



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109298174 A
(43)申请公布日 2019.02.01

(21)申请号 201811127416.4

(22)申请日 2018.09.26

(71)申请人 姜云瀚

地址 400000 重庆市沙坪坝区新桥医院

(72)发明人 姜云瀚 彭锦

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 葛松生

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

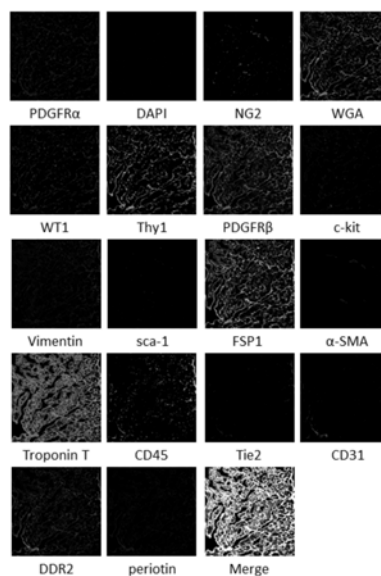
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种多色免疫荧光标记方法和成像方法

(57)摘要

本发明公开了一种多色免疫荧光标记方法和成像方法,涉及免疫荧光技术领域。该多色免疫荧光标记方法包括多个荧光标记步骤以及在每个荧光标记步骤之后进行的用交联固定剂孵育样本的交联固定步骤;交联固定剂含有:丙酮、多聚甲醛和PBS缓冲液。采用该标记方法可针对样本中的多种抗原标记上多种不同的荧光染料,标记后的样本可用于共聚焦显微成像,显示出多种不同的颜色,且各种颜色清晰、明亮、不窜色,该方法为科研工作者同时观察多种抗原的性质、定位以及含量等提供了基础。



1. 一种多色免疫荧光标记方法,其特征在于,其包括:多个荧光标记步骤以及在每个荧光标记步骤之后进行的交联固定步骤;

所述荧光标记步骤包括:用二抗孵育经一抗孵育后的样本,其中,二抗标记有荧光染料;

每个所述荧光标记步骤中使用的荧光染料不同,每个荧光标记步骤中一抗所结合的抗原不同;

所述交联固定步骤包括:用交联固定剂孵育所述样本;

其中,所述交联固定剂含有:丙酮、多聚甲醛和PBS缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,按体积百分比计,所述交联固定剂含有:45%-57%丙酮、0.3%-0.7%多聚甲醛和42.5%-54.5%PBS缓冲液。

3. 根据权利要求2所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,所述交联固定步骤包括:用所述交联固定剂孵育所述样本4-6min,然后用PBS缓冲液清洗所述样本,清洗后的所述样本用于下一个荧光标记步骤或复染核步骤。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,所述荧光标记步骤包括:

一抗孵育:用一抗孵育所述样本,再用PBS缓冲液清洗;

二抗孵育:清洗后,用二抗孵育所述样本;然后用PBS缓冲液清洗,清洗后的所述样本用于交联固定步骤。

5. 根据权利要求4所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,

在一抗孵育步骤中,同时使用多种一抗孵育所述样本;其中,多种一抗来自不同种属的动物,多种一抗结合不同的抗原。

6. 根据权利要求5所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,所述动物为小鼠、大鼠、兔、山羊、人、骆驼、马、猴、鸡或猪。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,荧光染料选自AF647、AF633、AF700、PE-Cy7、AF532、AF568、BODIPY FL、Qdot625、AF514、PerCP-Cy5.5、Cy5.5、TRITC、Cy5、CFL680、Cy3、Dylight405、AF488、Qdot655、Qdot585和AF430。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,所述样本为组织切片、冰冻切片或者细胞。

9. 根据权利要求8任一项所述的多色免疫荧光标记方法,其特征在于,

所述多色免疫荧光标记方法还包括:在第一个荧光标记步骤之前进行的预处理步骤;

