



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109490544 A

(43)申请公布日 2019.03.19

(21)申请号 201811070303.5

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2018.09.13

G01N 15/14(2006.01)

(71)申请人 浙江博真生物科技有限公司

地址 325600 浙江省温州市乐清市乐清经济开发区纬十七路261号C幢403(乐清市科技孵化创业中心内)

(72)发明人 倪万茂 迟妍妍 陈乐芝 倪万根  
倪声雷 张鸿 张鸿君 林鹏程  
刘维杰 朱阳承

(74)专利代理机构 北京鼎佳达知识产权代理事务所(普通合伙) 11348  
代理人 王伟锋 刘铁生

(51)Int.Cl.

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

权利要求书2页 说明书9页

(54)发明名称

一种用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用

(57)摘要

本发明提供一种用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用,所述试剂盒中的试剂由CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体组成;所述CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体分别标记有适用于流式细胞仪的四种荧光素;四种所述荧光素的颜色互不相同;所述试剂盒中的试剂,其组分如下:荧光标记的CD3,0.66-94.34%;荧光标记的CD4,0.66-94.34%;荧光标记的CD31,0.66-94.34%;荧光标记的CD45RA,0.66-94.34%。所述的试剂盒用于检测人体胸腺新近输出细胞数量,并根据所述的胸腺新近输出细胞数量的检测结果确定人的免疫年龄,用以评价人体的免疫能力的方法。

1. 一种试剂盒,其特征在于,  
所述试剂盒中的试剂由CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体组成;  
所述CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体分别标记有适用于流式细胞仪的四种荧光素;  
四种所述荧光素的颜色互不相同。
2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,  
所述的荧光素选自FITC、APC、APC/Cy7、PerCP/Cy5.5、PerCP、Brilliant Violet 510<sup>TM</sup>、  
PE/Cy7、PE、Alexa Fluor<sup>®</sup> 700、Brilliant Violet 605<sup>TM</sup>、Biotin、PE/Cy5、Alexa Fluor<sup>®</sup>  
488、Alexa Fluor<sup>®</sup> 647、Pacific Blue<sup>TM</sup>、PE/Dazzle<sup>TM</sup> 594、Brilliant Violet 421<sup>TM</sup>、  
Brilliant Violet 570<sup>TM</sup>、Alexa Fluor<sup>®</sup> 594、Brilliant Violet 711<sup>TM</sup>、Brilliant Violet  
650<sup>TM</sup>、APC/Fire<sup>TM</sup> 750、Brilliant Violet 785<sup>TM</sup>的任意一种。
3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在于,  
所述的荧光素选自FITC、PerCP、PE和APC的任意一种。
4. 根据权利要求1-3任一项所述的试剂盒,其特征在于,  
所述试剂盒中的试剂,以体积百分含量计,其组分如下:  
荧光标记的CD3,0.66-94.34%;  
荧光标记的CD4,0.66-94.34%;  
荧光标记的CD31,0.66-94.34%;  
荧光标记的CD45RA,0.66-94.34%。
5. 一种试剂盒的制备方法,其特征在于,其包括以下步骤:
  - 1) 将抗体进行荧光标记;
  - 2) 按照配方量计量荧光标记的抗体;
  - 3) 将上述计量的荧光标记的抗体加入避光的试剂瓶内,混合均匀,密封。
6. 一种权利要求1-5任一项所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用。
7. 根据权利要求6所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其特征在于,  
所述试剂盒用于检测人体胸腺新近输出细胞的数量;  
所述人体胸腺新近输出细胞的数量通过胸腺新近输出细胞的表型表征。
8. 根据权利要求6所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其特征在于,  
其检测样本来自人体外周血;所述人体包括各年龄段体检者,要求无胸腺瘤或胸腺相关疾病,未使用刺激免疫系统的药物。
9. 根据权利要求6-8任一项所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其特征  
在于,其检测包括以下步骤:
  - 1) 建立以“人体胸腺新近输出细胞的数量”为纵坐标,以“免疫年龄”为横坐标的免疫年  
龄模型;
  - 2) 通过流式细胞仪测试检测样品的人体胸腺新近输出细胞的数量;
  - 3) 根据人体胸腺新近输出细胞数量,对照免疫年龄模型,确定所述检测样本的免疫年  
龄。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其特征在于,  
所述的检测样品的制备包括以下步骤:
  - 1) 采集不少于100μL的人体外周血作为检测样本;所述的检测样本采集后即检测或者

