



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112105909 B

(45) 授权公告日 2021.10.26

(21) 申请号 201980028230.X

(22) 申请日 2019.02.14

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112105909 A

(43) 申请公布日 2020.12.18

(30) 优先权数据
10-2018-0048947 2018.04.27 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.26

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/KR2019/001822 2019.02.14

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/208920 KO 2019.10.31

(73) 专利权人 韩国化学研究院
地址 韩国大田市

(72) 发明人 朴淳铉 金基锡

(74) 专利代理机构 北京瑞恒信达知识产权代理
事务所(普通合伙) 11382

代理人 李琰

(51) Int.Cl.
G01N 1/30 (2006.01)
G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/483 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 106323708 A, 2017.01.11
US 2008038822 A1, 2008.02.14
US 2017370811 A1, 2017.12.28
CN 107621462 A, 2018.01.23
李俊. 透明化大尺度生物组织快速免疫染色
方法研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库
基础科学辑》.2017,
朱佳杰;沈夏霜;付强;周宇;谭芸. 吉富罗非
鱼肝脏蛋白质组双向电泳技术的建立与优化.
《西南农业学报》.2013,

审查员 于丹

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

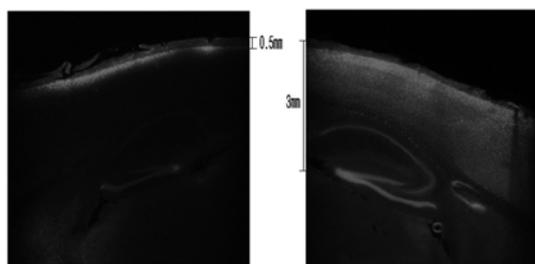
用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物和用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法

(57) 摘要

本发明涉及用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物和利用该组合物对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法。所述用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物增加在透明化的生物组织、尤其是厚度为3mm或更大的大生物组织中的抗体渗透性,以允许抗体深入渗透到厚组织中,由此克服现有方法中与抗体渗透受限相关的免疫染色问题;缩短对大组织进行免疫染色所需的时间,由此能够对大生物组织进行简单、快速的高分辨率三维生物成像;以及通过结构图像,可有利地用于鉴别各种疾病的病因、开

发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,所述用于对透明化的大组织免疫染色的组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其可制备为试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

1% Triton X-100 的 PBS 溶液 20% DMSO+1% Triton X-100+50mM Tris 的蒸馏水溶液



位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

1. 一种用于对透明化的生物组织进行免疫染色的方法,所述方法包括以下步骤:

用由CHAPS (3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐)和尿素组成的混合物透明化厚度为3mm或更大的生物组织;

用包含DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物处理所述透明化的厚度为3mm或更大的生物组织(步骤1);和

用第二抗体处理步骤1中处理的所述透明化的生物组织(步骤2)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述第一抗体通过所述步骤1渗透到所述生物组织中。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述方法使所述厚度为3mm或更大的透明化的大生物组织能够进行三维成像。

4. 一种用于对透明化的生物组织免疫染色的试剂盒,所述试剂盒包含:

一种包含由CHAPS (3-[(3-胆酰胺基丙基)二甲基氨基]-1-丙磺酸盐)和尿素组成的混合物的用于透明化生物组织的组合物,和

一种用于对被所述用于透明化的组合物透明化的厚度为3mm或更大的生物组织进行免疫染色的组合物;

其中,所述用于免疫染色的组合物包含DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体。

用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物和用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物和利用该组合物对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法。

背景技术

[0002] 通过诸如CT或MRI的二维扫描、再将扫描图像重建成三维图像进行三维观察的过程,通过x射线的医学诊断技术已经发展成一种非常精确的诊断方法。一种既利用光源又利用超声实现三维图像的技术活跃地用于诊断。然而,目前大多数的技术的显微分辨率都是毫米级,这表明它们不能满足能够实现细胞水平分析的显微级别的三维观察。因此,目前的细胞水平分析大多依赖于传统的二维方法。也就是说,像活检或尸检组织这样的生物组织用固定剂固定,然后用石蜡或聚合物包埋。将样品切成几微米或纳米厚的切片,以便光或电磁波能够通过。然后,通过利用光学显微镜或电子显微镜观察透射的图像,分析微观结构。

