

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580012082.0

[43] 公开日 2007年5月9日

[11] 公开号 CN 1961214A

[22] 申请日 2005.4.7

[21] 申请号 200580012082.0

[30] 优先权

[32] 2004.4.8 [33] US [31] 60/560,456

[86] 国际申请 PCT/US2005/011834 2005.4.7

[87] 国际公布 WO2005/101018 英 2005.10.27

[85] 进入国家阶段日期 2006.10.8

[71] 申请人 詹森药业有限公司

地址 比利时比尔斯

[72] 发明人 M·R·德安德里亚

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司  
代理人 程 淼 梁 谋

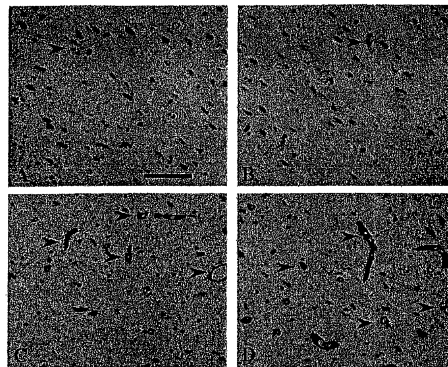
权利要求书2页 说明书15页 附图4页

[54] 发明名称

组织样品中胶原的免疫组化检测方法

[57] 摘要

用有效量的胶原酶预处理组织样品导致胶原的免疫检测增加和组织形态保持的增强。用于胶原免疫检测的这种改进方法可用于甲醛溶液固定、石蜡包埋的组织切片的免疫组化研究。



1. 检测组织样品中的胶原的免疫组织化学方法，包括如下步骤：
  - a. 用包括有效量胶原酶和为该胶原酶活性所需要的阳离子的缓冲溶液解育组织样品；
  - b. 将该组织样品暴露于能够特异结合该组织样品内胶原的抗体；以及
  - c. 检测结合该组织样品的抗体。
2. 根据权利要求1的方法，其中该组织样品固定在含有醛的溶液中。
3. 权利要求2的方法，其中该组织样品固定在含有甲醛溶液的溶液中。
4. 权利要求2的方法，其中该组织样品是石蜡包埋的。
5. 权利要求1的方法，其中该组织样品是组织切片。
6. 权利要求5的方法，其中该组织切片选自哺乳动物的脑、肾上腺、结肠、小肠、胃、心、肝、皮肤、肾、肺、胰腺、睾丸、卵巢、前列腺、子宫、甲状腺和脾的组织切片。
7. 根据权利要求1的方法，其中该胶原酶具有细菌或哺乳动物的起源。
8. 权利要求7的方法，其中该胶原酶能够催化一种或多种类型胶原的降解。
9. 权利要求8的方法，其中该胶原酶能够催化选自I型、II型、III型、IV型、V型、VI型、和XI型胶原的一种或多种类型胶原的降解。
10. 权利要求1的方法，其中该有效量的胶原酶在缓冲溶液中是大约10  $\mu$ g/ml至大约10 mg/ml。
11. 权利要求10的方法，其中该有效量的胶原酶在缓冲溶液中是大约1 mg/ml。
12. 权利要求1的方法，其中该阳离子是锌或钙阳离子。
13. 权利要求1的方法，其中该抗体能够特异结合一种或多种类型的胶原。
14. 权利要求13的方法，其中该胶原选自I型、II型、III型、IV型、V型、和VI型胶原。

15. 权利要求 1 的方法，其中孵育步骤包括在大约 37 至 45℃ 的温度范围内孵育组织样品。

16. 权利要求 15 的方法，其中温度是大约 40℃。

17. 检测组织样品中胶原的方法，其改进包括如下步骤：用包括有效量的胶原酶和为该胶原酶活性所需要的阳离子的缓冲溶液孵育组织样品。

18. 根据权利要求 17 的方法，其中该组织样品固定在含有醛的溶液中。

19. 根据权利要求 17 的方法，其中该胶原酶具有细菌或哺乳动物的起源。

20. 权利要求 19 的方法，其中该胶原酶能够催化一种或多种类型胶原的降解。

21. 权利要求 17 的方法，其中该阳离子是锌或钙阳离子。

## 组织样品中胶原的免疫组化检测方法

### 相关申请的相互参照

本申请要求 2004 年 4 月 8 日提交的美国申请系列号 60/560,456 的优先权，其全部内容在此并入作为参考。

### 发明领域

本发明涉及组织化学检测的方法。特别地，本发明涉及用于免疫组织化学检测组织样品中胶原的改进方法。

### 发明背景

胶原，在维持多种组织和器官的结构完整性中扮演重要角色的细胞外基质（ECM）蛋白质家族，在人体中是很丰富的。它们被发现基本上存在于全部的组织中，并且特别在例如骨、皮肤、腱、软骨、韧带和血管壁的组织中是很丰富的。

胶原的组织化学检测在诊断病理学中发挥重要作用。在许多疾病状态中，细胞产生改变（增加或降低）数量的胶原，或产生结构上有缺陷的胶原（Kivirikko, 1993, *Ann.Med.* 25: 113-126）。例如，胶原在间质中的过量积聚在导致纤维化的肝疾病中起着重要作用。此外，已经在糖尿病性的外周神经中观察到神经内膜胶原纤维的大小增加和细胞外基质沉淀的增加。细胞外基质沉淀增加的特点在于基底膜（BM）变厚，而 IV 型胶原是 BM 的关键成分。此外，恶性和侵入性的上皮细胞瘤中的 BM 是完全缺乏或是薄而间断的，然而许多良性上皮组织肿瘤具有完整的 BM。（Albrechtsen et al., 1981, *Cancer Res.* 41:5076-5081）。

组织内特异胶原的免疫组织化学检测已经是形态发生、细胞分化、和再生研究中的有效工具。胶原的免疫组化检测，类似于大多数免疫细胞化学染色，对新鲜的或新近冷冻的组织最能发挥作用。但是，由于新鲜的或新近冷冻的组织不是可方便得到的，并且有时冷冻的组织可能由于差的组织化学保存而是不合适的，因此胶原的免疫组织化学检测通常运用于已经通过固定然后进行脱水和包埋的组织。通过在甲醛溶液中固定，然后是脱水和石蜡-蜡包埋的组织保存仍然是用于形态学显微分析的主要制备方法。虽然这个保存技术对于形态学评估可能是最优的，但由于在处理过程期间发生抗原的结构变化，这个技术

