



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 206089663 U

(45)授权公告日 2017. 04. 12

(21)申请号 201621126930.2

(22)申请日 2016.10.17

(73)专利权人 杭州华得森生物技术有限公司

地址 310051 浙江省杭州市滨江区江陵路
88号4幢3楼

(72)发明人 张开山 苏广宇 宁宁

(51)Int.Cl.

G12M 1/00(2006.01)

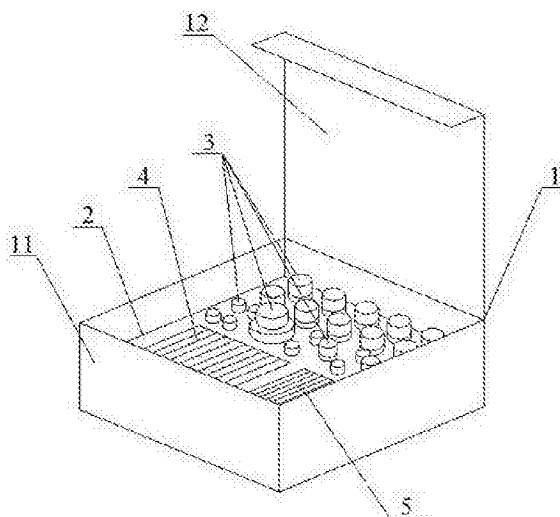
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54)实用新型名称

循环肿瘤细胞检测试剂盒

(57)摘要

本实用新型涉及一种循环肿瘤细胞检测试剂盒,包括试剂盒、试剂瓶、螺旋样品管和芯片,其特征在于:还包括底座,所述的底座放置在试剂盒内,所述的底座上有若干个放置孔,所述的试剂瓶、螺旋样品管和芯片放置在放置孔中。试剂盒内的底座结构设计合理,试剂瓶、螺旋样品管和芯片均能够合理放置并得到了很好的固定和保护;检测时,底座可取出直接作为试剂瓶架,试剂瓶取用方便,实验操作更简便;试剂瓶底座采用环保材料,减少了环境污染。



1. 一种循环肿瘤细胞检测试剂盒, 包括试剂盒、试剂瓶、螺旋样品管和芯片, 其特征在于: 还包括底座, 所述的底座放置在试剂盒内, 所述的底座上有若干个放置孔, 所述的试剂瓶、螺旋样品管和芯片放置在放置孔中。

2. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂瓶底座的放置孔为通孔, 所述的放置孔为圆孔或方孔。

3. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述试剂瓶的瓶体外形为圆柱体, 所述的试剂瓶竖直放置在放置孔内, 所述试剂瓶对应的放置孔为圆孔。

4. 根据权利要求1-3之一所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述的试剂瓶包括小号试剂瓶、中号试剂瓶、大号试剂瓶和特大号试剂瓶; 所述的放置孔包括小号试剂瓶孔、中号试剂瓶孔、大号试剂瓶孔、特大号试剂瓶孔、螺旋样品管放置孔和芯片放置孔。

5. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述螺旋样品管和芯片的外面均包有包装袋, 所述的螺旋样品管层叠放置在放置孔内, 所述的芯片层叠放置在放置孔内; 所述螺旋样品管和芯片对应的放置孔为方孔。

6. 根据权利要求1或5所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述的螺旋样品管有十个, 所述的芯片有十个。

7. 根据权利要求4所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述的小号试剂瓶有十个, 所述的中号试剂瓶有两个, 所述的大号试剂瓶有十个, 所述的特大号试剂瓶有一个。

8. 根据权利要求1所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述底座的材料为多孔发泡材料。

9. 根据权利要求8所述的循环肿瘤细胞检测试剂盒, 其特征在于: 所述底座的材料为珍珠棉。

循环肿瘤细胞检测试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种循环肿瘤细胞检测试剂盒,主要适用于循环肿瘤细胞的检测,属于体外诊断技术领域。

背景技术

[0002] 循环肿瘤细胞(Circulating Tumor Cells,CTCs)是指自发或因诊疗操作由实体瘤或转移灶释放进入外周血循环的肿瘤细胞,是存在于外周血中的各类肿瘤细胞的统称。

