



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118330207 A

(43) 申请公布日 2024.07.12

(21) 申请号 202410753957.7

(22) 申请日 2024.06.12

(71) 申请人 成都海默云因医学检验实验室有限公司

地址 611100 四川省成都市温江区永宁镇
芙蓉大道二段733号6栋6层(72) 发明人 周炜 毛俊娟 苏毅 彭彤
彭确昆

(74) 专利代理机构 成都天嘉知识产权代理有限公司 51211

专利代理师 向丹

(51) Int. Cl.

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

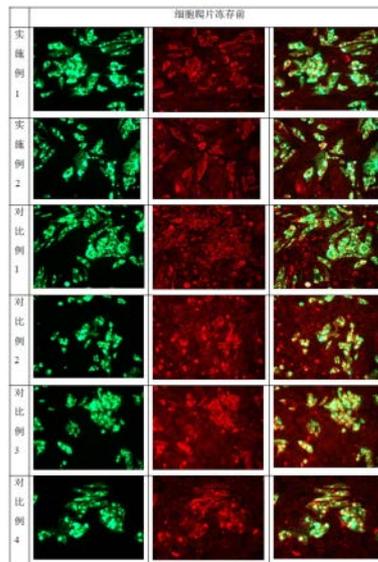
权利要求书1页 说明书11页 附图5页

(54) 发明名称

一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂及其固定细胞的方法

(57) 摘要

本发明属于生物及医药工程技术领域,公开了一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂及其固定细胞的方法,通过将多聚甲醛溶解于含有甘氨酸-L-谷氨酸的溶液而制得,制得的固定剂至少满足以下条件:多聚甲醛的浓度为10~20g/L;甘氨酸-L-谷氨酸的浓度1~2g/L;其中甘氨酸-L-谷氨酸的含量为多聚甲醛的1/10;渗透压为800~2400 mOsm/L;pH值为7.0~7.6。该固定剂可在高渗透压作用下实现细胞固定,同时实现保护细胞膜结构及细胞膜内外过表达蛋白的抗原构象,也能防止细胞在固定过程中的细胞自溶和裂解现象,能够解决细胞爬片非特异性荧光背景增高和荧光对比度降低的问题。



1. 一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂,其特征在于:将多聚甲醛溶解于含有甘氨酸-L-谷氨酸的溶液而制得,所述溶液选自水、缓冲溶液或生理盐水中的至少一种,制得的固定剂至少满足以下条件:

- 1) 其中多聚甲醛的浓度为10~20g/L;
- 2) 其中甘氨酸-L-谷氨酸的浓度1~2g/L;
- 3) 其中甘氨酸-L-谷氨酸的含量为多聚甲醛的1/10;
- 4) 渗透压为800 ~ 2400 mOsm/L;
- 5) pH值为7.0~7.6。

2. 根据权利要求1所述的固定剂,其特征在于:所述固定剂用于固定膜蛋白时,控制其渗透压为1920~2400mOsm/L。

3. 根据权利要求1所述的固定剂,其特征在于:所述固定剂用于固定胞内蛋白时,控制其渗透压为800~960mOsm/L。

4. 根据权利要求1所述的固定剂,其特征在于:所述溶液包括NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 。

5. 根据权利要求4所述的固定剂,其特征在于:所述固定剂中,NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 的浓度依次为20~60g/L、0.5~1.5g/L、3.6~10.8g/L和0.6~1.8g/L。

6. 一种利用权利要求1~5任一项所述固定剂固定细胞的方法,其特征在于:将细胞用固定剂浸泡固定20~30分钟,对细胞进行清洗、后处理、晾干后,冻存备用。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述后处理包括封闭处理,当固定剂用于固定膜蛋白时,在清洗后,向膜蛋白中加入封闭液,封闭处理30~60分钟,吸弃封闭液,晾干细胞爬片后,冻存于-20°C中,备用。

8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述后处理还包括透膜处理,当固定剂用于固定胞内蛋白时,在清洗后,向胞内蛋白中加入细胞裂解液透膜处理5分钟,再加入封闭液,封闭处理30~60分钟,吸弃封闭液,晾干细胞爬片后,冻存于-20°C中,备用。

9. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于:所述封闭液为牛血清白蛋白溶液。

10. 根据权利要求8所述的方法,其特征在于:所述细胞裂解液为TritonX-100。

一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂及其固定细胞的方法

技术领域

[0001] 本发明是一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂及其固定细胞的方法,具体涉及一种能降低细胞免疫荧光法中固定细胞爬片整体非特异性荧光背景和提高荧光对比度的固定剂,以及使用该固定剂固定细胞的方法,属于生物及医药工程技术领域。

背景技术

[0002] 细胞免疫荧光法(CBA)是用于临床抗体病诊断的一种技术,是基于细胞转染的间接免疫荧光法,其作用原理是将人源抗原基因转染入细胞,使细胞大量特异性表达抗原蛋白,将使用活细胞或将细胞固定于爬片上制备为检测材料,将患者标本中的抗体(一抗)与抗原特异性结合,随后使用带荧光标记的二抗结合一抗,根据荧光显微镜下观察的特异性的荧光情况阅片判读结果,其中固定细胞的方法即固定细胞免疫荧光法(Fixed cell based assay,F-CBA)。

[0003] 在常规细胞免疫荧光法固定爬片的制备过程中,用于固定细胞的固定剂通常采用多聚甲醛或甲醛溶液,并用与细胞等渗的磷酸缓冲液配制而成,其固定组织和细胞的原理是多聚甲醛能够与细胞内的氨基基团发生化学交联,形成网状结构,从而在一定时间内将细胞内的蛋白固定在某一节段。但使用多聚甲醛固定细胞时,细胞表面蛋白有些位点在固定后构象可能发生改变,使得抗体无法结合产生假阴性,也可能由于固定作用,导致其它位点产生非特异性结合(假阳性),而这会造成F-CBA细胞爬片中的非特异性荧光背景。

