



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105223360 B

(45)授权公告日 2017.03.22

(21)申请号 201510539692.1

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2015.08.28

G01N 15/14(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

审查员 舒霏霏

申请公布号 CN 105223360 A

(43)申请公布日 2016.01.06

(73)专利权人 北京大学人民医院

地址 100044 北京市西城区西直门南大街
11号

(72)发明人 刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐

袁晓英 黄晓军

(74)专利代理机构 石家庄众志华清知识产权事

务所(特殊普通合伙) 13123

代理人 墨伟

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

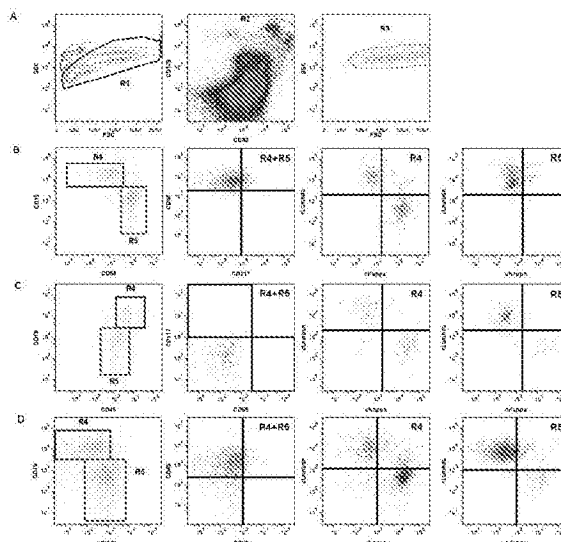
权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54)发明名称

鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及应用,与流式细胞仪配套使用,所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合:Ig,κ Light Chain、Ig,λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45。本发明用CD38和CD138首先识别浆细胞,借助CD45、CD56、CD19和CD117识别浆细胞的表面标志是正常还是异常,对正常和异常表型的设门(R4和R5)后,再分别观察正常表型和异常表型中cKappa和cLambda的表达比值。采用本发明的试剂盒识别所有cPCs的应用中,具有准确率高、分析快速、方法简单的优势。



1. 一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,与流式细胞仪配套使用,其特征在于所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合:Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45,并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记:FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450和V500。

2. 根据权利要求1所述的鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,其特征在于还包括固定/破膜剂和溶红细胞液。

3. 权利要求1所述的试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,其特征在于所述应用包括:将所述试剂盒中针对CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45的单克隆抗体加入至同一个装有骨髓标本的试管中;经溶红细胞、破膜处理后,加入试剂盒中针对Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain的单克隆抗体,制成待测试样;将待测试样经流式细胞仪检测,设门分析如下:

①建立FSC/SSC密度图,将有核细胞区域划为R1;对R1细胞显示CD38/CD138散点图,将CD38⁺CD138⁺细胞划为R2;建立FSC/SSC散点图只显示R2门内细胞,将均一分布的细胞划为R3;

②将R3门内细胞分别建立CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117二维散点图,进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门,标记为R4和/或R5;

③对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立CD45/CD117、CD56/CD117和CD45/CD56的二维散点图;

④对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain二维点图,分析Ig κ Light Chain和Ig λ Light Chain的表达及其比值。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,其特征在于待测试样的处理包括以下步骤:

①洗涤细胞:用1×PBS缓冲液充分离心洗涤骨髓标本;

②标记抗体:将洗涤后的骨髓标本与CD19-PE-Cy5 2.5 μ L, CD117- PE-Cy7 2.5 μ L, CD138- APC 5 μ L, CD56 -APC-Cy7 2.5 μ L, CD38-V450 2.5 μ L 和CD45-V500 3 μ L混匀,室温避光孵育10~20分钟;

③溶红细胞:向步骤②的体系中加入红细胞溶解液,混匀后避光,室温放置5~10分钟,溶解红细胞;

④破膜处理:1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中的细胞固定液 100 μ L,震荡混匀,避光孵育15min;

加入500 μ L 1×PBS缓冲液,混匀,1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中的破膜液100 μ L,混匀,并同时加入10 μ L的Ig κ Light Chain- FITC / Ig λ Light Chain- PE,避光孵育15min;

