



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107884330 A

(43)申请公布日 2018.04.06

(21)申请号 201710982362.9

(22)申请日 2017.10.19

(71)申请人 南通大学

地址 226019 江苏省南通市啬园路9号

(72)发明人 王国华 高纯一 姜正林 徐丽华

王金星 李霞

(74)专利代理机构 深圳市威世博知识产权代理

事务所(普通合伙) 44280

代理人 李庆波

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

C12Q 1/6886(2018.01)

权利要求书2页 说明书10页

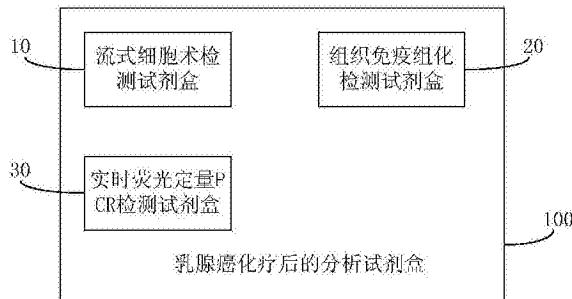
序列表3页 附图2页

(54)发明名称

用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒

(57)摘要

本申请公开了一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒,该试剂盒包括:流式细胞术检测试剂盒、组织免疫组化检测试剂盒以及实时荧光定量PCR检测试剂盒,流式细胞术检测试剂盒对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数,组织免疫组化检测试剂盒对临床组织样本进行双重染色,以获得乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数,实时荧光定量PCR检测试剂盒对临床组织样本进行定量扩增,以获得乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数;通过第一耐药性评估系数、第二耐药性评估系数以及第三耐药性评估系数,可以获得乳腺癌患者经化疗后的耐药指数。通过上述方式,本申请能够为综合全面评估乳腺癌患者经化疗后的耐药性情况提供产品上的支持。



1. 一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括:

流式细胞术检测试剂盒,用于结合流式细胞术对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数a;

组织免疫组化检测试剂盒,用于结合免疫组织化学双标染色技术对所述临床组织样本进行双重染色,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第二比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数b;

实时荧光定量PCR检测试剂盒,用于结合实时荧光定量PCR技术对所述临床组织样本进行定量扩增,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第三比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数c;

其中,通过所述第一耐药性评估系数a、所述第二耐药性评估系数b以及所述第三耐药性评估系数c,可以获得所述乳腺癌患者经化疗后的耐药指数RI。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述实时荧光定量PCR检测试剂盒包括:

ETV7引物,包括ETV7正向引物和ETV7反向引物,用于扩增ETV7的基因;

ID01引物,包括ID01正向引物和ID01反向引物,用于扩增ID01的基因;

SELENOP引物,包括SELENOP正向引物和SELENOP反向引物,用于扩增SELENOP的基因;

NEURL3引物,包括NEURL3正向引物和NEURL3反向引物,用于扩增NEURL3的基因;

TRANK1引物,包括TRANK1正向引物和TRANK1反向引物,用于扩增TRANK1的基因。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述乳腺癌患者经化疗后的耐药指数RI为: $RI = (a+b+c) / 21 \times 100\%$ ;其中,当 $RI < 34$ 时,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后具有低度耐药风险,当 $34 \leq RI \leq 66$ 时,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后具有中度耐药风险,当 $RI > 66$ ,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后具有高度耐药风险。

4. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述ETV7正向引物是TTCTTGTGATTTCCCCAGAGT,所述ETV7反向引物是TGATAACCGATATGAGCCCTAC;所述ID01正向引物是AATGTGCTCTTGTGGGTTAC,所述ID01反向引物是GAAC TGAGGC ACTGATTAA;所述SELENOP正向引物是ACTCCATCGCCTCATTAC,所述SELENOP反向引物是CTGGCATATCTCGGTTCT;所述NEURL3正向引物是GGCTGATTAGCAAGAGGT,所述NEURL3反向引物是TGCTTCAAGTCCAGGTTTC;所述TRANK1正向引物是ACGGGTAAACTCACTCCACATAG,所述TRANK1反向引物是CCATTCTTCCAAAAGCAAC。

5. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述实时荧光定量PCR检测试剂盒还包括:

CD16引物,包括CD16正向引物和CD16反向引物,用于扩增CD16的基因;

CD206引物,包括CD206正向引物和CD206反向引物,用于扩增CD206的基因;

所述实时荧光定量PCR检测试剂盒还用于通过实时荧光定量PCR技术对所述乳腺癌患者化疗后的临床血液样本中的ETV7、ID01、SELENOP、NEURL3、TRANK1、CD16、CD206的基因进行定量扩增,以获得所述乳腺癌患者经化疗后的预后风险评估系数d,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的预后指数PI。

6. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述乳腺癌患者经化疗后的预后指数PI为: $PI = d / 3 \times 100\%$ ;其中,当 $PI < 34$ 时,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后为预后良好,当

34≤PI≤66时,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后为预后中等,当PI>66时,可以提示所述乳腺癌患者经化疗后为预后不良。

7. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述CD16正向引物是TTGGACACCCAGATG TTTCAG,所述CD16反向引物是GTCTTCCTTGAGCACCTGGATC;所述CD206正向引物是CAAGGAAG GTTGGCATTGT,所述CD206反向引物是CCTTCAGTCCTTGCAAGC。

8. 根据权利要求5所述的试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括:

外周血循环肿瘤DNA片段ctDNA提取试剂盒,用于提取所述临床血液样本中的ctDNA。

9. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述流式细胞术检测试剂盒包括:PerCP-Cy5.5标记的CD45抗体、Allexa Fluor®488标记的CD11b抗体、藻红蛋白PE标记的CD86抗体、别藻青蛋白APC标记的CD206抗体。

10. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述组织免疫组化检测试剂盒包括:

第一抗体,包括兔来源的CD11b第一抗体、羊来源的CD86第一抗体、鼠来源的CD206第一抗体;

