



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103076448 B

(45) 授权公告日 2015.06.17

(21) 申请号 201210593378.8

(22) 申请日 2012.12.31

(73) 专利权人 广州鸿琪光学仪器科技有限公司  
地址 510000 广东省广州市高新技术产业开发区科学城开源大道11号A6栋第三层

(72) 发明人 王勇 罗琪

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 曹志霞

(51) Int. Cl.

G01N 33/531(2006.01)

(56) 对比文件

CN 101203596 A, 2008.06.18,  
CN 1920559 A, 2007.02.28,  
WO 2007089911 A2, 2007.08.09,  
EP 2541249 A1, 2013.01.02,  
JP 2010151677 A, 2010.07.08,  
康熙雄 主编. 免疫胶体金技术原理和特点. 《免疫胶体金技术临床应用》. 2010,  
倪灿荣 主编. 免疫胶体金技术. 《免疫组织化学实验新技术及应用》. 1993,

Marisa Maltez-da Costa 等. Detection of circulating cancer cells using electrocatalytic gold nanoparticles.. 《Small》. 2012, 第8卷

杨建柱等. 上皮细胞黏附分子、β-环连蛋白在子宫颈鳞状上皮癌变过程中表达的研究. 《中华肿瘤杂志》. 2003, (第04期),

姜梅芳等. E-钙粘蛋白、β-环连蛋白、上皮细胞粘附分子在宫颈鳞状细胞癌变过程中的表达. 《中国妇幼保健》. 2008, (第01期),

Konstantin Sokolov 等. Real-Time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles.. 《Cancer Research》. 2003, 第63卷

Marisa Maltez-da Costa 等. Detection of circulating cancer cells using electrocatalytic gold nanoparticles.. 《Small》. 2012, 第8卷

审查员 毕秀华

权利要求书2页 说明书7页 附图3页

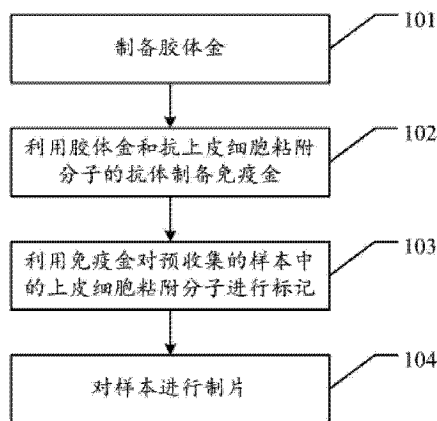
(54) 发明名称

一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置

装置简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

(57) 摘要

本发明实施例公开了一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置,可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。本发明实施例方法包括:制备胶体金;利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;对所述样本进行制片。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见,当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时,通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质,由于子宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高,所以可以通过本发明实施例中的制备方法及



