



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107677827 A

(43)申请公布日 2018.02.09

(21)申请号 201710930734.3

(22)申请日 2017.10.09

(71)申请人 亚能生物技术(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市宝安区67区留仙
一路高新奇科技工业园2区1栋10楼

(72)发明人 吴莹莹 肖淑英 黄慧玲 李印淑
何伟

(74)专利代理机构 深圳市博锐专利事务所
44275

代理人 张明

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

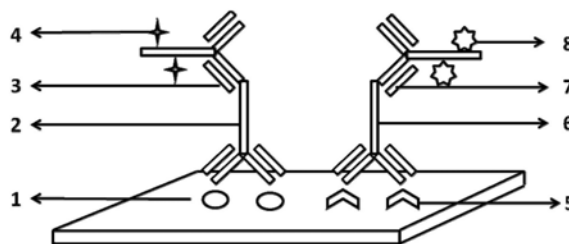
权利要求书1页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用,包括试剂A液:P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗;试剂B液:AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗;试剂C液:过氧化氢溶液;试剂D液:二氨基联苯胺;试剂E液:使试剂D液显色的缓冲液;试剂F液:核固红色原;试剂G液:使试剂F液显色的缓冲液。将上述试剂盒应用于非治疗目的的宫颈癌细胞检测中,包括以下步骤:S10预处理:取样本进行制片和固定后,再进行抗原修复后,先用试剂C液进行封闭处理;S20双染:先滴加试剂A液再滴加试剂B液进行染色鉴定和S30复染。



1. 一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒,其特征在於:包括试剂A液:P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗;试剂B液:AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗;试剂C液:过氧化氢溶液;试剂D液:二氨基联苯胺;试剂E液:使试剂D液显色的缓冲液;试剂F液:核固红色原;试剂G液:使试剂F液显色的缓冲液。

2. 根据权利要求1所述的宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒,其特征在於:所述试剂C液为3~5%的过氧化氢溶液。

3. 根据权利要求1或2所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:包括以下步骤:

S10预处理:取样本进行制片和固定后,再进行抗原修复后,先用试剂C液进行封闭处理;

S20双染:滴加试剂A液孵育30~60分钟,用PBST洗涤液漂洗后滴加试剂B液孵育10~30分钟,再次用PBST洗涤液漂洗;

然后滴加二氨基联苯胺显色液反应3~5分钟,自来水冲洗后用PBST洗涤液漂洗;再滴加AP-Red显色15-30分钟,自来水冲洗终止反应;

其中,所述二氨基联苯胺显色液为试剂D液和试剂E液的混合溶液,所述AP-Red显色液为试剂F液和试剂G液的混合溶液;

S30复染:苏木素染色液复染10~60秒、自来水冲洗5~10分钟后,PBS缓冲液中返蓝8~15分钟,水性封片剂封片;

所述应用以非治疗为目的。

4. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述步骤S30中还包括将载玻片放入二甲苯中孵育1-20分钟,然后使用中性树脂封片后加盖盖玻片。

5. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:还包括以下步骤:S40结果判读:将上述操作处理完后的样本放在光学显微镜下观察,当至少一个细胞同时出现棕色细胞浆免疫染色和红色细胞核免疫染色,则确认为阳性;否则为阴性。

6. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述步骤S10中制片和固定操作如下:取液基细胞学剩余标本,制片;将玻片放入95~99%乙醇固定10-30分钟,室温晾干。

7. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述步骤S10中抗原修复操作如下:将玻片放入pH值为7.5~8.0的EDTA抗原修复液中进行高压抗原修复1-3分钟,冷却至室温,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。

8. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述步骤S10中封闭操作如下:用试剂C液室温孵育10~15分钟后,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。

9. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述二氨基联苯胺显色液采用将试剂D液和试剂E液按体积比为1:20。

10. 根据权利要求3所述的双染试剂盒的应用,其特征在於:所述AP-Red显色液,采用以下配方配制:试剂F液:试剂G液体积比为1:75。

一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于液基细胞学免疫细胞化学领域,具体涉及一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 宫颈癌是指发生在宫颈阴道部或移行带的鳞状上皮细胞及宫颈内膜的柱状上皮细胞交界处的恶性肿瘤,是妇科常见的恶性肿瘤,发病率居妇科肿瘤第二位。中国是宫颈癌的高发地区,且宫颈癌的发病还具有年轻化的趋势。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。由于宫颈易于观察和取材,只要癌变前发现和正确治疗就可以预防宫颈癌。