[0003] 恶性肿瘤都会通过血液传播转移到身体的其他器官,而肿瘤转移是导致肿瘤患者死亡的主要原因。肿瘤细胞侵入到原发肿瘤细胞的周围组织中,进入血液和淋巴管系统,形成循环肿瘤细胞(CTCs),并转运到远端组织,再渗出,适应新的微环境,最终“播种”、“增殖”、“定植”、形成转移灶;因此早期发现血液中的CTCs,对于肿瘤患者预后判断、疗效评价和个体化治疗都有着重要的指导作用。但是,CTCs在外周血中的数量非常稀少,仅占外周血白细胞的 $1/10^6 \sim 1/10^7$,并且它是连续产生的,在血液中呈动态分布,会出现滞后现象,具有很强的异质性,因此CTCs的检测一直受到挑战。在目前,针对上皮源性肿瘤的循环肿瘤细胞的研究甚少,因此将循环肿瘤细胞作为一种实时上皮源性肿瘤的“液体活检”的手段,即减缓了肿瘤患者组织活检的生理及心理的痛苦,又可以辅助临床医生进行患者总生存期和无进展生存期的评估、临床放化疗的疗效监测、肿瘤转移复发预测以及早期预警等,进而具有指导个体化医疗、改善肿瘤患者的生存状态的重要临床意义。

[0004] 随着研究手段的不断进步,将CTCs作为一个潜在的肿瘤标志物,其对临床肿瘤进行辅助诊断及治疗的想法也在一步步实现。经临床试验验证,CTCs 多数是从上皮恶性肿瘤上脱落进入血液中,如胆管癌、肝癌、乳腺癌和前列腺癌等等。目前CTCs的富集与捕获主要采用以下几种方式:①利用结合EpCAM抗体的免疫磁珠,进行患者外周血中CTCs的磁性富集、捕获、纯化等;②利用流式细胞术的方法进行CTCs检测;③利用微流控细胞免疫芯片的方法进行CTCs富集、捕获;等等。

[0005] 利用结合EpCAM抗体的免疫磁珠,进行患者外周血中CTCs的磁性富集、捕获、纯化的方法主要以美国Janssen Diagnostics, LLC公司的CELLSEARCH®为代表。该方法对CTCs的捕获效率较低,并且捕获的CTCs细胞活性较低,无法进行后期的细胞培养,同时也无法进行细胞分离,用于下游技术的研究。

[0006] 流式细胞计量术(flow cytometry,FCM)检测方法相对简便,且准确度与灵敏度均较高,能够定量检测癌症患者外周血中的CTCs,但FCM检测方法因在形态学方面存在先天不足,因而在确认肿瘤细胞的细胞形态方面,仍然需要采用镜下特异的免疫细胞染色观察,方可弥补其方法缺陷。

[0007] 微流控细胞免疫芯片(CTCs-chip)的方法是通过微流控装置(micro-fluid device)检测CTCs,该检测方法具有极高的特异性、敏感性、可重复性等特点,捕获的CTCs具有细胞活性,可分离,并用于细胞培养和其他各种下游技术研究,是CTCs临床应用价值研究的一种全新高效的方法。

实用新型内容

[0008] 本实用新型的目的在于提供一种设计合理、使用方便的循环肿瘤细胞检测试剂盒。

[0009] 本实用新型解决上述问题所采用的技术方案是：该循环肿瘤细胞检测试剂盒包括试剂盒、试剂瓶、螺旋样品管和芯片，其特征在于：还包括底座，所述的底座放置在试剂盒内，所述的底座上有若干个放置孔，所述的试剂瓶、螺旋样品管和芯片放置在放置孔中。试剂瓶和放置孔一般为一一一对应，试剂瓶孔与放置孔尺寸相吻合，即试剂瓶放入部分的外表面正好贴合放置孔的内表面，并且能够适当卡住，使试剂瓶不会随意移动；螺旋样品管和芯片一般为多个叠放后再放入放置孔中，多个叠放后的螺旋样品管或芯片放入放置孔中被适当卡住，不会随意移动或掉出。实际应用中，为了更好地保护和固定螺旋样品管和芯片，也可采用螺旋样品管和芯片和放置孔一一一对应的方式，但是工艺上相对繁琐、成本会有所上升。

