



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101846626 B

(45) 授权公告日 2012. 07. 11

(21) 申请号 201010180339. 6

(22) 申请日 2010. 05. 24

(73) 专利权人 天津商业大学

地址 300134 天津市北辰区津霸公路东口

(72) 发明人 陈庆森 李伟 阎亚丽

(74) 专利代理机构 天津市三利专利商标代理有限公司 12107

代理人 肖莉丽

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 1/28 (2006. 01)

C12Q 1/02 (2006. 01)

(56) 对比文件

JP 2002540426 A, 2002. 11. 26, 全文.

DE 19950262 C2, 2001. 05. 31, 全文.

王雷等. 罗伦隐球酵母冻干粉在贮藏期的活性及安全性研究. 《食品研究与开发》. 2006, 第

27 卷 (第 6 期), 162-164.

赵修春等. 流式细胞术检测小鼠中性粒细胞吞噬功能的方法学探讨. 《蚌埠医学院学报》. 2004, 第 29 卷 (第 5 期), 388-390.

关兴丽. 流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬荧光素标记结核分枝杆菌的方法学探讨. 《中国医药指南》. 2010, 第 8 卷 (第 2 期), 171-172.

金齐力等. 流式细胞术检测单核巨噬细胞吞噬荧光素标记结核分枝杆菌的方法学探讨. 《蚌埠医学院学报》. 2008, 第 33 卷 (第 5 期), 505-508.

审查员 冯志华

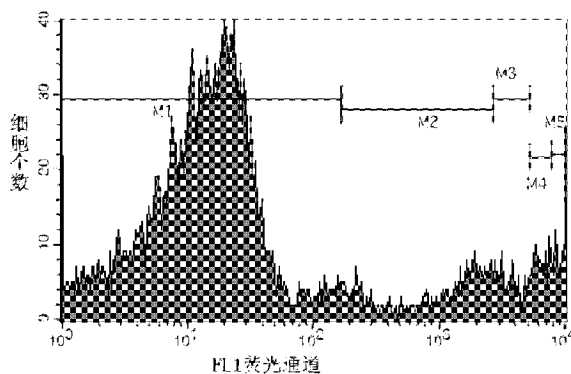
权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 4 页

(54) 发明名称

一种利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法

(57) 摘要

本发明公开了一种利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法,旨在提供一种能够消除未吞噬荧光酵母细胞对分析结果的影响,对吞噬细胞吞噬酵母的个数进行定量分析,快速、准确、简单易行的检测吞噬细胞活性的方法。包括下述步骤:制备啤酒酵母细胞冻干粉;利用 FITC 标记啤酒酵母细胞;将荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与小鼠血清室温孵育;将腹腔吞噬细胞悬液加入培养板的一个孔中;将与小鼠血清孵育后的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与同样的腹腔吞噬细胞悬液加入到细胞培养板中其余的孔中,将细胞培养板贴壁孵育;利用流式细胞仪获取数据并对数据进行分析。本发明方法较为准确的测定了吞噬率和吞噬指数,重复性好。



CN 101846626 B

1. 一种利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法,其特征在于,包括下述步骤:

(1) 制备啤酒酵母细胞冻干粉:利用土豆培养基培养啤酒酵母细胞,并将获得的啤酒酵母细胞溶液通过冷冻干燥制成啤酒酵母细胞冻干粉;

(2) 利用FITC标记啤酒酵母细胞:将FITC与二甲亚砜按照1mg:200 μ l的比例溶解,然后与pH值为9.5、浓度为0.5M的碳酸缓冲液混合配制成浓度为0.1mg/ml的FITC溶液备用;将步骤(1)中得到的啤酒酵母细胞冻干粉与pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液按20mg:1ml的比例混匀后,80 $^{\circ}$ C灭活15min;灭活后离心,弃上清液取沉淀;将得到的沉淀物与上述备用的0.1mg/ml的FITC溶液混匀,室温避光孵育1h对啤酒酵母细胞进行荧光标记,其中,0.1mg/ml的FITC溶液的用量为与步骤(1)中得到的啤酒酵母冻干粉的比例为1ml:20mg;将上述荧光标记后的溶液用pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液离心洗涤,直至上清液无色透亮;离心,弃上清液取沉淀得到荧光标记的啤酒酵母细胞;检测荧光标记率,调整最终荧光标记率合格的荧光标记啤酒酵母细胞悬液,其荧光标记啤酒酵母细胞浓度为 2×10^9 个/ml于4 $^{\circ}$ C冰箱中保存备用;

(3) 将步骤(2)中得到的备用的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与小鼠血清按照体积比为1:1的比例室温孵育60min,用pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液调整荧光标记啤酒酵母细胞浓度为 1×10^9 个/ml;

(4) 将吞噬细胞的个数至少为 1×10^6 个/ml的腹腔吞噬细胞悬液加入培养板的一个孔中作为阴性对照;将步骤(3)中得到的与小鼠血清孵育后的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与同样的上述吞噬细胞的个数至少为 1×10^6 个/ml的腹腔吞噬细胞悬液加入到细胞培养板中其余的孔中,按照吞噬细胞和荧光标记的啤酒酵母细胞个数比为1:20的比例混合;然后将细胞培养板置于37 $^{\circ}$ C培养箱中贴壁孵育40min,用4 $^{\circ}$ C pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液冲洗除去细胞培养板中多余的啤酒酵母细胞和没有贴壁的腹腔吞噬细胞,最后,在培养板除阴性对照孔外的各孔中加入4 $^{\circ}$ C的0.5ml pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液混匀,获得吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液,用移液枪将其转移至流式管中,将流式管置于冰上,待上流式细胞仪检测;

