



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110333357 A

(43)申请公布日 2019.10.15

(21)申请号 201910551172.0

G01N 15/14(2006.01)

(22)申请日 2019.06.24

G01N 1/28(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

(71)申请人 浙江大学

地址 310058 浙江省杭州市西湖区余杭塘路866号

(72)发明人 曹红翠 刘景琪 冯旭东 俞炯
潘巧玲 徐燕萍 曾浔 李兰娟

(74)专利代理机构 杭州中成专利事务所有限公司 33212

代理人 周世骏

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/60(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

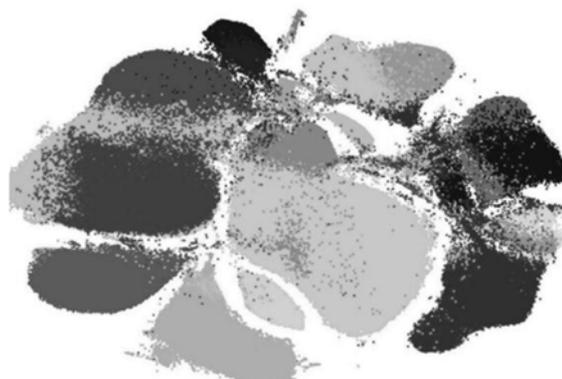
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法

(57)摘要

本发明涉及肝脏全免疫细胞特征图谱研究,旨在提供一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法。包括步骤:小鼠肝脏全免疫细胞的提取;质谱流式抗体的标记;免疫细胞抗体染色;质谱流式分析。本发明能够在保证细胞纯度的基础上,尽可能的去除肝脏实质细胞,分离出高得率的小鼠肝脏全免疫细胞。本发明分离的小鼠肝脏全免疫细胞得率在高于研磨法得率,且细胞活率大于传统研磨法。本发明根据肝脏、肺脏中免疫细胞特点,创新性地使用试剂盒以稳定金属同位素与抗体连接,同时基于通道干扰最小原则设计质谱流式通道,实现全面小鼠对肝脏全免疫细胞的分类和功能进行描述,最多可同时检测43个标志物,能够观察到小鼠肝脏全免疫细胞的动态改变。



1. 一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 小鼠肝脏全免疫细胞的提取

取因急性肝衰竭而自然死亡的新鲜小鼠尸体,摘取肝脏并灌流出其内部的血液;将肝脏剪碎后以酶混合液消化半个小时,再进行密度梯度离心和红细胞裂解,得到纯净的小鼠肝脏全免疫细胞;

(2) 质谱流式抗体的标记

使用美国Fluidigm公司的MaxPAR X8抗体偶联试剂盒,以稳定的金属同位素与小鼠肝脏免疫细胞表面标志物抗体连接,得到标记抗体;

(3) 免疫细胞抗体染色

将分离得到的小鼠肝脏全免疫细胞与标记抗体进行孵育,标记免疫细胞;

(4) 质谱流式分析

将标记后的小鼠肝脏全免疫细胞在质谱流式上机分析,采用t-SNE和X-shift算法对所得数据进行分析;然后将不同的细胞亚群的多个检测抗体的表达分布在同一张热图上,并通过viSNE图表现不同标志物的表达以及不同细胞亚群的分布,以此表现小鼠肝脏全免疫细胞的分类图谱。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)具体包括:

(1.1) 用75%酒精棉擦拭小鼠尸体,剪开腹部分离出小鼠肝脏,保留胆囊和至少1厘米长度的主血管;

(1.2) 以磷酸盐缓冲液经肝门静脉持续灌流、冲洗肝脏,清除内部血液使肝脏从血红色变为白色;

(1.3) 剥离胆囊和主血管,将肝脏置于含有磷酸盐缓冲液的培养皿内浸洗;

(1.4) 将肝脏剪碎后置于含有4.7毫升改良杜氏伊格尔培养基和0.3毫升酶混合液的解离管内;

(1.5) 将解离管放入德国MACS公司GentleMACS™Dissociator解离机器中,以m_liver_03模式运行两次;

(1.6) 取出解离管,置于37℃恒温、220转/分钟转速的摇床上消化30分钟;

(1.7) 消化结束后,将解离管再次置于解离机器中,以m_liver_04模式运行两次;

(1.8) 将解离管内混悬液以100微米滤器过滤到50毫升离心管内,用5毫升磷酸盐缓冲液重悬解离管内残留物后,再次将液体部分过滤至离心管内;

(1.9) 在室温条件下,以相对离心力300g离心处理10分钟;

(1.10) 弃掉上清液后,向沉淀内加3毫升36%Percoll细胞分离液;在室温条件下,以相对离心力600g离心处理15分钟;

(1.11) 弃掉包含肝细胞碎片的上清液,并向沉淀内加入2毫升红细胞裂解液裂解3分钟以完全去除红细胞;然后加入5ml磷酸盐缓冲液终止裂红,在4℃条件下以相对离心力400g离心处理5分钟;弃上清,得到纯净的小鼠肝脏全免疫细胞。

3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述磷酸盐缓冲液中包括氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钾,总浓度为0.01摩尔/升,酸碱度7.4。

4. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述酶混合液的配置方法为:向100毫升磷

酸盐缓冲液里加入12毫克胶原酶IV、30毫克链酶蛋白酶和5毫克脱氧核糖核酸酶I粉末,混匀。

5. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:在将剪碎后的肝脏置于解离管内之前,先将含改良杜氏伊格尔培养基和酶混合液的解离管置于37℃水浴中预热5分钟。

6. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述Percoll细胞分离液的配置方法为:先将1毫升10倍磷酸盐缓冲液与9毫升percoll原溶液混合均匀,再加入15毫升1倍的磷酸盐缓冲液得到25毫升36%的Percoll分离液。

