

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 33/577



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01133652.8

[45] 授权公告日 2004 年 9 月 29 日

[11] 授权公告号 CN 1168984C

[22] 申请日 2001.11.8 [21] 申请号 01133652.8

[71] 专利权人 华中科技大学同济医学院附属同济
医院

地址 430030 湖北省武汉市汉口解放大道
1095 号同济医院

[72] 发明人 龚建平 覃吉超 陶德定 冷彦
申漫里 冯永东 高纯 余源

审查员 刘铭

[74] 专利代理机构 武汉开元专利代理有限责任公
司

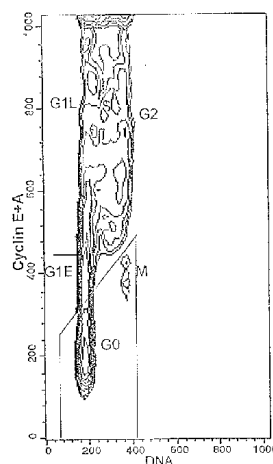
代理人 胡镇西

权利要求书 2 页 说明书 6 页 附图 5 页

[54] 发明名称 双参数细胞周期分析方法

[57] 摘要

本发明公开了一种双参数细胞周期分析方法，主要解决现有分析方法中不能将细胞周期区分得更详细的不足。该方法将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 1 ~ 16 : 1 ~ 16 : 800 的体积比混合，组成鼠抗人细胞周期蛋白 E 和 A 单克隆抗体的混合抗体，利用此混合抗体以及碘化丙啶和核糖核酸酶混合液对所要分析的各种细胞包括肿瘤细胞和正常细胞进行染色，并通过流式细胞仪对其进行荧光检测，从而获得细胞周期蛋白 E + A 表达情况的二维等高图，在图中人们可以清晰地将细胞周期区分为 G₀期、早 G₁期、晚 G₁期、S 期、G₂期和 M 期六个细胞群体。该方法能减少检测误差，节约样本细胞量，并对肿瘤的研究分析和治疗有很强的指导意义。



ISSN 1008-4274

1. 一种双参数细胞周期分析方法, 包括以下步骤:
 - 1) 取经 70~80%冰乙醇固定 2 小时以上的浓度为 $2\sim 8\times 10^5$ 个/毫升的细胞 2~4 毫升, 离心去除固定液, 用磷酸盐缓冲液清洗一遍;
 - 2) 在步骤 1) 所得的细胞中加入 0.5~1 毫升的表面活性剂, 并放置 5~10 分钟;
 - 3) 用 2~4 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 2) 所得的细胞清洗一遍, 再吸干残液;
 - 4) 配制鼠抗人细胞周期蛋白单克隆混合抗体: 将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 1~16:1~16:800 的体积比混合, 组成鼠抗人细胞周期蛋白 E 和 A 单克隆抗体的混合抗体, 其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升;
 - 5) 将步骤 3) 所得的细胞与 0.05~0.2 毫升步骤 4) 所配制的混合抗体充分混合均匀, 并在温度为 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的条件下放置 30 分钟~48 小时;
 - 6) 用 2~4 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 5) 中经混合抗体孵育后的细胞清洗一遍, 再吸干残液;
 - 7) 配制异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液: 将异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白和小牛血清白蛋白液按 1:10~20 的体积比混合, 其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升;
 - 8) 将步骤 6) 中经清洗过的细胞与 0.05~0.2 毫升步骤 7) 所配制的异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液充分混合均匀, 并在室温条件下避光放置 20~30 分钟;
 - 9) 用磷酸盐缓冲液将步骤 8) 中经荧光素标记的细胞再清洗一遍;
 - 10) 配制碘化丙啶和核糖核酸酶混合液: 将碘化丙啶与核糖核酸酶同置于磷酸盐缓冲液中稀释, 使碘化丙啶的浓度为 0.005~0.1 毫克/毫升, 核糖核酸酶的浓度为 0~0.01 毫克/毫升;
 - 11) 将步骤 9) 中经清洗过的细胞与 0.5~1 毫升步骤 10) 所配制的碘

