

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510119865.0

[51] Int. Cl.

G01N 1/28 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 1/44 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2006年11月1日

[11] 公开号 CN 1854711A

[22] 申请日 2004.5.14

[21] 申请号 200510119865.0

分案原申请号 200410020546.X

[71] 申请人 沈阳迈迪生物医学技术有限公司

地址 110179 辽宁省沈阳市浑南新区世纪路  
29号海外学子园G座

[72] 发明人 李文欣

[74] 专利代理机构 沈阳科威专利代理有限责任公司

代理人 刁佩德

权利要求书1页 说明书10页 附图1页

## [54] 发明名称

乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法

## [57] 摘要

一种乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法, 先将人乳腺癌组织进行固定, 然后进行抗原性恢复处理, 再染色, 利用含氨基功能基高分子 PAMAM 树突状物的生物特性标记抗体与抗原反应、通过发色剂显色, 显微镜下观察检测结果; 所述人乳腺癌组织为手术切除的组织标本, 所述对人乳腺癌组织切片进行抗原性恢复处理, 即将石蜡包埋的组织切片, 经常规脱蜡后放入枸橼酸溶液中, 经微波装置加热处理迅速达到 100℃ 沸腾后, 降低照射力度, 然后取出容器放置室温 20 分钟再染色。它操作简便, 可以进一步正确掌握利用该试剂盒完成各种癌组织诊断 Her-2 的表达情况的检测, 进一步提高试剂盒的特异性, 使检测结果更加准确、稳定、有效。

1、一种乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法，其特征在于：先将人乳腺癌组织进行固定，然后进行抗原性恢复处理，再染色，利用含氨功能基高分子 PAMAM 树突状物的生物特性标记抗体与抗原反应、通过发色剂显色，显微镜下观察检测结果；所述的人乳腺癌组织为手术切除的组织标本，其取材规格为  $1 \times 1 \times 0.5$  mm，并在 24~72 小时内固定于 10%中性福尔马林溶液中；所述对人乳腺癌组织切片进行抗原性恢复处理，即将石蜡包埋的组织切片，经常规脱蜡后放入 0.1M、pH 6.2 的枸橼酸溶液中，经微波装置加热处理迅速达到 100℃沸腾后，降低照射力度保持 90-98°、15~30 分钟，然后取出容器放置室温 20 分钟再染色。

2、根据权利要求 1 所述的乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法，其特征在于：所述染色操作步骤如下：将所述组织切片用蒸馏水洗净后，适量 3%过氧化氢水溶液处理 10 分钟后加非特异性蛋白阻断剂 1-2 滴，反应 10 分钟，吸掉反应液后不冲洗，根据组织的大小加初始抗体量从 10 $\mu$ l 至 100 $\mu$ l 调整，30 分钟后，加连接抗体 1-2 滴 30 分钟，加酶标 PAMAM 试剂 1-2 滴 30 分钟，加已调制的显色试剂 100 $\mu$ l，3-5 分钟，以上各步骤之间均 PBS 洗 3 次每次 3 分，用干净的滤纸擦净组织周围的 PBS，每一步都不能使组织干燥务必要保持组织的湿润，核染色；苏木素染核 1 分钟，脱水、透明、封片、显微镜观察，上述反应均在室温下进行。

## 乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法

### 技术领域

本发明是专利申请日为 2004 年 5 月 14 日、申请号为 200410020546.X、发明名称为“乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒”的分案申请。

本发明涉及一种适用乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒的检测对象的处理方法。这种利用 PAMAM 树突状多聚物的生物特性标记抗体，对乳腺癌的 Her-2 进行免疫组织化学诊断的试剂盒的检测对象的处理方法，也可用于 ELSA 方法及其他各种癌组织诊断 Her-2 的表达情况的检测。

### 背景技术

近年来乳腺癌患病人数正在急剧上升，发病率居女性肿瘤第一位。我国每年约有 5-9 万名妇女发生乳腺癌，3-4 万名妇女死于乳腺癌。在沿海大城市如上海，乳腺癌发病率居女性肿瘤第一位。每年约有 12-15 万名乳腺癌患者需要观察和治疗。在所有的乳腺癌患者中，有 25-30% 的人有 Her-2/neu（表皮生长因子受体）蛋白的过度表达，该类型肿瘤更具转移性，危险性。美国肿瘤学会 2000 年就推荐“Her-2/neu”作为乳腺癌标记物，无论对在诊断当时，还是复发时的检测都具有重要价值。自 1987 年斯莱曼（Slamon）等人发表了 Her-2 与人类乳腺癌的增生，预后相关研究以来，Her-2 的研究取得很大进展。1998 年美国罗氏公司推出治疗乳腺癌新药 Herceptin（赫塞汀）得到 FDA（美国食品和药物管理局）批准上市。并且迅速在加拿大，欧洲，日本得到使用。新药 Herceptin 的应用更推动了 Her-2 基因和蛋白的临床检查的发展。到了 2000 年美国临床肿瘤学会出版的《肿瘤标记物指南》又指出“在原发性乳腺癌病例中