7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:所述的10倍磷酸盐缓冲液中包括氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钾,总浓度为0.1摩尔/升,酸碱度7.4。

8. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1.9)、(1.10)中启动离心机前,应先将离心机升速降速均调整到最低档。

9. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)具体包括:先用金属标记物标记多聚物,获得螯合特定金属的多聚体,然后将其用于标记抗体,获得标记抗体。

10. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(2)中,所述稳定金属同位素包括:Y-89、In-113、In-115、La-139、Pr-141、Nd-142、Nd-143、Nd-144、Nd-145、Nd-146、Nd-148、Nd-150、Sm-147、Sm-149、Sm-152、Sm-154、Eu-151、Eu-153、Gd-155、Gd-156、Gd-157、Gd-158、Gd-160、Gd-197、Tb-159、Dy-161、Dy-162、Dy-163、Dy-164、Ho-165、Er-166、Er-167、Er-168、Er-170、Tm-169、Yb-171、Yb-172、Yb-173、Yb-174、Yb-176、Lu-175、Pt-198、Bi-209;

所述抗体有43个,包括:anti-CD45、anti-CD44、anti-CD19、anti-KI67、anti-CD24、anti-MHC II、anti-B220、anti-CD5、anti-CD43、anti-CD38、anti-Ly6G、anti-Ly6C、anti-CX3CR1、anti-IgD、anti-CD62L、anti-CD11c、anti-TCRd、anti-CD49a、anti-CD80、anti-BST2、anti-CD25、anti-CD3、anti-F4/80、anti-CD115、anti-iNOS、anti-CXCR3、anti-CD27、anti-CD103、anti-ICOS、anti-Argnase I、anti-CD49b、anti-Foxp3、anti-CD127、anti-CD21、anti-CD23、anti-CD138、anti-CD172a、anti-CTLA-4、anti-SiglecF、anti-IgM、anti-CD4、anti-CD8a、anti-CD11b。

一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法

发明领域

[0001] 本发明涉及肝脏全免疫细胞特征图谱研究,具体涉及一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法。

背景技术

[0002] 急性肝衰竭是短时间内发生大量肝细胞坏死及严重肝功能损害,并引起肝性脑病的一组严重临床综合征。本病病死率高,肝移植是目前确切有效的治疗手段。然而,器官短缺和移植后并发症等因素大大限制了肝移植在临床的应用。近年免疫制剂、干细胞移植等针对发病机制的治疗手段发展迅速,有望成为新的治疗手段。

[0003] 肝衰竭时肝脏免疫细胞大量浸润,如B淋巴细胞,T淋巴细胞等,同时免疫细胞分泌大量的促炎因子,进一步加剧肝脏衰竭。肝衰竭病理状态下,肝脏全免疫细胞种类、比例都发生了哪些变化,这些变化对于研制新型免疫调节药物具有重要意义。因目前技术方法的限制,肝衰竭时肝脏固有免疫细胞和反应性免疫细胞特征性变化尚不清楚。传统的分离方法是将肝脏免疫细胞用流式抗体标记,用传统流式进行分离。因传统流式存在检测通道受限和荧光基团发射光谱重叠等技术限制,大于12色的实验就无法进行,导致对肝脏免疫细胞检测的覆盖度不够,不能精准反映肝衰竭时肝脏免疫细胞亚群特征性变化。

发明内容

[0004] 本发明要解决的技术问题是,克服现有技术中的不足,提供一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法。

[0005] 为解决技术问题,本发明的解决方案是:

[0006] 提供一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 小鼠肝脏全免疫细胞的提取

[0008] 取因急性肝衰竭而自然死亡的新鲜小鼠尸体,摘取肝脏并灌流出其内部的血液;将肝脏剪碎后以酶混合液消化半个小时,再进行密度梯度离心和红细胞裂解,得到纯净的小鼠全免疫细胞;

[0009] (2) 质谱流式抗体的标记

[0010] 使用美国Fluidigm公司的MaxPAR X8抗体偶联试剂盒,以稳定的金属同位素与小鼠免疫细胞表面标志物抗体连接,得到标记抗体;

[0011] (3) 免疫细胞抗体染色

[0012] 将分离得到的小鼠肝脏全免疫细胞与标记抗体进行孵育,标记免疫细胞;

[0013] (4) 质谱流式分析

[0014] 将标记后的小鼠肝脏全免疫细胞在质谱流式上机分析,采用t-SNE和X-shift算法对所得数据进行分析;然后将不同的细胞亚群的多个检测抗体的表达分布在同一张热图上,并通过viSNE图表现不同标志物的表达以及不同细胞亚群的分布,以此表现小鼠肝脏全免疫细胞的分类图谱。

[0015] 本发明中,所述步骤(1)具体包括:

[0016] (1.1)用75%酒精棉擦拭小鼠尸体,剪开腹部分离出小鼠肝脏,保留胆囊和至少1厘米长度的主血管;

[0017] (1.2)以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)经肝门静脉持续灌流、冲洗肝脏,清除内部血液使肝脏从血红色变为白色;

[0018] (1.3)剥离胆囊和主血管,将肝脏置于含有磷酸盐缓冲液的培养皿内浸洗;

[0019] (1.4)将肝脏剪碎后置于含有4.7毫升改良杜氏伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)和0.3毫升酶混合液的解离管内;

[0020] (1.5)将解离管放入德国MACS公司GentleMACS™ Dissociator解离机器中,以 m_liver_03模式运行两次;

[0021] (1.6)取出解离管,置于37℃恒温、220转/分钟转速的摇床上消化30分钟;

