

Analysis By  
**ABEL**  
Emitted Light

# 细胞活力分析测试

测试自由基或其他活性物质的产生

**KSL**  
Knight Scientific Ltd

# ABEL细胞活力测试 ( PHOLASIN™ )

ABEL™ (发光测试分析) 细胞活性分析试剂盒针对检测全血和分离的细胞中产生的白细胞性的自由基和其他活性物质。这发生在超氧化物产生的NADPH氧化酶系统激活过程中, 称之为呼吸爆发。这个测试也可以用于检测其他类型的包含NADPH氧化系统的细胞的超氧化物的产生 (如纤维原细胞, ), 同样可以用于如黄嘌呤/黄嘌呤氧化酶等酶系统产生的超氧化物分析。此外, 此试剂盒能够被用于检测白细胞脱粒和确定倾向于脱粒的细胞。

这些独特的化学发光分析仅需要 1µl 的全血或几千个细胞就可以, 并在 10 分钟内完成。

试剂盒包含有独特的发光蛋白Pholasin™, 细胞刺激剂PMA和fMLP, 以及配置和测试所需的缓冲液。针对全血测试的试剂也包含有血稀释缓冲液和稀释管, 并有佐剂增强发光信号。

细胞活性测试试剂盒简单易用, 快速, 超敏感 (能用于毛细血管血), 化学发光测试实时的自由基产生和脱粒。

它们能用于:

- 测试白细胞的呼吸爆发;
- 研究 NADPH 氧化酶的异常, 如发生在不同类型的 CGD 和多种多样性中
- 区分受体活性和细胞内 NADPH 氧化酶活性;
- 检测 NADPH 氧化酶对感染, 发炎和医学干涉等的活性变化, 因此可应用于:
  - ◇ 生物相容性监测
  - ◇ 药物评估和测试
  - ◇ 疫苗的 QC
  - ◇ 外科
  - ◇ 疾病管理
  - ◇ 评估在化疗, 移植后的嗜中性粒细胞的活性
- 监测髓过氧化物酶的脱粒;
- 超敏感检测多种细胞, 如脑细胞, 产生的自由基和氧化物。

NADPH 氧化酶在激活时形成一个蛋白复合物, 在细胞膜内侧组装。这有一个超氧化物的连续流, 它是通过细胞膜到氧的持续电子转移 (从 NADPH) 释放到细胞外。这个”呼吸爆发”用于描述上述事件, 因为大量的氧 (比正常的高 10-20 倍) 在葡萄糖氧化成 NADPH

的过程中消耗掉了，它的逆反不是通过线粒体的呼吸来进行的。NADPH 氧化酶的膜成分也发生在次级颗粒膜上，在脱粒过程中次级颗粒膜与其他的颗粒融合，也包括细胞膜。频繁的脱粒伴随着的是依赖于刺激剂的氧化酶的激活。因为过量的自由基，氧化物和酶释放到细胞外。那些测试细胞内超氧化物歧化产生的过氧化氢只是对呼吸爆发的一小部分进行了定量测试。

## Pholasin™ 的介绍

Pholasin™ 是来自海洋岩生的生物发光软体动物—*Pholas dactylus* 的发光蛋白。Pholasin™ 自身不会发光，需要有启动剂。白细胞（和其他细胞类型）产生的自由基和其他的反应氧能够激活 Pholasin™ 发光。Pholasin™ 能超敏感检测到被激活的白细胞。

Pholasin™ 在以下物质存在下能够发光：

- 自由基：超氧阴离子，单线氧，羟基自由基和/或过渡自由基
- 氧化物如：次氯酸和次溴酸，氯胺，溴胺和 peroxynitrite
- 酶：过氧化物酶和特定的氧化酶

## 临床意义

不同类型的白细胞用不同的途径对不时进入体内的外来细菌和病毒做出反应。一个重要的反应是负责超氧阴离子（可以转换成过氧化氢）产生的酶系统的激活。这些细胞也可以正常地释放出含有这些酶的颗粒，产生反应氧类物质如次氯酸和次溴酸。

例如在心脏中，伴随心脏病的是白细胞移除死细胞。这些活力对辅助恢复是重要的。实际上，没有这些细胞我们的生命就不能存活，甚至是很小的感染。然而在它们的工作中，这些细胞大量聚集释放出破坏性的反应氧（ROS）和颗粒酶到受伤组织，并引起炎症。在小范围，炎症能够辅助伤口愈合。但是一般炎症是破坏性的，当它失去控制时会导致一个接一个的器官的破坏，甚至是杀死个体。

这有许多的疾病和状况中自由基，反应氧和氮类物质发挥着重要作用。白细胞是这些反应的主要制造者，经常预示着这些疾病的病理学和进程。

## 白细胞功能

- 它们可以直接被激活和产生超氧化物，其中一些可能转变成过氧化氢。
- 它们可以脱粒和释放出大量的酶。
- 它们可以因为其他物质（细胞因子，趋化因子，补体，病毒，细菌，毒物，外来物质等）而致敏，对后来刺激因子的响应增强或减弱。
- 它们可以离开这个循环而迁移到炎症位点，它们被进一步激活而产生自由基和脱粒。
- 它们的蛋白水解酶可以破坏组织，例如肺和肾。
- 初级脱粒酶和髓过氧化物酶涉及：
  - ◇ 通过产生次氯酸和较长寿命的氯胺而破坏组织，如软骨。
  - ◇ 在正常环境下通过激活抗水解蛋白酶阻止蛋白酶，如胰肽酶（另一颗粒酶）来损害组织。

