



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104991073 B

(45)授权公告日 2016.08.24

(21)申请号 201510339477.7

(22)申请日 2015.06.18

(73)专利权人 南通大学附属医院

地址 226000 江苏省南通市西寺路20号

(72)发明人 肖明兵 倪润洲 江枫 黄华

陆翠华 倪温慨

(74)专利代理机构 北京一格知识产权代理事务

所(普通合伙) 11316

代理人 滑春生

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

审查员 张绚

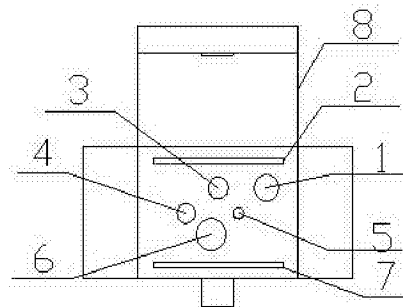
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒,有盒体,盒体中装有3% H₂O₂去离子水容器、粉剂型抗原修复液容器及粉剂型磷酸盐缓冲液,还装有单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器、聚合物增强剂容器、HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器及二氨基联苯胺容器;试剂盒试剂成分包括:3% H₂O₂;粉剂型抗原修复液;粉剂型磷酸盐缓冲液;单克隆小鼠抗人SCML2抗体;聚合物增强剂;HRP酶标抗鼠IgG聚合物;二氨基联苯胺。本发明的优点在于:大大简化了检测操作过程,并能保证检测结果有良好的质控;本发明还具有简易、快捷、灵敏、通用、重现性好、成本低的特点。



1. 检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒的非诊断目的的使用方法,其特征在于:所述试剂盒包括盒体,所述盒体中包括以下容器:

3% H_2O_2 去离子水容器,其内试剂成分为3% H_2O_2 ;

粉剂型抗原修复液容器,其内试剂成分为粉剂型抗原修复液;

粉剂型磷酸盐缓冲液容器,其内试剂成分为粉剂型磷酸盐缓冲液;

单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器,其内试剂成分为单克隆小鼠抗人SCML2抗体,储存浓度为0.2 $\mu g/\mu L$;

聚合物增强剂容器,其内试剂成分为聚合物增强剂;

HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器,其内试剂成分为HRP酶标抗鼠IgG聚合物;

二氨基联苯胺容器,其内试剂成分为二氨基联苯胺;

所述试剂盒的使用方法包括以下步骤:

(1)切片和烤片:石蜡包埋组织5 μm 连续切片,贴于载玻片上,在电热恒温干燥箱内烘片1h,所述烘片温度为67 $^{\circ}C$;

(2)脱蜡、水化组织切片:二甲苯5 min \times 2次 \rightarrow 无水乙醇5 min \times 1次 \rightarrow 95%乙醇5 min \times 1次 \rightarrow 80%乙醇5 min \rightarrow 70%乙醇5 min \rightarrow 自来水冲洗片刻 \rightarrow 0.01 mol/L PBS冲洗1 min \times 3次;

(3)阻断内源性过氧化物酶:每张切片滴加1滴3% H_2O_2 去离子水容器内的试剂,室温10 min,0.01 mol/L PBS冲洗3 min \times 3次;

(4)抗原修复:高压锅内加适量的水置电磁炉上煮沸,取粉剂型抗原修复液容器内的试剂配制成抗原修复液,将切片浸入装有抗原修复液的瓷缸中,所述抗原修复液的成分为0.01 mol/L柠檬酸缓冲液,所述柠檬酸缓冲液的pH为6.0,放入高压锅内,加热至喷气,维持3 min;取出瓷缸使抗原修复液自然冷却至室温,0.01 mol/L PBS冲洗3 min \times 3次;

(5)一抗反应:甩去切片上的PBS液,取单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器内的试剂,按照1:100的比例进行稀释,并滴加到切片上,室温孵育2 h;0.01 mol/L PBS冲洗3 min \times 3次;

(6)滴加聚合物增强剂:擦去多余水分,滴加1滴聚合物增强剂容器内的试剂,室温孵育20 min;0.01 mol/L PBS冲洗3 min \times 3次;

(7)二抗反应:甩去多余水分,滴加1滴HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器内的试剂,室温孵育30 min,0.01mol/L PBS冲洗3min \times 3次;

