



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109541214 A

(43)申请公布日 2019. 03. 29

(21)申请号 201811523965.3

(22)申请日 2018.12.13

(71)申请人 钱军

地址 201203 上海市浦东新区自由贸易试
验区碧波路572弄116号2幢A座

(72)发明人 钱军 周丽

(74)专利代理机构 上海精晟知识产权代理有限
公司 31253

代理人 杨军

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

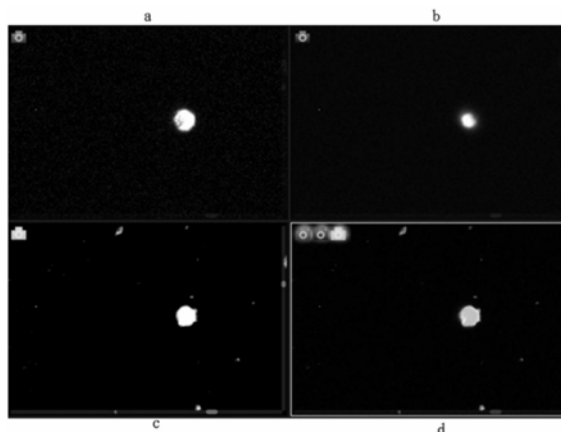
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法

(57)摘要

本发明涉及一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法,包括以下步骤:将全血用红细胞裂解液处理,分离出有核细胞,并用甲醛进行固定;先通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,用Her2一抗孵育所有细胞,然后用标记有FITC荧光基团的Her2二抗孵育,再用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞;采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,即实现对循环肿瘤细胞表面标志分子Her2的检测;本发明同现有技术相比,该检测方法简便、快速、经济,无创,灵敏度高,特异性好,能够解决现有技术检测HER2的不足,值得推广应用。



1. 一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

1) 将全血用红细胞裂解液处理,分离出有核细胞,并用甲醛进行固定;

2) 先通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,用Her2一抗孵育所有细胞,然后用标记有FITC荧光基团的Her2二抗孵育,再用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞;

3) 采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,即实现对循环肿瘤细胞表面标志分子Her2的检测。

2. 如权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤2)的具体反应条件如下:

a. 向细胞固定后的培养皿中加入含4-6%脱脂奶粉的PBS溶液,4℃避光孵育40-70min;

b. 吸除脱脂奶粉PBS溶液后,沿壁加入PBST清洗若干次;

c. 向封闭液中加入肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK和Her2一抗,抗体来源为abcam公司,混合均匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育过夜;

d. 吸除混合液,向封闭液中加入标记有FITC荧光基团的Her2二抗,抗体来源为abcam公司,混匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育40-70min;

e. 吸除抗体,用PBST清洗若干次,加入DAPI,常温避光孵育20-40min。

3. 如权利要求2所述的方法,其特征在于:条件b中,PBST中含0.02wt% Tween-20的PBS。

4. 如权利要求1所述的方法,其特征在于:步骤3)中,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则Her2+,不显绿色则Her2-,显红色则CK+,不显红色则CK-;根据荧光显色,将DAPI+且CK+的点认为是循环肿瘤细胞CTC,若该循环肿瘤细胞CTC上存在Her2+,那么该循环肿瘤细胞CTC为Her2+CTC。

循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法

[技术领域]

[0001] 本发明属于分子生物学领域,具体地说是一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法。

[背景技术]

[0002] 人类表皮生长因子受体2 (her-2) 是乳腺癌最主要的原癌基因之一,又称为c-erbB-2基因,定位于人类染色体17q21,编码分子量为185KD具有酪氨酸激酶活性的跨膜蛋白。亚洲有25%的病人从HER2靶向治疗中受益。在乳腺癌诊治过程中,HER-2是重要的预后指标和靶向HER-2药物的预测指标,约18%~20%的乳腺癌病人会出现HER-2的过表达,准确分析HER-2状态是乳腺癌病人预后判断以及制定有效治疗方案的先决条件,对乳腺癌的诊疗具有重要的指导作用。

[0003] 目前,检测HER2的方法主要有ELISA、IHC、FISH、CISH、RT-PCR等,临床常规的HER-2检测手段包括免疫组化(IHC)和荧光原位杂交(FISH)。IHC法检测的是细胞膜上HER-2蛋白的表达情况,而FISH法则是检测HER2的基因扩增水平。IHC和FISH为美国FDA针对曲妥珠单抗(Herceptin)治疗而推荐的用于石蜡组织的检测方法,FISH法是在Her2探针的基础上,以17号染色体着丝粒探针(CEP17)作为内参,为目前Her2检测的“金标准”。

