



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108375675 A

(43)申请公布日 2018.08.07

(21)申请号 201810081788.1

(22)申请日 2018.01.29

(71)申请人 李小峰

地址 030001 山西省太原市杏花岭区精营  
东二道街38号5号楼1单元2号

(72)发明人 罗静 李小峰 高崇 张升校  
赵向聪 张辰 吴琪 梁聪聪  
来娜琳

(74)专利代理机构 太原市科瑞达专利代理有限  
公司 14101

代理人 江淑兰

(51)Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

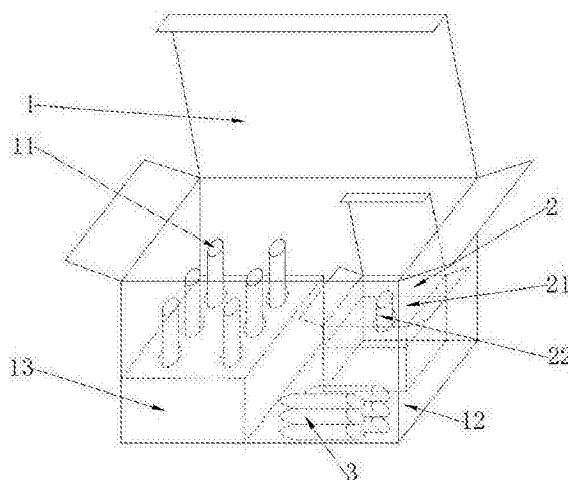
权利要求书4页 说明书11页 附图14页

## (54)发明名称

外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒  
及其检测方法

## (57)摘要

本发明涉及外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒及其检测的方法,属于细胞检测筛查技术领域,解决细胞检测误差大、步骤繁琐的技术问题,提供多种抗体及试剂,实现临床多个样本同时检验,实验步骤简便,质量控制较好,细胞检测精度高。解决方案为:包括抗体试剂盒和配套使用的刺激液试剂盒,抗体试剂盒中存放有六孔试剂槽,六孔试剂槽编号相对应地设置有分别代表六种抗体溶液的A号至F号试剂管,抗体试剂盒中还存放有备用试剂瓶,通过外周血淋巴细胞亚群细胞浓度的检测与CD4+T细胞亚群细胞浓度检测后,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以MultiSET软件或者CellQuest软件获取并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数。



1. 外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒, 它包括抗体试剂盒(1)和配套使用的刺激液试剂盒(2), 其特征在于: 抗体试剂盒(1)与刺激液试剂盒(2)均设置为带有封盖的盒体, 所述抗体试剂盒(1)内的一侧设置为抗体试剂区, 另一侧设置为备用试剂区(12), 所述抗体试剂区中设置有字母从A至F依次编号的六孔试剂槽(13), 与六孔试剂槽(13)编号相对应地设置有分别代表六种抗体溶液的A号至F号试剂管(11); 所述刺激液试剂盒(2)放置于备用试剂区(12)中并靠近抗体试剂盒(1)的后侧壁, 所述备用试剂区(12)中存放有分别添加溶血素、培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂的备用试剂瓶(3); 所述刺激液试剂盒(2)中设置有一个单孔试剂槽(21), 单孔试剂槽(21)中配套设置有存放刺激液的刺激液试剂瓶(22)。

2. 根据权利要求1所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒, 其特征在于: 所述抗体试剂盒(1)的保存温度为 $2^{\circ}\text{C}$ 至 $8^{\circ}\text{C}$ 。

3. 根据权利要求1所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒, 其特征在于: 所述刺激液试剂盒(2)的保存温度为 $-2^{\circ}\text{C}$ 。

4. 采用如权利要求1所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒检测的方法, 其特征在于包括以下步骤:

#### I、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度的检测

a、样本要求: 带有紫色头盖的规格为3ml的EDTA抗凝管作为实验样本;

b、试剂准备:

溶血素;

抗体A溶液: 0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD8/CD45/CD4抗体试剂1ml,

其中, 异硫氰酸荧光素标记的CD3抗体的质量-体积浓度为 $2.3\mu\text{g}/\text{mL}$ , 藻红蛋白标记的CD8抗体的质量-体积浓度为 $1.75\mu\text{g}/\text{mL}$ , 多甲藻素叶绿素蛋白标记的CD45抗体的质量-体积浓度为 $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ , 别藻蓝蛋白标记的CD4抗体的质量-体积浓度为 $0.92\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

抗体B溶液: 0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD16+CD56/CD45/CD19抗体试剂1ml,

其中, 异硫氰酸荧光素标记的CD3抗体的质量-体积浓度为 $2.3\mu\text{g}/\text{mL}$ , 藻红蛋白标记的CD16+CD56抗体的质量-体积浓度为 $2.75\mu\text{g}/\text{mL}$ , 多甲藻素叶绿素蛋白标记的CD45抗体的质量-体积浓度为 $7.5\mu\text{g}/\text{mL}$ , 别藻蓝蛋白标记的CD19抗体的质量-体积浓度为 $2.3\mu\text{g}/\text{mL}$ ;

c、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测

从抗体试剂区中取出A号试剂管和B号试剂管进行以下操作:

1)、向A号试剂管和B号试剂管中分别加入外周血血样 $50\mu\text{l}$ ;

2)、向A号试剂管中加入抗体A溶液 $5\mu\text{l}$ , 向B号试剂管中加入抗体B溶液 $5\mu\text{l}$ ;

3)、将A号试剂管和B号试剂管的头盖盖合后混匀震荡, 然后避光静置15分钟, 使抗体A和抗体B分别与A号试剂管和B号试剂管中的外周血血样充分发生特异性结合;

4)、向步骤3)中的A号试剂管和B号试剂管中分别加入 $450\mu\text{l}$ 步骤b中准备好的溶血素, 震荡后避光静置20分钟;

5) 将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图, 用MultiSET软件获取15000个细胞进行检测, 得出外周血淋巴细胞亚群细胞的相对计数及绝对计数;

#### II、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测

a、样本要求: 带有绿色头盖的规格为3ml的肝素抗凝管作为实验样本;

**b、试剂准备：**

抗体C溶液：异硫氰酸荧光素标记的CD4抗体含量为 $10\mu\text{l}$ /人份、藻红蛋白标记的白介素-17抗体含量为 $10\mu\text{l}$ /人份、别藻蓝蛋白标记的干扰素- $\gamma$ 抗体含量为 $2.5\mu\text{l}$  /人份；

抗体D溶液：异硫氰酸荧光素标记的CD4抗体含量为 $10\mu\text{l}$ /人份、藻红蛋白标记的白介素-4抗体含量为 $2.5\mu\text{l}$ /人份或者为 $5\mu\text{l}$ /人份；

抗体E溶液：异硫氰酸荧光素标记的CD4抗体含量为 $10\mu\text{l}$ /人份、别藻蓝蛋白标记的CD25抗体含量为 $2.5\mu\text{l}$ /人份；

抗体F溶液：藻红蛋白标记的叉状头转录因子3抗体含量为 $10\mu\text{l}$ /人份；

其中，异硫氰酸荧光素标记的CD4抗体的质量-体积浓度为 $3.0\mu\text{g}/\text{mL}$ ，别藻蓝蛋白标记的CD25抗体的质量-体积浓度为 $12\mu\text{g}/\text{mL}$ ，别藻蓝蛋白标记的干扰素- $\gamma$ 抗体的质量-体积浓度为 $12\mu\text{g}/\text{mL}$ ，藻红蛋白标记的白介素-4抗体的质量-体积浓度为 $12.5\mu\text{g}/\text{mL}$ ，藻红蛋白标记的白介素-17抗体的质量-体积浓度为100次/ $20\mu\text{l}$ ，藻红蛋白标记的叉状头转录因子3抗体的质量-体积浓度为100次/ $20\mu\text{l}$ ，

另需准备充足的培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂，留待后步使用；

**c、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测****1)、C号试剂管和D号试剂管****①、刺激**

从抗体试剂区中取出C号试剂管和D号试剂管，向C号试剂管和D号试剂管中分别加入外周血血样 $200\mu\text{l}$ 、 $200\mu\text{l}$ 培养液、 $1\mu\text{l}$ 刺激液，将混合液震荡后放入孵育箱5-6小时，留待后步使用；

**②、标记**

2.1、取出上步①中在孵育箱内放置的刺激好的样本充分震荡，将 $100\mu\text{l}$ 刺激好的样本分别加入C号试剂管和D号试剂管中；

2.2、向上步2.1步中的C号试剂管和D号试剂管中分别加入破膜剂 $1000\mu\text{l}$ ，C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟；

2.3、向上步2.2步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液 $2\text{ml}$ ，充分震荡后避光静置5分钟；

2.4、将上步2.3步中静置后的C号试剂管和D号试剂管置于离心机中，以 $1500\text{rad}/\text{min}$ 的转速离心5分钟；

2.5、将上步2.4步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液，并向C号试剂管内再次加入体积为 $22.5\mu\text{l}$ 的抗体C溶液，向D号试剂管内加再次加入体积为 $12.5\mu\text{l}$ 或者体积为 $15\mu\text{l}$ 的抗体D溶液，将C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟；

2.6、向上步2.5步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液 $2\text{ml}$ ，将混合液充分震荡后置于离心机中，以 $1500\text{rad}/\text{min}$ 的转速离心5分钟；

2.7、将上步2.6步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液，并向C号试剂管和D号试剂管中分别加入体积为 $150\mu\text{l}$ 的磷酸缓冲盐溶液充分震荡，制得标记好的标本C和标本D；

**③、过滤**

用300目尼龙过滤膜过滤上步②中标记好的标本C和标本D,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以CellQuest软件获并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数,计算各亚群的细胞绝对数计算公式为:

细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比×CD4+T细胞绝对数,其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l;

2)、E号试剂管

①、从抗体试剂区中取出E号试剂管,向E号试剂管中加入质量-体积浓度为3.0 $\mu$ g/mL的CD4细胞溶液的体积为10 $\mu$ l,加入质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL的CD25细胞溶液的体积为2.5 $\mu$ l,并加入体积为80 $\mu$ l的外周血血样,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

