



(12)发明专利申请



(10)申请公布号 CN 110196327 A

(43)申请公布日 2019.09.03

(21)申请号 201910415557.4

(22)申请日 2019.05.18

(71)申请人 贵州医科大学附属医院

地址 550004 贵州省贵阳市云岩区贵医街
28号

(72)发明人 章俊 高婷 李珀

(74)专利代理机构 北京栈桥知识产权代理事务
所(普通合伙) 11670

代理人 刘亚娟

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

权利要求书2页 说明书7页

(54)发明名称

基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒

(57)摘要

本发明公开了一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,由以下物质组成:(1)直肠癌细胞药物试剂;(2)含有通过绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液A;(3)含有通过红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液B;(4)底物培养基和稀释缓冲液。本发明以野生型P53基因蛋白和变异型P53基因蛋白的表达量同时进行计算衡量患者对药物的敏感性,个体化更突出且检测结果更加精准,为该病的治疗筛选出比较敏感的药物,选择出最优化疗方案。

1. 一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 由以下物质组成:

(1) 直肠癌细胞药物试剂;

(2) 含有通过绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液A;

(3) 含有通过红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液B;

(4) 底物培养基和稀释缓冲液。

2. 如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 所述直肠癌细胞药物试剂为含有质量分数为20%直肠癌细胞药物的注射剂。

3. 如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 所述磁性纳米颗粒指示液A的制备方法包括以下步骤:

A1: 将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

A2: 将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.3-1.5倍的野生P53蛋白抗体溶液中, 超声负载1-2h;

A3: 再加入与所述野生P53蛋白抗体溶液同等体积的绿色荧光蛋白溶液, 以及5-10 μ g/mL的EDC, 在pH为7-7.3, 温度为2-8 $^{\circ}$ C条件下, 反应2-3h, 得到经绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液I;

A4: 向所述悬液I中滴加配制液定容至1-5mL。

4. 如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 所述磁性纳米颗粒指示液B的制备方法包括以下步骤:

B1: 将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

B2: 将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.3-1.5倍的抗变异P53蛋白抗体溶液中, 超声负载1-2h;

B3: 再加入与所述抗变异P53蛋白抗体溶液同等体积的红色荧光蛋白溶液, 以及5-10 μ g/mL的EDC, 在pH为7-7.3, 温度为2-8 $^{\circ}$ C条件下, 反应2-3h, 得到经红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液II;

B4: 向所述悬液II中滴加配制液定容至1-5mL。

5. 如权利要求3或4所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 所述配制液按照质量百分比计包括: 1-2%聚乙二醇、2-3%BSA、0.1-0.2%维生素E、0.3-0.5%茶多酚, 余量为0.9%无菌生理盐水。

6. 如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒, 其特征在于, 所述底物培养基的配方为: 以50-100mL无血清DMEM培养基作为底物, 终浓度为220-250ng/mL Wnt/ β -连环蛋白、终浓度为30-40ng/mL柚皮苷、终浓度为10-30ng/mL丁酸钠、终浓度为0.5-2nM肠促胰液素、终浓度为75-85ng/mL表皮细胞生长因子、终浓度为1-5 μ M维生素C、终浓度为15-25mM神经酰胺、终浓度为20-25ng/mL成纤维细胞生长因子、终浓度为60-100ng/mL胶原蛋白多肽、终浓度为180-250 μ g/mL抗菌剂、终浓度为80-120ng/mL游离氨基酸。

7. 如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,

其特征在于,所述稀释缓冲液的配方为:100-500ml pH6.8磷酸盐缓冲液、0.5-1ml吐温、0.2g过氧化脲素、0.1g醋酸铵。

8.如权利要求1所述的一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,其特征在于,所述稀释缓冲液的配方为:100-500ml pH6.8磷酸盐缓冲液、0.5-1ml吐温、0.2g过氧化脲素、0.1g醋酸铵。

9.利用权利要求1-8中任意一项所述试剂盒进行直肠癌细胞药物敏感性检测的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:利用OncoQuick分离法分离出检测者外周血中的直肠癌循环肿瘤细胞,将所述直肠癌循环肿瘤细胞均分为A组和B组,并且利用所述稀释缓冲液重悬定容至1ml;

