



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102313813 A

(43) 申请公布日 2012.01.11

(21) 申请号 201110182666.X

(22) 申请日 2008.05.20

(62) 分案原申请数据

200810097889.4 2008.05.20

(71) 申请人 北京莱尔生物医药科技有限公司

地址 100005 北京市东城区东单北大街1号
楼5层501室

(72) 发明人 林平

(74) 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 吴贵明

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

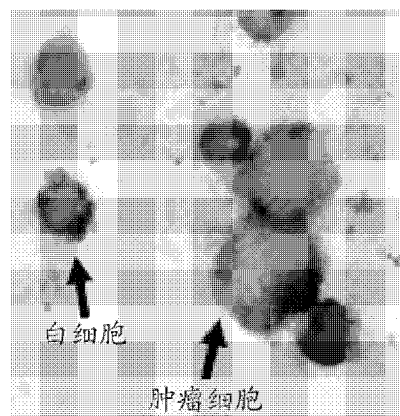
权利要求书 2 页 说明书 8 页 附图 1 页

(54) 发明名称

从生物体液样本中富集与检测稀有细胞的整合方法

(57) 摘要

本发明涉及一种对富集的稀有细胞进行检测的方法,包括进行基于免疫组化的染色与免疫荧光相结合,或基于免疫组化的双色、三色、或多色染色,以及利用荧光或普通光学显微镜或基于显微镜原理的扫描仪进行观察鉴定。本发明新颖独特的富集与染色方法已被证明成本低,且能快速高效及高特异性地富集并定量检测血中的稀有细胞。



1. 一种对富集的稀有细胞进行检测的方法,包括基于免疫组化的染色与免疫荧光相结合,或基于免疫组化的双色、三色、或多色染色,以及利用荧光或普通光学显微镜或基于显微镜原理的扫描仪进行观察鉴定。

2. 根据权利要求 1 的方法,还包括染色体荧光原位杂交。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述双色染色是指对所述稀有细胞的标示物如一种或多种角蛋白,以及白细胞的标示物如 CD45 分别进行染色,所述稀有细胞和所述白细胞被染成不同的颜色;所述三色染色是指在所述双色染色的基础上对所述稀有细胞的细胞核进行另外一种颜色的染色,或对所述稀有细胞的其他标示物进行第三种颜色的染色,所述染色包括将特异性识别所述稀有细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体以及特异性识别所述白细胞的一抗单克隆或多克隆抗体与所述富集的稀有细胞进行孵育。

4. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,所述特异性识别所述稀有细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体以及所述特异性识别所述白细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体分别与不同的小分子相共价偶联,所述小分子选自以下物质:罗丹明、生物素、异羟基洋地黄甙、Alexa Fluor 系列分子、FITC、及 Texas Red,以及类似物质。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其中,所述染色包括加入可特异性识别所述小分子的与不同的酶相偶联的二抗单克隆或多克隆抗体。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,所述偶联的酶是过氧化物酶,或碱性磷酸酶,所述碱性磷酸酶被用于检测所富集的稀有细胞。

7. 根据权利要求 1 所述的方法,还包括联合使用免疫荧光染色与基于免疫组化的染色及可见光下的观察,所述免疫荧光用于检测所述富集的稀有细胞,而所述基于免疫组化的染色则用于白细胞染色。

8. 根据权利要求 3 所述的方法,其中,将抗所述稀有细胞的标示物与抗白细胞的标示物的一抗抗体按任意顺序与所述富集的稀有细胞一起进行孵育,或将两种抗体制成混合液同时与所述富集的稀有细胞进行孵育。

9. 根据权利要求 1 所述的方法,在载玻片上或在溶液中对所述富集的稀有细胞进行染色。

10. 根据权利要求 1 所述的方法,所述稀有细胞或其它细胞既可直接被共价或非共价偶联于任意适宜固体表面的抗体所捕获,也可从生物体液样本中富集。

11. 一种对富集的稀有细胞进行检测的方法,包括进行染色体荧光原位杂交,以及利用荧光或普通光学显微镜或基于显微镜原理的扫描仪进行观察鉴定。

12. 一种用于检测富集的稀有细胞的试剂盒,包括特异性识别所述稀有细胞标示物的共价偶联了小分子的一抗单克隆或多克隆抗体,可识别所述小分子的偶联了酶的二抗单克隆或多克隆抗体以及所述酶的相应底物。

