



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111077302 A

(43)申请公布日 2020.04.28

(21)申请号 201911364620.2

(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 李文成 汪骏青 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 33/541(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

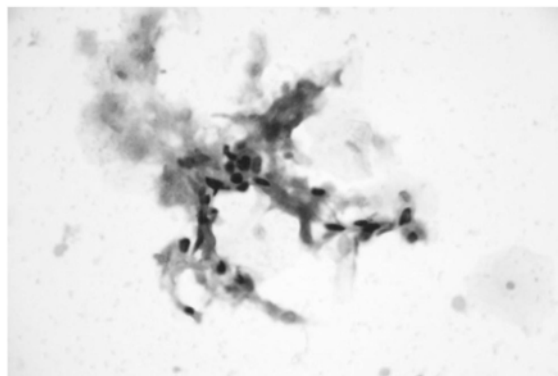
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

### (54)发明名称

一种基于葡聚糖信号放大ki67和p16<sup>INK4a</sup>检测试剂盒

### (57)摘要

本发明公开一种基于葡聚糖信号放大ki67和p16<sup>INK4a</sup>检测试剂盒,所述试剂盒包括ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体、p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体、DAB显色液和AP显色液。本发明试剂盒采用酶标多聚一抗进行免疫检测,公开了葡聚糖多聚抗体制备的特定条件,同时以葡聚糖分子为支撑骨架,复合抗体和信号标记物形成葡聚糖多聚抗体,其携带大量的信号标记物极大的提高了信号强度,降低了抗体使用浓度、避免非特异信号干扰。同时,高分子复合物与酶是多位点结合,为酶的天然三维构象提供了稳定的支撑,大幅度维持了酶和抗体的稳定性,实现大分子之间的高效键合。本发明试剂盒极大的减少了抗体用量,减少了操作流程和时间,且具有更高的显色效率和检测灵敏度。



1. 一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体、p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体、DAB显色液和AP显色液;

所述ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体制备方法为:将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入适量高碘酸钠进行氧化,用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜,水溶碱性磷酸酶,加入适量高碘酸钠氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化葡聚糖和ki-67抗体和活化后碱性磷酸酶混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液;

所述p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体制备步骤为:将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入适量高碘酸钠进行氧化,用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜,水溶辣根过氧化物酶,加入适量高碘酸钠氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化葡聚糖和p16<sup>INK4a</sup>抗体和活化后辣根过氧化物酶混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液。

2. 根据权利要求1所述的一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,其特征在于,所述葡聚糖分子量为400000-500000。

3. 根据权利要求1所述的一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,其特征在于,所述葡聚糖多聚抗体保存液配方包括:PBS、Tris或HEPES缓冲液中的一种,以及1%-2%牛血清蛋白,0.01%-1%的Proclin300。

4. 根据权利要求1所述的一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,其特征在于,所述DAB显色液组成为A液底物:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;B液增强:NiCl<sub>2</sub>;C液色原:二氨基联苯胺。

5. 根据权利要求1所述的一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,其特征在于,所述AP显色液组成为A液稀释:Tris缓冲液;B液底物:α-萘酚AS-BI磷酸盐;C液色原:品红。

## 一种基于葡聚糖信号放大ki67和p16<sup>INK4a</sup>检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物化学检测领域,尤其涉及一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 在以抗体抗原反应为基本原理的免疫学检测方法中,结合抗体所携带的信号强弱是检测过程中关注的焦点。一般多采用酶类氧化显色、化学发光物质、有色标记物、荧光标记物作为信号源,抗体结合信号源的类型、数量的差异直接影响信号检测的灵敏度。

[0003] 目前,宫颈癌发病率占中国女性生殖系统恶性肿瘤第一位,每年宫颈癌新发病例约10万。宫颈癌是妇科最常见的恶性肿瘤之一,可通过早期筛查发现早期宫颈癌和宫颈病变,实现早期诊断、早期治疗。目前宫颈癌筛查方案多样,但均有不同的局限性。细胞学由最初的传统宫颈涂片进展到现今的液基细胞学制片技术,其细胞涂片质量明显提高,但仍有假阴性的问题存在,并且其需要细胞病理学家的诊断,使细胞学的进展受到制约。多基因的突变导致了宫颈癌的发生,临床研究认为p16<sup>INK4a</sup>、Ki67在宫颈癌的发生过程中具有协同作用,联合检测p16<sup>INK4a</sup>、Ki67抗原在宫颈组织、宫颈脱落细胞的阳性表达,能协助诊断宫颈上皮内瘤变、宫颈鳞癌、并可作为CIN分级诊断的辅助方法,有较好的临床价值。但目前技术中ki-67和p16<sup>INK4a</sup>抗体低浓度下信号强度比较弱,高浓度下非特异性干扰多,还没有能联合检测p16<sup>INK4a</sup>、Ki67抗原的高敏多聚一抗试剂盒。

