



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109856383 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201910162981.2

(22)申请日 2019.03.05

(71)申请人 湖北泰康医疗设备有限公司

地址 432100 湖北省孝感市市辖区高新区  
崇礼路55号

(72)发明人 肖国林

(74)专利代理机构 上海微策知识产权代理事务  
所(普通合伙) 31333

代理人 王小穗

(51)Int.Cl.

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页 附图3页

(54)发明名称

一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色  
试剂盒

(57)摘要

本发明涉及液基细胞学免疫细胞化学领域，具体涉及到一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫组织化学试剂盒。本发明中提供了一种即用型抗体工作液，包括抗体试剂、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、中性无机盐、表面活性剂、防腐剂；其中所述抗体试剂为试剂A或试剂B；所述试剂A为p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的PBS缓冲溶液；所述试剂B为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液；所述PBS缓冲溶液的pH值为7.2~7.8。



1. 一种即用型抗体工作液,其特征在于,包括抗体试剂、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中所述抗体试剂为试剂A或试剂B;所述试剂A为p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的PBS缓冲溶液;所述试剂B为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液;所述PBS缓冲溶液的pH值为7.2~7.8。

2. 如权利要求1所述的即用型抗体工作液,其特征在于,包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.1~1.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.1~1.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2~2.5g/L;所述非还原性糖浓度为1~8g/L;所述甜菜碱浓度为2~4g/L;所述环糊精浓度为0.1~2.5g/L;所述表面活性剂含量0.01~1wt%。

3. 如权利要求1所述的即用型抗体工作液,其特征在于,包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为0.5~4mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为1~4mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2~2.5g/L,所述非还原性糖浓度1~8g/L;所述甜菜碱浓度2~4g/L;所述环糊精浓度0.1~2g/L;所述表面活性剂含量0.01~0.5wt%。

4. 如权利要求3所述的即用型抗体工作液,其特征在于,所述表面活性剂为非离子型表面活性剂;所述非离子型表面活性剂为脂肪酸酯类表面活性剂。

5. 如权利要求1所述的即用型抗体工作液,其特征在于,所述非还原性糖为海藻糖和/或蔗糖。

6. 一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,其特征在于,包括如权利要求2和3所述的即用型抗体工作液、快速无蛋白封闭液、稳定型辣根过氧化物酶显色试剂、即用型碱性磷酸酶显色试剂、水性封片剂。

7. 如权利要求6所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,其特征在于,所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、PVP、吐温;其中所述缓冲溶液为pH值为7.2~7.8的PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液;所述海藻糖浓度1~25g/L;所述PEG和PVP的浓度为0~12g/L,且不同时为零;所述吐温含量0.1~5wt%。

8. 如权利要求6或7所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒的使用方法,其特征在于,包括如下步骤:

1) 取样本制成细胞涂片并且固定,然后用过氧化氢处理,并室温孵育10min;

2) 对第一步前处理得到的细胞涂片用快速无蛋白封闭液进行封闭5~30min,然后去除快速无蛋白封闭液,用含有p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的如权利要求2所述的即用型抗体工作液37℃孵育30~80min,PBS缓冲液洗涤;然后用含有羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗的如权利要求3所述的即用型抗体工作液37℃孵育5~40min,PBS缓冲液洗涤;

3) 取稳定型辣根过氧化物酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,然后用显微镜观察显色至细胞质棕色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色,然后用即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色;然后苏木素复染,洗涤后水性封片剂封片,显微镜下观察;

4) 结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色;仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性;当涂片中出现一个或

多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性。

9. 如权利要求8所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒的使用方法, 其特征在于, 第3步中所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂包括: DAB反应液, DAB底物, DAB色原。

10. 如权利要求8所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒的使用方法, 其特征在于, 第一步中所述固定过程采用95~99wt%乙醇或4wt%多聚甲醛。

## 一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及液基细胞学免疫细胞化学领域,具体涉及到一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒。

### 背景技术

[0002] 宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,其发病率仅次于乳腺癌并呈年轻化趋势,严重危害妇女身体健康。然而,宫颈癌又是唯一明确病因,有望成为第一个被人类攻克的肿瘤。因此,预防及早期筛查对降低宫颈癌的发病及死亡率具有重要意义。

[0003] 目前,宫颈癌诊断的主要方法有:宫颈脱落细胞学检查、人乳头瘤病毒(HPV)检测、阴道镜检查、病理活检等;中华医学会推荐的宫颈癌诊断三阶段程序为细胞学、阴道镜、宫颈组织活检。该诊断程序虽然有效,但也存在明显的局限性。阴道镜、组织活检是一种创伤性检查,给受检者带来一定痛苦,不适用于对所有病例进行筛查,应用范围比较小。而细胞学检测主要是通过病理医生对宫颈脱落细胞进行病理染色后再于显微镜下进行观察诊断。该方法操作较为简便,患者无痛苦,适合进行常规筛查。但受限于病理医生的经验,存在一定的假阳性和假阴性,造成部分高危患者的漏诊。因此,急需更加客观的肿瘤标志物的辅助诊断方法,提高细胞学筛查的敏感度和特异度。

[0004] 大量研究证实,大于90%的宫颈癌的发生与HPV的感染相关,HPV的E6、E7蛋白分别与P53的抑癌基因产物和pRb蛋白结合,影响与细胞周期和增殖相关的基因p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67等的表达。P16<sup>INK4a</sup>基因是一种直接作用于细胞周期、抑制细胞分裂的抑癌基因,其过度表达与HPV感染密切相关,并已成为HPV感染转化的一个替代标志物。Ki-67是一种细胞增殖相关蛋白,只能在增殖细胞的细胞核中检出。因此,同一个正常宫颈上皮组织细胞中不会同时表达该两种蛋白。如果在宫颈上皮细胞中同时检测到p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67的表达,则认为该细胞的周期调控出现失常,并以此作为宫颈上皮细胞转化状态的一个指标。另外,p16<sup>INK4a</sup>主要表达细胞核和细胞质,而Ki-67只在细胞核中表达,因此可以实现通过免疫组化实验检测宫颈癌组织细胞中两蛋白的共表达情况。大量研究表明p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67免疫组化双染检出CIN2及以上宫颈癌病变的灵敏度较高,其特异性明显高于细胞学检查和高危HPV检测,能够降低误诊率,提高诊断阳性预测值。

[0005] 本发明要解决的技术问题是:当患者的高危HPV感染结果为阳性以及细胞学筛查诊断结果为非典型性鳞状细胞(ASCUS)或低鳞状上皮病变(LSIL)时,可以通过一种非创伤性且比较有效的检测方法对患者进行辅助诊断。同时,该检测方法要求操作简单方便,稳定性好,结果易于观察。

