

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810150909.X

[43] 公开日 2009年2月11日

[11] 公开号 CN 101363846A

[22] 申请日 2008.9.5

[21] 申请号 200810150909.X

[71] 申请人 甘肃省医学科学研究院

地址 730050 甘肃省兰州市七里河区小西湖
东街二号

[72] 发明人 姚伯程

[74] 专利代理机构 兰州中科华西专利代理有限公司
代理人 李艳华

权利要求书 2 页 说明书 6 页

[54] 发明名称

一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品及其制备方法

[57] 摘要

本发明涉及一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，它是由经中性缓冲甲醛溶液固定后的人淋巴细胞和保护剂组成的细胞浓度为 400 ~ 600 万/mL 的细胞悬液，经冻干后呈灰白色絮状固体；其标示值为 CD3⁺: 37.2 ~ 69.1%，CD4⁺: 17.9 ~ 33.7%，CD8⁺: 12.4 ~ 23.9%，CD4⁺/CD8⁺: 0.98 ~ 1.94。同时本发明还公开了该质控品的制备方法。本发明具有抗原保存良好，抗原性稳定的特点，可用作流式细胞仪法、免疫荧光法、免疫酶法、SPA(金黄色葡萄球菌 A 蛋白)花环法等方法检测淋巴细胞表面标志(CD 系列)抗原性的质量控制试剂。

1、一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，其特征在于：它是由经固定剂固定后的人淋巴细胞和保护剂组成的细胞浓度为400~600万/mL的细胞悬液；其标示值为 $CD3^+$ ：37.2~69.1%， $CD4^+$ ：17.9~33.7%， $CD8^+$ ：12.4~23.9%， $CD4^+/CD8^+$ ：0.98~1.94。

2、如权利要求1所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，其特征在于：所述固定剂为体积浓度为0.02%~4%、pH值为7.0~7.4的中性缓冲甲醛溶液；该溶液是指将蒸馏水和质量浓度为40%的甲醛按9:1的体积比混合后，加入碳酸钙，使其呈过饱和状态，即得到pH值为7.0、质量浓度为4%的中性甲醛溶液，然后将该中性甲醛溶液与pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液按1:99~0的体积比配制而成。

3、如权利要求1所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，其特征在于：所述保护剂为质量浓度为0.15~2.5%、pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏明胶溶液；该溶液是将0.15~2.5克明胶溶解于100mL pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液中，经过滤后配制而成的。

4、一种如权利要求1所述的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法，包括以下步骤：

(1)通过预试验选择合格供者，抽取静脉血，以1:1~3的体积比加入pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液，混匀，叠加在淋巴细胞分离液上，离心；

(2)取单个核细胞，用pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液洗涤后，离心，弃上清；

(3)将沉淀后的细胞用pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液稀释成400~600万/mL细胞悬液，然后滴加于固定剂中；在-20~30℃下搅拌固定0.25~48h，得固定细胞悬液；

(4)将固定细胞悬液用尼龙丝网过滤后，离心，弃上清；再用pH值为7.0~7.4的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液或蒸馏水洗涤后弃上清，得固定细胞沉淀；

(5)将保护剂加入固定细胞沉淀中，配成400~600万/mL细胞悬液，以每瓶0.2~1.0mL的量分装于冻存管或安培瓶后，即刻置于-80~-20℃冰箱中冷冻4~72h；

(6)将冷冻干燥机预冷至-38~-42℃，取出盛有细胞悬液的冻存管或安培瓶放入冷冻干燥机中，冻干 4~18h 后取出，立即封口，并将冻存管或安培瓶置-20℃~4℃下保存即可。

5、如权利要求 4 所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法，其特征在于：所述步骤(1)中的静脉血采用肝素或乙二胺四乙酸抗凝剂抽取。

6、如权利要求 4 所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法，其特征在于：所述步骤(3)中的细胞悬液与固定剂的体积比为 1：5~20。

7、如权利要求 4 所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法，其特征在于：所述步骤(4)中的尼龙丝网为 200~450 目。

8、一种如权利要求 1 所述的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品在人淋巴细胞表面抗原检测中的应用，其特征在于：使用时，在人淋巴细胞表面抗原质控品中加入 100~1000 μ L 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液、含 20%新生小牛血清的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液、磷酸盐缓冲液、蒸馏水中的任意一种，使其溶解，其中所述无钙、镁汉克氏平衡盐溶液或磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0~7.4。

一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品及其制备方法

技术领域

本发明涉及医学免疫学中的质控品，尤其涉及一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品及其制备方法。