## ABEL™ 测试介绍

- 它们可以监测 NADPH 氧化酶系统激活的动力学情况。
- 它们可以监测细胞超氧化物的产生和细胞外释放。
- 它们可以确定细胞是否被激活。
- 它们可以确定被致敏的细胞。
- 它们可以预览外周血循环的细胞可能对炎症位点的反应。
- 它们可以用于确定所谓“正常”控制下的白细胞的异常性。
- 它们可以用于确定患者的并发症的危险性：
  - ◇ 手术过程
  - ◇ 与医疗器械材料接触如用于肾透析和心肺旁路材料。
- 它们可以用于监测炎症性疾病或并发症的进程和病人对药物干涉的反应。

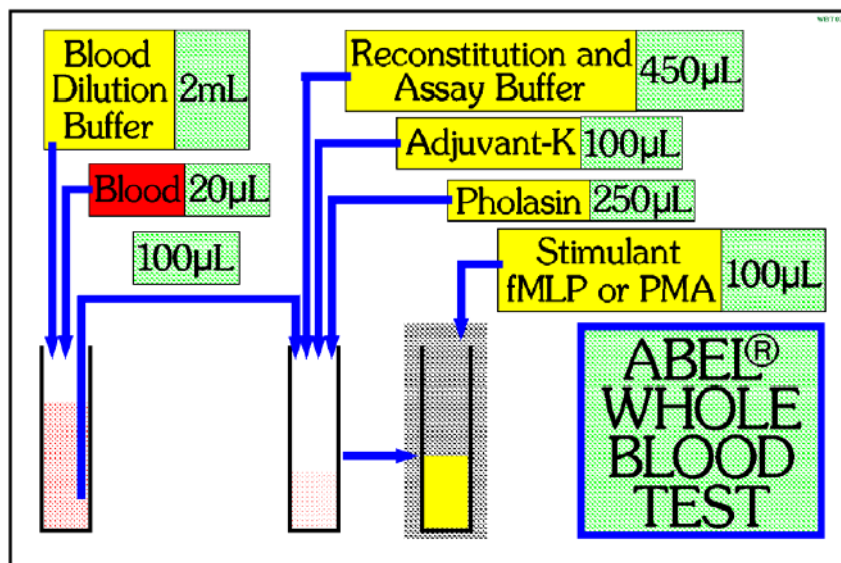
## 测试原理

这个测试通过刺激细胞的NADPH氧化酶系统，如嗜中性细胞，嗜曙红细胞，单核细胞和巨噬细胞。在有Pholasin™存在时，不管是分离的或稀释的全血，检测相关的发光响应。试剂盒中提供的这两个能够激发呼吸爆发的刺激剂是：受体刺激剂fMLP和佛波醇PMA。PMA能够进入细胞和激活蛋白激酶C。同时存在fMLP和PMA能够使在次级颗粒膜上的NADPH氧化酶激活。实际上PMA激活了整个细胞的NADPH氧化酶，但是比fMLP的效应来的慢；它同样促进脱粒。

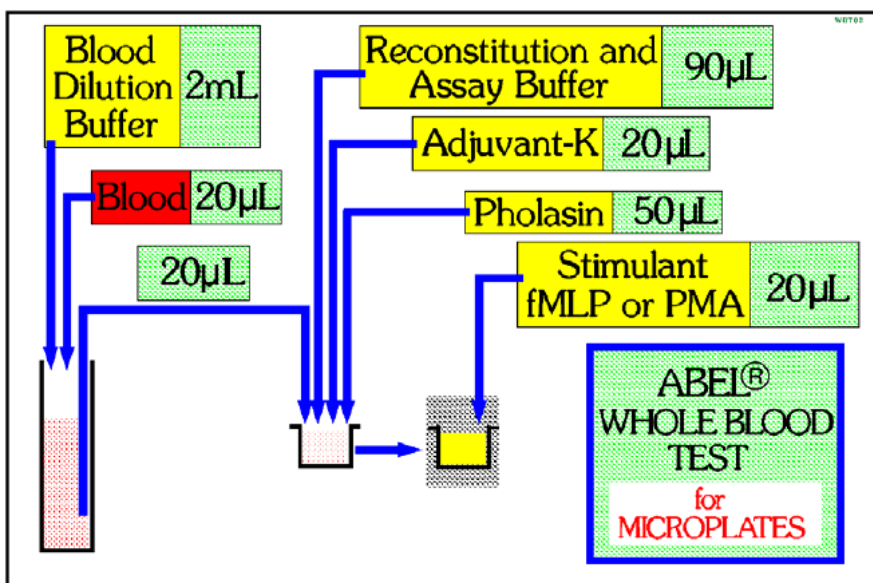
在测试试剂盒中提供了 fMLP 和 PMA，其他的介质如血小板激活因子（PAF），抗-Fc受体抗体和脂多糖（LPS）也可能使用。一些低浓度的介质可能引起细胞致敏，可能是通过受体的上调引起的，因此它们随后以一种加强的方式来响应进一步的刺激。

## 全血测试程序：管式化学发光仪

- 用 2ml 的全血稀释缓冲液将 20 $\mu$ l 全血按照 1: 100 的稀释度进行稀释；100 $\mu$ l 的被稀释血液用于每管的分析
- 测试管中有：100 $\mu$ l被稀释的血液，450 $\mu$ l分析缓冲液，250 $\mu$ l Pholasin™ (2.5ug)，100 $\mu$ l Adjuvant-K (1 个单位的增强剂)。
- 注意Pholasin™可以在试管进入发光仪之前或之后加入。
- 混合物在 37 孵育 1 分钟。
- 每秒钟测试 1 次总共 60 秒（光值读数是每秒钟所检测到的光的总和，表达为相对光单位，在一些发光仪中，也可表示为 mV）。
- 1 分钟后加入刺激剂。
- 加入刺激剂后，光测试时间为：以 fMLP 为刺激物的为 5 分钟，PMA 或 fMLP 和 PMA 混合物为 8-10 分钟。