[0004] 中国实用新型专利CN209387663U公开了一种P16/Ki-67联合宫颈癌检测试剂盒,包括吸塑壳体、包装盒体、试剂组以及冲洗液瓶,所述吸塑壳体容置在包装盒体内,且所述吸塑壳体上设有第一凹槽以及第二凹槽,所述试剂组包括p16蛋白一抗试剂瓶以及Ki67蛋白一抗试剂瓶,所述p16蛋白一抗试剂瓶以及Ki67蛋白一抗试剂瓶分别容置在不同的第一凹槽内,所述冲洗液瓶容置在第二凹槽内。所述试剂组还包括封闭剂试剂瓶、内源性过氧化物酶抑制剂试剂瓶、内源性碱性磷酸酶抑制剂试剂瓶、细胞膜穿孔剂试剂瓶、HRP标记二抗试剂瓶、AP标记的二抗试剂瓶、DAB色原试剂瓶、BCIP/NBT色原试剂瓶、PBS缓冲液试剂盒、苏木素染色液试剂瓶以及水溶性封片剂试剂瓶。目前普遍使用的双染试剂盒采用一抗-二抗的免疫检测方法,工艺流程复杂,操作时间长。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的在于,提供一种信号强度大、抗体使用浓度低的基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒。

[0006] 为了实现上述目的,本发明提供了一种基于葡聚糖信号放大ki-67和p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒,所述试剂盒包括ki-67葡聚糖多聚AP(碱性磷酸酶)标记抗体、p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP(辣根过氧化物酶)标记抗体、DAB显色液和AP显色液;

[0007] 所述ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体制备方法为:将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入适量高碘酸钠进行氧化,用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜,水溶碱性

磷酸酶,加入适量高碘酸钠氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化葡聚糖和ki-67抗体和活化后碱性磷酸酶混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液;

[0008] 所述p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体制备步骤为:将葡聚糖溶于磷酸盐缓冲溶液中,加入适量高碘酸钠进行氧化,用葡聚糖基质相同磷酸盐缓冲溶液进行透析过夜,水溶辣根过氧化物酶,加入适量高碘酸钠氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化葡聚糖和p16<sup>INK4a</sup>抗体和活化后辣根过氧化物酶混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液。

[0009] 作为一个优选方案,所述葡聚糖分子量为400000-500000。

[0010] 作为一个优选方案,所述葡聚糖多聚抗体保存液配方包括:PBS、Tris或HEPES缓冲液中的一种,以及1%-2%牛血清蛋白,0.01%-1%的Proclin300。

[0011] 作为一个优选方案,所述DAB显色液组成为A液底物:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;B液增强:NiCl<sub>2</sub>;C液色原:二氨基联苯胺。

[0012] 作为一个优选方案,所述AP显色液组成为A液稀释:Tris缓冲液;B液底物:α-萘酚AS-BI磷酸盐;C液色原:品红。

[0013] 本发明试剂盒以葡聚糖分子为支撑骨架,复合抗体和信号标记物形成葡聚糖多聚抗体,其携带大量的信号标记物极大的提高了信号强度,降低了抗体使用浓度、避免非特异信号干扰。同时,高分子复合物与酶是多位点结合,为酶的天然三维构象提供了稳定的支撑,大幅度维持了酶或抗体的稳定性,实现大分子之间的高效键合。试剂盒通过活化葡聚糖标记酶再与一抗偶联形成多聚标记抗体,抗体抗原一步孵育结合后采用试剂盒内的显色体系进行免疫组化显色。

[0014] 本发明的优点在于,本发明公开的试剂盒采用酶标多聚一抗进行免疫检测,公开了葡聚糖多聚抗体制备的特定条件,同时以葡聚糖分子为支撑骨架,复合抗体和信号标记物形成葡聚糖多聚抗体,其携带大量的信号标记物极大的提高了信号强度,降低了抗体使用浓度、避免非特异信号干扰。同时,高分子复合物与酶是多位点结合,为酶的天然三维构象提供了稳定的支撑,大幅度维持了酶和抗体的稳定性,实现大分子之间的高效键合。本发明试剂盒极大的减少了抗体用量,减少了操作流程和时间,且具有更高的显色效率和检测灵敏度。

## 附图说明

[0015] 图1是ki-67/p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒免疫组化实验镜检图。

[0016] 图2是葡聚糖信号放大ki-67/p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒免疫组化实验镜检图。

## 具体实施方式

[0017] 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。

[0018] 实施例1.