### 发明内容

[0006] 针对上述问题,本发明的第一方面提供了一种即用型抗体工作液,包括抗体试剂、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中所述抗体试剂为试剂A或试剂B;所述试剂A为p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的PBS缓冲溶液;所述试剂B为辣根

过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液;所述PBS缓冲溶液的pH值为7.2~7.8。

[0007] 作为一种优选的技术方案,所述即用型抗体工作液包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.1~1.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.1~1.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2~2.5g/L;所述非还原性糖浓度为1~8g/L;所述甜菜碱浓度为2~4g/L;所述环糊精浓度为0.1~2.5g/L;所述表面活性剂含量0.01~1wt%。

[0008] 作为一种优选的技术方案,所述即用型抗体工作液包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为0.5~4mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为1~4mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2~2.5g/L,所述非还原性糖浓度1~8g/L;所述甜菜碱浓度2~4g/L;所述环糊精浓度0.1~2g/L;所述表面活性剂含量0.01~0.5wt%。

[0009] 作为一种优选的技术方案,所述表面活性剂为非离子型表面活性剂;所述非离子型表面活性剂为脂肪酸酯类表面活性剂。

[0010] 作为一种优选的技术方案,所述非还原性糖为海藻糖和/或蔗糖。

[0011] 本发明的第二个方面提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包括如上所述的即用型抗体工作液、快速无蛋白封闭液、稳定型辣根过氧化物酶显色试剂、即用型碱性磷酸酶显色试剂、水性封片剂。

[0012] 作为一种优选的技术方案,所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、PVP、吐温;其中所述缓冲溶液为pH值为7.2~7.8的PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液;所述海藻糖浓度1~25g/L;所述PEG和PVP的浓度为0~12g/L,且不同时为零;所述吐温含量0.1~5wt%。

[0013] 本发明的第三个方面提供了如上所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0014] 1) 取样本制成细胞涂片并且固定,然后用过氧化氢处理,并室温孵育10min;

[0015] 2) 对第一步前处理得到的细胞涂片用快速无蛋白封闭液进行封闭5~30min,然后去除快速无蛋白封闭液,用含有p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的如上所述的即用型抗体工作液37℃孵育30~80min,PBS缓冲液洗涤;然后用含有羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗的如上所述的即用型抗体工作液37℃孵育5~40min,PBS缓冲液洗涤;

[0016] 3) 取稳定型辣根过氧化物酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,然后用显微镜观察显色至细胞质棕色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色,然后用即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色;然后苏木素复染,洗涤后水性封片剂封片,显微镜下观察;

[0017] 4) 结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色;仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性;当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性。

[0018] 作为一种优选的技术方案,第3步中所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂包括:DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)。

[0019] 作为一种优选的技术方案,第一步中所述固定过程采用95~99wt%乙醇或4wt%

多聚甲醛。

[0020] 有益效果：本试剂盒组分较少，采用即用设计，各组分使用方便，极大简化了繁杂的免疫组化操作。其中即用型抗体工作液中包含优化后的高质量抗体以及多种抗体保护成分，使用方便，易于保存，可以长期存储于2-8℃而保持质量稳定。使用时无需稀释，直接滴加在样本上即可，方便快捷。快速无蛋白封闭液用无动物来源的小分子成分配制，封闭速度快，背景低，并在一定程度上提升信号强度。

[0021] 该发明对显色方式也进行了极大的改良，可节省操作时间，节约成本，方便观察双染结果，减少阳性漏判及误判的概率。其中棕色细胞质信号和蓝紫色细胞核信号叠加可形成鲜明对比。稳定型辣根过氧化物酶显色试剂可将阳性细胞的细胞质催化形成棕色信号，而即用型碱性磷酸酶显色试剂可将阳性细胞的细胞核催化形成蓝紫色信号，双染阳性一目了然。试剂盒包含即用型碱性磷酸酶显色试剂，杜绝了传统显色液需要提前配置且稳定性差的弊端，节省了操作人员的时间，减少不同批次检测间的误差。稳定型辣根过氧化物酶显色试剂配置后可在2-8℃稳定保存长达1周时间，可一次配置可多次使用，避免试剂浪费，节约成本。染色结束后用水溶性封片剂封片，无需脱水，透明等步骤，缩短封片操作的时间，提高病理医生的工作效率。

[0022] 总之，该发明试剂盒可以利用液基细胞学诊断剩余的液基细胞学涂片作为样本，通过简便操作来原位检测宫颈脱落细胞中p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67蛋白的表达情况，为宫颈癌早期筛查诊断提供有力辅助手段，同时降低患者的痛苦，减轻医生的工作压力，提升宫颈癌诊断的特异性和灵敏度，具有极大的临床诊断价值及应用前景。

## 附图说明

[0023] 图1为化学发光法检测即用型二抗工作液中辣根过氧化物酶活性图，其中从左至右四个圆点分别表示实施例7、实施例8、实施例1和普通抗体稀释液新鲜配制液中抗体活性亮度点。

[0024] 图2为WesternBlot实验检测本试剂盒成分中快速封闭液曝光1秒时的信号放大效果，其中从左至右两个短横线分别表示实施例5、实施例4和实施例1中检测信号强度图（越亮表示信号强度越好）。

[0025] 图3为WesternBlot实验检测本试剂盒成分中快速封闭液曝光3秒时的信号放大效果，其中从左至右两个短横线分别表示实施例5、实施例4和实施例1中检测信号强度图（越亮表示信号强度越好）。

[0026] 图4为WesternBlot实验检测本试剂盒成分中快速封闭液曝光5秒时的信号放大效果，其中从左至右两个短横线分别表示实施例5、实施例4和实施例1中检测信号强度图（越亮表示信号强度越好）。

[0027] 图5为实施例1提供的试剂盒按照该实施例提供的方法进行检测得到的p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性结果图。

[0028] 图6为实施例1提供的试剂盒按照该实施例提供的方法进行检测得到的p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阴性结果图。

[0029] 图7为实施例1提供的试剂盒按照该实施例提供的方法进行检测得到的Ki-67阳性细胞结果图。

[0030] 图8为实施例1提供的试剂盒按照该实施例提供的方法进行检测得到的p16<sup>INK4a</sup>阳性细胞结果图。

### 具体实施方式

[0031] 下面结合具体实施方式对本发明提供技术方案中的技术特征作进一步清楚、完整的描述,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。

[0032] 本发明中的词语“优选的”、“优选地”、“更优选的”等是指,在某些情况下可提供某些有益效果的本发明实施方案。然而,在相同的情况下或其他情况下,其他实施方案也可能是优选的。此外,对一个或多个优选实施方案的表述并不暗示其他实施方案不可用,也并非旨在将其他实施方案排除在本发明的范围之外。

[0033] 应当理解,除了在任何操作实例中,或者以其他方式指出的情况下,表示例如说明书和权利要求中使用的成分的量的所有数字应被理解为在所有情况下被术语“约”修饰。

