



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109187977 A

(43)申请公布日 2019.01.11

(21)申请号 201810908228.9

(22)申请日 2018.08.10

(71)申请人 北京莱尔生物医药科技有限公司

地址 101111 北京市丰台区北京经济技术
开发区科创六街88号院3幢五层609室

(72)发明人 郭素杰 郭志敏 樊晓婷

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所
(普通合伙) 11130

代理人 王为 孟旭

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

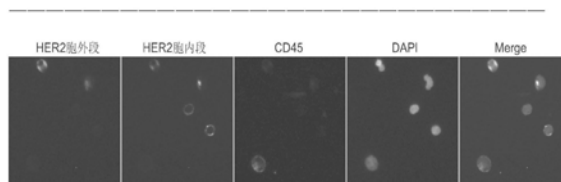
权利要求书2页 说明书15页 附图1页

(54)发明名称

一种检测HER2抗原不同位点的免疫荧光试剂盒及应用

(57)摘要

本发明涉及一种检测HER2抗原不同位点的免疫荧光试剂盒及应用,本发明所述方法,检测原理如下:首先富集非体液性稀有有核细胞,然后根据抗原抗体反应原理,采用免疫荧光检测方法,检测富集的细胞中目的蛋白在细胞中的表达。本试剂盒通过对靶标细胞和白细胞共同抗原CD45进行荧光标记,通过筛选目的蛋白阳性、CD45阴性的细胞,从而对血液中特定蛋白阳性的非体液性稀有有核细胞进行判读和计数。



1. 一种检测非体液性稀有有核细胞中HER2表达部位的方法,所述方法,步骤如下:

1) 稀有有核细胞的富集

取血液和其他体液样品,对其中的非体液性稀有有核细胞进行富集,其中所述富集,方法可选用任何一种稀有有核细胞的分离富集方法,选自:红细胞去除、阴性富集、阳性富集、密度梯度分离法、膜过滤法、微流控法、流式细胞技术;或者不经富集将血标本涂于多张载玻片,

富集后的样本采用固定液固定,所述固定液选自:乙醇、甲醇、福尔马林、丙酮、冰醋酸、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、丙烯醛、苦味酸、PLP液、ECD-G液,

2) 将富集的稀有有核细胞进行免疫荧光检测,免疫荧光检测方法步骤如下:

2.1) CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;

2.2) 吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min×1次;吸去多余液体,加200μl冰丙酮:甲醇(7:3)作用5min,CYP1洗片3min×3次,吸去多余水分;

2.3) 加100~150μl封闭液室温封闭20~30min,吸去多余封闭液,加100μl稀释好的HER2抗体1、HER2抗体2和CD45抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;

2.4) 避光,取CYP2 100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;

2.5) 加100μl稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育,CYP2洗3min×4次,吸去多余水分,

2.6) 复染:取10μL DAPI染液,加至标本区,

2.7) 盖上盖玻片,并吸去周边液体,用于下一步或置于2~8℃或-20℃环境下避光保存,

3) 对样本进行镜检观察

将样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区,若发现片状或者圈状信号时,切换至高倍镜下进一步鉴定,记录每个阳性细胞的坐标,并且40×物镜分别在不同通道下拍照,必要时可使用油镜观察,

4) 结果判断

阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性且无血源性白细胞表面抗原荧光信号的有核细胞,记为一个阳性细胞,并记录HER2抗体1和/或HER2抗体2阳性细胞的比例,

阴性细胞:细胞有血源性白细胞表面抗原荧光信号,不论目的蛋白是否有荧光均记为阴性。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,检测过程中需要使用到荧光素,所述荧光素优先使用绿色荧光、橘色荧光、红色或深红色荧光的组合,选自:Alexa Fluor、Dylight、华青染料、异硫氰酸荧光素、生物素、量子点、Texas Red、藻红蛋白、藻蓝蛋白、罗丹明。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,检测过程中使用的CD45抗体是针对白细胞通用抗原的抗体,用于排除血源性细胞,或者选自以下抗体:CD3、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD34、CD35、CD36、CD38、CD41、CD58、CD61、CD66b、CD235a。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法可以与荧光原位杂交(FISH)技术联用,步骤为以下任一种:(i):先用免疫荧光检测再进行荧光原位杂交;(ii):先用荧光原位杂交再进行免疫荧光检测;(iii):同时进行免疫荧光检测和荧光原位杂交。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,检测过程使用的缓冲液CYP1、CYP2、CYPP中含有表面活性剂和蛋白保护剂,表面活性剂选自:0~10%的Triton X-100、saponin、

Tween、NP-40、SDS、聚乙二醇；蛋白保护剂选自：0~10%的BSA、海藻糖、蔗糖。

6. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，检测过程使用的封闭液选自：动物血清、0.5%~10%BSA、Fc受体抗体。

7. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，检测过程使用的修复方法选自：酶消化修复、EDTA修复、高压修复、微波修复。

8. 根据权利要求1所述的方法，其特征在于，检测过程使用的核染料选自DAPI，Hoechst、碘化丙啶。

9. 一种试剂盒，所述试剂盒中包括了权利要求1检测方法步骤中的主要试剂：缓冲液CYP1、CYP2、CYPP、封闭液、至少一种检测HER2不同位点的特异性抗体以及相应的荧光二抗、荧光标记的CD45抗体、抗体稀释液、细胞核染色液，任选的所涉及的对照细胞包含或者不包含在试剂盒中。