[0010] 本实用新型所述试剂瓶底座的放置孔为通孔，所述的放置孔为圆孔或方孔。实际应用中，放置孔也可以是盲孔，有底的盲孔可以更好地保护试剂瓶、螺旋样品管和芯片，但是通孔相对比较好加工，并且可以在底座下面增加一个保护垫。放置孔的形状根据放入的东西形状来设计，一般放置试剂瓶用圆孔或方孔，其他配件为方孔（包括配件为薄片状或长条状时采用条形孔）。

[0011] 本实用新型所述试剂瓶的瓶体外形为圆柱体，所述的试剂瓶竖直放置在放置孔内，所述试剂瓶对应的放置孔为圆孔。

[0012] 本实用新型所述的试剂瓶包括小号试剂瓶、中号试剂瓶、大号试剂瓶和特大号试剂瓶；所述的放置孔包括小号试剂瓶孔、中号试剂瓶孔、大号试剂瓶孔、特大号试剂瓶孔、螺旋样品管放置孔和芯片放置孔。所述试剂瓶按尺寸大小分为小号试剂瓶、中号试剂瓶、大号试剂瓶和特大号试剂瓶；所述试剂瓶对应的放置孔按尺寸大小分为小号试剂瓶孔、中号试剂瓶孔、大号试剂瓶孔和特大号试剂瓶孔；所述的放置孔还包括螺旋样品管放置孔和芯片放置孔。所述的小号试剂瓶、中号试剂瓶、大号试剂瓶和特大号试剂瓶依次对应放在小号试剂瓶孔、中号试剂瓶孔、大号试剂瓶孔和特大号试剂瓶孔中；所述的螺旋样品管放置在螺旋样品管放置孔内，所述的芯片放置在芯片放置孔内。

[0013] 本实用新型所述螺旋样品管和芯片的外面均包有包装袋，所述的螺旋样品管层叠放置在放置孔内，所述的芯片层叠放置在放置孔内；所述螺旋样品管和芯片对应的放置孔为方孔。包装袋可起到保护螺旋样品管和芯片的作用，必要时还可在包装袋中放置干燥剂。

[0014] 本实用新型所述的螺旋样品管有十个，所述的芯片有十个。

[0015] 本实用新型所述的小号试剂瓶有十个，所述的中号试剂瓶有两个，所述的大号试剂瓶有十个，所述的特大号试剂瓶有一个。小号试剂瓶容量一般在1.5ml以下，用来盛放抗体稀释液、细胞通透剂、白细胞阻断剂、鼠抗-EpCAM捕获抗体、标记有FITC的鼠抗-PanCK检测抗体、标记有PE 的鼠抗-CD45检测抗体、DAPI染色液，其中，抗体稀释液、细胞通透剂、DAPI染色液各有两瓶；中号试剂瓶容量一般为5-15ml，分别用来盛放缓冲液和细胞固定剂；大号试剂瓶容量一般为20-30ml，用来盛放十瓶细胞保存液；特大号试剂瓶容量一般为30-50ml，用来盛放密度梯度离心液。

[0016] 本实用新型所述底座的材料为多孔发泡材料,且优选为珍珠棉。多孔发泡材料有一定弹性,能够很好的起到固定以及防碰撞的作用,适合用来放置酶标试剂瓶。珍珠棉即EPE 珍珠棉,又称聚乙烯发泡棉,它是非交联闭孔结构,是一种新型环保的包装材料,相对于其他发泡材料使用更加安全,减少了环境污染。实际应用中也可采用海绵、泡沫塑料等材料来代替珍珠棉。

[0017] 本实用新型具有以下优点和效果:试剂盒内的底座结构设计合理,试剂瓶、螺旋样品管和芯片均能够合理放置并得到了很好的固定和保护;检测时,底座可取出直接作为试剂瓶架,试剂瓶取用方便,实验操作更简便;试剂瓶底座采用环保材料,减少了环境污染。

附图说明

[0018] 图1是本实用新型的整体结构示意图;

[0019] 图2是本实用新型底座的结构示意图;

