



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105087778 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201510441612. 9

(22) 申请日 2015. 07. 24

(71) 申请人 北京莱尔生物医药科技有限公司

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

(72) 发明人 詹厅 杨璞杰 马好婕

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所

(普通合伙) 11130

代理人 王为 孟旭

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/573(2006. 01)

G01N 33/58(2006. 01)

权利要求书3页 说明书11页

(54) 发明名称

一种基于稀有细胞检测 HER-2/CEP17 基因状
态的方法及相关试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及一种基于稀有细胞检测 HER-2/
CEP17 基因状态的方法及试剂盒,所述方法包括
以下步骤:步骤 1,获得血液样本或体液样本,样
本中包含循环肿瘤细胞或其他稀有细胞与白细胞
的混合细胞群;步骤 2,用缓冲液稀释样本,去除
血浆,并回收 CTC 或其他稀有细胞;步骤 3,用红
细胞裂解液裂解,去除红细胞,并回收 CTC 或其
他稀有细胞;步骤 4,用包被有抗人白细胞相关
抗原抗体的磁微粒同回收细胞混匀孵育,结合并
形成磁微粒-白细胞混合体;步骤 5,离心将磁
微粒-白细胞混合体与其他细胞分离,得到含有
CTC 或其他稀有细胞及少量白细胞的混合细胞
群;步骤 6,使用免疫荧光细胞化学与荧光原位
杂交的相结合的方法,测定 HER-2/CEP17 的状
态,同时进行 CTC 或其他稀有细胞的鉴别。

1. 一种基于稀有细胞检测 HER-2/CEP17 基因状态的方法,其特征在于,所述方法包括以下步骤:

步骤 1,从患者获得血液样本或其他含有稀有细胞的体液样本,样本中包含 CTC 或其他稀有细胞与白细胞的混合细胞群;

步骤 2,用缓冲液稀释样本,离心去除血浆,并回收 CTC 或其他稀有细胞;

步骤 3,用红细胞裂解液裂解,离心去除红细胞并回收 CTC 或其他稀有细胞;

步骤 4,用包被有抗人白细胞相关抗原抗体的磁微粒同步骤 3 所得的回收细胞混匀孵育,以使磁微粒同标的白细胞充分结合并形成磁微粒-白细胞混合体;

步骤 5,离心将磁微粒-白细胞混合体与其他细胞分离,得到含有 CTC 或其他稀有细胞及少量白细胞的混合细胞群;

步骤 6,使用免疫荧光细胞化学与荧光原位杂交的相结合的方法,测定 HER-2/CEP17 的状态,同时进行 CTC 或其他稀有细胞的鉴别。

2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 2 所述缓冲液为与血液密度相近、包含 BSA 及 PBS、PH7-8 的缓冲液,其中,步骤 3 所述红细胞裂解液为任意一种红细胞裂解液。

3. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 4 所述包被有抗人白细胞相关抗原抗体的磁微粒为一种包被抗白细胞共同抗原抗体的链亲和素磁珠,能够牢固地结合白细胞。

4. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 5 所述离心介质为一种密度介于 1.070-1.080 之间的密度梯度离心液。

5. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 6 所述使用免疫荧光细胞化学与荧光原位杂交的方法,测定 HER-2/CEP17,对 CTC 或其他稀有细胞进行鉴别,方法如下:

(1)HER-2 扩增型 CTC:将标本置于荧光显微镜相应通道下观察,若发现多个 HER-2 信号点分布(≥ 3 个),且数目大于 CEP17 的信号点数,并且无 CD45 抗原表达,则计为一个 CTC 阳性细胞,且直接视该细胞为 HER-2 阳性细胞;

(2) 染色体扩增型 CTC:计数单个有核细胞 CEP17 信号数目,若大于等于 3 个信号点且无 CD45 抗原表达,则计为一个 CTC 阳性细胞;

(3)HER-2/CEP17-CTC 总数目:记录所有 HER-2 扩增型及染色体扩增型 CTC 数目,总和视为 HER-2/CEP17-CTC 总数目;

(4)HER-2 基因扩增状态记录:在所有标本区域中若有明显且典型 HER-2 扩增,则记为 HER-2 扩增;若无,则将所有 CTC 细胞内平均每个细胞核中 HER-2 信号数量、平均每个细胞核中 CEP17 信号数量、平均每个细胞核中 HER-2 和 CEP17 信号数量比值的结果。

6. 一种用于权利要求 1 方法的试剂盒,其特征在于,包括如下成分:

CS1 浓缩缓冲液 (10 \times)

CS2 浓缩储存液 (10 \times)

CS3 分离介质

磁微粒混悬液

CF1 固定液

10 \times CF2 固定液

DAPI 染色液

HER-2/CEP17 探针

CD45-AF594 荧光抗体
甲酰胺工作液
20×SSC 浓缩缓冲液
BSA。

7. 权利要求 6 所述试剂盒的使用方法,其特征在於,步骤如下:

(1) 将 0.1-5mL 血液标本加入至 50mL 离心管中,加入稀释好的 CS1 工作液至 45mL, 650×g 离心 5 分钟,吸弃上清并剩余约 12mL 液体;

(2) 轻摇混匀,加入稀释好的 CS2 裂解工作液至 45mL,混匀 8-10 分钟,650×g 离心 5 分钟,吸弃上清液体;

(3) 加入 CS1 工作液适量并轻摇混匀,再次加入一定量 CS1 工作液,加入清洗过的磁微粒混悬液 200uL,水平摇匀 (120rpm) 20 分钟;

(4) 吸取全部混匀后液体,叠加至 CS3 分离介质上,300×g 离心 5 分钟;

(5) 吸取除磁微粒沉淀以外的上两层液体至 15mL 离心管中,加入 CS1 工作液至 15mL, 950×g 离心 5 分钟,吸弃上清;

(6) 加入 1mL CS1 工作液,吹打混匀并加入至新 2mL 离心管中,磁力分选 2 分钟。转移上清至 1.5mL 离心管中,放置在 15mL 离心管上,3400rpm 离心 3 分钟;

(7) 吸弃上清,加入 CF1 固定液,吹打混匀并涂片,自然晾干;

(8) 加入 CF2 固定工作液,计时 8-10 分钟;

(9) 吸弃液体,放入已预热的 2×SSC 染缸 10 分钟;

(10) 依次放入 75%、85%、无水乙醇中 2-5 分钟;

(11) 加入 10uL HER-2/CEP17 探针,盖上盖玻片,封片并放入杂交仪或其他控温装置, 76°C 5 分钟,37°C 4-20 小时;

(12) 取出标本,撕下封片物质,放入已预热的甲酰胺工作液,计时 15 分钟;

(13) 置于 2×SSC 中 5-10 分钟;

(14) 取出,加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 +180uL 2% BSA),每玻片 200uL,避光反应 1-5 小时;

(15) 吸弃多余液体,0.2% BSA 清洗 1-3 次,加入 DAPI 复染剂 10uL,封片。

8. 一种用于权利要求 1 方法的试剂盒,其特征在於,包括如下成分:

CF1 固定液

10×CF2 固定液

DAPI 染色液

HER-2/CEP17 探针

CD45-AF594 荧光抗体

甲酰胺工作液

20×SSC 浓缩缓冲液

BSA。

9. 权利要求 8 所述试剂盒的使用方法,其特征在於,步骤如下:

(1) 将本方法步骤 (7) 或其他方法获得的细胞悬液,涂于载玻片或膜片上,并自然晾干,加 CF2 固定工作液,计时 8-10 分钟;

- (2) 吸弃液体,放入已预热的 $2\times$ SSC 染缸 10 分钟;
 - (3) 依次放入 75%、85%、无水乙醇中 2-5 分钟;
 - (4) 加入 10uL HER-2/CEP17 探针,盖上盖玻片,封片并放入杂交仪或其他控温装置, 76°C 5 分钟, 37°C 4-20 小时;
 - (5) 取出标本,撕下封片物质,放入已预热的甲酰胺工作液,计时 15 分钟;
 - (6) 置于 $2\times$ SSC 中 5-10 分钟;
 - (7) 取出,加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 +180uL 2% BSA),每玻片 200uL,避光反应 1-5 小时;
 - (8) 吸弃多余液体,0.2% BSA 清洗 1-3 次,加入 DAPI 复染剂 10uL,封片。
10. 权利要求 6 或 8 任意一项试剂盒在测定稀有细胞的同时,检测 HER-2/CEP17 基因状态的应用。

一种基于稀有细胞检测 HER-2/CEP17 基因状态的方法及相 关试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及医学诊断学,特别涉及肿瘤细胞的检测。更具体地讲,本发明涉及检测癌症和评估患者的治疗方案的诊断方法。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cell, CTC)指进入到血液循环中的肿瘤细胞,其可由原发灶或转移灶脱落入血,亦可能在形成实体瘤病灶之前进入血液中。肿瘤细胞侵入循环系统,大部分由于机体的免疫识别、机械杀伤及自身凋亡在短期内死亡,只有极少数存活下来,并在远端或原发组织及器官种植,进一步发展为转移灶,是导致肿瘤转移和复发的最直接因素。

[0003] CTC作为一种可以代表原发肿瘤的“液体活检”样本,外周血标本易获取、创伤性小、可反复采集,是临床检测更为理想的标本来源,可对肿瘤治疗进行实时全面监测。可有效实现肿瘤复发预警,疗效及时评价以及肿瘤个体化治疗用药指导,目前 CTC 检测已广泛运用于临床肿瘤患者的疗效实时评价、病情实时监测、耐药析因、预后判断中。