背景技术

淋巴细胞在整个机体免疫应答过程中起着核心作用。在外周血白细胞中，淋巴细胞占 20%~50% [绝对值 $(1\sim 3.3) \times 10^9/L$]，其主要包括 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞。由于淋巴细胞是不均一的细胞群体，它包括了许多具有不同免疫功能的亚群，因此用免疫学技术测定淋巴细胞表面标志物，可用于判断人体的免疫功能，有助于人体的预防保健及疾病的诊断、治疗和预后。

目前，测定淋巴细胞表面标志物的方法很多，但无论何种方法，都是应用免疫学抗原-抗体反应的原理，即被测表面标志的特异性单克隆抗体与淋巴细胞反应，通过采用不同的方式（如荧光、染色或花环）显示阳性细胞而获得结果的。

当前，测定淋巴细胞 CD 系列的单克隆抗体 (McAb) 已在世界范围内进行了规模化、商品化生产，各个实验室根据自身的实际情况选择不同的 CD McAb 生产厂家、不同的 CD McAb 品种和淋巴细胞亚群的测定方法。目前，由于各实验室选用的检测方法不同，实验仪器型号不一，且中国人的淋巴细胞亚群参考值尚无统一定论，因此在实际工作中暂时参照各自所选用的试剂盒说明书中的参考值作为判断标准，从而致使淋巴细胞亚群检测结果的可靠性、可比性差，检测质量难以保证。

目前《全国临床检验操作规程》(中华人民共和国卫生部医政司编，第三版，东南大学出版社，2007:349; 第二版 1997:381-384 和第一版 1991:286-287) 中规定的用于细胞免疫检测的质量控制的试剂是使用液氮冻存的活淋巴细胞，该试剂通过预试验选择合格供者，自静脉取空腹抗凝（肝素或乙二胺四乙酸）血，分离淋巴细胞，洗涤 2~3 次，混悬于细胞冷冻保存液中获得，然后进行小量分装后置液氮中保存，液氮罐置于冷库中，在每批试验中用作质量控制。使用时，从液氮罐中取出一支细胞冻存管，迅速移入 37℃ 水浴中复

苏，吸出细胞悬液于另一离心管中离心，弃上清，洗涤 2~3 次，根据用途加入定量细胞悬浮液悬浮，调节到所需细胞浓度备用。但是在该技术中，细胞须在液氮中冷冻保存，且液氮罐须置于冷库中，保存要求条件严格、设备条件苛刻，使得保存费用很高；同时因为保存的是活的细胞，一旦操作过程和实验条件稍有不妥，细胞就很容易损伤和死亡，从而影响细胞抗原性和试验结果，因此普通临床实验室常因无此条件和能力而无法进行此项试验，而有条件者在实际使用时往往由于细胞分离、冻存、复苏过程技术要求高，操作复杂，费时费力，且有效期短而难以得到有效推广。

由于淋巴细胞表面抗原属于不稳定抗原，在保存过程中极易丢失，因此应用活的淋巴细胞质控品，无法解决实际工作中普遍应用的问题。

发明内容

本发明所要解决的技术问题是提供一种使淋巴细胞失去生物学活性而保存其抗原活性，并尽可能地保持淋巴细胞形态结构的适用于不同人淋巴细胞表面抗原检测方法、不同地域、不同条件的实验室的不同操作者的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品。

本发明所要解决的另一个技术问题是提供一种用冷冻干燥的方法使淋巴细胞表面抗原长期稳定存在的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法。

为解决上述问题，本发明所述的一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，其特征在于：它是由经固定剂固定后的人淋巴细胞和保护剂组成的细胞浓度为 400~600 万/mL 的细胞悬液；其标示值为 $CD3^+$ ：37.2~69.1%， $CD4^+$ ：17.9~33.7%， $CD8^+$ ：12.4~23.9%， $CD4^+/CD8^+$ ：0.98~1.94。

所述固定剂为体积浓度为 0.02%~4%、pH 值为 7.0~7.4 的中性缓冲甲醛溶液；该溶液是指将蒸馏水和质量浓度为 40% 的甲醛按 9:1 的体积比混合后，加入碳酸钙，使其呈过饱和状态，即得到 pH 值为 7.0、质量浓度为 4% 的中性甲醛溶液，然后将该中性甲醛溶液与 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液按 1: 99~0 的体积比配制而成。

所述保护剂为质量浓度为 0.15~2.5%、pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏明胶溶液；该溶液是将 0.15~2.5 克明胶溶解于 100mL pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液中，经过滤后配制而成的。

一种如上所述的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法，包括以下

步骤:

(1)通过预试验选择合格供者,抽取静脉血,以 1: 1~3 的体积比加入 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液,混匀,叠加在淋巴细胞分离液上,离心;

(2)取单个核细胞,用 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液洗涤后,离心,弃上清;

(3)将沉淀后的细胞用 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液稀释成 400~600 万/mL 细胞悬液,然后滴加于固定剂中;在-20~30℃下搅拌固定 0.25~48h,得固定细胞悬液;

