



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104101701 B

(45) 授权公告日 2015. 10. 28

(21) 申请号 201410335507. 2

WO 2006061835 A1, 2006. 06. 15,

(22) 申请日 2014. 07. 15

刘海港等. 山羊 β 雌激素受体多克隆抗体的制备及免疫组化方法的建立. 《畜牧兽医学报》. 2013, (第 2 期),

(73) 专利权人 上海中医药大学附属曙光医院
地址 201203 上海市浦东新区张江高科技园区张衡路 528 号

审查员 黄晓丽

(72) 发明人 鄂裘恺 胡义扬 郭绍文 王敏燕
韩志宏

(74) 专利代理机构 南通市永通专利事务所
32100

代理人 葛雷

(51) Int. Cl.

G01N 33/532(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 101302495 A, 2008. 11. 12,

CN 102346184 A, 2012. 02. 08,

CN 102980995 A, 2013. 03. 20,

CN 103344760 A, 2013. 10. 09,

CN 201386105 Y, 2010. 01. 20,

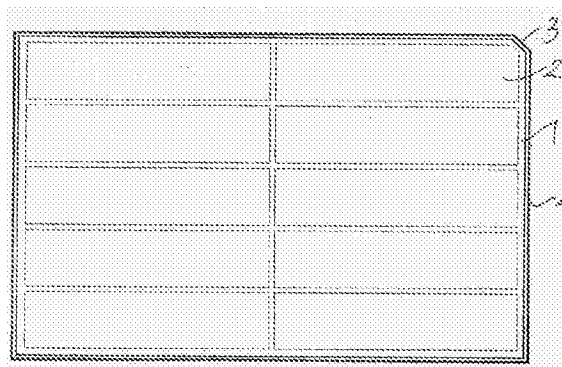
权利要求书2页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

高效细胞爬片免疫组化方法

(57) 摘要

本发明公开了一种高效细胞爬片免疫组化方法,将均已经过灭菌消毒处理的大面积载玻片和培养皿匹配使用,载玻片置于培养皿中,将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片,细胞培养结束后进行免疫细胞组织化学染色鉴定;所述免疫细胞组织化学染色鉴定包括用工具印章蘸取油墨,将载玻片的细胞爬片面覆盖于工具印章拓印面,压迫载玻片拓印出与工具印章拓印面相同一致大小的由油墨框条构成的细胞染色区,如有油墨缺失则用油墨涂画笔填补。本发明可进行大规模,多样本的医学实验科学研究。



1. 一种高效细胞爬片免疫组化方法, 将已经过灭菌消毒处理的载玻片置于培养皿中, 将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片, 细胞培养结束后进行免疫细胞组织化学染色鉴定; 培养皿设有培养皿盖, 其特征是: 所述培养皿设有多个相同大小、可放置载玻片的细胞培养槽, 每个细胞培养槽中分别放置一片载玻片; 所述免疫细胞组织化学染色鉴定依次包括下列步骤:

- (1) 用冰丙酮固定 15min 或 4% 多聚甲醛固定;
- (2) 流水漂洗, 用 PBS 清洗标本 3 次;
- (3) 用 PBS 配的 0.5% Triton X - 100 孵育 10min;
- (4) 0.3% H_2O_2 孵育 10min;
- (5) 用 PBS 清洗标本 3 次后, 热风充分干燥;

(6) 用工具印章蘸取油墨, 将载玻片的细胞爬片面覆盖于工具印章拓印面, 压迫载玻片拓印出与工具印章拓印面相同一致大小的由油墨框条构成的细胞染色区, 揭取载玻片并查看, 如有油墨缺失则用油墨涂画笔填补;

- (7) 空气充分干燥;
- (8) 用正常二抗血清封闭孵育 10min;
- (9) 在各细胞染色区分别滴加小鼠或兔抗第一抗体孵育 30 ~ 60min;
- (10) 吸除各细胞染色区液体并用 PBS 清洗标本 3 次;
- (11) 滴加酶联小鼠或兔第二抗体工作液孵育 30 ~ 60min;
- (12) PBS 清洗标本 3 次;
- (13) DAB 显色, 避光, 镜下观察;
- (14) 蒸馏水洗;
- (15) 苏木素衬染;
- (16) 盐酸酒精分化, 自来水洗;
- (17) 梯度酒精脱水, 二甲苯透明;
- (18) 中性树胶封片。

