



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109254147 A

(43)申请公布日 2019.01.22

(21)申请号 201811191491.7

(22)申请日 2018.10.12

(71)申请人 东莞暨南大学研究院

地址 523000 广东省东莞市高新技术产业
开发区创新科技园11号楼2楼202室

(72)发明人 尹芝南 吴扬哲

(74)专利代理机构 北京超凡志成知识产权代理
事务所(普通合伙) 11371

代理人 王焕

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

权利要求书2页 说明书16页

(54)发明名称

人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒
及评估方法

(57)摘要

本发明提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒及评估方法。本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒包括抗人CD3、CD4、CD8、CD19、CD21、CD24、CD25、CD27、CD28、CD38、CD56、CD57、CD94、CD127、CD45RA、CXCR3、CXCR5、CCR4、CCR6、CCR7、HLA-DR、PD-1、P30、P46、NKG2D、KIR(NKB1)、 $\gamma\delta$ 、 $V\delta 2$ 、IgD、IgM抗体,以上抗体均携带荧光素标记。该试剂盒能够用于对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估,使用方便、安全。

1. 一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,包括:带荧光素标记的抗人CD3抗体、带荧光素标记的抗人CD4抗体、带荧光素标记的抗人CD8抗体、带荧光素标记的抗人CD19抗体、带荧光素标记的抗人CD21抗体、带荧光素标记的抗人CD24抗体、带荧光素标记的抗人CD25抗体、带荧光素标记的抗人CD27抗体、带荧光素标记的抗人CD28抗体、带荧光素标记的抗人CD38抗体、带荧光素标记的抗人CD56抗体、带荧光素标记的抗人CD57抗体、带荧光素标记的抗人CD94抗体、带荧光素标记的抗人CD127抗体、带荧光素标记的抗人CD45RA抗体、带荧光素标记的抗人CXCR3抗体、带荧光素标记的抗人CXCR5抗体、带荧光素标记的抗人CCR4抗体、带荧光素标记的抗人CCR6抗体、带荧光素标记的抗人CCR7抗体、带荧光素标记的抗人HLA-DR抗体、带荧光素标记的抗人PD-1抗体、带荧光素标记的抗人NKP30抗体、带荧光素标记的抗人NKP46抗体、带荧光素标记的抗人NKG2D抗体、带荧光素标记的抗人KIR抗体、带荧光素标记的抗人 γ δ 抗体、带荧光素标记的抗人V δ 2抗体、带荧光素标记的抗人IgD抗体、带荧光素标记的抗人IgM抗体。

2. 如权利要求1所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为单克隆抗体。

3. 如权利要求1所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的任意一种为粉剂或者液体制剂。

4. 如权利要求3所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均采用抗体试剂管封装,所述抗体试剂管为透光率在10%以下的棕色塑料管。

5. 如权利要求4所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗体试剂管的透光率为零,即完全不透光。

6. 如权利要求4所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗体试剂管中盛装的抗体为液体制剂时,所述抗体试剂管中抗体的体积为0.5ml-5ml。

7. 如权利要求3所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在于,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人

CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为液体制剂。

8. 如权利要求3所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在於,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的至少一种为粉剂,所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒还包括磷酸盐缓冲液。

9. 如权利要求3所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,其特征在於,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体的荧光素标记选自PerCP-Cy5.5、BV510、FITC、AF647、PE-Cy7、BV421、PE、AF647、APC-H7、BB515。

10. 一种人体外周血免疫细胞功能全面评估方法,其特征在於,包括如下步骤:

步骤1、提供如权利要求1至权利要求9中任一项所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒;

从2ml-10ml人体外周血中提取外周血单个核细胞;

步骤2、当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中的所有抗体均为液体制剂时,从所有抗体中分别取1 μ l-5 μ l,全部与所述外周血单个核细胞进行混合,在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C条件下避光孵育10分钟至30分钟,得到细胞检测样本;

当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中至少有一种抗体为粉剂时,首先采用磷酸盐缓冲液将粉剂溶解为抗体溶液,之后从所有液体形式的抗体中分别取1 μ l-5 μ l,全部与所述外周血单个核细胞进行混合,在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C条件下避光孵育10分钟至30分钟,得到细胞检测样本;

所述液体制剂中抗体的浓度为0.1-2mg/ml;所述粉剂与磷酸盐缓冲液混合后得到的抗体溶液中抗体的浓度为0.1-2mg/ml;

步骤3、采用流式细胞仪对所述细胞检测样本进行检测分析。

人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒及评估方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗领域,尤其涉及一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒及评估方法。

背景技术

[0002] 人体免疫细胞的免疫功能与各类疾病的发生、进展均有直接相关性,比如肿瘤的发生、发展过程就是因为人体自身免疫细胞功能长期下调或受到抑制的结果。但是,纵观国内外研究文献,发现目前国际上还没有用于专门评估人体外周血具有杀伤能力的免疫细胞功能的方法。目前国内外临床、第三方检测机构评价人体免疫功能的方法还停留在细胞的数量、比例等常规指标。比如,医院的血常规仅仅给出了白细胞的数量范围和比例,如CD3细胞的数量、比例,CD4+T细胞的数量、比例等,这些数据对医生进行临床诊断的参加意义不大。

[0003] 目前,包括临床和第三方检测机构等均没有真正能评价免疫细胞本身功能和质量的方法。

发明内容

[0004] 本发明的目的首先在于提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,能够结合流式细胞仪用于对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估,使用方便、安全。

[0005] 本发明的目的还在于提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估方法,能够对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估。

[0006] 为实现以上目的,本发明首先提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,包括:带荧光素标记的抗人CD3抗体、带荧光素标记的抗人CD4抗体、带荧光素标记的抗人CD8抗体、带荧光素标记的抗人CD19抗体、带荧光素标记的抗人CD21抗体、带荧光素标记的抗人CD24抗体、带荧光素标记的抗人CD25抗体、带荧光素标记的抗人CD27抗体、带荧光素标记的抗人CD28抗体、带荧光素标记的抗人CD38抗体、带荧光素标记的抗人CD56抗体、带荧光素标记的抗人CD57抗体、带荧光素标记的抗人CD94抗体、带荧光素标记的抗人CD127抗体、带荧光素标记的抗人CD45RA抗体、带荧光素标记的抗人CXCR3抗体、带荧光素标记的抗人CXCR5抗体、带荧光素标记的抗人CCR4抗体、带荧光素标记的抗人CCR6抗体、带荧光素标记的抗人CCR7抗体、带荧光素标记的抗人HLA-DR抗体、带荧光素标记的抗人PD-1抗体、带荧光素标记的抗人NKP30抗体、带荧光素标记的抗人NKP46抗体、带荧光素标记的抗人NKG2D抗体、带荧光素标记的抗人KIR抗体、带荧光素标记的抗人 $\gamma\delta$ 抗体、带荧光素标记的抗人V δ 2抗体、带荧光素标记的抗人IgD抗体、带荧光素标记的抗人IgM抗体。

