

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/543 (2006.01)
B01L 3/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580023626.3

[43] 公开日 2007年6月20日

[11] 公开号 CN 1985173A

[22] 申请日 2005.7.15

[21] 申请号 200580023626.3

[30] 优先权

[32] 2004.7.15 [33] GB [31] 0415860.6

[86] 国际申请 PCT/GB2005/002758 2005.7.15

[87] 国际公布 WO2006/008469 英 2006.1.26

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.12

[71] 申请人 牛津免疫科技有限公司

地址 英国牛津

[72] 发明人 T·S·德怀尔 S·W·特纳

T·戴

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司
代理人 张广育 姜建成

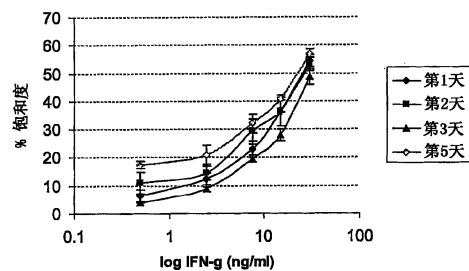
权利要求书 2 页 说明书 14 页 附图 3 页

[54] 发明名称

免疫测定载体

[57] 摘要

提供一种免疫测定方法，包括：(a) 提供具有多个凹孔的测定板，凹孔中含有有抗体结合的固体支持物；(b) 在一个或多个但不是所有的有抗体结合的凹孔中进行测定；(c) 以后再在步骤(b) 未使用的一个或多个凹孔中进行测定。



1. 一种免疫测定方法，包括：
 - (a) 提供具有多个凹孔的测定板，凹孔中含有有抗体结合的固体支持物；
 - (b) 在一个或多个但不是所有的有抗体结合的凹孔中进行测定；
 - (c) 以后再在步骤(b)未使用的一个或多个凹孔中进行测定。
2. 根据权利要求1的测定方法，还包括：
 - (d) 在(b)和(c)的测定中未使用的一个或多个凹孔中一次或多次重复步骤(c)进行测定。
3. 根据权利要求1或2的测定方法，其中在步骤(b)之前覆盖一个或多个凹孔，步骤(b)在未覆盖的凹孔中进行，揭开一个或多个所述覆盖的凹孔以便进行步骤(c)和/或(d)的测定。
4. 根据权利要求3的测定方法，其中所述覆盖物封住所述凹孔。
5. 根据权利要求4的测定方法，其中所述覆盖物包括封膜。
6. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中步骤(b)、(c)和/或(d)的测定包括将所述板在25℃或更高的温度下培养1小时或更长时间。
7. 根据权利要求6的测定方法，其中步骤(b)、(c)和/或(d)的测定包括将所述板在25℃至60℃的温度下培养1至24小时。
8. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中所述测定板在步骤(b)、(c)和/或(d)的每次测定之间被储存。
9. 根据权利要求8的测定方法，其中所述测定板在步骤(b)、(c)和/或(d)的每次测定之间被储存最多达7天。
10. 根据权利要求9的测定方法，其中所述测定板在步骤(b)、(c)和/或(d)的每次测定之间被储存最多达2天。
11. 根据权利要求8至10任一项的测定方法，其中所述测定板被储存于-5至10℃。
12. 根据权利要求11的测定方法，其中所述测定板被储存于2至8℃。
13. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中所述测定板包括微量滴定板。
14. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中所述固体支持物为固体可渗透支持物。

-
15. 根据权利要求 14 的测定方法，其中所述固体支持物包括 PVDF 膜或硝酸纤维素膜。
 16. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中每块测定板用于进行最多达 5 次的独立的测定。
 17. 根据前述权利要求任一项的测定方法，其中所述测定为基于细胞的测定。
 18. 根据权利要求 17 的测定方法，其中所述测定为 ELISPOT 测定。

免疫测定载体

技术领域

本发明涉及测定方法以及在这类测定方法中使用的测定板和试剂。具体而言，本发明涉及结合有抗体的微量滴定板或其他测定板，以及所述板在例如 ELISPOT 测定等的测定方法中的使用和再利用。

背景技术

过滤免疫斑测定也被称为酶联免疫斑点测定 (ELISPOT)，最先被开发用于检测和定量个体抗体分泌 B 细胞。在这种技术开发出来后，它给常规的空斑形成细胞测定提供了一种快速和多用途的备选手段。最近的改进提高了 ELISPOT 的灵敏度，使得可以检测到每秒产生少至 100 个特定蛋白质分子的细胞。这些测定利用了紧挨蛋白质分泌细胞的环境中的相对高浓度的给定蛋白质性细胞产物 (例如细胞因子)。使用高亲和力抗体捕获并检测这些细胞产物。ELISPOT 测定综述于 Current Protocols in Immunology, Unit 6.19 pages 6.19.1-8。

ELISPOT 测定方法包括六个具体步骤：(1) 将纯化的细胞因子特异性抗体包被于有膜支持物的微量滴定板上；(2) 将板封闭以阻止任何其它蛋白质的非特异性吸附；(3) 将分泌细胞因子的细胞与合适的试剂一起培养；(4) 移去细胞和试剂；(5) 加入被标记的抗细胞因子二抗；和 (6) 检测膜上的抗体-细胞因子复合物。

ELISPOT 测定方法利用针对同一细胞因子分子不同表位的两种高亲和力细胞因子特异性抗体：可用两种单克隆抗体，或者一种单克隆抗体和一种多价抗血清的组合。ELISPOT 基于检测单个细胞分泌的细胞因子的显色反应而产生斑点。斑点代表了产生细胞因子的原始细胞的“足迹”。斑点持久，并可通过目测、显微方法或电子手段定量。使用荧光标记的检测方法也已在本领域内有实践。