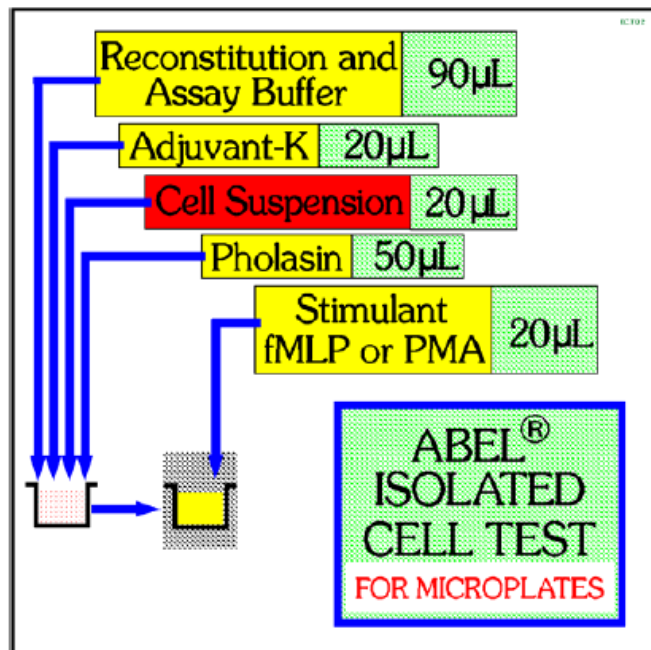
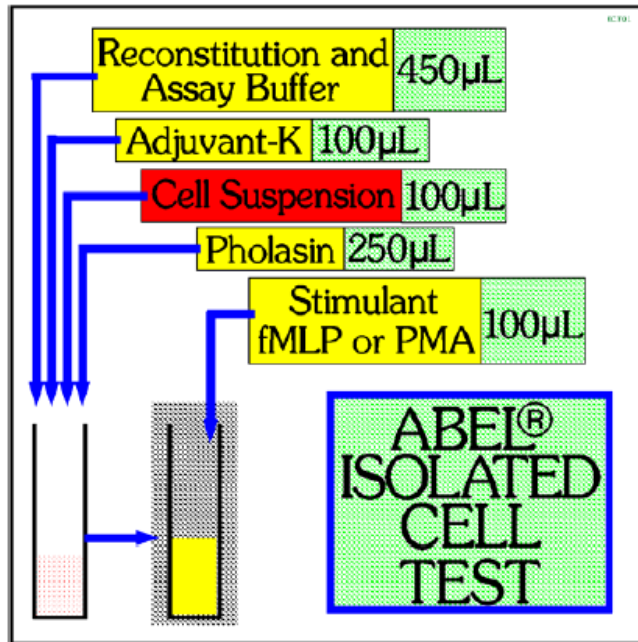


全血测试程序：微孔板形式

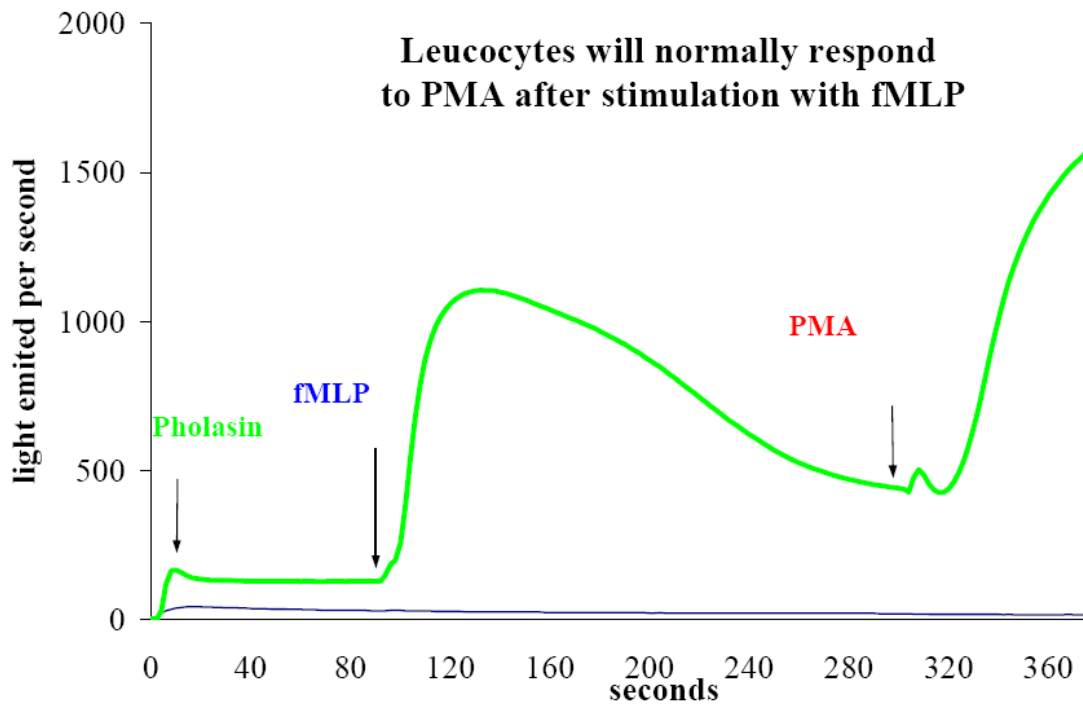
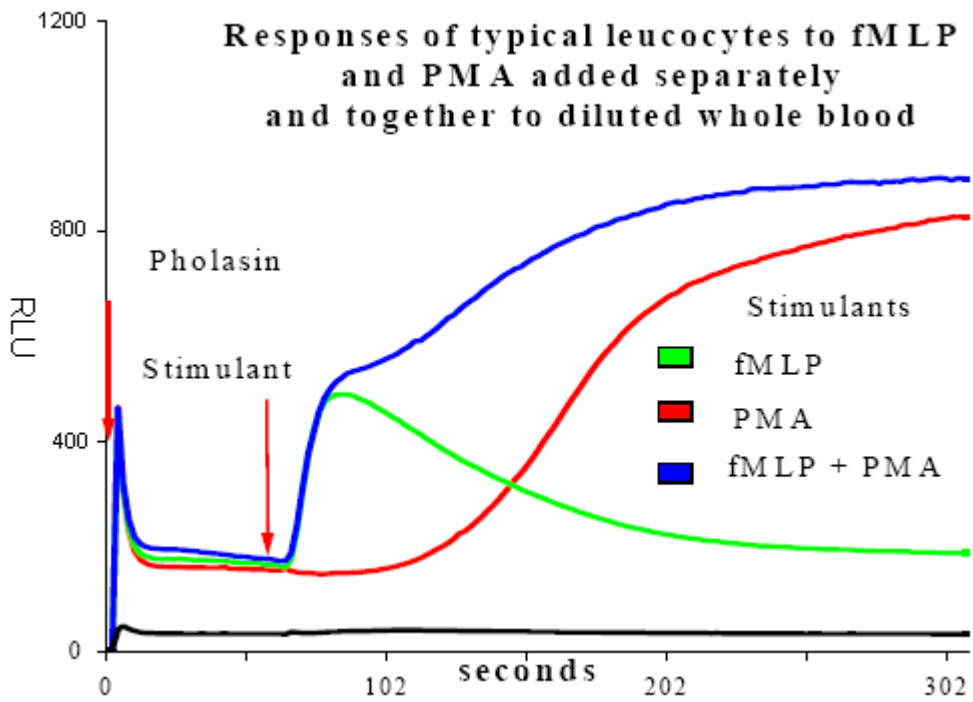


