

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580028947.2

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
G01N 1/00 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 8 月 29 日

[11] 公开号 CN 101027557A

[22] 申请日 2005.8.12
[21] 申请号 200580028947.2
[30] 优先权
[32] 2004. 8. 27 [33] US [31] 10/928,570
[86] 国际申请 PCT/US2005/028563 2005.8.12
[87] 国际公布 WO2006/026109 英 2006.3.9
[85] 进入国家阶段日期 2007.2.27
[71] 申请人 贝克曼库尔特有限公司
地址 美国加利福尼亚州
共同申请人 健康网络大学
[72] 发明人 休·乔 戴维·赫德利
T·文森特·尚克伊
帕特里夏·格罗姆

[74] 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司
代理人 丁香兰 赵晓梅

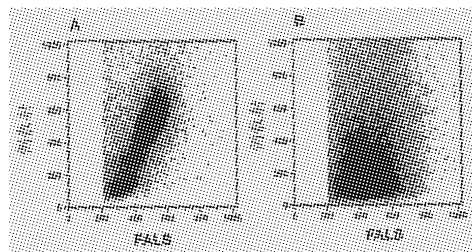
权利要求书 3 页 说明书 29 页 附图 15 页

[54] 发明名称

用于细胞信号途径的细胞计数分析的全血制备

[57] 摘要

本发明涉及用于细胞信号途径的细胞计数分析的全血制备，具体地说，本发明涉及用于测量蛋白表位的生物样品的制备方法，该方法使得可以保持细胞内蛋白表位和基于俘获表位的瞬时激活态的能力检测信号转导途径。本发明提供的方法使得可以快速固定含有红细胞的生物样品，以保证信号转导分子的表位和其他细胞内蛋白表位保持在活化态。本发明的方法进一步使得可溶解红细胞，因此使其成为一种用于对生物样品进行细胞计数分析的有用方法，所述生物样品包括例如全血、骨髓抽吸物、腹膜液以及其他含红细胞样品。本发明还提供了一种复原或“暴露”细胞内抗原上由于固定样品所需的交联固定剂而导致隐蔽的表位。重要的是，本发明的方法使得可以保持和分析直接取自患者的生物样品中磷酸基表位水平以确定疾病特异性特征。



1. 一种用于测量蛋白表位的含有红细胞的生物样品的制备方法，该方法使得能保留用于检测的细胞内蛋白表位，该方法包括如下步骤：

(a) 固定步骤，该固定步骤包括将所述样品与固定剂接触，其中所述固定剂的加入量使得所达到的终浓度足以交联蛋白质、脂质和核酸分子；

(b) 去污剂步骤，该去污剂步骤包括向所述样品中加入去污剂，其中所述去污剂的加入量使得所达到的终浓度足以溶解所述红细胞和透化白细胞；以及

(c) 标记步骤，其中所述样品与对一个或多个表位具有特异性的可检测结合剂接触。

2. 如权利要求1所述的方法，该方法还包括醇步骤，该醇步骤包括将所述样品与醇接触，所述醇的量使得所达到的终浓度足以暴露所述细胞内表位而不降低细胞表面表位的反应性。

3. 如权利要求2所述的方法，其中所述醇浓度为大约25%~大约75%。

4. 如权利要求3所述的方法，其中所述醇浓度为大约40%~大约60%。

5. 如权利要求2所述的方法，其中所述醇选自乙醇和甲醇组成的组。

6. 如权利要求5所述的方法，其中所述醇是甲醇。

7. 如权利要求1所述的方法，其中步骤(a)和(b)是在室温进行的。

8. 如权利要求1所述的方法，其中步骤(a)和(b)是在37℃进行的。

9. 如权利要求2所述的方法，其中所述样品可以保存在低于凝固点而不降低所述细胞内表位的可接近性的温度。

10. 如权利要求9所述的方法，其中所述温度是大约-20℃。

11. 如权利要求 1 所述的方法,该方法还包括 T-淋巴细胞的豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA)激活的初始步骤。

12. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述细胞内表位包括磷酸化的表位。

13. 如权利要求 12 所述的方法,其中所述细胞内蛋白与信号转导途径相关。

14. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述检测由细胞计数法完成。

15. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述细胞计数法是流式细胞计数法。

16. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述细胞计数法是激光扫描细胞计数法。

17. 如权利要求 14 所述的方法,其中所述细胞计数法是图像细胞计数法。

18. 如权利要求 1 所述的方法,该方法还包括第一温育步骤,该第一温育步骤包括在步骤 (a) 之后和步骤 (b) 之前对所述样品进行温育。

19. 如权利要求 18 所述的方法,其中所述第一温育步骤的持续时间为大约 30 秒~大约 1 小时。

20. 如权利要求 1 所述的方法,该方法还包括第二温育步骤,该第二温育步骤包括在步骤 (b) 之后和步骤 (c) 之前对所述样品进行温育。

21. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述第二温育步骤的持续时间为大约 30 秒~大约 1 小时。

22. 如权利要求 21 所述的方法,其中所述持续时间是大约 10 分钟。

23. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述固定剂浓度为大约 0.1%~大约 20%。

24. 如权利要求 23 所述的方法,其中所述固定剂浓度为大约 2%~大约 4%。

25. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述固定剂是甲醛。

26. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述去污剂浓度为大约 0.1%~大约 8%。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中所述去污剂浓度为大约 0.1%~大约 1%。

28. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述去污剂是离子型去污剂。

29. 如权利要求 28 所述的方法, 其中所述离子型去污剂选自由 Triton X-100、Nonidet P-40 (NP-40) 和 Brij-58 组成的组。

30. 如权利要求 29 所述的方法, 其中所述去污剂是 Triton X-100。

31. 如权利要求 1 所述的方法, 该方法还包括第一离心步骤, 该第一离心步骤包括在步骤 (b) 之后和步骤 (c) 之前对所述样品进行离心。

32. 如权利要求 1 所述的方法, 该方法还包括再次离心步骤, 该再次离心步骤包括在步骤 (e) 之后对所述样品进行离心。

33. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述生物样品选自由血液、骨髓抽吸物和腹膜液组成的组。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 其中所述生物样品包括未稀释的外周血。

用于细胞信号途径的细胞计数分析的全血制备

技术领域

本发明主要涉及用于细胞计数的样品制备领域，更具体地说，本发明涉及能够用于采用流式细胞计数法和图像细胞计数法进行信号转导测量的生物样品的制备方法。

背景技术

由于流式细胞计数法能够区分异质细胞群体中的亚群，所以其已成为临床和基础免疫学研究中不可缺少的工具。最近，在流式细胞计数法仪器和应用方面获得了重大进展，使得能同时分析的参数的数目增加到十三个以上。随着可使用参数的增多，研究者已开始基于表面表位染色来鉴别淋巴细胞样品的更多非常明确的和生物学上感兴趣的亚群。

流式细胞计数法常规用于基于表面表型鉴别细胞群体以及也用于诸如细胞毒性、生存力和凋亡等的基于细胞的化验。得到普遍理解的是，流式细胞计数法提供了评估存在于诸如外周血等复杂群体中的细胞亚群的异质性的能力。虽然表面染色可以是表征细胞的有效办法，但它不能提供关于那些细胞对立即反映细胞内事件的刺激的功能性响应的信息。甚至在使用标记是细胞因子受体或者受体酪氨酸激酶的情况下，抗原的水平也不总是与对特定配体的细胞响应相关。因此，已建立通过测量细胞内表位：细胞因子、DNA、mRNA、酶、激素受体、细胞周期蛋白的水平以及磷酸化信号分子的水平来表征细胞的方法。结果，流式细胞计数法的研究应用正逐渐地应用于测量调节细胞过程和代表用于新型抗癌剂的重要治疗靶的细胞内蛋白质。

目前的蛋白质组学方法，例如蛋白翻译后修饰的双向 SDS-PAGE 和质谱是非常强大的并已对许多细胞内激活过程提供了有价值的见解。然而，由于细胞被溶解了，所以这些实验的读出数据显然是细胞群体间的

蛋白激活状态的平均值。通过这样的平均化可掩盖重要的生物事件，因为既不能收集体里个别细胞中蛋白激活分布的信息，也不具有追溯性地分辨与活性蛋白的可检测水平相对应的细胞群体的能力。因此，关于存在于所限定的细胞群体中和横跨不同细胞子类型的免疫细胞群体变化的重要信息是不可检测的，而且也不能为需要细胞溶解用于蛋白分析的方法所克服。最后，蛋白激活信号级联必须在其生物背景既与人造物相关又不含有人造物时测量。

最近开发的基于使用磷酸化态特异性抗体来分析信号转导途径的技术引起特别关注。多参数流式细胞计数分析使得能够使用细胞表面标记辨别小型子群体——代表不同细胞亚群、分化态或激活态。同样，表征信号事件的单细胞技术的使用提供了在单细胞水平上进行多参数实验，以在所限定的淋巴细胞群体里鉴定特定分子的独特信号结合点，以及通过关联多种同时与信号级联相关的活性激酶而获得对信号网络范围的全面理解的能力。此外，将这些方法引入传统临床流式细胞计数法方案中对于包括选择患者进行高度特异性分子癌症治疗在内的血液学恶性肿瘤分类以及对于监测药物对病人的效果具有广泛应用。

通过流式细胞计数法分析信号转导途径显示出在目前常规临床应用中不会遇到的技术问题。个别信号元件的磷酸化状态在响应特定激酶和磷酸酶时会快速发生改变，并因此在样品保存和制备过程中发生人为改变。对激活或抑制输入的细胞响往往比磷酸化态的稳态测量具有更多信息。许多抗癌剂表现出对其分子靶的可逆结合。结果，药效监测只好测量全血样品而不是分离的白细胞。最后，磷酸基(phospho)特异性流式细胞计数法在临床环境中的已有的或潜在的应用，包括表征免疫系统发育和信号转导、抗原特异性 T-细胞应答、药物筛选以及疾病表型分析，必须考虑到磷酸化是指示信号蛋白活化态的暂时的可逆的事件。

因此，需要开发能够用于采用流式细胞计数法进行信号转导测量的生物样品的制备方法，该信号转导测量是有力的并适用于普通临床应用且能俘获代表信号蛋白激活态的磷酸化事件。本发明满足了该要求并且还具相关的优点。

发明内容

本发明涉及一种用于测量蛋白表位的生物样品的制备方法，该方法使得可以保持细胞内蛋白表位和基于俘获表位的瞬时激活态的能力检测信号转导途径。本发明提供的方法使得可以快速固定含有红细胞的生物样品，以保证信号转导分子的表位和其他细胞内蛋白表位保持在活化态。本发明的方法进一步使得可以溶解红细胞，因此使其成为一种用于对生物样品进行细胞计数分析的有用方法，所述生物样品包括例如全血、骨髓抽吸物、腹膜液、以及其他含红细胞样品。本发明还提供了一种复原或“暴露”细胞内抗原上由于固定样品所需的交联固定剂而导致隐蔽的表位。重要的是，本发明的方法使得可以保持和分析直接取自患者的生物样品中磷酸基表位水平以确定疾病特异性特征。

附图说明

图1提供用于计算WBC群体的费歇尔距离(Fisher Distance)的技术的图例，所述技术采用光散射测量通过流式细胞计数法测量的全血样品。

图2显示在活化全血后不采用固定(上图)或立即采用固定(下图)的低渗溶解的影响。在改进方法A(下图)中样品在RBC低渗溶解后立即固定。两种方法均显示出相似的磷酸基-ERK信噪比(S/N)。立即固定法一般提供更好的光散射群体分离度，但较低的CD3阳性T细胞百分比。

图3显示不同去污剂对全血光散射测量的影响。所示使用Triton X-100处理的全血样品数据代表了其他两种去污剂。

图4显示使用方法A(低渗溶解技术)(上图)制备的全血样品结果与使用2%甲醛固定后用0.1% Triton X-100(下图)制备的全血样品结果的比较。此处所示的典型结果说明：采用方法A，通过光散射得到的WBC群体分离度差，CD3染色强度较低但P-ERK信噪比较好。两种方法的相似抗微管蛋白染色强度表明细胞内区室对于两种方法来说具有相似的易接近性。

图5显示不同变性剂(行)和不同去污剂(TX-100, 右图; Brij-58, 中

图；NP-40，左图)对光散射测量、CD3 表达和 P-ERK 染色强度的效果。

图 6 显示不同甲醛固定剂浓度和温育温度对光散射测量、CD3 表达和 P-ERK 染色强度的影响。

图 7 显示不同 Triton X-100 浓度(图从上至下，0.1%~1.0%)对光散射测量、CD3 表达和 P-ERK 染色强度的影响。

图 8 显示用于“暴露”的不同醇浓度(甲醇或乙醇)对光散射测量和对 CD3 表达的效果。在 CD3 染色前，成对样品在每种醇浓度下温育 15 分钟，或在 4℃ 保存过夜。

图 9 显示不同细胞制备方法的效果比较，显示全血溶解(顶行)、方法 B(中行)、或方法 B'(底行)对光散射测量、CD3 表达和 P-ERK 水平的影响。

图 10 显示不同 WBC 群体(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)的总偏差图，所述总偏差图由流式细胞计数光散射测量由三种不同技术(Q-PrepTM、方法 B 或方法 B')制备的全血样品而确定。三种不同技术的值与使用 LH-750TM 分类细胞计数器对每个样品得到的分类计数进行比较。

