



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104360049 A

(43) 申请公布日 2015. 02. 18

(21) 申请号 201410486072. 1

(22) 申请日 2014. 09. 22

(71) 申请人 重庆医科大学附属儿童医院
地址 400014 重庆市渝中区中山二路 136 号

(72) 发明人 赵晓东 周丽娜

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 赵青朵

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书22页 附图8页

(54) 发明名称

一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒

(57) 摘要

本发明属于免疫学技术领域,公开了一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法,包括:取不同的荧光标记的抗体,与待检测样品混合,孵育后,经流式细胞术检测,得检测数据,分析所得检测数据;该抗体包括:抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。本发明的方法实现了对 T 淋巴细胞进行更加全面的精细免疫分型,所需待测样品少,操作简单、所需时间短、准确性高、可广泛应用于淋巴细胞亚群免疫分型。

1. 一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法,其特征在于,包括:
取不同的荧光标记的抗体,与待检测样品混合,孵育后,经流式细胞术检测,得检测数据,分析所述检测数据;
所述抗体包括:
抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体;
所述分析的方法包括:
细胞表面标志 CD3⁺TCR $\alpha\beta$ ⁺CD4⁻CD8⁻ 代表 TCR $\alpha\beta$ ⁺ 双阴性 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺TCR $\gamma\delta$ ⁺ 代表 $\gamma\delta$ T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺ 代表辅助初始 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻ 代表辅助耗竭 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺ 代表辅助中心记忆 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻ 代表辅助效应记忆 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺ 代表细胞毒性初始 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻ 代表细胞毒性耗竭 T 细胞;
细胞表面标志 CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺ 代表细胞毒性中心记忆 T 细胞;
细胞表面标志 CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻ 代表细胞毒性效应记忆 T 细胞。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,还包括统计所述待测样品中 T 淋巴细胞数目的步骤,包括:
检测所述待测样品中淋巴细胞的总数;
检测所述待测样品中 T 淋巴细胞占所述淋巴细胞的百分比;
通过计算,即得所述待测样品中 T 淋巴细胞的数目。
3. 一种淋巴细胞免疫分型的方法,其特征在于,其包括如权利要求 1 或 2 所述的 T 淋巴细胞免疫分型的步骤。
4. 一种用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒,其特征在于,包括如下不同的荧光标记的抗体:
抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。
5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体的荧光标记为 PE。
6. 根据权利要求 4 或 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体的荧光标记为 BV421 或 FITC。
7. 根据权利要求 4 至 6 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Percp-cy5.5 或 Pacific blue。
8. 根据权利要求 4 至 7 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗 CD4 的抗体的荧光标记为 FITC 或 APC-Cy7。
9. 根据权利要求 4 至 8 中任一项所述的试剂盒,其特征在于,所述抗 CD8 的抗体的荧光标记为 BV510。
10. 一种用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒,其特征在于,其包括如下不同的荧光标记的

抗体：

抗 TCR α β 的抗体、抗 TCR γ δ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。

一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于免疫学技术领域,特别涉及一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。

背景技术

[0002] 淋巴细胞 (lymphocyte) 也称淋巴球,为白细胞中体积最小的一种,直径 6-8 微米;在人体约占白细胞数目的 20% -30%,圆形细胞核,细胞质很少;由淋巴器官产生,是机体免疫应答功能的重要细胞成分,是一类具有免疫识别功能的细胞系。淋巴细胞是复杂的异质性细胞群体,根据其表型和功能特征可分为不同类别,如 T 细胞、B 细胞、NK 细胞等,这些细胞还可以进一步分为若干亚群。淋巴细胞及其亚群在免疫应答过程中相互协作、相互制约,共同完成对抗原物质的识别、应答和清除,从而维持机体内环境稳定。

[0003] 早期研究根据淋巴细胞按其发生迁移、表面分子和功能的不同,大体上将淋巴细胞分为 T 细胞、B 细胞和自然杀伤 (NK) 细胞。其中 T 细胞可分为细胞毒性 T 细胞 (cytotoxic T lymphocyte, Tc)、辅助 T 细胞 (helper T lymphocyte, Th)、记忆 T 细胞 (memory T lymphocyte, Tm) 和调节 / 抑制 T 细胞 (regulatory/suppressor T lymphocyte); B 细胞可进一步分为记忆 B 细胞 (memory B cell)、浆细胞 (plasma cell)、初始 B 细胞 (naïve B cell) 等亚类。

[0004] 随着科学研究的不断进步,科学家发现了更多的细胞表面标志,可以将各类淋巴细胞进行更加精细的细胞亚群分类。例如,可以将 T 细胞进一步划分为:TCR $\alpha \beta^+$ 双阴性 T 细胞 (double negative T lymphocyte, DNT)、 $\gamma \delta$ T 细胞、辅助初始 T 细胞、辅助耗竭 T 细胞、辅助中心记忆 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞、细胞毒性初始 T 细胞、细胞毒性耗竭 T 细胞、细胞毒性中心记忆 T 细胞、细胞毒性效应记忆 T 细胞。

[0005] 血液样品中淋巴细胞的种类与机体的免疫系统性能有着重要关系。通过对血液样品中淋巴细胞进行免疫分型和定量分析,能够更加准确地评价机体的免疫功能,也能够更好地研究某些疾病的发生、发展以及治疗效果评价。目前,常用于血液样品中的淋巴细胞免疫分型和定量分析的方法主要有:免疫酶标法、普通淋巴细胞分类、较细淋巴细胞亚群检测。免疫酶标法只是针对某一种或一类特定的抗原或抗体发生特异反应,检测面窄、操作复杂、对待检测样品需求量大,费时费力。普通淋巴细胞分类,普遍应用于淋巴细胞检测,但只能将淋巴细胞分为 T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞和 NK 细胞,不能进一步对细胞进行分型。较细淋巴细胞亚群检测依赖于流式细胞术,采用多色流式的方法,对淋巴细胞进行较为详细的分型,除传统的 T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞和 NK 细胞外,还检测 Tm 细胞及细胞数量。但是,如果想进一步对细胞亚群进行免疫分型和定量分析的话,还需要借助于其他的细胞免疫分型方法,操作复杂,对待测样品的需求量大,并不适合实际应用。所以,还需要对淋巴细胞免疫分型和定量分析的方法进行研究,以求尽可能利用简单的方法将淋巴细胞进行较精细地免疫分型和定量分析。

发明内容

[0006] 有鉴于此,本发明的发明目的在于提供一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。该 T 淋巴细胞免疫分型的方法能够对 T 淋巴细胞进行更为全面的精细免疫分型和定量分析,效率高,且节约了待测样品的用量,更合适 T 淋巴细胞的免疫分型和定量分析。

[0007] 为了实现本发明的发明目的,本发明采用如下的技术方案:

[0008] 本发明提供了一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法,包括:

[0009] 取不同的荧光标记的抗体,与待检测样品混合,孵育后,经流式细胞术检测,得检测数据,分析所述检测数据;

[0010] 该抗体包括:

[0011] 抗 TCR $\alpha \beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体;

[0012] 该分析的方法包括:

[0013] 细胞表面标志 $CD3^+TCR \alpha \beta^+CD4^-CD8^-$ 代表 TCR $\alpha \beta^+$ 双阴性 T 细胞;

[0014] 细胞表面标志 $CD3^+TCR \gamma \delta^+$ 代表 $\gamma \delta$ T 细胞;

[0015] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^+$ 代表辅助初始 T 细胞;

[0016] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^-$ 代表辅助耗竭 T 细胞;

[0017] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^+$ 代表辅助中心记忆 T 细胞;

[0018] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^-$ 代表辅助效应记忆 T 细胞;

[0019] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^+$ 代表细胞毒性初始 T 细胞;

[0020] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^-$ 代表细胞毒性耗竭 T 细胞;

[0021] 细胞表面标志 $CD8^+CD45RA^-CD27^+$ 代表细胞毒性中心记忆 T 细胞;

[0022] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD27^-$ 代表细胞毒性效应记忆 T 细胞。

[0023] 在本发明中,流式细胞术中所用到的抗体可以为与待测样品同源的抗体或也可以为与待测样品非同源的抗体,只要该抗体能够与待测样品中细胞表面标志物产生抗原-抗体特异性结合反应即可。

[0024] 在本发明中,“+”代表阳性,即表示该抗原在细胞表面有表达;

[0025] “++”代表强阳性,即表示该抗原在细胞表面高表达;

[0026] “-”代表阴性,即表示该抗原在细胞表面不表达。

[0027] 淋巴细胞的表面标志是指存在于淋巴细胞表面的膜分子,它们是淋巴细胞识别抗原、与其他免疫细胞相互作用以及接受信号刺激并产生应答的物质基础,也是鉴别和分离淋巴细胞的重要依据。在淋巴细胞的分化发育过程中,淋巴样干细胞进一步分化成各个细胞亚群,赋予了各个细胞亚群特定的表面标志。有些表面标志是淋巴细胞共有的,有些表面标志是某一类或某几类淋巴细胞特有的,所以在进行淋巴细胞免疫分型时,可以有众多组合。但是并不是每种组合都能够实现淋巴细胞的免疫分型,本发明通过大量的创造性劳动发现:针对 T 细胞,细胞表面标志为 $CD3^+TCR \alpha \beta^+CD4^-CD8^-$ 时,可对 TCR $\alpha \beta^+$ 双阴性 T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+TCR \gamma \delta^+$ 时,可对 $\gamma \delta$ T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^+$ 时,可对辅助初始 T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^-$ 时,可以对辅助耗竭 T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^+$ 时,可以对辅助中心记忆 T 细胞进行免疫分型;细胞表

面标志为 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^-$ 时,可以对辅助效应记忆 T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^+$ 时,可以对细胞毒性初始 T 细胞进行免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^-$ 时,可以对细胞毒性耗竭 T 细胞免疫分型;细胞表面标志为 $CD8^+CD45RA^-CD27^+$ 时,可以对细胞毒性中心记忆 T 细胞免疫分型;细胞表面标志为 $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD27^-$ 时,可以对细胞毒性效应记忆 T 细胞免疫分型。本发明根据对各个细胞所对应的细胞表面标志,设计获得了最优的细胞表面标志的抗体组合,通过流式细胞术,对 T 淋巴细胞进行了更为全面的免疫分型。本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法所需待测样品少、操作简单、准确性高,能够用于 T 淋巴细胞的免疫分型。

[0028] 优选地,本发明提供 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,还设置对照组和同型对照组。设置对照组的意义在于排除无关变量的影响,增加实验结果的可信度和说服力;设置同型对照组的意义在于区别抗体染色过程中相同亚型所造成的背景信号影响。

[0029] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,对照组所用不同的荧光标记的抗体具体为:

[0030] 抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体。

[0031] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体的荧光标记为 PE。

[0032] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体的荧光标记为 BV421 或 FITC。在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体的荧光标记为 FITC。

[0033] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Percp-cy5.5 或 Pacific blue。在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Pacific blue。

[0034] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD4 的抗体的荧光标记为 FITC 或 APC-Cy7。在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD4 的抗体的荧光标记为 APC-Cy7。

[0035] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD8 的抗体的荧光标记为 BV510。

[0036] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD27 的抗体的荧光标记为 APC。

[0037] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,抗 CD45RA 的抗体的荧光标记为 PE-Cy7。

[0038] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,同型对照所用的抗体具体为:PE 标记的同型抗体、FITC 标记的同型抗体、APC 标记的同型抗体、PE-Cy7 标记的同型抗体。

[0039] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法,具体为:

[0040] 取荧光标记的抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、荧光标记的抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体,与待测样品混合,室温(即 $20^{\circ}\text{C} \sim 25^{\circ}\text{C}$)条件下,孵育 25min \sim 35min,得第一产品;

[0041] 取荧光标记的抗 CD3 的抗体、荧光标记的抗 CD4 的抗体、荧光标记的抗 CD8 的抗

体、荧光标记的抗 CD27 的抗体、荧光标记的抗 CD45RA 的抗体,与第一产品混合,室温(即 20℃~25℃)条件下,孵育 25min~35min,得第二产品;

[0042] 取第二产品与红细胞裂解液混合,并将所得混合液置于 36.5℃~37.5℃的中水中水浴 9min~11min,洗涤,流式上机检测,得检测数据,分析检测数据;

[0043] 分析的方法包括:

[0044] 细胞表面标志 $CD3^+TCR\alpha\beta^+CD4^-CD8^-$ 代表 TCR $\alpha\beta^+$ 双阴性 T 细胞;

