



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362871 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201810124399.2

(22)申请日 2018.02.07

(71)申请人 远见生物科技(上海)有限公司
地址 201114 上海市闵行区新骏环路245号
第6层E619室

(72)发明人 杜飞

(74)专利代理机构 上海邦德专利代理事务所
(普通合伙) 31312

代理人 余昌昊

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

G01N 15/00(2006.01)

G01N 15/10(2006.01)

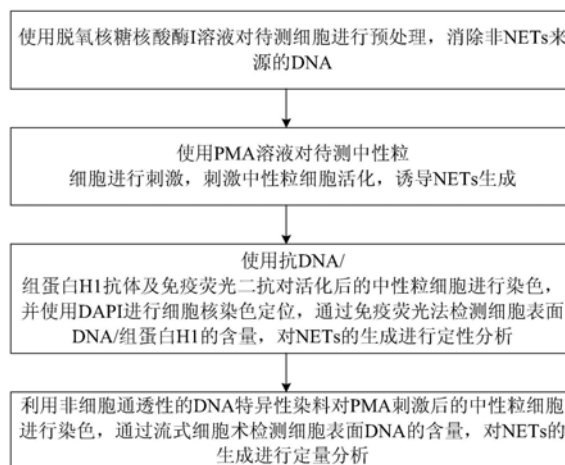
权利要求书2页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明提出了一种用于中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)检测的试剂盒及检测方法,通过体外刺激诱导产生NETs,对其进行定性和定量检测。适用于检测生理或病理条件下受试者NETs的生成能力,对促进或抑制NETs生成药物的筛选,以及其他与NETs相关的免疫实验研究等。本发明的试剂盒不仅限于人类样本的检测,还可用于其他物种NETs的检测,包括小鼠、大鼠、兔、狗、牛、猪等,具有广泛的工业应用价值。



1. 一种用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,其特征在于,包括:脱氧核糖核酸酶I溶液、PMA溶液、抗DNA/组蛋白H1抗体、免疫荧光二抗、DAPI和非细胞通透性的DNA特异性染料。

2. 如权利要求1所述的用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,其特征在于,所述脱氧核糖核酸酶I溶液的浓度为0.01-1mg/ml;所述PMA溶液的终浓度为10-200nM;所述抗DNA/组蛋白H1抗体的终浓度为1-20ug/ml;所述DNA特异性染料为Sytox green或Sytox red,所述DNA特异性染料的终浓度为0.1-1uM;所述DAPI的终浓度为0.1-10ug/ml。

3. 一种中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,采用如权利要求1或2所述的任意一种用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,其特征在于,包括如下步骤:

步骤一:使用脱氧核糖核酸酶I溶液对待测细胞进行预处理,消除非NETs来源的DNA;

步骤二:使用PMA溶液对待测中性粒细胞进行刺激,刺激中性粒细胞活化,诱导NETs生成;

步骤三:使用抗DNA/组蛋白H1抗体及免疫荧光二抗对活化后的中性粒细胞进行染色,并使用DAPI进行细胞核染色定位,通过免疫荧光法检测细胞表面DNA/组蛋白H1的含量,对NETs的生成进行定性分析;

步骤四:利用非细胞通透性的DNA特异性染料对PMA刺激后的中性粒细胞进行染色,通过流式细胞术检测细胞表面DNA的含量,对NETs的生成进行定量分析。

4. 如权利要求3所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述步骤一包括以下步骤:

S1. 向待测中性粒细胞中滴入浓度为0.1mg/ml的脱氧核糖核酸酶I溶液,同时转动离心管;

S2. 室温下孵育10-30分钟;

S3. 向离心管中加入25ml的含有10%FBS的RPIM培养基悬浮细胞,300x g,离心8-20分钟,去除全部上清;

S4. 用含有5%FBS的RPMI培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。

5. 如权利要求4所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述步骤一还包括步骤:取预定量悬浮细胞并设置多份对照组与实验组,留做后续免疫荧光染色做NETs生成的定性分析及定量分析。

6. 如权利要求5所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述步骤二包括以下步骤:

向实验组中加入1u1 PMA溶液于待测的悬浮细胞中,至终浓度为100nM;向对照组细胞中加入1u1稀释液,并在37°C下孵育3-5小时。

7. 如权利要求6所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述步骤三包括以下步骤:

S1. 向所述待测的悬浮细胞加入4%多聚甲醛,至终浓度为1%;3°C-6°C固定预定时间;

S2. 吸去上清,加入200u1 PBS洗涤后去除PBS;

S3. 加入100u1封闭液室温封闭0.5-2小时;

S4. 利用含有1%BSA的PBS稀释抗DNA/组蛋白H1抗体,至终浓度为4ug/ml,并向所述悬浮细胞中加入100u1稀释后的抗DNA/组蛋白H1抗体,并室温孵育半小时至2小时;

