



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108508196 A
(43)申请公布日 2018.09.07

(21)申请号 201810331146.2

(22)申请日 2018.04.13

(71)申请人 沈阳汇敏源生物科技有限责任公司
地址 110000 辽宁省沈阳市中国(辽宁)自
由贸易试验区沈阳片区创新路153-13
号(1门)101室

(72)发明人 何韶衡 何萍

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569
代理人 刘奇

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

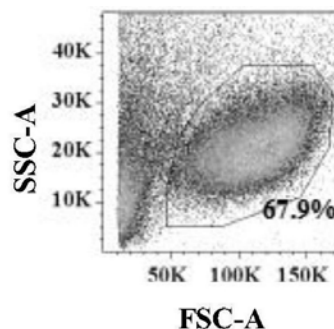
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及检测方法

(57)摘要

本发明提供了一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及其检测方法,属于细胞亚型检测技术领域。本发明提供的试剂盒,包括以下组分:血液稀释液,单个核细胞分离液,细胞培养液,淋巴细胞活化液,死细胞去除染料,FcR阻断剂、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体、荧光标记的抗人细胞内分子的抗体、PBS缓冲液、脂多糖、洗涤缓冲液、细胞染色缓冲液、细胞固定液和透膜洗液。检测时,首先分离全血中的单个核细胞,其次刺激人外周血单个核细胞,最后荧光抗体染色即可检测调节性T细胞亚型。利用本发明的试剂盒及检测方法可简单快捷的分辨2-6种调节性T细胞亚型。



1. 一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒,包括以下组分:血液稀释液、单个核细胞分离液、细胞培养液、淋巴细胞活化液、死细胞去除染料、FcR阻断剂、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体、荧光标记的抗人细胞内分子的抗体、脂多糖、洗涤缓冲液、细胞染色缓冲液、细胞固定液和透膜洗液;所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体包括:抗人CD3或CD4抗体,抗人CD8抗体,抗人CD25抗体,抗人CD127抗体,抗人ICOS抗体,抗人TGF- β 抗体和抗人CCR6抗体;所述荧光标记的抗人细胞内分子的抗体包括:抗人IL-10抗体,抗人IL-17抗体和抗人Foxp3抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述死细胞去除染料、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体荧光种类和荧光标记的抗人细胞内分子的抗体荧光种类包括:Alexa Fluor 488、Alexa Fluor 594、Alexa Fluor 647、Alexa Fluor 700、APC、APC/Cy7、APC/Cy7、APC/H7、Brilliant Violet 421、Brilliant Violet 510、Brilliant Blue 515、Brilliant Violet 570、Brilliant Violet 605、Brilliant Violet 650、Brilliant Violet 711、Brilliant Violet 785、FITC、LEAF、Pacific Blue、PE、PE/Cy5、PE/Cy7、PE/Dazzle、PerCP或PerCP/Cy 5.5。

3. 根据权利要求2所述的试剂盒,其特征在于,所述荧光的种类根据流式细胞仪的激光和滤光片的配置进行自由组合。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,所述FcR阻断剂的有效成分包括人免疫球蛋白或与其使用的流式抗体同一种属且亚型相同的不相关的免疫球蛋白。

5. 根据权利要求1~4任一项所述的试剂盒检测人调节性T细胞亚型的方法,包括以下步骤:

1) 将静脉血与血液稀释液混合后置于单个核细胞分离液上层,离心15~35min后,吸取单个核细胞,所述静脉血、血液稀释液及单个核细胞分离液的体积比为1:(0.5~2):(0.5~2);

2) 将步骤1)得到的所述单个核细胞用血液稀释液稀释后,90~600g离心4~30min后,收集细胞沉淀;

3) 将步骤2)得到的所述细胞沉淀用细胞培养液重悬,调整所述细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL,得第一细胞悬液;

4) 将步骤3)得到的所述第一细胞悬液与淋巴细胞活化液和脂多糖均匀混合,置于含CO₂培养箱中培养4~6h,得第一孵育细胞;

5) 将步骤4)得到的所述第一孵育细胞与PBS缓冲液按照1:(0.5~10)的体积比混合后,90~600g离心4~30min,弃去上清后得第二细胞悬液;

6) 取步骤5)得到的所述第二细胞悬液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与0.1~10 μ L含死细胞去除染料的DMSO溶液和0.1~10 μ L FcR阻断剂混合后,4~40 $^{\circ}$ C孵育5~30min,得第二孵育细胞;

7) 将步骤6)得到的所述第二孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后将细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~20 μ L每种荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体,均匀混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育5~30min;

8) 将步骤7)得到的所述第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与0.5

~5mL细胞染色缓冲液混合后90~600g离心4~30min,弃上清后向沉淀中按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.1~5mL细胞固定液重悬,4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得重悬的第三孵育细胞;

9) 将步骤8)得到的所述重悬的第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与0.5~5mL透膜洗液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后得第三孵育细胞沉淀,再次按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~5mL透膜洗液重悬第三孵育细胞沉淀,90~600g离心4~30min,弃上清,得第三孵育细胞沉淀;

10) 将步骤9)得到的所述第三孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~20 μ L每种荧光标记的抗细胞内分子的抗体,混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得第四孵育细胞;

11) 将步骤10)得到的所述第四孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~5mL透膜洗液,均匀混合后,90~600g离心4~30min,弃上清,得第四孵育细胞沉淀,用PBS调整细胞浓度为 $(0.1-10) \times 10^6$ 个/mL后用流式细胞仪检测抗体的表达;根据抗体的表达得到Treg细胞亚型的检测结果,所述Treg细胞亚型与抗体表达的关系对应如下:

序号	Treg 细胞亚型	抗体表达情况
1	诱导型 (适应型) Treg (iTreg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ TGF- β ⁺
2	CD127 低表达和阴性 Treg (CD127 (low&-) Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 ^(low&-)
3	ICOS 阳性 Treg (ICOS ⁺ Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ICOS ⁺
4	产 IL-10 的 1 型 Treg (Tr1)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ IL-10 ⁺
5	CD8 阳性 Treg (CD8 ⁺ Treg)	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
6	产 IL-17 的 Treg (IL-17 ⁺ Treg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺

注:+为阳性;low为低表达;-为阴性。

6. 根据权利要求5所述的检测人调节性T细胞亚型的方法,其特征在于,步骤1)所述离心的条件包括:离心力为200~1000g,离心温度为18~22 $^{\circ}$ C。

7. 根据权利要求5所述的检测人调节性T细胞亚型的方法,其特征在于,步骤3)所述的细胞培养液以RPMI 1640培养基为基础,包括体积浓度为0.1%~20%的胎牛血清和体积浓度为0~3%的青霉素-链霉素双抗溶液。

8. 根据权利要求5所述的检测人调节性T细胞亚型的方法,其特征在于,步骤4)所述孵育培养的条件包括:在含5%CO₂的培养箱中进行培养,培养温度为35~40 $^{\circ}$ C。

9. 根据权利要求5所述的检测人调节性T细胞亚型的方法,其特征在于,步骤7)和步骤9)所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体和抗人细胞内分子的抗体中各抗体的添加量根据孵育细胞的数量和抗体的工作浓度而定。

一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞亚型检测技术领域,具体涉及一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及检测方法。

背景技术

[0002] 19世纪90年代中期,人们提出CD4⁺抑制性T细胞,即调节性T(Treg)细胞,可以抑制效应性T细胞如Th细胞对机体的免疫损伤效应。目前,越来越多的资料显示人体内有几种不同亚型的Treg,且其在免疫系统中的作用不同,使得Treg的作用更加复杂。

[0003] 幼稚T细胞在不同条件可分化为多种调节性T(Treg)细胞,目前已鉴定出至少7种Treg细胞亚型:(1)nTregs:分泌IL-10和TGF- β 的CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺的T细胞,是数量最多的Treg细胞亚型;(2)iTregs:外来抗原可刺激外周血幼稚CD4⁺T细胞诱导其表达Foxp3,此外分泌TGF- β 和IL-10的Th3细胞也属于该亚型;(3)CD127^{low/-}Treg:在新生儿胸腺发现了CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}Foxp3⁺Treg细胞;(4)ICOS⁺Treg:ICOS⁺Treg细胞表达IL-10、IL-17和干扰素(IFN)- γ ;(5)Tr1细胞:Tr1细胞是不表达Foxp3但分泌IL-10并可抑制效应性Th细胞功能CD4⁺T细胞;(6)CD8⁺Tregs:OT-1CD8细胞在IL-4和IL-12作用下可迅速分化为表达CD8、分泌IL-10的Treg细胞(CD8⁺Treg细胞),且共表达活化和幼稚细胞相关的标记物;(7)产IL-17的Foxp3⁺Tregs。

[0004] 鉴于Treg细胞有多种亚型,且其在机体中的作用不同,将其分辨开进行单独研究显得尤为重要。但是目前市售的Treg试剂盒仅将CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺T细胞定义为Treg细胞,并不包括CD8⁺Treg细胞和CD127^{low/-}Treg细胞,也不能进一步鉴定CD4⁺Treg细胞中的其它Treg细胞亚型。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种可同时分辨2-6种人调节性T细胞亚型的试剂盒。

[0006] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0007] 本发明提供了一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒,包括以下组分:血液稀释液、单个核细胞分离液、细胞培养液、淋巴细胞活化液、死细胞去除染料、FcR阻断剂、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体、荧光标记的抗人细胞内分子的抗体、脂多糖、洗涤缓冲液、细胞染色缓冲液、细胞固定液和透膜洗液;所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体包括:抗人CD3或CD4抗体,抗人CD8抗体,抗人CD25抗体,抗人CD127抗体,抗人ICOS抗体,抗人TGF- β 抗体和抗人CCR6抗体;所述荧光标记的抗人细胞内分子的抗体包括:抗人IL-10抗体,抗人IL-17抗体和抗人Foxp3抗体。

[0008] 优选的,所述死细胞去除染料、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体荧光种类和荧光标记的抗人细胞内分子的抗体荧光种类独立的包括:AlexaFluor488、AlexaFluor 594、AlexaFluor 647、AlexaFluor 700、APC、APC/Cy7、APC/Cy7、APC/H7、

BrilliantViolet421、BrilliantViolet 510、Brilliant Blue 515、BrilliantViolet 570、BrilliantViolet 605、BrilliantViolet 650、Brilliant Violet711、Brilliant Violet785、FITC、LEAF、Pacific Blue、PE、PE/Cy5、PE/Cy7、PE/Dazzle、PerCP或PerCP/Cy 5.5。

[0009] 优选的,所述荧光的种类根据流式细胞仪的激光和滤光片的配置进行自由组合。

[0010] 优选的,所述FcR阻断剂的有效成分包括人免疫球蛋白或与使用的流式抗体同一种属且亚型相同的不相关的免疫球蛋白。

[0011] 本发明提供了一种利用上述试剂盒检测人调节性T细胞亚型的方法,包括以下步骤:

[0012] 1) 将静脉血与血液稀释液混合后置于单个核细胞分离液上层,离心 15~35min后,吸取单个核细胞,所述静脉血、血液稀释液及单个核细胞分离液的体积比为1:(0.5~2):(0.5~2);