[0007] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人

PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为单克隆抗体。

[0008] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的任意一种为粉剂或者液体制剂。

[0009] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均采用抗体试剂管封装,所述抗体试剂管为透光率在10%以下的棕色塑料管。

[0010] 优选的,所述抗体试剂管的透光率为零,即完全不透光。

[0011] 可选的,所述抗体试剂管中盛装的抗体为液体制剂时,所述抗体试剂管中抗体的体积为0.5ml-5ml。

[0012] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为液体制剂。

[0013] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的至少一种为粉剂,所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒还包括磷酸盐缓冲液。

[0014] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体的荧光素标记选自PerCP-Cy5.5、BV510、FITC、AF647、PE-Cy7、BV421、PE、AF647、APC-H7、BB515。

[0015] 本发明还提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估方法,包括如下步骤:

- [0016] 步骤1、提供如上文所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒；
- [0017] 从2ml-10ml人体外周血中提取外周血单个核细胞；
- [0018] 步骤2、当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中的所有抗体均为液体制剂时，从所有抗体中分别取1 μ l-5 μ l，全部与所述外周血单个核细胞进行混合，在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C条件下避光孵育10分钟至30分钟，得到细胞检测样本；
- [0019] 当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中至少有一种抗体为粉剂时，首先采用磷酸盐缓冲液将粉剂溶解为抗体溶液，之后从所有液体形式的抗体中分别取1 μ l-5 μ l，全部与所述外周血单个核细胞进行混合，在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C条件下避光孵育10分钟至30分钟，得到细胞检测样本；
- [0020] 所述液体制剂中抗体的浓度为0.1-2mg/ml；所述粉剂与磷酸盐缓冲液混合后得到的抗体溶液中抗体的浓度为0.1-2mg/ml；
- [0021] 步骤3、采用流式细胞仪对所述细胞检测样本进行检测分析。
- [0022] 本发明的有益效果：
- [0023] 本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒能够结合流式细胞仪用于对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估，使用方便，且对人体安全，该试剂盒可用于人体免疫健康管理评价以及相关感染患者的免疫功能评估等多种免疫功能评估项目中。本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估方法能够对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估，操作步骤简单，操作过程安全。
- [0024] 本发明在国际范围内第一次建立了对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估的方法，采用多种免疫功能指标对人体外周血中的免疫细胞的功能进行了全面评估，若判断人体外周血中的免疫细胞的功能过低，则提示被检测者采用免疫治疗等干预手段对自身的免疫功能进行提升，提升人体的健康状态。

具体实施方式

- [0025] 如本文所用之术语：
- [0026] “由……制备”与“包含”同义。本文中所述的术语“包含”、“包括”、“具有”、“含有”或其任何其它变形，意在覆盖非排它性的包括。例如，包含所列要素的组合物、步骤、方法、制品或装置不必仅限于那些要素，而是可以包括未明确列出的其它要素或此种组合物、步骤、方法、制品或装置所固有的要素。
- [0027] 连接词“由……组成”排除任何未指出的要素、步骤或组分。如果用于权利要求中，此短语将使权利要求为封闭式，使其不包含除那些描述的材料以外的材料，但与其相关的常规杂质除外。当短语“由……组成”出现在权利要求主体的子句中而不是紧接在主题之后时，其仅限定在该子句中描述的要素；其它要素并不被排除在作为整体的所述权利要求之外。
- [0028] 当量、浓度、或者其它值或参数以范围、优选范围、或一系列上限优选值和下限优选值限定的范围表示时，这应当被理解为具体公开了由任何范围上限或优选值与任何范围下限或优选值的任一配对所形成的所有范围，而不论该范围是否单独公开了。例如，当公开了范围“1~5”时，所描述的范围应被解释为包括范围“1~4”、“1~3”、“1~2”、“1~2和4~5”、“1~3和5”等。当数值范围在本文中被描述时，除非另外说明，否则该范围意图包括其端

值和在该范围内的所有整数和分数。

[0029] “质量份”指表示多个组分的质量比例关系的基本计量单位,1份可表示任意的单位质量,如可以表示为1g,也可表示2.689g等。假如我们说A组分的质量份为a份,B组分的质量份为b份,则表示A组分的质量和B组分的质量之比a:b。或者,表示A组分的质量为aK,B组分的质量为bK(K为任意数,表示倍数因子)。不可误解的是,与质量份数不同的是,所有组分的质量份之和并不受限于100份之限制。

[0030] “和/或”用于表示所说明的情况的一者或两者均可能发生,例如,A和/或B包括(A和B)和(A或B);

[0031] 此外,本发明要素或组分前的不定冠词“一种”和“一个”对要素或组分的数量要求(即出现次数)无限制性。因此“一个”或“一种”应被解读为包括一个或至少一个,并且单数形式的要素或组分也包括复数形式,除非所述数量明显旨指单数形式。

[0032] 本发明首先提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒,包括:带荧光素标记的抗人CD3抗体、带荧光素标记的抗人CD4抗体、带荧光素标记的抗人CD8抗体、带荧光素标记的抗人CD19抗体、带荧光素标记的抗人CD21抗体、带荧光素标记的抗人CD24抗体、带荧光素标记的抗人CD25抗体、带荧光素标记的抗人CD27抗体、带荧光素标记的抗人CD28抗体、带荧光素标记的抗人CD38抗体、带荧光素标记的抗人CD56抗体、带荧光素标记的抗人CD57抗体、带荧光素标记的抗人CD94抗体、带荧光素标记的抗人CD127抗体、带荧光素标记的抗人CD45RA抗体、带荧光素标记的抗人CXCR3抗体、带荧光素标记的抗人CXCR5抗体、带荧光素标记的抗人CCR4抗体、带荧光素标记的抗人CCR6抗体、带荧光素标记的抗人CCR7抗体、带荧光素标记的抗人HLA-DR抗体、带荧光素标记的抗人PD-1抗体、带荧光素标记的抗人NKP30抗体、带荧光素标记的抗人NKP46抗体、带荧光素标记的抗人NKG2D抗体、带荧光素标记的抗人KIR抗体、带荧光素标记的抗人 $\gamma\delta$ 抗体、带荧光素标记的抗人V δ 2抗体、带荧光素标记的抗人IgD抗体、带荧光素标记的抗人IgM抗体。