[0004] 虽然目前HER2的临床检测一定程度上满足了乳腺癌临床诊断治疗的需求,但是随着临床治疗理念的不断发展,IHC和FISH的一些不足也成为乳腺癌诊疗所面临的新的问题。主要表现在以下方面:

[0005] (1) IHC虽然具有检测成本低、操作简单、耗时短、可实现自动化检测和染色后切片便于存档等优点,但IHC易受到受检组织固定时间、固定液的选择、抗体试剂盒的选择和染色结果判读的主观性等诸多因素影响;

[0006] (2) FISH方法特异性、稳定性都更高,但FISH价格昂贵、操作步骤繁杂、不能观察组织形态学且染色后样本不能长期保存;

[0007] (3) 如存在一些IHC与FISH均为不确定结果,则无法明确HER2状态;

[0008] (4) 肿瘤异质性导致IHC和FISH无法避免假阴性的结果;

[0009] (5) 部分病人无法提供组织标本,或者组织标本无法满足检测的基本要求,另外,检测所需组织标本要通过手术获取,取材繁琐且对患者影响较大;

[0010] (6) 临床研究表明,患者病情发展及治疗过程中也会发生HER2状态的变化,IHC和FISH技术都无法对病人进行实时动态监测。基于此,为更好的指导乳腺癌患者的个体化治疗,亟需寻找新的检测方法以便对IHC和FISH结果补充参考,同时也能够对HER2状态实时动态监测,及时调整治疗方案。

[0011] 循环肿瘤细胞是由原发灶脱落,进入血循环后,在远处器官或原发脏器定居,形成转移灶。循环肿瘤细胞CTC检测作为液体活检的热门领域,在肿瘤诊断、治疗和监控等方面的临床表现已逐渐崭露头角,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,临床应用价值极其显著。

[0012] 因此,若能提供一种检测循环肿瘤细胞表面Her2的方法,将具有非常重要的意义。

[发明内容]

[0013] 本发明的目的就是要解决上述的不足而提供一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法,该检测方法简便、快速、经济,无创,灵敏度高,特异性好,能够解决现有技术检测HER2的不足。

[0014] 为实现上述目的设计一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法,包括以下步骤:1) 将全血用红细胞裂解液处理,分离出有核细胞,并用甲醛进行固定;2) 先通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,用Her2一抗孵育所有细胞,然后用标记有FITC荧光基团的Her2二抗孵育,再用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞;3) 采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,即实现对循环肿瘤细胞表面标志分子Her2的检测。

[0015] 进一步地,步骤2) 的具体反应条件如下:a.向细胞固定后的培养皿中加入含4-6%脱脂奶粉的PBS溶液,4℃避光孵育40-70min;b.吸除脱脂奶粉PBS溶液后,沿壁加入PBST清洗若干次;c.向封闭液中加入肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK和Her2一抗,抗体来源为abcam公司,混合均匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育过夜;d.吸除混合液,向封闭液中加入标记有FITC荧光基团的Her2二抗,抗体来源为abcam公司,混匀后沿壁加入培养皿中,4℃避光孵育40-70min;e.吸除抗体,用PBST清洗若干次,加入DAPI,常温避光孵育20-40min。

[0016] 进一步地,条件b中,PBST中含0.02wt%Tween-20的PBS。

[0017] 进一步地,步骤3) 中,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则Her2+,不显绿色则Her2-,显红色则CK+,不显红色则CK-;根据荧光显色,将DAPI+且CK+的点认为是循环肿瘤细胞CTC,若该循环肿瘤细胞CTC上存在Her2+,那么该循环肿瘤细胞CTC为Her2+CTC。

[0018] 本发明同现有技术相比,首次将CTC检测和HER2标志物检测结合起来,通过对血液进行红细胞裂解,利用纳米技术使剩余有核细胞(主要是CTC和淋巴细胞)全部平铺富集在纳米基底上固定,然后用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞,之后通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选,由于CTC表面具有HER2的特异性表达,用HER2一抗孵育所有细胞,再用标记有FITC荧光基团的二抗孵育,最后通过高通量技术扫描,最终实现对循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测;此外,本发明所述的循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法简便、快速、经济,无创,灵敏度高,特异性好,解决了现有技术检测HER2的不足,值得推广应用。

