



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105784983 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610021908.X

(22)申请日 2016.01.13

(71)申请人 深圳中山生殖与遗传研究所

地址 518000 广东省深圳市福田区福强路
1001号

(72)发明人 黄春宇 刁梁辉 陈现 李玉叶
连若纯 陈聪

(74)专利代理机构 北京轻创知识产权代理有限公司 11212

代理人 杨伦

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

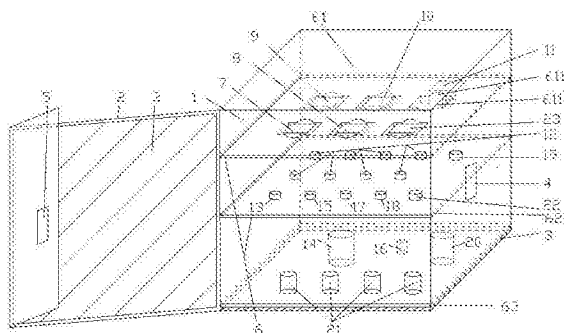
权利要求书3页 说明书8页 附图2页

(54)发明名称

一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法,属于医学和生物学检测领域。其包括盒体和设置在所述盒体侧面开口处的盒盖,所述盒体的底部和四周侧壁设有隔热板,所述盒盖内壁设有隔热板,在盒体、盒盖的外端面上相对应的分别设有磁性下锁扣与磁性上锁扣,所述盒体内部设有泡沫垫和1份使用说明书,所述泡沫垫上设有2个对照标准品、21瓶试剂、抗原修复粉剂、pH试纸、载玻片和盖玻片。本发明还公开了上述试剂盒的使用方法。本发明具有操作简单、灵敏性高、特异性强等特点,且检测结果准确、客观、快捷。



1. 一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括盒体(1)和设置在所述盒体(1)侧面开口处的盒盖(2),其特征在于,所述盒体(1)的底部和四周侧壁设有隔热板(3),所述盒盖(2)内壁设有隔热板(3),在盒体(1)、盒盖(2)的外端面上相对应的分别设有磁性下锁扣(4)与磁性上锁扣(5),所述盒体(1)内部设有泡沫垫(6)和1份使用说明书,所述泡沫垫(6)上设有2个对照标准品、21瓶试剂、抗原修复粉剂(23)、pH试纸(7)、载玻片(8)和盖玻片(9),2个对照标准品分别为阳性标准品(10)和阴性标准品(11),21瓶试剂分别为8瓶一抗储存液(12)、1瓶二抗储存液(13)、1瓶抗体稀释液(14)、1瓶PBS片剂(15)、1瓶吐温-20(16)、1瓶过氧化物酶失活剂储存液(17)、1瓶非特异性蛋白阻断粉剂(18)、1瓶显色液储存液(19)、1瓶显色液稀释液(20)、4瓶复染液(21)和1瓶封片剂(22)。

2. 根据权利要求1所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述泡沫垫(6)包括位于盒体(1)内部靠上的第一泡沫垫(61)、位于盒体(1)内部居中的第二泡沫垫(62)和位于盒体(1)内部靠下的第三泡沫垫(63),且所述第一泡沫垫(61)、第二泡沫垫(62)和第三泡沫垫(63)上下平行设置,所述第一泡沫垫(61)上开设有6个分别放置pH试纸(7)、载玻片(8)、盖玻片(9)、阳性对照标准品(10)、阴性对照标准品(11)和抗原修复粉剂(23)且与上述物品的长度相适配的腔体(611),在腔体(611)的长度方向的壁体上并且在彼此对应的位置各凹设有两个指腔(6111),所述第二泡沫垫(62)上开有14个分别放置8瓶一抗储存液(12)、二抗储存液(13)、PBS片剂(15)、过氧化物酶失活剂储存液(17)、非特异性蛋白阻断粉剂(18)、显色液储存液(19)和封片剂(22)的圆形的凹槽,所述第三泡沫垫(63)上开有7个分别放置抗体稀释液(14)、吐温-20(16)、显色液稀释液(20)和4瓶复染液(21)的圆形的凹槽。

3. 根据权利要求2所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,每个所述指腔(6111)形状均为半球形。

4. 根据权利要求1所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述阳性对照标准品(10)为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照标准品(11)为不含一抗的5%BSA敷育的子宫内膜组织石蜡块。

5. 根据权利要求1所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述一抗储存液(12)为100×抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100×抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100×抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100×抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、100×抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100×抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100×抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100×抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,所述二抗储存液(13)为100×辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述过氧化物酶失活剂储存液(17)为30%v/v过氧化氢溶液,所述非特异性蛋白阻断粉剂(18)为白蛋白粉,所述显色液储存液(19)为50×DAB溶液,所述复染液(21)为苏木素,所述封片剂(22)为中性树脂,所述抗原修复粉剂(23)为Tris/EDTA。

6. 根据权利要求1所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述阳性标准品(10)为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述阴性对照标准品(11)为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述一抗储存液(12)为黑色帽的白色PE塑料管,所述二抗储存液(13)为黑色帽的白色PE塑料管,所述抗体稀释液(14)为红色帽的黑色PE塑料瓶,所述PBS片剂(15)为灰色帽的红色PE塑料瓶,所述吐温-20(16)为黄色帽的灰色PE塑料瓶,所述过氧化物酶失活剂

储存液(17)为绿色帽的黄色PE塑料管,所述非特异性蛋白阻断粉剂(18)为蓝色帽的绿色PE塑料瓶,所述显色液储存液(19)为紫色帽的蓝色PE塑料管,所述显色液稀释液(20)为白色帽的紫色PE塑料瓶,所述复染液(21)为绿色帽的黑色PE塑料瓶,所述封片剂(22)为红色帽的黄色PE塑料管。

