



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106944163 A

(43)申请公布日 2017.07.14

(21)申请号 201710054588.2

(22)申请日 2017.01.24

(71)申请人 瑞汉智芯医疗科技(嘉善)有限公司

地址 314100 浙江省嘉兴市嘉善县惠民街
道台升大道1号2号楼204室

(72)发明人 韩平畴 金百冶 陈安琪 傅广候

(74)专利代理机构 上海光华专利事务所 31219

代理人 李艳 许亦琳

(51)Int.Cl.

B01L 3/00(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页 附图5页

(54)发明名称

一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的
免疫荧光染色技术

(57)摘要

本发明属于生物体液体外检测领域,具体涉及一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术。针对目前尿路上皮癌临床诊断中存在的敏感度低、依赖病理医生的主观判断、有创、低效等问题,本发明提供了一种高效的尿路上皮癌尿脱落肿瘤细胞免疫荧光染色技术,同时使用CK20和CD44v6两个蛋白作为一组标记物并采用免疫荧光法鉴定尿脱落肿瘤细胞,从而检测尿路上皮癌,提高了人尿液中的尿脱落肿瘤细胞的检测准确度,且全程无创,并摆脱了常规方法对于病理医生主观经验的依赖。

1. CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的用途。
2. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为生物标志物。
3. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的用途,包括两方面的内容,其一,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的诊断指标应用于尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的制备;CK20蛋白和CD44v6蛋白用于筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的识别靶标筛选分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂,从而作为尿脱落肿瘤细胞诊断试剂。
4. 根据权利要求1所述的用途,其特征在于,所述肿瘤为尿路上皮癌。
5. 分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒的用途。
6. 根据权利要求5所述的用途,其特征在于,所述分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂选自分别或同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体或配体。
7. 一种尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒,所述的试剂盒中至少包括分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂。
8. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂选自分别或同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体或配体。
9. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中包括:特异性结合CK20蛋白的第一抗体,特异性结合CD44v6的第一抗体,以及荧光素染料标记的分别特异性结合所述第一抗体的第二抗体。
10. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒中还包括细胞核荧光染料。
11. 根据权利要求7所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括微流控芯片,所述微流控芯片用于分选和捕获尿脱落细胞,所述微流控芯片包括依次连接的样本入口、细胞捕获区域以及样本出口,所述细胞捕获区域设有多个细胞分选器,所述细胞分选器由三个整体呈弧形排布的柱状凸起构成,柱状凸起之间存在间隙,弧形开口作为液流入口,中间柱状凸起两侧的间隙作为液流出口,两个液流出口呈对称分布。
12. 根据权利要求11所述的试剂盒,其特征在于,所述细胞捕获区域设有三种不同尺寸规格的细胞分选器,分别为第一尺寸细胞分选器、第二尺寸细胞分选器和第三尺寸细胞分选器,所述第一尺寸细胞分选器、第二尺寸细胞分选器和第三尺寸细胞分选器的尺寸依次减小。
13. 根据权利要求12所述的试剂盒,其特征在于,相邻的细胞分选器尺寸不同。
14. 根据权利要求13所述的试剂盒,其特征在于,所述微流控芯片包括多个细胞分选单元,每个所述细胞分选单元由一个第一尺寸细胞分选器、一个第二尺寸细胞分选器和一个第三尺寸细胞分选器组成。
15. 根据权利要求14所述的试剂盒,其特征在于,位于同一行的细胞分选单元中各尺寸细胞分选器的排布方式相同。
16. 根据权利要求15所述的试剂盒,其特征在于,横向相邻的细胞分选器,边距相同。

17. 根据权利要求16所述的试剂盒,其特征在于,横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器、一个第二尺寸细胞分选器和一个第三尺寸细胞分选器组成一个第一细胞分选单元;横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器、一个第三尺寸细胞分选器和一个第二尺寸细胞分选器组成一个第二细胞分选单元;多个第一细胞分选单元横向循环排布构成第一细胞分选阵列,多个第二细胞分选单元横向循环排布构成第二细胞分选阵列,相互平行的一个第一细胞分选阵列和一个第二捕获阵列组成一个细胞分选二级阵列,细胞捕获区域中多个相互平行的细胞分选二级阵列纵向等间距循环排布。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其特征在于,在每个细胞分选二级阵列中,第二细胞分选阵列的第一尺寸细胞分选器的液流入口的中点与对应第一细胞分选阵列的第三尺寸细胞分选器和第二尺寸细胞分选器横向边距的中点对齐。

19. 根据权利要求18所述的试剂盒,其特征在于,各奇数行细胞分选二级阵列的首行首列细胞分选器纵向位置对齐;各偶数行细胞分选二级阵列较相邻的前一奇数行细胞分选二级阵列向右侧等距偏移。

20. 根据权利要求12~19任一项所述的试剂盒,其特征在于,第一尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $60 \pm 5 \mu\text{m}$,液流出口的宽度为 $22 \pm 5 \mu\text{m}$;第二尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $30 \pm 3 \mu\text{m}$,液流出口的宽度为 $10 \pm 3 \mu\text{m}$;第三尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $16 \mu\text{m} \pm 1 \mu\text{m}$,液流出口的宽度为 $4 \pm 1 \mu\text{m}$ 。

一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术

技术领域

[0001] 本发明属于生物体液体外检测领域,具体涉及一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术。

背景技术

[0002] 1、临床现役技术-尿脱落细胞学检查:尿脱落细胞学检查(Cytology)是目前临床上普遍使用的尿路上皮癌检测方法。为寻找肿瘤细胞,该方法依赖病理医生对涂片进行主观观察(针对细胞的细胞核、染色质、胞浆等因素对细胞进行判断),主要有以下缺点:

[0003] (1) 检测敏感度低,一般只有30-50%。

[0004] (2) 阅片完全依赖于病理医生的主观经验,不同病理医生之间的判断结果或不一致。

[0005] (3) 染色过程繁琐,人工参与度大、工作强度大。细胞染色效果受人员经验、熟练度的影响。

[0006] 2、临床现役技术-膀胱镜、输尿管软镜检查

[0007] 膀胱镜、输尿管软镜检查是目前临床诊断尿路上皮癌的金标准。其通过导管将窥镜经尿道传送至目标区域,对可疑占位进行成像、观察。但仍具有如下缺陷:

[0008] (1) 属于侵入式检查,患者所承受的痛苦大;

[0009] (2) 肿瘤发展到肉眼可见时才能被观察到,不利于早期诊断。

[0010] 3、其他在研技术-基于微滤膜的尿液细胞检查

[0011] 为克服传统尿脱落细胞学检查敏感度低的缺点,一些研究组使用微滤膜来检测尿脱落肿瘤细胞。相较于传统尿脱落细胞学检查,该方法利用滤膜过滤的原理捕获尿脱落细胞,敏感度略有提升,但仍具有以下缺陷:

[0012] (1) 捕获到细胞后,仍仅采用传统的病理学染色方法(巴氏染色),该方法如同临床现役的尿脱落细胞学检查,高度依赖病理科医生,受主观因素的制约;

