



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105911269 A

(43)申请公布日 2016.08.31

(21)申请号 201610121071.6

C12Q 1/68(2006.01)

(22)申请日 2016.03.03

G01N 33/574(2006.01)

(71)申请人 复旦大学附属儿科医院

地址 201102 上海市闵行区万源路399号外科

申请人 上海张江转化医学研发中心有限公司

(72)发明人 董瑞 张楨珍 董岢然 郑珊

吴唯唯 李凯 郑超 刘翔琪
许骋

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限公司 31266

代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书1页 说明书10页 附图2页

(54)发明名称

腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤CTC检测试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明提供了腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤CTC检测试剂盒及检测方法。具体的,本发明提供了一种循环肿瘤细胞检测试剂盒,所述试剂盒含有如下组分:(i)红细胞与白细胞联合抗体;(ii)白细胞表面共同抗原抗体;(iii)细胞核荧光染料;和(iv)染色体FISH探针。采用本发明的检测试剂盒和方法可以在只需采集少量的血(如2ml或更少)的情况下,精确、快速检测循环肿瘤细胞,从而诊断腹膜后起源的神经母细胞瘤的患病风险。

1. 一种循环肿瘤细胞检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒含有如下组分:
 - (i)红细胞与白细胞联合抗体;
 - (ii)白细胞表面共同抗原抗体;
 - (iii)细胞核荧光染料;和
 - (iv)染色体FISH探针。
2. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述白细胞表面共同抗原抗体包括CD45抗体。
3. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述细胞核荧光染料包括DAPI染料。
4. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述染色体FISH探针包括针对染色体着丝粒的FISH探针。
5. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括一种或种额外的检测相关试剂,所述检测相关试剂选自下组:分离介质、CTC细胞洗涤缓冲液、红细胞裂解液、细胞固定液、通透处理剂、洗涤缓冲液母液(SSC)、NP-40、抗体稀释液、或其组合。
6. 如权利要求1所述的检测试剂盒,其特征在于,所述循环肿瘤细胞包括腹膜后起源的神经母细胞瘤的肿瘤细胞。
7. 一种权利要求1所述检测试剂盒的用途,其特征在于,用于制备诊断循环肿瘤细胞的产品。
8. 一种非诊断性的检测循环肿瘤细胞的方法,其特征在于,包括步骤:
 - (a)提供一待测血样,所述血样体积为1-4mI;
 - (b)去除血浆后,用权利要求1所述的检测试剂盒处理,得到经处理的血样;
 - (c)用荧光原位杂交技术和免疫荧光染色技术对经处理的血样进行检测,观察是否存在所述循环肿瘤细胞。
9. 一种试剂组合,其特征在于,所述试剂组合包括:
 - (i)红细胞与白细胞联合抗体;
 - (ii)白细胞表面共同抗原抗体;
 - (iii)细胞核荧光染料;和
 - (iv)染色体FISH探针。
10. 如权利要求9所述试剂组合的用途,其特征在于,用于制备诊断腹膜后起源的神经母细胞瘤的试剂盒。

腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤CTC检测试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞检测领域；具体地，涉及一种循环肿瘤细胞检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 小儿肿瘤是威胁儿童健康的重要问题，目前已成为了继外伤之后导致儿童死亡的第二大原因。其中，神经母细胞瘤是小儿最常见的腹部恶性肿瘤，占有儿童肿瘤的8~10%，占婴儿总癌症发病率的28%，为婴儿阶段发病率最高的恶性肿瘤，位居迄今为止治疗最为棘手的小儿常见恶性实体肿瘤之首。

[0003] 神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是源于节后交感神经系统的胚胎性恶性肿瘤，主要起源于肾上腺，但也可起源于肾上腺外颈、纵膈、椎旁等交感神经链分布的任何部位，如腹膜后、胸部、颈部等，其发病率仅低于白血病和中枢神经系统肿瘤。在临床上，神经母细胞瘤往往包绕重要结构脏器，完整切除率仅为70%，尽管采用手术、化疗、放疗和生物治疗等综合性措施，却始终不能根除其定植于体内的微小残留灶，从而导致治疗停止后的复发和再次转移。欧美国家的数据表明，高危组的神经母细胞瘤(肿瘤包绕重要结构脏器，无法完整切除，有远处转移，N-myc基因扩增和病理类型为预后不良型的肿瘤生物学类型)的5年总体生存率仅为30-40%，而在国内仅为20-30%。其所处情况之严峻使得对该肿瘤的诊断及治疗研究一直是医学界研究的热点和难点。

[0004] 神经母细胞瘤具有恶性程度高、发生部位广、疾病进展迅速、易发生早期骨髓、骨和肝、脑、肺等其他脏器转移的特点，且疾病早期多无特异性全身症状，因此大多数患儿(大于50%)确诊时疾病已进展至中、晚期，预后较差，长期存活率低。另外，该肿瘤起病隐匿，与Ewing肉瘤、原发性神经外胚层肿瘤等小圆细胞肿瘤起源相似，病理形态相似，难以鉴别。加之小儿查体时配合性较差，且不能完整准确地描述症状也给疾病的确诊带来困难，导致了一定程度的误诊、漏诊。

[0005] 现有研究结果显示，以腹部包块为首发的患儿，如能对疾病早发现、早分期，即使分期较差的患儿也不发生骨髓转移，治疗效果堪好。由此可见，在现有的治疗水平基础上，寻找早期或超早期的诊断方法是何其重要，这无疑具有重大的临床和社会意义。

