



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110389219 A

(43)申请公布日 2019.10.29

(21)申请号 201910506524.0

(22)申请日 2019.06.12

(71)申请人 杭州华得森生物技术有限公司

地址 310051 浙江省杭州市滨江区江陵路  
88号4幢3楼

(72)发明人 崔莹 张开山 于杰

(74)专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公司 33200

代理人 陈升华

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 1/40(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

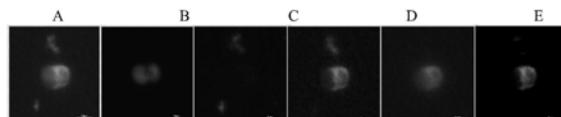
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法，包括：生物素标记的上皮间质混合抗体（采用生物素标记的EpCAM抗体和生物素标记的抗CSV抗体）；上皮间质混合型CTCs的分离富集；采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体（采用荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体）对不同亚型CTCs的免疫检测；采用PD-L1一抗与荧光素标记的PD-L1二抗对捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测。本发明方法不仅可以简捷高效特异地富集检测上皮间质混合型CTCs，而且可以富集检测上皮型与间质型CTCs。



1.一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1)生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备;

所述的生物素标记的上皮间质混合抗体采用生物素标记的EpCAM抗体和生物素标记的抗CSV抗体;

2)上皮间质混合型CTCs的分离富集;

3)采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体对不同亚型CTCs的免疫检测;

所述的荧光素标记的上皮间质混合型抗体采用荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体;

4)采用PD-L1一抗与荧光素标记的PD-L1二抗对步骤3)中捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测。

2.根据权利要求1所述的富集检测方法,其特征在于,步骤1)中,所述的生物素标记的上皮间质混合抗体中生物素标记的EpCAM抗体的质量百分数为35%~60%;所述的生物素标记的上皮间质混合抗体中生物素标记的抗CSV抗体的质量百分数为25%~50%。

3.根据权利要求1所述的富集检测方法,其特征在于,步骤1)中,所述的生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备具体包括:

用移液器吸取链霉亲和素溶液,加入微流控载体,在10~35℃下孵育3~5h后放置在环境湿度低于30%的干燥室干燥20~28h,直至微流控载体内无液体残留,用乙醇处理微流控载体,然后立即用PBS缓冲液冲洗微流控载体;

将生物素标记的抗EpCAM抗体和生物素标记的抗CSV抗体的混合液,加入微流控载体内35~39℃孵育25~35min后,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,加入捕获增强液至微流控载体内,10~35℃孵育0.5~1.5h,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备,将其置于湿盒备用。

4.根据权利要求3所述的富集检测方法,其特征在于,所述的捕获增强液为含有质量百分浓度为0.2%~2%的表面活性剂、质量百分浓度为0.5%~10%的牛血清白蛋白与质量百分浓度为88%~99.3%封闭血清的混合溶液。

5.根据权利要求1所述的富集检测方法,其特征在于,步骤2)中,上皮间质混合型CTCs的分离富集具体包括:

用PBS缓冲液稀释外周血,之后加入到含有单核细胞分离液的梯度离心管的多孔屏障上方,离心后,吸取单核细胞层,并将其转移至无菌离心管中,使用细胞清洗液洗涤单核细胞,离心,弃除上清液,再加入细胞清洗液轻柔重悬单核细胞,完成CTCs的粗分离液的制备;

采用微流泵系统吸取CTCs的粗分离液,以3~4mL/h的注入速度缓慢匀速注入步骤1)中制备好的生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体中,然后吸取PBS缓冲液冲洗微流控免疫捕获载体,完成上皮间质混合型CTCs的富集,得到富集有上皮间质混合型CTCs的微流控载体。

6.根据权利要求1所述的富集检测方法,其特征在于,步骤3)中,采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体对不同亚型CTCs的免疫检测,具体包括:

取细胞固定液,注入步骤2)中富集有上皮间质混合型CTCs的微流控载体中,10~35℃反应15~25min后,吸取PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成细胞固定;

用移液器吸取细胞通透液,注入已完成细胞固定的微流控载体内,置于避光湿盒中10~35℃作用8~12min后,吸取PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成细胞通透;

将荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液的混合液加入到已完成细胞通透的微流控载体内10~35℃避光孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液缓慢微流控载体,接着吸取核酸染色液注入微流控载体,置于避光湿盒中10~35℃孵育10~20min,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成上皮型CTCs、上皮间质混合型CTCs、与间质型CTCs的免疫检测,用倒置荧光显微镜观察荧光显色情况。

7.根据权利要求6所述的富集检测方法,其特征在于,步骤3)中,所述的荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体、染色阻断液A与染色阻断液B混合的体积比为1:1:1:1:1。

8.根据权利要求6所述的富集检测方法,其特征在于,步骤3)中,所述的染色阻断液A为含有FC受体阻断剂的溶液;所述的染色阻断液B为含有鼠血清、兔血清、羊血清中的一种以上成分的溶液;所述的抗体稀释液包括含有质量百分浓度为2%~10%牛血清白蛋白与质量百分浓度为0.3%~5%蛋白保护稳定剂的溶液。

9.根据权利要求1所述的富集检测方法,其特征在于,步骤4)中,采用PD-L1一抗与荧光素标记的PD-L1二抗对步骤3)中捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测,具体包括:

将PD-L1一抗、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液混合液加入步骤3)中已反应完成的微流控载体中,置于湿盒中避光10~35℃孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液冲洗微流控载体;

将荧光素标记的PD-L1二抗用抗体稀释液缓慢加入已完成PD-L1一抗反应的微流控载体中,置于湿盒中避光10~35℃孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成不同亚型CTCs的PD-L1表型检测,用倒置荧光显微镜观察染色结果。

