



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110907644 B

(45) 授权公告日 2023.01.06

(21) 申请号 201911265615.6

CN 109406789 A, 2019.03.01

(22) 申请日 2019.12.11

CN 211179515 U, 2020.08.04

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 107904204 A, 2018.04.13

申请公布号 CN 110907644 A

CN 103602633 A, 2014.02.26

(43) 申请公布日 2020.03.24

CN 1882687 A, 2006.12.20

(73) 专利权人 深圳市达科为生物工程有限公司

CN 101426902 A, 2009.05.06

地址 518000 广东省深圳市坪山区坑梓街

CN 102858376 A, 2013.01.02

道金辉路14号深圳市生物医药创新产

US 2013031666 A1, 2013.01.31

业园区1号楼702、703

WO 2017183946 A1, 2017.10.26

(72) 发明人 何志昂 姜维 吴庆军

黄立锋等. 大鼠CD4+CD25+调节性T细胞的分离及功能鉴定.《感染.炎症.修复》.2008,第9卷(第03期),

(51) Int. Cl.

Katsunori Uchida MD, ET AL.. ΔNp63

G01N 33/569 (2006.01)

(p40) expression in prostatic

G01N 33/574 (2006.01)

adenocarcinoma with diffuse p63

G01N 33/543 (2006.01)

positivity..《Human Patholog》.2015,

(56) 对比文件

审查员 张绚

JP 2009148236 A, 2009.07.09

CN 102321760 A, 2012.01.18

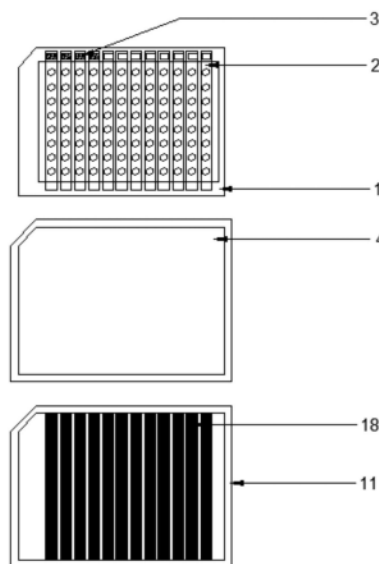
权利要求书1页 说明书8页 附图4页

(54) 发明名称

多种细胞鉴定试剂盒及操作方法

(57) 摘要

本发明涉及一种多种细胞鉴定试剂盒及操作方法。该试剂盒包括试验孔板和分别容纳活细胞染色剂和清洗剂的试剂瓶,所述试验孔板包括孔板架和可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条包被可拆板条。另外,该试剂盒还包括可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条未包被可拆板条、位于所述孔板架下方并与可其贴合设置的孔板磁力底座以及容纳磁珠偶联抗体、细胞通透剂、死细胞染色剂的试剂瓶。本发明还涉及多种细胞鉴定试剂盒的操作方法。利用本发明的试剂盒能够快速、准确地鉴定MSC细胞、NK细胞、CIK细胞、肺癌细胞、前列腺癌细胞等多种细胞,且具有操作步骤简单、结果易判断和适用样本广等优点。



1. 一种用于操作多种细胞鉴定试剂盒的方法,其特征在于所述试剂盒包括试验孔板和分别容纳活细胞染色剂和清洗剂的试剂瓶,所述试验孔板包括孔板架和可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条包被可拆板条,其中所述包被可拆板条上包被有抗CD45、CD105、CD34、CD90、CD73、CD3、CD56、CEA和CA125的抗体,所述活细胞染色剂为MTT,所述清洗剂为PBS;其中所述活细胞染色剂还含有1-5重量%苏木素,还包括可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条未包被可拆板条、位于所述孔板架下方并与其贴合设置的孔板磁力底座以及分别容纳磁珠偶联抗体、细胞通透剂和死细胞染色剂的试剂瓶;所述孔板底座有多个磁力条,所述磁珠偶联的抗体为抗PSA、p63和p40抗体,所述细胞通透剂为Triton-X或二甲苯,所述死细胞染色剂为台盼蓝;所述操作办法包括以下步骤: 1) 向包被可拆板条加入待检测细胞和对照细胞的培养悬液,向包被可拆板条中的1个待测孔加入PBS作为空白对照孔,在30-45℃孵育10-30min; 2) 用清洗剂清洗,加入活细胞染色剂在30-45℃孵育5-15min,再次用清洗剂清洗,加入50-150 μl DMSO并观察所产生的颜色; 3) 将所述细胞鉴定试剂盒置于酶标仪上,读取波长490nm下的吸光值,并根据下式计算待测孔的细胞阳性率: 待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值); 4) 根据步骤2)和步骤3)的结果鉴定待检测细胞的类型; 如果含有抗CD3抗体的包被可拆板条为无色,含有抗CD56抗体的包被可拆板条为紫色,且CD3表达阳性率≤10%,CD56表达阳性率≥40%,则确定待测细胞为NK细胞; 如果含有抗CD3、CD56抗体的包被可拆板条为紫色,且CD3、CD56表达阳性率≥40%,则可确定待测细胞为CIK细胞; 如果含有抗CEA、CA125抗体的包被可拆板条为紫色,且CEA、CA125表达阳性率≥20%,则确定待测细胞为肺癌细胞; 所述操作方法还包括以下步骤: 1) 向未包被可拆板条加入检测细胞与对照细胞培养悬液,加入等体积细胞通透剂,然后加入磁珠偶联抗PSA、p63和p40抗体混匀,在30-45℃孵育10-30min; 2) 将试验孔板放入孔板磁力底座,静置2-10min,倒掉悬液并用清洗剂清洗待测孔; 3) 向待测孔中加入5-20μl死细胞染色剂,观察所产生的颜色; 如果观察到含有抗PSA、p63和p40抗体的包被可拆板条均显示为蓝色,则确定待测试细胞为前列腺癌细胞; 所述操作方法不用于疾病的诊断和/或治疗。