对于随后的免疫组织化学研究具有较多的缺点。对于保存的组织已经观察到胶原免疫组化检测的明显损失并且经常是完全消除的。

已经发展出大量的抗原去屏蔽方法来在常规的组织制备后恢复抗原的免疫反应性 (MacIntyre, 2001, *Br. J. Biomed. Sci.* 58: 190-196)。两个最普及的去屏蔽技术是酶消化和加热诱导的表位恢复。使用广谱蛋白酶, 也称为广义蛋白酶 (general protease) 对甲醛溶液-固定、石蜡-包埋的组织的预处理已经显示增强胶原的免疫组化检测 (Barsky, et al., 1984, *Am. J. Clinical. Pathology* 82: 191-194; Lowry et al., 1997, *J. Anat.*, 191:376-374)。令人遗憾地, 这些广谱蛋白酶, 例如胃蛋白酶、链霉蛋白酶、胰蛋白酶和蛋白酶 K, 可消化许多组织蛋白, 使得该组织形态模糊不清和扩散, 并且有时使得关键的细胞结构几乎不能被识别出来。当优化胶原检测时, 很难平衡, 例如所使用的蛋白酶的类型和浓度, 孵育时间和温度的条件, 来消化组织切片中的一些而不是全部的蛋白质。这些条件经常是特异于组织类型以及固定类型的。例如, 如脑的组织中的结构是较少经受广谱蛋白酶 (实施例 2) 的副作用的, 但是具有复杂组织学的其他组织, 例如肾、肠、脾、睾丸等中的大多数结构 (上皮、精细胞、基质等) 是受影响的 (实施例 3)。尽管如本发明所显示的, 加热预处理技术已经广泛用于在组织切片中增强抗原检测 (MacIntyre, 2001, 同上文), 加热预处理只不过或多或少地增加甲醛溶液-固定、石蜡-包埋组织 (实施例 2) 中胶原的免疫组化检测。

需要开发保持周围组织形态的完整性, 同时增加组织样品中胶原的免疫组化检测的新的组织化学检测方法。

### 发明概述

现在已经发现当甲醛溶液-固定、石蜡包埋的组织用胶原酶, 一种能够打断天然胶原的特异蛋白水解酶预消化时, 获得保持周围组织形态的完整性, 同时增加胶原检测的优良结果。

在一个广义的方面, 本发明因此涉及检测组织样品中胶原的免疫组织化学方法, 包括步骤:

a. 用包括有效量胶原酶和为该胶原酶活性所需要的阳离子的缓冲溶液孵育组织样品;

b. 将该组织样品暴露于能够特异结合组织样品内的胶原的抗体; 以及

### c. 检测结合该组织样品的抗体。

在优选的实施方案中，组织样品是甲醛溶液-固定和石蜡包埋的组织切片。

#### 附图简述

图 1 显示多种预处理对正常人脑的甲醛溶液-固定和石蜡-包埋组织的胶原 IV 免疫检测的影响：(A) 没有利用预处理方法；(B) 利用加热预处理方法；(C) 利用胃蛋白酶预处理方法；和 (D) 利用胶原酶（梭菌肽酶 A IV 型）预处理方法。注意多种预处理条件当中胶原 IV 免疫检测（箭头）的不同强度。Bar = 100  $\mu$  m。

图 2. 显示通过胶原酶预处理在具有复杂组织结构的组织中改善的胶原 IV 的免疫检测，和增强的组织形态的维持。正常人睾丸 (A、C、E) 和肾 (B、D、F) 的甲醛溶液-固定、石蜡包埋的组织没有任何酶促预处理 (A、B)、或用胃蛋白酶 (C、D) 或梭菌肽酶 A IV 型 (E、F) 预先消化。注意多种预处理条件当中胶原 IV 免疫标记（箭头）的不同强度。也注意与没有酶促预处理（箭头，A、B）或用胶原酶预处理（箭头，E、F）相比较，用胃蛋白酶预处理的一些周围组织结构，例如精细胞（箭头，C）和集合小管上皮（箭头，D）的较差形态。Bar = 100  $\mu$  m。

图 3. 显示通过用多种类型的梭菌肽酶 A 预处理组织改善胶原 IV 的免疫检测。正常人脾 (A、C、E) 和睾丸 (B、D、F) 的甲醛溶液-固定、石蜡包埋的组织用梭菌肽酶 A I 型 (A、B)、梭菌肽酶 A IV 型 (C、D)、和梭菌肽酶 A XI 型 (E、F) 预消化。注意多种胶原酶预处理当中胶原 IV 免疫标记（箭头）的相似强度和组织形态维持的增强（箭头）。Bar = 100  $\mu$  m。

图 4. 显示通过用胶原酶预处理组织改善各种胶原的免疫检测。甲醛溶液固定、石蜡包埋的正常人脾组织用梭菌肽酶 A IV 型预消化：A. I 型胶原的免疫检测；B. V 型胶原的免疫检测；C. VI 型胶原的免疫检测；和 D. 利用泛胶原抗体的 I、II 和 III 型胶原的免疫检测。Bar = 50  $\mu$  m。

#### 发明的详细说明及其优选的实施方案

在此引用的全部出版物由此并入作为参考。除非另外定义，否则在此使用的全部技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常理解的具有相同的意义。

术语"包括"、"包含"、"含有"、和"具有"在此以其开放的、非限制的意义被使用。

如在此使用的"抗体"是指具有特异氨基酸序列并且只结合抗原或紧密相关的抗原群的免疫球蛋白分子或免疫球蛋白分子的免疫活性部分。"抗体"的实例包括 IgG、IgM、IgA、IgD 和 IgE。免疫球蛋白分子的免疫活性部分的实例包括可通过用酶，例如胃蛋白酶来处理抗体而产生的 Fab 和 F(ab)'<sub>2</sub> 片段。特别地，如在此使用的"抗体"结合一种或多种类型的胶原，但基本上不结合分析样品内的任何其他蛋白质。

"抗体"可以是单克隆抗体或多克隆抗体。术语"单克隆抗体"或"单克隆抗体组合物"是指只包含一种抗原结合部位并且能够与特定的表位免疫反应的抗体分子群体。术语"多克隆抗体"是指包含一种以上的抗原结合部位并且能够与多肽上多于一个的表位免疫反应的抗体分子群体。多克隆抗体制品的实例是包含针对一类胶原，而不是其他类胶原上的多个表位的抗体的制品。

如在此使用的"抗原"是指包含刺激宿主的免疫系统产生体液和/或细胞抗原特异应答的一个或多个表位的分子。术语"抗原"在此与"免疫原"可互换地使用。术语"表位"如在此使用的，是指特异抗体分子与其结合的抗原或半抗原上的位点。术语"表位"在此与"抗原决定簇"或"抗原决定簇位点"可互换地使用。

"胶原"如在此使用的，是指在保持多种组织和器官的结构完整性中扮演重要角色的紧密相关但不同的细胞外基质蛋白质家族中的成员。"胶原"可以由超过 30 个独特基因编码的 21 类已知胶原中的任一种。"胶原"也可以是任何还有待于鉴定的新型胶原。"胶原"的实例列在表 1 中 (Kivirikko, 1993, 同上; Buckwalter et al., 1995, *Spine*, 20: 1307-1314)。