7. 根据权利要求1所述的一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,其特征在于,所述pH试纸(7)为100张,所述载玻片(8)为400张,所述盖玻片(9)为400张,所述阳性标准品(10)为1块,7g,所述阴性标准品(11)为1块,7g,所述一抗储存液(12)为8管,每管各50 μ L,所述二抗储存液(13)为1管,300 μ L,所述抗体稀释液(14)为1瓶,50mL,所述PBS片剂(15)为1瓶,15片,所述吐温-20(16)为1瓶,10mL,所述过氧化物酶失活剂储存液(17)为1管,5mL,所述非特异性蛋白阻断粉剂(18)为1瓶,10g,所述显色液储存液(19)为1管,600 μ L,所述显色液稀释液(20)为1瓶,30mL,所述复染液(21)为4瓶,20mL/瓶,所述封片剂(22)为1管,10mL,所述抗原修复粉剂(23)分为20个试剂袋袋装,每袋1.58g。

8. 一种如权利要求1-7任一项所述的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

(1)工作液配制:片剂、粉剂溶解,储存液稀释如下:

a、PBS片剂(15)溶解:将1片PBS片剂(15)溶于1000mL超纯水中,得到1 $\times$ PBS溶液,将1片PBS片剂(15)溶于1000mL超纯水中,加500 μ L吐温-20(16),得到1 $\times$ PBST溶液;

b、非特异性蛋白阻断粉剂(18)溶解:取0.5g白蛋白粉溶于10mL步骤(1)a所得1 $\times$ PBST溶液中,得到5%v/v的非特异性蛋白阻断剂工作液;

c、抗原修复粉剂(23)溶解:取1袋1.58g Tris/EDTA溶于1000mL超纯水中,加入0.5mL吐温-20(16),用pH试纸(7)监测溶液pH值,调整pH至9.0,得到抗原修复剂工作液;

d、一抗储存液(12)稀释:分别取100 $\times$ 抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100 $\times$ 抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100 $\times$ 抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100 $\times$ 抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、100 $\times$ 抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100 $\times$ 抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100 $\times$ 抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100 $\times$ 抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,加抗体稀释液(14)稀释100倍,得到一抗工作液;

e、二抗储存液(13)稀释:取100 $\times$ 辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,加抗体稀释液(14)稀释100倍,得到二抗工作液;

f、过氧化物酶灭活剂储存液(17)稀释:取30%v/v的过氧化氢溶液,加超纯水稀释10倍,得到3%v/v的过氧化物酶灭活剂工作液;

(2)石蜡切片脱蜡:将取自活体的人体的子宫内膜的待测样本、阳性对照标准品10和阴性对照标准品11的各8张切片先放入250mL二甲苯中浸泡10min,再放入另一份250mL二甲苯中浸泡5min,无水酒精与二甲苯等体积混合溶液中浸泡3min,得到脱蜡后切片;

(3)水化:将步骤(2)所得脱蜡后切片,依次放入100%酒精浸泡2min,95%酒精浸泡2min,另一份95%酒精浸泡2min,80%酒精浸泡2min,然后用步骤(1)a所述的1 $\times$ PBS溶液冲洗3min,得到水化后的切片;

(4)内源性过氧化物酶失活:将步骤(3)所得水化后的切片,甩去多余的液体,浸泡在步骤(1)f所得过氧化物酶灭活剂工作液中15min,再用步骤(1)a所得1 $\times$ PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

(5)抗原修复:将步骤(1)c所得抗原修复剂工作液放入耐高温容器中,再将步骤(4)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片置于其中,煮沸15min,放置室温冷却,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到抗原修复后的切片;

(6)封闭:将步骤(5)所得抗原修复后切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,室温孵育20min,得到非特异性蛋白封闭后的切片;

(7)一抗孵育:将步骤(6)所得非特异性蛋白封闭切片,除阴性对照标准品(11)外,待测样本和阳性对照标准品(10)的各8张切片均甩去步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,并分别滴加步骤(1)d所得一抗工作液,37℃水浴孵育60min,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,然后用步骤(1)a所得1×PBST溶液冲洗3min,得到一抗后的切片;

(8)二抗孵育:将步骤(7)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)e所得二抗工作液,37℃水浴孵育30min,甩去二抗工作液,然后使用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

(9)显色:

a、显色液储存液(19)稀释:取50×DAB溶液,加显色液稀释液(20)稀释50倍,得到显色液工作液;

b、将步骤(8)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(9)a所得显色液工作液进行显色,得到显色后的切片;

(10)复染、分化、返蓝:将步骤(9)所得显色后的切片,甩去显色液工作液,滴加复染液(21)复染4min、1%v/v盐酸酒精分化20s、1%v/v氨水中返蓝30s,得到返蓝后的切片;

(11)脱水、透明化:将步骤(10)所得返蓝后的切片,依次放入70%酒精浸泡2min、80%酒精浸泡2min、95%酒精浸泡2min、100%酒精浸泡2min,脱水后转入二甲苯溶液浸泡3min,再转入另一份二甲苯溶液10min,最后转入另一份二甲苯溶液5min进行透明化处理,得到透明化后的切片;

(12)封片:将步骤(11)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,用封片剂(22)封片,得到免疫组织化学染色切片,然后采用成像显微镜和病理图片分析软件分析结果,评估子宫内膜容受性是否异常。

9.根据权利要求8所述的试剂盒的使用方法,其特征在于,步骤(2)所述待测样品为取自活体的人体的子宫内膜。

一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法,属于医学和生物学检测领域。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织评估,目前每7对夫妇中约有1对夫妇存在生殖障碍问题,主要表现为流产或不孕。关注生殖健康是国家发展的重要部分。研究表明,子宫内膜容受性的改变可能是导致生殖障碍的主要因素之一。子宫内膜容受性是指子宫内膜接受胚胎的能力,指子宫内膜处于一种允许胚胎定位、黏附和侵入的状态。该时期又被称为子宫内膜的种植窗期。如果种植窗期子宫内膜对胚胎的容受性发生异常,其对胚胎发生排斥反应,进而不允许胚胎正常着床发育,这一状态将会导致流产或不孕等不良妊娠结局。因此,子宫内膜容受性的评估对于生殖障碍患者的诊治具有重要意义。

