



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104849228 A

(43) 申请公布日 2015. 08. 19

(21) 申请号 201510127627. 8 *G01N 33/574*(2006. 01)
(22) 申请日 2007. 05. 14 *C12Q 1/68*(2006. 01)
(30) 优先权数据 *G06T 7/00*(2006. 01)
06116336. 6 2006. 06. 29 EP *G06T 7/40*(2006. 01)
06118438. 8 2006. 08. 04 EP *G01N 15/14*(2006. 01)
(62) 分案原申请数据
200780024364. 1 2007. 05. 14
(71) 申请人 皇家飞利浦电子股份有限公司
地址 荷兰艾恩德霍芬
(72) 发明人 B·H·W·亨德里克斯
E·R·福森纳尔 G·斯佩克维尔斯
N·C·范德瓦尔特 S·凯珀
(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
72002
代理人 王健

(51) Int. Cl.
G01N 21/33(2006. 01)
G01N 33/53(2006. 01)
G01N 33/50(2006. 01)
G01N 33/58(2006. 01)

权利要求书1页 说明书24页 附图3页

(54) 发明名称

使用基于 UV 光的 DNA 成像细胞术来检测和 /
或诊断癌症的体外方法

(57) 摘要

本发明涉及使用 UV 光进行 UV 吸收测定在体外确定人或动物细胞内细胞核 DNA 的量的方法。本发明还涉及用于基于上述原则体外检测生物样品中的癌细胞的方法。本发明也涉及诊断或预测人或动物对象体内癌症的可能发生的体外方法。

1. 体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核核酸的量的方法, 包括如下步骤:

- a) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸,
- b) 体外测量 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收。

2. 权利要求 1 的方法, 其中使用 UV 光和 / 或相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸。

3. 权利要求 1 或 2 的方法, 其中在步骤 a) 和 / 或 b) 中使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。

4. 权利要求 3 的方法, 其中在步骤 a) 和 / 或 b) 中使用波长为大约 250nm、255nm 或 260nm 的 UV 光。

5. 权利要求 1 至 4 任一项的方法, 其中所述至少一个细胞与能够与所述至少一个细胞内的双链核酸相互作用的至少一种荧光标记接触, 并且其中用通过用合适的光源激发所获得的信号确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的细胞核信号强度。

6. 权利要求 1 至 4 任一项的方法, 其中所述细胞核核酸未用免疫组化染色、化学反应或荧光标记显色。

7. 权利要求 1 至 6 任一项的方法, 其中所述方法用于检测所述至少一个生物样品中的至少一个推断的癌细胞的方法。

8. 权利要求 7 的方法, 其中所述至少一个癌细胞与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

9. 权利要求 7 的方法, 其中通过将步骤 b) 中获得的细胞核 UV 吸收与也使用权利要求 1 的步骤 a) 和 b) 分析的至少一个非癌细胞的细胞核 UV 吸收进行对比, 从而使用步骤 b) 中的细胞核 UV 吸收计算推断的癌细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态。

10. 权利要求 9 的方法, 其中倍性状态或细胞核 DNA 含量偏离数值 2 至少 10% 提示癌细胞。

11. 权利要求 9 的方法, 其中倍性状态或细胞核 DNA 含量为 1.8 至 2.2 提示近似二倍体状态, 倍性状态或细胞核 DNA 含量为 3.6 至 4.4 提示近似四倍体状态, 倍性状态或细胞核 DNA 含量在这些范围之外提示 X- 倍体状态。

12. 诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的方法, 所述方法包括如下步骤:

- a) 提供包含来自人或动物对象的至少一个细胞的生物样品;
- b) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;
- c) 体外确定在 b) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收;
- d) 从步骤 c) 中获得的细胞核 UV 吸收计算所述至少一个细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态, 以及
- e) 基于所述细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

使用基于 UV 光的 DNA 成像细胞术来检测和 / 或诊断癌症的 体外方法

[0001] 本申请是 2007 年 5 月 14 日提交的题为“使用基于 UV 光的 DNA 成像细胞术来检测和 / 或诊断癌症的体外方法”的中国专利申请 200780024364.1 的分案申请。

[0002] 发明主题

[0003] 本发明涉及通过测量细胞核核酸的 UV 吸收在体外确定人或动物细胞的细胞核内的细胞核核酸的量的方法。

[0004] 本发明还涉及基于细胞核核酸的 UV 吸收的体外检测生物样品中的癌细胞的的方法。

[0005] 本发明进一步涉及基于细胞核核酸的 UV 吸收的诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的体外方法。

[0006] 发明背景

[0007] 癌症的早期检测是治疗癌症患者的关键因素。有各种在生物样品中检测癌细胞，并从而诊断已存在的癌症或至少估计未来癌症发展的可能性的可能的选择。这些不同的方法包括癌组织的物理检验、癌细胞的形态特征检测、细胞结构例如膜和细胞核的免疫组化染色及特征鉴定、测量肿瘤特异因子的表达等等。

[0008] 检测癌细胞的一种可能的选择是所谓的 DNA 细胞术 (DNA cytometry)，其测量细胞核 DNA 的量以检测与正常 DNA 含量的偏离。假设如果一个细胞（作为突变事件的后果）含有比已知标准（已知为非癌性的，即“健康的”或“正常的”类型）更少或更多的 DNA，那么 DNA 含量上的这种偏离可以提示重要的染色体重排及正在进行的癌症发展。

[0009] 因此在癌症诊断范围，在科研和临床应用中，通过核酸特异性染色对细胞核 DNA 进行量化正在越来越多地进入实际应用中。

[0010] 通过流式或成像细胞术对细胞核 DNA 含量进行测量特别基于如下假设：(i) 结合至 DNA 的染料的数量正比于存在的 DNA 的量，和 (ii) 从染料通过发射、吸收或透射产生的光信号正比于染料的数量。

[0011] 典型地用于通过 DNA 成像细胞术 (DNA image cytometry) 测量细胞核 DNA 的一种 DNA 特异性染色方法是一种基于酸的反应，根据 Feulgen 和 Rossenbeck 命名，通常简单地称为福尔根反应 (Feulgen reaction)。事实上所述福尔根反应是一种生色反应，其中 DNA 被酸水解产生具有游离醛基的不含嘌呤的 DNA（即所谓脱嘌呤核酸 (apurinic acid, APA)）。这些物质之后与含有共价结合至所述游离醛基的染料的希夫试剂 (schiff's reagent) 反应。

[0012] 虽然所述福尔根反应对于 DNA 具有特异性，但是其具有多种缺点。其非常耗费时间，并且是一种复杂精细的反应，需要非常小心地控制并验证以获得可重复的和有意义的结果。普遍用于移除嘌呤碱基的 HCl 将 APA 水解为较小片段导致一个问题。APA 分子的片段化导致这些片段从细胞核中移除并因此导致丢失可染色的 DNA 物质。

[0013] 因此，本领域中已经进行了尝试以基于形态特征鉴定、免疫组化染色和 DNA 染色的组合可靠地检测癌细胞并诊断癌症。

[0014] US 2004/0197839 A1 公开了同时使用两种不同类型的染色以鉴别癌细胞,其中一种染色例如检测形态特征,而第二种(免疫学)染色例如测量一种肿瘤特异性标记的表达。

[0015] 但是,仍然需要给出测量细胞核 DNA 的量并检测癌细胞和癌症的可靠、迅速及有效的途径的方法。

[0016] 发明目的和简述

[0017] 本发明的一个目的是提供用于确定细胞的细胞核内的核酸的量的方法。这些核酸可以是双链的,例如 DNA。

[0018] 本发明的另一个目的是提供检测待测生物样品中癌细胞的存在的方法。

[0019] 本发明一个进一步的目的是提供使得能够诊断人或动物对象体内癌症的存在和/或癌症可能发生的方法。

[0020] 为了实现上述目的,提供了独立权利要求中限定的方法。本发明一些优选的实施方案特别在从属权利要求中限定。

[0021] 根据本发明的一个实施方案,提供了体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核核酸例如细胞核 DNA 的量的方法,其中所述方法包括如下步骤:

[0022] a) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和/或尺寸,

[0023] b) 体外确定 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收。

[0024] 在一个示例性实施方案中,所述细胞核的位置和/或尺寸可以通过使用 UV 光和/或相差显微术在所述至少一个细胞中(粗略)确定。如果在步骤 a) 中使用 UV 光,应当优选地使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。特别优选的是波长例如为大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0025] 在另一个示例性实施方案中,使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光用于在步骤 b) 中测量 UV 吸收。特别优选的是波长例如为大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0026] 在另一个实施方案中,可以将所述至少一个细胞与至少一种能够与所述至少一个细胞内的双链核酸相互作用的荧光标记接触,并从而通过步骤 b) 中的 UV 吸收确定结合至细胞核双链核酸的所述至少一种荧光标记的细胞核信号强度。为此目的,可以使用例如波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。

[0027] 然而,在本发明其他示例性实施方案中,不需要使所述细胞中的细胞核核酸例如 DNA 通过例如免疫组化染色、化学反应例如福尔根反应或荧光标记显色。

[0028] 因此,本发明的方法包括实现确定细胞内细胞核的位置和/或尺寸并确定所述细胞核的边界内的 UV 吸收的基本概念的各种实施方案。为了确定细胞核位置和/或尺寸(等同于确定细胞核的边界),可以使用利用可见光的相差显微术以及利用 UV 光的检测方法。为了确定细胞核的 UV 吸收,可以仅依赖于 UV 测量而不加入能够与双链核酸相互作用的荧光标记,或者可以使用这些标记。

[0029] 因此,理论上可以用相差显微术对细胞核进行定位并确定所述细胞核的 UV 吸收而不使用上文描述的标记,也可以用相差显微术对细胞核进行定位并使用上文描述的标记确定所述细胞核的 UV 吸收,可以使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并测量细胞核 UV 吸收而不使用上文描述的标记,以及可以使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并使用上文描述的标记测量细胞核 UV 吸收,等等。

[0030] 在两个示例性实施方案中,本发明涉及用相差显微术对细胞核进行定位并使用

上文描述的标记确定 UV 吸收,或涉及使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并测量细胞核 UV 吸收而不使用上文描述的标记。这两个实施方案将在下文进一步详细描述。然而,本领域技术人员清楚地了解,如果在这两个实施方案的范围内讨论某些方面例如优选的波长、标记的性质、使用的检测装置等等,那么这些解释等同地适用于如上文所述的本发明的其他实施方案,除非其另外明确地指出。术语例如“细胞”、“癌细胞”、“样品”、“非整倍性(aneuploidy)”等等的定义在本发明的各个实施方案中当然具有同样的含义,除非另外指出。本发明设想的各种方法也可以用于同样目的。

[0031] 在本发明一个示例性实施方案中,前述用于确定细胞内细胞核核酸例如 DNA 的量的方法可以用于体外检测至少一个生物样品内的至少一个癌细胞。

[0032] 在上述方法的一个进一步的实施方案中,细胞核 UV 吸收(也可以称为细胞核信号强度)也可以用于计算细胞的(非整)倍性((aneu)ploidy)状态。

[0033] 这可以通过将获得的细胞核 UV 吸收与在与已知为非癌类型并且细胞核 DNA 含量已知的细胞在基本上相仿或相同条件下获得的细胞核 UV 吸收对比实现。

[0034] 在本发明另一个实施方案中,偏离 2 或 4 至少 10% 的非整倍性状态被认为提示癌细胞。

[0035] 在本发明一个实施方案中,如上述确定细胞内细胞核核酸例如 DNA 的量的方法用于检测至少一个生物样品中的至少一个癌细胞,所述癌细胞与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌(cerebrospinal cancer)、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

[0036] 在本发明另一个实施方案中,如上述确定细胞内细胞核核酸例如 DNA 的量的方法在生物样品的至少一个细胞上进行,其中所述生物样品选自包括骨髓细胞、淋巴结细胞、粘膜样品、周围血样品、脑脊液样品、尿样品、渗出物样品、细针抽取物、周围血碎屑、皮肤碎屑、石蜡包埋组织和冷冻切片的一组。

[0037] 在本发明另一个实施方案中,检测生物样品中具有上文描述的特征的癌细胞的方法使用能够检测、测量和计算 UV 吸收信号及任选地相差信号的显微镜。在一个优选的实施方案中,使用共聚焦激光扫描显微镜。