表 1.胶原及其存在的实例

类型	存在
I	普遍存在的
II	软骨、玻璃体
III	普遍存在的
IV	基底膜
V	间质组织
VI	软组织
VII	锚定纤维
VIII	内皮、间充质
IX	软骨、玻璃体
X	过度生长的软骨
XI	软骨、玻璃体
XII	许多
XIII	许多组织
XIV	皮肤、腱
XV	许多组织
XVI	成纤维细胞、角化细胞
XVII	皮肤半桥粒
XVIII	肝、肾、胎盘
IX	核、环、和终板

"胶原酶"如在此使用的，是指能够酶促切割胶原的蛋白水解酶。一旦通过胶原酶产生胶原的最初切割，特异性更低的蛋白酶完成该胶原的降解。胶原酶是需要金属离子，例如锌或钙离子用于其蛋白水解活性的金属酶。"胶原酶"可以是被发现与细菌细胞，例如溶组织梭菌 (*Clostridium histolyticum*) 细胞天然缔合的"细菌胶原酶"。"细菌胶原酶"的实例包括梭菌肽酶 A。如纯化方案所定义的各种类型的梭菌肽酶 A 能从 Sigma (St. Louis, MO) 购买得到。"胶原酶"也可以是被发现与哺乳动物细胞，例如结缔组织细胞天然缔合的"哺乳动物胶原酶"。如在此使用的，"哺乳动物胶原酶"包括基质金属蛋白酶 (MMPs)，其

是分泌的和膜结合的锌-内肽酶。MMPs的实例是间质胶原酶，也称为MMP-1，其降解III型胶原比I型或II型胶原更有效；嗜中性的胶原酶，也称为MMP-8，其在降解I型胶原中比II型或III型胶原更有效；以及胶原酶3，也称为MMP-13，其对于II型胶原具有最高的亲合力。如在此使用的，“哺乳动物胶原酶”也包括明胶酶，亦称为IV型胶原酶，其降解明胶（变性的胶原），以及胶原IV、V、VII、IX和X型。明胶酶的实例包括明胶酶A（MMP-2）和明胶酶B（MMP-9），其被认为就其底物而论具有相似的底物特异性，并且主要负责基底膜中胶原IV成分的降解。（Duffy et al., 2000, *Breast Cancer Res.* 2 (4) : 252-257）。

“免疫组织化学测定”或“免疫染色测定”是利用特异结合免疫活性物质的抗体，通过检测与组织或细胞的特定免疫活性物质相关联的特异标记来研究组织或细胞的生化组成的生物测定。该抗体具有能够以高度特异的组合来结合免疫活性物质的性质。结合的特点在于其高度的特异性和低的离解常数。免疫活性的物质可以是能够作为抗原并且引发免疫反应的任何生物材料。对胶原的免疫组化测定有用的免疫活性物质的实例包括存在于组织样品中全部类型的胶原，例如结缔组织中的I、II、和III型胶原，和基底膜中的IV型胶原。

术语“组织样品”是指从生物体（例如患者）或从生物体的成分（例如细胞）获得的样品。样品可以是任何生物学组织。样品可以是“临床的样品”，其是来源于患者的样品，因此是“患者样品”，例如活组织检查。“组织样品”如在此使用的，可以是新鲜、或冷冻的、或固定和包埋的组织切片。组织样品的实例包括但不限于取自哺乳动物，例如人、小鼠、大鼠、猪、狗、等的脑、肾上腺、结肠、小肠、胃、心、肝、皮肤、肾、肺、胰腺、睾丸、卵巢、前列腺、子宫、甲状腺和脾的组织切片。

术语“标记的”，关于用于免疫组织化学测定的标记抗体，是用来包括通过将可检测的物质偶联（即物理连接）至抗体的抗体直接标记，以及使得抗体可被直接标记的一种或多种其他试剂检测的抗体间接标记。可在本发明中用于直接标记的标记包括：荧光标记、或放射性同位素，例如<sup>35</sup>S、<sup>32</sup>P、<sup>3</sup>H等。间接标记的实例包括利用荧光标记的第二抗体等检测第一抗体。

术语组织样品的“定影”或“固定”是指在组织样品，例如细胞学、

组织学、或病理学样品的制备中，为了保持组织样品中组成部分的存在形式和结构，利用称为"生物学固定剂"的化学试剂的技术。固定过程通常涉及变性、沉淀、或组织样品的组成部分与生物学固定剂的交联。

术语固定组织样品的"包埋"是指样品在蜡或塑料中被包埋以制备用于显微镜检验的组织切片的方法。包埋介质，例如火棉或石蜡，为组织样品提供机械支持。

本发明证明用胶原酶预孵育组织样品增强胶原的免疫检测而不影响非胶原的蛋白质由此保持组织的形态。一般用于离解细胞的胶原酶，从来没有被成功地用于增强甲醛溶液固定、石蜡包埋的组织切片中胶原的免疫检测。胶原酶用于胶原的改进的免疫组化检测的这个新用途是很容易使用的，在所测试的全部类型的胶原，例如 I、IV、V、和 VI 型当中具有多能性 (versatility)。本发明因此提供用于胶原的免疫组化检测的新方法。这种方法保持组织的结构，提供精确的组织学信息，同时增加组织样品中胶原的免疫组化检测。

在一个广义的方面，本发明因此涉及检测组织样品中胶原的免疫组织化学方法，包括步骤：

- a. 用包括有效量胶原酶和为该胶原酶活性所需要的阳离子的缓冲溶液孵育组织样品；
  - b. 将该组织样品暴露于能够特异结合组织样品内的胶原的抗体；
- 以及
- c. 检测结合该组织样品的抗体。

在一个实施方案中，该组织样品是新鲜或新近冷冻的。获得新鲜的或新近冷冻的组织样品的方法是本领域技术人员已知的，例如通过快速冷冻，然后是冰冻替代或低温切片。

在优选的实施方案中，该组织样品通过固定在化学溶液中，然后脱水和包埋而被保存。组织固定和包埋的方法是本领域技术人员已知的(例如，参见综述 Oliver et al., 1999, *Methods Mol Biol*, 115: 319-26)。组织样品可在生物学固定剂，例如丙酮、乙醇、甲醛溶液、或多聚甲醛中固定。优选，组织样品被固定在甲醛溶液中。甲醛溶液是当甲醛气体溶于水溶液时产生的基于醛的固定剂。例如，包含 0.5% 戊二醛和 2% 甲醛的固定剂通常适于多种的组织固定。组织样品的固定可通

过将样品浸入固定剂一段时间，例如 30 分钟至 1 小时来实现。备选地，组织样品的固定可通过组合化学固定剂和加热作用，例如微波来实现。参数包括但不限于组织的类型、固定剂的组成、固定的时间和温度，其可能影响免疫标记特定抗原的能力。适于胶原免疫化学检测的最佳固定条件可通过变化这些参数来实验性地确定。

