



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110501497 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201910804572.8

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 深圳市森盈生物科技有限公司

地址 518000 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 黄子权

(74)专利代理机构 广州德伟专利代理事务所

(普通合伙) 44436

代理人 黄浩威 何文颖

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒

(57)摘要

本发明涉及生物科技技术领域,具体为一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,检测试剂盒中包括以下试剂:0.5—1.0ml的p16免疫细胞标准品浓度为81pg/mL;1.5—2.0ml的标准品稀释液;2—4ml辣根过氧化物酶;2—4ml样品稀释液;2—4ml显色剂A液;2—4ml显色剂B液;2—4ml终止液;20ml×20倍的浓缩洗涤液。本发明用纯化的人p16抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入p16,再与辣根过氧化物酶标记的p16抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加显色剂A底物显色。显色剂A和B在辣根过氧化物酶酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,定位效果和显色效果好,标记更加明显,颜色的深浅和样品中的p16呈正相关,用酶标仪在450nm波长下测定吸光度。

1. 一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述试剂盒中包括以下试剂:
0.5—1.0ml的p16免疫细胞标准品浓度为81pg/mL;
1.5—2.0ml的标准品稀释液;
2—4ml辣根过氧化物酶;
2—4ml样品稀释液;
2—4ml显色剂A液;
2—4ml显色剂B液;
2—4ml终止液;
20ml×20倍的浓缩洗涤液。

2. 根据权利要求1所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:p16免疫细胞标准品、标准品稀释液、辣根过氧化物酶、样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、终止液和浓缩洗涤液均在2—8℃的环境中进行保存。

3. 根据权利要求1所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:试剂盒从冷藏环境中取出后,在室温放置15—30min后再进行使用。

4. 根据权利要求1所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:检测试剂盒的实验使用步骤具体如下:

S1样本处理:将样本进行离心处理后,获取上清液;

S2标准品稀释:酶标包被板上设标准品孔10孔,在第一、第二孔中分别加标准品100μL,在第一、第二孔中加标准品稀释液50μL,混匀,从第一孔、第二孔中各取100μL分别加至第三孔和第四孔,再在第三、第四孔分别加标准品稀释液50μL混匀,在第三孔和第四孔中先各取50μL弃掉,再各取50μL分别加到第五、第六孔中,再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液50μL,混匀;混匀后从第五、第六孔中各取50μL分别加到第七、第八孔中,再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液50μL,混匀后从第七、第八孔中分别取50μL加到第九、第十孔中,再在第九第十孔分别加标准品稀释液50μL,混匀后从第九第十孔中各取50μL弃掉,稀释后十个孔中的容量均为50μL,浓度分别为54pg/mL、54pg/mL、36pg/mL、36pg/mL、18pg/mL、18pg/mL、9pg/mL、9pg/mL、4.5pg/mL、4.5pg/mL;

S3加样:每组设置一个空白对照组,不加样品及辣根过氧化物酶,其余各步操作相同,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40μL,再加待测样品10μL,样品最终稀释度为5倍,加样将样品加于酶标板孔底部,不触及孔壁,摇晃混匀;

S4温育:用封板膜封板后置35—37℃温育30—40分钟;

S5配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

S6洗涤:打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

S7加酶:在处空白孔除外的每孔加入辣根过氧化物酶50μL;

S8温育洗涤:用封板膜封板后置35—37℃温育30—40分钟,之后打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

S9显色:每孔先加入显色剂A50μL,再加入显色剂B50μL,震荡混匀,5—37℃避光显色15分钟;

S10终止:每孔加终止液50μL,终止反应;

S11测定:加终止液的15min内,以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度。

5. 根据权利要求4所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述样本采用血清、血浆、尿液、细胞培养上清或组织标本。

6. 根据权利要求5所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述血清提取上清液具体操作为:在室温中将血液自然凝固10—20min,再离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

7. 根据权利要求5所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述血浆提取上清液具体操作为:在血浆中添加EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂,混合10—20min后,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

8. 根据权利要求5所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述尿液提取上清液具体操作为:用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

9. 根据权利要求5所述的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,其特征在于:所述细胞培养上清提取上清液具体操作为:检测分泌性时,用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及生物科技技术领域,具体为一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒。

背景技术

[0002] 人类P16蛋白是细胞中的一种保护性蛋白,能够防止人体细胞癌变,起到阻止细胞过度增殖的作用。人类P16蛋白的编码基因为CDKN2A,位于9号染色体短臂上。P16蛋白能够与周期素依赖性激酶4结合并抑制其活性,使细胞停留于G1期,无法持续增殖。故而,P16是一种抑癌蛋白。细胞中,P16蛋白的表达通常受到另两种抑癌蛋白:P53和RB的调控,处于低水平状态。

[0003] 目前市面上的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒在实验时定位效果差,显色效果差,标记效果差。鉴于此,我们提供一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,以解决上述背景技术中提出现如今p16免疫细胞化学标记显色试剂盒在实验时定位效果差,显色效果差,标记效果差的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,检测试剂盒中包括以下试剂:

[0007] 0.5—1.0ml的p16免疫细胞标准品浓度为81pg/mL;

[0008] 1.5—2.0ml的标准品稀释液;

[0009] 2—4ml辣根过氧化物酶;

[0010] 2—4ml样品稀释液;

[0011] 2—4ml显色剂A液;

[0012] 2—4ml显色剂B液;

[0013] 2—4ml终止液;

[0014] 20ml×20倍的浓缩洗涤液。

[0015] 作为优选,p16免疫细胞标准品、标准品稀释液、辣根过氧化物酶、样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、终止液和浓缩洗涤液均在2—8℃的环境中进行保存。

[0016] 作为优选,试剂盒从冷藏环境中取出后,在室温放置15—30min后再进行使用。

[0017] 作为优选,检测试剂盒的实验使用步骤具体如下:

[0018] S1样本处理:将样本进行离心处理后,获取上清液;

[0019] S2标准品稀释:酶标包被板上设标准品孔10孔,在第一、第二孔中分别加标准品100μL,在第一、第二孔中加标准品稀释液50μL,混匀,从第一孔、第二孔中各取100μL分别加至第三孔和第四孔,再在第三、第四孔分别加标准品稀释液50μL混匀,在第三孔和第四孔中先各取50μL弃掉,再各取50μL分别加到第五、第六孔中,再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液50μL,混匀;混匀后从第五、第六孔中各取50μL分别加到第七、第八孔中,再在第七、

第八孔中分别加标准品稀释液50 μ L,混匀后从第七、第八孔中分别取50 μ L加到第九、第十孔中,再在第九第十孔分别加标准品稀释液50 μ L,混匀后从第九第十孔中各取50 μ L弃掉,稀释后十个孔中的容量均为50 μ L,浓度分别为54pg/mL、54pg/mL、36pg/mL、36pg/mL、18pg/mL、18pg/mL、9pg/mL、9pg/mL、4.5pg/mL、4.5pg/mL;

[0020] S3加样:每组设置一个空白对照组,不加样品及辣根过氧化物酶,其余各步操作相同,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40 μ L,再加待测样品10 μ L,样品最终稀释度为5倍,加样将样品加于酶标板孔底部,不触及孔壁,摇晃混匀;

[0021] S4温育:用封板膜封板后置35—37 $^{\circ}$ C温育30—40分钟;

[0022] S5配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

[0023] S6洗涤:打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

[0024] S7加酶:在处空白孔除外的每孔加入辣根过氧化物酶50 μ L;

[0025] S8温育洗涤:用封板膜封板后置35—37 $^{\circ}$ C温育30—40分钟,之后打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

[0026] S9显色:每孔先加入显色剂A50 μ L,再加入显色剂B50 μ L,震荡混匀,5—37 $^{\circ}$ C避光显色15分钟;

[0027] S10终止:每孔加终止液50 μ L,终止反应;

[0028] S11测定:加终止液的15min内,以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度。

[0029] 作为优选,所述样本采用血清、血浆、尿液、细胞培养上清或组织标本。

[0030] 作为优选,所述血清提取上清液具体操作为:在室温中将血液自然凝固10—20min,再离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0031] 作为优选,所述血浆提取上清液具体操作为:在血浆中添加EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂,混合10—20min后,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0032] 作为优选,所述尿液提取上清液具体操作为:用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0033] 作为优选,所述细胞培养上清提取上清液具体操作为:检测分泌性的成份时,用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0034] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:

[0035] 1、本p16免疫细胞化学标记显色试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人p16水平,用纯化的人p16抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入p16,再与辣根过氧化物酶标记的p16抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加显色剂A底物显色。显色剂A和B在辣根过氧化物酶酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,定位效果和显色效果好,标记更加明显,颜色的深浅和样品中的p16呈正相关,用酶标仪在450nm波长下测定吸光度,更加准确,此外可以通过标准曲线计算样品中人p16含量。

[0036] 2、本p16免疫细胞化学标记显色试剂盒可以根据不同试验的需求和条件,选择适合试验的样本液,满足不同人群的需求,便于推广。

具体实施方式

[0037] 下面将结合本发明实施例,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。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0038] 实施例1

[0039] 一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒,检测试剂盒中包括以下试剂:

[0040] 0.5—1.0ml的p16免疫细胞标准品浓度为81pg/mL;1.5—2.0ml的标准品稀释液;2—4ml辣根过氧化物酶;2—4ml样品稀释液;2—4ml显色剂A液;2—4ml显色剂B液;2—4ml终止液;20ml×20倍的浓缩洗涤液。

[0041] 进一步的,p16免疫细胞标准品、标准品稀释液、辣根过氧化物酶、样品稀释液、显色剂A液、显色剂B液、终止液和浓缩洗涤液均在2—8℃的环境中进行保存,保存时间更加持久。

[0042] 具体的,试剂盒从冷藏环境中取出后,在室温放置15—30min后再进行使用,试验结果更加准确。

[0043] 值得说明的是,检测试剂盒的实验使用步骤具体如下:

[0044] S1样本处理:将样本进行离心处理后,获取上清液;

