

T/CSBM

团 体 标 准

T/CSBM 0044—2023

外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离 检测方法

Non-antibody-dependent magnetic separation detection method of
circulating tumor cells in peripheral blood

2023 - 12 - 04 发布

2024 - 05 - 04 实施

中国生物材料学会 发布

目 次

前言	III
引言	IV
1 范围	1
2 规范性引用文件	1
3 术语和定义	1
4 方法原理	2
5 检测条件	2
6 试剂材料和仪器设备	2
7 检测流程	2
8 样本制备	3
8.1 血液样本采集	3
8.2 样本前处理	3
9 样本检测	4
9.1 检测准备	4
9.2 CTC 磁分离捕获	4
9.3 细胞制片	5
9.4 CTC 鉴定	5
10 测定结果有效性判定	7
10.1 细胞病理鉴定法	7
10.2 免疫细胞化学和免疫荧光法	8
10.3 荧光原位杂交法	8
10.4 逆转录聚合酶链式反应法 (RT-PCR)	8
10.5 基因测序法	9
11 测定结果	9
11.1 测定结果表述	9
11.2 测定结果使用	10
12 注意事项	10
12.1 安全管理	10
12.2 试剂材料防污染	10
12.3 废弃物处理	10
附录 A (规范性) 试剂材料和仪器设备	11
A.1 试剂材料	11
A.2 试剂配制方法	11
A.3 仪器设备	12
A.4 各检测阶段试剂材料和仪器设备	12
附录 B (资料性) CTC 磁分离检测操作	14

B.1	样本前处理	14
B.2	CTC 捕获探针准备	14
B.3	涂片放置	15
B.4	CTC 染色鉴定	16
B.5	采图操作	16
附录 C (资料性)	膜过滤法	17
C.1	方法原理	17
C.2	试剂材料及仪器设备	17
C.3	操作步骤	17
附录 D (资料性)	微流控芯片法	18
D.1	方法原理	18
D.2	试剂材料及仪器设备	18
D.3	操作步骤	18
附录 E (资料性)	荧光原位杂交探针	19
附录 F (资料性)	逆转录聚合酶链式反应靶点	20
附录 G (资料性)	基因测序类别	22
	参考文献	23

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

本文件由中国生物材料学会提出。

本文件由中国生物材料学会团体标准化技术委员会归口。

本文件起草单位：致慧医疗科技（上海）有限公司、福建省致慧医疗科技有限公司、同济大学、同济大学附属东方医院、上海市第十人民医院、吉林大学第一医院、北京麦斯达夫科技股份有限公司。

本文件主要起草人：陈炳地、刘中民、乐文俊、高金莉、孙奋勇、董春燕、许建成、张惠棋、郑波。

引 言

本文件的发布机构提请注意，声明符合本文件时，可能涉及到《一种非抗体依赖的循环肿瘤细胞检测方法》（专利号：202111189852.6）相关的专利的使用。

本文件的发布机构对于该专利的真实性、有效性和范围无任何立场。

该专利持有人已向本文件的发布机构承诺，他愿意同任何申请人在合理且无歧视的条款和条件下，就专利授权许可进行谈判。该专利持有人的声明已在本文件的发布机构备案。相关信息可以通过以下联系方式获得：

专利持有人姓名：福建省致慧医疗科技有限公司。

地址：福建省泉州市晋江市罗山街道世纪大道南段3001号三创园A区105号。

请注意除上述专利外，本文件的某些内容仍可能涉及专利。本文件的发布机构不承担识别专利的责任。

外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法

重要提示:使用本文件的人员具备实验室工作经验十分重要。本文件并未指出所有可能的安全问题。使用者有责任采取适当的安全和健康措施, 并保证符合国家有关法规规定的条件。

1 范围

本文件规定了方法原理、检测条件、试剂材料和仪器设备、检测流程、样本制备、样本检测、测定结果有效性判定、测定结果和注意事项。

本文件适用于外周血液循环肿瘤细胞的非抗体依赖磁分离检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中, 注日期的引用文件, 仅该日期对应的版本适用于本文件; 不注日期的引用文件, 其最新版本(包括所有的修改单)适用于本文件。

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

外周血 peripheral blood

位于体表或肢体表面大血管的终末分支中的血液。主要指组织内的小动脉和与组织发生物质交换的毛细血管内的血液。

3.2

循环肿瘤细胞 Circulating Tumor Cell (CTC)

从原发肿瘤脱落并在血液中循环的细胞, 其转移和继发与肿瘤的形成、癌症相关死亡密切相关。

3.3

循环肿瘤细胞捕获探针 CTC capture probe

可识别循环肿瘤细胞并使其被高效富集的材料。

注: 本文件中特指根据非抗体依赖的循环肿瘤细胞的捕获技术原理设计而成的细胞捕获探针。

3.4

密度梯度离心 density gradient centrifugation

用一定的介质在离心管内形成连续或不连续的密度梯度, 将细胞混悬液或匀浆置于介质的顶部, 通过重力或离心力场的作用使细胞分层、分离的方法。

3.5

免疫细胞化学 immunohistochemistry

利用抗原与抗体特异性结合的原理, 以标记抗体作为探针来显示细胞内抗原成分, 主要是多肽与蛋白质(包括受体、酶、分泌物前体等各种基因表达产物), 对其进行定位、定性及定量的研究。

3.6

免疫荧光 immunofluorescence

用荧光素标记抗体（或抗原），检测相应抗原（或抗体）的免疫标记技术。

3.7

荧光原位杂交 fluorescence in situ hybridization (FISH)

一种非放射性原位杂交技术。将变性后的标记核苷酸探针（包括直接与荧光素结合的直接标记探针；用生物素、地高辛等标记的间接标记探针）与变性后的染色体、细胞、组织中的核酸按照碱基互补配对原则进行杂交，经洗脱后直接分析或通过免疫荧光系统检测，最后在荧光显微镜下观察。

3.8

逆转录聚合酶链式反应 reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

先将RNA通过逆转录酶的作用合成与之互补的DNA链，再以该链作模板进行聚合酶链反应扩增特定RNA序列的方法。

3.9

基因测序 gene sequencing

分析特定DNA片段的碱基序列，即腺嘌呤（A）、胸腺嘧啶（T）、胞嘧啶（C）与鸟嘌呤（G）的排列方式。

4 方法原理

4.1 基于 CTC 和血球细胞之间的特性差异，利用非抗体依赖的方法捕获 CTC 并通过细胞染色、免疫细胞化学、荧光原位杂交或逆转录聚合酶链式反应法对捕获细胞进行分析鉴定。