### 分离细胞的测试程序

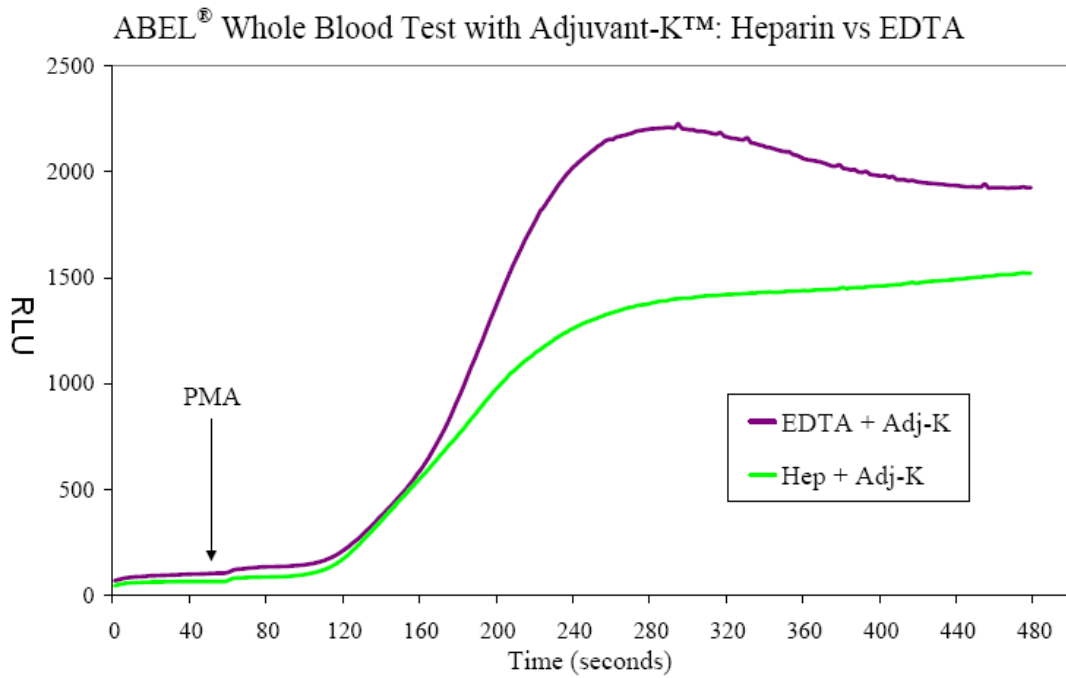
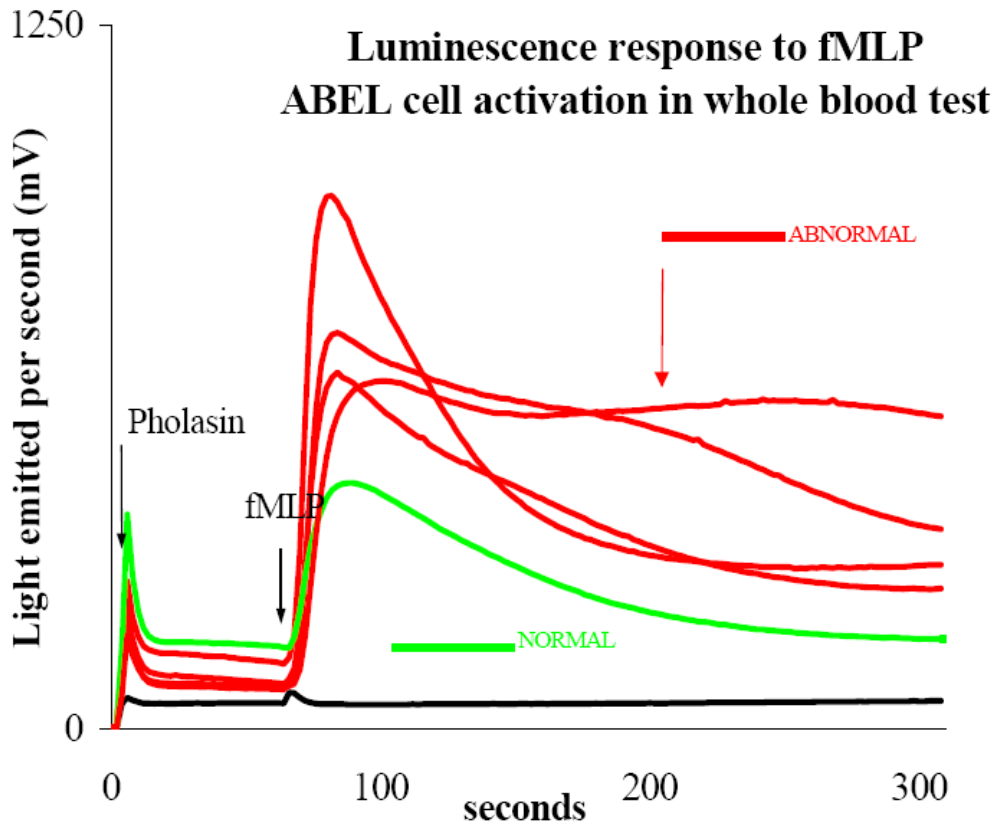
- 从血液中分离的细胞，灌洗液，分泌液，或组织培养物等与分析缓冲液混合，然后取出 100µl（管式化学发光仪）或 20µl（微孔板式化学发光仪）的细胞悬浮液用于每个分析。
- 试剂盒中包含有 Adjuvant-K。在测试中是否需要 Adjuvant-K 决定于细胞类型和细胞数目。第一次首先需要进行有和无 Adjuvant-K 的测试。
- 其他的程序与全血的测试程序一致。



