

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/50

G01N 33/53 G01N 33/569

## [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00109652.4

[43]公开日 2001年1月3日

[11]公开号 CN 1278601A

[22]申请日 2000.6.21 [21]申请号 00109652.4  
[71]申请人 张国庆  
地址 100080 北京市海淀区西苑操场15号海淀体  
委院内  
[72]发明人 张国庆

[74]专利代理机构 北京集佳商标专利事务所  
代理人 厦新

权利要求书4页 说明书8页 附图页数0页

[54]发明名称 一种T-淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白  
Ag-NORs的检测方法

[57]摘要

本发明涉及一种T-淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白  
Ag-NORs的检测方法,其包括细胞培养、细胞分防、制  
片、染色、检测五个部分,具有用血量小、操作简便、过程  
简单、易于普及等优点。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

# 权 利 要 求 书

---

1. 一种T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法，其特征在于其包括T—细胞的培养、分离、制片、染色、检测五个部分；

(1) 细胞培养：

①培养液的制备：

培养液的组成成分及配制1000克培养液的用量为：

N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(Hepes)	3-6g
碳酸氢钠	1-3g
RPMI 1640培养基（以干粉量计）	5-10g
L-谷氨酰胺(LG)	0.1- 0.3g
肝素钠(150u/mg)	0.1 - 0.3g
植物血凝素（PHA）	5-20mg
胎牛血清	100 -300ml
青霉素（80万u /2ml）	0.1- 0.5ml
链霉素（100万u /2ml）	0.1- 0.5ml

余量用蒸馏水补齐：

该培养液的PH值为6.5-7.5；

②细胞培养：

I. 室温下将冰冻的、上述①步骤制备的T—淋巴细胞培养液解冻；

II. 抽取静脉血注入盛培养液的容器内，立即混匀，血与培养液的体积比为1:8-12；

III. 将上述容器置于37℃±0.5℃培养箱中48—96小时；

(2) 细胞分离：

① 吸入经过细胞培养步骤制得的细胞液4.5ml，在转速为2000转/分的条件下离心5分钟；

② 弃上清，然后加入低渗液5ml充分混匀，再加固定液0.5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

③ 弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

④ 弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

⑤ 弃上清，加固定液0.3ml，混匀备用；

上述低渗液为0.43%氯化钠溶液；固定液为甲醇与冰醋酸按体积比3:1比例配制的混合溶液；

(3) 制片：

① 将冷冻载玻片置于水平位；

② 吸取经细胞分离步骤分离的细胞悬液，在距玻片20cm高度处，向玻片滴加2—3滴；

③ 细胞悬液快干时，将玻片快速过火2—3次，室温凉干；

(4) 染色：

### ①染色液的制备:

染色液由A液和B液两部分组成, A液的组成成分及其配比为: 硝酸银(分析纯) 30—60g , 蒸馏水 100ml ; B液的组成成分及其配比为: 明胶 1—3g , 纯甲酸 200—500微升, 蒸馏水 100ml ; 细胞染色时, A液与B液的体积比为: 1—3 : 1;

### ②染色:

按如下方法进行细胞染色:

I. 将上述①步骤制备的染色液A液和B液置于室温或37℃温箱中恒温备用;

II. 将三用水箱预热至80-90℃后恒温;

III. 将上述制片步骤制好的玻片放在水箱之铝板上;

IV. 向玻片上有细胞悬液处, 先后滴加A液和B液, 两者的体积比为1—3 : 1, 混匀后将盖玻片盖上;

V. 待颜色变为深金黄色后, 将玻片取下;

VI. 用少量、慢速自来水冲净玻片, 再用蒸馏水冲一遍, 晾干, 即完成染色;

### (5) 检测:

将上述(4)步骤经过染色的玻片在KL型肿瘤免疫图像分析系统进行读片, 分析30-50个细胞, 取胞核与核仁形成区面积比平均值作为量化值。

2. 如权利要求1所述的T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs

的检测方法，其特征在于所述组成染色液的A液和B液的组成成分和配比为：

A液：硝酸银（分析纯）50g ， 蒸馏水 100ml ；

B液：明胶 2g ， 甲酸 250微升， 蒸馏水 100ml 。

# 说明书

一种T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法

本发明属于生物检测方法，特别是一种淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法。

现有技术中的检测只用于组织切片，受检者必须先行手术，取活体组织进行制片染色检查，病人痛苦大，并且不宜重复检查。

本发明采取了新检测对象，即对外周血中的T—淋巴细胞进行检测，克服了现有技术中的不足，提供了一种用血量小、操作简便、过程简单、易于普及的T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法。