无论是在诊断当时，还是术后复发时，Her-2 的过度表达对预后判断，治疗方案的选择等都具有重要的意义”。但是，目前已经有的乳腺癌诊断试剂操作程序繁琐，非特异性高，特异性低，不能迅速、准确地诊断恶性的乳腺癌、观察其预后转化。

PAMAM(聚酰胺-胺)是一种纳米级树突状多聚物，PAMAM Dendrimer 树状大分子是近年来合成并迅速发展的一类新型聚合物。该聚合物与传统的聚合物相比,可在纳米水平上严格控制设计分子大小、结构和表面基团,因而具有精确的分子结构、致密的球状外形、单分散性、极好的水溶性。萨顿 (SATON.) 等人 2001 年发表用 PAMAM 来携带寡核苷酸基因片段进行体内和体外实验,证明其具有非常好的传递功能。帕特里安尼克 (PATRIANILK) 等人 2002 年应用 PAMAM 结合抗体片段靶向性治疗前列腺癌。专利号为 US2003/0044407A1 的“标记抗体或抗体片段的免疫脂质或多聚物用于系统治疗的传输或诊断试剂”中公开了 2001 年张,埃丝特 (Chang, Esther H) 等人,应用 PAMAM 标记稀有金属和抗体注入体内,通过核磁共振测定进行影像学诊断。但是因其在体内分解、代谢所产生的毒性作用尚不清楚,有动物实验研究表明,一定的 PAMAM 剂量可使小鼠产生溶血性变化。因此,体内实验难于广泛应用。

大量研究证实, Her-2 阳性患者对现有的常规化疗、放疗及激素的抗乳腺癌治疗均不敏感,术后易复发,转移快,存活时间短,上述病例都与 Her-2/neu (c-erbB-2) 蛋白过度表达密切相关。一些发展国家已经建立了一些有效的 Her-2/neu 基因和蛋白检测、评价标准,用于指导和预测治疗的效果,但是其试剂昂贵,检测麻烦。

在专利申请号为 200410020546.X 的文献中,针对现有的乳腺癌诊断试剂

操作存在的上述缺陷,提供了一种“乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒”。该试剂盒具有以下优点: 即其利用 PAMAM 树突状多聚物的生物特性标记抗体, 对乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断, 不仅明显扩大染色可视性, 提高免疫反应的特异性, 敏感性, HER-2 过度表达的检测更为准确, 而且使与 Her-2/neu 蛋白过度表达患者能得到有效, 及时的治疗, 减少患者不必要的医疗费用支出, 提高患者的生存质量和延长生存时间, 体外诊断检测操作简便、对肿瘤早期诊断准确、稳定、有效。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法, 该方法操作简便, 有利于正确掌握利用该试剂盒完成各种癌组织诊断 Her-2 的表达情况的检测, 以提高试剂盒的特异性, 使检测结果更加准确、稳定、有效。

本发明的目的是这样实现的: 该方法是先将人乳腺癌组织进行固定, 然后进行抗原性恢复处理, 再染色, 利用含氨基功能基高分子 PAMAM 树突状物的生物特性标记抗体与抗原反应、通过发色剂显色, 显微镜下观察检测结果; 所述的人乳腺癌组织为手术切除的组织标本, 其取材规格为  $1 \times 1 \times 0.5$  mm, 并在 24~72 小时内固定于 10% 中性福尔马林溶液中; 所述对人乳腺癌组织切片进行抗原性恢复处理, 即将石蜡包埋的组织切片, 经常规脱蜡后放入 0.1M、pH 6.2 的枸橼酸溶液中, 经微波装置加热处理迅速达到 100℃ 沸腾后, 降低照射力度保持 90-98°、15~30 分钟, 然后取出容器放置室温 20 分钟再染色。

