

[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 200610053641.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

[43] 公开日 2007年4月11日

[11] 公开号 CN 1945333A

[22] 申请日 2006.9.28

[21] 申请号 200610053641.9

[71] 申请人 孙爱静

地址 312000 浙江省绍兴市龙洲花园 46 幢  
602 室

[72] 发明人 苏晶石 孙爱静 田景琦

[74] 专利代理机构 绍兴市越兴专利事务所

代理人 方剑宏

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 1 页

[54] 发明名称

乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂及其检测方法

[57] 摘要

本发明公开了一种乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂及应用该试剂的检测方法, 通过将直接标记的可将转移癌细胞与淋巴结固有细胞区别开来的多种抗体混合成试剂, 经一步反应, 特异性使淋巴结中的转移癌细胞着色。本发明用于早期乳腺癌前哨淋巴结转移快速病理诊断, 旨在提高前哨淋巴结转移癌诊断的灵敏度、准确度, 推动乳腺癌前哨淋巴结快速病理检查的广泛应用, 为早期乳腺癌制定手术方案提供依据。以此解决由于常规病理检查手段灵敏度低、特异性差、操作繁琐, 带来冰冻活检假阴性率高, 制约前哨淋巴结临床应用的问题。

1. 一种乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述试剂通过 HRP 或荧光色素标记抗体，制备抗体-HRP 或抗体-荧光色素标记复合物，通过效价测定，混合标记抗体配置而成。

2. 根据权利要求 1 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述抗体为具有乳腺癌细胞表达而淋巴结组织固有细胞不表达的阳性检测抗体。

3. 根据权利要求 2 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述阳性检测抗体包括细胞角蛋白、上皮标记、粘蛋白、乳腺癌相关蛋白等。

4. 根据权利要求 1 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述抗体为具有转移癌周围增生窦内皮细胞、组织细胞和淋巴细胞表达而乳腺癌细胞不表达的阴性对照抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述阴性对照抗体为淋巴管标记、血管标记、组织细胞标记、淋巴细胞标记等。

6. 根据权利要求 1 或 3 或 5 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，其特征在于：所述制成的抗体-HRP/荧光色素标记复合物有用抗 CK19 抗体-HRP/荧光色素、抗 EMA 抗体-HRP/荧光色素、抗 MUC1 抗体-HRP/荧光色素和抗 mammaglobin 抗体-HRP/荧光色素混合调制成阳性检测试剂；用抗 VEGFR-3 抗体-HRP/荧光色素、抗 CD31 抗体-HRP/荧光色素、抗 CD68 抗体-HRP/荧光色素和抗 LCA 抗体-HRP/

荧光色素混合调制成阴性对照试剂。

7. 根据权利要求 1 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂, 其特征在于: 所述的 HRP 与抗体偶联体系中加入葡聚糖形成抗体-葡聚糖-HRP 标记复合物。

8. 一种应用权利要求 1 所述试剂的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测方法, 包括以下步骤:

(1) 切片制备(恒温冷冻切片法): 选取患者手术中切除的新鲜引流淋巴结冰冻切片, 贴附在多聚赖氨酸和/或树脂粘附剂涂被的载玻片上用丙酮、甲醇、乙醇、乙醚、醋酸及其各种混合固定剂固定、冲洗;

(2) 免疫组化染色: 运用免疫组化试剂对切片进行染色, 低档微波辐射、孵育后用磷酸缓冲液。冲洗、滴加显色试剂、自来水冲洗、苏木精复染细胞核, 水洗, 封固。荧光色素标记时, 抗体孵育冲洗后, 滴加二脒基二苯基吡啶/碘化丙啶, 直接封片;

(3) 显微镜检查/荧光镜检, 得出染色检测结果。

9. 根据权利要求 8 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测方法, 其特征在于: 所述显色试剂包括由 0.3% 过氧化氢水溶液组成发色氧化反应试剂, 发色剂选用 3,3'-二氨基联苯胺, 显色缓冲液选用 0.005Mol 的三羟甲基氨基甲烷盐酸。