[0020] 图3是本实用新型试剂瓶、螺旋样品管和芯片放在底座中的示意图;

[0021] 图4是本实用新型不同规格试剂瓶的示意图。

[0022] 图中:试剂盒1、试剂盒体11、试剂盒盖12,底座2、放置孔20、小号试剂瓶孔21、中号试剂瓶孔22、大号试剂瓶孔23、特大号试剂瓶孔24、螺旋样品管放置孔24、芯片放置孔25,试剂瓶3、小号试剂瓶31、中号试剂瓶32、大号试剂瓶33、特大号试剂瓶34,螺旋样品管4,芯片5。

具体实施方式

[0023] 下面结合附图并通过实施例对本实用新型作进一步说明。

[0024] 实施例一、循环肿瘤细胞检测试剂盒。

[0025] 参见图1-4,本实施例包括:试剂盒1、试剂盒体11、试剂盒盖12,底座2、放置孔20、小号试剂瓶孔21、中号试剂瓶孔22、大号试剂瓶孔23、特大号试剂瓶孔24、螺旋样品管放置孔24、芯片放置孔25,试剂瓶3、小号试剂瓶31、中号试剂瓶32、大号试剂瓶33、特大号试剂瓶34,螺旋样品管4和芯片5。

[0026] 参见图1,在本实施例中,试剂盒1包括试剂盒体11和试剂盒盖12,试剂盒盖12的一侧边与试剂盒体11相连,试剂盒盖12可盖在试剂盒体11上并将其开口盖住。底座2放在试剂盒1中,且底座2的外表面贴合试剂盒1的内表面并适当卡住,试剂瓶3、螺旋样品管4和芯片5均放置在底座2的放置孔20中。

[0027] 参见图2-4,在本实施例中,试剂瓶底座2上共有二十五个放置孔20,包括:十个小号试剂瓶孔21、两个中号试剂瓶孔22、十个大号试剂瓶孔23、一个特大号试剂瓶孔24、一个螺旋样品管放置孔25和一个芯片放置孔26;相对应的,试剂瓶3共有二十三个,包括十个小号试剂瓶31、两个中号试剂瓶32、十个大号试剂瓶33和一个特大号试剂瓶34;十个螺旋样品管4外均包有包装袋且层叠放置在一个螺旋样品管放置孔25中,十个芯片5外均包有包装袋且层叠放置在一个芯片放置孔26中。底座的厚度为40mm,小号试剂瓶孔21为内径10mm的圆形通孔,中号试剂瓶孔22为内径25mm的圆形通孔,大号试剂瓶孔23为内径34mm的圆形通孔,特大号试剂瓶孔24为内径39mm的圆形通孔,螺旋样品管放置孔25为截面120mm×150mm的长方形通孔,芯片放置孔26为截面120mm×70mm的长方形通孔。

[0028] 参见图1和图3,在本实施例中,十个小号试剂瓶31分别盛放了1.4ml抗体稀释液、1.1ml细胞通透剂、110u1白细胞阻断剂、550u1鼠抗-EpCAM捕获抗体、70u1标记有FITC的鼠抗-PanCK检测抗体、140u1标记有PE 的鼠抗-CD45检测抗体、1.1ml DAPI染色液,其中,盛放抗体稀释液、细胞通透剂和DAPI染色液的小号试剂瓶31各有两瓶;两个中号试剂瓶分别盛放了6ml缓冲液和11ml细胞固定剂;十个大号试剂瓶均各盛放了25ml细胞保存液;一个特大号试剂瓶盛放了33ml密度梯度离心液。

[0029] 参见图3,实际使用时,十个小号试剂瓶31、两个中号试剂瓶32、十个大号试剂瓶33和一个特大号试剂瓶34可不从底座2中取出,直接开盖使用,将底座2当做试剂摆放操作台使用。

[0030] 本实用新型的使用过程如下:

[0031] 1循环肿瘤细胞的分离

[0032] 1.1将密度梯度离心液加入到密度梯度离心管中,室温离心,将密度梯度离心液离心到多孔屏障下方;

[0033] 1.2 用缓冲液稀释全血样本,将稀释后的全血样本加入含密度梯度离心液的密度梯度离心管中,室温离心;

