



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106645726 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(21)申请号 201610878477.9

(22)申请日 2016.10.09

(71)申请人 天津普拉德生物科技有限公司

地址 300385 天津市西青区天津市西青经
济技术开发区赛达新兴产业园E3座

(72)发明人 李文忠 漆敏

(74)专利代理机构 天津佳盟知识产权代理有限
公司 12002

代理人 侯力

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书11页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法

(57)摘要

一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法。本试剂盒联合免疫捕获和膜过滤的方法分离循环肿瘤细胞。所述试剂盒包括循环肿瘤细胞吸附剂、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针；所述循环肿瘤细胞吸附剂中肿瘤细胞表面特异性抗体选自：EpCAM或EGFR；所述白细胞荧光纳米探针中白细胞特异性抗体选自：CD45、CD15或CD33；所述肿瘤细胞荧光纳米探针中肿瘤细胞特异性抗体选自：CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或plastin-3；本试剂盒具有操作便捷、检测时间短、快速准确、无需大型仪器、可降低癌症筛查成本、易被患者接受等特点，可产生良好的经济和社会效益。

1. 一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒,其特征在于:包括循环肿瘤细胞吸附剂、细胞核特异性探针、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针、微孔滤膜、缓冲液、裂解液、固定液、封闭液、空采血管、过滤装置和染色池。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的循环肿瘤细胞吸附剂是载体通过偶联剂与循环肿瘤细胞表面特异性单克隆抗体形成的载体-抗体复合物;所述的载体材料为聚乙烯醇、聚苯乙烯或聚丙烯酸酯类,形状为球状,粒径为10-100 μm ,表面引入活性基团,所述活性基团包括氨基、羟基、羧基或醛基,具有良好的亲水性和血液相容性。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于:其特征在于所述的循环肿瘤细胞表面特异性单克隆抗体具体是EpCAM或EGFR单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的细胞核特异性探针具体是DAPI(4',6-二脒基-2-苯基吲哚)或Hoechst 33258。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的肿瘤细胞荧光纳米探针是由CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或pIastin-3肿瘤细胞特异性抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的白细胞荧光纳米探针是由CD45、CD15或CD33白细胞特异性抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得。

7. 根据权利要求5或6所述的试剂盒,其特征在于:所述的荧光纳米量子点材料是非金属量子点荧光材料、或金属量子点荧光材料、或贵金属量子点荧光材料,荧光量子点粒径为0.1-2.0 μm ,激发光波长为200-700nm,荧光发光色为蓝色、绿色、橙色或者红色,且表面带有丰富的羧基、羟基或醛基活性基团,水溶性强。

8. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于:所述的微孔滤膜材料具体为聚碳酸酯或纤维素,孔径为5-10 μm ,有很好的强度和可操作性。

9. 一种权利要求1所述试剂盒的制备方法,其特征在于:

①循环肿瘤细胞吸附剂制备

取粒径为10-100 μm ,材料为聚乙烯醇、聚苯乙烯或聚丙烯酸酯类的载体微球,加入氢氧化钠和环氧氯丙烷,水浴震荡活化,加入氢氧化钠和己二胺,水浴震荡反应;加入PBS溶胀微球,加入DCC、DPS、戊二醛或乙酸酐,混匀反应,加入PBS洗涤,再加入EpCAM或EGFR抗体,混匀反应,即得到循环肿瘤细胞吸附剂;

②肿瘤细胞荧光纳米探针制备

取粒径为0.1-2 μm 的荧光量子点制成荧光量子点溶液;加入EDC溶液,震荡反应,再加入NHS溶液,混匀反应,PBS洗涤;再加入CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或pIastin-3抗体,震荡反应,PBS洗涤,分散于PBS,即得到肿瘤细胞荧光纳米探针;

③白细胞荧光纳米探针制备

取粒径为0.1-2 μm 的荧光量子点制成荧光量子点溶液;加入EDC溶液,震荡反应,再加入NHS溶液,混匀反应,PBS洗涤;再加入CD45、CD15或CD33抗体,震荡反应,PBS洗涤,分散于PBS,即得到白细胞荧光纳米探针。

10. 一种权利要求1所述试剂盒的应用方法,其特征在于:包含以下步骤

a、红细胞裂解:取血液样品,加入裂解液裂解红细胞,血液以外生物样品无需此步骤;

b、肿瘤细胞吸附:红细胞裂解液中加入循环肿瘤细胞吸附剂,混匀孵育;

- c、过滤：将b步处理后的样品加入过滤装置中，抽滤使液体缓慢通过滤器和滤膜；
- d、滤膜染色：取出微孔滤膜放入染色池，加入固定液固定，加入封闭液封闭，漂洗滤膜，再依次加入细胞核特异性探针、肿瘤细胞荧光纳米探针和白细胞荧光纳米探针，混匀孵育；
- e、肿瘤细胞鉴定和计数：将滤膜固定于载玻片上，在荧光显微镜下观察，对肿瘤细胞进行鉴定和计数。