于2-8℃冷藏后检测；

2) 从所述试剂盒吸取试剂0.4-20μL于流式管内，将所述的检测样本100μL加入所述的流式管，振荡混匀，得第一预样品；

3) 将所述的第一预样品于常温下避光孵育15min，得第二预样品；

4) 于所述的第二预样品中加入红细胞裂解液2mL，振荡混匀，于常温下避光孵育10min，得第三预样品；

5) 将所述的第三预样品离心，得第四预样品；所述离心的离心加速度为500×g，离心时间5min；

6) 弃所述的第四预样品的上清液1750μL，向弃上清液后剩余的样品中加入磷酸缓冲盐溶液50μL重悬，得检测样品；

7) 将检测样品上流式细胞仪检测。

## 一种用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医药技术领域,特别是涉及一种试剂盒及其应用,所述试剂盒用于检测人体免疫年龄。

### 背景技术

[0002] 胸腺(thymus)为机体的重要淋巴器官,既是人体免疫系统的中枢免疫器官,又是内分泌系统的一个腺体。作为免疫系统的中枢控制器官,其功能与免疫紧密相关,对整个人体免疫系统的建立、完善和功能的发挥都起着重要的作用。

[0003] 随着年龄的增加,胸腺发生着明显的病理学变化,大部分被脂肪组织取代,仅剩下极少的胸腺皮质或髓质。因此,长期以来一直认为,年龄相关的胸腺演化过程伴随着胸腺的无功能。

[0004] 然而最近研究表明:胸腺增生尽管与年龄呈负相关的关系,但其能够持续终生地产生初始的(*naïve*)、新分化的细胞并将其输送到外周血,见【CML患者胸腺近期输出功能和TCR V $\beta$ 谱系利用特点】。

[0005] 胸腺输出功能的测定是评价细胞免疫功能重建的一个重要指标,人体胸腺是T细胞发育和成熟的主要部位,骨髓来源的前T细胞会选择性的迁移到胸腺,并在胸腺内发育为成熟T细胞;其在胸腺发育后,重排形成具有多样化T细胞受体(TCR)的成熟T细胞释放到外周,见【胸腺近期输出功能测定在评价细胞免疫功能重建中的应用】。

[0006] Recent thymic emigrants(胸腺新近输出,RTE)是一类刚从胸腺释放到外周血的*naïve* T细胞,RTE被释放到外周血后,表面TCR(T cell receptor,T细胞抗原受体,是所有T细胞表面的特征性标志)会逐渐发生多样化重组,变成常规T细胞,以便对抗和监视细菌、病毒和癌细胞。尽管RTE会随着年龄的增长而降低,但是其也遵循特定的规律,因此我们可根据RTE的比例反推该RTE水平所对应的年龄范围,这就是免疫年龄。

[0007] 常规T细胞根据标记不同分为辅助T细胞和细胞毒T细胞,后者主要起到杀伤病毒作用,而前者的角色多样,有起主持战斗的司令官,有带领不同病种的团长,所以对抗细菌、真菌、病毒、体内突变的癌细胞等均少不了辅助T细胞。辅助T细胞根据状态不同可大致分为初始T细胞和记忆T细胞,初始T细胞相当于没有见过坏蛋的战士,需要战斗后才能变成有丰富经验的、能记住敌人特征的记忆T细胞。初始T细胞和记忆T细胞也会随着年龄有降低趋势。尽管规律不明显,但需要各自维持一定的水平,若记忆T细胞水平过高,有可能会存在免疫系统功能的耗竭,进一步加剧严重感染或癌症的风险。

