



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112806352 A

(43) 申请公布日 2021.05.18

(21) 申请号 202011428224.4

(22) 申请日 2014.03.14

(30) 优先权数据

61/798,627 2013.03.15 US

(62) 分案原申请数据

201480014875.5 2014.03.14

(71) 申请人 特拉基应用基因组学有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 托尼·K·贝克

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

有限公司 11262

代理人 陆扬 李肖芳

(51) Int.Cl.

A01N 1/02 (2006.01)

C12Q 1/6806 (2018.01)

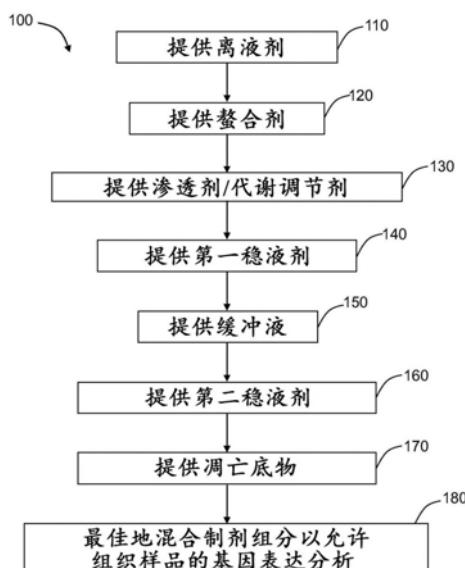
权利要求书2页 说明书19页 附图8页

(54) 发明名称

用于保持已手术去除的组织中的癌细胞活力的方法和试剂

(57) 摘要

一种组合物和方法,其用于生成试剂以及这些试剂的组合物,这些试剂用于通过用低摩尔浓度的协同化学品以及激素生长促进剂显著调节细胞代谢来稳定和保持已被手术切除的癌组织的活力以及暂停和/或终止凋亡(细胞死亡),同时保持手术切除的组织的正常基因表达谱。



1. 一种制备用于组织样品的试剂的方法, 该方法包括:

提供至少一种离液剂;

提供至少一种稳液剂;

提供螯合剂;

提供缓冲液;

提供凋亡底物;

提供代谢调节剂; 以及

将所述离液剂、稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物和代谢调节剂以特定的顺序混合, 以便能够进行置于所述试剂中的组织样品的基因表达分析。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其特征在于, 所述凋亡底物是癌细胞凋亡底物并且所述组织样品是手术切除的癌组织样品。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔, 所述稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔, 所述螯合剂的最终浓度为约0.1M至约2摩尔, 且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

4. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法, 其特征在于, 所述离液剂选自硫氰酸钠、H₂PO₄⁻、HC₀₃⁻、I⁻、Cl⁻、NO₃⁻、NH₄⁻、CS、K⁺、(NH₄)₂CO₃、胍的所有盐、Br和Rb。

5. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法, 该方法包括:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加硫氰酸钠, 接着添加EDTA, 然后添加DMSO, 接着添加甘油, 然后添加磷酸钠, 接着添加aa-海藻糖, 接着添加瘦素; 以及

在各次组分添加之间以允许组织样品的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

6. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法, 该方法包括:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加至少一种离液剂、螯合剂、代谢调节剂、第一稳液剂, 接着添加缓冲液, 然后添加第二稳液剂, 接着添加凋亡底物; 以及

在各次组分添加之间以允许所述组织样品在置于所述试剂中时的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

7. 一种允许基因表达分析的用于组织样品的试剂, 该试剂包含以下组分:

至少一种离液剂;

至少一种稳液剂;

螯合剂;

缓冲液;

凋亡底物; 以及

代谢调节剂。

8. 一种用于组织样品的试剂盒, 其包含: 容器, 该容器被配置用于容纳细胞活力试剂, 该细胞活力试剂包含允许所述组织样品的基因表达分析的组分, 所述试剂盒的特征在于所述试剂的组分包含至少一种离液剂、至少一种稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物和代谢调

节剂。

9. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法,该方法由以下步骤组成:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加硫氰酸钠,接着添加EDTA,然后添加DMSO,接着添加甘油,然后添加磷酸钠,接着添加aa-海藻糖,接着添加瘦素;以及

在各次组分添加之间以允许置于所述试剂中的组织样品的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

10. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法,该方法由以下步骤组成:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加至少一种离液剂、螯合剂、代谢调节剂、第一稳液剂,接着添加缓冲液,然后添加第二稳液剂,接着添加凋亡底物;以及

在各次组分添加之间以允许所述组织样品在置于所述试剂中时的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

用于保持已手术去除的组织中的癌细胞活力的方法和试剂

本申请是申请日为2014年03月14日、申请号为201480014875.5、发明名称为“用于保持已手术去除的组织中的癌细胞活力的方法和试剂”的中国专利申请(其对应PCT申请的申请日为2014年03月14日、申请号为PCT/US2014/029198)的分案申请。

技术领域

[0001] 本发明涉及生成用于已手术切除的癌组织的稳定、保存和活力的试剂以及试剂组合物的方法。

背景技术

[0002] 几十年来,用来检测来自切除组织的癌细胞的用于病理分析的手术组织收集已经成为癌症诊断的标准实践。当前的组织样品收集方案要求将切除组织收集并置于福尔马林溶液中,并随后将其运送到病理实验室进行染色和分析。遗憾的是,福尔马林固定细胞(例如,杀死细胞)并且在这一过程中引起细胞完整性的显著改变,从而在准确地进行基因组检测(RNA、mRNA和蛋白质生物标志物分析,和基因表达研究)分析的能力方面产生问题。

[0003] 分子技术,如采用实时聚合酶链反应技术(RT-PCR)进行的基因组检测,已发展到某些癌症可以匹配于特定的化学疗法的程度,该化学疗法已被证明响应于在癌细胞中发现的某些基因表达谱。因此,能够获得从患者切除的癌细胞的准确基因表达谱允许通过设计个性化的化学疗法以及其他处理来进行个性化健康照护。这是治疗范例的非常重要的转变,并将代表在不久的将来的医护标准。

[0004] 已在福尔马林中保存的癌组织样品并非用于完成基因表达分析的活的组织样品。福尔马林并非对组织样品实现基因表达分析的良好试剂的一个原因是,福尔马林导致蛋白质缓慢交联成网状网络,并且由于有价值的靶蛋白质没有针对降解得到保护,因此它们可能被福尔马林处理破坏。

[0005] 此外,随着福尔马林渗透组织样品,发生细胞死亡(凋亡)。癌细胞是独特的,因为它们具有代谢性预程序化凋亡,从而在福尔马林中发生加速的凋亡。随着组织样品中的细胞死亡,总细胞群体的子集裂解并释放宽范围的内部调节酶,这些内部调节酶进一步导致细胞死亡加速。这些酶中的许多酶将降解或破坏靶核酸DNA、RNA、mRNA、调节蛋白以及在分子基因组分析中使用的相关生物标志物。在固定过程中,福尔马林杀死了组织样品中的细胞,而基因表达可成为不稳定的,并且关键基因的基因组表达可变得欠表达或过表达,从而产生某些癌基因的表达的不准确值。这是在基于来自选定基因的特定mRNA的水平作出化学疗法决定时的主要问题。因此,当前不可能对在福尔马林中固定的癌细胞获得准确的基因组检测。

[0006] 还应当注意的是,用福尔马林固定组织样品中的蛋白质和细胞需要约48小时才发生。这使得福尔马林过程不能非常准确地确定在从患者收集组织时有什么样的基因表达。

[0007] 通常,从组织固定获得的遗传数据的科学有用性与组织的质量和该组织对于基因组检测的有用性直接相关。目前,福尔马林固定在获得准确的基因表达信息方面并不是非

常有用的。因此,需要这样的试剂:其用于固定组织样品,以使得所收集的样品包含用于遗传检测的准确基因表达标志物。

[0008] 还需要不像福尔马林那样危险的组织样品固定试剂。遗憾的是,福尔马林给使用者带来显著的癌症风险,以及关于含福尔马林产品的使用和处置的重要州及联邦规定。

[0009] 本发明公开了用于制备允许收集从患者中手术去除的癌组织的试剂和试剂组合物的方法,其中组织样品中的癌细胞的遗传细胞信息保持在活的状态,使得组织样品适合于基因表达分析。

发明内容

[0010] 本发明公开了制备用于组织样品如活检样品的细胞活力试剂的新方法,该细胞活力试剂允许样品中细胞的基因表达分析。

[0011] 在制备用于组织样品的试剂的方法的大多数实施方案中,该方法包括:提供至少一种离液剂(chaotrope),提供至少一种稳液剂(kosmotrope),提供螯合剂,提供缓冲液,提供凋亡底物,提供代谢调节剂,以及将所述离液剂、稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物以及代谢调节剂以能够进行组织样品的基因表达分析的方式混合。

[0012] 在制备用于组织样品的试剂的方法的许多实施方案中,所述凋亡底物是癌细胞凋亡底物并且所述组织样品是手术切除的癌组织。

[0013] 在本发明方法的大多数实施方案中,在用于组织样品的试剂中,所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔(Molar)至约2摩尔,所述稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述螯合剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

[0014] 在本发明方法的某些实施方案中,所述离液剂选自SCN⁻(硫氰酸钠)、H₂PO₄⁻、HCO₃⁻、I⁻、Cl⁻、NO₃⁻、NH₄⁺、C_S、K⁺、(NH₄)C⁺胍、胍的所有盐、Br或Rb。

[0015] 在制备所述试剂的方法的一些实施方案中,所述至少一种稳液剂选自甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因(Ectoine)、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖或D-乳糖。

[0016] 在其他实施方案中,所述螯合剂选自EDTA、EGTA或BABTA。

[0017] 在本发明方法的另一实施方案中,所述缓冲液选自BIS-TRIS、BIS-TRIS丙烷、HEPES、HEPES钠盐、MES、MES钠盐、MOPS、MOPS钠盐、钠盐或磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄)。

[0018] 在所述方法的又一实施方案中,所述凋亡底物选自DMSO、瘦素、甘氨酸甜菜碱(Glycine betaine)、柠檬酸钾、三甲胺、脯氨酸、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCl₂或CTAB。

[0019] 在一些实施方案中,所述代谢调节剂选自极性非质子溶剂、DMSO、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺或乙腈。

[0020] 在大多数实施方案中,制备所述试剂的方法进一步包括将所述试剂的各种组分按照以下的相继顺序添加至净化水的整分试样中:添加至少一种离液剂,接着添加所述螯合剂,接着添加所述代谢调节剂,接着添加第一稳液剂,接着添加所述缓冲液,接着添加不同于第一稳液剂的第二稳液剂,最后接着添加所述凋亡底物。

[0021] 在本发明的许多实施方案中,所述离液剂是SCN⁻ (硫氰酸钠),所述第一稳液剂是甘油而所述第二稳液剂是aa-海藻糖,所述螯合剂是EDTA,所述缓冲液是磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄³⁻),所述细胞凋亡底物是瘦素,且所述代谢调节剂是DMSO。

[0022] 在另一实施方案中,制备用于分析组织样品的试剂的方法包括:提供净化水的整分试样;将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:添加硫氰酸钠、EDTA、DMSO、甘油、磷酸钾缓冲液以及aa-海藻糖,接着添加人瘦素;以及在各种组分的各次添加之间以允许组织样品或活检组织的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