[0045] 细胞表面标志 $CD3^+TCR\gamma\delta^+$ 代表 $\gamma\delta$ T 细胞;

[0046] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^+$ 代表辅助初始 T 细胞;

[0047] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^-$ 代表辅助耗竭 T 细胞;

[0048] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^+$ 代表辅助中心记忆 T 细胞;

[0049] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^-$ 代表辅助效应记忆 T 细胞;

[0050] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^+$ 代表细胞毒性初始 T 细胞;

[0051] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^-$ 代表细胞毒性耗竭 T 细胞;

[0052] 细胞表面标志 $CD8^+CD45RA^-CD27^+$ 代表细胞毒性中心记忆 T 细胞;

[0053] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD27^-$ 代表细胞毒性效应记忆 T 细胞。

[0054] 在本发明中,本发明提供的方法中,各个荧光标记的抗体中的荧光标记物不受本发明的限制,本领域技术人员可以根据实际情况选择合适的荧光标记物,以及对应的同型对照。

[0055] 优选地,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,还包括统计待测样品中 T 淋巴细胞数目的步骤。

[0056] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞数目的步骤包括:

[0057] 检测待测样品中淋巴细胞的总数;

[0058] 检测待测样品中 T 淋巴细胞占所述淋巴细胞的百分比;

[0059] 通过计算,即得待测样品中 T 淋巴细胞的数目。

[0060] 本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞数目中,淋巴细胞总数乘以其中 T 淋巴细胞的百分比,即得 T 淋巴细胞的数目。在本发明中通过对待测样品各个 T 细胞亚群进行免疫分型和相对数统计,再结合 T 淋巴细胞的绝对数,即可获得每个 T 细胞亚群的细胞绝对数。

[0061] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤,包括:

[0062] 取不同的荧光标记的抗体,与新的所述待测样品混合,孵育后,经流式细胞术检测,得检测数据,分析所述检测数据;

[0063] 检测待测样品中 T 淋巴细胞的百分比中所用的抗体包括:

[0064] 抗 CD45 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD16 的抗体、抗 CD56 的抗体、抗 CD19 的抗体;

[0065] 检测待测样品中 T 淋巴细胞的百分比中所用的抗 CD3 的抗体与 T 淋巴细胞免疫分型中所述抗 CD3 的抗体,各自独立地带有荧光标记。

[0066] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,对照组所用抗体为:荧光标记的抗 CD45 抗体、荧光标记的抗 CD3 抗体、荧光标

记的 CD4 抗体、荧光标记的 CD8 抗体。

[0067] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD45 的抗体荧光标记为 Percp。

[0068] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD3 的抗体的荧光标记为 FITC。

[0069] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD16 的抗体的荧光标记为 PE。

[0070] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD56 的抗体的荧光标记为 PE。

[0071] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD19 的抗体的荧光标记为 APC。

[0072] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD4 的抗体的荧光标记为 APC。

[0073] 在本发明的一些实施例中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤中,抗 CD8 的抗体的荧光标记为 PE。

[0074] 在本发明中,本发明提供的方法中,检测样品中 T 淋巴细胞的百分比的步骤为常规的淋巴细胞免疫分型和定量分析方法,该方法不受本发明的限制,本领域技术人员可以根据实际情况选择测定待测样品中 T 淋巴细胞的百分比的方法。

[0075] 在本发明的另外一些实施例中,本发明提供的方法中,检测待测样品中淋巴细胞的总数的方法为采用血细胞计数仪进行计数。在本发明中,本发明提供的方法中,检测待测样品中淋巴细胞的总数的方法为常规的方法,该方法不受本发明的限制,本领域技术人员可以根据实际情况选择检测待测样品中淋巴细胞的总数的方法。

[0076] 本发明还提供了一种淋巴细胞免疫分型的方法,其包括本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的步骤;

[0077] 该 T 淋巴细胞免疫分型的方法包括:

[0078] 取不同的荧光标记的抗体,与待检测样品混合,孵育后,经流式细胞术检测,得检测数据,分析所述检测数据;

[0079] 该抗体包括:

[0080] 抗 TCR $\alpha \beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体;

[0081] 该分析的方法包括:

[0082] 细胞表面标志 $CD3^+TCR \alpha \beta^+CD4^-CD8^-$ 代表 TCR $\alpha \beta^+$ 双阴性 T 细胞;

[0083] 细胞表面标志 $CD3^+TCR \gamma \delta^+$ 代表 $\gamma \delta$ T 细胞;

[0084] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^+$ 代表辅助初始 T 细胞;

[0085] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^-$ 代表辅助耗竭 T 细胞;

[0086] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^+$ 代表辅助中心记忆 T 细胞;

[0087] 细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^-$ 代表辅助效应记忆 T 细胞;

[0088] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^+$ 代表细胞毒性初始 T 细胞;

[0089] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^-$ 代表细胞毒性耗竭 T 细胞;

[0090] 细胞表面标志 $CD8^+CD45RA^-CD27^+$ 代表细胞毒性中心记忆 T 细胞；

[0091] 细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD27^-$ 代表细胞毒性效应记忆 T 细胞。

[0092] 本发明还提供了一种用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒，包括如下不同的荧光标记的抗体：

[0093] 抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。

[0094] 在本发明中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，荧光标记的抗体，可以是荧光标记物与抗体单独放置，在使用时将两者偶联获得荧光标记的抗体；也可以是荧光标记的抗体，在使用时，直接使用即可。

[0095] 在本发明的一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒包括荧光标记物和抗体；

[0096] 该抗体包括：

[0097] 抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。

[0098] 在本发明一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\alpha\beta$ 的抗体的荧光标记为 PE。

[0099] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体的荧光标记为 BV421 或 FITC。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\gamma\delta$ 的抗体的荧光标记为 FITC。

[0100] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Percp-cy5.5 或 Pacific blue。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Pacific blue。

[0101] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD4 的抗体的荧光标记为 FITC 或 APC-Cy7。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD4 的抗体的荧光标记为 APC-Cy7。

[0102] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD8 的抗体的荧光标记为 BV510。

[0103] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD27 的抗体的荧光标记为 APC。

[0104] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD45RA 的抗体的荧光标记为 PE-Cy7。

[0105] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于 T 淋巴细胞免疫分型的试剂盒中的抗体，还包括同型对照抗体，具体为：PE 标记的同型抗体、BV421 标记的同型抗体、APC 标记的同型抗体、PE-Cy7 标记的同型抗体。

[0106] 在本发明中，本发明提供的试剂盒中，各个荧光标记的抗体中的荧光标记物不受本发明的限制，本领域技术人员可以根据实际情况选择合适的荧光标记物，以及对应的同型对照。

[0107] 本发明还提供了一种用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒，其包括如下不同的荧光标

记的抗体：

[0108] 抗 TCR $\alpha \beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体。

[0109] 在本发明一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\alpha \beta$ 的抗体的荧光标记为 PE。

[0110] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体的荧光标记为 BV421 或 FITC。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体的荧光标记为 FITC。

[0111] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Percp-cy5.5 或 Pacific blue。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD3 的抗体的荧光标记为 Pacific blue。

[0112] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD4 的抗体的荧光标记为 FITC 或 APC-Cy7。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD4 的抗体的荧光标记为 APC-Cy7。

[0113] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD8 的抗体的荧光标记为 BV510。

[0114] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD27 的抗体的荧光标记为 APC。

[0115] 在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的用于淋巴细胞免疫分型的试剂盒中，抗 CD45RA 的抗体的荧光标记为 PE-Cy7。

[0116] 在本发明中，流式细胞术检测过程中，通过目标细胞分群是否清楚、目标细胞荧光强度等表示准确性的高低；目标细胞分群清楚、目标细胞荧光强度准确高，则表示准确性高。

[0117] 本发明提供了一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。本发明提供的 T 淋巴细胞免疫分型的方法，包括：取不同的荧光标记的抗体，与待检测样品混合，孵育后，经流式细胞术检测，得检测数据，分析所得检测数据；该抗体包括：抗 TCR $\alpha \beta$ 的抗体、抗 TCR $\gamma \delta$ 的抗体、抗 CD3 的抗体、抗 CD4 的抗体、抗 CD8 的抗体、抗 CD27 的抗体和抗 CD45RA 抗体；该分析的方法包括：细胞表面标志 $CD3^+TCR \alpha \beta^+CD4^-CD8^-$ 代表 TCR $\alpha \beta^+$ 双阴性 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+TCR \gamma \delta^+$ 代表 $\gamma \delta$ T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^+$ 代表辅助初始 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^+CD27^-$ 代表辅助耗竭 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^+$ 代表辅助中心记忆 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD4^+CD45RA^-CD27^-$ 代表辅助效应记忆 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^+$ 代表细胞毒性初始 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^+CD27^-$ 代表细胞毒性耗竭 T 细胞；细胞表面标志 $CD8^+CD45RA^-CD27^+$ 代表细胞毒性中心记忆 T 细胞；细胞表面标志 $CD3^+CD8^+CD45RA^-CD27^-$ 代表细胞毒性效应记忆 T 细胞。实验结果证实，本发明设计获得了最优的细胞表面标志的抗体组合，通过流式细胞术，实现了对 T 淋巴细胞进行更加全面的免疫分型和定量分析。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的方法，所需待测样品少、操作简单、所需时间短。在本发明的另外一些实施例中，本发明提供的方法重复性好、准确性高、可广泛应用于 T 淋巴细胞亚群免疫分型

和定量分析。

附图说明

- [0118] 图 1 示实施例 1 中淋巴细胞分类结果；
- [0119] 图 2 示实施例 1 中 T 淋巴细胞分型结果；其中，图 2-A、图 2-B 示 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的细胞分型结果；图 2-C 示 γ δ T 细胞的细胞分型结果；图 2-D 示辅助 T 细胞亚类的细胞分型结果；图 2-E 示细胞毒性 T 细胞亚类的细胞分型结果；
- [0120] 图 3 示实施例 1 中 B 淋巴细胞分型结果；
- [0121] 图 4 示实施例 2 中淋巴细胞分类结果；
- [0122] 图 5 示实施例 2 中 T 淋巴细胞分型结果；其中，图 5-A、图 5-B 示 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的细胞分型结果；图 5-C 示 γ δ T 细胞的细胞分型结果；图 5-D 示辅助 T 细胞亚类的细胞分型结果；图 5-E 示细胞毒性 T 细胞亚类的细胞分型结果；
- [0123] 图 6 示实施例 2 中 B 淋巴细胞分型结果；
- [0124] 图 7 示实施例 3 中淋巴细胞分类结果；
- [0125] 图 8 示实施例 3 中 T 淋巴细胞分型结果；其中，图 8-A、图 8-B 示 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的细胞分型结果；图 8-C 示 γ δ T 细胞的细胞分型结果；图 8-D 示辅助 T 细胞亚类的细胞分型结果；图 8-E 示细胞毒性 T 细胞亚类的细胞分型结果；
- [0126] 图 9 示实施例 3 中 B 淋巴细胞分型结果；
- [0127] 图 10 示实施例 4 中淋巴细胞分类结果；
- [0128] 图 11 示实施例 4 中 T 淋巴细胞分型结果；其中，图 11-A、图 11-B 示 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的细胞分型结果；图 11-C 示 γ δ T 细胞的细胞分型结果；图 11-D 示辅助 T 细胞亚类的细胞分型结果；图 11-E 示细胞毒性 T 细胞亚类的细胞分型结果；
- [0129] 图 12 示对比例中 CD45RO 和 CCR7 相组合时，所得的流式图。

具体实施方式

[0130] 本发明公开了一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。本领域技术人员可以参考本文内容，实施该方法，实现其应用，特别需要指出的是，所有类似的替换和改动对本领域技术人员来说是显而易见的，它们都被视为包括在本发明内。本发明的方法及应用已经通过较佳的实施例进行了描述，相关人员明显能在不脱离本发明内容、精神和范围内对本文制备方法和应用进行改动或适当变更与组合，来实现和应用本发明技术。

[0131] 本发明提供的一种 T 淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒中所用到的试剂和原料均可由市场购得。

[0132] 本发明中用到的荧光标记 Percp、FITC、PE、APC、BV421、Percp-cy5.5、BV510、PE-Cy7、BV450 均为常见的荧光标记可以由市场购得，各个荧光标记的抗体也可以由市场购得。