10. 根据权利要求9的试剂盒，含有以下组分：

名称	数量	单位	总体积/质量
CYP1	1	瓶	80ml
CYP2	1	瓶	15ml
CYPP	1	管	1.5ml
封闭液	1	管	1ml
HER2 抗体 1	1	管	100 μ l
HER2 抗体 2	1	管	100 μ l
CD45 抗体	1	管	100 μ l
荧光二抗-1	1	管	100 μ l
荧光二抗-2	1	管	100 μ l
抗体稀释液	1	管	1ml
DAPI	1	管	100 μ l。

一种检测HER2抗原不同位点的免疫荧光试剂盒及应用

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种医用检测方法，特别涉及体液中的肿瘤细胞的检测，具体涉及人表皮生长因子受体2 (HER2) 抗原不同位点免疫荧光检测试剂盒，适用于不同类型样本HER2检测，还涉及该试剂盒在检测HER2抗原不同位点中的用途。

背景技术：

[0002] 目前癌症发病率较高，严重威胁人类健康。有些癌症较难早期发现，诊断时多为晚期，如肺癌，结直肠癌，卵巢癌，胰腺癌等。相应的，晚期癌症的5年存活率显著低于早期患者，早发现早诊断精准治疗可显著延长患者的存活时间。

[0003] 人表皮生长因子受体2 (Human epidermal growth factor receptor 2, HER2) 是重要的免疫组化标志物之一，在20%~30%的乳腺癌患者中存在HER2基因的扩增及其编码蛋白的过表达 (Slamon DJ, et al. Science, 1989)，对这些患者来说，内分泌治疗和标准化疗的治疗效果并不理想。在包括胃癌、肠癌、肺癌、子宫内膜癌等的其他多种恶性肿瘤中同样检测到HER2蛋白的过表达。

[0004] HER2位于人染色体17q21，编码具有酪氨酸激酶活性的I型跨膜糖蛋白。HER2受体由三个不同区域组成，包括一个N-末端胞外结构域 (ECD)、一个单一的 α -螺旋跨膜结构域 (TM) 和胞内结构域。N-末端胞外结构域包括4 (I-IV) 个结构域。I区和III区参与配体结合，II区和IV区则参与受体的二聚活化。抗HER2抗体曲妥珠和帕妥珠抗体通过结合于胞外IV区和II区二聚化关键位点抑制其二聚体化。目前肿瘤诊断主要依赖于病理学、影像学 and 血清学三种方法。病理学是肿瘤诊断的金标准，但是组织取样具有一定的创伤性，且受限于取材部位，同时由于肿瘤组织的异质性，单点组织取样不足以反应整体肿瘤状态，且难以重复取样动态监测。影像学方法在诊断肿瘤中作用较广泛，但是影像学一般存在辐射伤害。而且，影像学通常只反应肿瘤大小等信息，难以判断肿瘤的恶性程度。更重要的一点，影像学通常只能检测2mm以上的肿瘤组织，对于较小的肿瘤组织诊断敏感性较差，存在滞后性。血清学目前通常用于辅助判断癌症治疗疗效等信息，取样较为方便，但是灵敏度和特异性较差，且与病理生理相关性差。同样的，在治疗方面，目前临床上也存在一定的局限性。对于肿瘤患者，特别是发生转移的患者，目前通常只依据原发灶的信息来判断治疗方案，忽略了对转移灶甚至微转移灶的检测与治疗。治疗过程中，目前主要通过影像学或血清学来判断治疗疗效，在疗效判断的精准性等方面存在一定的局限。

[0005] 目前，HER2表达水平的检测主要是通过免疫组织化学方法，由于存在肿瘤异质性和微小转移灶不可见的原因，原位癌组织中HER2检测并不能直接反映体液及转移灶中HER2的水平。研究显示，HER2在乳腺癌组织和CTC中的状态并不一致，符合率约48%~97% (Lee JS, et al. Breast Cancer Res Treat, 2016)。组织中HER2的检测是在组织切片上进行的，单张片子并不能反映患者整体的HER2表达水平且缺乏HER2不同位点同时检测的结果。

[0006] 因此迫切需要一种新的方法，对肿瘤患者非体液性稀有有核细胞中HER2表达水平进行检测，用于预测患者对HER2单抗类药物治疗的作用，为疾病治疗方案的选择提供参考，

更好的指导临床应用。

[0007] 以循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell,CTC)为主的体液肿瘤细胞的检测可为上述局限性提供一些解决方案。CTC是指在肿瘤形成或进展过程中从原发灶或转移灶脱落进入血液循环的肿瘤细胞,CTC的检出提示体内原发灶或转移灶的存在,或癌前病变细胞的存在,是转移病灶形成的“种子”细胞,是肿瘤发生发展的直接证据。近年来不断有证据显示:在肿瘤发生发展的早期,甚至是影像学可见病灶形成之前肿瘤就播散入血了,这种播散可能存在于肿瘤发展的整个过程中。所以,对CTC进行检测有利于早期发现肿瘤、辅助诊断或为选择治疗方案提供参考。同时,对CTC进行动态检测可了解患者对治疗药物的敏感性,及早发现耐药信号。体液性有核细胞指生物体液内含有的有核细胞,也包括这些细胞在病理情况下的渗出或漏出,如血液、炎性渗出液中的各种白细胞;非体液性稀有有核细胞是指体液内出现的非正常的稀有有核细胞,包含CTC、循环肿瘤干细胞(circulating tumor cell,CSC),以及胸/腹腔积液、灌洗液、心包积液、脑脊液、尿液、引流液、痰液、前列腺液、精液、骨髓、脐带血、羊水等来源的肿瘤细胞,以及血中的胎儿细胞。对非体液性稀有有核这些细胞进行检测,可为患者诊断、治疗提供更全面的信息。

