



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106644632 B

(45)授权公告日 2019.08.27

(21)申请号 201611019350.8

(22)申请日 2016.11.17

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106644632 A

(43)申请公布日 2017.05.10

(73)专利权人 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所

地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城科灵路88号

(72)发明人 唐玉国 尹焕才 董文飞 刘广兴
田晶晶 黎海文 付威威

(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理
事务所(普通合伙) 11369

代理人 韩飞

(51)Int.Cl.

G01N 1/28(2006.01)

(56)对比文件

CN 102321582 A,2012.01.18,

CN 103344755 A,2013.10.09,

CN 102618506 A,2012.08.01,

CN 103983496 A,2014.08.13,

CN 102565317 A,2012.07.11,

CN 103558055 A,2014.02.05,

JP 2002537561 A,2002.11.05,

CN 101122601 A,2008.02.13,

EP 1023458 B1,2004.04.21,

李宏伟等.人循环内皮细胞的分离和鉴定.

《基础医学与临床》.2006,第26卷(第6期),第
640-643页.

审查员 张娟

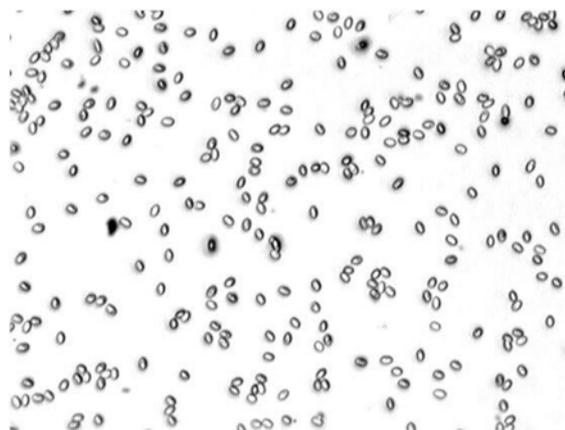
权利要求书1页 说明书4页 附图4页

(54)发明名称

用于单层细胞平铺的人工基质

(57)摘要

本案涉及用于单层细胞平铺的人工基质,至少包括有缓冲基液、牛血清白蛋白、糖源、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和明胶;其中,所述缓冲基液选自PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液和NaCl水溶液中的一种;所述糖源选自蔗糖、海藻糖、甘露糖或其组合。本案通过对现有人工基质缓冲液的配方改进,可以使血液中的细胞或者实验室培养细胞在经过预处理(如染色液或荧光标记处理)后,在加入本案人工基质后,可以更好实现细胞在载玻片或类似的载玻片平面结构的单层平铺,以利于光学显微镜或者荧光显微镜(预期为自动化扫描判读装置)进行观察,提高检查结果的准确性。



1. 一种用于单层细胞平铺的人工基质,其特征在於,至少包括有缓冲基液、牛血清白蛋白、糖源、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和明胶;

其中,所述缓冲基液选自PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液和NaCl水溶液中的一种;所述PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液和硼酸盐缓冲液的浓度为0.01M,所述NaCl水溶液的浓度为0.85wt%;所述缓冲基液的pH为7.2-7.4;

以质量分数为计,所述牛血清白蛋白的浓度为1-8%,所述糖源的浓度为0.2-2%,所述聚乙二醇的浓度为0.1-2%,所述聚乙烯吡咯烷酮的浓度为0.2-2%,所述明胶的浓度为0.5-5%;

所述糖源选自蔗糖、海藻糖、甘露糖或其组合。

2. 如权利要求1所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其特征在於,所述人工基质中还包有醋酸锌和硫酸镁。

3. 如权利要求2所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其特征在於,以质量分数为计,所述醋酸锌的浓度为0.02-0.04%,所述硫酸镁的浓度为0.02-0.04%。