[0034] 为了解决该问题,利用以上工作原理,我们设计了p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67免疫化学染色试剂盒,该试剂盒可以利用液基细胞学诊断剩余的液基细胞学涂片作为样本,方便快捷的原位检测宫颈脱落细胞中p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67蛋白的表达情况,为宫颈癌早期筛查诊断提供有力辅助手段,同时降低患者的痛苦,减轻医生的工作压力,提升宫颈癌诊断的特异性和灵敏度,具有重要的临床应用价值。

[0035] 具体的,本发明的第一方面提供了一种即用型抗体工作液,包括抗体试剂、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中所述抗体试剂为试剂A或试剂B;所述试剂A为p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的PBS缓冲溶液;所述试剂B为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液;所述PBS缓冲溶液的pH值为7.2~7.8。

[0036] p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体是含有重要抑癌基因的蛋白,在多数肿瘤中扮演着抑癌基因的角色,但是由于它的基因突变、缺失或启动子区甲基化,造成P16<sup>INK4a</sup>基因表达下调,导致该蛋白失去抑癌的作用。研究表明P16<sup>INK4a</sup>过度表达与HPV感染密切相关,并已成为HPV感染转化的一个替代标志物。Ki-67是一种细胞增殖相关蛋白,只能在增殖细胞的细胞核中检出。大量研究表明p16<sup>INK4a</sup>和Ki-67免疫组化双染检出CIN2及以上宫颈癌病变的灵敏度较高,其特异性明显高于细胞学检查和高危HPV检测,能够降低误诊率,提高诊断养性预测值。

[0037] 本发明中的p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体并没有特殊限定,均使用市面上常规的试剂,例如可以使用北京义翘神州科技有限公司的相关产品。

[0038] 牛血清白蛋白(BSA)是牛血清中的一种球蛋白,包含607个氨基酸残基,分子量为66.446KDa,等电点为4.7。本发明中的牛血清白蛋白(BSA)由于其特殊的成分和结构,有助于防止酶的分解和非特异性吸附,能减轻有些酶的变性。该试剂可以自制,也可以从市面上购买获得。

[0039] 非还原性糖是不能还原斐林试剂或托伦斯试剂的糖。在一些实施方式中,所述非还原性糖为海藻糖和/或蔗糖;优选的,所述非还原性糖为海藻糖。

[0040] 海藻糖是由两个葡萄糖分子以1,1-糖苷键构成的非还原性糖。由于不具有还原

性,对加热和酸碱性能都具有较好的稳定性。海藻糖能包被在蛋白表面形成一种保护膜,提高蛋白稳定性。由于抗体试剂、标记用的各种酶等组分的稳定性差,不能长期保存,而本发明中的非还原性糖因其独特的结构,与抗体工作液中其它组分之间的协同作用下,有助于提高抗体工作液中抗体蛋白及标记酶的稳定性,使得工作液有效成分能在冷藏条件下长期保存。

[0041] 甜菜碱是一种生物碱,学名为三甲基甘氨酸,为白色鳞状或棱状结晶粉末,具有强烈的吸湿性能。甜菜碱的溶解度很高,不带静电荷,其高浓度对许多酶及其他生物大分子没有影响,甚至有保护作用。可提高酶热变性所需的温度,解除高浓度盐对酶活性的毒害;防止脱水诱导的蛋白质热动力学干扰,在于非还原性糖、环糊精、表面活性剂等成分之间的协同作用之下有助于提高酶和抗体蛋白的热稳定性。

[0042] 环糊精简称CD是直链淀粉在由芽孢杆菌产生的环糊精葡萄糖基转移酶作用下生成的一系列环状低聚糖的总称,通常含有6~12个D-吡喃葡萄糖单元。本发明中优选使用 $\beta$ -环糊精。 $\beta$ -环糊精是由淀粉经微生物酶作用后提取制成的由7个葡萄糖残基以 $\beta$ -1,4-糖苷键结合构成的环状物。 $\alpha$ -环糊精, $\gamma$ -环糊精,羟丙基环糊精等多种环糊精衍生物均具有类似效果。但由于 $\alpha$ -环糊精分子空洞孔隙较小,通常只能包接较小分子的客体物质,应用范围较小; $\gamma$ -环糊精的分子洞大,但其生产成本低,工业上不能大量生产,而且因其大的孔径对一些客体的吸附和封锁能力受到影响,从而使其应用受到限制; $\beta$ -环糊精是由淀粉经微生物酶作用后提取制成的由7个葡萄糖残基以 $\beta$ -1,4-糖苷键结合构成的环状物。由于其分子结构特殊性,可以包络蛋白质结构,增加包络物对光热,氧化的稳定性,降低外界环境对抗体的影响。

[0043] 表面活性剂是指加入少量能使其溶液体系的界面状态发生明显变化的物质。在一些实施方式中,所述表面活性剂为非离子型表面活性剂;所述非离子型表面活性剂为脂肪酸酯类表面活性剂;优选的,所述脂肪酸酯类表面活性剂选用吐温类表面活性剂,优选使用吐温-20。

[0044] 本发明中的Tween-20含有较多的亲水性基团—聚氧乙烯基,为一种非离子型表面活性剂,与蛋白质类似具有两亲性。Tween-20试剂在与环糊精、甜菜碱等组分之间的协同作用之下,有助于防止过多的封闭蛋白形成层积效应,即多层蛋白粘附在切片表面从而提高封闭效果,还可通过氢键结合到蛋白表面的疏水区域,降低蛋白之间聚集,使蛋白的变性温度升高,蛋白稳定性增强,同时减少抗原抗体的非特异性吸附。

[0045] 在一些实施方式中,所述即用型抗体工作液包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液(优选pH值为7.4)、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.1~1.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.1~1.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2~2.5g/L;所述非还原性糖浓度为1~8g/L;所述甜菜碱浓度为2~4g/L;所述环糊精浓度为0.1~2.5g/L;所述表面活性剂含量0.01~1wt%。优选的,还包括中性无机盐和防腐剂;所述中性无机盐浓度为1~4g/L;所述防腐剂含量0.1~1wt%。进一步优选的,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述非还原性糖浓度为1.7g/L;所述甜菜碱浓度为3.6g/L;所述环糊精浓度为2.1g/L;所述表面活性剂含量0.07wt%。其中所述的含量是指组分在所述即用型抗体工作液中所占的重量比例。优选的,还包括中性无机盐和防腐剂;所述中性无



机盐浓度为3.2g/L;所述防腐剂含量0.5wt%。

[0046] 本发明中的中性无机盐没有特殊限定,可以选自氯化钠、硫酸镁、硫酸钠、硫酸铵中的一种或多种;优选的,所述中性无机盐选用氯化钠。氯化钠能增加蛋白质部分结合,从而增加蛋白分子表面电荷,增强蛋白质分子与水分子之间的作用,在于其它成分之间的协同作用之下有助于保护蛋白不易变性。

