

团 体 标 准

T/CSBM XXXX-2023

外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离
检测方法

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

(征求意见稿)

2023-XX-XX 发布

2023-XX-XX 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 检测流程	3
6 检测条件	3
7 试剂和材料	3
8 仪器设备	4
9 样品制备	5
9.1 血液样本采集	5
9.2 样品前处理	5
10 样本检测	5
10.1 检测准备	5
10.2 循环肿瘤细胞磁分离捕获	6
10.2.1 无标记捕获探针法	6
10.2.2 多肽纳米探针法	6
10.3 循环肿瘤细胞非磁分离捕获	6
10.4 细胞制片	6
10.5 循环肿瘤细胞染色鉴定	6
11 测定结果有效性判定	9
11.1 细胞病理鉴定法	9
11.2 免疫组化和免疫荧光法	9
11.3 荧光原位杂交法	9
11.4 反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）	9
11.5 基因测序法	10
12 测定结果表述	10
12.1 细胞病理鉴定法	10
12.2 免疫组化和免疫荧光法	10
12.3 荧光原位杂交法	10
12.4 反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）	10
12.5 基因测序法	11

13	灵敏度、精密度和特异性	11
13.1	灵敏度	11
13.2	精密度	11
13.3	特异性	11
14	安全保证与质量控制	11
14.1	人工操作安全	11
14.2	试剂材料防止污染	11
附录 A	(规范性) 循环肿瘤细胞磁分离检测操作参考示例	12
附录 B	(规范性) 不同检测阶段对应不同方法的试剂和材料及试剂配制方法	15
附录 C	(资料性) 膜过滤法	17
附录 D	(资料性) 微流控芯片法	18

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、吉林大学第一附属医院、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、姜珂、张惠棋、郑波。

本文件为首次发布。

引 言

文件的发布机构请注意如下事实，声明符合本文件时，可能涉及到样品制备与《一种非抗体依赖的循环肿瘤细胞检测方法》（专利号：202111189852.6）专利权的使用。

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保证，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：

专利权人：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这些专利的责任。

外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法

1 范围

本文件规定了外周血中循环肿瘤细胞非抗体依赖磁分离检测方法的原理、检测流程、检测条件、试剂和材料、仪器设备、样品制备、样本检测、灵敏度、精密度和特异性、安全保障与质量控制等内容。

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

除骨髓以外的血液，可以通过肢体表浅的外周血管获得，也可以通过颈部、腹股沟或锁骨下的深部血管穿刺获得。

3.2

循环肿瘤细胞 Circulating Tumor Cell (CTC)

由肿瘤原发灶或转移灶脱落进入血液循环系统的肿瘤细胞。

3.3

循环肿瘤细胞捕获探针 CTC capture probe

一种可识别循环肿瘤细胞并使其被高效富集的材料。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

活化 activate

为了减少材料团聚，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。

3.5

分散性 dispersity

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。

3.6

细胞离心涂片 cell centrifugal smear

（加入离心吊片中的）细胞利用离心转盘的离心力涂覆在载玻片（的过程）。

3.7

重悬 resuspend

用适当的缓冲液或培养液将离心或沉降等方法得到的固体（沉淀、细胞、活性物质等）重新悬浮。

3.8

磁吸附 magnetic adsorption

具有磁性的一类材料在外加磁铁的作用下，从液相中自发地发生材料运动并吸附至磁铁（的现象/过程）。

3.9

细胞染色 cell staining

（以细胞形态学为基础）利用碱性和酸性染料结合运用化学反应使细胞基质及细胞外基质着色。

3.10

读片，审片 film review

（涂覆且染色在载玻片的细胞）在显微镜下进行细胞形态观察，并判定细胞类型的动作。

3.11

核质比 nucleocytoplasmic ratio

一个细胞的细胞核与细胞质在量（容积）上的比例。

3.12

反转录聚合酶链式反应 reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR

将RNA逆转录（RT）和cDNA 聚合酶链式扩增（PCR）相结合的技术。

4 方法原理

基于循环肿瘤细胞和血球细胞之间的特性差异，利用非抗体依赖的方法捕获循环肿瘤细胞并通过细胞染色、免疫组化、原位荧光杂或聚合酶链式技术对捕获细胞进行分析鉴定。非抗体依赖的方法包括无标记捕获探针、多肽捕获探针、滤膜法和微流控法。