⑤洗涤细胞:加入2mL含0.5vovI.%~2vovI.%血清和0.1wt.% NaN₃的1×PBS,混匀,1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入300 μ L 1×PBS缓冲液,混匀、待测。

鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用

[0001] 本发明属于细胞表型确认过程中的专用试剂盒结构设计,具体涉及一种应用八色抗体组合识别克隆性浆细胞表型的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 浆细胞疾病是指克隆性浆细胞(clonal plasma cells,cPCs)过度增殖并产生大量单克隆免疫球蛋白的一组疾病,cPCs是浆细胞疾病的发病根源。免疫球蛋白固定电泳或游离轻链检测可以帮助确定是否存在克隆性浆细胞,但无法提示其比例;如果cPCs为非分泌型,即不合成免疫球蛋白,则无法诊断。传统的骨髓形态学方法可以识别形态异常浆细胞或幼稚浆细胞的比例,但不能确定其克隆性。某些疾病例,如意义未明的单克隆丙种球蛋白病、冒烟型骨髓瘤,或治疗后的多发性骨髓瘤(multiple myeloma,MM),骨髓中浆细胞数量较低,且多数同时存在cPCs和正常浆细胞(normal plasma cells,nPCs),此时通过传统的形态学方法难以鉴别。

[0003] 多参数流式细胞仪(multiparameter flow cytometry,MFC)具有高敏感、高特异性。利用MFC对膜抗原检测,可以判断是否存在nPCs和异常表型浆细胞(abnormal plasma cells,aPCs)并确定其比例;通过对胞浆内免疫球蛋白(immunoglobulin,Ig)κ和λ轻链检测,可进一步判断nPCs是否为多克隆、aPCs是否为单克隆,以判断是否存在cPCs及其比例;当nPCs和aPCs同时存在且aPCs数量较低时,更显示其优越性。因此MFC被越来越多地应用于浆细胞疾病的检查,不仅可以帮助诊断,还可以在治疗后检测微量cPCs,对治疗效果进行评价,以便及时调整治疗方案。

[0004] 如何选择合适的抗体组合是利用MFC准确区分nPCs、aPCs和cPCs的关键。目前文献报道多采用3-4色抗体组合,除去设门抗体,每管试管中只能检测1-2种其它抗体,若想检测多个抗体以确定浆细胞是否异常,需重复应用设门抗体,大概需要3-5组抗体组合,总共需要9-20个抗体;这样导致费用过高、所需标本量增大、操作费时,且灵敏度不高。而且,4色抗体组合无法同时囊括设门抗体、胞膜抗体和针对胞浆Ig轻链的抗体,不能达到分群设门并进一步分析克隆性的要求。

发明内容

[0005] 本发明要解决的技术问题是提供一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用,其采用8色抗体组合、借助流式细胞仪一次检测、经逐级设门即可准确区分nPCs、aPCs和cPCs并提示表达比例,检测的敏感度高、成本低、适用范围广,具有广泛的应用前景与临床意义。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒,与流式细胞仪配套使用,所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合: Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45,并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记:FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450和V500。

[0008] 本发明还提供了一种试剂盒在制备鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的产品中的应用,所述应用包括:将所述试剂盒中针对CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45的单克隆抗体加入至同一个装有骨髓标本的试管中;经溶红细胞、破膜处理后,加入试剂盒中针对Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain的单克隆抗体,制成待测试样;将待测试样经流式细胞仪检测,设门分析如下:

[0009] ①建立FSC/SSC密度图,将有核细胞区域划为R1;对R1细胞显示CD38/CD138散点图,将CD38⁺CD138⁺细胞划为R2;建立FSC/SSC散点图只显示R2门内细胞,将均一分布的细胞划为R3;

[0010] ②将R3门内细胞分别建立CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117二维散点图,进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门,标记为R4和/或R5;

[0011] ③对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立CD45/CD117、CD56/CD117和CD45/CD56的二维散点图;

[0012] ④对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立Ig κ Light Chain/ Ig λ Light Chain二维散点图,分析Ig κ Light Chain和Ig λ Light Chain的表达及其比值。