[0006] 目前，神经母细胞瘤的确诊，主要借手术中取得肿瘤组织，进行病理学检查，这一方法通常需要在全麻下进行，麻醉和手术具有巨大的风险，严重者导致患儿在术中术后死亡；而且，开放手术破坏了肿瘤包膜的完整性，又会进一步增加肿瘤的侵袭力和转移，结果往往是得不偿失。

[0007] CTC(循环肿瘤细胞)是指自发或诊疗操作时而进入外周血的肿瘤细胞。具有高度活力和高度转移潜能的CTC可以在循环系统中存活，并在合适的环境中增殖，导致肿瘤的复发和转移。对CTC的监测能够为肿瘤的临床进展、疗效判断和预后评估等提供极具价值的科学依据。

[0008] 现有的CTC检测方法通常由富集和鉴定两部分组成，其中富集是CTC检测的难点，

也是CTC分子特征检测和CTC计数的关键。常用的检测方法如过滤法、免疫磁珠分离法、CTC芯片等需要的样本采集量比较大,操作过程复杂,检测费用也比较高。

[0009] 此外,目前的标准或常规方法需要采集约7.5mI或更多的血液,而儿童尤其是婴幼儿采血相对比较困难,也不宜大量采血,这无疑是对患儿及其家庭经济状况都提出了巨大的挑战。

[0010] 因此,本领域迫切需要开发一种微创,采血量少,检测简单快速且能实现早期诊循环肿瘤细胞(如腹膜后起源的神经母细胞瘤)的检测试剂盒。

发明内容

[0011] 本发明的目的是提供一种微创,采血量少,检测简单快速且能实现早期诊循环肿瘤细胞(如腹膜后起源的神经母细胞瘤)的检测试剂盒。

[0012] 本发明第一方面提供了一种循环肿瘤细胞检测试剂盒,所述试剂盒含有如下组分:

[0013] (i)红细胞与白细胞联合抗体;

[0014] (ii)白细胞表面共同抗原抗体;

[0015] (iii)细胞核荧光染料;和

[0016] (iv)染色体FISH探针。

[0017] 在另一优选例中,各组分分别位于不同容器中。

[0018] 在另一优选例中,所述白细胞表面共同抗原抗体包括CD45抗体。

[0019] 在另一优选例中,所述细胞核荧光染料包括DAPI染料。

[0020] 在另一优选例中,所述染色体FISH探针包括针对染色体着丝粒的FISH探针。

[0021] 在另一优选例中,所述染色体FISH探针包括针对8号染色体的FISH探针。

[0022] 在另一优选例中,所述染色体FISH探针包括CEP8。

[0023] 在另一优选例中,所述白细胞表面共同抗原抗体包括带有可检测标记或不带有检测标记的红细胞与白细胞联合抗体。

[0024] 在另一优选例中,所述染色体FISH探针包括带有可检测标记或不带有可检测标记的染色体FISH探针。

[0025] 在另一优选例中,所述可检测标记选自下组:生色团、化学发光基团、荧光团、同位素或酶。

[0026] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括用于采集血样的采样容器,采样体积 $\leq 4\text{mI}$,较佳地, $\leq 3\text{mI}$,更佳地, $\leq 2.5\text{mI}$ 。

[0027] 在另一优选例中,所述采样体积 ≥ 1 。

[0028] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括一种或种额外的检测相关试剂,所述检测相关试剂选自下组:分离介质、CTC细胞洗涤缓冲液、红细胞裂解液、细胞固定液、通透处理剂、洗涤缓冲液母液(SSC)、NP-40、抗体稀释液、或其组合。

[0029] 在另一优选例中,所述检测相关试剂可以为浓缩形式、原液形式或经稀释可直接使用的形式。

[0030] 在另一优选例中,所述通透处理剂包括胃蛋白酶和/或甲醛。

[0031] 在另一优选例中,所述抗体稀释液包括PBS。

[0032] 在另一优选例中,所述抗体稀释液包括含有FBS的PBS,所述FBS的含量为0.5-5%,较佳地,1-4%,更佳地,1-3%,以抗体稀释液的总重计。

[0033] 在另一优选例中,所述试剂盒还包括标签或说明书,所述标签或说明书注明所述试剂盒采集的血样量为0.5-3.5mI,较佳地,1-3mI,更佳地,1.5-2.5mI。

[0034] 在另一优选例中,所述循环肿瘤细胞包括腹膜后起源的神经母细胞瘤的肿瘤细胞。

[0035] 本发明的第二方面提供了一种本发明第一方面所述检测试剂盒的用途,用于制备诊断循环肿瘤细胞的产品。

[0036] 在另一优选例中,所述循环肿瘤细胞包括腹膜后起源的神经母细胞瘤。

[0037] 在另一优选例中,所述检测试剂盒可用于配套的检测设备自动化操作。

[0038] 本发明第三方面提供了一种非诊断性的检测循环肿瘤细胞的方法,包括步骤:

[0039] (a)提供一待测血样,所述血样体积为1-4mI;