2. 根据权利要求 1 所述的高效细胞爬片免疫组化方法, 其特征是: 所述工具印章包括印章基座, 印章基座的底部设置多个方框凸起, 方框凸起内为凹区。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的高效细胞爬片免疫组化方法, 其特征是: 所述油墨由下列重量百分比的组分组成:

石蜡	15~20%
松香	2~3%
松节油	4~6%
汽油	20~26%
异丙醚	2~3%
二硫化碳	12~16%
二氯甲烷	2~5%
石油醚	2~3%
乙二醇丁醚	0.8~1.2%
乙醚	6~10%
丙酮	3~6%
环己酮	6~10%
四氯化碳	5~8%
微晶蜡	2~3%
蜂蜡	2~3%;

上述各组分用量之和为 100%。

4. 根据权利要求 1 或 2 所述的高效细胞爬片免疫组化方法,其特征是:培养皿的一个角呈斜面形式,方便方位标识;培养皿盖的一个角呈与培养皿本体呈斜面的角配合的斜面形式;培养皿盖与培养皿吻合口周缘的交错深度 $\geq 10\text{mm}$ 。

高效细胞爬片免疫组化方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种细胞爬片免疫组化方法。

背景技术

[0002] 细胞爬片免疫组织化学是用标记的特异性抗体对细胞标本中某些化学成分의 分布和含量进行组织和细胞原位定性、定位或定量研究,这种技术称为免疫细胞化学(immunocytochemistry)技术。

[0003] 常规细胞爬片免疫组织化学检测是对单张细胞爬片一片一片进行染色操作,一般只能对单样本做一种抗体,蛋白及基因的检测,难以胜任大规模,多样本及多组别的医学实验科学研究。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种可进行大规模,多样本多组别的医学实验科学研究的高效细胞爬片免疫组化方法。

[0005] 本发明的技术解决方案是:

[0006] 一种高效细胞爬片免疫组化方法,将均已经过灭菌消毒处理的大面积载玻片和培养皿匹配使用,载玻片置于培养皿中,,将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片,细胞培养结束后进行免疫细胞组织化学染色鉴定;培养皿设有培养皿盖,其特征是:所述培养皿设有多个相同大小、可放置载玻片/盖玻片的细胞培养槽,每个细胞培养槽中分别放置一片载玻片;所述免疫细胞组织化学染色鉴定依次包括下列步骤:

[0007] (1) 用冰丙酮固定 15min 或 4%多聚甲醛固定;

[0008] (2) 流水漂洗,用 PBS 清洗标本 3 次;

[0009] (3) 用 0.5% Triton X-100(PBS 配) 孵育 10min;

[0010] (4)0.3% H₂O₂ 孵育 10min;

[0011] (5) 用 PBS 清洗标本 3 次后,热风充分干燥;

[0012] (6) 用工具印章蘸取油墨,将载玻片的细胞爬片面覆盖于工具印章拓印面,压迫载玻片拓印出与工具印章拓印面相同一致大小的由油墨框条构成的细胞染色区,揭取载玻片并查看,如有油墨缺失则用油墨涂画笔填补;

[0013] (7) 空气充分干燥;

[0014] (8) 用正常二抗血清封闭孵育 10min;

[0015] (9) 在各细胞染色区分别滴加小鼠或兔抗第一抗体孵育 30 ~ 60min;

[0016] (10) 吸除各细胞染色区液体并用 PBS 清洗标本 3 次;

[0017] (11) 滴加酶联小鼠或兔第二抗体工作液孵育 30 ~ 60min;

[0018] (12)PBS 清洗标本 3 次;

[0019] (13)DAB 显色,避光,镜下观察;

[0020] (14) 蒸馏水洗;