[0003] 及早发现和正确治疗癌前病变能够极大程度上降低宫颈癌的发病率和死亡率,目前宫颈癌的筛查主要有细胞学筛查和人乳头瘤病毒(human papillomavirus,HPV)检测,通过筛查极大降低了宫颈癌的发病率和死亡率。但目前的筛查存在有一定局限,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 intraepithelial neoplasia,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。

[0004] 目前有专利申请文件CN201510085334.8中提出了,对宫颈上皮组织标本,通过免疫组化双染的方法来判断宫颈上皮是否发生瘤样病变。该方法是对宫颈鳞状上皮组织样本的两种标记物磷蛋白(stathmin)和微小染色体维持蛋白(mini-chromosome maintenance proteins,MCM2),通过使用免疫酶底物显色法来判断是否发生高度瘤样病变(CIN III)。但是该方法中样本为宫颈活检取材,属于有创性检测,一方面对个体带来创伤,另一方面以目前宫颈癌筛查标准需对病人进行二次取样,增加取样难度;还有该方法的两种标志物在癌前病变中的诊断研究还比较有限,临床应用更加有限。

[0005] 中国发明专利CN201210567622.3提出以宫颈脱落细胞,通过免疫细胞化学的方法检测P16^{INK4a}蛋白表达来判断是否有宫颈癌前病变,但通过P16^{INK4a}蛋白除了在宫颈异常增生细胞中过表达,也同时在输卵管化生细胞、子宫内膜细胞和正常柱状细胞中过表达,最终结果诊断仍需要结合细胞形态学来判断,降低医生的工作量比较有限。

[0006] 目前,国内外市场上关于宫颈癌筛查的细胞学染色检测试剂盒产品并不多见,且多以单一抗体为主,仅有的检测试剂盒产品也更多的是参照免疫组化试剂盒产品。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是:提供一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用方法。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒,包括试剂A液:P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗;试剂B液:碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,AP)标记的羊抗兔二抗与辣根过氧化物酶(horse radish

peroxidase,HRP) 标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗;试剂C液:过氧化氢溶液;试剂D液:二氨基联苯胺;试剂E液:使试剂D液显色的缓冲液;试剂F液:核固红(fast red)色原;试剂G液:使试剂F液显色的缓冲液。

[0009] 本发明的有益效果在于:本试剂盒主要运用于细胞学筛查诊断为意义不明的非典型鳞状细胞(atypical squamous cell of undetermined significance,ASCUS)或低度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion,LSIL)的患者,或在高危型HPV检查结果为阳性时,则可用该试剂盒进行检测,结果为双色阳性才能判断为阳性,单色阳性或者双阴结果则为阴性,通过双染鉴定结果更准确可靠,可以大大的减少阴道镜转诊率,减轻医生和病人的负担。该双染试剂盒运用了混合的免疫标记物P16^{INK4a}抗体和Ki-67抗体,对宫颈鳞状上皮病变检测,由于两种抗体的运用,提高了检测的灵敏度和特异性,增加了细胞学的信息量,免疫显色的强烈颜色对比结果也简化了阅片医生的工作量。本发明双染试剂盒针对宫颈鳞状上皮脱落细胞,检测两种不同抗原的表达情况,P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白分别表达于宫颈癌前病变细胞不同部位,P16^{INK4a}蛋白主要表达于胞核和胞浆,Ki-67蛋白位于胞核表达,且均随着病变程度加深而表达量增加,两种抗体的联合使用可以使癌前病变诊断更加明确。

[0010] 本发明还包括上述双染试剂盒应用,具体操作流程包括以下步骤:

[0011] S10预处理:取样本进行制片和固定后,再进行抗原修复后,先用试剂C液进行封闭处理;

[0012] S20双染:滴加试剂A液孵育30~60分钟,用PBST洗涤液漂洗后滴加试剂B液孵育10~30分钟,再次用PBST洗涤液漂洗;

[0013] 然后滴加二氨基联苯胺显色液反应3~5分钟,自来水冲洗后用PBST洗涤液漂洗;

[0014] 滴加AP-Red显色15~30分钟,自来水冲洗终止反应;

[0015] 其中,所述二氨基联苯胺显色液为试剂D液和试剂E液的混合溶液,所述AP-Red显色液为试剂F液和试剂G液的混合溶液;

