

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910017282.5

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/52 (2006.01)

G01N 21/31 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

[43] 公开日 2010 年 2 月 17 日

[11] 公开号 CN 101650364A

[22] 申请日 2009.7.31

[21] 申请号 200910017282.5

[71] 申请人 山东省医学科学院基础医学研究所

地址 250061 山东省济南市历下区经十路 89 号

[72] 发明人 王郡甫 张建华 陈 红

[74] 专利代理机构 济南圣达专利商标事务所有限公司

代理人 杨 琪

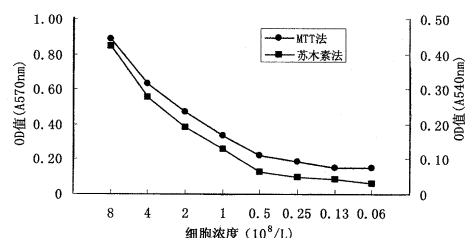
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 3 页

[54] 发明名称

苏木素在检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应中的应用

[57] 摘要

本发明公开了一种利用苏木素检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应的测定方法：将贴壁肿瘤细胞悬液置于细胞培养板中，贴壁后，加入待测免疫效应细胞，构成一定的效靶比，于培养箱中共孵育适当时间后，取出，弃上清，用 PBS 洗板 3 次（以去除效应细胞）后，立即加入 4% 多聚甲醛固定 30 分钟，然后加入苏木素染色液， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ，染色 20 分钟后，蒸馏水洗 3 ~ 5 次（以去除未结合的染料），室温晾干；加入 1% 的盐酸酒精脱色， $100\mu\text{l}/\text{孔}$ ，脱色后立即用酶标仪测定 540nm 处的吸光度值并记录，计算各效靶比的杀伤率，公式如图所示。研究表明本方法具有特异、稳定、简便、经济等优点。



$$\text{杀伤率}(\%) = 1 - \frac{OD(E+T) - OD(E)}{OD(T)} \times 100\%$$

1. 苏木素在检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用，其特征在于，应用方法如下：将贴壁肿瘤细胞悬液置于细胞培养板中，贴壁后，加入待测免疫效应细胞，构成一定的效靶比，于培养箱中共孵育适当时间后，取出，弃上清，用PBS洗板3次后，立即加入4%多聚甲醛固定30分钟，然后加入苏木素染色液，100 μl/孔，染色20分钟后，蒸馏水洗3~5次，室温晾干；加入1%的盐酸酒精脱色，100 μl/孔，脱色后立即用酶标仪测定540nm处的吸光度值并记录，计算各效靶比的杀伤率，公式如下：

$$\text{杀伤率}(\%) = 1 - \frac{OD(E+T) - OD(E)}{OD(T)} \times 100\%;$$

其中，OD(E)表示效应细胞(E)孔OD值，OD(T)表示靶细胞(T)孔OD值，OD(E+T)表示效应细胞(E)+靶细胞(T)孔OD值。

苏木素在检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应中的应用

技术领域

本发明涉及苏木素在检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应中的应用。

背景技术

NK、CTL 和 DC 等免疫效应细胞具有重要的抗肿瘤作用。随着肿瘤免疫学研究的深入进展,显示细胞介导的细胞毒效应测定方法应运而生,为肿瘤生物治疗的基础和临床研究奠定了基础。目前,检测细胞介导的细胞毒效应方法较多,基本可分为同位素法和非同位素法两类。同位素法包括 $4\text{h}^{51}\text{Cr}$ 释放法和 ^3H -TdR 掺入法。这两种方法虽然敏感、特异,但前者存在半衰期短、自然释放率高等问题,后者则需要复杂的仪器设备,同时二者均可造成环境污染,使其应用受到限制。非同位素法包括流式细胞分析(FACS)法、乳酸脱氢酶法、微量 NAG 释放法、结晶紫染色法和克隆形成法等,诸多方法均有不尽人意之处,例如 FACS 法特异、敏感,但需要大型仪器设备和配套试剂,不适合基层推广应用。MTT 比色法敏感、简便、无环境污染,不需复杂仪器设备,近年来通过对各种实验条件的不断完善,一直用于细胞增殖活性和细胞毒效应测定。各种 NK 细胞系的相继建立为进一步研究 NK 细胞的功能提供了良好的模型。然而 NK 细胞系一般来源于恶性肿瘤,具有倍增周期短、代谢率高等生物学特性,在采用 MTT 比色法检测该类细胞介导的细胞毒效应时,重复性较差的情况时有发生,基于此,建立稳定、特异、简便、经济的检测细胞介导的细胞毒效应的方法具有重要的应用价值。