[0033] 本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒能够结合流式细胞仪用于对人体外周血中的免疫细胞进行检测分析,获得免疫细胞的72项免疫功能指标,所述72项免疫功能指标包括:T细胞总比例、辅助性T细胞的比例、杀伤性T细胞的比例、双阳性T细胞的比例、辅助性T细胞与杀伤性T细胞的比值(Th/Tc)、初始化CD4+T细胞的比例、终末分化CD4+T细胞的比例、中心记忆CD4+T细胞的比例、效应性记忆CD4+T细胞的比例、衰竭CD4+T细胞的比例、功能性CD4+T细胞的比例、调节性T细胞的比例、初始化CD8+T细胞的比例、终末分化CD8+T细胞的比例、中心记忆CD8+T细胞的比例、效应性记忆CD8+T细胞的比例、衰竭CD8+T细胞的比例、非活跃期特异性CD8+T细胞的比例、非活跃期特异性终末分化CD8+T细胞的比例、持续表达病毒特异性CD8+T细胞的比例、持续表达病毒特异性的终末分化CD8+T细胞的比例、功能阻断性CD8+T细胞的比例、功能性CD8+T细胞的比例、终末衰老CD8+T细胞的比例、总的记忆性CD8+T细胞的比例、回巢性记忆性CD8+T细胞的比例、Th1细胞的比例、Th2细胞的比例、Th17细胞的比例、Th1细胞与Th2细胞的比值(Th1/Th2)、Th17细胞与Th2细胞的比值(Th17/Th2)、Th1细胞+Th17细胞与Th2细胞的比值(Th1+Th17/Th2)、Tfh细胞的比例、功能抑制性Tfh细胞的比例、外围辅助Tfh细胞的比例、Tfh1细胞的比例、Tfh2细胞的比例、Tfh17细胞的比例、Tc1细胞(1型CD8+T细胞)的比例、Tc2细胞(2型CD8+T细胞)的比例、Tc17细胞(17型CD8+T细胞)的比例、NK T细胞的比例、NK细胞的比例、未成熟NK细胞的比例、成熟NK细胞

(Mature NK cells)的比例、未成熟/成熟NK的比值、早期功能阻断性NK细胞的比例、晚期功能阻断性NK细胞的比例、活化NK细胞的比例、常规的杀伤性NK细胞的比例、病毒感染特异杀伤性NK细胞的比例、 $\gamma\delta$ T细胞的比例、V δ 1阳性T细胞的比例、V δ 2阳性T细胞的比例、V δ 1+/V δ 2+的比值、功能性V δ 2阳性T细胞的比例、功能抑制性V δ 2+T细胞的比例、常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例、病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例、功能性V δ 1阳性T细胞的比例、功能抑制性V δ 1阳性T细胞的比例、常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例、病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例、B细胞的比例、记忆未转换型B细胞 (memory unswitched (MZ-like) B cells) 的比例、记忆转换的B细胞 (classic memory switched B cells) 的比例、浆细胞 (Plasmablast) 的比例、CD21阴性B细胞 (CD21low B cells) 的比例、幼稚B细胞 (Naïve B cells) 的比例、前幼稚细胞 (Pre-Naïve B cells) 的比例、B10细胞 (B10cells) 的比例、记忆性B细胞 (Memory B cells) 的比例。

[0034] T细胞总比例为相同体积的人体外周血中T细胞总数与淋巴细胞总数的比值；T细胞的作用在于发挥适应性免疫功能；T细胞总比例的参考范围为45.76%~77.45%。

[0035] 辅助性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中辅助性T细胞数与T细胞总数的比值；辅助性T细胞能够在适应性免疫中发挥关键作用，如抗体产生、巨噬细胞的吞噬功能、杀伤细胞的杀伤作用等需由辅助性T细胞传递信号；辅助性T细胞的比例的参考范围为40%~67%。

[0036] 杀伤性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中杀伤性T细胞数与T细胞总数的比值；杀伤性T细胞主要发挥杀伤性免疫功能，包括清除异变的细胞如癌细胞，清除被病菌感染的细胞，对产生特殊抗原反应的目标细胞进行清除；杀伤性T细胞的比例的参考范围为31%~58%。

[0037] 双阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中双阳性T细胞数与T细胞总数的比值；双阳性T细胞主要为未分化的胸腺T细胞；双阳性T细胞的比例的参考范围为1%~5%。

[0038] 辅助性T细胞与杀伤性T细胞的比值 (Th/Tc) 为相同体积的人体外周血中辅助性T细胞数与杀伤性T细胞数的比值；辅助性T细胞与杀伤性T细胞的比值 (Th/Tc) 的参考范围为0.57%~2.44%，该比值在免疫功能评估中有重要意义，是临床判断人体免疫功能紊乱的敏感指标，如CD4/CD8比值增高，表明免疫功能处于过度活跃状态，如无急性感染或过敏，应警惕高血压、糖尿病及类风湿等自身免疫性疾病，如比值降低，则说明机体处于免疫抑制状态，要警惕恶性肿瘤包括白血病、红斑狼疮、艾滋病、呼吸道感染等。

[0039] 初始化CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中初始化CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值；初始化CD4+T细胞对免疫系统从未遇过的病原体进行识别并产生免疫应答反应，该细胞的比例代表了CD4+T细胞的初始储备及后续分化能力，接受抗原刺激后，初始化CD4+T在不同条件下分化为不同亚型细胞，发挥不同免疫功能；初始化CD4+T细胞的比例的参考范围为36.3%±15.3%。

[0040] 终末分化CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中终末分化CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值；终末分化CD4+T细胞为无分化更新能力的CD4+T细胞；终末分化CD4+T细胞的比例的参考范围为15.3%±1.5%。

[0041] 中心记忆CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中中心记忆CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值；中心记忆CD4+T细胞对抗原刺激 (尤其是二次刺激) 高度敏感，产生

快速的免疫效应反应,对疫苗产生免疫记忆效应尤为重要;中心记忆CD4+T细胞的比例的参考范围为 $33.8\% \pm 15.6\%$ 。

[0042] 效应性记忆CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中效应性记忆CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值;效应性记忆CD4+T细胞具有效应功能,可快速释放各类炎症因子;效应性记忆CD4+T细胞的比例的参考范围为 $27.6\% \sim 55.9\%$ 。

[0043] 衰竭CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中衰竭CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值;衰竭CD4+T细胞数与多种自身免疫疾病相关联,比如1型糖尿病、类风湿等;衰竭CD4+T细胞的比例的参考范围为 $11.96\% \pm 8.60\%$ 。

[0044] 功能性CD4+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能性CD4+T细胞数与CD4+T细胞总数的比值;功能性CD4+T细胞是可活化性CD4+T细胞;功能性CD4+T细胞的比例的参考范围为 $89.56\% \pm 3.06\%$ 。

[0045] 调节性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中调节性T细胞数与CD4+T细胞总数的比值;调节性T细胞维持免疫平衡的重要调节细胞,主要对体内自身免疫反应起负控制/抑制作用,调控免疫耐受。其比例对肿瘤、免疫缺陷、排斥都有很大的作用。过高与肿瘤相关,过低与自身免疫病相关;调节性T细胞的比例的参考范围为 $4.14\% \pm 1.85\%$ 。

[0046] 初始化CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中初始化CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值;初始化CD8+T细胞是细胞免疫治疗的重要细胞群之一;初始化CD8+T细胞的比例的参考范围为 $35.4\% \sim 53.2\%$ 。

