



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105807053 B

(45)授权公告日 2019.04.02

(21)申请号 201610235031.4

G01N 33/535(2006.01)

(22)申请日 2016.04.15

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105807053 A

Elizabeth A. Leadbetter et al..Chromatin-IgG complexes activate B cells by dual engagement of IgM and Toll-like receptors.《NATURE》.2002,第416卷

(43)申请公布日 2016.07.27

(73)专利权人 苏州药明康德新药开发股份有限公司

王咏梅 等.透明质酸酶和透明质酸对血管内皮细胞增殖及CD44表达的影响.《第二军医大学学报》.2001,第22卷(第2期),

地址 215168 江苏省苏州市吴中区吴中大道1318号

审查员 赵晓明

(72)发明人 张宁 张祁尧 刘艳 冀群升

(74)专利代理机构 北京奉思知识产权代理有限公司 11464

代理人 吴立 邹轶蛟

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

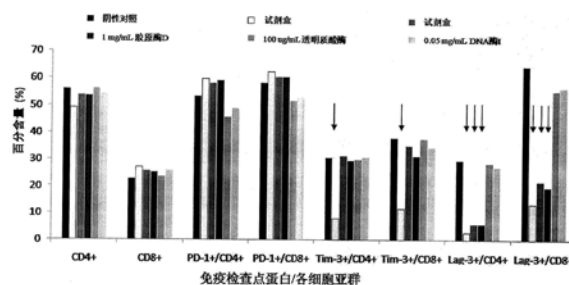
权利要求书1页 说明书7页 附图6页

(54)发明名称

一种肿瘤解离试剂在流式细胞检测中的应用

(57)摘要

本发明涉及一种肿瘤组织解离试剂,所述解离试剂成分不包含胶原酶和胰酶,但其成分还包含透明质酸酶或透明质酸酶和DNA酶I二者的混合物。本发明还公开了采用上述解离试剂分散肿瘤组织并用于流式细胞检测细胞表面分子标记物的表达程度。本发明的解离试剂不会造成细胞表面分子标记物如CD8、PD-1、Tim-3、Lag-3等的降解,从而不影响下游实验检测。



1. 一种用于肿瘤解离的酶在制备用于检测肿瘤组织中免疫检查点标记物表达的试剂中的应用,其中,所述用于肿瘤解离的酶由透明质酸酶和DNA酶I中的至少一种组成,所述用于肿瘤解离的酶不降解或不部分降解免疫检查点标记物,所述免疫检查点标记物为CD8、PD-1、PD-L1、TIM-3和LAG-3蛋白中的一种或多种。

2. 如权利要求1所述的应用,所述透明质酸酶的浓度为100 μ g/mL以下,所述DNA酶I的浓度为50 μ g/mL以下。

3. 如权利要求1所述的应用,检测肿瘤组织中免疫检查点标记物表达的方法为流式细胞术检测。

4. 如权利要求1所述的应用,所述肿瘤组织为肿瘤浸润免疫细胞。

5. 一种用于肿瘤解离的酶在制备用于流式细胞术检测肿瘤组织中免疫检查点标志物表达的试剂盒中的应用,其中,所述用于肿瘤解离的酶由浓度为100 μ g/mL以下的透明质酸酶和浓度为50 μ g/mL以下的DNA酶I中的至少一种组成,所述用于肿瘤解离的酶不降解或不部分降解免疫检查点标记物,所述免疫检查点标记物为CD8、PD-1、PD-L1、TIM-3和LAG-3蛋白中的一种或多种。

6. 如权利要求5所述的应用,所述肿瘤组织为肿瘤浸润免疫细胞。

7. 一种用于流式细胞术的肿瘤解离方法,包括使用一种用于肿瘤解离的酶处理肿瘤组织,其中,所述用于肿瘤解离的酶由浓度为100 μ g/mL以下的透明质酸酶和浓度为50 μ g/mL以下的DNA酶I中的至少一种组成,所述用于肿瘤解离的酶不降解或不部分降解免疫检查点标记物,所述免疫检查点标记物为CD8、PD-1、PD-L1、TIM-3和LAG-3蛋白中的一种或多种。

8. 如权利要求7所述的方法,所述肿瘤组织为肿瘤浸润免疫细胞。

一种肿瘤解离试剂在流式细胞检测中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种将临床实体肿瘤组织分散成单细胞悬液,并保护表面标志物不被降解且可被用于流式检测的肿瘤解离试剂。

背景技术

[0002] 在对肿瘤组织的细胞生物学特性进行分析研究(如细胞表位检测等)时,需先将样品组织块制备成分散的单细胞悬液,获得高得率的细胞,并且细胞及表位的完整性保留完好,可直接用于下游实验。只有当样品组织中的各种细胞成分处在单细胞状态下,才能有效地对其进行各种细胞效应的检测分析,而细胞悬液质量的好坏与消化液配方和消化方法密切相关。目前常用的单细胞悬液制备方法有化学法、酶法和物理法。

[0003] 酶学法主要是破坏细胞间的连接物如胶原酶、弹性纤维、粘多糖物质、紧密连接装置蛋白等而使细胞分散。胰酶、胶原蛋白酶、透明质酸酶等是目前常用的酶。现有技术中,商品化的解离试剂盒如美天旋组织解离试剂盒据称可以处理多种组织,包括肿瘤组织、骨骼肌、脾、肺、神经组织、表皮、固有层组织、新生鼠心脏、新生神经元及拟胚体等组织,并且根据细胞表面的抗原对酶消化的敏感性不同还设计了不同的酶反应体系,以尽可能保护细胞表面抗原不被破坏,从而不影响下游实验。而事实上,实际操作中仍存在会降解或部分降解某些细胞表面分子标记物,使得无法准确检测。

