



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104807988 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 29

(21) 申请号 201510214042. X

(22) 申请日 2015. 04. 29

(71) 申请人 辽宁医学院附属第一医院

地址 121001 辽宁省锦州市古塔区人民街五
段 2 号

(72) 发明人 何韶衡

(74) 专利代理机构 沈阳科威专利代理有限责任
公司 21101

代理人 杨滨

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 15/14(2006. 01)

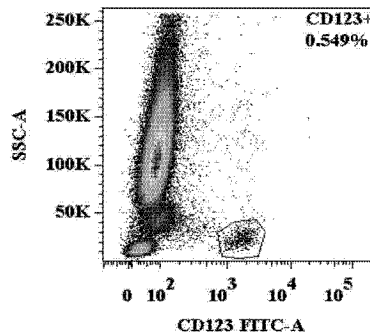
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54) 发明名称

一种嗜碱性粒细胞的特异性免疫识别方法

(57) 摘要

本发明提供一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,包括:按顺序将试验样本编号并标记好试验所需的流式上样管;在每个流式上样管内加入所需的抗人CD123、抗人CCR3、抗人HLA-DR荧光标记流式抗体组合;将混匀的全血加到标记好的流式管内,室温避光孵育;每个样本管内加入红细胞裂解液,室温避光孵育;孵育结束后,离心去上清;用流式细胞仪检测并分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。本发明在无需分离纯化嗜碱性粒细胞情况下能将外周血 98-100% 的嗜碱性粒细胞与其他种类细胞分辨出来,每例待测样本需要不超过 100 μL 的全血,重复性好,误差小。同时分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度,能全面反映被检测分子在嗜碱性粒细胞上的表达状况。



1. 一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:包括如下步骤:

①首先按照 9:1 的比例,用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的红细胞裂解液储存液稀释到工作状态;同样地用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的磷酸盐缓冲液的储存液稀释到工作状态;

②按顺序将试验样本编号,并标记好试验所需的流式上样管;

③在每个流式上样管内加入所需的抗人 CD123、抗人 CCR3 和抗人 HLA-DR 荧光标记流式抗体组合,如 FITC 标记的抗人 CD123、APC 标记的抗人 CCR3、APC/Cy7 标记的抗人 HLA-DR,用量为每人份三种抗体各 5 μ L;

④患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25 μ L 至 125 μ L 全血加到标记好的流式管内,漩涡振荡器上低速漩涡混匀 3 ~ 5s,室温避光孵育 15min;

⑤孵育结束后,每个样本管内加入 1mL 的红细胞裂解液,漩涡振荡器上低速漩涡混匀 3 ~ 5s,室温避光孵育 10min;

⑥孵育结束后,1200rpm/min 转速离心 6min,离心结束后,弃去上清液,加入 1mL 的 PBS 缓冲液,以同样的速度离心,(离心结束取样操作时,应避免剧烈晃动引起细胞沉淀悬浮);

⑦离心后,以同样的方式去上清液,加入 300 μ L 的 PBS 缓冲液,用流式细胞仪检测;

⑧用不同流式细胞仪相应的分析软件分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。

2. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:所述荧光标记流式抗体包括 FITC、APC、APC/Cy7、PE、PE/Cy7 或 PerCP 荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3 和抗人 HLA-DR 抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:所述抗体组合为任何荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

4. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:所述抗体组合为任何分子标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

5. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:所述混合好的 25 μ L 至 125 μ L 全血为 25 μ L 至 125 μ L 之间的任何量。

6. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在於:所述的流式细胞仪分析包括嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。

一种嗜碱性粒细胞的特异性免疫识别方法

技术领域

[0001] 本发明涉及过敏性疾病诊断的技术领域,具体为一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法。

背景技术

[0002] 变态反应性疾病发病率占世界总人口的 30% 以上,被世界卫生组织列为 21 世纪的四大非感染性疾病之一。随着工业经济的发展,生态环境的改变,近年来此类疾病日益增多,成为常见病、多发病,是我国健康及经济发展领域需要解决的重大问题。