[0013] (2) 该滤膜的滤孔口径单一,为7.5 μ m;然而尿路上皮癌患者尿液中的细胞成分复杂,除了肿瘤细胞,还有正常脱落的尿路上皮细胞、白细胞、红细胞等,这些细胞尺寸均不一致,若使用单一孔径,仍将导致视野中细胞成分混乱,干扰后续的判断分析;

[0014] (3) 无法对细胞的捕获过程进行实时成像、监测、调控,例如:(a) 在细胞量过剩导致滤膜堵塞的情况下,无法及时终止进程;(b) 在流速过高导致细胞破损严重的情况下,无法实时控制流速;

[0015] (4) 受最大载荷量的限制,当细胞数量过高,所有滤孔均被占据,该滤膜随即失效;随后而来的细胞将全部堵塞于滤膜,导致视野混乱,难以进行下一步细胞层面的判读。

发明内容

[0016] 为了克服现有技术中所存在的问题,本发明的目的在于提供一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术。

[0017] 为了实现上述目的以及其他相关目的,本发明采用如下技术方案:

[0018] 本发明的第一方面提供了CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的用途。

[0019] 优选地,CK20蛋白和CD44v6蛋白联用共同作为生物标志物。

[0020] 优选地,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的用途,包括两方面的内容,其一,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的诊断指标应用于尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的制备。在本发明一些实施方式中,列举了将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为标准品或阳性对照,用于尿液样本中尿脱落肿瘤细胞的检测。

[0021] 其二,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的识别靶标筛选分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂(包括抗体或配体),从而作为尿脱落肿瘤细胞诊断试剂。在本发明一些实施方式中,列举了用分别特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞。此外,也可以采用同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞,例如双特异性抗体,这些都是本领域技术人员所公知的技术,再次不在详述。

[0022] 优选地,所述肿瘤为尿路上皮癌。所述肿瘤选自但不限于膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌。

[0023] 本发明的第二方面提供了分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒的用途。

[0024] 优选地,所述分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂选自分别或同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体或配体。

[0025] 在本发明一些实施方式中,列举了用分别特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞。此外,也可以采用同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞,例如双特异性抗体,这些都是本领域技术人员所公知的技术,再次不在详述。

[0026] 本发明的第三方面提供了一种尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒,所述的试剂盒中至少包括分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂。

[0027] 优选地,所述特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂选自特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体或配体。在本发明一些实施方式中,列举了用分别特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞。此外,也可以采用同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞,例如双特异性抗体,这些都是本领域技术人员所公知的技术,再次不在详述。

[0028] 优选地,所述试剂盒还包括免疫结合(如抗原抗体结合)试剂;或荧光免疫检测试剂。

[0029] 优选地,所述试剂盒中包括:特异性结合CK20蛋白的第一抗体,特异性结合CD44v6的第一抗体,以及荧光素染料标记的分别特异性结合所述第一抗体的第二抗体。

[0030] 优选地,所述试剂盒中还包括细胞核荧光染料。当CK20蛋白、CD44v6蛋白和细胞和三者同时阳性时,可判定为尿脱落肿瘤细胞。

[0031] 进一步优选地,细胞核荧光染料对细胞核染色后发出的荧光波长与两种用于标记第二抗体的荧光素染料发出的荧光波长各不同,能够区别。例如,能够被人眼或光学图像传感器(CCD,CMOS等)区分。

[0032] 所述用于标记第二抗体的荧光素染料选自但不限于Alexa Fluor 488、Alexa Fluor® 594、Cy3、Cy5。所述细胞核荧光染料选自但不限于:DAP1、Syto DNA、Hoechst33342、PI (碘化丙啶)、EB (溴化乙锭)。

[0033] 优选地,所述试剂盒还包括微流控芯片,所述试剂盒还包括微流控芯片,所述微流控芯片用于分选和捕获尿脱落细胞,所述微流控芯片包括依次连接的样本入口、细胞捕获区域以及样本出口,所述细胞捕获区域设有多个细胞分选器,所述细胞分选器由三个整体呈弧形排布的柱状凸起构成,柱状凸起之间存在间隙,弧形开口作为液流入口,中间柱状凸起两侧的间隙作为液流出口,两个液流出口呈对称分布。

[0034] 优选地,所述细胞捕获区域设有三种不同尺寸规格的细胞分选器,分别为第一尺寸细胞分选器、第二尺寸细胞分选器和第三尺寸细胞分选器,所述第一尺寸细胞分选器、第二尺寸细胞分选器和第三尺寸细胞分选器的尺寸依次减小。

[0035] 优选地,相邻的细胞分选器尺寸不同。

[0036] 优选地,所述微流控芯片包括多个细胞分选单元,每个所述细胞分选单元由一个第一尺寸细胞分选器、一个第二尺寸细胞分选器和一个第三尺寸细胞分选器组成。

[0037] 优选地,位于同一行的细胞分选单元中各尺寸细胞分选器的排布方式相同。

[0038] 优选地,横向相邻的细胞分选器,边距相同。

[0039] 优选地,横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器、一个第二尺寸细胞分选器和一个第三尺寸细胞分选器组成一个第一细胞分选单元;横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器、一个第三尺寸细胞分选器和一个第二尺寸细胞分选器组成一个第二细胞分选单元;多个第一细胞分选单元横向循环排布构成第一细胞分选阵列,多个第二细胞分选单元横向循环排布构成第二细胞分选阵列,相互平行的一个第一细胞分选阵列和一个第二细胞分选阵列组成一个细胞分选二级阵列,细胞捕获区域中多个相互平行的细胞分选二级阵列纵向等边距循环排布。

[0040] 优选地,在每个细胞分选二级阵列中,第二细胞分选阵列的第一尺寸细胞分选器的液流入口的中点与对应第一细胞分选阵列的第三尺寸细胞分选器和第二尺寸细胞分选器横向边距的中点对齐。

[0041] 优选地,各奇数行细胞分选二级阵列的首行首列细胞分选器纵向位置对齐;各偶数行细胞分选二级阵列较相邻的前一奇数行细胞分选二级阵列向右侧等距偏移。

[0042] 优选地,第一尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $60 \pm 5 \mu\text{m}$,液流出口的宽度为 $22 \pm 5 \mu\text{m}$;第二尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $30 \pm 3 \mu\text{m}$,液流出口的宽度为 $10 \pm 3 \mu\text{m}$;第三尺寸细胞分选器的液流入口的宽度为 $16 \mu\text{m} \pm 1 \text{m}$,液流出口的宽度为 $4 \pm 1 \mu\text{m}$ 。

[0043] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:

[0044] 针对目前尿路上皮癌临床诊断中存在的敏感度低、依赖病理医生的主观判断、有创、低效等问题,本发明提供了一种高效的尿路上皮癌尿脱落肿瘤细胞免疫荧光染色技术,同时使用CK20和CD44v6两个蛋白作为一组标记物并采用免疫荧光法判定尿脱落肿瘤细胞来判定肿瘤细胞,提高了人尿液中的尿脱落肿瘤细胞的检测准确度,且全程无创,并摆脱了