[0003] 为了获得利用这种显微成像技术的三维图像,需要共焦显微镜。在这种情况下,可以获得数十微米级别的厚度信息。大体上,该厚度受光源能够穿透的深度的限制。生物组织中的大部分重要结构至少有几百微米大小,这使得用上述传统的方法只能获得一部分信息。因此,为了获得较厚组织的图像,需要依次制备一系列数十微米厚的切片,然后用显微镜对每个切片进行成像和重建。对于脑组织中整个神经元的成像,在组织切割和重建过程中尤其存在问题,因为一个神经元可以将其轴突伸展长达几米。

[0004] 组织透明化技术是一种可以在不破坏组织的情况下研究组织内部结构和蛋白质分布的技术。因此,克服了传统方法的局限性,组织透明化技术在对组织结构进行更深入的观察以及探究来自不同系统的结构和分子的完整信息的许多方面都取得了进展。

[0005] 在上述方法中,将一种水凝胶载体渗透入组织中。当水凝胶浓度增加时,与蛋白质的结合程度增加,并且因为形成了致密的网状结构,结构变得坚硬。另一方面,当组织变硬时,表面活性剂使脂质逸出变得困难,所以透明化就变得需耗费更长的时间。此外,该方法存在导致空气和黑色颗粒沉积在组织表面或使组织变为黄色的问题。还有,由于可能一次只进行一个脑透明化,因此会造成大量的经济和时间损失。一个更大的问题是抗体染色很难渗透到形成网状结构的聚丙烯酰胺之间。

[0006] 最近,本发明的发明人开发了一种利用SunHyun 3D图像工具包、基于CHAPS+尿素的新方法。这种方法不需要传统方法进行组织透明化所具有的任何有害或特殊的技术、设备或技术诀窍,并且可以根据试验方案中给出的顺序通过使用一种溶液来容易地使组织透明化。此外,该方法能够以相比传统组织透明化方法更高的抗体渗透性对透明化的组织免疫染色。

[0007] 然而,所述利用SunHyun 3D图像工具包的组织透明化方法和到目前为止现有方法的最大问题是,这些方法在使用抗体对大于1mm的组织实现免疫染色方面是受限制的。原因是由于透明化所用的溶液、水凝胶杂化形式和大组织的厚度而使抗体难以扩散和渗透。最

近,人们致力于克服免疫染色的局限性。具有代表性的是,抗体在用于CLARITY的水凝胶杂化形式中的渗透性存在很大的问题,并且2016年,蛋白质组扩增分析(MAP)显示,通过将体积增大到基本组织的近4倍,抗体渗透性增加。然而,这种方法有一个致命的缺点,即荧光亮度显著降低,是传统方法的1/64,而且因为透明化过程通过将组织在95℃以上煮沸,蛋白质、DNA和RNA几乎全被破坏和消失。在为了克服使用有机溶剂的限制而发展起来的uDisco方法中,通过将抗体渗透到1mm大小的组织中进行免疫染色需要超过一个月的时间。然而,这种方法并没有被研究人员普遍采用或者从研究成果中衍生,也不是一种商业可得的方法。用于二维薄切片样品的免疫染色方法在三维透明化的大组织中的应用存在局限。因此,为了利用免疫染色技术在透明化的大组织中获得三维生物图像,开发一种适用于透明化的大组织的免疫染色组合物和方法是绝对必要的。

[0008] 相关现有技术文献如下:

[0009] 专利参考文献1:国际公开公报W0 2016/108359;

[0010] 非专利参考文献1:Chung K,等.(2013)Nature 497(7449):332-337;

[0011] 非专利参考文献2:Lee H,等.BMC Developmental Biology 2014 14:781;

[0012] 非专利参考文献3:Taeyun Ku.,等.Nat Biotech.2016,doi:10.1038/nbt.3641;

[0013] 非专利参考文献4:Pan C,等.Nat Methods.(2016)10(13):859-67。

发明内容

[0014] 本发明的目的是提供一种用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物。

[0015] 本发明的另一个目的是提供一种用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法。

[0016] 为了实现上述目的,在本发明的一个方面,本发明提供一种用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的组合物,所述组合物包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液。

