



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106680480 A

(43)申请公布日 2017.05.17

(21)申请号 201510745290.7

(22)申请日 2015.11.05

(71)申请人 常州文松生物技术有限公司
地址 213000 江苏省常州市新北区河海路
108号生物医药孵化器

(72)发明人 夏小兵 姜石松 蔡丽丽 陈璞
李子剑

(74)专利代理机构 上海一平知识产权代理有限
公司 31266
代理人 崔佳佳 马莉华

(51)Int.Cl.
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/50(2006.01)

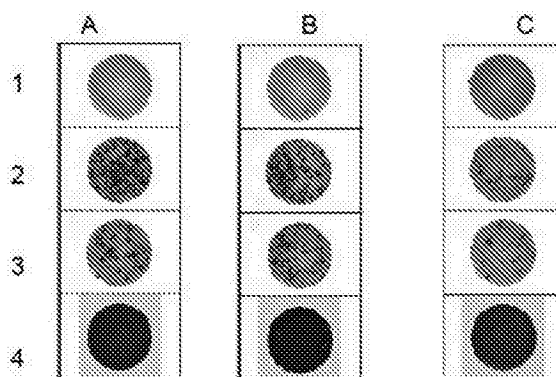
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

一种T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法

(57)摘要

本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,包括预包被抗体和预包被抗原。本发明的T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法使抗原和抗体共包被后,制备出一种操作简单、保存时间长,且特异性、敏感性和液态抗原加入刺激效果一致的抗原抗体包被孔膜。



1. 一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,其特征在於:包括以下步骤:

(1) 预包被抗体:将 PVDF 孔膜检测条安装到孔板框上,每孔加入乙醇,对 PVDF 孔膜活化后,除去乙醇,并用 PBS 溶液洗涤;

(2) 用 PBS 溶液对抗体稀释,使每孔中含有抗体 $10 \mu\text{l}$,对抗体进行包被过夜,然后用 PBS 溶液洗涤;

(3) 用含有血清的培养基封闭孔膜;

(4) 预包被抗原:在预设的检测孔内加入抗原,在预设的阳性对照孔内加入植物凝集素,在预设的阴性对照孔内加入等体积的 PBS 缓冲液;

(5) 将上述处理过的抗原抗体包被板进行真空干燥处理,密封保存。

2. 根据权利要求 1 所述的一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,其特征在於:步骤 (1) 中每孔加入体积含量为 70% 的乙醇,步骤 (2) 中于 4°C 条件下对抗体进行包被过夜,步骤 (3) 中用含有体积分数为 10% 小牛血清的 R1640 培养基封闭孔膜。

3. 根据权利要求 1 所述的一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,其特征在於:步骤 (4) 中在预设的抗原孔中加入的抗原为结核 ESAT-6/CFP-10 重组串联肽,步骤 (5) 中真空干燥条件为 25°C 干燥 10min。

一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫诊断技术领域,具体涉及一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法。

背景技术

[0002] 机体感染细菌病毒或者受到癌细胞刺激 T 淋巴细胞致敏,然后转化为记忆 T 淋巴细胞。当机体再次接触同一种抗原后,会迅速产生特异性免疫反应包括效应 T 淋巴细胞反应,并产生 IFN- γ 等细胞因子。目前的 T 细胞斑点检测技术就是首先将一种抗细胞因子的抗体包被于 PVDF 孔膜(例如 96 孔 PVDF 膜),然后在孔膜中加入待检测人群的外周血淋巴细胞以及特异性的抗原,当细胞因子释放的时候,可以被包被好的抗体所捕获。所捕获的细胞因子可以被第二个识别该细胞因子的单克隆抗体识别,经过底物显色后,加有受感染人群的淋巴细胞的 PVDF 孔膜的孔底会出现数量不等的斑点,这些斑点代表受抗原刺激后产生了 IFN- γ 等细胞因子的 T 细胞。

[0003] T 细胞斑点检测技术已经广泛用于筛选 T 细胞特异性表位等科研工作。此外该技术已经成功地用于结核的感染的诊断。该方法特异性、灵敏度高,对于结核感染,尤其是自然感染和卡介苗接种等潜伏感染的诊断也具有很强的特异性。代表产品是 T-SPOT. TB 试剂盒(Oxford Immunotec Limited, Abingdon, United Kingdom),该试剂盒利用以结核特异性的早期分泌靶向抗原(ESAT-6)和 10KD 培养滤过蛋白(CFP-10)为抗原,通过检测外周血中是否有能被这些抗原刺激而释放 γ 干扰素的 T 淋巴细胞来诊断结核的感染。