②、向上步①中静置后的E号试剂管中加入体积为1ml的破膜液,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

③、向上步②中静置后的E号试剂管中加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡后避光静置5分钟;

④、将上步③中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑤、向上步④中弃去上清液的E号试剂管中加入F号试剂管中抗体Foxp3溶液的体积为10 $\mu$ l,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

⑥、向上步⑤中静置后的E号试剂管中再次加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡;

⑦、将上步⑥中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑧、向上步⑦中弃去上清液的E号试剂管中加入体积为150 $\mu$ l的磷酸缓冲盐溶液,混合液充分震荡;

⑨、用300目尼龙过滤膜过滤上步⑧中制得的混合液,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以CellQuest软件获取并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数,计算各亚群的细胞绝对数计算公式为:

细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比×CD4+T细胞绝对数,其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l。

5. 根据权利要求4所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测的方法,其特征在于:所述步骤II-c-1)-①中,孵育箱的温度为37 $^{\circ}$ C,孵育箱中CO<sub>2</sub>气体的浓度为5%,孵育箱中的湿度为80-90%湿度。

6. 根据权利要求4所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测的方法,其特征在于:所述步骤II-c-1)-①中,孵育时间到后如不能及时标记,可以先将实验样本放入温度为4 $^{\circ}$ C的冰箱中冷藏。

7. 根据权利要求4所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测的方法,其特征在于:所述步骤I-c-2)中,在向A号试剂管和B号试剂管中加入抗体的过程中,枪尖倾斜,将抗体加在管底另一侧,不要触碰到血样。

8. 根据权利要求4所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测的方法,其特征在于:所述步骤I-c-5)、步骤II-c-1)-③和步骤II-c-2)-⑨中,如待测试样不能及时上机,先放入避光

冰箱冷藏保存。

9. 根据权利要求4所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测的方法,其特征在于:向实验样本中加入抗体或者刺激液时,要将抗体或者刺激液加入实验样本内部,保证抗体或者刺激液与实验样本充分接触。

## 外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于细胞检测筛查技术领域,特别涉及外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 淋巴细胞的数目和功能对维持自身免疫系统的稳态与平衡起着至关重要的作用。外周血淋巴细胞可分为T细胞、B细胞、自然杀伤细胞(NK细胞)等,其中,各细胞根据其所表达的抗原及其功能的差异,又可分为不同亚群。

[0003] T细胞受体-白细胞分化抗原3(TCR-CD3)复合物是T细胞特有的重要标志,故称T细胞为CD3+T淋巴细胞,它可反映机体细胞免疫功能。其增高常见于CD3+T淋巴细胞白血病、某些自身免疫性疾病(如系统性红斑狼疮)、重症肌无力、慢性活动性肝炎等;而降低可见于恶性肿瘤、白血病(如B系细胞白血病)、免疫缺陷病、应用免疫抑制剂等造成机体免疫功能处于相对较低的其他一些情况。T淋巴细胞大致可分为白细胞分化抗原4+(CD4+)和白细胞分化抗原8+(CD8+)两个大类。CD8+T减少见于 $\gamma$ 免疫球蛋白缺乏症、胸腺发育不良、严重联合免疫缺陷病、肿瘤放射治疗等;其升高多见于病毒感染,如乙肝病毒、巨细胞病毒、EB病毒等。CD4+T淋巴细胞亚群较为复杂,它包括辅助性效应T(包括Th1,Th2和Th17)和调节性T(Treg)淋巴细胞。辅助性效应T(Th)细胞与表达MHC-I类抗原的细胞结合,分泌白介素等细胞因子,以刺激B淋巴细胞及CD8+T细胞的增值分化,又可刺激B7因子等免疫启动因子的生成,使T细胞活力提高,免疫反应增强,阻止肿瘤细胞的生长与转移。反之调节性T(Treg)淋巴细胞,可通过抑制细胞接触和产生抑制因子、抑制效应T细胞的产生和活性,从而降低机体抗肿瘤的能力。更重要的是,Treg细胞在免疫耐受中起重要作用,研究发现,许多患类风湿关节炎、红斑狼疮等自身免疫疾病的病人,外周血Treg细胞绝对计数(浓度)明显降低。白细胞分化抗原19+B淋巴细胞(CD19+B淋巴细胞)主要反映了患者的体液免疫水平。其升高可见于多发性骨髓瘤、巨球蛋白血症、淋巴瘤等;降低常见于原发性免疫缺陷病,如性联无丙种球蛋白血症、恶性肿瘤等。CD16+56+NK细胞可不依赖抗体、补体及预先致敏即可快速杀死肿瘤细胞,并与单核细胞,粒细胞等协同作用,而起到抗肿瘤抗感染的免疫调节作用。其增高可见于某些病毒感染性疾病的早期、长期使用干扰素或干扰素的诱导物、骨髓移植术后,习惯性流产、白介素-2(IL-2)治疗后;降低常见于恶性肿瘤,特别是中晚期伴有转移的患者,免疫缺陷病及使用肾上腺激素等免疫抑制剂、部分病毒、细菌和真菌感染、某些白血病及白血病前期。

[0004] 我们的前期研究发现,虽然淋巴细胞各亚群细胞比例的异常可以提示很多疾病,但其绝对值计数的变化可能更能反映诸多自身免疫疾病的真正面貌,且与患者的治疗和预后息息相关。然而,因目前检测流逝细胞的方法需要进行多种标记,进行细胞标记的技术有一定难度,这些问题在破膜标记的细胞中更为突出,故绝大多数试验室仅测量目标细胞的百分比。虽然目前外周血淋巴细胞亚群浓度(绝对计数)可用多步骤流式细胞仪测试方法替代,但存在如下缺点和不足:1.过程复杂,要从多个公司购买试剂,质量控制很难;2.步骤

多,操作误差大,难以比较不同实验室的结果;3.耗时多,不能实现临床多个样本同时检测;4.精度不够,且结果稳定性差;5.仅测量目标细胞的百分比,无绝对值测量。

## 发明内容

[0005] 本发明的目的在于克服现有技术的缺陷,解决现有技术中细胞检测误差大、步骤繁琐的技术问题,提供一种外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒及其检测方法。

[0006] 本发明通过以下技术方案予以实现。

[0007] 外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒,它包括抗体试剂盒和配套使用的刺激液试剂盒,其中:抗体试剂盒与刺激液试剂盒均设置为带有封盖的箱体,所述抗体试剂盒内的一侧设置为抗体试剂区,另一侧设置为备用试剂区,所述抗体试剂区中设置有字母从A至F依次编号的六孔试剂槽,与六孔试剂槽编号相对应地设置有分别代表六种抗体溶液的A号至F号试剂管;所述刺激液试剂盒放置于备用试剂区中并靠近抗体试剂盒的后侧壁,所述备用试剂区中存放有分别添加溶血素、培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂的备用试剂瓶;所述刺激液试剂盒中设置有一个单孔试剂槽,单孔试剂槽中配套设置有存放刺激液的刺激液试剂瓶。

[0008] 进一步地,所述抗体试剂盒的保存温度为2℃至8℃。

[0009] 进一步地,所述刺激液试剂盒的保存温度为-2℃。

[0010] 采用所述的外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒检测的方法,包括以下步骤:

### I、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度的检测

a、样本要求:带有紫色头盖的规格为3ml的EDTA抗凝管作为实验样本;

b、试剂准备:

溶血素;

抗体A溶液:0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD8/CD45/CD4抗体试剂1ml,

其中,异硫氰酸荧光素(FITC)标记的CD3抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL,藻红蛋白(PE)标记的CD8抗体的质量-体积浓度为1.75μg/mL,多甲藻素叶绿素蛋白(PerCP)标记的CD45抗体的质量-体积浓度为7.5μg/mL,别藻蓝蛋白(APC)标记的CD4抗体的质量-体积浓度为0.92μg/mL;

抗体B溶液:0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD16+CD56/CD45/CD19抗体试剂1ml,

其中,FITC标记的CD3抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL,PE标记的CD16+CD56抗体的质量-体积浓度为2.75μg/mL,PerCP标记的CD45抗体的质量-体积浓度为7.5μg/mL,APC标记的CD19抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL;

c、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测

从抗体试剂区中取出A号试剂管和B号试剂管进行以下操作:

1)、向A号试剂管和B号试剂管中分别加入外周血血样50μl;

2)、向A号试剂管中加入抗体A溶液5μl,向B号试剂管中加入抗体B溶液5μl;

3)、将A号试剂管和B号试剂管的头盖盖合后混匀震荡,然后避光静置15分钟,使抗体A和抗体B分别与A号试剂管和B号试剂管中的外周血血样充分发生特异性结合;

4)、向步骤3)中的A号试剂管和B号试剂管中分别加入450μl步骤b中准备好的溶血素,

震荡后避光静置20分钟；

5) 将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,用MultiSET软件获取15000个细胞进行检测,得出外周血淋巴细胞亚群细胞的相对计数及绝对计数。

#### [0011] II、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测

a、样本要求:带有绿色头盖的规格为3ml的肝素抗凝管作为实验样本;

b、试剂准备:

抗体C溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、PE标记的白介素-17(IL-17)抗体含量为10 $\mu$ l/人份、APC标记的干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )抗体含量为2.5 $\mu$ l /人份;

抗体D溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、PE标记的白介素-4(IL-4)抗体含量为2.5 $\mu$ l/人份或着为5 $\mu$ l/人份;

抗体E溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、APC标记的CD25抗体含量为2.5 $\mu$ l/人份;

抗体F溶液:PE标记的叉状头转录因子3(Foxp3)抗体含量为10 $\mu$ l/人份;

其中,FITC标记的CD4抗体的质量-体积浓度为3.0 $\mu$ g/mL,APC标记的CD25抗体的质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL,APC标记的INF- $\gamma$ 抗体的质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL,PE标记的IL-4抗体的质量-体积浓度为12.5 $\mu$ g/mL,PE标记的IL-17抗体的质量-体积浓度为100次/20 $\mu$ l,PE标记的Foxp3抗体的质量-体积浓度为100次/20 $\mu$ l,

