



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109752530 A

(43)申请公布日 2019.05.14

(21)申请号 201910095241.1

(22)申请日 2019.01.31

(71)申请人 宜昌美光硅谷生命科技股份有限公司

地址 443005 湖北省宜昌市开发区发展大道大连路33号清华科技园6号楼3楼

(72)发明人 邓亚光 许新华 孙长胜 覃程陈
李宴清 邓伟平

(74)专利代理机构 北京众达德权知识产权代理有限公司 11570

代理人 刘杰

(51)Int.Cl.

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C12Q 1/6869(2018.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图5页

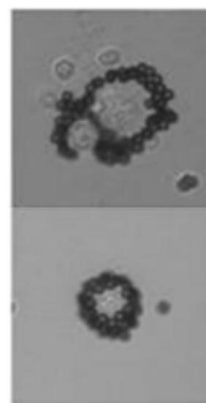
(54)发明名称

一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用,包括:S1:将血液样本离心,吸取血浆,加入细胞缓冲液,均匀混合细胞,得到血液细胞样本;S2:取肿瘤细胞识别抗体磁珠,加至血液细胞样本中,放于摇床上缓慢转动,室温孵育;S3:将孵育完成的血液细胞样本,瞬时离心后转移至细胞培养板中,将细胞培养板放入磁捕仪中,进行分离和提取活的循环肿瘤细胞;S4:将活的循环肿瘤细胞使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液,使循环肿瘤细胞在液体状态中达到标志物染色;S5:液体状态下,免疫荧光鉴定染色后的循环肿瘤细胞。本发明可以对分离提取的活的靶细胞进行细胞定性的荧光免疫鉴定后,液相下,可流动的完整的单个细胞用于后续的各种细胞分析。

明场



1. 一种液相细胞免疫鉴定方法,其特征在于:包括如下步骤:

S1:将血液样本离心,吸取血浆,加入细胞缓冲液,均匀混合细胞,得到血液细胞样本;

S2:取肿瘤细胞富集抗体磁珠,加至所述血液细胞样本中,放于摇床上缓慢转动,孵育,使抗体磁珠和靶细胞特异性结合;

S3:将所述孵育完成的所述血液细胞样本,瞬时离心后转移至细胞培养板中,将所述细胞培养板放入磁捕仪中,进行无创伤的分离和提取活的循环肿瘤细胞;

S4:将细胞培养板中提取到的循环肿瘤细胞,在液相下,使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液,使循环肿瘤细胞达到标志物染色;

S5:在荧光显微镜下液相观测免疫荧光鉴定染色后的循环肿瘤细胞,并分离提取作后续的细胞分析。

2. 根据权利要求1所述液相细胞免疫鉴定方法,其特征在于:所述步骤S1中,细胞缓冲液体积与吸取的血浆体积相同。

3. 根据权利要求1所述液相细胞免疫鉴定方法,其特征在于:所述步骤S4中,染色包括如下步骤:

(1) 从步骤S3磁捕仪中取出培养板,用细胞固定液室温固定分离提取的靶细胞;

(2) 用靶细胞标志物抗体室温孵育,标记靶细胞;

(3) 用DAPI试剂,室温孵育标记细胞核;

(4) 孵育完成后吸弃染色液,沿孔壁缓慢加入细胞缓冲液至释放槽中,恢复细胞在液相状态。

4. 根据权利要求3所述液相细胞免疫鉴定方法,其特征在于:所述步骤(2)中,所述抗体包括识别靶细胞的抗体。

5. 根据权利要求4所述液相细胞免疫鉴定方法,其特征在于:所述抗体选自识别肿瘤细胞用的角蛋白抗体,识别血细胞用的抗体CD45,以及荧光标记的二级抗体。

6. 如权利要求1-5任一项所述液相细胞免疫鉴定方法的应用,其特征在于:将所述免疫荧光鉴定后的靶细胞,分离提取获得单个或经过鉴定的纯靶细胞,直接用于后续的细胞分析包括细胞培养、单细胞或少量纯细胞的基因分析。