[0017] 在本发明的另一方面,本发明提供一种用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法,所述方法包括以下步骤:

[0018] 用所述用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的组合物处理透明化的大生物组织(步骤1);和

[0019] 用第二抗体处理步骤1中处理的透明化的大生物组织(步骤2)。

[0020] 在本发明的另一方面,本发明提供一种用于对透明化的生物组织进行免疫染色的试剂盒,所述试剂盒包含所述用于免疫染色的组合物。

[0021] 有益效果

[0022] 所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述组合物增加在透明化的生物组织、尤其是厚度为3mm或更大的大生物组织中的抗体渗透性,以允许抗体深入渗透到厚组织中,由此克服现有方法中与抗体渗透受限相关的免疫染色问题;缩短对大组织进行免疫染色所需的时间,从而能够对大生物组织进行简单、快速的高分辨率三维生物成像;以及通过结构图像,可有利地用于鉴别各种疾病的病因、开发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,所述用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其

可制备为试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

附图说明

[0023] 图1是一组照片,显示了在制备例1中制备的透明化小鼠脑的图像。

[0024] 图2是一组照片,显示了透明化的脑组织的图像,其中DNA用DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)染色。

[0025] 图3是一组照片,显示了免疫染色结果在Microscopy Lightsheet Z.1中用5倍物镜的染色图像,所述免疫染色使用NeuN(一种用作神经元标记物的神经元核染色抗体)作为第一抗体,驴抗兔IgG Alexa Fluor-647作为第二抗体。

具体实施方式

[0026] 以下,详细描述本发明。

[0027] 本发明的一个目的是提供一种用于对透明化的大生物组织进行免疫染色的组合物。特别地,本发明的一个目的是提供一种用于免疫染色的组合物,该组合物由于增加抗体渗透性和改善第一抗体渗透性,使得能够对厚度为3mm或更大的大生物组织的内部进行清晰、高分辨率三维成像。

[0028] 为了实现上述目的,在本发明的一个方面,本发明提供一种用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,所述组合物包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砜)、Triton X-100和第一抗体的水溶液。

[0029] 基于组合物的总计100体积份,所述组合物可含有5-50体积份的DMSO,优选10-40体积份的DMSO,更优选20体积份的DMSO。

[0030] 如果包括少于5体积份的DMSO,则第一抗体不会足够深入地渗透到透明化的生物组织中,以致无法获得能够对厚度为3mm或更大的大生物组织的内部进行清晰、高分辨率三维成像的免疫染色组合物。另一方面,如果包括多于50体积份的DMSO,则可发生第一抗体的淬灭,使免疫染色困难。

[0031] 基于组合物的总计100体积份,所述组合物可含有0.01-10体积份的Triton X-100,优选0.1-5体积份的Triton X-100,更优选1体积份的Triton X-100。

[0032] 如果包括少于0.01体积份的Triton X-100,则在细胞膜中开孔可存在问题。另一方面,如果包括多于10体积份的Triton X-100,则组织的尺寸将会太小,因而会降低抗体渗透性。

[0033] 为了防止所含过量的DMSO淬灭第一抗体,所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物还可含有Tris(三(羟甲基)氨基甲烷),但并不总是限于此。

[0034] Tris可进一步以0.01-10% (w/v) 的浓度包含在所述组合物中。例如,当所述组合物总计为100mL时,可含有0.01-10g的Tris。

[0035] 此外,Tris可进一步以0.1-5% (w/v) 的浓度、优选1% (w/v) 的浓度包含在所述组合物中。Tris能防止DMSO淬灭第一抗体。如果包括少于0.01% (w/v) 的Tris,则可发生抗体的变性(degeneration)。另一方面,如果包括多于10% (w/v) 的Tris,则可因为使组织的尺寸减小而抗体渗透性出现问题。

