



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110632292 A

(43)申请公布日 2019.12.31

(21)申请号 201910504472.3

(22)申请日 2019.06.12

(71)申请人 江苏莱尔生物医药科技有限公司  
地址 225700 江苏省泰州市泰州医药高新技术产业园第五期标准厂房G102栋东半侧

(72)发明人 郭志敏 樊晓婷 郭素杰

(74)专利代理机构 南京科知维创知识产权代理有限公司 32270  
代理人 许益民

(51)Int.Cl.  
G01N 33/533(2006.01)  
G01N 33/574(2006.01)

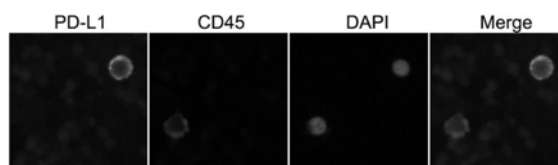
权利要求书3页 说明书13页 附图1页

(54)发明名称

一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用方法

(57)摘要

本发明涉及一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用其的检测方法;所述的试剂盒包括以下试剂:缓冲液CYP1、CYP2、CYPP、封闭液、检测PD-L1的特异性抗体以及相应的荧光二抗、荧光标记的CD45抗体、荧光标记的CD8抗体、抗体稀释液、细胞核染色液。本发明还提出应用所述的试剂盒进行抗原检测的方法。本发明的试剂盒检测结果可以对实际用药进行指导,不仅能够反映整体肿瘤,包括原位癌和可能存在的不可见的微小转移灶负荷,同样可以反映CTC中PD-L1的表达情况;根据PBMC中PD-L1和CD8阳性细胞比例,可以为治疗药物的精准选择提供参考;在取材上比基于肿瘤组织的检测技术更加方便。



1. 一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒,包括以下试剂组分:

名称	数量	单位	总体积/质量
CYP1缓冲液	1	瓶	80ml
CYP2缓冲液	1	瓶	15ml
CYPP缓冲液	1	管	4.5ml
封闭液	1	管	3ml
PD-L1抗体	1	管	200 $\mu$ l
CD8抗体	1	管	100 $\mu$ l
CD45抗体	1	管	200 $\mu$ l
荧光二抗	1	管	200 $\mu$ l
抗体稀释液	1	管	3ml
染色液	1	管	300 $\mu$ l

其中,所述的CYP1缓冲液为0.01M PBS加纯化水充分搅拌溶解调节pH至7.20-7.40后分装;

所述的CYP2缓冲液是在0.01M PBS溶液中加入0.1%Triton X-100、0.5%Trehalose,充分搅拌溶解后分装;

所述的CYPP缓冲液是在0.01M PBS溶液中加入0.2%Triton X-100,充分搅拌溶解后分装;

所述的封闭液含PBS和BSA或者选用动物血清、0.5%~10%BSA或Fc受体抗体;

所述的PD-L1抗体为PD-L1抗体的10倍浓缩液,分装于1.5ml棕色避光管;

所述的CD8抗体为AlexaFluor® 594标记的CD8抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

所述的CD45抗体为AlexaFluor® 647标记的CD45抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

所述的荧光二抗为AlexaFluor® 488标记的荧光二抗,分装于1.5ml棕色避光管;

所述的抗体稀释液含Tris-HCl缓冲液、牛血清白蛋白;

所述的染色液为取DAPI粉末,用超纯水稀释后加入抗淬灭剂ThermoFisher, ProLong®分装;或者为Hoechst或碘化丙啶。

2. 如权利要求1所述的一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒,其特征在于,所述的缓冲液CYP1、CYP2、CYPP中含有表面活性剂和蛋白保护剂,表面活性剂可以采用0~10%的Triton X-100、saponin、Tween、NP-40、SDS或聚乙二醇;所述的蛋白保护剂可采用0~10%的BSA、海藻糖(Trehalose)或蔗糖。

3. 一种应用如权利要求1或2所述的试剂盒进行PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的检测方法包括如下步骤:

步骤一、CTC富集和PBMC涂片,具体操作步骤为:

S1、取血液和其他体液样品,对其中的CTC进行富集;

S2、取外周血,对其中的PBMC进行分离和涂片;

步骤二、将富集的CTC和PBMC细胞涂片进行免疫荧光检测,具体检测方法步骤如下:

S1、CYP1洗载玻片3min $\times$ 3次,每次100~150 $\mu$ l,确保覆盖满整个标本区;

S2、吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min $\times$ 3次;吸去多余液

体,加100~150 $\mu$ l封闭液室温封闭20~30min;

S3、吸去多余封闭液,加100 $\mu$ l稀释好的PD-L1抗体和CD45抗体或CD8抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;其中CTC进行PD-L1+CD45抗体孵育,PBMC细胞涂片分别进行CD8和PD-L1+CD45抗体孵育;

S4、避光,取CYP2 100~150 $\mu$ L/片洗片3min $\times$ 3次,吸去多余水分;

S5、加100 $\mu$ l稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育;37 $^{\circ}$ C,25~30min或室温30~60min;CYP2洗3min $\times$ 4次,吸去多余水分;

S6、复染:取10 $\mu$ L DAPI染液,加至标本区;

S7、盖上盖玻片,并吸去周边液体,用于下一步或置于2~8 $^{\circ}$ C或-20 $^{\circ}$ C环境下避光保存;

步骤三、对样本进行镜检观察:将CTC样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,若发现片状或者圈状信号时,切换至高倍镜下进一步鉴定;记录每个阳性细胞的坐标,并且40 $\times$ 物镜分别在不同通道下拍照;必要时可使用油镜观察;将PBMC样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,记录PD-L1或CD8阳性细胞个数和总细胞数;

步骤四、结果判断,具体为:

CTC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性且无血源性白细胞表面抗原荧光信号的有核细胞,记为一个阳性细胞;

CTC阴性细胞:细胞有血源性白细胞表面抗原荧光信号,不论目的蛋白是否有荧光均记为阴性;

PBMC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性并且有完整的细胞核,计为一个阳性细胞;