[0133] 为了使本技术领域的技术人员能够更好地理解本发明的技术方案，下面结合实施例，进一步阐述本发明：

[0134] 实施例 1 淋巴细胞精细免疫分型和定量分析

[0135] 实验材料：

[0136] 待测样品：抗凝外周血样品，来源于健康志愿者，为正常人的外周血。

[0137] BD Biosciences 淋巴细胞分类试剂盒 (cat340503)，购买于BD biosciences，其中混合抗体 1 包括：荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体、抗 CD4 (APC) 的抗体、抗 CD8 (PE) 的抗体；混合抗体 2 包括：荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD19 (APC) 的抗体、抗 CD56 和 CD16 (PE) 的抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体。BD 临床试剂盒自带的红细胞裂解液。

[0138] 自配的红细胞裂解液：每 1L 红细胞裂解液中含 NH_4Cl 18.29g、 KHCO_3 1g、 EDTA 0.37g。

[0139] 实验方法：

[0140] 取 500 μL 抗凝外周血样品，取 200 μL 待测样品，通过血细胞计数仪测得淋巴细胞绝对数，得淋巴细胞的绝对数为 4.22×10^9 个/L。

[0141] 剩下 300 μL 用于检测淋巴细胞各亚群，进行淋巴细胞免疫分型和定量分析。

[0142] 淋巴细胞分类

[0143] 1、取两根流式管，分别标记为 L-1、L-2，将 BD Biosciences 淋巴细胞分类试剂盒 (cat340503) 中两种混合抗体分别加入到对应的流式管中，其中混合抗体 1 加入到 L-1 号流式管中；混合抗体 2 分别加入对 L-2 号流式管中。

[0144] 2、向 L-1、L-2 号流式管中，各加入 50 μL 待测样品，充分涡旋，室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 30min；

[0145] 3、用试剂盒中 1 \times BD 红细胞裂解液裂解红细胞，5min；

[0146] 4、加入 1mL PBS 洗涤一次后 (3500rpm/min, 2min)，加入 200 μL PBS 流式上机，并分析结果。

[0147] T 淋巴细胞精细免疫分型

[0148] 1、取两根流式管，分别标记为 T-1、T-2，其中 T-1 为对照组和同型对照组，T-2 为待检测组；按照表 1 向各个流式管中加入以下抗体：

[0149] 表 1 各个流式管中加入的抗体的类别和加入的体积

[0150]

流式管	T-1	T-2
荧光标记抗体	PE 标记的同型抗体，5 μL	PE 标记的抗 TCR $\alpha\beta$ 抗体，5 μL
	FITC 标记的同型抗体，2.5 μL	FITC 标记的抗 TCR $\gamma\delta$ 抗体，2.5 μL

[0151] 2、向 T-1、T-2 号流式管中，各加入 50 μL 待测样品，充分涡旋后，室温 (25 $^{\circ}\text{C}$) 避光孵育 30min；

[0152] 3、按照表 2 向各个流式管中加入以下抗体：

[0153] 表 2 各个流式管中加入的抗体的类别和加入的体积

[0154]

流式管	T-1	T-2
荧光标记抗体	Pacific blue标记的抗CD3抗体, 2.5 μ L	Pacific blue标记的抗CD3抗体, 2.5 μ L
	APC-Cy7标记的抗CD4抗体, 2.5 μ L	APC-Cy7标记的抗CD4抗体, 2.5 μ L
	BV510标记的抗CD8抗体, 2.5 μ L	BV510标记的抗CD8抗体, 2.5 μ L
	APC标记的同型抗体, 5 μ L	APC标记的抗CD27抗体, 5 μ L
	PE-Cy7标记的同型抗体, 2.5 μ L	PE-Cy7标记的抗CD45RA抗体, 2.5 μ L

[0155] 4、用自配的红细胞裂解液裂解红细胞后,37 $^{\circ}$ C水浴 10min ;

[0156] 5、各加入 1mL PBS 洗一次后,流式上机并分析结果。

[0157] B 淋巴细胞精细免疫分型

[0158] 1、取两个流式管,分别编号为 B-1、B-2,其中,B-1 为对照组和同型对照组,B-2 为待检测组 ;按照表 3 向各个流式管中加入以下抗体 :

[0159] 表 3 各个流式管中加入的抗体的类别和加入的体积

[0160]

流式管	B-1	B-2
荧光标记抗体	APC标记的抗CD19抗体, 5 μ L	APC标记的抗CD19抗体, 5 μ L
	BV450标记的同型抗体, 5 μ L	BV450标记的抗CD27抗体, 5 μ L
	BV510标记的同型抗体, 2.5 μ L	BV510标记的抗IgD抗体, 2.5 μ L
	PE标记的同型抗体, 5 μ L	PE标记的抗CD24抗体, 5 μ L
	Percep-cy5.5标记的同型抗体, 2.5 μ L	Percep-cy5.5标记的抗CD38抗体, 2.5 μ L

[0161] 2、向 B-1、B-2 号流式管中,各加入混匀的 50 μ L 待测样品,混匀后室温 (25 $^{\circ}$ C) 避光孵育 30min ;

[0162] 3、用自配的红细胞裂解液裂解红细胞 ;

[0163] 4、加入 1mL PBS 洗一次后,流式上机并分析结果。

[0164] 结果分析 :

[0165] 通过以上三步,得到各淋巴细胞亚群相对数 (百分数) 和淋巴细胞绝对数。各淋巴细胞亚群相对数 (百分数) \times 淋巴细胞绝对数,即得到各淋巴细胞亚群绝对数。这里的各淋巴细胞亚群相对数是指 :针对淋巴细胞分类时为分别为 T、B、NK 等细胞占淋巴细胞的百分比 ;针对 T 细胞精细免疫分型时为各细胞亚群占 T 细胞的百分比 ;针对 B 细胞精细免疫分型时为各细胞亚群占 B 细胞的百分比。

[0166] 淋巴细胞免疫分型和定量分析结果 (采用 BD 自动分析软件分析)

[0167] 淋巴细胞分型结果见图 1,从图中可知,T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞、NK 细胞的相对数 (百分数);根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数,具体实验结果见表 4。

[0168] 表 4 各个细胞亚群免疫分型所用的细胞表面标志、各个细胞亚群的相对数和绝对数

[0169]

细胞亚群	细胞表面标志	细胞亚群相对数 (占淋巴细胞总数的百分数)	细胞亚群绝对数
T细胞	CD3 ⁺	64.58%	2725个/ μ L
Tc细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺	21.72%	917个/ μ L
Th细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺	41.15%	1737个/ μ L
B细胞	CD19 ⁺	23.30%	983个/ μ L
NK细胞	CD16 ⁺ CD56 ⁺	9.13%	385个/ μ L
--	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.92%	--
--	4/8 Ratio	1.89	--

[0170] T细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0171] T淋巴细胞分型结果见图 2-A、2-B、2-C、2-D 和 2-E, 从图中可知, 各类 T 细胞亚群的相对数 (百分数), 该相对数为相对于 T 细胞数目的百分数; 根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数), 计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0172] 1、TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞 (TCR α β ⁻DNT 细胞)

[0173] 由图 2-A, 图 2-B 可知, TCR α β ⁻DNT (即, CD3⁺TCR α β ⁻CD4⁻CD8⁻) 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 1.82%, 可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, TCR α β ⁻ 双阴性 T 细胞的绝对数为 50 个/ μ L。

[0174] 2、 γ δ T 细胞

[0175] 由图 2-C 可知, CD3⁺TCR γ δ ⁺ 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 3.4%, 可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, γ δ T 细胞的绝对数为 93 个/ μ L。

[0176] 3、辅助 T 细胞亚类

[0177] 从图 2-D 可得, 以下四个细胞亚群: ①辅助初始 T 细胞 (即 CD4⁺ Naïve, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 34.36%, 绝对数 936 个/ μ L; ②辅助耗竭 T 细胞 (即图中 Q4-2, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 0.12%, 绝对数 3 个/ μ L; ③辅助中心记忆 T 细胞 (即 CD4⁺CM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 6.34%, 绝对数 173 个/ μ L; ④辅助效应记忆 T 细胞 (即 CD4⁺EM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 0.37%, 绝对数 10 个/ μ L。

[0178] 4、细胞毒性 T 细胞亚类

[0179] 由图 2-E 可得, 以下四个细胞亚群: ①细胞毒性初始 T 细胞 (即 CD8⁺ Naïve, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 17.68%, 绝对数 482 个/ μ L; ②细胞毒性耗竭 T 细胞 (即 CD8⁺TEMRA, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 2.69%, 绝对数 73 个/ μ L; ③细胞毒性中心记忆 T 细胞 (即 CD8⁺CM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 1.09%, 绝对数 30 个/ μ L; ④细胞毒性效应记忆 T 细胞 (即 CD8⁺EM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 0.28%, 绝对数 8 个/ μ L。

[0180] B 细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0181] B 淋巴细胞分型结果见图 3-A 和图 3-B, 从图中可知, 各类 B 细胞亚群的相对数 (百

分数),该相对数为相对于B细胞数目的百分数;根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数(百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0182] 由图3可知,待测样品中以下四个细胞亚群和该亚群的细胞数目:①记忆B细胞(CD19⁺D27⁺),相对数12.0%,绝对数127个/ μ L;②初始B细胞(CD19⁺D27⁻IgD⁺),相对数69.5%,绝对数605个/ μ L;③过渡B细胞(CD19⁺CD24⁺CD38⁺),相对数9.0%,绝对数95个/ μ L;④浆母细胞(CD19⁺CD24⁻CD38⁺),相对数3.4%,绝对数37个/ μ L。

[0183] 根据文献报道,正常人的淋巴细胞中的各个细胞亚群的相对数的参考范围见表5所示。

[0184] 表5 正常人的淋巴细胞中各个细胞亚群相对数

[0185]

细胞	细胞亚群	细胞亚群相对数(百分数)	
		正常人的参考范围	待测样品中的相对数
NK细胞	NK细胞	7%-40%	9.13%

[0186]

T细胞	T细胞	50%-84%	64.58%
B细胞	B细胞	5%-18%	16.7%
--	4/8 Ratio	0.7-2.8	1.89
Tc细胞 (CD8 ⁺ T细胞)	Tc细胞 (CD8 ⁺ T细胞)	15%-44% (占T细胞的百分数)	21.72% (占T细胞的百分数)
Th细胞 (CD4 ⁺ T细胞)	Th细胞 (CD4 ⁺ T细胞)	27%-51% (占T细胞的百分数)	41.15% (占T细胞的百分数)
TCR $\alpha\beta$ ⁺ 双阴性T细胞	TCR $\alpha\beta$ ⁺ 双阴性T细胞	<3.5% (占T细胞的百分数)	1.82% (占T细胞的百分数)
$\gamma\delta$ T细胞	$\gamma\delta$ T细胞	0.5-16%, 平均5% (占T细胞的百分数)	3.4% (占T细胞的百分数)
辅助T细胞亚类	辅助初始T细胞	46%-99% [*] (占T细胞的百分数)	34.36% (占T细胞的百分数)
	辅助耗竭T细胞	0.1%左右 [*] (占T细胞的百分数)	0.12% (占T细胞的百分数)
	辅助中心记忆T细胞	0.35%-100% [*] (占T细胞的百分数)	6.34% (占T细胞的百分数)
	辅助效应记忆T细胞	0.27%-18% [*] (占T细胞的百分数)	0.37% (占T细胞的百分数)
细胞毒性T细胞亚类	细胞毒性初始T细胞	16%-100% [*] (占T细胞的百分数)	17.68% (占T细胞的百分数)
	细胞毒性耗竭T细胞	2%-41% [*] (占T细胞的百分数)	2.69% (占T细胞的百分数)
	细胞毒性中心记忆T细胞	1%-6% [*] (占T细胞的百分数)	1.09% (占T细胞的百分数)
	细胞毒性效应记忆T细胞	0.28%-50% [*] (占T细胞的百分数)	0.28% (占T细胞的百分数)
B细胞	记忆B细胞	5.2%-12.1% [*] (占B细胞的百分数)	12.0% (占B细胞的百分数)

[0187]

初始B细胞	69.4%-80.4% [*] (占B细胞的百分数)	69.5%(占B细胞的百分数)
过渡B细胞	4.5%-9.2% [*] (占B细胞的百分数)	9.0% (占B细胞的百分数)
浆母细胞	0.7%-3.5% [*] (占B细胞的百分数)	3.4% (占B细胞的百分数)

