



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111089964 A

(43)申请公布日 2020.05.01

(21)申请号 201911363146.1

(22)申请日 2019.12.26

(71)申请人 江苏美克医学技术有限公司

地址 211800 江苏省南京市浦口区高新技术开发区江北新区新锦湖路3-1号二期D栋3层

(72)发明人 徐丽红 李文成 孙康俊 黄宝福

(74)专利代理机构 上海盈盛知识产权代理事务所(普通合伙) 31294

代理人 孙佳胤

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

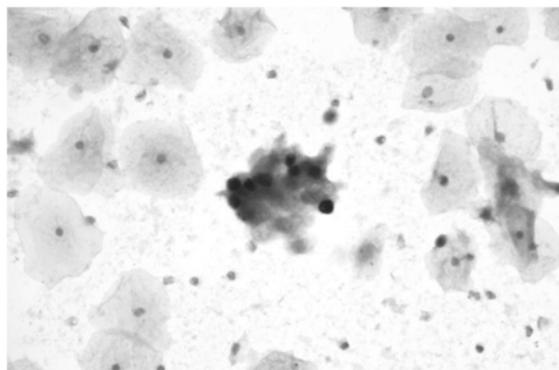
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒

(57)摘要

本发明提供一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,所述试剂盒包括标记了葡聚糖的Ki67单克隆抗体和标记了葡聚糖的P16<sup>INK4A</sup>单克隆抗体组成的混合一抗工作液,DAPI染液。本发明试剂盒同时高效激发多色荧光,只需要一种激发光就能表现出所有的颜色,不需要切换波段,直接普通显微镜观察观测拍摄;减少了二抗的孵育过程,缩短了整个流程的操作时间;操作简单,灵敏度和准确度高。



1. 一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括标记了葡聚糖的Ki67单克隆抗体和标记了葡聚糖的P16<sup>INK4A</sup>单克隆抗体组成的混合一抗工作液,DAPI染液;

葡聚糖标记单克隆抗体通过以下方法制备:

(1) 将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入高碘酸钠进行氧化,避光30°C~37°C搅拌反应2-3小时后加入过量乙二醇终止;使用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜;

(2) 检测所需抗体磷酸盐缓冲溶液透析过夜;

(3) 将氧化葡聚糖和抗体混合反应后,加入适量氰基硼氢化钠避光反应时间为1.5-3小时,反应温度4°C-6°C;

(4) 加入适量乙二胺进行胺化反应后使用硼氢化钠还原,磷酸盐缓冲溶液透析过夜。

2. 根据权利要求1所述的一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,其特征在于,Ki67单克隆抗体标记荧光素Pacific Green,P16<sup>INK4A</sup>单克隆抗体标记荧光素Pacific Orange。

3. 根据权利要求2所述的一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,其特征在于,标记荧光素时,使用磷酸盐缓冲液透析、纯化树脂柱纯化或者超滤离心管离心纯化中的一种来去除游离荧光素。

4. 根据权利要求1所述的一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,其特征在于,工作液包括PH值为7.2-7.8的磷酸盐缓冲液。

## 一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明属于液基细胞学免疫荧光染色技术领域,涉及一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒。

### 背景技术

[0002] 宫颈癌是最常见的妇科恶性肿瘤,其发病率仅次于乳腺癌,严重危害妇女身体健康。宫颈癌的发生发展是一个漫长且渐变的过程,从癌前病变到发展为癌大约需要十年时间。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。细胞学筛查常见轻度细胞异常情况,但大部分能自行转好不会发展为宫颈上皮内瘤变(cervical intraepithelialneoplasia,CIN);HPV感染大多也是一过性感染,能自行转为阴性;而且两种检测方法都存在一定假阳性和假阴性的比例,造成漏诊和过度诊断的情况。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Ki67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。Ki67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Ki67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Ki67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Ki67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] 荧光抗体技术,用荧光物标记抗体来检测细胞或组织中相应抗原或抗体的技术。荧光物种类一般有异硫氰酸荧光素、罗丹明荧光素、二氯三嗪基氨基荧光素等。一般是将待测标本固定于玻片表面,滴加已知荧光抗体后再以缓冲液冲洗,干燥后于荧光显微镜下观察阳性是可见带荧光的抗原抗体复合物;阴性无荧光(因为带荧光的抗体不能与抗原结合,被冲洗掉)。该技术具有简单、特异性高、敏感性低、同时检测多种抗原时较复杂等特点。

