

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810048733.7

[43] 公开日 2009 年 1 月 7 日

[11] 公开号 CN 101339188A

[22] 申请日 2008.8.8

[21] 申请号 200810048733.7

[71] 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌珞珈山

[72] 发明人 陈 创 李 雁 庞代文 朱小波
夏和顺

[74] 专利代理机构 武汉宇晨专利事务所

代理人 王敏锋

权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 3 页

[54] 发明名称

一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点
免疫荧光试剂盒及应用

[57] 摘要

本发明公开了一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒及应用，该试剂盒包括 a) 封闭液，b) 清洗液，c) 生物素化抗体稀释液，d) 封片液，和 e) 量子点标记的链霉亲和素复合物 (QDs-SA) 探针液，采用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物作为荧光探针，通过与生物素化的二抗或一抗结合，间接标记石蜡包埋乳腺癌组织中的抗原。利用该试剂盒检测人乳腺癌石蜡包埋组织抗原的方法以及该试剂盒在快速准确检测人乳腺癌组织抗原中的应用。该试剂盒及方法克服了传统和现代方法中存在的不足，可准确、快速、经济、灵敏地对乳腺癌组织抗原进行定量检测。

1、一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：该试剂盒中包括 a) 封闭液，b) 清洗液，c) 生物素化抗体稀释液，d) 封片液，和 e) 量子点标记的链霉亲和素复合物探针液；采用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物作为荧光探针，与检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的生物素化抗体相结合，间接标记石蜡包埋乳腺癌组织中的抗原；

所述的封闭液由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.005-0.02 M/L，PH 7.2-7.6，与 100%牛血清白蛋白按质量百分比 100：1—3 配制；

所述的清洗液由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.005-0.02 M/L，PH 7.2-7.6，与吐温-20 按体积百分比 1000：0.2—1 配制；

所述的生物素化抗体稀释液由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.005-0.02 M/L，PH 7.2-7.6，与 100%牛血清白蛋白按质量比 100：1—3 配制；

所述的封片液由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.005-0.02 M/L，PH 7.2-7.6，与无荧光甘油按体积比 1：7—10 配制；

所述的量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液和生物素化抗体稀释液按体积百分比 1：10—200 配制，所述的量子点浓度 0.5—1 $\mu\text{M/L}$ 、激发波长 590—620 nm。

2、根据权利要求 1 所述的一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：所述的封闭液是由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.01M/L，与 100%牛血清白蛋白按质量比 50：1 配制。

3、根据权利要求 1 所述的一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：所述的清洗液是由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.01M/L，与吐温-20 按体积百分比 2000：1 配制。

4、根据权利要求 1 所述的一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：所述的生物素化抗体稀释液由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.01 M/L，与 100%牛血清白蛋白按质量比 50：1 配制。

5、根据权利要求 1 所述的一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：所述的封片液是由三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液：0.01 M/L，与无荧光甘油按体积比 1：9 配制。

6、根据权利要求1所述的一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，其特征是：所述的量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液，量子点浓度 $0.6-0.8\ \mu\text{M/L}$ ，生物素化抗体稀释液为三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液： $0.009-0.011\ \text{M/L}$ ，与 100%牛血清白蛋白组成，或

量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液与生物素化抗体稀释液按体积百分比 1：50 配制；所述的量子点浓度为 $0.76\ \mu\text{M/L}$ ，激发波长 $600-610\ \text{nm}$ ；所述的生物素化抗体稀释液为三羟基氨基甲烷—盐酸缓冲液： $0.01\ \text{M/L}$ ，与 100%牛血清白蛋白按质量比 50：1 配制。

7、权利要求1所述的一种量子点组织免疫荧光试剂盒在检测人乳腺癌石蜡包埋组织抗原中的应用。

一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒及应用

技术领域

本发明属组织免疫荧光技术领域，具体涉及一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，适用于人乳腺癌组织抗原的准确、定量检测以及量子点标记的链霉亲和素复合物探针（QDs-SA）应用中的质量控制，还涉及该试剂盒在定量检测人乳腺癌组织抗原中的用途。

背景技术

人乳腺癌相关标志物，比如人类表皮生长因子受体 2（HER2），雌激素受体（ER）、孕激素受体（PR）等在乳腺癌分子靶向治疗、预后判断及化疗方案选择中具有重要作用，准确检测非常重要。目前检测的主要方法是，利用待测组织靶抗原的特异性抗体与组织靶抗原结合后，采用显色试剂盒中酶标记的亲合素或已知抗体（或抗原）作为探针，通过酶-底物显色来反映待测组织靶抗原的量。目前市场上已有多种酶底物显色试剂盒，最常用的是 DAB（3,3'-二氨基联苯胺）显色试剂盒。采用这种试剂盒对组织抗原的检测存在敏感性有限、实验室内差异较大，结果判断主观性等不足，其中酶-底物显色反应的控制程度是导致产生差异的主要原因之一；这种试剂盒中的 DAB 为致癌物质，对人体有一定的伤害作用；而且采用这种试剂盒难以对抗原实现准确、定量检测。