(4)将固定细胞悬液用尼龙丝网过滤后,离心,弃上清;再用 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液或蒸馏水洗涤后弃上清,得固定细胞沉淀;

(5)将保护剂加入固定细胞沉淀中,配成 400~600 万/mL 细胞悬液,以每瓶 0.2~1.0mL 的量分装于冻存管或安培瓶后,即刻置于-80~-20℃冰箱中冷冻 4~72h;

(6)将冷冻干燥机预冷至-38~-42℃,取出盛有细胞悬液的冻存管或安培瓶放入冷冻干燥机中,冻干 4~18h 后取出,立即封口,并将冻存管或安培瓶置-20℃~4℃下保存即可。

所述步骤(1)中的静脉血采用肝素或乙二胺四乙酸抗凝剂抽取。

所述步骤(3)中的细胞悬液与固定剂的体积比为 1: 5~20。

所述步骤(4)中的尼龙丝网为 200~450 目。

一种如上所述的冻干人淋巴细胞表面抗原质控品在人淋巴细胞表面抗原检测中的应用,其特征在于:使用时,在人淋巴细胞表面抗原质控品中加入 100~1000 μ L 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液、含 20%新生小牛血清的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液、磷酸盐缓冲液、蒸馏水中的任何一种,使其溶解,其中所述无钙、镁汉克氏平衡盐溶液或磷酸盐缓冲液的 pH 值为 7.0~7.4。

本发明与现有技术相比具有以下优点:

1、由于本发明是经过固定剂固定后的冻干品,是表面抗原保存良好的无生物活性的淋巴细胞,因此抗原性稳定,有效期长至 2~5 年,质量可靠。

2、由于本发明为冻干品并密封,其体积、重量小,可在低于 25℃的常温下或-20℃~4℃运输、保存,后者首选,无需特殊技术和条件,因此可大大降低存储费用。

3、本发明使用中不需要特殊设备和条件，操作简单，可广泛适用于普通临床实验室开展质控工作，从而促进和提高人淋巴细胞表面抗原活性检测的质量和水平。

4、本发明产品价格低廉，易得到，运输存储方便。

5、本发明产品可用作流式细胞仪法、免疫荧光法、免疫酶法、SPA（金黄色葡萄球菌 A 蛋白）花环法等方法检测淋巴细胞表面标志（CD 系列）抗原性的质量控制试剂（参考品），以及用于有关淋巴细胞表面标志的其他检测项目（受体）和方法的室内室外质控；同时还可用于检测淋巴细胞表面标志 McAb 的亲合力、效价、型别等检测，评价淋巴细胞表面抗原 McAb。

6、如对本发明产品经国际或国内质控相关专业部门——如 WHO（世界卫生组织）、IUIS（国际免疫学联合会）、中国卫生部临床检验中心实验室标定抗原活性后，可提供国际或国内的一级、二级参考品，作为淋巴细胞表面抗原质量控制统一标准参考品，用于淋巴细胞表面抗原质量控制、评价单克隆抗体（McAb）质量和 McAb 质量控制。

具体实施方式

实施例 1 一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，它是由经甲醛溶液固定后的人淋巴细胞和明胶溶液组成的细胞浓度为 400~600 万/mL 的细胞悬液，经冻干后呈灰白色絮状固体；采用流式细胞仪法测定淋巴细胞亚群（CD），得到其标示值为 $CD3^+$ ：37.2~69.1%， $CD4^+$ ：17.9~33.7%， $CD8^+$ ：12.4~23.9%， $CD4^+/CD8^+$ ：0.98~1.94。

上述冻干人淋巴细胞表面抗原质控品的制备方法如下：

(1)首先通过对身体健康、无传染性疾病和其它急、慢性疾病、无免疫系统疾病的 18~38 岁的男性或女性细胞免疫功能——淋巴细胞 $CD3^+$ 、 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD4^+/CD8^+$ 进行检测，将结果正常者确定为预试验合格供者。

然后对预试验合格供者采用肝素或乙二胺四乙酸抗凝剂空腹抽取静脉血，以 1: 1~3 的体积比加入 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁 Hank's 平衡盐溶液（无钙、镁 Hank's 液），混匀，叠加在淋巴细胞分离液（来源：中国医学科学院血液病研究所）上，以 1500~2500 rpm 的转速离心 15~30min。

(2)取单个核细胞（PBMC），用 5~10 倍量的 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁 Hank's 液洗涤 2~3 次后，以 500~1500 rpm 的转速离心 5~10min，弃上清。

(3)将沉淀后的细胞用 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液稀释成 400~600 万/mL 细胞悬液，然后滴加于 pH 值为 7.0~7.4、体积浓度为 0.02%~4%的缓冲甲醛溶液中，细胞悬液与甲醛溶液的体积比为 1: 5~20；在 -20~30℃下磁力搅拌固定 0.25~48h，得固定细胞悬液。