4.2 非抗体依赖的方法包括无标记捕获探针法（见 9.2.1）、多肽捕获探针法（见 9.2.2）、膜过滤法（见附录 C）和微流控芯片法（见附录 D）等。非抗体依赖磁分离方法包括但不限于以下两种：

- 无标记捕获探针法：CTC 在一定密度梯度介质中通过离心力进行分层分离后，利用无标记的顺磁性纳米磁性微粒捕获 CTC，并在外加磁场的作用下实现 CTC 与其他血液成分有效分离和富集；
- 多肽捕获探针法：利用多肽修饰的磁性微粒捕获外周血中的 CTC，多肽捕获探针与外周血中的 CTC 稳定结合，并在外加磁场的作用下实现 CTC 与其他血液成分有效分离和富集。

5 检测条件

检测条件如下：

- 温度：25 °C ± 5 °C；
- 相对湿度：30% ~ 65%；
- 压强：标准大气压。

6 试剂材料和仪器设备

试剂材料和仪器设备应符合附录A的要求。

7 检测流程

7.1 外周血中 CTC 检测流程见图 1。

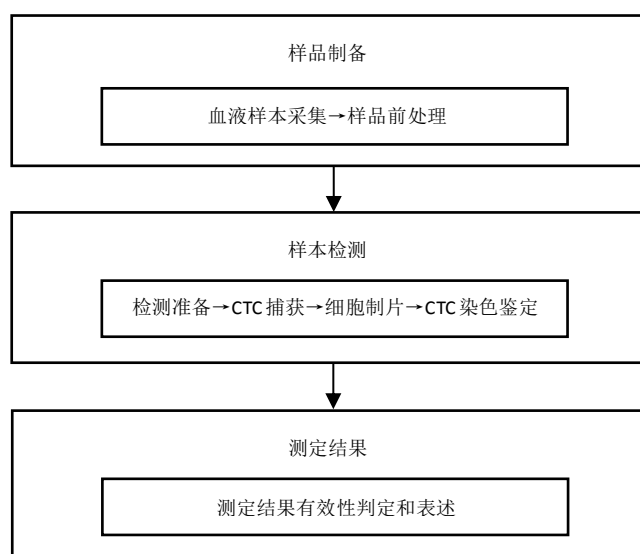


图1 外周血中 CTC 检测流程图

7.2 CTC 磁分离检测操作见附录 B。

8 样本制备

8.1 血液样本采集

8.1.1 采血前准备肝素/EDTA-K2 真空抗凝管。

8.1.2 采血量宜为 4 mL~15 mL, 采血收集完毕后, 应立即颠倒混匀采血管不少于 5 次, 不宜剧烈震荡, 产生气泡。

8.1.3 血样应在 4 °C~8 °C 环境下保存, 72 h 内进行 CTC 检测。

8.2 样本前处理

8.2.1 密度梯度离心法

8.2.1.1 离心前检查血样, 无溶血、凝块即为合格样本。

8.2.1.2 将细胞密度梯度分离液置于 37 °C 水浴预热 15 min。水浴锅水位应高于样本液面, 确保容器内样本达到目标温度。

8.2.1.3 预热后依次加入 15 mL 离心管中。

8.2.1.4 手握采血管两端, 轻缓 180° 翻转采血管 8 次~10 次, 充分混匀外周血样本。

8.2.1.5 取 1 mL 混匀的血样, 按照 1:3 比例加入 3 mL 1×PBS 稀释, 用吸管将稀释后的血液缓缓加入密度梯度分离液上层。

注: PBS 为磷酸缓冲盐溶液 (Phosphate Buffered Saline)。

8.2.1.6 放置离心机中 400 g~450 g, 离心 30 min~40 min。

8.2.1.7 离心后分层界面清晰, 离心后溶液分为 3 层: 上层为血浆层, 中层为白膜层, 下层为红细胞层。中层为目的细胞收集层, 目的细胞层中间有以单个核细胞为主的白膜带, 目的细胞截留率 > 85%。

8.2.1.8 用吸管去除上层血浆后，再将中层目的细胞收集层（2.5 mL~6.5 mL 之间）全部转移至 15 mL 离心管中，加入 PBS 定容至 12 mL，盖紧管盖，轻缓 180° 翻转离心管数次，放置于离心机中 300 g~350 g，离心 5 min~7 min。

8.2.1.9 离心后，保留底部约 100 μ g 液体。加入适量 PBS 重悬细胞。

8.2.2 红细胞裂解法

8.2.2.1 取样：宜在 4 $^{\circ}$ C 条件下操作，取 1 mL 新鲜抗凝血于离心管中。

8.2.2.2 裂解：按照 1:3 比例在离心管中加入 3 mL 1 \times 红细胞裂解液，裂解 5 min。

8.2.2.3 离心：在室温下，500 g 离心 5 min，弃红色上清液。

8.2.2.4 二次裂解离心：若发现红细胞裂解不完全，可以重复裂解（见 8.2.2.2）和离心（见 8.2.2.3）一次。

8.2.2.5 洗涤：加入适量 1 \times PBS，轻柔混匀重悬沉淀，在室温下，500 g 离心 5 min。

8.2.2.6 沉淀：离心后去除上清液，用适量 1 \times PBS 重悬沉淀细胞。

9 样本检测

9.1 检测准备

9.1.1 CTC 捕获探针活化和分散性评估

9.1.1.1 用镊子夹住管壁，离心管倾斜 45°，打开超声清洗仪，左右激烈晃动，保持 1 min 以上。

9.1.1.2 取 2 μ L 活化后的 CTC 捕获探针均匀铺在载玻片上，肉眼观察无明显沉淀与絮状物。

9.1.1.3 必要时于显微镜下观察，要求能均匀分散为细小粒子悬浮于分散介质中而不沉淀、不抱团，CTC 捕获探针活化完成。

注1：活化是减少材料团聚，提升材料反应活性，对材料进行化学处理改善材料分散性的处理过程。

注2：分散性指材料在水或其他均匀液体介质中，能均匀分散为细小粒子悬浮于分散介质中而不沉淀的性能。

注3：分散性评估指用超声清洗仪充分超声分散探针，取少量用粒径分析仪检测探针的粒径分布，其中多分散指数（Polydispersity Index, PDI） ≤ 0.3 ，说明分散性良好。