[0004] 事实上,一些常用的酶解试剂的成分会影响细胞表面分子标记物的检测。例如,胰酶对细胞的分散能力强,作用时间短,应用胰酶制备单细胞悬液产量高,但胰酶的作用条件复杂,胰酶对细胞表面抗原甚至对细胞均有破坏作用。例如,经胰酶处理小鼠胸腺细胞表面受体CD4和CD8会被胰酶消化切割掉(Thomas Barthlott, Rebecca J. Wright and Brigitta Stockinger, J Immunol, 1998年第161期3992-3999页)。因此胰酶适用于检测检测细胞内抗原,对于细胞表面抗原,尤其是弱表达抗原检测并不适宜。

[0005] 免疫检查点蛋白是肿瘤治疗中的关键靶点,在免疫治疗中起到非常重要的作用,可能成为人类征服癌症的有力武器。正是如此,癌症的诊断和治疗都要求对其检测的准确性。

[0006] 而对临床肿瘤病人进行诊断并确定下一步的治疗方案(特别是靶向治疗)的过程中,流式细胞计数方法由于其能同时检测单个细胞上多种标志物,所以在对样本细胞亚群进行细分和细胞表面标志物的确定方面有其它技术难以比拟的优势。但是,肿瘤组织需要经过消化酶处理成单细胞悬液后才能用于后续的流式检测。而在本发明中,我们发现目前商品化的人源肿瘤消化试剂或常用的消化试剂如胶原酶都对本专利中涉及的多种蛋白(包括免疫检查点蛋白如Tim-3和Lag3)的表达水平都有明显影响,这无疑加大了疾病的误诊率,容易导致错误的治疗方案。因此各消化液对肿瘤组织的消化效果和对细胞表面抗原的保护作用尚有待改进。找到一种消化酶或混合物能有效的消化人源肿瘤组织并且不影响表面标志物的表达至关重要。

发明内容

[0007] 本发明的目的之一在于提供了一种肿瘤解离试剂。

[0008] 其中,该解离试剂不包含胶原酶且包含透明质酸酶,所述肿瘤解离试剂不降解或不部分降解检查点受体等膜表面受体。

[0009] 本发明同时公开了另一种肿瘤解离试剂,其不包含胰蛋白酶和胶原酶且包含透明质酸酶,所述肿瘤解离试剂不降解或不部分降解检查点受体等膜表面受体。

[0010] 其中,本发明所述的透明质酸酶的浓度范围优选为1mg/mL以下,透明质酸酶浓度更优选为1 μ g/mL至1mg/mL。

[0011] 本发明还公开了一种肿瘤解离试剂,其还包含DNA酶I。

[0012] 其中,本发明所述的DNA酶I的浓度范围优选为20mg/mL以下,DNA酶I浓度更优选为0.01 μ g/mL至20mg/mL。

[0013] 在本发明的一个实施例中,该解离试剂不降解或不部分降解检查点受体等膜表面受体中所述膜表面受体,包括但不限于检查点受体CD8、PD-1,PD-L1,TIM-3和LAG-3蛋白中的一种或多种。

[0014] 本发明的目的之二在于提供一种制备方法,其中,该方法可以避免降解肿瘤组织中免疫检查点标志物,其中使用了本发明公开的所述肿瘤解离试剂处理细胞。

[0015] 本发明的目的之三在于公开了所述的肿瘤解离试剂在检测肿瘤组织中免疫检查点标记物表达的用途,优选地在流式细胞术检测肿瘤组织中的蛋白表达的用途。

[0016] 在本发明中,所述肿瘤组织为肿瘤浸润免疫细胞。

[0017] 在本发明中,所述蛋白为膜表面受体为检查点受体。

[0018] 在本发明的一个实施例中,在流式细胞术检测肿瘤组织中所述膜表面受体为检查点受体包括但不限于CD8、PD-1,PD-L1,TIM-3和LAG-3蛋白中的一种或多种。

[0019] 本发明的目的之四在于提供一种用于肿瘤解离的试剂盒,其包括本发明所述的肿瘤解离试剂。

[0020] 本发明同时公开了所述的试剂盒在流式细胞术检测肿瘤组织中蛋白表达的用途。

[0021] 本发明的一个实施例公开了一种用于流式细胞术的肿瘤解离方法,包括使用本发明所述的肿瘤解离试剂来解离肿瘤组织。

[0022] 在该方法中,所述肿瘤组织为肿瘤浸润免疫细胞。

[0023] 发明的有益效果

[0024] 本发明的有益效果在于所建立了不含胶原酶和胰酶的肿瘤解离试剂,该解离试剂不会降解或部分降解肿瘤组织中膜表面标志物,因此可以采用该肿瘤解离试剂在流式细胞术检测肿瘤组织中蛋白的表达。

附图说明

[0025] 图1是示出不同消化酶处理后辅助T细胞(CD4+)中的检查点蛋白PD-1、Tim-3和Lag-3的流式分析图。

[0026] 图2是示出不同消化酶处理后毒性T细胞(CD8+)中的检查点蛋白PD-1、Tim-3和Lag-3的流式分析图。

[0027] 图3是示出不同消化酶处理后细胞表面检查点蛋白的百分含量的统计图。

[0028] 图4是示出经二酶混合物处理后细胞表面检查点蛋白PD-1、Tim-3和Lag-3的百分含量的统计图。

[0029] 图5是示出不同消化酶处理后细胞表面检查点蛋白CD4和CD8的流式分析图。

[0030] 图6是示出不同酶消化处理后的细胞得率。

具体实施方式

[0031] 下面通过具体实施方式及实验数据对本发明作进一步的说明。尽管为了清楚的目的,在下文中使用了专用术语,但这些术语并不意味着定义或限制本发明的范围。

[0032] 如本文中所使用,术语“解离试剂”指代酶消化试剂,在本发明中,肿瘤解离试剂指的是用酶消化液消化肿瘤组织为单个细胞悬液的酶消化试剂。

[0033] 如本文中所使用,术语“膜表面受体”指代的是细胞表面的一种或一类分子,它们能识别、结合专一的生物活性物质(称配体),生成的复合物能激活和启动一系列物理化学变化,从而导致该物质的最终生物效应。细胞环境中各种因素的变化,是通过细胞膜受体的作用而影响细胞内的生理过程发生相应的变化。

[0034] 下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0035] 具体实施例:

[0036] 实施例1消化酶试剂的配制

[0037] 透明质酸酶消化缓冲体系:将50 μ L初始浓度为10mg/mL的透明质酸酶透明质酸酶(Hyaluronidase,购自sigma公司,货号H3506)溶液加到4.95mL的DMEM培养基中(终浓度为100 μ g/mL)配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0038] 胶原酶D消化缓冲体系:将500 μ L初始浓度为10mg/mL的胶原酶D(Collagenase D,购自Roche公司,货号11088882001)溶液加到4.5mL的DMEM培养基中(终浓度为1mg/mL)配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0039] DNA酶I消化缓冲体系:将50 μ L初始浓度为5mg/mL的DNA酶I溶液(DNase I,购自sigma公司,货号DN25-1G)加到4.95mL的DMEM培养基中(终浓度为0.05mg/mL)配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0040] 三酶混合物消化缓冲体系:分别将50 μ L初始浓度为10mg/mL的透明质酸酶溶液,500 μ L初始浓度为10mg/mL的胶原酶D溶液和50 μ L初始浓度为5mg/mL的DNA酶I溶液加到4.4mL的DMEM培养基中配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0041] 二酶混合物消化缓冲体系:分别将50 μ L初始浓度为10mg/mL的透明质酸酶溶液和50 μ L初始浓度为5mg/mL的DNA酶I溶液加到4.9mL的DMEM培养基中配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0042] 美天旋人源肿瘤分离试剂盒(Human tumor dissociation kit,货号no.130-095-929)消化缓冲体系:按说明书要求配置好相应浓度的消化酶A,H和R母液,分装后保存在-20 $^{\circ}$ C。实验时,将200 μ L酶H,100 μ L酶R和25 μ L酶A母液加入4.7mL DMEM培养基中配制成5mL肿瘤组织消化液。

[0043] 实施例2流式染色设计

[0044] 细胞表面不同的具体的染色通道的设计请详见表1所示。

[0045] 表1细胞表面分子标记物使用的通道

[0046]

通道	空白对照	同型对照组2	方案组2
FITC	--	Isotype	Tim3
PE	--	Isotype	PD-1
PerCP	--	CD4	CD4
PE-Cy7	--	Isotype	Lag-3
APC	--	CD3	CD3
APC-Cy7	--	CD8	CD8
BV421	Live/Dead	Live/Dead	Live/Dead
BV510	--	CD45	CD45

[0047] 实施例3不同消化酶对于检查点蛋白PD-1、TIM3和LAG-3阳性率的影响

[0048] 毒性T细胞 (CD8+) 和辅助T细胞 (CD4+) 两群细胞群经PHA处理, 会诱导表达PD-1, Tim-3和Lag-3, 我们在这两群细胞中分析不同的消化酶是否对三种蛋白的表达水平有影响。

[0049] 由于肿瘤不是单细胞悬液, 所以不能直接做流式检测, 如果不用酶消化, 只是机械消化, 单细胞得率比较低, 这些机械消化出的单细胞的分子标记蛋白阳性率不一定能代表整块组织真实的数值。因此本发明中使用外周血单核细胞检测细胞的分子标记蛋白, 证实一些消化液会对细胞表面的标记蛋白表达水平产生影响。

[0050] 首先将冻存的人外周血单核细胞 (PBMC) 复苏后用10ug/mL PHA刺激48小时使得细胞处于激活状态, 随后计数, 平均分成21管, 每管细胞数为 3×10^5 个, 分别加入前面已经配置好的5mL消化缓冲液, 阴性对照管加入5mL DMEM培养基 (购自Gibco公司, 货号11960-051), 放入37℃水浴锅 (购自上海易友公司, 型号THZ-82), 消化15分钟。不同处理组的具体信息如下:

[0051] 表2不同处理组中的消化条件

名称	消化酶	消化条件
[0052] PBMC	阴性对照	37℃, 15 分钟
	美天旎人源肿瘤分离试剂盒 (Kit)	37℃, 15 分钟
	三酶混合物	37℃, 15 分钟
	1 mg/mL 胶原酶 D	37℃, 15 分钟
	100 ug/mL 透明质酸酶	37℃, 15 分钟
	0.05 mg/mL DNA 酶 I	37℃, 15 分钟
	二酶混合物	37℃, 15 分钟

[0053] 将消化好的细胞用离心机 (购自Eppendorf公司, 型号5810R) 离心, 弃上清, 细胞用磷酸盐缓冲液PBS (购自Hyclone公司, 货号SH3002802B) 洗2次, 离心弃上清后加入配制好的抗体混合液, 4℃避光孵育30分钟。

[0054] 4℃, 300×g离心5分钟, 去上清; 200μL流式细胞染色缓冲液 (购自BD公司, 货号Pharmingen-554657) 重悬细胞, 4℃, 300×g离心5分钟, 并重复一次。

[0055] 加入100 μ L细胞固定液(购自BD公司,货号BD-554655)重悬细胞,4℃避光孵育20-30分钟。

[0056] 用200 μ L流式细胞染色缓冲液(购自BD公司,货号Pharmingen-554657)重悬细胞,4℃,300 $\times$ g离心5分钟,并重复一次,最后用流式细胞染色缓冲液(购自BD公司,货号Pharmingen-554657)重悬细胞,把悬液转移到流式管,终体积为500 μ L,上流式细胞仪(BD公司三激光管8色FACS Canto II)检测。

[0057] 与阴性对照相比,经过美天旎人源肿瘤分离试剂盒15分钟的处理,辅助T细胞(CD4+)和毒性T细胞(CD8+)中Tim-3和Lag-3蛋白的表达水平均明显下降。相似地,经过三酶混合物或胶原酶处理后,辅助T细胞(CD4+)和毒性T细胞(CD8+)中Lag-3蛋白的表达水平均明显下降。(如图1、图2、图3和表3所示)。