所述染色操作步骤如下: 将所述组织切片用蒸馏水洗净后, 适量 3% 过氧化氢水溶液处理 10 分钟后加非特异性蛋白阻断剂 1-2 滴, 反应 10 分钟, 吸掉反应液后不冲洗, 根据组织的大小加初始抗体量从 10 $\mu$ l 至 100 $\mu$ l 调整, 30 分

钟后，加连接抗体 1-2 滴 30 分钟，加酶标 PAMAM 试剂 1-2 滴 30 分钟，加已调制的显色试剂 100 $\mu$ l，3-5 分钟，以上各步骤之间均 PBS 洗 3 次每次 3 分，用干净的滤纸擦净组织周围的 PBS，每一步都不能使组织干燥务必要保持组织的湿润，核染色，苏木素染核 1 分钟，脱水、透明、封片、显微镜观察，上述反应均在室温下进行。

由于本发明是先将检测对象人乳腺癌组织进行固定，然后进行抗原性恢复处理，再染色，利用含氨功能基高分子 PAMAM 树突状物的生物特性标记抗体与抗原反应、通过发色剂显色，进行显微镜观察，所以对乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断，不仅明显扩大染色可视性，而且提高免疫反应的特异性，敏感性。该方法对 Her-2 过度表达的体外诊断检测操作简便，对肿瘤早期诊断准确、稳定、有效。这种体外诊断学方法与其它方法相比，分子量较小，更容易渗透，敏感度高，具有使检测方法实现规范化、标准化的优点。因此，将其用于乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学的体外诊断，开辟了新的体外诊断学方法。形成了利用该乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒对各种癌组织诊断 Her-2 的表达情况的检测的判断标准和评价方法。

## 附图说明

以下结合附图对本发明作进一步描述。

图 1 是本发明的一种显微镜下 Her-2 染色结果判定图谱。

## 具体实施方式：

以下结合实施方式对本发明作进一步描述。该试剂盒内容物中包括非特异性蛋白阻断剂，鼠抗人的初始抗体，羊抗鼠的单克隆连接抗体，酶标 PAMAM 试剂，由发色氧化反应剂、发色剂、显色缓冲液调配成的显色试剂等。操作时要依次滴入各试剂，其用量的重量比为：非特异性蛋白阻断剂：初始抗体：

连接抗体：酶标 PAMAM 试剂：显色试剂=5~10：1~10：5~10：5~10：10。可根据实际使用情况，按上述比例在每盒内分装 20 人份、50 人份、100 人份等剂量的各试剂。

#### 按每盒 50 人份制备乳腺癌的 Her-2 免疫组织化学诊断试剂盒

非特异性蛋白阻断剂是由动物血清组成，将羊、马、兔等动物，抽取其正常血后，分离血清后取得备用。其作用是非特异性阻断人组织切片中交叉蛋白反应。6ml/盒

初始抗体是针对人体乳腺癌组织中特异性 Her-2 抗原所制备的鼠抗人的特异性单克隆抗体。10ul-100ul/例，2ml/盒。

连接抗体是由羊抗鼠的抗体组成，充当特异性初始抗体与显色试剂之间的连接桥梁。6ml/盒。

酶标 PAMAM 试剂是用来标记抗体的，PAMAM 是一种纳米级树突状多聚物，其表面有高密度的氨基基团，在生理环境的 pH 时带正电性，与带负电的抗体蛋白结合，酶标 PAMAM 试剂是由辣根过氧化物酶标记的抗体与带正电荷的 PAMAM Dendrimer 混合，在室温条件下反应 10~15 分钟制成，二者的混合浓度为 0.1~10：1 摩尔比。可稳定溶解于缓冲液中。6ml/盒。

发色氧化反应剂是由 3%过氧化氢水溶液组成。2ml/盒。

发色剂可根据显色的需要选用以下试剂中的一种，即棕色发色剂选用 DAB (3, 3-diaminobenzidine tetrahydrochloride)，红色发色剂选用 AEC (3-amino-9ethylcarbazole)，紫兰色发色剂选用 BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/ nitroblue tetrazolium)。3ml/盒。