[0047] 终末分化CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中终末分化CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值;终末分化CD8+T细胞是无分化更新功能的CD8细胞;终末分化CD8+T细胞的比例的参考范围为 $21.2\% \sim 40.3\%$ 。

[0048] 中心记忆CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中中心记忆CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值;中心记忆CD8+T细胞是对病毒、抗原再次感染或刺激敏感的细胞,能够调动快速免疫响应,可在次级淋巴器官稳定增殖并在抗原刺激下分化为效应细胞;中心记忆CD8+T细胞的比例的参考范围为 $4.61\% \sim 6.0\%$ 。

[0049] 效应性记忆CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中效应性记忆CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值;效应性记忆CD8+T细胞具有抗感染、抗肿瘤功能,可释放多种抗病毒细胞活素并对异变细胞具有杀伤能力;效应性记忆CD8+T细胞的比例的参考范围为 $33.1\% \sim 56.3\%$ 。

[0050] 衰竭CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中衰竭CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值;衰竭CD8+T细胞数与多种病毒性感染相关联。若衰竭细胞增多,则表明CD8细胞抗感染、抗肿瘤及清除靶细胞能力降低;衰竭CD8+T细胞的比例的参考范围为 $30\% \sim 55\%$ 。

[0051] 非活跃期特异性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中非活跃期特异性CD8+T细胞数与效应性记忆CD8+T细胞总数的比值;非活跃期特异性CD8+T细胞的比例的参考范围为 $78.7\% \sim 96\%$ 。

[0052] 非活跃期特异性终末分化CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中非活跃期特异性终末分化CD8+T细胞数与终末分化CD8+T细胞总数的比值;非活跃期特异性终末分化CD8+T细胞的比例的参考范围为 $85.2\% \sim 98.8\%$ 。

[0053] 持续表达病毒特异性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中持续表达病毒

特异性CD8+T细胞数与效应性记忆CD8+T细胞总数的比值；持续表达病毒特异性CD8+T细胞的比例的参考范围为2.3%~8.6%。

[0054] 持续表达病毒特异性的终末分化CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中持续表达病毒特异性的终末分化CD8+T细胞数与终末分化CD8+T细胞总数的比值；所述持续表达病毒特异性的终末分化CD8+T细胞的比例的参考范围为6.4%~20%。

[0055] 功能阻断性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能阻断性CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值。功能阻断性CD8+T是功能抑制性的CD8+T细胞，特别是与抗肿瘤能力相关，在维持机体免疫功能稳态及建立移植免疫耐受中发挥着重要作用，可作为一些自身免疫性疾病、爱滋病及免疫缺陷的免疫检测指标，比例升高，则免疫效应作用受到抑制。功能阻断性CD8+T细胞的比例的参考范围为 $24.4 \pm 7.6\%$ 。

[0056] 功能性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能性CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值。功能性CD8+T细胞是具有免疫功能活性的CD8+T细胞，能杀伤病菌感染的靶细胞及肿瘤细胞，在抗肿瘤、抗感染和同种异体移植排斥中发挥重要的效应功能。功能性CD8+T细胞的比例的参考范围为52.5%-70%。

[0057] 终末衰老CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中终末衰老CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值。终末衰老CD8+T细胞具有低增殖、易凋亡的特点，其比例升高与其免疫效应下降相关。终末衰老CD8+T细胞的比例的参考范围为5.45%~20.48%。

[0058] 总的记忆性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中总的记忆性CD8+T细胞数与CD8+T细胞总数的比值。总的记忆性CD8+T细胞是可被抗原再刺激并快速激活而起直接杀伤肿瘤细胞或病菌感染细胞的亚群。总的记忆性CD8+T细胞的比例的参考范围为12.9%~25.8%。

[0059] 回巢性记忆性CD8+T细胞的比例为相同体积的人体外周血中回巢性记忆性CD8+T细胞数与总的记忆性CD8+T细胞细胞数的比值。回巢性记忆性CD8+T细胞是能迁移到二级淋巴器官接受抗原刺激而二次活化为效应细胞，是HIV感染患者的治疗与预后的重要指标。回巢性记忆性CD8+T细胞的比例的参考范围为 $73\% \pm 10.3\%$ 。

[0060] Th1细胞的比例为相同体积的人体外周血中Th1细胞数与Th细胞总数的比值。Th1细胞又称炎症性T细胞，主要分泌白介素2、干扰素- γ 、干扰素-a、肿瘤坏死因子等，主要介导细胞毒和局部炎症有关的免疫应答，辅助抗体生成，参与细胞免疫及迟发型超敏性炎症的发生，可被视为迟发型超敏反应T细胞。Th1细胞参与抗胞内病菌免疫。Th1细胞的比例过高会引起器官特异性自身免疫疾病。Th1细胞的比例的参考范围为14%~46%。

[0061] Th2细胞的比例为相同体积的人体外周血中Th2细胞数与Th细胞总数的比值。Th2细胞主要分泌白介素4,5,6和10等，主要功能为刺激B细胞增殖并产生免疫球蛋白G(IgG1)和E(IgE)抗体，与体液免疫有关。Th2细胞参与抗胞外病原寄生虫免疫。Th2细胞的比例过高会引起过敏性炎症和哮喘。Th2细胞的比例的参考范围为12%~25%。

[0062] Th17细胞的比例为相同体积的人体外周血中Th17细胞数与Th细胞总数的比值。Th17细胞参与介导炎症反应(抗胞外细菌、真菌感染)、自身免疫性疾病、肿瘤和移植排斥等的发生和发展。Th17细胞主要起促炎作用，比例过高会引起炎症性疾病(EAE、CIA等)。Th17细胞的比例的参考范围为0.8%~8.3%。

[0063] Th1细胞与Th2细胞的比值(Th1/Th2)为相同体积的人体外周血中Th1细胞数与Th2

细胞数的比值;Th1细胞与Th2细胞的比值(Th1/Th2)的参考范围为0.71~3.33;Th1/Th2比例升高将促进细胞免疫反应,增强CD+8T细胞的活性,增强抗肿瘤能力,以及清除细胞内病毒的能力,但同时增加炎症反应,如乙肝病毒感染会加重肝细胞的损伤。Th1/Th2比例降低将促进体液免疫反应,但抑制细胞免疫反应,细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxicity t lymphocyte,CTL)细胞活性减弱,肝细胞损伤减轻。

[0064] Th17细胞与Th2细胞的比值(Th17/Th2)为相同体积的人体外周血中Th17细胞数与Th2细胞数的比值;Th17细胞与Th2细胞的比值(Th17/Th2)的参考范围为0.04~0.6;Th17/Th2比例升高与包括慢性炎症在内的炎症性疾病、肿瘤等发生、发展相关。

