



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 107202888 B

(45)授权公告日 2018.10.12

(21)申请号 201710562392.4

(51)Int.Cl.

(22)申请日 2017.07.11

G01N 33/574(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

G01N 33/535(2006.01)

申请公布号 CN 107202888 A

审查员 周洋

(43)申请公布日 2017.09.26

(73)专利权人 广州江元医疗科技有限公司

地址 510663 广东省广州市高新技术产业

开发区科学城科丰路31号华南新材料

创新园G7栋601

(72)发明人 李小梅 骆伟明 李飞 李高峰

申令

(74)专利代理机构 广州圣理华知识产权代理有

限公司 44302

代理人 顿海舟 李唐明

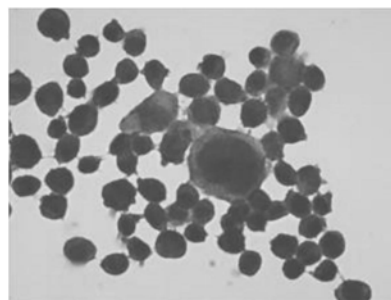
权利要求书1页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种用于宫颈液基细胞的p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

(57)摘要

本发明属于临床医学病理技术领域,具体涉及一种用于宫颈液基细胞的p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒。所述试剂盒包括:p16^{INK4a}抗原保存液,第一抗体,第二抗体,DAB显色液,内源性过氧化物酶阻断剂,封闭液,缓冲液,阳性对照品和阴性对照品。本发明试剂盒特异性强,利用抗原抗体特异性结合的染色方法,克服了当前液基细胞学非特异性巴氏染色、全靠肉眼形态判断的特异性低的缺陷。



1. 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:p16^{INK4a}抗原保存液,第一抗体,第二抗体,DAB显色液,内源性过氧化物酶阻断剂,封闭液,缓冲液,阳性对照品和阴性对照品;所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成:NaCl 60-100mmol/L、KCl 2-10mmol/L、乙二胺四乙酸二钠1-5mmol/L、尿素30-50mmol/L、柠檬酸钠1-5mmol/L、蔗糖5-20mmol/L、PEG-400 4-10mmol/L、多聚甲醛2%-3%、甘油2-10mmol/L和二硫苏糖醇10-20mmol/L,余量为溶剂;所述内源性过氧化物酶阻断剂为体积百分比0.5%-1%高碘酸溶液;封闭液为动物非免疫羊血清。

2. 根据权利要求1所述用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,其特征在于,所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成:NaCl 85mmol/L、KCl 7.5mmol/L、乙二胺四乙酸二钠3.5mmol/L、尿素42mmol/L、柠檬酸钠3.6mmol/L、蔗糖16mmol/L、PEG-400 6.5mmol/L、多聚甲醛2%、甘油8.4mmol/L和二硫苏糖醇16.5mmol/L,余量为溶剂。

3. 根据权利要求1所述用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,其特征在于,所述第一抗体为宫颈液基细胞p16^{INK4a}鼠抗人单克隆抗体;所述第二抗体为标记了辣根过氧化物酶的兔抗小鼠IgG抗体。

4. 根据权利要求1所述用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,其特征在于,所述缓冲液为含有0.1%-0.5%吐温20的pH值为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求1所述用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,其特征在于,所述阳性对照品为高表达p16^{INK4a}蛋白的宫颈鳞癌细胞SiHa;阴性对照品为低表达p16^{INK4a}蛋白的正常宫颈细胞。

一种用于宫颈液基细胞的p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于临床医学病理技术领域,具体涉及一种用于宫颈液基细胞的 p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒。

背景技术

[0002] 宫颈癌是妇科最常见的女性生殖系统恶性肿瘤之一,发病率仅次于乳腺癌,位居女性恶性肿瘤第二位,严重威胁着女性的身体健康和生活质量。中国是宫颈癌的高发国家,发生率及死亡率约占全世界的1/3。宫颈癌也是目前唯一病因明确,通过有效的早期诊断及治疗可以完全治愈的癌症。