[0008] 发明目的:

[0009] 临床实践发现,抗HER2抗体有原发耐药和继发耐药,耐药机制如HER2受体分子结构的变化、持续激活的p95HER2变异本(HER2胞外段缺失)、HER2蛋白下游信号通路的改变等,这时候就需要应用不同作用机制的药物。抗HER2抗体曲妥珠和帕妥珠抗体通过结合于HER2胞外区发挥作用。而抑制酪氨酸激酶活性的小分子药物拉帕替尼和阿法替尼作用于HER2的胞内结构域。由此,可以通过检测HER2表达部位进行精准分型从而采取不同的辅助治疗方案。本发明中的试剂盒可检测非体液性稀有有核细胞中HER2的表达水平和细胞定位(胞外和/或胞内区域),对肿瘤患者的用药提供参考性的意见。

[0010] 目前肿瘤患者的HER2检测,主要是进行组织免疫组织化学检测。由于某些转移灶在很小的时候不易发现,加上肿瘤异质性的影响,其存在有创、不能反复取样本进行检测、不能动态监测、单个组织样本不足以反映整体肿瘤负荷的缺点。本发明中通过免疫荧光染色对患者的非体液性稀有有核细胞中HER2蛋白的表达水平进行检测,可以更精确的反映患者的疾病负荷。并且可以反复取材、动态监测病情,从而为HER2单抗类药物治疗方案的选择提供更多的依据。目前的免疫组化组织化学染色检测,不同的蛋白只能在不同的片子上进行染色。本发明中通过不同抗体和荧光标记实现多标免疫荧光检测,可以在同一张片子上对HER2主要表达部位进行检测,同时获得阳性细胞数、蛋白表达量和蛋白定位信息,结果更加准确。

[0011] Maurizio Scaltriti等(Scaltriti M,et al.J Natl Cancer Inst,2007)采用转染全长HER2和HER2胞内段的乳腺癌细胞系,对细胞增殖、受体激活和体外移植瘤进行检测,研究HER2胞内段和胞外段对HER2不同特异性单抗类药物的有效性。采用特异性靶向HER2胞内段的单抗类药物lapatinib能够显著性抑制过表达HER2胞内段蛋白的细胞的增殖和体外移植瘤的生长,相反采用特异性针对HER2胞外段的单抗类药物Trastuzumab,没有任何效果。进一步对46例转移性乳腺癌患者的石蜡包埋组织中的HER2全长和胞内段进行检测,对比患者的用药效果。结果发现对于HER2胞外段表达缺失的患者,Trastuzumab的有效性只有11.1%;而HER2全长表达的患者,Trastuzumab有效性达到51.4%。该研究检测患者组织中

全长HER2和HER2胞内段的表达,不能判断胞外段缺失情况,而且需要分别采用两张组织切片,只能对可以观察并取到肿瘤组织的患者进行检测,无法进行动态检测。本发明在对非体液性稀有有核细胞计数的基础上可同时对此类细胞中HER2不同位点的蛋白表达水平进行检测。

[0012] 本发明可对包括组织、血液、细胞系、积液、灌洗液、前列腺液、尿液、引流液等来源的非体液性稀有有核细胞进行检测。

发明内容:

[0013] 针对现有技术的不足,本发明提供一种检测HER2抗原的方法及其试剂盒。

[0014] 现有技术尚无采用免疫荧光方法同时检测非体液性稀有有核细胞中HER2不同位点表达的报道。

[0015] 本发明所述方法,检测原理如下:

[0016] 首先采用已知的方法富集非体液性稀有有核细胞,其中所述富集方法可以采用中国专利200810097889.4、201310057307.0、2015104411229中描述的方法。然后根据抗原抗体反应原理,采用已知的免疫荧光检测方法,检测富集的细胞中目的蛋白的表达。本试剂盒通过对靶标细胞和白细胞共同抗原CD45进行荧光标记,通过筛选目的蛋白阳性、CD45阴性的细胞,从而对血液中特定蛋白阳性的非体液性稀有有核细胞进行判读和计数。在此基础上,将靶蛋白阳性、CD45阴性的候选非体液性稀有有核细胞按照目的蛋白荧光强度将其表达按照高、中、低表达进行分类。

[0017] 但将免疫荧光检测方法用于检测非体液性稀有有核细胞中HER2不同位点表达在实践中遇到诸多困难,包括:细胞容易从玻片脱落、荧光较弱、非特异染色、基质背景高等。

[0018] 本发明经过多次筛选研究,最终得到一种适合的方法,解决了上述困难,同时在实际过程中,意外的发现,本发明的检测结果和现有技术相比检测精度和准确率大大提高。

[0019] 本发明的检测方法,步骤如下:

[0020] 1) 稀有有核细胞的富集

[0021] 取血液和其他体液样品,对其中的非体液性稀有有核细胞可进行富集,其中所述富集,方法可选用任何一种稀有有核细胞的分离富集方法,选自:红细胞去除、阴性富集、阳性富集、密度梯度分离法、膜过滤法、微流控法、流式细胞技术等;也可以不经富集将血标本涂于多张载玻片。

[0022] 其中所述稀有有核细胞:是一种非正常生理状态下出现的稀有有核细胞,通常使用流式细胞仪分选、磁珠阳性分选方法富集得到,优选的使用阴性富集方法得到,本发明最佳方法如下:

[0023] 使用去除血浆、红细胞、白细胞的阴性富集方法获得各种亚型的异常细胞;使用室温或类似条件使玻片自然干燥;使用固定剂固定细胞及抗原。

[0024] 富集后的样本采用固定液固定,所述固定液选自:乙醇、甲醇、福尔马林、丙酮、冰醋酸、甲醛、多聚甲醛、戊二醛、丙烯醛、苦味酸、PLP液(过碘酸盐-赖氨酸-多聚甲醛固定液)、ECD-G液(碳二亚酰胺-戊二醛)等。在后续检测步骤中也可以采用这些试剂进行后固定。

[0025] 2) 将富集的稀有有核细胞进行免疫荧光检测,免疫荧光检测方法步骤如下:

- [0026] 2.1 CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;
- [0027] 2.2吸去载玻片上多余液体,加入CYPP作用5min,CYP1同上洗片3min×1次;吸去多余液体,加200μl冰丙酮:甲醇(7:3)作用5min,CYP1洗片3min×3次,吸去多余水分;
- [0028] 2.3加100~150μl封闭液室温封闭20~30min。吸去多余封闭液,加100μl稀释好的HER2抗体1、HER2抗体2和CD45抗体,室温湿盒内避光孵育1~2h;(CD45抗体也可在2.5加入)。
- [0029] 2.4避光,取CYP2100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;
- [0030] 2.5加100μl稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育(37℃,25~30min或室温30~60min)。CYP2洗3min×4次,吸去多余水分。
- [0031] 2.6复染:取10μL DAPI染液,加至标本区。
- [0032] 2.7盖上盖玻片,并吸去周边液体,用于下一步或置于2~8℃或-20℃环境下避光保存。
- [0033] 3)对样本进行镜检观察
- [0034] 将样本置于荧光显微镜下,扫描整个标本区。若发现片状或者圈状信号时,切换至高倍镜下进一步鉴定。记录每个阳性细胞的坐标,并且40×物镜分别在不同通道下拍照。必要时可使用油镜观察。
- [0035] 4)结果判断
- [0036] 阳性细胞:目的蛋白荧光信号阳性且无血源性白细胞表面抗原荧光信号的有核细胞,记为一个阳性细胞。并记录HER2抗体1和/或HER2抗体2阳性细胞的比例。
- [0037] 阴性细胞:细胞有血源性白细胞表面抗原荧光信号,不论目的蛋白是否有荧光均记为阴性。
- [0038] 以上步骤中,需要使用到荧光素,其可以直接标记在抗体上或者通过荧光标记的第二抗体进行检测;标记抗体的荧光素具有不同的发射光谱,优选绿色荧光(如Alexa Fluor 488)、橘色荧光(如Alexa Fluor 555)、红色(如Alexa Fluor 594)或深红色荧光(如Alexa Fluor 647)的组合;标记抗体的荧光素不限于Alexa Fluor系列荧光素,同样可以采用Dylight、华青染料、异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate, FITC)、生物素(biotin)、量子点、Texas Red、藻红蛋白(PE)、藻蓝蛋白(APC)、罗丹明(rhodamine)等系列的荧光素标记抗体,或者不同系列的荧光素标记抗体联用。
- [0039] CD45抗体是针对白细胞通用抗原的抗体,用于排除血源性细胞,也可以选自以下细胞表面抗原的抗体:CD3、CD11b、CD14、CD16、CD19、CD34、CD35、CD36、CD38、CD41、CD58、CD61、CD66b、CD235a;在组织或者细胞系上进行免疫荧光检测可以省略CD45抗体。
- [0040] 本发明的检测方法包含手工和自动化设备的操作。
- [0041] 本发明的检测方法可以与荧光原位杂交(FISH)技术联用,步骤为以下任一种:
(i):先用免疫荧光检测再进行荧光原位杂交;(ii):先用荧光原位杂交再进行免疫荧光检测;(iii):同时进行免疫荧光检测和荧光原位杂交。
- [0042] 本检测过程使用的缓冲液CYP1、CYP2、CYPP中含有表面活性剂和蛋白保护剂,这些表面活性剂可以采用0~10%的Triton X-100、saponin、Tween、NP-40、SDS、聚乙二醇;蛋白保护剂可采用0~10%的BSA、海藻糖(Trehalose)、蔗糖。
- [0043] 作为本领域技术人员公知的,本检测过程使用的封闭液也可以选用:动物血清、

