

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/543

G01N 33/574

G01N 33/532



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410065235.5

[43] 公开日 2005 年 5 月 25 日

[11] 公开号 CN 1619310A

[22] 申请日 2004. 11. 3

[21] 申请号 200410065235.5

[71] 申请人 东南大学

地址 210096 江苏省南京市四牌楼 2 号

[72] 发明人 唐祖明 陆祖宏 杨玉志 张春秀
郁颖蕾

[74] 专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司
代理人 叶连生

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称 肿瘤免疫细胞检测芯片的制备和检测方法

[57] 摘要

肿瘤免疫细胞检测芯片的制备和检测方法，涉及一种对人体肿瘤患者外周血有核细胞进行检测的芯片和检测方法，其芯片的制备为：在载体上进行化学修饰，即修饰上氨基，醛基；然后在以上修饰有化学基因的载玻片上点上相应的抗体，如：肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等，置于潮湿环境中存放后取出载玻片，用缓冲液清洗。检测方法为：对所取已含有抗凝剂的外周血，加白细胞或者淋巴细胞分离液，除去红细胞得到血液中的有核细胞，将有核细胞悬浮在 PBS 或其他与人体等渗溶液中，然后将溶液中的悬浮细胞滴加到肿瘤免疫细胞检测芯片上，然后在显微镜或 CCD 上观察或将细胞染色观察各点结合细胞情况。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种肿瘤免疫细胞检测芯片的制备方法，其特征在于首先在载体上进行化学修饰，即修饰上氨基，醛基，以保证载体上的化学基团可与抗体发生反应而结合在载体上，并能保持结合在载体上抗体的免疫学活性；然后在以上修饰有化学基团的载玻片上点上相应的抗体，如：肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等，置于 0℃—55℃ 潮湿环境中存放 0.1—72 小时后取出载玻片，用 pH4.0—10，离子浓度 0.00—0.75m/L 的缓冲液清洗。

2、按照权利要求 1 所述的一种肿瘤免疫细胞检测芯片的制备方法，其特征在于在载体上进行化学修饰，即修饰上氨基，醛基的方法为：

a、载玻片清洗：取载玻片用水清洗干净，放入由过氧化氢和浓硫酸组成的溶液中浸泡，然后用去离子水或蒸馏水冲洗、煮沸，在氮气流下干燥，保存备用；

b、载玻片表面的氨基硅烷化：将清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷“3-aminopropyltriethoxysilane”的 95%丙酮/水的溶液 3—30 分钟，取出后，玻片用丙酮、去离子蒸馏水依次冲洗，最后烘干，保存；

c、玻片表面的醛基修饰：将硅烷化后的玻片放入含 1%—10%戊二醛的磷酸盐缓冲液中，在室温下浸泡，取出后先用 PB 溶液清洗，然后用去离子蒸馏水冲洗，用氮气吹干，保存备用；

d、玻片表面的聚赖氨酸修饰：将清洗干净的玻片放入含 2%~5%聚赖氨酸的磷酸盐氯化钠缓冲液中反应，取出后先用 PB 洗，然后用去离子蒸馏水冲洗，吹干，保存；

e、玻片表面琼脂糖膜的制备：按 0.5—3.0g 的琼脂糖加至 100ml 的双蒸水的比例配成琼脂糖溶液，完全混合后煮沸；将琼脂糖溶液覆盖在预热的氨基硅烷修饰的载玻片上；琼脂糖凝固后，载玻片干燥、保存；

f、载玻片表面的小牛血清白蛋白-N-羟基丁二酰亚胺（BSA-NHS）修饰：按 1.76g N-N'-disuccinimidyl 碳酸盐，与 1—5ml 的 N-N'-二异丙基乙胺的比例，将上述两材料溶解于 65—69ml 的无水二甲基甲酰胺“DMF”，取玻片放入此溶