化丙啶和核糖核酸酶混合液相混合, 室温避光放置 20~30 分钟, 用流式细胞仪对其进行检测。

2. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 1) 中的细胞经 80%冰乙醇固定 12~24 小时。

3. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 2) 中加入的表面活性剂为 0.25%Triton X-100, 放置的时间为 5 分钟。

4. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 4) 中将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 8~16:1~8:800 的体积比混合。

5. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 4) 中将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 16:4:800 的体积比混合。

6. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 5) 中取 0.1 毫升混合抗体与细胞充分混合均匀, 并在温度为 4⁰C 的条件下放置 12~14 小时。

7. 根据权利要求 1 所述的双参数细胞周期分析方法, 其特征在于: 所说的步骤 7) 中将异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白和小牛血清白蛋白液按 1:20 的体积比混合。

双参数细胞周期分析方法

技术领域

本发明涉及基础医学领域中对细胞的分析研究，具体地指一种双参数细胞周期分析方法。

背景技术

基础医学领域中对细胞的分析研究最初是从一百多年前开始的。1879年 Flemming W. 通过光学显微镜对活细胞进行观察，可将细胞周期分为有丝分裂间期和有丝分裂期，此即为细胞周期分析方法的萌芽，其简单、粗略可想而知。随着人们对细胞的不断深入研究和检测技术手段的不断发展和更新，1969年 Vandilla MA. 采用流式细胞术对细胞内的脱氧核糖核酸（DNA）进行分析，通过流式细胞仪所检测得到的脱氧核糖核酸含量直方图（DNA content histogram）可将细胞周期分为 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期三个细胞群体。但其对 S 期的分析需用数学公式进行推断，而且与 G_0/G_1 期以及 G_2/M 期的期峰值有部分重叠，为了对 S 期进行更为详细的分析，众多的学者都在不停地探索更优的方法。到了 90 年代，随着细胞周期调控机制的突破，人们发现细胞周期蛋白（Cyclin）是一种位于细胞内且与细胞周期相关的蛋白质。细胞周期蛋白包括 A~I 种类型，细胞周期蛋白 A~I 可分别写为 Cyclin A、Cyclin E、……Cyclin I。通过流式细胞仪对细胞周期蛋白 E 与脱氧核糖核酸（DNA）同时进行检测的方法称为 Cyclin E /DNA 双参数流式细胞术，该方法能将细胞周期分为 G_0 期、早 G_1 期、晚 G_1 期、S 期、 G_2/M 期五个细胞群体；通过流式细胞仪对细胞周期蛋白 A 与脱氧核糖核酸（DNA）同时进行检测的方法称为 Cyclin A /DNA 双参数流式细胞术，该方法能将细胞周期分为 G_0/G_1 期、S 期、 G_2 期、M 期四个细胞群体。上述方法揭示了细胞周期蛋白在细胞周期中的表达规律，从而使应用细胞周期蛋白进行细胞周期分析成为可能。但为了对细胞周期进行更为详细的分析，人们不得不逐一地对单个种类的细胞周期蛋白进行分

析,这就无法避免多次实验之间带来的误差,进而导致细胞周期分析的不正确性概率加大。因此,在临床和实验室的细胞样本分析中,采用上述单个种类的细胞周期蛋白逐一检测的方法,很难满足医学上只取少量的细胞样本并能将其区分得更为详细的要求。

发明内容

本发明的目的就是要克服上述分析方法不足,提供一种可以同时对同一样本的细胞进行细胞周期分析、且能将细胞周期区分得更细、检测误差率更低、所需样本细胞量更少的双参数细胞周期分析方法。

为实现此目的,本发明所探索和研究出的双参数细胞周期分析方法,包括以下步骤:

1) 取经 70~80%冰乙醇固定至少 2 小时以上的浓度为 $2\sim 8\times 10^5$ 个/毫升的细胞 2~4 毫升,离心去除固定液,用磷酸盐缓冲液清洗一遍;

