



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771185 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201611103862.2

(22)申请日 2016.12.05

(71)申请人 湖北省肿瘤医院

地址 430079 湖北省武汉市洪山区卓刀泉南路116号

(72)发明人 胡德胜 周晓艺 吴媛 漆楚波
张志凌 庞代文 朱小波

(74)专利代理机构 武汉华旭知识产权事务所
42214

代理人 刘天钰

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

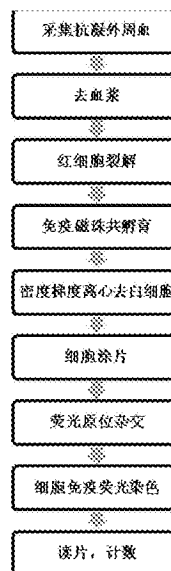
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒

(57)摘要

本发明提供了一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,由人外周血白细胞去除部分和免疫荧光原位杂交鉴定部分组成,其中人外周血白细胞去除部分包括稀释缓冲液、红细胞裂解液、密度梯度离心介质、细胞固定液A以及免疫磁珠,其中红细胞裂解液由氯化铵、碳酸氢钠以及EDTA二钠溶液混合而成。所述的免疫荧光原位杂交鉴定部分包括缓冲液,杂交固定液B,生物素标记的CEP8探针,红色量子点标记的CD45抗体,绿色量子点标记的链霉亲和素,封片剂以及牛血清白蛋白粉末。该试剂盒结合免疫磁富集分离技术、荧光原位杂交技术、免疫荧光细胞化学技术、鼻咽癌循环肿瘤细胞计数技术,能精确测定样本中鼻咽癌循环肿瘤细胞个数。



1. 一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征在于由人外周血白细胞去除部分和免疫荧光原位杂交鉴定部分组成,其中人外周血白细胞去除部分包括稀释缓冲液、红细胞裂解液、密度梯度离心介质、细胞固定液A以及免疫磁珠,其中红细胞裂解液由氯化铵、碳酸氢钠以及EDTA二钠溶液混合而成,所述免疫磁珠是共价偶联了抗人白细胞共同抗原的抗体的磁珠,该抗体为CD45,所用免疫磁珠粒径为 $0.2\sim 1.5\mu\text{m}$;细胞固定液A功效成分为醇类;

所述的免疫荧光原位杂交鉴定部分包括缓冲液,杂交固定液B,生物素标记的CEP8探针,红色量子点标记的CD45抗体,绿色量子点标记的链霉亲和素,封片剂以及牛血清白蛋白粉末;所述杂交固定液B功效成分为多聚甲醛,所述CEP8探针能够通过荧光原位杂交的方法对肿瘤细胞进行探针标记,所述红色量子点标记的CD45抗体对剩余白细胞进行染色且其发射波长为 $585\text{nm}\sim 625\text{nm}$,绿色量子点标记的链霉亲和素能够与CEP8探针相结合从而对DNA片段进行标记,且其发射波长为 $525\text{nm}\sim 545\text{nm}$,所述封片剂含有能够与DNA强力结合的荧光染料DAPI。

2. 根据权利要求1所述的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征为:所述的红细胞裂解液的pH值为 $7.0\sim 8.0$,其中氯化铵的浓度为 $0.5\sim 2\text{M}$,碳酸氢钠浓度为 $10\sim 200\text{mM}$,EDTA二钠的浓度为 $1\sim 10\text{mM}$ 。

3. 根据权利要求1所述的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征为:所述的生物素标记的CEP8探针购自于美国雅培分子公司。

4. 根据权利要求1所述的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征为:红色量子点标记的CD45抗体的发射波长为 605nm ,绿色量子点标记的链霉亲和素的发射波长为 525nm ,两者均采用共价偶联的方式将量子点与蛋白进行连接。

5. 根据权利要求1所述的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征为:所述的密度梯度离心介质的密度为 $1.02\sim 1.5\text{g}/\text{cm}^3$,其有效成分为蔗糖,且蔗糖的质量浓度为 $5\%\sim 60\%$ 。

一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明提供了一种鼻咽癌循环肿瘤细胞的检测试剂盒,属于鼻咽癌循环肿瘤细胞检测领域。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells,CTCs)指进入到血液中的肿瘤细胞。这部分肿瘤细胞参与到血液循环当中,并且随着血液循环的方向可以迁移至相关组织或器官,在合适的条件下发展成肿瘤病灶。CTCs主要来源分为两方面:一为脱落,即由原发灶或转移灶脱落下来穿透血管壁进入到血液中。二为较早的阶段进入,即在尚未增殖形成影像学可见的肿瘤病灶组织时,以癌变细胞的形式提前进入到血液中,因此从理论上讲,CTCs的出现要早于影像学对肿瘤实体的发现。