10.根据权利要求9所述的富集检测方法,其特征在于,步骤4)中,所述PD-L1一抗与染色阻断液A、染色阻断液B混合的体积比为1:2:2。

11.根据权利要求9所述的富集检测方法,其特征在于,步骤4)中,所述的荧光素标记的PD-L1二抗用抗体稀释液中荧光素标记PD-L1二抗的体积百分数为2%~5%。

## 一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及循环肿瘤细胞亚型的富集及其检测方法领域,具体涉及一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法。

### 背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cells, CTCs) 为自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞,是存在于外周血中的各类肿瘤细胞的统称。CTCs主要是由上皮型CTCs、间质型CTCs和上皮间质混合型(上皮间质转化型和间质上皮转化型)CTCs亚群,以及上述亚群CTCsPD-L1阳性或阴性亚型组成的多种类型的异质性种群。

[0003] 肿瘤转移扩散是导致癌症进展与相关死亡的主要原因。CTCs在肿瘤形成远端转移的过程中扮演着重要的角色。恶性肿瘤患者血液中若含有较多数量的CTCs,则预示着预后不良与肿瘤转移的概率增加。CTCs诱发的肿瘤转移主要涉及上皮间质转化 (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT) 与间质上皮转化 (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET) 两个动态过程,其中EMT过程涉及肿瘤细胞从原发灶脱落入血形成具有转移侵袭性的上皮间质混合型CTCs,MET过程参与了远端转移灶的形成、稳定和增殖过程。在上述CTCs发生EMT与MET的过程中伴随着上皮型、上皮间质混合型和间质型不同表型间的CTCs转变,且在肿瘤发生发展的不同阶段(早期、进展期与转移期)中对于上述不同亚群的CTCs检测具有不同的临床应用价值:上皮型CTCs的检测分析可应用于肿瘤的早期辅助鉴别诊断与预后评估等方向;上皮间质混合型与间质型CTCs检测分析可指导进展期和转移期的肿瘤患者的转移复发监测和疗效监测等。因此,以无创的方式获取与检测肿瘤患者外周血中的不同亚群的CTCs,尤其是上皮间质混合型(EMT与MET)的CTCs对肿瘤患者临床肿瘤早期辅助诊断、预后判断、肿瘤治疗疗效监测与评价、肿瘤转移复发监测以及早期预警、个体化治疗指导和改善肿瘤患者的生存状态都有着重要的临床应用价值。

[0004] 细胞程序式死亡配体1 (Programmed cell death 1 ligand 1, PD-L1),也称为表面抗原分化簇274 (cluster of differentiation 274, CD274),是人类体内的一种蛋白质,CTCs可通过表达PD-L1,使T细胞效应功能下调来诱导形成免疫抑制性的肿瘤微环境,逃避机体的抗肿瘤免疫反应,使肿瘤细胞免于机体免疫系统的监视和清除。通过检测肿瘤的PD-L1表达,选择PD-L1阳性个体使用PD-L1免疫抑制剂可有助于阻断肿瘤细胞的免疫耐受,产生持久的抗肿瘤治疗效果。目前PD-L1的检测方法主要采用免疫组织化学方法。该方法被认为是PD-L1检测的金标准,但对于部分缺乏手术指征或存在手术禁忌症的癌症患者,由于肿瘤组织无法切除,细针穿刺组织又容易造成肿瘤播散,PD-L1状态评估变得困难。因此,临幊上亟需一种无创的通过CTCs上PD-L1检测的液体活检方法来评估患者PD-L1的表达状态。

[0005] CTCs在外周血中的数量非常稀少,仅占外周血白细胞的 $1/10^6\sim1/10^7$ ,因此对于不同类型CTCs的有效富集与检测技术瓶颈更高、难度更大,一直影响着CTCs的实际应用。目前CTCs的富集检测主要采用以下2种形式:①依赖抗EpCAM富集捕获CTCs与抗细胞角蛋白

(CK8、CK18和CK19等)抗体及CD45鉴别检测CTCs的方法(代表为CellSearch系统),此种方法仅针对上皮型CTCs的富集与检测,且用血量大(7.5mL),无法富集检测具有重要临床价值的间质表型与上皮间质混合型的CTCs;②不依赖捕获标记物富集CTCs(膜过滤法、梯度离心法等),虽然克服了富集捕获标志物的限制,但是此种方式的富集特异性不高,用血量大(10mL),会漏检具有特殊生物物理特性的CTCs,并且仍存在仅能富集检测单一亚群的CTCs的缺陷,最重要的是仍然无法富集检测上皮间质混合型的CTCs。因此常规CTCs的富集与检测不仅用血量大,且往往局限于单一类群的CTCs的富集与检测,无法富集检测上皮间质混合型的CTCs,由于CTCs的异质性、动态演化等原因影响,单一类型的富集与检测方法很大程度限制了CTCs的临床应用效果。

[0006] 为克服现有CTCs富集检测技术检测用血量大,仅能富集检测上皮型或间质型一种单一类型的CTCs,无法富集检测上皮间质混合型的CTCs及其不同类型CTCs的PD-L1免疫表型的技术缺陷局限,本发明通过上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物、特异性免疫检查点抗体标志物与捕获染色增强液组合结合微流控技术,提供了一种用血量小、不仅可以高效灵敏特异地富集检测上皮型、间质型的CTCs,而且可以最大限度地富集检测现有技术不能富集检测的上皮间质混合型CTCs,以及上皮型PD-L1阳性表型、上皮间质混合型PD-L1阳性表型与间质型PD-L1阳性表型的CTCs的方法,为肿瘤的精准治疗临床应用提供更加可靠的诊断、治疗和预后判断证据。