用于单层细胞平铺的人工基质

技术领域

[0001] 本发明属于细胞平铺缓冲系统,特别涉及一种适用于单层细胞平铺的人工基质。

背景技术

[0002] 细胞是人体最重要,最基础的组成部分,其状态优劣常与人体健康存在直接关系。常用来进行细胞分析的仪器设备主要流式细胞仪、血细胞分析仪或荧光显微镜等。利用流式或血细胞检测仪器进行细胞分析的原理是依赖细胞自身的物理或化学特性(比如大小、折射率、形态等)的不同,细胞在分析前需要制备成悬液,分析过程中细胞需要在鞘液的配合下依次通过检测单元,记录每个细胞的参数后,进行适当的统计分析,进而用于疾病的检测或健康评估。

[0003] 显微镜是一种用于观察生物微观世界的重要工具,在生物健康领域其应用十分广泛,例如利用光学显微镜对染色后的血液进行观察可用于疾病的诊断、使用激光光聚焦扫描显微镜可以对病变细胞表面特异性标志物的有无以及含量进行测定、利用STED显微镜可以对细胞表面纳米级微结构进行成像观测等。

[0004] 显微镜的应用十分广泛,其应用时的测试对象需要为一个平面载体,一般为载玻片,或者形状类似载玻片的平面结构。使用显微镜进行细胞分析时常需要将细胞平铺在平面载体上,保持细胞的固定状态,才能用于进一步的观察。例如在使用显微镜对血涂片进行观察前,需要制备具有单层细胞分布的血涂片,进入血涂片干燥形成血膜后才能使用瑞特染色液等进行染色,染色也相对复杂需要经过几次加染料、冲洗和再加染料再冲洗的过程。而最终观察的具有单层细胞分布的区域其大小只占血膜的很小部分,由于细胞的重叠其它部分无法观察,其获得的生物信息也相对有限。众所周知,对于统计分析获得的结果而言,其样本量越大结果也越准确。因此,如果能够减少重叠细胞,形成更多便于观察的的单层细胞,对检查结果的准确性而言将大大提升。

[0005] 在制备单层细胞时过程中需要从多个方面综合考虑才能制备出适合于显微观察的优质玻片。例如细胞所处的缓冲液离子条件(即人工基质),可直接影响细胞形态,不佳的缓冲液甚至可以导致细胞破碎从而无法观察;又例如细胞在缓冲液中的固定程度,如果细胞漂浮在缓冲液中,往往使自动化图像观察变得十分困难,影响成像效果;再例如细胞所处的缓冲液干燥后的结晶状况,由于单层细胞的所形成膜十分薄,可在几分钟内干燥,随之伴随的是大量结晶盐的析出,对后期观察尤其是荧光成像效果的观察将产生极大影响等等。

[0006] 由于上述问题的存在,制备一种可用于细胞单层分布平铺的缓冲液人工基质显得尤为重要。

发明内容

[0007] 针对现有技术中存在的细胞易聚团、易结晶以及细胞形态易改变甚至破裂等问题,本案的目的在于提供一种适用于单层细胞平铺的人工基质,来有效避免细胞聚团、结晶,保护细胞形态,利于后续观察和结果判读。

[0008] 为实现上述目的,本案通过以下技术方案实现:

[0009] 一种用于单层细胞平铺的人工基质,其至少包括有缓冲基液、牛血清白蛋白、糖源、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和明胶;

[0010] 其中,所述缓冲基液选自PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液和NaCl水溶液中的一种;

[0011] 所述糖源选自蔗糖、海藻糖、甘露糖或其组合。

[0012] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述牛血清白蛋白的浓度为1-8%。

[0013] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述糖源的浓度为0.2-2%。

[0014] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述聚乙二醇的浓度为0.1-2%。

[0015] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述聚乙烯吡咯烷酮的浓度为0.2-2%。

[0016] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述明胶的浓度为0.5-5%。

[0017] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,所述PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液和硼酸盐缓冲液的浓度为0.01M;所述NaCl水溶液的浓度为0.85wt%。