[0022] (1.7)消化结束后,将解离管再次置于解离机器中,以m_liver_04模式运行两次;

[0023] (1.8)将解离管内混悬液以100微米滤器过滤到50毫升离心管内,用5毫升磷酸盐缓冲液重悬解离管内残留物后,再次将液体部分过滤至离心管内;

[0024] (1.9)在室温条件下,以相对离心力300g离心处理10分钟;

[0025] (1.10)弃掉上清液后,向沉淀内加3毫升36%Percoll细胞分离液;在室温条件下,以相对离心力600g离心处理15分钟;

[0026] (1.11)弃掉包含肝细胞碎片的上清液,并向沉淀内加入2毫升红细胞裂解液(ACK lysis buffer)裂解3分钟以完全去除红细胞;然后加入5ml磷酸盐缓冲液终止裂红,在4℃条件下以相对离心力400g离心处理5分钟;弃上清,得到纯净的小鼠肝脏全免疫细胞。

[0027] 本发明中,所述磷酸盐缓冲液中包括氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钾,总浓度为0.01摩尔/升,酸碱度(pH值)7.4。

[0028] 本发明中,所述酶混合液的配置方法为:向100毫升磷酸盐缓冲液里加入12毫克胶原酶IV、30毫克链酶蛋白酶和5毫克脱氧核糖核酸酶I粉末,混匀。

[0029] 本发明中,在将剪碎后的肝脏置于解离管内之前,先将含改良杜氏伊格尔培养基和酶混合液的解离管置于37℃水浴中预热5分钟。

[0030] 本发明中,所述Percoll细胞分离液的配置方法为:先将1毫升10倍磷酸盐缓冲液与9毫升percoll原溶液混合均匀,再加入15毫升1倍的磷酸盐缓冲液得到25毫升质量浓度为36%的Percoll分离液。

[0031] 本发明中,所述的10倍磷酸盐缓冲液中包括氯化钠、磷酸二氢钾、磷酸氢二钠和氯化钾,总浓度为0.1摩尔/升,酸碱度(pH值)7.4。

[0032] 本发明中,所述步骤(1.9)、(1.10)中启动离心机前,应先将离心机升速降速均调整到最低档。

[0033] 本发明中,所述步骤(2)具体包括:先用金属标记物标记多聚物,获得螯合特定金属的多聚体,然后将其用于标记抗体,获得标记抗体。

[0034] 本发明中,所述步骤(2)中,所述稳定金属同位素包括:钇(Y-89)、铟(In-113、In-115)、镧(La-139)、镨(Pr-141)、钕(Nd-142、Nd-143、Nd-144、Nd-145、Nd-146、Nd-148、Nd-150)、钐(Sm-147、Sm-149、Sm-152、Sm-154)、铕(Eu-151、Eu-153)、钆(Gd-155、Gd-156、Gd-157、Gd-158、Gd-160、Gd-197)、铽(Tb-159)、镝(Dy-161、Dy-162、Dy-163、Dy-164)、钬(Ho-

165)、铈(Er-166、Er-167、Er-168、Er-170)、铥(Tm-169)、镱(Yb-171、Yb-172、Yb-173、Yb-174、Yb-176)、镱(Lu-175)、铂(Pt-198)、铋(Bi-209)；

[0035] 所述抗体有43个,包括:anti-CD45、anti-CD44、anti-CD19、anti-KI67、anti-CD24、anti-MHC II、anti-B220、anti-CD5、anti-CD43、anti-CD38、anti-Ly6G、anti-Ly6C、anti-CX3CR1、anti-IgD、anti-CD62L、anti-CD11c、anti-TCRd、anti-CD49a、anti-CD80、anti-BST2、anti-CD25、anti-CD3、anti-F4/80、anti-CD115、anti-iNOS、anti-CXCR3、anti-CD27、anti-CD103、anti-ICOS、anti-Argnase I、anti-CD49b、anti-Foxp3、anti-CD127、anti-CD21、anti-CD23、anti-CD138、anti-CD172a、anti-CTLA-4、anti-SiglecF、anti-IgM、anti-CD4、anti-CD8a、anti-CD11b。

[0036] 与现有技术相比,本发明的有益效果在于:

[0037] 1、传统的分离方法将肝脏组织研磨,根据细胞密度采用离心,去除肝实质细胞,这样分离得到的免疫细胞得率较低,而且只能分离特定密度的细胞亚群,不能有效分离肝脏内所有免疫细胞。

[0038] 本发明能够在保证细胞纯度的基础上,尽可能的去除肝脏实质细胞,分离出高得率的小鼠肝脏全免疫细胞。

[0039] 2、经流式细胞术测定细胞是否结合碘化丙啶和CD45-异硫氰酸荧光素方法验证,碘化丙啶阳性为死细胞,CD45阳性为免疫细胞。与现有技术中研磨法分离的结果相比,本发明分离的小鼠肝脏全免疫细胞得率在大于 5×10^6 /只,高于研磨法得率的 $1 \sim 2.5 \times 10^6$ /只,且细胞活率大于95%,大于传统研磨法细胞活率约85%。

[0040] 3、MaxPAR X8抗体偶联试剂盒是商业化产品,其中仅含有金属同位素和偶联试剂。本发明根据肝脏、肺脏中免疫细胞特点,创新性地使用该试剂盒以稳定金属同位素与商业纯化抗体产品连接,同时基于通道干扰最小原则设计质谱流式通道,实现全面小鼠对肝脏全免疫细胞的分类和功能进行描述。