图 11 显示根据不同 WBC 群体(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)的 MFI(平均荧光强度)测量的总偏差估计值，所述不同 WBC 群体涉及三种不同技术(Q-PrepTM、方法 B(“减化”)或方法 B'(“完全”))制备的全血样品。相对于针对所使用的 6 种不同 CD 标记中的每一种进行 WBC 群体计数的两种方法间的平均值绘制近似容许限度图。

具体实施方式

本发明涉及一种用于测量蛋白表位的生物样品的制备方法，该方法使得可以保持细胞内蛋白表位和基于俘获表位的瞬时激活态的能力检测信号转导途径。本发明提供的方法使得可以快速固定含有红细胞的生物样品，以保证信号转导分子的表位和其他细胞内蛋白表位保持在活化态。本发明的方法进一步使得可以溶解红细胞，因此使其成为一种用于对生物样品进行细胞计数分析的有用方法，所述生物样品包括例如全血、骨髓抽吸物、腹膜液、以及其他含红细胞样品。本发明还提供了一种复原或“暴露”细胞内抗原上由于固定样品所需的交联固定剂而导致隐蔽的

表位。重要的是，本发明的方法使得可以保持和分析直接取自患者的生物样品中磷酸基-表位水平以确定疾病特异性特征。

本发明提供的方法部分地基于如下发现，即采用全血样品通过细胞计数分析研究信号转导途径可通过初始固定步骤完成，该固定步骤实现了保持细胞表位的激活态而不使得红细胞对随后的溶解不敏感。该发现克服了在传统方法中遇到的问题，传统方法在固定前通过密度梯度分离或溶解从样品中移除红细胞，由于处理时间延迟了固定，可导致信号转导表位的去磷酸化。相反，通过提供快速固定含红细胞生物样品的方法使得可去除延迟固定的费时的分离或溶解步骤，本发明的方法使得使用者可俘获和测量处于其活化态的蛋白表位。

在具体实施方式中，本发明提供了一种用于全血固定、透化和红细胞溶解的方法，该方法快速地固定细胞（作为初始步骤），保持光散射测量，维持用于鉴别特定血液细胞群体的关键细胞表面表位，以及提供最佳的磷酸基-表位测量。

本发明的方法目的在于制备用于细胞计数法测量细胞表位的生物样品。细胞计数法的优点是能根据细胞表面染色性质区分细胞类型，所述细胞表面染色性质例如 T 细胞的 CD3、B 细胞的 CD19。在本发明的方法使得可以保持用于检测的细胞内表位的同时，通过本发明方法也能实现维持区分细胞类型所必需的表面表位识别的重要目的。因此，本文所述的方法使得使用者可以保持用于细胞计数检测的表面和细胞内表位的物理完整性。

本发明提供的方法进一步部分基于如下发现，即特定的靶表位（例如包括 p-ERK、p-STAT1 和 p-STAT5 在内的磷酸基特异性表位）的检测可通过醇步骤得以优化。

在一个实施方式中，本发明提供了一种制备用于蛋白表位测量的含红细胞生物样品的方法，该方法为随后的检测保留了细胞内蛋白表位。所述方法包括固定步骤，该固定步骤包括使所述样品与固定剂接触，该固定剂用量所达到的终浓度足以交联蛋白质、脂质和核酸分子；去污剂步骤，该去污剂步骤包括向生物样品中加入去污剂，该去污剂用量所达

到的终浓度足以溶解红细胞并透化白细胞；以及标记步骤，其中所述样品与对一个以上表位具有特异性的可检测结合剂接触。

在一个实施方式中，本发明提供了一种制备用于蛋白表位测量的含红细胞生物样品的方法，该方法为随后的检测保留了细胞内蛋白表位。所述方法包括固定步骤，该固定步骤包括使样品与固定剂接触，所述固定剂用量所达到的终浓度足以交联蛋白质、脂质和核酸分子。固定剂浓度可为大约0.1%~大约20%，大约0.5%~大约15%，大约1%~大约10%，大约1%~大约8%，大约1%~大约4%，大约1%~大约2%。所述固定剂可以浓缩液形式或者稀释形式加入以得到所需浓度。所述固定剂可以是使用者希望的任何适当试剂，例如甲醛或低聚甲醛，或福尔马林。

用于制备用于蛋白表位测量的含红细胞生物样品并为随后的检测保留了细胞内蛋白表位的本发明方法还包括去污剂步骤，其中去污剂加入用量所达到的终浓度足以溶解红细胞并透化白细胞。所述去污剂浓度可由使用者根据不同条件选择并在以下范围内：大约0.1%~大约8%，大约0.1%~大约7%，大约0.1%~大约6%，大约0.1%~大约5%，大约0.1%~大约4%，大约0.1%~大约3%，大约0.1%~大约2%，大约0.1%~大约1%。

去污剂可根据多种因素进行选择，并可以是离子型或非离子型去污剂。去污剂优选为选自非离子型去污剂。目前一种优选去污剂是乙氧化辛基苯酚，其商业名为Triton X-100 (Sigma T9284)。在优选实施方式中，所述方法采用Triton X-100进行。用于本发明方法的适当去污剂可透化细胞并保持表面表位的完整性。在本发明中有用的离子型去污剂还包括辛基苯氧基聚(乙烯氧基)乙醇(以Igepal® CA-630 (Sigma N-6507)或Nonidet P-40 (NP-40) (Sigma)市售)、Brij-58和直链醇烷氧化物(以Plurafac®A-38 (BASF 公司)或Plurafac®A-39 (BASF 公司)市售)。

在复杂的细胞群体中，例如在未稀释的外周血、骨髓抽吸物和腹膜液中，在同一过程中通过表面标记区分细胞亚群并检测细胞内磷酸基-表位染色是有用的。本发明提供的用于制备用于蛋白表位测量的含红细胞生物样品并为随后的检测保留了细胞内蛋白表位的方法适用于将细胞内

表位检测和细胞表面表位检测相联合。在本发明提供的方法中，细胞内表位和细胞外表位均可保持完整，使之能通过细胞计数分析进行随后测量。例如，典型 T 细胞标记（包括例如 CD4、CD3、CD62L 和 CD8）的表面检测能与细胞内表位检测相联合。

在另一个实施方式中，本发明的方法包括进一步的醇步骤，该醇步骤包括将生物样品与醇接触，该醇的用量所达到的终浓度足以暴露在固定步骤中因为交联而失去的细胞表位。如这里所述，醇步骤可保留大部分的细胞外表位并可由使用者根据需要保留的表位调节温育长短、温度和浓度。

本领域应当理解对于涉及多参数细胞计数分析的临床应用，期望能为检测而暴露和保留与特定生物标记有关的细胞外表位的亚群，所述特定生物标记可包括例如 CD3、CD35、HLA DR、CD4、HLA DP、HLA DQ、CD5、CD10、CD1 Ia、CD29、CD32、CD36、CD38、CD40、CD45、CD49、CD54、CD55、CD56、CD58、CD59、CD71、CD83、CD85i (IL T2)、CD85j (IL T3)、CD85f (IL T-4)、CD86、CD87、CD99、CD103、CD116、CD126、CD135、CD206、CD208 (DC-LAMP)、b2-微球蛋白、cBcl2、CCR5、CXCR4、HLA ABC、L25、MPO、CD3、CD79，以及表面 CD2、CD4、CD8、CD11b、CD13、CD14、CD15、CD16、CD19、CD20、CD21、CD23、CD24、CD25、CD28、CD33、CD34、CD35、CD41、CD42b、CD61、CD62L、CD64、CD65、CD66b、CD69、CD72、CD94、CD106、CD122、CD138、CD154、CD158a、CD116、NKb1 以及可以根据使用者的目选择的在本领域已知的其他表位。

本领域技术人员能根据其他多种变量选择最终醇浓度，所述变量包括例如，温育时间、温度和旨在暴露和测量的特定表位。最终醇浓度可以为大约 25%~大约 75%，大约 30%~大约 70%，大约 35%~大约 65%，大约 40%~大约 60%，大约 45%~大约 55%。所述醇还可选自由乙醇和甲醇构成的组。如果需要，丙酮在醇步骤中可替代醇。样品可与醇或丙酮在以下温度接触，所述温度例如大约 -30℃，大约 -20℃，大约 -10℃，大约 -5℃，大约 0℃，大约 4℃，大约 6℃，大约 8℃，或者有利于暴露细

胞内表位而不降低细胞表面表位的反应性的任何其他温度。

如果需要，通过本发明方法制备的生物样品可以在醇步骤后保存在低于凝固点的温度，例如保存在大约-40℃，在大约-30℃，在大约-20℃，在大约-10℃，在大约-5℃，并能保持光散射特征和细胞外表位的完整性，而不降低其易接近性或不改变细胞内表位的激活态长达 2 个月的时间。应当理解，信号损失的百分比涉及多种因素，包括例如所剩水分的百分比和靶表位。在一个优选实施方式中，所述样品可以保存在大约-20℃达 2 天以上、3 天以上、5 天以上、10 天以上、12 天以上、14 天以上、16 天以上、20 天以上、30 天以上、40 天以上、50 天以上、60 天以上。磷酸基-表位在醇中的稳定性根据本领域所理解的多种因素变化，所述因素例如所剩水分在样品中的百分比和靶表位。因此，本发明方法提供了磷酸基-表位在醇中的稳定性并使得生物样品的长期保存期在分析前保持达几天至 2~3 周或者更长时间。

在本发明的各种实施方式中，制备含红细胞的生物样品以用于包括例如病毒粒子、免疫球蛋白、雌激素受体、细胞因子以及特定细胞内蛋白等表位的测量。应当理解静态蛋白分子的染色可使得能在长期实验里观察细胞对刺激的响应。本发明的方法使得细胞外标记与细胞内信号事件相关联，或者信号事件之间相互关联，使不同时监测单个细胞里的事件就不可能观察到的免疫细胞作用和信号转导的复杂性得以理解。

虽然本文就细胞内磷酸基-表位进行举例证明，但是本发明的方法同样可用于制备目的在于测量其他翻译后修饰的生物样品，所述翻译后修饰包括例如泛素化、糖基化、甲基化、乙酰化、棕榈酰化，或蛋白质-蛋白质相互作用。因此，本发明使得能检测细胞内多种蛋白的非磷酸基表位，进一步扩展了所述方法的用途。使用者可根据所研究的特定细胞事件选择经标记的结合剂。本发明提供的方法能对具体时间段里的途径和途径特异性方式进行检测，这是以前不能获得的。虽然多种细胞内表位可被选择用于流式细胞计数法分析，但是应当理解使用者可优化并修改本文提供的方法以适用于被研究的特定表位，其中考虑的因素包括例如定位、构象/结构、抗体易接近性以及表位的稳定性。本文提供的方法一

般可用于多色、多参数细胞计数分析。

磷酸化是指示信号蛋白激活态的瞬时、可逆事件。因此，通过使用流式细胞计数法测定蛋白质的磷酸化态，可以确定响应诸如细胞因子或生长因子等特定刺激所使用的何种信号级联、信号转导的动力学和被转录的下游目标。此外，对比病态细胞和健康样品可容易地鉴别出异常信号事件，该事件是对癌症和免疫疾病进行表型分类的有用特征。因此，在诊断环境中，本发明的方法可用于制备生物样品以用于根据例如磷酸基-蛋白状态等病理学人体样品的诊断性流式细胞计数法分析。在另外的应用中，本发明的方法可用于制备用于从分子库筛选原代细胞群体的生物样品以发现激酶信号级联的新型抑制剂和激活剂。

用于制备用于蛋白表位测量的含红细胞的生物样品并为随后的检测保留了细胞内蛋白表位的本发明方法还在涉及免疫系统表征的应用中 useful，所述免疫系统表征包括例如免疫细胞发育(通过监测发育中 T 细胞、B 细胞或其他谱系特定细胞的磷酸基-识别标记以将细胞内活动与细胞分化阶段相关联)；免疫疾病状态概况(包括将四倍体染色与细胞内信号评估相联合以研究病毒和/或细菌感染中抗原特异性 T 细胞，并可潜在用于监测淋巴细胞亚群在急性和慢性感染情况下的响应)；监测患病鼠类模型或患者体内的淋巴细胞群体，例如血液白血病或诸如类风湿关节炎等自身免疫疾病以将磷酸基-识别标记和疾病表现相关联；不能通过传统生化技术分析的罕见细胞群体的生化识别标志，所述细胞群体包括树状细胞、幼稚和记忆效应细胞、干细胞；细胞信号转导网络的多维评估以理解细胞功能；鉴别不同信号级联间的信号转导阈和联系；监测病毒感染细胞的被改变的功能和细胞内信号转导；以及表征免疫细胞对细胞因子和细胞外刺激的响应模型。

用于制备用于蛋白表位测量的含红细胞的生物样品并为随后的检测保留细胞内蛋白表位的本发明方法还在涉及药效学监测和药物筛选的应用中 useful，所述药物筛选包括例如为快速鉴别靶激酶的特异性抑制剂/调节剂进行的细胞内激酶筛选；在原代细胞中进行药物筛选以测定亚群特异性功效和副作用；通过同时分析多条细胞内途径证实化合物专一性的

靶点；监测特定化合物在药物治疗过程中对感兴趣的细胞群体的效果而进行临床试验；通过将细胞内生化差异与其它临床参数相关联而鉴别激酶上的磷酸基-表位（作为疾病进程的诊断标志）；以及在接种程序中进行磷酸基-表位分析以监测细胞水平的功效。