10. 根据权利要求 8 所述的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测方法, 其特征在于: 所述多种抗体在同一切片同一时间同时反应, 切片厚度为 4-8  $\mu\text{m}$ 。

## 乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂及其检测方法

### 技术领域

本发明涉及一种用于乳腺癌淋巴结检测用试剂，特别是指乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂，本发明还涉及免疫组化检测方法，应用于早期乳腺癌淋巴结快速病理诊断。

### 背景技术

乳腺癌淋巴结清扫是以往乳腺外科必不可少的治疗原则。近年来，随着乳腺疾病普查和诊断技术的进步，早期乳腺癌的发现率不断提高。因为早期乳腺癌的大部分并无腋窝淋巴结转移，若一律施行腋窝淋巴结清扫，无腋窝淋巴结转移的患者非但不能从中获益反而造成不必要的损害。因此，准确预测腋窝淋巴结转移的有无对为早期乳腺癌患者制定治疗方案极为重要。通过临床查体，影像学及肿瘤标志物等方法均不能准确预测早期乳腺癌患者腋窝淋巴结转移的有无，而前哨淋巴结（sentinel lymph node, SLN）检查可为这部分患者提供有益的帮助。

前哨淋巴结是接受肿瘤淋巴引流的第一个淋巴结，通过检查乳腺癌 SLN 来推断腋窝淋巴结有无转移是以最小创伤来获取乳腺癌淋巴结转移资料最有效的方法，避免不必要的腋窝淋巴结清扫。SLN 是 Cabanes 于 1977 年在睾丸癌研究中提出的，20 世纪 90 年代初 Giuliano 等用于乳腺癌研究。通过十余年的探索，目前临床上对乳腺癌 SLN 的定位和检测技术日趋完善，大量的研究证实了其可行性和准确性。一些国家正在进

行大规模的临床实验,如美国称为 ACSOGZ0010 的计划对 T<sub>1</sub> 或 T<sub>2</sub>N<sub>0</sub>M<sub>0</sub> 乳腺癌, SLN 阴性患者不做腋窝淋巴结清扫, SLN 阳性则进入 Z0011 试验或做腋窝淋巴结清扫。Z0011 试验对 SLN 阳性患者随机做腋窝淋巴结清扫或不做。而命名为 NSABP-32 的研究计划则是将 SLN 阳性患者做腋窝淋巴结清扫, 阴性患者随机做或不做, 已经得出初步肯定结果。国内已有多家单位将 SLN 应用于临床。费用/效益分析结果显示, 前哨淋巴结活检(sentinel lymph node biopsy, SLNB)提高了疗效, 降低了费用; 危险/效益分析结果显示, SLNB 减少了手术并发症, 保持了患者上肢功能, 提高了生活质量。Beechey 将 SLNB 称之为乳腺癌外科治疗中的一次革命。

SLN 的实际应用与研究大多局限于 SLNB, 由于目前还缺乏 SLN 病理学检测的统一标准, 加上存在病理检测的灵敏度和准确度问题, 检测 SLNB 的微转移灶相当困难, 常规检测假阴性率高达 20-30%。其原因主要有两点: 一是切片时没有切到微转移灶所在部位, 二是微转移灶周围往往伴有窦内皮细胞和组织细胞增生, 单纯形态学上难以判定。针对前者目前普遍建议做多组织平面检查, 而对后者则建议作免疫组化染色。常用的免疫标记有: 上皮类标记抗体 CK19、CK(AE1/AE3)、CK20、EMA、MUC1, 另外, 近年来克隆的人乳腺球蛋白以其对乳腺癌的高度敏感性和特异性得到了广泛关注。这些抗原或具有上皮细胞特性或具有乳腺癌特异性, 在乳腺癌细胞表达而淋巴结固有细胞则无相关表达, 因此被广泛用于淋巴结微小转移的诊断。

