



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104007257 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 27

(21) 申请号 201310057307. 0

(22) 申请日 2013. 02. 24

(71) 申请人 北京莱尔生物医药科技有限公司
地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
科创六街 88 号院 3 幢五层 609 室

(72) 发明人 詹厅

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

G01N 21/64 (2006. 01)

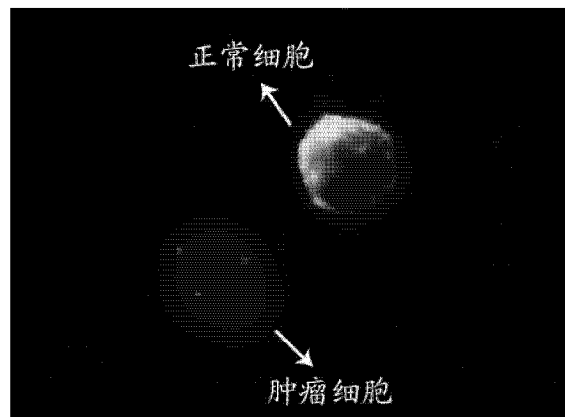
权利要求书2页 说明书21页 附图3页

(54) 发明名称

一种检测非体液性稀有有核细胞的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种对非体液性稀有有核细胞进行检测的新方法,对于多种手段得到生物体液中的非体液性稀有有核细胞,通过联合使用体液性细胞表面标志物的抗体以及非体液性稀有有核细胞的特异性探针,达到鉴别富集后的该稀有有核细胞的目的。相对于目前市场上已有的商品化鉴别方法而言,本方法将处理非体液性稀有有核细胞的荧光原位杂交(FISH)方法与处理体液性有核细胞的免疫荧光染色进行了良好的结合,针对同一张标本片进行系统的结合性处理,能同时并清晰地观察到这两种处理的结果。



1. 一种对非体液性稀有有核细胞进行检测的方法,其包括:
 - a. 用重固定剂重固定待检测样品,
 - b. 在步骤 a 之后,使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理待检测样品,
 - c. 读片,例如在显微镜下读取处理结果。
2. 权利要求 1 的检测方法,其中所述待检测样品是从生物体液富集非体液性稀有有核细胞获得的样品。
3. 权利要求 1 的方法,其中所述非体液性稀有有核细胞是体液中非体液性质的稀有有核细胞。
4. 权利要求 1 的方法,其中所述体液性细胞表面标志物是用于免疫荧光技术的标志物,包括:CD3、CD31、CD34、CD45、CD50、CD69、CD84,或 CD102。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述非体液性稀有有核细胞的特异性探针是用于荧光原位杂交(FISH)的探针。
6. 权利要求 1 的方法,步骤 b 为以下的任一种:
 - (i): 先用体液性细胞表面标志物的抗体处理,再用非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理;
 - (ii): 先用非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理,再用体液性细胞表面标志物的抗体处理;
 - (iii): 同时使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理;
 - (iv): 交替使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理,或包含(i)至(iii)中两种、三种或四种的组合。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述重固定剂选自戊二醛、甲醛、丙酮、甲醇、乙醇、醋酸、丙烯醛、醋酸铀、铬酸、苦味酸,或其组合,优选为多聚甲醛为 0.2-8% (W/V),更优选 0.8-5% 多聚甲醛,最优选 1.0-4% 多聚甲醛。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述方法用于非治疗用途。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述非治疗用途包括:用于科研目的的非体液性稀有有核细胞计数,用于非体液性稀有有核细胞遗传信息的研究平台。
10. 一种用于检测稀有细胞的试剂盒,其包括:i.) 体液性细胞表面标志物的抗体; ii.) 非体液性稀有有核细胞的特异性探针;和 iii.) 重固定剂。
11. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述体液性细胞表面标志物是用于免疫荧光技术的标志物。
12. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述非体液性稀有有核细胞的特异性探针是用于荧光原位杂交技术的探针。
13. 权利要求 11 的试剂盒,其中所述用于免疫荧光技术的标志物为血源性细胞表面标志物。
14. 权利要求 12 的试剂盒,其中所述用于荧光原位杂交技术的探针为所述非体液性稀有有核细胞特异性的核酸探针。
15. 权利要求 10 的试剂盒,其还包括说明书,其中所述说明书中记载前述权利要求 1 至

9 中任一项的方法。

16. 权利要求 10 的试剂盒,其中所述重固定剂选自戊二醛、甲醛、丙酮、甲醇、乙醇、醋酸、丙烯醛、醋酸铀、铬酸、苦味酸,或其组合,优选为多聚甲醛为 0.2-8% (W/V),更优选 0.8-5% 多聚甲醛,最优选 1.0-4% 多聚甲醛。

17. 一种稀有细胞的检测系统,其能够进行权利要求 1 至 9 中任一项的方法,和 / 或能够使用权利要求 10 至 16 中任一项的试剂盒处理待检测样品。

18. 权利要求 17 的系统,其中所述系统是自动化系统。

19. 权利要求 10 至 16 中任一项的试剂盒用于权利要求 1 至 9 中任一项的方法中的用途。

一种检测非体液性稀有有核细胞的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种非体液性稀有有核细胞的检测方法,其包括在对样品进行重固定之后,结合使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理待检测样品。本发明还涉及包含 i.) 体液性细胞表面标志物的抗体;ii.) 非体液性稀有有核细胞的特异性探针;和 iii.) 重固定剂的试剂盒,该试剂盒用于本发明的方法的用途,以及实现本发明的方法的检测系统。

背景技术

[0002] 近年来,越来越多的报道热衷于循环肿瘤细胞(CTC)、循环内皮细胞(CEC)、肿瘤干细胞等的研究,成果多覆盖于乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等实体瘤(Joost, Cytometry Part A, 75A, 2009;Shaffer DR, Clin Cancer Research, 2007, 13(1))。其中美国国家食品药品监督管理局已审批通过 Immunicon/Veridex 公司的 CellSearch™ 循环肿瘤细胞试剂盒,通过对 CTC 的捕获后计数,可用于转移性乳腺癌、结直肠癌、前列腺癌等肿瘤预后情况的临床预测。目前该试剂盒也已通过我国国家食品药品监督管理局的审批,可在国内临床上使用。

[0003] 很多报道显示,CTC 计数不但可为肿瘤的预测、治疗、预后等提供很好的判断依据,同时也可为进一步研究提供良好的平台,例如在该细胞基础上进一步研究患者肿瘤细胞的遗传信息。因此准确分离 CTC,并可长时间保存尤为重要。已有报道的分离 CTC 的方法主要以免疫磁珠分离法以及基于细胞形态学的富集法为主,后期再辅以相应的方法鉴别所得细胞,主要为上皮源标志物,也有特异性探针的荧光原位杂交(FISH)方法检测。

[0004] 多数免疫磁珠分离法的报道依赖于上皮源标志物对 CTC 的免疫阳性捕获及检测,例如 CellSearch™ 的 CTC 检测试剂盒,即是利用上皮源标志物 EpCAM 的免疫磁珠捕获 CTC,后期采用上皮源标志物 CK8, 18 和 / 或 19 的免疫荧光染色方法来进一步鉴别。

[0005] 目前血液中出现上皮源标志的细胞即被认为是 CTC,如 EpCAM, 细胞角蛋白(CK)等,但缺乏有力的证据证明这些细胞就是 CTC,而不是上皮细胞本身进入体液带来的假阳性细胞。除此之外,EpCAM 和 CK 等上皮源标志物在入血的过程中,经过上皮间皮转化过程,其阳性会有所减弱甚至消失,因此弱阳性及假阴性给 CTC 的判定带来了很大的干扰。另外,因缺乏高特异性的肿瘤相关抗原,免疫阳性捕获在分离 CTC 的过程中容易丢失真正的肿瘤细胞,如后期检测继续使用上皮标志物,则增加了假阴性结果的风险。

[0006] 另有一种免疫磁珠分离法叫做阴性免疫磁珠 CTC 富集法,其利用包被了血源性表面标志物 CD45 的免疫磁珠去除血液样本中 98-99% 的白细胞,将剩余细胞涂片,再对这些剩余的细胞进行检测。该富集方法避开了依赖于上皮标志物的免疫阳性捕获途径,能高效地拿到 CTC。但该方法的局限性在于后期检测灵敏度及特异性较低。经阴性去除白细胞富集所得的 CTC 及白细胞混合物,背景较高,如利用上皮源标志物进行鉴定,则更容易受到弱阳性及假阴性的困扰。

[0007] 利用形态学的 CTC 富集法是目前常用的另一种富集肿瘤细胞的方法,该方法对设备要求不高,方法较为简单。例如 OncoQuick 分离法,用一种专用的 50ml 试管,内置多

孔屏障,其下为密度梯度分离液,使用时,将标本置于屏障之上,从而避免在离心时直接与分离液混合而污染。该法比常用的 Ficoll 法对肿瘤细胞的回收率更高 (Rosenber R, Cytometry, 2002, 49(4))。但过多依赖于肿瘤细胞的形态学特性,如相对密度、细胞大小等,缺乏特异性。近几年兴起的 ISET 分离法,根据肿瘤细胞与正常细胞的大小不同来分离肿瘤细胞,目前还没有报道证实所有的肿瘤细胞都大于 8um,使其分离的灵敏性受到质疑。因此对该法分离的 CTC,如不能辅以很好的后期检测,则由判定引起的细胞丢失的可能性也较大。

[0008] 对于检测来说,有多种检测方法,其中一种为利用免疫细胞化学(ICC)来检测 CTC 的方法,即利用肿瘤标志物来对获得的细胞进行定位、定性及定量,如上皮源细胞角蛋白(Cytokeratin, CK),上皮细胞膜特异性抗原(EMA、HMFG、HEA-125 等),肿瘤相关糖蛋白(TAG)等。其优点为可观察到细胞形态,缺陷在于敏感性较低。

[0009] 另一个用的较多的检测方法为流式细胞术,但其易受标本保存、研究人员差异等因素干扰,造成结果误差。

[0010] 此外,新近出现的 CTCs-Chip 也是一项集富集与检测为一体的先进技术,检测灵敏度非常高,即使只有极少量的肿瘤细胞。也只需一个步骤即可从全血中富集 CTC,检验可随时进行,结果不会受肿瘤细胞间断释放的影响,便于对患者进行实时监测,且不影响细胞活性,有利于进一步进行分子生物学和遗传学分析 (Nagrath S, Nature2007, 450(7131))。但其价格昂贵。

[0011] 后期鉴定的方法中,也有少数报道采用了 FISH 技术来鉴别 (Joost, Cytometry Part A, 2009;75A;Katz RL, Clin Cancer Res;2008, 16(15))。FISH 方法依赖于遗传学的改变,相比于上皮标志物来说有很大的稳定性,能很大程度地避免上述的上皮细胞污染,以及弱阳性和假阴性的产生。而对于阴性去除白细胞的方法,用 FISH 检测,更容易受到残留的杂质等因素的影响,带来了另外一种假阳性细胞干扰,给结果的判断及更进一步的研究带来很大困难。因此,无论是利用上皮标志物,还是采用传统的 FISH 检测,均不可避免地干扰了结果的最终判断。且单独使用 FISH 同样缺乏证据证明其是 CTC,而不是血源性的异常细胞,例如已有报道显示在肺癌初期淋巴细胞也有遗传性的改变(B J Dave, Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 1995, 4(7))。

