



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105164272 A

(43) 申请公布日 2015. 12. 16

(21) 申请号 201480023884. 0 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2014. 02. 28 *C12Q 1/28*(2006. 01)
(30) 优先权数据 *C12Q 1/68*(2006. 01)
2013-039672 2013. 02. 28 JP *G01N 33/53*(2006. 01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 *G01N 33/531*(2006. 01)
2015. 10. 27 *G01N 33/535*(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2014/055004 2014. 02. 28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02014/133120 JA 2014. 09. 04

(71) 申请人 株式会社日冷生物科学
地址 日本东京都

(72) 发明人 笠松敏幸 北野由里子

(74) 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司 11243
代理人 金鲜英 陈彦

权利要求书2页 说明书13页

(54) 发明名称
使用标记酶的染色用含 DAB 底物试剂盒

(57) 摘要

本发明提供一种含 DAB 底物试剂盒,其对于使用过氧化物酶标记抗体的显色反应,使用含有 DAB 及作为其敏化剂的咪唑的显色反应液,能够在增强特异染色强度的同时,抑制 DAB 凝集所致的在含 DAB 底物溶液中的沉淀、及背景染色等非特异性染色。本发明的试剂盒为含有含显色团溶液 (A) 以及显色试剂 (B)、且至少含显色团溶液 (A) 及显色试剂 (B) 分开保管的 2 液型以上,所述含显色团溶液 (A) 含有作为过氧化物酶显色团的 DAB 和水,所述显色试剂 (B) 含有 :EDTA · 2Na、EDTA · 2NH₄、GEDTA 和 NTA 中的至少 1 种的螯合剂,POE 烷基醚系非离子表面活性剂和 / 或 POP 烷基醚系非离子表面活性剂、咪唑、过氧化氢以及水。

1. 一种使用过氧化物酶标记抗体的染色用含 DAB 底物试剂盒, 其为含有含显色团溶液 (A) 和显色试剂 (B)、且至少含显色团溶液 (A) 及显色试剂 (B) 分开保管的 2 液型以上的试剂盒, 所述含显色团溶液 (A) 含有作为过氧化物酶显色团的二氨基联苯胺 (DAB) 和水, 所述显色试剂 (B) 含有: 选自由四乙二胺四乙酸二钠·二水合物、乙二胺四乙酸·二铵盐、乙二醇二乙醚二胺四乙酸、及次氨基三乙酸组成的组中的至少 1 种的螯合剂, 包含聚氧乙烯 (POE) 烷基醚系非离子表面活性剂及聚氧丙烯 (POP) 烷基醚系非离子表面活性剂中的至少 1 种的非离子表面活性剂, 咪唑, 过氧化氢和水。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒, 将试剂盒制成 3 液型, 其中, 显色试剂 (B) 为显色化溶液 (B1) 和底物稳定化溶液 (B2) 分开保管的 2 液型, 所述显色化溶液 (B1) 含有过氧化氢及水, 所述底物稳定化溶液 (B2) 含有所述螯合剂、聚氧乙烯烷基醚系非离子表面活性剂、咪唑及水。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒, 其用于免疫染色法或原位杂交法的染色中。

4. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的试剂盒, 其中, POE 烷基醚系非离子表面活性剂及 POP 烷基醚系非离子表面活性剂为选自由 POE (23) 月桂基醚 (Brij 35)、POE (20) 鲸蜡基醚 (Brij 58)、POE 硬酯基醚、POE 油基醚、POE 肉豆蔻基醚、POE 辛基十二烷基醚、POP 月桂基醚、POP 鲸蜡基醚、POP 硬酯基醚、POP 油基醚、POP 肉豆蔻基醚及 POP 辛基十二烷基醚组成的组中的至少 1 种。

5. 根据权利要求 1~3 中任一项所述的试剂盒, 其中, 螯合剂为 EDTA·2Na, 且 POE 烷基醚系非离子表面活性剂为 POE (23) 月桂基醚。

6. 根据权利要求 1~5 中任一项所述的试剂盒, 其中, 含显色团溶液 (A) 中的 DAB 的含量为如下量: 以所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀释而成的含 DAB 底物溶液中的浓度计为 0.1~10mg/mL 的量。

7. 根据权利要求 1~6 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述显色试剂 (B) 或所述底物稳定化溶液 (B2) 中的所述螯合剂的含量为如下量: 以所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀释而成的含 DAB 底物溶液中的浓度计为 0.1~10mM 的量。

8. 根据权利要求 1~7 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述显色试剂 (B) 或所述底物稳定化溶液 (B2) 中的所述 POE 烷基醚系非离子表面活性剂及 POP 烷基醚系非离子表面活性剂中的至少 1 种的非离子表面活性剂的含量为如下量: 以所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀释而成的 DAB 底物溶液中的含有比例计为 0.05~30 质量%的量。

9. 根据权利要求 1~8 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述显色试剂 (B) 或所述底物稳定化溶液 (B2) 中的咪唑的含量为如下量: 以所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀释而成的含 DAB 底物溶液中的浓度计为 3~300mM 的量。

10. 根据权利要求 1~9 中任一项所述的试剂盒, 其中, 所述显色试剂 (B) 或所述显色化溶液 (B1) 中的过氧化氢的含量为如下量: 以所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀释而成的含 DAB 底物溶液中的含有比例计为 0.001~0.3 质量%的量。

11. 根据权利要求 1~10 中任一项所述的试剂盒, 其中, 调整显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 的 pH, 使得所使用的将所述染色用含 DAB 底物试剂盒的各溶液混合或混合并稀

释而成的含 DAB 底物溶液的 pH 为 5 ~ 9。

12. 根据权利要求 1 ~ 11 中任一项所述的试剂盒,其中,过氧化物酶为来自辣根的过氧化物酶。

使用标记酶的染色用含 DAB 底物试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种含 DAB 底物试剂盒,其对于使用过氧化物酶标记抗体的免疫组织化学染色(IHC)法、免疫细胞化学染色(ICC)法等免疫染色法以及原位杂交(ISH)法中的显色反应,使用含有二氨基联苯胺(DAB)及作为其敏化剂的咪唑的显色反应液,能够抑制 DAB 凝集所致的在含 DAB 底物溶液中的沉淀及非特异性染色所致的例如背景染色,增强特异染色强度。

背景技术

[0002] 目前,在病理、分子生物学领域中,IHC 法、ICC 法或 ISH 法中使用的显色反应液根据用于显色的标记酶的种类而将试剂分类使用。在非专利文献 1 中记载有,作为标记酶,目前最常使用的是过氧化物酶,通常使用植物性的来自辣根的过氧化物酶(HRP)(分子量 40~45kDa)。作为 HRP 的酶反应的氢供体,日常使用的是显色为茶色的含有二氨基联苯胺(DAB)及过氧化氢的含 DAB 底物溶液。

