



(12)发明专利



(10)授权公告号 CN 106970225 B

(45)授权公告日 2018.09.18

(21)申请号 201710157840.2

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2017.03.16

C12Q 1/6886(2018.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106970225 A

(56)对比文件

CN 104007257 A,2014.08.27,权利要求1、2,实施例.

(43)申请公布日 2017.07.21

CN 204086278 U,2015.01.07,权利要求1,

(73)专利权人 武汉康录生物技术股份有限公司

实施例.

地址 430075 湖北省武汉市东湖高新开发区高新大道666号B4栋4楼

CN 103091491 A,2013.05.08,全文.

CN 106370867 A,2017.02.01,全文.

(72)发明人 叶伦 李雪梅 李倩 程弘夏
陈刚

Julie Ann Mayer等.FISH-based

determination of HER2 status in circulating tumor cells isolated with the microfluidic CEEtm platform.《cancer genetics》.2011,(第204期),第590页右栏第3段,591页左栏第1-2段.

(74)专利代理机构 湖北武汉永嘉专利代理有限公司 42102

代理人 邬丽明 徐晓琴

审查员 吕健

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书1页 说明书6页

序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明属于生物医学临床检测领域,具体涉及一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针一步法共染鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用。所述试剂盒包括:固定液、 $2\times$ SSC、0.3%NP-40/0.4 $\times$ SSC、0.075M KCl溶液、CD45单抗和CEP 8探针混合液、DAPI复染剂、穿孔剂、封闭液和封片剂。本发明采用CD45免疫荧光抗体联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定捕获的循环肿瘤细胞,通过一步法完成了免疫荧光和荧光原位杂交检测,克服了免疫荧光检测和荧光原位杂交检测联合使用时存在相互干扰、检测耗时较长的问题,一步法杂交孵育在2h内快速完成,大大减少了检测时间,并且检测结果观察直观。

1. 一种应用CD45免疫荧光联合CEP8荧光原位杂交探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒检测鉴定循环肿瘤细胞的方法,所述方法用于非疾病诊断和治疗目的,其特征在于,具体地包括如下步骤:

- (1) 收获细胞:将捕获的循环肿瘤细胞样本(CTCs)吸至尖底离心管,离心、去上清;
- (2) 低渗:加入预温至37℃的0.075mol/L KCl 溶液6~8mL,用吸管吹打混匀后置37℃恒温箱20~30min;
- (3) 预固定:加入固定液2mL,吹打混匀,离心;
- (4) 吸去上清液,加新鲜配制的固定液5mL,吹打混匀,固定10min,离心;
- (5) 重复步骤(4)直至细胞沉淀洗白洗干净;
- (6) 细胞悬液的制备:吸去上清液,加入适量固定液,制成浓度合适的细胞悬液;
- (7) 制片:吸取3~5μL细胞悬液滴至防脱载玻片上,56℃老化0.5~2小时;
- (8) 封闭:向玻片加入100μL封闭液,室温封闭10min后,2×SSC漂洗5min;
- (9) 穿孔:滴加100μL穿孔剂,室温封闭10min后,2×SSC漂洗5min;
- (10) 脱水:将玻片依次置于70%、85%和100%乙醇溶液中各2min脱水后自然干燥玻片;
- (11) 杂交孵育:取出CD45单抗和CEP 8探针混合液,室温静置5分钟,彻底混匀后短暂离心,取10μL滴于细胞滴片杂交区域,立即盖上22mm×22mm的盖玻片,探针在盖玻片下应均匀展开无气泡,用树脂封边,将玻片置于杂交仪上进行杂交孵育;所述杂交孵育的条件为:75℃变性2分钟,37℃孵育2小时;
- (12) 洗涤:取出孵育后的玻片,去除盖玻片上的橡皮胶,立即将玻片置于65℃~68℃ 0.3%NP-40/0.4×SSC溶液中,振荡10~20s脱去盖玻片,浸泡5~10分钟,将玻片置于37℃去离子水中,振荡1~3s,浸泡2分钟,暗处自然干燥玻片;
- (13) 封片:滴加10μL DAPI复染剂;
- (14) 阅片:在荧光显微镜下选用合适的滤光片观察玻片;
- (15) 结果判定:a. CD45染色阳性为白细胞;b. CD45未被染色,但呈巨大裸核,为非肿瘤细胞;c. CD45未被染色,信号点≥2个,非巨大裸核可以判断为循环肿瘤细胞;