(8)显色:除去PBS液,每张切片滴加1滴由二氨基联苯胺容器内的试剂新鲜配制的二氨基联苯胺工作液,同时在显微镜下观察控制显色程度,待出现阳性反应,则置流水下冲洗及时终止反应;

(9)衬染:苏木素复染30s \sim 2min,流水冲洗,1%盐酸-乙醇分化,流水冲洗;

(10)脱水:70%乙醇3 min \rightarrow 80%乙醇3 min \rightarrow 95%乙醇3 min \rightarrow 无水乙醇3 min \rightarrow 二甲苯3 min \times 2次;

(11)封片:中性树脂封固;

(12)显微镜下观察确定SCML2抗原的表达水平和细胞定位情况。

检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于医学生物技术领域,具体涉及检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒。

背景技术

[0003] SCML2是Montini等于1999年首先在果蝇的SCM基因Xp22染色体被鉴定出来,总长约15Kb,在C端为高度保守内含子和外显子的结构。SCML2在哺乳动物广泛表达并且编码一个700个氨基酸的蛋白。SCML2是多梳基因家族的一个成员,多梳家族基因编码一组染色体结合蛋白,研究表明它在胚胎发育过程中起到关键作用,它能抑制trxG蛋白对胚胎发育的活化作用。大多数的哺乳动物的多梳家族基因与果蝇同源,敲除老鼠的多梳家族基因,老鼠出现造血缺陷、神经嵴缺陷、心脏畸形。SCML2可能与HOX基因转录抑制有关,而后者的突变可导致发育畸形;并且SCML2与多梳蛋白抑制复合体的调节有关,后者与维持抑制和阻止染色体重塑有关,同时它在调控胚胎发育的同源基因中起着重要作用。近来部分临床研究资料也证实多梳家族基因与细胞增殖和肿瘤形成的调控有关,SCML2可在急性髓细胞白血病过度表达,进一步佐证其在细胞分化和细胞周期调控中起重要作用。

[0004] 我们运用自建的SCML2即用型快速酶免疫组织化学试剂盒检测发现SCML2在人神经内分泌肿瘤组织中呈现高表达,并且它的表达水平与神经内分泌肿瘤的病理类型、病理分级、浸润深度及分期相关。我们的研究进一步发现,神经内分泌肿瘤中SCML2表达阳性率为90.6%,而癌旁组织及其他类型肿瘤中均不表达,差异有统计学意义,提示SCML2可能在神经内分泌肿瘤发生发展过程中起着较重要作用,且为神经内分泌肿瘤特异性诊断标志物。

[0005] 快速酶免疫组织化学法与一般的免疫组化法比较,有以下几点优势:①快速酶免疫组织化学法将二抗和酶联接成一个多聚体,可直接放大信号40~50倍,再与已经结合的一抗反应,最后显色剂显色,大大提高了检测敏感性及定位性;②快速酶免疫组织化学法所使用的多聚物在组织中不含有,减少了非特异性背景;③快速酶免疫组织化学法以酶代替生物素与二抗连接,从而避免了组织中生物素的干扰;④快速酶免疫组织化学法染色步骤为两步,且第二抗体孵育时较短,比较省时。

[0006] 本发明建立快速酶免疫组织化学法检测人组织标本中SCML2,该方法具有简易、快捷、灵敏、通用、重现性好的特点,为临床病理组织标本中SCML2的检测提供了良好的平台。

[0007] 目前,国际上还没有相关报道,更没有专门用于检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒提供,因此,该试剂盒的开发和应用,填补了这方面的空白。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于针对现有技术的不足,本发明的目的是提供一种简易、快捷、灵敏、通用、重现性好的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒,以此来确定人组织样本中SCML2抗原的表达水平和细胞定位情况。

[0009] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案是:检测SCML2的即用型快速酶免疫组织

化学试剂盒,其创新点在于:有盒体,盒体中包括以下容器:

- [0010] (1)3% H_2O_2 去离子水容器;
- [0011] (2)粉剂型抗原修复液容器;
- [0012] (3)粉剂型磷酸盐缓冲液容器;
- [0013] (4)单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器;
- [0014] (5)聚合物增强剂容器;
- [0015] (6)HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器;
- [0016] (7)二氨基联苯胺容器。
- [0017] 进一步的,所述盒体中试剂成分包括:
- [0018] (1)3% H_2O_2 去离子水容器中的试剂成分为3% H_2O_2 ;
- [0019] (2)粉剂型抗原修复液容器中的试剂成分为粉剂型抗原修复液;
- [0020] (3)粉剂型磷酸盐缓冲液容器中的试剂成分为粉剂型磷酸盐缓冲液;
- [0021] (4)单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器中的试剂成分为单克隆小鼠抗人SCML2抗体,储存浓度为 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{I}$;
- [0022] (5)聚合物增强剂容器中的试剂成分为聚合物增强剂;
- [0023] (6)HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器中的试剂成分为HRP酶标抗鼠IgG聚合物;
- [0024] (7)二氨基联苯胺容器中的试剂成分为二氨基联苯胺。
- [0025] 进一步的,所述使用方法包括以下步骤:
- [0026] (1)切片和烤片:石蜡包埋组织 $5\mu\text{m}$ 连续切片,贴于载玻片上,在电热恒温干燥箱内烘片1 h,所述烘片温度为 67°C ;
- [0027] (2)脱蜡、水化组织切片:二甲苯5 min \times 2次 \rightarrow 无水乙醇5 min \times 1次 \rightarrow 95%乙醇5 min \times 1次 \rightarrow 80%乙醇5 min \rightarrow 70%乙醇5 min \rightarrow 自来水冲洗片刻 \rightarrow 0.01 moI/L PBS冲洗1 min \times 3次;
- [0028] (3)阻断内源性过氧化物酶:每张切片滴加1滴3% H_2O_2 ,室温10 min,0.01 moI/L PBS冲洗3 min \times 3次;
- [0029] (4)抗原修复:高压锅内加适量的水置电磁炉上煮沸,将切片浸入装有抗原修复液的瓷缸中,所述抗原修复液的成分为0.01 moI/L柠檬酸缓冲液,所述柠檬酸缓冲液的pH为6.0,放入高压锅内,加热至喷气,维持3 min;取出瓷缸使修复液自然冷却至室温,0.01 moI/L PBS冲洗3 min \times 3次;
- [0030] (5)一抗反应:甩去切片上的血清,滴加1:100稀释的单克隆小鼠抗人SCML2抗体,室温孵育2 h;0.01 moI/L PBS冲洗3 min \times 3次。
- [0031] (6)滴加聚合物增强剂:擦去多余水分,滴加1滴聚合物增强剂,室温孵育20 min;0.01 moI/L PBS冲洗3 min \times 3次;
- [0032] (7)二抗反应:甩去多余水分,滴加1滴HRP酶标抗鼠IgG聚合物,室温孵育30 min,0.01moI/L PBS冲洗3min \times 3次;
- [0033] (8)显色:除去PBS液,每张切片滴加1滴新鲜配制的二氨基联苯胺工作液,同时在显微镜下观察控制显色程度,待出现阳性反应,则置流水下冲洗及时终止反应;
- [0034] (9)衬染:苏木素复染30s \sim 2min,流水冲洗,1%盐酸-乙醇分化,流水冲洗;
- [0035] (10)脱水:70%乙醇3 min \rightarrow 80%乙醇3 min \rightarrow 95%乙醇3 min \rightarrow 无水乙醇3 min \rightarrow 二

甲苯3 min×2次；

[0036] (11)封片:中性树脂封固；

[0037] (12)显微镜下观察确定SCML2抗原的表达水平和细胞定位情况。

[0038] 本发明的有益效果如下：

[0039] (1)本试剂盒将快速酶免疫组织化学检测过程中所用试剂集中到一个盒体中,无需各实验室自行分别购置及称量配制,减少了实验人员的工作量、不同试剂误差及配制误差。其特征是:有盒体,盒体中装有3% H₂O₂去离子水容器、粉剂型抗原修复液容器及粉剂型磷酸盐缓冲液,还装有单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器、聚合物增强剂容器、HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器及二氨基联苯胺容器,其有益效果为:大大简化了检测操作过程,并能保证检测结果有良好的质控。

[0040] (2)本试剂盒将抗鼠IgG和酶联接成一个多聚体,可直接放大信号40-50倍,再与已经结合的单克隆小鼠抗人SCML2抗体反应,最后显色剂显色,大大提高了检测敏感性及定位性;本试剂盒所使用的多聚物在组织中不含有,减少了非特异性背景;本试剂盒以酶代替生物素与抗鼠IgG连接,从而避免了组织中生物素的干扰;本试剂盒染色步骤为两步,且第二抗体孵育时较短,比较省时,最后显微镜下观察确定SCML2抗原的表达水平和细胞定位情况,这是该试剂盒的一个显著特色和创新。