[0004] 截止到目前为止,无论是科研还是诊断用的 T 细胞斑点试验,抗原都是在加完外周血淋巴细胞后以液态形式加入到反应孔中的。抗原可以是蛋白质也可以是含有 T 细胞表位的多肽,但是两者液态状态下稳定性有限。尽管冻干的形式对于蛋白质和多肽抗原的保存时非常有利的。但是临床检验来说,把 ELISPOT 的抗原做成冻干形式增加了一个操作步骤,提高了诊断误差,也增加了生产成本。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,抗原和抗体共包被后,制备出一种操作简单、保存时间长,且特异性、敏感性和液态抗原加入刺激效果一致的抗原抗体包被孔膜。

[0006] 为实现上述目的,本发明所采用的技术方案是:一种 T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法,包括以下步骤:

[0007] (1) 预包被抗体:将 PVDF 孔膜检测条安装到孔板框上,每孔加入乙醇,对 PVDF 孔膜活化后,除去乙醇,并用 PBS 溶液洗涤;

[0008] (2) 用 PBS 溶液对抗体稀释,使每孔中含有抗体 $10 \mu\text{l}$,对抗体进行包被过夜,然后用 PBS 溶液洗涤;

[0009] (3) 用含有血清的培养基封闭孔膜;

[0010] (4) 预包被抗原：在预设的检测孔内加入抗原，在预设的阳性对照孔内加入植物凝集素，在预设的阴性对照孔内加入等体积的 PBS 缓冲液；

[0011] (5) 将上述处理过的抗原抗体包被板进行真空干燥处理，密封保存。

[0012] 优选的，步骤 (1) 中每孔加入体积含量为 70% 的乙醇，步骤 (2) 中于 4℃ 条件下对抗体进行包被过夜，步骤 (3) 中用含有体积分数为 10% 小牛血清的 R1640 培养基封闭孔膜。

[0013] 优选的，步骤 (4) 中在预设的抗原孔中加入的抗原为结核 ESAT-6/CFP-10 重组串联肽，步骤 (5) 中真空干燥条件为 25℃ 干燥 10min。

[0014] 采用上述技术方案后，本发明具有以下积极效果：

[0015] 本发明的目的就是要改变传统的抗原加入方法，抗原和抗伽马干扰素抗体共包被后，制备出一种操作简单、保存时间长，且特异性、敏感性和液态抗原加入刺激效果一致的抗原抗体包被孔膜，用于结核诊断。由于使用该板减少了操作步骤，因此可以减少人为误差，实现操作的标准，产品便于商品化和推广应用。本方案实施后，可为生产单位创造出巨大的经济效益，如能被其他疾病的 ELISPOT 诊断所借鉴，将会对 ELISPOT 技术的发展及应用起到推动作用。