[0047] 防腐剂是能够灭杀或抑制微生物,特别是细菌和真菌生长的化学物质。本发明中的防腐剂优选使用KATHON(可从北京南大合荣科技发展有限公司等购买获得)。本发明中的防腐剂可以通过作用于微生物的细胞膜、细胞壁及酶等多个靶点,破坏细胞的分裂,抑制微生物的生长和繁殖,达到防腐的目的。

[0048] 本发明中的即用型抗体工作液实际上包括两种,其一为上述即用型混合一抗工作液,其中包含p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体;另一个为如下所述的即用型混合二抗工作液,其中包含辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗。由于所述p16<sup>INK4a</sup>抗体、Ki-67抗体、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗等之间结构、稳定性成之间差异,导致所述牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、中性无机盐、表面活性剂,防腐剂等用量、浓度等存在较大的不同。

[0049] 在一些实施方式中,所述即用型抗体工作液包括pH值为7.2~7.8的PBS缓冲溶液(优选pH值为7.4)、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、表面活性剂;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为0.5-4mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为1-4mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.2-2.5g/L,所述非还原性糖浓度1-8g/L;所述甜菜碱浓度2-4g/L;所述环糊精浓度0.1-2g/L;所述表面活性剂含量0.01-0.5wt%;优选的,还包括中性无机盐和防腐剂;所述中性无机盐1-4g/L;所述防腐剂含量0.1-1wt%。进一步优选的,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L,所述非还原性糖浓度3.3g/L;所述甜菜碱浓度3.5g/L;所述环糊精浓度1.6g/L;所述表面活性剂含量0.05wt%。更进一步优选的,所述中性无机盐(优选氯化钠)3g/L;所述防腐剂(优选KATHON)含量0.06wt%。

[0050] 本发明的第二个方面提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包括如上所述的即用型抗体工作液、快速无蛋白封闭液、稳定型辣根过氧化物酶显色试剂、即用型碱性磷酸酶显色试剂、水性封片剂,即该双染试剂盒包含即用型混合一抗工作液(1瓶),即用型混合二抗工作液(1瓶),快速无蛋白封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶),水性封片剂(1瓶)。

[0051] 本发明中所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1),即用型,无需提前配制,直接滴加在样本上即可显色。本发明中的所述NBT/BCIP预混液为本领域技术人员所熟知的、本领域常用的显色试剂。

[0052] 本发明中所述水性封片剂包含甘油和PBS缓冲液,即用型,直接滴加在样本上封片即可。另外具体使用时,使用者还需要自行准备3%的过氧化氢溶液,PBS缓冲液,95-99%乙醇或4%多聚甲醛,苏木素染色液,可根据本领域技术人员所熟知的方法操作即可。

[0053] 在一些实施方式中,所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、PVP、吐温;其中所述缓冲溶液为pH值为7.2~7.8的PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液;所述海藻糖浓度

1-25g/L;所述PEG和PVP的浓度为0-12g/L,且不同时为零;所述吐温(优选吐温-20)含量0.1-5wt%。优选的,所述快速无蛋白封闭液还包括防腐剂,所述防腐剂含量0.1-2wt%。

[0054] 进一步优选的,所述快速无蛋白封闭液中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液或Tris-HCl缓冲液;所述海藻糖浓度5g/L;所述PEG或PVP的浓度为3g/L;所述吐温(优选吐温-20)含量3wt%;所述防腐剂(优选KATHON或叠氮化钠)含量0.5wt%

[0055] 所述PEG是聚乙二醇英文名polyethylene glycol的缩写,是指环氧乙烷的寡聚物或聚合物;在一些实施方式中,所述PEG的重均分子量为2000~20000。

[0056] 所述PVP是聚乙烯吡咯烷酮的简称,是一种非离子型高分子化合物,本发明中对其重均分子量等参数没有特殊限定,使用常规PVP成分即可。

[0057] 申请人发现在上述试剂盒中快速无蛋白封闭液对试剂盒成分的保存稳定性、测试效果的准确性。现有技术中实验者做免疫组化实验最常用的是自己配置的是5%奶粉或者3%BSA封闭液,封闭时间2-4小时。该类封闭液主要成分是动物来源的蛋白质,有多种缺陷,例如由于成分复杂且分子大小不均一,有大有小,导致封闭效果无法预测,封闭时间久了,过多的蛋白质成分会封闭部分抗体抗原结合位点,导致最终检测信号变弱。封闭时间短了,封闭效果可能不佳,导致背景提高,信噪比降低。而且动物源性成分可能存在内源性的生物素干扰,另外也可能跟二抗产生交叉反应,引起背景升高或出现假阳性信号。此外由于都是营养成分极易变质,该类封闭液必须现用现配,无法长期在2-8℃保存,给实验者造成诸多不便和成本浪费。

[0058] 而本发明的快速封闭液,成分明确,颗粒较小且均一,可以实现快速封闭(10分钟)。该成分不会干扰抗原抗体的结合。因此相比于常用封闭液可以提升信号强度(1-5倍)。无动物源性成分,杜绝了杂质对实验结果的干扰,使结果更清晰,减少假阳性。添加了食品级别的高效防腐剂,提高产品稳定性。

[0059] 本发明的第三个方面提供了如上所述的用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0060] 1) 取样本制成细胞涂片并且固定,然后用过氧化氢处理,并室温孵育10min;在一些实施方式中,所述固定过程采用95~99wt%乙醇或4wt%多聚甲醛;将95-99%乙醇或4%多聚甲醛固定5-30min,PBS洗涤2次,每次5min,直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用(可储存30天)。

[0061] 2) 对第一步前处理得到的细胞涂片用快速无蛋白封闭液进行封闭5-30min,然后去除快速无蛋白封闭液,用含有p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的即用型抗体工作液37℃孵育30-80min,PBS缓冲液洗涤;然后用含有羊抗鼠二抗和羊抗兔二抗的即用型抗体工作液37℃孵育5-40min,PBS缓冲液洗涤;

[0062] 3) 取稳定型辣根过氧化物酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,然后用显微镜观察显色至细胞质棕色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色,然后用即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度,PBS缓冲液洗涤停止显色;然后苏木素复染,洗涤后水性封片剂封片,显微镜下观察;

[0063] 4) 结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色;仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性;当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性。

[0064] 具体的：

[0065] 1) 利用液基薄层细胞制片机制成薄层细胞涂片，95-99%乙醇或4%多聚甲醛固定5-30min，PBS洗涤2次，每次5min，直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用(可储存30天)。

[0066] 2) 准备好的薄层细胞涂片每张滴加50微升3%的过氧化氢溶液，室温孵育10min，消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤液洗涤2次，每次5min。