[0058] 相反,透明质酸酶组或DNA酶I处理组中,不同细胞表面分子标记物如PD-1、Tim-3和Lag-3的表达与阴性对照组相比没有变化或没有明显降低(如图1、图2、图3和表3所示)。这说明胶原酶和美天旎人源肿瘤分离试剂盒处理均会影响某个或某几个细胞表面分子标记物例如Tim-3、Lag-3的表达,进而不利于进一步在流式细胞仪上的检测。而不包含胶原酶的试剂,而单用透明质酸酶、DNA酶I在给定条件下并不会影响这些免疫细胞表面分子标记物的表达。这一实验验证了DNA酶I和透明质酸酶均不会影响检查点蛋白的表达水平。进一步,我们发现,1mg/mL透明质酸酶或1 μ g/mL透明质酸酶的处理结果与100 μ g/mL透明质酸酶的处理结果一致,均不会影响细胞表面分子标记物如CD8、PD-1、Tim-3和Lag-3的表达。相似地,高达20mg/mL的DNA酶I的处理结果也不会降低PD-1、Tim-3和Lag-3的表达,尽管其中CD8荧光信号明显部分降低,PD-1阳性率略有升高,但不降低其他免疫检查点的荧光信号强度;并且低于0.05 μ g/mL的DNA酶I的处理都不影响分子标记物的检测。

[0059] 为了进一步验证透明质酸酶组或DNA酶I对细胞表面分子标记物的保护作用,将DNA酶I与透明质酸酶的混合物按照上述实验方法处理人外周血单核细胞(PBMC),实验结果显示DNA酶I与透明质酸酶的混合物同样不会影响检查点蛋白的表达水平(如图4和表4所示),这一数据也有利于增加了对于酶种类的选择性,以期待能在某些肿瘤样本中,在改变蛋白表达水平的同时提高细胞得率。

[0060] 表3不同细胞表面分子标记物的阳性表达率(%)

[0061]

分组	CD4+	CD8+	PD-1+/ CD4+	PD-1+/ CD8+	Tim-3+/ CD4+	Tim-3+/ CD8+	Lag-3+/ CD4+	Lag-3+/ CD8+
阴性对照	55.80	22.80	53.30	58.40	30.80	38.20	29.90	65.00
试剂盒	49.10	27.10	59.90	62.60	7.99	11.70	2.74	13.50
三酶混合物	53.70	25.80	58.30	60.50	31.40	35.40	6.05	22.10
胶原酶D	53.50	25.20	59.30	60.60	29.70	31.40	5.98	19.80
透明质酸酶	56.10	23.60	45.70	51.80	30.20	37.80	28.70	55.90
DNA酶I	54.10	25.90	48.90	53.10	31.00	34.80	27.40	57.10

[0062] 表4二酶混合物处理后不同细胞表面分子标记物的阳性表达率(%)

[0063]

分组	CD4+	CD8+	PD-1+/ CD4+	PD-1+/ CD8+	Tim-3+/ CD4+	Tim-3+/ CD8+	Lag-3+/ CD4+	Lag-3+/ CD8+
阴性对照	33.7	25.9	59	49.4	40.6	55.2	53.2	79.9
二酶混合物	42.2	24	68.7	52.2	39.9	64.5	46.1	76.5

[0064] 实施例4人外周血单核细胞(PBMC)表面标记物CD8的检测

[0065] 用将冻存的人外周血单核细胞(PBMC)复苏后用10ug/mL PHA刺激48小时使得细胞处于激活状态,随后计数,平均分成21管,每管细胞数为 3×10^5 个,分别加入前面已经配置好的5mL消化缓冲液,阴性对照管加入5mL DMEM培养基(购自Gibco公司,货号11960-051),放入37℃水浴锅(购自上海易友公司,型号THZ-82),消化60分钟。

[0066] 其他步骤与实施例3相同,结果发现,商品化的人源肿瘤试剂盒60分钟处理后CD8的荧光强度下降,说明试剂盒处理会降低CD8的表达水平(如图5和表5所示)。

[0067] 表5试剂盒处理后细胞表面分子标记物CD4和CD8的阳性表达率(%)

[0068]

分组	CD4+	CD8+
阴性对照	55.80	22.80
试剂盒60分钟	53.70	13.90

[0069] 实施例5人源肿瘤组织处理

[0070] 将通过手术获取的临床肿瘤样本放入事先准备的MACS组织保存液中,4℃条件下

运送到上海药明康德新药开发有限公司。这些肿瘤样本将在手术后48小时之内进行相关处理。临床肿瘤组织处理前,需进行相应的样本编号,并记录下病人的病历号,肿瘤组织质地,颜色和临床信息。肿瘤组织称重。

[0071] 首先去除明显的脂肪组织,纤维组织和坏死部分,然后将获取的临床肿瘤样本在预冷的DMEM培养基中冲洗三次,用眼科剪和镊子将肿瘤组织剪成 10mm^3 左右大小的小块。

[0072] 将 $50\mu\text{L}$ 初始浓度为 10mg/mL 的透明质酸酶溶液加到 4.95mL 的DMEM培养基中(终浓度为 $100\mu\text{g/mL}$)配制成肿瘤组织消化液,然后将配制好的肿瘤组织消化液 5mL 加到美天旋组织处理专用C管(购自Militeyni公司,货号130-093-237)中,用镊子将剪碎的肿瘤组织也转移到美天旋组织处理专用C管中,拧紧盖子,轻轻摇动使组织碎块在消化液中充分散开,肿瘤组织在 10mg - 1000mg 范围内都可采用此消化体系。

[0073] 轻轻的将上述C管插到天旋组织处理器的C管插槽中,注意使肿瘤组织碎块集中在C管中的刀片区域。

[0074] 将美天旋组织处理器的程式设置为h_tumor_01,运转程式一次。h_tumor_01程式结束后将C管取下,正置,使肿瘤碎块组织全部置于管底部的消化液中,如果有必要可以拧开盖子,用镊子将粘着在顶部的碎块组织转移到底部的消化液中,将取下的C管放入 37°C 恒温水浴锅中7分钟,期间可以适当摇晃若干次。重复以上步骤一次。