## 发明内容

[0007] 为解决现有CTCs富集检测技术检测用血量大,仅限于富集检测上皮型或间质型单一类群CTCs,且不能富集检测上皮间质混合型的CTCs与不同类型CTCs PD-L1免疫表型的技术局限,本发明的目的在于通过上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物、特异性免疫检查点抗体标志物与捕获染色增强液组合结合微流控技术提供一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法,具体为一种用血量小、可简捷高效灵敏特异的富集检测上皮型、间质型、上皮间质混合型CTCs与上皮型PD-L1阳性表型、上皮间质混合型PD-L1阳性表型与间质型PD-L1阳性表型CTCs的方法。

[0008] 此外,多种抗体组合时会影响目标细胞与抗体的结合效率,导致CTCs的捕获与检测特异性降低。为解决此问题,本发明的目的还在于,通过捕获增强液与染色增强液组合,充分暴露CTCs细胞膜表面的抗原决定簇,使上皮间质特异性捕获与检测抗体及特异性免疫检查点抗体更容易结合在CTCs细胞膜表面的抗原上,以提高捕获与检测抗体对CTCs的结合特异性与敏感性,同时增强检测抗体在CTCs细胞膜表面的荧光强度,使CTCs的荧光显色形态更加典型清晰完整。

[0009] 本发明解决上述问题所采用的具体技术方案如下:

[0010] 一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法,包括以下步骤:

[0011] 1)生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备;

[0012] 所述的生物素标记的上皮间质混合抗体采用生物素标记的EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体和生物素标记的的抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体;

[0013] 2)上皮间质混合型CTCs的分离富集;

[0014] 3)采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体对不同亚型CTCs的免疫检测;

[0015] 所述的荧光素标记的上皮间质混合型抗体采用荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体；

[0016] 4) 采用PD-L1一抗与荧光素标记的PD-L1二抗对步骤3) 中捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测。

[0017] 本发明中，利用上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物、特异性免疫检查点抗体标志物与捕获染色增强液组合结合微流控技术富集检测上皮型CTCs、间质型CTCs与上皮间质混合型CTCs及其不同类型CTCs的PD-L1免疫表型；其中所述的上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物包括：抗EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体、抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体、抗PanCK抗体、抗Vimentin(波形蛋白)抗体、抗CD45抗体；所述的特异性免疫检查点抗体标志物包括：抗PD-L1一抗及抗PD-L1二抗；该方法利用上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物、特异性免疫检查点抗体标志物与捕获增强液与染色增强液组合结合微流控技术不仅解决了现有CTCs检测技术用血量大的问题，提高了CTCs的检测敏感性，而且在此基础上同时解决了现有CTCs检测技术不能检测不能富集检测上皮间质混合型CTCs的技术缺陷，不仅可以简捷高效特异地富集检测上皮间质混合型CTCs，而且可以富集检测上皮型与间质型CTCs。

[0018] 以下作为本发明的优选技术方案：

[0019] 步骤1) 中，所述的生物素标记的上皮间质混合抗体中生物素标记的EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体的质量百分数为35%~60%；所述的生物素标记的上皮间质混合抗体中生物素标记的抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体的质量百分数为25%~50%。

[0020] 优选的，微流控技术为微流控载体芯片技术；更优选的，为包括含有PDMS(聚二甲基硅氧烷)的蚀刻人字形微涡旋流体甬道顶层与含有纳米底物涂层结构基片的微流控装置。

[0021] 所述的生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备具体包括：

[0022] 用移液器吸取链霉亲和素溶液，加入微流控载体，在10~35℃下孵育3~5h后放置在环境湿度低于30%的干燥室干燥20~28h，直至微流控载体内无液体残留，用乙醇处理微流控载体，然后立即用PBS缓冲液冲洗微流控载体；

[0023] 将生物素标记的抗EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体和生物素标记的抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体的混合液，加入微流控载体内35~39℃孵育25~35min后，用PBS缓冲液冲洗微流控载体，加入捕获增强液至微流控载体内，10~35℃孵育0.5~1.5h，用PBS缓冲液冲洗微流控载体，完成生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备，将其置于湿盒备用。

[0024] 所述的捕获增强液为含有质量百分浓度为0.2%~2%的表面活性剂、质量百分浓度为0.5%~10%的BSA(牛血清白蛋白)与质量百分浓度为88%~99.3%封闭血清的混合溶液；

[0025] 步骤2) 中，上皮间质混合型CTCs的分离富集具体包括：

[0026] 用PBS缓冲液稀释外周血，之后加入到含有单核细胞分离液的梯度离心管的多孔屏障上方，离心后，吸取PBMCs(单核细胞)层，并将其转移至无菌离心管中，使用细胞清洗液洗涤PBMCs(单核细胞)，离心，弃除上清液，再加入细胞清洗液轻柔重悬PBMCs(单核细胞)，完成CTCs的粗分离液的制备；

[0027] 采用微流泵系统吸取CTCs的粗分离液，以3~4mL/h的注入速度缓慢匀速注入步骤

1) 中制备好的生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体中,然后吸取PBS缓冲液冲洗微流控免疫捕获载体,完成上皮间质混合型CTCs的富集,得到富集有上皮间质混合型CTCs的微流控载体。

[0028] 步骤3) 中,采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体对不同亚型CTCs的免疫检测,具体包括:

[0029] 取细胞固定液,注入步骤2) 中富集有上皮间质混合型CTCs的微流控载体中,10~35℃反应15~25min后,吸取PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成细胞固定;

[0030] 用移液器吸取细胞通透液,注入已完成细胞固定的微流控载体内,置于避光湿盒中10~35℃作用8~12min后,吸取PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成细胞通透;