[0065] Th1细胞+Th17细胞与Th2细胞的比值(Th1+Th17/Th2)为相同体积的人体外周血中Th1细胞+Th17细胞数与Th2细胞数的比值;Th1细胞+Th17细胞与Th2细胞的比值(Th17/Th2)的参考范围为0.89~3.79;Th1+Th17/Th2与自身免疫性疾病、肿瘤和移植物抗宿主等疾病的发生和发展相关。

[0066] Tfh细胞的比例为相同体积的人体外周血中Tfh细胞数与CD4+T细胞总数的比值。Tfh细胞分泌多种细胞因子及表达多种共刺激分子完成对B细胞产生抗体的辅助作用。Tfh细胞的比例过高会引起抗体相关自身免疫疾病。Tfh细胞的比例过低会引起免疫缺陷。Th17细胞的比例的参考范围为23%~41.2%。

[0067] 功能抑制性Tfh细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能抑制性Tfh细胞数与CD4+T细胞总数的比值。功能抑制性Tfh细胞具有免疫负调节作用,可抑制Tfh细胞过度活化。功能抑制性Tfh细胞的比例的参考范围为15.2%~36%。

[0068] 外围辅助Tfh细胞的比例为相同体积的人体外周血中外围辅助Tfh细胞数与CD4+T细胞总数的比值。外围辅助Tfh细胞是具有抑制功能的辅助T细胞。外围辅助Tfh细胞的比例的参考范围为22.6%~39.6%。

[0069] Tfh1细胞的比例为相同体积的人体外周血中Tfh1细胞数与Tfh细胞总数的比值。Tfh1细胞在辅助B细胞分化中不起主要作用,与流感疫苗的抗体反应较差相关。Tfh1细胞在自发性淋巴瘤等自身免疫病中数量减少。Tfh1细胞的比例的参考范围为19.2%~29.8%。

[0070] Tfh2细胞的比例为相同体积的人体外周血中Tfh2细胞数与Tfh细胞总数的比值。Tfh2细胞能更有效地辅助初始B细胞分化形成浆母细胞,在自身免疫病及高级别B细胞非霍金奇淋巴瘤等患者中数量增加。Tfh2细胞的比例的参考范围为15.3%~23.6%。

[0071] Tfh17细胞的比例为相同体积的人体外周血中Tfh17细胞数与Tfh细胞总数的比值。Tfh17细胞与Tfh2细胞一样能更有效地辅助初始B细胞分化形成浆母细胞。Tfh17细胞的功能与Tfh2细胞的功能类似。Tfh17细胞的比例的参考范围为31%~40%。

[0072] Tc1细胞(1型CD8+T细胞)的比例为相同体积的人体外周血中Tc1细胞数与Tc细胞总数的比值。Tc1细胞是1型细胞毒T细胞,能迁移至炎症部位,分泌INF- γ ,杀死靶细胞,达到抗病毒感染的目的。

[0073] Tc2细胞(2型CD8+T细胞)的比例为相同体积的人体外周血中Tc2细胞数与Tc细胞总数的比值。Tc2细胞是2型细胞毒T细胞,分泌IL4、IL5、IL10。Tc2细胞主要与慢性感染、肿瘤、自身免疫性疾病等慢性疾病相关。该群细胞增多与疾病的严重程度和进展相关。

[0074] Tc17细胞(17型CD8+T细胞)的比例为相同体积的人体外周血中Tc17细胞数与Tc细胞总数的比值。Tc17细胞是产生白介素17的一群细胞毒T细胞,在抗肿瘤、抗感染免疫中发

挥重要作用。Tc17细胞与Tc1细胞一起在抗甲型流感病毒中具有重要作用。

[0075] NK T细胞的比例为相同体积的人体外周血中NK T细胞数与淋巴细胞总数的比值。NK T细胞是具有直接杀伤活性的一类NK细胞。NK T细胞的比例的参考范围为11.71%~33.1%。

[0076] NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中NK细胞数与淋巴细胞总数的比值。NK细胞是人体重要的免疫细胞,与抗肿瘤、抗病毒感染和免疫调节有着密切的联系,亦参与超敏反应和自身免疫性疾病的发生,能够识别靶细胞、杀伤介质。NK细胞的比例的参考范围为6.26%~37.16%。

[0077] 未成熟NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中未成熟NK细胞数与NK细胞总数的比值。未成熟NK细胞是NK细胞的一个亚群,与成熟的NK细胞比,其对靶细胞的杀伤能力较低,但能最高效产生细胞因子如IFN- γ 。未成熟NK细胞的比例的参考范围为5.6~27.8%。

[0078] 成熟NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中成熟NK细胞数与NK细胞总数的比值。成熟NK细胞由不成熟NK细胞分化而来,具强大的杀伤活性,可直接杀伤靶细胞。成熟NK细胞的比例的参考范围为43~82%。

[0079] 未成熟/成熟NK的比值为未成熟NK细胞数与成熟NK细胞数的比值。该比值跟病情发展及疗效有密切联系,比值升高一般与疗效不佳或病情进展相关。该比值的参考范围为0.068~0.72。

[0080] 早期功能阻断性NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中早期功能阻断性NK细胞数与NK细胞总数的比值。早期功能阻断性NK细胞能够加强NK细胞的杀伤功能。早期功能阻断性NK细胞的比例的参考范围为36.3%~52.7%。

[0081] 晚期功能阻断性NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中晚期功能阻断性NK细胞数与NK细胞总数的比值。晚期功能阻断性NK细胞为调节性NK细胞。晚期功能阻断性NK细胞的比例的参考范围为22%~29%。

[0082] 活化NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中活化NK细胞数与NK细胞总数的比值。活化NK细胞是具有抗肿瘤、抗病毒功能的功能性NK细胞。活化NK细胞的比例的参考范围为25%~53%。

[0083] 常规的杀伤性NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中常规的杀伤性NK细胞数与NK细胞总数的比值。常规的杀伤性NK细胞为抗肿瘤免疫的效应细胞,主要对肿瘤细胞和病菌感染的细胞起杀伤或清除作用。常规的杀伤性NK细胞的比例的参考范围为38.5%~64%。

[0084] 病毒感染特异杀伤性NK细胞的比例为相同体积的人体外周血中病毒感染特异杀伤性NK细胞数与NK细胞总数的比值。病毒感染特异杀伤性NK细胞与病毒感染直接相关,病毒感染特异杀伤性NK细胞的比例降低与病毒感染、肿瘤进展等相关。病毒感染特异杀伤性NK细胞的比例的参考范围为9.93%~80.85%。

[0085] $\gamma\delta$ T细胞的比例为相同体积的人体外周血中 $\gamma\delta$ T细胞数与T细胞总数的比值。 $\gamma\delta$ T细胞为参与机体免疫的第一道防线,具有一定的非特异性杀伤作用,并且具有广谱的抗肿瘤、抗感染的功能。 $\gamma\delta$ T细胞的比例的参考范围为0.5%~8.2%。