[0013] 采用上述单克隆抗体组合鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的原理如下:nPCs的表型是受基因严格控制的,其表型具有一致性和可重复性;nPCs强表达CD38(CD38st)和CD138,同时表达CD19和CD45,不表达CD117和CD56,其胞浆Ig轻链cKappa和cLambda为多克隆性,即cKappa与cLambda的比值在0.3-3.0之间。aPCs是指浆细胞抗原表达出现异常,如CD38的强度比nPCs减弱、CD19和CD45变为阴性,或者异常表达CD56、CD117、CD28、CD33等;出现上述这些抗原的表达异常,可定义为aPCs。但aPCs是否为克隆性,还需要进一步检测cKappa和cLambda。如果aPCs只表达ckappa或cLambda一种轻链,为轻链限制性表达,可确定为cPCs;如果ckappa和cLambda比值在正常范围内,则为多克隆,不支持诊断。

[0014] 因此,本发明设计了一组八色抗体组合,采用逐级设门方法确定cPCs。采用本发明的试剂盒可检测所有浆细胞,通过同时检测膜抗原和胞浆Ig轻链以及精确设门,能够有效区分nPCs和cPCs,检测的敏感度为0.01%。

[0015] 以多发性骨髓瘤(multiple myeloma, MM)患者为例,采用本发明的试剂盒、借助八色流式细胞仪检测初诊和治疗后MM患者骨髓浆细胞上的抗原表达,结果发现:几乎所有患者均表达CD38和CD138,采用CD38/CD138散点图对浆细胞设门,根据异常抗原的表达进一步设门后分析浆细胞的克隆性适用于所有患者;本发明的试剂盒,同时检测胞膜抗原和胞浆Ig轻链以确定其克隆性,能够有效区分nPCs和cPCs,适用于所有初诊和治疗后MM患者;检测敏感度可达0.01%。

[0016] 采用上述技术方案产生的有益效果在于:(1)本发明的试剂盒在识别所有cPCs的应用中,具有准确率高、分析快速、方法简单的优势,为cPCs的表型分类提供了一种可靠的新的荧光标记的单克隆抗体组合;(2)本发明试剂盒的应用能够识别所有浆细胞,检测cPCs的敏感度为0.01%,有助于诊断并进行疗效判定;(3)本发明采用一组包含八个单抗的八色组合,识别浆细胞准确、可靠,同时减少了设门抗体的重复使用,减低患者和国家的经济负担,而且简化了抗体的标记过程,便于检测的标准化和规范化,具有广泛的应用前景与临床意义;(4)本发明的方法简单、可靠,检测敏感度可达0.01%,易于推广。

附图说明

[0017] 图1 A-D是采用本发明试剂盒对MM患者nPCs、aPCs和cPCs的设门分析方法；

[0018] 图2是初诊MM患者浆细胞抗原表达的阳性比例。

具体实施方式

[0019] 鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒，与流式细胞仪配套使用，其特征在于所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合：Ig, κ Light Chain/ Ig, λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45，并依次按照下述顺序依次进行荧光素标记：FITC/PE、PE-Cy5、PE-Cy7、APC、APC-Cy7、V450和V500。各单克隆抗体的荧光素标记及成分等信息参见表1。

[0020] 表1 流式单克隆抗体信息

[0021]

名称	荧光素标记	成分	克隆	产品目录号	公司
Ig, κ Light Chain	FITC/PE	Mouse IgG1	TB28-2	349516	BD
Ig, λ Light Chain			1-155-2		
CD19	PE-Cy5	Mouse IgG1	H1B19	302210	Biolegend
CD117	PE-Cy7	Mouse IgG1	104D2	339195	BD
CD138	APC	Mouse IgG1	B-B4	130-091-250	Miltenyi
CD56	APC-Cy7	Mouse IgG1	HCD56	318332	Biolegend
CD38	V450	Mouse IgG1	HB7	646857	BD Horizon
CD45	V500	Mouse IgG1	HI30	560777	BD Horizon

[0022] 所述试剂盒中还包括红细胞溶解液(10 \times ，货号：555899，BD公司)、固定/破膜剂(货号：GAS006，Miltisciences公司，包括A液20mI和B液 20mI，A液为细胞固定液，作用为固定细胞；B液为破膜液，使抗体顺利进入胞内，并使细胞形态仍然保存完整)和pH 为7.2~7.4的10 \times PBS缓冲液。采用本发明的试剂盒对患者骨髓浆细胞表型测定的步骤如下：