由于肿瘤在发生发展以及转移过程中, 会出现不同性质的分化,

使得瘤细胞的免疫标记呈现多样性。在一张切片上针对某种抗体有的细胞出现阳性反应，而有的细胞则为阴性，所以肿瘤的免疫组化染色阳性结果的判断标准一般定为着色肿瘤细胞超过肿瘤细胞总数的5%-20%，显然，对于只有少数肿瘤转移灶或微转移灶甚至单个肿瘤细胞，这个判断标准极不适用，应用单一抗体容易出现漏诊。

迄今为止，应用各种上皮细胞特性或乳腺癌特异性抗体检测SLNB标本的研究报告很多，所有的报告都证实了应用免疫组化染色可以提高检测的敏感度。Marchetti等在mRNA水平检测包括CEA、CK19、C-Met、hMAM (Mammaglobin)、MUC1、beta1->GalNAc-T和p97在内的7种乳腺癌标志物在乳腺癌引流淋巴结中的表达，证实了各抗体之间表达差异及组织学未能检出的微转移灶的存在。目前还缺乏SLN病理学检测的金标准，加上所用的抗体及病理标本的不同，难以对这些报告的一致性和灵敏度做出恰当的比较和评价。多组织平面HE染色联合应用多种抗体进行免疫组化染色，是病理学上检测SLN有无转移最敏感的方法。

对于多种抗体联合应用的免疫组化染色，传统上有如下两种方法，一是做连续切片，在不同的切片上滴加不同的抗体，该方法的最大缺点是每张切片只能反映一种抗原表达的信息，工作量庞大，信号强弱的差异、阳性标准、结果的对比分析等很难掌握；二是双重、多重免疫染色，既在同一张切片上按顺序完成一个抗体的免疫组化染色后再进行第二种，第三种染色，该方法的缺点是操作繁琐费时，一套染色至少需要数小时才能完成。

SLN 更有意义的临床应用在于术中快速冰冻活检，SLN 的快速冰冻活检诊断要求主要有两点，一是准确定性判断转移的有无，二是快速（20 分钟内）。显然，传统的免疫组化染色系统繁琐费时不适用术中快速诊断标本，目前，由于缺乏灵敏度高、特异性强、简便易行的病理检查手段，冰冻活检假阴性率高这一问题制约着 SLN 的临床应用。寻找敏感性和特异性均好，同时又简便快速的免疫组化染色试剂是 SLN 研究急需解决的重点问题之一。

### 发明内容

本方法的目的是克服了现有技术中的不足，提供了一种用于冰冻切片的免疫组化检测的试剂及操作简单易行的检测方法。利用该试剂，使染色过程变的简单快速，前哨淋巴结病理检测的灵敏度高，特异性强、简便、快速，能在 15-20 分钟内作出判断。

为了解决上述技术问题，本发明是通过以下方法来实现的：所述试剂通过辣根过氧化物酶（简称为 HRP）或荧光色素标记抗体，制备抗体-HRP 或抗体-荧光色素标记复合物，通过效价测定，混合标记抗体配置而成。

所述抗体是指具有乳腺癌细胞表达而淋巴结组织固有细胞不表达的阳性检测抗体或具有转移癌周围增生窦内皮细胞、组织细胞和淋巴细胞表达而乳腺癌细胞不表达的阴性对照抗体。

上述阳性检测抗体指细胞角蛋白（如 CK19）、上皮标记（如 EMA）、粘蛋白（如 MUC1）、乳腺癌相关蛋白（mammaglobin）等。

上述阴性对照抗体为淋巴管标记（如 VEGFR-3）、血管标记（如

CD31)、组织细胞标记(如 CD68)、淋巴细胞标记(LCA)等。

所述荧光色素可为异硫氰酸荧光黄-FITC、四甲基异硫氰酸罗丹明-tetramethylrhodamineisothiocyanate, TRITC 及四乙基罗丹明-rhodamine, RIB200 的任意一种。