无标记捕获探针法：循环肿瘤细胞在一定密度梯度介质中通过离心力下进行分层分离后，利用无标记的顺磁性纳米磁性微粒捕获循环肿瘤细胞，并在外磁场的作用下实现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全血中的循环肿瘤细胞，多肽捕获探针与外周血中的循环肿瘤细胞稳定结合，并在外磁场的作用下实现CTC与其他血液成分有效分离和富集。

5 检测流程

5.1 外周血中循环肿瘤细胞检测流程见图 1。

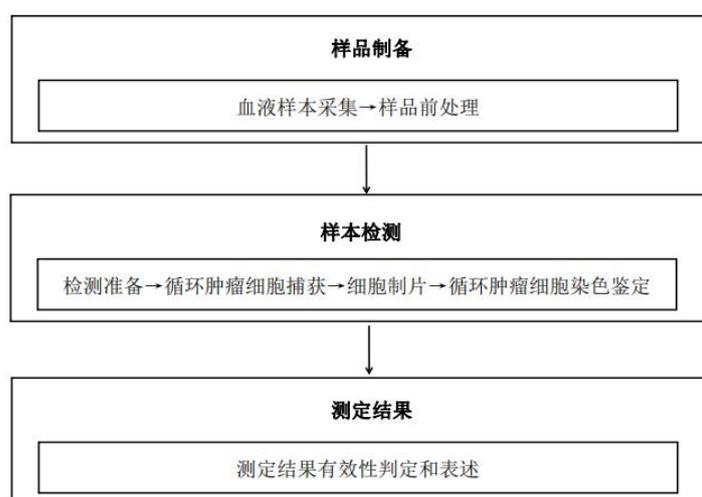


图 1 外周血中循环肿瘤细胞检测流程图

5.2 循环肿瘤细胞磁分离检测操作示例见附录 A。

6 检测条件

检测条件如下：

- a) 温度：25 ℃ ± 5 ℃；
- b) 相对湿度：30%~65%；
- c) 压强：标准大气压。

7 试剂和材料

7.1 检测所涉及的试剂材料包括但不限于：

- a) 磷酸缓冲盐溶液（PBS）：浓度为 1×PBS（0.01M），pH 值为 7.2；
- b) 细胞密度梯度分离液：浓度为 50%~60%，pH 值为 7.2~7.4；
- c) 1×红细胞裂解液，pH：7.2~7.4；
- d) 细胞质染色液：伊红染色液：浓度为 0.3%（w/v），pH 值为 4.7~5.0；

- e) 细胞核染色液：亚甲蓝染色液：浓度为 1% (w/v)；
- f) 细胞固定液：4%多聚甲醛；
- g) 柠檬酸钠缓冲液：2×SCC，pH 值：7.0；
- h) 巴斯德吸管；
- i) 多肽纳米探针；
- j) 循环肿瘤细胞捕获探针；
- k) 粘附载玻片：规格为 25 mm×75 mm，厚度为 1 mm~1.2 mm，抛光边，表面经正电荷处理；
- l) 盖玻片：规格为 22 mm×22 mm，厚度为 0.13 mm~0.16 mm；
- m) 离心管：规格为 1.5 mL~50 mL；
- n) 单道移液器枪头：适用于 10/20/50/100/200/1000 μL；
- o) 封片剂。

7.2 不同检测阶段对应不同方法的试剂和材料及试剂配制方法见附录 B。

8 仪器设备

8.1 不同检测阶段对应不同的方法的设备仪器见表 1 所示。

- a) 离心涂片机（甩片机）：最高转速为 3000 r/min，最大容量为 0.5 ml×6；
- b) 显微镜：10 倍、20 倍、40 倍、100 倍；
- c) 迷你旋转培养器；
- d) 水浴锅：RT+5℃~99℃；
- e) 超声波清洗仪；
- f) 离心机：最高转速为 5000 r/min，最大容量为 15 ml×32；
- g) 单道移液器；
- h) 多功能磁分离器；
- i) 过滤器：0.8 μm 孔径滤膜；
- j) 纳米微流控芯片。

