



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107190044 A

(43)申请公布日 2017.09.22

(21)申请号 201710554467.4

(22)申请日 2017.07.07

(71)申请人 左衍海

地址 211100 江苏省南京市江宁区竹山路  
378号万欣花园22幢1单元202室

(72)发明人 陶晓丽

(51)Int.Cl.

G12Q 1/06(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

### (54)发明名称

一种检测细胞分泌功能的方法

### (57)摘要

本发明公开了一种检测细胞分泌功能的方法,解决的技术问题:针对现有方法检测细胞分泌功能时无法排除细胞数量这一干扰因素的问题。技术方案为,1)将细胞悬液接种至细胞培养板上,定期更换细胞培养液;2)定期收取细胞培养板中的细胞培养液,测量细胞培养液中细胞分泌物的含量;3)收取细胞培养板中的细胞培养液后,立即对细胞培养板中的细胞进行细胞计数;4)利用步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量与步骤3所测的细胞培养板中的细胞数量的比值,校正步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量。优点:排除了细胞数量对细胞分泌功能检测结果的干扰。

1. 一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于,其包括如下步骤:1) 将细胞悬液接种至细胞培养板上,定期更换细胞培养液;2) 定期收取细胞培养板中的细胞培养液,测量细胞培养液中细胞分泌物的含量;3) 收取细胞培养板中的细胞培养液后,立即对细胞培养板中的细胞进行细胞计数;4) 利用步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量与步骤3所测的细胞培养板中的细胞数量的比值,校正步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量。

2. 根据权利要求1所述的一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于:利用现有的基于WST-8的CCK-8试剂盒对步骤3所述的细胞培养板中的细胞进行细胞计数。

3. 根据权利要求1所述的一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于:利用现有的酶联免疫吸附剂测定法、免疫印迹法、羟脯氨酸试剂盒等方法测量步骤2中所述细胞培养液中细胞分泌物的含量。

4. 根据权利要求1所述的一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于:在同一取材时相点,步骤2中收取细胞培养液的细胞培养板与步骤3中进行细胞计数的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的两个细胞培养板。

5. 根据权利要求1所述的一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于:各取材时相点,步骤2中收取细胞培养液的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的多个细胞培养板;步骤3中进行细胞计数的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的多个细胞培养板。

6. 根据权利要求1所述的一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于:所述细胞既可以是贴壁生长的细胞,也可以是悬浮生长的细胞。

## 一种检测细胞分泌功能的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测体外培养的细胞的细胞分泌功能的方法,特别涉及一种能排除细胞数量对细胞分泌功能检测结果造成干扰的方法。

### 背景技术

[0002] 比较研究体外培养的细胞的细胞分泌功能是科研过程中十分常见的实验内容,例如,研究不同干预因素下同一种细胞的细胞分泌功能的改变;研究数种细胞经相同干预因素处理后的细胞分泌功能的改变,等等。常规的实验步骤往往是:将各细胞进行细胞计数,等量接种于细胞培养板,定期换液,保证各组细胞除干预因素外的其它培养条件一致,定期收取细胞培养板中的细胞培养液并检测其中细胞分泌物的含量。常用的检测方法包括酶联免疫吸附剂测定法、免疫印迹法、羟脯氨酸试剂盒等。

[0003] 上述实验过程无法回答如下问题:等量的同一种细胞接种后,培养过程中经过不同干预因素处理,其细胞数量的差异有没有统计学意义;等量的数种细胞接种后,经过一段时间的培养,其细胞数量的差异有没有统计学意义;上述问题表明,应用上述方法检测细胞分泌功能时无法排除细胞数量这一干扰因素。为了排除细胞数量对实验结果造成的干扰,有研究在收取细胞培养板中的细胞培养液后,将细胞培养板中的细胞消化后用细胞计数板计数,或者直接在显微镜下计数细胞培养板上的细胞数量;也有研究在收取细胞培养板中的细胞培养液后,将细胞培养板上的细胞消化,测量其蛋白浓度,间接反映细胞数量。上述方法要么主观性太强,要么操作繁琐。有必要探索更客观、更简单的方法排除细胞数量对实验结果造成的干扰。

[0004] WST-8与MTT类似,在电子耦合试剂存在时,被线粒体内的脱氢酶还原生成橙黄色的formazan,对于同样的细胞而言,颜色的深浅和细胞的数量呈线性关系。Cell Counting Kit-8简称CCK-8试剂盒正是利用这一原理进行细胞增殖能力的检测。更重要的是,WST-8对细胞无明显毒性,检测完毕更换培养液后可以继续培养该细胞。

### 发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是:针对现有方法检测细胞分泌功能时无法排除细胞数量这一干扰因素的问题。

[0006] 为了排除细胞数量对实验结果造成的干扰,本专利提供一种检测细胞分泌功能的方法,应用该方法可以测得细胞数量、细胞培养液中细胞分泌物的含量,利用细胞培养液中细胞分泌物的含量与细胞数量的比值反映细胞分泌功能。该方法操作方便,结果客观。

[0007] 本发明采取的技术方案是:

[0008] 一种检测细胞分泌功能的方法,其特征在于,其包括如下步骤:1) 将细胞悬液接种至细胞培养板上,定期更换细胞培养液;2) 定期收取细胞培养板中的细胞培养液,测量细胞培养液中细胞分泌物的含量;3) 收取细胞培养板中的细胞培养液后,立即对细胞培养板中的细胞进行细胞计数;4) 利用步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量与步骤3所测的

细胞培养板中的细胞数量的比值,校正步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量。

[0009] 为了测量各取材时相点的细胞数量,利用现有的基于WST-8的CCK-8试剂盒对步骤3所述的细胞培养板中的细胞进行细胞计数。

[0010] 为了测量各取材时相点收取的细胞培养液中细胞分泌物的含量,利用现有的酶联免疫吸附剂测定法、免疫印迹法、羟脯氨酸试剂盒等方法测量步骤2中所述细胞培养液中细胞分泌物的含量。

[0011] 根据不同实验设计的需要,在同一取材时相点,步骤2中收取细胞培养液的细胞培养板与步骤3中进行细胞计数的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的两个细胞培养板。

[0012] 根据不同实验设计的需要,各取材时相点,步骤2中收取细胞培养液的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的多个细胞培养板;步骤3中进行细胞计数的细胞培养板既可以是同一细胞培养板,也可以是相同接种条件、培养条件的多个细胞培养板。

[0013] 本发明中所述细胞既可以是贴壁生长的细胞,也可以是悬浮生长的细胞。

[0014] 本发明与现有技术相比:使用本发明的方法所检测出的细胞分泌功能经过细胞数量校正,排除了细胞数量对测量结果的干扰,结果更客观。

## 具体实施方式

[0015] 为使本发明的内容更加易懂,以下结合两个具体实施方式进一步说明本发明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0016] 实施例1:贴壁生长细胞细胞分泌功能的测定

[0017] (1) 细胞的接种

[0018] 20万个人真皮成纤维细胞接种于六孔细胞培养板中,加入培养液2.5ml,每3天更换一次细胞培养液。

[0019] (2) 细胞培养液的取材

[0020] 接种后第3,6天,从细胞培养板中吸取细胞培养液1.5ml。

[0021] (3) 细胞计数

[0022] 步骤(2)中细胞培养液取材完毕,弃去细胞培养板中残留的细胞培养液,根据CCK-8试剂盒的说明书,加入WST-8,测得细胞培养板中的细胞数量。弃去细胞培养板中WST-8并用PBS漂洗3次,加入细胞培养液2.5ml继续培养细胞。

[0023] (4) 细胞培养液中细胞分泌物含量的测定

[0024] 根据羟脯氨酸试剂盒的说明书,测得上述各时相点收取细胞培养液中胶原蛋白的含量。

[0025] (5) 细胞培养液中细胞分泌物含量的校正

[0026] 利用步骤(4)中所测胶原蛋白含量与步骤(3)所测细胞数量的比值,校正步骤(4)所测胶原蛋白含量。

[0027] 实施例2:悬浮生长细胞细胞分泌功能的测定

[0028] (1) 细胞的接种

[0029] 20万个大鼠巨噬细胞接种于六孔细胞培养板中,加入培养液2.5ml,每3天更换一

次细胞培养液。

[0030] (2) 细胞计数

[0031] 接种后第3,6天,根据CCK-8试剂盒的说明书,向六孔板中加入WST-8,测得细胞培养板中的细胞数量。

[0032] (3) 细胞培养液的取材

[0033] 步骤(2)检测完毕,将细胞悬液转移至无菌离心管,低速离心,从上清中吸取培养液1.5ml,弃去残留上清,2.5ml细胞培养液重悬细胞沉淀后接种于六孔板中继续培养细胞。

[0034] (4) 细胞培养液中细胞分泌物含量的测定

[0035] 根据转化生长因子- $\beta$ 的酶联免疫试剂盒的说明书,测得上述各时相点收取细胞培养液中转化生长因子- $\beta$ 的含量。

[0036] (5) 细胞培养液中细胞分泌物含量的校正

[0037] 利用步骤(4)中所测转化生长因子- $\beta$ 的含量与步骤(2)所测细胞数量的比值,校正步骤(4)所测转化生长因子- $\beta$ 的含量。

专利名称(译)	一种检测细胞分泌功能的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107190044A</a>	公开(公告)日	2017-09-22
申请号	CN201710554467.4	申请日	2017-07-07
[标]发明人	陶晓丽		
发明人	陶晓丽		
IPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/06 G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种检测细胞分泌功能的方法，解决的技术问题：针对现有方法检测细胞分泌功能时无法排除细胞数量这一干扰因素的问题。技术方案为，1)将细胞悬液接种至细胞培养板上，定期更换细胞培养液；2)定期收取细胞培养板中的细胞培养液，测量细胞培养液中细胞分泌物的含量；3)收取细胞培养板中的细胞培养液后，立即对细胞培养板中的细胞进行细胞计数；4)利用步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量与步骤3所测的细胞培养板中的细胞数量的比值，校正步骤2所测的细胞培养液中细胞分泌物的含量。优点：排除了细胞数量对细胞分泌功能检测结果的干扰。