[0018] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,所述缓冲基液的pH为7.2-7.4。

[0019] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,所述人工基质中还包括有醋酸锌和硫酸镁。

[0020] 优选的是,所述的用于单层细胞平铺的人工基质,其中,以质量分数为计,所述醋酸锌的浓度为0.02-0.04%,所述硫酸镁的浓度为0.02-0.04%。

[0021] 本发明的有益效果是:本案通过对现有人工基质缓冲液的配方改进,可以使血液中的细胞或者实验室培养细胞在经过预处理(如染色液或荧光标记处理)后,在加入本案人工基质后,可以更好实现细胞在载玻片或类似的载玻片平面结构的单层平铺,以利于光学显微镜或者荧光显微镜(预期为自动化扫描判读装置)进行观察,提高检查结果的准确性。

附图说明

[0022] 图1为本案实施例1的光学显微镜图。

[0023] 图2为本案实施例3的光学显微镜图。

[0024] 图3为本案对比例1的光学显微镜图。

[0025] 图4为本案对比例2的光学显微镜图。

[0026] 图5为本案对比例3的光学显微镜图。

[0027] 图6为本案对比例4的光学显微镜图。

[0028] 光学显微镜:ZEISS;型号:Lab A1;放大倍数:物镜40倍,目镜10倍。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图对本发明做进一步的详细说明,以令本领域技术人员参照说明书文字能够据以实施。

[0030] 本案列出一实施例的用于单层细胞平铺的人工基质,其至少包括有缓冲基液、牛血清白蛋白(BSA)、糖源、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和明胶;

[0031] 其中,缓冲基液选自PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液、硼酸盐缓冲液和NaCl水溶液中的一种;

[0032] 糖源选自蔗糖、海藻糖、甘露糖或其组合。

[0033] 缓冲基液的作用是维持细胞渗透压,保持细胞状态,防止细胞破裂。其中,NaCl水溶液对血液中固有细胞(如红细胞、白细胞)的平铺制备效果最好;PBS、Tris-HCl、硼酸盐缓冲液对人工培养细胞(如肿瘤细胞)或者人血液稀有细胞的平铺制备效果最好。

[0034] 牛血清白蛋白、糖源、聚乙二醇、聚乙烯吡咯烷酮和明胶的作用是增加细胞与玻片粘性,有助于单层细胞形成,利于细胞平铺和细胞分散,保持细胞表面的抗原活性,减少细胞聚集,防止结晶。

[0035] 其中,以质量分数为计,牛血清白蛋白的浓度优选为1-8%。

[0036] 其中,以质量分数为计,糖源的浓度优选为0.2-2%。

[0037] 其中,以质量分数为计,聚乙二醇的浓度优选为0.1-2%。

[0038] 其中,以质量分数为计,聚乙烯吡咯烷酮的浓度优选为0.2-2%。

[0039] 其中,以质量分数为计,明胶的浓度优选为0.5-5%。

[0040] 其中,PBS缓冲液、Tris-HCl缓冲液和硼酸盐缓冲液的浓度优选为0.01M;NaCl水溶液的浓度优选为0.85wt%。

[0041] 其中,缓冲基液的pH为7.2-7.4。

[0042] 作为本案另一实施例,其中,人工基质中还可优选包括有醋酸锌和硫酸镁。醋酸锌和硫酸镁的组合可以进一步提高人工基质维持细胞渗透压的能力,降低细胞对温度和pH波动的敏感度,同时可以平衡细胞在人工基质中的扩散速率,提高细胞的平铺分散度,以利于后期观察尤其是对荧光成像效果的观察。其中,以质量分数为计,醋酸锌的浓度优选为0.02-0.04%,硫酸镁的浓度优选为0.02-0.04%。

[0043] 实施例1

[0044] 新型血涂片

[0045] 1、取适当体积全血;

[0046] 2、加入全血体积3-5倍的瑞特染色液并混合均匀,染色30-60s;

[0047] 3、加入与染色液体积相当的磷酸盐缓冲液并与瑞特染色液混合均匀,放置5-10min;

