



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102308213 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 200980156181. 4

(22) 申请日 2009. 12. 04

(30) 优先权数据

61/120, 033 2008. 12. 04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2011. 08. 04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2009/066876 2009. 12. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02010/065929 EN 2010. 06. 10

(73) 专利权人 麻省理工学院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 J·C·洛夫 韩庆

V·特瑞珀拉恩尼

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

代理人 过晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

(56) 对比文件

W0 2007/035633 A2, 2007. 03. 29,

W0 03/035824 A1, 2003. 05. 01,

Sally Kent. OR. 39. Enumeration and

Phenotype of Autoreactive B Cells in

Pancreatic Draining Lymph Nodes from Type 1 Diabetes Subjects. 《Clinical immunology》. 2009, 第 131 卷 S19.

William D. Harriman. Antibody discovery via multiplexed single cell characterization. 《Journal of Immunological Methods》. 2008, 第 341 卷

Elizabeth M. Bradshaw. Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: Cytokines and antigen-reactive antibodies. 《Clinical Immunology》. 2008, 第 129 卷

Elizabeth M. Bradshaw. Concurrent detection of secreted products from human lymphocytes by microengraving: Cytokines and antigen-reactive antibodies. 《Clinical Immunology》. 2008, 第 129 卷

审查员 刘迎鸣

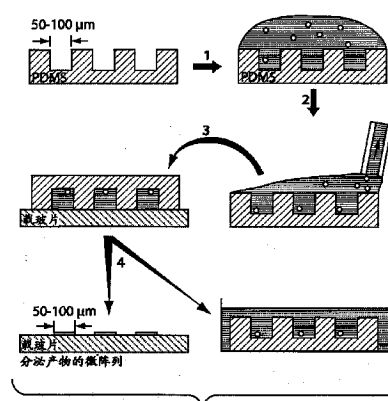
权利要求书2页 说明书23页 附图23页

(54) 发明名称

诊断过敏性反应的方法

(57) 摘要

本发明提供了一种单一细胞中多重细胞因子检测方法,其目的是产生疾病的免疫曲线。



1. 一种测定主体的分泌细胞因子曲线的方法,该方法包括:

提供来自主体的活的外周血单核细胞细胞悬浮液,将其沉积在可模压的平板上,该可模压的平板在每一微孔列中包含至少一个微孔,其中在微孔列中至少一个微孔具有亚纳米升体积的单个细胞;

将所述微孔列与一种底物相接触,其中所述底物被预先用至少两种检测试剂处理过,并且,其中每一种所述检测试剂与所述细胞的一种分泌的细胞因子相结合;

测定在所述底物上的每个所述的分泌的细胞因子水平,所述水平相当于所述单个细胞的所述分泌的细胞因子的量;并且

确定来自所述单个细胞的每个分泌的细胞因子的分泌速率;

由此确定分泌细胞因子曲线;

其中所述方法进一步包括通过在多个时间点进行上述接触、测定、以及确定步骤从而在所述分泌细胞因子曲线上测定随着时间改变的动态变化。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子是 Th1、Th2、Th9、或 Th17 细胞因子。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述底物用至少三种检测试剂预先处理。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述底物用至少四种检测试剂预先处理。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子包括白细胞间介素 (IL)-17、白细胞间介素 (IL)-10、白细胞间介素 (IL)-4 和干扰素 (IFN)- γ 。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子是 T-辅助因子 2 (Th2) 细胞因子。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子包括白细胞间介素 (IL)-4、白细胞间介素 (IL)-5、白细胞间介素 (IL)-13 和白细胞间介素 (IL)-9。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子是细胞毒性 T 淋巴 (“CTL”) 或者 Th1 细胞因子。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子选自由 IFN γ 、MIP-1 β 、TNF α 、穿孔蛋白 (perforin) 和白细胞间介素 (IL)-2 所组成的组中。

10. 根据权利要求1所述的方法,其进一步包括在将所述外周血单核细胞沉淀在所述可模压平板上之前,对所述外周血单核细胞进行刺激。

11. 根据权利要求10所述的方法,其中,所述外周血单核细胞被一种疑似的或者已知的过敏原刺激。

12. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括确定所述单一细胞的表型或者谱系。

13. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括确定 CD4 或者 CD8 是否在所述单一细胞的表面上进行表达。

14. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述过敏原是一种食物产品。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中,所述食物产品是牛奶、鸡蛋、花生、树坚果、鱼、小麦、蛋制品、或者豆类。

16. 根据权利要求11所述的方法,其中,所述过敏原是一种药物。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中,所述药物是羟氨苄青霉素、青霉素、一种磺胺类药物、巴比妥酸盐、胰岛素、或者碘。

18. 根据权利要求 11 所述的方法,其中,所述过敏原是灰尘、花粉、宠物皮屑、乳液,氯,或者是与蚊虫叮咬有关的毒液。

19. 根据权利要求 11 所述的方法,其中,所述过敏原来自于黄蜂、火蚁、或者蜜蜂。

20. 根据权利要求 1 所述的方法,其中,所述分泌的细胞因子为高达四种不同的细胞因子。

诊断过敏性反应的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求 2008 年 12 月 4 日递交的美国 U. S. S. N. 61/120, 033 号申请的优先权，本申请通过引证在此全部并入本文。

[0003] 联邦资助研究声明

[0004] 本发明部分由美国政府资助，资助号为 5U19AI050864-07，由国家卫生研究院授予。政府具有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本发明提供了从单一细胞中检测多重细胞因子和相关表面表达的免疫生物标志物的方法，目的是产生疾病的免疫学曲线。