[0040] (b)去除血浆后,用本发明第一方面所述的检测试剂盒处理,得到经处理的血样;
和

[0041] (c)用荧光原位杂交技术和免疫荧光染色技术对经处理的血样进行检测,观察是否存在所述循环肿瘤细胞。

[0042] 在另一优选例中,所述处理还包括用所述相关检测试剂进行处理,得到经处理的血样。

[0043] 在另一优选例中,所述哺乳动物包括人。

[0044] 在另一优选例中,所述人的年龄为0.5-15岁,较佳地,1-12岁,更佳地,1-10岁。

[0045] 在另一优选例中,所述的检测为定量检测或定性检测。

[0046] 在另一优选例中,所述方法包括步骤(d),对经处理的血样进行成像分析,根据成像结果,确定是否存在所述循环肿瘤细胞,并观察所述循环肿瘤细胞的数量。

[0047] 在另一优选例中,当DAPI+/CD45-/CEP8的细胞总数(即CTC总数) ≥ 3 ,较佳地,4-9,更佳地,4-7时,则可判断该细胞为循环肿瘤细胞(CTC细胞)。

[0048] 在另一优选例中,所述循环肿瘤细胞包括腹膜后起源的神经母细胞瘤的肿瘤细胞。

[0049] 在另一优选例中,当DAPI+/CD45-/CEP8的细胞总数(即CTC总数) ≥ 3 ,较佳地,4-9,更佳地,4-7时,则可判断对象患有腹膜后起源的神经母细胞瘤。

[0050] 本发明第四方面提供了一种试剂组合,所述试剂组合包括:

[0051] (i)红细胞与白细胞联合抗体;

[0052] (ii)白细胞表面共同抗原抗体;

[0053] (iii)细胞核荧光染料;和

[0054] (iv)染色体FISH探针。

[0055] 本发明第五方面提供了一种本发明第四方面所述试剂组合的用途,用于制备诊断腹膜后起源的神经母细胞瘤的试剂盒。

[0056] 应理解,在本发明范围内中,本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合,从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅,在此不再一一累述。

附图说明

- [0057] 图1显示了CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。
- [0058] 图2显示了CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。
- [0059] 图3显示了手术前,CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。
- [0060] 图4显示了手术后,CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。
- [0061] 附图中,merge表示合并或叠加,WBC表示白细胞;CTC表示循环肿瘤细胞。

具体实施方式

[0062] 本发明人经过长期广泛而深入的研究,通过大量筛选和测试,首次意外地发现,用含有(i)红细胞与白细胞联合抗体;(ii)白细胞表面共同抗原抗体(如CD45抗体);(iii)细胞核荧光染料(如DAPI);和(iv)染色体FISH探针(如CEP8)的试剂盒检测循环肿瘤细胞(如腹膜后起源的神经母细胞瘤),只需要采集极少量的血液(如2mL或更少)就可快速、精确检测到循环肿瘤细胞,特别适合用于诊断腹膜后起源的神经母细胞瘤(尤其是腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤)。在此基础上,本发明人完成了本发明。

[0063] 检测试剂盒

[0064] 本发明提供一种快速、低成本、有效的检测腹膜后起源的神经母细胞瘤CTC检测试剂盒。

[0065] 在本发明中,本发明的试剂盒包含以下组分:

[0066] (i)红细胞与白细胞联合抗体;

[0067] (ii)白细胞表面共同抗原抗体;

[0068] (iii)细胞核荧光染料;和

[0069] (iv)染色体FISH探针。

[0070] 在本发明中,本发明的试剂盒中的各个组分之间的比例,以及各个组分的含量不受限制。

[0071] 本发明的试剂中的各组分可购买获得,或用常规方法制备。

[0072] 本发明的试剂盒可精确检测循环肿瘤细胞(腹膜后起源的神经母细胞瘤),并只需采集很少的需(0.5-3.5mL,较佳地,1-3mL,更佳地,1.5-2.5mL)。

[0073] 检测方法

[0074] 本发明还提供了一种检测循环肿瘤细胞(如腹膜后起源的神经母细胞瘤)的方法。

[0075] 在一优选实施方式中,本发明所述的检测方法包括步骤:

[0076] (i)采集患者外周血2mL于BD抗凝管,48小时内(尽量24h内)用本发明试剂盒进行检测。

[0077] (ii)对全血中的循环肿瘤细胞进行富集,富集的细胞固定后涂到载玻片上;

[0078] (iii)对上述(2)所述载玻片上的细胞采用荧光原位杂交技术和免疫荧光染色技术进行鉴定;

[0079] (iv)将上述(3)所得细胞玻片置于荧光显微镜下判读,拍照记录下CTC细胞图,并统计CTC细胞总数。

[0080] (v)结果分析。如果检测的目的是判别肿瘤类型,当CTC细胞数 ≥ 15 个/2mL血,则可

判断该患者肿瘤类型为腹膜后起源的神经母细胞瘤的可能性很大;如果检测目的是肿瘤进展的实时监控,则可比较本次检测结果与上次检测结果(通常监控检测的间隔时间是一个月),通过CTC检出数值变化预示肿瘤进展情况,进而确定是否需要联合其他肿瘤干预方法或更改治疗方案。

[0081] 具体地,当采用本发明的检测腹膜后起源的神经母细胞瘤CTC检测试剂盒进行检测时,典型地可包括以下检测步骤及后续CTC细胞判读过程:

[0082] (1)循环肿瘤细胞富集部分(采用的试剂为Human CD45Depletion Cocktail试剂盒,主要参考原试剂盒说明书)

[0083] 1.1 2mL全血800g离心8分钟,去除上层血浆,加入与血浆等体积的CTC细胞洗涤缓冲液,颠倒混匀。

[0084] 1.2向上述(1.1)中体系加入100 μ L白细胞与红细胞联合抗体,充分混匀,室温孵育20分钟。

[0085] 1.3取3mL分离介质于干净15mL离心管中。向上述(1.2)中体系加入2mLCTC细胞洗涤缓冲液,充分混匀后,全部溶液体系轻轻叠加到3mL分离介质上,963g(2200rpm)离心20分钟(试剂盒说明书为1200g,我们调整后的参数离心效果更理想)。

