



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107402296 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201710721836.4

(22)申请日 2017.08.22

(71)申请人 亚能生物技术(深圳)有限公司

地址 518000 广东省深圳市宝安67区留仙
一路高新奇科技工业园2区1栋10楼

(72)发明人 杨昂 张磊

(74)专利代理机构 深圳市博锐专利事务所
44275

代理人 张明

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

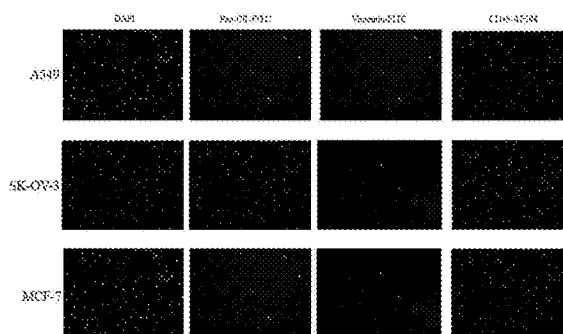
权利要求书2页 说明书14页 附图1页

(54)发明名称

一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色及判读方法

(57)摘要

本发明公开了一种循环肿瘤细胞免疫荧光染色及判读方法,包括以下步骤:S10对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;S20用磷酸缓冲溶液润洗处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;S30向处理后的血液样品在暗处滴加anti-pan-CK-FITC、anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。所述判读方法,包括扫描观察和结果判定。与现有技术相比,本发明染色方法具有操作简便、易于推广等优点;判读方法具有判定准确等优点。



1. 一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:包括以下步骤:

S10样本处理:对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;

S20染色前处理:用磷酸缓冲溶液润洗所述步骤S10处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;

S30免疫染色:向所述步骤S20处理后的血液样品在暗处滴加anti-pan-CK-FITC染色液、anti CD45-AF594染色液和anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。

2. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:所述核酸荧光染料为4',6-二脒基-2-苯基吲哚。

3. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:所述循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法还包括添加封片剂进行封片处理的步骤。

4. 根据权利要求3所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:所述封片剂为抗荧光淬灭剂。

5. 根据权利要求3所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:所述封片剂中含有质量浓度百分比为5~10%甘油。

6. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:所述步骤S30中,每加入一种染色液后都避光孵育一次。

7. 根据权利要求6所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:每次加入染色液后避光孵育的时间为10~45min。

8. 根据权利要求6所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:加入核酸荧光染料后继续孵育的时间为每次加入染色液后避光孵育时间的1/20~1/5。

9. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,其特征在于:包括以下步骤:

S10样本处理:向淋巴分离管中加入3mI密度梯度分离液,瞬时离心使密度梯度分离液全部转至管底,按顺序分别加入3mI患者外周全血和5mI PBS溶液,于1000g下离心15min;

吸去白膜层及上层废液,将剩余液体小心倒入离心管中,加入3mI PBS冲洗淋巴管后倒入离心管中,然后于500g离心10min,弃上清;

加入4mI红细胞裂解液,重悬,使血细胞均匀分散于裂解液中,2~8℃充分裂解8min,裂解过程中至少进行2次颠倒混匀,然后于300g下离心5min,真空抽滤除去上清液;

取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μI/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中用PBS溶液进行润洗;

在裂解后的离心管中先加入4mI孵育液重悬,按照100μI/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中孵育20min后取出离心管置于磁力架上静置,将免疫磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到另一支离心管中,吸取3mIPBS溶液分别冲洗离心管和盖子3次,每次待磁珠完全被吸附后澄清液全部转移然后于300g离心5min,抽滤弃去上清液;

S20染色前处理:取上述样品用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;取1000μI 4%甲醛溶液于通风厨内固定血液样品中的细胞10min;再用1000μI以上PBS溶液至少润洗1

次,每次4min;用1000 μ I透化液透化细胞5min;再次用1000 μ I以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;用1000 μ I封闭液封闭30min,之后移除封闭液;

S30免疫染色:用抗体稀释液稀释好的500 μ I anti-CK-FITC抗体加入样品管内,室温下避光孵育30min;用1000 μ I以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;将用抗体稀释液稀释好的500 μ I anti-Vimentin-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育20min后用1000 μ I以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;再将用抗体稀释液稀释好的500 μ I anti-CD45-AF594抗体加在样品管内,室温下避光孵育25min后用1000 μ I以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;将用稀释好的200 μ I DAPI加在样品管内,室温下避光孵育2min;

S40封片:移除样品管内的液体,将样品全部转移至黏附载玻片样品框内,滴加10 μ I抗荧光淬灭剂进行封片,盖上盖玻片。

10.一种对如权利要求1~9任一项所述的染色方法染色后的血液样品的判读方法,其特征在于:包括以下步骤:

S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况;

S2结果判定:若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该细胞为循环肿瘤细胞;

其中,所述判读方法的结果判定以非治疗为目的。

一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色及判读方法

技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断技术领域,涉及肿瘤细胞的鉴定,具体涉及一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色及判读方法。

背景技术

[0002] 据世界卫生组织发布的《2014年世界癌症报告》称,肿瘤已经成为全世界人类最大致死原因,恶性肿瘤是严重威胁人类健康和社会经济发展的重大公共健康问题。根据流行病学调查结果显示,肺癌、乳腺癌、胰腺癌、肝癌、结直肠癌等恶性肿瘤的发病率和死亡率位居前列,2012年全世界共新增1400万癌症病例并有820万人死亡。早在2006年,世界卫生组织就提出了“早期发现、早期诊断、早期治疗”肿瘤防治的黄金三原则。也因此,考虑到肿瘤诊断技术在肿瘤早期诊断、肿瘤监测、预后判断等方面具有重要的临床意义,过去几十年间许多学者针对肿瘤诊断技术进行了大量的研究。

[0003] 传统肿瘤诊断手段包括:影像学检查、肿瘤标志物检查、病理学检查等,但这些诊断手段各有局限性,比如影像学反应的肿瘤大小与肿瘤的恶性程度及侵犯能力不一致;基于血清肿瘤标记物的免疫、生物化学检验因肿瘤的生物标志物在人群中表达的巨大差异、灵敏性和可靠性较低等因素,到目前为止,血清肿瘤标志物检查仍无法保证对肿瘤的有效诊断;病理学检查需要手术或者穿刺活检,一方面技术要求较高,另一方面无论手术或者穿刺均为有创操作,无法反复多次、长期或随时获取。由于传统肿瘤诊断方法远远不能满足临床需求,所以现代临床医学迫切需要新的诊断方法。在此背景下,循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells,CTC)技术逐步兴起。从而起到肿瘤早期诊断、指导个体化治疗方案选择、实时药物疗效监测、指导预后判断、预警复发、预警耐药、个体化药物选择等作用。

