

# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00808978.7

[43]公开日 2002年6月26日

[11]公开号 CN 1355887A

[22]申请日 2000.6.14 [21]申请号 00808978.7

[30]优先权

[32]1999.6.14 [33]GB [31]9913819.0

[86]国际申请 PCT/GB00/02316 2000.6.14

[87]国际公布 WO00/77525 英 2000.12.21

[85]进入国家阶段日期 2001.12.14

[71]申请人 普拉斯马柯特有限公司

地址 挪威卑尔根

[72]发明人 拉斯·R·哈海姆

[74]专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事  
务所

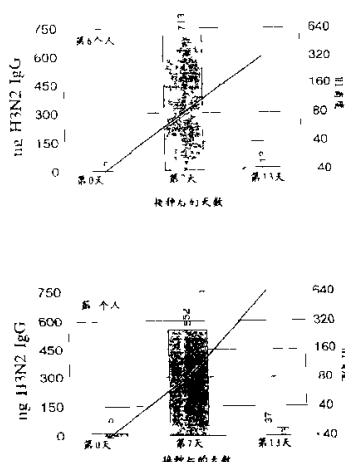
代理人 李 强

权利要求书3页 说明书23页 附图页数5页

[54]发明名称 测定方法

[57]摘要

本发明提供了一种对样品中应答免疫原而生成的新合成抗体存在或含量进行检测的方法,该方法对含淋巴细胞样品中释放出的抗体或其部分进行检测,通过裂解淋巴细胞释放出了其中的与淋巴细胞相关的合成抗体或其部分,从而测定出所述样品中新合成抗体的存在或含量,本发明还提供了利用该方法的诊断方法以及实施该方法的试剂盒。该方法还可经改进后用于非特异性感染标记的检测。



# 权 利 要 求 书

---

1. 一种对样品中应答免疫原而生成的新合成抗体的存在或含量进行检测的方法，该方法包括：

检测含淋巴细胞样品中释放出的抗体或其部分，所述淋巴细胞已裂解因而释放出了其中的与淋巴细胞相关的合成抗体或其部分，从而可以对所述样品中新合成抗体的存在或含量进行测定。

2. 权利要求1所述的方法，该方法包括以下步骤：

获得含有淋巴细胞的样品；

裂解所述淋巴细胞从而释放出与淋巴细胞相关的抗体或其部分；以及

对释放出的抗体或其部分进行检测，从而测定出所述样品中新合成抗体的存在或含量。

3. 如权利要求1或2所述方法，其中所述的样品为淋巴或外周血。

4. 权利要求1-3中任一项所述的方法，其中采用物理裂解方法或细胞裂解缓冲液或溶液裂解淋巴细胞。

5. 权利要求1-4中任一项所述的方法，其中所述抗体或其部分的检测是通过与一种或多种抗原的结合实现的，所述抗原可识别所述抗体或其部分。

6. 权利要求1-5中任一项所述的方法，其中释放出的抗体的检测是通过固相结合测定试验完成的。

7. 权利要求6中所述方法，其中所述固相上携带有一种或多种抗原（固相抗原），该抗原能够被待检抗体或其部分（靶抗体）识别。

8. 权利要求6中所述方法，其中所述固相上携带有一种或多种抗体（固相抗体），该抗体能够识别待检抗体或其部分（靶抗体）。

9. 权利要求1-8中任一项所述的方法，其中该方法可用于婴儿或新生儿血样，将其中新合成的抗体与被动转移的母源抗体区分开来。

10. 权利要求1-9中任一项所述的方法，其中在裂解淋巴细胞前或者在裂解后但检测前，将所述样品保存在约4°C或以下。

11. 权利要求1-10中任一项所述的方法，其中用于该方法的所述血样或者用于制备本发明所用淋巴细胞的血样，其体积可小于1 ml。

12. 权利要求1-11中任一项所述的方法，其中从所述样品分离出的淋巴细胞可直接用于该方法。

13. 权利要求1-12中任一项所述的方法，其中所述的检测步骤是通过免疫测定，优选为ELISA进行的。

14. 权利要求6-13中任一项所述的方法，其中将一种或多种抗原与所述固相接触，该抗原可被固定在所述固相上的靶抗体识别。

15. 权利要求6-13中任一项所述的方法，其中将一种或多种抗体与所述固相接触，该抗体可被固定在所述固相上的靶抗体识别。

16. 权利要求1-15中任一项所述的方法，其中所述检测步骤中使用可溶底物，该底物能生成分光光度分析法可检测的信号。

17. 权利要求1-16中任一项所述的方法，其中使用阴性对照抗原。

18. 权利要求6-17中任一项所述的方法，其中使用多个固相，每个固相各带有一种不同的靶抗原。

19. 一种诊断或监测免疫原对人或者非人动物或该动物的一部分的感染的方法，其中该方法包括从所述动物体中获得含有淋巴细胞的样品，用权利要求1-18中任一项所述的方法测定新合成的，抗所述免疫原的，与淋巴细胞相关的抗体或其部分的存在或含量，与合适的对照和/或参照样品对照测定出所述免疫原感染的存在或感染程度。

20. 权利要求1-19中任一项所述的方法，其中所述免疫原是一种细菌或病毒抗原，诊断或检测的是细菌或病毒源的感染。

21. 权利要求20中的方法，其中所述抗原得自选自下列的病毒：单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、人免疫缺陷病毒(HIV)和任一型肝炎病毒以及弓形体和EB病毒(EBV)。

22. 一种对样品中应答免疫原而产生的感染标记的存在或含量进行测定的方法，该方法包括：

获得含淋巴细胞的样品；

裂解所述淋巴细胞从而释放出待检的感染标记；以及

用权利要求1-18中任一项所述的方法,检测上述释放出的感染标记,从而测定出所述样品中感染标记的存在或含量。

## 测定方法

本发明涉及抗体的检测，具体涉及利用简单方法检测样品中经感染或接种等引发产生的新合成抗体，所述简单方法涉及在检测抗体存在之前裂解淋巴细胞。

长期以来一直用ELISA来检测和测定抗体（或抗原）的水平。最常见的情况是，将ELISA用作血清学分析，但是它也可用于研究抗原或抗体的免疫化学特性，还经常用于，例如，免疫反应的评估及定性，另外还可在杂交瘤技术中用于通过细胞培养研究抗体的产生。

ELISA试验使用简单，敏感且相对快速，但是它仅仅能够对样品中靶抗体的存在进行简单地测定；它无法将应答抗原而即时合成的抗体与感染或被动转移后业已存在的抗体区分开来。尽管在一些情况下，仅需获得抗体存在与否的信息就足以，但是在其它情况下，例如在接种过程中，或者在婴儿感染的诊断中，却需要能够测定在检测时所检测的靶抗体是否被淋巴细胞急速合成，从而将其与被动转移的母源抗体区分开来。这在经典ELISA方法中是无法实现的。

因而发展出了其它能够检测即时抗体合成的方法。值得一提的有酶联免疫斑点(ELISPOT)测定(也称斑点ELISA 或ELISA-噬斑测定)，综述参见，例如，Czerkinsky 等，ELISA及其它固相免疫测定，D.M. Kenneny和S.J. Challacombe编著，1988，第10章，217-239。该技术以ELISA方法为基础，可对分泌抗一种或多种靶抗原之抗体的淋巴细胞计数。所述ELISPOT基本上是ELISA方法的一种变体，因而可以通过以下方法来获得抗体分泌细胞(ASC)，即在用靶抗原包被过的经专门改进的ELISA孔中培养淋巴细胞，用酶-底物复合物代替标准ELISA试剂，该酶-底物复合物可在分泌细胞近处生成显色沉淀（斑点）。然后通过斑点计数来测算出抗体分泌细胞的数目。可在培养基中加入蛋白质合成的抑制剂，以确保所检测到的斑点是由体外保温期间的抗体从头合成途径生成的。

尽管ELISPOT 技术在研究体液免疫应答动力学中非常有用，并可用于检测经免疫受试者外周循环中瞬时出现的自发ASC，但该方法的某些特性限制了它在临床诊断中的应用。首先，由于每个样品的斑点都须单个测量，耗时且费力，该方法尤其不适用于大量样品的分析，例如临床诊断试验室中的操作。其次，只测定每个样品中的抗体分泌细胞的数目，一般来说，这理论上讲需要大量样品，例如，几毫升。另外ELISPOT测定板也很昂贵，而且该测定不易自动化。

WO 96/26443 描述了一种改良的ELISA试验，该试验可用于检测即时抗体合成。在该试验中，分离淋巴细胞然后进行培养，测定该培养过程中生成的抗体水平。因此，为了能对保温过程中分泌的抗体进行测定，该技术需要在约37°C下保温待测样品的淋巴细胞。平均保温时间为2-5小时，这就极大地限制了该测定的操作速度。另外保温还需要在测试位点提供适当的装置，以便其能在测试步骤前立即完成。这通常意味着淋巴细胞的测试必须在样品离体后很短的时间内完成，不可以通过例如冷冻贮存样品，因为这会导致细胞活力的下降。通过在0°C的冰上储存或稍差一点在4°C保存纯化后的细胞，也只能在相当短的时间内保持活力。

因此，可以看出，尽管抗体检测技术有着诸多的优点，但是仍需对测定技术进一步改良，以期达到简单、快速、经济、高效，这样才能确保自发分泌抗体的精确定量，这种改良后的测定技术可区分从头合成的抗体，并可用于样品，例如血样的诊断。本发明满足了这种需要。

上述技术中，培养时间的选择要与下述考虑相符，即必须获得足够大的抗体滴度从而保证获得能用于免疫诊断的测定结果。

文献中已经公开了下述内容：抗体（免疫球蛋白）的生物合成发生在B淋巴细胞（见：Roitt I, Brostoff J, Male D. "免疫学",第4版, Mosby 出版, 伦敦 1996, 6.12-6.13），随后它们被分泌入血流中抵抗感染。当被抗体分泌细胞(ASC)分泌时，抗体分子完整装配(以IgG分子为例，两条重链与两条轻链通过二硫键连接在一起)并糖基化。抗体生物合成的限速步骤为胞内转运以及经由内质网和高尔基体糖基化（约需1小时或1小时以上），而免疫球蛋白的多条重链和轻链的生物合成仅需数分钟即可完

成。总之，合成及分泌步骤约需2小时 (Melchers, 1971, 组织化学杂志, 3, p 389-397)。由于免疫球蛋白快速分泌出细胞，因而以前从没认识到功能抗体，抑或部分合成抗体（例如，糖基化之前）能够大量存在于淋巴细胞中。而且还未认识到样品中淋巴细胞的裂解能够产生足量的“新合成抗体”从而使得免疫诊断得以进行。