[0041] (3)本发明还具有简易、快捷、灵敏、通用、重现性好、成本低的特点。

附图说明

[0042] 图1为检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒组成示意图。

具体实施方式

[0043] 1、3% H₂O₂去离子水容器,2、粉剂型抗原修复液容器,3、HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器,4、二氨基联苯胺容器,5、单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器,6、聚合物增强剂容器,7、粉剂型磷酸盐缓冲液容器,8、盒体

[0044] 以下由特定的具体实施例说明本发明的实施方式,熟悉此技术的人士可由本说明书所揭露的内容轻易地了解本发明的其他优点及功效。

[0045] 本发明中有盒体8,盒体8中包括以下容器:

[0046] (1)3%H₂O₂去离子水容器1;

[0047] (2)粉剂型抗原修复液容器2;

[0048] (3)粉剂型磷酸盐缓冲液容器7;

[0049] (4)单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器5;

[0050] (5)聚合物增强剂容器6;

[0051] (6)HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器3;

[0052] (7)二氨基联苯胺容器4。

[0053] 本发明的盒体8中试剂成分包括:

[0054] (1)3%H₂O₂去离子水容器1中的试剂成分为3%H₂O₂;

[0055] (2)粉剂型抗原修复液容器2中的试剂成分为粉剂型抗原修复液;

[0056] (3)粉剂型磷酸盐缓冲液容器7中的试剂成分为粉剂型磷酸盐缓冲液;

- [0057] (4)单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器5中的试剂成分为单克隆小鼠抗人SCML2抗体,储存浓度为 $0.2\mu\text{g}/\mu\text{I}$;
- [0058] (5)聚合物增强剂容器6中的试剂成分为聚合物增强剂;
- [0059] (6)HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器3中的试剂成分为HRP酶标抗鼠IgG聚合物;
- [0060] (7)二氨基联苯胺容器4中的试剂成分为二氨基联苯胺。
- [0061] 本发明的试剂配方:
- [0062] (1)磷酸盐缓冲液:其成分为 140mM NaCl , 2.7mM KCl , $10\text{mM Na}_2\text{HPO}_4$, $1.8\text{mM KH}_2\text{PO}_4$,pH值为7.4;
- [0063] (2)粉剂型抗原修复液:为 0.01 mol/L 柠檬酸缓冲液,pH 为6.0,其成分为 0.37818g 柠檬酸 $\cdot\text{H}_2\text{O}$, 2.4124g 柠檬酸钠 $\cdot 2\text{H}_2\text{O}$,定容至 1 L ;
- [0064] (3)3% H_2O_2 : 0.01 mol/L PBS液配制的3% H_2O_2 ;
- [0065] (4)DAB工作液:DAB 1mg 溶于 2.5mI 0.01 mol/L PBS中,加入由1滴3% H_2O_2 。
- [0066] 本发明的具体操作步骤:
- [0067] (1)切片和烤片:石蜡包埋组织 $5\mu\text{m}$ 连续切片,贴于载玻片上,在电热恒温干燥箱内烘片 1 h ,烘片温度为 67°C ;
- [0068] (2)脱蜡、水化组织切片:二甲苯 $5\text{ min}\times 2$ 次 \rightarrow 无水乙醇 $5\text{ min}\times 1$ 次 $\rightarrow 95\%$ 乙醇 $5\text{ min}\times 1$ 次 $\rightarrow 80\%$ 乙醇 $5\text{ min}\rightarrow 70\%$ 乙醇 $5\text{ min}\rightarrow$ 自来水冲洗片刻 $\rightarrow 0.01\text{ mol/L}$ PBS冲洗 $1\text{ min}\times 3$ 次;
- [0069] (3)阻断内源性过氧化物酶:每张切片滴加1滴3% H_2O_2 ,室温 10 min , 0.01 mol/L PBS冲洗 $3\text{ min}\times 3$ 次;
- [0070] (4)抗原修复:高压锅内加适量的水置电磁炉上煮沸,将切片浸入装有抗原修复液的瓷缸中,放入高压锅内,加热至喷气,维持 3 min ;取出瓷缸使修复液自然冷却至室温, 0.01 mol/L PBS冲洗 $3\text{ min}\times 3$ 次;
- [0071] (5)一抗反应:甩去切片上的血清,滴加 $1:100$ 稀释的单克隆小鼠抗人SCML2抗体,室温孵育 2 h ; 0.01 mol/L PBS冲洗 $3\text{ min}\times 3$ 次;
- [0072] (6)滴加聚合物增强剂:擦去多余水分,滴加1滴聚合物增强剂,室温孵育 20 min ; 0.01 mol/L PBS冲洗 $3\text{ min}\times 3$ 次;
- [0073] (7)二抗反应:甩去多余水分,滴加1滴HRP酶标抗鼠IgG聚合物,室温孵育 30 min , 0.01 mol/L PBS冲洗 $3\text{ min}\times 3$ 次;
- [0074] (8)显色:除去PBS液,每张切片滴加1滴新鲜配制的二氨基联苯胺工作液,同时在显微镜下观察控制显色程度,待出现阳性反应,则置流水下冲洗及时终止反应;
- [0075] (9)衬染:苏木素复染 $30\text{s}\sim 2\text{min}$,流水冲洗,1%盐酸-乙醇分化,流水冲洗;
- [0076] (10)脱水: 70% 乙醇 $3\text{ min}\rightarrow 80\%$ 乙醇 $3\text{ min}\rightarrow 95\%$ 乙醇 $3\text{ min}\rightarrow$ 无水乙醇 $3\text{ min}\rightarrow$ 二甲苯 $3\text{ min}\times 2$ 次;
- [0077] (11)封片:中性树脂封固;
- [0078] (12)显微镜下观察确定SCML2抗原的表达水平和细胞定位情况。
- [0079] 上述实施例只是本发明的较佳实施例,并不是对本发明技术方案的限制,只要是不经过创造性劳动即可在上述实施例的基础上实现的技术方案,均应视为落入本发明专利的权利保护范围内。