组织免疫荧光技术是采用荧光物质标记的亲合素或已知抗体作为探针，与待测组织靶抗原结合，使形成的抗原抗体复合物上带有荧光物质，在激发光照射下，荧光物质发出明亮荧光，以此来检测抗原并通过荧光强度进行量化。该技术1941年由Coons等创建，发展至今已有很大的进展，已在现代生物学和医学领域广泛应用。但以异硫氰酸荧光素（fluorescein isothiocyanate, FITC）、罗丹明（rhodamine）为代表的传统荧光染料，其荧光效率及强度均不理想，且荧光易漂白及易受组织自发荧光干扰，而难以广泛用于常规分子病理学检测。

量子点（Quantum dots, QDs）是一类大小在1~10 nm，半径小于或接近于激子玻尔半径的新型半导体纳米晶粒，自1998年在生物医学领域应用以来，随着QDs制备及修饰技术的进步，逐渐引起临床应用的关注，将其作为一种新型纳米荧光材料探针，能克服传统有机荧光染料的不足，具有激发光谱宽、连续，检测灵敏度高，抗光漂白能力强，荧光强度高而稳定，

生物相容性好, 不易受组织自发荧光干扰等特点。目前所国内外采取的QDs检测组织抗原的方法主要是将量子点直接与一抗或二抗结合制成探针, 进行多抗原同时标记, 这种方法成本较高, 实用性不强, 难以与目前临床现有的检测体系相结合, 探针保存期有限, 难以常规临床应用。目前尚无用于检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的QDs-SA免疫荧光试剂盒。

发明内容

本发明的目的在于提供了一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒, 该试剂盒可与目前临床上检测乳腺癌组织抗原的生物素化抗体相结合; 更重要的是, 采用该试剂盒能够经济、快速、灵敏、准确地对组织抗原进行定量检测。

本发明的另一个目的是提供一种量子点免疫荧光试剂盒在检测人乳腺癌石蜡包埋组织抗原中的应用, 该试剂盒可简便、快速、灵敏、高效地对组织抗原进行定量检测。

为了实现上述目的, 本发明采用以下技术措施: 一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒, 其特征是: 该试剂盒中包括 a) 封闭液, b) 清洗液, c) 生物化抗体稀释液, d) 封片液, 和 e) 量子点标记的链霉亲和素复合物探针液; 采用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物 (QDs-SA) 作为荧光探针, 与目前临床上现有的检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的生物素化抗体相结合, 间接标记石蜡包埋乳腺癌组织中的抗原; 所述的封闭液由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与 100% 牛血清白蛋白 (BSA) 按质量百分比 100: 1—3 配制; 清洗液由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与吐温-20 按体积百分比 1000: 0.2—1 配制; 生物素化抗体稀释液由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与 100% 牛血清白蛋白 (BSA) 按质量比 100: 1—3 配制; 封片液由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与无荧光甘油按照体积比 1: 7—10 配制; 量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物 (QDs-SA) 溶液 (量子点浓度 0.5—1 $\mu\text{M/L}$, 激发波长 590—620 nm) 和上述的生物素化抗体稀释液按照体积百分比 1: 10—200 配制。

在本发明的一个优选方案中, 封闭液是由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.2-7.6) 与 100% 牛血清白蛋白 (BSA) 以质量百分比 100: 1—3 配制; 在本发明的一个具体方案中, 封闭液是由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.2-7.6) 与 100% 牛血清白蛋白 (BSA) 以质量比 50: 1 配制。

在本发明的一个优选方案中, 清洗液是由三羟基氨基甲烷—盐酸 (TBS) 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.2-7.6) 与吐温-20 按照体积百分比 1000: 0.2—1; 在本发明的一个具体方案中, 清洗液

是由三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01M/L，PH 7.2-7.6）与吐温-20 以体积百分比 2000：1 配制。

在本发明的一个优选方案中，生物素化抗体稀释液由三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01 M/L，PH 7.2-7.6）与 100%牛血清白蛋白（BSA）按质量比 100：1—3 配制；在本发明的一个具体方案中，生物化抗体稀释液是由三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01 M/L，PH 7.2-7.6）与 100%牛血清白蛋白（BSA）按质量比 50：1 配制。

在本发明的一个优选方案中，封片液是由三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01 M/L，PH 7.2-7.6）与无荧光甘油按照体积比 1：7—10 配制；在本发明的一个具体方案中，封片液是由三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01 M/L，PH 7.2-7.6）与无荧光甘油按照体积比 1：9 配制。