常规方法对于病理医生主观经验的依赖。

附图说明

- [0045] 图1:微流控芯片结构及基本原理示意图。
- [0046] 图2:细胞分选器的结构示意图。
- [0047] 图3:不同尺寸的细胞分选器依据细胞尺寸差异分级捕获细胞原理示意图。
- [0048] 图4:微流控芯片细胞捕获区中细胞分选单元示意图。
- [0049] 图5:微流控芯片细胞捕获区中细胞捕获阵列示意图。
- [0050] 图6:本发明微流控芯片捕获到的尿脱落细胞,比例尺:20um。
- [0051] 图7:微流控芯片捕获到的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光图像:DAP1+、CK20+、CD44v6+。
- [0052] 图8:尿路上皮癌尿脱落细胞微流检测技术所得的ROC曲线。
- [0053] 图9:利用本发明微流控芯片捕获、回收的6个尿脱落细胞进行单细胞测序,并分析其CNV情况。
- [0054] 元件标号说明
- | | | |
|--------|-----|-----------|
| [0055] | 1-1 | 样本入口 |
| [0056] | 1-2 | 细胞捕获区域 |
| [0057] | 1-3 | 样本出口 |
| [0058] | 2 | 细胞分选器 |
| [0059] | 201 | 柱状凸起 |
| [0060] | 202 | 液流入口 |
| [0061] | 203 | 液流出口 |
| [0062] | 2-1 | 第一尺寸细胞分选器 |
| [0063] | 2-2 | 第二尺寸细胞分选器 |
| [0064] | 2-3 | 第三尺寸细胞分选器 |
| [0065] | 3 | 细胞分选单元 |
| [0066] | 3-1 | 第一细胞分选单元 |
| [0067] | 3-2 | 第二细胞分选单元 |
| [0068] | 4 | 细胞分选二级阵列 |
| [0069] | 4-1 | 第一细胞分选阵列 |
| [0070] | 4-2 | 第二细胞分选阵列 |

具体实施方式

[0071] 一、CK20蛋白和CD44v6蛋白的用途

[0072] 本发明经过广泛而深入的研究,首次发现CK20蛋白和CD44v6蛋白可联用共同作为诊断尿脱落肿瘤细胞的生物标志物:(i)进行尿脱落肿瘤(尿路上皮癌)细胞的鉴别诊断,和/或易感分析;(ii)评估相关人群的肿瘤(尿路上皮癌)治疗药物、药物疗效、患者预后,以及选择合适的治疗方法;(iii)评估相关人群肿瘤(尿路上皮癌)患病风险、检测并进行早期防治。

[0073] 进一步地,所述肿瘤为尿路上皮癌。所述肿瘤选自但不限于膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌。

[0074] 因此,本发明提供了CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的新用途。

[0075] CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的用途,包括两方面的内容,其一,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的诊断指标应用于尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的制备。在本发明一些实施方式中,列举了将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为标准品或阳性对照,用于尿液样本中尿脱落肿瘤细胞的检测。其二,CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂,是指将CK20蛋白和CD44v6蛋白共同作为尿脱落肿瘤细胞的识别靶标筛选分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂(包括抗体或配体),从而作为尿脱落肿瘤细胞诊断试剂。在本发明一些实施方式中,列举了用分别特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞。此外,也可以采用同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞,例如双特异性抗体,这些都是本领域技术人员所公知的技术,再次不在详述。

[0076] 所述肿瘤为尿路上皮癌。所述肿瘤选自但不限于膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌。

[0077] 二、分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂的用途

[0078] 基于CK20蛋白和CD44v6蛋白共同用于制备或筛选尿脱落肿瘤细胞诊断试剂的发现,分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂用于制备尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒。

[0079] 进一步地,所述分别或同时特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的试剂选自分别或同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体或配体。

[0080] 在本发明一些实施方式中,列举了用分别特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞。此外,也可以采用同时特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿液样本中尿脱落肿瘤细胞,例如双特异性抗体,这些都是本领域技术人员所公知的技术,再次不在详述。

[0081] 三、尿脱落肿瘤细胞诊断试剂盒

[0082] 可采用各种本领域已知的技术来检测尿脱落细胞上CK20蛋白和CD44v6蛋白的存在与否及表达情况,这些技术均包含在发明中。例如,可用已有技术如免疫荧光染色法、Southern印迹法、Wester印迹法等,这些方法可结合使用。

[0083] 本发明还提供用于在尿脱落细胞中检测CK20蛋白和CD44v6蛋白的存在与否以及表达情况的试剂。优选地,当进行蛋白存在与否以及表达情况的检测时,可采取特异性识别CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来确定CK20蛋白和CD44v6蛋白的存在与否。

[0084] 利用特异性结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体来检测尿脱落细胞中CK20蛋白和CD44v6蛋白表达情况的方法也是本领域人员熟知的技术。

[0085] 可采用免疫荧光染色的方法来检测尿脱落细胞中CK20蛋白和CD44v6蛋白表达情况。基于免疫荧光染色方法的检测试剂可包括特异性结合CK20蛋白的第一抗体,特异性结合CD44v6的第一抗体,分别荧光素染料标记的特异性结合所述第一抗体的第二抗体,以及细胞核荧光染料。细胞核荧光染料对细胞核染色后发出的荧光波长与两种用于标记第二抗

体的荧光素染料发出的荧光波长不同,能够区别。例如,能够被人眼或光学图像传感器(CCD,CMOS等)区分。所述用于标记第二抗体的荧光素染料选自但不限于Alexa Fluor 488、Alexa Fluor®594、Cy3、Cy5。所述细胞核荧光染料选自但不限于:DAPI、Syto DNA、Hoechst33342、PI(碘化丙啶)、EB(溴化乙锭)。

[0086] 可以通过本领域内技术人员已知的各种技术制备结合CK20蛋白和CD44v6蛋白的抗体,也可采用商业化的抗体。例如,纯化的CK20蛋白和CD44v6蛋白,可被施用于动物以诱导多克隆抗体产生。与之相似的,表达CK20蛋白和CD44v6蛋白的细胞可用来免疫动物来产生抗体。本发现的抗体也可以是单克隆抗体。此类克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备(见Kohler等人,Nature256:495,1975;Kohler等人,Eur.J.Immunol.6:511,1976;Hammerling等人,In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas,Elsevier,N.Y.,1981)。

[0087] 多克隆抗体的生产可用CK20蛋白和CD44v6蛋白免疫动物,如家兔、小鼠、大鼠等。多种佐剂可用于增强免疫反应,包括但不限于弗氏佐剂等。

[0088] 本发明的一些实施方式中列举了:特异性结合CK20蛋白的第一抗体为Anti-Cytokeratin20抗体(购自abcam的兔单克隆抗体ab76126),对应的与之特异性结合的第二抗体为Alexa Fluor 488标记的羊抗兔IgG二抗(Invitrogen,A11070)。特异性结合CD44v6的第一抗体为Anti-CD44v6抗体(购自abcam的小鼠单克隆抗体ab78960),对应的与之特异性结合的第二抗体为AlexaFluor®594标记的山羊抗小鼠IgG二抗(abcam,ab150116)。细胞核荧光染料为DAPI。DAPI是指4,6联脒-2-苯基吡啶。DAPI与细胞核内的DNA结合的亲和力极高。因此,DAPI发射的荧光主要反映了细胞核内的DNA分布状态。

