



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111024935 A

(43)申请公布日 2020.04.17

(21)申请号 201911371895.9

(22)申请日 2019.12.27

(71)申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市相城区济学路8号

(72)发明人 陈涛 黄玉洁 陶怡舟 任斐

(74)专利代理机构 苏州谨和知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 32295

代理人 唐静芳

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

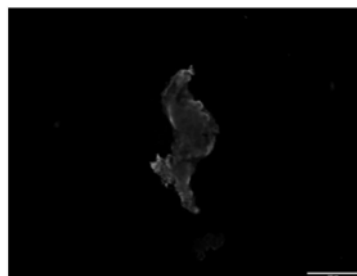
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法

(57)摘要

本发明公开了一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,包括以下步骤:S1、取干净载玻片用荧光记号笔画直径为1cm的圆圈,在圆圈中加入多聚甲醛,将载玻片放入湿盒中;S2、固定斑马鱼心脏;S3、洗涤;S4、封闭;S5、重复步骤S3;S6、加入一抗,4℃孵育过夜;S7、次日室温放置湿盒;S8、重复步骤S3;S9、加入二抗,室温避光孵育;S10、重复步骤S3;S11、在荧光显微镜或激光共聚焦下成像,拍照记录结果。本发明解决了整鱼做免疫荧光时心脏染不上色,PBST洗涤过程中心脏容易丢失,二抗体孵育后样本不能长期保存以及抗体用量大的问题,此方法操作简单、抗体用量少、封片后样本可保存两周,在显微镜下直接观察心脏个体,保证了实验的准确性。



1. 一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、取干净载玻片用荧光记号笔画直径为1cm的圆圈,在圆圈中加入50 μ l 4%多聚甲醛,将载玻片放入湿盒中;

S2、在显微镜下取斑马鱼心脏放入4%多聚甲醛中固定;

S3、洗涤;

S4、取50 μ l, 5%BSA加入载玻片圆圈中,放入湿盒中封闭;

S5、封闭后重复步骤S3;

S6、加入50 μ l PBST配置的一抗,将载玻片放进湿盒中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;

S7、次日室温放置湿盒,便于抗体结合;

S8、恢复至室温后重复步骤S3;

S9、加入50 μ l PBST配置的带有荧光标记物的二抗,室温避光孵育;

S10、在显微镜下重复步骤S3;

S11、加入20 μ l的荧光猝灭剂,将圆圈中的心脏在荧光显微镜或激光共聚焦下成像,拍照记录结果。

2. 如权利要求1所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,步骤S2所述的待测样品固定后在显微镜下吸弃4%多聚甲醛,室温干燥,使其完全贴在载玻片上,便于后续洗涤。

3. 如权利要求1所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,步骤S11所述的待测样品中加入的荧光猝灭剂为DAPI,然后于所述待测样品上盖上干净的盖玻片后,用密封剂封住盖玻片四周,待其干燥。

4. 如权利要求1所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,步骤S6所述的待测样品孵育过程不超过16小时。

5. 如权利要求1至4任一项所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,步骤S3所述洗涤过程包括待测样品干燥后在显微镜下加入50 μ lPBST,后吸弃。

6. 如权利要求1所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,所述一抗为8-OHdG antibody。

7. 如权利要求1所述的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,其特征在于,所述带有荧光标记物的二抗为FITC Goat Anti-mouse IgG。

一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术领域,具体涉及一种的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法。

背景技术

[0002] 斑马鱼身体延长而略呈纺锤形,头小而稍尖,吻较短,全身布满多条深蓝色纵纹似斑马,与银白色或金黄色纵纹相间排列纹路比较有条理。在水族箱内成群游动时犹如奔驰于非洲草原的斑马群,故此得斑马鱼之美称。斑马鱼和人类基因有着87%的高度相似性,作为模式生物的优势很突出,这意味着其实验结果大多数情况下适用于人体。常可用于水质环境的监测。同时斑马鱼也是一种常见的观赏鱼。斑马鱼的孵育与繁殖不仅能够带来较大的经济效益同时也具有不可忽略的生物医学研究价值。在斑马鱼的养殖过程中,心脏是最早形成并发挥功能的器官之一,为了准确地判断斑马鱼胚胎心脏发育早期的状态,提高斑马鱼的孵育质量,利用免疫荧光法对心脏中特异性表达物质进行检测,并制作成标本观察保存。