- S5. 吸去所述抗DNA/组蛋白H1抗体,并使用PBS清洗,吸去PBS;
- S6. 利用含有1%BSA的PBS,按照1:1000稀释免疫荧光二抗;向悬浮细胞加入100u1稀释后的免疫荧光二抗,室温避光孵育0.5-2小时;
- S7. 吸去免疫荧光二抗,使用PBS清洗,吸去PBS;
- S8. 用PBS稀释DAPI至终浓度为1ug/ml,向悬浮细胞加入100u1稀释后的DAPI溶液,室温避光孵育3-10分钟;
- S9. 移去DAPI溶液,并PBS清洗;
- S10. 滴加抗荧光淬灭封片液于悬浮细胞上,盖上盖玻片,使用荧光显微镜下观察NETs的形成情况,进行定性分析。
8. 如权利要求6所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述步骤四包括以下步骤:
- S1. 向悬浮细胞中加入1%BSA的PBS稀释后的DNA特异性染料,至终浓度为0.25uM;
- S2. 室温避光孵育3-10分钟;
- S3. 吸出悬浮细胞及上清至流式管中,1500rpm离心3-10分钟,弃去上清,加入200u1 PBS;
- S4. 利用流式细胞术检测DNA特异性染料的荧光强度,完成定量分析。
9. 如权利要求3所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,其特征在于,所述待测细胞制备步骤包括以下步骤:
- S1、取受试者新鲜EDTA外周静脉血5ml,与PBS按照1:1的比例稀释;
- S2、取1个50ml离心管,首先加入5ml白细胞分离液Histopaque-1119,再将5ml Histopaque-1077加入到Histopaque-1119液面之上;再将稀释好的受试者血液沿管壁滴流叠加盛有上述白细胞分离液的试管内,然后室温条件下700x g水平离心30min;
- S3、管内分为6层,自上而下依次为血浆,单个核细胞,Histopaque-1077,多形核白细胞、Histopaque-1119及红细胞;用毛细管伸至多形核白细胞层中,沿管壁吸出全部细胞,然后用PBS清洗多次,每次300x g离心5-20分钟,留取沉淀。

用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒领域,可以用于诱导中性粒细胞胞外诱捕网生成,并对其进行定量检测,属于生物医学研究领域。

背景技术

[0002] 正常机体受到外界病原微生物等的刺激后,通过一系列固有免疫和适应性免疫反应抵抗感染、行使免疫防御功能。其中,固有免疫是机体先天获得的第一道防线,出现早且反应迅速,在机体清除病原体的过程中发挥重要作用。中性粒细胞是固有免疫系统的重要组成部分。2004年人们首次发现了一种中性粒细胞新型抗感染机制,即中性粒细胞经病原体活化刺激后释放中性粒细胞胞外诱捕网(neutrophil extracellular traps,NETs)参与病原体感染的免疫应答。NETs是由中性粒细胞受到刺激活化后释放到胞外的一种网状结构,以DNA为骨架,其间镶嵌有组蛋白、髓过氧化物酶(MPO)、中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)、组织蛋白酶G、钙网蛋白、蛋白酶3等具有杀菌和增加通透性作用的蛋白。NETs主要依靠其独特的三维网状结构捕获病原体,并依靠包含的大量抗菌蛋白对病原体进行杀灭,同时NETs对病原体的捕捉固定可以增强其他白细胞的吞噬作用。NETs释放发挥其抗菌作用后,可被血浆DNA酶和巨噬细胞快速清除。在各种生理或病理条件下,若NETs不能正常生成,或生成太多,或生成后不能及时被降解,则会导致疾病的发生。研究表明,NETs参与了多种疾病的病理生理过程。例如NETs已被报道与血栓生成、牙周炎发生、自身免疫性疾病的发生等密切相关。

[0003] 然而目前,国内并没有用于诱导中性粒细胞胞外诱捕网生成,并对其进行定量检测的成品试剂盒,导致各医院、高校、科研院所、第三方检验机构进行本试验检测时困难重重,需要进行大量前期实验条件摸索;且由于参考文献不同等原因,可能导致不同机构进行检测时所用实验方法不同,因此检测结果差异性很大。因此,有必要提供一种中性粒细胞胞外诱捕网检测试剂盒以克服上述缺陷。

发明内容

[0004] 本发明的目的在于提供一种用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及检测方法,能够对中性粒细胞受到刺激后生成的NETs进行定性和定量分析,以克服现有技术中存在的问题。

[0005] 为了实现上述目的,本发明提出了一种用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,包括:脱氧核糖核酸酶I溶液、PMA溶液、抗DNA/组蛋白H1抗体、免疫荧光二抗、DAPI和非细胞通透性的DNA特异性染料。

