



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699641 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 22

(21) 申请号 201610058813. 5

(22) 申请日 2016. 01. 28

(71) 申请人 山东省肿瘤防治研究院

地址 250117 山东省济南市槐荫区济兗路
440 号

(72) 发明人 王振丹 李胜 仇红

(74) 专利代理机构 济南诚智商标专利事务所有
限公司 37105

代理人 黎明

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/574(2006. 01)

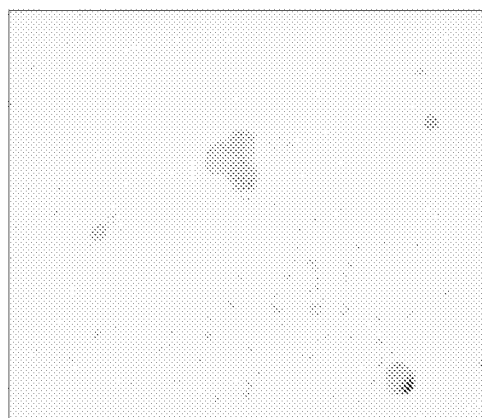
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54) 发明名称

一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法

(57) 摘要

本发明公开了一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法。该方法利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞,然后利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞。借助于 ISET 技术分离富集 CTC,依靠细胞免疫荧光技术鉴定 CTC,不仅能够克服单纯 ISET 技术鉴定 CTC 存在的困难,亦能捕获上皮抗原表达减弱或缺失的肿瘤细胞,即克服单纯免疫学检测技术存在的假阴性。同时,该技术设备要求不高,方法易于掌握,并能实时监测。



1. 一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于,所述方法为利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞,然后利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞。

2. 根据权利要求1所述的外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于,所述的膜过滤装置包括滤器(3)、血样容器(2)、废液缸(5)和铁架台(1),所述铁架台(1)设有底座(11)、立架(12)和支架(13),所述血样容器(2)通过支架(13)设置于铁架台(1)上部,血样容器(2)的下方为滤器(3),滤器(3)通过输液器(4)联通至废液缸(5),废液缸(5)设置于底座(11)上。

3. 根据权利要求2所述的外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于:所述滤器(3)包括滤器上口(6)、滤膜(7)、载滤膜平台(8)和滤器下口(9),滤膜(7)置于载滤膜平台8上;滤器上口(6)接血样容器(2),滤器下口(9)通过输液器(4)接废液缸(5)。

4. 根据权利要求3所述的外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于:所述滤膜(7)为疏水材料制成,其上均匀布满口径为10微米的滤孔(10)。

5. 根据权利要求1所述的外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于,所述的利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞,步骤如下:

A、采集晚期癌症患者外周血:肘正中静脉5ml;

B、外周血样预处理:将采集的外周血样10倍稀释,稀释液成分:1mmol/1EDTA+0.1% BSA),稀释后用4%多聚甲醛固定外周血样10分钟;

C、利用膜过滤装置分离预处理后的外周血样,富集外周血循环肿瘤细胞:将预处理后的外周血样加入到膜过滤装置的血样容器(2)中,使其依靠重力自然过滤;

D、过滤结束后,从膜过滤装置中取下滤器(3),PBS冲洗2-3次,外周血循环肿瘤细胞被截留在滤膜(7)上。

6. 根据权利要求1所述的外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法,其特征在于,所述的利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞,步骤如下:

A、向分离获取外周血循环肿瘤细胞的滤器(3)中加入Cytoperm/Cytofix试剂300 μ l,固定、穿孔15min;

B、PBS漂洗3次,每次5分钟,之后加入wash buffer 300 μ l,封闭30min;

C、加入CK8/18/19、CD45、AFP一抗混悬液300 μ l,三种一抗均以wash buffer稀释,混匀后的终浓度为1:250,室温下孵育45min;

D、Wash buffer洗涤3次,每次5分钟,之后加入二抗混悬液300 μ l,三种二抗均以wash buffer稀释,混匀后的终浓度为1:500,室温下避光孵育30min;

E、Wash buffer洗涤3次,每次5分钟,之后加入Hoechst 300 μ l,洗染细胞核5min;

F、PBS漂洗2次,每次3分钟,之后取出滤膜(7)置于载玻片上,滴加10 μ l抗荧光淬灭封闭液封片;

G、荧光显微镜下2h内观察结果,拍照、记录,确定是否存在CTC。

一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种分离获取并鉴定晚期癌症患者外周血中循环肿瘤细胞的方法。