所述试剂盒包括:固定液、2×SSC、0.3%NP-40/0.4×SSC、0.075M KCl溶液、CD45单抗和CEP8探针混合液、DAPI复染剂、穿孔剂、封闭液和封片剂;所述CD45单抗和CEP8探针混合液的组分为荧光标记CD45单抗、CEP 8荧光原位杂交探针、硫酸葡聚糖、去离子甲酰胺、BSA、SSC和Triton X-100;所述CD45单抗和CEP8探针混合液各组分的浓度为:荧光标记CD45单抗的浓度为0.002mg/ml,CEP8荧光原位杂交探针的浓度为2ng/μL,硫酸葡聚糖10%、去离子甲酰胺50%、BSA1%、6×SSC、Triton X-100 1%;所述固定液为甲醇和冰乙酸按体积比3:1混合所得混合液;所述穿孔剂的组分为5%Triton X-100、0.1M磷酸盐缓冲液;所述封闭液为5%的BSA;所述封片剂为树脂。

一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物医学临床检测领域,具体涉及一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTCs)是指是存在于外周血中的各类肿瘤细胞的统称,因自发或诊疗操作从实体肿瘤病灶(原发灶、转移灶)脱落释放进入外周血循环的肿瘤细胞,大部分CTCs在进入外周血后发生凋亡或被吞噬,少数能够逃逸并锚着发展成为转移灶。近几年CTCs在肿瘤诊断、治疗和监控等方面的临床表现逐渐崭露头角,是目前最具发展潜力的肿瘤无创诊断和实时疗效监测手段,临床应用价值极其显著。与传统的影像学诊断、内窥镜检查以及病理学诊断相比,优势显著,可更加敏感地发现疾病的变化,更加科学、迅速的评价某一治疗方案的效果。而且分离富集CTCs只需抽取患者少量外周血,对患者没有副作用,因此可以高频度的监测,达到实时监测疾病进展的目的。更为重要的是,CTCs可作为分析患者肿瘤生物学特征的实时样本,可以发现患者的实时生物学变化,并根据结果及时调整治疗方案,实现实时的个体化治疗。

[0003] CTCs富集捕获的方法基本上基于以下三种原理:免疫捕获、细胞大小、其他特征的识别(如细胞密度、电荷、形变能力等),前两种是目前应用较多的方法。捕获后对CTCs鉴定是实现CTCs运用于临床肿瘤患者的疗效实时评估、病情实时监测、指导用药和预后判断的关键。鉴定CTCs最常用的方法主要有6种方法:(1)免疫荧光法;(2)流式细胞法;(3)荧光原位杂交法;(4)RT-PCR;(5)基因芯片法;(6)二代测序法。免疫荧光法和流式细胞法基于CTCs膜蛋白特征鉴定技术;荧光原位杂交法、RT-PCR、基因芯片法和二代测序法基于CTCs核酸特征鉴定技术。

[0004] 免疫荧光是利用抗原与抗体特异性结合的原理,使荧光素标记的抗体与特异的肿瘤标志物(主要包括上皮细胞角蛋白、上皮细胞膜特异性抗原等)结合,通过酶和底物反应显色来判断肿瘤细胞的存在。免疫荧光是检测CTCs的成熟方法之一,简便、直观并可以进行形态学分析,但其敏感性只有 10^5 左右,而且许多分化差的肿瘤不能表达目标抗原,而非上皮细胞中细胞角蛋白和上皮细胞抗原亦可能阳性,加之镜下对结果观察和判读的主观性较强,这些都限制了免疫荧光在CTCs检测中的应用。

[0005] 荧光原位杂交(Fluorescence in situ hybridization,FISH)是一门新兴的分子细胞遗传学技术,是20世纪80年代末期在原有的放射性原位杂交技术的基础上发展起来的一种非放射性原位杂交技术。目前这项技术已经广泛应用于动植物基因组结构研究、染色体精细结构变异分析、病毒感染分析、人类产前诊断、肿瘤遗传学和基因组进化研究等许多领域。FISH的基本原理是用已知的标记单链核酸为探针,按照碱基互补的原则,与待检材料中未知的单链核酸进行特异性结合,形成可被检测的杂交双链核酸。由于DNA分子在染色体上是沿着染色体纵轴呈线性排列,因而可以用探针直接与染色体进行杂交从而将特定的基