[0036] 所述生物组织可以由源自从活体分离的脑、血管、肝、肺、肾、胰腺、心脏和肠的细

胞构成,但并不总是限于此。

[0037] 另外,所述生物组织可以是厚度为3mm或更大的大组织。

[0038] 所述组合物能够在厚度为3mm或更大的透明化的大生物组织中增加抗体渗透性和改善免疫染色的分辨率。

[0039] 透明化可以通过常规的组织透明化方法来进行,并且本发明的组合物不以组织的透明化本身为特征,因此所述透明化方法不受特别限制。

[0040] 利用所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物对透明化的生物组织进行免疫染色的结果是,证实了在厚度为3mm或更大的透明化的大生物组织中,免疫染色的深度为3mm或更大。此外,在Microscopy Lightsheet Z.1中使用5倍物镜,免疫染色图像和GFP(绿色荧光蛋白)信号得到了确认(见实验例1和图3)。

[0041] 以上结果表明,抗体渗透性问题(这是传统组织透明化方法存在的问题)已得到解决。此外,还实现了高清晰度的免疫染色成像,从而可以获得高分辨率的图像。

[0042] 因此,本发明用于对透明化的组织免疫染色的组合物可用于各种疾病的标记物发现和采用磷酸化活性测量的机制研究,并且可应用于各种脑成像研究。

[0043] 由此,所述用于对透明化的生物组织免疫染色的组合物,包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述组合物增加在透明化的生物组织、尤其是厚度为3mm或更大的大生物组织中的抗体渗透性,以允许抗体深入渗透到厚组织中,由此克服现有方法中与抗体渗透受限相关的免疫染色问题;缩短对大组织进行免疫染色所需的时间,从而能够对大生物组织进行简单、快速的高分辨率三维生物成像;以及通过结构图像,可有利地用于鉴别各种疾病的病因、开发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,所述用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其可制备为试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

[0044] 在本发明的另一方面,本发明提供一种用于对透明化的生物组织进行免疫染色的方法,所述方法包括以下步骤:

[0045] 用所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物处理透明化的生物组织(步骤1);和

[0046] 用第二抗体处理步骤1中处理的透明化的生物组织(步骤2)。

[0047] 本发明的所述免疫染色方法使用用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,所述组合物包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述DMSO具有显著增加抗体渗透性的作用。

[0048] 根据用于透明化的生物组织的常规免疫染色技术,由于透明化所用的溶液、水凝胶杂化形式以及大组织的厚度,抗体难以扩散和渗透,因此厚度为1mm或更大的组织很难进行免疫染色。本发明解决了这个问题,并且通过使用本发明所述的组合物,即使在厚度为3mm或更大的大生物组织中也可以促进抗体的扩散和传递。因此,由于第一抗体深入渗透到生物组织的内部,因此具有在随后用第二抗体处理时获得组织内部深处的清晰、高分辨率三维图像这一优势。

[0049] 此外,就免疫染色所需的时间而言,在对厚度为1mm或更大的组织进行免疫染色时,透明化的生物组织的常规免疫染色技术要求进行预处理步骤以增加抗体渗透性。即使组织不厚,通常也需要进行延长的预处理操作,并且存在这样的问题:该方法不仅比本发明

增加了更多的步骤,而且整个方法也需要几个月的完成时间。本发明解决了这一问题,并且通过使用本发明的组合物,可以在不进行任何预处理步骤的情况下进行免疫染色,并且与现有技术相比,厚度为3mm或更大的大组织的免疫染色时间可以显著缩短,因此具有获得组织内部深处的清晰、高分辨率三维图像这一优势。也就是说,本发明的方法不需要任何预处理,并且通过使用本发明的组合物,具有可以简单、容易地增加抗体渗透性的优势。

[0050] 以下,详细描述所述免疫染色方法。

[0051] 所述免疫染色方法的步骤1是通过将生物组织浸入用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物中,使第一抗体渗透到生物组织中的步骤,所述组合物包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砜)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述DMSO具有显著增加抗体渗透性的作用。

[0052] 特别地,基于组合物的总计100体积份,所述组合物可含有5-50体积份的DMSO,优选10-40体积份的DMSO,更优选20体积份的DMSO。

[0053] 如果包括少于5体积份的DMSO,则第一抗体不会足够深入地渗透到透明化的生物组织中,以致无法获得能够对厚度为3mm或更大的大生物组织的内部进行清晰、高分辨率三维成像的免疫染色组合物。另一方面,如果包括多于50体积份的DMSO,则可发生第一抗体的淬灭,使免疫染色困难。