[0048] 4、将上述染色液在800RPM下离心5min,弃上层染色液,保留下层细胞;

[0049] 5、将下层细胞加入人工基质中,其主要成分是0.85%NaCl、5%BSA、1%蔗糖、0.1%PEG、0.2%PVP以及0.5%明胶;

[0050] 6、将上述细胞混匀后,将其制成单层细胞,配合光学显微镜进行观察。

[0051] 实施例2

[0052] 用于循环肿瘤细胞的检测

[0053] 1、取新鲜全血7.5ml,加入3-5倍体积的红细胞裂解液,将红细胞完全裂解,800rpm离心10min,弃上清保留下层细胞;

[0054] 2、将上述细胞放置于抗体染色液中(内部含有不同荧光标记的anti-45、DAPI、CK8/CK18/CK19抗体),染色15min;

[0055] 3、800rpm离心10min,分离染色后的细胞,加入细胞平铺人工基质中,其主要成分为0.01M PBS、4%BSA、1%海藻糖、0.2%PEG、0.1%PVP、0.5%明胶;

[0056] 4、将上述细胞混匀后,将其制成单层细胞,使用荧光显微镜观察细胞表面荧光分布情况,EpCAM+,CK+,DAPI+和CD45-细胞即为循环肿瘤细胞。

[0057] 实施例3

[0058] 在人工基质中再加入0.03%的醋酸锌和0.03%的硫酸镁,其余与实施例1相同。

[0059] 对比例1(现有技术中最常用的人工基质)

[0060] 将实施例1中人工基质的组成变为仅含有“0.85%NaCl”,删除5%BSA、1%蔗糖、0.1%PEG、0.2%PVP以及0.5%明胶,其余不变。

[0061] 对比例2

[0062] 将实施例1中人工基质中的“0.85%NaCl”替换为“0.85%KCl”,其余不变。

[0063] 对比例3

[0064] 删除实施例3中人工基质中的“0.03%的醋酸锌”,其余不变。

[0065] 对比例4

[0066] 删除实施例3中人工基质中的“0.03%的硫酸镁”,其余不变。

[0067] 由图1-6可以看出,实施例1和3的平铺效果最好,其中,从细胞分散均匀度来看,实施例3的效果要略好于实施例1。图4表明KCl并不能替代NaCl,NaCl在整个配方中的作用要明显优于KCl。图5和图6中的细胞团聚点的数量略高于图2,跟图1类似,说明醋酸锌和硫酸镁作为组合使用时,其改进效果要略优于其独自被添加,当独自被添加进实施例1的方案中时,其所获得的效果与实施例1相近。