7. 根据权利要求6所述液相细胞免疫鉴定方法的应用,其特征在于:将所述单个或经过鉴定的纯靶细胞通过蛋白酶处理后,用于细胞培养、单细胞或少量纯细胞的基因分析。

8. 根据权利要求6所述液相细胞免疫鉴定方法的应用,其特征在于:所述基因分析包括基因扩增、分析基因表达和基因测序。

一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及分子细胞生物学领域；具体地，涉及一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用。

背景技术

[0002] 近年来，血液循环肿瘤细胞作为液体活检中重要的一部分，在不同肿瘤早筛、诊断、治疗以及疗效跟踪和监控等方面的临床效果使之成为临床研究的热点，是目前最具有发展潜力的肿瘤无创诊断和实时疗效检测的有效技术，临床应用价值极其显著。但是，作为精准医疗需要分析到基因水平，所以仅仅获得循环肿瘤细胞的计数是不够的，还需要分离提取循环肿瘤细胞并进行包括少量或单细胞的基因分析。现有的科研和临床应用，基本上对获得的循环肿瘤细胞，只能在免疫荧光鉴定或基因分析两者中取一个，或者是将细胞离心到载玻片上，干燥染色后，再从载玻片上设法收集靶细胞用以作基因分析，这样，不仅细胞变化大、收集到的细胞不完整，极大地影响到基因分析结果的可靠性，而且操作非常复杂、麻烦，不利于在科研和临床上的实际应用。细胞在液相环境中，就很容易进行全细胞或完整单细胞的操作，但市场上缺少液相鉴定循环肿瘤细胞然后用于计数以及后续的单细胞分析包括单细胞或纯的少量细胞的基因分析技术。

发明内容

[0003] 本发明的主要目的在于针对现有技术中循环肿瘤细胞的基因分析的缺陷，提供一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用，本发明可以对分离提取的活的循环肿瘤细胞进行初步的免疫鉴定后，液相下，完整的可流动的细胞用于后续的单细胞或少量的纯靶细胞的基因分析。

[0004] 为了实现上述目的，在基础的实施方案中，本发明一方面提供一种液相细胞免疫鉴定方法，包括如下步骤：

[0005] 一种液相细胞免疫鉴定方法，其特征在于：包括如下步骤：

[0006] S1：将血液样本离心，吸取血浆，加入细胞缓冲液，均匀混合细胞，得到血液细胞样本；

[0007] S2：取肿瘤细胞富集抗体磁珠，加至所述血液细胞样本中，放于摇床上缓慢转动，孵育，使抗体磁珠和靶细胞特异性结合；

[0008] S3：将所述孵育完成的所述血液细胞样本，瞬时离心后转移至细胞培养板中，将所述细胞培养板放入磁捕仪中，进行无创伤的分离和提取活的循环肿瘤细胞；

[0009] S4：将细胞培养板中提取到的循环肿瘤细胞，在液相下，使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液，使循环肿瘤细胞达到标志物染色；

[0010] S5：在荧光显微镜下液相观测免疫荧光鉴定染色后的循环肿瘤细胞，并分离提取作后续的单细胞分析。

[0011] 在一种优选的实施方案中，所述步骤S1中，细胞缓冲液体积与吸取的血浆体积相

同。

[0012] 在一种优选的实施方案中,所述步骤S4中,染色包括如下步骤:

[0013] (1) 从步骤S3磁捕仪中取出培养板,用细胞固定液室温固定分离提取的靶细胞;

[0014] (2) 用靶细胞标志物抗体室温孵育,标记靶细胞;

[0015] (3) 用DAPI试剂,室温孵育标记细胞核;

[0016] (4) 孵育完成后吸弃染色液,沿孔壁缓慢加入细胞缓冲液至释放槽中,恢复细胞在液相状态。

[0017] 在一种优选的实施方案中,所述步骤(2)中,制备荧光标记或未标记的一级抗体包括识别靶细胞的各种抗体。

[0018] 在一种优选的实施方案中,所述抗体选自识别肿瘤细胞用的角蛋白抗体,识别血细胞用的抗体CD45,以及荧光标记的二级抗体。

[0019] 本发明另一方面还提供了上述液相细胞免疫鉴定方法的应用,将所述免疫荧光鉴定后的靶细胞,分离提取获得单个或少量纯的靶细胞,直接用于单细胞或少量纯细胞的基因分析。