(5) 利用流式细胞仪对步骤(2)中备用的荧光标记啤酒酵母细胞悬液和步骤(4)中得到的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液样本进行检测,获取数据并对数据进行分析:①取步骤(4)中没有加荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液作为阴性对照进行上样,通过调整FL1荧光通道电压,使腹腔吞噬细胞群体峰的位置位于荧光电压横轴左侧,并对腹腔吞噬细胞进行获取;②在流式细胞仪各荧光电压参数和阈值保持不变的情况下,利用流式细胞仪测得步骤(2)中备用的荧光标记的啤酒酵母细胞的平均荧光强度,并以此荧光强度作为标准;③取步骤(4)中获得的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液进行上样,在流式细胞仪各参数保持不变的情况下,利用流式细胞仪对流式管中的腹腔吞噬细胞样本进行细胞获取;④利用BD CellQuest Pro数据分析软件对获取的腹腔吞噬细胞数据进行分析,先画散点图,通过前向光和侧向光,圈住腹腔吞噬细胞群体区域,然后画柱状图对阴性区域设门M1;将步骤②的荧光标记的啤酒酵母细胞的平均荧光强度设为一个标准单位,对步骤③得到的细胞获取结果按照标准单位的倍数进行设门,从门M1的右端至一个标准单位的位置为M2,在2倍、3倍.....、n-1倍标准单位处设门依次分别为M3、M4..... Mn,其中:M1代表M1门内的腹腔吞噬细胞数,即阴性腹腔吞噬细胞群体,为没有吞

噬啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞总数；M₂ 代表 M₂ 门内的腹腔吞噬细胞总数，即吞噬 1 个酵母细胞的腹腔吞噬细胞个数；M_n 代表 M_n 门内的腹腔吞噬细胞个数，即吞噬 n-1 个酵母细胞的腹腔吞噬细胞个数；

根据设门的个数来确定 n 的值，对门内细胞进行分析，分别得到 M₁、M₂、M₃、……、M_n 门内的腹腔吞噬细胞个数和 M₁ 门内腹腔吞噬细胞占总吞噬细胞的百分率，按照下列两个公式分别计算吞噬细胞的吞噬率和吞噬指数：

吞噬率(%) = 吞噬啤酒酵母细胞的吞噬细胞数 / 获取的吞噬细胞总数 = 1 - M₁ 门内吞噬细胞占总吞噬细胞的百分率；

吞噬指数 = 被吞噬的酵母细胞总数 / 获取的吞噬细胞总数 = [M₂ + 2M₃ + 3M₄ + …… + (n-1)M_n] / 获取的吞噬细胞总数。

2. 根据权利要求 1 所述的利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法，其特征在于，利用土豆培养基培养啤酒酵母细胞的方法为：将啤酒酵母菌种接种在斜面土豆培养基进行活化，向斜面土豆培养基里面加入无菌水，用接种环轻刮，使斜面土豆培养基表面的啤酒酵母悬于无菌水中，将啤酒酵母悬液置于涡旋混匀器上混匀，得到啤酒酵母菌悬液；吸取 0.5ml 啤酒酵母菌悬液加入平板土豆培养基，涂布后，置于 28℃ 的培养箱中，3 天后，向每个土豆平板培养基中加入无菌水，用玻璃棒刮取并收集啤酒酵母细胞，用 PBS 缓冲液 8000rpm × 1min 离心洗涤两次之后，500rpm × 1min 离心，弃去沉淀，取上层细胞悬液 8000rpm × 1min 离心一次，弃去上清，获取沉淀，即为啤酒酵母细胞；将获得的啤酒酵母细胞悬液放入 -20℃ 的冰箱中冷冻后，置入冷冻干燥机中冷冻干燥制成啤酒酵母冻干粉。

3. 根据权利要求 1 所述的利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法，其特征在于，所述土豆培养基的成分按以下质量比例进行配置：去皮土豆：葡萄糖：琼脂：水 = 50 : 5 : 4 : 200。

一种利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞生物实验技术领域,更具体的说,是涉及一种利用流式细胞仪的快速、准确的特点来检测腹腔吞噬细胞活性的方法。

背景技术

[0002] 腹腔吞噬细胞对于机体抵御病原体的入侵起着重要的作用。吞噬细胞属于非特异性免疫细胞,能够非特异性的吞噬进入人体内的病原体,衰老病变细胞,参与抗原识别与递呈,生成多种细胞因子,在机体的固有免疫中发挥重要作用。因此,检测吞噬细胞活性对于药物的筛选和功能性食品的开发具有极其重要的意义。而传统的检测吞噬细胞的活性主要有吞噬鸡红细胞和酵母的方法,由于这些方法费时、工作量大,受人的主观因素影响比较大,观察的数量较少,一般只计数 100 个吞噬细胞,所以存在一定误差。

[0003] 目前,用流式细胞仪来检测吞噬细胞活性已经越来越受到人们的关注。由于流式细胞仪检测速度可达每秒 10,000 个左右的细胞,共计数 20,000 个细胞,极大的提高了检测的准确性,并为样本数量较多的实验设计提供了一个快速、准确、可行的实验方法。自 1982 年 Steinkamp 首创荧光微球流式细胞术定量检测吞噬细胞吞噬功能以来,到目前为止,发展起来的技术方法也很多,如吞噬荧光微球的方法以及吞噬荧光标记大肠杆菌、金黄色葡萄球菌和结核分枝杆菌等细菌的方法。其中,吞噬荧光微球的方法中,荧光微球颗粒比较均一,与小鼠血清孵育后,能够使其表面结合免疫球蛋白,有很好的检测效果,但是成本较高。用大肠杆菌等一些细菌用来检测吞噬细胞活性具有以下缺点:第一,细胞较小,很容易被吞噬细胞表面受体所粘附,影响检测结果。第二,利用 FITC 标记这些细菌,标记率较低,因此在实验中会产生一定的误差。V.Miliukien ė 等报道了用流式细胞术技术检测外周血中性粒细胞吞噬荧光标记啤酒酵母来检测其吞噬活性,但由于其没有把未吞噬的荧光酵母细胞除去,只是利用前向光和侧向光圈住吞噬细胞,由于酵母细胞个体较大,数目远多于粒细胞的个数,因此,在流式细胞仪获取的细胞中含有大量的酵母细胞,使获取的粒细胞数量减少,同时其中混有大量的酵母细胞,也影响了分析结果的准确性;而且,在结果分析中,没有对中性粒细胞吞噬酵母的个数进行定量分析,因此无法计算出粒细胞的吞噬指数。