[0023] 步骤一、试剂的制备

[0024] 1.1、将10 \times PBS缓冲溶液稀释为1 \times PBS备用。

[0025] 所述10 \times PBS缓冲液的配制方法：

[0026] Na₂HPO₄ · 12H₂O 26.3g

[0027] NaH₂PO₄ · 2H₂O 3.0g

[0028] NaCl 85.0g

[0029] 加蒸馏水至1000mL，常温保存。

[0030] 1.2、将溶红细胞液用蒸馏水稀释10倍，备用。

[0031] 1.3、在1 \times PBS缓冲液中加入小牛血清和NaN₃，制备含0.5voI.%~2voI.%血清与

0.1wt.% NaN₃的PBS,4℃保存。

[0032] 步骤二、标本的制备:

[0033] 2.1、洗涤细胞:取洁净的5mL试管,加入1mL患者骨髓标本,加入2mL 1×PBS缓冲液充分混匀、离心洗涤。重复3遍,进行细胞计数,调整细胞浓度至 1×10^7 个细胞/mL;

[0034] 2.2、标记抗体:根据流式细胞仪的需要选择流式专用5mL试管一只,分别加入CD19 PE-Cy5 2.5μL,CD117 PE-Cy7 2.5μL,CD138 APC 5uL, CD56 APC-Cy7 2.5μL,CD38 V450 2.5μL 和CD45 V500 3μL,再加入100μL上述步骤1中洗涤后标本(1×10^6 个细胞),轻轻混匀,室温(环境温度保持在22℃左右)避光孵育15分钟;

[0035] 2.3、溶红细胞:加入步骤1.2中稀释后的红细胞溶解液2mL,混匀后避光,室温放置8分钟,溶解红细胞;

[0036] 2.4、破膜处理:将经步骤2.3处理的标本再经1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中A液100μL,震荡混匀,避光孵育15min;加入步骤1.1中500μL 1×PBS缓冲液,混匀,1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入固定/破膜剂中B液100μL,轻微混匀,并同时加入10μL的κ/λ FITC/PE,避光孵育15min;

[0037] 2.5、洗涤细胞:加入2mL步骤1.3中含0.5vovl.%~2vovl.%血清和0.1wt.% NaN₃的PBS,混匀,1500转/分离心8分钟,弃上清液,加入300μL 1×PBS缓冲液,混匀、待测。

[0038] 步骤三、采用流式细胞仪进行检测

[0039] 按照流式细胞仪的操作规程,对步骤二中制备的待测标本进行流式细胞仪测试,获取750,000个有核细胞。

[0040] 步骤四、采用流式细胞仪分析标本中的nPCs、aPCs及cPCs

[0041] 用流式细胞仪分析软件进行分析,具体设门方法(参见图1)包括:

[0042] 4.1、CD38/CD138对浆细胞进行设门(图1A)

[0043] 先建立FSC/SSC密度图,将有核细胞区域划为R1,以排除死细胞和细胞碎片;对R1细胞显示CD38/CD138散点图,将CD38⁺CD138⁺细胞划为R2,为浆细胞;建立FSC/SSC散点图只显示R2门内细胞,将均一分布的细胞划为R3,R3为浆细胞。

[0044] 、界定nPCs、aPCs并确定其克隆性

[0045] ①建立FSC/SSC密度图,将有核细胞区域划为R1;对R1细胞显示CD38/CD138散点图,将CD38⁺CD138⁺细胞划为R2;建立FSC/SSC散点图只显示R2门内细胞,将均一分布的细胞划为R3;

[0046] ②将R3门内细胞分别建立CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117二维散点图,进一步对二维散点图内集中分布的细胞设门,标记为R4和/或R5;

[0047] ③对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立CD45/CD117、CD56/CD117和CD45/CD56的二维散点图;

[0048] ④对应CD19/CD56、CD19/CD45和CD19/CD117中R4和/或R5门内细胞分别依次建立cKappa/cLambda二维点图,分析cKappa和cLambda的表达及其比值。

[0049] 总体思路的鉴别思路是:用CD38和CD138首先识别浆细胞,借助CD45、CD56、CD19和CD117识别浆细胞的表面标志是正常还是异常,对正常和异常表型的设门(R4和R5)后,再分别观察正常表型和异常表型中cKappa和cLambda的表达比值,从而确定异常表型是否可以归为克隆性浆细胞。