PBMC阴性细胞:目的蛋白荧光信号阴性,均记为阴性。

4. 如权利要求3所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的检测方法中的CTC检测与荧光原位杂交技术联用,具体步骤为以下任一种:(i)先用免疫荧光检测再进行荧光原位杂交;(ii)先用荧光原位杂交再进行免疫荧光检测;(iii)同时进行免疫荧光检测和荧光原位杂交。

5. 如权利要求3或4所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的检测方法还包括使用修复方法对样品进行处理的步骤,所述的修复方法包或酶消化修复、EDTA修复、高压修复或微波修复。

6. 如权利要求5所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的检测方法进一步包含针对PD-L1抗体和白细胞共同抗原CD45对富集的细胞进行免疫荧光检测的步骤。

7. 如权利要求3或4所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的步骤一中的步骤S1中,是使用去除血浆、红细胞、白细胞的阴性富集方法获得各种亚型的CTC;再使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥,使用固定剂固定细胞及抗原。

8. 如权利要求3或4所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法,其特征在于,所述的步骤一中的步骤S2,是采用如下方法:

(1) 取外周血0.5ml,加入0.5ml 1 $\times$ PBS,吹打混匀;

(2) 取0.5ml淋巴细胞分离,将混匀后的外周血轻轻叠加到淋巴细胞分离上层;

(3) 离心1500rpm,5min;

(4) 小心吸取离心后的白膜层,尽可能将所有细胞都回收,但不要混入红细胞沉淀;

- (5) 补加10ml 1×PBS, 颠倒混匀后, 离心1500rpm, 5min;
- (6) 弃上清, 用0.5ml 1×PBS重悬, 吹打混匀后, 血球计数板计数, 适当稀释后涂片;
- (7) 使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥;
- (8) 使用固定剂固定细胞及抗原。

9. 如权利要求8所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法, 其特征在于, 所述的固定剂选自乙醇、甲醇、福尔马林、丙酮、冰醋酸、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、丙烯醛、苦味酸、PLP液或ECD-G液。

10. 如权利要求3或4所述的一种PD-L1和CD8抗原检测的检测方法, 其特征在于, 所述步骤四的结果判断过程中的排除标准为若细胞核碎裂无法确定是单个细胞, 多个细胞核聚集则不能记为一个阳性细胞。

## 一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种医学检测方法,尤其涉及体液中的癌细胞的检测和PBMC中免疫相关细胞的检测,具体涉及循环肿瘤细胞中程序性死亡配体(programmed death-ligand 1, PD-L1)抗原免疫荧光检测和PBMC中PD-L1和CD8比例检测的试剂盒,适用于不同类型样本PD-L1和CD8检测,还涉及该试剂盒在检测PD-L1和CD8中的应用方法。

### 背景技术

[0002] 目前,癌症发病率较高,严重威胁人类健康。有些癌症较难早期发现,诊断时多为晚期,如肺癌,结直肠癌,卵巢癌,胰腺癌等。相应的,晚期癌症的5年存活率显著低于早期患者,早发现早诊断精准治疗可显著延长患者的存活时间。

[0003] 共刺激分子是一类参与免疫反应的辅助分子,它既包括促进T细胞增殖的正性分子,也包括诱导和维持T细胞免疫耐受以至凋亡的负性分子。程序性死亡因子(programmed death-1,PD-1)与其配体PD-L1(programmed death-ligand 1,又称B7-H1)构成的共刺激途径对淋巴细胞的活化具有重要的调节功能,通过与受体PD-1结合抑制T细胞的增值和过度活化,在细胞免疫应答过程中起负调控作用,同时通过影响细胞因子的分泌对体液免疫也发挥了调控作用。PD-L1/PD1路径在机体自身免疫耐受和肿瘤细胞逃逸机体免疫监控过程中都发挥着重要作用。肿瘤细胞表面结构上相似于免疫球蛋白的分子B7-H1(又称PD-L1),在肿瘤微环境中大量表达可抑制淋巴细胞对肿瘤的杀伤。用特异性抗体封闭PD-1/PD-L1结合可增强免疫反应,基于这个原理设计的用于阻断PD-1和PD-L1结合的抗体治疗(简称抗PD治疗)已经在成千上万的癌症病人身上使用,并证实,在十余种晚期癌症,包括肺癌、肾癌、黑色素瘤、头颈癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、胃癌、食管癌、脑胶质瘤、结肠癌、何杰金氏淋巴瘤等有显著疗效,PD治疗是目前最有效的免疫治疗方法。

[0004] 根据肿瘤组织微环境中浸润免疫细胞的有无或多少可以将其分为有免疫源性的肿瘤(immunogenic tumor,即热肿瘤)和无免疫源性的肿瘤(non-immunogenic tumor,即冷肿瘤),研究认为在热肿瘤中存在免疫细胞,但由于肿瘤细胞PD-L1的表达抑制了T细胞的杀伤作用。采用免疫监测点抑制剂治疗,可解除免疫细胞的免疫抑制,使之能够对肿瘤细胞进行杀伤。对这类患者,单独使用PD-1/PD-L1抗体的有效率较高,生存期更长。而对那些肿瘤组织中没有或者只有很少免疫细胞的“冷”肿瘤患者,免疫监测点抑制剂的疗效不佳,即使封闭了肿瘤细胞上PD-L1分子,也因为缺少相应的免疫细胞而不能对肿瘤组织进行有效的杀伤,需要联合其他治疗方可使免疫细胞聚集于肿瘤组织中。

[0005] 目前肿瘤诊断主要依赖于病理学、影像学和血清学三种方法。病理学是肿瘤诊断的金标准,但是组织取样具有一定的创伤性,且受限于取材部位,同时由于肿瘤组织的异质性,单点组织取样不足以反应整体肿瘤状态,且难以重复取样动态监测。影像学方法在诊断肿瘤中作用较广泛,但是影像学一般存在辐射伤害。而且,影像学通常只反应肿瘤大小等信息,难以判断肿瘤的恶性程度。更重要的一点,影像学通常只能检测2mm以上的肿瘤组织,对于较小的肿瘤组织诊断敏感性较差,存在滞后性。血清学目前通常用于辅助判断癌症治疗