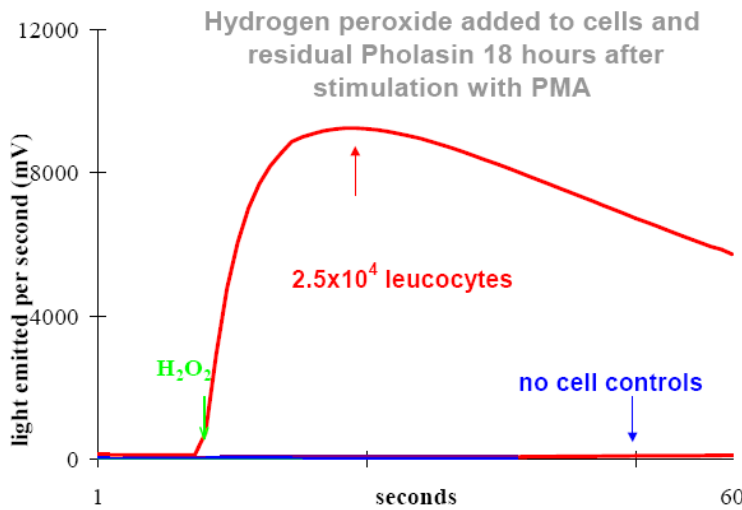
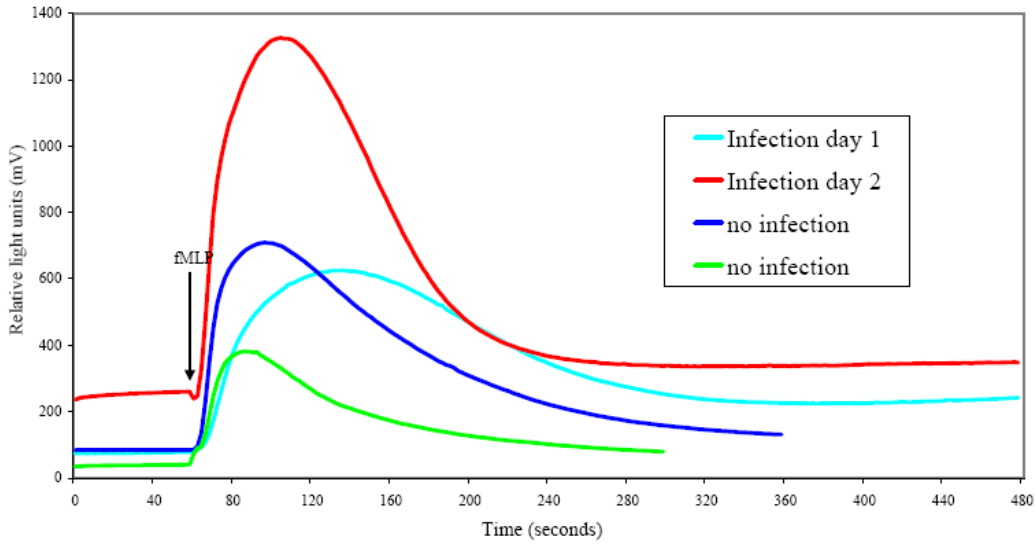
## 典型分析