[0003] 目前,临床中子宫内膜容受性的评估手段主要是形态学评估。其评估指标包括三大类:(1)子宫内膜厚度、回声和血流等超声形态;(2)腺体大小、间质疏密和血管丰度等组织活检形态;(3)子宫内膜胞饮突。然而,形态学评估子宫内膜容受性存在一定争议。因为,子宫内膜容受性由一系列细胞和细胞因子相互作用调控,细胞及其分泌的细胞因子在与胚胎接触过程中发挥重要作用。但是,子宫内膜的形态学表征并不能准确反映其细胞和细胞因子的表达情况。

[0004] 在此背景下,子宫内膜活检结合分子检测等新的评估手段开始发展。因此,子宫内膜容受性生物标记物的研究越来越受到重视。研究表明,子宫内膜免疫细胞在其容受性调控中发挥重要作用。子宫内膜免疫细胞主要包括自然杀伤细胞、巨噬细胞、T细胞和树突状细胞等四大类。并且,各类免疫细胞又分为不同的亚群,在子宫内膜容受性调节中发挥不同的作用。自然杀伤细胞作为子宫内膜中主要的免疫细胞,通过促进滋养层细胞侵入、支持螺旋动脉重构以及调控自身杀伤能力等途径调节子宫内膜容受性,参与胚胎种植。巨噬细胞在子宫内膜局部及系统激素的调节下可以进行亚群的转换,在种植过程中既可以清除病原体,又可以诱导子宫内膜对胚胎的免疫耐受,进而维持成功妊娠。T细胞主要包括辅助性T细胞、杀伤性T细胞以及调节性T细胞。其中,辅助性T细胞主要通过分泌细胞因子,调控子宫内膜的分化,为胚胎种植做好准备;杀伤性T细胞主要通过调控滋养层细胞侵入与分泌毒性颗粒的平衡参与种植过程;而调节性T细胞发挥免疫抑制作用,其通过抑制子宫内膜对胚胎的过度炎症反应,进而维持继续妊娠。树突状细胞作为重要的抗原提呈细胞,根据其成熟程度可以分为两类:未成熟树突状细胞和成熟树突状细胞。未成熟树突状细胞在妊娠中发挥免疫耐受作用,而成熟树突状细胞在妊娠中发挥免疫排斥作用,因此,两者的平衡在子宫内膜接受胚胎过程中同样发挥着必不可少的作用。以上研究结果表明,子宫内膜容受性的调控因素并不是单一的,而是各种免疫细胞相互作用,相互平衡的结果。

[0005] 但是,目前国内外以子宫内膜免疫细胞作为其容受性评估指标时,多是检测其中一种免疫细胞,并且检测方法各异,分析结果不统一、波动性大。根据这些结果,临床医生不

能对患者子宫内膜容受性进行准确评估,故而无法制定完善的治疗方案。因此,开发稳定可靠的子宫内膜多种免疫细胞检测试剂盒可以对子宫内膜容受性进行准确评估,为患者的诊疗提供可靠依据。

[0006] 目前针对子宫内膜免疫细胞数量的检测方法主要有流式细胞术和免疫组织化学检测两种方法。但是,流式细胞术不能对子宫内膜细胞的定位情况进行分析,并且在制备细胞悬液的过程中存在细胞和抗原丢失等问题。因此,免疫组织化学染色方法成为了更好的选择。在临床上,免疫组织化学染色已经在肿瘤病理诊断中得到了广泛应用,涉及领域包括肿瘤组织起源的鉴别、未分化恶性肿瘤性质的判定、各种形态系统肿瘤鉴别、确定肿瘤原发部位等。其原理是用标记的抗体对细胞或组织内的相应抗原进行定位、定性或定量检测,经过组织化学的呈色反应而呈现醒目的阳性色彩,在光学显微镜、荧光显微镜或电子显微镜下进行人工计数,或者采用显微镜采集图像并结合病理图片分析软件对其进行定量分析。

[0007] 但迄今为止,市面上尚未用于评估子宫内膜容受性的试剂盒。

发明内容

[0008] 本发明的目的,是提供一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法。该试剂盒用于评估子宫内膜容受性,具有操作简单、灵敏性高、特异性强等特点,且检测结果准确、客观、快捷。

[0009] 本发明解决上述技术问题的技术方案如下:一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括盒体和设置在所述盒体侧面开口处的盒盖,所述盒体的底部和四周侧壁设有隔热板,所述盒盖内壁设有隔热板,在盒体、盒盖的外端面上相对应的分别设有磁性下锁扣与磁性上锁扣,所述盒体内部设有泡沫垫和1份使用说明书,所述泡沫垫上设有2个对照标准品、21瓶试剂、抗原修复粉剂、pH试纸、载玻片和盖玻片,2个对照标准品分别为阳性标准品和阴性标准品,21瓶试剂分别为8瓶一抗储存液、1瓶二抗储存液、1瓶抗体稀释液、1瓶PBS片剂、1瓶吐温-20、1瓶过氧化物酶失活剂储存液、1瓶非特异性蛋白阻断粉剂、1瓶显色液储存液、1瓶显色液稀释液、4瓶复染液和1瓶封片剂。

[0010] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0011] 进一步,所述泡沫垫包括位于盒体内部靠上的第一泡沫垫、位于盒体内部居中的第二泡沫垫和位于盒体内部靠下的第三泡沫垫,且所述第一泡沫垫、第二泡沫垫和第三泡沫垫上下平行设置,所述第一泡沫垫上开设有6个分别放置pH试纸、载玻片、盖玻片、阳性对照标准品、阴性对照标准品和抗原修复粉剂且与上述物品的长度相适配的腔体,在腔体的长度方向的壁体上并且在彼此对应的位置各凹设有两个指腔,所述第二泡沫垫上开有14个分别放置8瓶一抗储存液、二抗储存液、PBS片剂、过氧化物酶失活剂储存液、非特异性蛋白阻断粉剂、显色液储存液和封片剂的圆形的凹槽,所述第三泡沫垫上开有7个分别放置抗体稀释液、吐温-20、显色液稀释液和4瓶复染液的圆形的凹槽。