[0008] 人胸腺功能测定主要是检测胸腺近期输出*naïve* T细胞的能力,是研究多种与细胞免疫功能重建或免疫缺陷相关疾病等的重要手段。应用流式细胞仪分析胸腺新近输出细胞的表型,能够确定胸腺功能或者是近期胸腺输出功能,见【Weinberg K,Blazar BR,Wagner JE,Agura E,Hill BJ,Smogorzewska M,Koup RA,Betts MR,Collins RH,Douek DC(2001) Factors affecting thymic function after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation.Blood 97:1458-166】。Weinberg K等在有关化疗和造血干细胞移植患者

免疫重建的研究中,已经把细胞表面分子CD45RA作为胸腺新近输出细胞的表型标志,研究发现:儿童癌症患者化疗之后,外周血胸腺新近输出细胞中的CD4+T细胞和CD45RA+的数量与患者年龄呈负相关。

[0009] 了解癌症发生的危险因素是生物医学研究的主要目标。一直以来,医学研究的重点一直是体细胞突变的作用,并且把癌症通常在较大年龄发生的原因主要归因于此类突变的逐渐积累。Sam Palmer等人在2018年2月份的PNAS上发表了一篇文章,质疑这一观点,提出与年龄相关的免疫系统衰退才是癌症发生的主要原因,并提出了T细胞产生和年龄的免疫学模型,可评估许多癌症类型和感染性疾病的风险概况,表明通过治疗方法逆转T细胞耗竭或恢复T细胞产生,将是有希望的治疗途径。

[0010] 时代在进步,人们对于自身免疫力状况的重视程度也远超从前。工作压力大、生活节奏快、环境恶化等多种因素引起人体免疫力低下,对于年轻职业工作者、儿童、老年人、疾病治愈后等特殊人群,掌握自身免疫力状况,对于重大疾病的预防,十分必要。

[0011] 然而,对于胸腺功能的测定,传统的CT扫描分析胸腺体积是检测胸腺功能的一种解剖学方法,根据胸腺组织的大小可分为5个等级,并形成公认的TI评分,但胸腺体积测定存在一定的局限性,组织界限难以确定、部位无法区分等。因此,胸腺体积测定的方法仅能作为胸腺功能的一个参考指标。

[0012] 目前对于人体免疫年龄的检测,尚无任何一家医学检测机构提出;目前对于人体免疫年龄的判定,并没有一个成熟的检测方法。

## 发明内容

[0013] 本发明的主要目的在于提供一种试剂盒及其应用,所述的试剂盒用于检测人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞数量,并根据所述的胸腺新近输出细胞数量的检测结果确定人体的免疫年龄,用以评价人体的免疫能力。本发明在现有技术免疫学模型的基础上,根据检测的数百例样本,建立了适合中国人检测的反映胸腺新近输出细胞产生能力的“免疫年龄”模型,该模型可反映该人体的胸腺新近输出细胞产生能力是否与其年龄相符,从而评估其免疫力是否出现提前衰老。

[0014] 本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的一种试剂盒,所述试剂盒中的试剂由CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体组成;所述CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体分别标记有适用于流式细胞仪的四种荧光素;四种所述荧光素的颜色互不相同。

[0015] 本发明的目的及解决其技术问题还可采用以下技术措施进一步实现。

[0016] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的荧光素选自FITC、APC、APC/Cy7、PerCP/Cy5.5、PerCP、Brilliant Violet 510<sup>TM</sup>、PE/Cy7、PE、Alexa Fluor<sup>®</sup>700、Brilliant Violet 605<sup>TM</sup>、Biotin、PE/Cy5、Alexa Fluor<sup>®</sup>488、Alexa Fluor<sup>®</sup>647、Pacific Blue<sup>TM</sup>、PE/Dazzle<sup>TM</sup> 594、Brilliant Violet 421<sup>TM</sup>、Brilliant Violet 570<sup>TM</sup>、Alexa Fluor<sup>®</sup>594、Brilliant Violet 711<sup>TM</sup>、Brilliant Violet 650<sup>TM</sup>、APC/Fire<sup>TM</sup> 750、Brilliant Violet 785<sup>TM</sup>的任意一种。

[0017] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的荧光素选自FITC、PerCP、PE和APC的任意一种。

[0018] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的荧光标记的单克隆抗体分别为CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE和CD45RA-APC。