疗效等信息,取样较为方便,但是灵敏度和特异性较差,且与病理生理相关性差。同样的,在治疗方面,目前临床上也存在一定的局限性。对于肿瘤患者,特别是发生转移的患者,目前通常只依据原发灶的信息来判断治疗方案,忽略了对转移灶甚至微转移灶的检测与治疗。治疗过程中,目前主要通过影像学或血清学来判断治疗疗效,在疗效判断的精准性等方面存在一定的局限。

[0006] 目前,PD-L1表达水平的检测主要是通过免疫组织化学方法,由于存在肿瘤异质性和微小转移灶不可见的原因,原位癌组织中PD-L1检测并不能直接反映体液及转移灶中PD-L1的水平。组织中PD-L1的检测是在组织切片上进行的,单张片子并不能反映患者整体的PD-L1表达水平。并且肿瘤患者单纯PD-L1表达水平的检测,并不能准确反映患者接受PD治疗的效果。

[0007] 因此迫切需要一种新的方法,对肿瘤患者整体PD-L1表达水平和患者免疫细胞状态进行检测,联合二者检测结果用于预测患者对PD治疗的作用,为疾病治疗方案的选择提供参考,更好的指导临床应用。循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell,CTC)中PD-L1的检测联合PBMC中PD-L1和CD8的检测可为上述局限性提供一些解决方案。CTC是指在肿瘤形成或进展过程中从原发灶或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞,CTC的检出提示体内原发灶或转移灶的存在,或癌前病变细胞的存在,是转移病灶形成的“种子”细胞,是肿瘤发生发展的直接证据。近年来不断有证据显示:在肿瘤发生发展的早期,甚至是影像学可见病灶形成之前肿瘤就播散入血了,这种播散可能存在于肿瘤发展的整个过程中。所以,对CTC进行检测有利于早期发现肿瘤、辅助诊断或为选择治疗方案提供参考。同时,联合CTC中PD-L1表达水平和PBMC中PD-L1和CD8比例的动态检测可了解患者对治疗药物的敏感性,及早发现耐药信号。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的是为了解决现有技术中尚无采用免疫荧光方法同时检测CTC中PD-L1表达水平和PBMC中PD-L1和CD8阳性细胞比例的问题,提出一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用方法。

[0009] 为实现上述目的,本发明采用了如下技术方案:

[0010] 一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒,包括以下试剂组分:

[0011]

名称	数量	单位	总体积/质量
CYP1缓冲液	1	瓶	80ml
CYP2缓冲液	1	瓶	15ml
CYPP缓冲液	1	管	4.5ml
封闭液	1	管	3ml
PD-L1抗体	1	管	200 $\mu$ l
CD8抗体	1	管	100 $\mu$ l
CD45抗体	1	管	200 $\mu$ l
荧光二抗	1	管	200 $\mu$ l
抗体稀释液	1	管	3ml
染色液	1	管	300 $\mu$ l

[0012] 其中,所述的CYP1缓冲液为0.01M PBS加纯化水充分搅拌溶解调节pH至7.20-7.40后分装;

[0013] 所述的CYP2缓冲液是在0.01M PBS溶液中加入0.1% Triton X-100、0.5% Trehalose,充分搅拌溶解后分装;

[0014] 所述的CYPP缓冲液是在0.01M PBS溶液中加入0.2% Triton X-100,充分搅拌溶解后分装;

[0015] 所述的封闭液含PBS和BSA或者选用动物血清、0.5%~10%BSA或Fc受体抗体;

[0016] 所述的PD-L1抗体为PD-L1抗体的10倍浓缩液,分装于1.5ml棕色避光管;

[0017] 所述的CD8抗体为Alexa Fluor® 594标记的CD8抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

[0018] 所述的CD45抗体为Alexa Fluor® 647标记的CD45抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

[0019] 所述的荧光二抗为Alexa Fluor® 488标记的荧光二抗,分装于1.5ml棕色避光管;

[0020] 所述的抗体稀释液含Tris-HCl缓冲液、牛血清白蛋白;

[0021] 所述的染色液为取DAPI粉末,用超纯水稀释后加入抗淬灭剂ThermoFisher, ProLong®分装;或者为Hoechst或碘化丙啶。

[0022] 优选的,所述的缓冲液CYP1、CYP2、CYPP中含有表面活性剂和蛋白保护剂,表面活性剂可以采用0~10%的Triton X-100、saponin、Tween、NP-40、SDS或聚乙二醇;所述的蛋白保护剂可采用0~10%的BSA、海藻糖(Trehalose)或蔗糖。

[0023] 根据本发明的另一目的,本发明的应用上述的试剂盒进行PD-L1和CD8抗原检测的方法包括如下步骤:

[0024] 步骤一、CTC富集和PBMC涂片,具体操作步骤为:

[0025] S1、取血液和其他体液样品,对其中的CTC进行富集;

[0026] S2、取外周血,对其中的PBMC进行分离和涂片;

[0027] 步骤二、将富集的CTC和PBMC细胞涂片进行免疫荧光检测,具体检测方法步骤如下:

[0028] S1、CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;

[0029] S2、吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min×3次;吸去多余液体,加100~150μl封闭液室温封闭20~30min;

[0030] S3、吸去多余封闭液,加100μl稀释好的PD-L1抗体和CD45抗体或CD8抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;其中CTC进行PD-L1+CD45抗体孵育,PBMC细胞涂片分别进行CD8和PD-L1+CD45抗体孵育;

[0031] S4、避光,取CYP2 100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;

[0032] S5、加100μl稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育;37℃,25~30min或室温30~60min;CYP2洗3min×4次,吸去多余水分;

[0033] S6、复染:取10μL DAPI染液,加至标本区;

[0034] S7、盖上盖玻片,并吸去周边液体,用于下一步或置于2~8℃或-20℃环境下避光保存;

[0035] 步骤三、对样本进行镜检观察:将CTC样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,若发现片状或者圈状信号时,切换至高倍镜下进一步鉴定;记录每个阳性细胞的坐标,并且40×物镜分别在不同通道下拍照;必要时可使用油镜观察;将PBMC样本置于荧光显微镜下,扫

描整个标本区,记录PD-L1或CD8阳性细胞个数和总细胞数;

[0036] 步骤四、结果判断,具体为:

[0037] CTC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性且无血源性白细胞表面抗原荧光信号的有核细胞,记为一个阳性细胞;