所述预处理步骤包括:用多聚甲醛固定所述样本,用PBS缓冲液清洗所述样本,再用封闭破膜液孵育所述样本;

其中,所述封闭破膜液为含有Triton-100的山羊血清,用封闭破膜液孵育所述样本的条件为:温度35-38℃,时间1.2-2h。

10. 一种多色免疫荧光成像方法,其特征在于,其包括:将经权利要求1-9任一项所述的多色免疫荧光标记方法处理后的样本用共聚焦显微镜成像。

一种多色免疫荧光标记方法和成像方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫荧光技术领域,具体而言,涉及一种多色免疫荧光标记方法和成像方法。

背景技术

[0002] 免疫荧光染色技术是根据抗原抗体反应的原理,先将已知的抗原或抗体标记上荧光素制成荧光标记物,再用这种荧光抗体(或抗原)作为分子探针检查细胞或组织内的相应抗原(或抗体)。在细胞或组织中形成的抗原抗体复合物上含有荧光素,利用荧光显微镜观察标本,荧光素受激发光的照射而发出明亮的荧光(黄绿色或桔红色),可以看见荧光所在的细胞或组织,从而确定抗原或抗体的性质、定位,以及利用定量技术测定含量。

[0003] 但是,现有的免疫荧光技术的染色种类有限,且针对一份样本染色种类较多时,容易出现窜色的情况。

[0004] 鉴于此,特提出本发明。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于提供一种多色免疫荧光标记方法,采用该标记方法可对样本中的多种抗原标记上多种不同的荧光染料,标记后的样本可用于共聚焦显微成像,显示出多种不同的颜色,最多可达20种颜色,且各种颜色清晰、明亮、不窜色。

[0006] 本发明的另一目的在于提供一种多色免疫荧光成像方法,采用该成像方法可以针对标记多种不同的荧光染料的样本进行成像,显示出多种不同的颜色,最多可达20种颜色,且各种颜色清晰、明亮、不窜色。

[0007] 本发明是这样实现的:

[0008] 一方面,本发明提供了一种多色免疫荧光标记方法,其包括:多个荧光标记步骤以及在每个荧光标记步骤之后进行的交联固定步骤;

[0009] 荧光标记步骤包括:用二抗孵育经一抗孵育后的样本,其中,二抗标记有荧光染料;

[0010] 每个荧光标记步骤中使用的荧光染料不同,每个荧光标记步骤中一抗所结合的抗原不同;

[0011] 交联固定步骤包括:用交联固定剂孵育样本;

[0012] 其中,交联固定剂含有:丙酮、多聚甲醛和PBS缓冲液。

[0013] 本发明提供的多色免疫荧光标记方法,在每次荧光标记后,使用含丙酮、多聚甲醛和PBS缓冲液交联固定剂进行固定,通过不断地重复荧光标记步骤和交联固定步骤即可将多种荧光染料稳定地标记到样本中的不同抗原上,通过共聚焦显微成像可将这些标记的荧光染料逐个显色,显色的数量与标记的荧光染料类别一致,且显示出的各种颜色清晰、明亮、不窜色。该方法为科研工作者同时观察多种抗原的性质、定位以及含量等提供了基础。

[0014] 荧光标记步骤的数量可以根据实际需要研究的观察研究的抗原类别等情况确定。

例如,需要研究10种抗原,则荧光标记步骤的数量可以是10个,每一个荧光标记步骤使用不同的荧光染料标记不同的抗原,每次荧光标记步骤完成后都需进行一次交联固定步骤,交联固定后再进行下一个抗原的荧光标记步骤。

[0015] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,按体积百分比计,交联固定剂含有:45%-57%丙酮、0.3%-0.7%多聚甲醛和42.5%-54.5%PBS缓冲液。

