



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106198984 A

(43)申请公布日 2016. 12. 07

(21)申请号 201610705258.0

(22)申请日 2016.08.22

(71)申请人 上海立闻生物科技有限公司

地址 200082 上海市虹口区飞虹路360弄9
号3602C室

(72)发明人 闻丹忆

(74)专利代理机构 上海专尚知识产权代理事务
所(普通合伙) 31305

代理人 张雪勇 张政权

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

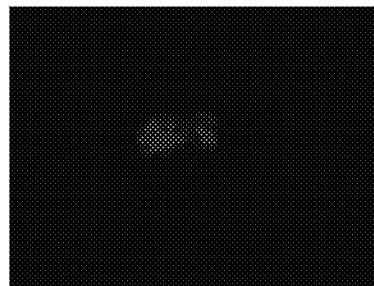
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞
PDL1基因的检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法,其步骤如下:步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测,以确定PDL1表达情况。如果在步骤c中检测到PDL1单色阳性细胞,进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。



(红色)

1. 一种非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法,其特征在于,检测方法如下:

步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;

步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;

步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测,以确定PDL1表达情况。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,在步骤c中,使用免疫荧光双标方法对所述滤膜进行原位检测。

3. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,如果在步骤c中检测到PDL1单色阳性细胞,进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。

4. 如权利要求2所述的方法,其特征在于,所述免疫荧光双标方法包括以下步骤:

通透:向所述滤膜滴加200 μ l含0.2%-1%Tween20或Triton的通透液通透30分钟;

封闭:用PBS漂洗3次,每次5分钟,之后加入200 μ l含3%BSA的PBS,封闭30min;

一抗孵育:加入PDL1、CD45一抗混悬液200 μ l,两种一抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:500,在室温下孵育40min;

二抗孵育:将经过一抗孵育后的滤膜,用PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入二抗混悬液200 μ l,两种二抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:1000,在室温下避光孵育30min,且两种二抗中,一种抗体带有红色荧光标记,一种抗体带有绿色荧光标记;

细胞核染色及封片:用PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入DAPI50 μ l,染细胞核5min。

5. 如权利要求3所述的方法,其特征在于,所述HE染色包括如下步骤:

清洗:冲洗所述滤膜,以去掉荧光染料;

苏木精染色:用苏木精液染色约5分钟后清洗掉染液;

分化:用1%盐酸乙醇分化液分化处理3-5秒;

伊红染色:用0.5%伊红液染色1-2分钟;

脱水:用80%乙醇冲洗3-5秒,95%乙醇洗3-5分钟,无水乙醇洗1分钟。

6. 如权利要求1或2所述的方法,其特征在于,所述的利用膜过滤装置包括废液缸(1)、滤器架(2)、滤器(3),所述滤器(3)放置在滤器架(2)的孔上,所述滤器架(2)放置于废液缸(1)中。

7. 一种滤膜在制备原位检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1的膜过滤装置或试剂盒中的用途,其中,所述滤膜是透明的,所述滤膜为疏水材料制成,且其滤孔直径为8-10微米。

8. 如权利要求7所述的用途,其特征在于,所述检测的方法如下:

步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本用所述滤膜进行过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;

步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;

步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测,以确定PDL1表达情况。

9. 如权利要求8所述的用途,其特征在于,在步骤c中,使用免疫荧光双标方法对所述滤膜进行原位检测。

10. 如权利要求8或9所述的用途,其特征在于,其特征在于,如果在步骤c中检测到PDL1

单色阳性细胞,进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。

非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测外周血循环肿瘤细胞新靶标蛋白的方法,尤其涉及一种检测非小细胞肺癌患者外周血肿瘤细胞PDL1基因的方法。

背景技术

[0002] 细胞程序式死亡配体1(Programmed cell death 1 ligand 1,PDL1),也称为表面抗原分化簇274(cluster of differentiation 274,CD274)或B7同源体(B7 homolog 1, B7-H1),是人类体内的一种蛋白质,由CD274基因编码。非小细胞肺癌通过表达PDL1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。研究显示PDL1/PD1在非小细胞肺癌组织中的表达水平与患者的临床病理因素及预后存在显著的相关性。PDL1/PD1抑制剂在非小细胞非小细胞肺癌患者的治疗中都表现出了令人惊喜的疗效及良好的耐受性,也提示了免疫治疗可以作为一种安全而有效的治疗方式。以PDL1/PD1为代表的免疫治疗成为非小细胞肺癌的治疗领域的新焦点。