[0004] 目前,尚未有利用荧光标记的酵母细胞作为材料来检测腹腔吞噬细胞活性的方法,由于 V.Miliukien ė 的方法中存在上述缺陷,因此,需要在原有利用流式细胞仪检测吞噬细胞活性的基础上探索出一套更加准确、可靠、易行的方法。

发明内容

[0005] 本发明是为了克服现有利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性技术中的不足之处,提供一种能够消除未吞噬荧光酵母细胞对分析结果的影响,对吞噬细胞吞噬酵母的个数进行定量分析,快速、准确、简单易行的检测吞噬细胞活性的方法。

[0006] 本发明通过下述技术方案实现:

[0007] 一种利用流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞活性的方法,其特征在于,包括下述步

骤：

[0008] (1) 制备啤酒酵母细胞冻干粉：利用土豆培养基培养啤酒酵母细胞，并将获得的啤酒酵母细胞溶液通过冷冻干燥制成啤酒酵母细胞冻干粉；

[0009] (2) 利用 FITC 标记啤酒酵母细胞：将 FITC 与二甲亚砜按照 1mg : 200 μ l 的比例溶解，然后与 pH 值为 9.5、浓度为 0.5M 的碳酸缓冲液混合配制成浓度为 0.1mg/ml 的 FITC 溶液备用；将步骤 (1) 中得到的啤酒酵母细胞冻干粉与 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液按 20mg : 1ml 的比例混匀后，80℃ 灭活 15min；灭活后离心，弃上清液取沉淀；将得到的沉淀物与上述备用的 0.1mg/ml 的 FITC 溶液混匀，室温避光孵育 1h 对啤酒酵母细胞进行荧光标记，其中，0.1mg/ml 的 FITC 溶液的用量为与步骤 (1) 中得到的啤酒酵母冻干粉的比例为 1ml : 20mg；将上述荧光标记后的溶液用 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液离心洗涤，直至上清液无色透亮；离心，弃上清液取沉淀得到荧光标记的啤酒酵母细胞；检测荧光标记率，调整最终荧光标记率合格的荧光标记啤酒酵母细胞悬液，其荧光标记啤酒酵母细胞浓度为 2×10^9 个 /ml 于 4℃ 冰箱中保存备用；

[0010] (3) 将步骤 (2) 中得到的备用的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与小鼠血清按照体积比为 1 : 1 的比例室温孵育 60min，用 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液调整荧光标记啤酒酵母细胞浓度为 1×10^9 个 /ml；

[0011] (4) 将吞噬细胞的个数至少为 1×10^6 个 /ml 的腹腔吞噬细胞悬液加入培养板的一个孔中作为阴性对照；将步骤 (3) 中得到的与小鼠血清孵育后的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与同样的上述吞噬细胞的个数至少为 1×10^6 个 /ml 的腹腔吞噬细胞悬液加入到细胞培养板中其余的孔中，按照吞噬细胞和荧光标记的啤酒酵母细胞个数比为 1 : 20 的比例混合；然后将细胞培养板置于 37℃ 培养箱中贴壁孵育 40min，用 4℃ pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液冲洗除去细胞培养板中多余的啤酒酵母细胞和没有贴壁的腹腔吞噬细胞，最后，在培养板除阴性对照孔外的各孔中加入 4℃ 的 0.5ml pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液混匀，获得吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液，用移液枪将其转移至流式管中，将流式管置于冰上，待上流式细胞仪检测；

[0012] (5) 利用流式细胞仪对步骤 (2) 中备用的荧光标记啤酒酵母细胞悬液和步骤 (4) 中得到的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液样本进行检测，获取数据并对数据进行分析：①取步骤 (4) 中没有加荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液作为阴性对照进行上样，通过调整 FL1 荧光通道电压，使腹腔吞噬细胞群体峰的位置位于荧光电压横轴左侧，并对腹腔吞噬细胞进行获取；②在流式细胞仪各荧光电压参数和阈值保持不变的情况下，利用流式细胞仪测得步骤 (2) 中备用的荧光标记的啤酒酵母细胞的平均荧光强度，并以此荧光强度作为标准；③取步骤 (4) 中获得的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液进行上样，在流式细胞仪各参数保持不变的情况下，利用流式细胞仪对流式管中的腹腔吞噬细胞样本进行细胞获取；④利用 BD CellQuest Pro 数据分析软件对获取的腹腔吞噬细胞数据进行分析，先画散点图，通过前向光和侧向光，圈住腹腔吞噬细胞群体区域，然后画柱状图对阴性区域设门 M1；将步骤②的荧光标记的啤酒酵母细胞的平均荧光强度设为一个标准单位，对步骤③得到的细胞获取结果按照标准单位的倍数进行设门，从门 M1 的右端至一个标准单位的位置为 M2，在 2 倍、3 倍……、n-1 倍标准单位处设门依次分别为 M3、M4……Mn。其中：M1 代表 M1 门内的腹腔吞噬细胞数，即阴性腹腔吞噬细胞群体，为没有