[0019] 优选的,前述的试剂盒,其中所述试剂盒中的试剂,以体积百分含量计,其组分如下:荧光标记的CD3,0.66-94.34%;荧光标记的CD4,0.66-94.34%;荧光标记的CD31,0.66-94.34%;荧光标记的CD45RA,0.66-94.34%。

[0020] 本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的一种试剂盒的制备方法,其包括以下步骤:1)将抗体进行荧光标记;2)按照配方量计量荧光标记的抗体;3)将上述计量的荧光标记的抗体加入避光的试剂瓶内,混合均匀,密封。

[0021] 本发明的目的及解决其技术问题是采用以下技术方案来实现的。依据本发明提出的一种试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用。

[0022] 优选的,前述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其中所述的试剂盒用于检测人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量;所述人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量通过胸腺新近输出细胞的表型表征。

[0023] 优选的,前述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其检测样本来自人体外周血;所述人体包括各年龄段体检者,要求无胸腺瘤或胸腺相关疾病,未使用刺激免疫系统的药物。

[0024] 优选的,前述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其中所述的其检测包括以下步骤:1)建立以“人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量”为纵坐标,以“免疫年龄”为横坐标的免疫年龄模型;2)通过流式细胞仪测试检测样品的人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量;3)根据人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量,对照免疫年龄模型,确定所述检测样本的免疫年龄。

[0025] 优选的,前述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,其中所述的检测样品的制备包括以下步骤:

[0026] 1)采集不少于100 $\mu$ L的人体外周血作为检测样本;所述的检测样本采集后即检测或者于2-8℃冷藏后检测;

[0027] 2)从所述试剂盒吸取试剂0.4-20 $\mu$ L于流式管内,将所述的检测样本100 $\mu$ L加入所述的流式管,振荡混匀,得第一预样品;

[0028] 3)将所述的第一预样品于常温下避光孵育15min,得第二预样品;

[0029] 4)于所述的第二预样品中加入红细胞裂解液2mL,振荡混匀,于常温下避光孵育10min,得第三预样品;

[0030] 5)将所述的第三预样品离心,得第四预样品;所述的离心的离心加速度为500 $\times$ g,离心时间5min;

[0031] 6)弃所述的第四预样品的上清液1750 $\mu$ L,向弃上清液后剩余的样品中加入磷酸缓冲盐溶液50 $\mu$ L重悬,得检测样品;

[0032] 7)将检测样品上流式细胞仪检测。

[0033] 借由上述技术方案,本发明所提供的用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用至少具有下列优点:

[0034] 随着社会的发展,人们的工作压力越来越大,环境越来越差,越来越多的人都处于一种亚健康的状态。然而目前对于人体免疫年龄的判定,并没有一个成熟的检测方法。本发明在现有技术的免疫学模型的基础上,根据检测的数百例样本,建立了适合中国人检测的反映胸腺新近输出细胞产生能力的“免疫年龄”模型,该模型可反映人体的胸腺新近输出细

胞产生能力是否与其年龄相符,从而评估其免疫力是否出现提前衰老。

[0035] 通过检测可以发现体检者是否存在免疫力提前衰老的问题。对于提前衰老的人群,如有可能,可推荐在医生指导下,采用胸腺肽刺激T细胞产生进行调理。

[0036] 本发明提供的试剂盒利用较少的抗体数量,设计合适的抗体组合,提供了一组四色抗体组合,在多色流式细胞仪的基础上,运用本发明提供的方法,一个样本只需在同一试管中处理,通过特异性的设门分析,即可对人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞数量进行测量,可有效地评价体检者的免疫能力。

[0037] 采用本发明产生的有益效果在于:

[0038] 1)采用本发明的试剂盒,通过静脉采集外周血即可快速、准确地对人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量进行定量分析;

[0039] 2)该试剂盒适用于各年龄段体检者的免疫年龄检测,要求无胸腺瘤或胸腺相关疾病,未使用刺激免疫系统的药物;

[0040] 3)本试剂盒特异性强,灵敏度高;每种抗体仅需要0.1μL的量即可准确测量,且测量数据的重复性再现性均很好;