第二抗体,包括带有生物素酶连接的碱性磷酸酶-羊抗兔IgG、带有生物素酶连接的辣根过氧化物酶-猴抗羊IgG、带有生物素酶连接的辣根过氧化物酶-羊抗人IgG;

底物,包括固红AP-Red、二氨基联苯胺DAB;

其中,所述第一抗体来自两种不同的动物,所述第二抗体来自另外的两种不同的动物。

## 用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒

### 技术领域

[0001] 本申请涉及快速检测试剂盒技术领域,特别是涉及一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒。

### 背景技术

[0002] 乳腺癌是女性最为常见的恶性肿瘤之一,官方数据显示,2015年,我国新发乳腺癌的女性达26.8万,因乳腺癌死亡的女性则约6.95万。近年来,医学的进步在一定程度上减少了癌症的发病率和死亡率,但是仍然有很多人被诊断为癌症。

[0003] 乳腺癌是一种对化疗中度敏感的肿瘤,化疗在乳腺癌的治疗中起着重要的作用。而癌细胞在化疗过程中产生的耐药导致很多受检者在化疗后仍会出现短期内的复发或转移,这也是乳腺癌受检者死亡率居高不下的原因之一。因此,揭示乳腺癌耐药的相关细胞分子机制,已经成为提高乳腺癌临床治疗效果和延长乳腺癌受检者寿命的关键。

[0004] 过往肿瘤耐药的产生机制研究侧重于肿瘤细胞本身。目前研究较多的肿瘤相关巨噬细胞M1型和M2型在乳腺癌的耐药和预后中都起着重要的作用。但是国内外的相关研究大多集中在M2型巨噬细胞,这对于乳腺癌化疗耐药性的评价系统不够全面。

### 发明内容

[0005] 本申请主要解决的技术问题是提供一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒,能够为综合全面评估乳腺癌患者经化疗后的耐药性情况提供产品上的支持。

[0006] 为解决上述技术问题,本申请采用的一个技术方案是:提供一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒,所述试剂盒包括:流式细胞术检测试剂盒,用于结合流式细胞术对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数a;组织免疫组化检测试剂盒,用于结合免疫组织化学双标染色技术对所述临床组织样本进行双重染色,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第二比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数b;实时荧光定量PCR检测试剂盒,用于结合实时荧光定量PCR技术对所述临床组织样本进行定量扩增,以获得所述临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第三比例,并进而获得所述乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数c;其中,通过所述第一耐药性评估系数a、所述第二耐药性评估系数b以及所述第三耐药性评估系数c,可以获得所述乳腺癌患者经化疗后的耐药指数RI。

[0007] 本申请的有益效果是:区别于现有技术的情况,本申请用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒包括流式细胞术检测试剂盒、组织免疫组化检测试剂盒以及实时荧光定量PCR检测试剂盒,流式细胞术检测试剂盒对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数,组织免疫组化检测试剂盒对临床组织样本进行双重染色,以获得乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数,实时荧光定量PCR检测试剂盒对临床组织样本进行定量扩增,以获得乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系

数;通过第一耐药性评估系数、第二耐药性评估系数以及第三耐药性评估系数,可以获得乳腺癌患者经化疗后的耐药指数。由于这三种试剂盒分别从细胞水平、蛋白水平和转录水平获得各自的耐药性评估系数,再综合这三种耐药性评估系数而得到乳腺癌患者经化疗后的耐药指数,通过这种方式,能够为综合全面评估乳腺癌患者经化疗后的耐药性情况提供产品上的支持。

## 附图说明

[0008] 为了更清楚地说明本申请实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本申请的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。其中:

- [0009] 图1是本申请用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒一实施方式的结构示意图;
- [0010] 图2是以ETV7为例,通过TCGA临床乳腺癌数据库对本申请的结果进行验证的示意图;
- [0011] 图3是以SELENOP为例,通过Kaplan-Meier pIotter临床数据库对本申请的结果进行验证的示意图;
- [0012] 图4是本申请用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒另一实施方式的结构示意图。

## 具体实施方式

[0013] 下面将结合本申请实施例中的附图,对本申请实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本申请一部分实施例,而不是全部实施例。基于本申请中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性的劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0014] 参见图1,图1是本申请用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒一实施方式的结构示意图,该试剂盒100包括:流式细胞术检测试剂盒10、组织免疫组化检测试剂盒20以及实时荧光定量PCR检测试剂盒30。

[0015] 其中,流式细胞术检测试剂盒10用于结合流式细胞术对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例,并进而获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数a。

[0016] 本实施方式中,流式细胞术检测试剂盒10用流式细胞术检测临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化标志性分子的表达倾向性,以获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例,并进而获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数a。

[0017] 流式细胞术工作原理是在细胞分子水平上通过单克隆抗体对单个细胞或其他生物粒子进行多参数、快速的定量分析。流式细胞技术(flow cytometry, FCM)是利用流式细胞仪进行的一种单细胞定量分析和分选技术。流式细胞术是单克隆抗体及免疫细胞化学技术、激光和电子计算机科学等高度发展及综合利用的高技术产物。

[0018] 第一耐药性评估系数a是指通过流式细胞术检测试剂盒结合流式细胞术获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例后,进而通过第一比例而得到的。

[0019] 巨噬细胞由单核吞噬细胞系统分化而来,具有自身独特的细胞表型,并表达一些

特异性的细胞标志物。一般情况下,根据巨噬细胞的不同功能特性及其诱导Th1或者Th2应答的情况,把巨噬细胞分为M1和M2两种类型。大量研究证实,当巨噬细胞迁移至肿瘤组织后,其由经典的M1型向M2型转化,表现为抗原呈递能力降低,并产生抑制T细胞的增殖和活性的因子,从而完成由“肿瘤细胞杀手”到“肿瘤发展帮凶”的角色转换。

[0020] 其中,用CD45从临床组织样本中圈定白细胞,CD11b为巨噬细胞的标记物,CD86是M1型巨噬细胞的标志性蛋白,CD206则为M2型巨噬细胞的标志性蛋白,这两种蛋白分别用来鉴定M1型巨噬细胞和M2型巨噬细胞。

