



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103940997 B

(45)授权公告日 2017.01.04

(21)申请号 201410108435.8

(22)申请日 2014.03.21

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 103940997 A

(43)申请公布日 2014.07.23

(73)专利权人 上海柏慧康生物科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区张江高科技
园区郭守敬路351号2号楼A639-06室

(72)发明人 沈鹤柏 梁晓飞

(74)专利代理机构 上海泰能知识产权代理事务

所 31233

代理人 黄志达

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 202482328 U,2012.10.10,权利要求1,
说明书第3-17段,图1.

CN 102414562 A,2012.04.11,权利要求1-
56,说明书第11-15、39-58段.

CN 103501832 A,2014.01.08,全文.

CN 201819826 U,2011.05.04,全文.

CN 102527353 A,2012.07.04,全文.

审查员 周洋

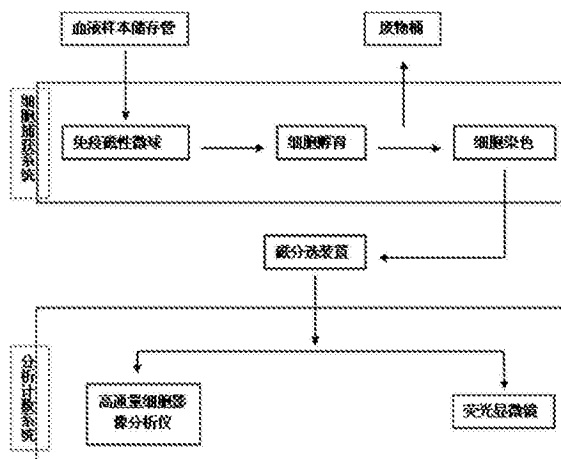
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂
盒

(57)摘要

本发明涉及一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测
系统及试剂盒,该检测系统包括乳腺癌循环肿瘤
细胞捕获系统、磁分选装置和分析计数系统;所
述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统包括功能性
富集盒、免疫磁性微球、细胞孵育装置和荧光染
色剂;所述的全自动磁分选装置用于富集肿瘤细
胞,并进行荧光染色;所述的分析计数系统包含
荧光显微镜和高通量细胞影像分析仪;该试剂
盒包括免疫磁性微球和荧光染色剂。本发明将
结合磁性细胞分选技术和免疫细胞化学技术进
行外周血循环肿瘤细胞的检测,通过分析计数
系统对肿瘤细胞进行分析、计数,可高效率地
实现对循环肿瘤细胞在分子及基因方面的分析。



1. 一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统,包括乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统和分析计数系统;所述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统用于对样本血液进行免疫磁性细胞捕获、富集和对富集的靶细胞进行荧光染色;所述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统包括功能性富集盒、免疫磁性微球、细胞孵育装置和荧光染色剂;所述的免疫磁性微球的粒径范围为0.1~10微米,所述免疫磁性微球表面活性物为抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的两种;

所述的分析计数系统包含荧光显微镜和高通量细胞影像分析仪,所述的高通量细胞影像分析仪通过连续扫描荧光显微镜下图像,自动分析产生数据;

功能性富集盒为四方结构,其体积为 $0.1\text{cm}^3\sim 1.0\text{m}^3$,其中一面使用活性物修饰,所用活性物为抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的两种。

2. 根据权利要求1所述的一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统,其特征在于:所述的循环肿瘤细胞检测系统设置有计算机接口,通过计算机对分析计数系统进行控制。

3. 一种如权利要求1或2所述的乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统,其特征在于:该检测系统中还具有乳腺癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,包括:免疫磁性微球和荧光染色剂;

所述的免疫磁性微球的表面活性物为抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的两种;所述的荧光染色剂为含有DAPI和FITC标记的CK蛋白染色剂。

一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于乳腺癌循环肿瘤细胞检测领域,特别涉及一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂盒。