[0006] 优选的,在所述的用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒中,所述脱氧核糖核酸酶I溶液的浓度为0.01-1mg/ml;所述PMA溶液的终浓度为10-200nM;所述抗DNA/组蛋白H1抗体的终浓度为1-20ug/ml;所述DNA特异性染料为Sytox green或Sytox red,所述DNA特异性染料的终浓度为0.1-1uM;所述DAPI的终浓度为0.1-10ug/ml。

[0007] 在本发明中,还提出了一种中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,采用如上文所述的用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,包括如下步骤:

[0008] 步骤一:使用脱氧核糖核酸酶I溶液对待测细胞进行预处理,消除非NETs来源的DNA;

[0009] 步骤二:使用PMA溶液对待测中性粒细胞进行刺激,刺激中性粒细胞活化,诱导NETs生成;

[0010] 步骤三:使用抗DNA/组蛋白H1抗体及免疫荧光二抗对活化后的中性粒细胞进行染色,并使用DAPI进行细胞核染色定位,通过免疫荧光法检测细胞表面DNA/组蛋白H1的含量,对NETs的生成进行定性分析;

[0011] 步骤四:利用非细胞通透性的DNA特异性染料对PMA刺激后的中性粒细胞进行染色,通过流式细胞术检测细胞表面DNA的含量,对NETs的生成进行定量分析。

[0012] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述步骤一包括以下步骤:

[0013] S1. 向待测中性粒细胞中滴入浓度为0.1mg/ml的脱氧核糖核酸酶I溶液,同时转动离心管;

[0014] S2. 室温下孵育10-30分钟;

[0015] S3. 向离心管中加入25ml的含有10%FBS的RPIM培养基悬浮细胞,300x g,离心8-20分钟,去除全部上清;

[0016] S4. 用含有5%FBS的RPMI培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。

[0017] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述步骤一还包括步骤:取预定量悬浮细胞并设置多份对照组与实验组,留做后续免疫荧光染色做NETs生成的定性分析及定量分析。

[0018] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述步骤二包括以下步骤:

[0019] 向实验组中加入1u1 PMA溶液于待测的悬浮细胞中,至终浓度为100nM;向对照组细胞中加入1u1稀释液,并在37°C下孵育3-5小时。

[0020] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述步骤三包括以下步骤:

[0021] S1. 向所述待测的悬浮细胞加入4%多聚甲醛,至终浓度为1%;3°C-6°C固定预定时间;

[0022] S2. 吸去上清,加入200u1 PBS洗涤后去除PBS;

[0023] S3. 加入100u1封闭液室温封闭0.5-2小时;

[0024] S4. 利用含有1%BSA的PBS稀释抗DNA/组蛋白H1抗体,至终浓度为4ug/ml,并向所述悬浮细胞中加入100u1稀释后的抗DNA/组蛋白H1抗体,并室温孵育半小时至2小时;

[0025] S5. 吸去所述抗DNA/组蛋白H1抗体,并使用PBS清洗,吸去PBS;

[0026] S6. 利用含有1%BSA的PBS,按照1:1000稀释免疫荧光二抗;向悬浮细胞加入100u1稀释后的免疫荧光二抗,室温避光孵育0.5-2小时;

[0027] S7. 吸去免疫荧光二抗,使用PBS清洗,吸去PBS;

[0028] S8. 用PBS稀释DAPI至终浓度为1ug/ml,向悬浮细胞加入100u1稀释后的DAPI溶液,室温避光孵育3-10分钟;

[0029] S9. 移去DAPI溶液,并PBS清洗;

