



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107656044 A

(43)申请公布日 2018.02.02

(21)申请号 201710872446.7

(22)申请日 2017.09.25

(71)申请人 亚能生物技术(深圳)有限公司
地址 518000 广东省深圳市宝安区67区留仙
一路高新奇科技工业园2区1栋10楼

(72)发明人 杨昂 张磊

(74)专利代理机构 深圳市博锐专利事务所
44275

代理人 张明

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

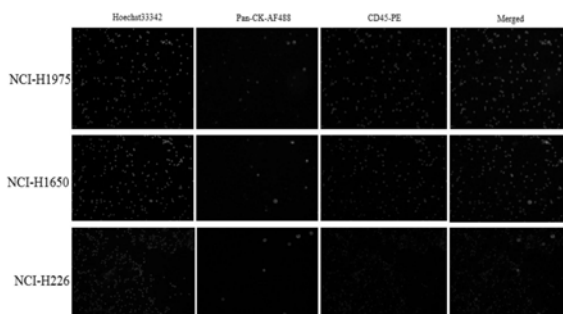
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法,该试剂盒包括PBS缓冲液、密度梯度分离液、红细胞裂解液、CD45免疫磁珠、孵育液、固定液、透化液、封闭液、抗荧光淬灭封片剂、抗体稀释液及荧光抗体浓缩液,所述荧光抗体浓缩液中包含荧光染料pan-CK-AF488、CD45-PE和细胞核染料Hoechst33342。该检测方法包括:S10、对血液样本进行离心处理,通过分离、富集CTCs;S20、对富集得到的CTCs通过细胞核染料Hoechst33342、pan-CK-AF488和CD45-PE荧光抗体进行染色鉴定;其中,所述检测以非治疗为目的。采用本发明方案进行检测,检测结果准确可靠。



1. 一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:包括PBS缓冲液、密度梯度分离液、红细胞裂解液、CD45免疫磁珠、孵育液、固定液、透化液、封闭液、抗荧光淬灭封片剂、抗体稀释液以及荧光抗体浓缩液,所述荧光抗体浓缩液中包含荧光染料pan-CK-AF488、CD45-PE和细胞核染料Hoechst33342。

2. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述密度梯度分离液为淋巴分离液。

3. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述红细胞裂解液包括红细胞膜破碎剂,所述红细胞膜破碎剂包括pH值为7.4的氯化铵、碳酸氢钾和EDTA混合溶液。

4. 根据权利要求3所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述氯化铵的浓度为10g/L,所述碳酸氢钾的浓度为0.5g/L,所述EDTA的浓度为0.3g/L。

5. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述CD45免疫磁珠采用直接法制备,包括以下步骤:

S10、将4.5 μ m磁珠与IgG抗原相结合形成复合物;

S20、将上述步骤制得的复合物溶于含有质量百分比浓度为0.05~5%BSA和3mmol/L EDTA的PBS溶液中,4 $^{\circ}$ C中孵育2h。

6. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述固定液为质量分数为1~6%的多聚甲醛水溶液。

7. 一种循环肿瘤细胞的检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

S10、利用密度梯度分离液对血液样本进行离心处理,通过分离、富集循环肿瘤细胞;

S20、对富集得到的循环肿瘤细胞通过细胞核染料Hoechst33342、荧光抗体pan-CK-AF488和CD45-PE进行染色鉴定;

其中,所述检测以非治疗为目的。

8. 根据权利要求7所述的一种循环肿瘤细胞的检测方法,其特征在于:步骤S10中所述的循环肿瘤细胞富集过程包括如下步骤:

S1、PBMC分血:将密度梯度分离液和血液在淋巴分离管中混合,加入PBS进行稀释,400g下离心10min使样本分层,离心后共分为三层,底层红色部分为聚集的红细胞,中间位置略带白色的中间层为白细胞和循环肿瘤细胞,上层淡黄色部分为血浆成分,将红细胞层以上的液体部分全部转移,并用PBS冲洗管壁3次后合并洗液,红细胞层弃去;

将所述步骤S1中获取的样本100g下离心10min后弃去上清,按照1倍体积的新鲜全血,加入3倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋或颠倒混匀;冰上放置15分钟,其间轻轻涡旋混匀两次,红细胞裂解后,溶液应该是清亮透明的;

S2、收集细胞:4 $^{\circ}$ C,450g离心10min以沉淀白细胞,小心吸弃上清液;向白细胞沉淀中加入两倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋充分重悬白细胞;

将所述步骤S2中获取的样本加入孵育液重悬并加入免疫磁珠,4 $^{\circ}$ C低速共孵育50min,取出后置于磁力架上静置吸附磁珠,将含有循环肿瘤细胞的澄清液全部转移至另一个离心管中,于通风橱内加入2%的多聚甲醛固定20min,PBS洗涤后弃去上清液。

9. 根据权利要求7所述的一种循环肿瘤细胞的检测方法,其特征在于:步骤S20所述的循环肿瘤细胞免疫染色过程包括如下步骤:

A、抗体染色液的配制:将荧光抗体浓缩液pan-CK-AF488、CD45-PE和Hoechst33342在抗体稀释液中预先配置成1mg/ml,避光保存;

B、染色:将样本用固定液先固定后先浸于透化液中充分透化,再转移至封闭液中封闭30min,分别将上述步骤中预先配置好的抗体染液滴加至样本区,避光孵育60min,抗体孵育完毕后将样本转移至黏附载玻片上,鼓风干燥,封片观察。