[0012] 进一步,每个所述指腔形状均为半球形。

[0013] 进一步,所述阳性对照标准品为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照标准品为不含一抗的5%BSA敷育的子宫内膜组织石蜡块。

[0014] 进一步,所述一抗储存液为100×抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100×抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100×抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100×抗人辅助

性T细胞表面分子CD4的抗体、100×抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100×抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100×抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100×抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,所述二抗储存液为100×辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述过氧化物酶失活剂储存液为30%v/v过氧化氢溶液,所述非特异性蛋白阻断粉剂为白蛋白粉,所述显色液储存液为50×DAB溶液,所述复染液为苏木素,所述封片剂为中性树胶,所述抗原修复粉剂为Tris/EDTA。

[0015] 进一步,所述阳性标准品为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述阴性对照标准品为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述一抗储存液为黑色帽的白色PE塑料管,所述二抗储存液为黑色帽的白色PE塑料管,所述抗体稀释液为红色帽的黑色PE塑料瓶,所述PBS片剂为灰色帽的红色PE塑料瓶,所述吐温-20为黄色帽的灰色PE塑料瓶,所述过氧化物酶失活剂储存液为绿色帽的黄色PE塑料管,所述非特异性蛋白阻断粉剂为蓝色帽的绿色PE塑料瓶,所述显色液储存液为紫色帽的蓝色PE塑料管,所述显色液稀释液为白色帽的紫色PE塑料瓶,所述复染液为绿色帽的黑色PE塑料瓶,所述封片剂为红色帽的黄色PE塑料管。

[0016] 进一步,所述pH试纸为100张,所述载玻片为400张,所述盖玻片为400张,所述阳性标准品为1块,7g,所述阴性标准品为1块,7g,所述一抗储存液为8管,每管各50μL,所述二抗储存液为1管,300μL,所述抗体稀释液为1瓶,50mL,所述PBS片剂为1瓶,15片,所述吐温-20为1瓶,10mL,所述过氧化物酶失活剂储存液为1管,5mL,所述非特异性蛋白阻断粉剂为1瓶,10g,所述显色液储存液为1管,600μL,所述显色液稀释液为1瓶,30mL,所述复染液为4瓶,20mL/瓶,所述封片剂为1管,10mL,所述抗原修复粉剂分为20个试剂袋袋装,每袋1.58g。

[0017] 一种如上任一项所述的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0018] (1)工作液配制:片剂、粉剂溶解,储存液稀释如下:

[0019] a、PBS片剂溶解:将1片PBS片剂溶于1000mL超纯水中,得到1×PBS溶液,将1片PBS片剂溶于1000mL超纯水中,加500uL吐温-20,得到1×PBST溶液;

[0020] b、非特异性蛋白阻断粉剂溶解:取0.5g白蛋白粉溶于10mL步骤(1)a所得1×PBST溶液中,得到5%v/v的非特异性蛋白阻断剂工作液;

[0021] c、抗原修复粉剂溶解:取1袋1.58g Tris/EDTA溶于1000mL超纯水中,加入0.5mL吐温-20,用pH试纸监测溶液pH值,调整pH至9.0,得到抗原修复剂工作液;

[0022] d、一抗储存液稀释:分别取100×抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100×抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100×抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100×抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、100×抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100×抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100×抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100×抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,加抗体稀释液稀释100倍,得到一抗工作液;

[0023] e、二抗储存液稀释:取100×辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,加抗体稀释液稀释100倍,得到二抗工作液;

[0024] f、过氧化物酶失活剂储存液稀释:取30%v/v的过氧化氢溶液,加超纯水稀释10倍,得到3%v/v的过氧化物酶失活剂工作液;

[0025] (2)石蜡切片脱蜡:将取自活体的人体的子宫内膜的待测样本、阳性对照标准品和阴性对照标准品的各8张切片先放入250mL二甲苯中浸泡10min,再放入另一份250mL二甲苯中浸泡5min,无水酒精与二甲苯等体积混合溶液中浸泡3min,得到脱蜡后切片;

[0026] (3)水化:将步骤(2)所得脱蜡后切片,依次放入100%酒精浸泡2min,95%酒精浸泡2min,另一份95%酒精浸泡2min,80%酒精浸泡2min,然后用步骤(1)a所述的1×PBS溶液冲洗3min,得到水化后的切片;

[0027] (4)内源性过氧化物酶失活:将步骤(3)所得水化后的切片,甩去多余的液体,浸泡在步骤(1)f所得过氧化物酶灭活剂工作液中15min,再用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

[0028] (5)抗原修复:将步骤(1)c所得抗原修复剂工作液放入耐高温容器中,再将步骤(4)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片置于其中,煮沸15min,放置室温冷却,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到抗原修复后的切片;

[0029] (6)封闭:将步骤(5)所得抗原修复后切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,室温敷育20min,得到非特异性蛋白封闭后的切片;

[0030] (7)一抗敷育:将步骤(6)所得非特异性蛋白封闭切片,除阴性对照标准品外,待测样本和阳性对照标准品的各8张切片均甩去步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,并分别滴加步骤(1)d所得一抗工作液,37℃水浴敷育60min,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,然后用步骤(1)a所得1×PBST溶液冲洗3min,得到一抗后的切片;

[0031] (8)二抗敷育:将步骤(7)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)e所得二抗工作液,37℃水浴敷育30min,甩去二抗工作液,然后使用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

[0032] (9)显色:

[0033] a、显色液储存液稀释:取50×DAB溶液,加显色液稀释液稀释50倍,得到显色液工作液;

[0034] b、将步骤(8)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(9)a所得显色液工作液进行显色,得到显色后的切片;

[0035] (10)复染、分化、返蓝:将步骤(9)所得显色后的切片,甩去显色液工作液,滴加复染液复染4min、1%v/v盐酸酒精分化20s、1%v/v氨水中返蓝30s,得到返蓝后的切片;