[0021] 具体地,在一实施方式中,流式细胞术检测试剂盒10包括PerCP-Cy 5.5标记的CD45抗体(例如:PerCP-Cy 5.5标记的Mouse Anti-Human CD45)、Alexa Fluor®488标记的CD11b抗体(例如:Alexa Fluor®488标记的Mouse Anti-Human CD11b)、藻红蛋白PE标记的CD86抗体(例如:PE标记的Mouse Anti-Human CD86)、别藻青蛋白APC标记的CD206抗体(例如:APC标记的Mouse Anti-Human CD206)。

[0022] 例如:在一具体实施方式中,该流式细胞术检测试剂盒10包括PerCP-Cy 5.5标记的Mouse Anti-Human CD45、Alexa Fluor®488标记的Mouse Anti-Human CD11b、PE标记的Mouse Anti-Human CD86、APC标记的Mouse Anti-Human CD206,在一具体应用中,利用该流式细胞术检测试剂盒的操作步骤具体可以是:

[0023] 1、将待检临床组织样本消化为单细胞悬液,细胞计数后取约 $1\times 10^6$ 个细胞,用PBS洗涤两次,1200rpm离心5分钟,倒去上清。

[0024] 2、参照试剂盒中说明书的浓度将抗体加入100微升1X PBS重悬细胞,4℃孵育一小时。

[0025] 3、1X PBS洗涤细胞两次,1200rpm离心5分钟,倒去上清。

[0026] 4、加入对应二抗,用100微升1X PBS 1:500稀释,4℃避光孵育一小时。

[0027] 5、1X PBS洗涤两次,1200rpm离心5分钟,倒去上清。

[0028] 6、用1%多聚甲醛起固定细胞作用,室温下放置15分钟。

[0029] 7、1XPBS洗涤一次,1200rpm离心5分钟,倒去上清。

[0030] 8、300微升1X PBS重悬细胞,上机检测。

[0031] 利用该流式细胞术检测试剂盒10检测临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第一比例,继而对乳腺癌患者经化疗后药物耐药性做出判断的具体评估指南如表1:

[0032] 表1流式细胞术检测乳腺癌患者经化疗后耐药性评估

临床组织样本 (细胞计数)	耐药性 (第一耐药性评估系数)
M2/M1 > 3	9
2 < M2/M1 ≤ 3	6
1 < M2/M1 ≤ 2	3
M2/M1 < 1	0

[0034] 在上述表1的实施方式中,第一耐药性评估系数的获得方式是:首先按照M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例的大小,将M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例分为4个范围,然后分别确定每个范围内第一耐药性评估系数的大小。在实际检测的时候,根据临床组织样本检测出来的M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例的大小所在的范围而确定出该临床组织样本所对应的第一耐药性评估系数。在实际应用中,M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例分为4个范围(或者,根据实际情况为其他数量的范围),需要通过已确定的流式细胞术检测试剂盒和一定数量的已知临床诊断结果(与耐药性相关的诊断结果)的临床组织样本来进行确定。例如,上述表1中,通过前期121例乳腺癌患者肿瘤组织样本回顾性研究,利用流式细胞术检测试剂盒结合流式细胞术,统计巨噬细胞极化分型M1、M2细胞计数,获得其二者的比值,本申请的发明人发现 $M2/M1 > 3$ ,患者出现耐药概率超过63%; $2 < M2/M1 \leq 3$ ,患者耐药概率为30%; $1 < M2/M1 \leq 2$ ,患者出现耐药概率为15%; $M2/M1 < 1$ ,患者出现耐药概率为2%。通过统计分析,因此制定了上述综合的评估指南。

[0035] 当然,在其他实施方式,也可以采用其他的方式来确定第一耐药性评估系数,在此不做限定。

[0036] 从表1可知,M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例越大,表明“肿瘤发展帮凶”M2型巨噬细胞越来越多,这说明化疗已经不起作用了,耐药性越来越大了。

[0037] 组织免疫组化检测试剂盒20用于结合免疫组织化学双标染色技术对临床组织样本进行双重染色,以获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第二比例,并进而获得乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数b。

[0038] 第二耐药性评估系数b是指通过组织免疫组化检测试剂盒20结合免疫组织化学双标染色技术获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第二比例后,进而通过第二比例而得到的。

[0039] 在一实施方式中,组织免疫组化检测试剂盒20包括:第一抗体、第二抗体以及底物。

[0040] 第一抗体包括兔来源的CD11b第一抗体、羊来源的CD86第一抗体、鼠来源的CD206第一抗体;第二抗体包括带有生物素酶连接的ALP-GAR (ALP-羊抗兔IgG)、带有生物素酶连接的HRP-DAG (HRP-猴抗羊IgG)、带有生物素酶连接的HRP-GAM (HRP-羊抗人IgG);底物包括固红AP-Red、二氨基联苯胺DAB;其中,第一抗体来自两种不同的动物,第二抗体来自另外的两种不同的动物。ALP为碱性磷酸酶,HRP为辣根过氧化物酶。需要说明的是,在实际应用中,第一抗体还可以是其他动物来源的抗体,相应地,第二抗体也可以是其他动物来源的对应的二抗,以及底物可以根据不同的染色剂进行相应的选择,在此不做限定。

[0041] 第一抗体(一抗)是指能和非抗体性抗原(特异性抗原)特异性结合的蛋白,种类包括单克隆抗体和多克隆抗体。第二抗体(二抗)是指能和抗体结合,即抗体的抗体,其主要作用是检测抗体的存在,放大一抗的信号。二抗是利用抗体是大分子的蛋白质具有抗原性的性质,去免疫异种动物,由异种动物的免疫系统产生的针对于此抗体的免疫球蛋白。

[0042] 获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第二比例的具体步骤可以是:

[0043] a.利用组织免疫组化检测试剂盒按如下步骤操作:

[0044] 1、石蜡切片脱蜡水化;

[0045] 2、组织内源性过氧化物酶灭活;

- [0046] 3、抗原高温高压酸修复 (pH=6.0)；  
 [0047] 4、牛血清封闭液阻断非特异性结合；  
 [0048] 5、第一标抗体孵育：滴加合适浓度的CD86或CD206抗体工作液，4℃孵育16h，阴性对照PBS代替抗体，其余相同；  
 [0049] 6、生物素标记的二抗孵育，链霉菌抗生物素蛋白-碱性磷酸酶链接二抗DAG或GAM；  
 [0050] 7、AP-Red呈色反应；  
 [0051] 8、碱性磷酸酶液洗脱液洗脱抗体和碱性磷酸酶；  
 [0052] 9、第二次非特异性阻断；  
 [0053] 10、第二标抗体孵育：滴加合适浓度的第二标抗体CD11b，4℃孵育16h；  
 [0054] 11、生物素标记的二抗孵育，辣根过氧化物酶链接二抗GAR；  
 [0055] 12、DAB呈色反应；  
 [0056] 13、苏木精复染细胞核，甘油封片剂封片，显微镜下及时观察采图。  
 [0057] 免疫组织化学双重标记中第一标记AP-Red的红色与第二标记DAB的棕黄色反差大，背景低，易于分辨。两种颜色标记的同一部位呈现砖红色，易于表示双标部位。  
 [0058] b. 在共聚焦显微镜下观察，CD11b蛋白的表达主要见于总肿瘤相关巨噬细胞的细胞膜，CD86蛋白的表达主要见于M1型肿瘤相关巨噬的细胞膜，CD206蛋白的表达主要见于M2型肿瘤相关巨噬细胞的细胞膜及细胞质。  
 [0059] c. 按步骤b分别确定若干个阳性信号分布均匀的视野，统计每个视野下CD86/CD206阳性细胞在CD11b阳性细胞中所占的比例，进行线性回归分析。  
 [0060] d. 按步骤c分析肿瘤中巨噬细胞在当前时期的表型，计算两种分型占总巨噬细胞的比例。  
 [0061] 在一具体实施方式中，CD11b第一抗体为兔来源、CD86第一抗体为羊来源、CD206第一抗体为鼠来源；带有生物素酶连接的ALP-GAR为带有生物素酶连接的UItraPoLymer Goat anti-Rabbit IgG (H&L)、带有生物素酶连接的HRP-DAG为带有生物素酶连接的UItraPoLymer Dokey anti-Goat IgG (H&L)、带有生物素酶连接的HRP-GAM为带有生物素酶连接的UItraPoLymer Goat anti-Human IgG (H&L)。通过该组织免疫组化检测试剂盒20检测临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型比例后继而对乳腺癌患者经化疗后的耐药性做出判断的具体评估指南如表2：  
 [0062] 表2免疫组化染色技术检测乳腺癌患者经化疗后耐药性评估

	临床组织样本 (细胞计数)	耐药性 (第二耐药性评估系数)
[0063]	M2/M1 >4	6
	2<M2/M1 ≤ 4	4
	1<M2/M1 ≤ 2	2
[0064]	M2/M1 <1	0

[0065] 在上述表2的实施方式中,第二耐药性评估系数的获得方式是:首先按照M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例的大小,将M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例分为4个范围,然后分别确定每个范围内第二耐药性评估系数的大小。在实际检测的时候,根据临床组织样本检测出来的M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例的大小所在的范围而确定出该临床组织样本所对应的第二耐药性评估系数。在实际应用中,M2型巨噬细胞与M1型巨噬细胞数量的比例分为4个范围(或者,根据实际情况为其他数量的范围),需要通过已确定的组织免疫组化检测试剂盒和一定数量的已知临床诊断结果(与耐药性相关的诊断结果)的临床组织样本来进行确定。例如,上述表2中,通过前期121例乳腺癌患者肿瘤组织样本回顾性研究,利用组织免疫组化检测试剂盒结合免疫组织化学双标染色技术,统计巨噬细胞极化分型M1、M2细胞计数,获得其二者的比值,本申请的发明人发现 $M2/M1 > 4$ ,患者出现耐药概率超过58%; $2 < M2/M1 \leq 4$ ,患者耐药概率为25%; $1 < M2/M1 \leq 2$ ,患者出现耐药概率为10%; $M2/M1 < 1$ ,患者出现耐药概率为0%。通过统计分析,因此制定了上述综合的评估指南。

[0066] 当然,在其他实施方式,也可以采用其他的方式来确定第二耐药性评估系数,在此不做限定。

[0067] 实时荧光定量PCR检测试剂盒30用于结合实时荧光定量PCR技术对临床组织样本进行定量扩增,以获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第三比例,并进而获得乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数c;其中,通过第一耐药性评估系数a、第二耐药性评估系数b以及第三耐药性评估系数c,可以获得乳腺癌患者经化疗后的耐药指数RI。

[0068] 第三耐药性评估系数c是指通过实时荧光定量PCR检测试剂盒30实时荧光定量PCR技术获得临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型的第三比例后,进而通过第三比例而得到的。

[0069] 在本实施方式中,通过实时荧光定量PCR技术对临床组织样本进行定量扩增是指通过实时荧光定量PCR技术对临床组织样本中与肿瘤相关巨噬细胞极化有密切关联的基因进行定量扩增。其中,与肿瘤相关巨噬细胞极化有密切关联的基因根据实际情况确定。