但是，人们惊奇地发现，淋巴细胞的细胞内容物含有足量的抗体，使得当在免疫应答急性阶段对样品进行分析时，可以对受试者体内快速合成的抗体进行检测甚至定量。通常，这与抗体分泌细胞在外周血中出现的预期时间间隔大致相同。因而可以提供可用于诊断的有用信息。

有利之处在于，由于测定无需保温淋巴细胞，这避免了在测定前对样品，例如纯化的淋巴细胞制品的长期保温。

本发明所述测定试验还提供了一种可信赖的测定方法，其中在准备测定前可以先将样品储存起来，例如，冰箱保存（优选保存在大约4°C或在0°C以下冻存）。

本领域技术人员应当知道全血优选冰箱保存（例如，如下文所述）而不可冻存以防细胞裂解。但是，在进行本发明的测定之前可以冻存或冰箱保存样品，例如纯化后的淋巴细胞，而不会干扰实验结果。因此，可以在测定前长时间地保存样品，甚至可以用会影响细胞活力的方法（例如，用与血清或血浆样品存储相类似的方法）保存样品。因此，本发明所述测定方法在样品收集、存储及处理方面具有显著的优势，具体而言就是可以明显地延长野外获得试样测定前的保存时间从而满足实验测试需要。

因此，一方面，本发明提供了一种测定样品中应答免疫原而新合成抗体的存在或含量的方法，该方法包括：

获得含有淋巴细胞的样品；

裂解所述淋巴细胞从而释放与淋巴细胞相关的抗体或其部分；以及

对释放出的抗体或其部分进行检测，从而测定出所述样品中新合成抗体的存在或含量。

本文中使用的“新合成的抗体”一词是指具有抗原活性的抗体（即能够识别并结合与免疫原相对应的抗原），所述抗体作为即时免疫应答

的一部分，由淋巴细胞应答体内免疫原的存在而产生或在其中合成。因此，淋巴细胞合成所述抗体发生在体内因免疫原呈递所激发的免疫应答过程中，即合成发生在含淋巴细胞样品取离受试动物体的时候或之前。

本文中提及的与所述淋巴细胞相关的抗体或其部分是指新合成的抗体，或其部分，其具有抗原活性（即能够识别并结合免疫原），并且还未分泌出细胞。如上文所述，尽管分泌途径的时程长短不一，但是通常对应于前2小时产生的抗体（如果细胞保存条件合适，那么在细胞裂解之前，该过程将完全发生在体内或至少部分在体外发生）。尽管抗体可以在细胞内快速合成（例如，1-2分钟，尽管分泌要更慢一些），但是构成抗体的游离链或未经糖基化或仅部分糖基化的抗体或抗体链还是可以出现在淋巴细胞中，因此，只有裂解这些淋巴细胞，它们才能被释放。如果前文所述的“部分”具有上文所述的抗原活性，那么它们也可被检测到，或应包括在对新合成抗体存在或含量的测定中。从淋巴细胞中释放出的抗体或其部分包括新合成的抗体。这类新合成抗体水平的测定为测定应答于某一特定免疫原而生成的活性抗体，即作为例如即时慢性或急性免疫应答的一部分而产生的抗体的含量提供了相关信息。因此，本发明还提供了一种通过将新合成抗体水平与合适的对照样品相比来检测活性抗体存在或含量的方法。

所述的含有淋巴细胞的样品可以取自在取样前经免疫原免疫过的任何动物，优选哺乳动物，例如人。通常，用本发明所述方法检测免疫应答时，该应答是由近来的感染或接种引发的，因而应在暴露于免疫原后数周或数天内取样。从受试者体内取样的最佳时机取决于感染的特性或所接种疫苗的类型，而且进一步还由受试者的免疫应答机制的效力来决定，也可应个体而不同。但是，取样的时机应当为受试者免疫系统的淋巴细胞处于应答靶免疫原的急速抗体合成阶段。因此，通常认为为了从本发明所述测定中得到有意义结果，应当在受试者接种免疫原3周内取样，优选在感染或接种后8-12天取样，但是，某些情况下，在感染或接种1-5天内，或更特别地为2-3天内就有足量的抗体合成。

所述样品可以是血样或取自受试者淋巴系统的样品。通常，任一种

所述样品可以是血样或取自受试者淋巴系统的样品。通常，任何一种含有来自于受试者免疫系统的淋巴细胞的体液或组织样品都是合适的。需要指出的是，虽然在临床或实验中可以方便地从受试者中取得淋巴或外周血，但是任一种淋巴或淋巴样组织或任一种含有淋巴细胞的血液同样都是合适的，包括取自淋巴结或淋巴腺的样品或者取自扁桃体等淋巴小结的样品。外科介入技术的发展使得可以从受试者中取得活检材料，适当时候使用该技术还可以得到可用于本发明方法的样品。在实施本发明的测定方法之前，依据淋巴细胞的来源确定是否需要对其进行分离和纯化。但是，当需要或希望进行时，可对淋巴细胞进行纯化。因此，优选地，测定中所用样品为用本领域已知技术从上述一种来源中制备而来的淋巴细胞制品。

“裂解”淋巴细胞是指含有任何合成抗体的细胞内容物从细胞膜和内膜结构的限制中释放出来，从而可以用任何便捷的生化或化学方法进行检测。已知免疫球蛋白是在经由内质网和高尔基体的途径中合成和分泌的。因此，有必要强调，裂解必须从这些内部结构中释放。因此，可以用已知的细胞裂解方法裂解淋巴细胞，所述方法应能使膜区室中的内容物释放出来，例如通过细胞裂解，例如用物理裂解方法，例如反复冻融或者是使用细胞裂解缓冲液或溶液的化学方法。

本发明中所用的术语“检测”及“测定存在或含量”包括抗体生成水平的定性和定量测定，意味着获得样品中抗体生成量的绝对值，还有抗体生成水平的指数、比率、百分比或类似指示，以及半定量或定性测定。术语“测定存在”还包括下述情况：阴性结果表示不含合成抗体，是评定受试者免疫应答的指标。例如，阴性结果表示对靶免疫原缺乏免疫应答，或者如果血清中存在针对靶免疫原的抗体的话，则表示慢性感染。

新合成抗体的检测使得能够测定此类特异于一种或多种免疫原的抗体水平，而并非能测定细胞中出现的所有抗体。

合成抗体的检测可以采用任一种能够鉴定可与引发免疫应答的靶免疫原结合的抗体的方法。因此，任一种能生成可反映靶抗体存在与否的

信号的检测技术都可使用。例如，可使用酶联测定，测定过程中由底物生成的可溶或不溶产物，其量可以测定。

通过固相结合测定方法，例如ELISA，可以方便地对所述合成抗体进行测定，其中抗体可与测定中所用抗原结合，尽管所用抗原不同于先前刺激免疫应答所使用的免疫原。因此，尽管测定中所用抗原与先前刺激了或正在刺激体内抗体生成的免疫原二者之间凭借相同或很相似的表位与待测抗体结合，但是在其它方面抗原和免疫原可以不同。因此，本发明方法中使用的抗原可以是含有相关免疫原(例如，取自感染个体)的全部或某些部分的物质，或者来自相同或类似物质的纯化部分，类似地，可以用合成方法制备抗原，例如通过化学合成或重组表达，所述抗原与天然抗原相比，具有添加或缺失部分。因此，融合蛋白，或者只表达有适当表位的分子都可使用。

本发明提供了已知抗体测定技术所不具备的一些优点。首先，与检测血清抗体水平的技术(例如血清ELISA)不同，本发明所述测定可以对指示现时感染/免疫刺激的抗体进行检测，可以将新生儿体内的母源和新生儿抗体区分开来。样品中的淋巴细胞可以直接用于本发明所述的测定方法，而不必经过任何其它形式的预处理或刺激，例如用抗原体外刺激。因而取样时淋巴细胞内合成的抗体可被检测到。(使用该方法，即使使用少量样品，也可将应答靶免疫原产生的自发即时抗体合成与淋巴细胞的旁观者活化区分开来)另外，所述测定也可以在下述淋巴细胞上实施：所述细胞在自发产生和分泌，或正在开始分泌抗体的阶段，未刺激细胞启动任何记忆就已经破裂。这不同于其它已知的方法，这些已知方法使用了体外抗原刺激，这些刺激增加了试验的灵敏度，但是却启动了细胞记忆，因而这些已知的方法并非是检测应答即时感染或近期接种而急速生成或新合成的抗体的准确或适当的技术。

另一方面，本发明采用了自发抗体分泌，使得可以利用受试抗原对指示即时感染的血液抗体进行检测；在感染或接种等以后的前几周内，血浆淋巴细胞可以分泌抗受试抗原的抗体。用本发明所述方法检测这类抗体可以对感染进行诊断或测定，或者能监测对接种的抗体应答等等。

因此，本发明另一方面提供了一种诊断或监测免疫原对人或者非人动物或所述动物的感染的方法，该方法使用本发明所述的方法，参照合适对照和/或参照样品的测定免疫原感染的存在或程度。

本发明所述方法特别适用于婴儿和新生儿，重要之处在于该方法可以将新合成抗体与被动转移的母源抗体区分开来。可以用多种相关抗原通过同一个试验或多个单独试验对含有淋巴细胞的同一样品中的抗几种不同感染原的抗体进行分析，因而可以使用与患者临床症状一致的相关接触抗原。

在感染诊断中，能够将即时抗体合成与先前感染保留下来的抗体区分开来具有重要意义。体外抗原刺激唤醒免疫记忆有悖于旨在鉴定即时急性感染的试验的初衷，因而现有技术中基于抗原刺激的方法不具有上述的优点。另外，包括抗原刺激这一步骤也会抵消本发明所述测定方法的时间优势，与现有技术中的方法相比，本发明所述测定方法可以快速完成。

第二，与检测抗体分泌细胞或活性分泌抗体技术不同，在本发明中，尽管急速抗体合成提供了检测的基本参数，但无需将样品置于能够促进抗体合成和/或分泌的条件下。这就极大地简化了试验，与WO96/26443中公开的已知测定方法相比，具有很大的优势，所述已知方法需要取样后保温淋巴细胞，还需在试验中保持条件以使淋巴细胞持续分泌抗体。

本发明的一个重要优点是避免了任一保温步骤或特定的测定条件，这就意味着取样后能够快捷处理样品，以裂解或溶解得到的细胞，然后可在测定前将裂解液存储，例如冻存或冰箱保存一段时间。

或者，如上所述，裂解细胞前，可以将样品，例如全血或纯化制品保存，例如冻存或冰箱保存（依样品确定）一段时间，例如几小时或几天，例如4小时以上。例如，如果必要或需要的话，可以在处理样品裂解细胞前，将纯化后的淋巴细胞制品冻存一段时间，例如数小时或数天，或者冰箱保存，例如数小时。因此例如，在处理以裂解或溶解细胞之前可以将纯化后的淋巴细胞在4<sup>0</sup>C下保存数小时，例如4-6小时。