附图说明

[0016] 图 1 为待检测病人的检测结果；

[0017] 图 2 为液态抗原和真空干燥抗原放置不同时间后 SDS-PAGE 分析结果。

[0018] 其中，1、阴性对照孔，2、检测孔一，3、检测孔二，4、阳性对照孔，I、液态抗原，II、干燥抗原。

具体实施方式

[0019] 一、结核 ESAT-6/CFP-10 重组串联肽的制备

[0020] 根据 ESAT-6 和 CFP-10 蛋白的氨基酸顺序设计重组串联肽。重组串联肽蛋白由一系列 25-35 个氨基酸多肽相连组成，相邻二个多肽有 9-11 个氨基酸是完全重叠相同，重叠肽之间由相同的组织酶切 S 偏爱序列位点 (Leu-Arg-Met-Lys) 连接。编码 DNA 由 GeneArt 公司在人工合成后，克隆到 pET28 载体中，并转化 BL21 (DE3) 大肠杆菌后，在 37℃ 条件下在 LB 培养基中培养到 OD600 = 1，加入 0.2mM 异丙基硫代半乳糖苷 (IPTG) 并将培养温度调节到 20℃ 诱导蛋白表达，诱导时间为 16 小时；在 LB 培养液中进行 IPTG 诱导表达。于 4000rpm 离心，收集菌体，并在含有 8M 尿素的磷酸缓冲液中重悬。而后超声破菌，15000 转 /min 高速离心后收取上清。上清以 1ml/min 的流速通过 Ni-NTA 柱，重组重叠肽蛋白结合到 Ni-NTA 柱，经过充分的洗涤去掉杂蛋白后，重组重叠肽被含有 6M 尿素以及 250mM 的咪唑洗脱缓冲液洗脱下来。洗脱的蛋白质首先用含有精氨酸的 PBS (pH9.5) 稀释 8 倍，除菌后，加入到 15KDa 的蛋白浓缩管 (millipore) 中，3500rpm 离心浓缩到 2mg/ml，待用。

[0021] 二、T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备

[0022] (1) 预包被抗体：将 PVDF 孔膜检测条安装到 96 孔板框上，每孔加入体积含量为 70% 的乙醇，室温放置 1 分钟对 PVDF 孔膜活化后，除去乙醇，并用 PBS 溶液洗涤四次；

[0023] (2) 用 PBS 溶液对抗体稀释，使每孔中含有抗体 10 μl，对抗体于 4℃ 条件下进行包被过夜，然后用 PBS 溶液洗涤；

[0024] (3) 用含有体积比为 10% 小牛血清的 R1640 培养基封闭孔膜；

[0025] (4) 预包被抗原：在预设的检测孔一 2、检测孔二 3 内加入抗原结核 ESAT-6/CFP-10 重组串联肽，检测孔一 2 中加入的量为 12.5 μg ，检测孔二 3 中加入的量为 25 μg ，在预设的阳性对照孔 4 内加入植物凝集素 PHA，在预设的阴性对照孔 1 内加入等体积的 PBS 缓冲液；

[0026] (5) 将上述处理过的抗原抗体包被板于 25 $^{\circ}\text{C}$ 条件下进行真空干燥处理 10min，4 $^{\circ}\text{C}$ 密封保存。

[0027] 三、T 细胞斑点试验的预包被反应孔膜的检测

[0028] 1. 检测方法

[0029] (1) 外周血淋巴细胞的制备：在离心管中加入 Ficoll-Hypaque (聚蔗糖 - 泛影葡胺)，将采集的待检测的血液加在 Ficoll-Hypaque 的上层，离心处理，吸出位于界面处的淋巴细胞，用无血清 RPMI1640 培养基洗涤，所得淋巴细胞用含有 10% 小牛血清及 50 单位的青霉素、链霉素的 RPMI1640 培养基悬浮；

[0030] (2) 将上述淋巴细胞加入到阴性对照孔 1、阳性对照孔 4 和检测孔一 2 和检测孔二 3 中，每孔加入 100 μl ；

[0031] (3) 在孔膜中加入 100 μl 含有 0.5% 的 BSA (牛血清白蛋白)、1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 的 Biotin- 检测抗体 (生物素 - 检测抗体)，放置一段时间；

[0032] (4) 用含有 PBS 缓冲液的吐温 -20 对 Biotin- 检测抗体洗涤，然后每孔中加入 100 μl 链亲和素 -ALP，放置一段时间后，用 PBS- 吐温 -20 洗涤；

[0033] (5) 加入 100 μl 显色液室温放置，直至阳性对照孔 4 中的斑点明显出现后，用清水冲洗终止反应，干燥后观察各孔中斑点情况。

[0034] 2. 结核感染阴阳性判断标准

[0035] a. 若阳性对照孔 4 正常，空白对照孔 1 斑点为 0-5 个时，检测孔一 2 或检测孔二 3 的斑点数 - 空白对照孔 4 的斑点数 ≥ 6 时，表示发生了结核感染，为阳性；

[0036] b. 若空白对照孔 1 斑点数为 6-10 个，检测孔一 2 或检测孔二 3 的斑点数 $\geq 2x$ 空白对照孔 1 斑点数，表示发生了结核感染，为阳性；

