



## (12) 发明专利申请

(10) 授权公告号 CN 103063849 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201210582824. 5

(22) 申请日 2012. 12. 28

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山武汉大学

(72) 发明人 何禹禹 赵显达 陈洪雷 朱小波

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 薛玲

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法,属于组织免疫荧光技术领域。该方法采用第一种量子点标记所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体,或者标记能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,以及至少第二种量子点标记其表达蛋白的抗体,或者标记能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同,第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。本发明还公开了用于同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的试剂盒。本发明方法简便、高效、准确、同时检测,适合于推广到其他多种肿瘤相关标志物的同时标记及定量分析。

1. 一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法,该方法采用第一种量子点标记所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体,或者标记能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,以及至少第二种量子点标记其表达蛋白的抗体,或者标记能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同,第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述肿瘤相关成纤维细胞标记物为 $\alpha$ -SAM。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述表达蛋白为肿瘤标记物。

4. 根据权利要求1~3任一项所述的方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1). 将石蜡包埋的组织4 $\mu$ m厚切片固定于经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上,然后脱蜡,水化,用TBS缓冲液冲洗3次,每次3-4min;

(2) 配制0.01M pH6.0柠檬酸缓冲液,其中A液:0.1M/L柠檬酸:柠檬酸21.0g,加蒸馏水调至1000mL,浓盐酸调pH值为6.0;B液:0.1M/L柠檬酸钠溶液:柠檬酸钠29.41g,加蒸馏水调至1000mL,取A液1.9mL,B液8.1mL,加蒸馏水90mL,95 $^{\circ}$ C微波抗原修复10min,冷却30min,TBS冲洗3次,每次3-4min;

(3) 滴加2%胎牛血清白蛋白封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C孵育20-30min;

(4) 滴加兔抗人待检测表达蛋白抗体和鼠抗人成纤维细胞标记物 $\alpha$ -SAM抗体的混合物,37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育1-2h或4 $^{\circ}$ C过夜;

(5) 滴加2%BSA稀释的生物素化羊抗兔或鼠IgG,37 $^{\circ}$ C湿盒孵育30-60min;

TBS-T溶液洗涤切片3次,每次3-4min;

加2%BSA封闭缓冲液,37 $^{\circ}$ C湿盒中孵育15-20min;

(6) 滴加2%BSA稀释的波长为605nm的QDs标记的链霉亲和素复合物和波长为545nm的QDs标记的羊抗鼠或羊抗兔IgG;37 $^{\circ}$ C湿盒孵育30-60min,TBS-T溶液洗涤3次,每次3-4min;

(7)TBS溶液洗涤2次,每次3-4min;

(8)90%缓冲甘油封片,上荧光显微镜,紫外光同时激发两种QDs,以细胞内出现橙红色和绿色的荧光颗粒为阳性。

5. 量子点在制备检测肿瘤相关成纤维细胞和其蛋白表达试剂中的应用。

6. 用于检测肿瘤相关成纤维细胞和其蛋白表达的试剂盒,其包括第一种量子点标记的所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体,或者标记的能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗,或者标记的链霉亲和素,以及至少第二种量子点标记的其表达蛋白的抗体,或者标记的能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗,或者标记的链霉亲和素,其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同,第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。

7. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述肿瘤相关成纤维细胞标记物为 $\alpha$ -SAM。

8. 根据权利要求6所述的试剂盒,其特征在于,所述表达蛋白为肿瘤标记物。

9. 根据权利要求6~8任一项所述的试剂盒,其特征在于,其还包括以下试剂中的一种

或多种 ;TBS 缓冲液、柠檬酸缓冲液和封闭缓冲液。

## 一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于组织免疫荧光技术领域,具体涉及同时检测肿瘤相关成纤维细胞(Cancer associated fibroblasts, CAFs)和其表达蛋白的标记方法。