9.1.2 涂片放置

进行离心涂片前按“载玻片+滤纸+涂片漏斗”的顺序依次对齐放置，涂片漏斗孔和滤纸孔对齐；在涂片机上加载玻片正面贴紧滤纸，光滑面朝外的方式夹紧，应无缝隙。

9.2 CTC 磁分离捕获

9.2.1 无标记捕获探针法

9.2.1.1 将洗涤后的细胞沉淀用少量 PBS 重悬在 1.5 mL 离心管中，定容至 1 mL。

9.2.1.2 取适量磁性纳米探针加入 1.5 mL 离心管中。

9.2.1.3 将加有磁性纳米探针的离心管放置于迷你旋转培养器上，在 4 $^{\circ}$ C 条件下混匀 6 min~8 min。

9.2.1.4 取出离心管后立即置于多功能磁分离器上，在 4 $^{\circ}$ C 条件下磁吸附 6 min~8 min。

注：磁吸附为磁性材料在外加磁场的作用下，从液相中自发地发生材料运动并吸附至磁铁的现象。

9.2.1.5 用单道移液器缓慢吸掉上清液，并重新加入适量 PBS，再次颠倒混匀后，立即放入多功能磁分离器，在 4 $^{\circ}$ C 条件下磁吸附 8 min~10 min。

9.2.1.6 用单道移液器缓慢吸掉上清液，取出离心管，加入适量 PBS，将 CTC 捕获探针捕获的细胞轻轻吹打混匀，制备细胞混悬液。

9.2.2 多肽纳米探针法

9.2.2.1 取混合均匀的抗凝血至离心管中，用 PBS 稀释抗凝血。

9.2.2.2 将多肽纳米探针涡旋混匀后，取 10 μ L 多肽纳米探针至 2 mL 稀释后的外周血中，混匀后，37 $^{\circ}$ C 孵育 1 h。

9.2.2.3 孵育结束后，将离心管放置在多功能磁分离器上，磁吸附分离 30 min。

9.2.2.4 加入 PBS 洗涤，将离心管放置在多功能磁分离器上，缓慢吸掉上清液，重复 2 次~3 次。

9.2.2.5 将富集细胞用适量 PBS 重悬混匀为细胞混悬液。

注：除磁分离方法，非抗体依赖还有膜过滤法、微流控芯片法等；膜过滤法见附录C，微流控芯片法见附录D。

9.3 细胞制片

9.3.1 取出干净的载玻片，标记样本信息及检测时间，按“涂片漏斗+滤纸片+载玻片”的顺序对齐贴合好后放进离心涂片机中。

9.3.2 将 0.2 mL~0.5 mL 细胞混悬液加入相应标注的涂片漏斗加样管中，启动离心涂片机，室温下 800 r/min 离心 5 min，离心完成后，轻缓取下载玻片。

注1：样本稀释后（即细胞混悬液），轻度浑浊，细胞浓度过高，会造成细胞相互堆叠，影响观察及鉴定；细胞浓度过低，则涂片中细胞稀疏，容易造成假阴性。

注2：离心速度过低，细胞结构不清晰，离心速度过高，细胞容易破坏。

9.3.3 制片结果为细胞呈单层、分布均匀、细胞形态清晰、结构完整。

9.3.4 细胞制片适用无标记捕获探针法、多肽纳米探针法、微流控芯片法，膜滤法无需要采用细胞制片。

9.4 CTC 鉴定

9.4.1 细胞病理鉴定法（常规染色）

细胞病理染色鉴定按以下步骤进行：

- 细胞固定：将制片后得到的细胞片室温晾干，用细胞固定液固定 10 min~15 min；
- 细胞染色：去掉细胞固定液，室温晾干后，依次用细胞质染色液、细胞核染色液进行染色，每种染色液染色 1 min~2 min；
- 封片：细胞染色后，蒸馏水冲洗 2 次~3 次，室温晾干，用封片剂封片；
- 观察：用 10 倍和 40 倍显微镜下观察细胞形态及染色情况，细胞质与细胞核结构清晰后，细胞间没有重叠，非细胞区域没有或仅有微量残留染色液；
- 识别：在 100 倍显微镜下，根据细胞病理学特征识别肿瘤细胞。

9.4.2 免疫细胞化学和免疫荧光法

9.4.2.1 免疫细胞化学按以下步骤进行：

- 细胞固定：将制片后得到的细胞片室温晾干，细胞固定液固定 10 min~20 min，将细胞片浸入 PBS 缓冲液中清洗 3 次，每次 5 min；
- 通透（针对胞内抗原）：用 0.2% Triton X-100 通透细胞 10 min，用 PBS 缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min；
- 封闭：按试剂说明书使用内源性过氧化物酶封闭液封闭，PBS 浸泡 2 次，每次 5 min；非特异性封闭：将反应位置用组化笔画圈，滴加 5% BSA 封闭液，封闭 30 min；
- 一抗孵育：倒去 BSA 封闭液，将稀释好的一抗（CK、CD45）直接滴加到反应位置，37 $^{\circ}$ C 湿盒孵育 1 h~2 h，弃去一抗，用 PBS 缓冲液漂洗 3 次，每次 5 min；

- e) 二抗孵育：将稀释好的二抗滴加到反应位置，37℃下在湿盒中避光孵育 0.5 h~1 h，弃去二抗，将片子浸入 PBS 缓冲液中清洗 3 次，每次 5 min；
- f) DAB 显色：将配置好的 DAB 显色液滴加到反应位置，显色 5 min~10 min，见细胞区域变黄后冲洗掉多余的 DAB；
- g) 细胞染色：将苏木素中滴加到反应位置，染色 1 min 后流水冲洗；将切片置于盐酸乙醇中分化 5 s，再置于氨水中反蓝 10 s，最后流水冲洗，用封片剂封片，光学显微镜下观察染色识别肿瘤细胞。

9.4.2.2 免疫荧光法按以下步骤进行：

- a) 细胞固定、通透、封闭、一抗孵育同 9.4.2.1 中 a)、b)、c)、d)；
- b) 二抗孵育：将稀释好的二抗滴加到反应位置，室温下，在湿盒中避光孵育 0.5 h~1 h，弃去二抗，将片子浸入 PBS 缓冲液中避光清洗 3 次，每次 5 min；
- c) 复染：滴加 DAPI 染液染核，2 min~3 min 后用 PBS 清洗，用封片剂封片，荧光显微镜下观察识别肿瘤细胞。