[0003] 有史以来,疾病的定义及诊断方案绝大多数都是由发达国家提出的。2011 年何韶衡、张慧云在东京举行的首届中-日-韩三国过敏年度交流会上,在国内外率先对沿用了近 40 年的过敏性疾病的定义进行了修正商榷,将原来的“过敏性疾病是一组由 IgE 介导的疾病”修改为“是一组由肥大细胞 / 嗜碱性粒细胞 (MC/Bas) 介导的疾病”。而 IgE 介导的过敏性疾病只是其中的一个亚型,从而修正了人们对过敏性疾病认识的偏差。这是因为过敏反应 (速发型超敏反应) 的根本问题是激活后的初始效应细胞—MC/Bas 释放炎症性介质,从而启动炎症的病理生理过程,导致临床症状的出现。基于原有“过敏性疾病是一组由 IgE 介导的疾病”的定义,国外一些专家人为的把那些非 IgE 介导的过敏性疾病下了个“类过敏反应”的定义,即“类过敏反应”临床表现与过敏反应相同、治疗方法相同,但是血液中的 IgE 水平不增高。使人们对过敏性疾病认识的偏差进一步加大。我们对过敏性疾病的新定义必将使人们重新认识此类疾病,将会大大提高过敏性疾病的预防和诊治水平。

[0004] 也是基于“过敏性疾病是一组由 IgE 介导的疾病”的定义,目前临床上血清中过敏原特异性 IgE 水平的检测几乎成了过敏性疾病的唯一诊断方法,甚至有人错误的认为这项检测是过敏性疾病诊断的“金标准”,使人们对过敏性疾病认识的偏差进一步加大,完全忘记了过敏性疾病诊断的“金标准”是过敏原特异性激发试验这一客观事实。由于特异性 IgE 检测的临床意义在于告诉 IgE 依赖性过敏患者对哪一种常见过敏原过敏,而对非 IgE 依赖性过敏反应如绝大多数药物过敏反应、80% 以上的食物过敏、大多数哮喘的患者、自然环境中的小分子如汽车尾气、乙醇等物质过敏无任何诊断意义,因此临床上急需研究出对过敏性疾病有定性诊断价值的方法,从而帮助医生对药物过敏还是药物不良反应,食物过敏还是其它原因的腹泻、过敏性哮喘还是内源性哮喘等进行鉴别诊断。

[0005] 过敏原特异性激发试验分为体内激发试验和体外激发试验两种,前者是过敏性疾病诊断的“金标准”,但是有一定风险,甚至能诱发重度过敏反应,临床上很少开展;后者 (包括过敏原特异性肥大细胞激发试验和过敏原特异性嗜碱性粒细胞激发试验两种) 在临床意义上虽然不如前者直接,但是无风险,因此获得广泛的认可。但是,人们经过数十年的无数次努力,始终无法获得可靠的体外激发试验方法。多年来,作为肥大细胞脱颗粒的特异性标记物,组胺受到了极大的关注,但是令人遗憾的是组胺检测系统不仅较昂贵、功能单一,而且较难获得稳定数据,目前在临床上很难开展。此外,由于肥大细胞位于组织中,而除过敏性鼻炎患者的鼻腔灌洗液外,很难获取过敏患者的肥大细胞进行激发试验,所以根本

无法用于临床诊断。

[0006] 过敏原特异性嗜碱性粒细胞激发试验是目前唯一有潜力应用于过敏性疾病临床检测的激发试验方法。不难理解,这个激发试验方法有两个基本要求,其一为嗜碱性粒细胞的特异性识别,其二为特异性的过敏原。但是令人遗憾的是到目前为止尚未有一种可靠的、重复性好的在全血中特异性识别嗜碱性粒细胞的免疫学方法,导致过敏原特异性嗜碱性粒细胞激发试验无法开展。近十年来,人们发现 CC-趋化因子受体 3(CCR3),又名嗜酸性粒细胞趋化因子受体及 CD193,稳定表达于人嗜碱性粒细胞上,但是由于血液中仅有大约 70%左右的 CCR3 表达于人嗜碱性粒细胞上,而其他 30%表达于嗜酸性粒细胞、血小板、Th2 淋巴细胞上,所以单独 CCR3 的表达是不能代表嗜碱性粒细胞的。CD123(IL-3 受体 α 链)表达阳性,HLA-DR 阴性细胞能够将 80%左右的外周血嗜碱性粒细胞与其它细胞区分开来,但是也不能完全代表嗜碱性粒细胞。我们最近的研究发现如果同时检测 CD123、HLA-DR、CCR3,CCR3+CD123+HLA-DR- 细胞群 98-100%是嗜碱性粒细胞,从而率先基本上解决了嗜碱性粒细胞的特异性免疫识别问题,为过敏原特异性嗜碱性粒细胞激发试验打下了坚实基础,为嗜碱性粒细胞的鉴定提供了方法。