[0038] 在所有上述方法中,可以依赖于具有预先确定的单一波长的(UV)光检测细胞核并测量细胞核 UV 吸收。

[0039] 在本发明另一个实施方案中,提供了诊断和/或预测人或动物对象体内癌症的体外方法,所述方法包括如下步骤:

[0040] a) 提供得自所述对象的生物样品;

[0041] b) 体外确定所述样品的至少一个细胞内细胞核的位置和/或尺寸;

[0042] c) 体外测量在 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收;

[0043] d) 从步骤 d) 中获得的细胞核信号强度计算所述至少一个细胞的倍性状态,和

[0044] e) 基于所述倍性状态确定癌症的存在和/或可能未来发生癌症。

[0045] 本发明的诊断方法也包括实现确定细胞内细胞核的位置和/或尺寸并确定所述细胞核的边界内的 UV 吸收的基本概念的各种实施方案。为了确定细胞核位置和/或尺寸(等同于确定细胞核的边界),仍旧可以使用利用可见光的相差显微术以及利用 UV 光的检测方法。为了确定细胞核的 UV 吸收,可以仅依赖于 UV 测量而不加入能够与双链核酸相互

作用的荧光标记,或者可以使用这些标记。

[0046] 虽然诊断方法仍旧将主要针对两个示例性实施方案描述,即用相差显微术对细胞核进行定位并使用上文描述的标记确定细胞核的 UV 吸收,或使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并测量细胞核 UV 吸收而不使用上文描述的标记,但是本领域技术人员了解,如果在这两个实施方案的范围内讨论某些方面例如优选的波长、标记的性质、使用的检测装置等等,那么这些解释等同地如上文所述应用于本发明的其他实施方案,除非其另外明确地指出。术语例如“细胞”、“癌细胞”、“样品”、“非整倍性 (aneuploidy)”等等的定义在本发明的各个实施方案中当然具有同样的含义,除非另外指出。

[0047] 当然,上文描述的各个方面例如使用某些波长或某些类型的显微镜等等,等同地应用于诊断范围。

[0048] 因此,在一个示例性实施方案中,细胞核的位置和 / 或尺寸可以通过使用 UV 光和 / 或相差显微术在所述至少一个细胞中 (粗略) 确定。如果在步骤 b) 中使用 UV 光,应当优选地使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。特别优选的是波长例如为大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0049] 在本发明另一个实施方案中,在步骤 b) 中细胞核在所述至少一个细胞中的位置和 / 或尺寸仅通过相差显微术确定。

[0050] 在另一个示例性实施方案中,在步骤 c) 中使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光测量 UV 吸收。特别优选的是波长例如为大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0051] 在另一个实施方案中,在步骤 c) 中可以将所述至少一个细胞与至少一种能够与所述至少一个细胞内的双链核酸相互作用的荧光标记接触,并从而确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的细胞核信号强度。为此目的,可以使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。

[0052] 在诊断方法的另一个示例性实施方案中,不需要使所述细胞中的细胞核核酸例如 DNA 通过例如免疫组化染色、化学反应例如福尔根反应或荧光标记显色。

[0053] 如果使用荧光标记,那么可以将上文和下文描述的同样类型的标记与细胞接触。

[0054] 本发明这一方面的另外一个实施方案涉及诊断和 / 或预测人或动物对象体内的癌症的体外方法,所述方法包括上述特征,并且其中偏离 $2n$ 或 $4n$ (n 是染色体数目) 至少 10% 的倍性状态提示癌细胞,并因此提示癌症的存在或 (未来) 可能发生的癌症。

[0055] 当然,对于本发明这些关于诊断方法的方面,所述生物样品可以选自与上文描述的相同的样品。

[0056] 因此,用上文描述的诊断方法诊断的和 / 或预测的癌症可以选自与上文描述的相同的一组癌症。

[0057] 在本发明另一个实施方案中,诊断和 / 或预测人或动物对象体内的癌症的方法使用能够检测 UV 吸收信号、荧光信号并且可任选地用于相差目的的显微镜。为了确定细胞核的位置和 / 或尺寸以及细胞核 UV 吸收,可以优选地使用共聚焦激光扫描显微镜。

附图说明

[0058] 图 1 示出了一幅直方图,即当确定了一群非癌细胞的细胞核 DNA 含量后典型地获得的光密度模式。所述细胞处于非增殖状态。

[0059] 图 2 示出了一幅直方图,即当确定了一群癌细胞的细胞核 DNA 含量后典型地获得的光密度模式。相应于值为 4 的峰提示正在进行的癌症发展,因为被检查的细胞类型在其正常状态是非增殖的。

[0060] 图 3 示出了在眼中(左图)和口中(右图)的刷拭活检的实施例。

[0061] 图 4 示出了在大约 230nm 和 300nm 波长范围之间 DNA 和蛋白质的不同吸收行为。

[0062] 图 5 示出了本发明使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光确定细胞核的边界的一个实施方案的原则的示意图。

[0063] 图 6 示出了粘膜细胞的荧光测量,所述细胞已经用 EtBr 染色。细胞核清晰可见,但是细胞其他部分也显示一些荧光。

[0064] 图 7 示出了粘膜细胞的相差图像(左图)、荧光图像(中间图)和组合图像(右图),所述细胞已经用 EtBr 染色。将所述相差显微术图像与荧光图像合并并相关使得可以精确地确定细胞核位置及其尺寸。

[0065] 发明详述

[0066] 通过 DNA 细胞术鉴别癌细胞典型地使用流式细胞术或成像细胞术进行。

[0067] 在 DNA 成像细胞术(也可以称为 ICM)的情况下,DNA 用标记染色以使 DNA 显色。接下来,使用通常称为非整倍性的 DNA 量的改变或染色体结构畸变检测癌细胞的存在,因为非整倍性被认为是已经存在的癌性状态或正在发展的暂时性癌性状态的特征。因此,检测 DNA 非整倍性使得可以通过检测癌细胞进行癌症的早期及敏感诊断,通常在组织活检的形态学和组织学特征鉴定之前几年。

[0068] 然而,如上文所述,已经确立的 DNA 生色反应例如福尔根染色方法非常耗力及耗时。

[0069] 本发明人令人惊讶地发现体外确定细胞核 DNA 的量以及细胞的倍性状态不需要进行免疫组化染色或荧光标记或化学反应。

[0070] 本发明人发现,一旦已经确定细胞内细胞核的位置和/或尺寸/边界,就可以仅依赖于 UV 光确定细胞核对 UV 的吸收。之后确定的 UV 吸收可用于计算细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态。这些发现特别适用于使用具有优选的波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光的情况。

[0071] 本发明人进一步令人惊讶地发现在基于 DNA 成像细胞术的检测生物样品中癌细胞的方法中也可以使用能够与细胞内的双链核酸特异地相互作用的荧光标记。

[0072] 因此,本发明在一个实施方案中涉及体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核核酸的量的方法,其中所述方法包括如下步骤:

[0073] a) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和/或尺寸,

[0074] b) 体外测量 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收。

[0075] 如上文所述,基本上在步骤 a) 中可以使用任何可以确定细胞核的位置和/或尺寸以及边界的方法。这样的例子是相差显微术。然而,优选地在步骤 a) 中仅使用优选地波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的紫外(UV)光。步骤 a) 和 b) 中特别优选的波长大约为 250nm、255nm 或 260nm。

[0076] 如果使用相差显微术,可以优选地通过将细胞与一个上文或下文所述的荧光标记接触确定细胞核 UV 吸收,即细胞核信号强度。

[0077] 然而,在本发明其他示例性实施方案中,不需要通过将细胞与荧光标记接触而协助细胞核核酸显色。

[0078] 这些方法可特别用于确定一个个体或物种的基因组大小。当然,这些方法也可用于检测至少一个生物样品中的至少一个癌细胞。将获得的细胞核 UV 吸收与已经用相同方法分析的非癌细胞的细胞核 UV 吸收对比可以实现此目的。

[0079] 如上文所述,本发明的方法包括实现确定细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸并确定所述细胞核的边界内的 UV 吸收的基本概念的各种实施方案。为了确定细胞核位置和 / 或尺寸 (等同于确定细胞核的边界), 可以使用利用可见光的相差显微术以及利用 UV 光的检测方法。为了确定细胞核的 UV 吸收,可以仅依赖于 UV 测量而不加入能够与双链核酸相互作用的荧光标记,或者可以使用这些标记。

[0080] 因此,原则上可以用相差显微术对细胞核进行定位并确定所述细胞核的 UV 吸收而不使用上文描述的标记,也可以用相差显微术对细胞核进行定位并使用上文描述的标记确定所述细胞核的 UV 吸收,可以使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并测量细胞核 UV 吸收而不使用上文描述的标记,以及可以使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并使用上文描述的标记测量细胞核 UV 吸收,等等。

[0081] 在两个示例性实施方案中,本发明涉及用相差显微术对细胞核进行定位并使用上文描述的标记确定 UV 吸收,或涉及使用 UV 吸收测量以对细胞核进行定位并测量细胞核 UV 吸收而不使用上文描述的标记。这两个实施方案将在下文进一步详细描述。然而,本领域技术人员清楚地了解,如果在这两个实施方案的范围内讨论某些方面例如优选的波长、标记的性质、使用的检测装置等等,那么这些解释等同地如上文所述应用于本发明的其他实施方案,除非其另外明确地指出。术语例如“细胞”、“癌细胞”、“样品”、“非整倍性 (aneuploidy)” 等等的定义在本发明的各个实施方案中当然具有同样的含义,除非另外指出。本发明设想的各种方法也可以用于同样目的。

[0082] 在更详细地描述本发明的一些实施方案之前,介绍如下定义。

[0083] 如在本说明书中和在后附权利要求书中所用,单数形式“一个”也包括相应的复数形式,除非上下文另外清晰地说明。因此,术语“一个微载体珠”可以包括多于一个微载体珠,即两个、三个、四个、五个等等微载体珠。

[0084] 术语“大约”在本发明的范围内表示离精确值有一点距离,本领域技术人员了解所述距离仍旧保证所涉及的特征的技术效果。该术语典型地提示与所涉及的数字值偏差 $\pm 10\%$, 优选地 $\pm 5\%$ 。术语“大约”在关于波长的范围内涉及偏差 1.5% , 优选地 1% , 最优选地 0.5% 。

[0085] 为了本发明的目的,术语“体外”是指细胞的分析,所述细胞已经从其天然环境分离并且在人或动物体外进行研究。

[0086] 为了本发明的目的,术语“癌细胞”涉及任何细胞、由细胞组成的细胞性组织或器官,这些细胞中的一些或全部含有与针对非癌细胞确定的细胞核 DNA 的量有偏差的量的细胞核 DNA,这是染色体重复、缺失、插入、易位等等的结果。

[0087] 已知染色体 DNA 的插入、重复、缺失和易位很大程度上导致癌症发展,并且因此被认为是癌细胞的特征。

[0088] 为了本发明的目的,术语“生物样品”涉及任何含有细胞物质,优选人或动物对象

的细胞的样品,所述样品需要测试在这些细胞中细胞核 DNA 的量,特别是测试癌细胞的存在。

[0089] 这些生物样品因此可以选自包括骨髓细胞、淋巴结细胞、淋巴细胞、红细胞、神经细胞、肌肉细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、粘膜样品、周围血样品、脑脊液样品、尿样品、渗出物样品、细针抽取物、细针抽取活检、刷拭活检、周围血碎屑、皮肤碎屑、脱落细胞涂片、来自体液的细胞离心制备物、细胞分离样品(在机械和/或酶分散之后)、石蜡包埋组织和冷冻切片的一组。

[0090] 术语“细胞核信号强度”典型地用于使用荧光标记的范围内,并且在下文进一步解释。本领域技术人员了解所述细胞核信号强度与细胞核 UV 吸收相关,假定所述信号强度通常越高,定位至细胞核的荧光标记吸收的 UV 光越多。

[0091] 为了本发明的目的,术语“荧光标记”是指任何能够与双链核酸特异地相互作用并在用合适的光源激发后提供荧光信号的分子。一般地,本发明的荧光标记吸收波长在大约 100nm(UV) 至大约 800nm 之间的光。

