



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104458539 A

(43) 申请公布日 2015. 03. 25

(21) 申请号 201410786994. 4

(22) 申请日 2014. 12. 17

(71) 申请人 重庆医科大学附属儿童医院

地址 400014 重庆市渝中区中山二路 136 号

(72) 发明人 赵晓东 秦涛

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

G01N 15/10(2006. 01)

G01N 33/58(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图11页

(54) 发明名称

一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及细胞增殖检测领域,特别涉及一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒。该方法包括:将第一待测血液样本与淋巴细胞多克隆激活剂混合,经细胞培养,获得第一血液细胞;将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与第一血液细胞进行孵育,裂解红细胞,加入绝对计数用微球,采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量,根据淋巴细胞数量、绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得刺激组淋巴细胞的浓度。本发明不仅可检测淋巴细胞各亚群的增殖比例,还可检测淋巴细胞各亚群增殖的绝对值,可准确反应淋巴细胞的增殖情况;使用全血进行增殖实验,不需要分离 PBMC,血标本量要求很小;操作步骤简易,耗时短,误差较小。

1. 一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法,其特征在于,包括如下步骤:

将第一待测血液样本与淋巴细胞多克隆激活剂混合,经细胞培养,获得第一血液细胞;将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与所述第一血液细胞进行孵育,裂解红细胞,加入绝对计数用微球,采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量,根据所述淋巴细胞数量、所述绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得刺激组淋巴细胞的浓度;

将第二待测血液样本进行细胞培养,获得第二血液细胞;将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与所述第二血液细胞进行孵育,裂解红细胞,加入绝对计数用微球,采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量,根据所述淋巴细胞数量、所述绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得未刺激组淋巴细胞的浓度;

比较所述刺激组淋巴细胞的浓度与所述未刺激组淋巴细胞的浓度,获得淋巴细胞增殖情况;

所述第一待测血液样本与所述第二待测血液样本的来源相同。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述淋巴细胞表面标记抗体为T淋巴细胞表面标记抗体和/或B淋巴细胞表面标记抗体。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述T淋巴细胞表面标记抗体为CD3抗体、CD8抗体、CD45抗体、CD4抗体、CD14抗体或CD15抗体中的一种或两者以上的混合物。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述B淋巴细胞表面标记抗体包括CD3抗体、CD45抗体、CD19抗体、CD14抗体或CD15抗体中的一种或两者以上的混合物。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述淋巴细胞多克隆激活剂为PWM或PHA。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述待测血液样本的用量不大于300 μ L。

7. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述细胞培养具体为在35 $^{\circ}$ C~40 $^{\circ}$ C、4~6% CO₂的条件下培养5~10天。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述孵育具体为:在20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C避光条件下孵育10~30min。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述裂解所用的试剂为溶血素。

10. 一种检测淋巴细胞增殖情况的试剂盒,其特征在于,包括淋巴细胞多克隆激活剂、荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体,溶血素、绝对计数用微球和抗凝剂。

一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及细胞增殖检测领域,特别涉及一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 原发性免疫缺陷病(Primary immunodeficiency disease,PID)系因相关基因突变导致免疫细胞或其组成成分量或质的变化,导致机体对多种病原体易感性显著增高的疾病。迄今已发现的约200多种PID中,已有200余个基因突变被明确。而免疫功能评估对PID的诊断及预后具有重要意义。一方面,已经基因确诊的PID患儿进行免疫功能评估有助于判断患儿的病情严重程度,指导临床用药,为临床治疗以及造血干细胞移植提供参考意见;另一方面,对疑诊的PID患儿进行免疫功能评估可以为诊断提供线索,并为下一步基因筛查及诊断治疗提供帮助。免疫功能的初步评估通常运用全血细胞计数,总的和特异的免疫球蛋白水平测定,联合分析补体系统,评估淋巴细胞不同亚群的数量。但是这些检测指标还不够,因为PID的临床表现不一定是由于细胞数量的减少导致,而是跟细胞功能的缺失有关。

[0003] 淋巴细胞增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段。因此,检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究和临床免疫功能检测的一种常用方法。目前,检测淋巴细胞增殖水平的方法主要包括形态学观察法、放射性核素($^3\text{H-TdR}$, $^{125}\text{I-UdR}$)掺入法、核苷类似物(BrDU)溴脱氧尿苷掺入法、细胞能量代谢测定(MTT比色法)和CFSE(羧基荧光素乙酰磺琥珀酰亚胺酯)染色流式测定法:

[0004] (一)形态学观察法

[0005] 形态学观察法是依据淋巴母细胞转化的形态学特征,借助光学显微镜进行检测。但其存在多种不足,主要体现在:用形态观察的方法判断淋巴细胞增殖情况,准确性较差;该法只能分析总的淋巴细胞的增殖情况,无法判断淋巴细胞亚群的增殖情况;需要分离外周血单个核细胞(PBMC),血标本量要求较大(通常 $>4\text{mL}$),在小年龄患者中收集标本更困难;该法只能计算淋巴细胞增殖比例,不能得到细胞增殖的绝对值。

[0006] (二)放射性核素($^3\text{H-TdR}$, $^{125}\text{I-UdR}$)掺入法

[0007] 放射性核素($^3\text{H-TdR}$, $^{125}\text{I-UdR}$)掺入法是指增殖的细胞其新合成DNA需摄取核苷酸原料,故可用核素标记的核苷酸参与反应,通过测定放射性强度以反映淋巴细胞增殖水平。其不足之处包括:标记为放射性核素,存在放射性污染危险;该法只能分析总的淋巴细胞的增殖情况,无法判断淋巴细胞亚群的增殖情况;需要分离PBMC,血标本量要求较大(通常 $>4\text{mL}$),在小年龄患者中收集标本更困难;该法只能计算淋巴细胞增殖比例,不能得到细胞增殖的绝对值。

[0008] (三)核苷类似物(BrDU)溴脱氧尿苷掺入法

[0009] 核苷类似物(BrDU)溴脱氧尿苷掺入法的原理同放射性核素掺入法的原理近似,其不足之处包括:该法敏感度不高;该法只能分析总的淋巴细胞的增殖情况,无法判断淋巴细胞亚群的增殖情况;需要分离PBMC,血标本量要求较大(通常 $>4\text{mL}$),在小年龄患者中

收集标本更困难；该法只能计算淋巴细胞增殖比例，不能得到细胞增殖的绝对值。

[0010] (四) 细胞能量代谢测定 (MTT 比色法)

[0011] 细胞能量代谢测定 (MTT 比色法) 是指活细胞内有活性的线粒体作用于噻唑蓝 (MTT)，可生产蓝黑色甲替产物，其生成量与细胞代谢活跃程度呈正相关，由此间接定量分析细胞增殖水平。其不足之处包括：该法为间接评估淋巴细胞增殖状况的方法，是通过计算活细胞的比率，而非直接检测分裂的细胞数；该法只能分析总的淋巴细胞的增殖情况，无法判断淋巴细胞亚群的增殖情况；需要分离 PBMC，血标本量要求较大（通常 >4mL），在小年龄患者中收集标本更困难；该法只能计算淋巴细胞增殖比例，不能得到细胞增殖的绝对值。

[0012] (五) CFSE (羧基荧光素乙酸琥珀酰亚胺酯) 染色流式测定法

[0013] CFSE (羧基荧光素乙酸琥珀酰亚胺酯) 染色流式测定法是指用流式细胞术检测增殖后的 CFSE 标记的细胞，以及该群细胞的表面标志分子，从而分析目标细胞的增殖动力学。由于 CFSE 是非极性分子，可自由扩散进入细胞，在胞内酯酶水解后产生具有荧光特性的 CFSE，并与胞内蛋白的赖氨酸等胺基发生不可逆偶联，形成稳定的大分子荧光结合物。当细胞分裂时，荧光结合物平均分配到两个子细胞中，而荧光强度为亲代细胞的一半。在一个增殖细胞群体中，连续各代细胞的荧光强度表现为二倍递减的特征，所以 CFSE 标记的细胞在增殖后具有系列减半的荧光强度这一特点。其不足之处包括：需要分离 PBMC，血标本量要求较大（通常 >4mL），在小年龄患者中收集标本更困难；PBMC 的提取后，通常后续要多次洗涤，可能活化，损伤，或选择性地丢失细胞；该法只能计算淋巴细胞增殖比例，不能得到细胞增殖的绝对值；操作步骤繁复，误差较大，而且该方法是基于在刺激组和未刺激组的最初的 PBMC 数量（而不是淋巴细胞数量）是相同的，而且后续多次的洗涤吹打可能引入更多的误差；CFSE 染色要求均匀，CFSE 高浓度时有一定毒性。

[0014] 基于上述几种淋巴细胞增殖水平检测方法存在的不足，急需开发一种不需要分离 PBMC，血液标本量要求少，不仅能得到淋巴细胞增殖比例和绝对值，还可以得到分析总的淋巴细胞的增殖情况和淋巴细胞各亚群的增殖情况，操作简易、误差小的淋巴细胞增殖水平的检测方法具有重要的现实意义。

