



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105758783 A

(43)申请公布日 2016.07.13

(21)申请号 201610292665.3

(22)申请日 2016.05.05

(71)申请人 苏州大学

地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区
仁爱路199号

(72)发明人 吴庆宇 严茹红 董宁征

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 陶海锋 张湔

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

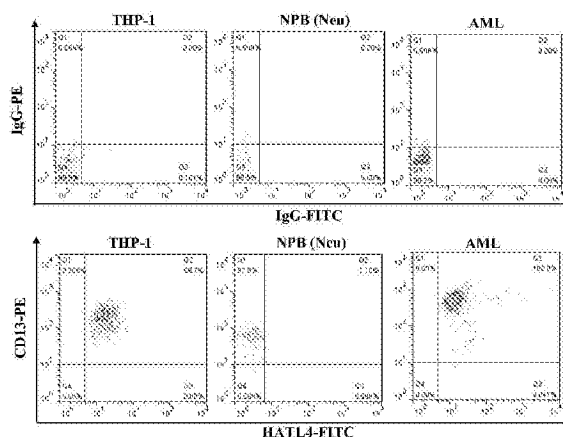
权利要求书1页 说明书3页 附图1页

(54)发明名称

一种利用流式细胞术检测人气道胰蛋白酶样蛋白酶4的方法

(57)摘要

本发明公开了一种利用流式细胞术检测人气道胰蛋白酶样蛋白酶4的方法。具体而言,该方法包括下列步骤:1)骨髓或外周血样品采集;2)免疫荧光标记;和3)上流式细胞仪检测。本发明的检测方法既可以使用少量的骨髓细胞作为样品,又可以使用外周血作为样品,极大地减轻了患者在样品采集过程中所承受的痛苦,提高了患者的顺从性。另外,本发明的检测方法中的操作步骤简单、便捷,检测周期短,仅需数小时即可完成检测,极大地缩短了检测周期,有利于加快相关研究的进度,节省了时间成本。



1. 一种利用流式细胞术检测HATL4的方法,其包括如下步骤:

1)样品采集:选取0.1~1 mL骨髓或外周血作为样品;当以骨髓作为样品时,取髂前上棘后上方1~2 cm处作为穿刺点,取样后置于经抗凝化处理的针筒中;当以外周血作为样品时,取肘静脉处作为采血点,取样后置于经抗凝化处理的试管中;

2)免疫荧光标记:吸取100 μ L已抗凝的样品,置于样品管中,加入CD45-PerCP、CD13-PE和HATL4-FITC各10 μ L混匀,并向异常细胞群中加入标志,同时向对照管中加入同型对照,然后于室温避光反应30分钟,再分别加入1 mL溶血剂,混匀后避光溶血15分钟,待完全溶血后,于2000 rpm离心5分钟,弃去上清液后,再用PBS洗涤1遍,于2000 rpm离心5分钟;

3)检测:检测前进行三色荧光补偿,检测时用CD45-PerCP/SSC设门,用于将异常细胞群与正常细胞群分开,将异常细胞群圈出设门后,每份样品捕获分析 2×10^4 个细胞,上流式细胞仪检测。

2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤1)中所述样品为外周血。

3. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤1)中所述样品的取样量为0.1 mL。

4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤1)中所述抗凝化处理采用肝素来完成。

5. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤2)中所述标志按照下列方式加入:向粒细胞中加入CD13,向单核细胞中加入CD14,向淋巴细胞中加入CD19或CD3。

6. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:

步骤2)中所述溶血剂按照下列方法配制:按照1 L水溶解8~9 g NH_4Cl 、0.5~1.5 g KHCO_3 和20~40 mg EDTA-2Na 的比例,向水中加入 NH_4Cl 、 KHCO_3 和 EDTA-2Na ,搅拌均匀后,用0.45 μm 滤膜过滤,即得。