苏木素是一种天然染料,通过氧化变为苏木红,通常用于生物组织切片细胞核的染色。目前尚无将苏木素染色法用于测定细胞介导的细胞毒效应测定的相关研究报道。

发明内容

针对上述现有技术,本发明提供了一种利用苏木素检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应的测定方法,也是苏木素的一种新用途。

具体应用时,方法如下:将贴壁肿瘤细胞悬液置于细胞培养板中,贴壁后,加入待测免疫效应细胞,构成一定的效靶比,于培养箱中共孵育适当时间后,取出,弃上清,用 PBS 洗板 3 次(以去除效应细胞)后,立即加入 4%多聚甲醛固定 30 分钟,然后加入苏木素染色液, $100\mu\text{l}$ /孔,染色 20 分钟后,蒸馏水洗 3~5 次(以去除未结合的染料),室温晾干;加入 1%的盐酸酒精脱色, $100\mu\text{l}$ /孔,脱色后立即用酶标仪测定 540nm 处的吸光度值并记录,计算各效靶比的杀伤率,公式如下:

$$\text{杀伤率}(\%) = 1 - \frac{OD(E+T) - OD(E)}{OD(T)} \times 100\%;$$

其中, OD(E) 表示效应细胞(E)孔 OD 值, OD(T) 表示靶细胞(T)孔 OD 值, OD(E+T) 表示效应细胞(E)+靶细胞(T)孔 OD 值。

在加入苏木素染色液前, 用 4% 的多聚甲醛固定待测细胞液(效应细胞已被洗去, 主要用来固定靶细胞, 但也有部分未洗去的效应细胞被固定), 固定 30 分钟。

所述苏木素染色液是按文献【《常用苏木素几种配方与染色结果的比较》(李文, 张赛霞, 解剖学杂志, 2000; 23 (4): 393)】中的描述配制的, 方法如下所示: 1.5g 苏木素用 5ml 无水乙醇溶解, 蒸馏水溶解钾明矾(加温至 90℃, 勿煮沸), 将溶解的苏木素和碘酸钠同时加入钾明矾水溶液内, 流水冷却至室温, 再加甘油, 震荡 1 小时后即可使用, 染液可保用 6 个月。

所述 1% 盐酸酒精溶液是指盐酸和酒精体积分数分别为 1% 和 70% 的溶液。

所述 PBS 是指 0.01mol/L 的磷酸盐缓冲液, PH=7.2。

所述 4% 的多聚甲醛溶液是按照【文献《组织培养和细胞学技术》(鄂征, 北京出版社 P146)】中的描述配制的, 方法如下: 将多聚甲醛 40g 溶于 0.1mol PBS 1000ml 中, 加热至 60℃ 左右, 不断搅拌至透明, 也可加少许 1molNaOH 使溶液透明。

本方法的基本原理如下: 苏木素染色法利于立即固定的细胞着色, 而固定前早已死亡或自溶的细胞及碎片不能吸附染料, 所以细胞必须进行固定后方可进行苏木素染色。在测定 OD 值之前, 用 1% 盐酸酒精将吸附在细胞核上的染料溶解, 此时各孔中液体呈现粉红色。选择 540nm 波长立即进行测定, 活细胞数量越多, 细胞状况越好, 则染色越深, 所测 OD 值越高, 反之, 活细胞越少, 状况越差, 则染色越浅, OD 值越低, 从而对活细胞进行定量。

本发明的发明人采用苏木素染色法观察人贴壁肿瘤细胞系 Hep2 的增殖活性, 测定了人 NK 细胞系 NK92、NKL 和 YT 对 SGC7901 和 Hep2 细胞系的细胞毒效应, 新西兰白兔 CTL 细胞对 VX2 细胞的杀伤活性; 同时与 MTT 比色法及 CCK-8 比色法进行比较; 结果显示 NK92、NKL 和 YT 三种效应细胞对 SGC7901 和 Hep2 细胞杀伤 6h 或 12h 后, 在效靶比分别为 10:1、5:1、2.5:1 和 1.25:1 时, 三种方法所测结果具有良好的效靶关系, 且杀伤趋势基本一致, 重复性较好 (CV<8%)。苏木素染色法和 MTT 比色法所测兔 CTL 杀伤效应结果高度一致, 线性关系明显。研究表明将苏木素染色法用于效应细胞对贴壁肿瘤细胞系的细胞毒效应的测定, 具有特异、稳定、简便、经济等优点。

附图说明

图 1 为 Hep2 细胞增殖曲线图;

