



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103604919 A

(43) 申请公布日 2014. 02. 26

(21) 申请号 201310542753. 0

(22) 申请日 2013. 11. 05

(71) 申请人 复旦大学附属华山医院

地址 200031 上海市静安区乌鲁木齐中路
12 号

(72) 发明人 焦正 范琳琳 邱晓燕 钟明康
张明

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事
务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种检测人外周血中 T 淋巴细胞活化期标记物的方法

(57) 摘要

本发明属医学检测技术领域,涉及一种定量流式细胞术同时测定人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物 CD69、CD25 和 CD71 的方法;所述方法首先对外周血进行培养和刺激;然后将培养刺激后的外周血进行染色处理,并对染色后样品进行红细胞裂解和洗涤;最后将洗涤后的样品进行定量流式检测。同时根据 QuantiBRITE PE 微球建立标准曲线,通过标准曲线计算得到每个细胞表面抗原的具体表达数量。本发明所述的方法可准确、灵敏地测定人 T 淋巴细胞表面 CD69、CD25 和 CD71 抗原表达量,反映被测 T 细胞的免疫学特征,为临床研究提供一定的免疫学依据和检测指标。

1. 一种检测人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物的方法,其特征在于,其包括:首先对外周血进行培养和刺激;然后将培养刺激后的外周血进行染色处理,并对染色后样品进行红细胞裂解和洗涤;最后将洗涤后的样品进行定量流式检测;同时测定 QuantiBRITE PE 荧光得到标准曲线,根据标准曲线换算所测样品中 T 淋巴细胞表面 CD69、CD71 及 CD25 的表达量。

2. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述的人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物为 CD69、CD25 和 CD71。

3. 按权利要求 1 所述的方法,其特征在于,其包括步骤:

(1) 采集检测样本;

采集静脉外周血 2-3ml, EDTA 抗凝,室温放置;

(2) 荧光染色;

①取抗凝全血,加入适量 RPMI1640 培养基及 ConA 刺激剂,使 ConA 刺激剂的终浓度为 10-12ng/ml, 37°C, 5%CO₂ 培养 24-48h;

②取培养后样品离心,吸弃上清培养基;

③加入 anti-human-CD3-PerCP-5.5、anti-human-CD69PE、anti-human-CD25PE 和 anti-human-CD71PE 抗体,避光孵育,加入红细胞裂解液,室温下避光静置 10-15min;

④离心弃上清,加入 PBS 洗涤,离心弃上清,该过程重复 2-3 次;

加入 100 μ l PBS 重悬细胞,上机检测;

(3) 样本检测;

①配制标准微球溶液:QuantiBRITE PE 微球测定管中加入 1ml PBS,充分混匀后待测。

②流式细胞仪检测 QuantiBRITE PE 标准微球荧光强度:用前向角设阈值,前向角/侧向角设门,建立荧光通道 2 (FL2) 直方图;

③根据 4 种标准微球的标定 PE 分子数 (X) 和实际测定的平均荧光强度 (Y),建立定量分析的标准曲线: $\log Y = A \log X + B$;

④流式细胞仪测定样品 T 细胞的 CD69、CD25 和 CD71 的荧光强度;将荧光强度代入标准曲线,计算得到 CD69、CD25 和 CD71 结合的 PE 分子数。

⑤根据有效荧光素/蛋白 (F/P) 比值,换算得到每个 T 淋巴细胞上 CD69、CD25 和 CD71 表达量。

一种检测人外周血中 T 淋巴细胞活化期标记物的方法

技术领域

[0001] 本发明属医学检测技术领域,具体涉及一种检测人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物的方法。尤其是应用定量流式细胞术同时检测人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物 CD69、CD25 和 CD71 的方法。

背景技术

[0002] 研究显示,免疫抑制剂的安全范围(即治疗窗)较窄,血药浓度等药动学参数个体间和个体内变异大,易发生感染或排异等严重不良反应,需要进行治疗药物监测(Therapeutic Drug Monitoring, TDM)和个体化给药。目前对免疫抑制剂的治疗药物监测通常是进行血药浓度监测。但是,近年来研究发现相同的血药浓度会产生不同的药物效应。因此,越来越多的国内外学者提出需进行免疫药效学监测,通过检测免疫细胞功能来调整给药方案,提高免疫抑制剂的安全性和有效性。

[0003] CD69、CD25 和 CD71 分别是 T 淋巴细胞活化早、中、晚期的标志物,对其进行监测可以直接反映人体的免疫抑制状态,为及时调整免疫抑制剂的用药方案提供依据。传统流式细胞术(Flow cytometry, FCM)的分析结果通常用荧光强度、平均荧光强度(Mean fluorescence intensity, MFI)、相对荧光强度(Relative fluorescence intensity RFI)、阳性或阴性细胞百分率等方式表达。然而,上述结果未能表达出细胞或颗粒上的某种抗原或分子的绝对数量。此外,T 淋巴细胞活化抗原 CD69、CD25 和 CD71 的表达是一个连续变化过程,而荧光强度的定性分析无法准确反映其动态变化特点,并且各实验室间的检测结果亦无法直接进行比较。