[0041] 4)样本易得,报告周期短,检测时间、成本都有效降低。

[0042] 上述说明仅是本发明技术方案的概述,为了能够更清楚了解本发明的技术手段,并可依照说明书的内容予以实施,以下以本发明的较佳实施例并配合详细说明如后。

## 具体实施方式

[0043] 为更进一步阐述本发明为达成预定发明目的所采取的技术手段及功效,以下通过较佳实施例,对依据本发明提出的用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用的具体实施方式、结构、特征及其功效,详细说明如后。在下述说明中,不同的“一实施例”或“实施例”指的不一定是同一实施例。此外,一或多个实施例中的特定特征、结构或特点可由任何合适形式组合。

[0044] 本发明提供的免疫年龄的测试方法适用于各年龄段的体检者,要求体检者无胸腺瘤或胸腺相关疾病、未使用刺激免疫系统的药物,以免影响初始T细胞产生能力的检测,从而影响免疫年龄评估。

[0045] 应用流式细胞仪分析胸腺新近输出细胞的表型来确定胸腺功能或者是近期胸腺输出功能,以前有关化疗和造血干细胞移植患者免疫重建的研究中已把细胞表面分子CD45RA作为胸腺新近输出细胞(*naïve* T细胞)的表型标志。

[0046] 本发明相关人员通过对传统胸腺功能检测方法的分析及根据前述的学术理论,在研究的基础上,我们搭建了以CD3、CD4、CD45RA、CD31等为基础的方案,每种抗体被分别标记FITC、PerCP、PE、APC等流式细胞术可能的荧光搭配。利用多色流式检测了数百例健康人群的基础样本,建立了适合中国人的反映胸腺输出T细胞能力的“免疫年龄”模型,可准确评估个人胸腺输出T细胞能力是否与其年龄相符,从而判断其免疫力是否出现提前衰老,帮助个人进行正确的免疫力管理。

[0047] CD3(分化簇3)T细胞的共受体是一种蛋白质复合物,它由四个不同的链组成。在哺乳动物中,该复合物含有一个CD3 $\gamma$ 链,CD3 $\delta$ 链,和2CD3 $\epsilon$ 链。这些链具有被称为一个分子副T细胞受体(TCR)和 $\zeta$ -链以产生激活信号的T淋巴细胞。该TCR, $\zeta$ 链和CD3分子一起构成的T细

胞受体复合物。CD3分子通过盐桥与T细胞抗原受体(T cell receptor, TCR)相连,参与T细胞的信号转导,主要用于标记胸腺细胞、T淋巴细胞及T细胞淋巴瘤。CD3仅存在于T细胞表面,由6条肽链组成,常与TCR紧密结合形成含有8条肽链的TCR-CD3复合体。

[0048] CD4细胞,英文为cluster of differentiation 4,是人体免疫系统中的一种重要免疫细胞,CD4主要表达于辅助T (Th) 细胞,是Th细胞TCR识别抗原的共受体,与MHC II类分子的非多肽区结合,参与Th细胞TCR识别抗原的信号转导。

[0049] CD31又称为血小板-内皮细胞粘附分子(Platelet endothelial cell adhesion molecule-1,PECAM-1/CD31),分子量为130kDa,其结构属于免疫球蛋白超家族成员,在清除体内老化的中性粒细胞过程中发挥重要作用。CD31存在于血小板、中性粒细胞、单核细胞和某些类型的T细胞表面,以及内皮细胞间紧密连接处。

[0050] CD45RA是白细胞共同抗原的高分子量异构体。正常表达于造血干祖细胞、B细胞、幼稚T细胞、单核细胞,异常表达于大部分B细胞肿瘤。

[0051] FITC,异硫氰酸荧光素(Fluorescein isothiocyanate,FITC),为黄色粉末,有吸湿性,是一种生化试剂,也是医学诊断药物,能与各种抗体蛋白结合,结合后的抗体不丧失与一定抗原结合的特异性,并在碱性溶液中仍有强烈绿色荧光,加酸后析出沉淀,荧光消失。激发波长488nm,发射波长518nm。

[0052] PerCP,叶绿素蛋白(peridinin chlorophyll protein,PerCP)为单个分子,是从一种生活于深海区域的鞭毛虫中发现的色素,其功能为将可渗透入深海的落光传递至鞭毛虫的叶绿素发色基团,进而发出红光。激发波长488nm,发射波长675nm。