[0003] 当前宫颈癌及癌前的病变的早期诊断分为“三阶梯”。第一步为阴道脱落细胞学检查,筛查出可疑病例。第二步为阴道镜检查,在阴道镜下对可疑病例取活检组织。然后进行第三步活体组织检查,最终确诊。

[0004] 做为宫颈癌及癌前病变诊断的第一步,阴道脱落细胞学检查起着非常重要的门户作用,当前脱落细胞学的主要检查技术为液基薄层制片技术。

[0005] 液基薄层细胞制片术改良自传统“巴氏涂片法”,使用独特的细胞保存液和液基薄层制片机器,代替传统巴氏的手工涂片法,可制出均匀薄层的细胞有利于病理医院镜下观察,降低了传统巴氏的漏诊率和假阳性、假阴性率。

[0006] 然而液基薄层细胞制片术采用的依旧是非特异性的巴氏/HE染色,并未从根源上弥补细胞学检查的技术缺陷。受取材、染色、及病理医生的主观判断等因素的影响,仍存在假阴性率高、灵敏度和特异性不理想等缺点。特别是对病理医生的要求较高,且我国病理医生缺乏、病理医生的工作量大,易出现人为因素导致漏检的情况。

[0007] 液基细胞学的技术缺陷促进了宫颈癌及癌前病变筛查辅助技术的发展,当前主要的辅助筛查技术为HPV检测,目前HPV的检测方法有多种,灵敏度和特异度较高的有杂交捕获二代检测系统(HC-II)、荧光定量PCR技术等。

[0008] 研究已揭示高危型人乳头瘤病毒(human papilloma virus,HPV)的持续感染是导致宫颈癌的主要原因。目前已知的HPV亚型有近200种,大多数不会引起宫颈癌,只有14种高危型,是引起宫颈癌的主要原因。女性的一生中,感染HPV 的风险超过50%,而这些感染者有90%以上可在一至两年内通过人体自身的免疫力清除掉HPV,即转阴自愈。因而HPV检测作为一个筛查指标明显缺乏特异性,易导致病人的心理恐慌和过度医疗。且HPV分子生物学检测技术对实验环境和人员的要求较高,检测价格较贵,限制了其在临床上的广泛应用。

[0009] 寻找新的灵敏度和特异度更好的分子生物标志物用于宫颈癌的早期诊断具有重要意义。

[0010] p16^{INK4a}是一种重要的抑癌基因,特异性的与CDK4结合,抑制CDK4的活性,从而抑制细胞从G1期进入S期,使细胞无法持续增殖。p16^{INK4a}蛋白的表达通常受到另两种抑癌蛋白P53和pRB调控,在正常增殖的细胞中处于低水平表达状态。

[0011] 已知宫颈癌发生的主要原因是持续性的人乳头瘤病毒(HPV)感染(99%以上)。HPV

的持续感染会导致病毒的致癌基因蛋白E6和E7含量升高,E6和 E7作用是分别与人体抑癌基因蛋白p53和pRB结合,E6通过抑制P53而阻断凋亡,E7通过抑制pRB使细胞周期失控。在宫颈癌及癌前病变中P53和pRB 功能常处于被抑制状态,导致p16^{INK4a}蛋白从被抑制状态释放出来,过量表达。研究显示,p16^{INK4a}蛋白的过度表达和宫颈癌及癌前病变的分级显著相关,随着病变等级的越高p16^{INK4a}蛋白的表达量越高,固在宫颈癌及癌前病变细胞中检测p16^{INK4a}蛋白的表达量即可预测这些细胞的病变转化程度。

[0012] p16^{INK4a}做为高危HPV的代表和宫颈癌前病变的发展密切相关,具有较高的特异性和灵敏度,在宫颈组织活检样本中,已经得到普遍被认可与应用。将 p16^{INK4a}免疫标记应用于液基细胞学,可利用抗原抗体的特异性结合,在液基细胞学中提供特异性的染色技术,避免宫颈癌前筛查易受病理医生经验和人员缺乏等影响因素。