[0067] 3) 每张薄层细胞涂片滴加50微升快速无蛋白封闭液，37℃封闭5-30min。

[0068] 4) 甩去封闭液，每张涂片滴加50微升即用型混合一抗工作液，37℃孵育30-80min，PBS洗涤2次，每次5min。

[0069] 5) 甩去PBS，每张滴加50微升即用型混合二抗工作液，37℃孵育5-40min。PBS洗涤2次，每次5min。

[0070] 6) 取适量提前配好的稳定型过氧化氢酶显色试剂50微升滴加到待测样品上，37℃避光孵育，显微镜下观察显色至细胞质棕色信号强度适中，PBS洗涤停止显色。甩去PBS，取50微升即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上，37℃避光孵育，显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度适中，PBS洗涤停止显色。苏木素复染，洗涤后水溶性封片剂封片，显微镜下观察，拍照。

[0071] 7) 结果判定标准：p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色(图5)。仅细胞核蓝紫色(图7)或仅细胞质及细胞核棕色(图8)，以及细胞未显色均为阴性(图6)。当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性，可作为进一步诊断的判定依据。

[0072] 在一些实施方式中，第3步中所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂包括：DAB反应液，DAB底物(20倍)，DAB色原(20倍)。使用时，将DAB底物(20倍)，DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用，配制完成可于2-8℃避光保存1周不影响显色效果。例如，配制1毫升的工作液：取900微升的DAB反应液，50微升的DAB底物(20倍)，50微升DAB色原(20倍)，混合均匀即可。相当于底物和色原需要用反应液稀释20倍后使用。

[0073] 下面通过实施例对本发明进行具体描述。有必要在此指出的是，以下实施例只用于对本发明作进一步说明，不能理解为对本发明保护范围的限制，该领域的专业技术人员根据上述本发明的内容做出的一些非本质的改进和调整，仍属于本发明的保护范围。

[0074] 另外，如果没有其它说明，所用原料都是市售的。

[0075] 实施例1提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒，包含即用型混合一抗工作液(1瓶)，即用型混合二抗工作液(1瓶)，快速无蛋白封闭液(1瓶)，稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶)，即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶)，水性封片剂(1瓶)。

[0076] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON；其中，所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2mg/L；所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L；所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L；所述海藻糖浓度为1.7g/L；所述甜菜碱浓度为3.6g/L；所述β-环糊精浓度为2.1g/L；所述氯化钠浓度为3.2g/L；所述吐温-20含量0.07wt%；所述KATHON含量0.5wt%。

[0077] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、β-环糊精、

氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度3.3g/L;所述甜菜碱浓度3.5g/L;所述 $\beta$ -环糊精浓度1.6g/L;所述氯化钠3g/L;所述吐温-20含量0.05wt%;KATHON含量0.5wt%。

[0078] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、KATHON;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述海藻糖浓度5g/L;所述PEG的浓度为3g/L;所述吐温-20含量3wt%;所述KATHON含量0.5wt%。

[0079] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M Tris-HCl缓冲液,PH7.6;DAB底物:0.6%双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液;DAB色原:1%二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0080] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1);所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0081] 上述试剂盒的具体使用方法,包括如下步骤:

[0082] 1.利用液基薄层细胞制片机制成薄层细胞涂片,99%乙醇固定20min,PBS洗涤2次,每次5min,直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用。

[0083] 2.准备好的薄层细胞涂片每张滴加50微升3%的过氧化氢溶液,室温孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤液洗涤2次,每次5min。

[0084] 3.每张薄层细胞涂片滴加50微升快速无蛋白封闭液,37℃封闭20min。

[0085] 4.甩去封闭液,每张涂片滴加50微升即用型混合一抗工作液,37℃孵育50min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0086] 5.甩去PBS,每张滴加50微升即用型混合二抗工作液,37℃孵育20min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0087] 6.取适量提前配好的稳定型过氧化氢酶显色试剂50微升滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞质棕色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。甩去PBS,取50微升即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。苏木素复染,洗涤后水溶性封片剂封片,显微镜下观察,拍照。

[0088] 7.结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色,仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性。当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性,可作为进一步诊断的判定依据。

[0089] 实施例2提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包含即用型混合一抗工作液(1瓶),即用型混合二抗工作液(1瓶),快速无蛋白封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶),水性封片剂(1瓶)。

[0090] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.2的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、 $\beta$ -环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.3mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.4g/L;所述海藻糖浓度为2g/L;所述甜菜碱浓度为2g/L;所述 $\beta$ -环糊精浓度为0.3g/L;所述氯化钠浓度为1g/L;所述吐温-20含量0.08wt%;所述KATHON含量0.2wt%。

[0091] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、 $\beta$ -环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为0.8mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为1mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度2g/L;所述甜菜碱浓度2g/L;所述 $\beta$ -环糊精浓度0.1g/L;所述氯化钠1g/L;所述吐温-20含量0.1wt%;KATHON含量0.3wt%。

[0092] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、KATHON;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述海藻糖浓度3g/L;所述PEG的浓度为3g/L;所述吐温-20含量0.5wt%;所述KATHON含量0.2wt%。

[0093] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M Tris-HCl缓冲液,PH7.6;DAB底物:0.6%双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液;DAB色原:1%二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0094] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1);所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0095] 上述试剂盒的具体使用方法,包括如下步骤:

[0096] 1.利用液基薄层细胞制片机制成薄层细胞涂片,99%乙醇固定20min,PBS洗涤2次,每次5min,直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用。

[0097] 2.准备好的薄层细胞涂片每张滴加50微升3%的过氧化氢溶液,室温孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤液洗涤2次,每次5min。

[0098] 3.每张薄层细胞涂片滴加50微升快速无蛋白封闭液,37℃封闭20min。

[0099] 4.甩去封闭液,每张涂片滴加50微升即用型混合一抗工作液,37℃孵育50min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0100] 5.甩去PBS,每张滴加50微升即用型混合二抗工作液,37℃孵育20min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0101] 6.取适量提前配好的稳定型过氧化氢酶显色试剂50微升滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色及细胞质棕色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。甩去PBS,取50微升即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。苏木素复染,洗涤后水性封片剂封片,显微镜下观察,拍照。

[0102] 7.结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色,仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性。当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性,可作为进一步诊断的判定依据。

[0103] 实施例3提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包含即用型混合一抗工作液(1瓶),即用型混合二抗工作液(1瓶),快速无蛋白封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶),水性封片剂(1瓶)。

[0104] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.7的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、 $\beta$ -环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为1.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为1.1mg/L;所述牛血清白蛋白浓

度为2.2g/L;所述海藻糖浓度为7g/L;所述甜菜碱浓度为4g/L;所述 $\beta$ -环糊精浓度为2g/L;所述氯化钠浓度为4g/L;所述吐温-20含量1wt%;所述KATHON含量0.8wt%。

