

一种用于流式细胞仪分析的淋巴细胞样品的制备方法

5 技术领域

本发明涉及医药领域，具体涉及一种淋巴细胞样品的制备方法，特别是涉及一种用于流式细胞仪分析的免疫细胞中淋巴细胞样品的制备方法。

10 背景技术

流式细胞样品主要用于血液样品检测中，而常规的流式细胞仪检测细胞样品的制备通常采用如下方法：（1）外周血不同处理方式对流式细胞仪检测结果影响分析；（2）流式细胞术检测 25 例肺癌患者 T 淋巴细胞亚群表型分析；取流式管，加入相应体积的抗体，然后加入抗凝外周血样品 50 或 100 μ l，混匀，室温避光孵育 20 分钟，分别加入 1 \times 溶血素（即红细胞裂解液），混匀后再用于上机检测。目前的流式细胞样本制备方法多是通过抗凝外周血与抗体孵育 20-30 分钟，加入红细胞裂解液进行裂解 5-15 分钟，然后直接上机检测，或者洗涤一次再上机检测。这样的制备方法，有如下问题，一、加入红细胞裂解液控制时间问题。根据红细胞的多少，加入足量的溶血素，加入溶血素后要观察是否清亮，如果清亮就说明红细胞裂解完全，但是容易造成淋巴细胞损伤，如果裂解时间不足，红细胞裂解不完全，影响检测分析。二、不能严格控制淋巴细胞样本量，无论原血中的淋巴细胞多与少，都加入一样体积的抗体，容易造成抗体过饱和或不足，细胞检测样本量少时，微量的细胞亚型很难被检测到或因样本量少而不准确，不能够准确反映某些淋巴细胞亚群的实际情况。细胞样本量多时，如患病的某些人群淋巴细胞超标，抗体的量就会不足，导致检测结果偏低；三、裂解得到样品碎片多，背景不干净，影响流式细胞仪数据的收集和分析，对淋巴细胞补偿调整可能引起偏倚现象。

CN 201410486089.7 公开了一种淋巴细胞免疫分型的方法和试剂盒，其方法包括：取两根流式管，加入混合抗体到相应流式管中，加入 50 μ l 抗凝外周血样品，充分混均，室温避光孵育 30 分钟，然后，用红细胞裂解液裂解红细胞，5 分钟，加入 1mlPBS 洗涤一次后（3500rpm，2min），
5 加入 200 μ l PBS，流式细胞仪上机检测，该发明同样存在上述技术问题。

因此，有必要开发新的用于流式细胞仪分析的淋巴细胞样品的制备方法。

发明内容

10 针对以上技术现状，本发明提供一种流式细胞样品的制备方法，所述方法包括：

1) 取离体抗凝血液样品进行离心，分离血浆和血液沉淀，得血液细胞沉淀；

2) 将血液细胞沉淀与 PBS 溶液混合，得血液细胞稀释液；

15 3) 取一支离心管，加入步骤 2) 中终体积等量的淋巴细胞分离液。将血液细胞稀释液加入到淋巴细胞分离液的离心管中，去除血浆，取白膜层细胞；

4) 添加白膜层细胞到离心管中，添加 PBS 溶液混匀、离心、弃上清液，再加入 PBS 溶液调整细胞浓度，得 1×10^5 个/ml~ 1×10^8 个/ml，优选
20 1.5×10^6 个/ml~ 3×10^6 个/ml，最佳为 $1.5 \sim 2.0 \times 10^6$ 个/ml 的淋巴细胞悬液；

作为示例性的说明，可以为 1.5×10^6 个/ml、 1.6×10^6 个/ml、 1.7×10^6 个/ml、 1.8×10^6 个/ml、 1.9×10^6 个/ml、或 2.0×10^6 个/ml 的浓度；

5) 将淋巴细胞悬液分别加入流式管内，然后加入用于标记淋巴细胞亚群的流式抗体，混匀，静置于 2~8 $^{\circ}$ C 避光孵育；

25 6) 加入 PBS 溶液混匀，离心去除未结合的抗体；

7) 样本的完成

①如果立即上机检测，弃去上清，用 2~8 $^{\circ}$ C 的 PBS-EDTA 溶液，混匀，用于流式检测；

②如不能立即检测，加入 0.05-5% 的福尔马林、优选 1% 的福尔马林，
30 混匀，静置于 2~8 $^{\circ}$ C 避光保存；检测前各管加入 PBS 溶液离心弃掉上清

液；用 2~8°C 的 PBS-EDTA 溶液，混匀，用于流式检测；

本发明方法中，作为实施方案之一，所述 PBS 溶液为 pH7.2~7.4 的 0.005-0.05M PBS 溶液；本发明方法中，作为示例的说明，所述 0.005-0.05M PBS 溶液可以为 0.005 M PBS、0.01 M PBS、0.02 M PBS、0.03 M PBS、
5 0.04 M PBS 或 0.05 M PBS 溶液

作为实施方案之一，可选择地，PBS 缓冲溶液中可以含有小牛血清和/或 EDTA，所述小牛血清或 EDTA 的浓度可是本领域常规的浓度。

本发明方法中，作为实施方案之一，所述 PBS-EDTA 溶液为 pH 7.2~7.4 的含有 0.005-0.05M PBS 和终浓度为 2-3mM EDTA 的混合溶液。

10 本发明方法中，作为实施方案之一，本发明所述步骤 1) 进一步包括离心条件：1500~3500rpm、5~30min；优选为 1500-2900rpm、15-20min。

本发明方法中，作为实施方案之一，所述步骤 2) 中血液细胞沉淀与 PBS 溶液的按 1:0.5~1:2、优选 1:1 的体积比例加入。

15 本发明方法中，作为实施方案之一，本发明所述步骤 3) 进一步包括离心条件为 1500-3500rpm，10-20min，4°C；优选 1500-2900rpm，20min，4°C。

本发明方法中，作为实施方案之一，本发明所述步骤 4) 进一步包括离心为条件为 1500-3500rpm 离心 5-20 分钟；优选 1500-2900rpm 下离心 5-10 分钟。

