



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104316683 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 28

(21) 申请号 201410538494. 9

(22) 申请日 2014. 10. 14

(71) 申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府
大道 999 号

(72) 发明人 许恒毅 傅芬 聂丽菊 叶称连
张婉怡 李福来

(74) 专利代理机构 南昌新天下专利商标代理有
限公司 36115

代理人 施秀瑾

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

权利要求书1页 说明书8页 附图2页

(54) 发明名称

针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒

(57) 摘要

本发明提供了针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒。所述试剂盒主要包含能够特异性识别卵巢癌细胞人附睾蛋白(HE4)抗原的 HE4 山羊多克隆抗体及生物素化的牛血清蛋白(BSA)-叶酸(FA), 链霉亲和素化的纳米磁珠(SA-IO)、链霉亲和素化的 QDs(SA-QDs)、生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG 以及连接试剂等。所述试剂盒可利用免疫磁珠的可富集特性高效分离卵巢癌患者全血中的癌细胞, 并通过 SA-QDs 与生物素化的 HE4 抗原抗体复合物特异性结合靶向卵巢癌细胞, 实现多重信号协同放大。该试剂具有较强的灵敏性和特异性, 在卵巢癌的早期检测中具有极广阔的应用前景。

1. 针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒,其特征在于:所述试剂盒包括 1) HE4 山羊多克隆抗体;2)生物素化的 BSA-FA;3)链霉亲和素化的纳米磁珠 SA-IO;4)链霉亲和素化的 QDs 即 SA-QDs;5)生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG;所述的 SA-QDs,其制备方法如下:1)100 μ L 8 μ mol/L QDs 溶于 100 μ L pH 为 5.5 的 BB,按照 QD:EDC 摩尔比 1:1 000,QD:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min;2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 1.056 mg,持续混匀 2 h 后,加入 10 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)SA-QDs 复合物 10 000 r/min,离心 5 min 除去沉淀后,使用 2 mL pH 为 7 的 BB 在 100K 超滤管中洗涤,最后重悬于 0.1 mL pH 为 7 的 BB 中。

2. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的纳米磁珠是 Fe_2O_3 及 Fe_3O_4 复合物纳米磁珠,粒径为 25nm,磁珠表面为羧基功能化。

3. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的生物素化 BSA-FA,其制备方法如下:1)FA-PEG-NH₂ 的偶联:FA 6 mg 溶解于 600 μ L 二甲基亚砜中,加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)3 mg、N,N'-羟基琥珀酰亚胺(NHSS)3 mg 及三乙胺 60 μ L 共同暗室反应 4 h,加入双氨基聚乙二醇 30 mg 暗室反应过夜;反应完全后离心,使用 -20℃丙酮沉淀,乙酸乙酯洗涤 3 次,置于通风柜中干燥并避光保存;2)FA-PEG-BSA 的偶联:FA-PEG-NH₂ 5 mg、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)2.5 mg、NHSS 2.5 mg 溶于 500 μ L pH 为 7 的硼酸缓冲液(BB)中共同室温反应 10 min;加入 BSA 8.35 mg,室温反应 2 h,透析纯化 3 次后于 4℃冰箱保存;3)生物素化 BSA-FA 的制备:按长链生物素:FA-PEG-BSA 摩尔比 20:1 混合后室温孵育 30 min,将混合溶液于 4℃超纯水透析 3 d,4℃保存备用。

4. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG,其制备方法如下:1)取生物素 15 mg、EDC 2.4mg、NHSS 3.6mg 溶解于 2 mL 0.02 M pH 为 6.5 磷酸盐缓冲液(PBS)中;2)加入抗 HE4 兔抗羊 IgG 5.3 mg,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;3)上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d,-20℃储存。

5. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述 SA-IO 通过 SA 与 IO 经由共价键偶联制备;其制备方法如下:1)400 μ L 5mg/mL IO 溶于 400 μ L pH 为 5.5 的 BB,按照 IO:EDC 摩尔比 1:1 000,IO:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min;2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 0.08 mg,持续混匀 2 h 后,加入 20 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)加入适量 pH 为 7 的 BB 混匀,于 1.0 特斯拉磁分离器中分离纯化 IO-SA 10~24 h,重复 2 次后重悬于 1 mL pH 为 7 的 BB 中,新制磁珠浓度为 2 mg/mL。

6. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述试剂盒还包括固定液、渗透液、封闭液,洗涤液。

7. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的检测样品为全血。

8. 根据权利要求 1 所述的试剂盒,其特征在于:所述的 QDs 为 CdSSe/ZnS,发射波长为 550nm。

针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术与生物医学领域。具体地,本发明提供了一种检测卵巢癌的试剂盒。

背景技术

[0002] 卵巢癌是妇科常见恶性肿瘤,其发病率位于女性生殖系统肿瘤中第三位,病死率却居于首位。大多数卵巢癌被确诊时已是晚期,其 5 年生存率仅为 30%,早期诊断和治疗卵巢癌是改善患者预后,提高其生存率的重要因素。目前,临床上卵巢癌常见的筛选方法有 2 种:1)经阴道超声检查;2)血清 CA125 检测。二者都存在其局限性。研究表明,肿瘤患者外周血中循环肿瘤细胞(CTCs)的出现早于可见实体瘤,因此,寻找一种高特异性富集人体外周血中 CTCs 的方法是目前研究的热点。