[0003] 目前通常使用免疫组织化学方法,检测非小细胞肺癌组织标本中的PDL1蛋白表达情况。该方法被认为是PDL1检测的金标准,但对于部分缺乏手术指证或存在手术禁忌症的非小细胞肺癌患者,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,PDL1状态评估变得困难。另外,对于非小细胞肺癌转移、复发早期的患者,由于无法获得肿瘤组织样本,更加无法判断PDL1状态。

[0004] 循环肿瘤细胞(Circulating tumor cell,CTC)是从实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞,它存在于非小细胞肺癌、肝癌、胃癌、结直肠癌、乳腺癌等多种恶性肿瘤中,其检测对于评估肿瘤患者的预后判断、疗效评估、复发转移监测,以及选择合适的个体化治疗具有重要的临床意义。因CTC检测具有实时、基本无创等特点,被称为“无创液态活检”。

[0005] CTCs检测过程一般分为分离和检测两个步骤。CTCs分离的主要方法包括依赖于肿瘤细胞相关标志物的免疫学分离技术、依赖于免疫细胞相关标志物的免疫学分离技术及基于形态学富集的膜过滤技术(Isolating by size of epithelial tumor cells,ISET)。第一种方法是通过包被肿瘤细胞表面抗原的特异性抗体EpCAM、CK等的磁珠,借助外加磁场筛选富集CTCs,又称阳性富集法。比如申请号为201310219229.X的中国专利公开了一种利用树状分子与特异性物质共价偶联并进一步修饰后捕获循环肿瘤细胞的分离方法。但是,该技术由于抗原表达的缺失及特异性问题,会造成假阴性结果。

[0006] 第二种及第三种方法,是通过去除非肿瘤细胞成分的方法达到CTCs富集的目的,又称阴性富集法。第二种方法是通过裂解红细胞后,利用包被免疫细胞表面抗原的特异性抗体的磁珠,去除大部分的免疫细胞,从而留下CTCs及少量免疫细胞,从而达到富集CTCs的目的。例如申请号为201310200385.1的中国专利公开了一种裂解去除红细胞并且利用免疫微珠去除白细胞等的循环肿瘤细胞的富集方法。

[0007] 第三种方法是根据细胞大小的差异,利用过滤的方法将体积较大的肿瘤细胞筛选

富集。第二种和第三种方法的优势在于不会导致CTCs的丢失,方法简单、价格低廉,分离获得的CTCs具有活性可用于后续研究;但由于混杂有免疫细胞等非CTCs,无法直接准确判断CTCs的数量及种类。必须通过其它检测手段才能准确检测CTCs。一般来说,需要先用石蜡包埋,然后做成石蜡切片后再进行染色鉴定。整个检测过程非常复杂困难。使得成本上升。

发明内容

[0008] 为了克服上述提到的技术问题,以及为了克服传统的循环肿瘤细胞检测手段及对于缺乏手术指证或存在手术禁忌症的非小细胞肺癌患者,及非小细胞肺癌转移、复发早期的患者,由于无法获得肿瘤组织样本而无法判断PDL1状态的不足,本发明提供了一种非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法,其特征在于,检测方法如下:步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测,以确定PDL1表达情况。常规PDL1检测,是通过将病人肿瘤病理组织样本进行检测,而对于无法取得肿瘤病理组织样本的病人的PDL1表达情况无法检测。本发明通过对病人的循环肿瘤细胞进行分离和检测,从而实现了病人的PDL1表达情况进行评估,解决了原本因无法取得肿瘤病理组织样本而不能对病人PDL1进行检测的问题,使无论能否通过手术等手段取得肿瘤病理组织的所有病人受益。在本发明中,对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤分离以获取外周血循环肿瘤细胞以后;用同一张滤膜原位利用细胞免疫荧光双标方法检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞的PDL1和CD45表达情况。膜原位免疫荧光检测PDL1相对于常规检测,不需要将循环肿瘤细胞从滤膜上分离,也无需进行常规病理组织免疫荧光检测方法中包埋、脱蜡、蛋白修复等过程,避免了以上过程中对靶蛋白的损伤,使结果更加准确,不必使用二甲苯等有机溶剂,降低环境污染,同时减少了步骤,使操作更加简单、方便,并降低检测成本。