促进单克隆或多克隆抗体在 PVDF 膜或其它固相上的包被的技术已十分成熟 (Catt and Tregear(1967) ; Salmon et al.(1969) 和

Perlmann (1972))。关键参数包括固相的预活化、抗体溶液的浓缩、包被缓冲液的 pH 和离子强度、包被时间和温度以及包被后的处理。需要使所有这些参数最优化以得到高浓度的包被抗体均匀分布于固相表面的微量滴定板。用于 ELISPOT 测定的微量滴定板中固相的预包被使得大量板之间的灵敏度和稳定性保持一致。这对于诊断样品的常规处理方法十分重要。

ELISPOT 测定可用于临床处置，例如每个试剂盒一次可测定 24 个患者的样品（用 96 孔板，每个样品用 4 个孔）。对少量体积的使用者而言，对板和试剂循环使用的方法会有很大的好处。由于例如下述的原因，很多诊所或实验室无法一次获得 24 个新鲜的血样：在某一具体诊疗时间段内患者人数较少；或者一些实验室出于例如员工和设备等的可用性的后勤原因更愿意进行小量样品的测定。不管在哪种情况下，测定少于 24 个样品并且使板和试剂在以后的时间循环使用或再利用都可以大大提高实验室的效率。

发明内容

本发明中意外地发现抗体预包被的测定板和试剂可以循环使用，也就是说，可以在微量滴定板的一部分（所有孔的一部分）上进行测定，然后将板和试剂储存起来，以后在同一块板的另一部分上使用另外的测定试剂进行其它测定。

根据本发明，提供一种免疫测定方法，包括：

- (a) 提供具有多个凹孔的测定板，凹孔中含有有抗体结合的固体支持物；
- (b) 在一个或多个但不是所有的有抗体结合的凹孔中进行测定；
- (c) 以后再在步骤 (b) 未使用的一个或多个凹孔中进行测定。

附图说明

图 1. 基于表 1 的结果，在乙酸盐封条封住的 ELISPOT 板上进行多次测试的效果。图中表示的是平均值 ± 1 标准差。

图 2. 基于表 2 的结果，在乙酸盐封条封住的 ELISPOT 板上进行多

次测试（长时程）的效果。图中表示的是平均值 ± 1 标准差。

图 3. 基于表 3 的结果，在两种温度下储存的多次使用试剂与对照试剂相比的斑点计数。图中表示的是平均值 ± 1 标准差。由于孔被完全饱和，新鲜阳性的斑点计数显示出人为处理的较低读数。

图 4. 基于表 4 的结果，用不同浓度的干扰素 γ 强化的多次使用的二抗偶联剂与 ELISPOT 板偶联的效果。图中表示的是饱和度百分比的平均值 ± 1 标准差。使用 t 检验发现在所有点得到的结果之间没有显著差异 ($\alpha=0.05$)。

图 5. 对 T 细胞系 D454 E12 用肽池 2 (Peptide pool 2) 进行短期研究 ($n=12$) 的 SFC 计数的平均值 \pm 标准差。

图 6. 对 T 细胞系 D481 B9 用肽池 2 进行长期研究 ($n=8$) 的 SFC 计数的平均值 \pm 标准差。

具体实施方式

本发明涉及使用具有多个凹孔或反应孔的测定板的测定方法，每个凹孔或反应孔中含有有抗体结合的固体支持物。结合的抗体用于在一个或多个凹孔或反应孔中的测定。所述测定可包括加入细胞和试剂，以及在合适的温度下培养。在第一次测定中未使用的凹孔或反应孔随后可以用于在以后的时间进行的测定中。用一块板就可在不同的时间点进行几次独立的测定。

在本发明的一个优选方面中，测定板包括微量滴定板。所述微量滴定板是广泛使用的。这些板通常具有 96 个或 384 个孔。通常孔呈阵列排布，例如 96 孔板为 8×12 排列，384 孔板为 24×16 排列。板上具有许多凹孔或反应孔，96 孔板的孔被设计为使用约 $125 \mu\text{l}$ 样品，384 孔板的孔被设计为使用约 $30 \mu\text{l}$ 样品。孔通常呈规则阵列紧密地排布。这类微量滴定板通常由例如聚丙烯的合适的塑料材料制成。

例如微量滴定板的本发明测定板通常可由合适的塑料材料制成。凹孔或反应孔中含有有抗体结合的固体支持物。优选地，固体支持物为固体可渗透支持物。所述固体支持物通常为在凹孔底部的例如硝酸纤维素膜或 PVDF 膜的膜。或者固体支持物包括凹孔的固体基质，例如固体聚苯乙烯基质或被处理过以接受或增强抗体结合的基质。

固体支持物上有抗体结合。抗体根据要进行的测定选择。优选地，测定为基于细胞的测定，并可以为例如 ELISPOT 测定的免疫斑点测定。通常，使用例如针对人类干扰素 γ 、IL-2 或 TNF- α 的抗体的抗细胞因子抗体进行例如 ELISPOT 测定的测定。通过任何合适的手段将抗体结合于固体支持物。通常，提供有相同的抗体结合于每一凹孔或反应孔中的固体支持物的测定板。

