



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101329230 B

(45) 授权公告日 2010. 10. 20

(21) 申请号 200810069979. 2

CN 1314414 A, 2001. 09. 26, 全文.

(22) 申请日 2008. 07. 14

审查员 王伟

(73) 专利权人 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 11275
代理人 赵荣之

(51) Int. Cl.

G01N 1/30(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

(56) 对比文件

JP 60-157050 A, 1985. 08. 17, 全文.

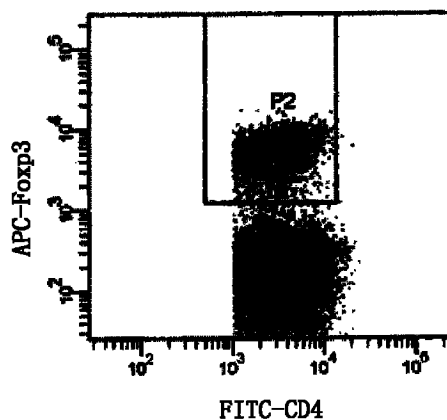
权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图 1 页

(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:所述染色细胞为调节性 T 细胞;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;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。

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 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

[0001] 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

[0002] 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⁺CD25⁺ 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⁺ 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⁺CD25⁺T 细胞;在人类不仅表达于 CD4⁺CD25⁺T 细胞,还表达于 CD8⁺CD28⁻T 细胞,但在 CD4⁺T 细胞中的表达明显高于 CD8⁺T 细胞,是目前公认的 Treg 细胞的特异、敏感标志。

[0003] 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:

[0004] 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°C 避光孵育 20 分钟;同时设阴性同型对照;

[0005] 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;

[0006] 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°C 避光孵育 30-60 分钟;

[0007] 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;

[0008] 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°C 避光孵育至少 30 分钟;同时设阴性同型对照;

[0009] 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;

[0010] 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。

[0011] 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

[0012] 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
对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。

[0013] 本发明的改进的免疫荧光细胞染色方法,包括以下步骤:

[0014] 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;

[0015] 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;

[0016] 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;

[0017] 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;

[0018] 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。

[0019] 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;

[0020] 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;

[0021] 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。

[0022] 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 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,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

[0023] 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:

[0024] 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;

[0025] 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

[0026] 以下将参照附图,对本发明的优选实施例进行详细的描述。

[0027] 本实施例采用本发明的改进的免疫荧光细胞染色方法对 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,并与 eBioscience 公司方法进行比较。

[0028] 实验动物:6-8 周龄 Ba1b/c 小鼠 3 只,由第三军医大学实验动物中心提供。

[0029] 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。

[0030] 实验设备:FACS Aria 流式细胞仪为美国 BD 公司产品。

[0031] 实验方法:包括以下步骤:

[0032] a、固定 / 通透:在分离的脾脏淋巴细胞沉淀 (细胞数为 1×10^6 个) 中,加入固定 / 通透液 1ml,脉冲式涡旋混匀,于温度 4°C 避光孵育 30 分钟;

[0033] 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 1ml,于温度 4°C 、300g 离心 5 分钟洗涤细胞,弃上清;重复洗涤 1 次;

[0034] 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 0.5mg/ml 的 FITC-CD4 $1 \mu\text{l}$ 、浓度为 0.2mg/ml 的 APC-Foxp3 $32 \mu\text{l}$,混匀,于温度 4°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;

[0035] d、洗涤:在经步骤 c 染色处理后的细胞悬液中,加入通透液 1ml,离心洗涤细胞,弃上清;重复洗涤 1 次;

[0036] 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。

[0037] f、检测:用流式细胞仪检测,FACS Diva 4.1 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。

[0038] 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⁺ 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 ($P > 0.05$)。

[0039] 表 1、采用本发明方法与 eBioscience 公司方法染色的检测结果比较

[0040]

染色方法	CD4 ⁺ T 细胞中 Foxp3 ⁺ 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 ± 0.83
eBioscience 公司方法	12.0	9.2	11.2	11.43 ± 0.50

[0041] 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。

[0042] 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。

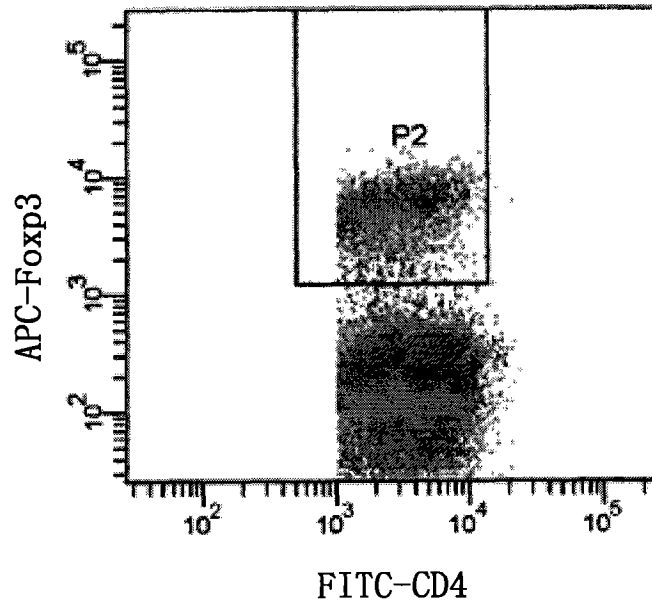


图 1

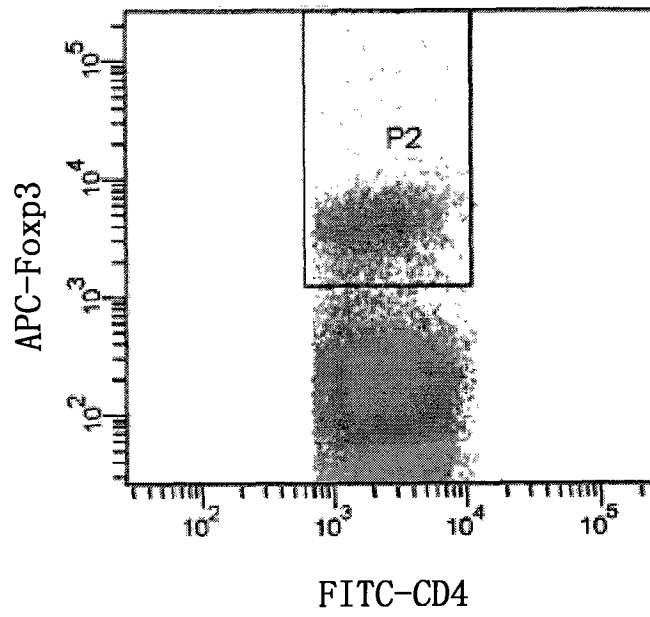


图 2

专利名称(译)	改进的免疫荧光细胞染色方法		
公开(公告)号	CN101329230B	公开(公告)日	2010-10-20
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		
审查员(译)	王伟		
其他公开文献	CN101329230A		
外部链接	Espacenet SIPO		

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。