吞噬啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞总数；M2 代表 M2 门内的腹腔吞噬细胞总数，即吞噬 1 个酵母细胞的腹腔吞噬细胞个数；Mn 代表 Mn 门内的腹腔吞噬细胞个数，即吞噬 n-1 个酵母细胞的腹腔吞噬细胞个数；

[0013] 根据设门的个数来确定 n 的值，对门内细胞进行分析，分别得到 M1、M2、M3.....Mn 门内的腹腔吞噬细胞个数和 M1 门内腹腔吞噬细胞占总吞噬细胞的百分率，按照下列两个公式分别计算吞噬细胞的吞噬率和吞噬指数：

[0014] 吞噬率(%) = 吞噬啤酒酵母细胞的吞噬细胞数 / 获取的吞噬细胞总数 = 1-M1 门内吞噬细胞占总吞噬细胞的百分率；

[0015] 吞噬指数 = 被吞噬的酵母细胞总数 / 获取的吞噬细胞总数 = $[M2+2M3+3M4+.+(n-1)Mn]$ / 获取的吞噬细胞总数。

[0016] 利用土豆培养基培养啤酒酵母细胞的方法为：将啤酒酵母菌种接种在斜面土豆培养基进行活化，向斜面土豆培养基里面加入无菌水，用接种环轻刮，使斜面土豆培养基表面的啤酒酵母悬于无菌水中，将啤酒酵母悬液置于涡旋混匀器上混匀，得到啤酒酵母菌悬液；吸取 0.5ml 啤酒酵母菌悬液加入平板土豆培养基，涂布后，置于 28℃ 的培养箱中，3 天后，向每个土豆平板培养基中加入无菌水，用玻璃棒刮取并收集啤酒酵母细胞，用 PBS 缓冲液 8000rpm×1min 离心洗涤两次之后，500rpm×1min 离心，弃去沉淀，取上层细胞悬液 8000rpm×1min 离心一次，弃去上清，获取沉淀，即为啤酒酵母细胞。将获得的啤酒酵母细胞悬液放入 -20℃ 的冰箱中冷冻后，置入冷冻干燥机中冷冻干燥制成啤酒酵母冻干粉。

[0017] 所述土豆培养基的成分按以下质量比例进行配置：去皮土豆：葡萄糖：琼脂：水 = 50 : 5 : 4 : 200。

[0018] 本发明具有下述技术效果：

[0019] 1、本发明的方法利用流式细胞仪所获取的细胞数据和吞噬细胞易贴壁的生物特性，以及 FITC 标记啤酒酵母细胞接近 100% 的荧光标记率，消除了未吞噬的荧光啤酒酵母细胞对分析结果的影响，能够准确的测定吞噬率和吞噬指数。

[0020] 2、本发明的方法中，培养板中吞噬细胞和荧光酵母个数比为 1 : 20，这样就保证了酵母细胞与吞噬细胞的充分结合，并且通过几次冲洗，除去了培养板中多余的啤酒酵母细胞和未贴壁的吞噬细胞，减小了进行流式分析时啤酒酵母细胞对吞噬细胞的干扰。

[0021] 3、本发明将啤酒酵母通过冷冻干燥制成冻干粉，延长了啤酒酵母的保存时间，对于制备检测腹腔吞噬细胞活性试剂盒具有很好的应用前景。而且，细胞大小均一，保证了荧光强度的均一性和吞噬细胞吞噬荧光酵母的稳定性。

[0022] 4、本发明根据吞噬细胞吞噬啤酒酵母细胞后的荧光强度来对吞噬细胞吞噬荧光标记啤酒酵母的个数进行定量分析，利用本发明中的公式通过简单的数据计算，较为准确的测定了吞噬率和吞噬指数，提供了一种重复性好，快速、准确、简单易行的检测吞噬细胞活性的方法。

[0023] 5、本发明的方法中利用将啤酒酵母作为吞噬颗粒，利用 FITC 进行荧光标记，具有较高的标记率。

附图说明

[0024] 图 1 为未被标记的啤酒酵母细胞的散点图；

- [0025] 图 2 为未被荧光标记的啤酒酵母细胞的柱状图；
[0026] 图 3 为 FITC 荧光标记的啤酒酵母的柱状图；
[0027] 图 4 为未吞噬酵母的腹腔吞噬细胞流式柱状图
[0028] 图 5 为测定荧光标记啤酒酵母的平均荧光强度；
[0029] 图 6 为吞噬荧光标记啤酒酵母的腹腔吞噬细胞的散点图；
[0030] 图 7 是腹腔吞噬细胞吞噬荧光标记啤酒酵母的流式柱状图。

具体实施方式

[0031] 实施例 1

[0032] (1) 制备啤酒酵母细胞冻干粉：

[0033] 将啤酒酵母菌种接种在斜面土豆培养基进行活化，向斜面土豆培养基里面加入无菌水 3ml，用接种环轻刮，使斜面土豆培养基上的啤酒酵母细胞悬浮于无菌水中，将啤酒酵母悬液置于涡旋混匀器上混匀，得到啤酒酵母菌悬液。吸取 0.5ml 啤酒酵母菌悬液加入土豆培养基平板上，涂布后，置于 28℃ 的培养箱中，3 天后，向每个土豆培养基平板上加入无菌水约 0.1-0.2ml，用玻璃棒刮取并收集啤酒酵母细胞，用 PBS 缓冲液 8000rpm×1min 离心洗涤两次之后，500rpm×1min 离心，弃去沉淀，取上层细胞悬液 8000rpm×1min 离心一次，弃去上清，获取沉淀，即为啤酒酵母细胞。将获得的啤酒酵母细胞溶液放入 -20℃ 的冰箱中冷冻后，置入冷冻干燥机中冷冻干燥制成啤酒酵母冻干粉。所述土豆培养基的成分是：去皮土豆 200g、葡萄糖 20g、琼脂 16g、水 1000ml。