[0003] 而目前现有技术中存在的问题包括:整鱼做免疫荧光时,抗体很难结合到心脏部位,导致最后在荧光显微镜下心脏部位没有颜色,且抗体用量极大,极大增加实验成本;现有的技术将心脏取出固定后,在洗涤过程中由于心脏在PBST中有流动性,很容易丢失;二抗孵育结束洗涤后直接在荧光显微镜下成像,样本只能使用一次。

发明内容

[0004] 针对上述现有技术存在的不足,本发明的目的在于提供一种的斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,以此解决整鱼做免疫荧光时心脏染不上色,PBST洗涤过程中心脏容易丢失,第二抗体孵育后样本不能长期保存以及抗体使用量大的问题,此方法操作简单、抗体用量少、封片后样本可保存两周,在显微镜下直接观察心脏个体,保证了实验的准确性。

[0005] 为达到上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法,包括以下步骤:

[0007] S1、取干净载玻片用荧光记号笔画直径为1cm的圆圈,在圆圈中加入50 μ l 4%多聚甲醛,将载玻片放入湿盒中;

[0008] S2、在显微镜下取斑马鱼心脏放入4%多聚甲醛中固定;

[0009] S3、洗涤;

[0010] S4、取50 μ l, 5% BSA加入载玻片圆圈中,放入湿盒中封闭;

[0011] S5、封闭后重复步骤S3;

[0012] S6、加入50 μ l PBST配置的一抗,将载玻片放进湿盒中,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;

[0013] S7、次日室温放置湿盒,便于抗体结合;

[0014] S8、恢复至室温后重复步骤S3;

[0015] S9、加入50 μ l PBST配置的带有荧光标记物的二抗,室温避光孵育;

- [0016] S10、在显微镜下重复步骤S3；
- [0017] S11、加入20 μ l的荧光猝灭剂，将圆圈中的心脏在荧光显微镜或激光共聚焦下成像，拍照记录结果。
- [0018] 进一步地，步骤S2中的待测样品固定后在显微镜下吸弃4%多聚甲醛，室温干燥，使其完全贴在载玻片上，便于后续洗涤。
- [0019] 进一步地，步骤S11中的待测样品中加入的荧光猝灭剂为DAPI，然后于待测样品上盖上干净的盖玻片，用密封剂封住盖玻片四周，待其干燥。
- [0020] 进一步地，步骤S6中的待测样品孵育过程不超过16小时。
- [0021] 进一步地，步骤S3洗涤过程包括待测样品干燥后在显微镜下加入50 μ l PBST，再用10 μ l的移液枪吸弃。
- [0022] 进一步地，一抗选用8-OHdG antibody。
- [0023] 进一步地，带有荧光标记物的二抗选用FITC Goat Anti-mouse IgG。
- [0024] 本发明的有益效果在于：
- [0025] 1、在载玻片上用荧光记号画一圆圈，将取出的心脏局限于圆圈中可极大减少抗体使用量，同时保证心脏的准确性。
- [0026] 2、将心脏局限在圆圈中，进行干燥后贴于载玻片上，使得心脏在洗涤过程中不易丢失。
- [0027] 3、滴加DAPI进行封片，使得心脏样本可以在4 $^{\circ}$ C避光保存至少两周，极大地延长了样品的保存时间，便于观察记录，降低了制作成本。
- [0028] 上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以本发明的较佳实施例并配合附图详细说明如后。

附图说明

- [0029] 图1为本发明的斑马鱼胚胎心脏的荧光检测图。

具体实施方式

- [0030] 下面结合附图和实施例，对本发明的具体实施方式作进一步详细描述。以下实施例用于说明本发明，但不用来限制本发明的范围。
- [0031] 本发明中用于配置多聚甲醛溶液的多聚甲醛原液、PBST购自Sigma-Aldrich, BSA、8-OHdG antibody、FITC Goat Anti-mouse IgG、DAPI购自Abcam, 荧光显微镜IX73购自OLYMPUS。
- [0032] 一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法，具体步骤如下：
- [0033] 1、取干净载玻片用荧光记号笔画直径为1cm的圆圈，在圆圈中加入50 μ l 4%多聚甲醛，将载玻片放入湿盒中；
- [0034] 2、在显微镜下取斑马鱼心脏放入4%多聚甲醛中，固定20分钟；
- [0035] 3、固定后在显微镜下吸弃4%多聚甲醛，室温干燥斑马鱼心脏，使心脏完全贴在载玻片上，便于后续洗涤；
- [0036] 4、心脏干燥后在显微镜下加入50 μ l PBST，再用10 μ l的移液枪吸弃，洗涤3次；
- [0037] 5、取50 μ l, 5%BSA加入载玻片圆圈中，放入湿盒中封闭1小时；