另需准备充足的培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂,留待后步使用;

c、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测

1)、C号试剂管和D号试剂管

①、刺激

从抗体试剂区中取出C号试剂管和D号试剂管,向C号试剂管和D号试剂管中分别加入外周血血样200 $\mu$ l、200 $\mu$ l培养液、1 $\mu$ l刺激液,将混合液震荡后放入孵育箱5-6小时,留待后步使用;

②、标记

2.1、取出上步①中在孵育箱内放置的刺激好的样本充分震荡,将100 $\mu$ l刺激好的样本分别加入C号试剂管和D号试剂管中;

2.2、向上步2.1步中的C号试剂管和D号试剂管中分别加入破膜剂1000 $\mu$ l,C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟;

2.3、向上步2.2步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液2ml,充分震荡后避光静置5分钟;

2.4、将上步2.3步中静置后的C号试剂管和D号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟;

2.5、将上步2.4步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液,并向C号试剂管内再次加入体积为22.5 $\mu$ l的抗体C溶液,向D号试剂管内加再次加入体积为12.5 $\mu$ l或者体积为15 $\mu$ l的抗体D溶液,将C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟;

2.6、向上步2.5步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液2ml,将混合液充分震荡后置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟;



2.7、将上步2.6步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液,并向C号试剂管和D号试剂管中分别加入体积为150 $\mu$ l的磷酸缓冲盐溶液充分震荡,制得标记好的标本C和标本D;

### ③、过滤

用300目尼龙过滤膜过滤上步②中标记好的标本C和标本D,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以CellQuest软件获取并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数,计算各亚群的细胞绝对数计算公式为:细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比 $\times$ CD4+T细胞绝对数,其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l;

### 2)、E号试剂管

①、从抗体试剂区中取出E号试剂管,向E号试剂管中加入质量-体积浓度为3.0 $\mu$ g/mL的CD4细胞溶液的体积为10 $\mu$ l,加入质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL的CD25细胞溶液的体积为2.5 $\mu$ l,并加入体积为80 $\mu$ l的外周血血样,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

②、向上步①中静置后的E号试剂管中加入体积为1ml的破膜液,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

③、向上步②中静置后的E号试剂管中加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡后避光静置5分钟;

④、将上步③中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑤、向上步④中弃去上清液的E号试剂管中加入F号试剂管中抗体F<sub>oxp3</sub>溶液的体积为10 $\mu$ l,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

⑥、向上步⑤中静置后的E号试剂管中再次加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡;

⑦、将上步⑥中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑧、向上步⑦中弃去上清液的E号试剂管中加入体积为150 $\mu$ l的磷酸缓冲盐溶液,混合液充分震荡;

⑨、用300目尼龙过滤膜过滤上步⑧中制得的混合液,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以CellQuest软件获取并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数,计算各亚群的细胞绝对数计算公式为:细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比 $\times$ CD4+T细胞绝对数,其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l。

[0012] 进一步地,所述步骤II-c-1)-①中,孵育箱的温度为37 $^{\circ}$ C,孵育箱中CO<sub>2</sub>气体的浓度为5%,孵育箱中的湿度为80-90%湿度。

[0013] 进一步地,所述步骤II-c-1)-①中,孵育时间到后如不能及时标记,可以先将实验样本放入温度为4 $^{\circ}$ C的冰箱中冷藏。

[0014] 进一步地,所述步骤I-c-2)中,在向A号试剂管和B号试剂管中加入抗体的过程中,枪尖倾斜,将抗体加在管底另一侧,不要触碰到血样。

[0015] 进一步地,所述步骤I-c-5)、步骤II-c-1)-③和步骤II-c-2)-⑨中,如待测试样不能及时上机,先放入避光冰箱冷藏保存。

[0016] 进一步地,向实验样本中加入抗体或者刺激液时,要将抗体或者刺激液加入实验

样本内部,保证抗体或者刺激液与实验样本充分接触。

[0017] 本发明与现有技术相比具有以下有益效果。

[0018] 本发明可提供多种抗体及试剂,无需多家公司购买,质量控制较好;简化实验步骤,减少试验误差;可实现临床多个样本同时检验,节约时间及成本;细胞检测精度高。

### 附图说明

[0019] 图1为外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒使用状态立体结构示意图。

[0020] 图2为试剂管对应插入六孔试剂槽状态时立体结构示意图。

[0021] 图3为刺激液试剂盒展开状态立体结构示意图。

[0022] 图4为A号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+的淋巴细胞示意图。

[0023] 图5为A号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+CD4+CD8-的淋巴细胞与CD45+CD8+CD4-的淋巴细胞示意图。

[0024] 图6为A号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+CD3+CD4+CD8-的Th淋巴细胞示意图。

[0025] 图7为A号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+CD3+CD8+CD4-的Ts淋巴细胞示意图。

[0026] 图8为B号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+的淋巴细胞示意图。

[0027] 图9为B号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD45+CD19+的淋巴细胞与CD45+CD16+CD56+淋巴细胞示意图。

[0028] 图10为B号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD3-CD45+CD19+的总B淋巴细胞示意图。

[0029] 图11为B号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD3-CD45+CD16+CD56+的NK细胞示意图。

[0030] 图12为C号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD4+的淋巴细胞示意图。

[0031] 图13为C号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中Th17(IL-17)淋巴细胞示意图。

[0032] 图14为C号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中Th1(IFN- $\gamma$ )淋巴细胞示意图。

[0033] 图15为D号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中CD4+的淋巴细胞示意图。

[0034] 图16为D号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中Th2(IL-4)淋巴细胞示意图。

[0035] 图17为E号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图。

[0036] 图18为E号试剂管在流式细胞仪上分析获得的流式细胞图中Treg(CD25+Foxp3)淋巴细胞示意图。

[0037] 图中,1为抗体试剂盒,11为试剂管,12为备用试剂区,13为六孔试剂槽,2为刺激液

试剂盒,21为单孔试剂槽,22为刺激液试剂瓶,3为备用试剂瓶。

### 具体实施方式

[0038] 下面结合实施例对本发明做详细说明:本实施例是以本发明技术方案为前提进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下面的实施例。

#### [0039] 实施例一

如图1至图3所示,外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测试剂盒,它包括抗体试剂盒1和配套使用的刺激液试剂盒2,其中:抗体试剂盒1与刺激液试剂盒2均设置为带有封盖的箱体,所述抗体试剂盒1内的一侧设置为抗体试剂区,另一侧设置为备用试剂区12,所述抗体试剂区中设置有字母从A至F依次编号的六孔试剂槽13,与六孔试剂槽13编号相对应地设置有分别代表六种抗体溶液的A号至F号试剂管11;所述刺激液试剂盒2放置于备用试剂区12中并靠近抗体试剂盒1的后侧壁,所述备用试剂区12中存放有分别添加溶血素、培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂的备用试剂瓶3;所述刺激液试剂盒2中设置有一个单孔试剂槽21,单孔试剂槽21中配套设置有存放刺激液的刺激液试剂瓶22。

[0040] 所述抗体试剂盒1的保存温度为2℃至8℃,所述刺激液试剂盒2的保存温度为-2℃。使用时,将分别保存的抗体试剂盒1和配套使用的刺激液试剂盒2取出,根据需要,取用分别添加有溶血素、培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂的若干备用试剂瓶3。

#### [0041] 实施例二

##### I、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度的检测

a、样本要求:带有紫色头盖的规格为3ml的EDTA抗凝管作为实验样本;

b、试剂准备:

溶血素;

抗体A溶液:0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD8/CD45/CD4抗体试剂1ml,

其中,FITC标记的CD3抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL,PE标记的CD8抗体的质量-体积浓度为1.75μg/mL,PerCP标记的CD45抗体的质量-体积浓度为7.5μg/mL,APC标记的CD4抗体的质量-体积浓度为0.92μg/mL;

抗体B溶液:0.1%叠氮化钠缓冲液溶解CD3/CD16+CD56/CD45/CD19抗体试剂1ml,

其中,FITC标记的CD3抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL,PE标记的CD16+CD56抗体的质量-体积浓度为2.75μg/mL,PerCP标记的CD45抗体的质量-体积浓度为7.5μg/mL,APC标记的CD19抗体的质量-体积浓度为2.3μg/mL;

c、外周血淋巴细胞亚群细胞浓度检测

从抗体试剂区中取出A号试剂管和B号试剂管进行以下操作:

1)、向A号试剂管和B号试剂管中分别加入外周血血样50μl;

2)、向A号试剂管中加入抗体A溶液5μl,向B号试剂管中加入抗体B溶液5μl;

3)、将A号试剂管和B号试剂管的头盖盖合后混匀震荡,然后避光静置15分钟,使抗体A和抗体B分别与A号试剂管和B号试剂管中的外周血血样充分发生特异性结合;

4)、向步骤3)中的A号试剂管和B号试剂管中分别加入450μl步骤b中准备好的溶血素,

震荡后避光静置20分钟；

5)、将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,用MultiSET软件获取15000个细胞进行检测,得出外周血淋巴细胞亚群细胞的相对计数及绝对计数。

[0042] 如图4至图7为A号试剂管在流式细胞仪上分析后获得的流式细胞图,即Th(CD3+CD4+)淋巴细胞及Ts(CD3+CD8+)淋巴细胞流式细胞图,其中:

图4中圈出的R1部分即CD45+淋巴细胞,其中横坐标表示CD45 PerCP荧光信号强度,纵坐标表示散射光相对强度;

图5中圈出的R2部分即CD45+CD4+CD8-的淋巴细胞,圈出的R3部分即CD45+CD8+CD4-的淋巴细胞,其中横坐标表示PE标记的CD8荧光信号强度,纵坐标表示APC标记的CD4荧光信号强度;