2) 在步骤 1) 所得的细胞中加入 0.5~1 毫升的表面活性剂,放置 5~10 分钟;

3) 用 2~4 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 2) 所得的细胞清洗一遍,再吸干残液;

4) 配制鼠抗人细胞周期蛋白单克隆混合抗体: 将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 1~16:1~16:800 的体积比混合,组成鼠抗人细胞周期蛋白 E 和 A 单克隆抗体的混合抗体,其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升;

5) 将步骤 3) 所得的细胞与 0.05~0.2 毫升步骤 4) 所配制的混合抗体充分混合均匀,并在温度为 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 的条件下放置 30 分钟~48 小时;

6) 用 2~4 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 5) 中经混合抗体孵育后的细胞清洗一遍,再吸干残液;

7) 配制异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液: 将异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白和小牛血清白蛋白液按 1:10~20 的体积比混合,其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升;

8) 将步骤 6) 中经清洗过的细胞与 0.05~0.2 毫升步骤 7) 所配制的

异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液充分混合均匀，并在室温条件下避光放置 20~30 分钟；

9) 用磷酸盐缓冲液将步骤 8) 中经荧光素标记的细胞再清洗一遍；

10) 配制碘化丙啶和核糖核酸酶混合液：将碘化丙啶与核糖核酸酶同置于磷酸盐缓冲液中稀释，使碘化丙啶的浓度为 0.005~0.1 毫克/毫升，核糖核酸酶的浓度为 0~0.01 毫克/毫升；

11) 将步骤 9) 中经清洗过的细胞与 0.5~1 毫升步骤 10) 所配制的碘化丙啶和核糖核酸酶混合液相混合，室温避光放置 20~30 分钟，用流式细胞仪对其进行检测，即可将细胞周期分为 G₀ 期、早 G₁ 期、晚 G₁ 期、S 期、G₂ 期和 M 期六个细胞群体。

上述步骤 1) 中的细胞可经 80%冰乙醇固定 12~24 小时。对细胞内蛋白质固定需要一定的时间，且应选用对细胞膜没有交联作用的固定剂，实验表明 80%冰乙醇对细胞膜没有交联作用，用其固定细胞 12~24 小时效果较好。

上述步骤 2) 中加入的表面活性剂最好用 0.25% Triton X-100，即 Triton X-100 与磷酸盐缓冲液的体积比为 0.25%，放置的时间为 5 分钟。Triton X-100 是一种现有的非离子表面活性剂，它不仅不会破坏细胞膜成分，而且能很好地增加细胞膜的通透性。

上述步骤 4) 中将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 8~16:1~8:800 的体积比混合较佳，而按 16:4:800 的体积比混合最佳。上述两种抗体是直接和抗原即细胞周期蛋白结合的，既要使其结合有特异性，又要使其结合充分，故上述浓度最为经济实用。如果浓度过高的话，一些非特异性物质就会结合进来，影响检测效果，而浓度过低的话，则结合就不充分，同样影响检测效果。

上述步骤 5) 中可取 0.1 毫升混合抗体与细胞充分混合均匀，并在温度为 4°C 的条件下放置 12~14 小时。抗体为蛋白质，要使其与抗原充分结合需要一定时间，且不能让其变质，故宜将其置于 4°C 的条件下放置 12~14 小时为佳。

上述步骤 7) 中将异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白和小牛血

清白蛋白液按 1:20 的体积比混合较好。荧光素标记的免疫球蛋白与抗体结合应充分结合,这样才能将结合了细胞周期蛋白的混合抗体明显标示出来,故其浓度选择高一些为佳,但过高则会浪费试剂。