[0038] CTC阴性细胞:细胞有血源性白细胞表面抗原荧光信号,不论目的蛋白是否有荧光均记为阴性;

[0039] PBMC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性并且有完整的细胞核,计为一个阳性细胞;

[0040] PBMC阴性细胞:目的蛋白荧光信号阴性,均记为阴性。

[0041] 优选的,所述的检测方法中的CTC检测与荧光原位杂交技术联用,具体步骤为以下任一种:(i)先用免疫荧光检测再进行荧光原位杂交;(ii)先用荧光原位杂交再进行免疫荧光检测;(iii)同时进行免疫荧光检测和荧光原位杂交。

[0042] 再优选的,所述的检测方法还包括使用修复方法对样品进行处理的步骤,所述的修复方法包或酶消化修复、EDTA修复、高压修复或微波修复。

[0043] 再优选的,所述的检测方法进一步包含针对PD-L1抗体和白细胞共同抗原CD45对富集的细胞进行免疫荧光检测的步骤。

[0044] 再优选的,所述的步骤一中的步骤S1中,是使用去除血浆、红细胞、白细胞的阴性富集方法获得各种亚型的CTC;再使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥,使用固定剂固定细胞及抗原;

[0045] 再优选的,所述的步骤一中的步骤S2,是采用如下方法:

[0046] (1)取外周血0.5ml,加入0.5ml 1×PBS,吹打混匀;

[0047] (2)取0.5ml淋巴细胞分离,将混匀后的外周血轻轻叠加到淋巴细胞分离上层;

[0048] (3)离心1500rpm,5min;

[0049] (4)小心吸取离心后的白膜层,尽可能将所有细胞都回收,但不要混入红细胞沉淀;

[0050] (5)补加10ml 1×PBS,颠倒混匀后,离心1500rpm,5min;

[0051] (6)弃上清,用0.5ml 1×PBS重悬,吹打混匀后,血球计数板计数,适当稀释后涂片;

[0052] (7)使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥;

[0053] (8)使用固定剂固定细胞及抗原。

[0054] 再优选的,所述的固定剂选自乙醇、甲醇、福尔马林、丙酮、冰醋酸、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、丙烯醛、苦味酸、PLP液或ECD-G液。

[0055] 再优选的,所述步骤四的结果判断过程中的排除标准为若细胞核碎裂无法确定是单个细胞,多个细胞核聚集则不能记为一个阳性细胞。

[0056] 现有技术相比,本发明的有益效果为:

[0057] 1.与现有技术根据肿瘤组织中蛋白表达情况来指导用药相比,本发明的检测结果可以对实际用药进行指导,不仅能够反映整体肿瘤,包括原位癌和可能存在的不可见的微小转移灶负荷,同样可以反映CTC中PD-L1的表达情况;同时,根据PBMC中PD-L1和CD8阳性细胞比例,可以为治疗药物的精准选择提供参考;

[0058] 2.与现有技术对肿瘤组织中PD-L1进行免疫组化检测相比,对CTC中PD-L1细胞进

行计数和表达量的区分,能够更精准的反映PD-L1与临床参数的相关性和指导用药;

[0059] 3.与现有技术相比较,本研究所采用的样本是血液来源的细胞,在取材上比基于肿瘤组织的检测技术更加方便。

### 附图说明

[0060] 图1为同一样品的3种荧光显示图,分别为PD-L1、白细胞通用抗原CD45、细胞核染料DAPI、合图。

### 具体实施方式

[0061] 为使对本发明的目的、构造、特征、及其功能有进一步的了解,兹配合实施例详细说明如下。

[0062] 本发明的检测原理为,首先采用已知的方法富集循环肿瘤细胞和其他稀有细胞,其中所述富集方法可以采用中国专利200810097889.4、201310057307.0、2015104411229中描述的方法;然后根据抗原抗体反应原理,采用已知的免疫荧光检测方法,检测富集的细胞中目的蛋白的表达。本发明的试剂盒通过对靶标细胞和白细胞共同抗原CD45进行荧光标记,通过筛选目的蛋白阳性、CD45阴性的细胞,从而对血液中特定蛋白阳性的CTC进行判读和计数。在此基础上,将靶蛋白阳性、CD45阴性的候选非体液性稀有有核细胞按照目的蛋白荧光强度将其表达按照高、中、低表达进行分类。

[0063] 但将免疫荧光检测方法用于检测CTC中PD-L1表达在实践中遇到诸多困难,比如细胞容易从玻片脱落、荧光较弱、非特异染色、基质背景高等;同时如何在本发明的试剂盒中快速准确的检测患者免疫系统活化状态也是需要解决的难点。本发明经过多次筛选研究,最终得到一种适合的方法,解决了上述困难,同时与实践过程中进行验证,本发明的检测结果和现有技术相比检测精度和准确率大大提高。

[0064] 具体来讲,应用本发明的试剂盒进行PD-L1和CD8抗原检测的应用方法包括如下步骤:

[0065] 步骤一、CTC富集和PBMC涂片,具体操作步骤为:

[0066] S1、取血液和其他体液样品,对其中的CTC可进行富集:其中所述富集方法可任选任何一种CTC的分离富集方法,比如红细胞去除、阴性富集、阳性富集、密度梯度分离法、膜过滤法、微流控法或流式细胞技术等;也可以不经富集将血标本涂于多张载玻片;其中所述CTC是指在肿瘤形成和进展过程中从原发灶或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞,通常使用流式细胞仪分选、磁珠阳性分选方法富集得到,优选的使用阴性富集方法得到;在一优选的实施方式中,是使用去除血浆、红细胞、白细胞的阴性富集方法获得各种亚型的CTC;使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥;使用固定剂固定细胞及抗原;

[0067] S2、取外周血,对其中的PBMC进行分离和涂片:其中所述PBMC是指外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell),包含淋巴细胞、单核细胞等,可通过淋巴细胞分离液分离得到;在一优选的实施方式中,是采用如下方法:

[0068] (1)取外周血0.5ml,加入0.5ml 1×PBS,吹打混匀;

[0069] (2)取0.5ml淋巴细胞分离液,将混匀后的外周血轻轻叠加到淋巴细胞分离液上层;

[0070] (3)离心1500rpm,5min;