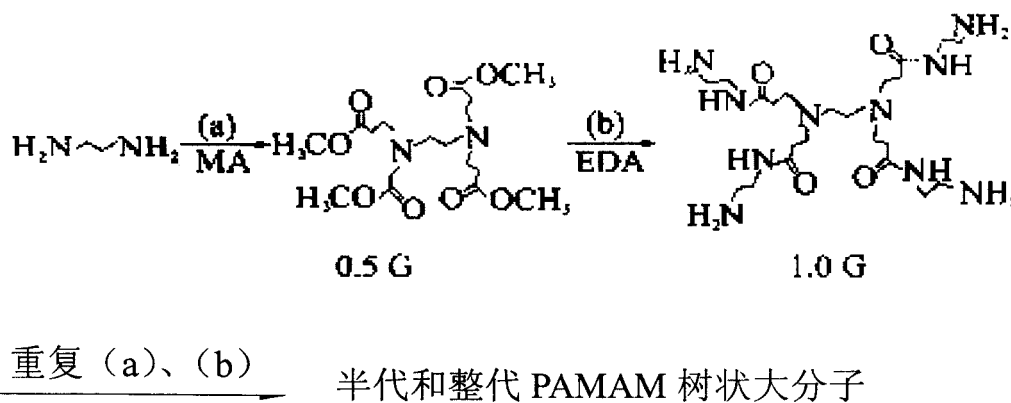
显色缓冲液选用 0.05Mol 的 Tris-HCl 缓冲液等。6ml/盒

实施例一：本发明用于组织切片免疫组织化学染色诊断的具体操作步骤如

下:

## 1、合成 PAMAM Dendrimer 。

PAMAM Dendrimer 由 0 代至 10 代, 其分子直径在 10Å 至 130Å 之间, 属于纳米尺度的分子。其合成是采用分支法, 即分子由核心部分开始向外生长。根据树木分枝的规律将预先制好的单体按放射状的顺序、分支的枝梢再接分支, 依次重复组合起来。以乙二胺(EDA)为引发核, 第 1 步反应(a)与丙烯酸甲酯(MA)通过 Michael 加成反应生成 1 个四元酯[称为 0.5 代(G)]; 第 2 步反应(b)四元酯与过量的乙二胺发生氨解反应生成 1 个四元酰胺化合物(称为 1 代)。重复(a)、(b)Michael 加成和氨解的反应步骤, 即可得到不同代数的 PAMAM 树状大分子化合物。合成产物均用 FT2IR、FAB2MS、 $^1\text{H}$  NMR 和  $^{13}\text{C}$  NMR 进行结构表征。以下是 PAMAM 合成反应路线。



不同pH值PAMAM对增溶的影响不同, 不同质量浓度的PAMAM溶液对增溶试验也产生5.0代PAMAM不同质量浓度。通过实验证明在较大的pH值范围内和不同的缓冲条件(水、PBS、0.5mmol/L NaCl等)下稳定存在, 并不解离。

## 2、制备Her-2抗原。

人乳腺癌手术切除的Her-2强阳性新鲜肿瘤组织提取总RNA, 用按Her-2的cDNA序列设计引物, 进行PCR扩增得到人PCR片段, 纯化后用双酶切开与同样

双切酶的表达质粒Pet42b进行连接，得到重组原核表达质粒，然后将该质粒转入大肠杆菌进行扩增，经测序验证后，提取重组原核表达质粒，并以其转化表达菌BL21。将BL21接种于LB培养液中37℃培养扩增。收集菌体于缓冲液中，经超声波破菌后，离心、洗脱、收集。用WESTERN印迹检测纯化后的样品。纯度：96.0%。

**制备初始抗体：**取抗 Her-2 工作细胞库杂交瘤细胞  $2 \times 10^7$ /只，腹腔注射经石蜡油预先致敏的 BALB/c 小鼠，10-14 天后抽取腹水。

**纯化：**硫酸铵沉淀、A 蛋白-Sepharose 亲和层析交换分离方法从杂交瘤细胞株培养液中分离纯化抗 Her-2 单克隆抗体。

**抗体的效价：**经ELISA法测定培养上清液中抗体亲和力，达到最大的结合50%所需腹水单抗的浓度为  $7.5 \times 10^{-6}$ ，亲和常数  $K_a = 1.3 \times 10^5 \text{ mol}^{-1}$ 。利用罗氏公司的亚类测定试剂盒，检测3株阳性杂交瘤细胞的培养上清液，用间接ELISA法检测细胞培养上清液和腹水的单抗效价可达  $10^{-5}$ ，腹水经纯化后ELISA法检测抗体效价为  $10^{-6}$ 。

