



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02823987.3

[43] 公开日 2005 年 4 月 13 日

[11] 公开号 CN 1606628A

[22] 申请日 2002.11.20 [21] 申请号 02823987.3
 [30] 优先权
 [32] 2001.11.30 [33] US [31] 60/337,282
 [86] 国际申请 PCT/IB2002/004856 2002.11.20
 [87] 国际公布 WO2003/046218 英 2003.6.5
 [85] 进入国家阶段日期 2004.5.31
 [71] 申请人 辉瑞产品公司
 地址 美国康涅狄格州
 [72] 发明人 葆拉·A·米尔鲍尔
 老梅克·J·舒勒

[74] 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所
 代理人 巫肖南 封新琴

权利要求书 2 页 说明书 29 页 附图 12 页

[54] 发明名称 检测染色体数量异常细胞的方法

[57] 摘要

本发明提供了检测染色体数量异常的有丝分裂细胞的方法和诱导细胞染色体数量异常的试剂。在优选实施方案中，所述方法包括用检测有丝分裂细胞的有丝分裂标记和定量 DNA 染料染色细胞，并显示在所述有丝分裂细胞中的 DNA 量。优选使用流式细胞仪分析染色细胞。

ISSN 1008-4274

1. 一种检测染色体数量异常的方法,其包括用有丝分裂标记和定量DNA染料处理有丝分裂细胞并用所述定量DNA染料对所述细胞的DNA量进行
5 定量。
2. 权利要求1的方法,其中所述DNA定量包括流式细胞术的应用。
3. 权利要求1的方法,其还包括如果所述细胞由所述定量确定比正常倍性的细胞含有的DNA多或DNA少,将所述细胞限定为具有染色体数量异常。
- 10 4. 从细胞群中鉴定染色体数量异常细胞的方法,其包括用有丝分裂标记和定量DNA染料处理细胞群,并且如果所述细胞被所述有丝分裂标记鉴定为有丝分裂的并进一步由所述定量DNA染料确定为比正常倍性的细胞含有的DNA多或DNA少,从所述群中鉴定出染色体数量异常的细胞。
5. 权利要求4的方法,其中用细胞计数法来鉴定所述细胞为有丝分裂的并确定所述细胞比正常倍性的细胞含有的DNA多或DNA少。
15
6. 权利要求1或4的方法,其中所述有丝分裂标记是检测有丝分裂中出现的组氨酸磷酸化的试剂。
7. 权利要求1或4的方法,其中所述有丝分裂标记是6G3单克隆抗体。
8. 权利要求1或4的方法,其中所述定量DNA染料选自插入染料、小
20 沟结合物、花青染料以及碘化丙啶。
9. 权利要求1或4的方法,其中所述定量DNA染料为碘化丙啶。
10. 从细胞群中分离染色体数量异常细胞的方法,其包括用有丝分裂标记和定量DNA染料处理细胞群,如果该细胞被所述有丝分裂标记鉴定为有丝分裂的并进一步由所述定量DNA染料确定为比正常倍性的细胞含有的
25 DNA多或DNA少,从所述群中鉴定染色体数量异常的细胞并分离该细胞。
11. 权利要求10的方法,其中所述细胞群含有至少两个均具有不同染色体数量异常的细胞亚群,并且其中所述方法还包括将所述细胞亚群彼此分离及从所述细胞群中分离。
12. 鉴定诱导细胞中染色体数量异常的试剂的测定方法,其包括用被测
30 试剂处理细胞,用有丝分裂标记和定量DNA染料处理所述细胞或其后代,并且如果所述细胞或其后代在用有丝分裂标记和定量DNA染料处理中是有

丝分裂的，就使用所述定量 DNA 染料来定量所述细胞中的 DNA 量。

13. 权利要求 12 的测定方法，其中所述细胞为外周血单个核细胞、淋巴细胞、上皮细胞和结缔组织细胞。

14. 检测细胞染色体数量异常的试剂盒，其包括有丝分裂标记和定量 DNA 染料。

15. 含有有丝分裂标记和定量 DNA 染料的组合物。

检测染色体数量异常细胞的方法

5 技术领域:

本发明涉及使用有丝分裂标记和定量 DNA 染料检测细胞染色体数量异常。染色体数量异常如非整倍性和多倍性可用来量度细胞毒性和肿瘤可能性。

10 背景技术:

染色体数量异常,如非整倍性和多倍性,与多种疾病包括出生缺陷、妊娠损耗以及癌症有关。代表性疾病包括 Down 综合征、Klinefelter's 综合征、Turner's 综合征、XXX(Triplo-X)综合征、四 X(Tetra-X)综合征、五 X(Penta-X)综合征、XYY 综合征、以及包括 7、10、11、13、18、21、X 和 Y 在内的任何染色体的单体性或多体性。此外,染色体数量异常如多倍性和非整倍性在人类自发性流产中常见。

与染色体数量异常相关的代表性的肿瘤包括白血病如急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性非淋巴细胞性白血病(ANL)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓细胞性白血病(CML);实体瘤如膀胱癌、结肠癌、大肠癌、恶性黑色素瘤以及子宫癌。此外,一些肿瘤发生的模型也显示了非整倍性在啮齿类动物肿瘤发生的多步进程中的作用。

此外,有报道认为很多化学化合物如苯来特、安定和灰黄霉素可导致染色体数量异常。

大多数现存检测染色体数量异常的方法都是依据染色体计数方法,其中使用 DNA 特异性染料如 Giemsa 对分裂中期细胞进行染色,然后计数个体染色体。这种方法非常麻烦,因为它需要手工计数数千细胞。或者,用对微核的诱导来检测化学断裂剂。但这种方法不易区分断裂剂和非整倍剂且对染色体不分离不敏感。其它的技术包括使用染色体特异性 DNA 探针的荧光原位杂交(FISH)技术,该探针与染色体上的互补序列退火然后用作特异性标记。

30 这种 DNA 探针包括区域特异性探针或全染色体探针,它们在特定染色体全

长上产生均一或几乎均一系列的荧光信号。

但所有这些技术都耗时耗力。因此，需要有一种快速、廉价、可靠的方法用于鉴定染色体数量异常。这种方法可用于检测生物样品中的染色体数量异常以及鉴定诱导染色体数量异常的化合物。

- 5 本申请通篇引用的参考资料包括文献参考资料、授权专利、公开的专利申请的内容都在此以全文引入作为参考。

发明概述:

10 本发明提供了检测细胞中一或多处染色体数量异常的方法。所述染色体异常可为异常倍性(ploidy)，如多倍性或非整倍性。在优选实施方案中，该方法包括使用有丝分裂标记和定量 DNA 染料标记细胞，以将处于有丝分裂期的细胞中的 DNA 量进行定量，并检测有丝分裂细胞中一或多处染色体数量异常的存在。所述有丝分裂标记可为检测有丝分裂细胞特征的试剂，所述特征例如与有丝分裂期染色质浓集相关的组蛋白磷酸化，例如丝氨酸-10 上 H3 组蛋白的磷酸化。所述试剂可为抗体，如 6G3 单克隆抗体。可从例如嵌入染料、小沟结合剂或花青染料中选择任何定量 DNA 染料。优选定量 DNA 染料为碘化丙啶(propidium iodide)。该方法优选包括用流式细胞术处理所述经有丝分裂标记和定量 DNA 染料染色的细胞来分析所述染色细胞。

20 本发明也提供了检测细胞群中的一或多个细胞中一或多处染色体数量异常的方法，其包括用有丝分裂标记和定量 DNA 染色标记对所述细胞群染色，然后将处于有丝分裂的细胞的 DNA 量进行定量，并确定一或多个细胞中存在一或多处染色体数量异常。

25 本发明也提供了从细胞群中分离有一或多处染色体数量异常的一或多个细胞的方法。其包括用有丝分裂标记和定量 DNA 染料对所述细胞群进行染色，使用流式细胞术对所述细胞进行处理，从而使所述细胞中的 DNA 含量可见，从而鉴定有一或多处染色体异常的细胞，并且将所述有一或多处染色体异常的一或多个细胞从所述细胞群中分离。优选的分析和分离方法包括流式细胞术。此方法可包括将至少两种不同的细胞亚群彼此分离并从所述细胞群中分离。本发明的方法可适用于任何一种有丝分裂细胞或可经有丝分裂原刺激进行有丝分裂的细胞，例如真核细胞。细胞实例包括哺乳动物细胞，如人类细胞。30 优选细胞包括体细胞和生殖细胞。所述细胞可来源于生物样本，例

如活检，或来源于培养细胞，例如来源于细胞系的细胞。

本发明还提供了鉴定诱导细胞染色体数量异常的化合物的测定。在优选实施方案中，测定包括将一种被试化合物与细胞群接触足够的时间以诱导子代细胞任何可能的染色体数量异常，将所述细胞用本发明方法处理，并确定
5 细胞中染色体异常的存在，这样与未接触所述被试化合物的类似细胞群相比，在接触所述被试化合物的细胞群中染色体异常的细胞数量较多，这表明所述被试化合物诱导细胞染色体数量异常。本测定中可使用任何真核细胞，例如哺乳动物细胞，例如人类细胞。

在另一实施方案中，本发明提供了一种确定在人类受试者或动物的细胞
10 群中存在含有一或多处染色体异常的细胞的方法。所述方法优选包括从人类受试者或动物获取细胞样本，用本发明方法处理所述细胞样本从而确定在人类受试者或动物存在含有一或多处染色体数量异常的细胞。疾病实例包括各种癌症、生殖细胞非整倍体性 (aneusomy) 以及遗传性疾病，如三体性和单体性。

15 本发明还提供了检测细胞染色体数量异常的试剂盒。这种试剂盒可以是鉴定细胞毒性的化合物或鉴定样品染色体数量异常的试剂盒。试剂盒可包含一种标记物，如有丝分裂标记或定量 DNA 染料。在优选的实施方案中，试剂盒包括有丝分裂标记和定量 DNA 染料，试剂盒可包括的其它组分包括附加标记物、检测试剂、缓冲液、阴性或阳性对照以及获取生物样品的装置。
20 此试剂盒也可包含使用说明书。

本发明也提供包含有丝分裂标记和定量 DNA 染料的组合物。

本发明至少提供如下优点：使分析细胞中染色体异常的速度显著加快，降低数据变异性，增加统计学意义，并总体改进有丝分裂群数量异常的评估。

25 附图简述：

图 1A 代表用流式细胞仪分析人类淋巴细胞得到的双参数点图 (FL2-W/FL2-A)，其显示了确定完全获取所述循环(cycling)细胞群的适当“过关(gating)设定”。

30 图 1B 代表用流式细胞仪分析正常人类淋巴细胞得到的双参数点图 (抗-H3 mAb/FL2-A)，其显示了根据多细胞周期的 DNA 含量 (即 G0-G1-S 以及 G2) 鉴定不同有丝分裂细胞群的适当“过关设定”。

图 2A 代表用流式细胞仪分析经那可汀 (Noscapine) 处理的人类淋巴细胞所得到的双参数点图 (FL2-W/FL2-A) 实例, 其显示了 DNA 含量增加的所述“过关”循环细胞群。

图 2B 代表用流式细胞仪分析经那可汀处理的人类淋巴细胞所得到的双参数点图 (抗-H3 mAb /FL2-A) 实例, 其显示了定量亚二倍体 (R2)、二倍体 (R3)、超二倍体 (R4) 以及多倍体 (R5) 细胞的适当“过关设定”。

图 3A 代表 MODFIT3.0 软件的一个 DNA “设定”柱状图实例, 其显示所述 DNA G1 和 G2 峰的手动排列 (manual alignment)。

图 3B 代表 MODFIT3.0 软件的一个 DNA “分析”柱状图实例, 其显示了在 G1、G2 和 S 期、细胞聚集物中以及细胞残骸中计算出的细胞数。

图 4 所示为显示用手工和流式细胞计数分析用不同量那可汀处理的人类淋巴细胞群中的多倍体细胞的比较图表。

图 5 所示为用流式细胞计数分析所确定的, 亚二倍体、超二倍体以及多倍体细胞在用不同量的氰化钾 (KCN) 处理的人类淋巴细胞群中的百分比图表。

图 6 所示为用流式细胞计数分析确定的, 亚二倍体、超二倍体以及多倍体细胞在用不同量的细胞松弛素 B 处理的人类淋巴细胞群中的百分比图表。

图 7 所示为用流式细胞计数分析确定的, 亚二倍体、超二倍体以及多倍体细胞在用不同量的秋水仙酰胺处理的人类淋巴细胞群中的百分比图表。

图 8 所示为用流式细胞计数分析确定的, 亚二倍体、超二倍体以及多倍体细胞在用不同量的灰黄霉素处理的人类淋巴细胞群中的百分比图表。

图 9 所示为用流式细胞计数分析确定的, 亚二倍体、超二倍体以及多倍体细胞在用不同量的那可汀处理的人类淋巴细胞群中的百分比图表。

25 发明内容:

本发明至少部分根据以下发现: 将循环细胞群用有丝分裂标记标记并对 DNA 含量进行染色, 通过流式细胞术使所述染色细胞可见化以提供一种直接检测细胞群中染色体数量异常细胞的方法。所述结果显示了具有多余或缺失染色体或具有成倍多余染色体的有丝分裂细胞的数量。

30 在本发明的检测方法、鉴定方法、分离方法以及测定方面, 可首先用有丝分裂标记, 然后用定量 DNA 染料或可以颠倒此顺序来处理细胞。或者,

可首先用定量 DNA 染料处理细胞然后进行 DNA 定量。然后通过用有丝分裂标记处理可鉴定那些显示有染色体数量异常的细胞是否为有丝分裂的。再或者可首先鉴定细胞是否为有丝分裂的，再经定量 DNA 染料处理来鉴定染色体数量异常。所有上述替代方法均在该发明范围内。

5 本文所用术语在本领域都具有其通常的含义，但为使发明更清楚，为方便起见在说明书、实施例和附录权利要求中所使用的某些术语和短语的含义见下。

“非整倍剂”是一种试剂，如一种诱导非整倍性的化学品。“非—非整倍剂(non-aneugen)”为不可导致非整倍性的试剂。

10 “非整倍性”和“多倍性”是指细胞具有的染色体数与通常的单倍体数 (“n”) 或双倍体数 (“2n”) 不同的情况。对于人类，正常的单倍体染色体数为 23，双倍体染色体数为 46。正常细胞应具有 46 条染色体的双倍体染色体数量。非整倍体细胞具有的染色体数不是正常染色体单倍体数的整倍数。例如，非整倍体细胞可为具有三倍体的细胞，即具有一个染色体的三个拷贝的细胞；或为单倍体，即仅具有一个染色体的单拷贝的细胞。非整倍性可由有丝分裂中染色体不分离产生。多倍体细胞是指细胞具有的染色体数为正常单倍体数量的数倍，比通常的二倍体数 (2n) 大。例如，多倍体细胞可为三倍体 (n=69) 或四倍体 (n=92) 细胞。

20 术语“生物样品”是指从生物体或生物体 (organism) 成分 (例如细胞) 得到的样品。所述样品可为任何生物组织或液体。通常情况下所述样品为源自病人的“临床样品”。此种样品包括但不限于痰、血液、血细胞 (例如白细胞)、组织或细针活检样品、尿、腹水以及胸膜积液或由其获得的细胞。生物样品还可包括组织切片(section)如为组织学目的的冷冻切片。

25 “染色体数量异常”是指与正常细胞相比，细胞中存在更多附加的染色体或其部分，或缺少更多的染色体或其部分。

细胞的“染色体含量”是指其染色体及其部分的数量。二倍体细胞的正常染色体含量为 2n，单倍体细胞为 n。在有丝分裂时二倍体细胞的正常染色体含量为 4n。

30 “定量 DNA 染料”是指一种允许检测和定量所述细胞 DNA 的试剂。优选的定量 DNA 染料是一种可对 DNA 进行染色的试剂，例如插入剂。定量 DNA 染料的实例是碘化丙啶。