[0034] (2) 小鼠血清的制备：用昆明小鼠制备小鼠血清作为调理素。用镊子摘除小鼠眼球取血，在离心管中室温静置 30min，在 4℃ 冰箱放 2h。随后在 4℃、1000g 离心力下离心 30min，吸取上层血清，分装后，于 -20℃ 冰箱中保存。

[0035] (3) 用 FITC 荧光标记啤酒酵母细胞：

[0036] 将 1mg FITC 用 200 μ l 二甲亚砜溶解后与 pH 值为 9.5、浓度为 0.5M 的碳酸缓冲液混合配置成浓度为 0.1mg/ml 的 FITC 溶液备用。将步骤 (1) 中得到的 120mg 啤酒酵母冻干粉与 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 6ml PBS 缓冲液混匀后，放入 80℃ 恒温水浴箱中加热 15 分钟灭活。灭活后 8000rpm 离心 2min，弃上清液取沉淀物，将得到的沉淀物与 6ml 上述备用的 0.1mg/ml 的 FITC 溶液混匀，室温避光孵育 1h 对啤酒酵母细胞进行荧光标记。将上述荧光标记后的溶液用 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液离心洗涤 4 次，直至上清液无色透亮。离心弃上清液取沉淀得到荧光标记的啤酒酵母细胞。

[0037] 利用流式细胞仪检测荧光标记酵母的标记率：

[0038] 首先利用流式细胞仪检测未标记的啤酒酵母细胞悬液：将步骤 (1) 得到的少许啤酒酵母细胞冻干粉与 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液混匀制成没有标记的啤酒酵母细胞悬液。上样未被标记的啤酒酵母细胞悬液，图 1 为未被标记的啤酒酵母细胞的散点图，分析圈住的 R1 区域为啤酒酵母细胞群体，调整荧光电压通道，使啤酒酵母细胞群体处于流式柱状图的左侧，并设阴性对照门 N1，如图 2 所示，其中 N1 门内的阴性酵母细胞个数为 9986，占的比例为 99.86%。

[0039] 然后取少许荧光标记的啤酒酵母细胞悬液利用流式细胞仪检测荧光标记率：将少许上述得到的荧光标记的啤酒酵母细胞加入 pH 值为 7.2、浓度为 0.01M 的 PBS 缓冲液混匀

制成荧光标记的啤酒酵母细胞悬液,上样荧光标记的啤酒酵母细胞悬液进行检测,如图3所示,共获取了10000个酵母细胞,将图2中N1的门复制到图3中,然后在图3中N1的右侧区域设门N2,N2中的荧光标记后的阳性细胞个数为9997,占的比例为99.97%,啤酒酵母细胞的荧光标记率即为N2门内的啤酒酵母细胞数占图1中圈中R1区域的啤酒酵母细胞总数的百分率,为99.97%,荧光标记率大于99.9%的说明标记合格。

[0040] 将得到的标记合格的荧光标记的啤酒酵母细胞加入pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液混匀,并调整最终荧光标记啤酒酵母细胞的浓度为 2×10^9 个/ml,得到荧光标记啤酒酵母细胞的悬液于4℃冰箱中保存备用。

[0041] (4) 将步骤(3)中得到的备用的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与步骤(2)中得到的小鼠血清按照体积比为1:1的比例室温孵育60min,用pH值为7.2、0.01M的PBS缓冲液调整,最终调整获得的荧光标记的啤酒酵母细胞浓度为 1×10^9 个/ml。

[0042] (5) 腹腔吞噬细胞悬液的制备:实验前两天,向小鼠腹腔注射1ml的肉汤。实验时,断颈处死小鼠,用注射器向小鼠腹腔注射pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液4ml,轻柔小鼠腹部,剪开腹腔,吸取腹腔液2ml于离心管中,用pH值为7.2、0.01M的PBS缓冲液洗涤,离心一次后取沉淀,加入pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液0.5ml悬浮腹腔吞噬细胞,混匀后,调整吞噬细胞浓度为 2×10^6 个/ml,得到腹腔吞噬细胞悬液。

[0043] (6) 将步骤(5)中制备的腹腔吞噬细胞悬液加入到细胞培养板的一个孔中作为阴性对照。将步骤(4)中得到的与小鼠血清孵育后的荧光标记啤酒酵母细胞的悬液与步骤(5)中制备的腹腔吞噬细胞悬液加入到细胞培养板的其余的孔中按照吞噬细胞和荧光标记的啤酒酵母细胞个数比为1:20的比例混合,然后将细胞培养板置于37℃培养箱中贴壁孵育40min,弃去孔内液体,在细胞培养板除阴性对照孔外的各孔加入4℃pH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液1ml,轻轻晃动冲洗一次,洗除去培养板中多余的啤酒酵母细胞和没有贴壁的腹腔吞噬细胞,然后在培养板除阴性对照孔外的各孔加入4℃的0.5mlpH值为7.2、浓度为0.01M的PBS缓冲液抽吸吹打,混匀,获得吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液,用移液枪将其转移至流式管中,将流式管置于冰上,待上流式细胞仪检测。

