



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103630679 B

(45) 授权公告日 2016.06.29

(21) 申请号 201310597958.9

(22) 申请日 2013.11.22

(73) 专利权人 南方医科大学珠江医院

地址 510282 广东省广州市海珠区工业大道中 253 号

(72) 发明人 潘明新 程佩伦 蒋泽生 汪艳高毅

(74) 专利代理机构 北京市立方律师事务所
11330

代理人 刘延喜 王增鑫

(51) Int. Cl.

G01N 33/533(2006.01)

(56) 对比文件

CN 87107218 A, 1988.06.08,

WO 03/012078 A2, 2003.02.13,

US 2013/0225427 A1, 2013.08.29,

MarkJ. Miller. Autonomous T cell

trafficking examined in vivo with

intravital two-photon microscopy.

《PNAS》. 2003, 第 100 卷 (第 5 期), 第 2604-2609

页.

汤永永. 基于 CFSE 染色的小鼠淋巴细胞体内示踪方法的建立. 《中国输血杂志》. 2011, 第 24 卷 (第 10 期), 第 850-853 页.

丘陵. 荧光染料 CFSE 检测淋巴细胞增殖的研究. 《荧光染料 CFSE 检测淋巴细胞增殖的研究》. 2005, 第 15 卷第 22-24 页.

包晶晶. CFSE 标记技术的研究进展. 《免疫学杂志》. 2010, 第 26 卷 (第 5 期), 第 461-464 页.

审查员 刘迎鸣

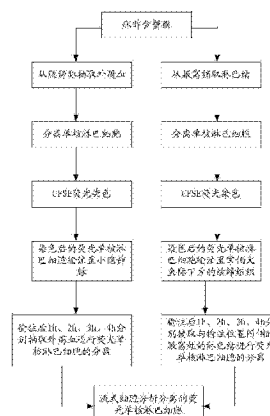
权利要求书2页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

单核淋巴细胞体内示踪方法

(57) 摘要

本发明公开了一种单核淋巴细胞体内示踪方法,包括步骤:采集食蟹猴腋窝处的淋巴结;利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞;将单核淋巴细胞进行荧光染色;将染色后的单核淋巴细胞输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中;再次采集与所述输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结,并对再次采集的淋巴结采用流式细胞仪进行检测。通过上述方法,本发明能够使荧光染色后的单核淋巴细胞富集于淋巴结中,以便进行免疫示踪。



1. 一种单核淋巴细胞体内示踪方法,其特征在于,包括以下步骤:

获取淋巴结,所述淋巴结为食蟹猴腋窝处的淋巴结;

利用密度梯度离心法获取所述淋巴结中的单核淋巴细胞;

将所述单核淋巴细胞进行荧光染色以获得荧光标记;

将所述染色后的单核淋巴细胞回输至所述食蟹猴,所述回输位置为食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织;

再次获取与所述回输位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结,并对再次获取的淋巴结中的荧光标记采用流式细胞仪进行检测。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述荧光染色中采用的染料为羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于,所述利用密度梯度离心法获取所述淋巴结中的单核淋巴细胞的步骤包括:

200目不锈钢网研磨所述淋巴结,并利用磷酸盐缓冲液、Hank's液或RPMI 1640制备淋巴细胞悬液;

在所述悬液中加入红细胞裂解液以裂解悬液中的红细胞;

将所述红细胞裂解后的悬液缓慢加入葡聚糖-泛影葡胺液面上,水平离心 $2000\text{rpm} \times 20\text{min}$;

吸取离心后云雾层的液体,置于一短中管中,并加入5倍以上体积的磷酸盐缓冲液、Hank's液或RPMI 1640;

$1500\text{rpm} \times 10\text{min}$ 洗涤重悬离心3次,获得单核淋巴细胞。

4. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于,所述将单核淋巴细胞进行荧光染色的步骤包括:

将 $500\mu\text{g}$ CFSE和 $90\mu\text{L}$ 二甲基亚枫混合以制备 10mmol/L 的CFSE母液;

利用磷酸盐缓冲液将所述CFSE母液稀释至 $2\mu\text{mol/L}$;