[0013] 然而宫颈液基细胞样本的特殊性限制了其应用的发展:(1) 宫颈液基样本常含有较多的炎症细胞、红细胞等干扰成分,含丰富的内源性过氧化物酶,易导致免疫染色的非特异性;(2) 当前液基细胞的保存液不能很好的保存细胞的 p16^{INK4a}抗原,易导致染色结果的假阴性。

[0014] 许振国等人在“p16^{INK4a}作为分子标记物在宫颈癌筛查中的应用”中采用的p16^{INK4a}免疫细胞化学染色方法为:将液基细胞保存液中的剩余标本离心沉淀后制成涂片,丙酮固定10min,4℃冰箱保存。采用Maxvision™法检测,染色步骤为:①细胞片在抗原修复液中95℃~100℃处理1~2min,室温下冷却10min,用流水冲压力锅外壁直至冷却;②取出玻片用流水冲洗干净,用PBS (pH值7.4) 冲洗3次,3min/次;③除去PBS液,每张玻片滴加50μL曲拉通X-100液,室温孵育10min,PBS (pH值7.4) 冲洗3次,3min/次;④除去PBS液,每张玻片滴加1:200稀释的100μLp16^{INK4a}单克隆抗体至室温下孵育60min或4℃冰箱过夜;⑤滴加Maxvision™试剂;⑥二甲基联苯胺(DAB)显色;⑦自来水冲洗,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,封片。阳性细胞为细胞核和细胞质出现棕黄色颗粒,以异形的阳性染色细胞数≥10个判定为阳性。

发明内容

[0015] 为解决上述问题,本发明提供了一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒。本发明宫颈液基细胞的p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒在当前阴道脱落液基细胞学的基础上,利用抗原抗体的特异性结合提供了一种特异性的染色方法,弥补了当前液基细胞学非特异性巴氏染色、全靠肉眼形态判断的特异性低,容易漏诊的缺陷。

[0016] 本发明通过以下技术方案实现:

[0017] 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,所述试剂盒包括: p16^{INK4a}抗原保存液,第一抗体,第二抗体,DAB显色液,内源性过氧化物酶阻断剂,封闭液,缓冲液,阳性对照品和阴性对照品。

[0018] 优选地,所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成:NaCl 60-100mmol/L、KCl 2-10mmol/L、乙二胺四乙酸二钠1-5mmol/L、尿素 30-50mmol/L、柠檬酸钠1-5mmol/L、蔗糖5-20mmol/L、PEG-4004-10mmol/L、多聚甲醛2%-3%、甘油2-10mmol/L和二硫苏糖醇10-20mmol/L。

[0019] 优选地,所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成:NaCl 85mmol/L、KCl

7.5mmol/L、乙二胺四乙酸二钠3.5mmol/L、尿素42mmol/L、柠檬酸钠 3.6mmol/L、蔗糖16mmol/L、PEG-4006.5mmol/L、多聚甲醛2%、甘油8.4mmol/L 和二硫苏糖醇16.5mmol/L。

[0020] 优选地,所述第一抗为宫颈液基细胞p16^{INK4a}鼠抗人单克隆抗体;所述第二抗体为标记了辣根过氧化物酶的兔抗小鼠IgG抗体。

[0021] 优选地,所述内源性过氧化物酶阻断剂为0.5%-1%高碘酸溶液;封闭液为动物非免疫羊血清。

[0022] 优选地,所述缓冲液为含有0.1%-0.5%吐温20的pH值为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液。

[0023] 优选地,所述阳性对照品为高表达p16^{INK4a}蛋白的宫颈鳞癌细胞SiHa;阴性对照品为低表达p16^{INK4a}蛋白的正常宫颈细胞。

[0024] 本发明还提供了一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0025] (1)用一次性宫颈刷刷取女性患者宫颈移行区的细胞样本,用p16^{INK4a}抗原保存液保存细胞,并用JY-3200型自动制片机进行自动制片;