[0030] S10. 滴加抗荧光淬灭封片液于悬浮细胞上,盖上盖玻片,使用荧光显微镜下观察

NETs的形成情况,进行定性分析。

- [0031] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述步骤四包括以下步骤:
- [0032] S1.向悬浮细胞中加入1%BSA的PBS稀释后的DNA特异性染料,至终浓度为0.25uM;
- [0033] S2.室温避光孵育3-10分钟;
- [0034] S3.吸出悬浮细胞及上清至流式管中,1500rpm离心3-10分钟,弃去上清,加入200ul PBS;
- [0035] S4.利用流式细胞术检测DNA特异性染料的荧光强度,完成定量分析。
- [0036] 优选的,在所述的中性粒细胞胞外诱捕网检测方法中,所述待测细胞制备步骤包括以下步骤:
- [0037] S1、取受试者新鲜EDTA外周静脉血5ml,与PBS按照1:1的比例稀释;
- [0038] S2、取1个50ml离心管,首先加入5ml白细胞分离液Histopaque-1119,再将5ml Histopaque-1077加入到Histopaque-1119液面之上;再将稀释好的受试者血液沿管壁滴流叠加盛有上述白细胞分离液的试管内,然后室温条件下700x g水平离心30min;
- [0039] S3、管内分为6层,自上而下依次为血浆,单个核细胞,Histopaque-1077,多形核白细胞、Histopaque-1119及红细胞;用毛细管伸至多形核白细胞层中,沿管壁吸出全部细胞,然后用PBS清洗多次,每次300x g离心5-20分钟,留取沉淀。
- [0040] 与现有技术相比,本发明的有益效果主要体现在:通过体外刺激诱导产生NETs,对其进行定性和定量检测。适用于检测生理或病理条件下受试者NETs的生成能力,对促进或抑制NETs生成药物的筛选,以及其他与NETs相关的免疫实验研究等。本发明的试剂盒不仅限于人类样本的检测,还可用于其他物种NETs的检测,包括小鼠、大鼠、兔、狗、牛、猪等,具有广泛的工业应用价值。

附图说明

- [0041] 图1为本发明用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒的原理示意图;
- [0042] 图2为本发明中性粒细胞胞外诱捕网检测方法的流程图;
- [0043] 图3为本发明实施例一中操作说明示意图;
- [0044] 图4为本发明实施例一中实验结果示意图。

具体实施方式

- [0045] 下面将结合示意图对本发明的用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及其检测方法进行更详细的描述,其中表示了本发明的优选实施例,应该理解本领域技术人员可以修改在此描述的本发明,而仍然实现本发明的有利效果。因此,下列描述应当被理解为对于本领域技术人员的广泛知道,而并不作为对本发明的限制。
- [0046] 本发明提出了一种用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒,包括:脱氧核糖核酸酶I溶液(RNase free DNase I溶液)、PMA溶液、抗DNA/组蛋白H1抗体、免疫荧光二抗、DAPI和非细胞通透性的DNA特异性染料。
- [0047] 其中,所述脱氧核糖核酸酶I溶液的浓度为0.01-1mg/ml。所述PMA溶液的终浓度为10-200nM。所述抗DNA/组蛋白H1抗体的终浓度为1-20ug/ml。所述DNA特异性染料为Sytox green或Sytox red,所述DNA特异性染料的终浓度为0.1-1uM。所述DAPI的终浓度为0.1-

10ug/ml。

[0048] 此外,在本发明中,还提出了一种中性粒细胞胞外诱捕网检测方法,如图2所示,包括如下步骤:

[0049] 步骤一:使用脱氧核糖核酸酶I溶液对待测细胞进行预处理,消除非NETs来源的DNA;

[0050] 步骤二:使用PMA溶液对待测中性粒细胞进行刺激,刺激中性粒细胞活化,诱导NETs生成,如图1所示;

[0051] 步骤三:使用抗DNA/组蛋白H1抗体及免疫荧光二抗对活化后的中性粒细胞进行染色,并使用DAPI进行细胞核染色定位,通过免疫荧光法检测细胞表面DNA/组蛋白H1的含量,对NETs的生成进行定性分析;

[0052] 步骤四:利用非细胞通透性的DNA特异性染料对PMA刺激后的中性粒细胞进行染色,通过流式细胞术检测细胞表面DNA的含量,对NETs的生成进行定量分析。

[0053] 具体的,所述步骤一包括以下步骤:

[0054] S1. 向待测中性粒细胞中滴入浓度为0.1mg/ml的脱氧核糖核酸酶I溶液,同时转动离心管;

[0055] S2. 室温下孵育10-30分钟;

[0056] S3. 向离心管中加入25ml的含有10%FBS的RPIM培养基悬浮细胞,300x g,离心8-20分钟,去除全部上清;

[0057] S4. 用含有5%FBS的RPMI培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。

[0058] 除此之外,所述步骤一还包括步骤:取预定量悬浮细胞并设置多份对照组与实验组,留做后续免疫荧光染色做NETs生成的定性分析及定量分析。

[0059] 其中,所述步骤二包括以下步骤:

[0060] 向实验组中加入1u1 PMA溶液于待测的悬浮细胞中,至终浓度为100nM;向对照组细胞中加入1u1稀释液,并在37°C下孵育3-5小时。

[0061] 所述步骤三包括以下步骤:

[0062] S1. 向所述待测的悬浮细胞加入4%多聚甲醛,至终浓度为1%;3°C-6°C固定预定时间;

[0063] S2. 吸去上清,加入200u1 PBS洗涤后去除PBS;

[0064] S3. 加入100u1封闭液室温封闭0.5-2小时;

[0065] S4. 利用含有1%BSA的PBS稀释抗DNA/组蛋白H1抗体,至终浓度为4ug/ml,并向所述悬浮细胞中加入100u1稀释后的抗DNA/组蛋白H1抗体,并室温孵育半小时至2小时;