抗体为免疫球蛋白分子，这为本领域所熟知 (Immunology, Ivan Roitt, et al, Gower Medical Publishing, 1985)。它们通常包括由硫氢键 (sulphydryl bond) 连接的两条“重”多肽链和两条“轻”多肽链，以高亲和力结合特定抗原的抗体种类可以按常规以单克隆或多克隆抗体种类形式产生。可以产生特异性针对细胞因子分子的典型抗细胞因子抗体，例如抗干扰素 γ 、IL-2、IL-10 和抗 TNF- α 。也可以产生例如 F(ab)2 片段的抗体片段。原则上，只要分子保留着其抗原特异性结合位点，使其可以结合其相应半抗原/抗原，那么这些分子，包括针对例如类固醇和其它蛋白和非蛋白激素的非细胞因子半抗原/抗原的分子，都可以用于结合固相并用于本文所述类型的免疫测定。

通过加入合适的测定试剂可以进行任何合适的测定。测定可包括根据测定方案在合适的温度下培养该板。通常，这类测定中包括在 20 至 60 $^{\circ}\text{C}$ 之间、1 至 48 小时的培养步骤。例如培养温度通常在 25 至 42 $^{\circ}\text{C}$ 之间，例如约 37 $^{\circ}\text{C}$ 。培养步骤进行 2 至 24 小时，例如至少 4 小时或至少 8 小时例如 8 至 12 小时，或至少 12 小时或至少 16 小时例如 16 至 20 小时。使用同一块测定板的每个测定可以相同或不同。通常，测定为基于细胞的测定，包括含有细胞的样品在测定板上的培养。

在任何特定测定中用不到的凹孔或反应孔可在测定过程中被覆盖。在本发明的一方面，这类凹孔或反应孔被封住。凹孔可使用背面粘性的膜或箔或通过加热将这类膜封于板表面而被封住。这类封板物为本领域所熟知并可包括乙酸盐膜或聚酯 (Mylar) 封板膜。在第一次测定前可对整个测定板提供这种覆盖。

在测定将要进行时可将测定所用的凹孔上的覆盖物移去，而保持其余凹孔被覆盖或被封住。可例如用吸量管将覆盖物穿孔，以便于将试剂加入到要用的反应孔中。也可以将要用的反应孔上的覆盖物完全移去。可以揭开在第一次测定过程中保持封住的一个或多个凹孔以便使用同

一块板进行下一次测定。可以移去所有凹孔或反应孔上的覆盖物，再重新使用该覆盖物只覆盖或封住未使用过或下次测定不需使用的凹孔。这样用同一块板可以进行10次或更多次的独立的测定。通常同一块板可用于进行4至5次独立的测定，每次测定前揭开所需数量的凹孔。每次测定中可使用相同或不同数量的凹孔或反应孔。

具有抗体结合的板可在各次测定之间储存起来。板在各次测定之间可储存最长达1年，例如最长达3至6个月、或例如最长达40天、例如最长达10天，通常在每次测定之间储存1至2天。优选地，板可在1年例如2个月或40天内用于最多达5次独立的测定中，优选在5至10天内使用。板可储存于任何合适的温度，通常在-5至10℃之间，优选地在2至8℃之间。

测定板可具有任何合适数量的凹孔。优选地，测定板为具有96个凹孔或孔的微量滴定板。通常，所有的孔都用抗体预包被。每次将板用于测定时可使用相同或不同数量的凹孔或孔。

优选地，板用于ELISPOT测定，其中经抗体预包被的板被封闭以阻止蛋白质的非特异性吸附，将分泌细胞因子的细胞和合适的试剂与孔一起培养，洗涤除去细胞和试剂，加入标记的抗细胞因子二抗并检测抗体-细胞因子复合物。因此，在测定中可使用含有针对细胞因子抗体的二抗的偶联试剂和含有发色试剂的底物试剂。

在这类测定中，微量滴定板的使用和再利用使得抗体包被的板的使用有更好的成本效益。可对少量的样品进行测定，并不需丢弃部分使用的测定板，没有使用的孔可以用于测定在以后的时间点采集的样品。

以下的实施例解释了本发明：

实施例1：用于酶联检测的PVDF或硝酸纤维素微量滴定板孔的预包被。

将抗体预包被至微量滴定板孔的方法已有明确定义而且很常见。可在50-100mM碳酸盐缓冲液(pH 9.0)中配制一抗，并以每孔0.01-15 μg的抗体水平加入到微量滴定板(例如Multiscreen HTS, Cat. No. MSIPS45, Millipore Corp., Bedford, Mass., USA)的所需孔中(50-100 μl/孔)，在4℃培养过夜。用PBS洗涤除去包被液。以上方法描述于Catt and Tragear(1967)、Salmon et al.(1969)和Perlmann(1972)。

实施例 2: 典型的 ELISPOT 测定: CEF 肽池的评价
受试者为健康的实验室工作人员。

CEF 肽池获自 Mabtech, Stockholm, Sweden。

依照厂商说明书, 使用 Vacutainer CPT 系统 (Becton Dickinson, USA) 回收外周血单核细胞 (PBMC), 离心洗涤并重悬于 AIM-V™ 培养基 (GIBCO™) 中, 并加入至已用抗 IFN γ Mab 1-DIK (h-IFN- γ ELISpot^{PRO} 试剂盒, Mabtech, Stockholm, Sweden) 预包被的 PVDF 为支持物的 96 孔板中, 终体积为每孔 100 μ l 的 AIM-V。加入细胞数通常为每孔 2.5×10^5 。加入 50 μ l 的 2 μ g CEF 肽/ml 的溶液。测定通常在 37℃、含 5%CO₂ 气氛中培养 16-20 小时。移去孔中内容物并洗涤以停止培养。在所有孔中加入 50 μ l 的 1:200 稀释的偶联试剂 (mAb 7-B6-1, h-IFN- γ ELISpot^{PRO} 试剂盒, Mabtech, Stockholm, Sweden) 并在室温下培养一小时。再次洗涤孔并加入 50 μ l 底物试剂 (BCIP/NBT, h-IFN- γ ELISpot^{PRO} 试剂盒, Mabtech, Stockholm, Sweden)。再过 5-15 分钟后用水洗涤孔以终止显色反应。在放大镜下对斑点计数, 并计算空斑形成细胞 (SFC) 的数量。

