



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108445206 A

(43)申请公布日 2018.08.24

(21)申请号 201710083178.0

(22)申请日 2017.02.16

(71)申请人 中国科学院合肥物质科学研究院

地址 230031 安徽省合肥市蜀山区蜀山湖
路350号

(72)发明人 钟凯 徐金勇 汪增荣

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 贺卫国

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

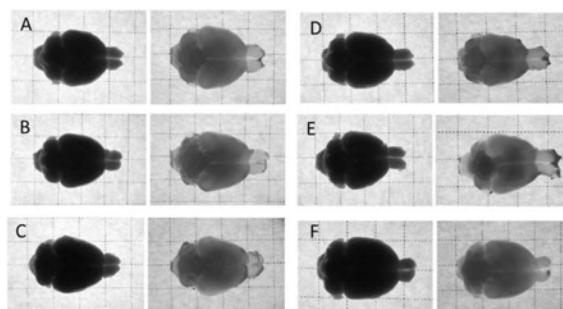
权利要求书1页 说明书7页 附图3页

(54)发明名称

生物组织器官透明化处理液、处理方法和免疫标记方法

(57)摘要

本发明涉及生物组织器官透明化处理液、处理方法和免疫标记方法。本发明的生物组织器官透明化处理液包含：尿素；非离子表面活性剂，其为曲拉通和吐温的混合物；水；和以下任选组分中的至少一种：糖类、氨类、pH调节剂和抗氧化剂。该处理液可使完整脑、脏器、荷瘤脏器整体器官透明，并且允许抗体等生物大分子进入整体器官内。本发明的方法简单、高效、荧光兼容、允许免疫标记，对于在整体器官尺度上探索生物组织三维结构、简化病理组织检验方法等，具有重要的应用价值。



1. 一种生物组织器官透明化处理液, 包含:
尿素;
非离子表面活性剂, 其为曲拉通和吐温的混合物;
水; 和
以下任选组分中的至少一种: 糖类、氨类、pH调节剂和抗氧化剂。
2. 根据权利要求1所述的处理液, 其中所述曲拉通包括曲拉通X-100和曲拉通X-114;
和/或所述吐温包括吐温20, 吐温40和吐温60。
3. 根据权利要求1所述的处理液, 其中在所述非离子表面活性剂中, 曲拉通与吐温的体积比例为5:3至1:5。
4. 根据权利要求1所述的处理液, 其中
所述糖类为果糖或蔗糖中的至少一种; 和/或
所述氨类为氨水; 和/或
所述pH调节剂为碳酸钠/碳酸氢钠、醋酸钠和柠檬酸钠中的至少一种; 和/或
所述抗氧化剂为巯基乙醇、 α -巯基甘油、硫辛酸和维生素C中的至少一种。
5. 根据权利要求1所述的处理液, 其中每100ml处理液包含: 20-30g的尿素, 5-30ml的非离子表面活性剂, 0-60g的糖类, 0-20ml的氨类, 0-200mmol/l的pH调节剂, 0-2ml的抗氧化剂, 余量为水。
6. 根据权利要求5所述的处理液, 其中每100ml处理液包含: 20-30g的尿素, 10-15ml的非离子表面活性剂, 40-60g的糖类, 0-20ml的氨类, 0-2ml的抗氧化剂, 余量为水; 优选地, 随着糖类含量的增加, 尿素含量也增加, 或者随着糖类含量的减少, 尿素含量也减少。
7. 根据权利要求5所述的处理液, 其中每100ml处理液包含: 20-30g的尿素, 5-30ml的非离子表面活性剂, 0-20ml的氨类, 0-200mmol/l的pH调节剂, 0-2ml的抗氧化剂, 余量为水。
8. 一种生物组织器官透明化处理方法, 包括用权利要求1至7中任一项所述的处理液浸泡生物组织器官; 优选地, 所述生物组织器官包括完整的脑、脏器以及荷瘤脏器。
9. 根据权利要求8所述的方法, 其中
当使用含糖类且不含氨类的处理液时, 生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行2-3天;
当使用含糖类且含氨类的处理液时, 该处理液中含有抗氧化剂, 并且生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行12-15小时;
当使用不含糖类且不含氨类的处理液时, 该处理液中含有pH调节剂, 并且生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行7-30天。
10. 一种使生物组织器官透明化同时进行免疫标记的方法, 包括将荧光标记抗体以1:50-1:200的比例溶于权利要求1至7中任一项所述的处理液中, 并且用所得的处理液浸泡生物组织器官样本。

生物组织器官透明化处理液、处理方法和免疫标记方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物组织器官透明化和免疫标记的方法,特别是涉及一种让完整脑、脏器(例如肝、肾脏、心脏)、荷瘤脏器等整体器官透明化的处理液及处理方法以及免疫荧光标记方法。

