



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105785005 A

(43)申请公布日 2016.07.20

(21)申请号 201610226512.9

(22)申请日 2016.04.13

(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 张开山 苏广宇 宁宁

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明涉及一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用,所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒包括芯片、样本稀释液、细胞分离液、细胞捕获剂、细胞清洗液、细胞固定剂、抗体稀释液、细胞通透剂和荧光染色剂。本发明试剂盒的应用主要包括循环肿瘤细胞的分离,捕获抗体的包被,循环肿瘤细胞的捕获和循环肿瘤细胞的免疫荧光染色几个步骤。本发明主要用于肿瘤预后、复发、转移、疗效监测和早期诊断预警,监控疗效及肿瘤进展情况;利用循环肿瘤细胞的分子分型及筛选特异性等特点,针对性研究循环肿瘤细胞的敏感药物,以补充肿瘤转移、复发及耐药等机制,指导个体化医疗。

1. 一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述的试剂盒包括芯片、样本稀释液、细胞分离液、细胞捕获剂、细胞清洗液、细胞固定剂、抗体稀释液、细胞通透剂和荧光染色剂。

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:所述的样本稀释液和抗体稀释液为磷酸盐缓冲液;所述的细胞清洗液为液体细胞培养基;所述的细胞通透剂为一定浓度的表面活性剂溶液;所述的细胞固定剂为多聚甲醛水溶液。

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:所述的细胞分离液为密度梯度离心液。

4. 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:所述的细胞捕获剂含有生物素标记的抗体;所述的芯片内固定有链霉亲和素。

5. 根据权利要求1或4所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒,其特征在于:所述的细胞捕获剂含有生物素标记的鼠单抗-EpCAM抗体。

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:所述的荧光染色剂包括至少一种核酸荧光染色剂和至少两种荧光素标记的检测抗体。

7. 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:所述的抗体稀释液、细胞清洗液和细胞固定剂中含有防腐剂。

8. 一种所述循环肿瘤细胞的检测试剂盒的应用,其特征在于:所述的试剂盒用于检测循环肿瘤细胞的步骤包括:

(1) 循环肿瘤细胞的分离:

- a. 采用样本稀释液对样本进行稀释;
- b. 采用细胞分离液对稀释后的样本进行密度梯度离心;
- c. 移出单核细胞层部分,采用细胞清洗液对单核细胞层部分进行清洗;
- d. 最后采用细胞清洗液重悬细胞沉淀,制备成单核细胞悬液;

(2) 捕获抗体的包被:

- a. 采用无水乙醇和缓冲液对芯片进行初清洗;
- b. 将捕获抗体加入缓冲液中,再注入芯片中孵育;
- c. 再采用缓冲液对芯片进行清洗,芯片包被完成;

(3) 循环肿瘤细胞的捕获:

- a. 采用细胞清洗液清洗芯片;
- b. 将制备好的单核细胞悬液注入包被好的芯片中;
- c. 将细胞固定剂注入芯片,完成循环肿瘤细胞的捕获;

(4) 循环肿瘤细胞的免疫荧光染色:

- a. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
- b. 将细胞通透剂注入芯片中,静置;
- c. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
- d. 将荧光染色剂加入抗体稀释液中,并注入芯片,避光孵育;
- e. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
- f. 将另外种类的荧光染色剂注入芯片,静置;
- g. 采用缓冲液对芯片进行清洗,孵育;

h. 进行荧光显微镜观察。

9. 根据权利要求8所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒的应用,其特征在於:所述步骤(4)的d中的荧光染色剂为至少两种荧光素标记的检测抗体;所述步骤(4)的f中的荧光染色剂为至少一种核酸荧光染色剂。

10. 根据权利要求9所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒的应用,其特征在於:所述的核酸荧光染色剂为DAPI。

一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用,用于肿瘤预后、复发、转移、疗效监测等的临床辅助诊断,属于体外诊断技术领域。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells,CTCs)是指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。