8.2 不同检测阶段对应不同的方法的设备仪器见表 2 所示。

表 1 不同检测阶段对应不同的方法的设备仪器

项目	方法	设备仪器
样品前处理	密度梯度离心法	水浴锅、离心机
	红细胞裂解法	离心机
循环细胞捕获	无标记捕获探针法	迷你旋转培养器、多功能磁分离器
	多肽纳米探针法	水浴锅、多功能磁分离器
细胞制片		离心涂片机
染色鉴定	病理鉴定法	显微镜
	免疫组化和免疫荧光法	显微镜
	荧光原位杂交法	水浴锅、显微镜
	反转录聚合酶链式反应法	离心机、水浴锅
	基因测序法	离心机、测序仪

9 样品制备

9.1 血液样本采集

- 9.1.1 采血前应核对采样者姓名、性别、年龄等信息，准备肝素/EDTA-K2 真空抗凝管。
- 9.1.2 使用前禁止拨开真空采血管帽，采血量可参看采血管标签上的刻度线，并在管签上进行采样者信息标注，采样者及其采集的血样标本应一一对应。
- 9.1.3 采样者应在安静状态下取血，取坐位或卧位，采血部位为前臂肘窝的正中静脉。采血处应避免皮肤红肿、溃疡等现象。采血量以 4mL~15mL 为宜。
- 9.1.4 采血收集完毕后，需立即颠倒混匀采血管不少于 5 次，避免剧烈震荡，以免产生气泡。
- 9.1.5 应于 72h 内进行循环肿瘤细胞检测，以保证检验结果的可靠性。

9.2 样品前处理

9.2.1 密度梯度离心法

- 9.2.1.1 将细胞密度梯度分离液置于 37℃ 水浴 15 min。
注：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。
- 9.2.1.2 将预热的密度梯度分离液依次加入 15mL 离心管中，要求界面清晰可见。
- 9.2.1.3 手握采血管两端，轻缓 180° 翻倒采血管 8~10 次，充分混匀外周血样本。
- 9.2.1.4 取 1mL 混匀的抗凝血，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。
- 9.2.1.5 离心：400g~450g，离心 30 min~40 min。
- 9.2.1.6 离心后要求界面清晰，离心后溶液分为 3 层：上层为血清层，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，下层为红细胞层。
- 9.2.1.7 用吸管去除上层血清后，再将中层目的细胞收集层（6.5 mL~2.5 mL 之间）全部转移至 15mL 离心管中，加入 PBS 定容至 12mL，盖紧管盖，轻缓 180° 翻倒离心管数次，放置于离心机中 300g~350g，离心 5 min~7 min。
- 9.2.1.8 离心后，保留底部约 100 μL 液体。加入适量 PBS 重悬细胞。

9.2.2 红细胞裂解法

- 9.2.2.1 本操作步骤在 4℃ 条件下操作更佳，亦可在室温下操作。
- 9.2.2.2 取 1mL 新鲜抗凝血于离心管中。
- 9.2.2.3 裂解：按照 1:3 比例在离心管中加入 3mL 1×红细胞裂解液，裂解 5min。
- 9.2.2.4 离心：在室温下，500g 离心 5min，弃红色上清液。
- 9.2.2.5 若发现红细胞裂解不完全，可以重复本文件 9.2.2.3 和 9.2.2.4 一次。
- 9.2.2.6 洗涤：加入适量 1×PBS，轻柔混匀重悬沉淀，在室温下，500g 离心 5min。
- 9.2.2.7 离心后去除上清液，用适量 1×PBS 重悬沉淀细胞。

10 样本检测

10.1 检测准备

10.1.1 循环肿瘤细胞捕获探针活化和分散性评估

用镊子夹住管壁，使离心管倾斜45°角，打开超声清洗仪，左右激烈晃动，保持1 min以上，然后进行分散性评估，若分散性评估合格则说明循环肿瘤细胞捕获探针活化完成。

注：取2 μL活化后的循环肿瘤细胞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。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。

10.1.2 吊片放置

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

10.2 循环肿瘤细胞磁分离捕获

10.2.1 无标记捕获探针法

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

10.2.1.2 取适量磁性纳米探针加入 1.5mL 离心管中。

10.2.1.3 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 °C 条件下混匀 6 min~8 min。

10.2.1.4 取出离心管后立即置于多功能磁分离器上，在 4 °C 条件下磁吸附 6 min~8 min。

10.2.1.5 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 °C 条件下磁吸附 8 min~10 min。