发明内容

[0015] 有鉴于此，本发明提供了一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒。该方法不仅可以检测淋巴细胞各亚群的增殖比例，还可以检测淋巴细胞各亚群增殖的绝对值，可准确反应淋巴细胞的增殖情况；使用全血进行增殖实验，不需要分离 PBMC，血标本量要求很小，最多只需要 300 μ L，是现有技术用血量的 5%；操作步骤简易，耗时短，误差较小。

[0016] 为了实现上述发明目的，本发明提供以下技术方案：

[0017] 本发明提供了一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法，包括如下步骤：

[0018] 将第一待测血液样本与淋巴细胞多克隆激活剂混合，经细胞培养，获得第一血液细胞；将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与第一血液细胞进行孵育，裂解红细胞，加入绝对计数用微球，采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量，根据淋巴细胞数量、绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得刺激组淋巴细胞的浓度；

[0019] 将第二待测血液样本进行细胞培养，获得第二血液细胞；将荧光标记的淋巴细胞

表面标记抗体与第二血液细胞进行孵育,裂解红细胞,加入绝对计数用微球,采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量,根据淋巴细胞数量、绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得未刺激组淋巴细胞的浓度;

[0020] 比较刺激组淋巴细胞的浓度与未刺激组淋巴细胞的浓度,获得淋巴细胞增殖情况;

[0021] 第一待测血液样本与所述第二待测血液样本的来源相同。

[0022] 淋巴细胞 (lymphocyte) 是白细胞的一种,由淋巴器官产生,机体免疫应答功能的重要细胞成分,是体内极为复杂的不均一细胞群体,包括许多形态上相似而功能不同的亚群,功能和表面标记各不相同,具有明显的异质性。根据淋巴细胞的发育部位、表面、抗原、受体及功能等不同,可将淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、NK 细胞等多种。T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞是其中最主要的两大群体。

[0023] T 淋巴细胞 (又名 T 细胞) 和 B 淋巴细胞 (又名 B 细胞) 都起源于造血干细胞。T 细胞随血循环到胸腺,在胸腺激素等的作用下成熟,然后再随血循环到周围淋巴器官,在各自既定的区域定居、繁殖。受抗原激活即分化增殖,产生效应细胞,行使其免疫功能。T 淋巴细胞的免疫功能主要是抗胞内感染、瘤细胞与异体细胞等。B 细胞则在骨髓或腔上囊发育成熟,可以释放淋巴因子促进 T 细胞的形成。B 淋巴细胞可以增殖分化为效应 B 淋巴细胞 (所谓的浆细胞) 和记忆 B 淋巴细胞,而效应 B 淋巴细胞可以释放抗体 (免疫球蛋白),作用于抗原,形成沉淀物,最终被吞噬细胞吞噬。淋巴细胞的增殖和分化是机体免疫应答过程的一个重要阶段。因此,检测淋巴细胞增殖水平是细胞免疫研究和临床免疫功能检测的一种常用方法。

[0024] 在淋巴细胞表面具有可供鉴别的特殊结构,这一特殊结构为表面标记。在淋巴细胞的不同分化阶段,其各种表面标记的表达也各不相同。淋巴细胞与其它细胞之间、与周围环境中的分子间的相互作用以及淋巴细胞识别抗原、活化、辅助、抑制、杀伤等生物学作用均与其表面标记有关。因此,淋巴细胞表面标记可用于淋巴细胞及其亚群的鉴别。淋巴细胞表面标记主要包括簇分化抗原 (CD)、组织相容性抗原 (MHC) 等。

[0025] CD 是淋巴细胞在分化成熟过程中,不同的发育阶段和不同亚类的淋巴细胞可表达不同的分化抗原,这是区分淋巴细胞的重要标记。淋巴细胞表面主要 CD 抗原及其分布见表 1。

[0026] 表 1 参与免疫应答的细胞表面主要 CD 抗原及其分布

[0027]

种类	CD 抗原	分布
T 细胞	CD2	全部 T 细胞和 NK 细胞
	CD3	成熟 T 细胞
	CD4	T _H /T _d 细胞、Mφ
	CD8	T _c /T _s 细胞、部分 NK 细胞
	CD25	活化 T 细胞
	CD28	活化 T 细胞
B 细胞	CD5	部分 B 细胞
	CD19	原始到成熟的 B 细胞
	CD21	补体受体
	CD22	成熟 B 细胞
	CD23	活化 B 细胞
白细胞	CD45	所有淋巴细胞、粒细胞
单核细胞	CD14	单核细胞
粒细胞	CD15	粒细胞
NK 细胞	CD16	NK 细胞
	CD56	NK 细胞

[0028] 由上表可知, CD4 和 CD8 是 T 淋巴细胞表面标记; CD19 是 B 细胞表面标记; CD3 为成熟 T 细胞标记; CD45 为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞共有标记; CD14、CD15 分别是单核细胞和粒细胞的标记; CD16 和 CD56 是 NK 细胞标记。

[0029] 在本发明中, 以淋巴细胞多克隆激活剂作为刺激源, 刺激淋巴细胞增殖。淋巴细胞表面标记 (CD4 和 CD8 为 T 淋巴细胞表面标记, CD19 是 B 细胞表面标记) 与相应的抗体结合, 并排除细胞表面标记的影响因子, 根据抗体上结合的荧光标记和绝对计数用微球, 采用流式细胞术检测增殖后的淋巴细胞的绝对浓度。同时设置不加入淋巴细胞多克隆激活剂的对照, 从而可以得到增殖的淋巴细胞的绝对浓度。

[0030] 排除细胞表面标记的影响因子具体为:

[0031] CD3 为成熟 T 细胞标记, CD3⁺ 的 T 细胞又分为 CD3⁺CD4⁺ 的 T 细胞及 CD3⁺CD8⁺ 的 T 细胞, 即为检测 T 淋巴细胞的标记。如果不先找出 CD3⁺ 的 T 细胞, 直接圈出 CD4⁺ 及 CD8⁺, 则有可能圈到 CD3⁻CD4⁺ 的 T 细胞或 CD3⁻CD8⁺ 的 T 细胞;

[0032] CD45 为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞共有标记, 一方面将血液中与其形态相近的细胞排除, 使结果更精确; 另一方面, 由于加入绝对计数用荧光微球, 不能对检测样本进行清洗及倾倒, 所以死亡细胞与活细胞不能明确分开, 加入 CD45 后可区分死亡细胞与活细胞;

[0033] CD14、CD15 分别是单核细胞和粒细胞的标记, 因为刺激后淋巴细胞转化为淋巴母

细胞,形态变大,会与单核细胞和粒细胞形态接近,在流式检测时需要进行标记区分,使结果更精确;

[0034] CD16 和 CD56 是 NK 细胞标记,对其标记以进行排除。

[0035] 在本发明提供的一些实施例中,淋巴细胞表面标记抗体为 T 淋巴细胞表面标记抗体和 / 或 B 淋巴细胞表面标记抗体。

[0036] 在本发明提供的一些实施例中, T 淋巴细胞表面标记抗体为 CD3 抗体、CD8 抗体、CD45 抗体、CD4 抗体、CD14 抗体或 CD15 抗体中的一种或两者以上的混合物。

[0037] 在本发明提供的一些实施例中, B 淋巴细胞表面标记抗体包括 CD3 抗体、CD45 抗体、CD19 抗体、CD14 抗体或 CD15 抗体中的一种或两者以上的混合物。

[0038] 在本发明提供的一些实施例中,为排除 NK 细胞的影响,抗体还包括 CD16 抗体和 / 或 CD56 抗体。

[0039] 作为优选,淋巴细胞多克隆激活剂为 PWM(美洲商陆)或 PHA(植物凝集素)。PWM 和 PHA 均为丝裂原,丝裂原又称有丝分裂原,因可致细胞发生有丝分裂而得名,由于其与淋巴细胞表面的相应受体结合,刺激静止淋巴细胞转化为淋巴母细胞和有丝分裂,激活某类淋巴细胞的全部克隆,因而被认为是一种非特异性的淋巴细胞多克隆激活剂。T、B 淋巴细胞表面表达多种丝裂原受体,均可对多种丝裂原刺激产生增殖反应,可被广泛应用于体外机体免疫功能的检测。PHA 主要对 T 淋巴细胞有刺激作用。PWM 对 T、B 淋巴细胞均有刺激作用。

[0040] 在本发明提供的一些实施例中,淋巴细胞多克隆激活剂的加入量为 5 ~ 15 μ g/mL。

[0041] 作为优选,淋巴细胞多克隆激活剂的加入量为 10 μ g/mL。

[0042] 在本发明提供的一些实施例中,刺激组淋巴细胞的浓度的计算公式如式 I 所示:

$$[0043] \quad \text{淋巴细胞的浓度} = \frac{\text{淋巴细胞数量}}{\text{微球数量}} \times \text{微球浓度} \quad \text{式 I}$$

[0044] 在本发明提供的一些实施例中,待测血液样本的用量不大于 300 μ L。

[0045] 作为优选,细胞培养具体为在 35 $^{\circ}$ C ~ 40 $^{\circ}$ C、4 ~ 6% CO₂ 的条件下培养 5 ~ 10 天。

