

## 人外周血循环肿瘤细胞检测试剂盒使用说明书 (免疫磁捕获、免疫细胞化学鉴定)

### 简介:

本试剂盒利用免疫磁球捕获肿瘤病人全血中极少量的循环肿瘤细胞 (Circulating Tumor Cell, CTC), 并通过免疫细胞化学鉴定所捕获的细胞, 从而实现对 CTC 的灵敏检测。其中免疫磁球表面修饰有抗上皮细胞粘附分子 (EpCAM) 抗体。免疫细胞化学鉴定是通过异硫氰酸荧光素标记的细胞角蛋白抗体 (FITC-anti-CK19)、Alexa Fluor 594 标记的抗白细胞共同抗原抗体 (AF594-anti-CD45) 和 DAPI 对细胞进行免疫荧光染色, DAPI 染色阳性, CK19 表达阳性, CD45 表达阴性 (DAPI+/CK19+/CD45-) 的细胞被鉴定为 CTC。本试剂盒对目标细胞的捕获效率高达 90%, 简便快速、特异性强、非常可靠, 可以在 3 小时内完成对全血中 CTC 的检测。

### 试剂盒所含试剂: (10 人份/盒)

试剂标号	组分	用途	状态	规格	配制
试剂 A	牛血清白蛋白	封闭	固体粉末		
试剂 B	免疫磁球	磁捕获	悬液	200 $\mu$ L	即用型
试剂 C	4%多聚甲醛	固定细胞	液体	5 mL	即用型
试剂 D	1%Triton X-100	通透细胞	液体	5 mL	即用型
试剂 E	DAPI	细胞染色	液体	50 $\mu$ L	即用型
试剂 F	FITC-anti-CK19	细胞染色	液体	20 $\mu$ L	即用型
试剂 G	AF594-anti-CD45	细胞染色	液体	50 $\mu$ L	即用型
试剂 H	1 $\times$ PBS	洗涤	液体	25 mL	即用型

\*保存条件: 4-8 $^{\circ}$ C

### 用户自备试剂和材料:

#### 1. 试剂 L: 通透封闭液

于 0.05 g 试剂 A 中加入 0.5 mL 试剂 D 溶解待用, 或按照此用量比配置所需用量的通透封闭液, 标为“试剂 L”。



## 2. 试剂 M: 染色液

于 0.01 g 试剂 A 中加入 190  $\mu\text{L}$  试剂 H 溶解后, 向其中加 5  $\mu\text{L}$  的试剂 E, 2  $\mu\text{L}$  的试剂 F, 5  $\mu\text{L}$  试剂 G, 或按照此用量比配置所需用量的染色液, 标为“试剂 M”, 4 $^{\circ}\text{C}$  避光保存待用。

## 4. 磁力架 (推荐 Dynal 公司 123-20D)

5. 移液器 (吉尔森)、涡旋仪、超声波清洗器、进口耗材 (离心管、枪头等)、恒温水浴摇床、荧光倒置显微镜等。

## 6. 96 孔板或 PDMS 小槽

### 检测步骤:

#### 1. 捕获

抽取约 1.5 mL 病人血液于 EDTA 抗凝真空采血管中, 将全血样品转移到 2 mL 的离心管内, 加入 20  $\mu\text{L}$  试剂 B (试剂 B 预先用超声仪超声分散均匀), 手摇或涡旋分散均匀后, 置于恒温摇床上, 150 rpm, 37 $^{\circ}\text{C}$  下孵育 30 min。

#### 2. 细胞固定

将步骤 1 中的样品置于磁力架上, 吸引约 5 min, 用移液器延外侧轻轻吸出清液, 再用 400  $\mu\text{L}$  的试剂 C 重悬样品, 室温放置 10 min。

#### 3. 细胞通透封闭

将步骤 2 中的样品于磁力架上, 吸引约 3 min, 用移液器去掉清液, 再取 400  $\mu\text{L}$  的试剂 L 重悬样品, 室温放置 20 min。

#### 4. 细胞染色

将步骤 3 中的样品置于磁力架上, 吸引约 3 min, 用移液器去掉清液, 再取 200  $\mu\text{L}$  的试剂 M 重悬样品, 37 $^{\circ}\text{C}$  避光孵育 30 min。待孵育结束后, 将样品置于磁力架上, 吸引约 3 min, 用移液器去掉清液; 再用 200  $\mu\text{L}$  的试剂 H 重悬, 再磁吸引, 去掉清液, 用试剂 H 重复洗涤 3 次, 最后用 100  $\mu\text{L}$  的试剂 H 分散样品。