[0004] 目前用于细胞爬片的固定液(即含多聚甲醛溶液或甲醛的缓冲盐溶液)还存在诸多不足之处,例如:现有用于固定细胞的多聚甲醛溶液或甲醛溶液,其浓度为1~4%,多聚甲醛溶液常用的缓冲盐溶液有:1)磷酸二氢钠1.9mM,磷酸氢二钠8.1mM;2)0.1M 磷酸盐缓冲液。这些固定液基本为等渗或低于细胞内渗透压的配方,在采用这类固定剂固定细胞爬片时,由于多聚甲醛的非特异性结合,不可避免的产生非特异性荧光背景,使得制备好的细胞爬片在用于免疫荧光检测低浓度抗体样本尤其是含抗体浓度较低的血清样本时,灵敏度降低。此外,用多聚甲醛固定过的细胞样本,必须在短时间内检测,比如一些使用多聚甲醛固定过的CBA细胞要求在4小时内检测,否则会出现串联染料降解等影响荧光强度等不利影响。

[0005] 但对于大批量制备的细胞爬片,如果需要长时间使用,F-CBA细胞爬片需长期保存于4°C或-20°C冰箱,而冻存过程中,使用多聚甲醛固定的爬片中非特异性荧光背景会进一步增高,同时由于长期存储或冻存处理,其荧光对比度会随储存时间降低,造成阅片中灵敏度和准确性的降低。

[0006] 不同于低渗或等渗(280~310mOsm/L)的固定液,当使用超高渗透压(800~2400mOsm/L)作为固定液时,超高渗透压导致细胞皱缩的同时会提高荧光强度,但由于非特异性荧光背景和细胞表面的特异性荧光信号会同时提高,其对比度反而较低渗或等渗的固定液更低。因此,为提高固定细胞免疫荧光法(F-CBA)固定爬片检测的灵敏度和准确性,需要提

供一种降低非特异性荧光背景和提高荧光对比度的固定剂配方。现有技术中,公开号为CN108169474A的发明专利提出了一种应用于免疫荧光技术的新型细胞固定剂,采用L-抗坏血酸与水或PBS缓冲液或生理盐水配制形成的溶液浸泡细胞爬片,可以很好地保存其抗原形态,有利于与相应抗体的特异结合,同时,L-抗坏血酸在对细胞进行固定时,还可对细胞进行一定的通透处理,因此在固定细胞时无需再额外添加细胞通透剂,且采用L-抗坏血酸替代多聚甲醛等,其本身无毒性,还可避免有毒有害物质的产生。虽然L-抗坏血酸具有上述的一系列优点,但L-抗坏血酸在用于细胞固定剂时,为维持细胞渗透压,仍然需要采用等渗或低于细胞内渗透压的溶液进行配制,而该专利并未说明在用于免疫荧光检测时,L-抗坏血酸的使用是否能够改善多聚甲醛等在用于细胞爬片时的非特异性荧光背景,也没有说明该固定剂是否能提高荧光对比度,继而保证检测结果的灵敏度和准确性,且该专利和现有技术均未给出相应的数据支持。

发明内容

[0007] 本发明的目的是提供一种改善固定细胞免疫荧光法中荧光背景的固定剂,采用多聚甲醛和甘氨酸-L-谷氨酸组合用于配制具有超高渗透压的固定剂,可使细胞膜上和胞内蛋白迅速固定,同时保护高渗透压下的细胞膜结构和细胞膜内外过表达蛋白的抗原构象,也能防止细胞在固定过程中的细胞自溶、裂解,避免在后续免疫荧光实验中F-CBA细胞爬片的非特异性荧光背景增高和荧光对比度的降低。

[0008] 本发明的另一目的是提供一种利用上述固定剂固定细胞的方法,由该方法处理得到的细胞爬片,即使经过冷冻保存,也依然可以在免疫荧光实验中实现较普通固定方法更低的F-CBA细胞爬片非特异性荧光背景和更高荧光对比度的效果。

[0009] 本发明通过下述技术方案实现:降低固定细胞爬片荧光背景的固定剂,将多聚甲醛溶解于含有甘氨酸-L-谷氨酸的溶液而制得,所述溶液选自水、缓冲溶液或生理盐水中的至少一种,制得的固定剂至少满足以下条件:

- 1) 其中多聚甲醛的浓度为10~20g/L;
- 2) 其中甘氨酸-L-谷氨酸的浓度1~2g/L;
- 3) 其中甘氨酸-L-谷氨酸的含量为多聚甲醛的1/10;
- 4) 渗透压为800~2400mOsm/L;
- 5) pH值为7.0~7.6。

[0010] 所述固定剂用于固定膜蛋白时,控制其渗透压为1920~2400mOsm/L。

[0011] 所述固定剂用于固定胞内蛋白时,控制其渗透压为800~960mOsm/L。

[0012] 所述溶液包括NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 。

[0013] 所述固定剂中,NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 和 KH_2PO_4 的浓度依次为20~60g/L、0.5~1.5g/L、3.6~10.8g/L和0.6~1.8g/L。

[0014] 一种利用上述固定剂固定细胞的方法,将细胞用固定剂浸泡固定20~30分钟,对细胞进行清洗、后处理、晾干后,冻存备用。

[0015] 对细胞进行清洗时,可采用PBS清洗细胞3次,每次5分钟。

[0016] 所述后处理包括封闭处理,当固定剂用于固定膜蛋白时,在清洗后,向膜蛋白中加入封闭液,封闭处理30~60分钟,吸弃封闭液,晾干细胞爬片后,冻存于-20℃中,备用。