图 2 为 NK92 对 SGC7901 的杀伤作用比较示意图；

图 3 为 NK92 对 Hep2 的杀伤作用比较示意图；

图 4 为 NKL 对 SGC7901 的杀伤作用比较示意图；

图 5 为 NKL 对 Hep2 的杀伤作用比较示意图；

图 6 为 YT 对 SGC7901 的杀伤作用比较示意图；

图 7 为 YT 细胞对 Hep2 的杀伤作用比较示意图；

图 8 为兔 CTL 细胞对 VX2 的杀伤效应示意图。

具体实施方式

下面结合实施例对本发明做进一步的说明：

实施例 1：检测 Hep2 细胞增殖活性

(1) 苏木素染色法检测 Hep2 细胞增殖活性：取含 100ml/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基（完全培养基）加入 96 孔细胞培养板中，100 μ l/孔。用 2.5g/L 的胰酶消化 Hep2 细胞，离心后弃上清，用完全培养基调相应的细胞浓度。然后各取 100 μ l 细胞悬液分别加入上述 96 孔细胞培养板各相应孔中，混匀后倍比 2 稀释，依次设 8 个稀释度，每个稀释度 3 复孔，然后各孔补充完全培养基至 200 μ l，并设酶标仪调零孔。将 96 孔细胞培养板置 37℃、50ml/L CO₂ 恒温饱和湿度培养箱中孵育 44 小时。取出 96 孔细胞培养板甩弃上清，立即加入 40g/L 的多聚甲醛溶液，150 μ l/孔，固定 30 分钟后收集固定液。PBS 洗 3 次，弃上清，室温晾干。取苏木素染色液 100 μ l 加入各孔，染色 20 分钟。蒸馏水洗 3-5 次以去除未结合的染料，室温晾干。于倒置显微镜下观察细胞着色状况，加入 1%盐酸酒精，100 μ l/孔，此时各孔液体呈现不同程度的粉红色，脱色后立即用酶标仪测定 540nm 处的吸光度值并记录。绘制 Hep2 细胞增殖曲线，如图 1 所示。

(2) MTT 比色法观察 Hep2 细胞的增殖活性，按文献【田志刚, 张建华, 等. MTT 法在检测细胞增殖与细胞毒效应中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1994, 1(1):74-79.】中的方法进行，绘制细胞增殖曲线，如图 1 所示。

结果：采用苏木素染色法和 MTT 比色法同时观察孵育 44h 的 Hep2 细胞的增殖活性，虽然两种方法需选择两种不同的波长（540nm 和 570nm），但细胞在 $0.063-8 \times 10^5$ /L 密度范围内两种测定方法所显示的 OD 值均呈现正向线性关系，表明苏木素染色法与 MTT 比色法均能客观地反映细胞的数量及活性状态（图 1）。

实施例 2：检测人 NK 细胞系的细胞毒效应：

(1) 苏木素染色法检测人 NK 细胞系的细胞毒效应：

I. 人 NK 细胞系的培养扩增: NK92 细胞培养基为含 125ml/L 胎牛血清、125ml/L 马血清和 1×10^5 U/L rhIL-2 的 α -MEM 培养基, 2-3 天传代。NKL 细胞培养基为含 100ml/L 胎牛血清和 1×10^5 U/L rhIL-2 的 RPMI1640 培养基, 2-3 天传代。YT 细胞培养基为含 100ml/L 小牛血清的 RPMI1640 培养基, 2-3 天传代。

II. 人 NK 细胞系的细胞毒效应检测: 2.5ml/L 胰酶消化 Hep2 和 SGC7901 细胞, 离心后用完全培养基调细胞数为 1×10^8 /L, 加入 96 孔细胞培养板中, 置 37℃、50ml/L CO₂ 恒温饱和湿度培养箱中孵育 12 小时使其贴壁。将 NK92、NKL、YT 细胞用 Hanks 液洗涤细胞 1 次, 去除残存的 rhIL-2, 避免其干扰实验结果。加入不含 rhIL-2 的培养基重悬细胞并调相应的细胞数, 分别取细胞悬液 100 μ l 加入 96 孔细胞培养板各相应孔构成一定的效靶比, 另外分别设相应浓度的效应细胞对照, 靶细胞对照, 均为 3 复孔或 6 复孔, 另设 1 孔酶标仪调零孔, 补充各对照孔培养基至 200 μ l。将其置培养箱中孵育相应的时间 (NK92 细胞为 6h; NKL 和 YT 细胞为 16h)。取出 96 孔细胞培养板, 立即弃上清, 用 PBS 洗板 3 次, 以去除效应细胞。立即加入 40g/L 的多聚甲醛溶液, 150 μ l/孔, 固定 30 分钟后收集固定液。PBS 洗 3 次, 弃上清, 室温晾干。取苏木素染色液 100 μ l 加入各孔, 染色 20 分钟。蒸馏水洗 3-5 次以去除未结合的染料, 室温晾干。加入 1% 盐酸酒精, 100 μ l/孔, 脱色后立即用酶标仪测定 540nm 处的吸光度值并记录。计算各效靶比的杀伤率。公式如下:

$$\text{杀伤率}(\%) = 1 - \frac{OD(E+T) - OD(E)}{OD(T)} \times 100\%;$$

OD(E): 效应细胞(E)孔 OD 值; OD(T): 靶细胞(T)孔 OD 值; OD(E+T): 效应细胞(E)+靶细胞(T)孔 OD 值。

(2) MTT 比色法检测人 NK 细胞系的细胞毒效应, 按文献【田志刚, 张建华, 等. MTT 法在检测细胞增殖与细胞毒效应中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1994, 1(1): 74-79.】中的方法进行。