[0012] 已有的以 FISH、CK 阳性、CD45 阴性鉴定 CTC 的报道中,多为免疫荧光染色和 FISH 分开处理标本,即先用免疫荧光方法将标本染色,经读片鉴定后,揭去盖玻片,洗掉免疫荧光信号,再用 FISH 处理(任传利,2008,中国肿瘤,17(6);Margaret A, Clin Cancer Res;2009, 15(6);Elizebeth A, Plos ONE, 2010, 5(9))。如将两种方法分开处理待检测样品,则先进行免疫荧光后 FISH 处理,不能先进行 FISH 处理,因为随着离体时间的延长,细胞上的抗原降解愈发严重,如在标本观察结果后再进行免疫荧光,则很可能已无法观察到 CK 或 CD45。但无论哪种处理顺序,需将标本盖上盖玻片,待显微镜下鉴别完毕后,再洗去盖玻片进行下一步处理。这样处理,虽然可以利用 FISH 鉴别信号,但在揭掉盖玻片的过程中,极易丢失及损坏细胞。如第一次镜下鉴别到阳性细胞,在此定位基础上再定位寻找目标细胞,容易发生偏差,如无精密的定位装置,而依靠人工定位或不精密的定位装置,则会使找寻工作需耗费较长的时间,降低了检测效率。

发明内容

[0013] 针对以上提出的单独使用上皮细胞标志物检测非体液性稀有有核细胞易产生假阳性、弱阳性或假阴性结果,而单独使用 FISH 不能确定是否为淋巴细胞突变或杂质干扰,以及分开使用 FISH 及免疫荧光处理容易丢失及损伤细胞,重复定位操作困难,且先进行 FISH 处理及 FISH 结果的观察,容易引起免疫标志物的降解等技术问题,本发明提出一种稀有细胞的检测方法,其结合使用白细胞标志物作为体液性细胞表面标志,以肿瘤特异性的核酸突变作为 FISH 检测探针的方法,既能够同时观察两种信号,又能避免细胞丢失及损伤,且因省略了一次结果的观察,能够最大程度避免细胞表面抗原标志物的降解,提高了非体液性稀有有核细胞检测的灵敏度和特异性,另一方面又可以提高读片速度,避免重复定位。用体液性细胞表面标志物抗体去除血源性细胞及杂质的干扰;用 FISH 特异性探针鉴定稀有细胞。

[0014] 本发明在传统的 FISH 技术基础上进行了改进,将其与生物的体液性细胞表面标志物结合起来,即对于同一个标本,先以重固定剂例如多聚甲醛进行重固定,再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(可视体液有核细胞表面标志物表达强弱及实验需求,设置调换两种方法的处理顺序)。最终同时用两个标准来判定所得细胞区分体液性有核细胞和非体液性稀有有核细胞,排除了体液性有核细胞的假阳性干扰。

[0015] 具体地,本发明包括以下内容:

[0016] 实施方式 1. 一种对非体液性稀有有核细胞进行检测的方法,其包括:

[0017] a. 用重固定剂重固定待检测样品,

[0018] b. 在步骤 a 之后,使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理待检测样品,

[0019] c. 在显微镜下读取处理结果。

[0020] 实施方式 2. 实施方式 1 的检测方法,其中所述待检测样品是从生物体液富集非体液性稀有有核细胞获得的样品。

[0021] 实施方式 3. 实施方式 1 的方法,其中所述非体液性稀有有核细胞是体液中非体液性质的稀有有核细胞。

[0022] 实施方式 4. 实施方式 1 的方法,其中所述体液性细胞表面标志物是用于免疫荧光技术的标志物,包括:CD3、CD31、CD34、CD45、CD50、CD69、CD84,或 CD102。

[0023] 实施方式 5. 实施方式 1 的方法,其中所述非体液性稀有有核细胞的特异性探针是用于荧光原位杂交(FISH)的探针。

[0024] 实施方式 6. 实施方式 1 的方法,步骤 b 为以下的任一种:

[0025] (i): 先用体液性细胞表面标志物的抗体处理,再用非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理;

[0026] (ii): 先用非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理,再用体液性细胞表面标志物的抗体处理;

[0027] (iii): 同时使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理;

[0028] (iv): 交替使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性

探针处理,或包含(i)至(iii)中两种、三种或四种的组合。

[0029] 实施方式7. 实施方式1的方法,其中所述重固定剂选自戊二醛、甲醛、丙酮、甲醇、乙醇、醋酸、丙烯醛、醋酸铀、铬酸、苦味酸,或其组合,优选为多聚甲醛为0.2-8%(W/V),更优选0.8-5%多聚甲醛,最优选1.2-4%多聚甲醛。

[0030] 实施方式8. 实施方式1的方法,其中所述方法用于非治疗用途。

[0031] 实施方式9. 实施方式8的方法,其中所述非治疗用途包括:用于科研目的的非体液性稀有有核细胞计数,用于非体液性稀有有核细胞遗传信息的研究平台。

[0032] 实施方式10. 一种用于检测稀有细胞的试剂盒,其包括:i.) 体液性细胞表面标志物的抗体;ii.) 非体液性稀有有核细胞的特异性探针;和iii.) 重固定剂。

[0033] 实施方式11. 实施方式10的试剂盒,其中所述体液性细胞表面标志物是用于免疫荧光技术的标志物。

[0034] 实施方式12. 实施方式10的试剂盒,其中所述非体液性稀有有核细胞的特异性探针是用于荧光原位杂交技术的探针。

[0035] 实施方式13. 实施方式11的试剂盒,其中所述用于免疫荧光技术的标志物为血源性细胞表面标志物。

[0036] 实施方式14. 实施方式12的试剂盒,其中所述用于荧光原位杂交技术的探针为所述非体液性稀有有核细胞特异性的核酸探针。

[0037] 实施方式15. 实施方式10的试剂盒,其还包括说明书,其中所述说明书中记载前述实施方式1至9中任一项的方法。

[0038] 实施方式16. 实施方式10的试剂盒,其中所述重固定剂选自戊二醛、甲醛、丙酮、甲醇、乙醇、醋酸、丙烯醛、醋酸铀、铬酸、苦味酸,或其组合,优选为多聚甲醛为0.2-8%(W/V),更优选0.8-5%多聚甲醛,最优选1.2-4%多聚甲醛。

[0039] 实施方式17. 一种稀有细胞的检测系统,其能够进行实施方式1至9中任一项的方法,和/或能够使用实施方式10至16中任一项的试剂盒处理待检测样品。

[0040] 实施方式18. 实施方式17的系统,其中所述系统是自动化系统。

[0041] 实施方式19. 实施方式10至16中任一项的试剂盒用于实施方式1至9中任一项的方法中的用途。

[0042] 本发明的主要特征之一是结合使用体液性细胞表面标志物的抗体和非体液性稀有有核细胞的特异性探针处理待检测样品。在具体的实施方式中,用FISH特异性探针鉴定非体液性稀有有核细胞,使用体液性细胞表面标志物的抗体去除体液性细胞的干扰,以排除FISH的假阳性。如将两种方法分开处理待检测样品,无论是先进行FISH后免疫荧光处理,或先进行免疫荧光后FISH处理,均需将标本盖上盖玻片,待显微镜下鉴别完毕后,再洗去盖玻片进行下一步处理,此操作极易丢失及损伤细胞。且如先进行FISH处理,待观察后再进行免疫荧光处理的话,则细胞表面的免疫标志物随着时间的延长,降解程度将急剧增加。而本方法同时观察这两种方法处理所得的信号,不需通过重复定位找到目标细胞来观察第二次处理结果。并且避免分开处理导致的细胞丢失及伤害等情况,从而提高了检测效率及灵敏度。此外,本方法可根据目的需求来调换FISH及免疫荧光的处理顺序,为不同目的的实验提供了极大的便利。

[0043] 总之,本发明优势在于:

- [0044] 1. 体液性有核细胞表面标志物的抗体与非体液性稀有有核细胞特异性探针组合检测,具有很高的检测灵敏度、特异性以及效率。
- [0045] 2. 本方法可用于多种体液中的非体液性稀有有核细胞的鉴别。
- [0046] 3. 进一步发现,在使用重固定剂多聚甲醛后,效果更好。
- [0047] 4. 更进一步发现,1%多聚甲醛的最佳固定时间第8-12分钟(即可控时间范围为4分钟),相比于2%、4%多聚甲醛的可控时间范围(<2分钟),更利于标本较多时的操作。因此,在本发明优选的实施方式中,使用1%多聚甲醛作为重固定剂处理4-20分钟,更优选8-12分钟。
- [0048] 5. 多个肿瘤标志物与FISH联合,可稍许提高阳性细胞的计数结果,但同时也增加了假阳性,且操作繁琐。因此本方法更利于特异性的提高。
- [0049] 6. 本方法处理后的标本片,仍可作为下一步基因研究的平台。

附图说明

- [0050] 图1是本方法的灵敏度测试结果。
- [0051] 图2是仅用FISH方法的灵敏度测试结果。
- [0052] 图3是正常人中本方法与仅用FISH方法测得的假阳性结果。
- [0053] 图4是血液标本中本方法检测到的阳性细胞。
- [0054] 图5是本方法检测到的肿瘤细胞的EGFR基因电泳图。
- [0055] 图6是不同浓度多聚甲醛固定效果的对比结果。
- [0056] 定义:

[0057] 体液性有核细胞:指某种生物的体液中所含有的有核细胞,如白细胞,白细胞包括淋巴细胞(T细胞、B细胞)、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞等。

[0058] 非体液性稀有有核细胞:循环的具有上皮来源的或不具有上皮来源的肿瘤细胞和循环的血管内皮细胞,肿瘤干细胞,干细胞,血中胎儿细胞,某些免疫细胞等稀有细胞。所述非体液性稀有有核细胞在血液中占有有核细胞的0.1%以下。在本申请中,在描述本发明的方法时,术语稀有细胞就是指此处的非体液性稀有有核细胞。

[0059] 循环肿瘤细胞(Circulating tumor cell, CTC):通常把进入人体外周血的肿瘤细胞称为循环肿瘤细胞。循环肿瘤细胞是非体液性稀有有核细胞的一种。

[0060] 循环内皮细胞(Circulating endothelial cell, CEC):把脱落入血的血管内皮细胞称为循环内皮细胞。循环内皮细胞也是非体液性稀有有核细胞的一种。

[0061] 免疫荧光技术(Immunofluorescence):用荧光抗体示踪或检查相应抗原的方法,称为荧光抗体法;用已知的荧光抗原示踪或检查相应抗体的方法称荧光抗原法。这两种方法总称免疫荧光技术。

