



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104237504 B

(45)授权公告日 2017.04.05

(21)申请号 201410477793.6

审查员 李倩

(22)申请日 2014.09.19

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104237504 A

(43)申请公布日 2014.12.24

(73)专利权人 汕头大学医学院

地址 515041 广东省汕头市金平区新陵路
22号

(72)发明人 苏敏 苏雪 王晓艳 刘茜
田东萍

(74)专利代理机构 汕头市南粤专利商标事务所
(特殊普通合伙) 44301

代理人 余飞峰

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

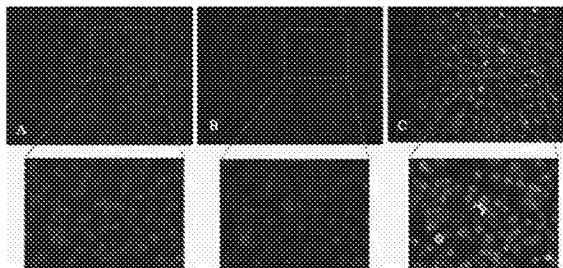
权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54)发明名称

一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断
方法及试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断方法,通过免疫荧光双标技术对IgE与肥大细胞(MC)脱颗粒进行免疫荧光共定位;其试剂盒包括:与人类胰蛋白酶结合的第一重标记第一抗体,该第一抗体是特异性结合人类胰蛋白酶的鼠源性单克隆抗体;与人IgE结合的第二重标记第一抗体,该第一抗体是特异性结合人IgE的兔源性多克隆抗体;FITC以及Cy3标记的荧光二抗;抗原修复试剂;DAPI 细胞核染色剂及缓冲液系统等。该试剂盒有特异性好、灵敏度高、稳定、通用的特点。主要应用于病理学与法医病理学的鉴定中,能精准地提供过敏性休克直观的病理学依据。



1.一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断方法，其特征在于：

步骤一：制作组织片；

步骤二：抗原修复：先将抗原修复试剂放入高压锅，煮沸后将组织片放入，冒气后2分钟关火，从高压锅取出组织片及抗原修复试剂，自然冷却至室温；

步骤三：采用 PBS 缓冲液洗 3 分钟，共计 3 次；

步骤四：滴加第一抗体混合液在组织片上，将组织片放入湿盒，在 4℃冰箱内保持 8-12小时；

所述第一抗体混合液为 PBS 缓冲液中同时加入抗人类胰蛋白酶抗体与抗人 IgE 抗体，两种一抗混合后浓度范围各为 1:100-1:300；

步骤五：将组织片放在 PBS 缓冲液洗 5 分钟，共计 3 次；

步骤六：将组织片滴加荧光二抗 1 和 2 的混合液，室温孵育 30 分钟；所述荧光二抗 1 为 FITC-labeled goat anti-mouse IgG (H+I)；

所述荧光二抗 2 为 Cy3-labeled goat anti-rabbit IgG (H+I)；

所述荧光二抗1和2的混合液为在PBS缓冲液中同时加入荧光二抗1和荧光二抗2，两种二抗混合后浓度范围各为 1:100-1:300；

步骤七：将组织片放在 PBS 缓冲液洗 5 分钟，共计 3 次；

步骤八：滴加 DAPI 细胞核染色剂，在荧光显微镜下观察；

步骤九：图像分析与结果判定

对免疫荧光双标后进行封片处理的切片进行观察，利用荧光显微镜和图像采集系统并结合后期 Image-Pro Plus6.0 软件图像处理，随机选取不重复的 10 个高倍视野来进行实验结果图像采集；使用图像分析软件进行实验结果的图像分析；