[0017] 所述后处理还包括透膜处理,当固定剂用于固定胞内蛋白时,在清洗后,向胞内蛋白中加入细胞裂解液透膜处理5分钟,再加入封闭液,封闭处理30~60分钟,吸弃封闭液,晾干细胞爬片后,冻存于-20℃中,备用。

[0018] 所述封闭液为牛血清白蛋白溶液,如PBS+5%BSA。

[0019] 所述细胞裂解液为TritonX-100,如0.2%浓度的TritonX-100。

[0020] 本发明与现有技术相比,具有以下优点及有益效果:

(1) 本发明创造性的采用超高渗复方多聚甲醛固定剂配方,利用常规渗透压3~8倍的超高渗透压溶液来配制多聚甲醛溶液,同时添加甘氨酸-L-谷氨酸作为保护剂和特异性荧光信号增强剂,可在高渗透压作用下实现细胞固定,同时实现保护细胞膜结构及细胞膜内外过表达蛋白的抗原构象,也能防止细胞在固定过程中的细胞自溶和裂解现象。

[0021] (2) 本发明可解决现有甲醛或多聚甲醛固定剂配方在固定细胞时存在的F-CBA细胞爬片非特异性荧光背景增高和荧光对比度的降低问题,首次采用多聚甲醛和甘氨酸-L-谷氨酸作为特异性组合使用,在特定浓度范围下溶解于超高渗透压的溶液中,可以解决F-CBA细胞爬片非特异性荧光背景增高和荧光对比度降低的问题,从而提高检测的灵敏度和准确性。

[0022] (3) 本发明涉及的固定剂适用于膜蛋白以及胞内蛋白的固定,可根据细胞结构的不同,采用不同渗透压和多聚甲醛/甘氨酸-L-谷氨酸浓度进行操作,操作简单。

[0023] (4) 本发明方法可实现大批量细胞爬片的制备,由其处理的细胞爬片,可在冷冻环境中保存备用,经实验证明,即使经过冷冻保存,该细胞爬片仍然可以在免疫荧光实验中提供较普通固定方法更低的背景及更高的灵敏度。

附图说明

[0024] 图1为实施例1、实施例2、对比例1至对比例4中在CHO细胞上固定膜蛋白时的免疫荧光图片(冻存前)。

[0025] 图2为实施例1、实施例2、对比例1至对比例4中在CHO细胞上固定膜蛋白时的免疫荧光图片(冻存后)。

[0026] 图3为实施例3、实施例4、对比例5至对比例8中在CHO细胞上固定胞内蛋白时的免疫荧光图片(冻存前)。

[0027] 图4为实施例3、实施例4、对比例5至对比例8中在CHO细胞上固定胞内蛋白时的免疫荧光图片(冻存前)。

[0028] 图5为实施例5中在HEK293细胞上固定膜蛋白时的免疫荧光图片。

[0029] 图6为实施例6中在HEK293细胞上固定胞内蛋白时的免疫荧光图片。

具体实施方式

[0030] 下面结合实施例对本发明作进一步地详细说明,但本发明的实施方式不限于此。

[0031] 用于膜蛋白的固定剂、细胞固定方法、免疫荧光实验及对比实验:

实施例1:超高渗复方多聚甲醛固定剂

按以下配方用量(见表1)配制超高渗复方多聚甲醛固定剂,即本发明所述改善固定细胞免疫荧光法中细胞爬片荧光背景的固定剂。

[0032] 配制时,取适量多聚甲醛溶解于NaCl、KCl、 Na_2HPO_4 、 KH_2PO_4 和甘氨酸-L-谷氨酸的水溶液中,即得。配制完成后的固定剂渗透压为2400 mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0033] 表1

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na_2HPO_4	10.8
4	KCl	1.5
5	KH_2PO_4	1.8
6	甘氨酸-L-谷氨酸	1

实施例2:超高渗复方多聚甲醛固定剂

按实施例1的相同方式制备超高渗复方多聚甲醛固定剂。其配方用量见表2。配制完成后的固定剂渗透压为2400mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0034] 表2

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na_2HPO_4	10.8
4	KCl	1.5
5	KH_2PO_4	1.8
6	甘氨酸-L-谷氨酸	1

对比例1:等渗固定剂

配制常规等渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表3。配制完成后的固定剂渗透压为320mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0035] 表3

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	8
3	Na_2HPO_4	1.44
4	KCl	0.2
5	KH_2PO_4	0.24

对比例2:高渗固定剂

配制高渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表4。配制完成后的固定剂渗透压为2400mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0036] 表4

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na ₂ HPO ₄	10.8
4	KCl	1.5
5	KH ₂ PO ₄	1.8

对比例3:高渗固定剂

配制高渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表5。配制完成后的固定剂渗透压为2400mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0037] 表5

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na ₂ HPO ₄	10.8
4	KCl	1.5
5	KH ₂ PO ₄	1.8
6	亚精胺	0.15

对比例4:添加亚精胺的超高渗复方多聚甲醛固定剂

在实施例1的配方基础上增加亚精胺,其配方用量见表6。配制完成后的固定剂渗透压为2400mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0038] 表6

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na ₂ HPO ₄	10.8
4	KCl	1.5
5	KH ₂ PO ₄	1.8
6	甘氨酸-L-谷氨酸	1
7	亚精胺	0.15