[0013] 2) 将步骤1)得到的所述单个核细胞用血液稀释液稀释后,90~600g 离心4~30min后,收集细胞沉淀;

[0014] 3) 将步骤2)得到的所述细胞沉淀用细胞培养液重悬,调整所述细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL,得第一细胞悬液;

[0015] 4) 将步骤3)得到的所述第一细胞悬液与淋巴细胞活化液和脂多糖均匀混合,置于含CO₂培养箱中培养4~6h,得第一孵育细胞;

[0016] 5) 将步骤4)得到的所述第一孵育细胞与PBS缓冲液按照1:(0.5~10) 的体积比混合后,90~600g离心4~30min,弃去上清后得第二细胞悬液;

[0017] 6) 取步骤5)得到的所述第二细胞悬液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.1~10 μ L含死细胞去除染料的DMSO溶液和0.1~10 μ LFcR阻断剂混合后,4~40 $^{\circ}$ C孵育5~30min,得第二孵育细胞;

[0018] 7) 将步骤6)得到的所述第二孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后将细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~20 μ L各荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体,均匀混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育5~30 min;

[0019] 8) 将步骤7)得到的所述第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合后90~600g离心4~30min,弃上清后向沉淀中按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.1~5mL细胞固定液重悬,4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得重悬的第三孵育细胞;

[0020] 9) 将步骤8)得到的所述重悬的第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL透膜洗液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后得第三孵育细胞沉淀,再次按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~5mL透膜洗液重悬第三孵育细胞沉淀,90~600g离心4~30min,弃上清,得第三孵育细胞沉淀;

[0021] 10) 将步骤9)得到的所述第三孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞 /100 μ L 的体系加入0.5~20 μ L各荧光标记的抗细胞内分子的抗体,均匀混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得第四孵育细胞;

[0022] 11) 将步骤10)得到的所述第四孵育细胞沉淀按照 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系

加入0.5~5mL透膜洗液,均匀混合后,90~600g离心4~30min,弃上清,得第四孵育细胞沉淀,用PBS调整细胞浓度为 $(0.1-10) \times 10^6$ 个/mL 后用流式细胞仪检测抗体的表达;根据抗体的表达得到Treg细胞亚型的检测结果,所述Treg细胞亚型与抗体表达的关系对应如下:

[0023]

序号	Treg 细胞亚型	抗体表达情况
----	-----------	--------

[0024]

1	诱导型(适应型) Treg (iTreg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ TGF-β ⁺
2	CD127 低表达和阴性 Treg (CD127 (low&-) Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 (low&-)
3	ICOS 阳性 Treg (ICOS ⁺ Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ICOS ⁺
4	产 IL-10 的 1 型 Treg (Tr1)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ IL-10 ⁺
5	CD8 阳性 Treg (CD8 ⁺ Treg)	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
6	产 IL-17 的 Treg (IL-17 ⁺ Treg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺

[0025] 注:+为阳性;low为低表达;-为阴性。

[0026] 优选的,步骤1)所述离心的条件包括:离心力为200~1000g,离心温度为18~22℃。

[0027] 优选的,步骤3)所述的细胞培养液以RPMI 1640培养基为基础,包括体积浓度为0.1%~20%的胎牛血清和体积浓度为0~3%的青霉素-链霉素双抗溶液。

[0028] 优选的,步骤4)所述孵育培养的条件包括:在含5%CO₂的培养箱中进行培养,培养温度为35~40℃。

[0029] 优选的,步骤7)和步骤9)所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体和抗人细胞内分子的抗体中各抗体的添加量根据孵育细胞的数量和抗体的工作浓度而定。

[0030] 本发明提供了一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及其检测方法,试剂盒成分简单易得,可同时鉴别人体血液中的2~6种Treg细胞亚型。

附图说明

[0031] 图1为人外周血单个核细胞群;

[0032] 图2为去除死细胞后的人外周血单个核细胞群;

[0033] 图3为人外周血单个核细胞群中CD4⁺(CD3⁺CD8⁻)和CD8⁺(CD3⁺CD8⁻)的表达情况;

[0034] 图4为人外周血CD3⁺CD8⁺细胞群中CD8⁺Treg:CD8⁺CD25⁺Foxp3⁺的表达情况;

[0035] 图5为人外周血CD3⁺CD8⁻细胞群中CD25和Foxp3表达情况;

[0036] 图6为人外周血CD3⁺CD8⁻Foxp3⁺细胞群中诱导型(或适应型)Treg (iTreg):CD4⁺Foxp3⁺IL-10⁺TGF-β⁺的表达情况;

[0037] 图7为人外周血CD3⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁻细胞群中产IL-10的1型Treg (Tr1):CD4⁺CD25⁺Foxp3⁻IL-10⁺的表达情况;

[0038] 图8为人外周血CD3⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺细胞群中CD127低表达和阴性Treg (CD127^(low&-)Treg):CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺CD127^(low&-)的表达情况;

[0039] 图9为人外周血CD3⁺CD8⁻CD25⁺Foxp3⁺细胞群中ICOS阳性Treg, (ICOS⁺Treg):CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ICOS⁺的表达情况;

[0040] 图10为人外周血CD3⁺CD8⁻Foxp3⁺细胞群中产IL-17的Treg (IL-17⁺ Treg):CD4⁺Foxp3⁺CCR6⁺IL-17⁺的表达情况。

