



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107607509 A

(43)申请公布日 2018.01.19

---

(21)申请号 201710819668.2

(22)申请日 2017.09.11

(71)申请人 武汉科技大学

地址 430081 湖北省武汉市青山区和平大道947号

(72)发明人 谭萍 卫向红

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

---

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种荧光染色液用于湖北钉螺血淋巴细胞检测及分类的方法

(57)摘要

本发明属于荧光染色液领域,具体涉及一种用于湖北钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液及其染色方法。为克服现有染色方法存在的两大缺陷:①染色后的螺血淋巴细胞内颗粒不清,且与染料中的杂质不易分辨;②不同类型的血淋巴细胞不易分辨。我们采用一种荧光染色液检测湖北钉螺血淋巴细胞的形态及分类,获得了很好的效果,该荧光染色液与螺血细胞内的不同成分结合后,发射出红橙黄绿蓝各色荧光,使不同类型的螺血淋巴细胞明显区别开来,且胞质清晰不含杂质,其内有无颗粒极易分辨。此法适用于观察各种理化、生物、环境等因素对湖北钉螺血淋巴细胞的影响,以判断钉螺血淋巴细胞在免疫环节中发挥的作用,对灭螺药物的研发起到了重要的指导作用。

A  
CN 107607509

CN

1. 一种用于钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液,其特征在于,包括染色液、固定剂和防淬灭液:

所述染色液包括1份母液和9份1/15mol/L磷酸缓冲液(PBS);

所述母液包括0.1g荧光染料粉剂和100ml蒸馏水;

所述固定剂为100%甲醇溶液;

所述防淬灭液包括3份甘油和97份1/15mol/L的PBS。

2. 如权利要求1所述的钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液,其特征在于,所述荧光素为吖啶橙(acridineorange,AO),该荧光染色液可与细胞内DNA和RNA等不同的细胞成分结合,由于存在结合量的差异,从而发射出红橙黄绿蓝各色荧光。

3. 如权利要求1所述的钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液,其特征在于,所述1/15mol/L PBS包括1份甲液和1份乙液:

所述甲液1/15mol/L Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>溶液包括:9.465g Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>和1000ml蒸馏水,

所述乙液1/15mol/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>溶液包括:9.07g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>和1000ml蒸馏水。

4. 一种如权利要求1所述的钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液的染色方法,其特征在于,包括以下步骤:

a) 制备钉螺的血淋巴液,通过分离钉螺的软体获得头足部组织,然后用250目的尼龙筛网包裹30只钉螺头足部软体,用止血钳于筛网外轻轻钳夹包裹着的钉螺头足部软体,使挤出的钉螺血淋巴液混入盛有1/15mol/L PBS的烧杯中,然后离心,弃上清液,使螺血细胞达到一定的浓度,充分混匀后涂片于载玻片上;

b) 将涂有钉螺血淋巴细胞样本的载玻片上滴加固定剂100%甲醇,覆盖整个样本,待甲醇自然晾干;

c) 滴加AO染色液以覆盖整个样本为准,23℃条件下染色10min;

d) 用自来水缓慢冲洗,自然晾干;

e) 滴加一滴防淬灭液,加盖玻片;

f) 置于荧光显微镜下观察。

## 一种荧光染色液用于湖北钉螺血淋巴细胞检测及分类的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于荧光染色液领域,具体涉及一种用于湖北钉螺血淋巴细胞的检测及分类的荧光染色液及其染色方法。

### 背景技术

[0002] 螺类缺乏与脊椎动物类似的免疫系统,但诸多研究表明螺宿主具有抵抗异己的能力,认为螺宿主体内的防御反应至少是细胞介导的,即血淋巴细胞,以及产生的各种体液因子,包括凝集素、调理素、抗菌肽、非特异性的水解酶、氧化酶、活性氧和NO等,在免疫防御中发挥重要的作用。如果破坏钉螺的免疫机制,则钉螺丧失对血吸虫、以及环境中的细菌或病毒等病原体的抵抗力能力,以致病原体在钉螺体内大量繁殖,导致钉螺死亡;反之,如果加强钉螺的免疫力,则血吸虫的毛蚴侵入钉螺体内后未能发育至尾蚴即被钉螺宿主的螺血细胞杀灭。故调节钉螺的免疫机制可成为一把双刃剑,削弱或加强钉螺的免疫机制均可达到杀灭螺体内血吸虫幼虫的目的。

[0003] 既然钉螺的免疫机制是通过血淋巴细胞来实现的,那么,在研究药物或各种生物与理化因素对钉螺的免疫调节作用时,可将钉螺血淋巴细胞的数量、分类、聚集、黏附、吞噬等功能的改变作为一个重要的观察指标,或者说药物作用的靶向目标,因此,建立一种切实有效、且简便易行的钉螺血淋巴细胞的检测方法成为亟待解决的问题。