[0003] 恶性肿瘤都会通过血液传播转移到身体的其他器官,而肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤细胞侵入到原发肿瘤细胞的周围组织中,进入血液和淋巴管系统,形成循环肿瘤细胞(CTCs),并转运到远端组织,再渗出,适应新的微环境,最终“播种”、“增殖”、“定植”、形成转移灶;因此早期发现血液中的CTCs,对于肿瘤患者预后判断、疗效评价和个体化治疗都有着重要的指导作用。但是,CTCs在外周血中的数量非常稀少,仅占外周血白细胞的 $1/10^6 \sim 1/10^7$,并且它是连续产生的,在血液中呈动态分布,会出现滞后现象,具有很强的异质性,因此CTCs的检测一直受到挑战。在目前,针对上皮源性肿瘤的循环肿瘤细胞的研究甚少,因此将循环肿瘤细胞作为一种实时上皮源性肿瘤的“液体活检”的手段,即减缓了肿瘤患者组织活检的生理及心理的痛苦,又可以辅助临床医生进行患者总生存期和无进展生存期的评估、临床放化疗的疗效监测、肿瘤转移复发预测以及早期预警等,进而具有指导个体化医疗、改善肿瘤患者的生存状态的重要临床意义。

[0004] 随着研究手段的不断进步,将CTCs作为一个潜在的肿瘤标志物,其对临床肿瘤进行辅助诊断及治疗的想法也在一步步实现。经临床试验验证,CTCs 多数是从上皮恶性肿瘤上脱落进入血液中,如胆管癌、肝癌、乳腺癌和前列腺癌等等。目前CTCs的富集与捕获主要采用以下几种方式:①利用结合EpCAM抗体的免疫磁珠,进行患者外周血中CTCs的磁性富集、捕获、纯化等;②利用流式细胞术的方法进行CTCs检测;③利用微流控细胞免疫芯片的方法进行CTCs富集、捕获;等等。

[0005] 利用结合EpCAM抗体的免疫磁珠,进行患者外周血中CTCs的磁性富集、捕获、纯化的方法主要以美国Janssen Diagnostics, LLC公司的CELLSEARCH®为代表。该方法对CTCs的捕获效率较低,并且捕获的CTCs细胞活性较低,无法进行后期的细胞培养,同时也无法进行细胞分离,用于下游技术的研究。

[0006] 流式细胞计量术(flow cytometry,FCM)检测方法相对简便,且准确度与灵敏度均较高,能够定量检测癌症患者外周血中的CTCs,但FCM检测方法因在形态学方面存在先天不足,因而在确认肿瘤细胞的细胞形态方面,仍然需要采用镜下特异的免疫细胞染色观察,方可弥补其方法缺陷。

[0007] 微流控细胞免疫芯片(CTCs-chip)的方法是通过微流控装置(micro-fluid device)检测CTCs,该检测方法具有极高的特异性、敏感性、可重复性等特点,捕获的CTCs具有细胞活性,可分离,并用于细胞培养和其他各种下游技术研究,是CTCs临床应用价值研究的一种全新高效的方法。

发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用。

[0009] 本发明解决上述问题所采用的技术方案是：该循环肿瘤细胞的检测试剂盒，其特征在于：所述的试剂盒包括芯片、样本稀释液、细胞分离液、细胞捕获剂、细胞清洗液、细胞固定剂、抗体稀释液、细胞通透剂和荧光染色剂。

[0010] 本发明所述的芯片为微流控纳米芯片，所述芯片包括固定外壳、PDMS硅胶模和硅化玻片；所述硅化玻片上具有纳米微阵列，该纳米微阵列柱上偶联有链霉亲和素；所述PDMS硅胶膜与硅化玻片贴合的一面具有蚀刻的流道。

[0011] 本发明所述的样本稀释液和抗体稀释液为磷酸盐缓冲液，也可以是其它类型的生物缓冲液，不破坏细胞和抗体；所述的细胞清洗液优选为液体细胞培养基；所述的细胞通透剂优选为一定浓度的表面活性剂溶液，用于细胞染色前的处理；所述的细胞固定剂优选为多聚甲醛水溶液，用于杀死细胞并不破坏抗原抗体的活性。