[0070] 在一实施方式中,通过生物信息学分析,筛选并鉴定出5个与肿瘤相关巨噬细胞极化有密切关联的基因:ETV7 (ETS variant 7)、IDO1 (indoleamine 2,3-dioxygenase 1)、SELENOP P (seIenoprotein P, pIasma, 1)、NEURL3 (neuralized E3ubiquitin protein Ligase 3)、TRANK1 (tetra tricopeptide repeat and ankyrin repeat containing 1)。通过实时荧光定量PCR检测临床血液与临床组织样本中ETV7、IDO1、SELENOP、NEURL3及TRANK1基因表达,发现SELENOP及TRANK1基因在M2型肿瘤相关巨噬细胞中显著过表达并随着耐药程度增加表达增强;ETV7、IDO1及NEURL3基因主要在M1型巨噬细胞中表达并随着耐药程度增加表达减弱。如图2所示,以ETV7为例,通过TCGA临床乳腺癌数据库对上述结果进行验证发现临床大数据下乳腺癌组织与癌旁乳腺组织的ETV7表达有显著性差异,说明ETV7与临床乳腺癌患者间存在相关性。

[0071] 据此,在一实施方式中,实时荧光定量PCR检测试剂盒包括:ETV7引物、IDO1引物、SELENOP引物、NEURL3引物以及TRANK1引物。

[0072] 其中,ETV7引物包括ETV7正向引物和ETV7反向引物,用于扩增ETV7的基因;IDO1引物,包括IDO1正向引物和IDO1反向引物,用于扩增IDO1的基因;SELENOP引物,包括SELENOP正向引物和SELENOP反向引物,用于扩增SELENOP的基因;NEURL3引物,包括NEURL3正向引物

和NEURL3反向引物,用于扩增NEURL3的基因;TRANK1引物,包括TRANK1正向引物和TRANK1反向引物,用于扩增TRANK1的基因。上述引物的设计根据ETV7、ID01、SELENOP、NEURL3及TRANK1基因序列(可以参见GenBank数据库)进行设计。

[0073] 在一实施方式中,乳腺癌患者经化疗后的耐药指数RI为: $RI = (a+b+c) / 21 \times 100\%$ ;其中,当 $RI < 34$ 时,可以提示乳腺癌患者经化疗后具有低度耐药风险,当 $34 \leq RI \leq 66$ 时,可以提示乳腺癌患者经化疗后具有中度耐药风险,当 $RI > 66$ ,可以提示乳腺癌患者经化疗后具有高度耐药风险。通过上述方式,可以综合评估乳腺癌患者经化疗后的耐药风险性。

[0074] 进一步,ETV7正向引物是TTCTTGTGATTCCCCAGAGT,ETV7反向引物是TGATACCGATATGAGCCCTAC;ID01正向引物是AATGTGCTCTGGTGGTTAC, ID01反向引物是GAACCTGGAGGCCTGATTAA;SELENOP正向引物是ACTCCATGCCTCATTAC,SELENOP反向引物是CTGGCATATCTCGGTTCT;NEURL3正向引物是GGCTGATTAGCAAGAGGT,NEURL3反向引物是TGCTTCAAGTCCAGGTTTC;TRANK1正向引物是ACGGGTAAACTCACTCCACATAG,TRANK1反向引物是CCATTCTTCCAAAAGCAAC。

[0075] 在一具体应用中,利用上述实时荧光定量PCR检测试剂盒可以按照如下步骤操作:

[0076] 1、组织称重,加1mL TRizoI试剂,混匀,冰上放置裂解5min;

[0077] 2、加氯仿200μL/mL TRizoI,混匀,剧烈摇匀,使其呈乳浊液,静置5min;

[0078] 3、12000g,5min,4度离心;

[0079] 4、小心吸取上清至另一EP管。加入等体积预冷异丙醇,混匀;

[0080] 5、12000g,15min,4度离心;

[0081] 6、弃上清,加1mL 75%乙醇,洗涤沉淀,8000g,8min,4度离心;

[0082] 7、吸净上清,晾干酒精;

[0083] 8、加RNase-free water溶解RNA;

[0084] 9、测定总RNA浓度,取1μgRNA逆转录得到的cDNA后进行扩增。

[0085] 以GAPDH作为检测的内参物,以10μL作为qPCR扩增的反应体系。上机检测。以内参的循环数作为对照,计算 $2^{-\Delta\Delta CT}$ ,再进行统计学分析。

[0086] 例如,在一具体实施方式中,通过实时荧光定量PCR(qPCR)检测临床组织样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型比例继而对乳腺癌化疗耐药性做出判断的具体评估指南如表3:

[0087] 表3qPCR检测乳腺癌化疗耐药性量化评估

	临床组织样本 (拷贝数比值)	耐药性 (第三耐药性评估系数)
[0088]	$(SELENOP+TRANK1)/(ETV7+ID01+NEURL3) > 8$	6
	$4 < (SELENOP+TRANK1)/(ETV7+ID01+NEURL3) \leq 8$	4
	$2 < (SELENOP+TRANK1)/(ETV7+ID01+NEURL3) \leq 4$	2
	$(SELENOP+TRANK1)/(ETV7+ID01+NEURL3) < 1$	0

[0089] 在上述表3的实施方式中,第三耐药性评估系数的获得方式是:首先按照 $(SELENOP+TRANK1)$ 拷贝数与 $(ETV7+ID01+NEURL3)$ 拷贝数的比例的大小,将 $(SELENOP+TRANK1)$ 拷贝数

与(ETV7+ID01+NEURL3)拷贝数的比例分为4个范围,然后分别确定每个范围内第三耐药性评估系数的大小。在实际检测的时候,根据临床组织样本检测出来的(SELENOP+TRANK1)拷贝数与(ETV7+ID01+NEURL3)拷贝数的比例的大小所在的范围而确定出该临床组织样本所对应的第三耐药性评估系数。在实际应用中,(SELENOP+TRANK1)拷贝数与(ETV7+ID01+NEURL3)拷贝数的比例分为4个范围(或者,根据实际情况为其他数量的范围),需要通过已确定的实时荧光定量PCR检测试剂盒和一定数量的已知临床诊断结果(与耐药性相关的诊断结果)的临床组织样本来进行确定。例如,上述表3中,通过前期121例乳腺癌患者肿瘤组织样本回顾性研究,利用实时荧光定量PCR检测试剂盒结合实时荧光定量PCR技术,统计(SELENOP+TRANK1)拷贝数与(ETV7+ID01+NEURL3)拷贝数,获得其二者的比值,本申请的发明人发现比值>8,患者出现耐药概率超过58%;4<比值≤8,患者耐药概率为25%;2<比值≤4,患者出现耐药概率为10%;比值<1,患者出现耐药概率为0%。通过统计分析,因此制定了上述综合的评估指南。