步骤十：判断依据

计录每张图片中脱颗粒 MC 数及 MC 总数，以 10 个高倍视野 MC 计数的均值作为此图片的最后平均数作为统计量，并计算出每张图片 10 个视野的平均 MC 脱颗粒率，作为最后 MC 脱颗粒率的统计量，MC 脱颗粒率 $\geq 50\%$ 即为过敏；IgE 计数每张图片 10 个视野的阳性细胞，以 10 个视野计数的均值作为此图片的最后的平均数作为统计量，判断免疫荧光双标检测肥大细胞脱颗粒与 IgE 表达情况，观察其MC脱颗粒率是否大于50%以及MC 脱颗粒率与IgE 表达是否呈正相关，有无共表达，如有，则表明是过敏性休克。

2.如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：

所述 PBS 缓冲液为 0.01mol/L, pH7.2-7.6的 PBS 缓冲液；

所述抗原修复试剂为柠檬酸钠 0.01 M pH6.0。

3.如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于，包括以下步骤：

荧光显微镜观察：

步骤一：MC 阳性细胞判断，MC 阳性细胞核形态：呈圆形或椭圆形，形状规则，大小不等，MC 阳性细胞胞浆形态：胞浆呈不规则形态，可见周围绿色阳性颗粒脱出，即为 MC 脱颗粒；

步骤二：IgE 阳性判断，以胞浆出现红色为阳性；

步骤三：MC 阳性细胞与 IgE 阳性共定位呈现黄色。

4.如权利要求 1 或2所述的方法，其特征在于，组织片的制作方法：

步骤一：先将石蜡标本连续切片，每片基本为 4-6 μ m 厚度，用蒸馏水将所有组织片进行摊片，随后放在 60℃烤箱内烤片 2 小时；浸入 100% 二甲苯溶液 30 分钟，共 3 次；依次浸入梯度 100% 酒精溶液，95% 酒精溶液，85% 酒精溶液，75% 酒精溶液，各 5 分钟；蒸馏水洗 3 次，每次 5 分钟；

步骤二：室温下浸入浓度 3% 的过氧化氢溶液 10 分钟；

步骤三：再将组织片放在 PBS 中洗净 5 分钟，共计 3 次，得到准备进行检测的组织片。

5. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：

在荧光显微镜的观察下，通道 a：紫外荧光激发光下观察细胞核呈蓝色；通道 b：550nm 激发光下观察 MC 阳性表达呈绿色；通道 c：492nm 激发光下观察 IgE 阳性表达呈红色；通道 d：双通道下观察 MC 阳性和 IgE 阳性共表达呈黄色。

6. 一种用于病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断的试剂盒，其内容物包括：

抗原修复试剂、

与人类胰蛋白酶结合的第一重标记第一抗体、

与人 IgE 结合的第二重标记第一抗体、

荧光二抗 1：FITC-labeled goat anti-mouse IgG (H+I)、

荧光二抗 2：Cy3-labeled goat anti-rabbit IgG (H+I)、

DAPI 细胞核染色剂。

7. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其特征在于：试剂盒内各组分独立包装，荧光二抗用隔绝光线的材质进行包装。

8. 如权利要求 6 所述的一种用于病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断的试剂盒，其特征在于：所述的抗原修复试剂为柠檬酸盐 0.01M，PH6.0。

一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医药检测技术领域,是一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断及用于该方法的试剂盒。

背景技术

[0002] 过敏性休克(anaphylaxis,anaphylactic shock)为I型变态反应,是外界某些抗原性物质进入已致敏的机体后,通过免疫机制在短时间内发生的一种强烈的多脏器累及症群。

[0003] 当机体首次接触过敏原时,浆细胞产生大量的IgE,并且通过MC膜上IgE高亲和力受体FcεR1来结合于MC,当再次过敏时多个IgE结合于一个抗原体,此时IgE发生桥连从而激活了MC,MC脱颗粒并释放出一系列活性介质在过敏性休克发生发展中起着举足轻重的作用。因此IgE是鉴别是否为变态反应的关键所在。血清IgE含量的增多可以作为过敏性休克诊断依据之一。但是某些寄生虫病、真菌感染、金黄色葡萄球菌感染及死后溶血、凝血等均会影响到血清IgE的测定结果。另外,机体产生过敏反应时,IgE含量是否升高还与抗原性质以及遗传因素等相关。所以单纯依靠检测血清IgE来诊断过敏性休克是不可靠的。