### 背景技术

[0002] 在肿瘤发生、发展过程中,微环境充当着“土壤”的作用,是促进肿瘤进展的重要条件。肿瘤微环境由多种成分组成,除肿瘤细胞本身以外,还包括成纤维细胞、免疫或炎性细胞、脂肪细胞以及血管内皮细胞等。其中成纤维细胞数目较多。在肿瘤细胞的影响下,微环境发生了一系列变化从而更加适合肿瘤细胞的生存。CAF<sub>s</sub> 是被肿瘤细胞激活的成纤维细胞,高表达  $\alpha$ -平滑肌肌动蛋白( $\alpha$ -smooth muscle actin,  $\alpha$ -SMA)是其重要标志之一。CAF<sub>s</sub> 作用广泛,对肿瘤的浸润和转移起着重要的作用。它参与细胞外基质的沉积和降解,并且分泌大量的细胞因子,调节自身及周围肿瘤细胞的增殖、血管的新生和肿瘤免疫,促进肿瘤细胞的迁移。目前已有研究表明,表达在 CAF<sub>s</sub> 上的蛋白不仅可成为判断肿瘤预后的标志物,而且可能成为肿瘤治疗的新靶点。

[0003] 目前,肿瘤微环境已成为肿瘤相关研究的热点。CAF<sub>s</sub> 所发挥的重要作用也越来越受到研究者的关注,尤其是对表达在 CAF<sub>s</sub> 上的肿瘤标记物的研究。要研究表达在 CAF<sub>s</sub> 上的肿瘤标记物,常常需要同时精确观察 CAF<sub>s</sub> 的标记物  $\alpha$ -SMA 及其相关功能蛋白的定位和表达情况。以往的研究中,多采用传统的免疫组织化学法进行定位观察。然而无论是免疫酶法,还是传统免疫荧光法,都有其固有的缺点,有待改进。

[0004] 免疫组织化学法:基于抗原抗体特异性结合原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(如荧光素、金属离子、酶等)显色来确定组织细胞的抗原,并进行定位、定性及定量的研究。由于具有特异性强、灵敏度高、技术简单等优点,免疫组织化学法常常被用于医学研究和临床病理诊断中。然而,传统免疫荧光法所发荧光易与组织高自发荧光混淆、易淬灭、结果不易长期保存、且对研究条件要求较高等缺点,限制了它的广泛应用。此外,传统荧光染料所需激发光谱较窄,使其只能用不同的激发光激发不同的荧光染料标记的抗原显色,然后通过图像合成的方法观察两种或两种以上的抗原共表达情况,过程复杂且容易产生偏倚,使结果的准确性降低。而免疫酶法的显色基于色原的沉着,不利于在同一张切片上观察两种或两种以上抗原。

[0005] 量子点(quantum dots, QDs)是一种半导体纳米晶体,直径约 1-10nm,由 II-VIII 或 III-V 族元素组成。在激发光的诱导下,可发出荧光。到目前为止,还没有将量子点用于 CAF<sub>s</sub> 和其表达的肿瘤标记物的标记。

### 发明内容

[0006] 本发明的目的在于提供一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法。

[0007] 本发明的另一个目的在于提供用于同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的试剂盒。

[0008] 为实现上述目的,本发明采用如下技术方案:

一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法,该方法采用第一种量子点标记所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体,或者标记能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,以及至少第二种量子点标记其表达蛋白的抗体,或者标记能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗,或者标记链霉亲和素,其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同,第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。

[0009] 所述肿瘤相关成纤维细胞标记物可以是  $\alpha$ -SAM,所述表达蛋白可以是肿瘤标记物,或其他待检蛋白或多肽。

[0010] 具体地,本发明方法包括如下步骤:

(1). 将石蜡包埋的组织  $4\mu\text{m}$  厚切片固定于经多聚赖氨酸处理的防脱玻片上,然后脱蜡,水化,用 TBS 缓冲液冲洗 3 次,每次 3-4min;TBS 缓冲液配制方法是:三羟基氨基甲烷 1.21g,氯化钠 7.6g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 到 7.4。

[0011] (2). 配制 0.01M pH6.0 柠檬酸缓冲液,其中 A 液:0.1M/L 柠檬酸:柠檬酸 21.0g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 值为 6.0;B 液:0.1M/L 柠檬酸钠溶液:柠檬酸钠 29.41g,加蒸馏水调至 1000mL,取 A 液 1.9mL, B 液 8.1mL,加蒸馏水 90mL,95 C 微波抗原修复 10min,冷却 30min, TBS 冲洗 3 次,每次 3-4min;