“亚二倍体”细胞是指染色体 DNA 少于同种正常二倍体细胞的细胞。

“超二倍体”细胞是染色体 DNA 多于同种正常二倍体细胞的细胞。

“标签”和“可检测的标签”是指可检测的分子，包括但不限于放射性同位素、荧光团、化学发光部分、酶、酶的底物、酶的辅因子、酶的抑制剂、染色剂、金属离子、配体（例如生物素或半抗原）等等。术语“荧光剂”是指能够在可检测的范围内发出荧光的一种底物或其部分。本发明可使用的标签实例包括荧光素、罗丹明、丹酰基、伞形酮、得克萨斯红、氨基苯二酰肼、NADPH、 α - β -半乳糖苷酶以及辣根过氧化物酶。

“标记”可为一种可对细胞某些特征进行标记的试剂，例如细胞周期的阶段或一种细胞成分，例如 DNA 的存在和/或数量。

“有丝分裂标记”是指可对有丝分裂细胞进行标记的试剂。优选的有丝分裂标记是检测色氨酸-10 位点上的 H3 组蛋白的磷酸化试剂。

“倍性”是指染色体正常数量的重复程度。具有“倍性”的细胞是指染色体数量与同种正常细胞不同的细胞并可为，例如非整倍体或多倍体细胞。细胞的“倍性测定”是指细胞中染色体数量的确定。

本文使用的术语“小分子”是指一种分子量小于约 5kD 最优选小于约 4kD 的组合物。小分子可为核酸、肽、多肽、肽模拟物、碳水化合物、脂类或其它有机（含碳）或无机分子。很多制药公司都有化学和/或生物混合物，通常为真菌性、细菌性或藻类提取物的大型库，该库可用本发明的任何一种测定进行筛选来鉴定导致染色体数量异常的化合物。

“染料”指任何能检测靶的试剂，例如 DNA 染料。

在一实施方案中，本发明提供了一种确定细胞染色体含量，例如倍性的方法，其包括用有丝分裂标记对细胞进行标记并对 DNA 含量进行染色，继而处于有丝分裂的细胞 DNA 量进行定量，从而确定所述细胞的染色体含量。使用有丝分裂标记得到的标签的存在表明所述细胞处于有丝分裂期。用定量 DNA 染料染色得到的量与所述细胞中的 DNA 量，例如细胞中染色体或其部分的数量相关。使用有丝分裂标记可使对 DNA 含量的分析限于有丝分裂细胞中。对细胞染色体含量的确定包括确定细胞中非整倍性或多倍性的存在以及染色体部分是否存在。因此，DNA 含量为 $4n$ 以外的有丝分裂细胞则被认为是染色体数量异常。如所述 DNA 含量是正常单倍体数的倍数且倍数超过 $4n$ ，如 $8n$ ，则所述细胞一定是多倍体。如果所述含量基本不等于 $4n$

并且不是倍数超过 $4n$ 的 n 的整倍数，则所述细胞一定是非整倍体。可用很多技术检测和/或定量所述染料。优选的方法是使用流式细胞术。

5 细胞中染色体数量异常，例如非整倍性和多倍性的存在也可简单通过检测所述细胞的 DNA 含量来评估而无需考虑有丝分裂状态。但通过优选评估有丝分裂细胞，会提高染色体数量异常的检测。这是由于从循环细胞群选择有丝分裂细胞，很大程度地减少了几种背景误差来源，包括死亡细胞、经历程序性细胞死亡的细胞（也称细胞凋亡）以及细胞碎片或残骸，它们通过 DNA 含量检测都表现为染色体数量异常。

10 所述细胞可为细胞群中的细胞。因此，本发明提供了确定细胞群中存在一或多个细胞染色体数量异常的方法，其包括使用有丝分裂标记和定量 DNA 染料对所述细胞群进行染色，然后对所述有丝分裂细胞的 DNA 量进行定量。本发明提供了定量细胞群中有一处或几处染色体数量异常的细胞数的方法。例如，该方法可包括对染色体数量非 $4n$ 的有丝分裂细胞进行计数。

15 本发明方法适用于细胞系和原代细胞以及生物样品，例如来源于动物的活检的培养物。可使用任何处于有丝分裂的细胞。优选的细胞包括真核细胞。所述细胞可为脊椎动物细胞，例如哺乳动物细胞，例如人类、牛、羊、猪、马、犬、猫、非人类灵长类，小鼠或大鼠的细胞。所述细胞可来源于真核生物的任何器官或组织，例如血细胞、上皮细胞、骨髓细胞、肺细胞、肾细胞或羊水细胞。本发明的方法也可用于真菌细胞、果蝇细胞、蟾蜍细胞、*C.elegans* 细胞或任何其它含有染色体的细胞。

20 其用途为例如，鉴定导致染色体数量异常的试剂的细胞系可由，例如从美国典型培养物保藏中心（ATCC），10801 University Blvd., Manassas, VA 20110-2209 获得。

25 可使用侵入(invasive)或非侵入的取样方法由个体获得细胞生物样品。如涉及从动物皮肤或器官内部获取细胞，则该取样方法被称作“侵入的”。介入方法实例包括血液收集、精液收集、针吸活检、胸膜抽吸、脐带活检、羊水活检等。这些方法的实例见 Kim, C. H 等 (J. Virol. 66: 3879-3882 (1992)); Biswas, B. 等. (Annals NY Acad. Sci. 590: 582-583 (1990)); Biswas, B.等. (J. Clin. Microbiol. 29: 2228-2233 (1991))讨论。

30 与此相比，“非侵入”取样方法是指由动物内或外表面恢复 (recover) 所述细胞。这种“非侵入”取样方法的实例包括“棉拭法”收集泪、唾液、

尿、排泄物、汗或排汗 (perspiration)、毛发等。此收集可通过使用棉拭鼻孔、口腔、直肠、阴道或耳道, 接触皮肤或泪腺, 收集毛发碎屑等来完成。本文所用“棉拭法”是指用含有或包含可吸收物质的棉花棒/收集棒(collector) (“棉拭子”)以—种足以收集细胞方式接触表面。

5 所述细胞群可为纯细胞群, 例如由—种细胞系培养的细胞, 或为不同的细胞群。在—实施方案中, 所述细胞为外周血单个核细胞 (PBMC)。由不同类型的细胞组成的群—步被富集为—种或多种亚型。例如, 可从 PBMC 中分离出淋巴细胞。可使用各种方法分离细胞的亚群, 如亲和纯化或利用抗体与细胞表面标记特异反应的淘选法 (panning method)。

10 本发明方法可用于单个细胞, 本发明方法优选用于至少为 10, 优选至少为 10^2 、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 或 10^8 个细胞的群落。

在—实施方案中, 用纺锤体阻断剂 (spindle block), 例如 Colcemid[®] 或秋水仙碱 (GIBCO, BLR) 和 TN16 (Wako 化学纯) 孵育所述细胞。例如, 固定之前可让细胞接触秋水仙酰胺 (约 $0.1\mu\text{g/ml}$; GIBCO) 1-3 小时。“纺锤体阻断剂”是—种可使细胞在有丝分裂时累积的试剂。

15 在染色前后, 可选用溶剂固定所述细胞, 也可选对所述细胞膜进行渗透。很多固定剂和固定条件适用此目的。可用的固定剂包括但不局限于甲醛, 例如 2% 的低聚甲醛; 冷甲醇; 冷乙醇, 例如 70% 乙醇。也可通过在 3.7% 低聚甲醛溶液中孵育约 15-30 分钟完成细胞固定。

20 在固定前, 可用小内径吸量管吹吸所述细胞以确保单个细胞悬液。也可过滤所述细胞, 例如通过 $35\mu\text{m}$ 的过滤网 (Becton Dickinson; Franklin Lakes, N.J.) 达到此目的。

通常在特定的试剂中固定细胞并且时间足够以用于特定所用方法, 例如流式细胞术。对于特定细胞种类适当的固定方法可由本领域已知的方法确定, 例如进行固定方法不同的测定以确定在使用特定的方法时适于细胞染色的固定方法。

25 根据所使用的有丝分裂标记和/或定量 DNA 染料, 有必要在用有丝分裂标记前对细胞进行渗透。例如, 在用抗体标记细胞之前, 优选对所述细胞进行渗透。渗透作用可用于使大量通常情况下由于细胞膜不可渗透的标记进入胞腔空间。渗透可通过将所述细胞在试剂, 如丙酮、乙醇、DMSO 或各种去污剂如 Tween-80 或 TritonX-100 中进行孵育来完成。例如, 渗透所述细

胞可通过细胞固定中或之后（如果有）在约 0.05-1.0% TritonX-100 中进行孵育。

通常当细胞被渗透时，使用一种试剂进行渗透并且时间要足以使所用特定染色剂、标记和或检测试剂达到其存在于细胞上或细胞内的靶。根据本领域已知方法可确定对特定细胞适当的渗透方法和该法所使用的特定试剂，例如通过进行几种渗透方法不同的测定，从而确定适合所述细胞染色的渗透方法。

本领域已知大量固定剂、固定条件以及渗透试剂，并且本发明中其它固定或渗透样品细胞的方法以及染料对本领域一般技术人员都是显而易见的。

10 优选定量 DNA 染料为碘化丙啶（PI; Molecular Probes, product no.P-3566; Calbiochem;La Jolla,Calif）。其它可使用的定量 DNA 染料为荧光核酸染料。本领域已知多种适当的核酸染料，包括但不限于噻唑橙、溴乙啶同型二聚体、溴化乙啶、HOECHST 33258 以及 DAPI。核酸染料可为插入型染料，如菲啶和丫啶，例如溴乙啶和碘化丙啶；小沟结合剂，如 DAPI 和
15 所述 Hoechst 染料；或不属于这两类任一，如吡啶橙、7-AAD 和羟蔗糖。花青染料是理想的染料，因为其摩尔吸收性高、内在荧光极低、结合核酸后荧光增强显著，对核酸的亲合性从中等到很高，对其它生物聚合物染色几乎没有或无。一些核酸染料是细胞不渗透的，而其它染料则是细胞渗透性染料。细胞渗透性染料在染色前无需对细胞进行渗透。渗透染料实例为花青染料
20 （SYTO 核酸染料）；hexidium iodide、二氢乙啶和溴乙啶同型二聚体。

现有的其它染料包括插入剂 7-氨基放射菌素 D 和放射菌素 D, 多色羟蔗糖，Long-Wave LDS751 和 Neurtrace Fluorescent Nissl 染料。另一定量 DNA 染料是一种碱基类似物 5-溴-2'脱氧尿苷（BrdU, 得自 Sigma Chemical Co.）。其它可用的核酸染料见国际申请 WO93/06482（公开于 Apr.1,1993）；
25 WO94/24213（公开于 Oct.27,1994）；授予 Yue 等，1994 的美国专利 5,321,130；授予 Yue 等，1995 的美国专利 5,410,030；授予 Haugland 等，1995 的美国专利 5,436,134；授予 Haugland 等，1995 的美国专利 5,437,980 描述。本发明选择与有丝分裂标记联合使用的适当的核酸染料可同时或相继观察到有丝分裂细胞和 DNA 含量。

30 可将碘化丙啶（PI; Calbiochem;La Jolla,Calif.）以浓度至少约 0.1 $\mu\text{g/ml}$ 到约 100 $\mu\text{g/ml}$ ，优选至少约 0.1 到约 10 $\mu\text{g/ml}$ ，最优选至少约 1 到约 5 $\mu\text{g/ml}$

的浓度加入细胞群。可将所述细胞在室温下，可选在黑暗中，孵育约 1 分钟到约 2 小时，优选约 10 分钟到 1 小时，最优选约 15 到约 30 分钟。也可在冰上进行孵育至少约 1 分钟，优选至少约 5 分钟，最优选至少约 15 分钟。

通常用定量 DNA 染料染色细胞,其量以及时间足够检测及定量细胞中的 DNA。对特定细胞类型以及检测方法适当的染色步骤可由本领域已知的方法确定。例如，使用几种 DNA 染料、浓度以及孵育时间进行测定以确定细胞染色的适宜条件。

对细胞中 DNA 内容物的染色也可通过用一种对染色体 DNA 以外的核酸（例如 RNA）不染色的试剂处理细胞来完成。在一阐述的实施方案中，使用降解 RNA 的试剂如核糖核酸酶对所述细胞进行处理。例如可加入约 100-500 $\mu\text{g/ml}$ 的核糖核酸酶 A（BD Clontec; Palo Alto, California）。

通常使用对染色体 DNA 以外的核酸不染色的试剂以足以使所述染色体 DNA 的染色明显超过其它核酸染色的浓度和时间来孵育细胞。可由本领域已知方法确定适当的条件，例如在不同条件下使用不同的试剂进行测定以确定所用方法的适当条件。

优选的有丝分裂标记是一种特异性检测有丝分裂细胞的试剂，其检测一种在非有丝分裂细胞中基本缺失或检测不到的有丝分裂细胞（M）的特征。在优选的实施方案中，有丝分裂标记是一种可检测到发生于有丝分裂中而不是在细胞间期（即不在 G₀, G₁, S 或 G₂ 期）的染色质浓缩的标记物。甚更优选的有丝分裂标记是一种检测丝氨酸-10 上 H3 组蛋白磷酸化的试剂（抗-H3-P 抗体）（Juan 等（1998）Cytometry 32: 71）。这种试剂可为抗体，如单克隆抗体。优选的抗体是抗-H3-P 抗体 6G3, 可由 Cell Signalling Technology 购买（Beverly, MA）（Juan 等，见上文）。这种抗体特异性检测所述丝氨酸-10 残基的磷酸化形式而不是非磷酸化的形式。通过所述抗-H3-P 抗体可检测到由前期到末期的有丝分裂细胞。但这种抗体对细胞间期（即 G₀, G₁, S 和 G₂ 期）染色质的结合则弱很多。因此，与此种抗体结合的细胞仅为处于有丝分裂期的细胞。

其它可使用的有丝分裂标记包括 TG-3 单克隆抗体（Anderson 1998, Experimental Cell Res 238,498-502）。

通常使用有丝分裂标记对细胞进行标记，其浓度和标记时间需足以使所用的特定方法，例如流式细胞术检测到有丝分裂细胞。可由本领域已知的方法

法确定适当的条件，例如在不同条件下用有丝分裂标记孵育细胞以确定适宜的条件。

在某些实施方案中，可使用一种或多种附加标记对细胞进行染色。例如，第三种标记可以是确定其它两种标记所得结果的另一种有丝分裂标记或 DNA 标记。或者，另一种标记还可为可检测所述细胞或细胞器大小或颗粒性的标记。

例如，附加标记可为任何可选择性对细胞器如细胞膜、细胞核、高尔基复合体、内质网、溶酶体进行染色的探针或染料，或是线粒体二次染料，如罗丹明 123，或是一种可固定的线粒体染料，见授予 Haugland 等（1995）的美国专利 5,459,268 所述。附加标记的特定实例包括酸性细胞器的染料如 LYSOTRACKER（Molecular Probes, Eugene, Oreg.）以及其它美国专利 6,291,203 所述的溶酶体染料。将溶酶体选择性染料与本发明中的染料联合使用以使有丝分裂细胞、DNA 含量以及例如细胞中的线粒体及酸性细胞器呈现多色可见化。

所述有丝分裂标记和/或定量 DNA 染料本身并不能被检测到，但可通过使用二级试剂“检测试剂”进行检测。例如，标记物可为一种抗体。这种抗体可被直接标记，如用下述标签进行标记。或者抗体可与另一种可识别该种抗体的二级（或第二）试剂进行反应。本领域已知各种二级试剂，例如 FITC。所述抗体也可连接于生物素并且所述二级试剂可连接于抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素。通常这种二级试剂会携带所述标签。携带该标签的试剂被称为“检测试剂”。