[0026] (2)制片后用4%多聚甲醛固定5-10min,后60℃烘干10min;

[0027] (3)烘干结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0028] (4)清洗过后滴加封闭液,32℃恒温孵育10-20min后抛干;

[0029] (5)滴加第一抗体,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育30-60min;

[0030] (6)孵育结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0031] (7)滴加第二抗体,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育15-30min;

[0032] (8)孵育结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0033] (9)滴加内源性过氧化物酶阻断剂,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育2-5min;

[0034] (11)用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0035] (12)滴DAB显色液,显色5-10min;

[0036] (13)用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0037] (14)用苏木素复染后,中性树胶封片。

[0038] 试剂盒使用过程中,首先使用了p16^{INK4a}抗原保存液,在细胞收集阶段就很好的保存了细胞p16^{INK4a}抗原决定簇,防止其受其它化学物质影响而封闭;制片后使用4%多聚甲醛固定液代替了传统液基的乙醇/甲醇固定液,从而对p16^{INK4a}抗原具有更好的保护效果;与传统免疫组织化学的缓冲液相比,本发明在pH值为7.2-7.6的磷酸盐缓冲液中添加了0.1%-0.5%吐温20的表面活性剂,使反应过程中清洗更彻底。

[0039] 本发明用低浓度的强氧化剂HIO₃替代了传统的内源性过氧化物酶阻断剂中现配现用的H₂O₂溶液,缩短了反应时间,提高了内源性过氧化物酶的阻断效果;并且HIO₃溶液不需现配现用,可长期保存。此外,本发明将内源性过氧化物酶阻断步骤在二抗孵育节后进行,与传统操作步骤中将内源性过氧化物酶阻断步骤在一抗反应前进行相比,避免了氧化剂对抗原的影响。

[0040] 本发明p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒中含有p16^{INK4a}抗原保存液,并对免疫显色体系及流程进行了优化,能够有效检测p16^{INK4a}的表达,从而解决了将免疫显色技术应用于宫

颈液基细胞学的限制。本发明试剂盒与现有相比具有以下突出优点：

[0041] (1) 本发明试剂盒特异性强，利用抗原抗体特异性结合的染色方法，克服了当前液基细胞学非特异性巴氏染色、全靠肉眼形态判断的特异性低的缺陷；

[0042] (2) 本发明试剂盒灵敏度高，稳定性强，成本低，操作方便。

附图说明

[0043] 图1：阴性对照品：P16低表达的正常宫颈细胞；

[0044] 图2：样品：P16高表达的宫颈病变细胞；

[0045] 图3：阳性对照品：P16高表达的宫颈鳞癌细胞株SiHa。

具体实施方式

[0046] 下面将结合说明书附图和实施例进一步的详细说明本发明。需要指出的是，以下说明仅仅是对本发明要求保护的技术方案的举例说明，并非对这些技术方案的任何限制。本发明的保护范围以所附权利要求书记载的内容为准。

[0047] 多聚甲醛，CAS号30525-89-4。

[0048] 实施例1 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

[0049] 所述试剂盒包括：p16^{INK4a}抗原保存液，第一抗体，第二抗体，DAB显色液，内源性过氧化物酶阻断剂，封闭液，缓冲液，阳性对照品和阴性对照品。

[0050] 其中，所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成：NaCl 85mmol/L、KCl 7.5mmol/L、乙二胺四乙酸二钠3.5mmol/L、尿素42mmol/L、柠檬酸钠 3.6mmol/L、蔗糖16mmol/L、PEG-4006.5mmol/L、多聚甲醛2%、甘油8.4mmol/L 和二硫苏糖醇16.5mmol/L。