液；用乙醇冲洗；将载玻片浸入含 0.2—5% 小牛血清白蛋白的 PBS 溶液中室温反应；用去离子水冲洗，然后再用乙醇冲洗；除去残留溶剂，再浸入无水二甲基甲酰胺“DMF”溶液中，室温放置，吹干保存；

g、选用相关癌基因及其表达蛋白质制备抗体，将这些抗体固定在载体上。

3、一种如权利要求 1 所述的肿瘤免疫细胞检测芯片的制备方法制备的芯片的检测方法，其特征在于，对所取已含有抗凝剂的外周血，加白细胞或者淋巴细胞分离液，除去红细胞得到血液中的有核细胞，将有核细胞悬浮在 PBS 或其他与人体等渗溶液中，然后将溶液中的悬浮细胞滴加到肿瘤免疫细胞检测芯片上，置于 2℃—55℃环境中 0.1—72h；取出载体，用 pH4.0—12，离子浓度 0.001-1.100M 溶液将没有被载体上抗体结合的游离有核细胞洗去；然后在显微镜或 CCD 上观察或将细胞染色观察各点结合细胞情况，即进行检测。

肿瘤免疫细胞检测芯片的制备和检测方法

技术领域

本发明涉及一种人体肿瘤患者的外周血中有核细胞免疫芯片的制备和检测方法，属生物芯片的制造和检测的技术领域。

背景技术

癌症是危害人类健康的常见疾病之一，由于发病机制尚未有彻底探讨清楚，到目前亦无特效的治疗方法，尤其是中晚期病人。癌症患者的预后往往与癌症的发现的早晚有一定关系。早期发现应用免疫治疗或手术可以根治。如果到了中晚期对于癌症患者预后非常不利。这样就显示出对于癌症患者早期诊断的重要意义。癌症如能早期发现，早期诊断，大多数病人获得根治。但临床所见到的大多数病人不是早期癌症。因为癌症早期常无特殊症状。故病人一般不会主动到医院就诊检查，而一旦感觉明显病情常常已到中晚期。所以很多癌症病人一旦发现就是中晚期或晚期，为病人的治疗带来了很大的困难。如能有一种能在癌症行成的早期即可诊断的方法，那就为患者治疗带来了希望。这样根治癌症患者亦不是幻想了。

肿瘤的诊断方法有多种，如生化、免疫及影像方法这几种诊断方法在近几年有很大进展，但目前仍以病理学方法诊断最为可靠，当然病理诊断也存在一些问题。首先病理诊断需要肿瘤组织，所以一般能取到肿瘤亦非早期患者。另因其是活检标本、具体取材和切片部位均属抽样检查，在光镜下见到的仅是病变的一小部分，有时不能完全代表整个病变。另外病理诊断是否可靠也与病理标本的选取有关。有时也有假阴性的结果。应用肿瘤特异抗原和肿瘤相关抗体诊断亦是对肿瘤诊断的一种较为有效的早期诊断方法。但有些肿瘤因其表达量有限亦不能在早期得到诊断。应用肿瘤标志物肿瘤特异抗原和肿瘤相关抗原对肿瘤诊断的一种较为有效的早期诊断方法。对肿瘤类型有特异性(直接针对肿瘤)；灵敏度高,在低肿瘤负荷时即能检测出来；并且在血液或其他体液中的标志浓度和肿瘤细胞负荷高