[0041] 4、传统流式检测技术对大于12色的实验无法进行,导致对肝脏免疫细胞检测的覆盖度不够,不能精准反映肝衰竭时肝脏免疫细胞亚群特征性变化。本发明能够对小鼠肝脏免疫细胞进行系统性的检测和分类,最多可同时检测43个标志物,包括谱系特异性表面抗体,细胞因子抗体和功能性抗体,如共刺激分子抗体等。

[0042] 5、本发明能够观察到小鼠肝脏全免疫细胞的动态改变。

附图说明

[0043] 图1为分离到的肝脏免疫细胞形态显微镜观察图(20倍物镜观察)；

[0044] 图2为肝实质细胞瑞氏染色图；

[0045] 图3为分离到的肝脏免疫细胞瑞氏染色图；

[0046] 图4为肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞分类图谱示意；

[0047] 图5为肝衰竭小鼠肝脏各群免疫细胞的标志物表达情况(heatmap)示意。

具体实施方式

[0048] 首先对本发明所用小鼠肝脏的来源进行说明:

[0049] 本发明所用的小鼠肝脏均取自实验室废弃的因急性肝衰竭而自然死亡的小鼠,摘

取肝脏应距死亡时间1小时内。选择其中的6-8周龄、体重18-25g的C57BL/6J幼鼠尸体,用100毫升70%乙醇清洗后,在生物安全柜内取出肝脏供后续试验。本发明的实施过程中,不存在杀死存活小鼠的操作,也不存在对小鼠活体采取剖开、切除等创伤性或者介入性处置。

[0050] 下面结合具体实施例子,对本发明的技术方案详细描述。

[0051] 仪器和试剂

[0052] 解离管(MACS,German),解离机器(MACS,German),恒温摇床(Thermo, America),离心管(Corning,America),离心机(Eppendorf,German),10厘米培养皿(Greiner, German),100微米滤网(Corning,America),水浴锅(Thermo,America),倒置显微镜(Nikon, Japan),数字切片扫描装置(HAMAMATSU,Japan),载玻片(世泰,中国),质谱流式细胞仪(Fluidigm,America),纯水机(Thermo,America),50千道尔顿(kDa)的过滤器(merck millipore,America),3千道尔顿(kDa)的过滤器(merck millipore,America)

[0053] DMEM(Gibco,America),PBS(吉诺,中国),10倍PBS(Gibco,America),胶原酶IV(Invitrogen,America),链酶蛋白酶(Roche,America),脱氧核糖核酸酶I(Sigma, America),percoll细胞分离液(GE Healthcare,Sweden),红细胞裂解液(Gibco, America),瑞氏姬姆萨染色液(贝索,中国),多聚体连接物(Fluidigm, America),金属同位素(Fluidigm,America),MaxPAR X8抗体偶联试剂盒(Fluidigm, America),牛血清白蛋白(索莱宝,中国),叠氮化钠(Sigma,America),TCEP还原剂(Thermo,America),抗体封闭液(Equitech-Bio,America),固定液(Fluidigm, America),perm buffer(Fluidigm, America),20%EQ beads(Fluidigm,America)。

[0054] (一)小鼠肝脏全免疫细胞的分离

[0055] 高效获取小鼠肝脏全免疫细胞的方法包括以下步骤:

[0056] (1)取因急性肝衰竭而自然死亡的新鲜小鼠尸体,用75%酒精棉擦拭干净后剪开腹部,分离出小鼠肝脏置于10厘米培养皿上,注意保留胆囊和至少1厘米长度的主血管;

[0057] (2)以磷酸盐缓冲液(phosphate buffer saline,PBS)经肝门静脉持续灌流、冲洗肝脏,清除肝脏内的血液使得小鼠肝脏从血红色变为白色;

[0058] (3)剥离胆囊和主血管,将肝脏置于含有PBS的10厘米培养皿内浸洗;

[0059] (4)将肝脏剪碎后置于含有4.7毫升改良杜氏伊格尔培养基(dulbecco's modified eagle medium,DMEM)和0.3毫升酶混合液的解离管内;

[0060] (5)将解离管放入GentleMACS™ Dissociator解离机器中,以m_liver_03模式运行两次;

[0061] (6)之后再将解离管置于37℃,以220转/分钟的转速旋转的恒温摇床上消化30分钟;

[0062] (7)消化结束后,再将解离管置于解离机器中,以m_liver_04模式运行两次;

[0063] (8)解离管内混悬液经100微米滤器过滤到50毫升离心管内,然后用5毫升PBS重悬解离管内残留物,然后再过滤至50毫升的离心管内,最后将50毫升离心管内液体转移到15毫升的离心管内;

[0064] (9)室温下,300相对离心力(g)离心10分钟,注意将离心机升速降速均调整到最低档再进行离心;

[0065] (10)弃掉上清液后,往沉淀内加3毫升36%Percoll细胞分离液,600相对离心力

(g) 室温离心15分钟,注意将离心机升速降速均调整到最低档再进行离心;

[0066] (11) 弃掉包含肝细胞碎片的上清液,并往沉淀内加入2毫升红细胞裂解液(ACK lysis buffer)裂解3分钟以完全去除红细胞,之后加入5ml PBS终止裂红并在400相对离心力(g) 4℃条件下离心5分钟,弃上清后可得到纯净的小鼠肝脏全免疫细胞。

[0067] 上述步骤中:

[0068] 磷酸盐缓冲液为商业试剂,其成分为氯化钠,磷酸二氢钾,磷酸氢二钠和氯化钾,浓度为0.01摩尔/升(磷酸二氢钾0.24克/升,磷酸氢二钠1.42克/升,氯化钠8.0克/升,氯化钾0.2克/升),酸碱度(pH值)7.4。酶混合液的配置方法为:100毫升磷酸盐缓冲液里加入12毫克胶原酶IV、30毫克链酶蛋白酶和5毫克脱氧核糖核酸酶I粉末。含有4.7毫升改良杜氏伊格尔培养基和0.3毫升酶混合液的解离管需要置于37℃水浴预热5分钟。所述滤器是:100微米过滤网。36%Percoll细胞分离液的配置方法为:先将1毫升10倍PBS与9毫升percoll原溶液混合均匀后,在加入15毫升1倍的PBS得到25毫升的36%Percoll分离液。10倍PBS的成分为氯化钠,磷酸二氢钾,磷酸氢二钠和氯化钾,浓度为0.1摩尔/升,酸碱度(pH值)7.4。

[0069] 细胞形态观察

[0070] 用1毫升PBS重悬实施例1所得小鼠肝脏全免疫细胞,并滴一滴在载玻片中心,倒置显微镜下观察细胞。

[0071] 免疫细胞瑞氏染色鉴定

[0072] (1) 用1毫升PBS重悬免疫细胞,并滴一滴在载玻片整片的四分之一处,用玻片以均匀的速度将液滴向载玻片的另一端推动,干燥后形成细胞涂片。

[0073] (2) 滴加0.5毫升瑞氏姬姆萨A液在涂片上,并让染液覆盖整个标本染色1分钟。

[0074] (3) 再将瑞氏姬姆萨B液加于A液上面(滴加量为A液的2-3倍),以嘴或洗耳球吹出微风使液面产生涟漪状,使两液充分混合,染色5分钟。

[0075] (4) 水洗(冲洗时不能先倒掉染液,应以流水冲去,以防有沉渣沉淀在标本上),干燥后用数字切片扫描装置扫片,免疫细胞的细胞核会被染成紫红色,胞浆染成粉红色。

[0076] 分离的免疫细胞形态观察

[0077] 在倒置显微镜下对免疫细胞进行观察发现,刚分离出来的细胞呈现圆形,饱满且透亮度好(20倍物镜),且含有的杂质较少。

[0078] 分离的免疫细胞瑞氏染色鉴定

[0079] 根据扫描仪扫出来的图像,可以观察到分离的免疫细胞的细胞核均染上了紫红色,胞浆染成了粉红色,且细胞大多为单个核的淋巴细胞,未见红细胞。

[0080] (二) 质谱流式抗体的标记

[0081] (1) 取5微升终浓度为2.5毫摩尔每升的金属同位素,以及多聚体连接物;在37℃条件下,分别预热30分钟;加入300微升的R buffer到50千道尔顿(kDa)的旋转过滤器内;

[0082] (2) 加入300微升的R buffer到50千道尔顿(kDa)的旋转过滤器内,继续加入100微克的抗体到上述的过滤器内,12000相对离心力(g)离心10分钟;

[0083] (3) 加入100ul TCEP还原剂;在37℃条件下预热30分钟孵育还原抗体;

[0084] (4) 加入200微升的L-Buffer到3千道尔顿(kDa)的旋转过滤器内,在12,000相对离心力(g)高速离心25分钟;继续加300微升的C-Buffer,12,000相对离心力(g)高速离心30分钟;

[0085] (5) 继续加300微升C-Buffer到50千道尔顿 (kDa) 旋转过滤器内,12,000相对离心力(g) 高速离心10分钟;继续加400微升的C-Buffer,12,000相对离心力(g) 高速离心10分钟;

[0086] (6) 将50千道尔顿 (kDa) 旋转过滤器内和3千道尔顿 (kDa) 旋转过滤器内的沉淀混匀,转移到50kDa旋转过滤器内,充分混匀;在37℃条件下预热90分钟孵育还原抗体;

[0087] (7) 加300微升W-Buffer到50千道尔顿 (kDa) 过滤器内,12,000相对离心力(g) 高速离心10分钟,三次;

[0088] (8) W-buffer回收标记好的抗体,在280nm下测定其光密度值,计算浓度。

[0089] 上述步骤中涉及到的金属同位素、R buffer、L-Buffer、C-Buffer、W-Buffer试剂均来自于MaxPAR X8抗体偶联试剂盒 (Fluidigm, America)。

[0090] 上述步骤中涉及到的金属同位素为:钇 (Y-89)、铟 (In-113、In-115)、镧 (La-139)、镨 (Pr-141)、钕 (Nd-142、Nd-143、Nd-144、Nd-145、Nd-146、Nd-148、Nd-150)、钐 (Sm-147、Sm-149、Sm-152、Sm-154)、铕 (Eu-151、Eu-153)、钆 (Gd-155、Gd-156、Gd-157、Gd-158、Gd-160、Gd-197)、铽 (Tb-159)、镝 (Dy-161、Dy-162、Dy-163、Dy-164)、钬 (Ho-165)、铒 (Er-166、Er-167、Er-168、Er-170)、铥 (Tm-169)、镱 (Yb-171、Yb-172、Yb-173、Yb-174、Yb-176)、镱 (Lu-175)、铂 (Pt-198)、铋 (Bi-209)。

[0091] 上述步骤中涉及到的抗体为:anti-CD45、anti-CD44、anti-CD19、anti-KI67、anti-CD24、anti-MHC II、anti-B220、anti-CD5、anti-CD43、anti-CD38、anti-Ly6G、anti-Ly6C、anti-CX3CR1、anti-IgD、anti-CD62L、anti-CD11c、anti-TCRd、anti-CD49a、anti-CD80、anti-BST2、anti-CD25、anti-CD3、anti-F4/80、anti-CD115、anti-iNOS、anti-CXCR3、anti-CD27、anti-CD103、anti-ICOS、anti-Argnase I、anti-CD49b、anti-Foxp3、anti-CD127、anti-CD21、anti-CD23、anti-CD138、anti-CD172a、anti-CTLA-4、anti-SiglecF、anti-IgM、anti-CD4、anti-CD8a、anti-CD11b。