[0003] 鼻咽癌常见的检查方法有:磁共振成像检查,CT检查,鼻咽镜检查,X射线检查,血清学诊断等。常见基于血清学诊断主要是依据鼻咽癌患者血清中EB病毒抗体水平与其它恶性肿瘤患者和健康人之间存在明显差异。

[0004] 鼻咽部解剖位置隐蔽,鼻咽癌早期症状不典型,临床上容易延误诊断,应特别提高警惕。而鼻咽癌的治疗方法主要是以放化疗为主,检测及监测鼻咽癌患者循环肿瘤细胞的数量可提示早期诊断,并进行放化疗疗效的评估。

[0005] 采用人外周全血进行检测,早中晚期鼻咽癌患者血液中,只要存在进入血液循环的鼻咽癌肿瘤细胞,均可被检测到。由于CTC在外周血的数量极少,通常需在约1亿个白细胞和500亿个红细胞中寻找仅有的数个肿瘤细胞,因此为了提高CTC的检出率,通常须在检测前进行CTC富集。目前CTC的富集方法按其原理主要分为基于抗原抗体反应原理的富集法和基于细胞形态的富集方法。并且CTC的检测方法众多,根据检测原理可分为两大类:细胞计数法和核酸检测法,前者主要包括各种免疫细胞化学技术、流式细胞术、免疫荧光技术等;后者主要包括聚合酶链反应、逆转录聚合酶链反应及其各种改进的技术等。目前的检测方法中普遍存在有以下缺陷:由于外周血中的白细胞去除率不高,白细胞作为有核细胞会对肿瘤细胞的富集造成干扰。此外,血源性异常细胞也会对非血源性异常细胞(循环肿瘤细胞)的筛选造成干扰。此外,目前大多采用正分选的方法捕获循环肿瘤细胞,利用磁珠表面偶联有特异性抗体(如Epcam、CK19等)捕获肿瘤细胞,该方法得到的细胞表面带有磁珠,导致细胞活性降低。并且由于标志物的关系,导致肿瘤细胞富集回收率较低。

发明内容

[0006] 本发明解决了现有技术中的不足,提供了一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,该试剂盒结合免疫磁富集分离技术、荧光原位杂交技术、免疫荧光细胞化学技术、鼻咽癌循环肿瘤细胞计数技术,能精确测定样本中鼻咽癌循环肿瘤细胞个数。

[0007] 实现本发明上述目的所采用的技术方案为:

[0008] 一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒,由人外周血白细胞去除部分和免疫荧光原

位杂交鉴定部分组成,其中人外周血白细胞去除部分包括稀释缓冲液、红细胞裂解液、密度梯度离心介质、细胞固定液A以及免疫磁珠,其中红细胞裂解液由氯化铵、碳酸氢钠以及EDTA二钠溶液混合而成,所述免疫磁珠是共价偶联了抗人白细胞共同抗原的抗体的磁珠,该抗体为CD45,所用免疫磁珠粒径为0.2~1.5 μm ;细胞固定液A功效成分为醇类;

[0009] 所述的免疫荧光原位杂交鉴定部分包括缓冲液,杂交固定液B,生物素标记的CEP8探针,红色量子点标记的CD45抗体,绿色量子点标记的链霉亲和素,封片剂以及牛血清白蛋白粉末;所述杂交固定液B功效成分为多聚甲醛,所述CEP8探针能够通过荧光原位杂交的方法对肿瘤细胞进行探针标记,所述红色量子点标记的CD45抗体对剩余白细胞进行染色且其发射波长为585nm~625nm,绿色量子点标记的链霉亲和素能够与CEP8探针相结合从而对DNA片段进行标记,且其发射波长为525nm~545nm,所述封片剂含有能够与DNA强力结合的荧光染料DAPI。

[0010] 所述的红细胞裂解液的pH值为7.0~8.0,其中氯化铵的浓度为0.5~2M,碳酸氢钠浓度为10~200mM,EDTA二钠的浓度为1~10mM。

[0011] 所述的生物素标记的CEP8探针购自于美国雅培分子公司。

[0012] 红色量子点标记的CD45抗体的发射波长为605nm,绿色量子点标记的链霉亲和素的发射波长为525nm,两者均采用共价偶联的方式将量子点与蛋白进行连接。