- [0021] (15) 苏木素衬染；
- [0022] (16) 盐酸酒精分化, 自来水洗；
- [0023] (17) 梯度酒精脱水, 二甲苯透明；
- [0024] (18) 中性树胶封片。
- [0025] 所述工具印章包括印章基座, 印章基座的底部设置多个方框凸起, 方框凸起内为凹区。
- [0026] 所述油墨由下列重量百分比的组分组成：
- | | | |
|--------|-------|------------|
| [0027] | 石蜡 | 15 ~ 20% |
| [0028] | 松香 | 2 ~ 3% |
| [0029] | 松节油 | 4 ~ 6% |
| [0030] | 汽油 | 20 ~ 26% |
| [0031] | 异丙醚 | 2 ~ 3% |
| [0032] | 二硫化碳 | 12 ~ 16% |
| [0033] | 二氯甲烷 | 2 ~ 5% |
| [0034] | 石油醚 | 2 ~ 3% |
| [0035] | 乙二醇丁醚 | 0.8 ~ 1.2% |
| [0036] | 乙醚 | 6 ~ 10% |
| [0037] | 丙酮 | 3 ~ 6% |
| [0038] | 环己酮 | 6 ~ 10% |
| [0039] | 四氯化碳 | 5 ~ 8% |
| [0040] | 微晶蜡 | 2 ~ 3% |
| [0041] | 蜂蜡 | 2 ~ 3%。 |
- [0042] 上述各组分用量之和为 100%。
- [0043] 培养皿的一个角呈斜面形式, 方便方位标识; 培养皿盖的一个角呈与培养皿呈斜面的角配合的斜面形式; 培养皿盖与培养皿吻合口周缘的交错深度 $\geq 10\text{mm}$ 。
- [0044] 本发明有利于免疫组化的染色, 染色步骤与常规免疫组织化学相似, 但样本处理的温度, 时间, 试剂浓度等标准一致, 标记的一抗种类多, 可比性和可靠性均显著提高! 处理的样本数量多, 高效快捷。PBS 清洗、血清孵育、标记二抗, 衬染(苏木素)等不需要分隔的染色可一同处理, 方便快捷, 实验条件标准一致且易控制。采用大面积细胞爬片进行细胞培养 本处理的温度, 时间, 试剂浓度等标准一致, 使实验结果的可比性和可靠性均显著提高。专用细胞培养皿培养孔的数量减少, 操作方便, 高效快捷。特定的油墨配方充分保证了工作效果。

附图说明

- [0045] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步说明。
- [0046] 图 1 是本发明培养皿的结构示意图。
- [0047] 图 2 是培养皿盖的结构示意图。
- [0048] 图 3 是工具印章的结构示意图。
- [0049] 图 4 是细胞爬片分隔分区示意图。

[0050] 图 5 是油墨涂画笔的结构示意图。

具体实施方式

[0051] 一种高效细胞爬片免疫组化方法,将已经过灭菌消毒处理的载玻片置于培养皿中,将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片,细胞培养结束后进行免疫细胞组织化学染色鉴定;所述培养皿是透明材料,设有多个相同大小、可放置载玻片的细胞培养槽,槽深度 $\geq 20\text{ml}$,每个细胞培养槽中分别可放置一片载玻片;培养皿的一个角呈斜面形式,方便方位标识;培养皿盖与培养皿的底口周缘有吻合堤互相交错,交错深度 $\geq 10\text{mm}$ 。

[0052] 细胞培养槽的规格为 $80\times 30/\text{mm}$ (放单张载玻片); $64\times 28/\text{mm}$ (放单张 60×24 的盖玻片); $54\times 28/\text{mm}$ (放单张 50×24 的盖玻片); $38\times 28/\text{mm}$ (放单张 $34\times 24/\text{mm}$ 的盖玻片);所述免疫细胞组织化学染色鉴定依次包括下列步骤:

[0053] (1) 用冰丙酮固定 15min 或 4% 多聚甲醛固定;

[0054] (2) 流水漂洗,用 PBS 清洗标本 3 次;

[0055] (3) 用 0.5% Triton X-100 (PBS 配) 孵育 10min;

[0056] (4) 0.3% H₂O₂ 孵育 10min;

[0057] (5) 用 PBS 清洗标本 3 次后,热风充分干燥;