S2:在两个培养皿中分别加入3-5ml底物培养基,每个培养皿中单独加入A组或B组的直肠癌循环肿瘤细胞溶液,在A组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗粒指示液A,在B组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗粒指示液B,37 $^{\circ}$ C孵育培养30min;

向A组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的直肠癌细胞药物试剂,B组中则加入100 μ L稀释缓冲液,37 $^{\circ}$ C孵育培养12h,每隔2h补加1/2体积的底物培养基以及1/2体积的指示液A和指示液B;

S3:将S2中孵育后的A组和B组细胞打散过滤成单细胞,利用配备488nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中野生P53蛋白的表达量,分别记为X1和X2;

利用配备575nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中变异P53蛋白的表达量,分别记为Y1和Y2;

S4:通过公式(1)计算药物敏感值S,公式(1)如下所示:

$$S = \frac{X1 - X2}{X1 + X2} - \frac{Y1 - Y2}{Y1 + Y2} \quad (1)$$

在规定的实验条件下,当 $S < 0.5$ 时,判为药物敏感性低;当 $S > 0.5$ 时,判为药物敏感性高。

基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及疾病检测技术领域,具体是一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 直肠癌是指从齿状线至直肠乙状结肠交界处之间的癌,是消化道最常见的恶性肿瘤之一。由于肿瘤是一种特殊的细胞群体,对于同一种药物的敏感性也不同,因此不同患者的肿瘤化疗效果也不相同。不当的化疗既不能缓解病情,又给患者带来了很大的毒副作用,从而导致治疗失败。因此在实际操作中根据患者的各种临床病理资料如患者肿瘤类型、分期、既往治疗史,结合药敏实验结果来选择个性化的治疗方案,以补充传统的经验治疗给患者带来最大益处。因此,为了实现对直肠癌进行个体化化疗,减少不良反应,防止多药耐药的情况发生,同时也为了避免患者不必要的身体和经济上的负担,有必要对直肠癌患者治疗药物的敏感性进行预测,以便有效地筛选抗癌药,指导临床治疗以提高疗效。

[0003] P53是一种肿瘤抑制基因(tumor suppressor gene)。在所有恶性肿瘤中,50%以上会出现该基因的突变。由这种基因编码的蛋白质(protein)是一种转录因子(transcriptional factor),其控制着细胞周期的启动。经研究表明,在用药后,当直肠癌患者体内野生型P53基因蛋白较多时,表明药物疗效较好,相反,如果变异型P53基因蛋白较多时,则表明药物疗效较差。现有技术中采用的传统检测方法过于繁琐,不利于大规模的进行筛查普及,并且现有技术中有的对药物敏感性的检测是采用直接测量药物表达量浓度的方式,这种方式是一种普遍手段,具有一定的参考价值,但是由于个体差异较大,不能用固定的参数去进行衡量,这样会影响到测试结果的精准度。

发明内容

[0004] 本发明解决的技术问题是提供一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,以野生型P53基因蛋白和变异型P53基因蛋白的表达量同时进行计算衡量患者对药物的敏感性,个体化更突出且检测结果更加精准。

[0005] 本发明的技术方案为:一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,由以下物质组成:

[0006] (1) 直肠癌细胞药物试剂;

[0007] (2) 含有通过绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液A;

[0008] (3) 含有通过红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液B;

[0009] (4) 底物培养基和稀释缓冲液。

[0010] 进一步地,在上述方案中,所述直肠癌细胞药物试剂为含有质量分数为20%直肠癌细胞药物的注射剂。

[0011] 进一步地,在上述方案中,所述直肠癌细胞药物负载在缓释载体上。所述缓释载体可采用聚乳酸微球,采用喷雾干燥法进行包埋负载,用于控释药物的释放,防止药物消耗过快,从而影响药效检测的准确性。

[0012] 进一步地,在上述方案中,所述直肠癌细胞药物为TAS 102或Regorafenib或TAS 102联合Regorafenib。

[0013] 进一步地,在上述方案中,所述磁性纳米颗粒指示液A的制备方法包括以下步骤:

[0014] A1:将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

[0015] A2:将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.3-1.5倍的野生P53蛋白抗体溶液中,超声负载1-2h;

[0016] A3:再加入与所述野生P53蛋白抗体溶液同等体积的绿色荧光蛋白溶液,以及5-10 $\mu\text{g/mL}$ 的EDC,在pH为7-7.3,温度为2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,反应2-3h,得到经绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液I;

[0017] A4:向所述悬液I中滴加配制液定容至1-5ml。

[0018] 进一步地,在上述方案中,所述磁性纳米颗粒指示液B的制备方法包括以下步骤:

[0019] B1:将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

[0020] B2:将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.3-1.5倍的抗变异P53蛋白抗体溶液中,超声负载1-2h;

[0021] B3:再加入与所述抗变异P53蛋白抗体溶液同等体积的红色荧光蛋白溶液,以及5-10 $\mu\text{g/mL}$ 的EDC,在pH为7-7.3,温度为2-8 $^{\circ}\text{C}$ 条件下,反应2-3h,得到经红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液II;

[0022] B4:向所述悬液II中滴加配制液定容至1-5ml。

[0023] 进一步地,在上述方案中,所述配制液按照质量百分比计包括:1-2%聚乙二醇作为稳定分散剂、2-3%BSA作为封闭剂、0.1-0.2%维生素E作为抗氧化剂、0.3-0.5%茶多酚作为抑菌剂,余量为0.9%无菌生理盐水。

[0024] 进一步地,在上述方案中,所述底物培养基的配方为:以50-100ml无血清DMEM培养基作为底物,终浓度为220-250ng/mL Wnt/ β -连环蛋白,终浓度为30-40ng/mL柚皮苷、终浓度为10-30ng/mL丁酸钠,柚皮苷和丁酸钠这两个都是通过Wnt/ β -连环蛋白调控肿瘤细胞的凋亡,终浓度为0.5-2nM肠促胰液素,终浓度为75-85ng/mL表皮细胞生长因子,终浓度为1-5 μM 维生素C、终浓度为15-25mM神经酰胺,用于调节与p53基因蛋白与抗体进行结合,终浓度为20-25ng/mL成纤维细胞生长因子,终浓度为60-100ng/mL胶原蛋白多肽,终浓度为180-250 $\mu\text{g/mL}$ 抗菌剂,终浓度为80-120ng/mL游离氨基酸。

[0025] 进一步地,在上述方案中,所述稀释缓冲液的配方为:100-500ml pH6.8磷酸盐缓冲液、0.5-1ml吐温、0.2g过氧化脲素、0.1g醋酸铵。

[0026] 本发明还提供了一种利用上述试剂盒进行直肠癌细胞药物敏感性检测的方法,包括以下步骤:

[0027] S1:利用OncoQuick分离法分离出检测者外周血中的直肠癌循环肿瘤细胞,将所述直肠癌循环肿瘤细胞均分为A组和B组,并且利用所述稀释缓冲液重悬定容至1ml;

[0028] S2:在两个培养皿中分别加入3-5ml底物培养基,每个培养皿中单独加入A组或B组的直肠癌循环肿瘤细胞溶液,在A组中加入100 μL 利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗

粒指示液A,在B组中加入100μL利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗粒指示液B,37℃孵育培养30min;

[0029] 向A组中加入100μL利用稀释缓冲液1:100稀释的直肠癌细胞药物试剂,B组中则加入100μL稀释缓冲液,37℃孵育培养12h,每隔2h补加1/2体积的底物培养基以及1/2体积的指示液A和指示液B;

[0030] S3:将S2中孵育后的A组和B组细胞打散过滤成单细胞,利用配备488nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中野生P53蛋白的表达量,分别记为X1和X2;

[0031] 利用配备575nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中变异P53蛋白的表达量,分别记为Y1和Y2;

[0032] S4:通过公式(1)计算药物敏感值S,公式(1)如下所示:

$$[0033] \quad S = \frac{X1 - X2}{X1 + X2} - \frac{Y1 - Y2}{Y1 + Y2} \quad (1)$$

[0034] 在规定的实验条件下,当 $S < 0.5$ 时,判为药物敏感性低;当 $S > 0.5$ 时,判为药物敏感性高。

[0035] 进一步地,所述基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒的检测原理为:

[0036] 利用绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白不同激发波长的特性,分别标记了野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒作为指示液A,以及标记了抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒作为指示液B,与待测者血液中的直肠癌细胞在底物培养基及培养条件下培养,加入药物后继续孵育记为A组,同时做一组空白对照组记为B组,在空白对照组中不加入药物,在孵育过程中不断给A组和B组补充等量的底物培养基和指示液A及指示液B,使得指示液A中的野生P53蛋白抗体与培养基中带有野生P53蛋白的细胞表面结合,同理,使得指示液B中的抗变异P53蛋白抗体与培养基中带有变异P53蛋白的细胞表面结合。通过配备不同波长的氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中野生P53蛋白的表达量以及变异P53蛋白的表达量。A组中对药物敏感性较高时,药物的治疗效果较好,此时,检测出的野生P53蛋白数量会增多,相反,如果变异P53蛋白数量增多则说明药物的治疗效果较差,也即测试者对药物的敏感性较低。而通过研究表明的在理论上待测者在没有药物干涉的B组中野生P53蛋白数量与变异P53蛋白数量相差不大,但个体情况不同,单纯的定义阈值偏差较大,因此用待测者自体细胞作为空白对照组B组,再通过将A组和B组代入公式计算,得到精准度和准确度更高的实验测试结果。

[0037] 与现有技术相比,本发明的有益效果为:本发明是以不同颜色的荧光蛋白分别标记了野生P53蛋白抗体和抗变异P53蛋白抗体,用于特异性检测待测者的血液在添加直肠癌细胞药物后的野生P53蛋白和变异P53蛋白表达量,并与自体空白组进行对比计算,得到药物敏感性的预测结果。相对于现有技术中直接测量药物表达量浓度的方式,针对性更强,更加精准和准确,本发明对解决直肠癌的优化治疗具有重要的现实意义,通过对患者对直肠癌细胞药物敏感性的检测,可以提前掌握患者的身体情况,做到因人施药,精准施药,为该病的治疗筛选出比较敏感的药物,选择出最优化疗方案。

具体实施方式

[0038] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。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。

[0039] 实施例1

[0040] 一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒,由以下物质组成:

[0041] (1) 含有质量分数为20%直肠癌细胞药物(TAS 102)的注射剂;

[0042] (2) 含有通过绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液A;制备磁性纳米颗粒指示液A包括以下步骤:

[0043] A1:将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

[0044] A2:将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.4倍的野生P53蛋白抗体溶液中,超声负载1.5h;

[0045] A3:再加入与所述野生P53蛋白抗体溶液同等体积的绿色荧光蛋白溶液,以及7 μ g/mL的EDC,在pH为7.2,温度为6 $^{\circ}$ C条件下,反应2.5h,得到经绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液I;

[0046] A4:向所述悬液I中滴加配制液定容至3ml。

[0047] (3) 含有通过红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液B;制备磁性纳米颗粒指示液B,包括以下步骤:

[0048] B1:将磁性纳米颗粒利用戊二醛进行表面活化;

[0049] B2:将活化后的磁性纳米颗粒加入到质量比为1.4倍的抗变异P53蛋白抗体溶液中,超声负载1.5h;

[0050] B3:再加入与所述抗变异P53蛋白抗体溶液同等体积的红色荧光蛋白溶液,以及7 μ g/mL的EDC,在pH为7.2,温度为6 $^{\circ}$ C条件下,反应2.5h,得到经红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行修饰的磁性纳米颗粒的悬液II;

[0051] B4:向所述悬液II中滴加配制液定容至3ml。指示液A和指示液B中所用到的配制液按照质量百分比计包括:1.5%聚乙二醇作为稳定分散剂、2.5%BSA作为封闭剂、0.15%维生素E作为抗氧化剂、0.4%茶多酚作为抑菌剂,余量为0.9%无菌生理盐水。