具体实施方式

[0041] 本发明提供了一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒,包括以下组分:血液稀释液、单个核细胞分离液、细胞培养液、淋巴细胞活化液、死细胞去除染料、FcR阻断剂、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体、荧光标记的抗人细胞内分子的抗体、PBS缓冲液、脂多糖、洗涤缓冲液、细胞染色缓冲液、细胞固定液和透膜洗液。

[0042] 在本发明中,所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体包括:抗人 CD3或CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD25抗体、抗人CD127抗体、抗人TGF-β抗体、抗人ICOS抗体和抗人CCR6抗体;所述荧光标记的抗人细胞内分子抗体包括:抗人IL-10抗体、抗人IL-17抗体和抗人Foxp3抗体。

[0043] 在本发明中,所述死细胞去除染料、荧光标记的抗人细胞膜外段分子的抗体荧光种类和荧光标记的抗人细胞内分子的抗体荧光种类独立的优选包括:Alexa Fluor488、Alexa Fluor 594、AlexaFluor 647、Alexa Fluor 700、APC、APC/Cy7、APC/Cy7、APC/H7、BrilliantViolet 421、BrilliantViolet 510、Brilliant Blue 515、BrilliantViolet 570、BrilliantViolet 605、BrilliantViolet 650、BrilliantViolet711、BrilliantViolet785、FITC、LEAF、Pacific Blue、PE、PE/Cy5、PE/Cy7、PE/Dazzle、PerCP或PerCP/Cy 5.5。

[0044] 在本发明中,所述荧光的种类可以根据流式细胞仪的激光和滤光片的配置进行自由组合。

[0045] 在本发明中,所述血液稀释液优选的渗透压与人体血浆渗透压相等的溶液,具体的所述血液稀释液优选的包括NaCl溶液或PBS缓冲液,所述NaCl 溶液的质量浓度优选的为0.9%;在本发明中,所述PBS缓冲液优选的包括以下重量份的组分:8.0份NaCl,0.20份KCl,1.16份Na₂HPO₄和0.20份 KH₂PO₄;所述PBS缓冲液的pH值优选的为7.0~7.6,更优选的为7.2~7.5。本发明对血液稀释液的来源没有特殊限定。

[0046] 在本发明中,所述单个核细胞分离液的有效成分优选的包括:聚蔗糖和泛影葡胺,或者泛影钠和多聚糖,或者碘克沙醇,所述单个核细胞分离液的的溶剂优选的为蒸馏水。本发明对所述单个核细胞分离液的来源及品种没有特殊限定,优选的所述单个核细胞分离液的密度是1.076~1.078g/mL,渗透压是275~305mOsm。

[0047] 本发明对所述细胞培养液的品种及来源没有特殊限定,优选的为培养人外周血单个核细胞的培养液,所述培养液更优选的以RPMI 1640培养基为基础,包含胎牛血清和青霉素-链霉素双抗溶液。本发明中,所述胎牛血清的体积终浓度优选的为0.1~20%,更优选的为0.5~15%,最优选的为1~10%。在本发明中所述青霉素-链霉素双抗溶液的体积终浓度优选的为0~3%,更优选的为0.5~2%。

[0048] 在本发明中,所述淋巴细胞活化液的有效成分优选的包括:豆蔻酰佛波醇乙酯、离子霉素和莫能菌素,或者豆蔻酰佛波醇乙酯、离子霉素和布雷非德菌素A,或者豆蔻酰佛波醇乙酯、钙离子载体和莫能菌素,或者豆蔻酰佛波醇乙酯、钙离子载体和布雷非德菌素A;本发明中,所述淋巴细胞活化液的浓度是使用时工作液浓度的500~5000倍;所述豆蔻酰佛波醇乙酯的工作浓度优选的为0.01~0.50 μ M,更优选的为0.050~0.2 μ M;所述离子霉素的工作浓度优选的为0.5~5.0 μ M,更优选的为1.0~4.0 μ M;所述莫能菌素的工作浓度优选的为0.5~6.0 μ M,更优选的为1.0~3.0 μ M;所述布雷非德菌素A的工作浓度优选的为0.5~30 μ g/mL,更优选的为1~20 μ g/mL;所述钙离子载体工作浓度优选的为25~1000ng/mL,更优选的为100~500ng/mL。本发明所述淋巴细胞活化液的溶剂优选的为DMSO。

[0049] 在本发明中,所述死细胞去除染料优选的包括胺活性荧光染料。所述胺活性荧光染料可以透过受损细胞的胞膜而不能透过完整细胞的胞膜。本发明中,所述死细胞去除染料优选的用DMSO溶解胺活性荧光染料得到的溶液。

[0050] 在本发明中,所述荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体包括:抗人 CD3或CD4抗体、抗人CD8抗体、抗人CD25抗体、抗人CD127抗体、抗人ICOS抗体、抗人TGF- β 和抗人CCR6抗体;所述荧光标记的抗人细胞内分子抗体包括:抗人IL-10抗体、抗人IL-17抗体和抗人Foxp3抗体。

[0051] 在本发明中,所述死细胞去除染料、荧光标记的抗人细胞胞膜外段分子的抗体和荧光标记的抗人细胞内分子的抗体的荧光种类分别包括:Alexa Fluor488、AlexaFluor 594、AlexaFluor 647、AlexaFluor 700、APC、APC/Cy7、APC/Cy7、APC/H7、BrilliantViolet421、BrilliantViolet 510、BrilliantBlue 515、BrilliantViolet 570、BrilliantViolet 605、BrilliantViolet 650、BrilliantViolet711、BrilliantViolet785、FITC、LEAF、Pacific Blue、PE、PE/Cy5、PE/Cy7、PE/Dazzle、PerCP、PerCP/Cy 5.5等。