[0066] S5. 吸去所述抗DNA/组蛋白H1抗体,并使用PBS清洗,吸去PBS;

[0067] S6. 利用含有1%BSA的PBS,按照1:1000稀释免疫荧光二抗;向悬浮细胞加入100u1稀释后的免疫荧光二抗,室温避光孵育0.5-2小时;

[0068] S7. 吸去免疫荧光二抗,使用PBS清洗,吸去PBS;

[0069] S8. 用PBS稀释DAPI至终浓度为1ug/ml,向悬浮细胞加入100u1稀释后的DAPI溶液,室温避光孵育3-10分钟;

[0070] S9. 移去DAPI溶液,并PBS清洗;

[0071] S10. 滴加抗荧光淬灭封片液于悬浮细胞上,盖上盖玻片,使用荧光显微镜下观察

NETs的形成情况,进行定性分析。

[0072] 所述步骤四包括以下步骤:

[0073] S1.向悬浮细胞中加入1%BSA的PBS稀释后的DNA特异性染料,至终浓度为0.25uM;

[0074] S2.室温避光孵育3-10分钟;

[0075] S3.吸出悬浮细胞及上清至流式管中,1500rpm离心3-10分钟,弃去上清,加入200ul PBS;

[0076] S4.利用流式细胞术检测DNA特异性染料的荧光强度,完成定量分析。

[0077] 所述待测细胞制备步骤包括以下步骤:

[0078] S1、取受试者新鲜EDTA外周静脉血5ml,与PBS按照1:1的比例稀释;

[0079] S2、取1个50ml离心管,首先加入5ml白细胞分离液Histopaque-1119,再将5ml Histopaque-1077加入到Histopaque-1119液面之上;再将稀释好的受试者血液沿管壁滴流叠加盛有上述白细胞分离液的试管内,然后室温条件下700x g水平离心30min;

[0080] S3、管内分为6层,自上而下依次为血浆,单个核细胞,Histopaque-1077,多形核白细胞、Histopaque-1119及红细胞;用毛细管伸至多形核白细胞层中,沿管壁吸出全部细胞,然后用PBS清洗多次,每次300xg离心5-20分钟,留取沉淀。

[0081] 以下结合具体实施例进行详细介绍:

[0082] 实施例一

[0083] 通过本发明的试剂盒可检测受试者生理或病理条件下NETs的生成能力,以判定受试者NETs的生成是否异常。通常需要受试者的新鲜外周静脉血进行试验。

[0084] 如图3所示,本实施例的具体操作步骤如下:

[0085] 第一步,受试者中心粒细胞的分离

[0086] 取受试者新鲜EDTA外周静脉血5ml,与PBS按照1:1的比例稀释。取1个50ml离心管,首先加入5ml白细胞分离液Histopaque-1119,再将5ml Histopaque-1077小心加入到Histopaque-1119液面之上,注意不要混合。再将稀释好的受试者血液沿管壁徐徐滴流叠加盛有上述分离液的试管内(注意不要破坏液面分层),然后室温条件下700xg水平离心30min。管内分为6层,自上而下依次为血浆,单个核细胞(PBMC),Histopaque-1077,多形核白细胞(PMN,其中绝大多数为中性粒细胞)、Histopaque-1119,红细胞。用毛细管伸至PMN层中(位于Histopaque-1077与Histopaque-1119的界面上),沿管壁轻轻吸出全部细胞。然后用PBS洗两次,每次300xg离心10min,留取沉淀。

[0087] 第二步,RNase free DNase I预处理细胞,消除非NETs来源的DNA

[0088] S1.向上述细胞中缓慢滴入浓度为0.1mg/ml的RNase free DNase I溶液,同时缓慢转动离心管;

[0089] S2.室温下孵育15分钟;

[0090] S3.向离心管中加入25ml的含有10%FBS的RPIM培养基悬浮细胞,300xg,离心10分钟,小心去除全部上清;