固定组织样品的例证性方法包括步骤：1) 在缓冲液（例如磷酸盐缓冲液盐水）中漂洗组织样品，在固定剂（例如 0.5% 戊二醛和 2% 甲醛，或 95% 乙醇）中孵育样品，一段时间后（例如 30 min 至 1 h 或几天）；2) 在缓冲液中再次漂洗样品；3) 淬灭游离的醛基（例如通过在 0.1% 甘氨酸中漂洗样品）；以及任选地 4) 在第二固定剂（例如在 0.1M cacodylate 缓冲液中的 2% OsO<sub>4</sub>）中固定样品一段时间（例如 1 h），然后再次漂洗样品（例如在 0.1M cacodylate 缓冲液中）。

固定后，组织样品用增加浓度的、直到无水的有机溶剂，例如乙醇、甲醇或丙酮常规脱水。脱水的组织样品用石蜡-蜡浸渍一段时间，然后在包埋模子中包埋在新鲜的蜡中。脱水和包埋固定组织样品的方法是本领域技术人员已知的。组织切片可例如利用切片机，从固定和包埋的组织切割来用于显微分析。

被固定和包埋的组织样品还可从商业来源获得，例如来自 Dako ( Carpenturia, CA, Cat. No : T1068) 或 Biomedica ( Foster City, CA, Cat. No : M89) 的人方格图案的组织块 ( human checkerboard tissue blocks ) 。

根据本发明的方法，在胶原的免疫组织化学检测前，组织样品用包括有效量胶原酶和为该胶原酶的酶活性所需要的离子的酶溶液孵育。"有效量的胶原酶"如在此使用的，是指在胶原检测前当与组织样品一起孵育时，能够增加样品中胶原的免疫组化检测，同时为了关于该样品准确的组织学信息而保持组织结构的胶原酶数量。例如所研究组织的类型、用于固定和包埋组织的技术、所使用的胶原酶的种类、待检测的胶原种类、孵育的时间和温度等等参数，可能影响胶原酶的有效量。胶原酶的有效量以及用于测定的其他参数，可被实验性地确定。

任何类型的胶原酶，包括细菌的胶原酶或哺乳动物胶原酶，可被用于本发明的方法。用从 Sigma 获得的细菌胶原酶，例如梭菌肽酶 A I、

IV、和 XI 型预处理组织样品如实施例 4 所描述的全部增强胶原 IV 型的免疫组化检测。

在本发明的一个实施方案中，胶原酶的有效量是在胶原酶浓度范围为 10  $\mu$ g/ml 至 10 mg/ml，并且该酶溶液的体积足够覆盖所述组织样品的酶溶液中胶原酶的数量。优选地，胶原酶的有效量是在胶原酶浓度为 1mg/ml，并且该酶溶液的体积足够覆盖所述组织样品的酶溶液中胶原酶的数量。例如，用于显微镜载玻片上甲醛溶液固定和石蜡包埋的组织切片的胶原酶有效量是酶浓度范围为 10  $\mu$ g/ml 至 10 mg/ml，优选为大约 1 mg/ml 的大约 2 - 3 滴胶原酶溶液。

在本发明优选的实施方案中，组织样品与包括有效量胶原酶和为该胶原酶活性所需要的离子的酶溶液在 37 至 45 $^{\circ}$ C 的温度范围孵育。最优选，孵育温度是大约 40 $^{\circ}$ C。先前报道用细菌胶原酶或 IV 型胶原酶在 37 $^{\circ}$ C 的温度下预处理甲醛溶液固定和石蜡包埋的组织 30 分钟至 24 小时的不同时间过程，对于增强与基底膜缔合的胶原的免疫组化检测是无效的 (Barsky, 1984, *Am. J. Clin. Pathol.* 82: 191-194)。然而，本发明中观察到用胶原酶在 37 $^{\circ}$ C 的温度下预处理甲醛溶液固定和石蜡包埋的组织导致胶原免疫组化检测的某些增强，尽管其不如当在 40 $^{\circ}$ C 进行孵育时的效果强。这些结果的不符可能是由于在先前研究的孵育缓冲液中缺乏钙，这一为胶原酶活性所需要的离子。因此，在本发明的方法中，为胶原酶的酶活性所需要的离子，例如钙或锌离子，被包括在酶溶液中。优选的酶溶液包括钙离子，Ca<sup>2+</sup>，锌离子，Zn<sup>2+</sup>，其为胶原酶活性所需要的，但其在纯化期间与胶原酶紧密结合。附加的 Zn<sup>2+</sup> 应该不是必需的，只要没有螯合剂被加入该酶溶液。

在本发明的另一实施方案中，组织样品与包括有效量胶原酶和为该胶原酶的酶活性所需要的阳离子的酶溶液孵育范围为 10 分钟至 24 小时的一段时间，优选范围为大约 1 至 4 小时的一段时间，以及最优选 1 小时的一段时间。

根据本发明的方法，在组织样品用有效量的胶原酶预消化后，预处理的组织样品中的胶原可通过免疫组织化学的检测方法检测，该方法包括步骤：将该组织样品暴露于能够特异结合组织样品内胶原的抗体，以及检测结合至该组织样品的抗体。

对本发明有用的抗体可以是特异结合任何类型胶原的单克隆或多

克隆的抗体。该抗体可衍生自多种来源，包括但不限于山羊、小鼠、大鼠、绵羊、马、鸡、和兔。生产特异结合胶原的抗体的方法是本领域技术人员已知的。例如，多克隆的抗体可通过用有或没有免疫佐剂的胶原免疫合适的目标动物，例如小鼠、大鼠、豚鼠、兔、山羊、马等产生，其中兔是优选的。单克隆抗体 (mAb) 可通过在组织培养基中使杂交瘤细胞生长来生产，其中该杂交瘤细胞可通过在容许形成稳定杂交瘤的条件下，混合来自胶原免疫的近交小鼠，优选 Balb/c 的脾淋巴细胞，和适当的融合伴侣，优选骨髓瘤细胞来获得。对本发明有用的抗体还可从商业来源获得，例如结合几种类型胶原，例如 I、II、和 III 型胶原的集合的兔多克隆的泛胶原抗体 (Chemicon, Temecula, CA)、特异结合 I 型胶原的山羊多克隆胶原 I 抗体 (Santa Cruz, Santa Cruz, CA)、特异结合 IV 型胶原的小鼠单克隆胶原 IV 抗体 (Dako)、特异结合 V 型胶原的山羊多克隆胶原 V 抗体 (Santa Cruz)、和特异结合 VI 型胶原的山羊多克隆胶原 VI 抗体 (Santa Cruz)。

根据本发明，特异结合胶原的抗体与胶原酶预消化的组织样品在水溶液中孵育，以容许该抗体特异结合至样品内的胶原。该抗体与胶原的结合可通过本领域技术人员已知的多种方法来检测 (Mokry, 1996, *Acta Medica (Hradec Kralove)*, 39 : 129 - 40)。该结合可通过利用标记的抗体，例如特异结合胶原的荧光标记的抗体，并且检测标记的直接方法来检测。