13. 根据权利要求 12 所述的试剂盒,还包括免疫荧光染料标记的抗体。

14. 根据权利要求 12 所述的试剂盒,还包括用于染色体荧光原位杂交的探针及试剂。

15. 根据权利要求 12 至 14 中任一项所述的试剂盒,还包括说明书,用于说明试剂盒的使用。

16. 一种对富集的稀有细胞进行检测的自动化系统,包括基于免疫组化的双色或多色染色的装置,普通光学显微镜或基于显微镜原理的自动扫描装置。

17. 根据权利要求 16 所述的自动化系统,所述染色装置包括自动加样器,孵育器和自动清洗装置。

从生物体液样本中富集与检测稀有细胞的整合方法

[0001] 本申请是在 2008 年 5 月 20 日提交的、发明名称为“从生物体液样本中富集与检测稀有细胞的整合方法”的、申请号为 200810097889.4 的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明主要涉及从生物体液样本中富集与检测稀有细胞的整合方法。

背景技术

[0003] 自从美国国家食品药品监督管理局于 2004 年审批通过美国 Immunicon/Veridex (Philadelphia, USA) 公司的直接捕获人外周血中循环肿瘤细胞的技术后,有关获取及检测循环肿瘤细胞,循环内皮细胞,肿瘤干细胞,以及某些免疫细胞的重要的科研及临床意义已不断的被广泛报道 (Cristofanilli et al, 2004 New Eng J. Med. 351 :781 ;Braun and Marth, 2004 New Eng. J. Med. 351 :824).

[0004] 然而这种利用抗体偶联磁珠直接捕获循环肿瘤细胞的方法有着尽人皆知的缺点 (Mocellin et al, 2006 Trends in Molecular Medicine 12 :130) :鉴于肿瘤细胞表面标志表达的异质性,所以许多肿瘤细胞不能被此种方法所捕获,这已被许多临床病例所证明 ;除此之外,由于肿瘤细胞被抗体偶联的磁珠“触及”并被刺激,致使这些捕获的被大量免疫颗粒包被的肿瘤细胞已不再是处于自然状态的细胞,从而很难对其进行后续分析与研究。有鉴于此,人们开始寻求其它的替代手段以获取循环稀有细胞。与直接捕获细胞技术相比,现已公认通过去除红细胞及白细胞从而达到富集循环稀有细胞的方法是最为有效可行的替代手段。虽然某些去除或分离特定细胞群的单一实验方法已经有所报道,诸如密度离心法 (U. S. Pat. No. 4, 927, 750), 免疫磁性颗粒法 (U. S. Pat. No. 4, 177, 145), 红细胞裂解法,以及必须借助特殊细胞分离管的免疫磁性颗粒与密度离心的初步结合方法 (U. S. Pat. No. 5, 840, 502), 但所有这些方法已被证明耗时长,白细胞及红细胞去除率低,靶细胞回收率低,以及因需要某些特殊器材而带来的操作不便。基于上述原因,本发明对现有的几种互不关联的技术进行了优化组合,从而提供了一套新颖独特的整合方法,包括去除血浆蛋白,加红细胞裂解,加抗体包被的免疫微球,加基于独特的细胞分离介质而成的密度离心分离方法。源于此一独特的整合试验方法的不可预知的实验结果已经被证明能够非常快速高效及高特异性地去除血浆蛋白,白细胞及红细胞,从而达到有效富集循环稀有细胞的目的,而且可以始终维持很高的稀有细胞回收率。

[0005] 迄今为止,人们所采用的所有有关从富集样品中检测循环稀有细胞包括循环肿瘤细胞及剩余白细胞的方法都是基于免疫荧光染色。然而,其不可避免的高非特异染色信号,昂贵的荧光显微镜,以及必需但不便利的工作环境 (例如暗室) 极大地限制了基于免疫荧光法进行循环肿瘤细胞及循环内皮细胞检测工作的开展。本发明提供了基于碱性磷酸酶和过氧化物酶酶标抗体的特异组合进行双色或多色染色,从而达到检测富集的循环稀有细胞的目的。经此新方法染色过的循环稀有细胞具有很好的细胞形态,并可借助普通光学显微镜或扫描仪进行观察与分析,从而能快速简便地从剩余白细胞中检测出富集的循环稀有细胞。

胞。

发明内容

[0006] 本发明提供了一套新颖独特的整合方法包括去除血浆蛋白,红细胞裂解,加入免疫微球或免疫材料以去除白细胞,加入基于独特的细胞分离介质而成的密度离心以从生物体液标本中分离循环稀有细胞。由浓缩与富集构成的本方法能够快速地从生物体液标本,如外周血中,富集循环稀有细胞,且回收率高。富集的细胞具有可用于影像学分析的很好的细胞形态。同时,病人标本中的大部分白细胞亦可被高效回收以应用于其它研究分析,例如基因谱的研究。在本项发明中,任何特殊器材如细胞分离管或磁铁均不需要。

