



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109655616 A

(43)申请公布日 2019.04.19

(21)申请号 201811555617.4

(22)申请日 2018.12.19

(71)申请人 广州金域医学检验中心有限公司

地址 510335 广东省广州市海珠区新港东路2429号三楼

(72)发明人 潘建华 张静文 何凯琴 郑倩
李明敏 郭鸣琪

(74)专利代理机构 广州新诺专利商标事务所有
限公司 44100

代理人 李海恬

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页 附图17页

(54)发明名称

检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系
统

(57)摘要

本发明涉及一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统，属于医学技术领域。该组合试剂，包括以下抗体组合中的至少一种：抗体组合1，包括CD38、CD13、CD34、CD117、CD33、CD19、HLA-DR和CD45抗体；抗体组合2，包括CD38、CD64、CD34、CD123、CD56、CD14、HLA-DR和CD45抗体；抗体组合3：包括CD38、CD7、CD34、CD5、CD11b、CD15和CD45抗体。本发明的抗体组合涵盖了粒、单、淋三系的表达标记，加上建立了正常的抗体表达模式，可以最大程度的识别出肿瘤细胞。而且，经过大量实验数据说明，本发明各个组合中的各抗体之间不存在相互抑制表达的问题。可全面、快速、高灵敏度的通过多参数流式细胞分析检测AML-MRD。

1. 一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,其特征在于,包括以下抗体组合中的至少一种:

抗体组合1,包括CD38、CD13、CD34、CD117、CD33、CD19、HLA-DR和CD45抗体;

抗体组合2,包括CD38、CD64、CD34、CD123、CD56、CD14、HLA-DR和CD45抗体;

抗体组合3:包括CD38、CD7、CD34、CD5、CD11b、CD15和CD45抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,其特征在于,所述抗体标记不同的荧光标记。

3. 根据权利要求2所述的检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,其特征在于,所述荧光标记选自:FITC、PE、PerCP-CyTM 5.5、PE-CyTM 5、PE-CY7、APC、APC-H7、APC-Cy7、APC Alexa Fluor 750、Pacific BlueTM、V450、V500、Pacific OrangeTM、Krome Orange。

4. 根据权利要求3所述的检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,其特征在于,所述荧光标记与所述抗体的标记配合关系为:CD38标记FITC;CD13、CD64和CD7标记PE;CD34标记PerCP-CyTM 5.5或PE-CyTM 5;CD117、CD123和CD5标记PE-CY7;CD33、CD56和CD11b标记APC;CD19、CD14标记APC-H7或APC-Cy7或APC Alexa Fluor 750;HLA-DR和CD15标记Pacific BlueTM或V450;CD45标记V500或Pacific OrangeTM或Krome Orange。

5. 一种检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,包括:

数据获取模块,获取以权利要求1-4任一项所述的组合试剂染色的待测细胞的流式细胞术检测结果数据;

数据分析模块,对上述获取的数据进行分析,根据预定的判断标准判定待测细胞是否为肿瘤细胞。

6. 根据权利要求5所述的检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,还包括检测模块,所述检测模块对待测细胞进行流式细胞术检测,包括:

单细胞悬液模块,用以制备单细胞悬液;

孵育模块,用以将单细胞悬液与权利要求1-4任一项所述的组合试剂分别进行孵育;

重悬模块,用以向上述经孵育的细胞中加入溶血素、离心、洗涤后重悬细胞;

测定模块,用以对上述重悬后的细胞进行流式细胞术测定。

7. 根据权利要求5所述的检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,所述数据分析模块包括:正常对照人群抗体表达模式模板和待测细胞抗体表达模式,所述预定的判断标准为,如待测细胞抗体表达模式落入所述正常对照人群抗体表达模式模板中,则将待测细胞判定为免疫表型正常的细胞群;如待测细胞抗体表达模式未落入所述正常对照人群抗体表达模式模板中,则将待测细胞判定为疑似肿瘤细胞群。

8. 根据权利要求7所述的检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,所述正常对照人群抗体表达模式模板通过以下方法建立:获取正常对照人群细胞群的流式细胞术检测结果数据,通过设门将细胞分群,圈出目的细胞群,再分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到正常对照人群抗体表达模式模板;

所述待测细胞抗体表达模式通过以下方法建立:获取待测细胞的流式细胞术检测结果数据,按照正常对照人群抗体表达模式中的方式设门将细胞分群,圈出目的细胞群,再按照正常对照人群抗体表达模式中的方式分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到待测细胞抗体表达模式。

9. 根据权利要求8所述的检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,所述设门使用CD45-SSC设门,并根据CD45的表达情况将细胞群分为粒细胞区域、单核细胞区域、淋巴细胞区域、CD45弱阳性区域和CD45阴性区域,再分别对每个区域的目的细胞进行分析。

10. 根据权利要求9所述的检测急性髓系白血病细胞的系统,其特征在于,以CD45弱阳性区域的细胞群为目细胞群进行分析,所述目标细胞群中各荧光抗体通过抗体对方式表达,所述抗体对选自:CD34-CD38,CD34-CD13,CD34-33,CD34-CD19,CD34-HLADR,CD34-CD123,CD34-CD64,CD34-CD56,CD34-CD14,CD34-CD7,CD34-CD5,CD34-CD11b和CD34-CD15中的至少一对。

检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统

技术领域

[0001] 本发明涉及医学技术领域,特别是涉及一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统。

背景技术

[0002] 急性髓细胞性白血病(Acute myeloid leukemia, AML)是髓系造血干/祖细胞恶性疾病。以骨髓与外周血中原始和幼稚髓性细胞异常增生为主要特征,临床表现为贫血、出血、感染和发热、脏器浸润、代谢异常等,多数病例病情急重,预后凶险,如不及时治疗常可危及生命。对于化疗诱导和/或骨髓重建的患者微小残留病灶(MRD)的存在是患者复发的高危因素。临幊上需要根据MRD水平的高低,调幊治疗方案,调节用药量,以达到治愈的目的。因此,能否准确测定AML MRD具有重要的临幊价值。

[0003] 目前可用于残留检测的有细胞形态学、多参数流式细胞分析、染色体核型分析、分子生物学相关基因检测等几种方法检测。

[0004] 然而,细胞形态学分析其灵敏度较低,且治疗后残留的肿瘤细胞可能较少,形态学有一定的局限;分子生物学方法虽然灵敏度较高,但对于基因检测无异常发现的病例,则无法使用。多参数流式细胞分析具有快速简便的特点,是目前公认的检测微小残留的有效方法。使用多参数流式分析采用的分析方法主要为监测白血病相关免疫表型(LAIP)或不同于正常的表达模式(DFN)。但是,LAIP方法由于免疫表型漂移的原因会有漏诊,而DFN方法对分析人员的经验和专业知识水平要求较高。另外,急性髓细胞性白血病其免疫表型多变,且治疗后表型变化现象常见,目前尚无统一的试剂组合标准用于AML的MRD监测。

[0005] 根据以上所述,临幊上需要一种灵敏度高、简便快速的检测技术,以及时监测急性髓系白血病的微小残留病。

发明内容

[0006] 基于此,有必要针对现有检测方法中存在的灵敏度低、无统一标准、容易漏诊等问题,提供一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统,采用该组合试剂和系统,可全面、快速、高灵敏度的通过多参数流式细胞分析检测AML-MRD。

[0007] 一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,包括以下抗体组合中的至少一种:

[0008] 抗体组合1,包括CD38、CD13、CD34、CD117、CD33、CD19、HLA-DR和CD45抗体;

[0009] 抗体组合2,包括CD38、CD64、CD34、CD123、CD56、CD14、HLA-DR和CD45抗体;

[0010] 抗体组合3:包括CD38、CD7、CD34、CD5、CD11b、CD15和CD45抗体。

[0011] 上述抗体组合,抗体组合1中包括CD38/CD13/CD34/CD117/CD33/CD19/HLA-DR/CD45抗体,该组合除了CD45作为白细胞设门抗体外,骨架抗体CD34、CD38可识别出可疑细胞群,在CD45DIM(弱阳性)区域,若出现一群CD34+CD38-/DIM的细胞,可将其定为可疑的AML肿瘤细胞。该组合还增加了正常髓系标记CD13、CD117、CD33、HLA-DR,这些标记有一定的抗原表达谱模式,若可疑细胞群的免疫表型不同于这个表达模式,比如过度表达或缺失表达,可

怀疑为肿瘤细胞。另外,该组合还增加了CD19,一方面,CD19可在M2b型白血病细胞中特征性异常表达,因此可识别出特殊亚型白血病细胞,另一方面,CD19可识别出B祖细胞,B祖细胞作为骨髓重建的标记,视为有效造血,与AML肿瘤细胞不同,然而,B祖细胞在抗体表达上与AML肿瘤细胞同在CD45dim区,加入CD19,联合CD34、CD117等指标可识别出正常增生的B祖细胞,不仅有利于AML肿瘤细胞的识别,也可作为治疗疗效和骨髓重建状态判断的重要依据。