[0036] (11)脱水、透明化:将步骤(10)所得返蓝后的切片,依次放入70%酒精浸泡2min、80%酒精浸泡2min、95%酒精浸泡2min、100%酒精浸泡2min,脱水后转入二甲苯溶液浸泡3min,再转入另一份二甲苯溶液10min,最后转入另一份二甲苯溶液5min进行透明化处理,得到透明化后的切片;

[0037] (12)封片:将步骤(11)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,用封片剂封片,得到免疫组织化学染色切片,然后采用成像显微镜和病理图片分析软件分析结果,评估子宫内膜容受性是否异常。

[0038] 在上述技术方案的基础上,本发明还可以做如下改进。

[0039] 进一步,步骤(2)所述待测样品为取自活体的人体的子宫内膜。

[0040] 本发明的有益效果是:

[0041] 1.安全性高:本发明的试剂盒,在第一泡沫垫上设置腔体,可供物品容纳并对物品限定,以避免在运输之类的环节中震损诸如载玻片、盖玻片这些易损物品;通过在腔体的对应壁体上凹设的指腔,可有利于操作人员方便而可靠地拿取这些物品。

[0042] 2.密封性好:本发明的试剂盒,在盒盖和盒体相应设置了磁性锁合装置,试剂盒的

密封性好,便于移动和运输。

[0043] 3.使用方便:本发明的试剂盒,盒体的开口设在侧面,有利于试剂的取出,用到哪一层的试剂,就取出哪一层的泡沫垫,而不必像顶部开口的试剂盒,要一层层地取出泡沫垫。

[0044] 4.市场前景广阔:本发明的试剂盒,具有操作简单、灵敏性高、特异性强等特点,且检测结果准确、客观、快捷,能大大提高子宫内膜容受性的评估效率,且结构简单、设计合理、容易制造,市场需求量大,适于规模化生产。

附图说明

[0045] 图1为本发明打开盒盖后的结构示意图。

[0046] 图中,各标号所代表的部件列表如下:

[0047] 1、盒体,2、盒盖,3、隔热板,4、磁性下锁扣,5、磁性上锁扣,6、泡沫垫,61、第一泡沫垫,62、第二泡沫垫,63、第三泡沫垫,7、pH试纸,8、载玻片,9、盖玻片,10、阳性标准品,11、阴性标准品,12、一抗储存液,13、二抗储存液,14、抗体稀释液,15、PBS片剂,16、吐温-20,17、过氧化物酶失活剂储存液,18、非特异性蛋白阻断粉剂,19、显色液储存液,20、显色液稀释液,21、复染液,22、封片剂,23、抗原修复粉剂。

[0048] 图2为本发明在子宫内膜容受性评估中的检测应用。

[0049] 图中,(A)为子宫内膜自然杀伤细胞染色图片,(B)为子宫内膜巨噬细胞染色图片,(C)为子宫内膜T细胞染色图片,(D)为子宫内膜辅助性T细胞染色图片,(E)为子宫内膜杀伤性T细胞染色图片,(F)为子宫内膜调节性T细胞染色图片,(G)为子宫内膜未成熟树突状细胞染色图片,(H)为子宫内膜成熟树突状细胞染色图片。

具体实施方式

[0050] 以下结合附图对本发明的原理和特征进行描述,所举实例只用于解释本发明,并非用于限定本发明的范围。

[0051] 如图1所示,一种评估子宫内膜容受性的试剂盒,包括盒体1和设置在所述盒体1侧面开口处的盒盖2,所述盒体1的底部和四周侧壁设有隔热板3,所述盒盖2内壁设有隔热板3,在盒体1、盒盖2的外端面上相对应的分别设有磁性下锁扣4与磁性上锁扣5,所述盒体1内部设有泡沫垫6和1份使用说明书,所述泡沫垫6上设有2个对照标准品、21瓶试剂、抗原修复粉剂23、pH试纸7、载玻片8和盖玻片9,2个对照标准品分别为阳性标准品10和阴性标准品11,21瓶试剂分别为8瓶一抗储存液12、1瓶二抗储存液13、1瓶抗体稀释液14、1瓶PBS片剂15、1瓶吐温-2016、1瓶过氧化物酶失活剂储存液17、1瓶非特异性蛋白阻断粉剂18、1瓶显色液储存液19、1瓶显色液稀释液20、4瓶复染液21和1瓶封片剂22。

[0052] 所述泡沫垫6包括位于盒体1内部靠上的第一泡沫垫61、位于盒体1内部居中的第二泡沫垫62和位于盒体1内部靠下的第三泡沫垫63,且所述第一泡沫垫61、第二泡沫垫62和第三泡沫垫63上下平行设置,所述第一泡沫垫61上开设有6个分别放置pH试纸7、载玻片8、盖玻片9、阳性对照标准品10、阴性对照标准品11和抗原修复粉剂23且与上述物品的长度相适配的腔体611,在腔体611的长度方向的壁体上并且在彼此对应的位置各凹设有两个指腔6111,所述第二泡沫垫62上开有14个分别放置8瓶一抗储存液12、二抗储存液13、PBS片剂

15、过氧化物酶失活剂储存液17、非特异性蛋白阻断粉剂18、显色液储存液19和封片剂22的圆形的凹槽,所述第三泡沫垫63上开有7个分别放置抗体稀释液14、吐温-2016、显色液稀释液20和4瓶复染液21的圆形的凹槽。

[0053] 每个所述指腔6111形状均为半球形

[0054] 所述阳性对照标准品10为正常育龄妇女子宫内膜组织石蜡块,所述阴性对照标准品11为不含一抗的5%BSA敷育的子宫内膜组织石蜡块。

[0055] 所述一抗储存液12为100×抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100×抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100×抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100×抗人辅助性T细胞表面分子CD4的抗体、100×抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100×抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100×抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100×抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,所述二抗储存液13为100×辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,所述过氧化物酶失活剂储存液17为30%v/v过氧化氢溶液,所述非特异性蛋白阻断粉剂18为白蛋白粉,所述显色液储存液19为50×DAB溶液,所述复染液21为苏木素,所述封片剂22为中性树胶,所述抗原修复粉剂23为Tris/EDTA。