将上述实施例1、实施例2、对比例1至对比例4的固定剂进行膜蛋白固定。

[0039] 以抗水通道蛋白4 (Aquaporin 4) 抗体 (以下简称AQP4) 为例, 抗AQP4抗体是自身免疫抗体的一种, AQP4是一种膜蛋白, 与视神经脊髓炎、脱髓鞘等疾病相关。

[0040] 在CHO细胞上过表达AQP4基因, 选择稳转细胞进行下面操作:

将稳定表达AQP4的CHO细胞和野生型CHO细胞混合, 接种到96孔板, 生长到完全汇合后, 进行细胞固定。

[0041] 将上述配制好的固定剂浸泡固定细胞20分钟, PBS清洗细胞3次, 每次5分钟, 然后加入PBS+5%BSA, 封闭处理45分钟, 吸弃封闭液, 晾干细胞爬片后, 冻存于-20°C中, 备用。

[0042] 分别取上述实施例1、实施例2、对比例1至对比例4中制备的F-CBA细胞爬片进行免疫荧光实验, 包括F-CBA细胞爬片冻存前和冻存后 (冻存30天)。

[0043] 免疫荧光实验方法如下:

准备血液或脑脊液样品, 样品稀释液含如下成分:

磷酸缓冲液 (pH7.0 ~ 7.4), BSA (2%);

用样品稀释液对样本进行初次测定稀释, 血清的稀释比例为1:10, 脑脊液采用原液 (不稀释);

样品孵育: 37°C孵育1小时, PBS洗涤3次;

用样品稀释液稀释二抗: 采用羊抗人IgG (H+L), 稀释比例为1:500, 室温孵育45分钟, PBS洗涤3次;

判读: 显微镜下判读样本阴阳性。

[0044] 实验结果见图1和图2所示。

[0045] 图1中, 由左至右分别对应实施例1、实施例2、对比例1至对比例4的细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。

[0046] 由图1可见, 实施例1和实施例2的固定剂对膜蛋白的固定效果最佳, 图中可见其荧光对比度高, 同时无特异性荧光背景出现; 图中可见实施例1和实施例2的荧光效果相同, 由此可以证明, 本发明的固定剂在用于膜蛋白固定时, 效果稳定, 在平行实验中一致性较好。根据其二抗荧光强度和背景可见, 实施例1、实施例2、对比例4的荧光效果相同且最优, 对比例1至对比例3的荧光效果明显较实施例1、实施例2及对比例4更差。对比例4与实施例1和实施例2的荧光效果相同, 说明在本发明的固定剂基础上, 添加细胞膜保护剂亚精胺, 对效果

无影响。

[0047] 图2中,由左至右分别对应实施例1、实施例2、对比例1至对比例4的细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。

[0048] 由图2可见,细胞爬片冻存后,并不影响本发明固定剂对膜蛋白的固定效果。

[0049] 用于胞内蛋白的固定剂、细胞固定方法、免疫荧光实验及对比实验:

实施例3:超高渗复方多聚甲醛固定剂

按实施例1的相同方式制备超高渗复方多聚甲醛固定剂,其配方用量见表7。配制完成后的固定剂渗透压为960mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0050] 表7

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72
6	甘氨酸-L-谷氨酸	2

实施例4:超高渗复方多聚甲醛固定剂

按实施例1的相同方式制备超高渗复方多聚甲醛固定剂,其配方用量见表8。配制完成后的固定剂渗透压为960mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0051] 表8

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72
6	甘氨酸-L-谷氨酸	2

对比例5:等渗固定剂

配制常规等渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表9。配制完成后的固定剂渗透压为320mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0052] 表9

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	8
3	Na ₂ HPO ₄	1.44
4	KCl	0.2
5	KH ₂ PO ₄	0.24

对比例6:高渗固定剂

配制高渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表10。配制完成后的固定剂渗透压为960mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0053] 表10

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72

对比例7:高渗固定剂

配制高渗多聚甲醛固定剂,其配方用量见表11。配制完成后的固定剂渗透压为960mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0054] 表11

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72
6	亚精胺	0.15

对比例8:添加亚精胺的超高渗复方多聚甲醛固定剂

在实施例5的配方基础上增加亚精胺,其配方用量见表12。配制完成后的固定剂渗透压为960mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0055] 表12

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72
6	甘氨酸-L-谷氨酸	2
7	亚精胺	0.15

将上述实施例3、实施例4、对比例5至对比例8的固定剂进行胞内蛋白固定。

[0056] 以抗谷氨酸脱羧酶65 (glutamic acid decarboxylase 65) 抗体 (以下简称GAD65) 为例, 抗GAD65抗体是自身免疫抗体的一种, GAD65是一种胞内蛋白, 与僵硬人综合征、小脑共济失调、慢性癫痫、边缘性脑炎等疾病相关。

[0057] 在CHO细胞上过表达GAD65基因, 选择稳转细胞进行下面操作:

将稳定表达GAD65的CHO细胞和野生型CHO细胞混合, 接种到96孔板, 生长到完全汇合后, 进行细胞固定。

[0058] 将上述配制好的固定剂浸泡固定细胞30分钟, PBS清洗细胞3次, 每次5分钟, 加入0.2%浓度TritonX-100透膜处理5分钟, PBS清洗细胞3次, 每次5分钟, 再加入PBS+5%BSA, 封闭处理45分钟, 吸弃封闭液, 晾干细胞爬片后, 冻存于-20°C中, 备用。

[0059] 分别取上述实施例3、实施例4、对比例5至对比例8中制备的F-CBA细胞爬片进行免疫荧光实验, 包括F-CBA细胞爬片冻存前和冻存后 (冻存30天)。

[0060] 免疫荧光实验方法如下:

准备血液或脑脊液样品, 样品稀释液含如下成分:

磷酸缓冲液 (pH7.0-7.4), BSA (2%);

用样品稀释液对样本进行初次测定稀释, 血清的稀释比例为1:10, 脑脊液采用原液 (不稀释);

样品孵育: 37°C孵育1小时, PBS洗涤3次;

用样品稀释液稀释二抗: 采用羊抗人IgG (H+L), 稀释比例为1:500, 室温孵育45分钟, PBS洗涤3次;

判读: 显微镜下判读样本阴阳性。

[0061] 实验结果见图3和图4所示。

[0062] 图3中, 由左至右分别对应实施例3、实施例4、对比例5至对比例8的细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。

[0063] 由图3可见, 实施例3和实施例4的固定剂对胞内蛋白的固定效果最佳, 图中可见其荧光对比度高, 同时无特异性荧光背景出现; 图中可见实施例3和实施例4的荧光效果相同, 由此可以证明, 本发明的固定剂在用于胞内蛋白固定时, 效果稳定, 在平行实验中一致性较好。根据其二抗荧光强度和背景可见, 实施例3、实施例4、对比例8的荧光效果相同且最优,

对比例5至对比例7的荧光效果明显较实施例3、实施例4及对比例8更差。对比例8与实施例3和实施例4的荧光效果相同,说明在本发明的固定剂基础上,添加细胞膜保护剂亚精胺,对效果无影响。

[0064] 图4中,由左至右分别对应实施例3、实施例4、对比例5至对比例8的细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。

[0065] 本发明所述固定剂不仅限于适合于CHO细胞系,也适用于其它细胞系。

[0066] 实施例5:高渗多聚甲醛复方固定剂、膜蛋白固定及细胞免疫荧光(HEK293细胞)

本实施例是以抗AQP4抗体为例,进行HEK293细胞的高渗多聚甲醛复方固定剂固定膜蛋白及细胞免疫荧光的实施例。

[0067] 按实施例1的相同方式制备超高渗复方多聚甲醛固定剂,其配方用量见表13。配制完成后的固定剂渗透压为2400 mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0068] 表13

	试剂	含量(g/L)
1	多聚甲醛	10
2	NaCl	60
3	Na ₂ HPO ₄	10.8
4	KCl	1.5
5	KH ₂ PO ₄	1.8
6	甘氨酸-L-谷氨酸	1

在HEK293细胞上过表达AQP4基因,选择稳转细胞进行下面操作:

将稳定表达AQP4的HEK293细胞和野生型HEK293细胞混合,接种到96孔板,生长到完全汇合后,进行细胞固定。

[0069] 将上述配制好的固定剂浸泡固定细胞30分钟,PBS清洗细胞3次,每次5分钟,PBS+5%BSA封闭45分钟,吸弃封闭液,晾干爬片后进行免疫荧光操作。

[0070] 免疫荧光:

准备血液或脑脊液样品,样品稀释液含如下成分:

磷酸缓冲液(pH7.0-7.4),BSA(2%);

用样品稀释液对样本进行初次测定稀释,稀释比例为:血清:1:10,脑脊液:原液;

样品孵育:37°C孵育1小时,PBS洗涤3次;

用样品稀释液稀释二抗:羊抗人IgG(H+L),1:500,室温孵育45分钟,PBS洗涤3次;

判读:显微镜下判读样本阴阳性。

[0071] 实验结果见图5所示。

[0072] 图5中,由左至右分别对应细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。由图5可见,采用本发明的固定剂在HEK293细胞上固定膜蛋白时,其荧光对比度高,且无特异性荧光背景出现。

[0073] 实施例6:高渗多聚甲醛复方固定剂、胞内蛋白固定及细胞免疫荧光(HEK293细胞)

以抗GAD65抗体为例,进行HEK293细胞的高渗多聚甲醛复方固定剂固定胞内蛋白及细胞免疫荧光的实施例。

[0074] 按实施例1的相同方式制备超高渗复方多聚甲醛固定剂,其配方用量见表14。配制完成后的固定剂渗透压为960 mOsm/L,pH值为7.0~7.6。

[0075] 表14

	试剂	含量 (g/L)
1	多聚甲醛	20
2	NaCl	24
3	Na ₂ HPO ₄	4.32
4	KCl	0.6
5	KH ₂ PO ₄	0.72
6	甘氨酸-L-谷氨酸	2

在HEK293细胞上过表达GAD65基因,选择稳转细胞进行下面操作:

将稳定表达GAD65的293细胞和野生型293细胞混合,接种到96孔板,生长到完全汇合后,进行细胞固定。

[0076] 将上述配制好的固定剂浸泡固定细胞30分钟,PBS清洗细胞3次,每次5分钟,加入0.4%浓度TritonX-100透膜处理5分钟,PBS清洗细胞3次,每次5分钟,PBS+5%BSA封闭45分钟,吸弃封闭液,晾干爬片后进行免疫荧光操作。

[0077] 免疫荧光:

准备血液或脑脊液样品,样品稀释液含如下成分:

磷酸缓冲液 (pH7.0-7.4),BSA (2%);

用样品稀释液对样本进行初次测定稀释,血清的稀释比例为1:10,脑脊液采用原液(不稀释);

样品孵育:37°C孵育1小时,PBS洗涤3次;

用样品稀释液稀释二抗:采用羊抗人IgG (H+L),稀释比例为1:500,室温孵育45分钟,PBS洗涤3次;

判读:显微镜下判读样本阴阳性。

[0078] 实验结果见图6所示。

[0079] 图6中,由左至右分别对应细胞本身表达的荧光图、二抗荧光图、前述两种荧光图同位重合的图片。由图6可见,采用本发明的固定剂在HEK293细胞上固定胞内蛋白时,其荧光对比度高,且无特异性荧光背景出现。