[0068] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的图例。

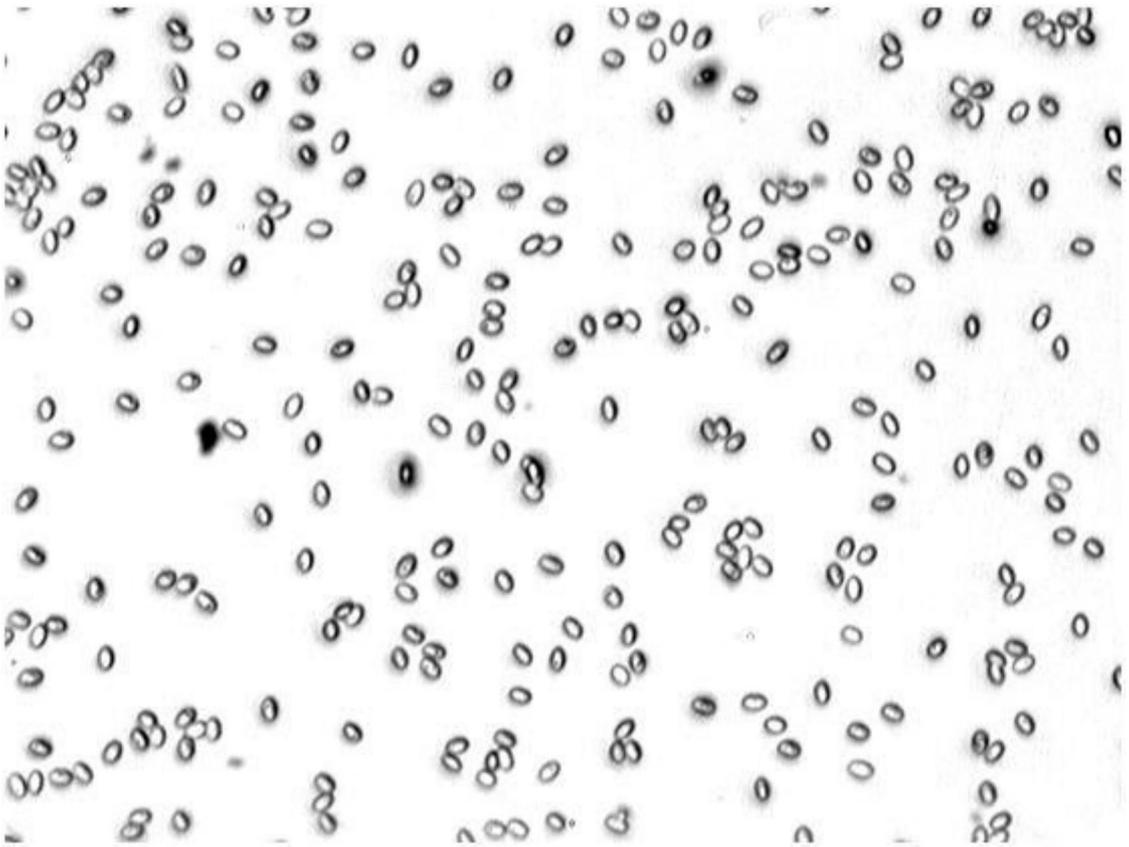