**抗体特异性：**蛋白印记分析测到分子量为 185dp 的带，和抗体经免疫组织化学染色显示特异性强、反应敏感。而不与非 Her-2 蛋白质结合。重组可溶性抗原 Her-2 常规免疫 BALB/c 小鼠，取脾细胞与 MOPC-21 衍生的，分泌 IgG 分子（K 轻链）的 BALB/c 骨髓瘤细胞融合制备抗体，筛选、纯化抗体、A 蛋白-Sepharose 亲和层析交换分离。

### 3、制备非特异性蛋白阻断剂。

非特异性蛋白阻断剂由动物血清组成，将羊、马、兔等动物，抽取其正常血后，分离血清后取得备用。

### 4、制备连接抗体。

连接抗体是常规制备的由羊抗鼠的抗体组成。

#### 5、制备酶标 PAMAM 试剂。

由辣根过氧化物酶标记的抗体或抗体片段与上述步骤 1（合成 PAMAM Dendrimer）中所制作的带正电荷的 PAMAM Dendrimer 以 0.1~10:1 摩尔比率的浓度混合，室温条件下反应 10-15 分钟，制成酶标 PAMAM 试剂。这是一个使 PAMAM 与辣根过氧化物酶标记的抗体混合在一起的极好比率及顺序，是简单、有效，稳定、非化学的结合方法。该方法比化学或其他方法有效或更有效。

#### 6、人乳腺癌组织的固定。

手术切除的组织离体的瞬间就开始发生各种变化，如组织自体溶解，腐败等。固定的目的就是使这种变化立即停止，保存其形态学特点和抗原性。手术切除的组织被立刻切成  $1 \times 1 \times 0.5$  mm 的组织标本，固定于常规 10% 中性福尔马林溶液中。最佳固定方法和时间范围是 24-72 小时。少于 24 小时固定不充分，超过 72 小时抗原性开始减弱。

#### 7、病理组织蜡块的适用。

经过中性缓冲福尔马林液固定，用于常规处理的和石蜡包埋的组织，适用该试验。不推荐酒精和其它福尔马林代用品。

#### 8、抗原性恢复处理。

石蜡包埋的组织切片，经脱蜡后放入 0.1M、pH 6.2 枸橼酸水溶液中，经微波装置加热处理迅速达到 100℃ 沸腾后，降低照射力度保持 90-98℃、15-30 分钟，然后取出容器放置室温 20 分钟左右再染色，使其抗原性恢复，增加染色强度。

#### 9、显色试剂的调制。

使用显色试剂前，将显色缓冲液取 2.5ml 装于另一试管中，滴入发色剂两滴（每滴约 50 $\mu$ l，以下同），再滴入发色氧化反应剂一滴，轻轻上下翻转数次，混合后备用。可根据染色片子的数量按该比率配制。其用量的重量比为：显色缓冲液：发色剂：发色氧化反应剂=50：2：1：。

#### 10、染色操作步骤。

上述组织切片用蒸馏水洗净后，适量 3%过氧化氢水溶液处理 10 分钟后加非特异性蛋白阻断剂 1-2 滴，反应 10 分钟，吸掉反应液后不冲洗，根据组织的大小加初始抗体量从 10 $\mu$ l 至 100 $\mu$ l 调整，30 分钟后，加连接抗体 1-2 滴 30 分钟，加酶标 PAMAM 试剂 1-2 滴 30 分钟，加已调制的显色试剂 100 $\mu$ l，3-5 分钟，以上各步骤之间均 PBS 洗 3 次每次 3 分，用干净的滤纸擦净组织周围的 PBS，每一步都不能使组织干燥务必要保持组织的湿润，核染色，苏木素染核 1 分钟，脱水、透明、封片、显微镜观察，上述反应均在室温下进行。