[0004] 循环肿瘤细胞是指自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的一类肿瘤细胞的统称。随着原位肿瘤的不断生长、增大,部分肿瘤细胞可以通过分泌一种抑制黏附因子表达的物质,增加其运动能力并促使其与母体脱离。这些脱落中的肿瘤细胞再分泌一种蛋白溶解酶,例如基质金属蛋白酶MMPs,降解细胞外基质和基底膜,破坏周边宿主结缔组织并进入脉管系统,增强癌细胞浸润能力,通过血液循环进行全身性的转移。循环肿瘤细胞即是指这一类由实体瘤或转移灶释放或脱落的肿瘤细胞通过上皮-间质转化(Epithelial Mesenchymal Transition,EMT),增强其流动性和侵袭性而进入外周血循环的肿瘤细胞。其具有血液分布极少、不同来源CTC表面抗原表达不同具有抗原异质性、不同于肿瘤细胞的常规形态、经历过EMT过程有更强的侵袭性和转移性、不同的CTC具有不同的拷贝数变异等特点,而且由于CTC与原发病灶肿瘤组织具有高度的一致性,所以其能够代表原发肿瘤的表型和遗传组成,并能够作为任何转移性肿瘤的“液体活检”。但是血液中循环肿瘤细胞通常以极低的数量存在于血液中,约 $1\sim 10$ 个/mL,仅占外周血白细胞的 $1/10^6\sim 1/10^7$,而正常成人外周血中细胞种类繁多,其中血细胞浓度为 10^9 /mL,白细胞的浓度是 $4\sim 10\times 10^6$ /mL。目前,虽然已经针对循环肿瘤细胞的分离已经开发出了各种各样的分离手段,诸如密度梯度离心法、滤膜过滤法、免疫磁珠法和微流控芯片法等,但是局于当前技术手段的

限制均不能获得完整、纯净的循环肿瘤细胞,以致于在后续的分析中如何判别目的细胞就显得尤为重要。

[0005] 目前,关于CTC鉴别的技术主要包括免疫细胞化学法(Immunocytochemical,ICC)、RT-PCR、荧光原位杂交(Fluorescence In Situ Hybridization,FISH)、单细胞基因组测序等。免疫细胞化学法主要利用了抗原抗体免疫反应的原理进行特异性的识别,该方法具有特异性好、灵敏度高等优点,可以从大量的血细胞中识别出表达特定抗原的目的细胞,CeII Search公司的CTC检测试剂盒,即是采用上皮源标志物CK-PE/CD45-FITC/DAPI的免疫荧光染色方法来进一步鉴别,该方法具有很大的局限性,因为并非所有肿瘤都来源于上皮细胞,CK等上皮源标志物在入血的过程中,经过EMT转化过程其阳性会有所减弱甚至消失(CeII Search被批准用于转移性乳腺癌、结肠直肠癌和前列腺癌)。而且有迹象表明,除了癌症,炎症也可能导致血液中存在上皮细胞,这就意味着依据该判断标准可能会导致假阳性和假阴性的出现,从而造成误判。事实上CTC存在不同类型,包括上皮细胞表型、间质细胞表型和上皮细胞与间质细胞混合表型。目前,尚没有一种100%特异性的肿瘤生物标记物。RT-PCR检测可以精准的获得癌症的突变信息,但不能进行CTCs计数,在临床上无法通过观察对比治疗前后CTC数目的变化而评价治疗效果,故其意义有限。荧光原位杂交是使用荧光素标记的探针,与核酸进行反应从而达到检测的目的,具有反应快、灵敏度高的特点,但是不能达到100%杂交,特别是在应用较短的cDNA探针时效率明显下降。中国专利文献CN104007257B报道了采用新型FISH技术,将其与生物的体液性细胞表面标志物结合起来,用体液性细胞表面标志物的抗体及非体液性稀有有核细胞的FISH特异性探针两个试剂来处理所得细胞的方法,可以提高准确度;但该方法由于采用了双重染色使染色步骤增加且针对不同样本需要设计不同探针增加了工作难度和操作的复杂性,也增加了临床实验人员掌握的难度。单细胞基因测序对样本要求较高,且在实际操作中获得符合要求的目的细胞难度较大,该技术更多处于实验室研究、验证阶段。

[0006] 综上所述,现有的CTC鉴定方法虽各有其优点,但仍存在一些问题,诸如容易产生漏检,操作复杂,成本高,普及难度大等,因此,迫切需要建立一种能够快速、可靠、准确、易于推广的CTC检测技术,以作为循环肿瘤细胞的常规筛查手段。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是:提供一种操作简单且结果可靠的循环肿瘤细胞免疫荧光染色和判读方法。

[0008] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案为:一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0009] S10样本处理:对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;

[0010] S20染色前处理:用磷酸缓冲溶液润洗所述步骤S10处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;

[0011] S30免疫染色:向所述步骤S20处理后的血液样品在暗处滴加异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)标记的广谱细胞角蛋白抗体(antibody pan-cytokeratin,anti pan-CK)染色液,简称anti-pan-CK-FITC染色液;荧光素AF594标记的白

细胞表面共同抗原抗体(antibody cluster of differentiation)染色液,简称anti-CD45-AF594染色液和异硫氰酸荧光素标记波形蛋白抗体(antibody vimentin,anti-Vimentin),简称anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。

[0012] 本发明的有益效果在于:

[0013] 1) 由于联合采用了多种特异性免疫荧光抗体(anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC)共同识别循环肿瘤细胞表面抗原提高了识别效率,极大地避免了发生上皮-间质转换的CTC的漏检;

[0014] 2) 由于采用了目前识别谱最广泛的广谱细胞角蛋白抗体,进一步扩展了对CK蛋白家族亚型的识别范围,比以往窄谱CK抗体有进一步改善,使得循环肿瘤细胞的识别效率进一步提高;