[0016] 优选的,在本发明的一些实施方案中,按体积百分比计,交联固定剂含有:50%丙酮、0.5%多聚甲醛和49.5%PBS缓冲液。

[0017] 例如100ml交联固定剂的制备方法是:取50ml丙酮、0.5ml多聚甲醛和49.5ml PBS缓冲液,混合,得到交联固定剂。

[0018] 该PBS缓冲液的1L配方:磷酸二氢钾(KH_2PO_4) 0.24g,磷酸氢二钠(Na_2HPO_4) 1.44g,氯化钠(NaCl) 8.0g,氯化钾(KCl) 0.2g,加水至1000mL,pH7.4左右。

[0019] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,交联固定步骤包括:用交联固定剂孵育样本4-6min,然后用PBS缓冲液清洗样本,清洗后的样本用于下一个荧光标记步骤或复染核步骤。

[0020] 当最后一个荧光标记步骤完成后,经交联固定步骤处理后,则进行复染核步骤。

[0021] 该复染核步骤包括:用DAPI孵育样本,用PBS缓冲液清洗后,加抗荧光淬灭封片液进行封片。封片后的样本即可用于成像观察。

[0022] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,荧光标记步骤包括:

[0023] 一抗孵育:用一抗孵育样本,再用PBS缓冲液清洗;

[0024] 二抗孵育:清洗后,用二抗孵育样本;然后用PBS缓冲液清洗,清洗后的样本用于交联固定步骤。

[0025] 需要说明的是:

[0026] 一抗即为结合目标抗原的第一抗体,不同的荧光标记步骤中针对的目标抗原不同,因此,不同的荧光标记步骤使用的一抗也是不相同的;

[0027] 二抗即为抗一抗的抗体,二抗标记有荧光染料,通过与一抗的结合,进而将荧光染料标记的目标抗原上。当然,为了显示目标抗原的不同。在多个荧光标记步骤中,任意两个荧光标记步骤中使用的荧光染料的类别是不同的,二者之间尽量具有不同的发射光谱,以便于观察颜色以区分标记的不同抗原。

[0028] 当然,需要说明的是,在一些实施方案中,荧光标记步骤中可直接用标记有荧光染料的一抗孵育样本,省略使用二抗再次孵育的步骤。

[0029] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,在一抗孵育步骤中,同时使用多种一抗孵育样本;其中,多种一抗来自不同种属的动物,多种一抗结合不同的抗原。

[0030] 在需要标记多种抗原时,为了节约时间,可以在一次荧光标记步骤中,同时使用多种一抗孵育样本。使多种一抗分别结合到相应的目标抗原上。相较于一次荧光标记步骤中仅标记一种目标抗原的方法,同时使用多种一抗孵育样本,可以同时标记多种目标抗原,尽可能地缩短标记时间,减少工作量。需要说明的是,这些多种一抗需来自不同种属的动物,以避免交叉反应。如果是来自同一种属的多种一抗,容易出现交叉反应。

[0031] 相应的,使用多种一抗孵育样本后,在二抗孵育步骤中,也需要使用相同类别的二抗来再次孵育,用分别抗多种一抗的多种二抗来孵育样本,多种二抗一一对应地与多种一

抗分别结合,进而将不同的荧光染料标记到不同的目标抗原上。当然,多种二抗所标记的荧光染料相互间也是不同的。

[0032] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,上述一抗来源的动物包括但不限于小鼠、大鼠、兔、山羊、人、骆驼、马、猴、鸡或猪等这些动物。只要是产生抗体的动物均可以作为本发明使用的一抗的来源。

[0033] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,荧光染料选自AF647、AF633、AF700、PE-Cy7、AF532、AF568、BODIPY FL、Qdot625、AF514、PerCP-Cy5.5、Cy5.5、TRITC、Cy5、CFL680、Cy3、Dylight405、AF488、Qdot655、Qdot585和AF430。

[0034] 当然,需要说明的是,使用多种荧光染料时,多种荧光染料的类别可以实际情况进行组合。当然,本发明所使用的荧光染料并不限于上述的荧光染料。

[0035] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,样本为组织切片、冰冻切片或者细胞。

[0036] 进一步地,在本发明的一些实施方案中,多色免疫荧光标记方法还包括:在第一个荧光标记步骤之前进行的预处理步骤;