[0003] 免疫磁分离技术是 CTCs 快速分离富集技术的重要组成部分之一,该技术涉及的免疫磁珠既可以结合活性蛋白质或配体又可以被磁铁吸引,经过一些处理,抗体或配体与磁珠结合后,可特异性地与靶抗原结合形成磁珠-抗体(配体)-抗原复合物,然后在外加磁场的作用下将含有靶抗原的目的细胞与其他细胞分离,从而达到分离纯化目的细胞的作用。该技术已广泛应用于各种肿瘤的诊断、治疗及预后研究,但在卵巢癌早期检测中却鲜少研究。由于叶酸受体(FR)在大多数正常组织中表达水平极低,而在卵巢癌细胞表面表达高为 95%,FA 与 FR 的结合亲和力为 0.19 nM,因此,本发明将 FA 连接到 Fe_2O_3 及 Fe_3O_4 复合纳米晶体表面,使磁珠具有靶向识别和磁性分离双重功能,从而实现卵巢癌细胞的富集,有效提高检测灵敏度实现早期检测卵巢癌。

[0004] 人附睾蛋白 4 (HE4) 是一种乳清酸性 4-二硫化中心(WFDC)蛋白,此蛋白大概为 20~25Kd。HE4 在卵巢癌细胞质内表达量高为 93%。一项对卵巢癌相关的大量生物标志物的评价研究表明 HE4 检测在早期诊断卵巢癌中具有最高的灵敏度,其敏感度是 82.7% 而 CA125 却仅有 45.9%。因此,HE4 作为一种新的肿瘤标志物,能够帮助进行卵巢癌的早期检测及风险评估。

[0005] 量子点(QDs)作为一种新型荧光纳米晶,具有一些独特的荧光性能,如量子产率高、光化学稳定性高好,不易光解等。目前将 QDs 与抗体结合制备荧光免疫探针的报道很多,但是 QDs 免疫荧光探针在对非常微量的物质进行检测时仍存在信号低、检测灵敏度低等问题。生物素-亲和素系统是一种新型信号放大标记技术,利用亲和素修饰 QDs 后, QDs 可以很容易的与生物素化的抗体结合,有效放大其荧光信号,从而实现超灵敏性卵巢癌细胞检测。

发明内容

[0006] 本发明所要解决的关键技术问题在于针对目前尚无的全血中卵巢癌细胞快速检测试剂盒提供一种基于磁性分离和 QDs 免疫荧光标记检测卵巢癌细胞的试剂盒。利用免疫磁珠的可富集特性和 QDs 荧光信号强度变化,组建多重信号协同放大,具有超高灵敏度的

全血中快速检测卵巢癌细胞的试剂盒。该试剂盒可以提高卵巢癌检测的分辨率、灵敏度及特异性,更为有效进行卵巢癌的早期检测及风险评估。

[0007] 本发明公开的针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒包括:HE4 山羊多克隆抗体,生物素化的牛血清蛋白(BSA)-叶酸(FA),链霉亲和素化的纳米磁珠(SA-IO),链霉亲和素化的 QDs (SA-QDs),生物素化兔抗羊(HE4) IgG。

[0008] 所述的纳米磁珠是 Fe_2O_3 及 Fe_3O_4 复合物纳米磁珠,粒径为 25nm,表面羧基功能化。HE4 山羊多克隆抗体及生物素化 BSA-FA 分别可特异性识别卵巢癌细胞质中 HE4 抗原及细胞膜表面的 FR,其中 HE4 为过表达于卵巢癌细胞质高尔基体上(93%)的抗原,其在正常组织中表达量较低。FR 在卵巢癌细胞表面的表达量高达 95%,而在大多数正常组织中表达量极低。

[0009] 所述的 SA-QDs,其制备方法如下:1)100 μL 8 $\mu\text{mol/L}$ QDs 溶于 100 μL pH 为 5.5 的 BB,按照 QD:EDC 摩尔比 1:1 000, QD:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min;2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 1.056 mg,持续混匀 2 h 后,加入 10 μL 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)SA-QDs 复合物 10 000 r/min,离心 5 min 除去沉淀后,使用 2 mL pH 为 7 的 BB 在 100K 超滤管中洗涤,最后重悬于 0.1 mL pH 为 7 的 BB 中。

[0010] 所述的生物素化 BSA-FA,其制备方法如下:1)FA-PEG- NH_2 的偶联:FA 6 mg 溶解于 600 μL 二甲基亚砜中,加入 N,N'-二环己基碳二亚胺(DCC)3 mg、N,N'-羧基琥珀酰亚胺(NHSS)3 mg 及三乙胺 60 μL 共同暗室反应 4 h,加入双氨基聚乙二醇 30 mg 暗室反应过夜;反应完全后离心,使用 -20°C 丙酮沉淀,乙酸乙酯洗涤 3 次,置于通风柜中干燥并避光保存;2)FA-PEG-BSA 的偶联:FA-PEG- NH_2 5 mg、1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐(EDC)2.5 mg、NHSS 2.5 mg 溶于 500 μL pH 为 7 的硼酸缓冲液(BB)中共同室温反应 10 min;加入 BSA 8.35 mg,室温反应 2 h,透析纯化 3 次后于 4°C 冰箱保存;3)生物素化 BSA-FA 的制备:按长链生物素:FA-PEG-BSA 摩尔比 20:1 混合后室温孵育 30 min,将混合溶液于 4°C 超纯水透析 3 d, 4°C 保存备用。

