



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104062426 A

(43) 申请公布日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201410273493. 6

(22) 申请日 2014. 06. 18

(71) 申请人 兰州大学第一医院

地址 730000 甘肃省兰州市城关区东岗西路  
11 号

(72) 发明人 白仲添 孟文勃 李汛 周文策  
狄翠霞 严俊

(74) 专利代理机构 北京科亿知识产权代理事务  
所(普通合伙) 11350

代理人 汤东风

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

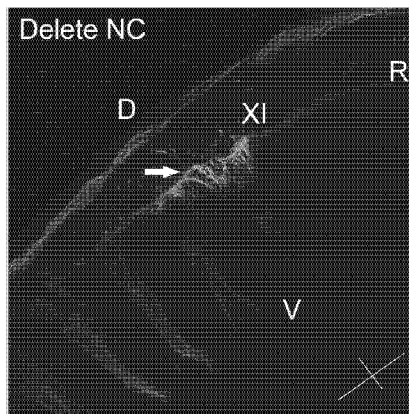
权利要求书1页 说明书3页 附图2页

(54) 发明名称

一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途

(57) 摘要

本发明公开了一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途,所述的试剂盒是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成,其特征在于:各试剂的体积比组成如下:固定液:甲醇 75-85%、二甲基亚砜 15-25%;漂液:甲醇 65-75%、二甲基亚砜 15-25%、双氧水 5-15%;封闭液:PBT 稀释的 1-5% 马血清 +1-5% 牛血清白蛋白;抗体稀释液:PBT+1-2.5% 牛血清白蛋白 +0.2-0.4% NaN<sub>3</sub>。染色方法步骤包括固定、漂液、复水、封闭、抗体杂交、成像。本发明所用试剂温和,对胚胎损伤小,胚胎形状完整,便于完整观察染色部位内部形态,具有速度快、背景清晰干净,无杂质荧光吸收干扰、采集的图像清晰完整等技术优势,且设备简单、操作简便、费用低廉、便于推广。



1. 一种整体胚胎免疫染色试剂盒,所述的试剂盒是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成,其特征在于:各试剂的体积比组成如下:固定液:甲醇 75-85%、二甲基亚砜 15-25%;漂液:甲醇 65-75%、二甲基亚砜 15-25%、双氧水 5-15%;封闭液:PBT 稀释的 1-5% 马血清 +1-5% 牛血清白蛋白;抗体稀释液:PBT+1-2.5% 牛血清白蛋白 +0.2-0.4% NaN<sub>3</sub>。

2. 如权利要求 1 所述的整体胚胎免疫染色试剂盒,其特征在于:所述的双氧水的浓度为 30%。

3. 如权利要求 1 所述的整体胚胎免疫染色试剂盒,其特征在于:PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.01-0.1% 的吐温 20 组成,其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

4. 如权利要求 1 所述的整体胚胎免疫染色试剂盒,其特征在于:PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.02% 的吐温 20 组成,其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

5. 如权利要求 1-4 任一项所述的整体胚胎免疫染色试剂盒的染色方法,其特征在于:所述方法的具体步骤如下:

(1) 固定:将胚胎放入加入固定液的带盖试管中,4℃ 固定 1-7 天;

(2) 漂液:倒掉固定液,加入漂液,4℃ 固定 12-24h;

(3) 复水:倒掉漂液,加入 100% 甲醇震荡清洗 3 次,每次 10-30min,倒掉清洗液,加入 50% 甲醇震荡清洗 3 次,每次 10-30min,加入 PBT 4℃ 震荡清洗 6 次,每次 1h;

(4) 封闭:倒掉反应相中的清洗液,加入封闭液,在 4℃ 下 2-4h 或室温下 30min 震荡封闭;

(5) 一抗杂交:将一抗加入抗体稀释液,在反应相中加入稀释过的一抗溶液,冰上震荡孵育 8-20h 或 2-8℃ 冰箱震荡过夜;

(6) 清洗:加入 PBT 4℃ 或冰上震荡清洗 6 次,每次 1h;

(7) 二抗杂交:按照抗体比例,将荧光二抗加入抗体稀释液,在反应相中加入稀释过的二抗溶液,4℃ 避光震荡孵育 12-24h 或将试管包裹在铝箔纸中过夜;

(8) 清洗:加入 PBT 4℃ 震荡清洗 6 次,每次 1h 或 4℃ 过夜;