[0012] 抗体组合2中包括CD38/CD64/CD34/CD123/CD56/CD14/HLA-DR/CD45抗体,除了可以识别出可疑的AML肿瘤细胞,加入了单核细胞判断标记CD64、CD14、HLA-DR,根据其表达谱可以判断单核细胞的残留肿瘤细胞情况,这对于M4、M5型白血病的意义较大,此外,还增加了肿瘤细胞的标记CD123、CD56。同时,CD56还可以作为跨系表达的判断,若髓系的细胞表达了CD56,视为跨系表达,应视为肿瘤细胞,且此类细胞提示预后不良。

[0013] 抗体组合3中包括CD38/CD7/CD34/CD5/CD11b/-/CD15/CD45抗体,除了可以识别出可疑的AML肿瘤细胞,加入了淋系的标记CD7、CD5,若髓系的细胞表达了淋系的标记,视为跨系表达,考虑为肿瘤细胞来源。此外,还增加了粒系发育相关标记CD11b、CD15,若发现一群细胞,既表达成熟的标记,又表达幼稚细胞的标记,视为时空错乱表达,考虑为肿瘤细胞来源。此管还可通过CD11b和CD15的表达模式,判断粒细胞抗原表达是否紊乱。

[0014] 对于一些病史不清晰的病例情况下,上述三个组合均采用检测,能够降低漏检的比例。

[0015] 在其中一个实施例中,上述抗体组合包括抗体组合1和抗体组合2,或者包括抗体组合1和抗体组合2。

[0016] 在其中一个实施例中,上述抗体优选单克隆抗体。

[0017] 在其中一个实施例中,所述抗体标记不同的荧光标记。从而可以在十色/八色流式细胞仪中同时检测上述指标。具有方便、快捷的优势。

[0018] 在其中一个实施例中,所述荧光标记选自:FITC(异硫氰酸荧光素)、PE、PerCP-CyTM5.5、PE-CyTM 5、PE-CY7、APC、APC-H7、APC-Cy7、APC Alexa Fluor 750、Pacific BlueTM、V450、V500、Pacific OrangeTM、Krome Orange。

[0019] 在其中一个实施例中,所述荧光标记与所述抗体的标记配合关系为:CD38标记FITC;CD13、CD64和CD7标记PE;CD34标记PerCP-CyTM 5.5或PE-CyTM 5;CD117、CD123和CD5标记PE-CY7;CD33、CD56和CD11b标记APC;CD19、CD14标记APC-H7或APC-Cy7或APC Alexa Fluor 750;HLA-DR和CD15标记Pacific BlueTM或V450;CD45标记V500或Pacific OrangeTM或Krome Orange。

[0020] 本发明还公开了一种检测急性髓系白血病细胞的系统,包括:

[0021] 数据获取模块,获取以上述的组合试剂染色的待测细胞的流式细胞术检测结果数据;

[0022] 数据分析模块,对上述获取的数据进行分析,根据预定的判断标准判定待测细胞是否为肿瘤细胞。

[0023] 上述检测急性髓系白血病细胞的系统,其流式细胞术过程参照常规技术即可,如选用溶血素、缓冲液(如:小牛血清)和固定液(如:多聚甲醛)等。所用设备和耗材选用流式细胞分析的设备和耗材,如流式专用管、震荡器,移液器等耗材。

[0024] 在其中一个实施例中,该系统还包括检测模块,所述检测模块对待测细胞进行流

式细胞术检测,包括:

- [0025] 单细胞悬液模块,用以制备单细胞悬液;
- [0026] 孵育模块,用以将单细胞悬液与上述的组合试剂分别进行孵育;
- [0027] 重悬模块,用以向上述经孵育的细胞中加入溶血素、离心、洗涤后重悬细胞;
- [0028] 测定模块,用以对上述重悬后的细胞进行流式细胞术测定。
- [0029] 在其中一个实施例中,所述数据分析模块包括:正常对照人群抗体表达模式模板和待测细胞抗体表达模式,所述预定的判断标准为,如待测细胞抗体表达模式落入所述正常对照人群抗体表达模式模板中,则将待测细胞判定为免疫表型正常的细胞群;如待测细胞抗体表达模式未落入所述正常对照人群抗体表达模式模板中,则将待测细胞判定为疑似肿瘤细胞群。
- [0030] 在其中一个实施例中,所述正常对照人群抗体表达模式模板通过以下方法建立:获取正常对照人群细胞群的流式细胞术检测结果数据,通过设门将细胞分群,圈出目的细胞群(即原始/幼稚髓系细胞),再分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到正常对照人群抗体表达模式模板;
- [0031] 所述待测细胞抗体表达模式通过以下方法建立:获取待测细胞的流式细胞术检测结果数据,按照正常对照人群抗体表达模式中的方式设门将细胞分群,圈出目的细胞群,再按照正常对照人群抗体表达模式中的方式分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到待测细胞抗体表达模式。
- [0032] 在其中一个实施例中,所述设门使用CD45-SSC(侧向散射光)设门,并根据CD45的表达情况将细胞群分为粒细胞区域、单核细胞区域、淋巴细胞区域、CD45弱阳性区域和CD45阴性区域,再分别对每个区域的目的细胞进行分析。具有检测分析效果好的优点。
- [0033] 在其中一个实施例中,根据CD45的表达情况将细胞群分为粒细胞、单核细胞、淋巴细胞、CD45弱阳性、CD45阴性5个区域,再分别对每个区域的目的细胞进行分析。
- [0034] 具体的,CD45为白细胞共同抗原,将CD45作为设门抗体,正常血细胞的CD45的表达强度大小为:淋巴细胞>单核细胞>粒细胞,SSC作为侧向散射光,与细胞的颗粒度有关,侧向散射光的正常表达强度为:粒细胞>单核细胞>淋巴细胞;结合CD45和SSC的表达特点,可划出淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的分区,其中淋巴细胞处于CD45最强而SSC最低的位置;单核细胞的CD45稍弱于淋巴细胞而SSC比淋巴细胞稍高;粒细胞CD45弱于单核细胞而SSC信号最高。在CD45弱阳性而SSC较低的区域划为CD45弱阳性区域,此区域主要为原始细胞所在的位置;而CD45阴性区域则主要为红系、巨核系、异常浆细胞等。根据这种表达模式将细胞群分为粒细胞(Gran)、单核细胞(Mono)、淋巴细胞(Lym),CD45弱阳性(CD45DIM)、CD45阴性(CD45neg)5个区域,便于对目的细胞进行分别分析。
- [0035] 在其中一个实施例中,所述目标细胞群中各荧光抗体通过抗体对方式表达,以CD45弱阳性区域的细胞群为分析对象,所述抗体对选自:CD34-CD38,CD34-CD13,CD34-33,CD34-CD19,CD34-HLADR,CD34-CD123,CD34-CD64,CD34-CD56,CD34-CD14,CD34-CD7,CD34-CD5,CD34-CD11b和CD34-CD15中的至少一对。
- [0036] 由于髓系原始细胞一般是CD45弱阳性表达,少量为CD45阴性,因此优选以CD45弱阳性区域的细胞群为分析对象。
- [0037] 与现有技术相比,本发明具有以下有益效果:

[0038] 本发明的一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,合理应用各项抗体指标,涵盖范围广,例如,本发明以CD45弱阳性(CD45DIM)区为主要目的细胞群时,本发明的组合抗体以CD38、CD34为骨架,设计了涵盖各种异常细胞的表达模式,如过表达、缺失表达、跨系表达,时空错乱表达等。

[0039] 尽管AML在治疗前后的免疫表型多变,本发明的抗体组合涵盖了粒细胞、单核细胞、淋巴细胞三系的表达标记,加上建立了正常的抗体表达模式,可以最大程度的识别出肿瘤细胞。而且,经过大量实验数据说明,本发明各个组合中的各抗体之间不存在相互抑制表达的问题。

[0040] 并且,本发明还对抗体进行了有效搭配,如设置骨架抗体、同一系列抗体分配于相应的抗体组、所使用荧光素之间有互无干扰(如APC与PC5不在同一管中使用等)情况,从而确保异常细胞群之间的免疫表型有效关联分析,不会出现荧光素相互干扰等情况,提高了结果准确性。

[0041] 本发明只需要三组试剂,而且操作简单,从样本接收到出检验结果,只需1-2小时,检测较为迅速,而且本发明优化了结果分析的模板,降低了对分析人员专业知识水平的要求,更为方便快捷。

附图说明

- [0042] 图1为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD45-SSC表达散点图示意;
- [0043] 图2为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34+散点图示意;
- [0044] 图3为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34+细胞群的CD38表达情况;
- [0045] 图4为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD38抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0046] 图5为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD13抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0047] 图6为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-33抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0048] 图7为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD19抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0049] 图8为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-HLADR抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0050] 图9为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD123抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0051] 图10为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD64抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0052] 图11为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD56抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0053] 图12为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD14抗体对的荧光抗体表达情况;
- [0054] 图13为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD7抗体对的荧光抗体表达情