[0016] S30复染:苏木素染色液复染10~60秒、自来水冲洗5~10分钟后,磷酸缓冲液(phosphate buffer saline,PBS或PBS缓冲液)中返蓝8~15分钟,水性封片剂封片;

[0017] 所述应用以非治疗为目的。

[0018] 本发明的有益效果在于:本发明样本可直接采用宫颈液基细胞学剩余样本,可跟细胞学联合检测取材,不需要另外取样,减轻病人的负担。利用免疫细胞化学标记物作为混合抗体,不仅使得操作流程简便,而且还使得检测结果更精确,观察结果客观性更强,可有效减轻阅片医生负担。

附图说明

[0019] 图1为本发明实施例1~3双染试剂盒的检测原理图。

[0020] 附图标记说明:1、P16^{INK4A}抗原;2、小鼠抗人P16^{INK4A}抗体;

[0021] 3、羊抗小鼠抗体;4、HRP;5、Ki-67抗原;6、兔抗人Ki-67抗体;

[0022] 7、羊抗兔抗体;8、AP。

具体实施方式

[0023] 为详细说明本发明的技术内容、所实现目的及效果,以下结合实施方式并配合附图予以说明。

[0024] 本发明最关键的构思在于:采用即用型单克隆一抗混合试剂(针对人P16^{INK4a}蛋白的鼠单克隆抗体和针对人的Ki-67蛋白的兔单抗体)检测P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白,经过细胞固定、抑制内源性过氧化物酶活性并与一抗孵育后,采用即用型辣根或氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔二抗检测系统,而后显色反应基于HRP介导的3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和AP介导Fast Red的转化,从而在P16^{INK4a}抗原位点上产生棕色沉淀,在Ki-67抗原位点上产生红色沉淀。

[0025] 一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒,包括试剂A液:P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗;试剂B液:AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗;试剂C液:过氧化氢溶液;试剂D液:二氨基联苯胺;试剂E液:使试剂D液显色的缓冲液;试剂F液:核固红(Fast Red)色原;试剂G液:使试剂F液显色的缓冲液。

[0026] P16^{INK4a}蛋白是一种重要的抑癌基因,在多数肿瘤中扮演着抑癌基因的角色,由于它的基因突变、缺失或启动子区甲基化,造成P16^{INK4a}基因表达下调,参与多种肿瘤的发生和发展。目前,已经有报道显示,P16^{INK4a}基因表达异常和宫颈癌发生有密切的关系,但在宫颈癌中,P16^{INK4a}的表达情况与其抑癌基因的形象并不相符,在57%的宫颈癌病例中存在P16^{INK4a}蛋白的高表达,且会随着宫颈癌病情的发展而呈现逐渐升高的趋势。文献报道,CIN和宫颈癌中检测到P16^{INK4a}阳性,原因可能是人持续感染HPV后,HPV E7癌蛋白在宫颈细胞内表达,竞争性抑制细胞周期蛋白依赖性激酶4(cyclin-dependent protein kinases, CDK4)与视网膜母细胞瘤蛋白(retinoblastoma protein,Rb)蛋白的结合,使Rb蛋白失活(类似其磷酸化的状态),激活了转录因子E2F,一方面使得HPV感染而表达E7蛋白的细胞在没有促分裂信号的作用下能够又G1期进入S期,而使细胞过度增殖,导致肿瘤发生,另一方面Rb蛋白失活可诱导P16^{INK4a}蛋白的表达,因此引起宫颈癌中P16^{INK4a}蛋白表达升高。P16^{INK4a}蛋白在宫颈癌和癌前病变中过表达,在正常组织和其他肿瘤中低表达,是一种宫颈癌特异的肿瘤标志物。

[0027] Ki-67蛋白是表达于增殖细胞的核抗原,在细胞增殖过程中各细胞周期均表达但除了G0期,Ki-67蛋白在增殖细胞中高表达,脱离细胞周期后迅速降解,这使Ki-67蛋白成为目前监测细胞增殖活性最可靠的指标之一,可用来识别生长中的正常和肿瘤细胞,评估细胞的增生程度。Ki-67蛋白可以作为一种细胞增殖过程中的标记物且用于辅助宫颈上皮内瘤变(CIN)分级诊断,病变程度越高表达量越大。目前认为Ki-67蛋白高表达是宫颈正常组织-上皮内瘤变-癌发生过程中的早期事件,因此可用于宫颈癌早期癌前诊断。

