



(21) 申请号 202311682550.1

(22) 申请日 2023.12.07

(71) 申请人 深圳市森盈生物科技有限公司

地址 518072 广东省深圳市南山区桃源街
道龙珠三路南山睿园9栋4楼401

(72) 发明人 黄小军 朱峻

(74) 专利代理机构 北京聚力顺为知识产权代理
事务所(普通合伙) 16274

专利代理师 朱立云

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/74 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页
序列表(电子公布)

(54) 发明名称

一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法,所述检测方法包括以下步骤:步骤1.染色液配置;染色剂1:PBS液,第一抗体为兔抗人雌激素受体、兔抗人孕激素受体、均为细胞核着色,兔抗人CerbB-2单克隆抗体,为细胞膜着色,第二抗体为快捷免疫细化Elivision试剂盒,DAB试剂盒;染色剂2:氨基三乙酸、葡萄糖酸、山梨糖醇、氨基醇、多聚甲醛、KC1及缓冲液;步骤2.组织切片:取受检者乳腺标本,经浓度为10%的中性甲醛进行固定,取病变组织,经酒精梯度脱水。本发明减少血清中的干扰物质产生假阳性影响,提高检测的准确性和特异性,提高检测灵敏度检测准确性高、假阴性率低,染色方法操作简便、染色结果清晰可见、易判读。

1. 一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法,其特征在于,所述检测方法包括以下步骤:

步骤1. 染色液配置;

染色剂1: PBS液, 第一抗体为兔抗人雌激素受体、兔抗人孕激素受体、均为细胞核着色, 兔抗人CerbB-2单克隆抗体, 为细胞膜着色, 第二抗体为快捷免疫细化Elivision试剂盒, DAB试剂盒;

染色剂2: 氨基三乙酸、葡萄糖酸、山梨糖醇、氨基醇、多聚甲醛、KCl及缓冲液;

步骤2. 组织切片: 取受检者乳腺标本, 经浓度为10%的中性甲醛进行固定, 取病变组织, 经酒精梯度脱水, 二甲苯透明、石蜡浸润包埋, 制成蜡块, 切片, 厚度在2~3um之间, 而后展片, 保证切片展开充分, 然后采取APES防脱片处理过的载玻片捞片, 最后在65℃条件下温箱烤片, 持续2~4小时;

步骤3. 免疫细化染色: 烤片完成后, 使用甲醛固定剂, 将组织样本固定在载玻片或离心管中, 以保持其形态结构并保护目标蛋白, 将固定的组织样本进行渗透处理, 使用渗透剂, Triton X-100使抗体能够进入细胞内, 将与目标蛋白特异性结合的一对抗体溶液添加到组织样本中, 其中一个抗体可与蛋白特定的表位结合, 另一个抗体则用于检测该结合, 用缓冲液洗涤样本, 以去除未结合的抗体和其他非特异性结合的物质, 通过使用荧光素或酶底物来放大与特定抗体结合的信号, 荧光素通常通过荧光显微镜观察, 而酶底物可以在显微镜下形成颜色反应, 使用荧光显微镜或普通光学显微镜观察组织样本, 并记录目标蛋白的表达情况。

一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及试剂盒技术领域,尤其涉及一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 乳腺癌是一种常见的恶性肿瘤,主要发生在女性乳房组织中,但也可罕见地发生于男性,以下是对乳腺癌的一些基本信息:原因:乳腺癌的具体原因尚未完全明确,但可能与遗传、生活方式和环境因素等多种因素有关。某些基因突变和家族遗传倾向可以增加乳腺癌的风险。其他可能的风险因素包括年龄、激素水平、肥胖、饮食不良、乳腺疾病史、长期使用激素替代疗法等,症状:早期乳腺癌可能无明显症状,但随着病情的发展,常见的症状可能包括乳房肿块、乳房皮肤改变(如凹陷、皮肤增厚、皮肤红肿等)、乳房疼痛或不适、乳头溢液、乳房肿胀、淋巴结肿大等,诊断:乳腺癌的诊断通常包括乳房检查、乳腺超声、乳腺X光摄影(乳腺钼靶或乳腺钼铀摄影)和乳腺组织活检等。这些检查有助于确定病变的性质和分期,并指导后续治疗方案的选择,治疗:乳腺癌的治疗方案多样,包括手术切除、放疗、化疗、内分泌治疗和靶向治疗等。具体的治疗方案将根据患者的个体情况、肿瘤特征和分期确定,旨在达到根治、生存延长和改善生活质量的目标,预防与早期筛查:乳腺癌的预防措施包括保持健康的生活方式、定期乳房自我检查、定期体检和参与乳腺癌筛查项目等。对于高风险人群或家族遗传倾向较明显的人群,可能需要进行更频繁的筛查和早期检测,重要的是要及早发现和诊断乳腺癌,以便尽早开始适当的治疗,并与医生密切合作制定个性化的治疗计划。如果怀疑乳腺癌,请及时咨询医生以获取专业建议和指导,乳腺细胞免疫细化染色是一种常用的实验技术,用于检测和定位乳腺组织中特定蛋白质的表达和分布情况,这项技术可以提供有关乳腺细胞类型、增殖活性、分化程度和蛋白质表达水平等方面的信息;

