



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101861383 B

(45) 授权公告日 2015. 11. 25

(21) 申请号 200880101692. 1

C12M 1/18(2006. 01)

(22) 申请日 2008. 08. 01

C12Q 1/02(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/15(2006. 01)

201493/2007 2007. 08. 02 JP

G01N 33/50(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2010. 02. 02

(56) 对比文件

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2008/063874 2008. 08. 01

WO 2007076411 A1, 2007. 07. 05,

CN 2478109 Y, 2002. 02. 20, 全文 .

CN 2478109 Y, 2002. 02. 20, 全文 .

(87) PCT国际申请的公布数据

W02009/017226 JA 2009. 02. 05

Adam Rosenthal et al. cell patterning chip for controlling the stem cell microenvironment. 《Biomaterials》. 2007, 第 28 卷 3208-3216.

(73) 专利权人 富山县

地址 日本富山县富山市新总曲轮 1 番 7 号

专利权人 瓦尔内瓦奥地利有限责任公司

Adam Rosenthal et al. cell patterning chip for controlling the stem cell

microenvironment. 《Biomaterials》. 2007, 第 28 卷 3208-3216.

(72) 发明人 金艾顺 岸裕幸 村口笃 小幡勤

(74) 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司 11100

审查员 彭海航

代理人 程凤儒

(51) Int. Cl.

C12M 1/34(2006. 01)

权利要求书2页 说明书21页 附图18页

(54) 发明名称

细胞筛选方法

(57) 摘要

本发明的目的是提供一种能同时测定在芯片上超过 1 万个抗原刺激下的淋巴细胞的反应性、及掌握个别细胞状态的方法, 以及用于该方法的装置。本发明的微孔阵列是在基体的一侧主表面上具有多个孔, 孔具有仅可容纳一个细胞的尺寸的微孔阵列。在孔周围的主表面上形成了与孔中容纳的细胞产生的物质具有结合性的物质的覆盖层。涉及一种筛选目的细胞的方法, 包括 : 在上述微孔阵列的孔中同时容纳被检体细胞和细胞培养液 ; 将覆盖层与孔浸渍在培养液中 ; 在培养液中含有的物质能从孔向覆盖层扩散的状态下培养细胞 ; 向覆盖层提供标识物, 该标识物可与被检体细胞含有的目的细胞产生的物质特异性结合 ; 根据标识物检测目的细胞产生的已与覆盖层物质相结合的物质, 由此确定目的细胞。

1. 一种微孔阵列,用于筛选目的细胞,该目的细胞为分泌特异性免疫球蛋白或特异性细胞因子的细胞,该微孔阵列是在基体一侧的主表面上具有多个孔,孔具有仅可容纳一个细胞的尺寸的微孔阵列,其特征在于,至少在上述孔外部周围的上述主表面的至少一部分上具有含有结合性的物质的覆盖层,该覆盖层结合在孔外部周围的主表面上,所述具有结合性的物质是与上述孔中容纳的目的细胞分泌的至少一部分特异性免疫球蛋白或特异性细胞因子具有结合性的物质;不含具有结合性的物质的覆盖层的上述主表面的至少一部分涂布有封闭剂。

2. 如权利要求 1 记载的微孔阵列,在该微孔阵列的至少一部分孔中同时容纳细胞和细胞培养液,将上述覆盖层及孔浸渍在培养液中,在培养液含有的物质能从孔向上述覆盖层扩散的状态下培养细胞;除去上述培养后的培养液之后,检测孔中容纳的目的细胞分泌的物质与上述覆盖层的物质有无结合。

3. 如权利要求 1 或 2 记载的微孔阵列,上述孔中容纳的目的细胞是分泌免疫球蛋白的细胞,与分泌免疫球蛋白的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是抗免疫球蛋白抗体或抗原。

4. 如权利要求 3 记载的微孔阵列,使用与分泌的免疫球蛋白相对应的抗体或抗原进行上述有无结合的检测。

5. 如权利要求 1 或 2 记载的微孔阵列,上述孔中容纳的目的细胞是分泌细胞因子的细胞,与分泌细胞因子的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是抗细胞因子抗体或细胞因子受体。

6. 如权利要求 5 记载的微孔阵列,使用与分泌的细胞因子相对应的抗体或细胞因子受体进行上述有无结合的检测。

7. 如权利要求 1 或 2 记载的微孔阵列,上述孔中容纳的目的细胞是分泌免疫球蛋白的细胞,与分泌免疫球蛋白的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是细胞因子受体或受体。

8. 如权利要求 7 记载的微孔阵列,使用所述受体的细胞因子或配基进行上述有无结合的检测。

9. 如权利要求 1 记载的微孔阵列,分泌免疫球蛋白的细胞及分泌细胞因子的细胞是天然细胞或杂交瘤细胞。

10. 如权利要求 1 记载的微孔阵列,基体是板状的。

11. 目的细胞的筛选方法,该目的细胞为分泌特异性免疫球蛋白或特异性细胞因子的细胞,该方法包括以下步骤:

在权利要求 1-10 中任意一项所述的微孔阵列的至少一部分孔中容纳被检体细胞和细胞培养液;

将上述覆盖层及孔均浸渍在培养液中,在培养液中含有的物质能从孔向上述覆盖层扩散的状态下培养细胞;

用任意方法除去培养液后,向上述覆盖层中加入与被检体细胞含有的目的细胞分泌的物质特异性结合的标识物;

与上述覆盖层物质结合后,根据上述标识物检测目的细胞分泌的物质,确定目的细胞。

12. 如权利要求 11 记载的筛选方法,包括:含有上述被检体细胞的细胞是接受预期抗

原的刺激能分泌物质的状态的细胞。

13. 如权利要求 11 或 12 记载的筛选方法,上述被检体细胞包括分泌免疫球蛋白的细胞,与目的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是抗免疫球蛋白抗体或抗原,目的细胞是分泌抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

14. 如权利要求 13 记载的筛选方法,使用与分泌的免疫球蛋白相对应的抗体或抗原进行上述有无结合的检测。

15. 如权利要求 11 或 12 记载的筛选方法,上述被检体细胞包括分泌免疫球蛋白的细胞,与目的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是细胞因子受体或受体,目的细胞是分泌抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

16. 如权利要求 15 记载的筛选方法,使用细胞因子或配基进行上述有无结合的检测。

17. 如权利要求 11 或 12 记载的筛选方法,上述被检体细胞包括分泌细胞因子的细胞,与目的细胞分泌的至少一部分物质具有结合性的物质是抗细胞因子抗体或细胞因子受体,目的细胞是分泌抗原特异性细胞因子的细胞。

18. 如权利要求 17 记载的筛选方法,使用与分泌的细胞因子相对应的抗体或细胞因子受体进行上述有无结合的检测。

19. 如权利要求 11 ~ 18 任一项记载的筛选方法,分泌免疫球蛋白的细胞及分泌细胞因子的细胞是天然细胞、杂交瘤细胞或细胞株。

20. 目的细胞的制造方法,包括从孔中回收根据权利要求 11 ~ 19 任一项记载的筛选方法确定的目的细胞的步骤。

细胞筛选方法

[0001] 相关申请的相互参照

[0002] 本申请请求 2007 年 8 月 2 日申请的日本特愿 2007-201493 号的优先权,其全部内容在此特别引入作为参考。

技术领域

[0003] 本发明涉及细胞筛选方法以及用于该方法的微孔阵列。更详细地,本发明涉及产生特异性免疫球蛋白的细胞及产生特异性细胞因子的细胞等免疫细胞的筛选方法、以及用于该方法的微孔阵列。

背景技术

[0004] 以往,为了制造单克隆抗体,需要制造产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞。在以往的杂交瘤细胞制造方法中,制造出杂交瘤细胞后对产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞克隆体进行筛选。然而,杂交瘤细胞的制造效率低下。也就是说,并不是所有的 B 淋巴细胞均形成杂交瘤细胞,与骨髓瘤细胞融合的 B 淋巴细胞中的一部分形成杂交瘤细胞。又,即使用受过抗原刺激的脾细胞制造杂交瘤细胞,也无法仅得到产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞,得到的大部分杂交瘤细胞要么将产生无关的抗体,要么不产生抗体本身。

[0005] 例如,当根据以往方法找到产生目的抗体的杂交瘤细胞时,用从接受免疫的小鼠取出的脾细胞与骨髓瘤细胞进行细胞融合,播种到约 10 块 96 孔板上。再播种全部细胞,当由 1 个人进行筛选时将受到时间限制,剩余部分以冷冻等方式进行保存。通过该方法通常能增殖出大约 500 个孔的杂交瘤细胞。

[0006] 然而,500 个孔的杂交瘤细胞不可能全部以相同速度进行增殖,有些增殖迅速有些增殖缓慢。因此,无法同时核查全部 500 个孔的增殖情况。首先,在显微镜下核查哪个孔中有细胞增殖,为了核查抗体核查细胞是否增殖至适当的细胞数目。随后,从适当的孔中取细胞上清液,确认是否产生抗原特异性抗体。这种细胞的核查与细胞上清液的核查有必要尽早进行。因为杂交瘤细胞接连不断的增殖,如果放着不管就会由于过度增殖的培养液的营养状态恶化而灭绝。因此,必须得在希望的杂交瘤细胞死亡前进行筛选。

[0007] 又,当发现孔中目的杂交瘤细胞出现增殖时,常常出现在该孔中增殖出产生目的抗体的杂交瘤细胞以外的产生其他抗体的杂交瘤细胞的情况。又,在丢失杂交瘤细胞自身染色体的同时进行增殖将导致产生抗体的杂交瘤细胞失去抗体染色体,无法获得抗体。这种细胞增殖通常比产生抗体的杂交瘤细胞快得多,如果放着不管,大部分培养的细胞将变成不产生抗体的细胞。因此,当发现孔中出现希望的杂交瘤细胞增殖时,立即将该孔中的细胞置于 96 孔板上,1 个细胞 1 个孔的重新分散(限界稀释法),再重新筛选出希望的产生抗体的杂交瘤细胞(二次筛选)。在检出目的杂交瘤细胞后,至二次筛选结束,该过程必须趁细胞状态没有出现恶化时快速的完成。

[0008] 如上所述,不筛选全部制作出的杂交瘤细胞,而仅筛选其中一部分,将难以得到能产生频率低的抗原特异性抗体的杂交瘤细胞。

[0009] 更具体来说,在人抗原特异性抗体的情况中,有一种用 EB 病毒使末梢 B 淋巴细胞特性转变株化来筛选产生抗原特异性抗体的细胞的方法(非专利文献 1)。在该方法中,由于建立的淋巴细胞细胞株的频率很低,因此得到产生抗原特异性抗体的 B 淋巴细胞细胞株的准确率非常低。又,建立细胞株需要 1 个月左右的时间。此外,建立的 B 淋巴细胞细胞株产生的抗体量较少。因此即使能制作出小鼠的杂交瘤细胞,也无法高效地制作出人的杂交瘤细胞系。

[0010] 小鼠的杂交瘤细胞是可制作的。以往来说,制作杂交瘤细胞的方法包括以下步骤:对小鼠进行抗原免疫,取出小鼠的脾脏或淋巴结,调制淋巴细胞,将调制的约 10^8 个淋巴细胞和约 10^7 个骨髓瘤细胞经聚乙烯醇或施加电压处理进行融合,用 HAT 等选择性培养基培养,对增殖的杂交瘤细胞用 ELISA、流式细胞仪等进行筛选,选出产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞(非专利文献 2、3)。根据该方法,虽然约 300 ~ 400 个孔中的杂交瘤细胞能出现增殖,但其中产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞增殖的孔仅是百分之几的数目。这个数目根据抗原的不同而不同,但在产生抗原特异性抗体的 B 淋巴细胞频率较低的情况下,用该方法将难以制作出杂交瘤细胞。

[0011] 因此,本发明人在不考虑频率较高的抗原特异性淋巴细胞的前提下,研究了即使是频率较低的抗原特异性淋巴细胞,也能从其中简便地筛选出对特定抗原具有特异性反应的淋巴细胞,并由选出的抗原特异性 B 淋巴细胞制作出产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞的方法,包括以下步骤:选出一个对特定抗原具有特异性反应的 B 淋巴细胞(抗原特异性 B 淋巴细胞),培养选出的抗原特异性 B 淋巴细胞,通过使培养增殖得到的抗原特异性 B 淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合制作杂交瘤细胞,由此完成了产生抗原特异性抗体的杂交瘤细胞的制作方法,首先提出了专利申请。(专利文献 1)

[0012] 此外,以一个一个的水平来确定、选择细胞,试着使用选出的细胞。例如,讨论了单独一个个地检测淋巴细胞的抗原特异性,随后回收一个经检测的抗原特异性淋巴细胞,用回收的一个抗原特异性淋巴细胞,例如,来制造抗体的方法

[0013] (专利文献 2、3)。

[0014] [专利文献 1]W02004/087911

[0015] [专利文献 2]特开 2004-173681 号公报

[0016] [专利文献 3]特开 2004-187676 号公报

[0017] [非专利文献 1]淋巴细胞机能检索法(改订 5 版)矢田纯一、藤原道夫编,中外医学社,1994 年,《用 EB 病毒变形 B 细胞制作人单克隆抗体》水野文雄、大里外誉郎,第 381-391 页)

[0018] [非专利文献 2]淋巴细胞机能检索法(改订 5 版)矢田纯一、藤原道夫编,中外医学社,1994 年,《用 B 细胞杂交瘤制作单克隆抗体的方法》成内秀夫,第 574-576 页

[0019] [非专利文献 3]Monoclonal antibodies in "Antibodies:A Laboratory Manual" by Ed Harlow and David Lane, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp139-pp244, 1988

[0020] [非专利文献 4]

[0021] In vitro antibody production. In Current Protocols in Immunology. Edited by J. E. Coligan et al., John Wiley&Sons (New York), p. 3. 8. 1-3. 8. 16, 1991.

[0022] [非专利文献 5]

[0023] Babcook, J. S., Leslie, K. B., Olsen, O. A., Salmon, R. A., Schrader, J. W. A novel strategy for generating monoclonal antibodies from single, isolated lymphocytes producing antibodies of defined specificities. Proc Natl Acad Sci U S A, 93 :7843-7848, 1996.

[0024] [非专利文献 6]

[0025] Measurement of polyclonal immunoglobulin synthesis using the ELISPOT assay. In Current Protocols in Immunology. Edited by J.E. Coligan et al., John Wiley&Sons (New York), p. 7. 14. 1-7. 14. 7, 1991.

[0026] [非专利文献 7]

[0027] Assays for antibody production. In Current Protocols in Immunology. Edited by J.E. Coligan et al., John Wiley&Sons (New York), p. 2. 1. 1-2. 1. 22, 1991.

[0028] [非专利文献 8]

[0029] J. C. Love, J. L. Ronan, G. M. Grotenbreg, A. G. van der Veen, H. L. Ploegh, A microengraving method for rapid selection of single cells producing antigen-specific antibodies. Nature Biotechnology, 24 :703-707, 2006.