本发明的T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法，包括细胞培养、细胞分离、制片、染色、检测五个部分。

## 1.细胞培养：

### (1)培养液的制备：

培养液的组成成分及配制1000克培养液的用量为：

N-(2-羟乙基)哌嗪-N'-2-乙烷磺酸(Hepes)	3-6g
碳酸氢钠	1-3g
RPMI 1640培养基(干粉)	5-10g
L-谷氨酰胺(LG)	0.1- 0.3g
肝素钠(150u/mg)	0.1- 0.3g
植物血凝素(PHA)	5-20mg

胎牛血清	100 -300ml
青霉素 (80万u /2ml)	0.1- 0.5ml
链霉素 (100万u /2ml)	0.1- 0.5ml

余量用蒸馏水补齐。

该培养液的PH值为6.5-7.5。

该培养液是通过如下方法及步骤制备而成的：

①将 Hepes、碳酸氢钠和1640培养基三种试剂按计量置于容器中，向容器中加入约300毫升蒸馏水，于37 °C 下混合溶解，再加入剩余量的蒸馏水，混合均匀待用；

②取密封在容器中的胎牛血清或将胎牛血清置于容器中，在56°C 水浴箱内30分钟灭活，冷却至室温后加入到①步骤制得的水溶液中；

③将 L-谷氨酰胺、肝素钠、植物血凝素 (PHA)、青霉素和链霉素，加入到②步骤的溶液中，充分混匀，直至全部溶解。

④将上述溶液用滤膜滤菌器过滤，即得本发明的培养液。

将培养液分装、密封后，于-18°C 以下冰冻保存。培养液置于37 °C 孵箱内孵育一周无细菌生长，则为合格。

(2)细胞培养：

依如下方法和步骤进行T—淋巴细胞培养：

①室温下将冰冻的、上述T—淋巴细胞培养液解冻；

②抽取静脉血注入盛培养液的容器内，立即混匀，血与培养液的体积比为1:8-12；

③将培养瓶置于 $37^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 培养箱中，48—96小时后即完成细胞培养。

## 2.细胞分离：

(1) 吸入上述细胞培养步骤制得的细胞液4.5ml，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(2) 弃上清，然后加入低渗液5ml充分混匀，再加固定液0.5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(3) 弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(4) 弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(5) 弃上清，加固定液0.3ml，混匀备用。

上述低渗液为0.43%氯化钠溶液；固定液为甲醇与冰醋酸按体积比3：1比例配制的混合溶液。

## 3.制片：

(1) 将冷冻载玻片置于水平位；

(2) 吸取经细胞分离步骤后的细胞悬液，在距玻片20cm高度处，向玻片滴加2—3滴；

(3) 细胞悬液快干时，将玻片快速过火2—3次，室温凉干。

## 4.染色：

(1) 染色液的制备：

染色液由A液和B液两部分组成，A液的组成成分及其配比为：硝酸银（分析纯） 30—60g ，蒸馏水 100ml 。A液的优选配比为：硝酸银（分析纯） 50g ，蒸馏水 100ml 。A液的配制方法为：按比例将硝酸银加入到蒸馏水中，充分搅拌，直至完全溶解，并装入棕色瓶中于2-8℃保存。

B液的组成成分及其配比为：明胶 1-3g ，纯甲酸 200-500微升，蒸馏水 100ml 。B液的优选配比为：明胶 2g ，甲酸 250微升，蒸馏水 100ml 。B液的配制方法为：将甲酸加入到蒸馏水中，混匀，再加入明胶，混合均匀，然后放入37℃培养或室温中至完全溶解，即得本发明的B液。将B液于2—8℃下保存。

细胞染色时，A液与B液的体积比为：1—3：1

(2)染色：

按如下方法进行细胞染色：

①将按上述(1)步骤制得的染色液的A液和B液置于室温或37℃温箱中恒温备用；

②将三用水箱预热至80-90℃后恒温；

③将上述制片步骤制好的玻片放在水箱之铝板上；

④向玻片上有细胞悬液处，先后滴加A液和B液，两者的体积比为1—3：1，混匀后将盖玻片盖上；

⑤待颜色变为深金黄色后，将玻片取下；

⑥用少量、慢速自来水冲净玻片，再用蒸馏水冲一遍，晾干，即

完成染色。

#### 5.检测:

将上述经过染色步骤的玻片在KL型肿瘤免疫图像分析系统（由北京健尔康医疗设备有限公司开发生产）进行读片，分析30-50个细胞，取胞核与核仁形成区面积比平均值作为量化值。