背景技术

[0002] 组织透明方法可以实现组织无损情况下的大尺度高分辨检测与组织形态的三维结构重建。相对于传统的组织切片与染色方法具有显著性的进步。目前开发的所有组织透明方法,其机理的假设是基于两个方面:1)生物膜脂质对光线的散射作用;2)生物组织内部各组成成分折光率的差异。目前,组织透明方法一般采用清除细胞膜脂质,以及选择高折射率溶液的折射率匹配,从而实现生物组织的透明化。现存的透明方案有:有机溶液浸泡实现溶液和样本组织折射率的匹配,如BABB,iDisco等;水溶液浸泡实现溶液和样本组织折射率的匹配,如SeeDB,Fruit等;丙烯酸胺包埋成凝胶,然后电泳去除脂质或者溶液浸泡匹配组织折光率,如Clarity,Act-presto等。其中,部分组织透明方案允许整体器官免疫标记,如iDisco,Clarity,Cubic,ACT-presto等,Clarity和Cubic均去除了细胞膜,允许大分子进入,但是过程繁琐,需时近1-2周;iDisco是有机溶剂,荧光兼容性较差,组织变硬变脆,且刺激性气味对人体有害;ACT-presto借助压力,需要专门设备,且免疫标记前需要繁杂的前处理过程。

发明内容

[0003] 本发明旨在提供一种操作简单、高效、无明显结构变形的整体器官透明及免疫标记的技术方案。

[0004] 为了实现上述目的,作为本发明的一个方面,本发明提供一种生物组织器官透明化处理液,包含:

[0005] 尿素;

[0006] 非离子表面活性剂,其为曲拉通和吐温的混合物;

[0007] 水;和

[0008] 以下任选组分中的至少一种:糖类、氨类、pH调节剂和抗氧化剂。

[0009] 在某些实施方案中,曲拉通包括曲拉通X-100和曲拉通X-114。

[0010] 在某些实施方案中,吐温包括吐温20,吐温40和吐温60。

[0011] 在某些实施方案中,非离子表面活性剂中曲拉通与吐温的体积比例为5:3至1:5;优选地曲拉通为曲拉通X-100并且吐温为吐温60。

[0012] 在某些实施方案中,糖类为果糖或蔗糖中的至少一种。

[0013] 在某些实施方案中,氨类为氨水。

[0014] 在某些实施方案中,pH调节剂为碳酸钠/碳酸氢钠、醋酸钠和柠檬酸钠中的至少一种。

[0015] 在某些实施方案中,抗氧化剂为巯基乙醇、 α -巯基甘油、硫辛酸和维生素C中的至少一种。

[0016] 在某些实施方案中,每100ml处理液包含:20-30g的尿素,5-30ml的非离子表面活性剂,0-60g的糖类,0-20ml的氨类,0-200mmol/l的pH调节剂,0-2ml的抗氧化剂,余量为水。

[0017] 在某些实施方案中,每100ml处理液包含:20-30g的尿素,10-15ml的非离子表面活性剂,40-60g的糖类,0-20ml的氨类,0-2ml的抗氧化剂,余量为水;优选地,随着糖类含量的增加,尿素含量也增加,或者随着糖类含量的减少,尿素含量也减少。

[0018] 在某些实施方案中,每100ml处理液包含:20-30g的尿素,5-30ml的非离子表面活性剂,0-20ml的氨类,0-200mmol/l的pH调节剂,0-2ml的抗氧化剂,余量为水。

[0019] 作为本发明的另一个方面,本发明还提供一种生物组织器官透明化处理方法,包括用上述的处理液浸泡生物组织器官。

[0020] 作为本发明的另一个方面,本发明还提供一种使生物组织器官透明化同时进行免疫标记的方法,包括将荧光标记抗体以1:50-1:200的比例溶于上述的处理液中,并且用所得的处理液浸泡生物组织器官。

[0021] 在某些实施方案中,所述生物组织器官包括完整脑、肝以及荷瘤组织器官。

[0022] 在某些实施方案中,当使用含糖类且不含氨类的处理液时,生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行2-3天。

[0023] 在某些实施方案中,当使用含糖类且含氨类的处理液时,该处理液中含有抗氧化剂,并且生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行12-15小时。

[0024] 在某些实施方案中,当使用不含糖类且不含氨类的处理液时,该处理液中含有pH调节剂,并且生物组织器官样本在处理液中的浸泡在37℃恒温进行7-30天。

[0025] 根据本发明,整个操作过程简单,不需要特殊实验装置,不需要梯度配液及更换;本发明方法的某些实施例透明效果确定、透明速度快,不会引起组织严重变形;既能与内源性荧光标记相兼容,也可以进行免疫荧光;没有明显的组织膨胀或皱缩等变形现象,PBS浸泡可实现可逆恢复,并且还可以进行切片及常规组织学检测。

附图说明:

[0026] 图1为成年小鼠脑在不同浓度果糖、尿素处理液及Fruit透明液中处理前后的对比图;(A:40%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween 60;B:40%果糖+5M尿素+5%TritonX-100+6%Tween 60;C:52%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;D:60%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;E:60%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;F:Fruit透明溶液。格栅:栅格为5mm×5mm)

[0027] 图2显示了分光光度计检测的各溶液折光率及透明处理后成年小鼠整脑的透光率;

[0028] (左图:本发明透明液实施例(含糖且不含氨)、Fruit、PBS透明液的折光率;右图:成年小鼠整脑标本经本发明透明液实施例(含糖且不含氨)、Fruit、PBS透明浸泡后的的透光率对比曲线图)

[0029] 图3为本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对荧光素的荧光兼容性实验结果(3天后);

[0030] (左图:PBS配制Alexa-488三天后的荧光强度;中图:本实施例透明溶液配制Alexa-488三天后的荧光强度;右图:水合氯醛配制Alexa-488三天后的荧光强度)

[0031] 图4为本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对脂溶性荧光物质DiI的兼容性实验结果;

[0032] (左图:DiI标记HepG2细胞的荧光图片;右图:本发明处理后100um DiI标记HepG2原位种植肝癌组织块的共聚焦成像图片)

[0033] 图5为本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对神经束路顺行追踪病毒HSV-GFP及HSV-mCherry的兼容性试验结果。

[0034] (左图:HSV-GFP顺行追踪剂双光子荧光图片(注射点在嗅球,成像区为梨状皮质);右图:HSV-mCherry顺行追踪剂双光子荧光图片(注射位置在外侧膝状体,成像区为V1区))

[0035] 图6为Thy1-gcamp3-GFP转基因小鼠脑标本经本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)整脑免疫荧光后的双光子显微镜图像

[0036] 图7为小鼠荷瘤肝标本经本发明实施例的处理液(含糖且不含氨),整体器官标记AFP及Survivin后的双光子显微镜图像。

[0037] (上图:整肝AFP免疫荧光图片;下图:整肝Survivin免疫荧光图片)

[0038] 图8为荧光蛋白转基因小鼠脑标本经本发明实施例的处理液(含糖且含氨)浸泡15h后的双光子显微镜图像。

[0039] 图9为小鼠脑标本经本发明实施例的处理液(不含糖且不含氨)浸泡2周后的体视显微镜图像。

具体实施方式

[0040] 发明人发现细胞膜在组织透明化和荧光标记技术中起着非常重要的作用,因而设想通过选择性地诱导细胞膜在原位形成孔隙来实现组织透明。经过进一步研究,发明人还发现细胞膜的孔隙率和大小显著影响透明化的速度和效果以及免疫荧光标记抗体进入细胞,而通过采用特定的非离子性表面活性剂(选自曲拉通和吐温两种的组合),可以使得细胞膜具有合适的孔隙率和大小,同时还保留其完整性(其可以通过用PBS处理而可逆回复),从而实现简单高效的透明化,并与免疫荧光标记技术兼容。

[0041] 即,本发明发现了一种新的透明机制,可以在保留细胞膜脂质的条件下实现组织透明。具体而言,发明人发现:通过选择不同亲水-疏水性非离子表面活性剂的组合,可以在细胞膜上形成具有合适的孔隙率和大小的开口,同时保持细胞膜结构的完整性。

[0042] 为了达到合适的亲水-疏水性,需要控制两者之间的相互比例。发明人发现,曲拉通单独高浓度使用或者曲拉通比例过高时,可能会破坏组织结构,而仅用吐温时,透明时间长,透明效果不佳。只有同时应用曲拉通及吐温,且在合适的比例时(例如5:3-1:5),可在较短的时间内达到较好的透明效果。

[0043] 另外,曲拉通和吐温的具体种类也是经过精心挑选的。其中,乳化作用相对温和的曲拉通X-100和曲拉通X-114是优选的,曲拉通X-100是最优选的。从与曲拉通匹配的角度考虑,吐温20,吐温40和吐温60是优选,最优选吐温60和曲拉通X-100的组合。

[0044] 本发明中,尿素可以用于打破非共价键的相互作用,使蛋白质发生可逆性变性,它的加入增加样品中膜蛋白的溶解性,使其充分水化,降低其折光率。在本发明的处理液中,

尿素的含量可以为20-30g/100ml处理液。

[0045] 本发明的生物组织器官透明化处理液可以含有糖类。但如果仅采用糖类和尿素，生物组织器官的透明化需要很长的时间，而且存在与免疫荧光标记技术不兼容的问题。本发明中，由于采用了曲拉通和吐温的混合非离子表面活性剂，可以实现免疫荧光标记。当还含有糖类时，透明时间与仅采用糖类和尿素相比也会大大缩短。而当不含有糖类时，需用碳酸钠或醋酸钠等pH调节剂调节溶液pH值(9-11.5)，也可以达到较好的透明效果，并兼具免疫荧光标记能力。