图6中圈出的R4部分即CD45+CD3+CD4+CD8-的Th淋巴细胞,其中横坐标表示CD3 FITC荧光信号强度,纵坐标表示CD4 APC荧光信号强度;

图7中圈出的R5部分即CD45+CD3+CD8+CD4-的Ts淋巴细胞,其中横坐标表示CD3 FITC荧光信号强度,纵坐标表示CD8 PE荧光信号强度。

[0043] 如图8至图11为B号试剂管在流式细胞仪上分析后获得的流式细胞图,即总B细胞(CD3-CD19+)与NK细胞(CD3-/CD16+CD56+)流式细胞图,其中:

图8中圈出的S1部分即CD45+淋巴细胞,其中横坐标表示CD45 PerCP荧光信号强度,纵坐标表示散射光相对强度;

图9中圈出的S2部分即CD45+CD19+淋巴细胞,圈出的S3部分即CD45+CD16+CD56+的淋巴细胞,其中横坐标表示PE标记的CD16+56荧光信号强度,纵坐标表示APC标记的CD19荧光信号强度;

图10中圈出的S4部分即CD3-CD45+CD19+的总B细胞,其中横坐标表示CD3 FITC荧光信号强度,纵坐标表示APC标记的CD19荧光信号强度;

图11中圈出的S5部分即CD3-CD45+CD16+CD56+的NK细胞示意图,其中横坐标表示FITC标记的CD3荧光信号强度,纵坐标表示PE标记的CD16+56荧光信号强度;

## II、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测

a、样本要求:带有绿色头盖的规格为3ml的肝素抗凝管作为实验样本;

b、试剂准备:

抗体C溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、PE标记的白介素-17(IL-17)抗体含量为10 $\mu$ l/人份、APC标记的干扰素- $\gamma$ (INF- $\gamma$ )抗体含量为2.5 $\mu$ l/人份;

抗体D溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、PE标记的白介素-4(IL-4)抗体含量为2.5 $\mu$ l/人份或着为5 $\mu$ l/人份;

抗体E溶液:FITC标记的CD4抗体含量为10 $\mu$ l/人份、APC标记的CD25抗体含量为2.5 $\mu$ l/人份;

抗体F溶液:PE标记的叉状头转录因子3(Foxp3)抗体含量为10 $\mu$ l/人份;

其中,FITC标记的CD4抗体的质量-体积浓度为3.0 $\mu$ g/mL,APC标记的CD25抗体的质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL,APC标记的INF- $\gamma$ 抗体的质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL,PE标记的IL-4抗体的质量-体积浓度为12.5 $\mu$ g/mL,PE标记的IL-17抗体的质量-体积浓度为100次/20 $\mu$ l,PE标记的Foxp3抗体的质量-体积浓度为100次/20 $\mu$ l,

另需准备充足的培养液、破膜液、蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液、磷酸缓冲盐溶液试剂，留待后步使用；

#### c、CD4+T细胞亚群细胞浓度检测

##### 1)、C号试剂管和D号试剂管

###### ①、刺激

从抗体试剂区中取出C号试剂管和D号试剂管，向C号试剂管和D号试剂管中加入外周血血样200 $\mu$ l、200 $\mu$ l培养液、1 $\mu$ l刺激液，将混合液震荡后放入孵育箱5-6小时，留待后步使用；

###### ②、标记

2.1、取出上步①中在孵育箱内放置的刺激好的样本充分震荡，将100 $\mu$ l刺激好的样本分别加入C号试剂管和D号试剂管中；

2.2、向上步2.1步中的C号试剂管和D号试剂管中分别加入破膜剂1000 $\mu$ l，C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟；

2.3、向上步2.2步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液2ml，充分震荡后避光静置5分钟；

2.4、将上步2.3步中静置后的C号试剂管和D号试剂管置于离心机中，以1500rad/min的转速离心5分钟；

2.5、将上步2.4步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液，并向C号试剂管内再次加入体积为22.5 $\mu$ l的抗体C溶液，向D号试剂管内加再次加入体积为12.5 $\mu$ l或者体积为15 $\mu$ l的抗体D溶液，将C号试剂管和D号试剂管中的混合液充分震荡后避光静置30分钟；

2.6、向上步2.5步中静置后的C号试剂管和D号试剂管中分别加入用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液2ml，将混合液充分震荡后置于离心机中，以1500rad/min的转速离心5分钟；

2.7、将上步2.6步中离心后的C号试剂管和D号试剂管弃去上清液，并向C号试剂管和D号试剂管中分别加入体积为150 $\mu$ l的磷酸缓冲盐溶液充分震荡，制得标记好的标本C和标本D；

###### ③、过滤

用300目尼龙过滤膜过滤上步②中标记好的标本C和标本D，将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图，以CellQuest软件获取并分析相对百分数，并计算各亚群的细胞绝对数，计算各亚群的细胞绝对数计算公式为：细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比 $\times$ CD4+T细胞绝对数，其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l。

[0044] 如图12至图14为C号试剂管在流式细胞仪上分析后获得的流式细胞图，即Th17 (IL-17)/Th1 (IFN- $\gamma$ )淋巴细胞流式细胞图，其中：

图12中圈出的C1部分即CD4+淋巴细胞，其中横坐标表示FITC标记的CD4荧光信号强度，纵坐标表示散射光相对强度；

图13中圈出的C2部分即Th17 (IL-17)的淋巴细胞，其中横坐标表示FITC标记的CD4荧光信号强度，纵坐标表示PE标记的IL-17荧光信号强度；

图14中圈出的C3部分即Th1 (IFN- $\gamma$ )淋巴细胞，其中横坐标表示FITC标记的CD4荧光信号强度，纵坐标表示APC标记的IFN- $\gamma$ 荧光信号强度。

[0045] 如图15和图16为D号试剂管在流式细胞仪上分析后获得的流式细胞图，即Th2 (IL-4)流式细胞图，其中：

图15中圈出的D1部分即CD4+淋巴细胞,其中横坐标表示FITC标记的CD4荧光信号强度,纵坐标表示散射光相对强度;

图16中圈出的D2部分即Th2(IL-4)淋巴细胞,其中横坐标表示FITC标记的CD4荧光信号强度,纵坐标表示PE标记的IL-4荧光信号强。

#### [0046] 2)、E号试剂管

①、从抗体试剂区中取出E号试剂管,向E号试剂管中加入质量-体积浓度为3.0 $\mu$ g/mL的CD4细胞溶液的体积为10 $\mu$ l,加入质量-体积浓度为12 $\mu$ g/mL的CD25细胞溶液的体积为2.5 $\mu$ l,并加入体积为80 $\mu$ l的外周血血样,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

②、向上步①中静置后的E号试剂管中加入体积为1ml的破膜液,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

③、向上步②中静置后的E号试剂管中加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡后避光静置5分钟;

④、将上步③中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑤、向上步④中弃去上清液的E号试剂管中加入F号试剂管中抗体F<sub>oxp3</sub>溶液的体积为10 $\mu$ l,混合液充分震荡后避光静置30分钟;

⑥、向上步⑤中静置后的E号试剂管中再次加入体积为2ml的用蒸馏水10倍稀释的缓冲溶液,混合液充分震荡;

⑦、将上步⑥中静置后的E号试剂管置于离心机中,以1500rad/min的转速离心5分钟,弃去离心后E号试剂管中的上清液;

⑧、向上步⑦中弃去上清液的E号试剂管中加入体积为150 $\mu$ l的磷酸缓冲盐溶液,混合液充分震荡;

⑨、用300目尼龙过滤膜过滤上步⑧中制得的混合液,将标本放置于流式细胞仪上分析流式细胞图,以CellQuest软件获取并分析相对百分数,并计算各亚群的细胞绝对数,计算各亚群的细胞绝对数计算公式为:细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比 $\times$ CD4+T细胞绝对数,其中T细胞绝对数的单位为cells/ $\mu$ l。

[0047] 如图17和图18为E号试剂管在流式细胞仪上分析后获得的流式细胞图,图18中圈出的E1部分即Treg(CD25+F<sub>oxp3</sub>)淋巴细胞,其中横坐标表示PE标记的F<sub>oxp3</sub>荧光信号强度,纵坐标表示APC标记的CD25荧光信号强。

[0048] 进一步地,所述步骤II-c-1)-①中,孵育箱的温度为37 $^{\circ}$ C,孵育箱中CO<sub>2</sub>气体的浓度为5%,孵育箱中的湿度为80-90%湿度。

[0049] 进一步地,所述步骤II-c-1)-①中,孵育时间到后如不能及时标记,可以先将实验样本放入温度为4 $^{\circ}$ C的冰箱中冷藏。

[0050] 进一步地,所述步骤I-c-2)中,在向A号试剂管和B号试剂管中加入抗体的过程中,枪尖倾斜,将抗体加在管底另一侧,不要触碰到血样。

[0051] 进一步地,所述步骤I-c-5)、步骤II-c-1)-③和步骤II-c-2)-⑨中,如待测试样不能及时上机,先放入避光冰箱冷藏保存。

[0052] 进一步地,向实验样本中加入抗体或者刺激液时,要将抗体或者刺激液加入实验样本内部,保证抗体或者刺激液与实验样本充分接触。

[0053] 进一步地,所述步骤 II-c-1)-①中,孵育箱的温度为37℃,孵育箱中CO<sub>2</sub>气体的浓度为5%,孵育箱中的湿度为80-90%湿度。