[0030] 上述专利文献 1 ~ 3 及非专利文献 1 ~ 7 的全部内容在此特别引入作为参考。

[0031] 在上述现有技术方法、手册中,都是一个一个地分别对淋巴细胞抗原特异性进行检测,再回收经检测的抗原特异性淋巴细胞。专利文献 2 和 3 中记载了按细胞单位来确认特定细胞,并记载了可回收特定细胞的方法。然而,实际上从多数淋巴细胞中检测出具有抗原特异性反应的淋巴细胞并不容易。

[0032] 作为检测方法,例如,利用与抗原反应的淋巴细胞中钙离子浓度升高,经荧光检测钙离子浓度变化,确定抗原特异性淋巴细胞的方法。然而,细胞(淋巴细胞)的种类将根据荧光的产生方式及强度等的不同而不同,既存在受到抗原刺激钙离子浓度立刻升高导致荧光强度也升高的淋巴细胞,也存在经抗原刺激一定时间以后钙离子浓度才升高导致荧光强度也升高的淋巴细胞。此外,有必要基本上一次性同时测定数厘米宽的正方形芯片表面上保持的 1 ~ 20 万左右的淋巴细胞的荧光强度,并且,由于每个细胞每次产生的荧光而导致荧光强度较低,有必要对荧光进行高精度的荧光检测。

[0033] 然而,到目前为止,还不存在可同时测定上述高度聚集在芯片表面上的多数且微弱的荧光强度的方法及装置。

[0034] 现有的装置有激光扫描流式细胞仪,用激光扫描流式细胞仪可测定数十万个细胞中每个细胞内钙的浓度。然而,一次扫描将耗费长达 10 分钟以上的时间,对于抗原刺激后数分钟中荧光强度将发生变化的淋巴细胞的检测来说,这种方法将缺乏实时性,不适宜使用。

[0035] 荧光显微镜摄影装置是在普通的荧光显微镜上合并使用摄影装置。虽然荧光显微镜摄影装置不存在速度上的问题,但普通的显微镜的摄影范围较窄,一次性最多仅能检测 1000 个左右,无法对数万~数十万个细胞进行一次性荧光检测。

[0036] 为了对细胞芯片上排列的细胞进行荧光检测,开发出的一种基于 DNA 微孔阵列扫描器的细胞芯片检测装置,可检测细胞内或细胞外的荧光。然而,在用激光激发荧光色素、

检测激发光的系统中,追踪时间变化的检测系统用激光进行线扫描速度较慢,无法对多数细胞领域进行同时检测。

[0037] 根据上述专利文献 2 及 3 中记载的方法检测对抗原有特异性反应的细胞时,希望反应检测系统具有能随时捕捉单个细胞的细胞内钙的变化的实时性、以及由于需要检测多数细胞中非常少的存在(反应)的细胞而单个地同时解析多个细胞的并列性。

[0038] 因此,本发明的目的是提供一种能同时测定芯片上保持的超过 1 万个、优选超过 10 万个的多数细胞的状态,例如,淋巴细胞对抗原刺激的反应性,并能单个地掌握每个细胞的状态的方法。

[0039] B 淋巴细胞在细胞表面上表达一种抗体,当病原体(抗原)等侵入时,抗原与细胞表面的抗体相结合,进行活化增殖和分化,最终分化成抗体分泌细胞。已经存在多种确定抗体分泌细胞的方法,其中确定单个抗体分泌细胞的典型方法是斑点法和 ELISPOT 法(Enzyme-linked Immunospot)。

[0040] 斑点法是利用红细胞,用抗体分泌细胞周围抗原标识的红细胞与抗体结合引起的溶血作为指标来确定分泌抗原特异性抗体的细胞的方法(非专利文献 4)。用斑点法进行检测分泌抗原特异性抗体的细胞回收抗体基因的方法已经得到实际应用(非专利文献 5)。

[0041] ELISPOT 法是在涂覆有抗原的板上播种细胞,抗体分泌细胞分泌的抗体与细胞周围的抗原相结合,用酶标识的抗 Ig 抗体等对其进行检测的方法(非专利文献 6)。在 ELISPOT 法中,用酶标识抗 Ig 抗体检测抗原特异性抗体与细胞周围的结合时,细胞自身将被洗掉,无法回收抗原特异性抗体分泌细胞。

[0042] 杂交瘤细胞也是分泌抗体的细胞,在筛选杂交瘤细胞时通常使用 ELISA 法(Enzyme-linked immunosorbent assay)(非专利文献 7)。近来,该方法得到广泛发展,已有报道在微小的孔中培养 1 个杂交瘤细胞,用荧光标识过的抗原等对孔中分泌的抗体进行检测,来检测抗原特异性抗体分泌细胞的方法(非专利文献 8)。

[0043] 本发明人为了实现上述本发明的目的,为提供一种不同于非专利文献 4~8 记载的方法、新的检测能分泌抗原特异性抗体的细胞等免疫细胞的方法进行多方面探讨,由此完成本发明。

发明内容

[0044] 以下将描述解决上述课题的本发明的技术方案。

[0045] [1] 一种微孔阵列,该微孔阵列是在基体一侧的主表面上具有多个孔,孔具有仅可容纳一个细胞的尺寸的微孔阵列,其特征在于,至少在上述孔周围的上述主表面的至少一部分上含有具有结合性的物质的覆盖层,所述具有结合性的物质是与上述孔中容纳的至少一部分细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质。

[0046] [2] 如 [1] 记载的微孔阵列,在该微孔阵列的至少一部分孔中同时容纳细胞和细胞培养液,将上述覆盖层及孔浸渍在培养液中,在培养液含有的物质能从孔向上述覆盖层扩散的状态下培养细胞;除去上述培养后的培养液之后,检测孔中容纳的至少一部分细胞产生的物质与上述覆盖层的物质有无结合。

[0047] [3] 如 [1] 或 [2] 记载的微孔阵列,上述孔中容纳的至少一部分细胞是产生免疫球蛋白的细胞或产生细胞因子的细胞。

[0048] [4] 如 [1] 或 [2] 记载的微孔阵列, 上述孔中容纳的至少一部分细胞是产生免疫球蛋白的细胞, 与产生免疫球蛋白的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是抗免疫球蛋白抗体或抗原。

[0049] [5] 如 [4] 记载的微孔阵列, 使用与产生的免疫球蛋白相对应的抗体或抗原进行上述有无结合的检测。

[0050] [6] 如 [1] 或 [2] 记载的微孔阵列, 上述孔中容纳的至少一部分细胞是产生细胞因子的细胞, 与产生细胞因子的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是抗细胞因子抗体或细胞因子受体。

[0051] [7] 如 [6] 记载的微孔阵列, 使用与产生的细胞因子相对应的抗体或细胞因子受体进行上述有无结合的检测。

[0052] [8] 如 [1] 或 [2] 记载的微孔阵列, 上述孔中容纳的至少一部分细胞是产生免疫球蛋白的细胞, 与产生免疫球蛋白的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是细胞因子受体或受体。

[0053] [9] 如 [8] 记载的微孔阵列, 使用细胞因子或配基进行上述有无结合的检测。

[0054] [10] 如 [1] ~ [9] 任一项记载的微孔阵列, 产生免疫球蛋白的细胞及产生细胞因子的细胞是天然细胞或杂交瘤细胞。

[0055] [11] 如 [1] ~ [10] 任一项记载的微孔阵列, 基体是板状的。

[0056] [12] 如 [1] ~ [11] 任一项记载的微孔阵列, 不含具有结合性的物质的覆盖层的上述主表面的至少一部分涂布有封闭剂, 所述的具有结合性物质是具有与孔中容纳的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质。

[0057] [13] 目的细胞的筛选方法, 包括以下步骤:

[0058] 基体一侧的主表面上具有多个孔, 孔具有仅可容纳一个细胞的尺寸, 并且至少在上述孔周围的上述主表面的至少一部分上具有与目的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质的覆盖层, 在具有覆盖层的微孔阵列的至少一部分孔中容纳了被检体细胞和细胞培养液;

[0059] 将上述覆盖层及孔均浸渍在培养液中, 在培养液中含有的物质能从孔向上述覆盖层扩散的状态下培养细胞;

[0060] 用任意方法除去培养液后, 向上述覆盖层中加入与被检体细胞含有的目的细胞产生的物质特异性结合的标识物;

[0061] 与上述覆盖层物质结合后, 根据上述标识物检测目的细胞产生的物质, 确定目的细胞

[0062] [14] 如 [13] 记载的筛选方法, 包括: 含有上述被检体细胞的细胞是接受预期抗原的刺激能产生物质的状态的细胞。

[0063] [15] 如 [13] 或 [14] 记载的筛选方法, 包括: 上述被检体细胞是产生免疫球蛋白的细胞或产生细胞因子的细胞。

[0064] [16] 如 [13] 或 [14] 记载的筛选方法, 上述被检体细胞包括产生免疫球蛋白的细胞, 与目的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是抗免疫球蛋白抗体或抗原, 目的细胞是产生抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

[0065] [17] 如 [16] 记载的筛选方法, 使用与产生的免疫球蛋白相对应的抗体或抗原进

行上述有无结合的检测。

[0066] [18] 如 [13] 或 [14] 记载的筛选方法,上述被检体细胞包括产生免疫球蛋白的细胞,与目的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是细胞因子受体或受体,目的细胞是产生抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

[0067] [19] 如 [18] 记载的筛选方法,使用细胞因子或配基进行上述有无结合的检测。

[0068] [20] 如 [13] 或 [14] 记载的筛选方法,上述被检体细胞包括产生细胞因子的细胞,与目的细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质是抗细胞因子抗体或细胞因子受体,目的细胞是产生抗原特异性细胞因子的细胞。

[0069] [21] 如 [20] 记载的筛选方法,使用与产生的细胞因子相对应的抗体或细胞因子受体进行上述有无结合的检测。

[0070] [22] 如 [13] ~ [21] 任一项记载的筛选方法,产生免疫球蛋白的细胞及产生细胞因子的细胞是天然细胞、杂交瘤细胞或细胞株。

[0071] [23] 目的细胞的制造方法,包括从孔中回收根据 [13] ~ [22] 任一项记载的筛选方法确定的目的细胞的步骤。

[0072] [24] 如 [23] 记载的制造方法,目的细胞是产生特异性免疫球蛋白的细胞或产生特异性细胞因子的细胞。

[0073] 依据本发明可提供能同时测定芯片上保持的例如超过 1 万个、优选超过 10 万个的多数细胞的状态,例如,淋巴细胞对抗原刺激的反应性,并能单个地把握每个细胞的状态的方法和手段。

附图说明

[0074] 图 1 为孔形状与标识物信号形状的关系示意图。

[0075] 图 2 为以分泌抗体的细胞为例子的本发明方法的说明图。

[0076] 图 3 为标识物为能与产生物质特异性结合的物质 (1) 的本发明方法的说明图。

[0077] 图 4-1 为制作例 1 的说明图。

[0078] 图 4-2 为制作例 1 的说明图。

[0079] 图 5-1 为制作例 2 的说明图。

[0080] 图 5-2 为制作例 2 的说明图。

[0081] 图 5-3 为制作例 2 的说明图。

[0082] 图 6-1 为制作例 3 的说明图。

[0083] 图 6-2 为制作例 3 的说明图。

[0084] 图 7-1 为制作例 4 的说明图。

[0085] 图 7-2 为制作例 4 的说明图。

[0086] 图 7-3 为制作例 4 的说明图。

[0087] 图 8 为表面处理方法的说明图。

[0088] 图 9 为保持芯片湿度的保湿箱的说明图。

[0089] 图 10 为实施例 1 中确认容纳了正在分泌抗原特异性抗体的细胞的孔的位置的结果。A 是检测分泌出的抗原特异性抗体的 Cy3 信号。B 是观察经 Oregon Green 标识的细胞。

[0090] 图 11 为实施例中 1 用本发明方法 (FLISPOT 法) 确定微孔阵列芯片上的分泌抗原

特异性抗体的细胞的结果。

[0091] 图 12 为实施例 2 中用本发明方法 (FLISPOT 法) 法检测经 HEL 免疫的小鼠脾细胞中能分泌 HEL 特异性抗体的细胞的结果。

[0092] 图 13 为实施例 2 用本发明方法 (FLISPOT 法) 检测人末梢血淋巴细胞中 HBs 抗原特异性抗体的细胞的结果。

[0093] 图 14 为实施例 3 的结果。

[0094] 图 15 为实施例 4 (产生细胞因子的细胞的检测) 的结果。

[0095] 图 16 为实施例 6 (应用于机能性抗体的筛选) 的结果。

具体实施方式

[0096] [微孔阵列]

[0097] 本发明的微孔阵列是在基体一侧的主表面上具有多个孔,每个孔具有仅能容纳 1 个细胞的尺寸的微孔阵列。具有上述结构的微孔阵列可直接使用例如上述专利文献 1 ~ 3 中记载的微孔阵列。

[0098] 例如,在微孔阵列芯片中设置了以相同间隔纵横排列的多个微孔。

[0099] 微孔的形状和尺寸没有特别限定,微孔的形状例如可以是圆筒形,除圆筒形之外,也可以是由多个面构成的多面体(例如长方体、六棱柱、八棱柱等)、倒圆锥形、倒角锥形(倒三角锥形、倒四角锥形、倒五角锥形、倒六角锥形、七角以上的倒多角锥)等,还可以是将两种以上这些形状组合得到的形状。例如可以是一部分为圆筒形,其余部分为倒圆锥形。另外,为倒圆锥形、倒角锥形时,底面为微孔的开口,不过也可以是从倒圆锥形、倒角锥形的顶切除一部分得到的形状(此时,微孔的底部平坦)。对于圆筒形、长方体,微孔的底部通常是平坦的,不过也可以制成曲面(凸面或凹面)。将微孔的底部制成曲面时,其情形与从倒圆锥形、倒角锥形的顶切除一部分得到的形状的情形相同。

[0100] 微孔为圆筒形时,其尺寸例如可以是直径为 3 ~ 100 μm ,生物体细胞为 B 淋巴细胞时,优选直径为 4 ~ 15 μm 。另外,深度例如可以是 3 ~ 100 μm ,生物体细胞为 B 淋巴细胞时,可优选深度为 4 ~ 40 μm 。不过,如上所述,微孔的尺寸应考虑要容纳在微孔中的生物体细胞直径与微孔尺寸的恰当比例来适当地确定。

[0101] 微孔的形状或尺寸可考虑要在微孔中容纳的生物体细胞的种类(生物体细胞的形状或尺寸等)来适当确定,以使一个微孔中可容纳一个生物体细胞。

[0102] 为了使一个微孔中容纳一个生物体细胞,例如,与微孔的平面形状内切的最大圆的直径为要容纳在微孔中的生物体细胞直径的 0.5 ~ 2 倍,优选 0.8 ~ 1.9 倍,更优选 0.8 ~ 1.8 倍的范围。

[0103] 另外,微孔的深度在要容纳的微孔中的生物体细胞直径的 0.5 ~ 4 倍的范围,优选 0.8 ~ 1.9 倍的范围,更优选 0.8 ~ 1.8 倍的范围适当确定。

[0104] 一个微孔阵列芯片所具有的微孔数量没有特别限定,当生物体细胞为淋巴细胞时,从抗原特异性淋巴细胞的频率为 10^5 个中至少有 1 个、多数情况约有 500 个的角度考虑,每 1cm^2 的微孔数例如可以是 2,000 ~ 1,000,000 个的范围。

[0105] 此外,本发明的微孔阵列至少在上述孔周围的上述主表面的至少一部分上具有覆盖层,该覆盖层的物质是与上述孔中容纳的至少一部分细胞产生的至少一部分物质具有结

合性的物质。这点是本发明的微孔阵列的特征。

[0106] 本发明的微孔阵列中基体可以是板状的（并不意在限定板的形式），设在基体主表面上的多个孔周围的主表面的至少一部分上设置有上述覆盖层。利用本发明的微孔阵列对孔中容纳的至少一部分细胞产生的物质与覆盖层物质有无结合进行检测。

[0107] 孔中容纳的细胞（被检体细胞）可以是例如包含产生免疫球蛋白的细胞或产生细胞因子的细胞的细胞群。此外，产生免疫球蛋白的细胞及产生细胞因子的细胞可以是天然细胞、杂交瘤细胞或细胞株。天然细胞可以是取自哺乳动物例如人、小鼠等的细胞，杂交瘤细胞可以是根据背景技术中描述的常规方法制成的杂交瘤细胞。细胞株可以是基因导入表达型 cDNA 库等的细胞株。

[0108] 当孔中容纳的细胞是包含产生免疫球蛋白的细胞的被检体细胞时，作为与细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质，可使用能与产生免疫球蛋白的细胞产生的免疫球蛋白反应的抗免疫球蛋白抗体或抗原。因而，上述有无结合的检测使用的是产生的免疫球蛋白的抗体或抗原。

[0109] 当孔中容纳的细胞是包含产生细胞因子的细胞的被检体细胞时，作为与细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质，可使用能与产生细胞因子的细胞产生的细胞因子反应的抗细胞因子抗体或细胞因子受体。因而，有无结合的检测使用的是产生的细胞因子的抗体或细胞因子受体。

[0110] 或者，当孔中容纳的细胞是包含产生免疫球蛋白的细胞的被检体细胞时，与细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质可以是能与产生免疫球蛋白的细胞产生的免疫球蛋白反应的细胞因子受体或受体。这时，有无结合的检测使用的是细胞因子受体或与受体反应得到的细胞因子或配基。产生的免疫球蛋白与细胞因子受体或受体相结合，封闭其与检测有无结合时使用的细胞因子或配基的结合，来检测有无结合。

[0111] 下表 1 示出了例子。

[0112] (1) 与细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质（结合性物质）、

[0113] (2) 孔中容纳的细胞（被检体细胞）、

[0114] (3) 细胞产生的物质（产生物质）以及

[0115] (4) 确定产生物质的标识物（标识物）。

[0116] 此外，为了确定产生物质，用来标识物质的物质可使用例如荧光物。但不限于荧光物，还可以是其他标识物。又，可使用抗原及抗体等荧光物质为标识物用公知方法进行标识。又，标识物可以是能与产生的物质特异性结合的物质，也可以是能与结合性物质特异性结合的物质。

[0117] 【表 1】

[0118]

结合性物质	细胞	产生物质	标识物
抗免疫球蛋白抗体	B 淋巴细胞	免疫球蛋白 (抗体) IgG, IgM, IgA, IgE 等全部抗体	抗原
抗免疫球蛋白抗体	B 淋巴细胞	免疫球蛋白 (抗体) IgG, IgM, IgA, IgE 等全	抗免疫球蛋白抗体

[0119]

		部抗体	
抗 IgG 抗体	B 淋巴细胞	IgG	抗原
抗 IgG 抗体	B 淋巴细胞	IgG	抗 IgG 抗体
抗 IgM 抗体	B 淋巴细胞	IgM	抗原
抗 IgM 抗体	B 淋巴细胞	IgM	抗 IgM 抗体
抗 IgA 抗体	B 淋巴细胞	IgA	抗原
抗 IgA 抗体	B 淋巴细胞	IgA	抗 IgA 抗体
抗 IgE 抗体	B 淋巴细胞	IgE	抗原
抗 IgE 抗体	B 淋巴细胞	IgE	抗 IgE 抗体
抗细胞因子抗体	T 淋巴细 胞、其他	细胞因子	抗细胞因子抗体
抗细胞因子抗体	T 淋巴细 胞、其他	细胞因子	(可溶性) 细胞因 子受体
(可溶性) 细胞 因子受体	T 淋巴细 胞、其他	细胞因子	抗细胞因子抗体
抗原	B 淋巴细胞	IgG	抗 IgG 抗体
抗原	B 淋巴细胞	IgM	抗 IgM 抗体
抗原	B 淋巴细胞	IgA	抗 IgA 抗体
抗原	B 淋巴细胞	IgE	抗 IgE 抗体
(可溶性) 细胞 因子受体	B 淋巴细胞	抗体	细胞因子*
(可溶性) 受体	B 淋巴细胞	抗体	配基**