[0054] 基于组合物的总计100体积份,所述组合物可含有0.01-10体积份的Triton X-100,优选0.1-5体积份的Triton X-100,更优选1体积份的Triton X-100。

[0055] 如果包括少于0.01体积份的Triton X-100,则在细胞膜中开孔可存在问题。另一方面,如果包括多于10体积份的Triton X-100,则组织的尺寸将会太小,因而会降低抗体渗透性。

[0056] 所述组合物可进一步包括Tris(三(羟甲基)氨基甲烷)。

[0057] 因此,本发明的免疫染色方法可以通过顺利地执行步骤1来执行步骤2,并且仅当采用含有上述范围的DMSO和Triton X-100的所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物时,才能对厚度为3mm或更大的大生物组织的内部进行清晰、高分辨率三维成像。

[0058] 在步骤1中,所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物可进一步含有Tris(三(羟甲基)氨基甲烷),目的是防止所含过量DMSO淬灭第一抗体,但并不总是限于此。

[0059] Tris可进一步以0.01-10% (w/v) 的浓度包含在所述组合物中。例如,当所述组合物总计为100mL时,可含有0.01-10g的Tris。

[0060] 此外,Tris可进一步以0.1-5% (w/v) 的浓度、优选1% (w/v) 的浓度包括在所述组合物中。Tris能防止DMSO淬灭第一抗体。如果包括少于0.01% (w/v) 的Tris,则可发生抗体的变性。另一方面,如果包括多于10% (w/v) 的Tris,则可因为使组织的尺寸减小而抗体渗透性出现问题。

[0061] 另外,在步骤1中,生物组织的透明化可以通过常规的组织透明化来进行,并且本发明的方法不以组织的透明化本身为特征,因此所述透明化方法不受特别限制。

[0062] 所述免疫染色方法的步骤2是用第二抗体处理生物组织的步骤,其中由于执行步骤1,第一抗体已经渗入所述组织。

[0063] 本发明的免疫染色方法的特征在于步骤1,因此第二抗体处理的步骤不限于特定的方法,该步骤可以由本领域技术人员所采用的常规方法来完成。

[0064] 所述生物组织可以由源自从活体分离的脑、血管、肝、肺、肾、胰腺、心脏和肠的细胞构成,但并不总是限于此。

[0065] 另外,所述生物组织可以是厚度为3mm或更大的大组织。

[0066] 所述组合物能够在厚度为3mm或更大的透明化的大生物组织中增加抗体渗透性和改善免疫染色的分辨率。

[0067] 使用所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的方法对透明化的生物组织进行免疫染色的结果是,证实了在厚度为3mm或更大的透明化的大生物组织中,免疫染色的深度为3mm或更大。此外,在Microscopy Lightsheet Z.1中使用5倍物镜,免疫染色图像和GFP(绿色荧光蛋白)信号得到了确认(见实验例1和图3)。

[0068] 以上结果表明,抗体渗透性问题(这是传统组织透明化方法存在的问题)已得到解决。此外,还实现了高清晰度的免疫染色成像,从而可以获得高分辨率的图像。

[0069] 因此,本发明所述用于免疫染色的方法可用于各种疾病的标记物发现和采用磷酸化活性测量的机制研究,并且可应用于各种脑成像研究。

[0070] 因此,所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述组合物增加在透明化的生物组织、尤其是厚度为3mm或更大的大生物组织中的抗体渗透性,以允许使得抗体深入渗透到厚组织中,由此克服现有方法中与抗体渗透有限相关的免疫染色问题;缩短对大组织进行免疫染色所需的时间,从而能够对大生物组织进行简单、快速的高分辨率三维生物成像;以及通过结构图像,可有利地用于鉴别各种疾病的病因、开发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,所述用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其可制备为试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