[0004] MC以及MC活化后脱颗粒是过敏性休克发生发展的核心。MC被激活后其内部的富含类胰蛋白酶的颗粒和组胺颗粒均释放入血液中,MC中类胰蛋白酶的外溢情况已被作为衡量有无过敏性休克的重要指标之一。除了血清检测该酶的方法外,还可以针对患者体内病变组织进行免疫组织化学方法检测MC胞内以及胞外的类胰蛋白酶含量。再运用相关软件进行分析MC活化情况,并进一步诊断过敏性休克类型。但近年来有研究指出冠心病、心肌梗死者、创伤性死者、注射海洛因、婴幼儿猝死综合征等不通过IgE途径也会导致血中类胰蛋白酶均会升高,因此MC类胰蛋白酶的测定不能作为单独的诊断依据。

[0005] 过敏性休克致死者一般接触过敏原后30分钟之内就会发生休克症状,由于发病突然,因此很难发现死者身上明确的形态学改变,尸检时也只是可见猝死时组织脏器淤血水肿等一般表现。因为过敏性休克常常不表现出特殊的病理形态学变化,诊断时必须结合过敏史、用药史,并且要排除窒息、中毒等其他种种死因,因此给法医学鉴定带来了很大的困难,所以寻找简便易行可靠的诊断指标成了法医病理学亟待解决的重要问题。

发明内容

[0006] 本发明的目的在于,提供一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断及试剂盒。利用抗原-抗体特异性结合的生物学特性,该诊断试剂盒采用免疫荧光技术,用鼠抗人类胰蛋白酶单抗以及兔抗人IgE多克隆抗体对IgE与MC脱颗粒共定位,可作为过敏休克的病理诊断指标。

[0007] 本发明采取的免疫荧光诊断方法包括如下步骤:

[0008] 步骤一:制作组织片;

[0009] 步骤二:抗原修复:先将抗原修复试剂放入高压锅,煮沸后将组织片放入,冒气后2

分钟关火,从高压锅取出组织片及抗原修复试剂,自然冷却至室温;

[0010] 步骤三:采用PBS缓冲液洗3分钟,共计3次;

[0011] 步骤四:滴加第一抗体混合液在组织片上,将组织片放入湿盒,在4℃冰箱内保持8-12小时;

[0012] 步骤五:将组织片放在PBS缓冲液洗5分钟,共计3次;

[0013] 步骤六:将组织片滴加荧光二抗1和2的混合液,室温孵育30分钟;

[0014] 步骤七:将组织片放在PBS缓冲液洗5分钟,共计3次;

[0015] 步骤八:滴加DAPI 细胞核染色剂,在荧光显微镜下观察。

[0016] 其中所述的PBS缓冲液为0.01mol/L (pH7.2-7.6)的PBS缓冲液;

[0017] 所述第一抗体混合液为:

[0018] 1) 与人类胰蛋白酶结合的第一重标记第一抗体(抗人类胰蛋白酶抗体)

[0019] 2) 与人IgE结合的第二重标记第一抗体(抗人IgE抗体)

[0020] 所述第一抗体混合液为PBS缓冲液中同时加入抗人类胰蛋白酶抗体与抗人IgE抗体,此两种抗体混合后浓度范围各为1:100-1:300;

[0021] 所述抗原修复试剂为柠檬酸钠 0.01 M PH6.0;

[0022] 所述荧光二抗1为FITC-labeled goat anti-mouse IgG (H+I);

[0023] 所述荧光二抗2为Cy3-labeled goat anti-rabbit IgG (H+I);

[0024] 所述荧光二抗1和2的混合液为在PBS缓冲液中同时加入荧光二抗1和荧光二抗2,两种二抗混合后浓度范围各为1:100-1:300;