[0023] 在一些实施方案中,制备用于分析组织样品的试剂的方法包括:提供净化水的整分试样;将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:添加至少一种离液剂,接着添加螯合剂,接着添加代谢调节剂,然后添加第一稳液剂,然后添加缓冲液,接着添加不同的第二稳液剂,接着添加凋亡底物;以及在各次组分添加之间以允许组织样品的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

[0024] 在大多数实施方案中,用于制备组织样品的、允许基因表达分析的试剂包含:至少一种离液剂、至少一种稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物以及代谢调节剂。

[0025] 为分析癌组织样品,所述凋亡底物是癌细胞凋亡底物。

[0026] 对于所述试剂的大多数实施方案,所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述至少两种稳液剂中每种稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述螯合剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

[0027] 在所述试剂的具体实施方案中,所述离液剂是SCN⁻ (硫氰酸钠),所述稳液剂是甘油和aa-海藻糖,所述螯合剂是EDTA,所述缓冲液是磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄³⁻),所述细胞凋亡底物是瘦素,且所述代谢调节剂是DMSO。

[0028] 在所述试剂的一些实施方案中,所述离液剂选自SCN⁻ (硫氰酸钠)、H₂PO₄²⁻、HCO₃⁻、I⁻、Cl⁻、NO₃⁻、NH₄⁺、C_S、K⁺、(NH₄)₂C₂O₄、胍的所有盐、Br或Rb。

[0029] 在所述试剂的其他实施方案中,所述稳液剂选自甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖或D-乳糖。

[0030] 在所述试剂的又一实施方案中,所述螯合剂选自EDTA、EGTA或BABTA。

[0031] 一些实施方案中的保存试剂包括选自BIS-TRIS、BIS-TRIS丙烷、HEPES、HEPES钠盐、MES、MES钠盐、MOPS、MOPS钠盐、钠盐或磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄³⁻)的缓冲液。

[0032] 在所述试剂的其他实施方案中,所述凋亡底物选自DMSO、瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、脯氨酸、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL₂或CTAB。

[0033] 所述试剂的又一实施方案包含选自极性非质子溶剂、DMSO、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺或乙腈的代谢调节剂。

[0034] 本文中提到的所有专利和出版物均通过引用整体并入本文。

附图说明

[0035] 图1是一张流程图,其示出了根据本发明制备用于手术去除组织、允许组织样品的基因表达分析的试剂的方法的一个实施方案。

[0036] 图2是一张流程图,其示出了根据本发明制备用于手术去除组织尤其是癌组织、允

许组织样品的基因表达分析的试剂的方法的一个实施方案。

[0037] 图3A和3B是配制列表,其示出了根据本发明的用于保存组织样品的试剂的组分以及各个组分的相继添加的一个实施方案。

[0038] 图4是来自老化LNCa-FGC细胞的PGK基因的rtPCR结果的曲线图,其中比较了根据本发明的细胞保存试剂的一个实施方案与常规保存试剂的使用。

[0039] 图5是来自老化PC3癌细胞的PBGD基因的mRNA拷贝的曲线图,其中比较了根据本发明的细胞保存试剂的一个实施方案与常规试剂的rtPCR结果。

[0040] 图6是各种老化肾癌细胞的G6PDH的mRNA拷贝的曲线图,其中比较了保存试剂的一个实施方案与常规保存溶液的使用。

[0041] 图7是比较在老化肾癌细胞上使用的保存试剂的三个不同实施方案的曲线图。

具体实施方式

[0042] 除非另有说明,本申请(包括说明书和权利要求书)中使用的以下术语具有下文给出的定义。必须要注意的是,除非上下文另外明确指示,如在说明书和所附权利要求书中使用的单数形式“一个”、“一种”和“该”包括复数指示物。

[0043] “任选的”或“任选地”意指随后描述的事件或情形可以但不是必须发生,并且该描述包括其中事件或情形发生的情况以及其中事件或情形不发生的情况。

[0044] 术语“上文所定义的那些”和“本文中所定义的那些”当涉及变量时通过引用并入该变量的广义定义以及优选的、更优选的和最优选的定义(如果有的话)。

[0045] 术语离液剂指与水分子发生弱相互作用并破坏蛋白质分子周围的水分子氢键网络的化合物。

[0046] 术语稳液剂指与水分子强烈相互作用并以通常有利的方式在蛋白质分子周围组织水分子的化合物。在一些实施方案中,生物材料稳定化组合物可包含稳液剂。不受限于任何特定的作用机理,在一些实施方案中,稳液剂可以稳定和/或改善水性组合物中的水与水的相互作用。稳液剂的实例可以包括但不限于,甘油、脯氨酸(例如,L-脯氨酸)、海藻糖(例如,D- (+) 海藻糖、D- (+) 海藻糖二水合物)、aa-海藻糖、甘氨酸-甜菜碱、葡萄糖、右旋糖、谷氨酸和/或天冬氨酸。在一些实施方案中,稳液剂的实例可以包括SO₄²⁻、HPO₄²⁻、Ca²⁺、Mg²⁺、Li⁺、Na⁺、OH⁻和/或PO₄³⁻。

[0047] 术语缓冲液是指给混合物提供约4.5至约8.5的pH的化合物。在一些实施方案中,合适的缓冲液可选自Good缓冲液(例如,HEPES)、乙酸钾、磷酸钠、碳酸氢钾、三(羟基氨基)甲烷(Tris)及它们的组合。例如,缓冲液可以包括乙酸钾、乙酸钠、磷酸钾(单碱式、三碱式)、磷酸钠、Tris、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-乙磺酸)(HEPES)缓冲液、3-(N-吗啉基)丙磺酸(MOPS)缓冲液、2-[2-氨基-2-氧代乙基]氨基]乙磺酸(ACES)缓冲液、N-(2-乙酰氨基)-2-亚氨基二乙酸缓冲液(ADA)、3-[1,1-二甲基-2-羟乙基]氨基]-2-丙磺酸(AMPSO)缓冲液、N,N-双(2-羟乙基)-2-氨基乙磺酸(BES)缓冲液、Bicine(N,N-双(2-羟乙基甘氨酸)缓冲液、双-(2-羟乙基)亚氨基-三(羟甲基)甲烷(Bis-Tris)缓冲液、3-(环己基氨基)-1-丙磺酸(CAPS)缓冲液、3-(环己基氨基)-2-羟基-1-丙磺酸(CAPSO)缓冲液、2-(N-环己基氨基)乙磺酸(Ches)缓冲液、3-[N,N-双(2-羟乙基)氨基]-2-羟基-丙磺酸(DIPSO)缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(3-丙磺酸)(HEPPS)缓冲液、N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-(2-羟基丙磺酸)(HEPPSO)

缓冲液、2-(N-吗啉)乙磺酸(MES)缓冲液、三乙醇胺缓冲液、咪唑缓冲液、甘氨酸缓冲液、乙醇胺缓冲液、磷酸盐缓冲液、3-(N-吗啉)-2-羟基丙磺酸(MOPS)缓冲液、哌嗪-N,N'-双(2-乙磺酸)(PIPES)缓冲液、哌嗪-N,N'-双(2-羟基丙磺酸)(POPSO)缓冲液、N-三[(羟甲基)甲基]-3-氨基丙磺酸(TAPS)缓冲液、2-羟基-3-[三(羟甲基)甲基氨基]-1-丙磺酸(TAPSO)缓冲液、N--[三(羟甲基)甲基]-2-氨基乙磺酸(TES)缓冲液、N-[三(羟甲基)甲基]甘氨酸(tricine)缓冲液、2-氨基-2-甲基-1,3-丙二醇缓冲液、2-氨基-2-甲基-1-丙醇缓冲液以及它们的组合。

[0048] 术语螯合剂指可结合可用的金属(例如,Mg²⁺和Ca²⁺)到这样的程度以致于保持可供金属依赖性酶(例如,脱氧核糖核酸酶)使用的金属不足以支持催化(即,核酸降解)的化合物。例如,非金属依赖性酶可包括DNA连接酶(例如,D4 DNA连接酶)、DNA聚合酶(例如,T7 DNA聚合酶)、核酸外切酶(例如,核酸外切酶2、λ-核酸外切酶)、激酶(例如,T4多核苷酸激酶)、磷酸酶(例如,BAP和CIP磷酸酶)、核酸酶(例如,BL31核酸酶和XO核酸酶)以及RNA修饰酶(例如,RNA聚合酶、SP6、T7、T3 RNA聚合酶和T4 RNA连接酶)。

[0049] 融合剂可以包括,例如,乙二胺四乙酸(EDTA)、[乙烯双(氧乙烯次氨基)]四乙酸(EGTA)和1,2-双(2-氨基苯氧基)乙烷-N,N,N',N'-四乙酸(BAPTA)和/或它们的盐。融合剂可以以任何需要的浓度存在。在两种或更多种融合剂包含在单个试剂中的情况下,每种融合剂的浓度或组合融合剂的总浓度可以落入所提供的任何范围内。在一些实施方案中,融合剂可包括EDTA、EGTA、BAPTA、咪唑、亚氨基二乙酸酯(IDA)、双(5-脒基-2-苯并咪唑基)甲烷(BABIM)和/或它们的盐。

[0050] 术语代谢调节剂指用于优化试剂制剂内的化学品的膜渗透性以及稳定细胞(并且尤其是缺氧癌细胞)的基因表达的渗透剂/代谢调节剂。

[0051] 术语凋亡为可发生在多细胞生物体中的程序性细胞死亡(PCD)的过程。生化事件导致特征性细胞变化(形态)和死亡。这些变化包括起泡、细胞收缩、核碎裂、染色质凝缩和染色体DNA片段化。(还参见凋亡的DNA片段化。)

[0052] 术语“凋亡底物”是作为减少凋亡中的关键组分的化合物或分子。凋亡底物与其他试剂制剂组分协同作用,以阻止凋亡并促进细胞的稳定性和细胞生长。

[0053] 术语“基因表达分析”指涉及检测细胞中、尤其是癌细胞中的过表达、欠表达或差异性表达的基因的分析。

[0054] 术语“过表达”(“overexpress”或“overexpression”)或“过表达的”(“overexpressed”)可以互换,是指与正常细胞相比通常在癌细胞中以可检测的更高水平翻译或转录的蛋白质或核酸(RNA)。该术语包括与正常细胞相比由于转录、转录后加工、翻译、翻译后加工、细胞定位(例如,细胞器、细胞质、细胞核、细胞表面)以及RNA和蛋白质稳定性而引起的过表达。可以使用用于检测mRNA(即,RT-PCR、PCR、杂交)或者蛋白质(即ELISA,免疫组织化学技术)的常规技术来检测过表达。过表达可以是与正常细胞相比高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更高。在某些情况下,过表达是与正常细胞相比1倍、2倍、3倍、4倍或更高水平的转录或翻译。

[0055] 术语“欠表达”(“underexpress”或“underexpression”)或“欠表达的”(“underexpressed”)或“下调”(“downregulated”)可以互换,是指与正常细胞相比在癌细胞中以可检测的较低水平翻译或转录的蛋白质或核酸。该术语包括与对照相比由于转录、