[0031] 将荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液的混合液加入到已完成细胞通透的微流控载体内10~35℃避光孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液缓慢微流控载体,接着吸取核酸染色液注入微流控载体,置于避光湿盒中10~35℃孵育10~20min,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成上皮型CTCs、上皮间质混合型CTCs、与间质型CTCs的免疫检测,用倒置荧光显微镜观察荧光显色情况。

[0032] 进一步优选的,所述的荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体、染色阻断液A与染色阻断液B混合的体积比为1:1:1:1:1。

[0033] 所述的染色阻断液A为含有FC受体阻断剂的溶液;所述的染色阻断液B为含有鼠血清、兔血清、羊血清中的一种以上(包括一种)成分的溶液;所述的抗体稀释液包括含有质量百分浓度为2%~10%BSA(牛血清白蛋白)与质量百分浓度为0.3%~5%蛋白保护稳定剂的溶液。

[0034] 优选的,所述的蛋白保护稳定剂为甘油与化学惰性高分子聚合物的混合物。更优选的,化学惰性高分子聚合物为PEG。

[0035] 步骤4) 中,采用PD-L1一抗与荧光素标记的PD-L1二抗对步骤3) 中捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测,具体包括:

[0036] 将PD-L1一抗、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液混合液加入步骤3) 中已反应完成的微流控载体中,置于湿盒中避光10~35℃孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液冲洗微流控载体;

[0037] 将荧光素标记的PD-L1二抗用抗体稀释液缓慢加入已完成PD-L1一抗反应的微流控载体中,置于湿盒中避光10~35℃孵育1.5~2.5h后,用PBS缓冲液冲洗微流控载体,完成不同亚型CTCs的PD-L1表型检测,用倒置荧光显微镜观察染色结果。

[0038] 所述PD-L1一抗与染色阻断液A、染色阻断液B混合的体积比为1:2:2;所述的荧光素标记的PD-L1二抗用抗体稀释液中荧光素标记PD-L1二抗的体积百分数为2%~5%。

[0039] 所述抗PanCK抗体、抗Vimentin抗体、抗CD45抗体与抗PD-L1二抗各自均标记了可以相互区别的不同发射波长的荧光素。根据本领域技术人员公知的,为了区分不同的特异性检测抗体,本发明采用的不同荧光素标记,可以通过荧光显微镜在不同的滤光片下可以完全区分开。标记荧光素可以采用本领域任何常用的荧光染料,更优选的,包括FITC(异硫氰酸荧光素)、PE(藻红蛋白)、Alexa Fluor系列分子、PerCP(多甲藻黄素-叶绿素-蛋白质复合物)、APC(别藻青蛋白)、TRITC(四甲基异硫氰酸罗丹明)等,荧光显色各不相同可相互区

别；

- [0040] 一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法，包括以下步骤：
- [0041] 1) 采用生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备
- [0042] 用移液器吸取300 $\mu$ L链霉亲和素溶液，加入微流控载体，在常温25℃下孵育4h后放置在环境湿度低于30%的干燥室干燥24h，直至微流控载体内无液体残留。用300 $\mu$ L 95%的乙醇处理微流控载体1次，然后立即用PBS缓冲液冲洗微流控载体两次。
- [0043] 将生物素标记抗EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体、生物素标记抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体混合液200 $\mu$ L，加入微流控载体内37℃孵育30min后，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次，加入200 $\mu$ L捕获增强液至微流控载体内，室温孵育1h，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次，完成上皮间质混合体捕获微流控载体的制备，将其置于湿盒备用。
- [0044] 2) 上皮间质混合型CTCs的分离富集
- [0045] 用PBS缓冲液1:1稀释2mL外周血，将其加入到含有3mL单核细胞分离液的梯度离心管的多孔屏障上方，室温1000 $\times$ g离心10min后，小心缓慢吸取PBMCs(单核细胞)层，并将其转移至无菌离心管中使用15mL细胞清洗液缓慢洗涤PBMCs，室温300 $\times$ g离心10min，小心弃除上清液，再加入1mL细胞清洗液轻柔重悬PBMCs，完成CTCs的粗分离液的制备。
- [0046] 采用微流泵系统吸取上述1mL CTCs粗分离液，在室温下以3.6mL/h的注入速度缓慢匀速注入步骤1)中制备好的微流控载体中，然后吸取300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次，完成上皮间质混合型CTCs的富集。
- [0047] 3) 上皮间质混合型CTCs的免疫检测
- [0048] 取200 $\mu$ L细胞固定液，注入步骤2)中富集有上皮间质混合型CTCs的微流控载体中，室温反应20min后，吸取300 $\mu$ L PBS缓冲液冲洗微流控载体两次，完成细胞固定。
- [0049] 用移液器吸取200 $\mu$ L细胞通透液，注入已完成细胞固定的微流控载体内，置于避光湿盒中室温作用10min后，吸取300 $\mu$ L PBS缓冲液冲洗微流控载体三次，完成细胞通透。
- [0050] 将荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液的混合液250 $\mu$ L加入微流控载体内室温避光孵育2h后，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次，接着吸取150 $\mu$ L核酸染色液缓慢注入上述微流控载体，置于避光湿盒中室温孵育15min，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次，完成上皮型CTCs、上皮间质混合型CTCs、与间质型CTCs的免疫检测，用倒置荧光显微镜观察荧光显色情况。
- [0051] 4) 不同亚型CTCs的PD-L1表型检测
- [0052] 将PD-L1一抗、染色阻断液A、染色阻断液B与抗体稀释液混合液150 $\mu$ L缓慢加入步骤3)中已反应完成的微流控载体中，置于湿盒中避光室温孵育2h后，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体三次。
- [0053] 将荧光素标记的PD-L1二抗用抗体稀释液稀释至300 $\mu$ L后缓慢加入上述已完成PD-L1一抗反应的微流控载体中，置于湿盒中避光室温孵育2h后，用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体三次，完成不同亚型CTCs的PD-L1表型检测，用倒置荧光显微镜观察染色结果。
- [0054] 优选的，步骤2)中所述的单核细胞分离液为含有聚蔗糖(Ficoll)与泛影酸葡甲胺的人淋巴细胞分离液，密度为1.077±0.001g/mL；所述的梯度离心管为内部含有一个或多个孔