[0092] 这些荧光标记可以例如结合至 DNA 大沟或小沟。它们可以是核酸碱基嵌入剂并选自包括 4',6-二脒-2-苯基吡啶(DAPI)、碘化吡啶(PI)和溴化乙锭(EtBr)的一组。荧光标记也包括 SYBR green。

[0093] 其他荧光剂包括 SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、POP-1、BOBO-1、YOYO-1、TOTO-1、JOJO-1、POPO-2、LOLO-1、BOBO-I、YOYO-3、TOTO-3、PO-PRO-I、BO-PRO-I、TO-PRO-I、JO-PRO-I、PO-PRO-3、LO-PRO-I、BO-PRO-3、YO-PRO-3、TO-PRO-3、TO-PRO-5、SYTO 40 蓝色荧光核酸染色剂(blue-fluorescent nucleic acid stain)、SYTO 41 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 42 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 43 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 44 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 45 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 9 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 10 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 11 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 12 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 13 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 14 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 15 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 16 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 20 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 21 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 22 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 23 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 24 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 25 绿色荧光核酸染色剂、SYTO26 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 27 绿色荧光核酸染色剂、SYTO BC 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 80 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 81 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 82 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 83 橙色荧光核酸染色剂、SYTO84 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 85 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 86 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 17 红色荧光核酸染色剂、SYTO 59 红色荧光核酸染色剂、SYTO 61 红色荧光核酸染色剂、SYTO 17 红色荧光核酸染色剂、SYTO62 红色荧光核酸染色剂、SYTO 63 红色荧光核酸染色剂、SYTO 64 红色荧光核酸染色剂、吖啶同源二聚体、吖啶橙、7-AAD(7-氨基-放线菌素 D)、放线菌素 D、ACMA、DAPI、二氢乙锭、溴化乙锭、乙锭同源二聚体-1(EthD-1)、乙锭同源二聚体-2(EthD-2)、Ethidium monoazide、Hexidium iodide、Hoechst 33258(bis-benzimide)、Hoechst 33342、Hoechst 34580、Hydroxystibamidine、LDS 751 或核黄。所有这些化合物可以购自例如 Invitrogen GmbH, Germany。

[0094] 为了本发明的目的,术语“与双链核酸相互作用”是指所述至少一种荧光标记与具有双链构象的核酸相互作用的能力。

[0095] 在一个优选的实施方案中所述荧光标记可以与双链核酸特异地相互作用。在此范围内,术语“与双链核酸特异地相互作用”是指所述至少一种荧光标记优先地与具有双链构象的核酸相互作用的能力。

[0096] 优先结合是指所述荧光标记在相同条件下与双链核酸相互作用,但是不与单链核酸相互作用,或至少以较低程度相互作用的能力。

[0097] 荧光标记是否优先与双链核酸反应而不与单链核酸反应可通过体外实验确定,在所述实验中将固定化的分离的双链核酸和固定化的分离的单链核酸在相同条件下平行接触并在室温温育。之后,使用漂洗缓冲液。对于双链核酸,如果在用合适的光源激发之后发射上述波长,观察到比单链核酸更强的信号,那么该荧光标记被认为是特异于双链核酸的。

[0098] 在另一个实施方案中,荧光标记可以不是如上述特异于双链核酸,但是具有当结合至核酸时发射出与其不结合时相比更强的荧光信号的能力。

[0099] 例如在溴化乙锭的情况中,当结合至双链核酸时荧光信号增加~20倍,当结合至单链核酸时增加~10倍。对于 SYBR green I,当结合至双链 DNA 时荧光信号增加~200倍。因此具有特异于双链核酸的标记并不是绝对必需的,因为根据本发明,在细胞核和细胞质染色之间进行区别将在下文进行解释。如果使用当结合至 DNA 时得到更强的信号的标记,则有可能避免漂洗,这将在下文进行解释。

[0100] 当然,在一个优选的实施方案中,可以使用与双链核酸特异地相互作用并具有在结合状态相对于未结合状态下发射出更强信号的能力的标记例如溴化乙锭。

[0101] 在确定细胞的细胞核的位置和/或尺寸,即边界之前,并且也在将所述至少一个生物样品中的至少一个(推断的癌)细胞与所述至少一个能够与双链核酸特异地相互作用的荧光标记接触之前,对于本发明的一些实施方案可能需要和/或建议制备所述生物样品,例如制备所述至少一个(推断的癌)细胞用于测量 UV 吸收。

[0102] 制备用于在 DNA 成像细胞术中测试生物样品中的细胞的生物样品是本领域技术人员熟知的,并且可以包括稀释所述样品、通过荧光激活细胞分选(FACS)分离均一细胞群、使用免疫富集或传统细胞生物学和生化技术包括酶水解、机械或渗透破裂、(密度)离心、色谱、缓冲液透析等等富集并纯化某些细胞类型例如骨髓细胞、淋巴结细胞、淋巴细胞、红细胞、肝细胞、肾细胞、神经细胞、成纤维细胞、角质形成细胞等等。

[0103] 如果需要,固定化(immobilized)在固体基质上的细胞样品可以被固定(fixed)。在这方面,本领域技术人员会考虑典型的固定辅助手段或辅助物例如干燥、甲醛、多聚甲醛、乙醇、丙醇、甲醇-丙酮、甲醇-冰乙酸、甲醇-福尔马林-冰乙酸等等。

[0104] 尽管在一些情况下固定可能是有用的,但是其并不总是必需的。如果用整体设备检查样品,可能会建议不固定细胞,而是仅固定化它们。

[0105] 但是,如果考虑固定,可以根据标准方案进行,包括例如如下步骤:

[0106] 在多聚甲醛的情况中:

[0107] ●向细胞添加 PBS 配制的 4% PF 溶液

[0108] ●在室温温育 5-30 分钟

[0109] ●用 PBS 漂洗

[0110] 在甲醇/丙酮的情况中:

[0111] ●将带有细胞的基质放入冰冷的 100% 甲醇中

[0112] ●在 -20℃温育 5-30 分钟

[0113] ●用 100%丙酮漂洗带有细胞的基质

[0114] ●使丙酮挥发。

[0115] 可用于上文描述的行为（即分离和制备样品、分离和制备细胞、固定化、渗透和固定细胞）的方案可以例如取自荧光显微术方面的标准细胞生物学教科书和实验室手册，例如 Cell Biology: A laboratory handbook, Volumes I-III, Cellis, J. E. ed. (1994)、Ausubel et al, Current Protocols in Molecular Biology, Volumes I-III, Ausubel, R. M. ed. (1994) 等等。

[0116] 之后可以进行步骤 a) 以使用例如波长优选地在大约 240nm 和大约 280nm 之间的紫外 (UV) 光或例如使用相差显微术确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸。

[0117] 在下文中，将会更加详细地讨论本发明的两个示例性实施方案。在第一个实施方案中（下文中称为实施方案 1），使用具有优选的波长的 UV 光并且优选地不包括相差显微术和 / 或荧光标记的使用进行细胞核的定位和细胞核 UV 吸收的确定。在第二个实施方案中（下文中称为实施方案 2），使用相差显微术和荧光标记进行细胞核的定位和细胞核 UV 吸收的确定。本领域技术人员了解这两个实施方案的某些方面（将进行更详细的讨论）例如在使用荧光标记的情况中的温育和漂洗步骤、检测设备和 UV 波长范围可以相似地应用至上文设想的其他实施方案中。在描述了所述两个实施方案的一些内容后，将要讨论可以如何使用细胞核 UV 吸收 / 细胞核信号强度确定细胞的倍性状态以及的癌发生性质的存在和 / 或可能发生。

[0118] 实施方案 1- 确定核酸的量

[0119] 如上文所述，在一个实施方案中，本发明涉及体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核核酸的量的方法，其中所述方法包括如下步骤：

[0120] a) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸，

[0121] b) 使用优选的波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光体外确定 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收。

[0122] 然而，在一个优选的实施方案中，使用优选的波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的紫外 (UV) 光。步骤 a) 和 b) 中特别优选的波长大约为 250nm、255nm 或 260nm。

[0123] 现在针对单一步骤 a) 至 b) 更详细地描述上文说明的确定细胞核核酸的量的方法（优选地用于检测至少一个生物样品中存在的至少一个癌细胞）。

[0124] 一旦如上文描述的制备了细胞，之后可以进行步骤 a) 以使用波长优选地在大约 240nm 和大约 280nm 之间的紫外 (UV) 光确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸。

[0125] DNA 对波长在 230 至 290nm 之间的 UV 光以与蛋白质不同的效率吸收。在图 4 中，蛋白质和 DNA 在这段波长范围内的吸收作为波长的函数作图。从这幅图可以清楚地看到当使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间例如 250nm 的 UV 光时，DNA 比蛋白质吸收多得多的光（大约多 50 倍）。

[0126] 这种行为可以用于确定细胞核的边界，即位置和 / 或尺寸。

[0127] 可以例如使用发射大约 240nm 和大约 280nm 之间的光的光点并用此光点在一个细胞的一个平面内扫描所述细胞。这可以例如使用共聚焦激光扫描显微镜实现。由于细胞核几乎包含细胞的全部 DNA，并且由于细胞质相当程度地由蛋白质组成，因此当所述光点从细

胞质透射至细胞核时,将会观察到吸收急剧增加。因此如果用这种光点扫描细胞的一个平面截面,可以通过测量吸收的改变清楚地鉴别所述细胞核的边界。

[0128] 为了本发明的目的,可以使用波长优选地在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光确定细胞内细胞核的边界。在本发明进一步优选的实施方案中,所述波长是大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0129] 使用共聚焦显微镜装置,可以将所述细胞的细胞核内的探测聚焦。典型地使共聚焦装置的探测点 (probe spot) 小于细胞核。

[0130] 使用此方法,可以不仅在单一框架内定位细胞核的位置,还可以实际上确定细胞核的整体尺寸即其体积。

[0131] 这可以如下进行。通过如上描述在一个单一平面内扫描光点,可以确定如上描述的确定反射光的强度。在移动方向上的距离 (在此距离内信号相对较低) 测量细胞核的局部厚度。

[0132] 如图 5 所示,对于细胞核的单一平面内的单一扫描,这些 1-D 扫描可以扩展至 3 维,以通过对不同平面进行同样的测量获得细胞核的完整形状。在不同坐标 (xy), 细胞核的局部厚度在 z 方向测量。因此,通过来自各个平面的不同 1-D 图像重建 3-D 图像,可以重建并计算细胞核的表观和体积。

[0133] 从细胞核反射回来的 UV 光的量 (如通过共聚焦装置测量的) 反比于被所述光点探测的区域吸收的光的量。假设此吸收在整个细胞核都几乎相等,那么可以优选地校准所述测量并确定细胞核核酸的 UV 吸收。

[0134] 校准由确定在所述共聚焦扫描的同一平面内细胞核和细胞核外的区域对 UV 光的吸收组成。对于细胞核内和外的测量,光线在到达感兴趣的细胞之前几乎穿透相同量和距离的组织,在两次测量中产生相当的和相似的背景信号。因此,细胞核吸收 vs. 非细胞核吸收的测量值之间的比例可以作为细胞核吸收的绝对测量值。但是,如果分析单层细胞,可能并不总是需要校准信号。

[0135] 在本发明的优选的实施方案中,使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。在一个特别优选的实施方案中,使用波长为大约 250nm、255nm 或 260nm 的 UV 光。

[0136] 使用 UV 光,特别是波长在 240nm 和 280nm 之间的 UV 光的原因仍然是细胞核中的 DNA 在这一波长范围内显示比蛋白质高得多的吸收 (参见图 4)。

[0137] 因此既含有蛋白质也含有 DNA 的细胞核比细胞的剩余部分 (主要含有蛋白质而几乎没有 DNA) 吸收更多的光。

[0138] 优选地使用共聚焦激光扫描显微镜,可以测量细胞核内的物质反射的 UV 光,并将其与细胞核外的细胞物质反射的进行对比。通过计算被细胞核吸收的 UV 光与被细胞核外的区域吸收的 UV 光的比值,可以获得一个信号,其是用共聚焦扫描获得的单一平面内的 DNA 密度的测量值。