[0011] 所述的生物素化 BSA-FA 主要是利用大分子 BSA 上丰富的氨基活性基团,将多量生物素及 FA 富集在 BSA 上,从而增加 FA 与细胞结合几率及生物素与 IO-SA 结合数量实现放大。

[0012] 所述的生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG,其制备方法如下:1)取生物素 15 mg、EDC 2.4mg、NHSS 3.6mg 溶解于 2 mL 0.02 M pH 为 6.5 磷酸盐缓冲液(PBS)中;2)加入抗 HE4 兔抗羊 IgG 5.3 mg,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;3)上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d, -20°C 储存。

[0013] 所述 SA-IO 通过 SA 与 IO 经由共价键偶联制备;其制备方法如下:1)400 μL 5mg/mL IO 溶于 400 μL pH 为 5.5 的 BB,按照 IO:EDC 摩尔比 1:1 000,IO:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min;2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 0.08 mg,持续混匀 2 h 后,加入 20 μL 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)加入适量 pH 为 7 的 BB 混匀,于 1.0 特斯拉磁分离器中分离纯化 IO-SA 10~24 h,重复 2 次后重悬于 1 mL pH 为 7 的 BB 中,新制磁珠浓度为 2 mg/mL。其中,5%BSA /PBS 可通过 BSA 上的活性氨基与偶联产物中 IO 或 QDs 表面残留的羧基结合,减少偶联产物的非特异性吸附。

[0014] 所述试剂盒还包括固定液(4%多聚甲醛/三羟基氨基甲烷-盐酸缓冲液(TBS) pH 7.6)、渗透液(TBS+0.1%吐温-20 pH 7.6)、封闭液(0.1%酪蛋白+5%BSA+TBS pH 7.6),洗涤

液(TBS pH 7.6)。

[0015] 所述的检测样品为全血。

[0016] 所述的 QDs 为 CdSSe/ZnS, 发射波长为 550nm。

[0017] 本发明公开了上述试剂盒在全血中富集卵巢癌细胞的应用, 并通过特异性抗体修饰化的 QDs 进行荧光标记, 通过倒置荧光显微镜观察计数分离效率及荧光信号采集系统定量分析获得最终检测结果。

[0018] 有益效果: 卵巢癌在妇科恶性肿瘤中病死率高居第一位, 建立简便、快速的卵巢癌细胞检测方法不仅对肿瘤的早期发现, 还对肿瘤患者化疗药物的快速评估、个体化治疗(临床筛药、耐药性的检测)、肿瘤复发的监测以及肿瘤新药的开发具有重要指导意义。

[0019] 本发明将抗体分子与生物素偶联, 避免了常规方法中将抗体分子偶联于 QDs 或磁珠表面导致抗体活性降低和空间位阻大的缺点。

[0020] 本发明利用大分子 BSA 上丰富的氨基活性基团, 将多量生物素及 FA 富集在 BSA 上, 从而增加 FA 与细胞结合几率及生物素与 IO-SA 结合数量实现放大。

[0021] 本发明根据荧光免疫的双抗体夹心原理, 利用免疫磁珠分离速度快、效率高、操作简便等优点, 结合 QDs 光化学稳定性高, 不易光解等优良的光学特性, 分别以免疫磁珠和 QDs 为载体连接生物素化的 BSA-FA 和抗 HE4 兔抗羊 IgG, 使得快速、准确地全血中癌细胞的检测得以实现。

附图说明

[0022] 图 1 基于磁性分离的 SKOV3 细胞及 A549 细胞的分离效率图, 其中 SKOV3-2 为未加入生物素化 BSA-FA 反应的单纯 IO-SA 磁分离时 SKOV3 细胞的分离效率。

[0023] 图 2 SKOV3 细胞和 A549 细胞的 QDs 免疫荧光标记染色结果。

具体实施方式

[0024] 通过以下实施例进一步说明本发明, 但本发明的权利要求不仅限于实施例。

[0025] 下述实施例如无特殊说明所用方法均为常规方法。

[0026] 实施例中用到的磁性纳米粒子 SHP-05-25 与 QD550 购自美国 Ocean NanoTech 公司, 生物素、SA 购于上海华蓝化学公司。HE4 山羊多克隆抗体(C-12) 购于圣克鲁斯生物技术公司, 兔抗羊(HE4) IgG (BA1040) 购于博士德生物技术公司, DCC, NHSS, NHS, EDC 购买于美国 Sigma-Aldrich 公司, BSA 购自 Biosharp 公司, 叶酸购自郑州嵩桦商贸有限公司, 倒置荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品, 荧光信号采集系统定量分析为网上下载 ImageJ 2x 软件分析所得。