[0007] 本发明中,从人或动物收集的所述生物体液标本包括但并不局限于以下来源:外周循环血,脐带血,尿液,精液,骨髓,羊水,脊髓及胸腔积液,腹水,痰液,处理过并/或匀浆化的人或动物组织,培养的人或动物细胞。

[0008] 所述免疫微球由特异性识别白细胞标示物的抗体与微球表面进行共价或非共价偶联而形成,所述微球的表面可经过或没有经过化学处理以适于与蛋白质相偶联,所述微球的直径介于 10 纳米-100 微米,即 10nm-100 μ m,所述微球包含或部分包含任何一种下列成份:二氧化硅 (silica),右旋糖苷 (dextran),琼脂糖 (sepharose, agarose),或交联葡聚糖 (sephadex)。用于制备所述免疫微球的微球为磁性或非磁性。

[0009] 在本发明中,用于制备免疫微球的抗体特异性地识别下述但不局限于这些白细胞表面标示物:CD3, CD31, CD34, CD45, CD50, CD69, CD84, 或 CD102 等。制备免疫微球过程中,或是识别这些 CD 分子中的任意一种的抗体,或是识别这些 CD 分子中任意两种或两种以上的抗体的组合与任何适宜偶联的固体表面进行共价或非共价偶联,例如直径介于 10 纳米到 100 微米 (10nm-100 μ m) 的磁性或非磁性微球。

[0010] 本发明中,所述免疫吸附剂是将任何经过或没有经过化学处理的适宜结合蛋白的固体表面如硅玻璃片 (silicon glass slide) 与配体 (ligand) 或特异的单克隆或多克隆抗体包括抗白细胞表面标示物如 CD45 的抗体进行共价或非共价偶联而制备而成。

[0011] 本发明中,所述独特的细胞分离介质在 20 $^{\circ}$ C 温度下比重范围介于 1.07256-1.07638 克/毫升 (gr/ml or gr/cm³),这一特定范围内的密度适于将几乎所有有核细胞与红细胞及免疫微球进行分离。所述细胞分离介质包含下列任何一种或任意两种或两种以上的试剂成份:聚乙烯吡咯烷包被的胶质二氧化硅 (polyvinylpyrrolidinede-coated colloidal silica);多聚糖 (polysucrose) 加泛影酸钠 (sodiumdiatrizoate) 或其衍生物;由蔗糖和表氯醇组成的非离子聚合物 (nonionic polymer consisting of sucrose and epichlorohydrin);或任何一种含糖的溶液,如右旋糖苷或蔗糖 (sucrose);碘化小分子化合物(如甲泛影酰胺 (metrizamide));或任意蛋白溶液,所述细胞分离介质的比重可用任何渗透压介于 280-320mOsm/kg H₂O, pH6.8-7.8 的缓冲液在 20 $^{\circ}$ C 温度下调制在 1.07256-1.07638 克/毫升 (gr/ml or gr/cm³) 范围内。所述免疫微球的比重高于所述细胞分离介质的比重。基于所述细胞分离介质的离心在普通商品化的离心管内进行。

[0012] 本发明的用于从生物体液中富集稀有细胞的方法还包括,将通过基于所述细胞分离介质的离心得到的沉积细胞以上的所有上清液全部收集。

[0013] 本发明的用于从生物体液中富集稀有细胞的方法,其中,所述裂解红细胞以去除

红细胞的步骤在所述加入免疫微球或免疫吸附剂进行孵育的步骤之前、之后或者同时进行。如果本发明的方法不包括加入红细胞裂解液进行红细胞裂解的步骤,则可以通过长时间的离心来分离去除红细胞。

[0014] 本发明方法富集的循环稀有细胞可以应用于以下方面:通过免疫荧光或免疫组化加普通光学显微镜或可见光扫描仪对所述富集的循环稀有细胞的计数;PCR;流式细胞仪检测;基因表达谱分析;蛋白表达谱分析;酶学测定;肿瘤病人体外化疗药物的筛选;有关肿瘤病人化疗方案的制定与指导化疗的进行;对肿瘤病人体内的肿瘤细胞使用化疗药物及/或一种或多种治疗肿瘤抗体效果的评估;体内或体外培养富集的稀有细胞;在富集的稀有细胞上鉴定及确认现有的或新发现的肿瘤细胞表面或细胞内的标示物;富集的稀有细胞应用于临床治疗;监测肿瘤病人的肿瘤复发;开发新的治疗肿瘤的药物;作为肿瘤诊断的辅助手段;健康人群体检;以及基于循环内皮细胞的有关心脏病的诊断与治疗。