所制成的抗体-HRP/荧光色素标记复合物有用抗 CK19 抗体-HRP/荧光色素、抗 EMA 抗体-HRP/荧光色素、抗 MUC1 抗体-HRP/荧光色素和抗 mammaglobin 抗体-HRP/荧光色素混合调制成阳性检测试剂;用抗 VEGFR-3 抗体-HRP/荧光色素、抗 CD31 抗体-HRP/荧光色素、抗 CD68 抗体-HRP/荧光色素和抗 LCA 抗体-HRP/荧光色素混合调制成阴性对照试剂。

优选在辣根过氧化物酶(HRP)与抗体偶联体系中加入葡聚糖(dextoran)形成抗体-葡聚糖-HRP 标记复合物。

所述的效价测定主要指通过 ELISA 方法检测标记抗体的工作浓度,将各抗体混合,使混合物中的各种抗体的最终浓度为测定的工作浓度。

所述乳腺癌手术中切除淋巴结为前哨淋巴结或腋窝淋巴结。

本发明的另外一个目的在于提供一种应用上了述试剂的乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测方法,包括以下步骤:

(1)切片制备:(恒温冷冻切片法):选取患者手术中切除的新鲜引流淋巴结(前哨淋巴结、腋窝淋巴结等)去除淋巴结组织周围脂肪,置恒温冷冻切片机载物台上,OCT包埋、-20℃冷冻1-2分钟;切4-8 $\mu$ m厚切片2张,贴附在多聚赖氨酸和/或树脂粘附剂涂被的

载玻片上；置丙酮、甲醇、己醇、己醚、醋酸及其各种混合固定剂固定，PBS 冲洗。

(2) 应用试剂染色：分别滴加阳性检测用和阴性对照用试剂于所述切片上；低档微波辐射 10-20 秒、间歇 5-15 秒，共两次；36℃-38℃ 孵育，2-5 分，PBS 冲洗；滴加 DAB 显色试剂，1-3 分，自来水冲洗；苏木精复染细胞核 1-3 分，水洗，封固；荧光色素标记时，抗体孵育冲洗后，滴加二脒基二苯基吲哚/碘化丙啶 (DAPI)，直接封片。

(3) 显微镜检查/荧光镜检, 得出染色检测结果。

所述显色试剂中的发色氧化反应试剂由 0.3% 过氧化氢水溶液组成，发色剂选用 3,3'-二氨基联苯胺 (DAB)，显色缓冲液选用 0.005Mol 的三羟甲基氨基甲烷盐酸 (Tris-Hcl)。

所述多种抗体在同一切片同一时间同时反应，切片厚度为 4-8 μm。

所述试剂应用后显微镜下观察结果判断依据是：应用阳性检测用抗体染色，可检测出细胞膜/细胞浆着色/发光的淋巴窦内单个或小灶性细胞团（微转移<2mm）；连续切片的阴性对照用抗体染色，可检测出淋巴结固有淋巴细胞周围增生窦内皮细胞及组织细胞，而转移癌不着色。

所述试剂应用后荧光镜检观察结果判断依据是：阳性检测用抗体（着）染色效果为癌细胞发光，即检测出细胞膜/细胞浆着色的淋巴窦内单个或小灶性细胞团（微转移<2mm）；阴性对照用抗体（着）染

色效果为癌细胞处出现发光缺失，可检测出淋巴结固有淋巴细胞周围增生窦内皮细胞及组织细胞，但转移癌细胞不着色。

所述阳性检测用抗体着色效果为癌细胞着色/发光，阴性对照用抗体着色效果为癌细胞处出现着色缺失/发光缺失。

本发明主要通过淋巴结转移癌细胞反应阳性而淋巴结固有细胞无反应的一系列抗体，对多病例大样本实施免疫组化染色，借助不同抗体对不同癌细胞集团的标记互补与重叠，筛选出可使所有淋巴结转移癌细胞得到清晰标记的一组抗体。主要包括以下步骤：

(1) 对 HE 染色证实有淋巴结转移的标本进行连续切片的免疫组化染色，筛选联合应用可令几乎所有转移癌细胞特异性着色的一组抗体，将多种抗体混合，借助其互补与重叠作用，防止单一抗体可能出现的假阴性、增强可视性及敏感性。