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

10.2.2 多肽纳米探针法

10.2.2.1 取混合均匀的抗凝血至离心管中，用 PBS 稀释抗凝血。

10.2.2.2 将多肽纳米探针涡旋混匀后，取 10 μL 多肽纳米探针至 2mL 稀释后的外周血中，混匀后，37°C，孵育 1h。

10.2.2.3 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 30min。

10.2.2.4 洗涤：缓慢吸掉上清液，在多功能磁分离器上，用 PBS 洗涤 2 次~3 次。

10.2.2.5 去除上清液后，将富集细胞用适量 PBS 重悬混匀为细胞混悬液。

10.3 循环肿瘤细胞非磁分离捕获

循环肿瘤细胞非抗体依赖检测中，除磁分离法外，有膜过滤法（见附录C）和微流控芯片法（见附录D）。

10.4 细胞制片

10.4.1 取出干净的载玻片，标记上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。

10.4.2 将 0.1mL~0.5mL 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 rpm 离心 5 min，离心完成后，轻缓取下载玻片。

注：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。

10.5 循环肿瘤细胞染色鉴定

10.5.1 细胞病理鉴定法

细胞病理染色鉴定步骤操作如下：

- a) 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 10min~15min；
- b) 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 1min~2min；
- c) 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；
- d) 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；
- e) 识别：在 100 倍显微镜下，根据细胞病理学特征识别肿瘤细胞。

10.5.2 免疫组化和免疫荧光法

10.5.2.1 免疫组化法操作如下：

- a) 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 10min~20min，将细胞片浸入 PBS 缓冲液中清洗 3 次，每次 5min；
- b) 通透（针对包内抗原）：用 0.2% Triton X-100 通透细胞 10min，用 PBS 缓冲液漂洗 3 次，每次 5min；
- c) 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/5min；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 30min；
- d) 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，常温或 37℃ 湿盒孵育 1h~2h，弃去一抗，用 PBS 缓冲液漂洗 3 次，每次 5min；
- e) 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 0.5h~1h，弃去二抗，将片子浸入 PBS 缓冲液中清洗 3 次，每次 5min；
- f) DAB 显色：组化用 DAB 显色：将配置好的 DAB 显色液滴加到反应位置，显色 5min~10 min，见细胞区域变黄后冲洗掉多余的 DAB；
- g) 细胞染色：将片子置于苏木素中 1min，染色后冲洗；再置于分化液体中，立即取出并冲洗；最后放入热水中 1min，用封片剂封片，光学显微镜下观察染色识别肿瘤细胞。

10.5.2.2 免疫荧光法操作如下：

- a) 与免疫组化法步骤中 a)、b)、c)、d) 同；
- 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 0.5h~1h，弃去二抗，将片子浸入 PBS 缓冲液中避光清洗 3 次，每次 5min；
- c) 复染：滴加 DAPI 染液染核，2min~3min 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。

10.5.3 荧光原位杂交法

荧光原位杂交法操作如下：

- 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 5min；
- c) 消化：滴加适量 0.04%胃蛋白酶溶液，室温消化细胞 10min~20min，2×SSC 缓冲液中浸泡洗涤 2 次，每次 5min；
- d) 脱水：70%、85%和 100%梯度乙醇依次梯度脱水，各 5min，室温晾干；
- d) 杂交：在暗室，取出探针（CEP3/CEP7、p16/CEP17），室温静置 5min，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 2h，或 88℃变性 2min；
- e) 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 0.5min 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~

2min;取出片子浸入提前 68℃ 预热的杂交后洗涤液(0.4×SC/0.3% NP-40)中洗涤 2 min~5min;取出片子浸入提前预热的去离子水中洗涤 1min,在暗处自然干燥片子;

- f) 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 10min~20min,在荧光显微镜下观察识别肿瘤细胞,不能立刻检查,应置于-20℃条件下保存。

10.5.4 反转录聚合酶链式反应法(RT-PCR)