[0013] 所述的密度梯度离心介质的密度为1.02~1.5g/cm³,其有效成分为蔗糖,且蔗糖的质量浓度为5%~60%。

[0014] 与现有技术相比,本发明具有以下优点:本发明采用负分选阴性富集的方法得到的肿瘤细胞活性高,肿瘤细胞富集回收率大于80%。试剂盒采用的荧光量子点作为非血源性基因异常型细胞的判定标记物,主要特点是荧光亮度高,性能稳定,不易漂白,易于观察。

[0015] 本发明采用阴性富集的方法,所得到的肿瘤细胞表面完整,活性高,更加方便进行后续培养及分子标志物检测。

[0016] 本发明采用去血浆、红细胞裂解技术、密度梯度离心技术,大大提高了循环肿瘤细胞的富集率,白细胞去除率大于99.99%。

[0017] 本发明采用荧光原位杂交及免疫荧光细胞化学技术对所富集到的循环肿瘤细胞进行鉴定,8号染色体探针对肿瘤细胞DNA序列进行标记,结果会显示三倍体、四倍体、多倍体信号。采用荧光原位杂交的方法不受限于上皮标志物的表达,提高检出的敏感性和特异性。红色量子点标记的CD45抗体对白细胞表面进行染色,与肿瘤细胞进行区分。所计数得到的肿瘤细胞准确无误。

[0018] 本发明CTC富集技术采用基于免疫磁性原理的阴性富集法,通过使用特异性单克隆抗体(CD45)包被的免疫磁微粒可去除血液内99.99%以上的白细胞,最大程度地降低背景有核细胞的干扰,从而达到富集肿瘤细胞的目的。因不依赖于肿瘤细胞表面抗原的表达,本发明CTC富集方法在各上皮来源实体瘤中具备一定的通用性,能达到较高的肿瘤细胞回收率。为排除血源性异常细胞的干扰,本发明独创技术:通过选用特异性探针将FISH与免疫细胞化学技术相结合,采用荧光量子点作为标记物,快速筛选出非血源性基因异常型细胞(肿瘤细胞)。

附图说明

[0019] 图1为本发明提供的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒的检测流程图；

[0020] 图2为本发明实施例中的临床标本检测数据分析图。

具体实施方式

[0021] 下面结合具体实施例对本发明做详细具体的说明,但是本发明的保护范围并不局限于以下实施例。

[0022] 本发明所提供的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒由人外周血白细胞去除部分和免疫荧光原位杂交鉴定部分组成,其中人外周血白细胞去除部分包括稀释缓冲液、红细胞裂解液、密度梯度离心介质、细胞固定液A以及免疫磁珠,其中红细胞裂解液由氯化铵、碳酸氢钠以及EDTA二钠溶液混合而成,所述免疫磁珠是共价偶联了抗人白细胞共同抗原的抗体的磁珠,该抗体为CD45,所用免疫磁珠粒径为0.2~1.5 μm 。所述的红细胞裂解液的pH值为7.0~8.0,其中氯化铵的浓度为0.5~2M,碳酸氢钠浓度为10~200mM,EDTA二钠的浓度为1~10mM。所述的密度梯度离心介质的密度为1.02~1.5g/cm³,其有效成分为蔗糖,且蔗糖的质量浓度为5%~60%。所述细胞固定液A主要成分为醇类。

[0023] 所述的免疫荧光原位杂交鉴定部分包括缓冲液,杂交固定液B,生物素标记的CEP8探针,红色量子点标记的CD45抗体,绿色量子点标记的链霉亲和素,封片剂以及以及牛血清白蛋白粉末,所述CEP8探针能够通过荧光原位杂交的方法对肿瘤细胞进行探针标记,所述的生物素标记的CEP8探针购自于美国雅培分子公司。所述杂交固定液B是对老化脱水前的细胞进行固定,主要成分为多聚甲醛。所述红色量子点标记的CD45抗体对剩余白细胞进行染色且其发射波长为585nm~625nm,本实施例中红色量子点标记的CD45抗体的发射波长为605nm,绿色量子点标记的链霉亲和素能够与CEP8探针相结合从而对DNA片段进行标记,且其发射波长为525nm~545nm,本实施例中绿色量子点标记的链霉亲和素的发射波长为525nm。红色量子点标记的CD45抗体与绿色量子点标记的链霉亲和素均采用共价偶联的方式将量子点与蛋白进行连接。所述封片剂含有能够与DNA强力结合的荧光染料DAPI。

[0024] 本发明所提供的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒在使用时的检测流程图如图1所示,具体的步骤如下:

[0025] 1、血浆及红细胞去除:血液样本中加入缓冲液450g~1000g后离心5~10min去除血浆,然后加入450g~1000g红细胞裂解液于摇床中旋转8-12min,离心5~10min后得到白细胞和肿瘤细胞。