转录后加工、翻译、翻译后加工、细胞定位(例如,细胞器、细胞质、细胞核、细胞表面)以及RNA和蛋白质稳定性而引起的欠表达。可以使用用于检测mRNA(即,RT-PCR、PCR、杂交)或者蛋白质(即ELISA,免疫组织化学技术)的常规技术来检测欠表达。欠表达可以是与对照相比10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更低。在某些情况下,欠表达是与对照相比1倍、2倍、3倍、4倍或更低水平的转录或翻译。

[0056] 术语“差异性表达”或“差异性调节”在本发明的上下文中通常指相比于在至少一个其他样品中在一个样品中过表达(上调)或欠表达(下调)的蛋白质或核酸(通常在癌症患者中相比于非癌性组织的样品)。

[0057] 如本文所用的术语“肿瘤”指所有的赘生性细胞生长和增殖(无论是恶性的或良性的)以及所有的癌前和癌性细胞和组织。

[0058] 术语“癌症”和“癌性”意指或描述了哺乳动物中通常以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于,乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌、肝细胞癌、胃癌、胰腺癌、宫颈癌、肝癌、膀胱癌、尿道癌、甲状腺癌、肾癌、癌、黑素瘤和脑癌。

[0059] 生物或组织样品包括诸如活检和尸检样品等组织的切片。生物样品通常获自真核生物,最优先哺乳动物,如灵长类动物(例如,黑猩猩或人)、牛、狗、猫、啮齿动物(例如,豚鼠、大鼠或小鼠)、兔或禽类、爬行动物或鱼类。

[0060] 活检指移取组织样品以供诊断或预后评估的过程,并指组织样本本身。本领域中已知的任何活检技术可应用于本发明的诊断和预后方法中。所应用的活检技术将取决于待评估的组织类型(例如,肺等)、肿瘤的大小和类型以及其他因素。代表性的活检技术包括但不限于,切除活检、切口活检(*incisional biopsy*)、针吸活检(*needle biopsy*)、手术活检和骨髓活检。切除活检指称取整个肿瘤块以及其周围的正常组织的小边缘。切口活检指从肿瘤内移取组织的楔形物。通过内窥镜术或射线照相指导作出的诊断或预后可能需要“针芯活检(*core-needle biopsy*)”或“细针抽吸活检(*fine-needle aspiration biopsy*)”,该活检通常从靶组织内获得细胞悬浮液。

[0061] 治疗性处理和癌症疗法指化学疗法、激素疗法、放射疗法、免疫疗法和生物(靶向)疗法。

[0062] 术语PCR指聚合酶链反应。这指核苷酸在核苷酸聚合酶、优选DNA聚合酶的存在下通过温度循环技术进行扩增的任何技术。这包括但不限于实时PCR技术,逆转录酶-PCR和标准的PCR方法。

[0063] 本发明公开了制备用于保持组织样品的细胞活力、允许进行组织样品中细胞的基因表达分析的试剂的方法。本发明还涉及允许检测组织样品中的活细胞、尤其是癌细胞的准确基因表达的试剂组合物。用于制备细胞活力试剂的方法通常包括相继添加化合物/分子以实现本发明试剂的最佳制剂。

[0064] 参照图1,其为根据本发明制备细胞活力试剂的方法的一个实施方案的流程图。用于生成细胞活力试剂的方法100包括在事件110提供离液剂。将离液剂添加至净化水的整分试样中。离液剂为具有对抗降解核酸的酶如DNA酶和RNA酶以及负责蛋白质破坏和凋亡的蛋白酶和调节酶的活性的分子。离液剂还对细胞中的水分布以及相关的代谢衰减具有显著的影响。

[0065] 在大多数实施方案中,离液剂为以下化合物中的至少一种:SCN⁻(硫氰酸钠)、

H_2PO_4^- 、 HCO_3^- 、 I^- 、 Cl^- 、 NO_3^- 、 NH_4^+ 、 C_S 、 K^+ 、 $(\text{NH}_4)^+$ 、 C^+ 、 胍 、 胍 的所有盐、 Br 或 Rb 。已知所有这些化合物均对细胞周围的水分布具有影响并有助于保持细胞活力。

[0066] 在一些实施方案中,离液剂在细胞活力试剂中具有以下范围浓度的最终浓度:约0.1摩尔至约2摩尔,更优选至少约1mM、至少约10mM、至少约0.05M、至少约0.1M、至少约0.5M、至少约1M、至少约1.75M、至少约2M到至少约3M的最大值。

[0067] 在事件120中,方法100包括提供至少一种螯合剂。将螯合剂添加至细胞活力制剂中,以有助于使降解核酸的Ca、Mg驱动的酶体系失活。在该实施方案中,螯合剂选自下组的化合物:EDTA、EGTA或BABTA。

[0068] 在配制细胞活力试剂的方法的大多数实施方案中,螯合剂以约0.1摩尔至约2摩尔,更优选从约至少约0.1M、至少约0.005M、至少约0.01、至少约0.05M和/或至少约0.1M的最终浓度存在。

[0069] 在事件130中,方法100进一步包括提供代谢调节剂/渗透剂化合物。代谢调节剂用于优化化学品的膜渗透,以及充当大分子如甘油的载体。此外,它充当细胞分化和功能的重要调节剂。代谢调节剂是在稳定缺氧癌细胞的基因表达中的关键组分。

[0070] 在方法100中,代谢调节剂/渗透剂选自极性非质子溶剂、DMSO、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺或乙腈。制剂中代谢调节剂的最终浓度为从至少0.25M,至少约0.5M,至少约0.75M,至少约1M,至少约1.5M,至最大约2M。

[0071] 方法100进一步包括在事件140中提供至少一种稳液剂以用于制备细胞活力试剂。在该实施方案中,在添加离液剂后向混合物中添加一种(多种)稳液剂。该一种(多种)稳液剂可以是以下化合物中的一种:甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖或D-乳糖。稳液剂对核酸、蛋白质和蛋白质折叠具有保护作用,并且是试剂的必要组分,其与离液剂协同作用以用于细胞和膜稳定性以及代谢调节,以便在细胞受到应激时稳定基因表达。

[0072] 在一些实施方案中,稳液剂存在于细胞活力试剂中的最终浓度为以下范围的浓度:约0.1摩尔至约2摩尔,或约0.1mM至约100mM,约1mM至约10mM,从约0.1M、约1.0M至约2.0M,约0.1M至约5.0M。

[0073] 在事件150中,方法100包括提供至少一种缓冲液,该缓冲液添加至制剂中以调节细胞活力试剂的pH。在大多数实施方案中,缓冲液选自BIS-TRIS、BIS-TRIS丙烷、HEPES、HEPES钠盐、MES、MES钠盐、MOPS、MOPS钠盐、钠盐或磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式 PO_4^-)。

[0074] 在大多数实施方案中,细胞活力试剂的最终pH为约4.5至约8,更优选约5.0至约5.5至约5.5至6.0,至约6.5,至约7.0至约7.5。

[0075] 方法100进一步包括在事件160中提供第二稳液剂以用于制备细胞活力试剂。在该实施方案中,在添加缓冲液后向混合物中添加一种(多种)稳液剂。该一种(多种)稳液剂可以是以下化合物中的一种:甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖或D-乳糖。稳液剂对核酸、蛋白质和蛋白质折叠具有保护作用,并且是试剂的必要组分,其与离液剂协同作用以用于细胞和膜稳定性以及代谢调节,以便在细胞受到应激时稳定基因表达。

[0076] 在一些实施方案中,稳液剂存在于细胞活力试剂中的最终浓度为以下范围的浓度:约0.1摩尔至约2摩尔,更优选约0.1mM至约100mM,约1mM至约10mM,从约0.1M、约1.0M至

约2.0M,约0.1M至约5.0M。

[0077] 方法100进一步包括在事件170中提供凋亡底物。该凋亡底物有助于阻止细胞、尤其是癌细胞的凋亡。凋亡底物选自DMSO、瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、脯氨酸、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL₂或CTAB。

[0078] 凋亡底物在细胞活力试剂中的最终浓度为约0.001M至约0.5M,或从约0.1mM,高达约1mM,高达约10mM,高达约0.1M,高达约0.25M,直到约1M,直到1.5M,直到约2M的最大值。

[0079] 在事件180中,方法100进一步提供混合离液剂、稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物以及代谢调节剂,以便允许进行组织样品的基因表达分析。样品的混合可以发生在本发明的配制所述试剂的整个方法中。处理并混合各个单独的组分以获得最佳的细胞活力试剂。制剂的组分的添加可以是随机的;然而,在大多数实施方案中,组分的添加按方法100中所示的顺序相继进行。

[0080] 用于制备所述试剂的制备时间由于批量大小、温度等而变化。通常,需要约一小时来完成细胞活力试剂的配制。所述试剂可以在用于组织样品之前在环境条件下储存长达12个月。也可以冷冻所述试剂以供更长时间的储存。

[0081] 一旦组织样品已添加至细胞活力试剂,则该组织被稳定化并在30°C温度下保持活基因表达组分最长达72小时。通常,细胞为活细胞的时间为约30小时至约50小时,并且更特别地为约两天。该时间范围足以用于活检组织(组织样品)的详细基因表达分析,该基因表达分析可以给出对于疾病如癌症的类型和进展的重要了解。

[0082] 参照图2,其为示出了根据本发明用于生成细胞活力试剂的方法的实施方案的流程图。方法200包括在事件210中提供硫氰酸钠。硫氰酸钠是一种离液剂,并添加至净化水中并充分混合,之后在事件220中添加螯合剂EDTA。在将EDTA混入溶液之后,在事件230中将代谢调节剂/渗透剂DMSO(二甲基亚砜)添加至混合物中。

[0083] 在事件240中将第一稳液剂——甘油添加到试剂的制剂中。混合制剂直至溶液澄清,并随后在事件250中添加试剂的缓冲液组分。图2中示出的方法的缓冲液是磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄)。该缓冲液确保最终细胞活力试剂的pH将为约7.0至7.6,并且更可能为约7.2。

[0084] 在事件260中,将不同于第一稳液剂的第二稳液剂添加到制剂中。方法200中的第二稳液剂是aa-海藻糖。

[0085] 在事件270中,方法200进一步包括添加瘦素——一种有助于阻止细胞凋亡、特别是癌细胞的凋亡底物。

[0086] 在事件280中,方法200进一步提供了将试剂制剂的组分混合。在各组分添加后,完成混合以确保各组分溶解在试剂溶液内。

表I

| 细胞活力研究 1 天(24 小时) | 细胞团 | 台盼兰 活力 | 活力/增殖 MTT |
|----------------------|-------|-----------|--------------|
| TAG-1 | 无细胞团 | 无死细胞 | 100% |
| TAG-2 | 少数细胞团 | 许多死细胞 | 53% |
| 福尔马林 | 细胞被破坏 | 所有细胞均死亡 | 0% |

[0087] 上述表I示出了Ishikawa癌细胞在分别暴露于保存试剂(向该试剂中添加和不添加瘦素)、TAG-1和TAG-2的一个实施方案一天后的活力。将表I中的TAG-1和TAG-2与Ishikawa癌细胞在置于20%缓冲福尔马林溶液时的活力进行比较。表I中的TAG-1包含硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、海藻糖、DMSO、甘油和瘦素。表I中示出的TAG-2溶液除不存在瘦素外包含与TAG-1相同的组分。