(9) 成像:将步骤 (8) 清洗后的反应相使用激光共聚焦显微镜或双光子显微镜成像。

6. 如权利要求 1-4 任一项所述的整体胚胎免疫染色试剂盒在一个反应相中实现脊椎动物早期胚胎、神经纤维、神经干细胞及其他组织器官的整体免疫化学染色的用途。

7. 如权利要求 6 所述的用途,其特征在于:所述的染色试剂盒同时在一个反应相中加三种以上不同来源的一抗,及三种以上对应的二抗来实现多抗体杂交。

## 一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途

### 技术领域

[0001] 本发明涉及试剂盒技术领域,尤其涉及一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途。

### 背景技术

[0002] 传统的免疫荧光染色通过免疫化学的方法,实现组织或细胞中特异抗原抗体的结合,对某一蛋白分子或多种蛋白分子实现荧光标记,达到定性、定量分析目的,并可将标记荧光素的二抗直接结合到一抗上,通过荧光吸收光进行检测。近年来,免疫组化逐渐应用到对早期胚胎的整体染色,完整地对神经纤维、器官、干细胞迁移等进行标记,但目前应用的整体胚胎的免疫荧光化学染色因固定后胚胎中残留 PFA 对荧光素的吸收导致背景荧光干扰,使得后期图片采集及数据处理都受到很大的影响;因目前配方的缺陷,导致胚胎在免疫杂交过程中受到不同程度的损伤,影响整体胚胎染色效果;另外,目前广泛应用的整体胚胎荧光化学染色方法,配方方法复杂凌乱、复杂、耗时长。

### 发明内容

[0003] 本发明专利的目的在于提供一种试剂盒及染色方法在一个反应相中对脊椎动物早期胚胎、神经纤维、神经干细胞的整体免疫荧光染色应用。

[0004] 本发明专利主要是通过快速便捷的操作方法,对胚胎实行整体胚胎神经纤维、神经干细胞以及其他组织的荧光染色。无背景干扰、不损坏胚胎完整性。用于胚胎发育早期神经系统、心血管系统等多种系统的形态学研究。

[0005] 本发明采用如下技术方案:

[0006] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒,是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成,各试剂的体积比组成如下:固定液:甲醇 75-85%、二甲基亚砜 15-25%;漂液:甲醇 65-75%、二甲基亚砜 15-25%、双氧水 5-15%;封闭液:PBT 稀释的 1-5%马血清 +1-5%牛血清白蛋白;抗体稀释液:PBT+1-2.5%牛血清白蛋白 +0.2-0.4%  $\text{NaN}_3$ 。

[0007] 所述的双氧水的浓度为 30%。

[0008] PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.01-0.1%的吐温 20 组成,其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2;优选 PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.02%的吐温 20 组成,其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

[0009] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒的染色方法步骤如下:

[0010] 固定:将胚胎放入加入固定液的带盖试管中(试管材质不限)。4℃固定 1-7 天。

[0011] 漂液:倒掉固定液,加入漂液,4℃固定 12-24h。

[0012] 复水:倒掉漂液,加入 100%甲醇震荡清洗  $3 \times 10-30\text{min}$ (根据胚胎大小而定),倒掉清洗液,加入 50%甲醇震荡清洗  $3 \times 10-30\text{min}$ (根据胚胎大小而定),加入 PBT 4℃震荡清洗  $6 \times 1\text{h}$ 。

[0013] 封闭:倒掉反应相中的清洗液,加入封闭液,4℃ 2-4h 或室温 30 分钟震荡封闭(根

据胚胎大小而定)。

[0014] 一抗杂交:按照抗体说明书及参考文献,将合适量的一抗加入抗体稀释液,在反应相中加入稀释过的一抗溶液。冰上震荡孵育 8-20h 或过夜。

[0015] 清洗:加入 PBT4℃或冰上震荡清洗 6×1h。

[0016] 二抗杂交:按照抗体比例,将荧光二抗加入抗体稀释液,在反应相中加入稀释过的二抗溶液。4℃避光震荡孵育 12-24h 或过夜(将试管包裹在铝箔纸中)。

[0017] 清洗:加入 PBT4℃震荡清洗 6×1h(或 4℃过夜)

[0018] 成像:激光共聚焦显微镜或双光子显微镜成像效果更佳(具体选择根据荧光强度及胚胎大小而定,胚胎较小用双光子显微镜,较大用共聚焦显微镜)。

[0019] 本发明的积极效果如下:

[0020] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法具有以下优点:1、设备简单,操作简便,只需要在一个反应相中即可完成;2、费用低廉,除抗体外,其他均为实验室常规试剂,无特殊污染物残留;3、染色效果好,无背景荧光杂色干扰,且组织完整性好。