[0019] ki-67/p16双染检测试剂盒免疫组化实验其主要步骤如下:

[0020] 1.选取TCT阳性宫颈刷片样本,离心制片,95%乙醇固定30分钟,抗原修复处理后晾干;

[0021] 2.分别滴加ki-67和p16<sup>INK4a</sup>抗体,均在37℃孵育1小时后使用PBS冲洗5遍;

- [0022] 3. 分别滴加对应种属的HRP二抗和AP二抗,均在室温孵育30分钟,使用PBS冲洗5遍;
- [0023] 4. 使用DAB显色剂ABC液添加纯水配置棕显色剂,室温显色6分钟后纯水冲洗5遍;
- [0024] 5. 使用AP显色剂ABC液配置红显色剂,室温显色30分钟后纯水冲洗5遍;
- [0025] 6. 苏木素复染后封片镜检,数据见图1。
- [0026] 实施例2。
- [0027] 葡聚糖信号放大ki-67/p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒免疫组化实验,其步骤如下:
- [0028] 1. ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体制备方法为:葡聚糖的活化、AP酶试剂活化、多聚物ki-67抗体偶联、洗涤、保存。所述ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体制备方法为:将葡聚糖(DeX)溶于PH=7.0的20mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,加入适量高碘酸钠(NaIO<sub>4</sub>)进行氧化,用DeX基质相同PBS进行透析过夜,水溶碱性磷酸酶(AP),加入适量NaIO<sub>4</sub>氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化DeX和ki-67抗体和活化后AP混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液;
- [0029] 2. p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体制备方法为:葡聚糖的活化、AP酶试剂活化、多聚物p16<sup>INK4a</sup>抗体偶联、洗涤、保存。所述p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体制备方法为:将葡聚糖(DeX)溶于pH=7.0的20mM的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中,加入适量高碘酸钠(NaIO<sub>4</sub>)进行氧化,用DeX基质相同PBS进行透析过夜,水溶辣根过氧化物酶(HRP),加入适量NaIO<sub>4</sub>氧化,使用乙二醇终止反应,透析过夜;将氧化DeX和p16<sup>INK4a</sup>抗体和活化后HRP混合反应后,透析过夜,使用保存液稀释至工作液;
- [0030] 3. 葡聚糖多聚抗体保存液配方包括:PBS、Tris或HEPES缓冲液中的任意一种,1%-2%牛血清蛋白,0.01%-1%的Proclin300;
- [0031] 4. 试剂盒DAB组成为A液底物:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;B液增强:NiCl<sub>2</sub>;C液色原:二氨基联苯胺。所述试剂盒AP显色液组成为A液稀释:Tris缓冲液;B液底物:α-萘酚AS-BI磷酸盐;C液色原:品红;
- [0032] 5. 选取TCT阳性宫颈刷片样本,离心制片,95%乙醇固定30分钟,抗原修复处理后晾干;
- [0033] 6. 滴加ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体,37℃孵育1小时后使用PBS冲洗5遍;
- [0034] 7. 滴加p16<sup>INK4a</sup>葡聚糖多聚HRP标记抗体,37℃孵育1小时后使用PBS冲洗5遍;
- [0035] 8. 使用DAB显色剂ABC液添加纯水配置棕显色剂,室温显色6分钟后纯水冲洗5遍;
- [0036] 9. 使用AP显色剂ABC液配置红显色剂,室温显色30分钟后纯水冲洗5遍;
- [0037] 10. 苏木素复染后封片镜检,数据见图2。
- [0038] 对照ki-67/p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒和葡聚糖信号放大ki-67/p16<sup>INK4a</sup>双染检测试剂盒以宫颈阳性细胞质控片进行免疫组化细胞双染,以确定信号强度和染色效果。
- [0039] 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。