多种细胞鉴定试剂盒及操作方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞鉴定领域,尤其是涉及一种能够鉴定多种细胞的试剂盒及操作方法。

背景技术

[0002] 目前细胞诱导、癌细胞诊断等常用的诊断方法是流式细胞术、酶联免疫法、免疫组化法。

[0003] 流式细胞术通过荧光耦合的抗体标记目的细胞检测荧光信号来进行细胞鉴定,需要使用荧光染料与流式细胞仪配套使用,导致检测成本增加。另外,荧光抗体需避光保存,荧光易淬灭造成检测结果不准确,因此,检测者需要掌握流式细胞仪操作方法与数据处理分析的专业知识。

[0004] 对于酶联免疫法,需要同时检测抗体与包被抗体两种抗体,从而使得成本增加。另外,检测物是细胞分泌物或细胞裂解液而非细胞本身,操作步骤较为繁杂。

[0005] 免疫组化法需要对细胞组织进行包埋切片,染色步骤虽然可以手动操作,但仍需要使用切片机、摊片机、包埋机、显微镜等,导致检测成本增加。同时,免疫组化需要使用一抗二抗两种抗体以及配套染色液、抗原封闭液、抗原修复液等,检测成本增加。另外,免疫组化步骤包括包埋、切片、烤片、脱蜡、修复、阻断、封闭、加一抗、加二抗、显色、复染、脱水透明、封片等操作极为繁杂,并且显微镜结果的判断需要专业知识人员判断。

[0006] 因此,在本领域中仍然需要一种能够以简单有效的方式及时、快速且准确鉴定多种细胞的技术手段。

发明内容

[0007] 针对现有技术存在的不足,本发明的一个目的在于提供一种能够以简单有效的方式及时、快速且准确地鉴定多种细胞的细胞鉴定试剂盒。所述多种细胞包括但不限于间充质干细胞(MSC)、自然杀伤(NK)细胞、细胞因子诱导杀伤(CIK)细胞、肺癌细胞和前列腺癌细胞。

[0008] 上述目的通过以下方案来实现:

[0009] 在第一方面,一种多种细胞鉴定试剂盒,其包括试验孔板和分别容纳活细胞染色剂和清洗剂的试剂瓶,所述试验孔板包括孔板架和可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条包被可拆板条。在一个优选方案中,所述试验孔板还包括与所述孔板架盖合的孔板盖。在一个优选方案中,所述包被可拆板条上可包被有抗体CD45、CD105、CD34、CD90、CD73、CD3、CD56、CEA、CA125中的一种或多种。

[0010] 在该技术方案中,利用所提供的多种细胞鉴定试剂盒,能够利用细胞膜标志物来鉴定多种细胞,例如MSC细胞、NK细胞、CIK细胞和肺癌细胞。具体而言,通过不同的包被可拆板条包被不同的捕获抗体,能够捕获悬浮细胞中的目标细胞,然后用洗涤液去掉杂细胞,利用活细胞染色剂使被捕获的目标细胞染色,通过显色与否来判断标志物的阴阳性,最后通

过酶标仪测对照组与检测组的吸光值可分析判断细胞的阳性率。

[0011] 进一步地,根据前述第一方面所述的多种细胞鉴定试剂盒,所述活细胞染色剂可以为3-(4,5-二甲基噻唑-2)-2,5-二苯基四氮唑溴盐(噻唑蓝,简称MTT),所述清洗剂可以为磷酸盐缓冲溶液(PBS)。在一个优选方案中,所述活细胞染色剂还包含0.5-5重量%苏木素,优选1重量%、1.5重量%、2重量%、2.5重量%、3重量%、3.5重量%、4重量%、4.5重量%苏木素。

[0012] 进一步地,根据前述第一方面所述的多种细胞鉴定试剂盒,其还包括可拆卸设置在所述孔板架内且带有多个待测孔的多条未包被可拆板条、位于所述孔板架下方并与可其贴合设置的孔板磁力底座以及容纳磁珠偶联抗体、细胞通透剂、死细胞染色剂的试剂瓶。在一个优选方案中,所述孔板磁力底座上设置有多个磁力条,所述磁珠偶联抗体可为PSA、p63或p40,所述细胞通透剂可以为Triton-X二甲苯,所述死细胞染色剂可以为台盼蓝。