[0051] 所述第一抗体为p16^{INK4a}鼠抗人单克隆抗体；所述第二抗体为标记了辣根过氧化物酶的兔抗小鼠IgG抗体。

[0052] 所述内源性过氧化物酶阻断剂为0.75%高碘酸溶液；所述封闭液为动物非免疫羊血清。

[0053] 所述缓冲液为含有0.3%吐温20的pH值为7.4的磷酸盐缓冲液。

[0054] 所述阳性对照品为高表达P16蛋白的宫颈鳞癌细胞SiHa；阴性对照品为低表达P16蛋白的正常宫颈细胞。

[0055] 实施例2 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

[0056] 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒，所述试剂盒包括：p16^{INK4a}抗原保存液，第一抗体，第二抗体，DAB显色液，内源性过氧化物酶阻断剂，封闭液，缓冲液，阳性对照品和阴性对照品。

[0057] 所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成：NaCl 60mmol/L、KCl 2mmol/L、乙二胺四乙酸二钠1mmol/L、尿素30mmol/L、柠檬酸钠1mmol/L、蔗糖5mmol/L、PEG-4004mmol/L、多聚甲醛2%、甘油2mmol/L和二硫苏糖醇 10mmol/L。

[0058] 其中，所述第一抗为p16^{INK4a}鼠抗人单克隆抗体；所述第二抗体为标记了辣根过氧化物酶的兔抗小鼠IgG抗体。

[0059] 所述内源性过氧化物酶阻断剂为0.5%高碘酸溶液；所述封闭液为动物非免疫羊血清。

[0060] 所述缓冲液为含有0.1%吐温20的pH值为7.2的磷酸盐缓冲液。

[0061] 所述阳性对照品为高表达P16蛋白的宫颈鳞癌细胞SiHa;阴性对照品为低表达P16蛋白的正常宫颈细胞。

[0062] 实施例3 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

[0063] 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒,所述试剂盒包括: p16^{INK4a}抗原保存液,第一抗体,第二抗体,DAB显色液,内源性过氧化物酶阻断剂,封闭液,缓冲液,阳性对照品和阴性对照品。

[0064] 其中,所述p16^{INK4a}抗原保存液由以下成分及其浓度组成:NaCl 100mmol/L、KCl 10mmol/L、乙二胺四乙酸二钠5mmol/L、尿素50mmol/L、柠檬酸钠5mmol/L、蔗糖20mmol/L、PEG-40010mmol/L、多聚甲醛2.5%、甘油10mmol/L和二硫苏糖醇20mmol/L。

[0065] 所述第一抗为p16^{INK4a}鼠抗人单克隆抗体;所述第二抗体为标记了辣根过氧化物酶的兔抗小鼠IgG抗体。

[0066] 所述内源性过氧化物酶阻断剂为1%高碘酸溶液;所述封闭液为动物非免疫羊血清。

[0067] 所述缓冲液为含有0.5%吐温20的pH值为7.6的磷酸盐缓冲液。

[0068] 所述阳性对照品为高表达P16蛋白的宫颈鳞癌细胞SiHa;阴性对照品为低表达P16蛋白的正常宫颈细胞。

[0069] 实施例4 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒的使用方法

[0070] 所述用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒的使用方法,包括以下步骤:

[0071] (1)用一次性宫颈刷刷取女性患者宫颈移行区的细胞样本,用p16^{INK4a}抗原保存液保存细胞,并用JY-3200型自动制片机进行自动制片;

[0072] (2)制片后用4%多聚甲醛固定5-10min,后60℃烘干10min;

[0073] (3)烘干结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0074] (4)清洗过后滴加封闭液,32℃恒温孵育10-20min后抛干;

[0075] (5)滴加第一抗体,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育30-60min;

[0076] (6)孵育结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0077] (7)滴加第二抗体,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育15-30min;

[0078] (8)孵育结束后用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0079] (9)滴加内源性过氧化物酶阻断剂,根据样本面积覆盖完全,32℃恒温孵育2-5min;

[0080] (11)用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0081] (12)滴DAB显色液,显色5-10mi;

[0082] (13)用1-2mL的缓冲液清洗3-5次,3-5min/次;