10.根据权利要求9所述的一种循环肿瘤细胞的检测方法,其特征在于:所述步骤B中先通过Hoechst33342对细胞核染色,再通过anti-pan-CK-AF488和anti-CD45-PE进行细胞染色,对Hoechst33342、pan-CK-AF488阳性和CD45-PE阴性的细胞优先进行计数,细胞计数通过荧光显微镜进行,镜下观察以pan-CK-AF488+/CD45-PE-/Hoechst33342+为循环肿瘤细胞,以pan-CK-AF488-/CD45-PE+/Hoechst33342+为白细胞,以pan-CK-AF488+/-/CD45-PE+/-/Hoechst33342-为非特异性染色,其中,“+”表示阳性,“-”表示阴性。

一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断技术研究领域,具体涉及一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 世界卫生组织预测21世纪恶性肿瘤将成为人类的“第一杀手”,故癌症控制已成为全球性的卫生战略重点。我国虽是发展中国家,但疾病谱已经发生转变,据报道,2012年我国癌症发病人数为306.5万,约占全球发病的五分之一;癌症死亡人数为220.5万,约占全球癌症死亡人数的四分之一,我国已成为世界第一癌症大国。根据流行病学调查研究发现,近年来我国每年新发病例约为160万,死亡高达130万,平均每死亡5个人中,就有一人死于癌症,每200个家庭中,就有一个家庭因有癌症病人而遭受打击。而且,随着工业化、城镇化、人口老龄化进程的不断加速、环境污染、不良生活习惯与不合理生活方式的普遍存在,我国肿瘤发病率正以每年3%~5%的速度提高,尤其是肺癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等。癌症不仅严重威胁着国民的生命与健康,而且给家庭、社会、国家造成了沉重的负担,是一个非常突出而又迫切需要解决的社会公共卫生难题。

[0003] 根据世界卫生组织提出的防癌三原则,即早发现、早诊断、早治疗,临床医务人员和科研工作者对此进行了深入探究,开发出了一系列临床检验手段,诸如血清肿瘤标志物鉴定、医学影像扫描、组织病理学切片、内窥镜探查等。上述方法在一定程度上提高了肿瘤临床诊断的准确性,但也依旧存在着各自的弊端和局限性。如利用血清肿瘤标志物鉴定,由于个体差异导致有些肿瘤缺乏高度特异性的标志物不能被有效检出,还容易导致假阴性/假阳性的出现,其可靠性较差;医学影像扫描可以非侵入地、快速地对患者的肿瘤情况进行评估,但即使是最先进准确的影像检测方法,肿瘤检出直径至少也要在2~3mm,即小于该直径范围的肿瘤通过影像学检查往往不能被发现。而且最近有多项回顾研究发现影像学“看到”的肿瘤大小常与肿瘤的恶性程度或浸润能力并不完全一致^[1],还会导致可能的放射伤害且费用较高;作为恶性肿瘤诊断“金标准”的组织病理学切片往往根据穿刺或术后取出的肿瘤组织才能鉴定,且技术要求较高,无法做到反复多次、长期或随时获取,此外,该方法还具有一定的创伤性且不能准确判定是否有转移情况发生;内窥镜探查则存在着较大的创伤性,患者配合意愿低,单处取材无法体现异质性,无法做到实时动态监测,只能单纯确定肿瘤的存在,而对肿瘤细胞是否已经发生浸润转移则无法确定的问题。

[0004] 综上所述,传统的检查手段均不能及时、准确的反应肿瘤的进展,更无法为肿瘤早期发现、肿瘤实时监测、临床用药、术后疗效判断提供更有价值的服务和支持。故而急需一种新的检查手段来弥补上述检查方法的缺陷与不足,在此背景下“液体活检循环肿瘤细胞(Circulating tumor cells,CTCs)”技术应运而生,依靠其非侵入性、无创伤性、取样简单、即时性的特点显示了广阔的应用前景。

[0005] 澳大利亚学者Ashworth在1869年就曾发现了类似肿瘤的癌症细胞,目前该类细胞被定义为:自发或因诊疗操作导致的由实体瘤释放进入外周血液中的肿瘤细胞。其在外周

血液中数量稀少(每10ml的血液中可能仅含有几个或几十个CTCs,而同样体积的血液中含有的白细胞和红细胞则数以亿计),难以捕获,但在临床上又具有重要的意义,如何从海量的血细胞中快速、精确的分离得到CTCs并进行分析、鉴定是一项极富有挑战性的工作。目前针对CTCs的分离富集方法主要分为物理化学方法和免疫结合,物理化学方法主要依赖于CTCs的生物学特性及其体积、密度、电荷和变形性等物理特征,利用诸如磁场、流体场、电场等外力作用进行分离捕获^[1],如Canpatrol™,MGI EASYCELL™循环肿瘤细胞分离系统;免疫结合方法主要利用细胞表面的抗原与偶联在分离介质上的特异性识别抗体相结合,在外力的作用下实现分离,例如Cell Search,HBCTC-Chip,Mag Sweep等。虽然上述分离方法已得到实际运用但仍存在难以克服的缺陷,如密度梯度离心分离存在特异性低,灵敏性差的问题,而且受离心转速、时间和温度的多重影响,应用前景暗淡;膜过滤法则存在对于体积较小的细胞易漏掉的问题,且过滤没有选择性,特异性较差,为了得到更纯的CTC仍需要后续操作;免疫识别方法中的微流控芯片耗时太长,分离效率不高且通量受限,而且分离出的细胞活性较差;阳性富集利用特定抗体从海量血细胞中捕获循环肿瘤细胞主要依赖于细胞表面特异性抗体如EpCAM,但有研究证实并非所有的肿瘤细胞都会表达EpCAM且其表达的强弱在不同细胞表面差异较大难以作为通用的识别抗原,而且由于血液中CTC数量极低加之肿瘤细胞易发生上皮-间质(Epithelial-mesenchymal transition,EMT过程)转换丢失上皮标志物很容易造成漏检,形成误判,例如目前唯一被食品药品监督管理局(Food and Drug Administration,FDA)批准的抗体捕获平台(Cell Search)系统,其捕获效率很低,存在非特异性吸附并且仪器昂贵,普通患者难以接受,目前已经退市。