[0071] 在本发明的另一方面,本发明提供一种用于对透明化的生物组织进行免疫染色的试剂盒,所述试剂盒包含所述用于免疫染色的组合物。

[0072] 以下,将通过以下实施例和实验例详细描述本发明。

[0073] 然而,以下实施例和实验例仅用于说明本发明,并且本发明的内容不限于此。

[0074] 制备例1:制备透明化的生物组织

[0075] 透明化的生物组织按以下方法制备。本说明书中所述的所有动物试验均按照韩国毒理学研究所动物资源委员会的指南(批准号:RS17003)进行。

[0076] 具体地,成年小鼠(8周龄)用吸入麻醉剂异氟醚(1cc/min)麻醉。通过尾静脉注射凝集素-488(Cat#DL1174)对小鼠血管进行染色。注射凝集素后5分钟,灌注50ml冰冷的1×PBS(磷酸盐缓冲盐水),然后再次灌注含有4%PFA的冰冷的PBS。摘取器官,浸泡于4%多聚甲醛和PFA溶液,然后4℃下孵育12小时。此处,冰冷条件所述的温度不受限制,但优选-20℃~40℃。

[0077] 接下来,用50ml PBS洗涤样品两次。经固定的样品在含CHAPS(20%w/v)和尿素(60w/v)的PBS混合溶液中,220rpm、37℃下孵育3天。

[0078] 将脑样品从CHAPS和尿素的混合物中转移到三级蒸馏水中,用50ml三级蒸馏水洗涤3次,用时12小时。将脑样品转移到CHAPS和尿素的混合物(一种固定溶液)中后,观察到脑被透明化,结果如图1所示。

[0079] 图1是一组照片,显示了在制备例1中制备的透明化小鼠脑的图像。

[0080] 如图1所示,证明了小鼠脑组织已完全透明化。

[0081] 实施例1:利用用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物对生物组织免疫染色

[0082] 利用本发明所述的用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,通过以下方法对制备例1中制备的透明化的组织进行免疫染色。

[0083] 步骤1:制备用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物

[0084] 通过将神经元标记物抗体NeuN (Cat#ab177487) 作为第一抗体按照1:100的比率,处理到由20% (v/v) DMSO、1% (v/v) Triton X-100、50mM Tris和蒸馏水组成的组合物 (20mL DMSO、79mL蒸馏水、1mL Triton X-100和0.65g Tris) 中,制备用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物。

[0085] 步骤2:所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物的处理(第一抗体的处理)

[0086] 通过用50mL蒸馏水替换3次,将制备例1中得到的所述透明化的组织孵育12小时。将所述组织样品浸入步骤1中得到的所述组合物中,并用第一抗体处理。用第一抗体处理后,所述组织样品在4℃下孵育7天。

[0087] 步骤3:第二抗体的处理

[0088] 在步骤2中用第一抗体处理后,所述组织样品再次用蒸馏水洗涤12小时。组织样品用含有PBS (磷酸盐缓冲盐水)、0.1% TritonX-100、DAPI (Cat#D5942 Sigma) 和驴抗兔IgG Alexa Fluor-647 (作为第二抗体) 的水溶液处理,然后在4℃下振荡孵育7天。7天后,为了去除样品中结合的非特异性抗体,在4℃下振荡的条件下,将组织样品用含有PBS和0.1% TritonX-100的水溶液洗涤12-24小时。经洗涤的样品放入CHAPS和尿素的混合溶液(一种固定溶液)中,然后孵育12小时。此处,DAPI处理组为化学染色组,其是用于在免疫染色和化学染色之间比较抗体渗透性的比较组。

[0089] 比较例1:采用TritonX-100对生物组织进行免疫染色

[0090] 采用TritonX-100通过以下方法对制备例1中制备的透明化的生物组织进行免疫染色。

[0091] 以与实施例1中所述的相同方式对生物组织进行免疫染色,除了采用含有1% TritonX-100的PBS代替由20% DMSO、1% Triton X-100、50mM Tris和蒸馏水组成的组合物。

[0092] 实验例1:确认免疫染色的生物组织的荧光

[0093] 为了确认实施例1和比较例1中制备的免疫染色的生物组织的荧光,在Microscopy Lightsheet Z.1中使用5倍物镜,观察小鼠脑内用作神经元标记物的DAPI和NeuN抗体的免疫染色荧光信号。使用DAPI (Cat#D5942 Sigma) (化学染色) 的免疫染色组织如图2所示,使用驴抗兔IgG Alexa Fluor-647 (抗体染色) 的免疫染色组织如图3所示。