[0054] 进一步地,所述步骤 II-c-1)-①中,孵育时间到后如不能及时标记,可以先将实验样本放入温度为4℃的冰箱中冷藏。

[0055] 进一步地,所述步骤 I-c-2) 中,在向A号试剂管和B号试剂管中加入抗体的过程中,枪尖倾斜,将抗体加在管底另一侧,不要触碰到血样。

[0056] 进一步地,所述步骤 I-c-5)、步骤 II-c-1)-③和步骤 II-c-2)-⑨中,如待测试样不能及时上机,先放入避光冰箱冷藏保存。

[0057] 进一步地,向实验样本中加入抗体或者刺激液时,要将抗体或者刺激液加入实验样本内部,保证抗体或者刺激液与实验样本充分接触。

[0058] 例一:王某某,女,27岁,主因“间断面部红斑3月余,多关节肿痛1月,发热5日”入院,诊断为“系统性红斑狼疮 狼疮肾炎 神经精神狼疮”。按照本实施例提供的筛查方法,化验得外周血淋巴细胞亚群细胞:总T淋巴细胞(CD3+CD19-) 198.11个/u1↓、(CD3+CD19-(%)) 51.31%↓;总B淋巴细胞(CD3-CD19+) 133.78个/u1、(CD3-CD19+(%)) 37.77%↑;Th细胞(CD3+CD4+) 45.29个/u1↓、(CD3+CD4+(%)) 10.79%↓;Ts细胞(CD3+CD4+) 157.45个/u1、(CD3+CD8+(%)) 37.50%;Th/Ts(CD3+CD4+/CD3+CD4+) 0.29↓;NK细胞(CD3-/CD16+CD56+) 29.06个/u1↓、(CD3-/CD16+CD56+(%)) 8.21%。CD4+T细胞亚群细胞相对计数:Th1(IFN-γ) 6.45%;Th2(IL-4) 1.27%;Th17(IL-17) 2.32%↑;Treg(CD25+Foxp3) 10.45%↑;通过细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比×CD4+T细胞绝对数(cells/u1)cells/μl 全血,计算得CD4+T细胞亚群细胞绝对计数:Th1(IFN-γ) 2.92个/u1↓;Th2(IL-4) 0.58个/u1↓;Th17(IL-17) 1.05个/u1↓;Treg(CD25+Foxp3) 4.73个/u1↓。

[0059] 例二:陈某,女,49岁,主因“多关节肿痛13年,加重5月余”入院,诊断为“类风湿关节炎”。按照本实施例提供的筛查方法,化验得外周血淋巴细胞亚群细胞:总T淋巴细胞(CD3+CD19-) 739.17个/u1、(CD3+CD19-(%)) 79.11%;总B淋巴细胞(CD3-CD19+) 79.35个/u1↓、(CD3-CD19+(%)) 8.84%;Th细胞(CD3+CD4+) 424.62个/u1、(CD3+CD4+(%)) 43.69%;Ts细胞(CD3+CD4+) 298.55个/u1、(CD3+CD8+(%)) 30.72%;Th/Ts(CD3+CD4+/CD3+CD4+) 1.42;NK细胞(CD3-/CD16+CD56+) 87.57个/u1↓、(CD3-/CD16+CD56+(%)) 9.76%。CD4+T细胞亚群细胞相对计数:Th1(IFN-γ) 14%;Th2(IL-4) 1.2%;Th17(IL-17) 0.37%↓;Treg(CD25+Foxp3) 3%;通过细胞绝对计数=各亚群阳性细胞的百分比×CD4+T细胞绝对数(cells/u1)cells/μl 全血,计算得CD4+T细胞亚群细胞绝对计数:Th1(IFN-γ) 59.45个/u1;Th2(IL-4) 5.10个/u1;Th17(IL-17) 1.57个/u1↓;Treg(CD25+Foxp3) 12.74个/u1↓。

[0060] 例三,白某某,男,62岁,主因“全身多处皮疹8月余,吞咽困难2月余,加重半月余”入院,诊断为“皮肤炎 恶性疾病带除外”。按照本实施例提供的筛查方法,化验得外周血淋巴细胞亚群细胞:总T淋巴细胞(CD3+CD19-) 274.86个/u1↓、(CD3+CD19-(%)) 54.69%↓;总B淋巴细胞(CD3-CD19+) 141.21个/u1、(CD3-CD19+(%)) 30.09%↑;Th细胞(CD3+CD4+) 167.64个/u1↓、(CD3+CD4+(%)) 31.22%;Ts细胞(CD3+CD4+) 109.97个/u1↓、(CD3+CD8+(%)) 20.48%;Th/Ts(CD3+CD4+/CD3+CD4+) 1.52;NK细胞(CD3-/CD16+CD56+) 56.96个/u1↓、(CD3-/CD16+CD56+(%)) 12.14%。CD4+T细胞亚群细胞相对计数:Th1(IFN-γ) 4.78%;Th2(IL-4) 0.87%;Th17(IL-17) 1.00%;Treg(CD25+Foxp3) 4.26%;通过细胞绝对计数=各亚群

阳性细胞的百分比 $\times$ CD4+T细胞绝对数(cells/u1)cells/ $\mu$ l 全血,计算得CD4+T细胞亚群细胞绝对计数:Th1(IFN- $\gamma$ ) 8.01个/u1;Th2(IL-4) 1.46个/u1 $\downarrow$ ;Th17(IL-17) 1.68个/u1 $\downarrow$ ;Treg(CD25+Foxp3) 7.17个/u1 $\downarrow$ 。

[0061] 上述三例外周血淋巴细胞亚群细胞检测表明各淋巴细胞相对计数无明显异常时,但是其绝对计数发现有明显的异常。因此,观察外周血淋巴细胞亚群细胞绝对计数可以更灵敏、更早期地发现机体免疫功能异常,有助于早期干预、诊断及治疗。

[0062] 以上所述,仅为本发明的具体实施方式,但本发明的保护范围并不局限于此,任何熟悉技术领域的技术人员在本发明揭露的技术范围内,可轻易想到的变化或替换,都应涵盖在本发明的保护范围之内。因此,本发明的保护范围应以所述权利要求的保护范围为准。