[0120] *封闭细胞因子结合的抗体的检测

[0121] **封闭配基结合的抗体的检测

[0122] 结合性物质的覆盖层的形成可以由下述方法形成的:为了确保结合性物质与主表面的结合性,例如用硅烷偶联剂对将形成基板的覆盖层的主表面进行表面处理;随后,在经硅烷偶联剂处理的表面上涂覆含有结合性物质的溶液。对于覆盖层来说结合性物质的覆盖量可根据结合性物质种类、细胞及产生物质种类、甚至是标识物种类而适当地确定。此外,为了确保结合性物质与主表面的结合性的表面处理的方法不限于硅烷偶联剂处理,还可以适当地选择使用能促进由蛋白质等构成的结合性物质与由无机材料(例如硅材料)或

有机材料（例如聚合物材料）构成的基板表面相结合的物质。

[0123] 覆盖有结合性物质的表面根据覆盖量的不同，存在没有致密地覆盖结合性物质，存在未被覆盖的表面的情况。这时，特别地，上述经硅烷偶联剂处理的表面属于细胞产生的物质与基板表面非特异性结合的情况。这种非特异性结合是降低检测敏感度精确度的原因。因此，在本发明中，与孔中容纳的细胞所产生的至少一部分物质具有结合性的物质覆盖层没有覆盖的上述主表面的至少一部分上优选涂覆有封闭剂。封闭剂例如可举出由与构成细胞膜的卵磷脂极性基团具有相同结构的 2-丙烯酞乙氧基磷脂酸胆（MPC）为构成单位的水溶性聚合物 LIPIDURE（注册商标）（リピジユア（注册商标））。

[0124] [筛选方法]

[0125] 本发明的筛选方法是使用上述本发明的微孔阵列，从包含被检体细胞的细胞群中筛选目的细胞的方法，包括以下步骤：

[0126] (1) 微孔阵列的至少一部分孔中同时容纳了被检体细胞及细胞培养液。

[0127] (2) 覆盖层及孔浸渍在培养液中，在培养液中含有的物质能从孔向覆盖层扩散的状态下培养细胞任意长的时间。

[0128] (3) 在除去培养液之后，向覆盖层中加入与被检体细胞包含的目的细胞产生的物质特异性结合的标识物。

[0129] (4) 与覆盖层物质结合后，通过标识物检测目的细胞产生或分泌出的物质，确定目的细胞。

[0130] 本发明的筛选方法中采用的 (1) 与细胞产生的至少一部分物质具有结合性的物质（结合性物质）、(2) 孔中容纳的细胞（被检体细胞）、(3) 细胞产生的物质（产生物质）以及 (4) 确定为标识的产生物质的物质（标识确定物）与在本发明微孔阵列中的描述相同，也可以以表 1 示出的内容为例子。

[0131] 步骤 (1)

[0132] 微孔阵列的至少一部分孔中同时容纳了包含被检体细胞的细胞（细胞群）以及细胞培养液。在容纳细胞之前用培养液洗净微孔阵列的孔及其周围，优选在形成结合性物质覆盖层时彻底除去表面附着的杂质，以便进行高精度的检测。细胞与培养液同时容纳在孔中。孔中容纳的被检体细胞可以是包含产生免疫球蛋白的细胞或产生细胞因子的细胞的细胞群，并且，产生免疫球蛋白的细胞及产生细胞因子的细胞可以是天然细胞或杂交瘤细胞。这些细胞群可以利用公知方法获得。

[0133] 孔中容纳的细胞可以是接受预期抗原刺激能产生物质的状态的细胞。例如，在产生免疫球蛋白的细胞的情况中，优选接受预期抗原刺激产生免疫球蛋白的状态的细胞。同样地，在产生细胞因子的细胞的情况中，优选接受预期抗原刺激产生细胞因子的状态的细胞。预期的抗原没有特别限制，可适当地选自多种蛋白质、糖类、脂质、核酸、有机化合物、无机化合物或它们的组合（包含细胞）等。培养液根据容纳、检测的细胞种类而适宜地确定。

[0134] 步骤 (2)

[0135] 覆盖层及孔均浸渍在培养液中，在培养液中含有的物质能从孔向覆盖层扩散的状态下培养细胞。培养的细胞将产生物质，产生的物质释放在培养液中，从孔扩散至孔周围的覆盖层。扩散到达覆盖层的产生的物质与构成覆盖层的结合性物质相结合。培养条件可根据细胞种类适当地确定，培养时间可根据与构成覆盖层的结合性物质相结合产生的物质的

量达到能检测出的水平适当地确定。在容纳不产生物质的细胞的孔周围的覆盖层上不出现产生物质与结合性物质的结合。此外,培养时间过长,产生的物质将过度扩散,将很难确定容纳了产生产生物质的细胞,所以培养时间优选在容易确定容纳了产生产生物质的细胞的孔的范围内适当地确定。

[0136] 步骤 (3)

[0137] 上述培养结束后,可采用任意方法除去培养液,随后向覆盖层中加入能与包含被检体细胞的目的细胞产生的物质特异性结合的标识物。目的细胞产生的物质在培养过程中扩散,与构成覆盖层的结合性物质相结合,在这个阶段中加入上述标识物,标识物可与结合在覆盖层上的产生物质相结合,或者与覆盖层中未被产生物质结合封闭的覆盖层相结合。前者是标识物与产生物质具有结合性的情况,后者是标识物不与产生物质相结合,而是标识物与构成覆盖层的结合性物质具有结合性的情况。这点将在下文中详细描述。

[0138] 在加入标识物之前,优选除去培养液。在培养液中,当孔中容纳的细胞例如是产生免疫球蛋白的细胞时,将大量地分泌抗体,这样的话例如一旦加入抗免疫球蛋白抗体,在与芯片表面抗体结合前将与培养液中的抗体相结合,导致无法对结合在芯片表面的抗体进行检测。但是,通过细胞与结合性物质的组合,在不除去培养液时向覆盖层中加入标识物,检测将不会出现问题。

[0139] 步骤 (4)

[0140] 可通过标识物检测与覆盖层物质结合的目的细胞所产生的物质,确定目的细胞。标识物与覆盖层中结合的产生物质相结合,因此可通过检测标识物而确定结合在覆盖层上的产生产生物质的细胞(目的细胞)。

[0141] 当标识物是能与产生物质特异性结合的物质时,标识物从孔扩散至孔周围的覆盖层,到达覆盖层时与构成覆盖层的结合性物质所结合的产生物质相结合,在结合后,检测标识物。另一方面,在不产生物质的孔周围的覆盖层上将不出现产生物质与结合性物质的结合,因此,没有标识物的结合就检测不出标识物。

[0142] 当标识物是能与结合性物质特异性结合的物质时,标识物从孔扩散至孔周围的覆盖层,到达覆盖层时与构成覆盖层的结合性物质相结合的产生物质将阻碍标识物与结合性物质相结合。另一方面,在不产生产生物质的孔周围的覆盖层上将不出现产生物质与结合性物质的结合,因此,标识物与结合性物质的结合将不被阻碍,与标识物结合。这时,产生产生物质的孔检测不到标识物,由此可识别出能检测到标识物的孔。

[0143] 当标识物例如是荧光标识时,可用荧光显微镜、荧光图像扫描器、图像阅读器等来确定目的细胞。

[0144] 下述的实施例主要使用的是正六边形形状的孔的芯片(图1左下)。这时,信号大概以同心圆状展开(图1左上)。然而,当如图1右下示出的以正六角形孔的倾斜方向进入狭缝时,产生的抗体等将向狭缝方向展开,形成如图1右上示出的银河系状的形状。如上所述,介入产生物得到的标识物发出的信号将出现与孔形状不同的形状。

[0145] 标识物是能与产生物质特异性结合的物质情况 (1)

[0146] 当孔中容纳的被检体细胞包含产生免疫球蛋白的细胞时,细胞培养产生免疫球蛋白,如果向覆盖层中加入抗免疫球蛋白抗体或抗原作为结合性物质,产生的免疫球蛋白将与覆盖层结合,可用该免疫球蛋白的抗体或抗原检测产生的与覆盖层结合的免疫球蛋白。

在容纳了不产生免疫球蛋白的细胞,即受到抗原刺激也不产生免疫球蛋白的细胞的孔周围,免疫球蛋白不会从孔中扩散出,因此可识别出容纳了产生免疫球蛋白的细胞的孔。因而,可确定目的细胞即产生抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

[0147] 根据图 2 进行更详细地说明。

[0148] (A) 向芯片表面上结合了抗免疫球蛋白 (Ig) 抗体的硅制微孔阵列芯片各孔中加入抗体分泌细胞。

[0149] (B) 培养细胞,分泌抗体。细胞分泌出的抗体与孔周围的抗 Ig 抗体结合。

[0150] (C) 随后加入荧光标识的抗原,抗原与孔周围捕捉的抗原特异性抗体相结合。

[0151] (D) 用荧光显微镜、扫描器等观察,观察抗原特异性抗体是否以圆环状在孔周围展开。

[0152] 标识物是能与产生物质特异性结合的物质情况 (2)

[0153] 当孔中容纳的被检体细胞是产生细胞因子的细胞时,细胞培养产生细胞因子,如果向覆盖层中加入抗细胞因子抗体或细胞因子受体作为结合性物质,产生的细胞因子与覆盖层相结合,可用与该细胞因子相对的抗体或细胞因子受体检测产生的与覆盖层结合的细胞因子。在容纳了不产生细胞因子的细胞、即在抗原刺激下不产生细胞因子的细胞的孔周围,细胞因子不从该孔中扩散出,因此可识别出容纳了产生细胞因子的细胞的孔。因而,可确定目的细胞即产生细胞因子的细胞。

[0154] 标识物是能与结合性物质特异性结合的物质情况

[0155] 当孔中容纳的被检体细胞是产生免疫球蛋白的细胞时,细胞培养产生免疫球蛋白,向覆盖层中加入细胞因子受体或受体作为结合性物质,产生的一部分免疫球蛋白与覆盖层相结合,产生的与覆盖层结合的一部分免疫球蛋白将阻碍细胞因子受体或受体与标识物即细胞因子或配基的结合,标识物在容纳了产生免疫球蛋白的细胞的孔周围将不进行结合。在容纳了不产生免疫球蛋白的细胞、即在抗原刺激下不产生免疫球蛋白的细胞的孔周围,免疫球蛋白不从该孔扩散出,无法阻碍细胞因子受体或受体与细胞因子或配基的结合;又,在容纳了虽然产生免疫球蛋白但该免疫球蛋白不与非细胞因子受体的受体结合的细胞的孔周围,以及,在容纳了虽然产生免疫球蛋白且该免疫球蛋白与非细胞因子受体的受体结合但不阻碍细胞因子受体或受体与细胞因子或配基结合的细胞的孔周围,与从孔中扩散出的免疫球蛋白进行结合,但不封闭细胞因子受体或受体与细胞因子或配基的结合,可识别容纳了产生免疫球蛋白的细胞的孔。因而,可确定目的细胞即产生抗原特异性免疫球蛋白的细胞。

[0156] 下文基于图 3 说明上述方法。

[0157] (A) 在芯片表面涂覆受体。

[0158] (B) 向微孔中添加抗体分泌细胞,进行培养。分泌的抗体进行扩散。受体特异性抗体与孔周围的受体相结合。

[0159] (C) 当与受体结合的抗体是在受体上配基结合部分结合时,荧光标识配基将不与受体结合。

[0160] (D) 当与受体结合的抗体是在受体上配基结合部分以外结合时,荧光标识配基将与受体结合。

[0161] [目的细胞的制造方法]

[0162] 本发明包括目的细胞的制造方法,该方法包括从孔中回收根据上述本发明的筛选方法确定的目的细胞。目的细胞可以是产生特异性免疫球蛋白的细胞或产生特异性细胞因子的细胞。

[0163] 此外,本发明还可从回收的目的细胞开始,回收抗原特异性免疫球蛋白基因 mRNA,表达抗体 cDNA,制造抗原特异性抗体蛋白质。又,还可以从产生细胞因子的细胞开始,回收该细胞表达的 T 细胞受体基因 mRNA,回收 T 细胞受体 cDNA,并通过将其导入其他细胞,来表达 T 细胞受体蛋白质。

[0164] 实施例

[0165] 以下将基于实施例进一步详细说明本发明。

[0166] 示出了微孔阵列芯片的制作例。

[0167] 制作例 1

[0168] 示出了使用硅基板的制作例。图 4-1 是制作例 1 的微孔阵列芯片的例子。此外图 4-2 示出了其制作步骤的例子。

[0169] (1) 在硅基板 1-b 上形成氧化膜 1-a。

[0170] (2) 在基板上涂布光致抗蚀剂 1-c、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。

[0171] (3) 用氟酸缓冲液对光致抗蚀剂 1-c 露出的氧化膜 1-a 进行蚀刻。

[0172] (4) 用干式蚀刻法、湿式蚀刻法形成深 10 ~ 20 微米的微孔 1-d。用蚀刻法适当地除去光致抗蚀剂 1-c。

[0173] (5) 用引物处理以形成均匀结合抗体的表面。例如硅烷化处理,在表面、孔内壁上形成硅烷基 1-e。同时,在这个处理步骤中使用的材料、方法可以多种多样,并不对本制作例的处理做出限定。

[0174] (6) 依据本发明进行抗体分泌细胞的检测。

[0175] 制作例 2

[0176] 为了清楚的观察到细胞分泌的抗体,可以在孔周围设置壁。图 5-1 示出了其外观,图 5-2 示出了其制作例。

[0177] (1) 在硅基板 2-b 上形成氧化膜 2-a。

[0178] (2) 在基板上涂布光致抗蚀剂 2-c、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。

[0179] (3) 用氟酸缓冲液对光致抗蚀剂 2-c 露出的氧化膜 2-a 进行蚀刻。

[0180] (4) 除去光致抗蚀剂 2-c,用蚀刻法形成深 1 ~ 5 微米的凹形 2-d。

[0181] (5) 在基板上再次涂布光致抗蚀剂 2-e、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。当凹形较深时,优选使用东京应化工业(株)OMR-85 等负性抗蚀剂。

[0182] (6) 用干式蚀刻法装置形成深 10 ~ 20 微米的孔 2-f。

[0183] (7) 用引物处理以形成均匀结合抗体的表面。例如硅烷化处理,在表面、孔内壁上形成硅烷基 2-g。同时,在这个处理步骤中使用的材料、方法可以多种多样,并不对本制作例的处理做出限定。

[0184] (8) 依据本发明进行抗体分泌细胞的检测。在本例子中,在孔的周围形成抑制抗体扩散的壁,抗体扩散将抑制散景,容易识别图像。

[0185] 图 5-3 是根据本制作例进行了试作。

[0186] 制作例 3

[0187] 由于孔周围表面积的增加,能更明确地观测分泌的抗体。可以通过例如形成多孔硅结构或凹凸结构来增大表面积。例如特开平 6-21509 中记载了多孔硅的制作方法。凹凸结构例如可通过蚀刻法、蒸镀等方法制成。图 6-1 示出了其外观,图 6-2 示出了其制作例。

[0188] (1) 在硅基板 3-b 上形成氧化膜 3-a。

[0189] (2) 在基板上涂布光致抗蚀剂 3-c、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。

[0190] (3) 用氟酸缓冲液对光致抗蚀剂 3-c 露出的氧化膜 3-a 进行蚀刻。

[0191] (4) 为了增大露出部分开口的表面积,例如制作多孔结构 3-d。多孔结构可通过阳极转化处理等方法形成。优选用氟酸和硝酸的混酸在表面上形成纳米结构。

[0192] (5) 在基板上再次涂布光致抗蚀剂 3-e、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。用干式蚀刻法装置形成深 10 ~ 20 微米的孔 3-f。

[0193] (6) 用引物处理以形成均匀结合抗体的表面。例如硅烷化处理,在表面、孔内壁上形成硅烷基 3-g。同时,在这个处理步骤中使用的材料、方法可以多种多样,并不对本制作例的处理做出限定。

[0194] (7) 依据本发明进行抗体分泌细胞的检测。在本例子中,增大孔周围的表面积、提高荧光标识结合密度,将更容易识别图像。

[0195] 制作例 4

[0196] 通过与仅在孔周围的局部存在的抗体相结合能更明确地观测抗体分泌。本方法根据图案形成等进行终止来获得具有仅与孔周围的抗体相结合的能力的物质。图 7-1 示出了其外观,图 7-2 示出了其制作例。在硅基板 4-b 上形成氧化膜 4-a。

[0197] (1) 在基板上涂布光致抗蚀剂 4-c、例如东京应化工业(株)OFPR-800,用曝光机形成图案。

[0198] (2) 用氟酸缓冲液对光致抗蚀剂 4-c 露出的氧化膜 4-a 进行蚀刻。

[0199] (3) 用引物 4-d 处理以形成均匀结合抗体的表面。例如用硅烷偶联剂、六甲基二硅氮烷等终止表面。此外,在这个处理步骤中使用的材料、方法可以多种多样,并不对本制作例的处理做出限定。