(3). 滴加 2% 胎牛血清白蛋白封闭缓冲液,37C 孵育 20-30min;

(4). 滴加兔抗人待检测表达蛋白抗体和鼠抗人成纤维细胞标记物  $\alpha$ -SAM 抗体的混合物,37C 湿盒中孵育 1-2h 或 4C 过夜;

(5). 滴加 2%BSA 稀释的生物素化羊抗兔或鼠 IgG,37 C 湿盒孵育 30-60min。TBS-T 溶液洗涤切片 3 次,每次 3-4min。加 2%BSA 封闭缓冲液,37C 湿盒中孵育 15-20min;

(6). 滴加 2% BSA 稀释的波长为 605nm 的 QDs 标记的链霉亲和素复合物和波长为 545nm 的 QDs 标记的羊抗鼠或羊抗兔 IgG;37 C 湿盒孵育 30 -60min, TBS-T 溶液洗涤 3 次,每次 3-4min;

(7). TBS 溶液洗涤 2 次,每次 3-4min;

(8). 90%缓冲甘油封片,上荧光显微镜,紫外光同时激发两种 QDs,以细胞内出现橙红色和绿色的荧光颗粒为阳性。

[0012] 根据上述检测方法,本发明提供量子点在制备检测肿瘤相关成纤维细胞和其蛋白表达试剂中的应用。

[0013] 量子点具有独特光学特性,主要体现在:①量子点是多电子体系,发光率远远高于单个分子,发射光强度是传统有机荧光染料(如最常用的罗丹明 6G 染料)的 20 倍;②量子点具有范围相当宽的激发波长,几乎涵盖了整个光谱,因此同一波长的光能激发直径大小不同的多种量子点;③量子点具有狭窄而对称的光谱峰和较大的斯托克斯位移,这使其发射光几乎不会出现交叠现象,通过控制量子点直径大小,可获得多种颜色可分辨的光;④量子点较传统有机荧光材料稳定性更强,即使反复多次激发也不容易发生淬灭;⑤量子点具有良好的生物兼容性,用做标记物对标本的生物活性无影响。因此,量子点在分子标记方面有着广阔的应用前景,不仅可以实现单一分子的标记,而且可以进行多分子、多组分同时显色,对开发研究多种成分相互作用机制以及表达在特定细胞上的肿瘤标记物的研究提供

了新方法。

[0014] 具体地,本发明提供的用于检测肿瘤相关成纤维细胞和其蛋白表达的试剂盒,其包括第一种量子点标记的所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体,或者标记的能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗,或者标记的链霉亲和素,以及至少第二种量子点标记的其表达蛋白的抗体,或者标记的能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗,或者标记的链霉亲和素,其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同,第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。

[0015] 上述试剂盒还可包括以下试剂中的一种或多种:TBS 缓冲液、柠檬酸缓冲液和封闭缓冲液。

[0016] 本发明提供了在肿瘤组织中同时标记肿瘤基质 CAFs 和其表达的肿瘤标记物的方法,其核心在于结合了免疫荧光技术和量子点独特光学特性。与现有的荧光技术相比,本方法主要具有以下优势:①灵敏度更高,传统的免疫荧光标记物很难在石蜡包埋的标本上检测抗原的表达,而以量子点为标记的免疫荧光法可以很好地在石蜡标本上进行抗原的检测,且背景清晰,便于分辨组织形态(图 1);②激发光谱广,不同直径的量子点可被同时激发,实现直观地观察到多种标记物,无需图像合成,有利于研究肿瘤组织中多种成分的相互作用(图 2,图 3)。③由于荧光色泽与背景色泽对比鲜明,荧光效率高,便于结果判断以及使用图像分析软件进行定量分析;④结果能长期保存,即使多次激发也不易淬灭;⑤实验条件不苛刻,整个实验过程均不需要避光,在一般免疫组化室均可完成,适合于广泛推广应用。