况；

- [0055] 图14为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD5抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0056] 图15为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD11b抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0057] 图16为实施例2中正常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD15抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0058] 图17为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD45-SSC表达散点图示意；
- [0059] 图18为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34+散点图示意；
- [0060] 图19为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34+细胞群的CD38呈阳性散点图示意；
- [0061] 图20为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD38抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0062] 图21为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD13抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0063] 图22为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-33抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0064] 图23为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD19抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0065] 图24为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-HLADR抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0066] 图25为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD123抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0067] 图26为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD64抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0068] 图27为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD56抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0069] 图28为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD14抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0070] 图29为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD7抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0071] 图30为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD5抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0072] 图31为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD11b抗体对的荧光抗体表达情况；
- [0073] 图32为实施例2中异常髓系原始细胞免疫表型CD34-CD15抗体对的荧光抗体表达情况。

具体实施方式

[0074] 为了便于理解本发明,下面将参照相关附图对本发明进行更全面的描述。附图中给出了本发明的较佳实施例。但是,本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明的公开内容的理解更加透彻全面。

[0075] 除非另有定义,本文所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的技术人员通常理解的含义相同。本文中在本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不是旨在于限制本发明。

[0076] 以下实施例中所用抗体均为市售购得,部分具体来源参见下表。

[0077] 表1.抗体来源

[0078]

抗体名称	货号	厂商
CD38 FITC	A07778	贝克曼库尔特
CD13 PE	652820	BD
CD64 PE	IM3601U	贝克曼库尔特
CD34 PerCP CY5.5	347203	BD
CD117 PE-Cy7	339195	BD
CD123 PE-Cy7	560826	BDP
CD5 PE-Cy7	348790	BD
CD33 APC	652807	BD

[0079]

CD56 APC	IM2474	贝克曼库尔特
CD11b APC	340937	BD
CD19 APC-H7/APC-Cy7/APC Alexa Fluor 750	A78838	贝克曼库尔特
CD14 APC-H7/APC-Cy7/APC Alexa Fluor 750	333951	BD
HLA-DR Pacific Blue™	307624	Biolegend
CD15 V450	561584	BDP
CD45 V500	560777	BDP

[0080] 实施例1

[0081] 一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂,具体如下:

[0082] 组合1:CD38/CD13/CD34/CD117/CD33/CD19/HLA-DR/CD45;

[0083] 组合2:CD38/CD64/CD34/CD123/CD56/CD14/HLA-DR/CD45;

[0084] 组合3:CD38/CD7/CD34/CD5/CD11b/CD15/CD45。

[0085] 上述各组合中相关单克隆抗体的荧光标记和用量如下表所示。

[0086] 表2.各单克隆抗体的用量

[0087]

荧光标记	第1管(抗体组合1)	第2管(抗体组合2)	第3管(抗体组合3)
FITC	CD38-5μl	CD38-5μl	CD38-5μl
PE	CD13-5μl	CD64-5μl	CD7-5μl
PerCP CY5.5	CD34-2.5μl	CD34-2.5μl	CD34-2.5μl
PE-Cy7	CD117-2μl	CD123-2μl	CD5-2μl
APC	CD33-2μl	CD56-2μl	CD11b-2μl
APC-H7/APC-Cy7/A PC Alexa Fluor 750	CD19-3μl	CD14-3μl	/
Pacific Blue™ /V450	HLA-DR-1μl	HLA-DR-1μl	CD15-2μl
V500	CD45-1μl	CD45-1μl	CD45-1μl
合计	21.5μl	21.5μl	19.5μl

[0088] 注:将市售购得的上述抗体进行浓度梯度验证,确定最佳用量,从而取上述用量的单克隆抗体分别装于编号1、2、3的流式管中。

[0089] 实施例2

[0090] 一种检测急性髓系白血病细胞的系统,包括:检测模块,数据获取模块和数据分析模块。

[0091] 所述检测模块对待测细胞进行流式细胞术检测;

[0092] 所述数据获取模块获取以实施例1所述的组合试剂染色的待测细胞的流式细胞术检测结果数据;

[0093] 所述数据分析模块对上述获取的数据进行分析,根据预定的判断标准判定待测细胞是否为肿瘤细胞。

[0094] 采用上述系统的具体工作流程如下:

[0095] 1、配制试剂。

[0096] 配制实施例1所述的组合试剂。

[0097] 2、样本处理。

[0098] 待测细胞的样本来源可以是骨髓、外周血、胸水、腹水等,根据细胞数调整浓度为 1×10^6 – 5×10^6 个/ml,制成单细胞悬液。

[0099] 3、样品检测。

[0100] 取流式管,标记1、2、3,加入实施例1中的1管、2管、3管抗体组合物,加入量分别为21.5μl、21.5μl、19.5μl,然后分别加入步骤2中的悬液100μl,涡旋震荡混匀,室温避光孵育15min。

[0101] 向孵育后的流式管1、2、3中各加入400μl BD溶血素,涡旋震荡,静置,待溶血透亮。

[0102] 溶血透亮后,流式管1、2、3以1500r/min离心5min,弃上清,加入2ml小牛血清,涡旋震荡,1500r/min离心5min,弃上清。加入400μl 1%多聚甲醛重悬。

[0103] 以上流式管用BD Canto II十色流式细胞仪检测,分析其免疫表型。

[0104] 4、数据分析。

[0105] (1)建立康人抗体表达模式模板和待测细胞抗体表达模式。

[0106] 按照上述方法,获取正常对照人群细胞群的流式细胞术检测结果数据,通过设门将细胞分群,优选使用CD45-SSC(侧向散射光)设门,圈出目的细胞群,

[0107] 以下将继续对此细胞群进行分析各荧光抗体表达情况,选择以下抗体对:CD34-

CD38,CD34-CD13,CD34-33,CD34-CD19,CD34-HLADR,CD34-CD123,CD34-CD64,CD34-CD56,CD34-CD14,CD34-CD7,CD34-CD5,CD34-CD11b,CD34-CD15。

[0108] 根据40例正常对照人群细胞群的流式细胞术检测结果数据,优化设定表达模式模板,得到预定的“门”模板。

[0109] (2) 分析待测细胞抗体表达模式。

[0110] A、一例待测细胞(正常细胞)抗体表达模式分析:

[0111] 获取一例待测细胞的流式细胞术检测结果数据,按照上述正常对照人群抗体表达模式中的方式设门将细胞分群,圈出目的细胞群,再按照正常对照人群抗体表达模式中的方式分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到待测细胞抗体表达模式。

[0112] 结果如图1所示。图1中,根据CD45-SSC的表达情况,将细胞群分为5个区域,分别为粒细胞(Gran)(图中中间上部区域)、单核细胞(Mono)(图中右侧上部区域)、淋巴细胞(Lym)(图中右侧下部区域),CD45弱阳性(CD45DIM)(图中中间下部区域)、CD45阴性(CD45neg)(图中左侧区域)5个区域,CD45DIM区域为本实施案例的目的细胞群,以下将对这群细胞进行免疫表型分析。

[0113] 图2为CD34+原始细胞免疫表型散点图,从图中可见CD34+的原始/幼稚细胞占有核细胞约1.90%,CD34表达于造血干/祖细胞表面,为原始/幼稚细胞表达标志,根据CD34的表达量可确认样本中原始/幼稚细胞的量并对其进一步分析。

[0114] 图3为CD34+细胞群的CD38表达情况散点图。一般情况下髓系原始细胞表达高水平的CD38,而肿瘤细胞CD38的表达减弱。联合CD34和CD38可初步识别出可疑肿瘤细胞,并对其进行进一步的免疫表型分析。

[0115] 图4-16分别为CD34-CD38,CD34-CD13,CD34-33,CD34-CD19,CD34-HLADR,CD34-CD123,CD34-CD64,CD34-CD56,CD34-CD14,CD34-CD7,CD34-CD5,CD34-CD11b,CD34-CD15抗体对的荧光抗体表达情况。图中的多边形折线所示出的“门”为本发明正常对照人群细胞群对应抗体的正常表达模式模板。

[0116] 从图中可以看出,正常对照人群细胞群抗体表达模式均落入正常对照人群抗体表达模式模板中,各个抗体都有正常的表达模式,正常的髓系原始细胞应绝大部分落在正常表达模式的门内,说明其为正常的髓系原始细胞,其免疫表型为CD34+、CD33+、CD117+、HLA-DR+,其表达强度、表达模式均为正常。

[0117] 即该一例待测细胞群在正常对照人群抗体表达模式模板中,判定该细胞群为免疫表型正常的细胞群。

[0118] 采用骨髓涂片形态学分析,亦未见明显残留肿瘤细胞,提示骨髓完全缓解,与上述结果吻合。

[0119] B、另一例待测细胞(异常细胞)抗体表达模式分析:

[0120] 获取另一例待测细胞的流式细胞术检测结果数据,按照上述正常对照人群抗体表达模式中的方式设门将细胞分群,圈出目的细胞群,再按照正常对照人群抗体表达模式中的方式分析所述目标细胞群中各荧光抗体表达情况,得到待测细胞抗体表达模式。