[0105] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.7的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、 $\beta$ -环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为4mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为4mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为2.2g/L;所述海藻糖浓度8g/L;所述甜菜碱浓度3g/L;所述 $\beta$ -环糊精浓度1.8g/L;所述氯化钠3.8g/L;所述吐温-20含量0.5wt%;KATHON含量1wt%。

[0106] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、叠氮化钠;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述海藻糖浓度18g/L;所述PEG的浓度为10g/L;所述吐温-20含量4.5wt%;所述叠氮化钠含量2wt%。

[0107] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M Tris-HCl缓冲液,PH7.6;DAB底物:0.6%双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液;DAB色原:1%二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0108] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1);所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0109] 上述试剂盒的具体使用方法,包括如下步骤:

[0110] 1.利用液基薄层细胞制片机制成薄层细胞涂片,99%乙醇固定20min,PBS洗涤2次,每次5min,直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用。

[0111] 2.准备好的薄层细胞涂片每张滴加50微升3%的过氧化氢溶液,室温孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤液洗涤2次,每次5min。

[0112] 3.每张薄层细胞涂片滴加50微升快速无蛋白封闭液,37℃封闭20min。

[0113] 4.甩去封闭液,每张涂片滴加50微升即用型混合一抗工作液,37℃孵育50min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0114] 5.甩去PBS,每张滴加50微升即用型混合二抗工作液,37℃孵育20min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0115] 6.取适量提前配好的稳定型过氧化氢酶显色试剂50微升滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞质棕色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。甩去PBS,取50微升即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。苏木素复染,洗涤后水溶性封片剂封片,显微镜下观察,拍照。

[0116] 7.结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色,仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性。当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性,可作为进一步诊断的判定依据。

[0117] 实施例4提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包含即用型混合一抗工作液(1瓶,与实施例1相同),即用型混合二抗工作液(1瓶,与实施例1相同),封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶,与实施例1相同),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶,与实施例1相同),水性封片剂(1瓶,与实施例1相同),与实施例1不同之处在于将

快速无蛋白封闭液用BSA的3wt%PBS缓冲液代替。

[0118] 上述试剂盒的具体使用方法如实施例1相同。

[0119] 实施例5提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒其与实施例1不同之处在于不包含快速无蛋白封闭液。

[0120] 上述试剂盒的具体使用方法与实施例1不同之处在于没有第三步骤,即为:

[0121] 1.利用液基薄层细胞制片机制成薄层细胞涂片,99%乙醇固定20min,PBS洗涤2次,每次5min,直接进行免疫组化染色或晾干冷藏于2-8℃备用。

[0122] 2.准备好的薄层细胞涂片每张滴加50微升3%的过氧化氢溶液,室温孵育10min,消除内源性过氧化物酶活性。PBS洗涤液洗涤2次,每次5min。

[0123] 3.甩去过氧化氢溶液,每张涂片滴加50微升即用型混合一抗工作液,37℃孵育50min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0124] 4.甩去PBS,每张滴加50微升即用型混合二抗工作液,37℃孵育20min。PBS洗涤2次,每次5min。

[0125] 5.取适量提前配好的稳定型过氧化氢酶显色试剂50微升滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞质棕色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。甩去PBS,取50微升即用型碱性磷酸酶显色试剂滴加到待测样品上,37℃避光孵育,显微镜下观察显色至细胞核蓝紫色信号强度适中,PBS洗涤停止显色。苏木素复染,洗涤后水溶性封片剂封片,显微镜下观察,拍照。

[0126] 6.结果判定标准:p16<sup>INK4a</sup>/Ki-67双染阳性细胞表现为细胞质棕色且细胞核蓝紫色,仅细胞核蓝紫色或仅细胞质及细胞核棕色,以及细胞未显色均为阴性。当涂片中出现一个或多个双染阳性细胞即判定为该病例为双染阳性,可作为进一步诊断的判定依据。

[0127] 实施例6提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包含即用型混合一抗工作液(1瓶),即用型混合二抗工作液(1瓶),快速无蛋白封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶),水性封片剂(1瓶)。

[0128] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度为1.7g/L;所述甜菜碱浓度为3.6g/L;所述β-环糊精浓度为2.1g/L;所述氯化钠浓度为3.2g/L;所述吐温-20含量0.07wt%;所述KATHON含量0.5wt%。

[0129] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度3.3g/L;所述甜菜碱浓度3.5g/L;所述β-环糊精浓度1.6g/L;所述氯化钠3g/L;所述吐温-20含量0.05wt%;KATHON含量0.5wt%。

[0130] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、PEG、KATHON;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述PEG的浓度为3g/L;所述KATHON含量0.5wt%。

[0131] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M

Tris-HCl缓冲液, PH7.6; DAB底物: 0.6% 双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液; DAB色原: 1% 二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0132] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1); 所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0133] 上述试剂盒的具体使用方法与实施例1相同。

[0134] 实施例7提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒, 包含即用型混合一抗工作液(1瓶), 即用型混合二抗工作液(1瓶), 快速无蛋白封闭液(1瓶), 稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶), 即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶), 水性封片剂(1瓶)。

[0135] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温-20、KATHON; 其中, 所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2; 所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L; 所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L; 所述氯化钠浓度为3.2g/L; 所述吐温-20含量0.07wt%; 所述KATHON含量0.5wt%。

[0136] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON; 其中, 所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L; 所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L; 所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L; 所述海藻糖浓度3.3g/L; 所述甜菜碱浓度3.5g/L; 所述β-环糊精浓度1.6g/L; 所述氯化钠3g/L; 所述吐温-20含量0.05wt%; KATHON含量0.5wt%。

[0137] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、KATHON; 其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液; 所述海藻糖浓度5g/L; 所述PEG的浓度为3g/L; 所述吐温-20含量3wt%; 所述KATHON含量0.5wt%。

[0138] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液, DAB底物(20倍), DAB色原(20倍)组成, 将DAB底物(20倍), DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液: 0.5M Tris-HCl缓冲液, PH7.6; DAB底物: 0.6% 双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液; DAB色原: 1% 二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0139] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1); 所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0140] 上述试剂盒的具体使用方法与实施例1相同。

[0141] 实施例8提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒, 包含即用型混合一抗工作液(1瓶), 即用型混合二抗工作液(1瓶), 快速无蛋白封闭液(1瓶), 稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶), 即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶), 水性封片剂(1瓶)。

[0142] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON; 其中, 所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2mg/L; 所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L; 所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L; 所述甜菜碱浓度为3.6g/L; 所述β-环糊精浓度为2.1g/L; 所述氯化钠浓度为3.2g/L; 所述吐温-20含量0.07wt%; 所述KATHON含量0.5wt%。

[0143] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、海藻糖、甜菜碱、氯化钠、吐温-20、KATHON; 其中, 所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L; 所述碱性磷酸



酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度3.3g/L;所述甜菜碱浓度3.5g/L;所述氯化钠3g/L;所述吐温-20含量0.05wt%;KATHON含量0.5wt%。

[0144] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、KATHON;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述海藻糖浓度5g/L;所述PEG的浓度为3g/L;所述吐温-20含量3wt%;所述KATHON含量0.5wt%。

[0145] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M Tris-HCl缓冲液,PH7.6;DAB底物:0.6%双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液;DAB色原:1%二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0146] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1);所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0147] 上述试剂盒的具体使用方法与实施例1相同。

[0148] 实施例9提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒,包含即用型混合一抗工作液(1瓶),即用型混合二抗工作液(1瓶),快速无蛋白封闭液(1瓶),稳定型辣根过氧化物酶显色试剂(3瓶),即用型碱性磷酸酶显色试剂(1瓶),水性封片剂(1瓶)。

[0149] 所述即用型混合一抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、p16<sup>INK4a</sup>单克隆抗体、Ki-67单克隆抗体、牛血清白蛋白、海藻糖、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述p16<sup>INK4a</sup>抗体浓度为0.2mg/L;所述Ki-67抗体浓度为0.3mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述海藻糖浓度为1.7g/L;所述氯化钠浓度为3.2g/L;所述吐温-20含量0.07wt%;所述KATHON含量0.5wt%。

[0150] 所述即用型混合二抗工作液包括pH值为7.4的PBS缓冲溶液、辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗、碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗、牛血清白蛋白、甜菜碱、β-环糊精、氯化钠、吐温-20、KATHON;其中,所述辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗浓度为3mg/L;所述碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗浓度为3.2mg/L;所述牛血清白蛋白浓度为0.5g/L;所述甜菜碱浓度3.5g/L;所述β-环糊精浓度1.6g/L;所述氯化钠3g/L;所述吐温-20含量0.05wt%;KATHON含量0.5wt%。

[0151] 所述快速无蛋白封闭液包含缓冲溶液、海藻糖、PEG、吐温-20、KATHON;其中所述缓冲溶液为pH值为7.4的PBS缓冲液;所述海藻糖浓度5g/L;所述PEG的浓度为3g/L;所述吐温-20含量3wt%;所述KATHON含量0.5wt%。

[0152] 所述稳定型辣根过氧化物酶显色试剂由DAB反应液,DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)组成,将DAB底物(20倍),DAB色原(20倍)用反应液稀释至1倍使用。所述DAB反应液:0.5M Tris-HCl缓冲液,PH7.6;DAB底物:0.6%双氧水溶于0.5M Tris-HCl缓冲液;DAB色原:1%二氨基联苯胺溶于0.5M Tris-HCl缓冲液。

[0153] 所述即用型碱性磷酸酶显色试剂为NBT/BCIP预混液(体积比为2:1);所述水性封片剂包含50wt%甘油的PBS溶液。

[0154] 上述试剂盒的具体使用方法与实施例1相同。

[0155] 性能测试

[0156] 将实施例中公开的混合一抗工作液和混合二抗工作液在37℃避光储存,记录工作

液失效的时间周期,再根据体外诊断行业中有效期计算规则,37℃加速1天相当于2-8℃实时存放2个月计算,预计抗体工作液的未开封冷藏保质期,其结果如表1所示。

[0157] 表1性能测试表

[0158]		保质期
	实施例 1	28
	实施例 2	25
	实施例 3	26
[0159]	实施例 4	28
	实施例 5	28
	实施例 6	28
	实施例 7	16
	实施例 8	15
	实施例 9	16

[0160] 此外,现有实验人员配制的普通抗体稀释液2-8摄氏度不超过1个月质量就已急剧下降。

[0161] 此外,本发明的快速封闭液,成分明确,颗粒较小且均一,可以实现快速封闭(10分钟)。该成分不会干扰抗原抗体的结合。因此相比于常用封闭液可以提升信号强度5倍左右。无动物源性成分,杜绝了杂质对实验结果的干扰,使结果更清晰,减少假阳性。添加了食品级别的高效防腐剂,提高产品稳定性。

[0162] 此外,化学发光法检测即用型二抗工作液中辣根过氧化物酶活性,将实施例中提供的即用型二抗工作液置于37℃避光保存2周后点与NC膜上,ECL化学发光法检测抗体活性,圆点亮度与抗体活性成正比。其中实施例1中的即用型二抗工作液中辣根过氧化物酶活性经过加速放置两周之后抗体活性最好,与普通抗体稀释液新鲜配制时的活性效果相当,如说明书附图1可以看出本试剂盒的即用型抗体工作液中抗体活性与新鲜配制(由辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液,其pH值为7.4)的无明显差异,但是实施例7和实施例8提供的即用型混合二抗工作液中的抗体活性明显受到显著的影响(结果如图1所示)。

[0163] WesternBlot实验检测本试剂盒成分中快速封闭液的信号放大效果。分别记录测试样品通过本实施例提供的试剂盒成分,和本实施例提供的方法进行测试,曝光1、3、5秒时的信号放大效果。其中本发明实施例1~3,7~9的信号放大效果好,实施例1最为显著,但是实施例4~6的效果很差,在曝光3秒时基本上很难能观察到信号,即便曝光5秒后其信号强度也相对比较弱,对试剂的检测具有很大的干扰,提高漏诊率(如图2~4所示)。

[0164] 本发明中采用多种组分保护的即用型试剂,在节省时间,操作方便,提高有效成分稳定性的同时,使即用型试剂中的有效成分可以长期稳定保存,使用多少滴加多少,避免浪

费。而且免疫组化作为操作性较强的检测手段,影响结果的因素较多,导致每次检测的稳定性不足,稍有不慎就可能出现不准确甚至错误的结果。使用即用型试剂,减少了手工配制过程中人为因素的影响,提高了每次检测的一致性和准确性。该试剂也适用于自动化的免疫组化仪器使用,进一步提高工作效率。

[0165] 本发明主要用于检测液基薄层细胞涂片上宫颈脱落细胞中p16INK4a和Ki-67蛋白的表达情况,为宫颈癌诊断提供可靠的辅助诊断依据,减轻患者痛苦,降低病理医生的工作压力,提升宫颈癌诊断的特异性和灵敏度,具有重要的临床诊断价值;为了节省操作时间,提高工作效率,试剂盒使用了多种即用型试剂的设计。即用型混合抗体工作液提前预混了所需的抗体,优化了抗体添加量,添加了多种抗体保护成分,使用方便,易于保存;快速无蛋白封闭液,不含蛋白成分,小分子物质封闭迅速,并能提高信号强度;即用型碱性磷酸酶显色液为NBT/BCIP预混液,无需提前配置,使用方便快捷,稳定保存;稳定型辣根过氧化物酶显色试剂一次配置后可长期保存,使用方便,避免试剂浪费;双染显色颜色的设计为细胞核蓝紫色与胞质棕色可形成强烈对比,辨识度更高;显色产物均可直接用水溶性封片剂直接封片,无需脱水透明等繁琐步骤,节省封片操作时间,较快得到检测结果。