[0139] 因此,根据本发明,特别通过校准细胞核内的 UV 吸收信号可以获得细胞核 UV 吸收的测量值。如果仅比较同一平面的信号的话,这个单一平面的 (校准的) 信号可以当作 UV 吸收的测量值。然而,也可以将用于确定细胞核的体积的各个平面的 (校准的) 信号 (见上文) 相加,获得对整个细胞的 UV 吸收的测量。

[0140] 所有这些优选地通过使用共聚焦激光扫描显微术实现,其中使用波长在大约

240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。在一个特别优选的实施方案中,使用波长为大约 250nm、255nm 或 260nm 的 UV 光。

[0141] 本领域技术人员当然熟知记录 UV 吸收信号以及使用这些信号计算例如细胞核的图像的方法。

[0142] 确定信号强度,即吸收的或透射的光的量,可以使用典型地用于这些目的的仪器进行。

[0143] 为了检测所述信号,可以使用能够检测 UV 吸收信号的显微镜。在本发明一个优选的实施方案中,同样的显微镜可以提供所需要的设备以在相差中也观察待检细胞。一种可以优选地用于检测 UV 吸收信号的显微镜类型可以是共聚焦激光扫描显微镜。

[0144] 共聚焦显微术具有优于传统光学显微术的一些优点,最重要的优点之一是消除扭曲图像的焦点外信息、可控景深和亚微米分辨率。共聚焦显微术的一个进一步的优点是可以通过过滤掉样品的各个部分的焦点外荧光,从而不干扰焦点内的部分或截面,从而产生比通过传统光学显微术获得的相当的图像明显更为清晰,并且显示更好的分辨率的图像。

[0145] 共聚焦扫描显微术的基础原理是使用了在与物镜被聚焦的点“共轭”的显微镜透镜系统的焦点具有小孔的屏幕。只有来自物镜焦点的光被聚焦在所述小孔并可以通过,到达检测器,例如可以是电荷耦合装置 (CCD)。来自样品的焦点外截面的光被几乎全部过滤掉。

[0146] 因此,对于 x- 和 y- 方向,共聚焦显微镜具有比传统显微镜显著更好的分辨率。另外,其在 z- 方向具有更小的景深。通过扫描穿过样品的焦点,可以观察样品的不同平面,并从而重建样品的 3 维图像。进一步地,共聚焦显微术与不同波长的光都相容。

[0147] 对于对细胞核进行定位,共聚焦扫描显微镜可以使用单色光或复色光;然而,波长在 240nm 和 280nm 之间的单色 UV 光可能是优选的。特别优选的可能是波长为 250nm、255nm 或 260nm 的 UV 光。

[0148] 对于共聚焦激光扫描显微镜,可以使用例如 LEICA DMLM 并具有 Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit 照相机单元 (www.qimaging.com) 的显微镜用于测量荧光信号的信号强度。

[0149] 信号强度(即被吸收的或透射的光的量)的确定通过使用典型地用于这些目的的仪器进行。

[0150] 因此,可以例如使用连接至当用上述光源激发时用于观察细胞的显微镜光圈的电荷耦合装置或数码照相机。当然也可以使用胶卷等等。

[0151] 检测单元可以例如是通过 BQ6000 图像采集板 (frame-grabber board) 连接至计算机的 Optronics DEI-700CE three-chip CCD 照相机。或者可以使用 Hitachi HV-C20three-chip CCD 照相机。用于图像分析的软件包可以例如是 Bioquant True Color Windows 98v3.50.6 图像分析软件包 (R&M Biometrics, Nashville, TN) 或 Image-Pro Plus 3.0 图像分析软件包。可以使用的另一个系统是 Bio View Duet 系统 (Bio View Ltd, Rehovot, Israel), 所述系统基于双模、全自动显微镜 (AxioPlan 2, Carl Zeiss, Jena, Germany)、XY 驱动的 8- 载片平台 (8-slides stage) (Marzhauser, Wetzler, Germany)、3CCD 顺序扫描彩色照相机 (DXC9000, Sony, Tokyo, Japan) 和用于控制和分析系统和数据的计算机。

[0152] 本发明的一个优点是细胞核的边界的确定和细胞核 UV 吸收的测量通过同样的仪器进行,例如共聚焦激光扫描显微镜。

[0153] 另一个优点是本发明不需要使细胞核 DNA 用例如荧光标记(尽管可以使用)、化学反应或免疫组化染色显色,因为优选的 UV 波长 240nm 至 280nm 及特别地 250nm、255nm 和 / 或 260nm 足以可靠地鉴别细胞核和可用于计算存在的细胞核 DNA 的量的 UV 吸收值。

[0154] 实施方案 2- 确定核酸的量

[0155] 如上文所述,在一个实施方案中,本发明涉及体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核酸的量的方法,其中所述方法包括如下步骤:

[0156] a) 将所述至少一个细胞与至少一种能够与所述至少一个细胞内的双链核酸相互作用的荧光标记接触;

[0157] b) 用通过用合适的光源激发所获得的信号确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的信号强度;

[0158] c) 通过相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0159] d) 通过将 b) 中获得的信号强度与 c) 中获得的细胞核的位置和 / 或尺寸相关联而确定结合至双链核酸的荧光标记的细胞核信号强度。

[0160] 在本发明另一个实施方案中,步骤 c) 可以在步骤 a) 之前进行,步骤 d) 可以在步骤 b) 之后进行。

[0161] 一旦已经以合适的方式制备了包括所述至少一个待检生物样品的所述至少一个(推断的癌)细胞的细胞,可以将被固定化的并且任选地被渗透并且固定的细胞与能够与细胞内的双链核酸特异地相互作用的至少一种荧光标记接触。

[0162] 为此目的,所述至少一种荧光标记可以配制进合适的温育缓冲液。原则上可以使用任何中性 pH 的等渗缓冲液。

[0163] 可以将细胞样品与这种含有荧光标记的溶液在至少 4°C 一起温育至少 10 秒。典型地,并且在一些情况中优选地,温育在室温(例如 20-25°C)进行至少几分钟。

[0164] 一旦将得自所述至少一个生物样品的细胞样品的至少一个(推断的癌)细胞与能够与双链核酸特异地相互作用的至少一种荧光标记接触,可以在上文中称为步骤 b) 的第二步骤中确定通过用合适的光源激发获得的特异地结合至温育的细胞内的双链核酸的所述至少一种荧光标记的信号强度。

[0165] 在测量所述信号强度之前,可以任选地漂洗与含有荧光标记的温育溶液一起温育的细胞样品,以增强信号的信号 / 背景比例。这些漂洗溶液可以含有生理学更高盐浓度或和 / 或去污剂的缓冲液以降低非特异性相互作用和背景信号,所述去污剂例如 NP-40、Tween 20、Tween 80、Triton X100 等等。这种漂洗缓冲液可以包含例如含有 0.05% Tween20 的 PBS pH7.4。可以使用任何生理学 pH 的等渗缓冲液。所述漂洗步骤是任选的,因为荧光标记当结合至双链核酸时显示比非结合的标记更高的信号强度。然而,为了更好的信号 / 背景比例,漂洗步骤可以是优选的。

[0166] 用能够激发所述荧光标记的光源进行激发。一般而言,所述光源发射波长在大约 100nm 至大约 800nm 之间。所述激发波长依赖于使用的荧光标记的性质。在溴化乙锭、碘化吡啶和 DAPI 的情况中,典型地使用从大约 300nm 至大约 550nm 的紫外光。这个波长范围对于其他标记例如碘化吡啶等等也是优选的。

[0167] 根据使用的荧光标记的吸收谱,所述光源可以发射单色光或复色光。

[0168] 应当了解所述荧光标记的信号强度对于不同细胞应当各自测量,这在使用显微镜时是必需的,以使得细胞可以在空间上分离。

[0169] 对于检测所述信号,可以使用能够检测荧光信号的显微镜。在本发明一个优选的实施方案中,同样的显微镜可以提供所需要的设备以便也以相差观察待检细胞。可以用于检测荧光信号的一种显微镜类型可以是共聚焦激光扫描显微镜。然而,对于本发明的方法典型地预见的应用,具有需要的滤镜、检测单元、软件等等的相差显微镜可能是足够的。

[0170] 信号强度(即被吸收的或透射的光的量)的确定通过使用典型地用于这些目的的仪器进行。这些仪器中的一些已经在上文实施方案 1 的文中得到描述。

[0171] 因此,可以例如也使用连接至用于当用上述光源激发时观察细胞的显微镜光圈的电荷耦合装置或数码照相机。当然也可以使用胶卷等等。

[0172] 荧光测量同样可以用任何标准滤镜(filter cube)(由阻挡滤片、激发滤片和二色镜组成)或针对特殊用途的任何定制滤镜进行,前提是发射谱处于系统灵敏度的谱域内。谱生物成像(spectral bioimaging)也可以与任何标准空间滤波方法例如暗场和相差和甚至偏振光显微术结合使用。

[0173] 可以使用例如电荷耦合装置(CCD)记录由上文所述的荧光标记产生的信号的荧光光学读数,其中所述电荷耦合装置为了定性区分光学效应(散射、反射)(通过反射光显微术或透射光显微术)实现荧光团和暗场的激发。在此过程中,细胞成像通过曝光或通过使用高分辨率光学器件重建产生。共聚焦扫描系统例如 US 5,304,810 描述的也使得可以评估来自样品被选取的平面的荧光信号。它们基于使用小孔沿着光轴选择荧光信号并且通常装备有强力自动聚焦系统。这些系统使得可以精确地定位产生自荧光标记的信号并测量它们的信号强度。

[0174] 检测单元仍旧可以例如是通过 BQ6000 图像采集板(frame-grabber board)连接至计算机的 Optronics DEI-700CE three-chip CCD 照相机。或者可以使用 Hitachi HV-C20three-chip CCD 照相机。用于图像分析的软件包可以例如是 Bioquant True Color Windows 98v3.50.6 图像分析软件包(R&M Biometrics,Nashville,TN)或 Image-Pro Plus 3.0 图像分析软件包。可以使用的另一个系统是 Bio View Duet 系统(Bio View Ltd,Rehovot,Israel),所述系统基于双模、全自动显微镜(Axioplan 2,Carl Zeiss,Jena,Germany)、XY 驱动的 8- 载片平台(Marzhauser,Wetzler,Germany)、3CCD 顺序扫描彩色照相机(DXC9000,Sony,Tokyo,Japan)和用于控制和分析系统和数据的计算机。

[0175] 因此也可以使用例如具有相差的 LEICA DMLM 并且具有 Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit 照相机单元(www.qimaging.com)的显微镜用于测量荧光信号的信号强度。

[0176] 由于众所周知用于测量荧光信号的信号强度的检测单元会达到饱和极限,因此可能需要稀释用于将所述细胞样品与荧光标记接触的荧光标记溶液和/或相应地稀释细胞样品。

[0177] 在上文中称为步骤 c) 的第三步骤中,使用相差显微术确定包括所述至少一个(推断的癌)细胞的生物样品的细胞的细胞核的位置和/或尺寸。为此目的,可以使用具有相差的典型的显微镜例如 LEICA DMLM。

[0178] 本领域技术人员熟知通过相差显微术进行的被固定和固定化的细胞的显微镜分析。

[0179] 为了本发明的目的,希望使用使得能够检测由荧光标记产生的信号,并且同时使得能够观察同样的细胞并从而通过相差显微术确定细胞核的位置和/或尺寸的显微镜。在此情况中,可以使用共聚焦激光扫描显微镜例如前述显微镜。使得同时记录荧光信号和相差图像的显微镜特别包括显微镜例如具有 NPlan 20x/0.40PH1 物镜或 Nplan 40x/0.65PH2 物镜的 LEICA DMLM。然而,也可以使用不同设备进行荧光信号的检测和通过相差显微术进行的细胞核的位置和/或尺寸的确定。

[0180] 一旦已经确定了所述荧光标记在用合适的光源激发后的信号强度并确定了样品中观察到的细胞的细胞核的位置和/或尺寸,在上文中称为步骤 d) 的第四步骤中,可以通过将前述步骤 b) 中获得的信号强度与上文描述的方法的前述步骤 c) 中获得的细胞核的位置和/或尺寸相关联而确定特异地结合至双链核酸(优选地细胞核 DNA) 的荧光标记的细胞核信号强度。这个步骤是必需的,因为典型地不能在用于确定荧光信号强度的模式中检测细胞核。