[0091] S4.台盼蓝染色,计数板计数。

[0092] S5.用含有5%FBS的RPMI培养基悬浮细胞,调整细胞密度为 1×10^6 /ml。第三步,刺激中性粒细胞活化,诱导NETs生成

[0093] S1.取200ul上述悬浮细胞置于四孔小室细胞培养玻片的一个孔中,设置对照组与

实验组,留做后续第三步免疫荧光染色做NETs生成的定性分析。

[0094] S2.取200ul上述悬浮细胞置于96孔板中,设置对照组与实验组,留做后续的NETs生成的定量分析。

[0095] S1.向实验组中加入1ul PMA溶液于上述细胞中,至终浓度为100nM;向对照组细胞中加入1ul稀释液。

[0096] S2.37℃孵育3小时。

[0097] 第四步,NETs生成的定性分析

[0098] S1.直接向上述八孔小室载玻片中的中性粒细胞加入4%多聚甲醛(PFA),至终浓度为1%。4℃固定过夜。

[0099] S2.吸去上清,每孔加入200ul PBS洗涤,去除PBS。

[0100] S3.每孔加入100ul封闭液(含有5%BSA和5%山羊血清的PBS),室温封闭1小时。

[0101] S4.利用含有1%BSA的PBS稀释抗DNA/组蛋白H1抗体,至终浓度为4ug/ml。

[0102] S5.向每孔细胞中加入100ul稀释好的抗体,室温孵育1小时。

[0103] S6.吸去抗体,PBS洗两次,每次5分钟;吸去PBS。

[0104] S7.利用含有1%BSA的PBS,按照1:1000稀释荧光二抗。向每孔细胞加入100ul S8.稀释好的抗体,室温避光孵育1小时。

[0105] S9.吸去抗体,PBS洗两次,每次5分钟;吸去PBS。

[0106] S10.用PBS稀释DAPI至终浓度为1ug/ml,向每孔细胞加入100ul稀释液,室温避光孵育5分钟。

[0107] S11.移去DAPI溶液,用镊子取出小室。PBS洗两次。

[0108] S12.加一滴抗荧光淬灭封片液于细胞上,盖上盖玻片,让细胞接触封片液,尽量避免气泡。

[0109] S13.荧光显微镜下观察NETs的形成情况。

[0110] 实验结果如图2所示,PMA刺激组检测到大量DNA/组蛋白H1释放,而未刺激组仅有少量DNA/组蛋白H1释放。

[0111] 第五步,NETs生成的定量分析

[0112] S1.向第二步中加入1%BSA的PBS稀释后的Sytox green染料,至终浓度为0.25uM。

[0113] S2.室温避光孵育5分钟。

[0114] S3.吸出细胞及上清至流式管中,1500rpm离心5分钟,弃去上清,加入200ul PBS。

[0115] S4.利用流式细胞术(488nm激发滤光片和530/30发射滤光片)检测Sytox green染料的荧光强度。

[0116] 检测结果如图4所示,PMA刺激组Sytox green荧光强度较高,而未刺激组Sytox green荧光强度较低。

[0117] 综上,在本发明实施例提供的用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及其检测方法中,试剂盒能够用于诱导中性粒细胞产生NETs,并对其定量检测。其具有如下优点:

[0118] 1.操作简单,仅需按照产品说明书进行简单操作即可,无需特别的实验技巧,可操作性强;

[0119] 2.利用RNase free DNase I预处理细胞,消除本底DNA,即非NETs来源的DNA,可提

高实验的精确度；

[0120] 3. 可在体外利用PMA刺激中性粒细胞并检测NETs生成的情况,检测结果清晰,便于操作,且易于分析;

[0121] 4. 利用免疫荧光法检测NETs特异性标志物DNA/组蛋白H1的含量,特异性强,实验结果直观、可靠,适用于NETs的定性检测;

[0122] 5. 利用非细胞通透性的DNA特异性染料Sytox green对细胞表面DNA进行染色,可直接反映NETs的生成情况。再通过流式细胞术进行分析,不受操作者主观判断影响,结果可重复性强,适用于NETs的定量检测;

[0123] 6. 通过定性和定量两种方法对NETs进行检测,实验结果真实可靠;

[0124] 7. 成本低,推广性强。

[0125] 上述仅为本发明的优选实施例而已,并不对本发明起到任何限制作用。任何所属技术领域的技术人员,在不脱离本发明的技术方案的范围内,对本发明揭露的技术方案和技术内容做任何形式的等同替换或修改等变动,均属未脱离本发明的技术方案的内容,仍属于本发明的保护范围之内。