[0083] (14)用苏木素复染后,中性树胶封片。

[0084] 对比例1 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

[0085] 所述试剂盒与实施例1的区别在于,所用保存液为CPS03保存液,其与成分均与实施例1类似。

[0086] 对比例2 一种用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒

[0087] 所述试剂盒与实施例1的区别在于,所用内源性过氧化物酶阻断剂为现配现用的

H₂O₂溶液,其与成分均与实施例1类似。

[0088] 试验例1 不同样品p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色

[0089] 利用实施例1试剂盒按实施例4使用方法,对p16^{INK4a}高表达的宫颈病变细胞进行p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色,并与本发明试剂盒中阳性对照品、阴性对照品进行比较,试验结果如图1、图2和图3所示。

[0090] 由图1、图2和图3可知,本发明试剂盒能够对p16^{INK4a}蛋白免疫标记进行特异性染色,从而能够实现对p16^{INK4a}表达的准确检测。

[0091] 试验例2 不同试剂盒p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色情况比较

[0092] 利用实施例1、对比例1和对比例2试剂盒按实施例4使用方法对P16高表达的宫颈病变细胞进行p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色,观察p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色程度,并计算阳性细胞颜色比例,结果如表1所示。

[0093] 表1 不同试剂盒p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色情况

[0094]

	实施例 1 试剂盒	对比例 1	对比例 2
p16 ^{INK4a} 蛋白免疫标记染色程度	+++	+	+
阳性染色细胞比例	≥97%	≤25%	≤45%

[0095] 注:+表示大于10%的细胞呈现微弱,不完全染色;+++表示大于10%的细胞呈现强的、完整的细胞染色。

[0096] 由表1可知,本发明试剂盒p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色情况明显优于对比例 1、对比例2;与对比例1相比,本发明试剂盒阳性染色细胞比例提高了2.9倍,这说明本发明试剂盒中所用p16^{INK4a}抗原保存液比普通保存液更能促进p16^{INK4a}蛋白免疫标记染色;与对比例2相比,本发明试剂盒阳性染色细胞比例提高了 1.2倍,这说明本发明用低浓度的强氧化剂HIO₃替代内源性过氧化物阻断剂中现配现用的H₂O₂溶液,效果更为明显。

[0097] 试验例3、用于宫颈液基细胞p16^{INK4a}免疫标记显色试剂盒的稳定性

[0098] 1、冻融稳定性

[0099] 为模拟试剂盒在运输过程中,低温环境下试剂盒各组份反复冻融对试剂盒稳定性的影响,将本发明实施例1整套试剂盒在-20℃的低温下冷冻过夜,然后在室温下复溶,然后再置于-20℃的低温下冷冻过夜,如此反复冻融5次,然后按实施例4的使用方法进行检测。结果如表2所示。

[0100] 表2:试剂盒冻融稳定性结果

[0101]

检测指标		要求	冻融 5 次
阴性对照		≥90%阴性	100%阴性
阳性对照		≥90%阳性	100%阳性
细胞形态		正常	正常
重复性	批内	无差异	无差异
	批间	无差异	无差异

[0102] 由表2可以看出,本发明试剂盒经反复冻融5次后,试剂盒的阴性对照、阳性对照、细胞形态以及重复性等均满足要求。这说明,本发明试剂盒具有较好的冻融稳定性。

[0103] 2、模拟运输稳定性

[0104] 为模拟试剂盒在运输过程中,车辆的颠簸以及高温环境对试剂盒稳定性的影响,将实施例1整套试剂盒固定在微量振荡器上,放置于37℃恒温箱振荡7天后按实施例4使用方法进行检测。结果如表3所示。

[0105] 表3:试剂盒模拟运输稳定性结果

[0106]

检测指标		要求	37℃运输 7 天
阴性对照		≥90%阴性	100%阴性
阳性对照		≥90%阳性	100%阳性
细胞形态		正常	正常
重复性	批内	无差异	无差异
	批间	无差异	无差异