优选地，组织样品中胶原特异抗体的结合可通过间接法检测，例如酶 / 抗-酶复合物方法，例如辣根过氧化物酶 / 抗-过氧化物酶和碱性磷酸酶 / 抗-碱性磷酸酶方法。间接检测方法的另一个实例是根据抗生物素蛋白-生物素的相互作用，例如桥联的抗生物素蛋白-生物素、抗生物素蛋白-生物素复合物、和标记的抗生物素蛋白-生物素的方法。间接检测方法的其他实例包括基于蛋白质 A-抗体相互作用的方法，和半抗原抗体抗-半抗原方法。

检测步骤通常通过产色的检测来进行。例如，用酶，例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶标记的第二抗体，在容许该第二抗体特异结合与样品中的胶原特异结合的抗体 (第一抗体) 的条件下首先与组织样品孵育。然后未结合的第二抗体被洗去，并且保留于样品的第二抗体的数量分别利用酶底物，例如 3,3'-二氨基联苯胺或硝基蓝四氮唑氯化

物/5-溴-4-氯-3-吡啶基-磷酸盐(甲苯胺盐)来检测。附着于第二抗体的酶能够将底物转化成为在光学显微镜下可见的显色沉淀物。

### 实施例 1

#### 方法和材料

甲醛溶液固定、石蜡包埋的人方格图案的组织块 (Dako, Carpenturia, CA; Biomed, Foster City, CA)按常规处理来用于免疫组织化学 (D'Andrea et al., 2003; *Neuroscience Letters* 333 (3):163-166)。这个研究中测定的组织是脑 (n=10)、肾上腺 (n=10)、结肠 (n=6)、小肠 (n=2)、胃 (n=2)、心 (n=6)、肝 (n=10)、皮肤 (n=3)、肾 (n=8)、肺 (n=10)、胰腺 (n=10)、睾丸 (n=8)、卵巢 (n=8)、前列腺 (n=8)、子宫 (n=8)、甲状腺 (n=10) 和脾 (n=10)。显微载玻片上的组织切片在根据常规方法使用前被脱蜡和再水合化 (D'Andrea et al., 2003, 同上文)。用于这个研究的各种胶原酶是细菌胶原酶、梭菌肽酶 A IA、IV、和 XI 型 (Sigma, St. Louis, MO, 产品号 C0130、C5138、和 C7657), 其在胶原酶缓冲液 (包含 11.47 g/l TES 游离酸 (Sigma, 产品号 T - 1375)、在去离子 H<sub>2</sub>O 中的 0.053 g/l 氯化钙二水合物 (Sigma, 产品号 C - 3881), 该缓冲液的 pH 用 1M NaOH 调节至 7.4) 中制备 (1 mg/ml)。用于这个研究的蛋白酶是胃蛋白酶溶液 (Invitrogen Corp., Carlsbad, CA, 目录号: 750102)、胰蛋白酶 (1 mg/ml; Dako, Carpenturia, CA) 和蛋白酶 K (1 mg/ml, Dako, Carpenturia, CA)。

在免疫组织化学测定前, 显微载玻片上的组织切片根据没有预处理、酶促预处理或加热预处理而被分组。对于胶原酶预处理, 在胶原酶缓冲液中的胶原酶 (10 μg/ml - 10 mg/ml, 通常为大约 1 mg/ml) 在 37 - 45°C (通常为大约 40°C) 预热 5 min。然后, 将大约 2 - 3 滴酶溶液置于各个显微镜载玻片上来覆盖该组织切片。盖玻片被轻轻地置于载片上组织切片的顶部, 并且该载片在保湿皿 (载片槽, Boeckel Scientific, Feasterville, PA, Model 240000) 中于 37 - 45°C (通常为大约 40°C) 孵育 10 min 至整夜 (通常为大约 1 h)。对于广义的蛋白酶预处理, 如上所述的胃蛋白酶、胰蛋白酶、或蛋白酶 K 酶溶液在 37°C 水浴中预热 5 分钟。然后, 将大约 2 - 3 滴酶溶液置于各个显微镜载玻片上来覆盖该组织切片。盖玻片被轻轻地置于载片上组织切片的顶部, 并

且该载片在保湿皿中于 37℃ 孵育大约 10 min。对于加热预处理，显微镜载玻片上的组织切片在 Target 缓冲液 (Dako, Carpenturia, CA) 中被微波处理 (Energy Beam Sciences, Inc., MA) (450W, 98℃ 2 次 3 min)，冷却，置入磷酸盐缓冲盐水 (pH 7.4, PBS) 并用 3.0% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 在室温下处理 10 min。为了加热准确度，被置于微波载物片架的相同数目的载片 (n = 24) 总是一起加热而不考虑其上具有组织的载片数目 (D'Andrea et al., 2003, 同上文)。

对于胶原的免疫组织化学测定，全部的孵育 (每次 30 min) 和洗涤在室温下进行。正常的封闭血清 (Vector Labs, Burlingame, CA) 被置于全部的组织载片上 10 min。在 PBS 中短暂漂洗后，切片用选自兔多克隆泛胶原 (1:2,000; Chemicon, Temecula, CA, Cat No : MAB1334)、山羊多克隆胶原 I (1:1,500; Santa Cruz, Santa Cruz, CA, Cat No : SC - 8784)、小鼠单克隆胶原 IV (1 : 200; Dako, M785)、山羊多克隆胶原 V (1:150, Santa Cruz, Cat No : SC - 9851) 和山羊多克隆抗-胶原 VI (1 : 25; Santa Cruz, Cat No : SC -9854) 的第一抗体孵育。为了一致性和比较分析，每组实验自始至终使用相同的第一抗体滴度。然后在 PBS 中洗涤载片，并与山羊抗-兔、兔抗-山羊或马抗-小鼠生物素酰化的第二抗体 (VECTASTAIN ABC Kit, Vector Labs, Burlingham, CA, Cat No: PK-6105) 孵育。在 PBS 中洗涤后，加入抗生物素蛋白-生物素-辣根过氧化酶复合物试剂 (Vector Labs)。洗涤全部载片并用 3,3'-二氨基联苯胺 (Biomed, S 10) 处理 2 次，每次 5 min，在蒸馏水中漂洗，并用苏木精 (Sigma, St. Louis, MO, MHS-16) 复染。

## 实施例 2

*通过酶促预处理增强甲醛溶液-固定、石蜡-包埋的正常人脑组织中胶原 IV 的免疫组化检测*

比较各种预处理方法对甲醛溶液-固定、石蜡包埋的正常人脑组织中胶原的免疫组化检测的影响。可进行相似的实验来比较预处理方法对其他类型组织样品，例如新鲜组织切片、冷冻组织切片、或其他类型固定和包埋组织的影响。

方格图案的人正常脑组织块 (Dako, Carpenturia, CA; Biomed, Foster City, CA) 被用于这个研究。该组织通过加热、通过广义的蛋白酶 (general protease)，例如胃蛋白酶 (从供应商预稀释的)、胰蛋

白酶 (1 mg/ml) 或蛋白酶 K (1 mg/ml), 或通过胶原酶、梭菌肽酶 A IV 型 (1 mg/ml), 利用实施例 1 中描述的程序来预先处理。对胶原 IV 的免疫组化测定如实施例 1 所描述的利用小鼠单克隆胶原 IV (1:200; Dako) 进行。