背景技术

[0006] 本领域已知单个细胞，即使外观一致，其许多特征也是不同的，例如，在表达特定基因方面的差异、关键细胞代谢物或者关键离子浓度的差异、或者对给定刺激反应方式的差异。活细胞对许多细胞成分具有非常低的拷贝数，所述细胞成分包括脱氧核糖核酸 (DNA) 和重要的调节分子。基因表达的生化过程所固有的随机事件（固有噪音）和在其他细胞成分中的不稳定性（外在噪音）基本上促进了细胞中的全部变化。细胞型、突变和不稳定性促进了人体内细胞的多样性。

[0007] 但是，大多数临床试验或者基于细胞的实验分析大量的细胞，使用血清或者细胞培养媒介物。这些实验通常将来自整个细胞群的信息平均化，且不提供更详细的信息，而这些更为详细的信息对评价生物系统的状态是至关重要的，例如，1) 在同样的细胞中，或者在该细胞不同的子群中，两种或者更多种基因是否共表达；2) 测量到的总体表达量的小幅增加是由全体细胞小幅、均一的增加引起的，还是由某一细胞子集的大幅增加引起的。

发明内容

[0008] 在纳米规模或者亚纳米规模的实验系统中，本发明的方法提供了定量测定同时从有生命力的细胞个体分泌多重（例如，2、4、5、6、8、10、20）分泌产物的频率和分泌速率分布的方法，所述分泌产物例如，细胞因子。这些方法为一种实验体系中的许多问题提供了答案，包括：“谁”（被试验细胞的表型或者谱系）、“什么”（分泌产物的一致性，例如，细胞因子、抗体、趋化因子或者生长因子）、“每隔多久有多少次”（在细胞群中反应因子的频率）和“多少”（分泌的数量，例如，各种分泌产物的量的水平）。这些方法能够有效绘制任何分泌细胞的曲线，例如，免疫细胞，例如，T 细胞或者 B 细胞，同时也能有效用于其他分泌细胞，例如，分泌激素或者酶的细胞。单个活体细胞的分泌曲线与其表型或者谱系相匹配（例如，由图像或者检查确定），从而产生该细胞的分泌曲线。这种分泌曲线为诊断疾病或者监测对治疗介入的反应提供有价值的情报。

[0009] 例如：本发明提供了一种诊断主体免疫性疾病的方法，所述免疫性疾病例如，传染

病、自身免疫疾病或者过敏。在一些实施方案中,经过试验绘制单个细胞(或者一些细胞)在个体内的免疫反应曲线,例如,过敏性反应。使用本发明方法产生的整体定量(多维)数据组来区分来自不同供体对不同刺激的细胞反应。这里描述的方法还可以有效用于疫苗、治疗性生物药物、正处于发作期的传染病、自身免疫疾病等等的临床检测。

[0010] 在一个方面,本发明的特点在于一种测定主体免疫曲线的方法,例如,分泌细胞因子曲线。本方法包括提供来自主体的细胞(例如,活细胞)悬浮液,将其储存在可模压的平板上,该平板在每一微孔列中包含至少一个微孔(每个微孔小于 $100 \times 100 \times 100 \mu\text{m}^3$,例如,是 $50 \times 50 \times 50 \mu\text{m}^3$),其中在微孔列中至少一个微孔具有单个细胞亚纳米升体积。在一个方面,所述细胞是全血细胞。在另一个方面,所述细胞是外周血单核细胞(PBMC)。将此微孔列于底物相接触,其中,所述底物预先使用至少一种检测试剂(例如,细胞因子检定剂)处理过,并且,其中,所述检测试剂与该细胞的一种分泌产物(例如,细胞因子)相结合。在一个方面,本发明使用至少两种检测试剂,至少三种检测试剂、或者至少四种检测试剂。测量底物上的检测试剂的水平,其中,所述水平相当于该细胞分泌产物的量,因此,检测免疫曲线。任选的,所述检测试剂检测分泌产物的 T 细胞组。在另一个方面,所述检测试剂检测分泌产物的 T-辅助因子 2(Th2) 组。

[0011] 在一个方面,对于每种分泌产物确定分泌速率。在另一个方面,确定细胞的表型。任选的,分泌产物与在此细胞上用于区分谱系的表面表达标记物相匹配。

[0012] 利用下列步骤进行确定个体活细胞曲线的方法:提供来自主体的细胞悬浮液,将其储存在可模压的平板上,该平板在每一微孔列中包含至少一个微孔,其中在微孔列中至少一个微孔具有单个细胞亚纳米升体积;将此微孔列于底物相接触,其中,所述底物预先使用至少一种检测试剂处理过,并且,其中,所述检测试剂与该细胞的一种分泌产物相结合,从而产生印模微阵列,对此印模微阵列成像,产生数据集;过滤数据集从而识别列中由单个细胞组成的位点;将此位点与单个细胞位点检测出的分泌产物水平相匹配,从而确定单个活细胞的免疫曲线。任选的,所述方法包括识别单个细胞的表型或者谱系,然后将此表型或者谱系与指定位点的分泌产物的水平相匹配。

[0013] 在一些实施方案中,所述曲线是一般的 T 细胞曲线、Th1 曲线、Th2 曲线、Th9 曲线、Th17 曲线、或其他分泌细胞曲线,例如,所述底物包括适当的抗体对或者抗体系列,从而检测所关心的细胞因子。检测细胞因子的不同的示例性抗体组表现出非对称的 Th 反应和特异性 Th2 和 Th1 反应。例如,一般 T 细胞组检测下列细胞因子:IL-4/IL-10/IL-17/IFN γ 。待检测细胞分泌产物中一种或者一种以上细胞因子的增加简单的勾勒出它的曲线。Th2 组包括针对 IL-4/IL-5/IL-9 的检测试剂,检测细胞毒淋巴细胞(CTL)或 Th1 曲线的小组包括用于检测 IFN γ /MIP-1 β /TNF α /穿孔蛋白/IL-2 的检测试剂,其中 MIP 和 / 或穿孔蛋白表明 CTL 表型的倾斜性,IL-2 表明 Th1 表型的倾斜性。包括用于检测 IFN γ /IL-10/IL-17/IL-22 的检测试剂的组可有效用于评价粘膜样品,例如,用于确定来自胃肠道的细胞的免疫曲线(也是一种评价疾病/紊乱或易患病的体质的方式)。检测抗体同型体可以有效用于评价过敏症或者过敏症潜伏期的个体。例如,研究检测试剂组,从而检测下列抗体的组(IgG1/IgA/IgE/IgG4 and IgG1/IgA/IgG3/IgM)。检测到 Ig 同型抗体的增加说明对刺激性过敏源的过敏反应。