对照孔含有 PBMC 但不含 CEF 肽。

结果:

参加测试的所有实验室工作人员都对肽显示出阳性反应。

实施例 3: 用于 ELISPOT 测定的预包被的微量滴定板的循环利用

1. 在 5 天时间里循环利用板 4 次。

使用乙酸盐封条 (ICN Biomedicals, USA) 封住预包被的 96 孔微量滴定板 (h-IFN- γ ELISpot^{PRO} 试剂盒, Mabtech, Stockholm, Sweden)。在时间点为零时, 通过移去乙酸盐封条以暴露 24 个孔。在含 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) 的 AIM-V 培养基 (GIBCO) 中制备五种浓度的人干扰素 γ (Autogen Bioclear) 溶液, 使它们的终浓度为 30、15、7.5、2.5 和 0.5ng/mL。将各溶液以 100 μ l/孔的量加至微量滴定板, 每四个孔加一种浓度的溶液。使用仅有 AIM-V 培养基的溶液作为阴性对照。

将板在室温下培养一小时。用 PBS (GIBCO) 洗涤板, 以 50 μ l/孔

的量加入工作强度的偶联试剂。

将板在室温下培养一小时，然后用 PBS 洗涤板，在所有孔中加入 50 μ l 底物试剂。在室温培养七分钟后除去底物，并用去离子水洗涤板以终止反应。

让板在室温下干燥一小时，使用自动板读数仪 (AID, Stra β berg, Germany) 分析每孔的饱和度百分比。在读数后，将板置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的加湿培养箱中过夜以模拟 ELISPOT 测定的培养条件。

在第二天，将板取出并在 2-8 $^{\circ}$ C 放置 2 小时。暴露接下来的 24 个孔并重复上述操作。在干燥后，将板再次置于 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂ 的加湿培养箱中过夜以模拟 ELISPOT 测定的培养条件。

在第三天，重复第二天的操作。在 37 $^{\circ}$ C 培养后将板置于 2-8 $^{\circ}$ C 储存器中直至第五天。

在第五天，重复第二天的操作。将板置于室温干燥过夜并在自动读数仪上读数。

对照板也按上述方法循环。不将板封住作为对照。

结果

表 1. 在乙酸盐封条封住的 ELISPOT 板上进行多次测试的效果。第一栏显示所用干扰素 γ 的浓度 (ng/ml)。n=4。平均值代表测试孔的饱和度百分比。

第 1 天				第 2 天				第 3 天				第 5 天			
平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV	
30	54.5	2.12	3.89	30	53.25	2.50	4.69	30	48.75	2.87	5.89	30	57	1.63	2.86
15	36	0.00	0.00	15	36.5	5.45	14.92	15	28	2.16	7.72	15	40.75	0.50	1.23
7.5	23	2.83	12.30	7.5	29.25	4.35	14.87	7.5	19.5	1.29	6.62	7.5	32	3.37	10.52
2.5	12.5	2.12	16.97	2.5	14.5	2.52	17.36	2.5	8.75	0.96	10.94	2.5	21	3.46	16.50
0.5	6.5	2.12	32.64	0.5	11	3.92	35.60	0.5	4	0.00	0.00	0.5	17.5	1.29	7.38
0	6.5	2.12	32.64	0	8.25	2.87	34.82	0	4	1.41	35.36	0	14.75	2.87	19.47

2. 在 10 天时间里循环利用板 4 次。

使用乙酸盐封条封住预包装的 96 孔微量滴定板。在时间点为零时，通过移去乙酸盐封条以暴露 24 个孔。在含 0.5% 牛血清清蛋白 (BSA) 的 AIM-V 培养基 (GIBCO) 中配制五种浓度的人干扰素 γ (Autogen Bioclear) 溶液，使它们的终浓度为 30、15、7.5、2.5 和 0.5 ng/mL。

将各溶液以 $100 \mu\text{l}$ /孔的量加至微量滴定板，每四个孔加一种浓度的溶液。使用仅有 AIM-V 培养基的溶液作为阴性对照。

将板在室温下培养一小时。用 PBS (GIBCO) 洗涤板，以 $50 \mu\text{l}$ /孔的量加入工作强度的偶联试剂。

将板在室温下培养一小时，然后用 PBS 洗涤板，在所有孔中加入 $50 \mu\text{l}$ 底物试剂。在室温培养七分钟后除去底物试剂，并用去离子水洗涤板以终止反应。

让板在室温下干燥一小时，使用自动板读数仪分析每孔的饱和度百分比。在读数后，将板置于 37°C 、 $5\%\text{CO}_2$ 的加湿培养箱中过夜以模拟 ELISPOT 测定的条件。

在第二天，将板置于 $2-8^\circ\text{C}$ 直至第三天。

在第三天，使用板上接下来的 24 个孔重复第一天的操作。

在第四天，将板置于 $2-8^\circ\text{C}$ 直至第八天。

在第八天，按第一天所述进行测定。

在第九天，将板置于 $2-8^\circ\text{C}$ 直至第十天，并在第十天使用最后的 24 个孔进行第一天所述的测定。将板置于室温干燥过夜并用自动读数仪读数。