1. 一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法,其特征在于,包括:
  - 制备胶体金;
  - 利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;
  - 利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;
  - 对所述样本进行制片;
  - 所述胶体金的制备方法包括:
    - (1) 将氯金酸配制成浓度为 0.005% -0.015% 的水溶液并取 100-200ml 加热至沸腾;
    - (2) 搅拌氯金酸水溶液,并向所述氯金酸水溶液加入 3-6ml 浓度为 0.5-1.5% 的柠檬酸三钠水溶液;
    - (3) 将经过步骤 (2) 处理之后的溶液加热煮沸 15-20 分钟;
    - (4) 冷却经过步骤 (3) 处理之后的溶液 2-10 分钟至室温后用双蒸馏水恢复所述经过步骤 (3) 处理之后的溶液的体积至原体积,得到胶体金溶液;
  - 所述利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金的方法包括:
    - (1) 调节所述胶体金溶液的 pH 值为 7.5 至 8.5;
    - (2) 将所述抗上皮细胞粘附分子的抗体置入透析袋内后放入双蒸馏水中透析 2-4 小时或过夜;
    - (3) 对经过步骤 (2) 处理之后的溶液在 4°C 下进行离心力为 50000-100000g 的离心沉淀 50-70 分钟并去除所述溶液中的聚合物;
    - (4) 取经过步骤 (3) 处理之后的溶液的上清液,调整所述上清液的蛋白质至 0.5-1mg/ml 的浓度并将调整后的上清液作为抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液;
    - (5) 用浓度为 0.004-0.006mol/l pH 值为 8.5-9.5 的硼酸盐缓冲液将所述抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液作系列稀释后,取 0.05-0.15ml 抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液加到 0.5-1.5ml 所述胶体金溶液中,另设一支不加所述抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液的对照管,4-6 分钟后分别向各管中加入 0.05-0.15ml 浓度为 8-12% 的 NaCl 溶液,混匀各管的溶液后静置 1.5-2.5 小时,在能使胶体金稳定的蛋白量上再加 9% -11% 并将所述蛋白量记为最佳标记蛋白量;
    - (6) 调整所述上清液中蛋白含量为所述最佳标记蛋白量并加入所述胶体金溶液并充分混合 15-30 分钟;
    - (7) 向经过步骤 (6) 处理之后的溶液中加入浓度为 2% -4% 的 PEG-2000 使所述溶液的 PEG-2000 最终浓度为 0.05% -0.1% 并搅拌所述溶液 10-15 分钟;
    - (8) 取经过步骤 (7) 处理之后的溶液中的沉淀部分并用含 0.5% -1.5% 的 BSA 和 0.01% -0.03% 的  $\text{NaN}_3$  的浓度为 0.01-0.03mol/l pH 值为 7.0-7.4 的 Tris-HCl 的缓冲液稀释所述沉淀部分,得到免疫金;
    - (9) 回收所述免疫金并用微孔滤膜进行过滤除菌。
2. 根据权利要求 1 所述的新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法,其特征在于,在步骤所述利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记之后和步骤所述对样本进行制片之前还包括:
  - 对玻片进行预处理;
  - 对样本细胞的抗体进行孵育;

所述对玻片进行预处理包括：

用浓度为 93% -97% 的乙醇浸泡处理所述玻片；

用双蒸馏水清洗所述玻片；

用 3- 氨丙基 -3- 乙氧基甲硅烷包被玻片。

3. 根据权利要求 2 所述的新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法, 其特征在于, 在步骤所述对样本进行制片之后还包括：

利用显微镜对所述制片进行观察。

4. 根据权利要求 2 所述的新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法, 其特征在于, 在步骤所述对样本进行制片之后还包括：

对所述制片进行染色；

利用显微镜对所述制片进行观察。

## 一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置

### 技术领域

[0001] 本发明实施例涉及生物医学技术领域,具体涉及一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置。

### 背景技术

[0002] 子宫颈癌是最常见的恶性肿瘤之一,发病率位于女性肿瘤的第二位。全世界每年大约有 20 万妇女死于这种疾病,而对子宫颈癌前病变的早期诊断和治疗可以降低其发生率。

[0003] 目前国际上较先进的一种宫颈癌细胞学检查技术是新柏氏液基细胞学检测(TCT, Thinprep Cytologic Test), TCT 检查是采用液基薄层细胞检测系统检测宫颈细胞并进行细胞学分类诊断的方法,与传统的宫颈刮片巴氏涂片检查相比明显提高了标本的满意度及宫颈异常细胞检出率,同时还能发现部分癌前病变,微生物感染如霉菌、滴虫、病毒、衣原体等。

[0004] 然而利用新柏氏液基细胞学检测进行病理诊断不但需要经验丰富的专家,而且即使这样,还是会出现误诊和漏诊。因此开发简便快速检测癌细胞的技术有很大的临床意义。

### 发明内容

[0005] 本发明实施例提供了一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置,可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

[0006] 本发明实施例提供的新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法,包括:

[0007] 制备胶体金;

[0008] 利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;

[0009] 利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;

[0010] 对所述样本进行制片。

[0011] 可选地,所述胶体金的制备方法包括:

[0012] (1) 将氯金酸配制成浓度为 0.005%-0.015% 的水溶液并取 100-200ml 加热至沸腾;

[0013] (2) 搅拌氯金酸水溶液,并向所述氯金酸水溶液加入 3-6ml 浓度为 0.5-1.5% 的柠檬酸三钠水溶液;

[0014] (3) 将经过步骤(2)处理之后的溶液加热煮沸 15-20 分钟;

[0015] (4) 冷却经过步骤(3)处理之后的溶液 2-10 分钟至室温后用双蒸馏水恢复所述经过步骤(3)处理之后的溶液的体积至原体积,得到胶体金溶液。

[0016] 可选地,所述利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金的方法包括:

[0017] (1) 调节所述胶体金溶液的 pH 值为 7.5 至 8.5;

[0018] (2) 将所述抗上皮细胞粘附分子的抗体置入透析袋内后放入双蒸馏水中透析 2-4 小时或过夜;

[0019] (3) 对经过步骤(2)处理之后的溶液在 4℃ 下进行离心力为 50000-100000g 的离心沉淀 50-70 分钟并去除所述溶液中的聚合物；

[0020] (4) 取经过步骤(3)处理之后的溶液的上清液,调整所述上清液的蛋白质至 0.5-1mg/ml 的浓度并将调整后的上清液作为抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液；

[0021] (5) 用浓度为 0.004-0.006mol/l pH 值为 8.5-9.5 的硼酸盐缓冲液将所述抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液作系列稀释后,取 0.05-0.15ml 抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液加到 0.5-1.5ml 所述胶体金溶液中,另设一管不加所述抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液的对照管,4-6 分钟后分别向各管中加入 0.05-0.15ml 浓度为 8-12% 的 NaCl 溶液,混匀各管的溶液后静置 1.5-2.5 小时,在能使胶体金稳定的蛋白量上再加 9%-11% 并将所述蛋白量记为最佳标记蛋白量；

[0022] (6) 调整所述上清液中蛋白含量为所述最佳标记蛋白量并加入所述胶体金溶液并充分混合 15-30 分钟；

[0023] (7) 向经过步骤(6)处理之后的溶液中加入浓度为 2%-4% 的 PEG-2000 使所述溶液的 PEG-2000 最终浓度为 0.05%-0.1% 并搅拌所述溶液 10-15 分钟；

[0024] (8) 取经过步骤(7)处理之后的溶液中的沉淀部分并用含 0.5%-1.5% 的 BSA 和 0.01%-0.03% 的  $\text{NaN}_3$  的浓度为 0.01-0.03mol/l pH 值为 7.0-7.4 的 Tris-HCl 的缓冲液稀释所述沉淀部分,得到免疫金；

[0025] (9) 回收所述免疫金并用微孔滤膜进行过滤除菌。

[0026] 可选地,在步骤所述利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记之后和步骤所述对样本进行制片之前还包括：

[0027] 对玻片进行预处理；

[0028] 对样本细胞的抗体进行孵育；

[0029] 所述对玻片进行预处理包括：

[0030] 用浓度为 93%-97% 的乙醇浸泡处理所述玻片；

[0031] 用双蒸馏水清洗所述玻片；

[0032] 用 3-氨基丙基-3-乙氧基甲硅烷包被玻片。

[0033] 可选地,在步骤所述对样本进行制片之后还包括：

[0034] 利用显微镜对所述制片进行观察。

[0035] 可选地,在步骤所述对样本进行制片之后还包括：

[0036] 对所述制片进行染色；

[0037] 利用显微镜对所述制片进行观察。

[0038] 本发明实施例提供的新的宫颈癌细胞的标记技术的制备装置,包括：

[0039] 制备单元一,用于制备胶体金；

[0040] 制备单元二,用于利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金；

[0041] 标记单元,用于利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记；

[0042] 制片单元,用于对所述样本进行制片。

[0043] 可选地,所述装置还包括：

[0044] 预处理单元,用于对玻片进行预处理；

[0045] 孵育单元,用于对样本细胞的抗体进行孵育。

[0046] 本发明实施例中,首先制备胶体金;然后利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;接着利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;最后对所述样本进行制片。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见,当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时,通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质,由于子宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高,所以可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

### 附图说明

[0047] 图1为本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备方法第一实施例流程图;

[0048] 图2为本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备方法第二实施例流程图;

[0049] 图3为本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备装置实施例结构图。

### 具体实施方式

[0050] 本发明实施例提供了一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置,可以简单、快速和准确地对癌细胞和间皮细胞进行鉴别诊断。

[0051] 请参阅图1,本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法的第一实施例包括:

[0052] 101、制备胶体金;

[0053] 胶体金的成份主要是氯金酸,制备方法可以采用柠檬酸三钠还原法,通常采用的还原剂有柠檬酸三钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷和硼氢化钠。