[0058] (6) 用工具印章蘸取油墨,将载玻片的细胞爬片面覆盖于工具印章的拓印面,压迫载玻片拓印出与工具印章拓印面相同一致大小的由油墨框条构成的细胞染色区,揭取载玻片并查看,如有油墨缺失则用油墨涂画笔填补;

[0059] (7) 空气充分干燥;

[0060] (8) 用正常二抗血清封闭孵育 10min;

[0061] (9) 在各细胞染色区分别滴加小鼠或兔抗第一抗体孵育 30 ~ 60min;

[0062] (10) 吸除各细胞染色区液体并用 PBS 清洗标本 3 次;

[0063] (11) 滴加酶联小鼠或兔第二抗体工作液孵育 30 ~ 60min;

[0064] (12) PBS 清洗标本 3 次;

[0065] (13) DAB 显色,避光,镜下观察;

[0066] (14) 蒸馏水洗;

[0067] (15) 苏木素衬染;

[0068] (16) 盐酸酒精分化,自来水洗;

[0069] (17) 梯度酒精脱水,二甲苯透明;

[0070] (18) 中性树胶封片。

[0071] 所述工具印章包括印章基座,印章基座的底部设置多个方框凸起,方框凸起内为凹区。

[0072] 所述油墨涂画笔包括笔筒,笔筒内设置笔芯,笔芯为包裹海绵样的圆柱体,其内中灌注有油墨,笔芯前端设置木质笔芯。

[0073] 所述油墨由下列重量百分比的组分组成:

[0074] 石蜡 15 ~ 20% (例 15%、18%、20%)

[0075] 松香 2 ~ 3% (例 2%、2.5%、3%)

[0076] 松节油 4 ~ 6% (例 4%、5%、6%)

-
- | | | |
|--------|------------------|-----------------------------|
| [0077] | 汽油 | 20 ~ 26% (例 20%、23%、26%) |
| [0078] | 异丙醚 | 2 ~ 3% (例 2%、2.5%、3%) |
| [0079] | 二硫化碳 | 12 ~ 16% (例 12%、14%、16%) |
| [0080] | 二氯甲烷 | 2 ~ 5% (例 2%、4%、5%) |
| [0081] | 石油醚 | 2 ~ 3% (例 2%、2.5%、3%) |
| [0082] | 乙二醇丁醚 | 0.8 ~ 1.2% (例 0.8%、1%、1.2%) |
| [0083] | 乙醚 | 6 ~ 10% (例 6%、8%、10%) |
| [0084] | 丙酮 | 3 ~ 6% (例 3%、4%、6%) |
| [0085] | 环己酮 | 6 ~ 10% (例 6%、8%、10%) |
| [0086] | 四氯化碳 | 5 ~ 8% (例 5%、6%、8%) |
| [0087] | 微晶蜡 | 2 ~ 3% (例 2%、2.5%、3%) |
| [0088] | 蜂蜡 | 2 ~ 3% (例 2%、2.5%、3%)。 |
| [0089] | 上述各组分用量之和为 100%。 | |