[0025] 该试剂盒内各组分独立包装,荧光二抗用隔绝光线的材质进行包装,试剂盒的内容物包括:

[0026] 抗原修复试剂;

[0027] 与人类胰蛋白酶结合的第一重标记第一抗体(抗人类胰蛋白酶抗体);

[0028] 与人IgE结合的第二重标记第一抗体(抗人IgE抗体);

[0029] 能与第一重标记和第二重标记第一抗体结合的荧光二抗1及荧光二抗2;

[0030] DAPI 细胞核染色剂。

[0031] 本发明的优点在于:

[0032] 两种第一抗体是分别用于检测肥大细胞脱颗粒的鼠抗人类胰蛋白酶单克隆抗体和检测IgE表达情况的兔抗人IgE多克隆抗体。在过敏性休克发病机制中浆细胞产生的特异性抗体IgE与高表达FcεRI受体的MC相结合,MC被激活后其内部的富含类胰蛋白酶的颗粒和组胺颗粒均快速释放。MC中类胰蛋白酶的外溢情况已被作为衡量有无过敏性休克的重要指标之一,同时对同部位进行IgE表达的检测可进一步诊断过敏性休克类型。

[0033] 该肥大细胞脱颗粒与IgE共定位免疫荧光双标诊断试剂盒,适用于人组织标本,常规10%中性福尔马林溶液固定,石蜡包埋的组织标本切片。该试剂盒中,采用的免疫荧光染色法可在同一张组织切片上同时标记类胰蛋白酶和IgE,在原位显示不同抗原的毗邻关系及伴随状况。

[0034] 以上技术特点保证了肥大细胞脱颗粒与IgE共定位免疫组化诊断试剂盒具有特异性好,敏感性高,稳定性好,简单通用的特性。

[0035] 附图说明:

[0036] 图1为过敏性休克死者大体标本(喉头明显水肿,声门关闭;双肺水肿);

[0037] 图2为标本组织形态学观察;(从左往右分别是过敏组喉粘膜输送水肿HE×200;过敏组肺组织急性肺淤血水肿HE HE×200;过敏组肠组织平滑肌痉挛HE×200)

[0038] 图3为荧光显微镜观察下的合成视图。(A、MC阳性细胞;B、IgE阳性;C、MC阳性细胞与IgE阳性共定位)

[0039] 具体实施方式:

[0040] 1.怀疑过敏性休克死亡病例病理尸检以及取材规范与评定准则

[0041] (1)按规范尸检方法完整取出舌、喉头、气管与肺,尸检现场观察并拍照记录喉头有无明显水肿以及声门开放情况,肺有无膨隆并称重。固定后之肺大体标本置于切肺板上,将肺背侧紧贴板面,左手将肺固定于板上,用力均匀,尽可能使肺大面积贴在板面。沿肺长轴自外侧缘向肺门作一水平切面,观察有无水肿液溢出。

[0042] (2)组织学取材:分别对喉头、气管、肺与肠进行取材,肺必须包括各个肺叶,每叶至少1块,每块厚3mm~4mm,面积2cm×2cm左右,将肠标本置于砧板上,沿肠管纵轴、横轴分别取材。取材的组织块要包括病变和可疑病变。取材组织块编号要与大体保持一致。组织学切片采用常规石蜡切片及苏木素伊红染色。

[0043] (3)大体标本眼观病变摄像记录方法

[0044] 摄像器材:

[0045] 翻拍架:四角对称,斜射45°对称灯台架;

[0046] 相机及镜头:单反数码相机配置 AF35-70mmf/2.8自动变焦镜头;像素要求不低于M3216×2136。

[0047] 光源:6400K日光色

[0048] 操作方法:尸检现场拍摄固定后喉头、肺、肠大体标本情况。固定相机于摄像台升降杆上,调整相机高度,镜头到标本的一般距离为800mm,可根据标本大小构图要求适当加以调整。将肺标本表面粘液、水分充分吸干,放在阅片灯乳白玻璃上,对取材前切面拍照一次,取材标记后再拍照一次。

