



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110824158 A

(43)申请公布日 2020.02.21

(21)申请号 201810535762.X

(22)申请日 2018.08.07

(71)申请人 上海恒润达生生物科技有限公司

地址 201210 上海市浦东新区张江路1238
弄1号楼9楼

(72)发明人 王海鹰 史子啸 彭荣

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

一种检测CART细胞针对靶抗原细胞因子的分泌的方法

(57)摘要

本发明涉及体外检测嵌合抗原受体T细胞分泌肿瘤特异性细胞因子的方法。所述方法包括：1)CD19抗原蛋白生物素化；2)将生物素的CD19抗原蛋白固定到磁珠上；3)CART细胞的形成；4)酶联免疫斑点检测CART细胞针对CD19抗原刺激所分泌细胞因子INF- γ 的能力。本发明可以检测CD19CART细胞的体外表达情况，计算方法简便，且灵敏度高，可以高通量的操作，便于实际操作。

1. 生物素化CD19抗原蛋白,其特征在於,包括:
 - 1) 将制备好的可溶性CD19蛋白用Amersham ECL蛋白质生物素化制备模块进行标记;
 - 2) 使用Sephadex G-25柱去除游离生物素,并收集生物素化蛋白质。
2. 生物素化CD19蛋白固定到streptavidin包被的磁珠上,其特征在於,包括:将生物素化CD19蛋白与streptavidin包被的磁珠混合并放在超声仪中进行超声。
3. 酶联免疫斑点 (ELISPOT) 体外检测CD19细胞分泌INF- γ ,其特征在於,包括:
 - 1) INF- γ 抗体包被酶联免疫斑点板子;
 - 2) 在酶联免疫斑点板子中加入待检测培养细胞;
 - 3) 加入生物素标记的二抗到酶联免疫斑点板;
 - 4) 加入HRP-链霉亲和素,再加入显色底物TMB;
 - 5) 使用ELISPOT reader读板分析。
4. 根据权利要求3所述INF- γ 抗体包被酶联免疫斑点板子,其特征在於,包括:
 - 1) 使用无菌的pH7.4的无钙镁离子的1 \times PBS稀释包被抗体 (INF- γ :1mg/ml) 至15 μ g/ml (1.5 μ g/100 μ l)。
 - 2) 取出Millipore 96-孔PVDF ELISPOT板子,每孔加入15 μ l 70%乙醇处理2min。
 - 3) 无菌水清洗板子5遍,每次每孔加入200 μ l。
 - 4) 每孔加入100 μ l步骤1稀释的INF- γ 抗体溶液,4-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。
5. 根据权利要求3所述在酶联免疫斑点板子中加入待检测培养细胞,其特征在於,包括:

取待检细胞,包括制备好的CART细胞,PBMC作为空白对照细胞,复苏后计数,然后在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下使得细胞恢复以达到2 \times 10⁶/ml细胞密度。
6. 根据权利要求3所述加入生物素标记的二抗到酶联免疫斑点板,其特征在於,包括:

用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释生物素标记的检测抗体INF- γ 至1 μ g/ml,再用0.22 μ m低蛋白结合的滤器过滤,然后每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育至少2h。
7. 根据权利要求3所述加入HRP-链霉亲和素,加入显色底物TMB,其特征在於,包括:
 - 1) 用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释链霉亲和素-HRP,每孔加入100 μ l,室温孵育至少1h。
 - 2) 使用1 \times PBS清洗每个孔4-6遍,每次200 μ l。
 - 3) 加入底物TMB,每孔100 μ l,直至清晰的斑点出现。
 - 4) 用去离子水来终止显色反应。
 - 5) 去除板子上所有多余的液体,用纸巾将孔的背部彻底擦干。
 - 6) 板子在黑暗环境中过夜,彻底晾干。

一种检测CART细胞针对靶抗原细胞因子的分泌的方法

技术领域

[0001] 本发明属于细胞治疗领域,具体用ELISPOT方法检测体外CART细胞针对靶抗原细胞因子的表达。

背景技术

[0002] ELISPOT全名为Enzyme-linked Immunospot Assay,其技术原理与ELISA 相似。其实验是在底部有PVDF膜的96孔板上进行的,PVDF膜上包被特异性的单克隆抗体,用以捕获细胞分泌的细胞因子。由于涉及到细胞培养的过程,对单克隆抗体的要求要远高于ELISA中使用的抗体,该抗体需要无毒,无内毒素,高亲和力等特点。随后,在培养板的孔中加入细胞培养基,待检测的细胞以及抗原刺激物进行培养。