[0015] 3) 由于采用了多种免疫荧光抗体于样品管中共染,避免了空气制片法中的细胞破裂、转移丢失、润洗丢失等问题,进一步提高了循环肿瘤细胞的回收率;而且不必过夜烘干,节约了操作时间,循环肿瘤细胞富集后可立即进行后续操作;

[0016] 4) 本发明的染色方法流程简单,操作简便,生产成本低廉,且无需购买专用仪器,有利于医疗机构或科研院所开展液体活检相关的实验研究,易于推广;

[0017] 5) 本发明的染色方法染色效率高,背景干净,对肿瘤细胞类型无特殊要求,适用于多种类型的肿瘤细胞的分析、鉴别。

[0018] 本发明还包括一种对上述步骤染色后的血液样品的判读方法,包括以下步骤:

[0019] S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况;

[0020] S2结果判定:若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该细胞为循环肿瘤细胞;

[0021] 其中,所述判读方法的结果判定以非治疗为目的。

[0022] 本发明的有益效果在于:通过对本发明染色方法染色的血液样品进行判读,判读结果准确,荧光素AF594标记的anti-CD45可广泛结合白细胞表面的CD45抗原进而对其进行有效的标记且该荧光抗体不易衰减或淬灭,数据稳定可靠;荧光素FITC标记的anti-Vimentin可以识别发生EMT过程后的CTC,肿瘤细胞经历EMT等一系列过程之后,上皮细胞标志物逐渐丢失而间质细胞标志物增多,Vimentin与侵袭过程密切相关,可以有效弥补因发生EMT过程导致的CTC漏检;提高了检测结果的可靠性;检测过程操作简便科学,易于临床分析人员掌握和使用。

附图说明

[0023] 图1为本发明实施例1处理后的血液样品在荧光显微镜下观察到的图像。

[0024] 图2为本发明实施例3处理后的血液样品中的CTC数目柱状图。

具体实施方式

[0025] 为详细说明本发明的技术内容、所实现目的及效果,以下结合实施方式并配合附

图予以说明。

[0026] 本发明最关键的构思在于:荧光素FITC标记的anti-Pan-CK可以广泛识别CK1、CK2、CK3、CK4、CK5、CK6、CK7、CK8、CK10、CK14、CK15、CK16和CK19;荧光素AF594标记的anti-CD45可广泛结合白细胞表面的CD45抗原进而对其进行有效的标记且该荧光抗体不易衰减或淬灭;荧光素FITC标记的anti-Vimentin可以识别发生EMT过程后的CTC,肿瘤细胞经历EMT等一系列过程之后,上皮细胞标志物逐渐丢失而间质细胞标志物增多,Vimentin与侵袭过程密切相关,其可以有效弥补因发生EMT过程导致的CTC漏检。

[0027] 一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0028] S10样本处理:对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;

[0029] S20染色前处理:用磷酸缓冲溶液润洗所述步骤S10处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;

[0030] S30免疫染色:向所述步骤S20处理后的血液样品在暗处滴加anti-pan-CK-FITC染色液、anti-CD45-AF594染色液和anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。

[0031] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:

[0032] 1) 由于联合采用了多种特异性免疫荧光抗体(anti-pan-CK-FITC, anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC)共同识别循环肿瘤细胞表面抗原提高了识别效率,极大地避免了发生上皮-间质转换的CTC的漏检;

[0033] 2) 由于采用了目前识别谱最广泛的广谱细胞角蛋白抗体,进一步扩展了对CK蛋白家族亚型的识别范围,比以往窄谱CK抗体有进一步改善,使得循环肿瘤细胞的识别效率进一步提高;

[0034] 3) 由于采用了多种免疫荧光抗体于样品管中共染,避免了空气制片法中的细胞破裂、转移丢失、润洗丢失等问题,进一步提高了循环肿瘤细胞的回收率;而且不必过夜烘干,节约了操作时间,循环肿瘤细胞富集后可立即进行后续操作;

[0035] 4) 本发明的染色方法流程简单,操作简便,生产成本低廉,且无需购买专用仪器,有利于医疗机构或科研院所开展液体活检相关的实验研究,易于推广;

[0036] 5) 本发明的染色方法染色效率高,背景干净,对肿瘤细胞类型无特殊要求,适用于多种类型的肿瘤细胞的分析、鉴别。

[0037] 优选地,所述核酸荧光染料为4',6-二脒基-2-苯基吲哚(2-(4-Amidinophenyl)-6-Indolylcarbamide dihydrochloride, DAPI)。

[0038] 进一步地,所述步骤S10中利用磷酸缓冲溶液稀释1~3倍后的血液样品进行离心处理。

[0039] 进一步地,所述步骤S10中离心处理的操作为:利用密度梯度离心液对稀释后的血液样品进行梯度离心。

[0040] 进一步地,所述密度梯度离心液为商业购买的GE Health FicoII-paque™ plus,由FicoII TTPM400和密度为1.077g/ml的泛影酸钠组成的溶液。

[0041] 进一步地,所述步骤S10中除去红细胞的操作为:通过向离心处理后的血液样品中按1:1~5的体积比加入红细胞裂解液进行充分裂解除去红细胞。

[0042] 进一步地,所述红细胞裂解液的主要成分是 NH_4Cl 、 KHCO_3 和EDTA。

[0043] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:科学地选择红细胞裂解液的种类,在裂解血液样品中的红细胞时不损伤其他有核细胞。

[0044] 进一步地,所述步骤S10中除去白细胞的操作为在除去红血球后加入磁珠孵育去除残余的白细胞。

[0045] 进一步地,所述免疫磁珠为CD45免疫磁珠。

[0046] 优选地,所述免疫磁珠为商业购买的Thermo Fisher生产的货号为11153D的CD45免疫磁珠。

[0047] 进一步地,所述步骤S20中,加入固定液对细胞进行固定化处理时间为5~20min。

[0048] 进一步地,所述步骤S20中,加入透化液进行透化处理的时间为所述固定化处理时间的 $1/3 \sim 1/2$ 。

[0049] 进一步地,所述步骤S20中,加入封闭液进行封闭处理的时间为所述固定化处理时间的1~5倍。

[0050] 进一步地,所述固定液为质量分数为2~6%的多聚甲醛水溶液。

[0051] 优选地,所述固定液为质量分数为4%的多聚甲醛水溶液。

[0052] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:4%的多聚甲醛(paraformaldehyde, PAF)水溶液用于在细胞表面形成分子间的交联,保持蛋白构型而使表面抗原稳定,避免降解。

