



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103743904 A

(43) 申请公布日 2014. 04. 23

(21) 申请号 201410026635. 9

(22) 申请日 2014. 01. 21

(71) 申请人 福州迈新生物技术开发有限公司

地址 350001 福建省福州市高新区海西高新技术
产业园创新区 12 号楼

(72) 发明人 杨清海 郑智勇

(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 33/574 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒

(57) 摘要

本发明属于免疫组织化学技术领域,涉及一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,为了解决 HE 染色片中微浸润性肺腺癌的浸润成分与非浸润成分不易明确区分的问题,制备 CD34 和 β -Tubulin-III 双标免疫组化染色试剂盒,应用于肺腺癌早期浸润灶与非浸润成分的鉴别,可以避免因人为判读差异造成的微浸润性肺腺癌的过度诊断或诊断不足。

1. 一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,其特征在于:检测方法中一抗为两种混合型一抗。
2. 根据权利要求1所述的一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,其特征在于:所述两种混合型一抗为 CD34 抗体和 β -Tubulin-III 抗体的混合液。
3. 根据权利要求1所述的一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,其特征在于:采用的显色剂为 DAB、AP-Red、BCIP/NBT、AEC 中的两种以上混合。
4. 根据权利要求1所述的一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,其特征在于:所述两种混合型一抗在同一切片同一时间同时反应。
5. 根据权利要求1所述的一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,其特征在于:检测方法采用与混合型一抗对应的 HRP 和 AP 酶标的混合二抗。

一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫组织化学技术领域,具体地,本发明涉及一种显示微浸润性肺腺癌的早期浸润灶的双标免疫组化染色试剂盒。

技术背景

[0002] 肺腺癌不同阶段的治疗策略不同,因此其病理分型对临床治疗和预后具有重要意义。2011 年 IASLC/ATS/ERS 肺腺癌分类中主要采用 HE 染色的肺腺癌形态学特点进行分型。然而这些诊断标准在实际应用中常会遇到一些问题,例如,塌陷性贴壁状腺癌与浸润生长的腺泡状腺癌两者之间没有明确界限;贴壁状腺癌局灶簇状生长、简单乳头、乳头状腺癌、微乳头状腺癌,可能是一种连续发展过程,但也可能从簇状生长直接发展为微乳头状腺癌。因此,仅凭 HE 染色来鉴别肺腺癌早期浸润灶具有一定难度。

[0003] 我们通过研究发现,当肺腺癌处于原位腺癌阶段时,肿瘤细胞呈 β -Tubulin-III 阴性表达,其间质成纤维细胞呈 CD34 阳性表达。当肿瘤发生浸润时,肿瘤细胞转为 β -Tubulin-III 阳性表达,其间质成纤维细胞转为 CD34 阴性表达。这两种标志物可清晰地显示肺腺癌早期浸润灶的范围,有利于肺腺癌的病理分型诊断。

[0004] 根据我们的研究结果,我们设计了 CD34 和 β -Tubulin-III 双标免疫组化染色试剂盒,用于在一张切片上显示微浸润肺腺癌浸润成分和非浸润成分,以避免因人为判读差异造成的微浸润性肺腺癌的过度诊断或诊断不足。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于,为避免病理医生对微浸润性肺腺癌的过度诊断或诊断不足,提供一种用于微浸润性肺腺癌早期浸润灶的双标免疫组化染色试剂盒。该试剂盒染色过程简便快捷,可以在同一张切片显示丰富且对比性强的病理图像信息,使微浸润性肺腺癌早期浸润灶的鉴别诊断更为容易且确定。

[0006] 本发明的一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒,检测方法的一抗为多种混合型抗体。

[0007] 所述混合型一抗为 CD34 抗体和抗 β -Tubulin-III 抗体混合液。

[0008] 采用的检测放大系统为多种属的 HRP 和 AP 酶标。

[0009] 采用的显色剂为 DAB、AP-Red、BCIP/NBT、AEC 中的两种以上混合。

[0010] 所述混合型一抗在同一切片同一时间同时反应,切片厚度为 3-5 μ m。

[0011] 所述检测方法采用与混合型一抗对应的 HRP 和 AP 酶标的混合二抗。

[0012] 本发明的双染检测方法,包括以下步骤:

(1) 组织切片放入 67℃ 恒温箱中干烤 2 h。

[0013] (2) 常规二甲苯脱蜡 3 次,每次 6 分钟,100%、100%、95%、85% 梯度乙醇中水化,每次 3 分钟,最后自来水冲洗。

[0014] (3) 在 pH6.0 的柠檬酸抗原修复液中高压修复 1.5-2 分钟,自然冷却至室温,自来

水冲洗, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0015] (4) 在 3wt. % 过氧化氢中室温孵育 10 分钟, 阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0016] (5) 用正常动物血清封闭 10 分钟, 甩去多余血清, 不洗, 滴加混合一抗, 室温孵育 1 小时, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0017] (6) 滴加混合二抗, 室温孵育 15 分钟, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0018] (7) 分步显色, 显微镜镜下监测显色过程, 适时终止反应。

[0019] (8) 苏木素复染, 水性封固剂封固, 等水性封固剂完全干燥后, 用中性树胶加盖玻片封固, 利于显微拍照。

[0020] 本发明的显著优点: 微浸润性肺腺癌早期浸润灶免疫组化双染检测方法, 首次将混合型一抗和多种属检测放大系统应用于微浸润性肺腺癌早期浸润灶的鉴别诊断, 不但保持了混合型抗体中各个抗体与单染时同样的敏感性和特异性外, 还具有染色步骤少, 实验时间短、稳定性高、实验结果直观对比, 所带来的信息量远比传统单染高等优点。

附图说明

[0021] 图 1 为微浸润性肺腺癌, 免疫组化结果显示肺腺癌非浸润成分(贴壁状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阳性表达(黑色), 但癌细胞呈 β -Tubulin-III 阴性; 肺腺癌浸润成分(腺泡状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阴性, 但癌细胞呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(红色) ($\times 100$)。

[0022] 图 2 为微浸润性肺腺癌, 免疫组化结果显示肺腺癌非浸润成分(贴壁状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阳性表达(红色), 但癌细胞呈 β -Tubulin-III 阴性; 肺腺癌浸润成分(腺泡状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阴性, 但癌细胞呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(黑色) ($\times 100$)。

[0023] 图 3 为浸润性肺腺癌, 免疫组化结果显示肺腺癌浸润成分(腺泡状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阴性表达, 但癌细胞呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(黑色) ($\times 40$)。

具体实施方式

[0024] 下面结合具体实施例对本发明进行详细说明, 以下实施例是为了进一步说明本发明, 但不应视为限制本发明。

[0025] 实施例 1:

研究对象为甲醛固定-石蜡包埋的微浸润性肺腺癌组织(南京军区福州总医院病理科)。免疫组织化学实验步骤如下:

(1) 组织切片放入 67°C 恒温箱中干烤 2h。

[0026] (2) 常规二甲苯脱蜡 3 次, 每次 6 分钟, 100%、100%、95%、85% 梯度乙醇中水化, 每次 3 分钟, 最后自来水冲洗。

[0027] (3) 在 pH6.0 的柠檬酸抗原修复液中高压修复 1.5-2 分钟, 自然冷却至室温, 自来水冲洗, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0028] (4) 在 3% 过氧化氢中室温孵育 10 分钟, 阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0029] (5) 用正常动物血清封闭 10 分钟, 甩去多余血清, 不洗, 滴加 CD34 和 β -Tubulin-III 混合一抗, 混合一抗中各抗体滴度分别为 CD34 1:200、 β -Tubulin-III 1:400, 室温孵育 1 小时, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0030] (6) 滴加与一抗对应的 HRP、AP 酶标的混合二抗, 室温孵育 15 分钟, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0031] (7) 滴加 AP-Red 显色液, 室温下孵育 15-30min, 显微镜镜下监测显色过程, 适时终止反应; 滴加 BCIP/NBT 显色液, 室温下孵育 10-30min, 显微镜镜下监测显色过程, 适时终止反应。