20 本发明方法中，作为实施方案之一，本发明所述步骤 6) 进一步包括离心为条件为 1500-2900rpm 下离心 5-10 分钟。

本发明方法中，作为实施方案之一，所述步骤 6) 中加入 PBS 溶液的量与血液细胞沉淀的等体积的量。

25 本发明方法中，作为实施方案之一，所述步骤 7) 中的 PBS 溶液为 pH7.2~7.4 的 0.005-0.05M PBS 溶液；作为实施方案之一，可选择地，PBS 缓冲溶液中可以含有小牛血清和/或 EDTA，所述小牛血清或 EDTA 的浓度可是本领域常规的浓度；作为实施方案之一，所述 PBS-EDTA 溶液为 pH7.2~7.4 的含有 0.005-0.05M PBS 和终浓度为 2-3mM EDTA 的混合溶液。

30 本发明方法中，作为实施方案之一，所述淋巴细胞包括但不限于淋

巴细胞亚群，可以包括记忆性淋巴细胞和其它需要检测的淋巴细胞亚群，以及针对淋巴细胞亚群的功能性分析和细胞因子分析、树突细胞成熟度检测等。

作为实施方案之一，本发明所述方法包括

5 (一) 外周血中分离人外周血单核细胞

(1) 取离体抗凝外周血液样品

(2) 将血液样品加入到离心管中离心；弃掉上层血浆，得下层血液细胞沉淀；

10 (3) 将血液细胞沉淀与 PBS 溶液按 1:1 体积比进行稀释，得血液细胞稀释液。

(4) 取离心管，加入与血液细胞稀释液等体积的淋巴细胞分离液。

(5) 将血液细胞稀释液缓慢加入到步骤 (4) 的离心管中，保持分离液分层清晰。

(6) 缓慢放入低速离心机内，配平后离心。

15 (7) 离心结束后弃掉上清，得白膜层细胞。

(8) 取白膜层细胞至离心管内，并添加 PBS 溶液，计数后、离心。

(9) 离心后，去除上清液。根据计数结果计算加入 2~8°C 的 PBS 溶液，使细胞密度在 $1.5-3.0 \times 10^6$ 个/ml，即得淋巴细胞悬液；

20 作为示例性说明， 1.5×10^6 个/ml、 2.0×10^6 个/ml、 2.5×10^6 个/ml、 3.0×10^6 个/ml 的浓度。

(二) 制作流式细胞样本

(1) 样本染色

25 流式管内加入淋巴细胞悬液 100 μ l，加入要标记淋巴细胞亚群的流式抗体，混均，2~8°C 避光孵育 10~30 分钟，优选 15~20 分钟，最佳为 20 分钟。

(2) 样本洗涤、加液

孵育后，加入预冷的 PBS 溶液重悬细胞，离心 1500-2900rpm 下离心 5-10 分钟，混均，去除未结合的抗体，即得。

本发明方法中，作为实施方案之一，所述方法包括：

30 (一) 外周血中分离人外周血单核细胞

(1) 取离体抗凝外周血液，其中取 0.2ml 计数，留样 1ml，标记信息，放置 4°C 度冰箱保存；

(2) 将剩余血液加入到离心管中，1500-2900rpm，离心 20min；去掉上层血浆。

5 (3) 剩余血液细胞沉淀与 PBS 溶液按体积比 1:1 进行稀释。

(4) 离心管中加入血液细胞稀释液等量的淋巴细胞分离液。

(5) 将血液细胞稀释液缓慢加入到步骤 (4) 的离心管中，保持分离液分层清晰。

(6) 缓慢放入低速离心机内，配平，1500-2900rpm，离心 10-20min。

10 (7) 离心结束后用移液管缓慢吸取上层上清弃掉。

(8) 吸取中间白膜层细胞至一个新的离心管内，加 PBS 溶液至 10ml，取 200 μ l 细胞悬液，用血细胞计数仪计数。剩余细胞悬液 1500-2900rpm，离心 5-10min。

15 (9) 离心后，弃上清，吸尽残余液体。根据计数结果，加入适量 2~8°C 预冷的 PBS 溶液，调整细胞密度在 1.5-2.0 $\times 10^6$ 个/ml。

作为示例性的说明，可以为 1.5 $\times 10^6$ 个/ml、1.6 $\times 10^6$ 个/ml、1.7 $\times 10^6$ 个/ml、1.8 $\times 10^6$ 个/ml、1.9 $\times 10^6$ 个/ml 或 2.0 $\times 10^6$ 个/ml 的浓度。

(二) 制作流式细胞样本

(1) 样本染色

20 每个流式管内加入 100 μ l 细胞悬液，加入要标记淋巴细胞亚群的流式抗体。并用涡旋振荡器轻缓震荡，2~8°C，避光孵育 10-30 分钟，优选 15~20 分钟，最佳 20 分钟。

(2) 样本洗涤、加液

25 染色结束后，加入 2ml 预冷的 PBS 溶液重悬细胞，1500-2900rpm，离心 5-10min。倒掉上清后加入 400 μ l 2~8°C 的 PBS-EDTA 溶液，混匀即得。

30 本发明解决现有技术中存在的不足问题，本发明采用离心分离出血浆，利用淋巴细胞分离液纯化出单核细胞，抗体孵育后洗涤。目前这种用淋巴细胞分离液和离心辅助的方法，根据淋巴细胞计数定量，加入定量的淋巴细胞，加入相匹配的抗体量，从而解决了现有技术中存在

的问题，同时避免了抗体过饱和，而形成二次结合，也不会因为细胞过多而造成抗体量不足。

与传统的样品相比，本发明富集纯化了淋巴细胞亚群，使得部分粒细胞、红细胞、血小板等背景细胞亚群均被除去，使检测时淋巴亚群分群明显，背景干净，补偿容易，节省抗体，使得流式细胞仪分析检测更加准确便捷。本发明节约了时间及抗体使用量，降低检测成本，使得背景干净、分群清晰明显、微量的亚群如 DC 细胞经过了富集，明显分群，使检测结果更加准确。

10 附图说明

图 1: 试验例 1 中现有技术用溶血素方法即裂解法所得样品的流式细胞图;

图 2: 试验例 1 中本发明实施例 1 所得样品的流式细胞图;

15 图 3: 试验例 1 中本发明实施例 1 所得样品的流式细胞图;

图 4: 试验例 1 中现有技术裂解法所得样品的流式细胞图;

图 5: 试验例 1 中本发明实施例 1 所得样品的流式细胞图;