在本发明的一个优选方案中，量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液（量子点浓度 0.6—0.8 $\mu\text{M/L}$ ，激发波长 590—620 nm）和生物素化抗体稀释液【三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.009—0.011 M/L，PH 7.2-7.6）与 100%牛血清白蛋白（BSA）按质量比 100：1—3 配制】，按照体积百分比 1：10—200 配制；在本发明的一个具体方案中，量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液（量子点浓度 0.76 $\mu\text{M/L}$ ，激发波长 600—610 nm）和生物素化抗体稀释液【三羟基氨基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.01 M/L，PH 7.2-7.6）与 100%牛血清白蛋白（BSA）按质量比 50：1 配制】按照体积百分比 1：50 配制。

在本发明提供的检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒中，量子点标记的链霉亲和素探针的用途是：待测抗原与生物素化抗体结合后，将该探针与生物素化抗体结合，在荧光显微镜下蓝光激发下，可观察到荧光信号，即为待测抗原，荧光信号的强弱可反映抗原表达量的多少，可通过光谱成像或软件分析系统对荧光强度进行定量。

在本发明提供检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒中，量子点复合物探针为一种纳米材料，极易产生非特异性吸附作用，针对该特点，结合传统免疫组织化学检测步骤，对试剂盒试剂进行优化，与现有临床上检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的生物素化抗体相结合，用于乳腺癌组织抗原的准确、定量检测。通过优化方案，反复实验，以及与传统检测方法进行比较，建立了准确、定量检测乳腺癌组织中 HER2 和 ER 抗原的方法，并研制出乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒，该试剂盒具有经济、简便、快速、灵敏的特点。

本发明中提供的检测乳腺癌组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒可用于乳腺癌组织抗原的高效、准确、快速、定量检测，以及对用传统免疫酶底物显色试剂盒检测的乳腺癌组织抗

原结果进行质量控制，同时还可对试剂盒中的量子点探针进行质量控制；该试剂盒可推广用于一种操作步骤简单、快速、灵敏、高效、经济实用的通用分子病理学检测技术及科研平台，并可替代一直沿用的免疫酶底物显色试剂盒。

在本发明的另外一个方面，还提供了使用本发明的试剂盒在检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原中的应用，其应用过程是：

1. 临床常规乳腺癌石蜡包埋组织，按常规免疫组化要求切片，并将切片脱蜡水化，按照待测抗原的要求进行抗原修复；
2. 蒸馏水冲洗，清洗液冲洗；
3. 除去清洗液，用封闭液封闭；
4. 除去封闭液，滴加待测抗原的单克隆抗体（若为生物素标记的一抗则直接进入第7步）；
5. 清洗液洗涤玻片，除去清洗液，封闭液封闭；
6. 除去封闭液，滴加用生物素化抗体稀释液稀释的生物素化二抗；
7. 清洗液洗涤玻片，除去清洗液，封闭液封闭；
8. 除去封闭液，加量子点标记的链霉亲和素复合物探针；
9. 清洗液洗涤玻片，再用 TBS 洗，除去清洗液，封片液封片。
10. 在荧光显微镜观察下，用蓝光激发观察橙红色量子点荧光并通过荧光信号采集系统进行定量，之后将切片置于 4℃ 避光保存。

本发明与现有技术相比具有以下优点和效果：

1. 检测灵敏度高、便于量化；
2. 背景清晰，便于组织形态学观察；
3. 方法简便，易于标准化，无需复染，影响因素相对较少，重复性较好，结果判断便利；
4. 无需 DAB（3,3-二氨基联苯胺）显色，对人毒害较小；
5. 荧光强度高，持续时间长，结果容易保存及反复观察；
6. 经济实惠。

附图说明

图 1 为检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒对人乳腺癌 HER2 的量子点免疫荧光特异性成像。图 1 中 A 为用特异性鼠抗人 HER2 抗体作为一抗，生物素标记的 IgG 作为二抗，再加入 SA-QDs 的标记结果；图 1 中 C 为用 TBS 作为一抗，生物素标记的 IgG 作为二抗，再加入 SA-QDs 的标记结果，证明该技术的特异性强。图 1 中 B 为该病例用免疫组织化学（IHC）试剂盒的检测结果；图 1 中 D 为该病例的原始苏木精和伊红（HE）染色结果，说明量子点探针标记的位置正确。【标尺为 100 μm ，量子点图象由 LEICA DM 4000B 正

置荧光显微镜在蓝光（波长 450–490 nm，蓝色荧光滤片）激发下，通过 Olympus DP71 成像系统采集图象，曝光时间 1/1.8 秒；原始 IHC 及 HE 染色图象由 OLYMPUS BX51 生物显微镜及 HMIAS-2000W 高清晰度彩色医学图文分析管理系统进行图象采集】

图 2 为检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒对人乳腺癌 HER2 的荧光稳定性实验示意图。将做好的切片置于 4℃ 保存，研究量子点荧光的光漂性，结果表明，图象荧光在 9 天内无明显变化。图 2 中 A 为制片当天的图象；图 2 中 B 为放置 75 天后的图象；图 2 中 C 为放置 150 天的图象；图 2 中 D 为放置 150 天后再次进行量子点复染的图象。结果显示组织荧光褪色后，重新加入量子点，依然可以清晰染色，与原始图片相比，此时组织背景更低。（标尺为 100 μm ，拍摄条件同上）