[0020] 在一种优选的实施方案中,将所述单个或经过鉴定的纯的靶细胞通过蛋白酶处理后,用于基因分析。

[0021] 在一种优选的实施方案中,所述基因分析包括基因扩增、分析基因表达和基因测序。

[0022] 通过上述技术方案,本发明细胞在液相中,处于流动状况下,通过磁珠和磁场作用,稳定在容器内而不容易被丢失,使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液,使细胞达到标志物染色、可在荧光显微镜下观察免疫荧光鉴定后的细胞的目的。因而,本发明可以对分离提取的活的循环肿瘤细胞进行初步的免疫鉴定后,液相下,可流动的完整的单个细胞用于后续的单细胞或纯的少量靶细胞的基因分析。与载玻片上的单个细胞基因分析相比,该发明的液相中初步鉴定的循环肿瘤细胞,可以很容易地获得完整的单个细胞,用于基因分析时,基因扩增效率高、检测稳定、灵敏度高,在临床和科研上实用性强。

附图说明

[0023] 图1A-1D为本发明实施例1磁珠标记后分离提取的乳腺癌细胞株MCF7细胞在液相下免疫鉴定示意图。

[0024] 图2A-2D为本发明实施例2磁珠标记后分离提取的乳腺癌患者血液循环肿瘤细胞在液相下免疫鉴定示意图。

[0025] 图3为单细胞多种基因表达谱。

[0026] 图4A-4C为本发明实施例4免疫鉴定后的肿瘤细胞的单细胞基因测序示意图

具体实施方式

[0027] 为了更好的理解上述技术方案,下面通过具体实施例对本申请技术方案做详细的说明,应当理解本申请实施例以及实施例中的具体特征是对本申请技术方案的详细的说明,而不是对本申请技术方案的限定,在不冲突的情况下,本申请实施例以及实施例中的技术特征可以相互结合。应当理解的是,这里所使用的术语“和/或”包括其中一个或更多所列

出的相关联项目的任意和所有组合。

[0028] 在本文中所披露的范围的端点和任何值都不限于该精确的范围或值,这些范围或值应当理解为包含接近这些范围或值的值。对于数值范围来说,各个范围的端点值之间、各个范围的端点值和单独的点值之间,以及单独的点值之间可以彼此组合而得到一个或多个新的数值范围,这些数值范围应被视为在本文中具体公开。

[0029] 为了现有技术中循环肿瘤细胞的基因分析的缺陷,本发明实施例的主要思路是:一种循环肿瘤细胞的基因分析方法,包括如下步骤:

[0030] S1:将血液样本离心,吸取血浆,加入与吸取的血浆相同体积的细胞缓冲液,均匀混合细胞,得到血液细胞样本;

[0031] S2:取EpCAM抗体磁珠,加至所述血液细胞样本中,放于3D摇床上缓慢转动,室温孵育使靶细胞识别抗体磁珠特异性地结合;

[0032] S3:将所述孵育完成的所述血液细胞样本,瞬时离心后转移至细胞培养板中,将所述细胞培养板放入磁捕仪中,进行分离和提取活的循环肿瘤细胞;

[0033] S4:将细胞培养板中提取到的活的循环肿瘤细胞使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液,使循环肿瘤细胞达到标志物染色;

[0034] S5:在荧光显微镜下免疫荧光鉴定染色后的循环肿瘤细胞。

[0035] 其中,本发明实施例采用新鲜的血液样本,通过离心处理,同一管血样的血浆部分吸取后,在低温下保存,用于循环肿瘤DNA、循环肿瘤RNA、外泌体和蛋白质的分析,细胞部分,使用宜昌美光硅谷(Advanced Gene Diagnostics Inc)生产的磁捕仪(MagCatcher)技术,分离和提取活的循环肿瘤细胞。