图 6: 试验例 2 中按实施例 1 方法所得样品与现有技术裂解法所得样品的细胞群对比图 (上边 3 个图为裂解法所得流式细胞图, 下边三图是上边 3 图对应样品的分离法所得的流式细胞图);

20 图 7: 试验例 2 中按实施例 1 方法所得样品与现有技术裂解法所得样品的细胞富集对比图;

图 8: 试验例 2 中按实施例 1 方法所得样品与现有技术裂解法所得样品的不同类型细胞富集对比图。

25 具体实施方式

以下实施例和试验例用于进一步阐述本发明，但不以任何的方式限制本发明的有效范围。

实施例 1 流式检测所需的 PBMC 样本的制备

1、目的

制备流式检测所需的 PBMC 样本（本发明上下中也成称为“样品”）。

2、原理

活细胞表面保留有较完整的抗原或受体，用荧光标记的抗体与细胞表面相应抗原结合，根据所测定的荧光强度和阳性百分率即可知相应抗原的密度和分布。

3、仪器耗材准备

3.1 仪器

苏净超净台，时代北利低速离心机 DT5-4，血细胞分析仪、涡旋振荡器，各量程移液器

3.2 耗材

15ml 离心管，10ml 移液管，1.5ml 离心管，流式管，3ml 巴氏吸管，各量程枪头。

3.3 试剂配制

名称	原液	配制
1×PBS	10×PBS	原液：纯水=1:9 配制
0.05-5%福尔马林	10%福尔马林	原液：1×PBS=1:9 配制
PBS 溶液	1×PBS	1×PBS (0.01M PBS, pH=7.2~7.4)
PBS-EDTA 溶液	1×PBS	向 1×PBS (0.01M PBS; pH=7.2~7.4) 中添加 0.5M EDTA 直至 EDTA 的终浓度为 2.5mM

常规流式检测用抗体：抗 CD3 抗体、lin1[Lineage Cocktail 1]、抗 CD123 的抗体、抗 CD11 的抗体。

4、操作步骤（以抗凝原血样 5ml 为例进行说明）

4.1.外周血中分离 PBMC

（1）取原血 0.2ml 计数。

（2）将剩余血液加入离心管中，1500-2900rpm，离心 15-20min，去

除上层血浆。

(3) 剩余血液细胞沉淀与 PBS 溶液按体积进行稀释。

(4) 准备 1 支离心管，用移液管加入与血液细胞稀释液等体积的淋巴细胞分离液。

5 (5) 将血液细胞稀释液缓慢加入到步骤 4 的离心管中，保持分离液分层清晰。

(6) 缓慢放入离心机内，配平后 1500-2900rpm，离心 15-20min。

(7) 离心结束后用移液管缓慢吸取上清弃掉。

10 (8) 吸出中间白膜层细胞至一个新的离心管内，加 PBS 溶液至 10ml，取 100 μ l 细胞液用全血细胞计数仪计数，以备后续稀释用。剩余细胞悬液 1500-2900rpm，离心 5-10min。

(9) 离心后，弃上清，用 1ml 移液器吸尽残余液体。根据计数结果，加入适量 4 $^{\circ}$ C 度预冷的 PBS 溶液，调整细胞浓度在 1.5-3.0 $\times 10^6$ 个/ml，作为示例性说明，可以 2 $\times 10^6$ 个/ml 的浓度。

15 4.2 制作流式细胞样本（本操作控制温度，全程样品及抗体在冰盒内操作）

(1) 样本染色

每个流式管内加入 100 μ l 细胞液，加入用于标记淋巴细胞亚群的流式抗体，使抗体与细胞充分混均，2~8 $^{\circ}$ C，避光孵育 20 分钟。

20 (3) 样本洗涤

染色结束后，加入 2ml 预冷的 PBS 溶液重悬细胞，1500-2900rpm，离心 5-10min。

(4) 样本完成

25 ①如果立即上机检测，则弃去上清，用预冷的 PBS-EDTA 溶液 400 μ l 混匀细胞，用于流式检测。

②如不能立即检测，则用 0.05-5% 福尔马林 500 μ l 悬起细胞，充分混匀，2~8 $^{\circ}$ C 避光保存。检测前各管加入 2ml PBS 溶液，1500-2900rpm，离心 5-10min，弃掉上清。用预冷的 PBS-EDTA 溶液 400 μ l，混匀细胞，上机检测。

试验例 1 本发明制备样品与用血溶素处理方法所得样品的对比试验

1.1 样品和试剂:

本发明淋巴细胞样品: 取离体血液样本按实施例 1 方法制备即得;

5 对比淋巴细胞样品: 取离体血液样本按取离体血液样本 1.2.1 部分中
用血溶素处理法处理所得

5ml 抗凝血样;

PBS 溶液: 10×PBS 溶液: 纯水按照 1:9 体积比配制

10 PBS-EDTA 溶液: 向 1×PBS 中加入 0.5M EDTA 直至 EDTA 的终浓
度为 2.5mM;

常规流式检测用抗体: 抗 CD3 抗体、lin1[Lineage Cocktail 1]、抗
CD123 的抗体、抗 CD11 的抗体;

1.2 试验方法:

1.2.1 血溶素处理方法:

15 (1) 样本染色: 每个流式管内加入 100 μ l 抗凝血液样本, 加入要标
记淋巴细胞亚群的流式抗体。并用涡旋振荡器轻缓震荡, 使抗体与细胞
充分混均, 2~8 $^{\circ}$ C, 避光孵育 20 分钟。

(2) 裂解: 向流式管中加入 2ml 1×BD 溶血素 (即红细胞裂解液),
5 分钟。

20 (3) 样本洗涤: 5 分钟后, 离心, 1500-2900rpm, 10 分钟, 离心结
束后, 弃掉上清, 加入 2ml 预冷的 PBS 溶液重悬细胞, 1500-2900rpm,
离心 5-20min。倒掉上清后加入 400 μ l 2~8 $^{\circ}$ C PBS-EDTA 溶液, 涡旋 3 秒
混匀, 即得对比淋巴细胞样品。

1.2.2 上流式细胞仪检测方法:

25 a) 开机前检查仪器状态;

b) 对流式细胞仪系统进行开机预热 5~10 分钟, 进行灌注;

c) 进行质控程序, 通过以后进行下一步;

d) 设置仪器各个参数, 调节各个检测通道的电压, 调节液流速度为
35~40 μ l/min;

e) 分别取制备好的本发明淋巴细胞样品和对比淋巴细胞样品涡旋振荡 3 秒, 分别进行检测。设置条件: 门内 15000 个细胞; 采集样品。

1.3 实验结果:

5 本发明制备的样品与用溶血素处理的方法处理样品对比观察结果如下:

1.3.1 用溶血素处理的方法处理样品观察如下: 所得的细胞群, 可以看出细胞较少, 细胞群过于紧密, 且其中的一部分粒细胞与淋巴细胞粘连严重, 分不清楚式哪一个群; 细胞碎片较多且弥散, 具体参见图 1。

10 本发明所得样品观察如下: 分离富集后细胞数量较多, 分群明显, 界限清晰, 且粒细胞那部分粘连的细胞群也在处理过程中去除了, 具体参见图 2。

对比图 1, 图 2 所得的细胞, 本发明样品成功实现了分离富集后细胞数量较多, 分群明显, 界限清晰, 且粒细胞那部分粘连的细胞群也在处理过程中去除了。

15 1.3.2 本发明制备的样品与用溶血素处理的方法处理样品富集细胞对比观察结果如下:

20 图 3、4、5 染色为抗体 lin1[Lineage Cocktail 1]、抗 CD123 的抗体、抗 CD11 的抗体; FITC 是第一通道, 染色的为抗体 lin1[Lineage Cocktail 1]; PerCP 是第三通道, 染色为抗 CD123 的抗体; APC 是第 4 通道, 染色的为抗 CD11 的抗体。其中, 图 4 是通过溶血素的方法得到的细胞图; 图 5 是通过淋巴细胞分离液和离心的方法得到的流式细胞图。比较明显的图 5 中细胞较图 4 中得到富集。

25 从细胞数目上看, 本发明样品中细胞富集效果更高。具体分析过程如下: 首先画直方图, 圈门 1: FL1-, 然后在门 1 内, 圈 FL3-H, FL4-H 子细胞群-1, 即细胞表面标志 $lin1^-CD123^+CD11C^-$ 代表浆细胞源性 DC 细胞 (pDC);

细胞表面标志 $lin1^-CD11C^+$ 代表髓细胞源性 DC 细胞 (mDC); 其中, 在流式细胞检测领域中, 能收集到的细胞相对越多, 越准确。比较明显的上图 5 中 mDC 细胞和 pDC 细胞的数量和分群都优于图 4。

30

试验例 2 本发明制备样品与血溶素裂解法所得样品的对比

2.1 样品和试剂:

本发明淋巴细胞样品: 取离体血液样品按实施例 1 方法制备, 即得。

对比淋巴细胞样品: 取离体血液样品按如下 2.2.1 部分方法制备即
5 得;

5ml 抗凝血样;

PBS 溶液: 10×PBS 溶液: 纯水按照 1:9 体积比配制;

PBS-EDTA 溶液: 向 1×PBS 中添加 0.5M EDTA 直至 EDTA 的终浓度
为 2.5mM;

10 常规流式检测用抗体: 抗 CD3 抗体、lin1、抗 CD123 的抗体、抗 CD11
的抗体、CD3 FITC、CD8PerCP、CD4PerCP。

2.2 试验方法:

2.2.1 血溶素裂解法处理方法:

15 (1) 样本染色: 每个流式管内加入 100μl 抗凝血液样本, 分别加入
要标记淋巴细胞亚群的流式抗体。使抗体与细胞充分混均, 2~8°C, 避光
孵育 20 分钟。

(2) 裂解: 向流式管中加入 2ml 1×BD 溶血素 (即红细胞裂解液), 5
分钟。

20 (3) 样本洗涤: 5 分钟后, 离心, 1500rpm, 10 分钟, 离心结束后,
弃掉上清, 加入 2ml 预冷的 PBS 溶液重悬细胞, 1500rpm, 离心 5min。
倒掉上清后加入 400μl 2~8°C PBS-EDTA 溶液, 混匀即得。

2.2.2 上流式细胞仪检测方法:

a) 开机前检查仪器状态;

b) 对流式细胞仪系统进行开机预热 5~10 分钟, 进行灌注;

25 c) 进行质控程序, 通过以后进行下一步;

d) 设置仪器各个参数, 调节各个检测通道的电压, 调节液流速度为
优选 35~40μl/min;

e) 分别取制备好的本发明淋巴细胞样品和对比淋巴细胞样品涡旋

振荡 3 秒，分别进行检测。设置条件：门内 15000 个细胞；采集样品。

2.3 实验结果：

2.3.1 通过对比可以看出裂解得到样品碎片多，背景不干净，影响流式细胞仪数据的收集和分析，对淋巴细胞补偿调整可能引起偏倚现象；

5 本方法（淋巴细胞分离液分离方法）使得背景干净、分群清晰明显（参见图 6）。

其中，通过观察裂解法得到的淋巴细胞亚群分析的图中圈的门内为淋巴细胞，由图可见淋巴细胞群和细胞碎片群分的很不理想（参见图 6 第一排三幅图）。

10 本发明所得到的淋巴细胞亚群分析的图中圈的门内为淋巴细胞群，由图可见淋巴细胞群和细胞碎片群分的很开，很理想（参见图 6 第二排三幅图）。

2.3.2 图 7 可以看出：本发明在使用荧光抗体时，由于是检测了淋巴细胞数量，根据比例添加荧光抗体，节约了 70% 以上的抗体，本发明检测时组合抗体的使用量为 15 μ l，而裂解法的使用量为 60 μ l。而本发明法不会造成抗体过量或不足。由图 7 可知：1 组标记的均是 CD3 FITC、CD8PerCP；2 组标记的均是 CD3 FITC、CD4PerCP。由于处理方法所得样品的不同，对于同一份离体外周血样品，其结果为裂解法得到的样品中的双阳性群比例明显减少，且抗体用量无法进行定量；而本发明方法得到的样品可以根据细胞的量进行抗体定量添加，除此之外，很明显，
20 分离法细胞得到了一定程度的富集。

2.3.3 图 8 可以看出：本发明制得的样品对于细胞亚群比例较小的样本，具有富集作用。同一份离体外周血样品，细胞亚群 mDC 和 pDC 所占比例比较小，在裂解法和本发明方法下，其所得样品的观察结果是不同的，本发明所得到样品中的细胞亚群都得到了富集。从细胞数目和百分比上看都可证明。
25