本发明的双参数细胞周期分析方法通过流式细胞仪对细胞周期蛋白 E、细胞周期蛋白 A 以及脱氧核糖核酸 (DNA) 同时进行检测,又称为 Cyclin E+A/DNA 双参数流式细胞术。其优点在于:该方法能同时对同一样本细胞进行细胞周期分析,可将样本细胞周期分为六个细胞群体: G_0 期、早 G_1 期、晚 G_1 期、S 期、 G_2 期和 M 期,同时避免了逐一采用 Cyclin E /DNA 双参数流式细胞术和 Cyclin A/DNA 双参数流式细胞术进行细胞分析而带来的检测误差和不正确性,并可极大地节约样本细胞量,这在细胞组织越来越难以获得的今天,有其独到和难以替代的优越性。而在临床医学实践中,越来越多的资料显示肿瘤是一类细胞周期疾病,表现在细胞周期驱动机制的失控以及监控机制的破坏上,有关细胞周期的深层次分析不但可以对肿瘤机制产生更深层次的认识,还可以对肿瘤的治疗提供重要资料。现在一般认为肿瘤的发生主要是因为细胞周期中特异期相性的检测点遭破坏而造成的,因此对细胞周期分期更为详细可以对肿瘤进行更加深入的研究,并可以对某一细胞群体也进行更加深入的研究。同时,现在的肿瘤治疗以选用细胞周期特异性药物为主,因而本发明方法的建立可以避免肿瘤用药的盲目性,并对用药剂量也有很强的指导意义。

附图说明

图 1 为采用普通流式细胞术所测得的细胞周期蛋白脱氧核糖核酸含量直方图;

图 2 为采用 Cyclin E /DNA 双参数流式细胞术所测得的细胞周期蛋白 E 表达情况的二维等高图;

图 3 为采用 Cyclin A /DNA 双参数流式细胞术所测得的细胞周期蛋白 A 表达情况的二维等高图;

图 4 为采用 Cyclin E+A/DNA 双参数流式细胞术所测得的细胞周期蛋白 E+A 表达情况的二维等高图;

图 5 为图 4 中的细胞周期蛋白 E+A 表达情况的模式图。

具体实施方式

以下结合附图对本发明的具体实施例作进一步的详细描述;

从图 1 所示的细胞周期蛋白脱氧核糖核酸含量直方图中可知, 采用普通流式细胞术仅能将细胞区分为 G_0/G_1 期、S 期、 G_2/M 期三个细胞群体。

从图 2 所示的细胞周期蛋白 E 表达情况的二维等高图中可知, 采用 Cyclin E /DNA 双参数流式细胞术只能将细胞区分为 G_0 期、早 G_1 期、晚 G_1 期、S 期、 G_2/M 期五个细胞群体。

从图 3 所示的细胞周期蛋白 A 表达情况的二维等高图中可知, 采用 Cyclin A /DNA 双参数流式细胞术只能将细胞区分为 G_0/G_1 期、S 期、 G_2 期、M 期四个细胞群体。

以急性 T 淋巴细胞白血病细胞 (MOLT-4 细胞) 的分析为例, 本发明所述的双参数细胞周期分析方法, 包括以下步骤:

1) 取经 80%冰乙醇固定 24 小时左右的浓度为 5×10^5 个/毫升的急性 T 淋巴细胞白血病细胞 2 毫升, 以 800~1000 转/分的速率离心去除固定液, 用磷酸盐缓冲液清洗一遍。

2) 在步骤 1) 所得的细胞中加入 0.5 毫升 0.25% Triton X-100, 它可使细胞膜进一步通透, 放置 5 分钟。

3) 用 2 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 2) 所得的细胞清洗一遍, 再吸干残液, 以免稀释抗体。

4) 配制鼠抗人细胞周期蛋白单克隆混合抗体: 将鼠抗人细胞周期蛋白 E 单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白 A 单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按 16:4:800 的体积比混合, 组成鼠抗人细胞周期蛋白 E 和 A 单克隆抗体的混合抗体, 其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升。

5) 将步骤 3) 所得的细胞与 0.1 毫升步骤 4) 所配制的混合抗体即一抗混合在一起, 用加样枪吹打使其均匀, 并在温度为 4°C 的条件下放置 12 小时。