[0089] 进一步地,所述试剂盒还包括微流控芯片,所述微流控芯片用于分选和捕获尿脱落细胞,本发明的微流控芯片的结构及原理示意图可参见图1。具体地,所述微流控芯片,包括沿液流方向A依次连接的样本入口1-1、细胞捕获区域1-2以及样本出口1-3。待处理的液体样本如尿液,从样本入口1-1进入微流控芯片,细胞捕获区域1-2是目标细胞的捕获与分选的核心区域,途径细胞捕获区域1-2时目标细胞如尿脱落细胞B在分选的过程中被捕获,剩余液体从样本出口1-3流出微流控芯片。

[0090] 为了适用于目标细胞如尿脱落细胞的分选与捕获,细胞捕获区域1-2设有多个细胞分选器2,如图2所示,所述细胞分选器2由三个整体呈弧形排布的柱状凸起201构成,柱状凸起之间存在间隙,弧形开口202作为液流入口,中间柱状凸起两侧的间隙203作为液流出口,两个液流出口呈对称分布。

[0091] 进一步地,各细胞分选器的底部呈弧状,有助于最大程度保持细胞形态完整,该设计是一种适应于回收被捕获细胞的优化设计。在回收所捕获的细胞时,缓冲液会从反向流入芯片(从样本出口1-3方向流向样本入口1-1方向),当细胞被冲出原细胞分选器时,将遇到前方众多的其他细胞分选器。此时,因细胞分选器的底部为弧形,细胞便更容易绕过细胞分选器而被顺利回收,从而大大降低了细胞受到的物理损伤。

[0092] 进一步地,如图3所示,为了依据细胞尺寸差异分级捕获细胞,捕获区域1-2设有三种不同尺寸规格的细胞分选器2,分别为第一尺寸细胞分选器2-1、第二尺寸细胞分选器2-2和第三尺寸细胞分选器2-3,第一尺寸细胞分选器2-1、第二尺寸细胞分选器2-2和第三尺寸细胞分选器2-3的尺寸依次减小。相邻的细胞分选器尺寸不同,在整个细胞捕获区域1-2内营造紊乱的液流环境。因此,液体样本中的目标细胞,如尿脱落细胞随机流经各个不

同尺寸规格的细胞分选器,当小尺寸的细胞进入大尺寸细胞分选器后,会从大尺寸细胞分选器底部的两个液流出口,并随着液流继续往前行,直到遇到尺寸相匹配的细胞分选器而被捕获。所以,不同尺寸的细胞只被对应尺寸的细胞分选器捕获,可针对性地捕获不同大小的目标细胞如尿脱落细胞。小尺寸细胞不会占据大尺寸细胞分选器的空间,大幅提高了各细胞分选器的利用率。本发明的一些实施方式中列举了:第一尺寸细胞分选器2-1的液流入口的宽度为 $60 \pm 5 \mu\text{m}$,两个液流出口的宽度均为 $22 \pm 5 \mu\text{m}$,可捕获直径在 $22 \sim 60 \mu\text{m}$ 范围内的细胞。第二尺寸细胞分选器2-2的液流入口的宽度为 $30 \pm 3 \mu\text{m}$,两个液流出口的宽度均为 $10 \pm 3 \mu\text{m}$,可捕获直径在 $10 \sim 22 \mu\text{m}$ 范围内的细胞。第三尺寸细胞分选器2-3的液流入口的宽度为 $16 \pm 1 \mu\text{m}$,两个液流出口的宽度均为 $4 \pm 1 \mu\text{m}$,可捕获直径在 $4 \sim 10 \mu\text{m}$ 范围内的细胞。尿液中的细胞普遍比血液中大,且常常存在细胞团的情况,针对尿液细胞特定设计的三种不同尺寸规格的细胞分选器,可避免出现细胞团的缺陷。

[0093] 如图4所示,所述捕获区域1-2包括多个细胞分选单元3,每个所述细胞分选单元3由一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第二尺寸细胞分选器2-2和一个第三尺寸细胞分选器2-3组成。进一步地,位于同一行的细胞分选单元中各尺寸细胞分选器的排布方式相同。横向相邻的细胞分选器,边距 d_1 相同。本发明的一些实施例中,列举了横向相邻的细胞分选器之间的边距 d_1 为 $60 \pm 3 \mu\text{m}$,该尺寸允许尿液中可能出现的其他杂质顺利通过,避免了芯片的堵塞。即便是当患者尿液中有大量的细胞而将微流控芯片内所有细胞分选器均已被占据时, $60 \pm 3 \mu\text{m}$ 的间距也能允许过剩的细胞通过,从而避免了传统滤膜法中视野混乱的问题。

[0094] 如图5所示,横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第二尺寸细胞分选器2-2和一个第三尺寸细胞分选器2-3组成一个第一细胞分选单元3-1;横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第三尺寸细胞分选器2-3和一个第二尺寸细胞分选器2-2组成一个第二细胞分选单元3-2;多个第一细胞分选单元3-1横向循环排布构成第一细胞分选阵列4-1,多个第二细胞分选单元3-2横向循环排布构成第二细胞分选阵列4-2,相互平行的一个第一细胞分选阵列和一个第二捕获阵列组成一个细胞分选二级阵列4,细胞捕获区域中多个相互平行的细胞分选二级阵列纵向等边距循环排布。

[0095] 进一步地,在每个细胞分选二级阵列4中,第二细胞分选阵列4-2的第一尺寸细胞分选器2-1的液流入口的中点与对应第一细胞分选阵列4-1的第三尺寸细胞分选器2-2和第二2-3尺寸细胞分选器横向边距的中点对齐。

[0096] 进一步地,各奇数行细胞分选二级阵列的首行首列细胞分选器纵向位置对齐;各偶数行细胞分选二级阵列较相邻的前一奇数行细胞分选二级阵列向右侧等距偏移。有助于营造紊乱、随机的液流环境,避免细胞沿单一路径取向,从而提升微流控芯片的捕获效率。

[0097] 流经本发明的前述微流控芯片的所有目标细胞如尿脱落细胞将以同等概率遭遇各级细胞分选器,从而达到“依据细胞尺寸差异分级捕获细胞”的目的。当细胞可以依据尺寸差异被分别捕获开来,则观察视野更整洁、细胞形态更清晰,有利于下一步针对细胞形态的分析判读(如现今临床通用的尿脱落细胞学检查)。

[0098] 可按照聚二甲基硅氧烷(PDMS)标准工艺,采用常规载玻片作为基底,通过等离子处理键合,来制备本发明的微流控芯片。

[0099] PDMS是聚二甲基硅氧烷的英文缩写。聚二甲基硅氧烷属于固化型聚合物,固化型聚合物与固化剂混合后,经过一段时间可固化变硬得到一定结构的微流控芯片。

[0100] 先采用利用微流控芯片分选和捕获尿脱落细胞的优势在于,(1)经微流控芯片捕获的细胞依据尺寸差异而分布开来,使得观察视野清晰,方便病理医师阅片,从而规避了传统的滤膜法中所有细胞挤在一起而干扰后续阅片的风险;(2)染色时,所用试剂由微流注射泵控制,染色时间精确、染色过程自动化。

[0101] 综上所述,本发明的利用微流控芯片分选和捕获尿脱落细胞,并免疫荧光方法检测人尿液中的脱落肿瘤细胞,能够准确、客观地检测尿路上皮癌(包括膀胱癌、输尿管癌、肾盂癌),且全程无创,并摆脱了对病理医生主观经验的依赖。因此,本发明有效克服了目前尿路上皮癌临床诊断中存在的敏感度低、依赖病理医生的主观判断、有创、低效等问题。