[0086] V δ 1阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中V δ 1阳性T细胞数与 $\gamma\delta$ T细胞总

数的比值。V δ 1阳性T细胞是具有免疫抑制、调节功能的 γ δ 细胞亚群。V δ 1阳性T细胞的比例的参考范围为8.2%~24%。

[0087] V δ 2阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中V δ 2阳性T细胞数与 γ δ T细胞总数的比值。V δ 2阳性T细胞是主要发挥抗肿瘤、抗感染作用的 γ δ T细胞亚群。V δ 2阳性T细胞的比例的参考范围为46.8%~72%。

[0088] V δ 1+/V δ 2+的比值为V δ 1阳性T细胞数与V δ 2阳性T细胞数的比值。该比值与 γ δ T细胞亚群的功能状态直接相关,比值升高一般表明 γ δ T细胞亚群的功能下降。V δ 1阳性T细胞数与V δ 2阳性T细胞的比例的参考范围为0.12~0.51。

[0089] 功能性V δ 2阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能性V δ 2阳性T细胞数与 γ δ T细胞总数的比值。该比例与抗肿瘤、抗感染功能直接相关。功能性V δ 2阳性T细胞的比例的参考范围为94.6%~99.8%。

[0090] 功能抑制性V δ 2阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能抑制性V δ 2阳性T细胞数与V δ 2 γ δ T细胞总数的比值。功能抑制性V δ 2阳性T细胞能够控制细胞过度激活,肿瘤患者中比例升高表明抗肿瘤功能受到抑制。功能抑制性V δ 2+T细胞的比例的参考范围为6.4%~38.9%。

[0091] 常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞数与V δ 2 γ δ T细胞总数的比值。常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞能够发挥抗肿瘤、抗感染作用。常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例的参考范围为0~1%。

[0092] 病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞数与V δ 2 γ δ T细胞总数的比值。病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞与病毒感染直接相关,病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例降低与病毒感染、肿瘤进展等相关,且影响细胞的活化。病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞的比例的参考范围为0~0.8%。

[0093] 功能性V δ 1阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中为相同体积的人体外周血中功能性V δ 1阳性T细胞与V δ 1 γ δ T细胞总数的比值。功能性V δ 1阳性T细胞为具有抗肿瘤功能的V δ 1 δ 1细胞群。功能性V δ 1阳性T细胞的比例的参考范围为94.6%~99.8%。

[0094] 功能抑制性V δ 1阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中功能抑制性V δ 1阳性T细胞数与V δ 1 γ δ T细胞总数的比值。功能抑制性V δ 1阳性T细胞是具有功能抑制性的V δ 1 δ 1细胞群,抑制细胞过度活化。功能抑制性V δ 1阳性T细胞的比例的参考范围为8.4%~38.9%。

[0095] 常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞数与V δ 1 γ δ T细胞总数的比值。常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞是能发挥抗肿瘤、抗感染作用的V δ 1 δ 1细胞群。常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例的参考范围为0~1%。

[0096] 病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例为相同体积的人体外周血中人体外周血中病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞数与V δ 1 γ δ T细胞总数的比值。病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞与病毒感染直接相关,比例降低与病毒感染、肿瘤进展等相关。病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞的比例的参考范围为0~9.6%。

[0097] B细胞的比例为相同体积的人体外周血中B细胞数与淋巴细胞总数的比值。B细胞主要产生抗体,在体液免疫中发挥重要功能。B细胞的比例的参考范围为5~15%。

[0098] 记忆未转换型B细胞(memory unswitched (MZ-like) B cells)的比例为相同体积的人体外周血中记忆未转换型B细胞数与B细胞总数的比值。记忆未转换型B细胞是记忆型B细胞前体,其数量代表了能转换为记忆型B细胞的能力。记忆未转换型B细胞的比例的参考范围为3.8%~35.6%。

[0099] 记忆转换的B细胞(classic memory switched B cells)的比例为相同体积的人体外周血中记忆转换的B细胞数与B细胞总数的比值。记忆转换的B细胞属于已转换的记忆型B细胞,其表面Ig从IgD转变成为了IgG、IgA或IgE,可以进一步向Plasmablast(浆母细胞)转换,开始大量分泌抗体。记忆转换的B细胞的比例的参考范围为4.6%~35.5%。

[0100] 浆细胞(Plasmablast)的比例为相同体积的人体外周血中浆细胞数与B细胞总数的比值。浆细胞由成熟B细胞经抗原刺激活化而来,主要功能是分泌抗体,中和抗原。浆细胞的比例的参考范围为0.3%~7.8%。

[0101] CD21阴性B细胞(CD21low B cells)的比例为相同体积的人体外周血中CD21阴性B细胞数与B细胞总数的比值。CD21阴性B细胞是一种记忆型的B细胞,在自身免疫病等慢性炎症患者中数量增加。CD21阴性B细胞的比例的参考范围为1.9%~19.3%。

[0102] 幼稚B细胞(Naïve B cells)的比例为相同体积的人体外周血中幼稚B细胞数与B细胞总数的比值。幼稚B细胞是尚未暴露或接触抗原的B细胞,可通过抗原刺激分化产生不同类型B细胞,代表了B细胞的储备能力。幼稚B细胞的比例的参考范围为17.9%~75.1%。

[0103] 前幼稚细胞(Pre-Naïve B cells)的比例为相同体积的人体外周血中前幼稚细胞数与B细胞总数的比值。前幼稚细胞的比例代表了其转化为幼稚细胞的能力。

[0104] B10细胞(B10cells)的比例为相同体积的人体外周血中B10细胞数与B细胞总数的比值。B10细胞是一群发挥免疫调节及抑制功能的B细胞,能分泌白介素10,在肿瘤发展过程中对免疫响应起抑制作用,在自身免疫疾病中可防止免疫反应对机体自身的损害。

[0105] 记忆性B细胞(Memory B cells)的比例为相同体积的人体外周血中记忆性B细胞数与B细胞总数的比值。记忆性B细胞是产生免疫记忆功能的重要效应细胞,能够对抗原二次刺激快速响应,产生大量抗体。记忆性B细胞的比例的参考范围为11%~46.6%。

[0106] 具体的,本申请中提到的参考范围均指的是健康人的正常范围。

[0107] 上述72项免疫功能指标能够全面反映人体外周血T细胞的免疫功能状态,通过对以上72项免疫功能指标进行分析,若判定人体的免疫功能低下(比如初始化细胞变少、功能性细胞变少、衰竭细胞增多等),则提示可能需要进行免疫干预,如通过药物、功能食品或生物治疗的方法来提高机体的免疫功能。

[0108] 为获得上述72项免疫功能指标,首先需要从人体外周血中提取外周血单个核细胞(PBMC),之后从本试剂盒的所有抗体中分别取一定量,全部与外周血单个核细胞进行混合、孵育,获得细胞检测样品,之后采用流式细胞仪对细胞检测样品进行检测,利用流式细胞仪自带的分析软件或者第三方分析软件对各种免疫细胞的分析结果进行统计分析后,获得上述17项免疫功能指标。