但是，令人惊奇地发现，一些样品，例如全血制品可以冰箱保存更

长时间而不会给细胞带来不良影响及干扰试验结果。例如，已发现全血样品可以冰箱（例如4°C）保存至少6天，如果需要的话，在开始纯化淋巴细胞之前，样品可以在室温(18-25°C)下间歇保存至少6小时，而不会影响试验的进行。这一点在下述情况下特别有用：当常规或增补血浆/血清测试方法的结果还没有得出之前，需要将试验全血样品保存在实验室中，并贮存于冰箱内。令人惊奇或出乎意料的是，由于保存过程中保持了淋巴细胞的物理完整性，因而能够保证随后从储存血样中纯化出淋巴细胞（如果需要的话）以及裂解淋巴细胞，而不会明显减少被检测的抗体。

因此，在裂解淋巴细胞前的一个优选实施方案中，例如样品是血液时，该样品可以保存数天，例如长达约6天或更长，尤其是当在约4°C的冰箱保存时，甚至允许从冰箱中取出样品，2或多次间断性置于室温，例如4-6小时，而不会给试验结果带来不良影响。当血样保存在冰箱中但是不可避免地要短时间地室温下置于试验台上时，本发明所述方法特别有用。令人奇怪的是，发现细胞活力并无太大影响以致干扰或阻止本发明所述测定方法得到满意的结果。在另一个优选的实施方案中，当使用纯化后的淋巴细胞样品时，这些样品可以在低于4°C的条件下储存(例如几天或更长)或者保存于4°C以上（例如6小时）。用于本发明所述测定方法的各种样品都可以储存，这一点使得本发明所述方法特别适用于大型的诊断实验室，这样可以一次使用大量样品，从而使昂贵的自动化试验设备，例如ELISA装置能够得到最大限度地利用。另外值得一提的是样品可以带到很多不同地点，以及邮寄或递送到中心诊断实验室，用于按照与其它类型实验中分析化学血清样品时建立起的方法相类似的方法进行分析。

因此，从另一方面来看，本发明提供了一种测定样品中应答免疫原而新合成抗体的存在或含量的方法，该方法包括：

测定含淋巴细胞样品中释放出来的抗体或其部分，所述淋巴细胞已经被裂解从而使得与淋巴细胞相关的合成抗体或其部分被释放了出来，因而能够测定所述样品中新合成抗体的存在与含量。

本发明的一个重要优势在于只需小量样品。在本发明所述方法中，淋巴细胞的数目少至100,000个，或者甚至低于50,000个都可以产生可检测信号。由于例如1ml血液中含有 $1 \times 10^6$ 个淋巴细胞，如果用本发明所述方法来分析取自血液的淋巴细胞，那么仅仅50或100  $\mu$ l血液就可以提供足以满足实施本发明所需的淋巴细胞。即使将适当的对照实验（例如，空白对照和阳性对照）考虑在内，也仅需要150~300  $\mu$ l就可满足诊断的需要。很明显一旦试验标准化，那么至少一些对照样品就可免去。因此，本发明所述试验需要，例如50-500  $\mu$ l, 优选100-300  $\mu$ l, 常用100-200  $\mu$ l的含淋巴细胞样品，体积与样品来源的总体积相当。因此本发明所述方法可以用，例如 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^5$ ，优选 $1 \sim 2 \times 10^5$ 个淋巴细胞。这与经典诊断试验不同，经典诊断试验通常需要几ml的血清或其它体液。这在血液取样只能获得少量样品的情况下特别有用，例如将本发明所述方法用于新生儿时，只需要 $\mu$ l体积的样品，例如可以从合适位点的毛细血管取血，例如从耳垂、指尖或足跟。

因此，本发明所述方法允许使用小量血样（例如， $\mu$ l 体积，小于1 ml, 优选少于 500  $\mu$ l, 例如小于100  $\mu$ l）用未经刺激的淋巴细胞直接检测自发或从头合成的抗体，而无需在测定前预培养淋巴细胞。

用于本发明所述检测方法的抗体针对的抗原或免疫原包括细菌及病毒抗原。临床上重要的抗原包括，但是不限于下述实例，单纯疱疹病毒、巨细胞病毒、人免疫缺损病毒 (HIV) 和任一型肝炎病毒以及弓形体和EB病毒(EBV)。但是，通常，本发明的方法可以检测任一种作为激发显著抗体应答（例如急性期）的感染或接种结果而出现的免疫原。当慢性感染在淋巴细胞中引发可检测水平的靶抗体时，这些抗体的检测也可以采用本发明所述方法。因此，例如，抗任一种可用常规ELISA方法检测的免疫原的抗体都可以用本发明所述方法进行检测。抗此类抗原的抗体的检测方法可以用于快速确定患者是否感染，例如用于血液筛选或用于确定和/或监测感染。

因此，本发明进一步提供了一种诊断或监测细菌或病毒对人或者非人动物或所述动物的一部分的感染的方法，其中该方法包括从所述动物

体中获得含有淋巴细胞的样品，用本发明所述方法测定与淋巴细胞相关的，新合成的抗所述细菌或病毒的抗体或其部分，与合适的对照和/或参照样品对照测定出所述细菌或病毒感染存在与否或感染程度。

本发明所述方法因其操作简单而特别有用，尤其是在复杂的试验设备无法获得时，例如在野外时可以使用。由于无需象其它测定方法那样保温样品，所以该方法易于自动化，另外，在复杂设备无法获得时可以相对快速和简单地进行细胞裂解和抗体检测。

现在对本发明所述方法作进一步的详细描述。优选地，该方法第一步包括从样品中分离淋巴细胞。但是如前所述，淋巴细胞制品并非一定要纯化，也可以使用已除去大量血浆抗体的制品。优选地，这类制品中的抗体含量可以低于样品中血浆抗体总量的15%，例如低于5%，优选地低于1%，便捷地，也可以使用基本不含血浆的制品（例如，低于5%（v/v）），例如，无血清制品。淋巴细胞制品可以用本领域已知的常规技术来制备，例如用过滤方法或者使用吸附剂物质的技术或淋巴细胞制备试剂盒来制备。因此，例如，各种全血制品都可以便捷地用来获得淋巴细胞，例如，肝素化血液，EDTA-血液，等等，这类样品可以在临床试验室中用常规方法制得。应当理解的是所有富集或纯化制品必须包含样品中存在的淋巴细胞，所述制品出自这些样品，从而可以检测自发或从头开始的抗体生成。

优选地，可以用标准的淋巴细胞分离介质分离淋巴细胞，例如，Lymphoprep (Nycomed Phárma AS, 奥斯陆, 挪威), 或者用免疫磁性分离 (IMS) 或者类似的基于固相的分离系统或其它一般技术。在用IMS 或类似分离技术时，可以使用固相，例如用特异于某一类白细胞的抗体包被过的磁珠，来选择性地分离出有用的淋巴细胞。当使用分离后的淋巴细胞时，可以在使用前用标准洗涤方法洗涤细胞。优选地，洗涤所述淋巴细胞以除去细胞分离后出现的任一血浆抗体。通常，为了实施本发明，淋巴细胞中血浆抗体的污染应降至最低限度，优选每100  $\mu$ l 样品中低于20 ng的血浆IgG，即血浆的最终稀释度为大约为1:50,000，例如，每100  $\mu$ l 样品中血清IgG的含量低于约0.5ng。但是，现已发现为了实现这一目的，

充分洗涤细胞并非必不可少。例如，现已发现全血样品用缓冲液3倍稀释后在大致相同于自旋的条件下简单离心，即可得到基本不含污染的血清/血浆抗体的淋巴细胞制品。详见实施例3。

通常而言，本发明所述方法不需在测定前对来自样品的淋巴细胞进行保温。但是应当知道如果淋巴细胞在裂解前要在能够继续生成或分泌抗体的条件下短时间放置，本发明所述方法仍可用于来评估与淋巴细胞相关的新合成抗体。

如果要获得分离的淋巴细胞，并已经按上述方法处理待测样品，就可以裂解所述样品以释放出其中新合成的抗体。该步骤可以采用本领域任一已知的便捷技术来完成，只要该方法能有效破裂外膜及内膜结构而不影响释放后的抗体与其互补表位结合的能力即可，例如用去污剂、离液剂、含有例如 EDTA的裂解缓冲液，或者其它裂解方法，例如超声或利用剪切力的物理破碎。但是通常优选使用裂解缓冲液这一最简单最便捷的方法，例如如实施例中所述，即含有去污剂，如0.5% 脱氧胆酸盐的缓冲液。可以用适当的裂解缓冲液来稳定释放后的抗体，例如控制pH或降解。因此如果有必要，可以使用含有蛋白酶抑制剂的缓冲液。其它裂解方法包括例如使用反复冻融或甚至使用液氮。这样即可制备到其中含有释放后的抗体的裂解液，以用于后续步骤。应当理解的是，为了在样品中获得足量可供检测的新合成抗体，要将尽可能多的细胞裂解以释放出其中的抗体。优选地，裂解方法适合于这一目的，样品中至少有40%或50%，更优选至少60%，70%或80%以及更优选至少90%或95%的淋巴细胞被裂解。裂解淋巴细胞后，用可以检测靶抗体的合适方法来评估样品中的抗体含量。为了便于实现这一点，将样品与载有合适结合配对物的固相接触，以固定待测抗体。方便地，所述结合配对物是可以被待检抗体或其部分识别的抗原（免疫原）或抗原群（即一种或多种抗原）。因此，在一个实施方案中，本发明提供了一种测定样品中新合成的抗体存在及含量的方法，该方法包括：

将等份的所述样品，或者任选地将等份的，直接分离自所述样品的淋巴细胞与一种或多种可被待检抗体识别的抗原结合，优选抗原携带在

固相上，其中上述淋巴细胞已被裂解，释放出了与所述淋巴细胞相关的抗体或其部分；

检测抗体与所述抗原的结合；以及

与对照和 / 或参照样品比较所述抗体的结合，从而测定出应答所述抗原而新合成抗体的存在或含量。在上述方法中，对照或参照样品可以是适当的阴性或阳性对照物，例如空白、常规样品或掺加样品。

其它的结合配对物也可以使用，例如A蛋白、G蛋白或可识别及结合待检测抗体的抗体。在后一种情况下，无需高度特异性结合，这是因为在此测定方法的实施方案中，通过随后结合能特异性结合待测抗体的抗原而引入特异性。因此，在所有实施方案中，都会制备出特异性的抗原-抗体复合物。这类优选被固定在一种固相支持物上的复合物的存在能在本发明所述方法的检测步骤中被测定出来。因此在一个优选实施方案中，本发明所述方法的检测步骤包括通过形成抗原：抗体复合物来检测释放后的抗体或其部分，其中所述抗原（优选不是一种抗体）包括或包含免疫原或含有所述免疫原的至少一个表位的部分。