(3) CCK-8 比色法检测人 NK 细胞系的细胞毒效应: 2.5ml/L 胰酶消化 Hep2 和 SGC7901 细胞, 离心后用完全培养基调细胞数为 1×10^8 /L, 加入 96 孔细胞培养板中, 置 37℃、50ml/L CO₂ 恒温饱和湿度培养箱中孵育 12 小时使其贴壁。将 NK92、NKL、YT 细胞用 Hanks 液洗涤细胞 1 次, 去除残存的 rhIL-2, 避免其干扰实验结果。加入不含 rhIL-2 的培养基重悬细胞并调相应的细胞数, 分别取细胞悬液 100 μ l 加入 96 孔细胞培养板各相应孔构成一定的效靶比, 另外分别设相应浓度的效应细胞对照, 靶细胞对照, 均为 3 复孔或 6 复孔, 另设 1 孔酶标仪调零孔, 补充各对照孔培养基至 200 μ l。将其置培养箱中孵育相应的时间 (NK92 细胞为 6h; NKL

和 YT 细胞为 16h)。取出 96 孔细胞培养板, 加入 CCK-8, 20 μ l/孔, 继续孵育 2 小时后, 用酶标仪测定 450nm 处的吸光度值。计算各效靶比的杀伤率, 公式同 (1)。

结果:

A. NK92 细胞对贴壁肿瘤细胞的细胞毒效应: NK92 细胞与 SGC7901 或 Hep2 细胞共同孵育 6h 后, 分别采用苏木素染色法、MTT 比色法和 CCK-8 比色法测定 NK92 细胞的杀伤活性, 结果比较如图 2、图 3 所示, 图 2、3 表明随着效靶比不断升高, NK92 细胞的杀伤活性逐渐增强。在效靶比为 10:1 时对两种肿瘤细胞的杀伤活性接近 90%, 虽然杀伤时间较短但 NK92 细胞对两种肿瘤细胞均有较强的杀伤效应。同时三种方法所测结果均显示出良好的效靶反应关系。但苏木素染色法所测各效靶比杀伤率略高于 MTT 比色法及 CCK-8 比色法。

B. NK1 细胞对贴壁肿瘤细胞的细胞毒效应: NK1 细胞与 SGC7901 或 Hep2 细胞共同孵育 16h 后, 分别采用苏木素染色法、MTT 比色法和 CCK-8 比色法测定 NK1 细胞的杀伤活性, 结果比较如图 4、图 5 所示, 图 4 表明在效靶比为 10:1 时, 三种方法所测 NK1 对 SGC7901 细胞的杀伤活性可达 50%以上。在 5:1、2.5:1 和 1.25:1 时, 其杀伤效应虽呈线性关系, 但差异较小。图 5 显示 NK1 细胞对 Hep2 细胞杀伤反应线性关系良好, 三种方法所测结果有较好的相关性。

C. YT 细胞对贴壁肿瘤细胞的细胞毒效应: YT 细胞与 SGC7901 或 Hep2 细胞共同孵育 16h 后, 三种方法均显示出 YT 细胞对 2 种肿瘤细胞有一定的杀伤活性, 结果比较如图 6、图 7 所示, 随着效靶比的不断降低, 其杀伤活性逐渐减弱。

实施例 3: 检测兔 CTL 细胞的细胞毒效应

(1) 苏木素染色法检测兔 CTL 细胞的细胞毒效应: 用 2.5ml/L 胰酶消化 VX2 细胞, 离心洗涤后用完全培养基调相应的细胞浓度, 将其加入 96 孔细胞培养板各相应孔中, 100 μ l/孔; 然后将 96 孔细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、50ml/L CO₂恒温饱和湿度培养箱中孵育使其贴壁。将荷瘤 (VX2 细胞) 12 天的新西兰白兔处死, 无菌取脾脏, 剪碎, 100 目钢网研磨制备脾单个细胞悬液, 洗涤 2 次后分别调整相应的细胞浓度, 加入 96 孔细胞培养板各相应孔中, 100 μ l/孔。设 40:1、20:1、10:1 和 5:1 四个效靶比 (E:T), 并设相应的 CTL 效应细胞对照和 VX2 靶细胞对照, 均为 6 复孔, 各对照孔补充完全培养基至 200 μ l/孔, 另设 1 孔酶标仪调零孔。将 96 孔细胞培养板置 37 $^{\circ}$ C、50ml/L CO₂恒温饱和湿度培养箱中培养 44 小时。取出 96 孔板, 立即弃上清, 用 PBS 洗板 3 次, 弃上清 (旨在去除相应各孔悬浮的 CTL 细胞, 减少效应细胞对检测结果的干扰), 立即加入 40g/L 的多聚甲醛溶液, 150 μ l/孔, 固定 30 分钟。取苏木素染色液 100 μ l 加入各孔, 染色 20 分钟。蒸馏水洗 3-5 次以去除未结合的染料, 室温晾干。加入 1%盐酸酒