9.4.3 荧光原位杂交法

荧光原位杂交法按以下步骤进行：

- a) 细胞固定：将制片后得到的细胞片室温晾干，滴加细胞固定液固定，室温晾干；
 - b) 漂洗：将片子置于 2×SSC 缓冲溶液中漂洗 2 次，每次 5 min；
- 注：SSC 为柠檬酸钠缓冲液 (Saline Sodium Citrate buffer)。
- c) 消化：滴加适量 0.04% 胃蛋白酶溶液，室温消化细胞 10 min~20 min，2×SSC 缓冲液中浸泡洗涤 2 次，每次 5 min；
 - d) 脱水：在 70%、85% 和 100% 梯度乙醇依次梯度脱水各 5 min，室温晾干；
 - e) 杂交：在暗室，取出探针 (见附录 E)，室温静置 5 min，用手指轻弹离心管底部，混匀探针后短暂离心，加 10 μL 探针溶液至杂交区域，立即盖上盖玻片，探针在盖玻片下均匀展开，用封片胶封片。将玻片置于杂交仪上，45℃变性 2 h，或 88℃变性 2 min；
 - f) 洗涤：在暗室，用镊子小心撕掉盖玻片周围封片胶，避免粘掉或者移动盖玻片，将片子浸入 2×SSC 中约 0.5 min 后取出，用镊子轻轻将盖玻片揭掉；将玻片置于 2×SSC，室温洗涤 1 min~2 min；取出片子浸入提前 68℃预热的杂交后洗涤液 (0.4×SSC/0.3% NP-40) 中洗涤 2 min~5 min；取出片子浸入提前预热的去离子水中洗涤 1 min，在暗处自然干燥片子；
 - g) 复染：在暗室晾干片子后，将 10 μL 的 DAPI 染色液滴于杂交区域，立即盖上盖玻片放置暗处染色 10 min~20 min。复染步骤中不能立刻进行荧光显微镜观察的玻片应置于 -20℃ 条件下保存。

9.4.4 逆转录聚合酶链式反应法 (RT-PCR)

9.4.4.1 RNA 提取按以下步骤进行：

- a) 细胞匀浆化：取富集的细胞混悬液，400 g 离心 5 min，加入适量 Trizol 反复吹打，溶解细胞；
- b) 分离 RNA：加入氯仿 [氯仿: Trizol (1: 5)]，盖好 EP 管上下颠倒剧烈震荡，冰上静置 5 min~10 min，直至上下分层清晰。4℃条件下，13 400 g 离心 15 min，样本会分为三层：有机相、中间层和上层无色的水相 (RNA 在水相中)，收集上清液；
- c) 沉淀 RNA：上清液中加入等量异丙醇，颠倒 5 次，室温静置 10 min，4℃条件下，13 400 g 离心 15 min，离心后在离心管管侧和管底形成胶状沉淀，弃去上清液；
- d) RNA 洗涤脱盐：加 75% 乙醇 (用 DEPC 水配制) 轻弹底部洗涤沉淀，4℃条件下，9 390 g 离心 5 min，弃去上清；

注：DEPC为焦碳酸二乙酯（Diethyl Pyrocarbonate）。

- e) RNA干燥和再溶解：取出滤纸，将EP管敞开放在滤纸上，管口向酒精，但不应完全干燥；20 μL~30 μL的DEPC水溶解，取2 μL电泳检测完整度（1.5%琼脂糖凝胶电泳，主要观察28 s、18 s和5 s三条带是否清晰），2 μL用于紫外分光光度计比色，其余冻存于-70 °C冰箱。

9.4.4.2 逆转录反应按以下步骤进行：

- a) RNA定量：用紫外分光光度计确定RNA浓度并定量；
 b) 去除DNA：在无RNA酶的200 μL干净试管内依次加入2 μL细胞总RNA，2 μL 250 pmol随机引物，2 μL 2.5 mmol/L的dNTP以及10 μL无RNA酶水混匀，瞬时离心后于70 °C中5 min，冰浴中淬冷；
 c) 逆转录：然后加入2 μL 10×逆转录缓冲液，1 U/μL逆转录酶，1 U/μL RNA酶抑制剂，混匀，瞬时离心后42 °C反应60 min，95 °C加热10 min灭活逆转录酶，-20 °C保存。

9.4.4.3 PCR扩增应按以下步骤进行：

- a) PCR扩增体系（25 μL）：包括DEPC水（可用高压双蒸水）17.5 μL，10×Taq buffer 2.5 μL，MgCl₂ 2.0 μL，10 mol/L dNTP Mix 0.5 μL，上游引物0.5 μL，下游引物0.5 μL，Taq酶（5u/μL）0.5 μL，cDNA模板1.0 μL；
 b) PCR扩增条件：94 °C预变性2 min，94 °C变性20 s，55 °C退火30 s，60 °C延伸40 s，45个循环；
 c) 循环扩增反应结束后查看扩增曲线及Ct值。

9.4.4.4 相应的引物扩增相应的基因靶点，逆转录聚合酶链式反应靶点见附录F。

9.4.4.5 常规PCR扩增后需采用凝胶电泳、核酸探针杂交等方法分析PCR扩增产物。

9.4.5 基因测序法

9.4.5.1 DNA提取按以下步骤进行：

- a) 将1 mL EDTA抗凝-20 °C冻存血液室温解冻后用预冷红细胞裂解液裂解，重复1次；
 b) 沉淀的白细胞团用STE缓冲液混匀，加入SDS核蛋白酶K裂解细胞，消化蛋白；
 c) 裂解过夜后，加入等体积Tris饱和苯酚溶液，转动混匀有机相和水相；
 d) 离心后用大口吸管转移水相，重复用Tris饱和苯酚溶液抽提一次；
 e) 加等体积氯仿：异戊醇（24:1），离心，小心转移收集水相，重复一次；
 f) 加入1/5体积醋酸钠混匀，再加入2倍体积-70 °C预冷无水乙醇，混匀出现白色絮状，离心收集沉淀；
 g) 用2 mL的70%乙醇洗涤2次，室温挥发干燥，不宜使DNA完全干燥；
 h) 加灭菌的TE（pH 7.4~8.4）缓冲溶液2 μL~50 μL溶解DNA，-20 °C保存。