[0050] 例如图1B,该患者具有一群CD19⁻aPCs,且CD56阳性,因此,选择CD19/CD56散点图,根据CD19和CD56的表达,对CD19⁺CD56⁻nPCs和CD19⁻CD56⁺aPCs分别设门(R4和R5),统计两者在有核细胞中所占比例;然后分析R4和R5门内细胞抗原的表达情况及cKappa和cLambda的比值。如果CD19⁻或CD56⁺细胞不明显,可以参考CD117⁺或CD45⁻对nPCs和aPCs分别设门(R4和R5)(图1C和1D),再进一步分析R4和R5门内其它抗原的表达及其胞浆Ig轻链的表达。以nPCs中CD56、CD19、CD117、CD45的表达作为对照,分析aPCs中CD56⁺、CD19⁻、CD117⁺和CD45^{-/dim+}细胞的比例,将 $\geq 20\%$ 定义为异常;以nPCs抗原表达的强弱为标准,aPCs抗原表达比nPCs强的定义为强表达,反之为弱表达。nPCs中cKappa和cLambda的比值在0.3~3.0之间,cPCs为cKappa或cLambda单阳性。即当cKappa和cLambda的比值在0.3~3.0之间时为nPCs;当cKappa和cLambda的比值在0.3~3.0范围之外时,为单阳性,则为cPCs。

[0051] 采用上述方法,对2001年9月-2013年8月在北京大学人民医院、北京大学血液病研究所收治的初诊和治疗后MM患者进行回顾性分析。其中初诊患者332例,中位年龄60(27-87)岁;治疗后患者121例,共209份标本,中位年龄54(27-84)岁。分析结果如下:

[0052] 一、CD38/CD138设门适用于所有浆细胞

[0053] 初诊MM患者浆细胞几乎全部表达CD38和CD138,阳性率与正常浆细胞相似,分别为100%(332/332)和98.8%(328/332)。虽然个别患者CD38和CD138表达明显减弱(CD38弱表达者4例,138阴性和弱表达的患者分别4例和13例)(结果见表2),但不存在CD38和CD138同时减弱而无法确定浆细胞的病例。

[0054] 治疗后存在aPCs的96份标本中,CD38和CD138全部阳性,11.46%(11/96)和36.46%(35/96)患者CD38和CD138表达强度较nPCs低(表2),但仍高于其它细胞。因此,采用CD38/CD138可对aPCs和nPCs进行设门,故CD38/CD138同时设门界定浆细胞适用于所有MM患者。

[0055] 表2 初诊和治疗后MM患者aPCs中异常抗原表达的发生率

异常抗原表达	初诊 MM (N=332)		治疗后 MM (N=96)	
	N	%	n	%
CD38 ^{dim-}	4	1.2	11	11.46
CD138 ^{-dim-}	17	5.1	35	36.46
CD56 ⁻	211	63.6	56	58.3
CD117 ⁻	142	42.8	47	49.0
CD45 ^{-dim-}	294	88.6	44	45.8
CD19 ^{-dim-}	320	96.4	95	99.0
轻链限制性表达	318/318	100	96	100
备注	初诊患者中,轻链限制性表达的检测数为318人			

[0057] 二、nPCs和aPCs的膜抗原表达及aPCs表达异常的抗原数目

[0058] 我们对治疗后20份仅存在nPCs的标本进行了分析, 结果发现, nPCs的表型均为CD38^{st+}CD138⁺CD56⁻CD117⁻; nPCs中90%以上的细胞表达CD45和CD19, 低于10%的细胞CD45或CD19阴性或弱表达; CD45^{-/dim+}和CD19^{-/dim+}细胞在nPCs中的中位比例分别为7.18% (0-14.84%) 和7.62% (0-25.11%), 其cKappa/cLambda的中位比值为1.40% (0.99%-2.07%), 未见单克隆细胞。aPCs表型多样, 存在一种或多种与nPCs相反的表型, 包括: CD38^{dim+}、CD56⁺、CD117⁺、CD45^{-/dim+}、CD19^{-/dim+}和CD138^{-/dim+}。

[0059] MM患者浆细胞数量不等, 332份初诊和96份治疗后标本中aPCs在有核细胞中的中位比例分别为11.13% (0.09%-80.47%) 和0.41% (0.01%-33.56%)。