[0015] 迄今所有检测循环稀有细胞的技术手段都基于免疫荧光方法。但来源于荧光染料自身负电荷引起的与靶细胞的非特异结合这一主要缺点却无可避免。此一缺点给人们在区分真假阳性染色信号的过程中带来了极大的困扰。本发明提供了一整套优化过的新颖的基于免疫组化的多色染色方法,从而能够克服免疫荧光带来的非特异染色,并使得对染色的循环稀有细胞的检测得以在普通光学显微镜下或者基于显微镜原理的扫描仪下进行。此方法已被证明为一种高特异性,快速,简单,低成本的技术手段,而且不再需要任何荧光染料及昂贵的荧光显微镜。

[0016] 本发明对富集的稀有细胞进行检测的方法还可以包括染色体荧光原位杂交。

[0017] 所述双色染色是指对所述稀有细胞的标示物如一种或多种角蛋白,以及白细胞的标示物如 CD45 分别进行染色,所述稀有细胞和所述白细胞被染成不同的颜色;所述三色染色是指在所述双色染色的基础上对所述稀有细胞的细胞核进行另外一种颜色的染色,或对所述稀有细胞的其他标示物进行第三种颜色的染色,所述染色包括将特异性识别所述稀有细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体以及特异性识别所述白细胞的一抗单克隆或多克隆抗体与所述富集的稀有细胞进行孵育。

[0018] 所述特异性识别所述稀有细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体以及所述特异性识别所述白细胞标示物的一抗单克隆或多克隆抗体分别与不同的小分子相共价偶联,所述小分子选自包括以下物质的组:罗丹明 (rhodamine),生物素 (biotin),异羟基洋地黄甙 (digoxigenin), Alexa Fluor 系列分子, FITC, 及 Texas Red, 但不限于这些物质。

[0019] 在本发明的某些具体实施方式中,可识别角蛋白 8, 18, 19 或广谱角蛋白中任何一种或任意两种或两种以上的一抗单克隆或多克隆抗体被用于识别从具有上皮来源的任何实体肿瘤脱落入血的循环肿瘤细胞。另外一株可识别白细胞表面标志 CD45 的单克隆或多克隆抗体用于白细胞染色以区分假阳性。

[0020] 所述染色包括加入可特异性识别所述小分子的与不同的酶相偶联的二抗单克隆或多克隆抗体。所述偶联的酶是过氧化物酶,或碱性磷酸酶,所述碱性磷酸酶被用于检测所富集的稀有细胞。

[0021] 可以在载玻片上或在溶液中对用本发明的方法富集的稀有细胞进行染色。

[0022] 在本发明的一些具体实施方式中,将抗所述稀有细胞的标示物与抗白细胞的标示物的一抗抗体按任意顺序与所述富集的稀有细胞一起进行孵育,或将两种抗体制备成混合

液同时与所述富集的稀有细胞进行孵育。

[0023] 本发明中,所述稀有细胞或其它细胞既可直接被共价或非共价偶联于任意适宜固体表面的抗体所捕获,也可通过本发明的富集方法所富集。

[0024] 本发明的染色方法还包括联合使用免疫荧光染色与基于免疫组化的染色及可见光下的观察,所述免疫荧光用于检测富集的循环稀有细胞,而所述基于免疫组化的染色则用于白细胞染色。

[0025] 在本发明的某个具体实施方式中,识别角蛋白的一抗抗体被标记上荧光分子,而抗 CD45 的一抗则被标记上小分子以用于过氧化物酶催化的基于免疫组化的可见光颜色反应。

[0026] 本发明独特的富集与染色两种方法的结合可以极大地促进检测血中稀有细胞如循环肿瘤细胞的普及应用。该新颖独特的富集与染色方法已被证明成本低,且能快速高效及高特异性地富集并定量检测血中的稀有细胞。

[0027] 本发明还涉及一种对富集的稀有细胞进行检测的方法,包括进行染色体荧光原位杂交,以及利用荧光或普通光学显微镜或基于显微镜原理的扫描仪进行观察鉴定。

[0028] 本发明的目的还在于一种用于从生物体液中富集稀有细胞的试剂盒,包括红细胞裂解液,免疫微球或者免疫吸附剂,独特的细胞分离介质。试剂盒还包括说明书用于说明试剂盒的使用。