[0006] 但是普通荧光双染试剂盒需在不同激发光下激发不同颜色荧光,再通过图像处理形成双染图像,需应用不同的荧光激发模块和图像处理系统。

### 发明内容

[0007] 本发明的目的在于,提供一种同时高效激发多色荧光,直接观测拍摄的用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒。

[0008] 为了实现上述目的,本发明提供了一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒,所述试剂盒包括标记了葡聚糖的Ki67单克隆抗体和标记了葡聚糖的P16<sup>INK4A</sup>单克隆抗体组成的混合一抗工作液,DAPI染液;

[0009] 葡聚糖标记单克隆抗体通过以下方法制备:

[0010] (1) 将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入高碘酸钠进行氧化,避光30℃~37℃搅拌反应2-3小时后加入过量乙二醇终止;使用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜;

[0011] (2) 检测所需抗体磷酸盐缓冲溶液透析过夜;

[0012] (3) 将氧化葡聚糖和抗体混合反应后,加入适量氰基硼氢化钠避光反应时间为1.5-3小时,反应温度4℃-6℃;

[0013] (4) 加入适量乙二醇进行胺化反应后使用硼氢化钠还原,磷酸盐缓冲溶液透析过夜。

[0014] 作为一个优选方案,Ki67单克隆抗体标记荧光素Pacific Green,P16<sup>INK4A</sup>单克隆抗体标记荧光素Pacific Orange。

[0015] 作为一个优选方案,标记荧光素时,使用磷酸盐缓冲液透析、纯化树脂柱纯化或者超滤离心管离心纯化中的一种来去除游离荧光素。

[0016] 作为一个优选方案,工作液包括PH值为7.2-7.8的磷酸盐缓冲液。

[0017] DAPI即4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole),是一种能够与DNA强力结合的荧光染料,常用于荧光显微镜观测。因为DAPI可以透过完整的细胞膜,它可以用于活细胞和固定细胞的染色。

[0018] 上述用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒的使用方法为:

[0019] (1) 制片固定:取一定量的样本制成细胞涂片并用固定;

[0020] (2) 抗原修复:固定好的细胞在EDTA抗原修复液中修复10-15min,冷却,磷酸盐缓冲液清洗;

[0021] (3) 通透:用Triton-100室温孵育20min,磷酸盐缓冲液清洗;

[0022] (4) 染色:滴加试剂1在37℃避光孵育60-90min,磷酸盐缓冲液清洗;

[0023] (5) 复染:DAPI染液室温孵育1-3min,自来水清洗;

[0024] (6) 封片:封片剂封片;

[0025] (7) 观察:显微镜下观察。

[0026] 步骤(1)中样本固定是用95%酒精固定10min。

[0027] 步骤(3)的Triton-100浓度为0.5%。

[0028] 步骤(6)的封片剂为防荧光淬灭封片剂。

[0029] 步骤(7)的显微镜需要带有荧光模块,在紫外下观察。

[0030] 结果判定:Ki67阳性表现为细胞核显示绿色荧光,P16<sup>INK4A</sup>阳性表现为细胞核或/与细胞质显示橙色,当至少一个细胞同时出现绿色细胞核和橙色细胞质时,则确认为双染阳性,反之则为阴性。

[0031] 本试剂盒通过选择特殊的荧光染料,在相同激发波长下激发双色荧光,和DAPI染料蓝色荧光,不需要切换不同激发波段,也不需要图像合成处理,同时鉴于特殊荧光素的观察对于显微镜要求极高的问题,本发明在抗体和荧光素之间选择葡聚糖放大的特殊处理,其制备条件特殊适用于本试剂盒抗体,由此能在普通荧光光学显微镜下直接观测和拍摄图像,本试剂盒相比同类荧光免疫试剂盒,突出了同时高效激发多色荧光,直接观测拍摄的特殊优势。