图 3 为检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒对人乳腺癌 HER2 标记切片在荧光淬灭后的 IHC 复染示意图。将用本发明标记后荧光淬灭的标本重新进行 DAB 显色。图 3 中 A 为原始 IHC 图象；图 3 中 B 为切片当天的图象；图 3 中 C 为量子点荧光淬灭后的 IHC 复染图象。表明量子点荧光淬灭后仍可进行 DAB 显色，从而便于结果的相互印证和保存。（标尺为 100 μm ，拍摄条件同上）

图 4 为检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒对人乳腺癌 HER2 的免疫荧光标记敏感性实验。图 4 中 A 为该标记技术对 IHC 分别为一、+、2+、3+ 病例的标记成像；图 4 中 B 为相对应的原始 IHC 图象；结果表明该标记技术可以更清晰地区分 HER2 的不同表达水平。同时选取 60 例主要为 IHC（2+）的标本同时进行本技术检测和 FISH 检测，后者委托北京金泰思生物科技有限公司进行检测，图 4 中 C 为 FISH 阴性，图 4 中 D 为 FISH 阳性，结果表明，该技术的操作性较好，影响因素相对较少，结果易于判断，便于量化，与 FISH 的吻合率较高。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应当理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明要求保护的范围。

实施例 1 检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒组成与配制：

该试剂盒中包括 a) 封闭液，b) 清洗液，c) 生物化抗体稀释液，d) 封片液，和 e) 量子点标记的链霉亲和素复合物探针液；采用水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物（QDs-SA）作为荧光探针，与目前临床上现有的检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的生物素化抗体相结合，间接标记石蜡包埋乳腺癌组织中的抗原；所述的封闭液由三羟甲基甲烷—盐酸（TBS）缓冲液（0.005–0.02 M/L，PH 7.2–7.6）与 100% 牛血清白蛋白（BSA）按质量百

分比 100: 1—3 配制; 清洗液由 TBS 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与吐温-20 按体积百分比 1000: 0.2—1 配制; 生物素化抗体稀释液由 TBS 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与 100%BSA 按质量比 100: 1—3 配制; 封片液由 TBS 缓冲液 (0.005-0.02 M/L, PH 7.2-7.6) 与无荧光甘油按照体积比 1: 7—10 配制; 量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物 (QDs-SA) 溶液 (量子点浓度 0.5—1 $\mu\text{M/L}$, 激发波长 590—620 nm) 和上述的生物素化抗体稀释液按照体积百分比 1: 10—200 配制。

A). 封闭液组成:

TBS 缓冲液【0.01M/L, PH 7.4; 配方: 三羟基氨基甲烷 (凌飞科技) 1.21 g, 氯化钠 (国药集团化学试剂有限公司) 7.6 g, 加蒸馏水 (SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂) 至 1000 ml, 浓盐酸 (国药集团化学试剂有限公司) 调整 PH 至 7.4】与 100%牛血清白蛋白 (BSA, 凌飞科技) 以质量比 50: 1 配制。

B). 清洗液组成:

TBS 缓冲液 (0.01M/L, PH 7.4) 与吐温-20 (国药集团化学试剂有限公司) 按照体积百分比 2000: 1 配制。

C). 生物素化抗体稀释液组成:

TBS 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.4) 与 100%BSA 按质量比 50: 1 配制。

D). 封片液组成:

TBS 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.4) 与无荧光甘油 (上海申博化工有限公司) 按照体积比 1: 9 配制。

E). 量子点标记的链霉亲和素探针液:

由量子点标记的链霉亲和素复合物探针由水溶性 CdSe/ZnS 核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物溶液 (量子点浓度 0.76 $\mu\text{M/L}$, 激发波长 605 nm, 武汉珈源量子点技术开发有限公司) 和生物素化抗体稀释液【TBS 缓冲液 (0.01 M/L, PH 7.4) 与 100%BSA 按质量比 50: 1 配制】组成, 按照体积百分比 1: 50 配制。

实施例 2 用检测乳腺癌组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒在检测乳腺癌石蜡包埋组织中人类表皮生长因子受体 2 (HER2) 中的应用, 其过程如下:

1. 临床常规乳腺癌石蜡包埋组织, 常规切片、脱蜡水化。
2. 高温高压抗原修复: 取 1500 ml 0.01M/L, PH 6.0 的柠檬酸缓冲液【(柠檬酸三钠, 2.45 g (上海试剂一厂), 柠檬酸, 0.38 g (湖北襄樊化学试剂厂) 加蒸馏水至 1000 ml, 浓盐酸和氢氧化钠 (均为国药集团化学试剂有限公司) 调整 PH 至 6.0】于高压锅 (不锈钢型压力锅, 规格高 20 cm, 容积 4.0 L, 浙江苏泊尔炊具股份有限公司) 中。用电磁炉 (型号:

C21A01, 浙江苏泊尔股份有限公司) 蒸煮档加热至沸腾 (100℃), 将脱蜡水化的切片置于耐高温染色架上, 放入已沸腾的修复液中; 盖上锅盖, 扣上压力阀, 继续加热至喷汽, 计时 2 分钟后, 关闭电磁炉并将压力锅离开热源; 室温 (20—25℃) 放置 20 分钟, 用自来水冲淋 20 分钟, 去阀开盖, 用自来水冲洗后取出切片, 蒸馏水 (SZ-93 型自动双重纯水蒸馏器, 上海亚荣生化仪器厂) 冲洗 2 次, 每次 2 分钟; 再用 0.01M/L, PH 7.4 的 TBS 缓冲液冲洗 2 次, 每次 2 分钟。

3. 除去 TBS, 封闭液封闭, 封闭条件为: 湿盒孵育, 37℃ (GNP-9080 型隔水式恒温培养箱, 上海精宏实验设备有限公司), 30 分钟。
4. 除去封闭液, 滴加鼠抗人类表皮生长因子受体 2 (human epidermal growth factor receptor 2, c-erbB-2 或 HER2/neu 或 HER2) 单克隆抗体 (一种抗人 c-erbB-2 的 IgG₁ 型单克隆抗体, 克隆号: CB11, 福州迈新生物技术开发有限公司, van de Vijver MJ, Peterse JL, Mooi WJ, et al. Neu-protein overexpression in breast cancer. Association with comedo-type ductal carcinoma in situ and limited prognostic value in stage II breast cancer[J]. N Engl J Med, 1988, 319(19):1239-1245.) 50 μl (1: 50 稀释, 稀释液为 0.01M/L, PH 7.4 的 TBS 缓冲液, 阴性对照仅加 TBS 缓冲液), 37℃, 湿盒孵育 1 小时。
5. 清洗液洗涤玻片, 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。
6. 除去清洗液, 封闭液封闭。封闭条件为: 湿盒孵育, 37℃, 10 分钟。
7. 除去封闭液, 滴加生物素标记的羊抗鼠 IgG 50 μl (1: 100 稀释, 抗体稀释液稀释, 福州迈新生物技术开发有限公司), 37℃, 湿盒孵育 30 分钟。
8. 清洗液洗涤玻片, 洗涤 3 次, 每次 3 分钟。
9. 除去清洗液, 封闭液封闭。封闭条件为: 湿盒孵育, 37℃, 20 分钟。
10. 除去封闭液, 加量子点复合物, 滴加量子点标记的链霉亲和素复合物 (QDs-SA) 探针 50 μl, 37℃, 湿盒孵育 30 分钟。
11. 清洗液洗涤玻片, 洗涤 2 次, 每次 3 分钟, 再用 TBS 缓冲液洗 2 次, 每次 3 分钟;
12. 除去清洗液, 缓冲甘油封片。
13. 在荧光显微镜观察 (LEICA DM 4000B 正置荧光显微镜) 用蓝光激发 (波长 450—490 nm, 蓝色荧光滤片) 观察橙红色量子点荧光, 并用 Olympus DP71 图象采集系统采集图象, 之后将切片置于 4℃避光保存。

用该试剂盒, 根据以上使用过程检测人乳腺癌 HER2, 做了如下实验:

1、本发明对人乳腺癌 HER2 的标记显像及特异性

按照上述的使用过程, 通过荧光显微镜, 在蓝光 (波长 450—490 nm, 蓝色荧光滤片) 激

发下,得到了乳腺癌 HER2 抗原的体外标记成像(图 1A),组织结构和抗原分布部位清晰、易于分辨,与原始 IHC 和 IIF 染色对比可看到量子点对 HER2 的识别部位一致(图 1B 和 D),

为了进一步证明本发明荧光标记的特异性,采用特异性鼠抗人 HER2 抗体作为一抗,生物化的羊抗鼠 IgG 作为二抗,用 QDs-SA 复合物探针作为三抗,进行人乳腺癌组织 HER2 抗原的标记,用 TBS 代替鼠抗人 HER2 抗体作为一抗,并按照同样的方法和条件标记作为阴性对照,荧光显微镜观察,发现视野中没有出现明显的 QDs 橘红色荧光,这与使用特异性一抗的结果形成鲜明的对比(图 1C),组织结构清晰可见,极少见非特异吸附。

2、本发明标记显像的稳定性及结果的保存和印证

将做好的切片置于4℃保存,研究量子点荧光的光漂性,结果表明,量子点荧光在9天内基本无变化,有些切片甚至在75天后仍可看到量子点荧光(图2B)。但不同强度和不同组织类型的荧光漂白速度不同,一般来说,HER2强度越高,荧光漂白越慢。待量子点荧光基本漂白后(图2C),先将切片置于蒸馏水中浸泡20分钟,去除盖玻片,用TBS冲洗2次,每次2分钟,再加入量子点探针,37℃,湿盒孵育30分钟,之后用含0.05% Tween20的TBS,洗涤2次,每次3分钟,再用TBS洗2次,每次3分钟;封片液封片,荧光显微镜下仍可观察到量子点荧光,荧光强度与初始无明显差异,而组织背景自发荧光更低(图2D)。