[0027] 纳米磁珠是 Fe_2O_3 及 Fe_3O_4 复合物纳米磁珠, 粒径为 25nm, 表面羧基功能化。

[0028] 所述的 QDs 为 CdSSe/ZnS, 发射波长为 550nm。

[0029] 实施例中简写:

量子点(QDs)、卵巢癌细胞人附睾蛋白(HE4)、牛血清蛋白(BSA)、叶酸(FA)、链霉亲和素化的纳米磁珠(SA-IO)、链霉亲和素化的 QDs (SA-QDs)、叶酸受体(FR)。

[0030] 固定液(4% 多聚甲醛 / 三羟基氨基甲烷 - 盐酸缓冲液(TBS) pH 7.6)、渗透液(TBS+0.1% 吐温 -20 pH 7.6)、封闭液(0.1% 酪蛋白 +5%BSA+TBS pH 7.6), 洗涤液(TBS pH

7.6)。

[0031] 实施例 1 针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒检测卵巢癌 SKOV3 细胞

1 制备生物素化 BSA-FA

1) FA-PEG-NH₂ 的偶联 :FA 6 mg 溶解于 600 μ L 二甲基亚砜中,加入 DCC 3 mg、NHSS 3 mg 及三乙胺 60 μ L 共同暗室反应 4 h,加入双氨基聚乙二醇 30 mg 暗室反应过夜;反应完全后离心,使用 -20℃ 丙酮沉淀,乙酸乙酯洗涤 3 次,置于通风柜中干燥并避光保存;2) FA-PEG-BSA 的偶联 :FA-PEG-NH₂ 5 mg、EDC 2.5 mg、NHS 2.5 mg 溶于 500 μ L pH 为 7 的 BB 中共同室温反应 10 min;加入 BSA 8.35 mg,室温反应 2 h,透析纯化 3 次后于 4℃ 冰箱保存;3)生物素化 BSA-FA 的制备 :按长链生物素 : FA-PEG-BSA 摩尔比 20:1 混合后室温孵育 30 min,将混合溶液于 4℃ 超纯水透析 3 d,4℃ 保存备用。

[0032] 2 制备生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG

1)取生物素 15 mg、EDC 2.4mg、NHSS 3.6mg 溶解于 2 mL 0.02 M pH 为 6.5 PBS 中;2)加入抗 HE4 兔抗羊 IgG 5.3 mg,室温置于混匀仪上搅拌 30 min;3)上述溶液减压旋干溶剂,去离子水溶解,在 PBS 和去离子水中透析 1 d,-20℃ 储存。

[0033] 3 制备 SA-IO

1)400 μ L IO(浓度为 5mg/mL)溶于 400 μ L pH 为 5.5 的 BB,按照 IO:EDC 摩尔比 1:1 000,IO:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min;2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 0.08 mg,持续混匀 2 h 后,加入 20 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)加入适量 pH 为 7 的 BB 混匀,于 1.0 特斯拉磁分离器中分离纯化 IO-SA 10~24 h,重复 2 次后重悬于 1 mL pH 为 7 的 BB 中,新制磁珠浓度为 2 mg/mL。

[0034] 4 制备 SA-QDs

1)100 μ L QDs(浓度为 8 μ M)溶于 100 μ L pH 为 5.5 的 BB,按照 QD:EDC 摩尔比 1:1 000,QD:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min。2)调整溶液 pH 到 8~8.5,加入 SA 1.056 mg,持续混匀 2 h 后,加入 10 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应。3)QD-SA 复合物 10 000 r/min,离心 5 min 除去沉淀后,使用 2 mL pH 为 7 的 BB 在 100K 超滤管中洗涤,最后重悬于 0.1 mL pH 为 7 的 BB 中。

[0035] 5 制备 FA 功能修饰的 IO (IO-FA)

1) FA-PEG-NH₂ 的偶联 :FA 6 mg 溶解于 600 μ L 二甲基亚砜中,加入 DCC 3 mg、NHSS 3 mg 及三乙胺 60 μ L 共同暗室反应 4 h,加入双氨基聚乙二醇 30 mg 暗室反应过夜;2) IO 与 FA-PEG-NH₂ 的偶联 :200 μ L IO (浓度为 5mg/mL)溶于 200 μ L pH 为 5.5 的 BB,按照 IO:EDC 摩尔比 1:1 000,IO:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS,室温反应 5~10 min。2)加入 500 μ L pH 为 8~8.5 BB,加入 FA-PEG-NH₂ 7 mg,持续混匀 2 h 后,加入 10 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应;3)加入适量 pH 为 7 的 BB 混匀,于 1.0 特斯拉磁分离器中分离纯化 IO-FA 10~24 h,重复 2 次后重悬于 500 μ L pH 为 7 的 BB 中,新制磁珠浓度为 2 mg/mL。

[0036] 6 SKOV3 细胞的染色及计数

1)获取对数生长期的卵巢癌 SKOV3 细胞 4 mL,加入 8 μ L Hoechst 核染料,置于 37℃、5% CO₂ 培养箱内孵育 30 min;1 000 r/min,离心 30 s 后弃上清,加入 PBS 10 mL 清洗,1 000 r/min 1 min (重复清洗 2 次);用 4 mL 3%BSA /PBS 重悬。2)用细胞计数板计数(25