[0032] 本发明的优点在于,(1)与传统的免疫细胞化学染色相比,荧光素被冲洗,背景低;(2)与传统细胞免疫荧光相比,只需要一种激发光就能表现出所有的颜色,不需要切换波段;(3)与传统细胞免疫荧光相比,只需要普通显微镜观察;(4)抗体经过放大处理后标记荧光素,最终信号强度要比正常抗体标记荧光素信号强。

## 附图说明

[0033] 图1是免疫细胞化学双染图。

[0034] 图2是免疫荧光双染图。

## 具体实施方式

[0035] 以下,结合具体实施方式对本发明的技术进行详细描述。应当知道的是,以下具体实施方式仅用于帮助本领域技术人员理解本发明,而非对本发明的限制。

[0036] 实施例1

[0037] 1.单克隆抗体标记葡聚糖放大工艺:

[0038] (1)将葡聚糖(DeX)溶于PH值为7.0的20mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,加入高碘酸钠( $\text{NaIO}_4$ )进行氧化,避光 $30^\circ\text{C}\sim 37^\circ\text{C}$ 搅拌反应2-3小时后加入过量乙二醇终止;使用DeX基质相同PBS进行透析过夜。

[0039] (2)检测所需抗体PBS透析过夜。

[0040] (3)将氧化DeX和抗体混合反应后,加入适量氰基硼氢化钠( $\text{NaCNBH}_3$ )避光反应时间为1.5-3小时,反应温度 $4^\circ\text{C}$ 。

[0041] (4)加入适量乙二醇进行胺化反应后使用硼氢化钠( $\text{NaBH}_4$ )还原,PBS透析过夜。

[0042] 2.Pacific Green是一种亮绿色荧光染料,由紫外激光405nm线激发,激发/发射波长为411/510nm。这种染料的共轭物即使在中性pH下也具有强烈的荧光。

[0043] Pacific Orange是一种明亮的橙色荧光染料,由紫外激光405纳米线激发,激发/发射波长为400/551nm。这种染料的共轭物即使在中性pH下也具有强烈的荧光。

[0044] 放大后的抗体标记荧光素:

[0045] (1)Ki67抗体标记Pacific Green

[0046] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。

[0047] ②取90 $\mu\text{l}$  Ki67抗体(Ki67抗体浓度为1mg/ml),加入10 $\mu\text{l}$  1M碳酸氢钠溶液。

- [0048] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜(DMSO)溶解;
- [0049] ④将溶解后的荧光素加入抗体中,37℃搅拌孵育2h;
- [0050] ⑤磷酸盐缓冲液(PH值为7.2)透析2天,去除游离荧光素;
- [0051] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0052] (2) P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange
- [0053] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。
- [0054] ②取30μl P16<sup>INK4A</sup>抗体(P16<sup>INK4A</sup>抗体浓度为3mg/ml),先加入60μl抗体稀释液稀释至1mg/ml,再加入10μl 1M碳酸氢钠溶液。
- [0055] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜(DMSO)溶解;
- [0056] ④将溶解后的荧光素加入抗体中,37℃搅拌孵育2h;
- [0057] ⑤磷酸盐缓冲液(PH值为7.2)透析2天,去除游离荧光素;
- [0058] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0059] (3) 最终Ki67抗体标记Pacific Green,P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange,将两者混合加入到保存液中。
- [0060] 3. 根据以上试剂盒,具体操作步骤:
- [0061] ①制片固定:取一定量的样本制成细胞涂片并用95%酒精固定10min;
- [0062] ②抗原修复:固定好的细胞在EDTA抗原修复液中修复10-15min,冷却,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min,EDTA抗原修复液的PH值在9左右;
- [0063] ③通透:用0.5%的Triton-100室温孵育20min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0064] ④染色:滴加试剂1在37℃避光孵育60-90min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0065] ⑤复染:DAPI染液室温孵育1-3min,自来水清洗;
- [0066] ⑥封片:防荧光淬灭封片剂封片;
- [0067] ⑦观察:荧光显微镜下观察。