因在染色体上定位。与传统的放射性标记原位杂交相比,荧光原位杂交具有快速、检测信号强、杂交特异性高和可以多重染色等特点,因此在分子细胞遗传学领域受到普遍关注。荧光原位杂交技术在应用于检测CTCs染色体多倍体,基因断裂,基因融合时,由于捕获的CTCs中存在大量的血细胞背景,在荧光显微镜下,寻找目标CTCs极为困难,从而限制了FISH技术在CTCs中的应用。

发明内容

[0006] 本发明针对现有技术的不足,目的在于提供一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用。

[0007] 为实现上述发明目的,本发明采用的技术方案为:

[0008] 一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒,包括:固定液、 $2\times$ SSC、0.3%NP-40/ $0.4\times$ SSC、0.075M KCl溶液、CD45单抗和CEP 8探针混合液、DAPI复染剂、穿孔剂、封闭液和封片剂。

[0009] 上述方案中,所述CD45单抗和CEP 8探针混合液的组分为荧光标记CD45单抗、CEP8荧光原位杂交探针、硫酸葡聚糖、去离子甲酰胺、BSA、SSC、Triton-100。

[0010] 上述方案中,所述CD45单抗和CEP 8探针混合液各组分的浓度为:荧光标记CD45单抗的浓度为0.002mg/ml,CEP 8荧光原位杂交探针的浓度为2ng/ μ L,硫酸葡聚糖10% (质量浓度)、去离子甲酰胺50% (体积浓度)、BSA1% (质量浓度)、 $6\times$ SSC、Triton-100 1‰ (体积浓度)。

[0011] 上述方案中,所述固定液为甲醇和冰乙酸按体积比3:1混合所得混合液。

[0012] 上述方案中,所述穿孔剂的组分为5‰Triton X-100、0.1M磷酸盐缓冲液。

[0013] 上述方案中,所述封闭液的组分为5%的BSA。

[0014] 上述方案中,所述封片剂为树脂。

[0015] 上述试剂盒在制备用于鉴定循环肿瘤细胞产品中的应用,具体地包括如下步骤:

[0016] (1) 收获细胞:将捕获的循环肿瘤细胞样本(CTCs)吸至尖底离心管,离心、去上清;

[0017] (2) 低渗:加入预温至37℃的0.075mol/L KCl溶液6~8mL,用吸管吹打混匀后置37℃温箱20~30min;

[0018] (3) 预固定:加入固定液2mL,吹打混匀,离心;

[0019] (4) 吸去上清液,加新鲜配制的固定液5mL,吹打混匀,固定10min,离心;

[0020] (5) 重复步骤(4)直至细胞沉淀洗白洗干净;

[0021] (6) 细胞悬液的制备:吸去上清液,加入适量固定液,制成浓度合适的细胞悬液($10\times$ 物镜在相差显微镜下观察细胞密度,要求细胞无重叠,且单视野细胞数量在100~200个为宜);

[0022] (7) 制片:吸取3~5 μ L细胞悬液滴至防脱载玻片上,56℃老化0.5~2小时;

[0023] (8) 封闭:向玻片加入100 μ L封闭液,室温封闭10min后, $2\times$ SSC (pH 7.0) 漂洗5min;

[0024] (9) 穿孔:滴加100 μ L穿孔剂,室温封闭10min后, $2\times$ SSC (pH 7.0) 漂洗5min;

[0025] (10) 脱水:将玻片依次置于70Vt% (体积浓度) 乙醇、85Vt%乙醇和100Vt%乙醇中各2min脱水后自然干燥玻片;

[0026] (11) 杂交孵育:取出CD45单抗和CEP 8探针混合液,室温静置5分钟,彻底混匀后短

暂离心,取10 μ L滴于细胞滴片杂交区域,立即盖上22mm $\times$ 22mm的盖玻片,探针在盖玻片下应均匀展开无气泡,用树脂封边,将玻片置于杂交仪上进行杂交孵育;

[0027] (12) 洗涤:取出孵育后的玻片,去除盖玻片上的橡皮胶,立即将玻片置于65 $^{\circ}$ C $\sim$ 68 $^{\circ}$ C 0.3%NP-40/0.4 $\times$ SSC溶液中,振荡10 $\sim$ 20s脱去盖玻片,浸泡5 $\sim$ 10分钟,将玻片置于37 $^{\circ}$ C去离子水中,振荡1 $\sim$ 3s,浸泡2分钟,暗处自然干燥玻片;

