



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109892320 A

(43)申请公布日 2019.06.18

(21)申请号 201910214657.0

(22)申请日 2019.03.20

(71)申请人 浙江省人民医院

地址 310014 浙江省杭州市上塘路158号

申请人 浙江博真生物科技有限公司

(72)发明人 倪万茂 迟妍妍 倪万根 倪声雷

张鸿 陈乐芝 林鹏程 张鸿君

(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.

A01N 1/02(2006.01)

G01N 15/14(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种细胞保存液及其制备方法和应用

(57)摘要

本发明涉及一种细胞保存液,含有以下组分:Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl及水。本发明还提供了上述细胞保护液的制备方法和应用。本发明所提供的细胞保存液,可以长期保存骨髓、外周血、组织等,并保证免疫分型、淋巴细胞亚群检测等多种白细胞相关检测结果的稳定和正确,特别适用于流式细胞检测。并且使用保存液保存的细胞依旧保持活性,可继续进行细胞培养和死活染料标记。

1. 一种细胞保存液,其特征在于,含有以下组分:Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl及水。

2. 如权利要求1所述的细胞保存液,其特征在于,所述水为纯水。

3. 如权利要求2所述的细胞保存液,其特征在于,所述细胞保存液含有以下终浓度的组分:

Na₂HPO₄ 0.1-10g/L;

葡萄糖 0.1-50g/L;

柠檬酸 0.1-10g/L;

腺嘌呤 0.1-10g/L;

NaCl 0.01-500mmol/L;

上述各组分的溶剂均为水。

4. 一种权利要求3所述的细胞保存液的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将配方量的Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl与水混合均匀,即得。

5. 如权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述制备方法还包括混合后进行过滤和/或分装的步骤。

6. 如权利要求5所述的制备方法,其特征在于,所述分装的体积为100~300μl/管。

7. 一种权利要求3所述的细胞保存液在流式细胞仪检测中的应用。

8. 如权利要求7所述的应用,其特征在于,所述应用包括以下步骤:

1) 提供含有细胞的样本液;

2) 将上述细胞保存液与所述样本液混合,其中所述细胞保存液与所述样本液的体积比为1:5~1:10;

3) 将步骤2)获得的混合物保存;

4) 将步骤3)获得的混合物取出50-100μl与荧光标记的流式单克隆抗体20μl混合加入流式管,混匀后避光孵育15分钟;

5) 向步骤4)孵育的流式管中加入溶血素2ml,混匀后室温孵育10分钟,200-300g,离心5分钟,倾倒弃去上清并以200μlPBS重悬样本;

6) 流式细胞仪检测步骤5)重悬的流式管,并计算结果;

7) 一周后取出进行重复测试。

9. 如权利要求8所述的应用,其特征在于,步骤1)中所述样本液为血液、骨髓或细胞悬浮液;步骤4)中所述流式单克隆抗体包括各5μl的CD45-FITC、CD13-PE、CD33-PerCP-cy5.5和CD7-APC。

10. 一种含有权利要求3所述的细胞保存液的保存剂。

11. 如权利要求10所述的保存剂,其特征在于,所述保存剂还包含样本液,所述细胞保存液与所述样本液的体积比为1:5~1:10。

12. 如权利要求10所述的保存剂,其特征在于,所述样本液为血液、骨髓或细胞悬浮液。

13. 一种权利要求10-12任一项所述的保存剂在用于流式细胞仪检测或在制备用于流式细胞仪检测的试剂盒中的应用。

14. 如权利要求13所述的应用,其特征在于,所述流式细胞仪检测为白细胞表面抗原及胞内抗原的检测。

一种细胞保存液及其制备方法和应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药技术领域,具体而言,涉及一种细胞保存液及其制备方法和应用。

背景技术

[0002] 随着科学技术的发展及各医学领域对细胞的深入研究,流式细胞术作为一项常规的检测技术应用在各个领域,在科学研究及临床诊断方面处于越来越重要的地位。包括本申请人之前申请的申请号为20161002721.4和201610768294.1的中国发明专利申请在内的许多现有技术着重对流式细胞术本身的步骤和参数进行了研究。然而,目前对于流式细胞术样本的保存,却没有一种公认的简单快捷的保存方法或产品。

[0003] 为了保证流式细胞术检测结果的准确性,细胞样本应尽可能保证新鲜,即使于2-8℃条件下保存,也应尽快使用,以免样本失活导致结果偏差。

[0004] 在本申请人之前申请的申请号为201610768294.1的中国发明专利申请公开了一种细胞保存液,专用于流式细胞术样本的保存,可长时间保持样本的稳定性,对于外周血样本,可稳定白细胞分群及表面抗原的表达。上述专利申请所衍生的产品对细胞具有固定作用,经过保存液保存后的细胞样本,无活性,无法继续进行培养或死活细胞鉴别。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的是提供一种细胞保存液及其制备方法和应用。

[0006] 为了达成上述的目的,本发明提供一种细胞保存液,含有以下组分:Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl及水。

[0007] 作为优选,其中所述水为纯水。

[0008] 作为优选,其中所述细胞保存液含有以下终浓度的组分:

[0009] Na₂HPO₄ 0.1-10g/L;

[0010] 葡萄糖0.1-50g/L;

[0011] 柠檬酸0.1-10g/L;

[0012] 腺嘌呤0.1-10g/L;

[0013] NaCl 0.01-500mmol/L;

[0014] 上述各组分的溶剂均为水。

[0015] 所述细胞保存液没有腐蚀性,也没有氧化性,可以装于多种材质的容器,如玻璃容器或塑料容器。

[0016] 本发明提供了上述保存液的制备方法,包括如下步骤:将Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl与混合均匀,即得。

[0017] 作为优选,其中所述制备方法还包括混合后进行过滤和/或分装的步骤。通常可以不分装,直接装于大试剂瓶中储存;对于硬连接采血方式采血样本的保存,优选分装成管装的保存液,这样可以直接向管内加入采集的血液或含细胞的样本而进行保存。分装可以分装在非真空管中,也可以分装在真空管中。鉴于通常血液样本的采集体积为1~2ml,因此分

装的体积对应为100~300 μ l/管,优选为250 μ l/管。

[0018] 本发明进一步提供了上述细胞保存液在用于流式细胞仪检测中的应用。

[0019] 作为优选,其中所述应用包括以下步骤:

[0020] 1) 提供含有细胞的样本液;

[0021] 2) 将上述细胞保存液与所述样本液混合,其中所述细胞保存液与所述样本液的体积比为1:5~1:10;

[0022] 3) 将步骤2) 获得的混合物保存;

[0023] 4) 将步骤3) 获得的混合物取出50-100 μ l与荧光标记的流式单克隆抗体20 μ l混合加入流式管,混匀后避光孵育15分钟;

[0024] 5) 向步骤4) 孵育的流式管中加入溶血素2ml,混匀后室温孵育10分钟,200-300g,离心5分钟,倾倒弃去上清并以200 μ lPBS重悬样本;

[0025] 6) 流式细胞仪检测步骤5) 重悬的流式管,并计算结果;

[0026] 7) 一周后取出进行重复测试。

[0027] 作为优选,其中含有细胞的样本液本身就可以是液体,如,血液、骨髓,这样提供该样本液本身即可。含有细胞的样本液本身可以是组织或细胞沉积,这样需要将组织中的细胞分离或将细胞沉积分散,形成细胞悬浮液,从而进行提供。

[0028] 作为优选,其中所述混合物可以于室温(如25 $^{\circ}$ C)保存,优选于2~8 $^{\circ}$ C保存,这样可以有更长的保存期。优选保存期为3天以上,更优选为5天以上,进一步优选为7天。

[0029] 本发明进一步提供了含有上述细胞保存液的保存剂。

[0030] 作为优选,其中所述保存剂还包含样本液,所述细胞保存液与所述样本液的体积比为1:5~1:10。

[0031] 作为优选,其中步骤1) 中所述样本液为血液、骨髓或细胞悬浮液;步骤4) 中所述流式单克隆抗体包括各5 μ l的CD45-FITC、CD13-PE、CD33-PerCP-cy5.5和CD7-APC。

[0032] 本发明进一步提供了上述保存剂在用于流式细胞仪检测或在制备用于流式细胞仪检测的试剂盒中的应用。

[0033] 作为优选,其中所述流式细胞仪检测为白细胞表面抗原及胞内抗原的检测。

[0034] 本发明的有益效果在于:

[0035] 1、本发明所提供的细胞保存液,可以长期保存骨髓、外周血、组织等,并保证免疫分型、淋巴细胞亚群检测等多种白细胞相关检测结果的稳定和正确,特别适用于流式细胞检测。并且经过保存的细胞依旧保持活性,可继续进行细胞培养和死活染料标记。

[0036] 2、本发明所提供的细胞保存液,含有细胞存活所需的特殊营养制剂(葡萄糖、腺嘌呤),对细胞各种物理指标和抗原表达没有影响,可有效保持细胞活性及表面抗原的稳定。添加过所述细胞保存液的细胞样本,后续可以继续培养,可进行死活染料标记,不会溶血,且样本可稳定保存七天。

具体实施方式

[0037] 以下本文将通过具体的实施例来描述发明。如未特别指明之处,可根据本领域技术人员所熟悉的《细胞实验指南》(科学出版社,北京,中国,2001年)、《免疫检测技术》(科学出版社,北京,中国,1991)等实验手册以及本文所引用的参考文献中所列方法来实施。其

中,所用的试剂原料均为市售品,可以通过公开渠道购买获得。

[0038] 实施例1瓶装细胞保存液1的制备

[0039] 所述瓶装细胞保存液1的配方如下:Na₂HPO₄ 0.4g/L;葡萄糖0.5g/L;柠檬酸2.68g/L;腺嘌呤2g/L;NaCl 5.8g/L。

[0040] 称取Na₂HPO₄ 0.4g、葡萄糖0.5g、柠檬酸2.68g、腺嘌呤2g、NaCl 5.8g,溶于900ml纯化水后,定容至1L,0.22μm膜过滤,灌装至无菌试剂瓶内,密闭试剂瓶,由此制得细胞保存液1L,根据需要分装至适当容量的瓶内。经测试,其于2~8℃环境下可至少稳定保存2年,适合长期储存。