[0094] 图2是一组照片,显示了透明化的脑组织的图像,其中DNA用DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 染色。

[0095] 如图2所示,在用DAPI进行化学染色的情况下,证实两种组合物之间没有显著差异。

[0096] 图3是一组照片,显示了免疫染色结果在Microscopy Lightsheet Z.1中用5倍物镜的染色图像,所述免疫染色使用NeuN(一种用作神经元标记物的神经元核染色抗体) 作为

第一抗体,驴抗兔IgG Alexa Fluor-647作为第二抗体。

[0097] 如图3所示,在使用驴抗兔IgG Alexa Fluor-647进行抗体染色的情况下,证实浸入比较例1的所述组合物(由1%TritonX-100和1X-PBS组成的组合物)中的样品的免疫染色深度为0.5mm,但样品浸入实施例1的组合物(蒸馏水中的20%DMSO、1%Triton X-100和50mM Tris的组合物),即本发明所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,免疫染色深度为3mm或更深。

[0098] 以上结果表明,抗体渗透性问题(这是传统组织透明化方法存在的问题)已得到解决。此外,还实现了高质量的免疫染色成像,显示可以获得高分辨率的图像。

[0099] 此外,在图3中,在Microscopy Lightsheet Z.1中使用5倍物镜,免疫染色图像和GFP(绿色荧光蛋白)信号得到了确认。因此,本发明所述用于对透明化的组织进行免疫染色的组合物可用于各种疾病的标记物发现和使用磷酸化活性测量的机制研究,并且可应用于各种脑成像研究。

[0100] 因此,所述用于对透明化的生物组织进行免疫染色的组合物,包含其中溶解了DMSO(二甲基亚砷)、Triton X-100和第一抗体的水溶液,所述组合物增加在透明化的生物组织、尤其是厚度为3mm或更大的大生物组织中的抗体渗透性,以允许抗体深入渗透到厚组织中,由此克服现有方法中与抗体渗透受限相关的免疫染色问题;缩短对大组织进行免疫染色所需的时间,从而能够对大生物组织进行简单、快速的高分辨率三维生物成像;以及通过结构图像,可有利地用于鉴别各种疾病的病因、开发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,所述用于对透明化的大组织免疫染色的组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其可制备成试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

[0101] 工业实用性

[0102] 本发明所述的用于对透明化的大组织进行免疫染色的组合物以及利用该组合物对透明化的大生物组织进行免疫染色的方法能够对大生物组织进行高分辨率三维生物成像,并且通过结构图像,可以有利地用于鉴别各种疾病的病因、开发新的治疗方法以及预测药物的疗效和毒性。此外,本发明的所述组合物可与各种医疗设备组合使用,尤其可制备成试剂盒并有利地用作体外诊断装置。

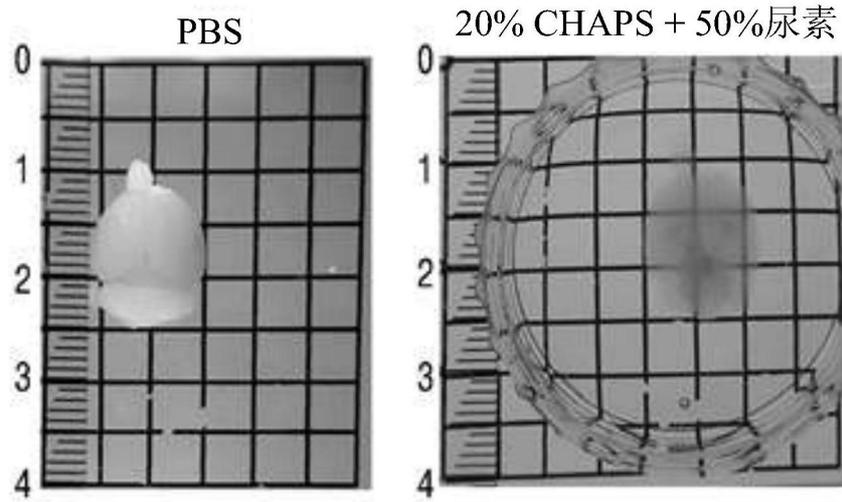
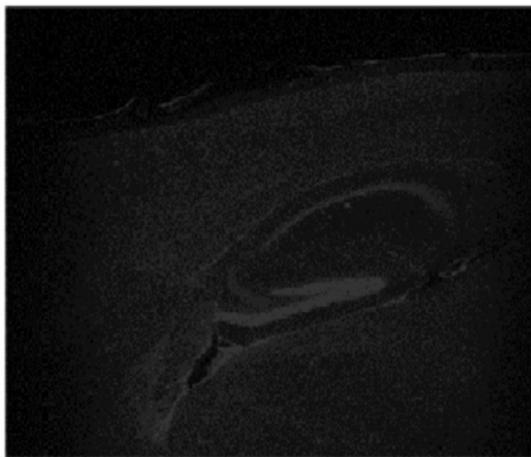