[0017] 本发明一种同时标记 CAFs 和其表达的肿瘤标记物的方法。主要涉及在免疫荧光技术的基础上,使用量子点标记的二抗或链霉亲和素来检测  $\alpha$ -SMA 和肿瘤标记物的共定位和定量。本方法准确、简便、快速,所有标记物同时显色,结果直观,为探究 CAFs 在肿瘤发生发展中的作用机制和寻找表达于 CAFs 上的肿瘤标志物提供了技术支持。

## 附图说明

[0018] 图 1 为量子点单色标记胃癌组织 Cav-1 蛋白(A)与 H&E 染色(B)对照图。A 中红色信号(如箭头 1)为 Cav-1 阳性信号,绿色信号(如箭头 2)为组织自发荧光。A 图背景清晰,可很好的显示组织构成。A、B 为连续切片,放大倍数为 40 $\times$ 。

[0019] 图 2 量子点同时标记胃癌组织 Cav-1 蛋白和基质 CAFs。A:发射光谱,其中红色(1)和绿色(2)分别为 QDs(605 nm)和 QDs(545 nm)的发射光,组织自发荧光为黑色(3);B:红色信号即 Cav-1 阳性信号;C:绿色信号即  $\alpha$ -SMA 阳性信号;D:Cav-1 和  $\alpha$ -SMA 同时显示。放大倍数:400 $\times$ 。注:黑白模式下观察到的即为荧光信号。

[0020] 图 3 量子点同时标记肺癌组织 Cav-1 蛋白和基质 CAFs。A:绿色信号即  $\alpha$ -SMA 阳性信号;B:红色信号即 Cav-1 阳性信号;C:Cav-1 和  $\alpha$ -SMA 同时标记(滤掉组织自发荧光)。D:Cav-1 和  $\alpha$ -SMA 同时标记,灰色为组织自发荧光。放大倍数:400 $\times$ 。

## 具体实施方式

[0021] 以下实施例用于进一步说明本发明,但不应理解为对本发明的限制。

[0022] 实施例 1 在胃癌组织芯片上同时标记 Cav-1 蛋白和 CAFs

1. 配制 TBS 缓冲液:三羟基氨基甲烷 1.21g,氯化钠 7.6g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 到 7.4。取 4 μ m 厚的胃癌组织芯片,脱蜡,水化,用 TBS 缓冲液(pH7.4)冲洗 3 次,每次 3-4min。

[0023] 2. 配制 0.01M pH6.0 柠檬酸缓冲液。A 液:0.1M/L 柠檬酸:柠檬酸 21.0g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 值为 6.0 ;B 液:0.1M/L 柠檬酸钠溶液:柠檬酸钠 29.41g,加蒸馏水调至 1000mL。取 A 液 1.9mL,B 液 8.1mL,加蒸馏水 90mL,95 C 微波抗原修复 10min,冷却 30min。TBS 冲洗 3 次,每次 3-4min。

[0024] 3. 滴加 2%BSA 封闭缓冲液(取 2g BSA 溶于 100mL TBS 溶液中制成),37C 孵育 20-30min。

[0025] 4. 滴加兔抗人 Cav-1 抗体(购自 se-894,美国 Santacruz 公司)和鼠抗人成纤维细胞标记物 α-SAM 抗体(购自英国 Abcam 公司,稀释比例为 1:150 )的混合物,37C 湿盒中孵育 1-2h。

[0026] 5. 滴加 2%BSA 稀释的生物素化羊抗兔 IgG(北京中杉金桥生物技术有限公司),37 C 湿盒孵育 45min。TBS-T 溶液洗涤切片 3 次,每次 3-4min。加 2%BSA 封闭缓冲液,37C 湿盒中孵育 15min。

[0027] 6. 滴加 2%BSA 稀释的 QDs (605nm)标记的链霉亲和素复合物(购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)(稀释比例为 1:120)和 QDs (545nm) 标记的羊抗鼠 IgG(购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司)(稀释比例为 1:80);37 C 湿盒孵育 30 -60min。TBS-T 溶液洗涤 3 次,每次 3-4min。