[0003] 含 DAB 底物溶液分成 2 液或 3 液(通常将 DAB 和过氧化氢分开,以避免 DAB 发生反应),市售的有使用时进行调制的高浓度浓缩(stock)溶液、或作为干燥品的板状片剂。例如,可以列举 Dako 公司制的液体 DAB+ 显色试剂盒(Liquid DAB+Substrate Chromogen System)(Code:K3468)、赛默飞世尔科技公司(Thermo SCIENTIFIC)制的 DAB Quanto(Code:TA-XXX-QHDX)、生命技术公司(Life Technologies)制的 Stable DAB(Code:750118)、日冷生物科学(Nichirei Biosciences INC.)制的 DAB 底物试剂盒。但是,关于其的组成,通常是不公开的。

[0004] 非专利文献 1 中记载了添加咪唑作为 DAB 显色的敏化剂。根据迄今为止的经验,已知咪唑虽然具有加快 DAB 反应的效果,但同时会引起 DAB 的凝集,引起经过一定时间在反应液中沉淀的现象。并且已知的是,由于敏化效果高,因此在组织上的目的物质以外的 HRP 存在下,在周边也引起非特异性染色,例如背景染色。

[0005] 另外,专利文献 1 中记载了可以根据需要使含 DAB 底物溶液中含有非离子性表面活性剂,专利文献 2 及 3 中记载了可以在含 DAB 底物溶液中配合 EDTA。但是,这些文献对于上述配合咪唑时的课题则未进行任何研究。

[0006] 现有技术文献

[0007] 专利文献

[0008] 专利文献 1: 日本专利第 3503890 号公报

[0009] 专利文献 2: 加拿大专利申请公开第 2417671 号说明书

[0010] 专利文献 3: 德国专利申请公开第 3812605 号说明书

[0011] 非专利文献

[0012] 非专利文献 1: 名仓宏,长村义之,堤宽;修订第四版渡边·中根酶抗体法(学际企画 2002)“酶抗体法”(修订第四版渡边·中根学际企画 2002)

发明内容

[0013] 发明要解决的课题

[0014] 本发明的课题在于提供一种含 DAB 底物试剂盒,其对于使用过氧化物酶标记抗体的免疫组织化学染色法、免疫细胞化学染色法等免疫染色法以及原位杂交法等中的显色反应,使用含有 DAB 及作为其敏化剂的咪唑的含 DAB 底物溶液,能够在增强特异染色强度的同时抑制非特异性染色。

[0015] 本发明的另一课题在于提供一种含 DAB 底物试剂盒,其对于使用过氧化物酶标记抗体的免疫染色法以及原位杂交法中的显色反应,使用含有 DAB 及作为其敏化剂的咪唑的显色反应液,能够在增强特异染色强度的同时,抑制含 DAB 底物溶液中的 DAB 的凝集所致的沉淀,并抑制非特异性染色。

[0016] 本发明的又一课题在于提供一种含 DAB 底物试剂盒,其对于使用过氧化物酶标记抗体的免疫染色法以及原位杂交法中的显色反应,使用含有 DAB 及作为其敏化剂的咪唑的含 DAB 底物溶液,在增强特异染色强度的同时,抑制背景染色等非特异性染色,且长期抑制含 DAB 底物溶液中的 DAB 的凝集所致的沉淀,并改善使用感及保存稳定性。

[0017] 用于解决课题的手段

[0018] 本发明人等为了解决上述课题进行了深入研究,结果发现,在使目前免疫染色法中的酶抗体法以及原位杂交法中通常使用的、用于显色的含 DAB 底物溶液的组成中含有已知的作为敏化剂的咪唑而使特异染色强度增大时,也可以通过使其中含有特定的螯合剂和特定的非离子表面活性剂,从而减轻非特异性染色的同时、抑制使用载玻片时产生的例如背景染色。进而发现,可以抑制含 DAB 底物溶液调制后的 DAB 凝集,进而通过以 2 液型以上形式来调制其组成,从而使其保存稳定性也变得格外良好,在 4℃ 遮光保存下,各液混合后 2 周也不会发生沉淀,且获得与含 DAB 底物溶液刚调制后同等的染色性,从而完成了本发明。

[0019] 其中,本发明中,含 DAB 底物溶液是指,将本发明的试剂盒混合或混合并稀释而获得的底物溶液。此外,本说明书中,有时将染色以染色或显色的意思来使用。

[0020] 根据本发明,提供一种含 DAB 底物试剂盒(以下有时简称为本发明的试剂盒),其为含有含显色团溶液(A)和显色试剂(B)、且至少含显色团溶液(A)及显色试剂(B)分开保管的 2 液型以上的用于使用过氧化物酶标记抗体的例如在 IHC 法、ICC 法、或 ISH 法的染色中使用的含 DAB 底物试剂盒,所述含显色团溶液(A)含有作为过氧化物酶显色团的二氨基联苯胺(DAB)和水,所述显色试剂(B)含有:选自由四乙二胺四乙酸二钠·二水合物(EDTA·2Na)、乙二胺四乙酸·二铵盐(EDTA·2NH₄)、乙二醇二乙醚二胺四乙酸(GEDTA)、以及次氨基三乙酸(NTA)组成的组中的至少 1 种的螯合剂,包含聚氧乙烯(以下简称为 POE)烷基醚系非离子表面活性剂及聚氧丙烯(以下简称为 POP)烷基醚系非离子表面活性剂中的至少 1 种的非离子表面活性剂,咪唑,过氧化氢和水。

[0021] 此外,根据本发明,提供将试剂盒制成了 3 液型的上述试剂盒,上述显色试剂(B)为显色化溶液(B1)和底物稳定化溶液(B2)分开保管的 2 液型,所述显色化溶液(B1)含有过氧化氢及水,所述底物稳定化溶液(B2)含有上述螯合剂、包含 POE 烷基醚系非离子表面活性剂及 POP 烷基醚系非离子表面活性剂中的至少 1 种的非离子表面活性剂、咪唑、及水。

[0022] 进而,根据本发明,提供一种 IHC 法、ICC 法或 ISH 法,其在使用 DAB 的组织、细胞

或这些的一部分的染色中使用本发明的试剂盒。

[0023] 进而,根据本发明,还提供一种染色法,其特征在于,在使用 DAB 的组织、细胞或这些的一部分的染色中使用本发明的试剂盒。

[0024] 发明的效果

[0025] 本发明的试剂盒由于是含有:含有作为过氧化物酶显色团的 DAB 和水的含显色团溶液 (A)、以及含有特定的螯合剂、特定的表面活性剂、咪唑、过氧化氢和水的显色试剂 (B),且至少含显色团溶液 (A) 及显色试剂 (B) 分开保管的 2 液型以上的试剂盒,因此在使用过氧化物酶的 IHC 法、ICC 法以及 ISH 法中,可以在增强特异染色强度的同时,抑制非特异性染色且抑制 DAB 的凝集所致的在含 DAB 底物溶液中的沉淀。进而,可以长期抑制上述沉淀,并改善使用感及保存稳定性。具有这样效果的本发明试剂盒,在通过 IHC 法将贴合于载玻片的组织检体染色时、通过 ICC 法将细胞检体染色时、以及通过 ISH 法将组织、细胞检体染色时尤其有用。