0.5%~10%BSA、Fc受体抗体。

[0044] 作为本领域技术人员公知的,本检测过程可使用修复方法对样品进行处理,包含酶消化修复、EDTA修复、高压修复、微波修复等。

[0045] 本检测过程使用的核染料不限于DAPI,同样可以采用Hoechst、碘化丙啶等。

[0046] 作为本领域技术人员公知的,免疫荧光检测中特异抗体与细胞的孵育过程可分为液体染色和固体染色。液体染色是将细胞制备成细胞悬液,在悬液中进行细胞透化、抗体孵育等操作,然后将细胞转移至载玻片固定、封片;而固体染色是先将细胞转移至载玻片固定,再进行细胞透化、抗体孵育等操作。

[0047] 本发明方法的核心部分在于步骤2.3)使用抗体的组合,为此本发明进一步包含针对HER2不同位点的抗体对富集的细胞进行免疫荧光检测。本发明免疫荧光检测方法的核心在于加入针对HER2胞内段和胞外段的抗体和相应的荧光二抗对HER2阳性细胞进行鉴定,在检测结果方面产生了极大的变化,使之完全不同于现有的方法。这些变化表现在:1)分别进行HER2胞内段、胞外段的免疫荧光检测。抗体类抗HER2药物主要作用于HER2胞外段;HER2胞外段缺失情况下选用的小分子药物主要作用于HER2胞内段;2)采用CD45抗体排除血源性细胞的干扰;3)通过对染色结果进行分析,可以将HER2阳性细胞分为高、中、低表达亚型,结果更加精确。

[0048] 本发明为进行上述免疫荧光检测,设计了一种便于操作的试剂盒,所述试剂盒中包括了上述免疫荧光检测步骤中的主要试剂,如以下试剂:

[0049] 缓冲液CYP1、CYP2、CYPP、封闭液、至少一种检测HER2不同位点的特异性抗体以及相应的荧光二抗、荧光标记的CD45抗体、抗体稀释液、细胞核染色液。操作过程中所涉及的对照细胞可以包含或者不包含在试剂盒中。

[0050] 本发明所述试剂盒优选以下组分:

[0051]

名称	数量	单位	总体积/质量
CYP1	1	瓶	80ml
CYP2	1	瓶	15ml
CYPP	1	管	1.5ml
封闭液	1	管	1ml
HER2抗体1	1	管	100μl
HER2抗体2	1	管	100μl
CD45抗体	1	管	100μl
荧光二抗-1	1	管	100μl
荧光二抗-2	1	管	100μl
抗体稀释液	1	管	1ml
DAPI	1	管	100μl

[0052] 以下对本发明试剂进行名称术语的解释:

[0053]

试剂名称	解释和说明（包括组分名称，组分配比，配制方法）
CYP1	缓冲液，0.01M PBS，纯化水充分搅拌溶解，调节 pH 至 7.20-7.40 后分装。
CYP2	缓冲液，0.01M PBS 中含 0.1% Triton X-100、0.5 % Trehalose，在 0.01M PBS 溶液中加入 0.1% Triton X-100、0.5 % Trehalose，充分搅拌溶解后分装。
CYPP	缓冲液，0.01M PBS 中含 0.2% Triton X-100，在 0.01M PBS 溶液中加入 0.2% Triton X-100，充分搅拌溶解后分

	装。
封闭液	分装的封闭液（含 PBS、BSA）。
HER2 抗体 1	HER2 抗体之一的 10 倍浓缩液。分装于 1.5ml 棕色避光管。
HER2 抗体 2	HER2 抗体之一的 10 倍浓缩液。分装于 1.5ml 棕色避光管。
CD45 抗体	Alexa Fluor® 647 标记的 CD45 抗体分装于 1.5ml 棕色避光管。
[0054] 荧光二抗-1	Alexa Fluor® 488 标记的荧光二抗，分装于 1.5ml 棕色避光管。
荧光二抗-2	Alexa Fluor® 555 标记的荧光二抗，分装于 1.5ml 棕色避光管。
抗体稀释液	抗体稀释液（含 Tris-HCl 缓冲液、牛血清白蛋白）分装于 1.5ml 离心管。
DAPI	DAPI 染色液。取 DAPI 粉末（4',6-二脒基-2-苯基吲哚，4',6-diamidino-2-phenylindole, Sigma 公司产品）用超纯水稀释后加入抗淬灭剂（ThermoFisher, ProLong®）分装。

[0055] 本试剂盒中HER2抗体-1和HER2抗体-2分别识别HER2蛋白的不同序列，其中HER2蛋白序列属于已知序列，公开在Yamamoto T, et al. Similarity of protein encoded by the human c-erb-B-2 gene to epidermal growth factor receptor. Nature, 1986, 319 (6050): 230-4. 文献中名称为c-erb-B-2。HER2抗体-1识别HER2蛋白第23-652位氨基酸序列，HER2抗体-2识别HER2蛋白第676-1255位氨基酸序列。