[0188] 其中, * 代表该数据并没有通用的参考范围, 仅是目前研究报道的实验结果;

[0189] 根据图 1 可知, 本实施例所用的方法能够成功将淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞, 并且进行定量分析, 获得了各个细胞的相对数和绝对数。从表 5 中结果可知, 各个细胞亚群的相对数完全落入正常人的参考范围, 与待检测样品的实际情况相一致, 说明本发明实验结果稳定、准确。

[0190] 根据图 2-A、图 2-B、图 2-C、图 2-D、图 2-E 可得, 本实施例所用的方法能够准确地将 T 淋巴细胞分为 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞、 γ δ T 细胞、辅助初始 T 细胞、辅助耗竭 T 细胞、辅助中心记忆 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞、细胞毒性初始 T 细胞、细胞毒性耗竭 T 细胞、细胞毒性中心记忆 T 细胞、细胞毒性效应记忆 T 细胞, 并且进行定量分析, 获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从表 5 中结果可知, 各个细胞亚群的相对数与正常人的参考范围基本一致, 与待检测样品的实际情况相一致, 说明本发明实验结果稳定、准确。

[0191] 根据图 3 可知, 本实施例所用的方法能够准确地将 B 淋巴细胞分为记忆 B 细胞、初始 B 细胞、过渡 B 细胞、浆母细胞, 并且进行定量分析, 获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从表 5 中结果可知, 各个细胞亚群的相对数与正常人的参考范围基本一致, 与待检测样品的实际情况相一致, 说明本发明实验结果稳定、准确。

[0192] 综上所述, 本发明提供的方法采用较少的待测样品就实现了对待测样品的淋巴细胞免疫分型, 并统计出了每个细胞亚群的含量; 且本发明提供的方法能够准确将各个细胞亚群进行免疫分型。

[0193] 实施例 2 淋巴细胞精细免疫分型和定量分析

[0194] 实验材料:

[0195] 待测样品: 抗凝外周血样品, 来源于来我院就诊患儿静脉血样品 (已签知情同意书), 为拟诊系统性红斑狼疮 (SLE) 患儿的外周血。

[0196] BD Biosciences 淋巴细胞分类试剂盒 (cat340503), 购买于 BD biosciences, 其中混合抗体 1 包括: 荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体、抗 CD4 (APC) 的抗体、抗 CD8 (PE) 的抗体; 混合抗体 2 包括: 荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD19 (APC) 的抗体、抗 CD56 和 CD16 (PE) 的抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体。BD 临床试剂盒自带的红细胞裂解液。

[0197] 自配的红细胞裂解液: 每 1L 红细胞裂解液中含 NH_4Cl 18.29g、 KHCO_3 1g, EDTA 0.37g。

[0198] 实验方法:

[0199] 取 500 μL 抗凝外周血样品, 取 200 μL 待测样品, 通过血细胞计数仪测得淋巴细胞绝对数, 得淋巴细胞的绝对数为 0.68×10^9 个/L。

[0200] 剩下 300 μ L 用于检测淋巴细胞各亚群,进行淋巴细胞免疫分型和定量分析。

[0201] 淋巴细胞分类

[0202] 与实施例 1 中记载的淋巴细胞分类方法相同,其中孵育时的温度为室温 (20 $^{\circ}$ C),孵育时间为 35min。

[0203] T 淋巴细胞精细免疫分型

[0204] 与实施例 1 中记载的 T 淋巴细胞分类方法相同,其中加入 PE 标记的抗 TCR α β 抗体、BV421 标记的抗 TCR γ δ 抗体后,孵育的温度为室温 (20 $^{\circ}$ C),孵育时间为 35min;加入剩余抗体后,孵育的温度为室温 (20 $^{\circ}$ C),孵育时间为 35min;用自配的红细胞裂解液裂解红细胞后,36.5 $^{\circ}$ C 水浴 11min。

[0205] B 淋巴细胞精细免疫分型

[0206] 1、取两个流式管,分别编号为 B-1、B-2,其中, B-1 为对照组和同型对照组, B-2 为待检测组;按照表 6 向各个流式管中加入以下抗体:

[0207] 表 6 各个流式管中加入的抗体的类别和加入的体积

[0208]

流式管	B-1	B-2
荧光标记抗体	APC-Cy7 标记的抗 CD19 抗体, 5 μ L	APC-Cy7 标记的抗 CD19 抗体, 5 μ L
	APC 标记的同型抗体, 5 μ L	APC 标记的抗 CD27 抗体, 5 μ L
	BV510 标记的同型抗体, 2.5 μ L	BV510 标记的抗 IgD 抗体, 2.5 μ L
	PE 标记的同型抗体, 5 μ L	PE 标记的抗 CD24 抗体, 5 μ L
	Perep-cy5.5 标记的同型抗体, 2.5 μ L	Perep-cy5.5 标记的抗 CD38 抗体, 2.5 μ L

[0209] 2、向 B-1、B-2 号流式管中,各加入混匀的 50 μ L 待测样品,混匀后室温 (20 $^{\circ}$ C) 避光孵育 30min;

[0210] 3、用自配的红细胞裂解液裂解红细胞;

[0211] 4、加入 1mL PBS 洗一次后,流式上机并分析结果。

[0212] 结果分析:

[0213] 通过以上三步,得到各淋巴细胞亚群相对数 (百分数) 和淋巴细胞绝对数。具体分析方法与实施例 1 提供的方法相同。

[0214] 淋巴细胞免疫分型和定量分析结果 (采用 BD 自动分析软件分析)

[0215] 淋巴细胞分型结果图 4,从图中可知, T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞、NK 细胞的相对 (百分数);根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数,具体实验结果见表 7。

[0216] 表 7 各个细胞亚群免疫分型所用的细胞表面标志、各个细胞亚群的相对数和绝对数

[0217]

细胞亚群	细胞表面标志	细胞亚群相对数 (占淋巴细胞总数的百分数)	细胞亚群绝对数
T细胞	CD3 ⁺	66.96 %	455个/ μ L
Tc细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺	20.34 %	138个/ μ L
Th细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺	45.60 %	310个/ μ L
B细胞	CD19 ⁺	30.83%	210个/ μ L
NK细胞	CD16 ⁺ CD56 ⁺	1.67%	11个/ μ L
--	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.24%	2个/ μ L
--	4/8 Ratio	2.24	--

[0218] T细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0219] T淋巴细胞分类结果见图 5-A、5-B、5-C、5-D 和图 5-E, 从图中可知, 各类 T 细胞亚群的相对数 (百分数), 该相对数为相对于 T 细胞数目的百分数; 根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数), 计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0220] 1、TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞 (TCR α β ⁺ DNT 细胞)

[0221] 由图 5-A, 图 5-B 可知, TCR α β ⁺ DNT (即 CD3⁺TCR α β ⁺CD4⁻CD8⁻) 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 3.04%, 可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的绝对数为 14 个/ μ L。

[0222] 2、 γ δ T 细胞

[0223] 由图 5-C 可知, CD3⁺TCR γ δ ⁺ 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 1.32%, 可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, γ δ T 细胞的绝对数为 6 个/ μ L。

[0224] 3、辅助 T 细胞亚类

[0225] 从图 5-D 可得, 以下四个细胞亚群: ①辅助初始 T 细胞 (即 CD4⁺ Naïve, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 16.87%, 绝对数 77 个/ μ L; ②辅助耗竭 T 细胞 (即图中 Q4-2, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 0.09%, 绝对数 0.3 个/ μ L; ③辅助中心记忆 T 细胞 (即 CD4⁺CM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 22.16%, 绝对数 101 个/ μ L; ④辅助效应记忆 T 细胞 (即 CD4⁺EM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 6.43%, 绝对数 29 个/ μ L。

[0226] 4、细胞毒性 T 细胞亚类

[0227] 由图 5-E 可得, 以下四个细胞亚群: ①细胞毒性初始 T 细胞 (即 CD8⁺ Naïve, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 12.33%, 绝对数 56 个/ μ L; ②细胞毒性耗竭 T 细胞 (即 CD8⁺TEMRA, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 1.97%, 绝对数 9 个/ μ L; ③细胞毒性中心记忆 T 细胞 (即 CD8⁺CM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 3.78%, 绝对数 17 个/ μ L; ④细胞毒性效应记忆 T 细胞 (即 CD8⁺EM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 2.24%, 绝对数 10 个/ μ L。

[0228] B 细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0229] B 淋巴细胞分型结果见图 6-A 和图 6-B, 从图中可知, 各类 B 细胞亚群的相对数 (百分数), 该相对数为相对于 B 细胞数目的百分数; 根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群

的相对数(百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0230] 由图 6 可知,待测样品中以下四个细胞亚群和该亚群的细胞数目:①记忆 B 细胞(CD19⁺D27⁺),相对数 28.0%,绝对数 59 个/ μ L;②初始 B 细胞(CD19⁺D27⁻IgD⁺),相对数 48.5%,绝对数 102 个/ μ L;③过渡 B 细胞(CD19⁺CD24⁺CD38⁺),相对数 0.5%,绝对数 1 个/ μ L;④浆母细胞(CD19⁺CD24⁻CD38⁺),相对数 13.8%,绝对数 29 个/ μ L。

[0231] 根据文献报道,正常人的淋巴细胞中的各个细胞亚群的相对数的参考范围见表 5 所示。

[0232] 根据图 4 可知,本实施例所用的方法能够成功将淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞,并且进行定量分析,获得了各个细胞的相对数和绝对数。从结果可知,待测样品中的 NK 细胞(CD16⁺CD56⁺)含量明显低于正常参考范围下限(7%-40%),而 B 细胞(CD19⁺)高于正常参考范围上限(5-18%),其余无明显异常,提示该待测样品中 B 细胞异常活化或增殖。

[0233] 根据图 5 可知,本实施例所用的方法能够准确地将 T 淋巴细胞分为 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞、 γ δ T 细胞、辅助初始 T 细胞、辅助耗竭 T 细胞、辅助中心记忆 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞、细胞毒性初始 T 细胞、细胞毒性耗竭 T 细胞、细胞毒性中心记忆 T 细胞、细胞毒性效应记忆 T 细胞,并且进行定量分析,获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从结果可知,各个细胞亚群的相对数与正常人的参考范围基本一致,无明显异常。

[0234] 根据图 6 可知,本实施例所用的方法能够准确地将 B 淋巴细胞分为记忆 B 细胞、初始 B 细胞、过渡 B 细胞、浆母细胞,并且进行定量分析,获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从结果可知,待测样品中过渡 B 细胞(Transitional B cell)仅占 B 细胞的 0.05%,几乎没有,提示其体液免疫过渡活化或失调。

[0235] 综上所述,本发明提供的方法采用较少的待测样品就实现了对待测样品的淋巴细胞免疫分型,并统计出了每个细胞亚群的含量;且本发明提供的方法能够准确将各个细胞亚群进行免疫分型。

[0236] 实施例 3 淋巴细胞精细免疫分型和定量分析

[0237] 实验材料:

[0238] 待测样品:抗凝外周血样品,来源于来我院就诊患儿静脉血样品(已签知情同意书),为拟诊高 IgM 综合征患儿的外周血。

[0239] BD Biosciences 淋巴细胞分类试剂盒(cat340503),购买于 BD biosciences,其中混合抗体 1 包括:荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD3(FITC)的抗体、抗 CD4(APC)的抗体、抗 CD8(PE)的抗体;混合抗体 2 包括:荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD19(APC)的抗体、抗 CD56 和 CD16(PE)的抗体、抗 CD3(FITC)的抗体。BD 临床试剂盒自带的红细胞裂解液。

[0240] 自配的红细胞裂解液:每 1L 红细胞裂解液中含 NH₄Cl 18.29g、KHCO₃ 1g、EDTA 0.37g。

[0241] 实验方法:

[0242] 取 500 μ L 抗凝外周血样品,取 200 μ L 待测样品,通过血细胞计数仪测得淋巴细胞绝对数,得淋巴细胞的绝对数为 0.89×10^9 个/L。

[0243] 剩下 300 μ L 用于检测淋巴细胞各亚群,进行淋巴细胞免疫分型和定量分析。

[0244] 淋巴细胞分类

[0245] 与实施例 1 中记载的淋巴细胞分类方法相同,其中孵育时的温度为室温 (22℃),孵育时间为 30min。

[0246] T 淋巴细胞精细免疫分型

[0247] 与实施例 1 中记载的 T 淋巴细胞分类方法相同,其中加入 PE 标记的抗 TCR α β 抗体、BV421 标记的抗 TCR γ δ 抗体后,孵育的温度为室温 (22℃),孵育时间为 25min;加入剩余抗体后,孵育的温度为室温 (22℃),孵育时间为 25min;用自配的红细胞裂解液裂解红细胞后,37.5℃水浴 9min。