[0013] 在该方案中,所述多种细胞鉴定试剂盒利用细胞质、细胞核标志物来鉴定细胞。具体而言,通过细胞通透剂使细胞膜通透性增加,磁珠偶联抗体进入细胞内,通过孔板磁力底座吸目的细胞,洗涤液去掉杂细胞,死细胞染色液使被捕获细胞染色,通过显色与否判断标志物的阴阳性。

[0014] 进一步地,根据前述第一方面所述的多种细胞鉴定试剂盒,其中所述试验孔板为96孔板或48孔板。

[0015] 在第二方面,提供了一种用于操作根据前述第一方面所述的多种细胞鉴定试剂盒的方法,其包括以下步骤:

[0016] 向包被可拆板条与未包被可拆板条分别加入待检测细胞和对照细胞的培养悬液,向包被可拆板条中的1个待测孔加入PBS作为空白对照孔,在30-45℃孵育10-30min;

[0017] 用清洗剂清洗,加入活细胞染色剂在30-45℃孵育5-15min,再次用清洗剂清洗,加入50-150 μ l DMSO并观察所产生的颜色;

[0018] 3) 将所述细胞鉴定试剂盒置于酶标仪上,读取波长490nm下的吸光值,并根据下式计算待测孔的细胞阳性率:

[0019] 待测孔的细胞阳性率 = (待测孔的平均吸光值 - 空白对照的平均吸光值) / (阳性对照的平均吸光值 - 空白对照的平均吸光值);

[0020] 4) 根据步骤2) 和步骤3) 的结果鉴定待检测细胞的类型。

[0021] 在前述方案中,DMSO用作溶解细胞显色结晶的溶剂。通过加入DMSO,能够使显色均一且较为显著,从而利用实验室比较常用的酶标仪检测,而不需要使用诸如流式细胞仪等昂贵的仪器来进行检测。

[0022] 根据前述第二方面所述的方法,在步骤4) 中,如果含有CD45、CD105的包被可拆板条为无色且含有CD34、CD90、CD73的包被可拆板条为紫色,且CD45、CD105表达阳性率 \leq 10%;CD34、CD90、CD73表达阳性率 \geq 90%,则可确定待测细胞为MSC细胞。

[0023] 根据前述第二方面所述的方法,在步骤4) 中,如果含有CD3的包被可拆板条为无色,含有CD56的包被可拆板条为紫色,且CD3表达阳性率 \leq 10%,CD56表达阳性率 \geq 40%,则可确定待测细胞为NK细胞。

[0024] 根据前述第二方面所述的方法,在步骤4) 中,如果含有CD3、CD56的包被可拆板条为紫色,且CD3、CD56表达阳性率 \geq 40%,则可确定待测细胞为CIK细胞。

[0025] 根据前述第二方面所述的方法,在步骤4)中,如果含有CEA、CA125的包被可拆板条为紫色,且CEA、CA125表达阳性率 $\geq 20\%$,则可确定待测细胞为肺癌细胞。

[0026] 在一个替代方案中,如果含有CD45、CD105的包被可拆板条为无色且含有CD34、CD90、CD73的包被可拆板条为紫色,且CD34、CD45表达阳性率 $\leq 10\%$;CD90、CD73、CD105表达阳性率 $\geq 90\%$,则可确定待测细胞为MSC细胞。

[0027] 在第三方面,提供了一种用于操作根据前述第一方面所述的多种细胞鉴定试剂盒的方法,其包括以下步骤:

[0028] 1) 向未包被可拆板条加入检测细胞与对照细胞培养悬液,加入等体积细胞通透剂,然后加入磁珠偶联抗体PSA、p63和p40混匀,在30-45℃孵育10-30min;

[0029] 2) 将试验孔板放入孔板磁力底座,静置2-10min,倒掉悬液并用清洗剂清洗待测孔;

[0030] 3) 向待测孔中加入5-20 μ l死细胞染色剂,观察所产生的颜色。

[0031] 根据前述第三方面所述的方法,在步骤3)中,如果观察到含有PSA、p63和p40的包被可拆板条均显示为蓝色,则可确定待测试细胞为前列腺癌细胞。

[0032] 通过上述方法,与现有技术相比,本发明能够实现如下良好的技术效果:

[0033] 1) 通过不同检测条组合显示鉴定指标的阴性或阳性来鉴定细胞,其替代了目前惯常使用的流式细胞术中的荧光显色法,这是细胞鉴定方面的重大改进;

[0034] 2) 本发明降低了成本,只使用了捕获抗体与简单的细胞试剂,不需要配套昂贵仪器;

[0035] 3) 本发明操作步骤简单,只需要加入待检细胞、孵育、洗涤、显色即完成操作;

[0036] 4) 本发明结果易判断,不需要专业知识的数据分析,可通过肉眼观察对应孔板显色的有无来判断检测指标的阴阳性;

[0037] 5) 本发明的适用样本广,可检测贴壁细胞、悬浮细胞、组织细胞等。

附图说明

[0038] 以下将结合附图来具体描述本发明的一些优选实施方式。本领域的普通技术人员将会理解,这些附图仅用于举例说明的目的,而无意于以任何方式来限制本发明的范围。