[0200] (4) 在此基础上,再次涂布光致抗蚀剂 4-e、例如东京应化工业(株)OFPR-800。

[0201] (5) 用曝光机使光致抗蚀剂 4-e 形成抗体结合的图案。抗体结合图案的尺寸必须比孔大,约 1 微米左右,接近相邻孔间隔的二分之一。

[0202] (6) 此外,用曝光机使光致抗蚀剂 4-e 加工形成孔图案。

[0203] (7) 用干式蚀刻法形成深 10 ~ 20 微米孔 4-f 的孔图案。当形成孔时,同时除去与没有受到光致抗蚀剂 4-e 保护的抗体结合的物质 4-d。可以用氧等离子体等进行除去步骤。

[0204] (8) 用丙酮等有机溶剂除去光致抗蚀剂 4-e。因而,由于仅在孔周围存在结合抗体的物质,可能使抗体结合范围仅在局部存在。

[0205] (9) 如果以上步骤使用具有感光性的硅烷偶联剂,将能更为简化。更具体地,在根据制作例 1 完成加工后,涂布感光性硅烷偶联剂,曝光形成预期图案,能得到与本制作例相

同的结果。

[0206] 在根据本制作例制作的微孔阵列芯片上播种荧光标识抗体,图 7-3 示出了观察到的结合状态。仅观察孔周围部分的抗体结合。又,本制作例的特征是仅在孔周围形成抗体结合表面,它能够通过多种方法实现。优选使用岸本产业株式会社·dix 系列等。在聚对苯撑二甲苯 (poly(p-xylylene) 树脂表面形成氨基也可能获得与本制作例相同的结合表面。又,如果必要的话可在抗体结合表面以外部分上形成具有与抗体结合用引物相反效果的膜,也能得到相同效果,例如可举出东洋合成工业株式会社·BIOSURFINE 等。

[0207] 表面处理方法(图 8)

[0208] 为使抗 Ig 抗体均匀地结合,用以下方法进行表面处理。

[0209] 1. 除去基板 5-a 表面的油分等污染物。除去污染物的方法例如用有机溶剂、酸及碱洗涤,用氧等离子体等干燥洗涤。可以根据污染容易度适当地选择基板材料。

[0210] 2. 其中为了提高基板与抗体等结合的引物表面的结合密度,可以在基板表面上形成置换引物的氢氧基 5-b。为了除去基板表面上形成氢氧基的表面微粒子,例如可用 1% 左右的氨水进行洗净。随后,用水彻底清洗。在硅的情况中,可以用 RCA 洗涤代替 SC-1 洗涤。但是,如果在步骤 1 中形成了彻底结合引物的表面,则可省略步骤 2。

[0211] 3. 在表面结合引物 5-c。浸入硅烷偶联剂等中,彻底置换表面的氢氧基。引物例如是六甲基二硅氮烷,表面经疏水化处理。此外,本处理步骤中的引物材料、方法可以多种多样,并不对本表面处理例做出限定。

[0212] 引物主要是硅烷偶联剂或硅烷剂,特征在于能结合有机物及无机物,用作表面改良剂,具有疏水化表面。用作半导体主要以六甲基二硅氮烷为典型的材料。可根据基板材料适当地选择引物,例如信越シリコーン (silicone) 社出售的硅烷偶联剂、硅烷剂等。

[0213] 引物涂布的方法可多种多样,有浸渍、旋涂、气体扩散、N₂ 气泡喷射等,有必要根据选择的材料选择使用最合适的方法。例如在气体扩散法中,可以将其暴露在 5 ~ 10 分钟左右气化的引物密闭容器氛围气体中进行实施。

[0214] 依据本制作例得到的微孔阵列芯片不限于是由硅形成,还可以由树脂、金属、玻璃等形成。其形态也不仅限于材料单体,还可以是形成在基板上的膜形状。

[0215] 树脂可举出例如丙烯酸树脂、聚丙烯、聚乙烯、聚氯乙烯、ABS、聚氨酯、环氧树脂、热硬化型树脂、光硬化性树脂、光溶解性树脂等。这些树脂可以通过喷射、压缩、热硬化、光硬化、干式蚀刻法等成型。可以在玻璃、硅、金属基板上用树脂制膜进行成型加工。成型为微孔形状的树脂还可与硅相同,用引物进行表面处理,可以进行抗体结合。例如,可根据本发明记载的表面处理方法进行实现。又,也可以利用感光性引物,与硅相同地形成抗体结合图案。其中,可以考虑与树脂材料的结合性适当地选择所使用的引物。此外,如果树脂表面具有能与抗体耦合而结合的能力,具有抗体结合性,则还能降低成本。

[0216] 金属可举出例如铝、铝合金、铜合金、金、不锈钢等。这些金属可通过金型成型、蚀刻法等成型。也可以在玻璃、硅及金属基板上制得金属膜进行成型加工。成型为微孔形状的金属还可与硅相同地用引物进行表面处理,以便能结合抗体。例如可根据本发明记载的表面处理方法实现这一点。其中,可以考虑与金属材料的结合性而进行适当地选择所使用的引物。

[0217] 可用蚀刻法使玻璃形成微孔。又,还可在表面用树脂、硅、金属制膜,形成微孔。成

型为微孔形状的金属可与硅相同用引物进行表面处理,以便能结合抗体。例如可根据本发明记载的表面处理方法实现这一点。其中使用的引物可考虑与玻璃、表面制膜材料的结合性而进行适当选择。

[0218] 以下的实施例使用了根据制作例 1 制作的硅制微孔阵列芯片。但是,实施例中使用芯片的孔的表面形状是六角形的(制作例 1 是圆形的)。

[0219] 实施例 1

[0220] 实验方法(试验 1)

[0221] 1. [涂布抗人 IgG 芯片] 在经硅烷偶联剂处理的硅制微孔阵列芯片上加入 80 μ L 按 10 μ g/mL 的浓度用 PBS 稀释的抗人 IgG 抗体,为防止芯片上的液体变干将芯片置入保湿箱(图 9),室温(15-25 $^{\circ}$ C)下静置 1 小时,使抗 IgG 抗体结合在硅芯片表面上。这时,与下述步骤 2 不同的,不进行减压脱气,也不向孔中加入抗体,而是将抗体分布在孔周围。(之后,当孵化芯片时通常将其放入上述保湿箱中防止干燥。)

[0222] 2. [封闭] 除去芯片上的抗体溶液,向芯片中加入 100 μ L PBS,随后重复 3 次除去的洗涤操作后,向芯片上加入 100 μ L 含有 0.2% (v/v) Lipidure(日本油脂(株)、BL-B03 Lipidure(5wt%))的 PBS,用真空泵减压彻底除去微孔内的气泡,使芯片表面及孔内充满 Lipidure 液。室温(15-25 $^{\circ}$ C)下静置 15 分钟,进行封闭。

[0223] 3. [细胞添加] 用 100 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液清洗芯片 3 次后,向芯片上加入用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液清洗 2 次的 X63/116 细胞(相对于 B 型肝炎病毒表面抗原(HBs 抗原)分泌人 IgG)或 HyHEL10 110TC 细胞(相对于鸡蛋溶菌酶(HEL)分泌小鼠/人嵌合体抗体),将细胞置入孔内,在室温下静置 10 分钟。

[0224] 4. [细胞培养] 用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液清洗没加入孔内的细胞数次(直到除去多余的细胞)并除去后,向芯片上加入 80 μ L 10% FCS 的 RPMI1640 培养液,将芯片置入 CO₂ 孵化器(37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂)中,培养芯片上细胞 2~3 小时。

[0225] 5. [生物素标识抗原的结合] 在防止细胞从孔中漏出的同时,除去芯片表面的缓冲液,在芯片表面上加入约 100 μ L PBS 清洗芯片,重复数次后除去 PBS,向芯片上加入 80 μ L 1 μ g/mL 生物素标识 HEL 或生物素标识 HBs 抗原,室温下静置 30 分钟。

[0226] 6. 与 5 相同的用 PBS 洗净芯片后,向芯片上加入 80 μ L 原液稀释 1000 倍的 Cy3 标识抗生蛋白链菌素(SIGMA, S-6402),同样地在室温下静置 30 分钟。

[0227] 7. 与 5 相同的用 PBS 洗净芯片后,向芯片上加入 PBS,在荧光显微镜下观察 Cy3 的荧光,以孔周围扩展出圆环形的 Cy3 的荧光为指标,确认容纳了分泌抗原特异性抗体的细胞的孔的位置(图 10)。

[0228] 8. 向芯片上加入 80 μ L 1 μ g/mL 的 Oregon Green,室温下静置 3 分钟,使 Oregon Green 标识细胞。与 5 相同的用 PBS 洗净芯片后,向芯片中加入新鲜的 PBS,以 Oregon Green 的荧光为指标观察细胞,同时用微操作装置回收分泌了目的抗原特异性抗体的细胞。

[0229] 用本发明的方法(FLISPOT 法)确定微孔阵列芯片上的分泌抗原特异性抗体的细胞

[0230] 在涂布了抗 IgG 抗体的硅制微孔阵列芯片上培养 HyHEL10 110TC 细胞、X63/116 细胞、110TC 细胞(阴性对照、不分泌抗体),随后,用生物素标识 HEL 或生物素标识 HBs 抗原及 Cy3 标识抗生蛋白链菌素检测抗原特异性抗体的分泌(图 11A)。如图 11A 所示,检测到

的分泌出的抗体在孔周围呈圆环状分布。没有分泌抗体的添加了 110TC 的芯片上没有检测到信号。然后用 Oregon Green 对细胞染色并确认细胞。(图 11B)

[0231] 这种染色是抗原特异性的,在加入了 HyHEL10 110TC 细胞的芯片上能检测到生物素标识 HEL 的信号,但检测不到生物素标识 HBs 抗原的信号。相反,在加入了 X63/116 细胞的芯片上不能检测到生物素标识 HEL 的信号,而能检测到生物素标识 HBs 抗原的信号(没有示出数据)。

[0232] 根据 FLISPOT 法确定分泌抗原特异性抗体的杂交瘤细胞(应用试验 I)

[0233] 制作经 HEL 蛋白免疫的 BALB/c 小鼠的脾细胞,用常规的聚乙烯醇的方法制作与 X63. Ag8. 653 骨髓瘤细胞融合的杂交瘤细胞。在 HAT 选择性培养基中选择杂交瘤细胞后,向涂布了抗小鼠 IgG 抗体的微孔阵列芯片上加入杂交瘤细胞,洗涤除去未置入孔中的细胞后,在芯片上培养 1 小时 30 分钟。用生物素标识 HEL 及 PE 标识抗生蛋白链菌素检测相对于 HEL 分泌抗体的杂交瘤细胞(图 11A)。随后在细胞中加入 Oregon Green 确认细胞位置(图 11B)。(图 11C) 是 A 和 B 的组合。

[0234] 实施例 2

[0235] 实验方法(试验 II)

[0236] 制作小鼠 CD138 阳性细胞(抗体分泌细胞)

[0237] 1. 制作小鼠脾细胞。

[0238] 2. 在 100 μ L 细胞悬浮液中按每 10^6 细胞小于 1 μ g 的量加入抗小鼠 CD138 抗体, 4 $^{\circ}$ C 时孵化 15 分钟。

[0239] 3 用 10mLPBS 洗净细胞 2 次后,将细胞悬浮于 100 μ LPBS 中,在细胞悬浮液中按每 10^6 细胞小于 1 μ g 的量加入抗大鼠 κ 链抗体结合微珠,4 $^{\circ}$ C 时孵化 15 分钟。

[0240] 4. 用 10mLPBS 洗净细胞 2 次后,将细胞悬浮在 1000 μ L PBS 中,用 AutoMACS 回收 CD138 阳性细胞。

[0241] 制作人 CD138 阳性细胞

[0242] 1. 根据人末梢血常规方法(用于淋巴细胞的比重离心法)分离淋巴细胞。

[0243] 2. 按每 10^7 细胞加入 20 μ L 的量加入 Fc 受体封闭试剂(ミルテニーバイオテク(miltenyibiotec)(株))后,按每 10^6 细胞小于 1 μ g 的量加入抗 CD138 抗体结合微珠,4 $^{\circ}$ C 时孵化 15 分钟。

[0244] 3. 用 10mLPBS 洗净细胞 2 次后,将细胞悬浮在 1000 μ LPBS 中,用 AutoMACS 回收 CD138 阳性细胞。

[0245] 实验方法(延续试验 II)

[0246] 1. 以下实验中在孵化芯片时采用与试验 I 相同的防止干燥措施。

[0247] 2. 在经硅烷偶联剂处理的硅制微孔阵列芯片上加入 80 μ L 用 PBS 稀释的 10 μ g/mL 来自驴的抗山羊 IgG 抗体,为防止芯片上的液体变干而将芯片置入保湿箱(图 1)中,室温(15 ~ 25 $^{\circ}$ C)静置 1 小时,使来自驴的抗山羊 IgG 抗体结合在硅芯片表面。

[0248] 3. 除去芯片上的抗体溶液,用 100 μ L PBS 清洗 3 次后,在芯片上加入 100 μ L 含 0.2% (v/v) Lipidure(日本油脂(株)、BL-B03Lipidure(5wt%))的 PBS,减压除去微孔内的气泡,在芯片表面及孔内充满 Lipidure 液。室温下静置 15 分钟进行封闭。

[0249] 4. 用 100 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液清洗芯片 3 次后,在芯片上加入用

10mL PBS 洗涤 1 次的 CD138 阳性抗体分泌细胞 (将 $1 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞悬浮在 30μ LPBS 中), 将细胞置入孔内, 室温下静置 10 分钟。

[0250] 5. 用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗涤除去没有进入孔内的细胞, 随后在芯片上加入 80μ L 10μ g/mL 来自山羊的抗人 (或小鼠) IgG, 室温下静置 30 分钟, 使抗体结合在芯片表面的抗山羊 IgG 抗体上。

[0251] 6. 在防止细胞溢出孔的同时用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗净芯片后, 再向芯片中加入 80μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液, 在 CO_2 孵化器内 (37°C , $5\% \text{CO}_2$) 培养细胞 3 小时。

[0252] 7. 下面的步骤按照试验 I 步骤 5 之后的步骤进行。

[0253] 用本发明的方法 (FLISPOT 法) 检测经 HEL 免疫的小鼠脾细胞中的分泌 HEL 特异性抗体的细胞

[0254] 用经鸡蛋溶菌酶 (HEL) 免疫的 BALB/c 小鼠脾细胞调制 CD138 阳性细胞, 按照试验 II 在结合了来自驴的抗山羊 IgG 抗体的硅制微孔阵列芯片上添加细胞, 通过随后的试验来自山羊的抗小鼠 IgG 抗体结合在芯片上后, 培养细胞约 3 小时。然后, 加入生物素标识 HEL 及 Cy3 标识抗生素链菌素, 在荧光显微镜下检测正在分泌 HEL 特异性 IgG 抗体的细胞 (图 12)。随后, 用微操作装置回收细胞, 扩增抗体基因。其制作出的结果是 7 个 IgG 中有 6 个结合了 HEL (没有示出数据)。

[0255] 用本发明的方法 (FLISPOT 法) 检测人末梢血淋巴细胞中分泌 HBs 抗原特异性抗体的细胞

[0256] 按照试验 II 用经 HBs 抗原疫苗增强的健康人的末梢血调制 CD138 阳性细胞。按照试验 II 向结合了来自驴的抗山羊 IgG 抗体的硅制微孔阵列芯片上添加 CD138 阳性细胞, 随后按照试验在芯片上结合来自山羊的抗人 IgG 抗体, 培养细胞约 3 小时。之后, 加入生物素标识 HBs 抗原及 Cy3 标识抗生素链菌素, 在荧光显微镜下检测正在分泌 HBs 抗原特异性 IgG 抗体的细胞 (图 13)。

[0257] 在获得同意的志愿者接种 HBs 疫苗 7 天后, 从眼睛采血 100mL, 从末梢血淋巴细胞中选出 CD138 阳性细胞, 播种到涂布了抗人 IgG 的芯片上。细胞培养后, 用生物素标识 HBs 抗原及 Cy3 标识抗生素链菌素检测分泌 HBs 特异性抗体的细胞。回收全部 24 个孔中的细胞。接种 HBs 疫苗 8 天后, 从眼睛采血 100mL, 从其中的末梢血淋巴细胞中按照相同方法检测分泌 HBs 特异性抗体的细胞, 回收 57 个孔的细胞。根据这些细胞制作抗体 53 对 H 链和 L 链的 cDNA。将 cDNA 经表达载体的 H 链和 L 链对通过基因导入 293T 细胞 (来自人胎儿肾的细胞株) 中, 回收培养的上清液, 用 ELISA 解析上清液中分泌的抗体是否与 HBs 抗原结合。结果可产生 41 个抗体蛋白, 其中 36 个具有 HBs 抗原特异性。

[0258] 实施例 3

[0259] 实验方法 (试验 III)

[0260] 1. 向经硅烷偶联剂处理的硅制微孔阵列芯片上添加 80μ L 用 PBS 稀释的 10μ g/mL 抗原 (HEL 蛋白), 为防止芯片上的液体变干, 将芯片置入保湿箱 (图 9) 中, 室温 ($15 \sim 25^\circ\text{C}$) 下静置 1 小时, 使 HEL 蛋白结合在硅芯片表面。(之后, 在芯片孵化时通常置入上述箱中防止干燥。)