[0044] (7) 利用流式细胞仪对步骤(3)中的备用的荧光标记啤酒酵母细胞悬液和步骤(6)中得到的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液以及贴壁孵育的没有加入荧光酵母的腹腔吞噬细胞悬液样本进行检测,每份样本获取10,000个细胞,利用BD CellQuest Pro获取细胞并对获取的数据进行分析:①取步骤(6)中贴壁孵育的没有加荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液作为阴性对照进行上样,通过调整FL1荧光通道电压,使腹腔吞噬细胞群体峰的位置位于荧光电压横轴左侧,设阴性对照门M1,如图4所示,并对腹腔吞噬细胞进行获取。②在流式细胞仪各荧光电压参数和阈值保持不变的情况下,利用流式细胞仪测得步骤(3)中的荧光标记的啤酒酵母细胞的平均荧光强度,并以此荧光强度作为标准,如图5所示,测得啤酒酵母细胞荧光强度为2603.31。③取步骤(6)中获得的流式管中的吞噬荧光啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞悬液进行上样,在流式细胞仪各参数保持不变的情况下,利用流式细胞仪对流式管中的腹腔吞噬细胞样本进行细胞获取。④利用BDCellQuest Pro数据分析软件对获取的数据结果进行分析,先画散点图,如图6所示,利用流式细胞仪通过前向光和侧向光,将腹腔巨噬细胞区域圈住,设为R2区域;然后对R2区域内细胞进行分析,然后画柱状图,如图7所示,将①中的阴性对照门M1复制作为图7中的阴性对照门,

并按照②中得到的荧光标记酵母的平均荧光强度 2603.31 设为一个标准单位,按照标准单位的倍数进行设门,从门M1的右端至一个标准单位的位置为M2,在2倍、3倍、4倍标准单位处设门依次分别为M3、M4、M5,如图7所示。其中:M1代表M1门内的腹腔吞噬细胞数,即阴性腹腔吞噬细胞群体,为没有吞噬啤酒酵母细胞的腹腔吞噬细胞总数;M2代表M2门内的腹腔吞噬细胞总数,即吞噬1个酵母细胞的腹腔吞噬细胞个数;M3、M4、M5分别代表吞噬1个、2个、3个、4个荧光酵母的吞噬细胞。利用BD CellQuest Pro 数据分析软件对获取的数据进行统计,分别得到M2、M3、M4、M5门内和总的腹腔吞噬细胞个数以及M1门内吞噬细胞占总吞噬细胞的百分率。其中M1门内细胞占总吞噬细胞的百分率为81.64;总腹腔吞噬细胞个数为7935;M2、M3、M4、M5门内细胞个数分别为665、246、236、333个。

[0045] (8) 计算吞噬率和吞噬指数:

[0046] 吞噬率(%) = 吞噬啤酒酵母细胞的吞噬细胞数 / 获取的吞噬细胞总数 = 1 - M1门内腹腔吞噬细胞占总腹腔吞噬细胞的百分率 = 1 - 81.64% = 18.36%

[0047] 吞噬指数 = 被吞噬的酵母细胞总数 / 吞噬细胞总数 = $[M2 + 2M3 + 3M4 + \dots + (n-1)Mn] /$ 吞噬细胞总数 = $(665 + 246 \times 2 + 236 \times 3 + 333 \times 4) / 7935 = 0.26$

[0048] 本发明的方法用流式细胞仪所获取的细胞数据和吞噬细胞易贴壁的生物学特性,以及FITC标记啤酒酵母细胞接近100%的荧光标记率,消除了没有吞噬的荧光啤酒酵母细胞对分析结果的影响。该方法能够降低流式细胞仪检测腹腔吞噬细胞吞噬活性的误差,针对以往所建立的检测方法中不能够准确的测定吞噬个数的缺陷,本发明根据吞噬细胞吞噬酵母细胞后的荧光强度来对吞噬细胞吞噬荧光标记啤酒酵母的个数进行定量分析,利用本发明中的公式通过简单的数据计算,较为准确的测定了吞噬率和吞噬指数,提供了一种重复性好,快速、准确、简单易行的检测吞噬细胞活性的方法。