[0086] 1.4离心后可见分层。转移上层细胞层至新的15mL离心管中,加入CTC细胞洗涤缓冲液补足体积至15mL,2000rpm离心5分钟,弃上层溶液至1mL处。(转移后的洗涤步骤为我们修改的)

[0087] 1.5(可选步骤)离心后观察沉淀有无明显的未去除干净的红细胞,如果没有或极少可直接进行以下1.6步骤,如果有则需进行红细胞处理。具体操作为:向上述1.4步骤所得溶液体系加入27 $^{\circ}$ C预热后的红细胞裂解液3mL,摇匀液体,静置3分钟,每隔1分钟摇匀一次液体。

[0088] 1.6轻轻摇动离心管以散开细胞沉淀,加入CTC细胞洗涤缓冲液补足体积至15mL,2000rpm离心5分钟。

[0089] 1.7取一防脱载玻片,用免疫组化笔画出1cm \times 1cm的方形涂布区域。

[0090] 1.8弃上层溶液至100 μ L处,轻轻吹散细胞沉淀,加入100 μ L细胞固定液,充分混匀,所得细胞悬液全部涂布至载玻片上的细胞涂布区域。

[0091] 1.9玻片静置晾干或31 \sim 32 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0092] (2)荧光原位杂交技术联合免疫荧光染色技术共同鉴定循环肿瘤细胞部分(CEP8探针可市售获得,例如购自Vysis公司)

[0093] 2.1实验前试剂准备:

[0094] a.按180 μ L/片的量取1%甲醛,37 $^{\circ}$ C预热20分钟。

[0095] b.提前将20X SSC(PH=5.3)母液用无菌去离子水10倍稀释制备成工作溶液,该溶液可多配制,最多可室温放置6个月。

[0096] c.提前配制洗涤缓冲液,可多配制,洗涤缓冲液可室温放置6个月。

[0097] 2.2将充分预热的1%甲醛与胃蛋白酶(0.05mg/mL)按180 μ L/片:20 μ L/片的比例迅速混合,立即滴加到上述1.8所得玻片的细胞涂布区域,确保溶液充分覆盖整个标本区,室温孵育10分钟。

[0098] 2.3吸弃玻片上的液体,用2X SSC 200 μ L/次.片洗涤玻片上的标本区域,一共洗涤

3次。前两次洗涤时,溶液加入后立即吸弃,最后一次溶液滴加后,静置1min后吸弃。

[0099] 2.4将标本玻片放入含有70%、85%、100%无水乙醇的染色缸中分别静置1分钟、1分钟、2分钟进行CTC细胞脱水处理。脱水处理后的玻片竖立无尘纸上轻轻嗑动,以吸干玻片流下的残留液,并用微型吹风机将玻片吹干。完全干燥的玻片立即进行下步操作。

[0100] 2.5滴加8号染色体FISH探针。按5 μ L/片的量将探针滴加至标本区中央,盖上盖玻片,用封片胶封片。本操作及以下操作均需在避光条件下进行。

[0101] 2.6荧光原位杂交。上述玻片放上杂交仪,设置杂交程序为:73 $^{\circ}$ C,10分钟;37 $^{\circ}$ C,6小时。

[0102] 2.7杂交结束前10分钟,进行抗体混合液的配制。白细胞表面共同抗原抗体(CD45抗体)用抗体稀释液按1:100进行稀释,抗体混合液按200 μ L/片的量准备。

[0103] 2.8标本免疫荧光前处理。

[0104] a.杂交结束后,使用镊子撕去封片胶,将玻片置于含有2X SSC的染色缸中,晃动移除盖玻片。立即进行以下清洗步骤。

[0105] b.2X SSC 200 μ L/次.片洗涤玻片上的标本区域,一个洗涤2次,每次静置1min。

[0106] c.洗涤缓冲液200 μ L/次.片洗涤玻片上的标本区域,一共洗涤3次。前两次洗涤时,溶液加入后立即吸弃,最后一次溶液滴加后,静置1min后吸弃。

[0107] 2.9将玻片置于湿盒中,200 μ L/片滴加抗体混合液至玻片标本区,30 $^{\circ}$ C避光孵育1小时。

[0108] 2.10吸弃玻片上的抗体混合液,用洗涤缓冲液洗涤抗体孵育后的CTC细胞。洗涤步骤同上2.8(c)。

[0109] 2.11按5 μ L/片滴加DAPI Mounting于标本区中央,盖上盖玻片。即完成了CTC的试剂盒检测部分。

[0110] (3)CTC镜下判读。将以上所得细胞玻片置于荧光显微镜下判读,同时拍照记录下所有CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。读取细胞玻片时,需先从视野的左上角开始,移动载玻片过程中不要有视野的遗漏。在40倍物镜下,首先在红色通道中寻找可疑细胞,即没有红色外圈(CD45不表达)的裸核细胞,然后再分别确认该可疑细胞在蓝色通道中是否有蓝色荧光信号和其在橙色通道中的看到的橙色荧光信号点个数,进而判断该细胞是否为CTC细胞。凡是同时具备DAPI+/CD45-/CEP8(即:CD45表达阴性,CEP8鉴定为异倍体)条件的细胞即可判别为CTC细胞。