[0075] 将上述C管插到美天旋组织处理器的C管插槽中,将美天旋组织处理器的程式设置为h_tumor_02,运转程式两次。取下C管,用 20mL 磷酸盐缓冲液重悬组织消化液,将 $70\mu\text{m}$ 的细胞筛网(购自falcon公司,货号352350)置于 50mL 离心管上,缓慢的将重悬的组织消化液通过 $70\mu\text{m}$ 的细胞筛网,如果有需要,可以在筛网上将细碎的组织块加以研磨以获得更多的单细胞悬液。用 20mL 至 30mL 的磷酸盐缓冲液冲洗细胞筛网,使经过筛网得到的单细胞悬液终体积为 50mL 。

[0076] $300\times\text{g}$ 离心10分钟,用移液泵吸掉上清。

[0077] 用 40mL 的磷酸盐缓冲液重悬上一步得到的单细胞, $300\times\text{g}$ 离心7分钟。

[0078] 用 0.5 - 5mL 的流式细胞染色缓冲液重悬成单细胞悬液,台盼蓝染色计数。

[0079] 实施例6不同酶处理组的细胞消化得率比较

[0080] 按照实施例5的方法将临床获得的病人肿瘤样本在相同温度时间条件下用不同消化酶消化处理后,用台盼蓝染色记录单细胞得率。每个样本计数三次,在图中以每克肿瘤获得单细胞数平均值+标准误表示。

[0081] 从图6的肿瘤样本的得率上来看,虽然细胞得率由于肿瘤种类或状态在不同样本之间有所不同,本专利中涉及到的三种酶组合与文献报导中的常用酶组合方法具有可比性,细胞得率差别不大,得到的细胞足够进一步的流式分析。

[0082] 以上,基于本发明的实施方式进行了说明,但本发明不限于此,本领域的技术人员应该明白,在本发明的主旨的范围内能够以进行变形和变更的方式实施,这样的变形和变更的方式,理应属于本发明的保护范围。