结果

表 2. 在乙酸盐封条封住的 ELISPOT 板上进行多次测试（长时程）的效果。第一栏显示所用干扰素 γ 的浓度 (ng/ml)。n=4。平均值代表测试孔的饱和度百分比。

第 1 天				第 3 天				第 8 天				第 10 天			
平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV		平均值	标准差	%CV	
30	35.75	1.26	3.52	30	35.75	1.71	4.78	30	35.75	1.26	3.52	30	48.75	1.26	2.58
15	23	2.45	10.65	15	24	1.83	7.61	15	21	1.83	8.69	15	35.25	1.89	5.37
7.5	14.75	1.71	11.58	7.5	16.75	2.06	12.31	7.5	13	1.83	14.04	7.5	28.25	5.38	19.04
2.5	8.25	0.96	11.61	2.5	7.75	0.96	12.35	2.5	5.75	1.71	29.70	2.5	24.25	4.99	20.58
0.5	8.75	0.50	5.71	0.5	5	1.41	28.28	0.5	4	0.82	20.41	0.5	18.75	0.96	5.11
0	5.75	0.96	16.65	0	5.5	1.00	18.18	0	3.5	0.58	16.50	0	22.25	4.99	22.43

使用聚酯封板条重复了相同的实验。

封板条（乙酸盐或聚酯）的使用对测定没有不良的影响。用未封的

对照板得到的结果与预先封住的板的结果相近,并且在预先封住的板中没有观察到污染或不良的影响。

封条本身对未使用的孔提供了良好的保护。乙酸盐和聚酯封条都便于使用,并可出于多次使用的目的对 ELISPOT 板提供便宜和有效的保护方式。

为做出全面评估,使用细胞和抗原重复了上述步骤。

实施例 4: 用于 ELISPOT 测定的试剂的循环使用。

1. 肽池 (1 和 2) 和阳性对照试剂

使肽池 1 和 2 和阳性对照试剂 (PCR) 的小瓶经过多次使用步骤,以便模拟在循环使用的板上顺序进行的 ELISPOT 测定。

肽池 1 和 2 每个都含有由结核分枝杆菌 (*M. tuberculosis*) 基因组的 RD1 区域编码的肽的混合物 (Ewer, et al. Comparison of T-cell-based assay with tuberculin skin test for diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection in a school tuberculosis outbreak. *The Lancet* 2003; 361: 1168-1173)。阳性对照试剂 (PCR) 为以 $1\ \mu\text{g}/\text{ml}$ 溶于细胞培养基 (AIM-V) 的细胞促分裂原 PHA 的混合物。

将肽池 1 和 2 和阳性对照试剂的小瓶打开,每个小瓶中取出 $50\ \mu\text{l}$ 溶液弃去。然后将小瓶重新封好并置于 $2-8^\circ\text{C}$ 或 37°C 过夜。在第二天和第三天从储存器中取出小瓶,每次再取出 $50\ \mu\text{l}$ 溶液。然后将小瓶置于其原保存条件下。

将来自五个人类捐献者的 PBMC 集中储存于液氮,然后解冻并用于在 ELISPOT 测定中评价循环使用的试剂的表现。

将 PBMC 解冻并用 AIM-V 培养基 (GIBCO) 洗涤。使用如 Cell Proliferation and Apoptosis (D. Hughes and H. Mehmet, 2003) 中所述的锥虫蓝染料排除法进行存活 PBMC 的计数。

将循环使用方法得到的试剂加入至预包被的 96 孔微量滴定板中进行如上所述的典型的 ELISPOT 步骤。

对照孔含有新鲜 (未循环使用) 的试剂。阴性对照含有 PBMC 但不含肽池 1 或 2 或 PCR。

结果

表 3. 与对照试剂相比, 使用在两种温度下储存的多次使用试剂结果产生的斑点计数 (SFC)。

	PCR 2-8°C	PCR 37°C	PCR 新鲜	肽池 1 2-8°C	肽池 1 37°C	肽池 2 2-8°C	肽池 2 37°C
SFCs 平均值	30.5	33.5	8.25	1	1.5	3	3
标准差	10.61	0.71	2.75	0.00	0.71	1.41	0.00
%CV	34.78	2.11	33.38	0.00	47.14	47.14	0.00

2. 偶联试剂

将偶联试剂瓶从储存器中取出并在 PBS 中以 1:200 稀释。1 小时后将含有稀释的偶联试剂的管置于 2-8°C。原先的偶联试剂瓶也再次置于 2-8°C。在最多 4 天内以 24 小时的时间间隔重复上述过程。通过进行实施例 3 所述的干扰素 γ 测定来测试所有稀释的偶联试剂溶液和原先的储液。

结果

表 4. 多次使用的二抗偶联剂与含有不同浓度干扰素 γ 的 ELISPOT 板偶联的效果。使用 t 检验发现在所有点得到的结果之间没有显著差异 ($\alpha=0.05$)。平均值代表测试孔的饱和度百分比。

	第 1 天		第 2 天		第 3 天		第 4 天		新鲜	
IFN γ (ng/ml)	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差	平均值	标准差
30	45.5	3.54	47.5	0.71	48.5	2.12	44.5	0.71	46.5	0.71
15	29	1.41	32	0.00	31.5	0.71	27.5	0.71	29	0.00
7.5	20.5	0.71	16	1.41	15	1.41	12	1.41	13.5	3.54
2.5	14.5	4.95	13.5	0.71	13	1.41	9.5	0.71	11	1.41
0.5	15.5	3.54	14.5	0.71	12.5	0.71	10	0.00	11	1.41