通常，所述检测试剂引入了一种产生可检测反应的方法。可检测反应是指在试验系统中一种可直接或通过仪器观察到的参数的变化或产生，其用来证实细胞样品中存在特异性结合对的特定靶成分。这种可检测的反应包括颜色、荧光、反射、pH、化学发光或红外发射的变化或出现。可产生可检测反应的适当的标记物包括但不限于如下物质：可见或荧光染料、通过酶反应产生可见或荧光沉淀物的酶底物（例如辣根过氧化物酶与二氨基联苯胺的反应）、通过酶转化产生荧光或可见光的酶底物、可见或荧光标记的乳胶微粒、或由光与试剂反应而产生的信号（例如由光解作用或光与二氨基联苯胺反应激活的被束缚（caged）荧光基团）。

目的荧光部分或标签包括香豆素及其衍生物，例如 7-氨基-4-甲基香豆

素, 氨基香豆素, bodipy 染料如 Bodipy FL, 级联(cascade)蓝, 荧光素及其衍生物例如异硫氰酸荧光素, Oregon 绿, 罗丹明染料, 例如得克萨斯红, 四甲基罗丹明, 伊红以及藻红, 花青染料如 Cy2, Cy3, Cy3.5, Cy5, Cy5.5, Cy7, FluoX, 镧离子大环螯合物如 quantum dyeTM, 荧光能量转移染料如噻唑橙-溴乙啶杂二聚体, TOTAB, 丹酰基等。可连接于检测试剂而发生作用或可经改造以引入此作用的个体荧光化合物包括, 例如丹磺酰氯; 荧光素如 3, 6-二羟基-9-苯二苯并吡喃醇; 异硫氰酸罗丹明; N-苯基-1-氨基-8-sulfonatonaphthalene; N-苯基-2-氨基-6-sulfonatonaphthalene; 4-乙酰氨基-4-异硫氰基-二苯乙烯-2, 2'-二磺酸; 苊-3-磺酸; 2-toluidinonaphthalene 6-sulfonate; N-苯基-N-甲基-2-aminoaphthalene-6-sulfonate; 溴化乙啶; stebrine; auromine-0,2-(9'-蒽基)棕榈酸盐; 丹酰磷脂酰乙醇胺; N, N'-双十八烷基 (dioctadecyl) 氧杂羰花青 (oxacarbocyanine); N, N'-2 己基氧杂羰花青; 部花青, 4-(3'-苊基)硬脂酸盐; d-3-脱氧氨基-马茶雌酮; 12-(9'-蒽基)硬脂酸盐; 2-甲基蒽; 9-乙烯基蒽; 2,2'(1,2-亚乙烯基-对-亚苯基)二苯并口恶唑; p-二(2-甲基-5-苯基-口恶唑基)苯; 6-二甲氨基-1,2-benzophenazin; 视黄醇; 二(3'-氨基吡啶)1,10-decandiyl 二碘化物; sulfonaphthylhydrazone of hellibrienin; 氯四环素; N-(7-二甲氨基-4-甲基-2-氧-3-chromenyl)马来酰亚胺; N-(对-(2-苯并咪唑基)-苯基)马来酰亚胺; N-(4-fluoranthyl)马来酰亚胺; 二(高香草酸); resazarin; 4-氯-7-氮-2,1,3-苯并口恶二唑 (benzooxadiazole); 部花青 540; 试卤灵; 孟加拉红; 以及 2,4-二苯基-3(2H)-呋喃酮。(见例如, Kricka, 1992, Non-isotopic DNA Probe Techniques, Academic Press San Diego, Calif.)。很多荧光标记都可从以下公司购买: SIGMA 化学公司(Saint Louis, Mo.), Amersham, Molecular Probes, R & D systems (Minneapolis, Minn.), Pharmacia LKB Biotechnology (Piscataway, N. J.), CLONTECH Laboratories, Inc. (Palo Alto, Calif.), Chem Genes Corp., Aldrich Chemical Company (Milwaukee, Wis.), Glen Research, Inc., GIBCO BRL Life Technologies, Inc. (Gaithersberg, Md.), Fluka Chemica-'Biochemika Analytika (Fluka Chemie AG, Buchs, Switzerland), 和 Applied Biosystems(Foster City, Calif.) 及本领域技术人员熟悉的其它商业来源。

30 化学发光标签包括萤光素和 2,3-(dihydrophthalazinediones), 例如氨基苯二酰一胂。目的同位素部分或标签包括 ³²P, ³³P, ³⁵S, ¹²⁵I, ²H, ¹⁴C 等

(见 Zhao 等(1995) Gene 156:207; Pietu 等(1996) Genome Res.6:492)。

5 标签亦可为信号产生系统的成分,它们可与同一系统中的一或多个附加成分共同产生可检测的信号。这种标记可被解释为特异性结合对的成分,如配体,例如生物素,荧光素,地高辛配基,抗原,多价阳离子,螯合剂组等,在这样的系统中,所述成分特异地结合所述信号产生系统中的附加成分,所述附加的成分可直接或间接产生一种可检测的信号,例如抗体与荧光部分或可将底物转化为发光产物的酶成分偶联,例如碱性磷酸酶偶联抗体等。可使用的试剂对实例包括酶和酶的底物;抗原和抗体,生物素和亲和素(或抗生物素蛋白),免疫球蛋白和蛋白 A 或蛋白 G 以及碳水化合物和凝集素。

10 酶底物作为工具在所述适当酶存在的条件下产生荧光沉淀物在授予 Haugland 等(1994)的美国专利 5,316,906 和授予 Haugland 等的 5,443,986 中被进一步描述。

15 识别所述抗体恒定区并与例如 6G3 抗体共同使用的标记抗体实例包括:使用如下荧光标记的抗体,例如 Alexa Fluor 488(Molecular Probes,A-11011),异硫氰酸荧光素(FITC),藻红蛋白(PE),R-藻红蛋白(R-PE),Cy-Chrome™以及 PerCP(BD PharMingen)。抗体也可偶联于别藻蓝蛋白(APC)和 Texas Red™。本领域众所周知这种经标记的二级抗体并可由很多商业来源获得。

20 其它适当的检测试剂包括经选择的荧光 pH 或金属离子指示剂如授予 Kuhn 等.(1995)的美国专利 5,453,517;授予 Kuhn 等.(1995)的美国专利 5,405,975;以及在 Haugland,见上文,1992 HANDBOOK, Sets 20-22 中所述。而其它目的标记包括如美国专利 5,563,037; WO 97/17471 和 WO 97/17076 中所述。

25 本领域众所周知的用于不同标记物可共同测定的可区别标签的实例包括:两种或以上发射波长不同的荧光染料,如 Cy3 和 Cy5,荧光蛋白与染料的结合,如 phicoerythrin 和 Cy5,发射能量不同的两种或以上的同位素,如 ³²P 和 ³³P,散射波谱不同的金或银粒子,在不同处理条件下如温度, pH, 附加化学试剂处理等产生信号,或在处理后的不同时间点产生信号的标签。根据酶的不同底物特异性(碱性磷酸酶/过氧化物酶),使用一种或多种产生信
30 号的酶可使更多样的可区分标签得到应用。

本发明中的一个优选方法包括在溶液中固定细胞并且时间要足以使所

述细胞固定。然后在一种含有使所述细胞渗透并适合所述方法所用的染料的试剂的溶液中孵育所述细胞。优选在含有去污剂的溶液中孵育所述细胞充足的时间以使所述细胞对特定的有丝分裂标记物并可选对二级检测试剂可渗透。渗透步骤是可选择的，其只在使用非细胞渗透性标记物或检测试剂时才是必需的。然后在存在第一标记物，例如一种有丝分裂标记物时孵育所述细胞，其量以及时间都足以使所述标记物与其靶分子的至少 70%，优选至少约 80%，最优选至少约 100%结合。在与所述第一标记物进行孵育后，将所述细胞与二级检测试剂进行孵育，其量以及时间都足以与其靶分子的至少约 70%，优选至少约 80%，最优选达到至少约 100%反应。所述细胞可与第二标记物如定量 DNA 染料孵育，其浓度以及时间要足以与其靶分子的至少约 70%，优选至少约 80%，最优选至少约 100%反应。

将所述标记物加入所述细胞的顺序非常关键。例如，所述定量 DNA 染料不可在有丝分裂标记物之前加入细胞。加入二级检测试剂是在已用二级检测试剂可识别的试剂染色所述细胞之后。二级检测试剂可在已经用一种、两种或更多标记物染色所述细胞后加入细胞。

因此在一举例实施方案中，在 PBS 中洗涤约 $1-10 \times 10^6$ 细胞，并在 70% 乙醇中在 -20°C 固定。然后离心所述细胞，并通过在约 0.05-1% 的 PBS/Tween 80 中孵育来对其进行渗透，优选在约 0.05-0.5%，最优选约 0.1-0.2% 的 PBS/Tween 80 中孵育足够时间以对所述细胞进行渗透。此适当的时间取决于所述细胞类型并可通过小规模测定确定。通常在室温条件下孵育约 5 分钟到约 30 分钟，优选约 10 分钟到约 20 分钟，最优选约 10 分钟到约 15 分钟对于使所述细胞被渗透是适当的。离心所述细胞，将所述细胞颗粒在含有 H3 (ser 10)6G3 抗体的溶液中重悬，该 H3 (ser10)6G3 抗体用购自 Cell Signaling Technology (Beverly, MA) 的溶液稀释约 100-1000 倍，优选约 300-700 倍，最优选约 400-500 倍。在 37°C 孵育所述细胞约 10 分钟到 1 小时，优选约 30 分钟到 1 小时，最优选约 40 分钟。然后将 PBS 加入所述溶液，与所述细胞混合，再将所述细胞离心。然后在 Alexz Fluor 488 标记的二级抗体中将所述细胞颗粒重悬并在 37°C 孵育约 10 到 60 分钟，优选约 20 到约 40 分钟，最优选约 30 分钟。将 PBS 加入所述细胞，与所述细胞混合，离心所述细胞，将所述颗粒在含有碘化丙啶，可选核糖核酸酶的溶液中重悬。优选所述碘化丙啶以浓度至少为约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 到约 $100\mu\text{g/ml}$ ，优选约 $0.1\mu\text{g/ml}$ 到约 $10\mu\text{g/ml}$ ，

最优选约 1 µg/ml 到约 5 µg/ml 加入。优选核糖核酸酶的加入浓度为约 10 µg/ml 到约 1000 µg/ml, 优选约 50 µg/ml 到约 500 µg/ml, 最优选约 100 µg/ml 到约 300 µg/ml。优选在冰上孵育至少约 1 分钟, 优选至少约 10 分钟。在进行 FACS 分析之前, 将所述细胞贮存于 4°C。可通过流式细胞术对细胞 DNA 含量 (荧光强度), 非整倍性 (包括多倍性) 以及细胞周期进行分析。

分析经一种或两种标记物染色的所述细胞的优选方法是使用多参数 (或多色) 显示的流式细胞术或激光扫描术。在更优选的实施方案中, 用双参数流式细胞术处理经有丝分裂标记和定量 DNA 染料染色的细胞。这可使所述有丝分裂细胞因其 DNA 含量可见, 也使例如染色体含量异常 (如非整倍性或多倍性) 的有丝分裂细胞的不同亚群可见。另外, 流式细胞术可分离有丝分裂细胞的亚群, 例如所有染色体较少的细胞可被分离到一个试管中, 而含有多余染色体的细胞则被分离到第二个试管中。因此细胞的多个亚群可彼此分离, 也可与其它细胞分离。这种细胞群可被进一步检查。

用荧光激活细胞分类仪 (FACS) 进行流式细胞术, 本文将进一步描述并且在本领域常见。可使用的 FACS 机器实例包括 FACS-Calibur (Becton Dickinson; Mountain View, Calif.) 和 Coulter 流式细胞仪 (Hialeah, Fla., USA) EPICS Elite^R。可使用 CellQuest (Becton Dickinson; Mountain View, Calif.), WinList (Verity Software House, Inc. Topsham, Maine), 多循环软件 (Phoenix Flow Systems, San Diego, Calif. USA) 以及 FACScan (Becton Dickinson, Mountain View, Calif.) 软件进行定量。

流式细胞仪测定与每个细胞相关的发光物质量, 以及其它参数, 并以, 例如柱状图、点图或成分表格的形式提供输出。与每个细胞相关的一种发光物质量可与该细胞的其它特征相比较, 如所述细胞群也接触的另一发光物质的量, 大小, 颗粒性或内在发光性。

当含有细胞的鞘液通过所述激光 (通常为逐个通过) 时, 其与各种波长的光相接触。由所述细胞计数器检测到的每个粒子称为一个“事件”。一个事件透射或分散一些入射光的程度可量度所述事件的特征, 例如相关的发光物质。例如, 所述事件可发射与其自身一致的光或可发射由导入所述事件的一种荧光物质所产生的荧光。这种物质的一个实例是荧光基团偶联抗体。该抗体粘附于事件的一个组成并且所述荧光基团应特定频率的入射光发射出已知频率的光, 此后者可由, 例如所述细胞计数器的光电倍增管 (PMTs)

检测。所述发射或反射光的强度由所述细胞计数仪测定并储存。

所述细胞计数仪将发射数据编辑为柱状图。所述柱状图可以一维形式报告。或者，其可与由其它入射波长获得的发射光的柱状图相结合。这种结合通常以“点图”来报告，其中事件被描绘在网格上，并且所述网格的坐标轴与两个被测参数对应。例如，可将事件与约 488nm 的入射光接触并测定正向光散射以及 530nm 波长时的发射。该波长与异硫氰酸荧光素 (FITC)，一种在激光扫描细胞术中常用的荧光基团的峰值发射波长相对应。

在由激光扫描细胞计数仪获得的典型的二维点图输出中，有丝分裂细胞会与非有丝分裂的 G2 群分离。所述有丝分裂群可相对于彼此定量，也可相对于所述非分裂群的 DNA 含量定量，其通过在其周围建立“关 (gate)”，即设定建立所述有丝分裂细胞 DNA 含量可接受的最低和最高染色水平的阈值。

同样，所述细胞群落部分也可根据其 DNA 含量进行分离。在碘化丙啶染色中将出现对应与正常有丝分裂细胞的 4n DNA 含量的吸收峰。在单倍体数量 n 的更高倍数也可出现吸收峰，可能对应于多倍体细胞。在碘化丙啶的染色水平也可出现不对应于单倍体数量 n 的倍数的峰或超出背景的平顶。这些事件可能对应于非整倍体细胞或含有附加染色体部分或缺失染色体部分的细胞。如实施例所述，可设定关来区分落入不同 DNA 含量范围的细胞和 DNA 含量不同的细胞。

在双色流式细胞分析中，所述两种目的标记物的荧光特征差异要足以使它们可通过激光扫描细胞术进行区分。例如，所述磷酸组氨酸 H3 (ser10) 6G3 单克隆抗体可与 FITC 偶联。带有这种抗体标签的细胞应波长约 488nm 的入射光可发射约 520nm 的光。而碘化丙啶发射 560nm 到 670nm 的光。在这些范围内将 PMTs 调为敏感即可区分所述来自 H3-(ser 10)6G3-FITC 和另一来自碘化丙啶的两种信号。

这样，可根据所述 H3-(ser 10)6G3 染色量将每个事件设关为“有丝分裂的”或“非有丝分裂的”。然后将所述有丝分裂细胞设关为“整倍体”、“二倍体”、“非整倍体”、“多倍体”、“超二倍体”、“亚二倍体”或其它，这取决于在所述未分裂群中碘化丙啶染色的量。

其它使用有丝分裂标记物和定量 DNA 染料鉴定有丝分裂细胞以及这些细胞的 DNA 含量的方法包括组化法、免疫组化法、免疫细胞化学法以及其

它本领域已知的分子生物学技术。这些技术也可与流式细胞计数分析相结合。例如，可利用流式细胞计数将有丝分裂细胞从其它细胞中分离出来。然后可使用非流式细胞计数分析这些细胞 DNA 含量。