[0014] 代表性的 Th 组包括能够检测白细胞介素 -17(IL-17)、IL-10, IL-4, 干扰

素- γ (IFN- γ), IL-1b, IL-2, IL-6, IL-7, IL-8, IL-12, IL-21, IL-22, IL-23, 巨噬细胞炎症性蛋白 (MIP) 1b, MIP1a, 和 / 或干扰素诱导蛋白 (IP)-10 的试剂。代表性的 Th2 组检测 IL-4, IL-5, IL-13 和 / 或 IL-9。在其他方面, 对细胞表面表达标记物 (例如, CD3, CD4, CD8, CD14, CD19, CD20, CD25, CD27, CD38, CD138, CD95, CD154, CD127) 成像。这些标记物与各自细胞的细胞因子曲线相匹配, 从而将这里描述的方法与其他之前描述的捕获方法区别开来。

[0015] 本方法可以选择性的或者额外使用一种检测试剂来检测抗体, 例如, IgE, IgG₁, IgG₄, IgG_A, IgG₂, IgG₃, IgM, IgA₁, 和 / 或 IgA₂。优选的细胞因子检测试剂是一种抗体, 例如, 是细胞因子的一种多克隆抗体或者单克隆抗体。作为选择, 所述细胞因子检测试剂是一种适体。

[0016] 通常, 可以使用任何含有能够产生细胞因子的细胞的生物组织。在一些实施方案中, 使用外周血单核细胞 (PBMC)。如果需要的话, 在将细胞沉积在可模塑平板上之前, 对细胞进行刺激。例如, 使用未知的或者已知的过敏原刺激细胞。作为选择, 可以使用多肽、蛋白质或者来自传染试剂的完整的病原体。

[0017] 在一些实施方案中, 所述过敏原是一种食物产品, 例如, 所述食物产品是牛奶、鸡蛋、花生、树坚果、鱼、贝类、大豆、小麦、蛋制品、豆类, 或者海鲜。在一些实施方案中, 所述过敏原是一种药物, 例如, 羟氨苄青霉素、青霉素、一种磺胺类药物、巴比妥酸盐、一种抗惊厥药物、胰岛素、或者碘。在一些实施方案中, 所述过敏原是灰尘、花粉、宠物皮屑、乳液, 或者氯, 或者是与蚊虫叮咬有关的毒液、例如、黄蜂咬伤、火蚁或蜜蜂螫伤。在一些实施方案中, 所述过敏原是一种生物治疗剂, 例如、G-CSF (非格司亭)、GM-CSF (沙格司亭)、EPO (促红细胞生成素)、RITUXAN® (美罗华)、赫赛汀 (HERCEPTIN®) (曲妥珠单抗)、人生长激素、BETASERON® (干扰素 β -1b)、AVONEX® (干扰素 β -1a, 或者 ENBREL® (依那西普)。

[0018] 在另一个方面, 本发明的特点在于评价主体对过敏原敏感性的方法。该方法包括, 从主体获得细胞悬浮液, 将其存储在可模压的平板上, 所述可模压的平板在每一微孔列中至少包含一个微孔, 其中, 所述微孔列中至少一个微孔具有单个细胞。优选的, 该细胞已经与实验的过敏原相接触。将所述微孔列与一种底物相接触, 其中, 所述底物预先使用至少一种对过敏原表现敏感性的检测试剂处理过。随后, 检测检测试剂, 例如, 测量检测试剂的水平。检测试剂的水平与分泌产物的水平有关, 所述分泌产物例如, 细胞因子或者抗体, 从而评价过敏原的敏感性。在一个实施例中, 检测试剂识别细胞因子, 例如, 与 Th1 细胞因子 IFN γ 的水平相比, Th2 细胞因子水平的增加, 所述 th2 细胞因子例如 IL-4, 这说明该主体是过敏性的或者有风险发展成为该过敏原的过敏性反应。在另一个实施例中, 所述检测试剂检测抗体同型体, 并且, 与其他同型体, 例如 IgG 的同型体 (尤其是 IgG₄, IgM 或者 IgA) 相比, IgE 同型体的增加说明对此刺激性过敏原发生过敏性反应, 并且说明提供此细胞的主体发生过敏或者易于患病。

[0019] 在另一个方面, 本发明的特点在与一种确定主题细胞因子曲线的方法, 所述主体表现出自身免疫疾病或传染性疾病。首先, 将来自主体的悬浮细胞沉积于可模压的平板上, 所述平板的一个微孔列中至少含有一个微孔。在一个方面, 该微孔列的至少一个微孔具有单个细胞。其次, 将此微孔列与底物相接触。在一个方面, 所述底物至少使用一种细胞因子检测试剂处理过。最后, 检测该细胞因子检测试剂, 并建立表现自身免疫疾病或者传染病的