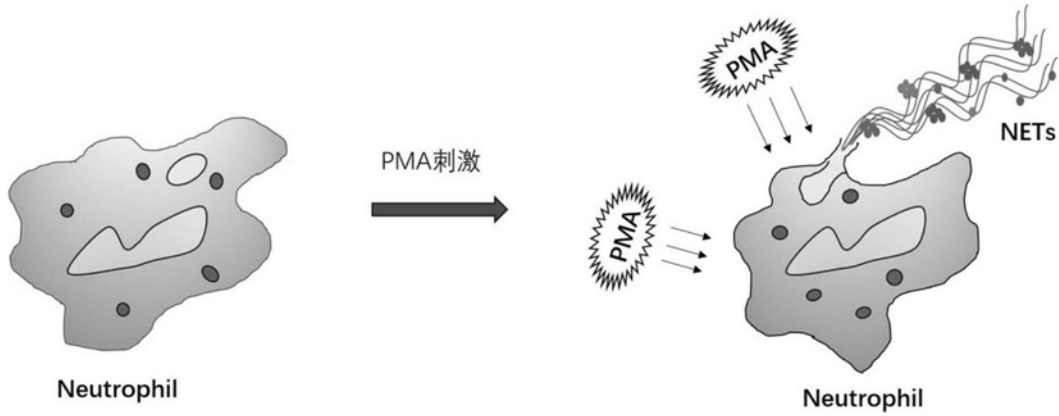


图1

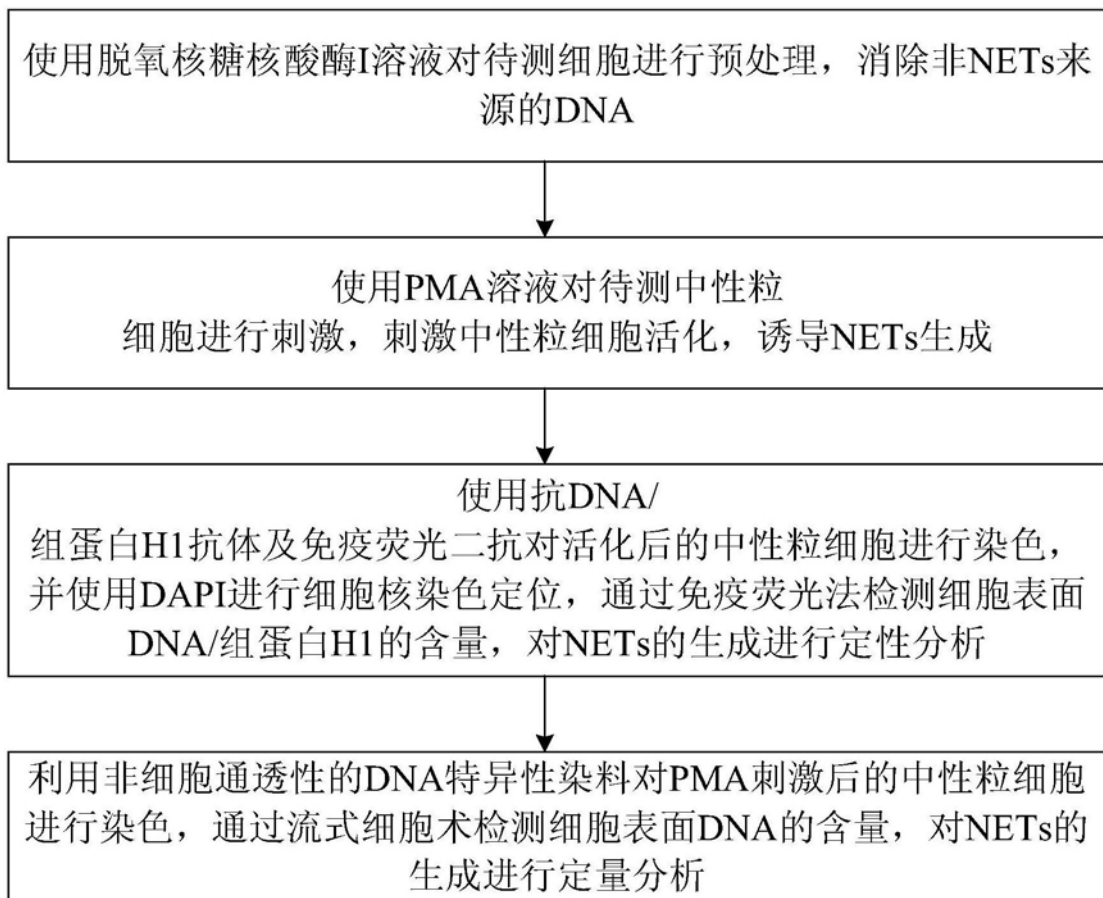


图2

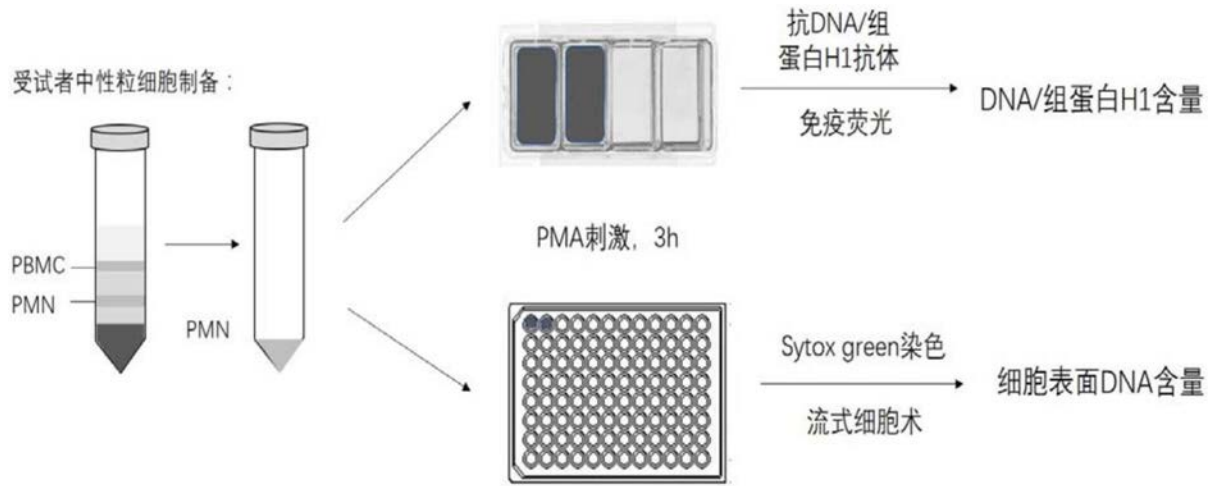


图3

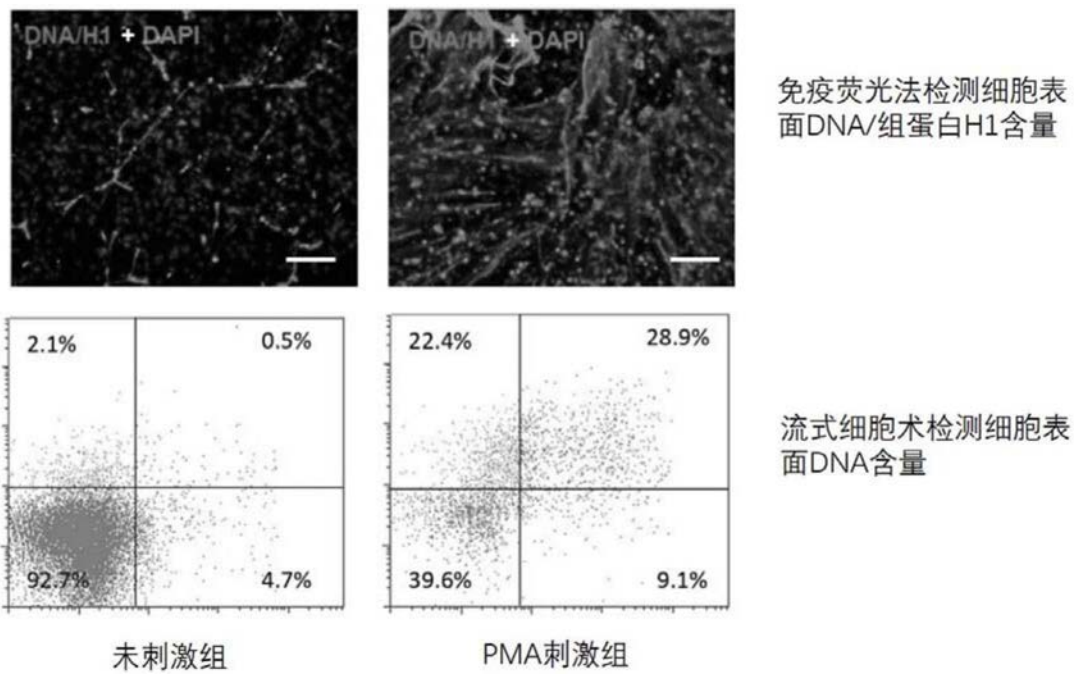


图4

专利名称(译)	用于中性粒细胞胞外诱捕网检测的试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN108362871A	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201810124399.2	申请日	2018-02-07
[标]申请(专利权)人(译)	远见生物科技(上海)有限公司		
申请(专利权)人(译)	远见生物科技(上海)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	远见生物科技(上海)有限公司		
[标]发明人	杜飞		
发明人	杜飞		
IPC分类号	G01N33/533 G01N15/14 G01N15/00 G01N15/10		
CPC分类号	G01N33/533 G01N15/00 G01N15/10 G01N15/1434 G01N2015/0065 G01N2015/1006		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提出了一种用于中性粒细胞胞外诱捕网(NETs)检测的试剂盒及检测方法，通过体外刺激诱导产生NETs，对其进行定性和定量检测。适用于检测生理或病理条件下受试者NETs的生成能力，对促进或抑制NETs生成药物的筛选，以及其他与NETs相关的免疫实验研究等。本发明的试剂盒不仅限于人类样本的检测，还可用于其他物种NETs的检测，包括小鼠、大鼠、兔、狗、牛、猪等，具有广泛的工业应用价值。