[0012] 本发明所述的细胞分离液优选为密度梯度离心液。所述的密度梯度离心液通常选用Histopaque® -1077密度梯度离心液。

[0013] 本发明所述的细胞捕获剂含有生物素标记的抗体；所述的芯片内固定有链霉亲和素。生物素-链霉亲和素系统具有高灵敏度、高特异性、高稳定性和适用性等特点。生物素易与蛋白质和核酸类等生物大分子结合，再和生物素衍生物结合，将信号多级放大，能保持大分子物质的原有生物活性。亲和素与生物素间的结合具有极高的亲和力，其反应呈高度专一性，不增加非特异性干扰，也不会因反应试剂浓度高低受影响。酸、碱、变性剂及有机溶剂均不会影响亲和素与生物素的结合力。研究表明，链霉亲和素与生物素能够在结合表面形成均一的多层膜维系紧密的结合，不仅能与酶、荧光素和放射性核素等各类标记结合，还可制成亲和介质，用于分离提纯。链霉亲和素是与亲和素有相似生物学特性的一种蛋白质，是streptomyces avidinii菌的分泌物，其分子量及结合生物素的能力与鸡蛋清中的亲和素相似，等电点6.0，非特异性结合远比亲和素低，被广泛使用。

[0014] 本发明所述的细胞捕获剂含有生物素标记的鼠单抗-EpCAM抗体。EpCAM是一种由GA-733-2基因编码的分子量为40kDa的跨膜糖蛋白，作为嗜同种的钙非依赖性的上皮细胞间粘附分子在上皮癌变过程中发挥着作用，是上皮型循环肿瘤细胞的一种很好的检测标志物。

[0015] 本发明所述的荧光染色剂包括至少一种核酸荧光染色剂和至少两种荧光素标记的检测抗体。所述的核酸荧光染色剂优选为DAPI；所述用于标记检测抗体的荧光素包括FITC、PE、Alexa 647等。

[0016] 本发明所述的抗体稀释液、细胞清洗液和细胞固定剂中含有防腐剂。防腐剂是为了防止溶液染菌变质，延长其保质期。

[0017] 本发明所述循环肿瘤细胞的检测试剂盒的应用，其特征在于：所述的试剂盒用于检测循环肿瘤细胞的步骤包括：

(1) 循环肿瘤细胞的分离：

a. 采用样本稀释液对样本进行稀释；

b. 采用细胞分离液对稀释后的样本进行密度梯度离心；

- c. 移出单核细胞层部分,采用细胞清洗液对单核细胞层部分进行清洗;
- d. 最后采用细胞清洗液重悬细胞沉淀,制备成单核细胞悬液;
- (2) 捕获抗体的包被:
 - a. 采用无水乙醇和缓冲液对芯片进行初清洗;
 - b. 将捕获抗体加入缓冲液中,再注入芯片中孵育;
 - c. 再采用缓冲液对芯片进行清洗,芯片包被完成;
- (3) 循环肿瘤细胞的捕获:
 - a. 采用细胞清洗液清洗芯片;
 - b. 将制备好的单核细胞悬液注入包被好的芯片中;
 - c. 将细胞固定剂注入芯片,完成循环肿瘤细胞的捕获;
- (4) 循环肿瘤细胞的免疫荧光染色:
 - a. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
 - b. 将细胞通透剂注入芯片中,静置;
 - c. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
 - d. 将荧光染色剂加入抗体稀释液中,并注入芯片,避光孵育;
 - e. 采用缓冲液对芯片进行清洗;
 - f. 将另外种类的荧光染色剂注入芯片,静置;
 - g. 采用缓冲液对芯片进行清洗,孵育;
 - h. 进行荧光显微镜观察。