实施本发明时，所述固相可以是本领域熟知的任一支持物或基质，所述支持物或基质目前被广泛使用，用于固定、分离等。这些支持物或基质可以采用颗粒、片层、凝胶、滤膜、薄膜或微量滴定条带、管或板等，以及也可以是由聚合物材料制备而成。但是，为了操作容易和简单，可以便捷地使用标准的微量滴定板或孔，优选使用标准的ELISA板。

所述固相可以经改进而用于检测特异于一系列不同抗原的抗体。因此，例如，因此，例如可用经不同抗原包被的合适固相材料，如硝酸纤维素或类似材料的盘状或条状物等，同时将它们添加到不含任何接触抗原的微量滴定孔或其它合适容器中。然后，可以用抗体结合检测方法来区别不同抗原。可便捷地使用夹心-型测定方法时，所述固相上载有一种或多种可被待测抗体或其部分(靶抗体)识别的抗原(固相抗原)。或者，所述固相可以携带一种或者多种抗体(固相抗体)，该抗体可识别待测抗体或其部分(靶抗体)。为了实施本发明所述的检测方法，适当时可根据所述固相支持物是否载有上述抗体或抗原，将可被固定在所述固相上的靶抗体

识别的一种或多种抗原与所述固相接触，或者，将一种或多种抗体与所述固相接触，该抗体能够识别固定在所述固相的靶抗体。这些后来被结合到固相支持物上的抗原或抗体可以被适当地标记，使得可进行下文所述的检测。

每套盘状物各用与某一特定临床状况或症状相关的抗原包被，使用多套这样的盘状物可以从多个可疑病原体中鉴别出究竟是哪个引发了疾病。然后将上述盘状物置于分开的孔中单个处理。由于可以使用同样少的血样同时对多种不同抗原（得自相同病原体或得自与每个病例的临床症状或状况相关的不同病原体）进行测试，因而这是一种特别节省原料的方法。另外一种替代方法是使用多个裂解后的淋巴细胞样品，即在分开的孔中添加这些样品，每个孔用不同的结合配对物（例如抗原或抗体）包被，然后进行试验。

与结合配对物结合的技术，例如抗原与固相结合的技术也是众所周知的，这些技术在文献中有大量的描述。多种标准的抗原包被方法的描述可参见，例如ELISA和其它固相免疫测定，理论和实践分册；1988，D.M. Kemeny & S.J. Challacombe, John Wiley & Sons编著。如果需要，也可以用标准方法洗涤及封闭微量滴定板。因此，例如，将标准的微量滴定板置于合适的缓冲液中，例如置于含结合配对物，例如浓度为0.01 ~ 150 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 蛋白质的磷酸盐缓冲液（PBS）中，于4 $^{\circ}\text{C}$ 将滴定板保温过夜，然后用合适的封闭介质（通常为中性缓冲液，例如PBS，其中含有封闭蛋白质，例如小牛血清或出自奶粉的蛋白质）进行封闭，再在例如37 $^{\circ}\text{C}$ 下保温1 ~ 5小时，这样简单的操作就可以将这些标准微量滴定板，例如ELISA板用结合配对物包被起来。除去封闭溶液，这些滴定板就可供使用。

但是，为了方便起见，本发明所述方法使用的材料可以以试剂盒的形式提供，其中所述的固相载体已用结合配对物包被并已被适当封闭。

可以在接触步骤前将裂解后的淋巴细胞样品悬液稀释，为了方便起见可以使用一系列细胞/样品稀释液。通常用其中含有裂解后的淋巴细胞的缓冲液作为稀释液进行稀释。

然后检测抗体与抗原的结合情况。为了方便起见，检测步骤，亦即信号读取，可以在溶液中进行。但是也可以产生不能在溶液中读取的不溶性产物或信号。只要能够生成可读信号，任何检测抗体结合的已知方法都可使用；例如根据荧光、化学发光、比色法或酶反应来产生可读信号。当不使用固相时，释放后的抗体可以用其它任一敏感的血清学方法，例如光散射(例如,比浊法)和共振方法来检测。为了方便起见，可以用免疫测定作为检测手段，优选使用酶联免疫吸附测定 (ELISA)。但是，ELISA之外的其它测试方法也在本发明用来检测抗体的方法范围之内。使用经包被的，例如用裂解后的淋巴细胞悬液覆盖后的盘状物或玻璃板的技术也是合适的。本领域中已知的任何检测抗体的标准技术，例如可生成不溶或可溶产物的技术都可经调整后用于本发明所述方法，进行定量分析抑或定性(例如，有/无)试验。

免疫测定技术，特别是ELISA，已为本领域技术人员熟知，其描述见文献(参见例如ELISA和其它固相免疫测定，理论和实践分册；1988, D.M. Kemeny & S.J. Challacombe, John Wiley & Sons编著)。

在与裂解后的淋巴细胞样品接触后，加入酶-抗体偶联物(例如在ELISA检测方法中)，该偶联物可与已结合了固相上的抗原的抗体相结合。类似地，如果待测抗体通过一种结合配对物，例如通过抗不同种类抗体的抗体非特异性地与固相结合，可以加入酶-抗原偶联物，该偶联物可与固定后的待检抗体特异性地结合。然后加入酶底物以生成可检测信号。本发明中为了方便起见可使用可溶性底物，生成可在溶液中检测的信号。由于本发明方法加速并简化了大量样品的操作和处理，并可估计抗体产量，因而是有利的，尽管如上所述，无需绝对定量，但如果需要可以得到定性或半定量的结果。为了方便起见，可以选用能产生可分光光度检测的信号的底物，所述信号可通过例如用标准ELISA板阅读仪读取吸收度来简便地读取。实际上，也可用标准ELISA试剂，这样做的好处是可以使本发明所述测定与临床实验室中常规使用的现有方法及技术匹配。但是，也可以使用其它检测/信号生成系统，产生可用荧光、化学发光等检测的信号。

还可以用免疫-酶放大方法加强信号及增强灵敏度，例如用抗生物素蛋白-生物素方法，例如Sigma公司的Extravidin系统。可用生物素化的第二抗体作为ELISA试剂，与过氧化物酶抗生物素蛋白复合物结合。由于一个抗生物素蛋白分子能结合数个生物素分子，所以用抗生物素蛋白-生物素过氧化物酶复合物可增加过氧化物酶分子的表面浓度，从而使得该方法更加灵敏。

为了方便起见，裂解淋巴细胞和检测抗体结合这两个步骤所用的材料和工具也可以与被结合配对物包被的固相一起以试剂盒的方式提供。

可用其它测定方法来增补本发明所述测定方法得到的信息。有关预先存在的血清/血浆抗体的其它有用信息可从经典ELISA试验中获取。此外，从血样中分离淋巴细胞后，可使用本发明所述测定方法中所用的用相同的结合配对物包被的固相来检测剩余血浆液中的预先存在的抗体。

为了保证本发明所述测定方法的结果可信，可加入合适的对照，来测定新合成抗体的存在或含量。例如，为了查明测试孔中记录的信号不是来自于随机及非特异性(旁观者)活化的淋巴细胞，需使用阴性对照抗原。该抗原出自最不可能引发患者急性疾病的感染性病原体，例如，破伤风类毒素。在所有环境中的任何情况下，此类旁观者的活化的淋巴细胞的数目都会大大低于要得到本发明所述方法阳性结果所需的淋巴细胞数目。设计本发明时已将这一点考虑在内。

如上所述，因其操作容易，快速并简便，本发明所述测定方法可用于诊断或其它临床或兽医学用途，例如鱼类养殖。除样品需要量小之外，另一个优点是只需一个样品，而非间隔2-3周取得的血清样品对，而大多数常规血清学试验都需要这样做。无需复杂设备，该测定方法易于自动化。此外，如果需要的话，还可测试不同的免疫球蛋白同种型。

上述的本发明测定方法提供了一种评估即时感染存在与否或程度的方法，该方法对特异于某一特定抗原的抗体的自发表达进行分析。很明显，该方法适用于评定这类疾病的病情，该疾病是已知的，或者可获得与相关免疫原有关的抗原，从而可提供特异性的感染标记。但是，在一些临

床情况下，并不能对特定疾病进行鉴定，和/或无法获得测定可用的适当抗原。这类情况下，可调整测定方法，用其来评定感染的非特异性标记的存在或程度。因此，例如，对于含淋巴细胞的样品，例如全血或者其中经纯化或富集后的淋巴细胞制品，可以对其中生成的感染标记进行检测，所述标记如细胞因子或干扰素，例如IL-2, IL-4或 $\gamma$ 干扰素。

因此，从另一方面来看，本发明提供了一种对样品中应答免疫原而产生的感染标记的存在或含量进行测定的方法，该方法包括：

获得含淋巴细胞的样品；

裂解所述淋巴细胞从而释放出待检的感染标记；以及

检测上述释放出的感染标记，从而测定出所述样品中感染标记的存在或含量。

为了实施该方法，可以使用带有合适俘获分子的固相，例如抗待检感染标记的抗体。当检测固定在固相上的所述感染标记的存在时，可以使用上述方法，例如用标记后的抗体或配体。在该方法中，可以选用适当的固定组分或检测分子鉴定特异性标记。因此，例如，可以将样品中的所有蛋白质都固定在固相支持物上，然后用标记后的特异性抗体或配体进行检测。或者，可以用一种特异性结合配对物固定相关感染标记，然后可以对该感染标记进行适当正或负标记，例如在前一种情况下将其与感染标记上出现但并非该分子独有的结构域结合，或者在后一种情况下，标记固相上的未结合的结合配对物。用于实施该方法的试剂盒也是本发明的一部分。

图1显示的是流感疫苗临床试验的结果，其中用淋巴细胞裂解方法对取自9个受试者（编号为2-10的人）的样品进行了测试。每个条形图左手边的标度是以ng计的H3N2 IgG，横坐标为接种后的天数。点线与每个条形图重叠处显示的是以右手边标注的针对A / Nanchong病毒的HI滴度。详细描述见实施例1和2。

现在结合下列非限制性实施例对本发明作更详细的描述。

## 实施例1

## 特异性

受试者: Initials LOH, 男性, 25岁。在从出现典型临床流感样病症当天起的第9天取血样。当地有甲型和乙型流感混合流行的记录。

分离淋巴细胞: 收集肝素化的外周静脉血样。根据厂商说明, 用Lymphoprep (Nycomed Pharma AS, Oslo) 分离淋巴细胞, 不同之处仅在于在第一次离心前用二倍量(而非等量)的磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.2)混合肝素化的血样。再将细胞沉淀物多洗涤两次。用Blue Dextrane排除法在血细胞计数仪中进行淋巴细胞计数。

