

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510131958.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

A61K 38/10 (2006.01)

A61K 38/16 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1987465A

[51] Int. Cl. (续)

A61P 31/00 (2006.01)

[22] 申请日 2005.12.22

[21] 申请号 200510131958.5

[71] 申请人 马子敏

地址 100842 北京市海淀区复兴路22号13楼6门1号

[72] 发明人 马子敏

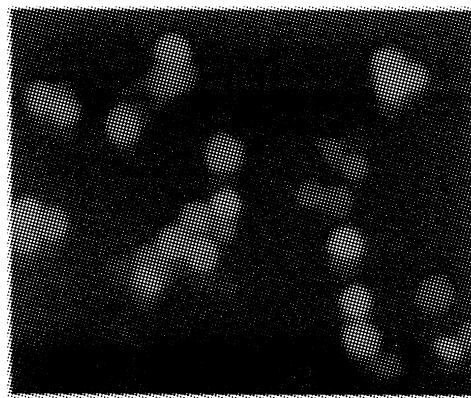
权利要求书1页 说明书2页 附图1页

[54] 发明名称

一种免疫荧光组化方法

[57] 摘要

本发明涉及一种在活细胞上进行免疫荧光染色的方法。特征在于使用一种连接肽帮助抗体分子进入活细胞内，进行针对活细胞、组织的免疫组织化学、基因组学、转录组学、糖组学以及蛋白质组学等研究。与传统免疫组化方法相比，本发明方法操作简单，不需要破坏细胞结构。



1. 一种在活细胞上进行免疫荧光染色的方法，其特征在于，使用一种连接肽帮助外源性抗体分子进入活细胞内。

2. 根据权利要求1所述的，该连接肽的一级结构如下：



3. 根据权利要求2所述的，连接肽一级结构也包括以下变化，N端的前3个氨基酸可以被G, H, A, K, R, M替换，C端的半胱氨酸可以被胱氨酸替换，n是小于28的正整数。

4. 根据权利要求1所述的，该方法可以用于针对活细胞、组织的免疫组织化学、基因组学、转录组学、糖组学以及蛋白质组学等研究，以及另一个潜在的用途是还可能被用于肿瘤、一些传染性疾病的治疗，以替代胞内抗体的作用。

一种免疫荧光组化方法

技术领域：

本发明涉及一种在活细胞上进行荧光免疫组化染色的方法。该方法可应用于研究活细胞内蛋白质相互作用等过程。

背景技术：

在生物医学研究中，荧光免疫组织化学方法是比较普遍采用的技术手段。其原理是利用抗原与抗体特异性结合的原理，同时利用标记在抗体上的荧光物质显色来确定组织、细胞内多肽或蛋白质抗原在定位、定性及定量方面的信息。

在常规免疫组织化学操作中，通常需要将细胞或组织用多聚甲醛或戊二醛等固定，并将细胞膜打孔以利于随后的抗原抗体进入细胞内。所以细胞在显色过程中膜结构受到破坏，结局是细胞是死亡了。另外，在石蜡切片标本处理时均用甲醛固定，这样就使得细胞内抗原形成醛键、羧甲键，部分抗原决定簇遭到封闭，同时蛋白之间发生交联而使抗原决定簇隐蔽。所以要求在进行染色时，需要先进行抗原修复或暴露，即将固定时分子之间所形成的交联破坏，而恢复抗原的原有空间形态。所以现在采用的免疫组织化学方法得到的信息并不能实时、真实地反映活细胞的功能本质，而是需要进一步推理。

通过免疫组化技术得到细胞或组织内分子性质、定位、定量等参数方面的结果，进一步对所研究的多个参数以及之间的联系进行综合分析、推理得到规律性的知识。目前大家使用的免疫组化方法基本上是针对单时间点上分析的方法，如果要对多个时间点进行分析，就需要设计一组或多组的实验分组，这样的工作量是很大的。除非发展一种可以用于分析活细胞的免疫组化方法。这样才会有可能去观察活的细胞内抗原抗体之间按照时间序列发生的相互作用的过程。但是目前使用的胞内表达抗体的方法在实际应用上很不容易操作。

发明内容:

本发明提出了一种在活细胞上进行免疫组化荧光分析的方法,希望能用于研究活细胞内的蛋白质相互作用等过程。本发明所述方法的另一个潜在的用途是还可能被用于肿瘤、一些传染性疾病的治疗。

本发明的有益效果是:

1) 与传统免疫组化方法相比,直接向细胞内引入外源性商业化抗体,所以操作更简单; 2) 不需要破坏细胞结构; 3) 也可以用功能性单抗封闭胞内蛋白质表位后,来观察细胞功能的变化,所以也可以用于功能蛋白质组学的研究。

附图说明:

附图 1 对活的PC12细胞进行免疫荧光染色

用 FITC 荧光标记的兔抗鼠 β -actin 单抗观察 PC12 细胞内染色情况,具体实施方式结合实施方法举例来说明。

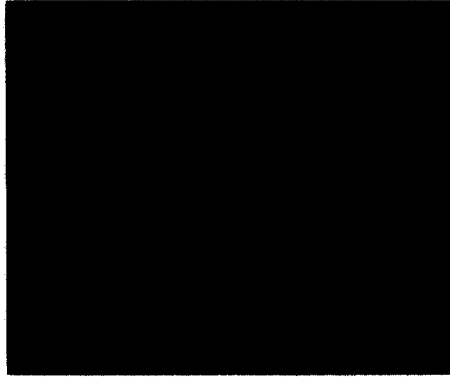
实施方法举例:

PC12 活细胞胞内 β -actin 的免疫荧光染色:

1. 参照分子克隆的方法或多肽合成的方法合成以下序列的连接多肽(Link-Peptide, LP)备用:



2. 取 200 微克 FITC 荧光标记的兔抗鼠 β -actin 单抗,溶于 100 微升 PBS (pH6.6),加入 10 微升马来酸亚胺,室温反应 20 分钟;
3. 用微量超滤器(分子截留量 10000 道尔顿)离心去除溶剂;
4. 用 50 微升 PBS, pH6.6 复溶后加入 5 微升 LP 肽,混合后室温、避光反应 2 小时;
5. 加入 5 微升 N-乙酰马来酸亚胺终止反应;
6. 用微量超滤器离心去除溶剂;
7. 用 50 微升 PBS (pH6.6) 复溶后作为免疫显色液置于 4°C 备用;
8. 具体使用时,取 1 皿常规培养的 PC12 细胞,弃去培养基,用 PBS (pH7.4) 1 毫升冲洗 1 次;
9. 加入 0.5 毫升 PBS (pH7.4, 含 1 克/升葡萄糖),加入 10 微升免疫显色液,在荧光显微镜下观察,结果见附图 1。



附图 1

专利名称(译)	一种免疫荧光组化方法		
公开(公告)号	CN1987465A	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200510131958.5	申请日	2005-12-22
[标]申请(专利权)人(译)	马子敏		
申请(专利权)人(译)	马子敏		
当前申请(专利权)人(译)	马子敏		
[标]发明人	马子敏		
发明人	马子敏		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/52 G01N1/30 A61K38/10 A61K38/16 A61P35/00 A61P31/00		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种在活细胞上进行免疫荧光染色的方法。特征在于使用一种连接肽帮助抗体分子进入活细胞内，进行针对活细胞、组织的免疫组织化学、基因组学、转录组学、糖组学以及蛋白质组学等研究。与传统免疫组化方法相比，本发明方法操作简单，不需要破坏细胞结构。

