区3固定有含有阳性表达内参照和阴性表达内参照的细胞免疫芯片,阳性表达内参照包括弱阳性表达内参照6、中等阳性表达内参照7和强阳性表达内参照8,阴性表达内参照5与三种阳性表达内参根据染色强度的连续变化呈阵列式排布。三种阳性表达内参照分别为稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色(淡黄色)、中等阳性染色(棕黄色)以及强阳性染色(棕褐色)的细胞株,阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株(抗体无显色)。此外,该具有内参照的免疫组化载玻片还具有名称标记区4,明确标注有该具有内参照的免疫组化载玻片所对应的目标抗体的名称。

[0034] 该具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法如下:

[0035] 阴性内参照筛选(一株细胞):针对某种目标抗体,选取稳定不表达该抗体相应抗原表的细胞株,并经过免疫组化实验验证证实,作为该目标抗体对应抗原阴性表达的内参照;

[0036] 阳性内参照筛选(三株细胞):针对某种目标抗体,选取稳定表达该抗体相应抗原表的细胞株,表达强度染色分别为弱阳性染色(淡黄色)、中等阳性染色(棕黄色)以及强阳性染色(棕褐色),并经过免疫组化实验验证证实,作为该目标抗体对应抗原阳性表达的内参照;

[0037] 内参照细胞芯片制备:利用细胞芯片技术,制备含上述四种细胞株的细胞芯片阵列石蜡块,常规石蜡切片制备细胞芯片;

[0038] 自带内参照质量控制的免疫组化实验载玻片:将含上述四种细胞株的细胞芯片平铺于预先标记有该目标抗体名称的免疫组化载玻片上,并固定成品。

[0039] 本发明的具有内参照的免疫组化载玻片在实际应用中,正常染色下三种阳性表达内参照应分别呈现淡黄色、棕黄色和棕褐色三种颜色,颜色区分明显。

[0040] 如果出现三种阳性表达内参照的染色情况全部偏浅或偏深,则可提醒实验人员注意到在该步操作中染色强度出现了偏差。实验人员应记录偏差情况,在做出诊断评估时应该根据染色偏差校正结论,或重新试验以得到正常染色的结果。当出现染色偏深或偏浅的时候,本发明的载玻片可以根据待测样品染色与三种阳性表达内参照染色强度的比对,对染色结果进行校正,克服染色差异而得出与实际更相符的定量结果。

[0041] 而现有技术中的免疫组化载玻片及检测方法,在实验过程中难以及时发现这种染色差异,一旦遇到因操作误差、组内实验误差及主观性缺陷等各种原因导致的染色差异的情况,实验最后得到的诊断结果准确性必然大大降低。这种不准确的诊断结果无法追溯其原因。

[0042] 下面提供部分具体实施例以对本发明的技术方案和技术效果做进一步的说明。未作特殊说明的,实施例中所使用的抗体、细胞株等材料或试剂均为商品化试剂。实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Clod Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件,或按照制造厂

商所建议的条件。

[0043] 实施例1

[0044] 一种针对S100A3抗体设计的具有内参照的免疫组化载玻片,其内参照贴片区所固定的细胞免疫芯片含有的阳性表达内参照分别为A-431、U-20S、U-251MG细胞,阴性表达内参照为NB-4细胞。以表达S100A3抗原的某组织样本作为待测样本,经三次标准操作得出该样本的阳性表达染色程度为中等阳性(棕黄色)。

[0045] 选择50名实验人员(均为具有2年以上本领域实验操作经验的技术人员)进行盲实验,分别使用普通载玻片进行一次免疫组化检测和使用本发明制备的针对S100A3抗体设计具有内参照的免疫组化载玻片进行一次免疫组化检测,统计染色情况和诊断结果如下:

分组	染色正常(例)	出现差异(例)	诊断结果
[0046]	44	6	中等阳性 44 例 (88%)
本发明	45	5	中等阳性 50 例 (100%)

[0047] 从实验结果可知,普通载玻片与本发明的载玻片在实验过程中均会因为操作误差及主观因素等原因导致染色差异出现。普通载玻片中染色出现差异有6例(染色程度与标准操作的染色明显不符导致实验人员做出不准确的诊断结果),其诊断结果为中等阳性44例,结果准确率88%。而本发明的载玻片中虽然染色出现差异有5例(阳性表达内参照染色程度明显偏浅或偏深),但实验人员根据待测样本染色与阳性表达内参照染色程度比对,进行差异校正后得出诊断结果的准确率达100%。这说明本发明能够根据实际染色结果进行修正,使实验检测结果报告更能接近真实地反映待测样本特定抗原的实际表达水平,从而更好地指导临床实践等工作。

[0048] 实施例2

[0049] 已知抗原S100A3仅表达在细胞质中,针对该抗原目前已有厂商生产出商品化抗体(Sigma-Idrich, HPA056140)。

[0050] 针对该抗体HPA056140,我们选用合适的细胞株A-431、U-20S、U-251MG和NB-4,设计了本文所述载玻片。其内参照贴片区所固定的细胞免疫芯片分别为细胞株A-431、U-20S和U-251MG,表达抗原S100A3的强度分别为强阳性、中阳性和弱阳性。阴性表达内参照为细胞株NB-4,不表达抗原S100A3。以未知是否表达抗原S100A3的180种组织样本制成组织芯片,作为待测样本。所制成的含组织芯片和阴�性内参照的切片命名为载玻片S。

