

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 1/30 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810069979.2

[43] 公开日 2008年12月24日

[11] 公开号 CN 101329230A

[22] 申请日 2008.7.14

[21] 申请号 200810069979.2

[71] 申请人 中国人民解放军第三军医大学

地址 400038 重庆市沙坪坝区高滩岩正街30号

[72] 发明人 倪兵 赵韧 吴玉章 许桂莲  
王庆红 付小岚 贾正才 王靖雪  
李健 石晶磊 黄泽民 田易  
田志强

[74] 专利代理机构 北京同恒源知识产权代理有限公司

代理人 赵荣之

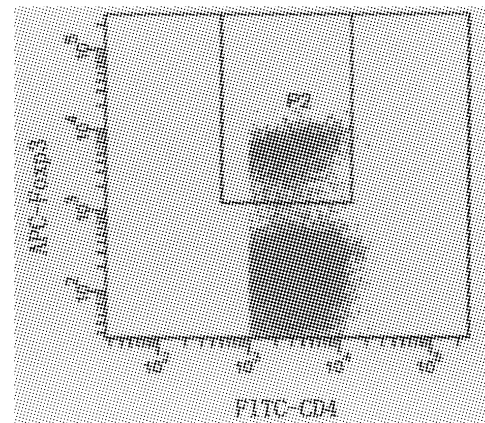
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

## [54] 发明名称

改进的免疫荧光细胞染色方法

## [57] 摘要

本发明公开了一种改进的免疫荧光细胞染色方法，包括固定/通透、通透、表面染色和核内染色、洗涤、重悬共5个步骤；本发明方法是对 eBioscience 公司的 Foxp3 免疫荧光细胞染色方法的改进，将二步多重染色法改为一步多重染色法，同时进行细胞表面染色和核内染色，具有操作简便，染色快速，节约试剂，降低成本等优点，研究显示本发明方法与 eBioscience 公司方法无显著性差异，可以用于细胞表面和核内同时染色，具有良好的应用前景和推广价值。



1、改进的免疫荧光细胞染色方法，包括以下步骤：

a、固定/通透：在分离的细胞沉淀中，加入固定/通透液，混匀，于温度 2 - 8℃ 避光孵育 30-60 分钟；

b、通透：在经步骤 a 固定/通透处理后的细胞悬液中，加入通透液，离心洗涤细胞，弃上清；

c、表面染色和核内染色：在经步骤 b 通透处理后的细胞沉淀中，加入细胞表面抗原的荧光标记抗体和核内抗原的荧光标记抗体，于温度 2 - 8℃ 避光孵育至少 30 分钟；同时设阴性同型对照；

d、洗涤：在经步骤 c 染色处理后的细胞悬液中，加入通透液，离心洗涤细胞，弃上清；

e、重悬：在经步骤 d 洗涤处理后的细胞沉淀中，加入流式细胞术染色液，重悬细胞。

2、根据权利要求 1 所述的改进的免疫荧光细胞染色方法，其特征在于：所述步骤 c 细胞表面抗原的荧光标记抗体选自荧光标记的抗 CD4 抗体或抗 CD25 抗体，或用不同颜色荧光标记的抗 CD4 抗体和抗 CD25 抗体。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的改进的免疫荧光细胞染色方法，其特征在于：所述步骤 c 细胞核内抗原的荧光标记抗体选自荧光标记的抗 Foxp3 抗体。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的改进的免疫荧光细胞染色方法，其特征在于：所述步骤 a 和步骤 c 的孵育温度优选地为 4℃，孵育时间优选地为 30 分钟。

5、根据权利要求 3 所述的改进的免疫荧光细胞染色方法，其特征在于：所述步骤 a 和步骤 c 的孵育温度优选地为 4℃，孵育时间优选地为 30 分钟。

## 改进的免疫荧光细胞染色方法

### 技术领域

本发明涉及生物领域，特别涉及改进的免疫荧光细胞染色方法。

### 背景技术

调节性T细胞 (regulatory T cell, Treg) 是一类具有免疫抑制作用的T细胞，是机体维持自身耐受的重要组成部分，在免疫相关性疾病、肿瘤免疫和器官移植免疫等方面具有重要意义。目前，免疫相关性疾病、肿瘤和器官移植患者外周血Treg细胞表达水平及其临床意义已成为研究的重点。已有研究表明，Treg细胞比例上升可能是导致系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、肺癌、胃癌、卵巢癌、鼻咽癌、乙肝病毒感染等免疫抑制的原因之一；患者治疗前后Treg细胞数量的变化可作为疗效评估的指标之一。传统鉴定Treg细胞主要是通过CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>双阳性来定义，但这种方法并不完全准确，因为CD25分子在部分活化的CD4<sup>+</sup>非Treg细胞上也会表达。研究发现，转录因子Foxp3 (forkhead box P3, Scurfin) 与Treg细胞的生长发育和功能维持密切相关，在小鼠特异性表达于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞；在人类不仅表达于CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T细胞，还表达于CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>T细胞，但在CD4<sup>+</sup>T细胞中的表达明显高于CD8<sup>+</sup>T细胞，是目前公认的Treg细胞的特异、敏感标志。