背景技术

[0002] 外周血循环肿瘤细胞(circulating tumor cells,CTC)存在于多种恶性肿瘤中,其检测对于肿瘤早期诊断、预后分析、疗效检测以及个体化治疗等众多方面具有重要的临床意义,并因能够实时检测、创伤小等优点成为备受关注的“液态活检”。

[0003] 目前CTC检测的主要方法是依赖肿瘤相关标志物检测的免疫学检测技术。该技术是基于细胞表面表达不同抗原标志,将针对肿瘤细胞表面抗原的特异性抗体EpCAM、CK等包被于磁珠表面以完成肿瘤细胞的特异性识别,借助外加磁场筛选富集CTC。该技术的优势在于特异度较高,已有商品化的半自动检测设备(CellSearch),但肿瘤特异性抗原表达的缺失会造成假阴性结果。

发明内容

[0004] 为了克服目前循环肿瘤细胞检测技术存在的不足,本发明提供了一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法。该方法利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞,然后利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞。

[0005] 该方法具体步骤如下:

[0006] 1、利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞:

[0007] A、采集晚期癌症患者外周血:肘正中静脉5ml;

[0008] B、外周血样预处理:将采集的外周血样10倍稀释,稀释液成分:1mmol/lEDTA+0.1%BSA,稀释后用4%多聚甲醛固定外周血样10分钟;

[0009] C、利用膜过滤装置分离外周血样,富集外周血循环肿瘤细胞:将预处理的外周血样加入到膜过滤装置的血样容器中,使其依靠重力自然过滤;

[0010] D、过滤结束后,从膜过滤装置中取下滤器,PBS冲洗2-3次,外周血循环肿瘤细胞被截留在滤膜上。

[0011] 2、利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞:

[0012] A、向分离获取外周血循环肿瘤细胞的滤器中加入Cytoperm/Cytofix试剂300 μ l,固定、穿孔15min;

[0013] B、PBS漂洗3次,每次5分钟,之后加入wash buffer 300 μ l,封闭30min;

[0014] C、加入CK8/18/19、CD45、AFP一抗混悬液300 μ l,三种一抗均以washbuffer稀释,混匀后的终浓度为1:250,室温下孵育45min;

[0015] D、Wash buffer洗涤3次,每次5分钟,之后加入二抗混悬液300 μ l,三种二抗均以wash buffer稀释,混匀后的终浓度为1:500,室温下避光孵育30min;

[0016] E、Wash buffer洗涤3次,每次5分钟,之后加入Hoechst 300 μ l,洗染细胞核5min;

[0017] F、PBS漂洗2次,每次3分钟,之后取出滤膜置于载玻片上,滴加10 μ l抗荧光淬灭封

闭液封片；

[0018] G、荧光显微镜下2h内观察结果，拍照、记录，确定是否存在CTC。

[0019] 外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法中所述的膜过滤装置，包括滤器、血样容器、废液缸和铁架台，所述铁架台设有底座、立架和支架，所述血样容器通过支架设置于铁架台上部，血样容器的下方为滤器，滤器通过输液器联通至废液缸，废液缸设置于底座上。

[0020] 所述滤器包括滤器上口、滤膜、载滤膜平台和滤器下口，滤膜置于载滤膜平台上；滤器上口接血样容器，滤器下口通过输液器接废液缸。

[0021] 所述滤膜为疏水材料制成，其上均匀布满口径为10微米的滤孔。

[0022] 有益效果：借助于1SET技术分离富集CTC，依靠细胞免疫荧光技术鉴定CTC，不仅能够克服单纯1SET技术鉴定CTC存在的困难，亦能捕获上皮抗原表达减弱或缺失的肿瘤细胞，即克服单纯免疫学检测技术存在的假阴性。同时，该技术设备要求不高，方法易于掌握，并能实时监测。

附图说明

[0023] 图1为本发明的膜过滤装置结构示意图；

[0024] 图2为本发明膜过滤装置的滤器的结构示意剖视图；

[0025] 图3为本发明膜过滤装置的滤器滤膜的结构示意图；

[0026] 图4为本发明一例晚期肝癌患者检测到的循环肿瘤细胞影像图。

[0027] 图中：1铁架台、2血样容器、3滤器、4输液器、5废液缸、6滤器上口、7滤膜、8载滤膜平台、9滤器下口、10滤孔、11底座、12立架、13支架。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图及实施例对本发明做具体描述。

[0029] 运用此技术方法分离获取并鉴定10例晚期肝癌患者(同时检测10例正常人样本做阴性对照)外周血循环肿瘤细胞并与免疫学技术CellSearch对比的实施例。