裂解淋巴细胞: 用裂解缓冲液10mM Tris HCl (pH 7.4)裂解级数量的淋巴细胞, 所述缓冲液内含有0.5% 脱氧胆酸盐, 2  $\mu$ g/ml 胃蛋白酶抑制剂A (Sigma P-4265, 批号18H0551), 2  $\mu$ g/ml 亮抑酶肽 (Sigma L-0649, 批号77H86221), 0.5% 抑肽酶(Sigma A-6279, 批号87H7010), 1 mM PMSF (Sigma P-7626, 批号 48H1265) (参照: Spector DL, Goldman RD, Leinwand LA, 细胞, 实验室手册, 冷泉港实验室出版社, 纽约, 1998, Vol 1:74.6), 然后用于ELISA试验(见表1)。

包被和封闭ELISA板: F-型 Greiner微量板, 中等结合能力, Cat #655001 (批号98260148), D-72636 Frickenhausen, 德国。用来测试流感抗体的病毒抗原(由Solvay-Duphar, 荷兰惠赠)有: A/Nanchang/933/95 (H3N2)表面抗原, 10  $\mu$ g/ml 溶于PBS, 100  $\mu$ l/孔。B/Harbin/07/94表面抗原, 10  $\mu$ g/ml 溶于PBS, 100  $\mu$ l/孔。测试用的常规IgG 抗体: 山羊抗-人IgG ( $\gamma$ -链特异性) Sigma I-7883 (批号76H8895), 用PBS做1:500倍的稀释, 100  $\mu$ l/孔。4 $^{\circ}$ C包被过夜。用含有10% 胎牛血清(FCS)的PBS室温下封闭1小时。在所有后续步骤之间, 均用含0.05% Tween 20的PBS洗涤免疫滴定板5次。

样品的板上布局: 流感IgG抗体和常规IgG抗体以及人IgG标准品的测试在同一块免疫滴定板上进行。所有样品均进行重复试验。

测试样品:待检样品: LOH “血清”(用血浆进行1:3稀释)。清洁并用含0.05% Tween 20和5% FCS的PBS (稀释液)10倍稀释, 100  $\mu$ l/孔。IgG标准品: Sigma I-4506 (批号 96H8840) : 10  $\mu$ g IgG/ml, 用含0.05%

Tween 20 和 5% FCS的PBS (稀释液)10倍稀释, 100  $\mu$  l/孔。

将300  $\mu$  l终细胞沉淀置于含1:9,368稀释度血清的PBS 溶液中。向该沉淀中加入700  $\mu$  l PBS (= 1:3.33稀释)。终沉淀有 $2.0 \times 10^7$ 细胞,血清污染度为1:31,200。测试的终上清液为1:9,370 血清稀释度。

细胞溶解物: 将溶解物细胞浓度调至800,000, 200,000和50,000个细胞/孔, 100  $\mu$  l/孔。

表1. 用于测试的细胞溶解物的混合物

细胞数目/孔	细胞沉淀	裂解缓冲液	稀释液	SUM $\mu$ l	稀释度相对于终细胞洗液
800,000	240	240	126	606	1: (2.53 $\times$ 3.33)
200,000	60	60	486	606	1: (10.1 $\times$ 3.33)
50,000	15	15	576	606	1: (40.4 $\times$ 3.33)

经计算, 相对于终细胞洗液的细胞制品的血清抗体污染度为: 对于800,000 个细胞而言为1:8.4 (10.6%), 相对于200,000个细胞而言为1:33.7 (2.9%), 相对于50,000个细胞而言为1:134.8 (0.7%)。

所有抗体样品均在室温下保温90分钟。

第二抗体: 生物素-标记的山羊抗-人IgG ( $\gamma$ -链特异性) Sigma B-1140 (批号96H8886),用含0.05% Tween20 和5% FCS的 PBS作1:500倍的稀释, 100  $\mu$  l/孔。室温下保温60分钟。

偶联: ExtrAvidin 过氧化物酶偶联物, Sigma E-2886 (批号28H4824), 用含0.05% Tween20和5% FCS的PBS作1:1000倍的稀释, 100  $\mu$  l/孔。室温下保温60分钟。

显色: 片状底物(o- Penylene diamine dihydrochloride), Sigma P-8287 (批号 88H8250)。将1片底物(10 mg)溶于25 ml 0.1M 磷酸盐-柠檬酸盐缓冲液, pH 5.0, 并加有20  $\mu$  l 强双氧水(30%  $H_2O_2$ )。加入100  $\mu$  l/孔底物溶液, 加入50  $\mu$  l/孔量的1M  $H_2SO_4$ , 10分钟后观察反应。在492 nm 下用Titertek Multiskan PLUS 阅读仪 (Flow Laboratories)读取光密度

值。

### 结果

从用IgG标准品稀释液制备的标准曲线中推算出IgG的量。所有测试样品均做重复试验，取光密度的平均值用于下列计算。

表2. 血清IgG抗体

抗体	血清抗体 ( $\mu\text{g/ml}$ )	%
常规IgG	2,365	100.0
乙型流感病毒	70	3.0
甲型流感病毒	112	4.8

表3. IgG抗体从裂解后的淋巴细胞中释放

特异性	100 $\mu\text{l}$ 孔中淋巴细胞的数目	孔中检测到的IgG(ng)	孔中血清IgG的污染量(ng)	孔中来自淋巴细胞的IgG净含量(ng)	单个淋巴细胞的IgG净含量(ng)
甲型流感病毒	50	1.06	$0.338/134.8=2.5 \times 10^{-3}$	1.06	2.12
	200	10.72	$0.338/33.7=10.0 \times 10^{-3}$	10.71	5.35
乙型流感病毒	200	0.38	测量值以后	0.38	0.19
	800	1.29	测量值以后	1.29	0.16
常规IgG	50	13.29	$10.6/134.8=0.08$	13.21	26.42
	200	44.6	$10.6/33.7=0.32$	44.28	22.14

表4. 概括：外周血淋巴细胞及血清中检测到的 IgG

抗体特异性	来自单个孔的淋巴细胞中的IgG净含量( $10^5$ ng)	%	血清IgG $\mu$ g/ml	%
甲型流感病毒	3.74	15.4	112	4.8
乙型流感病毒	0.18	0.7	70	3.0
常规IgG	24.28	100.0	2.365	100.0

结论：从表3中可以清楚地看出，受试者LOH感染的是甲型流感病毒。用这些数据，可以认为100,000个淋巴细胞/孔中能产生大约20 ng/ml的甲型流感IgG抗体，而生成乙型流感病毒IgG抗体的量为2 ng/ml。从实践角度看，前一个细胞浓度可生成便于测量的针对甲型流感病毒特异性抗体的ELISA信号，但是对于乙型流感病毒就不能生成这样的信号。与从血清中测得的流感病毒抗体水平（表2）不同，甲型流感病毒和乙型流感病毒抗体的水平非常接近。这类血清抗体最可能是预先存在的交叉-反应抗体，该抗体起因于先前接触流感病毒。很多年前人们就已经知道，以后再次接触异源病毒可以再次激活流感记忆，这就是所谓的“抗原记录(antigenic sin)”，多数情况是发生初始免疫过程的淋巴组织中的局部“旁观者”效应。

我们试验中来自裂解后淋巴细胞的抗体也能生成针对乙型流感病毒抗原（即不是使受试者LOH不舒服的病毒）的可测量ELISA信号，尽管该信号很小，产生该信号的原因可能是由于甲型流感病毒的免疫攻击使记忆淋巴细胞被非特异性重新活化而导致的。但是，据信这种记忆细胞异常重新活化是流感相关现象，并不适用于其它感染性病原体。因此，可以肯定的是，来自待检感染性病原体与其它病原体的不同抗原生成的信号之间的区别是显而易见的。

在本发明方法中，对于每种待检的抗原特异性抗体约需要100  $\mu$ l 肝素化血液(等于100,000个淋巴细胞),因而取自毛细血管中的血样也可以使用。

## 实施例2

### 动力学

这是一个临床流感疫苗试验。9位健康的受试者的登记情况为：其中6位女性年龄在24~27岁之间(平均26.2岁)，3位男性年龄在24-31岁之间(平均28.3岁)。医生告知了他们有关接种的禁忌症，他们均表示无此类禁忌症。他们以前均未接种过流感疫苗。所有疫苗都完成了试验，依照下述方法收集外周血样。给受试者接种有批号的三价灭活全病毒疫苗(Vaxigrip)，其中含有：

A/悉尼/5/97(H3N2)-样病毒，含有15 $\mu$ g血凝素/剂量；

A/北京/262/95(H1N1)-样病毒，含有15 $\mu$ g血凝素/剂量；

B/北京/184/93-样病毒，含有15 $\mu$ g血凝素/剂量；

购自Merieux Serums & Vaccines (法国)公司。

按照实施例1中的方法制备肝素化血样。所有操作均同实施例1中所述，不同之处仅在于通过将淋巴细胞试管置于液氮和流水下反复冻融(2次)来裂解淋巴细胞。

此外，用受体-破坏酶处理后的血浆样品进行血凝抑制(HI)试验，操作按照下列文献中的标准方法进行，Kendal等，1982，"实验室监控流感的概念和方法"，Viral Disease Unit, WHO, 日内瓦，使用4个血凝单位的A/Nanchang病毒和0.7%的火鸡红细胞。2倍稀释血浆进行测试，记录的滴度为完全抑制病毒血凝的最大稀释度的倒数。

使用的样品有免疫当天，免疫后7天以及免疫后13天收取的样品。

### 结果

图1显示的是使用下述溶液得到的抗相关A/Nanchang/933/95(H3N2)表面抗原的IgG的量(以ng计)(见实施例1)，即这些溶液有取自9个接种受试者(条形图)中每个人的300K个裂解后淋巴细胞制备而成的。它们是依据从裂解后的淋巴细胞中获得的流感特异性IgG抗体的量绘制而成的。左手边ng IgG标度对于全部受试者是不同的。叠加显示的为抗A/Nanchang病毒的HI滴度(点线)。国际标准为滴度 $\geq 40$ 就可视为有保护作用。

用。

## 结论

通常，HI抗体与病毒中和抗体一起被视为“最标准的”的流感抗体。根据国际标准，HI滴度 $\geq 40$ 即视为有保护作用。图1显示9个受试者中有4位（即第2，第5-7位受试者）在第7天获得了这样的抗体，除第3和第10位受试者外，所有受试者在第13天时均获得了这类的HI滴度。在第7天时，所有受试者的裂解后的淋巴细胞中都检测到了高水平的流感特异性IgG，但是在第7天时5位（第3、4、8-10位）受试者只检测到了来自裂解后的淋巴细胞的抗体，而未检测到达到保护水平的HI抗体。