[0028] 本发明试剂盒取样为宫颈液基细胞学剩余样本,对宫颈癌前病变中常用的两种肿瘤标志物P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白进行检测,采用免疫细胞化学原理,运用“一抗+酶标二抗+显色底物”的方式进行免疫显色来判断结果,在两种不同的酶底物显色系统下分别显色,其中P16^{INK4a}蛋白在“鼠抗人P16^{INK4a}一抗+HRP标记的羊抗鼠二抗+DAB显色液”下显色为褐色,显色部位为宫颈病变细胞的胞浆和/或胞核;Ki-67蛋白在“兔抗人Ki-67一抗+AP标记的羊抗兔二抗+AP-Red显色液”下显色为红色,显色部位为宫颈病变细胞的胞核。

[0029] 本发明的有益效果在于:本试剂盒主要运用于细胞学筛查诊断为意义不明的非典型鳞状细胞(atypical squamous cell of undetermined significance,ASCUS)或低

度鳞状上皮内病变(low-grade squamous intraepithelial lesion,LSIL)的患者,或在高危型HPV检查结果为阳性时,则可用该试剂盒进行检测,结果为双色阳性才能判断为阳性,单色阳性或者双阴结果则为阴性,通过双染鉴定结果更准确可靠,可以大大的减少阴道镜转诊率,减轻医生和病人的负担。该双染试剂盒运用了混合的免疫标记物P16^{INK4a}抗体和Ki-67抗体,对宫颈鳞状上皮病变检测,由于两种抗体的运用,提高了检测的灵敏度和特异性,增加了细胞学的信息量,免疫显色的强烈颜色对比结果也简化了阅片医生的工作量。本发明双染试剂盒针对宫颈鳞状上皮脱落细胞,检测两种不同抗原的表达情况,P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白分别表达于宫颈癌前病变细胞不同部位,P16^{INK4a}蛋白主要表达于胞浆或/和胞核,Ki-67蛋白位于胞核表达,且均随着病变程度加深而表达量增加,两种抗体的联合使用可以使癌前病变诊断更加明确。

[0030] 进一步地,所述试剂A液与试剂B液均为即用型。

[0031] 优选地,所述过氧化氢溶液浓度为3~5%。

[0032] 本发明还包括上述双染试剂盒应用于宫颈癌辅助分级诊断鉴定研究,具体操作流程包括以下步骤:

[0033] S10预处理:取样本进行制片和固定后,再进行抗原修复后,先用试剂C液进行封闭处理;

[0034] S20双染:滴加试剂A液孵育30~60分钟,用PBST洗涤液漂洗后滴加试剂B液孵育10~30分钟,再次用PBST洗涤液漂洗;

[0035] 然后滴加二氨基联苯胺显色液反应3~5分钟,自来水冲洗后用PBST洗涤液漂洗;再滴加AP-Red显色15-30分钟,自来水冲洗终止反应;

[0036] 其中,所述二氨基联苯胺显色液为试剂D液和试剂E液的混合溶液,所述AP-Red显色液为试剂F液和试剂G液的混合溶液;

[0037] S30复染:苏木素染色液复染10~60秒、自来水冲洗5~10分钟、磷酸缓冲液(phosphate buffer saline,PBS或PBS缓冲液)中返蓝8~15分钟后,返蓝时间优选为10分钟,水性封片剂封片。

[0038] 本发明的有益效果在于:本发明样本可直接采用宫颈液基细胞学剩余样本,可跟细胞学联合检测取材,不需要另外取样,减轻病人的负担。利用免疫细胞化学标记物作为混合抗体,不仅使得操作流程简便,而且还使得检测结果更精确,观察结果客观性更强,可有效减轻阅片医生负担。

[0039] S30复染:苏木素染色液复染

[0040] 进一步地,所述步骤S30中还包括将载玻片放入二甲苯中孵育1-20分钟,然后使用中性树脂封片后加盖盖玻片。

[0041] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:将所述载玻片放入二甲苯中孵育,以便于长期保存。

[0042] 优选地,所述步骤S20中,试剂A液和B液的孵育温度为36.5~37.5℃,更优选为37℃。

[0043] 进一步地,上述方法还包括以下步骤:S40结果判读:将上述操作处理完后的样本放在光学显微镜下观察,当至少一个细胞同时出现棕色细胞浆免疫染色和红色细胞核免疫染色,则确认为阳性;否则为阴性。