具体实施方式

[0026] 以下对本发明进行更详细的说明。

[0027] 本发明的试剂盒为 2 液型以上的含 DAB 底物试剂盒,其用于以使用过氧化物酶标记抗体的 IHC 法及 ICC 法中的染色以及 ISH 法中的显色为基础的、用 DAB 显色团将生物体的正常组织或肿瘤组织、细胞等中存在的例如抗原、mRNA、DNA 等特定物质染色,从而进行病理诊断、分子生物学实验等。

[0028] 本发明中,IHC 法中使用的组织检体、ICC 法中使用的细胞检体、ISH 法中使用的组织、细胞检体在按照不使组织、细胞变性的方式固定后切薄而使用。例如可以优选使用如下制备的检体:为了长期保存等,通常用福尔马林、醇等将检体固定,然后利用包括石蜡等在内的包埋介质进行包埋后,将组织检体切薄并贴合于载玻片。染色前的抗原抗体反应、使用经 DIG (Digoxigenin) 标记的探针的杂交后的抗体反应可以通过使用过氧化物酶标记抗体的直接法或间接法等公知方法进行。此时,作为过氧化物酶,可以优选使用 HRP。

[0029] 本发明的试剂盒可以优选用于使用上述贴合有组织、细胞检体的载玻片的间接法的酶抗体反应中。例如可以用于如下的方法中:在用福尔马林将检体固定后,对石蜡包埋的载玻片进行脱石蜡、亲水化,然后根据需要进行抗原性活化、内源性过氧化物酶的除去,然后使其与第一抗体反应或与经 DIG 标记的探针反应,然后,与结合有过氧化物酶、及第二抗体或抗 DIG 抗体的聚合物等反应,然后与将本发明试剂盒的各溶液混合而调制的含 DAB 底物溶液反应,以过氧化物酶为催化剂对其位置进行特异性显色。此外,在显色后还能够通过苏木精等进行核染色,从而使其形态更容易观察。

[0030] 上述含 DAB 底物溶液的调制例如可以通过将本发明试剂盒中所含的各溶液混合的方法、或将本发明的试剂盒中所含的各浓缩溶液混合在特定量的蒸馏水等水中的方法进行。

[0031] 作为可以使用本发明的试剂盒、在 IHC 法中的染色和利用 ISH 法的显色中使用的组织,可以列举例如大肠(正常·癌)、小肠(正常)、十二指肠(正常)、结肠(正常)、胃(正常·癌)、食道(正常)、舌(正常)、肝脏(癌)、胰脏(正常)、肾脏(正常)、脑(正常)、小脑(正常)、心脏(正常)、乳腺(正常·癌)、胎盘、前列腺(正常·癌)、肺(正

常·癌)、甲状腺(正常)、扁桃体(正常)、淋巴结(正常)、子宫颈(正常)、恶性黑色素瘤、霍奇金淋巴瘤、胸腺增生症、GIST(Gastrointestinal stromal tumor, 胃肠道间质瘤)、间皮瘤。以上的组织中,由于在大肠(正常·癌)、小肠(正常)、十二指肠(正常)、结肠(正常)、胃(正常·癌)等包含肌肉组织或结缔组织的部分中存在背景染色尤其明显的倾向,因此本发明的试剂盒对于这些组织的染色是极为有效的。

[0032] 作为可以使用本发明的试剂盒、在 ICC 法中的染色、ISH 法中的显色中使用的细胞,可以优选列举例如乳腺癌细胞、肺癌细胞、成淋巴细胞(正常)。

[0033] 本发明的试剂盒含有含显色团溶液(A),所述含显色团溶液(A)含有作为过氧化物酶显色团的 DAB 和水。该溶液(A)中所含的 DAB 在后述的过氧化氢与过氧化物酶反应时作为酶反应的氢供体起作用。并且,该 DAB 可以通过聚合反应而使过氧化物酶结合部分特异性地显色为茶色系。

[0034] 溶液(A)中,DAB 的含量为最终作为在 IHC 法、ICC 法的染色或 ISH 法的显色中使用的含 DAB 底物溶液能进行显色反应的量即可,以在所使用的含 DAB 底物溶液中的浓度计优选为 0.1 ~ 10mg/mL。若小于 0.1mg/mL,则有显色反应未充分发生的担心,另一方面,若超过 10mg/mL,则制成含 DAB 底物溶液时,有 DAB 发生凝集等而产生沉淀的担心。

[0035] 溶液(A)中,作为水,可以使用例如蒸馏水或超纯水。水的量为可在溶液(A)中溶解 DAB 的量,可以按照最终制成含 DAB 底物溶液时各成分的含量在适当范围内的方式适当选择、确定。

[0036] 溶液(A)中,除了 DAB 及水以外,为了提高 DAB 的溶解性或稳定性,还可以含有各种有机溶剂,其含量可以根据该目的适当选择。

[0037] 本发明的试剂盒含有显色试剂(B),所述显色试剂(B)含有特定的螯合剂、POE 烷基醚系非离子表面活性剂和 / 或 POP 烷基醚系非离子表面活性剂、咪唑、过氧化氢和水。

[0038] 显色试剂(B)可以分成例如含有过氧化氢及水的显色化溶液(B1)、以及含有特定的螯合剂、POE 烷基醚系非离子表面活性剂和 / 或 POP 烷基醚系非离子表面活性剂、咪唑及水的底物稳定化溶液(B2)。

[0039] 本发明的试剂盒只要是将 DAB 和过氧化氢分开保管的 2 液型以上的试剂盒,则可以任意液型,考虑到效率性时,优选制成由上述含显色团溶液(A)及上述显色试剂(B)构成的 2 液型,或由上述含显色团溶液(A)、上述显色化溶液(B1)及上述底物稳定化溶液(B2)构成的 3 液型。

[0040] 显色试剂(B)或底物稳定化溶液(B2)中使用的特定的螯合剂为选自由 EDTA·2Na、EDTA·2NH₄、GEDTA 及 NTA 组成的组中的至少 1 种,从其效果的观点出发,尤其优选使用 EDTA·2Na 或 GEDTA。这些特定的螯合剂尤其在抑制 DAB 的非特异性结合、尤其是使用贴合于载玻片的组织检体时,可以抑制背景染色。此外,通过与后述的特定的非离子表面活性剂组合,即使检体组织是肌肉组织、结合组织等,也可以有效地抑制 DAB 的非特异性结合。

[0041] 上述显色试剂(B)或上述底物稳定化溶液(B2)中的上述螯合剂的含量存在用量依赖性地改善上述作用效果的倾向,可以考虑其作用效果适当地选择。具体而言,作为在所使用的含 DAB 底物溶液中的浓度,可以以优选成为 0.1 ~ 10mM 的量、尤其优选成为 0.3 ~ 3mM 的量来含有。