[0029] 本发明还涉及一种用于检测富集的稀有细胞的试剂盒,包括特异性识别所述稀有细胞标示物的共价偶联了小分子的一抗单克隆或多克隆抗体,可识别所述小分子的偶联了酶的二抗单克隆或多克隆抗体以及所述酶的相应底物。该试剂盒可选地包括免疫荧光染料标记的抗体。该试剂盒还包括用于染色体荧光原位杂交的探针及试剂。该试剂盒还包括说明书,用于说明试剂盒的使用。

[0030] 本发明还涉及一种用于从生物体液样本中富集循环稀有细胞的自动化系统,包括用于自动去除血浆蛋白的离心机,用于自动加入红细胞裂解液的装置,用于自动加入免疫微球或免疫吸附剂的装置,用于自动加入一种细胞分离介质的装置,密度离心装置以及自动收集上清的装置。

[0031] 本发明还涉及一种对富集的稀有细胞进行检测的自动化系统,包括基于免疫组化的双色或多色染色的装置,普通光学显微镜或基于显微镜原理的自动扫描装置。所述染色装置包括自动加样器,孵育器和自动清洗装置。

[0032] 名词解释

[0033] 稀有细胞:其在采集的体液样本内的所有有核细胞中的占有比例小于 0.1%。它们包括循环肿瘤细胞,循环内皮细胞,肿瘤干细胞,干细胞,及某些免疫细胞等。

[0034] 循环稀有细胞:循环稀有细胞是指存在于体液中的稀有细胞。

[0035] 生物体液标本:其为从人或动物体中收集的液体,它们包括但并不局限于以下来源:外周循环血,脐带血,尿液,精液,骨髓,羊水,脊髓及胸腔积液,腹水,痰液,处理过的人或动物组织,培养的人或动物细胞。

[0036] 红细胞裂解 (hemolysis):在低渗条件下裂解红细胞。

[0037] 免疫组化 (IHC):通过偶联于抗体上的酶与底物的反应显现光学显微镜下可观察到的颜色。

[0038] 免疫荧光:将抗体标记荧光分子

附图说明

[0039] 图 1 是将乳腺癌病人外周血中的循环肿瘤细胞经本发明方法富集后,再经本发明的基于免疫组化的方法进行三色染色后获得的图像。

[0040] 图 2 是用染色体荧光原位杂交方法检测循环肿瘤细胞得到的图像。

具体实施方式

[0041] 本发明首次将四种互不关联的单一实验手段(即去除血浆蛋白,裂解红细胞,抗体包被的免疫微球及基于特殊细胞分离介质的密度离心)进行了改进与优化组合从而提供了一套新颖独特的可快速高效地从外周血或其它体液样本中富集循环稀有细胞的方法。富集后的循环稀有细胞不需经免疫荧光染色,而是用本发明中由免疫组化优化衍生而成的技术进行双色或多色染色,并可借助普通光学显微镜或扫描仪完成对染色的稀有细胞的观察,图像采集与分析处理。其中稀有细胞包括循环肿瘤细胞,循环内皮细胞,肿瘤干细胞,干细胞,及某些免疫细胞,其中所述循环肿瘤细胞来自于具有或不具有上皮来源的任何实体瘤,如黑色素瘤。

[0042] 1. 用于富集血中循环稀有细胞包括循环肿瘤细胞及循环内皮细胞的方法与试剂

[0043] 本发明中的技术手段可从源于体内或体外的体液标本中富集或分离任意所需的稀有细胞。体液标本包括但并不局限于以下来源:外周循环血,脐带血,尿液,精液,骨髓,羊水,脊髓及胸腔积液,腹水,痰液,处理过的人或动物组织,培养的人或动物细胞。

[0044] 在本发明的某些具体实施方式中,血液被收集于任意一种商品化的采血管中(如 BD, New Jersey, USA ;Cyto-Chex, Iowa, USA)。这些采血管含有任何一种下述抗凝剂:枸橼酸葡萄糖(ACD),乙二胺四乙酸(EDTA),肝素(heparin)等。标本应在 72 小时之内进行处理。

[0045] 在本发明的其它某些具体实施方式中,本方法将去除血浆蛋白,裂解红细胞,加入抗体包被的免疫磁珠,及基于特殊细胞分离介质的密度离心进行了组合优化从而可有效地去除血浆蛋白,红细胞和白细胞。作为替代手段,富集手段也可简化为由两个步骤组成,即免疫微球加红细胞裂解;或免疫微球加基于特殊细胞分离介质的密度离心。不同于其它常规的用密度离心法分离细胞后只能费时费力且非精确地收集不同比重的分界相溶液,本发明中沉积细胞以上的所有上清液全部被收集。