[0248] B 淋巴细胞精细免疫分型

[0249] 与实施例 1 中记载的 B 淋巴细胞分类方法相同,其中其中孵育时的温度为室温 (22℃),孵育时间为 25min。

[0250] 结果分析:

[0251] 通过以上三步,得到各淋巴细胞亚群相对数 (百分数) 和淋巴细胞绝对数。具体分析方法与实施例 1 提供的方法相同。

[0252] 淋巴细胞免疫分型和定量分析结果 (采用 BD 自动分析软件分析)

[0253] 淋巴细胞分型结果见图 7,从图中可知,T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞、NK 细胞的相对 (百分数);根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数,具体实验结果见表 8。

[0254] 表 8 各个细胞亚群免疫分型所用的细胞表面标志、各个细胞亚群的相对数和绝对数

[0255]

细胞亚群	细胞表面标志	细胞亚群相对数 (占淋巴细胞总数的百分数)	细胞亚群绝对数
T 细胞	CD3 ⁺	70.24%	625个/ μ L
Tc 细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺	27.81%	248个/ μ L
Th 细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺	33.71%	300个/ μ L
B 细胞	CD19 ⁺	25.42%	88个/ μ L
NK 细胞	CD16 ⁺ CD56 ⁺	2.22%	114个/ μ L
--	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	0.15%	--
--	4/8 Ratio	1.21	--

[0256] T 细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0257] T 淋巴细胞分类结果见图 8-A、8-B、8-C、8-D 和图 8-E,从图中可知,各类 T 细胞亚群的相对数 (百分数),该相对数为相对于 T 细胞数目的百分数;根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0258] 1、TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞 (TCR α β ⁺DNT 细胞)

[0259] 由图 8-A,图 8-B 可知,TCR α β ⁺DNT (即 CD3⁺TCR α β ⁺CD4⁻CD8⁻) 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 1.24%,可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数

算出, TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞的绝对数为 8 个 / μ L。

[0260] 2、 γ δ T 细胞

[0261] 由图 8-C 可知, CD3⁺TCR γ δ ⁺ 即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占 T 细胞的 18.1%, 可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, γ δ T 细胞的绝对数为 113 个 / μ L。

[0262] 3、辅助 T 细胞亚类

[0263] 从图 8-D 可得, 以下四个细胞亚群: ①辅助初始 T 细胞 (即 CD4⁺ Naïve, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 23.36%, 绝对数 146 个 / μ L; ②辅助耗竭 T 细胞 (即图中 Q4-2, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 0.17%, 绝对数 1 个 / μ L; ③辅助中心记忆 T 细胞 (即 CD4⁺CM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 9.47%, 绝对数 59 个 / μ L; ④辅助效应记忆 T 细胞 (即 CD4⁺EM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 0.71%, 绝对数 4 个 / μ L。

[0264] 4、细胞毒性 T 细胞亚类

[0265] 由图 8-E 可得, 以下四个细胞亚群: ①细胞毒性初始 T 细胞 (即 CD8⁺ Naïve, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺), 相对数 15.66%, 绝对数 98 个 / μ L; ②细胞毒性耗竭 T 细胞 (即 CD8⁺TEMRA, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻) 相对数 10.15%, 绝对数 63 个 / μ L; ③细胞毒性中心记忆 T 细胞 (即 CD8⁺CM, CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺) 相对数 1.20%, 绝对数 7 个 / μ L; ④细胞毒性效应记忆 T 细胞 (即 CD8⁺EM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁻) 相对数 0.81%, 绝对数 5 个 / μ L。

[0266] B 细胞精细免疫分型和定量分析结果 (采用 BD Diva 软件分析)

[0267] B 淋巴细胞分型结果见图 9-A 和图 9-B, 从图中可知, 各类 B 细胞亚群的相对数 (百分数), 该相对数为相对于 B 细胞数目的百分数; 根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数 (百分数), 计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0268] 由图 9 可知, 待测样品中以下四个细胞亚群和该亚群的细胞数目: ①记忆 B 细胞 (CD19⁺D27⁺), 相对数 0.5%, 绝对数 1 个 / μ L; ②初始 B 细胞 (CD19⁺D27⁻IgD⁺), 相对数 95.3%, 绝对数 216 个 / μ L; ③过渡 B 细胞 (CD19⁺CD24⁺⁺CD38⁺⁺), 相对数 28.3%, 绝对数 64 个 / μ L; ④浆母细胞 (CD19⁺CD24⁻CD38⁺⁺), 相对数 0.9%, 绝对数 2 个 / μ L。

[0269] 根据文献报道, 正常人的淋巴细胞中的各个细胞亚群的相对数的参考范围见表 5 所示。

[0270] 根据图 7 可知, 本实施例所用的方法能够成功将淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞, 并且进行定量分析, 获得了各个细胞的相对数和绝对数。从结果可知, 待测样品中的 NK 细胞 (CD16⁺CD56⁺) 为 2.22%, 明显低于正常参考范围下限 (7-40%), 而 B 细胞 (CD19⁺) 为 25.42%, 高于正常参考范围上限 (5-18%), 其余无明显异常, 提示 B 细胞异常活化或增殖。

[0271] 根据图 8 可知, 本实施例所用的方法能够准确地将 T 淋巴细胞分为 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞、 γ δ T 细胞、辅助初始 T 细胞、辅助耗竭 T 细胞、辅助中心记忆 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞、细胞毒性初始 T 细胞、细胞毒性耗竭 T 细胞、细胞毒性中心记忆 T 细胞、细胞毒性效应记忆 T 细胞, 并且进行定量分析, 获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从结果可知, 待测样品中细胞毒性耗竭 T 细胞 (CD8⁺TEMRA) 的含量占 T 细胞的 36.5%, 显著高于正常同龄儿童, 提示患儿可能存在长期慢性病毒感染; 待测样品中记忆 T 细胞 (各类中心 / 效应记忆 T) 均低于正常参考范围, 提示该患儿可能存在细胞免疫异常; 待测样品中 γ δ T 细胞

的含量占 T 细胞的 18.1%，远高于正常参考范围（低于 5%），提示患儿病毒感染、T 细胞异常活化或增值。

[0272] 根据图 9 可知，本实施例所用的方法能够准确地将 B 淋巴细胞分为记忆 B 细胞、初始 B 细胞、过渡 B 细胞、浆母细胞，并且进行定量分析，获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从结果可知，初始 B 细胞（naïve B）过多，而记忆 B 细胞（memory B）仅占 B 细胞的 0.5%，远低于正常下限，提示患儿体液免疫功能障碍。

[0273] 综上所述，本发明提供的方法采用较少的待测样品就实现了对待测样品的淋巴细胞免疫分型，并统计出了每个细胞亚群的含量；且本发明提供的方法能够准确将各个细胞亚群进行免疫分型。

[0274] 实施例 4 T 淋巴细胞精细免疫分型和定量分析

[0275] 实验材料：

[0276] 待测样品：抗凝外周血样品，来源于健康志愿者静脉血标本，为多次患“感冒”健康成人的外周血。

[0277] BD Biosciences 淋巴细胞分类试剂盒 (cat340503)，购买于 BD biosciences，其中混合抗体 1 包括：荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体、抗 CD4 (APC) 的抗体、抗 CD8 (PE) 的抗体；混合抗体 2 包括：荧光标记 Percp 的抗 CD45 抗体、抗 CD19 (APC) 的抗体、抗 CD56 和 CD16 (PE) 的抗体、抗 CD3 (FITC) 的抗体。BD 临床试剂盒自带的红细胞裂解液。

[0278] 自配的红细胞裂解液：。

[0279] 实验方法：

[0280] 取 500 μ L 抗凝外周血样品，取 200 μ L 待测样品，通过血细胞计数仪测得淋巴细胞绝对数，得淋巴细胞的绝对数为 1.38×10^9 个 /L。

[0281] 剩下 300 μ L 用于检测淋巴细胞各亚群，进行淋巴细胞免疫分型和定量分析。

[0282] 淋巴细胞分类

[0283] 与实施例 1 中记载的淋巴细胞分类方法相同，其中孵育时的温度为室温（20℃），孵育时间为 30min。

[0284] 淋巴细胞免疫分型和定量分析结果（采用 BD 自动分析软件分析）

[0285] 淋巴细胞分型结果见图 10，从图中可知，T 细胞、Tc 细胞、Th 细胞、B 细胞、NK 细胞的相对（百分数）；根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数（百分数），计算获得各个细胞亚群的绝对数，具体实验结果见表 9。

[0286] 表 9 各个细胞亚群免疫分型所用的细胞表面标志、各个细胞亚群的相对数和绝对数

[0287]

细胞亚群	细胞表面标志	细胞亚群相对数 (占淋巴细胞总数的百分数)	细胞亚群绝对数
T细胞	CD3 ⁺	83.28 %	1149 个/ μ L
Tc细胞	CD3 ⁺ CD8 ⁺	41.60 %	574 个/ μ L
Th细胞	CD3 ⁺ CD4 ⁺	33.85 %	467 个/ μ L
B细胞	CD19 ⁺	6.38 %	88 个/ μ L
NK细胞	CD16 ⁺ CD56 ⁺	8.24 %	114 个/ μ L
--	CD3 ⁺ CD4 ⁺ CD8 ⁺	1.98 %	27 个/ μ L
--	4/8 Ratio	0.81	--

[0288] T淋巴细胞精细免疫分型

[0289] 与实施例1中记载的T淋巴细胞分类方法相同,其中加入PE标记的抗TCR α β 抗体、BV421标记的抗TCR γ δ 抗体后,孵育的温度为室温(20 $^{\circ}$ C),孵育时间为30min;加入剩余抗体后,孵育的温度为室温(20 $^{\circ}$ C),孵育时间为30min。

[0290] T细胞精细免疫分型和定量分析结果(采用BD Diva软件分析)

[0291] T淋巴细胞分类结果见图11-A、11-B、11-C、11-D和图11-E,从图中可知,各类T细胞亚群的相对数(百分数),该相对数为相对于T细胞数目的百分数;根据淋巴细胞的绝对数、和各个细胞亚群的相对数(百分数),计算获得各个细胞亚群的绝对数。

[0292] 1、TCR α β ⁺双阴性T细胞(TCR α β ⁺DNT细胞)

[0293] 由图11-A,图11-B可知,TCR α β ⁺DNT(即CD3⁺TCR α β ⁺CD4⁻CD8⁻)即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占T细胞的0.73%,可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出,TCR α β ⁺双阴性T细胞的绝对数为8个/ μ L。

[0294] 2、 γ δ T细胞

[0295] 由图11-C可知,CD3⁺TCR γ δ ⁺即为目标细胞。由流式细胞仪可测得目标细胞占T细胞的30.2%,可由血细胞计数仪测得的淋巴细胞绝对数算出, γ δ T细胞的绝对数为347个/ μ L。

[0296] 3、辅助T细胞亚类

[0297] 从图11-D可得,以下四个细胞亚群:①辅助初始T细胞(即CD4⁺Naïve, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁺),相对数13.64%,绝对数157个/ μ L;②辅助耗竭T细胞(即图中Q4-2, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁺CD27⁻)相对数0.9%,绝对数4个/ μ L;③辅助中心记忆T细胞(即CD4⁺CM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁺)相对数16.01%,绝对数184个/ μ L;④辅助效应记忆T细胞(CD4⁺EM, CD3⁺CD4⁺CD45RA⁻CD27⁻)相对数11.6%,绝对数45个/ μ L。

[0298] 4、细胞毒性T细胞亚类

[0299] 由图11-E可得,以下四个细胞亚群:①细胞毒性初始T细胞(即CD8⁺Naïve, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁺),相对数12.98%,绝对数149个/ μ L;②细胞毒性耗竭T细胞(即CD8⁺TEMRA, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁺CD27⁻)相对数22.05%,绝对数253个/ μ L;③细胞毒性中心记

忆 T 细胞（即 CD8⁺CM, CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺）相对数 4.99%，绝对数 57 个 / μ L；④细胞毒性效应记忆 T 细胞（即 CD8⁺EM, CD3⁺CD8⁺CD45RA⁻CD27⁺）相对数 1.58%，绝对数 18 个 / μ L。