低直接相关,肿瘤标志出现于该型肿瘤的所有患者.大部分肿瘤能释放具有抗原性的大分子物质进入血循环,并可用免疫方法检测。

但目前用于肿瘤早期诊断或大量肿瘤筛选检查则仍缺乏特异性或敏感性的肿瘤标志物。

癌症无论是遗传,病毒感染还是一些其他物理化学因素的刺激所引起,首先都会致正常细胞发生基因突变或正常静止基因的激活而表达新的蛋白质分子,这些蛋白质可作用于细胞膜,机体有核细胞膜亦会发生相应改变,尤其是血液中有核细胞生命周期短,细胞膜受影响明显,易被机体某些免疫细胞识别,另外新的蛋白质被释放到体液当中后,这些蛋白质可能被机体一些免疫细胞识别,特别抗原呈递细胞识别而递呈给淋巴细胞产生抗体.可见癌症发生早期血液中的有核细胞膜最早发生改变,如何发现并及时抓住这一变化是对肿瘤能否进行早期诊断的一个技术关键.我们应用目前已明确与肿瘤基因及所表达蛋白相关的抗体来检测患者与正常机体之间差异.经临床试用,发现能较早地发现肿瘤,在机体实体瘤形成之前即可确诊.为肿瘤患者能及早发现并及时得到治疗提供了一种可靠的诊断方法。目前还没有通过外周血中有核细胞的检测来判断和较早地发现肿瘤方法。

发明内容

技术问题: 本发明的目的是提供一种肿瘤免疫细胞芯片的制备技术以及用该免疫细胞芯片进行肿瘤检测的方法。该方法具有准确率高、使用方便的效果,对于肿瘤早期诊断以及使肿瘤患者可以及时治疗都有非常大的意义。

技术方案: 本发明的肿瘤免疫细胞检测芯片的制备方法是:

首先在载体上进行化学修饰,即修饰上氨基,醛基,以保证载体上的化学基团可与抗体发生反应而结合在载体上,并能保持结合在载体上抗体的免疫学活性;然后在以上修饰有化学基团的载玻片上点上相应的抗体,如:肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等,置于 0℃—55℃ 潮湿环境中存放 0.1—72 小时后取出载玻片,用 pH4.0—10,离子浓度 0.00—0.75m/L 的缓冲液清洗。

在载体上进行化学修饰,即修饰上氨基,醛基的方法为:

a、载玻片清洗：取载玻片用水清洗干净，放入由过氧化氢和浓硫酸组成的溶液中浸泡，然后用去离子水或蒸馏水冲洗、煮沸，在氮气流下干燥，保存备用；

b、载玻片表面的氨基硅烷化：将清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0%氨基丙基三甲氧基硅烷“3-aminopropyltriethoxysilane”的 95%丙酮/水的溶液 3—30 分钟，取出后，玻片用丙酮、去离子蒸馏水依次冲洗，最后烘干，保存；

c、玻片表面的醛基修饰：将硅烷化后的玻片放入含 1%—10%戊二醛的 PB 溶液（磷酸盐缓冲液）中，在室温下浸泡，取出后先用 PB 溶液清洗，然后用去离子蒸馏水冲洗，用氮气吹干，保存备用；

d、玻片表面的聚赖氨酸修饰：将清洗干净的玻片放入含 2%~5%聚赖氨酸的 PBS 溶液（磷酸盐氯化钠缓冲液）中反应，取出后先用 PB 洗，然后用去离子蒸馏水冲洗，吹干，保存；

e、玻片表面琼脂糖膜的制备：按 0.5—3.0g 的琼脂糖加至 100ml 的双蒸水的比例配成琼脂糖溶液，完全混合后煮沸；将琼脂糖溶液覆盖在预热的氨基硅烷修饰的载玻片上；琼脂糖凝固后，载玻片干燥、保存；

f、载玻片表面的小牛血清白蛋白-N-羟基丁二酰亚胺（BSA-NHS）修饰：按 1.76g N-N'-disuccinimidyl 碳酸盐，与 1—5ml 的 N-N'-二异丙基乙胺的比例，将上述两材料溶解于 65—69ml 的无水二甲基甲酰胺“DMF”，取玻片放入此溶液；用乙醇冲洗；将载玻片浸入含 0.2—5% 小牛血清白蛋白的 PBS 溶液中室温反应；用去离子水冲洗，然后再用乙醇冲洗；除去残留溶剂，再浸入无水二甲基甲酰胺“DMF”溶液中，室温放置，吹干保存；