[0046] 在本发明的实施方式中,免疫微球的制备是将单克隆或多克隆抗体与任何经过或没有经过化学处理的适宜结合蛋白的固体表面(例如直径介于 10nm-100 μ m 的微球)进行共价或非共价偶联。这些微球包含或部分包含任何一种下列成份:二氧化硅(silica),右旋糖苷(dextran),琼脂糖(sepharose, agarose),或交联葡聚糖(sephadex)。这些微球可以是磁性的,也可为非磁性的。

[0047] 在本发明的某些实施方式中,免疫微球可由免疫吸附剂所替代。免疫吸附剂的制备是将特异的单克隆或多克隆抗体与任何经过或没有经过化学处理的适宜结合蛋白的固体表面进行共价或非共价偶联,如硅玻璃片(silicon glass slide)。

[0048] 在本发明的一些实施方式中,用于密度离心的特殊细胞分离介质具有特定范围

的比重,即 1.07256-1.07638 克/毫升 (gr/ml or gr/cm³),在此比重范围内的细胞分离介质可用于分离所需的细胞。本项发明中的细胞分离介质包含下列任何一种或任意两种以上的试剂成份:聚乙烯吡咯烷包被的胶质二氧化硅 (polyvinylpyrrolidinede-coated colloidal silica);多聚糖 (polysucrose) 加泛影酸钠或其衍生物;由蔗糖和表氯醇组成的非离子聚合物 (nonionic polymer consisting of sucrose and epichlorohydrin);任何一种含糖的溶液,如右旋糖苷或蔗糖 (sucrose);碘化小分子化合物 (如甲泛影酰胺 (metrizamide));和/或任意蛋白溶液。细胞分离介质的比重可用任何渗透压介于 280-320mOsm/kg H₂O, pH 6.8-7.8 的缓冲液调制而成。

[0049] 免疫微球的比重高于细胞分离介质的比重。

[0050] 在本发明的实施方式中,血浆蛋白可用离心方法去除。

[0051] 本发明中首次使用红细胞裂解法与基于特殊细胞分离介质的密度离心相结合以快速高效地去除红细胞。

[0052] 本发明中首次使用免疫微球与基于特殊细胞分离介质的密度离心相结合以快速高效地去除白细胞。作为替代手段,本发明中的去除白细胞亦可简化为只使用免疫微球或免疫吸附剂。

[0053] 在本发明的具体实施方式中,用于制备免疫微球或免疫吸附剂的抗体既可以是特异性地识别任意下述白细胞表面标示物的一种抗体,或是识别任意两种或两种以上下述白细胞表面标示物的抗体:CD3, CD31, CD34, CD45, CD50, CD69, CD84, 或 CD102 等。

[0054] 在本发明的具体实施方式中,红细胞与白细胞的去除可以以任意适宜的顺序进行。它们既可同时去除,亦可红细胞或白细胞先被去除。

[0055] 富集的循环稀有细胞可用于一系列后续分析,包括免疫荧光分析,基于免疫组化的染色分析,PCR,体外或体内培养富集的循环稀有细胞等。

[0056] 2. 检测富集的循环稀有细胞包括循环肿瘤细胞

[0057] 目前所有发表的有关检测循环肿瘤细胞的方法都基于免疫荧光染色。然而免疫荧光染色不可避免的主要缺点,即人们熟之为“鬼影”的非特异性染色却给人们在判断真假阳性细胞的过程中带来了极大的困扰。本发明提供了一整套优化后的基于免疫组化的多色染色方法。通过本发明试验手段富集的循环稀有细胞经此方法染色后,可极大地消除非特异染色。此染色方法与普通光学显微镜相结合,为不同领域的人们开展检测循环稀有细胞提供了极大的便利。

[0058] 在本发明的某一具体实施方式中,经本方法富集的循环稀有细胞用 2% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 固定。

[0059] 在本发明的其它具体实施方式中,可识别角蛋白 8, 18, 19 或广谱角蛋白中任何一种或任意两种或两种以上的一抗单克隆或多克隆抗体被用于识别循环肿瘤细胞,这些血中的循环肿瘤细胞脱落于具有上皮来源的任何实体瘤。另外一株可识别白细胞表面标志 CD45 的单克隆或多克隆抗体被用于区分假阳性。

[0060] 在本发明的其它一些具体实施方式中,抗角蛋白或 CD45 的一抗单克隆或多克隆抗体分别与下述任意一种小分子进行共价偶联,它们包括但不限于:罗丹明 (rhodamine), 生物素 (biotin), 异羟基洋地黄甙 (digoxigenin), Alexa Fluor 系列分子, FITC, 及 TexasRed 等。