[0107] 由表3可以看出,本发明试剂盒放置于37℃恒温箱振荡7天后,试剂盒的阴性对照、阳性对照、细胞形态以及重复性等均满足要求。这说明,本发明试剂盒具有较好的运输稳定性。

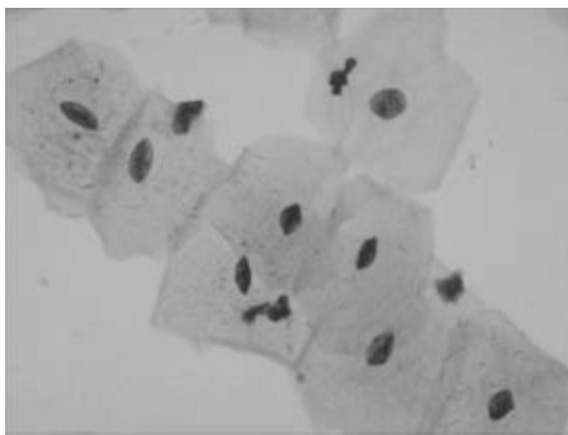


图1

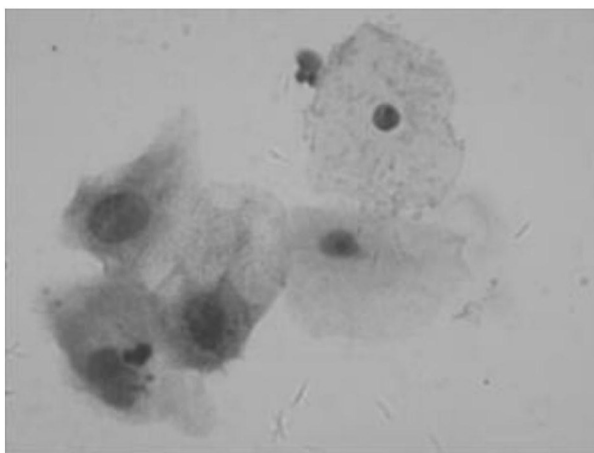


图2

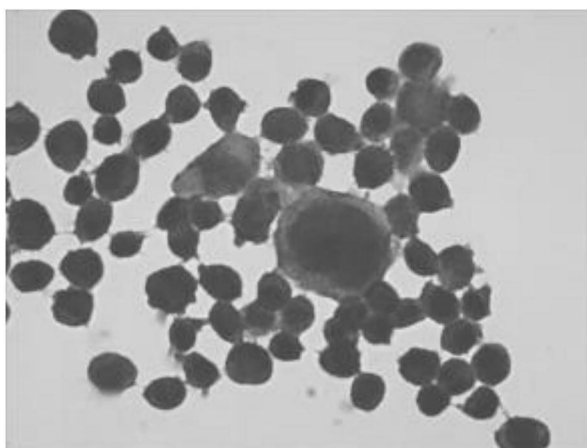


图3

专利名称(译)	一种用于宫颈液基细胞的p16INK4a免疫标记显色试剂盒		
公开(公告)号	CN107202888B	公开(公告)日	2018-10-12
申请号	CN201710562392.4	申请日	2017-07-11
[标]申请(专利权)人(译)	广州江元医疗科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州江元医疗科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州江元医疗科技有限公司		
[标]发明人	李小梅 骆伟明 李飞 李高峰 申令		
发明人	李小梅 骆伟明 李飞 李高峰 申令		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57442		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN107202888A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于临床医学病理技术领域，具体涉及一种用于宫颈液基细胞的p16INK4a免疫标记显色试剂盒。所述试剂盒包括：p16INK4a抗原保存液，第一抗体，第二抗体，DAB显色液，内源性过氧化物酶阻断剂，封闭液，缓冲液，阳性对照品和阴性对照品。本发明试剂盒特异性强，利用抗原抗体特异性结合的染色方法，克服了当前液基细胞学非特异性巴氏染色、全靠肉眼形态判断的特异性低的缺陷。