[0046] 当本发明的处理液含有糖类时，发明人发现在组织透明液中，当糖类浓度恒定时，尿素浓度越高，组织膨胀越明显；当尿素浓度恒定时，糖类浓度越高，组织皱缩越明显。本发明中，糖类和尿素的浓度同方向变化，例如，选择糖类为40-60%，尿素为20-30%，且两者同向变化，以达到一个既能水化膜蛋白、匹配折光率，又能保证组织不变形，并允许免疫染色的平衡。

[0047] 本发明的生物组织器官透明化处理液还可以含有氨类，例如氨水。氨类可以通过强氢键作用显著提高透明化处理的速度。在本发明的处理液中，氨类的含量可以为0-20ml/100ml处理液，优选0.5-5ml/100ml处理液，更优选0.5-2ml/100ml处理液。在采用糖类且同时采用氨类时，透明化处理时间可以缩短为12小时至15小时。

[0048] 本发明的生物组织器官透明化处理液还可以含有抗氧化剂。抗氧化剂可以为巯基乙醇、 α -巯基甘油、硫辛酸和维生素C中的至少一种。其含量可以为0-2ml/100ml处理液。抗氧化剂可以很好地阻止溶液褐变反应。当本发明的处理液含有氨类时，优选同时含有抗氧化剂。

[0049] 在本发明中，含糖且不含氨的处理液混合在处理组织时，组织的透明度达到与Fruit相当的水平，其他方面都具有优越的性能。尤其是作为使生物组织器官透明化同时进行免疫标记的方法，本发明只需将荧光标记抗体以1:50-1:200的比例溶于处理液或混合液中，并且用所得的处理液或混合液浸泡生物组织器官即可。

[0050] 本发明中，含糖且含氨的处理液，是一种快速简便的组织透明方法：将生物组织器官在本发明的处理液或混合液中持续浸泡12-15h，实现透明化。

[0051] 本发明中，不含糖且不含氨的处理液，是一种能够获得较好组织透明度的方法：将生物组织器官在本发明的处理液或混合液中持续浸泡7-30天，实现透明化。

[0052] 生物组织器官包括完整脑、脏器以及荷瘤脏器等。浸泡可以在37℃恒温进行。

[0053] 下面结合具体实施例，并参照附图，对本发明作进一步的详细说明。

[0054] (1) 标本制备：成年C57BL/N背景的转基因Thy1-gcamp3-GFP小鼠，体重约20-22g，过量3%苯巴比妥钠(2ml/kg)腹腔注射麻醉，用4%PFA经心脏灌注后，断头取脑，置于4%PFA中4℃冰箱中过夜，再次固定。

[0055] 成年C57BL小鼠，体重20-22g，立体定位仪下将构建好的神经束路顺行追踪剂HSV-GFP及HSV-mCherry分别注入嗅球及外侧膝状体，缝合伤口，4天后，过量3%苯巴比妥钠(2ml/kg)腹腔注射麻醉，用4%PFA经心脏灌注后，断头取脑，置于4%PFA中4℃冰箱中过夜，再次固定。

[0056] 裸鼠，体重约20左右，HepG2细胞(1×10^7 , 100u1/只)经皮注射入肝，进行肝原位癌的种植。约1月后，过量3%苯巴比妥钠(2ml/kg)腹腔注射麻醉，用4%PFA经心脏灌注后，剖

腹取肝,置于4%PFA中4℃冰箱中过夜,再次固定。

[0057] (2) 处理液的配制:称取52g果糖于200ml的烧杯,置于60℃水浴中溶解,再加入24g尿素,5ml曲拉通X-100,6ml吐温60,含有或不含有18ml氨水(当含有氨水时加入500ul的 α -巯基甘油,不含有氨水时可以不加 α -巯基甘油),去离子水定容至100ml,室温避光保存。

[0058] 不含糖透明处理液配制:称取30g尿素于200ml的烧杯,再加入5ml曲拉通X-100,3ml吐温60,及0.53g碳酸钠(50mmol/l),去离子水定容至100ml,溶解后,室温避光保存。

[0059] 荧光抗体处理液的配制:用上述配制好的含糖且不含氨的处理液将带荧光标记的抗体以1:50-1:200的比例进行稀释,混匀,避光,待用。

[0060] (3) 透明化处理及免疫荧光标记:

[0061] 整体器官透明化处理——取小鼠脑或肝,用0.01M PBS冲洗,3次 $\times$ 5min,然后置于50ml装有本发明的含糖且不含氨的处理液的离心管中,37℃恒温水浴,3天,待样本透亮后,取出备用;或将脑置于50ml装有本发明的含糖且含氨的处理液的离心管中,37℃恒温水浴,15小时,待样本透亮后,取出备用。或将脑置于50ml装有本发明的不含糖且不含氨的处理液的离心管中,37℃恒温水浴,持续7-30天,待样本透亮后,取出备用。