[0004] 在脊椎动物或非脊椎动物的血细胞染色方法中,通常采用Giemsa染色、瑞氏染色、或瑞氏-Giemsa复合染色,已有报道的关于湖北钉螺血淋巴细胞的检测方法同样如此,如王晓勤等(1994)、谭莘等(2001)、张红梅等(2007)、郑盛邦等(2014)均采用的Giemsa染色法,该染色方法的优点是简单、快捷、可在光学显微镜下观察,但同时存在两大缺点:①染色后的钉螺血淋巴细胞内的颗粒不清,且与染料中的杂质不易分辨;②不同类型的血淋巴细胞不易分辨。为此,我们摸索出荧光染料吖啶橙(acridineorange,AO)用于检测湖北钉螺血淋巴细胞的形态及分类,获得了很好的效果,由于AO荧光染料与钉螺血细胞内的不同成分结合后,可发射出红橙黄绿蓝各色荧光,因此能够使不同类型的螺血淋巴细胞明显区别开来,且胞质清晰不含杂质,其内有无颗粒清晰易辨。该检测方法的建立为研究理化、生物、环境等因素对湖北钉螺血淋巴细胞的影响,以及钉螺血淋巴细胞在免疫环节中发挥的作用奠定了基础,对灭螺药物的研发起到了重要的指导作用。且AO用于湖北钉螺血淋巴细胞的检测及分类方法迄今未见报道,也未见相应的专利公开。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是为了解决上述背景技术存在的不足,提供的一种荧光染料(AO)用于钉螺血淋巴细胞的检测及分类方法,该方法能将钉螺血淋巴细胞的不同类型明显区别开来,且涂片中不含杂质,细胞质内有无颗粒清晰可见,极大的方便了观察理化、生物、环境等因素对湖北钉螺血淋巴细胞的影响,以及钉螺血淋巴细胞在免疫环节中发挥的作用,从而对灭螺药物的研发起到了重要的指导作用。

[0006] 针对这一发明目的,本发明采用如下技术方案:

[0007] 1.制备钉螺的血淋巴液,通过分离钉螺的软体获得头足部组织,因该部位组织中含有大量血淋巴液,然后用250目的尼龙筛网包裹30只钉螺头足部软体,用止血钳于筛网外轻轻钳夹包裹着的钉螺头足部软体,使挤出的钉螺血淋巴液混入盛有1/15mol/L PBS的烧杯中,然后离心,弃上清液,使螺血细胞达到一定的浓度,充分混匀后涂片则使螺血细胞均匀分布于载玻片上。

[0008] 2.用0.1g/L的AO染色液(PH为6.8),滴于并覆盖经甲醇固定后的螺血淋巴液涂片上,23℃恒温下染色10min,自来水缓慢冲洗,自然晾干。

[0009] 3.荧光显微镜下观察染色标本:由于AO荧光染料可与细胞内DNA和RNA等不同的细胞成分结合,且因结合量的差异,从而发射出红橙黄绿蓝各色荧光。在荧光显微镜下(选用紫蓝光激发滤片),可见含DNA的细胞核显示黄绿色荧光,含RNA的核仁显示桔红色荧光,细胞质呈红色或淡绿色荧光,有些细胞质内含荧光颗粒。根据钉螺血淋巴细胞的形态不同、细胞质的荧光颜色不同、细胞质的多少不同、细胞质内有无颗粒、以及细胞质有无伸展形成伪足等特点,可见12种形态的钉螺血淋巴细胞。

## 具体实施方式

[0010] 1材料与方法

[0011] 1.1钉螺:采自湖北省武汉市近郊,选择活力强的阴性成螺收集螺血淋巴细胞。

[0012] 1.2螺血淋巴液的收集:将钉螺洗净后,置于手术止血钳中,螺壳纵轴方向与止血钳一致,并使螺厣端朝向止血钳头端,同时将一镊子的尖端(比钉螺的厣端稍窄的部分)置于钉螺外侧的止血钳头端,当捏合止血钳时螺壳破损,然后将其置于盛有少量1/15mol/L PBS的培养皿中,在解剖镜下执解剖针剔除破碎螺壳,得到钉螺软体,用刀片切取足跖肌及头部软体组织,共收集30只钉螺头足部,以1/15mol/L PBS洗涤3次后,包裹于250目的尼龙筛网中,并将包裹部分置入盛有5ml PBS的小烧杯中,然后用止血钳于筛网外轻轻钳夹包裹着的钉螺头足部软体,随之可见钉螺血淋巴液混入PBS中,然后将小烧杯中的液体倒入离心管,260xg离心8min,弃上清液,保留底部含螺血淋巴细胞的PBS 0.5ml,充分混匀后供涂片用。1.3涂片:将上述混匀后的螺血淋巴液涂于洁净的载玻片上,自然晾干后滴加100%甲醇固定,再晾干。