[0052] 在本发明中,所述荧光的种类可以根据流式细胞仪的激光和滤光片的配置进行自由组合。

[0053] 在本发明中,所述洗涤缓冲液优选的包括PBS缓冲液。

[0054] 在本发明中,所述细胞染色缓冲液优选的为无钙镁的Dulbecco's PBS (DPBS)溶液,所述DPBS溶液的有效成分是胎牛血清,本发明所述胎牛血清的工作浓度优选的为0.1~20%,更优选的为0.5~15%,最优选的为1~10%。本发明中所述细胞染色缓冲液的pH值优选的为7.0~7.6。

[0055] 在本发明中,所述细胞固定液的有效成分优选的包括甲醛和甲醇,所述甲醛的工作浓度优选的为0.5%~10% (质量/质量),更优选的为0.8%~2% (质量/质量);所述甲醇的工作浓度优选的为0.1%~2% (质量/质量),更优选的为0.2%~1% (质量/质量)。

[0056] 在本发明中,所述透膜洗液的有效成分优选的包括皂素和胎牛血清,或者皂素和牛血清白蛋白,所述皂素的浓度优选为0.1~5% (w/v);所述胎牛血清的体积浓度优选为0.1~20%;所述牛血清白蛋白的质量体积浓度优选为0.1~20%。

[0057] 在本发明中,所述FcR阻断剂的有效成分优选的包括人免疫球蛋白,或与使用的流式抗体同一种属且亚型相同的不相关的免疫球蛋白。所述FcR阻断剂的工作液的质量浓度优选为0.1~100 μ g/mL,更优选为1~10 μ g/mL。

[0058] 本发明还提供了一种利用上述试剂盒检测人调节性T细胞亚型的方法,包括以下步骤:

[0059] 1) 将静脉血与血液稀释液混合后置于单个核细胞分离液上层,离心 15~35min 后,吸取单个核细胞,所述静脉血、血液稀释液及单个核细胞分离液的体积比为1:(0.5~2):(0.5~2);

[0060] 2) 将步骤1)得到的所述单个核细胞用血液稀释液稀释后,90~600g 离心4~30min后,收集细胞沉淀;

[0061] 3) 将步骤2)得到的所述细胞沉淀用细胞培养液重悬,调整所述细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL,得第一细胞悬液;

[0062] 4) 将步骤3)得到的所述第一细胞悬液与淋巴细胞活化液和脂多糖均匀混合,置于含CO₂培养箱中培养4~6h,得第一孵育细胞;

[0063] 5) 将步骤4)得到的所述第一孵育细胞与PBS缓冲液按照1:(0.5~10) 的体积比混合后,90~600g离心4~30min,弃去上清后得第二细胞悬液;

[0064] 6) 取步骤5)得到的所述第二细胞悬液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.1~10 μ L含死细胞去除染料的DMSO溶液和0.1~10 μ LFcR阻断剂混合后,4~40 $^{\circ}$ C孵育5~30min,得第二孵育细胞;

[0065] 7) 将步骤6)得到的所述第二孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后将细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体每种0.5~20 μ L,均匀混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育5~30 min;

[0066] 8) 将步骤7)得到的所述第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合后90~600g离心4~30min,弃上清后向沉淀中按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.1~5mL细胞固定液重悬,4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得重悬的第三孵育细胞;

[0067] 9) 将步骤8)得到的所述重悬的第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系与0.5~5mL透膜洗液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后得第三孵育细胞沉淀,再次按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系加入0.5~5mL透膜洗液重悬第三孵育细胞沉淀,90~600g离心4~30min,弃上清,得第三孵育细胞沉淀;

[0068] 10) 将步骤9)得到的所述第三孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞 /100 μ L 的体系加入0.5~20 μ L各荧光标记的抗细胞内分子的抗体,均匀混合后4~40 $^{\circ}$ C避光孵育10~120min,得第四孵育细胞;

[0069] 11) 将步骤10)得到的所述第四孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的体系加入0.5~5mL透膜洗液,均匀混合后,90~600g离心4~30 min,弃上清,得第四孵育细胞沉淀,用PBS调整细胞浓度为 $(0.1-10) \times 10^6$ 个/mL后用流式细胞仪检测抗体的表达;根据抗体的表达得到Treg细胞亚型的检测结果,所述Treg细胞亚型与抗体表达的关系对应如下:

[0070]

序号	Treg 细胞亚型	抗体表达情况
1	诱导型 (适应型) Treg (iTreg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ TGF-β ⁺
2	CD127 低表达和阴性 Treg (CD127 (low&-) Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 ^(low&-)
3	ICOS 阳性 Treg (ICOS ⁺ Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ICOS ⁺
4	产 IL-10 的 1 型 Treg (Tr1)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ IL-10 ⁺
5	CD8 阳性 Treg (CD8 ⁺ Treg)	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
6	产 IL-17 的 Treg (IL-17 ⁺ Treg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺

[0071] 注:+为阳性;low为低表达;-为阴性。

[0072] 本发明将静脉血与血液稀释液混合后置于单个核细胞分离液上层,离心 15~35min后,吸取单个核细胞。本发明中所述静脉血与血液稀释液及单个核细胞分离液的体积比优选的为1:(0.5~2.0):(0.5~2.0),更优选的为1:(0.9~1.1):(0.9~1.1),最优选的为1:1:1。本发明所述混合优选的为将静脉血和血液稀释液按照1:1的体积比混合,而后置于单个核细胞分离液上层。在本发明中,所述离心时优选的设置升速为9,降速为0,所述离心的离心力优选的为200~1000g,更优选的为250~950g,最优选的为300~900g,所述离心的时间优选的为15~35min,当所述静脉血离体时间>2h时,优选的选择离心为20~40min;所述离心的温度优选的为18~22℃。离心后,液体分层,小心用滴管吸出界面上的白膜层,尽量不要吸出其上层液体,得单个核细胞。