[0053] PE,藻红蛋白(P-phycoerythrin,PE)作为天然染料,其相对分子质量较大,约为240000,故可能会对其他大探针产生空间位阻。但PE的化学结构非常稳定,有很高的荧光效率,并易与抗体分子结合。激发波长488nm,发射波长575nm。

[0054] APC别藻蓝蛋白(allophycocyanin,APC)激发波长635nm,发射波长660nm。

[0055] 本发明实施例中所使用的荧光标记的CD3、CD4、CD31、CD45RA单克隆抗体为市售,美国Biolegend品牌,但本发明的试剂盒的组成并不局限于本实施例所涉品牌的原材料。

[0056] 研究表明CD45RA+初始CD4+T细胞的CD31 (PECAM-1) 表达与高拷贝的TREC (T cell receptor excision DNA circles,T细胞受体重排删除环) 密切相关,而多色流式的强大、快速、高效、性价比高,因此是检测RTE非常理想的新工具。

[0057] 本发明在前期研究的基础上,对于免疫年龄进行检测,建立相应的流式细胞术方案,通过荧光标记的CD3、CD4、CD31、CD45RA四种抗体组合对人体免疫年龄进行测定。

[0058] 该检测方法适用于各年龄段体检者,但要求无胸腺瘤或胸腺相关疾病,未使用刺激免疫系统的药物,以免影响T细胞产生能力的检测,从而影响免疫年龄评估。

[0059] 通过抗体的滴定等方法,对于抗体的最佳用量进行确认。发现,每份、单种抗体,用量在0.1-5μL范围内均可以达到预期的检测效果。

[0060] 本发明提供的免疫年龄模型建立时的测试样本选取要求如下:测试人群近期无重大疾病或感冒发烧,无不良生活习惯,如嗜烟酒、持续通宵熬夜等。

[0061] 选取800个样本对其进行人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞数量进行测量。

[0062] 首先建立以“人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量”为纵坐标,以“免疫年龄”为横坐标的免疫年龄模型。方法如下:

[0063] 采用试剂盒,所述试剂盒中的试剂由CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体组成;所述CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体分别标记有适用于流式细胞仪的四种荧光素;四种所述荧光素的颜色互不相同。

[0064] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的荧光素选自FITC、APC、APC/Cy7、PerCP/Cy5.5、PerCP、Brilliant Violet 510<sup>TM</sup>、PE/Cy7、PE、Alexa Fluor<sup>®</sup>700、Brilliant Violet 605<sup>TM</sup>、Biotin、PE/Cy5、Alexa Fluor<sup>®</sup>488、Alexa Fluor<sup>®</sup>647、Pacific Blue<sup>TM</sup>、PE/Dazzle<sup>TM</sup> 594、Brilliant Violet 421<sup>TM</sup>、Brilliant Violet 570<sup>TM</sup>、Alexa Fluor<sup>®</sup>594、Brilliant Violet 711<sup>TM</sup>、Brilliant Violet 650<sup>TM</sup>、APC/Fire<sup>TM</sup> 750、Brilliant Violet 785<sup>TM</sup>的任意一种。

[0065] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的荧光素选自FITC、PerCP、PE和APC的任意一种。

[0066] 优选的,前述的试剂盒,其中荧光标记的单克隆抗体分别为CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE和CD45RA-APC。

[0067] 优选的,前述的试剂盒,其中所述的试剂盒中的试剂,以体积百分含量计,其组分如下:荧光标记的CD3,0.66-94.34%;荧光标记的CD4,0.66-94.34%;荧光标记的CD31,0.66-94.34%;荧光标记的CD45RA,0.66-94.34%。

[0068] 所述试剂盒的制备方法包括以下步骤:

[0069] 1) 将抗体进行荧光标记;

[0070] 2) 按照配方量计量所述的荧光标记的抗体;

[0071] 3) 将上述计量的荧光标记的抗体加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,旋盖密封,得试剂盒。

[0072] 所述试剂盒的保存条件:2-8℃,避光。

[0073] 所述的试剂盒制备完成之后,对所述的来自上述800个样本的人体外周血进行检测;所述人体包括各年龄段体检者,要求无胸腺瘤或胸腺相关疾病,未使用刺激免疫系统的药物。