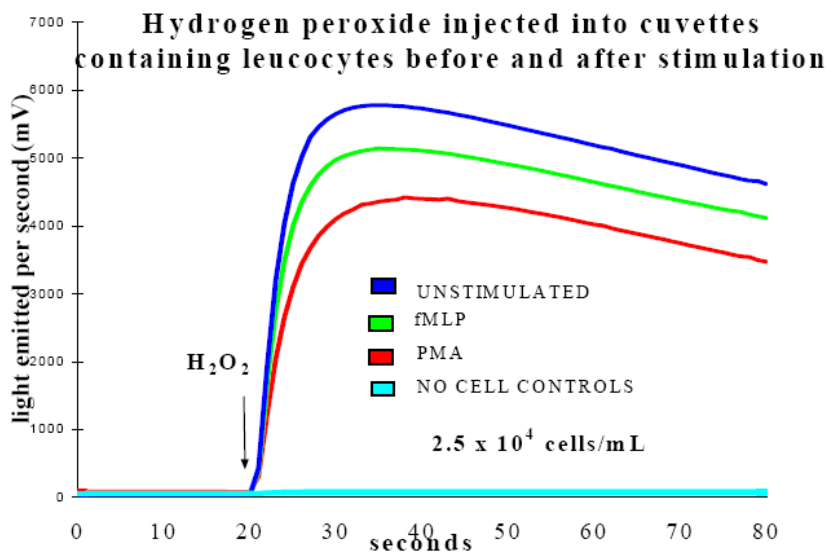




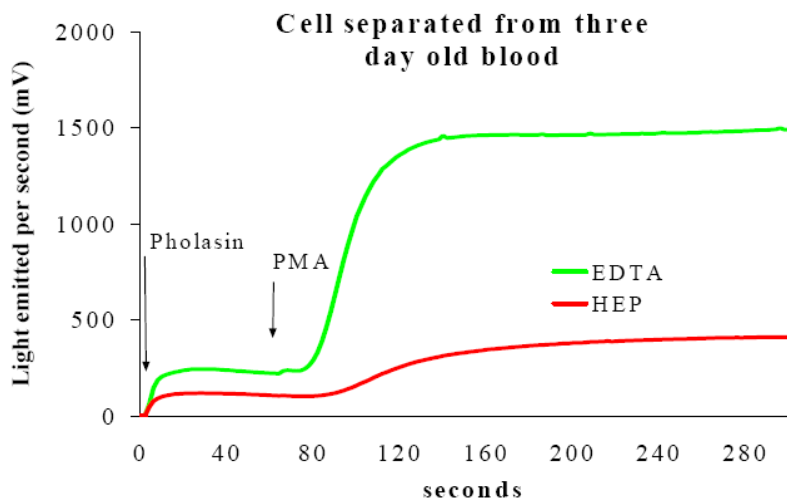
ABEL<sup>®</sup> Whole Blood Test with Adjuvant-K: following progress of an infection



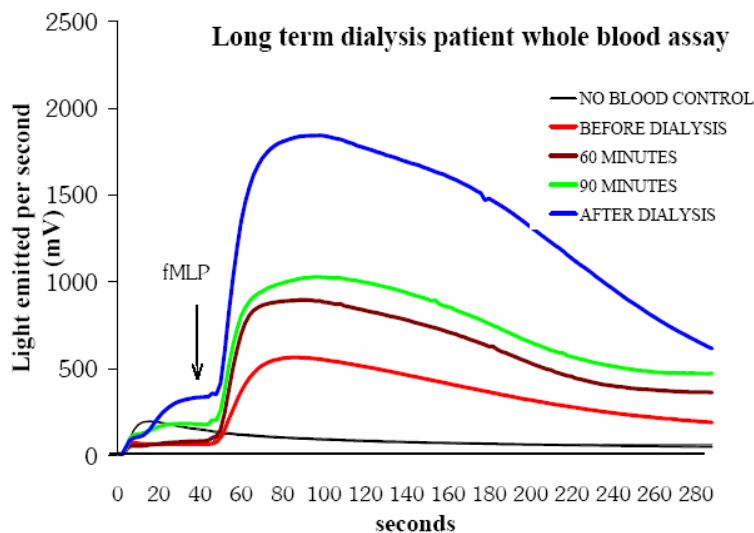
One method for residual granule contents such as myeloperoxidase is to stimulate the cells, either in the diluted whole blood sample or isolated, and inject hydrogen peroxide into the cuvette containing the cells and Phlorasin.



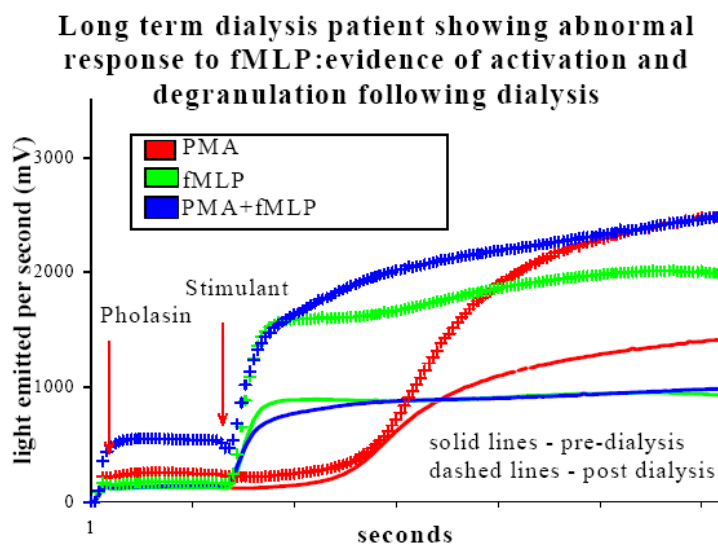
It is possible to identify the degree of degranulation that has occurred



Cells that are still remaining in stored blood will respond to stimuli, even after 3 days. However, cells more readily degranulate when stored in heparin blood and this phenomenon is seen when the cells are separated and the granules washed free from the surface of the cells.