6) 用 2 毫升磷酸盐缓冲液将步骤 5) 中经混合抗体孵育后的细胞清洗一遍, 再吸干残液, 以免稀释抗体。

7) 配制异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液: 将异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白和小牛血清白蛋白液按 1:20 的体积比混

合，其中小牛血清白蛋白液中小牛血清白蛋白与磷酸盐缓冲液的质量体积比为 0.01 克/毫升。

8) 将步骤 6) 中经清洗过的细胞与 0.1 毫升步骤 7) 所配制的异硫氰酸荧光素标记的羊抗鼠免疫球蛋白液即二抗混合在一起，用加样枪吹打使其均匀，并在室温条件下避光放置 30 分钟。

9) 用磷酸盐缓冲液将步骤 8) 中经荧光素标记的细胞再清洗一遍。

10) 配制碘化丙啶和核糖核酸酶混合液：将碘化丙啶与核糖核酸酶同置于磷酸盐缓冲液中稀释，使碘化丙啶的浓度为 0.02 毫克/毫升，核糖核酸酶的浓度为 0.005 毫克/毫升。

11) 将步骤 9) 中经清洗过的细胞与 0.5 毫升步骤 10) 所配制的碘化丙啶和核糖核酸酶混合液相混合，室温避光放置 20 分钟，用流式细胞仪对其进行检测即可。

图 4 为采用上述实施例所描述的 Cyclin E+A/DNA 双参数流式细胞术而测得的急性 T 淋巴细胞白血病细胞周期蛋白 E+A 表达情况的二维等高图；图 5 为该急性 T 淋巴细胞白血病细胞周期蛋白 E+A 表达情况的模式图，其中早 G_1 期用 G_{1E} 表示，晚 G_1 期用 G_{1L} 表示。我们从图中可以清晰地 将细胞区分为 G_0 期、早 G_1 期、晚 G_1 期、S 期、 G_2 期和 M 期六个细胞群体。