[0037] c. 若阳性对照孔 4 结果正常，检测孔一 2 或检测孔二 3 均达不到阳性的判断标准，则表示未发生结核感染，为阴性。

[0038] 3. 检测结果

[0039] 取一个待检测病人的外周血，分别用 A、B、C 三种抗原抗体检测，其中 A 列孔使用新鲜包被抗体以及新鲜的溶液态 ESAT-6/CFP-10 重组重叠肽抗原用于结核的检测；B 列孔使用 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 72h 的抗原抗体预先包被孔膜用于结核的检测；C 列孔使用 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 10 天的抗原抗体预先包被孔膜用于结核的检测。采用上述检测方法进行结核病检测，检测结果如图 1 所示。由此可知，A、B、C 均表示该病人感染过结核。

[0040] 四、真空干燥抗原与液态抗原的稳定性比较

[0041] 将 10 μl 的结核 ESAT-6/CFP-10 重组串联肽抗原溶液加入到 0.5ml 的微量离心管中，放入真空干燥器内，常温抽真空 10min。取出样品放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内，每隔一段时间取出一管，加入 20 μl 水悬浮，离心后取 10 μl 上清，SDS-PAGE 电泳分析。同时将同等浓度的抗原溶液放在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温箱内，取出干燥抗原的同时，取 10 μl 抗原溶液，加入 10 μl 水后，

取 10 μ l 进行 SDS-PAGE 电泳分析。如图 2 显示, I 表示液态抗原, II 表示真空干燥抗原, 干燥抗原 II 于 37 $^{\circ}$ C 放置 24h、72h 没有任何变化。而液态抗原 I 于 37 $^{\circ}$ C 放置 24h 大部分降解, 72h 候后抗原完全降解。表明抗原以液态形式保存的稳定性差, 以真空干燥形式保存时间长, 稳定性好。

[0042] 对本领域的技术人员来说, 可根据以上描述的技术方案以及构思, 做出其它各种相应的改变以及形变, 而所有的这些改变以及形变都应该属于本发明要求的保护范围之内。