图1

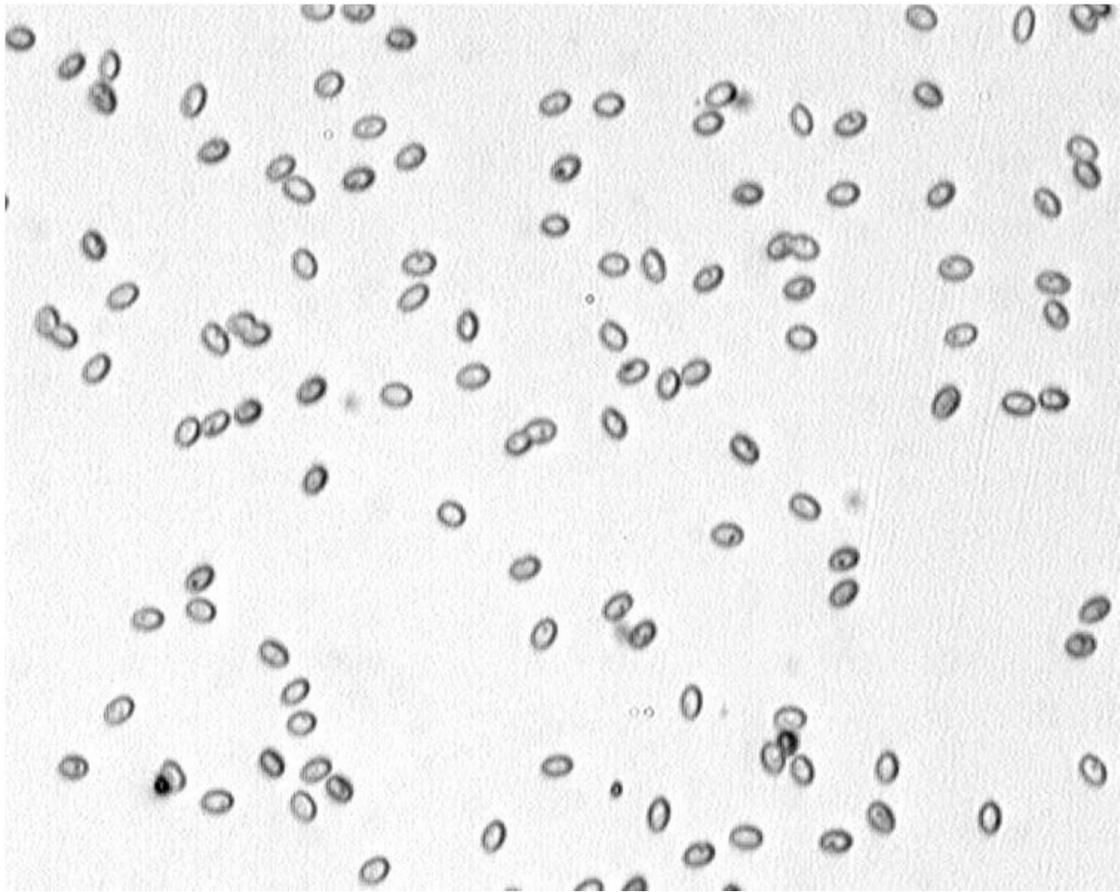


图2