[0037] 预处理步骤包括:用多聚甲醛固定样本,用PBS缓冲液清洗样本,再用封闭破膜液孵育样本;

[0038] 其中,封闭破膜液为含有Triton-100的山羊血清,用封闭破膜液孵育样本的条件为:温度35-38℃,时间1.2-2h。

[0039] 另一方面,本发明还提供了一种多色免疫荧光成像方法,其包括:将经如上的多色免疫荧光标记方法处理后的样本用共聚焦显微镜成像。

[0040] 该成像方法用共聚焦显微镜对经如上的多色免疫荧光标记方法处理后的样本进行成像,可以将多种不同荧光染料的颜色进行区分,显示出多种不同的颜色,最多可达20种颜色,且各种颜色清晰、明亮、不窜色。

附图说明

[0041] 为了更清楚地说明本发明实施例的技术方案,下面将对实施例中所需要使用的附图作简单地介绍,应当理解,以下附图仅示出了本发明的某些实施例,因此不应被看作是对范围的限定,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他相关的附图。

[0042] 图1为本发明实施例对C57/B6小鼠心脏的冰冻切片的共聚焦显微成像结果。

具体实施方式

[0043] 为使本发明实施例的目的、技术方案和优点更加清楚,下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述。实施例中未注明具体条件者,按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市售购买获得的常规产品。

[0044] 以下结合实施例对本发明的特征和性能作进一步的详细描述。

[0045] 实施例1

[0046] 本实施例以C57/B6小鼠心脏的冰冻切片为样本,对本实施例的多色免疫荧光标记方法进行说明,具体如下:

[0047] 1. 预处理

[0048] 1.1 C57/B6小鼠心脏的冰冻切片用4%多聚甲醛固定15min,再用PBS缓冲液清洗三次,每次5min。

[0049] 1.2清洗后,冰冻切片用封闭破膜液于37℃孵育1.5h。

[0050] 其中,封闭破膜液为山羊血清,其含0.3%的Triton-100。

[0051] 2. 第1次荧光标记

[0052] 2.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合Troponin T蛋白的Troponin T抗体(购自Abcam,规格200μg,货号ab8295)(按1:10比例稀释)和兔来源的可结合α-SMA蛋白的α-SMA抗体(购自Abcam,规格10ul,货号ab32575)(按1:20比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0053] 2.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片两次,每次5min。

[0054] 2.3二抗孵育:用带有荧光染料AF647标记的抗Troponin T抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自碧云天,规格0.1ml,货号A0473)(稀释比例1:10)和带有荧光染料AF633标记的抗α-SMA抗体的二抗山羊抗兔IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格500ul,货号A-21070)(稀释比例1:10)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0055] 2.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片两次,每次5min。

[0056] 3. 交联固定

[0057] 将经2.4步骤处理后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0058] 该交联固定剂含有:50%丙酮、0.5%多聚甲醛和49.5%PBS缓冲液。

[0059] 本文前述以及后文所涉及的PBS缓冲液1L的配制方法如下:

[0060] 取磷酸二氢钾(KH₂PO₄)0.24g,磷酸氢二钠(Na₂HPO₄)1.44g,氯化钠(NaCl)8.0g,氯化钾(KCl)0.2g,加水至1000mL,充分溶解即得,pH 7.4左右。

[0061] 本实施例中所用的交联固定剂100ml的配制方法如下:取50ml丙酮、0.5ml多聚甲醛和49.5ml PBS缓冲液,混合,即得本实施例所用交联固定剂。

[0062] 3. 第2次荧光标记

[0063] 3.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合DDR2蛋白的DDR2抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-81707)(按1:20比例稀释)和兔来源的可结合WT1蛋白的WT1抗体(购自Abcam,规格10ul,货号ab89901)(按1:20比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0064] 3.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片两次,每次5min。