一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,涉及医学和生物技术,具体涉及循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法。

背景技术

[0002] 生活环境的恶化,不良生活习惯和遗传因素使人类患癌症的几率越来越高,癌症已成为人类健康“第一杀手”,是全球关注的焦点。然而随着医学的不断进步,癌症已经不是人们眼中的绝症,大部分癌症如能早期发现、早期诊断、正确治疗是可以治愈的,即使癌症中晚期患者经过治疗也可减轻痛苦、延长生命。近年来,尽管随着早期诊断和预防、手术治疗、化疗、放疗等治疗方式的出现,癌症的生存率已经有了很大的改善,但是目前这些疗法对于解救全球上千万的癌症患者还是远远不够的。

[0003] 循环肿瘤细胞(Circulating tumour cells,CTCs)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。随着生物技术的迅速发展,CTC快速检测技术在癌症治疗紧迫的形式下应运而生,该技术是目前最具发展潜力的肿瘤无创诊断和实时疗效监测手段。外周血中的CTC数量极少,因此如何从几百万白细胞及几十亿红细胞中快速、特异性的、不遗漏的分选富集出CTC成为制约其为临床肿瘤早期诊断的主要问题。

[0004] 随着CTC临床应用价值凸显,许多研发团队都在推出不同的CTC检测技术。目前CTC捕获原理通常是基于CTC表面标志物和细胞尺寸。基于CTC表面标志物原理捕获CTC的技术有:CeII Search系统、MACS(通过免疫磁珠标记的捕获)、CTC-chip(CTC-芯片)、iFISH-CTC(免疫荧光染色结合FISH技术)等,这些技术的存在最大的缺点是:容易产生假阳性或假阴性结果,操作复杂,成本高,普及难度大。基于细胞尺寸大小原理捕获CTC的技术有Screen CeII等,该技术原理最大的缺点是:体积较小,形态变化好的CTC容易漏检,染色过程复杂,易丢失CTC。此外,国内外许多研究团队还推出了CTC表面标志物和细胞尺寸原理相结合的技术方案,如免疫磁珠阴性富集结合过滤法,这种技术方案较好的集合了两种原理的优势,CTC纯度较高、CTC团块富集效果好、便于后续分析、适合所有类型肿瘤,但该技术也存在着较大的局限性,如:体积较小,形态变化好的CTC容易漏检;表达白细胞表面标志物的CTC漏检(如:CTC相关性巨噬细胞,具有白细胞特性的CTC);样品处理时间长,费用高。因此,如今迫切需要建立一种快速、准确、价格适中的CTC检测和分离技术,作为癌症常规筛查手段。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有循环肿瘤细胞富集和检测技术存在的上述不足,提供一种操作简单、处理时间短、结果可靠、价格适中的循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法。

[0006] 本发明技术方案

[0007] 一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒,包括循环肿瘤细胞吸附剂、细胞核特异性探针、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针、微孔滤膜、PBS缓冲液、裂解液、固定液、

封闭液、空采血管、过滤装置和染色池。

[0008] 所述的特异性循环肿瘤细胞吸附剂；是载体通过偶联剂与循环肿瘤细胞表面特异性单克隆抗体形成的载体-抗体复合物。所述的载体材料为聚乙烯醇、聚苯乙烯或聚丙烯酸酯类，形状为球状，粒径为10-100 μm ，表面引入活性基团，所述活性基团包括氨基、羟基、羧基或醛基，具有良好的亲水性和血液相容性。所述的偶联剂为生物交联剂或化学交联剂，生物交联剂具体为DCC（二环己基碳二亚胺）或DPS（3,3'-二硫代二丙酸二（N-羟基丁二酰亚胺酯），化学偶联剂选自戊二醛或乙酸酐。所述的循环肿瘤细胞表面特异性单克隆抗体具体是EpCAM或EGFR单克隆抗体。

[0009] 所述的细胞核特异性探针具体是DAPI（4',6-二脒基-2-苯基吲哚）或Hoechst 33258。

[0010] 所述的肿瘤细胞荧光纳米探针是由CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或p1astin-3肿瘤细胞特异性抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得。

[0011] 所述的白细胞荧光纳米探针是由CD45、CD15或CD33白细胞特异性抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得。

[0012] 进一步地，所述的荧光纳米量子点材料是非金属量子点荧光材料、或金属量子点荧光材料、或贵金属量子点荧光材料，荧光量子点粒径为0.1-2.0 μm ，激发光波长为200-700nm，荧光发光色为蓝色、绿色、橙色或者红色，且表面带有丰富的羧基、羟基或醛基活性基团，水溶性强。所述的偶联剂具体是EDC（1-（3-二甲氨基丙基）-3-乙基碳二亚胺盐酸盐）和NHS（N-羟基琥珀酰亚胺），可与带有氨基的分子偶联。