[0039] 图1为根据本发明一个实施方案的试验孔板的分解结构示意图;

[0040] 图2为根据本发明一个实施方案的多种细胞鉴定试剂盒的操作方法示意图;

[0041] 图3为根据本发明一个实施方案进行磁珠偶联测试的方法示意图;

[0042] 图4为根据本发明一个实施方案利用人外周淋巴细胞为阳性对照细胞来鉴定MSC细胞的结果图;

[0043] 图5为根据本发明一个实施方案利用人外周淋巴细胞为阳性对照细胞来鉴定NK细胞和CIK细胞的结果图;

[0044] 图6为根据本发明一个实施方案利用人外周淋巴细胞为阳性对照细胞来鉴定肺癌细胞的结果图;

[0045] 图7为根据本发明一个实施方案利用人外周淋巴细胞为阳性对照细胞来鉴定前列腺细胞的结果图。

[0046] 附图标记说明:1.孔板架;2.包被可拆板条;3.未包被可拆板条;4.孔板盖;5.抗

体;6.细胞;7.活细胞染色剂;8.细胞通透剂;9.死细胞染色剂;10.清洗剂;11.孔板磁力底座;16.磁珠偶联抗体;17.磁珠;18.磁力条。

具体实施方式

[0047] 以下将结合附图和实施例来描述本发明的一些具体实施方式。本领域的普通技术人员会理解,提供这些实施例的目的仅仅是为了举例说明如何能够实施本发明的方案,而非以任何方式限制本发明的范围。

[0048] 目前细胞诱导、癌细胞诊断等常用的诊断方法是流式细胞术、酶联免疫法、免疫组化法,但是这些方法分别存在各自的缺点,而无法以准确且简单的方式来快速鉴定细胞。为此,本申请的发明人经过大量实践,获得了一种能够非常简单、快速且廉价地鉴定多种细胞的多种细胞鉴定试剂盒,从而成功解决了本领域长久以来期望解决的技术问题。

[0049] 具体而言,本发明提供了一种多种细胞鉴定试剂盒(例如,参见图1),其能够根据鉴定标志物所在的位置而能够对多种细胞进行鉴定。例如,当鉴定标志物位于细胞膜表面时,利用试剂盒中的活细胞染色剂,能够对活细胞进行染色来鉴定MSC细胞、NK细胞、CIK细胞、肺癌细胞等;当鉴定标志物位于细胞质或细胞核内时,利用试剂盒中的死细胞染色及磁珠偶联抗体作用来鉴定前列腺癌细胞。本发明提供的试剂盒具有操作步骤简单、结果易判断和适用样本广等诸多优点。

[0050] 图2示意性示出了利用本发明一个实施方案进行细胞检测和鉴定的操作方法。例如,可以往板孔中添加活细胞染色剂7和细胞通透剂8来进行活细胞染色,或者是可以往孔板中添加死细胞染色剂9来进行死细胞染色,从而进行活细胞或死细胞染色反应。

[0051] 图3为根据本发明一个实施方案进行磁珠偶联测试的方法示意图。在图5中,当细胞6与磁珠偶联抗体在板条2的待测孔中结合之后,在带有磁力条18的孔板磁力底座11的吸附作用下聚集在待测孔底部。

[0052] 下面将结合实施例对本发明的试剂盒及操作方法进行更为详细的描述和说明。本领域的普通技术人员将会理解,提供这些实施例的目的只是用于示例性说明的目的,即使本领域的普通技术人员能够更好地理解本发明是如何实施的,而不是对本发明的范围构成任何限制。

[0053] 实施例1:鉴定间充质干细胞(MSC)细胞

[0054] 将待鉴定的MSC细胞悬液离心重悬并调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,轻微吹打混合均匀,用200 μ l移液枪吸取MSC细胞悬液加入到细胞鉴定试剂盒中包被有CD45、CD105、CD34、CD90、CD73抗体的板条中,每个板条加2个孔重复对照,加入量为100 μ l/孔。不同抗体包被的板条设置1个空白对照孔,空白对照孔加入100 μ l/孔的PBS。设置CD45板条中的三个孔为阳性对照孔,每个阳性对照孔加入100 μ l的 1×10^6 个/ml的淋巴细胞。孔板置于37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0055] 将孵育后的细胞鉴定试剂盒倒立在滤纸上轻拍3下,加入清洗剂PBS清洗2次,加入量为100 μ l/孔,倒立在滤纸上轻拍去掉PBS。

[0056] 每孔加入10 μ lMTT+1%苏木素(5mg/ml)于37 $^{\circ}$ C孵育10min,倒掉用清洗剂PBS清洗1次,倒掉并每孔加入100 μ lDMSO。若待测细胞为MSC细胞时,则CD45、CD105的包被可拆板条应无色,含有CD34、CD90、CD73的包被可拆板条应为紫色。此时的结果见图4。

[0057] 将细胞鉴定试剂盒至于酶标仪上,设置检测波长为490nm读取吸光值,待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值),若待测细胞为MSC细胞时,则CD45、CD105表达阳性率应 $\leq 10\%$; CD34、CD90、CD73表达阳性率应 $\geq 90\%$ 。此时的检测结果见下表1。