[0049] 2.石蜡标本和切片的制作

[0050] 所有标本均用10%中性福尔马林溶液在常温下进行固定,一般时间为24~48小时,再按石蜡标本的制作标准进行取材。常规实验过程为:先进行标本脱水,再行透明,最后将标本浸蜡以及石蜡包埋。最后将制作符合标准的石蜡标本进行连续切片,片子常规厚度为4~6μm,40℃蒸馏水对切片进行摊片,随后用APES 处理之后的载玻片来捞取符合标准的无刀痕以及褶皱的完整组织片。

[0051] 3.HE染色与观察

[0052] (1)将组织片放在60℃烤箱中烤片1小时;

[0053] (2)二甲苯溶液对组织片脱蜡5分钟,共计3次;

[0054] (3)随后依次将组织片浸入100%酒精、90%酒精、80%酒精、70%酒精中均为5分钟,取出用自来水冲洗3分钟;

[0055] (4)组织片浸入苏木素染液2分钟;

[0056] (5)组织片放在自来水中冲洗5分钟;

[0057] (6)用浓度为1%的盐酸酒精溶液(一般按70%浓度酒精液配制而成)分化时间为

6-8秒左右,随后用自来水冲洗组织片3分钟;

[0058] (7) 用0.5%伊红染液对组织片进行5秒左右染色;

[0059] (8) 采用70%酒精、80%酒精、90%酒精、100%酒精溶液对组织本进行脱水各2分钟;

[0060] (9) 组织片浸入二甲苯溶液透明5分钟,共计3次;

[0061] (10) 中性树胶封片:先擦去组织片周围过剩的二甲苯液,不要让其干涸,随后迅速滴加中性树胶,再用盖玻片进行封固。

[0062] (11) 用普通显微镜对切片染色进行观察。

[0063] 4. 标本组织形态学HE染色观察

[0064] 喉组织:喉粘膜下粘液性腺体分泌亢进,粘膜下层组织疏松水肿,血管扩张淤血。

[0065] 肺组织:可见死者肺组织明显淤血水肿,肺内血管明显扩张淤血,肺泡扩张,腔内可见大量粉染水肿液,肺内支气管粘液腺分泌亢进,部分区域见代偿性肺气肿改变。

[0066] 肠组织:见平滑肌呈收缩波浪状。

[0067] 5. 免疫荧光双标染色与观察

[0068] (1) 将石蜡标本连续切片所得的组织片放在60℃烤箱内烤片2小时;浸入100%二甲苯溶液 30分钟,共3次;依次浸入梯度100%酒精溶液,95%酒精溶液,85%酒精溶液,75%酒精溶液,各5分钟;蒸馏水洗3次,每次5分钟;

[0069] (2) 室温下浸入浓度3%的过氧化氢溶液10分钟(可略);

[0070] (3) 再将组织片放在PBS中洗5分钟,共计3次;

[0071] (4) 抗原修复:柠檬酸盐(PH6.0)高压修复,先将柠檬酸盐放入高压锅,煮沸后将组织片放入,冒气后2 分钟关火,从高压锅取出组织片及柠檬酸盐,自然冷却至室温;

[0072] (5) 0.01mol/L (pH7.2-7.6) PBS洗3×3分钟;

[0073] (6) 滴加第一抗体混合液:在PBS缓冲液中同时加入抗人类胰蛋白酶抗体与抗人IgE抗体配制成第一抗体混合液(两种一抗浓度范围各为1:100-1:300),将第一抗体混合液滴加在组织片上,组织片放入湿盒,在4℃冰箱内过夜;

[0074] (7) 再将组织片放在0.01mol/L (pH7.2-7.6) PBS洗5分钟,共计3次;