[0090] 当然,在其他实施方式,也可以采用其他的方式来确定第三耐药性评估系数,在此不做限定。

[0091] 本申请实施方式中用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒包括流式细胞术检测试剂盒、组织免疫组化检测试剂盒以及实时荧光定量PCR检测试剂盒,流式细胞术检测试剂盒对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数,以获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数,组织免疫组化检测试剂盒对临床组织样本进行双重染色,以获得乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数,实时荧光定量PCR检测试剂盒对临床组织样本进行定量扩增,以获得乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数;通过第一耐药性评估系数、第二耐药性评估系数以及第三耐药性评估系数,可以获得乳腺癌患者经化疗后的耐药指数。由于这三种试剂盒分别从细胞水平、蛋白水平和转录水平获得各自的耐药性评估系数,再综合这三种耐药性评估系数而得到乳腺癌患者经化疗后的耐药指数,通过这种方式,能够为综合全面评估乳腺癌患者经化疗后的耐药性情况提供产品上的支持。

[0092] 本申请的发明人同时发现ETV7、ID01、SELENOP、NEURL3、TRANK1基因通过在肿瘤相关巨噬细胞分型中特异性表达,其表达量与临床预后相关。如图3所示,以SELENOP为例,通过Kaplan-Meier plotter临床数据库对上述结果进行验证,图中临床乳腺癌化疗,高表达SELENOP的患者,生存率更低。

[0093] 本申请的发明人发现通过联合检测受检者肿瘤组织中ETV7、ID01、SELENOP、NEURL3、TRANK1、CD16、CD206的基因表达可以判断受检者是否耐药及耐药程度,对个体化用药的化疗方案的实施具有重要的指导作用。

[0094] 据此,在一实施方式中,实时荧光定量PCR检测试剂盒30还包括:CD16引物和CD206引物。

[0095] CD16引物包括CD16正向引物和CD16反向引物,用于扩增CD16的基因;CD206引物,包括CD206正向引物和CD206反向引物,用于扩增CD206的基因。上述引物的设计根据CD16、CD206的基因序列(可以参见GenBank数据库)进行设计。

[0096] 此时,实时荧光定量PCR检测试剂盒30还用于通过实时荧光定量PCR技术对乳腺癌患者化疗后的临床血液样本中的ETV7、ID01、SELENOP、NEURL3、TRANK1、CD16、CD206的基因进行定量扩增,以获得乳腺癌患者经化疗后的预后风险评估系数d,并进而获得乳腺癌患者

经化疗后的预后指数PI。

[0097] 进一步,乳腺癌患者经化疗后的预后指数PI为: $PI = d/3 \times 100\%$ ;其中,当 $PI < 34$ 时,可以提示乳腺癌患者经化疗后为预后良好,当 $34 \leq PI \leq 66$ 时,可以提示乳腺癌患者经化疗后为预后中等,当 $PI > 66$ 时,可以提示乳腺癌患者经化疗后为预后不良。

[0098] 在一实施方式中,CD16正向引物是TTTGGACACCCAGATGTTTCAG,CD16反向引物是GTCTTCCTTGAGCACCTGGATC;CD206正向引物是CAAGGAAGGTTGGCATTGT,CD206反向引物是CCTTCAGTCCTTGCAAGC。

[0099] 例如,在一具体的实施方式中,通过实时荧光定量PCR(qPCR)检测临床血液样本中肿瘤相关巨噬细胞极化分型比例继而对乳腺癌化疗预后风险做出判断的具体评估指南如表4:

[0100] 表4qPCR检测乳腺癌化疗预后风险量化评估

	临床血液样本 (拷贝数比值)	预后风险	
		(预后风险评估系数)	
[0101]	(SELENOP+TRANK1+CD206)/(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16) > 4	3	
	2 < (SELENOP+TRANK1+CD206)/(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16) ≤ 4	2	
	1 < (SELENOP+TRANK1+CD206)/(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16) ≤ 2	1	
	(SELENOP+TRANK1+CD206)/(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16) < 1	0	

[0102] 在上述表4的实施方式中,预后风险评估系数的获得方式是:首先按照(SELENOP+TRANK1+CD206)拷贝数与(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16)拷贝数的比例的大小,将(SELENOP+TRANK1+CD206)拷贝数与(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16)拷贝数的比例分为4个范围,然后分别确定每个范围内预后风险评估系数的大小。在实际检测的时候,根据临床血液样本检测出来的(SELENOP+TRANK1+CD206)拷贝数与(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16)拷贝数的比例的大小所在的范围而确定出该临床血液样本所对应的预后风险评估系数。在实际应用中,(SELENOP+TRANK1+CD206)拷贝数与(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16)拷贝数的比例分为4个范围(或者,根据实际情况为其他数量的范围),需要通过已确定的实时荧光定量PCR检测试剂盒和一定数量的已知临床诊断结果(与预后风险相关的诊断结果)的临床血液样本来进行确定。例如,上述表4中,通过前期121例乳腺癌患者肿瘤组织样本回顾性研究,利用实时荧光定量PCR检测试剂盒结合实时荧光定量PCR技术,统计(SELENOP+TRANK1+CD206)拷贝数与(ETV7+IDO1+NEURL3+CD16)拷贝数,获得其二者的比值,本申请的发明人发现比值>4,患者出现预后风险概率超过30%;2<比值≤4,患者预后风险概率为20%;1<比值≤2,患者出现预后风险概率为10%;比值<1,患者出现耐药概率为0%。通过统计分析,因此制定了上述综合的评估指南。