11、本试验可适用于人工和自动染色。本试验可在配套的自动染色仪上自动操作。

#### 12、染色结果判定。

0+：细胞膜为阴性或细胞膜染色阳性的癌细胞少于 10%（单纯细胞浆染色性时判断为阴性）

1+：几乎很少有完整细胞膜阳性或有完整细胞膜染色阳性的癌细胞少于或等于全部癌细胞的 10%

2+：完整细胞膜弱-中度染色阳性的癌细胞大于或等于全部癌细胞的 10%

3+：完整细胞膜强染色阳性的癌细胞大于或等于全部癌细胞的 10%

结果判定：0+、1+为阴性， 2+、3+为阳性（详见图 1）。

实施例二：

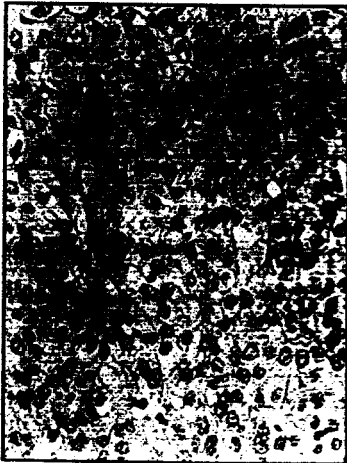
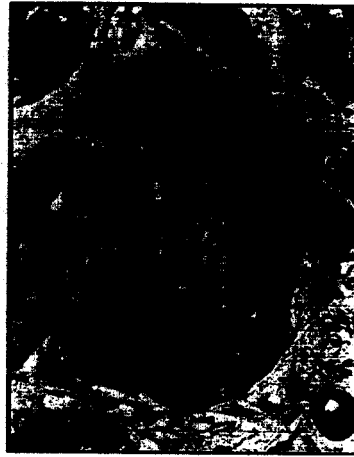
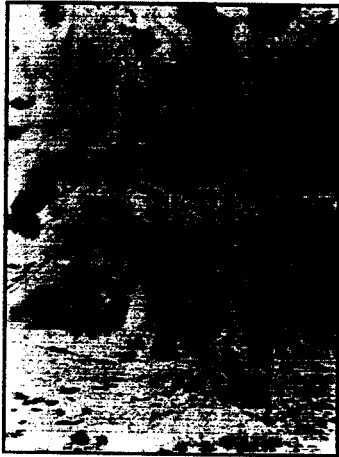
本抗体还适用于肿瘤穿刺脱落细胞检查。癌组织肿瘤穿刺细胞涂片染色或载玻片上细胞培养；穿刺细胞均匀涂在载玻片上待干燥后立即固定于 10%中性福尔马林溶液中 10 分钟。载玻片上细胞培养因癌细胞附着于玻片上，可以直接放入固定液中 10 分钟。蒸馏水洗净后，直接进入实施例一中的第 8 步骤，改用 0.3%的过氧化氢甲醇溶液（ $H_2O_2$ ；1ml；甲醇；99ml）阻断内源酶，室温 30 分钟反应后 PBS 洗净 3 次。以后的其他步骤同实施例一。

### 实施例三：

本试剂盒还可用于其他各种癌组织诊断 Her-2 的表达情况的检测。方法同实施例一。

1+

3+



0+

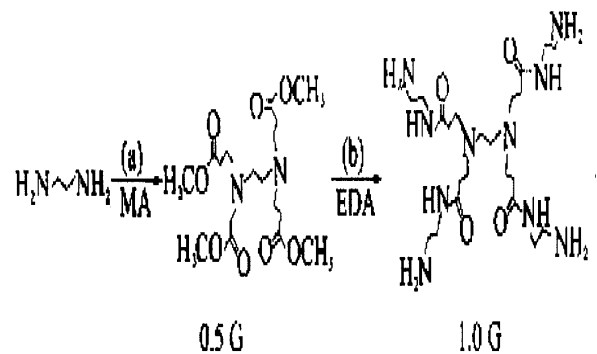
2+

图1

专利名称(译)	乳腺癌的Her - 2免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1854711A</a>	公开(公告)日	2006-11-01
申请号	CN200510119865.0	申请日	2004-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	沈阳迈迪生物医学技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	沈阳迈迪生物医学技术有限公司		
[标]发明人	李文欣		
发明人	李文欣		
IPC分类号	G01N1/28 G01N1/30 G01N1/44 G01N21/00 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种乳腺癌的Her - 2免疫组织化学诊断试剂盒检测对象的处理方法，先将人乳腺癌组织进行固定，然后进行抗原性恢复处理，再染色，利用含氨基功能基高分子PAMAM树突状物的生物特性标记抗体与抗原反应、通过发色剂显色，显微镜下观察检测结果；所述人乳腺癌组织为手术切除的组织标本，所述对人乳腺癌组织切片进行抗原性恢复处理，即将石蜡包埋的组织切片，经常规脱蜡后放入枸橼酸溶液中，经微波装置加热处理迅速达到100℃沸腾后，降低照射力度，然后取出容器放置室温20分钟再染色。它操作简便，可以进一步正确掌握利用该试剂盒完成各种癌组织诊断Her - 2的表达情况的检测，进一步提高试剂盒的特异性，使检测结果更加准确、稳定、有效。



重复 (a)、(b) → 半代和整代 PAMAM 树状大分子