[0018] 本发明还提供所述循环肿瘤细胞的检测试剂盒的应用,其特征在于:在优选的实施方案中,所述步骤(4)的d中的荧光染色剂为至少两种荧光素标记的检测抗体;所述步骤(4)的f中的荧光染色剂为至少一种核酸荧光染色剂。所述的核酸荧光染色剂优选为DAPI;所述用于标记检测抗体的荧光素包括FITC、PE、Alexa 647等。

[0019] 本发明所述的试剂盒主要用于肿瘤预后、复发、转移、疗效监测和早期诊断预警,监控疗效及肿瘤进展情况;利用循环肿瘤细胞的分子分型及筛选特异性等特点,针对性研究循环肿瘤细胞的敏感药物,以补充肿瘤转移、复发及耐药等机制,指导个体化医疗。

[0020] 本发明中提到的专业术语定义如下:

Circulating Tumor Cells(CTCs):循环肿瘤细胞。

[0021] Circulating Stem Cells(CSCs):循环肿瘤干细胞。

[0022] Cytokeratin(CK):细胞角蛋白。

[0023] PanCK:循环肿瘤细胞的特异细胞角蛋白家族谱,包含7种细胞角蛋白。

[0024] CD45:白细胞共同抗原,一般白细胞都具有的抗原。

[0025] CD133:5次跨膜糖蛋白,循环肿瘤干细胞独具的抗原。

[0026] PBS:磷酸盐缓冲液。

[0027] PBMCs层:外周血单核细胞层。

[0028] EpCAM:上皮细胞粘附分子。

[0029] FITC:异硫氰酸荧光素,能与各种抗体蛋白结合,结合后的抗体不丧失与一定抗原结合的特异性,并在碱性溶液中仍有强烈绿色荧光。在本发明实施例中用于标记鼠抗-PanCK检测抗体,与循环肿瘤细胞质中的相应抗原结合,在荧光显微镜下显示绿色。

[0030] PE:藻红蛋白,一种荧光素,在本发明实施例中用于标记鼠抗-CD45检测抗体,在荧光显微镜下显示橙色。

[0031] Alexa 647:一种荧光素,在本发明实施例中用于标记鼠抗-CD133检测抗体,在荧光显微镜下显示红色。

[0032] DAPI溶液:DAPI即4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole),是一种能够与DNA强力结合的荧光素,常用于荧光显微镜观测,因为DAPI可以透过完整的细胞膜,它可以用于活细胞和固定细胞的染色。在本发明实施例中可使细胞核在荧光显微镜下显示蓝色。

[0033] Wash Medium(WM):一种细胞清洗液,每1L溶液包含950mLRPMI 1640 Medium(一种市面上在售的细胞培养基)、50mL胎牛血清和1g叠氮钠。

[0034] 1×ADB:一种抗体稀释液,每1L溶液包含1L 0.01mol/L的PBS溶液和5g硫柳汞(硫汞柳酸钠)。

[0035] 2%PFA:一种细胞固定剂,2%(体积比)的多聚甲醛水溶液。

[0036] Triton X-100:一种表面活性剂。

[0037] 本发明所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒结合微流控分选技术和免疫细胞化学技术更为准确、高效地进行循环肿瘤细胞的富集和检测,通过分析计数系统对循环肿瘤细胞进行分析和计数,为临床诊断提供辅助作用;所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒主要用于肿瘤预后、复发、转移、疗效监测和早期诊断预警,监控抗肿瘤治疗及肿瘤进展情况,实现基于循环肿瘤细胞的分子分型及筛选特异性针对循环肿瘤细胞的敏感药物,以提升对肿瘤转移、复发及耐药相关机制的认识并指导肿瘤患者的个体化医疗。

附图说明

[0038] 图1是本发明胆管癌循环肿瘤细胞检测实施例的荧光显微镜观察结果图,其中A为3种荧光染色剂复合显色结果,B为FITC显色结果,C为PE显色结果,D为DAPI显色结果。