[0053] 进一步地,所述透化液为含有聚乙二醇辛基苯基醚的磷酸缓冲溶液。

[0054] 其中,所述聚乙二醇辛基苯基醚也称为曲拉通X-100或商业上的TritonX-100。

[0055] 进一步地,所述透化液中的TritonX-100的浓度范围为0.1~0.5mol/L。

[0056] 进一步地,所述封闭液为含有1~5mol/L驴血清(Normal Donkey Serum, NDS)和0.5~1mol/L牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin, BSA)的磷酸缓冲溶液。

[0057] 进一步地,所述anti-pan-CK-FITC染色液,anti-CD45-AF594染色液和anti-Vimentin-FITC染色液的配制方法为用抗体稀释液将anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC稀释至浓度为0.1~1%,所述抗体稀释液为含有1~5mol/LNDS和0.5~1mol/LBSA的磷酸缓冲溶液。

[0058] 进一步地,所述步骤S30中anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的滴加顺序对本实验操作无影响。

[0059] 进一步地,所述步骤S30中anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的滴加量为血液样品初始体积的 $1/10 \sim 1/2$ 。

[0060] 进一步地,所述循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法还包括添加封片剂进行封片处理的步骤。

[0061] 优选地,所述封片剂为抗荧光淬灭剂。

[0062] 更优选地,所述封片剂中含有质量浓度百分比为5~10%甘油。

[0063] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:含有一定比例的甘油,抗淬灭效果优良。

[0064] 进一步地,本发明中的磷酸缓冲溶液(Phosphate Buffer Solution, PBS)为生物学常用PBS溶液,其pH值范围是7.2~7.4。

[0065] 优选地,所述步骤S30中,每加入一种染色液后都避光孵育一次。

[0066] 进一步地,每次加入染色液后避光孵育的时间为10~45min。

[0067] 进一步地,加入DAPI后继续孵育的时间为每次加入染色液后避光孵育时间的1/20~1/5。

[0068] 优选地,一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0069] S10样本处理:向淋巴分离管中加入3mI密度梯度分离液,瞬时离心使密度梯度分离液全部转至管底,按顺序分别加入3mI患者外周全血和5mI PBS溶液,于1000g下离心15min;

[0070] 吸去白膜层及上层废液,将剩余液体小心倒入离心管中,加入3mI PBS冲洗淋巴管后倒入离心管中,然后于500g离心10min,弃上清;

[0071] 加入4mI红细胞裂解液,重悬,使血细胞均匀分散于裂解液中,2~8℃充分裂解8min,裂解过程中至少进行2次颠倒混匀,然后于300g下离心5min,真空抽滤除去上清液;

[0072] 取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μI/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中用PBS溶液进行润洗;

[0073] 在裂解后的离心管中先加入4mI孵育液重悬,按照100μI/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中孵育20min后取出离心管置于磁力架上静置,将免疫磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到另一支离心管中,吸取3mIPBS溶液分别冲洗离心管和盖子3次,每次待磁珠完全被吸附后澄清液全部转移然后于300g离心5min,抽滤弃去上清液;

[0074] S20染色前处理:取上述样品用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;取1000μI 4%甲醛溶液于通风厨内固定血液样品中的细胞10min;再用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;用1000μI透化液透化细胞5min;再次用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;用1000μI封闭液封闭30min,之后移除封闭液;

[0075] S30免疫染色:用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CK-FITC抗体加入样品管内,室温下避光孵育30min;用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;将用抗体稀释液稀释好的500μI anti-Vimentin-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育20min后用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;再将用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CD45-AF594抗体加在样品管内,室温下避光孵育25min后用1000μI以上PBS溶液至少润洗1次,每次4min;将用稀释好的200μI DAPI加在样品管内,室温下避光孵育2min;

[0076] S40封片:移除样品管内的液体,将样品全部转移至黏附载玻片样品框内,滴加10μI抗荧光淬灭剂进行封片,盖上盖玻片。

[0077] 本发明还包括一种对上述步骤染色后的血液样品的判读方法,包括以下步骤:

[0078] S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况;

[0079] S2结果判定:若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该细胞为循环肿瘤细胞;

[0080] 其中,所述判读方法的结果判定以非治疗为目的。

[0081] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:通过对本发明染色方法染色的血液样

品进行判读,判读结果准确,荧光素AF594标记的anti-CD45可广泛结合白细胞表面的CD45抗原进而对其进行有效的标记且该荧光抗体不易衰减或淬灭,数据稳定可靠;荧光素FITC标记的anti-Vimentin可以识别发生EMT过程后的CTC,肿瘤细胞经历EMT等一系列过程之后,上皮细胞标志物逐渐丢失而间质细胞标志物增多,Vimentin与侵袭过程密切相关,可以有效弥补因发生EMT过程导致的CTC漏检;提高了检测结果的可靠性;检测过程操作简便科学,易于临床分析人员掌握和使用。

[0082] 进一步地,若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道不可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道不可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为白细胞。

[0083] 进一步地,若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光或anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为荧光杂质。

[0084] 进一步地,对上述步骤染色后的血液样品的判读方法还包括,对细胞进行计数,所述计数过程中数上不数下。

[0085] 从上述描述可知,本发明的有益效果在于:对CTC细胞进行计数,还可对病患的病情严重性进行判定。

[0086] 优选地,一种对上述步骤染色后的血液样品的判读方法,包括以下步骤:

[0087] S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况;

[0088] S2结果判定:若DAPI通道可见蓝色荧光,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该细胞为循环肿瘤细胞;

[0089] 其中,所述判读方法的结果判定以非治疗为目的。

[0090] 进一步地,若DAPI通道可见蓝色荧光,anti-pan-CK-FITC通道不可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道不可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为白细胞。

[0091] 进一步地,若DAPI通道不可见蓝色荧光,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光或anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为荧光杂质。

[0092] 进一步地,在视野转换时,一定要找好参照物,可通过转化至DAPI通道找参照物。

[0093] 进一步地,所述视野转换时,上下两个视野至多有一个细胞大小的重合。

[0094] 进一步地,遇到不能确定绿色荧光信号时,转换通道至(DAPI,Phycoerythrin)通道予以确认。

[0095] 本发明实施例1为:取健康志愿者外周血液掺入一定数量的MCF-7细胞、A594细胞和SK-OV-3细胞,以评价本方法是否能有效检出掺入的不同细胞株,具体检测步骤如下:

[0096] S10样本处理:

[0097] a.向12mL淋巴分离管(建议使用无菌Leucosep™分离管)中加入3mL密度梯度分离液,瞬时离心使密度梯度分离液全部转至管底,按顺序分别加入3mL健康志愿者外周全血(已预先混入经精确计数且数量均为100个的MCF-7细胞、A594细胞和SK-OV-3细胞)和5mL

PBS,于1000g离心15min。

[0098] b.真空抽滤泵吸去白膜层及上层废液,将剩余液体小心倒入15mI离心管中,加入3mI PBS冲洗淋巴管后倒入15mI离心管中,上述15mI离心管,于500g离心10min,弃上清。

[0099] S101裂解除去红细胞:

[0100] 加入4mI的红细胞裂解液,重悬,使血细胞均匀分散于裂解液中,2~8℃充分裂解8min,颠倒多次使其充分混匀并于300g离心5min,真空抽滤泵吸去上清。

[0101] S102孵育除去白细胞:

[0102] a.免疫磁珠预处理:取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μI/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中进行润洗。

[0103] b.在裂解后的管子中先加入4mI孵育液重悬(用移液器轻轻吹打),按照100μI/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中孵育20min。取出离心管置于磁力架上静置,将磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到新15mI离心管中,吸取3mIPBS溶液分别冲洗离心管和盖子3次,每次待磁珠完全被吸附后澄清液全部转移后于300g离心5min,抽滤弃去上清。

[0104] S20染色前处理:

[0105] a.取富集完毕的样品用1000μI PBS润洗1遍,每次4min。

[0106] b.取1000μI4%甲醛溶液于通风厨内固定细胞10min。

[0107] c.用1000μIPBS润洗1次,每次4min。

[0108] d.用1000μI透化液透化细胞5min。

[0109] e.用1000μI PBS润洗1次,4min。

[0110] f.用1000μI封闭液封闭30min,之后移除封闭液。

[0111] S30免疫染色:

[0112] a.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-pan-CK-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育30min。用1000μI PBS润洗1次,润洗时间为4min。

[0113] b.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-Vimentin-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育20min。用1000μI PBS润洗1次,润洗时间为4min。

[0114] c.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CD45-AF594抗体加在样品管内,室温下避光孵育25min。用1000μIPBS润洗1次,润洗时间为4min。

[0115] d.将用稀释后的200μIDAPI加在样品管内,室温下避光孵育2min。

[0116] S40封片:

[0117] 移除样品管内的液体,将样品全部转移至黏附载玻片样品框内,滴加10μI抗荧光淬灭封片剂,盖上盖玻片。

[0118] 将封片后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况,扫描后的图像如图1所示。

[0119] 从图1可以看出,采用本发明所涉及的循环肿瘤细胞免疫荧光染色法均可以检出掺入全血中的肿瘤细胞株,说明该方法对不同种类的循环肿瘤细胞均适用,且从染色效果来看荧光亮度较强、背景干净无非特异性染色出现。

[0120] 对图1中的样品进行判读,判读标准如下:DAPI通道可见蓝色荧光,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道

不可见红色荧光表示该细胞为循环肿瘤细胞;DAPI通道可见蓝色荧光,anti-pan-CK-FITC通道不可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道不可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道可见红色荧光则表示该细胞为白细胞。

[0121] 本发明实施例2为:取健康志愿者外周血液掺入不同数量的NCI-H226细胞,以进一步评价本方法的染色效率和可靠性,所有实验分组均重复检测六次,具体检测步骤如下:

[0122] S10样本处理:

[0123] a.向12mI淋巴分离管(建议使用无菌Leucosep™分离管)中加入3mI密度梯度分离液,瞬时离心使密度梯度分离液全部转至管底,按顺序分别加入3mI健康志愿者外周全血(已预先混入经精确计数且数量分别为6、9、15、30、90、300个NCI-H226细胞)和5mI PBS,于1000g,离心15min。

[0124] b.真空抽滤泵吸去白膜层及上层废液,将剩余液体小心倒入15mI离心管中,加入3mI PBS冲洗淋巴管后倒入15mI离心管中,上述15mI离心管,于500g离心10min,弃上清。

[0125] S101裂解除去红细胞:

[0126] 加入4mI的红细胞裂解液,重悬,使血细胞均匀分散于裂解液中,2~8℃充分裂解8min(颠倒混匀)于300g离心5min,真空抽滤泵吸去上清。

[0127] S102孵育除去白细胞:

[0128] a.免疫磁珠预处理:取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μI/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中进行润洗。

[0129] b.在裂解后的管子中先加入4mI孵育液重悬(用移液器轻轻吹打),按照100μI/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中孵育20min。取出离心管置于磁力架上静置,将磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到新15mI离心管中,吸取3mIPBS溶液分别冲洗离心管和盖子3次,每次待磁珠完全被吸附后澄清液全部转移。300g离心5min,抽滤弃去上清。

[0130] S20染色前处理:

[0131] a.取富集完毕的样品用1000μIPBS润洗1遍,每次4min。

[0132] b.取1000μI 4%甲醛溶液于通风厨内固定细胞10min。

[0133] c.用1000μIPBS润洗1次,每次4min。

[0134] d.用1000μI透化液透化细胞5min。

[0135] e.用1000μIPBS润洗1次,4min。

[0136] f.用1000μI封闭液封闭30min,之后移除封闭液。

[0137] S30免疫染色:

[0138] a.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CK-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育30min。用1000μIPBS润洗1次,4min。

[0139] b.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-Vimentin-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育20min。用1000μI PBS润洗1次,4min。

[0140] c.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CD45-AF594抗体加在样品管内,室温下避光孵育25min。用1000μIPBS润洗1次,4min。

[0141] d.将用稀释好的200μI DAPI加在样品管内,室温下避光孵育2min。

[0142] S40封片:

[0143] 移除样品管内的液体,将样品全部转移至黏附载玻片样品框内,滴加10 μ I抗荧光淬灭封片剂,盖上盖玻片。

[0144] 将上述处理后的样品,置于荧光显微镜下观察并计数,计数结果如表1所示,表1为本实施例2处理后的血液样品的CTC数目统计表。

[0145] 表1

[0146]