本发明的所有步骤及过程中，所使用的器皿及其它用具等全部需要消毒灭菌处理，而且所有操作均应符合无菌操作，消毒灭菌方法和无菌操作方法均属于本领域的公知技术。

本发明的T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法，具有如下优点：

（1）用血量少，仅需要0.4-0.5ml血样，而现有技术一般需要5-10毫升；

（2）细胞培养方法简便、省时、易操作、设备简单，而现有技术中需要用淋巴细胞分离液做淋巴细胞分离，而且需要较昂贵的二氧化碳培养箱，操作繁琐、费时、仪器昂贵。

（3）标本染色效果好，染色均匀，背景清晰；

（4）染好的标本片色泽稳定，室温干燥条件下1—2个月不退色。

下面结合实施例进一步说明本发明：

#### 实施例一：

本实施例的T—淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag-NORs的检测方法，包括细胞培养、细胞分离、制片、染色、检测五个部分。

## 1.细胞培养:

### (1)培养液的制备:

按上述方法配制培养液,其组成成分及配制1000克培养液的用量为:

Hepes	4.76g
碳酸氢钠	1.6g
RPMI 1640培养基	8.32g
L-谷氨酰胺(LG)	0.3g
肝素钠(150u/mg)	0.1g
美国sigma生产的 PHA-P	10mg
青霉素(80万u/2ml)	0.35ml
链霉素(100万u/2ml)	0.3ml
胎牛血清	200ml
余量用蒸馏水补齐。	

该培养液的PH值为7.0-7.2。

### (2)细胞培养:

依下列方法及步骤进行T—淋巴细胞的培养:

(1) 室温下将上述4ml冰冻的淋巴细胞培养液解冻;

(2) 抽取静脉血0.4-0.5ml注入盛培养液的容器内,立即将两者混匀;

(3) 将上述容器置于37℃±0.5℃培养箱中,72小时后即完成细胞

#### (4) 培养。

依此方法，T—淋巴细胞转化率达80%以上，而且胞核涨大，核仁分裂。

#### 2.细胞分离：

(1) 吸入上述细胞培养步骤制得的细胞液4.5ml，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(2)弃上清，然后加入低渗液5ml充分混匀，再加固定液0.5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(3)弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(4)弃上清，加固定液5ml混匀，在转速为2000转/分条件下离心5分钟；

(5)弃上清，加固定液0.3ml，混匀备用。

上述低渗液为0.43%氯化钠溶液；固定液为甲醇与冰醋酸按体积比3：1比例配制的混合溶液。

#### 3.制片：

(1)将冷冻载玻片置于水平位；

(2)吸取经细胞分离步骤分离的细胞悬液，在距玻片20cm高度处，向玻片滴加2—3滴；

(3)细胞悬液快干时，将玻片快速过火2—3次，室温凉干。

#### 4.染色：

(1)染色液的制备:

按上述方法制备如下配比的染色液:

A液: 硝酸银(分析纯) 50g, 蒸馏水 100ml;

B液: 明胶 2g, 甲酸 340微升, 蒸馏水 100ml。

(2)染色:

按如下方法进行T—淋巴细胞染色, 其步骤为:

(1) 将上述A液 和B液置于室温或37℃温箱中恒温备用;

(2) 将三用水箱预热至85℃后恒温;

(3) 将上述制片后的玻片放在水箱之铝板上;

(4) 向玻片上先后滴加A液4滴、B液2滴, 混匀后将盖玻片盖上;

(5) 待颜色变为深金黄色后, 将玻片取下;

(6) 用少量、慢速自来水冲净玻片, 再用蒸馏水冲一遍, 晾干, 即完成染色。

5.检测:

将上述经过染色步骤的玻片在KL型肿瘤免疫图像分析系统(由北京健尔康医疗设备有限公司开发生产)进行读片, 分析30-50个细胞, 取胞核与核仁形成区面积比平均值作为量化值。

实施例二:

本实施例中所用染色液的B液的组成成分及配比为: 明胶 2g, 甲酸 250微升, 蒸馏水 100ml。其余试剂、步骤及条件均与实施例一相同。

专利名称(译)	一种T - 淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag - NORs的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1278601A</a>	公开(公告)日	2001-01-03
申请号	CN00109652.4	申请日	2000-06-21
[标]申请(专利权)人(译)	张国庆		
申请(专利权)人(译)	张国庆		
当前申请(专利权)人(译)	张国庆		
[标]发明人	张国庆		
发明人	张国庆		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/56972		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种T - 淋巴细胞核仁形成区嗜银蛋白Ag - NORs的检测方法,其包括细胞培养、细胞分防、制片、染色、检测五个部分,具有用量小、操作简便、过程简单、易于普及等优点。