取 100mL 稀释后的CFSE母液与 100mL 单核淋巴细胞悬液混合染色,获得 $1\mu\text{mol/L}$ 的CFSE荧光单核淋巴细胞悬液,其中,所述染色孵育温度为 37°C ,时间为 $15\sim 20\text{min}$ 。

5. 根据权利要求4所述的方法,其特征在于,所述再次获取与所述回输位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结,并对再次获取的淋巴结采用流式细胞仪进行检测的步骤包括:

回输所述CFSE荧光单核淋巴细胞后1h、2h、3h、4h分别获取与所述回输位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结;

所述荧光单核淋巴细胞的获取通过所述利用密度梯度离心法获取所述淋巴结中的单核淋巴细胞的方法实现;

将所述获取的荧光单核淋巴细胞通过流式细胞仪进行检测。

6. 根据权利要求5所述的方法,其特征在于,所述利用密度梯度离心法获取所述淋巴结中的单核淋巴细胞的步骤之后包括:

将所述单核淋巴细胞重悬;

取所述悬液与台盼兰染液混合,加至细胞计数板上,计算细胞个数。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于,所述将单核淋巴细胞进行荧光染色的步骤之后包括:

取CFSE荧光单核淋巴细胞悬液与台盼蓝溶液混合,加至细胞计数板,计数活细胞和死细胞的数量。

单核淋巴细胞体内示踪方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫示踪领域,特别是涉及一种单核淋巴细胞体内示踪方法。

背景技术

[0002] 单核淋巴细胞在机体的免疫反应中具有重要的作用,目前,临床常用免疫状态的检测方法为淋巴细胞介导的细胞毒性试验,该方法为体外实验,无法真实模拟体内免疫环境。由于免疫反应的复杂性,现有的免疫学检测方法均有其局限性。

[0003] 现有的细胞示踪技术有同位素标记技术、磁标记技术及生物发光标记技术等。各标记技术均有其优缺点,如:同位素标记技术灵敏度高,适于长期示踪,但有一定的放射性污染,检测复杂,并需要特定的检测场所;磁标记技术为假阳性率低、无创的示踪技术,但其检测需要特定的仪器及大小合适的核磁共振线圈;生物发光标记技术前期转染等标记方法复杂,且深部组织信号强度不理想。

[0004] 具体的示踪方法为从外周血中分离淋巴细胞,进行标记后回输体内,但由于灵长类等大动物血容量较大,回输体内会导致靶细胞过于稀释,难以进行监测,因此无法适用于免疫状态的检测。

发明内容

[0005] 本发明主要解决的技术问题是提供一种单核淋巴细胞体内示踪方法,能够使荧光染色后的单核淋巴细胞富集于淋巴结中,以便进行免疫示踪。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种单核淋巴细胞体内示踪方法,包括步骤:采集食蟹猴腋窝处的淋巴结;利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞;将单核淋巴细胞进行荧光染色;将染色后的单核淋巴细胞输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中;再次采集与所述输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结,并对再次采集的淋巴结采用流式细胞仪进行检测。

[0007] 其中,荧光染色中采用的染料为羧基荧光素二醋酸盐琥珀酰亚胺酯(CFSE)。

[0008] 其中,采集食蟹猴腋窝处的淋巴结的步骤包括以下内容。

[0009] 麻醉食蟹猴:手术前12h禁食,6h禁水,使用氯胺酮15mg/kg进行麻醉;麻醉后将食蟹猴仰卧保定,将其腋窝局部、四肢局部剃毛以暴露手术部位和静脉,所述静脉用于麻醉保定后补液,补液为5%葡萄糖氯化钠,补液注射速度为1mL/min。