[0042] 显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 中使用的特定的表面活性剂可以列举选自由 POE (23) 月桂基醚 (Brij 35)、POE (20) 鲸蜡基醚 (Brij 58)、POE 硬酯基醚、POE 油基醚、POE 肉豆蔻基醚、POE 辛基十二烷基醚等 POE 烷基醚, POP 月桂基醚、POP 鲸蜡基醚、POP 硬酯基醚、POP 油基醚、POP 肉豆蔻基醚、POP 辛基十二烷基醚等 POP 烷基醚组成的组中的至少 1 种, 尤其优选使用 Brij 35。这些特定的非离子表面活性剂尤其是在制成含有 DAB 和过氧化氢的含 DAB 底物溶液时, 抑制 DAB 在水溶液中聚合、沉淀的效果优异, 此外, 还可以增强 DAB 的显色强度。使用其他表面活性剂、例如 Triton X-100 (4 - (1, 1, 3, 3 - 四甲基丁基) 苯基 - 聚乙二醇)、NP-40 (4 - 壬基苯基 - 聚乙二醇) 或 Tween 20 (聚氧乙烯失水山梨醇单月桂酸酯) 时或使用非质子极性溶剂、例如 DMSO (二甲基亚砷) 时, 无法获得期望的效果。

[0043] 显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 中的上述 POE 烷基醚系非离子表面活性剂和 / 或 POP 烷基醚系非离子表面活性剂的含量存在用量依赖性地改善上述作用效果的倾向, 可以考虑其作用效果适当选择。具体而言, 作为在用于 IHC 法、ICC 法、ISH 法的含 DAB 底物溶液中的含有比例, 可以优选以成为 0.05 ~ 30 质量% 的量、尤其优选以成为 0.1 ~ 5 质量% 的量来含有。

[0044] 显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 中使用的咪唑, 是在 DAB 的显色中起到增强显色强度的增强剂作用的成分。显示这样的作用效果的咪唑一方面使显色强度增强, 另一方面在过氧化氢的存在下引起 DAB 的凝集, 引起经过一定时间在含 DAB 底物溶液中沉淀的现象, 并且还成为引起检体组织、检体细胞上的目的物质以外的非特异性染色、例如背景染色的原因。因此, 在本发明的试剂盒中, 在组合有上述特定的螯合剂及上述特定的非离子表面活性剂的显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 中配合咪唑。

[0045] 显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 中的咪唑含量虽然呈用量依赖性地获得上述 DAB 的显色增强作用, 但含量多时发生上述问题点的可能性也变高, 因此作为在用于 IHC 法、ICC 法、ISH 法的含 DAB 底物溶液中的浓度, 通常优选以成为 3 ~ 300mM 的量、尤其优选以成为 5 ~ 100mM 的量来含有。此外, 在提高咪唑浓度时, 上述特定的螯合剂的浓度也优选在上述范围内设定为较高。

[0046] 显色试剂 (B) 或显色化溶液 (B1) 中使用的过氧化氢是作用于过氧化物酶、关系到 DAB 的显色反应的成分。过氧化氢的含量可以为过量, 但过多时有特异染色强度下降的担心。此外, 过少时, 有显色反应未充分进行、以及制成含 DAB 底物溶液后的保存性下降的担心。

[0047] 因此, 以在用于 IHC 法、ICC 法、ISH 法的含 DAB 底物溶液中的含有比例计, 过氧化氢的含量可以优选以成为 0.001 ~ 0.3 质量% 的量、尤其优选以成为 0.01 ~ 0.05 质量% 的量来含有。

[0048] 显色试剂 (B)、显色化溶液 (B1) 及底物稳定化溶液 (B2) 中使用的水可以使用例如蒸馏水或超纯水。水的量可以按照使各成分的含量在适当范围的方式适当选择、确定。

[0049] 为了有效地获得本发明的期望效果, 本发明的试剂盒中, 显色试剂 (B) 或底物稳定化溶液 (B2) 的 pH 优选按照获得的含 DAB 底物溶液的 pH 通常为 5 ~ 9、尤其为 6 ~ 8 的方式进行调整。

[0050] pH 的调整可以利用盐酸等 pH 调整剂来进行, 此外也可以使用磷酸、Tris、MOPS、HEPES、ADA、CHES、MES 等缓冲剂来进行。从进一步提高含有过氧化氢的显色试剂 (B) 或获

得的含 DAB 底物溶液的保存稳定性的观点出发,尤其优选使用盐酸等 pH 调整剂。

[0051] 本发明的试剂盒中使用的上述各溶液中,为了获得其他效果,可以在不损害本发明的效果的范围内配合其他成分。作为其它成分,可以列举例如防腐剂、杀菌剂。

[0052] 本发明的试剂盒在手工方式下、使用自动设备的方式下均可以使用。尤其是在使用温度可控的自动设备及自动免疫组织化学染色设备、自动原位杂交装置的方法中的使用均简便,故而优选。

[0053] 使用本发明的试剂盒的在 IHC 法、ICC 法及 ISH 法中的染色或显色可以如下进行:将试剂盒的各溶液混合,或在特定量的水中混合、溶解试剂盒的各溶液,调制含 DAB 底物溶液,例如在使用载玻片的检体组织、检体细胞的酶抗体法时,通常在室温(15~30)℃下将含 DAB 底物溶液滴加到标记区域并使其反应 1~20 分钟,从而进行。

[0054] 实施例

[0055] 以下通过实施例、对照例及比较例对本发明进行更详细的说明,但本发明不受这些例子限定。

[0056] 予以说明,以下所示的例子中,评价按照下述方式进行。

[0057] 评价项目(1)

[0058] 特异染色强度:利用光学显微镜观察所获得的试样的特异染色强度。

[0059] 关于评价,将对照例 1 或 2 的特异染色强度设为“+”,以此为基准,通过其强度为对照例 1 或 2 的几倍来进行评价。

[0060] 评价项目(2)

[0061] 背景染色:利用光学显微镜观察所获得的试样的背景染色。

[0062] 关于评价,将观察到背景染色的比较例 1 或 8 设为“±”,将未观察到背景染色的对照例 1 或 8 设为“-”,以比较例 1 或 8 为基准,将比其的量多者设为“+”、多约 2 倍者设为“2+”,由此进行评价。

[0063] 评价项目(3)

[0064] 含 DAB 底物溶液的颜色:目视观察将后述的实施例及比较例中调制的试剂盒的各溶液混合后的混合溶液的颜色。

[0065] 评价项目(4)

[0066] 含 DAB 底物溶液中的沉淀物:目视观察将后述的实施例及比较例中调制的试剂盒的各溶液混合后的混合溶液中的沉淀物的状态。

[0067] 评价项目(5)

[0068] 保存稳定性:测定如下的保存期:将后述的实施例及比较例中调制的试剂盒在 37℃ 下保存时,与使用将刚调制后的试剂盒混合而获得的含 DAB 底物溶液进行评价时,在特异染色强度及背景染色方面获得同程度的评价结果的保存期。

[0069] 使用过氧化物酶标记抗体的免疫组织化学染色试样的制作

[0070] (A) 脱石蜡工序及亲水化工序

[0071] 将用福尔马林固定后进行石蜡包埋的人小肠组织切片用切片机切成 3 μm,贴合在预先涂敷有硅烷的涂敷载玻片上,在 37℃ 下干燥 16 小时。将其在二甲苯层中静置 3 分钟 × 3 次,进行脱石蜡。然后,在乙醇层中静置 3 分钟 × 4 次,进行亲水化。