另外，由于第13天时大部分受试者都具有了显著水平的血清抗体，所以这类抗体在第7天出现以及在第13天消失的现象表明了流感IgG抗体的特异性。

实施例2清楚地表明从裂解后的淋巴细胞检测到的抗体未被淋巴细胞沉淀中俘获的血清抗体污染，这一点在实施例1中有同样清楚的显示。

## 实施例3

### 从血清/血浆污染物中纯化淋巴细胞的简便方法

通常，通过3次连续离心分离，可以完全除去淋巴细胞中污染的血清/血浆抗体。300 $\mu$ l全血与10ml稀释剂混合，该稀释剂由2份PBS和1份蒸馏水组成。将该混合物室温下，400 X g离心20分钟。除去上清，向沉淀中加入10ml PBS。照上述方法离心悬液，将循环重复一次。将最终的沉淀物悬于100 $\mu$ l PBS中，作为随后测定用淋巴细胞的来源。

## 实施例4

### 纯化淋巴细胞前血样的储存

按照厂商说明，给男性受试者(EJAa, 20岁)接种有批号的三价灭活疫苗（见实施例2）。在接种当天（第0天）和接种后第9天各制备5ml肝素化血样。按照实施例3中的描述，收集后立即对300 $\mu$ l血样进行3个循

环的洗涤 / 离心，按照实施例1的方法裂解淋巴细胞。剩余血样4<sup>0</sup>C 下保存4天，然后在启动新一轮淋巴细胞纯化前室温下保存4小时。所有后续ELISA试验均按照实施例1中描述的方法进行。按照实施例2中的方法，用同源疫苗株进行血凝抑制试验（HI）。

表5. 4<sup>0</sup>C 下保存血液4天，然后室温下保存4小时。对来自裂解后淋巴

接种后的天数		H3N2		H1N1		B	
		立即	4天后	立即	4天后	立即	4天后
第0天	HI	640		<10		<10	
	细胞	704	598	058	060	224	210
第9天	HI	640		20		40	
	Cells	811	901	091	100	466	446

所有项目均为492 nm 处光密度x 1000以及血浆抗体的HI滴度。"细胞" 为从来自100 μ l血液的裂解淋巴细胞中获得的抗体。

### 结果

接种前已发现该受试者具有显著的抗A/悉尼/5/97(H3N2)疫苗组分的HI滴度，从第0天到第9天，淋巴细胞中释放出的抗体并未显著增加，HI滴度也未显著增大。对于H1N1 组分A/北京/ 262/95应答的HI疫苗是微弱的，这一点从细胞测定中也可看出。最明显的应答是抗乙型流感病毒组分B/北京/184/93的应答，这种情况下，HI 滴度从<10 升至40。这在细胞测定中也得到了验证。

将血样4<sup>0</sup>C下放置4天，然后室温下放置4小时，不会影响来自裂解后的淋巴细胞的记录的抗体活性。立即试验得到的结果与保存4天后得到的结果无显著差异。

其它试验也表明，在类似条件下（冰箱保存，间以室温下6小时的放置）即使6天后也不会影响对来自裂解后淋巴细胞的抗体的测量。

说明书附图

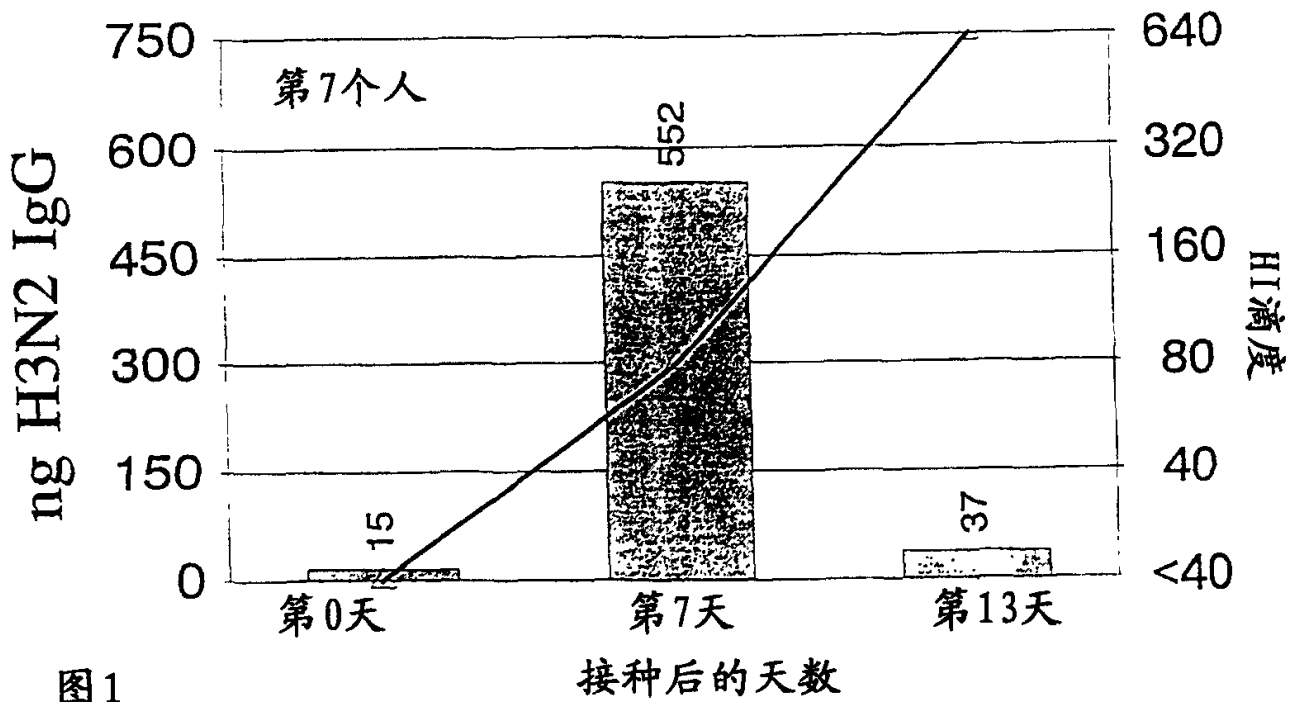
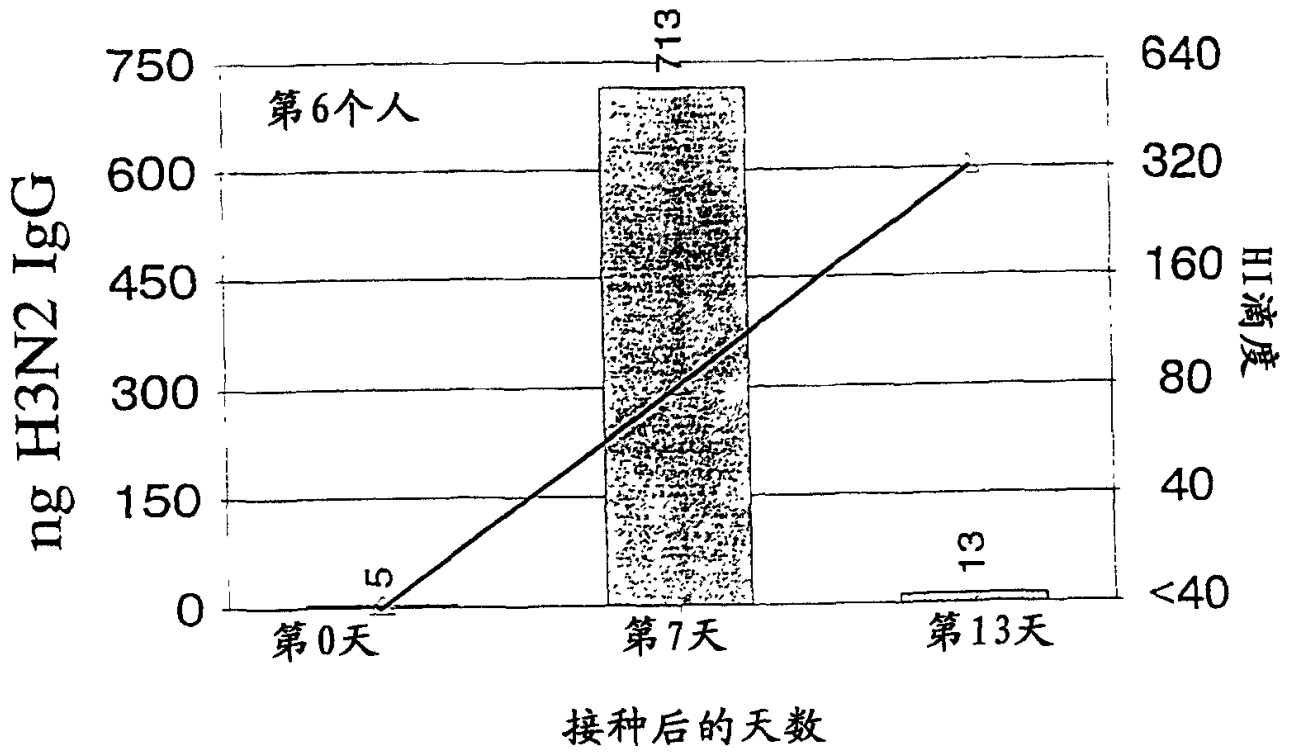