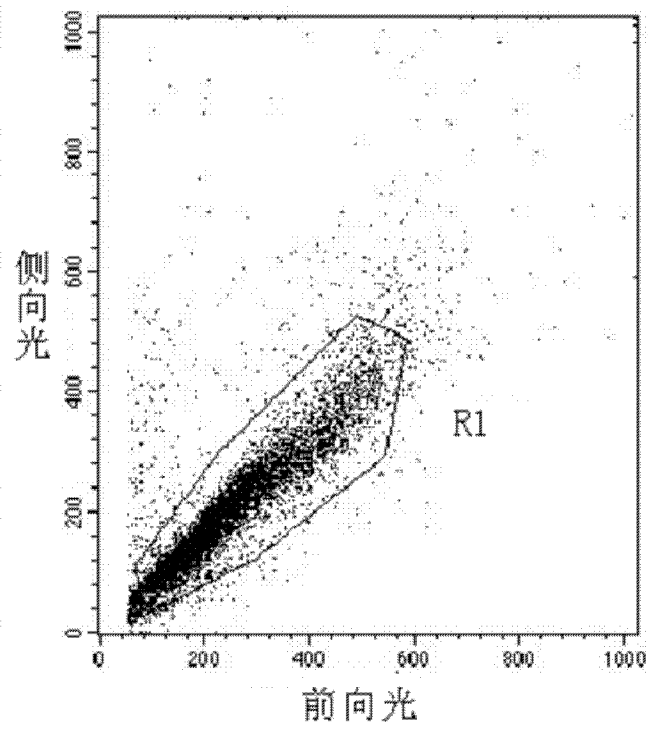


图 1

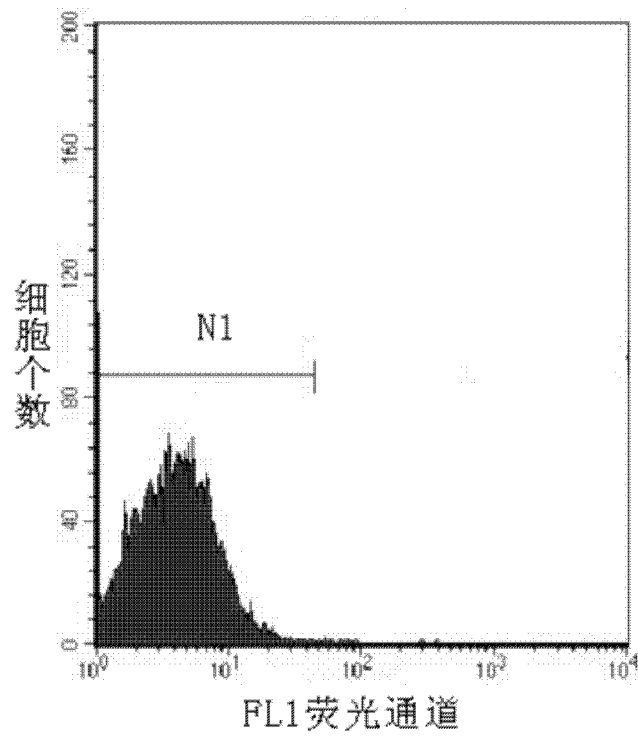


图 2

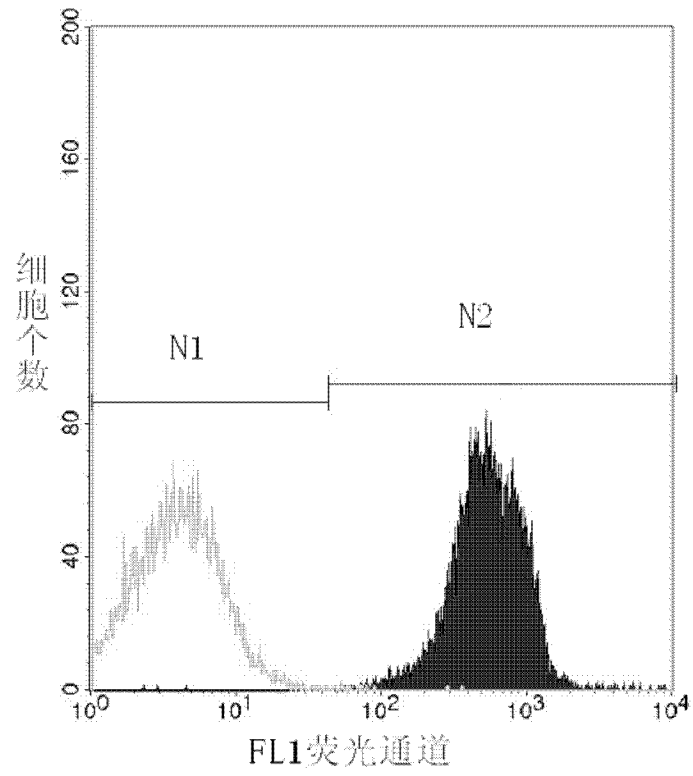


图 3

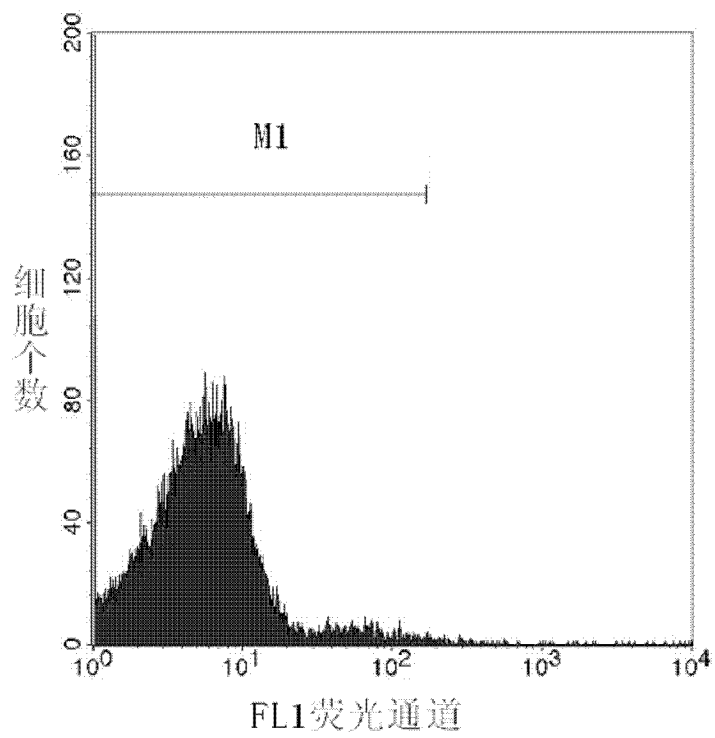