[0036] 本发明实施例的细胞在液相中,处于液体流动状况下,通过磁珠和磁场作用,稳定在容器内,使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液,使细胞达到标志物染色、可在荧光显微镜下免疫荧光鉴定细胞的目的。本发明实施例可对分离获得的活细胞作活细胞或半活性状况下的液相免疫荧光鉴定。鉴定后的细胞依然处于液相下,细胞彼此分离并处于流动状态,便于后续的细胞完整的分离和提取。本发明实施例操作方便,捕获到的活细胞,可直接在细胞培养皿中进行免疫荧光鉴定,不需要液体固定和离心处理,也不需要离心到载玻片上干燥染色。染色后的细胞,分离提取后,还可以低温保存,作将来基因分析等使用。

[0037] 因而,本发明实施例可将载玻片上的干燥免疫鉴定细胞,转换成液相活细胞的免疫鉴定,鉴定后的细胞可完整分离和提取,用于单细胞或少量细胞的基因分析。上述的单细胞基因分析是指,解除磁场作用后,细胞可恢复动态,容易被分离提取完整的单个细胞,获得的单个或少量细胞,可通过蛋白酶处理后,包括进行基因扩增、分析基因表达和基因测序等。本发明实施例获得活性或半活性状态细胞,直接用于基因扩增和分析时,细胞内的RNA、DNA等基因成分,容易完全均匀释放,基因分析结果稳定、可靠,特别是基因表达上,更加接近活细胞状况。单个细胞基因分析时,细胞取样完整,不会破碎,基因分析结果完善可靠。

[0038] 以下将结合具体实施例对本发明进行详细描述。实施例中所用的材料可通过市售渠道获得。

[0039] 实施例1乳腺癌肿瘤细胞株的磁珠标记和液相免疫染色鉴定

[0040] 一、乳腺癌肿瘤细胞株的磁珠标记方法

[0041] 1.将血液样本放入离心机中以1000rpm离心5min,离心结束后小心取出血样,避免

晃动。

[0042] 2.用移液枪吸弃上层清液即血浆,并加入血样相同体积的细胞漂洗液,轻轻颠倒混匀4-5次。

[0043] 3.将血样放入离心机中以1900rpm离心10min,离心结束后小心取出血样,避免晃动。

[0044] 4.用巴氏吸管吸弃上层清液。

[0045] 5.加入细胞漂洗液还原至血样原体积。

[0046] 6.取EpCAM磁珠,用20ul移液枪吹打混匀,取4ul磁珠至一EP管中并用PBS补足体积至100ul。

[0047] 7.吸取磁珠溶液至细胞悬液中,轻轻颠倒4-5次混匀,放于3D摇床上以7转/分钟的速度缓慢转动,室温孵育30min。

[0048] 二、乳腺癌免疫细胞株的液相免疫荧光染色鉴定方法

[0049] 1.免疫荧光染色

[0050] (1)从磁捕仪中取出培养板,吸取100ul 4%多聚甲醛固定液滴于释放槽中心,室温固定10min。

[0051] (2)冰上制备抗体:每孔分别取20ul Anti-cytokeratin (CAM5.2),2ul CD45 Ab-1 (Bra55/2),0.25ul Alexa **Fluor**[®] 568goat anti-mouse IgG1和0.25ul Alexa **Fluor**[®] 488anti-mouse IgG2a加入1.5mL EP管中,并用1xPBS补充体积至100ul。

[0052] (3)吸弃固定液,滴加100ul抗体至释放槽中心位置,室温孵育30min。

[0053] (4)滴加100ul DAPI至释放槽中心位置,室温孵育5min。

[0054] (5)孵育完成后吸弃染色液,沿孔壁缓慢加入1ml PBS至释放槽中。

[0055] 图1A-1D为本发明实施例1磁珠标记后分离提取的乳腺癌细胞株MCF7细胞在液相下免疫鉴定图片。图中,一种明场光下的细胞图片以及相同细胞在三种荧光下(DAPI染色细胞核,蓝色;CK染色角蛋白,绿色;CD45识别血细胞,红色)的图片。肿瘤细胞在明场光下,可见有识别肿瘤细胞的抗体磁珠结合在细胞周围,在DAPI荧光下,可见细胞核,角蛋白染色阳性,CD45阴性。