[0121] 结果如图17所示。图17中,根据CD45-SSC的表达情况,将细胞群分为5个区域,分别为粒细胞(Gran)、单核细胞(Mono)、淋巴细胞(Lym),CD45弱阳性(CD45DIM)、CD45阴性(CD45neg)5个区域,CD45DIM(弱阳性)区域为本实施案例的目的细胞群,以下将对这群细胞

进行免疫表型分析。图18为CD34+髓系原始细胞免疫表型散点图,从图中可见CD34+的原始/幼稚细胞占有核细胞约71.87%,相对比例明显增多。图19为CD34+细胞群的CD38表达情况。联合CD34和CD38可初步识别出可疑肿瘤细胞,并对其进行进一步的免疫表型分析。

[0122] 图20-32分别为CD34-CD38,CD34-CD13,CD34-33,CD34-CD19,CD34-HLADR,CD34-CD123,CD34-CD64,CD34-CD56,CD34-CD14,CD34-CD7,CD34-CD5,CD34-CD11b,CD34-CD15抗体对的荧光抗体表达情况。图中的多边形折线所示出的“门”为本发明正常对照人群细胞群的表达模式模板。

[0123] 从图中可以看出,该案例所示的原始细胞抗体表达模式部分落在门内,部分落在门外。如图21显示的该原始细胞群的CD13表达强度减弱,如图27显示的该原始细胞群异常表达CD56,如图29显示的该原始细胞群跨系表达淋系标记CD7,如图31显示的该原始细胞群部分同时表达幼稚和成熟的标志。以上免疫表型均提示该细胞群为AML肿瘤细胞。

[0124] 实施例3

[0125] 以实施例2的检测急性髓系白血病细胞的系统进行急性髓系白血病微小残留检测,随机抽取日常样本40例进行检测,与骨髓涂片形态学检测的金标准相比,结果出现假阳性0例,假阴性0例,证实上述系统可全面、快速、高灵敏度的通过多参数流式细胞分析检测AML-MRD。

[0126] 对比例1

[0127] 参照实施例2的检测急性髓系白血病细胞的系统进行急性髓系白血病微小残留检测,所采用的系统与实施例2中的系统相比,同样以CD45设门,区别仅在于:所述抗体组合为:CD20、CD45、CD81、CD66c、CD123、CD34、CD19、CD10和CD38。

[0128] 采用的抗体对为CD34-CD20,CD34-CD81,CD34-CD66c,CD34-CD123,CD34-CD19,CD34-CD10,CD34-CD38。

[0129] 结果发现:由于检测的抗体对主要表达于B淋巴细胞和原始细胞,无法有效识别髓系原始细胞,不能用于急性髓系白血病的微小残留监测。

[0130] 对比例2

[0131] 参照实施例2的检测急性髓系白血病细胞的系统进行急性髓系白血病微小残留检测,所采用的系统与实施例2中的系统相比,同样以CD45设门,区别仅在于:所述抗体组合为:CD20、CD45、CD81、CD304、CD73、CD34、CD19、CD10和CD38。

[0132] 采用的抗体对为CD34-CD20,CD34-CD81,CD34-CD304,CD34-CD73,CD34-CD19,CD34-CD10,CD34-CD38。

[0133] 结果发现:由于检测的抗体对主要表达于B淋巴细胞和原始细胞,无法有效识别髓系原始细胞,不能用于急性髓系白血病的微小残留监测。

[0134] 以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合,为使描述简洁,未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述,然而,只要这些技术特征的组合不存在矛盾,都应当认为是本说明书记载的范围。

[0135] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但并不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