[0103] 当然,在其他实施方式,也可以采用其他的方式来确定预后风险评估系数,在此不做限定。

[0104] 参见图4,在一实施方式中,试剂盒还包括:ctDNA提取试剂盒40。

[0105] 外周血循环肿瘤DNA片段ctDNA提取试剂盒40用于提取临床血液样本中的ctDNA。

[0106] ctDNA,即循环肿瘤DNA片段。ctDNA主要是死亡的肿瘤细胞破裂后所释放出来的、片段化的基因组DNA。理论上,所有的肿瘤都会产生ctDNA。ctDNA中能够检测到的遗传变异

信息非常丰富,从简单的点突变到复杂的结构变异(structural variation),甚至染色体拷贝数变异都能够检测到。ctDNA的检出率是高度依赖于肿瘤发展阶段、肿瘤类型和检测手段这三个重要因素。

- [0107] 通过这种方式,有助于快速高效提取上述7个基因的ctDNA。
- [0108] 在一实际应用中,利用外周血ctDNA提取试剂盒可以按照如下步骤操作:
- [0109] 1、准备15mL离心管,加入200L QIAGEN Proteinase K至离心管底;
- [0110] 2、加入2mL血浆(不足2mL的用PBS补足)至上述15mL离心管中;先按附件一,混合Buffer ACL和Carrier RNA溶液,轻轻颠倒10次混匀(避免气泡产生,不能vortex),此步结束后应立即进行下一步;
- [0111] 3、加入1.6mL Buffer ACL(含有1g Carrier RNA),pulse-vortexing混匀30s;
- [0112] 4、600C孵育30min;
- [0113] 5、将管子从60℃取下,置于实验台上,旋开管盖;
- [0114] 6、加入3.6mL Buffer ACB,pulse-vortexing混匀15s-30s;
- [0115] 7、将上述混匀的产物放在冰上冰浴Smin;
- [0116] 8、准备24孔底座,接上真空泵,在底座上分别插入支架和QIAamp Mini吸附柱,在吸附柱上插入20mL导管(Tube Extenders);
- [0117] 9、用移液器小心的将第7步管中的溶液加入到吸附柱里,打开真空泵开关,让溶液通过吸附柱;
- [0118] 10、向吸附柱中加入600L Buffer AC W 1,打开真空泵开关,让溶液通过吸附柱;
- [0119] 11、向吸附柱中加入750L Buffer ACW2,让溶液通过吸附柱;
- [0120] 12、向吸附柱中加入750L无水乙醇,让溶液通过吸附柱;
- [0121] 13、盖上吸附柱盖子,分别将吸附柱和支架从底座上取下来,将吸附柱装入洁净的2mL收集管中,14000rpm离心3min,丢弃收集管;
- [0122] 14、将吸附柱装入一个新的洁净的2mL收集管中,打开盖子,室温放置10min,随后放入56℃的金属浴中,烘干2min;
- [0123] 15、向吸附柱的中间悬空小心的先加入100L NF-Water水,室温放置5min,14000rpm离心1min,保留收集管约100L游离DNA溶液;
- [0124] 16、再向吸附柱的中间悬空小心加入50L NF-Water,室温放置5min;
- [0125] 17、14000rpm离心1min,保留收集管约150L游离DNA溶液,冻存-80℃冰箱。
- [0126] 以上所述仅为本申请的实施方式,并非因此限制本申请的专利范围,凡是利用本申请说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本申请的专利保护范围内。

## SEQUENCE LISTING

<110> 南通大学

<120> 用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒

<160> 14

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

ttcttgat ttcccaagat t 21

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

tgataccga tatgagccct ac 22

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

aatgtgtctt tggtgggtta c 21

<210> 4

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 4

gaactggagg cactgattta a 21

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 5

actccatcgc ctcattac 18

<210> 6

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 6  
ctggcatatc tcggttct 18  
<210> 7  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 7  
ggctgattag caagagg 18  
<210> 8  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 8  
tgcttcaagt ccaggttc 18  
<210> 9  
<211> 24  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 9  
acggtaaac ttcactccac atag 24  
<210> 10  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 10  
ccattttc ccaaaagcaa c 21  
<210> 11  
<211> 22  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 11  
tttggacacc cagatgttcc ag 22  
<210> 12  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 12  
gtttcccttg agcacctgga tc 22  
<210> 13

<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 13  
caaggaaggt tggcatttgt 20  
<210> 14  
<211> 20  
<212> DNA  
<213> 人工序列  
<400> 14  
cctttcagtc ctttgcaagc 20