[0080] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例,并非对本发明做任何形式上的限制,凡是依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化,均落入本发明的保护范围之内。

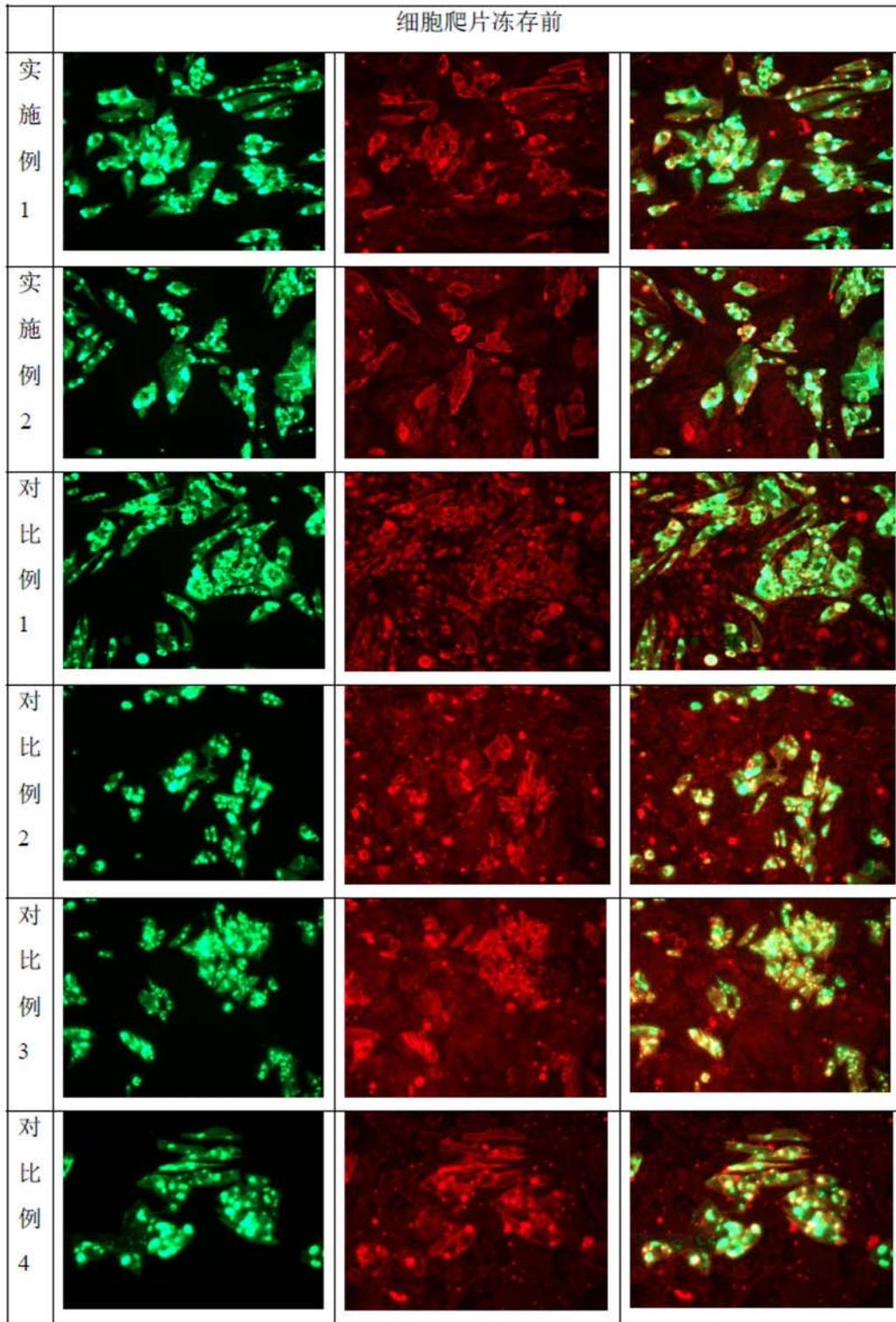


图1

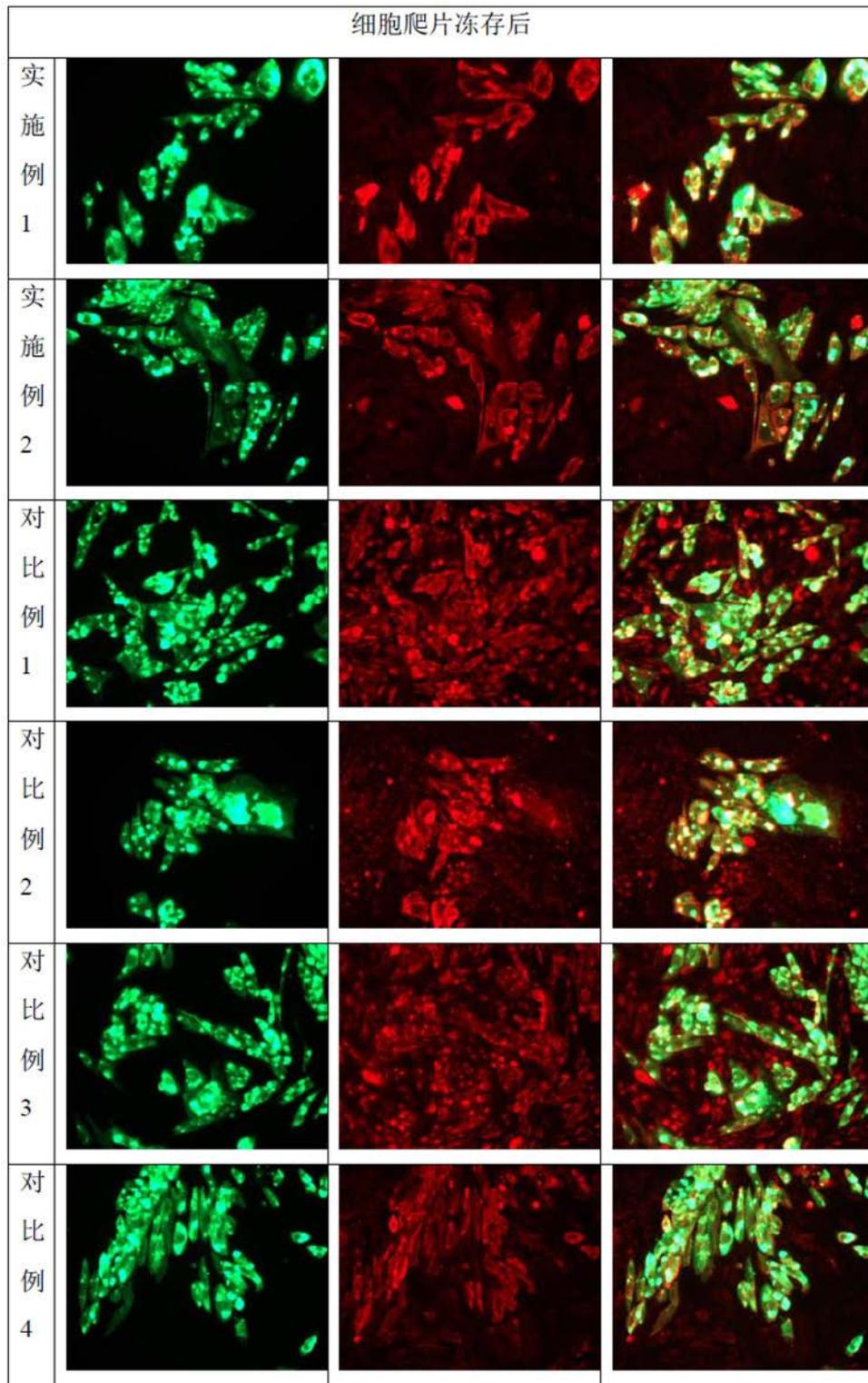


图2

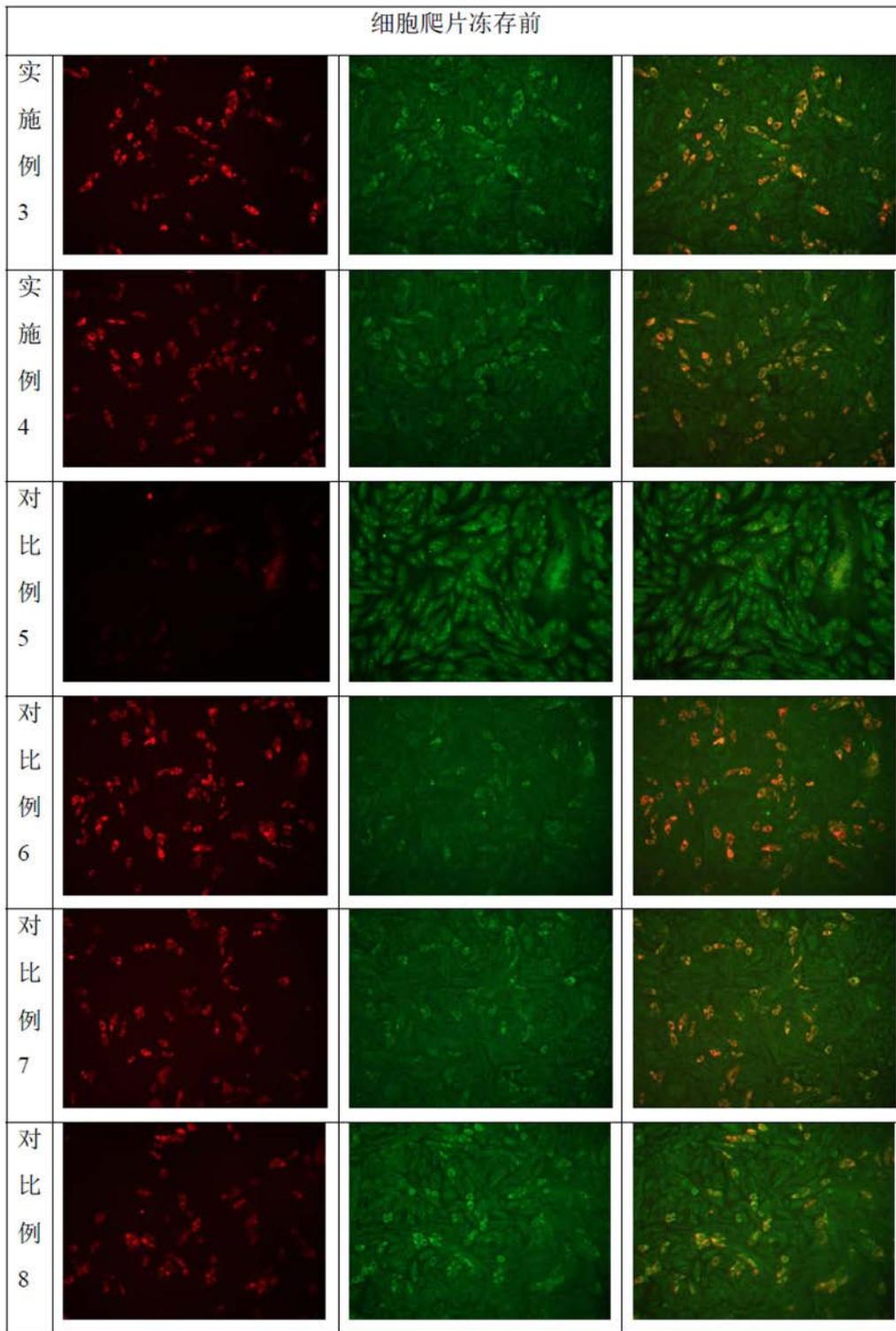