发明内容

[0007] 本发明所解决的技术问题在于提供一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,以解决上述背景技术中的问题。

[0008] 本发明所解决的技术问题采用以下技术方案来实现:一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,其特征在于:包括如下步骤:

[0009] ①首先按照 9:1 的比例,用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的红细胞裂解液储存液稀释到工作状态;同样地用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的磷酸盐缓冲液的储存液稀释到工作状态;

[0010] ②按顺序将试验样本编号,并标记好试验所需的流式上样管;

[0011] ③在每个流式上样管内加入所需的抗人 CD123、抗人 CCR3 和抗人 HLA-DR 荧光标记流式抗体组合,如 FITC 标记的抗人 CD123、APC 标记的抗人 CCR3、APC/Cy7 标记的抗人 HLA-DR,用量为每人份三种抗体各 5 μ L;

[0012] ④患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25 μ L 至 125 μ L 全血加到标记好的流式管内,漩涡振荡器上低速漩涡混匀 3 ~ 5s,室温避光孵育 15min;

[0013] ⑤孵育结束后,每个样本管内加入 1mL 的红细胞裂解液,漩涡振荡器上低速漩涡混匀 3 ~ 5s,室温避光孵育 10min;

[0014] ⑥孵育结束后,1200rpm/min 转速离心 6min,离心结束后,弃去上清液,加入 1mL 的 PBS 缓冲液,以同样的速度离心,(离心结束取样操作时,应避免剧烈晃动引起细胞沉淀悬浮);

[0015] ⑦离心后,以同样的方式去上清液,加入 300 μ L 的 PBS 缓冲液,用流式细胞仪检测;

[0016] ⑧用不同流式细胞仪相应的分析软件分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。

[0017] 所述红细胞裂解液由美国 BD 公司提供,如用其他公司的红细胞裂解液请根据试剂说明书进行稀释。

[0018] 所述荧光标记流式抗体包括 FITC、APC、APC/Cy7、PE、PE/Cy7 或 PerCP 荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3 和抗人 HLA-DR 抗体。

[0019] 所述的抗体组合为任何荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

[0020] 所述的抗体组合为任何分子标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

[0021] 与已公开技术相比,本发明具有如下优点:

[0022] (1) 能将外周血 98-100% 的嗜碱性粒细胞与其他种类细胞分辨出来;

[0023] (2) 无需分离纯化嗜碱性粒细胞;

[0024] (3) 每例样本检测仅需不超过 100 μ L 的全血;

[0025] (4) 本发明方法重复性好,误差小于 10%;

[0026] (5) 同时分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度,能更加全面的反映被检测分子在嗜碱性粒细胞上表达的状况。

附图说明

[0027] 图 1.1 所表达的是血液中 CD123 阳性细胞群;

[0028] 图 1.2 所表达的是血液中 CD123 阳性 HLA 阴性细胞群;

[0029] 图 1.3 所表达的是血液中 CD123 阳性 HLA 阴性 CCR3 阳性细胞群即嗜碱性粒细胞。

[0030] 本发明的检测结果;血液中同时表达 CD123 和 CCR3 而不表达 HLA-DR 的细胞 98% 以上是嗜碱性粒细胞。

具体实施方式

[0031] 为了使本发明的技术手段、创作特征、工作流程、使用方法达成目的与功效易于明白了解,下面将结合本发明实施例,对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 实施例 1

[0033] 一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法,如图 1.1、1.2、1.3 所示,包括如下步骤:

[0034] (1) 首先按照 9:1 的比例,用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的红细胞裂解液储存液稀释到工作状态;同样地用 9 倍的超纯水将试剂盒中的浓缩的磷酸盐缓冲液的储存液稀释到工作状态;注意:红细胞裂解液建议现用现配;

[0035] (2) 按顺序将试验样本编号,并标记好试验所需的流式上样管;

[0036] (3) 在每个流式上样管内加入所需的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 荧光标记流式抗体组合,如 FITC 标记的抗人 CD123、APC 标记的抗人 CCR3、APC/Cy7 标记的抗人 HLA-DR,用量为每人份三种抗体各 5 μ L;

[0037] (4) 患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25 μ L 至 125 μ L 全血加到标记好的流式管内,漩涡振荡器上低速漩涡混匀 3 ~ 5s,室温避光孵育 15min;