如上所述，本发明的方法具有制备用于药效学概况分析的生物样品的用途。例如，磷酸基-特异性流式细胞计数法可用于通过疾病信号状态和对特定化合物的响应来对疾病状态进行概况分析。磷酸基-表位识别标志与疾病进程间的关系可用于根据处于疾病早期或晚期的患者个体调整疗法的研究。例如，多种酪氨酸激酶受体，包括 Flt-3、PDGF-R、EGF-R 和 HER2，已经与白血病和乳腺癌的疾病严重性和预后相关联，并且是药物治疗的靶点(Dreys 等, *Curr Drug Targets* 4:113-21, 2003; Fjallskog 等, *Clin Cancer Res* 9:1469-73, 2003)。在本领域中已知多种细胞内分子是分裂活跃的癌症的指示，例如 p53 和周期蛋白(如 Tashiro 等, *Cancer Res* 63 424-31, 2003, 和 Kmet 等, *Cancer* 97: 389-404, 2003 所述)。尽管 cDNA 微阵和蛋白质矩阵提供关于分子丰度的信息，但是这些分析并没有提供关于活化态的信息。以低浓度存在的蛋白如果具有组成型活性则能在疾病进程中起重要作用，这是只能由磷酸基特异性分析才能表征的特征。因此，本发明提供的用于制备含红细胞的生物样品并为随后的检测保留细胞内蛋白表位的方法赋予使用者将蛋白质水平和其在特定疾病状态中的活性相关联的能力。

如本文所述，本发明提供的方法具有在各种临床环境中的用途，包括例如，肿瘤块的检测、活组织检查和得自组织的样品的分析(基于制备用于细胞计数分析的含红细胞的生物样品的能力)。通过允许使用者对异常信号转导进行概况分析，并随后分析在临床试验前和临床试验过程中疗法的功效和专一性，所述方法已扩展了在癌症和免疫系统疾病的研究和治疗中的用途。随着为流式细胞计数法发展并验证出更多的磷酸基-表位特异性抗体，可以筛选生物样品以发现用于药物开发以及对特定疾病致病原因的进一步研究的可能线索。根据其对含红细胞的生物样品，包括未稀释的外周血的适用性，本发明的方法使得能保持和分析直接取自

患者的生物样品中的磷酸基-表位水平以确定疾病特异性特征。

本发明提供的方法还具有在临床环境中的用途，包括例如，监测患者个体例如在慢性骨髓性白血病(CML)中对分子导向疗法的反应性；监测在全血或骨髓样品中 Gleevec™ 抑制 STAT5 的磷酸化的能力，这作为药物体内活性的标志以预测药效在临床上明显以前在 CML 患者中所常见的药效丧失；在 AML(急性骨髓性白血病)中通过监测下游途径，包括 STAT、MAPK 和 PKB/AKT 来监测 Flt-3 的抑制剂；在多发性骨髓瘤(MM)中通过监测 MARK、PI3K、STAT 和 Wnt 途径监测新开发出的分子导向抑制剂。

本发明提供的方法还具有监测多药物组合治疗对特定类型肿瘤的用途。例如，已知对大多数 CML 患者使用 Gleevec™ 单治疗最终将失败，大多数机构要求多形式治疗。本文提供的方法可用于通过监测诸如 MAPK、STAT、凋亡等下游信号转导途径来监测 Gleevec™ 与诸如 flavopiridol 或阿糖胞苷等其他试剂组合后的体外效果，以协助选择具有潜在体内疗效的组合。本文提供的方法可用于研究 AML 和 MM 患者个体中信号转导途径。在该实施方式中，可使用特定途径刺激物和/或抑制剂，例如，Flt-3 配体、PMA 和 Steele 因子+/-UO-126(MAPK 抑制剂)、用于 AML 的雷帕霉素(mTOR 抑制剂)处理血液或骨髓样品，并随后测量基线和在多途径中与细胞表面标记结合的磷酸化的(激活的)关键蛋白的可诱导和适居(inhabitable)的水平。

如本文所述，在优选实施方式中，本发明方法能用于制备用于进行蛋白表位的测量的含红细胞的生物样品以致能保留用于检测的细胞内磷酸基-表位，包括例如 ERK、p38、JNK，和信号转导物和转录激活物 3 (STAT3)、STAT1、STAT5、STAT6、AKT/PKB、mTOR、S6 激酶、组蛋白(例如组蛋白 H3)、ATM、NFKappaB、GSK3 等。因此，本发明提供的方法使得能保留与信号转导途径相关的细胞内磷酸基-表位。本发明提供的用以制备含红细胞的生物样品的方法部分通过快速细胞固定步骤有效地“冻住”蛋白的磷酸化状态实现了保留用以检测的细胞内磷酸基-表位。此外，可合为一步或者分别进行的溶解和透化步骤使可检测结合剂能接

近其同源表位，该表位必须在已透化处理的靶细胞中以适当的天然或变性的构象保留。在本领域中应当理解信号级联通常由下游效应器的蛋白磷酸化所驱动，所述下游效应器的蛋白磷酸化激活了效应器使其执行功能。因此，磷酸基-特异性的经标记结合剂，例如抗体可用于识别这些活性蛋白并分辨信号事件的“开-关”状态。

采用磷酸化作为激活下游效应器的方式的级联在本领域里是熟知的。多信号级联可被同时测量，例如，通过使用不同荧光团标记以测定配体或抑制剂的特异性，并且所述多信号级联可包括例如细胞分裂原激活蛋白(MAP)激酶级联和詹纳斯激酶-信号转导物和转录激活物(Jak-Stat)途径。MAP 激酶、细胞外调节激酶(ERK)、c-Jun N-端激酶(JNK)和 p38 是双重磷酸化的(在 Thr 和 Tyr 残基上)，随后移位进入细胞核以磷酸化多种转录因子。STAT 蛋白由生长因子和诸如 IFN-g、IL-4 和 GM-CSF 等细胞因子激活。在由 Jaks 磷酸化以后，STAT 蛋白发生二聚化并进入细胞核中，在细胞核中，其直接与 DNA 结合以调节转录。因此，用于制备用于蛋白表位测量的含红细胞的生物样品并为随后的检测保留细胞内蛋白表位的本发明方法在涉及测量在细胞刺激或应激后快速发生的动态信号转导事件的应用中有用。

在细胞分裂原激活蛋白(MAP)激酶级联中，信号开始于细胞表面并由 MAP 激酶激酶激酶(MEKK)传递给 MAP 激酶激酶(MEK)再传递给 MAP 激酶，最后传递给转录因子。该级联的每一个成员都由其上游成员磷酸化。转录因子的磷酸化通常增加 DNA 结合亲和力或者改变其构象而引起二聚化和 DNA 结合。在所述 JAK-Stat 级联中，细胞因子受体的二聚导致 JAKs 的激活，其随后使 STAT 在其二聚化区域磷酸化而导致二聚化的 STAT 进入细胞核并激活转录。磷酸化也能为其他蛋白提供停靠位点以结合和定位于特定细胞内位置，所述磷酸化例如受体酪氨酸激酶的酪氨酸基序的磷酸化。虽然通常导致“正”活性，但是磷酸化事件也可引起负结果，例如 T 细胞蛋白 Lck，其中磷酸化抑制酶活性，并且其是通过导致 Lck 发出信号的磷酸酶发生的去磷酸化事件。

为了单独地测定磷酸化事件，可增加与磷酸化形式蛋白的特异性结

合的经标记结合配偶体。这通常通过使用结合到载体蛋白上的经磷酸化的短肽免疫原完成。因此，可以在本发明提供的方法中采用对相同信号蛋白中不同磷酸基残基具有特异性的可检测结合剂，由此随后的测量可以了解对于特定信号事件重要的残基。可以通过比较静息细胞和被刺激的细胞，在分析前采用磷酸酶处理样品，使磷酸化肽与非磷酸化肽竞争并将磷酸基-蛋白水平归一化至总蛋白含量来确定磷酸基-特异性。

本发明提供的方法包括标记步骤，其中所述生物样品与对一种或多种表位具有特异性的可检测结合剂接触。为随后通过细胞计数法测定生物样品中一种或多种表位的存在，结合剂可以是单克隆抗体，吸附和/或亲和纯化或采用其它方式富含对一种或多种靶表位具有特异性的抗体的多克隆抗血清，以及诸如酶法制备的单价(Fab)或二价(F(ab'₂))抗原结合片段等抗体片段。此外，结合剂可以是抗体样分子或模拟物。

在标记步骤（本领域中也通常称为染色步骤）中，样品与饱和量的经标记结合剂（优选为荧光团结合抗体）接触，所述经标记的结合剂将结合到表达表位的细胞上。通过适当波长的激光激发，荧光团发射出特征荧光信号，从而随后鉴别出表达表位的细胞。优选的荧光团包括藻胆色素蛋白 B-藻红蛋白(B-PE)、R-藻红蛋白(R-PE)和别藻蓝蛋白(APC)，它们适用于或者要求高灵敏度或者要求同时多色检测的应用。如果需要，可以使用含有双标签的串联结合物(例如，藻红蛋白标记的结合试剂与绿色荧光检测试剂联合)以利用仪器激光的谱线同时激发来检测两种不同的信号。如果需要，也可设计和合成基于活性的标记，其中包括例如作为磷酸酶特异性俘获装置的 α -溴苄基磷酸酯以及将俘获装置与生物素标签相连的连接物，所述生物素标签用于可视化和纯化，如 Kumar 等, *Prod. Natl. Acad. Sci. USA* 101:7943-48, (2004)中所述。

磷酸基-特异性抗体也可与荧光团结合以形成初级标记的抗体，该抗体是适用于实施本发明提供的方法的可检测结合剂。当选择用于结合的荧光团标记时，荧光团标记的吸收光谱必须与细胞计数器中使用的激光线相匹配，并且其发射必须落在检测滤波器组件的范围里。此外，所述标记不能影响结合剂，例如，抗体结合特性或者穿过细胞结构的透过性。

可以理解诸如 PE 或 APC 等大蛋白荧光团可以减缓抗体进入细胞并影响其结合特性。小分子标记, 例如 FITC、Alexa 488 和 Alexa 647 等荧光团可提供最好的染色特性, 从而提供对荧光团/蛋白比例的恰当控制。荧光团在流式细胞计数法中的使用 and 应用的广泛讨论可在 Petit 等, *Biol. Cell* 78:1-13, 1993; Mullins, *Methods Mol Biol* 34: 107-16(1994); 以及 Shapiro, *Methods Cell Biol* 63: 107-29, 2001 中找到。

流式细胞计数法装置以及操作流程是本领域熟知的, 并在大量文献中得到详细的描述。参见例如, *Flow Cytometry and Sorting*, 第二版, (1990) M. R. Melamed 等编辑, Wiley-Liss; *Flow Cytometry and cell Sorting*, 第二版, (2000) A. Radbruch, Springer-Verlag; 和 *In Living Color: Protocols in Flow Cytometry and Cell Sorting* (2000) Diamond 和 Demaggio 编辑, Springer-Verlag。流式细胞计数方法同样在美国专利 5,968,738 和 5,804,387 中得以描述; 在此将所述公开内容以参考的方式引入。

本发明因此提供了一种制备用于蛋白表位测量的含红细胞的生物样品的方法, 该方法使得可以保留用于通过细胞计数法检测的细胞内蛋白表位, 所述细胞计数法例如流式细胞计数法或者激光扫描细胞计数法。细胞计数法是非常强大的用于分析磷酸基-特异性表位和其他非磷酸基-表位的多参数方法, 并且具有超过通过诸如蛋白质印迹和 ELISA 等方法进行分析的多项优势。为保持精确性和半定量结果, 所述细胞计数检测可以通过与诸如蛋白质印迹和 ELISA 等传统方法进行比较来得以确认。

细胞计数法使得能够不经过任何预先细胞筛选或损耗而分析: B 细胞对比 T 细胞, 病态/癌症细胞对比健康细胞, 在一个发育阶段的细胞对比另一阶段的细胞。通过能够以保留用于检测的细胞内表位的方式制备生物样品, 本发明的方法使得能进行细胞类型间的立即比较。应当理解根据选择的可检测试剂可以同时分析几个信号级联或者一个特定级联中的多个成员。在意欲检测多个表位的实施方式中, 可以使用能进行多色分析, 例如 2、4、6、8 或者更多个不同颜色的流式细胞计数法。因此, 所述方法能够根据疾病的信号状态或者通过它们对刺激的对应对比正常健康细胞对刺激的反应来对这些疾病进行概况分类。在这方面, 致瘤性

病症经常被表征为过度表达或者具有组成型活性的信号分子。本发明的方法进一步应用于制备生物样品用以使用流式细胞计数法进行基于细胞的药物筛选，其中可包括同时检测多个信号级联以确定药物特异性。

通过细胞计数法检测使得使用者可以分析在复杂群体里的罕见细胞亚群。由于能够分析异质群体中的罕见细胞亚群，流式细胞计数法可用于特别是存在许多细胞类型时的监测环境中的信号事件，该信号事件最好地刺激体内的信号事件。如本文所述，本发明的方法使得能制备含有红细胞的生物样品，其使信号事件固定在几乎任何时间点以用于随后的染色。