图1

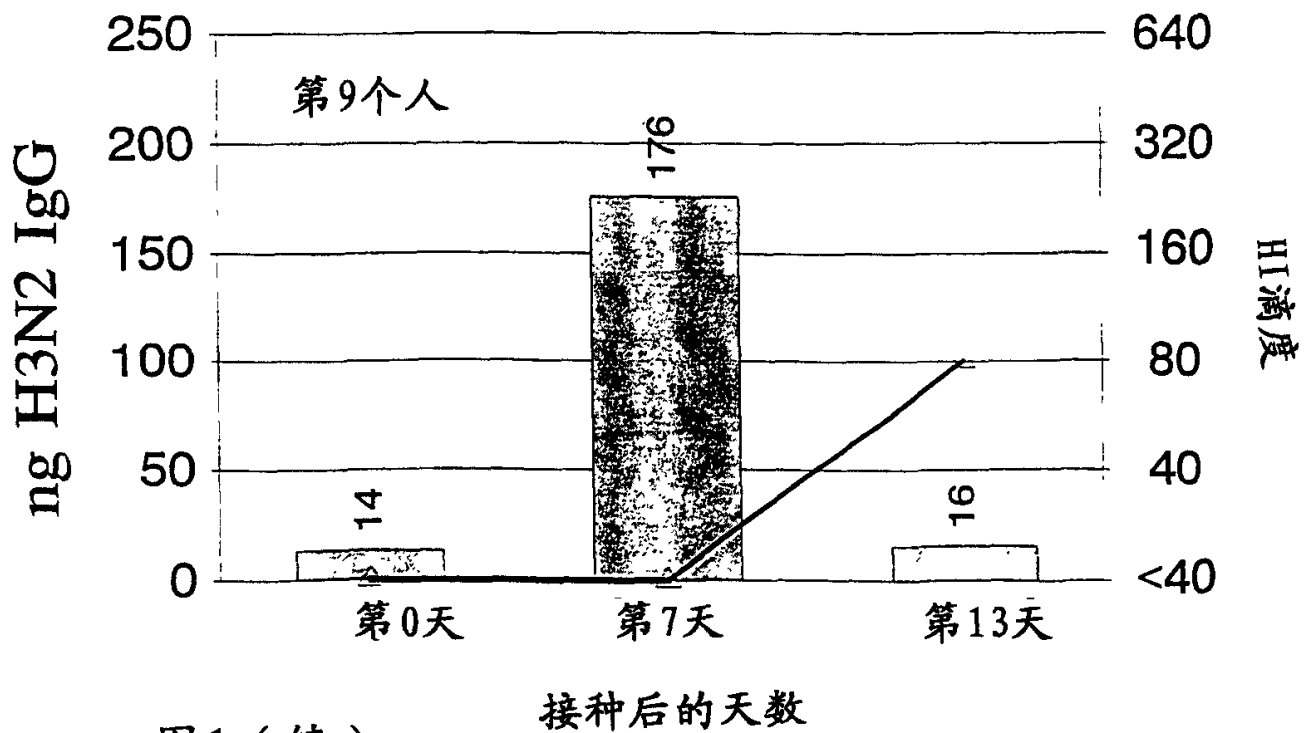
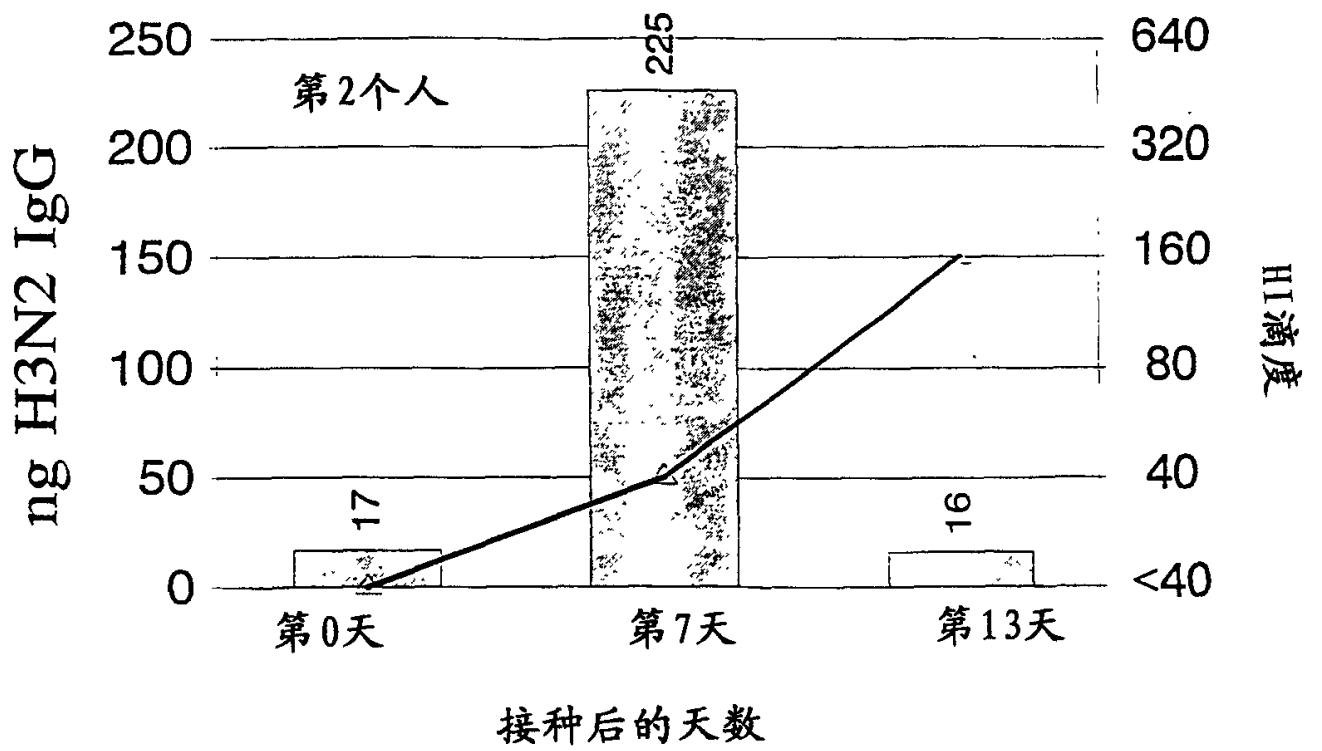


图1 (续)

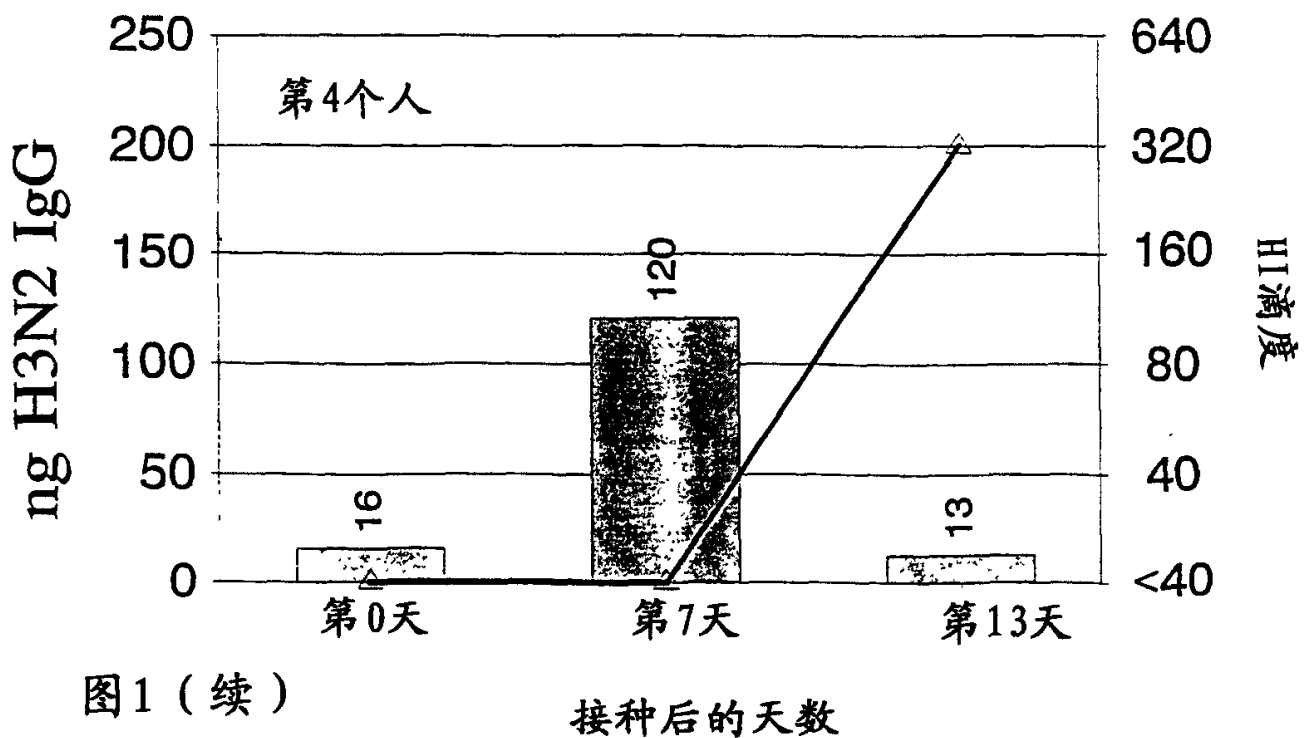
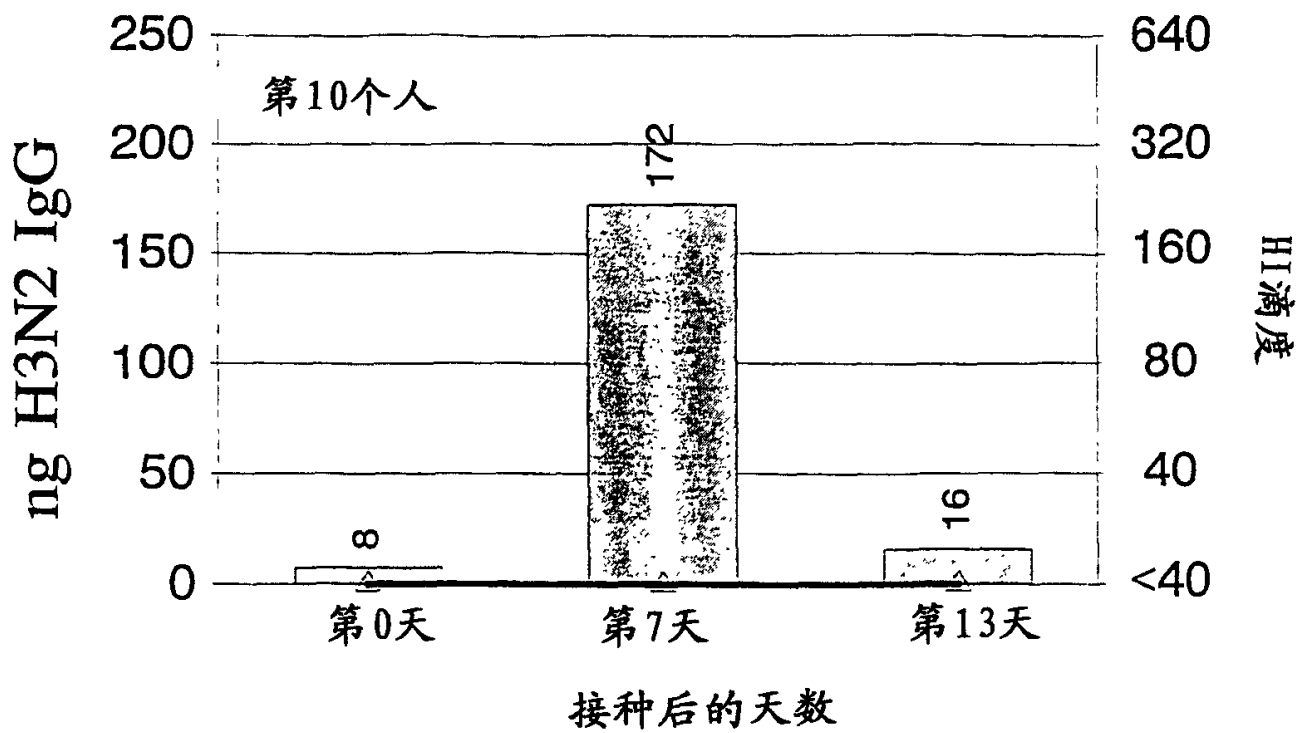