[0060] 初诊患者aPCs的主要表型是CD19和CD45阴性或弱表达, 分别占96.4% (320/332) 和88.6% (294/332); 63.6% (211/332) 和42.8% (142/332) 患者出现CD56和CD117的异常阳性表达 (表2和图2)。

[0061] 检测出aPCs的96份治疗后标本中, CD19^{-/dim+}和CD45^{-/dim+}标本分别占99.0% (95/96) 和45.8% (44/96); CD56和CD117的阳性表达率分别为58.3% (56/96) 和49.0% (47/96) (表2)。

[0062] 表3 初诊和治疗后MM患者aPCs中表达异常的膜抗原数目

[0063]

异常抗原数	初诊 MM (N=332)		治疗后 MM (N=96)	
	n	%	n	%
0	3	1.0	0	0
1	12	3.6	10	10.4
2	77	23.2	39	40.6
3	159	47.9	35	36.5
4	81	24.4	12	12.5

[0064] 表3显示了初诊与治疗后MM患者中aPCs表达异常的抗原数目及其所占比例。99.0%初诊患者和全部治疗后患者出现至少一种抗原表达异常; 初诊和治疗后异常抗原表达 ≥ 2 个的患者比例分别为95.4% (317/332) 和89.6% (86/96), 说明胞膜抗原的检测适用于绝大多数MM患者, 检查异常胞膜抗原数量越多, 判断aPCs的准确性和特异性越强。

[0065] 但是, 1.0% (3/332) 初诊患者浆细胞的胞膜抗原表达与nPCs相同, 这种情况下, 仅通过胞膜抗原检测无法鉴别; 另外, 96份治疗后可见aPCs的标本中, 有30份 (31.3%) 标本同时存在nPCs, aPCs和nPCs的中位比例分别为0.12% (0.01-2.43%) 和0.16% (0.01-0.84%)。治疗后标本中10.4% (10/96) 的浆细胞仅出现CD19^{-/dim+}, 其余胞膜抗原表达正常。因nPCs中少数细胞也可见CD19^{-/dim+}, 故仅通过胞膜抗原检测无法确定浆细胞是否为cPCs。以上说明, 除胞膜抗原外, 有必要同时检测胞内Ig轻链以明确诊断。

[0066] 三、aPCs的克隆性分析-----确定为cPCs

[0067] 胞浆Ig轻链克隆性检测结果显示,318例初诊MM患者的aPCs和96份存在aPCs的治疗后标本全部显示轻链限制性表达。

[0068] 在初诊患者中,3例通过胞膜抗原检测无法明确区分aPCs和nPCs,经胞浆Ig轻链检测为限制性表达,明确为cPCs;5例初诊患者,结合临床特点、免疫固定电泳及游离轻链检测证实为不分泌型MM,但流式检测显示为轻链限制性表达,因此可明确为cPCs。另外,上述10例仅出现CD19⁻/dim⁺异常的治疗后标本,经胞浆轻链检测也可明确为cPCs。结果提示,对浆细胞进行胞浆Ig轻链检测的克隆性分析至关重要,能够弥补仅通过胞膜抗原或其他检测手段无法明确的aPCs。

[0069] 另外,治疗后30%左右的标本同时存在nPCs和aPCs,当nPCs数量高于aPCs时,受nPCs非限制性的影响,cKappa/cLambda比值可能显示正常,从而掩盖cPCs的存在;因此,除设门抗体外,还需要同时检测其它表达异常的抗原首先界定nPCs和aPCs,然后再分别分析nPCs和aPCs中cKappa和cLambda的表达特点,以进一步确定其克隆性。如果不借助胞膜抗原首先区分nPCs和aPCs,而直接进行胞浆Ig轻链检测,有时不能正确反映cPCs的比例。

[0070] 以上结果说明,胞膜抗原和胞浆Ig轻链检测相互补充可提高诊断的敏感性与特异性,本发明试剂盒的优势正是结合胞膜和胞浆Ig轻链检测识别cPCs。

[0071] 胞浆Ig轻链的限制性表达是MFC确定cPCs的唯一指标,但由于血浆中具有较多的游离免疫球蛋白,使胞浆Ig轻链的检测容易出现假阴性。因此,本试剂盒强调,每份标本在进行检测时,一定要先用PBS洗三遍,然后再进行抗体标记。

