



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645724 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201611189879.4

(22)申请日 2016.12.21

(71)申请人 上海浦美生物医药科技有限公司

地址 201203 上海市浦东新区浦东自由贸易试验区碧波路572弄116号2幢A座

(72)发明人 张群 祝琳

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限公司 31253

代理人 杨军

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法

(57)摘要

本发明属于分子生物学领域,具体地说是一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法,包括以下步骤:通过对血液进行红细胞裂解,利用纳米技术使剩余有核细胞(主要是CTC和淋巴细胞)全部平铺富集在纳米基底上固定,然后用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞,之后通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,由于CTC表面具有GPC3的特异性表达,用GPC3一抗孵育所有细胞,再用标记有FITC荧光基团的二抗孵育,最后通过高通量技术扫描;本发明同现有技术相比,检测方法简便、快速、经济,灵敏度高,特异性好,能够解决现有技术检测GPC3需要标本量大反应不彻底的不足。

1. 一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 全血处理:

- a. 向全血中加入红细胞裂解液,室温放置15min,期间均匀摇晃;
- b. 于200RCF离心5分钟,吸除上清,保留细胞;
- c. 向离心管中加入1%FPBS,混匀后于200RCF离心5分钟,去上清;

2) 细胞全富集:

- a. 加入FPBS混匀后转入处理好的培养皿中,将培养皿置于37℃摇床中培养45min;
- b. 培养后将培养皿置于4℃冰箱中,静置1min;

3) 细胞固定:

- a. 吸除FPBS,向培养皿中加入4%甲醛后置于4℃静置1min;
- b. 吸除甲醛,再加入1mL甲醇,置于-20℃20min;
- c. 再吸除甲醇,每次用2mL PBS清洗三次;

4) 封闭及抗体孵育:

a. 向培养皿中加入5%*m/V*含0.02%Tween-20的脱脂奶粉,脱脂奶粉用PBS配置,4℃避光孵育1h;

b. 吸除脱脂奶粉后,沿壁加入PBST清洗4次,每次5min;

c. 向封闭液中加入anti-CK和GPC3一抗,混合均匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育过夜;

d. 吸除混合液,向封闭液中加入GPC3二抗,混匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育1h;

e. 吸除抗体,用PBST清洗三次,加入DAPI,常温避光孵育30min;

5) 扫描:

吸除抗体,用PBST清洗三次,再加入PBS扫描。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:所述FPBS由FBS、PBS配置而成,其体积比为FBS:PBS=1:99。

3. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤4)中,PBST中含0.02%Tween-20的PBS。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤5)中,采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则GPC3+,不显绿色则GPC3-,显红色则CK+,不显红色则CK-,根据荧光显色,将DAPI+且CK+的点认为是CTC,若该CTC上存在GPC3+,那么该CTC来源于肝脏。

循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法

[技术领域]

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体地说是一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法。

[背景技术]

[0002] 循环肿瘤细胞(circulating tumor cell;CTC)是从肿瘤原发灶脱落进入外周血的肿瘤细胞,会随着血液流动选择合适的微环境,种植于远处器官,形成转移灶。目前,外周血CTC检测技术只能实现对外周血中CTC的定性且相对定量的检测,并不能追踪到血液中的CTC来源于哪一个器官,CTC是从原发灶上脱落下来的肿瘤细胞,其表面含有在原发灶上特异性表达的标志分子。如磷脂酰肌醇蛋白聚糖3(glypican-3,GPC3)是一种聚合在细胞膜表面的肝素类硫酸蛋白多糖,可通过糖基磷脂酰肌醇锚定在细胞表面,对肿瘤细胞的增殖,迁移具有调控作用。有研究表明,GPC3在原发性肝细胞肝癌HCC中具有高表达,而在癌旁组织、肝硬化、肝炎组织、成人正常肝组织低表达或不表达。因此,若能提供一种检测循环肿瘤细胞表面GPC3的方法,将具有非常重要的意义。

[发明内容]

[0003] 本发明的目的就是要解决上述的不足而提供一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法,该检测方法简便、快速、经济,灵敏度高,特异性好,能够解决现有技术检测GPC3需要标本量大反应不彻底的不足。

[0004] 为实现上述目的设计一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法,包括以下步骤:

[0005] 1)全血处理:a.向全血中加入红细胞裂解液,室温放置15min,期间均匀摇晃;b.于200RCF离心5分钟,吸除上清,保留细胞;c.向离心管中加入1%FPBS,混匀后于200RCF离心5分钟,去上清;

[0006] 2)细胞全富集:a.加入FPBS混匀后转入处理好的培养皿中,将培养皿置于37℃摇床中培养45min;b.培养后将培养皿置于4℃冰箱中,静置1min;

[0007] 3)细胞固定:a.吸除FPBS,向培养皿中加入4%甲醛后置于4℃静置1min;b.吸除甲醛,再加入1mL甲醇,置于-20℃20min;c.再吸除甲醇,每次用2mL PBS清洗三次;