[0003] 现有的乳腺细胞免疫化学染色方法的染色剂易与非靶标磷酸化蛋白结合,非特异性结合和背景干扰较多,血清中的干扰物质易产生假阳性,检测灵敏度低,染色操作麻烦,为此我们提出一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法来解决上述问题。

发明内容

[0004] 本发明的目的是为了解决现有技术中存在的问题,而提出的一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法。

[0005] 为了实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0006] 一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法,所述检测方法包括以下步骤:

[0007] 步骤1.染色液配置;

[0008] 染色剂1:PBS液,第一抗体为兔抗人雌激素受体、兔抗人孕激素受体、均为细胞核着色,兔抗人CerbB-2单克隆抗体,为细胞膜着色,第二抗体为快捷免疫细化Elivision试剂盒,DAB试剂盒;

[0009] 染色剂2:氨基三乙酸、葡萄糖酸、山梨糖醇、氨基醇、多聚甲醛、KCl及缓冲液;

[0010] 步骤2.组织切片:取受检者乳腺标本,经浓度为10%的中性甲醛进行固定,取病变组织,经酒精梯度脱水,二甲苯透明、石蜡浸润包埋,制成蜡块,切片,厚度在2~3um之间,而后展片,保证切片展开充分,然后采取APES防脱片处理过的载玻片捞片,最后在65℃条件下温箱烤片,持续2~4小时;

[0011] 步骤3.免疫细化染色:烤片完成后,使用甲醛固定剂,将组织样本固定在载玻片或离心管中,以保持其形态结构并保护目标蛋白,将固定的组织样本进行渗透处理,使用渗透剂,Triton X-100使抗体能够进入细胞内,将与目标蛋白特异性结合的一对抗体溶液添加到组织样本中,其中一个抗体可与蛋白特定的表位结合,另一个抗体则用于检测该结合,用缓冲液洗涤样本,以去除未结合的抗体和其他非特异性结合的物质,通过使用荧光素或酶底物来放大与特定抗体结合的信号,荧光素通常通过荧光显微镜观察,而酶底物可以在显微镜下形成颜色反应,使用荧光显微镜或普通光学显微镜观察组织样本,并记录目标蛋白的表达情况15~20分钟,最后经PBS液清洗3次,DAB显色,复染,封片。

[0012] 本发明中有益效果如下:

[0013] 1、免疫细化染色结果显示,病变组织结构完整,未发生明显的脱片状况,阴性与阳性存在鲜明的对比,阳性物质定位十分准确,背景干净并且十分清晰,没有非特异性染色,结果稳定可靠,具有高度的敏感性,且特异性也较强;

[0014] 2、细胞染色液可以快速修复细胞抗原充分暴露抗原决定簇,同时提高细胞膜通透性,利于抗体分子进入细胞结合抗原,避免与除Ki67抗体以外的非靶标磷酸化蛋白结合,增强信噪比,降低非特异性结合和背景干扰;减少血清中的干扰物质产生假阳性影响,提高检测的准确性和特异性;稳定Ki67抗体稳定性,提高检测灵敏度检测准确性高、假阴性率低,染色方法操作简便、染色结果清晰可见、易判读。

具体实施方式

[0015] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。

[0016] 实施例1

[0017] 一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法,检测方法包括以下步骤:

[0018] 步骤1.染色液配置;

[0019] 染色剂:PBS液,第一抗体为兔抗人雌激素受体、兔抗人孕激素受体、均为细胞核着色,兔抗人CerbB-2单克隆抗体,为细胞膜着色,第二抗体为快捷免疫细化Elivision试剂盒,DAB试剂盒;

[0020] 步骤2.组织切片:取受检者乳腺标本,经浓度为10%的中性甲醛进行固定,取病变组织,经酒精梯度脱水,二甲苯透明、石蜡浸润包埋,制成蜡块,切片,厚度在2~3um之间,而后展片,保证切片展开充分,然后采取APES防脱片处理过的载玻片捞片,最后在65℃条件下温箱烤片,持续2~4小时;