实验	抗体蛋白与葡聚糖比例 (mg 蛋白: mg 葡聚糖)	抗体蛋白与荧光素比例 (mg 蛋白: mg 荧光素)
1	1: 10	1: 0.005
2	1: 10	1: 0.01
3	1: 10	1: 0.05
4	1: 50	1: 0.005
5	1: 50	1: 0.01
6	1: 50	1: 0.05
7	1: 100	1: 0.005
8	1: 100	1: 0.01
9	1: 100	1: 0.05

[0068] 实验结果:根据以上实验,实验5抗体蛋白与葡聚糖比例 (mg蛋白:mg葡聚糖) 为1:50,抗体蛋白与荧光素比例 (mg蛋白:mg荧光素) 为1:0.01为最优方案。首先该方案的放大倍数基本达到预期效果,并且背景少,而且荧光强度也基本可以,不会浪费太多原料,节省成本。

[0069] 实施例2.

[0070] 1.单克隆抗体标记葡聚糖放大工艺:

[0071] (1)将葡聚糖 (DeX) 溶于PH值为7.0的20mM的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中,加入高碘酸钠 ( $\text{NaIO}_4$ ) 进行氧化,避光 $30^\circ\text{C}\sim 37^\circ\text{C}$ 搅拌反应2-3小时后加入过量乙二醇终止;使用DeX基质相同PBS进行透析过夜。

[0072] (2)检测所需抗体PBS透析过夜。

[0073] (3)将氧化DeX和抗体混合反应后,加入适量氰基硼氢化钠 ( $\text{NaCNBH}_3$ ) 避光反应时间为1.5-3小时,反应温度 $4^\circ\text{C}$ 。

[0074] (4)加入适量乙二醇进行胺化反应后使用硼氢化钠 ( $\text{NaBH}_4$ ) 还原,PBS透析过夜。

[0075] 2.放大后的抗体标记荧光素:

[0076] (1)Ki67抗体标记Pacific Green

[0077] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。

[0078] ②取 $90\mu\text{l}$  Ki67抗体 (Ki67抗体浓度为 $1\text{mg}/\text{ml}$ ),加入 $10\mu\text{l}$  1M碳酸氢钠溶液。

[0079] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解;

[0080] ④将溶解后的荧光素加入抗体中, $37^\circ\text{C}$ 搅拌孵育2h;

[0081] ⑤用纯化树脂柱纯化,去除游离荧光素;

- [0083] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0084] (2) P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange
- [0085] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。
- [0086] ②取30 $\mu$ l P16<sup>INK4A</sup>抗体 (P16<sup>INK4A</sup>抗体浓度为3mg/ml),先加入60 $\mu$ l抗体稀释液稀释至1mg/ml,再加入10 $\mu$ l 1M碳酸氢钠溶液。
- [0087] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜(DMSO)溶解;
- [0088] ④将溶解后的荧光素加入抗体中,37 $^{\circ}$ C搅拌孵育2h;
- [0089] ⑤用纯化树脂柱纯化,去除游离荧光素;
- [0090] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0091] (3) 最终Ki67抗体标记Pacific Green,P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange,将两者混合加入到保存液中。
- [0092] 3. 根据以上试剂盒,具体操作步骤:
- [0093] ①制片固定:取一定量的样本制成细胞涂片并用95%酒精固定10min;
- [0094] ②抗原修复:固定好的细胞在EDTA抗原修复液中修复10-15min,冷却,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min,EDTA抗原修复液的PH值在9左右;
- [0095] ③通透:用0.5%的Triton-100室温孵育20min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0096] ④染色:滴加试剂1在37 $^{\circ}$ C避光孵育60-90min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0097] ⑤复染:DAPI染液室温孵育1-3min,自来水清洗;
- [0098] ⑥封片:防荧光淬灭封片剂封片;
- [0099] ⑦观察:荧光显微镜下观察。
- [0100] 实施例3.
- [0101] 1. 单克隆抗体标记葡聚糖放大工艺:
- [0102] (1) 将葡聚糖(DeX)溶于PH值为7.0的20mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,加入高碘酸钠(NaIO<sub>4</sub>)进行氧化,避光30 $^{\circ}$ C~37 $^{\circ}$ C搅拌反应2-3小时后加入过量乙二醇终止;使用DeX基质相同PBS进行透析过夜。
- [0103] (2) 检测所需抗体PBS透析过夜。
- [0104] (3) 将氧化DeX和抗体混合反应后,加入适量氰基硼氢化钠(NaCNBH<sub>3</sub>)避光反应时间为1.5-3小时,反应温度4 $^{\circ}$ C。
- [0105] (4) 加入适量乙二胺进行胺化反应后使用硼氢化钠(NaBH<sub>4</sub>)还原,PBS透析过夜。
- [0106] 2. 放大后的抗体标记荧光素:
- [0107] (1) Ki67抗体标记Pacific Green
- [0108] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。
- [0109] ②取90 $\mu$ l Ki67抗体(Ki67抗体浓度为1mg/ml),加入10 $\mu$ l 1M碳酸氢钠溶液。
- [0110] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜(DMSO)溶解;
- [0111] ④将溶解后的荧光素加入抗体中,37 $^{\circ}$ C搅拌孵育2h;