[0062] 荧光原位杂交技术(Fluorescence in situ hybridization, FISH):用荧光标记的核酸探针在染色体上进行的杂交方法,以确定与探针互补的核酸序列在染色体上的位置和分布。

[0063] 间期(Interphase):细胞从一次有丝分裂结束到下一次有丝分裂的分裂期之前的时期,是有丝分裂的准备阶段。一个细胞在细胞循环90%左右的时间是在间期中。

[0064] 同源染色体(Homologous chromosomes):在二倍体生物细胞中,形态、结构基本相

同的染色体。

[0065] 等位基因(Allele):位于一对同源染色体的相同位置上控制某一性状的不同形态的基因。

具体实施方式

[0066] 本发明中的待检测样品通常是从生物体液富集非体液性稀有有核细胞获得的样品。

[0067] 对于已富集的非体液性稀有有核细胞,用固定剂固定,均匀涂在载玻片上,室温放置,直至样本全部干燥。但勿放置过久,以免体液性标志物降解。一般室温下可过夜,之后短期内,可放于 4℃冰箱待处理;长期不进行检测,可放于 -20℃冰箱待处理。

[0068] FISH 处理,使标本的目标核酸结合上特异性的荧光探针。

[0069] 免疫荧光处理,使标本的目标蛋白结合上体液性表面标志物。

[0070] 经以上处理后的标本可长期保存于 4℃达二年以上。

[0071] 从生物体液样本中富集稀有细胞的方法介绍

[0072] 在本申请中,以富集循环肿瘤细胞(CTC)的方法为例,介绍富集稀有细胞的方法。富集 CTC 的方法以形态学和免疫学为主,主要有以下几种:

[0073] 基于形态学的富集方法:

[0074] 单核细胞相对于其他血液成分密度较低,因此能根据密度梯度的差别将其分离。采用 1.077g/ml 的密度梯度,单核细胞和肿瘤细胞可以与血液其他成分分离。Oncoquick 就是基于密度梯度分离的原则,增加了多孔屏障,使分离出的细胞更加纯化。

[0075] ISET 方法利用分子大小来分离肿瘤细胞,通过不同大小的孔径,将 >8um 的肿瘤细胞保存下来。

[0076] 基于免疫学的富集方法:

[0077] 免疫磁珠法原理是细胞表面抗原分子能与连接有磁珠的特异性单抗相结合,在外加磁场的作用下,通过抗体与磁珠相连的细胞被吸引而留在磁场中,而其他细胞因为不带磁性,不能在磁场中停留,从而使细胞得以分离。基于免疫学的富集方法分为阴性和阳性两种。免疫阴性富集可用抗 CD45 抗体,或是抗 CD61 抗体移除血液中的巨核细胞及血小板。免疫阳性分选可通过磁性微球连接上抗上皮的抗体,如 EpCAM。

[0078] 一般的稀有细胞的检测方法的步骤:

[0079] 免疫细胞化学法是指以显色剂标记的特异性抗体在组织细胞原位通过抗原抗体反应和细胞化学的呈色反应。其检测技术主要分为三类:1)上皮细胞角蛋白(CK),如 CK19、CK20 等;2)上皮细胞膜特异性抗原,如黏蛋白类,包括 EMA、HMFG、HEA-125 等;3)肿瘤相关蛋白(TAG)。其主要优点是可进行细胞大小和形态学的分析,缺点是灵敏度低,只能在 10^5 个细胞中检测到一个肿瘤细胞。

[0080] 流式细胞术作为检测 CTC 数目的方法之一,集激光、电子物理、光电测量、计算机、细胞荧光化学及单克隆抗体技术为一体,不仅能鉴定标本中细胞抗原性和形态学特征,还能使富集的目的细胞保持形态学特性并保持细胞活力。但该技术检测细胞的价值很大程度上依赖于可分析的细胞数量,且受标本固定贮存及研究人员间的差异等因素的干扰,且价格昂贵、耗时较长。

[0081] PCR检测CTC主要是通过检测癌基因、抑癌基因的突变。该方法灵敏度高,能在 10^6 个细胞中检测到一个肿瘤细胞,但极易出现假阳性,且使用范围有限。因血液中CTC和核酸的半衰期不稳定,检测到的游离DNA,可能仅仅是核酸,而不是真正的肿瘤细胞。

[0082] 近些年开发出的实时定量RT-PCR,具有引物和探针的双重特性,扩增效率高,反应污染少,Ct值稳定等优势,但是该方法不能对细胞形态进行分析。

[0083] 本发明的稀有细胞的检测方法包括以下步骤:

[0084] 1. 重固定剂重固定待检测样品;

[0085] 2. 进行FISH和免疫荧光处理;

[0086] 3. 读片(例如,在显微镜下读取处理结果)。

[0087] 通常,在使用重固定剂重固定待检测样品之前,常常需要准备已固定于载玻片上的待检测样品;若待检测样品为液体,则要涂于载玻片上至完全干燥。然而这个步骤对于本领域技术人员来说是显而易见的,并且本领域技术人员能够进行该步骤。

[0088] 在步骤1中,对于待检测样品例如已富集的非体液性稀有有核细胞进行多聚甲醛重固定。

[0089] FISH处理:在 37°C 的 $2\times\text{SSC}$ 中浸泡5-15min,后经75%、85%、无水乙醇逐级脱水。加入10ul探针,盖上盖玻片,变性5分钟,杂交20分钟-4小时不等。然后甲酰胺($\text{pH}7.0\pm 0.1$)中洗涤15min,或NP40洗涤1-5min。

[0090] 免疫荧光处理:室温下,体液性表面标志物避光孵育标本40分钟-1小时。轻轻洗掉标志物后,DAPI(4,6-二氨基-2-苯基吲哚)复染封片,即可镜下观察。该处理后的标本可长期保存于 4°C 。

[0091] 读片:在显微镜下读取检测结果。镜下“S”型扫读,确保无遗漏细胞。体液性有核细胞表现为:单个核呈圆形或椭圆形,体液性细胞表面标志物抗体呈阳性,DAPI呈阳性,以及任何数量的探针阳性点个数,多数情况下为2个点,部分细胞因试剂或血液中残留的杂质或自身的突变而表现为3个以上的点,或较少部分细胞未能充分杂交而呈现为1个点。非体液性稀有有核细胞需符合以下要求:单个核呈圆形或椭圆形,扩增型探针阳性表现为 ≥ 3 个点,体液性细胞表面标志物为阴性,DAPI阳性。缺失型探针表现为 < 2 个点,体液性细胞表面标志物阴性,DAPI阳性。

[0092] 本发明的方法提高灵敏度和特异性的原因:

[0093] DNA在稳定性方面,优于蛋白以及RNA等,因此利用FISH检测DNA,具有较高的灵敏度,但是如前述,检测同时产生的假阳性对特异性影响很大。本发明的方法在使用了FISH技术的基础上,又结合了体液细胞标志物,降低了假阳性的出现,从而在很大程度上提高了特异性。

[0094] 从生物体液中,通过上述某一种富集方法富集得到的非体液性稀有有核细胞后,将富集所得的样本涂于载玻片,并加以固定。经过本方法鉴定之后,该细胞可以其他方式将细胞取出,进行PCR的检测。

[0095] 该体液可以是外周循环血、脐带血、尿液、脊髓及胸腔积液、腹水、精液、骨髓、羊水、痰液等多种可能存在稀有有核细胞,且可用于富集的生物体液。非体液性稀有有核细胞包括循环肿瘤细胞,循环内皮细胞,肿瘤干细胞,干细胞,血中胎儿细胞,某些免疫细胞等稀有细胞。

[0096] 该体液如含白细胞,即可用血源性表面标志物对其进行免疫荧光染色处理。血源性标志物包括:CD3、CD31、CD34、CD45、CD50、CD69、CD84,或CD102等。用于荧光原位杂交技术的探针为对待检测的稀有有核细胞具有特异性的核酸探针,其在肿瘤细胞中会有某种特异性的突变,如扩增、缺失等。

[0097] 对本标本处理,调节免疫荧光染色与荧光原位杂交的顺序,对最终效果有不同的影响。

[0098] 同样条件下,包括同样的温度、PH值、处理时间,同样的固定方法等,不同的处理顺序所得到的效果不尽相同。

[0099] 对本标本先进行FISH,再进行免疫荧光染色处理,所得到的免疫荧光效果较弱。例如,在使用来源于血液的标本的情况下,在体液标本中的血源性表面标志物表达较强的情况下,该顺序操作较为简单,血源性表面标志物即可起到很好的辅助判断作用,且FISH信号能较好地得到保持。

[0100] 而对于血源性表面标志物表达一般的情况下,先进行免疫荧光染色,再进行FISH处理;若该标志物表达较弱,可先进行免疫荧光染色,再进行FISH处理,之后再进行一次免疫荧光染色。这样所得的顺序,能得到较强的免疫荧光染色效果,又能观察到较好的FISH信号。

[0101] 而同时进行免疫荧光和FISH处理,在这些处理顺序中,属于效果较不理想的一项。二者均受对方处理方式的影响,以至于效果均受影响,所得的免疫荧光效果稍显弥散,FISH信号也较弱。

[0102] 以上任意一种本方法的处理,均可用自动化系统进行编程,继而对本标本进行操作,包括不同顺序的处理,以及向标本加探针、抗体,以及对标本进行扫描读片等操作。

[0103] 本发明的技术方法的具体步骤:

[0104] 可用不同的富集方法,对可用于富集的体液进行富集非体液性稀有有核细胞获得带检测样品,用固定剂固定,均匀涂在载玻片上,面积约为4cm²。室温放置,直至样本全部干燥。

[0105] FISH处理,使标本的目标核酸结合上特异性的荧光探针。

[0106] 免疫荧光处理,使标本的目标蛋白结合上体液性表面标志物。

[0107] 读片。

[0108] 一方面,本发明提供了一种对非体液性稀有有核细胞检测的方法,其包括使用体液性表面标志物、非体液性稀有有核细胞的特异性探针以及连接试剂1%多聚甲醛处理待检测样品。

[0109] 另一方面,本发明提供了一种检测非体液性稀有有核细胞试剂盒,包括:a.) 体液性表面标志物;b.) 非体液性稀有有核细胞的特异性探针;和/或c.) 其组合;d.) 一种连接FISH和免疫荧光染色方法的试剂——1%多聚甲醛。其中体液性表面标志物为抗单克隆或多克隆的混合物。特异性探针为适用于FISH杂交的核酸探针。

[0110] 本发明的方法或者试剂盒具有高特异性、高灵敏度的特点,减小了细胞丢失频率,避免了操作的复杂性,可根据实验需求设置处理顺序,并且同时观察可极大地提高鉴别速度。而将两种方法分开处理样本则操作复杂(即先用FISH处理,镜下鉴别观察后,洗掉盖玻片,再进行免疫荧光;或反之,但均需洗掉盖玻片,该步骤极易丢失细胞,操作需非常小