以上结果显示用于测定的试剂是稳定的(表 3 和 4, 图 3 和 4)。

在所有条件下发现阴性对照、肽池 1 和肽池 2 的结果中的斑点计数

都没有差异。在目视检查后，在任一小组或试剂中均未观察到污染或褪色。当孔被完全饱和时“新鲜阳性”样品显示出低的斑点计数，因此计数器不能分辨确定的斑点。从这些结果可以得出结论：试剂在循环使用条件下是稳定的。

实施例 5：用于使用捐献者 PBMC 的 ELISPOT 测定的试剂和板的循环使用。

用乙酸盐封条封住微量滴定板。然后使每块板经过循环过程以模拟在多个时刻“顺序”进行 ELISPOT 测定的过程。上述板的培养过程包括在 37℃、5%CO₂ 气氛的加湿培养箱中过夜培养（16-20 小时），然后在 2-8℃ 储存 8 小时。上述过程重复最多达 6 次。

在真正的 ELISPOT 测定之前使微量滴定板循环 3、4 和 5 次。

使用人类捐献者样品（n=3）和 ELISPOT 测定方法测量经过循环的板的性能。在标准测定中以每肽 2 μg/ml 使用 CEF 肽池抗原（Mabtech, Stockholm, Sweden）以刺激测量的激活 T 细胞和释放的 IFN-γ。用如上所述的标准 ELISPOT 测定，相对未刺激的细胞对照测量了 1 μg/ml 的阳性对照溶液（PHA, MP Biomedicals）。

捐献者 1

表 5. 以测试孔的饱和度百分比和 SFC 表示的结果平均值

	阴性 (SFC)	阳性对照 (%饱和度)	CEF (SFC)
0 循环	0	44.5	45
3 循环	0	32	44.5
4 循环	0	29	45
5 循环	0	31.5	39.5

捐献者 2

表 6. 以测试孔的饱和度百分比和 SFC 表示的结果平均值

	阴性	阳性对照	CEF

	(SFC)	(%饱和度)	(SFC)
0 循环	0.5	60	46
3 循环	1	52	59
4 循环	1	46	50
5 循环	0	41.5	40.5

捐献者 3

表 7. 以测试孔的饱和度百分比和 SFC 表示的结果平均值。n/a 为在该时间点未获得结果。

	阴性 (SFC)	阳性对照 (%饱和度)	CEF (SFC)
0 循环	0	71.5	68.5
3 循环	n/a	n/a	n/a
4 循环	0.5	61	68
5 循环	n/a	n/a	n/a

从三个被测捐献者得到的结果显示：观察到的对 CEF（用于刺激阳性 T 细胞反应的抗原）的反应产生的斑点计数在 0、3、4 和 5 循环时是一致的。这一反应表明 ELISPOT 板可以重复利用最多达 5 次，并且乙酸盐封板条对未使用的孔提供了足够的保护。

随着循环次数的增加，由这三个捐献者所得的阳性对照反应逐渐变弱。观察到在第 5 循环时目测该反应有所减弱。这一观察结果由饱和度百分比水平得到了证实。在三个捐献者样本中都清楚出现的饱和度减弱表明板循环过程有一定的影响。可能是重复的循环使得一部分包被的抗体变性。只有当 ELISPOT 孔的饱和度水平很高时（例如在阳性对照溶液产生的干扰素 γ 饱和度的情况下）才可目测到这一现象。在五个循环后斑点强度的下降并不影响斑点计数。

这些数据可支持被封住的 ELISPOT 板可循环最多达四次的事实。

实施例 6 - ELISPOT 板的扩展应用

材料和方法

白细胞的制备

已知对 Mtb 抗原反应的 CD4 T 细胞克隆在本测定中被用作白细胞源，T 细胞系 D481 F4 对肽池 1 有反应，T 细胞系 D481 B9、D481 G7 和 D454 E12 对肽池 2 有反应（得自 D.M. Lewinsohn, Oregon Health & Science University, 数据未公开）。使用自体淋巴细胞克隆系（LCL）（亦得自 D.M. Lewinsohn, Oregon Health & Science University）提供抗原呈递细胞。将 T 细胞克隆和自体 LCL 在 37°C 快速解冻，并向细胞滴加 1ml 预热（37°C）的 GIBCO™ AIM-V™ 细胞培养基（Invitrogen, 产品编号 31035-025）。用 AIM-V 调节体积至 10ml，然后 600 × g 离心 7 分钟。将细胞沉淀重悬于 10ml 新鲜的热培养基中，350 × g 离心 7 分钟。

存活率计数

将细胞沉淀重悬于 1ml AIM-V 中；取出 10 μl 并在 0.4% (w/v) 锥虫蓝中稀释 5 倍；取 10 μl 稀释的细胞置于血细胞计数器上并用倒置显微镜计数存活细胞。将细胞在 AIM-V 中稀释至合适的细胞数量（每 100 μl 含 10000 个 TB 细胞克隆，每 50 μl 含 20000 个 LCL 细胞）。

T SPOT 测定

根据厂商说明书（目录号：TB.200, Oxford Immunotec）进行 T SPOT-TB 测定，除了测定中需要在抗 IFN-γ 抗体预包被的底部有膜的 96 孔板中按需要每孔加入 50 μl 的 LCL（20000 个细胞）和 100 μl 的 T 细胞克隆（10000 个细胞）。在短期研究中使用三块 T SPOT-TB 板，在长期研究中使用两块板，每块板含有每个细胞系每次循环的四个平行样（短期研究 n=12，长期研究 n=8）。