[0072] 浆细胞的克隆性只能通过cKappa和cLambda进行识别,如果不加入任何其它抗体,只加入这两种,不能识别浆细胞;浆细胞较特异的抗原是CD138,CD38表达较强,CD45表达不等,所以国内外多采用包括cKappa和cLambda在内的4色组合识别克隆性浆细胞,除cKappa和cLambda外,外加CD138、CD38和CD45中的2个。当患者体内浆细胞都是克隆性时,比如多发性骨髓瘤初诊患者,这样做是完全没有问题的;但某些疾病中,比如意义未明的单克隆丙种球蛋白病(Monoclonal Gammopathy Of Undetermined Significance, MGUS),冒烟型骨髓瘤(Smoldering Multiple Myeloma, SMM)或治疗后MM,正常浆细胞和克隆性浆细胞会同时存在,这时准确识别正常与克隆性至关重要,不但反映疾病的进展,还可以预测预后。而仅采用以上的4色组合或5色组合,无法做到明确区分正常与克隆性浆细胞的比例及比值。

[0073] 四、八色抗体组合检测的敏感度

[0074] 正常骨髓中不存在克隆性浆细胞,理论上讲,只要获取足够多的细胞数,就能提高检测的敏感性。本实验获取750,000个细胞,检测的敏感度为0.01%,增加获取的细胞数,可进一步提高敏感度。