[0056] 所述阳性标准品10为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述阴性对照标准品11为白色自封袋包裹的立方体蜡块,所述一抗储存液12为黑色帽的白色PE塑料管,所述二抗储存液13为黑色帽的白色PE塑料管,所述抗体稀释液14为红色帽的黑色PE塑料瓶,所述PBS片剂15为灰色帽的红色PE塑料瓶,所述吐温-2016为黄色帽的灰色PE塑料瓶,所述过氧化物酶失活剂储存液17为绿色帽的黄色PE塑料管,所述非特异性蛋白阻断粉剂18为蓝色帽的绿色PE塑料瓶,所述显色液储存液19为紫色帽的蓝色PE塑料管,所述显色液稀释液20为白色帽的紫色PE塑料瓶,所述复染液21为绿色帽的黑色PE塑料瓶,所述封片剂22为红色帽的黄色PE塑料管。

[0057] 所述pH试纸7为100张,所述载玻片8为400张,所述盖玻片9为400张,所述阳性标准品10为1块,7g,所述阴性标准品11为1块,7g,所述一抗储存液12为8管,每管各50μL,所述二抗储存液13为1管,300μL,所述抗体稀释液14为1瓶,50mL,所述PBS片剂15为1瓶,15片,所述吐温-2016为1瓶,10mL,所述过氧化物酶失活剂储存液17为1管,5mL,所述非特异性蛋白阻断粉剂18为1瓶,10g,所述显色液储存液19为1管,600μL,所述显色液稀释液20为1瓶,30mL,所述复染液21为4瓶,20mL/瓶,所述封片剂22为1管,10mL,所述抗原修复粉剂23分为20个试剂袋袋装,每袋1.58g。

[0058] 一种如上任一项所述的试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0059] (1)工作液配制:片剂、粉剂溶解,储存液稀释如下:

[0060] a、PBS片剂15溶解:将1片PBS片剂15溶于1000mL超纯水中,得到1×PBS溶液,将1片PBS片剂15溶于1000mL超纯水中,加500μL吐温-2016,得到1×PBST溶液;

[0061] b、非特异性蛋白阻断粉剂18溶解:取0.5g白蛋白粉溶于10mL步骤(1)a所得1×PBST溶液中,得到5%v/v的非特异性蛋白阻断剂工作液;

[0062] c、抗原修复粉剂23溶解:取1袋1.58g Tris/EDTA溶于1000mL超纯水中,加入0.5mL吐温-2016,用pH试纸7监测溶液pH值,调整pH至9.0,得到抗原修复剂工作液;

[0063] d、一抗储存液12稀释:分别取100×抗人自然杀伤细胞表面分子CD56的抗体、100×抗人巨噬细胞表面分子CD68的抗体、100×抗人T细胞表面分子CD3的抗体、100×抗人辅

助性T细胞表面分子CD4的抗体、100×抗人杀伤性T细胞表面分子CD8的抗体、100×抗人调节性T细胞核转录因子Foxp3的抗体、100×抗人未成熟树突状细胞表面分子CD1a的抗体、100×抗人成熟树突状细胞表面分子CD83的抗体,加抗体稀释液14稀释100倍,得到一抗工作液;

[0064] e、二抗储存液13稀释:取100×辣根过氧化物酶标记的IgG抗体,加抗体稀释液14稀释100倍,得到二抗工作液;

[0065] f、过氧化物酶灭活剂储存液17稀释:取30%v/v的过氧化氢溶液,加超纯水稀释10倍,得到3%v/v的过氧化物酶灭活剂工作液;

[0066] (2)石蜡切片脱蜡:将取自活体的人体的子宫内膜的待测样本、阳性对照标准品10和阴性对照标准品11的各8张切片先放入250mL二甲苯中浸泡10min,再放入另一份250mL二甲苯中浸泡5min,无水酒精与二甲苯等体积混合溶液中浸泡3min,得到脱蜡后切片;

[0067] (3)水化:将步骤(2)所得脱蜡后切片,依次放入100%酒精浸泡2min,95%酒精浸泡2min,另一份95%酒精浸泡2min,80%酒精浸泡2min,然后用步骤(1)a所述的1×PBS溶液冲洗3min,得到水化后的切片;

[0068] (4)内源性过氧化物酶失活:将步骤(3)所得水化后的切片,甩去多余的液体,浸泡在步骤(1)f所得过氧化物酶灭活剂工作液中15min,再用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到内源性过氧化物酶灭活后的切片;

[0069] (5)抗原修复:将步骤(1)c所得抗原修复剂工作液放入耐高温容器中,再将步骤(4)所得内源性过氧化物酶灭活后的切片置于其中,煮沸15min,放置室温冷却,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到抗原修复后的切片;

[0070] (6)封闭:将步骤(5)所得抗原修复后切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,室温敷育20min,得到非特异性蛋白封闭后的切片;

[0071] (7)一抗敷育:将步骤(6)所得非特异性蛋白封闭切片,除阴性对照标准品11外,待测样本和阳性对照标准品10的各8张切片均甩去步骤(1)b所得非特异性蛋白阻断剂工作液,并分别滴加步骤(1)d所得一抗工作液,37℃水浴敷育60min,然后用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,然后用步骤(1)a所得1×PBST溶液冲洗3min,得到一抗后的切片;

[0072] (8)二抗敷育:将步骤(7)所得一抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(1)e所得二抗工作液,37℃水浴敷育30min,甩去二抗工作液,然后使用步骤(1)a所得1×PBS溶液冲洗,每次3min,洗3次,得到二抗后的切片;

[0073] (9)显色:

[0074] a、显色液储存液19稀释:取50×DAB溶液,加显色液稀释液20稀释50倍,得到显色液工作液;

[0075] b、将步骤(8)所得二抗后的切片,甩去多余的液体,滴加步骤(9)a所得显色液工作液进行显色,得到显色后的切片;

[0076] (10)复染、分化、返蓝:将步骤(9)所得显色后的切片,甩去显色液工作液,滴加复染液21复染4min、1%v/v盐酸酒精分化20s、1%v/v氨水中返蓝30s,得到返蓝后的切片;