在一实施方案中，使用所述方法鉴定造成细胞中出现染色体数量异常（例如多倍性）的试剂。这种试剂包括细胞毒性试剂，例如致癌剂。在一实施方案中，所述方法包括将一个细胞与一种被测试剂接触足够时间来使试剂诱导子代细胞出现一种或多种染色体数量异常，如果有，就用有丝分裂标记以及定量 DNA 染料染色所述细胞以确定有丝分裂中的 DNA 数量，从而检测染色体数量异常，其中在一或多个子代细胞中出现一种或多种染色体数量异常表明这种被测试剂为诱导染色体数量异常的试剂。在另一实施方案中，所述方法包括将细胞群与被测试剂接触足够的时间来使得所述试剂诱导细胞中出现一种或多种染色体数量异常，如果有，之后用有丝分裂标记以及定量 DNA 染料染色所述细胞以确定有丝分裂中的 DNA 数量，从而检测染色体数量异常，而在一或多个子代细胞中出现一种或多种染色体数量异常表明这种检测试剂可诱导发生染色体数量异常。本发明方法可确定染色体数量异常的类型，即这种异常是非整倍性还是多倍性，或染色体部分的多余或缺失。

所述待测试剂可为任何分子或复合物，如有机小分子。例如，能被检测的试剂包括确定潜在非整倍剂性的潜在治疗剂。例如，可用本发明所述方法检测前导（lead）药物化合物的非整倍剂性。然后可改变认为具有非整倍剂性的化合物的结构以试图降低其非整倍剂性，化合物中每一种都可根据本发明所述方法检测其非整倍剂性。

也可使用本发明所述方法鉴定和/或检测细胞群中含有一种或多种染色体数量异常的一或多个细胞。所述细胞群可为，例如受试者的活检标本。可用所述方法确定异常细胞，例如癌细胞的存在。事实上，已知多数的癌细胞为非整倍体或多倍体。本发明所述方法也可用于确定染色体数量异常有关疾病的病程，其中此病程与染色体数量异常的存在相关。因此，本发明所述方法可用于诊断受试者患有疾病或预测受试者是否可能发病。

可用本发明所述方法进行诊断并显示与染色体异常相关的疾病实例包括：肿瘤，如恶性组织细胞性紊乱如恶性组织细胞增多病、急性单核细胞白血病以及大细胞性淋巴瘤；白血病如毛样细胞白血病、T 细胞，HTLV-II-相关性白血病、B 细胞性白血病、T 细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、

- 慢性淋巴细胞性白血病、肥大细胞白血病、慢性髓细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、费城-阴性髓细胞性白血病、费城-阳性髓细胞性白血病、急性髓性单核细胞性白血病、急性非淋巴细胞性白血病以及浆细胞性白血病；淋巴管肿瘤如淋巴管瘤、淋巴管肌瘤、淋巴管多发性肌瘤以及淋巴管肉瘤；淋巴瘤如何杰金氏病、免疫增生性小肠性疾病、非类脂组织细胞增多病 (Letterer-Siwe Disease)、非何杰金氏淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、弥漫淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、高等级 (grade) 淋巴瘤、中等级淋巴瘤、大细胞淋巴瘤、低等级淋巴瘤、混合细胞淋巴瘤、小细胞淋巴瘤、T 细胞淋巴瘤、未分化淋巴瘤、浆细胞瘤、多发性骨髓瘤、网状内皮组织增殖以及肥大细胞肉瘤；混合及复合肿瘤如腺淋巴瘤、多形性显瘤，腺肌瘤，腺肉瘤，腺样鳞状细胞癌，癌肉瘤、肝胚细胞瘤、间质瘤、中胚层混合瘤、缪勒混合瘤、肌上皮细胞瘤、肾母细胞瘤、WAGR 综合征、中胚层肾瘤、肺胚细胞瘤、杆状瘤、子宫内膜基质肉瘤以及胸腺瘤；结缔组织和软组织肿瘤如血管脂肪瘤、血管肌脂肪瘤、脂肪瘤、脂肪肉瘤、髓脂瘤、成软骨细胞瘤、软骨瘤、软骨肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、骨化性纤维瘤、骨巨细胞瘤、成骨细胞瘤、骨软骨瘤、骨软骨瘤病、骨瘤、骨肉瘤、Ewing's 肉瘤、皮肤纤维瘤、纤维性组织细胞瘤、纤维瘤、促结缔组织生成的纤维瘤、骨化纤维瘤、腹部纤维瘤病、攻击性纤维瘤病、纤维肉瘤、皮肤纤维肉瘤、神经纤维肉瘤、肌纤维瘤病、腺纤维瘤、Brenner 肿瘤、纤维性瘤、透明细胞肉瘤、小细胞肉瘤、滑液肉瘤、粒细胞肿瘤、平滑肌瘤、平滑肌肉瘤、肌瘤、横纹肌瘤、肌肉瘤、横纹肌肉瘤、软组织蜂窝状肉瘤、血管肉瘤、脂肪肉瘤、淋巴管肉瘤、粘液肉瘤、叶状肿瘤、以及 Kaposi 肉瘤；生殖细胞和胚胎肿瘤如胚胎瘤、脊索瘤、皮样囊肿、生殖细胞瘤、中肾瘤、神经外胚层瘤、畸胎瘤、畸胎瘤以及滋养层赘生物；腺体和上皮细胞肿瘤如腺瘤和腺癌、基底细胞癌、基细胞痣综合征、Basosquamous 肿瘤、毛基质瘤、浸润性导管癌、非浸润性导管癌、乳腺 Paget's 病、小叶癌、髓样癌、胰管癌、乳腺外 Paget's 病、输乳管内乳突状瘤、粘液腺癌、粘液表皮样癌、印戒细胞癌、Krukenberg 肿瘤、囊腺癌、囊腺瘤、腺瘤样肿瘤、间皮瘤、乳突癌、鳞状细胞癌、疣状癌、乳头状瘤、内翻型乳头状瘤以及囊性间皮瘤；神经上皮细胞肿瘤如神经胶质瘤、星细胞瘤、室鼓膜瘤、神经节神经胶质瘤、神经胶质肉瘤、成神经管细胞瘤、少突神经胶质瘤、视神经胶质瘤、神经细胞瘤、松果体瘤以及视网膜母细胞瘤；生殖腺组织肿瘤如

肾上腺剩余瘤、男性细胞瘤、粒层细胞瘤、睾丸间质细胞瘤、黄体瘤、睾丸支柱细胞瘤以及性索-基质瘤；神经组织肿瘤如脑膜瘤、神经鞘瘤、纤维神经瘤、丛状神经纤维瘤、神经纤维瘤病、神经纤维肉瘤、神经瘤、神经鞘瘤、颅咽管瘤以及神经鞘粘液瘤；血管组织肿瘤如血管纤维瘤、血管角质瘤、血管球瘤、血管瘤、血管内皮瘤以及血管外皮细胞瘤；以及牙源性肿瘤如成釉质细胞瘤、牙骨质瘤、牙源性钙化囊肿以及牙瘤。

其它与异常倍数或细胞DNA大小异常相关的疾病包括Klinefelter's综合征、Turner's综合征、Down综合征、脆性X综合征、Huntington's综合征、3X综合征、4X综合征、5X综合征、XYY综合征、任何包括7、10、11、13、18、21、X和Y的染色体单体性或多体性、类风湿性关节炎以及骨关节炎。

本发明还提供了检测细胞中染色体数量异常的试剂盒。所述试剂盒可鉴定为非整倍剂的化合物或鉴定样品中的染色体数量异常。试剂盒可包括一种标记物，如有丝分裂标记物或定量DNA染料。在优选实施方案中，试剂盒包含有丝分裂标记和定量DNA染料。试剂盒包含其它成分包括附加标记物、检测试剂、缓冲液、固定试剂、渗透试剂、核糖核酸酶、阳性或阴性对照以及获取生物样本的装置。所述试剂盒中还包含使用说明。

本发明还提供了包括有丝分裂标记物以及定量DNA染料的组合物。

本发明可由如下实施例进一步解释说明，但不应局限于此。

除有特别指明，所述本发明操作将使用本领域技术范围内的细胞生物学、细胞培养、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA以及免疫学中的常用技术。这些技术在文献中有全面解释。见例如，Molecular Cloning A Laboratory Manual, 2nd Ed, Sambrook, Fritsch Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1989); DNA Cloning, Volumes I and II (D. N. Glover ed. , 1985); (D. N. Glover ed. , 1985); Oligonucleotide Synthesis(M. J. Gait ed.,1984) ; Mullis等美国专利4,683, 195; Nucleic Acid Hybridization (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Transcription and Translation (B. D. Hames & S. J. Higgins eds. 1984); Culture of Animal Cells (R. I. Freshney, Alan R. Liss, Inc. , 1987); Immobilized Cells And Enzymes (IRL Press, 1986) ; B. Perbal, A Practical Guide To Molecular Cloning (1984); the treatise, Methods In Enzymology (Academic Press, Inc., N. Y.); Gene Transfer Vector For Mammalian

Cells (J. H. Miller and M. P. Calos eds. , 1987, Cold Spring Harbor Laboratory Press); Methods In Enzymology, Vols. 154 and 155 (Wu 等 eds.), Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology (Mayer and Walker, eds. , Academic Press, London,1987); Handbook Of Experimental Immunology, 5 Volumes I -IV (D.M. Weir and C.C.Blackwell, eds.,1986)。

实施例

所述实施例阐述了用双色流式细胞计数来分析细胞, 将所述细胞用所述有丝分裂特异性生物标记, 磷酸化组蛋白 H3(ser-10)6G3 单克隆抗体(H3-P) 10 染色来进行细胞周期分析, 用碘化丙啶染色来进行 DNA 含量评估。由于所述 H3-P 生物标记可将所述有丝分裂 (M) 群与所述间期群 (即 G₀ G₁, S 和 G₂ 期) 区分, 可通过将 DNA 含量分析限于有丝分裂细胞来容易地估计细胞群中, 例如非整倍体和多倍体。使用三种已知非整倍剂 (那可汀, Colcemid[®] 以及灰黄霉素)、一种已知的多倍性但不是非整倍性诱导剂 (细胞松弛素 B) 15 以及一种预期不诱导非整倍性和/或多倍性 (氰化钾) 的毒性化合物处理人类纯化刺激淋巴细胞 24 小时的流出数据见下。所述数据显示使用流式细胞术分析有丝分裂细胞群中染色体数量异常, 例如非整倍性和多倍性可以和分析这些细胞群的标准手工显微镜方法相比。此外, 利用在此所述方法将显著提高分析速度、降低数据变异性以及整体改善对有丝分裂群中数量异常的评 20 估。

实施例 1: 流式细胞计数评估盐酸那可汀处理的人类淋巴细胞培养物中的染色体数量异常

通过肝素化的真空容器 (vacutainer) 管静脉穿刺健康供者来得到人类淋 25 巴细胞。

将来自健康男性和女性志愿者 (<40 岁) 的外周血收集在肝素化的真空容器中。将约 10ml 全血放入一含有 ~ 10ml 无菌磷酸盐缓冲盐水的 Lymphoprep[™]管 (Nycomed Pharma AS Diagnostic, Oslo, Norway) 中。于 2000rpm 离心 20 分钟后, 将所述淋巴细胞群分离并用 PBS (1×) 洗涤。分 30 离的淋巴细胞贮存培养物在 Williams E 培养基中建立 (establish), 该培养基中加入了 10%胎牛血清、100U/ml 青霉素和 100 μg/ml 链霉素、2mM L-谷氨

酰胺以及 1.0%植物凝集素-M (所有试剂来自 Gibco BRL Life Technologies, Inc., Grand Island, NY)。将所述贮存培养物贮存于 37°C, 5%CO₂ 条件约 48 小时。用 0-100 µg/ml 的非整倍剂那可汀 (Sigma Chemicals), 一种已知的非整倍剂在 37°C 处理所述淋巴细胞 24 小时。

- 5 将所述经或未经那可汀处理的淋巴细胞于 1000rpm 离心 6 分钟, 去除所述上清并在 5ml 磷酸盐缓冲盐水 (PBS; GIBCO BRL) 中重悬所述淋巴细胞。然后将所述淋巴细胞离心, 去除所述上清, 并在 0.5ml PBS 中重悬所述细胞。将所述细胞悬液通过 9 寸 Pasteur 吸液管 (Kimble Glass Inc.) 吹吸以确保单个细胞悬液。在涡旋含 -20°C 70% 乙醇 (约 4.5ml) 的试管时, 逐滴加入所述
- 10 细胞悬液。所述乙醇溶液是通过将 30ml 蒸馏水加入 70ml 标准酒精度乙醇 (Pharmco Products) 来制备。然后将所述细胞在乙醇中于 -20°C 贮存至少 24 小时。

所述用于流式分析的样品和对照制备如下。

(1) H3-P (BLANK)

- 15 然后将所述于 -20°C 贮存至少 24 小时的细胞离心, 去除所述上清, 并在 1-3ml 0.1%PBS/Tween80 中重悬所述细胞颗粒。制备该后者溶液是将 1ml Tween80(Sigma Chemicals)与 1000ml PBS 混合。于室温孵育所述细胞 10-15 分钟。然后离心所述细胞, 去除所述上清, 并在 400 µl H3-P 抗体溶液原液 (Cell Signaling Technology product No.9706L; 通过将 36 µl 抗体与 14.4ml
- 20 PBS 混合以 1: 400 稀释所述抗体) 中重悬所述细胞颗粒。于 37°C 孵育所述细胞 40 分钟。将 5ml PBS 加入所述细胞, 将所述细胞离心, 去除所述上清, 并在 1ml PBS 中重悬所述细胞颗粒。将所述细胞如此贮存直至进行分析。

(2) H3-P+PI (RED):

- 25 用上述 H3-P 抗体染色于 -20°C 贮存至少 24 小时的细胞作为“空白”对照。在与所述抗体孵育 40 分钟后, 将 5ml PBS 加入所述细胞, 将所述细胞离心, 去除所述上清并在 1ml 碘化丙啶/核糖核酸酶 A 染料中重悬所述细胞颗粒。制备该后者溶液是通过将 4mg 核糖核酸酶 A(BD Clontech Product No. 4030-1)与 75 µl 碘化丙啶(Molecular Probes product No. P-3566 at 1mg/ml)于 20ml PBS 中混合。将所述细胞冰上贮存直至进行分析。

- 30 (3) H3-P+Alexa (GREEN):

用上述 H3-P 抗体染色于 -20°C 贮存至少 24 小时的细胞作为“空白”对

照。在与所述抗体孵育 40 分钟后，将 5ml PBS 加入所述细胞，将所述细胞离心，去除所述上清并在 400 μ l Alexa fluor488 羊抗鼠 IgG(H+L)偶联物 (2mg/ml)中重悬所述细胞颗粒。所述 Alexa fluor 试剂是通过将 13.5 μ l Alexa (Molecular Probe product No.A-11011) 加入到 13.5ml PBS 中来制备并避光
5 贮存。于 37 $^{\circ}$ C 孵育所述细胞 30 分钟。然后将 5.0ml PBS 加入所述细胞，将所述细胞离心，去除所述上清，并在 1.0ml PBS 中将所述细胞颗粒重悬。将所述细胞冰上贮存直至进行分析。

(4) H3-P+Alexa+PI (DUAL COLOR) 用于对照和处理的培养物:

用上述 H3-P 抗体和 Alexa Fluor 染色于 -20 $^{\circ}$ C 至少贮存 24 小时的所述细
10 胞作为 H3-P+Alexa (GREEN) 染色细胞。在所述细胞与所述 Alexa Fluor 于 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后，在所述细胞中加入 5 ml PBS，将所述细胞离心，去除所述上清，在 1.0ml PI/核糖核酸酶 A 染料 (如上所述) 中将所述细胞颗粒重悬。将所述细胞冰上贮存直至进行分析。