[0009] 优选地,在步骤c之后,进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。所述HE染色鉴定循环肿瘤细胞也是在所述滤膜原位进行的。在免疫荧光检测PDL1之后,接着在滤膜原位用HE染色鉴定检测循环肿瘤细胞,确定非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞及其数量。这相比常规的循环肿瘤细胞检测中,通过循环肿瘤细胞中的肿瘤标准物来确认肿瘤细胞,减少了漏检的风险,更加准确;同时,也减少了常规石蜡切片等一系列复杂的步骤,大大优化了检测。

[0010] 优选地,在利用细胞免疫荧光双标技术检测外周血循环肿瘤细胞的PDL1为单阳性表达的情况下,用HE染色的方法对样本进行细胞病理学分析,减少了常规通过肿瘤标志物来确定循环肿瘤细胞导致漏检的风险,更加准确。

[0011] 优选地,在膜过滤之前对非小细胞肺癌患者的外周血进行预处理:将采集的外周血样用生理盐水进行2-10倍稀释,稀释后用0.1%-2%多聚甲醛固定外周血样10-15分钟。这样可以使得过滤效果更佳。

[0012] 优选地,在过滤步骤中,将预处理后的外周血样加入到膜过滤装置的滤器仓后,使其依靠重力自然过滤。

[0013] 优选地,过滤结束后,在滤器仓内加生理盐水冲2-3次,外周血循环肿瘤细胞被截留在滤膜上。

[0014] 优选地,滤膜取出后,将滤膜细胞面朝上置于干净的新载玻片上,用中性树脂固定膜于载玻片上;并将滤膜浸泡在4%多聚甲醛中,室温静置固定25min。

[0015] 根据本发明的实施例,利用细胞免疫荧光双标方法检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞的PDL1和CD45表达情况的具体步骤如下:

[0016] 1)用免疫组化笔圈出样品区域;

[0017] 2)通透:向样本区域内滴加200 μ l含0.2%-1%Tween20或Triton的通透液通透30分钟;

[0018] 3)封闭:PBS漂洗3次,每次5分钟,之后加入200 μ l含3%BSA的PBS,封闭30min;

[0019] 4)一抗孵育:加入PDL1、CD45一抗混悬液200 μ l,两种一抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:500,室温下孵育40min;

[0020] 5)二抗孵育:PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入二抗混悬液200 μ l,两种二抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:1000,室温下避光孵育30min,两种二抗分别带有红色荧光和绿色荧光标记;

[0021] 6)细胞核染色及封片:PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入DAPI50 μ l,染细胞核5min,盖玻片封片;

[0022] 7)荧光显微镜下2h内观察结果,拍照、记录PDL1、CD45情况,确定是否存在PDL1单色阳性细胞;

[0023] 根据本发明的实施例,在利用细胞免疫荧光双标方法检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞的PDL1为单阳性表达的情况下,用HE染色的方法对样本进行细胞病理学分析,具体步骤如下:

[0024] 1)用自来水浸泡、冲洗去盖玻片及荧光染料;

[0025] 2)苏木精液染色约5分钟,自来水清洗染液;

[0026] 3)分化:1%盐酸乙醇分化液分化处理3-5秒,自来水洗;

[0027] 4)伊红染色:0.5%伊红液染色1-2分钟,自来水洗;

[0028] 5)脱水:80%乙醇冲洗3-5秒,95%乙醇洗3-5分钟,无水乙醇洗1分钟;

[0029] 6)封片:加30 μ l中性树脂胶,盖玻片封片;

[0030] 7)拍照采集照片,可供细胞病理学专家阅片。

[0031] 本发明的另一个方面还提供了一种膜过滤装置,其包括:废液缸、滤器架、滤器,所述滤器放置在滤器架的孔上,所述滤器架放置于废液缸中。

[0032] 优选地,所述滤器包括滤器仓、滤膜、滤膜支撑物、滤器下口,所述滤膜置于滤膜支撑物上,所述滤器仓下部连接滤膜,所述滤器下口上部连接滤膜支撑物。

[0033] 优选地,滤膜为透明的滤膜。更优选地,疏水材料制成,且其滤孔的直径为8-10微米。

[0034] 本发明另一方面提供了一种检测非小细胞肺癌细胞中PDL1蛋白的方法,所述方法通过检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因来确定,所述检测步骤包括:步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;步骤c:对步骤b获得的滤膜进行检测,以确定外周血循环肿瘤细胞的PDL1和CD45表达情况;步骤d:HE染色鉴定循环肿瘤细胞。