[0102] 在进一步描述本发明具体实施方式之前,应理解,本发明的保护范围不局限于下述特定的具体实施方案;还应当理解,本发明实施例中使用的术语是为了描述特定的具体实施方案,而不是为了限制本发明的保护范围。下列实施例中未注明具体条件的试验方法,通常按照常规条件,或者按照各制造商所建议的条件。

[0103] 当实施例给出数值范围时,应理解,除非本发明另有说明,每个数值范围的两个端点以及两个端点之间任何一个数值均可选用。除非另外定义,本发明中使用的所有技术和科学术语与本技术领域技术人员通常理解的意义相同。除实施例中使用的具体方法、设备、材料外,根据本技术领域的技术人员对现有技术的掌握及本发明的记载,还可以使用与本发明实施例中所述的方法、设备、材料相似或等同的现有技术的任何方法、设备和材料来实现本发明。

[0104] 除非另外说明,本发明中所公开的实验方法、检测方法、制备方法均采用本技术领域常规的分子生物学、生物化学、染色质结构和分析、分析化学、细胞培养、重组DNA技术及相关领域的常规技术。这些技术在现有文献中已有完善说明,具体可参见Sambrook等MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL,Second edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989and Third edition,2001;Ausubel等,CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY,John Wiley&Sons,New York,1987and periodic updates;the series METHODS IN ENZYMOLOGY,Academic Press,San Diego;Wolffe,CHROMATIN STRUCTURE AND FUNCTION,Third edition,Academic Press,San Diego,1998;METHODS IN ENZYMOLOGY,Vol.304,Chromatin(P.M.Wassarman and A.P.Wolffe,eds.),Academic Press,San Diego,1999;和METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY,Vol.119,Chromatin Protocols(P.B.Becker,ed.)Humana Press,Totowa,1999等。

[0105] 实施例1微流控芯片捕获尿脱落细胞

[0106] 如图1~5所示,本发明的微流控芯片,包括沿液流方向A依次连接的样本入口1-1、细胞捕获区域1-2以及样本出口1-3。细胞捕获区域1-2设有多个细胞分选器2,如图2所示,所述细胞分选器2由三个整体呈弧形排布的柱状凸起201构成,柱状凸起之间存在间隙,弧形开口202作为液流入口,中间柱状凸起两侧的间隙203作为液流出口,两个液流出口呈对称分布。细胞捕获区域1-2设有三种不同尺寸规格的细胞分选器2,分别为第一尺寸细胞分选器2-1、第二尺寸细胞分选器2-2和第三尺寸细胞分选器2-3,第一尺寸细胞分选器2-1、第二尺寸细胞分选器2-2和第三尺寸细胞分选器2-3的尺寸依次减小。其中,第一尺寸细胞分选器2-1的液流入口的宽度为60 μ m,两个液流出口的宽度均为22 μ m,可捕获直径在22~60 μ m范围内的细胞。第二尺寸细胞分选器2-1的液流入口的宽度为30 μ m,两个液流出口的宽度均

为 $10\mu\text{m}$,可捕获直径在 $10\sim 22\mu\text{m}$ 范围内的细胞。第三尺寸细胞分选器2-3的液流入口的宽度为 $16\mu\text{m}$,两个液流出口的宽度均为 $4\mu\text{m}$,可捕获直径在 $4\sim 10\mu\text{m}$ 范围内的细胞。相邻的细胞分选器尺寸不同,在整个细胞捕获区域1-2内营造紊乱的液流环境。

[0107] 所述捕获区域1-2包括多个细胞分选单元3,每个所述细胞分选单元3由一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第二尺寸细胞分选器2-2和一个第三尺寸细胞分选器2-3组成。进一步地,位于同一行的细胞分选单元中各尺寸细胞分选器的排布方式相同。横向相邻的细胞分选器,边距 d_1 相同,均为 $60\mu\text{m}$ 。横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第二尺寸细胞分选器2-2和一个第三尺寸细胞分选器2-3组成一个第一细胞分选单元3-1;横向依次等边距排列的一个第一尺寸细胞分选器2-1、一个第三尺寸细胞分选器2-3和一个第二尺寸细胞分选器2-2组成一个第二细胞分选单元3-2;多个第一细胞分选单元3-1横向循环排布构成第一细胞分选阵列4-1,多个第二细胞分选单元3-2横向循环排布构成第二细胞分选阵列4-2,相互平行的一个第一细胞分选阵列和一个第二捕获阵列组成一个细胞分选二级阵列4,细胞捕获区域中多个相互平行的细胞分选二级阵列纵向等边距($d_3=120\mu\text{m}$)循环排布。

[0108] 各奇数行细胞分选二级阵列的首行首列细胞分选器纵向位置对齐;各偶数行细胞分选二级阵列较相邻的前一奇数行细胞分选二级阵列向右侧等距($d_2=50\mu\text{m}$)偏移。按次规律,直至填满总长度和总宽度均为 $6000\mu\text{m}$ 的微流控芯片捕获区域1-2。

[0109] 按照聚二甲基硅氧烷(PDMS)标准工艺,采用常规 $2.5\times 7.5\text{cm}$ 载玻片作为基底,通过等离子处理键合,来制备本发明的微流控芯片。

[0110] 在注射泵的控制下,待处理的尿液样本或者尿沉渣的PBS(磷酸盐缓冲液)悬浮液,从样本入口1-1进入微流控芯片,途径细胞捕获区域1-2时尿脱落细胞被捕获,剩余液体从样本出口1-3流出微流控芯片。液体样本中的尿脱落细胞B随机流经各个不同尺寸规格的细胞分选器,不同尺寸的尿脱落细胞B被对应尺寸的细胞分选器2捕获。因此,不同尺寸的细胞在芯片内部规则分布开来,视野清晰,细胞形态完好,特别适用于下一步的分析。

[0111] 实施例2免疫荧光法判定尿脱落肿瘤细胞

[0112] 尿脱落细胞被实施例1中的微流控芯片捕获后,如图6所示,不同尺寸的细胞在芯片内部规则分布开来,视野清晰,细胞形态完好,特别适用于下一步的分析。

[0113] 本实施例通过免疫荧光法来区别尿脱落肿瘤细胞与正常尿路上皮细胞。

[0114] 免疫荧光染色步骤:多聚甲醛以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过捕获有尿脱落细胞的微流控芯片,维持30min;PBS以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过所述微流控芯片,维持3-5min;浓度为0.1%的Triton X-100溶液以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过所述微流控芯片,维持10min;PBS以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过所述微流控芯片,维持3-5min;BSA溶液以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过所述微流控芯片,维持30min。抗-CK20一抗(abcam,ab76126)、抗-CD44v6一抗(abcam,ab78960)混合溶液以 0.5ml/h 的流速通过所述微流控芯片,维持60min;PBS以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过微流控芯片,维持3-5min;CK20对应二抗(Invitrogen,A11070)、CD44v6对应二抗(abcam,ab150116)、DAPI(Invitrogen,MP01306)混合溶液以 0.5ml/h 的流速通过所述微流控芯片,维持30min;PBS以 $0.5\sim 4\text{ml/h}$ 的流速通过所述微流控芯片,维持3-5min。

