



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110501498 A

(43)申请公布日 2019.11.26

(21)申请号 201910806526.1

(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 33/532(2006.01)

G01N 1/30(2006.01)

权利要求书2页 说明书4页

(54)发明名称

一种p16免疫组化检测试剂盒

(57)摘要

本发明涉及生物科技技术领域,具体为一种p16免疫组化检测试剂盒,包括一抗:冻干粉p16抗体;无色试剂:内源性过氧化物酶阻断剂10—15ml;试剂A:免疫组化封闭液;试剂B:生物素标记二抗工作液;试剂C:辣根酶标记链酶卵白素工作液;棕色显色液D液1—2ml;白色显色液E液20—25ml;0.1M PBS缓冲液;柠檬酸钠抗原修复液;二氨基联本胺DAB染色液。本发明利用链霉亲和素—生物素信号放大技术生产的免疫组化检测试剂,具有高灵敏度,特异性强、定性定位准确、背景清晰、低倍景染色,直接滴加,操作方便,孵育时间短,适用于冷冻切片、石蜡切片及固定的细胞涂片;可用于检测细胞、组织内的特异性抗原。

1. 一种p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述检测试剂盒中包括以下试剂:

一抗:冻干粉p16抗体;

无色试剂:内源性过氧化物酶阻断剂10—15ml;

试剂A:免疫组化封闭液;

试剂B:生物素标记二抗工作液;

试剂C:辣根酶标记链酶卵白素工作液;

棕色显色液D液1—2ml;

白色显色液E液20—25ml;

0.1MPBS缓冲液;

柠檬酸钠抗原修复液;

二氨基联本胺DAB染色液。

2. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述检测试剂盒的实验步骤具体如下:

S1:制备一抗稀释液和DAB显色液;

S2:将石蜡切片,并进行脱蜡至水;

S3:蒸馏水冲洗,0.1MPBS缓冲液浸泡6—10min;

S4:进行抗原修复;

S5:采用3%—5%的无色双羊水去离子水孵育15—20min,消除内源性过氧化物酶活性;

S6:滴加蓝色试剂A免疫组化封闭液,室温孵育15—20min;

S7:滴加S1中制备的一抗稀释液,35—37℃孵育2—3小时;

S8:采用0.1MPBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加黄色试剂B生物素标记二抗工作液,30—37℃孵育15—20min;

S9:采用0.1MPBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加橙色试剂C辣根酶标记链酶卵白素工作液,30—37℃孵育15—20min;

S10:通过DAB显色液显色,并通过自来水充分冲洗;

S11:进行复染、脱水、透明,之后选择适当的封片剂封片。

3. 根据权利要求2所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述一抗稀释采用以下两种方法进行稀释:

(1) 将冻干粉p16抗体用0.1MPBS缓冲液稀释,将稀释后的抗体分装5—10支,20ulx5支或10ulx10支,放入—20℃保存;

(2) 将冻干粉p16抗体用0.1MPBS缓冲液稀释50ul成原液,再加50%甘油,放入—20℃保存。

4. 根据权利要求2所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述柠檬酸钠抗原修复液的修复方法包括沸水浴修复、微波修复或高压修复。

5. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述DAB显色液的制备实验具体包括如下步骤:将1ml的白色显色液E液作为DAB底物液,之后加入1滴50ul的棕色显色液D液作为DAB浓缩液,混合均匀,制得DAB显色液。

6. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述免疫组化封闭液包括封闭用正常山羊血清工作液。

7. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述生物素标记二抗工作液采用生物素标记羊抗兔免疫球蛋白G、生物素标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G或生物素标记羊抗兔、大鼠、小鼠和豚鼠免疫球蛋白G。

8. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述PBS缓冲液的酸碱度为pH7.2—7.4。

9. 根据权利要求1所述的p16免疫组化检测试剂盒,其特征在于:所述PBS缓冲液也可采用无菌蒸馏水。

## 一种p16免疫组化检测试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物科技技术领域,具体为一种p16免疫组化检测试剂盒。

### 背景技术

[0002] 免疫组化是利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂(荧光素、酶、金属离子、同位素)显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量的研究。目前免疫组织化学已广泛应用与临床病理学诊断,特别是用针对性地抗体进行肿瘤辅助诊断和鉴别诊断,成为临床病理学诊断不可缺少的重要手段。

[0003] 目前市面上的p16免疫组化检测试剂盒灵敏度低,特异性差、定性定位不准确、背景模糊、操作不方便,孵育时间太长。鉴于此,我们提供一种p16免疫组化检测试剂盒。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种p16免疫组化检测试剂盒,以解决上述背景技术中提出现如今p16免疫组化检测试剂盒灵敏度低,特异性差、定性定位不准确、背景模糊、操作不方便,孵育时间太长的问题。

[0005] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

[0006] 一种p16免疫组化检测试剂盒,所述检测试剂盒中包括以下试剂:

[0007] 一抗:冻干粉p16抗体;

[0008] 无色试剂:内源性过氧化物酶阻断剂10—15ml;

[0009] 试剂A:免疫组化封闭液;

[0010] 试剂B:生物素标记二抗工作液;

[0011] 试剂C:辣根酶标记链酶卵白素工作液;

[0012] 棕色显色液D液1—2ml;

[0013] 白色显色液E液20—25ml;

[0014] 0.1M PBS缓冲液;

[0015] 柠檬酸钠抗原修复液;

[0016] 二氨基联本胺DAB染色液。

[0017] 作为优选,所述检测试剂盒的实验步骤具体如下:

[0018] S1:制备一抗稀释液和DAB显色液;

[0019] S2:将石蜡切片,并进行脱蜡至水;

[0020] S3:蒸馏水冲洗,0.1M PBS缓冲液浸泡6—10min;

[0021] S4:进行抗原修复;

[0022] S5:采用3%—5%的无色双羊水去离子水孵育15—20min,消除内源性过氧化物酶活性;

[0023] S6:滴加蓝色试剂A免疫组化封闭液,室温孵育15—20min;

[0024] S7:滴加S1中制备的一抗稀释液,35—37℃孵育2—3小时;

- [0025] S8:采用0.1M PBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加黄色试剂B生物素标记二抗工作液,30—37℃孵育15—20min;
- [0026] S9:采用0.1M PBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加橙色试剂C辣根酶标记链酶卵白素工作液,30—37℃孵育15—20min;
- [0027] S10:通过DAB显色液显色,并通过自来水充分冲洗;
- [0028] S11:进行复染、脱水、透明,之后选择适当的封片剂封片。
- [0029] 作为优选,所述一抗稀释采用以下两种方法进行稀释:
- [0030] (1)将冻干粉p16抗体用0.1M PBS缓冲液稀释,将稀释后的抗体分装5—10支,20ulx5支或10ulx10支,放入-20℃保存;
- [0031] (2)将冻干粉p16抗体用0.1M PBS缓冲液稀释50ul成原液,再加50%甘油,放入-20℃保存。
- [0032] 作为优选,所述柠檬酸钠抗原修复液的修复方法包括沸水浴修复、微波修复或高压修复。
- [0033] 作为优选,所述DAB显色液的制备实验具体包括如下步骤:将1ml的白色显色液E液作为DAB底物液,之后加入1滴50ul的棕色显色液D液作为DAB浓缩液,混合均匀,制得DAB显色液。
- [0034] 作为优选,所述免疫组化封闭液包括封闭用正常山羊血清工作液。
- [0035] 作为优选,所述生物素标记二抗工作液采用生物素标记羊抗兔免疫球蛋白G、生物素标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G或生物素标记羊抗兔、大鼠、小鼠和豚鼠免疫球蛋白G。
- [0036] 作为优选,所述PBS缓冲液的酸碱度为pH7.2—7.4。
- [0037] 作为优选,所述PBS缓冲液也可采用无菌蒸馏水。
- [0038] 与现有技术相比,本发明的有益效果是:
- [0039] 1、本p16免疫组化检测试剂盒利用链霉亲和素—生物素信号放大技术生产的免疫组化检测试剂,具有高灵敏度,特异性强、定性定位准确、背景清晰、低背景染色,直接滴加,操作方便,孵育时间短,适用于冷冻切片、石蜡切片及固定的细胞涂片;可用于检测细胞、组织内的特异性抗原。
- [0040] 2、本p16免疫组化检测试剂盒通过设置的PBS缓冲液能够提供相对稳定的离子环境和pH缓冲能力,是生物学中经常使用的缓冲盐溶液,用于分子克隆及细胞培养等,pH为7.2—7.4,与人体血液等渗,主要成分为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠。
- [0041] 3、本p16免疫组化检测试剂盒通过设置的柠檬酸钠抗原修复液可以用于石蜡切片、冰冻切片等样品使用多聚甲醛、甲醛或其它醛类试剂固定后的抗原修复,可以有效去除醛类固定试剂导致的蛋白之间的交联,充分暴露石蜡切片等样品中的抗原表位,从而大大改善免疫染色效果。