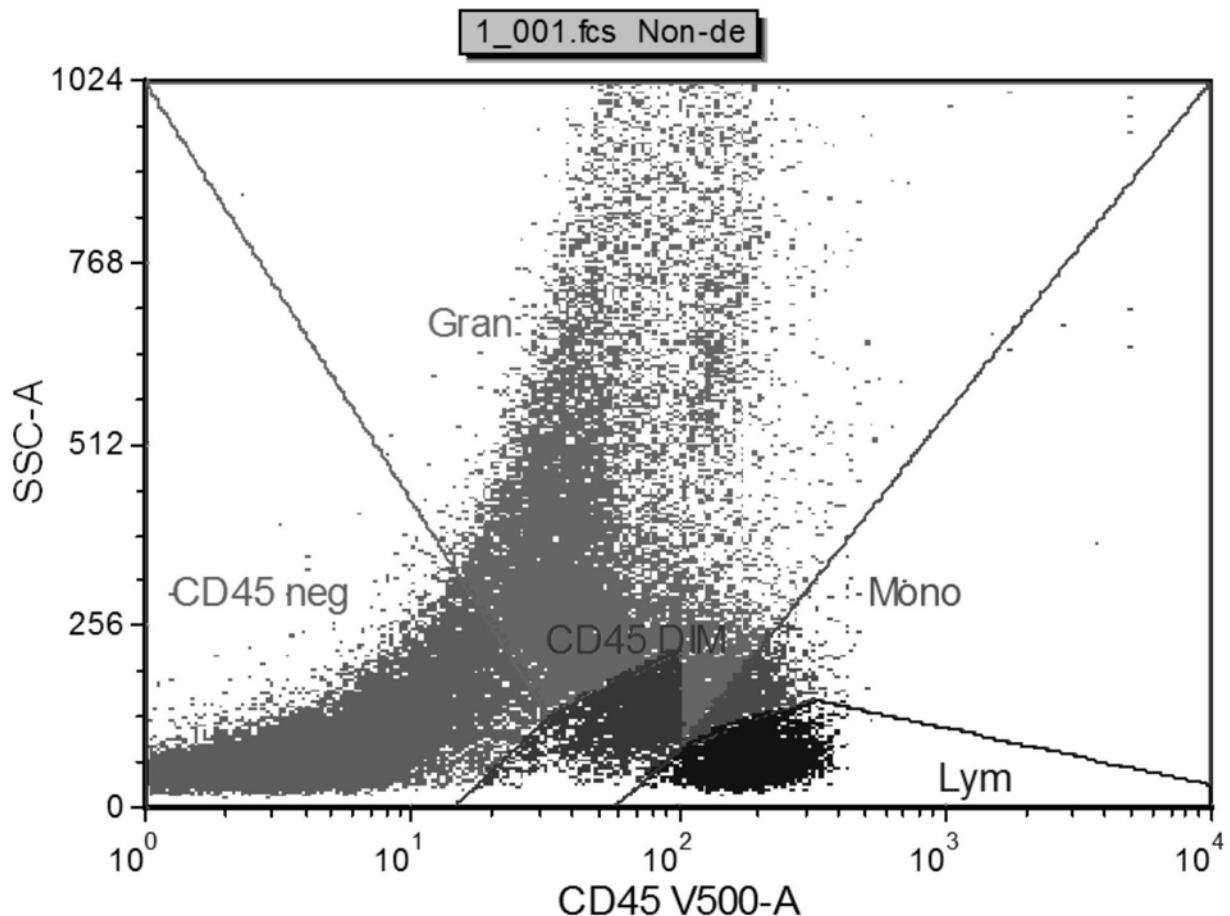


图1

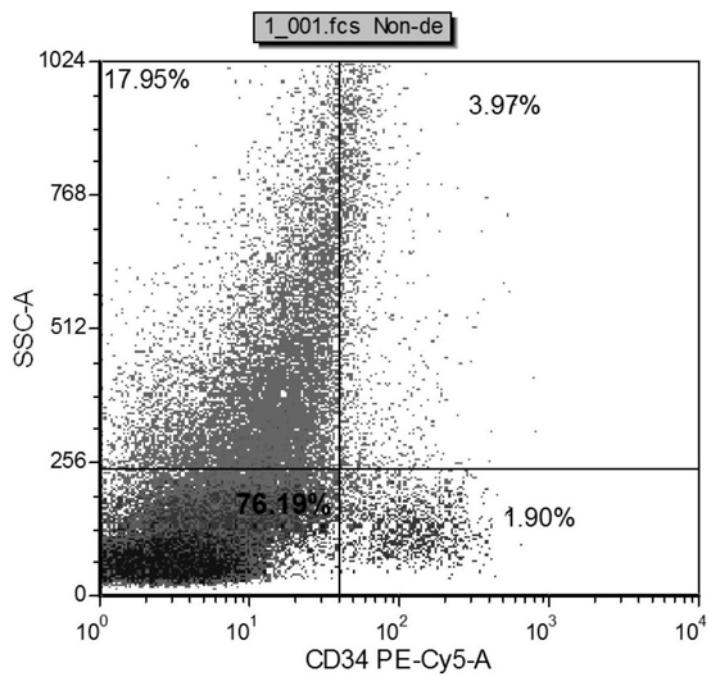


图2

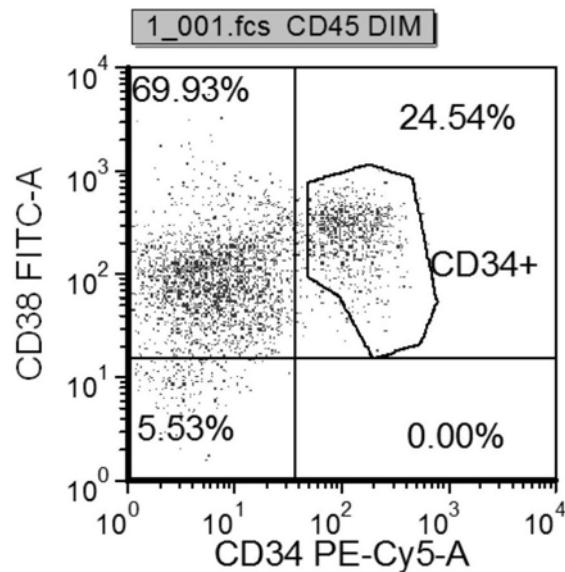


图3

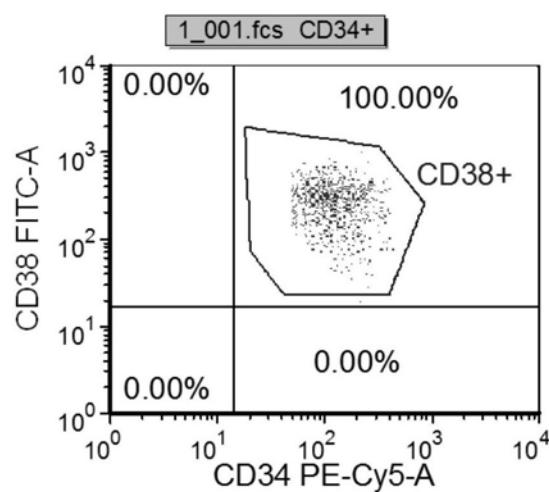


图4

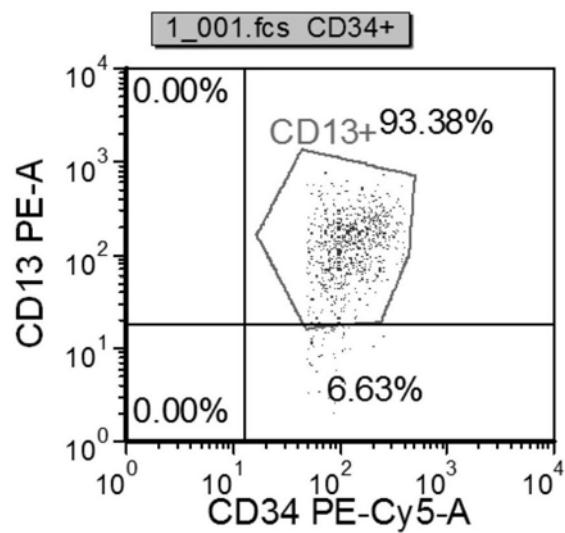


图5

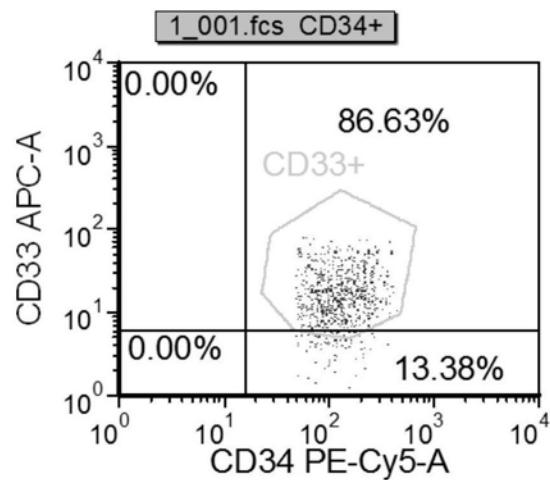


图6

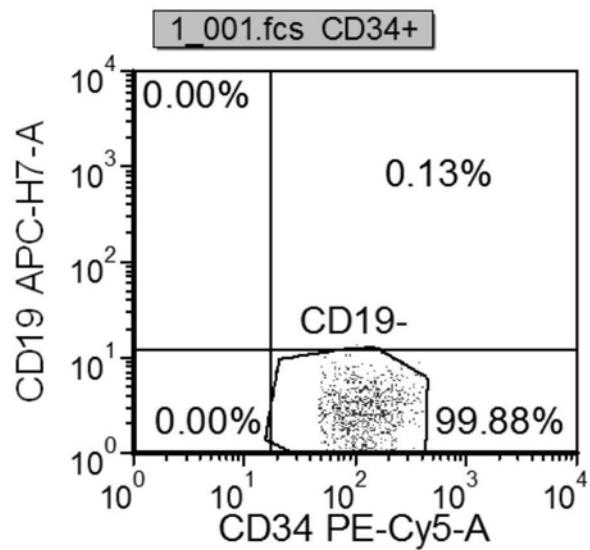


图7

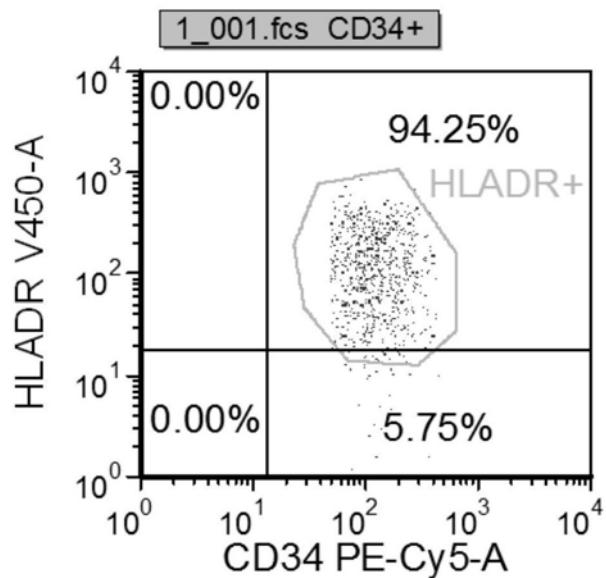


图8

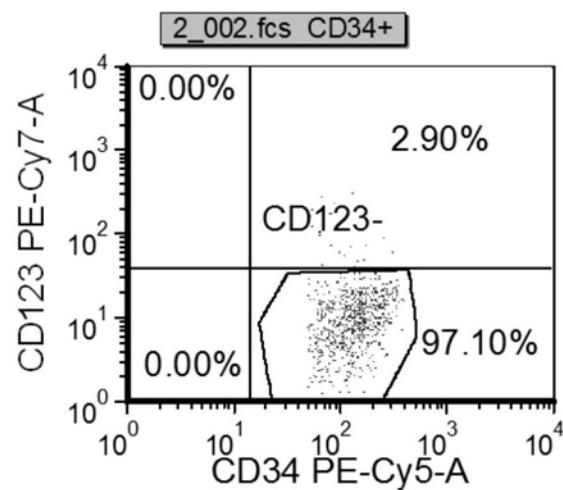


图9

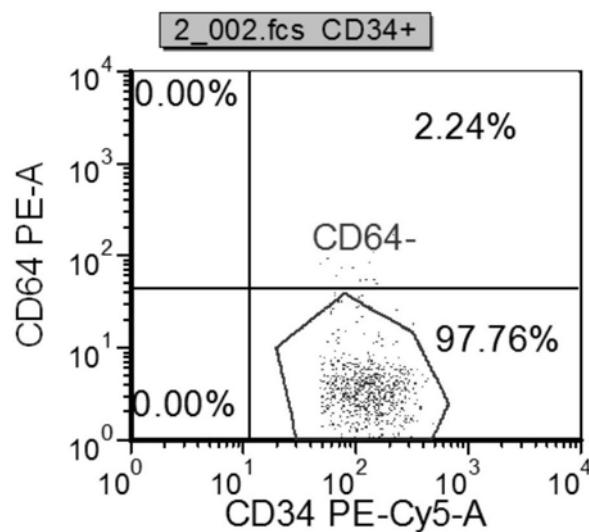


图10

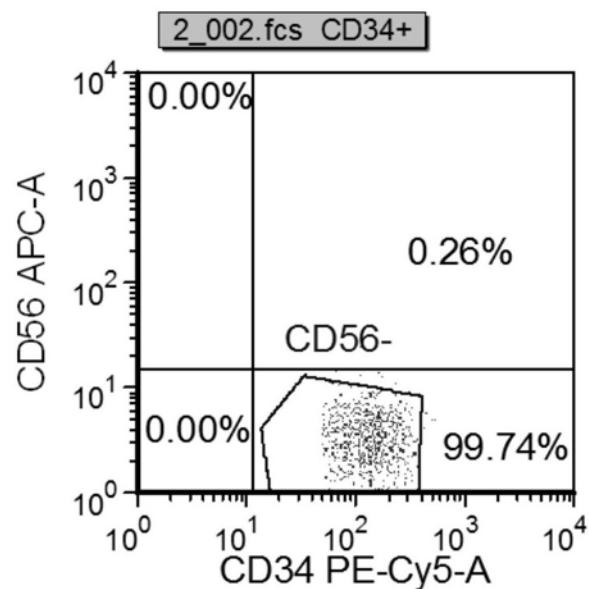


图11

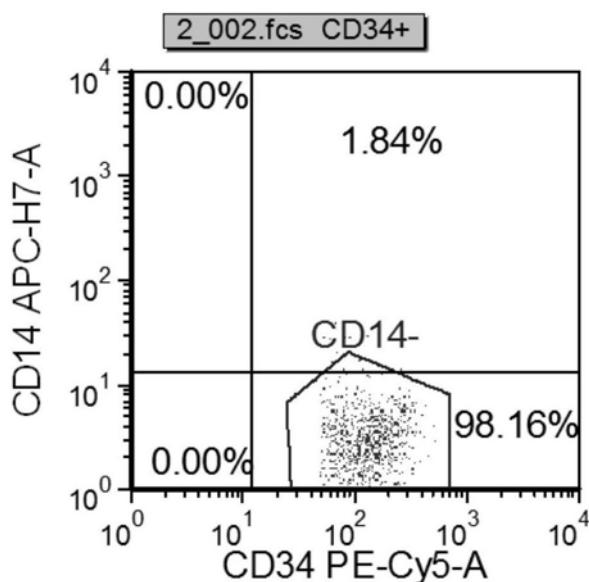


图12