[0044] 其中,玻片制片质量应符合“2014年Bethesda宫颈细胞学报告系统”制片要求。

[0045] 进一步地,所述PBST洗涤液由NaCl、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、KCl、吐温-20和水组成。

[0046] 进一步地,所述步骤S10中制片和固定操作如下:取液基细胞学剩余标本,制片;将玻片放入95~99%乙醇固定10~30分钟,室温晾干。

[0047] 进一步地,所述步骤S10中抗原修复操作如下:将玻片放入pH值为7.5~8.0的EDTA抗原修复液中进行高压抗原修复1~3分钟,冷却至室温,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。

[0048] 进一步地,所述步骤S10中封闭操作如下:用试剂C液室温孵育10~15分钟后,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。

[0049] 进一步地,所述二氨基联苯胺显色液采用以下配方配制:试剂D液和试剂E液体积比为1:15~30,优选为1:20。

[0050] 进一步地,所述AP-Red显色液采用以下配方配制:试剂F液:试剂G液=1:70~80,优选为1:75。

[0051] 进一步地,所述二氨基联苯胺显色液和AP-Red显色液均为即配即用,且所述二氨基联苯胺显色液配好后需避光保存,并在6个小时内使用。

[0052] 本发明实施例一为:一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒,试剂盒的作用原理如图1所示,由小鼠抗人P16^{INK4A}抗体2与兔抗人Ki-67抗体6组成的混合一抗分别和由HRP 4标记的羊抗小鼠抗体3与AP 8标记的羊抗兔抗体7组成的混合二抗与细胞中的P16^{INK4A}抗原1和Ki-67抗原5作用显色,从而实现P16^{INK4A}抗原和Ki-67抗原的检测鉴别。该试剂盒用于定性检测宫颈细胞学制片中的P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白,帮助识别存在高度宫颈上皮内病变的女性,主要用于体外诊断(in vitro diagnosis, IVD)。检测结果的解释只可由有资质的专业人员结合患者的临床病史以及已完成的其他诊断学检测做出。

[0053] 所述试剂盒,包括试剂A液:P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗,3ml;试剂B液:AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗,3ml;试剂C液:过氧化氢封闭液,5ml;试剂D液:二氨基联苯胺,0.25ml;试剂E液:使试剂D液显色的缓冲液,5ml;试剂F液:核固红色原,0.07ml;试剂G液:使试剂F液显色的缓冲液,5ml。

[0054] 本发明试剂盒产品开封前、开封后均置于2~8℃保存,有效期为12个月,25℃以下可运输7天。

[0055] 本试剂盒测试过程中采用宫颈脱落细胞样本,为了避免一些干扰性成分,例如血液和粘液,临床医师应当遵循推荐的采样技术。测试样本最多可在2~8℃下储存1个月,样本若需运输时需用泡沫箱加冰袋密封,在途时限可运输72小时。

[0056] 本试剂盒在测试中还需用到以下辅助试剂:

[0057] (1) 苏木素染色液;

[0058] (2) 乙醇(99%);

[0059] (3) 磷酸缓冲盐吐温溶液(PBST缓冲液):称取8.00g氯化钠、0.20g氯化钾、2.16g七水合磷酸氢二钠、0.2g磷酸二氢钾,加纯水800mL溶解,用1M盐酸和1M氢氧化钠调节pH值至7.3~7.4,定容至1000mL,加入0.5mL Tween-20,常温保存;

[0060] (4) Tris-EDTA抗原修复液(pH值为8.0):称取1.21g三羟甲基氨基甲烷、0.29g乙二胺四乙酸,加纯水800mL溶解,用1M盐酸和1M氢氧化钠调节pH值至8.0,定容至1000mL,常温

保存;

[0061] (5) 磷酸缓冲盐溶液 (PBS缓冲液): 称取8.00g氯化钠、0.20g氯化钾、2.16g七水合磷酸氢二钠、0.2g磷酸二氢钾, 加纯水800mL溶解, 用1M盐酸和1M氢氧化钠调节pH值至7.3~7.4, 定容至1000mL, 常温保存;

[0062] (6) 水性封片剂、中性树脂。

[0063] 本试剂盒检测过程中具体步骤如下:

[0064] 1. 标本制备

[0065] 1.1. 玻片制备, 本试剂盒适用下列玻片制备方法。

[0066] (1) 液基细胞学制片;