[0046] 优选地,细胞培养具体为在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的条件下培养 7 天。

[0047] 在本发明提供的一些实施例中,裂解所用的试剂为溶血素。

[0048] 在本发明提供的一些实施例中,待测血液样本采用抗凝剂经过抗凝处理。

[0049] 在本发明提供的一些实施例中,抗凝剂为肝素。

[0050] 作为优选,孵育具体为:在 20 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 10 ~ 30min。

[0051] 优选地,孵育具体为:在 20 $^{\circ}$ C ~ 30 $^{\circ}$ C 避光条件下孵育 20min。

[0052] 在本发明提供的一些实施例中,荧光标记为 FITC、PE、PerCP、APC 或 PE-CY7。

[0053] 本发明还提供了一种检测淋巴细胞增殖情况的试剂盒,包括淋巴细胞多克隆激活剂、荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体,溶血素、绝对计数用微球和抗凝剂。

[0054] 在本发明提供的一些实施例中,淋巴细胞多克隆激活剂为 PWM 或 PHA。

[0055] 在本发明提供的一些实施例中,淋巴细胞表面标记抗体为 T 淋巴细胞表面标记抗体和 / 或 B 淋巴细胞表面标记抗体。

[0056] 在本发明提供的一些实施例中，T 淋巴细胞表面标记抗体为 CD3 抗体、CD8 抗体、CD45 抗体、CD4 抗体、CD14 抗体或 CD15 抗体中的一种或两者以上的混合物。

[0057] 在本发明提供的一些实施例中，B 淋巴细胞表面标记抗体包括 CD3 抗体、CD45 抗体、CD19 抗体、CD14 抗体或 CD15 抗体中的一种或两者以上的混合物。

[0058] 在本发明提供的一些实施例中，为排除 NK 细胞的影响，抗体还包括 CD16 抗体和 / 或 CD56 抗体。

[0059] 在本发明提供的一些实施例中，荧光标记为 FITC(异硫氰酸荧光素)、PE(藻红蛋白)、PerCP(多甲藻叶绿素蛋白)、APC(交联藻红蛋白) 或 PE-CY7(三氢 - 吡啶菁型染料)。

[0060] 在本发明提供的一些实施例中，抗凝剂为肝素。

[0061] 本发明提供了一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒。该方法包括：将第一待测血液样本与淋巴细胞多克隆激活剂混合，经细胞培养，获得第一血液细胞；将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与第一血液细胞进行孵育，裂解红细胞，加入绝对计数用微球，采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量，根据淋巴细胞数量、绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得刺激组淋巴细胞的浓度；将第二待测血液样本进行细胞培养，获得第二血液细胞；将荧光标记的淋巴细胞表面标记抗体与第二血液细胞进行孵育，裂解红细胞，加入绝对计数用微球，采用流式细胞术检测淋巴细胞数量和绝对计数用微球数量，根据淋巴细胞数量、绝对计数用微球数量和绝对计数用微球浓度获得未刺激组淋巴细胞的浓度；比较刺激组淋巴细胞的浓度与未刺激组淋巴细胞的浓度，获得淋巴细胞增殖情况；第一待测血液样本与第二待测血液样本的来源相同。本发明至少具有如下优势之一：

[0062] 采用本发明提供的检测淋巴细胞增殖情况的方法不仅可以检测淋巴细胞各亚群的增殖比例，还可以检测淋巴细胞各亚群增殖的绝对值，该方法可准确反应淋巴细胞的增殖情况；

[0063] 本发明使用全血进行增殖实验，不需要分离 PBMC，血标本量要求很小，最多只需要 300 μ L，是现有技术用血量的 5%；

[0064] 本发明操作步骤简易，耗时短，误差较小。

附图说明

[0065] 图 1 示未刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD4⁺ 标记流式图；

[0066] 图 2 示未刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD8⁺ 标记流式图；

[0067] 图 3 示未刺激组 1 号管微球流式图；Beads 表示微球；

[0068] 图 4 示未刺激组 2 号管 B 淋巴细胞的 CD19⁺ 标记流式图；

[0069] 图 5 示未刺激组 2 号管微球流式图；Beads 表示微球；

[0070] 图 6 示 PWM 刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD4⁺ 标记流式图；

[0071] 图 7 示 PWM 刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD8⁺ 标记流式图；

[0072] 图 8 示 PWM 刺激组 1 号管微球流式图；Beads 表示微球；

[0073] 图 9 示 PWM 刺激组 2 号管 B 淋巴细胞的 CD19⁺ 标记流式图；

[0074] 图 10 示 PWM 刺激组 2 号管微球流式图；Beads 表示微球；

[0075] 图 11 示 PHA 刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD4⁺ 标记流式图；

- [0076] 图 12 示 PHA 刺激组 1 号管 T 淋巴细胞的 CD8⁺ 标记流式图；
- [0077] 图 13 示 PHA 刺激组 1 号管微球流式图；Beads 表示微球；
- [0078] 图 14 示未刺激组的 CD3⁺CD4⁺ 标记流式图；
- [0079] 图 15 示 PWM 刺激组的 CD3⁺CD4⁺ 标记流式图；
- [0080] 图 16 示 PHA 刺激组的 CD3⁺CD4⁺ 标记流式图；
- [0081] 图 17 示未刺激组的 CD3⁺CD8⁺ 标记流式图；
- [0082] 图 18 示 PWM 刺激组的 CD3⁺CD8⁺ 标记流式图；
- [0083] 图 19 示 PHA 刺激组的 CD3⁺CD8⁺ 标记流式图；
- [0084] 图 20 示未刺激组的 CD19⁺ 标记流式图；
- [0085] 图 21 示 PWM 刺激组的 CD19⁺ 标记流式图。

具体实施方式

[0086] 本发明公开了一种非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒，本领域技术人员可以借鉴本文内容，适当改进工艺参数实现。特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明。本发明的方法及应用已经通过较佳实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文所述的方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0087] 本发明提供的非诊断目的检测淋巴细胞增殖情况的方法及其试剂盒中所用试剂或仪器均可由市场购得。其中，聚丙烯流式管购自 BD 公司，货号为 352063；FBS（胎牛血清）购自 GIBCO 公司，货号为 10099-141；RPMI 1640 购自 GIBCO 公司，货号为 C22400500BT；PWM【美洲商陆凝集素 Lectin from *Phytolacca Americana* (pokeweed)】购自 sigma，L8777；PHA【外源凝集素，Lectin from *Phaseolus vulgaris* (red kidney bean)】购自 sigma，L4144；抗体均购自 BD 公司，抗体 CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC 合剂的货号为 340503，抗人 CD14PE-CY7 的货号为 557742，抗人 CD15PE-CY7 的货号为 560827，CD3FITC/CD16PE+CD56PE/CD45PerCP/CD19APC 合剂的货号为 340503；溶血素购自 BD 公司，货号为 349202；绝对计数用微球购自 Beckman，货号为 7547053。

[0088] 下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0089] 实施例 1 检测淋巴细胞增殖情况实例

[0090] 试验样品：来自重庆涪陵某小学的健康学生。学生及家长已知晓其内容，并签署了知情同意书。

[0091] 试验分组：试验分为未刺激组、PWM 刺激组（PWM 作为淋巴细胞多克隆激活剂）和 PHA 刺激组（PHA 作为淋巴细胞多克隆激活剂）。

[0092] 试验方法：取聚丙烯流式管，每管加入肝素抗凝全血 50 μ L，用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基按 1:10 稀释至 500 μ L/管。该混合液按上述分组方法分为三组。未刺激组包括 2 管，1 号管用来检测 T 淋巴细胞，2 号管用来检测 B 淋巴细胞；PWM 刺激组也包括 2 管，1 号管用来检测 T 淋巴细胞，2 号管用来检测 B 淋巴细胞；PHA 刺激组为 1 管，编为 1 号管，用来检测 T 淋巴细胞。在 PWM 刺激组中加入 10ug/ml 的 PWM，在 PHA 刺激组中加入 10ug/ml 的 PHA。将上述各组的聚丙烯流式管放在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱里培养 7 天。

[0093] 在第 7 天时，将各组聚丙烯流式管于 3500rpm、3 分钟离心后，吸取 300 μ L ~

400 μ L 的上清液冻存于 -80°C ，供后续细胞因子 / 趋化因子测定。同时对下层细胞进行染色，具体操作如下：

[0094] (1) 未刺激组染色方案

[0095] 未刺激组 1 号管中加入抗体 CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC 合剂、抗人 CD14PE-CY7 和抗人 CD15PE-CY7；

[0096] 未刺激组 2 号管中加入 CD3FITC/CD16PE+CD56PE/CD45PerCP/CD19APC 合剂、抗人 CD14PE-CY7 和抗人 CD15PE-CY7 (BD560827)。

[0097] (2) PWM 刺激组染色方案

[0098] PWM 刺激组 1 号管中加入抗体 CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC 合剂、抗人 CD14PE-CY7 和抗人 CD15PE-CY7；