g、选用相关癌基因及其表达蛋白质制备抗体，将这些抗体固定在载体上。

检测方法为：对所取已含有抗凝剂的外周血，加白细胞或者淋巴细胞分离液，除去红细胞得到血液中的有核细胞，将有核细胞悬浮在 PBS 或其他与人体等渗溶液中，然后将溶液中的悬浮细胞滴加到肿瘤免疫细胞检测芯片上，置于 2℃—55℃环境中 0.1—72h；取出载体，用 pH4.0—12，离子浓度 0.001-1.100M 溶液将没有被载体上抗体结合的游离有核细胞洗去；然后在显微镜或 CCD 上观察或将细胞染色观察各点结合细胞情况，即进行检测。

本发明所述免疫细胞芯片是在一载体上修饰有化学基团，并将肿瘤相关标志物抗体修饰在载体上，患有癌症的血液中有核细胞膜表面的特种蛋白质与芯片上

抗体结合，根据各点细胞有无及分布可判断有无肿瘤以及患何肿瘤。

本发明所述载体可以是高分子聚合物，亦可以是载玻片等，在载体上可以修饰氨基、醛基。

有益效果：由于本发明的方法属体外检测，因此除采集用外周血外，不接触人体，对人体不会有其他任何危害，而且可以在实体瘤未形成之前即可检出，且准确率高、使用方便，对于肿瘤早期诊断以及使肿瘤患者可以及时治疗都有非常大的意义。

具体实施方式

本发明的肿瘤免疫细胞检测芯片的制备方法是：首先在载体上进行化学修饰，即修饰上氨基，醛基，以保证载体上的化学基因可与抗体发生反应而结合在载体上，并能保持结合在载体上抗体的免疫学活性；然后在以上修饰有化学基因的载玻片上点上相应的抗体，如：肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等，置于 0℃—55℃ 潮湿环境中存放 0.1—72 小时后取出载玻片，用 pH4.0—10，离子浓度 0.00—0.75m/L 的缓冲液清洗，具体步骤为：

1.芯片制作：

1) .载玻片清洗

取载玻片用水清洗干净，放入由 1/3 过氧化氢和 2/3 浓硫酸组成的溶液中，浸泡 0.5—3.0 小时。然后用去离子水或蒸馏水冲洗 2—6 遍，再用去离子水或蒸馏水煮沸 2—30 分钟；在氮气流下干燥，于干燥处保存备用。

(1) .载玻片表面的氨基硅烷化

清洗好的载玻片浸入含有 0.1—10.0% 氨基丙基三甲氧基硅烷 (3-aminopropyltriethoxysilane) 的 95% 丙酮/水的溶液 3—30 分钟，取出后，玻片用丙酮洗 2—6 遍，每次 1—5 分钟，再用去离子蒸馏水冲洗 1—5 遍，每次 1—5 分钟，最后在 60—180℃ 下烘干，置于干燥处保存。

(2) .玻片表面的醛基修饰

将硅烷化后的玻片放入含 1%—10% 戊二醛的 PB 溶液 (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 中，在室温下浸泡 0.1—10 小时，取出后先用 PB (0.001—0.150M pH4.5—11.0) 洗 2—6 次，然后用去离子蒸馏水冲洗 3 遍，用氮气吹干，置于 4℃

保存备用。

(3) .玻片表面的聚赖氨酸修饰

将清洗干净的玻片放入含 3% 聚赖氨酸的 PBS 溶液 (0.01–0.14M pH4.0–11.0) 中反应 0.1–10 小时, 取出后先用 PB 洗 2–6 次, 然后用去离子蒸馏水冲洗 2–6 遍, 吹干, 于 4°C 保存。

2) .玻片表面琼脂糖膜的制备

(1) 0.5–3.0g 的琼脂糖加至 100ml 的双蒸水配成琼脂糖溶液, 完全混合微波炉煮沸 2–10 分钟;

(2) 将 1–5 ml 琼脂糖溶液覆盖在 60°C 左右预热的氨基硅烷修饰的载玻片上;