[0051] 选择三名实验人员,选用合适浓度的抗体HPA056140,在载玻片S上分别行三次标准免疫组化操作,得出该载玻片S上内参照区和待测样本区的显色结果。内参照区显色强度与预期一致(细胞A-431、U-20S和U-251MG的显色定位为细胞质,显色强度分别为强阳性、中阳性和弱阳性;细胞株NB-4无显色),待测样本区180种组织样本显色定位为细胞质,出现包含阴性、弱阳性、中阳性和强阳性在内的四种显色强度,且九次实验结果基本一致。

[0052] 拟开发针对抗原S100A3的一种新抗体,为验证该新抗体的准确性和有效性,选择三名实验人员,在载玻片S上选用合适浓度的新抗体001分别行三次标准免疫组化操作,得

出该切片S上内参照区和待测样本区的显色结果。若内参照区显色强度与预期一致(细胞株A-431、U-20S和U-251MG的显色定位为细胞质,显色强度分别为强阳性、中阳性和弱阳性;细胞株NB-4无显色),且待测样本区180种组织样本显色定位为细胞质,出现包含阴性、弱阳性、中阳性和强阳性在内的四种显色强度,九次实验结果与用抗体HPA056140所做实验结果基本一致,则可基本确定该开发中的新抗体001可行,并大致得出其效价。

[0053] 从实验结果可知,本发明的载玻片可用于新抗体开发过程中的验证及效价确定,这是普通载玻片所不可比拟的。这说明本发明在商业操作中具有较大的潜在的应用价值。

[0054] 综上所述,上述各实施例及附图仅为本发明的较佳实施例而已,并不用以限定本发明的保护范围,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何修改、等同替换、改进等,皆应包含在本发明的保护范围内。

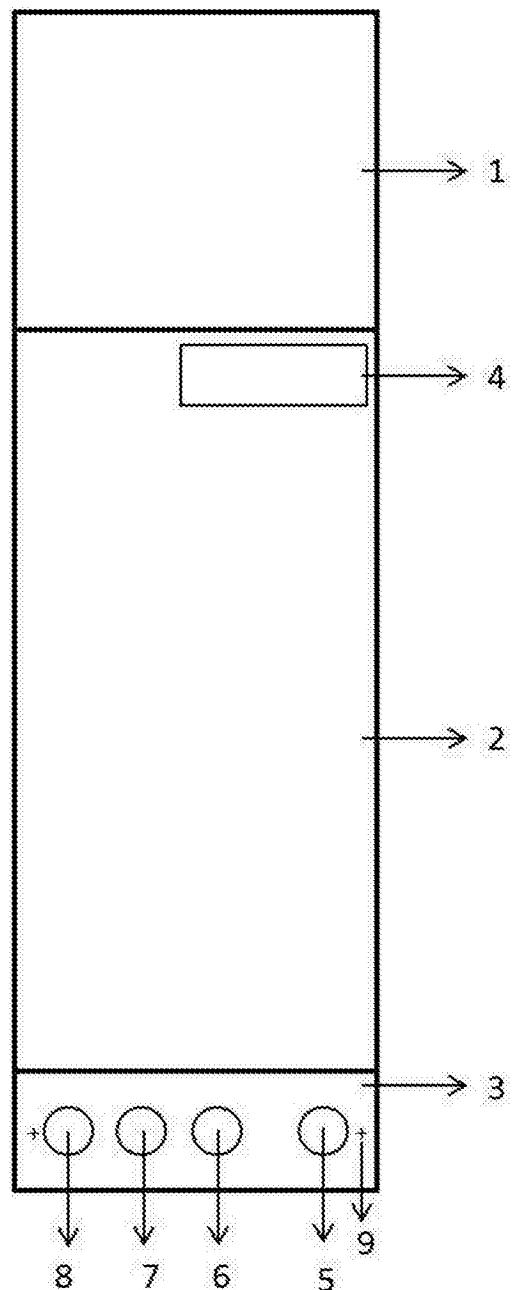


图1

专利名称(译)	具有内参照的免疫组化载玻片及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN107621542A	公开(公告)日	2018-01-23
申请号	CN201710701913.X	申请日	2017-08-16
[标]申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海芯超生物科技有限公司		
[标]发明人	郜恒骏 谭娟 张可浩		
发明人	郜恒骏 谭娟 张可浩		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	郑权		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明公开一种具有内参照的免疫组化载玻片，包括标签标记区、待测样本贴片区和内参照贴片区；其中，所述内参照贴片区固定有含有至少三种阳性表达内参照和一种阴性表达内参照的细胞免疫芯片，所述至少三种阳性表达内参照包括稳定表达目标抗体相应抗原强度为弱阳性染色、中等阳性染色以及强阳性染色的细胞株，所述阴性表达内参照为稳定不表达目标抗体相应抗原的细胞株。本发明能够对现有免疫组化技术中存在的客观性的操作误差、组内实验误差及判读的主观性缺陷等进行校正，并能够甄别染色强度的差异，在实验检测及结果报告全过程进行质量控制，保障了免疫组化实验检测的正确性和精准性。本发明还提供该具有内参照的免疫组化载玻片的制备方法及应用。