[0006] 关于CTCs的鉴定有以下几种方法:免疫细胞化学发光法(Immunocytochemical,ICC),流式细胞术(Flow Cytometry,FCM),反转录聚合酶链式反应(Reverse Transcription-PCR,RT-PCR)等。ICC法主要是利用了抗原抗体的免疫反应,针对不同的抗体分子结合上荧光发光基团,在对应的发射波激发下产生荧光,通过荧光显微镜直接镜下观察。FCM是可以用于细胞鉴定、分选的比较灵敏的一种方法,各个不同的激光通道发射不同的激光,细胞利用不同的荧光染料染色后可以在不同的激发波下被检测出来,该方法具有一定的灵敏度,操作也较为简单。RT-PCR广泛应用于CTC的检验,RT-PCR可以定量检测某些基因的表达量变化,对比与正常细胞的信使核糖核酸(mRNA)表达量即可轻易区分出正常细胞与肿瘤细胞,因此,在外周血中检测到异常的mRNA就可以提示CTCs的存在。但上述几种染色方法仍存在着抗原易降解、荧光染色效果不佳、容易漏检、多重染色分析困难、操作繁琐、通量低、难以对治疗前后的CTCs计数以评价治疗效果等问题。目前上述几种分离、鉴定方法均难以达到让人满意的分析目的,迫切需要建立一种高效的富集、鉴定办法。

发明内容

[0007] 针对现有循环肿瘤细胞分离和鉴定技术中存在的问题,本发明提供一种能够避免CTCs易丢失、回收率低及操作复杂的循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒,包括磷酸缓冲液(Phosphate Buffer Saline,PBS或PBS缓冲液)、密度梯度分离液、红细胞裂解液、白细胞表面共同抗原抗体45(Cluster of Differentiation 45,CD45)免疫磁珠、孵育液、固定液、透化液、封闭液、抗荧光淬灭封片剂、抗体稀释液以及荧光抗体浓缩液,

所述荧光抗体浓缩液中包含荧光染料Alexa Fluor488 (简称AF488) 标记的广谱细胞角蛋白 (pan cytokeratin, pan-CK) 抗体 (即pan-CK-AF488)、荧光染料PE标记的CD45抗体 (即CD45-PE) 和细胞核染料Hoechst33342。

[0009] 本发明的有益效果在于:本发明所采用的荧光抗体浓缩液包括pan-CK、CD45和Hoechst33342,其中pan-CK用AF488荧光基团标记显示绿色荧光、CD45用PE荧光基团标记显示红色荧光和核染料Hoechst33342显蓝色荧光,三种荧光染料的颜色各不相同,互不干扰;pan-CK是目前已知识别CK家族蛋白最为广谱的一种,包括CK1……CK8、CK10、CK14、CK15、CK16和CK19,可以有效检出表达CK蛋白的肿瘤细胞,目前已知CK蛋白广泛表达于肿瘤细胞表面是一种较为优良的靶蛋白;通过对CK的特异性识别可以有效地捕获到目的细胞,最大程度避免CTC细胞的丢失,提高了CTC的检出率,通过细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体共染,避免了染色步骤繁多,简化了操作流程;采用本试剂盒试剂可在ependoff离心管中直接进行固定、染色,避免了常规空气制片的耗时过长、不连续、细胞形态易破碎等难题,可以实现在CTC富集完成后直接进行后续染色操作,而且避免了转移过程中的细胞丢失情况,提高了CTC的回收率。而且本发明试剂盒灵敏度较高,针对不同类别细胞株的检出效率可以稳定在80%以上,优于同类竞品。

[0010] 本发明还提供了一种循环肿瘤细胞的检测方法,包括以下步骤:

[0011] S10、利用密度梯度分离液对血液样本进行离心处理,通过分离、富集循环肿瘤细胞;

[0012] S20、对富集得到的循环肿瘤细胞通过细胞核染料Hoechst33342、荧光抗体pan-CK-AF488和CD45-PE进行染色鉴定;

[0013] 其中,所述检测以非治疗为目的。

[0014] 本发明的有益效果在于:利用多种免疫荧光抗体 (细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体) 共染,在不同波段的激发光激发下观察荧光效果,并进行结果判读和统计。采用本发明方案能有效检出不同类别的肿瘤细胞株,且染色效果稳定、背景干净无杂质,易于判读。

附图说明

[0015] 图1为本发明实施例1的商品化Santa Cruz,AbCam,biologend抗体与本发明方案制备磁珠CZ01去除白细胞效果对比图;

[0016] 图2为本发明实施例3的一种循环肿瘤细胞的检测方法对不同肿瘤细胞富集后的荧光鉴定结果图。

具体实施方式

[0017] 为详细说明本发明的技术内容、所实现目的及效果,以下结合实施方式并配合附图予以说明。

[0018] 本发明最关键的构思在于:采用阴性富集的方法从血液样本中分离、富集循环肿瘤细胞 (即利用CD45免疫磁珠结合血液中的白细胞以达到大量去除白细胞的目的,避免对后续的实验造成干扰);其次,在富集得到循环肿瘤细胞的基础上利用多种免疫荧光抗体 (细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光