由此，美国 eBioscience 公司开发了一套针对 Foxp3 的免疫荧光细胞染色试剂和方案，用于流式细胞术检测 Treg 细胞，现已成为 Treg 细胞染色检测的常规方法，主要包括以下步骤：

a、表面染色：在细胞悬液中，加入细胞表面抗原（如 CD4、CD25 等）的荧光标记抗体，于温度 2 - 8℃ 避光孵育 20 分钟；同时设阴性同型对照；

b、洗涤：在经步骤 a 表面染色处理后的细胞悬液中，加入预冷的流式细胞术染色液（Flow Cytometry Staining Buffer）或预冷的磷酸盐缓冲液（PBS），离心洗涤细胞，弃上清；重复洗涤 2 次；

c、固定/通透：在经步骤 b 洗涤处理后的细胞沉淀中，加入固定/通透液（Fixation/Permeabilization），混匀，于温度 2-8℃ 避光孵育 30-60 分钟；

d、通透：在经步骤 c 固定/通透处理后的细胞悬液中，加入通透液（Permeabilization Buffer），离心洗涤细胞，弃上清；重复洗涤 1 次；

e、核内染色：在经步骤 d 通透处理后的细胞沉淀中，加入 Foxp3 荧光标记抗体，混匀，于温度 2-8℃ 避光孵育至少 30 分钟；同时设阴性同型对照；

f、洗涤：在经步骤 e 核内染色处理后的细胞悬液中，加入通透液，离心洗涤细胞，弃上清；重复洗涤 1 次；

g、重悬：在经步骤 f 洗涤处理后的细胞沉淀中，加入流式细胞术染色液，重悬细胞。

此方法为二步多重染色法，先进行细胞表面抗原染色，再进行细胞核内抗原染色，具有良好的染色效果，能够准确地识别 Treg 细胞，但存在操作较繁琐、耗时、且成本较高的缺点。因此，需要对此方法进行改进和优化，既能够保持良好的细胞染色效果，又可以简化操作、缩短时间、节省试剂、降低成本。

## 发明内容

有鉴于此，本发明的目的在于提供一种改进的免疫荧光细胞染色方法，可以同时细胞表面抗原和核内抗原进行多重染色，具有良好的染色效果，且方法简便、快速、经济。

本发明的改进的免疫荧光细胞染色方法，包括以下步骤：

a、固定/通透：在分离的细胞沉淀中，加入固定/通透液，混匀，于温度 2-8℃ 避光孵育 30-60 分钟；

b、通透：在经步骤 a 固定/通透处理后的细胞悬液中，加入通透液，离心洗涤细胞，弃上清；

c、表面染色和核内染色：在经步骤 b 通透处理后的细胞沉淀中，加入细胞表面抗原的荧光标记抗体和核内抗原的荧光标记抗体，于温度 2 - 8℃ 避光孵育至少 30 分钟；同时设阴性同型对照；

d、洗涤：在经步骤 c 染色处理后的细胞悬液中，加入通透液，离心洗涤细胞，弃上清；

e、重悬：在经步骤 d 洗涤处理后的细胞沉淀中，加入流式细胞术染色液，重悬细胞。

进一步，所述步骤 c 细胞表面抗原的荧光标记抗体选自荧光标记的抗 CD4 抗体或抗 CD25 抗体，或用不同颜色荧光标记的抗 CD4 抗体和抗 CD25 抗体；

进一步，所述步骤 c 细胞核内抗原的荧光标记抗体选自荧光标记的抗 Foxp3 抗体；

进一步，所述步骤 a 和步骤 c 的孵育温度优选地为 4℃，孵育时间优选地为 30 分钟。

本发明的有益效果在于：本发明对 eBioscience 公司的 Foxp3 免疫荧光细胞染色方法作了改进和优化，省略了原方法中的步骤 a 和步骤 b，改二步多重染色法为一步多重染色法，将细胞表面染色和核内染色同时进行。本发明方法具有如下优点：（1）染色和洗涤步骤减少，操作简便，时间缩短约 1 小时，染色快速；（2）原方法在步骤 a 表面染色和步骤 e 核内染色时均需设置相应的阴性同型对照，而本发明方法只需在步骤 c 进行表面染色和核内染色时设置阴性同型对照，操作简单且节约时间；（3）由于染色、洗涤步骤和阴性同型对照的减少，染色试剂如固定/通透液、通透液、流式细胞术染色液和 PBS 等的使用量减少，成本降低。分别采用本发明方法和 eBioscience 公司方法对 Ba1b/c 小鼠的脾脏淋巴细胞进行 CD4 和 Foxp3 染色，再用流式细胞仪检测，结果显示两种方法无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。本发明的改进的免疫