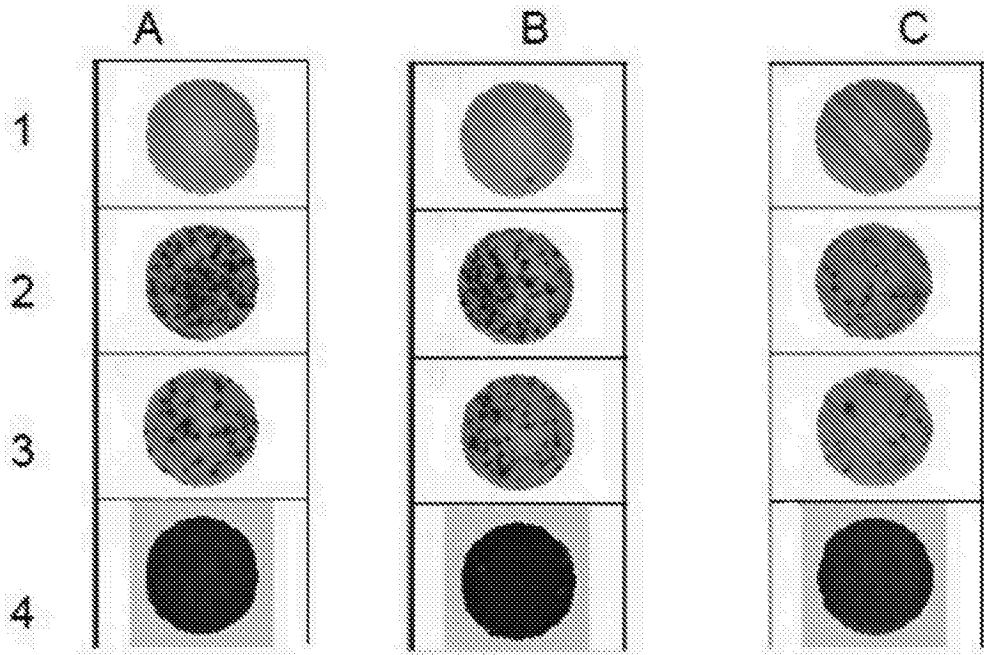


图 1

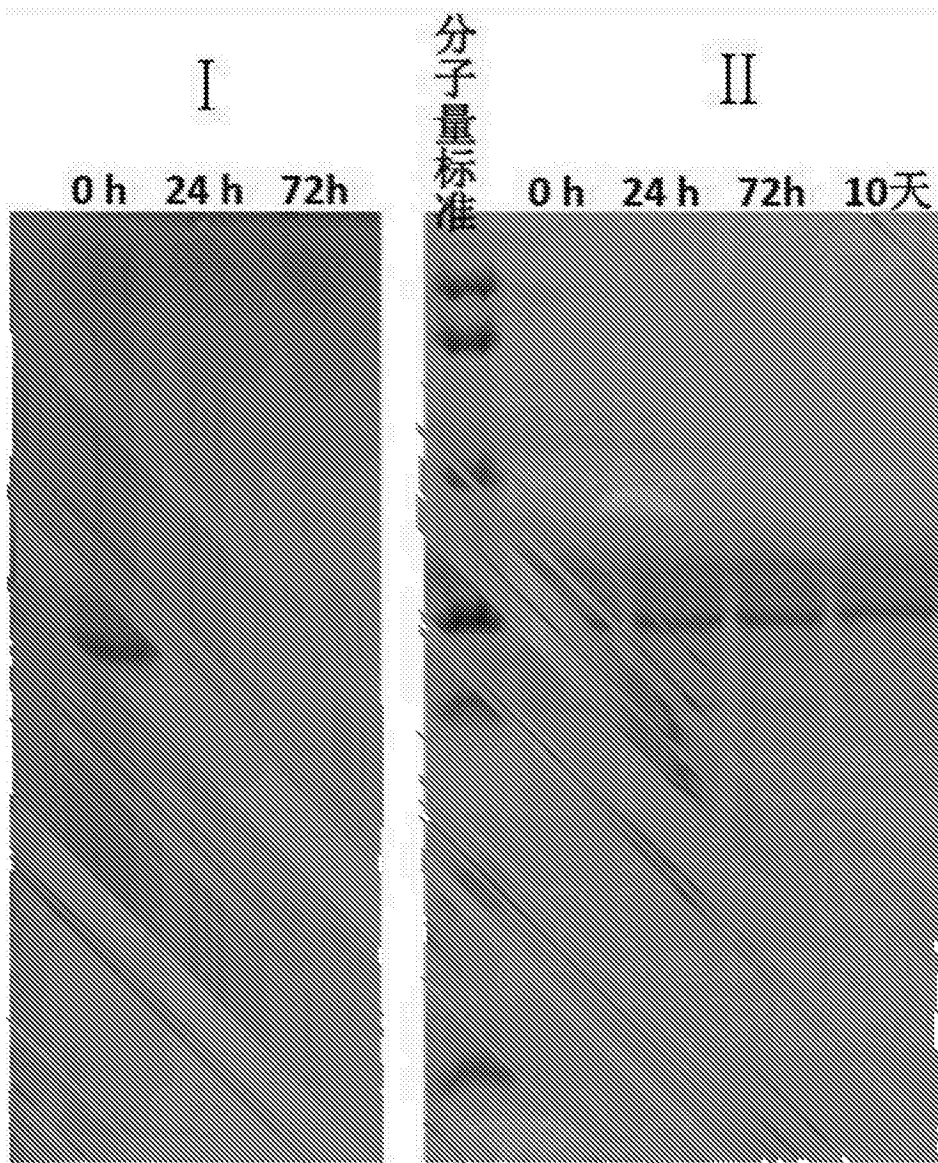


图 2

专利名称(译)	一种T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法		
公开(公告)号	CN106680480A	公开(公告)日	2017-05-17
申请号	CN201510745290.7	申请日	2015-11-05
[标]申请(专利权)人(译)	常州文松生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	常州文松生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	常州文松生物技术有限公司		
[标]发明人	夏小兵 姜石松 蔡丽丽 陈瑛 李子剑		
发明人	夏小兵 姜石松 蔡丽丽 陈瑛 李子剑		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/50		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/505		
代理人(译)	崔佳佳 马莉华		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于免疫诊断技术领域，具体涉及一种T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法，包括预包被抗体和预包被抗原。本发明的T细胞斑点试验的预包被反应孔膜的制备方法使抗原和抗体共包被后，制备出一种操作简单、保存时间长，且特异性、敏感性和液态抗原加入刺激效果一致的抗原抗体包被孔膜。