CTC 掺入 数量 /3ml	回收 数量1	回收 数量2	回收 数量3	回收 数量4	回收 数量5	回收 数量6	平均 回收 数	平均 回收 率%	标准 差%
6	4	3	6	3	3	2	3.50	58.33	22.97
9	8	8	10	5	9	6	7.67	85.19	20.69
15	15	14	12	8	13	15	12.83	85.56	17.6
30	28	25	21	26	29	28	26.17	87.22	9.76
90	39	65	68	58	72	70	62.00	68.89	13.64
300	206	217	231	223	234	239	225.00	75.00	4.06
均值								76.70	14.79

[0147] 从表1中可以看到使用本方法验证免疫荧光染色效果较为理想且染色效率较高,除6个NCI-H226细胞/3mI之外的掺入的循环肿瘤细胞平均回收率均在80%以上效果较为理想。

[0148] 本发明实施例3为:取6例临床病患血样(样本信息见表2),表2为临床病患血样信息表。

[0149] 表2

[0150]

样本编号	病理信息
P215	乳腺癌
P216	乳腺癌
P217	乳腺癌
P218	肺癌
P219	肺癌
P220	肺癌

[0151] 分别采用本发明的操作方法和isoFlux全自动分析仪进行操作,并对实验结果进行统计分析,以进一步评价本实验方法,具体检测步骤如下:

[0152] S10样本处理:

[0153] a.向12mI淋巴分离管(建议使用无菌Leucosep™分离管)中加入3mI密度梯度分离液,瞬时离心使密度梯度分离液全部转至管底,按顺序分别加入3mI患者外周全血和5mI

PBS,于1000g离心15min。

[0154] b.真空抽滤泵吸去白膜层上层废液,将剩余液体小心倒入15mI离心管中,加入3mI PBS冲洗淋巴管后倒入15mI离心管中,上述15mI离心管,于500g离心10min,弃上清。

[0155] S101裂解除去红细胞:

[0156] 加入4mI的红细胞裂解液,重悬,使血细胞均匀分散于裂解液中,2~8℃充分裂解8min(颠倒混匀)后于300g离心5min,真空抽滤泵吸去上清。

[0157] S102孵育除去白细胞:

[0158] a.免疫磁珠预处理:取出免疫磁珠进行振荡均匀,再按100μI/样本的使用量吸取免疫磁珠至离心管中进行润洗。

[0159] b.在裂解后的管子中先加入4mI孵育液重悬(用移液器轻轻吹打),按照100μI/样本加入免疫磁珠预处理液,置于2~8℃冰箱中的试管旋转摇床中孵育20min。取出离心管置于磁力架上静置,将磁珠吸附后剩余的澄清液全部转移到新15mI离心管中,吸取3mIPBS溶液分别冲洗离心管和盖子3次,每次待磁珠完全被吸附后澄清液全部转移后于300g离心5min,抽滤弃去上清。

[0160] S20染色前处理:

[0161] a.取富集完毕的样品用1000μIPBS润洗1遍,每次4min。

[0162] b.取1000μI4%甲醛溶液于通风厨内固定细胞10min。

[0163] c.用1000μIPBS润洗1次,每次4min。

[0164] d.用1000μI透化液透化细胞5min。

[0165] e.用1000μI PBS润洗1次,4min。

[0166] f.用1000μI封闭液封闭30min,之后移除封闭液。

[0167] S30免疫染色:

[0168] a.用抗体稀释液稀释好的500μIanti-CK-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育30min。用1000μI PBS润洗1次,4min。

[0169] b.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-Vimentin-FITC抗体加在样品管内,室温下避光孵育20min。用1000μIPBS润洗1次,4min。

[0170] c.用抗体稀释液稀释好的500μI anti-CD45-AF594抗体加在样品管内,室温下避光孵育25min。用1000μIPBS润洗1次,4min。

[0171] d.将用稀释好的200μI核染料工作液(DAPI)加在样品管内,室温下避光孵育2min。

[0172] S40封片:

[0173] 移除样品管内的液体,将样品全部转移至黏附载玻片样品框内,滴加10μI抗荧光淬灭封片剂,盖上盖玻片,封片后置于荧光显微镜下观察并计数,计数结果如图2所示,其中本发明方法简称为本法。

[0174] 从图2中可以看出利用本法和isoFlux全自动分析仪分别对6例临床样本进行分析本法获得数据与isoFlux全自动分析仪所得分析数据相近且部分优于isoFlux法,说明可以利用本发明公布的方法以非治疗目的用于对临床样本进行分析。

[0175] 说明:isoFlux全自动分析仪操作和结果判读按照其说明书进行,本发明公布方法的实验结果鉴别方法与实施例1相同。

[0176] 本发明实施例4为:一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0177] S10样本处理:对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;

[0178] S20染色前处理:用磷酸缓冲溶液润洗所述步骤S10处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;

[0179] S30免疫染色:向所述步骤S20处理后的血液样品在暗处滴加anti-pan-CK-FITC染色液、anti-CD45-AF594染色液和anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。

[0180] 所述步骤S10中利用磷酸缓冲液稀释1倍后的血液样品进行离心处理,所述步骤S10中离心处理的操作为:利用密度梯度离心液对稀释后的血液样品进行梯度离心。所述密度梯度离心液为商业购买的GE Health FicoII-paque™ plus,由FicoII TPM400和密度为1.077g/ml的泛影酸钠组成的溶液。所述步骤S10中除去红细胞的操作为:通过向离心处理后的血液样品中按1:1的体积比加入红细胞裂解液进行充分裂解除去红细胞。所述红细胞裂解液的主要成分是NH₄Cl、KHCO₃和EDTA。所述步骤S10中除去白细胞的操作为在除去红细胞后加入磁珠孵育去除残余的白细胞。所述免疫磁珠为商业购买的Thermo Fisher生产的货号为11153D的CD免疫磁珠。