[0077] (11)脱水、透明化:将步骤(10)所得返蓝后的切片,依次放入70%酒精浸泡2min、80%酒精浸泡2min、95%酒精浸泡2min、100%酒精浸泡2min,脱水后转入二甲苯溶液浸泡

3min,再转入另一份二甲苯溶液10min,最后转入另一份二甲苯溶液5min进行透明化处理,得到透明化后的切片;

[0078] (12)封片:将步骤(11)所得透明化后的切片,甩去多余的液体,用封片剂22封片,得到免疫组织化学染色切片,然后采用成像显微镜和病理图片分析软件分析结果,评估子宫内膜容受性是否异常。

[0079] 采用成像显微镜和病理图片分析软件评估子宫内膜容受性是否异常,具体操作如下:采用成像显微镜采集不重叠的20个视野的200倍图片;将所得8种免疫细胞的图片导入病理图片定量分析系统中进行分析。在病理图片定量分析系统中,设定细胞的大小为55~400像素,细胞核的苏木素染色强度需大于0.15,系统综合两个指标对所采集图片中总细胞进行识别并计数;组织中阳性细胞呈现醒目的棕黄色,系统将显示阳性细胞棕黄色的光密度值,系统将大于此值的所有细胞识别为阳性细胞并计数;根据阳性细胞数和总细胞数计算阳性细胞率。将待测样本的8种免疫细胞率与参考范围进行比较,进而判断待测样本的子宫内膜容受性。

[0080] 其中,自然杀伤细胞率参考范围为0.97~21.15%;巨噬细胞率参考范围为0.5~2.65%,T细胞率参考范围为1.12~9.10%,辅助性T细胞率参考范围为0.10~0.50%,杀伤性T细胞率参考范围为0.81~5.45%,调节性T细胞率参考范围为0.05~0.26%,未成熟树突状细胞率参考范围为0.006~0.140%,成熟树突状细胞率参考范围为0.07~4.01%。当待测样本的任一免疫细胞率超过其参考范围时,提示该待测样本的子宫内膜容受性异常。

[0081] 如图2所示,子宫内膜免疫细胞定量检测试剂盒在子宫内膜容受性评估中的应用,其中,(A)为自然杀伤细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为5.82%;(B)为巨噬细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.7%;(C)为T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为2.19%;(D)为辅助性T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.3%;(E)为杀伤性T细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,均匀分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为1.64%;(F)为调节性T细胞,其细胞核内呈现棕黄色,零星分布于子宫内膜基质细胞中,细胞率为0.02%;(G)为未成熟树突状细胞的,其细胞核周围呈现棕黄色,分布于靠近腺体的位置,细胞率为0.044%;(H)为成熟树突状细胞,其细胞核周围呈现棕黄色,并且细胞呈现两种分布方式,即单个细胞分布以及成簇分布,细胞率为3.04%。其中,调节性T细胞率为0.02%,低于参考范围0.05~0.26%,提示该样本的子宫内膜容受性异常。

[0082] 以上所述仅为本发明的较佳实施例,并不用以限制本发明,凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