[0181] 术语“细胞核信号强度”是指产生自结合至细胞的细胞核内的(双链)核酸的荧光标记的信号强度。

[0182] 短语“将前述步骤 b)(或在下文中诊断方法的情况中的步骤 c)) 中获得的信号强度与前述步骤 c)(或在下文中诊断方法的情况中的步骤 d)) 中获得的细胞核的位置和/或尺寸相关联”是指将测量荧光信号强度时获得的对于一个细胞的图像与同一细胞的相差图像相叠加,并从而确定从所述细胞核发射的荧光标记信号的信号强度。将各个图像相叠加并确定细胞核信号强度当然可以用如上述熟知的图像分析软件包进行。

[0183] 在所述关联中(所述关联可以使用典型地与例如共聚焦激光扫描显微镜一起提供的基于计算机的算法和软件进行),只考虑那些从细胞的细胞核发射的信号。需要使用相差显微术确定所述细胞核的尺寸和/或位置,以向基于计算机的算法提供必需的信息以去掉所有在步骤 b) 中确定的不是产生自细胞核,而是产生自其他细胞结构例如细胞质的信号强度。

[0184] 进行这种关联的目的是因为本发明的能够特异地与双链核酸相互作用的荧光标记不仅会引起细胞核的荧光信号,还会引起遍布所述细胞的信号,不过由于大部分双链核酸以染色体 DNA 的形式处于细胞核内而使得产生自细胞核的信号更强。

[0185] 由于产生自例如细胞的细胞质内的双链核酸的信号会负面影响例如细胞核的 DNA 含量的确定,因此本发明的方法仅使用从细胞核发射的信号。这显著提高了例如 DNA 含量测量的准确性。

[0186] 然而,由于细胞核的尺寸和/或位置不是使用如现有技术那样相对耗力的染色方法确定的,而是使用相差显微术,因此进行本发明的方法所需的时间显著减少。

[0187] 因此,将能够特异地与双链核酸相互作用的荧光标记和相差显微术组合使用以确定细胞核的位置和/或尺寸并将考虑的荧光信号后续限制为从细胞核发射的荧光信号,使得可以对细胞核内双链核酸的量进行迅速和容易的确定以及接下来对生物样品内的癌细胞进行检测。

[0188] 通过使用相差显微术将考虑的信号强度限制为从生物样品内潜在的癌细胞的细

胞核发射的信号强度,本发明的方法使得可以对细胞核内双链核酸的量进行迅速和准确的确定,在下文将进行解释。

[0189] 此处讨论的标记可以就是上文已经详细说明的那些标记。选自包括结合至 DNA 大沟或小沟的物质、4',6-二脒-2-苯基吡啶 (DAPI)、碘化吡啶 (PI)、溴化乙锭 (EtBr) 或 SYBR green 的一组的荧光标记可以是优选的。溴化乙锭可以是特别优选的,因为其特别使得可以检测生物刷拭活检样品中的与上皮癌相关的癌细胞。

[0190] 如上文所述与相差显微术组合起来的通过使用特异于双链核酸的荧光标记检测生物样品中至少一个癌细胞的方法使得可以与例如福尔根染色方法相比加速进行 DNA 细胞术方法。

[0191] 通过相差显微术步骤,精确定位细胞核并确定其尺寸以及接下来使用这一信息通过仅考虑从受检细胞的细胞核发射的荧光信号进行进一步的 DNA 含量确定成为可能。由于使用相差显微术确定细胞核的位置和 / 或尺寸,不需要在同样耗时耗力的第二反应中对细胞核进行染色。

[0192] 假设细胞核大小和位置由相差显微术确定,那么 DNA 含量的测量可以基于从细胞核发射的荧光信号,因此不会丧失 DNA 细胞术测量的精确性。由于荧光染色方法是几分钟的事,相差测量是几秒钟的事,因此 DNA 成像细胞术测量的进行比以前已知的 DNA 成像细胞术方法在时间上显著加快。在本发明一些实施方案中,本发明使得能够甚至在医生办公室内测量细胞的 DNA 含量。

[0193] 在本发明一个实施方案中,所述癌细胞可能与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

[0194] 因此本发明特别提供了用于通过使用能够与细胞内双链核酸相互作用的荧光标记检测生物样品中的至少一个癌细胞的方法。通过进行相差显微术,可以确定细胞核的位置和 / 或尺寸。之后这一信息可以通过例如使用适当的软件包与针对全细胞在例如覆盖图中获得的荧光标记的信号强度相关联,从而只有源自细胞核的信号被用于进一步计算。一旦获得了推断的至少一个癌细胞的荧光标记的细胞核信号强度,则将这个细胞核信号强度与通过同样方法针对已知为非癌的,并且以光密度图 (densitogram) 的形式已知其倍性状态 (2 或 4) 的相当的或相同的细胞类型获得的标准细胞核信号强度进行对比。显著偏离 2 或 4 的值或参考光密度图的峰面积被认为提示癌发展。

[0195] 本领域技术人员知道上文讨论的步骤顺序可以改变。因此可以通过首先将样品与荧光标记接触并温育开始、进行相差显微术以及之后确定荧光信号强度。在某些环境中,也可以例如首先进行相差显微术,之后将样品与荧光标记接触并温育,最后测量荧光信号强度。

[0196] 或者步骤 c) 可以在步骤 a) 之前进行,步骤 d) 可以在步骤 b) 之后进行。

[0197] 倍性状态的确定

[0198] 在下文将要描述如在实施方案 1、实施方案 2 中或根据上述任何其他实施方案获得的细胞核 UV 吸收 / 细胞核信号强度可以如何用于确定细胞的 (推断的) 癌发生状态。

[0199] 大多数哺乳动物细胞对于每一条染色体含有两套是本领域常识。因此,染色体数目可以计为 $2n$, 其中 n 是染色体数目。然而,当细胞复制时,它们在将染色体分离进子细胞

之前将染色体数目加倍。

[0200] 因此在 DNA 分离期间和细胞分裂之前,哺乳动物细胞会含有可以计为 $4n$ 的染色体数目,其中 n 还是染色体数目。

[0201] 如果哺乳动物细胞的 DNA 的量是指染色体数目,那么可以将称为“健康”或“正常”细胞的非癌细胞的 DNA 含量根据细胞的复制状态指定为 2 或 4。

[0202] 在本发明的范围内术语“倍性状态 (ploidy state)”是指正常的非癌细胞的 DNA 含量,如上文的解释,其值可以是 2 或 4。

[0203] 如何通过使用前述福尔根染色方法确定非癌细胞的倍性状态同样是本领域的常识。在此范围内,通过参考将 Hardie et al. (The Journal of Histochemistry&Cytochemistry (2002), 50 (6), 735-749) 并入本文,其描述了使用 DNA 染色方法确定细胞的 DNA 含量。

[0204] 在 Hardie et al. 参考的第 738 页的“Image Analysis Densitometry”部分,解释了通过例如福尔根染色方法或荧光标记或 UV 吸收信号获得的信号强度可以如何转化为光密度测定值。如上文所解释的,健康的非癌细胞会含有 $2n$ 或 $4n$ 染色体,其中 n 是染色体数目。因此,如本发明所用的得自细胞核 UV 吸收信号的信号强度的光密度测定分析会产生具有两个峰区的光密度测定模式。

[0205] 这两个峰区分别代表值为 2 或 4 (如果细胞正在增殖)。图 1 提供了这种光密度测定模式的一个实例。在这个特定情况中,分析了非增殖细胞群,这解释了为什么没有相应于 4 的峰。如果对于相同组织 (典型地也已知为非增殖的) 的细胞群,观察到值为 4,这将提示增殖,在这种情况下提示癌状态。

[0206] 简而言之,对于成像分析光密度测定法,通过与计算机相连的显微镜耦合的 CCD (电荷耦合设备) 检测设备或数码照相机获取用于观察细胞并测量细胞核 UV 信号的显微镜视野。被数字化成像的图像作为一系列像素被记录下来,每一个像素被赋予一种特征颜色和强度。之后典型地将强度通过基于计算机的算法转换为吸收值,之后通过图像分析软件展示为上述光密度图。

[0207] 本领域技术人员当然了解正常的非癌细胞的有意义的并且可靠的光密度图应当优选地由一群大量细胞计算得来,数量为优选地 25-100 个细胞典型地是足够的。在本发明一个优选的实施方案中,细胞核 DNA 的量通过如上文描述的对大约至少 30、40、50 或 60 个细胞测量细胞核 UV 吸收确定。

[0208] 在本发明一个进一步的实施方案中,可以使用细胞核 UV 吸收检测至少一个生物样品中的癌细胞。根据前述实施方案 2 获得的结合至双链核酸的荧光标记的细胞核信号强度当然也可以用于检测至少一个生物样品中的至少一个癌细胞。

[0209] 这通过使用本发明的上文描述的方法确定推断的癌细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态实现。之后将确定的倍性状态与倍性状态已经通过用相同方法获得的来自细胞核的信号强度确定的非癌细胞的倍性状态进行对比。

[0210] 为了确定是否一个推断的癌细胞确实是有癌症倾向的细胞,如上文描述的确定光密度图。针对非癌细胞观察到的光密度图称为“标准”或“参考”光密度图。

[0211] 优选地,这些参考光密度图用与检测癌细胞相同的方法测量,但是应当确保只使用非癌细胞。这可以通过使用同一个体但是来自不同于怀疑是癌性的其他组织位置的细胞实现。换一种方式或者另外地,可以使用相同的或相当的但是来自已知未患癌症的不同个

体的细胞类型。如果使用同一个体的细胞,应当优选地使用相当的细胞类型,只要确保这些细胞是非癌性的。在本领域技术人员知识范围内已知为了获得标准光密度图(即直方图)而需要研究的细胞数目和类型,其在 25 和 100 个细胞之间变化并且优选地大约 30、40、50 或 60 个细胞。

[0212] 为了本发明的目的,术语“相当的细胞类型(comparable cell type)”涉及与被怀疑的癌细胞具有相当的来源并且具有相当的细胞特征的细胞类型。例如如果针对癌症发展测试粘膜细胞,那么所述标准参考细胞也应当是粘膜来源的。另一方面,如果针对癌症发展测试淋巴细胞,那么所述标准参考细胞也应当是淋巴来源的以成为相当的细胞类型。

[0213] 典型的标准或相当的细胞类型可以是淋巴细胞、粒细胞、正常上皮或基质细胞。

[0214] 如果可能,已知为非癌性的并且用作从推断的癌细胞获得的细胞核信号强度的标准参考的相当的细胞类型的细胞核 UV 吸收/细胞核强度应当在高度相似的(如果不是相同的)条件下测量。

[0215] 因此,所述相当的细胞类型(也可以称作标准或参考细胞)应当从相当的生物探针制备并分离,并且与被分析的细胞基本上相同地固定和渗透(如果需要)。另外,参考细胞应当与真正的癌细胞用相同的显微镜条件在同一轮中分析。

[0216] 如果对于某个细胞,倍性状态被确定为偏离上述值 2 或 4,这提示实质上的复制、插入、缺失或染色体重排,进而提示癌细胞。在这种情况下,这个细胞的倍性状态偏离所述值 2 或 4;也称为非整倍性。这当然假设考虑甚至在其正常状态也典型地增殖的细胞类型。

[0217] 因此,如果检查通常已知为非增殖性的细胞,倍性值为 4 可能提示癌症发展。

[0218] 如果检查在其正常状态也是增殖性的细胞,那么值为 4 不认为是提示癌症发展。在这种情况下,只有偏离 2 和 4 才提示癌症发展。

[0219] 在本发明的范围内,术语“非整倍性状态”涉及细胞内细胞核 DNA 的异常量。

[0220] 为了获得可靠的结果,细胞核 DNA 的量和之后的推断的癌细胞的光密度图(直方图)优选地从一群细胞计算,并且优选地测量大约 100 至 700 个细胞,优选地大约 100 至 300 个细胞。