[0181] 所述步骤S20中,加入固定液对细胞进行固定化处理时间为5min。所述步骤S20中,加入透化液进行透化处理的时间为固定化处理时间的1/3。所述步骤S20中,加入封闭液进行封闭处理的时间为固定化处理时间的1倍。所述固定液为质量分数为2%的多聚甲醛水溶液。所述透化液为含有聚乙二醇辛基苯基醚的磷酸缓冲溶液。所述聚乙二醇辛基苯基醚也称为曲拉通X-100或商业上的TritonX-100。所述透化液中的TritonX-100的浓度范围为0.5mol/L。所述封闭液为含有5mol/L驴血清(Normal Donkey Serum,NDS)和1mol/L牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)的磷酸缓冲溶液。所述anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的配制方法为用抗体稀释液将anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC稀释至质量百分比浓度均为1%,所述抗体稀释液为含有5mol/LNDS和1mol/L BSA的磷酸缓冲溶液。

[0182] 所述步骤S30中anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的滴加量为血液样品初始体积的1/10。所述循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法还包括添加封片剂进行封片处理的步骤。所述封片剂为抗荧光淬灭剂。所述封片剂中含有质量浓度为10%甘油。所述步骤S30中,每加入一种染色液后都避光孵育一次。每次加入染色液后避光孵育的时间为10min。加入DAPI后继续孵育的时间为每次加入染色液后避光孵育时间的1/20。

[0183] 对上述步骤染色后的血液样品的判读方法,包括以下步骤:

[0184] S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况并计数;

[0185] S2结果判定:若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该细胞为CTC。若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道不可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道不可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为白细胞;若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-

Vimentin-FITC通道可见绿色荧光或anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为荧光杂质。

[0186] 本发明实施例5为:一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法,包括以下步骤:

[0187] S10样本处理:对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后,除去血液样品中的红细胞和白细胞;

[0188] S20染色前处理:用磷酸缓冲溶液润洗所述步骤S10处理后的血液样品,加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化,再加入封闭液进行充分封闭;

[0189] S30免疫染色:向所述步骤S20处理后的血液样品在暗处滴加anti-pan-CK-FITC染色液、anti-CD45-AF594染色液和anti-Vimentin-FITC染色液,避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。

[0190] 所述步骤S10中利用磷酸缓冲液稀释3倍后的血液样品进行离心处理,所述步骤S10中离心处理的操作为:利用密度梯度离心液对稀释后的血液样品进行梯度离心。所述密度梯度离心液为商业购买的GE Health FicoII-paque™ plus,由FicoII TPM400和密度为1.077g/ml的泛影酸钠组成的溶液。所述步骤S10中除去红细胞的操作为:通过向离心处理后的血液样品中按1:5的体积比加入红细胞裂解液进行充分裂解除去红细胞。所述红细胞裂解液的主要成分是NH₄Cl、KHCO₃和EDTA。所述步骤S10中除去白细胞的操作为在除去红细胞后加入磁珠孵育去除残余的白细胞。所述免疫磁珠为商业购买的Thermo Fisher生产的货号为11153D的CD免疫磁珠。

[0191] 所述步骤S20中,加入固定液对细胞进行固定化处理时间为20min。所述步骤S20中,加入透化液进行透化处理的时间为固定化处理时间的1/2。所述步骤S20中,加入封闭液进行封闭处理的时间为固定化处理时间的5倍。所述固定液为质量分数为6%的多聚甲醛水溶液。所述透化液为含有聚乙二醇辛基苯基醚的磷酸缓冲溶液。所述聚乙二醇辛基苯基醚也称为曲拉通X-100或商业上的TritonX-100。所述透化液中的TritonX-100的浓度范围为0.1mol/L。所述封闭液为含有1mol/L驴血清(Normal Donkey Serum,NDS)和0.5mol/L牛血清白蛋白(Bovine Serum Albumin,BSA)的磷酸缓冲溶液。所述anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的配制方法为用抗体稀释液将anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC稀释至质量百分比浓度均为0.1%,所述抗体稀释液为含有1mol/LNDS和0.5mol/L BSA的磷酸缓冲溶液。

[0192] 所述步骤S30中anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液的滴加量为血液样品初始体积的1/2。所述循环肿瘤细胞的免疫荧光染色方法还包括添加封片剂进行封片处理的步骤。所述封片剂为抗荧光淬灭剂。所述封片剂中含有质量浓度为5%甘油。所述步骤S30中,每加入一种染色液后都避光孵育一次。每次加入染色液后避光孵育的时间为45min。加入DAPI后继续孵育的时间为每次加入染色液后避光孵育时间的1/5。

[0193] 对上述步骤染色后的血液样品的判读方法,包括以下步骤:

[0194] S1扫描观察:将染色后的血液样品置于荧光显微镜下观察不同通道的荧光,通过Z形扫描法对样品进行扫描,观察各细胞的荧光显色情况并计数;

[0195] S2结果判定:若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道不可见红色荧光,则该

细胞为CTC。若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道不可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道不可见绿色荧光,anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为白细胞;若所述核酸荧光染料通道显色,anti-pan-CK-FITC通道可见绿色荧光或anti-Vimentin-FITC通道可见绿色荧光或anti-CD45-AF594通道可见红色荧光,则该细胞为荧光杂质。

[0196] 综上所述,本发明提供一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色及判读方法,该染色方法联合采用了多种特异性免疫荧光抗体(anti-pan-CK-FITC,anti-CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC)共同识别循环肿瘤细胞表面抗原提高了识别效率,极大地避免了发生上皮-间质转换的CTC的漏检;采用了目前识别谱最广泛的广谱细胞角蛋白抗体,进一步扩展了对CK蛋白家族亚型的识别范围,比以往窄谱CK抗体有进一步改善,使得循环肿瘤细胞的识别效率进一步提高;采用了多种免疫荧光抗体于样品管中共染,避免了空气制片法中的细胞破裂、转移丢失、润洗丢失等问题,进一步提高了循环肿瘤细胞的回收率;而且不必过夜烘干,节约了操作时间,循环肿瘤细胞富集后可立即进行后续操作;本发明的染色方法流程简单,操作简便,生产成本低廉,且无需购买专用仪器,有利于医疗机构或科研院所开展液体活检相关的实验研究,易于推广;染色效率高,背景干净,对肿瘤细胞类型无特殊要求,适用于多种类型的肿瘤细胞的分析、鉴别。该判读方法通过对本发明染色方法染色的血液样品进行判读,判读结果准确,荧光素AF594标记的anti-CD45可广泛结合白细胞表面的CD45抗原进而对其进行有效的标记且该荧光抗体不易衰减或淬灭,数据稳定可靠;荧光素FITC标记的anti-Vimentin可以识别发生EMT过程后的CTC,肿瘤细胞经历EMT等一系列过程之后,上皮细胞标志物逐渐丢失而间质细胞标志物增多,Vimentin与侵袭过程密切相关,可以有效弥补因发生EMT过程导致的CTC漏检;提高了检测结果的可靠性;检测过程操作简便科学,易于临床分析人员掌握和使用。