[0099] PWM 刺激组 2 号管中加入 CD3FITC/CD16PE+CD56PE/CD45PerCP/CD19APC 合剂、抗人 CD14PE-CY7 和抗人 CD15PE-CY7。

[0100] (3) PHA 刺激组染色方案

[0101] PHA 刺激组 1 号管中加入抗体 CD3FITC/CD8PE/CD45PerCP/CD4APC 合剂、抗人 CD14PE-CY7 和抗人 CD15PE-CY7。

[0102] 加入抗体后在 $20^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 避光条件下孵育 20 分钟。抗体孵育结束后，每管加入 $1 \times$ 溶血素 $450 \mu\text{L}$ ，裂解红细胞。在每管加入浓度为 1054 个 / μL 的绝对计数用微球 $50 \mu\text{L}$ ，充分混匀。用流式细胞计数器检测细胞数。结果见表 1，流式图见图 1 ~ 13。

[0103] 根据式 I 所示的公式计算目标细胞的数量，结果见表 2。

$$[0104] \quad \text{淋巴细胞的浓度} = \frac{\text{淋巴细胞数量}}{\text{微球数量}} \times \text{微球浓度式 I}$$

[0105] 根据式 II 所示的公式计算目标细胞的数量，结果见表 3。

[0106] 增殖绝对浓度 = 刺激组淋巴细胞浓度 - 未刺激组淋巴细胞浓度式 II

[0107] 表 1 淋巴细胞及微球数量

[0108]

项目	1号管淋巴细胞及微球数量 (个)			2号管淋巴细胞及微球数量 (个)	
	CD4 ⁺ 标记	CD8 ⁺ 标记	1号管微球	CD19 ⁺ 标记	2号管微球
未刺激组	1589	1294	2255	907	6193
PWM刺激组	3043	1927	2434	5210	4905
PHA刺激组	5050	6130	2336	—	—

[0109] 表 2 淋巴细胞的浓度

[0110]

项目	CD4 ⁺ 标记	CD8 ⁺ 标记	CD19 ⁺ 标记
未刺激组淋巴细胞浓度 (个/ μ L)	743	605	154
PWM 刺激组淋巴细胞浓度 (个/ μ L)	1318	834	1120
PHA 刺激组淋巴细胞浓度 (个/ μ L)	2279	2766	—

[0111] 表 3 淋巴细胞增殖绝对浓度

[0112]

项目	CD4 ⁺ 标记	CD8 ⁺ 标记	CD19 ⁺ 标记
PWM 刺激组 (个/ μ L)	575	229	966
PHA 刺激组 (个/ μ L)	1536	2161	—

[0113] 由表 3 的实验结果可知,刺激组淋巴细胞增殖绝对浓度有明显升高,证明淋巴细胞存在增殖现象。可见,采用本发明提供的检测淋巴细胞增殖情况的方法不仅可以检测淋巴细胞各亚群的增殖比例,还可以检测淋巴细胞各亚群增殖的绝对值,表明该方法可准确反应淋巴细胞的增殖情况。

[0114] 对比例 1 检测淋巴细胞增殖情况实例

[0115] 采用 CFSE 染色流式测定法对实施例 1 中血液样本进行检测,检测结果见图 14 ~ 21。

[0116] 从图中可看出,未刺激组各群细胞均无增殖峰,PWM 刺激组及 PHA 刺激组各群细胞均有增殖峰,但 CFSE 方法只能以此判断增殖情况,不能进行绝对计数。