[0038] (5) 孵育结束后,每个样本管内加入 1mL 的红细胞裂解液,漩涡振荡器上低速漩涡

混匀 3 ~ 5s, 室温避光孵育 10min ;

[0039] (6) 孵育结束后, 1200rpm/min 转速离心 6min, 离心结束后, 弃去上清液, 加入 1mL 的 PBS 缓冲液, 以同样的速度离心, (离心结束取样操作时, 应避免剧烈晃动引起细胞沉淀悬浮);

[0040] (7) 离心后, 以同样的方式去上清液, 加入 300 μ L 的 PBS 缓冲液, 用流式细胞仪检测;

[0041] (8) 用不同流式细胞仪相应的分析软件分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。

[0042] 本实施例中所述荧光标记流式抗体包括 FITC、APC、APC/Cy7、PE、PE/Cy7 或 PerCP 荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3 和抗人 HLA-DR 抗体。

[0043] 本实施例中所述的抗体组合为任何荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

[0044] 本实施例中所述的抗体组合为任何分子标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 三种抗体组合。

[0045] 以上显示和描述了本发明的基本原理、主要特征及本发明的优点。本行业的技术人员应该了解, 本发明不受上述实施例的限制, 上述实施例和说明书中描述的只是说明本发明的原理, 在不脱离本发明精神和范围的前提下, 本发明还会有各种变化和改进, 这些变化和改进都落入要求保护的本发明范围内。本发明的要求保护范围由所附的权利要求书及其等效物界定。

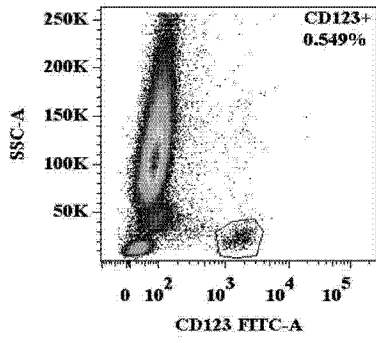


图 1.1

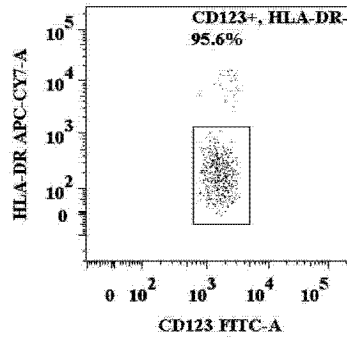


图 1.2

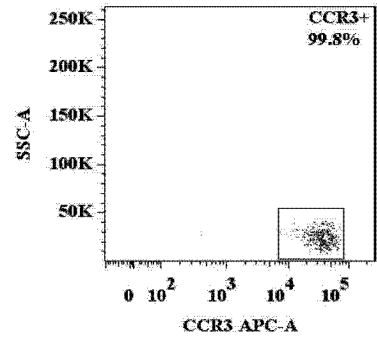


图 1.3

专利名称(译)	一种嗜碱性粒细胞的特异性免疫识别方法		
公开(公告)号	CN104807988A	公开(公告)日	2015-07-29
申请号	CN201510214042.X	申请日	2015-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	辽宁医学院附属第一医院		
申请(专利权)人(译)	辽宁医学院附属第一医院		
当前申请(专利权)人(译)	辽宁医学院附属第一医院		
[标]发明人	何韶衡		
发明人	何韶衡		
IPC分类号	G01N33/53 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/1434 G01N33/53 G01N2800/70		
代理人(译)	杨滨		
其他公开文献	CN104807988B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种嗜碱性粒细胞的特异性识别方法，包括：按顺序将试验样本编号并标记好试验所需的流式上样管；在每个流式上样管内加入所需的抗人CD123、抗人CCR3、抗人HLA-DR荧光标记流式抗体组合；将混匀的全血加到标记好的流式管内，室温避光孵育；每个样本管内加入红细胞裂解液，室温避光孵育；孵育结束后，离心去上清；用流式细胞仪检测并分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度。本发明在无需分离纯化嗜碱性粒细胞情况下能将外周血98-100%的嗜碱性粒细胞与其他种类细胞分辨出来，每例待测样本需要不超过100μL的全血，重复性好，误差小。同时分析嗜碱性粒细胞的计数及平均荧光强度，能全面反映被检测分子在嗜碱性粒细胞上的表达状况。