孔中适当地含有肽池 1 或肽池 2。将板在 37°C、5%CO₂ 条件下培养 16-20 小时。用 PBF 洗涤孔，用提供的抗 IFN-γ 抗体偶联剂和酶底物显色以显示被捕获的 IFN-γ 的存在。每个斑点记录一个特定抗原反应性 T 细胞的足迹。

板的再利用

在十天或两个月的时间段内用 T SPOT 板进行四轮 T SPOT-TB 测定。短期研究中在第 1、3、8 和 10 天进行测定，长期研究中在第 1、2、7 和 8 周进行测定。在以上两种研究中均使用 Titer-Tops 粘性膜(Fisher Scientific) 以避免未使用孔的污染。在测定之间将 T SPOT 板储存于 2-8℃。

结果

在十天或两个月的时间段内用板进行四轮 T SPOT-TB 测定，并比较 T 细胞系的 SFC 计数。T 细胞系 D481 F4 对肽池 1 有反应，T 细胞系 D481 B9、D481 G7 和 D454 E12 对肽池 2 有反应。

样品 D481 F4、D481 B9、D481 G7 和 D454 E12 的结果显示出对 Mtb 抗原的强特异性反应。例如，D454 E12 的 SFC 计数在短期研究的四次测定中保持一致（图 5），在使用 2 样本的假定等方差的 t 检验将第 1 次测定与第 2、3 和 4 次测定的 SFC 计数比较时，发现四次测定之间没有显著差异 ($p \geq 0.05$)（表 8）。对 D481 F4、D481 B9 和 D481 G7 也发现了相同的结果（数据未示出）。

表 8: 在对 D454 E12 的四次测定之间 SFC 计数的统计学分析（短期研究）。

	测定 1	测定 2	测定 3	测定 4
P 值	-	0.740	0.430	0.576

在长期研究中的所有四次测定之间也观察到了类似的结果。例如，对于 D481 B9 的 SFC 计数，在四次测定之间未显示出特定的趋势(图 6)。

上述结果显示在十天和两个月的时间段内用 T SPOT-TB 进行四次测定可以得到一致的结果。这一事实存在于例如对于 T 细胞克隆 D454 E12 和 D481 B9 的测定中。对于在两种研究中测试过的所有细胞系都能得到同样的结果。