- [0071] (4) 小心吸取离心后的白膜层,尽可能将所有细胞都回收,但不要混入红细胞沉淀;
- [0072] (5) 补加10ml 1×PBS,颠倒混匀后,离心1500rpm,5min;
- [0073] (6) 弃上清,用0.5ml 1×PBS重悬,吹打混匀后,血球计数板计数,适当稀释后涂片;
- [0074] (7) 使用室温或室温20%恒湿条件使玻片自然干燥;
- [0075] (8) 使用固定剂固定细胞及抗原。
- [0076] 富集后的样本采用固定液固定,所述固定液选自:乙醇、甲醇、福尔马林、丙酮、冰醋酸、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、丙烯醛、苦味酸、PLP液(过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液)、ECD-G液(碳二亚酰胺-戊二醛)等。
- [0077] 步骤二、将富集的CTC和PBMC细胞涂片进行免疫荧光检测,具体检测方法步骤如下:
- [0078] S1、CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;
- [0079] S2、吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min×3次;吸去多余液体,加100~150μl封闭液室温封闭20~30min;
- [0080] S3、吸去多余封闭液,加100μl稀释好的PD-L1抗体和CD45抗体或CD8抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;其中CTC进行PD-L1+CD45抗体孵育,PBMC细胞涂片分别进行CD8和PD-L1+CD45抗体孵育;
- [0081] S4、避光,取CYP2 100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;
- [0082] S5、加100μl稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育;37℃,25~30min或室温30~60min;CYP2洗3min×4次,吸去多余水分;
- [0083] S6、复染:取10μL DAPI染液,加至标本区;
- [0084] S7、盖上盖玻片,并吸去周边液体,用于下一步或置于2~8℃或-20℃环境下避光保存。
- [0085] 步骤三、对样本进行镜检观察:将CTC样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,若发现片状或者圈状信号时,切换至高倍镜下进一步鉴定;记录每个阳性细胞的坐标,并且40×物镜分别在不同通道下拍照;必要时可使用油镜观察;将PBMC样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,记录PD-L1或CD8阳性细胞个数和总细胞数。
- [0086] 步骤四、结果判断,具体为:
- [0087] CTC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性且无血源性白细胞表面抗原荧光信号的有核细胞,记为一个阳性细胞;
- [0088] CTC阴性细胞:细胞有血源性白细胞表面抗原荧光信号,不论目的蛋白是否有荧光均记为阴性;
- [0089] PBMC阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性并且有完整的细胞核,计为一个阳性细胞;
- [0090] PBMC阴性细胞:目的蛋白荧光信号阴性,均记为阴性。
- [0091] 排除标准:若细胞核碎裂无法确定是单个细胞,或者是多个细胞核聚集则不能记为一个阳性细胞。
- [0092] 以上步骤中,需要使用到荧光素,其可以直接标记在抗体上或者通过荧光标记的第二抗体进行检测;标记抗体的荧光素具有不同的发射光谱,优选绿色荧光(如Alexa

Fluor 488)、红色(如Alexa Fluor 594)或深红色荧光(如Alexa Fluor 647)的组合;标记抗体的荧光素不限于Alexa Fluor系列荧光素,同样可以采用Dylight、华青染料、异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、生物素(biotin)、量子点、Texas Red、藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(APC)、罗丹明(rhodamine)等系列的荧光素标记抗体,或者不同系列的荧光素标记抗体联用。

[0093] CD45抗体是针对白细胞通用抗原的抗体,用于排除血源性细胞,也可以选自以下细胞表面抗原的抗体:CD3、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD34、CD35、CD36、CD38、CD41、CD58、CD61、CD66b、CD235a;在组织或者细胞系上进行免疫荧光检测可以省略CD45抗体。

[0094] 另外,本发明的CTC检测方法可以与荧光原位杂交(FISH)技术联用,步骤为以下任一种:(i)先用免疫荧光检测再进行荧光原位杂交;(ii)先用荧光原位杂交再进行免疫荧光检测;(iii)同时进行免疫荧光检测和荧光原位杂交。

[0095] 本发明的检测过程使用的缓冲液CYP1、CYP2、CYPP中含有表面活性剂和蛋白保护剂,这些表面活性剂可以采用0~10%的Triton X-100、saponin、Tween、NP-40、SDS、聚乙二醇;蛋白保护剂可采用0~10%的BSA、海藻糖(Trehalose)、蔗糖;在一优选的实施方式中,本检测过程使用的封闭液也可以选用:动物血清、0.5%~10%BSA、Fc受体抗体;在一优选的实施方式中,本检测过程可使用修复方法对样品进行处理,包含酶消化修复、EDTA修复、高压修复、微波修复等。

[0096] 本检测过程使用的核染料不限于DAPI,同样可以采用Hoechst、碘化丙啶等;免疫荧光检测中特异抗体与细胞的孵育过程可分为液体染色和固体染色,液体染色是将细胞制备成细胞悬液,在悬液中进行细胞透化、抗体孵育等操作,然后将细胞转移至载玻片固定、封片;而固体染色是先将细胞转移至载玻片固定,再进行细胞透化、抗体孵育等操作。

[0097] 本发明的检测方法的关键部分在于步骤二的步骤S3使用抗体的组合,为此本发明进一步包含针对PD-L1抗体和白细胞共同抗原CD45对富集的细胞进行免疫荧光检测,采用针对PD-L1和CD8抗体对PBMC细胞涂片进行免疫荧光检测。本发明的免疫荧光检测方法的核心在于加入针对PD-L1+CD45的抗体组合对CTC进行检测,加入针对PD-L1和CD8的抗体分别对PBMC细胞涂片进行检测,在检测结果方面产生了极大的变化,使之完全不同于现有的方法。这些变化表现在:1)分别通过CTC中PD-L1的检测,反映患者转移性肿瘤整体的状态和PD-L1+CTC水平,通过PBMC中PD-L1和CD8的检测,反映患者免疫系统活化状况。联合二者检测结果,对患者进行PD治疗的疗效进行预测,指导患者用药;2)CTC检测中采用CD45抗体排除血源性细胞的干扰;3)通过对CTC染色结果进行分析,可以将CTC中PD-L1阳性细胞分为高、中、低表达亚型,结果更加精确;