[0030] 1、利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞：

[0031] 采集各样本外周血5ml，用45ml稀释液(成分：1mmol/l EDTA+0.1%BSA)稀释外周血，然后加入3ml的4%多聚甲醛固定稀释后的血样10分钟。

[0032] 在固定的间期，组装膜过滤装置：如附图1、图2、图3所示，该过滤装置由滤器3、滤膜7、血样容器2、废液缸5、铁架台1构成。

[0033] 用10mlPBS润湿滤器3，然后将固定好的外周血样加入到膜过滤装置的血样容器中，使其依靠重力自然过滤。

[0034] 过滤结束后，从膜过滤装置中取下滤器3，少量PBS冲洗3次。

[0035] 2、利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞

[0036] 向滤器3中加入Cytoperm/Cytofix试剂300 μ l，固定、穿孔细胞15min。

[0037] 5mlPBS漂洗滤器3次，每次5分钟，之后加入wash buffer试剂300 μ l，封闭30min。

[0038] 封闭结束后向滤器3中加入CK8/18/19、CD45、AFP一抗混悬液(三种一抗均以wash buffer稀释，混匀后的终浓度为1:250)300 μ l，室温下孵育45min。

[0039] 一抗孵育结束后，用Wash buffer洗涤滤器3次，每次5分钟，之后加入二抗混悬液

300 μ l(三种二抗均以wash buffer稀释,混匀后的终浓度为1:500),室温下避光孵育30min。

[0040] 二抗孵育结束后,用Wash buffer洗涤滤器3次,每次5分钟,之后加入Hoechst试剂300 μ l,洗染细胞核5min。

[0041] 再次用PBS漂洗滤器2次,每次3分钟,之后取出滤膜7置于载玻片上,滴加10 μ l抗荧光淬灭封闭液封片。立即在荧光显微镜下观察结果。

[0042] 总体实施例检测结果:10例正常人对照均未查到循环肿瘤细胞;10例晚期肝癌患者样本中有6例查到了循环肿瘤细胞,检出率明显高于免疫学技术CellSearch(3/10)(表1)。

[0043] 图4为其中一例晚期肝癌患者分离获取的循环肿瘤细胞影像图,其在荧光显微镜下的特点是:肿瘤细胞体积大,CK阳性,CD45阴性,Hoechst阳性。

[0044] 表1实施例检测结果

样本编号	样本来源	本技术检测结果 (n)	CellSearch 对照检测结果 (n)
1	正常人	0	0
2	正常人	0	0
3	正常人	0	0
4	正常人	0	0
5	正常人	0	0
6	正常人	0	0
7	正常人	0	0
8	正常人	0	0
9	正常人	0	0
10	正常人	0	0
11	晚期肝癌患者	3	0
12	晚期肝癌患者	11	2
13	晚期肝癌患者	0	0
14	晚期肝癌患者	4	0
15	晚期肝癌患者	2	0
16	晚期肝癌患者	0	0
17	晚期肝癌患者	0	0
18	晚期肝癌患者	26	7
19	晚期肝癌患者	13	2
20	晚期肝癌患者	0	0

[0045]