[0088] 表I示出了通过测定溶液中细胞团的存在、指示死细胞的存在的台盼蓝结果以及使用MTT得到的细胞的活力/增殖而得到的癌细胞的活力。MTT分析是一种比色分析,用于在限定的条件下评估细胞活力NAD(P)H-依赖性细胞氧化还原酶,其反映存在的活细胞数。这些酶能够将四唑染料还原成其呈紫色的不溶性甲臜。死细胞不会导致该颜色。将MTT染料添加至细胞悬浮液中,并在570nm的分光光度法设定值和背景波长630/690nm下读数。使用在限定的网格上的死细胞(黄色)与活细胞(紫色)的比值来计算活细胞的密度和生长细胞增殖。表I中示出的结果表明,在暴露于保存试剂24小时下,TAG-1具有100%的活力,TAG-2具有53%的活力,而福尔马林溶液具有0%的细胞活力。

表II

| 细胞活力研究 8 天(192 小时) | 细胞团 | 台盼兰 活力 | 活力/增殖 MTT |
|-----------------------|--------|-----------|--------------|
| TAG-1 | 少数细胞团 | 少数死细胞 | 88.94% |
| TAG-2 | 弥漫型细胞团 | >95%死细胞 | 5% |
| 福尔马林 | 细胞被破坏 | 所有细胞均死亡 | 0% |

[0089] 上述表II示出了Ishikawa癌细胞在暴露于TAG-1、TAG-2或福尔马林保存溶液八天后的活力。本发明的保存试剂TAG-1和TAG-2与表I示出的实验中使用的那些相同。在于室温下暴露于保存试剂八天后,TAG-1具有88.94%的活力,TAG-2具有5%的细胞活力,并且在福尔马林溶液中,所有细胞均死亡。这些结果表明,本发明的保存试剂在随时间保持细胞活力方面比福尔马林好得多。这些结果还表明添加瘦素作为凋亡组分的重要性。

[0090] 当试剂正确制备时它可以充当癌组织保存剂,保持组织中的细胞活力具有95%的活力长达24小时。一到约五天的活力可以采用约三天的平均活力来获得。该试剂还有助于抑制或显著阻抑组织中的癌细胞凋亡,控制细胞因子如缺氧,并有助于降解酶的快速失活以保护组织和核酸完整性。

[0091] 此外,在2小时内观察到约90%的组织渗透,且将化学组分快速缓冲至pH 7.2允许试剂组分的最大细胞代谢活性。本发明的试剂允许利用离液、稳液化学品、缓冲体系和已被证实增加肥胖患者的癌生长的新型癌刺激激素——瘦素,通过生化机制调节细胞代谢应

激。通过将冷冻保护剂如甘油添加至试剂制剂中,冷冻保护剂充当用于蛋白质保存的稳液剂,还赋予组织标本热稳定性。

[0092] 所述试剂的另一益处是该试剂稳定靶RNA、mRNA的基因表达(通过实时PCR以及微阵列方法测定)。而且已观察到试剂组分快速渗入细胞和组织中。

表III

| 制剂 化学品 | RIN 对照 0 小时 | RIN 24 小时 | RIN 72 小时 | RIN 120 小时 | RIN 170 小时 |
|-----------|----------------|--------------|--------------|---------------|---------------|
| TAG-1 | 8.7 | 8.2 | 7.9 | 7.4 | 6.0 |
| TAG-2 | 5.1 | 2.7 | 1.5 | 1.1 | 0 |
| TAG-3 | 6.7 | 3.1 | 1.6 | 1.3 | 0 |
| TAG-4 | 7.2 | 2.5 | 2.4 | 1.8 | 0 |
| TAG-5 | 5.8 | 4.2 | 1.3 | 0 | 0 |

[0093] 表III示出了比较本发明的细胞保存试剂的五种不同制剂的RNA完整性研究的结果。在从Ishikawa癌细胞中提取RNA之前将该细胞暴露于各种制剂或在各种制剂中老化长达170小时。TAG-1制剂包含瘦素和海藻糖、硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、DMSO以及甘油。TAG-2制剂中不存在海藻糖或瘦素。TAG-3制剂没有添加甘油、瘦素或海藻糖。TAG-4制剂不具有DMSO、缓冲液或瘦素。TAG-5制剂不具有瘦素、海藻糖、硫氰酸钠或EDTA。

[0094] 表III所示的研究中使用的Ishikawa癌细胞是在补充有5%牛血清的DMEM培养基中生长的子宫内膜腺癌细胞。将细胞以 1×10^6 的密度接种在100mm组织培养皿上。使用传统方法收获细胞,并随后将细胞重悬浮于本发明的细胞保存试剂的各种制剂中,并在室温下放置不同的时间长度。在各个时间点使用RNeasy mini试剂盒提取细胞RNA,并按照制造商的标准方案使用Agilent 2000生物分析仪来分析RNA的质量和数量。该研究的对照是保存的纯化细胞RNA。

[0095] 表III所示的结果表明本发明的优选实施方案包含图2中所示的所有要素。表III中清楚地显示了本发明的细胞保存制剂中对海藻糖和瘦素的需要。由Agilent 2000RNA分析仪测量的RNA完整性数(RIN)具有1到10的范围。低于6的任何数目被认为显示被降解和不可靠的RNA,而无法用于基因表达研究。TAG-1是RIN数保持在6.0以上(甚至在170小时的时间点)的唯一制剂。本发明的TAG-1制剂实施方案的最终浓度为:硫氰酸钠0.01M,EDTA 0.01M,甘油0.25M,缓冲液0.001M,瘦素0.001M,海藻糖0.20M。

[0096] 本发明的试剂还与标准染色病理学方法相容。将细胞在TAG-1试剂中处理24小时,并利用标准方案使用苏木精和曙红染料进行染色。将染色的细胞与也利用相同的标准方案使用苏木精曙红染料染色的未处理的细胞进行比较。用显微镜检查细胞的细胞质、细胞核和细胞外基质的特征。在两组细胞中,细胞核染成蓝色,而细胞质和细胞外基质具有一致的粉红色染色。总之,TAG-1处理的细胞与未用TAG-1化学品处理的细胞的染色无显著差异。

[0097] 在大多数实施方案中,细胞活力试剂包含离液剂、至少一种稳液剂、螯合剂、缓冲液、代谢调节剂和凋亡底物。试剂的这些组分与其他组织保存剂相比以低摩尔浓度存在。低摩尔浓度的离液剂起到非常不同的作用,并显示对核酸的稳定性和保存具有极大的保护作

用,以及如本文所述通过改变细胞的水分布和代谢而对细胞代谢具有重大影响。根据美国专利6,458,546 B1 (Baker)。离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述至少两种稳液剂中每种稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述螯合剂的最终浓度为约0.1M至约2摩尔,并且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。与破坏细胞以及使蛋白质和核酸变性的高摩尔浓度的离液剂不同,较低浓度的离液剂已被证明在保存组织样品中是有益的。此外,低摩尔浓度的稳液剂与低浓度的离液剂在改变细胞代谢、保护蛋白质和核酸方面非常好地协同作用。生物大分子(例如,癌细胞)的最佳稳定化需要一种或多种稳液阴离子与来自下组及各组之一的一种离液阳离子的混合物。

[0098] 在某些实施方案中,离液剂是SCN⁻(硫氰酸钠),稳液剂是甘油和aa-海藻糖,螯合剂是EDTA,缓冲液是磷酸钠缓冲液(单碱式、三碱式PO₄³⁻),细胞凋亡底物是瘦素,且代谢调节剂是DMSO。

[0099] 本发明还提供了用于活检样品的试剂盒,该试剂盒包括容器,该容器被配置用于容纳细胞活力试剂,其中该细胞活力试剂允许活检样品的基因表达分析。

[0100] 在大多数实施方案中,试剂盒中的容器是大小足以容纳活检组织样品以及本发明的试剂的整分试样的杯子或管。该管可以是Eppendorf管或更大的管,取决于待分析的组织样品的大小。试剂盒中的试剂包含至少一种离液剂、至少一种稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物和代谢调节剂。

[0101] 在其他实施方案中,所述杯子包含用于密封杯子中的细胞活力试剂的盖。

[0102] 在以下实施例中提供了制备用于组织样品、尤其是癌组织样品的细胞活力试剂的优选方法。

本发明提供了包括但不限于以下实施方案:

1.一种制备用于组织样品的试剂的方法,该方法包括:

提供至少一种离液剂;

提供至少一种稳液剂;

提供螯合剂;

提供缓冲液;

提供凋亡底物;

提供代谢调节剂;以及

将所述离液剂、稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物和代谢调节剂以特定的顺序混合,以便能够进行置于所述试剂中的组织样品的基因表达分析。

2.根据实施方案1所述的方法,其特征在于,所述凋亡底物是癌细胞凋亡底物并且所述组织样品是手术切除的癌组织样品。

3.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述螯合剂的最终浓度为约0.1M至约2摩尔,且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

4.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述离液剂选自硫氰酸钠、H₂PO₄⁻、HC₀₃⁻、I⁻、Cl⁻、NO₃⁻、NH₄⁻、CS、K⁺、(NH₄)₂PO₄、胍的所有盐、Br和Rb。

5.根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述至少一种稳液剂选自甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖和D-乳

糖。

6. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,螯合剂选自EDTA、EGTA和BABTA。

7. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述缓冲液选自BIS-TRIS、BIS-TRIS丙烷、HEPES、HEPES钠盐、MES、MES钠盐、MOPS、MOPS钠盐、钠盐和磷酸钠缓冲液。

8. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,凋亡底物选自DMSO、瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、脯氨酸、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL2和CTAB。

9. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述代谢调节剂选自极性非质子溶剂、DMSO、丙酮、N,N-二甲基甲酰胺和乙腈。

10. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法,其特征在于,所述混合进一步包括按照相继顺序向净化水的整分试样中添加至少一种离液剂,接着添加所述螯合剂,接着添加所述代谢调节剂,接着添加第一稳液剂,接着添加所述缓冲液,接着添加第二稳液剂,接着添加所述凋亡底物。

11. 根据实施方案10所述的方法,其特征在于,所述离液剂是硫氰酸钠,所述第一稳液剂是甘油,所述第二稳液剂是aa-海藻糖,所述螯合剂是EDTA,所述缓冲液是磷酸钠缓冲液,所述细胞凋亡底物是瘦素,且所述代谢调节剂是DMSO。

12. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法,该方法包括:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加硫氰酸钠,接着添加EDTA,然后添加DMSO,接着添加甘油,然后添加磷酸钠,接着添加aa-海藻糖,接着添加瘦素;以及

在各次组分添加之间以允许组织样品的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

13. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法,该方法包括:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加至少一种离液剂、螯合剂、代谢调节剂、第一稳液剂,接着添加缓冲液,然后添加第二稳液剂,接着添加凋亡底物;以及

在各次组分添加之间以允许所述组织样品在置于所述试剂中时的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

14. 根据实施方案13所述的方法,其特征在于,在用于组织样品的试剂中,所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述第一和第二稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔,所述螯合剂的最终浓度为约0.1M至约2摩尔,且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