应当理解本发明的方法可对诸如 96 孔板形式的大量样品平行进行操作以快速测量细胞内信号转导事件。在多个实施方式中，可以使用许多细胞因子对诸如未稀释外周血、骨髓抽吸物或腹膜液等生物样品进行刺激并在诸如 T 细胞、B 细胞和 NK 细胞等几种不同类型的细胞中测量诸如 ERK、p38 和 JNK 或者 STAT 转录因子等 MAP 激酶的磷酸化。因此，使用磷酸基-特异性流式细胞计数法，仅有淋巴细胞的一个特定亚群，例如 B 细胞或者 T 细胞能根据其对刺激的响应而被靶向，所述对刺激的响应不会由其他子群体所表现出来。分辨出细胞子群体并单独检测出样品中存在的细胞类型的能力能够使那些看上去非常小并且如果从整个群体背景下考虑则不能检测到的变化变得清晰。

本发明提供的方法可包括一步或多步温育步骤，例如，在固定步骤和去污剂步骤之间以及在去污剂步骤和随后的标记步骤之间。可以设想在生物样品与固定剂接触以后，接着进行大约在 30 秒钟~大约 1 小时范围的温育步骤。可以考虑在样品与去污剂接触后，在标记步骤以前，进行持续时间为大约 30 秒~大约 1 小时的第二温育步骤。在目前优选实施方式中，第二温育步骤的时间约为 10 分钟。

本发明的方法可进一步包括一步或多步离心步骤。如本文所举例的那样，在标记步骤前可进行其目的在于去除去污剂的第一离心步骤。此外，可在醇步骤后进行另外的离心步骤以去除醇。应当理解可根据使用者需要在多个步骤中进行洗涤步骤和在适当的缓冲液(例如磷酸缓冲盐水

(PBS))中的重悬浮。

如本文所述,本发明提供了包括在去除(溶解)红细胞和透化靶白细胞前加入固定剂的方法。结果,本发明提供的方法使得经标记的结合剂,例如抗体、抗体片段或抗体样分子可接近细胞内或细胞核内区室。此外,本发明提供了所述方法的以下实施方式,其包括本文所述的醇步骤,该醇步骤提供了使由于固定步骤而掩蔽的蛋白表位“暴露”的方式,已显示所述固定步骤对于检测诸如 ERK1、2 等关键信号转导蛋白的磷酸化是必须的。

当提供一个范围内的值时,应当理解在该范围的上限和下限间的每一个中间值,直到下限单位的十分之一(除非上下文明确指出),以及其他在所述范围内指明的或者位于中间的值都包含在本发明中。这些较小范围的上限和下限可独立地包含在所述较小范围里,并也包括在本发明内,在所指明范围里可特别排除任何的极限值。当所指明的范围包括一个或两个极限值时,排除其中一个或两个所包含的极限值的范围也包括在本发明中。

除非另外指明,否则本文使用的所有技术和科学术语具有本发明所属技术领域里的普通技术人员所通常理解的含义。除非上下文另外明确指明,否则本文使用的单数形式“一个”、“和”以及“所述”包括其所指物的复数。

应当理解那些未实质上影响本发明各种实施方式实行的修改也包括在本文提供的本发明限定范围内。因此,下述实施例用以描述而不是用以限制本发明。

实施例 1

红细胞的溶解、固定以及白细胞的透化

本实施例描述和比较了通过低渗溶解,随后的固定以及固定后的去污剂溶解来制备全血样品。

简言之,将豆蔻酰佛波醇乙酯(PMA, Sigma Chemical Corp., St. Louis, MO)在 100%无水乙醇中制备成 40 M 工作溶液,并以 400 nM 的

终浓度用在全血中。在本实施例中使用的 Triton X-100 和其他去污剂以 Surfact-Pak™ 去污剂样品试剂盒的形式从 Pierce Biotechnology(Rockford, IL)购得。所述样品试剂盒包含七种不同的非离子型去污剂(Tween-20、Tween-80、Triton X-100、Triton X-114、Nonidet P-40、Brij-35 和 Brij-58, 均以 10%水溶液形式提供)和三种粉末(非离子型辛基-B-葡萄糖苷, 和辛基-B-硫吡喃葡萄糖苷, 和两性 CHAPS)。粉末去污剂溶解在 PBS(不含有 Ca^{2+} 和 Mg^{2+})中制得 10%溶液。所有去污剂在即将使用前于 PBS 中溶解。

对于对磷酸基-特异性表位进行的细胞内染色, 使用冷洗涤缓冲液将已固定和透化的细胞(经过或未经过甲醇处理)洗涤一次并离心。向细胞沉淀中加入溶解在洗涤缓冲液中的抗体(单抗体或多抗体)以使最终体积为 100 μl 并在 40°C 温育 15~30 分钟。采用磷酸基-ERK1/2 的单克隆抗体(Thr 202/Tyr 204, 克隆 E1O) (Cell Signaling Technologies, Beverly, MA), 并根据制造商说明与 Alexa Fluor™ 488 (Molecular Probes, Eugene, OR)结合。结合的磷酸基-ERK1/2 具有 4.3~6.3 的染料:蛋白质比, 并在此前抗体滴定试验所确定的最佳抗体浓度(在 100 μl 中, 0.2 μg 结合的磷酸基-ERK1/2 相对于每 10^6 个细胞)使用。从 Beckman Coulter, Inc.得到抗-微管蛋白(FITC 结合物, 克隆 TB1A337.7)并以 100 μl 中相对于每 10^6 个细胞为 0.5 μg 的浓度使用。在抗体染色后, 将样品悬浮在 2 ml 洗涤缓冲液中, 并通过 35 微米尼龙网 (Small Parts, 在 PA 州某处) 过滤, 离心, 然后在使用 Beckman Coulter Epics® Elite™ 流式细胞仪分析前重悬浮于 150 μl ~300 μl 洗涤缓冲液中。

对于细胞表面加上细胞内染色, 将在按照制造商(Beckman Coulter, Inc., Miami, FL)说明进行 Q-Prep™ 处理后或者在进行经过或未经过 50% 冷甲醇处理的方法 B 后采用选定的单克隆抗体对全血样品 (100 μl) 进行染色过程。单克隆抗 CD 抗体(在使用方法 B 或 B'制备细胞样品后加入)包括 CD45(克隆 J.33)、CD3(克隆 UCHT-1)、CD19(克隆 J4.119)、CD13(克隆 SJZD1)、CD14(克隆 RMD52)和 CD33(克隆 D3HL60.25 1)。所有抗 CD 抗体均从 Beckman Coulter, Inc. (Miami, FL)获得并按照制造商推荐的抗体浓度用作 PE 结合物。在室温温育抗体 30 分钟后, 将试管离心($645 \times G$,

四分钟), 重悬浮于 1 ml 洗涤缓冲液, 并立即使用 FC-500TM, 或者 Epics XLTM 流式细胞仪(Beckman Coulter, Inc., Miami, FL)进行分析。

对于测量磷酸基-特异性表位变化的试验, 使用 Epics EliteTM 流式细胞仪(Beckman Coulter, Inc.)进行流式细胞计数测量, 该细胞仪配备有采用 20 mW 488 nm 照明的空气冷却的氩激光。通过 525 ± 10 nm 带通滤波器收集 FITC 或 Alexa FluorTM 488 荧光, 通过 575 ± 10 nm 带通滤波器收集 PE, 并采用最小补偿以消除在 PE 通道中的 FITC 或 Alexa FluorTM 488 信号。获得 2000~10000 的阳性事件(通常为 CD3 阳性)并保存在列表式文件中。使用 Epics EliteTM 软件进行数据分析, 计算平均荧光强度(MFI)和阳性事件百分比。

在采用 FALS 和侧散射测量比较淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的相对分离度的试验中, 和在测量采用三种不同技术(Q-PrepTM、甲醛/Triton(不采用醇)[方法 B], 或者采用醇的甲醛/Triton[方法 B'])制备的全血样品中选定的表面标记的相对荧光强度的试验中, 按照制造商提供的标准配置使用 FC-500TM, 或者 Epics XLTM 流式细胞仪(Beckman Coulter, Inc.)。采用 488 nm(唯一)提供照射, 并且用于 PE 通道(575 ± 10 nm)的仪器设置保持在同一值, 每次测量计数总共 45,000 个细胞。采用 FALS 鉴别器, 设置其用以消除大部分血小板和小的碎片。

在 Q-PrepTM、方法 B、或方法 B 加上 50%甲醇处理(称为方法 B')之后, 光散射群体(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)的定量回收差异通过比较 CBC 分析结果与基于流式细胞计数法的光散射所测定的群体的结果而确定。使用 CD45(FITC)相对于侧散射的同时测量进行基于光散射的群体的验证, 正如 Loken 等, *Cytometry* 11:453-459, 1990 中所描述。

如图 2 所示, 对比 PMA 刺激的和未刺激的全血, 低渗溶解技术(方法 A)通常给出 20~25 倍的磷酸基-ERK1/2 信号增加。为将淋巴细胞作为测量的靶点, 如 Chow 等, *Cytometry* 46:72-78, 2001 中所述, 测量了 CD3 阳性外周血淋巴细胞上的磷酸基-特异性 ERK 水平。这样做部分是由于低渗溶解技术后通过光散射所测量的白细胞群体的分离度低(图 2, 左图)。在磷酸基-ERK 信号(PMA 刺激的相对于未刺激的样品的比率)中未能观

察到采用方法 A(图 2, 上图)与采用在 RBC 溶解后立即进行福尔马林固定的改进低渗溶解技术(图 2, 下图)相比较的显著差异。这些结果表明对全血样品进行固定方面的延迟对磷酸基-ERK 的测量水平没有显著影响。

根据与低渗 RBC 溶解技术相关的技术难点, 进行在去污剂溶解后的固定。增加交联固定剂浓度、温育时间或者提高温度是使得红细胞更耐去污剂溶解的因素。为筛选不同的去污剂进行了一系列试验以评价在交联固定后它们溶解红细胞的能力。对于这些试验, 在室温(RT)使用 35 μ l 10%甲醛(终浓度 2%)固定 100 μ l 全血 10 分钟。随后在室温(不去除固定剂), 采用浓度为三种不同浓度之一(0.001%、0.01%、0.1%)的每种去污剂处理已固定的全血样品, 并进行目视监测以检测长至 2 小时的时间段内的红细胞溶解。

采用前向角光散射(FALS)对比侧散射(SS)分析去污剂处理的样品以确定白细胞群体的相对完整性和分离。如图 3 所示, 采用 0.1% Triton X-100(左图)对所固定的全血进行处理显示出淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的不同群体。相反, 采用终浓度为 0.001%的 Triton X-100 的处理未显示出不同的 WBC 群体(右图)。采用 0.01% Triton X-100 对所固定的样品进行处理通过光散射显示出相似的 WBC 群体分离不足(结果未示出)。对于表现出显著的红细胞溶解的三种去污剂(Triton X-100、NP-40 和 Brij 58)可以观察到相似结果, 所有这三种去污剂根据去污剂终浓度表现出相似的 RBC 溶解和 WBC 群体分离的模式(其中仅特定去污剂终浓度表现出清晰的 WBC 群体分离, 而相同去污剂的其他浓度未表现出明显的分离)。

对于表现出 RBC 溶解的三种去污剂(Triton X-100、NP-40 和 Brij 58), (在所测试的三种浓度中)0.1%去污剂终浓度通过光散射显现出 WBC 群体的分离。对于这三种去污剂, 在 0.01%时 RBC 溶解不可见, 在 0.001%去污剂处理的样品中仅可见部分溶解。

与在使用低渗溶解法(方法 A)制备的全血样品中的 20 倍或更高水平相比, 使用甲醛固定(2%浓度在室温下处理 10 分钟)和 0.1%去污剂处理, 在 PMA 刺激的全血中的磷酸基-ERK 水平仅仅比未刺激的对照高 2.5~3.5 倍(见图 4)。

如图 4 所示, 使用两种不同方法(方法 A 与甲醛/Triton(方法 B))制备并与抗-微管蛋白-FITC 同时温育的细胞显示出相同百分比的阳性细胞(基本上 100%为 CD3 阳性细胞), 以及相似的抗-微管蛋白染色的 MFI(图 4, 右图), 表明对使用任一方法制备的细胞中的胞内抗原具有等同的接近性, 并排除了甲醛/去污剂方法不能提供足以使抗体进入细胞内部的细胞透化作用的可能性。

在磷酸基-ERK(而不是抗微管蛋白)染色中的主要差别表明磷酸基-ERK 表位(而不是微管蛋白)在交联固定(在低渗溶解(方法 A)技术中通过醇处理提供的过程)需要暴露或变性。然而, 如图 2 和图 4 所示, 甲醛固定后的醇处理并不能保留光散射特性并使得可以分辨所有白细胞群体。甲醛/去污剂技术尽管保留了光散射但不能暴露磷酸基-ERK。

结果, 研究了使用高盐、低 pH 和加热作为变性条件是否可以潜在地暴露出磷酸基-ERK 表达。

使用高盐、低 pH 或者温度来暴露抗原

在 4%甲醛(室温 10 分钟)中固定全血样品和在室温使用 0.1%去污剂(Triton X-100、NP-40 或者 Brij 58)处理 30 分钟后, 通过在可见 RBC 溶解后直接将浓缩储备溶液(5M 储备液)加入到去污剂溶液中制得在 NaCl 或尿素中的 1M 或 2M 样品。对置于低 pH 的样品, 通过离心(在 30 分钟温育后)去除去污剂并将细胞重悬浮于 pH 调节为 5 的 PBS 中。将所有样品在室温置于高盐或酸中 30 分钟, 离心并重悬浮于洗涤缓冲液中。