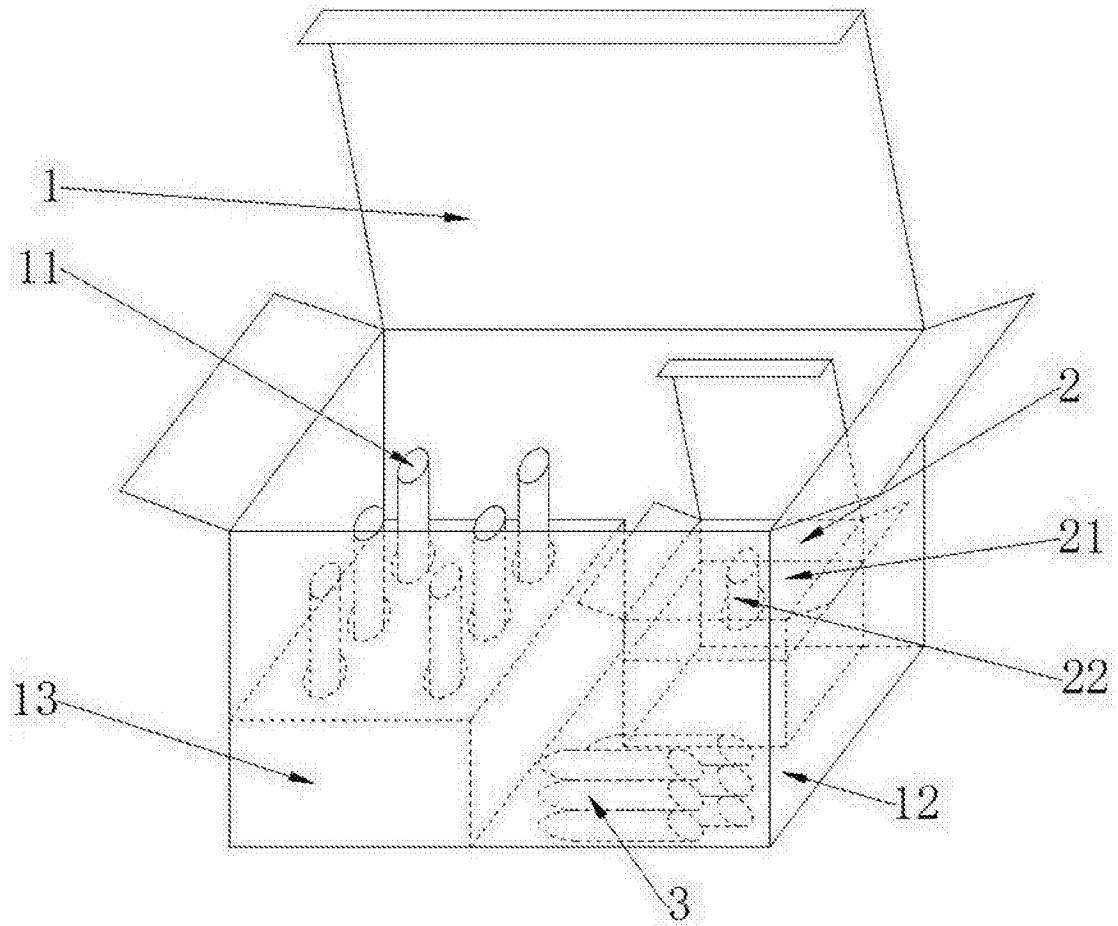


图1

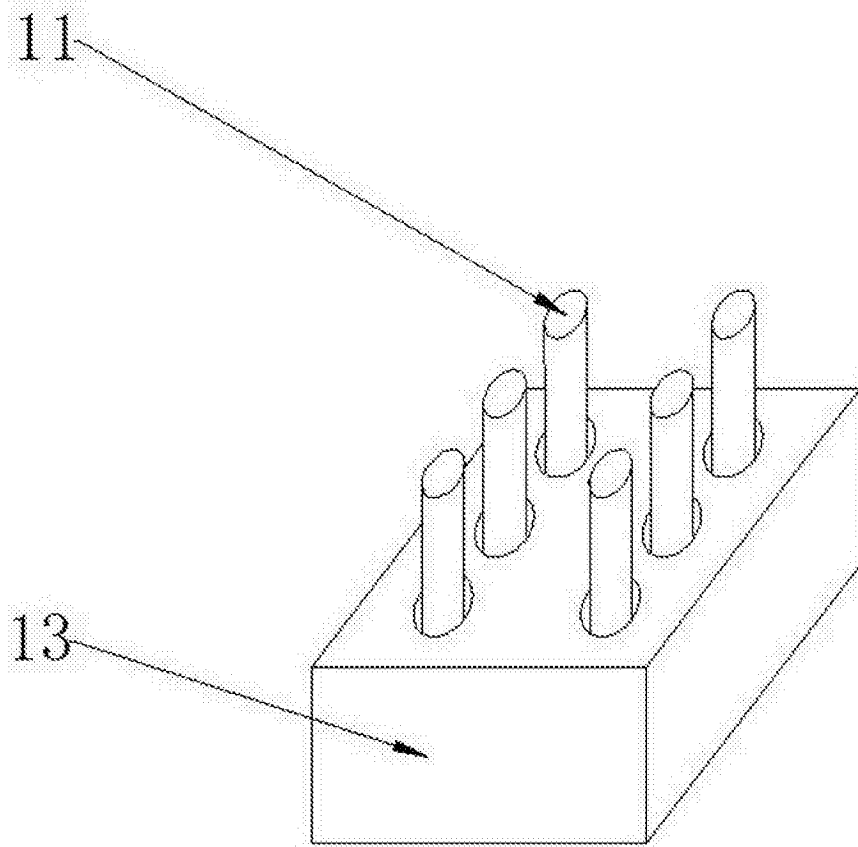


图2

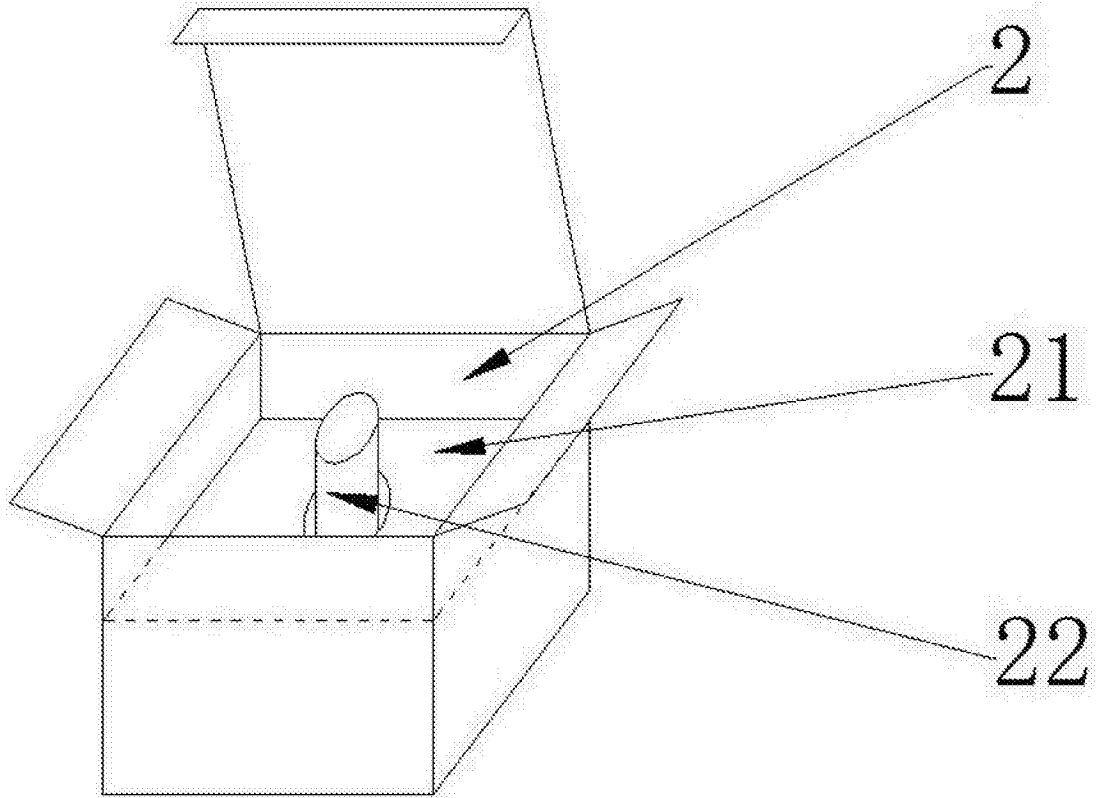


图3

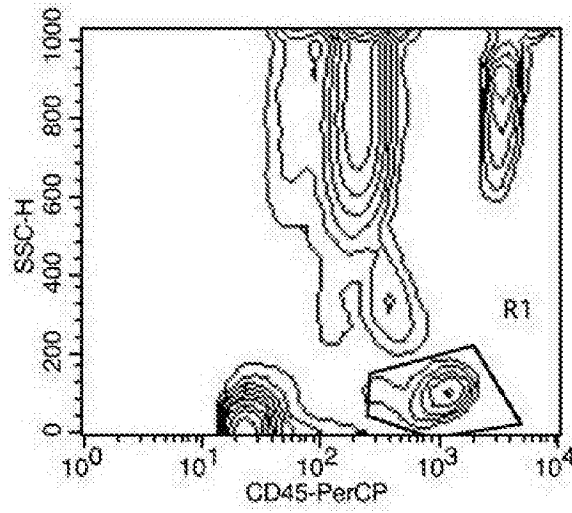


图4

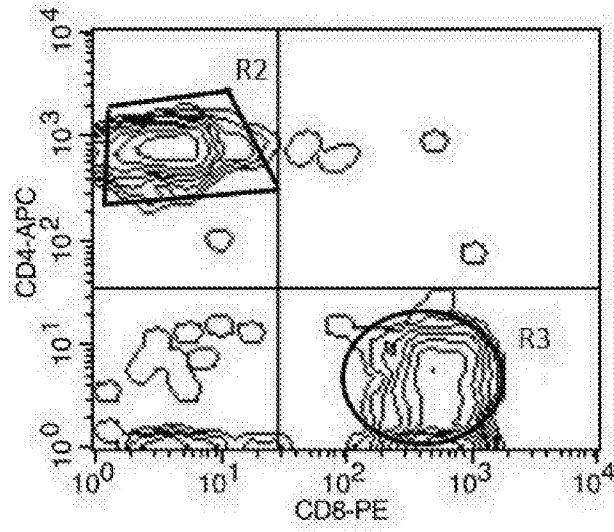


图5

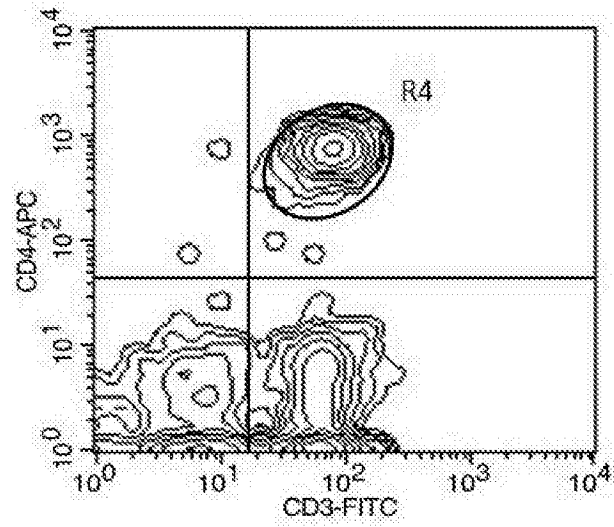


图6