[0004] 荧光原位杂交(fluorescent in situ hybridization, FISH)是一种细胞遗传学技术,可以用来对核酸进行检测和定位。目前基于脱落稀有细胞的 FISH 技术一般为定性检测,很难做到精准定量且保证其效果。究其根本原在于目前适用于组织标本的 FISH 检测方法及普通的脱落细胞学 FISH 检测方法,当数量级在 0-100 间的细胞涂片后,无法在着色效果和有效保持细胞方面取得较好的平衡并保持较高的稳定性,更难以形成有效稳定定量检测的成型产品。目前虽有相应专利阐述一种有效方法(US 6,524,798),但需极其高昂成本的专用检测设备,无法在常规实验室完成这基于及少量稀有细胞、甚至是单细胞层面的 FISH 检测工作。

[0005] 此前已描述了来自生物样品的肿瘤细胞、稀少细胞或其他生物实体的鉴定方法(如中国专利申请号:200810097889.4、201310057307.0)。此两步法要求有效富集以确保在分析之前获取靶细胞,同时去除大量碎片和其他干扰物质,使得可通过成像技术进行细胞检验。此方法以独特的阴性富集策略将免疫磁微粒与多密度离心方式、荧光原位杂交和免疫荧光细胞化学分析组合起来,精确定量地检测几乎所有实体肿瘤类型中脱落至含血液、胸/腹腔积液、尿液、脑脊液等多种生物体液标本中的稀有细胞(含 CTC)。此组合方法用于富集和计数血样中的染色体扩增型肿瘤细胞,因此提供了一种量度癌症的工具。

[0006] 原癌基因人类表皮生长因子受体 2(HER-2)基因,即 c-erbB-2 基因,定位于染色体 17q12-21.32 上,编码相对分子质量为 185000 的跨膜受体样蛋白,具有酪氨酸激酶活性。目前基于 HER-2 基因的检测,广泛应用于乳腺癌、胃癌等恶性肿瘤的预后分析,尤其是基于 HER-2 靶点的曲妥珠单抗(商品名:Herceptin)药物的临床应用方面。

[0007] 《乳腺癌 HER-2 检测指南》中指出乳腺癌 HER-2 检测方法 & 报告推荐用两种方法检测乳腺癌 HER-2,即检测蛋白的免疫组化法(IHC)和检测基因的荧光原位杂交(FISH)法,该

指南建议, HER-2 检测 FISH 报告主要包括: 所计数的浸润癌细胞数量、平均每个细胞核中 HER-2 信号数量、平均每个细胞核中 CEP17 信号数量、平均每个细胞核中 HER-2 和 CEP17 信号数量的比值。

[0008] 但是临床检测时, 会由于例如已手术切除、患者主观意愿不听从等诸多无法有效获得肿瘤组织的情况, 而存在以下局限性:

[0009] 1、作为有创性且受限于病灶位置的组织学检测, 存在标本取材不易或无法取材等局限性, 且术后不能反复取材, 导致组织取材无法提供实时性的监测信息。

[0010] 2、且受治疗的影响等, 肿瘤细胞的分子信息有可能发生动态改变。如: 有研究报告, 接受新辅助化疗的乳腺癌患者, 在化疗前接受活检, 并将结果与术后病理进行对照, 发现存在治疗前后 HER-2 表达不一致的情况。

[0011] 3、肿瘤组织异质性的存在以及单点活检造成的只是局部信息反映的现状, 使得传统组织学检测缺乏全面整体性的评价, 如原发灶、多发转移灶信息的综合评价等。

[0012] 本发明在于提供了一种检测 CTC 或其他稀有细胞的同时对 HER-2/CEP17 的数量及比值进行检测的方法。以获得更加全面的信息。本发明在分离获取血液中 CTC (或其他稀有细胞) 的基础上, 进行单细胞分子分析, 检测 HER-2 表达情况, 以此来从单细胞水平上, 即时地发现 HER-2 的分子信息, 以便对患者的状态进行实时观察。

发明内容

[0013] 本发明提供一种检测 CTC 或其他稀有细胞的同时对 HER-2/CEP17 的数量及比值进行检测的方法。直接帮助临床医师了解肿瘤患者实时的基因状态, 以辅助预测生存情况并拟定下一步治疗方案。本发明的方法包括以下全部及部分步骤:

[0014] 步骤 1, 从患者获得血液样本或其他含有稀有细胞的体液样本, 样本中包含 CTC 或其他稀有细胞与白细胞的混合细胞群;

[0015] 步骤 2, 用缓冲液稀释样本, 离心去除血浆, 并回收 CTC 或其他稀有细胞;