[0197] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等同变换,或直接或间接运用在相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

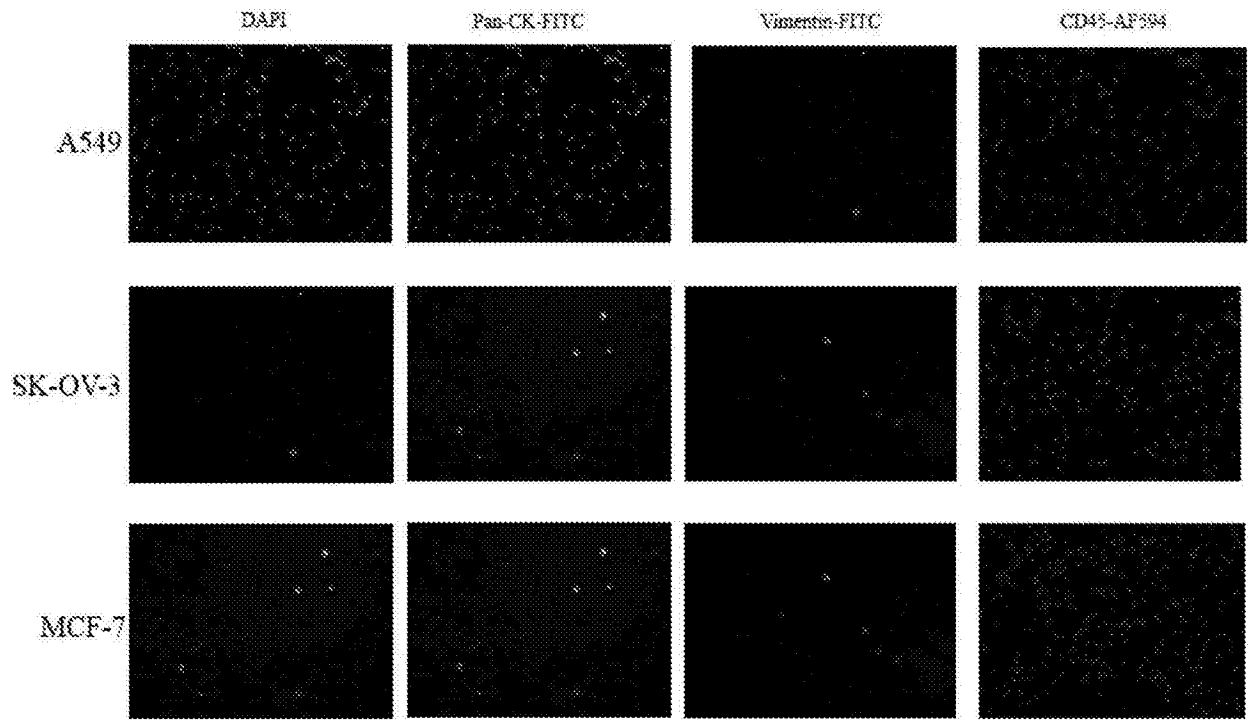


图1

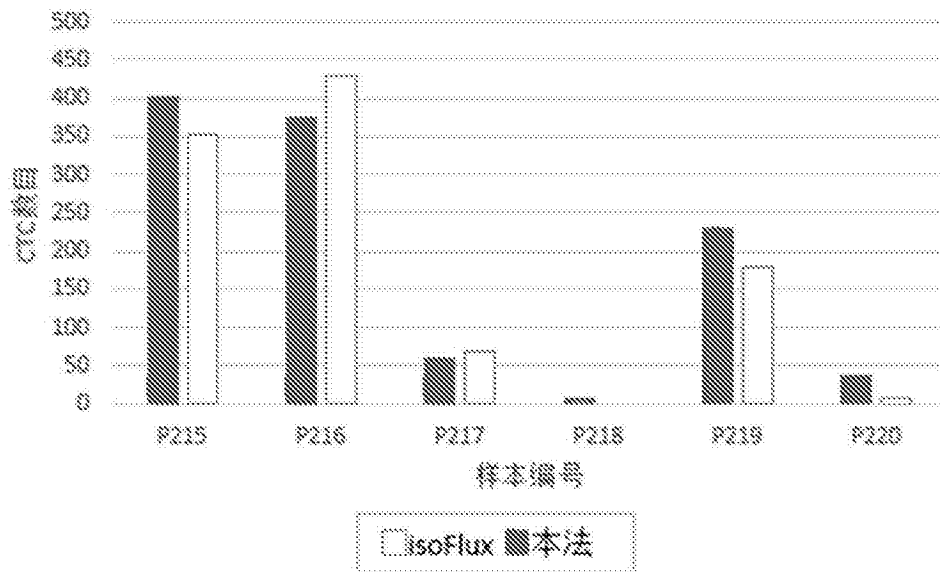


图2

专利名称(译)	一种循环肿瘤细胞的免疫荧光染色及判读方法		
公开(公告)号	CN107402296A	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN201710721836.4	申请日	2017-08-22
[标]申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	亚能生物技术(深圳)有限公司		
[标]发明人	杨昂 张磊		
发明人	杨昂 张磊		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/574 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/533 G01N21/6486 G01N33/57484		
代理人(译)	张明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种循环肿瘤细胞免疫荧光染色及判读方法，包括以下步骤：S10对用磷酸缓冲溶液稀释后的血液样品进行离心处理后，除去血液样品中的红细胞和白细胞；S20用磷酸缓冲溶液润洗处理后的血液样品，加入固定液对血液样品中的细胞进行固定后加入透化液进行透化，再加入封闭液进行充分封闭；S30向处理后的血液样品在暗处滴加 anti-pan-CK-FITC、anti CD45-AF594和anti-Vimentin-FITC染色液，避光孵育后弃去上述染色液加入核酸荧光染料继续孵育。所述判读方法，包括扫描观察和结果判定。与现有技术相比，本发明染色方法具有操作简便、易于推广等优点；判读方法具有判定准确等优点。