[0010] 麻醉过程中,观察食蟹猴的呼吸状态,当食蟹猴出现呼吸浅慢、角膜反射迟钝,即麻醉适度。

[0011] 采集淋巴结:以碘伏消毒所述手术部位,医用酒精脱碘;从食蟹猴腋中线剪开一小口,分离浅筋膜,暴露其深层的结缔组织、脂肪组织及淋巴结,取出淋巴结。

[0012] 第一次麻醉后约60min按照首次麻醉剂量的1/3剂量追加麻醉一次。

[0013] 其中,利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞的步骤包括以下内容。

[0014] 200目不锈钢网研磨淋巴结,并利用磷酸盐缓冲液(PBS)、Hank's液或RPMI1640制

备淋巴细胞悬液；在悬液中加入红细胞裂解液以裂解悬液中的红细胞。

[0015] 将红细胞裂解后的悬液缓慢加入葡聚糖-泛影葡胺液面上，水平离心 $2000\text{rpm} \times 20\text{min}$ ；其中，葡聚糖-泛影葡胺置于短中管中，用滴管将悬液沿管壁缓慢滴加于葡聚糖-泛影葡胺的液面上，滴加过程中需保持清楚的界面。

[0016] 离心后，管内分为三层，中层（云雾层）为单核淋巴细胞，吸取离心后云雾层的液体，置于一短中管中，并加入5倍以上体积的磷酸盐缓冲液、Hank's液或RPMI1640； $1500\text{rpm} \times 10\text{min}$ 洗涤重悬离心3次，获得单核淋巴细胞。末次离心后，弃上清，重悬单核淋巴细胞。

[0017] 其中，将单核淋巴细胞进行荧光染色的步骤包括以下内容。

[0018] 荧光染料CFSE的配置：将 $500\mu\text{g}$ CFSE和 $90\mu\text{L}$ 二甲基亚枫混合以制备 10mmol/L 的CFSE母液；利用磷酸盐缓冲液将CFSE母液稀释至 $2\mu\text{mol/L}$ 。

[0019] 取 100mL 稀释后的CFSE母液与 100mL 单核淋巴细胞悬液混合染色，获得 $1\mu\text{mol/L}$ 的CFSE荧光单核淋巴细胞悬液，其中，染色孵育温度为 37°C ，时间为 $15\sim 20\text{min}$ 。

[0020] 其中，将染色后的单核淋巴细胞输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中的步骤包括：将CFSE荧光单核淋巴细胞悬液输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中；CFSE荧光单核淋巴细胞悬液输注至食蟹猴内的体积为 0.5mL 。

[0021] 其中，再次采集与输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结，并对再次采集的淋巴结采用流式细胞仪进行检测的步骤包括以下内容。

[0022] 输注CFSE荧光单核淋巴细胞后1h、2h、3h、4h分别采集与输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结；采用步骤利用密度梯度离心法获取所述淋巴结中的单核淋巴细胞的方法获取荧光单核淋巴细胞。

[0023] 将获取的荧光单核淋巴细胞通过流式细胞仪进行检测，主要对荧光单核淋巴细胞的光散射信号进行测量，选定小淋巴细胞亚群为检测细胞对象群，测量阳性细胞的数量、比例以及时间依存的衰减情况。

[0024] 其中，利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞的步骤之后，可取单核淋巴细胞悬液与 0.2% 台盼兰染液混合，加至细胞计数板上，计算细胞个数。

[0025] 其中，将单核淋巴细胞进行荧光染色的步骤之后，取CFSE荧光单核淋巴细胞悬液与台盼蓝溶液混合，加至细胞计数板，计数活细胞和死细胞的数量。

[0026] 本发明的有益效果是：区别于现有技术的情况，本发明提出的单核淋巴细胞体内示踪方法可用于食蟹猴等灵长类大型动物单核淋巴细胞的体内荧光示踪。具体为：采集食蟹猴腋窝处的淋巴结；利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞；将单核淋巴细胞进行荧光染色；将染色后的单核淋巴细胞输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中；再次采集与输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结，并对再次采集的淋巴结采用流式细胞仪进行检测。通过上述方法，本发明能够使荧光染色后的单核淋巴细胞富集于淋巴结中，以便进行免疫示踪。

附图说明

[0027] 图1是本发明单核淋巴细胞体内示踪方法一实施例的流程示意图。

具体实施方式

[0028] 下面结合附图和实施例对本发明进行详细说明。

[0029] 实施例1

[0030] 请参阅图1,本实施例所用CFSE试剂购自美国Molecularprobes公司,所用红细胞裂解液及单核淋巴细胞分离液(葡聚糖-泛影葡胺)均购自美国BD公司。