[0111] 通常,当DAPI+/CD45-/CEP8细胞的数量 ≥ 3 时,则可判定所检测样品中患有数量较多的CTC细胞(如腹膜后起源的神经母细胞瘤的肿瘤细胞),进而判断被检测对象患有神经母细胞瘤(尤其是腹膜后起源的神经母细胞瘤)。

[0112] 用本发明的检测方法可快速、精确的检测循环肿瘤细胞,从而准确地诊断(或辅助诊断)对象是否患有腹膜后起源的神经母细胞瘤。

[0113] 本发明的主要优点包括:

[0114] (1)本发明仅需2mL患者外周血,微创且血液采集量少,样本获取比较容易,也极大减轻了对患儿尤其是不足周岁的幼儿的伤害。

[0115] (2)本发明的检测试剂盒及检测方法,操作简单,能快速、准确辅助诊断患儿肿瘤类型是否为腹膜后起源神经母细胞瘤,降低误诊率,也实现了对肿瘤早发现、早分期、早治

疗,提高患儿治疗效率和生存率。

[0116] (3)相较于现有的CTC检测方法,本发明检测试剂盒及检测方法极大降低了检测成本,大大减轻了患者及其家庭经济负担,对需进行连续监控检测的患者尤为适用。

[0117] (4)本发明的试剂盒可检测患儿外周血循环肿瘤细胞情况,辅助诊断患儿肿瘤类型是否为腹膜后起源的神经母细胞瘤,或实时监控腹膜后起源神经母细胞瘤患儿的肿瘤进展状况,以实现对该类疾病做到早发现早分期早治疗或及时调整治疗方案的目的,这对腹膜后起源的神经母细胞瘤的诊断和治疗有着及其重要的意义。

[0118] (5)本发明通过定期外周血CTC检测,还可对已实施手术或进行其他治疗了的患儿进行疾病进展的监控,以便及时调整治疗方案,提高治疗效率。

[0119] (6)本发明的试剂盒可配合自动化的设备,使得循环肿瘤细胞的检测能够自动化完成。

[0120] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而并不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数是重量百分比和重量份数。

[0121] 本发明所用的材料如无特别说明,均为市售产品。

[0122] 实施例1

[0123] 腹膜后起源的神经母细胞瘤的诊断试剂盒的制备及检测效果验证

[0124] 制备检测腹膜后起源的神经母细胞瘤CTC检测试剂盒,所述试剂盒包括:白细胞与红细胞联合抗体、分离介质、CTC细胞洗涤缓冲液(2%FBS+PBS)、红细胞裂解液、细胞固定液、胃蛋白酶(0.05mg/mL)、1%甲醛、20×SSC、8号染色体FISH探针、NP-40、抗体稀释液(1%FBS+PBS)、白细胞表面共同抗原抗体(CD45抗体)、细胞核荧光染料(DAPI)。

[0125] 试剂盒使用前部分工作溶液需提前进行以下准备:

[0126] (1)2×SSC的制备:取50mL 20×SSC(PH=5.3)母液,加入450mL无菌去离子水,充分混匀即可获得500mL 20X SSC(PH=5.3)溶液。

[0127] (2)洗涤缓冲液即0.1%NP-40的2×SSC溶液(PH=7.0~7.5)的制备:取上述(1)所得的20×SSC(PH=5.3)100mL、另取1mL NP-40及849mL无菌去离子水混匀,调PH至7.0~7.5,最终定容至1000mL即可。

[0128] (3)抗体稀释液(1%FBS+PBS)的制备:取1mL FBS加入99mL PBS,充分混匀即可。

[0129] 实施例2

[0130] 用实施例1制备的腹膜后来源神经母细胞瘤CTC检测试剂盒,进行检测并进行验证,具体步骤如下:

[0131] (1)采集数例:

[0132] 第一批次试验:已确诊的腹膜后来源神经母细胞瘤患儿外周血2mL,或对照个体的外周血2mI(其它肿瘤个体的外周血C1,或10个正常个体的外周血C2);

[0133] 第二批次试验:已确诊的腹膜后来源神经母细胞瘤患儿外周血2mL,以及其它肿瘤个体的外周血C3至C14,以及20个正常个体的外周血C15

[0134] (2)进行CTC的富集及细胞玻片的制备:

[0135] a. 2mL外周血800g离心8分钟,去除血浆,加入相应等体积的CTC细胞洗涤缓冲液,

混匀后再加入100 μ L白细胞与红细胞联合抗体,室温孵育20分钟。再加入2mLCTC细胞洗涤缓冲液,充分混匀后,全部体系叠加到3mL分离介质上,963g(2200rpm)离心20分钟,收集上层细胞层至新的15mL离心管中,即实现了CTC的富集;

[0136] b.对以上收集的细胞用15mL细胞洗涤缓冲液,2000rpm离心5分钟进行细胞洗涤,重复以上洗涤一次。最后制成100 μ L细胞悬液,加入100 μ L细胞固定液,充分混匀,将所有细胞悬液全部涂布至载玻片上的细胞涂布区域,制成细胞玻片。细胞玻片32 $^{\circ}$ C烘干过夜,为CTC鉴定准备;

[0137] (3)荧光原位杂交和免疫荧光染色共同鉴定CTC:

[0138] a.细胞玻片的荧光原位杂交检测。20 μ L胃蛋白酶(0.05mg/mL)与180 μ L提前预热至37 $^{\circ}$ C的1%甲醛混合制备成工作溶液后立即覆盖至整个标本区,室温孵育10分钟对细胞膜进行处理。2X SSC对标本区域进行洗涤。用70%、85%、100%无水乙醇依次对细胞进行脱水处理。微型吹风机将玻片完全吹干后立即滴加10 μ L 8号染色体FISH探针,用封片胶封片,杂交仪上进行荧光原位杂交。杂交程序为:73 $^{\circ}$ C,10分钟;37 $^{\circ}$ C,6小时;

[0139] b.细胞玻片的免疫荧光检测。杂交结束前10分钟,进行CD45抗体混合液的配制。杂交结束后,用镊子撕去封片胶,将玻片置于含有2X SSC的染色缸中,晃动移除盖玻片。用2X SSC和洗涤缓冲液洗涤分别对玻片上的标本区域进行洗涤。将洗涤后的玻片置于湿盒中,滴加200 μ L抗体混合液至玻片标本区,30 $^{\circ}$ C避光孵育1小时。抗体孵育结束后吸弃玻片上的抗体混合液,用洗涤缓冲液进行细胞洗涤;

[0140] c.细胞核染色。滴加5 μ L DAPI Mounting于标本区中央,盖上盖玻片使DAPI Mounting在整个标本区润开,吸弃玻片周围的多余液体,即完成了CTC的鉴定检测部分;

[0141] (4)CTC的镜下判读:

[0142] 按照CTC的判读标准DAPI+/CD45-/CEP8+(三倍体或以上的多倍体)对以上所得细胞玻片置于荧光显微镜下判读,同时拍照记录下所有CTC细胞在各个荧光通道中的细胞图。

[0143] 检测结果如表1所示。其中,对于2mL血样,检测到 ≥ 3 个CTC细胞,可判定为患有腹膜后来源神经母细胞瘤。

[0144] 表1CTC检测结果(外周血2mL)

[0145]

| 样本序号 | 年龄 | 临床诊断或备注 | CTC总数 |
|------|-----|----------------------|-------|
| 1 | 3岁 | 神经母细胞瘤(有腹膜后肾上腺区) | 33 |
| 2 | 4岁 | 神经母细胞瘤(左侧后腹膜) | 29 |
| 3 | 59天 | 神经母细胞瘤肝转移(左侧腹膜后肾上腺区) | 25 |

[0146]

| | | | |
|----|-------|------------|---|
| C1 | 7岁 | 恶性小细胞性肿瘤 | 1 |
| C2 | 2-10岁 | 正常个体(n=10) | 0 |

[0147] 表2其它肿瘤病例的CTC检测结果(外周血2mL)

[0148]

| 样本序号 | 年龄 | 临床诊断或备注 | CTC总数 |
|------|----|---------|-------|
|------|----|---------|-------|

| | | | |
|-----|-------|-------------------|----|
| 4 | 20月 | 神经母细胞瘤(右侧腹膜后肾上腺区) | 20 |
| 5 | 5岁 | 腹膜后节细胞神经母细胞瘤(后腹膜) | 40 |
| C3 | 5岁 | 间液性粘液性恶性小细胞性肿瘤 | 1 |
| C4 | 9月 | 肾上腺神经母细胞瘤(左侧肾上腺) | 0 |
| C5 | 4岁 | 成熟型囊性畸胎瘤 | 1 |
| C6 | 3岁 | 混合性生殖细胞肿瘤 | 0 |
| C7 | 13月 | 右肾上腺神经母细胞瘤 | 1 |
| C8 | 5岁 | 左侧肾上腺倾向神经母细胞瘤 | 1 |
| C9 | 3岁 | 节细胞神经瘤 | 0 |
| C10 | 15月 | 肾母细胞瘤 | 1 |
| C11 | 2岁 | 节细胞性神经母细胞瘤 | 0 |
| C12 | 11岁 | 恶性小细胞瘤 | 1 |
| C13 | 7岁 | 节细胞神经瘤 | 0 |
| C14 | 2岁 | 肾上腺来源节细胞性神经母细胞瘤 | 0 |
| C15 | 2-15岁 | 正常个体(n=20) | 0 |

[0149] 上述结果表明,腹膜后起源的神经母细胞瘤与其他来源的肿瘤在外周血中CTC的数量存在非常显著的差别,前者外周血中CTC数量非常多,甚至达到约50个/2mL,是CTC含量最多的肿瘤。因此,采用本发明的检测试剂盒或方法,仅用0.5-2毫升的血样,就足以较为准确地判断出腹膜后起源的神经母细胞瘤。

[0150] 以一个被检测个体中所检测的2个CTC细胞为例,结果如图1和图2所示。结果表明,本发明的检测方法可精确检测到腹膜后来源神经母细胞瘤。

[0151] 实施例3

[0152] 腹膜后起源的神经母细胞瘤CTC检测试剂盒的可行性验证

[0153] 应用实施例1制备的检测试剂盒进行可行性验证,具体情况如下:

[0154] (1)某5岁患儿出现不明原因发热及轻度贫血现象,疑为神经母细胞瘤患者,采集其外周血;

[0155] (2)应用本发明腹膜后神经母细胞瘤CTC检测试剂盒对采集的外周血进行循环肿瘤细胞的富集及检测,检测步骤同实施例1中(2)~(4)。

[0156] (3)检测结果显示,该患者2mL外周血检测到的CTC总数为16个,其中三倍体CTC 7个,四倍体CTC 4个,五倍体及以上CTC 5个,CTC细胞图如图3所示。CTC总数大于10,该患者为腹膜后起源的神经母细胞瘤患者的可能性非常大;