权利要求

1、一种供流式细胞仪分析的免疫细胞中的淋巴细胞样品的制备方法，其特征在于，所述方法包括：

5 1) 取离体抗凝血液样品离心，分离血浆和血液细胞沉淀，得血液细胞沉淀；

 2) 将血液细胞沉淀与 PBS 溶液进行混合，得血液细胞稀释液；

 3) 将血液细胞稀释液加入到含等体积量的淋巴细胞分离液的离心管中离心，去除血浆，得白膜层细胞；

10 4) 将白膜层细胞加入到离心管中，然后添加 PBS 溶液混匀，离心，弃上清液，然后加入 PBS 溶液调整细胞浓度，得 1×10^5 个/ml~ 1×10^8 个/ml 浓度的淋巴细胞悬液；优选浓度 1.5×10^6 个/ml~ 5×10^6 个/ml，进一步优选浓度 $1.5 \sim 3.0 \times 10^6$ 个/ml；

 5) 取淋巴细胞悬液加入流式管内；并加入用于标记淋巴细胞亚群的流式抗体，混匀，静置并在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 下避光孵育；

 6) 加入 PBS 溶液，混匀，离心并去除未结合抗体；

 7) 样本的完成

 ①如果立即上机检测，弃去上清，用 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 的 PBS-EDTA 溶液，混匀，用于流式检测；或

20 ②如不能立即检测，加入福尔马林溶液，混匀，静置于 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 避光保存；检测前各管加入 PBS 溶液离心弃掉上清液；用 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 的 PBS-EDTA 溶液，混匀，用于流式检测。

25 2、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述 PBS 溶液为 pH7.2~7.4 的 0.005-0.05M PBS 溶液；所述 PBS-EDTA 溶液为 pH 7.2~7.4 的含有 0.005-0.05M PBS 和终浓度为 2-3mM EDTA 的混合溶液。

 3、根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述步骤 1) 进一步包括离心条件为 1500~3500rpm，5~30min；优选为 1500-2900rpm，15-20min。

4、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤2)中血液细胞沉淀与PBS溶液按1:0.5~1:2，优选1:1的体积比例加入。

5 5、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤3)进一步包括离心条件为1500-3500rpm，10-20min，4°C；优选1500-2900rpm，20min，4°C。

6、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤4)进一步包括离心条件为：1500-3500rpm离心5-20分钟；优选离心条件为1500-2900rpm，离心5-10分钟。

10 7、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤6)进一步包括离心条件为1500-2900rpm离心5-10分钟。

8、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤6)中加入PBS溶液的量与血液细胞沉淀的等体积的量。

9、根据权利要求1所述的方法，其特征在于，所述步骤7)样品的后处理：

15 ①立即用于上机检测时，则弃去上清，用2~8°C的PBS-EDTA溶液，混匀，用于流式检测；或

20 ②不用于立即检测时，加入0.05-5%福尔马林溶液、优选1%的福尔马林溶液悬起细胞，混匀，静置于2~8°C避光保存；检测前各管加入PBS溶液，离心，弃掉上清液，用2~8°C的PBS-EDTA溶液，混匀，用于流式检测。

10、根据权利要求9所述的方法，其特征在于，所述PBS溶液为pH 7.2~7.4的0.005-0.05M PBS溶液；所述PBS-EDTA溶液为pH 7.2~7.4的含0.005-0.05M PBS和终浓度为2-3mM EDTA的混合溶液。

25 11、根据权利要求1~10任一所述的方法，其特征在于，所述方法包括：

(一)人外周血单核细胞的分离

(1)取离体抗凝外周血液样品计数；

(2)将血液样品加入到离心管中离心；去除上层血浆，得下层血液细胞沉淀；

(3) 剩余血液细胞沉淀与 PBS 溶液按 1:1 进行稀释，得血液细胞稀释液；

(4) 取离心管，加入与血液细胞稀释液等体积的淋巴细胞分离液；

5 (5) 将血液细胞稀释液缓慢加入到步骤 (4) 的离心管中，保持分离液液面分层清晰；

(6) 缓慢放入离心机内，配平后离心；

(7) 离心结束后弃掉上层血浆，得白膜层细胞；

(8) 取白膜层细胞至离心管中，并添加 PBS 溶液、计数后离心；

10 (9) 离心后，去除上清液，根据结果计数，加入 2~8°C 预冷的 PBS 溶液，使得到 $1.5-3.0 \times 10^6$ 个/ml 浓度的淋巴细胞悬液；

(二) 制作流式细胞样本

(10) 样本染色

向流式管内加入淋巴细胞悬液，加入相应抗体，混均，2~8°C 避光孵育 10~30 分钟，优选 15-20 分钟，最佳 20 分钟；

15 (11) 样本洗涤

染色后，加入 2~8°C 预冷的 PBS 溶液重悬细胞 1500-2900rpm，离心 5-10min，去除未结合的抗体，即得。

20

25

30

摘要

本发明涉及医药领域，提供一种流式细胞仪的淋巴细胞样品的制备方法，其包括：取抗凝血液样品离心，得血细胞沉淀，用 PBS 溶液稀释，
5 然后加入到含有淋巴细胞分离液的离心管中离心，弃掉血浆，得白膜层细胞；然后加入到离心管中，添加 PBS 溶液，离心弃上清液，再加入 PBS 溶液调节细胞浓度，将细胞溶液加入流式管内；然后加入抗体充分混均，避光孵育；离心并弃掉上清液，加入预冷的 PBS-EDTA 溶液重悬细胞，
10 即得。本发明方法得到的样品富集纯化了淋巴细胞，充分保存了淋巴细胞的活性，尽可能去除粒细胞、红细胞、血小板等其它血液成分，使需要检测的亚群分群明显纯化，分析检测更加准确，节省了分析抗体和试剂成本。