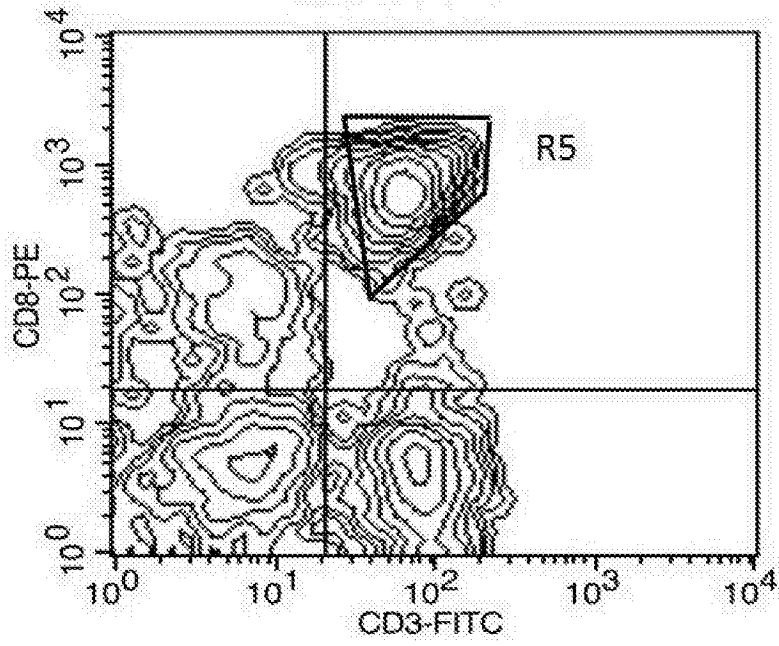


图7

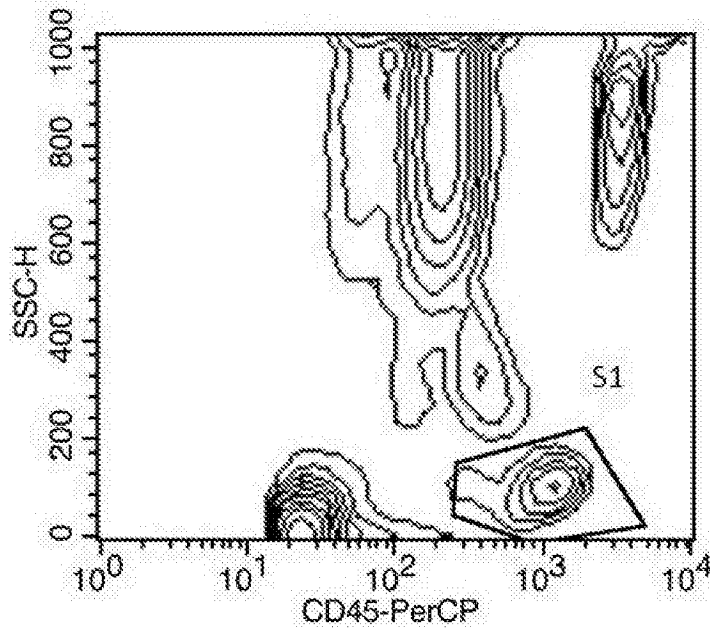


图8

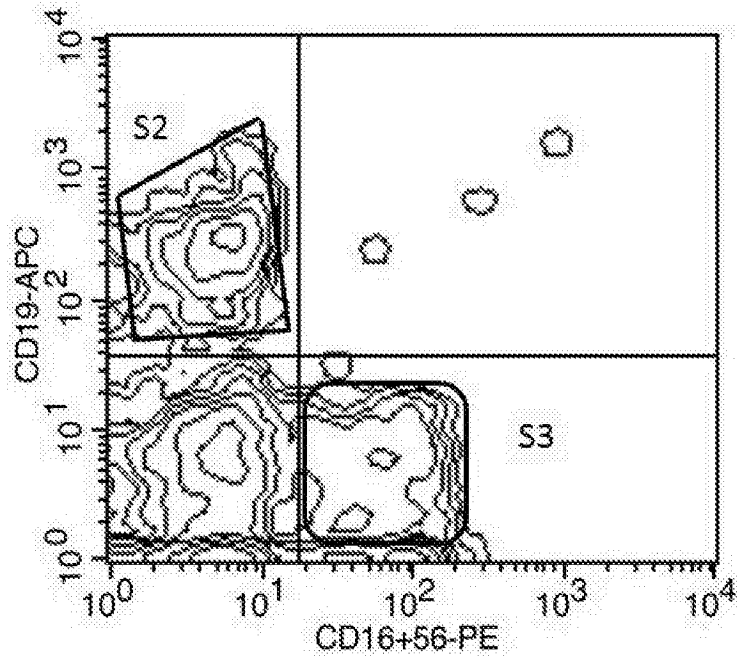


图9

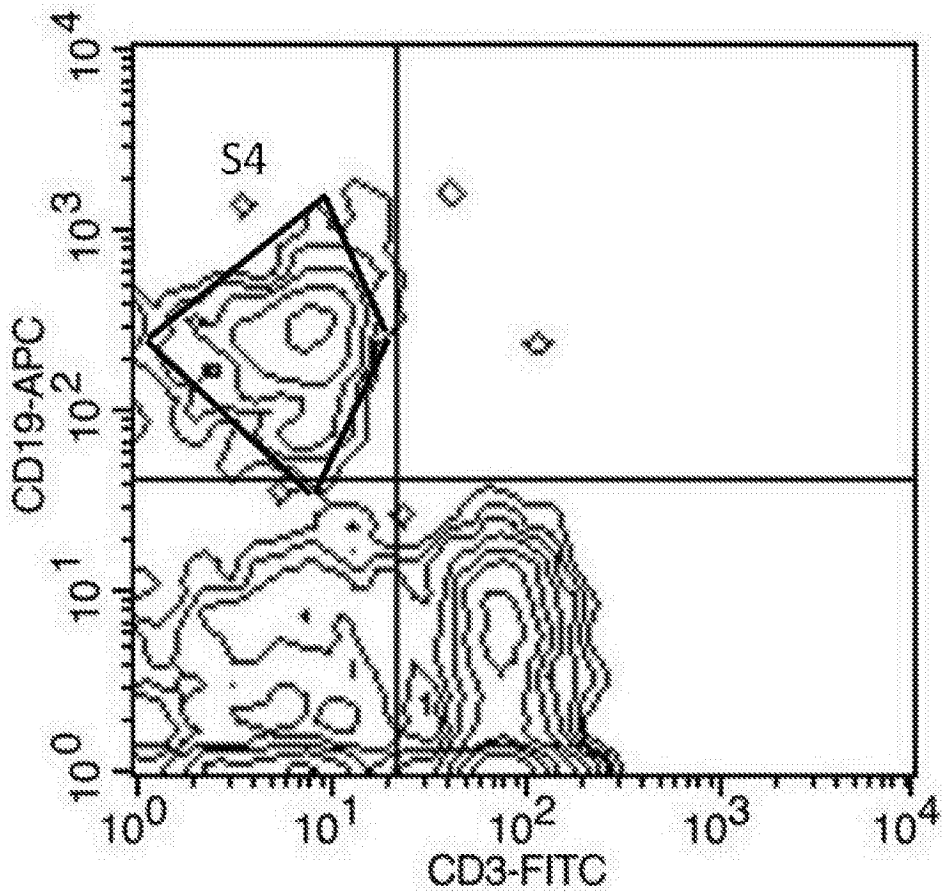


图10

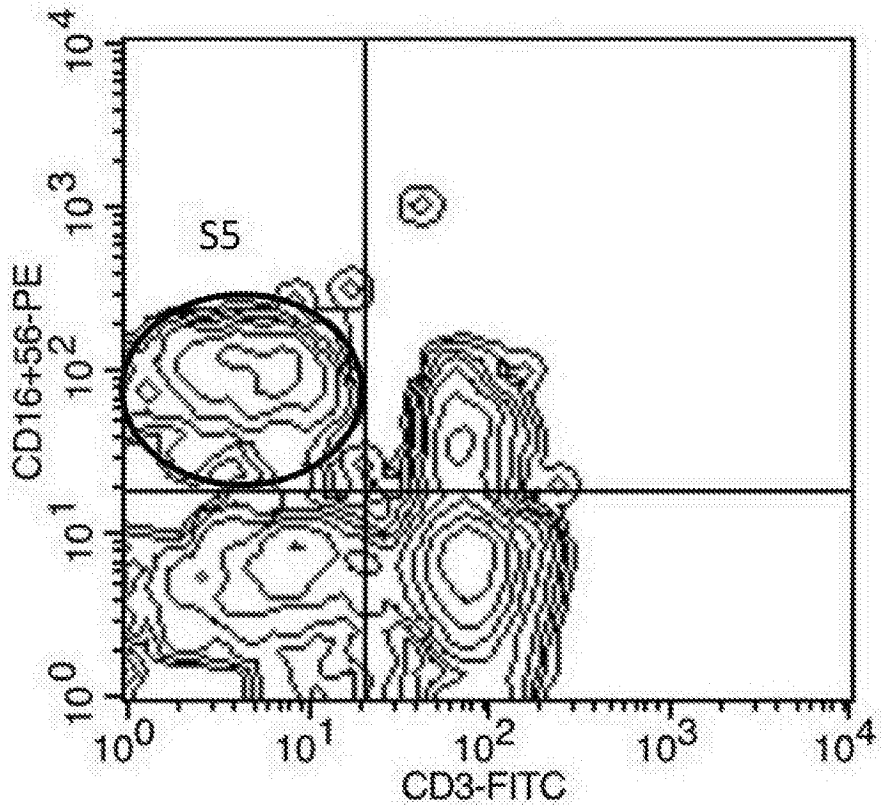


图11

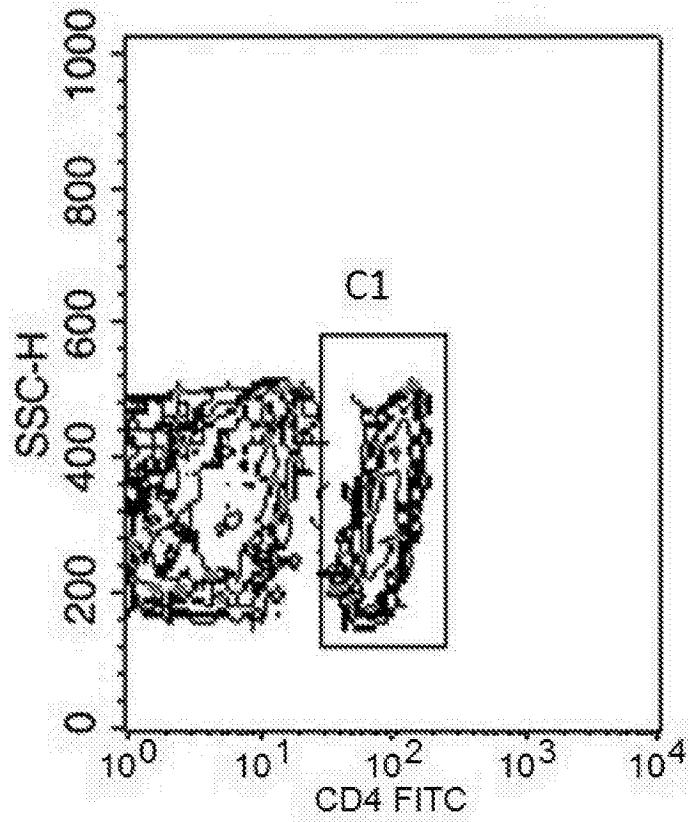


图12