[0039] 图2是本发明非小细胞肺癌循环肿瘤细胞检测实施例的荧光显微镜观察结果图,包含了两个视野的荧光显微镜观察结果,其中A、B、C、D、E为一个视野的荧光显微镜观察结果,a、b、c、d、e为另一个视野的荧光显微镜观察结果;其中A和a为4种荧光染色剂复合显色结果,B和b为FITC显色结果,C和c为PE显色结果,D和d为Alexa 647显色结果,E和e为DAPI显色结果。

具体实施方式

[0040] 下面通过实施例对本发明作进一步说明。

[0041] 实施例一:胆管癌循环肿瘤细胞检测

1循环肿瘤细胞分离

1.1 将密度梯度离心液平衡至室温。

[0042] 1.2 将3mL的密度梯度离心液加入到每个密度梯度离心管中。

[0043] 1.3 将含有3mL密度梯度离心液的管置于离心机中,1000×g室温离心30s,将密度梯度离心液离心到多孔屏障下方。

[0044] 1.4 用1×PBS以1:1的比例稀释胆管癌患者全血样本。

- [0045] 1.5 小心将4mL稀释后的全血样本注入密度梯度离心管(含密度梯度离心液)中。
- [0046] 1.6 将装有全血稀释样本的密度梯度离心管(含密度梯度离心液)置于离心机的吊桶式转子中,平衡后,1000×g室温离心10min。
- [0047] 1.7 移除上层血浆,保留PBMCs层上方5至10mm。
- [0048] 1.8 小心转移PBMCs层至一个新的15mL灭菌离心管中。
- [0049] 1.9 用10mL Wash Medium(WM)洗涤PBMCs。
- [0050] 1.10 4℃条件下300×g离心10min,小心吸弃上清液,不要触及底层沉淀,重复清洗两次。
- [0051] 1.11用105μL WM重悬细胞沉淀,制备成单核细胞悬液。
- [0052] 2捕获抗体的包被
- 2.1 将放于4℃的芯片平衡至室温。
- [0053] 2.2 用200μL无水乙醇清洗芯片2次,然后再用200μL 1×PBS溶液清洗芯片2次,并确定芯片通道中没有气泡残留。
- [0054] 2.3 将50 μL鼠抗-EpCAM捕获抗体(生物素标记)添加到50 μL 1×PBS溶液中,混匀,制备成抗体捕获工作液。
- [0055] 2.4 用移液器将100 μL抗体捕获工作液注入到芯片中,然后将芯片置于湿盒中,室温孵育1h。在整个孵育过程中,确保芯片的入口和出口都始终覆盖着抗体捕获工作液。
- [0056] 2.5 用200μL的1×PBS溶液清洗包被了捕获抗体的芯片3次,除去残留在芯片中的捕获抗体工作液。
- [0057] 2.6至此,芯片上捕获抗体的包被完成,并且随时可以使用。
- [0058] 3循环肿瘤细胞的捕获
- 3.1 用1mL的WM清洗芯片。
- [0059] 3.2 用移液器吸取制备好的单核细胞悬液,并注入包被好的芯片中。
- [0060] 3.3 用移液器吸取1mL的2%PFA注入芯片,循环肿瘤细胞被固定。
- [0061] 4 循环肿瘤细胞的免疫荧光染色
- 4.1 用200μL 1×PBS溶液注入清洗芯片3次。
- [0062] 4.2 用移液器吸取200μL 1×ADB/0.2%(体积百分比)Triton X-100,注入芯片中,室温静置20min。
- [0063] 4.3 用200μL 1×PBS清洗芯片3次,以去除残留的1×ADB/0.2% Triton X-100。
- [0064] 4.4 用移液器吸取250μL1×ADB至1.5mL离心管,再用移液器分别吸取6.25μL鼠抗-PanCK检测抗体(标记有FITC)和1.25μL鼠抗-CD45检测抗体(标记有PE)加入该离心管中,混匀,制备成检测抗体混合液。
- [0065] 4.5 用移液器吸取250 μL检测抗体混合液,注入芯片中,湿盒中室温避光孵育1h。
- [0066] 4.6 用200 μL 1×PBS溶液清洗芯片3次,以去除残留的检测抗体混合液。
- [0067] 4.7 用移液器吸取200 μL 300 nmol/L DAPI溶液,注入芯片中,静置10min。
- [0068] 4.8 用移液器吸取200 μL 1×PBS溶液注入芯片中,以去除残余的DAPI溶液,室温避光孵育5~15min。
- [0069] 4.9 CTC免疫荧光染色完成后可以立即进行荧光显微镜观察。检测是使用倒置荧光显微镜观察荧光颜色结合细胞分析与计数软件来完成的。检测结果参见图1:

图中, PanCK呈阳性即FITC显绿色、CD45呈阴性即PE不显色、DAPI显蓝色,表示该细胞为循环肿瘤细胞; PanCK呈阴性即FITC不显色、CD45呈阳性即PE显橙色、DAPI显蓝色,表示该细胞为白细胞。

[0070] 本实施例可用于检测胆管癌患者外周血液中的循环肿瘤细胞,提高胆管癌的循环肿瘤细胞检测灵敏度,特别是利用多种特异性富集抗体进行靶细胞的富集,显著提高了胆管癌循环肿瘤细胞的检测灵敏度。同时,在科学研究领域和临床试验验证的基础上,利用免疫鉴定循环肿瘤细胞的特异细胞角蛋白PanCK、白细胞共同抗原CD45、细胞核加上细胞形态染色的方法,有效检测出胆管癌患者外周血中上皮来源的循环肿瘤细胞;弥补目前市场产品不足之处,提供一种新型的胆管癌循环肿瘤细胞检测试剂盒;作为标准化优良的检测试剂盒,其可以根据使用者的目的,配合选择相应的市场产品,达到较高富集、分离和提取循环肿瘤细胞的效率,有效检测胆管癌患者外周血液中的上皮来源的循环肿瘤细胞,实现突出的准确性。

[0071] 实施例2:非小细胞肺癌循环肿瘤细胞与循环肿瘤干细胞检测

1 循环肿瘤细胞的分离

1.1 将密度梯度离心液平衡至室温。

[0072] 1.2 将3mL的密度梯度离心液加入到每个密度梯度离心管中。

[0073] 1.3 将含有3mL密度梯度离心液的管置于离心机中,1000×g室温离心30s,将密度梯度离心液离心到多孔屏障下方。

[0074] 1.4 用1×PBS以1:1的比例稀释胆管癌患者全血样本。

[0075] 1.5 小心将4mL稀释后的全血样本注入密度梯度离心管(含密度梯度离心液)中。

[0076] 1.6 将装有全血稀释样本的密度梯度离心管(含密度梯度离心液)置于离心机的吊桶式转子中,平衡后,1000×g室温离心10min。

[0077] 1.7 移除上层血浆,保留PBMCs层上方5至10mm。

[0078] 1.8 小心转移PBMCs层至一个新的15mL灭菌离心管中。

[0079] 1.9 用10mL Wash Medium(WM)洗涤PBMCs。

[0080] 1.10 4℃条件下300×g离心10min,小心吸弃上清液,不要触及底层沉淀,重复清洗两次。

[0081] 1.11用105μL WM重悬细胞沉淀,制备成单核细胞悬液。

[0082] 2 捕获抗体的包被

2.1 将放于4℃的芯片平衡至室温。

[0083] 2.2 用200μL无水乙醇清洗芯片2次,然后再用200μL 1×PBS溶液清洗芯片2次,并确定芯片通道中没有气泡残留。

[0084] 2.3 将50 μL鼠抗-EpCAM捕获抗体(生物素标记)添加到50 μL 1×PBS溶液中,混匀,制备成抗体捕获工作液。

[0085] 2.4 用移液器将100 μL抗体捕获工作液注入到芯片中,然后将芯片置于湿盒中,室温孵育1h。在整个孵育过程中,确保芯片的入口和出口都始终覆盖着抗体捕获工作液。