图 1 显示各种预处理条件对甲醛溶液-固定、石蜡包埋的正常人脑组织中胶原 IV 免疫检测的影响。胶原免疫标记的存在表现为棕褐染色。在其中第一抗体, 即特异结合胶原 IV 的抗体, 被替换为抗体稀释缓冲液 (Zymed Labs, South San Francisco, CA) 的阴性对照载片中没有观察到可观测到的标记。当该组织没有被预先处理时, 几乎任何胶原 IV 免疫标记都不能被检测到 (图 1A)。用加热预处理组织导致稍微更多的胶原 IV 免疫检测 (箭头) (图 1B)。显著增加数量的胶原 IV 在用胃蛋白酶预先处理的组织中被检测到 (图 1C)。通过胃蛋白酶预处理的胶原免疫组化检测的增强与先前报道的结果 (Barsky, 1984, 同上文) 相一致。与先前的报道 (Barsky, 1984, 同上文) 相反, 通过本发明观察到用胰蛋白酶或蛋白酶 K 预处理与胃蛋白酶相比产生相似的增加的胶原检测。用胶原酶、梭菌肽酶 A IV 型预处理组织, 导致与由胃蛋白酶预处理所产生的相比, 相等强度和细节的胶原 IV 免疫组化检测。(图 1D)。注意最小毛细管周围的胶原标记的精细细节 (图 1C、D)。用加热和胶原酶同时预处理的组织与单独用胶原酶预处理的组织相比不产生更多增强的胶原检测。这些数据表明对于增强甲醛溶液-固定、石蜡包埋的正常人脑组织中胶原 IV 免疫检测来说, 酶促预处理的有利影响大于加热预处理的影响。增加的胶原检测未必归因于通过加热方法除去或水化交联的甲醛溶液键, 而可能是由于在泛蛋白酶预处理期间从可接触到的胶原表位消化或除去蛋白质, 或在胶原酶预处理期间消化胶原而产生更多的表位。

### 实施例 3

*通过胶原酶预处理在具有复杂组织结构的组织中改进检测和维持组织形态*

广义蛋白酶预处理的一个常见的副作用是这种类型的预处理经常导致具有复杂组织结构的组织, 例如肾、肠管、脾、睾丸等当中周围区域形态的显著变化。例如, 睾丸的精细胞和周围睾丸结构 (箭头, 图 2C) 和肾集合小管上皮 (箭头, 图 2D) 的形态由于胃蛋白酶的过度

消化而几乎完全被损失掉，但是没有蛋白酶处理时则很好地被保存下来（图 2A、B）。用胰蛋白酶和 K 预处理产生与胃蛋白酶相似的副作用。尽管加热预处理保持组织形态，然而这种类型的预处理与酶预处理相比不增强胶原免疫检测（实施例 2）。当组织用胶原酶、梭菌肽酶 A IV 型预处理时，不仅与用广泛使用的泛蛋白酶预处理的组织相比检测到相等强度的免疫标记，而且最重要地是，在阴囊精细胞（箭头，图 2E）和肾集合小管上皮（箭头，图 2F）中周围组织的形态被保持下来。当组织用胶原酶预处理时，对具有复杂组织结构的许多其他组织，例如大肠和小肠、脾、胃、等观察到相似的有利结果，包括上皮细节及其他附属结构的保持。

#### 实施例 4

##### *胶原酶预处理方法的多能性*

胶原 IV 型免疫组化检测的增强也在用除细菌胶原酶、梭菌肽酶 A IV 型之外的其他胶原酶预先处理的组织中被观察到。例如，细菌的胶原酶、梭菌肽酶 A I 型、IV 型、或 XI 型在相同的测定条件，1 mg/ml 胶原酶，在大约 40℃ 孵育 1 小时下，被用于预处理正常人脾和睾丸的代表性实例。发现用梭菌肽酶 A I 型、IV 型或 XI 型预处理该组织导致在改善胶原 IV 免疫标记强度（箭头）和保持细胞结构（箭头）（图 3）方面相似的有利影响。

除 IV 型胶原外的许多其他类型的胶原的免疫组化检测增强也在用梭菌肽酶 A IV 型预处理的组织中被观察到。例如，用梭菌肽酶 A IV 型预处理正常人脾组织导致胶原 I 型（箭头，图 4A）、V 型（箭头，图 4B）、VI 型（图 4C）、和利用泛胶原抗体的全部胶原（图 4D）的免疫组化检测增强。该增强显示为胶原免疫标记的强度增加和组织形态的良好保持。

胶原免疫组化检测的增强在多种测定条件下被观察到。通常地，组织切片用有效量的胶原酶在 40℃ 预消化 1 小时。然而，胶原酶的有效量、用于预消化孵育的时间和温度可在宽范围内变化。例如，预消化孵育达到 4 小时与预消化孵育 1 小时产生相似的结果。即使当预处理在大约 37℃ 进行时，也观察到胶原免疫组化检测的一些增强。试验了从 10  $\mu$ g/ml 到 100 mg/ml 范围的胶原酶浓度。

胶原酶预处理方法的多能性对于广义蛋白酶预处理方法的狭窄操

作条件提供了巨大的益处。例如，在进行广义蛋白酶预处理的方法时，仅仅消化组织额外的 1 至 2 分钟可导致过度消化，以及因此导致较差的组织形态。此外，组织固定剂的类型也影响用于广义蛋白酶预处理的参数，其中醇固定剂需要最小的消化，而甲醛溶液固定剂需要附加的时间。对于广义蛋白酶预处理的每一个狭窄操作条件，如果不仔细考查，可能产生较差的形态，即使有良好的胶原免疫标记。

这是第一次成功使用胶原酶来预先处理甲醛溶液固定、石蜡包埋的组织切片来增加胶原免疫标记。胶原酶预处理方法的有益效果，除增加胶原免疫检测外，也包括很好维持组织形态以及容易使用。胶原酶预处理的方法容许在增强胶原免疫标记的情况下，更多组织学的信息被加以分析。此外，胶原酶预处理的方法具有多能性，使得胶原免疫组化检测的增强可在多种测定条件下被观察到。

尽管本发明的各方面已经在上面参考实施例和优选的实施方案被例证说明，将认识到本发明的范围并不受上述说明的限定，而是由借助专利法的原则适当解释的下列权利要求加以限定。