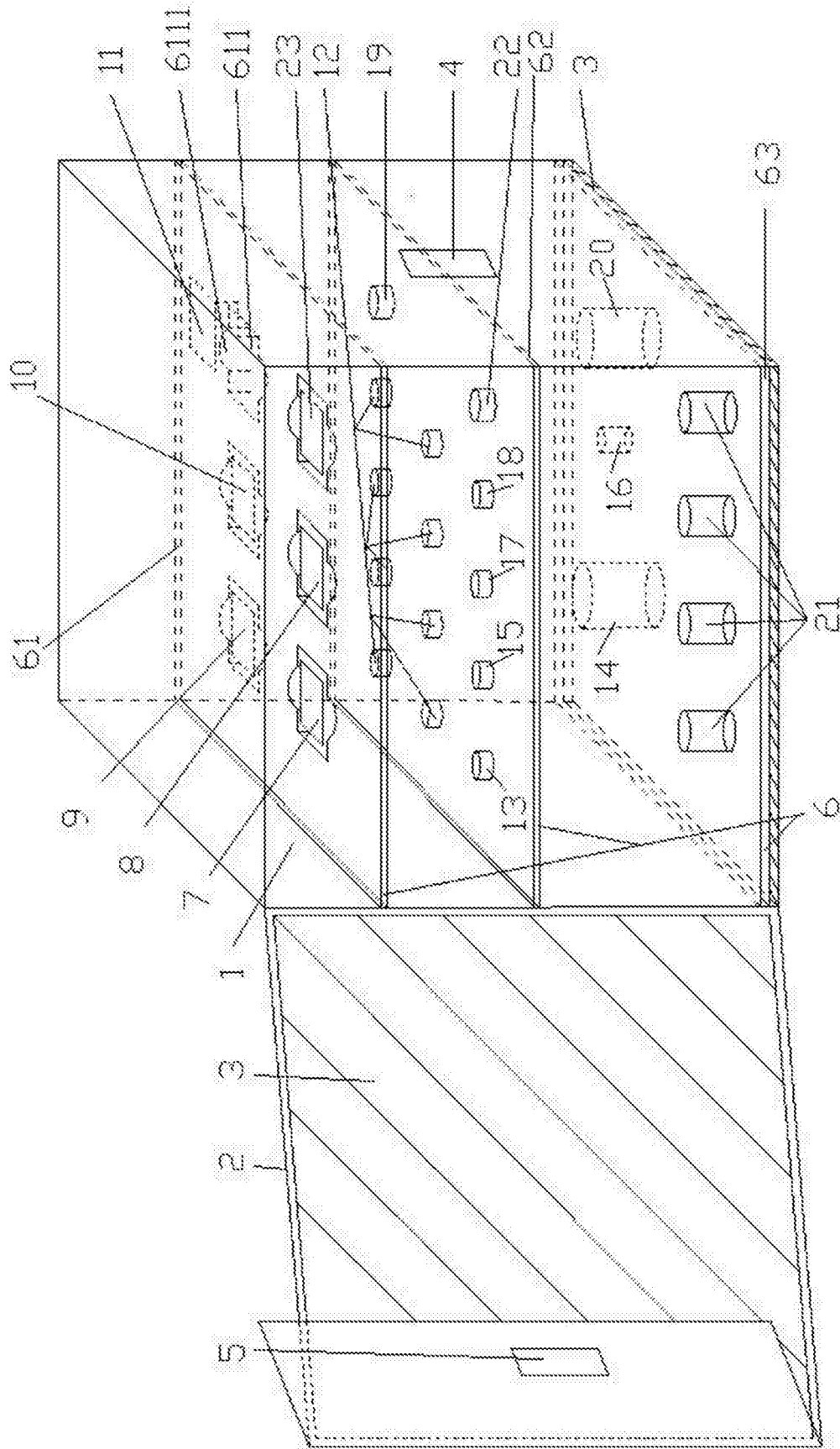


图1

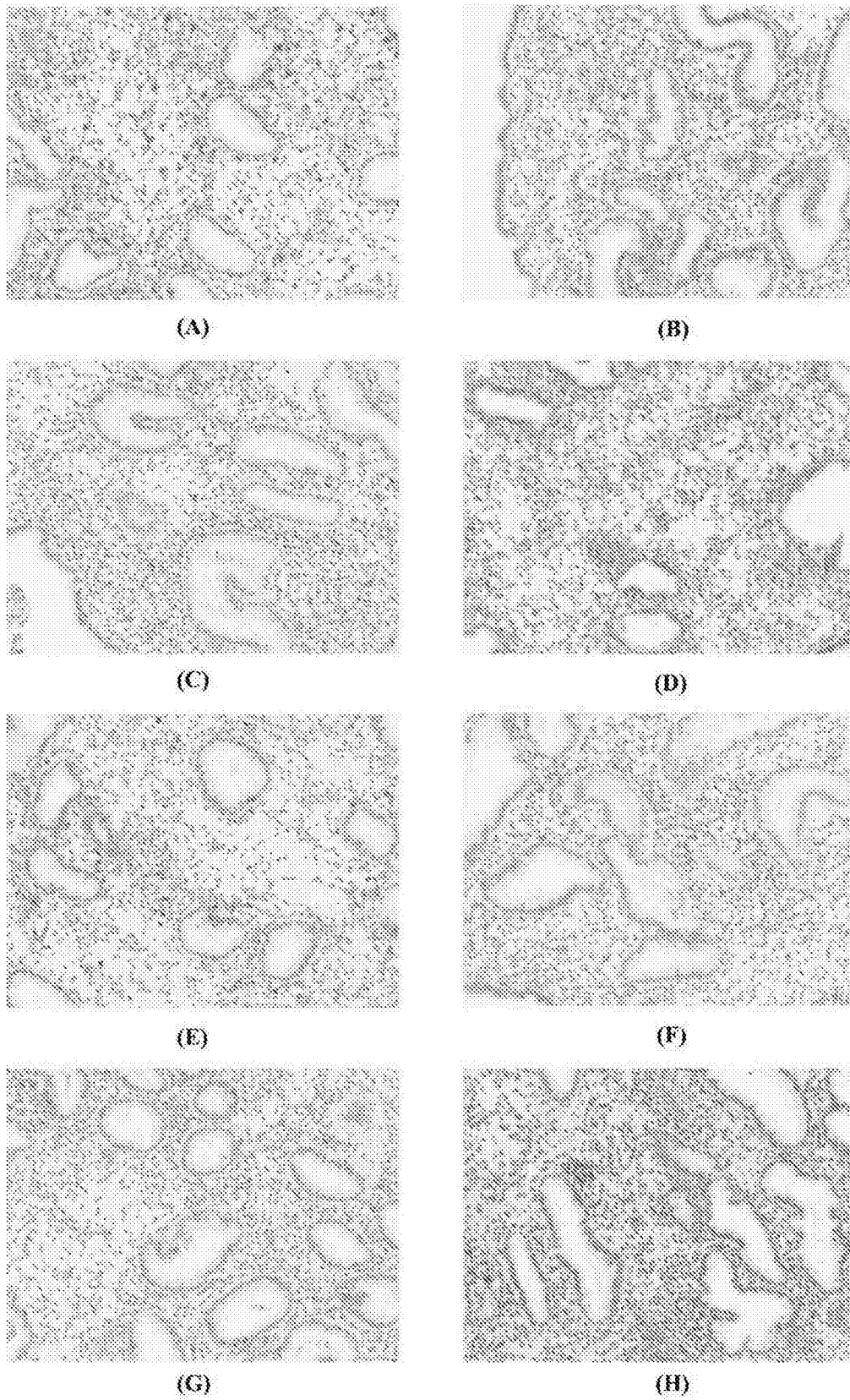


图2

专利名称(译)	一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN105784983A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610021908.X	申请日	2016-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
当前申请(专利权)人(译)	深圳中山生殖与遗传研究所		
[标]发明人	黄春宇 刁梁辉 陈现 李玉叶 连若纯 陈聪		
发明人	黄春宇 刁梁辉 陈现 李玉叶 连若纯 陈聪		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N2800/367 G01N2800/368		
代理人(译)	杨伦		
其他公开文献	CN105784983B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种评估子宫内膜容受性的试剂盒及其使用方法，属于医学和生物学检测领域。其包括盒体和设置在所述盒体侧面开口处的盒盖，所述盒体的底部和四周侧壁设有隔热板，所述盒盖内壁设有隔热板，在盒体、盒盖的外端面上相对应的分别设有磁性下锁扣与磁性上锁扣，所述盒体内部设有泡沫垫和1份使用说明书，所述泡沫垫上设有2个对照标准品、21瓶试剂、抗原修复粉剂、pH试纸、载玻片和盖玻片。本发明还公开了上述试剂盒的使用方法。本发明具有操作简单、灵敏度高、特异性强等特点，且检测结果准确、客观、快捷。