[0054] 102、利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;

[0055] 制备好胶体金之后,可以利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金。

[0056] 103、利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;

[0057] 制备好免疫金之后,可以利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记。

[0058] 104、对样本进行制片。

[0059] 利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记之后,可以对样本进行制片。

[0060] 本发明实施例中,首先制备胶体金;然后利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;接着利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;最后对样本进行制片。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见,当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时,通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质,由于子宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高,所以可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

[0061] 上面简单介绍了本发明新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法的第一实施例,

下面对本发明新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法的第二实施例进行详细的描述,请参阅图 2,本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法的第二实施例包括:

[0062] 201、制备胶体金;

[0063] 胶体金的成份主要是氯金酸,制备方法可以采用柠檬酸三钠还原法,通常采用的还原剂有柠檬酸三钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷和硼氢化钠。原理与具体操作方法如下:

[0064]  $2\text{HAuCl}_4 + 3\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 2\text{Au} + 3\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + 8\text{HCl} + 3\text{CO}_2$

[0065] 制备胶体金的具体方法包括:将氯金酸( $\text{HAuCl}_4$ )配制成浓度为 0.005%-0.015%,可以为 0.01%的水溶液并取 100-200ml,可以为 100ml 加热至沸;搅拌氯金酸水溶液,并向氯金酸水溶液加入 3-6ml,可以为 5ml,浓度为 0.5-1.5%,可以为 1%的柠檬酸三钠水溶液;接着继续加热煮沸上述溶液 15-20 分钟,可以为 15 分钟;最后将上述得到的溶液进行冷却 2-10 分钟,可以为 5 分钟至室温后用双蒸馏水恢复至原体积,可以得到胶体金。

[0066] 202、利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;

[0067] 制备好胶体金之后,可以利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金。

[0068] 具体制备免疫金的方法可以为:首先可以用浓度为 0.2mol/l 的  $\text{K}_2\text{CO}_3$  或浓度为 0.1mol/l 的  $\text{HCl}$  调节胶体金溶液的 pH 至选定值,可以为 7.5 至 8.5;然后将抗上皮细胞粘附分子的抗体置入透析袋内后,放入双蒸馏水中透析 2-4 小时或过夜,接着将上述溶液在 4℃ 下进行离心力为 50000-100000g,可以为 100000g 的离心沉淀 50-70 分钟,可以为 60 分钟并去除所述溶液中的聚合物,取上述溶液的上清液,调整所述上清液的蛋白质至 0.5-1mg/ml 的浓度并将上述上清液作为抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液。

[0069] 得到抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液后,用浓度为 0.004-0.006mol/l,可以为 0.005mol/l,碱度为 8.5-9.5,可以为 9.0 的硼酸盐缓冲液将抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液作系列稀释后,取 0.05-0.15ml,可以为 0.1ml 抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液加到 0.5-1.5ml,可以为 1ml 胶体金溶液中,另设一支不加抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液的对照管,4-6 分钟,可以为 5 分钟后分别向各支试管中加入 0.05-0.15ml,可以为 0.1ml 浓度为 8-12%,可以为 10%的  $\text{NaCl}$  溶液,混匀各管的溶液后静置 1.5-2.5 小时,可以为 2 小时,在能使胶体金稳定的蛋白量上再加 9%-11%,可以为 10% 并将上述蛋白量记为最佳标记蛋白量。

[0070] 得到最佳标记蛋白量后,调整上清液中蛋白含量为最佳标记蛋白量,取上述上清液加入胶体金溶液并充分混合 15-30 分钟,可以为 15 分钟,接着加入浓度为 2%-4%,可以为 3%的 PEG-2000 使上述溶液中的 PEG-2000 最终浓度为 0.05%-0.1%,可以为 0.05%,并搅拌上述溶液 10-15 分钟,取样品并吸取上清液,然后取管底沉淀部分,用含 0.5%-1.5%,可以为 1%的 BSA 和 0.01%-0.03%,可以为 0.02%的  $\text{NaN}_3$  的浓度为 0.01-0.03mol/l,可以为 0.02mol/l pH 值为 7.0-7.4,可以为 7.2 的 Tris-HCl 的缓冲液稀释上述沉淀部分,得到免疫金,最终免疫金的回收量为原体积的 10%。