[0056] 实施例2癌症病人血液中循环肿瘤细胞的液相免疫荧光鉴定

[0057] 一、癌症病人血液中循环肿瘤细胞的液相免疫荧光鉴定方法

[0058] 1.免疫荧光染色

[0059] (1)从磁捕仪中取出培养板,吸取100ul 4%多聚甲醛固定液滴于释放槽中心,室温固定10min。

[0060] (2)冰上制备抗体:每孔分别取20ul Anti-cytokeratin (CAM5.2),2ul CD45 Ab-1 (Bra55/2),0.25ul Alexa **Fluor**[®] 568goat anti-mouse IgG1和0.25ul Alexa **Fluor**[®] 488anti-mouse IgG2a加入1.5mL EP管中,并用1xPBS补充体积至100ul。

[0061] (3)吸弃固定液,滴加100ul抗体至释放槽中心位置,室温孵育30min。

[0062] (4)滴加100ul DAPI至释放槽中心位置,室温孵育5min。

[0063] (5)孵育完成后吸弃染色液,沿孔壁缓慢加入1ml PBS至释放槽中。

[0064] 图2A-2D为本发明实施例2磁珠标记后分离提取的乳腺癌患者血液循环肿瘤细胞在液相下免疫荧光染色鉴定图片。以下为实际应用案例:

[0065] 一位左侧乳腺癌患者,综合治疗后,现考虑右侧锁骨上淋巴结转移后行TP方案化疗1周期。4ml外周血中检测到16个CTCs。免疫荧光染色鉴定,明场下见细胞表面特异性粘附磁珠,具有蓝色荧光和绿色荧光,无红色荧光,表明该细胞被磁珠特异性标记,有细胞核和肿瘤细胞标志物,无白细胞标志物表达。图中,一种明场光下的细胞图片以及相同细胞在三种荧光下(DAPI染色细胞核,蓝色;CK染色角蛋白,绿色;CD45识别血细胞,红色)的图片。肿瘤细胞在明场光下,可见有识别肿瘤细胞的抗体磁珠结合在细胞周围,在DAPI荧光下,可见细胞核,角蛋白染色阳性,CD45阴性。

[0066] 实施例3乳腺癌肿瘤细胞株的液相免疫染色鉴定后的单细胞基因表型分析

[0067] 一、单细胞基因表型分析方法

[0068] 1. 预扩增

(1)	2*细胞直接反应混合液	5ul
	反应结合混合物	2.5ul
[0069]	含目的细胞的 PBS	1ul
	TE (pH8.0)	0.5ul
	RT-Taq 酶	1ul
[0070]	合计	10ul

[0071] 反应条件:50°C15min→(95°C15sec,60°C4min)*18个循环→cDNA产物5倍稀释。

[0072] 2. 微流控动态阵列

[0073] (1) 芯片用IFC控制器的润滑剂填充;

[0074] (2) 样品混合液混合好后加入样品入口

[0075] 2*TaqManMaster Mix 2.5ul

[0076] DA sample loading reagent 0.25ul

[0077] 预扩增cDNA 2.25ul

[0078] 合计5ul

[0079] (3) 反应混合液混合好后加入分析入口

[0080] 20*TaqMan gene expression assay mix 2.5ul

[0081] DA Assay loading reagent 2.5ul

[0082] 合计 5ul

[0083] (4) 装载芯片且混入IFC控制器;

[0084] (5) 芯片的qRT-PCR反应

[0085] (95°C10min)*40个循环→95°C15sec→60°C1min。

[0086] 3. 数据分析

[0087] (1) CT值<0.65或CT≥35被认为是缺失或者测量不到;

[0088] 没有分布到每一个芯片上的基因引物所对应的基因排除;至少一个芯片上产生假阳性产物的基因排除。

[0089] 图3为本发明实施例3不同乳腺癌细胞系的单细胞高维分析示意图。显示,对单个

细胞成功作多种基因的表达分析。结果分析如下：

[0090] (1) 7个单细胞,包括3种来自原发肿瘤的细胞系(粉红色:CCd1054,橙色:CCd1672,金色CCd1675)和4种来自转移渗出的肿瘤细胞系(红色:MDA-231,紫红色:SKBR3,深绿色:MCF7,亮绿色:T47D)。