[0062] 整脑免疫荧光——取小鼠脑,用0.01M PBS冲洗,3次 $\times$ 5min,然后置于5ml离心管中,注入共轭Alexa-594的抗GFP抗体(1:100)与含糖且不含氨的透明处理液配制的组合物中,37℃恒温水浴,待样本透亮后(3d),用含糖且不含氨的本发明处理液冲洗2h,摇床轻摇,并保存在本发明的处理液中直至双光子荧光成像。在整个过程中,荧光抗体配制的组合物应包裹锡纸以避光。

[0063] 整肝免疫荧光——取荷瘤肝,用0.01M PBS冲洗,3次 $\times$ 5min,然后置于5ml离心管中,注入共轭Alexa-488的抗AFP抗体(1:50,Abcam)及抗Survivin抗体(1:50,Cell signal)分别与含糖且不含氨的处理液配制的组合物,37℃恒温水浴,待样本透亮后(1-3d),用含糖且不含氨的本发明处理液冲洗2h,摇床轻摇;然后,放入用本发明的含糖且不含氨的处理液与DAPI配制的核染液(1:5)中,常温。1d后,用本发明的含糖且不含氨的处理液冲洗2h,摇床轻摇,并保存在本发明的处理液中直至双光子荧光成像。在整个过程中,荧光抗体配制的组合物应包裹锡纸以避光。

[0064] 图1至图9显示了部分试验结果。图1为成年小鼠脑在不同浓度果糖、尿素处理液及Fruit透明液处理前后的对比图,其中A:40%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween 60;B:40%果糖+5M尿素+5%TritonX-100+6%Tween 60;C:52%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;D:60%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;E:60%果糖+4M尿素+5%TritonX-100+6%Tween-60;F:Fruit透明溶液。由图1可见,经本发明处理液浸泡后,小鼠脑已经达到透亮状态。另外,当果糖浓度不变,尿素浓度增加时,组织膨胀;当尿素浓度不变,果糖浓度增加时,组织皱缩。因此,具体实施中,溶液成分的配比需要选择一个合适的比例,如果糖浓度为52%,尿素为4M时,组织形态基本不变,可达到光学透明要求,与Fruit一致。

[0065] 图2显示了分光光度计检测的各溶液折光率及透明处理后成年小鼠整脑的透光率。左图:本发明处理液实施例(含糖且不含氨)、Fruit、PBS透明液的折光率;右图:成年小鼠整脑标本经本发明处理液实施例(含糖且不含氨)、Fruit、PBS透明浸泡后的透光率对比曲线图。可见即使溶液成分不同,三种溶液的透光率几乎是重叠的,PBS的透光率稍高。在

处理脑组织后,本发明处理液实施例处理的小鼠脑的透光率不逊于梯度果糖溶液Fruit处理三天后的小鼠脑透光率;PBS浸泡24h后小鼠脑的透光率基本没改变。

[0066] 图3为本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对荧光素的荧光兼容性实验(3天后)。左图:PBS配制Alexa-488三天后的荧光强度;中图:本实施例透明溶液配制Alexa-488三天后的荧光强度;右图:水合氯醛配制Alexa-488三天后的荧光强度。可见该实施例处理液的荧光兼容性与PBS相当。

[0067] 图4显示了本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对脂溶性荧光物质DiI的兼容性实验。左图:DiI标记HepG2细胞的荧光图片;右图:本发明处理后100um DiI标记HepG2原位种植肝癌组织块的共聚焦成像图片。可见,本发明的处理液与脂溶性荧光物质DiI兼容,并且在透明后共聚焦成像图片中,细胞膜仍清晰可见,不损坏细胞膜。

[0068] 图5显示了本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)对神经束路顺行追踪病毒HSV-GFP及HSV-mCherry的兼容性试验。左图:HSV-GFP顺行追踪剂双光子荧光图片(注射点在嗅球,成像区为梨状皮质);右图:HSV-mCherry顺行追踪剂双光子荧光图片(注射位置在外侧膝状体,成像区为V1区)。远隔部分神经轴突都可以标记上,可见该实施例处理液与神经束路追踪剂的荧光具有兼容性。

[0069] 图6为Thy1-gcamp3-GFP转基因小鼠脑标本经本发明实施例的处理液(含糖且不含氨)整脑免疫荧光后的双光子显微镜图像。可见本发明处理液与荧光蛋白GFP也是兼容的,且允许大分子抗体物质进入,同步实现了整体器官的透明化处理及免疫荧光。

[0070] 图7显示了小鼠荷瘤肝标本经本发明的处理液(含糖且不含氨)透明化处理并整体器官标记AFP及Survivin后的双光子显微镜图像。上图:整肝AFP免疫荧光图片;下图:整肝Survivin免疫荧光图片。可见,经过该实施例处理液处理后,整肝组织可实现同时透明化及免疫荧光标记,携带Alexa-488的抗AFP可以进入整体肝组织,并且在荷瘤肝的肿瘤细胞胞浆中特异性表达(与DAPI染色互补),携带Alexa-488的抗Survivin可以也进入整体肝组织,并且在荷瘤肝的肿瘤细胞核中特异性表达(与DAPI染色重叠)。