[0013] 进一步地，所述的细胞核特异性探针、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针三者荧光发光色不同；

[0014] 所述的微孔滤膜材料为聚碳酸酯或纤维素，孔径为5-10 μm ，有很好的强度和可操作性。

[0015] 所述的（红细胞）裂解液主要成分为 NH_4Cl ，在裂解红细胞的同时几乎不损伤有核细胞。如下述配方的裂解液：8.29-13g/L NH_4Cl 、1-1.5g/L KHCO_3 和0.37-0.5g/L Na_2EDTA 。

[0016] 所述的固定液为包含以下浓度组分的溶液：2wt%-4wt%多聚甲醛、0.5wt%-1wt%triton x-100。

[0017] 所述的封闭液为5wt%BSA的PBS溶液。

[0018] 本发明同时提供了一种上述试剂盒的制备方法，其步骤为：

[0019] ①循环肿瘤细胞吸附剂制备

[0020] a、取粒径为10-100 μm ，材料为聚乙烯醇、聚苯乙烯或聚丙烯酸酯类的载体微球5mI，加入10mI 10moI/L的NaOH，60mI环氧氯丙烷，于50 $^\circ\text{C}$ 水浴震荡活化1-2小时，用蒸馏水洗涤3次，每次1min，加入8mI 3moI/L的NaOH，30mI的1,6-己二胺，于60 $^\circ\text{C}$ 水浴震荡反应12h，用蒸馏水洗涤3次，每次3min，备用。

[0021] b、取上述处理后的微球，加入20mI PBS（磷酸缓冲液，PH 7.2），溶胀微球，加入过量预先配制好的DCC、DPS、戊二醛或乙酸酐溶液，搅拌混匀，室温反应1h，吸弃反应液，PBS洗涤3次，每次5min，备用。

[0022] c、取上述b步处理后的微球，加入预先配制好的15 $\mu\text{g}/\text{mI}$ 的EpCAM或EGFR抗体溶液2-5mI，搅拌混匀，于37 $^\circ\text{C}$ 反应3h，即得到吸附剂溶液，4 $^\circ\text{C}$ 保存。

[0023] ②肿瘤细胞荧光纳米探针制备

[0024] a、取粒径为0.1-2 μ m的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液;

[0025] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ I NHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。

[0026] c、将5-10 μ g的CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或p1astin-3抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0027] ③白细胞荧光纳米探针制备

[0028] a、取粒径为0.1-2 μ m的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液;

[0029] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ I NHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。

[0030] c、将5-10 μ g的CD45、CD15或CD33抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0031] 本发明同时还提供了一种上述试剂盒的应用方法。

[0032] 本试剂盒适用于人或动物的外周循环血,胸/腹腔积液,脑脊液,乳头抽吸液,羊水,或培养的肿瘤细胞悬浮液中肿瘤细胞的检测,其中外周循环血样品需红细胞裂解过程,其它类型样品无需红细胞裂解过程。

[0033] 其步骤为:

[0034] a、红细胞裂解:取7.5mI血液样品,加入30mI缓冲液,800rpm离心5分钟,弃去上清液,按1:5-10的比例向细胞沉淀中加入4 $^{\circ}$ C预冷的裂解液,轻轻吹打混匀,4 $^{\circ}$ C裂解5min;800rpm离心5分钟,弃去上层红色清液,沉淀部分加入5mI缓冲液重悬细胞,800rpm离心5分钟,去上清,加入7.5mI缓冲液重悬细胞。

[0035] b、肿瘤细胞吸附:上述重悬液中加入5-10 μ I吸附液,37 $^{\circ}$ C孵育45min。

[0036] c、过滤:将上述孵育后的混悬液加入过滤装置中,抽滤处理使液体缓慢通过滤器和滤膜,加入5mI缓冲液冲洗上样管管壁和滤膜。

[0037] d、滤膜染色:取出微孔滤膜放入染色池,加入3mI固定液,37 $^{\circ}$ C固定5min,弃去固定液,加入5mI封闭液,4 $^{\circ}$ C封闭45min,弃去封闭液,用5mI缓冲液轻柔漂洗滤膜2次,每次1min,依次加入2 μ I细胞核特异性探针,2 μ I白细胞荧光纳米探针,2 μ I肿瘤细胞荧光纳米探针,37 $^{\circ}$ C孵育45min,弃去上清,加入5mI缓冲液轻柔漂洗2次,除去附着于滤膜上的染色剂。

[0038] e、肿瘤细胞鉴定和计数:将滤膜从染色池取出,固定于载玻片上,在荧光显微镜下观察,按照判定标准对肿瘤细胞进行鉴定和计数。

[0039] 肿瘤细胞和白细胞的判定标准为:

[0040] 肿瘤细胞:同时出现细胞核特异性探针发光色和肿瘤细胞荧光纳米探针发光色;

[0041] 白细胞:同时出现细胞核特异性探针发光色和白细胞荧光纳米探针发光色。

[0042] 本试剂盒的主要优点和积极效果

[0043] 1) 本试剂盒引入循环肿瘤细胞的吸附剂,使肿瘤细胞与吸附剂形成复合体,增加

肿瘤细胞的体积,同时也可降低细胞形态学的可塑性,使之利于被滤膜捕获,极大地降低了体积小的肿瘤细胞漏检率;

[0044] 2) 本试剂盒联合免疫捕获和膜过滤的方法分离循环肿瘤细胞,极大地避免了最具转移潜力的肿瘤细胞癌栓、上皮-间质转变过程中肿瘤细胞的漏检;

[0045] 3) 本试剂盒采用纳米荧光量子颗粒技术,减少了后续染色步骤,巧妙地避免了染色过程中肿瘤细胞的丢失和深背景颜色对操作人判定结果的影响;

[0046] 4) 本试剂盒无需要购置专用设备,操作简单,生产成本低,适用于多种类型癌细胞富集和检测,易于推广。

具体实施方式

[0047] 以下实施例进一步说明本发明,但不作为对本发明的限制。

[0048] 实施例1

[0049] 本发明试剂盒的制备,试剂盒包含以下组分:循环肿瘤细胞吸附剂、细胞核特异性探针、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针、微孔滤膜、缓冲液、裂解液、固定液、封闭液、真空采血管、过滤装置和染色池,如表1所示。

[0050] 表1 循环肿瘤细胞快速检测试剂盒主要组分

组分	主要成分
循环肿瘤细胞吸附剂	载体通过偶联剂与 EpCAM 或 EGFR 单克隆抗体形成的载体-抗体复合物
白细胞荧光纳米探针	CD45、CD15 或 CD33 抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得
肿瘤细胞荧光纳米探针	CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin 或 plastin-3 抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得
细胞核特异性探针	DAPI 或 Hoechst 33258
缓冲液	PBS 缓冲液
裂解液	红细胞裂解液主要成分为 NH_4Cl
固定液	含多聚甲醛、triton x-100
封闭液	含 BSA 的 PBS 溶液
真空采血管	内含 EDTA (乙二胺四乙酸), 可防止血液标本凝固
过滤装置	微孔滤膜可取出
微孔滤膜	孔径为 5-10 μm
染色池	直径为 35mm 的培养皿

[0051] [0052] 循环肿瘤细胞吸附剂的制备

[0053] a、取粒径为10 μm 的聚苯乙烯微球5mI,加入10mI 10moI/L的NaOH,60mI环氧氯丙烷,于50℃水浴震荡活化1h,用蒸馏水洗涤3次,每次1min,加入8mI 3moI/L的NaOH,30mI的1,6-己二胺,于60℃水浴震荡反应12h,用蒸馏水洗涤3次,每次3min,备用。

[0054] b、取上述处理后的微球,加入20mI PBS(磷酸缓冲液,PH 7.2),溶胀微球,加入1mI预先配制好的2.0mg/mI浓度的DCC,室温反应1h,吸弃反应液,PBS洗涤3次,每次5min,备用。

[0055] c、取上述微球,加入2mI预先配制好的15 μ g/mI的EpCAM抗体溶液,搅拌混匀,于37 $^{\circ}$ C反应3h,即得到吸附剂溶液,4 $^{\circ}$ C保存。

[0056] 肿瘤细胞荧光纳米探针的制备

[0057] a、取粒径为1.0 μ m发光色为红色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液。

[0058] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ INHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。

[0059] c、将5 μ g PanCK抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0060] 白细胞荧光纳米探针的制备

[0061] a、取粒径为0.1 μ m发光色为绿色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液。

[0062] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ INHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。

[0063] c、将5 μ g CD45抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0064] 细胞核特异性探针的制备

[0065] 5mg DAPI固体粉末溶于10mI PBS,4 $^{\circ}$ C保存,用时稀释100倍。

[0066] 缓冲液的制备

[0067] NaCl 8.0g,KCl 0.2g,KH₂PO₄0.24g,Na₂HPO₄•2H₂O 1.56g,溶于800mI蒸馏水中,用盐酸调pH值为7.4,蒸馏水定容至1000mI,高压灭菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0068] 裂解液的制备

[0069] NH₄CL 10.0g,KHCO₃1.2g,Na₂EDTA0.45g,溶于800mI蒸馏水中,充分搅拌,蒸馏水定容至1000mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0070] 固定液的制备