[0056] 本发明的核心技术在于步骤2) 将富集的稀有有核细胞进行免疫荧光检测，其中的涂片方法是本发明人经过多次实验和数据筛选获得的，有关条件的筛选过程如下：

[0057] 步骤2.2中，吸去载玻片上多余液体，加入CYPP作用5min，加100~150μl封闭液室温封闭20~30min；

[0058] 筛选过程如下：测试不同类型和不同浓度梯度的穿透试剂，不同的后固定试剂、封闭时间最终筛选到适合的反应条件。

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4
条件 1	穿透液类型	0.25% Triton X-100	0.3% saponin	0.2% NP-40	0.2% Tween 20
[0059]	条件 2	穿透剂浓度 Triton X-100	0.2% Triton X-100	0.3% Triton X-100	0.5% Triton X-100
	条件 3	穿透剂浓度 saponin	0.2% saponin	0.3% saponin	0.5% saponin
	条件 4	穿透剂浓度 NP-40	0.1% NP-40	0.2% NP-40	0.25% NP-40
	条件 5	穿透剂浓度 Tween 20	0.1% Tween 20	0.2% Tween 20	0.25% Tween 20
[0060]	条件 6	后固定 冰丙酮： 甲醇(1:1)	冰丙酮： 甲醇(7:3)	冰丙酮	甲醇
	条件 7	封闭液时间 10min	20min	30min	60min

[0061] 步骤2.3中，加100~150 μ l稀释好的HER2抗体和CD45抗体，室温湿盒内避光孵育1~2h；

[0062] 筛选过程如下：测试不同抗体浓度、孵育温度、孵育时间、洗片液，最终筛选到适合的反应条件。

[0063]

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4
条 件 1	抗 体 浓 度	5 μ g/ml	10 μ g/ml	15 μ g/ml	20 μ g/ml
条 件 2	抗 体 孵 育温度	10 $^{\circ}$ C	20 $^{\circ}$ C	30 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C
条 件 3	抗 体 孵 育时间	30 min	60 min	120 min	过 夜 (12~16 h)
条 件 4	洗片液	含 0.1 % Trehalose, 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.2 % Trehalose , 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.5 % Trehalose , 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS

[0064] 步骤2.5中加100~150 μ L稀释好的荧光二抗,湿盒内避光孵育(37 $^{\circ}$ C,25~30min或室温30~60min)。

[0065] 筛选过程如下:测试不同抗体浓度、孵育温度、孵育时间、洗片液,最终筛选到适合的反应条件。

[0066]

	方法	指标 1	指标 2	指标 3	指标 4
条件 1	抗体浓度	1 μ g/ml	2 μ g/ml	4 μ g/ml	8 μ g/ml
条件 2	抗体孵育温度	4 $^{\circ}$ C	15 $^{\circ}$ C	25 $^{\circ}$ C	37 $^{\circ}$ C
条件 3	抗体孵育时间	20 min	30 min	60 min	120 min
条件 4	洗片液	含 0.1 % Trehalose, 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.2 % Trehalose, 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.5 % Trehalose , 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS	含 0.1% Triton X-100 的 0.01M PBS

[0067] 经过上述筛选,得到本发明的涂片条件和方法,所得结果检测精度和准确率大大提高。

[0068] 本发明的试剂盒主要用于检测血液、胸/腹腔积液、灌洗液、心包积液、脑脊液、尿液、细胞系、引流液、痰液等中的非体液性稀有有核细胞。也可应用于细胞片如涂片/爬片、组织的免疫荧光检测等。

[0069] 本发明的试剂盒,可以适用于多种癌症细胞的检测,所述癌症可包括以下至少一种:乳腺癌、食管癌、胃癌、结肠癌、肺癌、子宫内膜癌、前列腺癌、睾丸癌、脑癌、皮肤癌、直肠癌、肉瘤、气管癌、头颈癌、胰腺癌、肝癌、卵巢癌、淋巴瘤、宫颈癌、外阴癌、黑素瘤、间皮瘤、肾癌、膀胱癌、甲状腺癌、骨癌、癌、肉瘤和软组织癌。

[0070] 以下通过实验数据进一步说明本发明的有益效果:

[0071]

	本发明	现有技术 1		现有技术 2	
		免疫组织化学(免疫组化) 技术	不同技术特征的优缺点说明	免疫荧光	不同技术特征的优缺点说明
技术特征相同点 1	运用抗体检测异常细胞表达的抗原，运用白细胞通用抗原 CD45 排除正常血细胞	运用抗体检测异常细胞表达的抗原，用形态学鉴别是否为异常细胞	对于一些表达靶标抗原而形态改变不明显的细胞，免疫组化方法常无法确定是否为异常细胞。如果将表达该抗原的正常细胞记为阳性可造成假阳性；如果将表达该抗原而细胞形态改变不明显的异常细胞记为阴性，可能造成假阴性。		
技术特征相同点 2	可运用标记的荧光二抗放大检测信号	可运用标记的酶标二抗放大检测信号	荧光标记可将检测靶抗原和 CD45 的抗体标记为不同颜色，从而通过颜色排除正常血液细胞，酶标抗体仅为单色。 荧光抗体需要在荧光显微镜下观察，酶标记二抗在光镜下观察。		
技术特征相同点 3	用荧光抗体检测特定抗原			用荧光抗体检测特定抗原	本发明在洗片溶液中加入了解保护抗原的海藻糖 (Trehalose)，提高了蛋白的荧光强度。 本发明检测异常体液细胞时可联合富集技术，以最大程度去除正常细胞； 本发明除了检测血液中的肿瘤细胞，还可检测其他体液中的肿瘤细胞。 本发明将 CTC 与特定蛋白的免疫检测联合，能够反应肿瘤患者原发

[0072]