使用 Becton Dickinson(BD)流式细胞仪 (488 氩激光器) 分析所述细胞，
15 该仪器按照下述方法校准。将 1ml 鞘液 (FACSFlow, Becton Dickinson Product No. 340398) 加入有盖的 12 \times 75mm Falcon 5ml 聚苯乙烯圆底试管 (Product No.35205) 中。将 3ml 鞘液加入另一有盖的 12 \times 75mm Falcon 5ml 聚苯乙烯圆底试管中。每管中加入一滴未标记的 CaliBRITETM 珠 (Becton Dickinson Product No.349502)，在加入此滴前已将所述未标记珠颠倒数次。将所述第
20 一个试管标记为管 A。在第二个 5ml 试管 (管 B) 中加入每滴都有异硫氰酸荧光素 (FITC) 和 CaliBRITETM 藻红蛋白 (PE) 的标记珠。在启动仪器前，开启 (filed) 鞘液槽并清空废液箱。必要时可使用鞘液冲洗真空线。开启所述细胞计数器，预热约 10 分钟。开启所述计算机并打开所述 FACSComp 软件 (Becton Dickinson Apple Systems 7.5.3Version 4.0)。

25 所述校准过程如下。在所述 Set-Up 页输入所述 CaliBRITETM 珠的批号信息。将所述细胞计数器设定为高速并从待机转为运行。将所述细胞计数器中装有水的 5ml 试管取出，并在所述细胞计数器中放入未标记珠 (管 A)。选择“运行”以使未标记珠设定所述 PMTs。该过程结束后，将管 A 取出，用管 B 替换。选择“运行”以使所述混合珠设定荧光补偿 (compensation) 和
30 灵敏度检测。将管 B 取出，并用装有水的 5 ml 试管替换。将所述细胞计数器转为待机并打印所述校准报告。

如下开始用所述仪器测定有丝分裂细胞的存在以及 DNA 分析。打开 CellQuest™ 软件 (Becton Dickinson, Version 3.1)。在所述获得 (Acquire) 菜单中选择选项“选择连接到细胞计数器”，在所述获得菜单中选择选项“选择采集和贮存”。设定事件数量为 10,000 个 (默认)。然后退出所述选项“选择采集和贮存”。

5 在所述获得菜单中选择选项“选择参数说明”。在参数说明窗口中，选择文件菜单、文件保存位置以及参数标记。在所述获得菜单中选择所述选项“选择计数器”以观察事件速率、全部事件以及采集中流失的时间。在细胞计数器菜单中选择选项“选择检测器/Amps”以选择每种参数的放大模式 (lin 或 log)。在选择菜单“从细胞计数器选择补偿”来调整样品

10 补偿。

如下获得采集点图和柱状图。在所述工具条中选择“点图和柱状图”，设定如下：

1. 采集点图：(X) PARAMETER = FSC-高 1024 FSC (LIN 刻度)，(Y) PARAMETER = SSC-高 1024 (LIN 刻度)，缺无关，在 OPTIONS 下将 SHOW

15 设定为 2000 点然后关闭。

2. 采集柱状图：PARAMETER=FL1-高 1024 (H3-P)，LOG 刻度，缺无关，在 OPTIONS 中将 MANUAL SCALE 设定为 50，SHOW 设定为 2000 事件然后关闭。

3. 采集柱状图：PARAMETER=FL2 高 1024 (PI)，LOG 刻度，缺无关，

20 在 OPTIONS 中将 MANUAL SCALE 设定为 50，SHOW 设定为 2000 事件然后关闭。

4. 获取柱状图：PARAMETER=FL2-区 1024 (PI)，缺无关，在 OPTIONS 中将 MANUAL SCALE 设定为 200，SHOW 设定为所有事件然后关闭。

5. 采集点图：(X) PARAMETER=FL2-区 1024 (PI) LIN 刻度，(Y)

25 PARAMETER=FL2-宽 1024 (PI) LIN 刻度，缺无关 (其后设定)，在 OPTIONS 中将 SHOW 设定为所有点然后关闭。

6. 采集点图：(X) PARAMETER=FL2-区 1024 (PI) LIN 刻度，(Y) PARAMETER=FL2-宽 1024 (H3-P) LOG 刻度，缺无关 (其后设定)，在 OPTIONS 中将 SHOW 设定为 5000 点然后关闭。

30 如下获取样品。将所述细胞计数器设定为在 LOW 速 RUN，然后将所述 BLANK (无染料) 样品放到该细胞计数器上。在看到 FSC/SSC 点图面板时，

在检测器/Amps 窗口中，通过电压设定调整 FSC 和 SSC 参数，直至点图上的 BLANK 细胞样品以约 45 度角对角出现于窗口中。所述细胞样品的基线位置尽可能接近轴线交叉 0 点。继续调整所述电压直至所有或大部分细胞出现于视野中。然后可见 FL1-高柱状图，增加或降低所述 FL1 检测器的电压直至在柱状图面板的左象限可见所述 BLANK 细胞样品。调整所述电压使细胞样品尽可能接近所述图的轴线交叉 0 点（所述峰均在所述轴的左侧）。然后观察所述 FL2-高柱状图，增加或降低所述 FL2 检测器的电压直至在柱状图面板的左象限可见所述 BLANK 细胞样品。调整所述电压使细胞样品尽可能接近所述图的轴线交叉 0 点（所述峰均在所述轴的左侧）。

- 10 将所述 BLANK 样品取出并用所述 GREEN (Alexa Fluor) 样品替换。在看到所述 FL1-高柱状图时，调整所述 FL1 检测器的电压以使细胞样品峰尽可能接近所述点图的轴线交叉 0 点（在所述图中应可见整个细胞峰）。在看到所述 FL2-高柱状图时，必要时调整所述补偿 (FL2-% FL1)。在所述柱状图中只有一个峰，其非常接近轴线交叉 0 点。当出现第二个小峰时，补偿值增加直至该第二个峰消失。

- 15 将所述 GREEN 样品取出并用所述 RED (PI) 样品替换。当看到所述 FL2-高柱状图时，调整 FL2 检测器的电压以使 RED 细胞样品峰值在 X 轴上超过 10^3 。在所述 FL2-区柱状图和 FL2-区/FL1-宽点图中，这种调整使所述 RED 细胞样品的 G1 峰超过 X 轴点 200。在看到所述 FL-1-高柱状图时，必要时调整所述补偿 (FL1-% FL2)。在柱状图中只有一个峰，并且该峰非常接近轴线交叉 0 点。当出现第二个小峰时，补偿值增加直至该第二个峰消失。

- 20 将所述 RED (PI) 样品取出并用 DUAL COLOR (Alexa 和 PI) 样品替换。最后调整所述电压以使 DUAL COLOR 细胞样品的 G1 峰在 FL2-区柱状图上超过 X 轴的整数 200。这使得所述细胞样品在 FL2-区/FL2-宽点图上超过点 200。以设置模式获取 2000-4000 细胞以鉴定所述循环群（该群在未经处理的细胞中在 X 轴上跨度由 200 到 400）。设定一关以测定 DNA 分布，其通过从所述循环群左侧少量开始然后继续到所述点图的右侧远区，于第二 Y 轴结束关。将此关扩展到所述点图的第二 Y 轴是为了容纳多于 4n DNA 的细胞。选择 FL2-区 (PI) /FL1-高 (H3-P) 采集点图并在工具条上选择格式点图。选择关 G1=R2。这种调整可使采集过程中的有丝分裂细胞可见。所述有丝分裂群直接出现在所述 G2 群的上方，因两者都含有 4n DNA。
- 25
- 30

将仪器的设定模式退出到获取模式。启动 DNA 分析的采集并获取 10,000 未过关的细胞。获取经处理的样品后,可观察 X 轴上所述 G1 峰的移动以及所述循环细胞群的扩展,这样如果所述细胞的循环群落在所述点图终点外,之后为采集非整倍性和多倍性将所述 FL2 电压降低(在 DNA 获取之后)。

- 5 按需最优化每个样品的 FL2 电压(即将所述 G1 峰保持在 FL2-A X 轴的 200)以获取非整倍性和多倍性。从每个样品获取 50,000 个未过关细胞。将此数据保存在列表模式。

- 如下确定淋巴细胞中非整倍体和多倍体细胞的存在。打开 CellQuest™ 软件,在工具条中 PLOT (绘图) 并 OPEN (打开) 一个对话框以创建一个点图。选择 FILE 并打开一个数据文件。设定 PARAMETERS 来鉴定所述“循环细胞群”: (X) = FL2-区 1024 (PI) (Y) = FL2-宽 1024, OPTIONS 显示 SHOW 100%, 缺无关。所述点图扩展到纸的宽度。为 DNA 分布设定一关,其通过由循环群的左侧少量开始然后继续到所述点图的右侧远区,于第二 Y 轴结束关。将此关扩展到所述点图的第二 Y 轴是为了容纳多于 4n DNA 的细胞。(见图 1A)。在工具条中 PLOT 并 OPEN 一个对话框以创建一个点图。设定所述 PARAMETERS 来鉴定所述“循环细胞群”: (X) = FL2-区 1024 (PI) (Y) = FL1-高 1024 (H3-P), OPTIONS 显示 SHOW 100% 并将关设定在 G1=R1。

- 使用所述间期细胞作为向导,在所述 G0G1-S 期区域上方的有丝分裂细胞区域设定第一关。然后从所述第一关终点开始,在 G2 区域(即 4n DNA 细胞,其为有丝分裂细胞中数量最多的群)上方的有丝分裂细胞设定第二关。从所述第二关的终点开始,在估计的下一个细胞周期的 G0G1-S 期设定第三关。为估计这个范围用所述 G2 (X) 轴值作为向导,二倍该值即可鉴定下个细胞周期的大概 G2 区域,例如,如果 G2 位于 X 轴 400 (第一个周期),则循环的 G2 细胞的第二个群应出现于 X 轴上约 800 (见图 1)。在工具条中选择 STATS 并选择 REGION GATE。软件自动计算所述点图中每个过关区域的过关群%:

区域 (ID): 关 (1): 区域 1 (R1) = 循环细胞群

关 (2): 区域 2 (R2) = 亚二倍体有丝分裂群

关 (3): 区域 3 (R3) = 正常有丝分裂细胞

30 关 (4): 区域 4 (R4) = 超二倍体有丝分裂群

关 (5): 区域 5 (R5) = 多倍体有丝分裂群

图 2B 为区域统计的实施例。

区域:

R1=区域 1; 过关间期细胞

5 R2=区域 2; DNA 含量 (DNA >2n 但 <4n) 的过关有丝分裂细胞 (亚二倍体细胞群)

R3=区域 3; DNA 含量 4n 的过关有丝分裂细胞 (正常细胞群)

R4=区域 4; DNA 含量 >4n 但 <8n 的过关有丝分裂细胞 (超二倍体细胞群)

10 R5=区域 5; DNA 含量 8n 的过关有丝分裂细胞 (多倍体细胞群)

计算:

1. 亚二倍体细胞频率(%):

$$\text{亚二倍体细胞}\% = R_2 / (R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 100$$

2. 超二倍体细胞频率(%):

15

$$\text{超二倍体细胞}\% = R_4 / (R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 100$$

3. 多倍体细胞频率

$$\text{多倍体细胞}\% = R_5 / (R_2 + R_3 + R_4 + R_5) \times 100$$

如下分析 DNA。为此目的用 MODFIT *LT* 软件 (Verity Software House, Version 3.0 Topsham, Maine)。在工具条中选择 FILE 并选择数据文件。在“选择分析参数”对话框中选择 P6 FL2 A。在“选择关”对话框中留下所述框不检查。在工具箱中选择 MOD。在“编辑手工分析特性”对话框中选择如下: 自动残骸 (检查的), 自动聚集物 (检查的), 细胞凋亡 (未检查的), 线性设为 2.00, 标准 (0), 模型模板=二倍体, 应将区域位置设定在“计算区域位置”。在工具箱上所述 RANGE 按钮呈现凹陷 (被激活)。自动鉴定所述 G1 和 G2 峰 (见图 3)。在工具条中选择 FIT 并且通过 MODFIT *LT* 软件确定 G1%, G2% 以及 S 相细胞% (见图 3)。

25

图 2 所示为流式细胞术分析经那可汀, 一种非整倍性诱导剂处理的人类淋巴细胞的结果。阴性对照, 即未经那可汀处理的淋巴细胞的分析结果见图 1。所述结果表明经过那可汀处理的细胞群中存在亚二倍体细胞 (R2 象限内)。

30

正常二倍体细胞 (R3 象限内)、超二倍体细胞 (R4 象限内) 以及多倍体细胞 (R5 象限内)。在未经那可汀处理的细胞群中未发现异常细胞 (即在 R2、R4 和 R5 中观察到的细胞) 的增加。亚二倍体细胞是指具有的 DNA 少于正常细胞的细胞, 而超二倍体细胞是指具有的 DNA 多于正常细胞的细胞。

- 5 因此, 该实施例表明用所述流式细胞术分析经有丝分裂标记染色的细胞和定量 DNA 染料染色的细胞可清楚地鉴定有染色体含量数量异常的细胞。

实施例 2: 比较流式细胞计数与手工分析在经那可汀处理的培养的人类淋巴细胞中的染色体异常频率

- 10 该实施例显示本文所述对染色体数量异常的细胞计数分析可得到与传统的手工分析染色体数量异常相似的结果。

对于经或不经上述的那可汀处理的上述人类淋巴细胞, 使用手工方法分析染色体数量异常, 以与实施例 1 中获得的染色体数量异常 (即多倍性) 的细胞数进行比较。在手工分析中, 于 1000 rpm 离心细胞样品 6 分钟。去除
15 所述上清并在 5ml 1% 预热 (37°C) 的柠檬酸钠中重悬所述细胞颗粒。该后者溶液是通过将 1g 柠檬酸 (Sigma Chemicals) 与 100ml 蒸馏水混合来制备。如上述立即离心所述细胞。去除所述上清并在 5ml 4°C 固定剂 (3: 1 甲醇:
20 醋酸) 中强力重悬所述细胞颗粒。然后将细胞如上述方法离心并在 5ml 4°C 固定剂 (3: 1 甲醇: 醋酸) 中重悬所述颗粒。然后于 -20°C 贮存所述细胞过夜或贮存至用于玻片制备。

制备所述玻片如下。如上述离心所述细胞然后弃所述上清。将在约 2ml 新鲜固定剂溶液中重悬所述细胞。将该悬液滴于湿冷玻片上, 灼烧该玻片以将细胞固定在玻片上。在 2-10% Giemsa (GIBCO, BRL) 溶液中染色所述玻片。

- 25 确定多倍体指数是通过在低放大倍数 (亮视野) 下系统计数 1000 个连续有丝分裂细胞的所述 8n 有丝分裂细胞频率。

图 4 所示的结果表明, 手工计数与通过流式细胞计数估计所计数的在每个那可汀浓度下的多倍体细胞数结果相似。因此, 所述流式细胞计数分析提供的数据与计数多倍体细胞的所述传统方法所得到的基本相同。

- 30 实施例 3: 流式细胞计数分析经 KCN 处理的人类淋巴细胞中的染色体数量异常

在存在/缺无 0 到 0.04 $\mu\text{g/ml}$ 的 KCN(FLUKA Chemicals)时在温度 37°C 孵育上述得到的人类淋巴细胞 24 小时……。图 5 所示结果表明所述异常细胞(亚二倍体、超二倍体或多倍体)的比例为能预期的最小,因为 KCN 已经已知不会诱导数量异常。

5

实施例 4: 流式细胞计数分析经细胞松弛素 B 处理的人类淋巴细胞中的染色体数量异常

在存在/缺无 0 到 6 $\mu\text{g/ml}$ 细胞松弛素 B (SIGMA Chemicals) 时在温度 37°C 孵育上述得到的人类淋巴细胞 24 小时。图 6 所示结果显示,超二倍体细胞的比
10 例最小,而亚二倍体和多倍体细胞数如预期一样多,因为已知细胞松弛素 B 主要诱导多倍性。