[0117] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

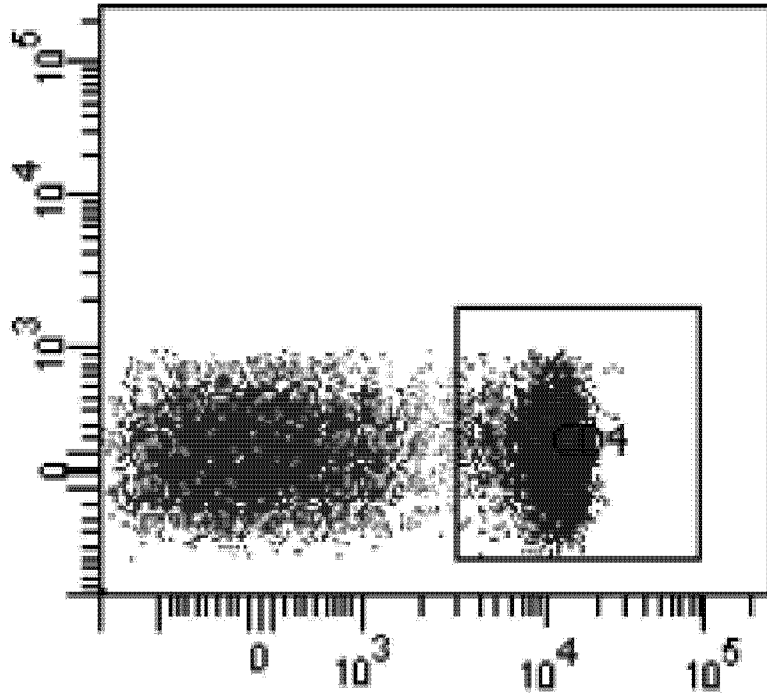


图 1

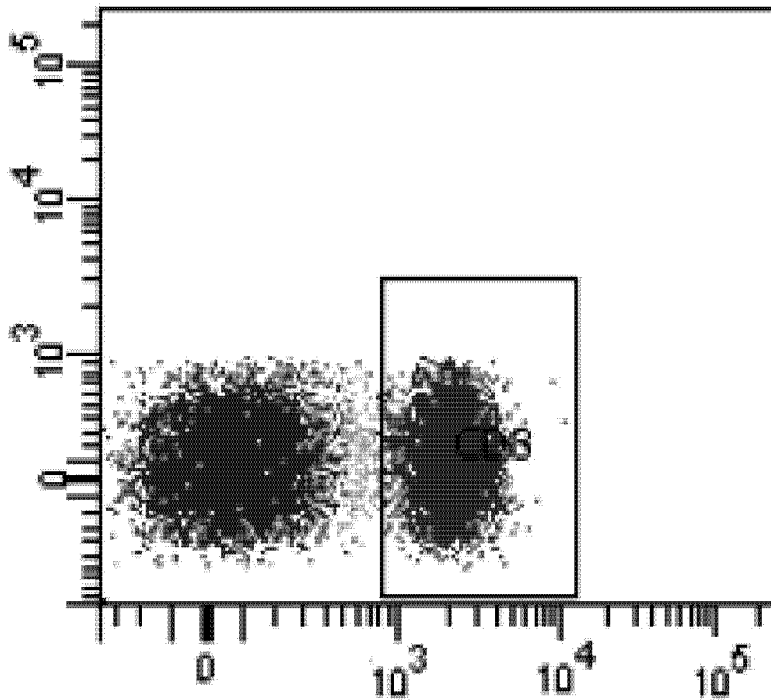


图 2

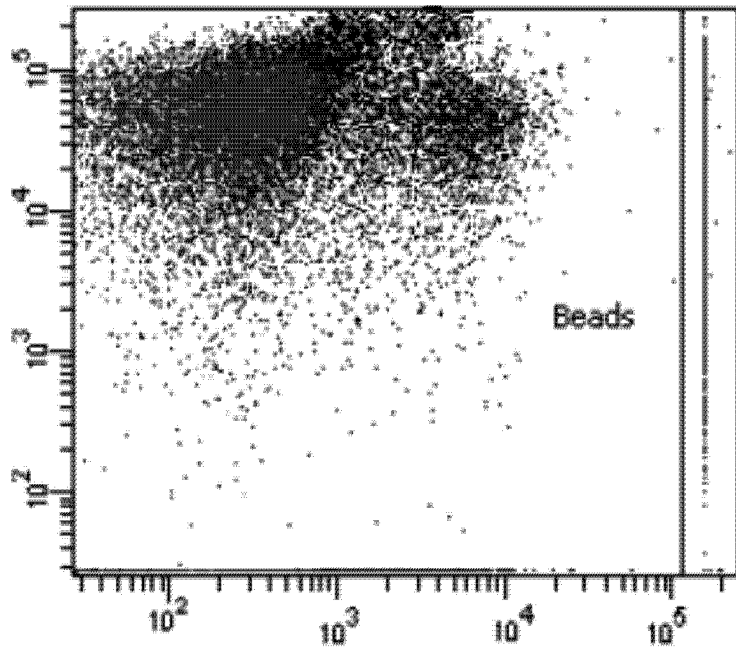


图 3

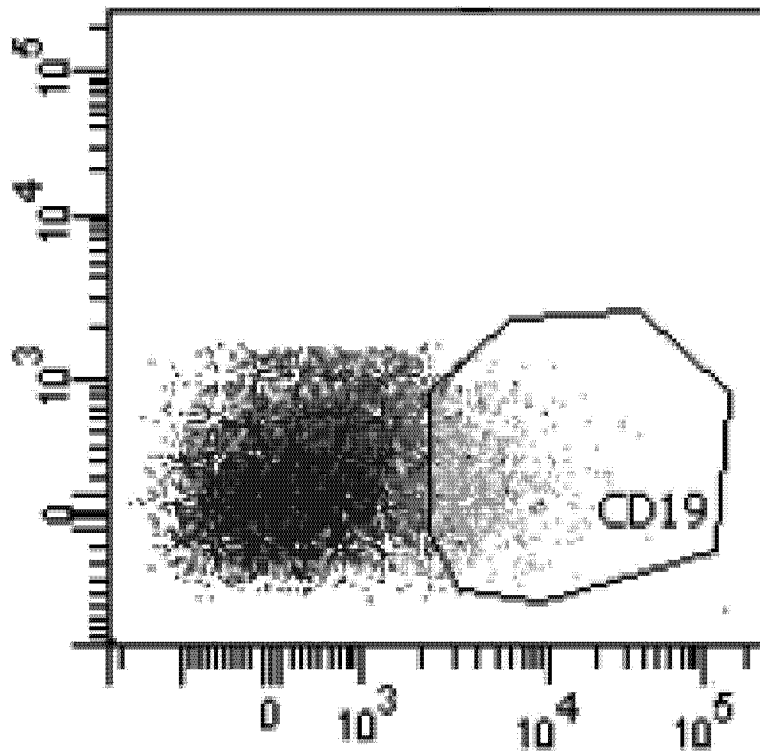


图 4