精, 100 μ l/孔, 脱色后立即用酶标仪测定 540nm 处的吸光度值并记录。计算各效靶比的杀伤率, 公式同实施例 2。

(2) MTT 比色法测定兔 CTL 细胞的细胞毒效应 按文献【田志刚, 张建华, 等. MTT 法在检测细胞增殖与细胞毒效应中的应用[J]. 中国肿瘤生物治疗杂志, 1994, 1(1):74-79.】中的方法进行。

结果: 将 VX2 细胞荷瘤新西兰白兔, 12 天后取荷瘤兔脾脏, 制备脾单个细胞(CTL)悬液, 以 VX2 细胞为靶细胞, 采用苏木素染色法和 MTT 比色法测定 CTL 细胞对 VX2 的细胞毒效应, 结果如图 8 所示, 图 8 表明随着效靶比的升高, CTL 细胞对 VX2 细胞的杀伤逐渐增强。在效靶比(E:T)为 40:1 时, 杀伤率可接近 100%, 显示出 CTL 细胞敏感特异的细胞毒效应。同时两种方法所测结果高度一致, 且具有良好的效靶比反应关系。

以上实施例中用到的仪器与试剂如下:

NK92、NKL 和 YT 细胞系均为人 NK 细胞系, 购自美国 ATCC。

Hep2 细胞系(人喉癌细胞)和 SGC7901(人胃腺癌细胞)购自中国科学院典型培养物保藏中心。

新西兰白兔购自山东省农科院。

α -MEM、RPMI1640 培养基、胎牛血清为 GIBICO 产品, 按说明书配制。

重组人白介素 2 (rhIL-2) 为长春生物制品研究所产品, 用生理盐水溶解至 5×10^7 U/L, 4℃存放备用。

胰酶 Hanks 溶液, 将体积分数为 0.25%的胰酶溶于 Hanks 溶液中。

MTT (四甲基偶氮唑盐) 为 Fluka 产品, 用生理盐水溶解为 5g/L, 过滤除菌。

10%的 SDS (十二烷基硫酸钠) 水溶液为 Sigma 产品。

CCK-8, 日本同仁化学研究所产品。

小牛血清为山东省劲牛生物材料有限公司产品。

马血清为中外合资兰州民海生物材料公司产品。

96 孔细胞培养板为 Costar 公司产品。

BioRad550 酶标仪为美国 BioRad 公司产品。

CO₂ 孵育箱为日本 ESPEC 公司产品。

8 道微量移液器为法国吉尔森产品。

综合讨论: 免疫效应细胞对相应靶细胞的细胞毒效应是肿瘤免疫学的重要组成部分。在进行免疫效应细胞对贴壁生长的肿瘤细胞系的细胞毒实验时, 由于某些效应细胞(例如某些

NK 细胞系、LAK 细胞等) 具有增殖快和代谢率高等生物学特性, 致使传统的 MTT 方法所测结果稳定性较差。本研究采用 MTT 比色法观察 NK92 细胞对 Hep2 和 SGC7901 细胞的杀伤效应时, MTT 比色法所测杀伤率均明显低于苏木素染色法, 其原因可能与两种方法不同的作用原理有关。MTT 比色法通过测定细胞中线粒体脱氢酶活性而反映细胞数量及状况, 细胞在死亡初期(或短时间内), 仍可摄取一定量的 MTT 并还原形成甲臜, 致使所测 OD 值偏高, 杀伤率降低。另外, 采用 MTT 比色法和 CCK-8 比色法测定细胞介导的细胞毒效应时, 效靶细胞均摄取 MTT 或 CCK-8 形成甲臜。在效、靶细胞反应初期, 效应细胞处在活化早期, 代谢旺盛, 杀伤效应相对较弱, 采用上述两种方法测定其杀伤效应, 通常所测效靶反应孔的 OD 值较高, 所以将 MTT 及 CCK-8 比色法用于此类实验时, 应适当延长反应时间, 方可获得较稳定的测定结果。而采用苏木素染色法检测这类效应细胞的杀伤效应时, 需先将培养板各孔中的培养基甩弃, 再经 3 次 PBS 洗涤后, 各孔中绝大多数细胞被甩弃, 大大避免了效应细胞的干扰(即使效应细胞去除不彻底, 在计算杀伤活性时仍需减去各效靶比组效应细胞对照孔 OD 值的均数)。例如本研究所述 NK 细胞系及荷瘤兔 CTL 活性检测, 进行苏木素染色时, 染料仅在固定前的活细胞中富集, 即仅显示靶细胞的 OD 值, 大大避免了效应细胞的干扰, 从而真实地反映出此类细胞的细胞毒效应。