[0026] 2、白细胞去除:将得到的白细胞及肿瘤细胞混合物中加入免疫磁微粒于水平摇床中反应,免疫磁微粒表面偶联有抗人白细胞共同抗原的抗体,该磁微粒特异性与白细胞结合,可与标本中99.99%的白细胞结合,从而达到去除白细胞的目的。

[0027] 3、密度梯度离心技术:将捕获了白细胞的磁微粒与肿瘤细胞混合物轻轻叠加至离心介质中,通过密度梯度离心技术,结果可分为4层,底层为免疫磁微粒与白细胞复合物,依次往上为离心介质层、肿瘤细胞层、缓冲液层。根据目的吸取肿瘤细胞层,可能会残留免疫磁微粒,通过靠磁力架的方式除去剩余免疫磁微粒,得到的细胞离心后于管底部,取出底部细胞进行涂片。

[0028] 4、细胞固定技术:涂片后细胞加入细胞固定液A,于25℃~30℃干燥12~36小时。

[0029] 5、原位杂交技术:待涂片后的细胞完全干燥后,将细胞区域采用杂交固定液B进行

固定,然后老化、脱水处理,进行原位杂交。所采用探针为生物素标记的CEP8,杂交仪设定变性温度为76℃,时间为5min;杂交温度为37℃,时间为1.5~3h。杂交完毕,取出玻片进行洗涤。

[0030] 6、免疫荧光细胞化学技术:将已完成原位杂交的玻片洗涤后,配制红色量子点标记的CD45与绿色量子点标记的链霉亲和素作为免疫荧光染色液,将染色液加入至细胞标本区于37℃温箱孵育1~3h,孵育完成后进行洗涤,加入DAPI封片剂进行封片。

[0031] 7、肿瘤细胞计数技术:将已完成原位杂交及免疫荧光检测的玻片置于荧光显微镜下,紫外激发观察蓝色DAPI信号,可确定细胞核形态;观察绿色CEP8探针信号,可确定细胞核内杂交信号点个数;观察红色CD45信号,确定白细胞细胞膜染色情况;最终确定细胞核为单核,探针信号点三个及以上,无CD45染色信号的细胞为异常细胞(肿瘤细胞)并计数,整张玻片扫描完毕,统计肿瘤细胞个数,即为该样本所含肿瘤细胞个数。

[0032] 本实施例寻找了103为临床标本进行检测分析,103例标本中有27例健康志愿者(Healthy Controls)、34例鼻咽部良性病变患者(Non-malignant Disease)和42例鼻咽癌患者,以上临床标本的循环肿瘤细胞检测数据分布如图2所示,由图2可知,本发明所提供的鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒的检测结果与实际状况相符。