[0221] 如果检查例如来自肝组织的癌细胞,将会例如获得具有两个主峰的光密度图,对应值为 2 和 4。然而,除了非癌细胞的情况之外,所述两个主峰光密度图不会是尖且窄的,而是宽的。另外,会在所述光密度图中观察到低于 2、高于 2、低于 4 和高于 4 的峰和信号。图 2 示出了一个实例。

[0222] 由于在任何实例中大多数细胞的 DNA 含量是 2,偏离所述大多数也可以被认为是异常或可疑的。在癌样品的情况中(正常细胞是少数),在 DNA 含量方面仍有可以用于将所述样品标记为可疑的大的差异。

[0223] 因此如果基于根据本发明如上文描述的所获得的细胞核 UV 吸收计算的光密度图显示峰信号在相应于值为 2(和 4,依赖于所述细胞在其正常状态中的增殖状态)的峰之外,可以将一个细胞评为癌性的。

[0224] 然而,相应于值为 2(和 4)的峰其本身可能也提示细胞的癌性可能,如果它们显示较宽的曲率的话。为了根据相应于值为 2(和 4)的峰型确定一幅光密度图是否确实提示癌症发展,可以将推断的癌细胞样品的光密度图与上文描述的标准或参考光密度图叠加。

[0225] 在提示标准光密度图的值 2 和 4 的光密度图的峰的曲线下的区域(area under

the curve, AUC) 被认为提示非癌细胞, 并且任何偏离推断的癌细胞的光密度图的相应峰的 AUC 至少 10% 被认为提示癌细胞或状态。在一个优选的实施方案中, 所述偏离至少是 15%、至少是 20%、至少是 25%、至少是 30%、至少是 40% 或至少是 50%。

[0226] 也可以应用在 Haroske et.al. "1997ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry", Analytical Cellular Pathology 17(1998)189-200 中列出的标准, 其中解释了当细胞被认为是正常的或癌性的时的详细情况。

[0227] 因此, 可疑癌细胞(群)的细胞核 UV 吸收 / 细胞核信号强度与从相当的非癌细胞类型获得的细胞核 UV 吸收的对比提示正在进行的或未来可能的癌症发展。

[0228] 为了本发明的目的, DNA 含量的显著异常被认为提示癌症发展, 如果可疑癌细胞的倍性状态偏离倍性值 2 (和 4, 如果所述细胞在其健康状态中是增殖的) 至少 10% 的话。在一个优选的实施方案中, 所述偏离至少是 15%、至少是 20%、至少是 25%、至少是 30%、至少是 40% 或, 至少是 50%。光密度图中的一个峰代表值为 2 或 4, 对于这个峰的与在参考光密度图中的相应峰相同的部分。

[0229] 相应于已有实践, 如果相应于参考光密度图的值为 2 的峰的峰范围为从 1.8 至 2.2, 可以将细胞的 DNA 含量称作近似二倍体 (peridiploid)。

[0230] 如果相应于参考光密度图的值为 4 的峰的峰范围为从 3.6 至 4.4, 可以将细胞的 DNA 含量称作近似四倍体 (peritetraploid)。

[0231] 在这些范围之外的值均被认为是 X- 倍体。

[0232] 为了本发明的目的, 具有近似二倍体、近似四倍体和 X- 倍体值的细胞和组织被认为是癌细胞。

[0233] 因此, 上文描述的方法可以用于通过将用本发明的方法对于推断的癌细胞获得的细胞核 UV 吸收与使用相同方法对于已知为非癌性的相当的细胞类型获得的细胞核 UV 吸收对比计算生物样品中的推断的癌细胞的倍性 (非整倍性) 状态。

[0234] 为了本发明的目的, 术语“非癌性的 (non-cancerous)”是指已知不提示癌症发生的细胞。

[0235] 在本发明的一个实施方案中, 所述癌细胞可以与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

[0236] 诊断方法

[0237] 如上文所述, 本发明也涉及诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的体外方法, 所述方法包括如下步骤:

[0238] a) 提供得自人或动物对象的生物样品;

[0239] b) 体外确定所述样品的至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0240] c) 体外测量在 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收;

[0241] d) 从步骤 d) 中获得的细胞核信号强度计算所述至少一个细胞的倍性状态,

[0242] e) 基于所述倍性状态确定癌症的存在和 / 或可能未来发生癌症。

[0243] 本发明的诊断方法也包括实现确定细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸并确定所述细胞核的边界内的 UV 吸收的基本概念的各种实施方案。为了确定细胞核位置和 / 或尺寸 (等同于确定细胞核的边界), 仍旧可以使用利用可见光的相差显微术以及利用 UV 光的检

测方法。为了确定细胞核的 UV 吸收,可以仅依赖于 UV 测量而不加入能够与双链核酸相互作用的荧光标记,或者可以使用这些标记。

[0244] 在下文中,将要讨论这些方法的一般方面。将要针对两个特别的实施方案讨论进一步的问题。本领域技术人员了解将要更详细地讨论的这两个实施方案的某些方面可以相似地应用于上文预料的其他实施方案。

[0245] 对于步骤 a),生物样品可以使用常规方法例如刷拭活检、抽取、细针抽取活检、内窥镜活检等等从人或动物对象获得。

[0246] 之后可以如上文描述的可以优选地应用于检测生物样品内至少一个癌细胞的体外确定细胞内细胞核双链核酸的量的方法的步骤 a) 和 b) 进行步骤 b)、c) 和 d)。

[0247] 在上文称为步骤 e) 的最后一步中,基于受检细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。在介绍两个实施方案后这个最后一步将会更加详细地进行讨论。

[0248] 当然,上文给出的关于确定针对推断的癌细胞的光密度图和参考或标准的光密度图的解释,术语例如“体外”、“大约”、“倍性”、“非整倍性”、“近似二倍体”、“近似四倍体”、“x- 倍体”、“AUC”等等的含义等同地应用于本发明的诊断和 / 或预防癌症的方法的范围内。

[0249] 术语“体外”是指上述诊断方法的所有步骤不直接接触所述人或动物体而进行。

[0250] 实施方案 1- 诊断方法

[0251] 在一个实施方案中,本发明涉及诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的体外方法,所述方法包括如下步骤:

[0252] a) 获取包含来自所述对象的至少一个细胞的生物样品;

[0253] b) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0254] c) 使用 UV 光体外测量在 b) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收;

[0255] d) 从步骤 c) 中获得的细胞核 UV 吸收计算所述至少一个细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态,以及

[0256] e) 基于所述细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

[0257] 步骤 b) 和 c) 可以如上文描述的体外确定一个细胞内的细胞核双链核酸的量的实施方案 1 的步骤 a) 和 b) 进行,所述实施方案 1 可以优选地进行以检测生物样品中存在的至少一个癌细胞。

[0258] 在本发明这些方面的一个优选的实施方案中,使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光在步骤 a) 和 / 或 b) 中测量 UV 吸收。特别优选的是波长例如为大约 250nm、255nm 或 260nm。

[0259] 步骤 d) 也可以如上文描述的进行。

[0260] 在上文称为步骤 e) 的最后一步中,基于受检细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

[0261] 在进行这个诊断和 / 或预测癌症的方法中,可以使用相同的用于分离生物样品、用于制备细胞样品、用于将涉及的细胞可能地与荧光标记接触、用于确定信号强度的方法。

[0262] 因此,在一个优选的实施方案中,使用共聚焦激光扫描显微术鉴别细胞核的边界和测量细胞核 UV 吸收。为此目的,可以使用例如上文描述的仪器。

[0263] 实施方案 2- 诊断方法

[0264] 在另一个实施方案中,本发明涉及诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的体外方法,所述方法包括如下步骤:

[0265] a) 获取来自所述对象的生物样品;

[0266] b) 将所述至少一个细胞与能够与所述至少一个细胞内的双链核酸在所述对象体外相互作用的至少一种荧光标记接触;

[0267] c) 用通过用合适的光源激发获得的信号确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的信号强度;

[0268] d) 通过相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0269] e) 通过将 c) 中获得的信号强度与 d) 中获得的细胞核的位置和 / 或尺寸相关联而确定结合至细胞核双链核酸的荧光标记的细胞核信号强度。

[0270] f) 从步骤 e) 中获得的细胞核信号强度计算所述至少一个细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态

[0271] g) 基于所述细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

[0272] 步骤 b) 至 e) 可以如上文描述的确定一个细胞内的细胞核双链核酸的量的实施方案 2 的步骤 a) 至 d) 进行,所述实施方案 2 可以优选地进行以检测生物样品中存在的至少一个癌细胞。

[0273] 步骤 f) 也可以如上文描述的进行。

[0274] 在上文称为步骤 g) 的最后一步中,基于受检细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

[0275] 在进行这个诊断和 / 或预测癌症的方法中,可以使用相同的用于分离生物样品、用于制备细胞样品、用于将涉及的细胞与荧光标记接触、用于确定信号强度、用于如上文列出的进行相差显微术以进行确定细胞核内双链核酸的量的方法的方法。

[0276] 因此,所述荧光标记可以是任何能够与双链核酸特异地相互作用并在用合适的光源激发后提供荧光信号的分子。

[0277] 这些荧光标记可以例如结合至 DNA 大沟或小沟。它们可以是核酸碱基嵌入剂并选自包括 4',6-二脒-2-苯基吡啶 (DAPI)、碘化吡啶 (PI) 和溴化乙锭 (EtBr) 的一组。荧光标记也包括 SYBR green。

[0278] 本领域技术人员知道上文讨论的步骤顺序可以改变。因此可以通过首先将样品与荧光标记接触并温育开始、进行相差显微术以及之后确定荧光信号强度。在某些环境中,也可以例如首先进行相差显微术,之后将样品与荧光标记接触并温育,最后测量荧光信号强度。

[0279] 在本发明的一个实施方案中,诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的方法大体上依赖于前述步骤,步骤 d) 在步骤 b) 至 c) 之前,步骤 c) 之后进行步骤 e)、f) 和 g)。

[0280] 诊断方法 - 评估

[0281] 在上述方法中,在最后一步 e) 中 (或 g),在实施方案 2 的情况中),断定癌症可能的未来发生的存在。

[0282] 癌症诊断可以认为是阳性的,如果针对得自所述对象的生物样品的细胞确定的细胞核 DNA 含量或倍性值偏离相当的细胞类型的细胞核 DNA 含量或倍性值 2 (和 4,如果所述细胞在其健康状态中是增殖的) 至少 10% 的话,其中所述相当的细胞类型的细胞核信号强

度已经在高度相当的或相同条件下测量,并且其已知是非癌性的。在一个优选的实施方案中,所述偏离至少是 15%、至少是 20%、至少是 25%、至少是 30%、至少是 40%或,至少是 50%。

[0283] 在提示标准光密度图的值 2 和 4 的峰的曲线下的区域 (area under the curve, AUC) 被认为提示非癌细胞,并且任何偏离预测的癌细胞的光密度图的相应峰的 AUC 至少 10%被认为提示癌细胞并因此导致阳性诊断。在一个优选地实施方案中,所述偏离至少是 15%、至少是 20%、至少是 25%、至少是 30%、至少是 40%或至少是 50%。

[0284] 相应于已有实践,如果相应于参考光密度图的值为 2 的峰的峰范围为从 1.8 至 2.2,可以将细胞的 DNA 含量称作近似二倍体 (peridiploid)。

[0285] 如果相应于参考光密度图的值为 4 的峰的峰范围为从 3.6 至 4.4,可以将细胞的 DNA 含量称作近似四倍体 (peritetraploid)。

[0286] 在这些范围之外的值均被认为是 X- 倍体。

[0287] 为了本发明的目的,具有近似二倍体、近似四倍体和 x- 倍体值的细胞被认为是癌细胞,并且相应地,如果 DNA 含量被认为是近似二倍体、近似四倍体或 x- 倍体,将会作出阳性癌症诊断。

[0288] 所述诊断和 / 或预测癌症的体外方法可以用于诊断和 / 或预测选自包含白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症。

[0289] 所述诊断和 / 或预测癌症的方法可以用于分析选自包含骨髓细胞、淋巴结细胞、淋巴细胞、红细胞、神经细胞、肌肉细胞、成纤维细胞、角质形成细胞、粘膜样品、周围血样品、脑脊液样品、尿样品、渗出物样品、细针抽取物、细针抽取活检、周围血碎屑、皮肤碎屑、脱落细胞涂片、来自体液的细胞离心制备物、细胞分离样品 (在机械和 / 或酶分散之后)、石蜡包埋组织和冷冻切片的一组的样品。