[0028] 7. TBS 溶液洗涤 2 次,每次 3-4min。

[0029] 8. 90%缓冲甘油封片,上荧光显微镜,紫外光同时激发 QDs(605 nm) 和 QDs(545 nm),细胞内橙红色荧光信号标记的是 Cav-1 蛋白,绿色荧光信号标记的是 CAFs (α-SAM)(见图 2)。

[0030] 实施例 2 在肺癌组织芯片上同时标记 Cav-1 蛋白和 CAFs

1. 配制 TBS 缓冲液:三羟基氨基甲烷 1.21g,氯化钠 7.6g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 到 7.4。取 4 μ m 厚的肺癌组织芯片,脱蜡,水化,用 TBS 缓冲液(pH7.4)冲洗 3 次,每次 3-4min。

[0031] 2. 配制 0.01M pH6.0 柠檬酸缓冲液。A 液:0.1M/L 柠檬酸:柠檬酸 21.0g,加蒸馏水调至 1000mL,浓盐酸调 pH 值为 6.0 ;B 液:0.1M/L 柠檬酸钠溶液:柠檬酸钠 29.41g,加蒸馏水调至 1000mL。取 A 液 1.9mL,B 液 8.1mL,加蒸馏水 90mL,95 C 微波抗原修复 10min,冷却 30min。TBS 冲洗 3 次,每次 3-4min。

[0032] 3. 滴加 2%BSA 封闭缓冲液(取 2g BSA 溶于 100mL TBS 溶液中制成),37C 孵育 20-30min。

[0033] 4. 滴加兔抗人 Cav-1 抗体(购自美国 Santacruz 公司)和鼠抗人成纤维细胞标记物 α-SAM 抗体(购自英国 Abcam 公司)(稀释比例为 1:150 )的混合物,4C 过夜。

[0034] 5. 滴加 2%BSA 稀释的生物素化羊抗兔 IgG,(购自北京中杉金桥生物技术有限公司)37 C 湿盒孵育 45min。TBS-T 溶液洗涤切片 3 次,每次 3-4min。加 2%BSA 封闭缓冲液,37C 湿盒中孵育 20min。

[0035] 6. 滴加 2%BSA 稀释的 QDs (605nm)标记的链霉亲和素复合物(购自武汉珈源量子

点技术开发有限责任公司) (稀释比例为 1:120) 和 QDs (545nm) 标记的羊抗鼠 IgG (购自武汉珈源量子点技术开发有限责任公司) (稀释比例为 1:80); 37 °C 湿盒孵育 45min。TBS-T 溶液洗涤 3 次, 每次 3-4min。

[0036] 7. TBS 溶液洗涤 2 次, 每次 3-4min。

[0037] 8. 90% 缓冲甘油封片, 上荧光显微镜, 紫外光同时激发 QDs (605 nm) 和 QDs (545 nm), 细胞内橙红色荧光信号标记的是 Cav-1 蛋白, 绿色荧光信号标记的是 CAFs ( $\alpha$ -SAM) (见图 3)。

[0038] 免疫酶法研究表达在 CAFs 的肿瘤标记需要进行连续切片, 对比识别 CAFs; 传统的荧光染色双标法必须在不同波长下激发, 通过软件进行图像合成, 然后才能获得双标图像, 容易造成结果偏倚。而用量子点进行免疫荧光多重染色, 在灵敏度高, 特异度强的前提下, 可以同时显示 CAFs 的标记物和待研究的表达于 CAFs 上的肿瘤标记物, 并具有石蜡切片免疫组织化学染色组织细胞结构, 抗原定位稳定的特点。综合以上实例, 可以看出本方法简单易行, 重复性高, 多指标同时成像等, 在一般免疫组化实验室即可完成, 适于大范围推广。