[0065] 3.3二抗孵育:用带有荧光染料AF700标记的抗DDR2抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格500ul,货号A-21036)(稀释比例1:20)和带有荧光染料PE-Cy7标记的抗WT1抗体的二抗山羊抗兔IgG(购自Santa,规格10ul,货号sc-516721)(稀释比例1:20)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0066] 3.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片两次,每次5min。

[0067] 4. 交联固定

[0068] 将经3.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0069] 5. 第3次荧光标记

[0070] 5.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合Vimentin蛋白的Vimentin抗体(购自Abcam,规格100ul,货号ab8978)(按1:50比例稀释)和兔来源的可结合FSP1蛋白的FSP1抗体(购自Abcam,规格100ul,货号ab197896)(按1:50比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0071] 5.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0072] 5.3二抗孵育:用带有荧光染料AF532标记的抗Vimentin抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格500ul,货号A-11002)(稀释比例1:50)和带有荧光染料AF568标记的抗FSP1抗体的二抗山羊抗兔IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格500ul,货号A-11011)(稀释比例1:50)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0073] 5.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0074] 6. 交联固定

[0075] 将经5.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0076] 7. 第4次荧光标记

[0077] 7.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合Thy1蛋白的Thy1抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-53116)(按1:100比例稀释)和兔来源的可结合NG2蛋白的NG2抗体(购自Abcam,规格100ul,货号ab129051)(按1:100比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0078] 7.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0079] 7.3二抗孵育:用带有荧光染料BODIPY FL标记的抗Thy1抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格1mg货号B-2752)(稀释比例1:100)和带有荧光染料Qdot625标记的抗NG2抗体的二抗F(ab')₂山羊抗兔IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格100ul,货号A-10194)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0080] 7.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0081] 8. 交联固定

[0082] 将经7.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0083] 9. 第5次荧光标记

[0084] 9.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合PDGFR-β蛋白的PDGFR-β抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-374573)(按1:100比例稀释)和兔来源的可结合Tie2蛋白的Tie2抗体(购自Abcam,规格100ul,货号ab221961)(按1:100比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0085] 9.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。

[0086] 9.3二抗孵育:用带有荧光染料AF514标记的抗PDGFR-β抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自Invitrogen,规格500ul,货号A-31555)(稀释比例1:100)和带有荧光染料PerCP-Cy5.5标记的抗Tie2抗体的二抗山羊抗兔IgG(购自Santa,规格10ul,货号sc-45101)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0087] 9.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。

[0088] 10. 交联固定

[0089] 将经9.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲

液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0090] 11. 第6次荧光标记

[0091] 11.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合periostin蛋白的periostin抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-398631)(按1:100比例稀释)和大鼠来源的可结合sca-1蛋白的sca-1抗体(购自Ebioscience,规格100ul,货号14-5981-81)(按1:100比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0092] 11.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片2次,每次5min。

[0093] 11.3二抗孵育:用带有荧光染料Cy5.5标记的抗periostin抗体的二抗羊抗小鼠IgG(购自博奥森,规格100ul,货号bs-0296G-Cy5.5)(稀释比例1:100)和带有荧光染料TRITC标记的抗sca-1抗体的二抗山羊抗大鼠IgG(购自中杉金桥,规格100ul,货号ZF-0318)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0094] 11.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片2次,每次5min。

[0095] 12. 交联固定

[0096] 将经11.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0097] 13. 第7次荧光标记

[0098] 13.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合CD45蛋白的CD45抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-1178)(按1:100比例稀释)和兔来源的可结合CD31蛋白的CD31抗体(购自Abcam,规格100ul,货号ab24590)(按1:100比例稀释)以及冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0099] 13.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片3次,每次5min。

[0100] 13.3二抗孵育:用带有荧光染料Cy5标记的抗CD45抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(购自博奥森,规格100ul,货号bs-0296G-Cy5)(稀释比例1:100)和带有荧光染料CFL680标记的抗CD31抗体的二抗山羊抗兔IgG(购自Santa,规格10ul,货号sc-516252)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0101] 13.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片3次,每次5min。