[0290] 在下文中,特别列出涉及上文描述的实施方案 1 或 2 的本发明的某些方面:

[0291] 实施方案 1- 某些方面

[0292] 1. 体外确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核核酸的量的方法,包括如下步骤:

[0293] a) 体外确定所述细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸,

[0294] b) 使用 UV 体外测量 a) 中确定的细胞核的边界内的 UV 吸收。

[0295] 2. 根据 1 的方法,其中使用 UV 光和 / 或相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸。

[0296] 3. 根据 1 或 2 的方法,其中在步骤 a) 和 / 或 b) 中使用波长在大约 240nm 和大约 280nm 之间的 UV 光。

[0297] 4. 根据 3 的方法,其中在步骤 a) 和 / 或 b) 中使用波长为大约 250nm、255nm 或 260nm 的 UV 光。

[0298] 5. 根据 1 至 4 任一项的方法,其中所述细胞核核酸未用免疫组化染色、化学反应或荧光标记显色。

[0299] 6. 根据 1 至 5 任一项的方法,其中所述方法用于检测所述至少一个生物样品中的至少一个推断的癌细胞的方法。

[0300] 7. 根据 1 至 6 任一项的方法,其中所述至少一个细胞与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

[0301] 8. 根据 6 的方法,其中步骤 b) 中的细胞核 UV 吸收通过将步骤 b) 中获得的细胞核 UV 吸收与也使用权利要求 1 的步骤 a) 和 b) 分析的至少一个非癌细胞的细胞核 UV 吸收对比而用于计算推断的癌细胞的细胞核 DNA 含量或细胞的倍性状态。

[0302] 9. 根据 8 的方法,其中倍性状态或细胞核 DNA 含量偏离 2 至少 10%提示癌细胞。

[0303] 10. 根据 8 的方法,其中倍性状态或细胞核 DNA 含量为 1.8 至 2.2 提示近似二倍体状态,倍性状态或细胞核 DNA 含量为 3.6 至 4.4 提示近似四倍体状态,倍性状态或细胞核 DNA 含量在这些范围之外提示 X- 倍体状态。

[0304] 实施方案 2- 某些方面

[0305] 1. 确定至少一个生物样品中存在的至少一个细胞中的细胞核双链核酸的量的方法,包括如下步骤:

[0306] a) 将所述至少一个细胞与至少一种能够与所述至少一个细胞内的双链核酸相互作用的荧光标记接触;

[0307] b) 用通过用合适的光源激发所获得的信号确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的信号强度;

[0308] c) 通过相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0309] d) 通过将 b) 中获得的信号强度与 c) 中获得的细胞核的位置和 / 或尺寸相关联而确定结合至双链核酸的荧光标记的细胞核信号强度。

[0310] 2. 根据 1 的方法,其中所述方法用于检测所述至少一个生物样品中的至少一个推断的癌细胞。

[0311] 3. 根据 2 的方法,其中步骤 d) 中的细胞核信号强度通过将步骤 d) 中获得的信号强度与也使用权利要求 1 的步骤 a) 至 d) 获得的非癌细胞的细胞核信号强度对比而用于计算细胞的细胞核 DNA 含量或倍性状态。

[0312] 4. 根据 1 的方法,其中倍性状态或细胞核 DNA 含量偏离 2 或 4 至少 10%提示癌细胞。

[0313] 5. 根据 4 的方法,其中倍性状态或细胞核 DNA 含量为 1.8 至 2.2 提示近似二倍体状态,倍性状态或细胞核 DNA 含量为 3.6 至 4.4 提示近似四倍体状态,倍性状态或细胞核 DNA 含量在这些范围之外提示 X- 倍体状态。

[0314] 6. 根据 2 的方法,其中所述至少一个癌细胞与选自包括白血病、淋巴瘤、脑癌、脑脊液癌、膀胱癌、前列腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫癌、卵巢癌、肾癌、口腔及喉癌、食管癌、肺癌、结直肠癌、胰腺癌和黑素瘤的一组的癌症相关。

[0315] 7. 根据 1 的方法,其中所述生物样品选自包括骨髓细胞、淋巴结细胞、粘膜样品、周围血样品、脑脊液样品、尿液、渗出物、细针抽取物、周围血碎屑、皮肤碎屑、石蜡包埋组织和冷冻切片的一组。

[0316] 8. 根据 1 的方法,其中所述荧光标记选自包括结合至 DNA 大沟或小沟的物质、4',6-二脒-2-苯基吡啶 (DAPI)、碘化吡啶 (PI) 和溴化乙锭 (EtBr)、SYBR green、SYTOX Blue、SYTOX Green、SYTOX Orange、POP-1、BOBO-1、YOYO-1、TOTO-1、JOJO-1、POPO-2、

LOLO-1、BOBO-1、YOYO-3、TOTO-3、PO-PRO-1、BO-PRO-1、TO-PRO-1、JO-PRO-1、PO-PRO-3、LO-PRO-1、BO-PRO-3、YO-PRO-3、TO-PRO-3、TO-PRO-5、SYTO 40 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 41 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 42 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 43 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 44 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 45 蓝色荧光核酸染色剂、SYTO 9 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 10 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 11 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 12 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 13 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 14 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 15 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 16 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 20 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 21 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 22 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 23 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 24 绿色荧光核酸染色剂、SYTO25 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 26 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 27 绿色荧光核酸染色剂、SYTO BC 绿色荧光核酸染色剂、SYTO 80 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 81 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 82 橙色荧光核酸染色剂、SYTO83 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 84 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 85 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 86 橙色荧光核酸染色剂、SYTO 17 红色荧光核酸染色剂、SYTO 59 红色荧光核酸染色剂、SYTO 61 红色荧光核酸染色剂、SYTO17 红色荧光核酸染色剂、SYTO 62 红色荧光核酸染色剂、SYTO 63 红色荧光核酸染色剂、SYTO 64 红色荧光核酸染色剂、吖啶同源二聚体、吖啶橙、7-AAD(7-氨基-放线菌素 D)、放线菌素 D、ACMA、DAPI、二氢乙锭、溴化乙锭、乙锭同源二聚体-1(EthD-1)、乙锭同源二聚体-2(EthD-2)、Ethidium monoazide、Hexidium iodide、Hoechst 33258(bis-benzimide)、Hoechst 33342、Hoechst 34580、Hydroxystibamide、LDS 751 和核黄的一组。

[0317] 9. 根据 1 的方法,其中荧光标记溴化乙锭用于检测生物刷拭活检样品中的与口腔上皮癌相关的癌细胞。

[0318] 10. 诊断和 / 或预测人或动物对象体内癌症的方法,包括如下步骤:

[0319] a) 获取来自所述对象的生物样品;

[0320] b) 将所述至少一个细胞与能够与所述至少一个细胞内的双链核酸在所述对象体外相互作用的至少一种荧光标记接触;

[0321] c) 用通过用合适的光源激发获得的信号确定结合至双链核酸的所述至少一种荧光标记的信号强度;

[0322] d) 通过相差显微术确定所述至少一个细胞内细胞核的位置和 / 或尺寸;

[0323] e) 通过将 c) 中获得的信号强度与 d) 中获得的细胞核的位置和 / 或尺寸相关联而确定结合至细胞核双链核酸的荧光标记的细胞核信号强度。

[0324] f) 从步骤 e) 中获得的细胞核信号强度计算所述至少一个细胞的倍性状态

[0325] g) 基于所述倍性状态确定癌症的存在或可能未来发生癌症。

[0326] 在下文中,本发明根据某些实验实施例进行说明。但是这些实施例不意味着将本发明限制为其范围,而是为了通过一些示例性实施方案说明本发明。

[0327] 实验

[0328] 实验 1- 在半固定的细胞上进行 DNA 成像细胞术测定

[0329] 第一步中,可以例如通过刷拭活检取样(参见图 3)。

[0330] 第二步中,从取样刷上通过用例如生理缓冲液例如 PBS pH7.4 淋洗取样单元洗脱细胞。

[0331] 第三步中,可以通过添加温和去污剂例如 Triton X-100 使所述细胞具有通透性而

用于染色。为此目的,可以例如使用含有 PBS pH 7.4, 0.05% (w/v) Triton X-100 的缓冲液。在(半)固定细胞方法的情况中,可以将细胞悬液加至显微镜载玻片上,之后干燥以进行固定化。

[0332] 在下一步中,可以例如通过用发射波长从 300 至 600nm 的 LEICA EL6000 光源照亮显微镜玻片进行荧光测量。可以例如使用 450nm 光源。

[0333] 通过全面扫描细胞,可以确定细胞核的位置。

[0334] 之后可以使用 Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit 照相机单元 (www.qimaging.com) 记录细胞核 UV 吸收。

[0335] 如果这个细胞核 UV 吸收与在相同条件下针对已知为非癌细胞获得的 DNA 含量相当,那么可以计算受检细胞的倍性状态并确定所述细胞是否可能发展为癌症。

[0336] 实验 2- 在半固定的细胞上进行 DNA 成像细胞术测定

[0337] 第一步中,可以例如通过刷拭活检取样(参见图 3)。

[0338] 第二步中,从取样刷上通过用例如生理缓冲液例如 PBS pH7.4 淋洗取样单元洗脱细胞。

[0339] 第三步中,可以通过添加温和去污剂例如 Triton X-100 使所述细胞具有通透性而用于染色。为此目的,可以例如使用含有 PBS pH 7.4, 0.05% (w/v) Triton X-100 的缓冲液。在(半)固定细胞方法的情况中,可以将细胞悬液加至显微镜载玻片上,之后干燥以进行固定化。

[0340] 之后可以通过添加荧光嵌入染料例如溴化乙锭对细胞 DNA 进行染色。由于这种以及许多其他荧光染料当结合至 DNA 时具有强得多的荧光,因此可以不需要洗脱游离染料。然而,如果使得提高信号/背景比例,也可以进行漂洗。

[0341] 在下一步中,可以例如通过用发射波长从 300 至 600nm 的 LEICA EL6000 光源照亮显微镜玻片进行荧光测量。可以例如使用 488nm 光源。(参见图 6)

[0342] 之后可以使用 Qimaging Retiga 2000R FASTCooled Mono 12-bit 照相机单元 (www.qimaging.com) 记录发射的荧光信号。