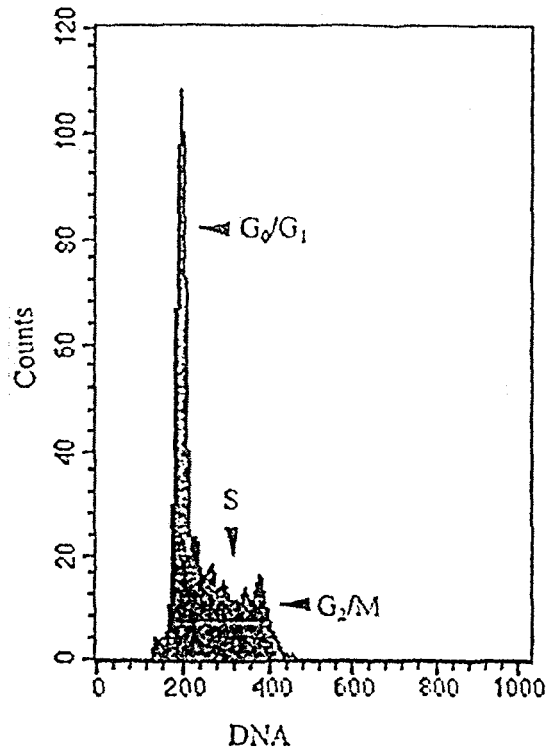


图 1

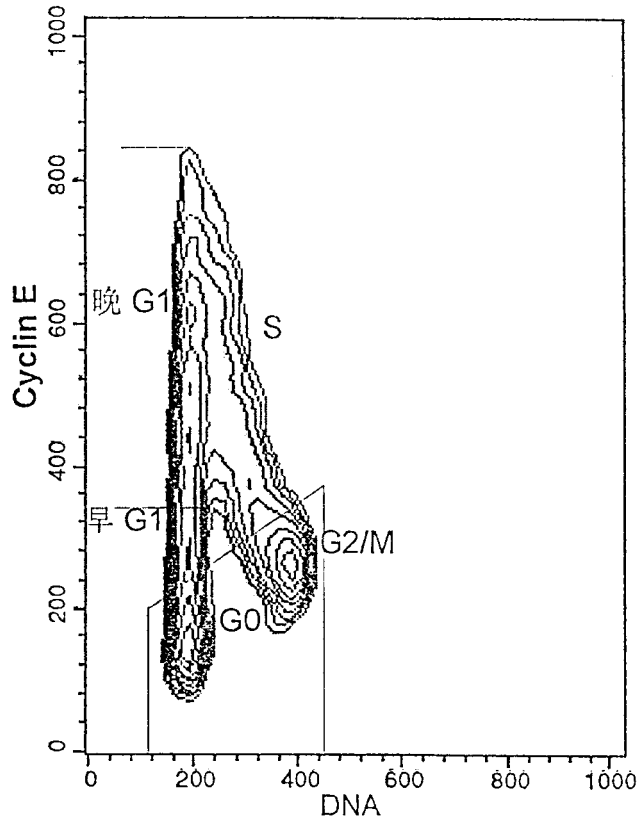


图 2

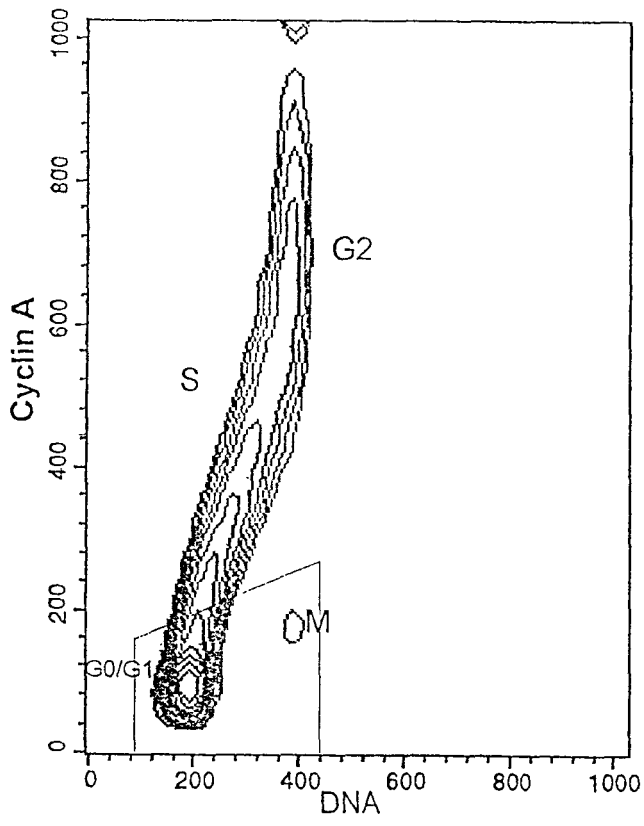


图 3

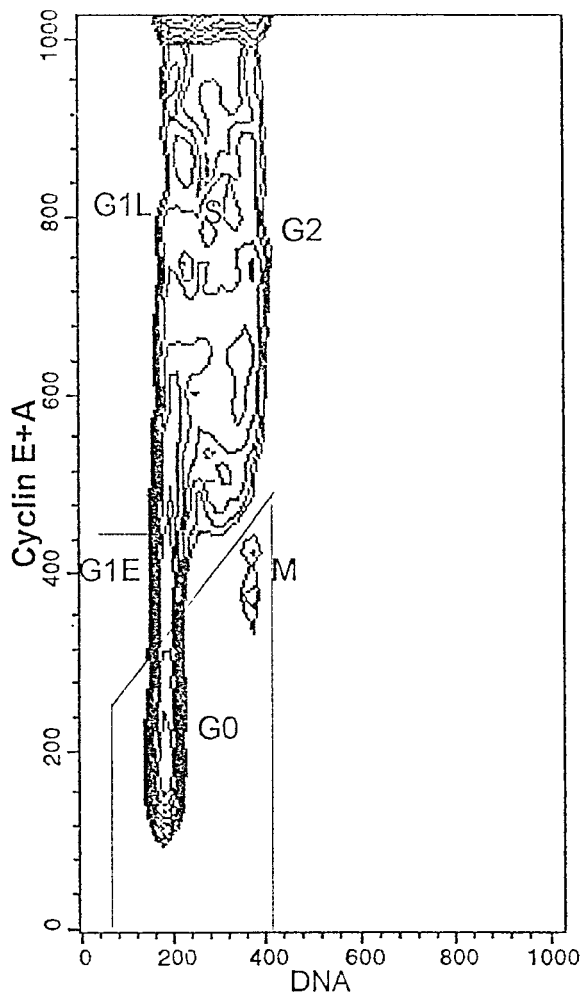
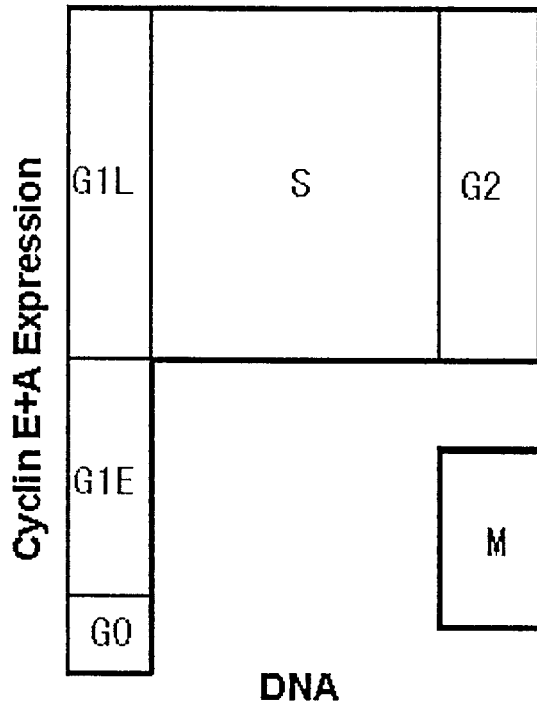


图 4



DNA

图 5

| | | | |
|----------------|---|---------|------------|
| 专利名称(译) | 双参数细胞周期分析方法 | | |
| 公开(公告)号 | CN1168984C | 公开(公告)日 | 2004-09-29 |
| 申请号 | CN01133652.8 | 申请日 | 2001-11-08 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 华中科技大学同济医学院附属同济医院 | | |
| 申请(专利权)人(译) | 华中科技大学同济医学院附属同济医院 | | |