[0071] 图8为Thy1-gcamp3-GFP荧光蛋白转基因小鼠脑标本经本发明处理液(含糖且含氨)组合浸泡后的双光子显微镜图像,显示出双光子显微镜下转基因小鼠整脑标本的荧光信号。从图片上可见,转基因小鼠脑经本发明实施例(含糖且含氨)的处理液组合浸泡处理后,脑内荧光标记明亮,神经元形态饱满,纤维突起清楚。

[0072] 图9为小鼠脑经本发明处理液(不含糖且不含氨)浸泡2周天后,浸泡在该透明液中的体视显微镜图片,显示出组织透明度良好。

[0073] 本发明的技术方案至少具有以下优点之一:

[0074] 1、本发明所用处理液不必使用梯度果糖溶液,不必频繁换液,37℃水浴恒温浸泡,没有繁杂的预处理和处理过程,操作简单;

[0075] 2、本发明可使器官透明,透明前后器官大小形态基本一致,与Fruit的透光效果相近(如图1、2、9所示);

[0076] 3、本发明所用处理液(含糖且不含氨)荧光兼容性好,与荧光素、脂溶性荧光物质、神经束路追踪剂、荧光蛋白都兼容(见图3、4、5、6);

[0077] 4、本发明所用处理液不破坏细胞膜(见图4);

[0078] 5、本发明所用处理液(含糖且不含氨)可与携带荧光的抗体配制成整体免疫荧光

溶液,可在整体器官水平实现同时透明化及免疫荧光标记的目的(见图6、7);

[0079] 6、本发明所用处理液(含糖且含氨)可在15h内完成快速透明,且具有荧光兼容性(见图8)。

[0080] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并非限定发明保护范围,凡在本发明的精神和原则之内的任何修改、替换或改进等均包含在本发明的保护范围中。