[0102] 14. 交联固定

[0103] 将经13.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

[0104] 15. 第8次荧光标记

[0105] 15.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合c-kit蛋白的c-kit抗体(购自Santa,规格10ul,货号sc-365504)(按1:50比例稀释)和冰冻切片,于4℃一起孵育过夜(>10h)。

[0106] 15.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。

[0107] 15.3二抗孵育:用带有荧光染料Cy3标记的抗c-kit抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自碧云天,规格100ul,货号A0521)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37℃一起孵育1h。

[0108] 15.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。

[0109] 16. 交联固定

[0110] 将经15.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。

- [0111] 17. 第9次荧光标记
- [0112] 17.1一抗孵育:用小鼠来源的可结合PDGFR α 蛋白的PDGFR α 抗体(购自Santa,规格10u1,货号sc-398206)(按1:50比例稀释)和冰冻切片,于4 $^{\circ}$ C一起孵育过夜(>10h)。
- [0113] 17.2一抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。
- [0114] 17.3二抗孵育:用带有荧光染料Dy1ight405标记的抗PDGFR α 抗体的二抗山羊抗小鼠IgG(H+L)(购自碧云天,规格100u1,货号A0609)(稀释比例1:100)和用带有荧光染料AF488标记的可结合WGA蛋白的WGA抗体(一抗,购自Sigma,规格2mg,货号L4895-2MG)(稀释比例1:100)以及冰冻切片,于37 $^{\circ}$ C一起孵育1h。
- [0115] 17.4二抗孵育结束后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片4次,每次5min。
- [0116] 18. 交联固定
- [0117] 将经17.4步骤后的冰冻切片置于交联固定试剂中,于室温孵育5min,然后PBS缓冲液清洗冰冻切片三次,每次5min。
- [0118] 19. 复染核
- [0119] 19.1将经步骤18处理后的冰冻切片用DAPI(购自碧云天,规格50ml,货号C1006)于37 $^{\circ}$ C条件下孵育10min。
- [0120] 19.2孵育后,用PBS缓冲液清洗冰冻切片5次,每次5min。
- [0121] 19.3清洗后,加入抗荧光淬灭封片液(购自博士德,规格10ml,货号AR1109)进行封片,备用。
- [0122] 在上述相关步骤中,一抗稀释时,用PBST缓冲液或者一抗稀释液稀释(购自碧云天,规格100ml,货号P0103);二抗稀释时,用PBST或者二抗稀释液稀释(购自碧云天,规格100ml,货号P0108);其中,1L的PBST为在1L的PBS缓冲液中加入3ml的Triton-X 100配成。
- [0123] 实施例2
- [0124] 本实施例提供了一种多色免疫荧光成像方法,其以实施例1制得的样本作为观察对象,用共聚焦显微镜(Leica SP5 confocal microscopy)进行成像,具体操作方法如下:
- [0125] 共聚焦的程序:
- [0126] 用405激光,照Dy1ight405的光(对415-445nm范围拍照);
- [0127] 用405激光,进行光谱扫描(扫描415-481nm的波长范围,以3nm为一个扫描单位,每增加1nm进行一次扫描(光谱扫描的方式后均相同))(拆分Dy1ight405和DAPI)(舍弃Dy1ight405,保存DAPI的图);
- [0128] 用405激光,照Qdot625的光(对600-660nm范围拍照);
- [0129] 用488激光,进行光谱扫描(扫描500-548nm)(拆分AF488,PE-Cy7和BODIPY FL);
- [0130] 用514激光,进行光谱扫描(扫描524-599nm)(拆分AF514,AF532,Cy3,TRITC);
- [0131] 用543激光,照AF568的光(对569-631nm范围拍照);
- [0132] 用633激光,进行光谱扫描(扫描643-685nm)(拆分AF633,AF647,Cy5)(舍弃Cy5,保存AF633和AF647的图);
- [0133] 用633激光,照Cy5的光(对675-685nm范围拍照);
- [0134] 用633激光,进行光谱扫描(扫描685-739nm)(拆分CFL680,Cy5.5,AF700)(舍弃Cy5.5,保存CFL680和AF700的图);
- [0135] 用633激光,照Cy5.5的光(对703-710nm范围拍照)。