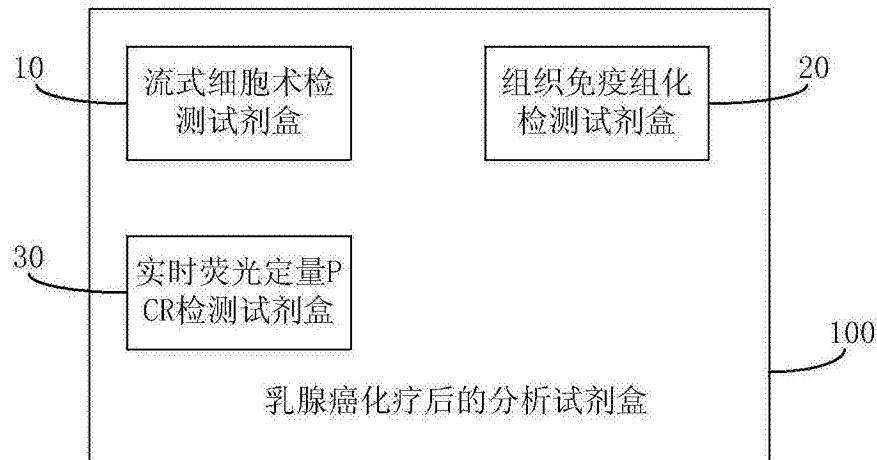


图1

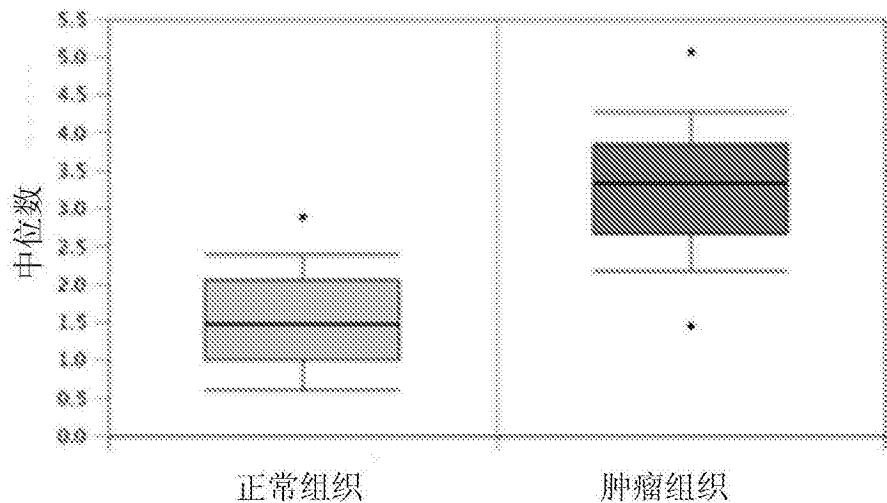


图2

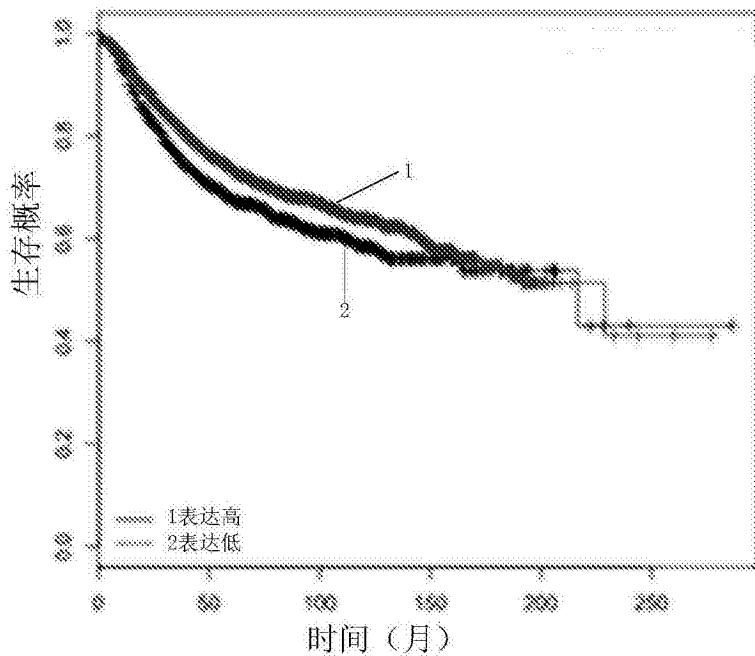


图3

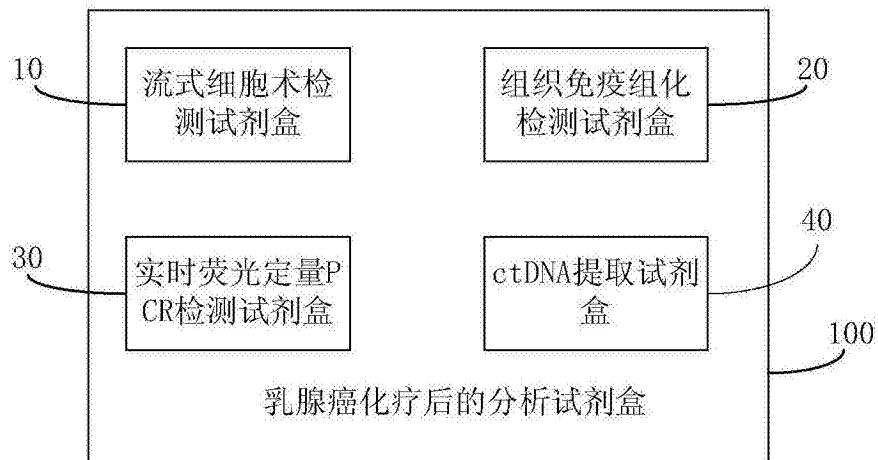


图4

专利名称(译)	用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107884330A</a>	公开(公告)日	2018-04-06
申请号	CN201710982362.9	申请日	2017-10-19
[标]申请(专利权)人(译)	南通大学		
申请(专利权)人(译)	南通大学		
当前申请(专利权)人(译)	南通大学		
[标]发明人	王国华 高纯一 姜正林 徐丽华 王金星 李霞		
发明人	王国华 高纯一 姜正林 徐丽华 王金星 李霞		
IPC分类号	G01N15/14 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/68 C12Q1/6886		
CPC分类号	G01N15/14 C12Q1/6886 C12Q2600/158 G01N33/5055 G01N33/5302 G01N33/68		
代理人(译)	李庆波		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本申请公开了一种用于乳腺癌化疗后的分析试剂盒，该试剂盒包括：流式细胞术检测试剂盒、组织免疫组化检测试剂盒以及实时荧光定量PCR检测试剂盒，流式细胞术检测试剂盒对乳腺癌患者化疗后的临床组织样本进行细胞计数，以获得乳腺癌患者经化疗后的第一耐药性评估系数，组织免疫组化检测试剂盒对临床组织样本进行双重染色，以获得乳腺癌患者经化疗后的第二耐药性评估系数，实时荧光定量PCR检测试剂盒对临床组织样本进行定量扩增，以获得乳腺癌患者经化疗后的第三耐药性评估系数；通过第一耐药性评估系数、第二耐药性评估系数以及第三耐药性评估系数，可以获得乳腺癌患者经化疗后的耐药指数。通过上述方式，本申请能够为综合全面评估乳腺癌患者经化疗后的耐药性情况提供产品上的支持。