[0091] (2) 结果显示为7个单细胞的87个基因的基因表达水平。

[0092] (3) 图中黄色表示基因高表达,灰色表示基因中度表达;蓝色表示基因低表达;黑色表示检测不到基因表达。所有的细胞与预期的表达形式相符合。乳腺癌细胞系MDA-231和SKBR3显示低分化和更多的间叶细胞样或干细胞的ER(-)特征;CCd1054,CCd1672,CCd1675,MCF7和T47D细胞显示高分化的ER(+)特征。

[0093] 实施例4乳腺癌肿瘤细胞株的液相免疫染色鉴定后的单细胞基因型分析

[0094] 一、单细胞基因型分析方法—突变分析

[0095] 1. 材料:单个细胞,来自17个乳腺癌患者的30个单个肿瘤细胞及MCF7细胞(包含PIK3CA的9号外显子G1633A突变),BT474细胞(PIK3CA的9号外显子和20号外显子为野生型),15个单个白细胞。

[0096] 2. 单个肿瘤细胞溶解

[0097] (1) 1*GeneAmpPCR buffer II 10ul:将蛋白酶K以1:10稀释

[0098] MgCl₂ 1ul

[0099] 10xPCR buffer 1ul

[0100] ProteinaseK 1ul

[0101] ddH₂O 7ul

[0102] 合计10ul

[0103] (2) 单个细胞(含1ul PBS缓冲液) 1ul的PCR管加入4ul的1*bufferII,反应条件65℃20min。

[0104] 3. 预扩增:扩增单个细胞的PIK3CA的9号外显子和20号外显子

[0105] (1) 反应混合液:

	DNA	2ul
[0106]	引物 F	1.25ul
	引物 R	1.25ul
	PCR buffer	2.5ul
	MgCl ₂	2.5ul
	dNTP Mix	0.5ul
[0107]	DNA polymerase	0.5ul
	ddH ₂ O	14.50ul
	合计	25ul

[0108] (2) 引物:PIK3CA exon9forward primer:CTGTGAATCCAGAGGGGA,reverse primer:

CAG

[0109] AGAATCTCCATTTTAGCAC;

[0110] PIK3CA exon 20 forward primer:GGAATGCCAGAACTACAATCTTTTG, reverse primer:

[0111] CCTATGCAATCGGTCTTTGC.

[0112] (3) 反应条件: (94°C30sec, 55°C30sec, 72°C30sec)*30个循环

[0113] 4. 再次扩增

[0114] 预扩增产物用双蒸水1:10稀释, 取4ul稀释后的预扩增产物进行PCR反应;

DNA 5ul

引物 F 1.25ul

引物 R 1.25ul

PCR buffer 2.5ul

[0115] MgCl₂ 2.5ul

dNTP Mix 0.5ul

DNA polymerase 0.5ul

ddH₂O₂ 11.50ul

合计 25ul

[0116] 5. 琼脂糖凝胶电泳: 2%琼脂糖凝胶电泳鉴别PCR产物; 产物进行测序。

[0117] 图4A-4C为单个细胞的PIK3CA突变检测示意图。结果分析如下:

[0118] (1) A图: 两个单个肿瘤细胞 (SC1, SC2) 的目的DNA用PCR成功进行预扩增, 包括PIK3CA exon9 (216bp) 和exon20 (269bp)

[0119] (2) B图: A图中的预扩增PCR产物进行两轮扩增分别扩增PIK3CA的9号外显子和20号外显子;

[0120] P1为第一轮扩增的PCR产物; P2为第二轮扩增的产物。

[0121] (3) C图PIK3CA上9号外显子的G1633A突变Sanger测序结果: MCF7单个细胞包含G1633A突变, BT474和单个白细胞均为野生型。

[0122] (4) C图编号12的乳腺癌患者的播散性的肿瘤细胞 (DTC) 和循环肿瘤细胞 (CTC) 检测到PIK3CA上9号外显子G1633A突变; 与MCF7一样, 其G1633A的突变与其相邻的A1634C的峰值不一致是因为22号外显子上有一个已知的假基因可能发生了共扩增现象。

[0123] (5) PIK3CA上20号外显子A3140G突变的Sanger测序结果: BT20细胞显示有突变但MCF7细胞, BT474细胞和CTCs未发现突变。