[0092] 上述步骤中同位素和抗体偶联的情况为:

[0093]

金属同位素	抗体
Y-89	anti-CD45
In-113	anti-CD44
In-115	anti-CD19
La-139	anti-KI67
Pr-141	anti-CD24
Nd-142	anti-MHC II
Nd-143	anti-B220
Nd-144	anti-CD5
Nd-145	anti-CD43
Nd-146	anti-CD38
Sm-147	anti-Ly6G
Nd-148	anti-Ly6C
Sm-149	anti-CX3CR1
Nd-150	anti-IgD
Eu-151	anti-CD62L
Sm-152	anti-CD11c
Eu-153	anti-TCRd
Sm-154	anti-CD49a
Gd-155	anti-CD80
Gd-156	anti-BST2
Gd-157	anti-CD25
Gd-158	anti-CD3
Tb-159	anti-F4/80
Gd-160	anti-CD115
Dy-161	anti-iNOS
Dy-162	anti-CXCR3
Dy-163	anti-CD27
Dy-164	anti-CD103
Ho-165	anti-ICOS
Er-166	anti-Argnase I
Er-167	anti-CD49b

[0094]	Er-168	anti-Foxp3
	Tm-169	anti-CD127
	Er-170	anti-CD21
	Yb-171	anti-CD23
	Yb-172	anti-CD138
	Yb-173	anti-CD172a
	Yb-174	anti-CTLA-4
	Lu-175	anti-SiglecF
	Yb-176	anti-IgM
	Gd-197	anti-CD4
	Pt-198	anti-CD8a
	Bi-209	anti-CD11b

[0095] (三) 免疫细胞标记

[0096] (1) 取 5×10^6 个步骤(一)提取到的肝脏全免疫细胞,加入1毫升流式细胞检测用缓冲液(FACS Buffer),400相对离心力(g)离心5分钟,弃去上清;

[0097] (2) 加入100微升含有金属同位素铂(Pt-194)的磷酸盐缓冲液(1:4000,即0.25 微摩尔每升)重悬细胞,冰上放置5分钟;

[0098] (3) 加入1毫升流式细胞检测用缓冲液(FACS Buffer)终止反应,400相对离心力(g)/5分钟离心,弃去上清;按照体积比1:100添加抗体封闭液,冰上封闭20分钟;

[0099] (4) 加入50微升偶联金属同位素的抗体混合液,冰上孵育30分钟后,各种抗体按照一定的体积比配置,稀释液为PBS;

[0100] (5) 加入1毫升流式细胞检测用缓冲液(FACS Buffer)终止反应,400相对离心力(g)/5分钟离心,弃去上清;

[0101] (6) 每个样本加入200微升固定液,过夜;

[0102] (7) 第二天,往样本中加入1毫升perm buffer后,800相对离心力(g)/10分钟离心,弃去上清

[0103] (8) 加入50微升针对细胞内抗原的偶联金属同位素的抗体混合液染色,冰上孵育30分钟;

[0104] (9) 加入1毫升perm buffer后,800相对离心力(g)/10分钟离心,弃去上清;

[0105] (10) 加入1毫升流式细胞检测用缓冲液(FACS Buffer)后,800相对离心力(g)/10分钟离心,弃去上清,两次;

[0106] (11) 加入1毫升去离子水,800相对离心力(g)/10分钟离心,弃去上清;

[0107] (12) 使用细胞计数板进行细胞计数;

[0108] (13) 加入1毫升去离子水,800相对离心力(g)/10分钟离心,弃去上清;

[0109] (14) 加入20%EQ beads水重悬,准备上机。

[0110] 上述步骤中,所述流式细胞检测用缓冲液中即为每100毫升内含有0.5克的牛血清白蛋白(BSA)和0.02克叠氮化钠(NaN_3)的磷酸盐缓冲液;抗体封闭液的配方:每毫升磷酸盐缓冲液内含有20毫克的小鼠/仓鼠/大鼠总IgG;针对胞内抗原的抗体为 anti-KI67、anti-iNOS、anti-Argnase I、anti-Foxp3、anti-CTLA-4;

[0111] 上述步骤中,所述的相应抗体稀释倍数为:

[0112]

抗体	稀释倍数
anti-CD45	1:200
anti-CD44	1:200
anti-CD19	1:100
anti-KI67	1:200
anti-CD24	1:100
anti-MHC II	1:400
anti-B220	1:200
anti-CD5	1:400
anti-CD43	1:400
anti-CD38	1:200
anti-Ly6G	1:200
anti-Ly6C	1:400
anti-CX3CR1	1:100
anti-IgD	1:400
anti-CD62L	1:400
anti-CD11c	1:200
anti-TCRd	1:100
anti-CD49a	1:100
anti-CD80	1:100
anti-BST2	1:100
anti-CD25	1:50
anti-CD3	1:50
anti-F4/80	1:100
anti-CD115	1:100
anti-iNOS	1:100
anti-CXCR3	1:100
anti-CD27	1:100
anti-CD103	1:100
anti-ICOS	1:100
anti-Argnase I	1:100
anti-CD49b	1:100
anti-Foxp3	1:100
anti-CD127	1:100
anti-CD21	1:200

[0113]	anti-CD23	1:100
	anti-CD138	1:100
	anti-CD172a	1:100
	anti-CTLA-4	1:100
	anti-SiglecF	1:100
	anti-IgM	1:100
	anti-CD4	1:800
	anti-CD8a	1:400
	anti-CD11b	1:100