[0004] 基于上述原因,本申请的发明人拟提供一种快速,准确的同时测定人外周血中 T 淋巴细胞表面抗原 CD69、CD25 和 CD71 表达量的方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是克服现有技术对 T 细胞表面抗原测定的不足,提供一种可以绝对定量人外周血中 T 淋巴细胞表面抗原的方法。该方法能快速、准确定量人外周血中 T 淋巴细胞活化标志物 CD69、CD25 和 CD71 的表达量(Antibody capacity, ABC),为临床个体化用药提供准确的免疫药效学依据。

[0006] 本发明采用定量流式细胞术检测 T 淋巴细胞活化标志物 CD69、CD25 和 CD71 的表达量。该法是通过检测标准微球的荧光强度及已知的荧光分子数建立标准曲线,通过标准曲线求得每个待测细胞上的平均荧光素分子数。根据每个抗体分子所结合的荧光分子数,计算每个细胞上抗体结合量(Antibody binding capacity, ABC),从而根据抗原抗体结合的原理,反映细胞表面抗原的表达量。

[0007] 本发明方法中,首先对外周血进行培养和刺激;然后将培养刺激后的外周血进行染色处理,并对染色后样品进行红细胞裂解和洗涤;最后将洗涤后的样品进行定量流式检测。

[0008] 本发明方法中,所使用的定量流式标准微球是 QuantiBRITE PE 微球。该微球是一种水溶性小球,以藻红蛋白(P-phycoerythrin, PE) 分子包被(或标记),其中含 4 种不同荧光水平。使用时,根据产品说明书中标称的每个微球上 PE 分子数量及流式细胞仪测得的实际荧光强度,可建立标准曲线。

[0009] 具体而言,本发明的检测人外周血中 T 淋巴细胞活化标记物的方法,其特征在于,其包括步骤:

[0010] (1) 采集样本

[0011] 采集人外周静脉血 2-3ml, K₂EDTA 抗凝;

[0012] (2) 荧光标记

[0013] ①取 100 μ l 抗凝全血,加入适量 RPMI1640 细胞培养基和 ConA 刺激剂,使 ConA 刺激剂的终浓度为 10-12ng/ml; 37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C, 5%CO₂ 培养箱中培养 24-48h;

[0014] ②取培养后样品离心,弃上清培养基;

[0015] ③加入 antihuman-CD3-PerCP-5.5、antihuman-CD69PE、antihuman-CD25PE 和 antihuman-CD71PE 抗体各 2 μ l, 避光孵育 30-45min, 然后加入 3-5ml 红细胞裂解液, 避光静置 10-15min;

[0016] ④离心后弃上清,再加入 2-3ml PBS 洗涤 2-3 次,弃上清液;

[0017] ⑤加入 100-200 μ l PBS 重悬细胞,待测;

[0018] (3) 检测分析

[0019] ①配制标准微球溶液:在含 QuantiBRITE PE 微球的测定管中加入 1ml PBS,混匀;

[0020] ②标准曲线建立:用前向角设阈值,前向角/侧向角设门(如图 1 所示),建立荧光通道 2 (FL2) 直方图,获得 4 种已知含不同 PE 分子数微球的平均荧光强度(如图 2 所示);再根据 4 种标准微球的标定 PE 分子数 (X) 和实际测定的平均荧光强度 (Y),建立定量分析的标准曲线 $\log Y = A \log X + B$ (如图 3 所示);③样本测定:流式细胞仪测定样品细胞的荧光强度;将荧光强度代入标准曲线,计算得到 CD69、CD25 和 CD71 抗体结合的 PE 分子数,再根据有效荧光素/蛋白 (Fluorochrome/Protein, F/P) 比值,换算得到每个 T 淋巴细胞上 CD69、CD25 和 CD71 表达量。

[0021] ④本发明方法可准确测定人外周血中 T 淋巴细胞表面 CD69、CD25 和 CD71 抗原表达量,反映人体的免疫学特征,为临床个体化用药提供更依据。

附图说明

[0022] 图 1 显示了流式细胞仪检测 QuantiBRITE PE 微球:前向角/侧向角(FSC/SSC)设门。

[0023] 图 2 显示了流式细胞仪检测 QuantiBRITE PE 微球:4 种不同 PE 分子数微球的平均荧光强度(MFI)。

[0024] 图 3 显示了荧光分子定量分析的标准曲线。

具体实施方式

[0025] 以下实施例用于说明本发明,但不使用限制本人发明的范围,若未特别指明,实施例中所用技术手段为本技术领域技术人员所熟知的常规手段,所用原料均为市售商品。