一种利用流式细胞术检测人气道胰蛋白酶样蛋白酶4的方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物检测技术领域,涉及一种人气道胰蛋白酶样蛋白酶4(Human airway trypsin-like protease 4,HATL4)的检测方法,尤其涉及一种利用流式细胞术检测HATL4的方法。

背景技术

[0002] 急性髓细胞性白血病(acute myeloid leukemia,AML)是由多能干细胞或由髓系细胞分化发育过程中不同阶段的造血祖细胞恶性转化所形成的一类造血系统的克隆性疾病。急性白血病中以AML最为常见,占成人白血病发病的2/3,并且随着人口老龄化而呈现出逐年增加的趋势。AML是一种具有高度异质性的疾病,发病时骨髓中异常的原始细胞及幼稚细胞(白血病细胞)大量增殖并抑制正常造血,广泛浸润肝、脾、淋巴结等各种脏器,出现贫血、发热、出血、感染和肝脾淋巴结肿大等相应的临床表现。

[0003] HATL4 mRNA在AML患者骨髓细胞中异常高表达,而在正常人外周血、正常人骨髓以及其他类型的恶性血液病(如慢性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)患者骨髓细胞中检测不到。目前,通过实时荧光定量PCR能够检测各种白血病患者骨髓细胞中的HATL4 mRNA(参见苏州大学蒋艺枝硕士论文“II型跨膜丝氨酸蛋白酶HATL4的表达及其单克隆抗体的研制”),但是这种方法存在所需骨髓标本量多和检测周期长等缺点。

[0004] 流式细胞术(Flow cytometry,FCM)是一种集合了光学、电子学、流体力学、细胞化学、免疫学和计算机科学等多门学科和技术为一体的细胞分析技术,其不受分子生物学异常的影响,可以直观地对白血病细胞上HATL4进行准确定量分析。

发明内容

[0005] 针对上述情况,本发明提供了一种利用流式细胞术检测HATL4的方法,其包括如下步骤:

(1)样品采集:选取0.1~1 mL骨髓或外周血作为样品;当以骨髓作为样品时,取髂前上棘后上方1~2 cm处作为穿刺点,取样后置于经抗凝化处理的针筒中;当以外周血作为样品时,取肘静脉处作为采血点,取样后置于经抗凝化处理的试管中;

(2)免疫荧光标记:吸取100 μ L已抗凝的样品,置于样品管中,加入CD45-PerCP、CD13-PE和HATL4-FITC各10 μ L混匀,并向异常细胞群中加入标志,同时向对照管中加入同型对照,然后于室温避光反应30分钟,再分别加入1 mL溶血剂,混匀后避光溶血15分钟,待完全溶血后,于2000 rpm离心5分钟,弃去上清液后,再用PBS洗涤1遍,于2000 rpm离心5分钟;

(3)检测:检测前进行三色荧光补偿,检测时用CD45-PerCP/SSC设门,用于将异常细胞群与正常细胞群分开,将异常细胞群圈出设门后,每份样品捕获分析 2×10^4 个细胞,上流式细胞仪检测。

[0006] 优选的,在上述方法中,步骤(1)中所述样品为外周血。

[0007] 优选的,在上述方法中,步骤(1)中所述样品的取样量为0.1 mL。

[0008] 优选的,在上述方法中,步骤(1)中所述抗凝化处理采用肝素来完成。

[0009] 优选的,在上述方法中,步骤(2)中所述标志按照下列方式加入:向粒细胞中加入CD13,向单核细胞中加入CD14,向淋巴细胞中加入CD19或CD3。

[0010] 优选的,在上述方法中,步骤(2)中所述溶血剂按照下列方法配制:按照1 L水溶解8~9 g NH_4Cl 、0.5~1.5 g KHCO_3 和20~40 mg EDTA-2Na 的比例,向水中加入 NH_4Cl 、 KHCO_3 和 EDTA-2Na ,搅拌均匀后,用0.45 μm 滤膜过滤,即得。