[0071] 2.0g多聚甲醛,1.0mI triton x-100,溶于80mI PBS中,充分搅拌,PBS定容至100mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0072] 封闭液的制备

[0073] 5g BSA,溶液80mI PBS中,充分搅拌,PBS定容至100mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0074] 真空采血管

[0075] 外购真空采血管,内含EDTA(乙二胺四乙酸),可防止血液标本凝固。

[0076] 过滤装置

- [0077] 外购微孔滤膜可取出的过滤装置。
- [0078] 微孔滤膜
- [0079] 外购孔径为5 μ m的醋酸纤维滤膜。
- [0080] 染色池
- [0081] 外购直径为35mm的培养皿。
- [0082] 实施例2
- [0083] 本发明试剂盒的制备。
- [0084] 循环肿瘤细胞吸附剂的制备
- [0085] a、取粒径为100 μ m的聚丙烯酸酯微球5mI,加入10mI 10moI/L的NaOH,60mI环氧氯丙烷,于50 $^{\circ}$ C水浴震荡活化1h,用蒸馏水洗涤3次,每次1min,加入8mI 3moI/L的NaOH,30mI的1,6-己二胺,于60 $^{\circ}$ C水浴震荡反应12h,用蒸馏水洗涤3次,每次3min,备用。
- [0086] b、取上述处理后的微球,加入20mI PBS(磷酸缓冲液,PH 7.2),溶胀微球,加入0.5mI预先配制好的5.0mg/mI浓度的DPS,室温反应1h,吸弃反应液,PBS洗涤3次,每次5min,备用。
- [0087] c、取上述微球,加入5mI预先配制好的15 μ g/mI的EpCAM抗体溶液,搅拌混匀,于37 $^{\circ}$ C反应3h,即得到吸附剂溶液,4 $^{\circ}$ C保存。
- [0088] 肿瘤细胞荧光纳米探针的制备
- [0089] a、取粒径为2.0 μ m发光色为红色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液。
- [0090] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ INHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。
- [0091] c、将10 μ g Vimentin抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。
- [0092] 白细胞荧光纳米探针的制备
- [0093] a、取粒径为1.0 μ m发光色为绿色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS,制成荧光量子点溶液。
- [0094] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ INHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。
- [0095] c、将7.5 μ g CD33抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。
- [0096] 细胞核特异性探针的制备
- [0097] 5mg Hoechst 33258固体粉末溶于10mI PBS,4 $^{\circ}$ C保存,用时稀释100倍。
- [0098] 缓冲液的制备
- [0099] NaCl 8.0g,KCl 0.2g,KH₂PO₄0.24g,Na₂HPO₄•2H₂O 1.56g,溶于800mI蒸馏水中,用盐酸调pH值为7.4,蒸馏水定容至1000mI,高压灭菌,4 $^{\circ}$ C保存。

- [0100] 裂解液的制备
- [0101] NH_4Cl 8.29g, KHCO_3 1.0g, Na_2EDTA 0.37g, 溶于800mI蒸馏水中, 充分搅拌, 蒸馏水定容至1000mI, 微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存。
- [0102] 固定液的制备
- [0103] 3.0g多聚甲醛, 0.75mI triton x-100, 溶于80mI PBS中, 充分搅拌, PBS定容至100mI, 微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存。
- [0104] 封闭液的制备
- [0105] 5g BSA, 溶液80mI PBS中, 充分搅拌, PBS定容至100mI, 微孔滤膜过滤除菌, 4℃保存。
- [0106] 真空采血管
- [0107] 外购真空采血管, 内含EDTA(乙二胺四乙酸), 可防止血液标本凝固。
- [0108] 过滤装置
- [0109] 外购微孔滤膜可取出的过滤装置。
- [0110] 微孔滤膜
- [0111] 外购孔径为8 μm 的聚碳酸酯滤膜。
- [0112] 染色池
- [0113] 外购直径为35mm的培养皿。
- [0114] 实施例3
- [0115] 本发明试剂盒的制备。
- [0116] 循环肿瘤细胞吸附剂的制备
- [0117] a、取粒径为50 μm 的聚乙烯醇微球5mI, 加入10mI 10moI/L的NaOH, 60mI环氧氯丙烷, 于50℃水浴震荡活化1h, 用蒸馏水洗涤3次, 每次1min, 加入8mI 3moI/L的NaOH, 30mI的1,6-己二胺, 于60℃水浴震荡反应12h, 用蒸馏水洗涤3次, 每次3min, 备用。
- [0118] b、取上述处理后的微球, 加入20mI PBS(磷酸缓冲液, PH 7.2), 溶胀微球, 加入0.4mI预先配制好的5.0mg/mI浓度的戊二醛, 室温反应1h, 吸弃反应液, PBS洗涤3次, 每次5min, 备用。
- [0119] c、取上述微球, 加入3mI预先配制好的15 μg /mI的EGFR抗体溶液, 搅拌混匀, 于37℃反应3h, 即得到吸附剂溶液, 4℃保存。
- [0120] 肿瘤细胞荧光纳米探针的制备
- [0121] a、取粒径为0.1 μm 发光色为红色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS, 制成荧光量子点溶液。
- [0122] b、称取5mg EDC和5mg NHS, 分别加入5mI PBS溶解, 配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液, 取300 μI EDC溶液加入上述荧光量子点溶液, 于4℃震荡反应15min, 再加入300 μI NHS溶液, 混匀反应30min, 用PBS快速洗涤两次, 备用。
- [0123] c、将7.5 μg pIastin-3抗体加入到上述荧光量子点中, 室温下震荡反应4h; 用PBS洗涤3次, 去除未反应的抗体, 最后分散于100 μL PBS(含有0.05% NaN_3 和1% BSA)中, 置于4℃保存备用。
- [0124] 白细胞荧光纳米探针的制备
- [0125] a、取粒径为2.0 μm 发光色为绿色的荧光量子点1mg溶于0.5mI PBS, 制成荧光量子