[0075] (8) 在组织片上荧光二抗1和2的混合液(两种二抗浓度范围各为1:100-1:300),室温孵育30min,再将标本切片放在0.01mol/L (pH7.2-7.4) PBS洗5min,共计3次;

[0076] (9) 滴加DAPI 细胞核染色剂,在荧光显微镜的观察下,通道a:紫外荧光激发光下观察细胞核呈蓝色;通道b:550nm激发光下观察MC阳性表达呈绿色;通道c:492nm激发光下观察IgE阳性表达呈红色;通道d:双通道下观察MC阳性和IgE阳性共表达呈黄色。

[0077] (10) 用荧光显微镜对所有组织片进行扫描拍照保存。

[0078] 6. 免疫荧光双标判断结果:

[0079] A. MC阳性细胞胞浆形态:胞浆呈不规则形态,可见周围绿色阳性颗粒脱出,即为MC脱颗粒;MC阳性细胞胞浆形态:胞浆呈不规则形态,可见周围绿色阳性颗粒脱出,即为MC脱颗粒。

[0080] B. IgE阳性:以胞浆出现红色为阳性。

[0081] C. MC阳性细胞与IgE阳性共定位呈现黄色。

[0082] 7. 免疫荧光双标检测肥大细胞脱颗粒与IgE表达情况

[0083] MC 脱颗粒率与IgE 表达是否呈正相关,尤其是有无共表达。

[0084] 8.图像分析与结果判定:

[0085] 对免疫荧光双标后进行封片处理的切片进行观察,利用荧光显微镜和图像采集系统(或荧光数字切片扫描与分析系统)并结合后期Image-Pro Plus6.0软件图像处理后,随机选取不重复的10 个高倍视野来进行实验结果图像采集;使用图像分析软件进行实验结果的图像分析;

[0086] 计录每张图片中脱颗粒MC 数及MC 总数,以10 个高倍视野MC 计数的均值作为此图片的最后平均数作为统计量,并计算出每张图片10 个视野的平均MC 脱颗粒率(MC 脱颗粒率=10 个视野脱颗粒MC 数/ 10 个视野MC 总数 $\times 100\%$)作为最后MC 脱颗粒率的统计量,MC脱颗粒率 $\geq 50\%$ 即为过敏;

[0087] IgE 计数每张图片10 个视野的阳性细胞,以10 个视野计数的均值作为此图片的最后的平均数作为统计量,判断免疫荧光双标检测肥大细胞脱颗粒与IgE表达情况,观察其MC脱颗粒率是否大于50%以及MC 脱颗粒率与IgE 表达是否呈正相关,尤其是有无共表达,如有,则表明是过敏性休克。

[0088] 通过对72例的喉、肺、小肠组织标本进行MC、MC脱颗粒率、IgE相关分析,结果显示在喉组织中MC与IgE、MC脱颗粒率与IgE表达是呈正相关关系,肺组织中MC与IgE呈正相关,肠组织中MC脱颗粒率与IgE表达是呈正相关关系。同时观察到IgE定位于MC膜上或者MC胞浆、浆细胞胞浆中,由IgE定位的MC绝大多数处于脱颗粒状态。

[0089] 免疫荧光是根据抗原抗体反应的原理给已知的抗原或抗体标上荧光素,再用荧光抗体(抗原)作为探针检查组织内的相应抗原(或抗体)。利用荧光显微镜观察含有荧光素的抗原抗体复合物。从而对抗原或抗体进行定位、定性及利用定量技术测定含量。而免疫荧光双标技术是指用不同颜色的荧光在同一切片上检测是否有两种抗原物质在于同一组织结构中。