[0073] 得单个核细胞后,本发明将所述单个核细胞用血液稀释液稀释后离心 4~30min后,收集细胞沉淀。本发明中所述单个核细胞与血液稀释液的体积比优选的为1:(0.5~50)。本发明中所述离心的时间优选的为4~30min,所述离心的离心力优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为 150~500g。

[0074] 收集细胞沉淀后,本发明将得到的所述细胞沉淀用细胞培养液重悬,调整所述细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL,得第一细胞悬液。在本发明中,所述细胞培养液优选的分两次添加,第一次用于重悬细胞沉淀,第一次加入培养基的体积为0.1~1.0mL/(1mL全血制备的外周血单个核细胞),然后进行细胞计数,然后第二次添加培养基,最终使细胞的密度为 $0.5 \times 10^6 \sim 4 \times 10^6$ 个/mL。

[0075] 得第一细胞悬液后,本发明将所述第一细胞悬液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μL体系与0.1~10μL淋巴细胞活化液和0.1~10μL脂多糖混合,孵育培养4~6h,得第一孵育细胞。在本发明中,所述混合优选的为用移液器吹打,所述移液器吹打的次数优选的为5~20次,更优选的为5~15次,最优选的为8~12次。在本发明中,所述孵育培养优选的为在CO₂培养箱中进行,所述CO₂培养箱中CO₂的体积浓度优选的为3%~8%,更优选的为4.5%~5.5%。本发明所述CO₂培养箱的温度优选的为35~40℃,更优选的为36~38℃,最优选的为36.5~37.5℃。

[0076] 得第一孵育细胞后,本发明将所述培养细胞与PBS缓冲液按照1:(0.5~50)的体积比混合后离心4~30min,弃上清后得第二细胞悬液。在本发明中,所述离心的转速优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为150~500g;所述离心的时间优选的为4~30min,更优选的为5~20min。在本发明中,所述离心后调整第一孵育细胞的密度,所述调整优选的利用PBS缓冲溶液调整。

[0077] 得第二细胞悬液后,本发明将所述第二细胞悬液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L体系与0.1~10 μ L含死细胞去除染料的DMSO溶液和0.1~10 μ L的FcR阻断剂混合后,孵育5~30min,得第二孵育细胞。在本发明中,溶解后的死细胞去除染料优选的为DMSO溶解。本发明所述孵育的温度优选的为4~40 $^{\circ}$ C,更优选的为15~35 $^{\circ}$ C,所述孵育优选的在避光环境中孵育,所述孵育的时间优选的为5~30min,更优选的为10~20min。

[0078] 得第二孵育细胞后,本发明将所述第二孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合,离心4~30min,弃上清后细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L体系加入0.5~20 μ L各荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体,均匀混合后孵育,得第三孵育细胞。本发明所述离心时的转速优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为150~500g,所述离心的时间优选的为4~30min,更优选的为5~20min。本发明所述孵育的温度优选的为4~40 $^{\circ}$ C,更优选的为15~35 $^{\circ}$ C,最优选的为18~28 $^{\circ}$ C;所述孵育优选的为在避光的环境中孵育;所述孵育的时间优选的为5~30min,更优选的为10~20min。

[0079] 得第三孵育细胞后,本发明将所述第三孵育细胞按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与0.5~5mL细胞染色缓冲液混合,90~600g离心4~30min,弃上清后向细胞沉淀中加入细胞固定液重悬,孵育10~120min,得重悬的第三孵育细胞。在本发明中,所述第二孵育细胞与细胞固定液的体积比优选的为按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系:(0.1~5.0)mL。本发明所述离心的转速优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为150~500g,所述离心的时间优选的为4~30min,更优选的为10~20min。本发明所述孵育的温度优选的为4~40 $^{\circ}$ C,更优选的为15~35 $^{\circ}$ C,最优选的为18~28 $^{\circ}$ C;所述孵育优选的为避光环境中孵育;所述孵育的时间优选的为10~150min,更优选的为20~120min。

[0080] 得重悬的第三孵育细胞后,本发明将所述重悬的第三孵育细胞与透膜洗液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系:(0.1~5mL)的体积比混合,离心4~30min,弃上清后,得第三孵育细胞沉淀。在本发明中,所述重悬的第三孵育细胞与透膜洗液的体积比优选的为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系:(0.1~5mL),更优选的为 $1 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系:(0.2~4mL)。本发明所述离心的转速优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为150~500g,所述离心的时间优选的为4~30min,更优选的为5~20min。

[0081] 得第三孵育细胞沉淀后,本发明将所述第三孵育细胞沉淀按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的体系与(0.1~20) μ L各荧光标记的抗人细胞内分子抗体混合,孵育10~120min,得第四孵育细胞。

[0082] 在本发明中,将所述第三孵育细胞沉淀与透膜洗液及荧光标记抗人细胞内分子抗体进行混合前,优选的清洗所述第三孵育细胞沉淀。在本发明所述清洗的次数优选的为1~3次,更优选的为2次,每次清洗时,优选的利用透膜洗液进行清洗,所述透膜洗液的用量按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系优选的为0.5~5mL,更优选的为0.5~4mL,最

优选的为1~3mL,清洗后离心弃上清,得清洗后第三孵育细胞沉淀。本发明所述离心的转速优选的为90~600g,更优选的为100~550g,最优选的为150~500g,所述离心的时间优选的为4~30min,更优选的为5~20min。