背景技术

[0002] 癌症是困扰人类生活的几大疾病之一,现在平均每年癌症发病率在22%左右;然而,目前的医疗设施所检测到的癌症大多都属于中晚期,发现的比较晚而此时的癌细胞已基本扩散,药物难以治疗。战胜癌症最重要的是早发现,早期癌症大都可以治愈。最初癌肿瘤细胞的无序生长使其失去了相互黏附的能力,松散的肿瘤细胞可以进入血管和淋巴管,进入血液循环或淋巴循环,通过血液循环实现转移的细胞称之为循环肿瘤细胞(circulating tumor cells;CTCs)。肿瘤发生转移的早期,循环肿瘤细胞(CTCs)可以沿循环系统种植于远处器官,逐渐形成转移灶。但是使用现有的、常规的、经验性的诊断手段却无法“看到”这样转移过程。因此,研究发展一种新的可以检测转移肿瘤细胞的方法是非常有必要的。乳腺癌细胞存在于人的乳腺中,相对于其它体内癌细胞更容易受到外在的机械作用力从而也更容易脱落形成循环肿瘤细胞;进而用特异性免疫磁性微球去捕获早期乳腺癌循环肿瘤细胞进行早期检测相对于其它癌症的早期检测更方便、准确。

[0003] 通常检测血液中的CTCs的方法有两种,其中一种方法是采用磁性细胞分选技术,其原理是先将特异性抗体包被在有同源二抗的磁珠上制成免疫磁性微球,再与靶细胞上的抗原结合成“靶细胞-抗原抗体-磁球”复合物,该复合物具有磁响应性,在外加磁场的作用下向一定方向移动,靶细胞得到富集,采用阳性筛选和阴性筛选结合的方法分选出靶细胞。另一种方法是采用免疫细胞化学技术,其原理是利用抗原与抗体特异性结合的特点,使染色剂(荧光素、酶等)标记的抗体与特异性的肿瘤标志物(主要包括上皮细胞角蛋白CK、上皮细胞膜特异性抗原等)结合,通过酶和底物反应显色或其他显色方法来判断肿瘤细胞的存在,再由检测人员在显微镜下进行肿瘤细胞统计。

[0004] 检测血液中的CTCs可分为以下两个步骤,(1)尽可能多的从患者的外周血中捕获CTCs;(2)尽可能的动用现有的临床检测方法对捕获的肿瘤细胞进行个体化分析。由于肿瘤细胞往往处于去分化状态,循环中的肿瘤细胞常也是高度异质性的,而一些变异的肿瘤细胞往往由于捕获系统的低特异性和低效性而逃脱掉捕,从而出现漏网现象,并得到假阴性结果,导致错误的诊断。因此,CTCs检测系统存在的主要问题为如何发展一种高效并具有高特异性的循环血肿瘤细胞捕获材料及检测系统。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是提供一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂盒,本发明结合了磁性细胞分选技术和免疫细胞化学技术,更为准确的进行循环肿瘤细胞检测。

[0006] 本发明的一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统,包括:

- [0007] 乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统、磁分选装置和分析计数系统；
- [0008] 所述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统用于对样本血液进行免疫磁性细胞捕获、富集和对富集的靶细胞进行荧光染色；所述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统包括功能性富集盒、免疫磁性微球、细胞孵育装置和荧光染色剂；
- [0009] 所述的磁分选装置用于富集荧光染色后的靶细胞；
- [0010] 所述的分析计数系统包含荧光显微镜和高通量细胞影像分析仪，所述的高通量细胞影像分析仪通过连续扫描荧光显微镜下图像，自动分析产生数据。
- [0011] 所述的循环肿瘤细胞检测仪器还设置有计算机接口，通过计算机对分析计数系统进行控制。
- [0012] 所述的免疫磁性微球的粒径范围为0.1~10微米，免疫磁性微球表面活性物为单一抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的一种或两种。
- [0013] 所述的功能性富集盒为四方结构，其体积为 $0.1\text{cm}^3\sim 1.0\text{m}^3$ ，其中一面使用活性物修饰，所用活性物为抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的一种或两种，示意图见图2。
- [0014] 本发明的一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测试剂盒，包括：免疫磁性微球和荧光染色剂；所述的免疫磁性微球的表面活性物为单一抗-Epcam抗体、叶酸、抗-丙酮酸激酶抗体中的一种或两种。
- [0015] 所述的荧光染色剂为含有DAPI和FITC标记的CK蛋白染色剂。
- [0016] 所述的免疫磁性微球的粒径范围为0.1~10微米。
- [0017] 有益效果
- [0018] (1)本发明结合磁性细胞分选技术和免疫细胞化学技术进行循环肿瘤细胞的富集和检测，通过分析计数系统对肿瘤细胞进行分析、计数，并实现对循环肿瘤细胞在分子及基因方面的分析，结果可靠性高；
- [0019] (2)另一方面，利用分析计数装置进行循环肿瘤细胞检测与计数，减少人工操作时间和处理程序。
- [0020] (3)本发明的细胞抓捕系统包含的免疫磁性微球技术是以免疫学为基础，利用包被有免疫活性物质的各种微球进行免疫学或其它生物学检测的新技术；此项技术由于具有快捷、简便、分离纯度高等优点已被广泛使用到各个领域并已取得巨大进展。