[0058] 表1:MSC细胞检测结果

Elisa 吸光值						
	CD45	CD105	CD34	CD90	CD73	阳性对照 CD45
测试1	0.12	0.11	1.25	1.15	1.18	1.33
测试2	0.11	0.12	1.21	1.26	1.27	1.34
空白对照	0.05	0.04	0.06	0.05	0.05	0.04
[0059]						
阳性百分比	5.17%	5.17%	93.90%	91.91%	93.50%	100%
阳性判定	-	-	+	+	+	+
鉴定 MSC 细胞, 阳性对照细胞为人外周血淋巴细胞 待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值),若待测细胞为 MSC 细胞时,则 CD45、 CD105 表达阳性率应 $\leq 10\%$; CD34、CD90、CD73 表达阳性率应 $\geq 90\%$						

[0060] 从上表1的结果可见,CD45、CD105表达阳性率分别为5.17(均 $\leq 10\%$); CD34、CD90、CD73表达阳性率分别为93.90%、91.91%和93.50%(均 $\geq 90\%$)。因此,可以确认所测试的细胞为MSC细胞。

[0061] 实施例2:鉴定自然杀伤(NK)细胞与细胞因子诱导杀伤(CIK)细胞将待鉴定的细胞悬液离心重悬并调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,轻微吹打混合均匀,用200u1移液枪吸取待测细胞悬液加入到细胞鉴定试剂盒的CD3、CD56抗体包被的板条中,每个板条加2个孔重复对照,加入量为100u1/孔。不同抗体包被的板条设置1个空白对照孔,空白对照孔加入100u1/孔的PBS。设置CD45板条中的三个孔为阳性对照孔,每个阳性对照孔加入100u1的 1×10^6 个/ml的淋巴细胞。孔板置于37℃孵育30min。

[0062] 将孵育后的细胞鉴定试剂盒板块倒立在滤纸上轻拍3下,加入清洗剂PBS清洗2次,加入量为100u1/孔,倒立在滤纸上轻拍去掉PBS。

[0063] 每孔加入10u1活细胞染色剂MTT+1%苏木素(5mg/ml)于37℃孵育10min,倒掉用清洗剂PBS清洗1次,倒掉并每孔加入100u1DMSO。若待测细胞为NK细胞时,则CD3的包被可拆板条应无色,含有CD56的包被可拆板条应为紫色。若待测细胞为CIK细胞时,则含有CD3、CD56的包被可拆板条应为紫色。此时的结果见图5。

[0064] 将细胞鉴定试剂盒至于酶标仪上,设置检测波长为490nm读取吸光值,待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值),然后对结果进行判定:若待测细胞为NK细胞,则CD3表达阳性率应 $\leq 10\%$; CD56表达阳性率应 $\geq 40\%$;若待测细胞为CIK细胞,则CD3、CD56表达阳性率应 $\geq 40\%$ 。检测结果见表2。

[0065] 表2NK细胞与CIK细胞检测结果

Elisa 吸光值						
图 5 左侧检测结果	CD3	CD56	阳性对照 CD45	CD3	CD56	阳性对照 CD45
测试1	0.09	0.76	1.27	0.88	0.84	1.31
测试2	0.11	0.89	1.3	0.94	0.79	1.28
空白对照	0.04	0.04	1.32	0.06	0.06	1.27
图 5 右侧检测结果						
测试1	0.15	0.18	1.04			
测试2	0.14	0.19	1.06			
空白对照	0.05	0.04	0.06			
图 5 左侧阳性百分率	4.77%	53.02%	100%	69.29%	61.55%	100%
图 5 右侧阳性百分率	1.98%	61.35%	100%			
阳性判定	-	+	+	+	+	+
阳性判定	-	+	+			
鉴定NK与CIK细胞，阳性对照细胞为人外周血淋巴细胞 待测孔的细胞阳性率=（待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值）/（阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值），若待测细胞为NK细胞时，则CD3表达阳性率应 $\leq 10\%$ ；CD56表达阳性率应 $\geq 40\%$ 。若待测细胞为CIK细胞时，则CD3、CD56表达阳性率应 $\geq 40\%$ 。						

[0067] 从上述表2可见，在图596孔板左侧的检测结果显示，测试1和2中的CD3表达阳性率分别为4.77%和1.98%（均 $\leq 10\%$ ）；测试1和2中的CD56表达阳性率分别为53.02%和61.35% $\geq 40\%$ ，因此符合NK细胞的判定，其可确认为均为NK细胞。同时，在图596孔板右侧的检测结果显示，测试1和2中的CD3表达阳性率分别为4.77%和1.98%（均 $\leq 10\%$ ）；测试1和2中的CD56表达阳性率分别为53.02%和61.35% $\geq 40\%$ ，因此符合NK细胞的判定规则，其可确认为均为NK细胞。