[0011] 与现有技术相比,采用上述技术方案的本发明具有如下优点:

(1)本发明的检测方法既可以使用少量的骨髓细胞作为样品,又可以使用外周血作为样品,极大地减轻了患者在样品采集过程中所承受的痛苦,提高了患者的顺从性;

(2)本发明的检测方法中的操作步骤简单、便捷,检测周期短,仅需数小时即可完成检测,极大地缩短了检测周期,有利于加快相关研究的进度,节省了时间成本。

附图说明

[0012] 图1为利用流式细胞术检测HATL4在AML患者骨髓中性粒细胞表面表达的结果图,其中THP-1(急性单核细胞性白血病)为阳性对照,NPB(正常人外周血)为阴性对照(n=8,数据为其中一个结果)。

[0013] 图2为利用流式细胞术检测HATL4在白血病患者骨髓单核细胞表面表达的结果图,其中THP-1为阳性对照,NPB为阴性对照(n=6,数据为其中一个结果)。

具体实施方式

[0014] 下面将结合附图和具体实施例来进一步说明本发明的技术方案。除非另有说明,下列实施例中所使用的药品、试剂、仪器均可通过商业手段获得。

[0015] 实施例一:采用CD45/SSC双参数散点图设门方法检测骨髓样本。

[0016] 本实施例以1 mL骨髓作为样品,取髂前上棘后上方1 cm处作为穿刺点,取样后置于预先肝素化处理的5 mL针筒中抗凝,待用。

[0017] 吸取100 μL 已抗凝骨髓,置于实验管中,并加入CD45-PerCP、CD13-PE和HATL4-FITC各10 μL 混匀,根据不同的异常细胞群加入不同的标志:向粒细胞中加入CD13,向单核细胞中加入CD14,向淋巴细胞中加入CD19、CD3,同时向对照管加入同型对照,然后于室温避光反应30 min,加1 mL溶血剂(向1 L水中加入8 g NH_4Cl 、1 g KHCO_3 和30 mg EDTA-2Na ,搅拌均匀后,用0.45 μm 微孔滤膜过滤,即得),混匀后避光溶血15 min,待完全溶血后,于2000 rpm离心5 min,弃去上清液后,再用PBS洗涤1遍,于2000 rpm离心5 min,待测。

[0018] 检测前进行三色荧光补偿,检测时用CD45-PerCP/SSC设门,将异常细胞群圈出设门,每份样品捕获分析 2×10^4 个细胞,上流式细胞仪(FACS CaLibur,美国BD Biosciences公司)检测,完成HATL4的检测过程。

[0019] 通过流式细胞术检测HATL4蛋白在AML患者骨髓细胞中的表达情况,其结果如图1和图2所示。从图1中可知,CD13是THP-1细胞和中性粒细胞的表面标志,以THP-1细胞为阳性对照,NPB中的中性粒细胞为阴性对照,AML患者骨髓中的中性粒细胞上都有HATL4蛋白的表达,阳性率为100%。从图2中可知,CD14是单核细胞的表面标志,以THP-1细胞为阳性对照,

NPB中的单核细胞为阴性对照,AML患者骨髓中的单核细胞上都有HATL4蛋白的表达,阳性率为100%。

[0020] 实施例二:采用CD45/SSC双参数散点图设门方法检测外周血样本。

[0021] 本实施例以1 mL外周血作为样品,取样后置于预先肝素化处理的5 mL试管中抗凝,待用。

[0022] 吸取100 μ L已抗凝外周血,置于实验管中,并加入CD45-PerCP、CD13-PE和HATL4-FITC各10 μ L混匀,根据不同的异常细胞群加入不同的标志:向粒细胞中加入CD13,向单核细胞中加入CD14,向淋巴细胞中加入CD19、CD3,同时向对照管加入同型对照,然后于室温避光反应30 min,加1 mL溶血剂(制法同上),混匀后避光溶血15 min,待完全溶血后,于2000 rpm离心5 min,弃去上清液后,再用PBS洗涤1遍,于2000 rpm离心5 min,待测。