心谨慎),易丢失细胞,需重复定位,对于第一次处理后鉴别的阳性细胞,如无精密的定位系统,只有人工定位或不精密的定位装置,找到该阳性细胞的工作将非常困难。

[0111] 在本发明的实施方式中,体液性表面标志物为某一生物的体液中,该体液性有核细胞共同表达或大部分表达的抗原。

[0112] 优选地,生物体液性标志物是指血源性表面标志物,例如 CD3、CD31、CD34、CD45、CD50、CD69、CD84,或 CD102 等,但不限于这些物质。

[0113] 在本发明的实施方式中,所述的生物体液性标志物使用标记蛋白类的荧光素进行标记。

[0114] 优选地,标记蛋白的荧光素是指能够直接或间接与蛋白共价或非共价偶联的任何颜色的荧光素,例如,Alexa Flour 系列分子,FITC,Texas Red,罗丹明(rhodamine),生物素(biotin),地高辛(digoxigenin),但不限于这些物质。

[0115] 在本发明的实施方式中,FISH 杂交所用的核酸探针为在某种疾病中出现遗传性改变的核酸片段。所述在某种疾病中出现遗传性改变的核酸片段包括扩增、缺失、重排,以及其他形式的突变等情况。

[0116] 在本发明的实施方式中,FISH 方法的鉴别原理是检测间期细胞的基因突变情况。正常人的体液性有核细胞正常情况下不会分裂生长,而处于间期状态,此时含有 2 条同源染色体,或 2 个等位基因。而恶性肿瘤细胞发生扩增或缺失等突变时,间期表现为 ≥ 3 或 ≤ 1 条染色体, ≥ 3 或 ≤ 1 个等位基因。利用核酸探针,可与每条染色体发生突变的区域杂交,并通过结合荧光素,达到镜下观察的目的。CTC 为恶性肿瘤细胞从组织上脱落入血,具有典型的恶性肿瘤细胞的特征。镜下观察到的 FISH 信号以“点”的形式表现出来,即 1 条染色体或 1 个等位基因对应 1 个点,如正常人体液性有核细胞为 2 个点,即可对应 2 条染色体,或 2 个等位基因。

[0117] 优选地,由于某些恶性肿瘤的淋巴细胞也会发生突变,或试剂及血液中残留的杂质,部分细胞杂交异常等原因,使得体液性有核细胞也表现为异常,即镜下观察为 ≥ 3 或 ≤ 1 个点。本发明的实施方式,通过体液性表面标志物 CD45 即可排除以上三种形式的干扰,从而鉴别出真正的非体液性稀有有核细胞。因此当我们观察到一个细胞核中信号数目 ≥ 3 或 ≤ 1 ,且无 CD45 时,即可视为 CTC 阳性;反之,为阴性。

[0118] 在本发明的实施方式中,该核酸探针尤其是指双链或单链 DNA 探针。

[0119] 在本发明的实施方式中,优选待测样品是从生物体液富集非体液性稀有有核细胞获得的样品。

[0120] 优选地,如检测对象为 RNA,则一定在进行生物体液的前期富集步骤中采用 RNA 保护剂,以避免 RNA 降解。

[0121] 在本发明的实施方式中,所述的特异性探针使用标记核酸类的荧光素进行标记。

[0122] 优选地,标记核酸类的荧光素是指能够直接或间接与核酸共价或非共价结合的任何颜色的荧光素,例如,Alexa Flour 系列分子,FITC,Texas Red,罗丹明(rhodamine),生物素(biotin),地高辛(digoxigenin),但不限于这些物质。

[0123] 在本发明的实施方式中,需将待检测样品涂在载玻片上。

[0124] 优选地,载玻片是指任何经过或未经过化学处理的适合荧光显微镜下观察的载玻片。

[0125] 优选地,为了减少非体液性稀有有核细胞的丢失,本技术所用的载玻片尤其是指防脱载玻片,即在普通载玻片表面涂有防脱剂,如多聚赖氨酸,但不限于该物质。

[0126] 在本发明的实施方式中,在室温下利用免疫荧光技术,将样本与体液性标志物孵育。

[0127] 优选地,该孵育过程避光处理,可避免光线引起的荧光素降解。

[0128] 在一种实施方式中,使用本方法提供的试剂盒时,或者实施本发明的方法时,在FISH过程中控制变性温度为71-81℃,优选为76℃;控制杂交温度为32至42℃,优选为37℃。

[0129] 在一种实施方式中,为了减少非体液性稀有有核细胞的丢失,可使用杂交仪。所述杂交仪是一种通过金属加热板对载玻片整体温度进行控制的仪器。避免使用液体控温,因为如果将载玻片浸没在液体中,则有可能增加稀有有核细胞丢失的可能性。

[0130] 对于不同的疾病来说,例如肿瘤、心脏病等,只要其细胞具备进入体液的功能,使用相应的特异性探针,即可将其与生物体液性有核细胞区分开来,增加了鉴定的特异性。该点克服了上皮源标志物不具有指向性的缺陷,从而为肿瘤的早期诊断提供了良好的手段。

[0131] 而相比于传统FISH,本方法借助于生物体液性标志物,很大程度上减小了假阳性的出现率,解决了CTC鉴别上的难题(图1)。

[0132] 本鉴定技术不受富集方法的影响,对于任何一种富集方法所得的非体液性稀有有核细胞,只要将所得细胞涂片于载玻片上,均可用该试剂盒来鉴别。

[0133] 另一方面,该方法避开上皮标志物的使用,能很大程度减小因上皮间皮化而产生的弱阳性及假阴性,以及上皮细胞的假阳性污染。

[0134] 该手段检测到的肿瘤细胞,结果清晰,易于观察,特异性高,为进一步研究搭建了良好的平台。

[0135] 该法由于灵敏度高,对用血量要求即可降低到3.75ml左右,较FDA通过的CellSearch™ CTC检测试剂盒所需的7.5ml血量低,从而进一步减少了处理血样品所耗费的人力及物力。

[0136] 本方法的标本(本申请中所述的标本即为待检测样品)来源为人或其他动物的体液。

[0137] 优选地,本方法的标本来源尤其是指人的体液。

[0138] 优选地,本方法的标本来源尤其是血液。

[0139] 本方法不需对标本进行任何处理,如消除外源性蛋白酶、RNA等,从而减小了损失细胞的可能性,同时也利于最大程度地保存生物体液的标志物。

[0140] 后期鉴定方法标志性较强,很大程度上排除了主观上的干扰,能够相对客观地评价出非生物性稀有有核细胞。

[0141] 除此之外,该方法耗时相对较短,整个操作过程可控制在2小时内完成。

[0142] 本发明的方法的优点在于,是针对同一标本,在一次系统性结合性的操作中完成FISH与免疫荧光染色,可根据实验需求设置两种方法的处理顺序,最后同时观察这两种处理结果,而不是分次完成,分别观察上述两种结果。

[0143] 相对于目前市场上已有的商品化鉴别方法而言,本方法将处理特异性稀有有核细胞的荧光原位杂交(FISH)方法与处理体液性有核细胞的免疫荧光染色进行了良好的结合,

针对同一张标本片进行系统的结合性处理,能同时并清晰地观察到这两种标志物。避免了分开使用上述两种方法处理同一标本,导致的细胞丢失及伤害的可能性,不需通过重复定位来找寻第一次处理所得的目标细胞,从而使鉴别的灵敏度、特异性、观察速度均有了很大提高,且已被证明成本低、效率高、耗时短,能够满足检测稀有有核细胞的需要。

[0144] 实施例

[0145] 实施例中使用的材料以及来源

[0146]

材料和设备	型号和来源	备注
杂交仪	DAKO	用来做 FISH 杂交
立式染色缸	北化	用来盛装处理标本的 FISH 试剂
移液枪	大龙	用来向标本区添加探针、抗体等试剂
多聚甲醛	Sigma	用于固定细胞
CEP7/8/12 探针	Vysis	FISH 所用的特异性标志物
CD45	Invitrogen	血源性表面标志物

	BSA	Sigma	用来配制抗体
	Alexa F 594/488	Invitrogen	荧光素名称, 一种红色荧光染料。
	SSC	Vysis	一种常用的缓冲液
	DAPI	Sigma	用于核酸复染, 以确定细胞核的位置
[0147]	Mitotracker-Green	Molecular Probes	一种绿色荧光线粒体探针。为采用 Molecular Probes 公司的 carbocyanine 进行了荧光标记的一种 Mito-Tracker, 分子量为 671.88, 可以用作线粒体特异性的荧光探针
	CK8/18/19	Thermo-pierce	上皮细胞所表达的抗体
	ER、PR	博研生物	乳腺癌的一种特异表达的抗体
	HER2	Thermo-pierce	乳腺癌的一种特异表达的抗体

[0148] 实施例 1

[0149] FISH 及 CD45 不同处理顺序产生的结果

[0150] 方法: 采自于同一个人的四管外周血, 用 FISH 及 CD45 不同顺序处理。

[0151] 实验组 1: 以 CEP8 为 FISH 探针, CD45 为白细胞表面标志物。采血当日, 随机选择一管血进行阴性富集(富集产品为本公司的白细胞去除试剂盒), 将标本涂片于载玻片上, 置于烘箱内 37℃ 至完全干燥。之后进行 1% 多聚甲醛固定 8 分钟, 采用先 FISH 再 CD45 的方式处理。FISH 处理步骤如下: 37℃ 下 2×SSC 浸泡 15min, 75%、85%、无水乙醇脱水各 5min, 加入 10ul 探针, 盖上盖玻片, 放入 DAKO 杂交仪中杂交 20min。之后 50% 甲酰胺洗涤 15min, 2×SSC 洗涤 5min。CD45 处理方法为: 0.2%BSA 洗涤两次, 2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594), 室温下, 与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后, DAPI 复染封片。

[0152] 实验组 2: 室温放置二天后, 阴性富集其中一管, 涂于载玻片上, 37℃ 烘箱内放置干燥后, 1% 多聚甲醛固定 8 分钟。采用先 CD45 再 FISH 最后 CD45 再染的方法进行处理。首先进行 CD45 的处理: 0.2%BSA 洗涤两次, 2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594), 室温下, 与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤。然后进行 FISH 处理: 37℃ 下 2×SSC 浸泡 15min, 75%、85%、无水乙醇脱水各 5min, 加入 10ul 探针, 盖上盖玻片, 放入 DAKO 杂交仪中杂交 20min。之后揭掉盖玻片, 50% 甲酰胺洗涤 15min, 2×SSC 洗涤 5min。最后再进行一次 CD45 处理: 0.2%BSA 洗涤两次, 2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594), 室温下, 与标

本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤。

[0153] 实验组 3:放置二天后的标本,阴性富集后涂于载玻片上,1%多聚甲醛固定 8 分钟,采用先 FISH 再 CD45 的方法。FISH 处理步骤如下:37℃下 2×SSC 浸泡 15min,75%、85%、无水乙醇脱水各 5min,加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入 DAKO 杂交仪中杂交 20min。之后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺洗涤 15min,2×SSC 洗涤 5min。CD45 处理方法为:0.2%BSA 洗涤两次,2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594),室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。