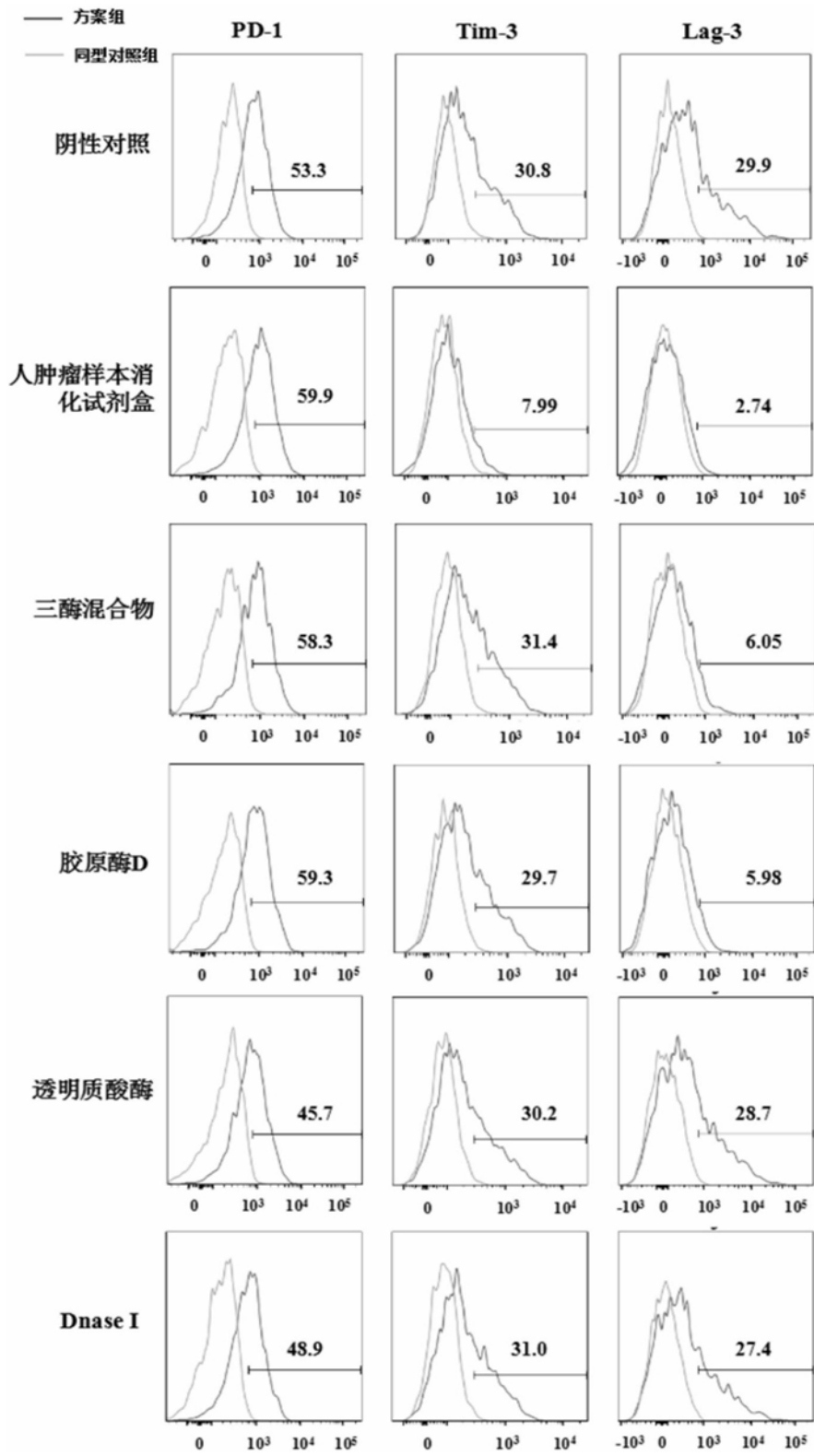


图1

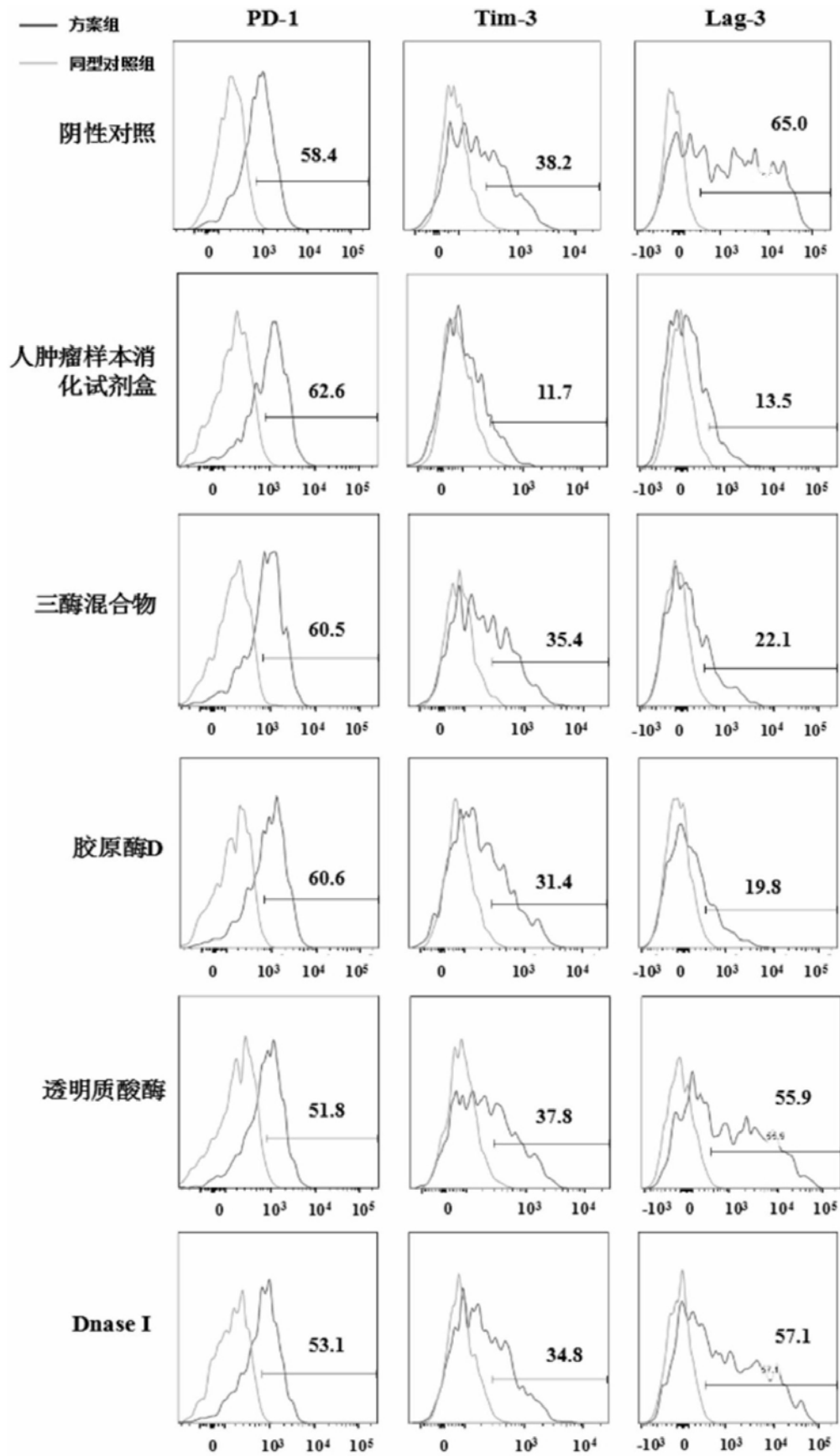


图2

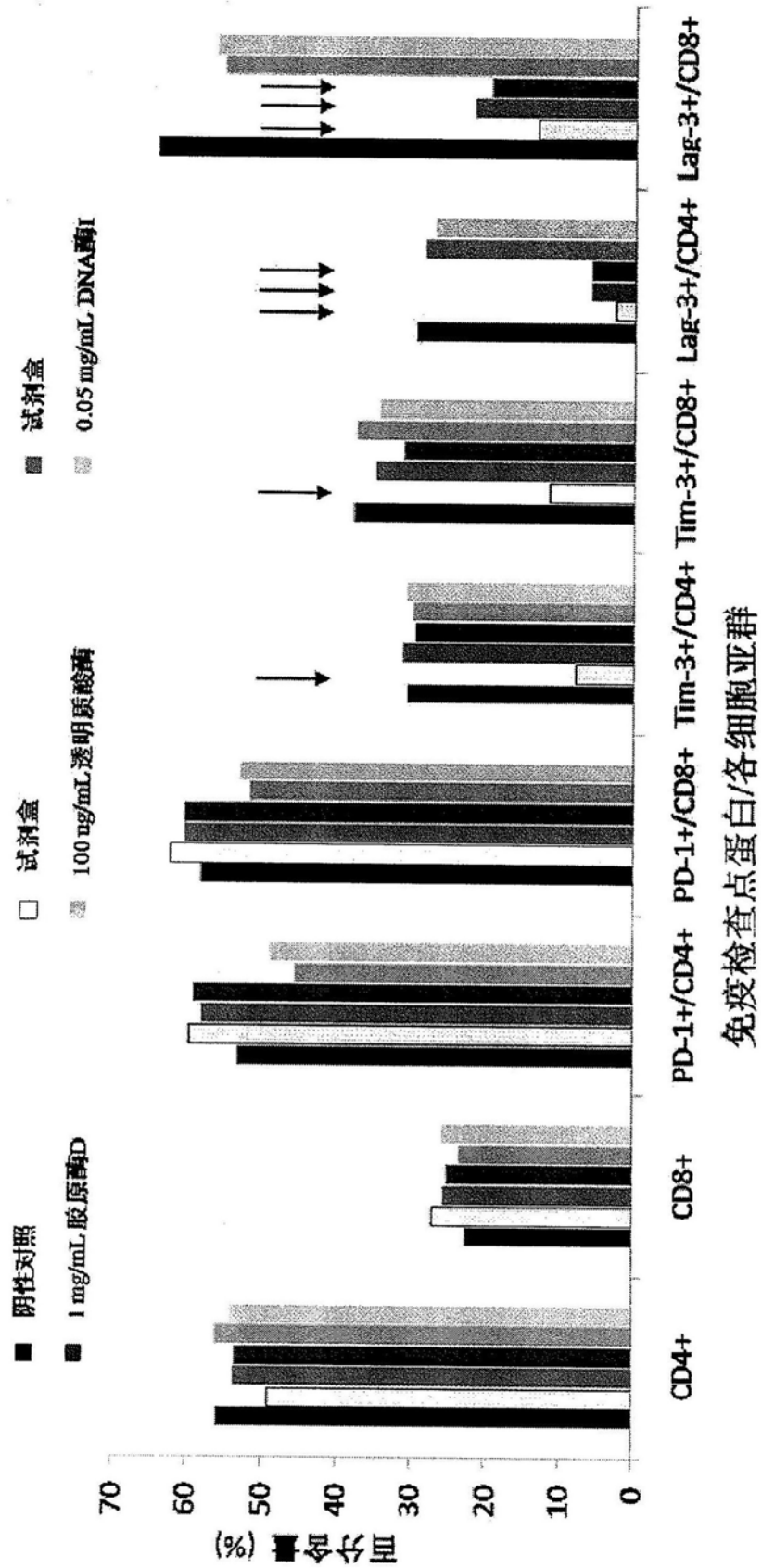


图3

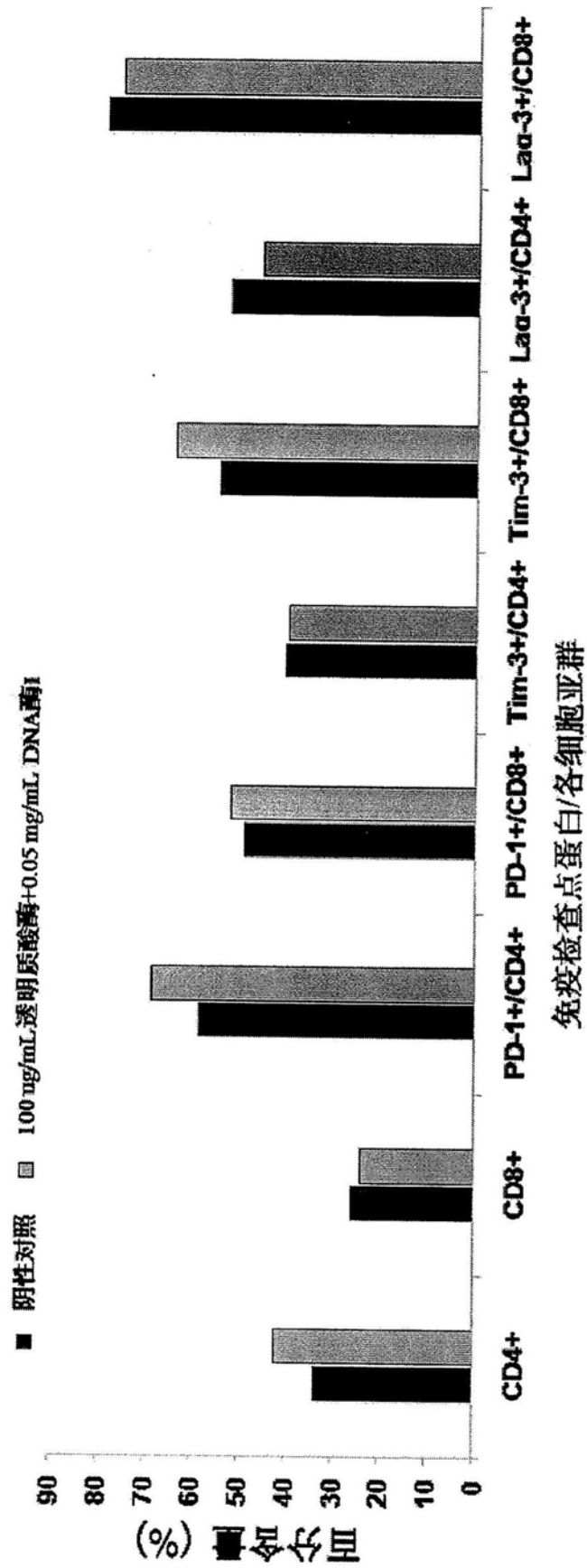


图4

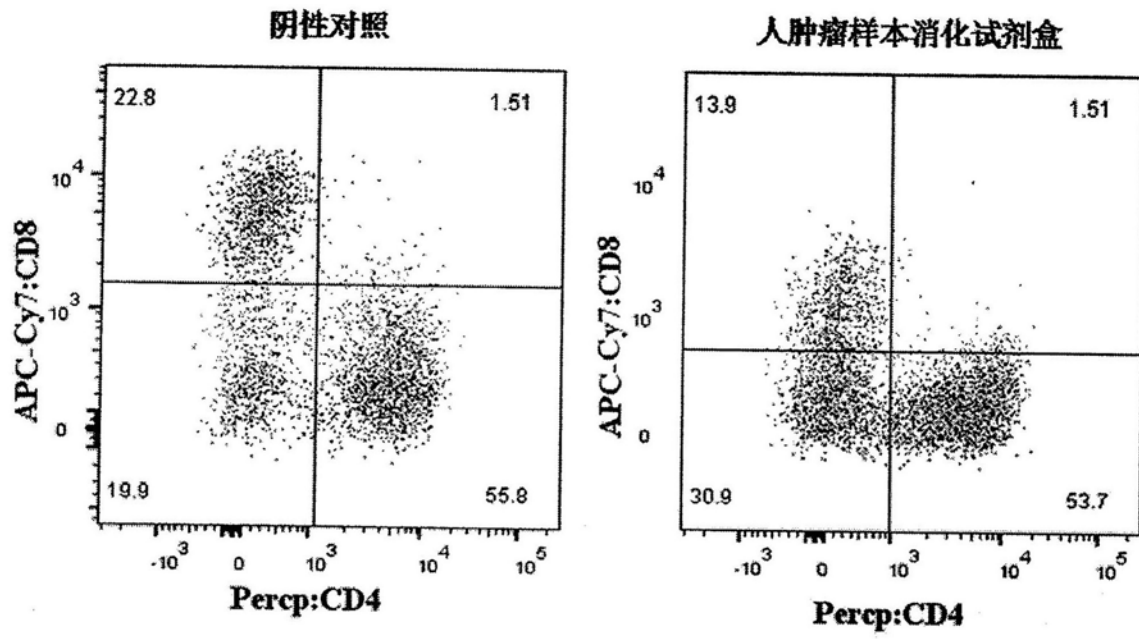


图5

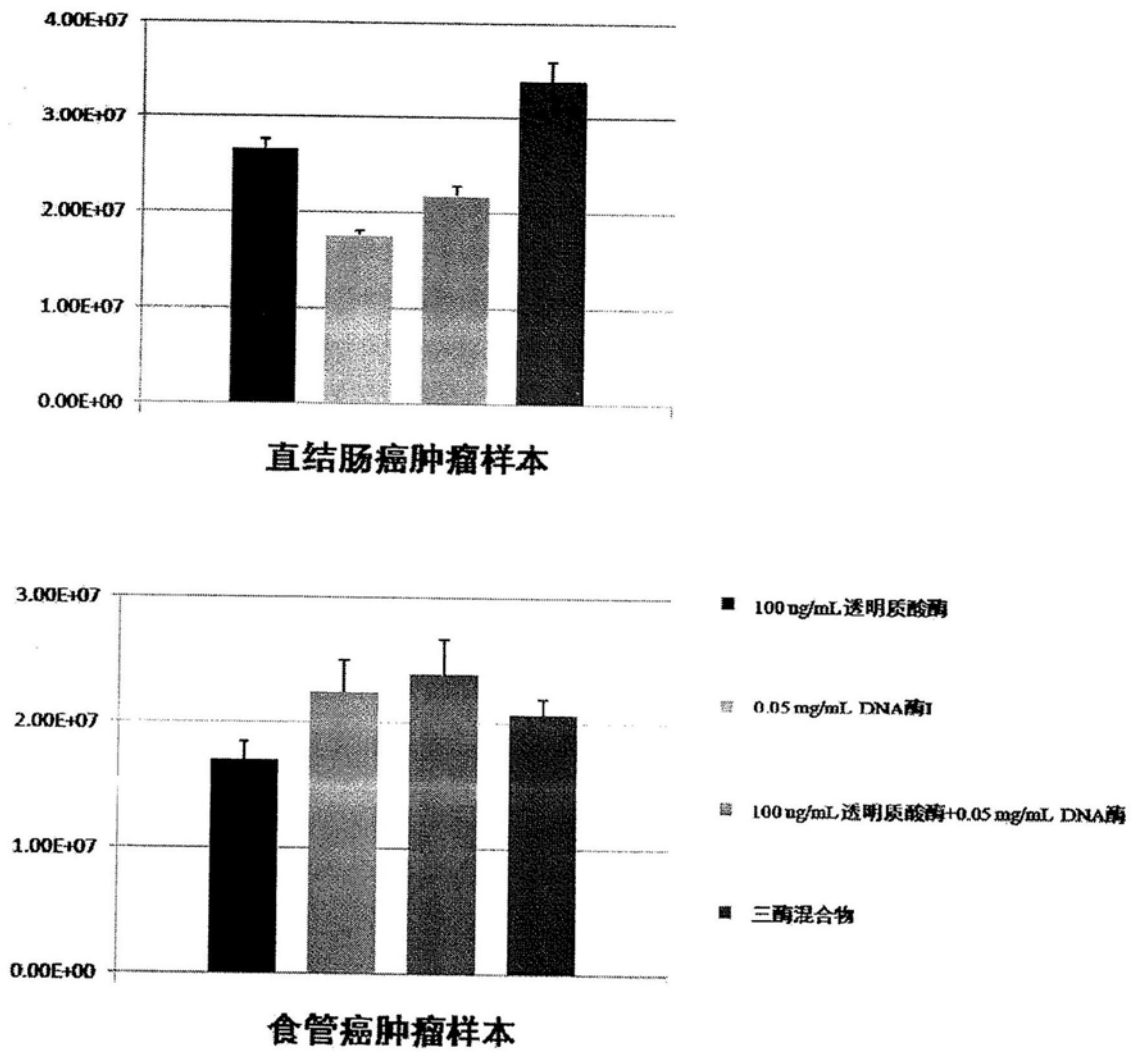


图6

专利名称(译)	一种肿瘤解离试剂在流式细胞检测中的应用		
公开(公告)号	CN105807053B	公开(公告)日	2019-04-02
申请号	CN201610235031.4	申请日	2016-04-15
[标]申请(专利权)人(译)	苏州药明康德新药开发有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州药明康德新药开发股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州药明康德新药开发股份有限公司		
[标]发明人	张宁 张祁尧 刘艳 冀群升		
发明人	张宁 张祁尧 刘艳 冀群升		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57492 G01N1/4044 G01N15/1459 G01N33/483 G01N33/56966 G01N33/57484 G01N2015/1006 G01N15/00 G01N15/14 G01N33/48 G01N33/574		
代理人(译)	吴立		
审查员(译)	赵晓明		
其他公开文献	CN105807053A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种肿瘤组织解离试剂，所述解离试剂成分不包含胶原酶和胰酶，但其成分还包含透明质酸酶或透明质酸酶和DNA酶I二者的混合物。本发明还公开了采用上述解离试剂分散肿瘤组织并用于流式细胞检测细胞表面分子标记物的表达程度。本发明的解离试剂不会造成细胞表面分子标记物如CD8、PD-1、Tim-3、Lag-3等的降解，从而不影响下游实验检测。