[0032] (8) 苏木素复染, 水性封固剂封固, 等水性封固剂完全干燥后, 用中性树胶加盖玻片封固, 利于显微拍照。

[0033] 如图 1 所示, 肺腺癌非浸润成分(贴壁状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阳性表达(黑色), 浸润成分(腺泡状腺癌)呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(红色)($\times 100$)。

[0034] 图 1 结果说明此检测方法能够明显区分出微浸润性肺腺癌早期浸润灶, 通过 β -Tubulin-III 强阳性表达来鉴别此病例为微浸润性肺腺癌。

[0035] 实施例 2:

研究对象为甲醛固定-石蜡包埋的微浸润性肺腺癌组织(南京军区福州总医院病理科)。免疫组织化学实验步骤如下:

(1) 组织切片放入 67°C 恒温箱中干烤 2h。

[0036] (2) 常规二甲苯脱蜡 3 次, 每次 6 分钟, 100%、100%、95%、85% 梯度乙醇中水化, 每次 3 分钟, 最后自来水冲洗。

[0037] (3) 在 pH6.0 的柠檬酸抗原修复液中高压修复 1.5-2 分钟, 自然冷却至室温, 自来水冲洗, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0038] (4) 在 3% 过氧化氢中室温孵育 10 分钟, 阻断内源性过氧化物酶, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0039] (5) 用正常动物血清封闭 10 分钟, 甩去多余血清, 不洗, 滴加 CD34 和 β -Tubulin-III 混合一抗, 混合一抗中各抗体滴度分别为 CD34 1:200、 β -Tubulin-III 1:400, 室温孵育 1 小时, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0040] (6) 滴加与一抗对应的 HRP、AP 酶标的混合二抗, 室温孵育 15 分钟, PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0041] (7) 滴加 AP-Red 显色液, 室温下孵育 15-30min, 显微镜镜下监测显色过程, 适时终止反应; 滴加 BCIP/NBT 显色液, 室温下孵育 10-30min, 显微镜镜下监测显色过程, 适时终止反应。

[0042] (8) 苏木素复染, 水性封固剂封固, 等水性封固剂完全干燥后, 用中性树胶加盖玻片封固, 利于显微拍照。

[0043] 如图 2 所示, 肺腺癌非浸润成分(贴壁状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阳性表达(红色), 浸润成分(腺泡状腺癌)呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(黑色)($\times 100$)。

[0044] 图 2 结果说明此检测方法能够明显区分出微浸润性肺腺癌早期浸润灶, 通过 β -Tubulin-III 强阳性表达来鉴别此病例为微浸润性肺腺癌。

[0045] 实施例 3:

研究对象为甲醛固定-石蜡包埋的微浸润性肺腺癌组织(南京军区福州总医院病理科)。免疫组织化学实验步骤如下:

(1)组织切片放入 67℃ 恒温箱中干烤 2h。

[0046] (2)常规二甲苯脱蜡 3 次,每次 6 分钟,100%、100%、95%、85% 梯度乙醇中水化,每次 3 分钟,最后自来水冲洗。

[0047] (3)在 pH6.0 的柠檬酸抗原修复液中高压修复 1.5-2 分钟,自然冷却至室温,自来水冲洗,PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0048] (4)在 3% 过氧化氢中室温孵育 10 分钟,阻断内源性过氧化物酶,PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0049] (5)用正常动物血清封闭 10 分钟,甩去多余血清,不洗,滴加 CD34 和 β -Tubulin-III 混合一抗,混合一抗中各抗体滴度分别为 CD34 1:200、 β -Tubulin-III 1:400,室温孵育 1 小时,PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0050] (6)滴加与一抗对应的 HRP、AP 酶标的混合二抗,室温孵育 15 分钟,PBS 冲洗 3×3 分钟。

[0051] (7)滴加 AP-Red 显色液,室温下孵育 15-30min,显微镜镜下监测显色过程,适时终止反应;滴加 BCIP/NBT 显色液,室温下孵育 10-30min,显微镜镜下监测显色过程,适时终止反应。