10.5.4.1 RNA 提取步骤如下:

- 细胞匀浆化:取富集的细胞混悬液,400g 离心 5min,加入适量 Trizol 反复吹打,溶解细胞;
- 分离 RNA:加入适量氯仿/Trizol,盖好 EP 管上下颠倒剧烈震荡,4℃条件下,13400g 离心 15min,样品会分为三层:有机相、中间层和上层无色的水相(RNA 在水相中),收集上清;
- 沉淀 RNA:上清中加入等量异丙醇,颠倒 5 次,室温静置 10min,4℃条件下,13400g 离心 15min,离心后在离心管管侧和管底形成胶状沉淀,弃去上清;
- RNA 的洗涤脱盐:加 75%乙醇(用 DEPC 水配制)轻弹底部洗涤沉淀,4℃条件下,9390g 离心 5min,弃去上清;
- RNA 的干燥和再溶解:取出滤纸,将 EP 管敞开放在滤纸上,管口向酒精,但不要完全干燥;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 28s、18s 和 5s 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℃冰箱。

10.5.4.2 逆转录反应操作如下:

- 用紫外分光光度计确定 RNA 浓度并定量;
- 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 250pmol 随机引物,2 μL 2.5mmol/L 的 dNTP 以及 10 μL 无 RNA 酶 H₂O 混匀,瞬时离心后于 70℃中 5min,冰浴中淬冷;
- 逆转录:然后加入 2μL 10×逆转录缓冲液,1U/ul 逆转录酶,1U/ul RNA 酶抑制剂,混匀,瞬时离心后 42℃反应 60min,95℃加热 10min 灭活逆转录酶,-20℃保存。

10.5.4.3 PCR 扩增:

- 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,10M 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 1.0ul。
- PCR 扩增条件:94℃预变性 2min,94℃变性 20s,55℃退火 30s,60℃延伸 40s,45 个循环。
- 循环扩增反应结束后查看扩增曲线及 Ct 值。

注: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。

10.5.5 基因测序法

10.5.5.1 DNA 提取步骤如下:

- 将 1ml EDTA 抗凝-20℃冻存血液室温解冻后用预冷红细胞裂解液裂解,重复 1 次;
- 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;
- 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;
- 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;
- 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;
- 加入 1/5 体积醋酸钠混匀,再加入 2 倍体积-70℃预冷无水乙醇,混匀出现白色絮状,离心收集沉淀;
- 用 2ml 的 70%乙醇洗涤 2 次,室温挥发干燥,但不能使 DNA 完全干燥;
- 加灭菌的 TE (pH 7.4~8.4) 缓冲溶液 20ul~50ul 溶解 DNA,-20℃保存。

10.5.5.2 PCR 扩增与 10.5.4.3 步骤一致。

10.5.5.3 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。

11 测定结果有效性判定

11.1 细胞病理鉴定法

11.1.1 病理学中不同类型的肿瘤细胞主要有以下六项形态特征：

- a) 细胞尺寸大，长直径大于 15 μm ；
- b) 细胞核质比高，大于 0.8；
- c) 细胞质内常见空泡或脂肪粒；
- d) 细胞核深染且染色不均，核仁明显；
- e) 核形态不一，可为巨核、双核或多核；
- f) 细胞表面褶皱或边界清楚。

11.1.2 如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。

11.2 免疫组化和免疫荧光法

11.2.1 测定结果有效性如下：

- a) 阳性对照：正确结果呈现阳性，即具有酶底物显色或有发射阳性抗原标记荧光，如 EpCAM、CK19 等。阳性对照为证实含有靶抗原的细胞涂片，可证实免疫细胞化学染色流程的有效性，排除假阴性；
- b) 阴性对照：正确结果呈现阴性，即无酶底物显色或发射阴性抗原标记荧光。阴性对照为证实不含有靶抗原的细胞对照，可以排除假阳性；
- c) 以上要求需要在同一次实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新实验。

11.2.2 具有酶底物显色（棕色或红色）或仅有发射阳性抗原标记荧光的细胞（可根据抗原表达强度及数量，用+，++，+++进行相应结果描述）为肿瘤细胞；未出现酶底物显色（棕色或红色）或仅有发射阴性抗原标记荧光的为正常细胞；肿瘤细胞和正常细胞需同时具有细胞核染色。

11.3 荧光原位杂交法

11.3.1 测定结果有效性如下：

- a) 阳性对照：细胞呈现染色体异常荧光信号（基因删除/扩增、基因融合或基因重排）；
- b) 阴性对照：细胞呈现染色体正常荧光信号；
- c) 以上要求需要在同一次实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新实验。