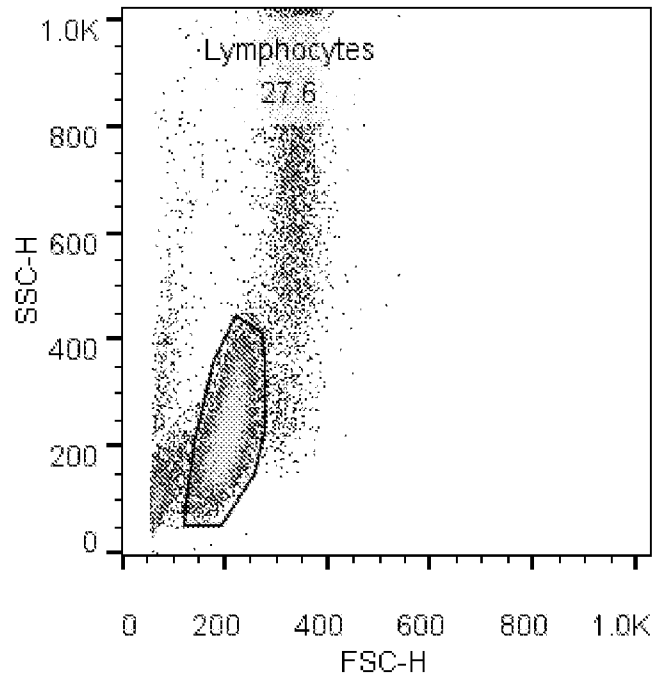


图 1

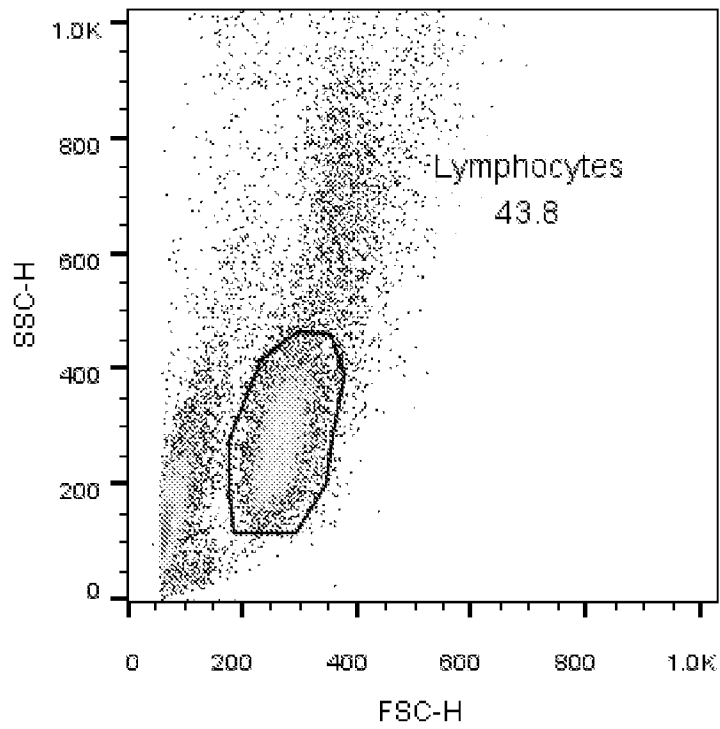


图 2

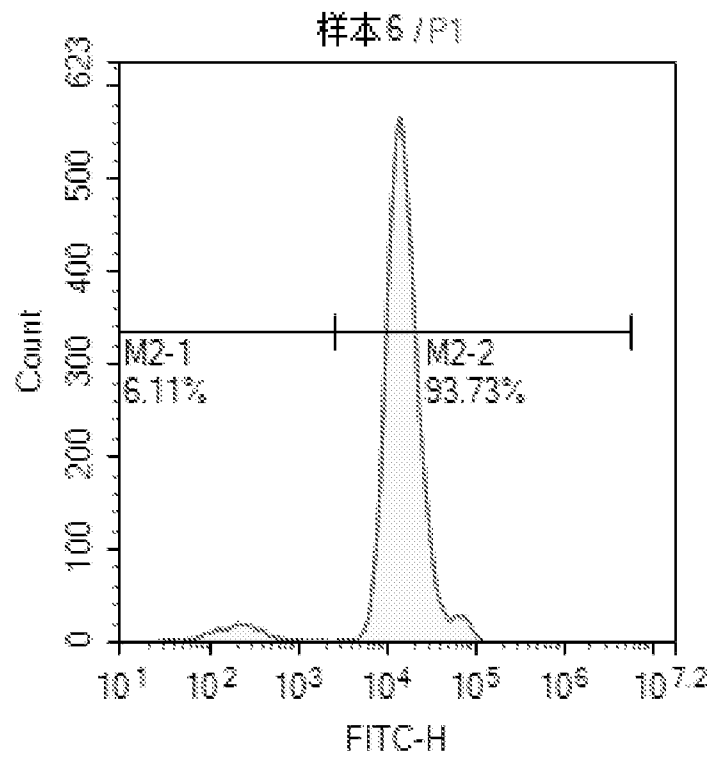


图 3

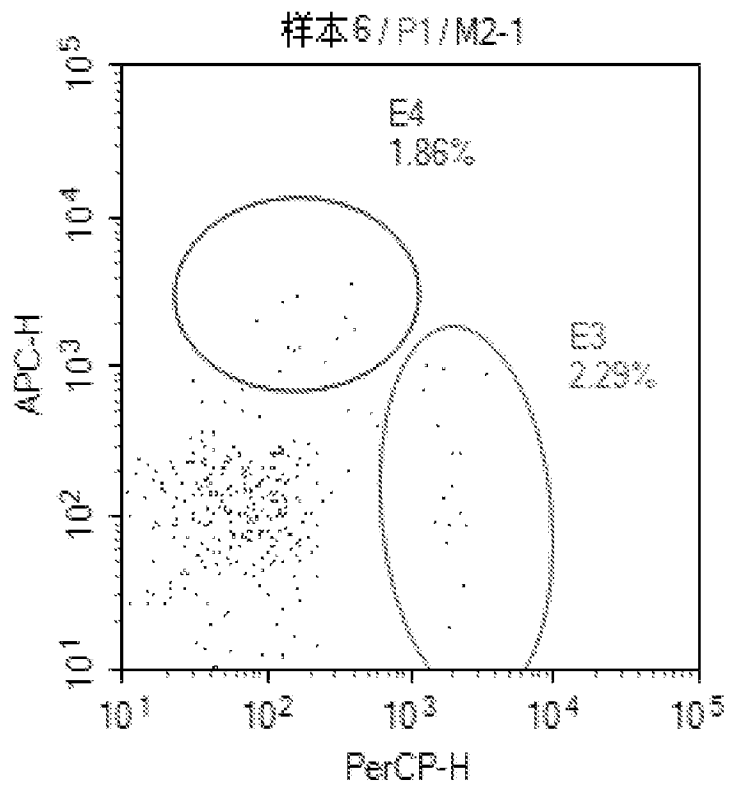