[0023] 检测前进行三色荧光补偿,检测时用CD45-PerCP/SSC设门,将异常细胞群圈出设门,每份样品捕获分析 2×10^4 个细胞,上流式细胞仪(FACS Calibur,美国BD Biosciences公司)检测,完成HATL4蛋白在AML患者外周血白细胞中表达情况的检测。

[0024] 由上述实施例可以看出,本发明的检测方法既可以使用少量的骨髓细胞作为样品,又可以使用外周血作为样品,极大地减轻了患者在样品采集过程中所承受的痛苦,提高了患者的顺从性;另外,本发明的检测方法中的操作步骤简单、便捷,检测周期短,仅需数小时即可完成检测,极大地缩短了检测周期,有利于加快相关研究的进度,节省了时间成本。

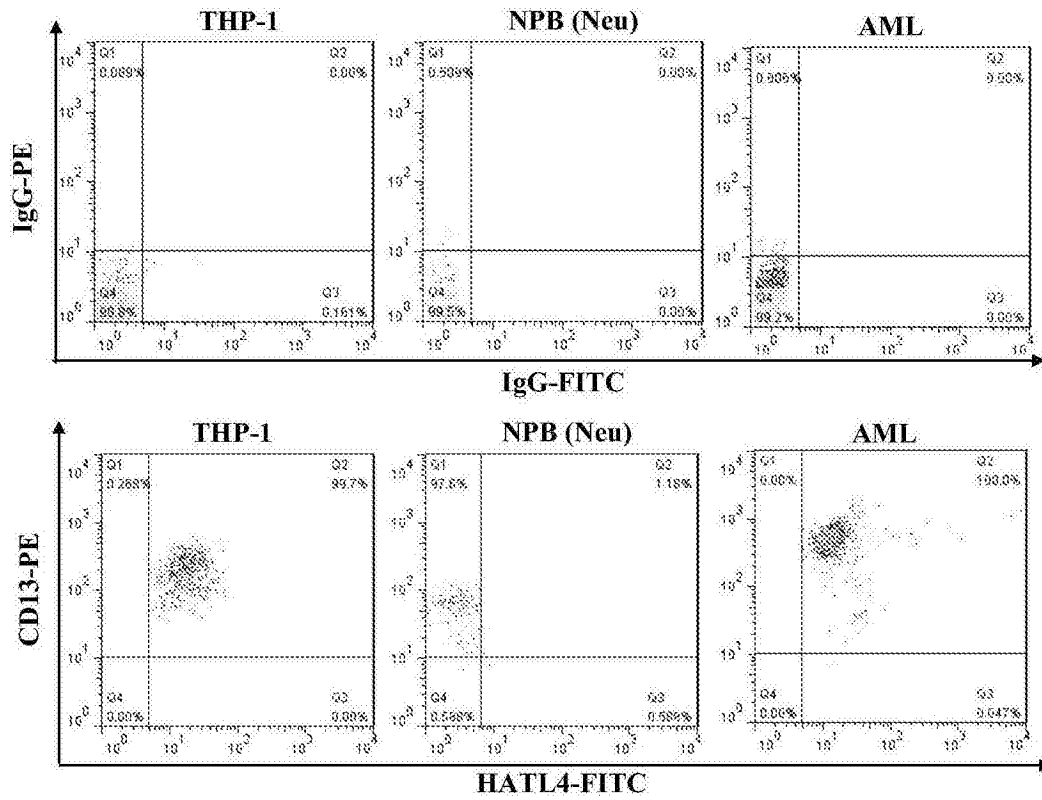


图1

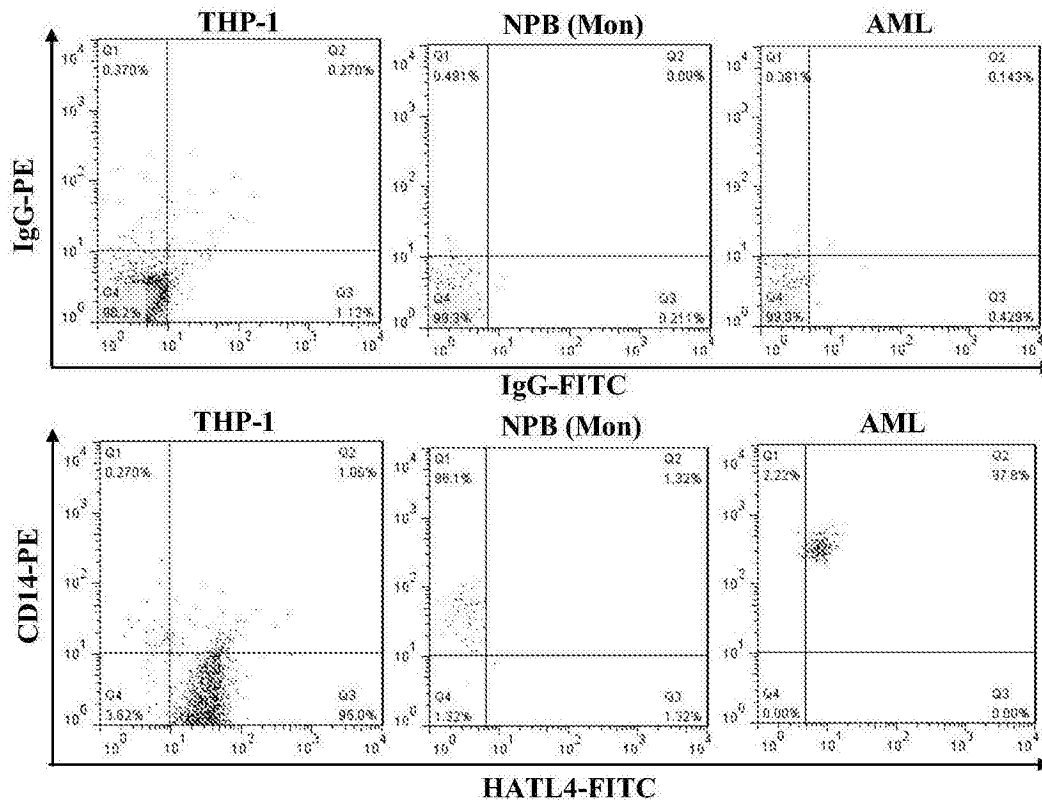


图2

专利名称(译)	一种利用流式细胞术检测人气道胰蛋白酶样蛋白酶4的方法		
公开(公告)号	CN105758783A	公开(公告)日	2016-07-13
申请号	CN201610292665.3	申请日	2016-05-05
[标]申请(专利权)人(译)	苏州大学		
申请(专利权)人(译)	苏州大学		
当前申请(专利权)人(译)	苏州大学		
[标]发明人	吴庆宇 严茹红 董宁征		
发明人	吴庆宇 严茹红 董宁征		
IPC分类号	G01N15/14 G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N15/14 G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	陶海锋 张湔		
其他公开文献	CN105758783B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种利用流式细胞术检测人气道胰蛋白酶样蛋白酶4的方法。具体而言，该方法包括下列步骤：1)骨髓或外周血样品采集；2)免疫荧光标记；和3)上流式细胞仪检测。本发明的检测方法既可以使用少量的骨髓细胞作为样品，又可以使用外周血作为样品，极大地减轻了患者在样品采集过程中所承受的痛苦，提高了患者的顺从性。另外，本发明的检测方法中的操作步骤简单、便捷，检测周期短，仅需数小时即可完成检测，极大地缩短了检测周期，有利于加快相关研究的进度，节省了时间成本。