[0028] (13) 封片:滴加10 μ L DAPI复染剂;

[0029] (14) 阅片:在荧光显微镜下选用合适的滤光片观察玻片;

[0030] (15) 结果判定:a.CD45染色阳性为白细胞;b.CD45未被染色,但呈巨大裸核,为非肿瘤细胞;c.CD45未被染色,信号点 $\geq$ 2个,非巨大裸核可以判断为循环肿瘤细胞,进行计数。

[0031] 上述方案中,步骤(11)所述杂交孵育的条件为:75 $^{\circ}$ C变性2分钟,37 $^{\circ}$ C孵育2小时。

[0032] 本发明的有益效果如下:

[0033] (1) 本发明采用免疫荧光联合荧光原位杂交技术鉴定循环肿瘤细胞,克服了免疫荧光检测或荧光原位杂交检测单一技术检测时,检测结果不能充分证实为循环肿瘤细胞的缺点,减少循环肿瘤细胞鉴定的错误;

[0034] (2) 本发明采用CD45免疫荧光抗体联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定捕获的循环肿瘤细胞,通过一步法完成了免疫荧光和荧光原位杂交检测,一步法杂交孵育在2h内快速完成,大大减少了检测时间;

[0035] (3) 本发明中所述CEP 8探针采用非重复序列技术制备而成,减少了常规CEP 8探针因为重复序列导致的非特异性杂交信号,能有效减少循环肿瘤细胞的计数错误;同时该技术制备的CEP 8探针能够在2个小时内快速完成杂交,比传统探针的16 $\sim$ 24小时杂交时间,大大缩短。

附图说明

[0036] 图1为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有多个(>2 个)荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞;B细胞被CD45染红色,核中含有2个荧光信号点,该细胞为血液细胞(白细胞)。

[0037] 图2为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有2个荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞,同时该肿瘤细胞形成细胞团,具有较强的复发转移能力。

[0038] 图3为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有多个(>2 个)荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞;B细胞被CD45染红色,核中含有2个荧光信号点,该细胞为血液细胞(白细胞)。

具体实施方式

[0039] 为了更好地理解本发明,下面结合实施例进一步阐明本发明的内容,但本发明的内容不仅仅局限于下面的实施例。

[0040] 实施例1

[0041] 一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂

盒,试剂盒的组成如下表1所示:

[0042] 表1试剂盒组成

[0043]

序号	名称	组分
1	固定液	甲醇: 乙酸的体积比 3:1
2	2×SSC	氯化钠、柠檬酸钠
3	0.3%NP-40/0.4×SSC	氯化钠、柠檬酸钠、NP-40
4	0.075M KCl 溶液	氯化钾
5	CD45 单抗和 CEP8 探针混合液	荧光标记 CD45 单抗的浓度为 0.002mg/ml, CEP 8 荧光原位杂交探针的浓度为 2ng/μL, 硫酸葡聚糖 10%、去离子甲酰胺 50%、BSA1%、6×SSC、Triton-100 1‰
6	DAPI 复染剂	DAPI、抗淬灭剂
7	穿孔剂	5‰Triton X-100、0.1M PBS
8	封闭液	5%的 BSA
9	封片剂	树脂

[0044] 实施例2

[0045] 使用实施例1所述试剂盒鉴定肺癌患者循环肿瘤细胞,采用的CD45单抗+8号染色体荧光原位杂交探针检测,8号染色体荧光原位杂交探针特异性序列(SEQ ID NO.1)为:

[0046] TTGAAACACTCTTTTGTAGAATCTGCAGGTGGATATTTGGCTAGCTTTGAGGATTTTCGTTGGAAACGG
TAATGTCTTCAAAGAAAATCTAGACAGAAGCATTCTCAGAAACAGCGTCGTGATGTTGCAATCAAGTCACAGAG

[0047] 具体包括如下步骤:

[0048] (1)收获细胞:将捕获的循环肿瘤细胞样本(CTCs)吸至尖底离心管,离心,1000转/min,10min,去上清;

[0049] (2)低渗:加入预温至37℃的0.075mol/L KCL溶液6~8mL,用吸管吹打混匀后置37℃温箱20~30min;