对于置于升高的温度作为变性因素的样品, 将已固定的全血样品(在室温条件下 4%甲醛处理 10 分钟)采用 0.1% Triton X-100 在室温处理 30 分钟, 然后在 70℃水浴中温育 10 分钟, 离心并重悬浮于洗涤缓冲液中。对于所有条件, 使用 CD3-PE 和磷酸基-ERK-Alexa 488 对样品进行染色, 洗涤并使用 Epics Elite™ 进行分析。

如图 5 所示并总结在表 1 中的结果表明, 通过低渗溶解技术制备的全血样品(顶行, 图 5)表现出: 对比刺激的样品和未刺激的样品, 在 CD3 阳性淋巴细胞中磷酸基-ERK 表达具有 26~34 倍的差异。对比仅用去污

剂处理的样品，使用 1N 或 2N NaCl，或者 1M 或 2M 尿素处理的样品表明很小而不显著的磷酸基-ERK 表达的增加，而置于 pH5 条件下表现出 7 倍的差异，进行 70℃处理表现出 6 倍的差异(PMA 刺激的相对于未刺激的)。使用任何去污剂处理并置于 NaCl、尿素或低 pH 的全血样品的散射图(FALS 对比 SS)表现出白细胞群体的分离度很差(图 5，每种去污剂处理的第一行)。所显示的结果代表对三份不同全血样品进行的相同试验。

表 1 不同变性条件对 p-ERK 在 CD3 阳性淋巴细胞中的表达的影响^a

变性条件	MFI		S/N
	对照	+PMA	

变性条件	MFI		S/N
	对照	+PMA	
方法 A ^b	1.05	29.8	28.3
方法 B ^c	1.71	4.9	2.9
1N NaCl	1.65	5.6	3.4
2N NaCl	1.03	4.98	4.8
1M 尿素	1.53	5.59	3.65
2M 尿素	1.38	5.86	4.2
pH 5	1.47	10.58	7.19
70℃	1.54	9.83	6.38

^a 所示结果获自三个单独的试验
^b 方法 A：低渗溶解加上固定
^c 方法 B：4%甲醛/0.1% TX-100

这些结果表明：虽然所述变性条件提高了 p-ERK 在甲醛/去污剂处理的细胞中的表达，但表达水平远比在使用低渗 RBC 溶解、固定和醇处理(方法 A)处理的全血样品中见到的表达水平要低。

实施例 II

固定剂和去污剂浓度对白细胞光散射的影响

该实施例表明固定剂和去污剂二者的浓度和温育时间对白细胞的分

离度和回收的影响。

根据先前研究所建议的高浓度交联固定剂有助于维持白细胞群体的光散射图和分离度，研究了不同固定剂浓度的影响。全血样品在室温或 37°C 在浓度逐渐升高的甲醛(从 1% 至 10% 终浓度)中温育 10 分钟，随后立即与 1 ml 0.1% TX-100(在室温)温育。如图 6 所示，甲醛浓度从 2%~4%(对于室温温育)的逐渐升高显著改进白细胞群体的分离度(左图)。相似地，在 37°C 使用甲醛处理全血样品导致使用光散射的 WBC 群体的分离改善，而对 CD3 表达没有显著影响(对于两个处理温度具有相似的 MFF，图 6，中图)。然而，较高甲醛浓度(超过 4%)导致 RBC 的不完全溶解，并且不能分辨白细胞群体(数据未示出)。如图 6 所示(右图)，在 37°C 的处理也导致提高了磷酸基-ERK 表达的 S/N(从室温的 2.5 提高到 37°C 处理的 5.2)。

为确定去污剂浓度对 WBC 回收、基于光散射的分离和 p-ERK 表达的影响，用 4% 甲醛(终浓度)在室温或 37°C 固定全血等分试样(100 μ l) 10 分钟，然后将其与 1 ml TX-100 温育，所用去污剂浓度从 0.1% 至 1.0%。对于这些实验，通过离心去除去污剂并洗涤(使用洗涤缓冲液洗涤三次)，然后使用抗-CD3-PE 对细胞进行染色。

如图 7 所示，去污剂浓度提高到超过 0.1% 导致 WBC 群体的分离度变差，伴随碎片量的增加以及显著丧失使用光散射从淋巴细胞分辨出单核细胞的能力(见图 7 左图)。此外，通过使用逐渐升高的去污剂浓度，CD3 相比侧散射直方图(图 7 中图)显示出 CD3 阳性事件百分比提高并伴随侧散射图显著高于在淋巴细胞中所发现的侧散射图。如图 7 所示，室温固定使得 RBC 在所有去污剂浓度下溶解，而在 37°C 固定的样品显示在所有去污剂浓度下细胞凝集且 RBC 溶解不完全。

这些结果启示：伴随去污剂浓度增加，或者 CD3 阳性淋巴细胞结合到单核细胞或粒细胞，或者溶解的 CD3 阳性淋巴细胞将膜片段结合到单核细胞和粒细胞(后者与图 7 的中图中所见的 SS 图更一致)。结合有关固定剂滴定的数据，这些数据表明使用 4% 甲醛和 0.1% TX-100 处理可获得最优的 RBC 溶解和 WBC 回收。然而，对使用上述讨论的甲醛和 TX-100 的范围所处理的细胞进行的 p-ERK 染色的研究未提供比未刺激的对照样

品高于 7.4 倍的 p-ERK 信号(对于 PMA 刺激的全血样品)(与最初描述的低渗溶解处理的 28 倍相比较)。

随后研究了使用 4%甲醛时全血样品与固定剂的温育时间的作用(10 分钟~30 分钟)。此外,研究了或者在存在固定剂(如前所述),或者在去除固定剂后,样品(在添加固定剂后)与去污剂温育的作用。样品在固定剂中温育时间超过 10 分钟则显示出不完全的 RBC 溶解和细胞凝集(结果未示出)。与使用固定剂温育 10 分钟,洗涤,然后再采用去污剂处理的样品(10 分钟~30 分钟)相比,存在固定剂时使用去污剂处理的样品显示出更完全的 RBC 溶解和更好的白细胞群体分离度(结果未示出)。此处,虽然全血样品表现出良好的 RBC 溶解和良好的淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的分离度,但是对于磷酸基-ERK1/2 的信噪比保持在 5~8,表明仍存在对该细胞内表位的明显屏蔽。

实施例 III

醇暴露剂对 p-ERK 的影响和对 CD3 表达的影响

该实施例表明了醇对淋巴细胞回收和对暴露表面表位的影响。

为了“暴露”在使用交联固定剂固定后变得非反应性的磷酸基-蛋白(和其他)表位,进行了一系列试验以评估在去污剂处理后的醇处理的影响。在置于去污剂中 30 分钟后,用冷(4℃)缓冲液(不含 Ca^{2+} 或 Mg^{2+} 的 PBS)洗涤已固定的全血样品并将其在 4℃重悬浮于一系列不同浓度的甲醇或乙醇中。将每种样品的一等分试样在 4℃保持过夜以研究在醇溶液中保存的影响。与以前相同,使用 CD3-PE 的抗体(以评估 T-淋巴细胞的回收和染色)和磷酸基-ERK 的抗体(以评估表位暴露)对样品进行染色(在通过离心和在 PBS 中洗涤而去除醇以后)。

如图 8 中提供的结果所示,甲醇处理(从 40%至 60%终浓度)保留了 WBC 光散射概图而同时保持了良好的 CD3 染色。乙醇处理导致更高百分比的碎片(图 8,左下图)以及单核细胞的损失。因为很多实验室通常将样品保存在 4℃的醇中不同时间段,所以作为研究的一部分,我们在分析前将两份完全相同的样品保存在醇溶液中过夜。结果如图 8 所示(右图)

表明：尽管在甲醇中保存过夜的溶液中碎片百分比有所增加，但是在甲醇处理的样品中没有光散射或者 CD3 表达的显著劣化。相反，保存在乙醇中过夜的样品(图 8，右下图)表现出明显的碎片、光散射的劣化和 CD3 染色的损失。

实施例 IV

醇处理对白细胞群体的影响

该实施例描述了醇处理对淋巴细胞群体的散射分离的影响

以上实施例 I~III 描述了两种用于全血样品固定、溶解 RBC，透化细胞的方法用以进行流式细胞计数法的细胞内抗原染色。在称为固定/去污剂溶解技术的基本方法的一个实施方式中，可用 4%甲醛在室温固定全血样品 10 分钟，随后在室温不去除固定剂而加入 1 ml 0.1% Triton X-100 (方法 B)。进一步可使用冷(4℃)50%甲醇(在蒸馏水或者缓冲液中)进行处理以暴露蛋白表位，且需要变性步骤(方法 B')。

如图 9 所示，通过方法 B 处理全血样品导致 WBC 群体的良好的光散射分离，CD3 在 T-淋巴细胞上的高水平表达，但是与使用我们最初低渗溶解技术(方法 A，图 9，那套上图)处理的全血相比，p-ERK 的表达水平较低(图 9 第二套图)。在去污剂处理后用 50%甲醇处理的全血样品(方法 B'，图 9 第三套图)保留了 WBC 光散射特性，CD3 表达和相对高水平的 p-ERK(此处对于方法 B'，S/N=19.1；对于方法 B，S/N=8.1；以及对于方法 A，S/N=29)。

为确定两种技术(方法 B 和方法 B')对白细胞群体分离度的影响，进行了一系列试验，比较了用 Q-Prep™ 系统(Beckman Coulter, Inc.)，或者固定/去污剂溶解技术(方法 B)，或固定/去污剂溶解后 50%冷甲醇(方法 B')处理的全血样品。

使用三种不同技术对来自正常捐献者个体的样品进行处理，并通过流式细胞计数法测量(使用 FALS 对比 SS)以确定淋巴细胞、单核细胞和粒细胞的相对分离度，所述相对分离度通过如 Riley 在 Statistical analysis and optimal classification of blood cell population using Gaussian

distributions, 博士论文: Florida International University; (2003)中所描述的测量光散射群体间费歇尔距离来进行。

简言之, 为确定不同全血制备技术对主要白细胞群体(淋巴细胞、单核细胞和粒细胞)的回收和鉴别的相对效果, 进行试验来通过前向角光散射相对于 90 度角光散射参数(均为线性)比较这三种群体的分离, 其中采用如 Riley, 同上, 2003 所述测量费歇尔距离。

如图 1 所描述, 该技术测量每一个基于光散射的群体团沿着两条主要轴(X 和 Y)的中心, 并计算直角三角形的斜边, 其中 $C = \sqrt{A^2 + B^2}$ 。在淋巴细胞(A)和单核细胞(B)之间的费歇尔距离 = $\frac{C}{SD(A) + SD(B)}$, 其中 SD =

标准偏差。通过将每个群体沿 X 和 Y 的 SD 相加并除以 2 计算每个群体。虽然该计算没有提供真实群体 SD, 但的确提供了能很容易计算的有效且有用的近似值。为计算费歇尔距离, 在单个 FC-500™ 流式细胞仪上分析由三种技术中的每一种制备的样品, 如前所述, 计数总数为 45,000 个事件。对于通过使用 Q-Prep™ 或者不含醇的方法 B 制备的样品, 将相同的增益和高电压设置用于 FALS 和侧散射检测器。对于使用醇处理(方法 B')制备的样品, 将更高的电压用于两个散射检测器(两个电压均高 3.3 倍)以获得三个群体的分离度。

使用 FALS 和侧散射获得淋巴细胞、单核细胞和粒细胞细目以计算单独样品的百分比分布。单独数值(百分比)乘以使用 CBC(从 LH-750™ 获得)从那个捐献者获得的 WBC 计数。为评估试验精确性(可重现性), 计算了每一套重复试验(用 CD45、3、19、13、14 和 33 染色的试管)的平均数、标准偏差和变异系数。

比较了样品制备方法的费歇尔距离、CBC 参数, 和表面标记的 MFF。方差分析和 Tukey-Kramer 检验用于比较各方法的费歇尔距离。对于单独 CD 使用 MFI 和对于 CBC 参数使用差异绘图在差异和总偏差方面比较各方法, 如同在 Bland 和 Altman, Lancet 1:307-31(1986)中所述。对于每个血液样品的两种方法间的差异在统计上可以被模型化为:

$$D = TB + E$$

其中 D 是差异, TB 是总偏差, 而 E 是随机误差。因为 E 主要与不精确

性有关，所以其标准偏差的值也是试验分析的不精确性的估计值。估算 TB 的详细细节可在 Magari, Journal of Biopharmaceutical Statistics, 2004(出版中)中找到。95%置信度和 99%覆盖度的容许限度根据估算的标准误差计算。SAS(SAS Institute Inc., Carry, NC)用于所有统计分析。

对所有三种技术进行比较的 24 个正常捐献者的测量结果总结在表 2 中。对于使用 Q-Prep™ 制备的样品，淋巴细胞和单核细胞间的费歇尔距离最大(费歇尔距离=2.19)，表明：对于测试的三种技术来说，该技术能最好地将单核细胞和淋巴细胞分离(和将单核细胞与粒细胞分离)。所述分析说明：比较使用 Q-Prep™ 和方法 B 制备的样品的费歇尔距离，具有显著差异。然而，比较方法 B 和方法 B'的淋巴细胞和单核细胞间的费歇尔距离，没有显著差异。因为使用六种不同的 CD 标记对每个样品进行染色，所以我们也分析了样品内部以及技术间的样品差异性。该分析说明：与通过相同技术制备的样品间的差异性相比，测定内差异性更大。