苏木素染色法检测细胞增殖活性, 在一定密度范围内细胞数量与 OD 值呈线性关系。当细胞密度过大或培养时间较长可引起培养基中营养成分过度消耗, 导致部分细胞死亡或生长不良, 干扰实验结果, 所以应进行预实验选择每种细胞适合的初始培养浓度。同时严密控制细胞孵育时间, 洗板后立即进行固定, 脱色后立即进行酶标仪测定, 亦是获得满意实验结果的基本条件。

在采用苏木素染色法进行细胞介导的细胞毒效应测定过程中, 使用多通道微量移液器不仅可简化试验程序而且可大大减少各孔之间的误差。同时染色后苏木素染色液可回收反复使用多次, 与昂贵的 CCK-8 试剂相比本方法的经济实用则显得颇为突出。

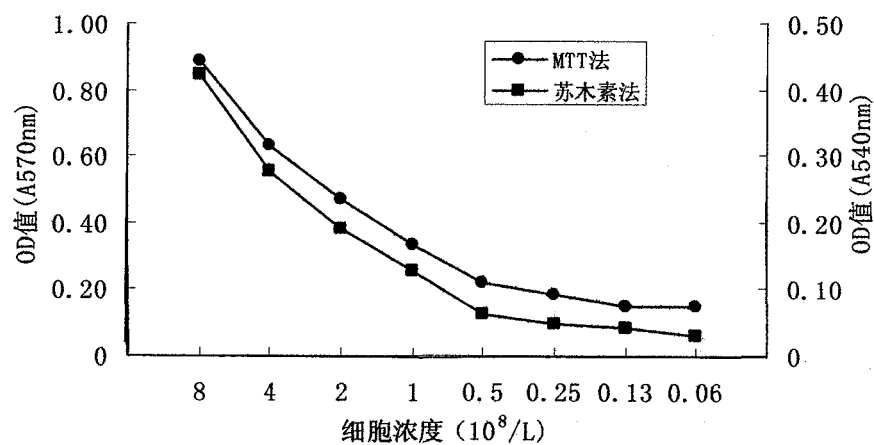


图 1

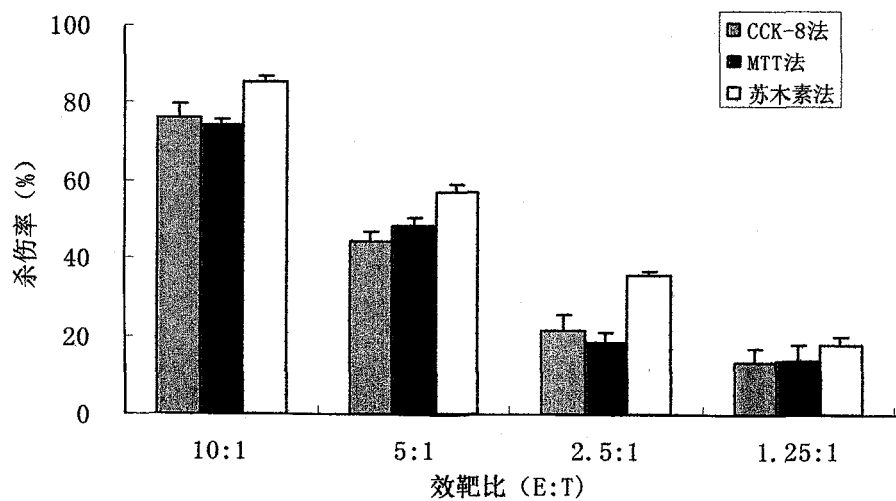


图 2

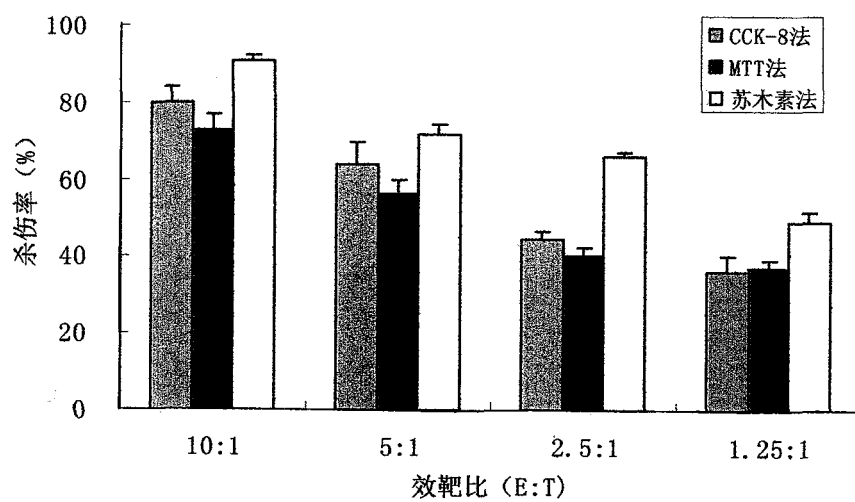


图 3

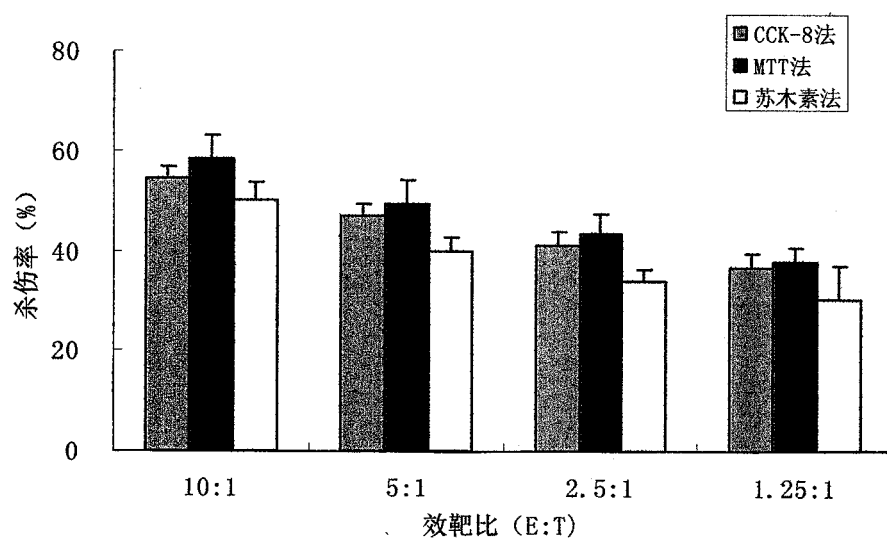