大格*16小格)SKOV3细胞的数量,荧光显微镜下计数原则为:压线细胞数左不数右、数上不数下。

[0037] 7 IO-FA 磁性纳米粒子全血分离 SKOV3 细胞

1)按照 $1:10^9$ /mL 将预染色的 SKOV3 细胞添加到 1 mL 全血中,混匀仪上室温充分混匀 1 h 后,按照 IO-FA 与 FR 摩尔比 20:1 加入 IO-FA 磁性纳米粒子,持续混匀 30 min,形成复合物 IO-FA-细胞;2)将 IO-FA-细胞复合物置于 1.0T 磁分离器中磁分离 1 h,小心弃上清,用 50 μ L PBS 重悬置于 24 孔细胞培养板内。

[0038] 8 基于生物素-SA 及 BAS 介导的磁性纳米粒子磁信号放大全血分离 SKOV3 细胞

1)按照 $1:10^9$ /mL 将预染色的 SKOV3 细胞添加到 1 mL 全血中,充分混匀后,按照生物素化 BSA-FA 与 FR 摩尔比为 5:1 加入生物素化 BSA-FA,混匀仪上室温混匀 1 h,形成的复合物为生物素化 BSA-FA-细胞;2)按照 IO-SA 与生物素化 BSA-FA 摩尔比 4:1 加入 IO-SA,持续混匀 30 min,形成的复合物为 IO-SA-生物素化 BSA-FA-细胞;3)将 IO-SA-生物素化 BSA-FA-细胞复合物置于 1.0T 磁分离器中磁分离 1 h,小心弃上清,用 50 μ L PBS 重悬置于 24 孔细胞培养板内。

[0039] 9 SKOV3 细胞的量子点免疫荧光染色

1)采用固定液在常温下固定细胞 15min,立即用洗涤液漂洗 3 次;2)用渗透液常温下渗透细胞 20min,洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭细胞上的非特异性结合位点 1h;3)除去封闭液,加入适量 HE4 山羊多克隆抗体与细胞在常温下共孵育 2h。洗涤液冲洗 3 次(每次 5min)后,加入生物素化-抗 HE4 兔抗羊 IgG 复合物与细胞在常温下共孵育 1h;4)洗涤液冲洗 3 次(每次 5min),加入适量 SA-QDs 复合物反应 30min,冲洗 3 次脱去背景色后于倒置荧光显微镜下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析及计算分离效率。

[0040] 10 磁珠非特异性对照实验

1)选用 SKOV3 细胞,步骤 1-4 同前;2)细胞计数同步骤 6,SKOV3 细胞全血磁分离过程不加入生物素化 BSA-FA,其余操作步骤同 8、9。

[0041] 11 QDs 非特异性对照实验

1)选用 SKOV3 细胞,步骤 1-8 同前。2)全血磁分离后的 SKOV3 细胞的量子点免疫荧光染色过程中不加入 HE4 山羊多克隆抗体及生物素化-抗 HE4 兔抗羊抗体复合物,其余步骤同 9。

[0042] 12 同期对照组实验

选用 FR 表达阴性及 HE4 低表达的肺癌 A549 细胞,其余操作步骤同前 1-9。

[0043] (上述步骤 7、8、10、12 为同等条件下同时进行的实验,且实验次数不少于 3 次;步骤 9 和 11 为同时进行的鉴定实验)

11 结果:

1)Hoechst 核染料可充分定位卵巢癌 SKOV3 细胞,经由生物素化-BSA-FA/IO-SA 和 IO-FA 免疫磁分离及 QDs-生物素化-抗 HE4 兔抗羊抗体-抗原复合物标记的 SKOV3,细胞数目均较多,其中,生物素化 BSA-FA/IO-SA 对 SKOV3 细胞的分离效率经多次实验可高达 87.1%,而 IO-FA 的分离效率最高为 43%,同等反应条件下 A549 细胞捕获数目稀少,其捕获效率仅有 23.3% 及 23.1%。此外,磁珠的非特异性实验表明,在没有 FA 参与的情况下,IO-SA 的分离效率均不高,其对 SKOV3 细胞的分离效率约为 8.7% 左右。而对 A549 细胞的分离效

率也在 8.6% 左右(图 1)。结果表明, FA 可特异性识别卵巢癌 SKOV3 细胞, 经生物素-SA 及 BAS 介导的磁性纳米粒子磁信号放大系统可明显提高细胞捕获效率, 提高细胞检测灵敏性。(图 1)

2) 经由生物素化-BSA-FA/IO-SA 和 IO-FA 免疫磁分离及 QDs-生物素化-抗 HE4 兔抗羊抗体-抗原复合物标记的 SKOV3 细胞, 细胞质内均可见明显的绿色荧光, 而磁分离捕获的 A549 细胞经标记后未见明显绿色荧光, 不加入 HE4 山羊多克隆抗体及生物素化-抗 HE4 兔抗羊抗体复合物由 SA-QDs 非特异性标记的 SKOV3 细胞, 细胞质内未见明显绿色荧光。(图 2)

3) 临床实际样本中, 20 例卵巢癌患者外周血和 100 例健康女性外周血使用该试剂盒检测后表明, 16 例卵巢癌患者外周血中发现循环肿瘤细胞, 而在健康女性外周血中未发现循环肿瘤细胞。(表 1)