9.4.5.2 PCR扩增：同9.4.4.3。

9.4.5.3 测序：按测序仪说明书操作进行对PCR纯化产物进行测序，分析测序结果，宜根据不同癌种的选择测序方式，测序类别见附录G。

10 测定结果有效性判定

10.1 细胞病理鉴定法

10.1.1 病理学中不同类型的肿瘤细胞主要有以下六项形态特征：

- 细胞长直径>15 μm；
- 细胞核质比>0.8；
- 细胞质内常见空泡或脂肪粒；

- 细胞核深染且染色不均，核仁明显；
- 核形态不一，可为巨核、双核或多核；
- 细胞表面褶皱或边界清楚。

10.1.2 若测定结果明确不是外周血中的正常白细胞，且满足上述 3 项或 3 项以上特征则判定测定结果有效；否则，测定结果判定为无效。

10.2 免疫细胞化学和免疫荧光法

10.2.1 测定结果有效性如下：

- 阳性对照：阳性对照可作为正确样本准备和适当染色技术的指示。每次染色应与同一测试条件下的阳性对照照片进行比较。阳性对照仅用于监控步骤的正确执行和试剂的测试，并不用于帮助叙述样本的明确诊断，若阳性结果不能显示适当的阳性染色，则该批次实验测试样本的结果认为是无效的；
- 阴性对照：每次染色应与同一测试条件下的空白对照试剂进行对比。空白试剂代替抗体对玻片进行染色用来判断非特异性着色，并对抗原部位特异性染色提供更好的解释，空白对照试剂的孵育时间应与抗体一致；
- 肿瘤细胞和正常细胞应同时具备细胞核染色。阳性标记免疫特征，可分为弱阳性（+）、中等阳性（++）、强阳性（+++）三级，免疫酶标记表现为淡黄色细颗粒、棕黄色颗粒和褐黄色粗颗粒，后者耀眼易见。免疫荧光法则表现为浅绿色荧光、明显绿色荧光和亮绿色耀眼荧光。

10.3 荧光原位杂交法

10.3.1 测定结果有效性如下：

- 阳性对照：细胞染色体任意两个以上位点（含两个）出现异常或一个位点有两种以上（含两个）异常（基因删除/扩增、基因融合或基因重排）；
- 阴性对照：细胞染色体无异常信号。

10.3.2 染色体异常且细胞核染色阳性的细胞为肿瘤细胞，染色体异常有基因删除/扩增、基因融合或基因重排，判定方法如下：

- 基因扩增：单色探针通常计数每个肿瘤细胞信号的绝对量，而双色探针则计算每个肿瘤细胞靶基因位点信号与参考染色体信号的比值；
- 染色体易位：可发生在染色体内或染色体间。少数情况下，易位也可出现其中一个分离探针信号的丢失；

注1：发生在染色体内，以分离探针信号之间达到1倍~2倍信号直径的间距判定易位。

注2：发生在染色体间，应有清楚的独立信号。

- 基因缺失：在应用单色探针（即没有参考染色体探针）时，需要增加计数细胞的数量，避免由于玻片导致的信号缺失而判读为阳性结果；双色探针以上的多色探针对其中的每种信号可以有不同的阈值要求。

10.4 逆转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）

10.4.1 测定结果有效性如下：

- 阳性对照：有典型 S 型扩增曲线（确定扩增体系有效）；
- 阴性对照：为直线或轻微斜线，无指数增长期（排除扩增体系出现污染）；
- PCR 熔解曲线是单峰曲线；
- 扩增曲线指数扩增区域，复孔之间 CT 值标准偏差应 <0.2 ；
- 阈值设置合理（设置在指数增长区）；

——扩增效率在 90%~110%之间，标准曲线 $R > 0.99$ 、 $R^2 > 0.98$ ；标准方差应 < 0.2 。阳性处理结果 Ct 约为 15~30；阴性对照结果 $Ct > 35$ 。

10.4.2 结果判定：

——阴性： $F \leq A$ ；

——阳性： $F > A$ 。 $F = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ， $\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{检测组基因1}} - Ct_{\text{检测组基因2}}) - (Ct_{\text{对照组基因1}} - Ct_{\text{对照组基因2}})$ ，其中基因 1 为 EpCAM、CK19 等待检基因，基因 2 为 β -Actin、GAPDH 等内参基因，Ct 是检测样本的阈值；

——A 为特定基因（如 EpCAM、CK19 等）的相对基因量在阴性样本与阳性样本之间的临界值。

10.5 基因测序法

10.5.1 测定结果有效性如下：

——测序结果为单个峰且与其他峰的交错较少，表明测序结果有效；

——若单个峰的一个位点出现多个峰，表明测序结果无效。

10.5.2 结果判定：

——阳性：检测到特定基因突变；阳性判断值为突变比例不低于 0.4%，测序有效深度不低于 500 ×，突变绝对拷贝数不低于 2，链平衡性介于 0.1~0.9 之间（融合不适用）；

——阴性：未检测到特定基因突变。

示例：特定基因突变，如：EGFR 基因/20 号外显子 p. T790 错义突变/c. 2369C>T/P. Thr790Met，突变丰度为 1.22%。

11 测定结果

11.1 测定结果表述

11.1.1 细胞病理鉴定法

11.1.1.1 在 2 mL 血样中检出单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇即为阳性，在恶性实体肿瘤中 CTC 不少于 5 个时，提示临床预后差。

11.1.1.2 在 2 mL 血样中进行检测，未检测到单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇即为阴性，提示检测样本无 CTC。

11.1.1.3 结果应按照合适的病人管理程序与来自诊断测试（即影像学、实验室检查）、体检和完整病史等信息结合使用。

11.1.2 免疫细胞化学和免疫荧光法

11.1.2.1 在 2 mL 血样中检出有棕黄色着色或表现绿色荧光的抗原阳性（如 EpCAM、CK19 等）的单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇。

11.1.2.2 在 2 mL 血样中未检出有棕黄色着色或表现绿色荧光的抗原阳性（如 EpCAM、CK19 等）的单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇。

11.1.3 荧光原位杂交法

11.1.3.1 在 2 mL 血样中检出染色体异常（基因删除/扩增、基因融合或基因重排）的单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇。