11.3.2 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：

- a) 基因删除/扩增探针：胞内荧光点 >2 或 <2 为阳性肿瘤细胞；胞内为 2 个荧光点为正常细胞；
- b) 融合探针：绿色与橙色荧光融合在一起为阳性肿瘤细胞；绿色与橙色荧光点分开分布为正常细胞；
- c) 重排探针：绿色和红色荧光点分开为阳性肿瘤细胞；绿色和红色荧光点在一起分布为正常细胞。

11.4 反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）

11.4.1 测定结果有效性如下：

- a) 阳性对照：有典型 S 型扩增曲线（确定扩增体系有效）；
- b) 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）；
- c) PCR 熔解曲线是单峰曲线；
- d) 扩增曲线指数扩增区域，复孔之间 CT 值 STD<0.2；
- e) 阈值设置合理（设置在指数增长区）；
- f) 扩增效率在 90%~110%之间。

注：以上要求需要在同一次实验中同时满足，否则本次PCR实验无效，需重新实验。

11.4.2 结果判定：阴性： $F \leq A$ ，其中 $F=2^{-\Delta\Delta Ct}$ ；阳性： $F > A$ 。

注：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。

11.5 基因测序法

11.5.1 测定结果有效性如下：

- a) 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；
- b) 若单个峰的一个位点出现多个峰，表明测序结果无效。

11.5.2 结果判定：阳性：检测到特定基因（如 EGFR、Her2 等）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%）；阴性：未检测到特定基因突变。

12 测定结果表述

12.1 细胞病理鉴定法

12.1.1 应用本方法在 2 mL 血样中检出单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇即为阳性，在恶性实体肿瘤中循环肿瘤细胞 ≥ 5 个时，提示临床预后差。

12.1.2 应用本方法在 2 mL 血样中进行检测，未检测到单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇即为阴性，提示检测样本无循环肿瘤细胞。

12.1.3 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。

12.2 免疫组化和免疫荧光法

12.2.1 应用本方法在 2 mL 血样中检出抗原阳性（如 EpCAM、CK19 等）的单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇。

12.2.2 应用本方法在 2 mL 血样中未检测出抗原阳性（如 EpCAM、CK19 等）的单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇。

12.3 荧光原位杂交法

12.3.1 应用本方法在 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）的单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇。

12.3.2 应用本方法在 2 mL 血样中未检测出染色体异常（基因删除/扩增、基因融合或基因重排）的单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇。

12.4 反转录聚合酶链式反应法（RT-PCR）

12.4.1 应用本方法在 2 mL 血样中检出特定生物标志物（如 EpCAM、CK19 等）扩增异常/表达异常的循环肿瘤细胞。

12.4.2 应用本方法在 2 mL 血样中未检出特定生物标志物（如 EpCAM、CK19 等）扩增异常/表达异常的循环肿瘤细胞。

12.5 基因测序法

12.5.1 应用本方法在 2 mL 血样中检出具有特定基因突变（如 EGFR、Her2 等）的循环肿瘤细胞。

12.5.2 应用本方法在 2 mL 血样中未检出具有特定基因突变（如 EGFR、Her2 等）的循环肿瘤细胞。

注：以上不同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于诊断测试（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。

13 灵敏度、精密度和特异性

13.1 灵敏度

本方法的灵敏度一般应为 ≥ 1 个/mL，应可检测出单个循环肿瘤细胞、白细胞群围绕的循环肿瘤细胞或循环肿瘤细胞团簇三种亚型。

13.2 精密度

应用本方法对同一份血液样品进行检测 ≥ 3 次，循环肿瘤细胞数量应在同一结果评价范围内。

13.3 特异性

生理条件下的其他细胞不影响本方法循环肿瘤细胞的检测结果，检测特异性 $\geq 95\%$ 。

14 安全保证与质量控制

14.1 人工操作安全

遵守GB 19489的规定。处理血液的全部操作应戴乳胶一次性手套，口罩和实验帽，同时避免因交谈或其他活动造成的飞沫、落尘带入的污染，必要的情况下或在超净工作台中进行操作。

14.2 试剂材料防止污染

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，不能混用。所有接触试剂和材料都应保持无菌，一旦有微生物污染应丢弃。