[0109] 具体的,各免疫细胞群的细胞标志为:

[0110] T细胞总群:CD3+;

[0111] 辅助性T细胞:CD3+CD4+;

[0112] 杀伤性T细胞:CD3+CD8+;

- [0113] 双阳性T细胞:CD3+CD4+CD8+;
- [0114] 初始化CD4+T细胞:CD3+CD4+CD45RA+CCR7+;
- [0115] 终末分化CD4+T细胞:CD3+CD4+CD45RA+CCR7-;
- [0116] 中心记忆CD4+T细胞:CD3+CD4+CD45RA-CCR7+;
- [0117] 效应性记忆CD4+T细胞:CD3+CD4+CD45RA-CCR7-;
- [0118] 衰竭CD4+T细胞:CD3+CD4+CD28-;
- [0119] 功能性CD4+T细胞:CD3+CD4+CD28+;
- [0120] 调节性T细胞:CD3+CD4+CD25+CD127-;
- [0121] 初始化CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7+CD45RA+;
- [0122] 终末分化CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA+;
- [0123] 中心记忆CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7+CD45RA-;
- [0124] 效应性记忆CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA-;
- [0125] 衰竭CD8+T细胞:CD3+CD8+CD28-;
- [0126] 非活跃期特异性CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA-CD127high;
- [0127] 非活跃期特异性终末分化CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA+CD127high;
- [0128] 持续表达病毒特异性CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA-CD127low;
- [0129] 持续表达病毒特异性的终末分化CD8+T细胞:CD3+CD8+CCR7-CD45RA+CD127low;
- [0130] 功能阻断性CD8+T细胞:CD3+CD8+PD-1+;
- [0131] 功能性CD8+T细胞:CD3+CD8+CD28+;
- [0132] 终末衰老CD8+T细胞:CD3+CD8+CD28-CD57+;
- [0133] 总的记忆性CD8+T细胞:CD3+CD8+HLADR+;
- [0134] 回巢性记忆性CD8+T细胞:CD3+CD8+HLADR+CD38+;
- [0135] Th1细胞:CD3+CD4+CXCR5-CXCR3+CCR4-;
- [0136] Th2细胞:CD3+CD4+CXCR5-CXCR3-CCR4+;
- [0137] Th17细胞:CD3+CD4+CXCR5-CXCR3-CCR4-CCR6+;
- [0138] Tfh细胞:CD3+CD4+CXCR5+;
- [0139] 功能抑制性Tfh细胞:CD3+CD4+CXCR5+PD-1+;
- [0140] 外围辅助Tfh细胞:CD3+CD4+CXCR5-PD-1+;
- [0141] Tfh1细胞:CD3+CD4+CXCR5+CXCR3+CCR4-;
- [0142] Tfh2细胞:CD3+CD4+CXCR5+CXCR3-CCR4+;
- [0143] Tfh17细胞:CD3+CD4+CXCR5+CXCR3-CCR4-CCR6+;
- [0144] Tc1细胞:CD3+CD8+CXCR5-CXCR3+CCR4-;
- [0145] Tc2细胞:CD3+CD8+CXCR5-CXCR3-CCR4+;
- [0146] Tc17细胞:CD3+CD8+CXCR5-CXCR3-CCR4-CCR6+;
- [0147] NKT细胞:CD3+CD56+;
- [0148] NK细胞:CD3-CD56+;
- [0149] 未成熟NK细胞:CD3-CD56+bright;
- [0150] 成熟的NK细胞:CD3-CD56+dim;
- [0151] 早期功能阻断性NK细胞:CD3-CD56+CD94+KIR-;

- [0152] 晚期功能阻断性NK细胞:CD3-CD56+CD94-KIR+;
- [0153] 活化NK细胞:CD3-CD56+NKG2D+;
- [0154] 常规的杀伤性NK细胞:CD3-CD56+NKP30+;
- [0155] 病毒感染特异杀伤性NK细胞:CD3-CD56+NKP46+;
- [0156] γ δ T细胞:CD3+ γ δ +;
- [0157] V δ 2阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 2+;
- [0158] 功能性V δ 2阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 2+NKG2D+;
- [0159] 功能抑制性V δ 2阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 2+PD1+;
- [0160] 常规的杀伤性V δ 2阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 2+NKP30+;
- [0161] 病毒感染特异杀伤性V δ 2阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 2+NKP46+;
- [0162] 功能性V δ 1阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 1+NKG2D+;
- [0163] 功能抑制性V δ 1阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 1+PD1+;
- [0164] 常规的杀伤性V δ 1阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 1+NKP30+;
- [0165] 病毒感染特异杀伤性V δ 1阳性T细胞:CD3+ γ δ +V δ 1+NKP46+;
- [0166] B细胞总群:CD3-CD19+;
- [0167] 记忆未转换型B细胞:CD3-CD19+CD27+IgD+;
- [0168] 记忆转换的B细胞:CD3-CD19+IgD-IgM-CD27+CD38^{low};
- [0169] 浆细胞:CD3-CD19+IgD-IgM-CD27+CD38+;
- [0170] CD21阴性B细胞:CD3-CD19+IgD+CD27-CD38^{low} CD21^{low};
- [0171] 幼稚B细胞:CD3-CD19+CD27-IgD+;
- [0172] 前幼稚细胞:CD3-CD19+IgM-IgD-CD27-CD38+;
- [0173] B10细胞:CD3-CD19+IgD+IgM+CD27+CD24+CD38-;
- [0174] 记忆性B细胞:CD3-CD19+IgD+IgM+CD27+CD38+CD24+。

[0175] 优选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为单克隆抗体。这是因为单克隆抗体的特异性好,染色后的荧光强度与抗原表达水平是线性关系,并且单克隆抗体不同生产批次间的差异较小。多克隆抗体虽然可以产生更强的信号,但是特异性差,染色后荧光强度与抗原水平不是线性关系,并且多克隆抗体不同生产批次间的差异很大,因此在流式检测过程中使用单克隆抗体能够保证较高的检测精确度。

[0176] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 γ δ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的任意一种为粉剂或者液体制剂。

[0177] 所述粉剂在使用前需要加入适量磷酸盐缓冲液 (PBS) 进行溶解,所述液体制剂不需溶解,直接使用。所述粉剂与液体制剂均可以置于4℃条件下保存,粉剂还可以置于-20℃条件下保存。

[0178] 具体的,所述液体制剂中抗体的浓度为0.1-2mg/ml (例如0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml)。

[0179] 可选的,所述液体制剂的成分包括抗体与磷酸盐缓冲液。

[0180] 具体的,所述粉剂使用时,将所述粉剂与磷酸盐缓冲液混合得到抗体溶液,所述抗体溶液中抗体的浓度为0.1-2mg/ml (例如0.1mg/ml、0.5mg/ml、1mg/ml、1.5mg/ml、2mg/ml)。

