



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104792687 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 22

(21) 申请号 201510213977. 6

(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 张慧云

(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 15/10(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

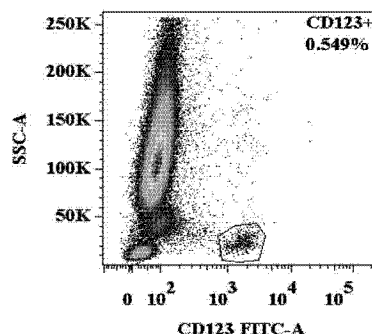
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

### (54) 发明名称

一种嗜碱性粒细胞致敏状态的鉴定方法

### (57) 摘要

本发明提供一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,包括如下步骤:首先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、抗人 Fc $\epsilon$ RI 荧光标记流式抗体组合;将混合好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。本发明方法在无需分离纯化嗜碱性粒细胞的情况下即能将外周血 98-100% 的嗜碱性粒细胞与其他种类细胞分辨出来,并能鉴定出嗜碱性粒细胞致敏状态,每例待测样本需要不超过 100  $\mu$ L 的全血,重复性好。



1. 一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于: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体组合:抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR、抗人 Fc $\epsilon$ RI 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, PE 标记的抗人 Fc $\epsilon$ RI,用量为每人份四种抗体各 5  $\mu$ L,以鉴定嗜碱性粒细胞的致敏状态;

④患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25  $\mu$ L 至 125  $\mu$ 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  $\mu$ 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致敏的鉴定方法,其特征在于: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、抗人 HLA-DR 和抗人 Fc $\epsilon$ RI 抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于:所述抗体组合为任何荧光标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 和抗人 Fc $\epsilon$ RI 四种抗体组合。

4. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于:所述抗体组合为任何分子标记的抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR 和抗人 Fc $\epsilon$ RI 四种抗体组合。

5. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于:所述的混合好的 25  $\mu$ L 至 125  $\mu$ L 全血为 25  $\mu$ L 至 125  $\mu$ L 之间的任何量。

6. 根据权利要求 1 所述的嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于: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。

## 一种嗜碱性粒细胞致敏状态的鉴定方法

### 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致敏状态的鉴定方法。

### 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。

[0004] 人们早已认识到只有“致敏”状态的肥大细胞 / 嗜碱性粒细胞脱颗粒才能启动过敏性疾病的病理生理过程,从而产生相应的临床表现。因此,鉴定出肥大细胞 / 嗜碱性粒细胞是否处于“致敏”状态将有助于判断出人群对过敏原的易感性。但是数十年来人们一直无法发现准确判定肥大细胞 / 嗜碱性粒细胞是否处于“致敏”状态的方法。我们最近的研究发现如果同时检测 CD123、HLA-DR、CCR3,CCR3+CD123+HLA-DR<sup>+</sup> 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。此外,人们早已认识到在致敏状态下,肥大细胞和嗜碱性粒细胞上 Fc $\epsilon$ RI 分子表达增强,与 IgE 结合数量增加。因此检测 Fc $\epsilon$ RI 分子表达变化,至少可部分代表肥大细胞、嗜碱性粒细胞致敏状态。我们进一步研究发现如果同时检测 CD123、HLA-DR、CCR3,Fc $\epsilon$ RI 可代表处于致敏状态的嗜碱性粒细胞的数量,为预测过敏性疾病的易感性问题提供了新的试验手段。

### 发明内容

[0005] 本发明所解决的技术问题在于提供一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,以解决上述背景技术中的问题。

[0006] 本发明所解决的技术问题采用以下技术方案来实现:一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,其特征在于:包括如下步骤:

[0007] 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;

[0008] 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;

[0009] ③在每个流式上样管内加入所需的抗体组合:抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人

HLA-DR、抗人 Fc  $\epsilon$  RI 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、PE 标记的抗人 Fc  $\epsilon$  RI,用量为每人份四种抗体各 5  $\mu$  L,以鉴定嗜碱性粒细胞的致敏状态;

[0010] ④患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25  $\mu$  L 至 125  $\mu$  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;

[0011] 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;

[0012] 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);

[0013] ⑦离心后,以同样的方式去上清液,加入 300  $\mu$  L 的 PBS 缓冲液,用流式细胞仪检测;

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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、抗人 HLA-DR 和抗人 Fc  $\epsilon$  RI。

[0017] 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、抗人 Fc  $\epsilon$  RI 四种抗体组合。

[0018] 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、抗人 Fc  $\epsilon$  RI 四种抗体组合。

[0019] 与已公开技术相比,本发明存在以下优点:

[0020] (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;

[0021] (2) 无需分离纯化嗜碱性粒细胞;

[0022] (3) 每例样本检测仅需不超过 100  $\mu$  L 的全血;