[0074] 所述的试剂盒用于检测时,所述的检测样品的制备包括以下步骤:

[0075] 1) 采集不少于100μL的人体外周血作为检测样本;所述的检测样本采集后即检测或者于2-8℃冷藏后检测;

[0076] 2) 从所述试剂盒按照试剂盒建议使用量吸取每人份的试剂0.4-20μL于流式管内,将所述的检测样本100μL加入所述的流式管,振荡混匀,得第一预样品;

[0077] 3) 将所述的第一预样品于常温下避光孵育15min,得第二预样品;

[0078] 4) 于所述的第二预样品中加入红细胞裂解液2μL,振荡混匀,于常温下避光孵育10min,得第三预样品;

[0079] 5) 将所述的第三预样品离心,得第四预样品;所述的离心的离心加速度为500×g,离心时间5min;

[0080] 6) 弃所述的第四预样品的上清液1750μL,向弃上清液后剩余的样品中加入磷酸缓冲盐溶液50μL重悬,得检测样品;

[0081] 7) 将检测样品上流式细胞仪检测。

[0082] 所述的试剂盒的应用基于流式细胞仪,所述试剂盒用于检测人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量;所述人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量通过胸腺新近输出细胞的表型表征。

[0083] 通过所述800个样本的人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量的检测结果、实际年龄,制作“人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量-免疫年龄”的免疫年龄模型。此模型基于如下假设:假设此甄选的800个样本的身体健康,其真实年龄与免疫年龄相符。

[0084] 本发明还提供一种所述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用。

[0085] 优选的,前述的试剂盒在用于检测人体免疫年龄中的应用,所述的试剂盒用于免疫年龄体检时,其检测包括以下步骤:

[0086] 1)通过流式细胞仪检测所述检测样品的人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量;

[0087] 2)根据人体胸腺释放的胸腺新近输出细胞的数量,对照上述制作的免疫年龄模型,确定所述检测样本的免疫年龄。

[0088] 实施例1

[0089] 试剂的配制:

[0090] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取125 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为5 $\mu$ L。

[0091] 实施例2

[0092] 试剂的配制:

[0093] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取50 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为2 $\mu$ L。

[0094] 实施例3

[0095] 试剂的配制:

[0096] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取10 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为0.4 $\mu$ L。

[0097] 实施例4

[0098] 试剂的配制:

[0099] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取500 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为20 $\mu$ L。

[0100] 实施例5

[0101] 试剂的配制:

[0102] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取10 $\mu$ L、500 $\mu$ L、500 $\mu$ L、500 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为15.1 $\mu$ L。

[0103] 实施例6

[0104] 试剂的配制:

[0105] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取500 $\mu$ L、10 $\mu$ L、500 $\mu$ L、500 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明

的产品,对应每人份产品的使用量为15.1 $\mu$ L。

[0106] 实施例7

[0107] 试剂的配制:

[0108] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取500 $\mu$ L、500 $\mu$ L、10 $\mu$ L、500 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为15.1 $\mu$ L。

[0109] 实施例8

[0110] 试剂的配制:

[0111] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取500 $\mu$ L、500 $\mu$ L、500 $\mu$ L、10 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为15.1 $\mu$ L。

[0112] 实施例9

[0113] 试剂的配制:

[0114] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取500 $\mu$ L、10 $\mu$ L、10 $\mu$ L、10 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为5.3 $\mu$ L。

[0115] 实施例10

[0116] 试剂的配制:

[0117] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取10 $\mu$ L、500 $\mu$ L、10 $\mu$ L、10 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为5.3 $\mu$ L。

[0118] 实施例11

[0119] 试剂的配制:

[0120] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取10 $\mu$ L、10 $\mu$ L、500 $\mu$ L、10 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为5.3 $\mu$ L。

[0121] 实施例12

[0122] 试剂的配制:

[0123] CD3-FITC、CD4-PerCP、CD31-PE、CD45RA-APC四种单克隆抗体,每种抗体分别取10 $\mu$ L、10 $\mu$ L、10 $\mu$ L、500 $\mu$ L,加入避光的塑料或玻璃试剂瓶内,混合均匀,即成为100人份本发明的产品,对应每人份产品的使用量为5.3 $\mu$ L。