[0021] 步骤3.免疫细化染色:烤片完成后,使用甲醛固定剂,将组织样本固定在载玻片或离心管中,以保持其形态结构并保护目标蛋白,将固定的组织样本进行渗透处理,使用渗透剂,Triton X-100使抗体能够进入细胞内,将与目标蛋白特异性结合的一对抗体溶液添加到组织样本中,其中一个抗体可与蛋白特定的表位结合,另一个抗体则用于检测该结合,用

缓冲液洗涤样本,以去除未结合的抗体和其他非特异性结合的物质,通过使用荧光素或酶底物来放大与特定抗体结合的信号,荧光素通常通过荧光显微镜观察,而酶底物可以在显微镜下形成颜色反应,使用荧光显微镜或普通光学显微镜观察组织样本,并记录目标蛋白的表达情况15~20分钟,最后经PBS液清洗3次,DAB显色,复染,封片;

[0022] pET-23a(+) 表达载体

[0023] 原始序列:

[0024] ATGGAGCCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGCCACGGCCGGCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAGGCGGGGGCGCTGCCAACGCACCGAATAGTTACGGTCGGAGGCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCACTGCGCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCTTGACACGCTGGTGGTGTGCACCGGGCCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCATGCCCGCATAGATGCCGCGGAAGTCCCTCAGACATCCCCGAT;

[0025] 优化后基因序列:

[0026] atgGCGAGCatgACCGGCGGCCAGCAGatgGGCCGTGGCAGCGAATTCatgGAACCGGCGGGCGGCAGCAGCatgGAACCGAGCGCGGATTGGCTGGCGACCGCGGCGGCGGTGGCCGTGTGGAAGAAGTGGTGGCTGCTGGAAGCGGGCGCGCTGCCGAACGCGCCGAACAGCTATGGCCGTCTGCGATTGAGGTGatgatgatggcagcgcgCGTGTGGCGGAACTGCTGCTGCTGCATGGCGGGAACCGAACTGCGCGGATCCGGCGACCCTGACCCGTCCGGTGCA TGATGCGGCGCGTGAAGGCTTCTGGATACCCTGGTGGTGTGCATCGTGCGGGCGCGCTCTGGATGTGCGTGATGCGTGGGCGCGTCTGCCGGTGGATCTGGCGGAAGAAGTGGCCATCGTGATGTGGCGGTTATCTGCGTGGGCGGCGGGCGGCACCCGTGGCAGCAACCATGCGCGTATTGATGCGGCGGAAGGCCCGAGCGATATTCCGGATAAGCTTGC GGCGGCGCTGGAACATCATCATCATCAT;

[0027] 优化后氨基酸序列:

[0028] MASMTGGQQMGRGSEFMPEAAGSSMEPSADWLATAAARGRVEEV RALLEAGALPNAPNSYGRRIQVM MMGSARVAELLLLHGAEPNCADPATLTRPVHDAAREGFLDTLVVLHRAGARLDVRDAWGRLPVDLAEELGHRDVAR YLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPDKLAAALEHHHHHH*;

[0029] 在癌细胞胞质或胞膜上出现黄染颗粒视为染色结果为阳性,其中颗粒呈现淡黄色,且均匀视为染色结果呈现弱阳性+;颗粒呈现黄色,分布较不均匀视为染色结果呈现中度阳性++;颗粒呈现深黄或者是褐色,块状视为染色结果呈现为强阳性+++;

[0030] 乳腺组织切片没有出现收缩或者是干裂现象,组织结构细胞形态观察清晰,乳腺癌细胞、炎症细胞均可获得清晰的辨别,经HE染色后,颜色鲜艳,细胞核呈现为鲜明的蓝色,细胞质伊红染色,呈现深浅不同的粉红色,细胞核呈现不同程度的蓝色,对比度鲜明,免疫组化染色结果显示,病变组织结构完整,未发生明显的脱片状况,阴性与阳性存在鲜明的对比,阳性物质定位十分准确,背景干净并且十分清晰,没有非特异性染色。结果稳定可靠,具有高度的敏感性,且特异性也较强。

[0031] 实施例二

[0032] 一种乳腺细胞免疫化学染色试剂盒及检测方法,所述检测方法包括以下步骤:

[0033] 步骤1.染色液配置;

[0034] 染色剂:氨基三乙酸、葡萄糖酸、山梨糖醇、氨基醇、多聚甲醛、KCl及缓冲液;

[0035] 步骤2.组织切片:取受检者乳腺标本,经浓度为10%的中性甲醛进行固定,取病变组织,经酒精梯度脱水,二甲苯透明、石蜡浸润包埋,制成蜡块,切片,厚度在2~3um之间,而后展片,保证切片展开充分,然后采取APES防脱片处理过的载玻片捞片,最后在65℃条件下温箱烤片,持续2~4小时;