附录 A
(规范性)
循环肿瘤细胞磁分离检测操作参考示例

A.1 样品前处理

按照9.2.1的处理步骤对血样进行离心，得到的样品示例见图A.1。

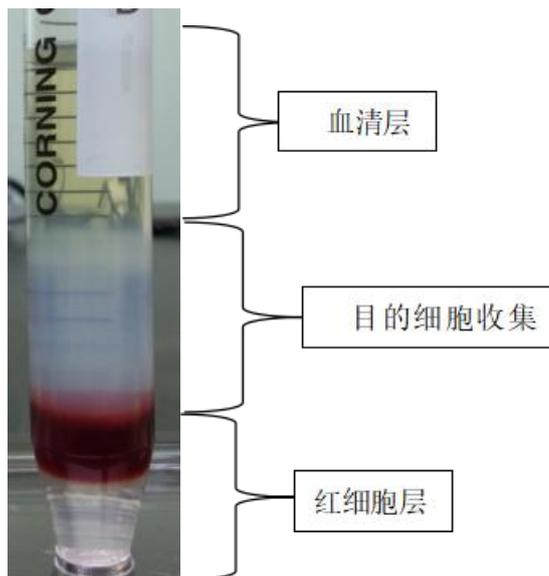


图 A.1 血样样品示例图

A.2 循环肿瘤细胞捕获探针准备

按照10.1.1的方法对循环肿瘤细胞捕获探针进行活化处理后，进行循环肿瘤细胞捕获探针的分散性评估，以检验循环肿瘤细胞捕获探针的质量，具体操作方法和分散性评估示例见图A.2。

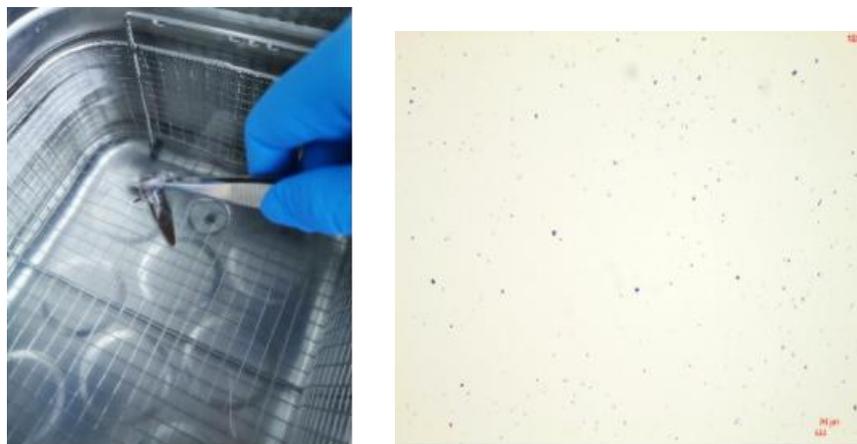


图 A.2 活化循环肿瘤细胞捕获探针操作示例图（左），循环肿瘤细胞捕获探针载玻片示例图（右）

A.3 吊片放置

吊片放置的顺序示例见图A.3，吊片对扣示例见图A.4，吊片在涂片机中放置示例见图A.5。



图 A.3 吊片放置顺序示例图

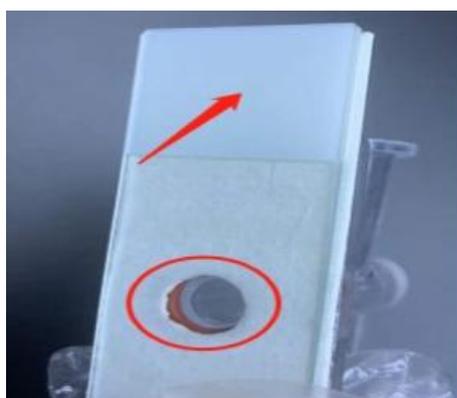


图 A.4 吊片对扣示例图



图 A.5 吊片在涂片机中放置示例图

A.4 循环肿瘤细胞染色鉴定

按照10.5.1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A.6。

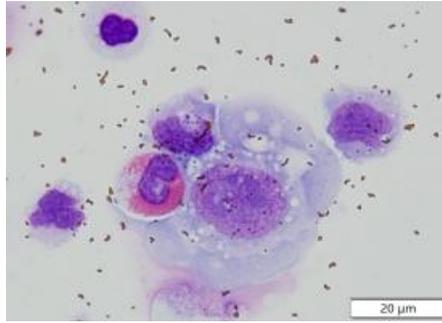


图 A.6 染色结果示例图

A.5 采图操作

A.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。

A.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A.7。



图 A.7 标签示例图

附录 B

(规范性)