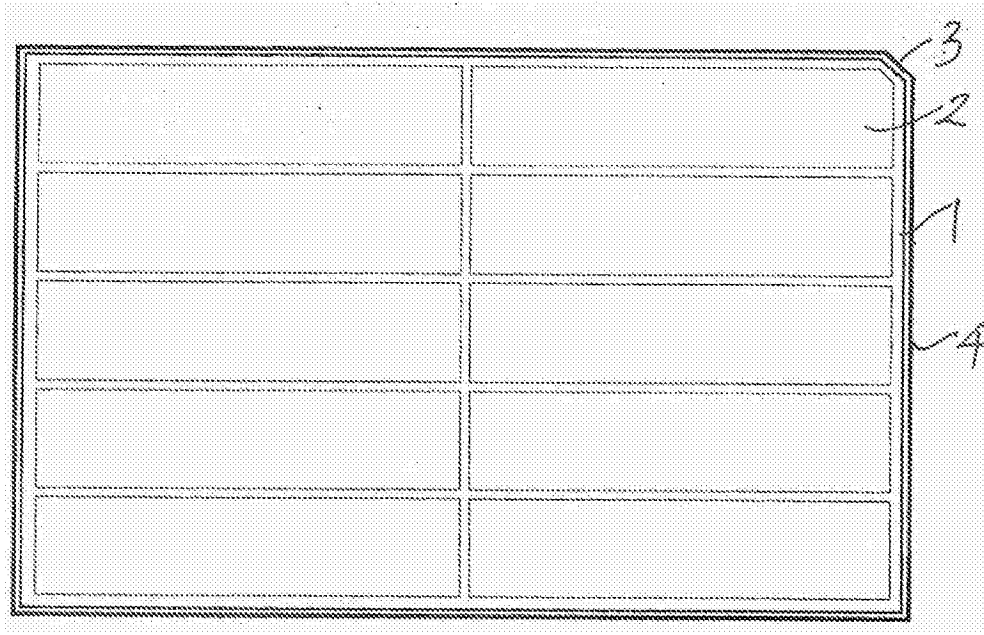


图 1

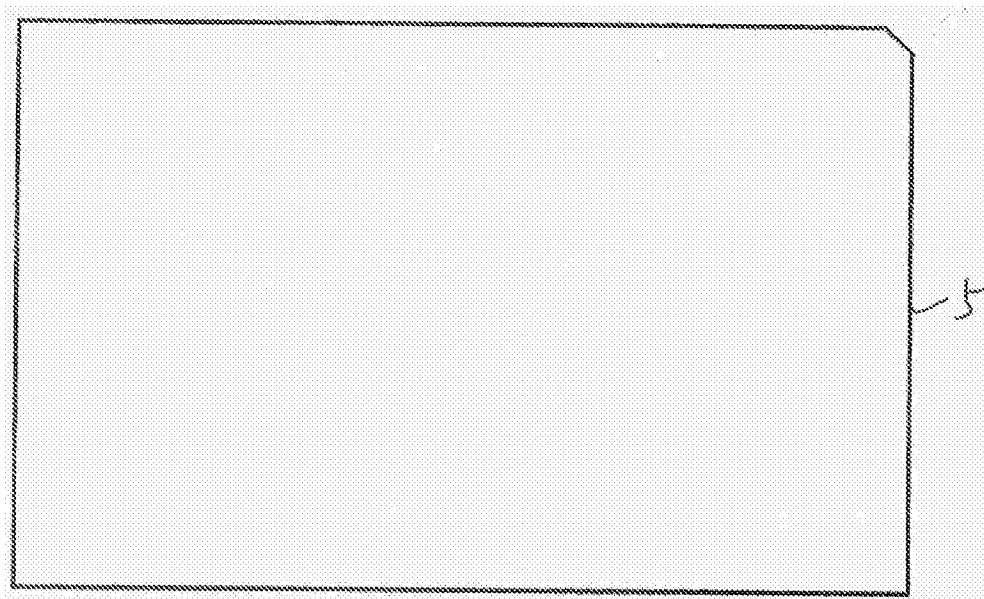


图 2

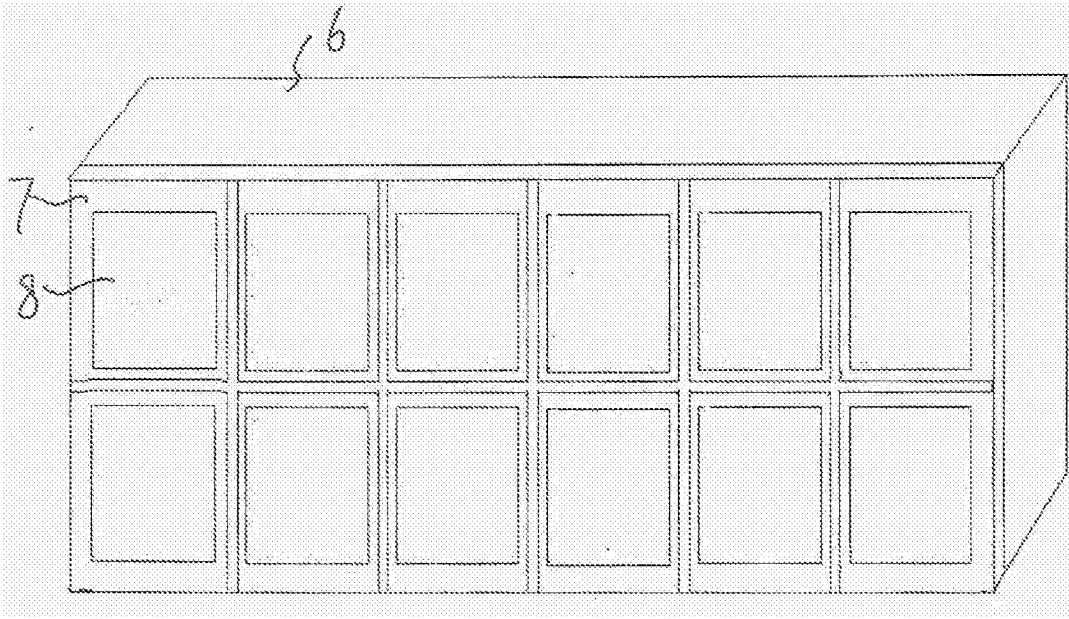


图 3

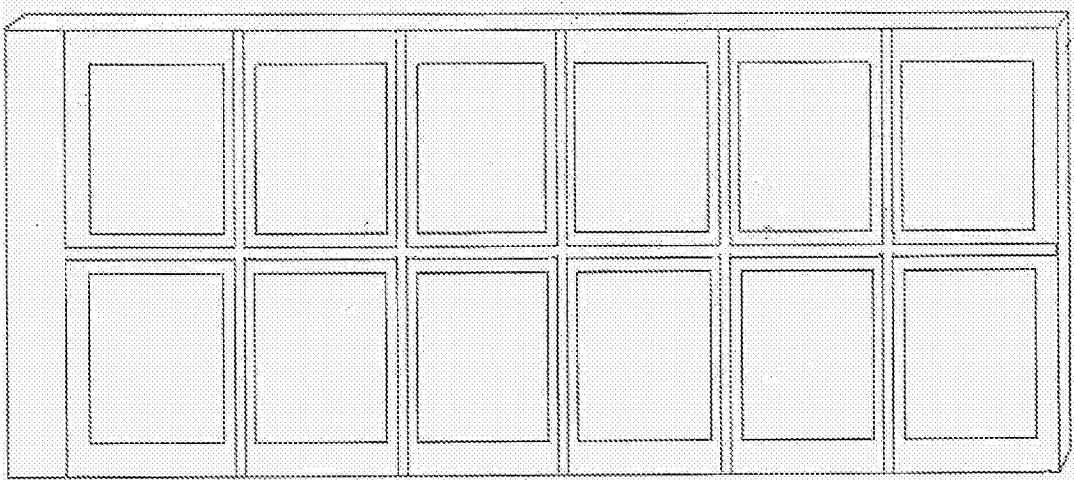


图 4



图 5

专利名称(译)	高效细胞爬片免疫组化方法		
公开(公告)号	CN104101701B	公开(公告)日	2015-10-28
申请号	CN201410335507.2	申请日	2014-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	上海中医药大学附属曙光医院		
申请(专利权)人(译)	上海中医药大学附属曙光医院		
当前申请(专利权)人(译)	上海中医药大学附属曙光医院		
[标]发明人	鄂裘恺 胡义扬 郭绍文 王敏燕 韩志宏		
发明人	鄂裘恺 胡义扬 郭绍文 王敏燕 韩志宏		
IPC分类号	G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/5302 G01N33/583		
代理人(译)	葛雷		
审查员(译)	黄晓丽		
其他公开文献	CN104101701A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种高效细胞爬片免疫组化方法，将均已经过灭菌消毒处理的大面积载玻片和培养皿匹配使用，载玻片置于培养皿中，将细胞接种于培养皿中进行细胞爬片，细胞培养结束后进行免疫细胞组织化学染色鉴定；所述免疫细胞组织化学染色鉴定包括用工具印章蘸取油墨，将载玻片的细胞爬片面覆盖于工具印章拓印面，压迫载玻片拓印出与工具印章拓印面相同一致大小的由油墨框条构成的细胞染色区，如有油墨缺失则用油墨涂画笔填补。本发明可进行大规模，多样本的医学实验科学研究。