细胞因子曲线。与正常 IFN γ 或者 IL-2 水平相比,表现自身免疫疾病或者传染病的示例性的细胞因子曲线包括增加的 IFN γ 或者 IL-2 水平。

[0020] 示例性的自身免疫疾病包括关节炎(包括类风湿性关节炎)、多发性硬化症、免疫调节的糖尿病或者 I 型糖尿病、炎症性肠病、全身性红斑狼疮、牛皮癣、硬皮病和自身免疫甲状腺疾病。传染病的例子包括,例如,非洲睡眠病、霍乱、隐孢子虫病、地方性蔷薇疹热、甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、人体免疫缺陷性病毒/爱滋病、流行性感、疟疾、日本脑炎、疟疾、家畜囊虫病、脑膜炎、盘尾丝虫病(“河盲”)、肺炎、轮状病毒、血吸虫病、志贺氏杆菌痢疾、脓毒性咽喉炎、肺结核、伤寒和黄热病。

[0021] 在另一个方面,组装试剂盒,其中包括一种底物,一种可模压的平板,该平板设计为接受底物并提供液体将可模压的平板和底物紧密的封闭起来,试剂盒还包括说明书,介绍使用合适的支持物和底物来识别相关的种类。该试剂盒优选具有一系列微孔,并设计接受底物并提供液体将可模压的平板和底物紧密的封闭起来。所述试剂盒优选的包括介绍使用合适的可模压的平板和底物来识别相关的种类。

[0022] 如这里所使用的,术语“相关”是指相互作用,例如,结合、吸附、离子吸引或者两种种类之间发生的其他类型的相互作用。在某些实施例中,相关的种类优选以大约 $10^9 M^{-1}$ 或更大的缔合常数彼此结合。以这样的缔合常数彼此结合的种类能够容易的将不相关的种类和相关的种类彼此区别开。

[0023] 根据某些实施例,在这里描述的方法和试剂盒中使用一种可模压的平板。如这里使用的“可模压的平板”是指一种装置,当被放置与一种底物相接触时,这种装置至少在一维空间里可以弯曲、移动或者变形。例如,在某些构型中,这种可模压的平板可以包括一种材料,例如,一种弹性材料,从而当与底物相接触时,在可模压平板和底物之间可以形成一种充分液化的密封剂,从而防止或者延迟可模压平板上的液体流出或者漏出。

[0024] 可模压的平板由软平版印刷和印模制成,是一种生物相容性材料,这种材料是无毒的,并且是透气的。可模压的平板、或者底物、或者二者共同包括一种或者一种以上的材料选自以下所组成的组中:玻璃、塑料、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚(二甲基硅氧烷)、硝化纤维、聚(1,1-二氟乙烯)和金属。所述金属是黄金、钯、铂、银、钢或者合金中的一种或者一种以上,或者是其混合物。在一些实施方案中,所述底物是一种载玻片,一种塑料片或者小珠,并且可模压的平板包括微孔列。将可模压的平板压在底物上形成一种紧密的,但是可逆的密封。所述微孔列包括一系列小孔,其中每个小孔的直径大约是 50 微米,深度大约是 50 微米,并且,这些小孔之间的间隔是大约 50 微米,或者,每个小孔的直径大约是 100 微米,深度大约是 100 微米,并且,这些小孔之间的间隔是大约 100 微米。这些小孔的尺寸大约能保持 1 纳升或者更少的液体。美国专利第 6,180,239 号和美国专利第 6,776,094 号较为详细的描述了生产可模压平板的示例性的方法,这些专利通过引证在此全部并入本文。

[0025] 在可模压平板中,小孔或者小室的准确数目可以是变化的。在一些实施例中,可模压的平板包括单一的大微孔,其中,可以筛选单一的种类,例如,可模压的平板包括单一种类的细胞、催化剂或者其他可筛选的种类。在结构中,其中,可模压的平板被设置成一行,单个微孔的数目可以是变化的,例如,为大约 1 个、4 个、8 个、24 个、48 个、96 个、384 个、1024 个、2048 个、5096 个、或者更多,或者在这些代表性数值中间的任意数值。

[0026] 雕刻板包括一系列微孔,这些微孔的直径小于 100 微升,并且包括单一细胞。优选

的,细胞的数目小于 5 个细胞。所述雕刻板是一种可透气的合适的组合物。这种平板具有的弹性模量(杨氏模量)在 200-2000 千帕(kPa) 范围内。所述平板上的组合物优选是聚二甲基硅氧烷。平板上的小孔包含至少一个细胞,所述细胞是免疫细胞,产生抗体的细胞、杂交瘤细胞、T 细胞或者其他来自血液或者组织中的细胞。该细胞的功能曲线或者分泌曲线是未知的。任选的,这些细胞产生重组分泌多肽。

[0027] 在另一个方面,本发明提供了一种检测仪器,该仪器包括可模压的平板,所述可模压的平板包括至少一个微孔形成微孔列,这种微孔列与底物通过一种或者多种这里描述的细胞因子检测试剂以某种方式相接触,从而提供一种液体,在可模压平板和底物之间形成一种紧密的密封。该仪器将一个物种,通常是细胞,放置于微孔列的至少一个微孔中。可模压平板的微孔被制成能够保持至少大约 1 纳升或者更少的液体体积。

[0028] 除非另有定义,这里使用的所有专业和技术术语与本发明所属技术领域普通技术人员的惯常理解具有相同的含义。虽然也可以在本发明的实践或者实验中使用与这里描述的相似或者等效的方法或者材料,但是,这里描述的是适当的方法和材料。所有在此提到的出版物、专利申请、专利及其他参考文献通过引证在此全部并入本文。如果出现矛盾,以本说明书,包括定义,为准。另外,这里的材料、方法和实施例只是说明性的,并不起到限制作用。