[0154] 实验组 4:当日阴性富集片子涂于载玻片上,37℃烘箱内放置干燥后,1%多聚甲醛固定 8 分钟,即进行 FISH 与 CD45 同时处理的方法。

[0155] 处理步骤如下:37℃下 2×SSC 浸泡 15min,75%、85%、无水乙醇脱水各 5min。然后用 0.2%BSA 洗涤两次,向 10ul 探针加入 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594),盖上盖玻片,吹打混匀后加至标本表面,放入杂交仪进行变性及杂交。杂交时间为 1 小时以保证 CD45 孵育充分。揭掉盖玻片,50% 甲酰胺洗涤 15min,2×SSC 洗涤 5min,脱水,DAPI 复染封片。

[0156] 结果:与实验组 1 相比,实验组 3 的 CD45 较弱,实验组 4 的结果最弱,而实验组 2 与实验组 1 染出效果相似。

[0157] 讨论:血液中白细胞的表面抗原 CD45 表达较强,但随室温放置的时间延长会进行降解。当天即进行 FISH-CD45 的处理,即可得到较好的效果;而即使是当天处理的标本,同时处理 FISH 及 CD45 却不能得到很好的信号。而放置二天后 CD45 已降解,在这种情况下仍采用 FISH-CD45 的方法处理,已不能得到很好的效果,而采用实验组 2 的 CD45-FISH-CD45 方法,可加强 CD45 的染出强度,能达到当天即进行 FISH-CD45 处理的效果,从而为辅助判断提供更好的帮助。

[0158] 因此,本方法针对不同细胞,根据体液有核细胞表面标志物的表达情况,需采用不同的处理顺序以得到最佳效果。

[0159] 实施例 2

[0160] 本发明方法在细胞系模型中的灵敏度测试

[0161] 以外周血为本次测试的体液,白细胞为体液性有核细胞,选取 CD45 作为体液性细胞表面标志物。选取具有 8 号染色体三体遗传特征的 A549 细胞系作为非体液性稀有有核细胞,该细胞系部分细胞具有三条 8 号同源染色体。通过将其标记上荧光标识,检测本方法的回收率,以鉴定其灵敏度。8 号染色体探针选择 Vysis 公司的着丝粒探针:CEP8 (橙色)。

[0162] 本测试先使用 FISH 处理,再使用 CD45 处理。

[0163] 取正常人外周血 1ml,经血浆去除、红细胞裂解后,在光学显微镜下,用血球计数板计数白细胞,并用 PBS 稀释并重悬,至浓度为 142 个/u1。取 8 份稀释后的白细胞混悬液,每份 40ul (即约 5500 个白细胞),之后每一份均分别用 60ul PBS 重悬。(其中 4 份用来做本方法的灵敏度测试,另 4 份用来做仅用 FISH 方法的灵敏度测试。)

[0164] 用培养皿贴壁培养 A549 细胞。Mitotracker-Green (一种绿色线粒体荧光染料) 5ul 加入到 A549 培养皿中,孵育 1 小时,用胰蛋白酶消化后, PBS 重悬,这时 A549 细胞在荧光显微镜下观察呈绿色。将 A549 细胞悬液稀释至 5 个/u1、10 个/u1、20 个/u1、和 30 个/u1 的数值梯度,并吹打混匀每一个梯度的细胞悬液。每个梯度各取 1ul 加入到一份白细胞混悬液中,共 8 份。

[0165] 置 37℃烘箱内至完全干燥。取其中的 4 份,用 1% 多聚甲醛固定 8 分钟,先进行 FISH 处理,再用 CD45 处理。处理步骤包括:37℃下 2×SSC 浸泡 15min,75%、85%、无水乙醇脱水各 5min,加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入 DAKO 杂交仪中杂交 20min。之后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺洗涤 15min,2×SSC 洗涤 5min。0.2%BSA 洗涤两次,2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594),室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。

[0166] 镜下绿色 Mitotracker、红色 CD45 与橙色探针均易于观察,计数无 CD45 信号,且 8 号呈三体(荧光显微镜下观察为细胞核内有 3 个橙色点)扩增的细胞。所有表现红色 CD45 信号的细胞均被排除计数结果之外,8 号三体扩增的细胞与 Mitotracker 的绿色信号吻合性很好。最终结果为计数回收所得的细胞数目。各梯度均重复三次,各次回收值汇总于图 1。如图所示,mitotrack-green 为打入血标本的原数值,实际回收值为经过本技术方法处理后,回收所得的数值。结果显示本方法回收率很高(图 1),平均值为 95.8%。

[0167] 对比例 2

[0168] 仅用 FISH 在细胞系模型中的灵敏度测试

[0169] 做上述实验的同时进行仅 FISH 灵敏度的测试。之前准备工作与上述实验相同,只是后续仅用 FISH 处理,而不用 CD45 处理。

[0170] 取上述准备中的另 4 份标本,进行 FISH 处理:37℃下 2×SSC 浸泡 15min,75%、85%、无水乙醇脱水各 5min,加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入 DAKO 杂交仪中杂交 20min。之后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺洗涤 15min,2×SSC 洗涤 5min,脱水。DAPI (蓝色)复染,盖片,镜下观察。

[0171] 镜下绿色 mitotracker 与橙色探针易于观察,计数 8 号呈三体扩增的细胞,结果细胞核内 3 个信号点的细胞明显多于呈现绿色 mitotracker 的细胞。如图 2 所示,mitotrack-green 为打入血标本的原数值,实际回收值为经过本技术方法处理后,回收所得的数值。结果显示仅用 FISH 方法回收率平均值为 135%,即出现了 35% 的假阳性细胞,这些假阳性来自于一些点状杂质或供血者本人的突变淋巴细胞的干扰。导致检出的阳性数目远远大于实际打入正常人血液的 A549 细胞数目。

[0172] 讨论:仅用 FISH 方法进行的灵敏度测试,受假阳性的影响较大。而本方法所得的结果更为真实。如果在有淋巴细胞突变的外周血中检测非体液性稀有细胞(例如有淋巴细胞突变的早期肺癌病人),仅使用 FISH 方法去检测,则很容易将突变的淋巴细胞计为非体液性的稀有细胞,从而出现假阳性。而本方法可以排除突变的淋巴细胞,使得非体液性稀有核细胞的计数结果更为真实。

[0173] 实施例 3

[0174] 本发明在多例正常人中的假阳性测试

[0175] 22 例正常人入组假阳性测试,使用本公司的白细胞去除试剂盒进行阴性富集,各涂片 2 张。其中一张用于本发明方法的测试,另一张用于 FISH 的测试。

[0176] 其中一张采用本方法,经 1% 多聚甲醛固定 8 分钟后,先 FISH 后 CD45 的顺序处理,另一张仅用 FISH 处理作为对比。筛选用 8 号着丝粒探针(Vysis,橙)。本方法处理步骤为:将样本于 37℃在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,

50% 甲酰胺 43℃洗涤 15 分钟, 2×SSC 洗涤 5 分钟。0. 2%BSA 洗涤两次, 2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594), 室温下, 与标本避光孵育 1 小时。0. 2%BSA 再次洗涤后, DAPI 复染封片。

[0177] 对比例 3

[0178] 仅 FISH 的假阳性测试

[0179] 仅用 FISH 处理同样的 22 例正常人标本的另一张涂片。探针选用同样的 8 号着丝粒探针(Vysis, 橙色)。然后将样本于 37℃在 2×SSC 中浸泡 15 分钟, 经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水, 每级 4 分钟。加入 10u1 探针, 盖上盖玻片, 放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟, 杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片, 50% 甲酰胺 43℃洗涤 15 分钟, 2×SSC 两次, 每次 5 分钟, 再次脱水, 每次 2 分钟。该步酒精脱水后直接用 DAPI 封片, 以供观察。

[0180] 结果: 正常人筛选结果显示 FISH 的假阳性远远高于本方法($p < 0.05$) (图 3)。正常人无癌变细胞的存在, 但由于某些杂质造成的杂点或突变淋巴细胞等因素的影响, 有些细胞在镜下也会观察到 3 个或 3 个以上信号点的情况。因此, 如检测到了 3 个或 ≥ 3 个信号点的细胞, 即为“假阳性”。假阳性细胞数目越多, 说明该方法的特异性越差。

[0181] 传统 FISH 方法中, 22 人中有 19 人检测出假阳性细胞, 假阳性率高达 86. 3% (19/22), 其中 14 人检测出的假阳性细胞数目在 2-10 之间(即每个标本均发现了假阳性细胞, 数目为 2 个到 10 个不等), 另 5 例则均检测出了 > 10 个的假阳性细胞(即这 5 例标本中, 每例均发现了 10 个以上的假阳性细胞)。但是本发明方法处理的标本假阳性率仅为 9. 09% (2/22), 即, 仅有 2 例正常人标本检测出假阳性, 且各自只有 1 个假阳性细胞。

[0182] 讨论: 由数据来看, 可见传统 FISH 方法的假阳性很高, 特异性很差。如用来评价体液中本就稀少的稀有有核细胞, 则严重影响结果的真实性。本方法能有效排除假阳性的干扰, 为真实的非体液性稀有有核细胞的判定提供有效的检测手段。

[0183] 实施例 4

[0184] 使用本发明方法在血液标本中鉴定循环肿瘤细胞

[0185] 采用盲筛手段, 由不同人进行肺部良性肿瘤病人及肺癌病人各 2 例的 7. 5ml 血液抽取、阴性富集、检测操作及读片。富集后的标本加入无水乙醇作为固定剂, 各涂片 2 张, 过夜干燥。每个标本的其中 1 张用于本发明方法的检测标本, 另 1 张则用于 FISH 的检测。

[0186] 本发明方法采用先 FISH 后用血源性表面标志物 CD45 处理的顺序处理。FISH 探针采用肺癌中扩增的橙色 8 号着丝粒探针。具体步骤为: 将样本用 1% 多聚甲醛重固定 8 分钟后, 在 37℃ 2×SSC 中浸泡 15 分钟, 经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水, 每级 4 分钟。加入 10u1 探针, 盖上盖玻片, 放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟, 杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片, 50% 甲酰胺 43℃洗涤 15 分钟, 2×SSC 洗涤 5 分钟。0. 2%BSA 洗涤两次, 2%BSA 配制 CD45 抗体, 室温下, 与标本避光孵育 1 小时。0. 2%BSA 再次洗涤后, DAPI 复染封片。

[0187] 在未知病理诊断的前提下, 鉴定人仔细读片, 将 8 号(橙色)出现扩增的细胞视为阳性的 CTC 细胞。观察结果得 2 例肺部良性瘤血片中未发现 CTC, 而 2 例肺癌病人中分别发现 15 个、12 个 CTC。与临床诊断结果相符(图 4)。