[0052] (4) 底物培养基,配方为:以75ml无血清DMEM培养基作为底物,终浓度为235ng/mL Wnt/ β -连环蛋白,终浓度为35ng/mL柚皮柑、终浓度为20ng/mL丁酸钠,柚皮柑和丁酸钠这两个都是通过Wnt/ β -连环蛋白调控肿瘤细胞的凋亡,终浓度为1.2nM肠促胰液素,终浓度为80ng/mL表皮细胞生长因子,终浓度为3 μ M维生素C、终浓度为20mM神经酰胺,用于调节与p53基因蛋白与抗体进行结合,终浓度为22ng/mL成纤维细胞生长因子,终浓度为80ng/mL胶原蛋白多肽,终浓度为220 μ g/mL抗菌剂,终浓度为100ng/mL游离氨基酸。

[0053] (5) 稀释缓冲液,配方为:300ml pH6.8磷酸盐缓冲液、0.7ml吐温、0.2g过氧化脲素、0.1g醋酸铵。

[0054] 利用本实施例的试剂盒进行直肠癌细胞药物敏感性检测的方法,包括以下步骤:

[0055] S1:利用OncoQuick分离法分离出检测者外周血中的直肠癌循环肿瘤细胞,将所述直肠癌循环肿瘤细胞均分为A组和B组,并且利用所述稀释缓冲液重悬定容至1ml;

[0056] S2:在两个培养皿中分别加入5ml底物培养基,每个培养皿中单独加入A组或B组的

直肠癌循环肿瘤细胞溶液,在A组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗粒指示液A,在B组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的磁性纳米颗粒指示液B,37 $^{\circ}$ C孵育培养30min;

[0057] 向A组中加入100 μ L利用稀释缓冲液1:100稀释的直肠癌细胞药物试剂,B组中则加入100 μ L稀释缓冲液,37 $^{\circ}$ C孵育培养12h,每隔2h补加1/2体积的底物培养基以及1/2体积的指示液A和指示液B;

[0058] S3:将S2中孵育后的A组和B组细胞打散过滤成单细胞,利用配备488nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中野生P53蛋白的表达量,分别记为X1和X2;

[0059] 利用配备575nm氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中变异P53蛋白的表达量,分别记为Y1和Y2;

[0060] S4:通过公式(1)计算药物敏感值S,公式(1)如下所示:

$$[0061] \quad S = \frac{X1 - X2}{X1 + X2} - \frac{Y1 - Y2}{Y1 + Y2} \quad (1)$$

[0062] 在规定的实验条件下,当 $S < 0.5$ 时,判为药物敏感性低;当 $S > 0.5$ 时,判为药物敏感性高。

[0063] 该基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒的检测原理为:

[0064] 利用绿色荧光蛋白和红色荧光蛋白不同激发波长的特性,分别标记了野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒作为指示液A,以及标记了抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒作为指示液B,与待测者血液中的直肠癌循环肿瘤细胞在底物培养基及培养条件下培养,加入药物后继续孵育记为A组,同时做一组空白对照组记为B组,在空白对照组中不加入药物,在孵育过程中不断给A组和B组补充等量的底物培养基和指示液A及指示液B,使得指示液A中的野生P53蛋白抗体与培养基中带有野生P53蛋白的细胞表面结合,同理,使得指示液B中的抗变异P53蛋白抗体与培养基中带有变异P53蛋白的细胞表面结合。通过配备不同波长的氩离子激光器的流式细胞仪检测A组和B组细胞中野生P53蛋白的表达量以及变异P53蛋白的表达量。A组中对药物敏感性较高时,药物的治疗效果较好,此时,检测出的野生P53蛋白数量会增多,相反,如果变异P53蛋白数量增多则说明药物的治疗效果较差,也即测试者对药物的敏感性较低。而通过研究表明的在理论上待测者在没有药物干涉的B组中野生P53蛋白数量与变异P53蛋白数量相差不大,但个体情况不同,单纯的定义阈值偏差较大,因此用待测者自体细胞作为空白对照组B组,再通过将A组和B组代入公式计算,得到精准度和准确度更高的实验测试结果。

[0065] 实施例2

[0066] 本实施例与实施例1基本相同,不同指出在于:

[0067] 所述直肠癌细胞药物负载在缓释载体上。所述缓释载体可采用聚乳酸微球,采用喷雾干燥法进行包埋负载,用于控释药物的释放,防止药物消耗过快,从而影响药效检测的准确性。

[0068] 实施例3

[0069] 本实施例与实施例2基本相同,不同指出在于:

[0070] 所述直肠癌细胞药物为Regorafenib。

[0071] 实施例4

[0072] 本实施例与实施例2基本相同,不同指出在于:

[0073] 所述直肠癌细胞药物为TAS 102联合Regorafenib。

[0074] 临床统计实验:

[0075] 分别用本发明实施例1、实施例2、实施例3、实施例4的试剂盒检测已确诊的临床样本1200例,将1200例样本均分为4组,每组分别对应为实施例1组、实施例2组、实施例3组、实施例4组,每组各300例。

[0076] 其中实施例1组和实施例2组的共600例中,有300例均为对TAS 102药物敏感性较差的可评估病例,300例均为对TAS 102药物敏感性较好的可评估病例;

[0077] 实施例3组的150例均为对Regorafenib药物敏感性较差的可评估病例,150例均为对Regorafenib药物敏感性较好的可评估病例;

[0078] 实施例4组的150病例均为对TAS 102和Regorafenib联合药物敏感性较差的可评估病例,150病例均为对TAS 102和Regorafenib联合药物敏感性较好的可评估病例。

[0079] 检测结果如表1所示。

[0080] 表1

[0081]

实施 例 1 组	TAS 102 敏感性差 (150 例)		TAS 102 敏感性好 (150 例)		总准确 率 (%)
	S<0.5	S>0.5	S<0.5	S>0.5	
	138	12	13	137	91.6%
实施 例 2	TAS 102 敏感性差 (150 例)		TAS 102 敏感性好 (150 例)		总准确 率 (%)
	S<0.5	S>0.5	S<0.5	S>0.5	

[0082]

组	147	3	8	142	96.3%
实施 例 3 组	Regorafenib 敏感性差(150 例)		Regorafenib 敏感性好(150 例)		总准确 率 (%)
	S<0.5	S>0.5	S<0.5	S>0.5	
	147	3	4	146	97.6%
实施 例 4 组	TAS 102 和 Regorafenib 联合 药物敏感性差 (150 例)		TAS 102 和 Regorafenib 联合 药物敏感性好 (150 例)		总准确 率 (%)
	S<0.5	S>0.5	S<0.5	S>0.5	
	150	0	4	146	98.6%

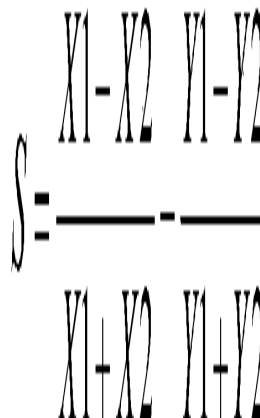
[0083] 由表1可知,本发明的试剂盒在对直肠癌药物敏感性检测的准确率基本能达到91%以上,最高可达98.6%。

[0084] 本发明不局限于上述具体的实施方式,本领域的普通技术人员从上述构思出发,不经过创造性的劳动,所作出的种种变换,均落在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒		
公开(公告)号	CN110196327A	公开(公告)日	2019-09-03
申请号	CN201910415557.4	申请日	2019-05-18
[标]申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
当前申请(专利权)人(译)	贵州医科大学附属医院		
[标]发明人	章俊 高婷 李珀		
发明人	章俊 高婷 李珀		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/54346 G01N33/57446		
代理人(译)	刘亚娟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种基于基因变异分析检测直肠癌细胞药物敏感性的试剂盒，由以下物质组成：(1)直肠癌细胞药物试剂；(2)含有通过绿色荧光蛋白标记野生P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液A；(3)含有通过红色荧光蛋白标记抗变异P53蛋白抗体进行表面修饰的磁性纳米颗粒指示液B；(4)底物培养基和稀释缓冲液。本发明以野生型P53基因蛋白和变异型P53基因蛋白的表达量同时进行计算衡量患者对药物的敏感性，个体化更突出且检测结果更加精准，为该病的治疗筛选出比较敏感的药物，选择出最优化疗方案。



(1)