其中甲醛溶液是指将蒸馏水和质量浓度为 40%的甲醛按 9: 1 的体积比混合后，加入碳酸钙，使其呈过饱和状态，即得到 pH 值为 7.0、质量浓度为 4%的中性甲醛溶液；然后将该中性甲醛溶液与 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液按 1: 99~0 的体积比配制而成。

(4)将步骤(3)得到的固定细胞悬液用 200~450 目尼龙丝网过滤后移入 5~50 mL 离心管中，以 500~2500 rpm 的转速离心 5~10min，弃上清；再用 pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁 Hank'S 液或蒸馏水洗涤 2~3 次后弃上清，得固定细胞沉淀。

(5)将 0.15~2.5 克明胶溶解于 100mL pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁汉克氏平衡盐溶液中，用 100~200 目尼龙丝网过滤后配制成 0.15~2.5%的明胶溶液。

将该明胶溶液加入步骤(4)得到的固定细胞沉淀中，混匀后用血细胞计数的方法计数细胞，配成 400~600 万/mL 细胞悬液，得到加有冻干保护剂的固定细胞悬液，然后以每瓶 0.2~1.0mL 的量分装于冻存管或安培瓶后，即刻置于 -80~-20℃冰箱中冷冻 4~72h。

(6)将冷冻干燥机预冷至 -38~-42℃，取出盛有细胞悬液的冻存管或安培瓶迅速放入冷冻干燥机中（切忌冰冻物溶解），冻干 4~18h 后取出，立即封口，并将冻存管或安培瓶置 -20℃~4℃下保存即可。

上述操作均在无菌环境下进行。

实施例 2 当该冻干人淋巴细胞表面抗原质控品应用于流式细胞仪法检测淋巴细胞亚群(CD)时，在人淋巴细胞表面抗原质控品中加入 100~1000 μ L、pH=7.0~7.4 的无钙、镁 Hank'S 液；或者在质控品中加入 100~1000 μ L、摩尔浓度为 0.01mol/L、pH=7.0~7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS)；或者在质控品中加入 100~1000 μ L 的蒸馏水，溶解，然后再用 250~450 目的尼龙丝网过滤，备用。

实施例 3 当该冻干人淋巴细胞表面抗原质控品应用于免疫荧光法、AP-AAP 桥联酶免疫法检测淋巴细胞亚群 (CD) 时，在人淋巴细胞表面抗原质控品中加入 100~1000 μ L、pH=7.0~7.4 的含 20%新生小牛血清的无钙、镁

Hank'S 液；或者在质控品中加入 100~1000 μ L、摩尔浓度为 0.01mol/L、pH=7.0~7.4 的含 20%新生小牛血清的 PBS；或者在质控品中加入 100~1000 μ L 的含 20%新生小牛血清的蒸馏水，溶解后备用。

实施例 4 当该冻干人淋巴细胞表面抗原质控品应用于单克隆抗体 SPA 花环法（McAb-A-E 直接法或间接法）检测淋巴细胞亚群（CD）时，在人淋巴细胞表面抗原质控品中加入 100~1000 μ L、pH 值为 7.0~7.4 的无钙、镁 Hank'S 液；或者在质控品中加入 100~1000 μ L 的蒸馏水，溶解后备用。

应该理解，这里讨论的实施例和实施方案只是为了说明，对熟悉该领域的人可以提出各种改进和变化，这些改进和变化将包括在本申请的精神实质和范围以及所附的权利要求范围内。

专利名称(译)	一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品及其制备方法		
公开(公告)号	CN101363846A	公开(公告)日	2009-02-11
申请号	CN200810150909.X	申请日	2008-09-05
[标]申请(专利权)人(译)	甘肃省医学科学研究院		
申请(专利权)人(译)	甘肃省医学科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	甘肃省医学科学研究院		
[标]发明人	姚伯程		
发明人	姚伯程		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	李艳华		
其他公开文献	CN101363846B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种冻干人淋巴细胞表面抗原质控品，它是由经中性缓冲甲醛溶液固定后的人淋巴细胞和保护剂组成的细胞浓度为400~600万/mL的细胞悬液，经冻干后呈灰白色絮状固体；其标示值为CD3+：37.2~69.1%，CD4+：17.9~33.7%，CD8+：12.4~23.9%，CD4+/CD8+：0.98~1.94。同时本发明还公开了该质控品的制备方法。本发明具有抗原保存良好，抗原性稳定的特点，可用作流式细胞仪法、免疫荧光法、免疫酶法、SPA(金黄色葡萄球菌A蛋白)花环法等方法检测淋巴细胞表面标志(CD系列)抗原性的质量控制试剂。