实施例 5: 流式细胞计数分析经 Colcemid[®]处理的人类淋巴细胞中的染色体数量异常

在存在/缺无 0 到 0.04 $\mu\text{g/ml}$ Colcemid[®] (GIBCO BRL) 时在温度 37°C 孵育上述得到的人类淋巴细胞 24 小时……。图 7 所示结果显示,超二倍体和亚二倍体细胞的百分比增高,并且多倍体细胞数如预期一样多,因为已知 Colcemid[®]诱导非整倍性。

实施例 6: 流式细胞计数分析经灰黄霉素处理的人类淋巴细胞中的染色体数量异常

在存在/缺无 0 到 100 $\mu\text{g/ml}$ 灰黄霉素 (Sigma Chemicals) 时在温度 37°C……孵育上述得到的人类淋巴细胞 24 小时的时间……。图 8 所示结果显示,超二倍体、亚二倍体和多倍体细胞的百分比如预期一样高,因为已知灰黄霉素诱导非整倍性。
25

实施例 7: 流式细胞计数分析经那可汀处理的人类淋巴细胞中的染色体数量异常

在存在/缺无 0 到 100 $\mu\text{g/ml}$ 那可汀 (Sigma Chemicals) 时在温度 37°C 孵育上述得到的人类淋巴细胞 24 小时的时间。图 8 所示结果显示,超二倍体、亚二倍体和多倍体细胞的百分比如预期一样高,因为已知那可汀诱导非
30

整倍性。

等同

本领域技术熟练者可识别或确定使用不超出常规的实验方法，很多本发明在此所述的具体实施方案的等同。以下的权利要求应包含这些等同。

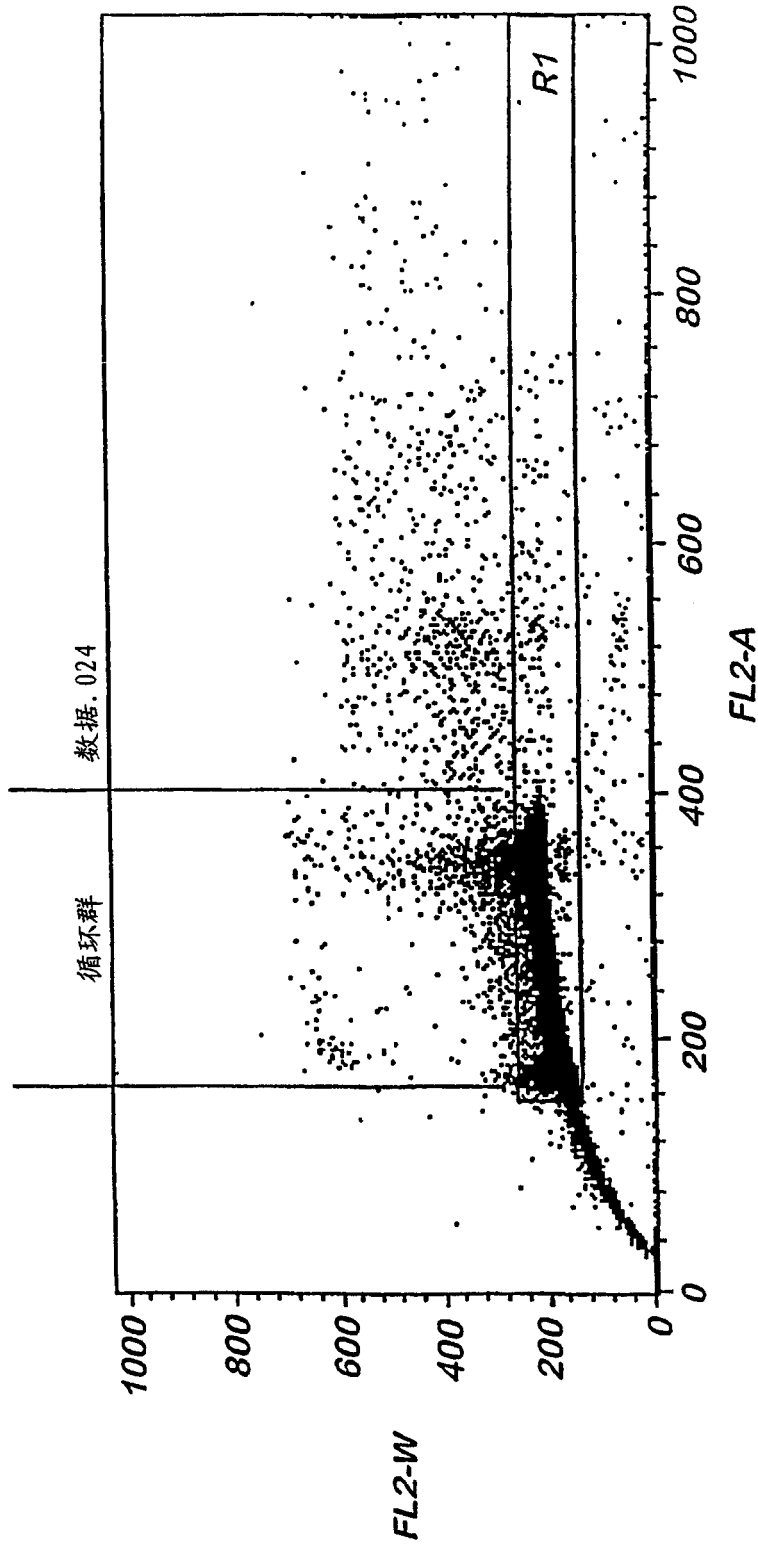


图 1A

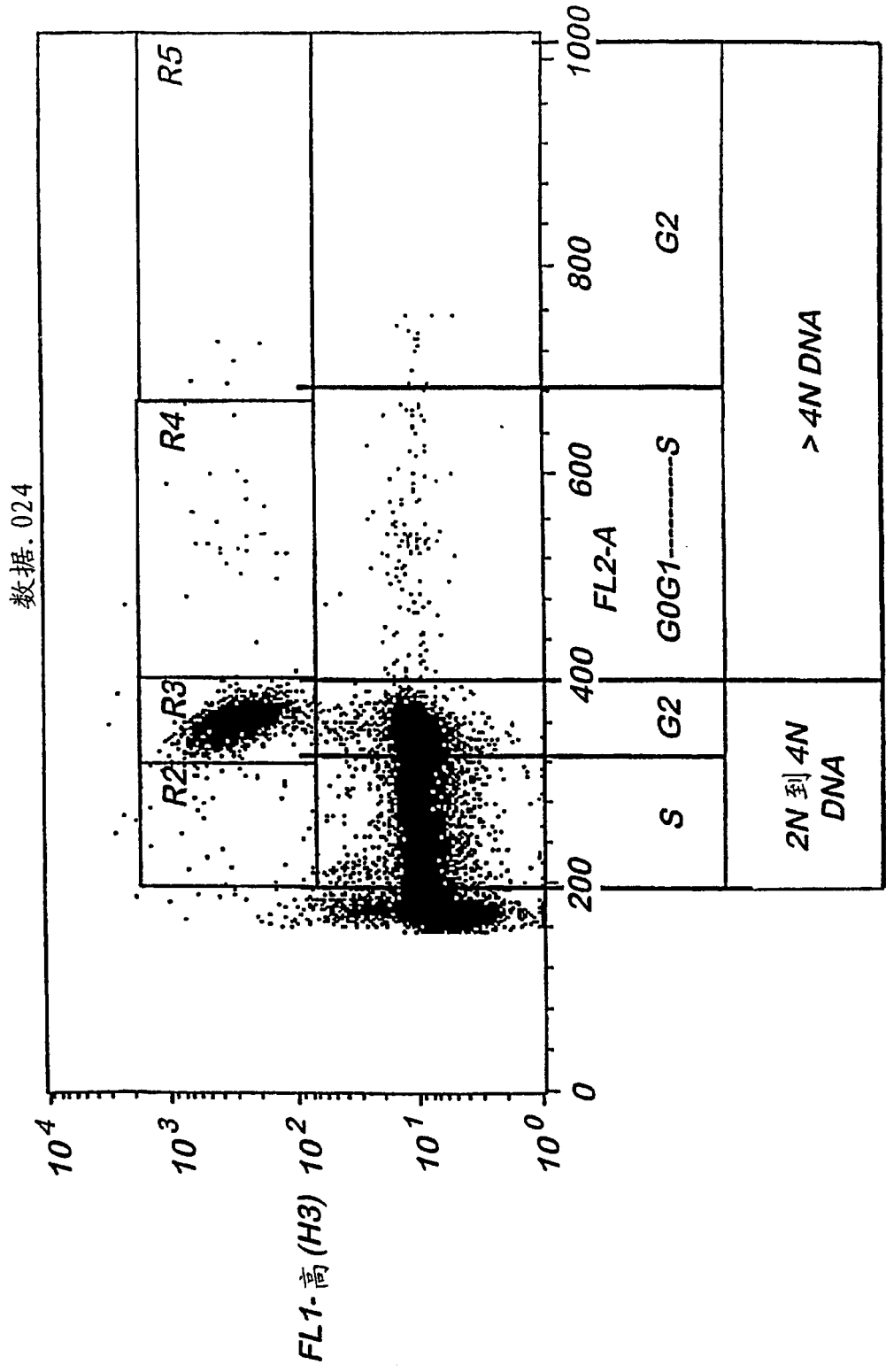
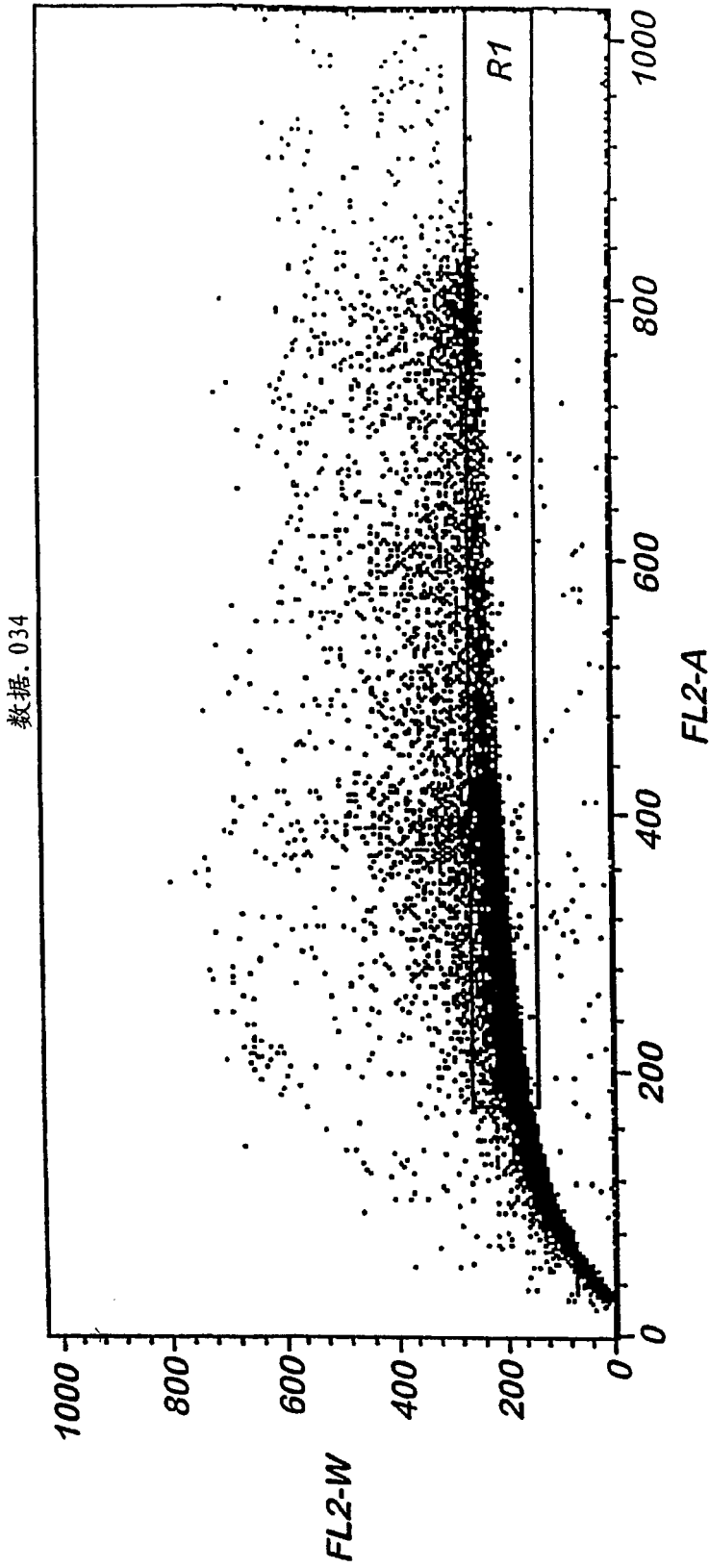


图 1B



对数值单位: 线性值
 关: G1
 总事件: 50000
 Y参数: FL1-H FL1-高(H3) (对数)

区域统计

文件: 数据.034
 采集日期: 02-Nov-01
 过关事件: 24678
 X参数: FL2-A (线性)

区域	事件	过关百分比	总百分比
R1	24678	100.00	49.36
R2	117	0.47	0.23
R3	2059	8.34	4.12
R4	215	0.87	0.43
R5	359	1.45	0.72