[0124] 所述的试剂盒配制完成后,试剂盒标识有建议的每人份产品使用量。

[0125] 通过实验,对于同一个检测样本,使用同一个实施例的试剂盒进行多次检测,所产生的检测结果一致,其数据的重复性、再现性很好,结果见表一。

[0126] 表一 同一检测样本使用同一实施例的试剂盒多次检测结果

[0127]

		一次	二次	三次	极差	标准偏差
样本4	实施例3	56.1%	56.1%	57.2%	1.10%	0.006350853
样本5	实施例3	70.2%	68.8%	72.0%	3.20%	0.016041613

样本6	实施例4	46.5%	44.5%	46.6%	2.10%	0.011846237
样本7	实施例4	66.8%	66.2%	67.8%	0.60%	0.004242641

[0128] 通过实验,对于同一个检测样本,使用上述12个实施例的试剂进行检测,发现按照试剂盒标识的建议每人份产品使用量0.4μL-20μL均可满足检测需求,所产生的检测结果无显著性差异。

[0129] 本发明提供的用于检测人体免疫年龄的试剂盒,用于为各类人群进行体检,并对体检者平时的身体状况进行调查,结果见表二。

[0130] 表二 体检者免疫年龄检测结果与平时身体状况调查表

[0131]

检测样本 数量	免疫年龄减去实 际年龄差异值	体检者平时身体状况
27 例	-5 岁	身体状况良好, 精力充沛, 无不适感
114 例	0 岁	身体状况良好, 精力充沛, 无不适感
231 例	5 岁	身体状况良好, 精力充沛, 无不适感

[0132]

82 例	10 岁	身体较易疲惫, 精力较为充沛, 无不适感
46 例	15 岁	身体较易疲惫, 精力较为充沛, 无不适感

[0133] 通过上述的数据可见,本发明所述的试剂盒能够快速准确地检测人体的免疫年龄,从而评估其是否存在提前衰老的问题。对于提前衰老的人群,如果体检者接受的话,可推荐在医生指导下采用胸腺肽刺激T细胞产生进行调理。

[0134] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非对本发明作任何形式上的限制,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与修饰,均仍属于本发明技术方案的范围内。

专利名称(译)	一种用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN109490544A</a>	公开(公告)日	2019-03-19
申请号	CN201811070303.5	申请日	2018-09-13
[标]申请(专利权)人(译)	浙江博真生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江博真生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江博真生物科技有限公司		
[标]发明人	倪万茂 迟妍妍 陈乐芝 倪万根 倪声雷 张鸿 张鸿君 林鹏程 刘维杰		
发明人	倪万茂 迟妍妍 陈乐芝 倪万根 倪声雷 张鸿 张鸿君 林鹏程 刘维杰 朱阳承		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/58 G01N33/533 G01N15/14		
CPC分类号	G01N33/577 G01N15/14 G01N33/533 G01N33/582		
代理人(译)	王伟锋 刘铁生		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

## 摘要(译)

本发明提供一种用于检测人体免疫年龄的试剂盒及其应用，所述试剂盒中的试剂由CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体组成；所述CD3、CD4、CD31和CD45RA单克隆抗体分别标记有适用于流式细胞仪的四种荧光素；四种所述荧光素的颜色互不相同；所述试剂盒中的试剂，其组分如下：荧光标记的CD3，0.66-94.34%；荧光标记的CD4，0.66-94.34%；荧光标记的CD31，0.66-94.34%；荧光标记的CD45RA，0.66-94.34%。所述的试剂盒用于检测人体胸腺新近输出细胞数量，并根据所述的胸腺新近输出细胞数量的检测结果确定人的免疫年龄，用以评价人体的免疫能力的方法。

检测样本 数量	免疫年龄减去实 际年龄差值	体检者平时身体状况
27例	-5岁	身体状况良好，精力充沛，无不适感
114例	0岁	身体状况良好，精力充沛，无不适感
231例	5岁	身体状况良好，精力充沛，无不适感