- [0112] ⑤超滤离心管离心纯化,转速15000r/min,离心3min,去除游离荧光素;
- [0113] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0114] (2) P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange
- [0115] ①配制1M碳酸氢钠溶液:称取约84mg的碳酸氢钠,加入1ml去离子水,混合至完全溶解。最终的碳酸氢钠溶液的PH值为8-9。
- [0116] ②取30 $\mu$ l P16<sup>INK4A</sup>抗体 (P16<sup>INK4A</sup>抗体浓度为3mg/ml),先加入60 $\mu$ l抗体稀释液稀释至1mg/ml,再加入10 $\mu$ l 1M碳酸氢钠溶液。
- [0117] ③称取一定量活化好的荧光素用二甲基亚砜(DMSO)溶解;
- [0118] ④将溶解后的荧光素加入抗体中,37 $^{\circ}$ C搅拌孵育2h;
- [0119] ⑤超滤离心管离心纯化,转速15000r/min,离心3min,去除游离荧光素;
- [0120] ⑥蛋白保存液中复溶保存。
- [0121] (3) 最终Ki67抗体标记Pacific Green,P16<sup>INK4A</sup>抗体标记Pacific Orange,将两者混合加入到保存液中。
- [0122] 3. 根据以上试剂盒,具体操作步骤:
- [0123] ①制片固定:取一定量的样本制成细胞涂片并用95%酒精固定10min;
- [0124] ②抗原修复:固定好的细胞在EDTA抗原修复液中修复10-15min,冷却,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min,EDTA抗原修复液的PH值在9左右;
- [0125] ③通透:用0.5%的Triton-100室温孵育20min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0126] ④染色:滴加试剂1在37 $^{\circ}$ C避光孵育60-90min,磷酸盐缓冲液清洗,洗3次,每次5min;
- [0127] ⑤复染:DAPI染液室温孵育1-3min,自来水清洗;
- [0128] ⑥封片:防荧光淬灭封片剂封片;
- [0129] ⑦观察:荧光显微镜下观察。
- [0130] 实验结果:三种不同的去除游离荧光素的方式做比较,都能达到目的,并且效果基本一致,具体操作可根据情况使用不同方法。
- [0131] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