荧光细胞染色方法，不仅可以用于 Treg 细胞的染色和流式细胞术检测；采用其它细胞相应的表面抗原和核内抗原的荧光标记抗体，还可以用于其它细胞如 Th1、Th2、Th17 等细胞的表面和核内转录因子同时染色。因此，本发明方法具有良好的应用前景和推广价值，具有突出的实质性特点和显著的进步。

## 附图说明

为了使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚，下面将结合附图对本发明作进一步的详细描述，其中：

图 1 为采用本发明方法染色的脾脏淋巴细胞的流式细胞图；

图 2 为采用 eBioscience 公司方法染色的脾脏淋巴细胞的流式细胞图。

## 具体实施方式

以下将参照附图，对本发明的优选实施例进行详细的描述。

本实施例采用本发明的改进的免疫荧光细胞染色方法对 Balb/c 小鼠的脾脏淋巴细胞进行 CD4 和 Foxp3 染色，再用流式细胞仪检测，并与 eBioscience 公司方法进行比较。

实验动物：6-8 周龄 Balb/c 小鼠 3 只，由第三军医大学实验动物中心提供。

实验试剂：异硫氰酸荧光素（FITC）标记的大鼠抗小鼠 CD4 抗体（FITC-CD4）、别藻蓝蛋白（APC）标记的大鼠抗小鼠 Foxp3 抗体（APC-Foxp3），同型对照：FITC 标记的大鼠抗小鼠 IgG2a（FITC-IgG2a）、APC 标记的大鼠抗小鼠 IgG2a（APC-IgG2a），以及固定/通透液、通透液、流式细胞术染色液均为 eBioscience 公司产品。

实验设备：FACS Aria 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

实验方法：包括以下步骤：

- a、固定/通透：在分离的脾脏淋巴细胞沉淀（细胞数为  $1 \times 10^6$  个）中，加入固定/通透液 1 ml，脉冲式涡旋混匀，于温度  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 分钟；
- b、通透：在经步骤 a 固定/通透处理后的细胞悬液中，加入通透液 1 ml，于温度  $4^\circ\text{C}$ 、300 g 离心 5 分钟洗涤细胞，弃上清；重复洗涤 1 次；
- c、表面染色和核内染色：在经步骤 b 通透处理后的细胞沉淀中，加入通透液 100  $\mu\text{l}$  重悬细胞，再加入浓度为 0.5 mg/ml 的 FITC-CD4 1  $\mu\text{l}$ 、浓度为 0.2 mg/ml 的 APC-Foxp3 2  $\mu\text{l}$ ，混匀，于温度  $4^\circ\text{C}$  避光孵育 30 分钟；同时设 1 个阴性同型对照：以 FITC-IgG2a 和 APC-IgG2a 代替 FITC-CD4 和 APC-Foxp3；
- d、洗涤：在经步骤 c 染色处理后的细胞悬液中，加入通透液 1 ml，离心洗涤细胞，弃上清；重复洗涤 1 次；
- e、重悬：在经步骤 d 洗涤处理后的细胞沉淀中，加入流式细胞术染色液 100  $\mu\text{l}$ ，重悬细胞。
- f、检测：用流式细胞仪检测，FACS Diva4.1 软件获取 10000 个细胞数据进行分析；以 FITC-CD4 设“门”于  $\text{CD4}^+\text{T}$  细胞，分析 Foxp3 的表达率，结果以百分比表示。

实验结果：采用本发明方法和 eBioscience 公司方法染色的脾脏淋巴细胞的流式细胞图分别见图 1、图 2，图 1-2 中的方框 P2 部分显示  $\text{CD4}^+\text{T}$  细胞中 Foxp3<sup>+</sup> 细胞所占百分比，如图所示，两种方法检测结果基本一致；两种方法染色的脾脏淋巴细胞的流式检测数据比较见表 1，经 *t* 检验分析，两种方法无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

表 1、采用本发明方法与 eBioscience 公司方法染色的检测结果比较

染色方法	CD4 <sup>+</sup> T 细胞中 Foxp3 <sup>+</sup> 细胞所占比例 (%)			
	1	2	3	$\bar{x} \pm s$
本发明方法	12.2	10.5	11.6	$10.80 \pm 0.83$
eBioscience 公司方法	12.0	9.2	11.2	$11.43 \pm 0.50$