[0003] 在特异性的抗原或者非特异性的有丝分裂原的刺激下,T细胞就会分泌各种细胞因子。细胞因子当即就被位于细胞下方的膜上的单克隆抗体所捕获。在洗去细胞后,被捕获的细胞因子可以与生物素标记的二抗结合,然后酶标亲和素再与生物素结合,进行化学酶联染色,就可以在膜的局部形成一个个圆形的斑点。每一个斑点就对应了当初一个分泌细胞因子的细胞,这些细胞被称为斑点形成细胞。统计膜上的斑点数目,再除以当初加入孔内的细胞总数,就可以计算出阳性细胞的百分比。

[0004] 免疫系统的细胞功能检测,一直是生物学技术的一个难点。而酶联免疫斑点(ELISPOT)实验的采用,克服了这一难点。酶联免疫斑点实验具有极高的灵敏度,在十万个免疫细胞中,只要有一个激活态的细胞,即可检测出来。同时,操作简单,结果稳定性好,以及可以高通量的检测等。由于具有这些明显的优点,使得酶联免疫斑点(ELISPOT)成为了检测免疫细胞功能的公认的实验方法。

[0005] 本发明采用酶联免疫斑点技术来检测体外培养的CART细胞针对靶抗原 CD19的INF- γ 分泌能力,本发明可以用来监测临床上是否存在针对目标抗原的特异性的CART细胞以及其分泌INF- γ 的能力。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种ELISPOT检测方法,检测CD19CART细胞针对靶抗原CD19阳性蛋白或细胞刺激后INF- γ 分泌情况。

[0007] ELISPOT检测INF- γ 分泌,包括以下步骤:

[0008] A准备酶联免疫斑点板子(需要无菌条件)

[0009] 1.使用无菌的pH7.4的无钙镁离子的1 \times PBS(0.22 μ m滤器过滤)稀释包被抗体(INF- γ :1mg/ml)至15 μ g/ml(1.5 μ g/100 μ l)(来自试剂盒)。

[0010] 2.取出Millipore 96-孔PVDF ELISPOT板子(MSIPS4510),每孔加入15 μ l 70%乙醇处理2min。

[0011] 3.无菌水(0.22 μ m滤器过滤)清洗板子5遍,每次每孔加入200 μ l。

[0012] 4.每孔加入100 μ l步骤1稀释的INF- γ 抗体溶液,4-8 $^{\circ}$ C孵育过夜。

- [0013] 第2天
- [0014] B在板子中培养细胞(需要无菌条件)
- [0015] 5.准备细胞:
- [0016] 取实施例3中制备的细胞,复苏后计数,然后在37℃,5%CO₂条件下使得细胞恢复以达到一个较高的密度。(50ml离心管中,完全的培养基中,5ml, 2×10^6 /ml细胞悬浮液。)
- [0017] 6.准备刺激物
- [0018] 酶联免疫斑点实验应该有的对照:
- [0019] 对照1:只有PBMC细胞+没有磁珠组
- [0020] 对照2:PBMC细胞+未包被的磁珠组
- [0021] 对照3:PBMC细胞+包被的磁珠组
- [0022] 对照4:未转染病毒的T细胞(mock transduced)+没有磁珠组
- [0023] 对照5:未转染病毒的T细胞(mock transduced)+未包被的磁珠组
- [0024] 对照6:未转染病毒的T细胞(mock transduced)+包被的磁珠组
- [0025] 对照7:转染病毒的T细胞(transduced T cells)+没有磁珠组
- [0026] 对照8:转染病毒的T细胞(transduced T cells)+未包被的磁珠组
- [0027] 实验组:转染病毒的T细胞(transduced T cells)+包被的磁珠组
- [0028] 7.去除板子中的抗体,无菌PBS清洗板子5遍,每次每孔200μl。
- [0029] 8.封闭板子:每孔加入200μl含有10%血清的培养基,室温孵育至少30min。
- [0030] 9.去除培养基封闭液。
- [0031] 10.轻轻铺板细胞,每孔50μl培养基, $2-4 \times 10^5$ cell/ml,轻拍板的边缘使得细胞均匀铺开,然后放入培养箱,37℃,5%CO₂培养16-20h。
- [0032] 注意:培养期间不要移动板子,并且采取措施防止蒸发,可以使用铝箔纸包裹板子。
- [0033] 第3天
- [0034] 11.去除每个孔中的细胞,然后用PBS+0.05%吐温-20清洗每个孔4-6遍以完全去除细胞,每次200μl。
- [0035] 注意:细胞去除不全会破坏斑点的形成。
- [0036] 12.用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释生物素标记的检测抗体INF- γ 至1μg/ml,再用0.22μm低蛋白结合的滤器过滤,然后每孔加入100μl,37℃孵育至少2h。
- [0037] 13.清洗每个孔,参考步骤11。
- [0038] 14.用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释链霉亲和素-HRP,每孔加入100μl,室温孵育至少1h。
- [0039] 15.使用1×PBS清洗每个孔4-6遍,每次200μl。
- [0040] 注意:不要使用带有吐温-20的洗脱缓冲液,因为吐温-20会干扰斑点的形成。
- [0041] 16.加入底物TMB,每孔100μl,直至清晰的斑点s出现。
- [0042] 注意:底物AEC/TMB稀释后要用0.45μm滤膜过滤。
- [0043] 17.用去离子水来终止显色反应。
- [0044] 18.去除板子上所有多余的液体,用纸巾将孔的背部彻底擦干。