图 2A

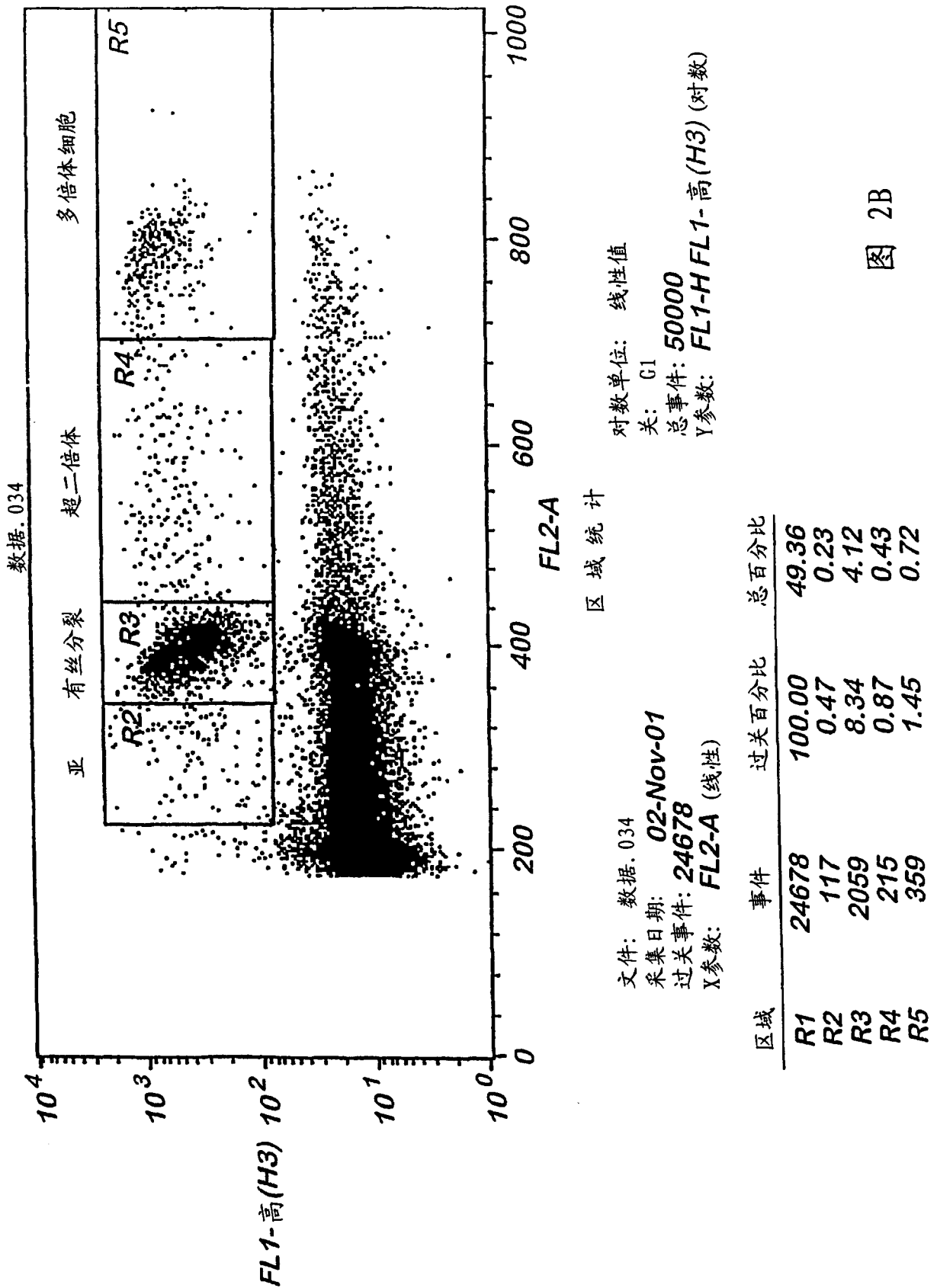


图 2B

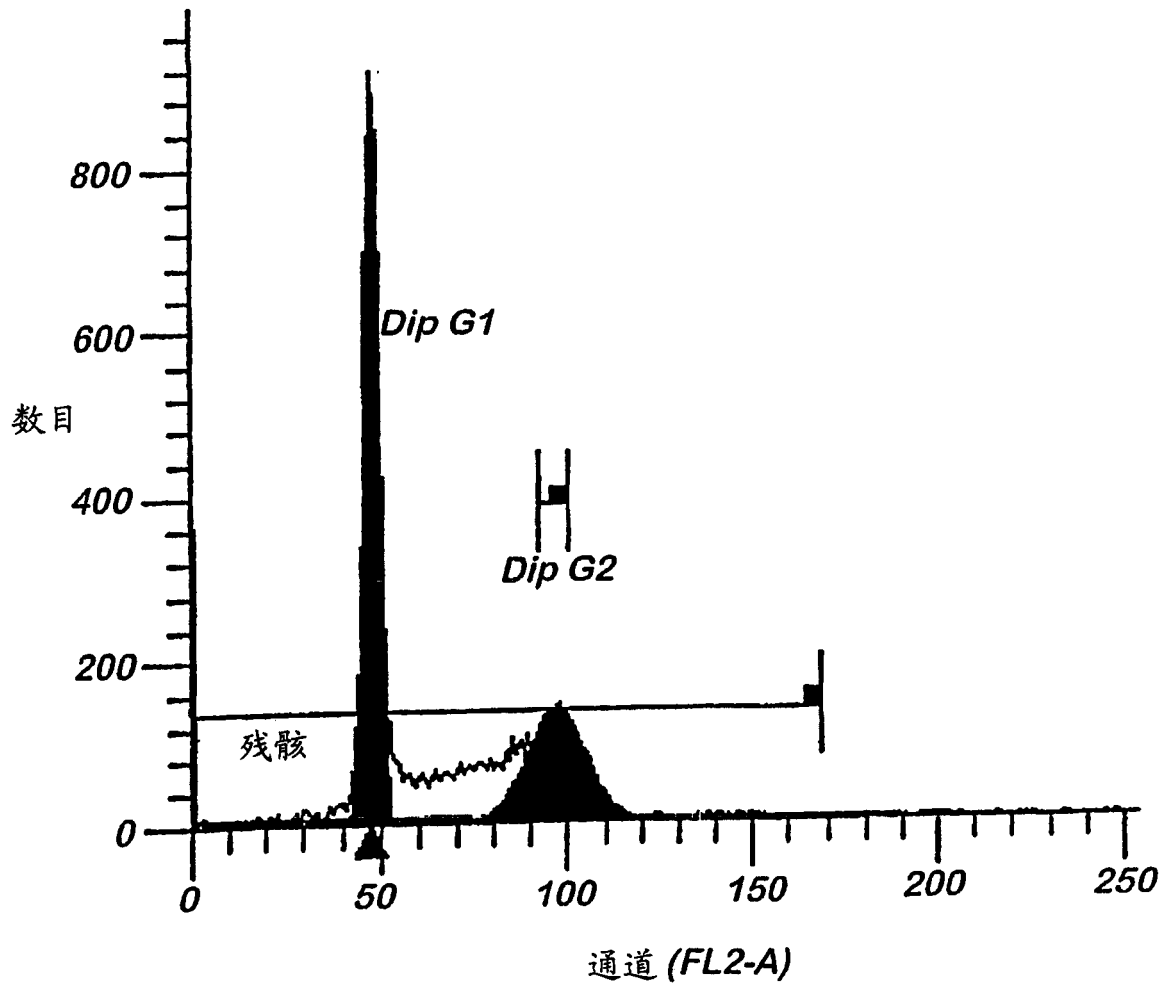


图 3A

残骸
 聚集体
 Dip G1
 Dip G2
 Dip S

所分析文件: 数据.002
 所分析日期: 10-Sep-2002
 模型: 1DA0n_DSF
 分析种类: 手工分析

二倍体: 100.00 %
 Dip G1: 49.32 % 在 48.09
 Dip G2: 12.14 % 在 97.98
 Dip S: 38.54 % G2/G1: 2.04
 % CV: 3.89