抗体)共染,在不同波段的激发光激发下观察荧光效果,并进行结果判读和统计。

[0019] 一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒,包括PBS缓冲液、密度梯度分离液、红细胞裂解液、CD45免疫磁珠、孵育液、固定液、透化液、封闭液、抗荧光淬灭封片剂、抗体稀释液以及荧光抗体浓缩液,所述荧光抗体浓缩液中包含荧光染料pan-CK-AF488、CD45-PE和细胞核染料Hoechst33342。

[0020] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:本发明所采用的荧光抗体浓缩液包括pan-CK、CD45和Hoechst33342,其中pan-CK用AF488荧光基团标记显示绿色荧光、CD45用PE荧光基团标记显示红色荧光和核染料Hoechst33342显蓝色荧光,三种荧光染料的颜色各不相同,互不干扰;pan-CK是目前已知识别CK家族蛋白最为广谱的一种,包括CK1……CK8、CK10、CK14、CK15、CK16和CK19,可以有效检出表达CK蛋白的肿瘤细胞,目前已知CK蛋白广泛表达于肿瘤细胞表面是一种较为优良的靶蛋白;通过对CK的特异性识别可以有效地捕获到目的细胞,最大程度避免CTC细胞的丢失,提高了CTC的检出率,通过细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体共染,避免了染色步骤繁多,简化了操作流程;采用本试剂盒试剂可在ependoff离心管中直接进行固定、染色,避免了常规空气制片的耗时过长、不连续、细胞形态易破碎等难题,可以实现在CTC富集完成后直接进行后续染色操作,而且避免了转移过程中的细胞丢失情况,提高了CTC的回收率。而且本发明试剂盒灵敏度较高,针对不同类别细胞株的检出效率可以稳定在80%以上,优于同类竞品。

[0021] 优选地,所述密度梯度分离液为淋巴分离液(Ficoll-paque plus)。

[0022] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:由于采用淋巴分离管对血样进行前处理,并优化了整体操作使得本方法更稳定,更便于操作,方便实验人员快速掌握。

[0023] 进一步地,所述红细胞裂解液包括红细胞膜破碎剂,所述红细胞膜破碎剂包括pH值为7.4的氯化铵、碳酸氢钾和乙二胺四乙酸(Ethylenediaminetetraacetic acid,EDTA)混合溶液。

[0024] 优选地,所述氯化铵的浓度为10g/L,所述碳酸氢钾的浓度为0.5g/L,所述EDTA的浓度为0.3g/L。

[0025] 进一步地,所述CD45免疫磁珠采用直接法制备,包括以下步骤:

[0026] S10、将3~5 μ m磁珠与免疫球蛋白G(Immunoglobulin G,IgG)抗原相结合形成复合物;

[0027] S20、将上述步骤制得的复合物溶于含有质量百分比浓度为0.05~5%牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)和2~4mmol/L EDTA的PBS溶液中,0~6 $^{\circ}$ C中孵育1~3h。

[0028] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:采用了自制免疫磁珠,具有独特的技术优势,在性能验证中免疫磁珠性能稳定,对白细胞去除率可达到90%以上,而且自行制备价格低廉有效降低了循环肿瘤细胞的富集成本。

[0029] 优选地,所述CD45免疫磁珠采用直接法制备,包括以下步骤:

[0030] S10、将4.5 μ m磁珠与IgG抗原相结合形成复合物;

[0031] S20、将上述步骤制得的复合物溶于含有质量百分比浓度为0.05~5%BSA和3mmol/L EDTA的PBS溶液中,4 $^{\circ}$ C中孵育2h。

[0032] 进一步地,所述固定液为质量分数为1~6%的多聚甲醛水溶液。

- [0033] 优选地,所述固定液为质量分数为2%的多聚甲醛水溶液。
- [0034] 进一步地,作为本发明所述用于循环肿瘤细胞检测的透化液、封闭液、抗体稀释液均含有不同比例的表面活性剂含有聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100)、驴血清(Normal Donkey Serum,NDS)和BSA。
- [0035] 进一步地,所述抗荧光淬灭封片剂中含有质量浓度百分比为5~10%甘油。
- [0036] 进一步地,所述透化液中含有体积分数为0.001~10%的TritonX-100。
- [0037] 进一步地,所述封闭液为含有0.001~2g/ml NDS、0.001~0.2mg/l BSA和体积分数为0.001~10%的TritonX-100。
- [0038] 进一步地,所述抗体稀释液为含有0.001~2g/ml NDS、0.001~0.2mg/l BSA和体积分数为0.001~10%的TritonX-100。
- [0039] 本发明还提供了一种循环肿瘤细胞的检测方法,包括以下步骤:
- [0040] S10、利用密度梯度分离液对血液样本进行离心处理,通过分离、富集循环肿瘤细胞;
- [0041] S20、对富集得到的循环肿瘤细胞通过细胞核染料Hoechst33342、荧光抗体pan-CK-AF488和CD45-PE进行染色鉴定;
- [0042] 其中,所述检测以非治疗为目的。
- [0043] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:利用多种免疫荧光抗体(细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体)共染,在不同波段的激发光激发下观察荧光效果,并进行结果判读和统计。采用本发明方案能有效检出不同类别的肿瘤细胞株,且染色效果稳定、背景干净无杂质,易于判读。
- [0044] 在一个优选的实施方案中,步骤S10中所述的循环肿瘤细胞富集过程包括如下步骤:
- [0045] S1、外周血单个核细胞(Peripheral blood mononuclear cell,PBMC)分血:将密度梯度分离液和血液在淋巴分离管中混合,加入PBS进行稀释,400g下离心10min使样本分层,离心后共分为三层,底层红色部分为聚集的红细胞,中间位置略带白色的中间层为白细胞和循环肿瘤细胞,上层淡黄色部分为血浆成分,将红细胞层以上的液体部分全部转移,并用PBS冲洗管壁3次后合并洗液,红细胞层弃去;
- [0046] 将所述步骤S1中获取的样本100g下离心10min后弃去上清,按照1倍体积的新鲜全血,加入3倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋或颠倒混匀;冰上放置15分钟,其间轻轻涡旋混匀两次,红细胞裂解后,溶液应该是清亮透明的;
- [0047] S2、收集细胞:4℃,450g离心10min以沉淀白细胞,小心吸弃上清液;向白细胞沉淀中加入两倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋充分重悬白细胞;
- [0048] 将所述步骤S2中获取的样本加入孵育液重悬并加入免疫磁珠,4℃低速共孵育50min,取出后置于磁力架上静置吸附磁珠,将含有循环肿瘤细胞的澄清液全部转移至另一个的离心管中,于通风橱内加入2%的多聚甲醛固定20min,PBS洗涤后弃去上清液。
- [0049] 进一步地,上述操作中使用的是离心管为ependoff离心管,所述步骤S2中PBS洗涤操作作为三次。
- [0050] 在一个优选的实施方案中,所述步骤S20所述的循环肿瘤细胞免疫染色过程包括如下步骤:

[0051] A、抗体染色液的配制：将荧光抗体浓缩液pan-CK-AF488、CD45-PE和Hoechst33342在抗体稀释液中预先配置成1mg/ml，避光保存；

[0052] B、染色：将样本用固定液先固定后先浸于透化液中充分透化，再转移至封闭液中封闭30min，分别将上述步骤中预先配置好的抗体染液滴加至样本区，避光孵育60min，抗体孵育完毕后将样本转移至黏附载玻片上，鼓风干燥，封片观察。

[0053] 在一个优选的实施方案中，所述步骤B中先通过Hoechst33342对细胞核染色，再通过anti-pan-CK-AF488和anti-CD45-PE进行细胞染色，对Hoechst33342、pan-CK-AF488阳性和CD45-PE阴性的细胞优先进行计数，细胞计数通过荧光显微镜进行，镜下观察以pan-CK-AF488+/CD45-PE-/Hoechst33342+为循环肿瘤细胞，以pan-CK-AF488-/CD45-PE+/Hoechst33342+为白细胞，以pan-CK-AF488+/-/CD45-PE+/-/Hoechst33342-为非特异性染色，其中，“+”表示阳性，“-”表示阴性。

[0054] 本发明实施例一为磁珠制备方法验证实验：

[0055] 为验证本发明方案制备的磁珠对白细胞的去除效果，分别购买Santa Cruz, AbCam, Biologend三种品牌的抗体与本发明方案制备的磁珠CZ01进行对比验证，流程如下：

[0056] 1、使用真空抗凝采血管(含EDTA)采集健康志愿者血液3mL。

[0057] 2、实验前先取出样本密度分离液平衡至室温再使用，在12mL淋巴分离管中预先加入3mL平衡至室温的样本密度分离液，瞬时离心使其全部转至管底，再按顺序分别加入3mL抗凝血和3mL PBS，于400g下离心10min；

[0058] 3、弃去淋巴分离管底部的红细胞层，将上层液体全部转移至15mL离心管中，取4mL PBS冲洗淋巴管壁，重复冲洗3次，合并转移，旋紧管盖于100g离心10min，弃上清。

[0059] 4、按照1倍体积的新鲜全血，加入3倍体积的红细胞裂解液，轻轻涡旋或颠倒混匀。冰上放置15分钟，其间轻轻涡旋混匀两次。

[0060] 5、收集细胞：4℃，450g离心10min以沉淀白细胞，小心吸弃上清液。向白细胞沉淀中加入两倍体积的红细胞裂解液，轻轻涡旋充分重悬白细胞。如起始血液为1ml，则加入2ml的红细胞裂解液。4℃，450g离心10min沉淀白细胞，小心并彻底吸去上清液。2~8℃充分裂解8min(中途取出一次进行颠倒混匀)。300g离心10min，真空抽滤泵吸去上清剩约0.5mL。

[0061] 6、免疫磁珠预处理：取出免疫磁珠进行振荡均匀，再按100μL/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中进行润洗(先将管子放入磁力架吸附磁珠，再吸去液体，取出加100μL/样本的孵育液进行轻轻吹打润洗，再放入磁力架吸附磁珠，吸去液体，重复润洗2次后再加入100μL/样本的孵育液)。

[0062] 7、在裂解后的管子中先加入2mL孵育液重悬(用移液器轻轻吹打)，再补加6mL孵育液完全重悬(用移液器轻轻吹打)，按照100μL/样本加入免疫磁珠预处理液，置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中，连续孵育50min。取出离心管置于磁力架上静置将磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到新15mL离心管中。300g离心5min，抽滤弃去上清剩约100μL；

[0063] 将上述样品转移至黏附载玻片样品框内，滴加核染料Hoechst33342避光孵育5min，置于荧光显微镜下观察白细胞去除效果，观察结果如图1所示。

[0064] 从图1可以看出采用本发明方案制备的磁珠CZ01对白细胞的去除效果较好，得益于其优良的去除效果可以获得纯度较高的循环肿瘤细胞，并且染色过程中无白细胞的非特异性结合干扰使的循环肿瘤细胞的鉴定更准确。

[0065] 本发明实施例二为本发明试剂盒的配制:

[0066] PBS缓冲液的配制:称取8.00g氯化钠(NaCl)、0.20g氯化钾(KCl)、1.158g磷酸氢二钠(Na_2HPO_4)、0.24磷酸二氢钾(KH_2PO_4),加纯水800mL溶解,用1M盐酸(HCl)和1M氢氧化钠(NaOH)调节pH至7.2~7.4,定容至1000mL,高压灭菌,4℃保存。

[0067] BSA溶液的配制:称取BSA 20g将其转移至硬质玻璃瓶中,量取100ml的PBS缓冲液混匀,将配制完毕的BSA(0.2g/ml)通过传递窗转移至生物安全柜中,使用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,随后按照15ml/管进行分装,并用封口膜封好。

[0068] 孵育液的配制:量取PBS缓冲液100ml,向PBS缓冲液中加入BSA(0.2g/ml)使BSA终浓度为0.001g/ml,振荡混合均匀,再加入一定体积的EDTA使EDTA终浓度为0.5mmol/l,颠倒混合均匀,在配液室用NaOH和HCl调节pH 7.2-7.4,每次滴加NaOH和HCl后充分混匀后再行测定,将配制完毕的孵育液通过传递窗转移至生物安全柜中,使用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,随后按照50ml/管进行分装,并用封口膜封好。

[0069] 红细胞裂解液的配制:主要由10g/L氯化铵,0.5g/L碳酸氢钾和0.3g/L乙二醇四乙酸混合溶解后调节pH至7.2-7.4,将配制完毕的红细胞裂解液通过传递窗转移至生物安全柜中,使用0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌,随后按照50ml/管进行分装,并用封口膜封好。

[0070] Hoechst33342染色液的配制:用无菌枪头吸取2.5ml的PBS缓冲液加入到装有Hoechst33342(10mg)的管中,使其终浓度为4mg/ml,轻轻混合均匀,使其全部溶解,即得。

[0071] TritonX-100(体积分数10%)配制:用无菌枪头吸取TritonX-100 10ml加入到灭菌的90ml的PBS缓冲液中,换用5ml枪头混合均匀,即得。

[0072] NDS(1g/ml)溶液的配制:称取NDS10g加入到灭菌的10ml的PBS中,充分震荡,使其全部溶解,4℃保存。

[0073] 透化液的配制:取一定量的TritonX-100加入PBS缓冲液中将其浓度稀释到体积分数为0.5%,即得。

[0074] 封闭液配制:取上述步骤制备的NDS(1g/ml)溶液,量取一定体积的BSA(0.2g/ml)后,再量取一定体积的TritonX-100(体积分数10%),用PBS缓冲液将NDS稀释到0.2g/ml、BSA稀释到0.02g/ml,TritonX-100稀释到体积分数0.01%,吹打混合均匀,封口膜封口,即得。

[0075] 抗体稀释液配制:按照体积比取上述步骤制备的NDS(1g/ml)溶液,量取一定体积的BSA(0.2g/ml)后,再量取一定体积的TritonX-100(体积分数10%),用PBS缓冲液将NDS稀释到0.2g/ml、BSA稀释到0.02g/ml,TritonX-100稀释到体积分数0.02%,吹打混合均匀,封口膜封口,即得。

[0076] 其中,所述真空采血管为外购真空采血管,内含EDTA防止血液凝固;所述滤膜为外购0.22 μm 微孔滤膜;所述磁力架为外购15mL八管磁力架;所述淋巴分离管:外购无菌Leucosep™分离管。

[0077] 本发明实施例3为一种循环肿瘤细胞的检测方法,具体为采用实施例2制备的试剂盒对肿瘤细胞的捕获能力验证实验,体外模拟掺入肺癌细胞NCI-H1975、NCI-H1650和NCI-H226,使用实施例2制备的试剂盒对其进行检测,具体的检测步骤如下:

[0078] 1、使用真空抗凝采血管(含EDTA)采集健康志愿者血液3mL。

[0079] 2、实验前先取出样本密度分离液平衡至室温再使用,在12mL淋巴分离管中预先加

入3mL平衡至室温的样本密度分离液,瞬时离心使其全部转至管底,再按顺序分别加入3mL抗凝血(已预先混入经精确计数且数量均为100个左右的NCI-H1975、NCI-H1650和NCI-H226)和3mL PBS,于400g下离心10min。

[0080] 3、弃去淋巴分离管底部的红细胞层,将上层液体全部转移至15mL离心管中,取4mL PBS冲洗淋巴管壁,重复冲洗3次,合并转移。旋紧管盖于100g离心10min,弃上清。

[0081] 4、按照1倍体积的新鲜全血,加入3倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋或颠倒混匀。冰上放置15分钟,其间轻轻涡旋混匀两次。

[0082] 5、收集细胞:再于4℃,450g离心10min以沉淀白细胞,小心吸弃上清液。向白细胞沉淀中加入两倍体积的红细胞裂解液,轻轻涡旋充分重悬白细胞。如起始血液为1ml,则加入2ml的红细胞裂解液。于4℃,450g下离心10min沉淀白细胞,小心并彻底吸去上清液。2~8℃充分裂解8min(中途取出一次进行颠倒混匀)。300g离心10min,真空抽滤泵吸去上清剩约0.5mL。

[0083] 6、免疫磁珠预处理:取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μL/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中进行润洗(先将管子放入磁力架吸附磁珠,再吸去液体,取出加100μL/样本的孵育液进行轻轻吹打润洗,再放入磁力架吸附磁珠,吸去液体,重复润洗2次后再加入100μL/样本的孵育液)。

[0084] 7、在裂解后的管子中先加入2mL孵育液重悬(用移液器轻轻吹打),再补加6mL孵育液完全重悬(用移液器轻轻吹打),按照100μL/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中,连续孵育50min。取出离心管置于磁力架上静置将磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到新15mL离心管中。300g离心5min,抽滤弃去上清剩约100μL。