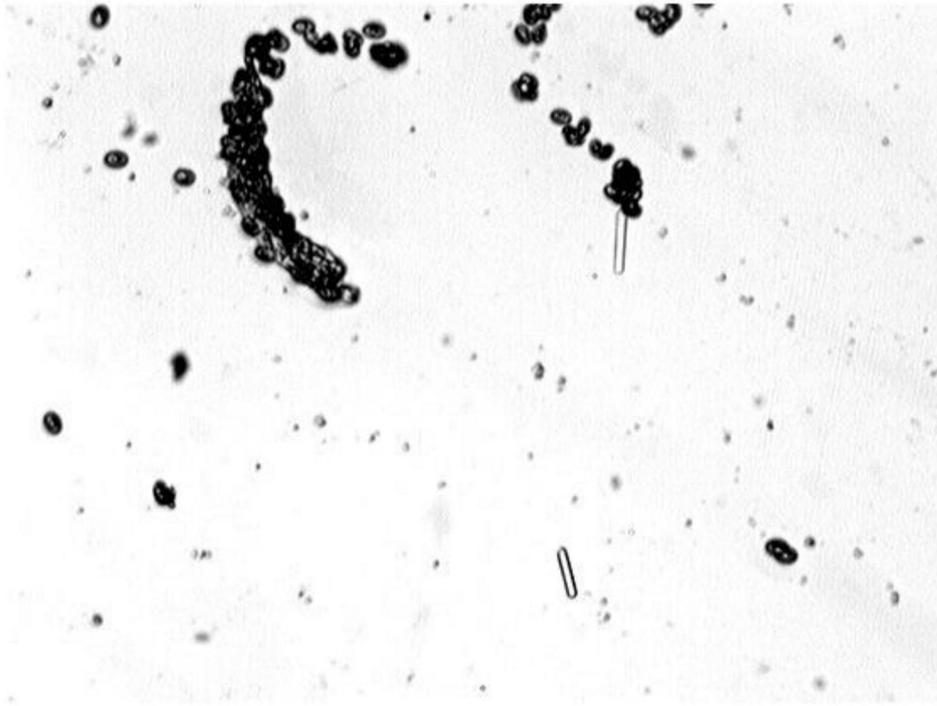


图3

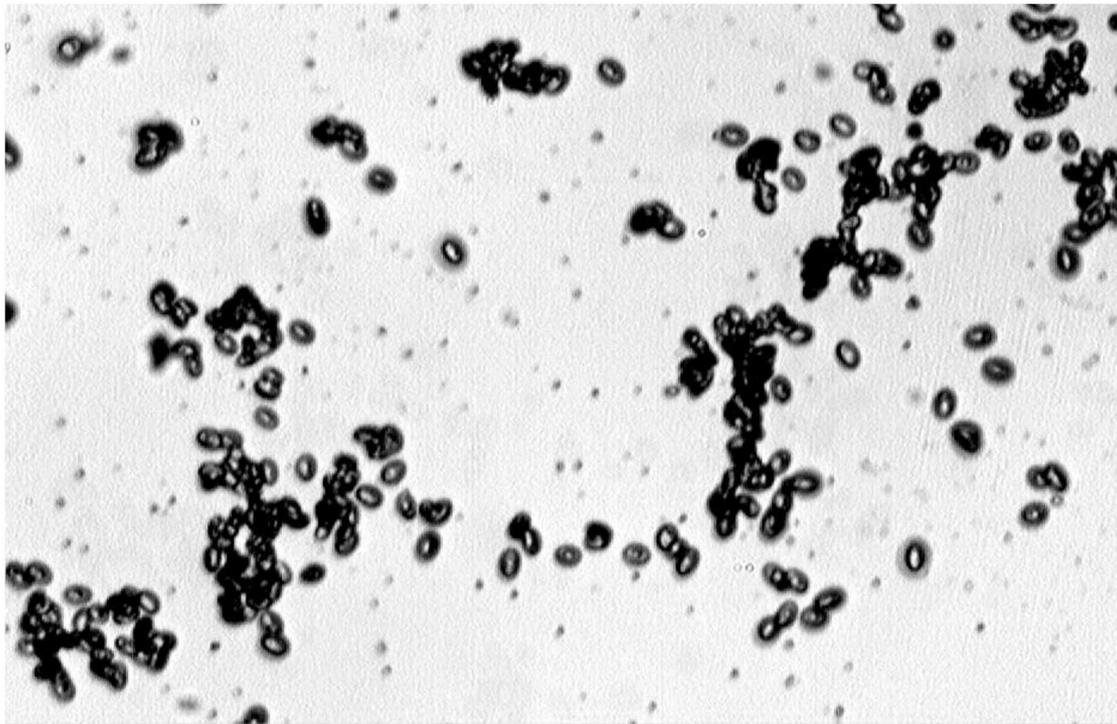


图4