[0124] 以上详细描述了本发明的优选实施方式, 但是, 本发明并不限于此。在本发明的技术构思范围内, 可以对本发明的技术方案进行多种简单变型, 包括各个技术特征以任何其它的合适方式进行组合, 这些简单变型和组合同样应当视为本发明所公开的内容, 均属于本发明的保护范围。

明场

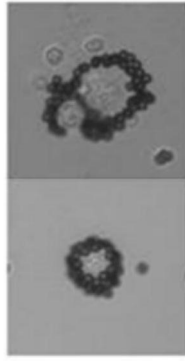


图1A

DAPI

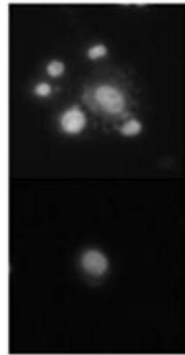


图1B

CK

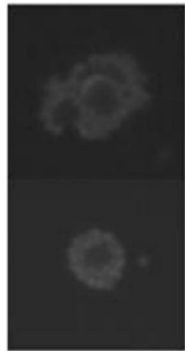


图1C

CD45

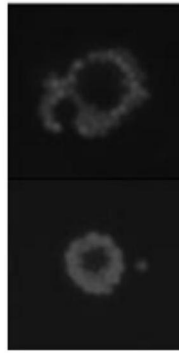


图1D

明场

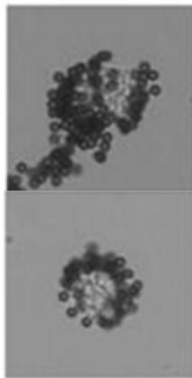


图2A

DAPI

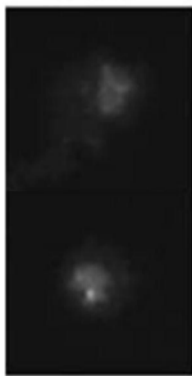


图2B

CK

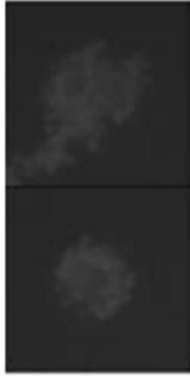


图2C

CD45

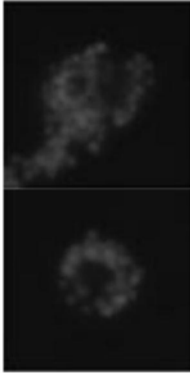


图2D

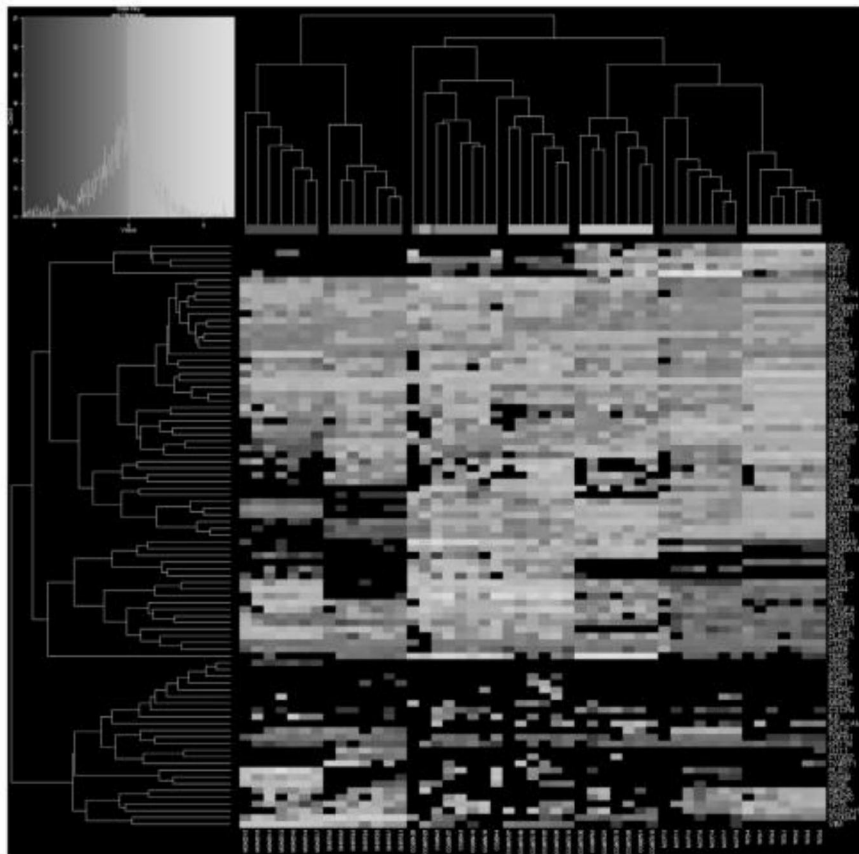


图3

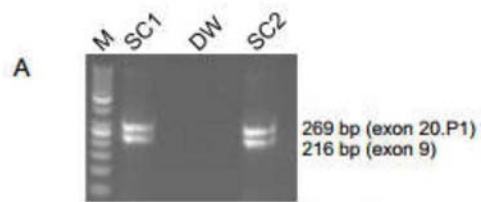


图4A



图4B