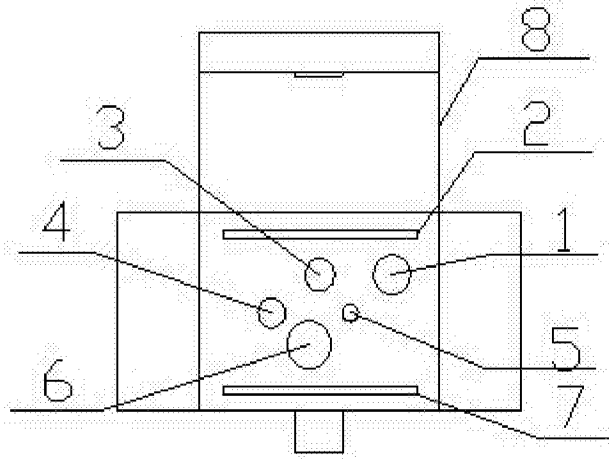


图1

专利名称(译)	检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒		
公开(公告)号	CN104991073B	公开(公告)日	2016-08-24
申请号	CN201510339477.7	申请日	2015-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学附属医院		
[标]发明人	肖明兵 倪润洲 江枫 黄华 陆翠华 倪温慨		
发明人	肖明兵 倪润洲 江枫 黄华 陆翠华 倪温慨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/577 G01N33/6803 G01N2333/47		
审查员(译)	张绚		
其他公开文献	CN104991073A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种检测SCML2的即用型快速酶免疫组织化学试剂盒，有盒体，盒体中装有3% H₂O₂去离子水容器、粉剂型抗原修复液容器及粉剂型磷酸盐缓冲液，还装有单克隆小鼠抗人SCML2抗体容器、聚合物增强剂容器、HRP酶标抗鼠IgG聚合物容器及二氨基联苯胺容器；试剂盒试剂成分包括：3% H₂O₂；粉剂型抗原修复液；粉剂型磷酸盐缓冲液；单克隆小鼠抗人SCML2抗体；聚合物增强剂；HRP酶标抗鼠IgG聚合物；二氨基联苯胺。本发明的优点在于：大大简化了检测操作过程，并能保证检测结果有良好的质控；本发明还具有简易、快捷、灵敏、通用、重现性好、成本低的特点。