[0098] 本发明的检测方法的步骤二中将富集的CTC进行免疫荧光检测,其中的检测方法是本发明人经过多次实验和数据筛选获得的,有关条件的筛选过程如下:

[0099] 步骤二的步骤S2中,吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,加100~150 $\mu$ l封闭液室温封闭20~30min;

[0100] 筛选过程如下(穿透试剂与封闭时间):

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4	
[0101]	条件 1	穿透液类型	0.25% Triton X-100	0.3% saponin	0.2% NP-40	0.2% Tween 20
	条件 2	穿透剂浓度	0.1% Triton X-100	0.2% Triton X-100	0.3% Triton X-100	0.5% Triton X-100
	条件 3	穿透剂浓度	0.1% saponin	0.2% saponin	0.3% saponin	0.5% saponin
	条件 4	穿透剂浓度	0.05% NP-40	0.1% NP-40	0.2% NP-40	0.25% NP-40
	条件 5	穿透剂浓度	0.05% Tween 20	0.1% Tween 20	0.2% Tween 20	0.25% Tween 20
	条件 6	封闭液时间	10min	20min	30min	60min

[0102] 步骤二的步骤S3中,加100~150 $\mu$ l稀释好的PD-L1抗体和CD45抗体或CD8抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;

[0103] 筛选过程(抗体孵育、清洗条件)如下:

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4	
[0104]	条件 1	抗体浓度	5 $\mu$ g/ml	10 $\mu$ g/ml	15 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
	条件 2	抗体孵育温度	4 $^{\circ}$ C	15 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C
	条件 3	抗体孵育时间	30 min	60 min	120 min	过夜(12~16 h)
[0105]	条件 4	洗片液	0.1% Trehalose	0.2% Trehalose	0.5% Trehalose	1% Trehalose

[0106] 步骤二中的步骤S5中加100~150 $\mu$ L稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育,37 $^{\circ}$ C,25~30min或室温,30~60min;

[0107] 筛选过程如下(抗体孵育、清洗条件):

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4	
[0108]	条件 1	抗体浓度	1 $\mu$ g/ml	2 $\mu$ g/ml	4 $\mu$ g/ml	8 $\mu$ g/ml
	条件 2	抗体孵育温度	4 $^{\circ}$ C	15 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	35 $^{\circ}$ C
	条件 3	抗体孵育时间	30min	60min	120min	过夜 (12~16 h)
	条件 4	洗片液	0.1% Trehalose	0.2% Trehalose	0.5% Trehalose	1% Trehalose

[0109] 经过上述筛选,得到本发明的涂片条件和方法,所得结果检测精度和准确率大大提高。

[0110] 为进行上述免疫荧光检测,本发明设计了一种便于操作的试剂盒,所述试剂盒中包括了上述免疫荧光检测步骤中的主要试剂,具体包括以下试剂:缓冲液CYP1、CYP2、CYPP、封闭液、检测PD-L1的特异性抗体以及相应的荧光二抗、荧光标记的CD45抗体、荧光标记的CD8抗体、抗体稀释液、细胞核染色液;操作过程中所涉及的对照细胞可以包含或者不包含在试剂盒中。

[0111] 在一优选的实施方式中,本发明所述试剂盒优选以下组分:

名称	数量	单位	总体积/质量
CYP1	1	瓶	80ml
CYP2	1	瓶	15ml
CYPP	1	管	4.5ml
封闭液	1	管	3ml
PD-L1 抗体	1	管	200 $\mu$ l
CD8 抗体	1	管	100 $\mu$ l
CD45 抗体	1	管	200 $\mu$ l
荧光二抗	1	管	200 $\mu$ l
抗体稀释液	1	管	3ml
DAPI	1	管	300 $\mu$ l

[0114] 上述试剂盒中的试剂名称术语及其分配比,配制方法详述如下:

[0115] CYP1:缓冲液,0.01M PBS,纯化水充分搅拌溶解,调节pH至7.20-7.40后分装;

[0116] CYP2:缓冲液,0.01M PBS中含0.1%Triton X-100、0.5%Trehalose,在0.01M PBS溶液中加入0.1%Triton X-100、0.5%Trehalose,充分搅拌溶解后分装;

[0117] CYPP:缓冲液,0.01M PBS中含0.2%Triton X-100,在0.01M PBS溶液中加入0.2%

Triton X-100,充分搅拌溶解后分装;

[0118] 封闭液:分装的封闭液,含PBS、BSA;

[0119] PD-L1抗体:PD-L1抗体的10倍浓缩液,分装于1.5ml棕色避光管;

[0120] CD8抗体:AlexaFluor®594标记的CD8抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

[0121] CD45抗体:AlexaFluor®647标记的CD45抗体,分装于1.5ml棕色避光管;

[0122] 荧光二抗:AlexaFluor®488标记的荧光二抗,分装于1.5ml棕色避光管;

[0123] 抗体稀释液:抗体稀释液,含Tris-HCl缓冲液、牛血清白蛋白;

[0124] DAPI:染色液,取DAPI粉末(4',6'-二脒基-2-苯基吲哚,4',6'-diamidino-2-phenylindole,Sigma公司产品),用超纯水稀释后加入抗淬灭剂(ThermoFisher,ProLong®)分装;

[0125] 本试剂盒中PD-L1抗体识别PD-L1蛋白序列,其中PD-L1蛋白序列属于已知序列,公开在Dong H,Zhu G,Tamada K,Chen L.B7-H1,a third member of the B7family,co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion.Nat Med.1999Dec;5(12):1365-9.文献中名称为B7-H1。

[0126] 本试剂盒中CD8抗体识别CD8蛋白序列,其中CD8蛋白序列属于已知序列,公开在Littman DR,Thomas Y,Maddon PJ,Chess L,Axel R.The isolation and sequence of the gene encoding T8:a molecule defining functional classes of T lymphocytes.Cell.1985Feb;40(2):237-46.文献中名称为T8。