[0008] 4)封闭及抗体孵育:a.向培养皿中加入5%*m/V*含0.02%Tween-20的脱脂奶粉,脱脂奶粉用PBS配置,4℃避光孵育1h;b.吸除脱脂奶粉后,沿壁加入PBST清洗4次,每次5min;c.向封闭液中加入anti-CK和GPC3一抗,混合均匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育过夜;d.吸除混合液,向封闭液中加入GPC3二抗,混匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育1h;e.吸除抗体,用PBST清洗三次,加入DAPI,常温避光孵育30min;

[0009] 5)扫描:吸除抗体,用PBST清洗三次,再加入PBS扫描。

[0010] 进一步地,所述FPBS由FBS、PBS配置而成,其体积比为FBS:PBS=1:99。

[0011] 进一步地,步骤4)中,PBST中含0.02%Tween-20的PBS。

[0012] 进一步地,步骤5)中,采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则GPC3+,不显绿色则GPC3-,显红色则CK+,不显红色则CK-,根据荧光显色,将DAPI+且CK+的点认为是CTC,若该CTC上存在GPC3+,那么该CTC来源于肝脏。

[0013] 本发明同现有技术相比,首次将CTC检测和GPC3标志物检测结合起来,通过对血液进行红细胞裂解,利用纳米技术使剩余有核细胞(主要是CTC和淋巴细胞)全部平铺富集在纳米基底上固定,然后用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞,之后通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,由于CTC表面具有GPC3的特异性表达,用GPC3一抗孵育所有细胞,再用标记有FITC荧光基团的二抗孵育,最后通过高通量技术扫描,最终实现对循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测,该检测方法简便、快速、经济,灵敏度高,特异性好,解决了现有技术检测GPC3需要标本量大反应不彻底的不足。

[具体实施方式]

[0014] 下面结合具体实施例对本发明作以下进一步说明:

[0015] 本发明提供了一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法,具体包括以下步骤:

[0016] 1)全血处理:

[0017] a.向2mL全血中加入200 μ L 1 \times 红细胞裂解液,室温放置15min,期间均匀摇晃。

[0018] b.200RCF离心5分钟,吸除上清,保留细胞。

[0019] c.向离心管中加入2mL 1%FPBS (V (FBS) : V (PBS) = 1:99),混匀后于200RCF离心5分钟,去上清。

[0020] 2)细胞全富集:

[0021] a.加入1mL FPBS混匀后转入处理好的培养皿中,将培养皿置于37 $^{\circ}$ C摇床中培养45min。

[0022] b.培养后将培养皿置于4 $^{\circ}$ C冰箱中,静置1min。

[0023] 3)细胞固定:

[0024] a.吸除FPBS,向培养皿中加入4%甲醛后置于4 $^{\circ}$ C静置1min。

[0025] b.吸除甲醛,加入1mL甲醇,置于-20 $^{\circ}$ C 20min。

[0026] c.吸除甲醇,每次用2mL PBS清洗三次。(注:每次加入液体时,沿培养皿壁加入,避免将细胞冲起。

[0027] 4)封闭及抗体孵育:

[0028] a.向培养皿中加入1mL 5% (m/V) 含0.02%Tween-20的脱脂奶粉(用PBS配置),4 $^{\circ}$ C避光孵育1h。

[0029] b.吸除脱脂奶粉后,沿壁加入2mL PBST(含0.02%Tween-20的PBS)清洗4次,每次5min。

[0030] c.向500 μ L封闭液中加入1 μ L anti-CK和2 μ L GPC3一抗(proteintech;25175-1-AP),混合均匀后沿壁加入培养皿中,4 $^{\circ}$ C避光孵育过夜。

[0031] d.吸除混合液,向500 μ L封闭液中加入5 μ L GPC3二抗(三箭生物;GR200G-02C),混

匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育1h。

[0032] e.吸除抗体,用PBST清洗三次,加入1mL细胞核染料DAPI (4,6-联咪-2-苯基吡啶),常温避光孵育30min。

[0033] 5) 扫描:吸除抗体,用2mL PBST清洗三次,加入1mL PBS扫描。

[0034] 上述步骤5)中,采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则GPC3+,不显绿色则GPC3-,显红色则CK+,不显红色则CK-,根据荧光显色,将DAPI+且CK+的“点”认为是CTC,如果该CTC上存在GPC3+,那么该CTC来源于肝脏,否则,则不是,该检测方法简便、快速、经济,灵敏度高,特异性好。

[0035] 本发明并不受上述实施方式的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法		
公开(公告)号	CN106645724A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201611189879.4	申请日	2016-12-21
[标]申请(专利权)人(译)	上海浦美生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海浦美生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海浦美生物医药科技有限公司		
[标]发明人	张群 祝琳		
发明人	张群 祝琳		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57496 G01N33/533		
代理人(译)	杨军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于分子生物学领域，具体地说是一种循环肿瘤细胞表面标志分子磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3的检测方法，包括以下步骤：通过对血液进行红细胞裂解，利用纳米技术使剩余有核细胞(主要是CTC和淋巴细胞)全部平铺富集在纳米基底上固定，然后用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞，之后通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选，由于CTC表面具有GPC3的特异性表达，用GPC3一抗孵育所有细胞，再用标记有FITC荧光基团的二抗孵育，最后通过高通量技术扫描；本发明同现有技术相比，检测方法简便、快速、经济，灵敏度高，特异性好，能够解决现有技术检测GPC3需要标本量大反应不彻底的不足。