[0072] (B) 清洗工序

[0073] 在最后的乙醇层静置后,用 pH7.6 的磷酸缓冲液进行 3 分钟 ×3 次的清洗。

[0074] (C) 免疫组织化学染色工序

[0075] 手工方式下的免疫组织化学染色

[0076] 去除进行了 (B) 清洗工序的载玻片的水汽,与 3%过氧化氢 / 甲醇溶液反应 10 分钟,进行内源性过氧化物酶的除去,反应结束后,用 pH7.6 的磷酸缓冲液进行 3 分钟 ×3 次的清洗。

[0077] 去除所获得的载玻片的水汽,用 PAP 笔 (大道产业公司制) 将组织检体的周围围住,制作试剂的堤坝。

[0078] 然后,去除载玻片的水汽,将 100 μ L 的来自小鼠的作为第一抗体的商品名“抗肌动蛋白 (平滑肌) 单克隆抗体 (克隆 1A4)” (日冷生物科学制) 滴加到载玻片上,在 25 $^{\circ}$ C 下反应 60 分钟。反应结束后,用 pH7.6 的磷酸缓冲液进行 3 分钟 ×3 次的清洗。

[0079] 然后,去除清洗后的载玻片的水汽,滴加 100 μ L 的在氨基酸聚合物上结合有过氧化物酶、和作为第二抗体的制成 Fab' 的抗小鼠 Ig 及抗兔 Ig 的标记聚合物 (商品名“Simple Stain MAX-PO (MULTI)”、日冷生物科学制),在 25 $^{\circ}$ C 下反应 30 分钟。反应结束后,用 pH7.6 的磷酸缓冲液进行 3 分钟 ×3 次的清洗。

[0080] 该清洗后,在去除了水汽的载玻片上滴加作为显色底物的、在各实施例及比较例中调制的试剂盒所获得的含 DAB 底物溶液,在室温下反应 5 分钟。反应结束后,进行 5 分钟的流水清洗。然后,为了进行对比染色,去除载玻片的水汽,与迈尔氏苏木精反应 30 秒使其核染色后,进行 5 分钟的流水清洗。

[0081] 然后,去除载玻片的水汽,进行乙醇层通过 ×3 次、乙醇层静置 3 分钟 ×1 次、二甲苯层通过 1 次、二甲苯层静置 5 分钟 ×2 次,进行脱水、透明。然后,使用非水溶性封闭剂 (日冷生物科学制) 进行封闭,从而制作各试样。

[0082] 对照例 1:不含咪唑、特定的螯合剂及特定的表面活性剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0083] 将在最终获得的含 DAB 底物溶液中的浓度为 15mg/mL 的量的 DAB 溶解于蒸馏水,调制含显色团溶液 (A)。此外,调制在蒸馏水中溶解有过氧化氢为 0.6 质量%的显色化溶液 (B1)、以及 pH7.6 的 Tris-HCl 的底物稳定化溶液 (B2')。使用由获得的含显色团溶液 (A)、显色化溶液 (B1) 及底物稳定化溶液 (B2') 组成的试剂盒,在蒸馏水 1mL 中混合各溶液 1 滴 (约 40 μ L) 并搅拌,由此调制含 DAB 底物溶液。

[0084] 使用获得的含 DAB 底物溶液,按照上述方法制作免疫组织化学染色试样。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) 及 (2)。结果如表 1 所示。

[0085] 比较例 1:不含特定的表面活性剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0086] 将在最终获得的含 DAB 底物溶液中的浓度为 15mg/mL 的量的 DAB 溶解于蒸馏水,调制含显色团溶液 (A)。此外,调制了在蒸馏水中溶解有过氧化氢量为 0.6 质量%的显色化溶液 (B1)、以及在蒸馏水中溶解有浓度为 0.5M 的咪唑、及浓度为 20mM 的 EDTA · 2Na 且用盐酸将 pH 调整为 7.5 的底物稳定化溶液 (B2')。使用由获得的含显色团溶液 (A)、显色化溶液 (B1) 及底物稳定化溶液 (B2') 组成的试剂盒,在蒸馏水 1mL 中混合各溶液 1 滴 (约 40 μ L) 并搅拌,由此调制了含 DAB 底物溶液。获得的溶液中的过氧化氢的含有比例为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA · 2Na 浓度为 0.8mM, pH 为 7.5。

[0087] 使用获得的含 DAB 底物溶液,按照上述方法制作免疫组织化学染色试样。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) ~ (4)。予以说明,关于评价项目 (3) 及 (4),在调制含 DAB 底物溶液后经过 1 小时后进行评价。结果如表 1 及表 2 所示。

[0088] 实施例 1 :使用 EDTA · 2Na 作为螯合剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0089] 代替底物稳定化溶液 (B2'),调制在蒸馏水中溶解有浓度为 0.5M 的咪唑、浓度为 20mM 的 EDTA · 2Na、及 POE(23) 月桂基醚 (Brij 35、西格玛奥德里奇 (SIGMA-ALDRICH) 公司制) 的含有比例为 1 质量%,且用盐酸将 pH 调整为 7.5 的底物稳定化溶液 (B2)。除了该 (B2) 溶液的调制以外,与比较例 1 同样地使用试剂盒调制含 DAB 底物溶液。获得的溶液中的过氧化氢浓度为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA · 2Na 浓度为 0.8mM、Brij 35 的含有比例为 0.04 质量%,pH 为 7.5。此外,与比较例 1 同样地进行各评价。予以说明,关于评价项目 (3) 及 (4),在调制含 DAB 底物溶液后经过 3 天后还进行了评价。结果如表 1 及表 2 所示。

[0090] 比较例 2 ~ 4 :含有不同的表面活性剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0091] 使用表 1 所示的作为聚氧失水山梨醇系非离子表面活性剂的 Tween 20、作为聚氧烷基苯基醚系非离子表面活性剂的 Triton X-100 或作为蔗糖脂肪酸酯的商品名“DK Ester SS”(第一工业制药公司制)代替 Brij 35,除此以外与实施例 1 同样地调制底物稳定化溶液 (B2')。关于含显色团溶液 (A) 及显色化溶液 (B1),与比较例 1 同样地进行调制,制成 3 液型的试剂盒。使用获得的试剂盒与比较例 1 同样地调制含 DAB 底物溶液,与实施例 1 同样地进行各评价。结果如表 1 及表 2 所示。予以说明,获得的含 DAB 底物溶液中的各浓度与实施例 1 相同。

[0092] 实施例 2 ~ 5 :改变了实施例 1 中使用的螯合剂的种类或浓度的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0093] 使用表 1 所示的浓度的 EDTA · 2NH₄、NTA、GEDTA 或 EDTA · 2Na 代替 EDTA · 2Na 20mM,除此以外与实施例 1 同样地调制底物稳定化溶液 (B2)。关于含显色团溶液 (A) 及显色化溶液 (B1),与比较例 1 同样地调制,制成 3 液型的试剂盒。使用获得的试剂盒,与比较例 1 同样地调制含 DAB 底物溶液,与实施例 1 同样地进行各评价。结果如表 1 及表 2 所示。予以说明,实施例 5 中获得的含 DAB 底物溶液中的过氧化氢浓度为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA · 2Na 浓度为 0.8mM、Brij 35 的含有比例为 0.04 质量%,pH 为 7.5。