[0035] 本发明还提供了一种检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的试

剂盒,其包括膜过滤装置、用于免疫荧光双标方法的一抗混悬液和二抗混悬液、以及用于HE染色的苏木精和伊红。还可以进一步包括:4%多聚甲醛、2%多聚甲醛、含0.5%Tween20的通透液、PBS、80%乙醇、95%乙醇、1%盐酸乙醇、无水乙醇、0.5%伊红液、中的一种或多种。

[0036] 本发明还提供了一种滤膜在制备原位检测非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1的膜过滤装置或试剂盒中的用途,其中,所述滤膜是透明的,所述滤膜为疏水材料制成,且其滤孔直径为8-10微米。优选地,检测的方法如下:步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本用所述滤膜进行过滤,以获得外周血循环肿瘤细胞;步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定;步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测,以确定PDL1表达情况。更优选地,在步骤c中,使用免疫荧光双标方法对所述滤膜进行原位检测。尤其优选地,如果在步骤c中检测到PDL1单色阳性细胞,进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。

[0037] 有益效果:本发明借助1SET技术原理分离富集CTCs,通过免疫荧光双标排除PDL1阳性的CD45阳性白细胞的干扰,再对PDL1单阳性细胞并进行HE染色病理分析,绕道满足了临床PDL1检测金标准的要求,对于非小细胞肺癌患者医学诊断具有很好的临床推广价值。

[0038] 更重要的是,本发明实现了在同一张膜上原位进行PDL1和病理检测,极大地降低了检测手续和成本提高了检测效率。本发明提供的非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法,该方法不依赖于是否获得肿瘤组织样本,同时,能够在同一张膜片上,利用细胞免疫荧光双标方法和HE病理染色技术鉴定非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞及循环肿瘤细胞中PDL1的表达情况,本发明中同时检测PDL1和CD45主要是为了排除白细胞的干扰,因为PDL1也会在白细胞膜上表达。而DAPI的用途是标记细胞的细胞核,一般呈蓝色。免疫荧光双标后PDL1单阳性表达说明符合PDL1检测金标准的要求,再结合HE细胞病理学分析更加能明确癌细胞的状态,对于医学诊断具有很好的临床推广价值。

[0039] 传统地,循环肿瘤细胞的检测一般是通过病理染色形状等确认细胞数量;或者通过细胞表面标志物确定细胞数量。本发明方法,直接检测非小细胞肺癌循环肿瘤细胞上的PDL1。大大提高了检测效率,降低了检测成本。

[0040] 本发明的基因检测方法不属于诊断或者治疗方法。

附图说明

[0041] 图1为本发明的膜过滤装置结构示意图;

[0042] 图2为本发明膜过滤装置的滤器的结构示意剖视图;

[0043] 图3为本发明膜过滤装置的滤器滤膜的结构示意图;

[0044] 图4为非小细胞肺癌患者外周血分离获取的循环肿瘤细胞PDL1免疫荧光图;

[0045] 图5为非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞HE染色图像。

[0046] 附图标记说明:

[0047] 1 废液缸;

[0048] 2 滤器架

[0049] 3 滤器;

[0050] 4 滤器仓;

[0051] 5 滤膜;

[0052] 6 滤膜支撑物;

[0053] 7 滤器下口；

[0054] 8 滤孔。

具体实施方式

[0055] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0056] 本发明中,术语HE染色苏木精—伊红染色法(hematoxylin-eosin staining),是石蜡切片技术里常用的染色法。苏木精染液为碱性,主要使细胞核内的染色质与胞质内的核糖体着紫蓝色;伊红为酸性染料,主要使细胞质和细胞外基质中的成分着红色。

[0057] 一、利用膜过滤装置分离获取非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞:

[0058] 非小细胞肺癌患者血液样本的获取:

[0059] 采集5例已经确诊为非小细胞肺癌患者的外周血,每例采集外周血5ml。同时抽取5例正常人血液样本5ml做阴性对照。

[0060] 外周血液样本预处理:

[0061] 将按照上面步骤采集到的外周血样用生理盐水进行10倍稀释,稀释后用2%多聚甲醛固定外周血样15分钟;

[0062] 过滤装置的准备:

[0063] 过滤装置的各个部件都是市售的,在预处理的间期,如图1、2、3所示组装膜过滤分离肿瘤细胞(1SET)装置。用10ml生理盐水润洗滤器。

[0064] 分离富集外周血循环肿瘤细胞:

[0065] 将经过预处理的外周血样加入到膜过滤装置的滤器仓中,使其依靠重力自然过滤;过滤结束后,生理盐水冲洗滤器仓及滤膜2-3次,外周血循环肿瘤细胞被截留在滤膜上;

[0066] 取膜及固定:

[0067] 取出滤膜,将滤膜正面朝上置于干净的新载玻片上,用中性树脂固定膜于载玻片上,将滤膜浸泡在4%多聚甲醛中,室温静置固定25min。

[0068] 二、利用细胞免疫荧光技术及HE病理染色技术鉴定非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞:

[0069] (一)免疫荧光技术检测PDL1表达情况:

[0070] 1、用免疫组化笔圈出样品区域;

[0071] 2、通透:向样本区域内滴加200 μ l含0.5%Tween20的通透液通透30分钟;

[0072] 3、封闭:PBS漂洗3次,每次5分钟,之后加入200 μ l含3%BSA的PBS,封闭30min;

[0073] 4、一抗孵育:加入PDL1、CD45一抗混悬液200 μ l,两种一抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:500,室温下孵育40min;

[0074] 5、二抗孵育:PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入二抗混悬液200 μ l,两种二抗均以PBS稀释,混匀后的终浓度为1:1000,室温下避光孵育30min,两种二抗分别带有红色荧光和绿色荧光标记;其中,二抗是抗鼠Ig抗体、抗兔Ig抗体,并且抗体上带有荧光标记。

[0075] 6、细胞核染色及封片:PBS洗涤3次,每次5分钟,之后加入DAPI50 μ l,染细胞核5min,盖玻片封片;

[0076] 7、荧光显微镜下2h内观察结果,拍照、记录PDL1、CD45情况,确定是否存在PDL1单色阳性细胞;如观察到PDL1单色阳性细胞则继续进行下一步检测,否则停止检测。

[0077] (二)HE染色鉴定循环肿瘤细胞:

[0078] 1、用自来水浸泡、冲洗去盖玻片及荧光染料;

[0079] 2、苏木精液染色约5分钟,自来水清洗染液;

[0080] 3、分化:1%盐酸乙醇分化液分化处理3-5秒,自来水洗;

[0081] 4、伊红染色:0.5%伊红液染色1-2分钟,自来水洗;

[0082] 5、脱水:80%乙醇冲洗3-5秒,95%乙醇洗3-5分钟,无水乙醇洗1分钟;

[0083] 6、封片:加30u1中性树脂胶,盖玻片封片;

[0084] 7、采集照片,细胞病理学专家阅片。

[0085] 检测结果分析:

[0086] 5例健康志愿者均未查到循环肿瘤细胞;在5例非小细胞肺癌患者外周血检测到的CTC,5例经免疫荧光检测到其有PDL1表达,阳性率为100%(表1)。

[0087] 图4所示为非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1免疫荧光图像,细胞膜显示明亮的红色荧光。

[0088] 图5所示为非小细胞肺癌患者外周血分离获取的循环肿瘤细胞HE染色图,其细胞核较大,细胞核形状不规则;高核质比。

[0089] 表1实施例检测结果(PDL1)

[0090]

序号	样本来源	检测结果 (CTC/CTM)	检测结果 (CTC中的PDL1 表达)
1	正常人	0	-
2	正常人	0	-
3	正常人	0	-
4	正常人	0	-
5	正常人	0	-
6	非小细胞肺癌患者	+	+
7	非小细胞肺癌患者	+	+
8	非小细胞肺癌患者	+	+
9	非小细胞肺癌患者	+	+
10	非小细胞肺癌患者	+	+