图 4

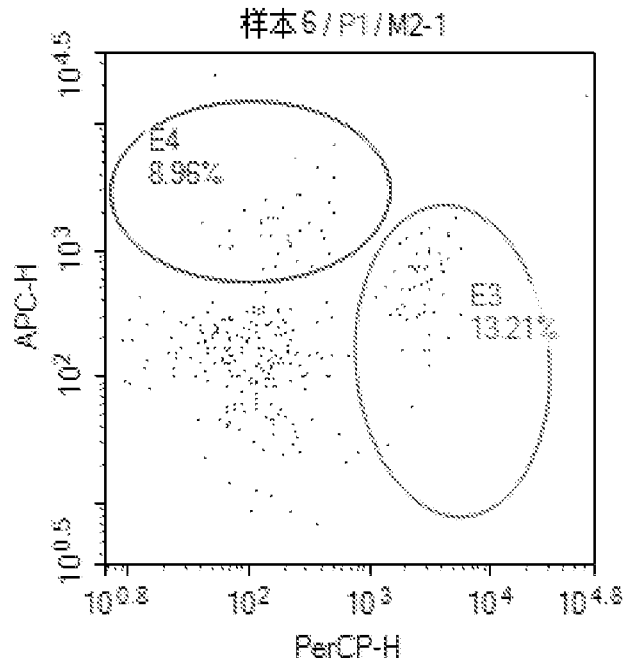


图 5

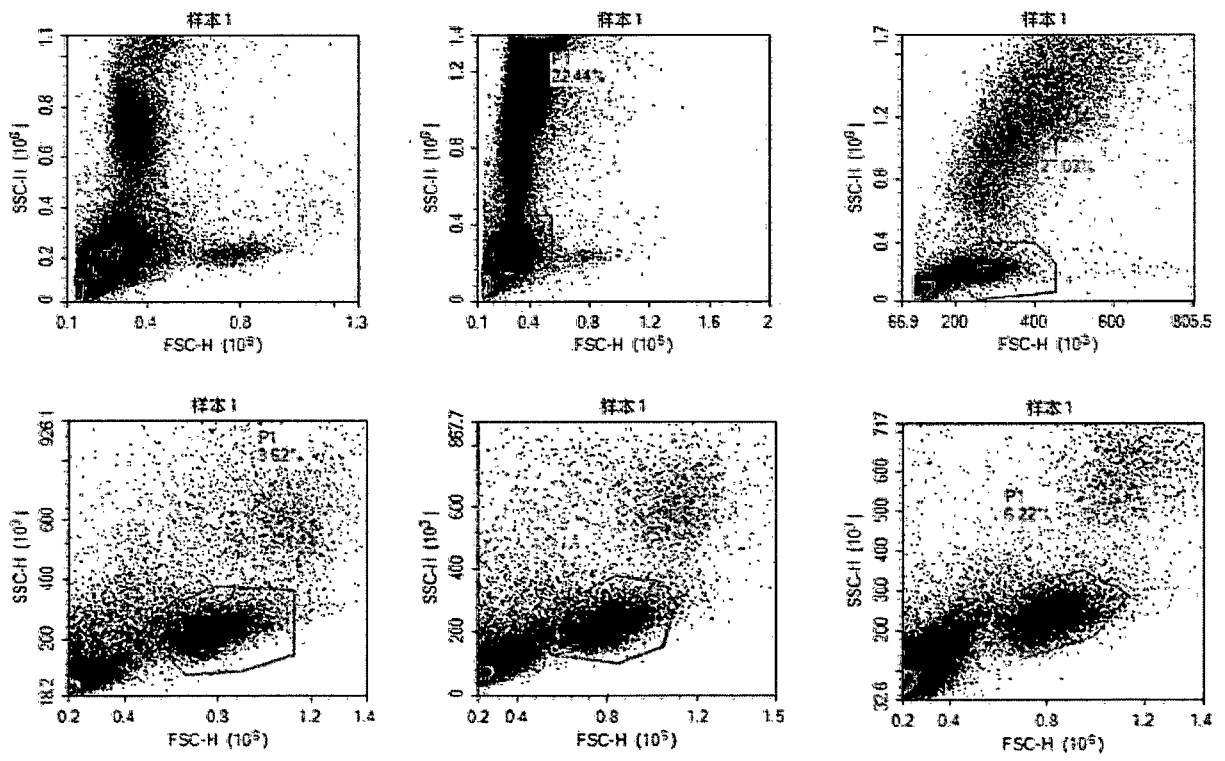
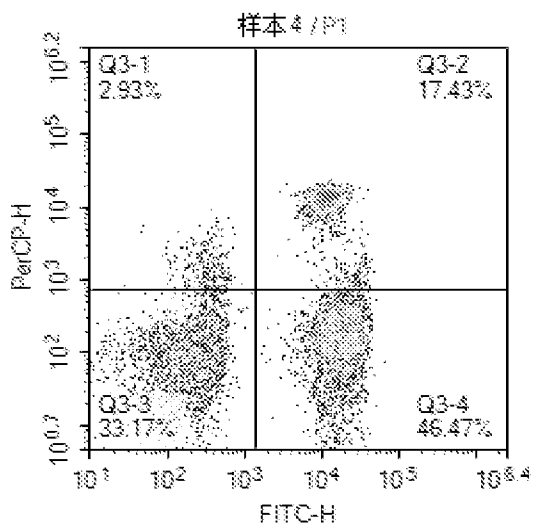
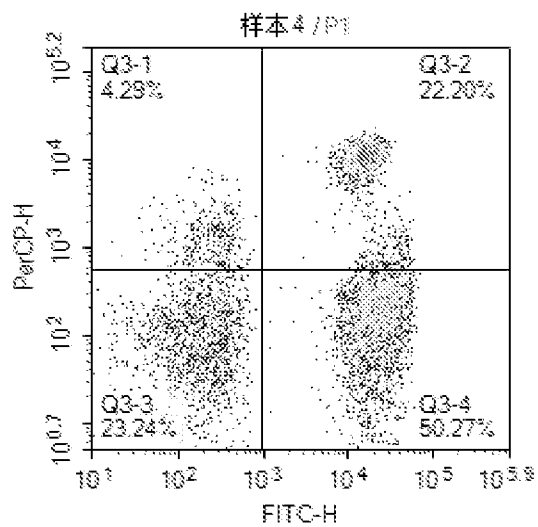