表 1

实际样本	病理诊断	血量 /mL	循环肿瘤细胞数目 / 个
1	卵巢粘液性囊腺癌	1	3
2	卵巢浆液性囊腺癌	1	2
3	卵巢 Krukenberg 瘤	2	21
4	卵巢粘液性囊腺癌	1.2	1
5	卵巢浆液性囊腺癌	1.5	8
6	clearcellcarcinoma	1.5	0
7	卵巢浆液性囊腺癌	1	5
8	卵巢浆液性囊腺癌	1.2	16
9	交界性浆液性囊腺癌	1	1
10	卵巢粘液性囊腺癌	1	2
11	卵巢浆液性囊腺癌	1	7
12	卵巢浆液性囊腺癌	1	31
13	透明细胞癌	1.5	0
14	交界性粘液性囊腺癌	1	0
15	交界性浆液性囊腺癌	1	1
16	卵巢浆液性囊腺癌	1.5	4
17	无性细胞瘤	1	0
18	卵巢浆液性囊腺癌	1	3
19	卵巢粘液性囊腺癌	2	1
20	卵巢浆液性囊腺癌	1	16
21-120	健康女性	1	0

以上实验证明了本发明基于生物素化 BSA-FA/IO-SA 的磁性分离和 QDs-SA/生物素化抗 HE4 抗原抗体复合物的免疫荧光标记可用于特异性富集卵巢癌 SKOV3 细胞并对其进行特异性验证, 从而可用于早期卵巢癌的检测。本发明方法检测卵巢癌结果为阳性后, 可以进一步的采用其他技术手段对卵巢癌进行确诊。

[0044] 实施例 2 针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒在卵巢癌患者全血中的应用

取本发明所述的试剂盒: 包括 1) HE4 山羊多克隆抗体; 2) 生物素化的 BSA-FA; 3) 链霉亲和素化的纳米磁珠 SA-IO; 4) 链霉亲和素化的 QDs 即 SA-QDs; 5) 生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG;

其中, 各物质制备方法如下:

1 制备生物素化 BSA-FA

1) FA-PEG-NH₂ 的偶联: FA 6 mg 溶解于 600 μ L 二甲基亚砜中, 加入 DCC 3 mg、NHS 3

mg 及三乙胺 60 μ L 共同暗室反应 4 h, 加入双氨基聚乙二醇 30 mg 暗室反应过夜; 反应完全后离心, 使用 -20°C 丙酮沉淀, 乙酸乙酯洗涤 3 次, 置于通风柜中干燥并避光保存; 2) FA-PEG-BSA 的偶联: FA-PEG-NH₂ 5 mg、EDC 2.5 mg、NHS 2.5 mg 溶于 500 μ L pH 为 7 的 BB 中共同室温反应 10 min; 加入 BSA 8.35 mg, 室温反应 2 h, 透析纯化 3 次后于 4°C 冰箱保存; 3) 生物素化 BSA-FA 的制备: 按长链生物素: FA-PEG-BSA 摩尔比 20:1 混合后室温孵育 30 min, 将混合溶液于 4°C 超纯水透析 3 d, 4°C 保存备用。

[0045] 2 制备生物素化抗 HE4 兔抗羊 IgG

1) 取生物素 15 mg、EDC 2.4mg、NHSS 3.6mg 溶解于 2 mL 0.02 M pH 为 6.5 PBS 中; 2) 加入抗 HE4 兔抗羊 IgG 5.3 mg, 室温置于混匀仪上搅拌 30 min; 3) 上述溶液减压旋干溶剂, 去离子水溶解, 在 PBS 和去离子水中透析 1 d, -20°C 储存。

[0046] 3 制备 SA-IO

1) 400 μ L 5mg/mL IO 溶于 400 μ L pH 为 5.5 的 BB, 按照 IO:EDC 摩尔比 1:1 000, IO:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS, 室温反应 5~10 min; 2) 调整溶液 pH 到 8~8.5, 加入 SA 0.08 mg, 持续混匀 2 h 后, 加入 20 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应; 3) 加入适量 pH 为 7 的 BB 混匀, 于 1.0 特斯拉磁分离器中分离纯化 IO-SA 10~24 h, 重复 2 次后重悬于 1 mL pH 为 7 的 BB 中, 新制磁珠浓度为 2 mg/mL。

[0047] 4 制备 SA-QDs

1) 100 μ L QDs (浓度为 8 μ M) 溶于 100 μ L pH 为 5.5 的 BB, 按照 QD:EDC 摩尔比 1:1 000, QD:NHS 摩尔比 1:2 000 加入 EDC/NHS, 室温反应 5~10 min; 2) 调整溶液 pH 到 8~8.5, 加入 SA 1.056 mg, 持续混匀 2 h 后, 加入 10 μ L 含 5% BSA 的 PBS 封闭 10 min 终止反应; 3) QD-SA 复合物 10 000 r/min, 离心 5 min 除去沉淀后, 使用 2 mL pH 为 7 的 BB 在 100K 超滤管中洗涤, 最后重悬于 0.1 mL pH 为 7 的 BB 中。