[0045] S2标准品稀释:酶标包被板上设标准品孔10孔,在第一、第二孔中分别加标准品100μL,在第一、第二孔中加标准品稀释液50μL,混匀,从第一孔、第二孔中各取100μL分别加至第三孔和第四孔,再在第三、第四孔分别加标准品稀释液50μL混匀,在第三孔和第四孔中先各取50μL弃掉,再各取50μL分别加到第五、第六孔中,再在第五、第六孔中分别加标准品稀释液50μL,混匀;混匀后从第五、第六孔中各取50μL分别加到第七、第八孔中,再在第七、第八孔中分别加标准品稀释液50μL,混匀后从第七、第八孔中分别取50μL加到第九、第十孔中,再在第九第十孔分别加标准品稀释液50μL,混匀后从第九第十孔中各取50μL弃掉,稀释后十个孔中的容量均为50μL,浓度分别为54pg/mL、54pg/mL、36pg/mL、36pg/mL、18pg/mL、18pg/mL、9pg/mL、9pg/mL、4.5pg/mL、4.5pg/mL;

[0046] S3加样:每组设置一个空白对照组,不加样品及辣根过氧化物酶,其余各步操作相同,在酶标包被板上待测样品孔中先加样品稀释液40μL,再加待测样品10μL,样品最终稀释度为5倍,加样将样品加于酶标板孔底部,不触及孔壁,摇晃混匀;

[0047] S4温育:用封板膜封板后置35—37℃温育30—40分钟;

[0048] S5配液:将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;

[0049] S6洗涤:打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

[0050] S7加酶:在处空白孔除外的每孔加入辣根过氧化物酶50μL;

[0051] S8温育洗涤:用封板膜封板后置35—37℃温育30—40分钟,之后打开封板膜,弃去液体,每孔加满稀释后的洗涤液,静置30s后弃去,重复5次;

[0052] S9显色:每孔先加入显色剂A50μL,再加入显色剂B50μL,震荡混匀,5—37℃避光显色15分钟;

[0053] S10终止:每孔加终止液50μL,终止反应;

[0054] S11测定:加终止液的15min内,以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度。

[0055] 本实施例的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒应用双抗体夹心法测定标本中人p16水平,用纯化的人p16抗体包被微孔板,制成固相抗体,往包被单抗的微孔中依次加入p16,再与辣根过氧化物酶标记的p16抗体结合,形成抗体—抗原—酶标抗体复合物,经过彻底洗涤后加显色剂A底物显色。显色剂A和B在辣根过氧化物酶酶的催化下转化成蓝色,并在酸的作用下转化成最终的黄色,定位效果和显色效果好,标记更加明显,颜色的深浅和样品中的p16呈正相关,用酶标仪在450nm波长下测定吸光度,可以通过标准曲线计算样品中人p16含量。

[0056] 实施例2

[0057] 作为本发明的第二种实施例,样本采用血清、血浆、尿液、细胞培养上清或组织标本。

[0058] 血清提取上清液具体操作为:在室温中将血液自然凝固10—20min,再离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0059] 血浆提取上清液具体操作为:在血浆中添加EDTA或柠檬酸钠作为抗凝剂,混合10—20min后,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0060] 尿液提取上清液具体操作为:用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0061] 细胞培养上清提取上清液具体操作为:检测分泌性的成份时,用无菌管收集,离心15—20min,转速为2000—3000r/min,收集上血清。

[0062] 本实施例的p16免疫细胞化学标记显色试剂盒可以根据不同试验的需求和条件,选择适合试验的样本液,满足不同人群的需求,便于推广。

[0063] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征和本发明的优点。本行业的技术人员应该了解,本发明不受上述实施例的限制,上述实施例和说明书中描述的仅为本发明的优选例,并不用来限制本发明,在不脱离本发明精神和范围的前提下,本发明还会有各种变化和改进,这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

专利名称(译)	一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒		
公开(公告)号	CN110501497A	公开(公告)日	2019-11-26
申请号	CN201910804572.8	申请日	2019-08-28
[标]发明人	黄子权		
发明人	黄子权		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/535 G01N33/54393		
代理人(译)	黄浩威		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物科技技术领域，具体为一种p16免疫细胞化学标记显色试剂盒，检测试剂盒中包括以下试剂：0.5 - 1.0ml的p16免疫细胞标准品浓度为81pg/mL；1.5 - 2.0ml的标准品稀释液；2 - 4ml辣根过氧化物酶；2 - 4ml样品稀释液；2 - 4ml显色剂A液；2 - 4ml显色剂B液；2 - 4ml终止液；20ml×20倍的浓缩洗涤液。本发明用纯化的人p16抗体包被微孔板，制成固相抗体，往包被单抗的微孔中依次加入p16，再与辣根过氧化物酶标记的p16抗体结合，形成抗体 - 抗原 - 酶标抗体复合物，经过彻底洗涤后加显色剂A底物显色。显色剂A和B在辣根过氧化物酶酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色，定位效果和显色效果好，标记更加明显，颜色的深浅和样品中的p16呈正相关，用酶标仪在450nm波长下测定吸光度。