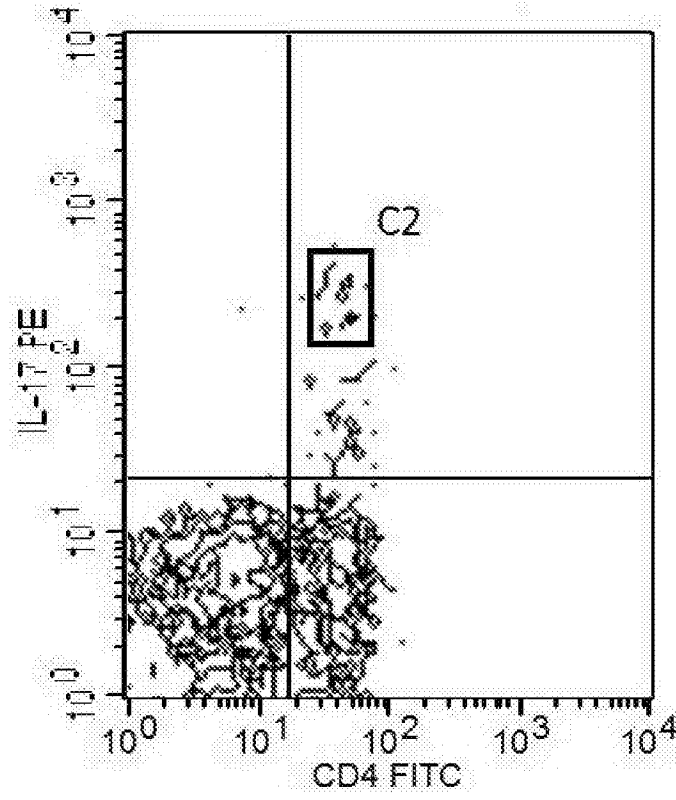


图13

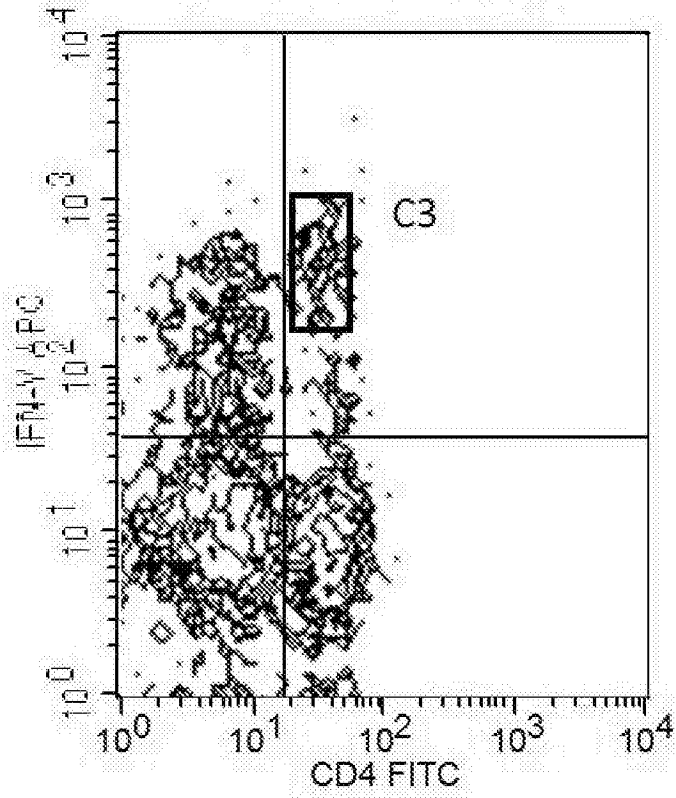


图14

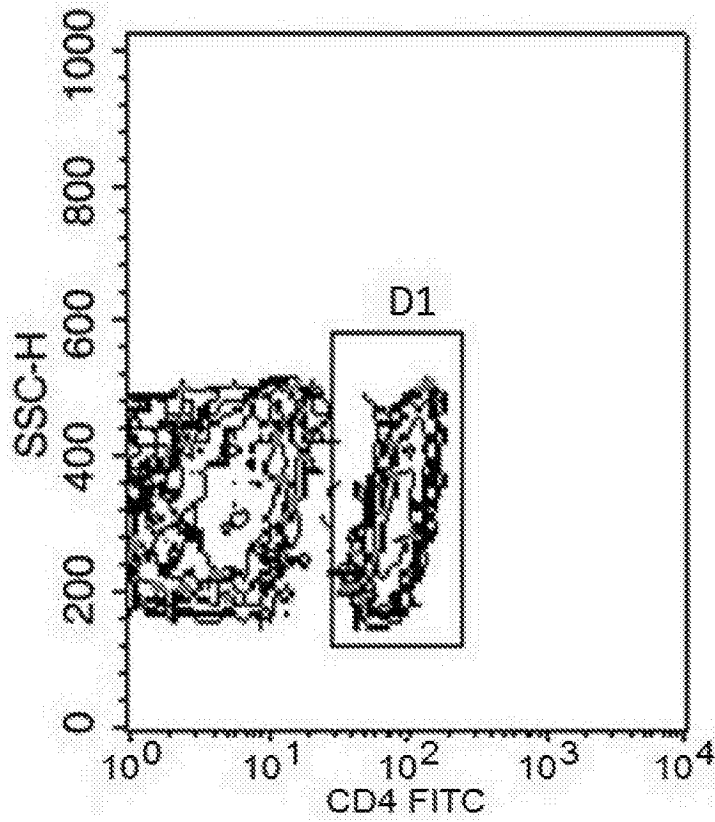


图15

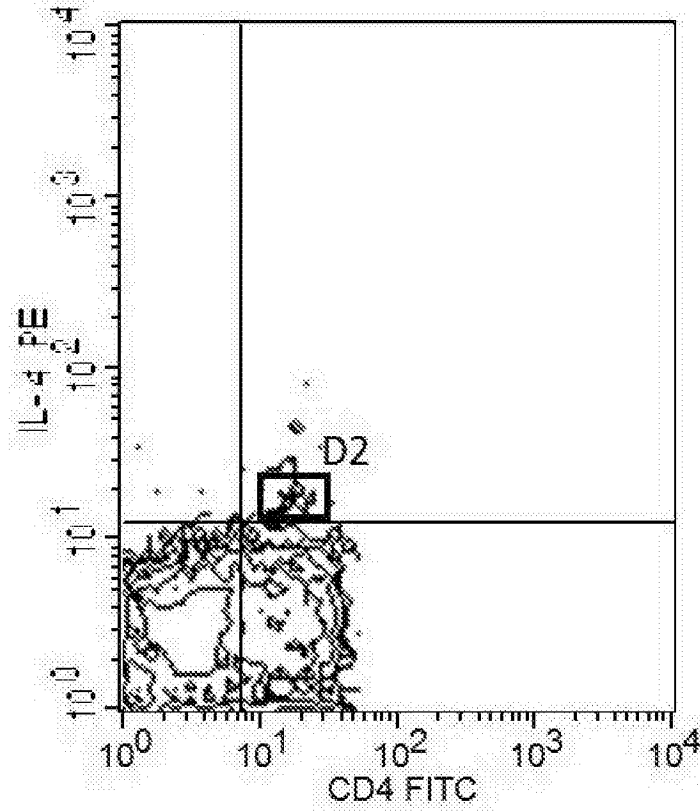


图16

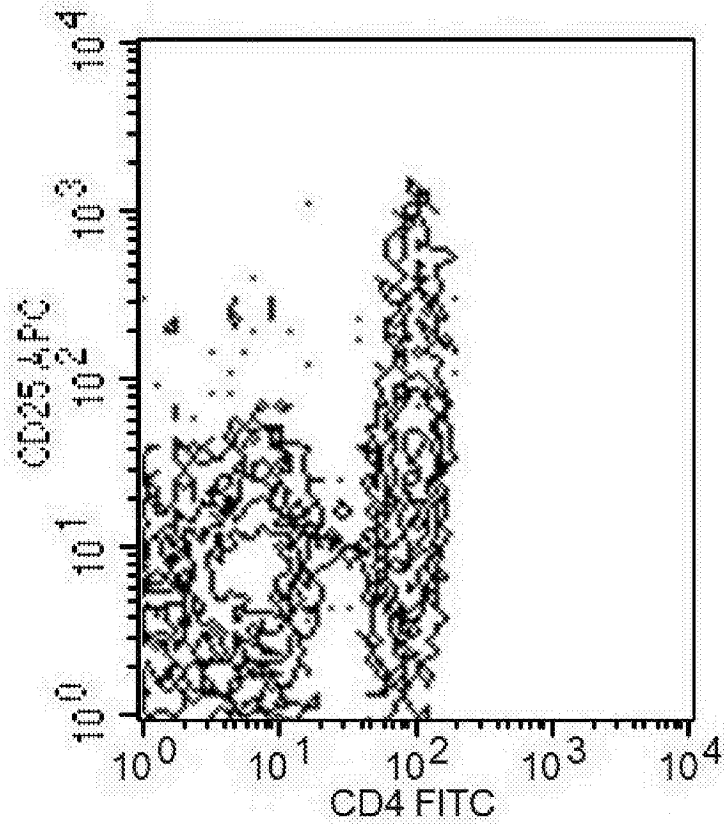


图17

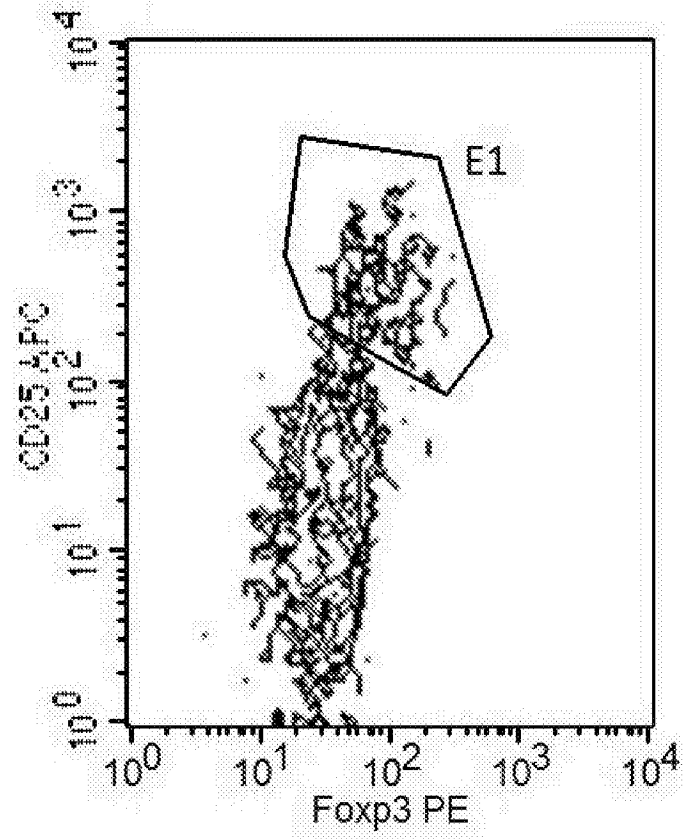


图18