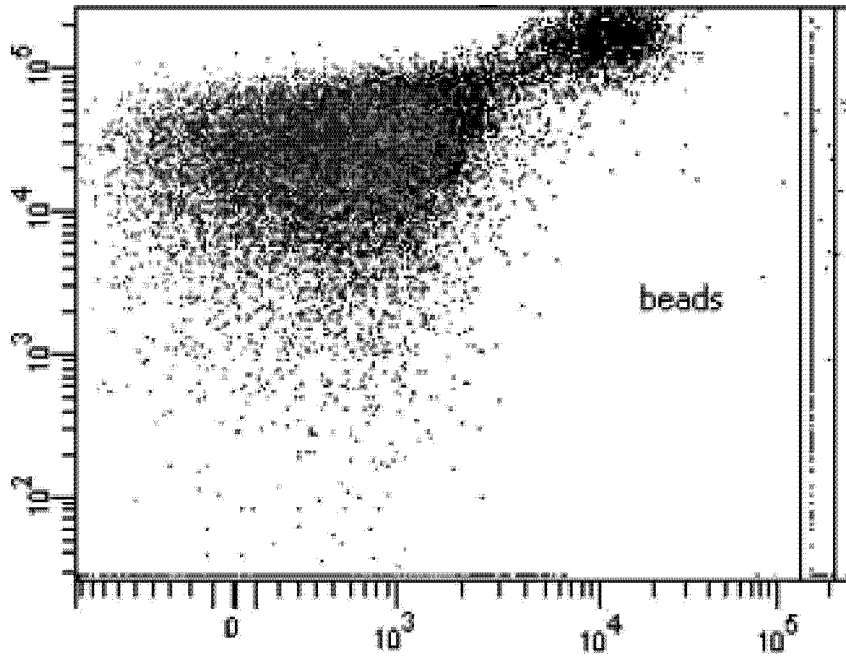


图 5

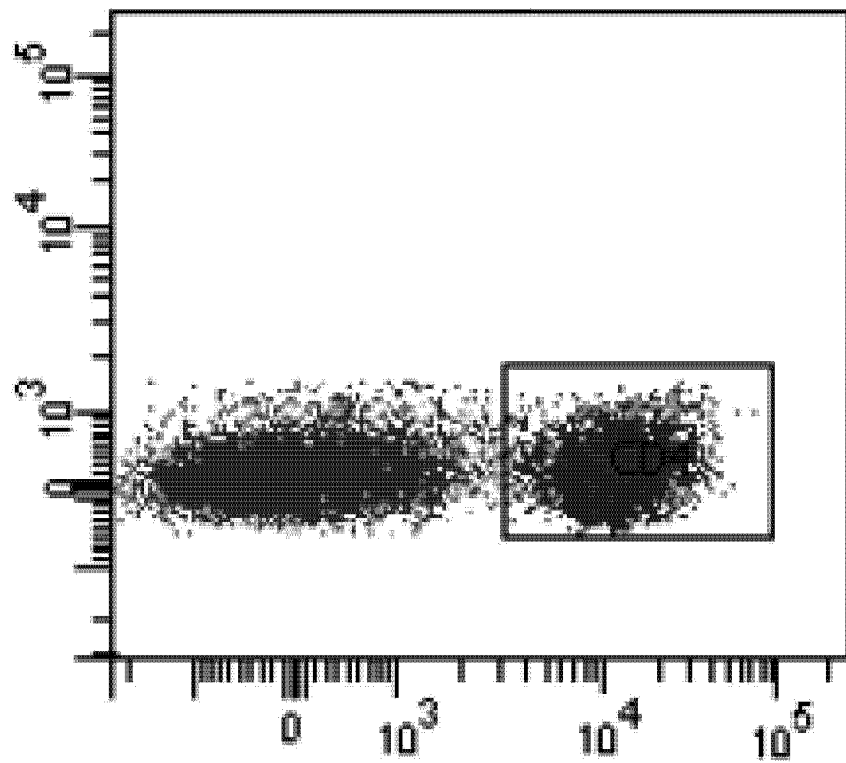


图 6

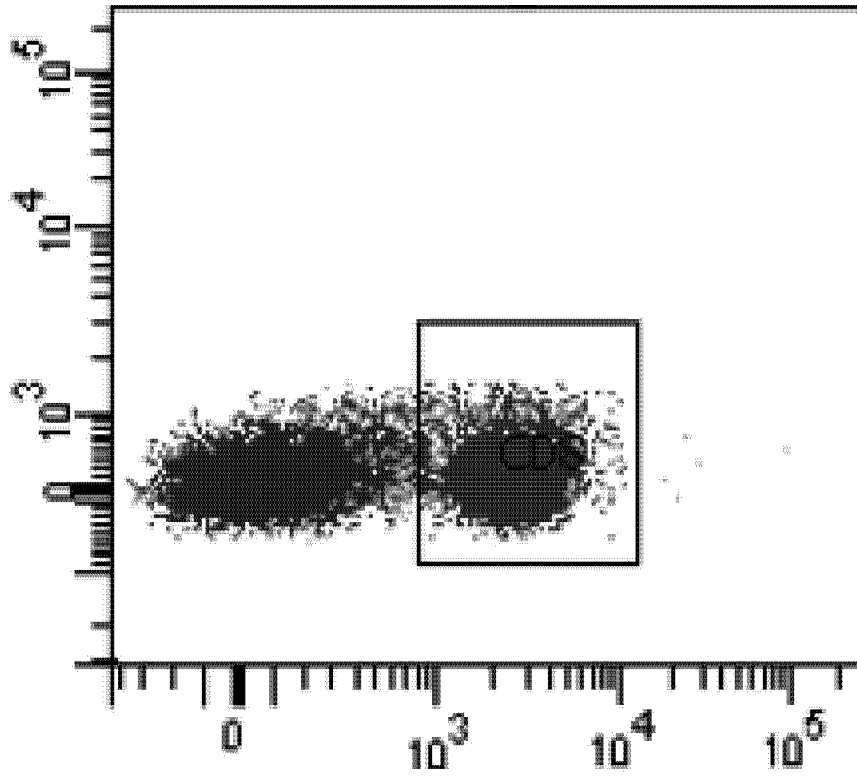


图 7

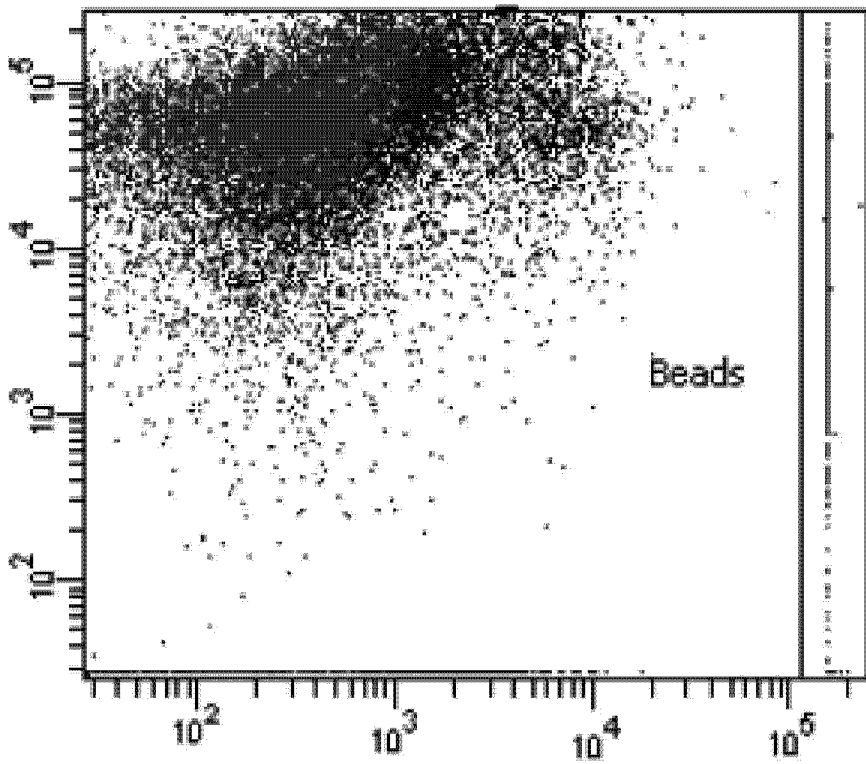


图 8

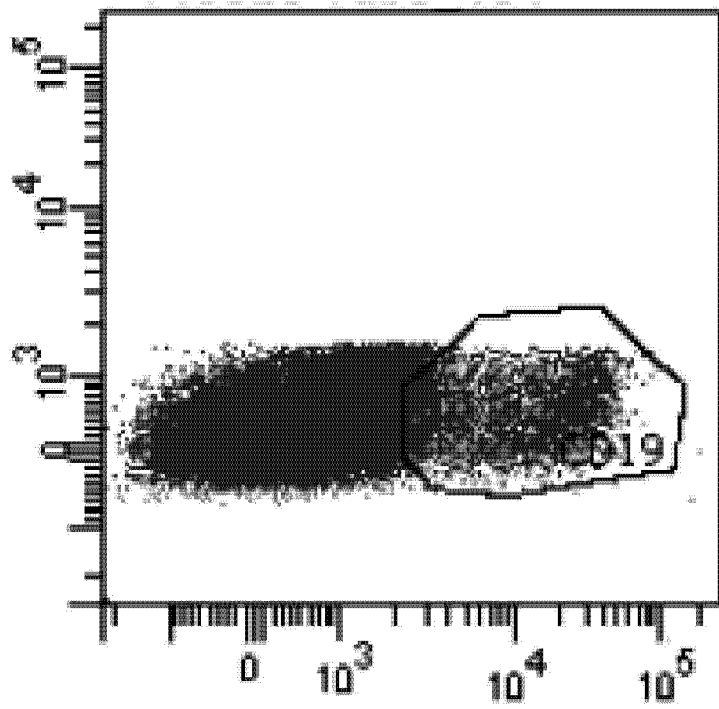


图 9

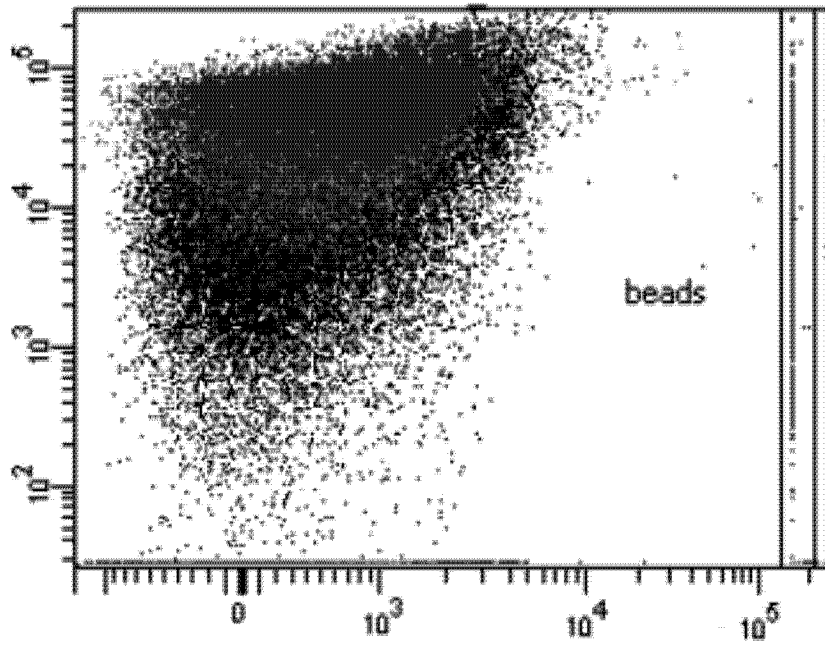


图 10