[0188] 对比例 4

[0189] 仅使用荧光原位杂交法在血液中鉴定循环肿瘤细胞

[0190] 采取盲筛手段, 上述每个标本涂片中的另外 1 张用来做 FISH 的检测。FISH 探针

采用肺癌中扩增的 8 号(橙)着丝粒探针。将样本于 37℃ 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10u1 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 两次,每次 5 分钟,再次脱水,每次 2 分钟,DAPI 复染封片。

[0191] 在未知病理诊断的前提下,鉴定人仔细读片,观察结果得 2 例肺部良性瘤血片中分别发现假阳性 CTC13 个、6 个,而 2 例肺癌病人中分别发现 35 个、19 个。良性肿瘤的计数结果与临床诊断结果不相符,出现了假阳性。

[0192] 讨论:良性肿瘤的细胞不会发生突变,而恶性肿瘤的突变率很高。由结果对比来看,本方法改进后,血液中 CTC 的假阳性数目明显降低,提高了 CTC 检测的真实性。

[0193] 实施例 5

[0194] 本方法对血液中直接涂片法 CTC 的鉴定

[0195] 取 1 例肺癌病人及 1 例正常人外周血各 2ml 经红细胞裂解后直接涂片。该方法因不经过富集步骤,所得白细胞数目很多,需各涂片 8 张,共 16 张。取每个标本的 4 张,共 8 张用于本发明方法的检测,另 8 张用于 FISH 方法的检测。

[0196] 应用本发明方法,以 CEP8 为 FISH 探针,以 CD45 为白细胞表面标志物,先用 FISH 处理,再用 CD45 处理。具体步骤为:将样本用 1% 多聚甲醛固定 8 分钟后,在 37℃ 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10u1 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 洗涤 5 分钟。0.2%BSA 洗涤两次,2%BSA 配制 CD45 抗体,室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。

[0197] 在未知的情况下,由鉴定人仔细读片,发现肺癌病人有 2 个 CTC,正常人没有发现 CTC。

[0198] 对比例 5

[0199] 仅用荧光原位杂交方法对血液中直接涂片法 CTC 的鉴定

[0200] 取上述涂片中的另 8 张,仅用 FISH 处理标本片。具体步骤为:将样本于 37℃ 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10u1 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 两次,每次 5 分钟,再次脱水,每次 2 分钟,DAPI 复染封片。

[0201] 在未知的情况下,由鉴定人仔细读片,发现肺癌病人有 12 个阳性细胞,正常人中发现 7 个假阳性细胞。

[0202] 讨论:由此可见,本方法可用于多种富集方法所获得的循环肿瘤细胞的鉴别。且相比于仅 FISH 方法的检测,本方法能排除假阳性结果。

[0203] 实施例 6

[0204] 使用本发明方法在胸水标本中鉴定循环肿瘤细胞

[0205] 采用胸水为体液,检测胸水中的非体液性稀有有核细胞。采用盲筛手段,由不同人进行 1 例肺结核病人及 1 例肺癌病人的胸水 7.5ml 抽取、阴性富集,最终加入无水乙醇(用于固定),各涂片 2 张,干燥过夜。每个标本的其中 1 张用于本发明方法的检测,另一张用于 FISH 方法的检测。

[0206] 本发明方法采用先 FISH 后 CD45 处理、读片的方式处理。FISH 探针采用肺癌中扩

增的 7 号(绿色)、8 号(橙色)(Vysis)二种着丝粒探针。将样本 1% 多聚甲醛重固定 8 分钟后,于 37℃ 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针(每种探针 5ul),盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 两次,每次 5 分钟,再次脱水,每次 2 分钟。0.2%BSA 洗涤两次,2%BSA 配制 CD45 抗体(连接荧光素 Alexa594),室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。

[0207] 在未知的前提下,鉴定人仔细读片,观察结果得肺结核病人本方法未发现异常细胞,而肺癌病人中发现 31 个 CTC。与临床诊断结果相符。

[0208] 对比例 6

[0209] 仅使用荧光原位杂交法在胸水标本中鉴定循环肿瘤细胞肺癌细胞

[0210] 上述涂片中的另一张用于 FISH 的检测。FISH 探针采用肺癌中扩增的 7 (绿)号、8 (橙)号(Vysis)二种着丝粒探针。将样本于 37℃ 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针(每种探针 5ul),盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 两次,每次 5 分钟,再次脱水,每次 2 分钟,DAPI 复染封片。

[0211] 在未知的前提下,鉴定人仔细读片,肺结核病人中发现 2 个假阳性细胞,病人中发现 45 个阳性细胞。

[0212] 讨论:由此可见,本方法可适用于在多种体液中鉴别非体液性稀有有核细胞。胸水中含有很多上皮细胞和白细胞,不能用上皮源标志物进行鉴定。如用本方法检测,则能区分出结核病人与肺癌病人。且本方法所检测到的 CTC 有利于观察到更多真实的 CTC。

[0213] 实施例 7

[0214] 使用本发明方法鉴定慢性淋巴白血病(CLL)的循环内皮细胞(CEC)

[0215] CEC 可能是 CLL 的进展标志(Rigolin, Cancer, 2010, 116)。CLL 常见的淋巴细胞突变为 CEP12 三体。部分 CEC 会表现出与淋巴细胞相同的遗传学病变。

[0216] 抽取 1 例 CLL 及 1 例正常人外周血(由合作实验室提供),经阴性富集,用无水乙醇固定后各涂片 2 张,其中一张用于本方法检测,另一张用于 FISH 检测。利用 CEP12 (绿色)为荧光原位杂交探针,以 CD45 为白细胞标志物。将标本用 1% 多聚甲醛重固定 8 分钟后,采用先 FISH 后 CD45 的方法进行检测。具体步骤为:将样本用 1% 多聚甲醛固定 8 分钟后,在 37℃ 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 洗涤 5 分钟。0.2%BSA 洗涤两次,2%BSA 配制 CD45 抗体,室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。结果发现,该 CLL、正常人标本中检测到的 CEC,分别为 8 个、0 个阳性细胞。

[0217] 对比例 7 仅使用 FISH 鉴定 CLL 标本的 CEC

[0218] 使用上述标本涂片的另一张做 FISH,使用同样的探针。将样本于 37℃ 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43℃ 洗涤 15 分钟,2×SSC 两次,每次 5 分钟,再次脱水,每次 2 分钟,DAPI 复染封片。经读片,CLL 与正常人中结果分别为 23 个、2 个。

[0219] 讨论:CLL患者本身淋巴细胞即存在12号染色体扩增的现象,若仅凭FISH来检测,则区分不出CEC与突变的淋巴细胞,而本方法可以加以区分,增加了CEC检测的真实性,为分析CEC的特性提供了方法学基础。本结果也证明本方法所检测到的CEC结果与临床表征相符,证明了本方法在CEC检测方面具有可行性。

[0220] 实施例8

[0221] 本方法在恶性肿瘤患者血液中计数CTC

[0222] 采集2例肺癌病人血液7.5ml,进行阴性富集,加入无水乙醇(用于固定),分别涂片二张,过夜干燥。其中一张用于本发明方法的检测,另一张用于FISH方法的检测。

[0223] 其中一张采用先FISH再CD45的方法进行检测。FISH探针采用肺癌中扩增的7(绿)、8(橙)号(Vysis)二种着丝粒探针。

[0224] 本方法处理:将样本用1%多聚甲醛重固定8分钟,于37℃在2×SSC中浸泡15分钟,经75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级4分钟。加入10ul探针(每种探针5ul),盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性5分钟,杂交20分钟。然后揭掉盖玻片,50%甲酰胺43℃洗涤15分钟,2×SSC洗涤5分钟。0.2%BSA洗涤两次,2%BSA配制CD45抗体(连接荧光素Alexa594),室温下,与标本避光孵育1小时。0.2%BSA再次洗涤后,DAPI复染封片。

[0225] 在未知的前提下,鉴定人仔细读片,两例病人CTC观察结果分别为12,15。

[0226] 对比例8

[0227] 上皮源标志物CK8,CK18,CK19联合检测在血液中计数CTC

[0228] CK8/18/19为目前市场上较为常用的CTC检测标志物。上述的另一张标本涂片用于上皮标志物CK8,CK18,CK19的联合检测,进行抗体CK类的染色计数。上皮源标志物免疫荧光染色:0.2%BSA洗涤两次,浸润两次3分钟,2%BSA配制CD45(连接荧光素Alexa594)及CK类抗体(连接荧光素Alexa488,绿色),室温下,与标本避光孵育1小时。0.2%BSA再次洗涤后,DAPI复染封片。

[0229] 结果:在未知的前提下,鉴定人仔细读片,两个病人观察结果分别为2,3。

[0230] 讨论:上皮标志物为目前临床诊断中较普遍的CTC标志物,但入血的上皮源肿瘤细胞,受间质化影响,上皮标志物表达下调。本方法的CTC标志物计数结果多于CK类计数,与临床诊断结果相符程度更高。

[0231] 实施例9

[0232] 本发明方法CD45+FISH联合在乳腺癌中的检测

[0233] 采集2例乳腺癌者,2例乳腺炎患者的7.5ml血,进行阴性富集,加入无水乙醇用于固定作用,分别涂2张片,过夜干燥。其中一张用于本发明方法的检测,另一张用于对比例9的检测。FISH探针采用乳腺癌中也扩增的8(橙)号(Vysis)着丝粒探针。

[0234] 本方法处理:将样本用1%多聚甲醛重固定8分钟,于37℃在2×SSC中浸泡15分钟,经75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级4分钟。加入10ul探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性5分钟,杂交20分钟。然后揭掉盖玻片,50%甲酰胺43℃洗涤15分钟,2×SSC洗涤5分钟。0.2%BSA洗涤两次,2%BSA配制CD45抗体(连接荧光素Alexa594),室温下,与标本避光孵育1小时。0.2%BSA再次洗涤后,DAPI复染封片。

[0235] 在未知的前提下,由鉴定人仔细读片,每张标本读片约40分钟。两例乳腺患者的CTC观察结果分别为4,9;两例乳腺炎患者的观察结果为0,0。

[0236] 对比例 9

[0237] CK+ 乳腺标志物 +CD45 与 FISH 联合在乳腺癌中的检测

[0238] 鉴于目前市场上很多产品使用多种标志物联合,以保证灵敏度及特异性。也有出现抗体与 FISH 联合检测,多为免疫荧光染色后揭掉盖玻片,再单独进行 FISH 处理。因此,本对比例选择了多种标志物联合 FISH 检测的方法,即免疫荧光染色与 FISH 分开单独处理。其中标志物选择市场上使用最多的 CK8, 18, 19, 以及加强染色标志物 ER、PR、HER2。这两种产品的共同特性在于其能在乳腺癌 CTC 的鉴别均有较好的检测效果。

[0239] 取实施例 9 中所述 4 例标本中的另一张用于本对比例的检测。操作方法为按照常规手段,先进行免疫荧光染色,读片鉴别后再进行 FISH 处理。方法如下:

[0240] 免疫荧光染色:0.2%BSA 洗涤两次,浸润两次,每次 3 分钟,2%BSA 配制 CD45 (连接荧光素 Alexa594,红色)、CK 类以及 ER、PR、HER2 抗体(均连接荧光素 Alexa488,绿色)。室温下,与标本避光孵育 1 小时。0.2%BSA 再次洗涤后,DAPI 复染封片。用 Bioview 公司 DUET-3 扫描软件进行结果的扫描,共耗时 60 分钟,即每张片 15 分钟,其可进行精确定位并把每个视野都拍照留存照片。

[0241] 然后将标本在 PBS 中轻轻滑动,小心甩掉盖玻片。接着于 37°C 在 2×SSC 中浸泡 15 分钟,经 75%、85%、无水乙醇逐级脱水,每级 4 分钟。加入 10ul 探针,盖上盖玻片,放入杂交仪(DAKO)变性 5 分钟,杂交 20 分钟。然后揭掉盖玻片,50% 甲酰胺 43°C 洗涤 15 分钟,2×SSC 洗涤 5 分钟。脱水后,DAPI 封片。

[0242] 之后进行 FISH 的人工读片,每张标本读片约 2 个小时。结果比对分 2 步:首先,将扫描软件所得的抗体阳性细胞照片与 FISH 结果比对,通过扫描软件的定位坐标,在 FISH 结果片上找到目标区域,通过逐步缩小观察范围,进而找到该阳性细胞,看该细胞是否也是 FISH 阳性。若为阳性,则计为双阳性细胞;若 FISH 不扩增,则计为单抗体阳性细胞。接着,将人工所读到的单 FISH 异常(即 CK 类、ER、PR、HER2 均未呈现阳性,而 FISH 出现扩增信号)的细胞定位,与软件所识别的该细胞照片去比对,以确定 CD45 是否为阳性,以确定单 FISH 阳性细胞的真实数目。最后,将这些阳性结果加和,则为该标本的阳性细胞数目。

[0243] 结果 1:两例乳腺癌患者的 CTC 观察结果分别为 6, 13。其中,2 例乳腺癌标本的抗体计数结果为 5, 9, 其中分别有 3、3 个抗体阳性细胞的 FISH 也为阳性,这些细胞计为双阳性。但也发现该 2 例标本分别有 1 个、2 个抗体阳性细胞在处理完 FISH 之后丢失(其周围细胞大部分均在,但该阳性细胞丢失,猜测该丢失可能发生在做 FISH 之前的揭掉盖玻片的这个步骤中)。之后进行的 FISH 读片,发现单 FISH 异常细胞数目为 4, 6, 通过比对 CD45, 发现其中分别有 3、2 个假阳性细胞,因此单 FISH 阳性细胞数目应为 1、4 个。这样将抗体染色的结果与 FISH 读片结果相加,即该 2 例乳腺癌患者的数目为 6 个(即 2 个单抗体阳性 +3 个双阳性 +1 个单 FISH 阳性), 13 个(6 个单抗体阳性 +3 个双阳性 +4 个单 FISH 阳性)。

[0244] 结果 2:采用同样的加和方式来计算 2 例乳腺炎的异常细胞数目为 0, 3。免疫荧光染色结果的单阳性细胞个数为 0、3 个,而单 FISH 异常细胞 1, 2 个,经过比对之前的 CD45 照片,发现 CD45 均为阳性,因此视为 FISH 假阳性细胞。同时,有一个抗体的阳性细胞在做完 FISH 后仍然丢失了。

[0245] 讨论:目前 CTC 检测趋于使用多种标志物联合,以提高检出率,避免肿瘤细胞抗原异质性的影响。本例也进行了增加标志物的对比,但结果发现,相对于本方法,增加标志物

并没有大幅度地提高检出率,反而对于炎症类的良性病人来说,增加了假阳性。另一方面,由于增加了标志物,读片时间增加了很多,结果的计算也颇为繁琐,严重降低了效率;且配制抗体既增加了操作的复杂性,又增加了成本。由此可见,本发明方法的灵敏度、特异性以及效率均好于多种肿瘤标志物与 FISH 的联合检测。

[0246] 实施例 10

[0247] CTC 的下一步应用

[0248] CTC 可作为进一步研究的平台,如进行遗传学基因的研究等。本实验测试了本方法得到 CTC 后是否可进行基因研究的可行性。

[0249] 将含 EGFR 突变的 H1975 细胞系打入正常人血。经阴性免疫磁珠富集后的血液标本,涂于可切割的 Leica 切割镀膜载玻片上,干燥后经 1% 多聚甲醛固定,进行先 FISH 后 CD45 的处理(FISH 以 EGFR 探针为特异性探针)。镜下定位异常的 H1975 细胞。在显微切割仪器上将该异常细胞切下,经过特异性的 PCR 扩增,得到的产物进行电泳,结果显示产物为 EGFR 片段。(图 5,箭头所示即为 EGFR 片段的电泳结果)。

[0250] 讨论:本方法的灵敏度、特异性均良好,经过本方法检测到的 CTC 更真实可靠,为进行下一步遗传学信息的分析奠定了良好的基础。

[0251] 实施例 11

[0252] 不同浓度多聚甲醛固定时间的比较

[0253] 取正常人外周血 1ml,经血浆去除、红细胞裂解后,在光学显微镜下,用血球计数板计数白细胞,并用 PBS 稀释并重悬,至浓度为 10^3 个 / μ l。取 12 份稀释后的白细胞混悬液,每份 10 μ l (即约 1000 个白细胞),编号为 1-12;之后每一份均分别用 90 μ l PBS 重悬,加无水乙醇过夜固定干燥。

[0254] 第二天将已干燥的标本片取出,按照以下重固定液处理这些片子:

[0255] 1%PFA 滴加至标本上,处理时间分别为 4、6、8、12、15、18 分钟;

[0256] 2%PFA 滴加至标本上,处理时间分别为 4、6、8 分钟;

[0257] 4%PFA 滴加至标本上,处理时间分别为 4、6、8 分钟。

[0258] 滴加固定液时以先滴加长时间的重固定液为原则,以避免固定时间带来的结果偏差,即,从实验倒计时 18 分钟开始,先对 1 号标本片滴加 1%PFA;倒计时第 15 分钟时对 2 号标本片滴加 1%PFA;倒计时第 12 分钟对 3 号标本滴加 1%PFA;倒计时第 8 分钟时,分别对 4、5、6 号标本滴加 1%、2%、4%PFA;倒计时第 6 分钟时,分别对 7、8、9 号标本滴加 1%、2%、4%PFA;倒计时第 4 分钟时,分别对 10、11、12 号标本滴加 1%、2%、4%PFA。经上述重固定后,标本片同时洗去多聚甲醛,再同时按先 FISH 后 CD45 的顺序处理标本片。

[0259] 实验处理完毕后,在荧光显微镜下随机挑选 5 个视野,每个实验计数 10 个细胞,观察 FISH 及 CD45 的效果,以 0、+、++、+++、※ 来代表效果的无、弱、中、好、弥散四种状态(※ 弥散指的是信号亮度虽较好,但分散成很多个细小的碎片,FISH 如出现这种信号,则在判读结果时可能会被判读为 2 个或者多个信号),最后对这些效果进行比对。

[0260] 比对结果见图 6。由比对结果可得知 FISH 信号及 CD45 均随着浓度的升高、时间的延长,信号有所减弱。其中,1%PFA \leq 6 分钟,2%PFA \leq 4 分钟时,CD45 虽较好,但 FISH 信号程序弥散的状态。

[0261] 1%PFA 的 8 及 12 分钟、2%PFA 的 6 分钟、4%PFA 的 4 分钟固定效果相似。但如果在

处理多个标本的情况下,需要留给操作者足够的时间滴加及洗去固定液,以保证固定效果。1%PFA 最佳范围为 8-12 分钟,其中至少有 4 分钟的时间浮动,足够操作者完成 10 个甚至更多的标本,而 2%、4%PFA 最佳固定效果的时间范围较短(< 2 分钟),不能留给操作者足够的时间。因此,在标本较少时,使用 1%、2%、4%PFA 均可使用,固定时间分别为 8 分钟、6 分钟、4 分钟;而当标本较多时,建议采用 1%PFA,固定时间为 8 分钟。

[0262] 实施例 12

[0263] 不同固定剂效果的比较

[0264] 抽取正常人外周血 1ml,经血浆去除、红细胞裂解后,在光学显微镜下,用血球计数板计数白细胞,并用 PBS 稀释并重悬,至浓度为 103 个/u1。取 4 份稀释后的白细胞混悬液,每份 10u1 (即约 1000 个白细胞),编号为 1-8;之后每一份均分别用 90u1 PBS 重悬,加无水乙醇过夜固定干燥,过夜干燥。

[0265] 第二天将已干燥的标本片取出,分别按如下步骤处理:

[0266] 1 号片不用重固定剂;

[0267] 2 号片用 1%PFA 处理 8 分钟;

[0268] 3、4 号片分别用 2% 戊二醛处理 8 分钟,1% 戊二醛处理 15 分钟;

[0269] 5、6 号片分别用丙酮处理 8、15 分钟;

[0270] 7、8 号片分别用 5% 冰醋酸处理 8、15 分钟。

[0271] 按照实施例 10 中同样的倒计时方法滴加固定液,控制固定时间。然后同时进行先 FISH 后 CD45 的处理。实验处理完毕后,在荧光显微镜下随机挑选 5 个视野,每个实验计数 10 个细胞,观察 FISH 及 CD45 的效果。

[0272] 结果总结如下:

[0273] 1 号:不用重固定剂,FISH 信号弥散,CD45 较好。

[0274] 2 号:用 1%PFA 处理 8 分钟,FISH 信号及 CD45 信号均较好。

[0275] 3、4 号:两片处理方法区别在于经 1% 戊二醛处理 15 分钟、2% 戊二醛处理 8 分钟。CD45 效果较好,但 FISH 信号情况较为复杂,有的信号较好,有的比 2 号片信号弱,有的亮度较好但弥散。