[0086] 2.5 用200μL的1×PBS溶液清洗包被了捕获抗体的芯片3次,除去残留在芯片中的捕获抗体工作液。

[0087] 2.6至此,芯片上捕获抗体的包被完成,并且随时可以使用。

[0088] 3循环肿瘤细胞的捕获

3.1 用1mL的WM清洗芯片。

[0089] 3.2 用移液器吸取制备好的单核细胞悬液,并注入包被好的芯片中。

[0090] 3.3 用移液器吸取1mL的2%PFA注入芯片,循环肿瘤细胞被固定。

[0091] 4 循环肿瘤细胞的免疫染色

4.1 用200 μ L 1 \times PBS溶液注入清洗芯片3次。

[0092] 4.2 用移液器吸取200 μ L 1 \times ADB/0.2%(体积百分比)Triton X-100,注入芯片中,室温静置20min。

[0093] 4.3 用200 μ L 1 \times PBS清洗芯片3次,以去除残留的1 \times ADB/0.2% Triton X-100。

[0094] 4.4 用移液器吸取240 μ L 1 \times ADB至1.5mL离心管,再用移液器分别吸取6.25 μ L鼠抗-PanCK检测抗体(标记有FITC)、1.25 μ L鼠抗-CD45检测抗体(标记有PE)和2.5 μ L鼠抗-CD133检测抗体(标记有Alexa 647)加入该离心管中,混匀,制备成检测抗体混合液。

[0095] 4.5 用移液器吸取250 μ L检测抗体混合液,注入芯片中,湿盒中室温避光孵育1h。

[0096] 4.6 用200 μ L 1 \times PBS溶液清洗芯片3次,以去除残留的检测抗体混合液。

[0097] 4.7 用移液器吸取200 μ L 300 nmol/L DAPI溶液,注入芯片中,静置10min。

[0098] 4.8 用移液器吸取200 μ L 1 \times PBS溶液注入芯片中,以去除残余的DAPI溶液,室温避光孵育5~15min。

[0099] 4.9 CTC免疫荧光染色完成后可以立即进行荧光显微镜观察。检测是使用倒置荧光显微镜观察荧光颜色结合细胞分析与计数软件来完成的。检测结果参见图2:

图中,PanCK呈阳性即FITC显绿色、CD45呈阴性即PE不显色、CD133呈阴性即Alexa 647不显色、DAPI显蓝色,表示该细胞为循环肿瘤细胞;PanCK呈阳性即FITC显绿色、CD45呈阴性即PE不显色、CD133呈阳性即Alexa 647显红色、DAPI显蓝色,表示该细胞为循环肿瘤干细胞;PanCK呈阴性即FITC不显色、CD45呈阳性即PE显橙色、CD133呈阴性即Alexa 647不显色、DAPI显蓝色,表示该细胞为白细胞。

[0100] 本实施例可用于检测非小细胞肺癌患者外周血液中的循环肿瘤细胞,提高非小细胞肺癌的循环肿瘤细胞检测灵敏度,特别是成功利用多种特异性富集抗体进行靶细胞的富集,也包括针对非小细胞肺癌肿瘤干细胞的特异性抗体,显著提高了非小细胞肺癌循环肿瘤细胞的检测灵敏度。同时,在科学研究领域和临床试验验证的基础上,利用免疫鉴定循环肿瘤细胞的特异细胞角蛋白PanCK、白细胞共同抗原CD45、细胞核加上细胞形态染色的方法,有效地鉴定出非小细胞肺癌患者外周血中上皮来源的肿瘤细胞;同时,弥补目前市场产品不足之处,是一标准优化的检测试剂盒,可以根据使用者的目的,配合选择相应的市场产品,达到较高的富集、分离、提取稀有细胞的效率,有效鉴定非小细胞肺癌患者外周血液中的上皮来源的循环肿瘤细胞,实现高准确率的效果。与一般的非小细胞肺癌循环肿瘤细胞鉴定试剂不同之处在于,除了有循环肿瘤细胞通用生物标志物,还具有非小细胞肺癌干细胞标志物,不仅能够获得患者血液中的循环肿瘤细胞生物学信息,还可以获得更具侵袭性的非小细胞肺癌干细胞的生物学信息,避免了结果假阳性,提高了准确率。