[0261] 2. 除去芯片上的抗原溶液, 用 100μ L PBS 洗净 3 次后, 向芯片上添加 100μ L 含

0.2% (v/v) Lipidure (日本油脂(株)、BL-B03 Lipidure (5wt%)) 的 PBS, 减压除去微孔内气泡, 在芯片表面及孔内充满 Lipidure 液。室温下静置 15 分钟, 进行封闭。

[0262] 3. 根据试验 II 从经 HEL 免疫的小鼠脾细胞调制 CD138 阳性细胞。

[0263] 4. 用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗净芯片后, 在芯片上添加用 10mL PBS 洗涤 1 次的 CD138 阳性细胞 ($1 \sim 2 \times 10^6$ 个细胞悬浮在 30 μ L PBS 中), 将细胞置入孔内, 静置约 10 分钟。

[0264] 5. 用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗涤除去没有进入孔内的细胞, 在芯片上添加 80 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液, 将芯片置入 CO₂ 孵化器 (37°C, 5% CO₂) 中, 培养芯片上的细胞 3 小时。

[0265] 6. 在防止细胞要从孔中溢出的同时, 除去芯片表面的缓冲液, 在芯片表面上添加 100 μ L PBS, 重复数次上述操作, 洗净芯片后, 在芯片上添加 80 μ L 1 μ g/mL Cy3 标识抗小鼠 IgG, 室温下静置 30 分钟。

[0266] 7. 与 6 相同用 PBS 洗净芯片后, 在芯片上添加 PBS, 在荧光显微镜下观察 Cy3 荧光, 以 Cy3 荧光在孔周围以圆环状展开为指标确认容纳有正在分泌抗原特异性抗体的细胞的孔的位置 (图 14)。

[0267] 8. 在芯片上添加 80 μ L Oregon Green, 室温下静置 3 分钟, 用 Oregon Green 标识细胞。与上述 6 相同用 PBS 洗净芯片后, 在芯片上加入新鲜的 PBS, 以 OregonGreen 的荧光为指标观察细胞, 同时用微操作装置回收正在分泌目的抗原特异性抗体的细胞。

[0268] 实施例 4

[0269] 实验方法 (应用试验 IV)

[0270] 用酶标识抗原或用酶标识抗体代替荧光标识抗原或荧光标识抗体。

[0271] 变更点

[0272] 1. 在酶标识抗原或酶标识抗体发生作用后, 在芯片上添加加入了酶的基质的缓冲液, 在室温中孵化。

[0273] 2. 基质在酶作用下产生的产物呈环状沉淀在孔周围。用光学显微镜观察, 检测分泌抗体的细胞。

[0274] 酶: 碱性磷酸酶, 基质: BCIP/NBT

[0275] 也可以用量子点 (quantum dot) 代替荧光色素结合的抗原、抗体进行检测。产生细胞因子的细胞的检测

[0276] 1. 在芯片上结合抗细胞因子抗体而不是在芯片上结合抗 IgG 抗体, 随后在芯片上播种正在分泌细胞因子的 T 细胞等, 产生细胞因子。

[0277] 2. 分泌出的细胞因子结合在孔周围的抗细胞因子抗体上。

[0278] 3. 随后, 加入荧光或酶标识的抗细胞因子抗体, 可检测到孔周围结合的细胞因子环, 进行分泌细胞因子的 T 细胞等的检测。

[0279] 芯片上的免疫斑点检测 (Immuno Spot Assay on Chip (ISAC))

[0280] 分泌细胞因子的细胞检测

[0281] 方法

[0282] 1. 从人末梢血调制淋巴细胞, 在 CO₂ 孵化器内 (37°C, 5% CO₂) 内在 10ng/mL 卞啉醇肉豆蔻酸乙酸酯 (phorbol myristate acetate) (PMA), 1 μ M 伊屋诺霉素 (ionomycin)

的存在下刺激一夜。

[0283] 2. 回收洗净淋巴细胞后,在涂布了抗人 IFN γ 抗体的微孔阵列芯片上加入细胞,为了防止干燥置入保湿箱(图9)中,在 CO₂ 孵化器内(37°C, 5% CO₂) 内培养 5 小时。

[0284] 3 用 PBS-Tween20 洗净芯片后,在芯片上添加生物素标识抗人 IFN γ 抗体,在保湿箱内室温下孵化 30 分钟。

[0285] 4. 用 PBS-Tween20 洗净芯片后,添加链酶亲和素,在保湿箱内室温下孵化 30 分钟。

[0286] 5. 用 PBS-Tween20 洗净芯片后,在荧光显微镜下观察分泌的细胞因子信号。

[0287] (曝光 2 秒)

[0288] 图 15 示出了结果。

[0289] 实施例 5(获得封闭抗体)

[0290] 1. 以下实验中芯片孵化时与试验 I 相同采取了防干燥措施。

[0291] 2. 在经硅烷偶联剂处理的硅制微孔阵列芯片上添加 80 μ L 用 PBS 稀释的 10 μ g/mL TRAIL-R1/Fc,为防止芯片上的液体变干,将芯片置入保湿箱(图9)中,室温(15~25°C)下静置 1 小时,待 TRAIL-R1/Fc 结合在硅芯片表面上。

[0292] 3. 除去芯片的抗体溶液,用 100 μ L PBS 洗涤 3 次后,在芯片上添加 100 μ L 含 0.2% (v/v) Lipidure(日本油脂(株)、BL-B03Lipidure(5wt%))的 PBS,减压除去微孔内气泡,将芯片表面及孔内充满 Lipidure 液。室温下静置 15 分钟进行封闭。

[0293] 4. 用 100 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗涤芯片 3 次后,在芯片上加入先用 10mL 洗涤 1 次后再用 1000 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗涤 2 次的 CD138 阳性抗体分泌细胞(1~2 \times 10⁶个细胞悬浮在 30 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液中),将细胞置入孔内,室温下静置 10 分钟。

[0294] 5. 在防止细胞从孔中溢出的同时用含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液洗净芯片,再向芯片上添加 80 μ L 含 10% FCS 的 RPMI1640 培养液,在 CO₂ 孵化器内(37°C, 5% CO₂) 中培养细胞 3 小时。

[0295] 6. 在防止细胞从孔中溢出的同时除去芯片表面的缓冲液,在芯片表面添加约 100 μ L 的 PBS,再除去,重复数次上述操作,洗净芯片后,在芯片上添加 80 μ L 1 μ g/mL 生物素标识 TRAIL,室温下静置 30 分钟。

[0296] 7. 与 6 相同用 PBS 洗净芯片后,在芯片上添加 80 μ L 原液稀释 1000 倍的 Cy3 标识抗生蛋白链菌素(SIGMA, S-6402),同样在室温下静置 30 分钟。

[0297] 8. 与 6 相同用 PBS 洗净芯片后,在芯片上添加 PBS,在荧光显微镜下观察 Cy3 的荧光,以芯片表面的孔周围有 Cy3 的荧光时呈红色,没有结合 Cy3 的荧光时呈黑色圆环状为指标,确认容纳了正在分泌 TRAIL-R1/Fc 与其配基的 TRAIL 间封闭的细胞的孔的位置。

[0298] 9. 在芯片上添加 80 μ L 1 μ g/mL Oregon Green,室温下静置 3 分钟使 Oregon Green 标识。与 6 相同用 PBS 洗净芯片后,在芯片上加入新鲜的 PBS,以 Oregon Green 的荧光为指标观察细胞,同时用微操作装置回收正在分泌目的抗原特异性抗体的细胞。

[0299] 实施例 6(应用于机能性抗体的筛选)

[0300] 在芯片表面涂布受体蛋白,在芯片上播种由经受体蛋白免疫的小鼠脾细胞调制的 CD138 细胞。细胞培养后,添加生物素标识配基及 Cy3 标识抗生蛋白链菌素。虽然芯片大部分结合了生物素标识配基/Cy3 标识抗生蛋白链菌素,但由于封闭了受体配基结合而产生

机能性抗体的细胞的孔周围生物素标识配基 /Cy3 标识抗生蛋白链菌素的结合被阻断,因此是暗色的。图 16 示出了结果。左:生物素标识配基 /Cy3 标识抗生蛋白链菌素的检测结果。中:观察 Oregon Green 对细胞的标识。右:重合左图和中图的结果。