[0114] (四) 数据分析

[0115] 采用t-SNE和X-shift对质谱流式的数据进行分析,不同的细胞亚群的43个检测抗体的表达分布在一张热图上,不同标志物的表达以及不同细胞亚群的分布通过viSNE图表现出来。

[0116] 质谱流式分析标记的肝脏全免疫细胞

[0117] 由于金属元素标记的抗体识别并结合细胞表面或内部的抗原,带有金属元素标记的抗体的细胞被逐个送入等离子炬中进行离子化,使得标签金属离子释放出来,释放出的金属离子被送入飞行时间检测室中进行分离检测,检测器会精确记录各种离子到达的时间,进而换算出每个细胞中各种金属标签的精确含量,从而得出细胞表面或内部的抗原表达量。再采用降维处理,用t-SNE和X-shift对质谱流式的数据进行分析,不同的细胞亚群的43个检测抗体的表达分布在一张热图上,不同标志物的表达以及不同细胞亚群的分布通过viSNE图表现出来。

[0118] 图4中,不同深浅的颜色布置代表了不同细胞亚群的分布。图5中,不同颜色的色块代表了不同细胞亚群43个抗体的表达分布情况。

[0119] 免疫细胞分群

[0120] 根据细胞表面标志物的表达,得到33个细胞亚群,涵盖在CD45⁺CD3⁺T细胞、CD45⁺CD19⁺B细胞、CD45⁺CD49a/b⁺NK细胞、CD45⁺CD11b⁺CD3⁻CD19⁻髓系细胞。小鼠肝脏NK细胞主要包括两个细胞亚群:表达CD49A不表达CD49B的肝脏常驻NK细胞,和表达CD49B不表达CD49A的传统NK细胞;5个DC细胞亚群:浆细胞DCs (pDCs)、CD103⁺DCs、CD11b⁺DCs、单核细胞来源的DCs和不成熟的DCs;将粒细胞分为嗜酸性粒细胞和两群中性粒细胞。根据CD172a的表达,将中性细胞分为CD172a⁺中性粒细胞和CD172a⁻中性粒细胞。T细胞群包括CD4⁺T-细胞、CD8⁺T-细胞、CD25⁺Treg, 和 $\gamma\delta$ T细胞。B细胞分为B1细胞亚群和B2细胞亚群。