屏障隔板的离心管,可以辅助PBMCs的分离,能有效维持PBMCs分层状态,便于CTCs分离操作;所述的细胞清洗液优选为含有细胞培养基与2%胎牛血清的混合液。所述的微流泵系统为含有多向阀与管线组合的,可以通过控制软件定速定量操控微小流体的微流体泵。更优选的,所述的微流体泵的最大容积为500微升。

[0055] 优选的,步骤3)所述的细胞固定液优选为含有2%PFA(多聚甲醛)的水溶液;所述的细胞通透液优选为含有0.4%Triton X-100的水溶液;所述的核酸染色液为常见细胞核染液优选为Hoechst33342或DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)中的一种。

[0056] 与现有技术相比,本发明具有以下优点和效果:

[0057] 该方法利用上皮间质特异性捕获与检测抗体标志物、特异性免疫检查点抗体标志物与捕获增强液与染色增强液组合结合微流控技术不仅解决了现有CTCs检测技术用血量大的问题,提高了CTCs的检测敏感性,而且在此基础上同时解决了现有CTCs检测技术不能检测不能富集检测上皮间质混合型CTCs的技术缺陷,不仅可以简捷高效特异地富集检测上皮间质混合型CTCs,而且可以富集检测上皮型与间质型CTCs。同时,本发明以无创的方式提供了一种不同类型CTCs的PD-L1免疫表型的检测方法,更加简捷经济,弥补了现有技术检测PD-L1的缺陷。

[0058] 此外,本发明通过捕获染色增强液组合,充分暴露CTCs细胞膜表面的抗原决定簇,增加了CTCs捕获与检测的灵敏度与特异性,更好地展现了CTCs荧光显色形态,利于细胞病理形态与表型分析。本发明为基于CTCs的液体活检在肿瘤的无创精准诊断、治疗和预后判断提供了一种更加可靠经济实用的临床应用方式。

## 附图说明

[0059] 图1是上皮型循环肿瘤细胞的显色示意图;

[0060] 图2是间质型循环肿瘤细胞的显色示意图;

[0061] 图3是上皮间质混合型循环肿瘤细胞的显色示意图;

[0062] 图4是上皮型循环肿瘤细胞PD-L1阳性表达的显色示意图;

[0063] 图5是间质型循环肿瘤细胞PD-L1阳性表达的显色示意图;

[0064] 图6是上皮间质混合型循环肿瘤细胞PD-L1阳性表达显色示意图;

[0065] 图中:以上不同类群的循环肿瘤细胞均来自临床肺癌样本,图中白色箭头指示不同类群的CTCs,A为合并图像,B为Hoechst33342标记CTCs细胞核显色图像(实际为蓝色),C为CD45-PE显色图像(实际为橘色),D为PanCk-PerCP显色图像(实际为深红色),E为Vimentin-FITC显色图像(实际为绿色),F为PD-L1-Alexa 647(远红外,显微镜扫描赋以黄色)。

## 具体实施方式

[0066] 下面结合具体实施例以及附图对本发明作进一步说明。

[0067] 实施例1肺癌循环肿瘤细胞分型检测及其PD-L1的表达检测

[0068] 材料:微流控载体采用微流控芯片,微流泵系统采用循环肿瘤细胞分析仪(WY-C3000,杭州华得森生物技术有限公司生产)

[0069] 1.生物素标记的上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体的制备

[0070] 1.1. 用移液器吸取300 $\mu$ L浓度为5 $\mu$ g/mL链霉亲和素溶液,加入微流控芯片中,在常温25℃下孵育4h后放置在环境湿度低于30%的干燥室干燥24h,直至微流控芯片内无液体残留。

[0071] 1.2. 吸取300 $\mu$ L体积百分数95%的乙醇注入微流控芯片中,然后立即用1×PBS缓冲液冲洗两次。

[0072] 1.3. 将生物素标记抗EpCAM(上皮细胞粘附分子)抗体、生物素标记抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体混合液200 $\mu$ L(两种抗体混合后的质量百分比为:生物素标记的抗EpCAM抗体50%;生物素标记抗CSV抗体50%),加入微流控载体内37℃孵育30min后,用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控芯片两次。

[0073] 1.4. 用移液器吸取200 $\mu$ L捕获增强液注入微流控芯片中,室温25℃孵育1h。捕获增强液为含有质量百分数为0.4%的Triton X-100、质量百分数为3%的BSA(牛血清白蛋白)与质量百分数为87%封闭血清的混合溶液,余量为水。

[0074] 1.5. 用300 $\mu$ L PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次,完成上皮间质混合抗体捕获微流控芯片的制备,将其置于湿盒备用。

## [0075] 2. 上皮间质混合型CTCs的分离富集

[0076] 2.1 用2mL PBS缓冲液稀释2mL外周血,将4mL稀释血样其加入到含有3mL单核细胞分离液 Histopaque®-1077密度梯度离心液的 Leucosep®梯度离心管的多孔屏障上方,室温25℃1000×g离心10min。单核细胞分离液为含有聚蔗糖(Ficoll)与泛影酸葡甲胺的人淋巴细胞分离液,密度为1.077±0.001g/mL;梯度离心管为内部含有一个多孔屏障隔板的离心管,可以辅助PBMCs的分离,能有效维持PBMCs分层状态,便于CTCs分离操作;