[0136] 采用普通拍照和光谱扫描的方式,能避免直接光谱扫描进行光谱拆分时出现错误的情况,因为部分荧光素的光谱离理论的光谱图谱有差异、拆分计算时出现的一些问题。其他的荧光素组合进行拍照,需结合实际的光谱情况,制定相应的共聚焦拍照程序。

[0137] 结果如图1所示,从图1可看出:

[0138] (第一张图 (PDGFR α) RGB (83,0,255),第二张图 (DAPI) RGB (0,0,255),第三张图 (NG2) RGB (0,255,255),第四张图 (WGA) RGB (0,255,0),第五张图 (WT1) RGB (255 255 0),第六张图 (Thy1) RGB (168,255,0),第七张图 (PDGFR β) RGB (225,119,49),第八张图 (c-kit) RGB (255,78,0),第九张图 (Vimentin) RGB (255,0,0),第十张图 (sca-1) RGB (255,0,255),第十一张图 (FSP1) RGB (0,0,0),第十二张图 (α -SMA) RGB (42,86,162),第十三张图 (Troponin T) RGB (120,185,85),第十四张图 (CD45) RGB (203,228,75),第十五张图 (Tie2) RGB (205,62,51),第十六张图 (CD31) RGB (111,255,134),第十七张图 (DDR2) RGB (242,166,57),第十八张图 (periotin) RGB (86,45,0),第十九张图 (Merge) 为前十八张图的合成的图)。图片下方文字为标记的抗原名称。

[0139] 由图1可以看出,经过多种不同的荧光染料标记的样本,可显示出多种不同的颜色,每种抗原蛋白均标记上不同的染料,显示出不同的颜色,本实施例多达18种,18中抗原蛋白被不同的染料标记,且各种颜色清晰、明亮、不窜色。在其他的实施例中可达20种,甚至更多,具体多少种可根据需求进行标记即可。

[0140] 综上,本发明实施例提供的多色免疫荧光标记方法的整个操作过程按一抗、二抗、交联固定剂的顺序多次分批次操作流程就是能够解决不同种属来源的一抗和二抗的交叉反应的问题。且在不同的荧光标记步骤操作时,按一定的次数和洗涤剂种类来洗涤抗体,减少洗涤对抗体结合的影响。并且按照拍照和光谱扫描的相结合的方式,能解决一些纯光谱拆分拆分不理想的情况。

[0141] 总之,采用该标记方法可针对样本中的多种抗原标记上多种不同的荧光染料,标记后的样本可用于共聚焦显微成像,显示出多种不同的颜色,最多可达20种颜色,且各种颜色清晰、明亮、不窜色。