[0083] 得清洗后第三孵育细胞沉淀后,本发明优选将所述清洗后第三孵育细胞沉淀与荧光标记的抗人细胞内分子的抗体按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L 的细胞体系:(0.1~20) μ L的比例混合,孵育10~120min,得第四孵育细胞。在本发明中,所述清洗后第三孵育细胞沉淀与荧光标记胞内抗体的体积比优选的为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系:(0.1~20) μ L,更优选的为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系:(0.5~15) μ L。在本发明中,所述孵育优选的在避光条件下进行,所述孵育的温度优选的为4~40 $^{\circ}$ C,更优选的为15~35 $^{\circ}$ C,最优选的为18~28 $^{\circ}$ C;所述孵育的时间优选的为10~120min,更优选的为20~100min。

[0084] 得第四孵育细胞后,本发明将所述第四孵育细胞与透膜洗液按照 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系:(0.5~5)mL的比例混合后离心,采用流式细胞仪检测抗体的表达。在本发明中,所述第四孵育细胞与透膜洗液及细胞染色缓冲液的体积比优选的为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系:(0.5~5)mL,更优选的为 $1 \times 10^5 \sim 10 \times 10^6$ 个细胞/100 μ L的细胞体系:(0.5~4)mL。在本发明中,采用流式细胞仪检测抗体的表达,根据抗体的表达分辨Treg的细胞亚型,具体如表1所示:

[0085] 表1.Treg细胞亚型与抗体表达对应表

[0086]

序号	Treg 细胞亚型	抗体表达情况
1	诱导型(适应型) Treg (iTreg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ IL-10 ⁺ TGF- β ⁺
2	CD127 低表达和阴性 Treg (CD127 (low&-) Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ CD127 (low&-)
3	ICOS 阳性 Treg (ICOS ⁺ Treg)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺ ICOS ⁺
4	产 IL-10 的 1 型 Treg (Tr1)	CD4 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁻ IL-10 ⁺
5	CD8 阳性 Treg (CD8 ⁺ Treg)	CD8 ⁺ CD25 ⁺ Foxp3 ⁺
6	产 IL-17 的 Treg (IL-17 ⁺ Treg)	CD4 ⁺ Foxp3 ⁺ CCR6 ⁺ IL-17 ⁺

[0087] 注:+为阳性;low为低表达;-为阴性。

[0088] 下面结合实施例对本发明提供的检测人调节性T细胞亚型的试剂盒进行详细的说明,但是不能把它们理解为对本发明保护范围的限定。

[0089] 实施例1

[0090] 分离全血中的单个核细胞:

[0091] 1) 取1mL新鲜静脉血(血液离体 \leq 2h)加入1mL血液稀释液稀释血液;

[0092] 2) 取1mL单个核细胞分离液于离心管底部,将稀释后的血液小心地叠加于单个核细胞分离液的上面,避免血液和单个核细胞分离液混合;

[0093] 3) 离心机中,800g离心20min,离心机的温度设为18℃,升速设为9,降速设为0;
[0094] 4) 用滴管吸出界面上的白膜层(单个核细胞),尽量不要吸出其上层液体;
[0095] 5) 2mL血液稀释液稀释单个核细胞溶液,室温250g离心10min;收集细胞沉淀,100μL细胞培养液重悬单个核细胞,获得的单个核细胞如图1所示。

[0096] 实施例2

[0097] 刺激人外周血单个核细胞:

[0098] 1) 细胞计数,用细胞培养液调整细胞密度为 1×10^6 /mL;

[0099] 2) 每1mL细胞悬液加入2μL淋巴细胞活化液和1μL LPS,均匀混合后接种于细胞培养板上,置于CO₂培养箱中37℃孵育4h;

[0100] 3) 每管收集细胞1mL,加入1mL磷酸盐缓冲液,200g离心6min;

[0101] 4) 细胞计数,磷酸盐缓冲液调整细胞密度为 1×10^7 /mL细胞悬液。

[0102] 实施例3

[0103] 荧光抗体染色:

[0104] 1) 每管加入100μL细胞悬液,然后加入1uL溶解后的死细胞去除染料和5uLFcR阻断剂,室温避光孵育15min;

[0105] 2) 每管加入1mL细胞染色缓冲液,200g离心6min,弃去上清液;得到的去除死细胞后的人外周血单个核细胞群如图2所示;

[0106] 3) 每管加入100μL细胞染色缓冲液重悬细胞,然后加入PerCP/Cy 5.5 标记的抗人CD3、FITC标记的抗人CD8、PE标记的抗人CD25、BrilliantViolet 421标记的抗人TGF-β和BrilliantViolet 510标记的抗人CD127抗体各5uL,或者PerCP/Cy 5.5标记的抗人CD3、FITC标记的抗人CD8、BrilliantViolet 510标记的抗人CD25、PE/Cy7标记的抗人CD278(ICOS)和PE标记的抗人CCR6抗体各5uL室温避光孵育15min;

[0107] 4) 每管加入1mL细胞染色缓冲液,200g离心6min,弃去上清液;

[0108] 5) 每管加入1mL固定透膜洗液重悬细胞,室温避光30min;

[0109] 6) 每管加入2mL透膜洗液,200g离心6min,弃去上清液;

[0110] 7) 每管加入100uL透膜洗液重悬细胞,然后Alexa Fluor 647标记的抗人Foxp3、PE/Cy 7标记的抗人IL-10各5μL,或者BrilliantViolet 421标记的抗人IL-17A和Alexa Fluor 647标记的抗人Foxp3抗体各5μL,室温避光孵育1h;