[0036] 步骤3.免疫细化染色:烤片完成后,使用甲醛固定剂,将组织样本固定在载玻片或离心管中,以保持其形态结构并保护目标蛋白,将固定的组织样本进行渗透处理,使用渗透剂,Triton X-100使抗体能够进入细胞内,将与目标蛋白特异性结合的一对抗体溶液添加到组织样本中,其中一个抗体可与蛋白特定的表位结合,另一个抗体则用于检测该结合,用缓冲液洗涤样本,以去除未结合的抗体和其他非特异性结合的物质,通过使用荧光素或酶底物来放大与特定抗体结合的信号,荧光素通常通过荧光显微镜观察,而酶底物可以在显微镜下形成颜色反应,使用荧光显微镜或普通光学显微镜观察组织样本,并记录目标蛋白的表达情况;

[0037] pET-22b(+) 表达载体

[0038] 原始序列:

[0039] ATGGAGCCGGCGGGGAGCAGCATGGAGCCTTCGGCTGACTGGCTGGCCACGGCCGCGGCCCGGGGTCGGGTAGAGGAGGTGCGGGCGCTGCTGGAGGCGGGGCGCTGCCAACGCACCGAATAGTTACGGTCGGAGGCCGATCCAGGTCATGATGATGGGCAGCGCCCGAGTGGCGGAGCTGCTGCTGCTCCACGGCGCGGAGCCCACTGCGCCGACCCCGCCACTCTCACCCGACCCGTGCACGACGCTGCCCGGGAGGGCTTCCTGGACACGCTGGTGGTGTGCACCGGGCCGGGCGCGGCTGGACGTGCGCGATGCCTGGGGCCGTCTGCCCGTGGACCTGGCTGAGGAGCTGGGCCATCGCGATGTCGCACGGTACCTGCGCGCGGCTGCGGGGGCACCAGAGGCAGTAACCATGCCGCATAGATGCCGCGGAAGTCCCTCAGACATCCCCGAT;

[0040] 优化后基因序列:

[0041] ATGAAATACCTGCTGCCGACCGCTGCTGCTGGTCTGCTGCTCCTCGCTGCCAGCCGGCGATGGCCATGGAACCGGCGGGCAGCAGCATGGAACCGAGCGCGGATTGGCTGGCGACCGCGGCGCGCGGCCGCGTGGAA GAAGTGC GCGCGCTGCTGGAAGCGGGCGCGCTGCCGAACGCGCCGAACAGCTATGGCCGCCGCCGATTTCAGGTGATGATGATGGGCAGCGCGCGGTGGCGGAAGTCTGCTGCTGCATGGCGCGGAACCGAAGTGC GCGGATCCGGCGACCTGACCCGCCCGGTGCATGATGCGGCGCGCAAGGCTTTCTGGATAACCCTGGTGGTGTGCATCGCGCGGGCGCGCGCCTGGATGTGCGCGATGCGTGGGGCCGCTGCCGGTGGATCTGGCGGAAGAACTGGGCCATCGCGATGTGGCGCGCTATCTGCGCGCGGGCGGGCGGCACCCGCGGCAGCAACCATGCGCGCATTGATGCGGCGGAAGGCCCGAGCGATATCCGATAAGCTTGGCGCCGCACTCGAGCACCACCACCACCAC;

[0042] 优化后氨基酸序列:

[0043] MKYLLPTAAAGLLLLAAQPAMAMEPAAGSSMEPSADWLATAAARGRVEEV RALLEAGALPNAPNSYGRPIQVMMMSARVAELLLLHGAEPNCADPATL TRPVHDAAREGFLDTLVV LHRAGARLDVRDAWGRLPVDLAEELGHRDVARYLRAAAGGTRGSNHARIDAAEGPSDIPDKLAAALEHHHHHHH*;

[0044] 细胞染色液可以快速修复细胞抗原充分暴露抗原决定簇,同时提高细胞膜通透性,利于抗体分子进入细胞结合抗原,避免与除Ki67抗体以外的非靶标磷酸化蛋白结合,增强信噪比,降低非特异性结合和背景干扰;减少血清中的干扰物质产生假阳性影响,提高检测的准确性和特异性;稳定Ki67抗体稳定性,提高检测灵敏度检测准确性高、假阴性率低,染色方法操作简便、染色结果清晰可见、易判读。

[0045] 以上所述,仅为本发明较佳的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉本技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,根据本发明的技术方案及其发明构思加以等同替换或改变,都应涵盖在本发明的保护范围之内。