| 当前申请(专利权)人(译) | 华中科技大学同济医学院附属同济医院 | | |
| [标]发明人 | 龚建平 覃吉超 陶德定 冷彦 申漫里 冯永东 高纯 余源 | | |
| 发明人 | 龚建平 覃吉超 陶德定 冷彦 申漫里 冯永东 高纯 余源 | | |
| IPC分类号 | C12Q1/02 G01N33/53 G01N33/533 G01N33/577 | | |
| 其他公开文献 | CN1417584A | | |
| 外部链接 | Espacenet SIPO | | |

摘要(译)

本发明公开了一种双参数细胞周期分析方法，主要解决现有分析方法中不能将细胞周期区分得更为详细的不足。该方法将鼠抗人细胞周期蛋白E单克隆抗体、鼠抗人细胞周期蛋白A单克隆抗体和小牛血清白蛋白液按1~16:1~16:800的体积比混合，组成鼠抗人细胞周期蛋白E和A单克隆抗体的混合抗体，利用此混合抗体以及碘化丙啶和核糖核酸酶混合液对所分析的各种细胞包括肿瘤细胞和正常细胞进行染色，并通过流式细胞仪对其进行荧光检测，从而获得细胞周期蛋白E+A表达情况的二维等高图，在图中人们可以清晰地将细胞周期区分为G0期、早G1期、晚G1期、S期、G2期和M期六个细胞群体。该方法能减少检测误差，节约样本细胞量，并对肿瘤的研究分析和治疗有很强的指导意义。