[0101] 本发明并不限于本文所示和所述的特定实施例,而是不脱离由说明书所限定的本发明的精神和范围的情况下作出各种变化和修改。

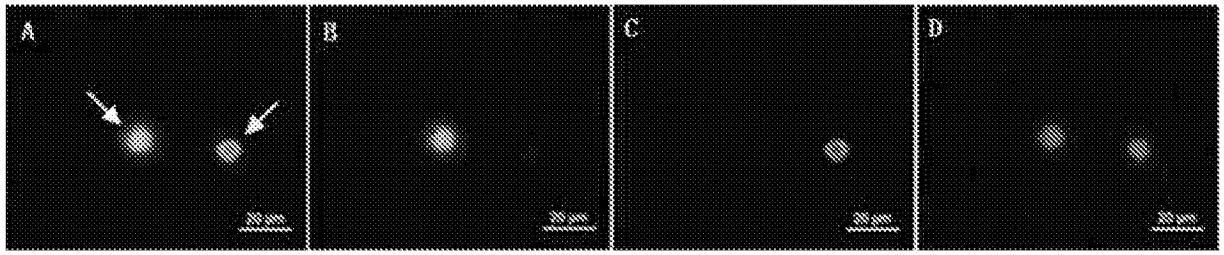


图1

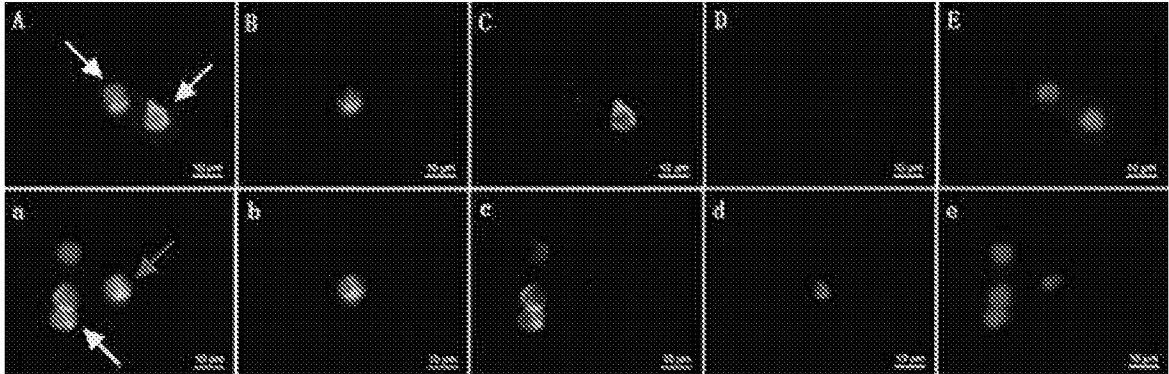


图2

专利名称(译)	一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105785005A	公开(公告)日	2016-07-20
申请号	CN201610226512.9	申请日	2016-04-13
[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	张开山 苏广宇 宁宁		
发明人	张开山 苏广宇 宁宁		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/574 G01N33/533 G01N33/56961		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种循环肿瘤细胞的检测试剂盒及其应用，所述的循环肿瘤细胞的检测试剂盒包括芯片、样本稀释液、细胞分离液、细胞捕获剂、细胞清洗液、细胞固定剂、抗体稀释液、细胞通透剂和荧光染色剂。本发明试剂盒的应用主要包括循环肿瘤细胞的分离，捕获抗体的包被，循环肿瘤细胞的捕获和循环肿瘤细胞的免疫荧光染色几个步骤。本发明主要用于肿瘤预后、复发、转移、疗效监测和早期诊断预警，监控疗效及肿瘤进展情况；利用循环肿瘤细胞的分子分型及筛选特异性等特点，针对性研究循环肿瘤细胞的敏感药物，以补充肿瘤转移、复发及耐药等机制，指导个体化医疗。