[0061] 在本发明的其它具体实施方式中,可特异识别标记在一抗体上的小分子的二抗单克隆或多克隆抗体分别与碱性磷酸酶,过氧化物酶或其它酶相共价偶联。

[0062] 在本发明的某个具体实施方式中,作为另外一种选择的替代方法,免疫荧光可与经可见光识别的免疫组化法相结合。在此方法中,识别角蛋白的一抗单克隆或多克隆抗体被标记上任何颜色的荧光分子,如 Alexa Fluor 系列, Quantum dot, FITC 等,而抗 CD45 的一抗被标记上上述小分子以用于过氧化物酶催化的免疫组化可见光颜色反应。这种组合可极大地降低由免疫荧光引起的白细胞表面标示物 CD45 的非特异染色。

[0063] 自动染色装置包括自动加样装置,孵育装置和自动清洗装置。

[0064] 实施例

[0065] 实施例 1. 从乳腺癌病人外周血中富集循环肿瘤细胞

[0066] 采集 5ml 人外周血于含有乙二胺四乙酸 (EDTA) 抗凝剂的采血管中 (BD, New Jersey, USA)。离心血样 (700xg, 10 分钟) 后,可以使用吸液管或者自动吸液装置来吸除上清液以去掉血浆蛋白。将离心后得到的沉淀物重悬于 30 毫升红细胞裂解液 (BD Pharmingen, California, USA) 后,孵育 20 分钟。进行标本离心 (700xg, 10 分钟) 以便分离出在上清液中的被裂解的红细胞碎片。去掉上清后,将沉淀物 (即沉积细胞) 重悬于 5 毫升磷酸盐缓冲液 (pH 7.4)。向其中加入 0.5 毫升包被有抗白细胞表面抗原例如 CD45 的单克隆抗体的磁珠后 (Invitrogen, California, USA), 室温孵育 30 分钟。将所有反应液加到普通 50 毫升离心管内的 5 毫升细胞分离介质的顶层,离心 400xg, 10 分钟。收集所有上清液。上清液离心 900xg, 10 分钟。离心后得到的沉积细胞重悬于磷酸盐缓冲液后可做进一步分析。

[0067] 该实施例中的细胞分离介质是这样制备的: 5.7% 多聚糖 (polysucrose) 与 9% 泛影酸钠 (Sigma, Missouri, USA) 的混合物在高精度数字密度仪 (型号 DMA 4500, Anton-Paar, Virginia, USA) 于 20°C 监测下,用 PBS 将其密度调至成 1.07256-1.07638 克/毫升 (gr/ml or gr/cm³)。

[0068] 实施例 2. 三色法染色从乳腺癌病人外周血中富集的循环肿瘤细胞

[0069] 富集的循环肿瘤细胞置于载玻片上,用由磷酸盐缓冲液配制而成的 2% 多聚甲醛 (paraformaldehyde) 室温固定 2 小时后,用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍。细胞与含生物素 (Pierce, Illinois, USA) 标记的抗角蛋白 8+18+19 单克隆抗体 (Abcam, UK, 1 μg/ml) 及罗丹明 (Pierce, Illinois, USA) 标记的抗 CD45 单克隆抗体 (Abcam, UK, 1 μg/ml) 混合液 (由磷酸盐缓冲液稀释而成) 在室温孵育 30 分钟。载玻片用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍后,与含碱性磷酸酶标记的抗生物素单抗 (Sigma, Missouri, USA, 1 μg/ml) 及过氧化物酶 (Pierce, Illinois, USA) 标记的抗罗丹明单抗 (Abcam, UK, 1 μg/ml) 混合液 (由磷酸盐缓冲液稀释而成) 室温孵育 30 分钟。载玻片用磷酸盐缓冲液冲洗 3 遍后,用 Vector Laboratories (California, USA) 出产的红色速染细胞核试剂盒,碱性磷酸酶及过氧化物酶底物试剂盒进行显色反应。染色结果见附图。

[0070] 参见附图 1,通过本发明中的实验方法对乳腺癌病人外周血中的循环肿瘤细胞进行富集后,再用基于免疫组化的三色染色法进行染色。图中所示为普通光学显微镜下观察到的循环肿瘤细胞。大细胞:乳腺癌细胞 (tumor cell),其角蛋白染成蓝色,细胞核为粉红色;小细胞:白细胞 (WBC),其表面 CD45 被染成棕色。