## 附图说明

[0021] 图 1 是鸡胚整体胚胎的免疫荧光染色的图。

[0022] 图中白色部分为 3A10 抗体标记的副神经及脊神经的神经纤维。Delete NC 表示对该胚胎神经嵴细胞行显微切除。D 为背侧;V 为腹侧;R 为头侧;XI 表示第十一对脑神经副神经。

[0023] 图 2 是鸡胚的神经轴突寻路特征的荧光染色图。

## 具体实施方式

[0024] 下面的实施例是对本发明的进一步详细描述。

[0025] 实施例 1

[0026] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒,是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成,各试剂的体积比组成如下:固定液:甲醇 75%、二甲基亚砜 25%;漂液:甲醇 65%、二甲基亚砜 25%、双氧水 10%;封闭液:PBT 稀释的 1% 马血清 +5% 牛血清白蛋白;抗体稀释液:PBT+1% 牛血清白蛋白 +0.4%  $\text{NaN}_3$ 。

[0027] 所述的双氧水的浓度为 30%。

[0028] PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.01% 的吐温 20 组成,其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

[0029] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒的染色方法步骤如下:

[0030] (1) 固定:将胚胎放入加入固定液的带盖试管中,4℃固定 1-7 天;

[0031] (2) 漂液:倒掉固定液,加入漂液,4℃固定 12-24h;

[0032] (3) 复水:倒掉漂液,加入 100% 甲醇震荡清洗 3 次,每次 10-30min,倒掉清洗液,加入 50% 甲醇震荡清洗 3 次,每次 10-30min,加入 PBT4℃震荡清洗 6 次,每次 1h;

[0033] (4) 封闭:倒掉反应相中的清洗液,加入封闭液,在 4℃下 2-4h 或室温下 30min 震荡封闭;

[0034] (5) 一抗杂交:将一抗加入抗体稀释液,在反应相中加入稀释过的一抗溶液,冰上

震荡孵育 8-20h 或 2-8℃ 冰箱震荡过夜；

[0035] (6) 清洗：加入 PBT 4℃ 或冰上震荡清洗 6 次，每次 1h；

[0036] (7) 二抗杂交：按照抗体比例，将荧光二抗加入抗体稀释液，在反应相中加入稀释过的二抗溶液，4℃ 避光震荡孵育 12-24h 或将试管包裹在铝箔纸中过夜；

[0037] (8) 清洗：加入 PBT 4℃ 震荡清洗 6 次，每次 1h 或 4℃ 过夜；

[0038] (9) 成像：将步骤 (8) 清洗后的反应相使用激光共聚焦显微镜或双光子显微镜成像。

[0039] 实施例 2

[0040] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒，是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成，各试剂的体积比组成如下：固定液：甲醇 85%、二甲基亚砜 15%；漂液：甲醇 75%、二甲基亚砜 15%、双氧水 10%；封闭液：PBT 稀释的 5% 马血清 +5% 牛血清白蛋白；抗体稀释液：PBT+2.5% 牛血清白蛋白 +0.4%  $\text{NaN}_3$ 。

[0041] 所述的双氧水的浓度为 30%。

[0042] PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.1% 的吐温 20 组成，其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

[0043] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒的染色方法同实施例 1。

[0044] 实施例 3

[0045] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒，是由固定液、漂液、封闭液和抗体稀释液组成，各试剂的体积比组成如下：固定液：甲醇 80%、二甲基亚砜 20%；漂液：甲醇 70%、二甲基亚砜 15%、双氧水 15%；封闭液：PBT 稀释的 3% 马血清 +3% 牛血清白蛋白；抗体稀释液：PBT+1.5% 牛血清白蛋白 +0.3%  $\text{NaN}_3$ 。

[0046] 所述的双氧水的浓度为 30%。

[0047] PBT 是由 1× 磷酸盐缓冲溶液和 0.02% 的吐温 20 组成，其中磷酸盐缓冲溶液的 pH 为 7.2。

[0048] 本发明的整体胚胎免疫染色试剂盒的染色方法同实施例 1。

[0049] 实施例 4

[0050] 使用实施例 3 的整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法对鸡胚整体胚胎进行染色，结果如图 1 和图 2 所示。