在对单核细胞和粒细胞间的费歇尔距离进行比较（表 2）时，所有三种技术给出具有显著性差异的结果，其中 Q-Prep™ 给出最好分离，随后是方法 B。虽然我们的总体分析指出方法 B 和 B'提供的 WBC 群体的分离不如 Q-Prep™ 提供的分离好，但使用方法 B 或 B'制备的全血样品的散射测量(FALS 和 SS)提供的分离度足以清晰地分离 WBC 群体，并基本上提供了比我们的最初低渗溶解技术(参见图 9, 上图)明显更好的分离度。

图 2 费歇尔距离计算的数据分析总结
淋巴细胞对比单核细胞

方法	费歇尔距离	SE	DF	t-值	p-值
Q-Prep	2.1994	0.02687	408	81.86	<0.0001
方法 B	1.7644	0.02687	408	65.67	<0.0001
方法 B' (使用甲醇)	1.7441	0.02687	408	64.92	<0.0001

单核细胞对比粒细胞					
方法	费歇尔距离	SE	DF	t-值	p-值
Q-Prep	2.5735	0.04362	408	59	<0.0001
方法 B	2.1733	0.04362	408	49.82	<0.0001
方法 B' (使用甲醇)	1.9682	0.04362	408	45.12	<0.0001

使用 LH-750TM (Beckman Coulter, Inc.)分析仪测量通过所有三种技术制备的全血样品的等分试样以得到淋巴细胞、单核细胞和粒细胞计数(CBC)，其目的在于确定任何血液细胞群体是否由于样品制备而降低(损失)(使用低固定浓度，加上去污剂和醇处理的先前实验已指出单核细胞的显著损失和优先损失)。使用偏差图(图 10)进行分析以确定是否在回收不同 WBC 群体时有显著差异。与 CBC 测定相比，所有三种全血制备技术的淋巴细胞群体(图 10，上图)始终被过高估计，而当比较三种全血技术时淋巴细胞的测定值没有明显差异。三种流式细胞计数淋巴细胞测定和 CBC 之间的差异可以解释为在淋巴细胞门中包括低散射(碎片、血小板)等事件的结果。对单核细胞(图 10，中图)和粒细胞(图 10，下图)回收进行的比较显示：对于任何用于单核细胞的全血技术来说，没有显著差异；与 CBC 相比，所有三种全血技术在回收粒细胞方面有小但不明显的降低。

实施例 V

全血固定技术对代表性 CD 标记表达的影响

该实施例表明各种固定、RBC 溶解和透化技术(加入或不加入 50%冷甲醇)对具有代表性的一套细胞表面标记的影响。

最后一组实验研究了固定、RBC 溶解和透化技术(加入或不加入 50%冷甲醇)对细胞表面标记的影响，所述细胞表面标记对于淋巴细胞为 CD3、CD19，对于单核细胞为 CD13、CD14，对于粒细胞为 CD13 和 CD33。如前所述，使用 Q-PrepTM 或者使用或不使用醇的固定/去污剂溶解法制备全血样品。在洗涤后，将样品与单抗体(所有均作为 PE 结合物)温育，并通过流式细胞计数法进行分析以测定阳性细胞百分比和平均荧光强度(MFI)。

24 个捐献者个体的 CD 标记测量的结果提供在表 3 和图 11 中。如表 3 所示, 尽管在三种不同全血制备技术的比较中, 对于任何一种标记的 MFI 都有些差异, 但是唯一的染色强度显著降低见于使用 50% 甲醇(方法 B') 处理的全血样品中的 CD19。

如用于 CD19 表达的偏差图所示(图 11, 第三图), 在使用方法 B 或 B' 制备的样品中该标记的表达具有相当的差异性, 提示: 该表位在血液捐献者个体中对甲醛/Triton(和甲醇)处理具有不同敏感度。不管所使用的全血制备技术如何, 在所有捐献者中可以很容易检测到 CD19 阳性细胞。尽管在不同方法的比较中, 其他标记在染色强度(MFI)方面表现出一些升高或降低, 但是对于这些六种代表性 CD 标记, 在所有情况下均有足够的染色强度使得可容易地区分出阳性细胞群体和阴性细胞群体。

表 3 使用不同全血制备技术在不同 WBC 群体上 CD 标记表达的强度
平均荧光强度(MFI)

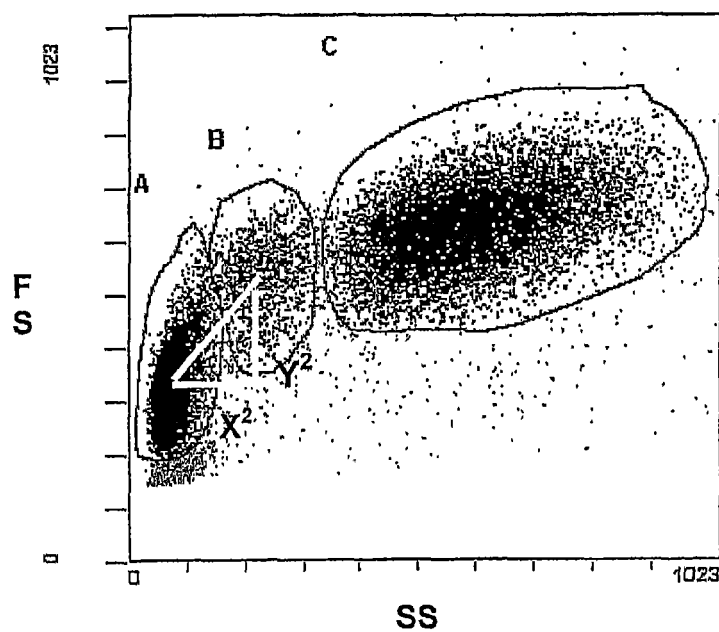
标记	Q-Prep™		方法 B F/TX (无甲醇)		方法 B' (F/TX, 使用甲醇)	
	平均值	SD	平均值	SD	平均值	SD
淋巴细胞"						
CD45	353.6	110.7	201.7	76.0	275.6	56.9
CD3	123.1	29.7	126.6	20.5	124.9	18.7
CD19	48.3	12.0	36.6	84.2	6.3"	1.9
单核细胞"						
CD45	224.9	66.8	260	108.8	351.3	62.7
CD13	84.1	45.6	41.5	19.2	41.9	18.3
CD14	81.4	28.9	103.7	21.6	86.4	15.7
CD33	44.0	20.9	18.9	10.7	20.1	9.4
粒细胞"						
CD45	69.9	20.9	127.0	56.9	185.7	37.8
CD13	53.3	20.5	51.4	12.0	53.0	6.0
CD33	12.1	2.7	12.2	7.6	12.0	7.9

- ^a 由光散射测定的 WBC 群体(FALS 对比 SS)
- ^b 与 Q-PrepTM相比, CD 表达水平的显著降低

贯穿本发明在插入语中参考了多篇文献。将这些文献的公开内容以参考方式整体引入本申请以更完整地描述本发明所属领域的情况。

虽然通过参考所公开的实施方式描述了本发明, 本领域技术人员可以容易地理解, 上述这些特定实施例和详细研究仅用于示例性说明本发明。应当理解, 可以做出各种修改而不背离本发明的精神。因此, 本发明仅受如下权利要求的限制。