[0034] 1.3 离心完成后,移除上层血浆,保留PBMCs层上方5至10mm,转移PBMCs层至15mL灭菌离心管中;

[0035] 1.4用细胞保存液洗涤PBMCs,4℃离心,弃上清,不要触及底层沉淀;重复两次;

[0036] 1.5用细胞保存液重悬细胞沉淀,制备成单核细胞悬液。

[0037] 2捕获抗体的包被

[0038] 2.1用缓冲液稀释鼠抗-EpCAM捕获抗体,注入芯片,室温避光孵育;

[0039] 2.2 用缓冲液清洗芯片3次;

[0040] 2.3 用缓冲液稀释白细胞阻断剂,注入芯片,室温避光孵育;

[0041] 2.4 用缓冲液清洗芯片3次;

[0042] 2.5芯片包被完成。

[0043] 3循环肿瘤细胞的捕获

[0044] 3.1 用细胞保存液清洗芯片;

[0045] 3.2 将步骤1制备的单核细胞悬液注入包被完成的芯片中,进行捕获;

[0046] 3.3 将细胞固定剂注入芯片,循环肿瘤细胞被固定。

[0047] 4 循环肿瘤细胞的免疫荧光染色

[0048] 4.1 用缓冲液清洗芯片3次;

[0049] 4.2 将细胞通透剂注入芯片中,室温静置;

[0050] 4.3 用缓冲液清洗芯片3次;

[0051] 4.4 将标记有FITC的鼠抗-PanCK检测抗体和标记有PE 的鼠抗-CD45检测抗体加入抗体稀释液中,注入芯片,室温避光孵育;

[0052] 4.5 用缓冲液清洗芯片3次;

[0053] 4.6 将DAPI染色液注入芯片中,室温静置;

[0054] 4.7 将缓冲液注入芯片中,室温避光孵育;

[0055] 4.8免疫荧光染色完成,使用倒置荧光显微镜观察荧光颜色结合细胞形态分析与

计数软件来进行检测。

[0056] 本实用新型中提到的专业术语定义如下：

[0057] Circulating Tumor Cells (CTCs)：循环肿瘤细胞；

[0058] Cytokeratin (CK)：细胞角蛋白；

[0059] PanCK：循环肿瘤细胞的特异细胞角蛋白家族谱，包含7种细胞角蛋白；

[0060] CD45：白细胞共同抗原，一般白细胞都具有的抗原；

[0061] PBS：磷酸盐缓冲液；

[0062] PBMCs层：外周血单核细胞层；

[0063] EpCAM：上皮细胞粘附分子；

[0064] FITC：异硫氰酸荧光素，能与各种抗体蛋白结合，结合后的抗体不丧失与一定抗原结合的特异性，并在碱性溶液中仍有强烈绿色荧光；

[0065] PE：藻红蛋白，一种荧光素，在本发明实施例中用于标记鼠抗-CD45检测抗体，在荧光显微镜下显示橙色；

[0066] DAPI染色液：DAPI即4',6-二脒基-2-苯基吲哚(4',6-diamidino-2-phenylindole)，是一种能够与DNA强力结合的荧光素，常用于荧光显微镜观测，因为DAPI可以透过完整的细胞膜，它可以用于活细胞和固定细胞的染色；

[0067] 细胞保存液：每1L溶液包含950mLRPMI 1640 Medium(一种市面上在售的细胞培养基)、50mL胎牛血清和1g叠氮钠；

[0068] 抗体稀释液：每1L溶液包含1L 0.01mol/L的PBS溶液和5g硫柳汞(硫汞柳酸钠)；

[0069] 细胞固定剂：2%的多聚甲醛水溶液；

[0070] Triton X-100：一种表面活性剂；

[0071] 细胞通透剂：加入了0.2%Triton X-100的抗体稀释液，用于处理细胞膜，便于后续的细胞染色；

[0072] 白细胞阻断剂：PBS溶液加入动物血清和表面活性剂制成，用于减少芯片中白细胞的残留。

[0073] 本说明书中没有详细描述的部分均采用本领域技术人员所公知的结构和原理，均为现有技术。

[0074] 通过上述描述，本领域的技术人员已能实施。

[0075] 此外，需要说明的是，本说明书中所描述的具体实施例，只要其部件未明确说明具体规格的，则该部件可以为与其功能相适应的任何规格；同时，部件所取的名称也可以不同。凡依本实用新型构思所述的构造、特征及原理所做的等效或简单变化，均包括于本实用新型专利的保护范围内。