[0016] 步骤 3, 用红细胞裂解液裂解, 离心去除红细胞并回收 CTC 或其他稀有细胞;

[0017] 步骤 4, 用包被有抗人白细胞相关抗原抗体的磁微粒同步步骤 3 所得的回收细胞混匀孵育, 以使磁微粒同标的白细胞充分结合并形成磁微粒 - 白细胞混合体;

[0018] 步骤 5, 离心将磁微粒 - 白细胞混合体与其他细胞分离, 得到含有 CTC 或其他稀有细胞及少量白细胞的混合细胞群;

[0019] 步骤 6, 使用免疫荧光细胞化学与荧光原位杂交的相结合的方法, 测定 HER-2/CEP17 的状态, 同时进行 CTC 或其他稀有细胞的鉴别。

[0020] 本发明所述的方法, 其中, 步骤 2 所述缓冲液为一种与血液密度相近的缓冲液, 含有 BSA、PBS 等物质, pH7-8 之间, 能够保证去除血浆的同时, 保护各种有核细胞。

[0021] 本发明所述的方法, 其中, 步骤 3 所述红细胞裂解液为一种红细胞裂解液, 利用等渗不等张的原理, 裂解红细胞的同时, 不会损伤其他有核细胞。

[0022] 如以下配方的裂解液:

[0023] NH₄Cl 82.9g

[0024] KHC0310g

[0025] EDTA0.37g

[0026] 加 H₂O 至 1000ml (高压灭菌, 4°C 保存)

[0027] 或

[0028] 红细胞裂解液 (Tris-NH₄Cl): 称取 3.735g 氯化铵、三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 1.3g 加水溶解并稀释至 500ml。0.22 μm 滤膜过滤除菌, 4°C 保存。

[0029] 本发明所述的方法, 其中, 步骤 4 所述包被有抗人白细胞相关抗原抗体的磁微粒为一种包被抗白细胞共同抗原抗体的链亲和素磁珠。能够最大量地、牢固地结合白细胞, 利于后续的分选处理。

[0030] 本发明所述的方法, 其中步骤 5 所述离心介质为一种密度介于 1.070-1.080 之间的密度梯度离心液, 其中以 1.072 最优, 可以在去除结合磁珠的白细胞的同时, 保存其他单个有核细胞不丢失。

[0031] 本发明所述的方法, 其中, 步骤 6 所述使用免疫荧光细胞化学与荧光原位杂交的方法, 对 CTC 或其他稀有细胞进行 CTC 鉴别, 同时测定 HER-2/CEP17, 方法如下:

[0032] (1) HER-2 扩增型 CTC: 将标本置于荧光显微镜相应通道下观察, 若发现多个 HER-2 信号点分布 (≥ 3 个), 且数目大于 CEP17 的信号点数, 并且无 CD45 抗原表达, 则计为一个 CTC 阳性细胞, 且直接视该细胞为 HER-2 阳性细胞;

[0033] (2) 染色体扩增型 CTC: 计数单个有核细胞 CEP17 信号数目, 若大于等于 3 个信号点且无 CD45 抗原表达, 则计为一个 CTC 阳性细胞;

[0034] (3) HER-2/CEP17-CTC 总数目: 记录所有 HER-2 扩增型及染色体扩增型 CTC 数目, 总和视为 HER-2/CEP17-CTC 总数目;

[0035] (4) HER-2 基因扩增状态记录: 在所有标本区域中若有明显且典型 HER-2 扩增, 则记为 HER-2 扩增; 若无, 则将所有 CTC 细胞内平均每个细胞核中 HER-2 信号数量、平均每个细胞核中 CEP17 信号数量、平均每个细胞核中 HER-2 和 CEP17 信号比值的结果。

[0036] 一种用于上述方法的试剂盒一, 包括如下成分:

[0037]

组份 \ 规格	主要组成成分
CS1 浓缩缓冲液 (10×)	10×浓缩的PBS、BSA等
CS2 浓缩储存液 (10×)	10×浓缩的氯化氨等
CS3 分离介质	金属盐、PBS等
磁微粒混悬液	磁微粒混悬液
CF1固定液	醇类等
10×CF2固定液	醛类、PBS

[0038]

DAPI染色液	DAPI、防荧光淬灭剂
HER-2/CEP17探针	探针、杂交液等
CD45-AF594荧光抗体	CD45抗体、AF594等
甲酰胺工作液	甲酰胺、蒸馏水等
20×SSC 浓缩缓冲液	柠檬酸钠、氯化钠等
BSA粉末	BSA粉末

[0039] 其中,10×、20× 表示浓度,即该溶液为 10 倍 /20 倍的浓度。

[0040] 本发明所述的试剂盒制备方法如下:

[0041] 试剂盒一包含下述富集及鉴别两部分的试剂。

[0042] 富集部分:

[0043] CS1 浓缩缓冲液 (10×):

[0044] 每 1000mL 水中,含有 60g BSA,5 包 PBS 粉末 (2L/包),100mL 0.5M 的 EDTA,0.8mL Proclin 300。

[0045] CS2 浓缩储存液 (10×):

[0046] 每 1000mL 水中,称取 82.9gNH₄Cl、10gKHCO₃、0.37gEDTA,水以及 0.8mL Proclin300,进行充分的搅拌溶解,定容,配制为 10X 浓缩液。

[0047] CS3 分离介质:

[0048] 将密度为 1.077 的梯度离心液稀释,稀释过程中测试密度,使其密度在 1.070-1.075 之间。

[0049] 磁微粒混悬液:

[0050] 将 CD45 抗体浓度调整为 1mg/mL,与链亲和素免疫磁珠按照 100uL:1mL 的比例进行孵育 1h,即配制为磁微粒混悬液。

[0051] 鉴别部分:

[0052] CF1 固定液:

[0053] 混合 PEG 和无水乙醇,使 PEG 终浓度为 1%,无水乙醇终浓度为 50%。

[0054] 10×CF2 固定液:

[0055] 以 PBS 为溶剂,溶解 PFA 粉末,配制为 5% 的 PFA 浓缩液。

[0056] 甲酰胺工作液:

[0057] 将甲酰胺原液稀释为 50% 的工作液。

[0058] 20XSSC 浓缩缓冲液:

[0059] 1000mL 水中,加入氯化钠 175.3g,柠檬酸铵 88.2g。

[0060] HER-2/CEP17 探针:

[0061] 使用甲酰胺、硫酸葡聚糖钠盐将 HER-2 及 CEP17,配制为探针工作液。

[0062] BSA 粉末:

[0063] 外购分装。

[0064] CD45-AF594 荧光抗体：

[0065] 将 CD45 抗体与 Alexa Flour 594 荧光素避光孵育 1h, 荧光素即可与 CD45 抗体连接。

[0066] DAPI 染色液：

[0067] 使用防淬灭剂 Mounting medium 将 1mg/mL 的 DAPI 原液按照 1:1000 进行稀释, 配制为 DAPI 染色工作液。

[0068] 本发明所述试剂盒一的使用方法, 步骤如下：

[0069] (1) 将 0.1-5mL 血液标本加入至 50mL 离心管中, 加入稀释好的 CS1 工作液至 45mL, 650×g 离心 5 分钟, 吸弃上清并剩余约 12mL 液体；

[0070] (2) 轻摇混匀, 加入稀释好的 CS2 裂解工作液至 45mL, 混匀 8-10 分钟, 650×g 离心 5 分钟, 吸弃上清液体；

[0071] (3) 加入 CS1 工作液适量并轻摇混匀, 再次加入一定量 CS1 工作液, 加入清洗过的磁微粒混悬液 200uL, 水平摇匀 (120rpm) 20 分钟；

[0072] (4) 吸取全部混匀后液体, 叠加至 CS3 分离介质上, 300×g 离心 5 分钟；

[0073] (5) 吸取除磁微粒沉淀以外的上两层液体至 15mL 离心管中, 加入 CS1 工作液至 15mL, 950×g 离心 5 分钟, 吸弃上清；

[0074] (6) 加入 1mL CS1 工作液, 吹打混匀并加入至新 2mL 离心管中, 磁力分选 2 分钟。转移上清至 1.5mL 离心管中, 放置在 15mL 离心管上, 3400rpm 离心 3 分钟。

[0075] (7) 吸弃上清, 加入 CF1 固定液, 吹打混匀并涂片, 自然晾干；

[0076] (8) 加入 CF2 固定工作液, 计时 8-10 分钟；

[0077] (9) 吸弃液体, 放入已预热的 2×SSC 染缸 10 分钟；

[0078] (10) 依次放入 75%、85%、无水乙醇中 2-5 分钟；

[0079] (11) 加入 10uL HER-2/CEP17 探针, 盖上盖玻片, 封片并放入杂交仪或其他控温装置, 76℃ 5 分钟, 37℃ 4-20 小时；

[0080] (12) 取出标本, 撕下封片物质, 放入已预热的甲酰胺工作液, 计时 15 分钟；(13) 置于 2×SSC 中 5-10 分钟；

[0081] (14) 取出, 加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 +180uL 2% BSA), 每玻片 200uL, 避光反应 1-5 小时；

[0082] (15) 吸弃多余液体, 0.2% BSA 清洗 1-3 次, 加入 DAPI 复染剂 10uL, 封片。本发明还提供另外一种用于本发明方法的试剂盒二, 包括如下成分：

[0083]