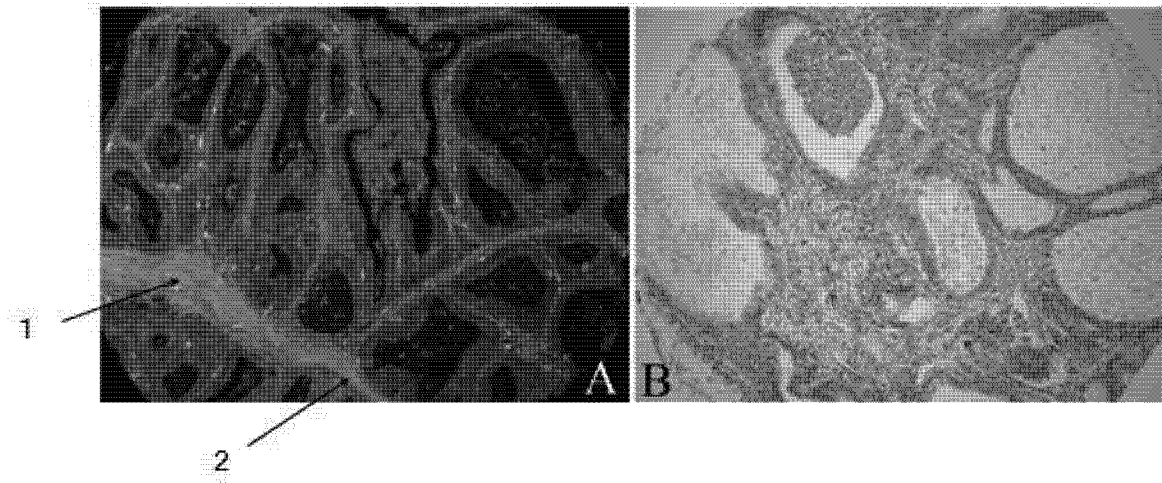


图 1

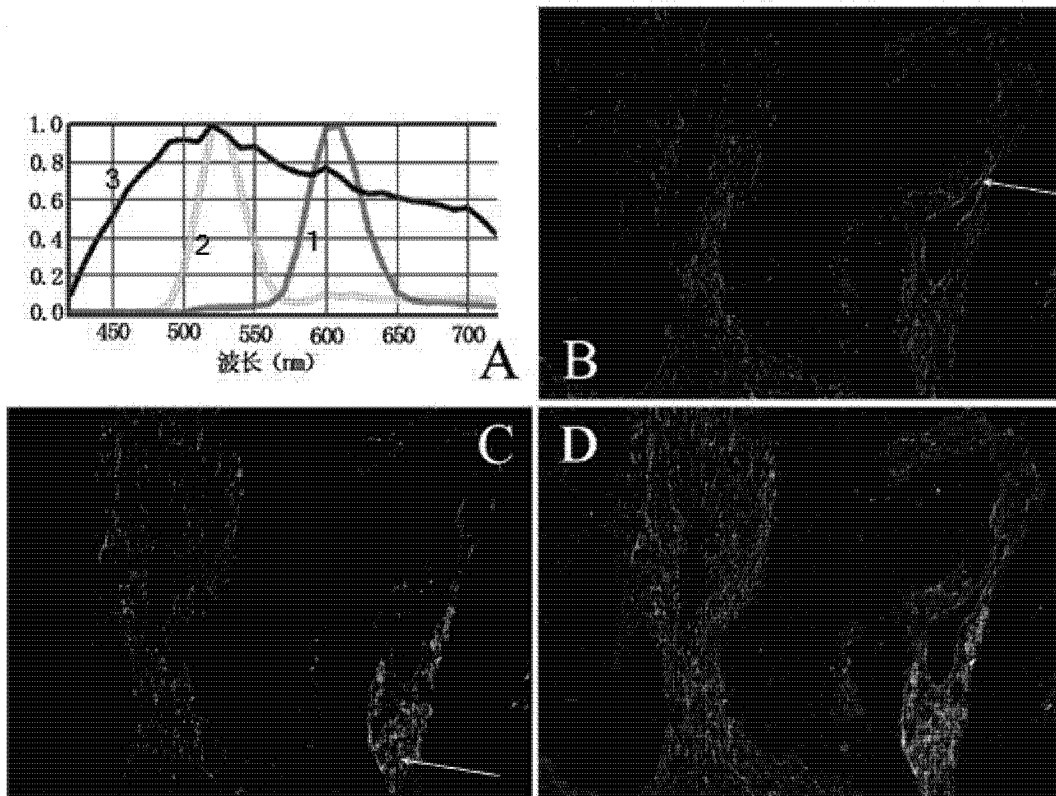


图 2

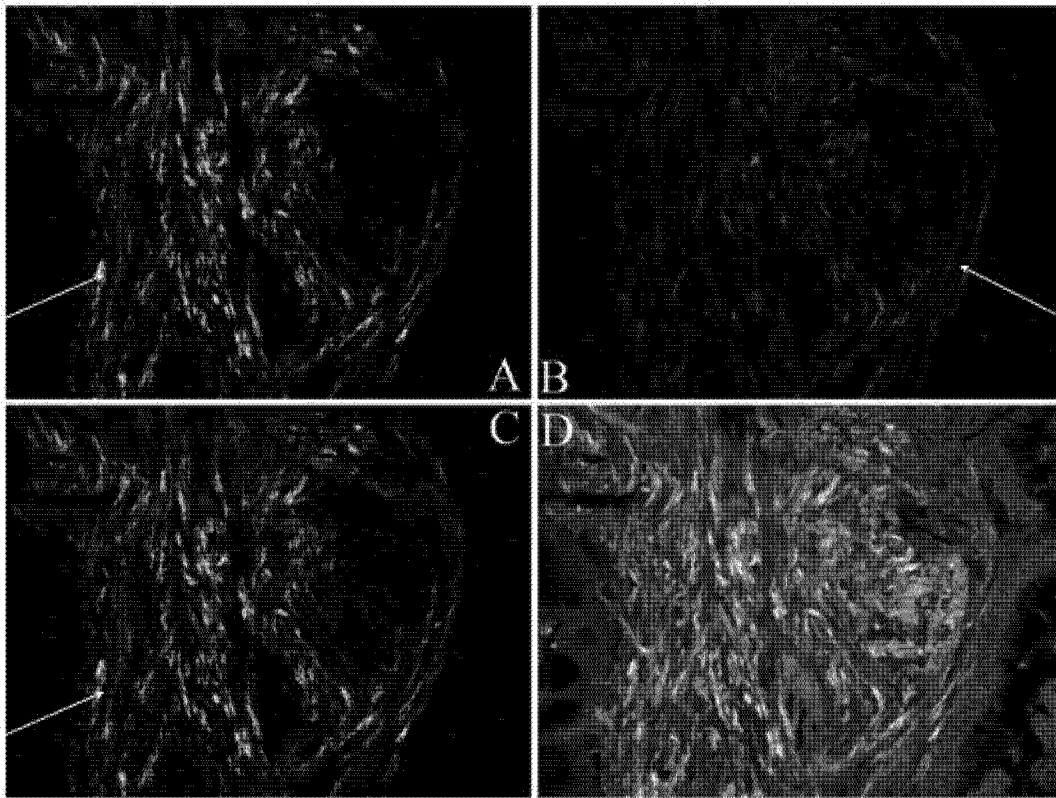


图 3

专利名称(译)	一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103063849A</a>	公开(公告)日	2013-04-24
申请号	CN201210582824.5	申请日	2012-12-28
[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	何禹禹 赵显达 陈洪雷 朱小波		
发明人	何禹禹 赵显达 陈洪雷 朱小波		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	薛玲		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的方法，属于组织免疫荧光技术领域。该方法采用第一种量子点标记所述肿瘤相关成纤维细胞标记物的抗体，或者标记能与所述成纤维细胞标记物的抗体特异结合的二抗，或者标记链霉亲和素，以及至少第二种量子点标记其表达蛋白的抗体，或者标记能与所述其表达蛋白的抗体特异结合的二抗，或者标记链霉亲和素，其中第一种量子点和第二种量子点的发射波长不同，第一种量子点和第二种量子点不同时标记链霉亲和素。本发明还公开了用于同时检测肿瘤相关成纤维细胞和其表达蛋白的试剂盒。本发明方法简便、高效、准确、同时检测，适合于推广到其他多种肿瘤相关标志物的同时标记及定量分析。