在上述使用过程中若不加入量子点探针,而加入生物素标记的二抗,进行DAB显色。结果显示,仍可对组织结构和抗原表达进行DAB显色(图3)。对该原因进行了探讨,可能是量子点与亲和素并非等比例结合,此外量子点粒径较大,使其并未占据所有抗原结合位点,量子点淬灭后,未结合位点暴露出来,因此本方法具有可重复标记的优点。先用过量的生物素处理切片后,再次加入量子点或者进行DAB显色时,未出现该现象。

3、本发明标记显像的可靠性及敏感性实验

为了验证该技术的可靠性、重复性及敏感性,对 54 例 HER2 IHC 不同强度的病例进行了该技术检测,其中仅 2 例检测失败,使用结果表明本发明可靠、重复性好、便于操作,对 HER2 低表达量仍可清晰检测(图 4A 和 B)。另外还将本发明与目前相对的“金标准”FISH 技术进行了对比,对 60 例主要为 HER2 IHC (2+)的病例进行了量子点探针技术检测,同时同时委托第三方(北京金泰思生物科技有限公司)进行 FISH 检测验证(图 4C 和 D),通过专门开发的量子点检测结果分析软件(购置武汉大学科学仪器工程技术中心),对每个病例进行了量化评分,在最佳点时,在 IHC(2+)中,量子点探针技术与 FISH 的吻合率为 78.85%,通过本发明的使用,有效地检测 HER2 扩增的特异度为 75%,灵敏度为 79.55%。