[0094] 比较例 5 ~ 7 :含有不同的螯合剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0095] 使用表 1 所示浓度的柠檬酸、酒石酸或没食子酸代替 EDTA · 2Na,除此以外与比较例 2 同样地调制底物稳定化溶液 (B2')。关于含显色团溶液 (A) 及显色化溶液 (B1),与比较例 1 同样地调制,制成 3 液型的试剂盒。使用获得的试剂盒与比较例 1 同样地调制含 DAB 底物溶液,与实施例 1 同样地进行各评价。其中,未进行混合 1 小时后的溶液颜色及沉淀物的状态的评价。结果如表 1 及表 2 所示。予以说明,比较例 5 ~ 7 中获得的含 DAB 底物溶液中的过氧化氢浓度为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、柠檬酸或酒石酸浓度为 0.8mM、没食子酸浓度为 0.08mM、Tween 20 的含有比例为 0.04 质量%。

[0096] [表 1]

[0097]

	(B2)液或(B2')液的 表面活性剂的种类	(B2)液或(B2')液的 螯合剂的种类和浓度	特异染色 强度	背景染色
对照例1	--	--	+	--
比较例1	--	20mM EDTA · 2Na	2.5+	±
实施例1	Brij 35	20mM EDTA · 2Na	3+	--
比较例2	Tween 20	20mM EDTA · 2Na	3+	+
比较例3	Triton X-100	20mM EDTA · 2Na	3+	+
比较例4	DK 88 55	20mM EDTA · 2Na	3+	+
实施例2	Brij 35	20mM EDTA · 2NH ₄	3+	--
实施例3	Brij 35	20mM NTA	3+	--
实施例4	Brij 35	20mM GEDTA	3+	--
实施例5	Brij 35	50mM EDTA · 2Na	3+	--
比较例5	Tween 20	20mM 柠檬酸	2+	+
比较例6	Tween 20	20mM 酒石酸	2+	+
比较例7	Tween 20	2mM 没食子酸	+	2+

[0098] [表 2]

[0099]

	混合1小时后的溶液		混合3天后的溶液	
	颜色	沉淀物的状态	颜色	沉淀物的状态
比较例1	透明溶液	有沉淀	--	--
实施例1	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀
比较例2	透明溶液	无沉淀	茶色白浊	有沉淀
比较例3	透明溶液	无沉淀	茶色白浊	有沉淀
比较例4	透明溶液	无沉淀	茶色白浊	沉淀物多
实施例2	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀
实施例3	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀
实施例4	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀
实施例5	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀
比较例5	--	--	茶色白浊	有沉淀
比较例6	--	--	茶色白浊	有沉淀
比较例7	--	--	茶色白浊	有沉淀

[0100] 根据表1及表2,不含具有显色增强作用的咪唑的对照例1中,特异染色强度低,但不产生背景染色。与此相对地,含有咪唑的比较例1中,即使含有特定的螯合剂EDTA · 2Na也产生背景染色,在混合1小时后这样的短时间内,在溶液中确认到沉淀。比较例3~4通过配合除POE烷基醚系非离子表面活性剂和/或POP烷基醚系非离子表面活性剂以外的非离子表面活性剂,与比较例1相比显示出更优异的特异染色强度,但背景染色也增强,进而,混合3天后的溶液中也确认到沉淀。比较例5~6为将螯合剂变更为螯合效果比EDTA · 2Na差的螯合剂的例子,此时,特异染色强度比使用了EDTA · 2Na的比较例2下降,背景染色及溶液的状态与比较例2为大致相同的结果。与此相对地,实施例1中,特异染色强度增强,也未确认到背景染色,混合3天后的溶液也没有确认到沉淀。进而,由实施例2~4可知,即使将EDTA · 2Na变更为特定的其他螯合剂,也与实施例1获得了同样的效果。

[0101] 实施例6:改变了咪唑浓度的3液型的含DAB底物试剂盒

[0102] 将咪唑的浓度由0.5M变更为0.1M(含DAB底物溶液中的咪唑浓度为4mM)、0.2M(含DAB底物溶液中的咪唑浓度为8mM)、0.3M(含DAB底物溶液中的咪唑浓度为12mM)及0.4M(含DAB底物溶液中的咪唑浓度为16mM),除此以外与实施例1同样地调制底物稳定化溶液(B2),与实施例1同样地制成3液型的试剂盒,进行同样的评价。由其结果可知,特异染色强度在+1.5~+2.5的范围内呈咪唑浓度用量依赖性增加。背景染色、混合溶液的

颜色以及沉淀状态均与实施例 1 同样。

[0103] 实施例 7 ~ 13 :改变了表面活性剂的浓度的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0104] 将 Brij 35 的浓度变更为表 3 所示的浓度,除此以外与实施例 1 同样地调制底物稳定化溶液 (B2)。关于含显色团溶液 (A) 及显色化溶液 (B1),与比较例 1 同样地调制,制成 3 液型的试剂盒。使用获得的试剂盒调制含 DAB 底物溶液,使用获得的刚混合后的溶液进行免疫组织化学染色试样的制作。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) 及 (2) 的评价。结果如表 3 所示。此外,使用在调制含 DAB 底物溶液后在 4℃ 遮光下保存 2 周后的混合溶液,进行了免疫组织化学染色试样的制作。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) 及 (2) 的评价,关于在 4℃ 遮光下保存 2 周后的混合溶液进行了评价项目 (3) 及 (4) 的评价。结果如表 4 所示。予以说明,调制的含 DAB 底物溶液中的 Brij 35 的浓度在实施例 7 中为 0.02 质量%、在实施例 8 中为 0.06 质量%、在实施例 9 中为 0.08 质量%、在实施例 10 中为 0.1 质量%、在实施例 11 中为 0.12 质量%、在实施例 12 中为 0.2 质量%、在实施例 13 中为 0.4 质量%。

[0105] [表 3]

[0106]

	Brij 35 的浓度 (质量%)	特异染色 强度	背景染色
实施例 7	0.5	3+	---
实施例 8	1.5	3+	---
实施例 9	2.0	3+	---
实施例 10	2.5	3+	---
实施例 11	3.0	3.5+	---
实施例 12	5.0	3.5+	---
实施例 13	10.0	3.5+	---

[0107] [表 4]

[0108]

	Brij 35 的浓度 (质量%)	混合后在 4℃ 遮光下保存 2 周		
		特异染色强度	背景染色	溶液保存后的沉淀状态
实施例 7	0.5	3+	---	有沉淀
实施例 8	1.5	3+	---	有沉淀
实施例 9	2.0	3+	---	有沉淀
实施例 10	2.5	3+	---	稍有沉淀
实施例 11	3.0	3.5+	---	无沉淀
实施例 12	5.0	3.5+	---	无沉淀
实施例 13	10.0	3.5+	---	无沉淀