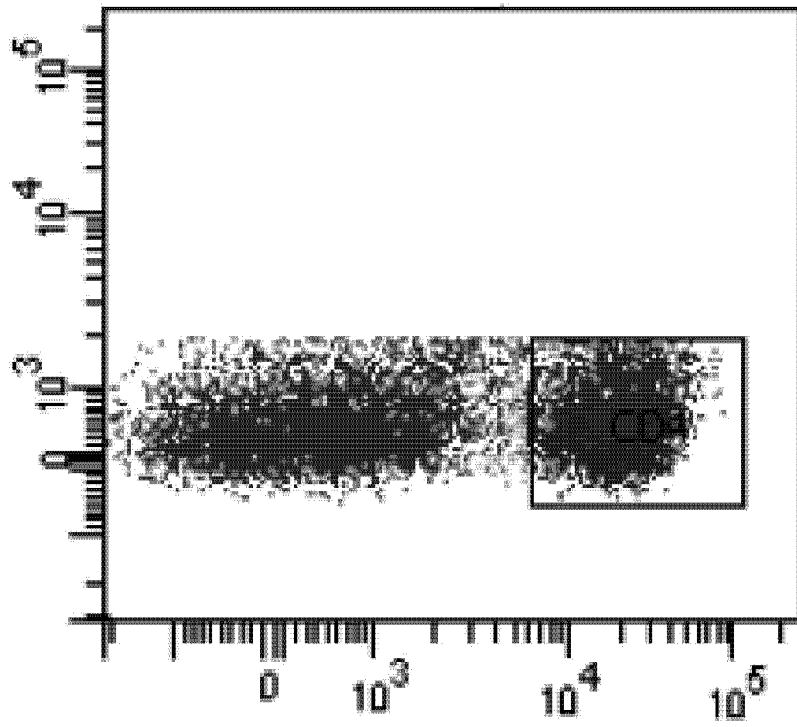


图 11

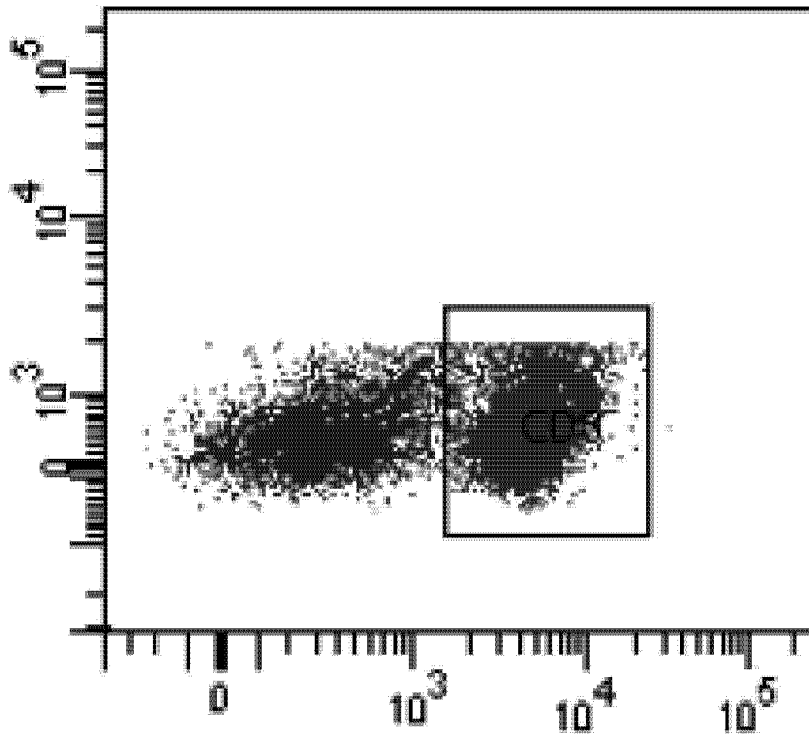


图 12

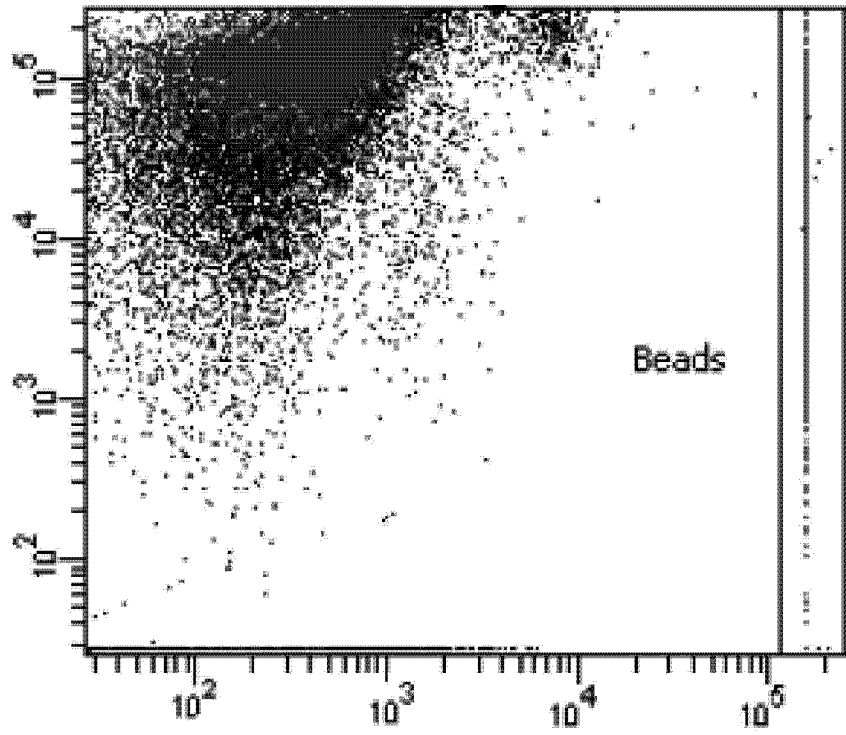


图 13

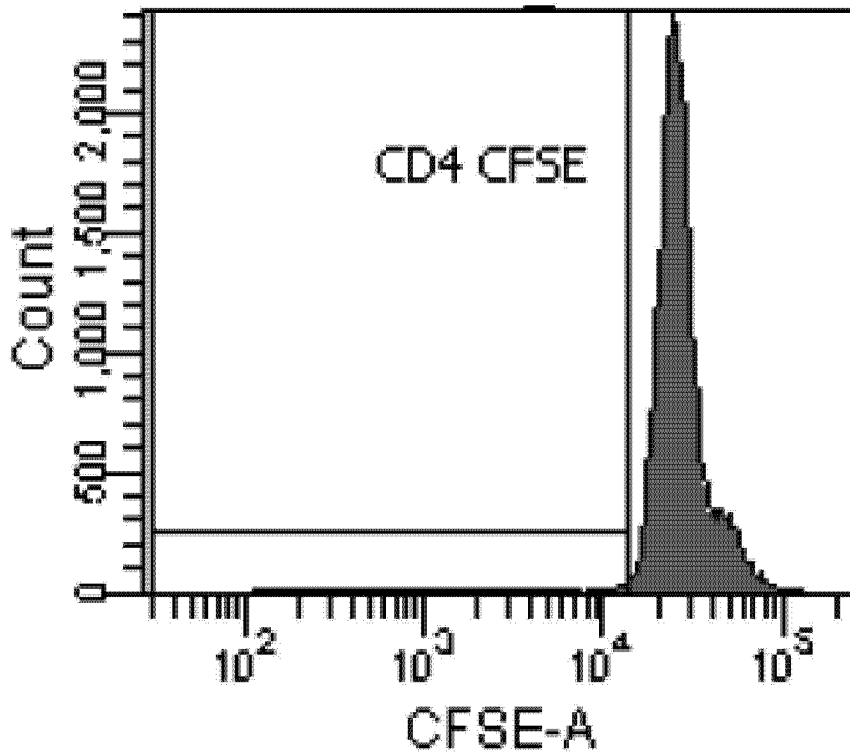


图 14

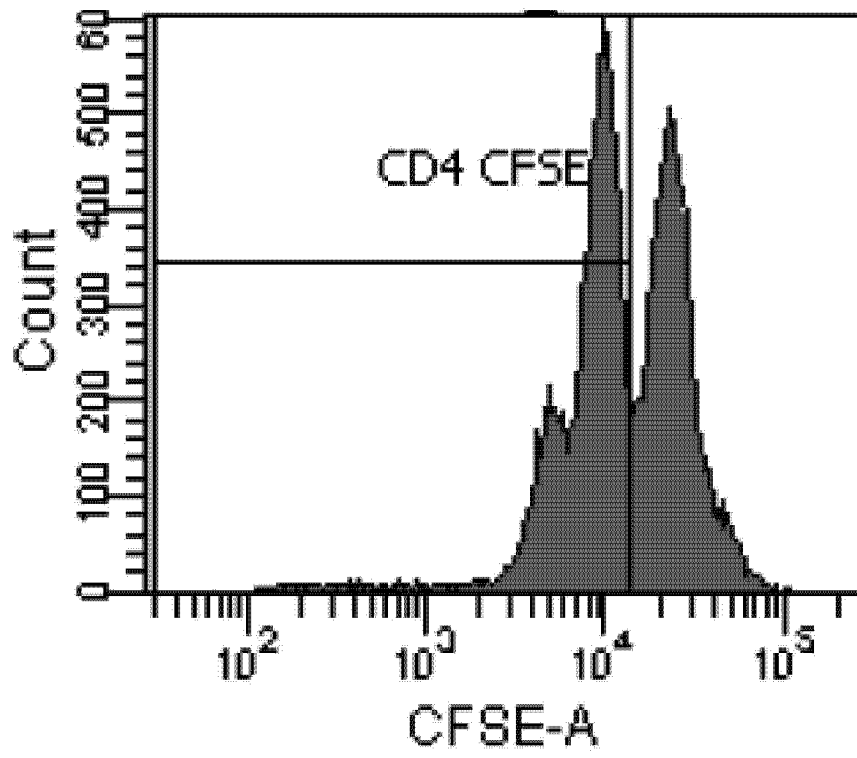


图 15

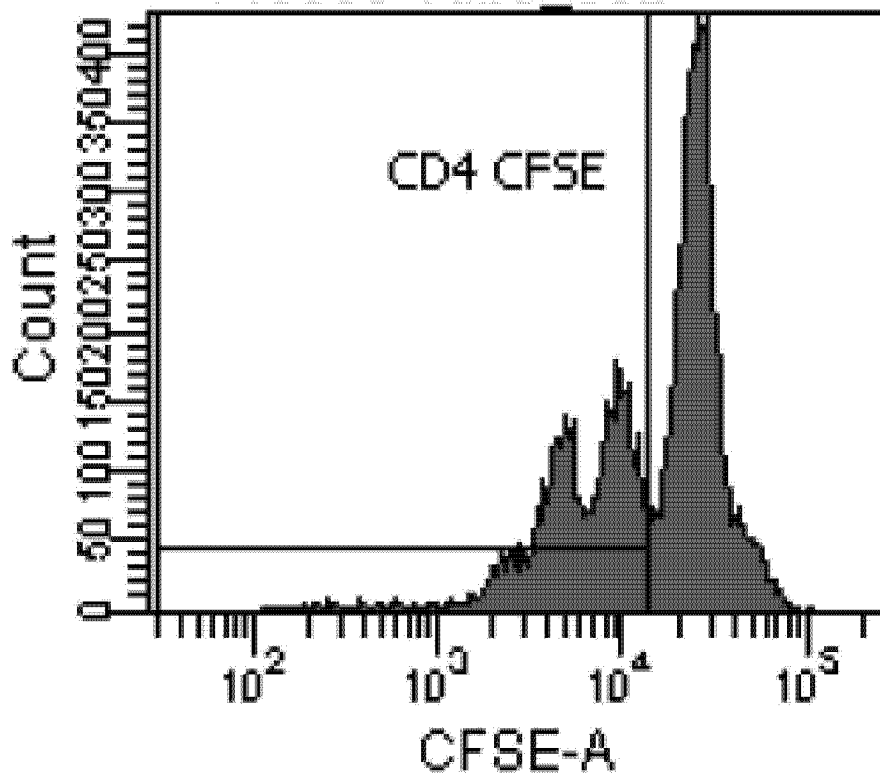