15. 一种允许基因表达分析的用于组织样品的试剂,该试剂包含以下组分:

至少一种离液剂;

至少一种稳液剂;

螯合剂;

缓冲液；
凋亡底物；以及
代谢调节剂。

16. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述凋亡底物是癌细胞凋亡底物。

17. 根据实施方案16所述的试剂，其特征在于，所述离液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔，所述至少一种稳液剂的最终浓度为约0.1摩尔至约2摩尔，所述螯合剂的最终浓度为约0.1M至约2摩尔，且所述凋亡底物的最终浓度为约0.001摩尔至约0.5摩尔。

18. 根据实施方案17所述的试剂，其特征在于，所述离液剂是硫氰酸钠，所述至少一种稳液剂是甘油和aa-海藻糖的组合，所述螯合剂是EDTA，所述缓冲液是磷酸钠缓冲液，所述细胞凋亡底物是瘦素，且所述代谢调节剂是DMSO。

19. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述离液剂选自硫氰酸钠、H2PO4-、HC03-、I-、Cl-、NO3-、NH4-、CS、K+、(NH4) C+胍、胍的所有盐、Br和Rb。

20. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述至少一种稳液剂选自甘油、三甲胺N-氧化物、依克多因、aa-海藻糖、3-二甲基锍丙酸盐、葡萄糖、葡聚糖和D-乳糖。

21. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述螯合剂选自EDTA、EGTA和BABTA。

22. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述缓冲液选自BIS-TRIS、BIS-TRIS丙烷、HEPES、HEPES钠盐、MES、MES钠盐、MOPS、MOPS钠盐、钠盐和磷酸钠缓冲液。

23. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，凋亡底物选自DMSO、瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、脯氨酸、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL2和CTAB。

24. 根据实施方案15所述的试剂，其特征在于，所述代谢调节剂选自极性非质子溶剂、DMSO、丙酮、N，N - 二甲基甲酰胺和乙腈。

25. 一种用于组织样品的试剂盒，其包含：容器，该容器被配置用于容纳细胞活力试剂，该细胞活力试剂包含允许所述组织样品的基因表达分析的组分，所述试剂盒的特征在于所述试剂的组分包含至少一种离液剂、至少一种稳液剂、螯合剂、缓冲液、凋亡底物和代谢调节剂。

26. 根据实施方案25所述的试剂盒，其特征在于，所述容器是配置用于容纳所述试剂的整分试样的杯子或管。

27. 根据实施方案26所述的试剂盒，其特征在于，所述管是Eppendorf管。

28. 根据实施方案26所述的试剂盒，其特征在于，所述杯子包含用于密封所述试剂的盖。

29. 根据实施方案25所述的试剂盒，其特征在于，所述组织样品是活检样品。

30. 根据实施方案1或实施方案2所述的方法，其特征在于，凋亡底物选自瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL2和CTAB。

31. 一种制备用于分析组织样品的试剂的方法，该方法由以下步骤组成：

提供净化水的整分试样；

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中：

添加硫氰酸钠,接着添加EDTA,然后添加DMSO,接着添加甘油,然后添加磷酸钠,接着添加aa-海藻糖,接着添加瘦素;以及

在各次组分添加之间以允许置于所述试剂中的组织样品的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

32.一种制备用于分析组织样品的试剂的方法,该方法由以下步骤组成:

提供净化水的整分试样;

将所述试剂的组分按照以下顺序添加至所述净化水中:

添加至少一种离液剂、螯合剂、代谢调节剂、第一稳液剂,接着添加缓冲液,然后添加第二稳液剂,接着添加凋亡底物;以及

在各次组分添加之间以允许所述组织样品在置于所述试剂中时的准确基因表达分析的方式混合所述组分。

33.根据实施方案15所述的试剂,其特征在于,凋亡底物选自瘦素、甘氨酸甜菜碱、柠檬酸钾、三甲胺、NDSB 195、ML-精氨酸、木糖醇、亚硒酸钠、NDSB 201、CuCL2和CTAB。

实施例

[0103] 提供以下制品和实施例以使本领域技术人员能够更清楚地理解并实施本发明。它们不应被认为是限制本发明的范围,而仅作为其说明和代表。

实施例I

[0104] 本实施例是制备用于保持组织样品的细胞活力的试剂的方法的一个实施方案的示例。图3A和3B是配制列表的图片,其列出了试剂的组分以及关于如何制备用于组织活检样品的细胞活力试剂的说明。在该实施例中,制备一升试剂。除了初始测出的净化水(50ml)外,配制列表上的组分以它们将被添加的顺序列出。将离液剂,即8.1gm的硫氰酸钠添加到水中以得到10%wv的硫氰酸钠最终浓度。混合硫氰酸钠直至溶液澄清。在加入离液剂后,将0.1M储液浓度的螯合剂EDTA添加到该溶液中。添加100ml的0.1M EDTA以得到试剂中0.01M EDTA的最终浓度。混合EDTA直到溶液均匀。添加至该溶液的下一组分是代谢调节剂——DMSO。将0.20ml的DMSO添加至溶液中,以得到试剂中2%DMSO的最终百分比。添加DMSO后,混合溶液直至均匀。然后将第一稳液剂,即甘油(25ml)添加至该溶液中,得到在试剂中为2.5%的甘油最终百分比。再次混合溶液直至均匀。然后将缓冲组分添加到该溶液中。首先添加3.93gm的K₂PO₄(磷酸二氢钾)并混合至均匀,然后添加5.02gm的K₃PO₄(磷酸钾)。一旦该溶液均匀,则将第二稳液剂,即aa-海藻糖二水合物添加到该溶液中。将7.56gm的海藻糖二水合物添加到该试剂中。然后将溶液混合直至澄清。添加至该溶液的最终组分是凋亡底物——人瘦素。将50微升或0.001M的瘦素添加至该溶液中,然后将该溶液混合直至澄清。

[0105] 然后添加净化水以使体积补充至一升。上述所有步骤均在室温下进行。细胞活力试剂可在环境条件下储存长达一年。

[0106] 图3A和图3B的配制列表以及本实施例是用于制备活细胞组织试剂的方法的一个实施方案的优异代表以及构成根据本发明的活细胞组织试剂的组分的良好示例。

实施例II

[0107] 实施例II是组织细胞保存试剂的一个实施方案对保存LNCa-FGC细胞和PC-3细胞的效果的研究。在TAG-1试剂中相比于在标准细胞重悬浮溶液中保存LNCa-FGC细胞的结果示于图4中。在TAG-1试剂中相比于在标准细胞重悬浮溶液中保存PC-3细胞的结果示于图5

中。

[0108] 人前列腺细胞系DU145、PC-3和LNCaP-FGC购自美国典型培养物保藏中心(American Type Collection) (Manassas Virginia, USA)。DU145细胞在补充有10%PBS加青霉素(100单位/ml)和链霉素(100u1/ml)的DMEM培养基中培养。PC-3和LNCaP-FGC细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)和青霉素(100单位/ml)和链霉素(100u1/ml)的RPMI 1640培养基中培养。使细胞在组织培养板中生长到约70%汇合。然后通过传统方法收获细胞并将细胞重悬浮于细胞保存试剂的一个实施方案即TAG-1中或对照溶液如K₂EDTA、20%福尔马林或含有硫柳汞的盐水中。

[0109] 使用LNCa-FGC细胞进行的研究比较了TAG-1、盐水硫柳汞溶液和K₂EDTA溶液的保存效果。将细胞重悬浮于TAG-1或对照溶液中并使其老化长达100小时。使TAG-1溶液保持在25℃,而K₂EDTA溶液保持在4℃。在不同的时间点,即0hr、24hr、48hr、72hr和100hr,从老化的细胞中提取RNA,以确定来自各样品的mRNA的完整性。图4是示出了在TAG-1试剂或两种对照溶液中老化的癌细胞的比较的曲线图。在每个时间点使用rtPCR检测G6PDH mRNA的拷贝。图4显示TAG-1溶液比对照溶液更好地使mRNA/细胞保持活力。该对照溶液在48hr时间点,甚至更早,显示没有G6PDH的拷贝。TAG-1溶液甚至在100小时时仍然能够使活细胞具有完整的mRNA。

[0110] 利用PC-3细胞进行的研究(图5)比较了TAG-1、盐水/硫柳汞溶液和K₂EDTA溶液的保存效果。将细胞重悬浮于TAG-1或对照溶液中并使其老化长达100小时。使TAG-1溶液保持在25℃,而K₂EDTA溶液保持在4℃。在不同的时间点,即0hr、24hr、48hr、72hr和100hr,从老化的细胞中提取RNA,以确定来自各样品的mRNA的完整性。图5是示出了在TAG-1试剂或两种对照溶液中老化的癌细胞的比较的曲线图。在每个时间点使用rtPCR检测PBGD mRNA的拷贝。图5显示TAG-1溶液比对照溶液更好地使mRNA/细胞保持活力。该对照溶液在48hr时间点时显示几乎没有PBGD的拷贝。TAG-1溶液甚至在100小时时仍然能够使活细胞具有完整的mRNA。

[0111] 使用肾癌细胞进行的研究比较了本发明的保存试剂的一个实施方案与其他两种溶液(一种是20%福尔马林,另一种是含有硫氰酸钠的K₂EDTA溶液)。使肾癌细胞生长并以与上述所用的前列腺癌细胞系相似的方式收获肾癌细胞。然后将细胞在TAG-1、20%福尔马林或含有硫氰酸钠的K₂EDTA溶液中老化长达100小时。

[0112] 图6示出了随时间(0hr、24hr、48hr、72hr和100hr)通过rtPCR检测到的老化肾癌细胞中的G6PDH mRNA拷贝的曲线图。在福尔马林溶液中老化的细胞在48小时时没有可检测到的G6PDH的拷贝,而在K₂EDTA加硫氰酸钠中老化的细胞在72小时时没有可检测到的mRNA G6PDH。在TAG-1制剂中老化的细胞在100小时时仍然具有可检测到的mRNA。

[0113] 用于这些实验的TAG-1制剂包含瘦素、海藻糖、硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、DMSO和甘油。该制剂的最终浓度为硫氰酸钠0.01M,EDTA 0.01M,甘油0.25M,缓冲液0.001M,瘦素0.001M,海藻糖0.20M。

实施例III

[0114] 实施例III是示出了在根据本发明的组织细胞保存试剂的一个实施方案中具有海藻糖及瘦素的细胞保存效果的研究。对于三种制剂(TAG-1,不含海藻糖的TAG-1,以及不含海藻糖和瘦素的TAG-1),使用肾癌细胞来比较随时间(0hr、24hr、48hr、72hr和100hr)存在

的G6PDH mRNA的拷贝。在从肾细胞中提取mRNA之前将样品置于室温下。图7示出了三种制剂的比较的曲线图,显示了在将肾癌细胞在三种细胞保存试剂溶液之一中老化(重悬浮于保存溶液中)后存在的G6PDH mRNA的拷贝数。图7清楚地显示了在细胞保存制剂中具有海藻糖和瘦素两者的有效性。不含有海藻糖的TAG-1和不含有海藻糖和瘦素的TAG-1在48小时时间点时显示没有G6PDH mRNA的拷贝,而甚至在100小时时间点时,在重悬浮于TAG-1制剂中的细胞中检测到mRNA G6PDH拷贝。