图 4

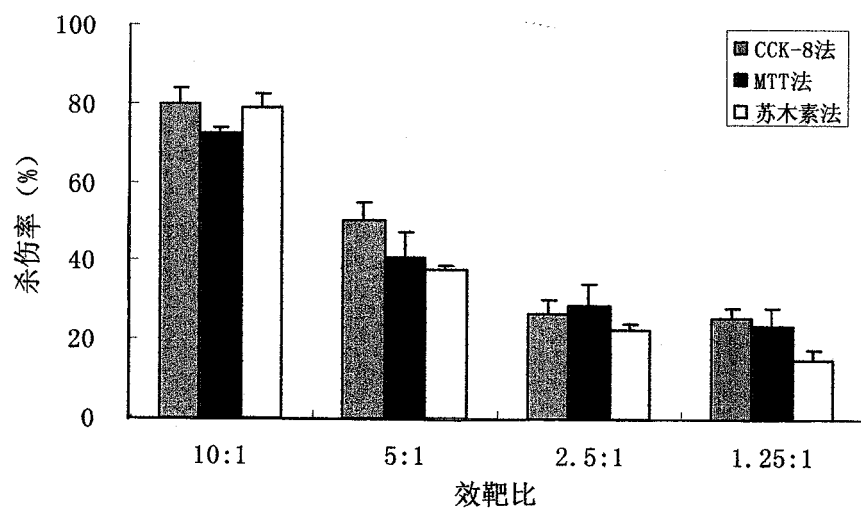


图 5

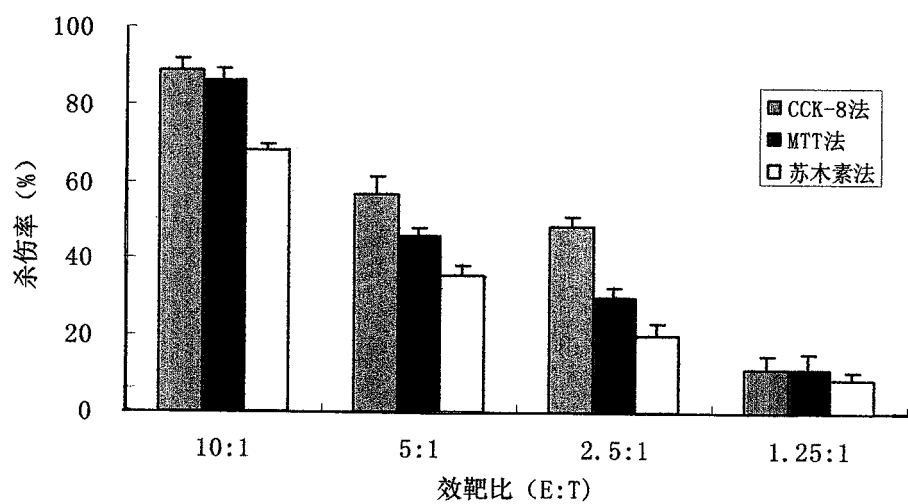


图 6

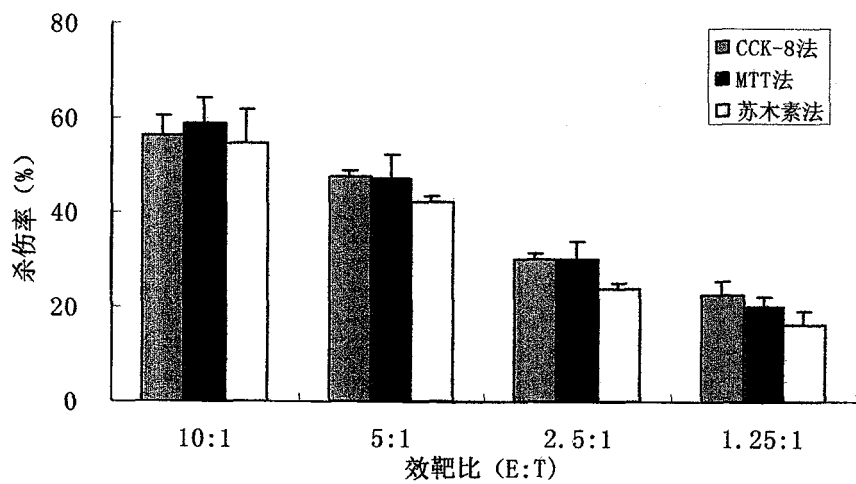


图 7

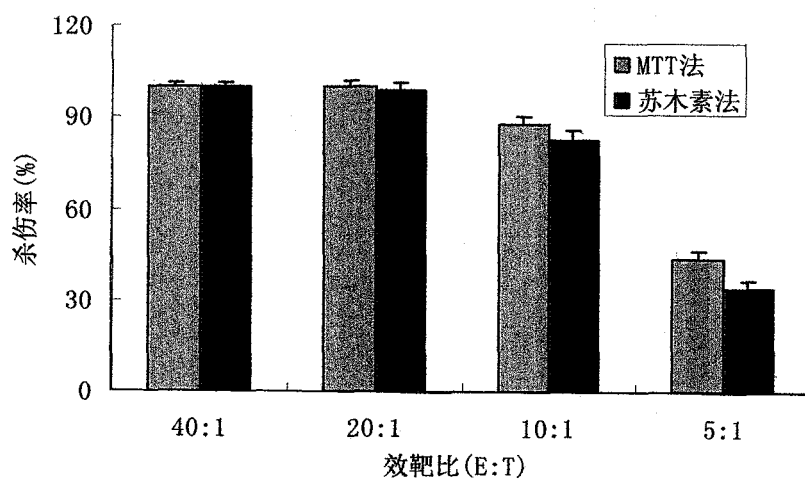


图 8

专利名称(译)	苏木素在检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应中的应用		
公开(公告)号	CN101650364A	公开(公告)日	2010-02-17
申请号	CN200910017282.5	申请日	2009-07-31
[标]申请(专利权)人(译)	山东省医学科学院基础医学研究所		
申请(专利权)人(译)	山东省医学科学院基础医学研究所		
当前申请(专利权)人(译)	山东省医学科学院基础医学研究所		
[标]发明人	王郡甫 张建华 陈红		
发明人	王郡甫 张建华 陈红		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/52 G01N21/31 C12Q1/00		
代理人(译)	杨琪		
其他公开文献	CN101650364B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用苏木素检测免疫效应细胞介导的细胞毒效应的测定方法：将贴壁肿瘤细胞悬液置于细胞培养板中，贴壁后，加入待测免疫效应细胞，构成一定的效靶比，于培养箱中共孵育适当时间后，取出，弃上清，用PBS洗板3次(以去除效应细胞)后，立即加入4%多聚甲醛固定30分钟，然后加入苏木素染色液，100 μ l/孔，染色20分钟后，蒸馏水洗3~5次(以去除未结合的染料)，室温晾干；加入1%的盐酸酒精脱色，100 μ l/孔，脱色后立即用酶标仪测定540nm处的吸光度值并记录，计算各效靶比的杀伤率，公式如图所示。研究表明本方法具有特异、稳定、简便、经济等优点。