[0031] 本实施例所使用的实验动物为健康、清洁级、雄性食蟹猴,体重为7.0Kg,实验动物质量合格证号:SCXK(粤)2009-0010。实验过程中对动物处置方法符合动物伦理学要求。

[0032] 为更好的突出本发明的优点,本实施例依据不同的采集、输注单核淋巴细胞的途径,分为血管通道组(A组)和淋巴管通道组(B组)。血管通道组(A组)将从外周血抽取分离单核淋巴细胞,标记后回输静脉,再次从血管中抽取外周血进行单核淋巴细胞的流式细胞检测;淋巴管通道组(B组)将从淋巴结中分离单核淋巴细胞,标记后回输皮下结缔组织,再次从淋巴结中分离单核淋巴细胞进行流式细胞检测;两组各自设置其阴性对照和阳性对照。

[0033] 本实施例操作过程如下:

[0034] (1)实验动物的准备

[0035] 手术前12h禁食,6h禁水,使用氯胺酮15mg/kg对食蟹猴进行麻醉,当食蟹猴出现呼吸浅慢、角膜反射迟钝,为麻醉适度表现。

[0036] 麻醉后仰卧保定,食蟹猴腹部及腹股沟区域剃毛,腋窝局部剃毛,四肢局部剃毛,暴露静脉,以利于手术中的补液。麻醉保定后开始补液,5%葡萄糖氯化钠注射液约1mL/min。补液按照先快后慢的原则,补液总量每公斤体重不超过100mL。

[0037] 手术过程中注意观察食蟹猴的呼吸状态,第一次麻醉后约60min按照首次麻醉剂量的1/3剂量追加麻醉一次。

[0038] (2)单核淋巴细胞的首次提取

[0039] a.A组单核淋巴细胞的提取

[0040] 以碘伏消毒手术部位,医用酒精脱碘,分离暴露股静脉,经股静脉抽取约50mL外周血,用红细胞裂解液进行红细胞裂解,裂解后加入肝素,同时加入PBS、Hank's液或RPMI1640,通过葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法进行细胞分离,分离得到三层分液,用吸管吸取中部云雾层分液,反复洗涤重悬离心3次,最后用PBS稀释,获得100mL单核淋巴细胞悬液,计数细胞总量约为 2×10^5 /mL。从悬液中取出1mL,标记为A0(A组阴性对照管)。

[0041] b.B组单核淋巴细胞的提取

[0042] 以碘伏消毒手术部位,医用酒精脱碘,

[0043] 从腋中线剪开一长约3cm左右小口,分离浅筋膜,暴露其深层的结缔组织、脂肪组织及淋巴结,取出1-2个淋巴结,使用200目不锈钢网研磨淋巴结,研磨后使用PBS稀释制备单核淋巴细胞悬液,经红细胞裂解后葡聚糖-泛影葡胺密度梯度离心法进行单核淋巴细胞的分离提取,反复洗涤重悬离心3次,最后用PBS稀释,获得100mL单核淋巴细胞悬液,计数细胞总量约为 5×10^6 /mL。从悬液中取出1mL,标记为B0(B组阴性对照管)。

[0044] (3)荧光单核淋巴细胞的制备

[0045] a.荧光染料CFSE的配制

[0046] 500ugCFSE用90uL二甲基亚砜(DMSO)溶解配成10mmol/L的母液,于-20℃蔽光保存,使用前用无菌PBS将母液稀释成所需浓度,要求现配现用。

[0047] b.荧光标记条件的确定

[0048] 从剩余A组或B组单核淋巴细胞悬液中取出4等份悬液;将配制好的CFSE母液用无菌的PBS稀释成4种不同浓度0.5 μ mol/L、1 μ mol/L、3 μ mol/L、5 μ mol/L。分别用4种浓度的CFSE以1:1比例染色4组细胞悬液,染色孵育温度为37℃,时间为15~20min。染色后将4份悬液稀释,各取1滴稀释液分别和1滴5g/L台盼蓝溶液混合,静置3min,加至细胞计数板,显微镜下观察,活细胞不着色,死细胞核成蓝色,计数活细胞和死细胞的数量,细胞存活率均达95%以上。荧光显微镜下观察荧光强度并用流式检测转染率,发现4组转染率都在99%以上,结果表明染色浓度和时间对转染率影响较小。考虑到染料的浓度和染料与细胞的接触时间对细胞状态的影响,本实施例确定CFSE染色浓度为1 μ mol/L。