[0077] 2.2 小心缓慢吸取PBMCs(单核细胞)层,并将其转移至无菌离心管中。

[0078] 2.3 向离心管中加入15mL细胞清洗液缓慢洗涤PBMCs,室温25℃300×g离心10min。细胞清洗液为含有质量百分数98%细胞培养基RPMI1640与质量百分数2%胎牛血清的混合液。

[0079] 2.4 用移液器小心弃除上清液,再加入1mL细胞清洗液轻柔重悬PBMCs,完成CTCs的粗分离液的制备。

[0080] 2.5 用微流泵系统[循环肿瘤细胞分析仪(WY-C3000)]吸取上述1mLCTCs粗分离液,在室温25℃下以3.6mL/h的注入速度缓慢匀速注入步骤1中制备好的微流控芯片中,然后吸取300 $\mu$ L 1×PBS缓冲液缓慢冲洗微流控芯片两次,完成上皮间质混合型CTCs的富集。微流泵系统为含有多向阀与管线组合的,可以通过控制软件定速定量操控微小流体的微流体泵。微流体泵的最大容积为500微升。

## [0081] 3. 上皮间质混合型CTCs的免疫检测

[0082] 3.1. 移液器取200 $\mu$ L细胞固定液,注入步骤2中富集有上皮间质混合型CTCs的微流控芯片中,室温25℃反应20min后,吸取300 $\mu$ L 1×PBS缓冲液冲洗微流控芯片两次,完成细胞固定。细胞固定液采用含有质量百分数2%PFA(多聚甲醛)的水溶液;

[0083] 3.2. 用移液器吸取200 $\mu$ L细胞通透液,注入已完成细胞固定的微流控芯片内,置于避光湿盒中室温作用10min后,吸取300 $\mu$ L 1×PBS缓冲液冲洗微流控芯片三次,完成细胞通透。细胞通透液采用含有质量百分数0.4% TritonX-100的水溶液;

[0084] 3.3. 将荧光素PerCP标记的抗PanCK抗体10 $\mu$ L、荧光素FITC标记的抗Vimentin抗体

10μL、荧光素PE标记的抗CD45抗体10μL、染色阻断液A 10μL、染色阻断液B 10μL与抗体稀释液200μL混匀后加入微流控芯片内,室温25℃避光孵育2h。染色阻断液A为含有FC受体阻断剂的溶液;染色阻断液B为含有鼠血清和兔血清的溶液;抗体稀释液为含有质量百分数为2%BSA与质量百分数为0.5%蛋白保护稳定剂的溶液。蛋白保护稳定剂为甘油与和PEG。

[0085] 3.4. 用移液器吸取300μL 1×PBS缓冲液缓慢冲洗微流控芯片两次。

[0086] 3.5. 接着吸取150μL核酸染色液Hoechst33342缓慢注入上述微流控芯片内,置于避光湿盒中室温25℃孵育15min,用300μL PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体两次,完成上皮型CTCs、上皮间质混合型CTCs、与间质型CTCs的免疫检测,用倒置荧光显微镜观察荧光显色情况。

[0087] 4. CTCs分型的倒置荧光显微镜观察结果判读

[0088] 4.1. 上皮型CTCs表型,图1:Hoechst33342+、PanCK+、Vimentin-、CD45-;

[0089] 4.2. 间质型CTCs表型,图2:Hoechst33342+、PanCK-、Vimentin+、CD45-;

[0090] 4.3. 上皮间质混合型CTCs表型,图3:Hoechst33342+、PanCK+、Vimentin+、CD45-

[0091] 5. 不同亚型CTCs的PD-L1表型检测

[0092] 5.1. 用移液器分别吸取PD-L1一抗6μL、染色阻断液A 12μL、染色阻断液B 12μL与抗体稀释液120μL混合均匀后,缓慢加入步骤3中已反应完成的微流控芯片中,置于湿盒中避光室温孵育2h

[0093] 5.2. 用300μL 1×PBS缓冲液缓慢冲洗微流控芯片三次。

[0094] 5.3. 将荧光素Alexa 647标记的PD-L1二抗6μL用294μL抗体稀释液稀释至300μL后,缓慢加入5.2中已完成PD-L1一抗反应的微流控芯片中,置于湿盒中避光室温25℃孵育2h;

[0095] 5.4. 用300μL PBS缓冲液缓慢冲洗微流控载体三次,完成不同亚型CTCs的PD-L1表型检测,用倒置荧光显微镜观察PD-L1的染色结果。

[0096] 6. CTCs分型的倒置荧光显微镜观察结果判读

[0097] 6.1. PD-L1阳性表型的上皮型CTCs,图4:Hoechst33342+、PanCK+、Vimentin-、CD45-、PD-L1+;

[0098] 6.2. PD-L1阳性表型的间质型CTCs,图5:Hoechst33342+、PanCK-、Vimentin+、CD45-、PD-L1+;

[0099] 6.3. PD-L1阳性表型的上皮间质混合型CTCs,图6:Hoechst33342+、PanCK+、Vimentin+、CD45-、PD-L1+;

[0100] 实施例2 CTCs富集检测效能对比实验

[0101] 对比例:与实施例1的区别在于,本实施例中按照传统技术方法设置a组(捕获抗体仅使用抗EpCAM抗体捕获检测仅使用抗PanCK抗体与抗CD45抗体)与b组(捕获抗体仅使用抗CSV抗体检测抗体仅使用抗CSV抗体与抗CD45抗体)与本技术方案做对比实验。

[0102] 材料:1)不同时期的乳腺癌细胞系BT474、MCF7、SKBR3与MDAMB231;2)6份2ml健康人外周血。

[0103] 将BT474 150颗、MCF7 150颗、SKBR3 150颗与MDAMB231150颗的细胞悬液混合为含有600颗左右细胞的悬液6份,分别掺入6份2ml的健康人外周血中,制备为模拟血样。