图3

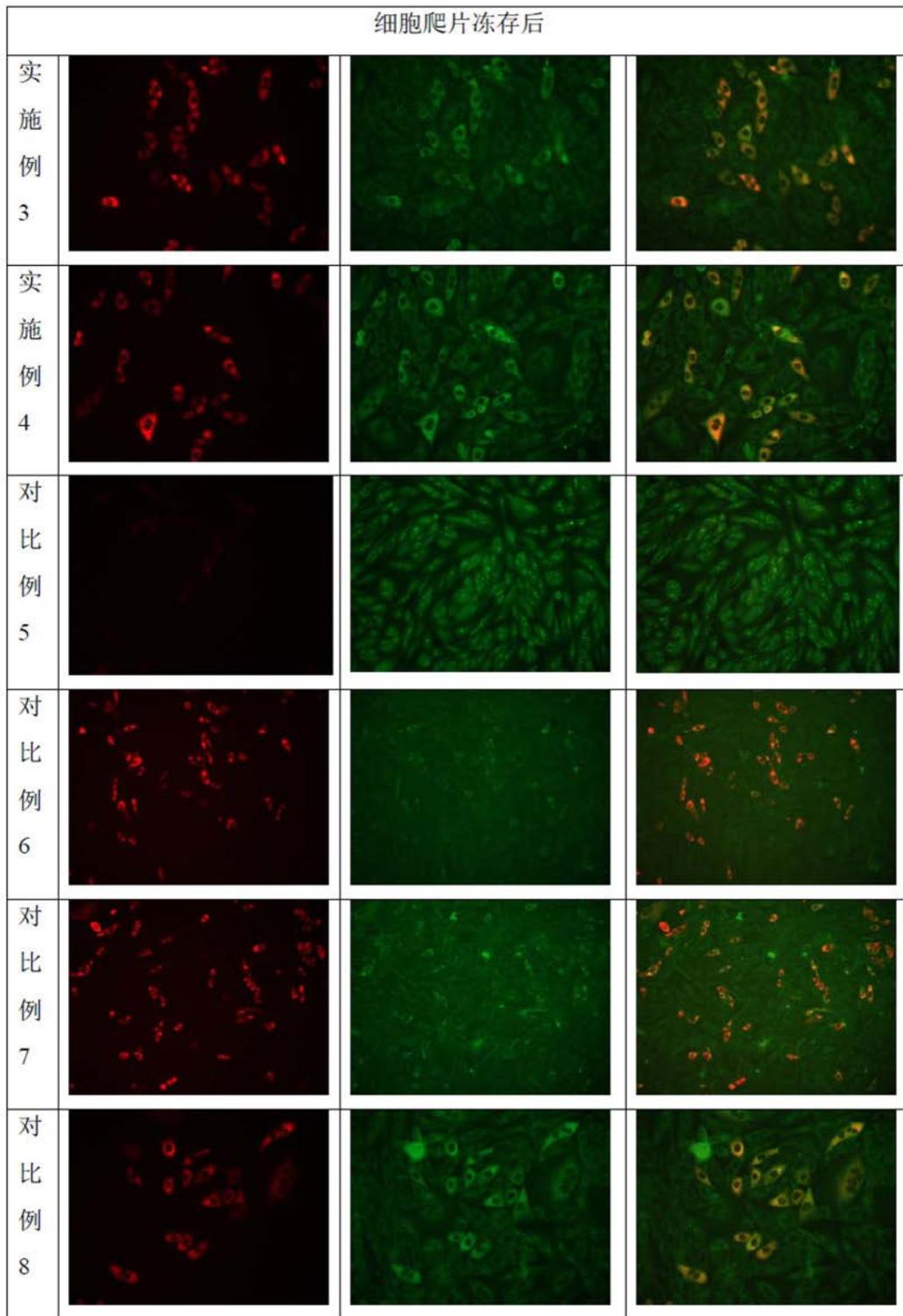


图4

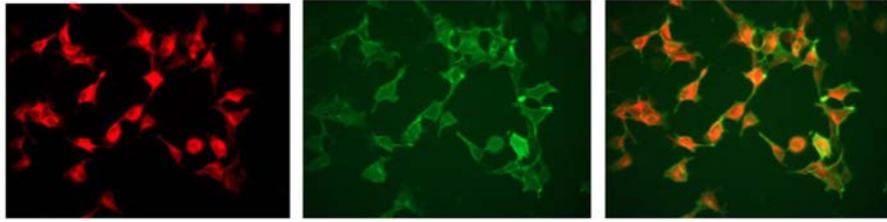


图5

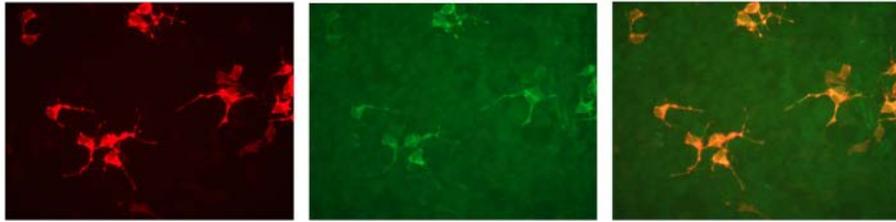


图6