[0049] c. 荧光标记

[0050] A组和B组单核淋巴细胞分别进行荧光标记,标记方法相同,如:将10 μ mol/L的CFSE母液稀释至2 μ mol/L,取等比例的2 μ mol/LCFSE染液与单核淋巴细胞悬液,充分混合,37℃染色孵育15~20min,获得1 μ mol/LCFSE的荧光单核淋巴细胞悬液。

[0051] 荧光染色后,从A组荧光单核淋巴细胞悬液中取出1mL,标记为A1(阳性对照管);从B组荧光单核淋巴细胞悬液中取出1mL,标记为B1(阳性对照管)。

[0052] 取数滴CFSE荧光单核淋巴细胞悬液与1滴5g/L台盼蓝溶液混合,静置3min,加至细胞计数板,倒置显微镜下观察,计数活细胞和死细胞数量,细胞存活率达95%以上。

[0053] (4) 荧光单核淋巴细胞的动物体输注

[0054] a. 分离暴露食蟹猴下肢小隐静脉,用75%的乙醇消毒后,用4号头皮针穿刺,注射A组荧光单核淋巴细胞悬液约0.5mL,注射细胞数约为 1×10^5 个。

[0055] b. 食蟹猴左手掌备皮,将B组荧光单核淋巴细胞悬液缓慢输注至掌侧大鱼际下方的结缔组织中,注射悬液量约0.5mL,注射细胞数约为 2×10^6 个。

[0056] (5) 获取荧光单核淋巴细胞

[0057] a. 经过1h、2h、3h、4h用消毒毛细管穿刺小隐静脉取血,每次约0.5mL,利用(2)中a的方法获得荧光单核淋巴细胞,将4次取血获得的荧光单核淋巴细胞悬液各取1mL,分别标记为A2、A3、A4、A5。

[0058] b. 经过1h、2h、3h、4h分别从食蟹猴左侧腋窝取出1-2个淋巴结,利用(2)中b的方法获得荧光单核淋巴细胞,将4次摘取淋巴细胞获得的荧光单核淋巴细胞悬液各取1mL,分别标记为B2、B3、B4、B5。

[0059] (6) 流式细胞仪分析

[0060] 用流式细胞仪首先对A0、A1、A2、A3、A4、A5和B0、B1、B2、B3、B4、B5光散射信号进行测量,并选定小淋巴细胞亚群为检测细胞群;选取细胞门水平为:前向散射(FSC)为170-290,侧向散射(SSC)为50-210,选定此细胞门水平作为流式检测水平,使用流式细胞仪分析各样本中阳性细胞的比例。每份样本计数10000个细胞。

[0061] 其中,A0、A1、B0、B1分别为对照,A2、A3、A4、A5、B2、B3、B4、B5为样本,每一样本测5次,均用Aa-Ae、Ba-Be标记,样本的测量结果取5次测量值的中位数。测量结果如表1、表2所示。

[0062] 表1. A组流式细胞结果数据汇总

[0063]

荧光细胞比例	Aa	Ab	Ac	Ad	Ae
--------	----	----	----	----	----

1h(A2)	2.18%	2.88%	2.64%	2.16%	2.01%
2h(A3)	0.47%	0.36%	0.59%	0.49%	0.47%
3h(A4)	0.01%	0.01%	0.02%	0.02%	0.01%
4h(A5)	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
平均衰减比例	78.4%	79.78%	77.65%	79.59%	76.61%

[0064] 表2.B组流式细胞结果数据汇总

[0065]

荧光细胞比例	Ba	Bb	Bc	Bd	Be
1h(B2)	12.99%	13.12%	12.51%	13.09%	12.15%
2h(B3)	3.29%	3.81%	3.12%	3.37%	2.98%
3h(B4)	0.07%	0.08%	0.08%	0.07%	0.07%
4h(B5)	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%	0.02%
平均衰减比例	74.67%	70.96%	75.06%	74.26%	75.47%