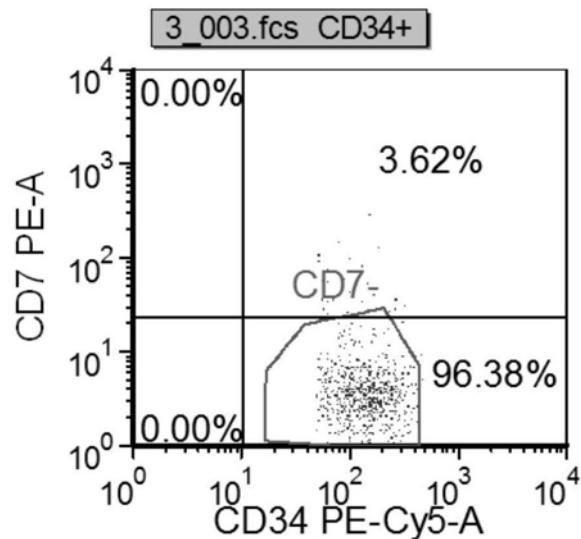


图13

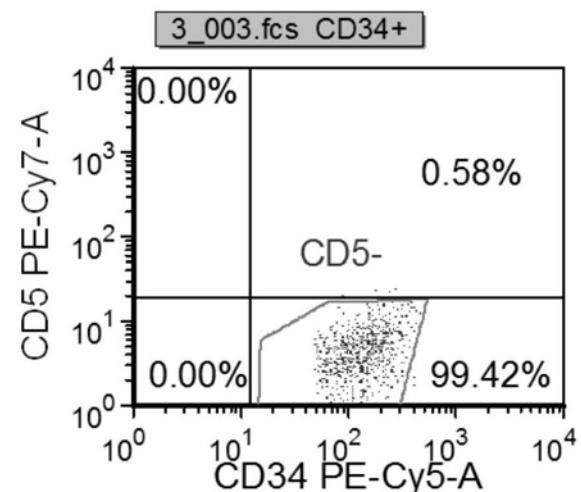


图14

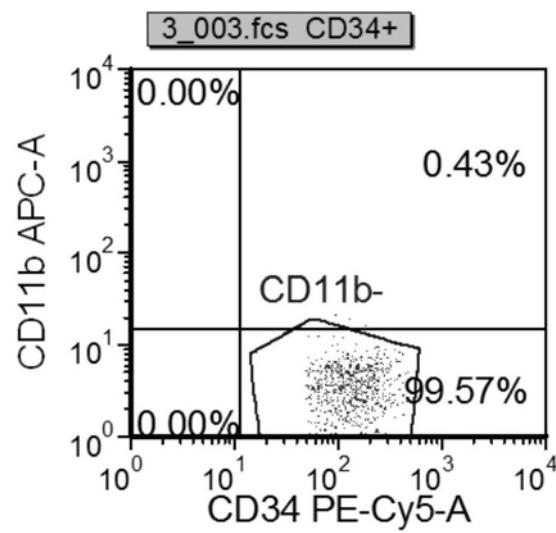


图15

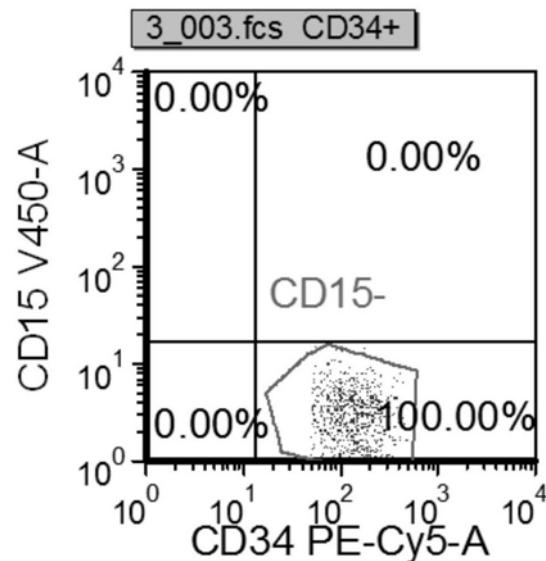


图16

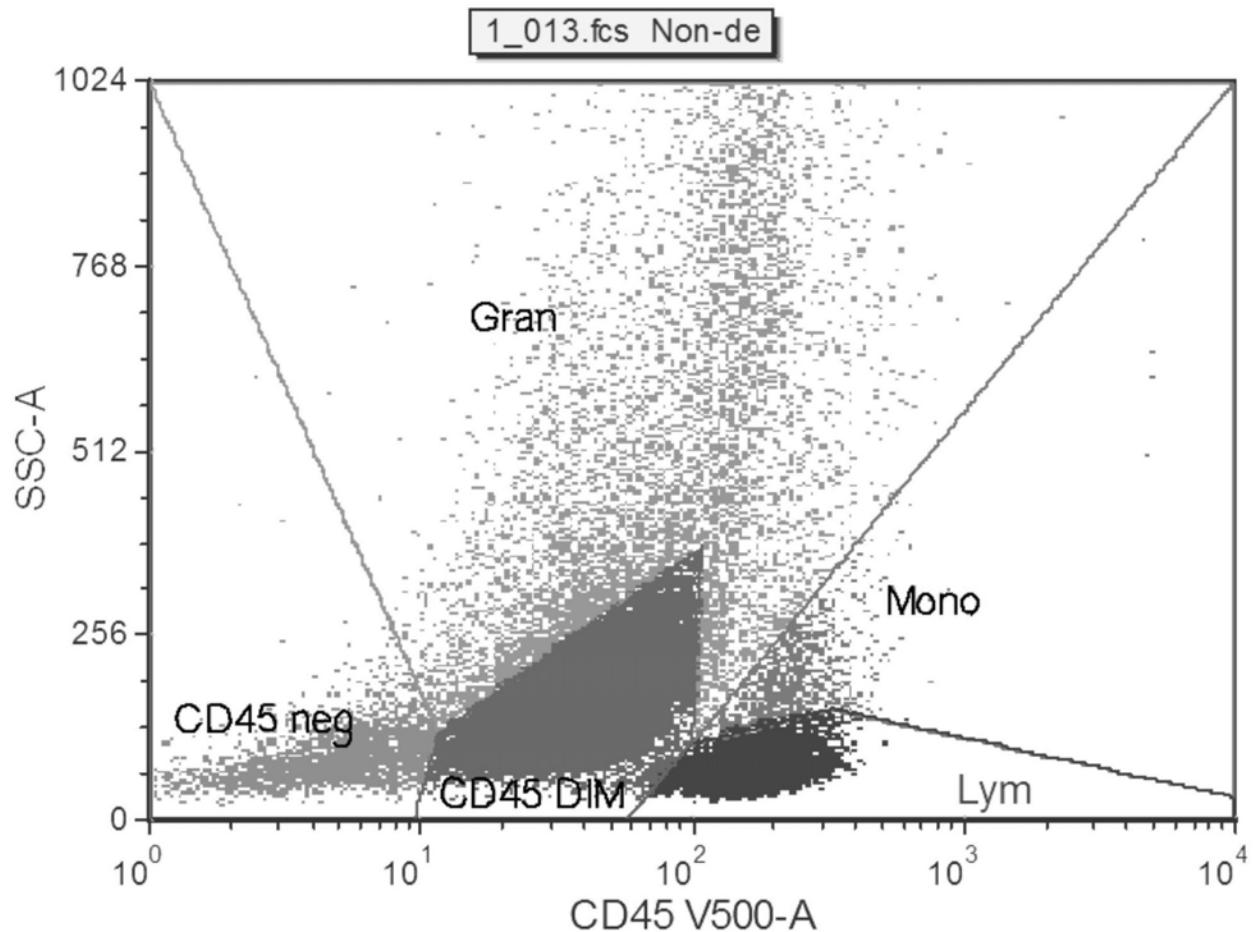


图17

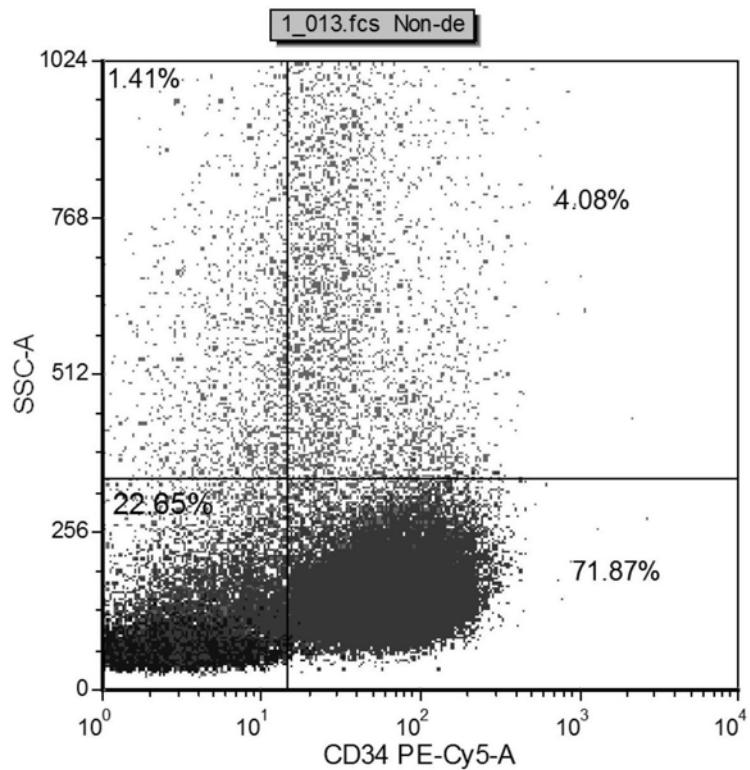


图18

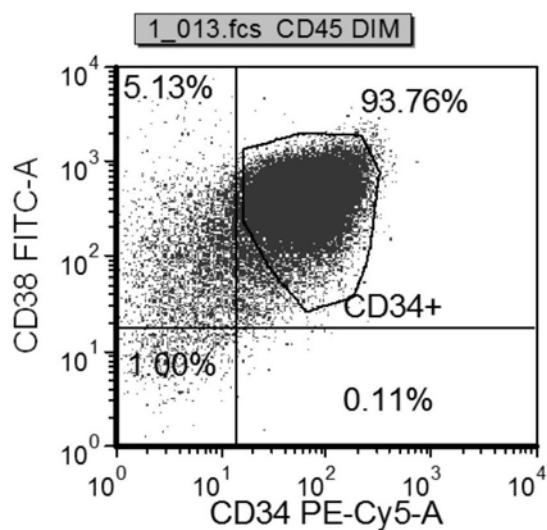


图19

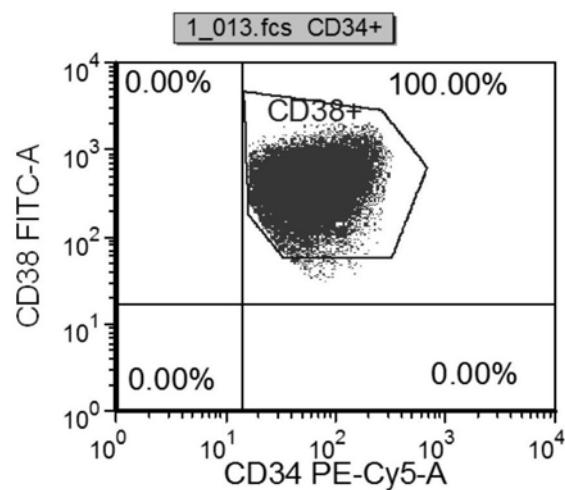


图20

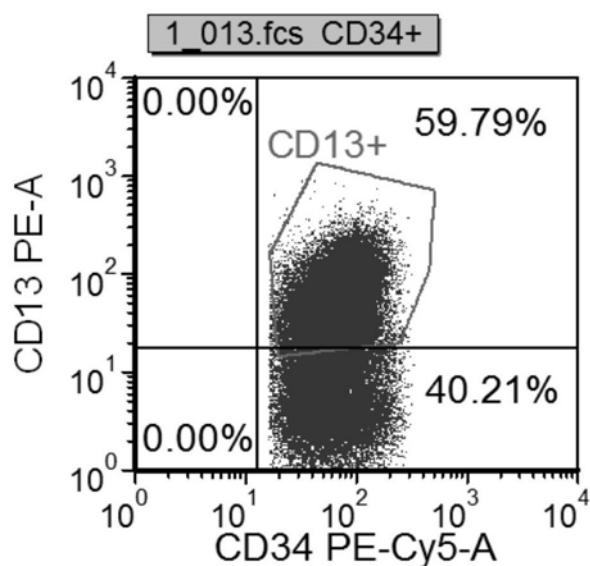


图21

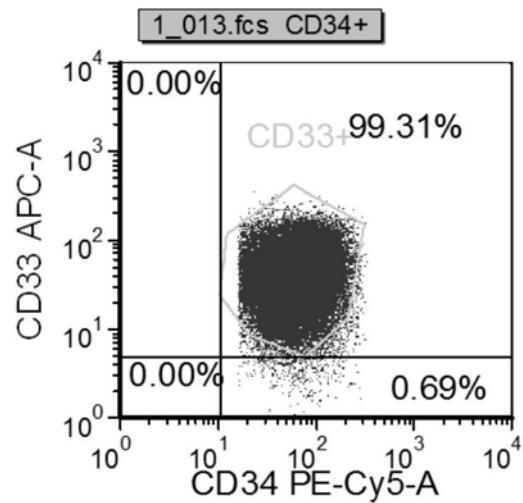


图22

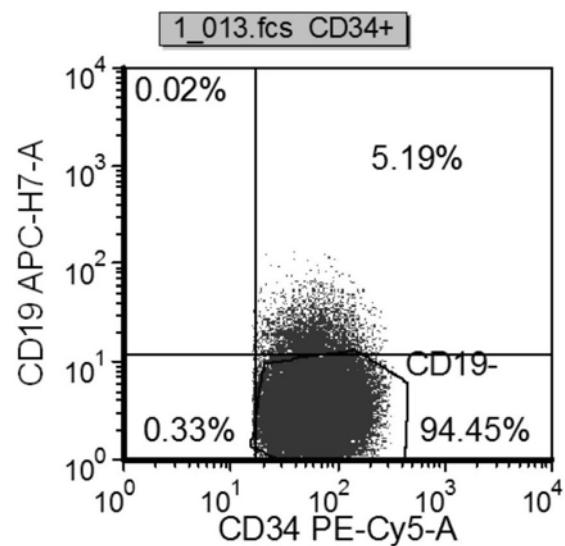


图23

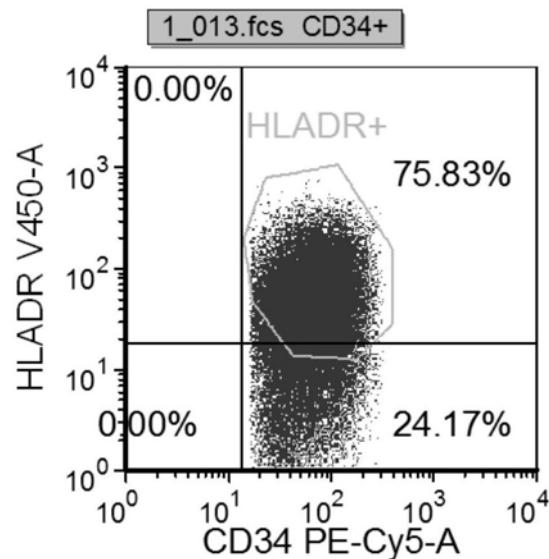


图24