总S期: 38.54 %
 总 B.A.D.: 5.64 %

残骸: 7.94 %
 聚集体: 4.76 %
 模型事件: 9204
 所有周期事件: 8035
 每通道周期事件: 158
 RCS: 1.689

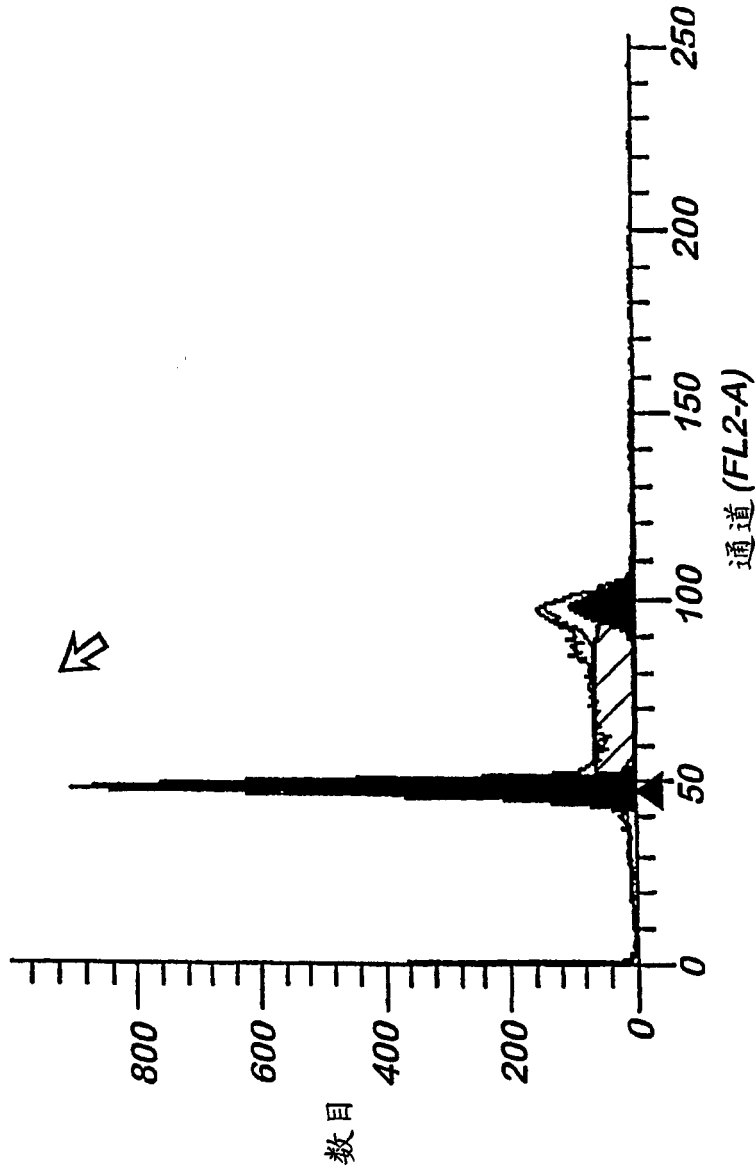


图 3B

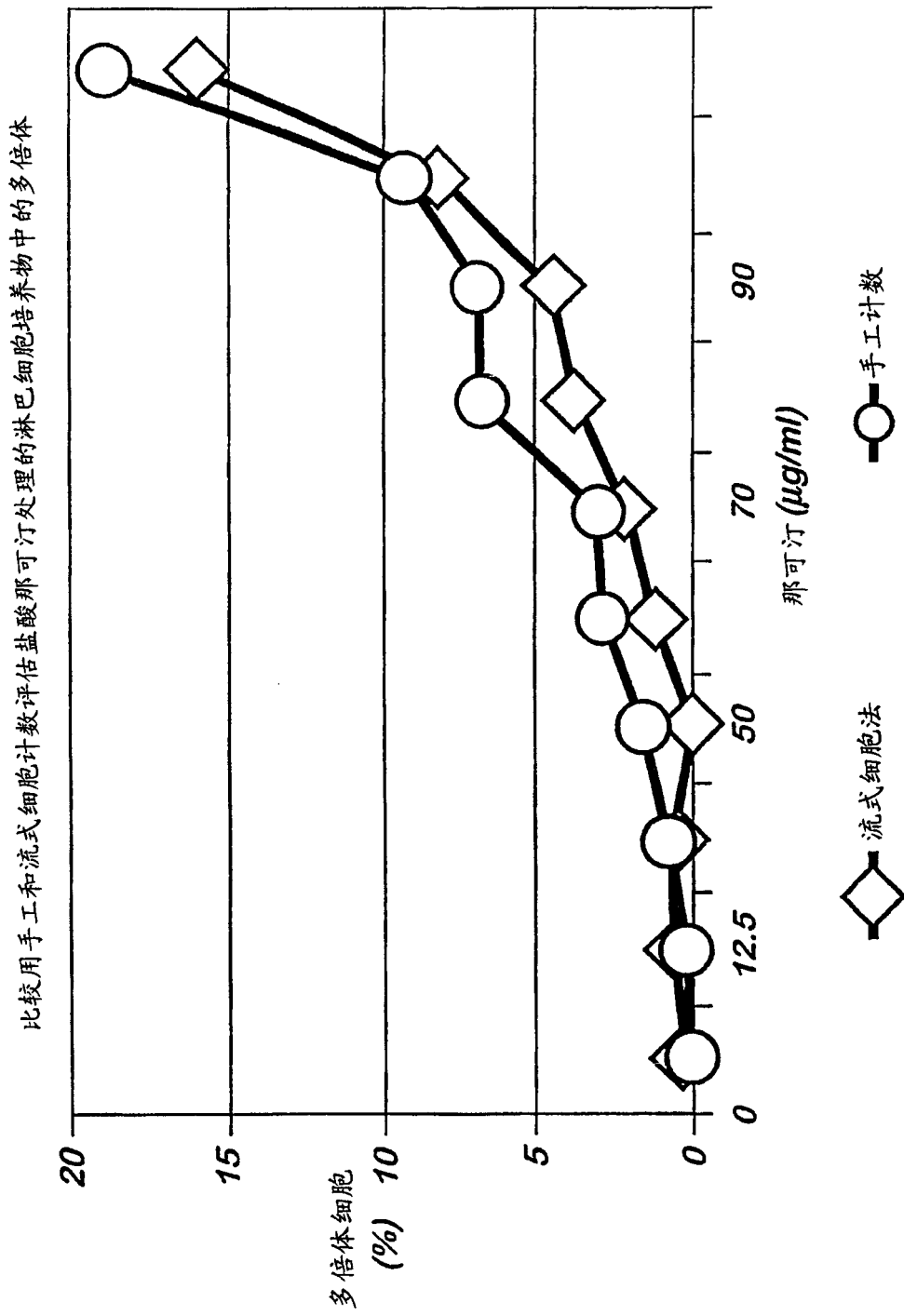


图 4

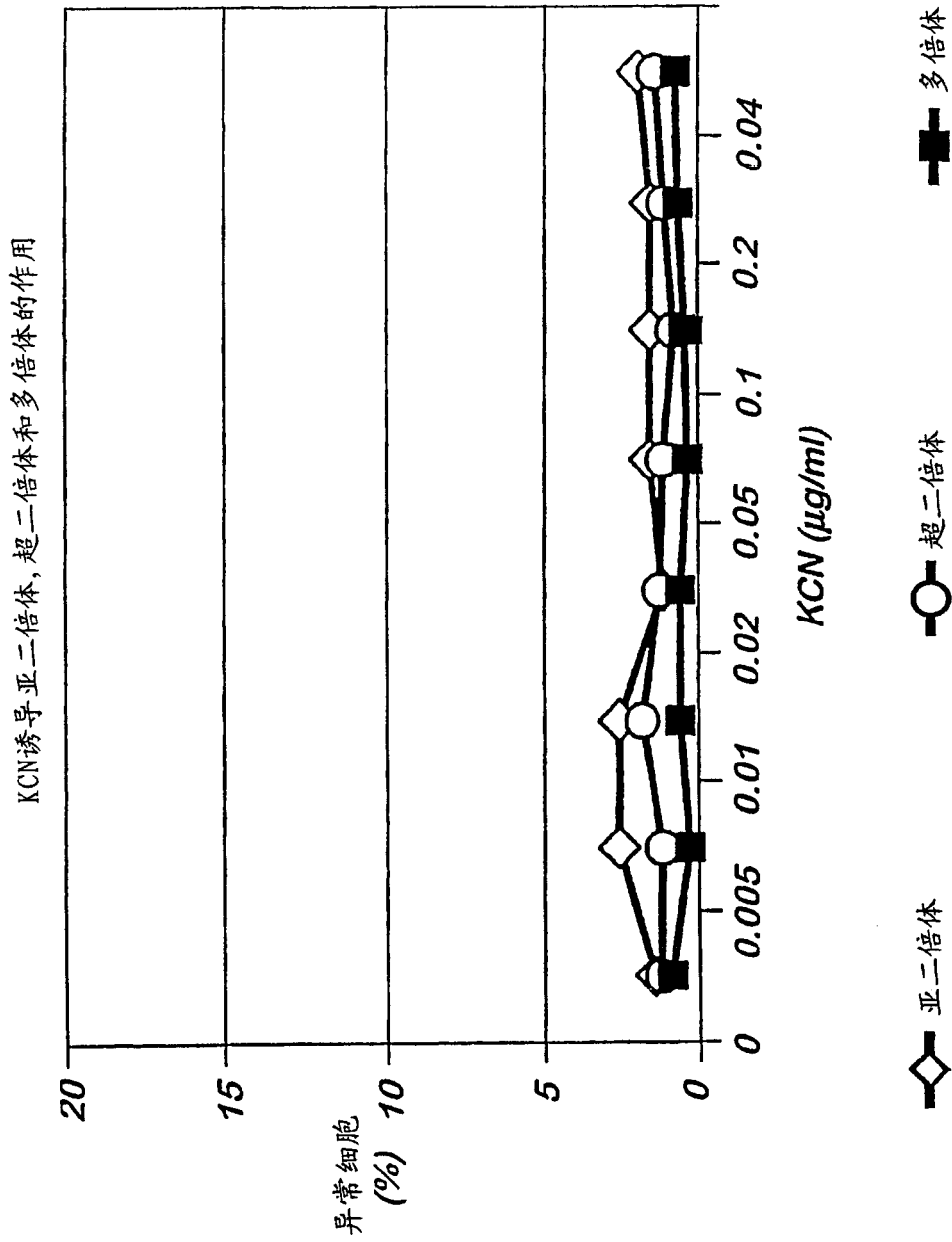


图 5

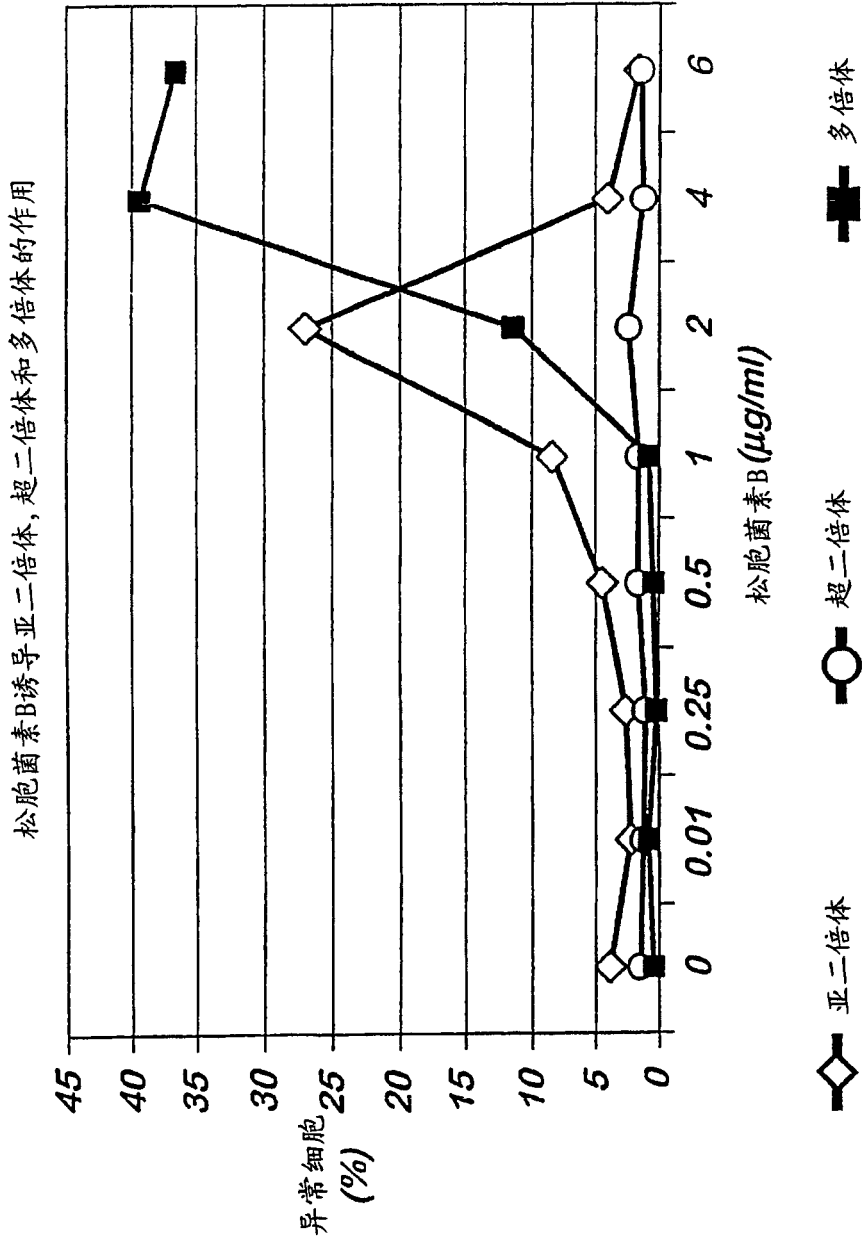


图 6

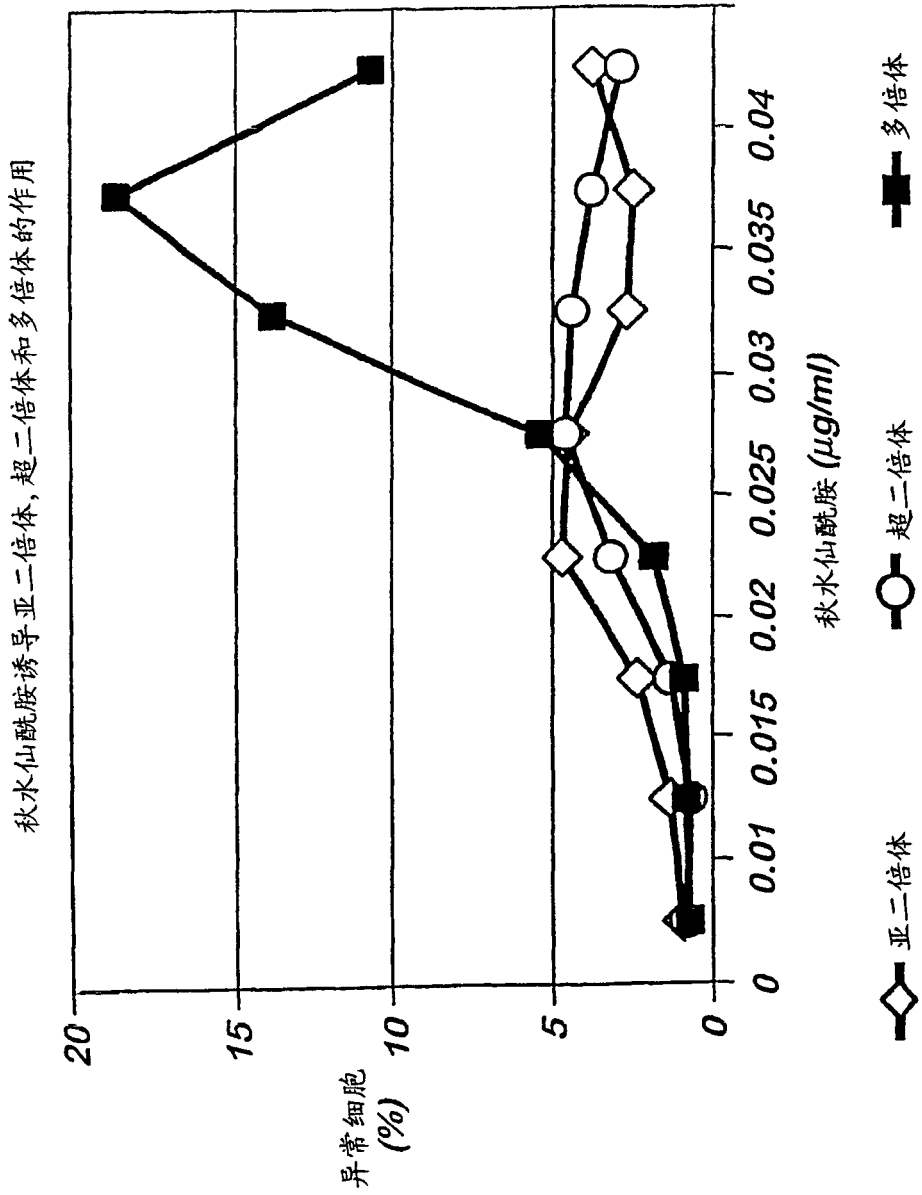


图 7

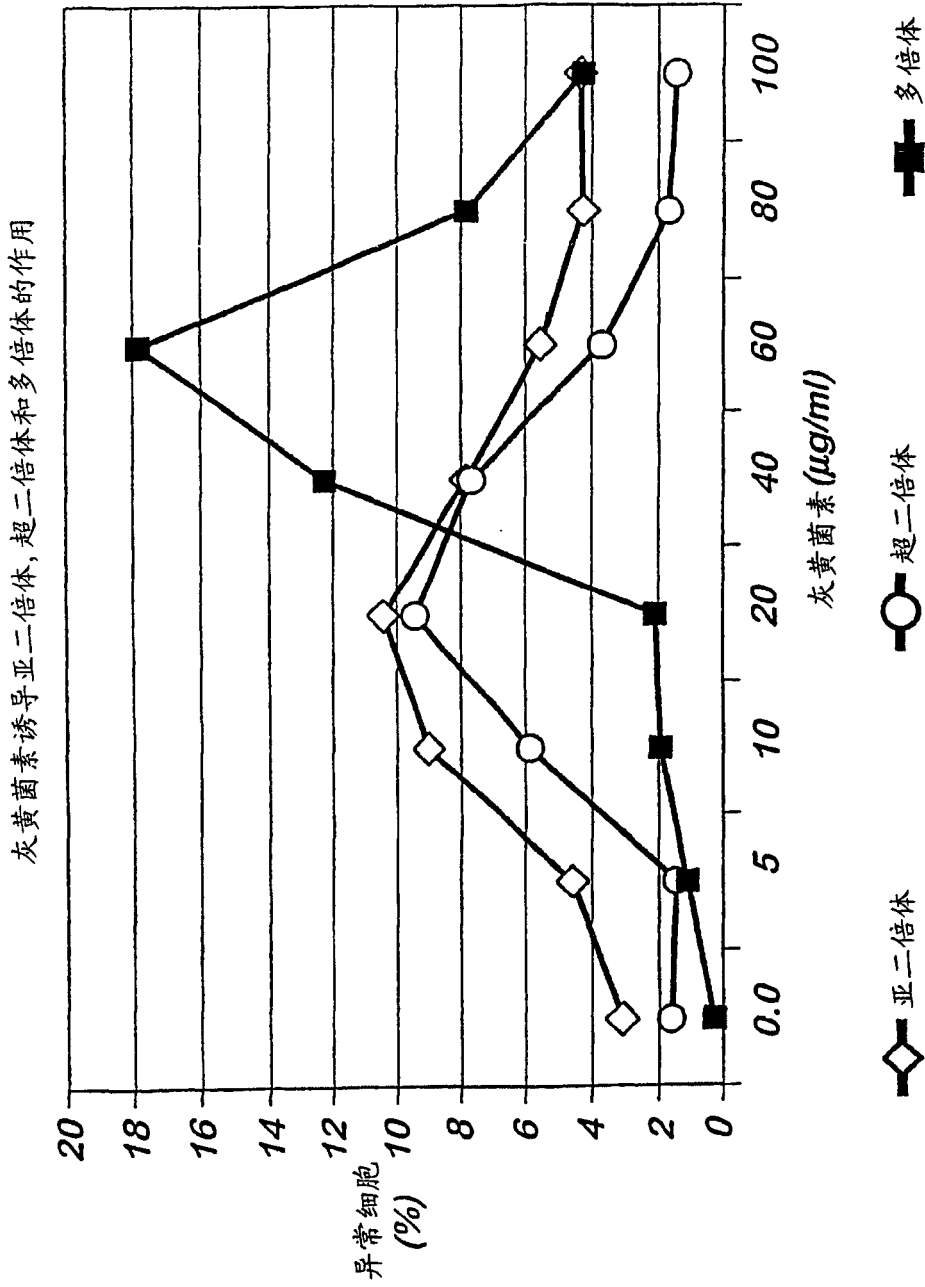


图 8

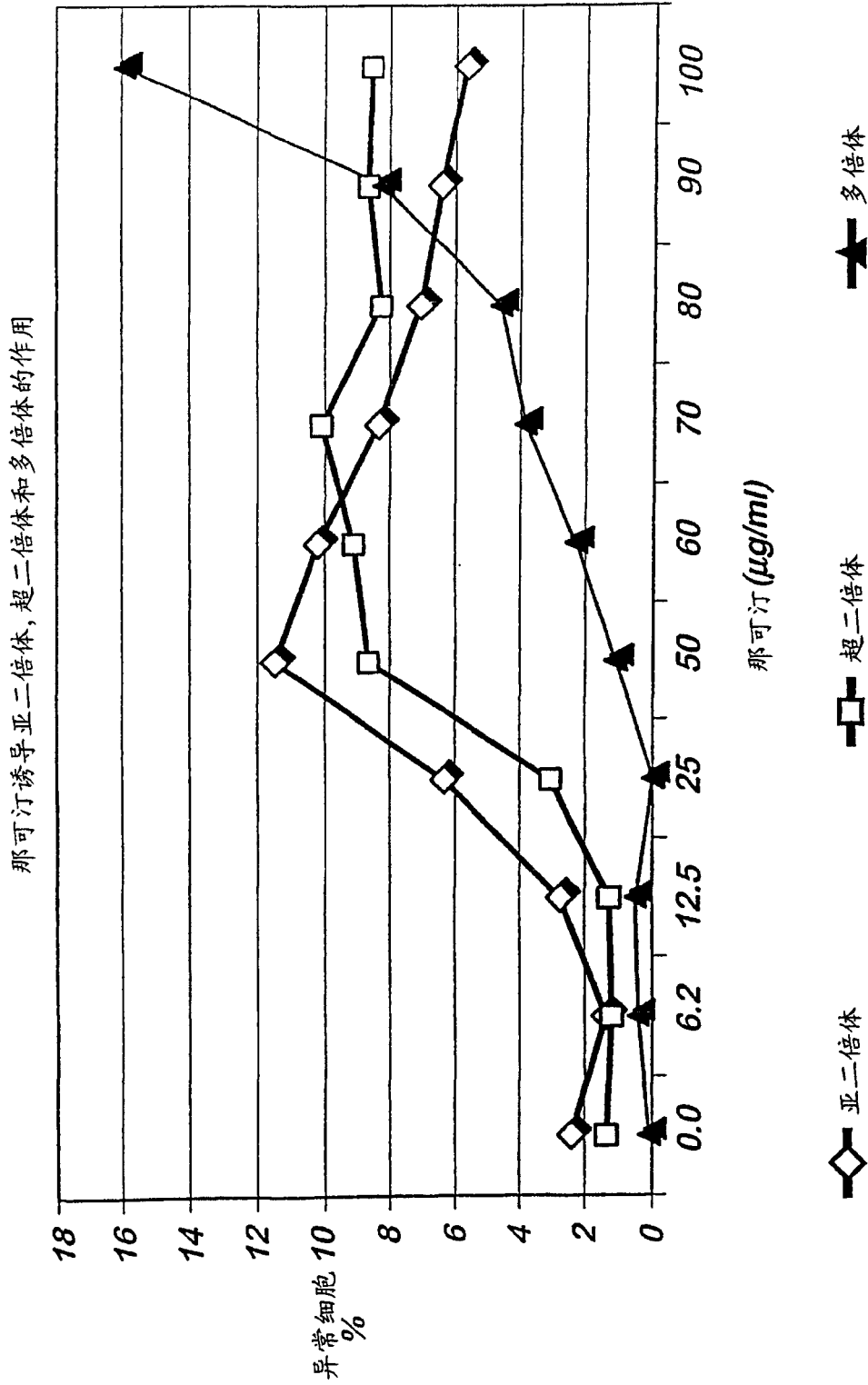


图 9

专利名称(译)	检测染色体数量异常细胞的方法		
公开(公告)号	CN1606628A	公开(公告)日	2005-04-13
申请号	CN02823987.3	申请日	2002-11-20
[标]申请(专利权)人(译)	美国辉瑞有限公司		
申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
当前申请(专利权)人(译)	辉瑞产品公司		
[标]发明人	葆拉A米尔鲍尔 老梅克J舒勒		
发明人	葆拉·A·米尔鲍尔 老梅克·J·舒勒		
IPC分类号	G01N33/50 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6875 C12Q1/6827 G01N33/5008 G01N33/502 G01N33/5044 G01N33/5091 G01N2500/10		
优先权	60/337282 2001-11-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了检测染色体数量异常的有丝分裂细胞的方法和诱导细胞染色体数量异常的试剂。在优选实施方案中，所述方法包括用检测有丝分裂细胞的有丝分裂标记和定量DNA染料染色细胞，并显示在所述有丝分裂细胞中的DNA量。优选用流式细胞仪分析染色细胞。