[0109] 由表 4 的结果可知,通过提高特定的表面活性剂的浓度,即使长期保存含 DAB 底物溶液,该溶液也不产生沉淀,保存稳定性优异。

[0110] 此外,关于实施例 13,将试剂盒进行了加速试验 (37℃ 3 个月) 及冷冻融化试验 (负 20℃ 保存 · 3 天) 后,将各溶液混合后进行了评价。其结果是染色性及沉淀没有问题。进而,在加速试验及冷冻融化试验后,还进行了将混合溶液在 4℃ 遮光下保存 5 天的评价,几乎未确认到特异染色强度的下降,也未确认到背景染色变化。但是,在使用经过了 7 天后的混合溶液时,虽然能够进行染色,但与当天调制的溶液相比,特异染色强度可见若干下

降。

[0111] 实施例 14 :2 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0112] 将在最终获得的含 DAB 底物溶液中的浓度为 20mg/mL 的量的 DAB 溶解于蒸馏水, 调制含显色团溶液 (A)。此外, 按照过氧化氢的含有比例为 0.025 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA·2Na 浓度为 2mM、及 Brij 35 的含有比例为 0.4 质量%的方式将其溶解在蒸馏水中, 仅通过盐酸将 pH 调制为 7.5, 由此调制显色试剂 (B)。使用由获得的含显色团溶液 (A) 及显色试剂 (B) 组成的 2 液型的试剂盒, 相对于 (B) 液 500 μ L 混合 (A) 液 1 滴 (约 20 μ L) 并搅拌, 调制含 DAB 底物溶液。获得的溶液中的过氧化氢的含有比例为 0.025 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA·2Na 浓度为 2mM、Brij 35 的含有比例为 0.4 质量%, pH 为 7.5。

[0113] 使用获得的含 DAB 底物溶液, 按照上述方法制作免疫组织化学染色试样。关于获得的试样, 进行了评价项目 (1) 及 (2), 关于获得的试剂盒, 进行了评价项目 (5) 的保存稳定性试验。结果如表 5 所示。

[0114] 实施例 15 ~ 18

[0115] 并非仅通过盐酸将 pH 调制为 7.5, 而是将表 5 所示的缓冲液用 HCl 或 NaOH 滴定而调制至表 5 所示的 pH, 除此以外与实施例 14 同样地调制显色试剂 (B)。此外, 含显色团溶液 (A) 的调制、以及各评价均与实施例 14 同样地进行。结果如表 5 所示。

[0116] [表 5]

[0117]

	缓冲液(pH)	特异染色强度	背景染色	37℃下能够保存的期间 评价项目(5)
实施例 14	-- (7.5)	3.5+	--	能够保存3个月
实施例 15	MOPS (7.5)	3.5+	--	能够保存2个月左右
实施例 16	HEPES (7.5)	3.5+	--	能够保存1个月左右
实施例 17	ADA (7.5)	3.5+	--	能够保存1个月左右
实施例 18	CHES (9.0)	3.5+	--	能够保存2个月左右

[0118] MOPS:3- 吗啉代丙磺酸、

[0119] HEPES:4-(2- 羟乙基)-1- 哌嗪乙磺酸、

[0120] ADA:N-(2- 乙酰胺基) 亚氨基二乙酸、

[0121] CHES:N- 环己基 -2- 氨基乙磺酸。

[0122] 由表 5 的结果可知, 显色试剂 (B) 在保存试验中的保存稳定性均优异、不含缓冲液的实施例 14 尤其优异。

[0123] 实施例 19

[0124] 将 EDTA·2Na 的浓度由 2mM 变更为 1mM、1.5mM, 除此以外, 与实施例 14 同样地调制显色试剂 (B)。此外, 调制含显色团溶液 (A) 并进行特异染色强度、背景染色的评价, 结果均与实施例 14 同样。此外, 观察了染色的色调, 结果在 EDTA·2Na 浓度至 1mM 为止为土黄色, EDTA·2Na 浓度为 1.5mM 以上时为暗褐色, 可知此时显示出更优选的色调。

[0125] 手工方式下的 CISH(Chromogenic in situ Hybridization)

[0126] (A) 组织切片的制作、脱石蜡、亲水化工序

[0127] 将石蜡包埋的预先确认为 HER2 阳性的人乳腺癌组织福尔马林固定组织切片用切片机切成 5 μ m, 贴合在预先涂敷有硅烷的载玻片上, 在 37℃ 下干燥 16 小时。将其在二甲苯中静置 3 分钟 \times 3 次, 进行脱石蜡。然后, 在乙醇中静置 3 分钟 \times 4 次, 进行亲水化。

[0128] (B) 前处理工序

[0129] 在最后的乙醇静置后,去除载玻片的水汽,放入 3%过氧化氢 / 水中,进行内源性过氧化物酶的除去,在 25℃ 下反应 5 分钟。反应结束后,用磷酸缓冲液 (pH7.6) 进行 1 分钟 × 2 次的清洗。

[0130] 去除载玻片的水汽,将载玻片放入事先用热水浴加温到 98℃ 的 10mM 柠檬酸缓冲液 (pH6.0) 中,反应 30 分钟。

[0131] 反应结束后,用磷酸缓冲液 (pH7.6) 进行 2 分钟 × 2 次的清洗。

[0132] 去除载玻片的水汽,滴加 100 μL 的将蛋白酶 (日冷生物科学制) 稀释至 1/5 的溶液,在 25℃ 下反应 3 分钟,反应结束后,用磷酸缓冲液 (pH7.6) 进行 5 分钟 × 3 次的清洗。

[0133] 为了进行脱水操作,与 70%、90% 及 100% 乙醇 (其余成分为去离子水) 在 25℃ 下各反应 1 分钟后,用干燥机直接对载玻片吹送冷风,将组织干燥。

[0134] 变性及杂交

[0135] 将 10 μL 的在存在于人 17 号染色体上 (17q21.1) 的形成约 220kb 的互补链的序列上介由接头施加了 DIG 标记的 HER2 探针滴加到干燥的组织周边。

[0136] 一边避免起泡一边在组织上载置 22mm×22mm 的盖玻片 (松浪硝子工业公司制),将盖玻片的周围用纸用粘合剂 (paper bond) 密封。密封后,将载玻片置于设定为 75℃ 的热板上,进行 5 分钟的热变性。反应后,将载玻片移动到湿润箱,在 37℃ 下反应一晚。

[0137] 杂交后 (post hybridization) 及检测

[0138] 然后,小心翼翼地剥离纸用粘合剂,用 2×SSC (柠檬酸缓冲液) 缓冲液在 25℃ 下反应 5 分钟。然后,用预先加温到 72℃ 的 2×SSC 缓冲液进行 5 分钟的清洗,然后用磷酸缓冲液 (pH7.6) 进行 1 分钟 × 2 次的清洗。

[0139] 滴加 100 μL 的在氨基酸聚合物上结合有过氧化物酶和制成 Fab' 的抗 DIG 抗体的标记聚合物,在 25℃ 下反应 30 分钟,反应结束后,用磷酸缓冲液 (pH7.6) 进行 1 分钟 × 3 次的清洗。

[0140] 在反应前,使用包含实施例及比较例中调制的各溶液的试剂盒调制含 DAB 底物溶液。去除载玻片的水汽,滴加各 100 μL 的含 DAB 底物溶液,室温下反应 10 分钟。反应结束后,进行 5 分钟的流水清洗。