11.1.3.2 在 2 mL 血样中未检出染色体异常（基因删除/扩增、基因融合或基因重排）的单个 CTC、白细胞群围绕的 CTC 或 CTC 团簇。

11.1.4 逆转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）

11.1.4.1 在 2 mL 血样中检出特定生物标志物（如 EpCAM、CK19 等）扩增异常/表达异常的 CTC。

11.1.4.2 在 2 mL 血样中未检出特定生物标志物（如 EpCAM、CK19 等）扩增异常/表达异常的 CTC。

11.1.5 基因测序法

11.1.5.1 在 2 mL 血样中检出具有特定基因突变（如 EGFR、Her2 等）的 CTC。

11.1.5.2 在 2 mL 血样中未检出具有特定基因突变（如 EGFR、Her2 等）的 CTC。

11.2 测定结果使用

11.2.1 荧光原位杂交法、逆转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）均要求应在同一次实验中同时满足，否则本次实验无效，应重新实验。

11.2.2 11.1 方法获得的最终结果应按照合适的采样者管理程序与来自诊断测试（即影像学、实验室检查）、体检和完整病史等所有的临床信息结合使用。

12 注意事项

12.1 安全管理

实验室安全管理及工作人员行为符合GB 19489的规定。工作人员处理血液的全部操作应戴乳胶一次性手套、口罩和实验帽。

12.2 试剂材料防污染

应对实验室进行功能分区，各区的工作服实验用具和实验记录本应区分标记，不应混用。注意因交谈或其他活动造成的飞沫、落尘带入的污染，必要的情况下在超净工作台中进行操作。

12.3 废弃物处理

操作区应有专门的固体和液体废弃物收集容器，废弃物应进行无害化处理。

附录 A (规范性) 试剂材料和仪器设备

A.1 试剂材料

检测所所需的试剂材料包括但不限于：

- PBS：浓度为 $1\times$ PBS (0.01 mol/L)，pH 值为 $7.2\sim 7.4$ ；
- 细胞密度梯度分离液：浓度为 $50\%\sim 60\%$ ，pH 值为 $7.2\sim 7.4$ ；
- $1\times$ 红细胞裂解液，pH 为 $7.2\sim 7.4$ ；
- 细胞质染色液：伊红染色液：浓度为 0.3% (w/v)，pH 值为 $4.7\sim 5.0$ ；
- 细胞核染色液：亚甲蓝染色液：浓度为 1% (w/v)；
- 细胞固定液： 4% 多聚甲醛缓冲溶液，pH 值为 $7.3\sim 7.5$ ；
- 柠檬酸钠缓冲液： $2\times$ SSC，pH 值为 $6.9\sim 7.1$ ；
- 巴斯德吸管；
- 多肽纳米探针；
- CTC 捕获探针；
- 粘附载玻片：规格为 $25\text{ mm}\times 75\text{ mm}$ ，厚度为 $1\text{ mm}\sim 1.2\text{ mm}$ ，抛光边，表面经正电荷处理；
- 盖玻片：规格为 $22\text{ mm}\times 22\text{ mm}$ ，厚度为 $0.13\text{ mm}\sim 0.16\text{ mm}$ ；
- 离心管：规格为 $1.5\text{ mL}\sim 50\text{ mL}$ ；
- 单道移液器枪头：适用于 $10/20/50/100/200/1\ 000\ \mu\text{L}$ ；
- 封片剂。

A.2 试剂配制方法

A.2.1 $1\times$ 磷酸盐缓冲液

分别称取 0.27 g 磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、 1.42 g 磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、 8 g 氯化钠 (NaCl) 和 0.2 g 氯化钾 (KCl) 于烧杯中，向烧杯中加入 800 mL 蒸馏水，充分搅拌溶解，用盐酸调节 pH 至 7.4 ，然后加入蒸馏水定容至 1 L ，高温高压灭菌后，室温保存。

A.2.2 密度梯度分离液

将 Percoll 原液 (密度： 1.130 g/mL) 与 $10\times$ PBS 以 $9:1$ 的比例混合为 100% 的 Percoll 液 (密度为 1.127 g/mL)；再将 90% 的 Percoll 液与 $1\times$ PBS 以一定的比例混合配制为 $50\%\sim 60\%$ 的 Percoll 液 (密度为 $1.067\text{ g/mL}\sim 1.077\text{ g/mL}$)。

A.2.3 $1\times$ 红细胞裂解液

A.2.3.1 分别称取 80 g 氯化铵 (NH_4Cl)、 10 g 碳酸氢钾 (KHCO_3)、 3.7 g EDTA- Na_2 盐溶于 900 mL 蒸馏水中，搅拌至完全溶解。

A.2.3.2 用盐酸或氢氧化钠调节 pH 至 $7.2\sim 7.4$ ，加蒸馏水定容至 1 L ，用 $0.22\ \mu\text{m}$ 的滤器过滤后 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 储存 ($10\times$ 红细胞裂解液)。

A.2.3.3 将 $10\times$ 储存液稀释 10 倍得到 $1\times$ 红细胞裂解液。

A.2.4 细胞固定液

取2 g多聚甲醛粉末，置于三角烧杯中，加入50 mL PBS，放入37 °C恒温水浴箱2 d至多聚甲醛全部溶解，调节pH至7.4。

A.2.5 细胞质染色液

取1.5 g伊红倒入500 mL 95%乙醇内，将溶液加热至60 °C，搅拌均匀，加冰醋酸调整pH至4.7~5.0，保存于棕色瓶中。

A.2.6 细胞核染色液

取5 g亚甲基蓝，溶于400 mL蒸馏水中，于60 °C水浴加热搅拌至完全溶解，将溶液定容至500 mL，保存于棕色瓶中。

A.2.7 2×柠檬酸钠缓冲液

A.2.7.1 称取175.2 g氯化钠，88.2 g柠檬酸钠二水，溶于800 mL去离子水中，搅拌均匀。

A.2.7.2 加入氢氧化钠溶液（10 mol/L）调节pH值至7.0，加去离子水定容至1 L得到20×SSC。

A.2.7.3 高温高压灭菌后，将20×SSC稀释10倍后得到2×SSC。

A.3 仪器设备

检测所需的设备仪器包括但不限于：

——离心涂片机（甩片机）：最高转速为3 000 r/min，最大容量为0.5 mL×6，室温；

——显微镜：10倍、20倍、40倍、100倍；

——迷你旋转培养器；

——水浴锅：RT+5 °C~99 °C；

——Q-PCR仪；

——超声波清洗机；

——离心机：最高转速为5 000 r/min，最大容量为15 mL×32；

——单道移液器；

——多功能磁分离器。

A.4 各检测阶段试剂材料和仪器设备

各检测阶段试剂材料和仪器设备一览表见表A.1。

表A.1 各检测阶段试剂材料和仪器设备一览表

检测阶段	方法	试剂	材料	仪器设备
样本前处理	密度梯度离心法	PBS	巴斯德吸管 离心管	水浴锅 离心机
	红细胞裂解法	红细胞裂解液 PBS		离心机
CTC捕获	无标记捕获探针法	无标记捕获探针 PBS	单道移液器枪头 离心管	迷你旋转培养器 多功能磁分离器
	多肽纳米探针法	多肽纳米探针 PBS	巴斯德吸管 离心管	水浴锅 多功能磁分离器