[0075] 综上所述,研究结果表明通过本发明的试剂盒并借助八色流式细胞仪有助于精确区分并定量nPCs、aPCs和cPCs,检测cPCs的敏感度为0.01%。

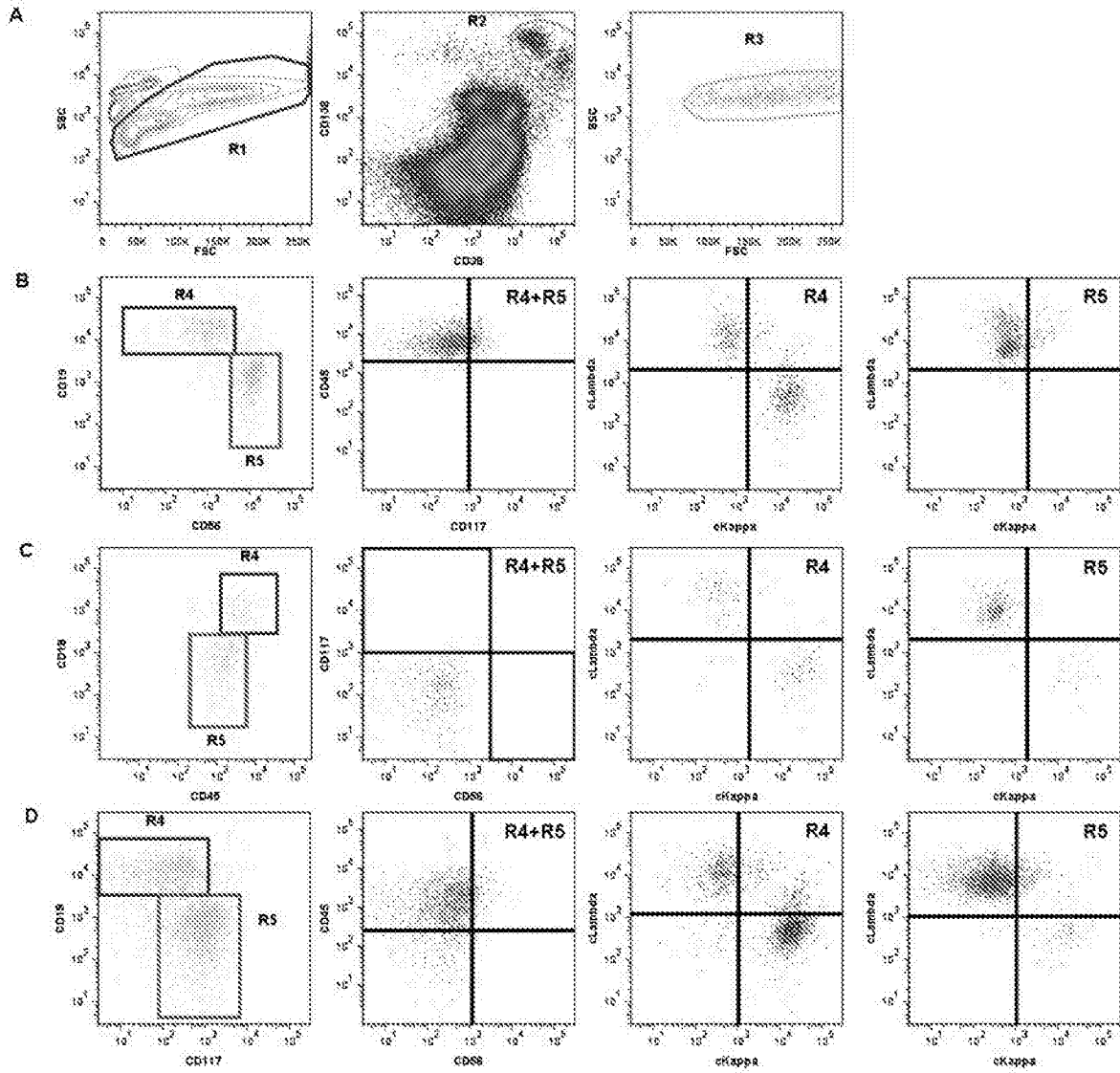


图1

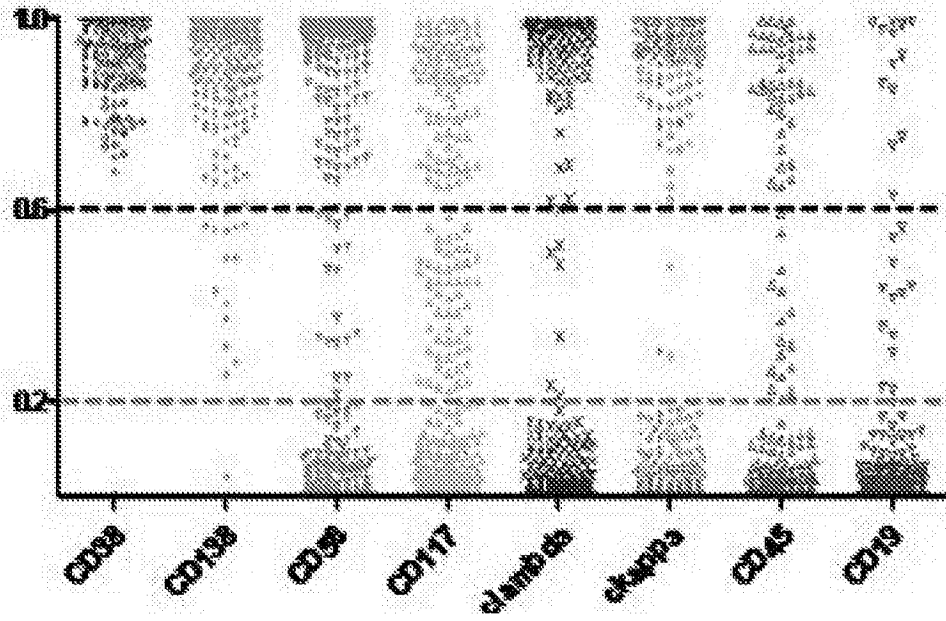


图2

专利名称(译)	鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	CN105223360B	公开(公告)日	2017-03-22
申请号	CN201510539692.1	申请日	2015-08-28
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学人民医院		
[标]发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
发明人	刘艳荣 王亚哲 常艳 郝乐 袁晓英 黄晓军		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N15/14		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/533 G01N33/577		
其他公开文献	CN105223360A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种鉴别检测正常浆细胞和克隆性浆细胞的试剂盒及应用，与流式细胞仪配套使用，所述试剂盒配备针对下述物质的单克隆抗体组合：Ig,κ Light Chain、Ig,λ Light Chain、CD19、CD117、CD138、CD56、CD38和CD45。本发明用CD38和CD138首先识别浆细胞，借助CD45、CD56、CD19和CD117识别浆细胞的表面标志是正常还是异常，对正常和异常表型的设门（R4和R5）后，再分别观察正常表型和异常表型中cKappa和cLambda的表达比值。采用本发明的试剂盒识别所有cPCs的应用中，具有准确率高、分析快速、方法简单的优势。