图1 (续)

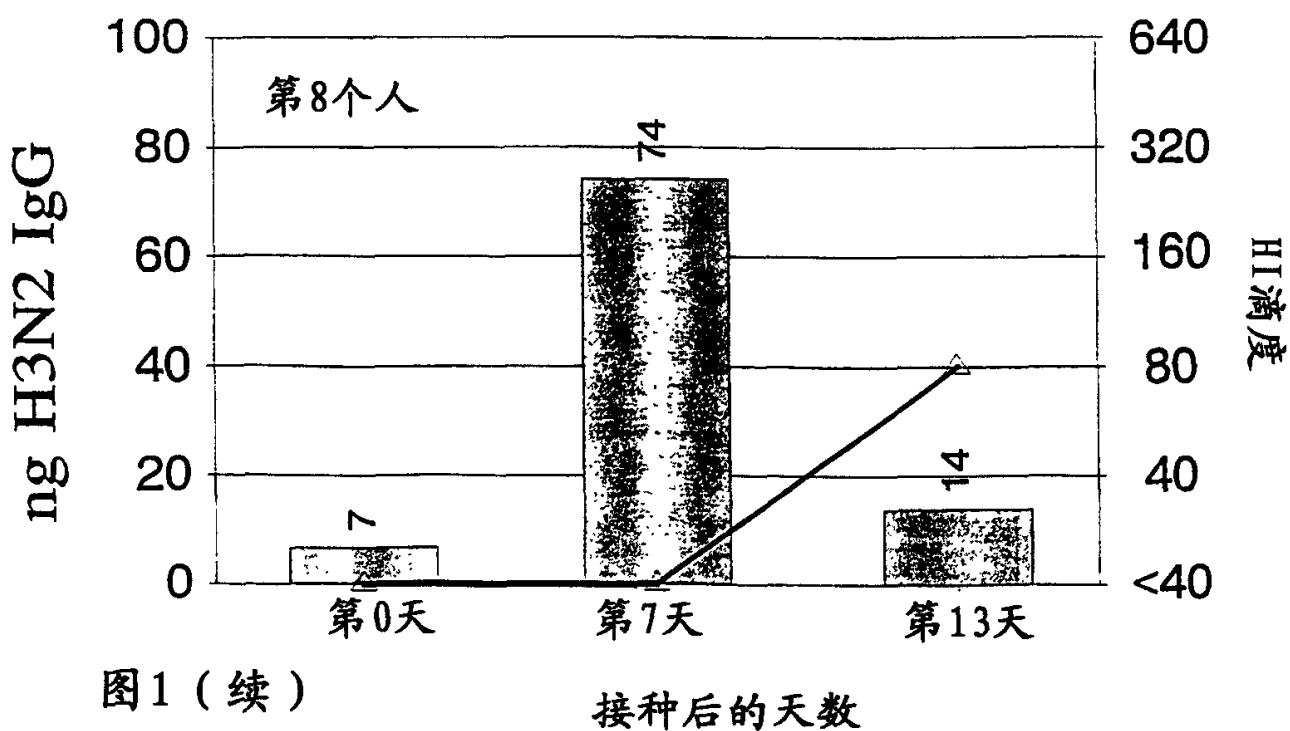
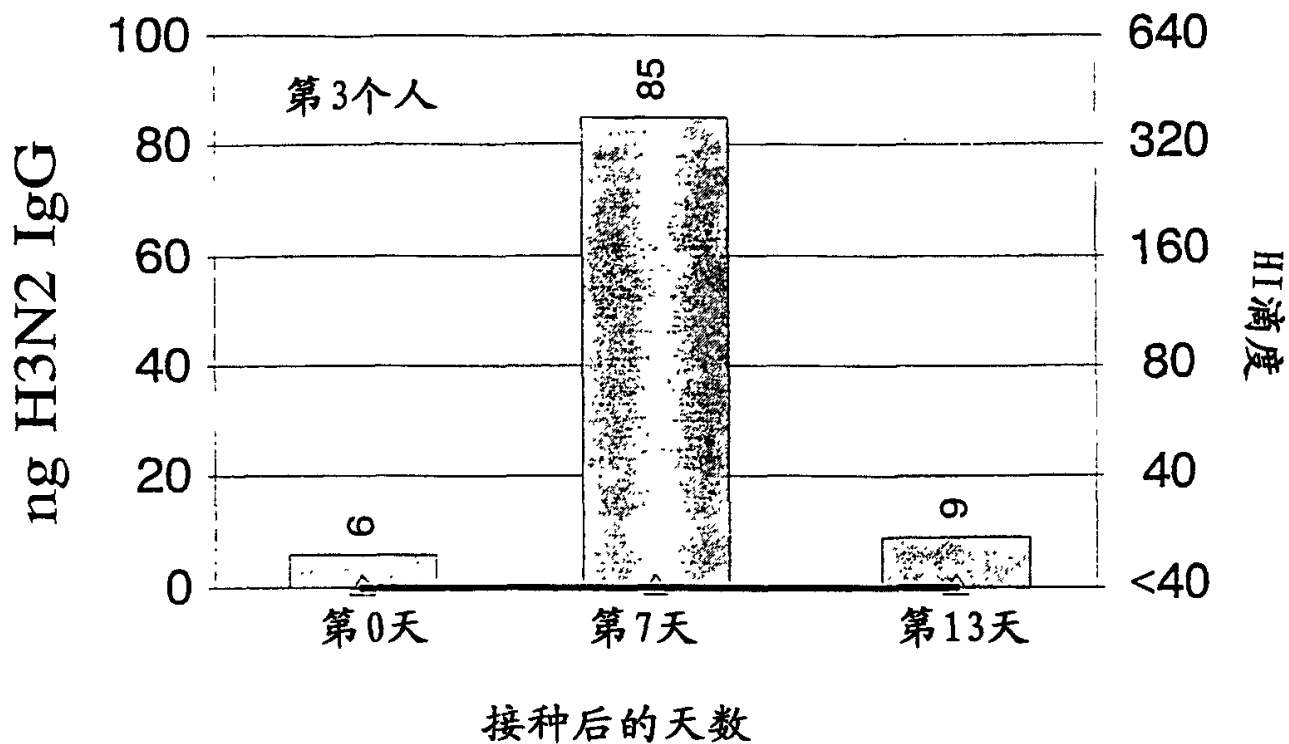


图1 (续)

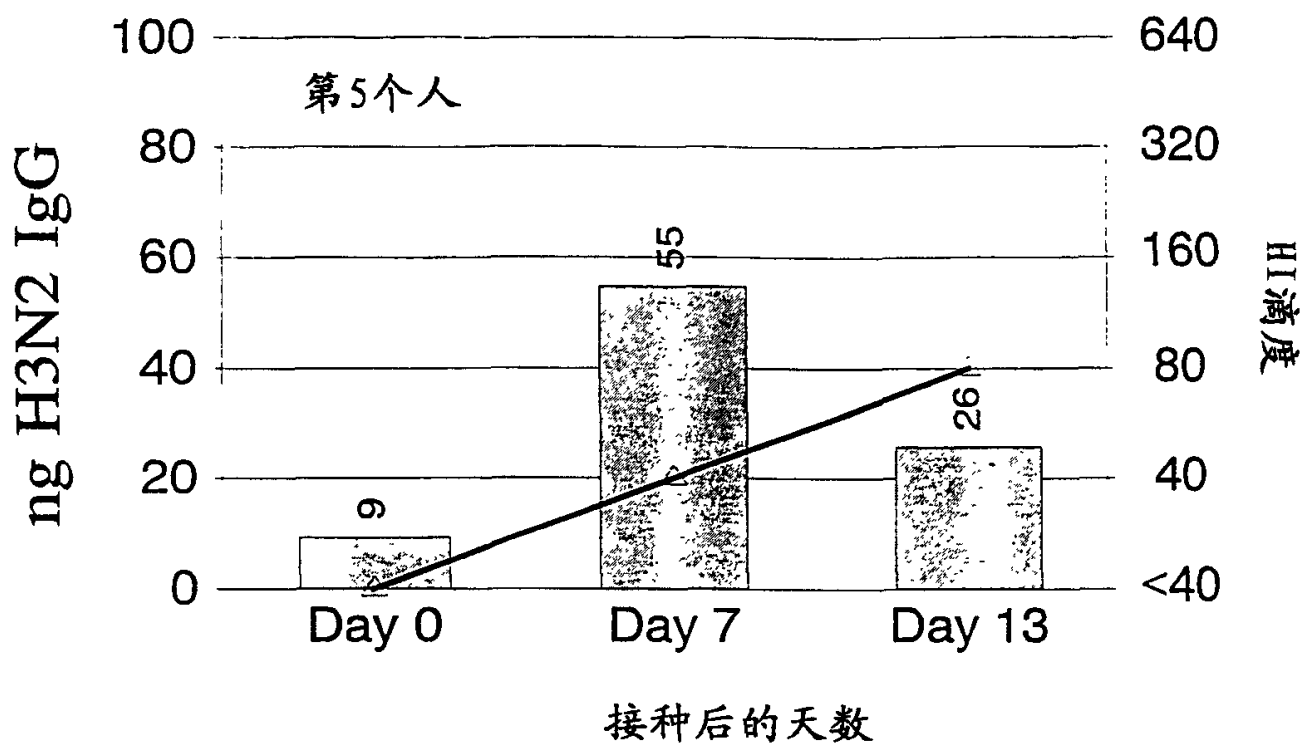


图1 (续)

专利名称(译)	测定方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1355887A</a>	公开(公告)日	2002-06-26
申请号	CN00808978.7	申请日	2000-06-14
[标]发明人	拉斯R哈海姆		
发明人	拉斯·R·哈海姆		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/569 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6854 Y10T436/255 Y10T436/25375 Y10T436/107497 Y10T436/25125		
代理人(译)	李强		
优先权	1999013819 1999-06-14 GB		
其他公开文献	CN1322328C		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种对样品中应答免疫原而合成的新合成抗体存在或含量进行检测的方法,该方法对含淋巴细胞样品中释放出的抗体或其部分进行检测,通过裂解淋巴细胞释放出了其中的与淋巴细胞相关的合成抗体或其部分,从而测定出所述样品中新合成抗体的存在或含量,本发明还提供了利用该方法的诊断方法以及实施该方法的试剂盒。该方法还可经改进后用于非特异性感染标记的检测。