[0301] 产业上的实用性

[0302] 本发明可用于与筛选产生特异性免疫球蛋白的细胞及产生特异性细胞因子的细胞等免疫细胞的方法相关联的技术领域,例如与抗体医药等免疫相关的医药或诊断领域。

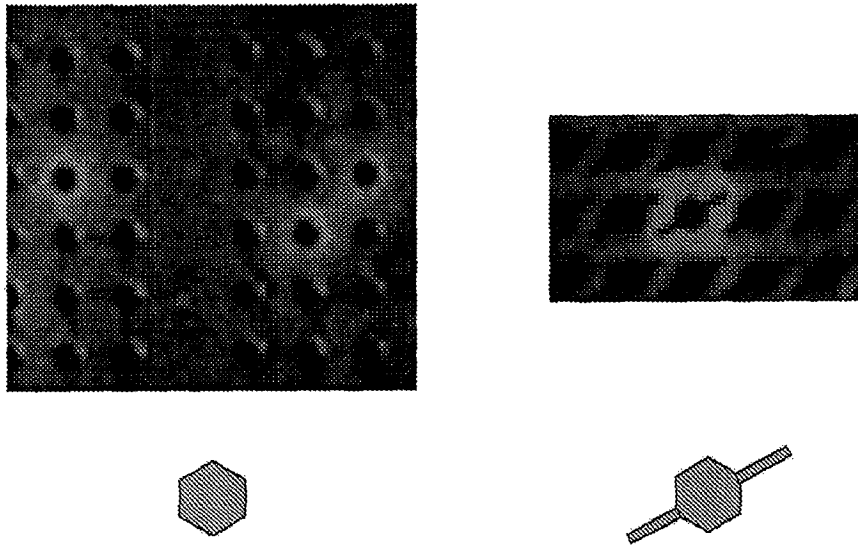


图 1

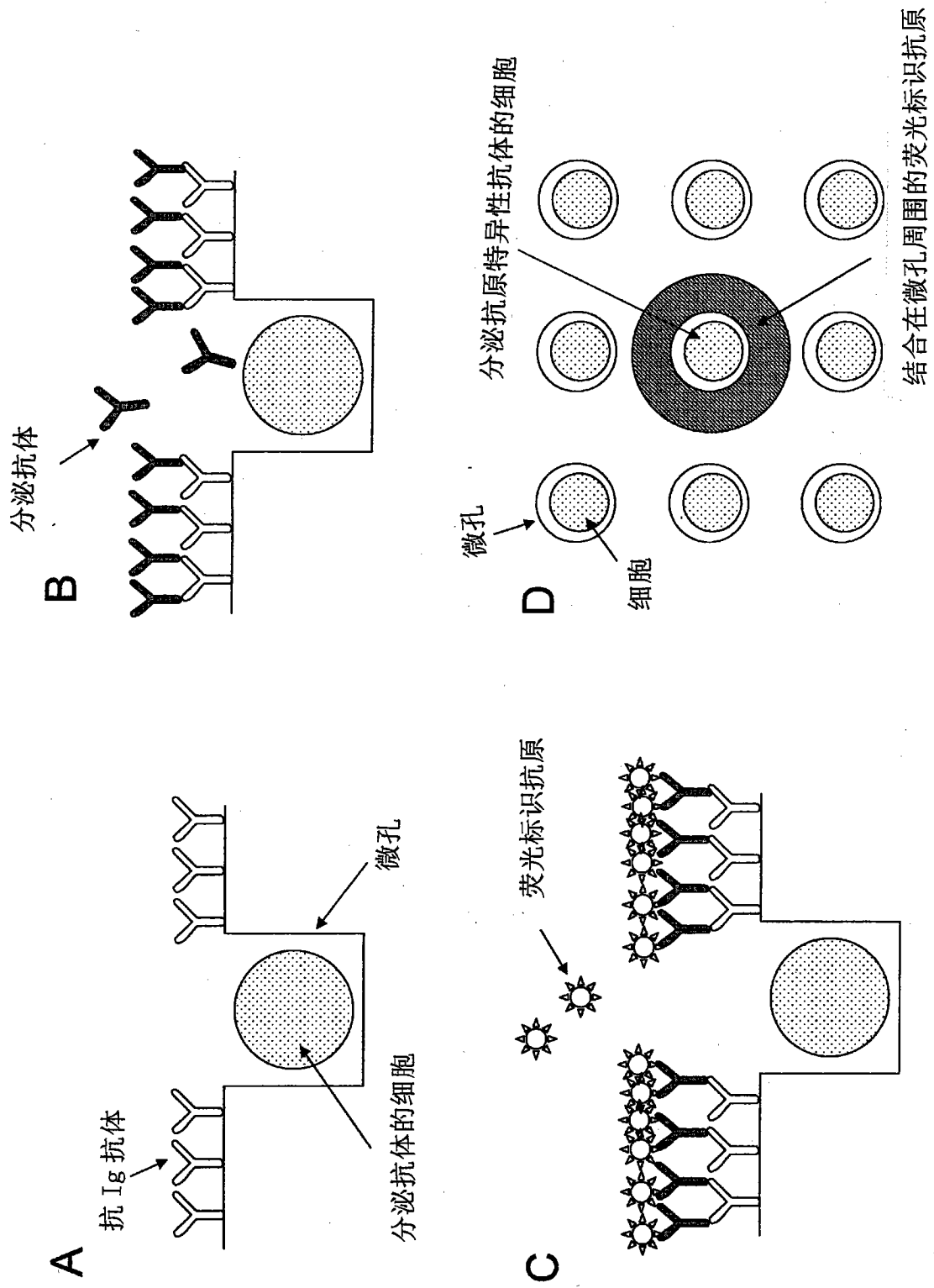


图 2

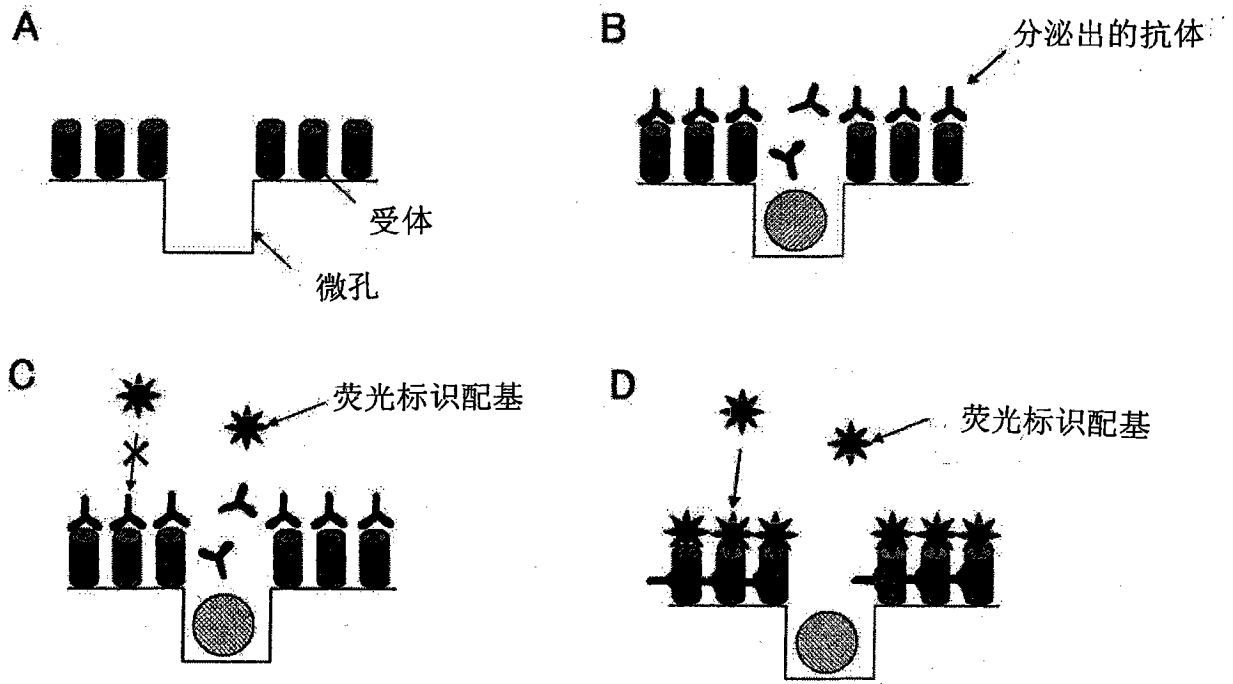


图 3

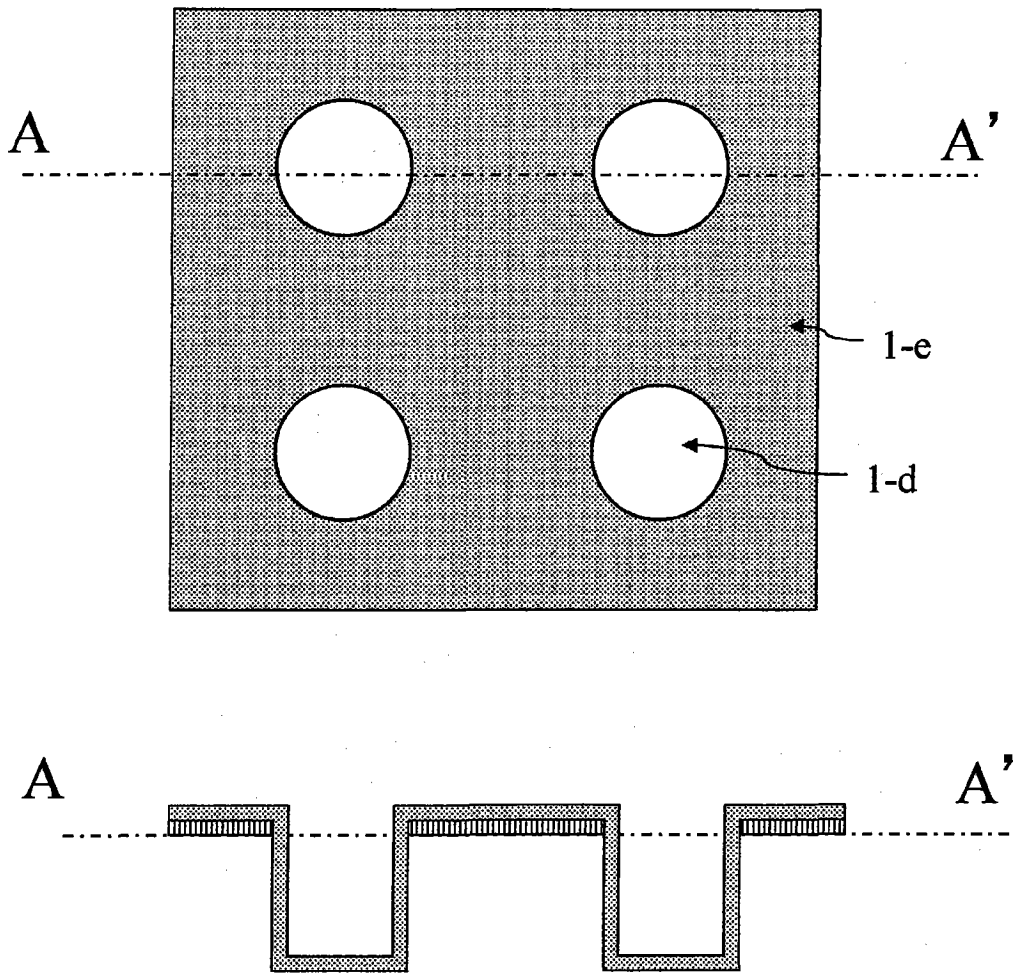


图 4-1

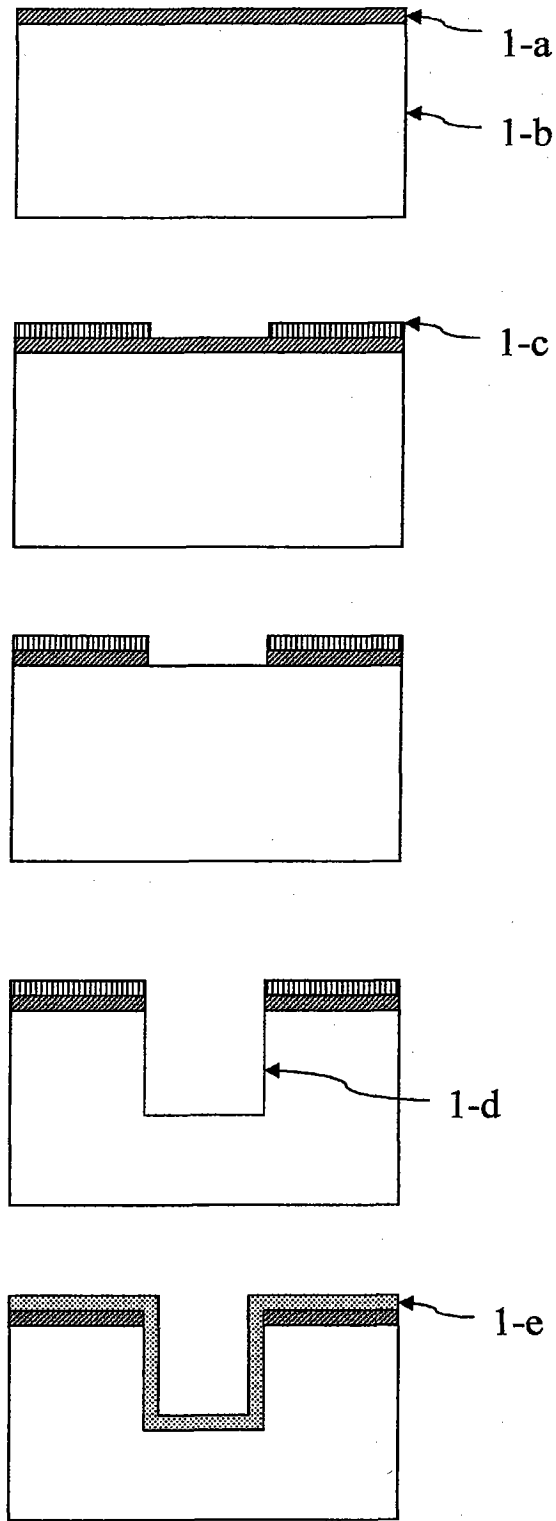


图 4-2

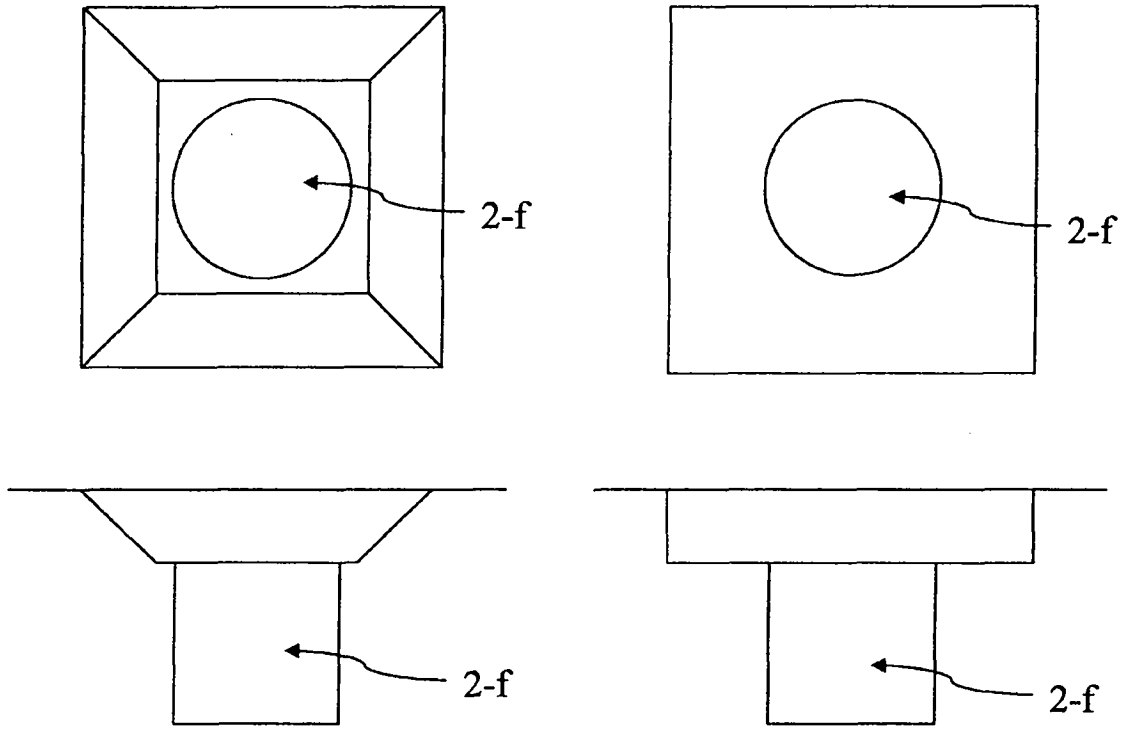


图 5-1

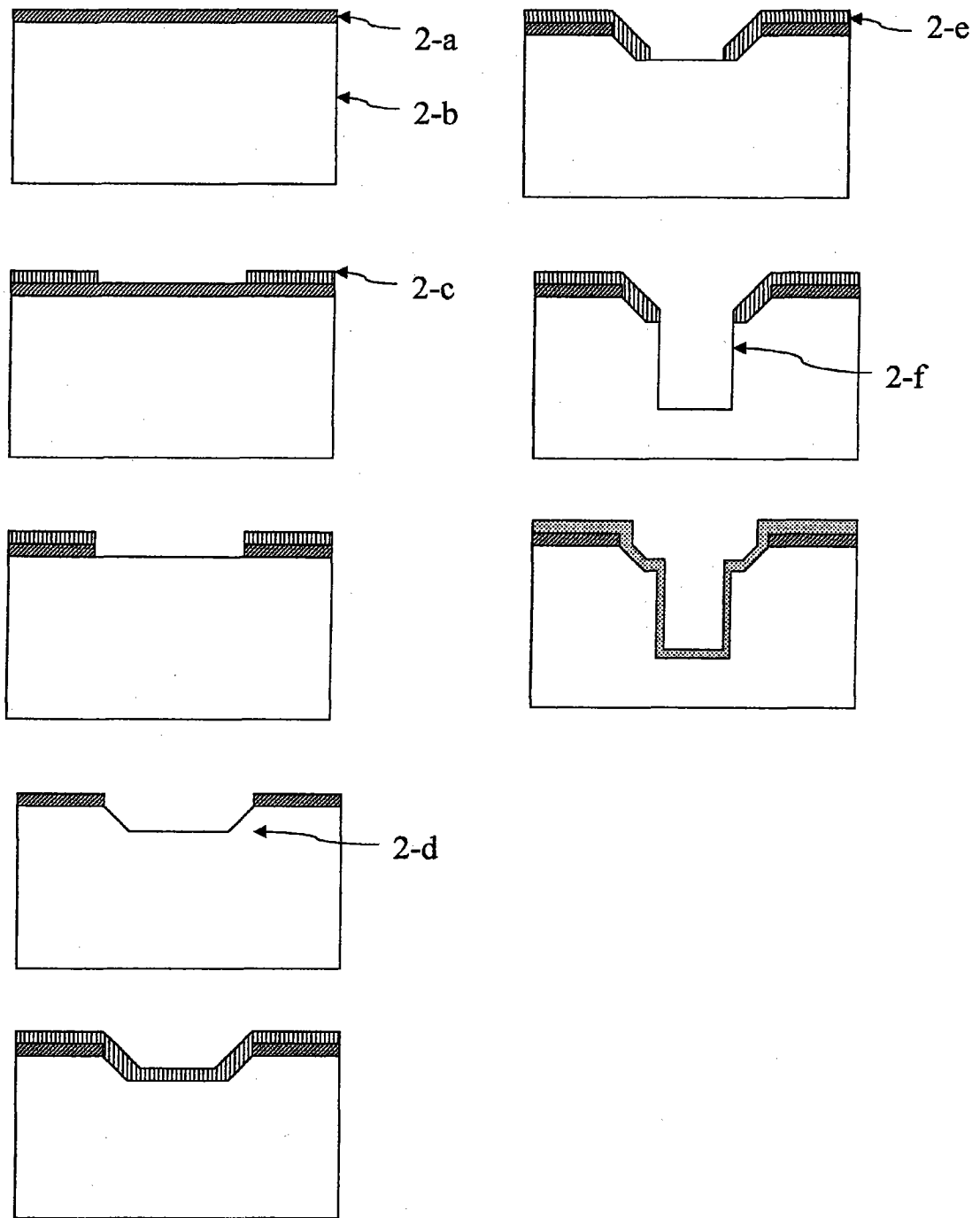


图 5-2

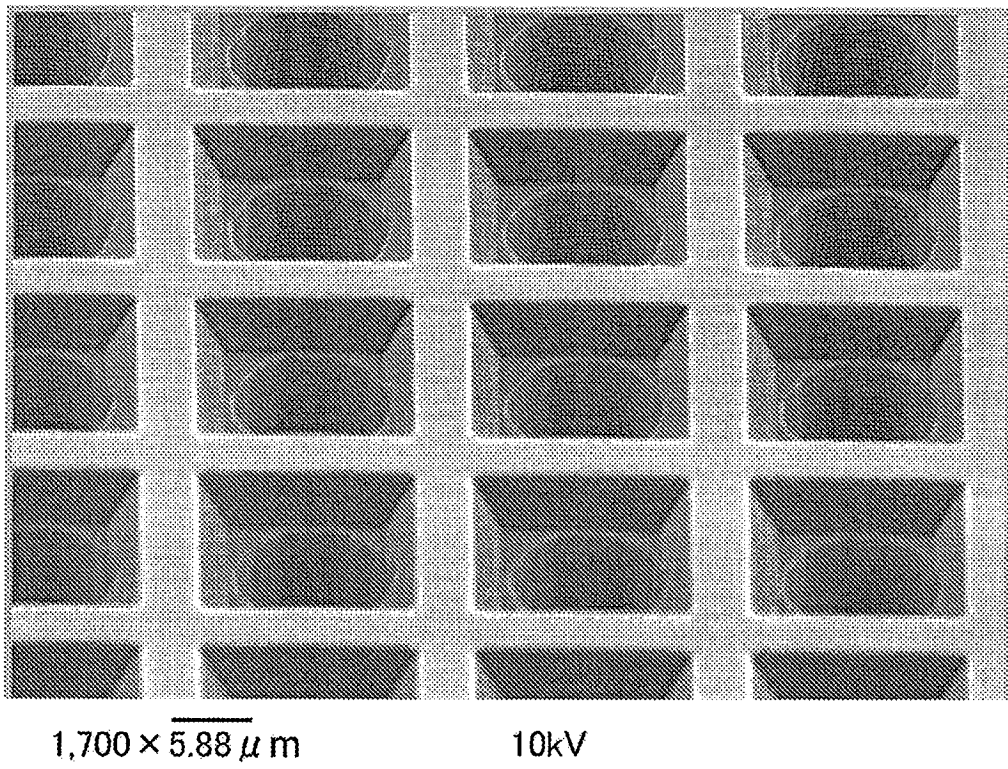


图 5-3

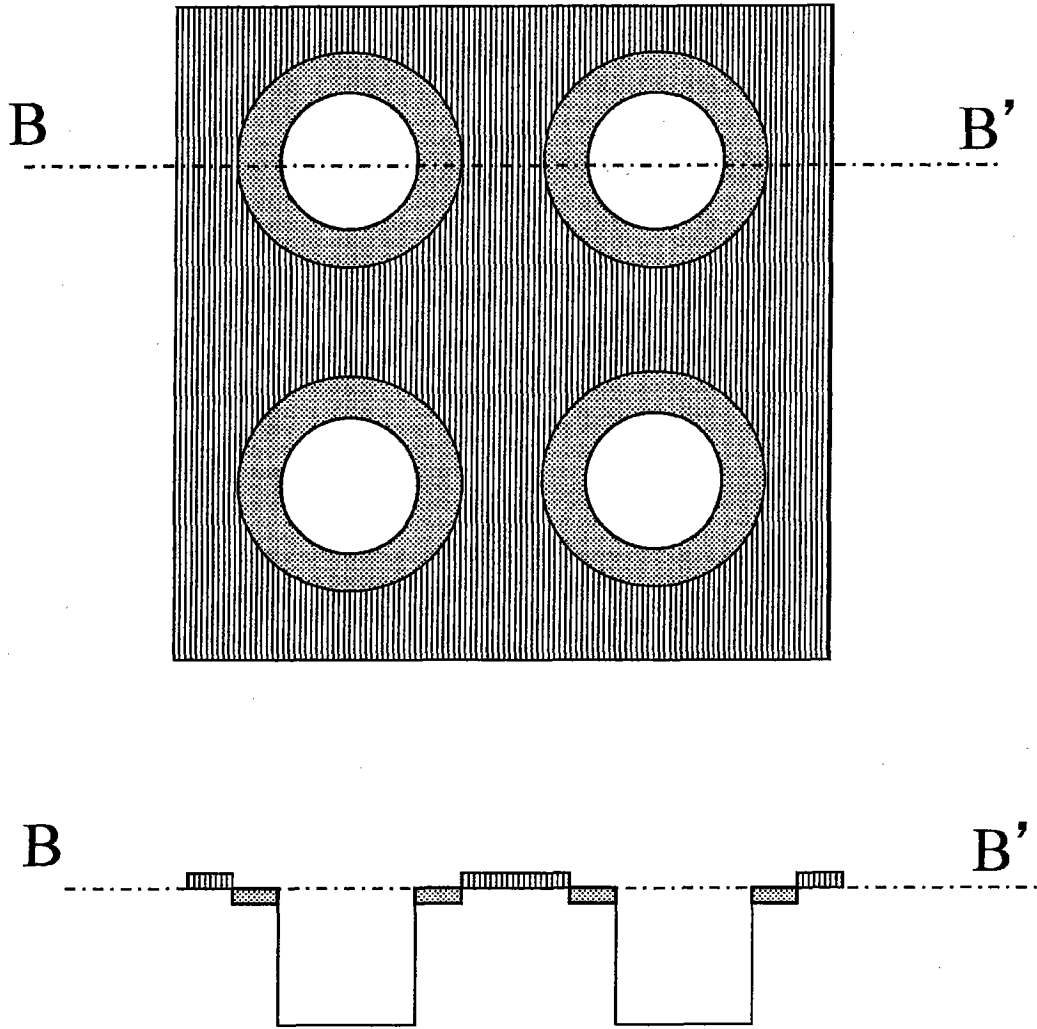


图 6-1

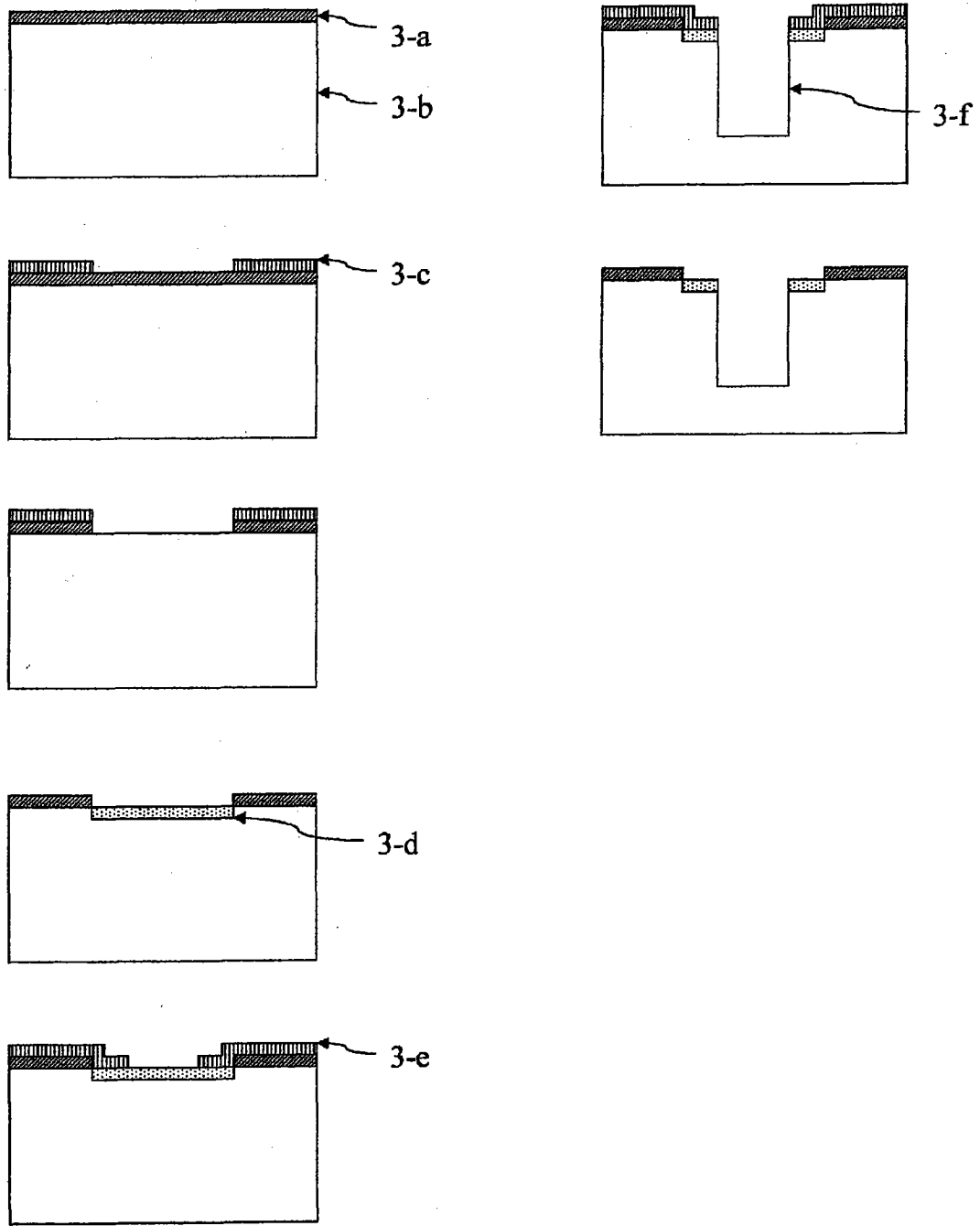


图 6-2

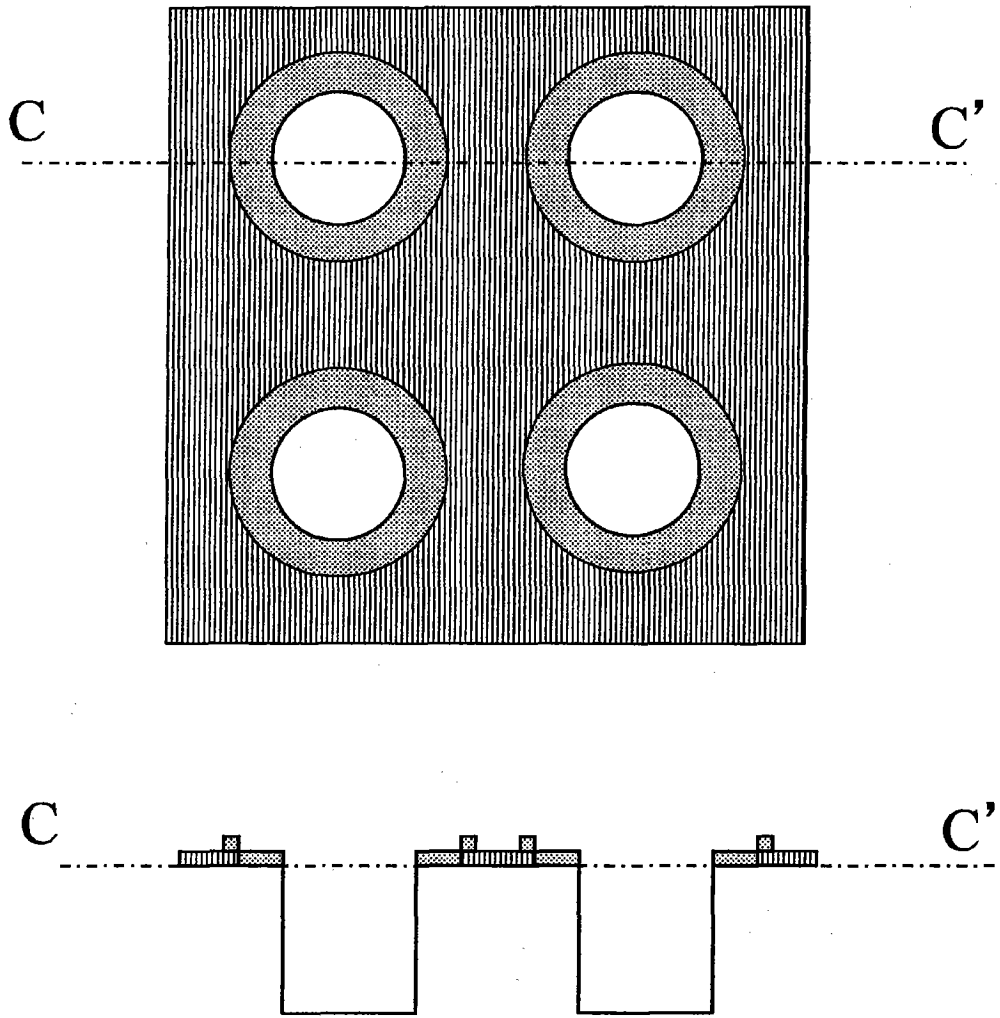


图 7-1