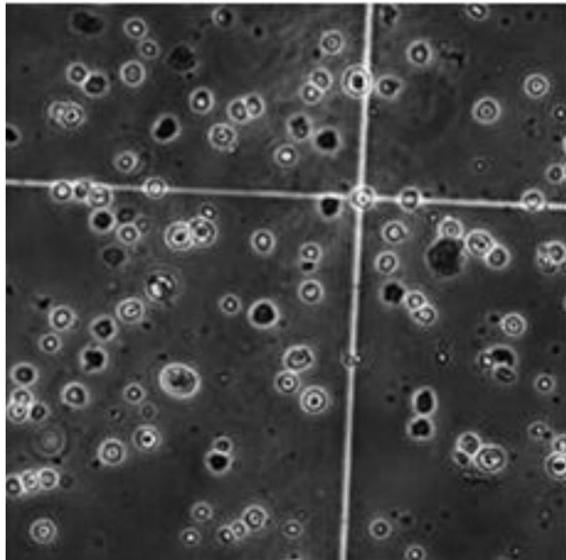


图1

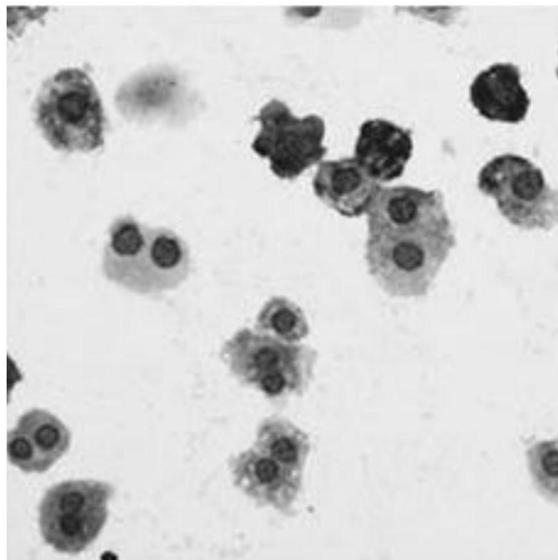


图2

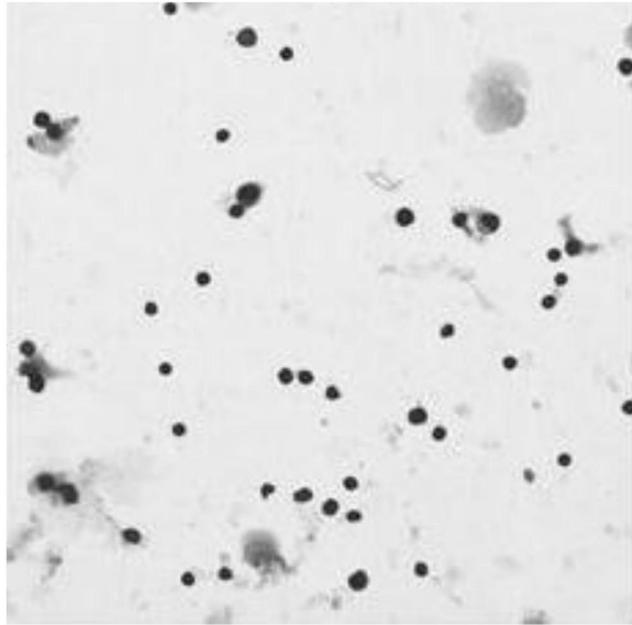


图3

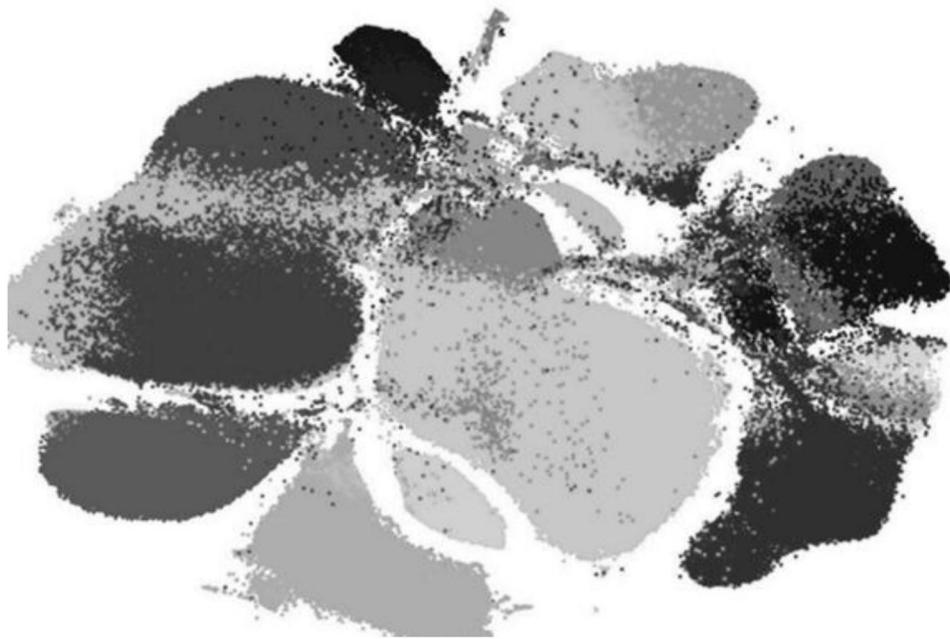


图4

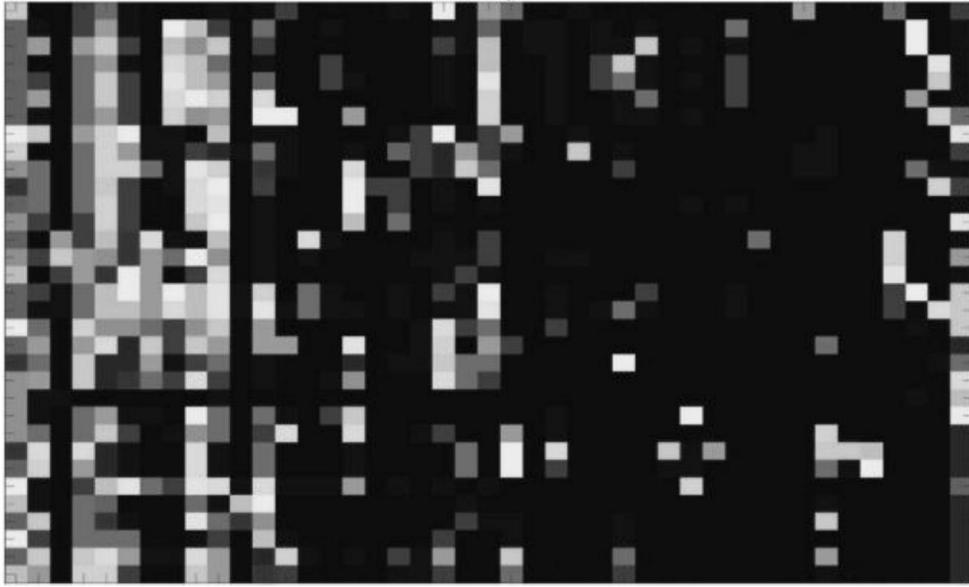


图5

专利名称(译)	一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法		
公开(公告)号	CN110333357A	公开(公告)日	2019-10-15
申请号	CN201910551172.0	申请日	2019-06-24
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学		
申请(专利权)人(译)	浙江大学		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学		
[标]发明人	曹红翠 冯旭东 俞炯 潘巧玲 徐燕萍 曾浔 李兰娟		
发明人	曹红翠 刘景琪 冯旭东 俞炯 潘巧玲 徐燕萍 曾浔 李兰娟		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/60 G01N33/532 G01N27/62 G01N15/14 G01N1/28 G01N33/50		
CPC分类号	G01N1/28 G01N15/14 G01N27/626 G01N33/5005 G01N33/532 G01N33/60 G01N33/6848 G01N33/6854 G01N2560/00		
代理人(译)	周世骏		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及肝脏全免疫细胞特征图谱研究，旨在提供一种急性肝衰竭小鼠肝脏全免疫细胞特征图谱的绘制方法。包括步骤：小鼠肝脏全免疫细胞的提取；质谱流式抗体的标记；免疫细胞抗体染色；质谱流式分析。本发明能够在保证细胞纯度的基础上，尽可能的去除肝脏实质细胞，分离出高得率的小鼠肝脏全免疫细胞。本发明分离的小鼠肝脏全免疫细胞得率在高于研磨法得率，且细胞活率大于传统研磨法。本发明根据肝脏、肺脏中免疫细胞特点，创新性地使用试剂盒以稳定金属同位素与抗体连接，同时基于通道干扰最小原则设计质谱流式通道，实现全面小鼠对肝脏全免疫细胞的分类和功能进行描述，最多可同时检测43个标志物，能够观察到小鼠肝脏全免疫细胞的动态改变。