图 6



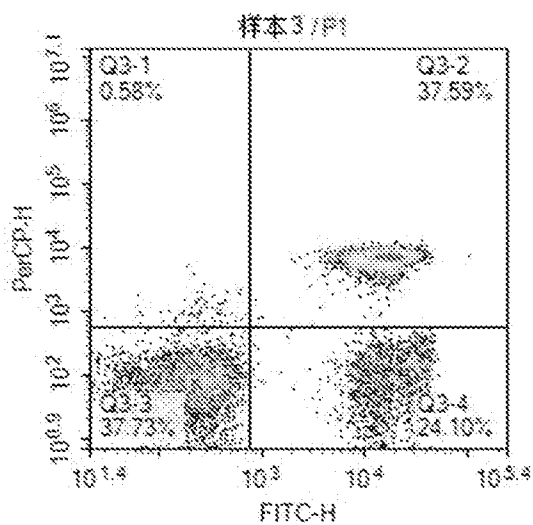
裂解法

1 组 (1)



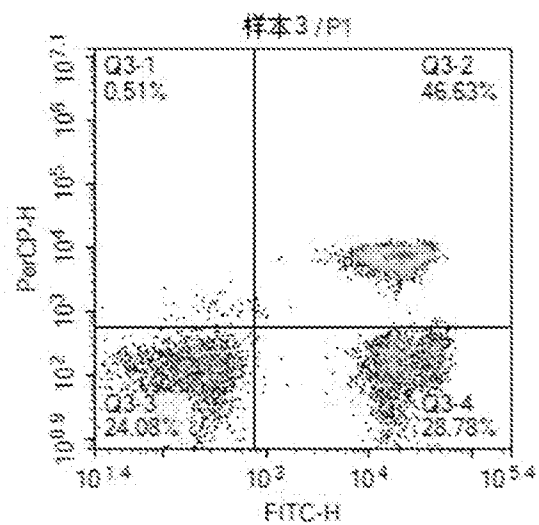
分离法

1 组 (2)



裂解法

2 组 (1)



分离法

2 组 (2)

图 7

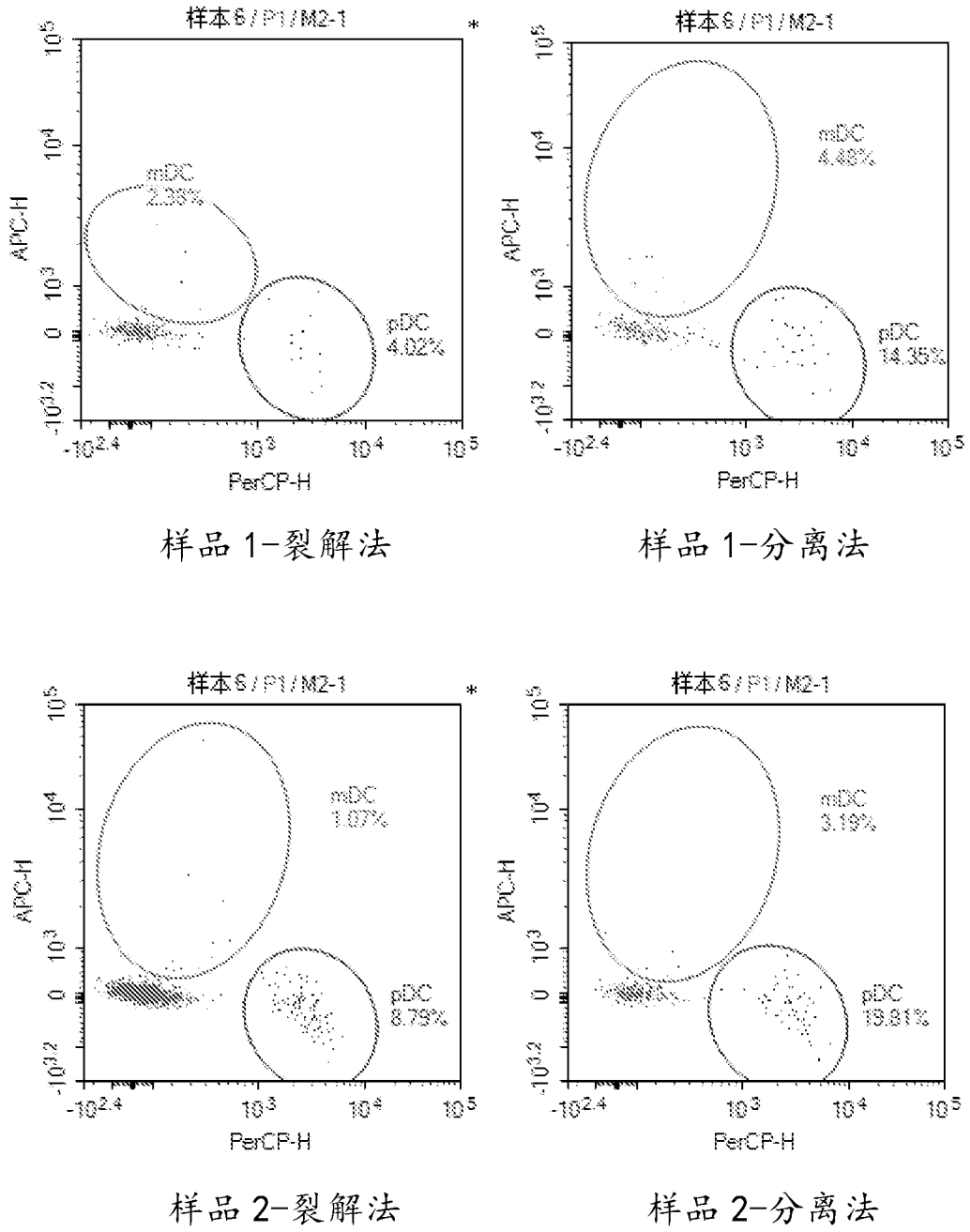


图 8