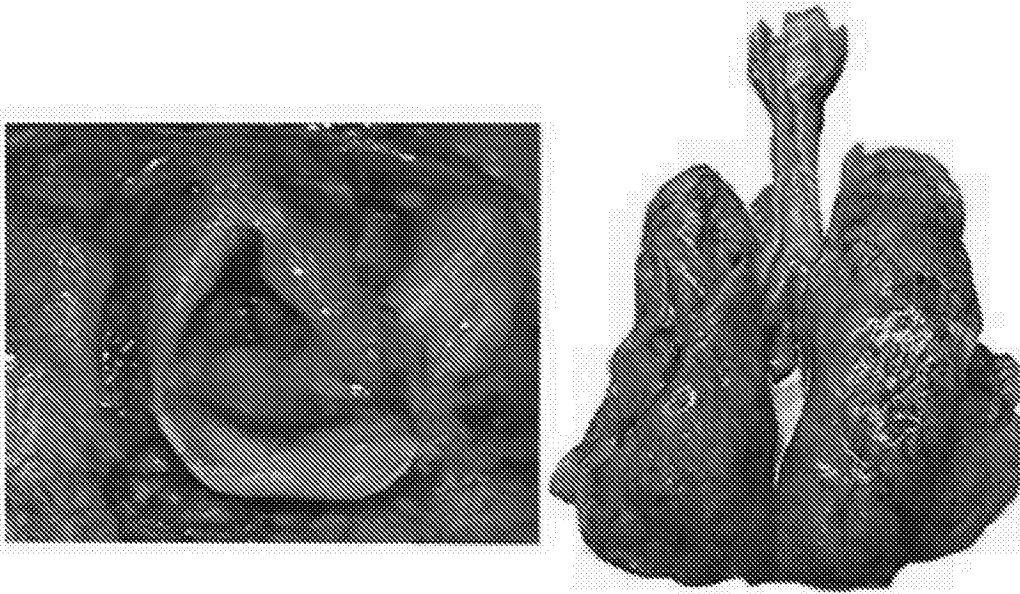


图1

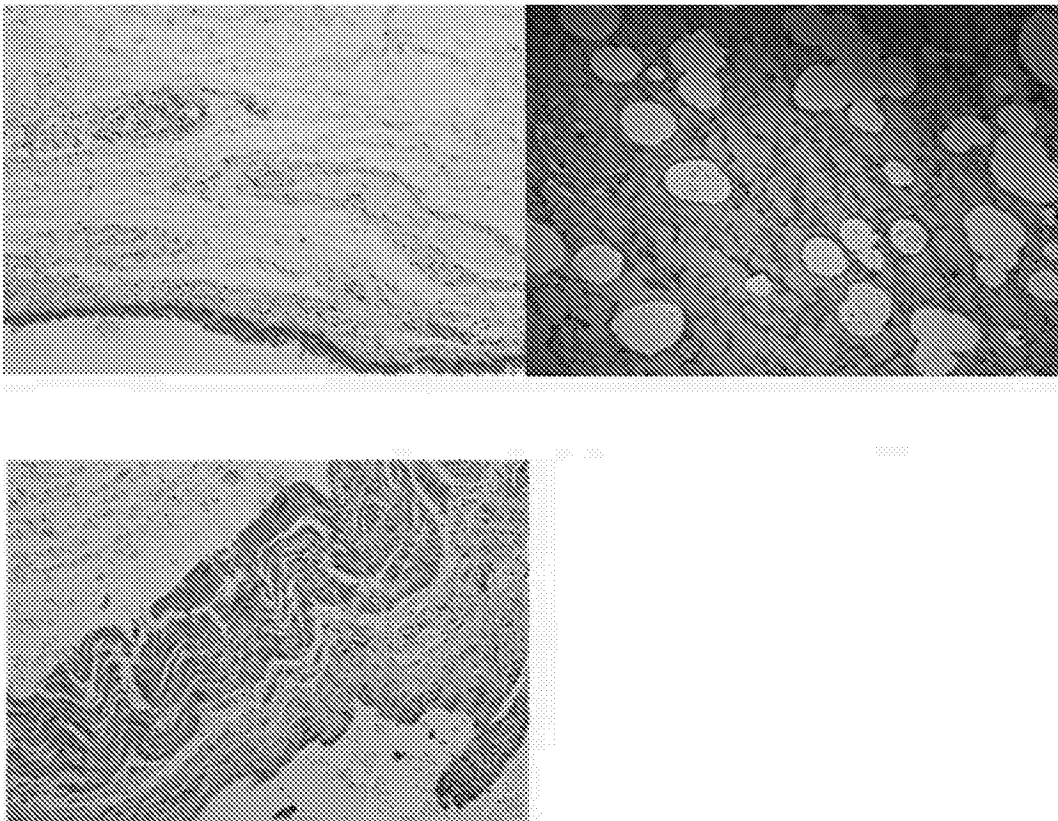


图2

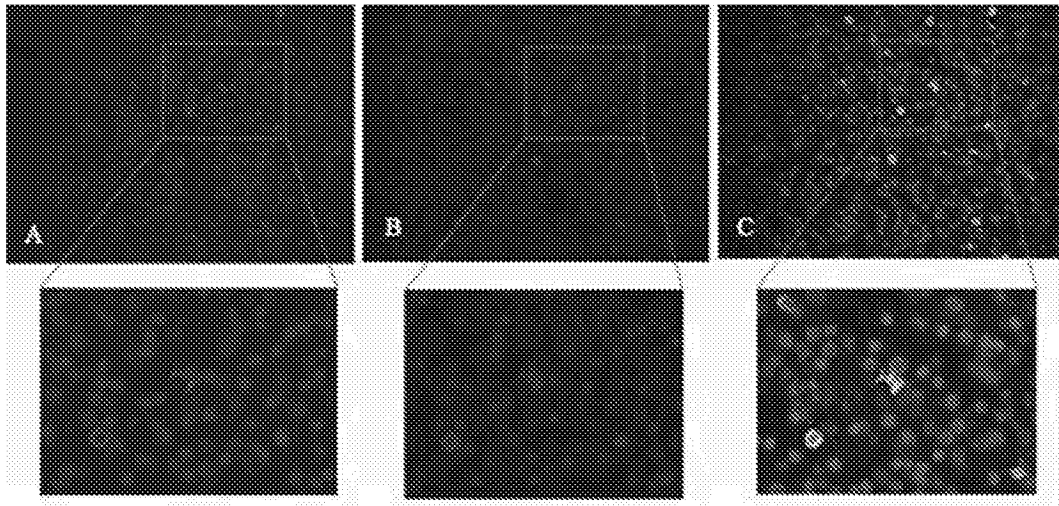


图3

专利名称(译)	一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断及试剂盒		
公开(公告)号	CN104237504B	公开(公告)日	2017-04-05
申请号	CN201410477793.6	申请日	2014-09-19
[标]申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
当前申请(专利权)人(译)	汕头大学医学院		
[标]发明人	苏敏 苏雪 王晓艳 刘茜 田东萍		
发明人	苏敏 苏雪 王晓艳 刘茜 田东萍		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N2800/24		
代理人(译)	余飞峰		
审查员(译)	李倩		
其他公开文献	CN104237504A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种病理尸检过敏性休克的免疫荧光诊断方法，通过免疫荧光双标技术对IgE与肥大细胞（MC）脱颗粒进行免疫荧光共定位；其试剂盒包括：与人类胰蛋白酶结合的第一重标记第一抗体，该第一抗体是特异性结合人类胰蛋白酶的鼠源性单克隆抗体；与人IgE结合的第二重标记第一抗体，该第一抗体是特异性结合人IgE的兔源性多克隆抗体；FITC以及Cy3标记的荧光二抗；抗原修复试剂；DAPI 细胞核染色剂及缓冲液系统等。该试剂盒有特异性好、灵敏度高、稳定、通用的特点。主要应用于病理学与法医病理学的鉴定中，能精准地提供过敏性休克直观的病理学依据。