[0045] 注意:残留的底物会引起孔中的色斑。

[0046] 19. 板子在黑暗环境中过夜,彻底晾干。

[0047] 20. 使用酶联免疫斑点分析仪观察计数。

[0048] 本发明的有益效果是:本发明可以检测出CD19CART细胞的体外针对CD19 抗原刺激INF- γ 分泌,计算方法简便,且灵敏度高,可以高通量的操作,便于实际操作。

附图说明

[0049] 图1 E1 ispot用于检测靶向CD19CART细胞INF γ 的分泌A组 1.5×10^5 个PBMC, mock transduced,transduced T cells与溶液孵育过夜,B组与 2.5×10^4 未包被磁珠孵育过夜,C组与 2.5×10^4 包被磁珠孵育过夜

[0050] 图2直方图展示各组分泌的斑点数量

具体实施方式

[0051] 本发明通过参考以下实验实施例进一步详细地进行描述。这些实施例仅出于说明性的目的提供,并不意欲为限制性的,除非另有规定。因此,本发明决不应被解释为限于以下实施例,而是应被解释为包括由于本文提供的教导变得显而易见的任何和全部的变化。实施例中所用的方法和试剂,除非另有说明,否则为本领域常规的方法和试剂。

[0052] 实施例1生物素化CD19蛋白

[0053] 使用Amersham ECL蛋白质生物素化制备模块(GE Healthcare Life Sciences, Buckinghamshire,UK)使CD19蛋白生物素化,我们简称为b CD19,简单地说,在室温下,纯化的CD19蛋白(公司生产)与ECL蛋白质生物素化模块共孵育1小时。使用Sephadex G-25柱去除游离生物素,并收集生物素化蛋白质。

[0054] 实施例2将生物素化CD19蛋白固定到streptavidin包被的磁珠上

[0055] bCD19被固定到0.5%w/v 6-8 μ m streptavidin包被的聚苯乙烯磁珠上(SCPP, reference number SVP-60-5;Spherotech,Lake Forest,IL,USA)。具体操作如下,将100微升的SCPP放置在超声水浴锅里被超声15分钟,100微升的bCD19被加到一个管里,100微升的PBS被加到另一个管里最为阴性对照,用磷酸钠(pH5.9)缓冲液调整体积到1ml,其中bCD19/SCPP(以下称为包被磁珠),PBS/SCPP(以下称为未包被磁珠)然后用2ml磷酸钠缓冲液洗涤三次并,3000g离心10分钟,然后放置在含1%BSA的PBS中,并在4 $^{\circ}$ C保存直至使用。

[0056] 实施例3CART细胞的产生

[0057] 1.用Ficcol分离液(天津灏洋)分离获得较纯的CD3+T细胞,用含5%AB血清 X-VIVO(LONZA)培养基调整细胞密度为 1×10^6 /mL。将细胞以1ml/孔接种到预先用抗人50ng/ml CD3抗体(北京同立海元)和50ng/ml CD28抗体(北京同立海元),再加入100IU/ml的白细胞介素2(北京双鹭),刺激培养48小时后病毒感染。

[0058] 2.T细胞活化培养后隔天,PBS稀释至终浓度为15 μ g/ml的 Retronectin(Takara)包被non-t issue treated培养板,24孔板每孔250 μ l。避光,4 $^{\circ}$ C过夜备用。

[0059] 3.T细胞活化培养两天后,取出2块包被好的24孔板,吸弃包被液,加入含 2%BSA的HBSS室温封闭30min。封闭液体积为每孔500 μ l,吸弃封闭液,用含 2.5%HEPES的HBSS洗板两次。