[0023] (4) 本发明方法重复性好,误差小于 10%

[0024] (5) 能可靠鉴定嗜碱性粒细胞致敏状态。

## 附图说明

[0025] 图 1.1 所表达的是血液中 CD123 阳性细胞群图;

[0026] 图 1.2 所表达的是血液中 CD123 阳性 HLA 阴性细胞群;

[0027] 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;

[0028] 图 1.4 所表达的是血液中 CD123 阳性 HLA 阴性 CCR3 阳性细胞 Fc  $\epsilon$  RI 表达情况即致敏状态检测结果;

[0029] 本发明的检测结果,血液中嗜碱性粒细胞致敏状态检测结果。

## 具体实施方式

[0030] 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。

[0031] 实施例 1

[0032] 一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法,如图 1.1、1.2、1.3、1.4 所示,包括如下步骤:

[0033] (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。

[0034] (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;

[0035] (3) 在每个流式上样管内加入所需的抗体组合:抗人 CD123、抗人 CCR3、抗人 HLA-DR、抗人 Fc $\epsilon$ RI 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、PE 标记的抗人 Fc $\epsilon$ RI,用量为每人份四种抗体各 5  $\mu$ L,以鉴定嗜碱性粒细胞的致敏状态;

[0036] (4) 患者全血低速漩涡混匀后,用加样枪吸取混合好的 25  $\mu$ L 至 125  $\mu$ 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;

[0037] (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;

[0038] (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);

[0039] (7) 离心后,以同样的方式去上清液,加入 300  $\mu$ L 的 PBS 缓冲液,用流式细胞仪检测;

[0040] (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。

[0041] 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、抗人 HLA-DR、抗人 Fc $\epsilon$ RI 抗体。

[0042] 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、抗人 Fc $\epsilon$ RI 四种抗体组合。

[0043] 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、抗人 Fc $\epsilon$ RI 四种抗体组合。

[0044] 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。

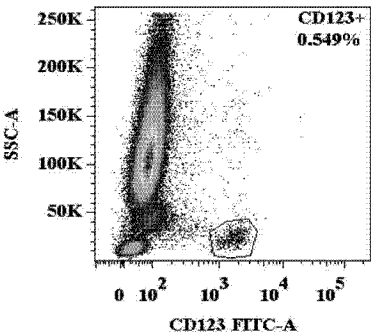


图 1.1

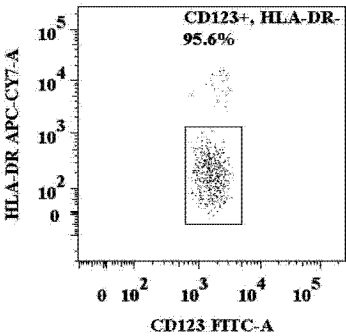


图 1.2

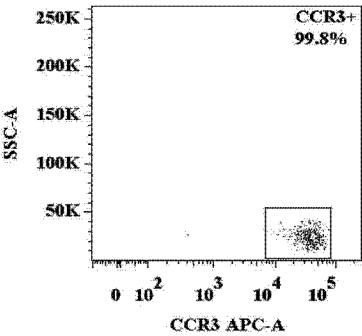


图 1.3

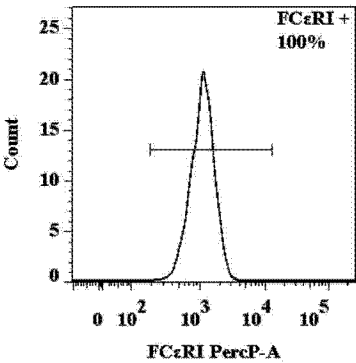


图 1.4

|                |                                                |         |            |
|----------------|------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 一种嗜碱性粒细胞致敏状态的鉴定方法                              |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN104792687A</a>                   | 公开(公告)日 | 2015-07-22 |
| 申请号            | CN201510213977.6                               | 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<br>张慧云                                     |         |            |
| 发明人            | 何韶衡<br>张慧云                                     |         |            |
| IPC分类号         | G01N15/10 G01N33/531                           |         |            |
| 代理人(译)         | 杨滨                                             |         |            |
| 其他公开文献         | CN104792687B                                   |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a> |         |            |

#### 摘要(译)

本发明提供一种嗜碱性粒细胞致敏的鉴定方法，包括如下步骤：首先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、抗人FcεRI荧光标记流式抗体组合；将混合好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。本发明方法在无需分离纯化嗜碱性粒细胞的情况下即能将外周血98-100%的嗜碱性粒细胞与其他种类细胞分辨出来，并能鉴定出嗜碱性粒细胞致敏状态，每例待测样本需要不超过100μL的全血，重复性好。