费歇尔距离的计算



$$\text{距离} = \sqrt{X^2 + Y^2}$$

$$\text{费歇尔距离} = \frac{\text{距离}}{SD(A) + SD(B)}$$

图 1

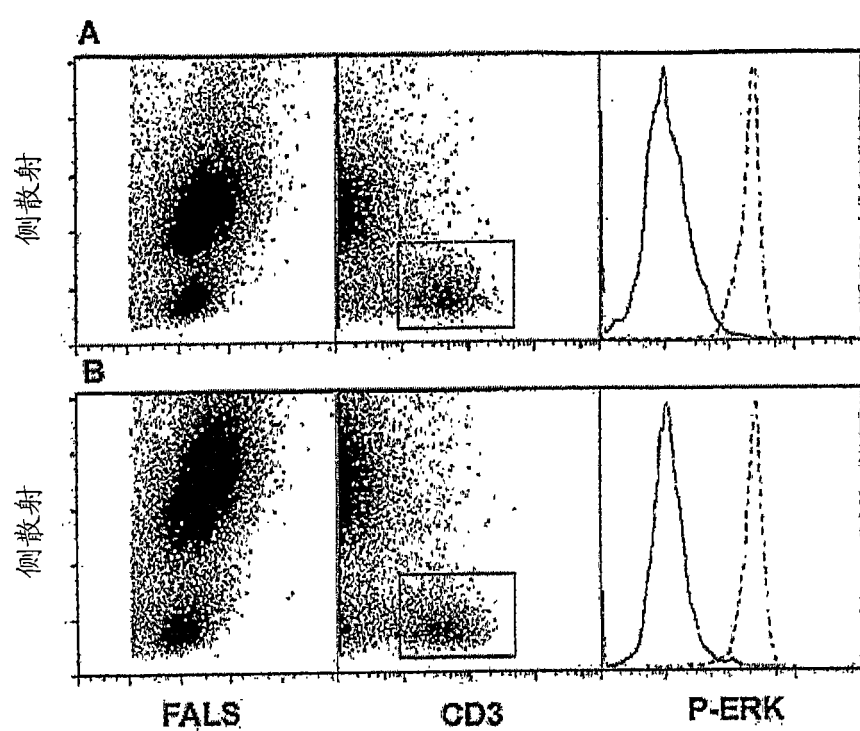


图 2

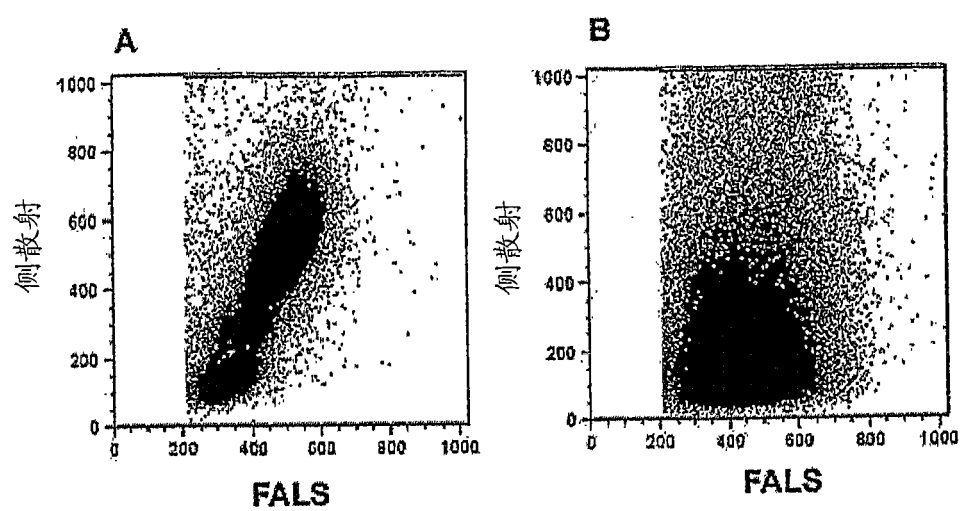


图 3

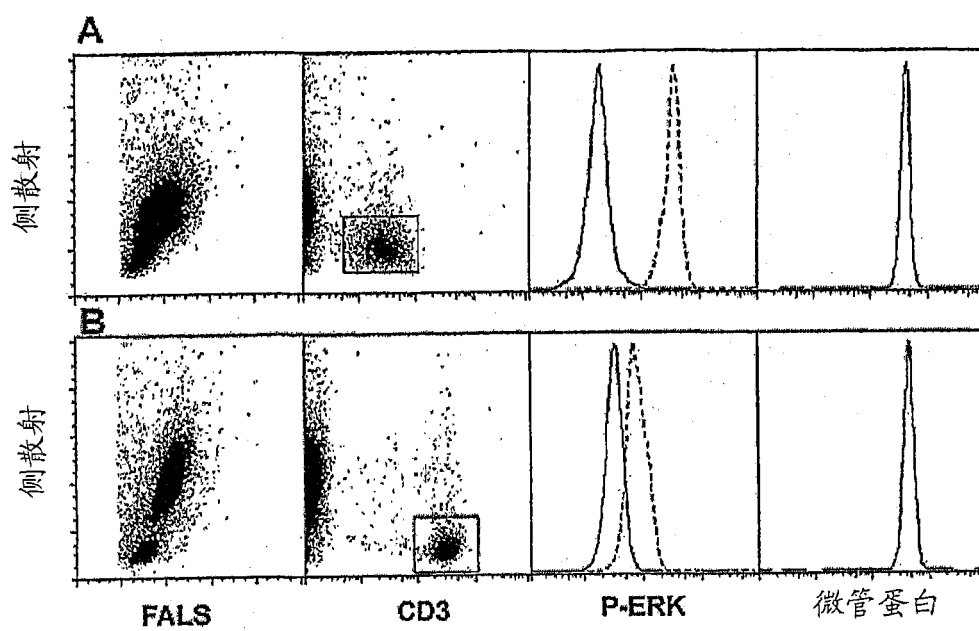


图 4

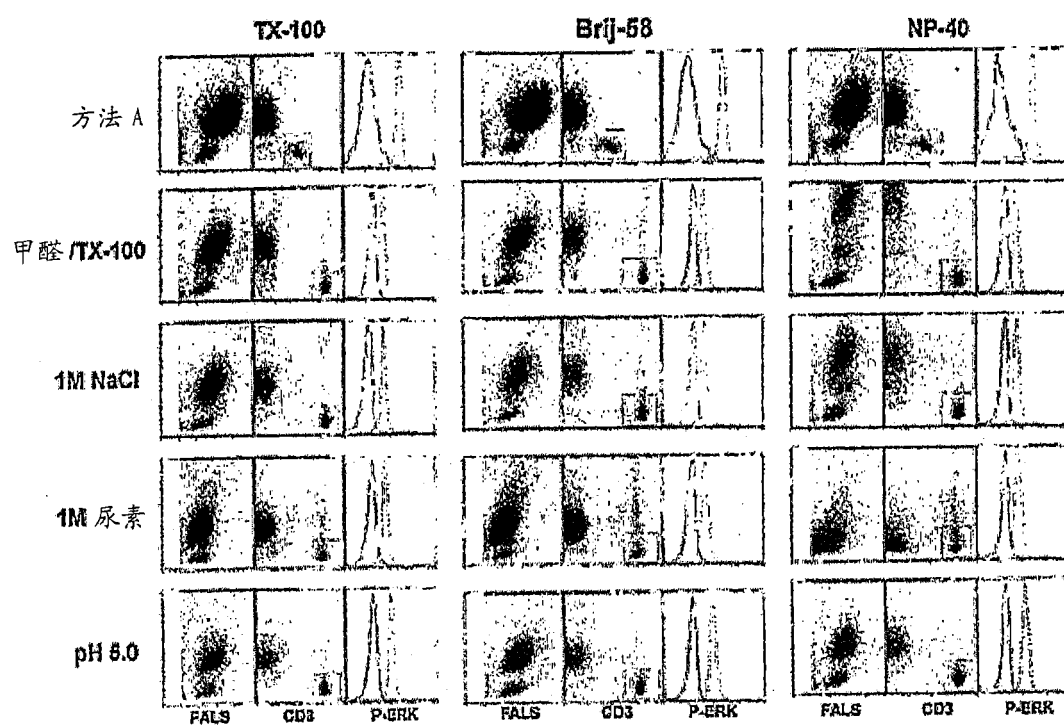


图 5

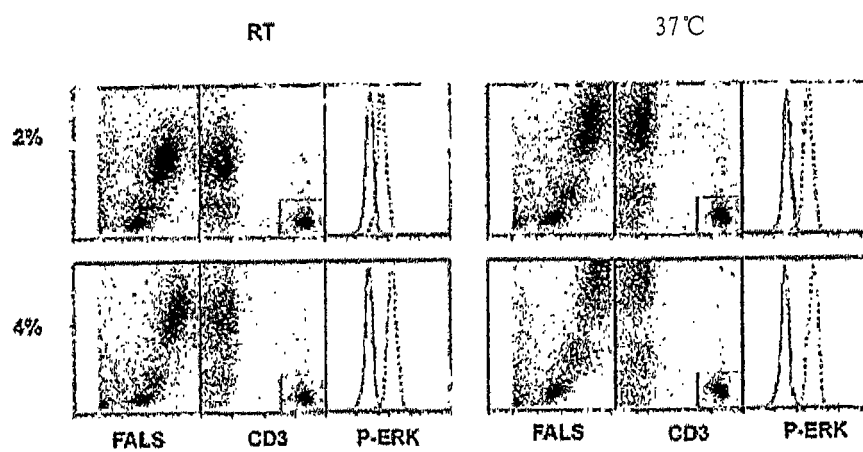


图 6

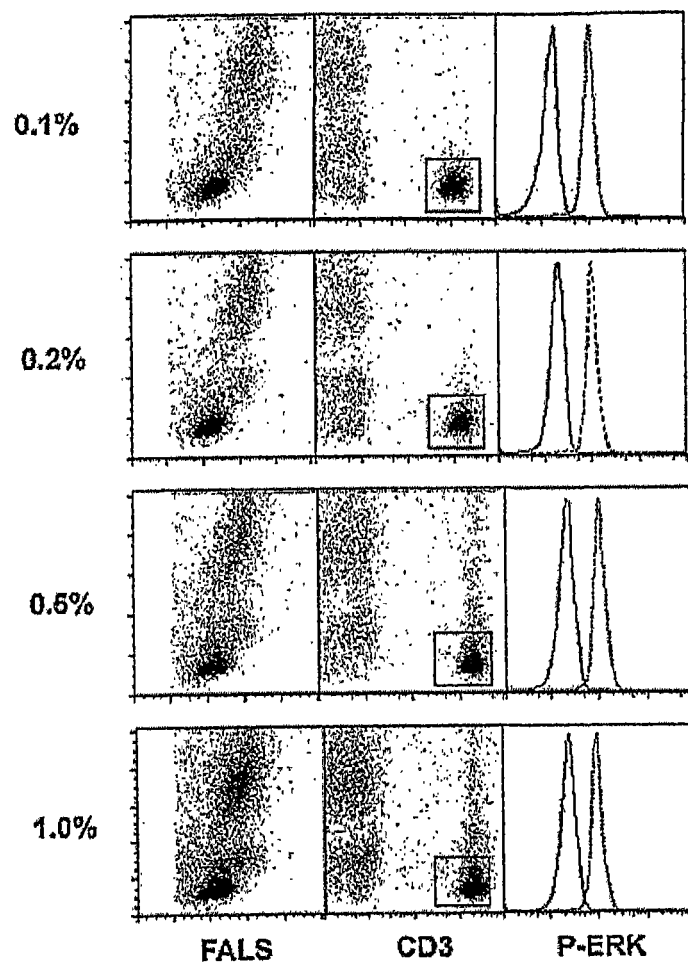


图 7

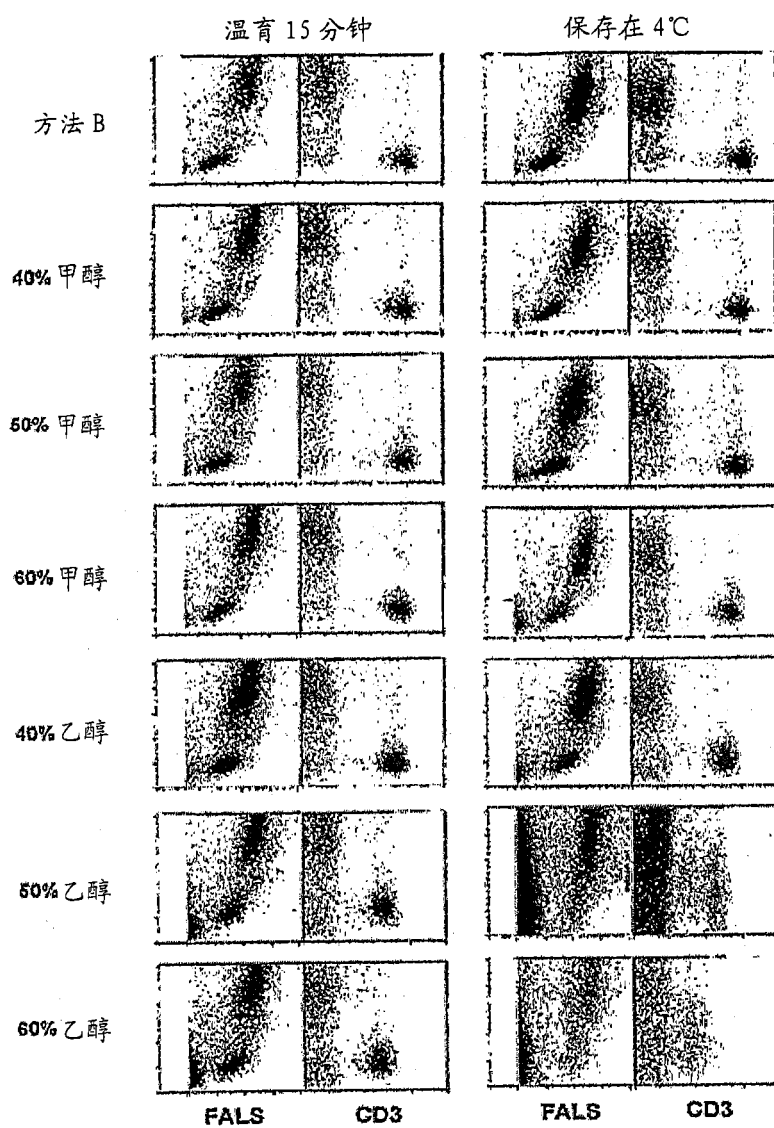


图 8

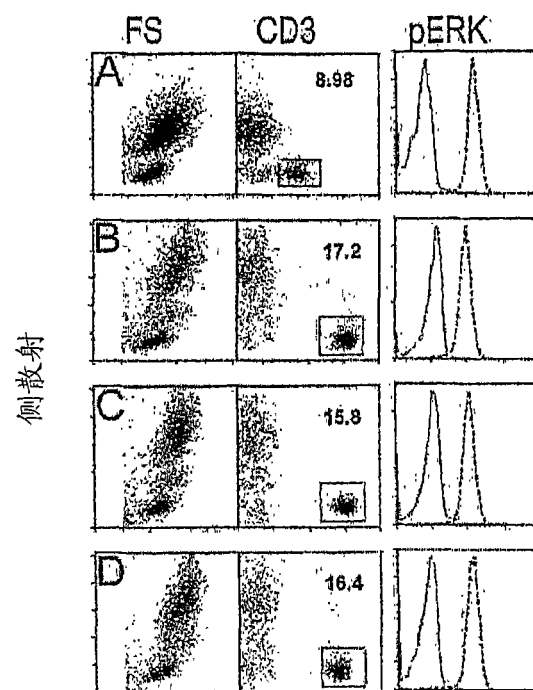


图 9

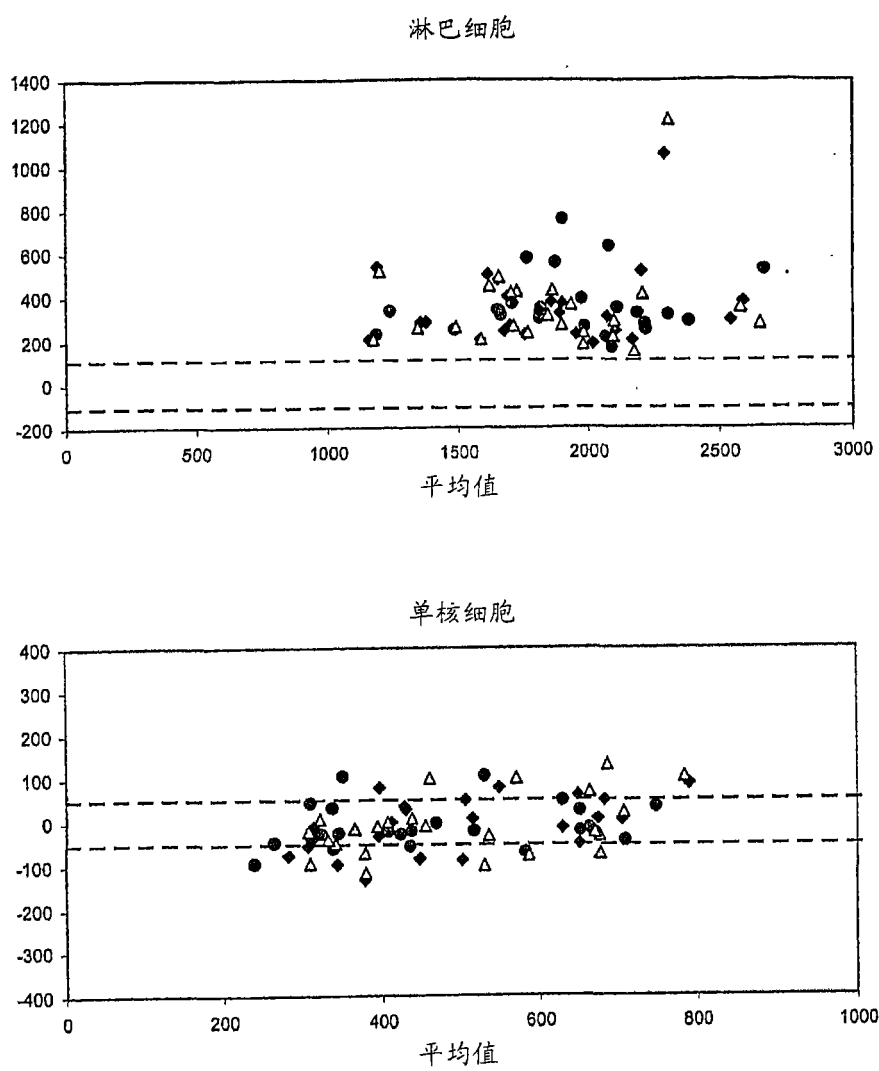


图 10

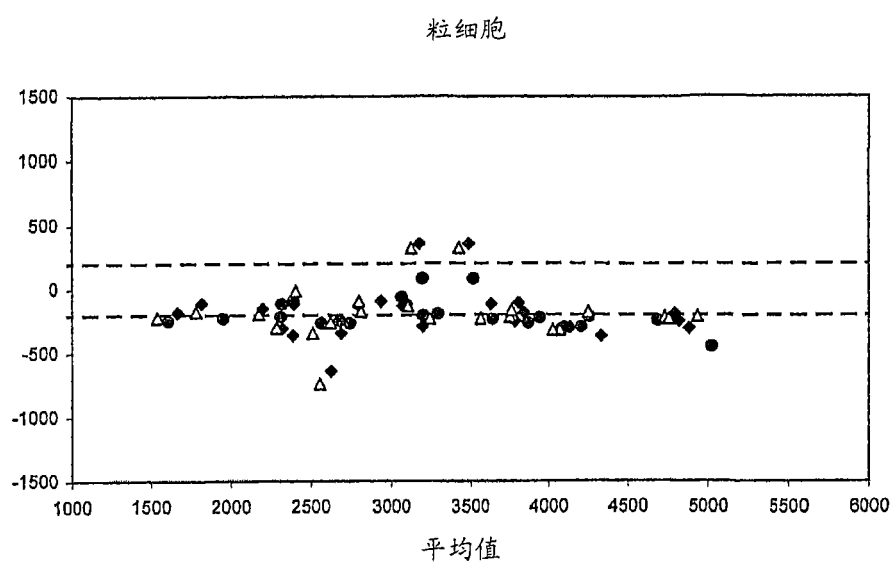


图 10(续)