[0066] 流式分析结果为,A0和B0为未进行荧光标记的单核淋巴细胞悬液,理论值为理论值为0%,实际值为0.04%;A1、B1为充分染色后未回输食蟹猴体内的阳性对照组,理论值为100%,实际值为99.94%。

[0067] A2、A3、A4、A5、B2、B3、B4、B5中阳性细胞的比例,即荧光细胞的比例如表1和表2所示。

[0068] 从表1、表2可以得出,在血管通道组,即A组中,按照体重计算食蟹猴外周血量约420mL,0.5mL外周血的荧光单核淋巴细胞被稀释至420mL血液中,计算理论比例应为11.9%,实际上在回输食蟹猴体内1h后仅剩2.18%,即血液系统中约75%的荧光细胞被归巢和自体杀伤作用消除。

[0069] 在淋巴通道组,即B组中,通过淋巴管系统回输食蟹猴体内的荧光单核淋巴细胞1h后还有12.99%,远超血管通道的2.18%,其原因为从结缔组织输注的荧光单核淋巴细胞,在淋巴管通道内由于淋巴结的过滤作用而被滞留,不易稀释至全身,使荧光单核淋巴细胞在淋巴结处具有较高的浓度,具有比血管更好的靶细胞凝聚效果。B组单核淋巴细胞示踪方式可大幅度增加可观察的靶细胞数量,提高流式结果的可靠性,能够更好的标记和示踪灵长类大动物的单核淋巴细胞。

[0070] 上述流式细胞检测,阳性结果即代表方法可行,因此无需进行统计学分析。

[0071] 综上所述,本发明分离食蟹猴腋窝淋巴结后通过CFSE进行荧光染色,将染色后的单核淋巴细胞输注后,不同时间点再采集淋巴结样本进流式细胞分析,同时设置空白自体无荧光阴性对照和全荧光阳性对照,从而了解单核淋巴细胞在体内的变化过程。

[0072] 本发明采用CFSE荧光染料进行单核淋巴细胞的标记,此标记方法具有标记简单方便、标记效率高、标记细胞种类广泛、对细胞形态与增殖影响小等优点,适用于长期示踪,并可以在单细胞水平对细胞增殖及示踪作检测;同时,本发明利用淋巴管道内细胞易于富集不易分散的特点,将荧光单核淋巴细胞注射到结缔组织下,再从其回流的淋巴结群将淋巴结取出进行二次分离,从而使荧光单核淋巴细胞集中于淋巴管道内,极大的增加最终采集的荧光单核淋巴细胞的数量,进而更好地认识灵长类等大动物的免疫调控系统。