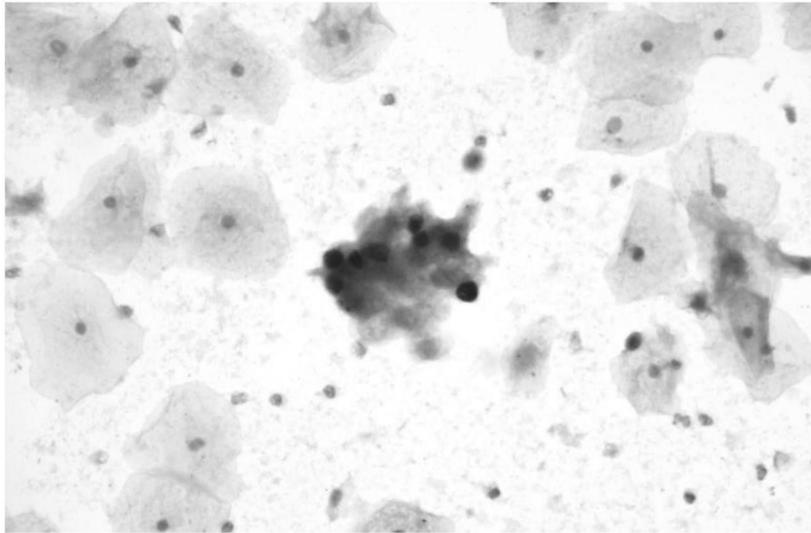


图1

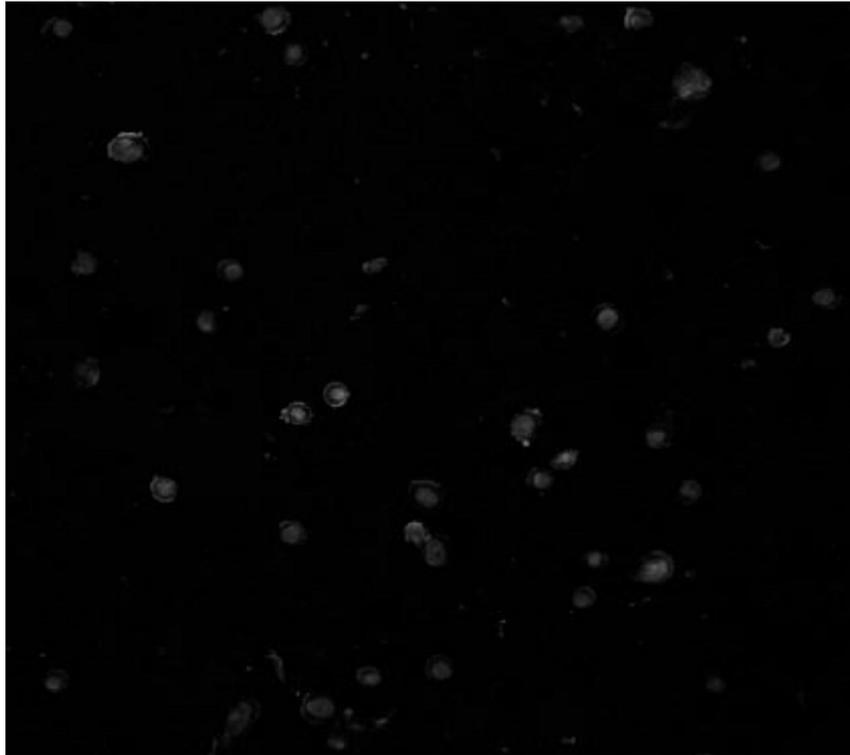


图2

专利名称(译)	一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN111089964A</a>	公开(公告)日	2020-05-01
申请号	CN201911363146.1	申请日	2019-12-26
[标]发明人	徐丽红 李文成 孙康俊 黄宝福		
发明人	徐丽红 李文成 孙康俊 黄宝福		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/577 G01N33/533		
代理人(译)	孙佳胤		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供一种用于宫颈癌辅助诊断的免疫荧光双染试剂盒，所述试剂盒包括标记了葡聚糖的Ki67单克隆抗体和标记了葡聚糖的P16INK4A单克隆抗体组成的混合一抗工作液，DAPI染液。本发明试剂盒同时高效激发多色荧光，只需要一种激发光就能表现出所有的颜色，不需要切换波段，直接普通显微镜观察观测拍摄；减少了二抗的孵育过程，缩短了整个流程的操作时间；操作简单，灵敏度和准确度高。