组份 \ 规格	主要组成成分
CF1固定液	醇类等
10×CF2固定液	醛类、PBS
DAPI染色液	DAPI、防荧光淬灭剂
HER-2/CEP17探针	探针、杂交液等
CD45-AF594荧光抗体	CD45抗体、AF594等
甲酰胺工作液	甲酰胺、蒸馏水等
20×SSC 浓缩缓冲液	柠檬酸钠、氯化钠等
BSA	BSA

[0084] 其中,10×、20× 表示浓度,即该溶液为 10 倍 /20 倍的浓度。

[0085] 试剂盒二包含下述鉴别部分的试剂。

[0086] 鉴别部分：

[0087] CF1 固定液：

[0088] 混合 PEG 和无水乙醇,使 PEG 终浓度为 1%,无水乙醇终浓度为 50%。

[0089] 10×CF2 固定液：

[0090] 以 PBS 为溶剂,溶解 PFA 粉末,配制为 5%的 PFA 浓缩液。

[0091] 甲酰胺工作液：

[0092] 将甲酰胺原液稀释为 50%的工作液。

[0093] 20XSSC 浓缩缓冲液：

[0094] 1000mL 水中,加入氯化钠 175.3g,柠檬酸铵 88.2g。

[0095] HER-2/CEP17 探针：

[0096] 使用甲酰胺、硫酸葡聚糖钠盐将 HER-2 及 CEP17,配制为探针工作液。

[0097] BSA 粉末：

[0098] 外购分装。

[0099] CD45-AF594 荧光抗体：

[0100] 将 CD45 抗体与 Alexa Flour 594 荧光素避光孵育 1h,荧光素即可与 CD45 抗体连接。

[0101] DAPI 染色液：

[0102] 使用防淬灭剂 Mounting medium 将 1mg/mL 的 DAPI 原液按照 1:1000 进行稀释,配制为 DAPI 染色工作液。

[0103] 所述试剂盒二的使用方法,步骤如下：

[0104] (1) 将本方法步骤 (7) 或其他方法获得的细胞悬液,涂于载玻片或膜片上,并自然

晾干。加 CF2 固定工作液,计时 8-10 分钟;

[0105] (2) 吸弃液体,放入已预热的 $2\times$ SSC 染缸 10 分钟;

[0106] (3) 依次放入 75%、85%、无水乙醇中 2-5 分钟;

[0107] (4) 加入 10uL HER-2/CEP17 探针,盖上盖玻片,封片并放入杂交仪或其他控温装置,76°C 5 分钟,37°C 4-20 小时;

[0108] (5) 取出标本,撕下封片物质,放入已预热的甲酰胺工作液,计时 15 分钟;

[0109] (6) 置于 $2\times$ SSC 中 5-10 分钟;

[0110] (7) 取出,加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 +180uL 2% BSA),每玻片 200uL,避光反应 1-5 小时;

[0111] (8) 吸弃多余液体,0.2% BSA 清洗 1-3 次,加入 DAPI 复染剂 10uL,封片。

[0112] 封片后即可利用显微镜进行结果的判别,即可对 CTC 或其他稀有细胞进行鉴别,同时获得 HER-2 扩增型 CTC 的数目、染色体扩增型 CTC 的数目、HER-2/CEP17-CTC 的总数目、HER-2 基因扩增状态。

[0113] 注:处理过程中,可视实际情况,使用 Triton X-100、Saponin 等打孔剂(但不限于这两种打孔剂)对细胞进行打孔处理,以减小探针进入细胞的阻力。

[0114] 本发明进一步提供本发明试剂盒的用途,即在鉴别 CTC 同时,该试剂盒还可以测定 HER-2/CEP17 结果,为此,本发明在于提供本发明的试剂盒在鉴别 CTC 同时,还可以测定 HER-2/CEP17 结果以判断肿瘤患者实时的基因状态中的应用。名词解释:

[0115] 稀有细胞:其在体液样本内的所有有核细胞中的占有比例小于 0.1%。包括 CTC,循环内皮细胞,胎儿细胞,肿瘤干细胞,干细胞,及某些免疫细胞等。

[0116] 循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC):指进入到血液循环中的肿瘤细胞。

[0117] 表格中的名词:

[0118]

规格 组份	主要组成成分	说明
CS1 浓缩缓冲液 (10×)	10×浓缩的PBS、BSA等	一种与血液密度相近的缓冲液，能够保证去除血浆的同时，保护各种有核细胞。
CS2 浓缩储存液 (10×)	10×浓缩的氯化氨等	一种红细胞裂解液，利用等渗不等张的原理，裂解红细胞的同时，不会损伤其他有核细胞。
CS3 分离介质	金属盐、PBS等	一种密度介于1.070-1.080之间的密度梯度离心液，其中以1.072最优，可以在去除结合磁珠的同时，保存其他单个有核细胞不丢失。
磁微粒混悬液	磁微粒混悬液	一种包被抗白细胞共同抗原抗体的链亲和素磁珠。能够最大量地、牢固地结合白细胞，利于后续的分选处理。
CF1固定液	醇类等	一种由乙醇及异丙醇组合而成的固定液，可在标本干燥过程中对细胞形态起到良好的固定作用。