[0276] 5、6 号:两片处理方法区别在于经丙酮分别处理 8、15 分钟。FISH 信号弥散,CD45 较好。

[0277] 7、8 号:两片处理方法区别在于经 5% 冰醋酸分别处理 8、15 分钟。FISH 信号较好,但 CD45 较弱。

[0278] 综合分析可知,多聚甲醛固定效果较好,能使 FISH 及 CD45 均出现较好的信号。

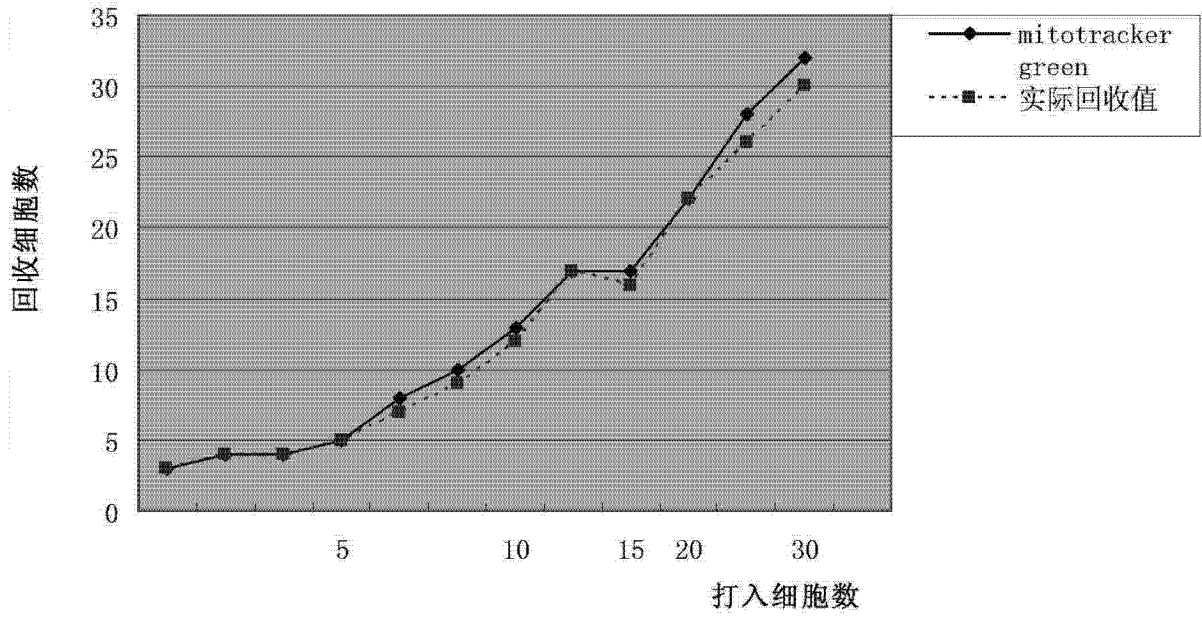


图 1

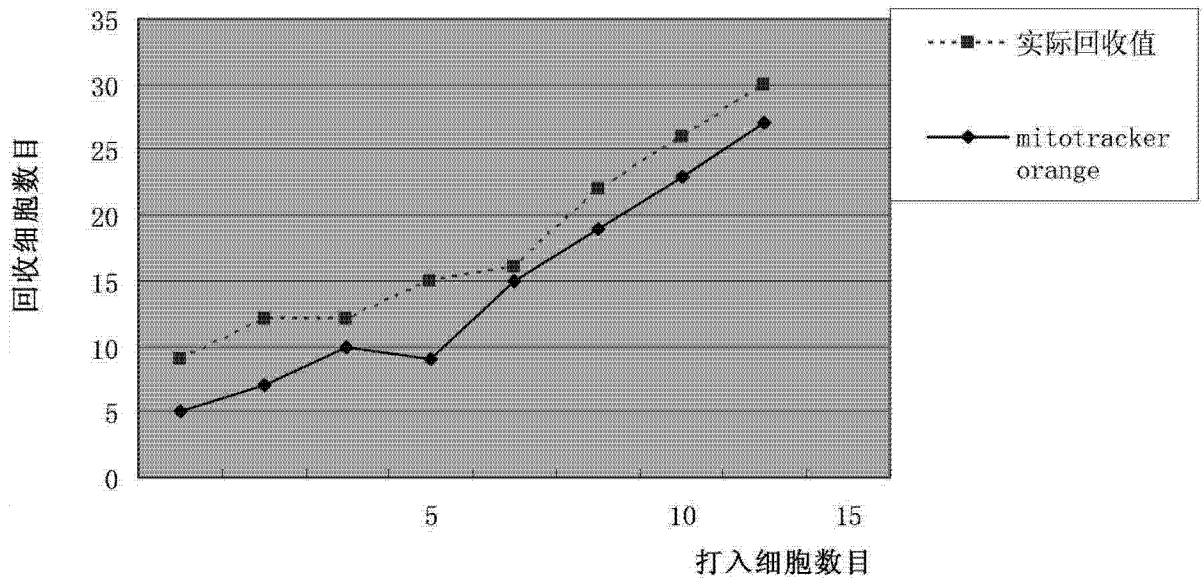


图 2

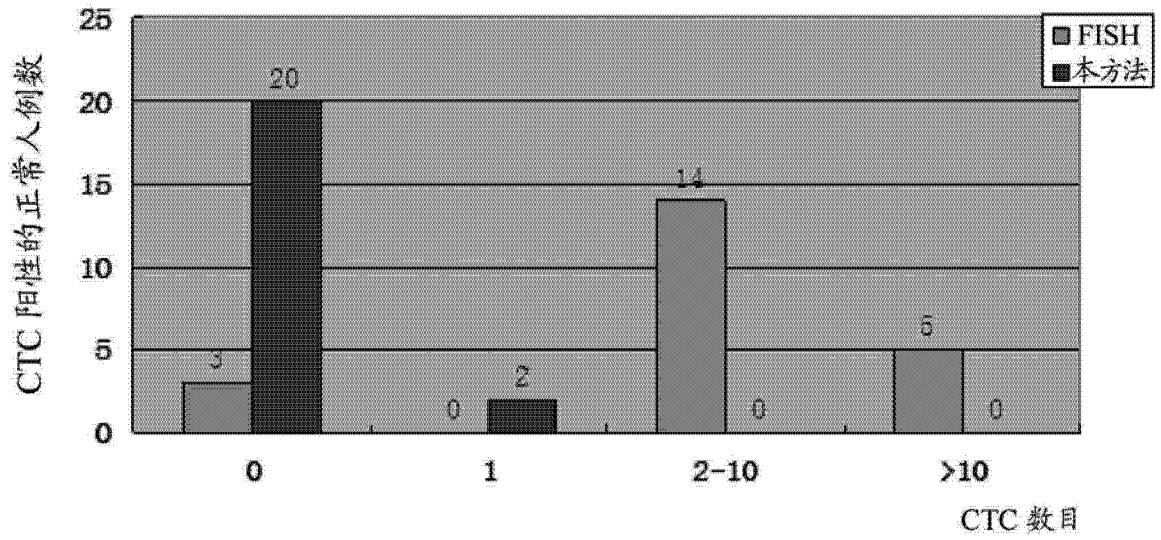


图 3

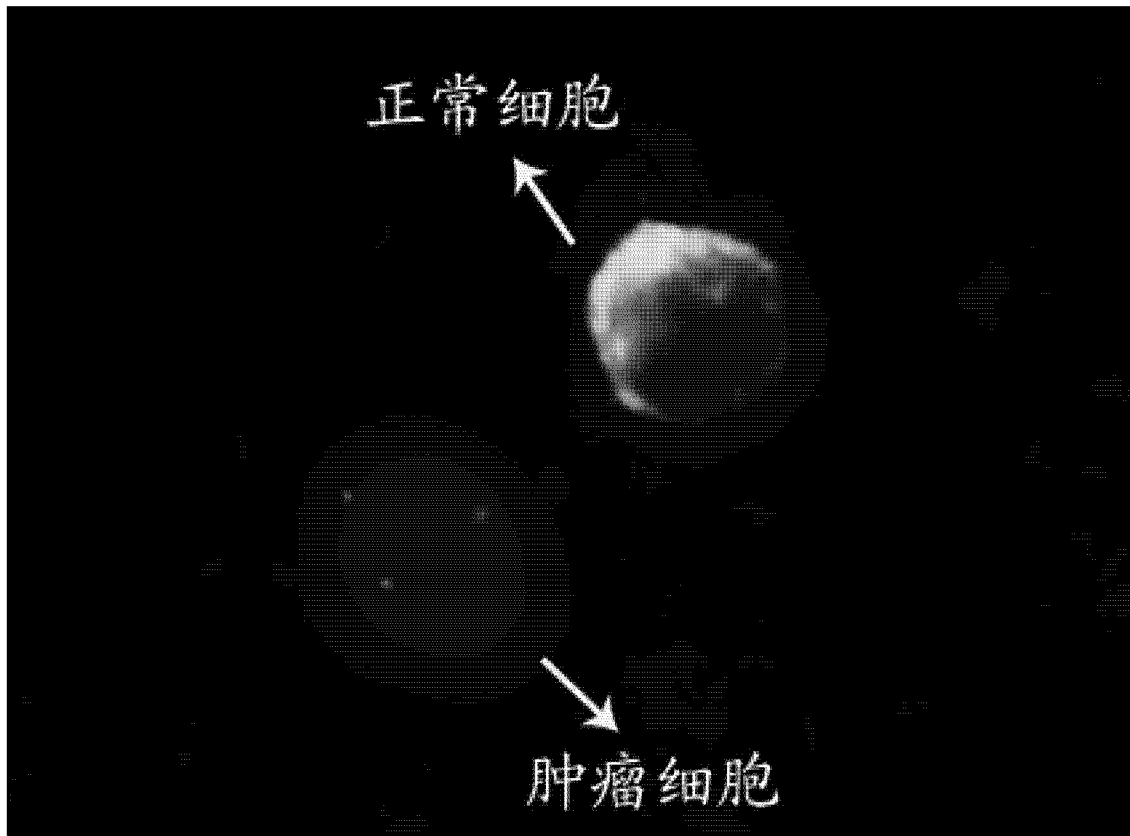


图 4

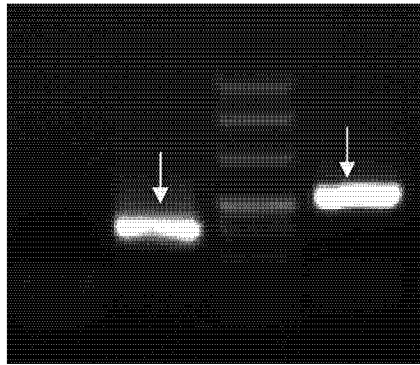


图 5

	FISH	CD45
1	0	+
2	++	++
3	+++	+++
4	+++	+++
5	++	++
6	0	0
7	※	+++
8	+++	+++
9	+	+
10	※	+++
11	※	+++
12	+++	+++

图 6

专利名称(译)	一种检测非体液性稀有有核细胞的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN104007257A	公开(公告)日	2014-08-27
申请号	CN201310057307.0	申请日	2013-02-24
[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	詹厅		
发明人	詹厅		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/57407 G01N33/57484 G01N2333/70525 G01N2333/70589		
其他公开文献	CN104007257B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种对非体液性稀有有核细胞进行检测的新方法，对于多种手段得到生物体液中的非体液性稀有有核细胞，通过联合使用体液性细胞表面标志物的抗体以及非体液性稀有有核细胞的特异性探针，达到鉴别富集后的该稀有有核细胞的目的。相对于目前市场上已有的商品化鉴别方法而言，本方法将处理非体液性稀有有核细胞的荧光原位杂交（FISH）方法与处理体液性有核细胞的免疫荧光染色进行了良好的结合，针对同一张标本片进行系统的结合性处理，能同时并清晰地观察到这两种处理的结果。