从上述实验对比可以说明,该试剂盒对乳腺癌抗原 HER2 的检测具有准确、快速、经济、灵敏、稳定、背景清晰、结果易保存、便于定量的特点。

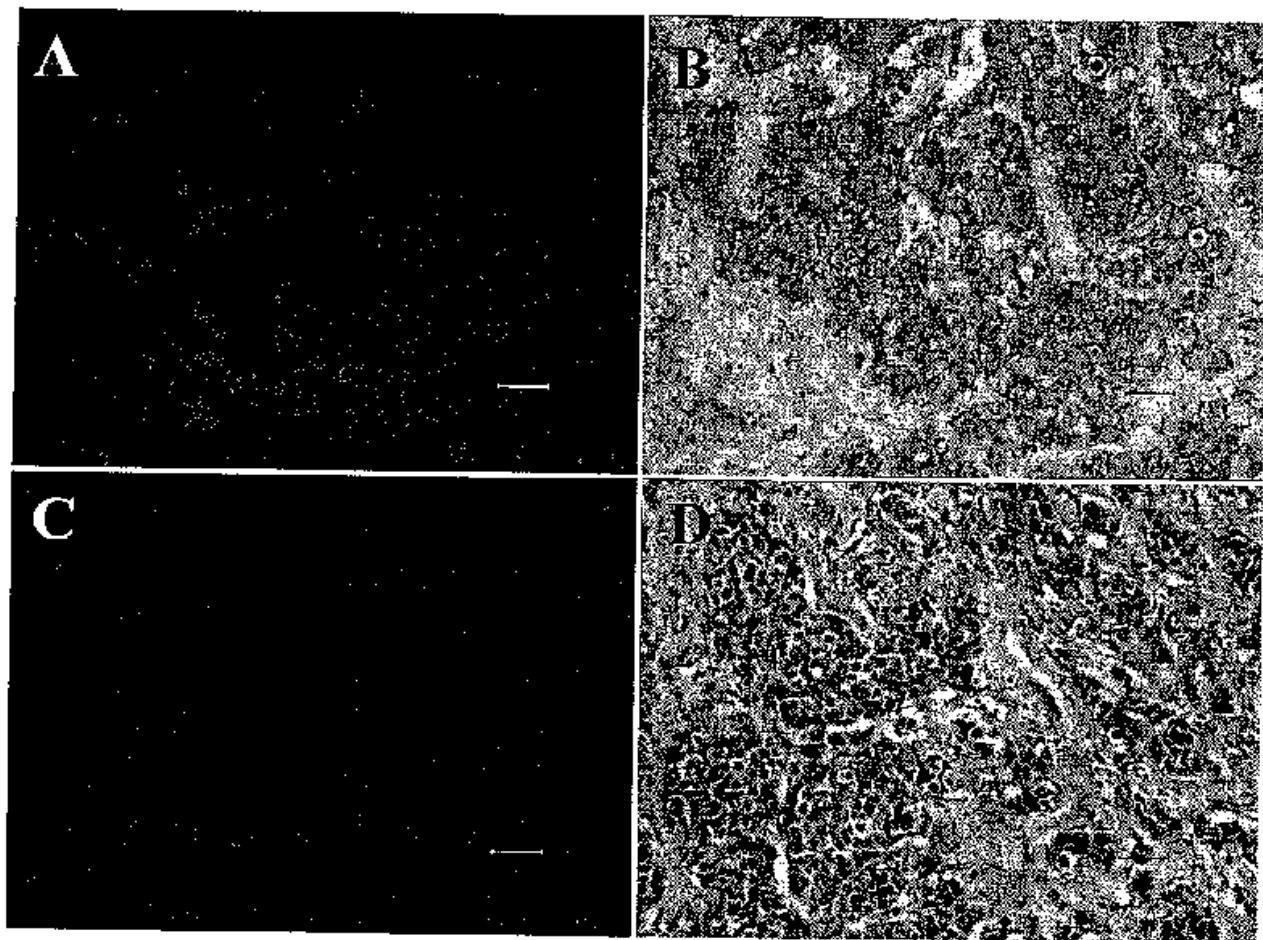


图 1

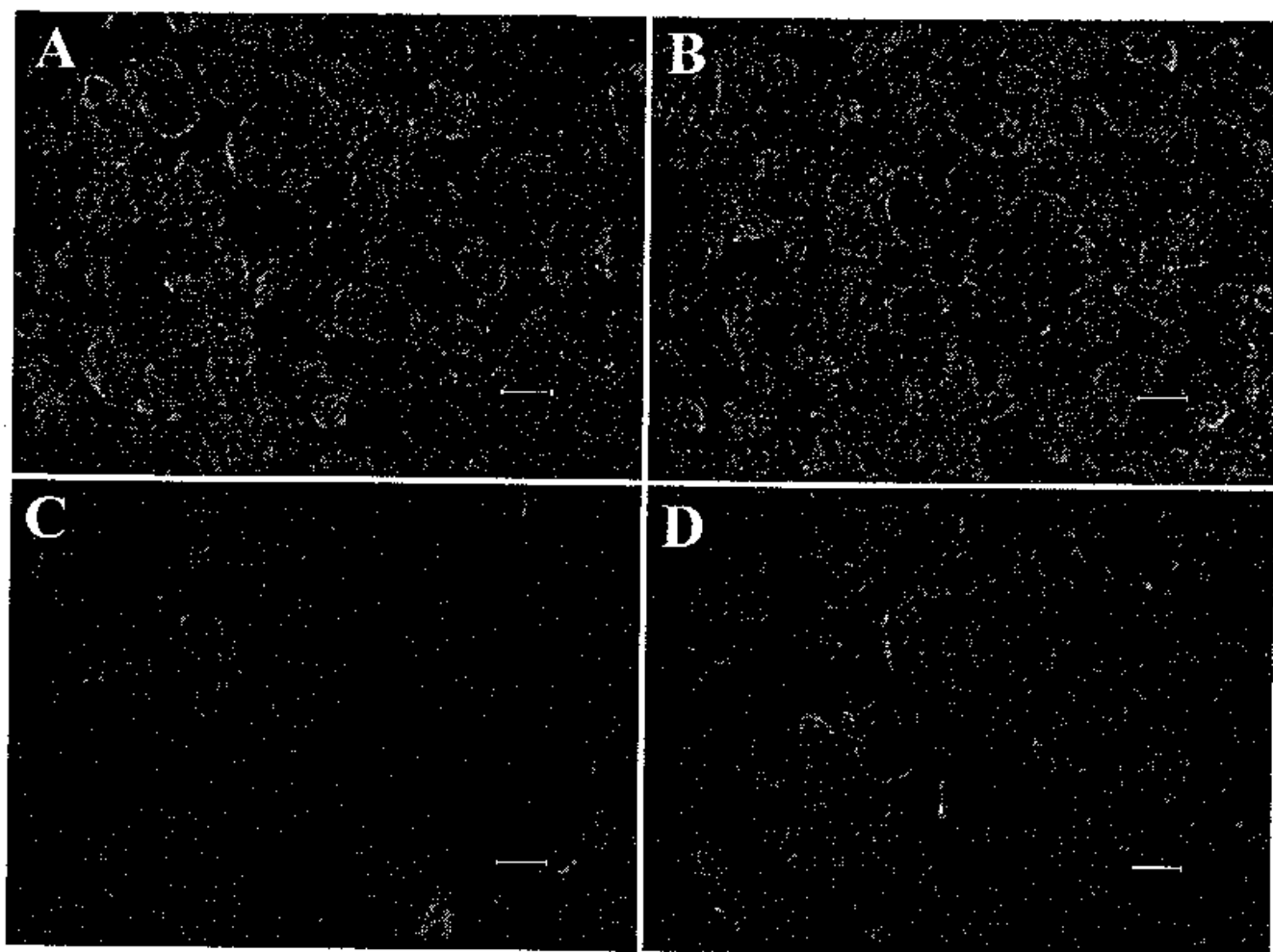


图 2



图 3

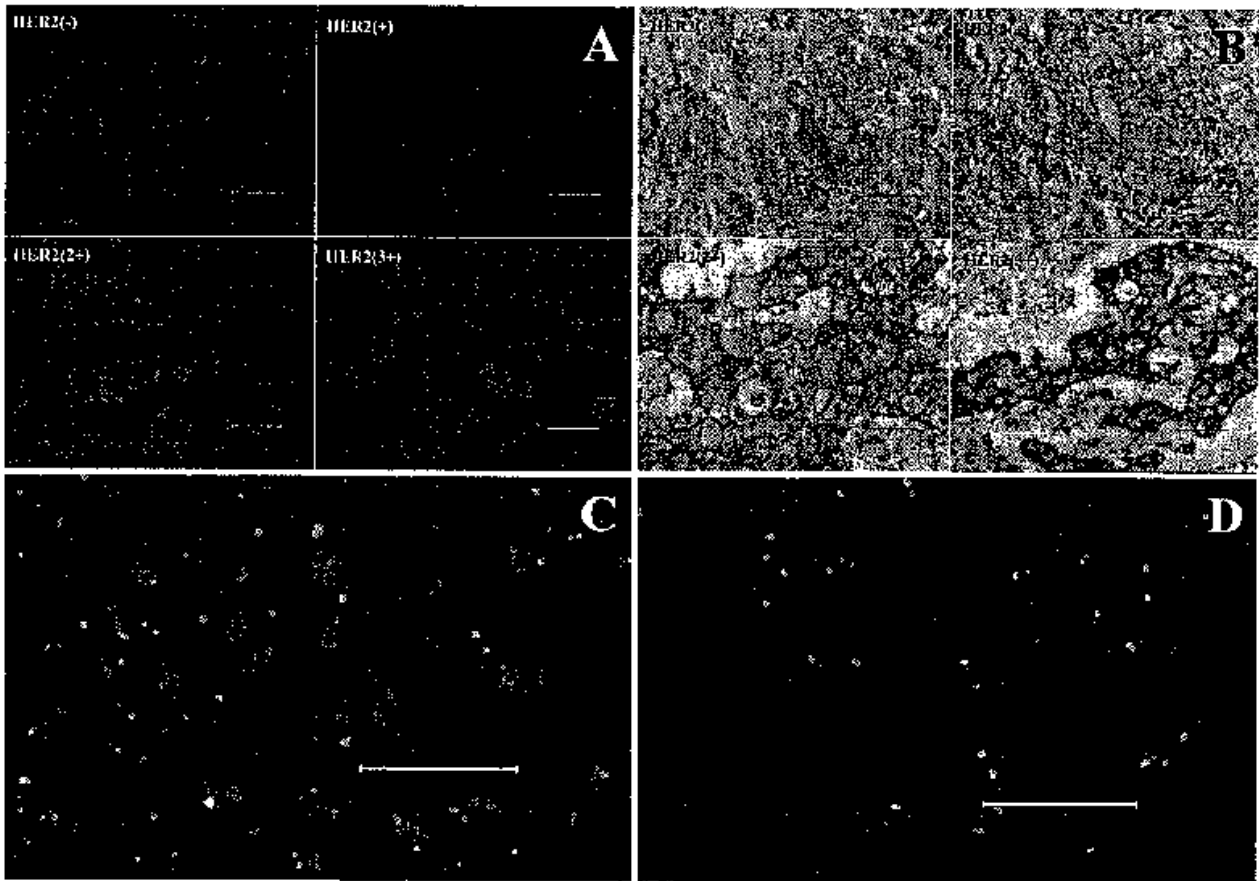


图 4

专利名称(译)	一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN101339188A	公开(公告)日	2009-01-07
申请号	CN200810048733.7	申请日	2008-08-08
[标]申请(专利权)人(译)	武汉大学		
申请(专利权)人(译)	武汉大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉大学		
[标]发明人	陈创 李雁 庞代文 朱小波 夏和顺		
发明人	陈创 李雁 庞代文 朱小波 夏和顺		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
代理人(译)	王敏锋		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测乳腺癌石蜡包埋组织抗原的量子点免疫荧光试剂盒及应用,该试剂盒包括a)封闭液, b)清洗液, c)生物素化抗体稀释液, d)封片液, 和e)量子点标记的链霉亲和素复合物(QDs - SA)探针液, 采用水溶性CdSe/ZnS核壳型量子点标记的链霉亲和素复合物作为荧光探针, 通过与生物素化的二抗或一抗结合, 间接标记石蜡包埋乳腺癌组织中的抗原。利用该试剂盒检测人乳腺癌石蜡包埋组织抗原的方法以及该试剂盒在快速准确检测人乳腺癌组织抗原中的应用。该试剂盒及方法克服了传统和现代方法中存在的不足, 可准确、快速、经济、灵敏地对乳腺癌组织抗原进行定量检测。