[0041] 实施例2瓶装细胞保存液2的制备

[0042] 所述瓶装细胞保存液2的配方如下:Na₂HPO₄ 5g/L;葡萄糖2.5g/L;柠檬酸1.25g/L;腺嘌呤0.5g/L;NaCl 11.6g/L。

[0043] 称取Na₂HPO₄ 5g、葡萄糖2.5g、柠檬酸1.25g、腺嘌呤0.5g、NaCl 11.6g,溶于900ml纯化水后,定容至1L,0.22μm膜过滤,灌装至无菌试剂瓶内,密闭试剂瓶,由此制得细胞保存液1L,根据需要分装至适当容量的瓶内。经测试,其于2~8℃环境下可至少稳定保存2年,适合长期储存。

[0044] 实施例3非真空管装细胞保存液3的制备

[0045] 取实施例1制备的细胞保存液,灌装至塑料管中,每管灌装量为250μl,密闭管塞,由此制得细胞保存液3,经测试,于2~8℃环境下可至少稳定保存2年。其可以直接使用。

[0046] 实施例4真空管装细胞保存液4的制备

[0047] 取实施例1制备的细胞保存液,灌装至塑料管中,每管灌装量为250μl,用抽真空设备以0.29个标准大气压抽真空处理并密闭管塞,由此制得细胞保存液4,经测试,于2~8℃环境下可至少稳定保存2年。其可以直接使用。

[0048] 实施例5本发明的细胞保存液在流式样本保存中的应用

[0049] 取按照实施例4制备得到的细胞保存液的塑料管,每管直接加入一例正常人外周血2mL,2~8℃放置保存,进行7日细胞保存测试,期间第3、5、7天取保存的样品,进行流式细胞仪检测,包括按照申请号为20161002721.4的中国专利申请的方法进行检测,结果良好(可有效保持细胞稳定一个月)。

[0050] 取按照实施例4制备得到的细胞保存液的塑料管,每管直接加入一例正常人外周血2mL,2~8℃放置保存,按照如下方法进行7日细胞活率测试。向流式管中加入50μl血液样本,加入2ml溶血素混匀,室温孵育10分钟。以1300rpm离心5分钟,弃去上清液,加入500μl PBS重悬,重复洗涤一次,最终以500μl PBS重悬。取90μl重悬细胞液,加入10μl,0.4wt%台盼蓝染色液,混匀,染色3分钟,即刻到显微镜下观察,计算未染色细胞(活细胞)占有细胞总数的百分比,结果如下表1所示。

[0051] 表1

[0052]

样本编号	新鲜样本的细胞活率	未添加保存液一周后的细胞活率	添加保存液一周后的细胞活率
1	64%	36%	75%
2	93.6%	52.7%	96%
3	70.2%	65.7%	81%

[0053] 从表1中可以看出,相比于新鲜样本的细胞活率,未添加保存液一周后的细胞活率下降可达43.8%,添加保存液一周后的细胞活率均未发现明显下降,这说明添加保存液后能够减缓细胞死亡,从而保持稳定。

[0054] 虽然,上文中已经用一般性说明及具体实施方案对本发明作了详尽的描述,但在本发明基础上,可以对之作一些修改或改进,这对本领域技术人员而言是显而易见的。因此,在不偏离本发明精神的基础上所做的这些修改或改进,均属于本发明要求保护的范围。

专利名称(译)	一种细胞保存液及其制备方法和应用		
公开(公告)号	CN109892320A	公开(公告)日	2019-06-18
申请号	CN201910214657.0	申请日	2019-03-20
[标]申请(专利权)人(译)	浙江省人民医院 浙江博真生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	浙江省人民医院 浙江博真生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	浙江省人民医院 浙江博真生物科技有限公司		
[标]发明人	倪万茂 迟妍妍 倪万根 倪声雷 张鸿 陈乐芝 林鹏程 张鸿君		
发明人	倪万茂 迟妍妍 倪万根 倪声雷 张鸿 陈乐芝 林鹏程 张鸿君		
IPC分类号	A01N1/02 G01N15/14 G01N33/53		
代理人(译)	王伟锋 刘铁生		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种细胞保存液，含有以下组分：Na₂HPO₄、葡萄糖、柠檬酸、腺嘌呤、NaCl及水。本发明还提供了上述细胞保护液的制备方法和应用。本发明所提供的细胞保存液，可以长期保存骨髓、外周血、组织等，并保证免疫分型、淋巴细胞亚群检测等多种白细胞相关检测结果的稳定和正确，特别适用于流式细胞检测。并且使用保存液保存的细胞依旧保持活性，可继续进行细胞培养和死活染料标记。

样本编号	新鲜样本的细胞活率	未添加保存液一周后的细胞活率	添加保存液一周后的细胞活率
1	64%	36%	75%
2	93.6%	52.7%	96%
3	70.2%	65.7%	81%