[0142] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

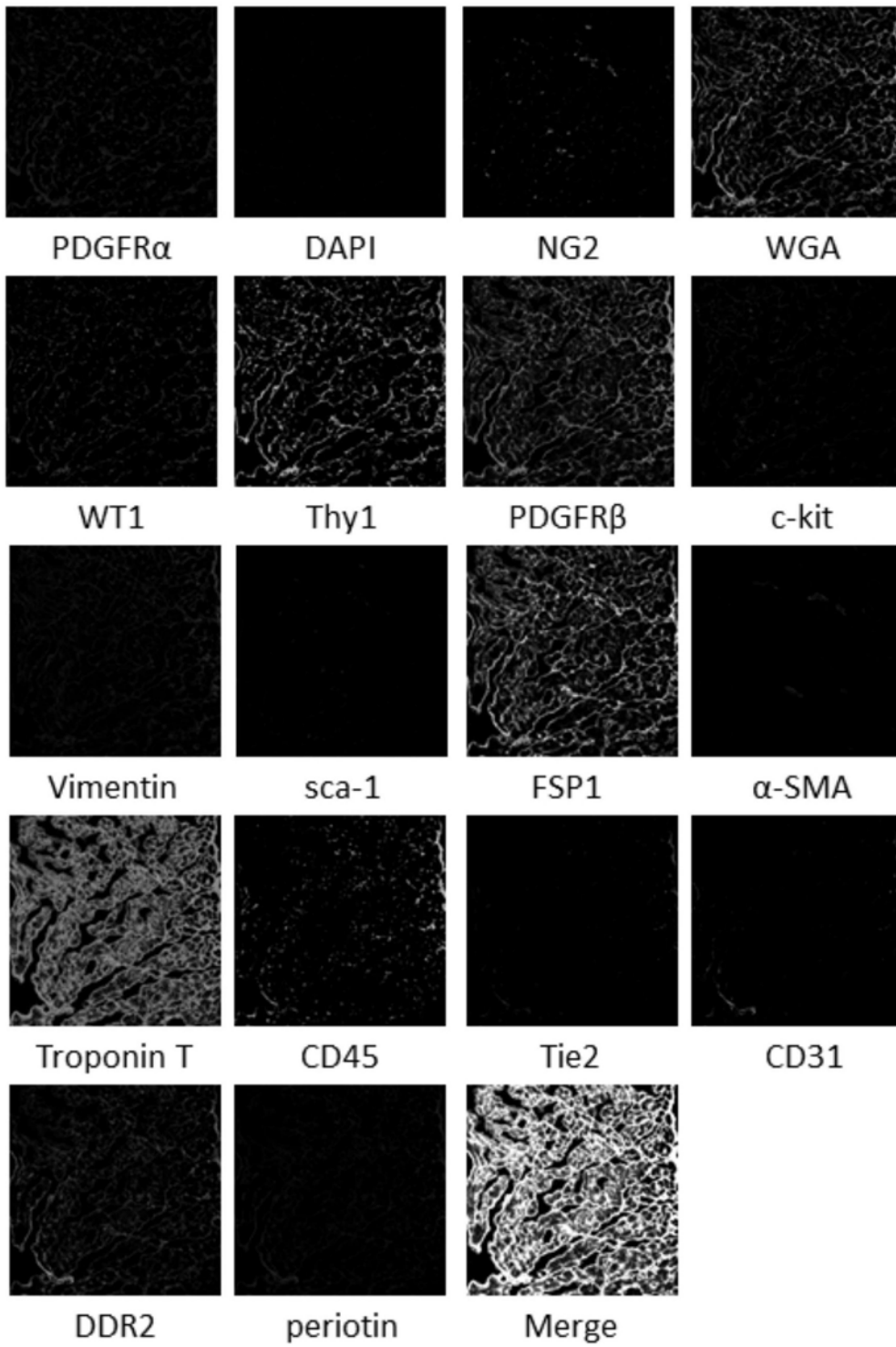


图1

专利名称(译)	一种多色免疫荧光标记方法和成像方法		
公开(公告)号	CN109298174A	公开(公告)日	2019-02-01
申请号	CN201811127416.4	申请日	2018-09-26
[标]发明人	姜云瀚 彭锦		
发明人	姜云瀚 彭锦		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/58		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/582		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种多色免疫荧光标记方法和成像方法，涉及免疫荧光技术领域。该多色免疫荧光标记方法包括多个荧光标记步骤以及在每个荧光标记步骤之后进行的用交联固定剂孵育样本的交联固定步骤；交联固定剂含有：丙酮、多聚甲醛和PBS缓冲液。采用该标记方法可针对样本中的多种抗原标记上多种不同的荧光染料，标记后的样本可用于共聚焦显微成像，显示出多种不同的颜色，且各种颜色清晰、明亮、不窜色，该方法为科研工作者同时观察多种抗原的性质、定位以及含量等提供了基础。