[0067] (2) 手动制备载玻片 (常规巴氏涂片)。

[0068] 2. 染色过程

[0069] 2.1. 将载玻片放入99%乙醇中, 固定10分钟, 室温晾干;

[0070] 2.2. 将载玻片EDTA (pH值为7.8-8.4) 抗原修复液中高压1-3分钟进行抗原修复, 自然冷却至室温, PBST漂洗3min×3次;

[0071] 2.3. 滴加试剂C液两滴 (约100μL), 室温孵育10min;

[0072] 2.4. 将载玻片放入PBST缓冲液中漂洗, 3min×3次;

[0073] 2.5. 滴加试剂A液一滴 (约50μL), 37℃孵育30min;

[0074] 2.6. 将载玻片放入PBST缓冲液中漂洗, 3min×3次;

[0075] 2.7. 滴加试剂B液一滴 (约50μL), 37℃孵育10-15min;

[0076] 2.8. 将载玻片放入PBST缓冲液中漂洗, 3min×3次;

[0077] 2.9. 滴加配制好的DAB显色液 (配方: 试剂D: 试剂E=1:20, 即配即用, 配好后避光保存, 6小时内使用), 室温显色3min, 流水充分冲洗, PBST漂洗3min;

[0078] 2.10. 滴加配制好的Fast Red显色液 (配方: 试剂F: 试剂G=1:75, 即配即用), 室温显色15-30min, 流水充分冲洗;

[0079] 2.11. 将载玻片放入苏木素染色液中复染10s~1min, 返蓝 (PBS缓冲液中漂洗10min);

[0080] 2.12. 在玻片中央滴1-2滴水性封片剂, 光学显微镜下评估结果; 如果标本需长期保存, 则将载玻片放入二甲苯中孵育1-20分钟, 然后使用中性树脂封片后加盖盖玻片。

[0081] 本试剂盒只对检测对象进行定性分析, 以检测信号颜色和有无进行判断, 信号的强弱不能提供定量方面的参考。

[0082] 正常细胞核显蓝色, 胞浆不显色。

[0083] 如果一个或多个宫颈上皮细胞 (细胞浆和/或细胞核) 存在特异性棕色细胞免疫染色且细胞核存在特异性红色细胞免疫染色, 可视为细胞学检测结果阳性。

[0084] 如果既没有宫颈上皮细胞出现特异性棕色也没有红色细胞免疫染色, 或者只有一种特异性染色, 可视为细胞学检测结果阴性。

[0085] 本试剂盒用于子宫颈细胞学结果为ASCUS (意义不明的非典型鳞状细胞) 或LSIL (低度鳞状上皮内病变) 的患者、或在高风险HPV检测结果为阳性患者, 辅助识别存在高度宫颈上皮内病变的女性, 可用于检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

[0086] 本试剂盒在检测过程中还存在以下注意事项：

[0087] 1. 仅用于体外诊断 (IVD)；

[0088] 2. 仅供专业人士使用；

[0089] 3. 禁忌新、旧染液混合使用,或与其他厂家生产的类似试剂混合使用；

[0090] 4. 可能对试剂结果产生影响的因素有：(1) 未按照储存条件保存导致试剂变质；(2) 染色步骤错误；(3) 苏木素分化或返蓝时间过长或过短；(4) 宫颈细胞取样不满意。

[0091] 5. 本产品含有化学试剂,操作时应避免染色液触及手、脸、皮肤、眼睛瞪暴露部位,如不慎触及,请及时用大量清水冲洗,严重者请送医疗机构救治。

[0092] 6. 实验使用后的容器、包装、标本物,应按医疗废物管理。

[0093] 本发明实施例二为：一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其在在宫颈癌辅助分级诊断中的应用,试剂盒的作用原理如图1所示,由小鼠抗人P16^{INK4A}抗体2与兔抗人Ki-67抗体6组成的混合一抗分别和由HRP 4标记的羊抗小鼠抗体3与AP 8标记的羊抗兔抗体7组成的混合二抗与细胞中的P16^{INK4A}抗原1和Ki-67抗原5作用显色,从而实现对P16^{INK4A}抗原和Ki-67抗原的检测鉴别。所述试剂盒,包括试剂A液：P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗；试剂B液：AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗；试剂C液：质量百分浓度为3-5%的过氧化氢溶液作为封闭液；试剂D液：二氨基联苯胺；试剂E液：使试剂D液显色的缓冲液；试剂F液：核固红色原；试剂G液：使试剂F液显色的缓冲液。