[0050] (3)预固定:加入固定液2mL,吹打混匀,1000转/min离心10min;

[0051] (4)吸去上清液,加新鲜配制的固定液5mL,吹打混匀,固定10min,1000转/min离心10min;

[0052] (5)重复步骤(4)直至细胞沉淀洗白洗干净;

[0053] (6)细胞悬液的制备:吸去上清液,加入适量固定液,制成浓度合适的细胞悬液;

[0054] (7)制片:吸取3~5μL细胞悬液滴至防脱载玻片上,56℃老化0.5~2小时;

[0055] (8)封闭:向玻片加入100ul封闭液,室温封闭10min后,2×SSC(pH 7.0)漂洗5min;

[0056] (9)穿孔:滴加100ul穿孔剂,室温封闭10min后,2×SSC(pH 7.0)漂洗5min;

[0057] (10)脱水:将玻片依次置于70Vt%乙醇、85Vt%乙醇和100Vt%乙醇中各2min脱水后自然干燥玻片;

[0058] (11)杂交孵育:取出CD45单抗和CEP8探针混合液,室温静置5分钟,彻底混匀后短暂离心,取10μL滴于细胞滴片杂交区域,立即盖上22mm×22mm的盖玻片,探针在盖玻片下应均匀展开无气泡,用树脂封边,将玻片置于杂交仪上,75℃变性2分钟,37℃孵育2小时;

[0059] (12)洗涤:取出孵育后的玻片,去除盖玻片上的橡皮胶,立即将玻片置于65℃~68

℃0.3%NP-40/0.4×SSC溶液中,振荡10~20秒脱去盖玻片,浸泡5~10分钟,将玻片置于37℃去离子水中,振荡1~3秒,浸泡2分钟,暗处自然干燥玻片;

[0060] (13)封片:滴加10ul DAPI复染剂;

[0061] (14)阅片:在荧光显微镜下选用合适的滤光片观察玻片。

[0062] 检测结果如图1和图2所示。图1为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有多个(>2个)荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞;B细胞被CD45染红色,核中含有2个荧光信号点,该细胞为血液细胞(白细胞)。图2为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有2个荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞,同时该肿瘤细胞形成细胞团,具有较强的复发转移能力。

[0063] 实施例3

[0064] 使用本发明实施例所述试剂盒,应用CD45免疫荧光和CEP8荧光原位杂交联合检测胰腺癌患者外周血样本,CEP8荧光原位杂交探针的序列(SEQ ID NO.1)为:

[0065] TTGAAACACTCTTTTGTAGAATCTGCAGGTGGATATTTGGCTAGCTTTGAGGATTTTCGTTGGAAACGGTAATGTCTTCAAAGAAAATCTAGACAGAAGCATTCTCAGAAACAGCGTCGTGATGTTGCAATCAAGTCACAGAG

[0066] 具体包括如下步骤:

[0067] (1)收获细胞:抽取患者外周血10ml,采用市售的循环肿瘤细胞捕获仪或试剂盒捕获的循环肿瘤细胞(CTCs),捕获后的循环肿瘤细胞吸至尖底离心管,离心,1000转/min,10min,去上清;

[0068] (2)低渗:加入预温至37℃的0.075mol/L KCL溶液6~8mL,用吸管吹打混匀后置37℃温箱20~30min;

[0069] (3)预固定:加入固定液2mL,吹打混匀,1000转/min离心10min;

[0070] (4)吸去上清液,加新鲜配制的固定液5mL,吹打混匀,固定10min,1000转/min离心10min;

[0071] (5)重复步骤(4)直至细胞沉淀洗白洗干净;

[0072] (6)细胞悬液的制备:吸去上清液,加入适量固定液,制成浓度合适的细胞悬液;

[0073] (7)制片:吸取3~5μL细胞悬液滴至防脱载玻片上,56℃老化0.5~2小时;

[0074] (8)封闭:向玻片加入100ul封闭液,室温封闭10min后,2×SSC(pH 7.0)漂洗5min;

[0075] (9)穿孔:滴加100ul穿孔剂,室温封闭10min后,2×SSC(pH 7.0)漂洗5min;

[0076] (10)脱水:将玻片依次置于70%乙醇、85%乙醇和100%乙醇中各2min脱水后自然干燥玻片;