图 16

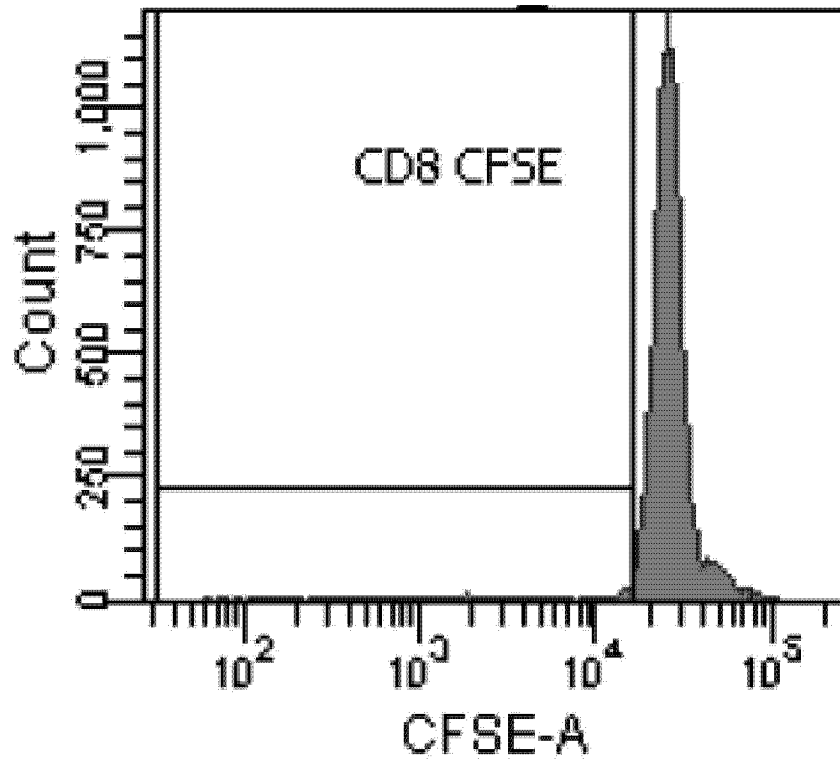


图 17

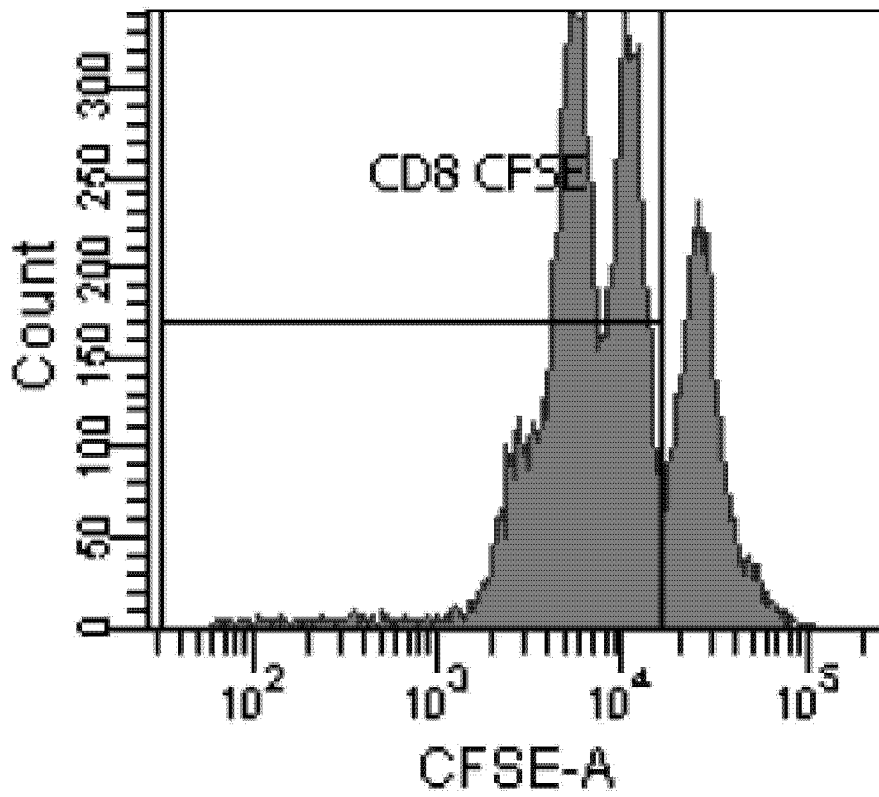


图 18

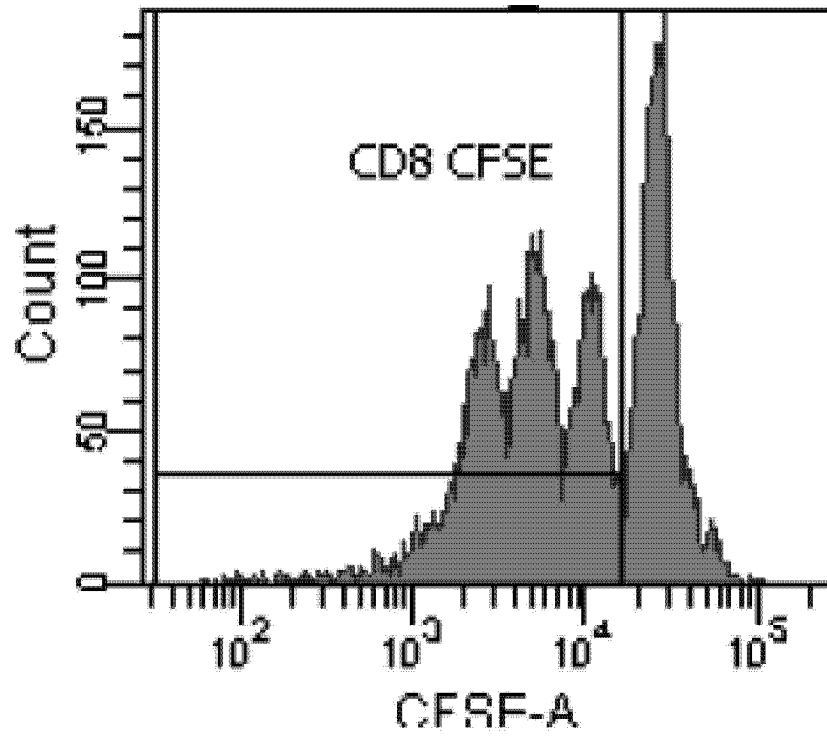


图 19

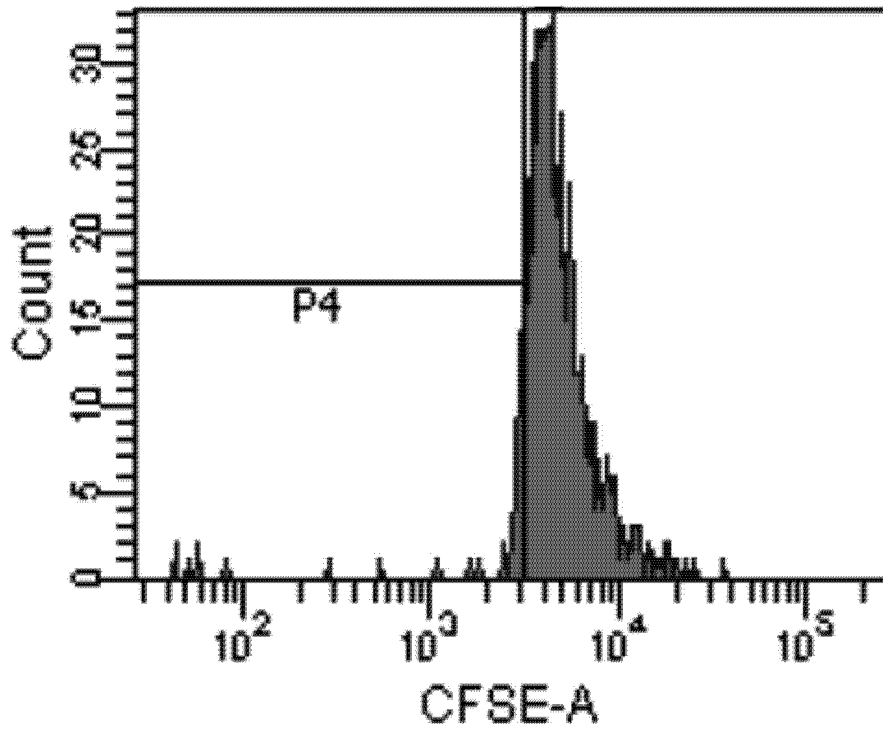


图 20

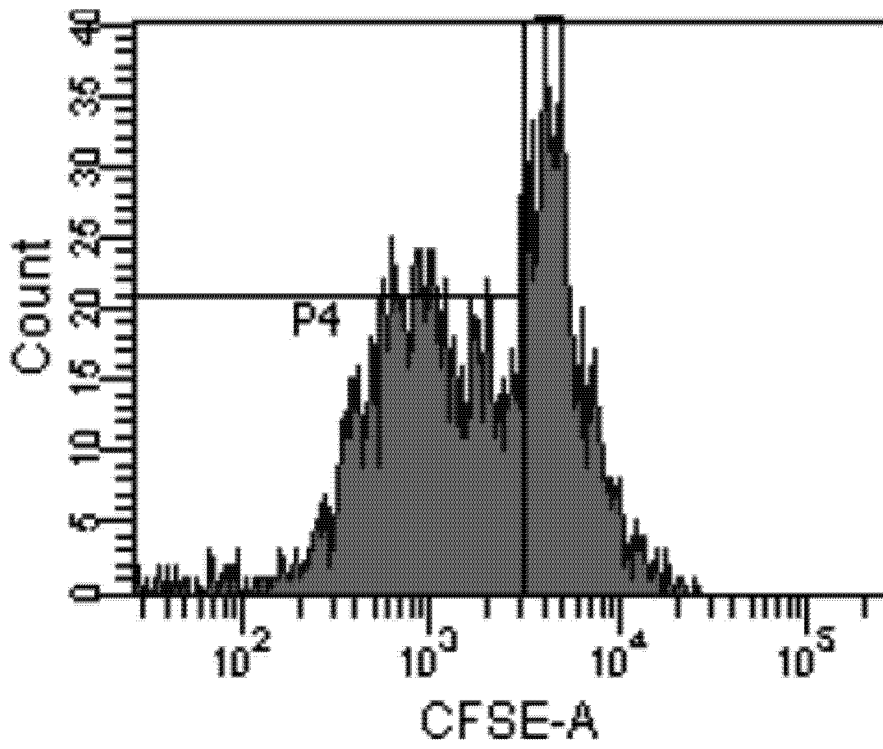


图 21