[0111] 8) 每管加入2mL透膜洗液,清洗一次,200uL细胞染色缓冲液重悬细胞,上流式细胞仪检测各分子的表达情况,得到的各抗体的表达情况如图 3~10所示。

[0112] 由上述实施例可知,利用本发明的试剂盒及其检测方法,可以快速的同时检测人体血液中2-6种Treg细胞亚型,诱导型(或适应型)Treg的表达如图6所示;产IL-10的Treg的表达如图7所示;CD127低表达和阴性Treg 的表达如图8所示;ICOS阳性Treg的表达如图9所示;产IL-17的Treg的表达如图10所示。

[0113] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

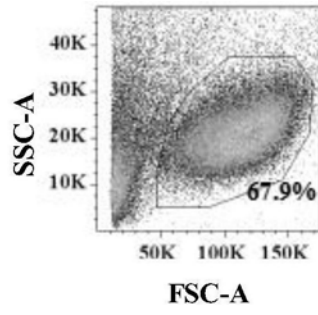


图1

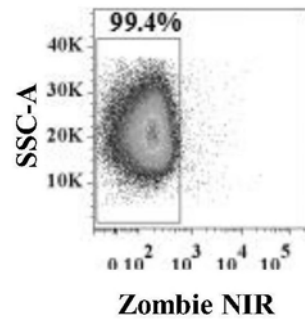


图2

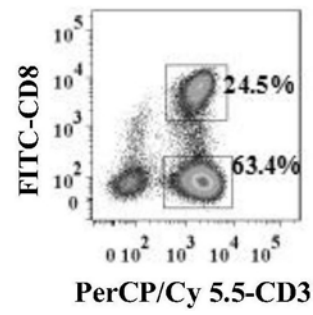


图3

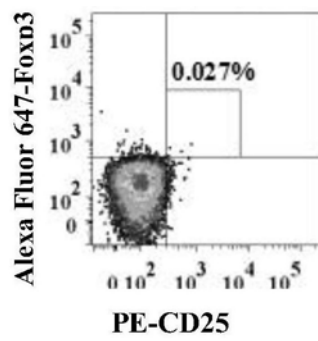


图4

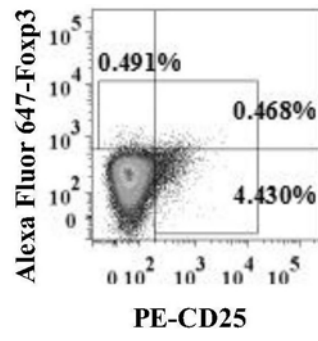


图5

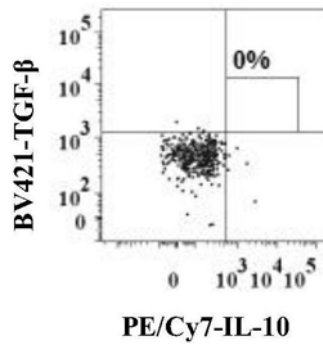


图6

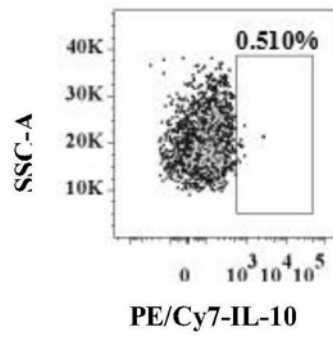


图7

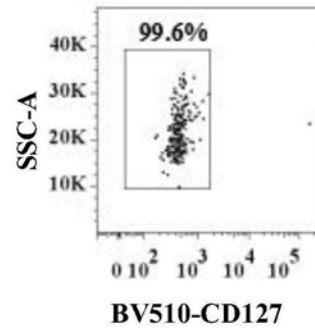


图8

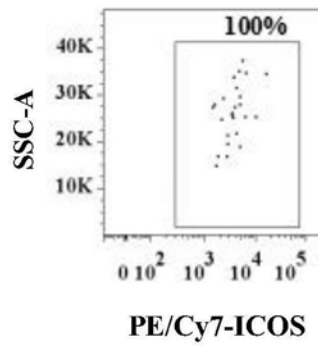


图9

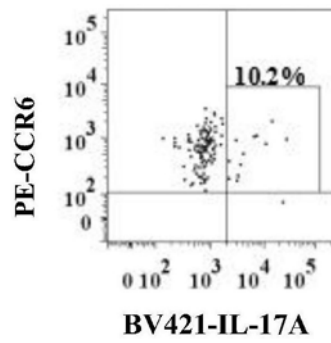


图10

专利名称(译)	一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及检测方法		
公开(公告)号	CN108508196A	公开(公告)日	2018-09-07
申请号	CN201810331146.2	申请日	2018-04-13
[标]发明人	何韶衡 何萍		
发明人	何韶衡 何萍		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/505 G01N33/533 G01N2333/4704 G01N33/56972		
代理人(译)	刘奇		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种检测人调节性T细胞亚型的试剂盒及其检测方法，属于细胞亚型检测技术领域。本发明提供的试剂盒，包括以下组分：血液稀释液，单个核细胞分离液，细胞培养液，淋巴细胞活化液，死细胞去除染料，FcR阻断剂、荧光标记的抗人细胞表面标记分子的抗体、荧光标记的抗人细胞内分子的抗体、PBS缓冲液、脂多糖、洗涤缓冲液、细胞染色缓冲液、细胞固定液和透膜洗液。检测时，首先分离全血中的单个核细胞，其次刺激人外周血单个核细胞，最后荧光抗体染色即可检测调节性T细胞亚型。利用本发明的试剂盒及检测方法可简单快捷的分辨2-6种调节性T细胞亚型。