- [0060] 4. CD19逆转录病毒液加入孔内,每孔加2ml病毒液,32℃,2000g,离心2h。
- [0061] 5. 弃去上清液,24孔板每孔加入活化后的T细胞 1×10^6 个,体积1ml,培养基为T细胞培养基中添加IL-2 200IU/ml。30℃,1000g,离心10min。
- [0062] 6. 离心完毕后,将培养板置于37℃,5%CO₂培养箱中培养。
- [0063] 7. 感染后24h,将细胞悬液吸出,1200rpm,4℃,离心7min。
- [0064] 8. 细胞感染后,每天观察细胞的密度,适时补加含IL-2 100IU/ml的T细胞培养液,使T细胞的密度维持在 5×10^5 /ml左右,使细胞扩增。
- [0065] 实施例5酶联免疫斑点 (ELISPOT)
- [0066] ELISPOT的操作人的INF- γ Diaclone ELISPOT试剂盒 (Gen-Probe, San Diego, CA, USA)。具体操作如下:
- [0067] 抗体包被酶联免疫斑点板子→在板子中加培养细胞→加入生物素标记的二抗→加入链霉亲和素-HRP→加入显色底物TMB→终止反应后晾干→使用ELISPOT reader读板分析。
- [0068] 第1天
- [0069] A准备酶联免疫斑点板子(需要无菌条件)
- [0070] 1. 使用无菌的pH7.4的无钙镁离子的1×PBS (0.22 μ m滤器过滤) 稀释包被抗体 (INF- γ :1mg/ml) 至15 μ g/ml (1.5 μ g/100 μ l) (来自试剂盒)。
- [0071] 2. 取出Millipore 96-孔PVDF ELISPOT板子 (MSIPS4510),每孔加入15 μ l 70%乙醇处理2min。
- [0072] 3. 无菌水 (0.22 μ m滤器过滤) 清洗板子5遍,每次每孔加入200 μ l。
- [0073] 4. 每孔加入100 μ l步骤1稀释的INF- γ 抗体溶液,4-8℃孵育过夜。
- [0074] 第2天
- [0075] B在板子中培养细胞(需要无菌条件)
- [0076] 5. 准备细胞:
- [0077] 取实施例3中制备的细胞,复苏后计数,然后在37℃,5%CO₂条件下使得细胞恢复以达到一个较高的密度。(50ml离心管中,完全的培养基中,5ml, 2×10^6 /ml细胞悬浮液。)
- [0078] 6. 准备刺激物
- [0079] 酶联免疫斑点实验应该有的对照:
- [0080] 对照1:PBMC细胞+没有磁珠组
- [0081] 对照2:PBMC细胞+未包被的磁珠组
- [0082] 对照3:PBMC细胞+包被的磁珠组
- [0083] 对照4:未转染病毒的T细胞 (mock transduced) +没有磁珠组
- [0084] 对照5:未转染病毒的T细胞 (mock transduced) +未包被的磁珠组
- [0085] 对照6:未转染病毒的T细胞 (mock transduced) +包被的磁珠组
- [0086] 对照7:转染病毒的T细胞 (transduced T cells) +没有磁珠组
- [0087] 对照8:转染病毒的T细胞 (transduced T cells) +未包被的磁珠组
- [0088] 实验组:转染病毒的T细胞 (transduced T cells) +包被的磁珠组
- [0089] 7. 去除板子中的抗体,无菌PBS清洗板子5遍,每次每孔200 μ l。
- [0090] 8. 封闭板子:每孔加入200 μ l含有10%血清的培养基,室温孵育至少30min。