点溶液。

[0126] b、称取5mg EDC和5mg NHS,分别加入5mI PBS溶解,配制成浓度为1mg/mI的EDC溶液和浓度为1mg/mI的NHS溶液,取300 μ I EDC溶液加入上述荧光量子点溶液,于4 $^{\circ}$ C震荡反应15min,再加入300 μ I NHS溶液,混匀反应30min,用PBS快速洗涤两次,备用。

[0127] c、将10 μ g CD15抗体加入到上述荧光量子点中,室温下震荡反应4h;用PBS洗涤3次,去除未反应的抗体,最后分散于100 μ L PBS(含有0.05%NaN₃和1%BSA)中,置于4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0128] 细胞核特异性探针的制备

[0129] 5mg DAPI固体粉末溶于10mI PBS,4 $^{\circ}$ C保存,用时稀释100倍。

[0130] 缓冲液的制备

[0131] NaCl 8.0g,KCl 0.2g,KH₂PO₄0.24g,Na₂HPO₄•2H₂O 1.56g,溶于800mI蒸馏水中,用盐酸调pH值为7.4,蒸馏水定容至1000mI,高压灭菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0132] 裂解液的制备

[0133] NH₄Cl 13.0g,KHCO₃1.5g,Na₂EDTA0.5g,溶于800mI蒸馏水中,充分搅拌,蒸馏水定容至1000mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0134] 固定液的制备

[0135] 4.0g多聚甲醛,0.5mI triton x-100,溶于80mI PBS中,充分搅拌,PBS定容至100mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0136] 封闭液的制备

[0137] 5g BSA,溶液80mI PBS中,充分搅拌,PBS定容至100mI,微孔滤膜过滤除菌,4 $^{\circ}$ C保存。

[0138] 真空采血管

[0139] 外购真空采血管,内含EDTA(乙二胺四乙酸),可防止血液标本凝固。

[0140] 过滤装置

[0141] 外购微孔滤膜可取出的过滤装置。

[0142] 微孔滤膜

[0143] 外购孔径为10 μ m的聚碳酸酯滤膜。

[0144] 染色池

[0145] 外购直径为35mm的培养皿。

[0146] 实施例4

[0147] 实施例1、2、3制备的循环肿瘤细胞吸附剂对肿瘤细胞捕获效果的考察

[0148] (本实验中,使用的MCF7-pEGFP在荧光显微镜下发出绿色荧光,因此染色过程无需加入特异性肿瘤细胞荧光纳米探针)

[0149] 1)取7.5mI的PBS,加入一定数量的MCF7-pEGFP细胞,搅拌混匀,加入5 μ I上述实施例中制备的循环肿瘤细胞吸附剂,37 $^{\circ}$ C孵育45min。

[0150] 2)将孵育后的混悬液加入过滤装置中,抽滤使液体缓慢通过过滤器和滤膜,加入5mI缓冲液冲洗上样管管壁和滤膜。

[0151] 3)取出微孔滤膜放入染色池,加入3mI对应试剂盒中的固定液,37 $^{\circ}$ C固定5min,弃去固定液,再加入5mI对应试剂盒中的封闭液,4 $^{\circ}$ C封闭45min,弃去封闭液,用5mI缓冲液轻

柔漂洗滤膜2次,每次1min,37℃孵育45min,弃去上清,加入5mI缓冲液轻柔漂洗2次,除去附着于滤膜上的染色剂。

[0152] 4) 将滤膜从染色池取出,固定于载玻片上,在荧光显微镜下对肿瘤细胞进行鉴定和计数。结果如表2所示,可见本发明试剂盒法对肿瘤细胞捕获效率高,效果理想。