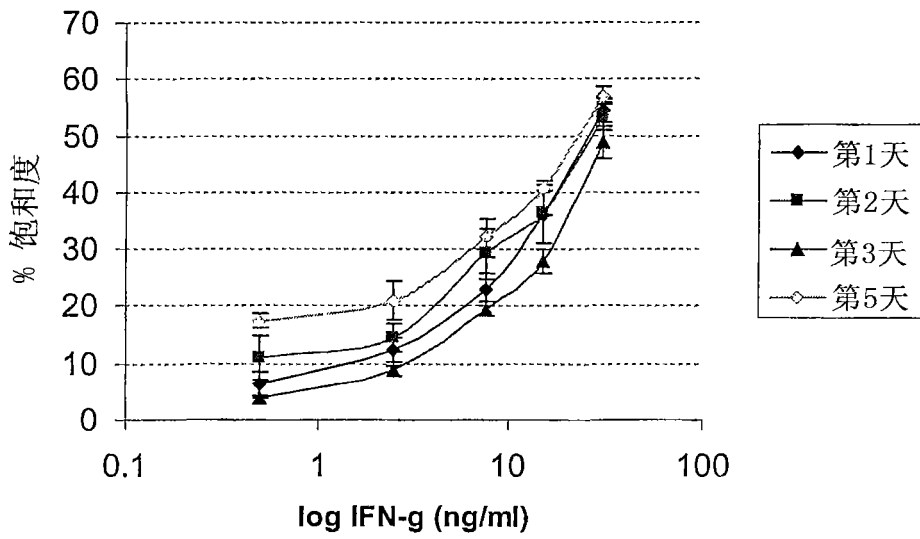


图 1

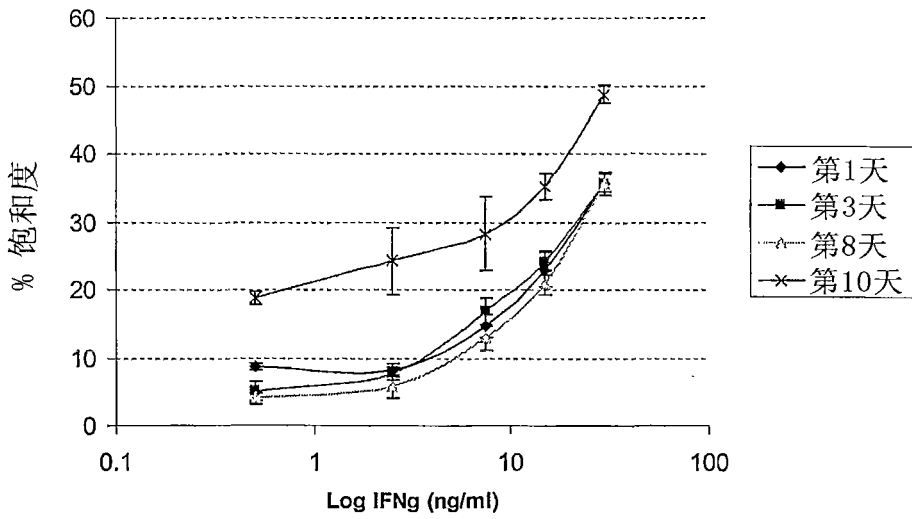


图 2

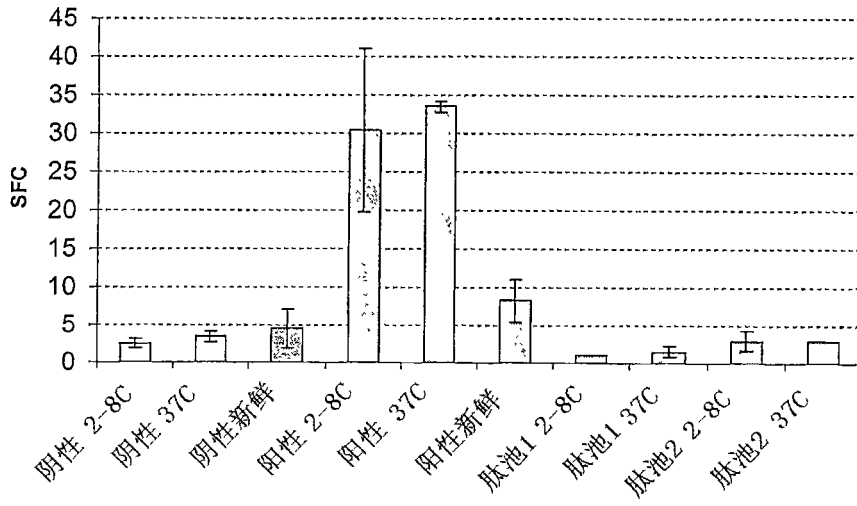


图 3

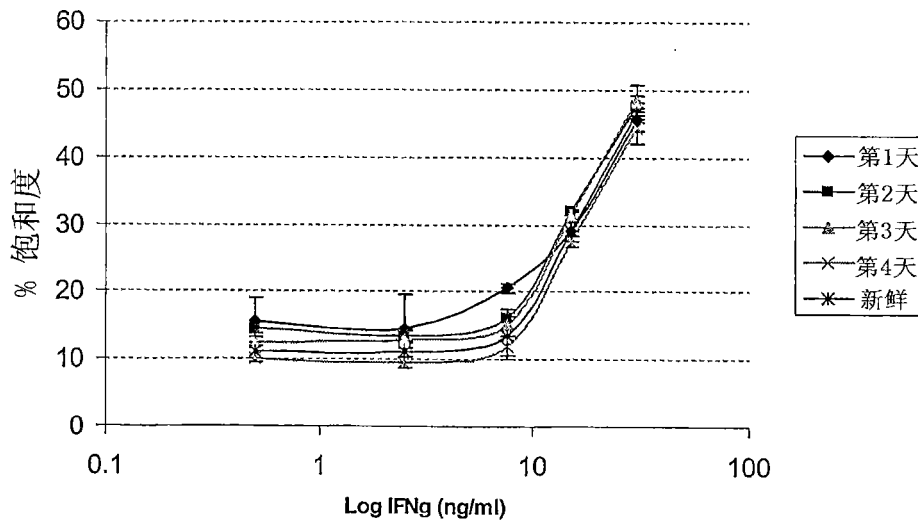


图 4

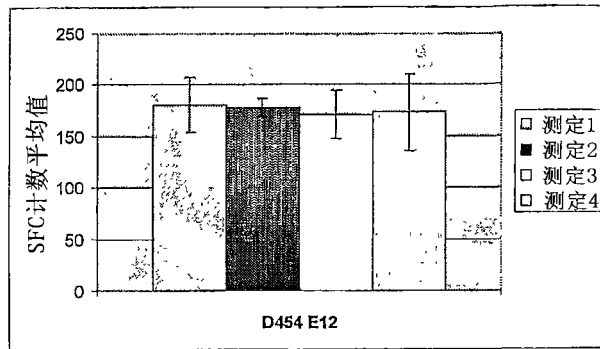


图 5

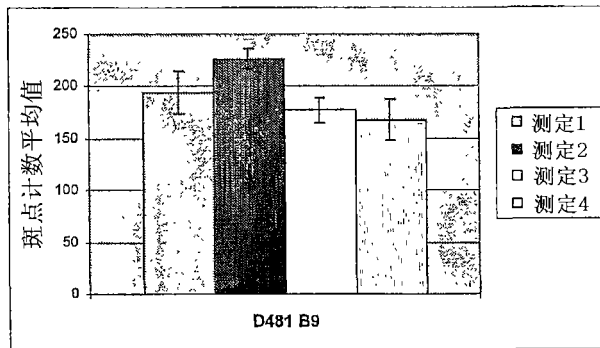


图 6

专利名称(译)	免疫测定载体		
公开(公告)号	CN1985173A	公开(公告)日	2007-06-20
申请号	CN200580023626.3	申请日	2005-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	牛津免疫科技有限公司		
[标]发明人	TS德怀尔 SW特纳 T戴		
发明人	T·S·德怀尔 S·W·特纳 T·戴		
IPC分类号	G01N33/543 B01L3/00 G01N33/53 G01N33/549 G01N35/02		
CPC分类号	G01N33/54366 B01L3/5085		
代理人(译)	姜建成		
优先权	2004015860 2004-07-15 GB		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供一种免疫测定方法，包括：(a)提供具有多个凹孔的测定板，凹孔中含有有抗体结合的固体支持物；(b)在一个或多个但不是所有的有抗体结合的凹孔中进行测定；(c)以后再在步骤(b)未使用的一个或多个凹孔中进行测定。