技术特征 区别点 1	检测异常体液细胞时上游联合了富集技术,固定时间短。	上游需要长时间的组织固定和制备蜡块、切片。加抗体前需要进行 H ₂ O ₂ 处理,以去除 HRP 标记二抗可能产生的非特异性。	本发明处理步骤更少,操作简单。本发明通常不需要修复,必要时用酶修复,减少了脱片。而免疫组化技术需要微波、高温高压等方法修复抗原且容易脱片。	常用于培养细胞、细胞的直接涂片等。	灶和/或转移灶靶蛋白的表达状况。 本发明与上游富集技术联用时,需要进行技术探索,如尽量减少两种技术联合时肿瘤细胞的丢失。 本发明在免疫荧光检测步骤加入了后固定步骤,可有效防止细胞脱片并增强荧光强度。
技术特征 区别点 2	多种抗体同时孵育	只孵育一种抗体	本发明在同一张片子上可以进行多种蛋白的同时检测。		
技术特征 区别点 3	本发明可多次采集体液进行检测	需要手术或影像学方法定位后穿刺针取出组织进行检测	本发明可对患者病情进行动态监测,如根据阳性细胞的降低或升高情况监测肿瘤是否复发、和药物的耐药情况;免疫组化技术由于依赖于组织,而且对机体创伤更大;对于手术切除肿瘤组织的患者,免疫组化技术无法动态监测病情。	用 DAPI 染色细胞核	在 DAPI 中加入抗淬灭剂延迟了荧光的淬灭时间,制片后保存时间延长。
技术特征 区别点 4	对 HER2 胞外段和胞内段进行检测	不区分 HER2 位点	本发明分别进行 HER2 胞内段、胞外段的免疫荧光检测。抗体类抗 HER2 药物主要作用于 HER2 胞外段;HER2 胞外段缺失情况下选用的分子药物主要作用于 HER2 胞内段。据此可对 HER2 阳性患者进行更精确的分型。	不区分 HER2 位点,通常根据靶蛋白的有无判断阳性细胞。	本发明分别进行 HER2 胞内段、胞外段的免疫荧光检测。抗体类抗 HER2 药物主要作用于 HER2 胞外段;HER2 胞外段缺失情况下选用的分子药物主要作用于 HER2 胞内段。据此可对 HER2 阳性患者进行更精确的分型。

[0073] 本发明的有益效果:

[0074] 与现有技术根据肿瘤组织中蛋白表达情况来指导用药相比,本发明的检测结果可

以对用药进行实时指导,不仅能够反映整体肿瘤(包括原位癌和可能存在的不可见的微小转移灶)负荷,同样可以反映体液中与转移相关的非体液性稀有有核细胞中HER2的表达情况。同时,根据HER2的表达部位,可以为治疗药物的精准选择提供参考。

[0075] 与现有技术对肿瘤组织中HER2进行免疫组化检测相比,对体液非体液性稀有有核细胞中HER2细胞进行计数和表达量的区分,能够更精准的反映HER2与临床参数的相关性和指导用药。

[0076] 与现有技术相比较,本研究所采用的样本是各种体液来源的细胞,在取材上比基于肿瘤组织的检测技术更加方便。

附图说明:

[0077] 图1为同一样品的5种荧光显示图,分别为靶蛋白HER2胞外段、HER2胞内段、白细胞通用抗原CD45、细胞核染料DAPI、合图。

具体实施方式:

[0078] 实施例1

[0079] 材料:阴性富集的血液样本涂片、对照细胞可用SKBR3涂片。

[0080] 实验步骤:

[0081] 1.抽取3.5ml外周血于ACD(柠檬酸钠)抗凝管中。用Cytte1®的人外周血白细胞去除试剂盒阴性富集肿瘤细胞,并固定于载玻片;

[0082] 2.CYP1洗载玻片3min×3次,每次100~150μL,确保覆盖满整个标本区;

[0083] 3.吸去载玻片上多余液体,加入CYP2作用5min,CYP1同上洗片3min×1次;吸去多余液体,加200μl冰丙酮:甲醇(7:3)作用5min,CYP1洗片3min×3次,吸去多余水分;

[0084] 4.加100~150μl封闭液室温封闭25~30min。吸去多余封闭液,加100μl稀释好的HER2抗体1、HER2抗体2和CD45抗体,室温湿盒内避光孵育1.5~2h;

[0085] 5.避光,取CYP2100~150μL/片洗片3min×3次,吸去多余水分;

[0086] 6.加100μl稀释好的二抗1、二抗2,湿盒内避光孵育(37℃,25~30min)。CYP2洗3min×4次,吸去多余水分。

[0087] 7.复染:将DAPI管瞬时离心后,液面处取10μL DAPI染液,加至标本区。

[0088] 8.盖片:盖上盖玻片,镜下观察。将HER2表达阳性、CD45抗体阴性的细胞视为阳性细胞(图1),并记录HER2胞外段阳性细胞及HER2胞内段阳性细胞的数量。

[0089] 结果说明:

[0090]	HER2+ CD45-细胞				共标细胞
	定位	+	++	+++	
	总数				
	HER2 胞外段	0	2	3	5
	HER2 胞内段	0	4	3	7