[0048] 5 基于生物素-SA 及 BAS 介导的磁性纳米粒子磁信号放大系统在卵巢癌全血分离循环肿瘤细胞的应用

1) 收集临床上病理确诊为卵巢癌且未经化疗的癌症患者 20 例及正常健康体检女性 100 例外周血, 每例样本约 1 mL 左右, 各血样均由加有 EDTA 的抗凝管保存, 血样在收集 24 h 内进行实验以防止细胞裂解。各血样来源于江西省妇幼保健院、江西省肿瘤医院、江西省南昌大学第一附属医院及江西省南昌大学第二附属医院。2) 按照生物素化 BSA-FA 与 FR 摩尔比 5:1 在血样中加入生物素化 BSA-FA, 混匀仪上室温混匀 1 h, 形成的复合物为生物素化 BSA-FA-细胞; 2) 按照 IO-SA 与生物素化 BSA-FA 摩尔比 4:1 加入 IO-SA, 持续混匀 30 min, 形成的复合物为 IO-SA-生物素化 BSA-FA-细胞; 3) 将 IO-SA-生物素化 BSA-FA-细胞复合物置于 1.0T 磁分离器中磁分离 1 h, 小心弃上清, 用 50 μ L PBS 重悬置于 24 孔细胞培养板内。

[0049] 6 循环肿瘤细胞的量子点免疫荧光染色

1) 采用固定液在常温下固定细胞 15min, 立即用洗涤液漂洗 3 次; 2) 用渗透液常温下渗透细胞 20min, 洗涤液冲洗 3 次后用封闭液封闭细胞上的非特异性结合位点 1h; 3) 除去封闭液, 加入适量 HE4 山羊多克隆抗体与细胞在常温下共孵育 2h。洗涤液冲洗 3 次 (每次 5min) 后, 加入生物素化-抗 HE4 兔抗羊 IgG 复合物与细胞在常温下共孵育 1h; 4) 洗涤液冲洗 3 次 (每次 5min), 加入适量 SA-QDs 复合物反应 30min, 冲洗 3 次脱去背景色后于倒置

荧光显微镜下观察荧光信号并通过荧光信号采集系统进行定量分析。

[0050] 虽然本发明已以较佳实施例披露如上,然其并非用以限定本发明。任何所属技术领域的技术人员,在不脱离本发明的精神和范围内,当可作些许的更动和改进,因此本发明的保护范围当视作权利要求所界定者为准。