[0104] 按照实施例1中的方法:对比组a组用200μL生物素标记抗EpCAM(上皮细胞粘附分

子)抗体制备微流控免疫捕获载体,检测抗体采用抗PanCK与抗CD45抗体1:1的质量百分比;对比组b组用200 $\mu$ L生物素标记抗CSV(细胞表面波形蛋白)抗体制备微流控免疫捕获载体,检测抗体采用抗CSV与抗CD45抗体1:1的质量百分比;实验组c组采用实施例1中的方法制备上皮间质混合抗体的微流控免疫捕获载体;上述3组CTCs的分离富集、检测与倒置荧光显微镜观察结果判读均采用实施例1中的方法,每个实验重复1次,结果计算上皮型CTCs的捕获效率、间质型CTCs的捕获效率与上皮间质混合型CTCs的捕获效率,捕获效率% = 芯片上的细胞数量/投入细胞数量。

[0105] 具体结果如表1所示,结果表明:c组完全采用实施例1的方法对不同类型CTCs的捕获效率总体高于对比方法a组与b组分别采用传统单一富集与检测抗体的方法。

[0106] 表1

[0107]

实 验 组	上皮型 CTCs 的捕 获率 (%)	平均捕 获率 (%)	间质型 CTCs 的捕 获率 (%)	平均捕 获率 (%)	上皮间质混 合型 CTCs 的捕获率 (%)	平均捕 获率 (%)	CTCs 的 总体捕获 率 (%) *
a 组	58.16	60.93	0	0	0	0	60.93
	63.71		0		0		
b 组	0	0	60.67	62.42	0	0	62.42
	0		64.17		0		
c 组	38.33	38.75	35	33.25	25.67	27.5	99.5
	39.17		31.5		29.33		

[0108] 注:\*, CTCs的总体捕获率% = 上皮型CTCs的平均捕获率+间质型CTCs的平均捕获率+上皮间质混合型CTCs的平均捕获率

[0109] 本说明书中没有详细描述的部分均采用本领域技术人员所公知的结构和原理,均为现有技术。

[0110] 通过上述描述,本领域的技术人员已能实施。

[0111] 此外,需要说明的是,以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,对本领域技术人员来说,对本发明的技术方案及发明构思加以等同替换或改变都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