[0029] 通过下面的详细介绍和权利要求书,本发明其他的特点和优势变得显而易见。

附图说明

[0030] 图 1 是微雕刻过程的示意图。(1) 将细胞悬浮液放置于由软平版印刷板制成的一系列微孔上。(2) 将细胞放置于孔内,然后吸出过量的培养基。(3) 将此列微孔与一种固体支持物相接触,所述固体支持物使用捕获抗体预先处理过,然后轻轻的按压,并培养 1-2 小时。(4) 从固体支持物上移出微孔,并放回到培养基中。使用检测抗体展开载玻片。

[0031] 图 2 是一系列条形图,显示了通过微雕刻技术和 ELISpot 测定的细胞因子分泌细胞的出现率。

[0032] 图 3 是一系列显微相片,显示了微雕刻技术产生的 CD4+T 细胞的四重细胞因子曲线。

[0033] 图 4 是一系列显微相片,显示了微雕刻技术产生的 CD4+T 细胞的四重 Th2 细胞因子曲线。

[0034] 图 5 是一系列直方图,显示了使用 (a) 抗 CD3/ 抗 CD28、(b) 植物血细胞凝集素、和 (c) 商陆促分裂原刺激的人 PBMC 的四重细胞因子实验。数据显示了经过 24 小时、48 小时和 72 小时刺激之后,通过微雕刻技术检测出的斑点数。

[0035] 图 6 是一系列图表,显示了从单一细胞中分泌的细胞因子的量。(A) 在微雕刻过程中,包含单一细胞的微孔的结构示意图。(B) 在培养基中累积的分析物计算量 (0) 和在玻璃表面上累积的分析物的计算量 (•) 在微雕刻过程中,当以 10 分子 / 秒的速率持续分泌细胞时的分析物计算量。(C,D) 使用 LPS 刺激人 PBMC 细胞 3 小时、6 小时或者 12 小时之后人 PBMC 细胞产生的 IL-6 的量。(C) 在每种刺激之后使用微雕刻技术测定的 IL-6 分泌速率分布直方图。(D) 使用定量 PCR 调节的 IL-6 的 mRNA 水平。(E) 使用 LPS、PHA 和 PWM 刺激之后,使用微雕刻技术测定来自两位通体的 IL-6 分泌速率分布的直方图。在 (C) 和 (E) 中显

示的 n 值表示各种曲线中的总细胞数已经被规范化。

[0036] 图 7 显示了使用微雕刻技术进行单一 - 分析物测定的实验室分析法。(A) 由个体人 PBMC 分泌的 IL-6 的测定。使用 LPS(10 微克 / 毫升) 和 PWM(5 微克 / 毫升) 刺激细胞 48 小时。测定捕获的 IL-6 的相对荧光强度, 作为培养时间的函数作图。在每个箱子中包括的最小值是 35。使用中位数值线性回归法调和实线。使用双尾 Student's t - 测验确定统计值。(B) 测定来自鼠杂交瘤细胞 HYB 099-01(抗卵白蛋白, Statens Serum 研究所) 的抗体分泌量。使用两种山羊抗鼠 IgG(来自 Zymed 和 Southern Biotech, 每种抗体为 50 微克 / 毫升) 的混合物捕获分泌的 IgG, 并用卵清蛋白 -Alexa 555 检测 (Invitrogen, 2 微克 / 毫升)。在微雕刻之后, 使用钙黄绿素紫罗兰 AM (Invitrogen) 染色剂确定微孔中活细胞数目。使用信号的中值作为每个小孔中存在的细胞数的函数在三个不同的培养时间 (15 分、30 分和 45 分) 制图。使用线性回归法拟合实线。

[0037] 图 8 是一种线性图, 显示作为捕获抗体分泌速率函数的捕获的分析物的计算值和亲和力 (KD)。实线代表作为时间函数的分泌的分析物的总量。 θ_0 是载玻片上结合部位的估计密度。这些计算结果教导了捕获抗体较低的亲和力 (KD = 10nM) 可能将分泌速率低估大约 2 倍。

[0038] 图 9 是标准参照载玻片的显微照片 (A) 和样品标准曲线 (B), 能够用于计算细胞的分泌速率。按照标明的浓度, 将一系列稀释并经过荧光标记的检测抗体在载玻片上打点 (1 微升 / 点), 绘制各个斑点的平均荧光强度, 从而产生标准曲线 (实线)。

[0039] 图 10 是一个显微照片和一系列图表, 显示了单一细胞的四重分析。使用 PMA/ 离子霉素刺激人 PBMC 细胞 6 小时。(A) 从相应细胞因子微孔列获得的微孔中个体细胞的代表性图像 (成排排列)。第一栏显示微孔的复合显微照片 (相衬显微镜) 和细胞的显微照片 (钙黄绿素 AM)。剩余的四列也是显微照片, 选取四种细胞因子 (IL-17, 蓝色; IFN γ , 绿色; IL-2, 黄色; TNF α , 红色) 的印模阵列的匹配位点。图像外部的橙色箱子是指在每一行中的阳性位点 (MFI > 背景 + 3 σ)。 (B) 按照生产的细胞因子结合物组织的各种细胞因子分泌速率的直方图。颜色与 (A) 中的安排相配合直方图的正方形中插入的各排表示由图中细胞产生的细胞因子组合物。在直方图中的 n 值被规范化为每 100,000 个细胞中细胞因子产生细胞的总数。用来自三个独立实验的数据构建直方图。

[0040] 图 11 是一张显微照片, 显示了低出现率功能性细胞在多重检测中的代表性图像。第一栏显示了微孔 (反向) 和细胞 (钙黄绿素 AM) 中的复合显微照片。剩下的四栏是四种细胞因子 (IL-17, 蓝色; IFN γ , 绿色; IL-2, 黄色; TNF α ; 红色) 打印微列相匹配位点上提取的显微照片。图外部的橙色框表示每一排上的阳性斑点 (MFI > 背景值 + 3SD)。