(2) 直接标记一组抗体，制备抗体-HRP/荧光色素标记结合物，建立一步免疫组化染色法，应用葡聚糖偶联技术直接标记第一抗体，制备抗体-葡聚糖-HRP 标记复合物，这样将一抗和检测系统结合为一种试剂，可避免传统检测系统带来的交叉反应，大幅度减少操作步骤并缩短染色时间。

(3) 调制让乳腺癌淋巴结转移灶几乎所有癌细胞都有反应的试剂。

(4) 应用于冰冻切片，一步免疫组化染色法。

抗体种类和性质：

1、CK19: 上皮组织中的主要中间丝，介于管腔上皮和基底上皮之

间的中间型上皮细胞标志物，细胞浆阳性着色，主要用于转移性腺癌的鉴别诊断。

2、EMA：是一组糖蛋白，广泛分布在各种正常上皮细胞膜及其肿瘤中，分布范围与细胞角蛋白相似，但对内脏腺上皮的表达优于细胞角蛋白。因此对上皮源性肿瘤，尤其是低分化腺癌，与细胞角蛋白联合应用，可提高阳性率。细胞膜/浆阳性着色。

3、MUC1：一种高分子糖蛋白，在上皮细胞中有特异性表达。胞膜/浆阳性着色。

4、mammaglobin：1990年从乳腺癌上皮细胞克隆出的一个乳腺癌相关蛋白为目前公认乳腺癌敏感且特异的标志物。细胞浆阳性着色。

5、CD31：(PECAM-1)是140kDa的细胞膜表面单链糖蛋白，主要表达于血小板、单核细胞、粒细胞、B淋巴细胞和内皮细胞。该试剂盒中用于与反应性增生窦内皮细胞的鉴别诊断。

6、CD68：(PGM1)是一种分子量110kDa的糖蛋白，为一种较好的组织细胞及单核细胞（包括浆样单核细胞）及其肿瘤细胞的标记。细胞浆内颗粒状阳性着色。

7、LCA：白细胞共同抗原，位于白细胞表面，包括T，B淋巴细胞、多形核白细胞、单核细胞等，主要用未分化/低分化小细胞癌，小圆细胞肉瘤的鉴别诊断。

8、VEGFR-3：血管内皮细胞生长因子受体3，淋巴管内皮细胞胞浆着色，为淋巴管内皮细胞标志物，主要用于新生淋巴管和血管的鉴别。

由于采用上述冰冻切片的免疫组化检测试剂及操作简单易行的检测方法。本发明的优点是：1. 应用于早期乳腺癌前哨淋巴结快速病理诊断，大幅度提高诊断的灵敏度、准确度和检出率，使乳腺癌前哨淋巴结快速病理检查的广泛应用成为可能，为早期乳腺癌制定手术方案提供最有力的依据；2. 简便、快速、特异性强，着色清晰，可视性强，15-20 分钟内可作出判断；3. 可用于手术中标本的冰冻切片；4. 检测 SLN 的微转移灶，是专用于乳腺癌淋巴结冰冻标本检测的体外诊断，可使整个检测过程操作简便易行，降低假阴性率，与常规方法相比具有染色步骤少、切片数少，处理时间短，信号清晰，成本低的优点，为早期乳腺癌手术过程中迅速准确地诊断 SLN 有无转移提供强有力的手段，同时，最大限度地减少无淋巴结转移早期乳腺癌患者的“过度治疗”；5. 此法具有价格低廉、覆盖面广的特点，容易普及推广应用。

以下结合附图和具体实施例对本发明作进一步描述：

### 附图说明

图 1 是本发明中阳性检测用抗体在显微镜下的着色效果图；

图 2 是本发明中阴性对照用抗体在显微镜下的着色效果图。

### 具体实施方式

[实施例 1]材料：①阳性标记 CK19, EMA, MUC1, mammaglobin 抗体；②阴性对照标记 VEGFR-3, CD31, CD68 抗体、LCA 抗体；③辣根过氧化物酶 (HRP)；④葡聚糖 (Dextran)；⑤发色氧化反应试剂 (0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)；⑥发色剂 (3,3-二氨基联苯胺, DAB)；⑦显色缓冲液 (0.005Mol