[0127] 本发明的试剂盒主要用于CTC,也可应用于细胞片如涂片/爬片、组织的免疫荧光检测等;本发明的试剂盒,可以适用于多种癌症细胞的检测,所述癌症可包括以下至少一种:乳腺癌、食管癌、胃癌、结肠癌、肺癌、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌、脑癌、皮肤癌、直肠癌、肉瘤、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、淋巴瘤、宫颈癌、外阴癌、黑素瘤、间皮瘤、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨癌、癌、肉瘤和软组织癌。

[0128] 结合本发明的检测方法与现有技术的异同点及具体实施方式及实验数据对本发明的有益效果进行详细叙述如下:

[0129] 实施例1:

[0130] 材料:阴性富集的血液CTC涂片、密度梯度离心的PBMC涂片。

[0131] 实验步骤:

[0132] 1.抽取3.5ml外周血于ACD(柠檬酸钠)抗凝管中;用Cytte1的人外周血白细胞去除试剂盒阴性富集肿瘤细胞,采用试剂盒中CS3密度梯度离心获得PBMC,并固定于载玻片;

[0133] 2.CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;

[0134] 3.吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min×1次;吸去多余液体,加100~150μl封闭液室温封闭25~30min;

[0135] 4.吸去多余封闭液,分别加100μl稀释好的PD-L1抗体+CD45抗体和CD8抗体,室温湿盒内避光孵育1.5~2h;

[0136] 5.避光,取CYP2 100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;

[0137] 6.PD-L1检测片子加入100μl稀释好的二抗,湿盒内避光孵育37℃,25~30min;CYP2洗3min×4次,吸去多余水分;

[0138] 7.复染:将DAPI管瞬时离心后,液面处取10μL DAPI染液,加至标本区;

[0139] 8. 盖片: 盖上盖玻片, 镜下观察, 将CTC样本中PD-L1表达阳性、CD45抗体阴性的细胞视为阳性细胞(参见图1), 并记录PBMC涂片中PD-L1和CD8阳性细胞的比例。

[0140] 结果说明:

[0141]	CTC 中 PD-L1+CD45-细胞			PBMC 检测		
	+++	++	+	阳性总数	CD8+细胞比例	PD-L1+细胞比例
	1	2	1	4	23%	35%

[0142] 实施例2:

[0143] 材料: 适量抗凝血液1管, 采用膜过滤方法富集后对其进行蛋白检测。

[0144] 实验步骤:

[0145] 1. 抽取适量外周血放入含有抗凝剂采血管中, 轻微震荡混匀;

[0146] 2. 将混悬液加入膜过滤分离肿瘤细胞技术装置中, 缓慢通过滤器和滤膜;

[0147] 3. 待过滤完毕后, 继续在膜过滤装置中加入50ml 0.01M PBS, 将管壁周围附着的细胞混悬液冲入膜过滤装置内, 让其通过滤器和滤膜;

[0148] 4. 固定滤膜上的细胞;

[0149] 5. 同实施例1操作检测蛋白。

[0150] 实施例3:

[0151] 材料: 适量抗凝血液1管, 采用微流控方法富集后对其进行蛋白检测。

[0152] 实验步骤:

[0153] 1. 抽取的适量血液采用各种原理的微流控芯片进行富集;

[0154] 2. 富集后样本进行蛋白免疫荧光检测。

[0155] 实施例4:

[0156] 材料: 冰冻组织切片

[0157] 实验步骤:

[0158] 1. 由冰冻切片机中取出载有切片的载玻片, 放入湿盒中;

[0159] 2. 待载玻片达到室温且未干时, 加CYP1于切片上洗载玻片3-5次;

[0160] 3. 吸去多余液体, 加CYPP孵育, CYP1洗片;

[0161] 4. 吸去多余液体, 加封闭液室温封闭;

[0162] 5. 吸去多余封闭液, 加稀释好的PD-L1抗体, 室温避光孵育适当时间;

[0163] 6. 避光, CYP2洗片, 吸去多余水分;

[0164] 7. 加稀释好的二抗, 避光孵育适当时间;

[0165] 8. CYP2洗片, 吸去多余水分;

[0166] 9. 加10 $\mu$ l DAPI, 封片镜检; 根据细胞形态和PD-L1表达判断是否为阳性细胞; 组织切片检测时, 可另外抽血进行PBMC中PD-L1和CD8细胞比例的检测。

[0167] 实施例5:

[0168] 材料: 阴性富集的血液CTC涂片, Cytte1荧光原位杂交试剂盒

[0169] 实验步骤:

[0170] 1. 富集后的CTC涂片采用37 $^{\circ}$ C预热的2 $\times$ SSC洗涤;

[0171] 2. 梯度乙醇脱水;