[附图说明]

[0019] 图1为检测循环肿瘤细胞HER2阳性表达的示意图。

[具体实施方式]

[0020] 下面结合具体实施例对本发明作以下进一步说明:

[0021] 实施例1

[0022] 图1为检测循环肿瘤细胞HER2阳性表达的示意图。其中,图1中a为蓝色荧光通道,使用DAPI标记细胞核,显蓝色的则DAPI+,说明是个完整的细胞,不显蓝色则DAPI-,不是完整的细胞;图1中b为绿色荧光通道,标记HER2蛋白,显绿色则HER2+,不显绿色则HER2-;图1中c为红色荧光通道,标记CK蛋白,显红色则CK+,不显红色则CK-。图1中d为三个通道的合成。

[0023] 本实施例以检测临床肝癌样本循环肿瘤细胞表面HER2表达一例,具体包括以下步骤:

[0024] 1) 全血处理:

[0025] a. 向2mL全血中加入200 μ L 1 $\times$ 红细胞裂解液,室温放置15min,期间均匀摇晃。

[0026] b. 200RCF离心5分钟,吸除上清,保留细胞。

[0027] c. 向离心管中加入2mL 1%FPBS (V (FBS) : V (PBS) = 1:99),混匀后于200RCF离心5分钟,去上清。

[0028] 2) 细胞全富集:

[0029] a. 加入1mL FPBS混匀后转入处理好的培养皿中,将培养皿置于37 $^{\circ}$ C摇床中培养45min。

[0030] b. 培养后将培养皿置于4 $^{\circ}$ C冰箱中,静置1min。

[0031] 3) 细胞固定:

[0032] a. 吸除FPBS,向培养皿中加入4%甲醛后置于4 $^{\circ}$ C静置1min。

[0033] b. 吸除甲醛,加入1mL甲醇,置于-20 $^{\circ}$ C 20min。

[0034] c. 吸除甲醇,每次用2mL PBS清洗三次。(注:每次加入液体时,沿培养皿壁加入,避免将细胞冲起。

[0035] 4) 封闭及抗体孵育:

[0036] a. 向培养皿中加入1mL 5% (m/V) 含0.02%Tween-20的脱脂奶粉(用PBS配制),4 $^{\circ}$ C避光孵育1h。

[0037] b. 吸除脱脂奶粉后,沿壁加入2mL PBST(含0.02%Tween-20的PBS)清洗4次,每次5min。

[0038] c. 向500 μ L封闭液中加入1 μ L anti-CK(购自abcam公司),再加入2 μ L HER2一抗(购自abcam公司),混合均匀后沿壁加入培养皿中,4 $^{\circ}$ C避光孵育过夜。

[0039] d. 吸除混合液,向500 μ L封闭液中加入5 μ L标记有FITC荧光基团的HER2二抗(购自abcam公司),混匀后沿壁加入培养皿中,4 $^{\circ}$ C避光孵育1h。

[0040] e. 吸除抗体,用PBST清洗三次,加入1mL细胞核染料DAPI (4,6-联咪-2-苯基吡啶),常温避光孵育30min。

[0041] 5) 扫描:吸除抗体,用2mL PBST清洗三次,加入1mL PBS扫描。

[0042] 对上述临床肝癌样本,采用高通量多色成像分析,选择CY5、FITC和DAPI的滤光片,观察通道表面荧光颜色,显蓝色的则DAPI+,不显蓝色则DAPI-,显绿色则HER2+,不显绿色则HER2-,显红色则CK+,不显红色则CK-,根据荧光显色,将DAPI+且CK+的“点”认为是CTC,如果该CTC上存在HER2+,那么该CTC为HER2+CTC(图1),否则,则不是。该检测方法简便、快速、经济,无创,灵敏度高,特异性好。