不同检测阶段对应不同方法的试剂和材料及试剂配制方法

B.1 试剂和材料

不同检测阶段对应不同方法的试剂和材料见表B.1所示。

表 B.1 不同检测阶段对应不同方法的试剂和材料

检测阶段	方法	试剂	材料
样品前处理	密度梯度离心法	磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	巴斯德吸管、离心管
	红细胞裂解法	红细胞裂解液 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	巴斯德吸管 离心管
循环细胞捕获	无标记捕获探针法	无标记捕获探针 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	单道移液器枪头 离心管
	多肽纳米探针法	多肽纳米探针 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	巴斯德吸管 离心管
细胞制片		-	粘附载玻片、盖玻片
染色鉴定	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
	免疫组化和免疫荧光法	细胞固定液 磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 苏木素 BSA封闭液	巴斯德吸管
	荧光原位杂交法	细胞固定液 柠檬酸钠缓冲液 (SCC) 乙醇 磷酸缓冲盐溶液 (PBS)	巴斯德吸管 离心管 粘附载玻片 盖玻片
	反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
	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

B.2 试剂配制方法

B.2.1 1×磷酸盐缓冲液 (1×PBS, 0.01M, pH值: 7.2~7.4)

分别称取0.27g磷酸二氢钾 (KH_2PO_4)、1.42g磷酸氢二钠 (Na_2HPO_4)、8g氯化钠 (NaCl) 和0.2g氯化钾 (KCl) 于烧杯中, 向烧杯中加入800mL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1L, 高温高压灭菌后, 室温保存。

B.2.2 密度梯度分离液 (浓度: 50%~60%, pH 值: 7.2~7.4)

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

B.2.3 1×红细胞裂解液 (pH 值: 7.2~7.4)

B.3.1 分别称取 80g 氯化铵 (NH_4Cl)、10g 碳酸氢钾 (KHCO_3)、3.7g EDTA- Na_2 盐溶于 900mL 蒸馏水中, 搅拌至完全溶解。

B.3.2 用盐酸或氢氧化钠调节 pH 至 7.2~7.4, 加蒸馏水定容至 1L, 用 0.22 μm 的滤器过滤后 4℃ 储存 (10×红细胞裂解液)。

B.3.3 将 10×储存液稀释 10 倍得到 1×红细胞裂解液。

B.2.4 细胞固定液 (4%多聚甲醛, pH 值: 7.4)

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

B.2.5 细胞质染色液 (伊红染色液, 浓度: 0.3% (w/v), pH 值: 4.7~5.0)

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

B.2.6 细胞核染色液 (亚甲蓝染色液, 浓度: 1% (w/v))

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

B.2.7 2×柠檬酸钠缓冲液 (2×SCC, pH 值: 7.0)

B.7.1 称取 175.2g 氯化钠, 88.2g 柠檬酸钠二水, 溶于 800mL 去离子水中, 搅拌均匀。

B.7.2 加入氢氧化钠溶液 (10mol/L) 调节 pH 值至 7.0, 加去离子水定容至 1L 得到 20×SCC。

B.7.3 高温高压灭菌后, 将 20×SCC 稀释 10 倍后得到 2×SCC。

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循环肿瘤细胞过滤掉，将体积较大的循环肿瘤细胞截留在滤膜上，实现CTC与其他血液成分的有效分离。

C.2 试剂材料及设备仪器

- C.2.1 氯化钠溶液。
- C.2.2 细胞固定液。
- C.2.3 磷酸缓冲盐溶液（PBS）。
- C.2.4 巴斯德吸管。

C.3 操作步骤

- C.3.1 取 5mL 混匀的抗凝血至离心管中。
- C.3.2 400g，离心 10min，离心，400g，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 18mL~25mL 固定液中，混匀，固定 15min。
- 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循环肿瘤细胞被截留在滤膜上。
- 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，将富集有循环肿瘤细胞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循环肿瘤细胞的非抗体依赖的分离富集,白细胞和循环肿瘤细胞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 试剂材料及设备仪器

D.2.1 磷酸缓冲盐溶液(PBS)。

D.2.2 巴斯德吸管。

D.2.3 微流控芯片仪器。

D.3 微流控芯片法操作步骤

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 15mL PBS 缓冲液,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 120mL/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。