[0115] 用于这些实验的TAG-1制剂包含瘦素、海藻糖、硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、DMSO和甘油。该制剂的最终浓度为硫氰酸钠0.01M,EDTA 0.01M,甘油0.25M,缓冲液0.001M,瘦素0.001M,海藻糖0.20M。

实施例IV

[0116] 实施例IV是比较液氮(LN_2)急速冷冻的组织与保持在本发明的一个实施方案——TAG-1细胞保存制剂中的组织的基因表达谱的微阵列研究。在Roche 4-重,19K基因阵列上完成mRNA基因表达。使用由Truckee Applied Genomics提供的Ishikawa癌细胞的mRNA,通过Roche内部基因表达服务进行阵列杂交和扫描。在使用四分位归一化进行比对后,通过从阵列中提取荧光来分析结果。使用稳健多芯片平均值(RMA,Robust Multichip Average)算法来生成Gen判定(Gen call)。成对比较在散点图上可视化,并通过分层聚类(hierarchical clustering)比较所有的处理,这是用于阵列数据可视化的两种标准方法。通过比较无明显离群值(outlier)的10个阵列中的表达分布来实现阵列质量控制。

[0117] 以下表IV显示了微阵列实验设计。组织在TAG-1中老化或在 LN_2 中储存指定的时间。

表IV

| | 0hr | 24hr | 48hr | 72hr | 96hr |
|---------------|-----|------|------|------|------|
| TAG-1 | N=1 | N=1 | N=1 | N=1 | N=1 |
| LN_2 | N=1 | N=1 | N=1 | N=1 | N=1 |

[0118] 以下表V中以表格和图形形式示出了成对相关矩阵。实验组与其本身聚类,并且通常显示出良好的内部相关性。

表V

| | LN2 0 hr | LN2 24 hr | LN2 48 hr | LN2 72 hr | LN2 96 hr | TAG 0 hr | TAG 24 hr | TAG 48 hr | TAG 72 hr | TAG 96 hr |
|-----------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|-------------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| LN2 0 hr | 1 | 0.987 | 0.984 | 0.981 | 0.975 | 0.971 | 0.94 | 0.922 | 0.873 | 0.89 |
| LN2 24 hr | 0.987 | 1 | 0.99 | 0.991 | 0.982 | 0.974 | 0.951 | 0.929 | 0.881 | 0.895 |
| LN2 48 hr | 0.984 | 0.99 | 1 | 0.992 | 0.984 | 0.97 | 0.947 | 0.925 | 0.876 | 0.891 |
| LN2 72 hr | 0.981 | 0.991 | 0.992 | 1 | 0.986 | 0.966 | 0.946 | 0.926 | 0.877 | 0.892 |
| LN2 96 hr | 0.975 | 0.982 | 0.984 | 0.986 | 1 | 0.954 | 0.94 | 0.918 | 0.886 | 0.897 |
| TAG 0 hr | 0.971 | 0.974 | 0.97 | 0.966 | 0.954 | 1 | 0.96 | 0.934 | 0.871 | 0.885 |
| TAG 24 hr | 0.94 | 0.951 | 0.947 | 0.946 | 0.94 | 0.96 | 1 | 0.97 | 0.918 | 0.926 |
| TAG 48 hr | 0.922 | 0.929 | 0.925 | 0.926 | 0.918 | 0.934 | 0.97 | 1 | 0.951 | 0.965 |
| TAG 72 hr | 0.873 | 0.881 | 0.876 | 0.877 | 0.886 | 0.871 | 0.918 | 0.951 | 1 | 0.982 |
| TAG | 0.89 | 0.895 | 0.891 | 0.892 | 0.897 | 0.885 | 0.926 | 0.965 | 0.982 | 1 |
| 96 hr | | | | | | | | | | |

[0119] 回归模型—针对24,000个基因中的每一个以及两个实验组中的每一组,拟合线性回归模型,其中以时间作为自变量而以表达作为因变量。该模型针对每个基因产生斜率和

相关的p-值。斜率和p-值汇总于以下表VI中。

表VI

| | 基因P<05 | 基因P<0.01 | 基因P<0.001 |
|-------|-------------------------------|-------------------|-----------------|
| TAG-1 | 5811 | 1696 | 197 |
| LN2 | 3101 | 786 | 85 |
| 交叉 | 825 | 66 | 0 |
| | 基因 P<0.05 斜率>0 | 基因 P<0.05 斜率<0 | 基因 P<0.05 总计 |
| TAG-1 | 2597 | 3214 | 5811 |
| LN2 | 1541 | 1560 | 3101 |
| | 绝对斜率, 所有基因 (中值, 第一至第三个四分位) | | |
| TAG-1 | 0.13 (0.09 至 0.23) | | |
| LN2 | 0.09 (0.04 至 0.15) | | |

斜率单位=每天log2表达单位

| | |
|-------|-------------------------------|
| | 绝对斜率, 所有基因 (中值, 第一至第三个四分位) |
| TAG-1 | 7% (6%至 13.1%) |
| LN2 | 6% (3%至 11%) |

斜率单位=每天的变化百分比

[0120] 跨时间的变异—针对24,000个基因中的每一个以及两个实验组中的每一组,计算在五个时间点之间的标准偏差和变异系数,参见以下表VII。这些结果与上述表VI所示的回归模型结果一致。

表VII

| | 基因时间标准偏差 中值(第一至第三个四分位) | 基因时间变异系数 中值(第一至第三个四分位) |
|-------|---------------------------|---------------------------|
| TAG-1 | 0.484 (0.210 至 0.421) | 32.8% (15.0%至 28.1%) |
| LN2 | 0.277 (0.199 至 0.376) | 19.0% (13.7%至 25.7%) |

[0121] 以下表VIII中示出了两组的平均差异。总体而言,尽管组 (LN2和TAG-1) 间存在显著的平均差异,但该差异在正差和负差之间得到较好的平衡。

[0122] 在液氮中冻结组织是用于保持细胞组织完整的金标准。上述实验比较了在TAG-1中与在液氮中储存组织的效果。上述结果表明,与在液氮中储存的细胞相比,在TAG-1中储存的细胞中的基因表达并没有过表达或欠表达,表明在测试的时间段中,在基因表达水平

上, TAG-1与液氮储存在保护细胞完整性方面是相当的。

[0123] 用于这些实验的TAG-1制剂包含瘦素、海藻糖、硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、DMSO和甘油。该制剂的最终浓度为硫氰酸钠0.01M, EDTA 0.01M, 甘油0.25M, 缓冲液0.001M, 瘦素0.001M, 海藻糖0.20M。

实施例V

[0124] 实施例V是评估离体膀胱和前列腺癌切片组织培养物的介质表现的研究。膀胱和前列腺肿瘤组织在本发明的一个实施方案(即TAG-1)中在室温下储存不同的时间长度。通过采用标准显微术的组织形态检查、针对细胞活力的MTT分析、针对凋亡的TUNEL分析以及使用免疫染色的Ki67增殖评估来评估随时间变化的切片活力。基因表达阵列实验也将包括在癌组织活力的评估中。

[0125] 将使用膜系统来进行切片培养物的比较,在膜系统中,组织切片(400-800微米厚)将通过穿过覆盖孔的膜接近TAG-1来保持。将对化疗药物和临床样品测试TAG-1的优化方案。

[0126] 通常的方法包括从NSG-PDX JAX小鼠或患者癌症针芯活检物(biopsy core)获得膀胱和前列腺癌组织样品。组织将被处理成切片或者切块,并在三维矩阵的培养板上或在膜上进行培养。来自同一患者的正常组织切片将作为对照,以确定癌组织与正常组织在表现上的差异。此外,将分析分离的外周血单核细胞(PBMC)与肿瘤细胞表现的相关性。为比较TAG-1与标准储存方案,在标准盐水/硫柳汞溶液、K₂EDTA溶液和TAG-1中,在长达八天内以不同时间间隔测定组织样品。

[0127] 用于这些实验的TAG-1制剂包含瘦素、海藻糖、硫氰酸钠、EDTA、缓冲液、DMSO和甘油。该制剂的最终浓度为硫氰酸钠0.01M, EDTA 0.01M, 甘油0.25M, 缓冲液0.001M, 瘦素0.001M, 海藻糖0.20M。

[0128] 应理解,提供说明性实施方案的详细描述是为了说明性目的。权利要求的范围并不限于这些具体的实施方案或实施例。因此,各种方法限制、要素、细节和用途可以与以上描述的那些不同,或者使用在商业上尚不可行的技术展开或实现,但仍然在本公开内容的发明构思内。本发明的范围由以下权利要求及其合法等同物来确定。