[0157] (4)医生根据该检测结果对该患者进行了有针对性的检查,在第二次腹部超声时发现可疑肿块,并对其及时实施了手术及相关治疗;

[0158] (5)术后3个月,再对该患者进行了外周血循环肿瘤细胞检测,检测过程同(2);

[0159] (6)经检测,该腹膜后来源神经母细胞瘤患者外周血CTC总数为2个,其中三倍体CTC 1个,四倍体CTC 1个,CTC细胞图如图4所示。患者外周血CTC数量急剧减少,其他临床检测指标也显示患者恢复状况极佳,可见治疗效果较好,可维持原有治疗方案继续进行治疗;

[0160] (7)术后治疗6个月后,采集其外周血,进行外周血循环肿瘤细胞检测,检测过程同实施例1中(2)~(4);

[0161] (8)经检测,该腹膜后来源神经母细胞瘤患者外周血CTC总数降为0,与其他临床检测结果相符,均显示患者治疗效果极佳。

[0162] 结果表明,本发明的检测方法和试剂盒可精确检测到腹膜后来源神经母细胞瘤并反映治疗效果。

[0163] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

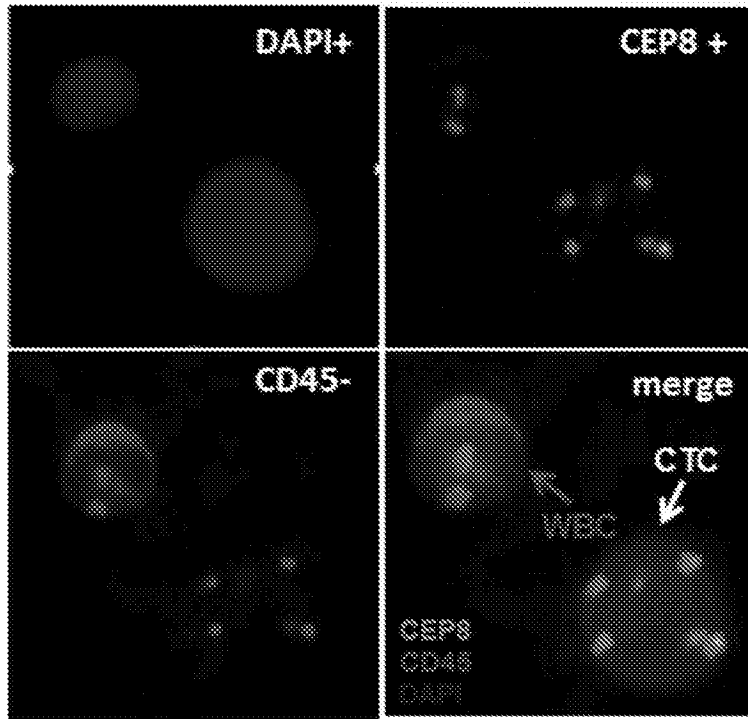


图1

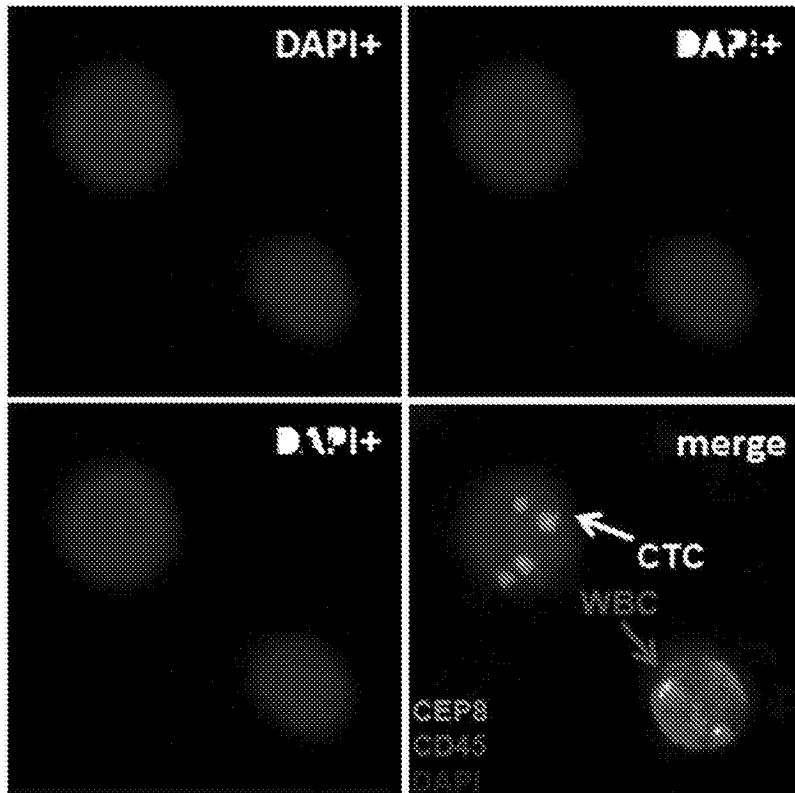


图2

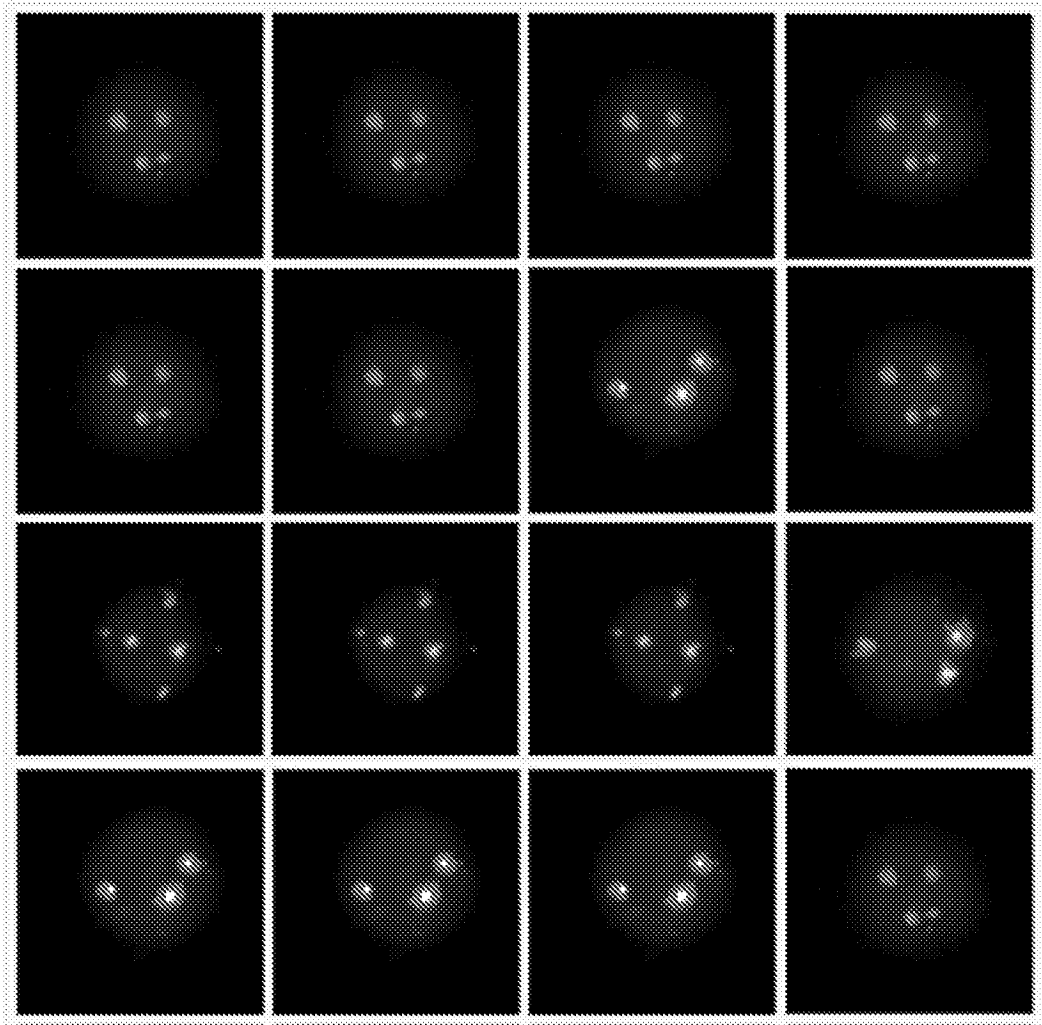


图3

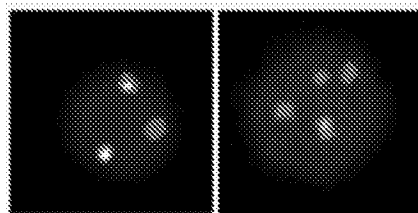


图4

| | | | |
|----------------|--|---------|------------|
| 专利名称(译) | 腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤CTC检测试剂盒及检测方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN105911269A | 公开(公告)日 | 2016-08-31 |