[0094] 将上述试剂盒在宫颈癌辅助分级诊断中的应用,包括以下步骤：

[0095] S10预处理：取样本进行制片和固定后,再进行抗原修复后,先用试剂C液进行封闭处理；

[0096] S20双染：滴加试剂A液孵育30~60分钟,用PBST洗涤液漂洗后滴加试剂B液孵育10~30分钟,再次用PBST洗涤液漂洗；然后滴加二氨基联苯胺显色液反应3~5分钟,自来水冲洗后用PBST洗涤液漂洗；再滴加AP-Red显色15-30分钟,自来水冲洗终止反应；其中,所述二氨基联苯胺显色液为试剂D液和试剂E液的混合溶液,所述AP-Red显色液为试剂F液和试剂G液的混合溶液；

[0097] S30复染：苏木素染色液复染10~60秒、自来水冲洗5~10分钟后,磷酸缓冲液(phosphate buffer saline,PBS或PBS缓冲液)中返蓝10分钟,水性封片剂封片；

[0098] S40结果判读：将上述操作处理完后的样本放在光学显微镜下观察,如果一个或多个宫颈上皮细胞同时出现棕色细胞浆免疫染色和红色细胞核免疫染色,该细胞学结果便可认为阳性；否则为阴性。

[0099] 本发明实施例三为：一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其在在宫颈癌辅助分级诊断中的应用,试剂盒的作用原理如图1所示,由小鼠抗人P16^{INK4A}抗体2与兔抗人Ki-67抗体6组成的混合一抗分别和由HRP 4标记的羊抗小鼠抗体3与AP 8标记的羊抗兔抗体7组成的混合二抗与细胞中的P16^{INK4A}抗原1和Ki-67抗原5作用显色,从而实现对P16^{INK4A}抗原和Ki-67抗原的检测鉴别。所述羊抗小鼠抗体即羊抗小鼠二抗,所述羊抗兔抗体即羊抗兔二抗。所述试剂盒,包括试剂A液：P16^{INK4a}抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗；试剂B液：AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗；试剂C液：质量百分浓度为5%过氧化氢溶液作为封闭液；试剂D液：二氨基联苯胺；试剂E液：使试剂D液显色的缓冲液；试剂F液：核固红色原；试剂G液：使试剂F液显色的缓冲液。

[0100] 将上述试剂盒应用于在宫颈癌辅助分级诊断研究,包括以下步骤:

[0101] S10预处理:取液基细胞学剩余标本,进行玻片制片,其中,玻片制片质量应符合“2014年Bethesda宫颈细胞学报告系统”制片要求。将玻片放入95~99%乙醇固定10~30分钟,室温晾干,再进行抗原修复后,所述抗原修复为将玻片放入pH值为7.5~8.0的EDTA抗原修复液中进行高压抗原修复1~3分钟,冷却至室温,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。用试剂C液进行封闭处理,所述封闭用操作为试剂C液室温孵育10~15分钟后,用PBST洗涤液至少漂洗3次、3分钟/次。

[0102] S20双染:滴加试剂A液37℃下孵育30~60分钟,用PBST洗涤液漂洗后滴加试剂B液37℃下孵育10~30分钟,再次用PBST洗涤液漂洗;然后滴加二氨基联苯胺显色液反应3~5分钟,自来水冲洗后用PBST洗涤液漂洗;再滴加AP-Red显色15~30分钟,自来水冲洗终止反应;其中,所述二氨基联苯胺显色液为将试剂D液和试剂E液按1:20的体积比进行混合制得,所述AP-Red显色液为将试剂F液和试剂G液的混合溶液按1:75的体积比混合制得。所述二氨基联苯胺显色液和AP-Red显色液均为即配即用,且所述二氨基联苯胺显色液配好后需避光保存,并在6个小时内使用。

[0103] S30复染:苏木素染色液复染10~60秒、自来水冲洗5~10分钟后磷酸缓冲液(phosphate buffer saline,PBS或PBS缓冲液)中返蓝8~15分钟,返蓝时间优选为10分钟,水性封片剂封片。

[0104] S40结果判读:将上述操作处理完后的样本放在光学显微镜下观察,当同一个细胞内胞核显红色且胞浆呈褐色、同一个细胞内胞核显红色和褐色且胞浆呈褐色或者当同一个细胞内胞核显红色和褐色且浆时,即为阳性;否则为阴性。