[0085] 8、取上述样品与通风橱内加入1mL的2%多聚甲醛水溶液固定20min,PBS洗涤3次后弃去上清液。将固定过的样本加入1mLPBS洗涤1次再浸于透化液中充分透化25min,透化完毕加入1mLPBS洗涤1次再转移至封闭液中封闭30min,分别将预先配置好的pan-CK-AF488、CD45-PE抗体染液滴加至样本区,避光孵育60min,抗体孵育完毕后将样本全部转移至黏附载玻片上。滴加核染料Hoechst33342避光孵育5min,32℃鼓风干燥30min,滴加一滴抗荧光淬灭封片剂封片后置于荧光显微镜下观察荧光效果,观察结果如图2所示;镜下观察以pan-CK-AF488+/CD45-PE-/Hoechst33342+为循环肿瘤细胞,以pan-CK-AF488-/CD45-PE+/Hoechst33342+为白细胞。

[0086] 对观察结果进行计数统计,统计结果如表1所示,表1为采用本发明方法检测不同类别肿瘤细胞株的统计结果表。

[0087] 表1

[0088]

Count cell line	掺入前计数	染色后计数	回收率
NCI-H226	157	129	82.17%
NCI-H1650	139	113	81.29%
NCI-H1975	119	96	80.37%

[0089] 从图2和表1中可以看出,本试剂盒可以有效检出不同类别的肿瘤细胞株,且染色效果稳定、背景干净无杂质,易于判读。而且本试剂盒灵敏度较高,针对不同类别细胞株的检出效率可以稳定在80%以上,优于同类竞品。

[0090] 注:NCI-H1975、NCI-H1650和NCI-H226掺入前和染色后计数分别重复3次,取平均值计算回收率。

[0091] 综上所述,本发明提供一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法,该试剂盒采用荧光染料pan-CK-AF488、CD45-PE和细胞核染料Hoechst33342共染,三种染料的颜色各不相同,互不干扰;pan-CK是目前已知识别CK家族蛋白最为广谱的一种,可以有效检出表达CK蛋白的肿瘤细胞,目前已知CK蛋白广泛表达于肿瘤细胞表面是一种较为优良的靶蛋白,通过对CK的特异性识别可以有效地捕获到目的细胞,最大程度避免CTC细胞的丢失,提高了CTC的检出率;通过细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体共染,避免了染色步骤繁多,简化了操作流程;采用本试剂盒试剂可在ependoff离心管中直接进行固定、染色,避免了常规空气制片的耗时过长、不连续、细胞形态易破碎等难题,可以实现在CTC富集完成后直接进行后续染色操作,而且避免了转移过程中的细胞丢失情况,提高了CTC的回收率。而且本发明试剂盒灵敏度较高,针对不同类别细胞株的检出效率可以稳定在80%以上,优于同类竞品。利用多种免疫荧光抗体(细胞核染料Hoechst33342,广角蛋白家族荧光抗体pan-CK和白细胞特异性抗体CD45荧光抗体)共染,在不同波段的激发光激发下观察荧光效果,并进行结果判读和统计。采用本发明方案能有效检出不同类别的肿瘤细胞株,且染色效果稳定、背景干净无杂质,易于判读。

[0092] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等同变换,或直接或间接运用在相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

[0093] 参考文献

[0094] [1]Lianidou ES.Circulating tumor cell isolation:a marathon raceworth running[J].Clin Chem,2014,60(2):287-289.