附图说明

- [0021] 图1是本发明专利的工作流程示意图；
- [0022] 图2是功能性富集盒的示意图；
- [0023] 图3为空白磁球“抓捕”肿瘤细胞后进行免疫染色的荧光显微镜图片；
- [0024] 图4为载Epcam抗体的磁球“抓捕”肿瘤细胞后进行免疫染色的荧光显微镜图片。

具体实施方式

- [0025] 下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。此外应理解，在阅读了本发明讲授的内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定

的范围。

[0026] 实施例1

[0027] 本实施例列举的循环肿瘤细胞检测仪器包括细胞抓捕系统、分析计数系统和废物桶等,所述分析计数系统包括荧光显微镜和高通量细胞影像分析仪,该循环肿瘤细胞检测仪器还设置有计算机接口,通过计算机对分析计数系统进行控制。

[0028] 参考图I,该循环肿瘤细胞检测仪器的 workflow 是:所述血液样本储存管内放置有经过优化的细胞保护剂,利用血液样本储存管采集、存储血液样本;细胞捕获系统中放有由特异性抗体具有同源二抗的磁珠制成的免疫磁性微珠,血液样本储存管中的样本血液置入细胞抓捕系统的功能性富集盒中,免疫磁性微珠与样本血液中靶细胞上的抗原结合成“靶细胞-抗原抗体-磁珠”复合物,在磁场作用下该复合物富集;被富集的靶细胞用含有DAPI和FITC标记的CK蛋白染色剂进行荧光染色,进一步分选出循环肿瘤细胞;所述废物桶通过导管与细胞捕获系统相连,用于盛放血液样本处理过程中废弃的血浆;分析计数系统中的高通量细胞影像分析仪通过连续扫描荧光显微镜下图像来自动分析并获取数据。

[0029] 高通量细胞影像分析仪、荧光显微镜均为现有技术,此处不做详细描述。

[0030] 本发明的循环肿瘤细胞检测仪器,设置有细胞捕获系统和分析计数系统,细胞抓捕系统结合磁性细胞分选技术和免疫细胞化学技术进行循环肿瘤细胞检测,通过分析计数装置对肿瘤细胞进行分析、计数,实现循环肿瘤细胞的准确检测与计数,可靠性高;另一方面,利用分析计数系统进行循环肿瘤细胞分析与计数,减少人工操作时间和处理程序。

[0031] 实施例2

[0032] 细胞抓捕系统功能型富集盒使用流程

[0033] 打开功能型富集盒外包装,体积大小为 10cm^3 ,用装好进样针头的注射器吸取 7.5mL 外周血样本,用 3.8% 柠檬酸钠 $1/10$ 体积抗凝离心 10min , 3000 转;吸取中间的白细胞层,等体积的无菌双蒸水室温下静置 5min ,离心 20min ;洗掉上清溶血液体,加等量的生理盐水,离心 15min ;吸弃上清,再加等量的生理盐水,离心 15min ,保存所得细胞。用 1.0mL 注射器吸取 0.5mL 免疫磁性微球样本,加入功能型富集管中进行孵育;孵育 30min 后,将细胞染色,加入磷酸盐缓冲溶液($\text{pH}=7.4,0.1\text{mol/L}$)洗涤 $1\sim 3$ 次;洗涤后,可对免疫磁性微球抓捕到的肿瘤细胞进行免疫染色分析。

[0034] 实施例3

[0035] 肿瘤细胞进行免疫染色分析

[0036] 将空白磁球和载有Epcam抗体的免疫磁球分别“抓捕”乳腺癌肿瘤细胞进行免疫染色,在荧光显微镜下观察,如图3和图4所示:

[0037] 从图中可以看出,载有Epcam抗体的免疫磁球抓捕乳腺癌细胞的能力明显高于空白磁球。

[0038] 实施例4

[0039] 乳腺癌患者外周血白细胞的分离提纯及捕获

[0040] 人体血液由血浆、血细胞组成,血浆占全血 $50\%-60\%$ 、血细胞为 $50\%-40\%$ 。血细胞可分为红细胞、白细胞、血小板。将经过抗凝处理的全血,以每分钟 3000 转的速度离心 30 分钟使血细胞下沉压紧,可见离心管上段为淡黄色的液体,此为血浆;下段为暗红色的血细胞,绝大部分为红细胞;在血浆与红细胞之间有一薄层灰白色为白细胞和血小板。而需“捕

获”的乳腺癌循环肿瘤细胞比重与白细胞相近,经离心处理后会中间层的白细胞与血小板内。血浆、红细胞均属杂质进入废物桶去除,以便更有利于乳腺癌循环肿瘤细胞的“捕获”。

[0041] 乳腺癌循环肿瘤细胞比重与白细胞相近,经离心处理分散于中间层的白细胞与血小板内。循环肿瘤细胞脱落分散在患者外周血的数量是非常少的,在5mI血液中的数量更是少之又少。成年人白细胞的数量为 $4\sim 10\times 10^9/L$,5mI血液内大概有 $2\sim 5\times 10^7$ 的白细胞,怎样才能在这些细胞内捕获出极少数的乳腺癌循环肿瘤细胞呢?最有效的就是采用联合富集的方法,即首先用免疫磁性微球富集部分白细胞使细胞混合液进一步浓缩;然后再用免疫磁球捕获乳腺癌循环肿瘤细胞。具体步骤如下:首先,

[0042] (1)取出白细胞冻存液在37℃水浴迅速复苏,轻微振荡使其混匀。

[0043] (2)移入25mI锥形瓶内,4℃低温下滴加PBS缓冲液稀释至5mI。

[0044] (3)再加入0.2mI细胞固定液振荡混匀,孵育30min。

[0045] (4)300g离心10min弃上清。

[0046] (5)重复(4)步骤一次。

[0047] (6)对此细胞悬浮液进行细胞计数,进行三次计数取平均值。

[0048] (7)移入1.5mIEp管中,加入免疫磁性微球,白细胞总数:微球总数比为1:20。

[0049] (8)轻微振荡混匀,室温孵育1h。

[0050] (9)免疫磁性分离;将磁性标记的细胞悬浮液通过磁性分离柱3-5次,并用PBS缓冲液反复冲洗,移入1.5mIEp管中,并对其进行再一次的细胞计数。

[0051] $P=(n_1-n_2)/n_1$

[0052] 用公式计算免疫磁性微球富集白细胞的去除率,式中 n_1 表示富集前白细胞总数, n_2 表示富集后白细胞总数。

[0053] 其次,将上述实验步骤分离出的白细胞分离液内加入免疫磁性微球并轻微振荡混匀,室温孵育1h;将磁性标记的细胞悬浮液通过磁性分离柱3-5次,并用PBS缓冲液反复冲洗,移入1.5mIEp管中。

[0054] 经过上述两步,可知免疫磁球的白细胞去除率高达78%,磁珠回收率达98%,因此,特异性免疫磁球捕获血液循环肿瘤细胞技术在乳腺癌早期诊断中具有广阔的前景。