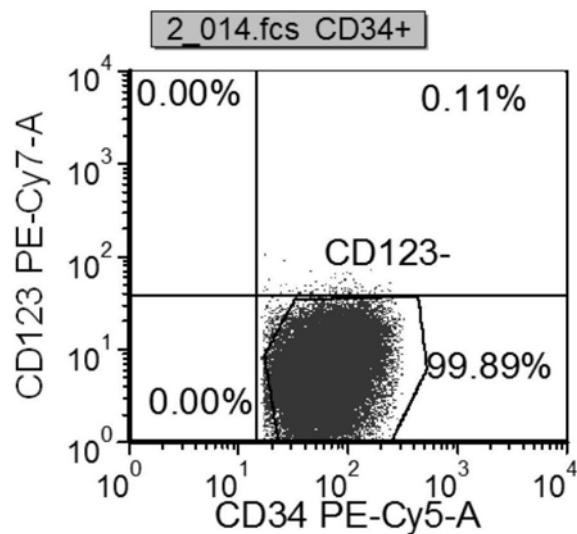


图25

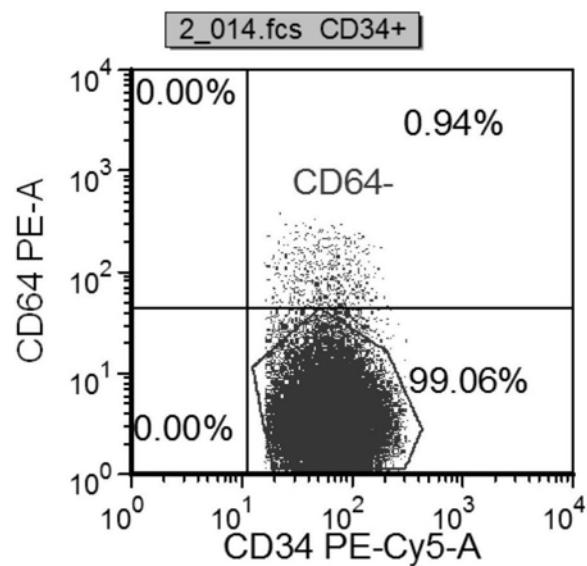


图26

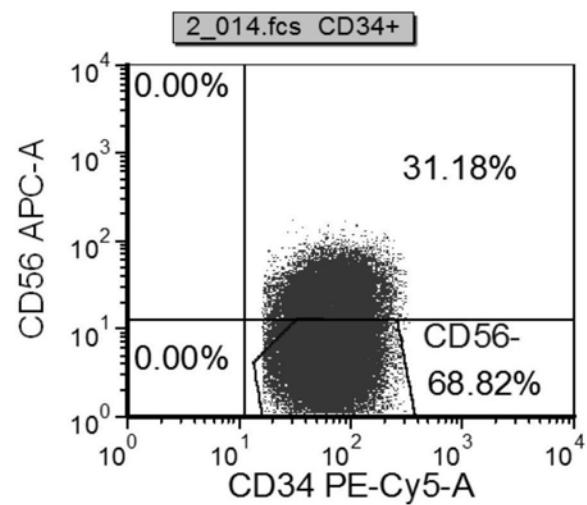


图27

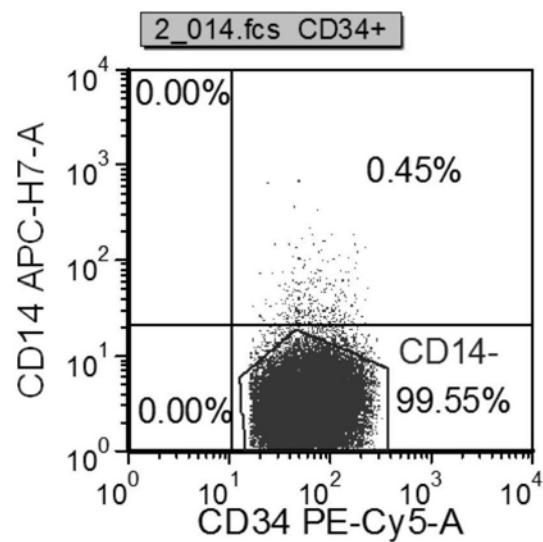


图28

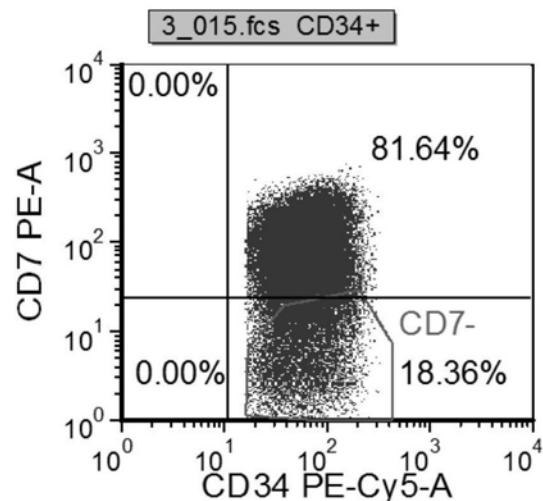


图29

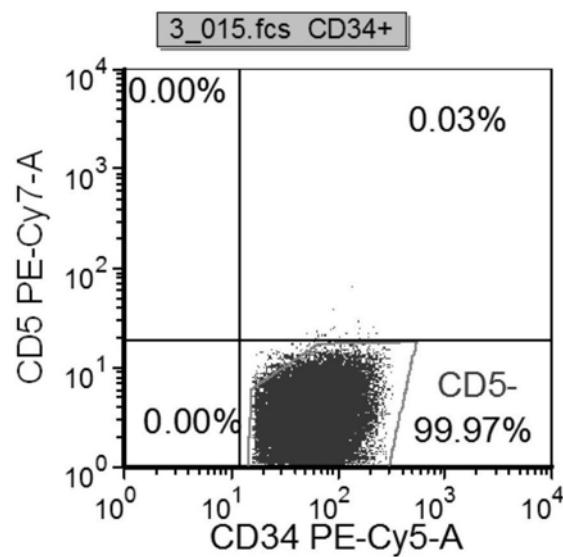


图30

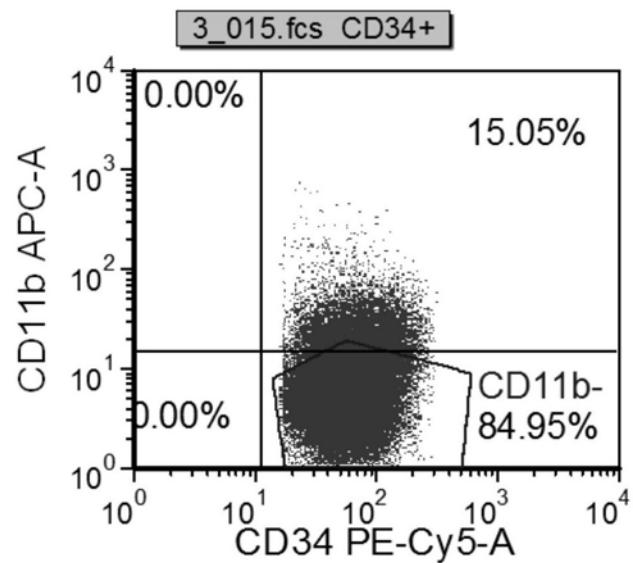


图31

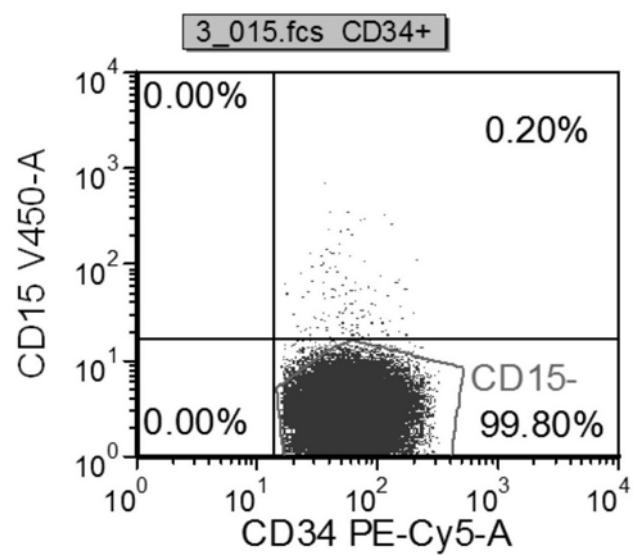


图32

专利名称(译)	检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统		
公开(公告)号	CN109655616A	公开(公告)日	2019-04-19
申请号	CN201811555617.4	申请日	2018-12-19
[标]申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州金域医学检验中心有限公司		
[标]发明人	潘建华 张静文 郑倩 李明敏		
发明人	潘建华 张静文 何凯琴 郑倩 李明敏 郭鸣琪		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/577 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/57426 G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet Sipo		

摘要(译)

本发明涉及一种检测急性髓系白血病细胞的组合试剂及系统，属于医学技术领域。该组合试剂，包括以下抗体组合中的至少一种：抗体组合1，包括CD38、CD13、CD34、CD117、CD33、CD19、HLA-DR和CD45抗体；抗体组合2，包括CD38、CD64、CD34、CD123、CD56、CD14、HLA-DR和CD45抗体；抗体组合3：包括CD38、CD7、CD34、CD5、CD11b、CD15和CD45抗体。本发明的抗体组合涵盖了粒、单、淋三系的表达标记，加上建立了正常的抗体表达模式，可以最大程度的识别出肿瘤细胞。而且，经过大量实验数据说明，本发明各个组合中的各抗体之间不存在相互抑制表达的问题。可全面、快速、高灵敏度的通过多参数流式细胞分析检测AML-MRD。