- [0026] 以下实施例中所用流式细胞仪为美国 BD 公司生产,型号 FACS Aria I。
- [0027] 实施例 1 健康人中 CD69、CD25 及 CD71 的表达量
- [0028] ①采集样本:选取 5 例健康志愿者,抽取外周静脉血 3ml,置于 K₂EDTA 抗凝管中;
- [0029] ②取 100 μ l 抗凝血,加入 2ml RPMI1640 细胞培养基及 20 μ l ConA 刺激剂,37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24h;
- [0030] ③加入 antihuman-CD3-PerCP-5.5、antihuman-CD69PE、antihuman-CD25PE 和 antihuman-CD71PE 各 2 μ l,避光孵育 30min,然后加入 3ml 红细胞裂解液,避光静置 10min
- [0031] ④ 477g 离心 10min,弃上清;
- [0032] ⑤加入 2ml PBS 洗涤,477g 离心 10min,弃上清,该过程重复 2 次;
- [0033] ⑥加入 100 μ l PBS 重悬细胞,待测;
- [0034] ⑦配制标准微球溶液:在含 QuantiBRITE PE 微球的测定管中加入 1ml PBS,混匀;
- [0035] ⑧标准曲线建立:用前向角设阈值,前向角/侧向角设门,建立荧光通道 2 直方图,获得 4 种已知含不同 PE 分子数微球的平均荧光强度;再根据 4 种标准微球的标定 PE 分子数 (X) 和实际测定的平均荧光强度 (Y),建立定量分析的标准曲线 $\log(y)=1.023\log(x)-0.124$;
- [0036] ⑨样本测定:流式细胞仪测定样品细胞的的荧光强度;将荧光强度代入标准曲线,计算得到 CD69、CD25 和 CD71 抗体结合的 PE 分子数,再根据 PE 分子数/抗体比值为 1:1,得到 5 名健康志愿者 CD69、CD25、和 CD71 的抗原表达量(如表 1 所示)。
- [0037] 表 1 5 名健康志愿者外周血 T 细胞 CD69、CD25 及 CD71 的表达量
- [0038]

志愿者编号	1	2	3	4	5
CD69ABC	1892.63	2533.83	2435.04	2237.88	2364.78
CD25ABC	4025.64	3840.49	2747.41	4141.73	4600.73
CD71ABC	2226.33	1017.54	2574.48	2135.06	2105.69

- [0039] ABC:每个细胞上抗体结合量 (Antibody binding capacity, ABC)。
- [0040] 实施例 2 肾移植患者外周血中 CD69、CD25 及 CD71 表达量
- [0041] ①采集样本:选取 5 例肾移植患者,抽取外周静脉血 3ml,置于 K₂EDTA 抗凝管中;
- [0042] ②取 100 μ l 抗凝血,加入 2ml RPMI1640 培养基及 20 μ l ConA 刺激剂,37℃,5%CO₂ 培养箱中培养 24h;
- [0043] ③加入 antihuman-CD3-PerCP-5.5、antihuman-CD69PE、antihuman-CD25PE 和 antihuman-CD71PE 抗体各 2 μ l,避光孵育 30min,然后加入 3ml 红细胞裂解液,避光静置 10min
- [0044] ④ 477g 离心 10min,弃上清;
- [0045] ⑤加入 2ml PBS 洗涤,477g 离心 10min,弃上清,该过程重复 2 次;
- [0046] ⑥加入 100 μ l PBS 重悬细胞,待测;
- [0047] ⑦配制标准微球溶液:在含 QuantiBRITE PE 微球的测定管中加入 1ml PBS,混匀;
- [0048] ⑧标准曲线建立:用前向角设阈值,前向角/侧向角设门,建立荧光通道 2 直方图,

获得 4 种已知含不同 PE 分子数微球的荧光强度 ; 根据 4 种标准微球的标定 PE 分子数 (X) 和实际测得的荧光强度 (Y), 建立定量分析的标准曲线 $\log(y)=0.984\log(x)-0.036$

[0049] ⑨样本测定 : 流式细胞仪测定样品细胞的荧光强度 ; 将荧光强度代入标准曲线, 计算得到 CD69、CD25 和 CD71 抗体结合的 PE 分子数, 再根据 PE 分子数 / 抗体比值为 1:1, 得到 5 名健康志愿者 CD69、CD25、和 CD71 的抗原表达量, 如表 2 所示。

[0050] 表 2 5 名肾移植患者外周血中 T 细胞 CD69、CD25 及 CD71 的表达量

[0051]

受试者编号	1	2	3	4	5
CD69ABC	1989.34	1675.94	1879.80	2852.398	1556.78
CD25ABC	1273.15	2704.68	1287.99	1777.824	2674.66
CD71ABC	1827.56	1289.22	1176.75	1497.258	1435.29