[0071] 实施例 3. 染色体荧光原位杂交法检测循环肿瘤细胞

[0072] 将富集的肿瘤细胞作为标本置于载玻片上。染色后的标本用 20 毫克/毫升的 RNA 酶处理 1 小时后,使用 SSC 缓冲液漂洗玻片。标本用无水乙醇脱水 10 分钟后,加热到 70℃ 持续 5 分钟变性。标本再用无水乙醇脱水 10 分钟,并于 45℃ 与探针杂交孵育过夜。标本用 SSC 缓冲液洗涤后,用荧光显微镜观察。该标本可以是经实例 2 中的方法染色后的富集肿瘤细胞,进行染色体荧光原位杂交的目的是进一步确定基于免疫组化的三色染色检测肿瘤细胞的真实性。为了便于快速诊断,标本亦可不经抗体染色,而直接进行染色体荧光原位杂交。染色体荧光原位杂交的结果见附图 2。细胞的染色体显示为红色和绿色。从红色或绿色的数目可以判断是否染色体发生变异,是否为肿瘤细胞。

[0073] 实施例 4. 检测循环肿瘤细胞应用于临床快速评估抗肿瘤化疗药物的疗效及肿瘤复发的监测

[0074] 目前临床上评估化疗药物的疗效的常用方法是每 3 个月为病人做一次 CT 检查。如此长的时间间隔对与那些化疗效果不佳的病人所造成的伤害是致命性的。而每 1-2 周进行的检测循环肿瘤细胞则在化疗开始 2-4 周后即可为医生提供准确的评估数据。循环肿瘤细胞数目的降低意味着化疗药物的有效性。反之,如果循环肿瘤细胞数目没有明显的改变甚至增高,则意味着病人需接受不同的化疗药物治疗。

[0075] 肿瘤复发意味着原发灶或转移灶的肿瘤又进入了活跃期。此时病人血中的循环肿瘤细胞数目会明显升高。对经过治疗后出院的肿瘤病人进行长期的循环肿瘤细胞的跟踪观察(一般为每 3 个月检查一次),可以为早期判断肿瘤是否复发提供非常有力的证据。

[0076] 本领域的技术人员应当明了,上述优选实施例只是对本发明的具体说明,并不构成对本发明的限制。根据需要可以对其进行多种改进,组合,亚组合以及变换,所有的改进,组合,亚组合、变换以及等效替换都落入在所附的权利要求的范围内。

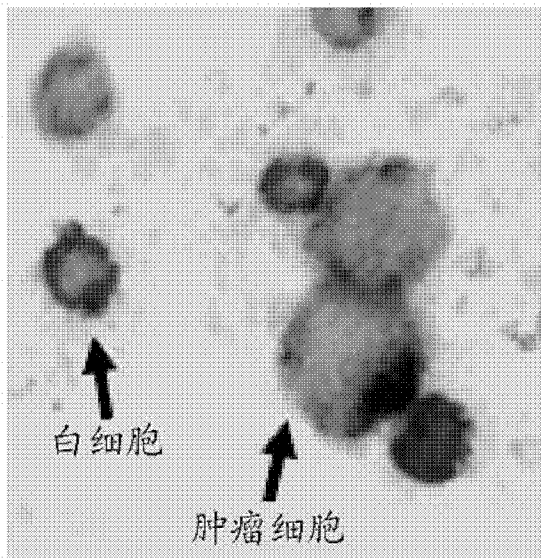


图 1

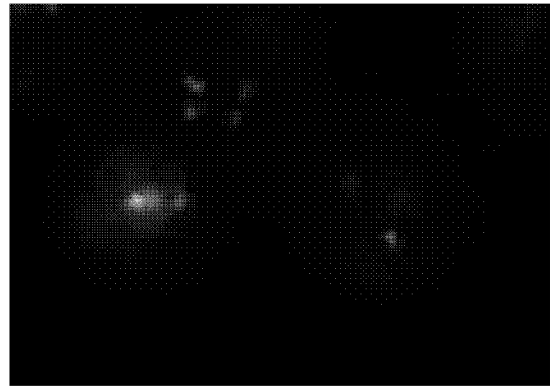


图 2

专利名称(译)	从生物体液样本中富集与检测稀有细胞的整合方法		
公开(公告)号	CN102313813A	公开(公告)日	2012-01-11
申请号	CN201110182666.X	申请日	2008-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
[标]发明人	林平		
发明人	林平		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N21/64		
代理人(译)	吴贵明		
其他公开文献	CN102313813B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种对富集的稀有细胞进行检测的方法，包括进行基于免疫组化的染色与免疫荧光相结合，或基于免疫组化的双色、三色、或多色染色，以及利用荧光或普通光学显微镜或基于显微镜原理的扫描仪进行观察鉴定。本发明新颖独特的富集与染色方法已被证明成本低，且能快速高效及高特异地富集并定量检测血中的稀有细胞。