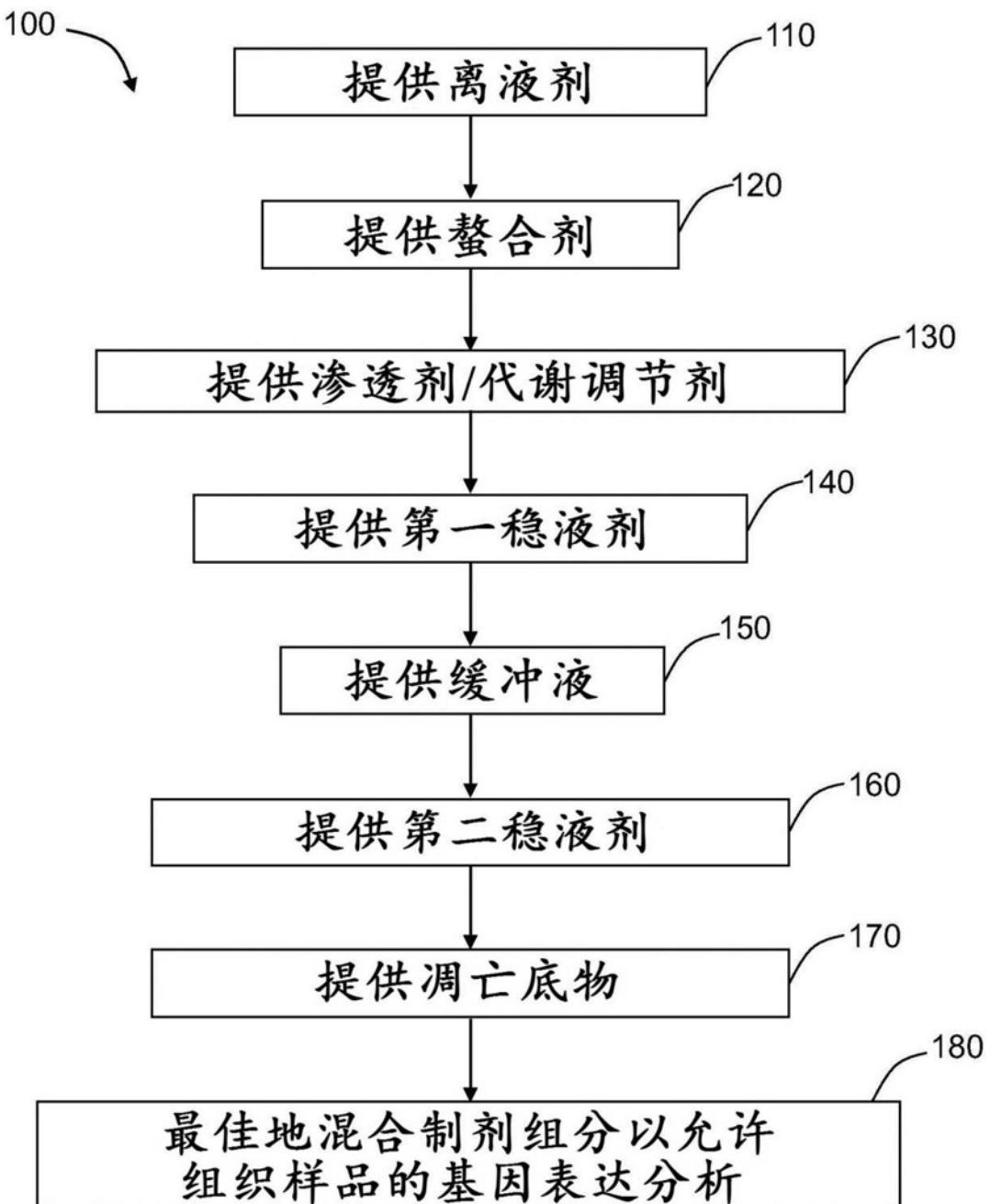


图1

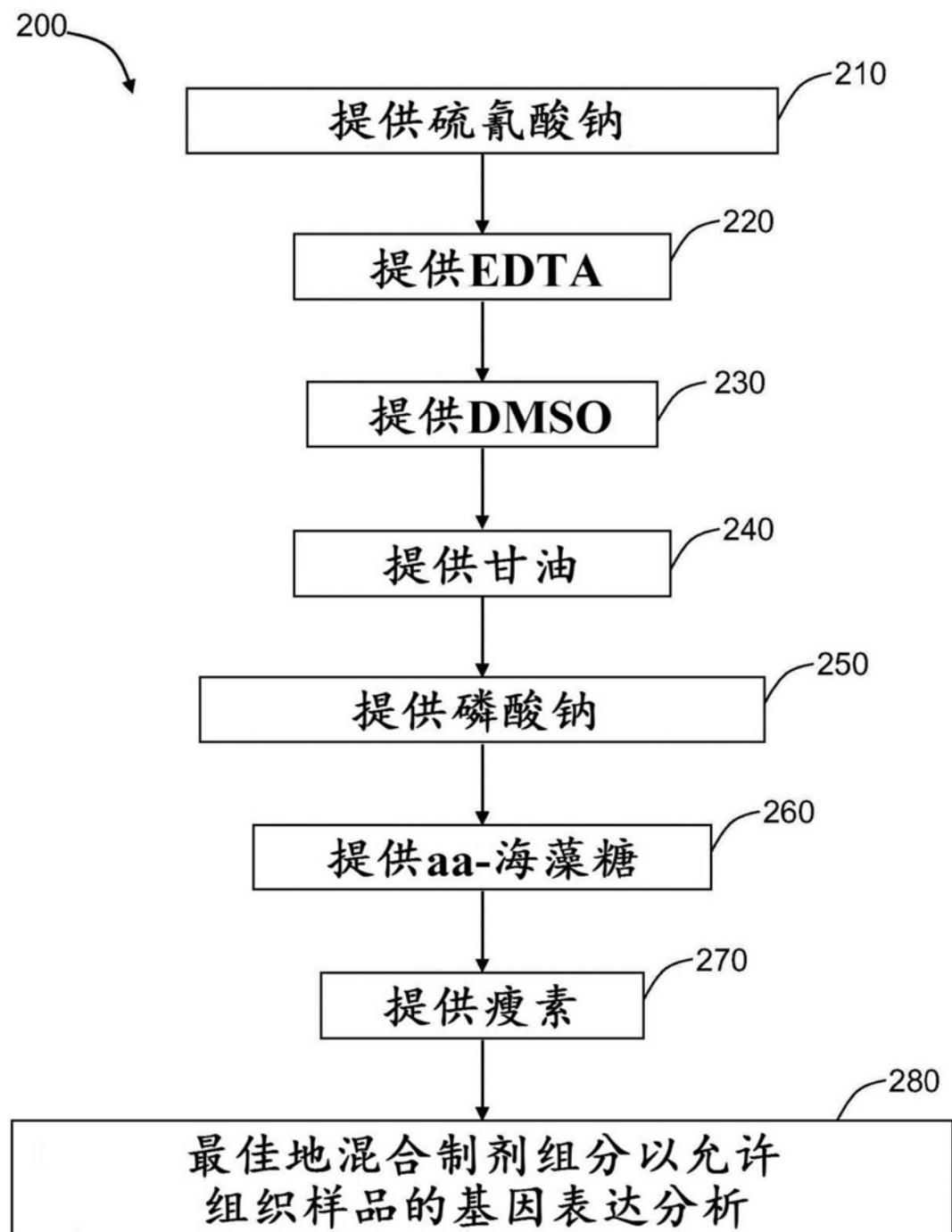


图2

附 书 明 说

第一页

材料清单

| 物品 by | 批号 | 料号 | 失效日期 | 每1000 ml 的量 | 用量 | 操作者 | 核查 |
|--------------------------------------|----|----|------|----------------|----|-----|----|
| 硫氰酸钠 | | | | 8.1 gm | | | |
| 0.1M EDTA | | | | 100 ml | | | |
| USP净化水 (批号的输入日期) | | | | QS 1000 ml | | | |
| DMSO | | | | 20 ml | | | |
| 甘油 | | | | 25 ml | | | |
| K ₃ PO ₄ 磷酸二氢钾 | | | | 3.93 gm | | | |
| K ₃ PO ₄ 磷酸钾 | | | | 5.02 gm | | | |
| 海藻糖二水合物 | | | | 7.56 gm | | | |
| 羧素 | | | | 50 μl | | | |

计算执行人

计算核查人

内容

| 记录制备的体积 | 日期 | 操作者 |
|---------|-------|-------|
| 开始日期 | | |
| 失效日期 | | |

- 指定从开始日期开始的1年失效期

签发人
日期
已附所有页批号正确 是 否
所有页批号正确 是 否
失效日期正确 是 否

文件核查人

核查日期

图3A

| 内容 | 日期 | 操作者 |
|--|----|-----|
| 2. 向合适大小的容器中添加50 ml的USP净化水 加水时间 | | |
| 3. 添加8.1 gm的硫氯酸钠并混合至澄清 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 4. 添加100 ml的0.1 M EDTA并混合至溶液均匀 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 5. 添加20 ml的DMSO并混合至溶液均匀 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 6. 添加25 ml的甘油并混合至溶液均匀 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 7. 添加3.93 gm的磷酸二氢钾，混合至溶液均匀 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 8. 添加5.02 gm的K3PO4磷酸钾 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 9. 添加7.65 gm海藻糖二水合物，混合至溶液澄清 混合停止时间 | | |
| 10. 添加50 μ l的人瘦素，混合至溶液澄清 混合开始时间 混合停止时间 | | |
| 11. (标签如下) Truckee Applied Genomics TAG-1组织保存系统 批号 失效日期 | | |
| 12. 适量DIUF水加至1000 ml | | |
| 审核人 日期 备注 | | |