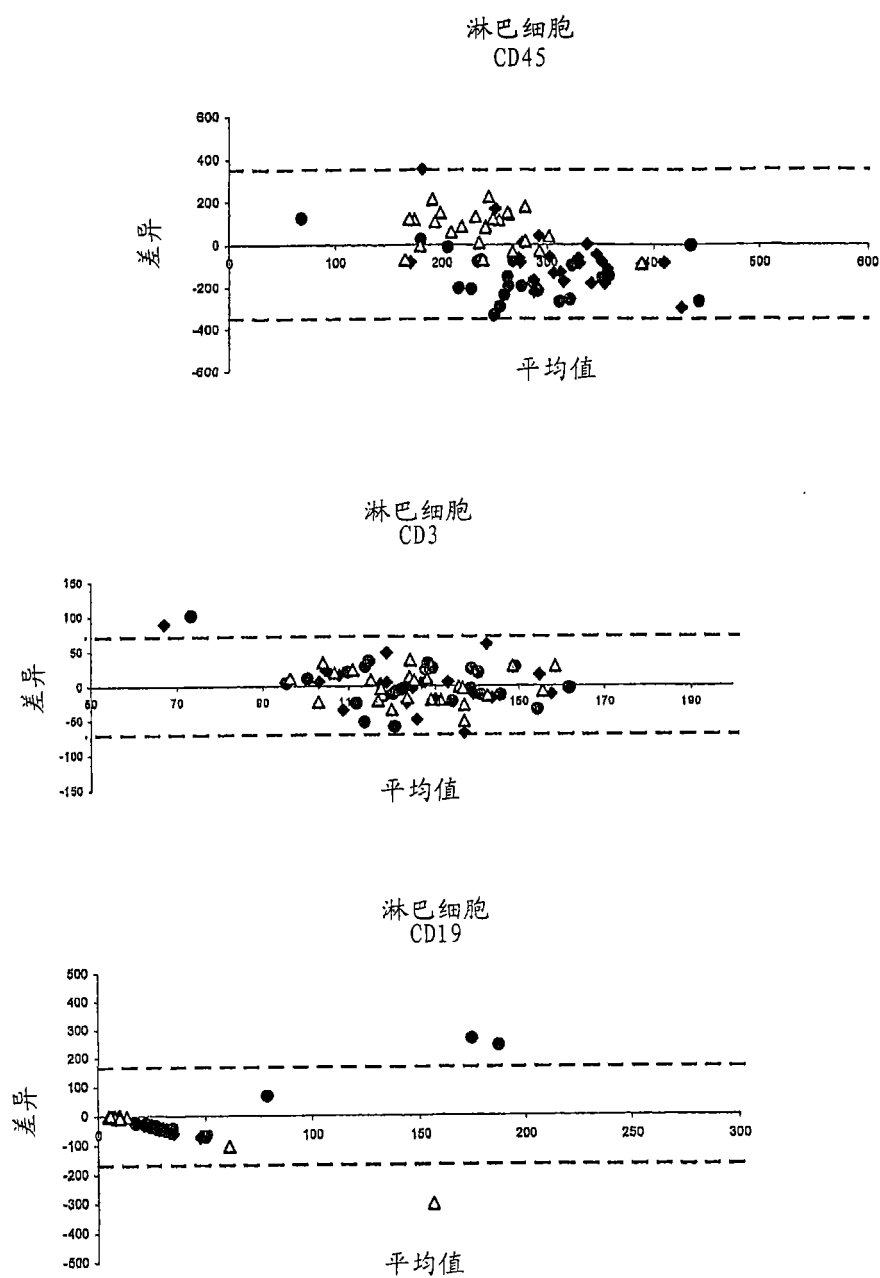


图 11

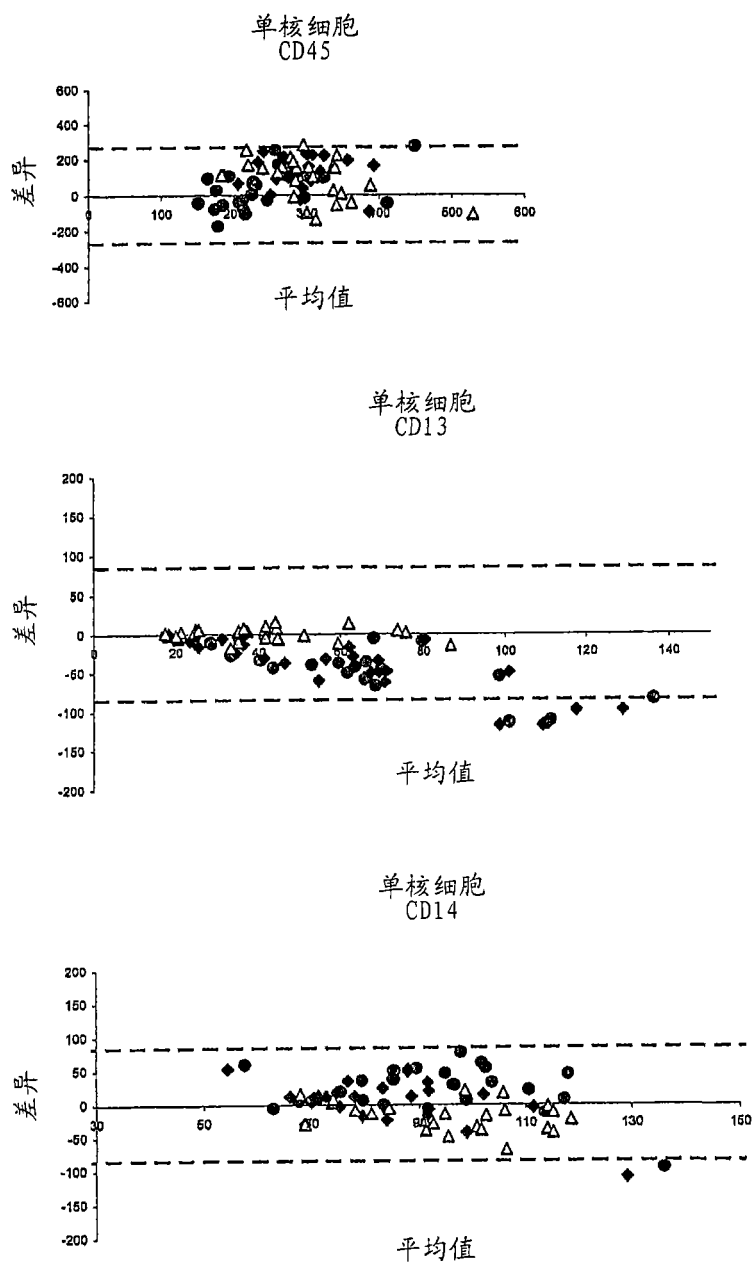


图 11 (续)

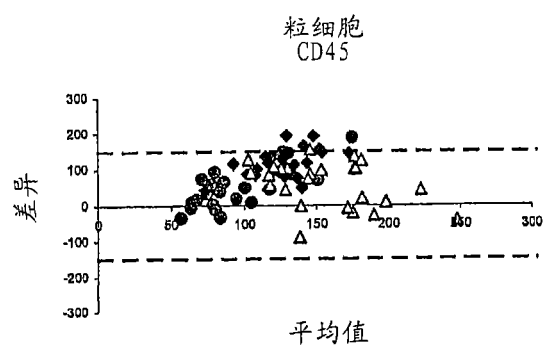
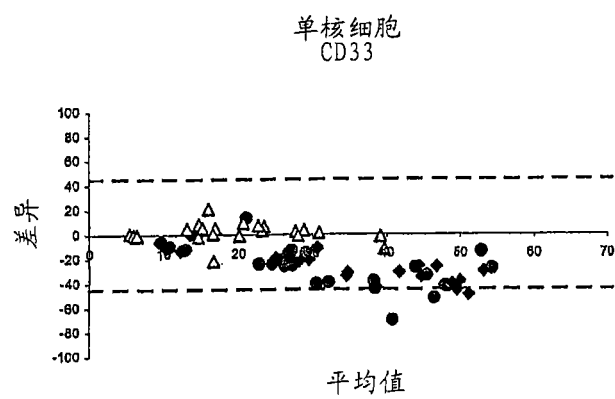


图 11 (续)

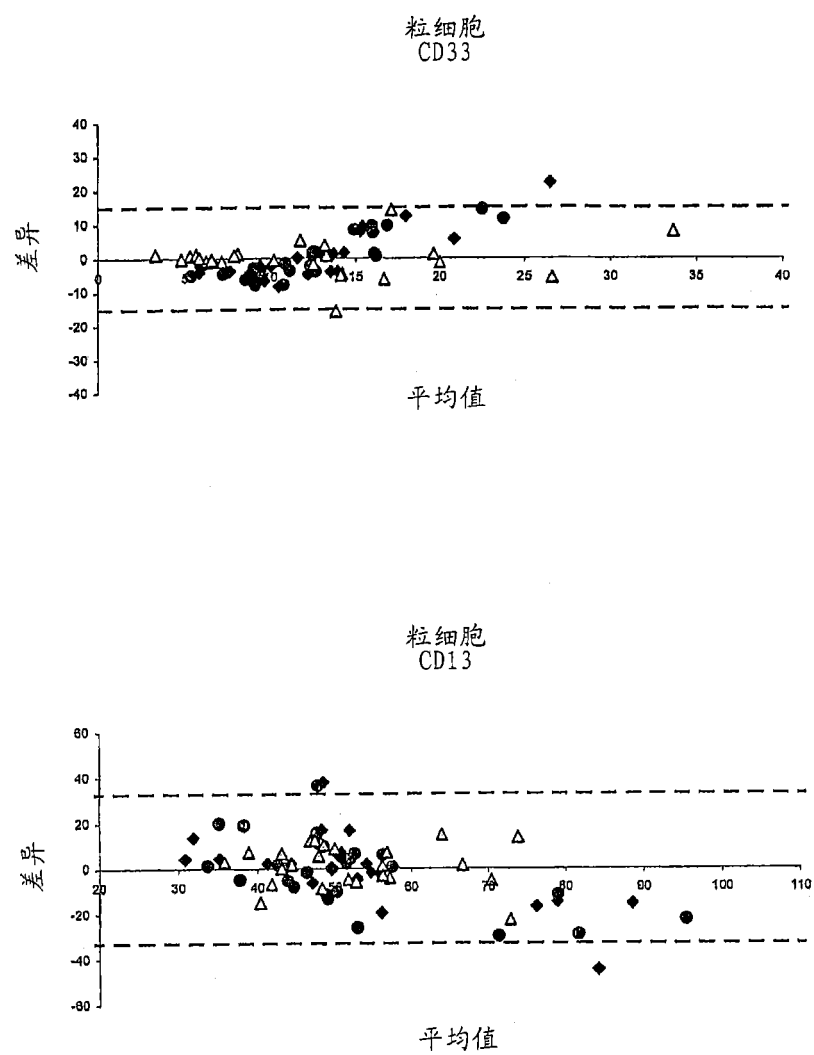


图 11(续)

专利名称(译)	用于细胞信号途径的细胞计数分析的全血制备		
公开(公告)号	CN101027557A	公开(公告)日	2007-08-29
申请号	CN200580028947.2	申请日	2005-08-12
[标]申请(专利权)人(译)	贝克曼库尔特公司 健康网络大学		
申请(专利权)人(译)	健康网络大学		
当前申请(专利权)人(译)	健康网络大学		
[标]发明人	休乔 戴维赫德利 T文森特尚克伊 帕特里夏格罗姆		
发明人	休·乔 戴维·赫德利 T·文森特·尚克伊 帕特里夏·格罗姆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N1/00 G01N15/10		
CPC分类号	G01N33/80 Y10T436/107497 Y10T436/108331 Y10T436/25 Y10T436/25125 Y10T436/2525 Y10T436/25375		
代理人(译)	赵晓梅		
优先权	10/928570 2004-08-27 US		
其他公开文献	CN101027557B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于细胞信号途径的细胞计数分析的全血制备，具体地说，本发明涉及用于测量蛋白表位的生物样品的制备方法，该方法使得可以保持细胞内蛋白表位和基于俘获表位的瞬时激活态的能力检测信号转导途径。本发明提供的方法使得可以快速固定含有红细胞的生物样品，以保证信号转导分子的表位和其他细胞内蛋白表位保持在活化态。本发明的方法进一步使得可溶解红细胞，因此使其成为一种用于对生物样品进行细胞计数分析的有用方法，所述生物样品包括例如全血、骨髓抽吸物、腹膜液以及其他含红细胞样品。本发明还提供了一种复原或“暴露”细胞内抗原上由于固定样品所需的交联固定剂而导致隐蔽的表位。重要的是，本发明的方法使得可以保持和分析直接取自患者的生物样品中磷酸基表位水平以确定疾病特异性特征。