[0115] 最后,在荧光显微镜对应波长的激发光下,寻找CK20、CD44v6、DAPI三者同时阳性的细胞,为尿脱落肿瘤细胞。如图7所示。

[0116] 具体地,CK20:激发波长450nm-480nm,发射波长515nm;CD44v6:激发波长515nm-585nm,发射波长610nm;DAPI:激发波长330nm-385nm,发射波长420nm。

[0117] 实施例3本发明的检测准确率

[0118] 为了验证本发明的准确率,我们收集了50位确诊的尿路上皮癌患者、13位非癌症志愿者的尿液采用上述实施例2中的方法进行检测。寻找CK20、CD44v6、DAPI三者同时阳性的细胞,为尿脱落肿瘤细胞。基于所有案例尿液中所检测到肿瘤细胞数目绘制ROC曲线(如图8所示),得本发明的敏感度为:88.9%;特异度为:76.9%,ROC曲线下面积为0.808。

[0119] 此外,我们也实施了与临床现役尿脱落细胞学检查的一对一比较。共采集17位尿路上皮癌确诊患者的尿液,其中一半尿液送往医院病理科进行尿脱落细胞学检查,另外一半尿液送往实验室采用本发明上述实施例2中的方法进行检测。寻找CK20、CD44v6、DAPI三者同时阳性的细胞,为尿脱落肿瘤细胞。结果为:17例确诊患者中,传统尿脱落细胞学检查呈阳性(包含疑似病例)的仅4例,准确率23.5%;而本发明在17位患者中检测出了15例阳性结果,准确率88.2%。详见下表1所示:

[0120] 表1:本发明与传统尿脱落细胞学检查的比较

[0121] N:阴性;S:疑似;P:阳性

[0122]

患者编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
传统尿脱落细胞学检查	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	P	P	P
本发明检测到的肿瘤细胞数(/ml)	P	P	P	P	P	P	P	N	P	N	P	P	P	P	P	P	P
	5.3	1.1	3.7	1.7	543.1	14.3	3.1	0.0	2.3	0.0	19.4	3.7	345.2	1910.5	40.0	173.3	60.0

[0123] 实施例4回收细胞进行单细胞测序

[0124] 对肿瘤细胞进行分子层面的分析具有巨大的临床价值,也充分体现了精准医疗的理念。本发明的一大优势为:可无损捕获、回收单个尿脱落肿瘤细胞,从而为下游的单细胞测序打下基础。我们使用本发明上述实施例1中的微流控芯片捕获并回收了一位尿路上皮癌患者的6个尿脱落细胞(1个正常尿路上皮细胞、5个肿瘤细胞),然后对该6个细胞分别进行单细胞测序,最后分析其拷贝数变异(CNV)情况。

[0125] 如图9结果显示,肿瘤细胞均如预期出现了拷贝数紊乱的情况,而正常尿路上皮细胞的拷贝数则符合正常的二倍体特征。

[0126] 这个例子充分证明了本发明可以高效地捕获并回收单个尿脱落细胞,全过程对目标细胞的损伤极小,可以衔接下游一系列的分子分析手段,因此具有重大价值与潜力。

[0127] 以上所述,仅为本发明的较佳实施例,并非对本发明任何形式上和实质上的限制,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还将可以做出

若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。凡熟悉本专业的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围的情况下,当可利用以上所揭示的技术内容而做出的些许更动、修饰与演变的等同变化,均为本发明的等效实施例;同时,凡依据本发明的实质技术对上述实施例所作的任何等同变化的更动、修饰与演变,均仍属于本发明的技术方案的范围