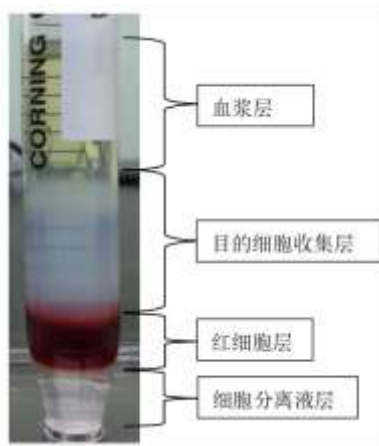
表A.1 各检测阶段试剂材料和仪器设备一览表（续）

检测阶段	方法	试剂	材料	仪器设备
细胞制片	-	-	粘附载玻片 盖玻片	离心涂片机
CTC鉴定	细胞病理鉴定法	细胞固定液 细胞质染色液 细胞核染色液	封片剂 巴斯德吸管	显微镜
	免疫细胞化学和免疫荧光法	细胞固定液 PBS 苏木素 BSA封闭液	巴斯德吸管	荧光显微镜
	荧光原位杂交法	细胞固定液 SSC 乙醇 PBS	巴斯德吸管 离心管 粘附载玻片 盖玻片	水浴锅 荧光显微镜
	逆转录聚合酶链式反应法	氯仿 异丙醇 乙醇 逆转录缓冲液	巴斯德吸管 离心管	Q-PCR仪 离心机 水浴锅
	基因测序法	红细胞裂解液 氯仿 异戊醇 乙醇	离心管 大口吸管	离心机 测序仪

附录 B
(资料性)
CTC 磁分离检测操作

B.1 样本前处理

按照8.2.1的处理步骤对血样进行离心，得到的样本示例见图B.1。



图B.1 血样样本示例图

B.2 CTC 捕获探针准备

按照9.1.1的方法对CTC捕获探针进行活化处理后，进行CTC捕获探针的分散性评估，以检验CTC捕获探针的质量，具体操作方法和分散性评估示例见图B.2、图B.3。



图B.2 活化 CTC 捕获探针操作示例图



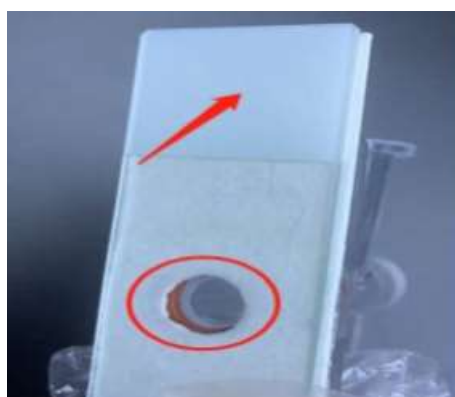
图B.3 CTC 捕获探针载玻片示例图

B.3 涂片放置

涂片放置（见9.1.2）的顺序示例见图B.4，涂片对扣示例见图B.5，涂片在涂片机中放置示例见图B.6。



图B.4 涂片放置顺序示例图



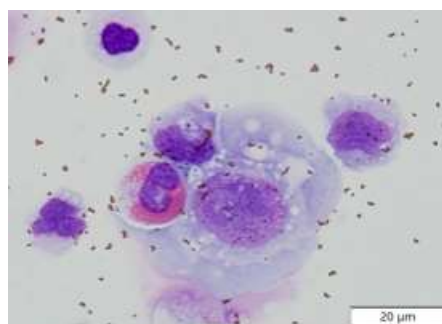
图B.5 涂片对扣示例图



图B.6 涂片在涂片机中放置示例图

B.4 CTC 染色鉴定

按照9.4.1的操作步骤使用细胞固定液、细胞核染色液、细胞质染色液对涂片进行细胞染色，染色结果示例见图B.7。



图B.7 染色结果示例图

B.5 采图操作

B.5.1 调节显微镜参数，确保显微镜及成像软件参数设定条件一致，确保每次图片的背景强度一致。

B.5.2 读片，审片结束后打印标签贴于样本上部，标签示例见图B.8。



图B.8 标签示例图

附录 C

(资料性)

膜过滤法

C.1 方法原理

利用有微孔的滤膜将体积较小的CTC过滤掉，将体积较大的CTC截留在滤膜上，实现CTC与其他血液成分的有效分离。

C.2 试剂材料及仪器设备

试剂材料及仪器设备如下：

- 氯化钠溶液；
- 细胞固定液；
- PBS；
- 巴斯德吸管；
- 过滤器：8 μm 孔径滤膜。

C.3 操作步骤

C.3.1 取5 mL混匀的抗凝血至离心管中。

C.3.2 400 g，离心10 min，用移液枪小心吸除上层血清。

C.3.3 将去除血清的血液成分转移至18 mL~25 mL固定液中，混匀，固定15 min。

C.3.4 用0.9% (w/v) 氯化钠溶液润洗过滤器中的滤膜。

C.3.5 将含血液成分的固定液用巴氏管转移至过滤器中过滤，血液中较大的细胞及CTC被截留在滤膜上。

C.3.6 加适量0.9% (w/v) 氯化钠溶液冲洗，利用负压使其流出，尽量将其去除干净。

C.3.7 取六孔板，在其中一个孔中放一块合适大小的封口膜，将富集有CTC的过滤器放置于封口膜上。

C.3.8 取出滤器中的滤膜继续后续检测。

附录 D

(资料性)

微流控芯片法

D.1 方法原理

裂解外周血中的红细胞后，在微流控芯片上采用流体力学实现对外周血中CTC的非抗体依赖的分离富集，白细胞和CTC分别在不同的出口流出，实现分离富集外周血中的CTC的目的。