Tris-Hcl)。

先通过 ELISA 法测定抗体的工作浓度。

具体方法:先将抗体用 0.05M PH=9.6 包被缓冲液稀释为  $10\ \mu\text{g/ml}$  左右,于聚苯乙烯板孔内加 0.1ml,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜,次日以洗涤缓冲液洗涤 3 次。酶标记抗体用 1%BSA-PBS 液依次稀释成 1:100, 1:200, 1:400, 1:800, 1:1600……, 分别加入反应孔, 每个稀释度二孔, 每孔 0.1ml,  $37^{\circ}\text{C}$  孵育 1 小时后洗涤。然后加底物液, 每孔 0.1ml,  $37^{\circ}\text{C}$  10-30 分钟。以  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$  0.05ml 终止反应。结果判断主要以 ELISA 比色仪读取各孔 OD 值。并以 OD 为纵坐标, 结合物为横坐标, 绘制滴定曲线, 由曲线上查得 OD 值为 1.0 左右, 且曲线斜率最大时的酶标抗体稀释度, 即为该标记物的工作浓度。

通过辣根过氧化物酶 (HRP), 用葡聚糖 (dextoran) 与抗体偶联制备抗体 (-葡聚糖)-HRP 标记结合物, (用标记物辣根过氧化物酶 (HRP) 标记抗体, 葡聚糖放大标记信号) 制备阳性试剂、阴性试剂。

切片制备: (恒温冷冻切片法): 选取乳腺癌手术中切除的新鲜引流淋巴结 (前哨淋巴结、腋窝淋巴结等) 去处淋巴结组织周围脂肪, 置恒温冷冻切片机载物台上, OCT 包埋、 $-20^{\circ}\text{C}$  冷冻 2 分钟; 切  $4\ \mu\text{m}$  厚切片 2 张, 贴附在多聚赖氨酸和/或树脂粘附剂涂被的载玻片上; 置 (丙酮/丙酮) 固定液中固定, PBS 冲洗。

应用试剂盒染色: 分别滴加阳性检测用和阴性对照用试剂于所述切片上; 低档微波辐射 15 秒、间歇 15 秒, 共两次;  $37^{\circ}\text{C}$  孵育, 3 分,

PBS 冲洗；滴加 DAB 显色剂，2 分，自来水冲洗；苏木精复染细胞核 2 分，水洗，封固。

显微镜检查：

参照图 1 所示，阳性检测用抗体（着）染色效果为癌细胞着色，即可检测出细胞膜/细胞浆着色的淋巴窦内单个或小灶性细胞团（微转移 $<2\text{mm}$ ）；参照图 2 所示，阴性对照用抗体（着）染色效果为癌细胞处出现着色缺失，可检测出淋巴结固有淋巴细胞周围增生窦内皮细胞及组织细胞，但转移癌细胞不着色。

[实施例 2] 材料：①阳性标记 CK19, EMA, MUC1, mammaglobin 抗体；②阴性对照标记 VEGFR-3, CD31, CD68 抗体、LCA 抗体；③荧光色素；④葡聚糖（Dextran）；⑤发色氧化反应试剂（0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ）；⑥发色剂（3,3'-二氨基联苯胺，DAB）；⑦显色缓冲液（0.005Mol Tris-HCl）。

先通过 ELISA 法测定抗体的工作浓度。

具体方法：先将抗体用 0.05M PH=9.6 包被缓冲液稀释为  $10\ \mu\text{g/ml}$  左右，于聚苯乙烯板孔内加 0.1ml， $4^\circ\text{C}$  过夜，次日以洗涤缓冲液洗涤 3 次。酶标记抗体用 1%BSA-PBS 液依次稀释成 1: 100, 1: 200, 1: 400, 1: 800, 1: 1600……，分别加入反应孔，每个稀释度二孔，每孔 0.1ml， $37^\circ\text{C}$  孵育 1 小时后洗涤。然后加底物液，每孔 0.1ml， $37^\circ\text{C}$  10-30 分钟。以  $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ , 0.05ml 终止反应。结果判断主要以 ELISA 比色仪读取各孔 OD 值。并以 OD 为纵坐标，结合物为横坐标，绘制滴