[0300] 根据文献报道，正常人的淋巴细胞中的各个细胞亚群的相对数的参考范围见表 5 所示。

[0301] 根据图 10 可知，本实施例所用的方法能够成功将淋巴细胞分为 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞和 NK 细胞，并且进行定量分析，获得了各个细胞的相对数和绝对数。从结果可知，该患者这集群细胞相对数在正常参考范围之内。

[0302] 根据图 11 可知，本实施例所用的方法能够准确地将 T 淋巴细胞分为 TCR α β ⁺ 双阴性 T 细胞、 γ δ T 细胞、辅助初始 T 细胞、辅助耗竭 T 细胞、辅助中心记忆 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞、细胞毒性初始 T 细胞、细胞毒性耗竭 T 细胞、细胞毒性中心记忆 T 细胞、细胞毒性效应记忆 T 细胞，并且进行定量分析，获得了各个细胞亚群的相对数和绝对数。从结果可知，待测样品中细胞毒性耗竭 T 细胞（CD8⁺TEMRA）的含量占 T 细胞的 22.05%，显著高于正常参考范围，提示该患者可能存在长期慢性病毒感染；待测样品中 γ δ T 细胞的含量占 T 细胞的 30.2%，远高于正常参考范围，提示该患者由于常患“感冒”，可能存在慢性感染的情况。

[0303] 对比例 不同的 T 淋巴细胞表面标记对 T 淋巴细胞精细免疫分型和定量分析的影响

[0304] 不同的淋巴细胞亚群具有不同的细胞表面标志，但是，并不是任何细胞表面标志的抗体都可以用于淋巴细胞的免疫分型和定量分析。在 T 细胞精细免疫分型中，以辅助中心 / 效应记忆 T 细胞为例，可用 CD45RA 和 CD45RO 表面标志（即抗原）区分辅助初始 T 细胞和辅助记忆 T 细胞，CCR7/CD62L/CD27 任意一个标记区分辅助中心 T 细胞、辅助效应记忆 T 细胞。但 CD62L 易受 PBMC 提取过程中梯度离心和环境温度的影响；CCR7 和 CD45RA/CD45RO 均为连续表达，用同型对照或者 FMO 对照划门很可能影响结果准确性和可操作性，导致无法准确区分各个细胞亚群。

[0305] 图 12 为以 CD45RO 和 CCR7 相组合，以抗 CD45RO 的抗体和抗 CCR7 的抗体作为检测抗体，对待测样品进行淋巴细胞免疫分型，所得的流式图，从图中可知，相比本发明用 CD45RA 和 CD27 划分上述四群细胞，用 CD45RO 和 CCR7 组合划分的方式分群不清晰，对同型对照抗体滴度要求高，划门难度大。

[0306] 以上仅是本发明的优选实施方式，应当指出的是，上述优选实施方式不应视为对本发明的限制，本发明的保护范围应当以权利要求所限定的范围为准。对于本技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明的精神和范围内，还可以做出若干改进和润饰，这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