[0343] 在另一步中,同样的样品在相差显微术下记录,以鉴别所述细胞核的位置和/或尺寸(参见图 7)。

[0344] 在进一步的步骤中,合并通过荧光和相差显微术获得的图像,从而只有来自于细胞核的荧光信号被记录下来(参见图 7)。

[0345] 如果这个信号与在相同条件下针对已知为非癌细胞获得的 DNA 含量相当,那么可以计算受检细胞的倍性状态并确定所述细胞是否可能发展为癌症。

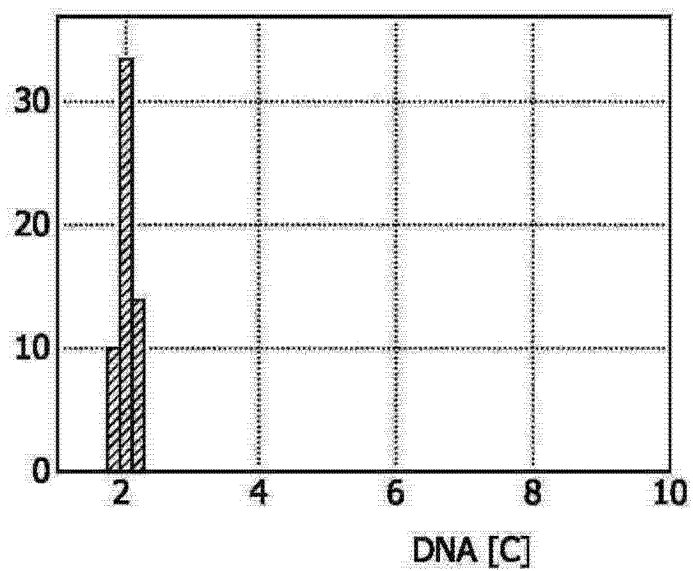


图 1

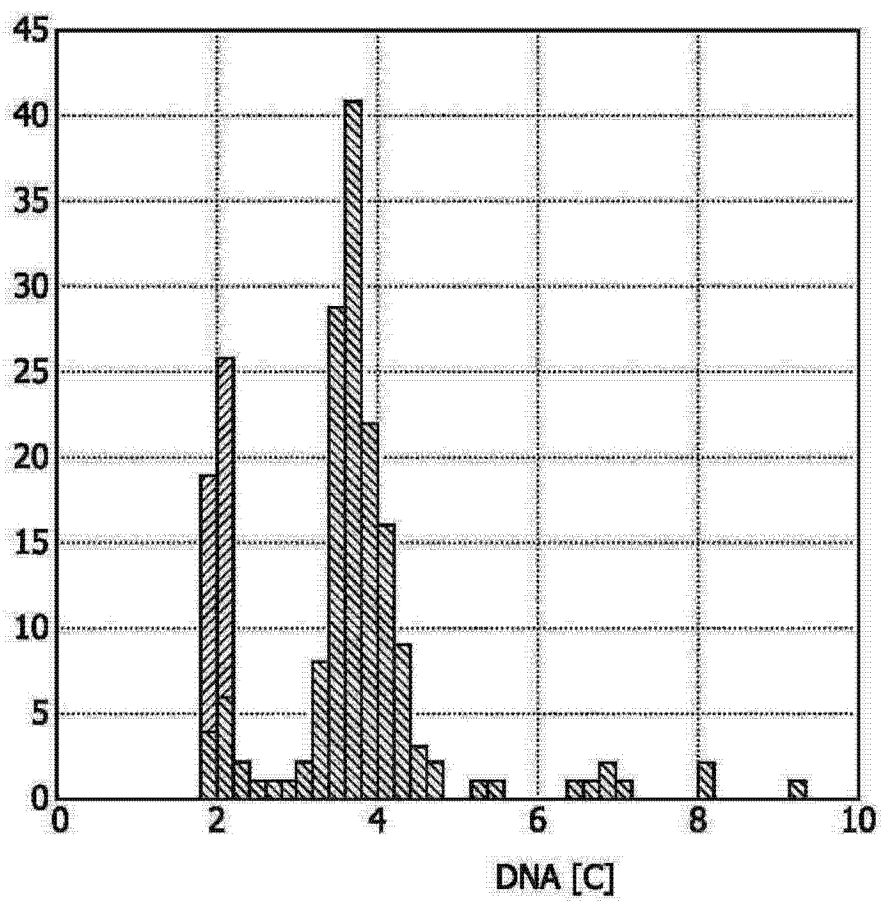


图 2

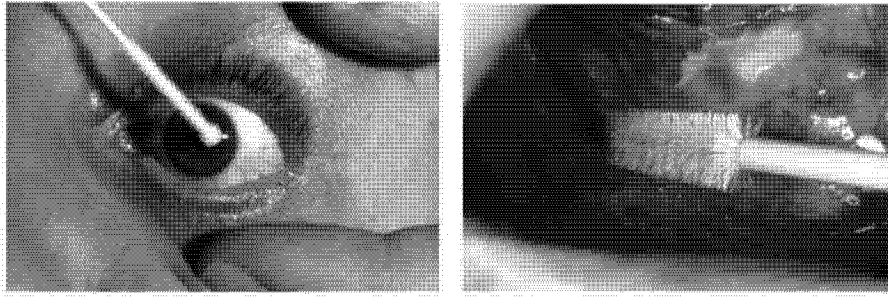


图 3

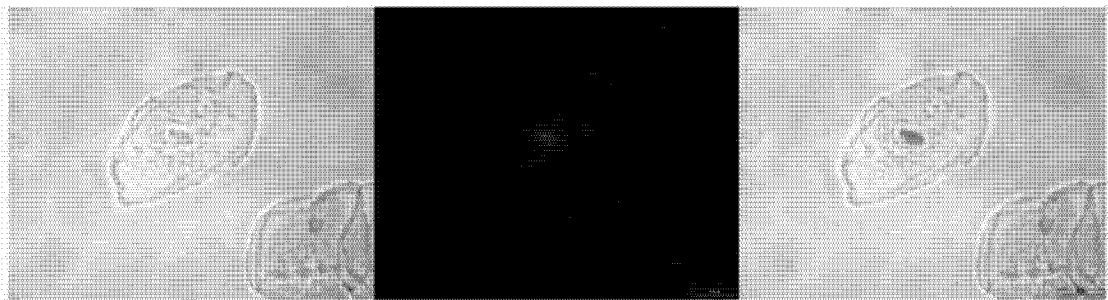


图 6

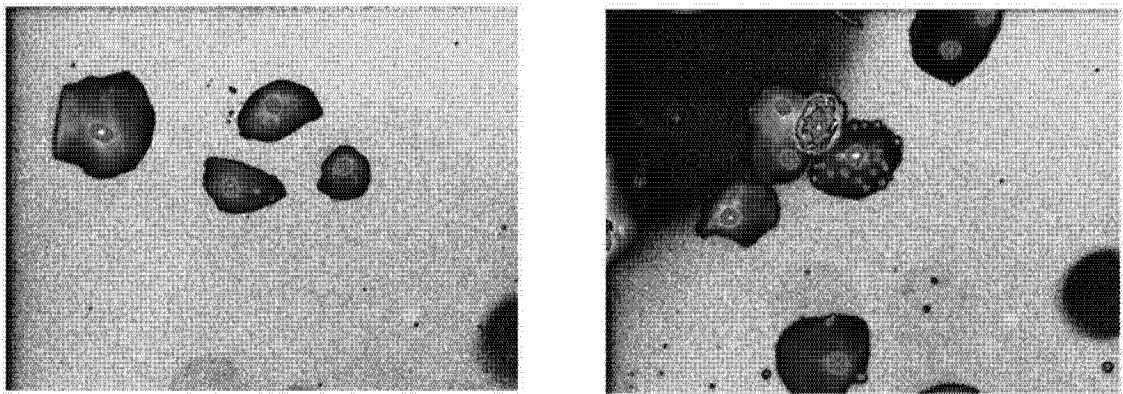


图 7

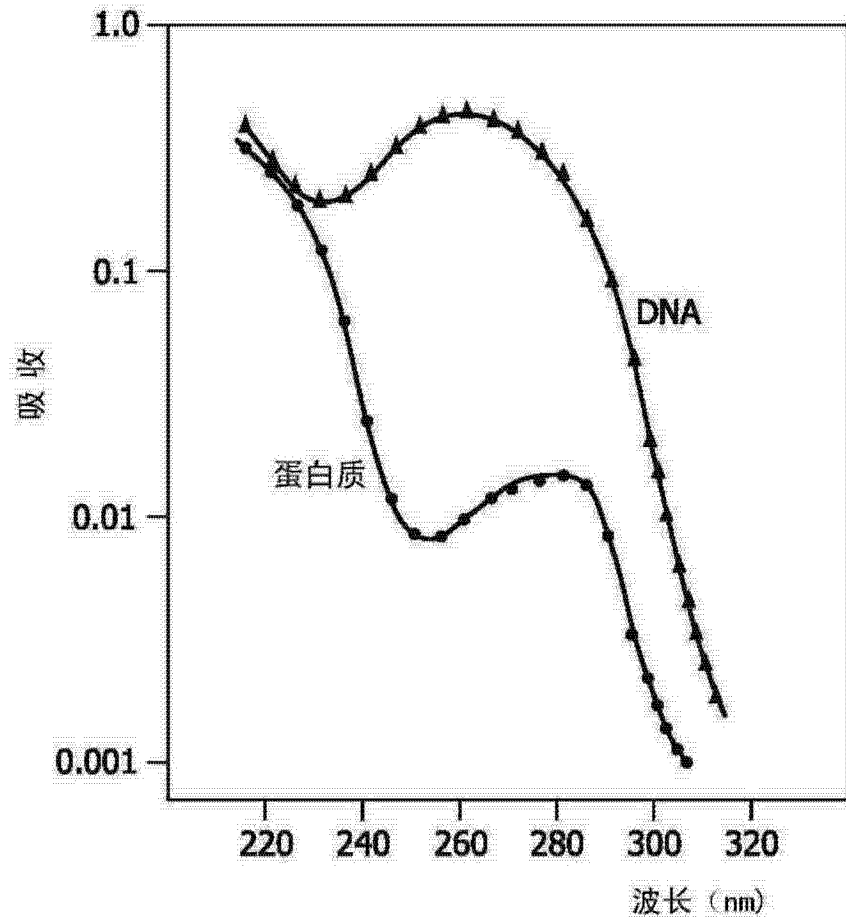


图 4

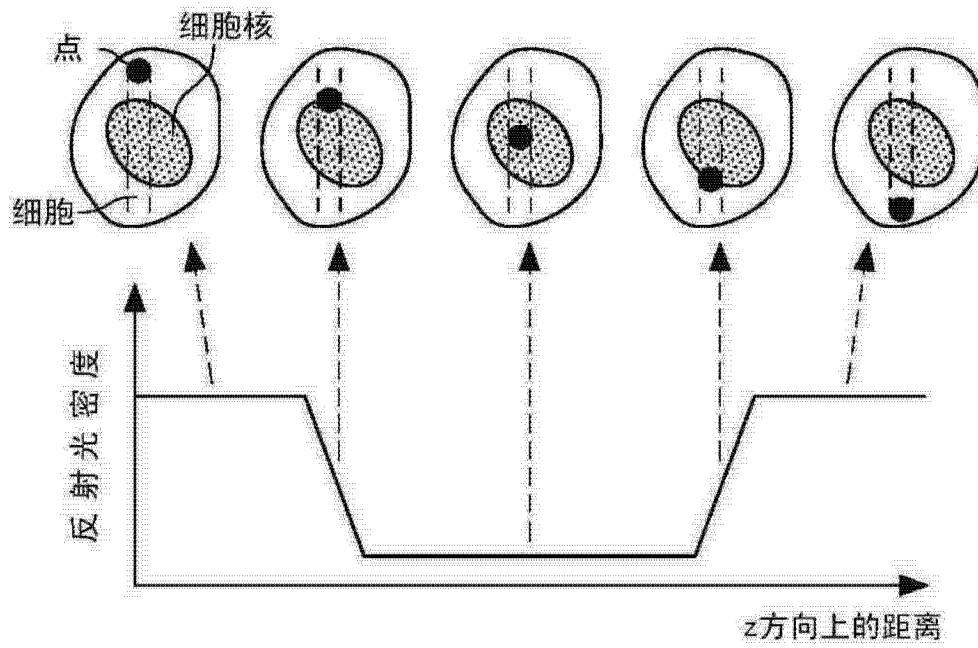


图 5

专利名称(译)	使用基于UV光的DNA成像细胞术来检测和/或诊断癌症的体外方法		
公开(公告)号	CN104849228A	公开(公告)日	2015-08-19
申请号	CN201510127627.8	申请日	2007-05-14
[标]申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	皇家飞利浦电子股份有限公司		
[标]发明人	BHW亨德里克斯 ER福森纳尔 G斯佩克维尔斯 NC范德瓦尔特 S凯珀		
发明人	B·H·W·亨德里克斯 E·R·福森纳尔 G·斯佩克维尔斯 N·C·范德瓦尔特 S·凯珀		
IPC分类号	G01N21/33 G01N33/53 G01N33/50 G01N33/58 G01N33/574 C12Q1/68 G06T7/00 G06T7/40 G01N15/14		
CPC分类号	G01N21/33 G06T2207/10056 G01N33/5076 G06T2207/30024 G01N15/147 G06T7/0012 G01N33/574 C12Q1/68 G01N33/582 G01N33/5308 G06T7/401 G01N33/5035 G06K9/00134 G06T7/41		
代理人(译)	王健		
优先权	2006118438 2006-08-04 EP 2006116336 2006-06-29 EP		
其他公开文献	CN104849228B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及使用UV光进行UV吸收测定在体外确定人或动物细胞内细胞核DNA的量的方法。本发明还涉及用于基于上述原则体外检测生物样品中的癌细胞的方法。本发明也涉及诊断或预测人或动物对象体内癌症的可能发生的体外方法。