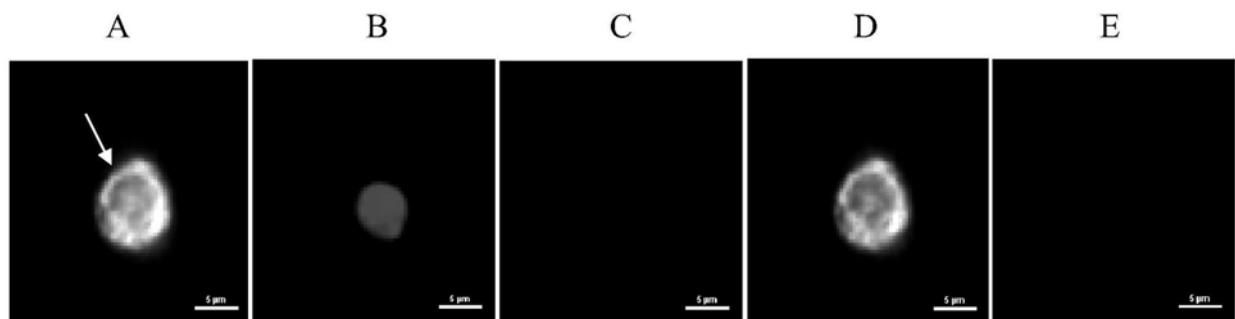


图1

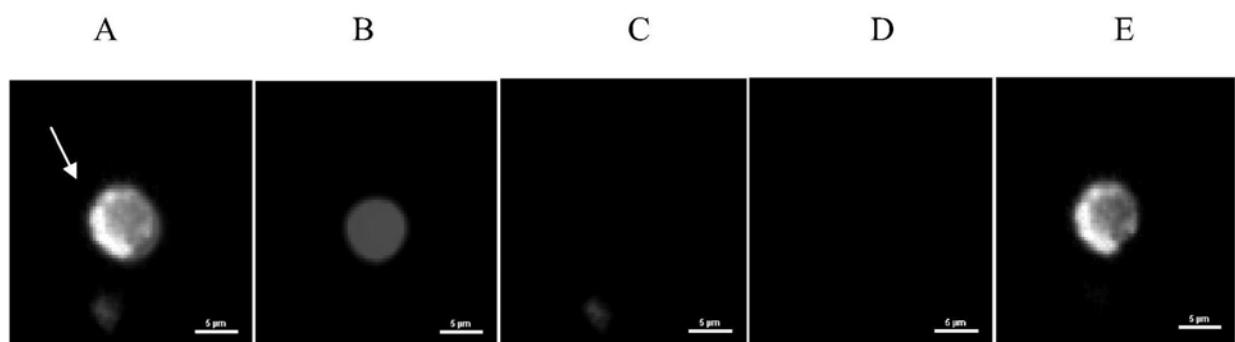


图2

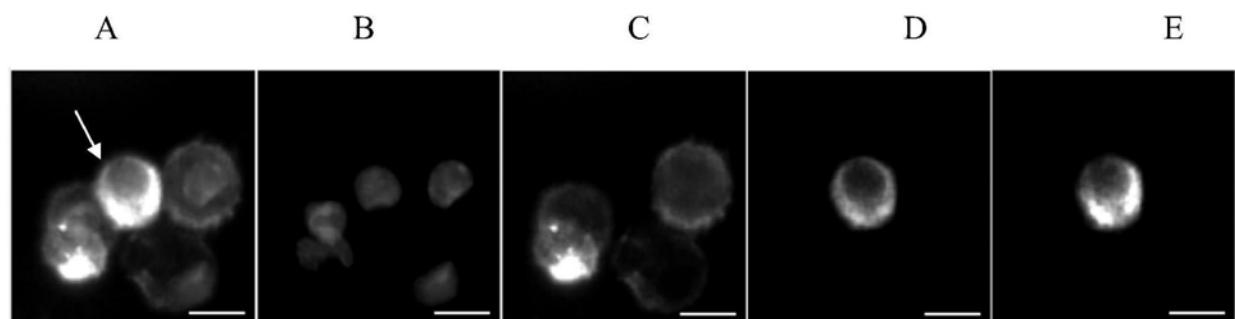


图3

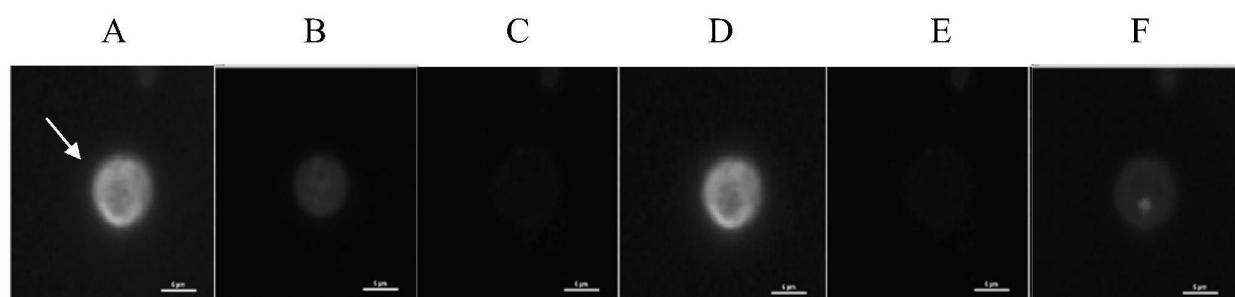


图4

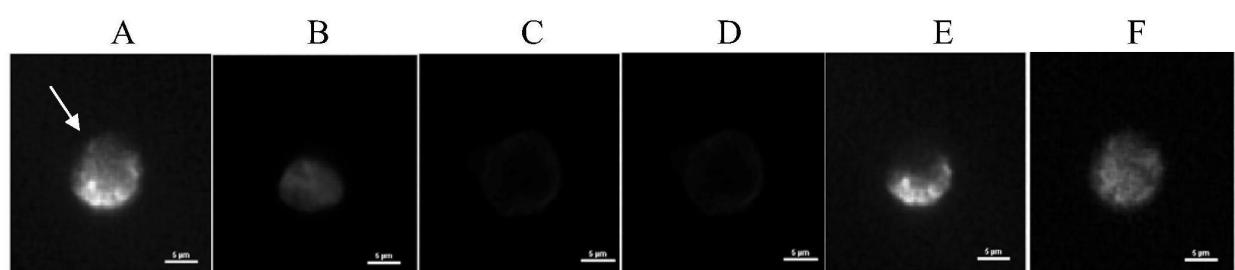


图5

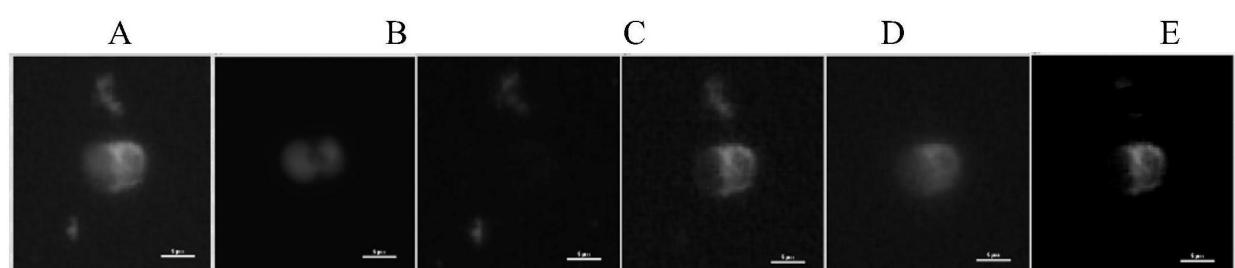


图6

专利名称(译)	一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110389219A</a>	公开(公告)日	2019-10-29
申请号	CN201910506524.0	申请日	2019-06-12
[标]申请(专利权)人(译)	杭州华得森生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	杭州华得森生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	杭州华得森生物技术有限公司		
[标]发明人	崔莹 张开山 于杰		
发明人	崔莹 张开山 于杰		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/536 G01N1/40 G01N33/574		
CPC分类号	G01N1/40 G01N33/533 G01N33/536 G01N33/574		
代理人(译)	陈升华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">Sipo</a>	

**摘要(译)**

本发明公开了一种上皮间质混合型及PD-L1阳性循环肿瘤细胞的富集检测方法，包括：生物素标记的上皮间质混合抗体(采用生物素标记的EpCAM抗体和生物素标记的抗CSV抗体)；上皮间质混合型CTCs的分离富集；采用荧光素标记的上皮间质混合型抗体(采用荧光素标记的抗PanCK抗体、荧光素标记的抗Vimentin抗体、荧光素标记的抗CD45抗体)对不同亚型CTCs的免疫检测；采用PD-L1—抗与荧光素标记的PD-L1二抗对捕获的不同亚型CTCs的PD-L1表型检测。本发明方法不仅可以简捷高效特异地富集检测上皮间质混合型CTCs，而且可以富集检测上皮型与间质型CTCs。