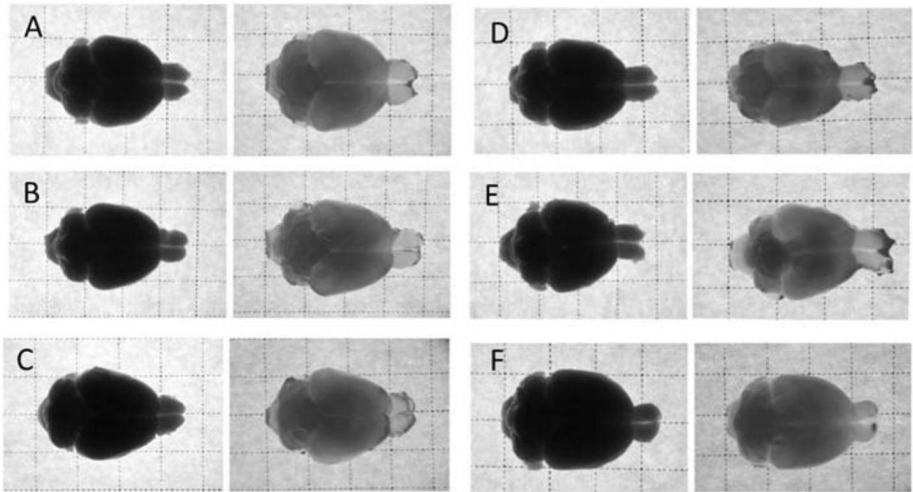


图1

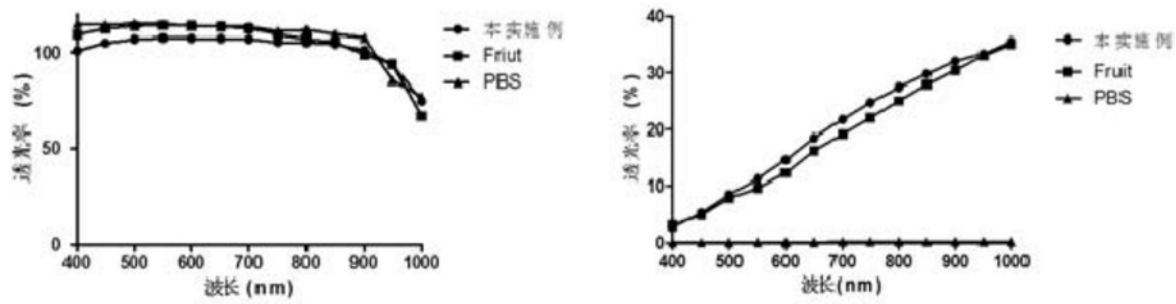


图2

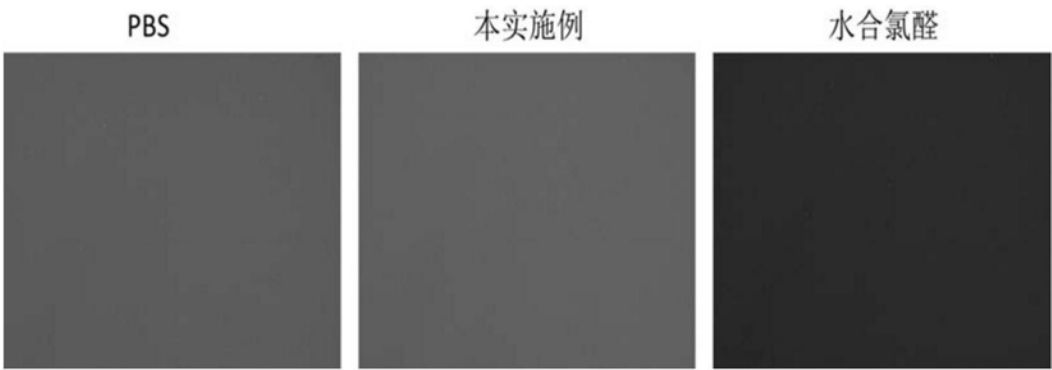


图3

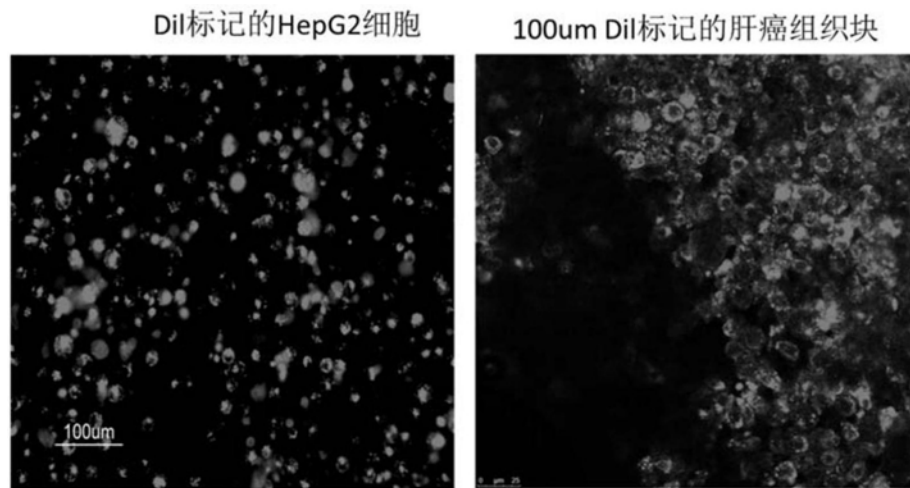


图4

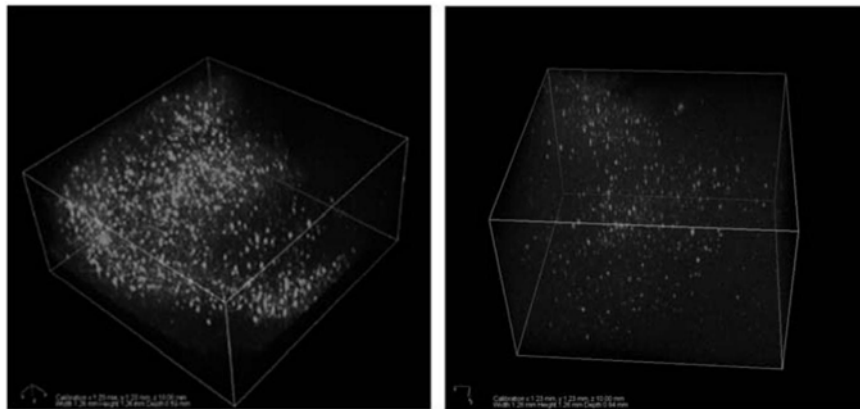


图5

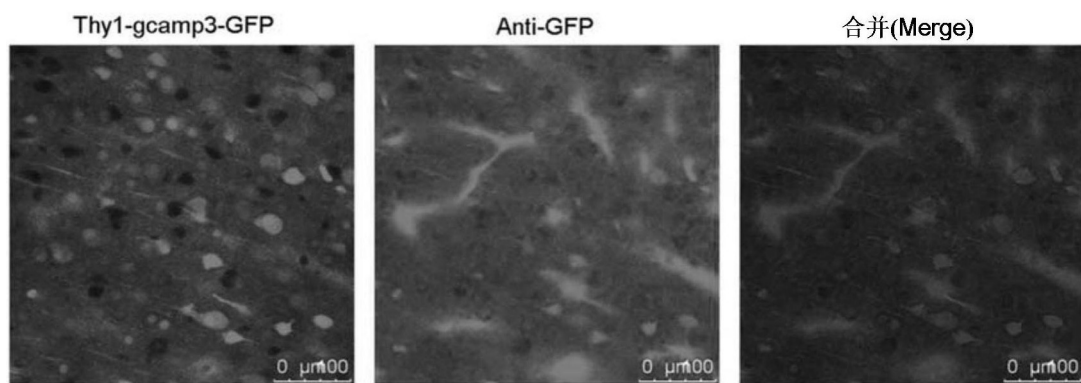


图6

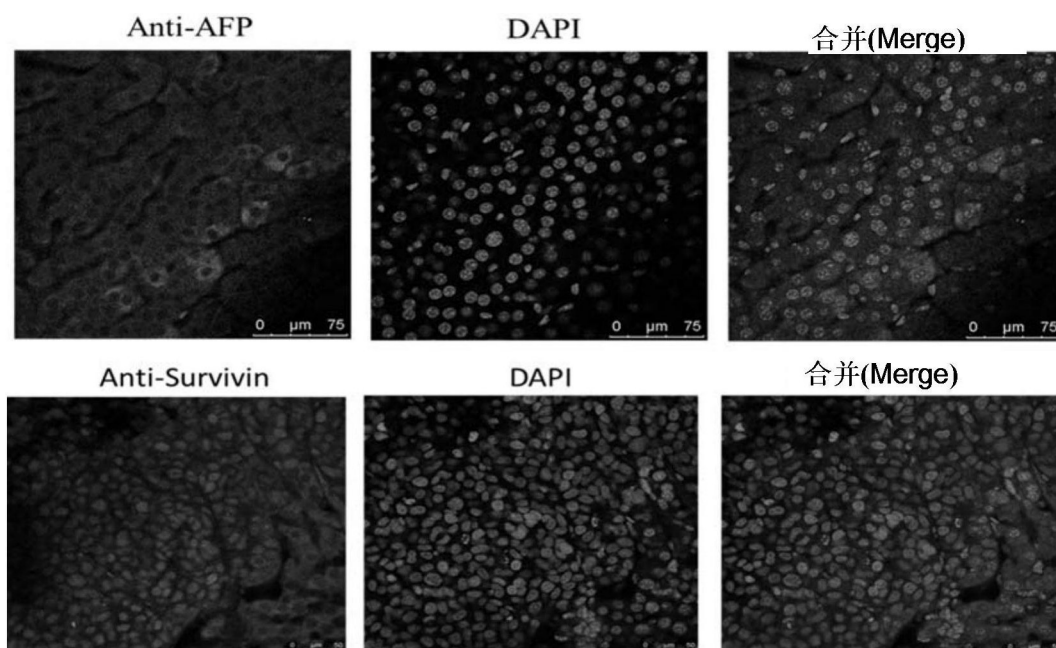


图7

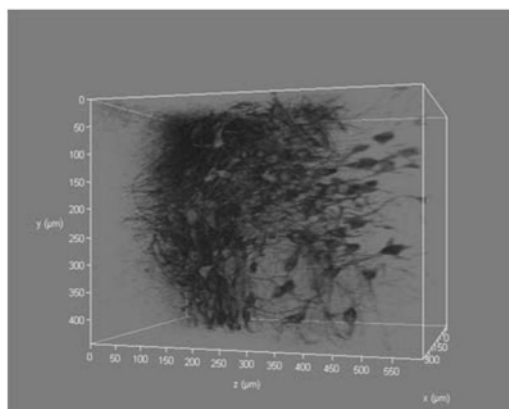


图8

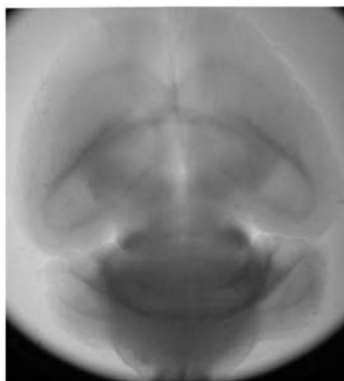


图9

专利名称(译)	生物组织器官透明化处理液、处理方法和免疫标记方法		
公开(公告)号	CN108445206A	公开(公告)日	2018-08-24
申请号	CN2017110083178.0	申请日	2017-02-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院合肥物质科学研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院合肥物质科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院合肥物质科学研究院		
[标]发明人	钟凯 徐金勇 汪增荣		
发明人	钟凯 徐金勇 汪增荣		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N1/28 G01N1/30 G01N33/48		
代理人(译)	贺卫国		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物组织器官透明化处理液、处理方法和免疫标记方法。本发明的生物组织器官透明化处理液包含：尿素；非离子表面活性剂，其为曲拉通和吐温的混合物；水；和以下任选组分中的至少一种：糖类、氨类、pH调节剂和抗氧化剂。该处理液可使完整脑、脏器、荷瘤脏器 etc 整体器官透明，并且允许抗体等生物大分子进入整体器官内。本发明的方法简单、高效、荧光兼容、允许免疫标记，对于在整体器官尺度上探索生物组织三维结构、简化病理组织检验方法等，具有重要的应用价值。