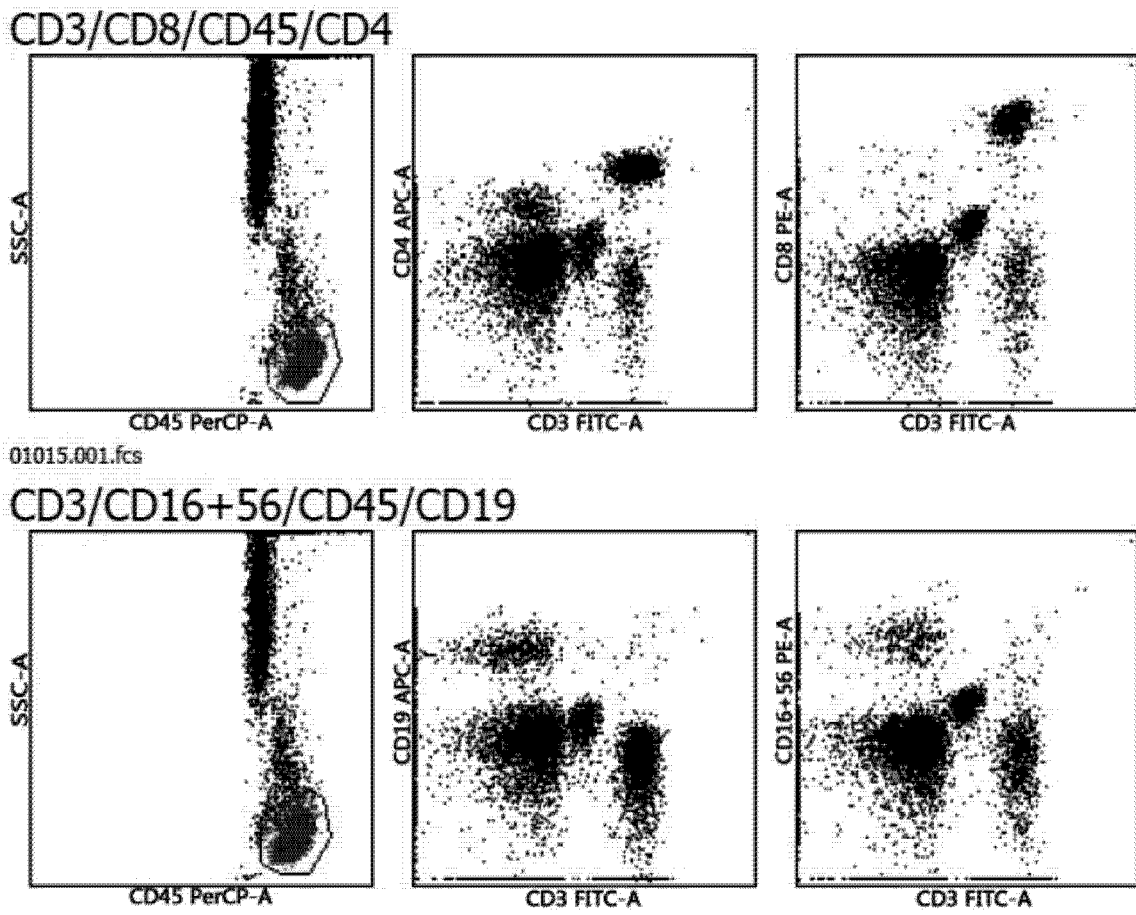


图 1

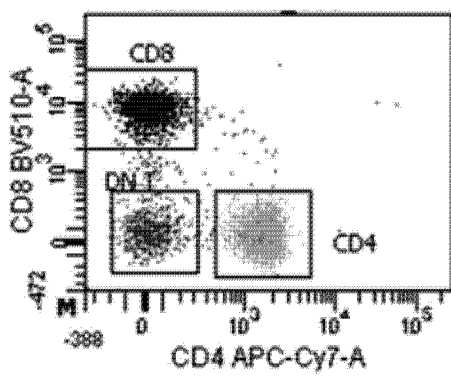


图 2-A

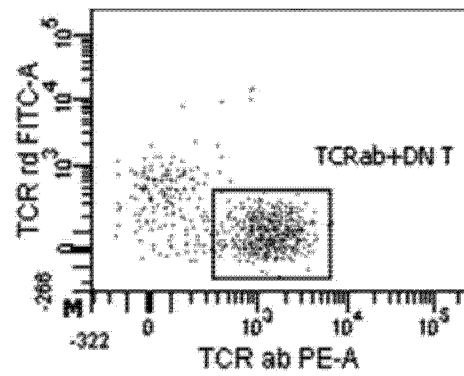


图 2-B

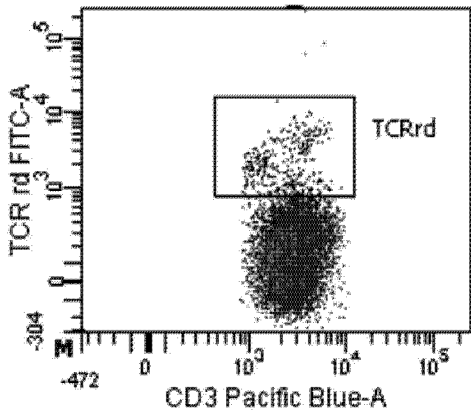


图 2-C

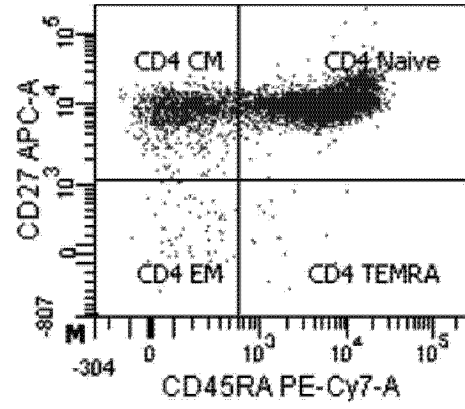


图 2-D

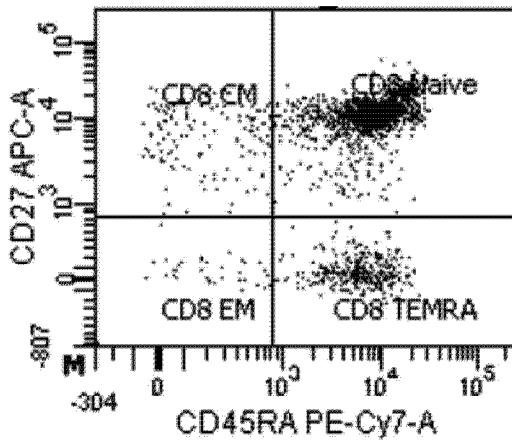


图 2-E

图 2

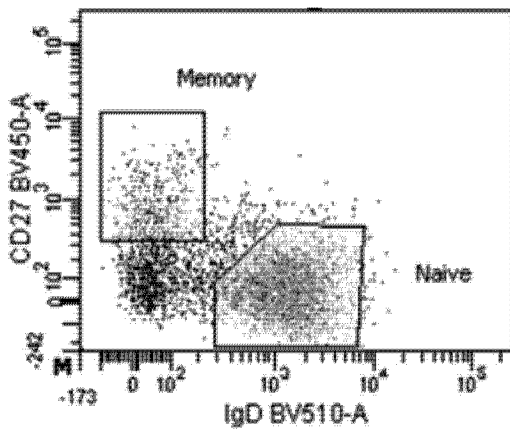


图 3-A

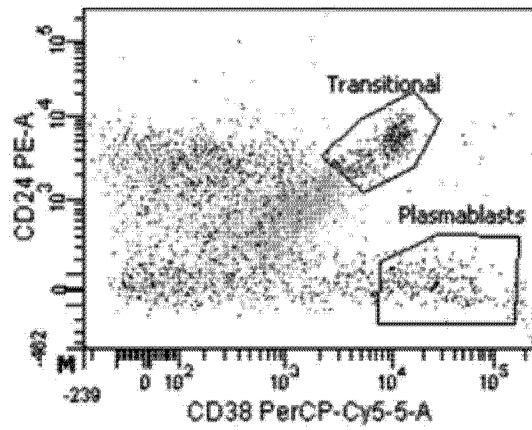


图 3-B

图 3

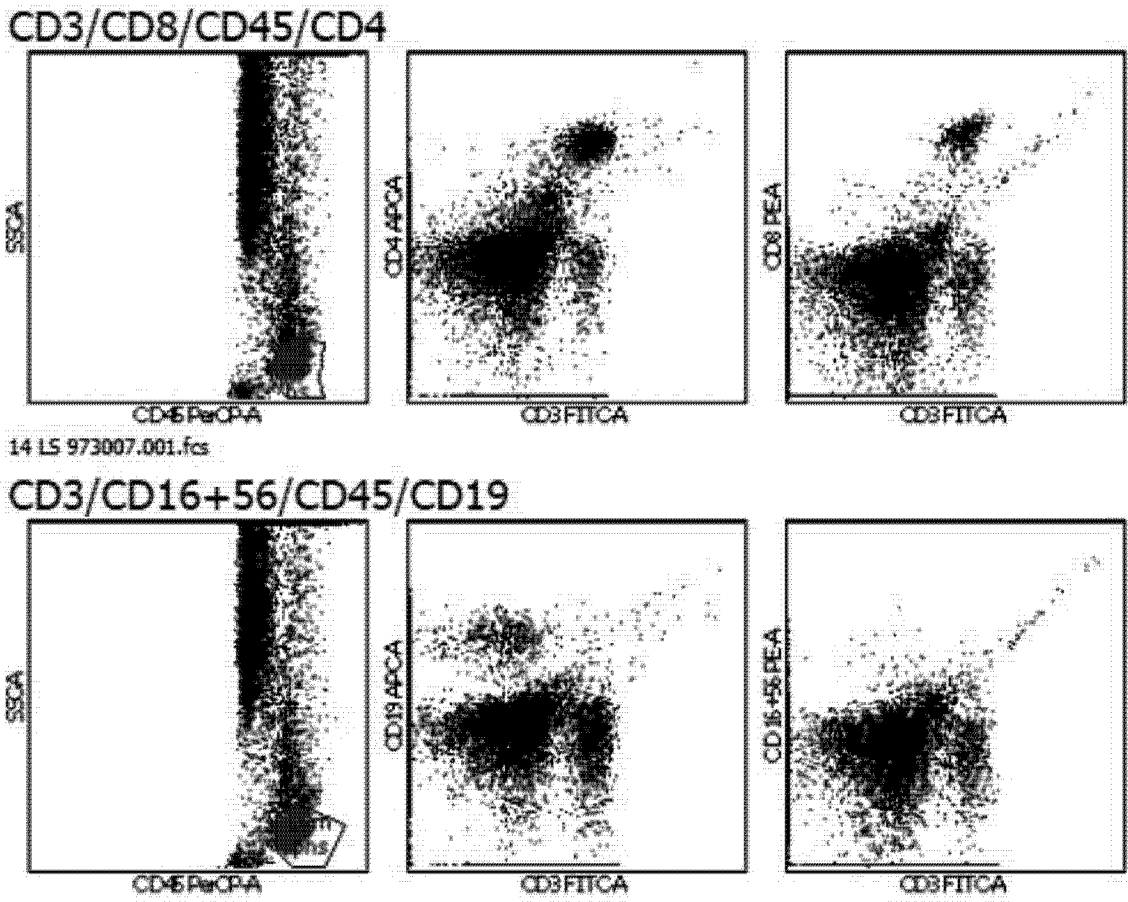


图 4

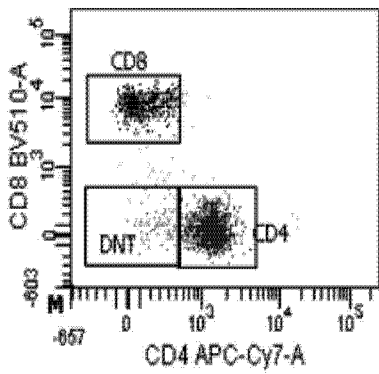


图 5-A

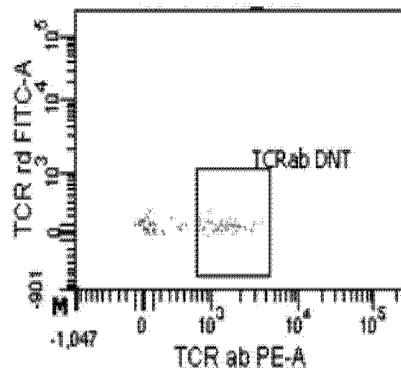


图 5-B

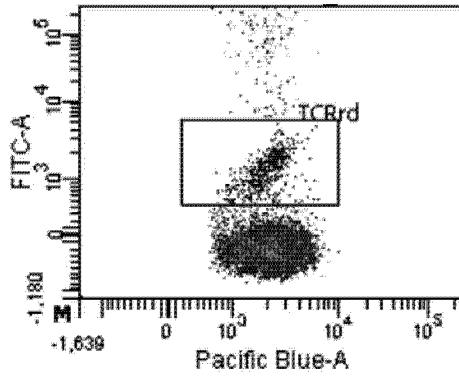


图 5-C

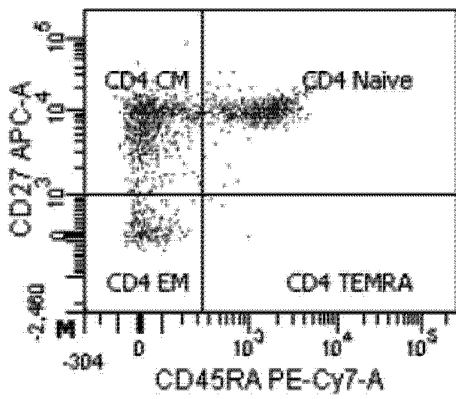


图 5-D

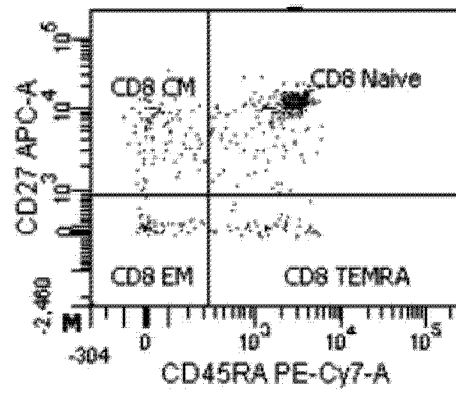


图 5-E

图 5

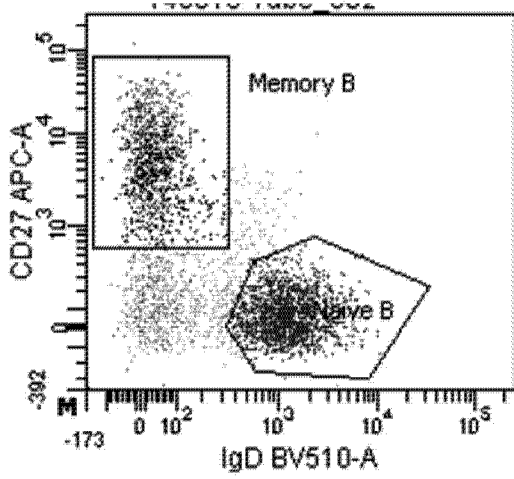


图 6-A

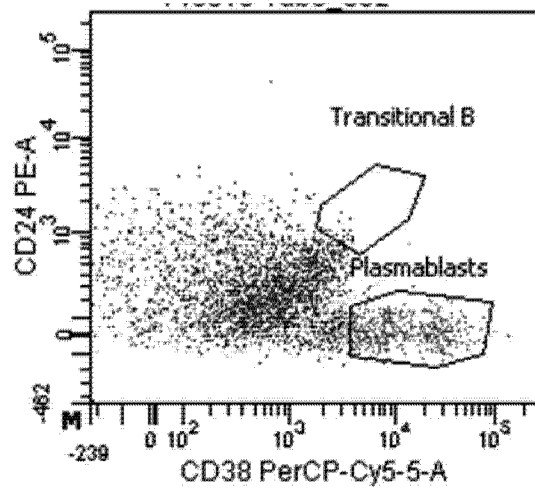


图 6-B

图 6

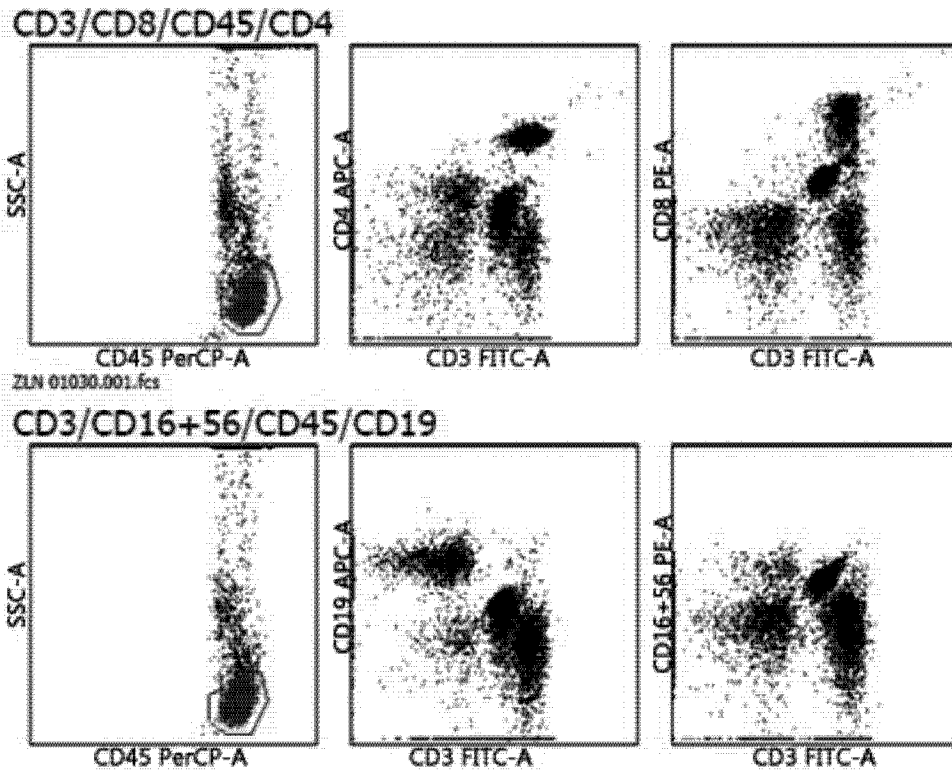


图 7

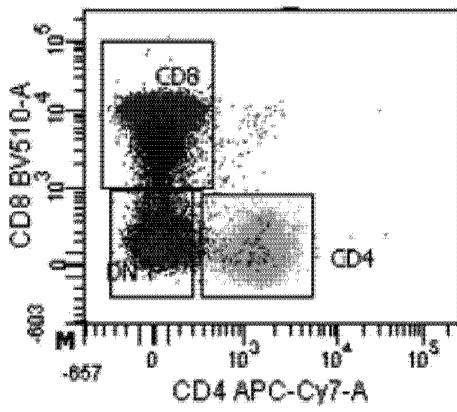


图 8-A

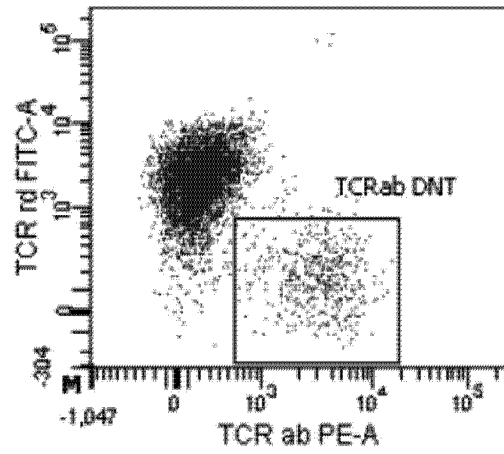


图 8-B

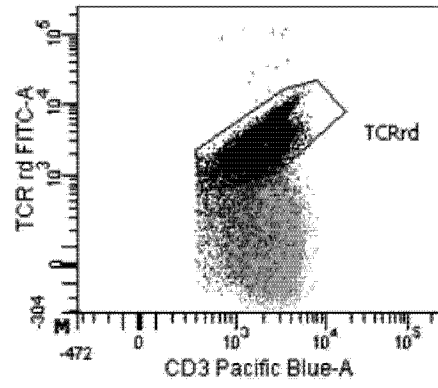


图 8-C

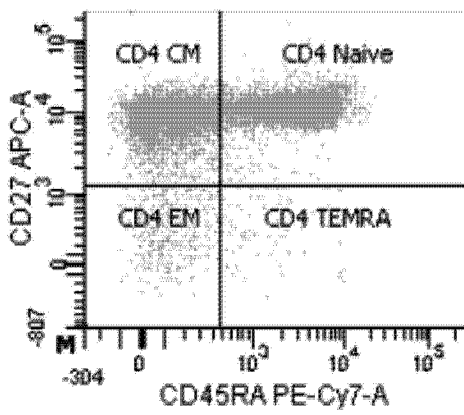


图 8-D

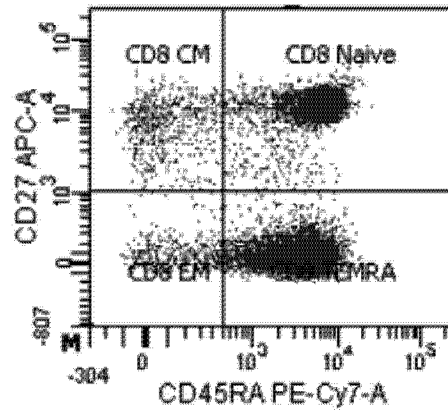


图 8-E

图 8

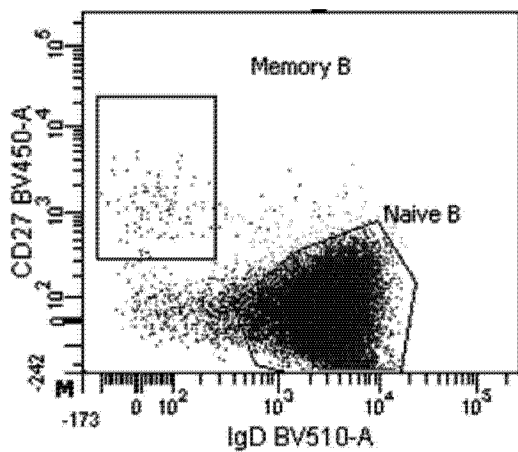


图 9-A

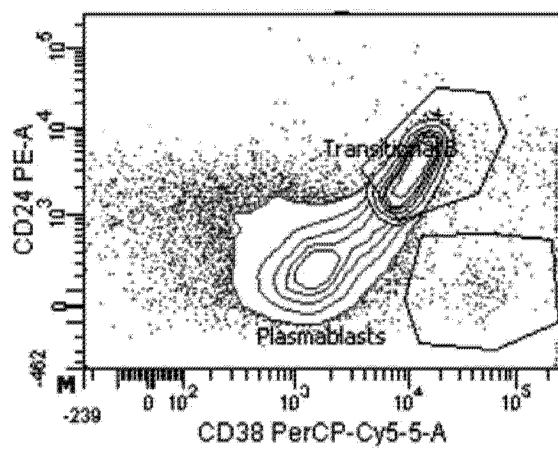


图 9-B

图 9