[0166] 以上所述仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对发明作其他形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或更改为等同变化的等效实施例,但凡是未脱离本发明技术方案内容,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,等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

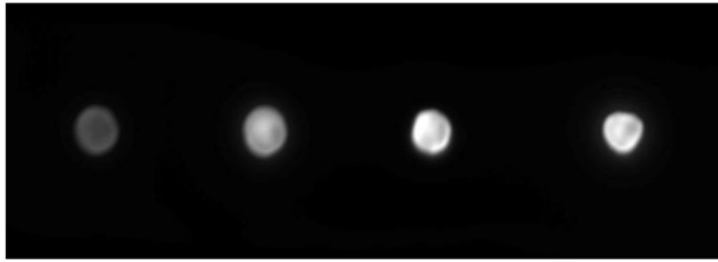


图1



图2

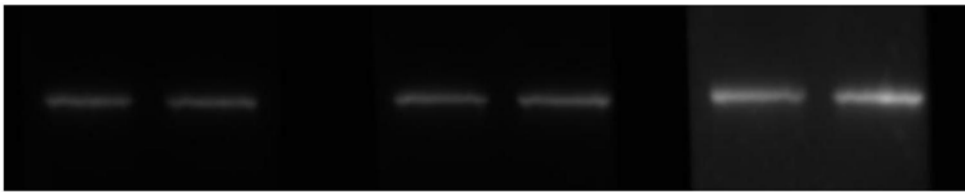


图3

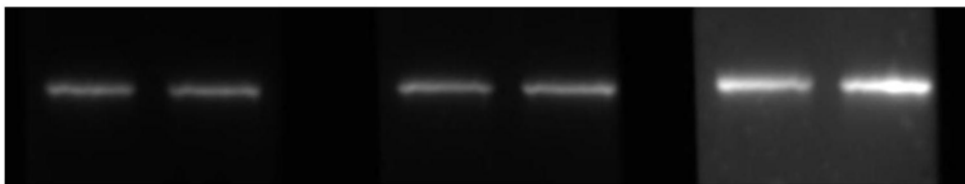


图4

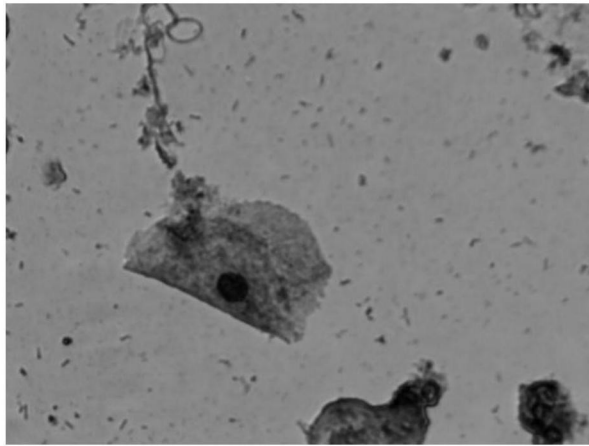


图5

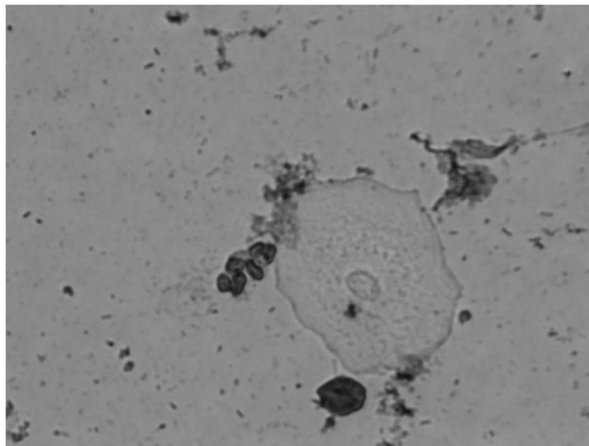


图6

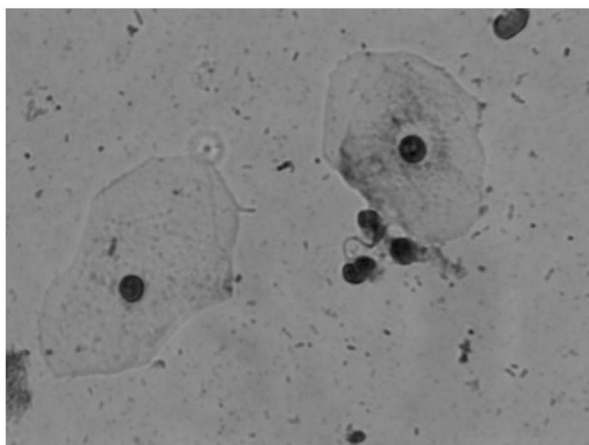


图7

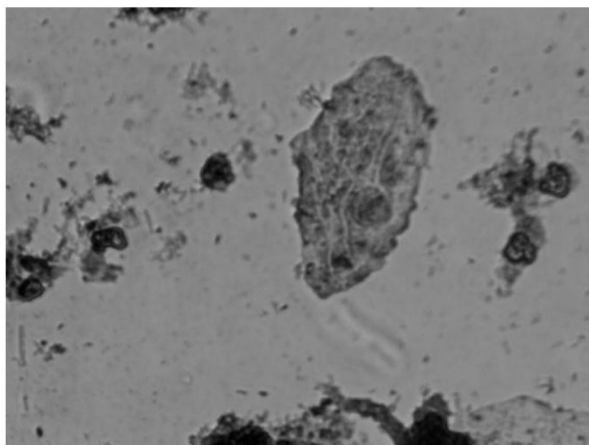


图8

专利名称(译)	一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫化学染色试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN109856383A</a>	公开(公告)日	2019-06-07
申请号	CN201910162981.2	申请日	2019-03-05
[标]发明人	肖国林		
发明人	肖国林		
IPC分类号	G01N33/52 G01N33/574 G01N33/535 G01N33/577 G01N33/58		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及液基细胞学免疫细胞化学领域，具体涉及到一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫组织化学试剂盒。本发明中提供了一种即用型抗体工作液，包括抗体试剂、牛血清白蛋白、非还原性糖、甜菜碱、环糊精、中性无机盐、表面活性剂、防腐剂；其中所述抗体试剂为试剂A或试剂B；所述试剂A为p16INK4a单克隆抗体和Ki-67单克隆抗体的PBS缓冲溶液；所述试剂B为辣根过氧化物酶标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗的PBS缓冲溶液；所述PBS缓冲溶液的pH值为7.2~7.8。