[0052] (8)苏木素复染,水性封固剂封固,等水性封固剂完全干燥后,用中性树胶加盖玻片封固,利于显微拍照。

[0053] 如图 3 所示,肺腺癌浸润成分(腺泡状腺癌)的间质成纤维细胞呈 CD34 阴性表达,浸润成分(腺泡状腺癌)呈 β -Tubulin-III 强阳性表达(黑色)(×40)。

[0054] 图 3 结果说明此检测方法能够明显区分出浸润性肺腺癌浸润灶,通过 β -Tubulin-III 强阳性表达和 CD34 阴性表达来鉴别此病例为浸润性肺腺癌。

[0055] 经过上述三种实施方式的研究,通过视觉上颜色对比,免疫组化结果特异性、敏感性的比较,决定将实施例 1 中的方法作为最佳的微浸润性肺腺癌早期浸润灶免疫组化双染检测方法。

[0056] 本专利中所述的各种试剂,除特别指出外,均可从商业途径上获得。

[0057] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,凡依本发明申请专利范围所做的均等变化与修饰,皆应属本发明的涵盖范围。

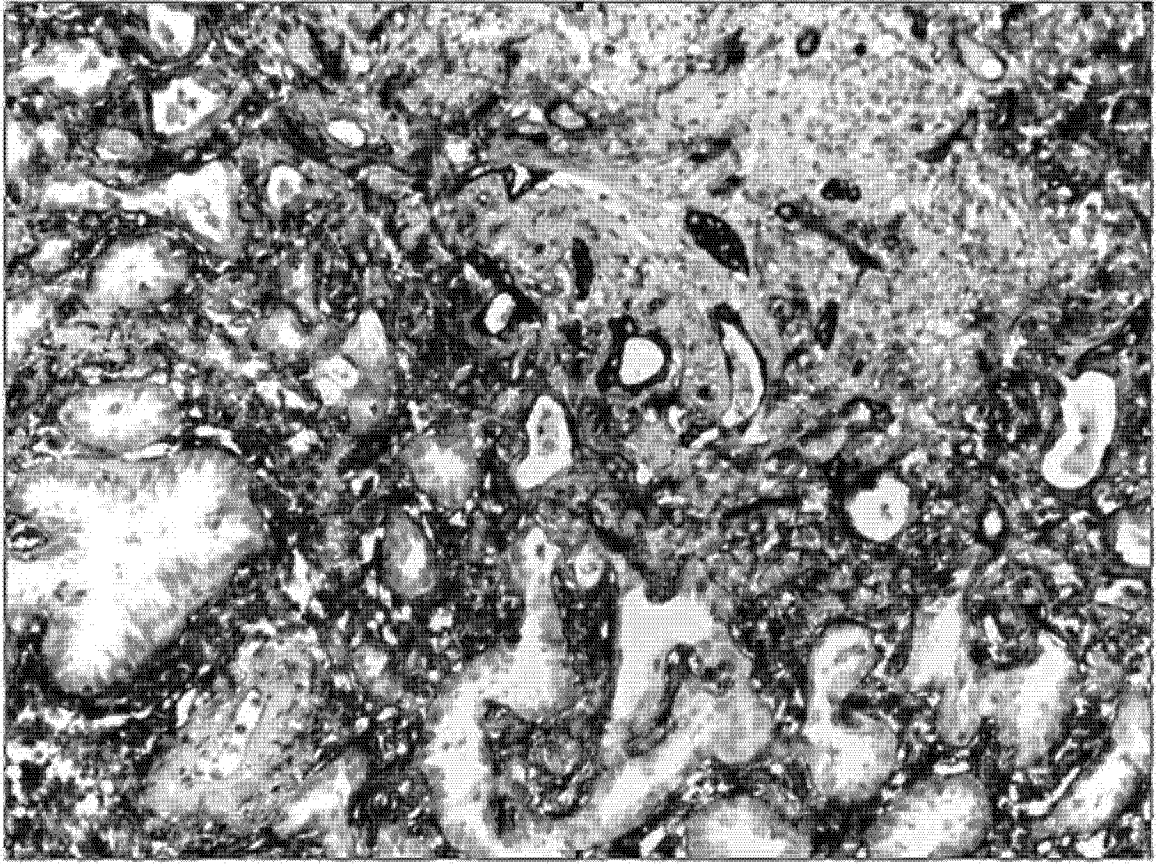


图 1

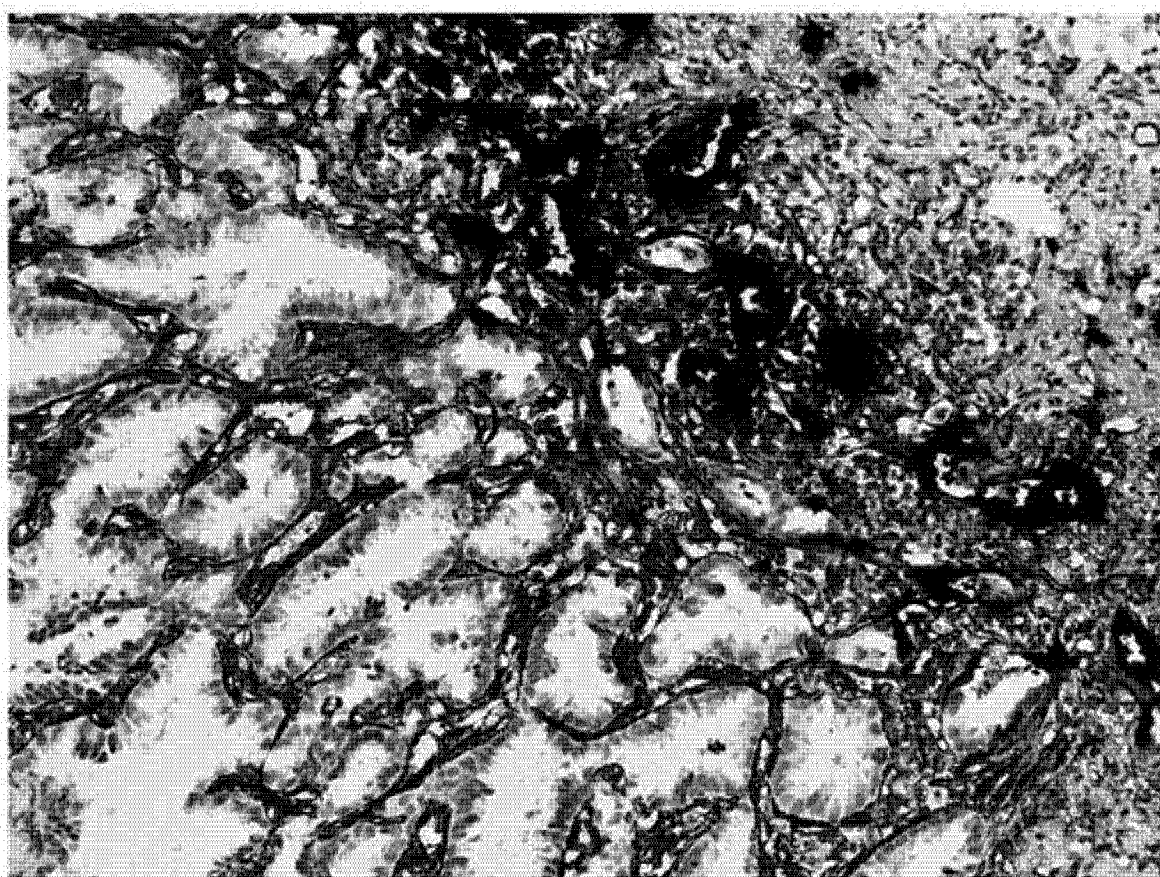


图 2

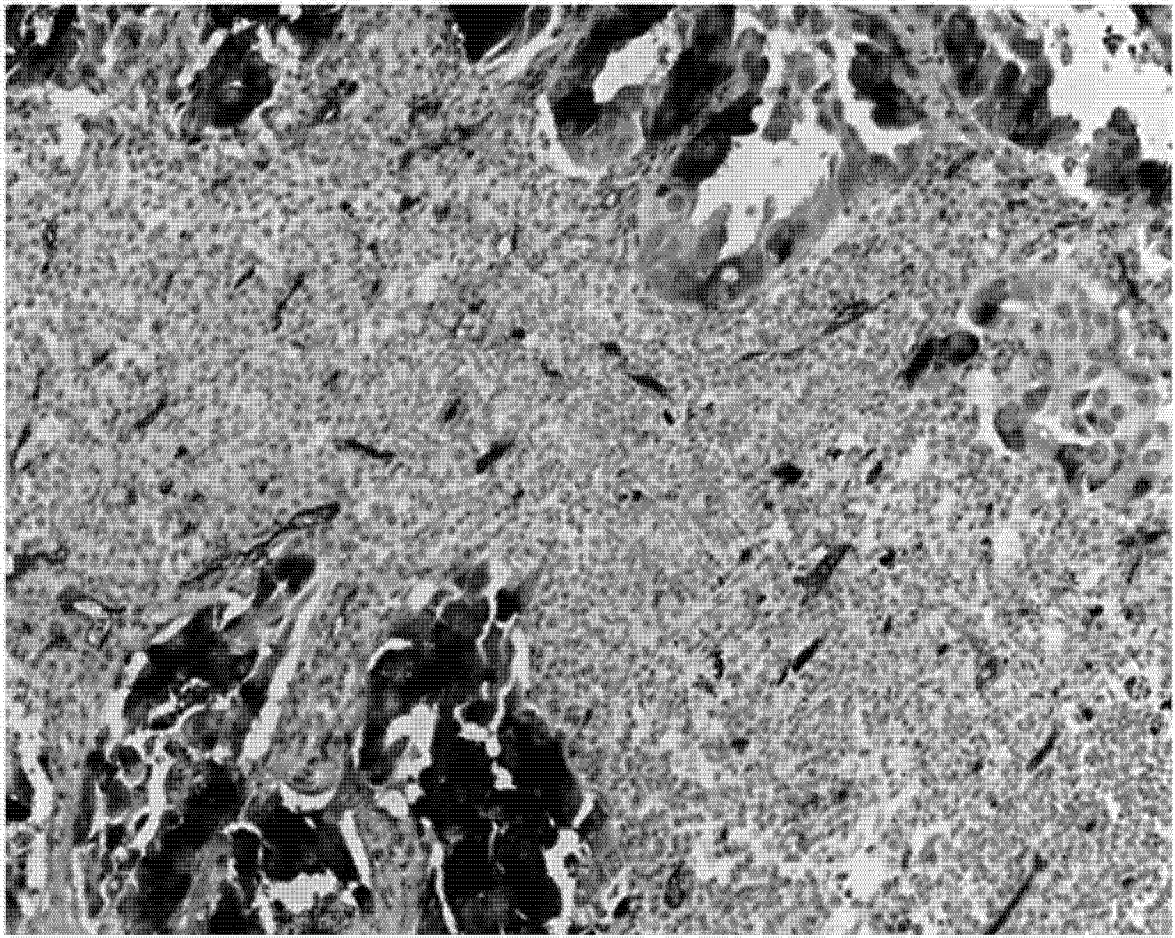


图 3

专利名称(译)	一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒		
公开(公告)号	CN103743904A	公开(公告)日	2014-04-23
申请号	CN201410026635.9	申请日	2014-01-21
[标]发明人	杨清海 郑智勇		
发明人	杨清海 郑智勇		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57407 G01N2800/12		
代理人(译)	蔡学俊		
其他公开文献	CN103743904B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫组织化学技术领域，涉及一种用于微浸润性肺腺癌的双标免疫组化染色试剂盒，为了解决HE染色片中微浸润性肺腺癌的浸润成分与非浸润成分不易明确区分的问题，制备CD34和 β -Tubulin-III双标免疫组化染色试剂盒，应用于肺腺癌早期浸润灶与非浸润成分的鉴别，可以避免因人为判读差异造成的微浸润性肺腺癌的过度诊断或诊断不足。