图 4

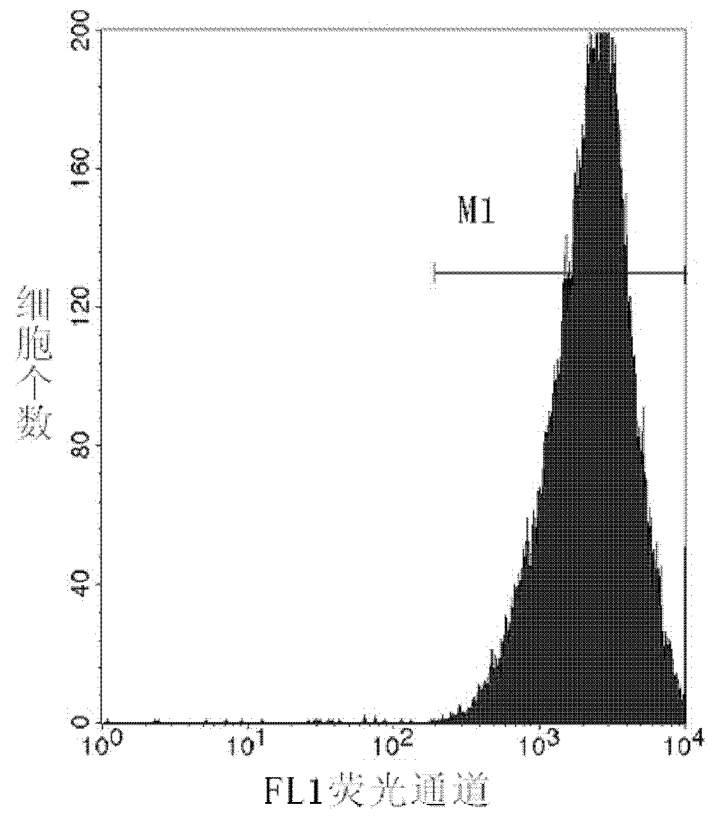


图 5

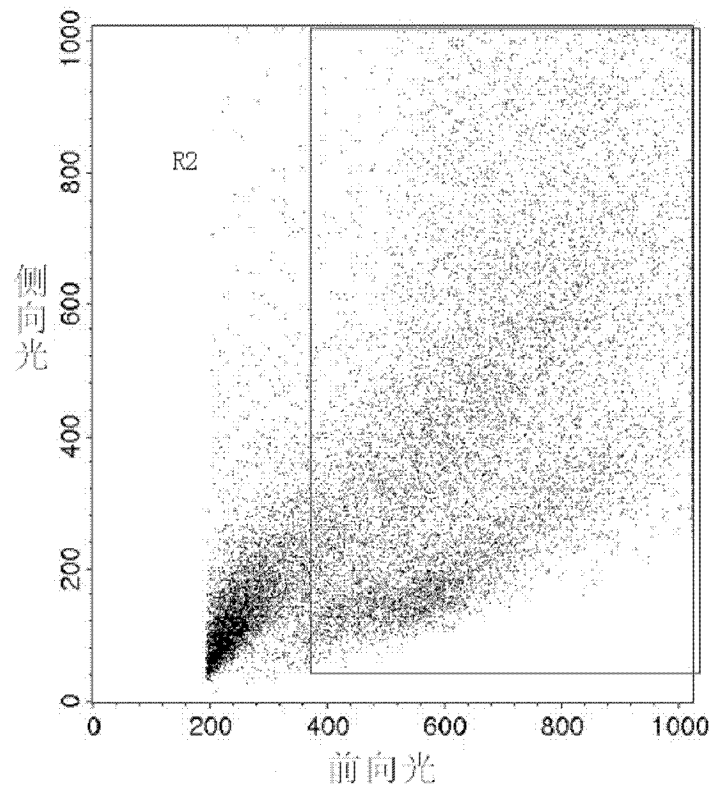


图 6

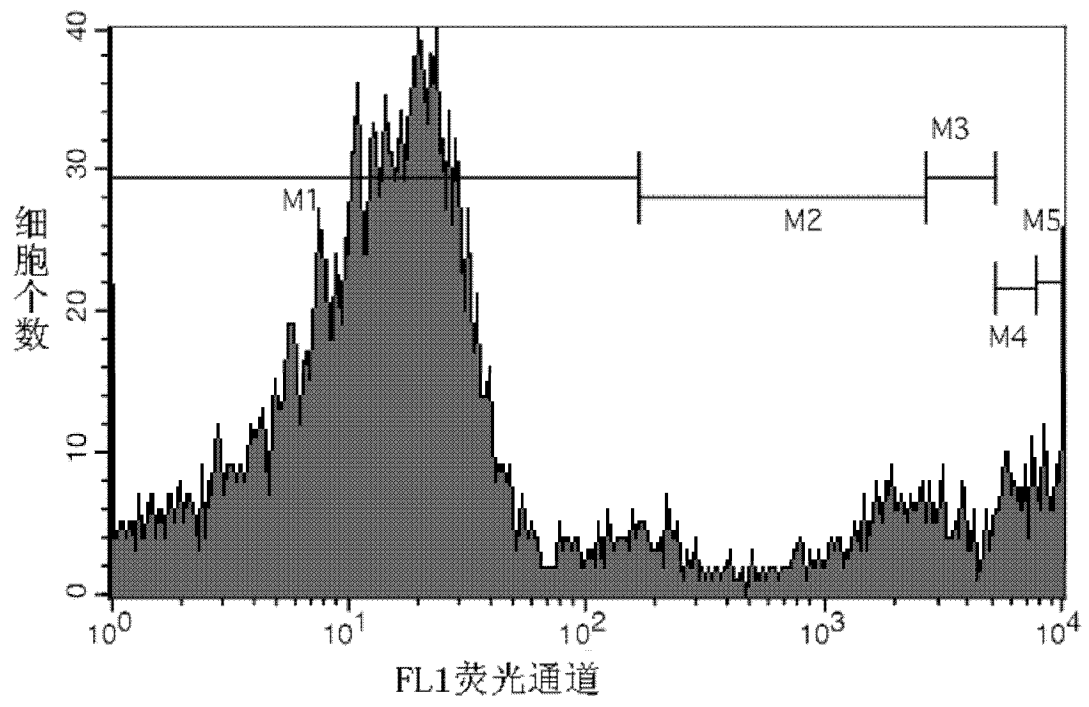


图 7