[0141] 然后,为了进行对比染色,去除载玻片的水汽,与迈尔氏苏木精反应 15 秒使其核染色后,进行 5 分钟的流水清洗。

[0142] 然后,在流水清洗后去除水汽,进行乙醇通过 × 3 次、乙醇静置 3 分钟 × 1 次、二甲苯通过 1 次、二甲苯静置 5 分钟 × 2 次,进行脱水、透明。然后,使用非水溶性封闭剂 (日冷生物科学制) 进行封闭,由此制作各试样。

[0143] 对照例 2: 不含咪唑、特定的螯合剂及特定的表面活性剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0144] 将在最终获得的含 DAB 底物溶液中的浓度为 15mg/mL 的量的 DAB 溶解于蒸馏水,调制含显色团溶液 (A)。此外,调制了在蒸馏水中溶解有过氧化氢为 0.6 质量% 的显色化溶液 (B1)、以及 pH7.6 的 Tris-HCl 的底物稳定化溶液 (B2')。使用由获得的含显色团溶液 (A)、显色化溶液 (B1) 及底物稳定化溶液 (B2') 组成的试剂盒,在蒸馏水 1mL 中混合各溶液 1 滴 (约 40 μL) 并搅拌,由此调制含 DAB 底物溶液。

[0145] 使用获得的含 DAB 底物溶液,按照上述方法制作 CISH 试样。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) 及 (2)。结果如表 6 所示。

[0146] 比较例 8 :不含特定的表面活性剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0147] 将在最终获得的含 DAB 底物溶液中的浓度为 15mg/mL 的量的 DAB 溶解于蒸馏水,调制含显色团溶液 (A)。此外,调制了在蒸馏水中溶解有过氧化氢量为 0.6 质量%的显色化溶液 (B1)、以及在蒸馏水中溶解有浓度为 0.5M 的咪唑、及浓度为 20mM 的 EDTA·2Na 并用盐酸将 pH 调整为 7.5 的底物稳定化溶液 (B2')。使用由获得的含显色团溶液 (A)、显色化溶液 (B1) 及底物稳定化溶液 (B2') 组成的试剂盒,在蒸馏水 1mL 中混合各溶液 1 滴 (约 40 μ L) 并搅拌,调制含 DAB 底物溶液。获得的溶液中的过氧化氢的含有比例为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA·2Na 浓度为 0.8mM, pH 为 7.5。

[0148] 使用获得的含 DAB 底物溶液,按照上述方法制作 CISH 试样。关于获得的试样,进行了评价项目 (1) ~ (4)。予以说明,关于评价项目 (3) 及 (4),在调制含 DAB 底物溶液后经过 1 小时后进行评价。结果如表 6 所示。

[0149] 实施例 20 :使用 EDTA·2Na 作为整合剂的 3 液型的含 DAB 底物试剂盒

[0150] 代替底物稳定化溶液 (B2'),调制了在蒸馏水中溶解有浓度为 0.5M 的咪唑、浓度为 20mM 的 EDTA·2Na、及 Brij 35 (西格玛奥德里奇公司制) 的含有比例为 10 质量%且用盐酸将 pH 调整为 7.5 的底物稳定化溶液 (B2)。除了该 (B2) 溶液的调制以外,与比较例 8 同样地使用试剂盒调制含 DAB 底物溶液。获得的溶液中的过氧化氢浓度为 0.024 质量%、咪唑浓度为 20mM、EDTA·2Na 浓度为 0.8mM、Brij 35 的含有比例为 0.4 质量%, pH 为 7.5。此外,与比较例 8 同样地进行各评价。予以说明,关于评价项目 (3) 及 (4),在调制含 DAB 底物溶液后经过 3 天后还进行了评价。结果如表 6 及表 7 所示。

[0151] [表 6]

[0152]

	(B2)液或(B2')液的表面活性剂的种类	(B2)液或(B2')液的整合剂的种类和浓度	特异染色强度	背景染色
对照例 2	--	--	+	--
比较例 8	--	20mM EDTA·2Na	2.5+	±
实施例 20	Brij 35	20mM EDTA·2Na	3+	--

[0153] [表 7]

[0154]

	混合 1 小时后的溶液		混合 3 天后的溶液	
	颜色	沉淀物的状态	颜色	沉淀物的状态
比较例 8	透明溶液	有沉淀	--	--
实施例 20	无色透明	无沉淀	茶色透明	无沉淀

[0155] 由以上的结果可知,本发明的试剂盒在用于 CISH 时,也具有增强特异染色强度、降低背景染色及抑制含 DAB 底物溶液中的沉淀的效果。

专利名称(译)	使用标记酶的染色用含DAB底物试剂盒		
公开(公告)号	CN105164272A	公开(公告)日	2015-12-16
申请号	CN201480023884.0	申请日	2014-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	株式会社日冷		
申请(专利权)人(译)	株式会社日冷生物科学		
当前申请(专利权)人(译)	株式会社日冷生物科学		
[标]发明人	笠松敏幸 北野由里子		
发明人	笠松敏幸 北野由里子		
IPC分类号	C12Q1/28 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/531 G01N33/535		
CPC分类号	C12Q1/28 G01N33/5306		
代理人(译)	金鲜英 陈彦		
优先权	2013039672 2013-02-28 JP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种含DAB底物试剂盒，其对于使用过氧化物酶标记抗体的显色反应，使用含有DAB及作为其敏化剂的咪唑的显色反应液，能够在增强特异染色强度的同时，抑制DAB凝集所致的在含DAB底物溶液中的沉淀、及背景染色等非特异性染色。本发明的试剂盒为含有含显色团溶液(A)以及显色试剂(B)、且至少含显色团溶液(A)及显色试剂(B)分开保管的2液型以上，所述含显色团溶液(A)含有作为过氧化物酶显色团的DAB和水，所述显色试剂(B)含有：EDTA·2Na、EDTA·2NH₄、GEDTA和NTA中的至少1种的螯合剂，POE烷基醚系非离子表面活性剂和/或POP烷基醚系非离子表面活性剂、咪唑、过氧化氢以及水。

	(B2)液或 (B2')液的 表面活性剂的种类	(B2)液或 (B2')液的 螯合剂的种类和浓度	特异染色 强度	背景染色
对照例1	-	-	+	-
比较例1	-	20mM EDTA·2Na	2.5+	±
实施例1	Brij 35	20mM EDTA·2Na	3+	-
比较例2	Tween 20	20mM EDTA·2Na	3+	+
比较例3	Triton X-100	20mM EDTA·2Na	3+	+
比较例4	DK 酯 SS	20mM EDTA·2Na	3+	+
实施例2	Brij 35	20mM EDTA·2NH ₄	3+	-
实施例3	Brij 35	20mM NTA	3+	-
实施例4	Brij 35	20mM GEDTA	3+	-
实施例5	Brij 35	50mM EDTA·2Na	3+	-
比较例5	Tween 20	20mM 柠檬酸	2+	+
比较例6	Tween 20	20mM 酒石酸	2+	+
比较例7	Tween 20	2mM 没食子酸	+	2+