[0091] 上述实施例仅仅是通过举例的方式描述。在不偏离本发明所附权利要求限定的保护范围的情况下,可有各种变体。

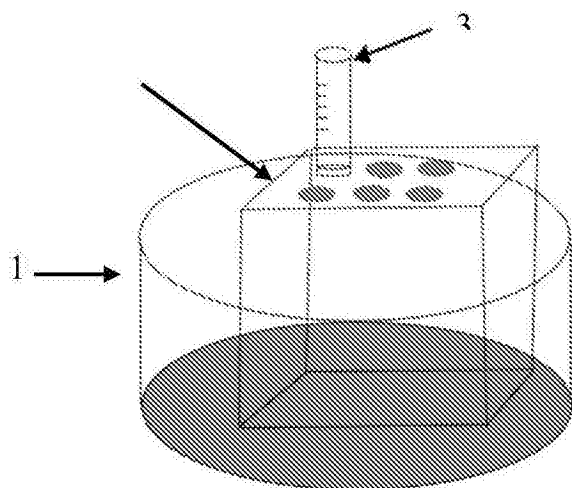


图1

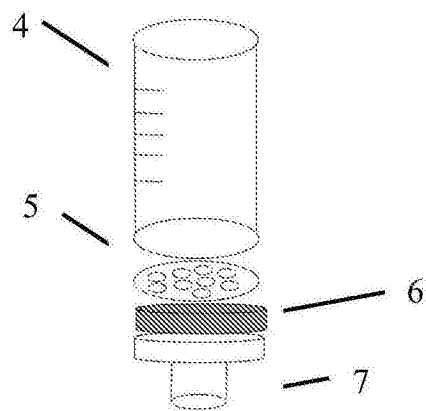


图2

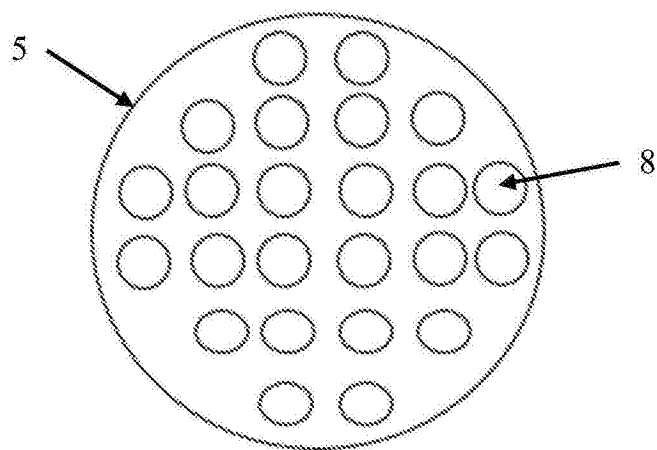
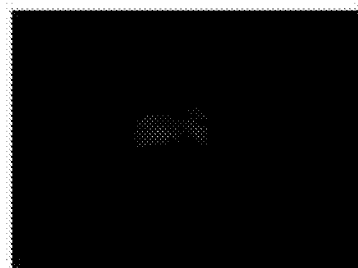
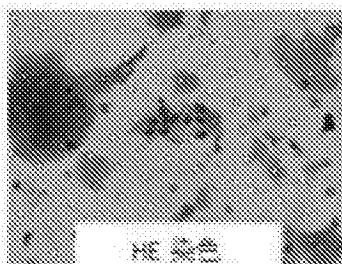


图3



(红色)

图4



HE 染色

图5

专利名称(译)	非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法		
公开(公告)号	CN106198984A	公开(公告)日	2016-12-07
申请号	CN201610705258.0	申请日	2016-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	上海立闻生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海立闻生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海立闻生物科技有限公司		
[标]发明人	闻丹忆		
发明人	闻丹忆		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57496		
代理人(译)	张政权		
其他公开文献	CN106198984B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种非小细胞肺癌患者外周血循环肿瘤细胞PDL1基因的检测方法，其步骤如下：步骤a:对来自于非小细胞肺癌患者的外周血标本进行膜过滤，以获得外周血循环肿瘤细胞；步骤b:对步骤a获得的滤膜进行固定；步骤c:对步骤b获得的滤膜进行原位检测，以确定PDL1表达情况。如果在步骤c中检测到PDL1单色阳性细胞，进一步对所述滤膜用HE染色鉴定循环肿瘤细胞。



(红色)