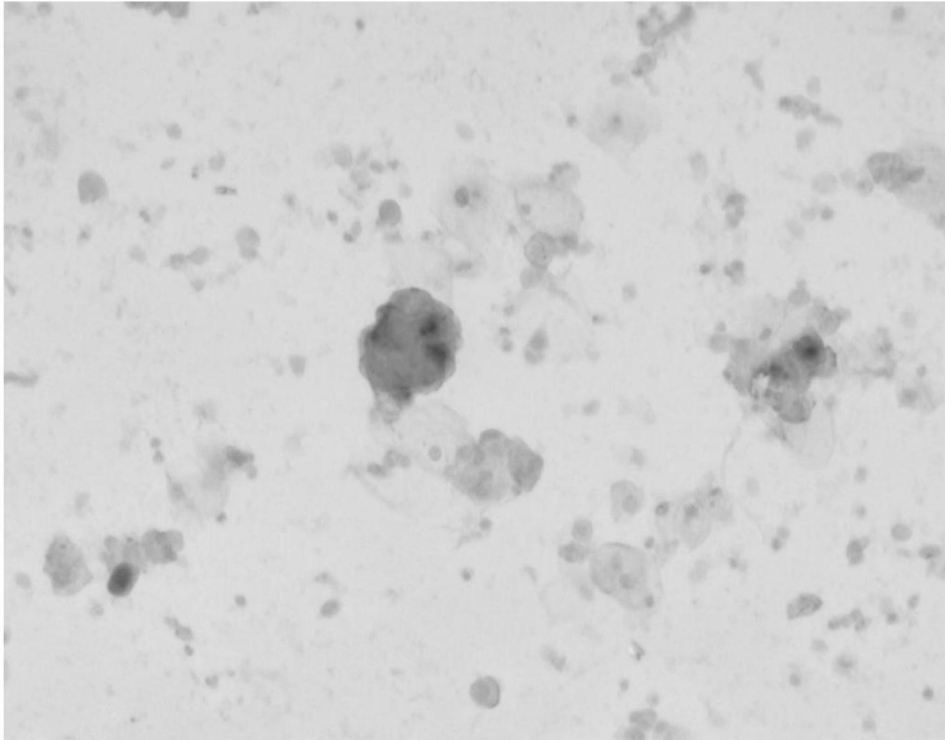


图1

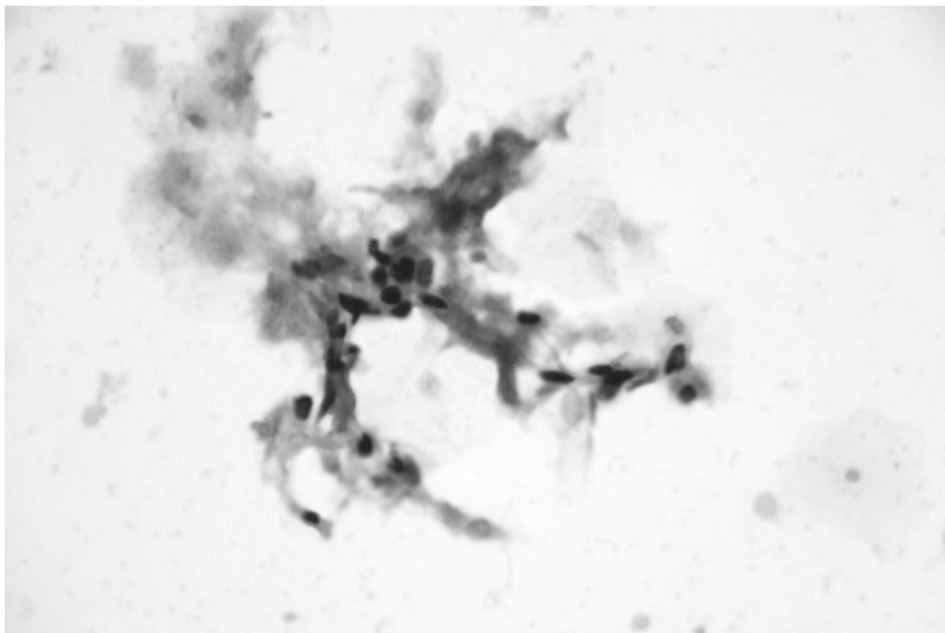


图2

专利名称(译)	一种基于葡聚糖信号放大ki67和p16INK4a检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN111077302A</a>	公开(公告)日	2020-04-28
申请号	CN201911364620.2	申请日	2019-12-26
[标]发明人	李文成 孙康俊 黄宝福		
发明人	李文成 汪骏青 孙康俊 黄宝福		
IPC分类号	G01N33/541 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/541		
代理人(译)	孙佳胤		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开一种基于葡聚糖信号放大ki67和p16INK4a检测试剂盒，所述试剂盒包括ki-67葡聚糖多聚AP标记抗体、p16INK4a葡聚糖多聚HRP标记抗体、DAB显色液和AP显色液。本发明试剂盒采用酶标多聚一抗进行免疫检测，公开了葡聚糖多聚抗体制备的特定条件，同时以葡聚糖分子为支撑骨架，复合抗体和信号标记物形成葡聚糖多聚抗体，其携带大量的信号标记物极大的提高了信号强度，降低了抗体使用浓度、避免非特异信号干扰。同时，高分子复合物与酶是多位点结合，为酶的天然三维构象提供了稳定的支撑，大幅度维持了酶和抗体的稳定性，实现大分子之间的高效键合。本发明试剂盒极大的减少了抗体用量，减少了操作流程和时间，且具有更高的显色效率和检测灵敏度。