D.2 试剂材料及仪器设备

试剂材料及仪器设备如下：

- PBS；
- 巴斯德吸管；
- 纳米微流控芯片；
- 微流控芯片仪器。

D.3 操作步骤

- D.3.1 用红细胞裂解液裂解外周血中的红细胞，获得细胞混悬液。
- D.3.2 加入15 mL PBS，将细胞混悬液稀释为进样样本。
- D.3.3 启动微流控芯片仪器，设定流速120 mL/h，将进样样本加入进样口。
- D.3.4 样本流经微流控芯片，CTC和白细胞分别从不同的管道和出口流出。
- D.3.5 在CTC出口用离心管收集细胞混悬液。

附 录 E
(资料性)
荧光原位杂交探针

荧光原位杂交探针信息见表E.1。

表E.1 荧光原位杂交探针信息

癌种	探针	阳性检测结果判读	阴性检测结果判读
乳腺癌	HER-2/CEP17融合探针	HER-2/CEP17比值 ≥ 2.0 ，且平均HER-2拷贝数/细胞 ≥ 4.0	HER-2/CEP17比值 < 2.0 且平均HER-2拷贝数/细胞 < 4.0
胃癌	HER-2/CEP17融合探针	HER-2/CEP17比值 ≥ 2.0	HER-2/CEP17比值 < 1.8
结直肠癌	APC探针, MMR探针, RAS探针, BRAF探针或HER-2/CEP17融合探针	-	-
肺癌	EBER探针	-	-
非小细胞肺癌	KIF5B/RET或CCDC6/RET融合探针	-	-
淋巴瘤	EBER探针	-	-
套细胞淋巴瘤	CCND1/IGH融合探针	-	-
鼻咽癌	EBER探针	-	-
胶质瘤	1p/19q缺失检测探针	-	-
胆囊癌	FGFR2探针, HER-2探针, NTRK1-3探针或RET探针	-	-
巨大淋巴结病	EBER探针	-	-
前列腺癌CTC	AR探针, MYC探针或8p探针	-	-
胰腺癌CTC	CEP8探针	CK+/CD45-/DAPI+/CEP8 ≥ 2 或CK-/CD45-/DAPI+/CEP8 > 2	-
神经母细胞瘤CTC	CEP8探针	DAPI+/CD45-/CEP8 ≥ 3	-
肺癌CTC	10q22.3/CEP10融合探针或3p22.1/3q29融合探针	-	-
非小细胞肺癌CTC	EML4/ALK融合探针	-	-

附 录 F
(资料性)
逆转录聚合酶链式反应靶点

逆转录聚合酶链式反应靶点见表F. 1。

表F. 1 逆转录聚合酶链式反应靶点

癌种	靶点	备注
乳腺癌	CK19	有扩增即为阳性
	CK7	CTC细胞中基因相对表达量为红细胞的1 000倍以上
	TACSTD1	
	MGB1	
	MGB2	
	PIP	
卵巢癌	CK7	-
	CK20	
宫颈癌	CK19	
结肠癌	CK20	CTC细胞中基因相对表达量为红细胞的1 000倍以上
	PLS3	
	CEA	
	CK19	
	CD133	
	EphB4	
	LAMγ2	
	MAT	
	TACSTD1	
	TM4SF3	
前列腺癌	AR-FL	-
	AR-V7	
	PSA	
	PSMA	
	HPRT	
皮肤黑色素瘤	B4GALNT1	-
	MAGEA3	
	MLANA	
	PAX3	有扩增即为阳性
	TRP-AGG2-6	
	MAGEA-plex	
	MART1	
TYR	CTC细胞中基因相对表达量为红细胞的1 000倍以上	
CEA		
食管癌	CK19	

表F.1 逆转录聚合酶链式反应靶点（续）

癌种	靶点	备注
食管癌	CK7	CTC细胞中基因相对表达量为红细胞的1 000倍以上
	TACSTD1	
	CK20	
	TM4SF3	
头颈部癌	CEA	
	CK19	
	SCCA	
	PTHrP	
肺癌	CEA	
	CK19	
	CK7	
	LUNX	
	SCCA	
	SFTPb	
	TACSd1	

附 录 G
(资料性)
基因测序类别

基因测序类别见表G.1。

表G.1 基因测序类别

癌种	测序类别
Stage IV colorectal carcinoma	单细胞测序
Prostate cancer	全外显子组测序
Lung cancer	全外显子组测序/全基因组测序
Prostate cancer	全外显子组测序
Prostate cancer	全基因组测序
Hepatocellular carcinoma	Ion semiconductor NGS
Melanoma Small-cell lung cancer	全基因组测序
Prostate cancer	全外显子组测序/全基因组测序
Metastatic breast cancer	单细胞测序
Metastatic breast cancer	Targeted NGS
Melanoma	NGS
Liver, colorectal, lungGastric, breast, prostate cancer	NGS
Breast, gastric, prostate, colon cancer	全外显子组测序/全基因组测序
Pancreatic cancer	单细胞测序
LNCaP, Prostate cancer	单细胞测序
Breast cancer	单细胞测序
KPC mice, pancreaticBreast, prostate cancer	单细胞测序
Prostate cancer	单细胞测序
Colorectal cancer cell line	单细胞测序

参 考 文 献

- [1] 中华医学会检验医学分会分子诊断学组. 循环肿瘤细胞临床应用与实验室检测专家共识[J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(11):1008-1020.
- [2] 《核医学名词》, ISBN:9787030557223
- [3] 兰峰, 刘永萍. 循环肿瘤细胞检测的临床进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015(15):2219-2222.
- [4] 细胞生物学名词(第二版) [J]. 中国科技术语, 2009, 11(04):63-64.
- [5] 微生物学名词(三) [J]. 中国科技术语, 2012, 14(06):58-60..
- [6] 放射医学与防护学名词(二) [J]. 中国科技术语, 2011, 13(03):60-63.
- [7] 生物化学与分子生物学名词 [J]. 中国科技术语, 2008(03):22-25.
- [8] 《医学遗传学名词》, ISBN:9787030694874
- [9] 才磊. 《化学名词》(第二版) 正式出版[J]. 中国科技术语, 2017, 19(01):73.
- [10] Bingdi C, Wenjun L, Yilong W, et al. Targeting Negative Surface Charges of Cancer Cells by Multifunctional Nanoprobes. [J]. Theranostics, 2016, 6(11).
- [11] O'Connell J M, Boul P, Ericson M L, et al. Reversible water-solubilization of single-walled carbon nanotubes by polymer wrapping[J]. Chemical Physics Letters, 2001, 342(3).
-