内。

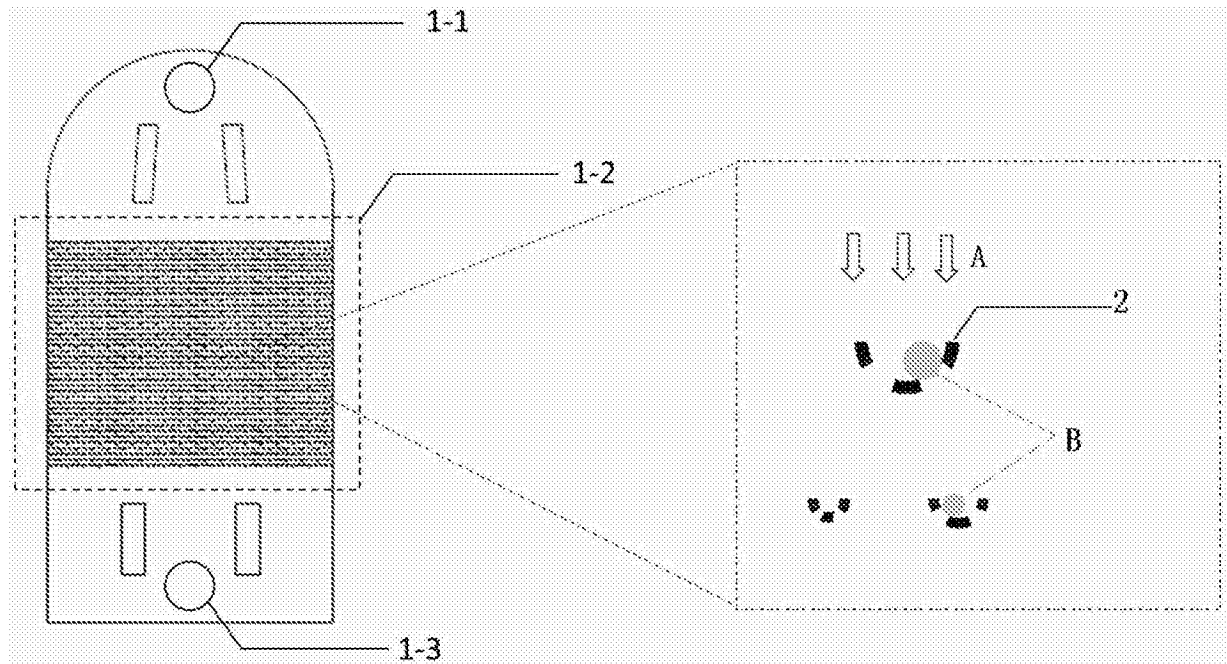


图1

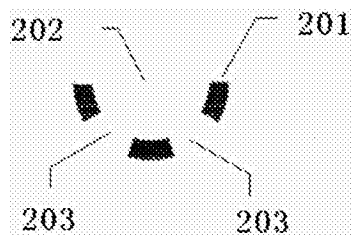


图2

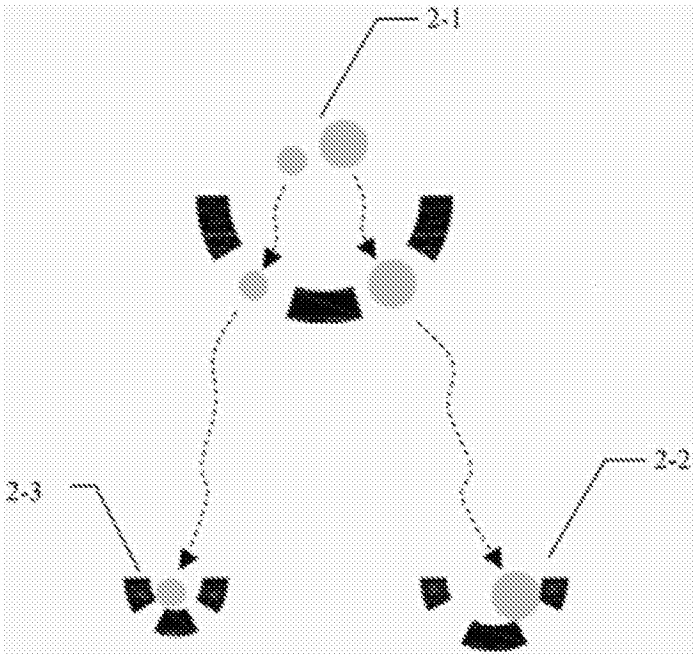


图3

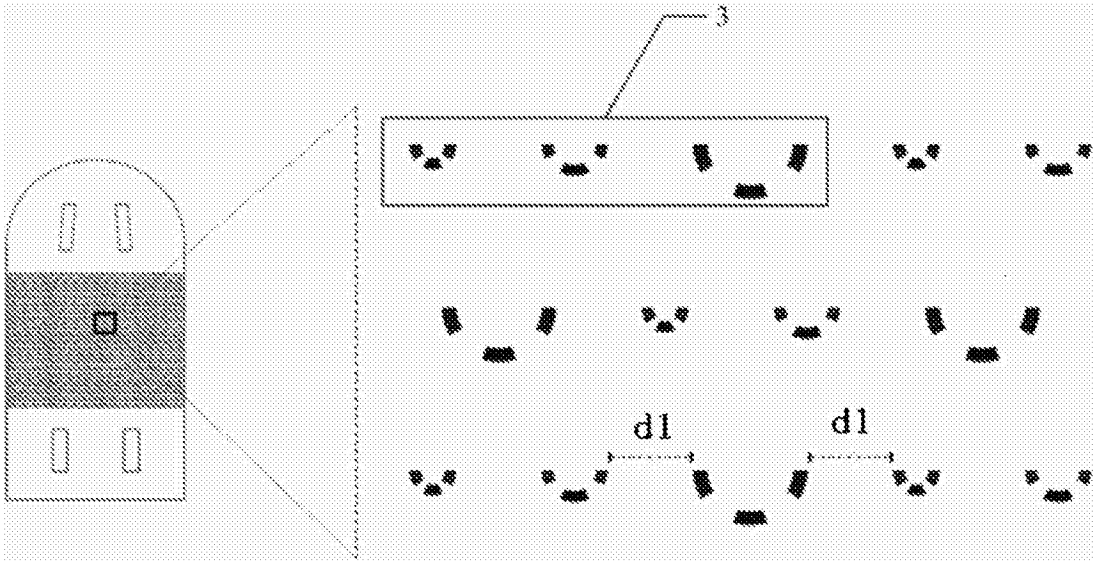


图4

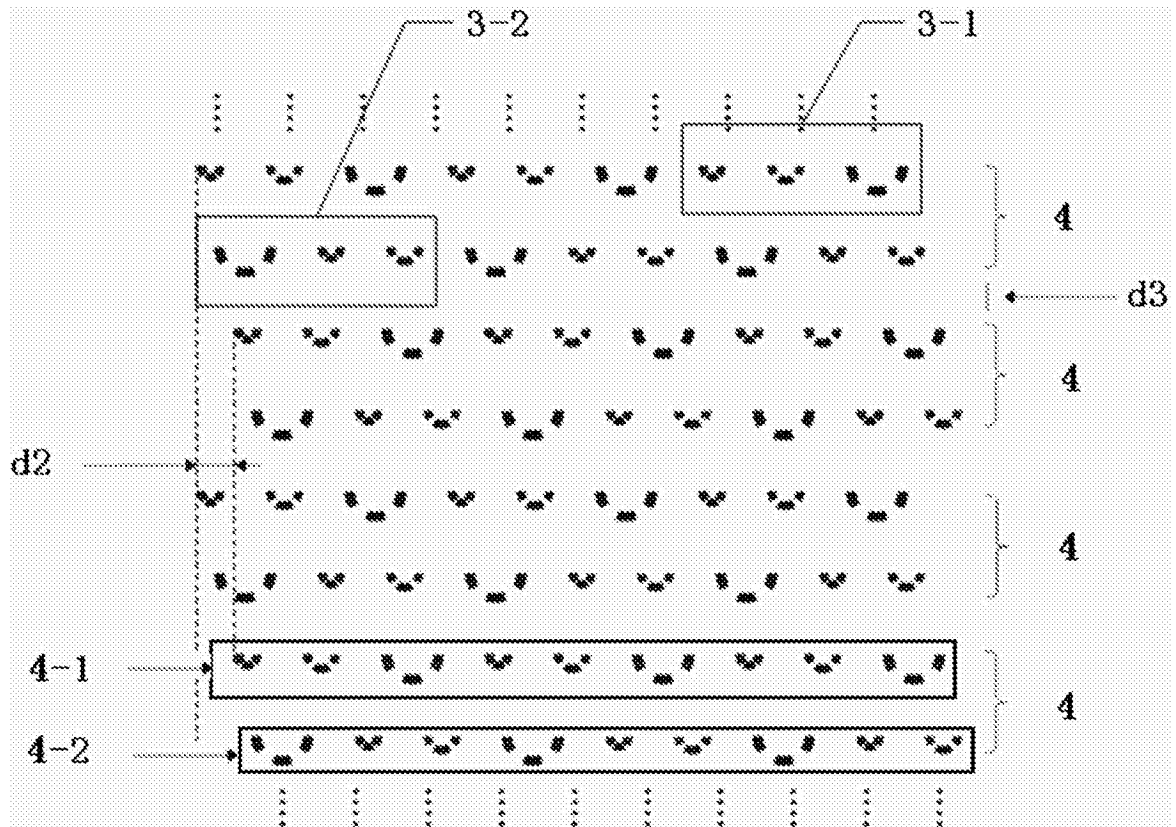


图5

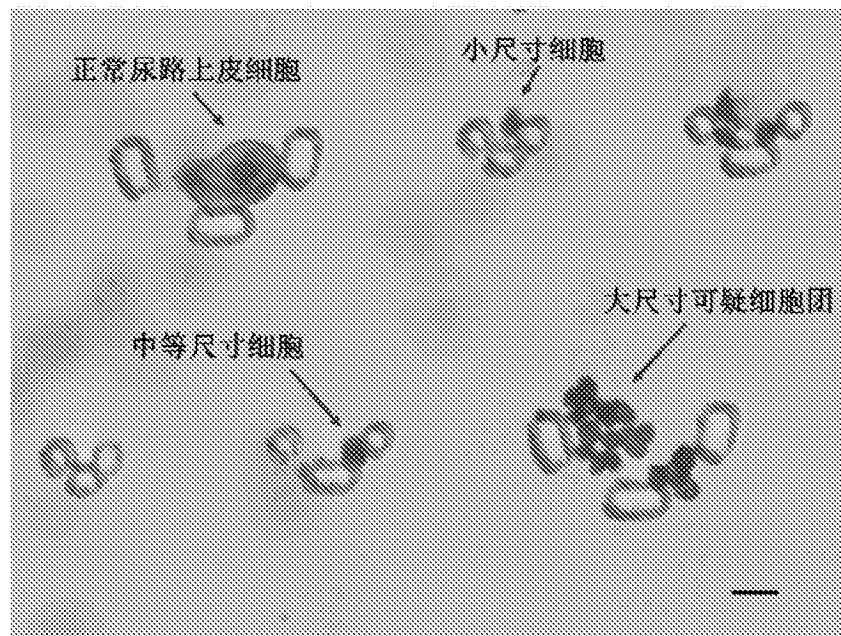


图6

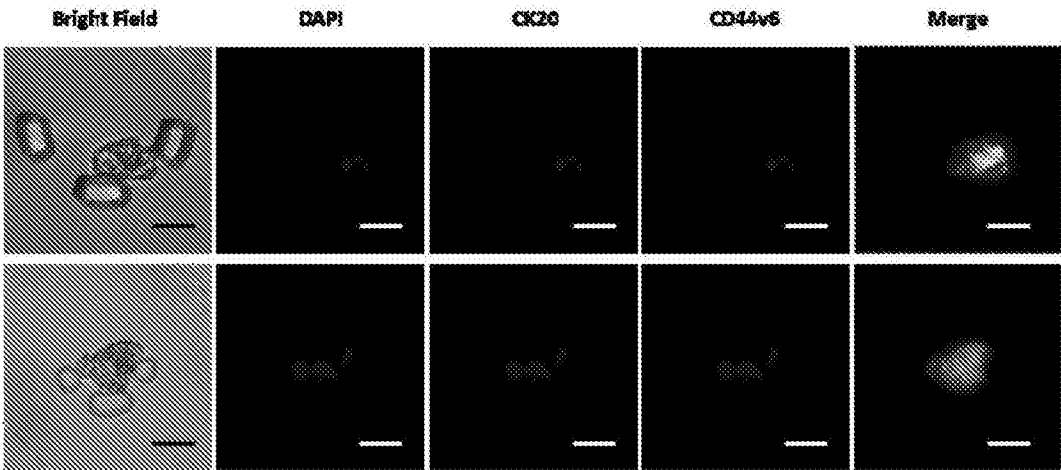


图7

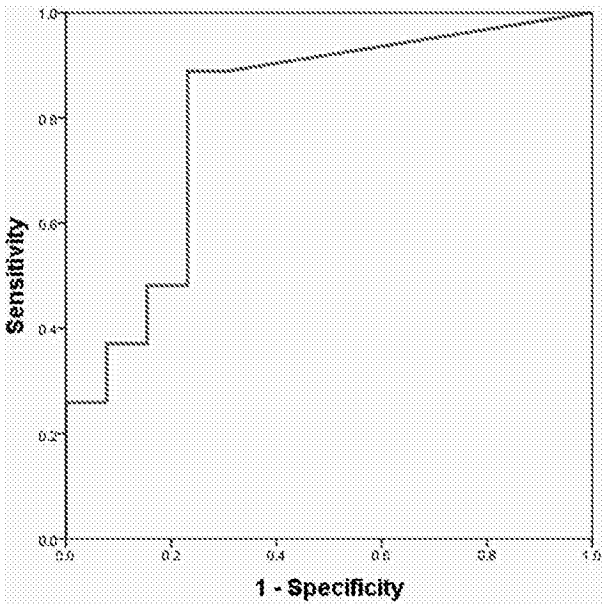


图8

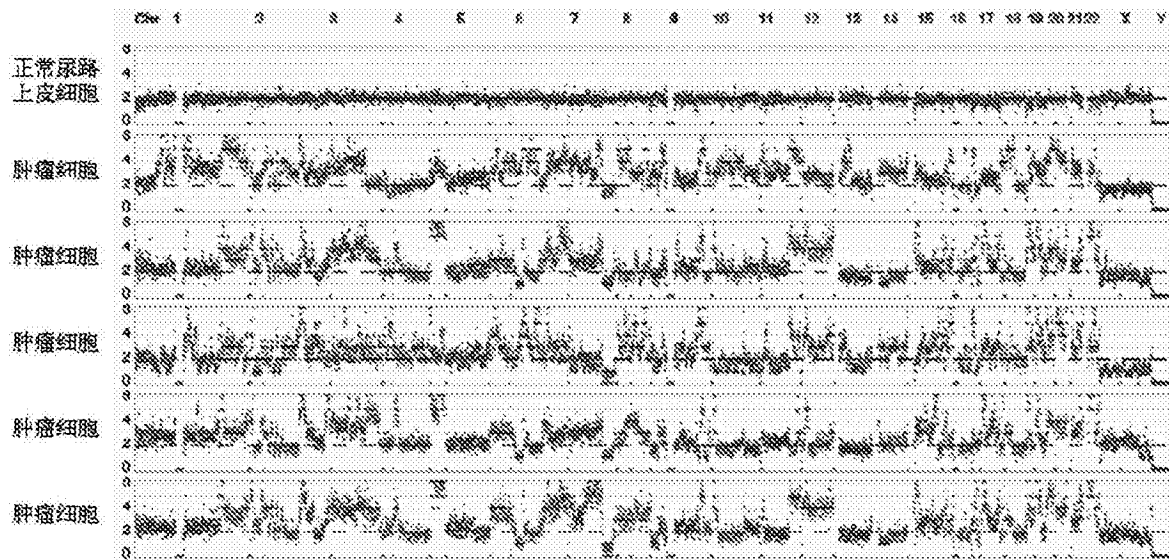


图9

专利名称(译)	一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术		
公开(公告)号	CN106944163A	公开(公告)日	2017-07-14
申请号	CN201710054588.2	申请日	2017-01-24
[标]发明人	韩平畴 金百冶 陈安琪 傅广候		
发明人	韩平畴 金百冶 陈安琪 傅广候		
IPC分类号	B01L3/00 G01N33/533 G01N33/574		
CPC分类号	B01L3/502753 B01L3/502761 B01L2200/021 B01L2200/0668 B01L2300/0864 B01L2300/0893 G01N33/533 G01N33/57484		
代理人(译)	李艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于生物体液体外检测领域，具体涉及一种针对尿路上皮癌的尿脱落肿瘤细胞的免疫荧光染色技术。针对目前尿路上皮癌临床诊断中存在的敏感度低、依赖病理医生的主观判断、有创、低效等问题，本发明提供了一种高效的尿路上皮癌尿脱落肿瘤细胞免疫荧光染色技术，同时使用CK20和CD44v6两个蛋白作为一组标记物并采用免疫荧光法鉴定尿脱落肿瘤细胞，从而检测尿路上皮癌，提高了人尿液中的尿脱落肿瘤细胞的检测准确度，且全程无创，并摆脱了常规方法对于病理医生主观经验的依赖。

患者编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
传统尿脱落细胞学检查	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	S	P	P	P
本发明检测到的肿瘤细胞数 (/ml)	5.3	1.1	3.7	1.7	543.1	14.3	3.1	0.0	2.3	0.0	19.4	3.7	345.2	1910.5	40.0	173.3	60.0