### 具体实施方式

[0042] 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。

[0043] 实施例1

[0044] 一种p16免疫组化检测试剂盒,检测试剂盒中包括以下试剂:

[0045] 一抗:冻干粉p16抗体;

[0046] 无色试剂:内源性过氧化物酶阻断剂10—15ml;

[0047] 试剂A:免疫组化封闭液;

[0048] 试剂B:生物素标记二抗工作液;

[0049] 试剂C:辣根酶标记链酶卵白素工作液;

[0050] 棕色显色液D液1—2ml;

[0051] 白色显色液E液20—25ml;

[0052] 0.1M PBS缓冲液;

[0053] 柠檬酸钠抗原修复液;

[0054] 二氨基联本胺DAB染色液。

[0055] PBS (phosphate buffered solution) 即磷酸盐缓冲液,能够提供相对稳定的离子环境和pH缓冲能力,是生物学中经常使用的缓冲盐溶液,用于分子克隆及细胞培养等,pH为7.2—7.4,与人体血液等渗,主要成分为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠等。

[0056] 本实施例的检测试剂盒实验步骤具体如下:

[0057] S1:制备一抗稀释液和DAB显色液;

[0058] S2:将石蜡切片,并进行脱蜡至水;

[0059] S3:蒸馏水冲洗,0.1M PBS缓冲液浸泡6—10min;

[0060] S4:进行抗原修复;

[0061] S5:采用3%—5%的无色双羊水去离子水孵育15—20min,消除内源性过氧化物酶活性;

[0062] S6:滴加蓝色试剂A免疫组化封闭液,室温孵育15—20min;

[0063] S7:滴加S1中制备的一抗稀释液,35—37℃孵育2—3小时;

[0064] S8:采用0.1M PBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加黄色试剂B生物素标记二抗工作液,30—37℃孵育15—20min;

[0065] S9:采用0.1M PBS缓冲液冲洗,每一分钟冲洗一次,三分钟冲洗三次,之后滴加橙色试剂C辣根酶标记链酶卵白素工作液,30—37℃孵育15—20min;

[0066] S10:通过DAB显色液显色,并通过自来水充分冲洗;

[0067] S11:进行复染、脱水、透明,之后选择适当的封片剂封片。

[0068] 免疫组化封闭液包括封闭用正常山羊血清工作液。

[0069] 生物素标记二抗工作液采用生物素标记羊抗兔免疫球蛋白G、生物素标记山羊抗小鼠免疫球蛋白G或生物素标记羊抗兔、大鼠、小鼠和豚鼠免疫球蛋白G。

[0070] 进一步的,PBS缓冲液的酸碱度为pH7.2—7.4,使得酸碱度适中。

[0071] 此外,PBS缓冲液也可采用无菌蒸馏水,可以降低成本。

[0072] 本实施例的p16免疫组化检测试剂盒利用链霉亲和素—生物素信号放大技术生产的免疫组化检测试剂,具有高灵敏度,特异性强、定性定位准确、背景清晰、低背景染色,直接滴加,操作方便,孵育时间短,适用于冷冻切片、石蜡切片及固定的细胞涂片;可用于检测细胞、组织内的特异性抗原;设置的PBS缓冲液能够提供相对稳定的离子环境和pH缓冲能