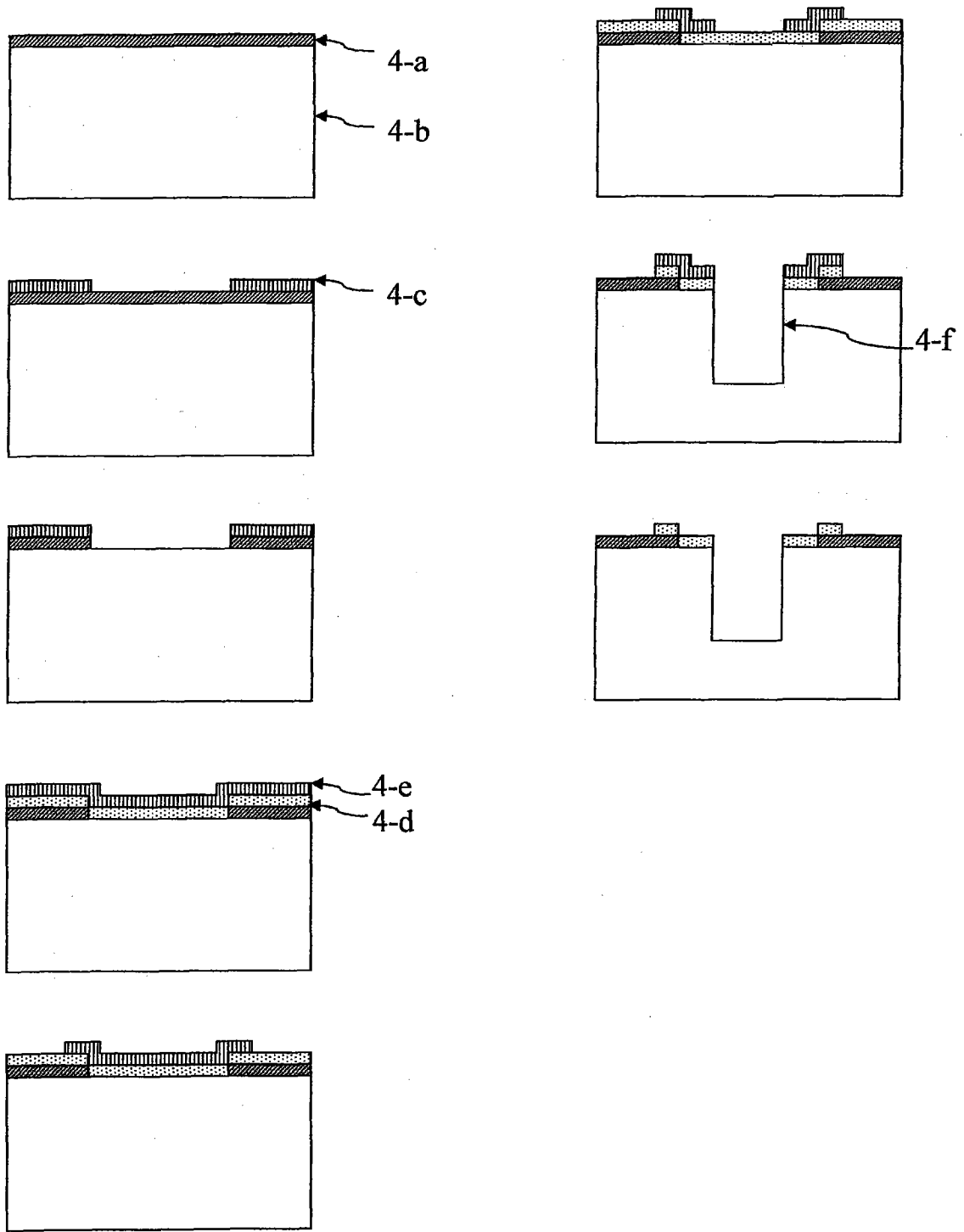


图 7-2

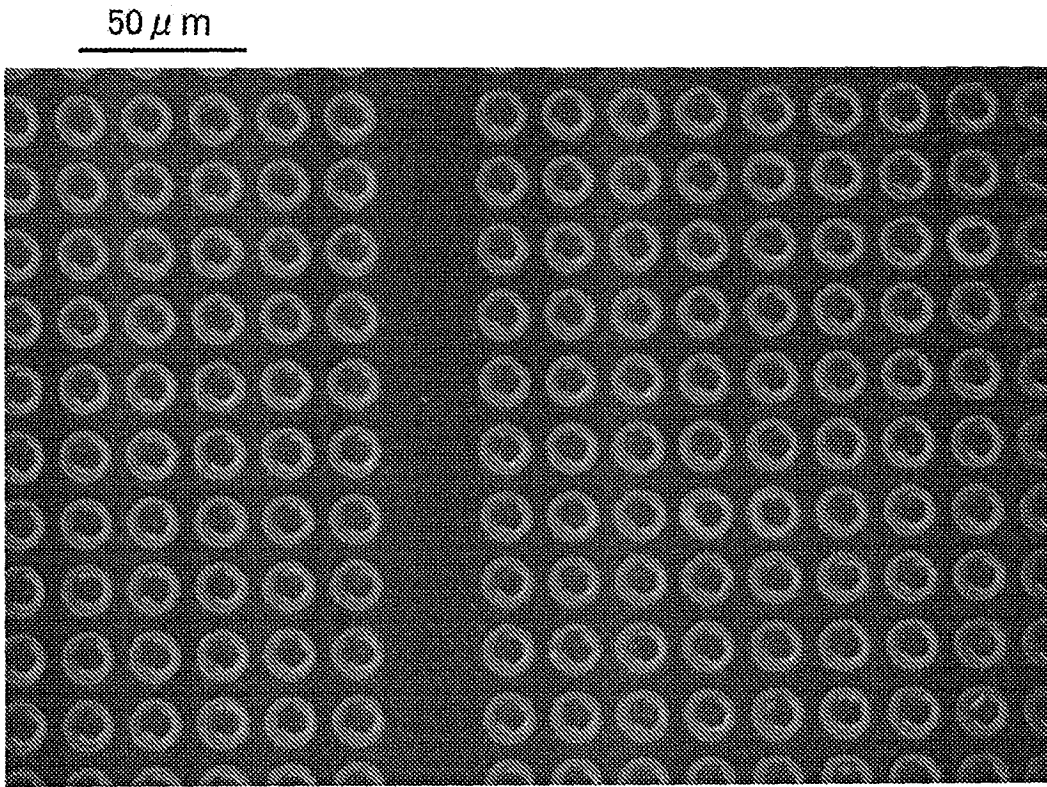


图 7-3

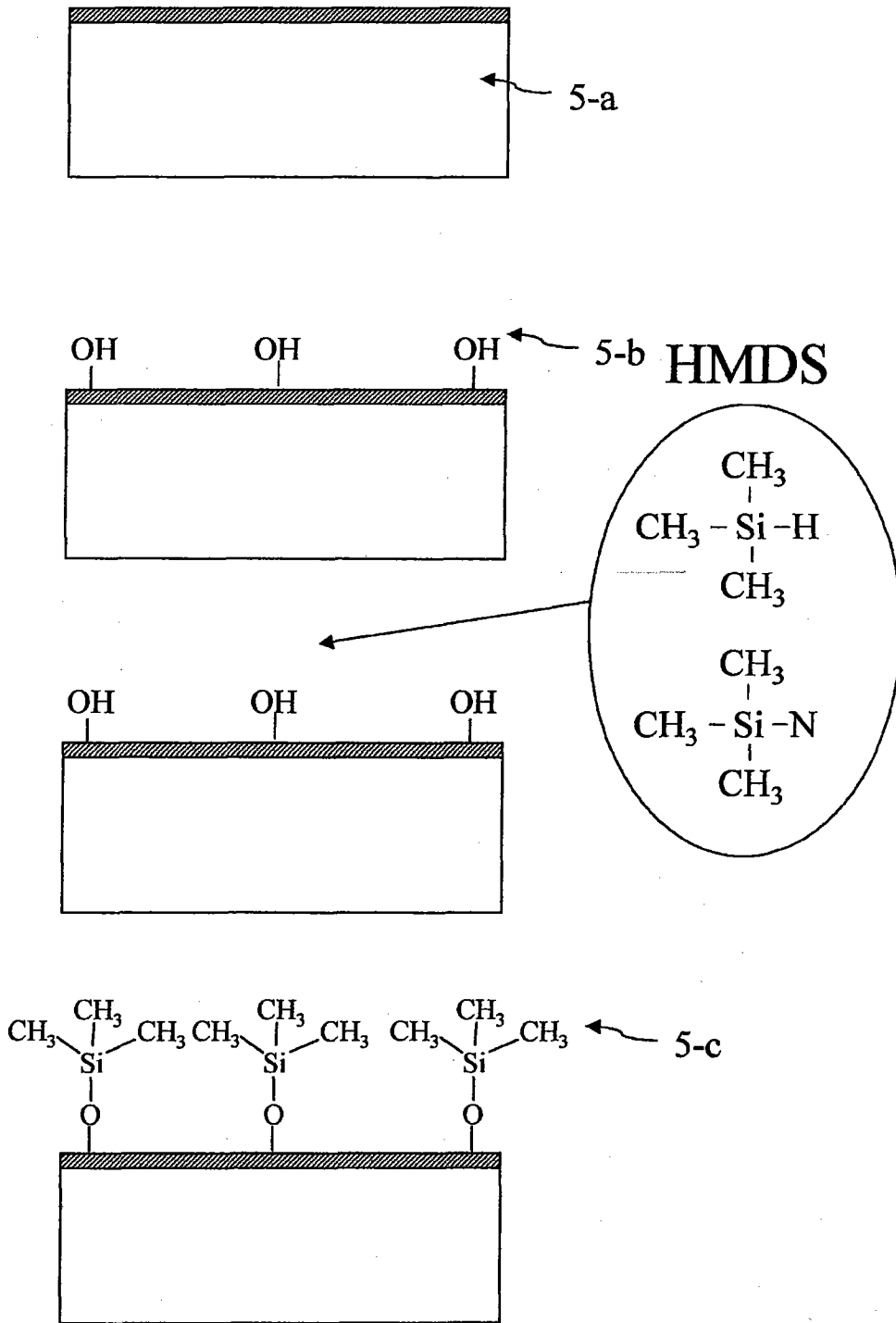


图 8

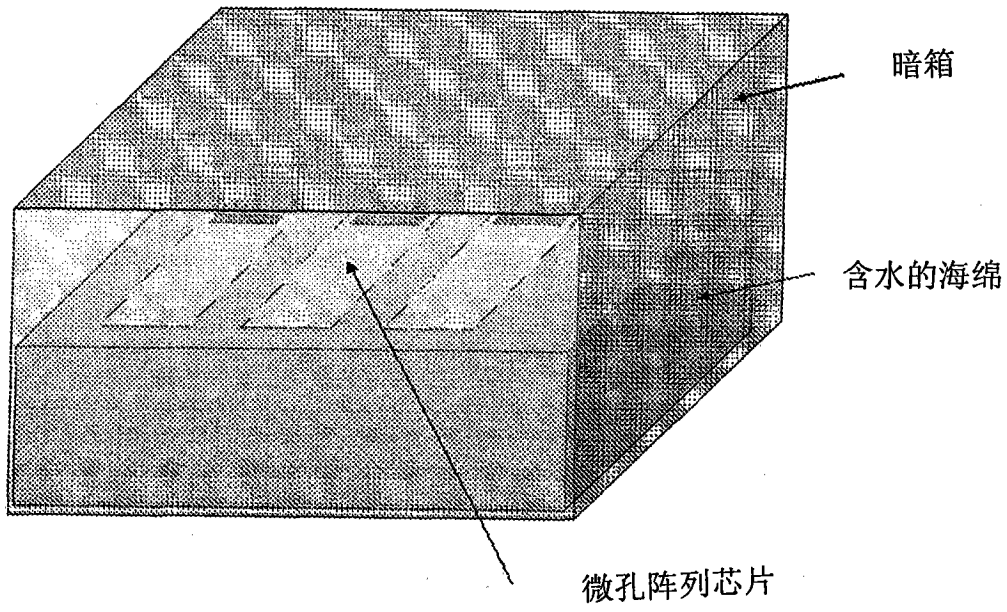


图 9

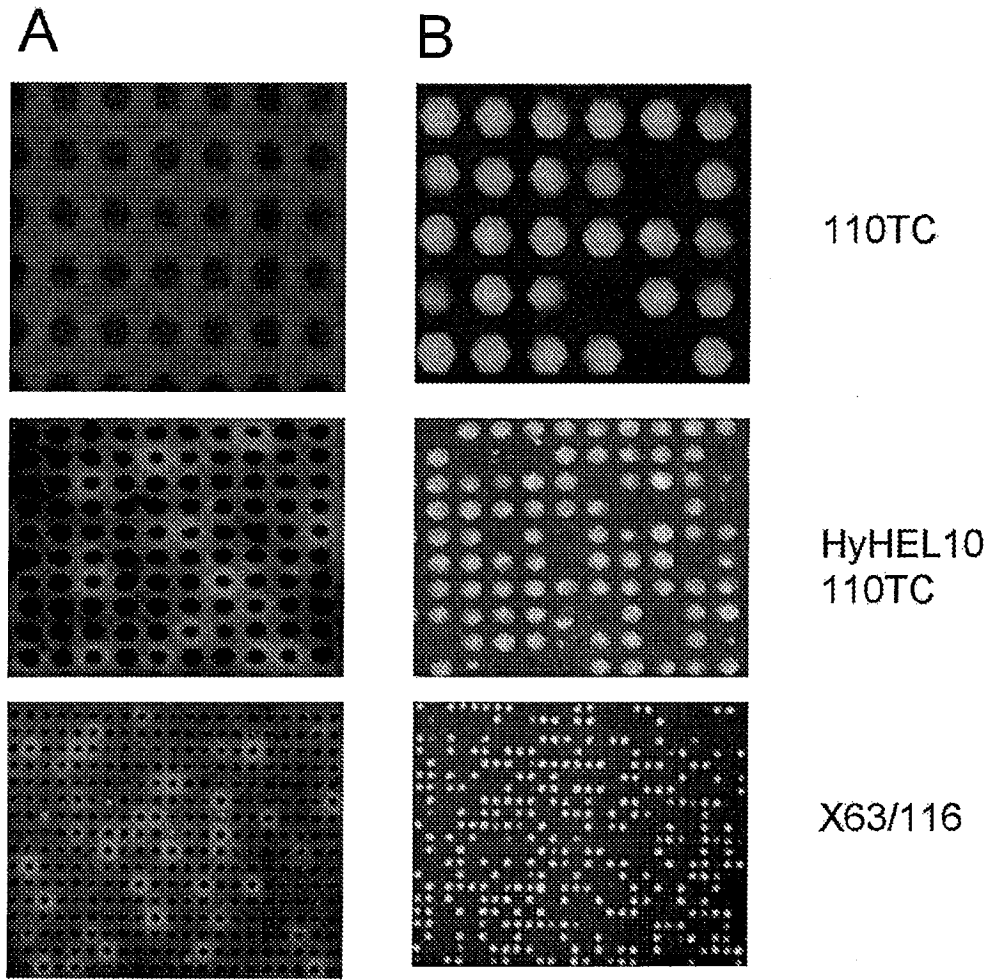


图 10

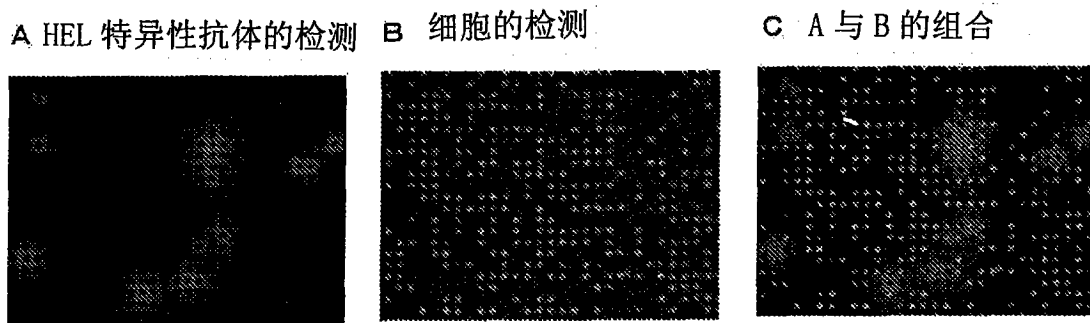


图 11



图 12

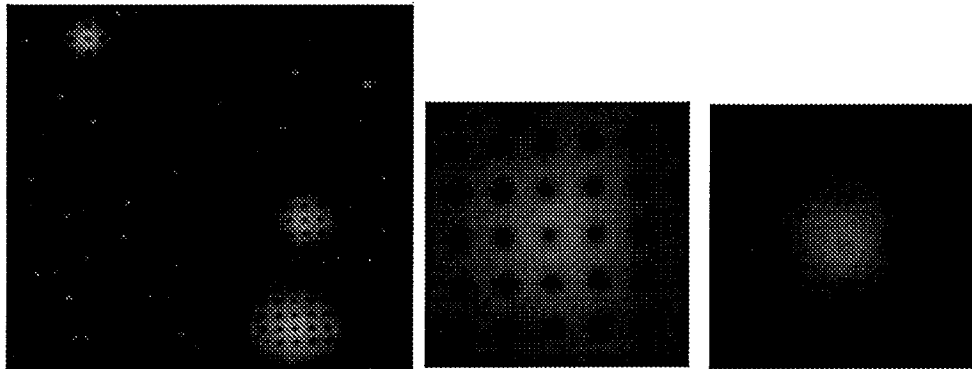
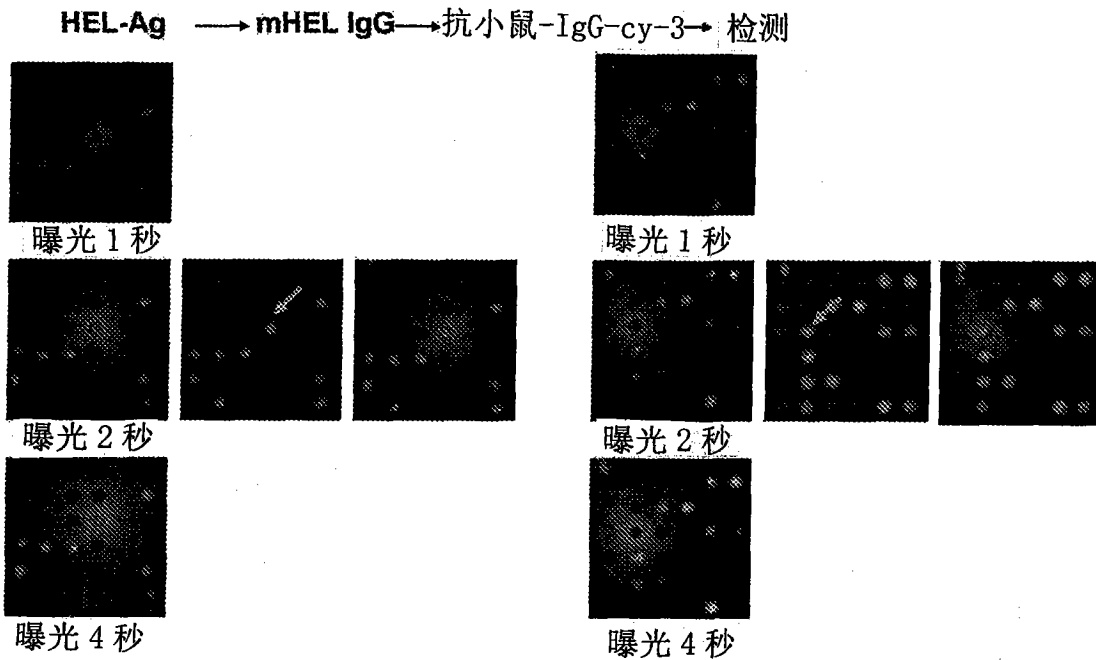


图 13



小鼠 CD138+ 来自 HEL 的细胞-免疫小鼠脾脏

图 14

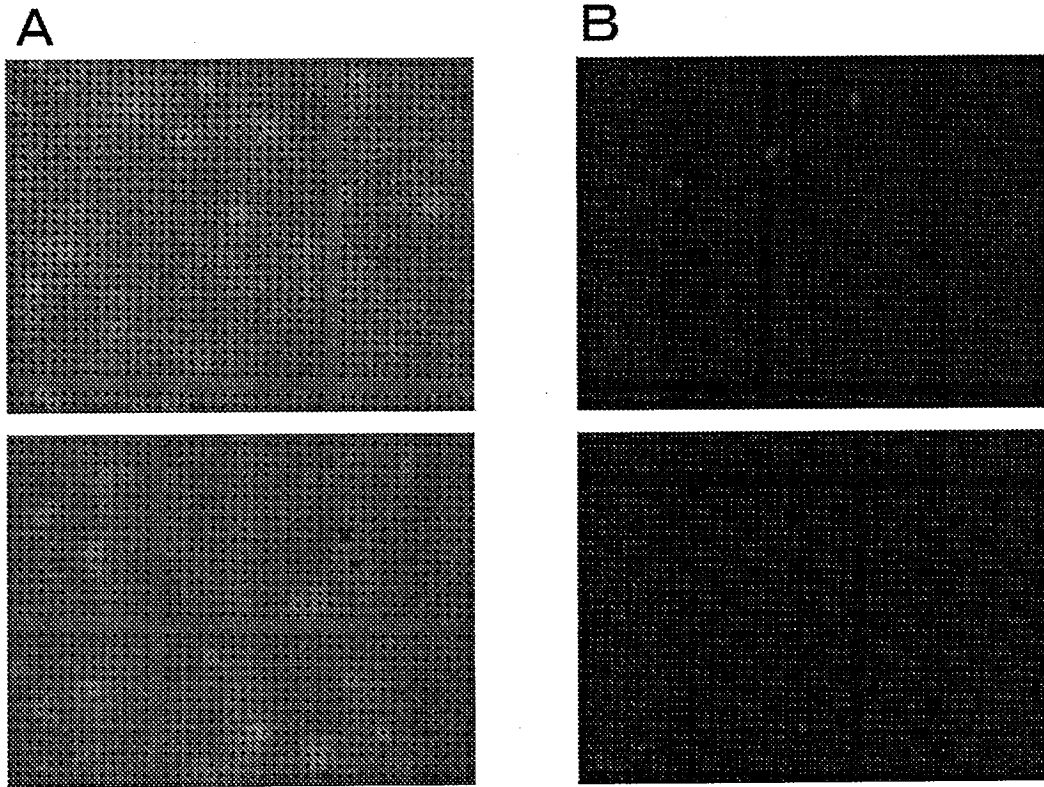


图 15

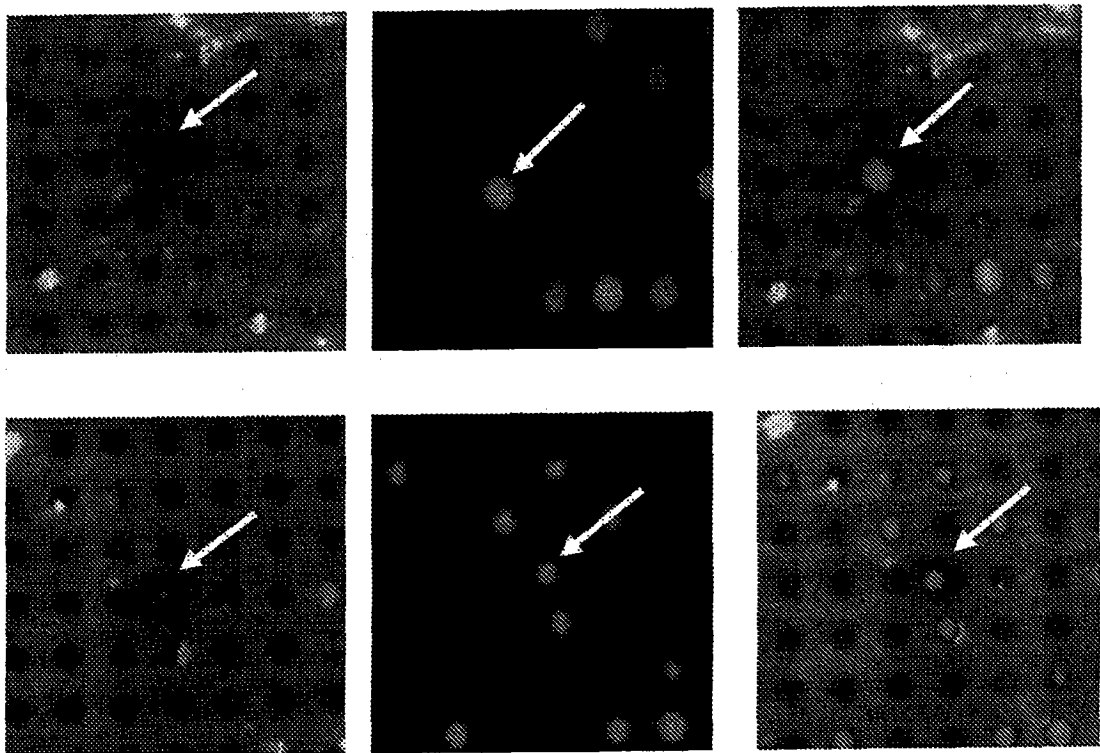


图 16

专利名称(译)	细胞筛选方法		
公开(公告)号	CN101861383B	公开(公告)日	2015-11-25
申请号	CN200880101692.1	申请日	2008-08-01
[标]申请(专利权)人(译)	富山县		
申请(专利权)人(译)	富山县		