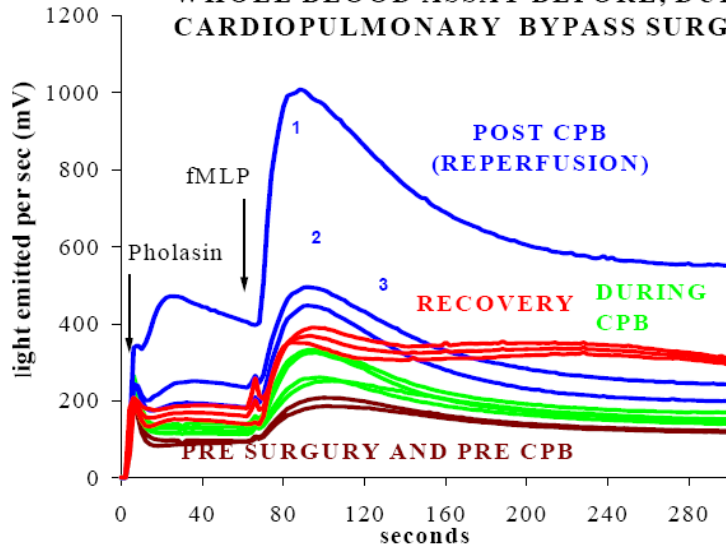


This patient is showing an unusual response to fMLP, even before the start of dialysis. His cells are responding to fMLP in a way approaching the response when cells are stimulated with fMLP and PMA together. This luminescent response is partly due to activation of the NADPH oxidase and partly due to degranulation. It can be seen in the sample after dialysis that the cells are showing some activation prior to injection of fMLP (blue trace).



This dialysis patient has cells that are responding to fMLP in the same way his cells respond to a combination of fMLP and PMA. The cells are showing enhanced production of superoxide, evidence of degranulation and at the end of dialysis, activation before stimulation.

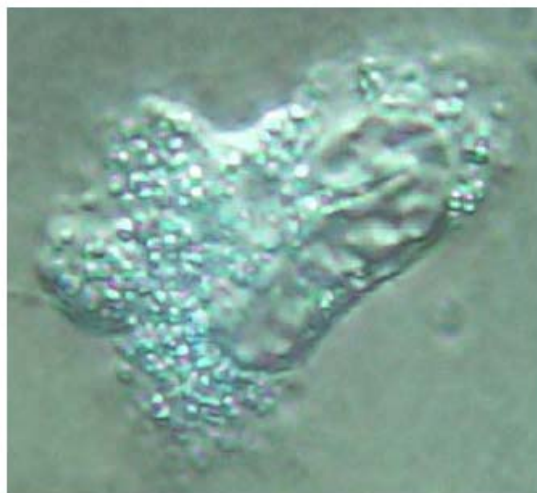
## WHOLE BLOOD ASSAY BEFORE, DURING AND AFTER CARDIOPULMONARY BYPASS SURGERY



This patient had a normal response to fMLP before surgery (dark red curves). During CPB (green curves) no significant change occurred. However, at the time of reperfusion of the heart (blue trace 1) there is an abnormal pre-stimulus signal and an enhanced fMLP response (reminiscent of complement activation). During the recovery 3 days (red) the shape of the curve became abnormal. This patient suffered serious complications



A. A stimulated neutrophil starting to become active.



B. An advanced stage of activation with the production of free radicals and the release of granules (degranulation)

## ABEL™ 测试试剂盒的应用领域:

衰老  
过敏  
哮喘  
动脉硬化症  
心脏病  
细胞生物学  
临床工程学  
手术并发症  
皮肤病  
药物疗效  
药物筛选

食物不耐性  
血液病  
感染  
炎症  
炎症肠  
疾病  
多器官衰竭  
肾脏学  
整形外科  
生殖生物学

呼吸  
忧郁综合症  
(儿科学)  
呼吸疾病  
风湿病  
脓血症  
吸烟  
毒物学  
肿瘤杀死研究  
动脉研究  
伤口愈合

## 特征和优势

特征	优势
能使用全血	没有细胞的分离步骤，缩短了样品间的收集和分析时间 防止了在分离过程中对细胞的伤害 结果反映了样品的真实的自然的生理状态
样品体积小（1 $\mu$ l血或几千个细胞）	对同一个病人可进行重复分析 减少了新生儿和婴儿的风险 可以连续对小动物连续取样进行长时间试验而不牺牲动物 能让珍贵的细胞进行大量的试验
绝佳的灵敏度和细致的动力学数据	能够分辨不寻常的病理学 能监测疾病活动 可进行快速药物筛选并获得详细的动力学信息 能够监测药物治疗的反应 消除了长时间测试收集而伴随产生的错误
确定致敏的白细胞	对疾病管理非常有用 可以用于评估一个材料（或医疗器械）暴露到不同人的血液中的可能效应 选择最合适的医疗器械 新材料的筛选 可以用于预测（和可预防）并发的不利反应 警示医学团队 对潜在的危险更清楚 对医学事件争议提供证据
简单易用的试剂盒	只需很少的操作培训 减少技术员的操作时间
分析在10分钟内完成	一天内能完成很多样品
绝佳的重复性	结果的可靠
PMA的使用友好的形式	不需要麻烦的处理