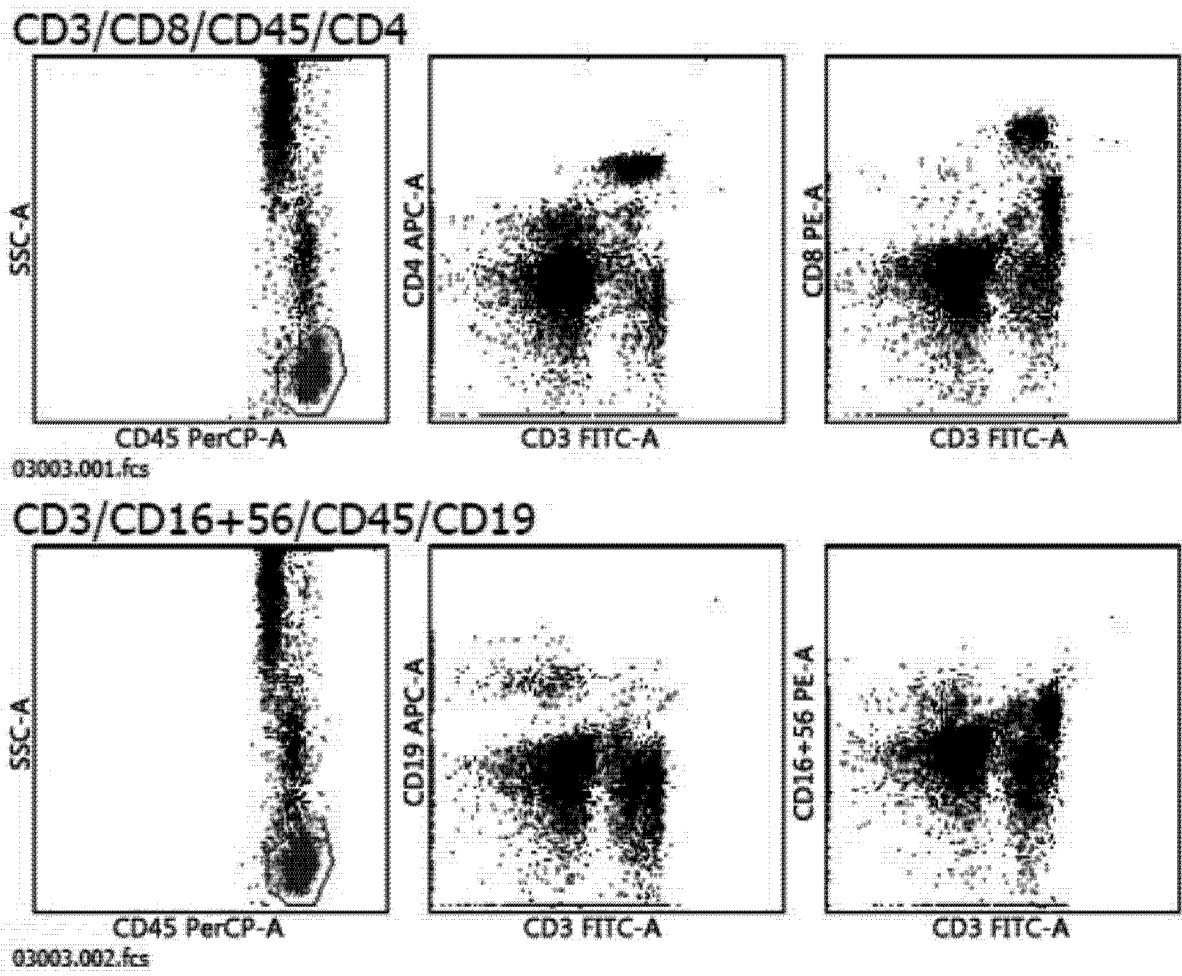


图 10

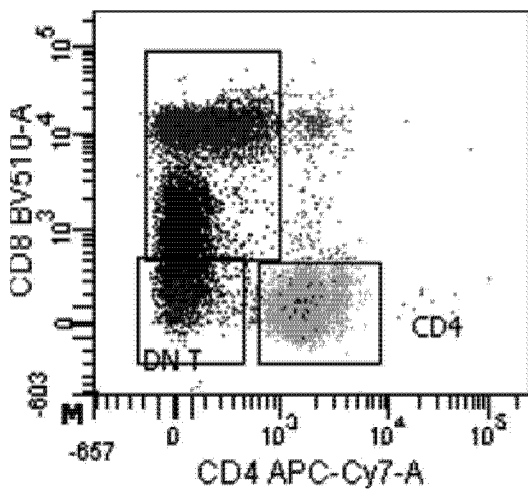


图 11-A

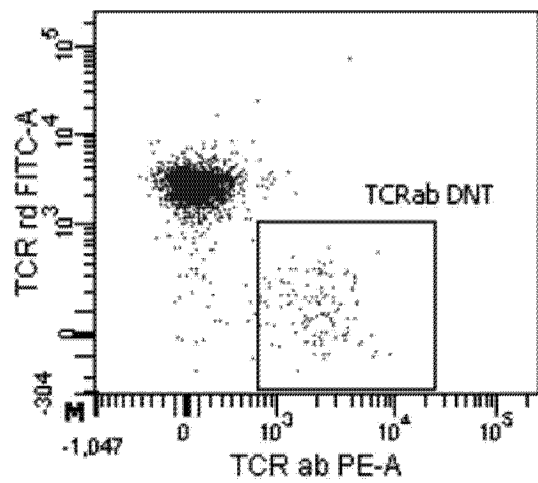


图 11-B

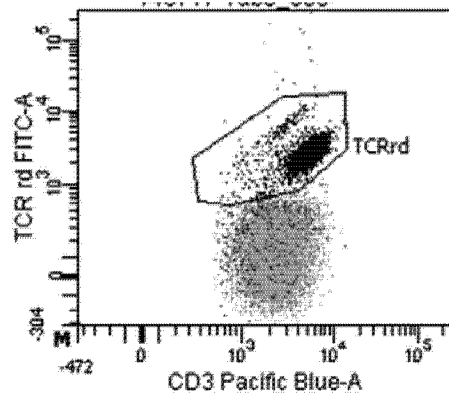


图 11-C

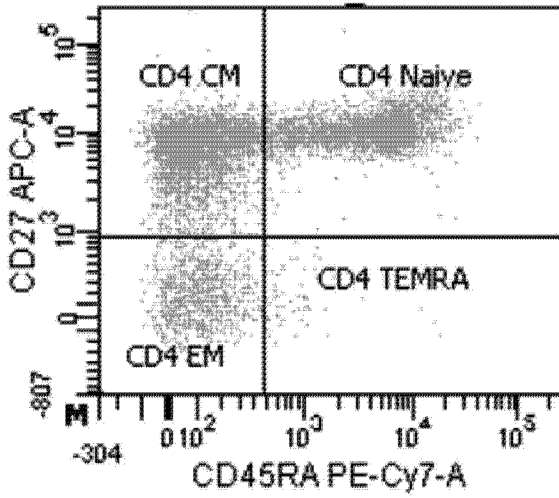


图 11-D

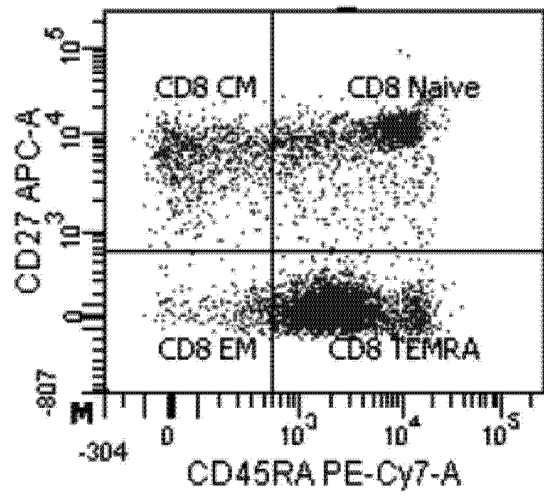


图 11-E

图 11

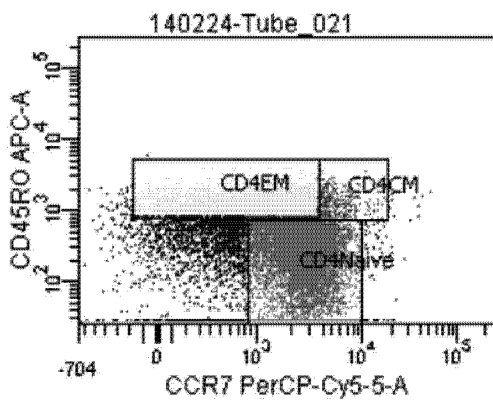


图 12-A

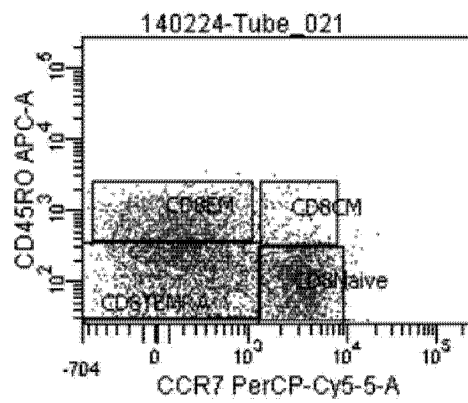


图 12-B

图 12

专利名称(译)	一种T淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN104360049A	公开(公告)日	2015-02-18
申请号	CN201410486072.1	申请日	2014-09-22
[标]申请(专利权)人(译)	重庆医科大学附属儿童医院		
申请(专利权)人(译)	重庆医科大学附属儿童医院		
当前申请(专利权)人(译)	重庆医科大学附属儿童医院		
[标]发明人	赵晓东 周丽娜		
发明人	赵晓东 周丽娜		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/505 G01N2333/705		
其他公开文献	CN104360049B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫学技术领域，公开了一种T淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒。本发明提供的T淋巴细胞免疫分型的方法，包括：取不同的荧光标记的抗体，与待检测样品混合，孵育后，经流式细胞术检测，得检测数据，分析所得检测数据；该抗体包括：抗TCR $\alpha\beta$ 的抗体、抗TCR $\gamma\delta$ 的抗体、抗CD3的抗体、抗CD4的抗体、抗CD8的抗体、抗CD27的抗体和抗CD45RA抗体。本发明的方法实现了对T淋巴细胞进行更加全面的精细免疫分型，所需待测样品少，操作简单、所需时间短、准确性高、可广泛应用于淋巴细胞亚群免疫分型。

流式管	T-1	T-2
荧光标记抗体	PE标记的同型抗体, 5 μ L	PE标记的抗TCR $\alpha\beta$ 抗体, 5 μ L
	FITC标记的同型抗体, 2.5 μ L	FITC标记的抗TCR $\alpha\beta$ 抗体, 2.5 μ L