[0043] 本发明并不受上述实施方式的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理

下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

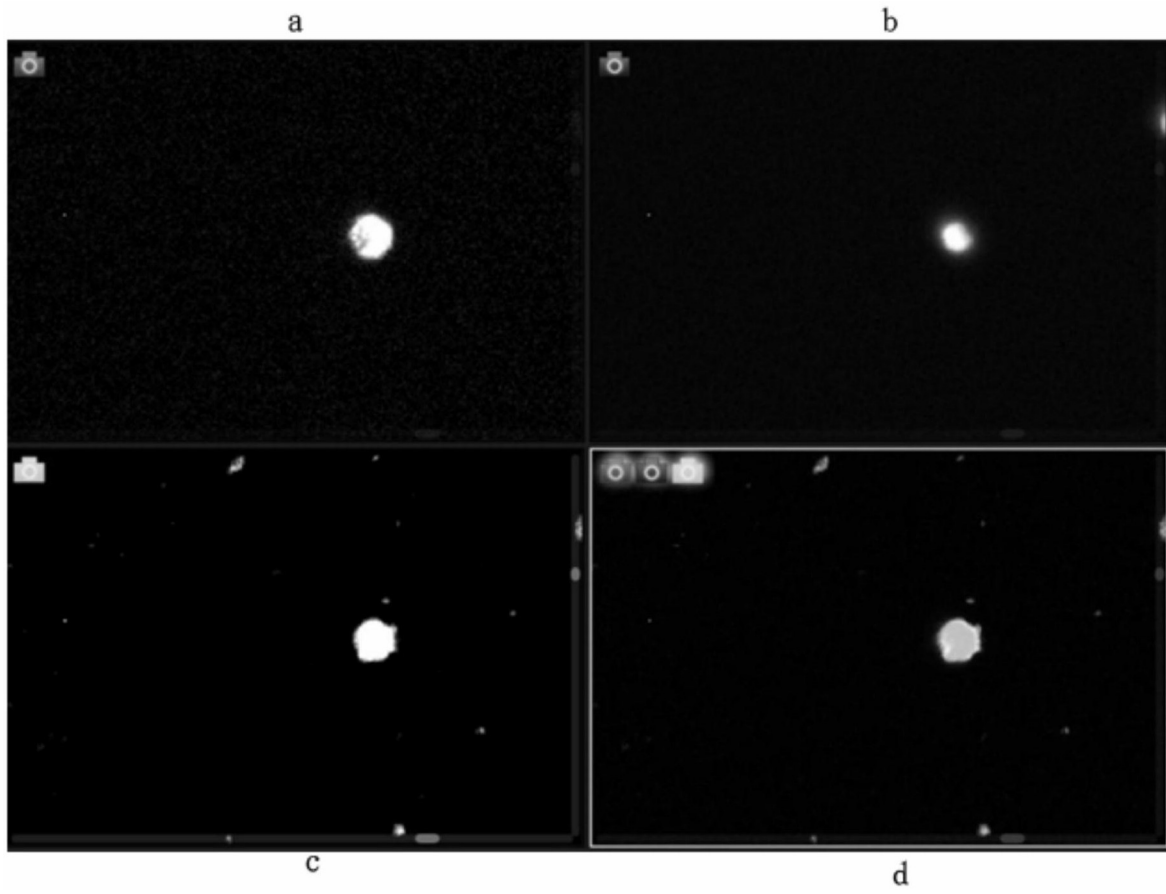


图1

专利名称(译)	循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法		
公开(公告)号	CN109541214A	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201811523965.3	申请日	2018-12-13
[标]申请(专利权)人(译)	钱军		
申请(专利权)人(译)	钱军		
当前申请(专利权)人(译)	钱军		
[标]发明人	钱军 周丽		
发明人	钱军 周丽		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/532 G01N33/574 G01N33/57415 G01N2333/71 G01N2800/365		
代理人(译)	杨军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种循环肿瘤细胞表面标志分子HER2的检测方法，包括以下步骤：将全血用红细胞裂解液处理，分离出有核细胞，并用甲醛进行固定；先通过肿瘤免疫荧光标志物细胞角蛋白抗体anti-CK进行阳性筛选，用Her2一抗孵育所有细胞，然后用标记有FITC荧光基团的Her2二抗孵育，再用细胞核荧光染料DAPI标记出所有细胞；采用高通量多色成像分析，选择CY5、FITC和DAPI的滤光片，观察通道表面荧光颜色，即实现对循环肿瘤细胞表面标志分子Her2的检测；本发明同现有技术相比，该检测方法简便、快速、经济，无创，灵敏度高，特异性好，能够解决现有技术检测HER2的不足，值得推广应用。