[0051] 图中可清晰地低倍荧光显微镜或共聚焦显微镜下观察神经纤维寻路特征，图 1：鸡胚整体胚胎的免疫荧光染色，图中白色部分为 3A10 抗体标记的副神经及脊神经的神经纤维，并可观察到单个的神经纤维丝，图 2：鸡胚的神经轴突寻路特征，图中可清晰显示单个神经纤维丝，其神经纤维穿过中枢神经系统到周围神经系统，延伸至鳃弓，支配靶肌肉的运动。

[0052] 上述结果证明：本发明的试剂盒所用试剂温和，对胚胎损伤小，胚胎形状完整，便于完整观察染色部位内部形态，具有速度快、背景清晰干净，无杂质荧光吸收干扰、采集的图像清晰完整等技术优势，且设备简单、操作简便、费用低廉、便于推广。

[0053] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例，对于本领域的普通技术人员而言，可以理解在不脱离本发明的原理和精神的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型，本发明的范围由所附权利要求及其等同物限定。

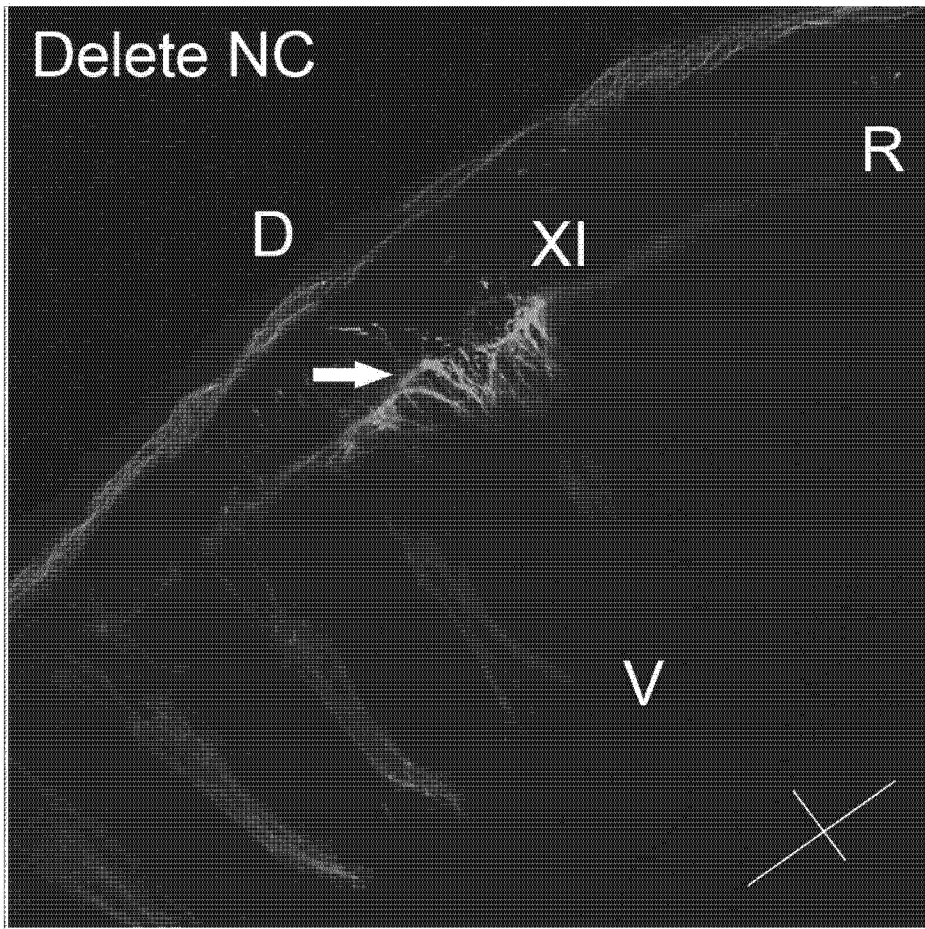


图 1

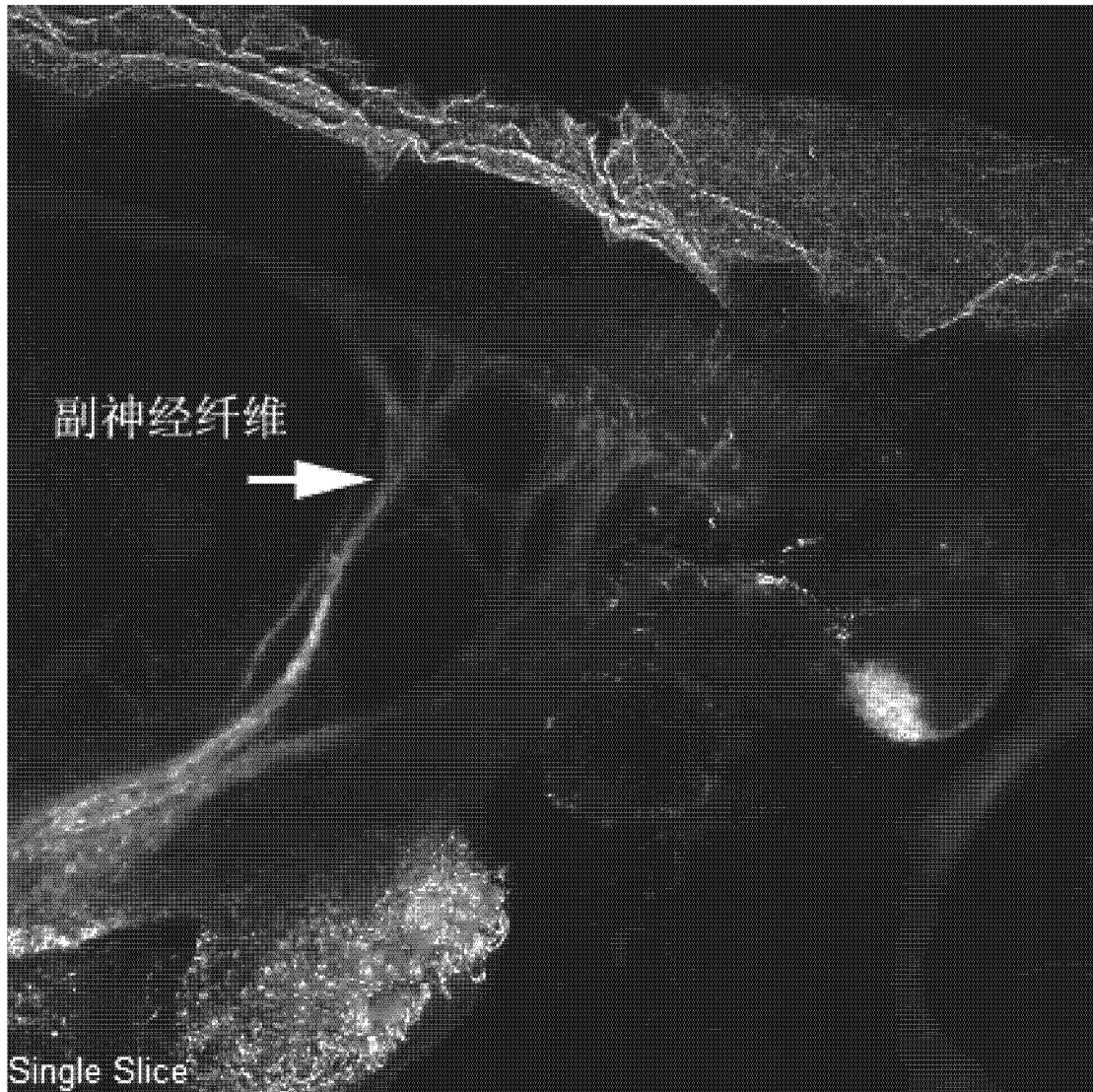


图 2

专利名称(译)	一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN104062426A</a>	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201410273493.6	申请日	2014-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	兰州大学第一医院		
申请(专利权)人(译)	兰州大学第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	兰州大学第一医院		
[标]发明人	白仲添 孟文勃 李汛 周文策 狄翠霞 严俊		
发明人	白仲添 孟文勃 李汛 周文策 狄翠霞 严俊		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N1/30		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种整体胚胎免疫染色试剂盒及其使用方法和用途，所述的试剂盒是由固定液、漂白液、封闭液和抗体稀释液组成，其特征在于：各试剂的体积比组成如下：固定液：甲醇75-85%、二甲基亚砜15-25%；漂白液：甲醇65-75%、二甲基亚砜15-25%、双氧水5-15%；封闭液：PBT稀释的1-5%马血清+1-5%牛血清白蛋白；抗体稀释液：PBT+1-2.5%牛血清白蛋白+0.2-0.4%NaN<sub>3</sub>。染色方法步骤包括固定、漂白、复水、封闭、抗体杂交、成像。本发明所用试剂温和，对胚胎损伤小，胚胎形状完整，便于完整观察染色部位内部形态，具有速度快、背景清晰干净，无杂质荧光吸收干扰、采集的图像清晰完整等技术优势，且设备简单、操作简便、费用低廉、便于推广。