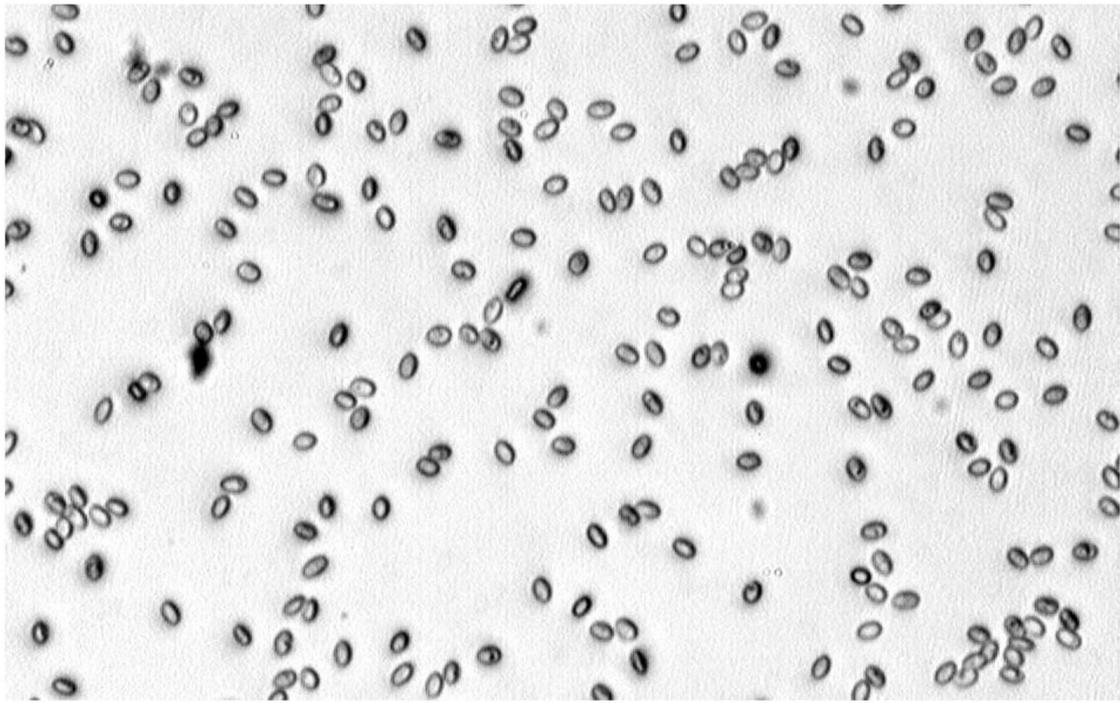


图5

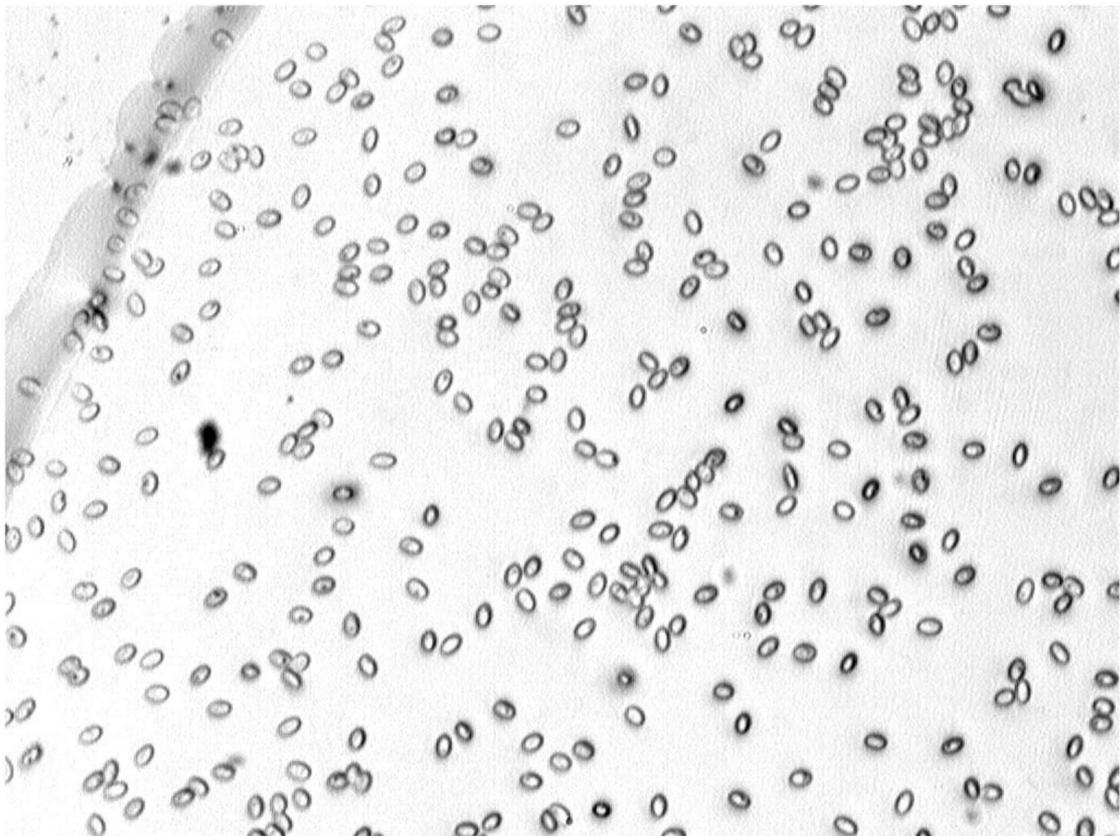


图6