[0119]

10×CF2固定液	醛类、PBS	一种固定剂，用于标本干燥后的重固定，进一步维持细胞形态。
DAPI染色液	DAPI、防荧光淬灭剂	一种细胞核染色剂，能够使细胞核染上荧光，作为细胞核是否存在的参照。
HER-2/CEP17探针	探针、杂交液等	一种HER-2与CEP17两种探针的混合物，能同时杂交出橙色的HER-2及绿色的CEP17。以CEP17为参照，可判定HER-2是否扩增。
CD45-AF594荧光抗体	CD45抗体、AF594等	一种白细胞的染色剂，其通过CD45与Alexa Fluor 594荧光素结合而成，能够通过CD45与白细胞免疫结合，从而将白细胞染上红色荧光。
甲酰胺工作液	甲酰胺、蒸馏水等	一种洗涤剂，能将杂交后未结合到目标区域的探针洗涤掉。
20×SSC 浓缩缓冲液	柠檬酸钠、氯化钠等	一种缓冲液，能中和DNA所带的负电荷，利于杂交，同时可起到洗涤作用。
BSA粉末	BSA粉末	牛血清蛋白，配制成的溶液可以起到保护蛋白的作用。

具体实施方式

[0120] 以下通过实施例进一步说明本发明，但不作为对本发明的限制。

[0121] 实施例 1

[0122] 使用试剂盒一对血液样本的检测

[0123] 测试 20 例正常人、20 例乳腺良性疾病、20 例乳腺癌患者血液样本，方法为将 3.2mL 血液标本加入至 50mL 离心管中，加入 CS1 工作液，650×g 离心 5 分钟，吸弃上清；加入 CS2 工作液裂解 8 分钟，650×g 离心 5 分钟，吸弃上清液体；再次加入一定量 CS1 工作液，加入磁微粒混悬液 200μL，摇匀 20 分钟；吸取全部混匀后液体，叠加至 CS3 分离介质上，300×g 离心 5 分钟；吸取除磁微粒沉淀以外的液体至 15mL 离心管中，加入 CS1 工作液至 15mL，950×g 离心 5 分钟，吸弃上清；加入 1mL CS1 工作液，吹打混匀并加入至新 2mL 离心管中，磁力分选

2 分钟。转移上清至 1.5mL 离心管中,放置在 15mL 离心管上,3400rpm 离心 3 分钟。吸弃上清,加入 CF1 固定液,吹打混匀并涂片,自然晾干;加入 CF2 固定工作液 8 分钟;吸弃液体,放入已预热的 2×SSC 染缸 10 分钟;依次放入 75%、85%、无水乙醇中脱水 2 分钟;加入 10uL HER-2/CEP17 探针,盖上盖玻片,封片并放入杂交仪或其他控温装置,76℃ 5 分钟,37℃ 4 小时;取出标本,揭去盖玻片,放入已预热的甲酰胺工作液中 15 分钟;置于 2×SSC 中洗涤 5 分钟;加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 +180uL 2% BSA),每玻片 200uL,避光反应 1 小时;吸弃多余液体,0.2% BSA 清洗 1-3 次,加入 DAPI 复染剂 10uL,封片。

[0124] 结果显示最终显微镜下剩余有核细胞数目分布范围 (2-79 个 /3.2mL),CEP17 扩增型 CTC 中位值 32 个 /3.2mL, HER-2 扩增型 CTC 中位值 5 个 /3.2mL。各亚组间无显著性差异。

[0125] 而同时,使用目前市场上常用的阳性方法对上述病人的另外 7.5mL 外周血进行处理作为对照组,方法为:将 7.5mL 外周血裂解后,使用 EpCAM 包被的磁珠结合血液中的 CTC;然后将悬液利用磁分选装置分离磁珠,从而得到了结合在磁珠表面的 CTC;最后对这些 CTC 进行 CK/CD45 染色,如 CK+/CD45- 视为一个阳性细胞。对照组结果为 58 个 /3.2mL。

[0126] 实施例 2

[0127] 本发明试剂盒的制备

[0128] 试剂盒一:

[0129] CS1 浓缩缓冲液 (10×):

[0130] 每 1000mL 水中,含有 60g BSA,5 包 PBS 粉末 (2L/包),100mL 0.5M 的 EDTA,0.8mL Proclin 300。

[0131] CS2 浓缩储存液 (10×):