[0068] 实施例3：鉴定肺癌细胞

[0069] 将肺组织切碎并用胰酶消化液消化为细胞悬液，将消化后的细胞悬液离心重悬并调整细胞密度为 1×10^6 个/ml，轻微吹打混合均匀，用200 μ l移液枪吸取待测细胞悬液加入到细胞鉴定试剂盒的CEA、CA125抗体包被的板条中，每个板条加2个孔重复对照，加入量为100 μ l/孔。不同抗体包被的板条设置1个空白对照孔，空白对照孔加入100 μ l/孔的PBS。设置CD45板条中的三个孔为阳性对照孔，每个阳性对照孔加入100 μ l的 1×10^6 个/ml的淋巴细胞。孔板置于37 $^{\circ}$ C孵育30min。

[0070] 将孵育后的细胞鉴定试剂盒板条倒立在滤纸上轻拍3下，加入清洗剂PBS清洗2次，加入量为100 μ l/孔，倒立在滤纸上轻拍去掉PBS。

[0071] 每孔加入10 μ l活细胞染色剂MTT+1%苏木素（5mg/ml）于37 $^{\circ}$ C孵育10min，倒掉用清

洗剂PBS清洗1次,倒掉并每孔加入100u1DMSO。若待测组织含有肺癌细胞时,则含有CEA、CA125的包被可拆板条应为紫色。此时的结果见图6。

[0072] 将细胞鉴定试剂盒至于酶标仪上,设置检测波长为490nm读取吸光值,待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值),若待测组织含有肺癌细胞时,则CEA、CA125表达阳性率应 $\geq 20\%$ 。本实施例的检测结果见下表3。

[0073] 表3肺癌细胞检测结果

Elisa 吸光值				
	CEA	CA125	阳性对照 CD45	
测试1	0.86	0.91	1.26	
测试2	0.75	0.79	1.31	
空白对照	0.05	0.05	0.04	
阳性百分率	61.24%	64.87%	100%	
阳性判定	+	+	+	
鉴定肺癌细胞,阳性对照细胞为人外周血淋巴细胞 待测孔的细胞阳性率=(待测孔的平均吸光值-空白对照的平均吸光值)/(阳性对照的平均吸光值-空白对照的平均吸光值),若待测组织含有肺癌细胞时,则CEA、CA125表达阳性率应 $\geq 20\%$ 。				

[0075] 从表3可见,CEA表达阳性率为61.24%,CA125阳性表达率为64.87%(均 $\geq 20\%$),符合肺癌细胞的判定规则,因此可以确认本实施例鉴定的细胞为肺癌细胞。

[0076] 实施例4:鉴定前列腺癌细胞

[0077] 将前列腺组织切碎并用胰酶消化液消化为细胞悬液,或将前列腺病理切片用胰酶消化液消化为细胞悬液,将消化后的细胞悬液离心重悬并调整细胞密度为 1×10^6 个/ml,轻微吹打混合均匀,用200u1移液枪吸取待测细胞悬液加入到细胞鉴定试剂盒的PSA、p63、p40板条中,每个板条加2个孔重复对照,加入量为100u1/孔。不同抗体包被的板条设置1个空白对照孔,空白对照孔加入100u1/孔的PBS。设置CD45板条中的三个孔为阳性对照孔,每个阳性对照孔加入100u1的 1×10^6 个/ml的淋巴细胞。

[0078] 所有孔加入100u1/孔的通透剂Triton-X,室温孵育10min,然后分别对应板条孔加入10u1的PSA、p63、p40、CD45磁珠偶联抗体(1u1/ml)。孔板置于37℃孵育20min。

[0079] 将孵育后的细胞鉴定试剂盒板条底部放入孔板磁力底座,贴合装有未包被可拆板条的孔板架静置5min,倒掉孔板内的液体,加入清洗剂PBS清洗2次,加入量为100u1/孔,倒立在滤纸上轻拍去掉PBS。

[0080] 每孔加入100u1于PBS,然后每孔加入10u1台盼蓝(40mg/ml),室温孵育5min。若待测组织含有前列腺癌细胞时,则含有PSA、p63、p40的可拆板条应为蓝色。

[0081] 本次鉴定的结果见在图7中示出。从图7可见,包被有PSA、p63、p40的可拆板条均表现出蓝色(在经灰度处理的图7中变成灰色),因此可确认本实施例鉴定的细胞为前列腺癌