当前申请(专利权)人(译)	富山县 瓦尔内瓦奥地利有限责任公司		
[标]发明人	金艾顺 岸裕幸 村口笃 小幡勤		
发明人	金艾顺 岸裕幸 村口笃 小幡勤		
IPC分类号	C12M1/34 C12M1/18 C12Q1/02 G01N33/15 G01N33/50 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/5047 G01N33/54366 G01N33/566 G01N33/6863 G01N2333/52 G01N2333/715		
优先权	2007201493 2007-08-02 JP		
其他公开文献	CN101861383A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的目的是提供一种能同时测定在芯片上超过1万个抗原刺激下的淋巴细胞的反应性、及掌握个别细胞状态的方法，以及用于该方法的装置。本发明的微孔阵列是在基体的一侧主表面上具有多个孔，孔具有仅可容纳一个细胞的尺寸的微孔阵列。在孔周围的主表面上形成了与孔中容纳的细胞产生的物质具有结合性的物质的覆盖层。涉及一种筛选目的细胞的方法，包括：在上述微孔阵列的孔中同时容纳被检体细胞和细胞培养液；将覆盖层与孔浸渍在培养液中；在培养液中含有的物质能从孔向覆盖层扩散的状态下培养细胞；向覆盖层提供标识物，该标识物可与被检体细胞含有的目的细胞产生的物质特异性结合；根据标识物检测目的细胞产生的已与覆盖层物质相结合的物质，由此确定目的细胞。