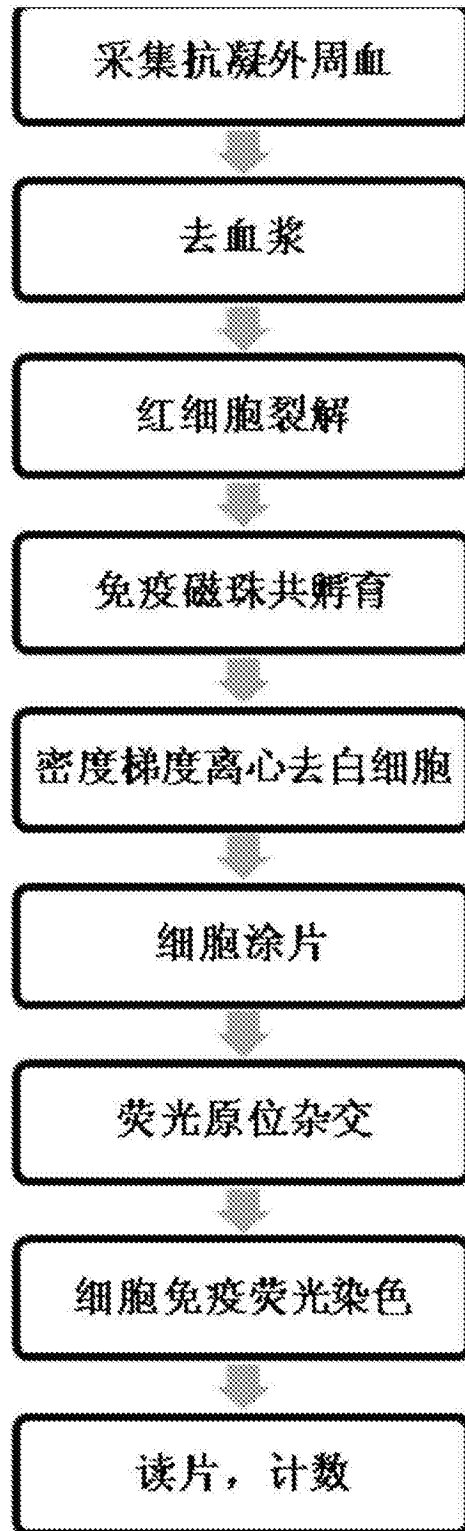


图1

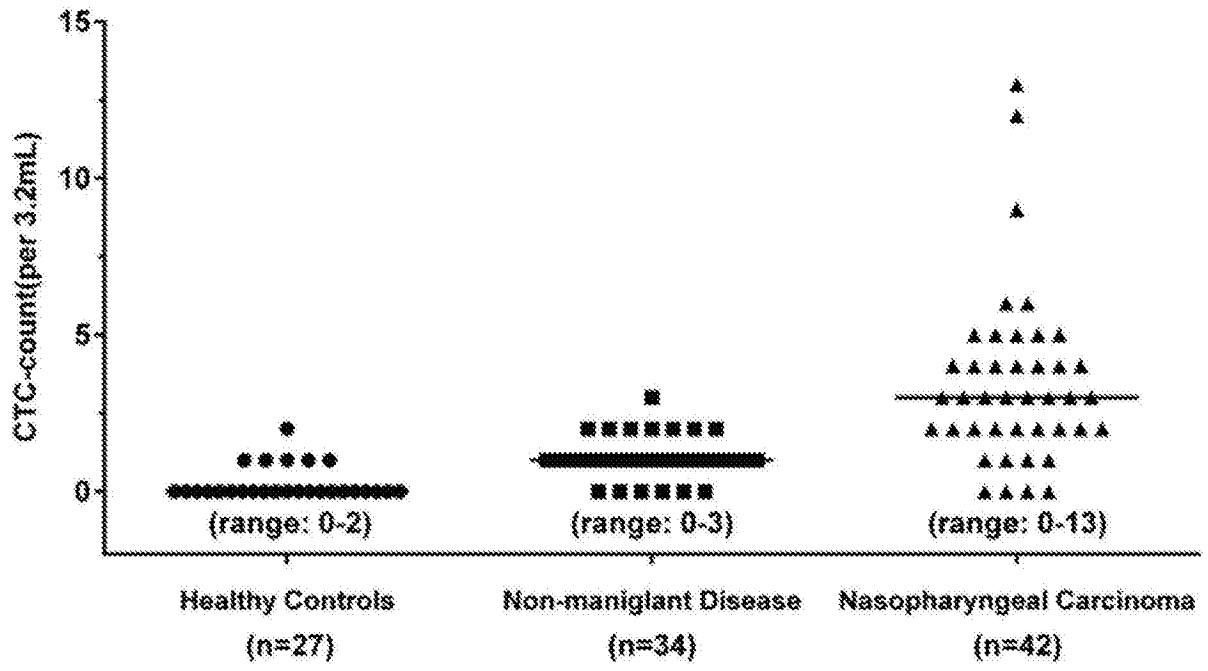


图2

专利名称(译)	一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒		
公开(公告)号	CN106771185A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201611103862.2	申请日	2016-12-05
[标]申请(专利权)人(译)	湖北省肿瘤医院		
申请(专利权)人(译)	湖北省肿瘤医院		
当前申请(专利权)人(译)	湖北省肿瘤医院		
[标]发明人	胡德胜 周晓艺 吴媛 漆楚波 张志凌 庞代文 朱小波		
发明人	胡德胜 周晓艺 吴媛 漆楚波 张志凌 庞代文 朱小波		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/533 G01N2333/46 G01N2800/14		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种鼻咽癌循环肿瘤细胞检测试剂盒，由人外周血白细胞去除部分和免疫荧光原位杂交鉴定部分组成，其中人外周血白细胞去除部分包括稀释缓冲液、红细胞裂解液、密度梯度离心介质、细胞固定液A以及免疫磁珠，其中红细胞裂解液由氯化铵、碳酸氢钠以及EDTA二钠溶液混合而成。所述的免疫荧光原位杂交鉴定部分包括缓冲液，杂交固定液B，生物素标记的CEP8探针，红色量子点标记的CD45抗体，绿色量子点标记的链霉亲和素，封片剂以及牛血清白蛋白粉末。该试剂盒结合免疫磁富集分离技术、荧光原位杂交技术、免疫荧光细胞化学技术、鼻咽癌循环肿瘤细胞计数技术，能精确测定样本中鼻咽癌循环肿瘤细胞个数。