[0181] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均采用抗体试剂管封装。

[0182] 优选的,所述抗体试剂管为完全不透光的棕色塑料管,也即是说,所述棕色塑料管的透光率为零。

[0183] 可选的,所述抗体试剂管中盛装的抗体为液体制剂时,所述抗体试剂管中抗体的体积为0.5ml-5ml,例如0.5ml、1ml、2ml、3ml、4ml、5ml等,该抗体试剂管中的抗体的使用次数为50-500次。

[0184] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体均为液体制剂,液体制剂使用起来更为方便,能够省去粉剂使用前的溶解步骤,并且能避免粉剂溶解不均匀时导致的检测误差问题。

[0185] 能够理解的是,粉剂形式的抗体虽然使用起来比较繁琐,需要增加溶解的步骤,但是相较于液体制剂形式的抗体来说,粉剂形式的抗体的保质期更长。

[0186] 当所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体中的至少一种为粉剂时,所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒还包括磷酸盐缓冲液 (PBS),所述磷酸盐缓冲液可置于试剂瓶中。通过提供磷酸盐缓冲液,为使用者节约了配制磷酸盐缓冲液的时间,使抗体的使用更加便捷。

[0187] 可选的,所述抗人CD3抗体、抗人CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD19抗体、抗人CD21抗体、抗人CD24抗体、抗人CD25抗体、抗人CD27抗体、抗人CD28抗体、抗人CD38抗体、抗人CD56抗体、抗人CD57抗体、抗人CD94抗体、抗人CD127抗体、抗人CD45RA抗体、抗人CXCR3抗

体、抗人CXCR5抗体、抗人CCR4抗体、抗人CCR6抗体、抗人CCR7抗体、抗人HLA-DR抗体、抗人PD-1抗体、抗人NKP30抗体、抗人NKP46抗体、抗人NKG2D抗体、抗人KIR抗体、抗人 $\gamma\delta$ 抗体、抗人V δ 2抗体、抗人IgD抗体、抗人IgM抗体的荧光素标记选自PerCP-Cy5.5、BV510、FITC、AF647、PE-Cy7、BV421、PE、AF647、APC-H7、BB515。

[0188] 本发明还提供一种人体外周血免疫细胞功能全面评估方法,包括如下步骤:

[0189] 步骤1、提供上文所述的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒;

[0190] 从2ml-10ml(例如2ml、4ml、6ml、8ml、10ml)人体外周血中提取外周血单个核细胞(PBMC)。

[0191] 由于所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒的具体内容已在上文进行详细描述,因此此处不再赘述。

[0192] 可选的,从人体外周血中提取外周血单个核细胞(PBMC)的方法包括如下步骤:

[0193] 1) 将2ml-10ml人体外周血的全血标本加入离心管内;

[0194] 2) 在全血标本中加入等体积的磷酸盐缓冲液(PBS),将PBS+全血标本上下摇动混均匀,得到标本稀释液;

[0195] 3) 取新的15ml离心管,加入FICOLL液与标本稀释液,通常按照FICOLL液与标本稀释液的体积比1:1的比例添加;

[0196] 4) 将离心管倾斜45°,用1000 μ L枪头贴壁将标本稀释液小心加入离心管内;

[0197] 5) 以2000rpm转速离心20min;

[0198] 6) 采用1000 μ l枪头吸掉少许上层黄色血清,后吸白色层细胞至新的离心管(不能吸到红细胞);

[0199] 7) 取等体积的磷酸盐缓冲液(PBS)以1500rpm转速离心15min;

[0200] 8) 倒掉PBS,将离心管倒置在纸上吸水;

[0201] 9) 在离心管中加入3ml红细胞裂解液,吹打均匀后裂解5min,期间不时上下颠倒混匀;

[0202] 10) 以1000rpm转速离心5min;

[0203] 11) 倒掉红细胞裂解液,将离心管倒置在纸上吸水;

[0204] 12) 加入5ml PBS,以1000rpm转速离心5min;

[0205] 13) 倒掉PBS,白色沉淀即为外周血单个核细胞(PBMC)。

[0206] 步骤2、当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中的所有抗体均为液体制剂时,从所有抗体中分别取1 μ l-5 μ l(例如1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l),全部与所述外周血单个核细胞进行混合,在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C(例如2 $^{\circ}$ C、3 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、6 $^{\circ}$ C,优选为4 $^{\circ}$ C)条件下避光孵育10分钟至30分钟(例如10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟),得到细胞检测样本;

[0207] 当所述人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒中至少有一种抗体为粉剂时,首先采用适量磷酸盐缓冲液(PBS)将粉剂溶解为抗体溶液,之后从所有液体形式的抗体中分别取1 μ l-5 μ l(例如1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l),全部与所述外周血单个核细胞进行混合,在2 $^{\circ}$ C-6 $^{\circ}$ C(例如2 $^{\circ}$ C、3 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ C、5 $^{\circ}$ C、6 $^{\circ}$ C,优选为4 $^{\circ}$ C)条件下避光孵育10分钟至30分钟(例如10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟),得到细胞检测样本。

[0208] 具体的,所述避光的条件指的是光照强度在0.2lux以下的环境。

[0209] 具体的,所述液体制剂中抗体的浓度为0.1-2mg/ml;所述粉剂与磷酸盐缓冲液混

合后得到的抗体溶液中抗体的浓度为0.1-2mg/ml。

[0210] 步骤3、采用流式细胞仪对所述细胞检测样本进行检测分析。

[0211] 综上所述,本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估试剂盒能够结合流式细胞仪用于对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估,使用方便,且对人体安全,该试剂盒可用于人体免疫健康管理评价以及相关感染患者的免疫功能评估等多种免疫功能评估项目中。本发明的人体外周血免疫细胞功能全面评估方法能够对人体外周血中的免疫细胞的功能进行全面评估,操作步骤简单,操作过程安全。

[0212] 由于本发明中所涉及的各工艺参数的数值范围在上述实施例中不可能全部体现,但本领域的技术人员完全可以想象到只要落入上述该数值范围内的任何数值均可实施本发明,当然也包括若干项数值范围内具体值的任意组合。此处,出于篇幅的考虑,省略了给出某一项或多项数值范围内具体值的实施例,此不应当视为本发明的技术方案的公开不充分。

[0213] 申请人声明,本发明通过上述实施例来说明本发明的详细工艺设备和工艺流程,但本发明并不局限于上述详细工艺设备和工艺流程,即不意味着本发明必须依赖上述详细工艺设备和工艺流程才能实施。所属技术领域的技术人员应该明了,对本发明的任何改进,对本发明产品各原料的等效替换及辅助成分的添加、具体方式选择等,落在本发明的保护范围内。