结论：本发明方法具有良好的染色效果，可以用于细胞表面和核内同时染色。不仅可以用于 Treg 细胞的染色和流式细胞术检测；采用其它细胞相应的表面抗原和核内抗原的荧光标记抗体，还可以用于其它细胞如 Th1、Th2、Th17 等细胞的表面和核内转录因子同时染色。

最后说明的是，以上实施例仅用以说明本发明的技术方案而非限制，尽管通过参照本发明的优选实施例已经对本发明进行了描述，但本领域的普通技术人员应当理解，可以在形式上和细节上对其作出各种各样的改变，而不偏离所附权利要求书所限定的本发明的精神和范围。

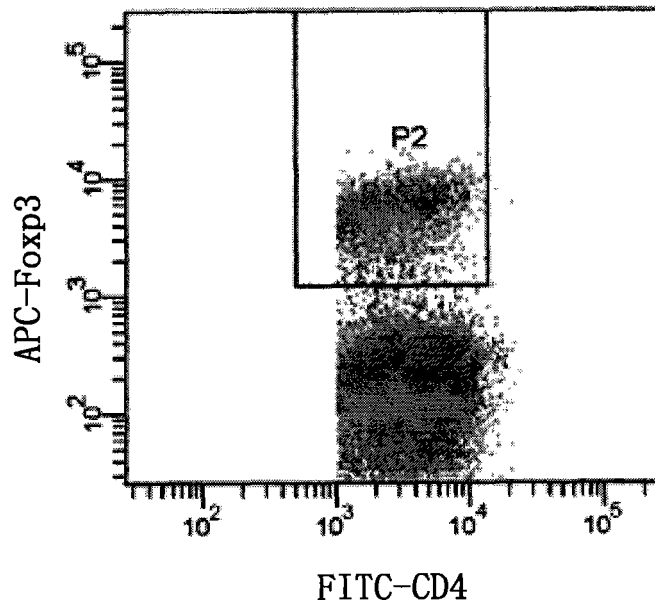


图 1

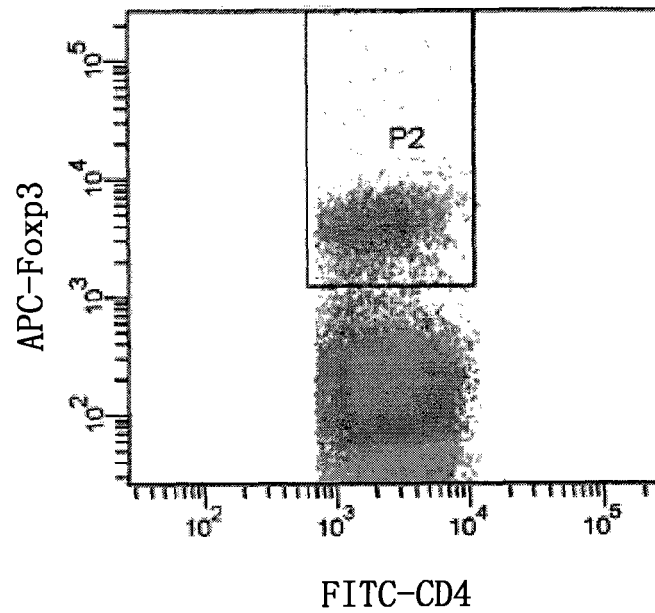


图 2

专利名称(译)	改进的免疫荧光细胞染色方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101329230A</a>	公开(公告)日	2008-12-24
申请号	CN200810069979.2	申请日	2008-07-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三军医大学		
[标]发明人	倪兵 赵韧 吴玉章 许桂莲 王庆红 付小岚 贾正才 王靖雪 李健 石晶磊 黄泽民 田易 田志强		
发明人	倪兵 赵韧 吴玉章 许桂莲 王庆红 付小岚 贾正才 王靖雪 李健 石晶磊 黄泽民 田易 田志强		
IPC分类号	G01N1/30 G01N33/533		
其他公开文献	CN101329230B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种改进的免疫荧光细胞染色方法，包括固定/通透、通透、表面染色和核内染色、洗涤、重悬共5个步骤；本发明方法是对eBioscience公司的Foxy3免疫荧光细胞染色方法的改进，将二步多重染色法改为一步多重染色法，同时进行细胞表面染色和核内染色，具有操作简便，染色快速，节约试剂，降低成本等优点，研究显示本发明方法与eBioscience公司方法无显著性差异，可以用于细胞表面和核内同时染色，具有良好的应用前景和推广价值。