[0091] 实施例2

- [0092] 材料:适量抗凝血液1管,采用膜过滤方法富集后对其进行蛋白检测。实验步骤:
- [0093] 1.抽取适量外周血放入含有抗凝剂采血管中,轻微震荡混匀。
- [0094] 2.将混悬液加入膜过滤分离肿瘤细胞技术装置中,缓慢通过滤器和滤膜。
- [0095] 3.待过滤完毕后,继续在膜过滤装置中加入50ml 0.01M PBS,将管壁周围附着的细胞混悬液冲入膜过滤装置内,让其通过滤器和滤膜;
- [0096] 4.固定滤膜上的细胞;
- [0097] 5.同实施例1操作检测蛋白。
- [0098] 实施例3
- [0099] 材料:适量抗凝血液1管,采用微流控方法富集后对其进行蛋白检测实验步骤:
- [0100] 1.抽取的适量血液采用各种原理的微流控芯片进行富集。
- [0101] 2.富集后样本进行蛋白免疫荧光检测。
- [0102] 实施例4
- [0103] 材料:冰冻组织切片
- [0104] 实验步骤:
- [0105] 1.由冰冻切片机中取出载有切片的载玻片,放入湿盒中。
- [0106] 2.待载玻片达到室温且未干时,加CYP1于切片上洗载玻片3-5次;
- [0107] 3.吸去多余液体,加CYP1孵育,CYP1洗片;
- [0108] 4.吸去多余液体,加封闭液室温封闭;
- [0109] 5.吸去多余封闭液,加稀释好的HER2抗体1、HER2抗体2,室温避光孵育适当时间;
- [0110] 6.避光,CYP2洗片,吸去多余水分;
- [0111] 7.加稀释好的二抗,避光孵育适当时间。
- [0112] 8.CYP2洗片,吸去多余水分。
- [0113] 9.加10 μ l DAPI,封片镜检。根据细胞形态和HER2表达判断是否为阳性细胞。
- [0114] 实施例5
- [0115] 材料:阴性富集的血液样本涂片,Cyttel®荧光原位杂交试剂盒
- [0116] 实验步骤:
- [0117] 1.富集后的涂片采用37℃预热的2 $\times$ SSC洗涤;
- [0118] 2.梯度乙醇脱水;
- [0119] 3.在载玻片上滴加10 μ l的荧光探针,盖上盖玻片,四周加封片胶封片;
- [0120] 4.杂交,76℃变性10min,37℃杂交1.5h;
- [0121] 5.撕去封片胶,在43℃预热的甲酰胺中甩掉盖玻片;
- [0122] 6.依次采用预热的甲酰胺和2 $\times$ SSC洗涤;
- [0123] 7.按照实施例1步骤进行免疫荧光检测。
- [0124] 8.显微镜读片,分别记录FISH信号多体、CD45表达阴性的细胞和目的蛋白表达阳性、CD45表达阴性的细胞。
- [0125] 实施例6
- [0126] 材料:阴性富集的血液样本涂片,Cyttel®荧光原位杂交试剂
- [0127] 实验步骤:
- [0128] 1.按照实施例1进行免疫荧光检测,读片;

[0129] 2. 免疫荧光检测后在 $2\times$ SSC中甩去盖玻片,按照实施例5进行FISH杂交;

[0130] 3. FISH杂交、洗涤后,DAPI封片,镜检,分别记录FISH信号多体、CD45表达阴性的细胞和目的蛋白表达阳性、CD45表达阴性的细胞。

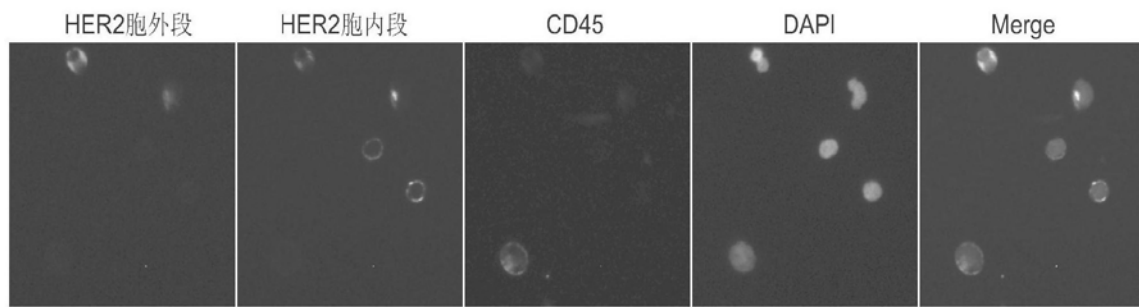


图1

专利名称(译)	一种检测HER2抗原不同位点的免疫荧光试剂盒及应用		
公开(公告)号	CN109187977A	公开(公告)日	2019-01-11
申请号	CN201810908228.9	申请日	2018-08-10
[标]申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京莱尔生物医药科技有限公司		
[标]发明人	郭素杰 郭志敏 樊晓婷		
发明人	郭素杰 郭志敏 樊晓婷		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/68 G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/57496 G01N21/6428 G01N33/533 G01N33/6803 G01N2800/7028		
代理人(译)	王为 孟旭		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种检测HER2抗原不同位点的免疫荧光试剂盒及应用，本发明所述方法，检测原理如下：首先富集非体液性稀有有核细胞，然后根据抗原抗体反应原理，采用免疫荧光检测方法，检测富集的细胞中目的蛋白在细胞中的表达。本试剂盒通过对靶标细胞和白细胞共同抗原CD45进行荧光标记，通过筛选目的蛋白阳性、CD45阴性的细胞，从而对血液中特定蛋白阳性的非体液性稀有有核细胞进行判读和计数。