力,是生物学中经常使用的缓冲盐溶液,用于分子克隆及细胞培养等,pH为7.2—7.4,与人体血液等渗,主要成分为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠;柠檬酸钠抗原修复液可以用于石蜡切片、冰冻切片等样品使用多聚甲醛、甲醛或其它醛类试剂固定后的抗原修复,可以有效去除醛类固定试剂导致的蛋白之间的交联,充分暴露石蜡切片等样品中的抗原表位,从而大大改善免疫染色效果。

[0073] 实施例2

[0074] 作为本发明的第二种实施例,一抗稀释采用以下两种方法进行稀释:

[0075] (1) 将冻干粉p16抗体用0.1M PBS缓冲液稀释,将稀释后的抗体分装5—10支,20ulx5支或10ulx10支,放入-20℃保存;

[0076] (2) 将冻干粉p16抗体用0.1M PBS缓冲液稀释50ul成原液,再加50%甘油,放入-20℃保存。

[0077] 具体的,DAB显色液的制备实验具体包括如下步骤:将1ml的白色显色液E液作为DAB底物液,之后加入1滴50ul的棕色显色液D液作为DAB浓缩液,混合均匀,制得DAB显色液,此溶液必须现用现配,配好后避光保存,6小时内使用,剩余的液体应弃去,标本显色时间一般为室温5—20分钟,在显微镜下观察显色情况,显色充分后应将标本及时脱水封固。

[0078] 实施例3

[0079] 柠檬酸钠抗原修复液的修复方法包括沸水浴修复、微波修复或高压修复,柠檬酸钠抗原修复液可以用于石蜡切片、冰冻切片等样品使用多聚甲醛、甲醛或其它醛类试剂固定后的抗原修复,可以有效去除醛类固定试剂导致的蛋白之间的交联,充分暴露石蜡切片等样品中的抗原表位,从而大大改善免疫染色效果。

[0080] 具体的,沸水浴修复将盛有修复液和玻片的烧杯置于沸水浴环境,保持外部沸腾状态15min,自然冷却至室温。

[0081] 微波修复,将盛有修复液和玻片的烧杯置于微波炉中,高火5min,停火3min,中火5min,自然冷却至室温。

[0082] 高压修复,将盛有修复液和玻片的烧杯置于高压锅,上汽后修复2—5min,然后将高压锅置入凉水中,减压至正常后取出玻片。

[0083] 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免疫组化检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN110501498A</a>	公开(公告)日	2019-11-26
申请号	CN201910806526.1	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 G01N33/532 G01N1/30		
CPC分类号	G01N1/30 G01N33/532 G01N33/54393 G01N2001/302		
代理人(译)	黄浩威		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及生物科技技术领域，具体为一种p16免疫组化检测试剂盒，包括一抗：冻干粉p16抗体；无色试剂：内源性过氧化物酶阻断剂10 - 15ml；试剂A：免疫组化封闭液；试剂B：生物素标记二抗工作液；试剂C：辣根酶标记链酶卵白素工作液；棕色显色液D液1 - 2ml；白色显色液E液20 - 25ml；0.1M PBS缓冲液；柠檬酸钠抗原修复液；二氨基联本胺DAB染色液。本发明利用链霉亲和素 - 生物素信号放大技术生产的免疫组化检测试剂，具有高灵敏度，特异性强、定性定位准确、背景清晰、低倍景染色，直接滴加，操作方便，孵育时间短，适用于冷冻切片、石蜡切片及固定的细胞涂片；可用于检测细胞、组织内的特异性抗原。