细胞。

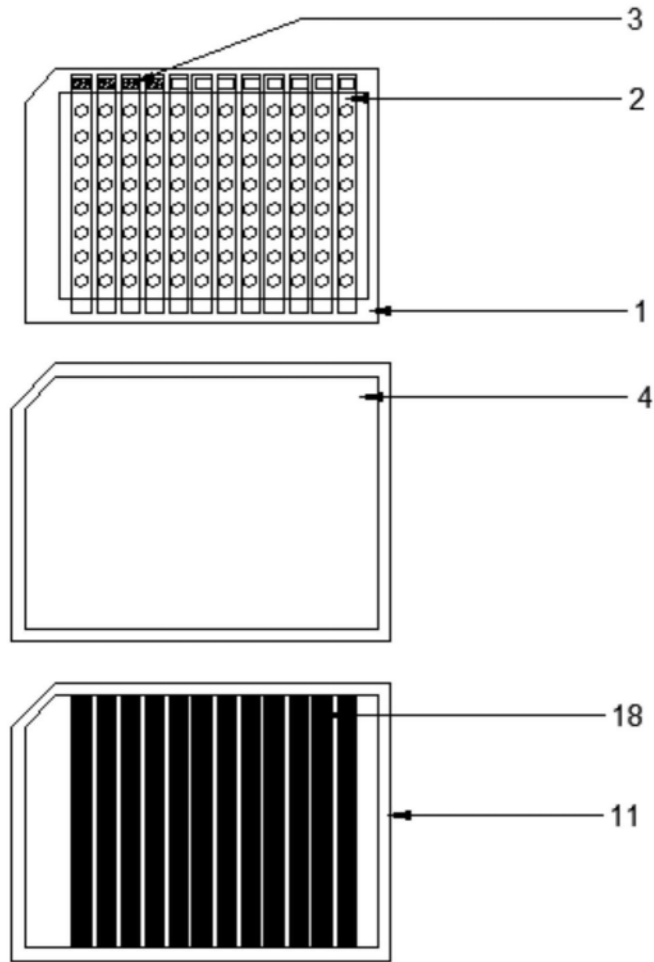


图1

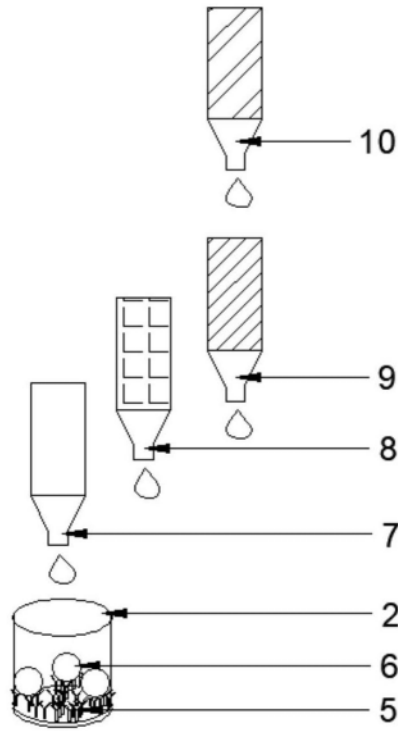


图2

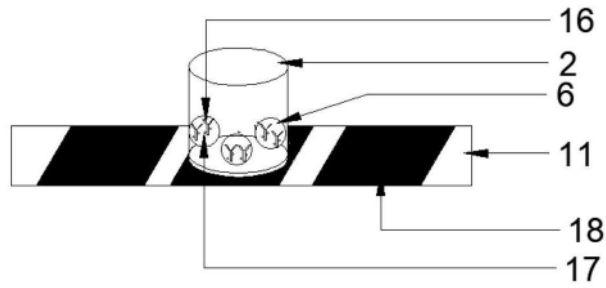


图3