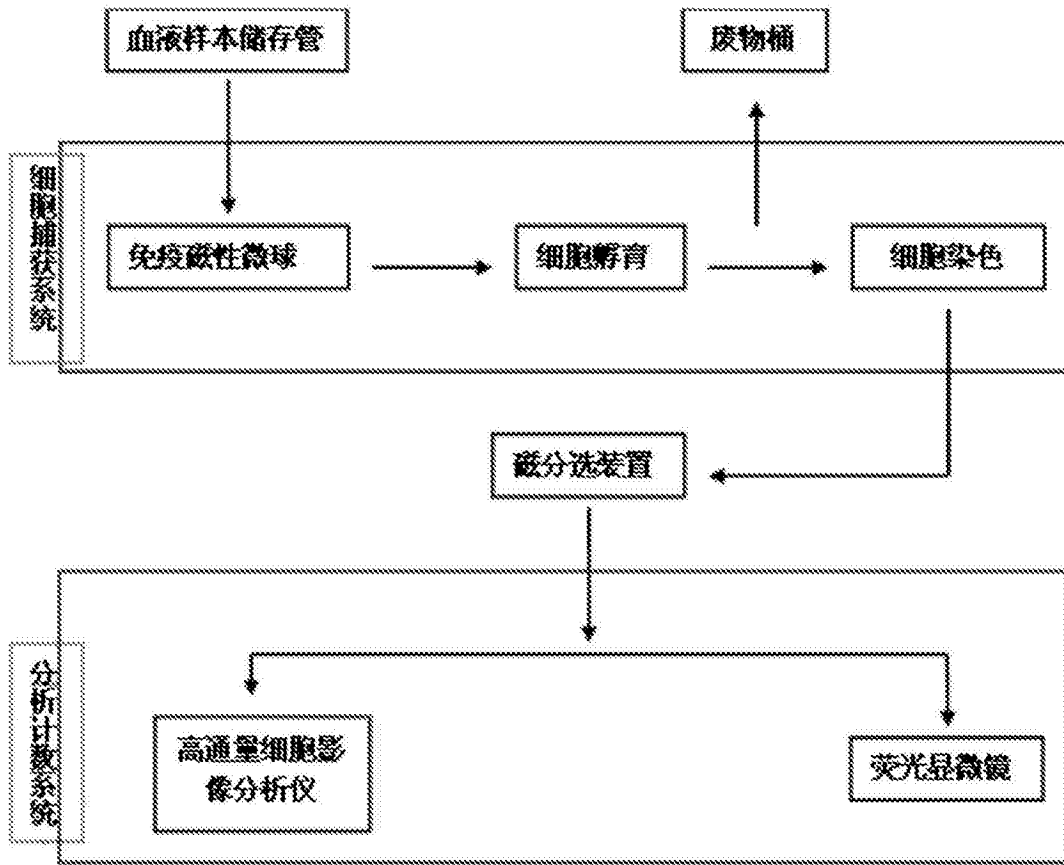


图1

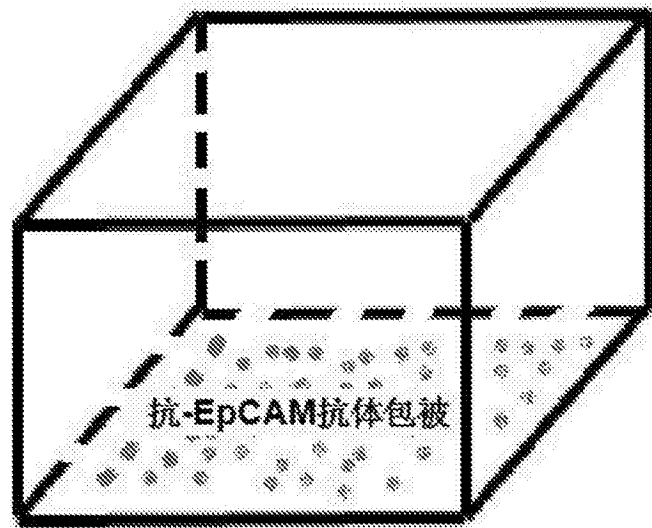


图2

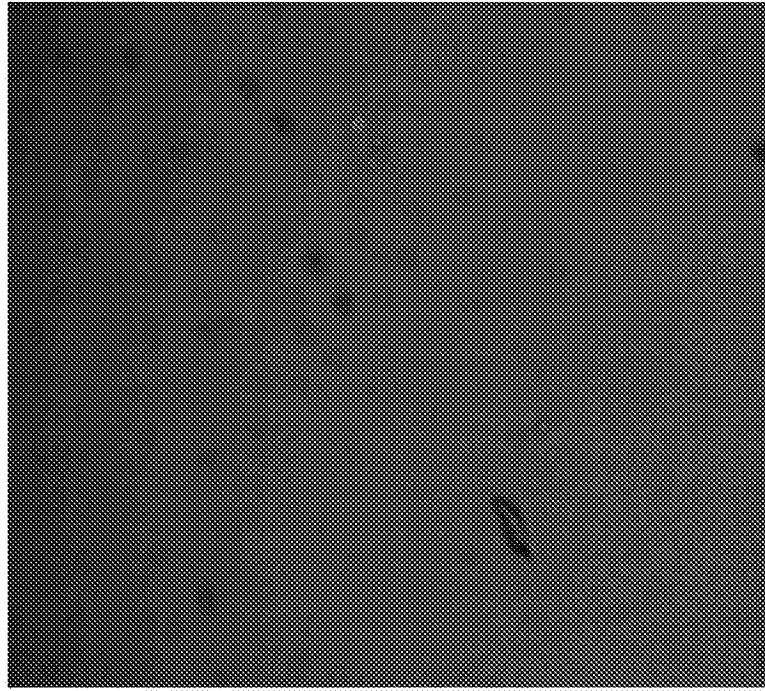


图3

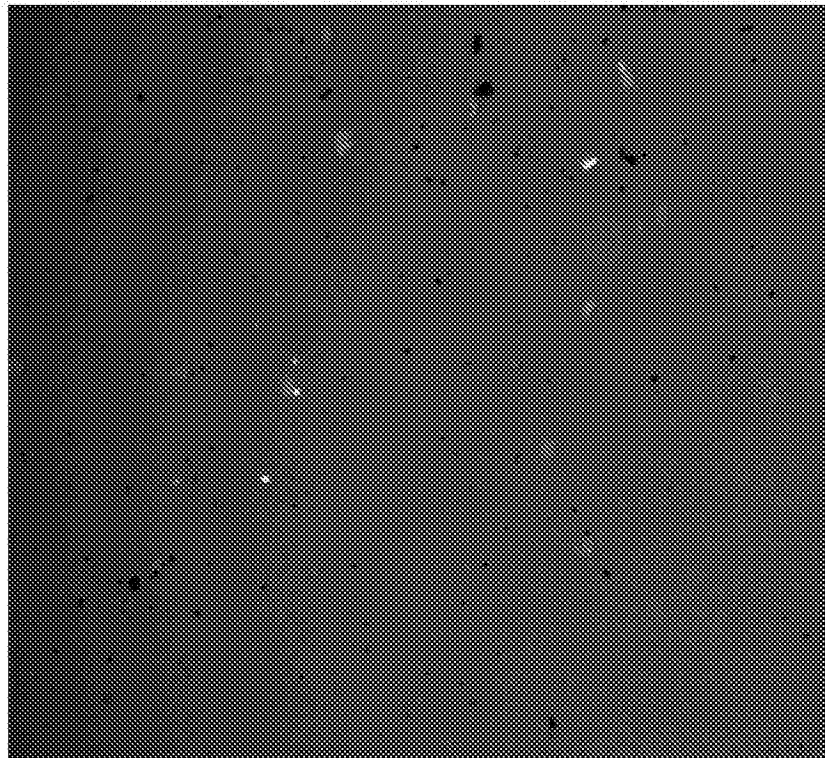


图4

专利名称(译)	一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂盒		
公开(公告)号	CN103940997B	公开(公告)日	2017-01-04
申请号	CN201410108435.8	申请日	2014-03-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海柏慧康生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海柏慧康生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海柏慧康生物科技有限公司		
[标]发明人	沈鹤柏 梁晓飞		
发明人	沈鹤柏 梁晓飞		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/5005 G01N33/57415 G01N2800/365		
代理人(译)	黄志达		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN103940997A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种乳腺癌循环肿瘤细胞检测系统及试剂盒，该检测系统包括乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统、磁分选装置和分析计数系统；所述的乳腺癌循环肿瘤细胞捕获系统包括功能性富集盒、免疫磁性微球、细胞孵育装置和荧光染色剂；所述的全自动磁分选装置用于富集肿瘤细胞，并进行荧光染色；所述的分析计数系统包含荧光显微镜和高通量细胞影像分析仪；该试剂盒包括免疫磁性微球和荧光染色剂。本发明将结合磁性细胞分选技术和免疫细胞化学技术进行外周血循环肿瘤细胞的检测，通过分析计数系统对肿瘤细胞进行分析、计数，可高效率地实现对循环肿瘤细胞在分子及基因方面的分析。