[0077] (11)杂交孵育:取出CD45单抗和CEP8探针混合液,室温静置5分钟,彻底混匀后短暂离心,取10μL滴于细胞滴片杂交区域,立即盖上22mm×22mm的盖玻片,探针在盖玻片下应均匀展开无气泡,用树脂封边,将玻片置于杂交仪上,75℃变性2分钟,37℃孵育2小时;

[0078] (12)洗涤:取出孵育后的玻片,去除盖玻片上的橡皮胶,立即将玻片置于65℃~68℃0.3%NP-40/0.4×SSC溶液中,振荡10~20秒脱去盖玻片,浸泡5~10分钟,将玻片置于37℃去离子水中,振荡1~3秒,浸泡2分钟,暗处自然干燥玻片;

[0079] (13)封片:滴加10ul DAPI复染剂;

[0080] (14)阅片:在荧光显微镜下选用合适的滤光片观察玻片。

[0081] 图3为本试剂盒鉴定捕获的循环肿瘤,其中A细胞未被CD45染红色,同时核中含有

多个(>2个)荧光原位杂交信号,该细胞为循环肿瘤细胞;B细胞被CD45染红色,核中含有2个荧光信号点,该细胞为血液细胞(白细胞)。

[0082] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的实例,而并非对实施方式的限制。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而因此所引申的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

[0001]	序列表	
[0002]	<110>武汉康录生物技术股份有限公司	
[0003]	<120>一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用	
[0004]	<160>1	
[0005]	<210> 1	
[0006]	<211> 144bp	
[0007]	<212> DNA	
[0008]	<213> 人工序列	
[0009]	<400> 1	
[0010]	ttgaaacact cttttttag aatctgcagg tggatatttg gctagctttg aggatttcgt	60
[0011]	tggaaacggt aatgtcttca aagaaaatct agacagaagc attctcagaa acagcgctcg	120
[0012]	gatgtttgca atcaagtcac agag	144