[0071] 接着还可以用 0.22um 的微孔滤膜过滤除菌,分装,并在 4℃ 下保存备用。

[0072] 203、利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;

[0073] 制备好免疫金之后,可以利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记。

[0074] 204、对玻片进行预处理;

[0075] 上述对玻片进行预处理可以包括：首先用浓度为 93%–97%，可以为 95% 的乙醇浸泡处理玻片；接着用双蒸馏水清洗玻片；最后用 3- 氨丙基 -3- 乙氧基甲硅烷包被玻片即可完成对玻片的预处理，上述的预处理过程可以设定在步骤 206 之前的任一步骤之前或之后，而不限定与本实施例中的在步骤 203 之后。

[0076] 205、对样本细胞的抗体进行孵育；

[0077] 上述具体的孵育过程可以为，将胶体金包被的抗体与样本孵育在 35–39℃，可以为 37℃ 的恒温孵育箱中，反应一段时间，可以为 2 小时或者在 4℃ 的恒温孵育箱中过夜，然后取出后依次用清洗液，可以用浓度为 1%Tween20 的 PBS 清洗，最后在转速，可以为 1000rpm 的离心机中离心若干次，可以为 3 次，每次持续若干时间，可以为 5 分钟。

[0078] 206、对样本进行制片。

[0079] 完成对样本细胞进行抗体孵育之后，可以对样本进行制片。具体的制片方法为现有技术中的内容，在此处不再赘述。

[0080] 对所述样本进行制片之后，可以对上述制片进行观察。在对上述制片进行观察之前，还可以对所述制片进行染色，然后再进行观察。

[0081] 本发明实施例中，首先制备胶体金；然后利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金；接着利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记；最后对样本进行制片。其中还可以对玻片进行预处理和对样本细胞进行抗体孵育。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见，当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时，通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质，由于子宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高，所以可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

[0082] 上面对本发明新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备方法的第二实施例作了详细描述，特别是制备胶体金和免疫金的过程，下面介绍本发明新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备装置实施例，请参阅图 3，本发明实施例中新的子宫颈癌细胞的标记技术及其制备装置实施例包括：

[0083] 制备单元一 301，用于制备胶体金；

[0084] 制备单元二 302，用于利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金；

[0085] 标记单元 303，用于利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记；

[0086] 制片单元 304，用于对样本进行制片。

[0087] 所述装置还包括：

[0088] 预处理单元 305，用于对玻片进行预处理；

[0089] 孵育单元 306，用于对样本细胞的抗体进行孵育。

[0090] 首先制备单元一 301 制备胶体金，胶体金的成份主要是氯金酸，制备方法可以采用柠檬酸三钠还原法，通常采用的还原剂有柠檬酸三钠、鞣酸、抗坏血酸、白磷和硼氢化钠。原理与具体操作方法如下：

[0091]  $2\text{HAuCl}_4 + 3\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 = 2\text{Au} + 3\text{C}_5\text{H}_6\text{O}_5 + 8\text{HCl} + 3\text{CO}_2$

[0092] 制备胶体金的具体方法包括：将氯金酸 ( $\text{HAuCl}_4$ ) 配制成浓度为 0.005%–0.015%，可以为 0.01% 的水溶液并取 100–200ml，可以为 100ml 加热至沸；搅拌氯金酸水溶液，并向

氯金酸水溶液加入 3-6ml, 可以为 5ml, 浓度为 0.5-1.5%, 可以为 1% 的柠檬酸三钠水溶液; 接着继续加热煮沸上述溶液 15-20 分钟, 可以为 15 分钟; 最后将上述得到的溶液进行冷却 2-10 分钟, 可以为 5 分钟至室温后用双蒸馏水恢复至原体积, 可以得到胶体金。

[0093] 制备单元一 301 制备好胶体金之后, 制备单元二 302 可以利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金。

[0094] 制备单元二 302 具体制备免疫金的方法可以为: 首先可以用浓度为 0.2mol/l 的  $K_2CO_3$  或浓度为 0.1mol/l 的 HCl 调节胶体金溶液的 pH 至选定值, 可以为 7.5 至 8.5; 然后将抗上皮细胞粘附分子的抗体置入透析袋内后, 放入双蒸馏水中透析 2-4 小时或过夜, 接着将上述溶液在 4℃ 下进行离心力为 50000-100000g, 可以为 100000g 的离心沉淀 50-70 分钟, 可以为 60 分钟并去除所述溶液中聚合物, 取上述溶液的上清液, 调整上清液的蛋白质至 0.5-1mg/ml 的浓度并将上述上清液作为抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液。