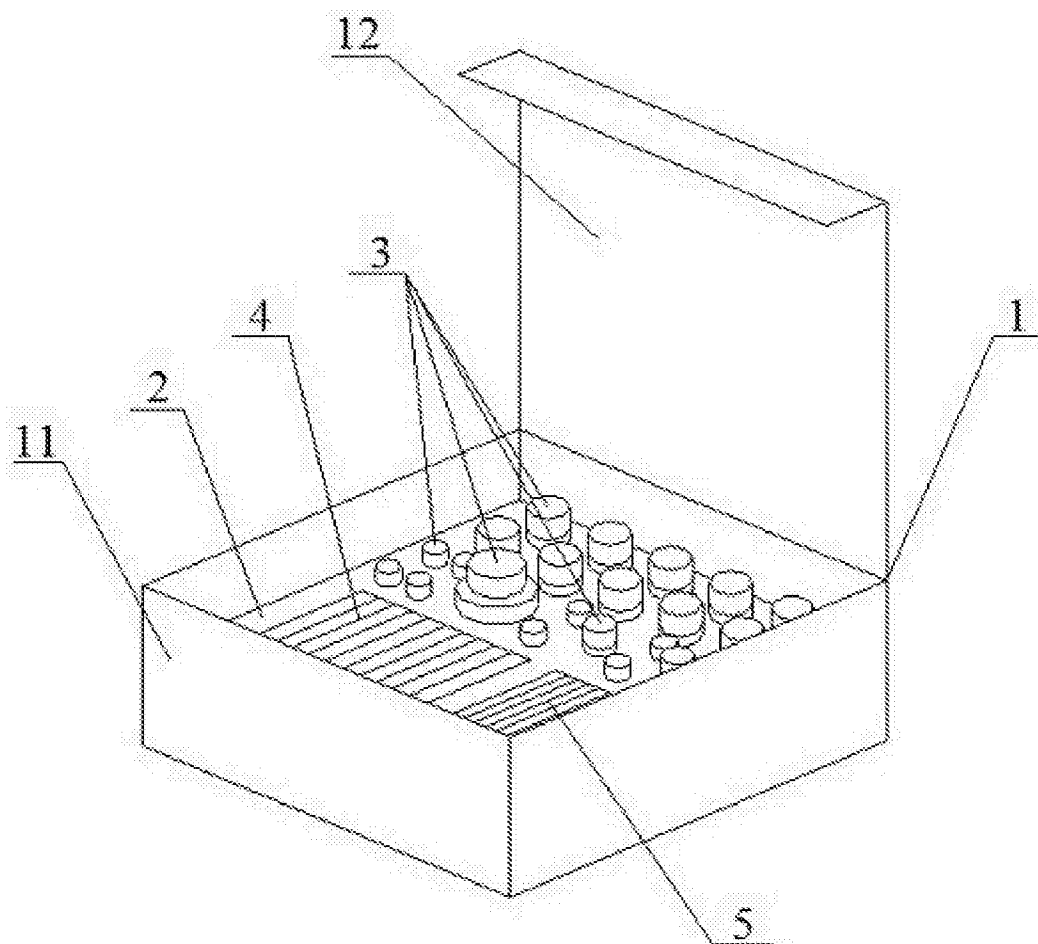


图1

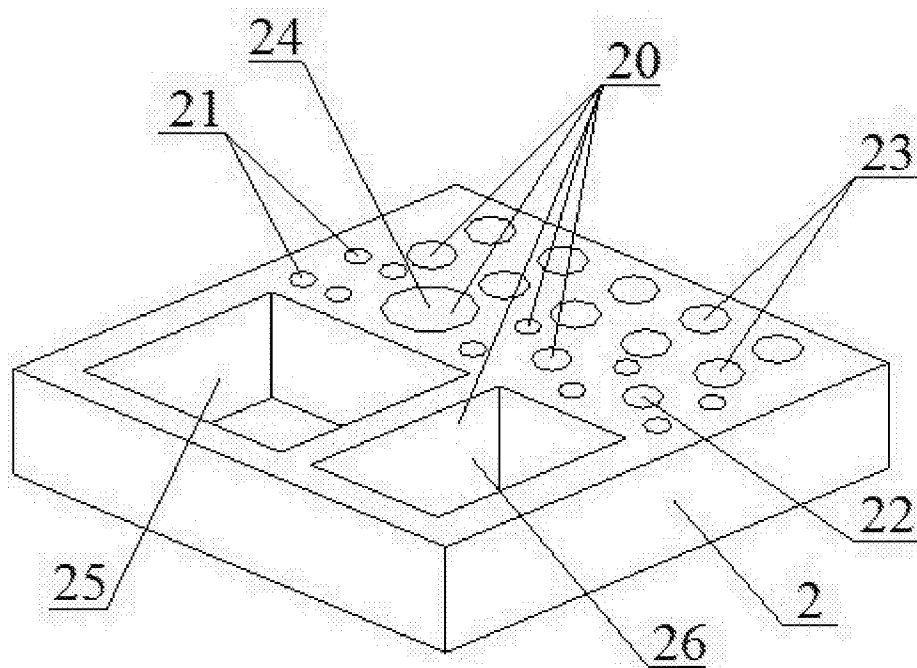


图2