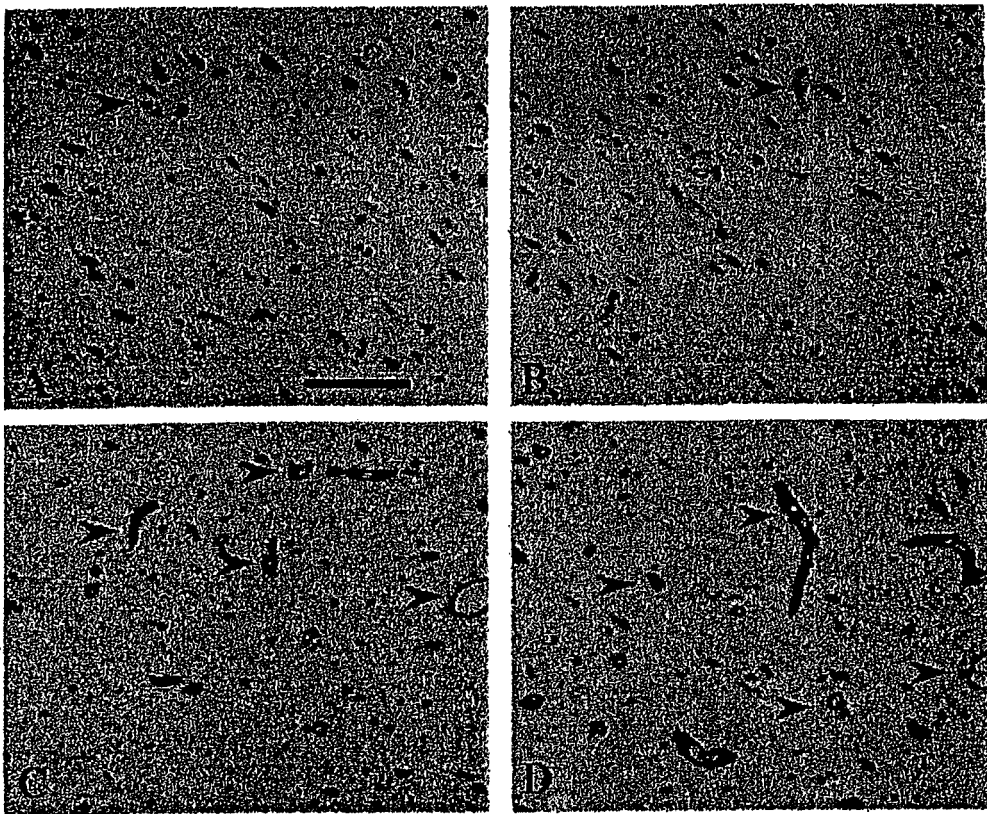


图 1

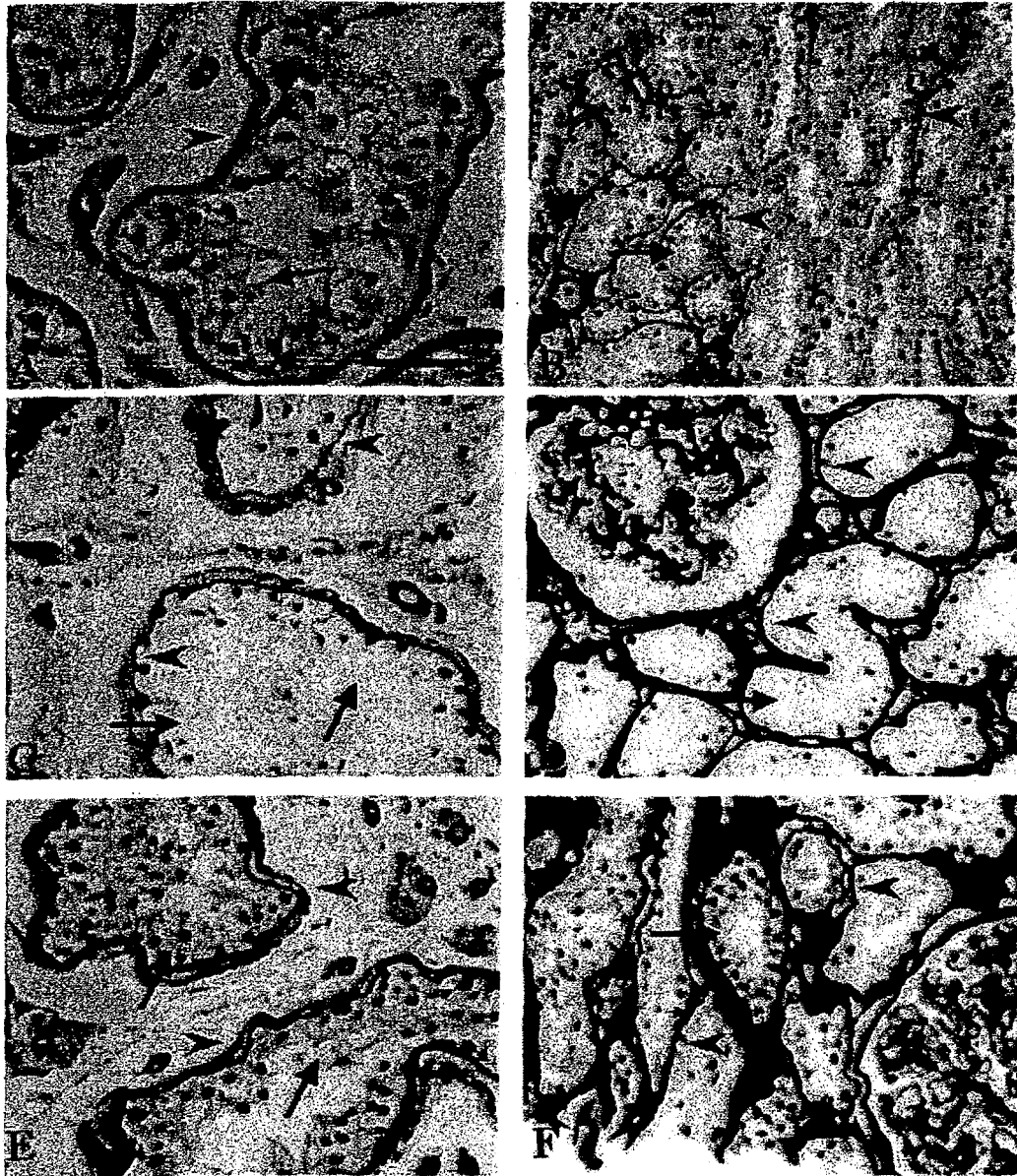


图 2

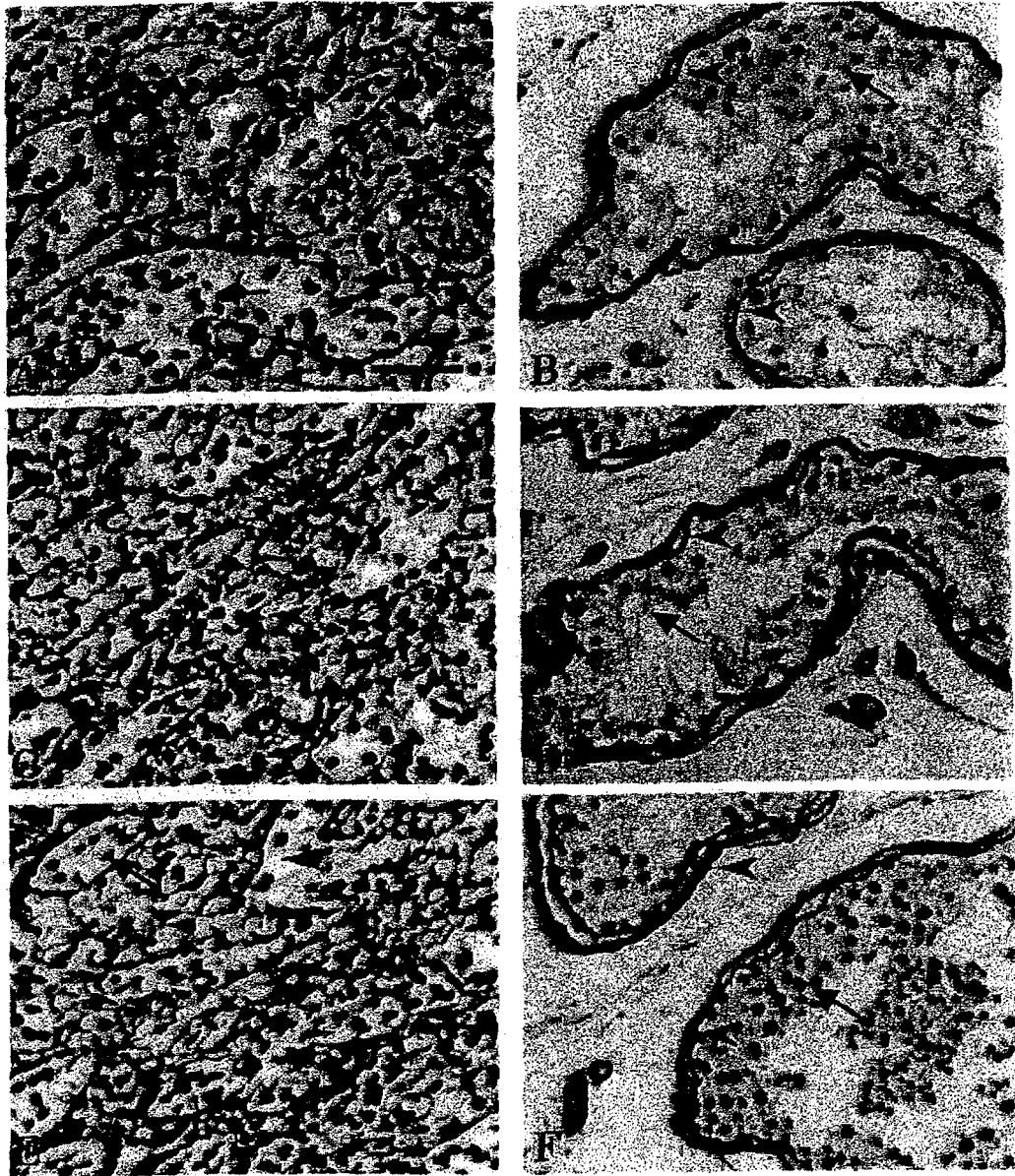


图 3

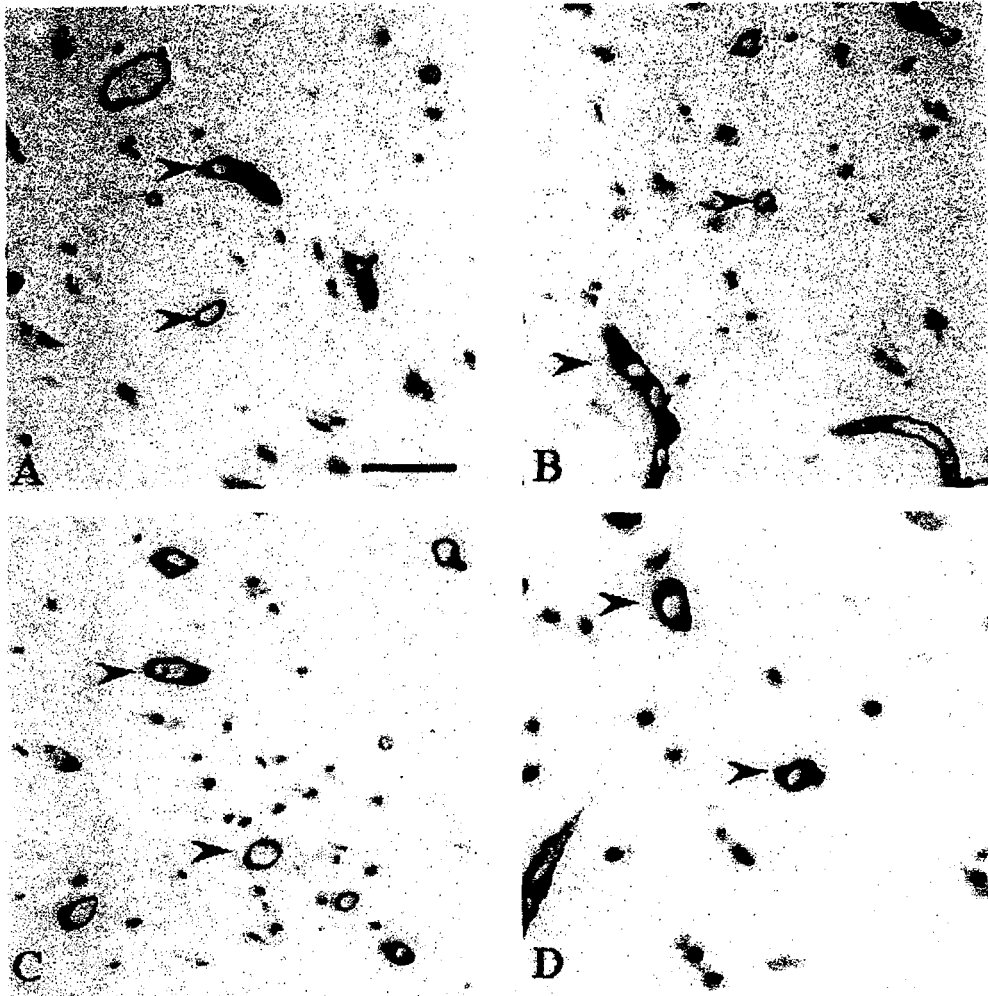


图 4

专利名称(译)	组织样品中胶原的免疫组化检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1961214A</a>	公开(公告)日	2007-05-09
申请号	CN200580012082.0	申请日	2005-04-07
[标]申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	詹森药业有限公司		
[标]发明人	MR德安德里亚		
发明人	M·R·德安德里亚		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N33/554 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N2333/96486 G01N33/6887 G01N33/68 G01N2333/78		
代理人(译)	程淼 梁谋		
优先权	60/560456 2004-04-08 US		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

用有效量的胶原酶预处理组织样品导致胶原的免疫检测增加和组织形态保持的增强。用于胶原免疫检测的这种改进方法可用于甲醛溶液固定、石蜡包埋的组织切片的免疫组化研究。