图3B

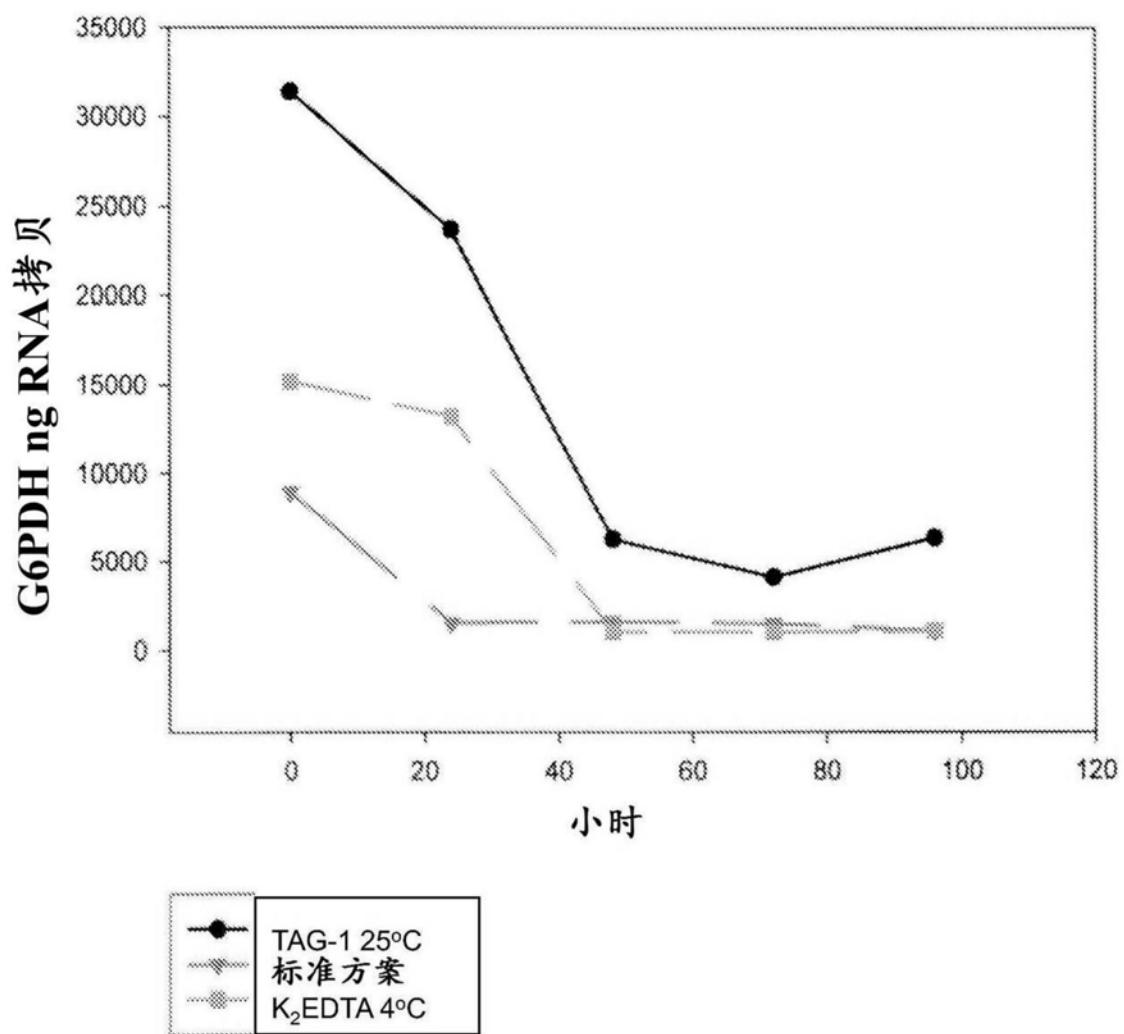


图4

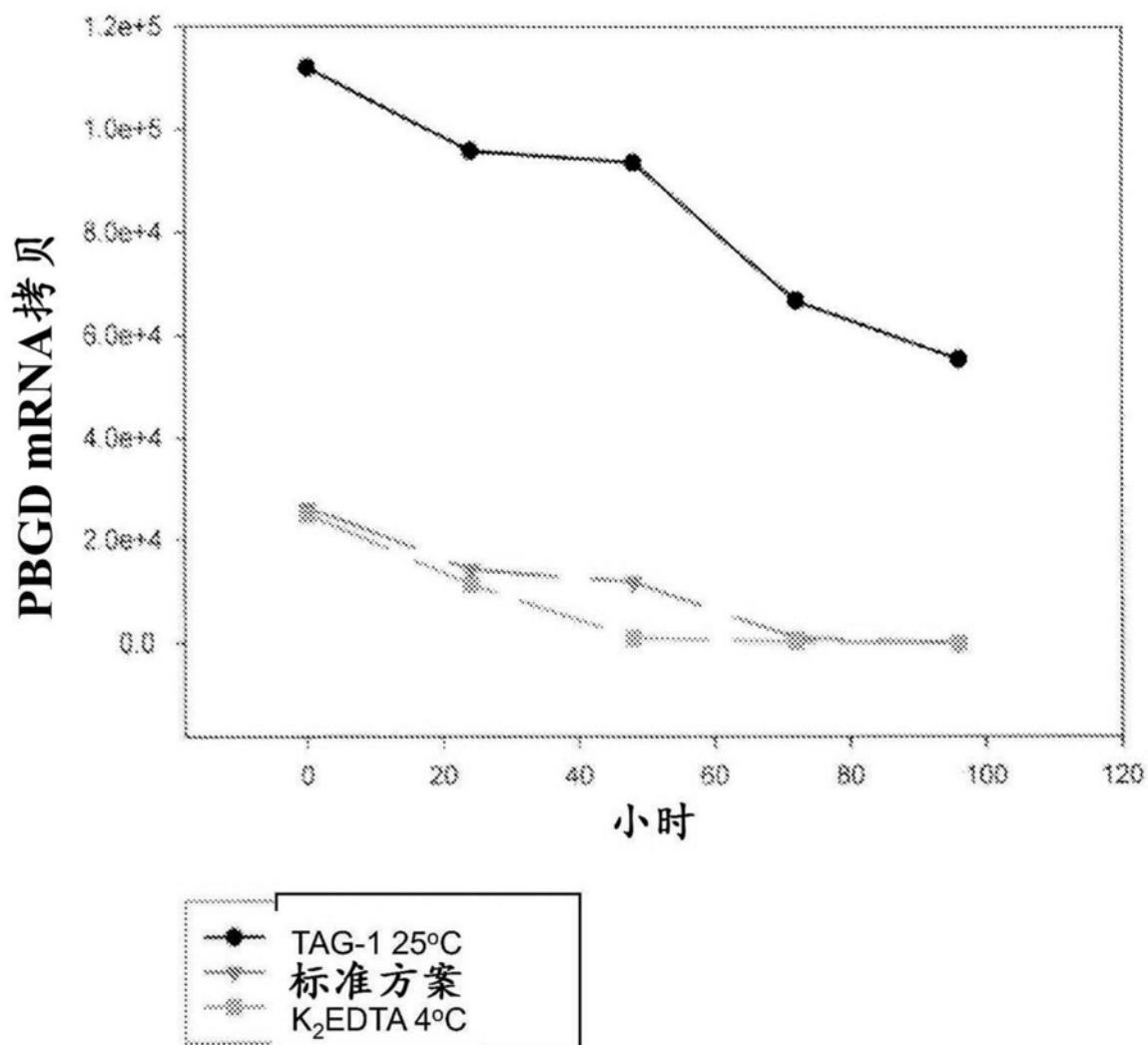


图5

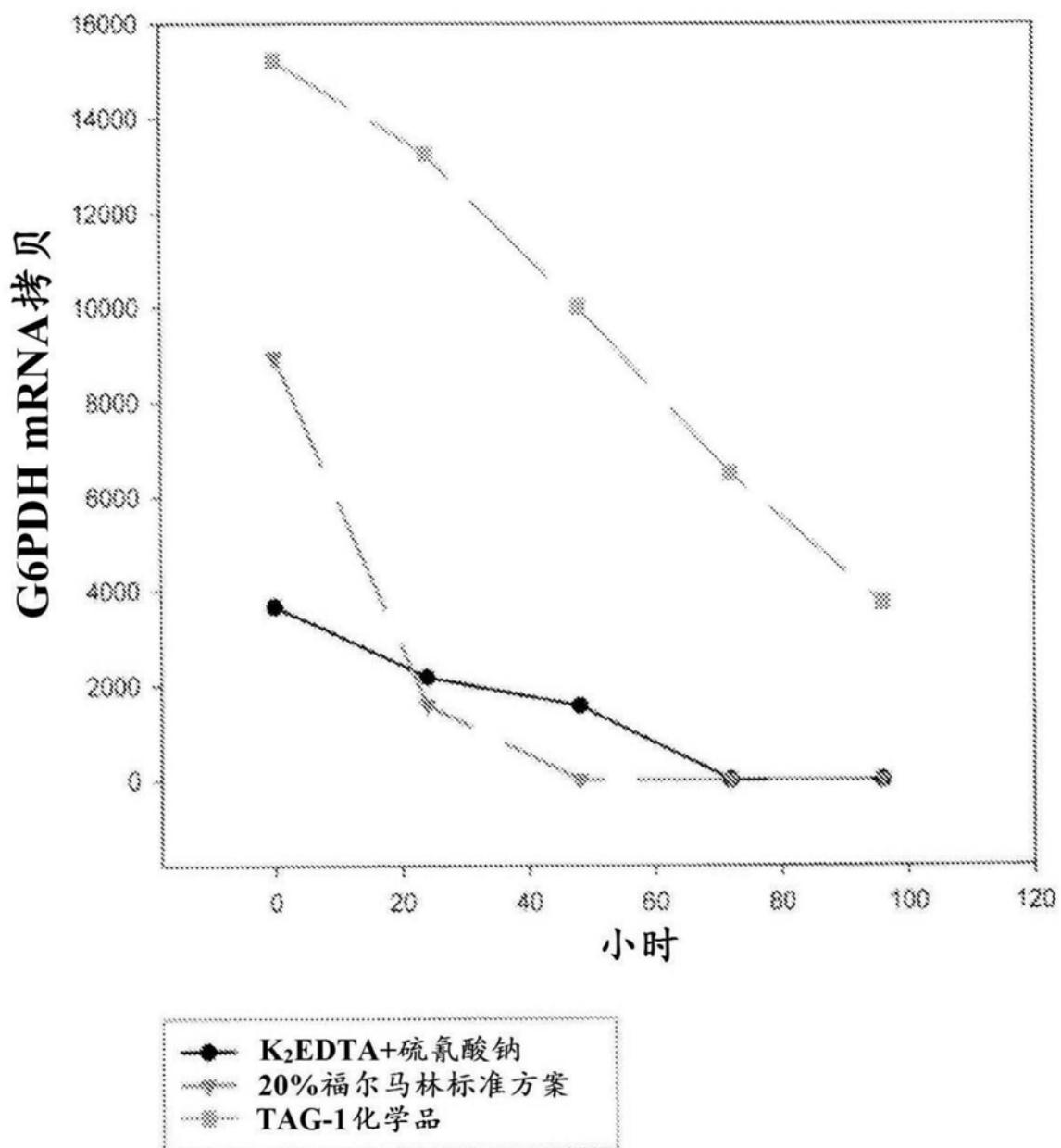


图6

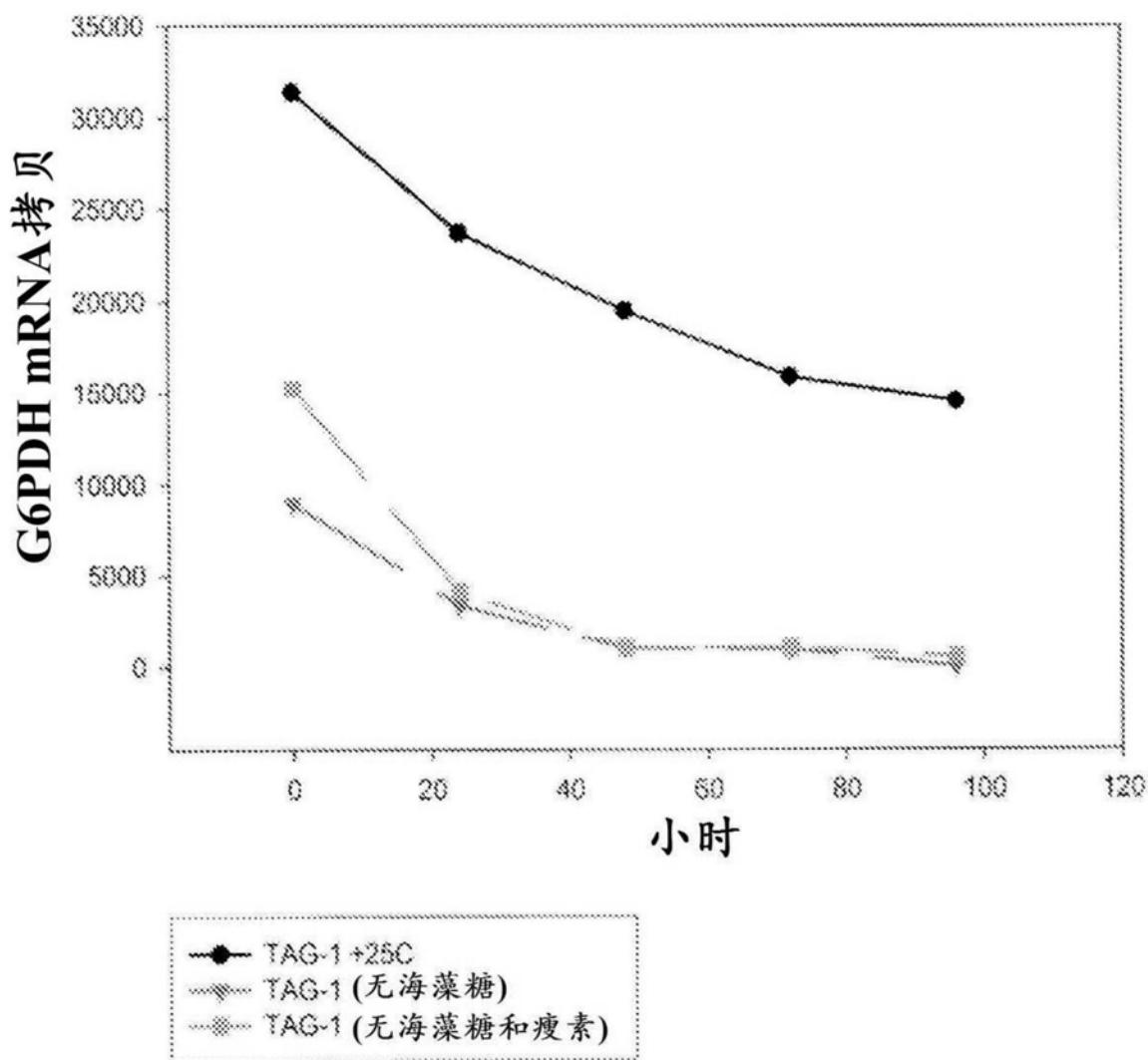


图7