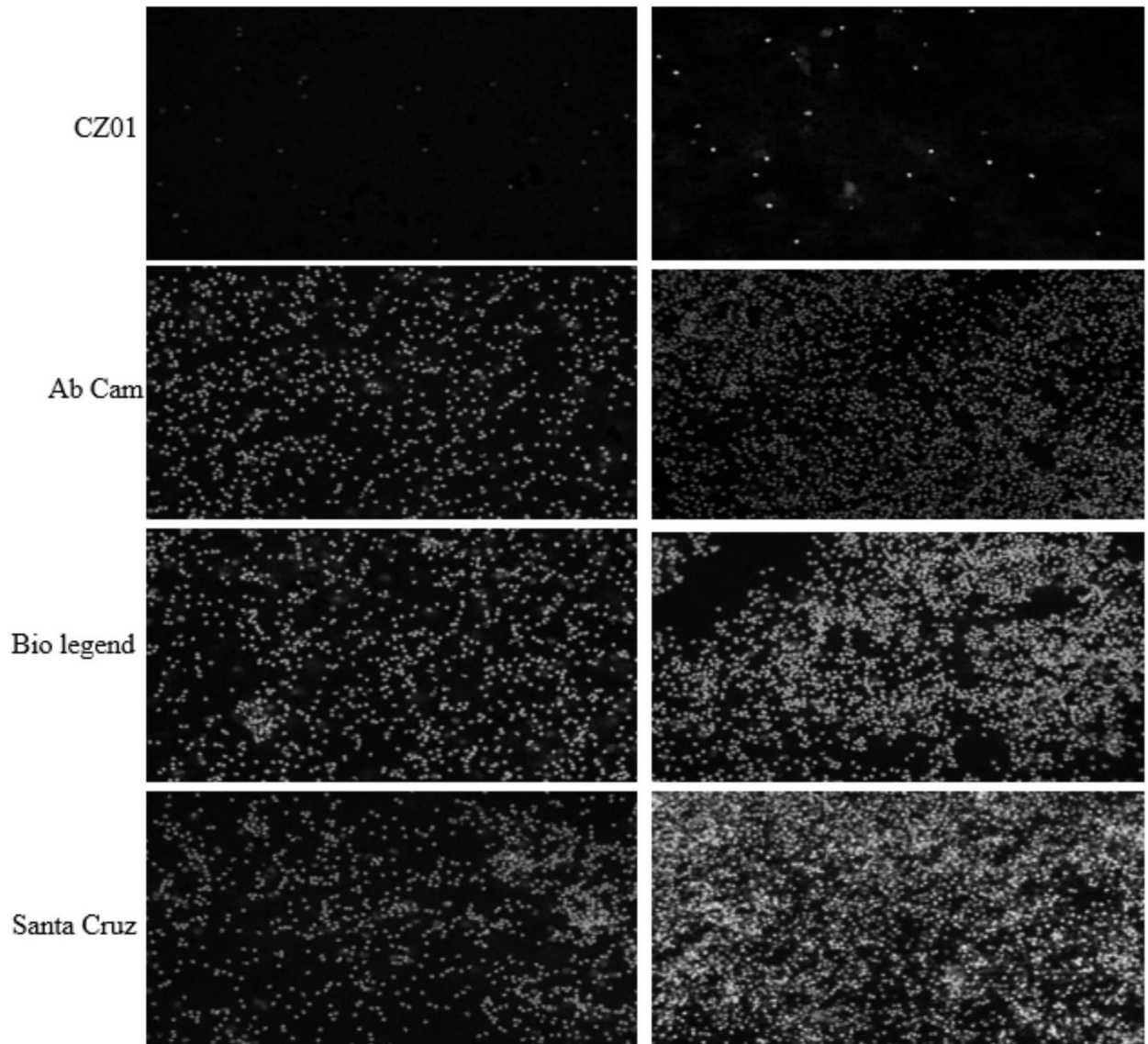


图1

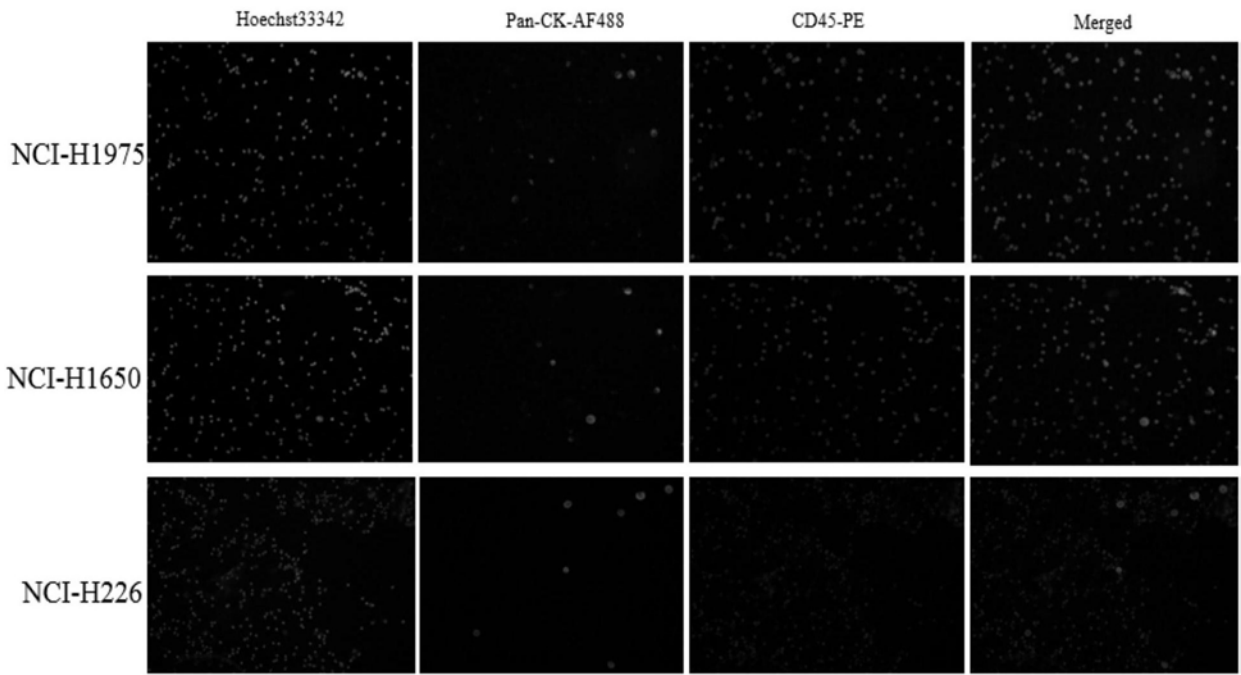


图2

专利名称(译)	一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN107656044A	公开(公告)日	2018-02-02
申请号	CN2017110872446.7	申请日	2017-09-25
[标]申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
[标]发明人	杨昂 张磊		
发明人	杨昂 张磊		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/543 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/57496		
代理人(译)	张明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及检测方法，该试剂盒包括PBS缓冲液、密度梯度分离液、红细胞裂解液、CD45免疫磁珠、孵育液、固定液、透化液、封闭液、抗荧光淬灭封片剂、抗体稀释液及荧光抗体浓缩液，所述荧光抗体浓缩液中包含荧光染料pan-CK-AF488、CD45-PE和细胞核染料Hoechst33342。该检测方法包括：S10、对血液样本进行离心处理，通过分离、富集CTCs；S20、对富集得到的CTCs通过细胞核染料Hoechst33342、pan-CK-AF488和CD45-PE荧光抗体进行染色鉴定；其中，所述检测以非治疗为目的。采用本发明方案进行检测，检测结果准确可靠。