[0038] 6、封闭后重复步骤4；

[0039] 7、加入50 μ l PBST配置的一抗(8-OHdG antibody),将载玻片小心放进湿盒中,将湿盒放入4 $^{\circ}$ C冰箱孵育过夜(不超过16小时)；

[0040] 8、第二天早上从4 $^{\circ}$ C冰箱中取出湿盒,室温放置1小时,便于抗体结合；

[0041] 9、恢复至室温后重复步骤4；

[0042] 10、加入50 μ l PBST配置的带有荧光标记物的二抗(FITC Goat Anti-mouse IgG),室温避光孵育1小时；

[0043] 11、在显微镜下重复步骤4；

[0044] 12、洗涤后弃掉PBST,在圆圈中加入20 μ l DAPI,盖上干净的盖玻片,用指甲油封住盖玻片四周；

[0045] 13、指甲油干燥后,将圆圈中的心脏在荧光显微镜下成像,拍照记录结果。

[0046] 8-OHdG在心脏胚胎的细胞核与细胞质中进行表达,由此通过蓝光激发绿色的荧光标记物标记出斑马鱼心脏胚胎细胞核与细胞质的位置,从而精准定位检测出心脏胚胎的形貌,从图1可以看出待测样品荧光信号轮廓流畅清晰,说明检测特异性较好,无交叉反应。

[0047] 本发明提供的荧光标记法

[0048] 1、将斑马鱼心脏取出后再做免疫荧光,与整鱼做免疫荧光相比较,保证了实验结果的准确性和精确性；

[0049] 2、由于全程在载玻片上操作,且在载玻片上用荧光记号画一圆圈,是的抗体使用量极少,减少实验成本；

[0050] 3、最后使用封片的步骤,使得心脏样本可以在4 $^{\circ}$ C避光保存至少两周；

[0051] 4、将心脏局限在圆圈中,并进行干燥后贴于载玻片上,使得心脏在洗涤过程中不易丢失；

[0052] 5、所取的心脏个数增加,防止后期部分心脏在洗涤过程中被不小心弃掉。

[0053] 6、操作简单、抗体用量少、封片后样本保存时间延长,对斑马鱼的孵育繁殖与生物医学研究有着重要的意义。

[0054] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0055] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

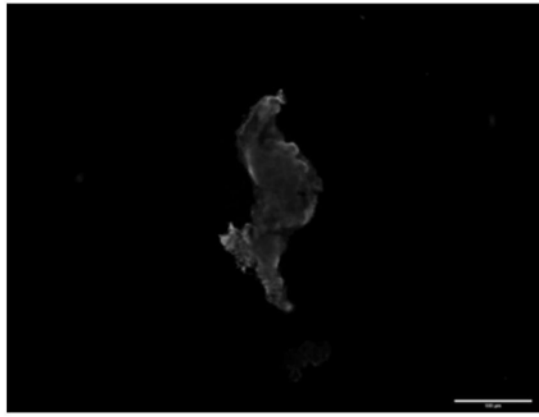


图1

专利名称(译)	一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法		
公开(公告)号	CN111024935A	公开(公告)日	2020-04-17
申请号	CN2019111371895.9	申请日	2019-12-27
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	陈涛 黄玉洁 任斐		
发明人	陈涛 黄玉洁 陶怡舟 任斐		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56966		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种斑马鱼胚胎心脏免疫荧光标记法，其特征在于，包括以下步骤：S1、取干净载玻片用荧光记号笔画直径为1cm的圆圈，在圆圈中加入多聚甲醛，将载玻片放入湿盒中；S2、固定斑马鱼心脏；S3、洗涤；S4、封闭；S5、重复步骤S3；S6、加入一抗，4℃孵育过夜；S7、次日室温放置湿盒；S8、重复步骤S3；S9、加入二抗，室温避光孵育；S10、重复步骤S3；S11、在荧光显微镜或激光共聚焦下成像，拍照记录结果。本发明解决了整鱼做免疫荧光时心脏染不上色，PBST洗涤过程中心脏容易丢失，二抗体孵育后样本不能长期保存以及抗体使用量大的问题，此方法操作简单、抗体用量少、封片后样本可保存两周，在显微镜下直接观察心脏个体，保证了实验的准确性。