[0052] ABC : 每个细胞上抗体结合量 (Antibody binding capacity, ABC)。

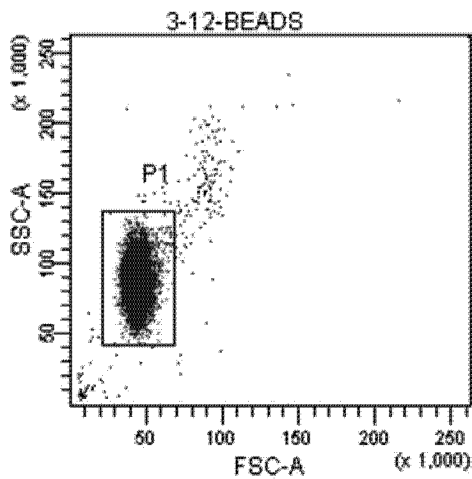


图 1

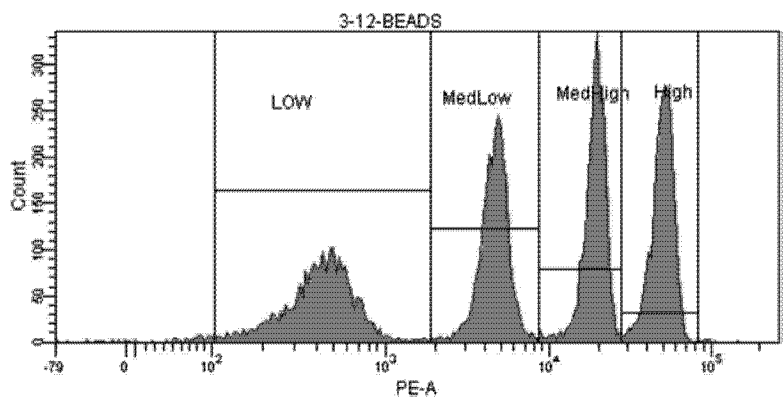


图 2

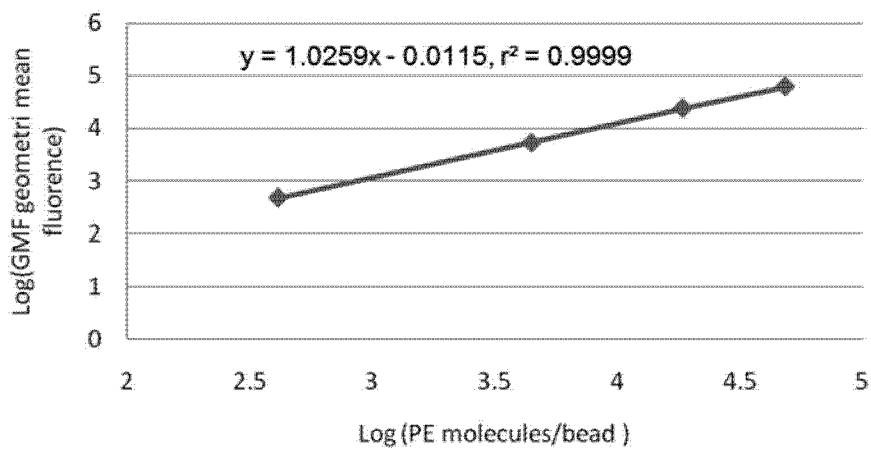


图 3

专利名称(译)	一种检测人外周血中T淋巴细胞活化期标记物的方法		
公开(公告)号	CN103604919A	公开(公告)日	2014-02-26
申请号	CN201310542753.0	申请日	2013-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学附属华山医院		
[标]发明人	焦正 范琳琳 邱晓燕 钟明康 张明		
发明人	焦正 范琳琳 邱晓燕 钟明康 张明		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N33/9493		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属医学检测技术领域，涉及一种定量流式细胞术同时测定人外周血中T淋巴细胞活化标记物CD69、CD25和CD71的方法；所述方法首先对外周血进行培养和刺激；然后将培养刺激后的外周血进行染色处理，并对染色后样品进行红细胞裂解和洗涤；最后将洗涤后的样品进行定量流式检测。同时根据QuantiBRITE PE微球建立标准曲线，通过标准曲线计算得到每个细胞表面抗原的具体表达数量。本发明所述的方法可准确、灵敏地测定人T淋巴细胞表面CD69、CD25和CD71抗原表达量，反映被测T细胞的免疫学特征，为临床研究提供一定的免疫学依据和检测指标。

志愿者编号	1	2	3	4	5
CD69ABC	1892.63	2533.83	2435.04	2237.88	2364.78
CD25ABC	4025.64	3840.49	2747.41	4141.73	4600.73
CD71ABC	2226.33	1017.54	2574.48	2135.06	2105.69