[0105] 综上所述,本发明在于辅助宫颈癌分级诊断,该发明可有效降低高级别宫颈病变的漏诊率,同时也改善前期宫颈疾病检测和早期干预,减少和避免了不必要的阴道镜检查,该发明适用于子宫颈细胞学结果为ASCUS(意义不明的非典型鳞状细胞)或LSIL(低度鳞状上皮内病变)的患者、或在高风险HPV检测结果为阳性患者,帮助识别是否存在高度宫颈上皮内病变的女性。本产品是一种免疫细胞化学法,可检测宫颈脱落细胞样本中的P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白。采用即用型单克隆一抗混合试剂(针对人P16^{INK4a}蛋白的鼠单克隆抗体和针对人的Ki-67蛋白的兔单克隆抗体)检测P16^{INK4a}蛋白和Ki-67蛋白,经过细胞固定、抑制内源性过氧化物酶活性并与一抗孵育后,采用即用型辣根或氧化物酶(HRP)标记的羊抗鼠二抗和碱性磷酸酶(AP)标记的羊抗兔二抗检测系统,而后显色反应基于HRP介导的3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和AP介导Fast Red的转化,从而在P16^{INK4a}抗原位点上产生棕色沉淀,在Ki-67抗原位点上产生红色沉淀。经过苏木素染色液复染和返蓝反应后,常规脱水封固,光学显微镜下评估染色结果。

[0106] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等同变换,或直接或间接运用在相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

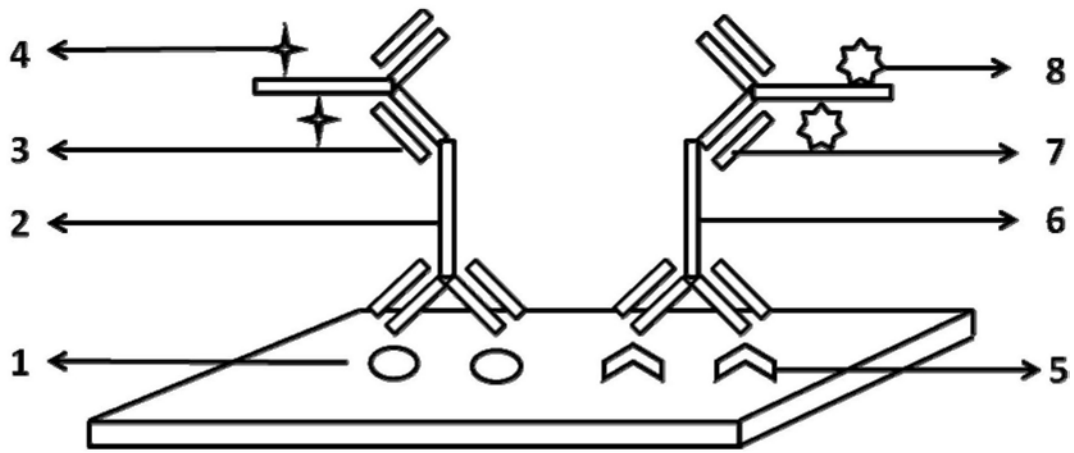


图1

专利名称(译)	一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN107677827A	公开(公告)日	2018-02-09
申请号	CN2017110930734.3	申请日	2017-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
[标]发明人	吴莹莹 肖淑英 黄慧玲 李印淑 何伟		
发明人	吴莹莹 肖淑英 黄慧玲 李印淑 何伟		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/574 G01N33/531 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/535 G01N33/57442		
代理人(译)	张明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种宫颈癌辅助分级诊断的双染试剂盒及其应用，包括试剂A液：P16INK4a抗体与Ki-67抗体组合成的混合一抗；试剂B液：AP标记的羊抗兔二抗与HRP标记的羊抗鼠二抗组合成的混合二抗；试剂C液：过氧化氢溶液；试剂D液：二氨基联苯胺；试剂E液：使试剂D液显色的缓冲液；试剂F液：核固红色原；试剂G液：使试剂F液显色的缓冲液。将上述试剂盒应用于非治疗目的的宫颈癌细胞检测中，包括以下步骤：S10预处理：取样本进行制片和固定后，再进行抗原修复后，先用试剂C液进行封闭处理；S20双染：先滴加试剂A液再滴加试剂B液进行染色鉴定和S30复染。