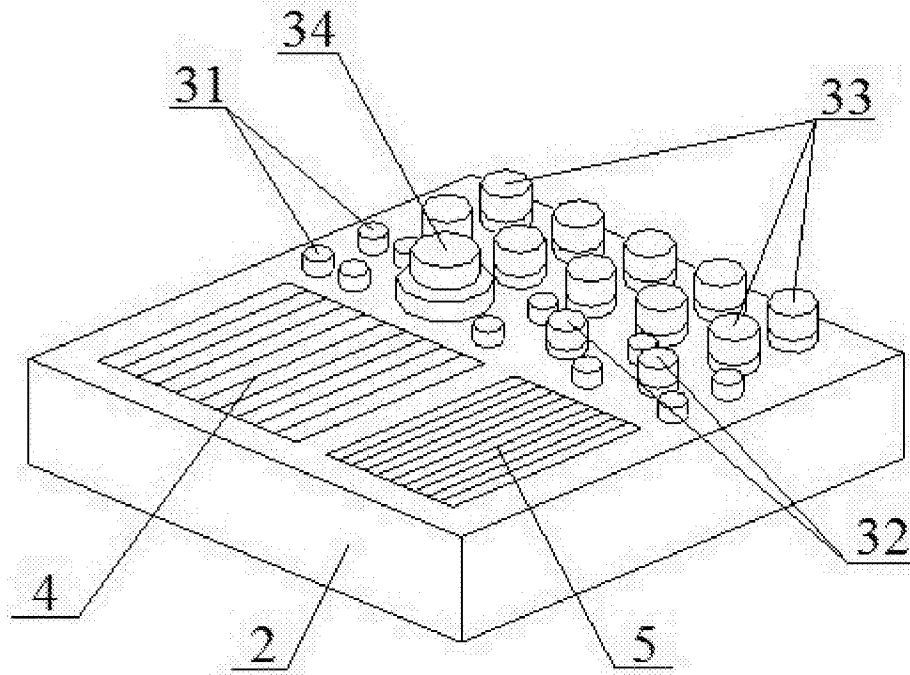


图3

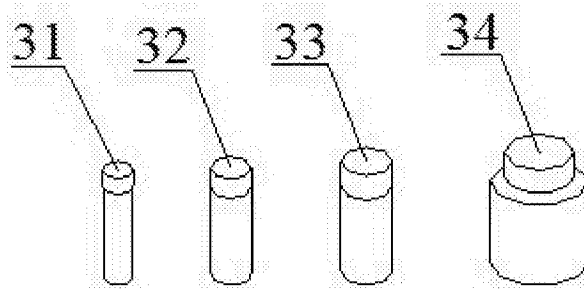


图4