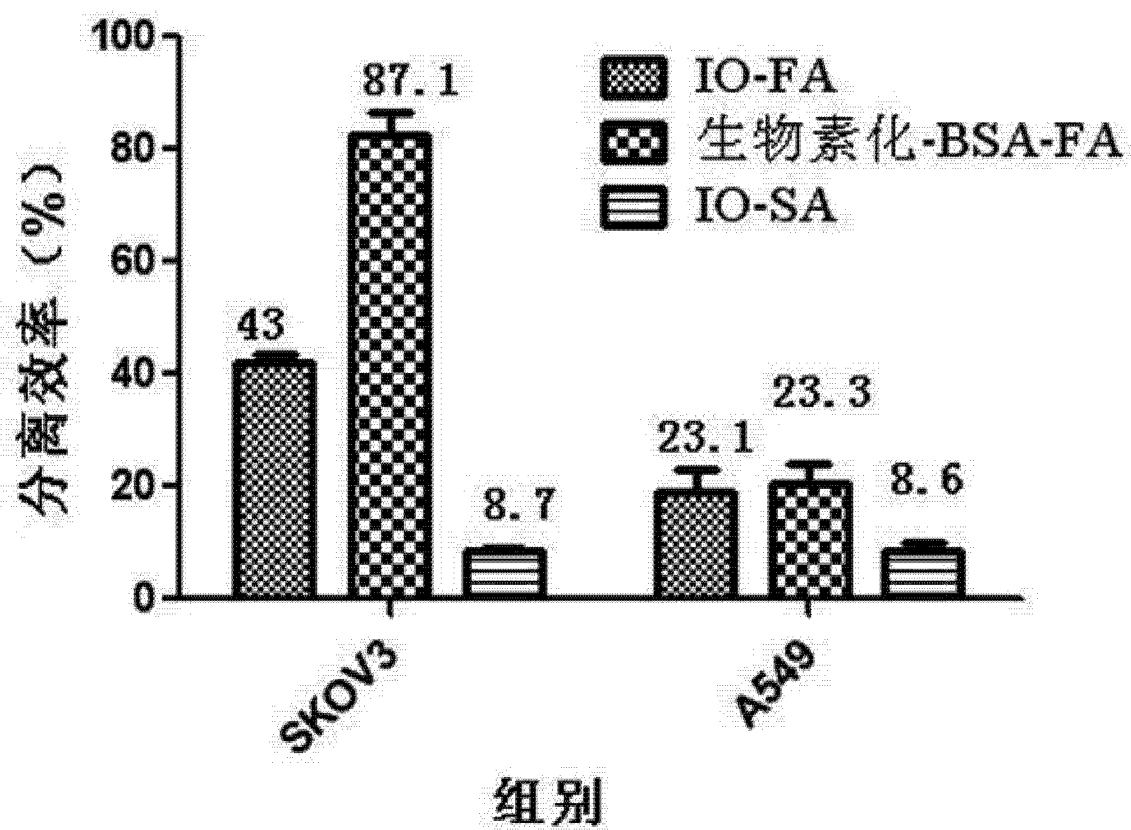


图 1

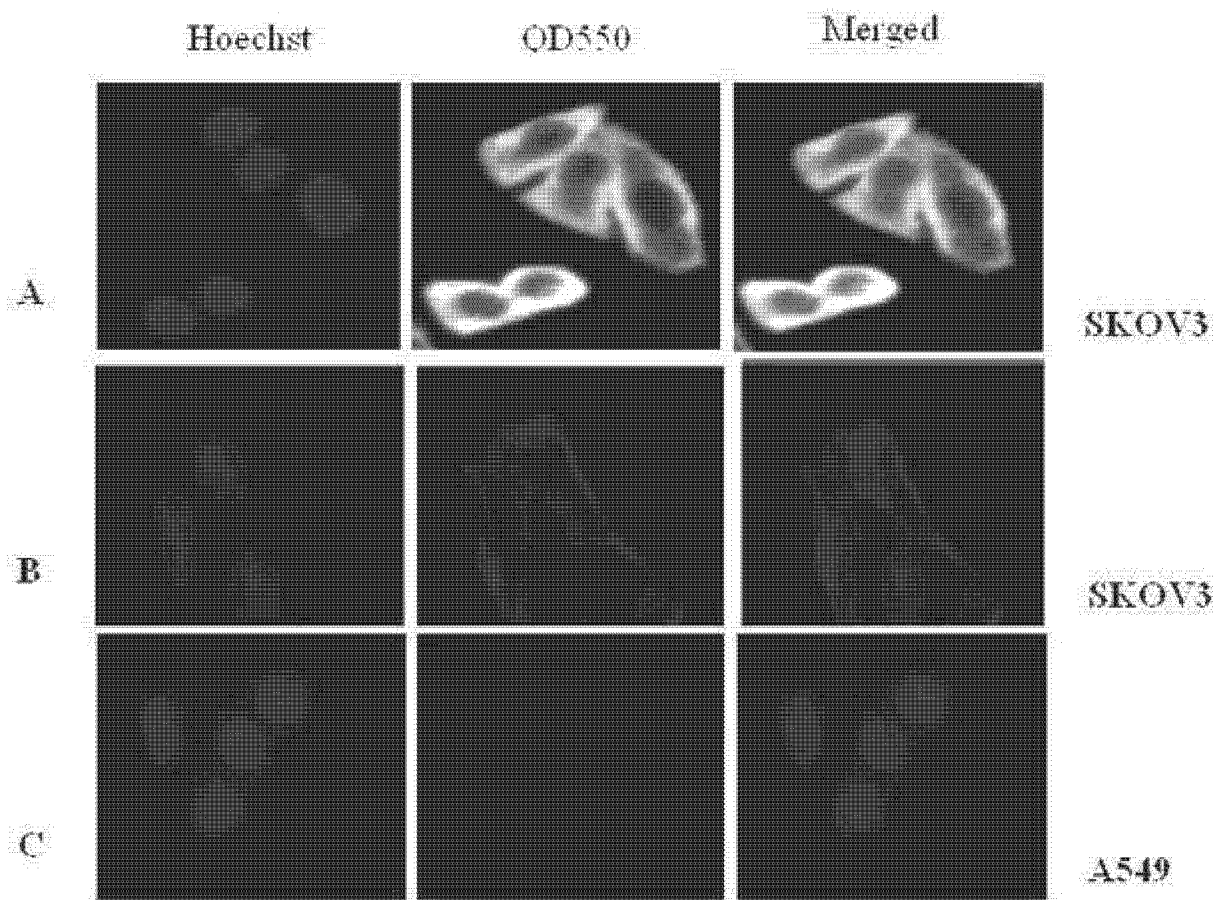


图 2

专利名称(译)	针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒		
公开(公告)号	CN104316683A	公开(公告)日	2015-01-28
申请号	CN201410538494.9	申请日	2014-10-14
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	许恒毅 傅芬 聂丽菊 叶称连 张婉怡 李福来		
发明人	许恒毅 傅芬 聂丽菊 叶称连 张婉怡 李福来		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/57449		
其他公开文献	CN104316683B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了针对全血的卵巢癌细胞检测试剂盒。所述试剂盒主要包含能够特异性识别卵巢癌细胞人附睾蛋白(HE4)抗原的HE4山羊多克隆抗体及生物素化的牛血清蛋白(BSA)-叶酸(FA)，链霉亲和素化的纳米磁珠(SA-IO)、链霉亲和素化的QDs(SA-QDs)、生物素化抗HE4兔抗羊IgG以及连接试剂等。所述试剂盒可利用免疫磁珠的可富集特性高效分离卵巢癌患者全血中的癌细胞，并通过SA-QDs与生物素化的HE4抗原抗体复合物特异性结合靶向卵巢癌细胞，实现多重信号协同放大。该试剂具有较强的灵敏性和特异性，在卵巢癌的早期检测中具有极广阔的应用前景。