- [0091] 9. 去除培养基封闭液。
- [0092] 10. 轻轻铺板细胞,每孔50 μ l培养基, $2-4 \times 10^5$ cell/ml,轻拍板的边缘使得细胞均匀铺开,然后放入培养箱,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养16-20h。
- [0093] 注意:培养期间不要移动板子,并且采取措施防止蒸发,可以使用铝箔纸包裹板子。
- [0094] 第3天
- [0095] 11. 去除每个孔中的细胞,然后用PBS+0.05%吐温-20清洗每个孔4-6遍以完全去除细胞,每次200 μ l。
- [0096] 注意:细胞去除不全会破坏斑点的形成。
- [0097] 12. 用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释生物素标记的检测抗体INF- γ 至1 μ g/ml,再用0.22 μ m低蛋白结合的滤器过滤,然后每孔加入100 μ l,37 $^{\circ}$ C孵育至少2h。
- [0098] 13. 清洗每个孔,参考步骤11。
- [0099] 14. 用PBS稀释的0.5%BSA或者PBS稀释的0.5%胎牛血清稀释链霉亲和素-HRP,每孔加入100 μ l,室温孵育至少1h。
- [0100] 15. 使用1 \times PBS清洗每个孔4-6遍,每次200 μ l。
- [0101] 注意:不要使用带有吐温-20的洗脱缓冲液,因为吐温-20会干扰斑点的形成。
- [0102] 16. 加入底物TMB,每孔100 μ l,直至清晰的斑点出现。
- [0103] 注意:底物AEC/TMB稀释后要用0.45 μ m滤膜过滤。
- [0104] 17. 用去离子水来终止显色反应。
- [0105] 18. 去除板子上所有多余的液体,用纸巾将孔的背部彻底擦干。
- [0106] 注意:残留的底物会引起孔中的色斑。
- [0107] 19. 板子在黑暗环境中过夜,彻底晾干。
- [0108] 20. 使用酶联免疫斑点分析仪观察计数。
- [0109] 本实施例结果由图1图2所示。

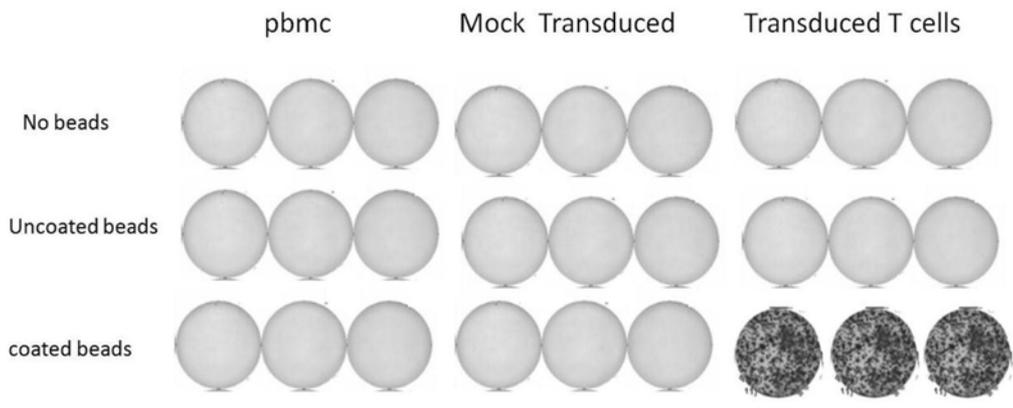


图1

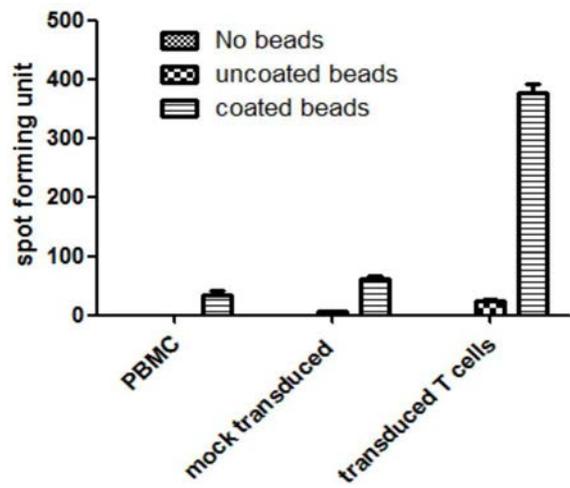


图2

专利名称(译)	一种检测CART细胞针对靶抗原细胞因子的分泌的方法		
公开(公告)号	CN110824158A	公开(公告)日	2020-02-21
申请号	CN201810535762.X	申请日	2018-08-07
[标]申请(专利权)人(译)	上海恒润达生生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	上海恒润达生生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	上海恒润达生生物科技有限公司		
[标]发明人	王海鹰 史子啸 彭荣		
发明人	王海鹰 史子啸 彭荣		
IPC分类号	G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及体外检测嵌合抗原受体T细胞分泌肿瘤特异性细胞因子的方法。所述方法包括：1)CD19抗原蛋白生物素化；2)将生物素的CD19抗原蛋白固定到磁珠上；3)CART细胞的形成；4)酶联免疫斑点检测CART细胞针对CD19抗原刺激所分泌细胞因子INF- γ 的能力。本发明可以检测CD19CART细胞的体外表达情况，计算方法简便，且灵敏度高，可以高通量的操作，便于实际操作。