- [0172] 3.在载玻片上滴加10 $\mu$ l的荧光探针,盖上盖玻片,四周加封片胶封片;
- [0173] 4.杂交,76 $^{\circ}$ C变性10min,37 $^{\circ}$ C杂交1.5h;
- [0174] 5.撕去封片胶,在43 $^{\circ}$ C预热的甲酰胺中甩掉盖玻片;
- [0175] 6.依次采用预热的甲酰胺和2 $\times$ SSC洗涤;
- [0176] 7.按照实施例1步骤进行免疫荧光检测;
- [0177] 8.显微镜读片,分别记录FISH信号多体、CD45表达阴性的细胞和目的蛋白表达阳性、CD45表达阴性的细胞。
- [0178] 实施例6:
- [0179] 材料:阴性富集的血液CTC涂片,Cyttl1荧光原位杂交试剂
- [0180] 实验步骤:
- [0181] 1.按照实施例1进行免疫荧光检测,读片;
- [0182] 2.免疫荧光检测后在2 $\times$ SSC中甩去盖玻片,按照实施例5进行FISH杂交;
- [0183] 3.FISH杂交、洗涤后,DAPI封片,镜检,分别记录FISH信号多体、CD45表达阴性的细胞和目的蛋白表达阳性、CD45表达阴性的细胞。
- [0184] 本发明的检测方法,与现有技术相比,其优点如下:
- [0185] 1、本发明的检测方法运用抗体检测异常细胞表达的抗原,运用白细胞通用抗原CD45排除正常血细胞,与现有技术的免疫组织化学技术运用抗体检测异常细胞表达的抗原,用形态学鉴别是否为异常细胞相比,对于一些表达靶标抗原而形态改变不明显的细胞,免疫组化方法常无法确定是否为异常细胞;如果将表达该抗原的正常细胞记为阳性可造成假阳性;如果将表达该抗原而细胞形态改变不明显的异常细胞记为阴性,可能造成假阴性;
- [0186] 2、本发明的检测方法可运用标记的荧光二抗放大检测信号,与现有技术的免疫组织化学技术可运用标记的酶标二抗放大检测信号相比,荧光标记可将检测靶抗原和CD45的抗体标记为不同颜色,从而通过颜色排除正常血液细胞,酶标抗体仅为单色;另外荧光抗体需要在荧光显微镜下观察,而酶标记二抗是在光镜下观察;
- [0187] 3、本发明的检测方法用荧光抗体检测特定抗原,与现有的用荧光抗体检测特定抗原相比,本发明在洗片溶液中加入保护抗原的海藻糖(Trehalose),提高了蛋白的荧光强度;本发明检测异常体液细胞时可联合富集技术,以最大程度去除正常细胞;本发明除了检测血液中的肿瘤细胞,还可检测其他体液中的肿瘤细胞;另外,本发明将CTC与特定蛋白的免疫检测联合,能够反应肿瘤患者原发灶和/或转移灶靶蛋白的表达状况;
- [0188] 4、本发明的检测方法检测CTC时上游联合了富集技术,固定时间短;而现有技术的免疫组织化学技术,上游需要长时间的组织固定和制备蜡块、切片,加抗体前需要进行H2O2处理,以去除HRP标记二抗可能产生的非特异性;本发明的检测方法通常不需要修复,必要时用酶修复,减少了脱片;而免疫组化技术需要微波、高温高压等方法修复抗原且容易脱片;本发明处理步骤更少,操作简单;现有的免疫荧光技术常用于培养细胞、细胞的直接涂片等,而本发明与上游富集技术联用时,需要进行技术探索,如尽量减少两种技术联合时肿瘤细胞的丢失;
- [0189] 5、本发明的检测方法可多种抗体同时孵育,在同一张片子上可以进行多种蛋白的同时检测;而现有技术的免疫组织化学技术只孵育一种抗体;
- [0190] 6、本发明的检测方法可多次采集体液进行检测,而现有技术的免疫组织化学技术

需要手术或影像学方法定位后穿刺针取出组织进行检测;本发明可对患者病情进行动态监测,如根据阳性细胞的降低或升高情况监测肿瘤是否复发、和药物的耐药情况;免疫组化技术由于依赖于组织,而且对机体创伤更大;对于手术切除肿瘤组织的患者,免疫组化技术无法动态监测病情;另外,现有的免疫荧光技术用DAPI染细胞核,本发明在DAPI中加入抗淬灭剂延迟了荧光的淬灭时间,制片后保存时间延长;

[0191] 7、本发明的检测方法采用同一管血,在CTC中PD-L1检测的基础上,分别对PBMC中PD-L1和CD8的阳性细胞比例进行检测,可用于评估患者免疫系统活化状况;联合二者数据,更精准的指导PD治疗;现有技术的免疫组织化学技术未进行相关检测,而现有的免疫荧光技术仅进行单纯的PD-L1检测。

[0192] 本发明的检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用方法与现有技术根据肿瘤组织中蛋白表达情况来指导用药相比,本发明的检测结果可以对实际用药进行指导,不仅能够反映整体肿瘤,包括原位癌和可能存在的不可见的微小转移灶负荷,同样可以反映CTC中PD-L1的表达情况;同时,根据PBMC中PD-L1和CD8阳性细胞比例,可以为治疗药物的精准选择提供参考;与现有技术对肿瘤组织中PD-L1进行免疫组化检测相比,对CTC中PD-L1细胞进行计数和表达量的区分,能够更精准的反映PD-L1与临床参数的相关性和指导用药;另外,本发明的检测方法采用的样本是血液来源的细胞,在取材上比基于肿瘤组织的检测技术更加方便。

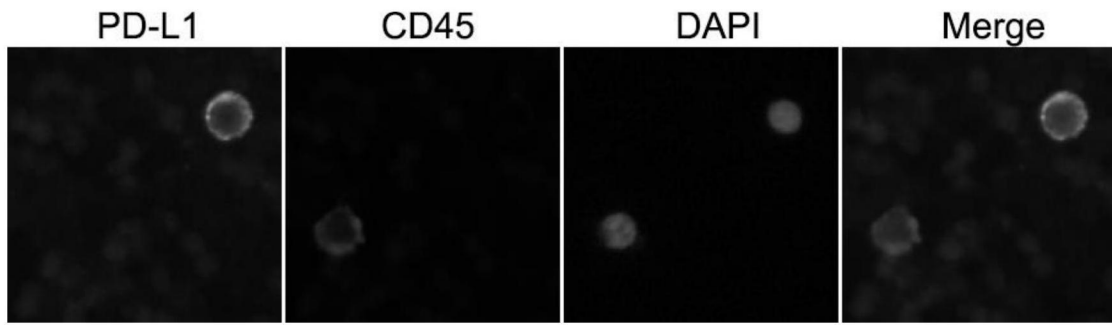


图1

专利名称(译)	一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110632292A</a>	公开(公告)日	2019-12-31
申请号	CN201910504472.3	申请日	2019-06-12
[标]发明人	郭志敏 樊晓婷 郭素杰		
发明人	郭志敏 樊晓婷 郭素杰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57484		
代理人(译)	许益民		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种检测PD-L1和CD8抗原的免疫荧光试剂盒及应用其的检测方法；所述的试剂盒包括以下试剂：缓冲液CYP1、CYP2、CYP3、封闭液、检测PD-L1的特异性抗体以及相应的荧光二抗、荧光标记的CD45抗体、荧光标记的CD8抗体、抗体稀释液、细胞核染色液。本发明还提出应用所述的试剂盒进行抗原检测的方法。本发明的试剂盒检测结果可以对实际用药进行指导，不仅能够反映整体肿瘤，包括原位癌和可能存在的不可见的微小转移灶负荷，同样可以反映CTC中PD-L1的表达情况；根据PBMC中PD-L1和CD8阳性细胞比例，可以为治疗药物的精准选择提供参考；在取材上比基于肿瘤组织的检测技术更加方便。