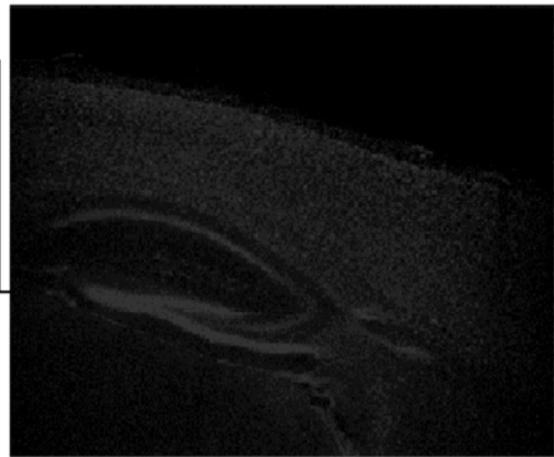
图1

1% Triton X-100 的 PBS 溶液

20% DMSO+1% Triton X-100+50mM Tris 的蒸馏水溶液



位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

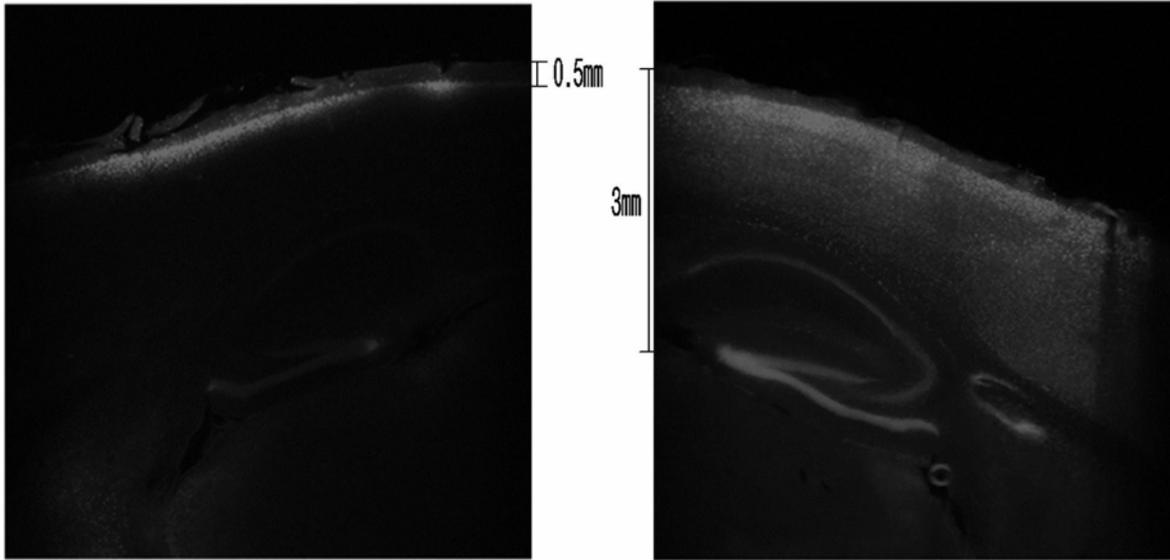


位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

图2

1% Triton X-100 的 PBS 溶液

20% DMSO+1% Triton X-100+50mM Tris 的蒸馏水溶液



位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

位于脑皮层和海马区的 NeuN 抗体

图3