[0041] 图 12 是一对直方图显示了 CD4 和 CD8T 细胞产生 (A) IFN γ 或者 (B) IL-2 的分泌速率。 N 是微雕刻之后包含在指定的表面标记物中的细胞数。

[0042] 图 13 是一系列图, 显示了共分泌细胞因子的关系。(A) 来自 IFN γ / IL-2, IFN γ / TNF α , 和 IL-2 / TNF α 双生产者的细胞因子对的分泌速率的二位散点图。各个坐标轴的颜色表示此维度中细胞因子的类型 (IFN γ , 绿色; IL-2, 黄色; TNF α ; 红色)。每个点代表一个细胞, 其中, x 和 y 值是细胞因子对的分泌速率; r 是相关系数, 且 p 是不相关概率。(B) IFN γ / IL-2 / TNF α 三生产者细胞的每对细胞因子的二维图。(c) CD4 (蓝色) 和 CD8 (红色) IFN γ / IL-2 (上图) 和 IFN γ / TNF α (下图) T 细胞的速率散点图。数值 n 是图中总斑点数。

[0043] 图 14 说明了滚环扩增的机制。将检测抗体与一种低聚核苷酸结合。DNA 环与低聚核苷酸中的补体序列杂交,并通过聚合酶链式反应 (PCR) 扩增。最后,通过与荧光标记的低聚核苷酸杂交原位标记扩增的 DNA 序列。

[0044] 图 15 是使用滚环扩增 (RCA) 设计的多重细胞因子检测的指示图。每种检测抗体都与独特的低聚核苷酸序列相连。使用四种带有引物补体序列的环状 DNA 扩增引物。使用补体的荧光团标记四种报道因子序列,从而杂交长 DNA 链。

[0045] 图 16 是一个图表,显示多种细胞因子检测的 RCA 基础上的顺序标记的设计。在如上所述的 RCA 过程之后,带有荧光标记的第一组报道因子序列被加入到系统中,用于检测相应的序列。在扫描之后,或者使用酶处理载玻片特异性裂解双链 DNA,或者使用化学试剂处理裂解报道因子序列和荧光基团之间的连接体。在此过程之后,使第一组细胞因子的扩增序列失活。然后,在系统中使用带有荧光基团的第二组报道因子序列。这个检测过程可以被重复多次。

[0046] 图 17 是一系列说明当前过敏试验问题的插图。

[0047] 图 18 是一个系列的插图和图表,表明此处所述的微雕刻方法的实施。

[0048] 图 19 是一系列反应过敏性反应的插图。

[0049] 图 20 是一个示意图,描绘微阵列数据的分析。

[0050] 图 21 是一个流程图,显示基于细胞型,分泌的幅度,和响应者频率的免疫曲线的计算。

[0051] 根据这里的公开,本领域普通技术人员应该可以识别出附图所显示的实施例不需要按照比例绘制。某些特点或者部分可能被放大、减少或者歪曲,一边更好的解释和理解这里描述的示例性方面和实施例。另外,图中使用阴影、图案、下划线等等并不是暗指或者代表任何特殊的材料或者物质,除非在上下文中另有明确说明。

具体实施方式

[0052] 本发明提供了多重细胞因子捕获的方法。本发明还提供了在不同谱系的细胞上将细胞因子与表面表达标记物相匹配,并定量分泌速率从而提高数据的维度。通过不同的标记识别接触区域。

[0053] 具体的说,本发明提供了一种在多克隆有丝分裂/过敏原(例如,美洲商陆有丝分裂原(PWM)和植物凝血素(PHA))以及 TCR-特异性活化(例如,抗 CD3/CD28)之后,测定相应细胞出现率的方法。从收集的细胞中定量分泌速率。额外获得的数据能够评价反应的频率和振幅(分布)。这种额外的维度对于改善细胞因子反应的分辨率是非常重要的。如下所述,一种具体的实施例包括,在使用美洲商陆有丝分裂原(PWM)和植物凝血素(PHA)等等刺激之后,测定来自两位不同供体的外周血单核细胞(PBMC)分泌的 IL-6(早期炎症性反应标记物)。如下所述,相应细胞的出现率是变化的,但是与反应的振幅不匹配。统计实验显示了一种独特的分布。这种多维数据改善了疾病(例如,过敏症、传染病、自身免疫等等)免疫检测的质量。对每种细胞中一种以上的细胞因子(至少 4 种)进行上述测定。

[0054] 如下所述,表面表达的表型标记物(例如,CD4 和 CD8)与各自的测定向匹配,通过对血细胞计数和相配的细胞因子释放成像进一步细化所得数据识别特定子集的分辨率。不同细胞因子的分泌速率与单一细胞相关。这里描述的方法能够整合量化(多维)数据组,并

且这些数据显示,这些测定可以被用于区别来自不同供体的细胞对不同刺激源的反应。本发明的应用包括过敏性检测、疫苗的临检测、治疗剂的生物制药法、正在进行中的感染、自身免疫疾病,等等。