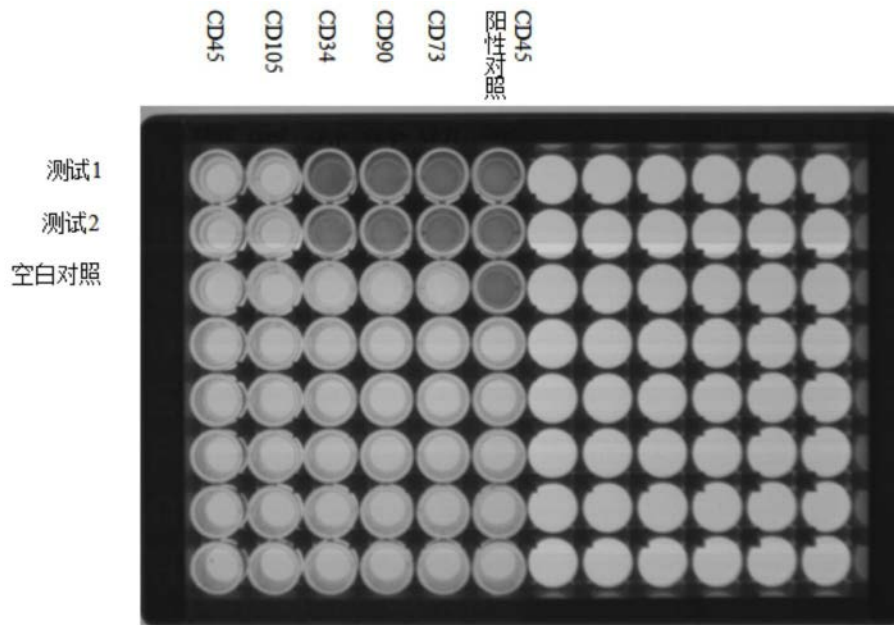


图4

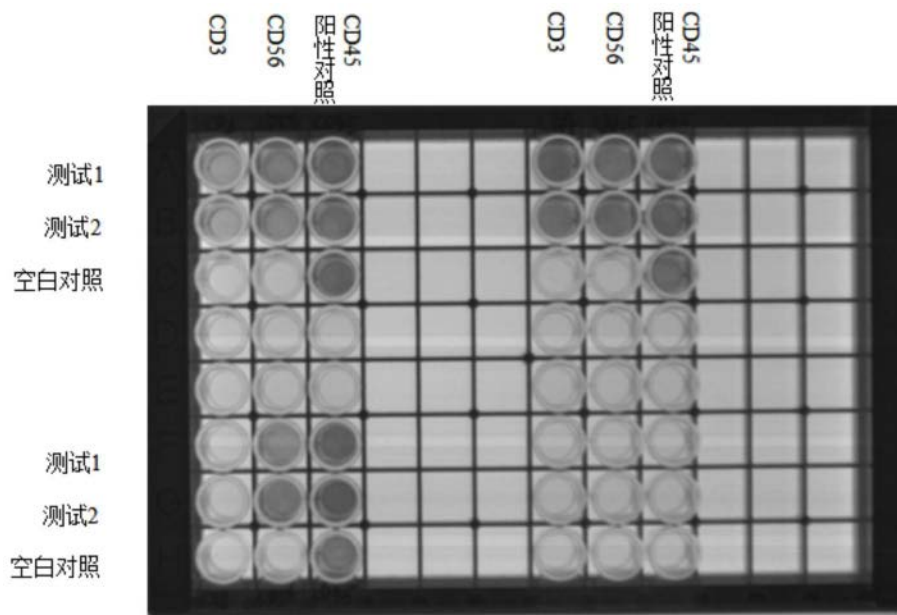


图5

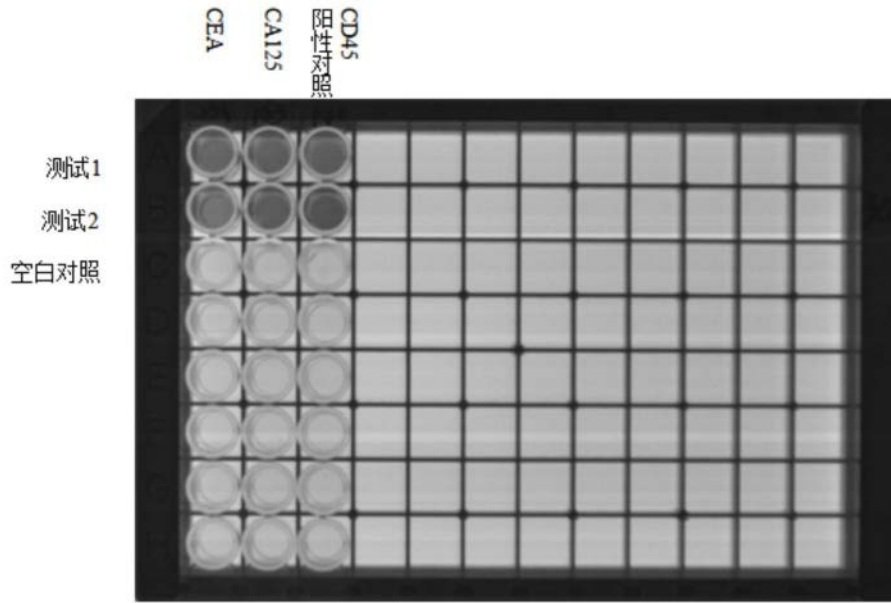


图6

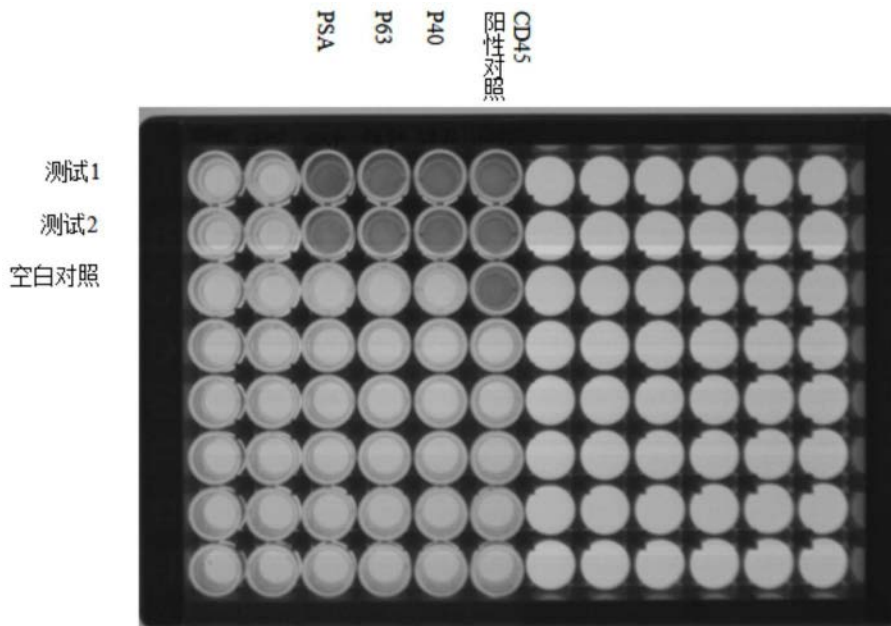


图7