[0073] 本发明在整体水平研究单核淋巴细胞可以对淋巴细胞各亚群间的关联细胞因子

与各淋巴细胞亚群间的关联进行全面了解,进而更好地认识整个免疫调控系统。与单独分离标记各细胞亚群相比,整体水平的研究可对机体免疫机制的认识更加深入全面立体。

[0074] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

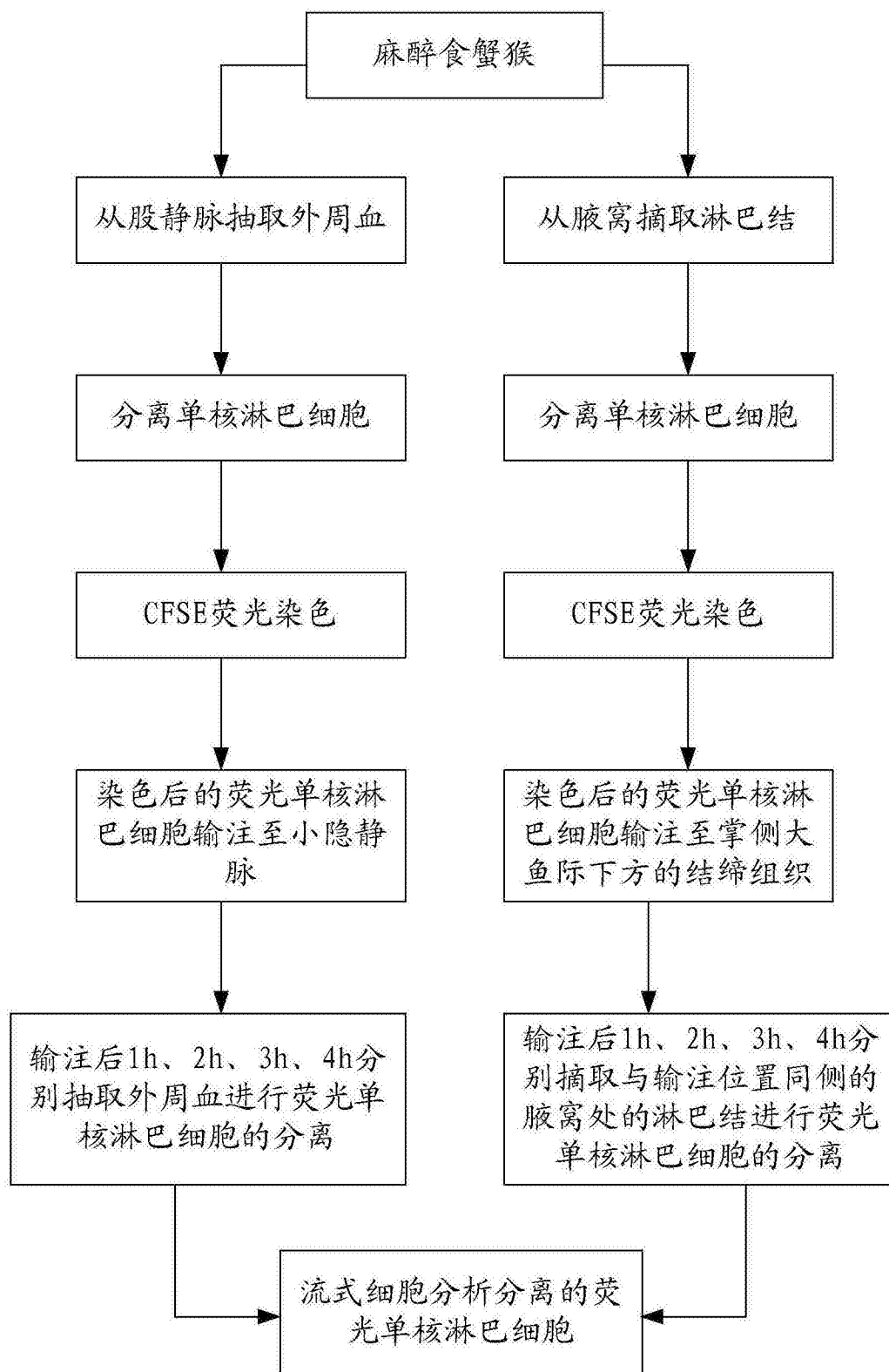


图1

专利名称(译)	单核淋巴细胞体内示踪方法		
公开(公告)号	CN103630679B	公开(公告)日	2016-06-29
申请号	CN201310597958.9	申请日	2013-11-22
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学珠江医院		
[标]发明人	潘明新 程佩伦 蒋泽生 汪艳 高毅		
发明人	潘明新 程佩伦 蒋泽生 汪艳 高毅		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/5014 G01N33/5091 G01N33/582		
代理人(译)	王增鑫		
其他公开文献	CN103630679A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种单核淋巴细胞体内示踪方法，包括步骤：采集食蟹猴腋窝处的淋巴结；利用密度梯度离心法获取淋巴结中的单核淋巴细胞；将单核淋巴细胞进行荧光染色；将染色后的单核淋巴细胞输注至食蟹猴掌侧大鱼际下方的结缔组织中；再次采集与所述输注位置同侧的食蟹猴腋窝处的淋巴结，并对再次采集的淋巴结采用流式细胞仪进行检测。通过上述方法，本发明能够使荧光染色后的单核淋巴细胞富集于淋巴结中，以便进行免疫示踪。