[0055] 本发明提供了通过检查表现出过敏性反应的细胞因子的水平,检测个体对一种或者一种以上过敏原的敏感性的方法和组合物,过敏症是免疫系统超敏感性的一种,这是由于与统称为过敏原的环境物质相接触造成的。过敏症是世界范围内的一种流行病。过敏性免疫反应要求致敏并发展针对过敏原的特异性免疫应答反应。在对过敏原致敏期间,过敏原特异性 CD4+Th2 细胞的活化导致 Th2 细胞因子的产生(例如白细胞间介素(IL)-4和白细胞间介素(IL)-13),其中, Th2 细胞因子负责诱导 IgE 在 B 细胞中的类别转换、粘液生产、Th2 细胞内皮细胞的活化作用和嗜曙红细胞向组织的细胞迁徙。IgE 通过与在其表面表达的高结合亲和性的 IgE 受体(Fc ϵ RI)结合致敏肥大细胞和嗜碱性细胞。在 IgE-Fc ϵ RI 复合物通过过敏原交联时,肥大细胞和嗜碱性细胞去颗粒化,释放血管活性胺(大部分是组胺)、脂类媒介物(前列腺素和半胱氨酰白细胞三烯)、细胞因子和趋化因子,所有这些物质具有直接过敏性反应状态的特点。在致敏阶段,观察靶点器官中过敏性炎症和对过敏原刺激的反应,导致过敏性的鼻结膜炎(rhinoconjunctivitis)、湿疹、哮喘或者全身性过敏反应(Larche, et al, 2006 Nat Rev Immunol, 6 :761-771 ;Romagnani, S. 2004 J Allergy Clin Immunol, 113 :395-400)。

[0056] Th2-型细胞因子,例如白细胞介素-4(IL-4)、白细胞间介素(IL)-5、白细胞间介素(IL)-9和白细胞间介素(IL)-13能够影响各种各样的与慢性过敏性炎症有关的过程。白细胞间介素(IL)-4和白细胞间介素(IL)-13刺激 IgE 和血管-细胞粘着分子 1 的产生,而白细胞间介素(IL)-5和白细胞间介素(IL)-9与嗜曙红细胞的发展有关,并且白细胞间介素(IL)-4和白细胞间介素(IL)-9促进肥大细胞的发展。白细胞间介素(IL)-9和白细胞间介素(IL)-13帮助促进气道高反应性,同时白细胞间介素(IL)-4、白细胞间介素(IL)-9和白细胞间介素(IL)-13还能促进粘液的超量生产(Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344 :109-113 ; Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344 :30-37)。已经发现调节性 T 细胞(TReg 细胞)作为另一种关键的 CD 4+T 细胞子集与过敏性疾病有所牵连。针对鼠模型的研究有利的显示,通过抑制性细胞因子白细胞间介素(IL)-10并且转化生长因子- β (TGF- β),调节性 T 细胞还控制人体内的 T_H12-细胞对遗传性过敏症反应,所述遗传性过敏症是由于 Th2 细胞和调节性 T 细胞细胞之间的不平衡引起的((Bacchetta, et al, 2007 J Allergy Clin Immunol, 120 :227-235 ; quiz 236-227 ;Larche, M. 2007 Chest, 132 :1007-1014)。T 调节细胞通过抑制 IgE 和诱导 IgG4,可能有助于抑制过敏性疾病,反之,通过 TLR7 和 TLR9 进行 B 细胞的活化作用,能够增强 IgA 的生产量(Meiler, F 2008 Allergy, 63 :1455-1463)。Th1 细胞(干扰素(IFN)- γ 产生的)和 Th2 细胞之间的不平衡在过敏症治疗方法中起到至关重要的作用。特异性免疫治疗与 Th2 细胞产生的细胞因子的下调作用有关。这些改变导致对过敏性炎症的抑制作用、能够控制 IgE 产生的细胞因子(干扰素和白细胞介素-12)的增加、“阻断”抗体(IgG)的产生、和涉及过敏原-特异性超反应的细胞因子的释放(白细胞间介素(IL)-10和转化生长因子(TGF)- β)(Kay, AB 2001 N Engl J Med, 344 :109-113)。另一种新识别的 CD4+T 细胞型被命名为 Th17 细胞,这种细胞与嗜中性的发炎有关(Stockinger, B 2007 Immunol Cell Biol, 85 :83-84)。白细胞间介素(IL)-17A 在哮喘患者起到中过表达,与嗜中性白细胞的流入有

关,通过人气道平滑肌细胞诱导嗜中性白细胞趋化引诱剂白细胞间介素 (IL)-8(CXCL8) 的产生 (Holgate, ST and Polosa, R 2008 Nat Rev Immunol, 8 :218-230)。健康个体和过敏性个体以不同的比例显示所有 3-Th1、Th2 和 Treg 过敏原 - 特异性子集 (Akdis, M et al, 2004 J Exp Med, 199 :1567-1575)。因此,显性子集的变化和 Th1、Th2 和 Treg 细胞之间的平衡可以导致过敏症的发展或者恢复。

[0057] 使用本领域已知的方法可以构造微阵列和平板,这些方法包括在 PCT/US2006/036282(公布号 W0/2007/035633) 和 USSN 61/057,371 中。这两个申请的内容通过引证在此全部并入本文。如这里使用的,“可模压的平板”是指一种装置,当被放置与一种底物相接触时,这种装置可以在至少一个维度中弯曲、移动或者变形。例如,在某些结构中,所述可模压平板包括一种材料,例如,一种弹性体材料,因此,当可模压的平板被放置与一种底物相接触时,在可模压平板和所述底物之间能够形成一种基本上液体密封,从而延迟或者预防可模压平板中的任何液体流出或者泄露。

[0058] 这里描述的方法、装置和试剂盒可以使用一种可模压的微孔列或者小室(例如,直径小于 100 微米,或者直径为 50-100 微米)列,并在每个微孔中保持一个或者几个细胞。所述列被放置与一种底物进行物理接触,从而使该微孔变成密闭容器或者检测装置。这种系统的培养允许细胞产生产物,例如,抗体、细胞因子及其他分泌产物,然后将这些产物固定在所述底物与微孔接触的区域上。通过这样的方式,产生来自每个微孔的细胞产物的微阵列。在对系统进行培养一定时间之后,例如,培养 1 分钟、5 分钟、30 分钟、40 分钟或者 50 分钟到几个小时(例如,1 小时、3 小时、6 小时、12 小时,24 小时或者更少),所述微阵列从底物和底物的固定化细胞产物中移出,使用已知的种类筛选所述微阵列或者微雕刻,从而确定固定的细胞产物是否与已知的种类有关。