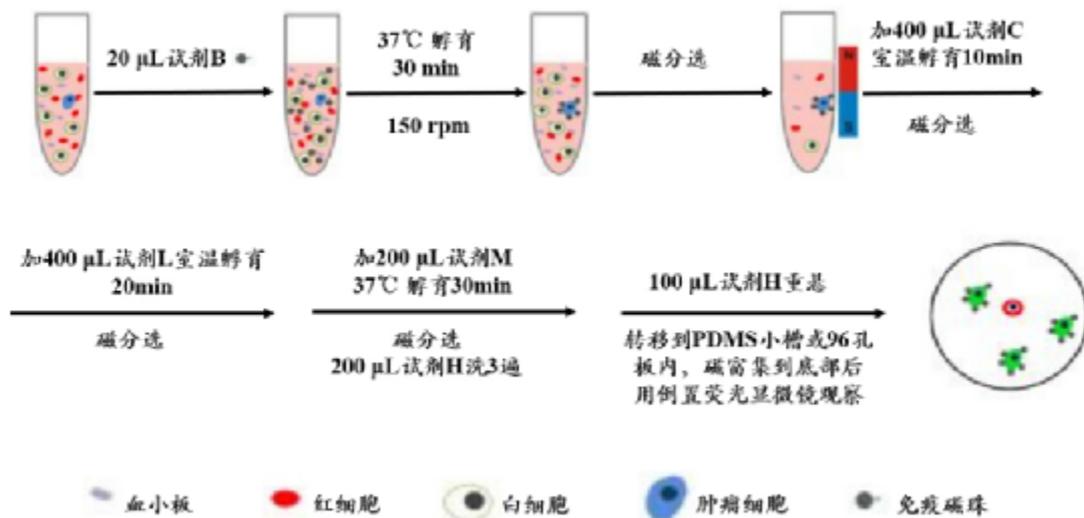
#### 5. 检测

将步骤 4 得到的样品转移到 96 孔板底部或者 PDMS 小槽内, 磁富集到底部后用倒置荧光显微镜观察。

三通道同时观察并用 CCD 采集图片, 其中 DAPI+/CK19+/CD45- 的细胞即为 CTC。

通道	激发波长 (nm)	发射波长 (nm)
1# (DAPI):	405	447 ± 30
2# (FITC-CK19)	488	525 ± 25
3# (AF594-CD45)	594	615 ± 20

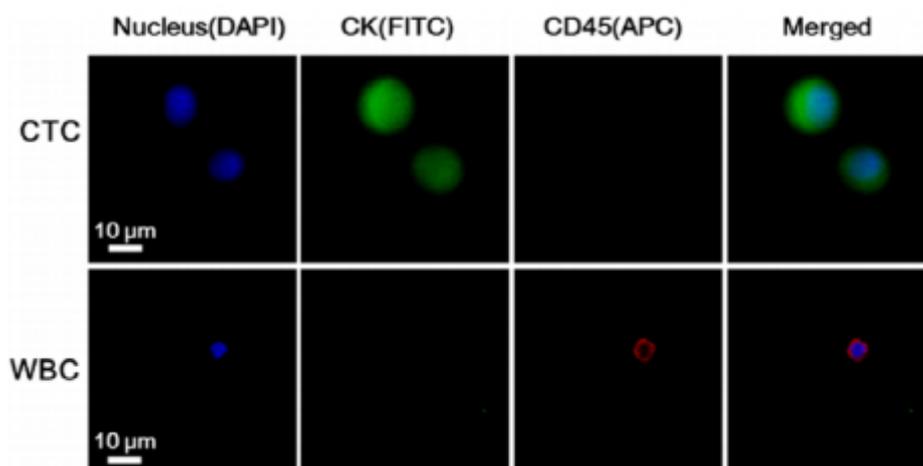
### 操作流程图



### 结果判断与分析:

循环肿瘤细胞 (CTC): DAPI+/CK19+/CD45-

白细胞 (WBC): DAPI+/CK19-/CD45+



### 操作注意事项:

1. 所有试剂 4℃冷藏保存，切勿冷冻。
2. 试剂盒供科研使用，任何物质均不能食用。
3. 试剂 B 用之前充分混匀分散。
4. 不同批号的试剂不要混用，保质期前使用。
5. 保质期：6 个月