[0095] 得到抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液后, 用浓度为 0.004-0.006mol/l, 可以为 0.005mol/l, 碱度为 8.5-9.5, 可以为 9.0 的硼酸盐缓冲液将抗上皮细胞粘附分子的抗体储存液作系列稀释后, 取 0.05-0.15ml, 可以为 0.1ml 抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液加到 0.5-1.5ml, 可以为 1ml 胶体金溶液中, 另设一支不加抗上皮细胞粘附分子的抗体系列稀释液的对照管, 4-6 分钟, 可以为 5 分钟后分别向各支试管中加入 0.05-0.15ml, 可以为 0.1ml 浓度为 8-12%, 可以为 10% 的 NaCl 溶液, 混匀各管的溶液后静置 1.5-2.5 小时, 可以为 2 小时, 在能使胶体金稳定的蛋白量上再加 9%-11%, 可以为 10% 并将上述蛋白量记为最佳标记蛋白量。

[0096] 得到最佳标记蛋白量后, 调整上清液中蛋白含量为最佳标记蛋白量, 取上述上清液加入胶体金溶液并充分混合 15-30 分钟, 可以为 15 分钟, 接着加入浓度为 2%-4%, 可以为 3% 的 PEG-2000 使所述溶液的 PEG-2000 最终浓度为 0.05%-0.1%, 可以为 0.05%, 并搅拌所述溶液 10-15 分钟, 取样品并吸取上清液, 然后取管底沉淀部分, 用含 0.5%-1.5%, 可以为 1% 的 BSA 和 0.01%-0.03%, 可以为 0.02% 的  $NaN_3$  的浓度为 0.01-0.03mol/l, 可以为 0.02mol/l pH 值为 7.0-7.4, 可以为 7.2 的 Tris-HCl 的缓冲液稀释上述沉淀部分, 得到胶体金标记复合物, 最终胶体金标记复合物的回收量为原体积的 10%。

[0097] 接着还可以用 0.22um 的微孔滤膜过滤除菌, 分装, 并在 4℃ 下保存备用。

[0098] 制备单元二 302 制备好免疫金之后, 标记单元 303 可以利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记, 标记单元 303 完成利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记之后预处理单元 305 可以对玻片进行预处理。

[0099] 上述对玻片进行预处理可以包括: 首先用浓度为 93%-97%, 可以为 95% 的乙醇浸泡处理玻片; 接着用双蒸馏水清洗玻片; 最后用 3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷包被玻片即可完成对玻片的预处理。

[0100] 预处理单元 305 完成玻片预处理过程之后, 孵育单元 306 可以对样本细胞的抗体进行孵育。

[0101] 上述具体的孵育过程可以为, 将胶体金包被的抗体与样本孵育在 35-39℃, 可以为 37℃ 的恒温孵育箱中, 反应一段时间, 可以为 2 小时或者在 4℃ 的恒温孵育箱中过夜, 然后取出后依次用清洗液, 可以用浓度为 1% Tween20 的 PBS 清洗, 最后在转速, 可以为 1000rpm 的离心机中离心若干次, 可以为 3 次, 每次持续若干时间, 可以为 5 分钟。

[0102] 孵育单元 306 对样本细胞进行抗体孵育的过程完成之后,制片单元 304 对所述样本进行制片。具体的制片方法为现有技术中的内容,在此处不再赘述。

[0103] 制片单元 304 对样本进行制片之后,可以对上述制片进行观察。在对上述制片进行观察之前,还可以对制片进行染色,然后再进行观察。

[0104] 本发明实施例中,制备单元一 301 首先制备胶体金;然后制备单元二 302 利用胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金;接着标记单元 303 利用免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记;最后制片单元 304 对样本进行制片。其中预处理单元 305 还可以对玻片进行预处理和孵育单元 306 对样本细胞进行抗体孵育。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见,当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时,通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质,由于宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高,所以可以简单、快速和准确地对宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