[0153] 表2. 加入肿瘤细胞检出率

肿瘤细胞数目 (理论混入值)	实验次数	吸附率 (%)		
		实施例 1 试剂盒	实施例 2 试剂盒	实施例 3 试剂盒
10	实验 1	100	90	100
	实验 2	90	100	100
	实验 3	90	90	100
	平均检出率	96.6	96.6	100.0
20	实验 1	95	100	90
	实验 2	100	100	100
	实验 3	95	90	95
	平均检出率	96.6	96.6	95.0
40	实验 1	100	90	97.5
	实验 2	90	100	95
	实验 3	95	92.5	95
	平均检出率	95	94.1	95.8

[0154] 实施例5

[0155] 使用实施例1、2、3制备的试剂盒检测体外模拟循环肿瘤细胞

[0156] 1) 将10个肿瘤细胞加入7.5mI健康志愿者的外周血中,模拟肿瘤患者外周血标本。加入30mI缓冲液,800rpm离心5分钟,弃去上清液,向细胞沉淀中加入37.5mI 4℃预冷的裂解液,轻轻吹打混匀,4℃裂解5min;800rpm离心5分钟,弃去上层红色清液,沉淀部分加入5mI缓冲液重悬细胞,800rpm离心5分钟,去上清,加入7.5mI缓冲液重悬细胞。

[0157] 2) 上述细胞重悬液中加入10μI肿瘤细胞吸附剂,37℃孵育45min。

[0158] 3) 将孵育后的混悬液加入过滤装置中,抽滤处理使液体缓慢通过滤器和滤膜,加入5mI缓冲液冲洗上样管管壁和滤膜。

[0159] 4) 取出微孔滤膜放入染色池,加入3mI固定液,37℃固定5min,弃去固定液,加入5mI封闭液,4℃封闭45min,弃去封闭液,用5mI缓冲液轻柔漂洗滤膜2次,每次1min,依次加入2μI细胞核特异性探针,2μI白细胞荧光纳米探针,2μI肿瘤细胞荧光纳米探针,37℃孵育45min,弃去上清,加入5mI缓冲液轻柔漂洗2次,除去附着于滤膜上的染色剂。

[0160] 5) 将滤膜从染色池取出,固定于载玻片上,在荧光显微镜下,按照判定标准对肿瘤细胞进行鉴定和计数。肿瘤细胞判定标准:细胞同时出现蓝色和红色荧光;白细胞判定标准:细胞同时出现蓝色和绿色荧光。

[0161] 结果如表3所示,可见本发明试剂盒对体外模拟循环肿瘤细胞检测效果理想。

[0162] 表3. 体外模拟循环肿瘤细胞检测率

[0164]

细胞株	来源	实验次数	检测率 (%)		
			实施例 1 试剂盒	实施例 2 试剂盒	实施例 3 试剂盒
HepG2	肝	实验 1	90	80	90
		实验 2	80	60	90
		实验 3	90	100	70
		平均检出率	86.6	80.0	83.3
HCC-9724	肝	实验 1	70	80	70
		实验 2	90	80	90
		实验 3	100	90	80
		平均检出率	86.6	83.3	80.0
A549	肺	实验 1	60	100	90
		实验 2	80	70	80
		实验 3	90	70	80
		平均检出率	76.6	80.0	83.3
NCI-H358	肺	实验 1	80	70	80
		实验 2	90	90	80
		实验 3	100	90	90
		平均检出率	90	83.3	83.3
MDA-MB-231	乳腺	实验 1	100	80	90
		实验 2	80	70	70
		实验 3	90	90	70
		平均检出率	90	80.0	76.6
MCF-7	乳腺	实验 1	80	90	90
		实验 2	80	90	100
		实验 3	90	90	100
		平均检出率	83.3	90.0	96.6

[0165] 实施例6

[0166] 使用实施例1、2、3制备的试剂盒对癌症患者血液样本进行检测

[0167] 1) 选择5例正常健康志愿者、10例肺癌患者、10例乳腺癌患者血液样本7.5mI。加入30mI缓冲液,800rpm离心5分钟,弃去上清液,向细胞沉淀中加入50mI 4℃预冷的裂解液,轻轻吹打混匀,4℃裂解5min;800rpm离心5分钟,弃去上层红色清液,沉淀部分加入5mI缓冲液重悬细胞,800rpm离心5分钟,去上清,加入7.5mI缓冲液重悬细胞。

[0168] 2) 上述重悬液中加入7.5μI肿瘤细胞吸附液,于37℃孵育45min。

[0169] 3) 将孵育后的混悬液加入过滤装置中,抽滤处理使液体缓慢通过过滤器和滤膜,加入5mI缓冲液冲洗上样管管壁和滤膜。

[0170] 4) 取出微孔滤膜放入染色池,加入3mI固定液,37℃固定5min,弃去固定液,加入5mI封闭液,4℃封闭45min,弃去封闭液,用5mI缓冲液轻柔漂洗滤膜2次,每次1min,依次加