## FAQ

问题	回答
可以使用哪些抗凝血剂?	肝素, EDTA或柠檬酸都可以使用, 但是用肝素易于使细胞脱粒, 特别是细胞在某些方式中致敏。在全血测试汇总表现为对PMA的反应增强, 而在分离细胞中的表现为减弱。
测试反应温度为多少?	推荐使用生理温度为测试温度 (37°C)
收集后是否需要冷却血液?	A. 对全血的分析样品需要放置在一个保温装置中, 不能有急剧的温度的变化; 例如它不需要防置在冰上。血样的长期的保存在冷冻前需要让样品首先达到室温。 B. 测试工作是针对从全血中分离出来的单核细胞, 然后转化成巨噬细胞, 血样需要立即冷冻以防止单核细胞的激活。
化学发光仪需要自动注射器吗?	不必要。但是由于细胞与fMLP的反应非常迅速, 因此当测试管位于监测器之前时, 迅速注入fMLP (可用注射器注入)。由于细胞与PMA的反应滞后时间大约为30秒, 可在发光仪外加入PMA, 之后迅速将检测管置于发光仪内。
在测试过程中需要混合样品?	对于全血测试需要频繁混合, 推荐使用一起的震荡功能。如果所用的发光仪不具备自动混合功能, 可以用涡流混合器对检测管中的试剂进行混合, 但可能不会得到最佳检测结果。
需要使用特殊的测试管或板?	最佳材料为聚丙烯。玻璃, 除非是硅的, 否则会激活白细胞。聚苯乙烯有时也激活细胞。
何种类型的细胞响应此测试?	A. 任何拥有NADPH氧化酶系统的细胞: 嗜中性细胞, 嗜曙红细胞, 单核细胞, 巨噬细胞, 纤维原细胞, 血管系膜细胞和软骨细胞等。 B. 任何有黄嘌呤脱氢酶/氧化酶的细胞。 C. 任何能产生细胞外NO和超氧化物的细胞。
何种动物的血可以使用?	我们报道过的成功地种类: 人, 大鼠, 小鼠, 羊, 牛, 马, 猪。需要注意的是在某些种类中fMLP可能缺失 (因为反应太快)
对于fMLP和PMA会得到什么样不同的信息?	A. fMLP不能穿过细胞, 但是可以结合一个细胞受体激发一系列事件的发生。如果细胞被脂多糖 (LPS, 能激活补体) 致敏, 它会表现出一个增强的反应。用Pholasin™ 测试到的对fMLP的不正常响应在长期做透析的病人中是非常普遍

	<p>的。自体免疫证据表明可能过敏，自体免疫疾病，食物不耐性和其他调价存在联系。</p> <p><b>B.</b> PMA进入细胞。在试剂盒中的PMA刺激后，Pholasin™通过测试NADPH氧化酶活性和髓过氧化物酶的相关活性来提供有关细胞脱离倾向性的证据。</p>
可以使用其他的刺激代替fMLP吗？	<p><b>C.</b> 可以。可以使用血小板刺激因子，抗-Fc受体抗体，LPS，血清，条理的酵母聚糖。其他一些佛波醇酯和受体激动剂也可能在检测中奏效。</p>
可以使用测试抗氧化的Pholasin™到细胞活力测试吗？	不行。

## 推荐设备

**发光仪：**推荐使用具有温度控制，自动震荡，自动加样（至少两个加样器）的化学发光仪。

**针管与针头：**Pholasin™, Adjuvant-K™, fMLP and PMA 均以干粉形式存在于真空瓶中，使用之前需要注入R&A缓冲液进行溶解。需要一个注射针和针筒（试剂中未提供）把缓冲液通过橡胶塞注射到试剂瓶中混合。在将R&A缓冲液注入试剂瓶中之前，不要拔掉橡胶塞，否则内容物可能随真空的流失而有所损失。我们建议使用1 inch, 21 gauge的针头和标准的5mL and 10mL的针管。

**血样收集管：**含有肝素，K2-EDTA或柠檬酸的管都可以。由于检测只需很少量的血液，儿科用的软管也可用来收集血液。

## Storage Conditions and Shelf Life

REAGENT	FORMAT	TEMPERATURE	SHELF LIFE
PHOLASIN <sup>®</sup>	freeze dried	-20°C or lower	up to 12 months
	reconstituted	-20°C or lower	up to 1 month
fMLP	freeze dried	-20°C or lower	up to 12 months
	reconstituted	-20°C or lower	up to 1 month
PMA	freeze-dried	-20°C or lower	up to 12 months
	reconstituted	2-8°C	up to 3 days
ADJUVANT-K <sup>™</sup>	freeze dried	-20°C or lower	up to 12 months
	reconstituted	2-8°C	up to 3 month
BLOOD DILUTION BUFFER	liquid	-20°C or lower	up to 12 months
	liquid	2-8°C	up to 1 month
RECONSTITUTION & ASSAY BUFFER	liquid	-20°C or lower	up to 12 months
	liquid	2-8°C	up to 1 month

### ORDERING INFORMATION

	Catalogue Number
Whole Blood Cell Activation Kits with Adjuvant-K <sup>™</sup>	KSL-ABEL-04 (40 x 1mL tests)
	KSL-ABEL-05 (80 x 1mL tests)
	KSL-ABEL-06 (120 x 1mL tests)
	KSL-ABEL-04M (200 x 200µL tests)
M = microplate kits	KSL-ABEL-04M2 (2 bottles Pholasin)

*Please enquire about ABEL<sup>®</sup> Whole Blood Kits with Adjuvant-P<sup>™</sup>*

	Catalogue Number
Isolated Cell Activation Kits with Adjuvant-K <sup>™</sup>	KSL-ABEL-14 (40 1mL tests)
	KSL-ABEL-15 (80 x 1mLtests)
	KSL-ABEL-16 (120 x 1mLtests)
	KSL-ABEL-14M (200 x 200µL tests)
M = microplate kits	KSL-ABEL-14M2 (2 bottles Pholasin)





### CONTRACT TESTING

Knight Scientific Limited offers contract testing and research services  
contact Dr Jan Knight for further information.

ABEL® products are developed and manufactured by:

**Knight Scientific Limited (KSL)**

15 Wolseley Close Business Park, Plymouth, PL2 3BY, UK

tel: +44 (0)1752 565 676 fax: +44 (0)1752 561 672

e-mail: info@[knightscientific.com](mailto:info@knightscientific.com) www.knightscientific.com

Document produced by Drs J Knight and M Ganderton

Translation by Xiaoli Gong

© March 2008 Knight Scientific Limited