[0105] 本领域普通技术人员可以理解实现上述实施例方法中的全部或部分步骤是可以通程序来指令相关的硬件完成,所述的程序可以存储于一种计算机可读存储介质中,上述提到的存储介质可以是只读存储器,磁盘或光盘等。

[0106] 以上对本发明所提供的一种新的宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置进行了详细介绍,对于本领域的一般技术人员,依据本发明实施例的思想,在具体实施方式及应用范围上均会有改变之处,综上所述,本说明书内容不应理解为对本发明的限制。

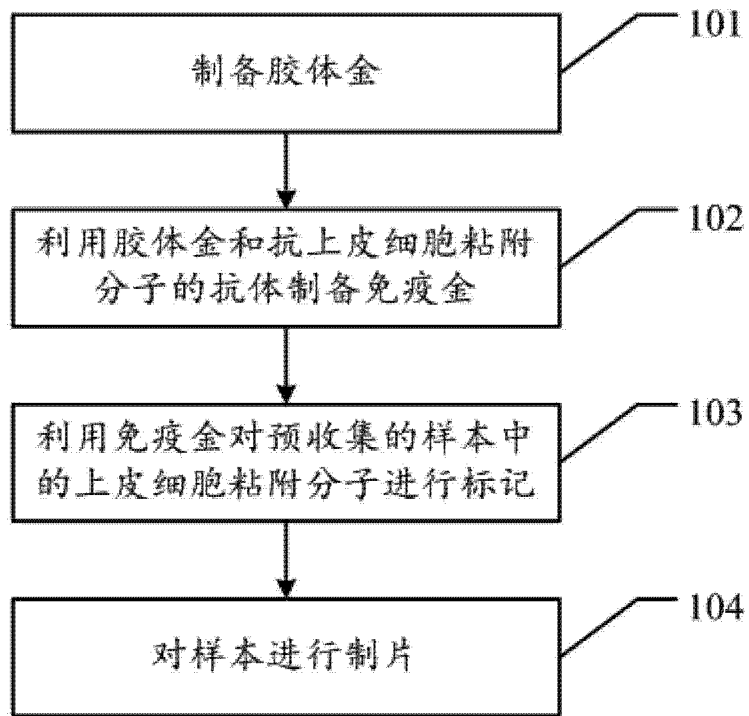


图 1

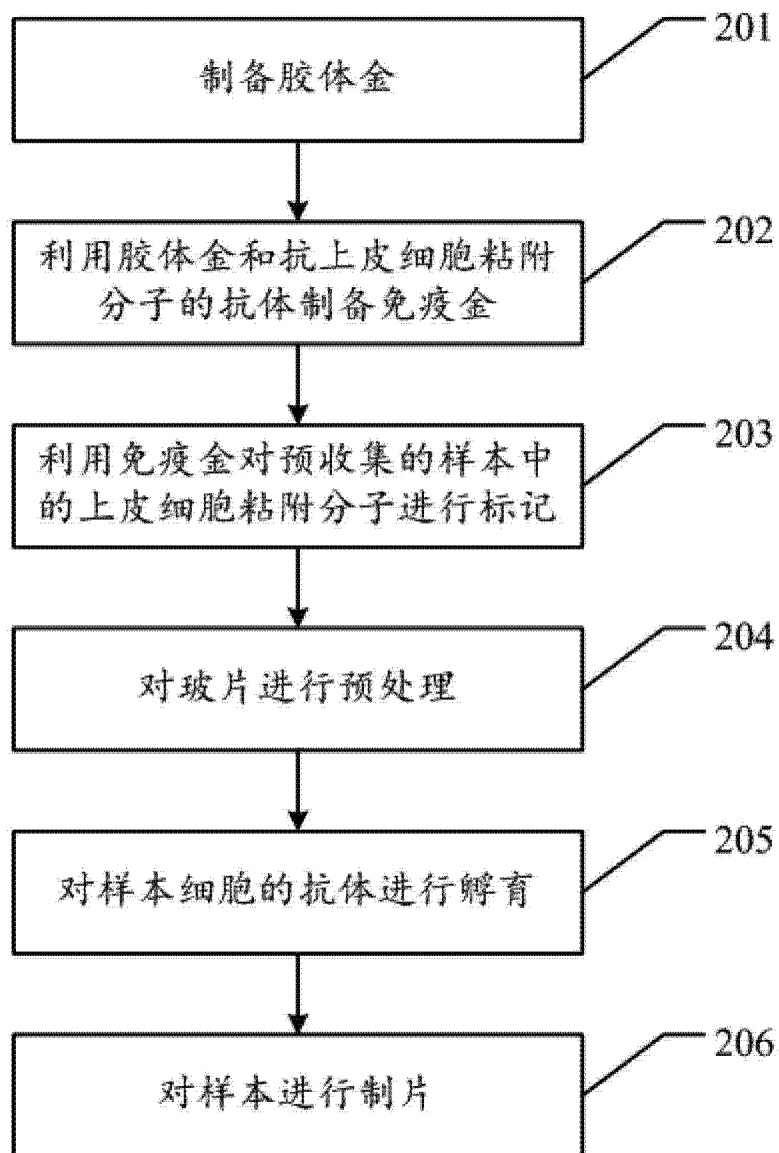


图 2

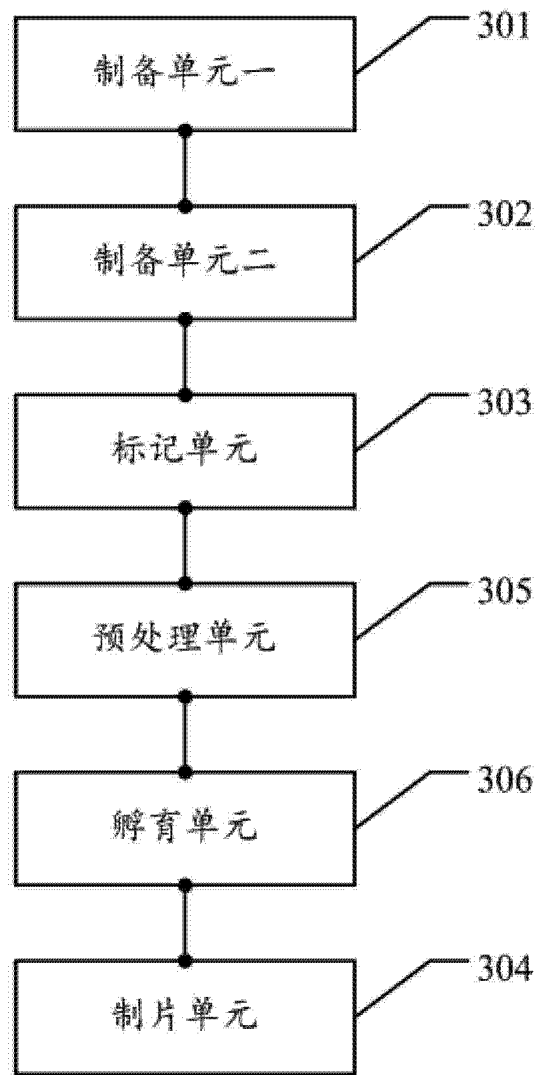


图 3

专利名称(译)	一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置		
公开(公告)号	<a href="#">CN103076448B</a>	公开(公告)日	2015-06-17
申请号	CN201210593378.8	申请日	2012-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州鸿琪光学仪器科技有限公司		
[标]发明人	王勇 罗琪		
发明人	王勇 罗琪		
IPC分类号	G01N33/531		
代理人(译)	曹志霞		
其他公开文献	CN103076448A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明实施例公开了一种新的子宫颈癌细胞的标记技术的制备方法及装置，可以简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。本发明实施例方法包括：制备胶体金；利用所述胶体金和抗上皮细胞粘附分子的抗体制备免疫金；利用所述免疫金对预收集的样本中的上皮细胞粘附分子进行标记；对所述样本进行制片。由于胶体金颗粒子在普通光学显微镜下可见，当利用胶体金与抗上皮细胞粘附分子的抗体制备的免疫金去标记上皮细胞粘附分子时，通过直接观察就可以确定上皮细胞粘附分子的性质，由于子宫颈癌细胞与其表面的上皮细胞粘附分子的表达水平相关度很高，所以可以通过本发明实施例中的制备方法及装置简单、快速和准确地对子宫颈癌细胞进行鉴别诊断。