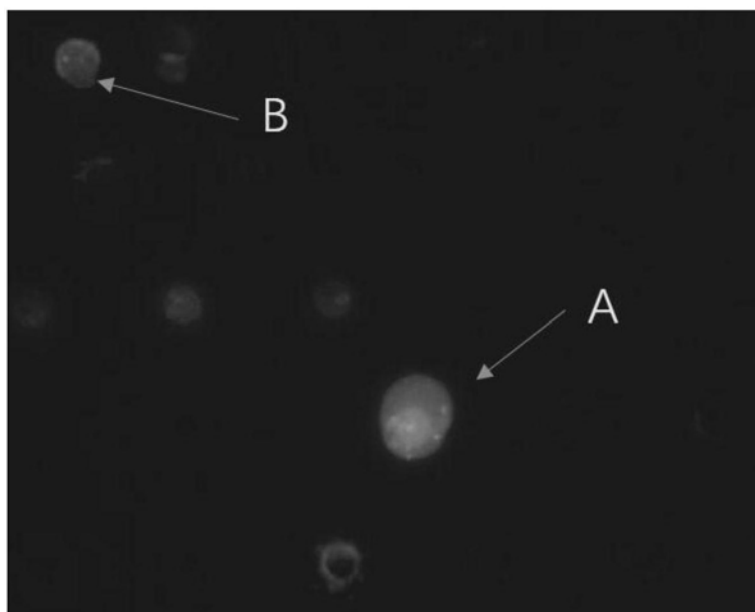


图1

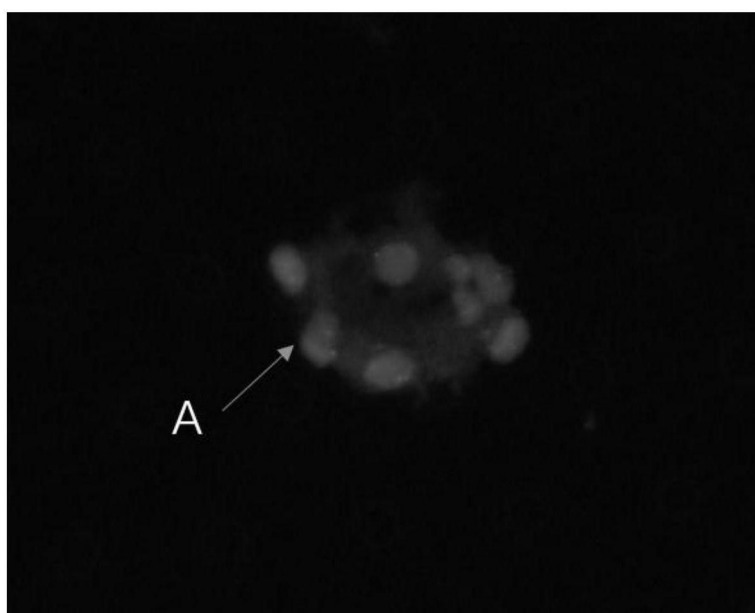


图2

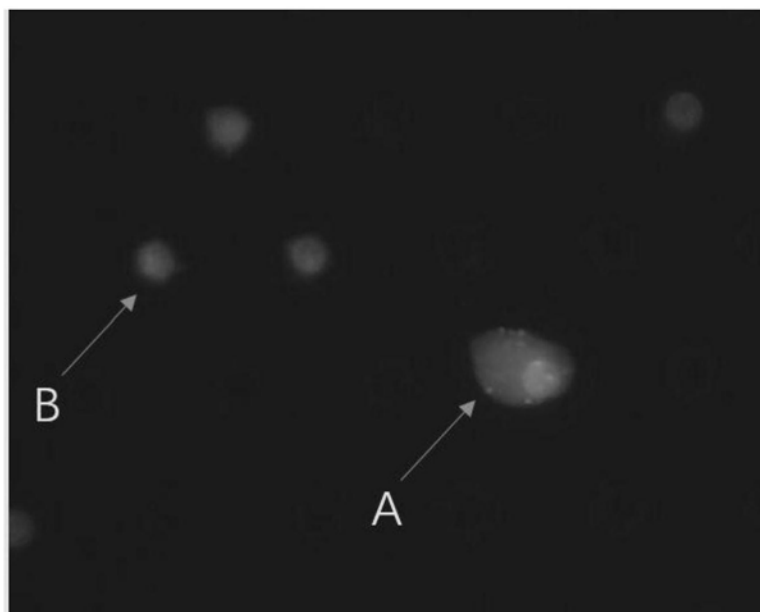


图3

专利名称(译)	一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8探针鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN106970225B	公开(公告)日	2018-09-18
申请号	CN201710157840.2	申请日	2017-03-16
[标]发明人	叶伦 李雪梅 李倩 程弘夏 陈刚		
发明人	叶伦 李雪梅 李倩 程弘夏 陈刚		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/569 G01N33/533 C12Q1/6886		
CPC分类号	C12Q1/6841 C12Q1/6888 G01N33/533 G01N33/56966 G01N33/577 C12Q2537/143 C12Q2563/107		
代理人(译)	徐晓琴		
审查员(译)	吕健		
其他公开文献	CN106970225A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物医学临床检测领域，具体涉及一种应用CD45免疫荧光联合CEP 8荧光原位杂交探针一步法共染鉴定循环肿瘤细胞的试剂盒及其应用。所述试剂盒包括：固定液、2×SSC、0.3%NP-40/0.4×SSC、0.075M KCl溶液、CD45单抗和CEP 8探针混合液、DAPI复染剂、穿孔剂、封闭液和封片剂。本发明采用CD45免疫荧光抗体联合CEP 8荧光原位杂交探针鉴定捕获的循环肿瘤细胞，通过一步法完成了免疫荧光和荧光原位杂交检测，克服了免疫荧光检测和荧光原位杂交检测联合使用时存在相互干扰、检测耗时较长的问题，一步法杂交孵育在2h内快速完成，大大减少了检测时间，并且检测结果观察直观。

序号	名称	组分
1	固定液	甲醇：乙酸的体积比 3:1
2	2×SSC	氯化钠、柠檬酸钠
3	0.3%NP-40/0.4×SSC	氯化钠、柠檬酸钠、NP-40
4	0.075M KCl 溶液	氯化钾
5	CD45 单抗和 CEP8 探针混合液	荧光标记 CD45 单抗的浓度为 0.002mg/ml，CEP 8 荧光原位杂交探针的浓度为 2ng/μL，硫酸葡聚糖 10%、去离子甲酰胺 50%、BSA1%、6×SSC、Triton-100 1%
6	DAPI 复染剂	DAPI、抗淬灭剂
7	穿孔剂	5% Triton X-100、0.1M PBS
8	封闭液	5%的 BSA
9	封片剂	树脂