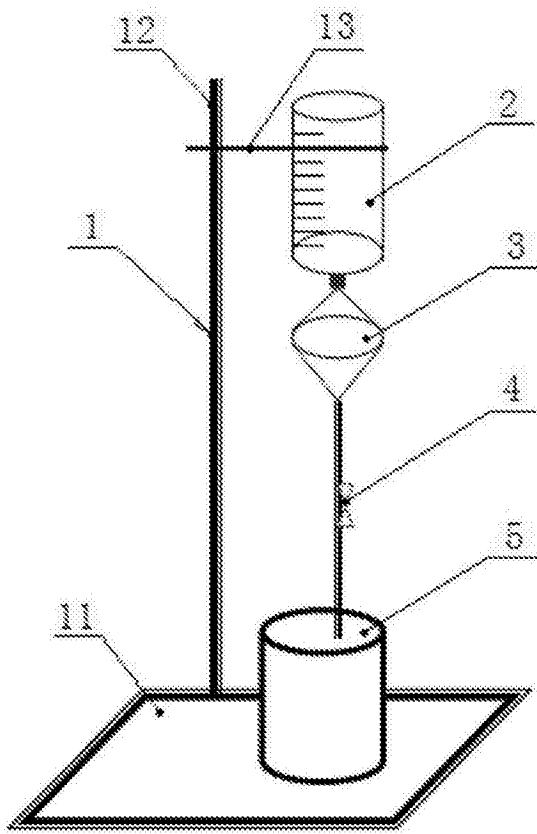


图1

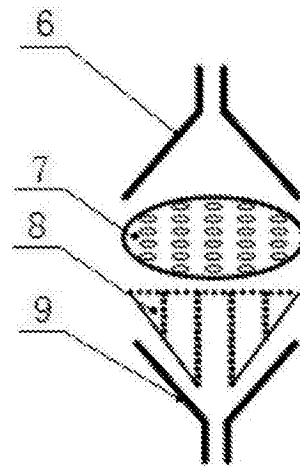


图2

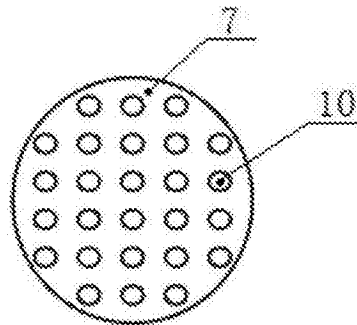


图3

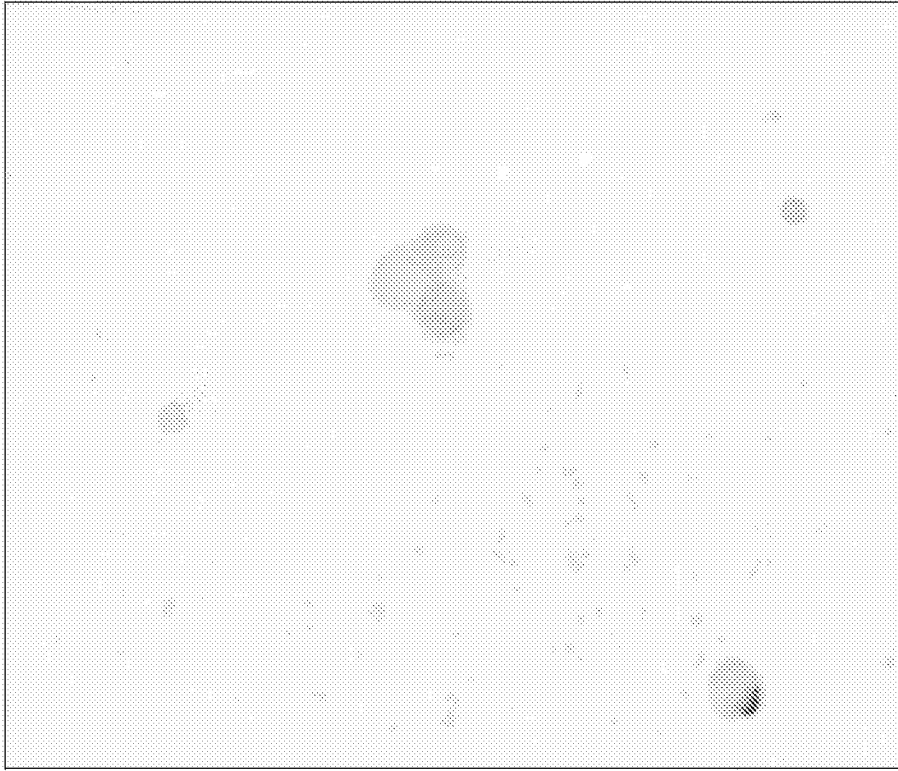


图4

专利名称(译)	一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法		
公开(公告)号	CN105699641A	公开(公告)日	2016-06-22
申请号	CN201610058813.5	申请日	2016-01-28
[标]申请(专利权)人(译)	山东省肿瘤防治研究院		
申请(专利权)人(译)	山东省肿瘤防治研究院		
当前申请(专利权)人(译)	山东省肿瘤防治研究院		
[标]发明人	王振丹 李胜 仇红		
发明人	王振丹 李胜 仇红		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/574 G01N33/57438		
代理人(译)	黎明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种外周血循环肿瘤细胞分离鉴定方法。该方法利用膜过滤装置分离获取外周血循环肿瘤细胞，然后利用细胞免疫荧光技术鉴定外周血循环肿瘤细胞。借助于ISET技术分离富集CTC，依靠细胞免疫荧光技术鉴定CTC，不仅能够克服单纯ISET技术鉴定CTC存在的困难，亦能捕获上皮抗原表达减弱或缺失的肿瘤细胞，即克服单纯免疫学检测技术存在的假阴性。同时，该技术设备要求不高，方法易于掌握，并能实时监测。