[0132] 每 1000mL 水中,称取 82.9gNH₄Cl、10gKHCO₃、0.37gEDTA,水以及 0.8mL Proclin300,进行充分的搅拌溶解,定容,配制为 10X 浓缩液。

[0133] CS3 分离介质:

[0134] 将密度为 1.077 的梯度离心液稀释,稀释过程中测试密度,使其密度在 1.070-1.075 之间。

[0135] 磁微粒混悬液:

[0136] 将 CD45 抗体浓度调整为 1mg/mL,与链亲和素免疫磁珠按照 100uL:1mL 的比例进行孵育 1h,即配制为磁微粒混悬液。

[0137] CF1 固定液:

[0138] 混合 PEG 和无水乙醇,使 PEG 终浓度为 1%,无水乙醇终浓度为 50%。

[0139] 10×CF2 固定液:

[0140] 以 PBS 为溶剂,溶解 PFA 粉末,配制为 5% 的 PFA 浓缩液。

[0141] 甲酰胺工作液:

[0142] 将甲酰胺原液稀释为 50% 的工作液。

[0143] 20XSSC 浓缩缓冲液:

[0144] 1000mL 水中,加入氯化钠 175.3g,柠檬酸铵 88.2g。

[0145] HER-2/CEP17 探针:

[0146] 使用甲酰胺、硫酸葡聚糖钠盐将 HER-2 及 CEP17,配制为探针工作液。

[0147] BSA 粉末：

[0148] 外购分装。

[0149] CD45-AF594 荧光抗体：

[0150] 将 CD45 抗体与 Alexa Flour 594 荧光素避光孵育 1h, 荧光素即可与 CD45 抗体连接。

[0151] DAPI 染色液：

[0152] 使用防淬灭剂 Mounting medium 将 1mg/mL 的 DAPI 原液按照 1:1000 进行稀释, 配制为 DAPI 染色工作液。

[0153] 试剂盒二仅包含 5)-12) 部分, 制备方法相同。

[0154] 实施例 3

[0155] 用本发明的试剂盒一对其他体液样本进行检测

[0156] 说明: 本试剂盒不仅适用于血液, 也适用于其他体液中稀有细胞的检测, 例如胸水、腹水、盥洗液、羊水等, 但不限于这几种体液。

[0157] 使用本试剂盒对 6 例胃癌腹水进行检测, 均发现 CEP17 扩增型阳性细胞, 中位值 9.5 (范围 4-15)。其中 2 例发现 HER-2 扩增型阳性细胞, 数量分别为: 2, 5。

[0158] 实施例 4

[0159] 使用试剂盒二对其他方法获取到的 CTC 进行检测

[0160] 说明: 试剂盒二中组份, 即 HER-2/CEP17 探针、CD45-AF594 荧光抗体、DAPI 染色液等, 也适用于其他方法获取到的 CTC, 例如过滤法、ChIP 法等等, 但不限于这两种方法。

[0161] 使用膜过滤法对 12 例乳腺癌外周血标本进行处理, 将直径为 8um 的 Ispore™ Membrane Filters 配合 SWINNEX 滤器配合使用。具体方法为, 首先将 5mL 血液标本与 10mL PBS 混匀, 加入至过滤器中, 通过重力作用自然沉降, CTC 因体积较大, 留在膜表面, 将滤膜转移至标准载玻片上。干燥后, 按照试剂盒二的操作方法对 CTC 进行染色处理, 方法如下: 将干燥后的标本经过 CF2 固定工作液 8 分钟; 吸弃液体, 放入已预热的 2×SSC 染缸 10 分钟; 依次放入 75%、85%、无水乙醇中脱水 2 分钟; 加入 10uL HER-2/CEP17 探针, 盖上盖玻片, 封片并放入杂交仪或其他控温装置, 76℃ 5 分钟, 37℃ 4 小时; 取出标本, 揭去盖玻片, 放入已预热的甲酰胺工作液中 15 分钟; 置于 2×SSC 中洗涤 5 分钟; 加入配制好的 CD45-AF594 荧光抗体 (20uL 抗体 + 180uL 2% BSA), 每玻片 200uL, 避光反应 1 小时; 吸弃多余液体, 0.2% BSA 清洗 1-3 次, 加入 DAPI 复染剂 10uL, 封片, 并在荧光显微镜下观察。结果统计, 9 例表现出 CEP17 扩增型 CTC 阳性, 2 例 HER-2 扩增型阳性。

[0162] 实施例 5

[0163] 本试剂盒一适用于血液中其他稀有细胞的检测

[0164] 说明: 有些患者血液中含有 CEC (即循环内皮细胞), 本试剂盒同样可以检测。

[0165] 使用本试剂盒对 5 例肾癌患者进行了 CEC 的检测, 其中 1 例检测出 HER-2 扩增型 CEC 2 个。