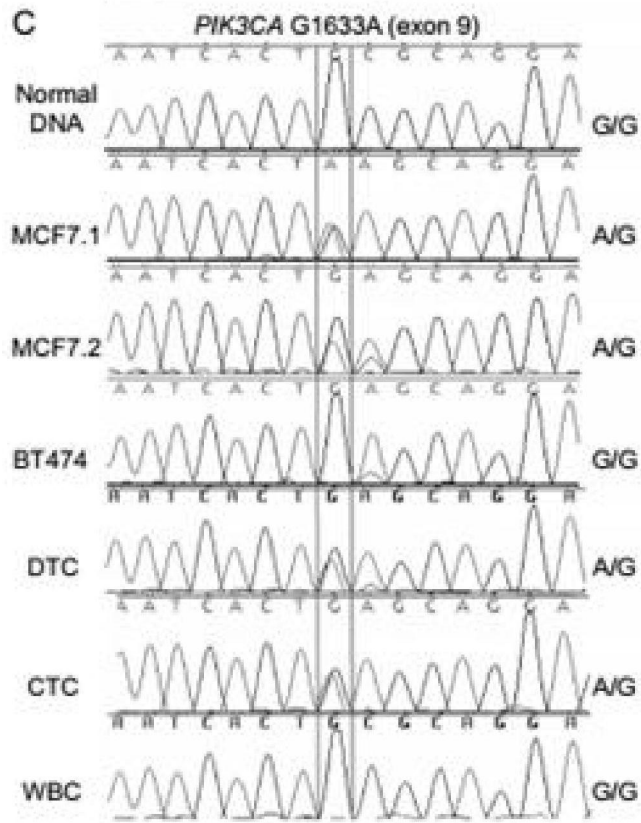


图4C

专利名称(译)	一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用		
公开(公告)号	CN109752530A	公开(公告)日	2019-05-14
申请号	CN201910095241.1	申请日	2019-01-31
[标]发明人	邓亚光 许新华 孙长胜 邓伟平		
发明人	邓亚光 许新华 孙长胜 覃程陈 李宴清 邓伟平		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/533 C12Q1/6869		
代理人(译)	刘杰		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种液相细胞免疫鉴定方法及其应用，包括：S1：将血液样本离心，吸取血浆，加入细胞缓冲液，均匀混合细胞，得到血液细胞样本；S2：取肿瘤细胞识别抗体磁珠，加至血液细胞样本中，放于摇床上缓慢转动，室温孵育；S3：将孵育完成的血液细胞样本，瞬时离心后转移至细胞培养板中，将细胞培养板放入磁捕仪中，进行分离和提取活的循环肿瘤细胞；S4：将活的循环肿瘤细胞使用荧光染色或荧光扩增染色和交换试剂液，使循环肿瘤细胞在液体状态中达到标志物染色；S5：液体状态下，免疫荧光鉴定染色后的循环肿瘤细胞。本发明可以对分离提取的活的靶细胞进行细胞定性的荧光免疫鉴定后，液相下，可流动的完整的单个细胞用于后续的各种细胞分析。