定曲线，由曲线上查得 OD 值为 1.0 左右，且曲线斜率最大时的酶标抗体稀释度，即为该标记物的工作浓度。

通过荧光色素标记抗体制备抗体-荧光色素标记结合物，制备阳性试剂、阴性试剂。

切片制备：（恒温冷冻切片法）：选取乳腺癌手术中切除的新鲜引流淋巴结（前哨淋巴结、腋窝淋巴结等）去处淋巴结组织周围脂肪，置恒温冷冻切片载物台上，OCT 包埋、-20℃冷冻 1 分钟；切 5 μm 厚切片 2 张，贴附在多聚赖氨酸和/或树脂粘附剂涂被的载玻片上；置（丙酮/丙酮）固定液中固定，PBS 冲洗。

应用试剂盒染色：分别滴加阳性检测用和阴性对照用试剂于所述切片上；低档微波辐射 10 秒、间歇 12 秒，共两次；38℃孵育，4 分，PBS 冲洗；滴加二脒基二苯基吲哚/碘化丙啶（DAPI），直接封片。

荧光镜检：

参照图 1 所示，阳性检测用抗体（着）染色效果为癌细胞发光，即检测出细胞膜/细胞浆着色的淋巴窦内单个或小灶性细胞团（微转移<2mm）；参照图 2 所示，阴性对照用抗体（着）染色效果为癌细胞处出现发光缺失，可检测出淋巴结固有淋巴细胞周围增生窦内皮细胞及组织细胞，但转移癌细胞不着色。

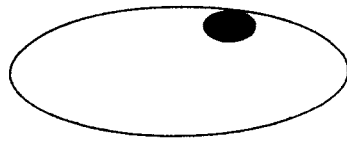


图 1

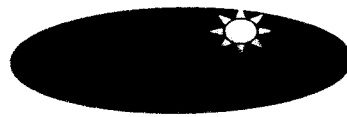


图 2

专利名称(译)	乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1945333A</a>	公开(公告)日	2007-04-11
申请号	CN200610053641.9	申请日	2006-09-28
[标]申请(专利权)人(译)	孙爱静		
申请(专利权)人(译)	孙爱静		
当前申请(专利权)人(译)	孙爱静		
[标]发明人	苏晶石 孙爱静 田景琦		
发明人	苏晶石 孙爱静 田景琦		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/53 G01N21/64 G01N33/52 G01N33/532 G01N1/30		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种乳腺癌淋巴结转移快速免疫组化检测试剂及应用该试剂的检测方法，通过将直接标记的可将转移癌细胞与淋巴结固有细胞区别开来的多种抗体混合成试剂，经一步反应，特异性使淋巴结中的转移癌细胞着色。本发明用于早期乳腺癌前哨淋巴结转移快速病理诊断，旨在提高前哨淋巴结转移癌诊断的灵敏度、准确度，推动乳腺癌前哨淋巴结快速病理检查的广泛应用，为早期乳腺癌制定手术方案提供依据。以此解决由于常规病理检查手段灵敏度低、特异性差、操作繁琐，带来冰冻活检假阴性率高，制约前哨淋巴结临床应用的问题。

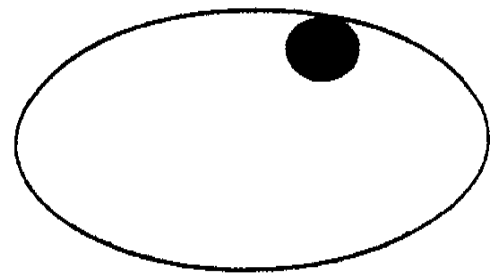


图 1