(3) 琼脂糖凝固后, 玻片在 10–120°C 下过夜干燥。可室温干燥条件下保存;

(4) 在使用之前, 琼脂糖膜要浸入 0.1–100mM 的 NaIO₄ 溶液, 室温下放置 0.05–6.00 小时, 再用双蒸水彻底冲洗干净, 并用氮气流干燥, 于室温或低温干燥保存。

3). 玻片表面的小牛血清白蛋白–N–羟基丁二酰亚胺 (BSA-NHS) 修饰

(1) 1.76g N–N'-disuccinimidyl 碳酸盐, 与 1–5ml 的 N–N'-二异丙基乙胺, 溶解于 65–69ml 的无水二甲基甲酰胺 (DMF)。取玻片放入此溶液, 室温 1–6 小时。

(2) 用 95% 乙醇冲洗数遍。

(3) 将玻片浸入含 0.2–5% BSA 的 PBS (0.01M pH7.4) 溶液, 室温反应 0.5–24 小时。

(4) 用去离子水冲洗数遍, 然后再用 95% 乙醇冲洗两遍。

(5) 除去残留溶剂, 再浸入 DMF 溶液, 室温放置 0.5–6 小时。除去溶剂, 气吹干于 4°C 保存。

在以上修饰有化学基因的载体上用手工或用点样仪点上相应的抗体 (肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等)。置于 0°C–55°C 潮湿环境中 (将载体放在潮湿盒子内) 内存放 0.1–72 小时后取出载体, 用 pH4.0–10, 离子浓度 0.00–0.75m/L 的缓冲液清洗 1–5 遍。以除去载体上未结合的抗体。制好的芯片吹干, 避光保存备用。

2、检测方法:

按体积1比1的比例取含有抗凝剂的人体外周血与白细胞分离液或淋巴细胞分离液，离心500—3000转除去血液中的红细胞，然后将有核细胞的悬浮在缓冲液中，再500—4000转离心沉淀细胞，以除去上清中白细胞分离液或淋巴细胞分离液，再将沉淀的有核细胞混悬在缓冲液中，制备成有核细胞混悬液。

取出1置备好的芯片，加上适量上述已分离好的有核细胞混悬液，在2℃—60℃放置0.1—72小时，细胞悬液不能干，要始终使细胞在液体内，取出后用缓冲液冲洗，除去未结合的游离细胞。然后在显微镜或CCD上观察或将细胞染色观察各点结合细胞情况以确定该患者是否患肿瘤以及是何种肿瘤。

专利名称(译)	肿瘤免疫细胞检测芯片的制备和检测方法		
公开(公告)号	CN1619310A	公开(公告)日	2005-05-25
申请号	CN200410065235.5	申请日	2004-11-03
[标]申请(专利权)人(译)	东南大学		
申请(专利权)人(译)	东南大学		
[标]发明人	唐祖明 陆祖宏 杨玉志 张春秀 郁颖蕾		
发明人	唐祖明 陆祖宏 杨玉志 张春秀 郁颖蕾		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/54353		
代理人(译)	叶连生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

肿瘤免疫细胞检测芯片的制备和检测方法，涉及一种对人体肿瘤患者外周血有核细胞进行检测的芯片和检测方法，其芯片的制备为：在载体上进行化学修饰，即修饰上氨基，醛基；然后在以上修饰有化学基因的载玻片上点上相应的抗体，如：肺癌、肝癌、胃癌等肿瘤以及骨骼系肿瘤白血病等基因突变表达的新蛋白抗体等，置于潮湿环境中存放后取出载玻片，用缓冲液清洗。检测方法为：对所取已含有抗凝剂的外周血，加白细胞或者淋巴细胞分离液，除去红细胞得到血液中的有核细胞，将有核细胞悬浮在PBS或其他与人体等渗溶液中，然后将溶液中的悬浮细胞滴加到肿瘤免疫细胞检测芯片上，然后在显微镜或CCD上观察或将细胞染色观察各点结合细胞情况。