入2 μ I细胞核特异性探针,2 μ I白细胞荧光纳米探针,2 μ I肿瘤细胞荧光纳米探针,37 $^{\circ}$ C孵育45min,弃去上清,加入5mI缓冲液轻柔漂洗2次,除去附着于滤膜上的染色剂。

[0171] 5) 将滤膜从染色池取出,固定于载玻片上,在荧光显微镜下,按照判定标准对肿瘤细胞进行鉴定和计数。肿瘤细胞判定标准:细胞同时出现蓝色和红色荧光;白细胞判定标准:细胞同时出现蓝色和绿色荧光。

[0172] 结果如表4所示,可见本发明试剂盒可成功检测肿瘤患者循环肿瘤细胞数目,有望用于癌症的早期诊断、疗效评估、复发监测。

[0173] 表4 7.5mI癌症患者血液样本CTC检测数

[0174]

人群	TNM分期	CTC/7.5 ml (个)		
		实施例1 试剂盒	实施例2 试剂盒	实施例3 试剂盒
健康志愿者 1	——	0	0	0
健康志愿者 2	——	0	0	0
健康志愿者 3	——	0	0	0
健康志愿者 4	——	0	0	0
健康志愿者 5	——	0	0	0
肺癌患者 1	T3N2M1	31	27	24
肺癌患者 2	T2N2M0	14	19	13
肺癌患者 3	T3N0M1	5	8	6
肺癌患者 4	T2N2M1	2	1	0
肺癌患者 5	T4N3M1	13	17	10
肺癌患者 6	T3N0M0	0	0	0
肺癌患者 7	T3N1M1	4	6	3
肺癌患者 8	T4N2M1	22	29	30
肺癌患者 9	T2N1M0	0	0	1
肺癌患者 10	T2N2M0	18	24	16
乳腺癌患者 1	T3N2M0	13	15	10
乳腺癌患者 2	T2N1M1	16	20	15
乳腺癌患者 3	T3N0M0	1	3	0
乳腺癌患者 4	T3N1M0	3	0	1
乳腺癌患者 5	T3N2M1	27	40	29
乳腺癌患者 6	T2N2M1	6	1	4
乳腺癌患者 7	T3N2M0	16	24	22
乳腺癌患者 8	T3N0M0	0	0	2
乳腺癌患者 9	T3N1M1	1	1	0
乳腺癌患者 10	T2N1M0	2	1	0

专利名称(译)	一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法		
公开(公告)号	CN106645726A	公开(公告)日	2017-05-10
申请号	CN201610878477.9	申请日	2016-10-09
[标]申请(专利权)人(译)	天津普拉德生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津普拉德生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津普拉德生物科技有限公司		
[标]发明人	李文忠 漆敏		
发明人	李文忠 漆敏		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/56966 G01N33/531 G01N33/533 G01N33/56972		
代理人(译)	侯力		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种循环肿瘤细胞快速检测试剂盒及其制备和应用方法。本试剂盒联合免疫捕获和膜过滤的方法分离循环肿瘤细胞。所述试剂盒包括循环肿瘤细胞吸附剂、肿瘤细胞荧光纳米探针、白细胞荧光纳米探针；所述循环肿瘤细胞吸附剂中肿瘤细胞表面特异性抗体选自：EpCAM或EGFR；所述白细胞荧光纳米探针中白细胞特异性抗体选自：CD45、CD15或CD33；所述肿瘤细胞荧光纳米探针中肿瘤细胞特异性抗体选自：CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin或plastin-3；本试剂盒具有操作便捷、检测时间短、快速准确、无需大型仪器、可降低癌症筛查成本、易被患者接受等特点，可产生良好的经济和社会效益。

组分	主要成分
循环肿瘤细胞吸附剂	载体通过偶联剂与 EpCAM 或 EGFR 单克隆抗体形成的载体-抗体复合物
白细胞荧光纳米探针	CD45、CD15 或 CD33 抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得
肿瘤细胞荧光纳米探针	CK8/CK18/CK19、PanCK、Vimentin 或 plastin-3 抗体与荧光纳米量子点通过偶联剂偶联制得
细胞核特异性探针	DAPI 或 Hoechst 33258
缓冲液	PBS 缓冲液
裂解液	红细胞裂解液主要成分为 NH ₄ Cl
固定液	含多聚甲醛、triton x-100
封闭液	含 BSA 的 PBS 溶液
真空采血管	内含 EDTA (乙二胺四乙酸)，可防止血液标本凝固
过滤装置	微孔滤膜可取出
微孔滤膜	孔径为 5-10μm
染色池	直径为 35mm 的培养皿