



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107807234 A

(43)申请公布日 2018.03.16

(21)申请号 201711030933.5

(22)申请日 2017.10.30

(71)申请人 柏基香

地址 225001 江苏省扬州市广陵区南通西路98号

申请人 闫可 甄勇 张恒柱 卞家蓉

(72)发明人 闫可 柏基香 甄勇 张恒柱
卞家蓉

(74)专利代理机构 扬州市锦江专利事务所
32106

代理人 江平

(51)Int. Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书2页

(54)发明名称

一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法

(57)摘要

一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法,涉及脑内小胶质细胞吞噬能力的检测方法。将脑内小胶质细胞用完全培养基吹打均匀后稀释,加入带有荧光的乳胶微粒,经过4小时孵育后,对各孔板中材料进行清洗,分别取得上清液和沉淀;取沉淀,加入质量百分数为4%的多聚甲醛固定细胞,再用DAPI进行核染色,在荧光显微镜下进行拍照;再对照片进行自动荧光强度分析。荧光强度越高,则吞噬能力较强。或将上清液用酶标仪测试吸光度值。吸光度值越小,则未被吞噬的乳胶微粒越小,吞噬能力越强。本发明方法可用于准确评估动物或人机体吞噬细胞的免疫能力的强弱,同时为检测与吞噬细胞相关的细胞生物学检测方法提供可借鉴的理论依据。

1. 一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法,其特征在于包括以下步骤:

1) 将脑内小胶质细胞用含血清为10%的完全培养基充分吹打均匀,然后用培养基稀释后种植于孔板中;经过24小时后,再将带有荧光的乳胶微粒加入所述孔板中进行孵育;

2) 孵育过程经过4小时后,对各孔板中材料进行清洗,分别取得上清液和沉淀;

3) 取沉淀,加入质量百分数为4%的多聚甲醛固定细胞,再用DAPI进行核染色,然后在荧光显微镜下进行拍照;再对照片进行自动荧光强度分析;

或将上清液用酶标仪测试吸光度值。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述乳胶微粒的直径为2 μ m。

一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物细胞学实验的相关领域,尤其涉及血液内巨噬细胞及脑内小胶质细胞吞噬能力的检测方法。

背景技术

[0002] 目前关于吞噬细胞吞噬能力的检测,国内外研究集中在对动物体内吞噬细胞的检测,检测的多为循环系统中的单核-吞噬细胞(为不贴壁细胞),其检测过程如下:

将鸡血红细胞等小细胞注入动物腹腔,之后解剖动物收集腹腔吞噬细胞,通过染色、镜检,观察吞噬细胞对鸡血红细胞的吞噬能力。最后通过计算吞噬百分比及吞噬指数测定吞噬细胞的吞噬能力(吞噬率= $[\text{吞噬细菌的细胞数}/\text{中性粒细胞总数}(200\text{个})] \times 100\%$;吞噬指数= $(200\text{个} \text{粒细菌吞菌总数}/200\text{个} \text{中性粒细胞}) \times 100\%$)。

[0003] 以上方法的缺点是:1.仅限于动物体内检测,受动物个体差异影响,无法标准化。2.受腹腔内其他杂细胞的影响,无法获得高纯度的吞噬细胞,观察指标困难。3.无法针对单独某一种吞噬细胞进行检测。4.被吞噬的小细胞在镜下观察时,由于细胞间重叠导致漏计数,影响计算精准度。5.动物身上操作,医学伦理学及实验人员安全。

发明内容

[0004] 本发明目的是为了克服现有技术的不足,提供一种操作简单、能客观反映细胞吞噬实际能力的检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法

本发明包括以下步骤:

1)将脑内小胶质细胞用含血清为10%的完全培养基充分吹打均匀,然后用培养基稀释后种植于孔板中;经过24小时后,再将带有荧光的乳胶微粒加入所述孔板中进行孵育;

2)孵育过程经过4小时后,对各孔板中材料进行清洗,分别取得上清液和沉淀;

3)取沉淀,加入质量百分数为4%的多聚甲醛固定细胞,再用DAPI进行核染色,然后在荧光显微镜下进行拍照;再对照片进行自动荧光强度分析。

[0005] 荧光强度越高,说明吞噬能力较强。

[0006] 或将上清液用酶标仪测试吸光度值。吸光度值越小,则未被吞噬的乳胶微粒越小,间接地反映了吞噬能力越强。

[0007] 经反复试验,以上孵育过程经过4小时可达到脑内小胶质细胞吞噬的高峰,在达到高峰吞噬效果时,采用多聚甲醛固定细胞,可防止吞入的荧光乳胶微粒流失。

[0008] 目前尚无离体细胞吞噬能力检测的相关检测方法,本发明的优点体现在以下方法:

1.是对“离体细胞”的检测,细胞单一,更容易标准化。

[0009] 2.可以检测如小胶质细胞等“贴壁细胞”的吞噬能力。

[0010] 3.采用直径为2微米的荧光乳胶微粒,使吞噬细胞吞噬荧光乳胶微粒,便于观察和计算。

[0011] 4. 采用计算荧光强度及上清液吸光度值的方法, 避免原始方法中被吞噬颗粒视觉重叠导致漏计数, 达到标准计算。

[0012] 5. 避免将鸡血红细胞等注入动物体内, 采用直接体外培养, 简化操作流程, 避免注射动物导致操作者受伤, 避免动物的痛苦, 提高效率、缩短时间。

[0013] 6. 以上检测方法, 可以扩展到其它组织中的贴壁吞噬细胞及循环系统的吞噬细胞。本发明方法可用于评估动物或人机体吞噬细胞的免疫能力的强弱, 同时为检测与吞噬细胞相关的细胞生物学检测方法提供可借鉴的理论依据。

[0014] 进一步地, 本发明乳胶微粒的直径为 $2\mu\text{m}$ 。经多次反复验证发现, 如果乳胶微粒直径过大, 会造成吞噬细胞的吞噬困难; 反之, 如果乳胶微粒直径过小, 则会造成观察及计数困难。

具体实施方式

[0015] 1、采用已知公用的振荡法或胰酶消化法, 获得SD大鼠的小胶质细胞。

[0016] 2、将小胶质细胞用含血清为10%的完全培养基充分吹打均匀, 然后用培养基稀释至细胞浓度为 $2 \times 10^5/\text{mI}$, 分别种植于24孔板中, 每孔 0.5mI 。

[0017] 3、24小时后, 将 $5\mu\text{L}$ 带有红色荧光的直径为 $2\mu\text{m}$ 的乳胶微粒分别加入各孔, 并继续孵育4小时。经试验证明: 4小时达到吞噬高峰。

[0018] 4、经过4小时吞噬后, 清洗, 分别取得上清液和沉淀。

[0019] 5、取沉淀, 用质量分数为4%的多聚甲醛固定细胞, 防止吞入的荧光乳胶微粒流失。再用DAPI进行核染色, 然后在荧光显微镜下观察细胞是否发挥吞噬功能, 以及吞噬的乳胶微粒数量的多少并拍照。

[0020] 细胞吞噬能力的计算

采用荧光显微镜下单张照片分析计算平均荧光强度: 将各照片用image J等软件进行自动荧光强度分析, 分别取得各照片的乳胶微粒红色荧光强度。

[0021] 并对24张照片的乳胶微粒红色荧光强度进行计算, 得出平均荧光强度。

[0022] 如平均荧光强度越高, 则说明吞噬能力较高。

[0023] 6、另外, 还可分别对24份上清液用酶标仪测试, 分另取得24份吸光度值, 再计算平均吸光度值。

[0024] 如吸光度值越低, 则未被吞噬的乳胶微粒越少, 这也间接地说明了小胶质细胞吞噬能力较强。

专利名称(译)	一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法		
公开(公告)号	CN107807234A	公开(公告)日	2018-03-16
申请号	CN201711030933.5	申请日	2017-10-30
[标]申请(专利权)人(译)	白吉祥 甄勇		
申请(专利权)人(译)	柏基香 甄勇		
当前申请(专利权)人(译)	柏基香 甄勇		
[标]发明人	闫可 柏基香 甄勇 张恒柱 卞家蓉		
发明人	闫可 柏基香 甄勇 张恒柱 卞家蓉		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/533 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/5005 G01N33/533 G01N33/535		
代理人(译)	江平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测脑内小胶质细胞吞噬能力的方法，涉及脑内小胶质细胞吞噬能力的检测方法。将脑内小胶质细胞用完全培养基吹打均匀后稀释，加入带有荧光的乳胶微粒，经过4小时孵育后，对各孔板中材料进行清洗，分别取得上清液和沉淀；取沉淀，加入质量百分数为4%的多聚甲醛固定细胞，再用DAPI进行核染色，在荧光显微镜下进行拍照；再对照片进行自动荧光强度分析。荧光强度越高，则吞噬能力较强。或将上清液用酶标仪测试吸光度值。吸光度值越小，则未被吞噬的乳胶微粒越小，吞噬能力越强。本发明方法可用于准确评估动物或人体吞噬细胞的免疫能力的强弱，同时为检测与吞噬细胞相关的细胞生物学检测方法提供可借鉴的理论依据。