| 申请号 | CN201610121071.6 | 申请日 | 2016-03-03 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 复旦大学附属儿科医院 上海张江转化医学研发中心有限公司 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 复旦大学附属儿科医院 上海张江转化医学研发中心有限公司 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 复旦大学附属儿科医院 上海张江转化医学研发中心有限公司 | | |
| [标]发明人 | 董瑞 张桢珍 董岚然 郑珊 吴唯唯 李凯 郑超 刘翔琪 许骋 | | |
| 发明人 | 董瑞 张桢珍 董岚然 郑珊 吴唯唯 李凯 郑超 刘翔琪 许骋 | | |
| IPC分类号 | G01N33/533 C12Q1/68 G01N33/574 | | |
| CPC分类号 | G01N33/533 C12Q1/6841 C12Q1/6886 G01N33/574 | | |
| 代理人(译) | 崔佳佳 马莉华 | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明提供了腹膜后起源的小儿神经母细胞瘤CTC检测试剂盒及检测方法。具体的，本发明提供了一种循环肿瘤细胞检测试剂盒，所述试剂盒含有如下组分：(i)红细胞与白细胞联合抗体；(ii)白细胞表面共同抗原抗体；(iii)细胞核荧光染料；和(iv)染色体FISH探针。采用本发明的检测试剂盒和方法可以在只需采集少量的血(如2ml或更少)的情况下，精确、快速检测循环肿瘤细胞，从而诊断腹膜后起源的神经母细胞瘤的患病风险。

| 样本序号 | 年龄 | 临床诊断或备注 | CTC 总数 |
|------|-----|----------------------|--------|
| 1 | 3岁 | 神经母细胞瘤（有腹膜后肾上腺区） | 33 |
| 2 | 4岁 | 神经母细胞瘤（左侧后腹膜） | 29 |
| 3 | 59天 | 神经母细胞瘤肝转移（左侧腹膜后肾上腺区） | 25 |