[0013] 1.4AO染液配制:将AO粉剂0.1g溶解于100ml蒸馏水中,配成0.1%AO母液,避光保存于4℃,可供多次实验使用。染色时再以1/15mol/L PBS稀释母液10倍成为0.1g/L的AO染色液,PH调至6.8,每次染色前新鲜配制。

[0014] 1.5吖啶橙染色:将0.1g/L的AO染色液滴于并覆盖甲醇固定后的螺血淋巴液涂片上,23℃恒温下染色10min,自来水缓慢冲洗,自然晾干。

[0015] 1.6封片滴一滴防淬灭液(3份甘油+97份1/15mol/L PBS)于血膜上,然后加盖玻片封片。

[0016] 1.7荧光显微镜下观察染色标本:选用紫蓝光激发滤片,物镜头选用放大100倍的油镜,目镜放大倍数为10倍。

[0017] 2使用本发明的观察结果:经AO染色后,在荧光显微镜(Olympus DP72型)油镜下能清晰地看到不同类型的钉螺血淋巴细胞(于染色后48h内观察效果最佳)。

[0018] 2.1根据细胞质的荧光颜色不同、细胞质的多少不同、以及细胞质内有无颗粒,可将湖北钉螺血淋巴细胞分为以下8类:A.红色多浆型无颗粒圆形淋巴细胞、B.红色多浆型有颗粒圆形淋巴细胞、C.红色少浆型无颗粒圆形淋巴细胞、D.红色少浆型有颗粒圆形淋巴细胞、E.绿色多浆型无颗粒圆形淋巴细胞、F.绿色多浆型有颗粒圆形淋巴细胞、G.绿色少浆型无颗粒圆形淋巴细胞、H.绿色少浆型有颗粒圆形淋巴细胞。

[0019] 2.2根据细胞质有无伸展形成伪足,又可以将湖北钉螺血淋巴细胞分为圆形细胞和伸展型细胞。上述8类均为圆形细胞,且圆形细胞的胞质中多数不含颗粒;伸展型细胞的细胞质均呈绿色荧光,形成伸展的伪足,内含颗粒,细胞质或多或少,呈现为:1.多浆伸展型淋巴细胞、J.少浆伸展型淋巴细胞。

[0020] 2.3多数湖北钉螺血淋巴细胞的形态为圆形或类圆形,少数形状近似梭形,故称之为梭形细胞,其胞质内不含颗粒,细胞质的荧光呈色或红或绿,呈现为:K.红色胞质梭形淋巴细胞、L.绿色胞质梭形淋巴细胞。

[0021] 总结湖北钉螺血淋巴细胞涂片经AO染色后,在荧光显微镜下呈现的形态共有12个类型:A.红色多浆型无颗粒圆形淋巴细胞、B.红色多浆型有颗粒圆形淋巴细胞、C.红色少浆型无颗粒圆形淋巴细胞、D.红色少浆型有颗粒圆形淋巴细胞、E.绿色多浆型无颗粒圆形淋巴细胞、F.绿色多浆型有颗粒圆形淋巴细胞、G.绿色少浆型无颗粒圆形淋巴细胞、H.绿色少浆型有颗粒圆形淋巴细胞、I.多浆伸展型淋巴细胞、J.少浆伸展型淋巴细胞、K.红色胞质梭形淋巴细胞、L.绿色胞质梭形淋巴细胞。

[0022] 以上所述的实施例只是本发明的一种较佳的方案,并非对本发明作任何形式上的限制,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明实施例原理以及权利要求的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也视为本发明实施例的保护范围。

专利名称(译)	一种荧光染色液用于湖北钉螺血淋巴细胞检测及分类的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107607509A</a>	公开(公告)日	2018-01-19
申请号	CN201710819668.2	申请日	2017-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	武汉科技大学		
申请(专利权)人(译)	武汉科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	武汉科技大学		
[标]发明人	谭萃 卫向红		
发明人	谭萃 卫向红		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/50 G01N33/533 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">Sipo</a>		

#### 摘要(译)

本发明属于荧光染色液领域，具体涉及一种用于湖北钉螺血淋巴细胞检测及分类的荧光染色液及其染色方法。为克服现有染色方法存在的两大缺陷：①染色后的血淋巴细胞内颗粒不清，且与染料中的杂质不易分辨；②不同类型的血淋巴细胞不易分辨。我们采用一种荧光染色液检测湖北钉螺血淋巴细胞的形态及分类，获得了很好的效果，该荧光染色液与血细胞内的不同成分结合后，发射出红橙黄绿蓝各色荧光，使不同类型的血淋巴细胞明显区别开来，且胞质清晰不含杂质，其内有无颗粒极易分辨。此法适用于观察各种理化、生物、环境等因素对湖北钉螺血淋巴细胞的影响，以判断钉螺血淋巴细胞在免疫环节中发挥的作用，对灭螺药物的研发起到了重要的指导作用。