[0059] 使用软平板印刷技术对密集的微孔(0.1-1 纳升)列进行微雕刻,从而印迹每个细胞分泌的分子的相应列,所述微孔包括单个细胞。雕刻后,这些细胞保持在微孔中的培养基中,按照市售蛋白质或者抗体相似的方式检查这里所获得的微阵列,例如,通过使用荧光标记的试剂和基于激光的荧光扫描仪。因此,这些方法能够快速识别显示所需性质的细胞,例如,分泌抗原特异性抗体的细胞,并能够快速从单独小孔中回收这些细胞用于克隆扩增。

[0060] 通常,在本发明的方法和组合物中可以使用能够特异性检测所需细胞因子的任何方法。通常,具有已知特异性的抗体列(多克隆或者单克隆)被用于检测细胞因子的存在。

[0061] 在一些实施方案中,检验的细胞因子曲线是 Th1 或者 Th2 曲线。例如,对于检测 Th1 组的检测试剂,所述细胞因子可以是,例如,白细胞间介素 (IL)-17、白细胞间介素 (IL)-10、白细胞间介素 (IL)-4 和 / 或干扰素 (IFN)- γ 。Th2 组包括,例如,IL-4、白细胞间介素 (IL)-5、白细胞间介素 (IL)-13 和 / 或白细胞间介素 (IL)-9。第三曲线评价 IgE、IgG1、IgG4 和 IgG4 抗体的水平。其他待检测的细胞因子包括 CC 趋化因子(例如,单核细胞趋化引诱剂蛋白-1(MCP-1 或者 CCL2) 和 RANTES(CCL5))、CXC 趋化因子(例如,白细胞间介素 (IL)-8)、C 趋化因子(例如,XCL1(淋巴细胞趋化因子- α) 和 XCL2(淋巴细胞趋化因子- β))、和 CX3C 趋化因子(例如,人神经趋化蛋白(fractalkine)(或者 CX3CL1))。

[0062] 通常,可以检测出任何已知的或者疑似的过敏原。常见的食物和药物过敏原包括,例如,牛奶、鸡蛋、豆科植物(包括花生),树坚果(核桃,腰果等),鱼类,贝类,大豆,小麦乳制品,蛋制品,海产品和贝类。药物过敏原包括,例如,阿莫西林,青霉素磺胺类药物,巴比妥

类,抗惊厥药,胰岛素和碘。其他常见的过敏原包括,如灰尘,花粉,宠物皮屑,乳胶,氯,蚊虫叮咬(黄蜂,火蚁和蜂蜇)。

[0063] 使用这里描述的方法进行单细胞分析能够提供许多独特的优点,帮助理解疾病的生物过程和机理。显微镜成像和化学分离已经解释了通过大量抽样过程没有发现的单细胞的独特的生物现象(Sims, CE and Allbritton, NL 2007 Lab Chip, 7 :423-440)。一个实施例表示了,在刺激单一细胞之后,随着时间的流逝, Ca^{2+} 浓度重复的增加和减少(Woods, et al, 1986 Nature, 319 :600-602)。当研究整个细胞群时,这一现象被掩盖,这是由于个体细胞反应时间和反应大小的差异造成的。单一细胞测量还对研究混合细胞群体很有价值。

[0064] 在疾病状态的研究中,对从模型有机体或者病人体内直接取样得到的样品进行分析是很复杂的,在这种情况下,通常是正常细胞与患病细胞的混合物。肿瘤活组织切片检查的单细胞研究已经显示,肿瘤中大多数细胞是正常的。但是,在不正常的细胞中,存在显著的异质性(Fink, et al, 2006 Exp Toxicol Pathol, 57 :Suppl 2, 25-29 ;Bodey, B 2002 Expert Opin Biol Ther, 2 :371-393)。因此,通过分析细胞溶解产物确定具有绝大部分肿瘤特性的分子具有极大的局限性。

[0065] 单细胞检测

[0066] 在过去的几十年中,已经开发出了一系列的技术进行高通量的单个细胞的分子机理研究。ELISPOT(酶联免疫)是一种在单细胞水平条件下检测细胞因子生成细胞的常用方法(Czerkinsky, et al, 1983 J Immunol Methods, 65 :109-121)。在此技术中,所述细胞被装载在膜上并在膜上生长,所述膜已经被特异性抗体功能化了。在培养过程中,使用细胞周围的抗体捕获每个细胞产生的细胞因子。在使用其他抗体检测之后,观察各个细胞的分泌产物。这种方法能够提供分泌蛋白的定量结果和响应细胞出现率的半定量结果。这种技术的缺点是每次只有一个或两个种分泌蛋白可以被检测到,并且这种技术不评估从每个细胞分泌的多种模式。此外,在试验之后,特定的细胞被丢失。

[0067] FACS(荧光活化的细胞分类)是流式细胞计的一种类型。使用针对细胞表面标记物或者针对细胞内蛋白质的荧光标记的抗体对每个细胞进行染色。随着新的检测技术的发展,多达 19 个参数(17 荧光色和 2 个物理参数)可以同时检测每个细胞(Perfetto, et al, 2004 Nat Rev Immunol, 4 :648-655),尽管常规应用仅仅局限在 6 到 8 种颜色上。FACS 是用于研究细胞群落的最常见的免疫学技术。他可以在每秒钟的时间内分析数千个细胞。但是,他难于在检测后收集和培养单个细胞,这使得随后研究一个细胞的动力学变得不可能实现。典型的 FACS 的灵敏度为 $\sim 0.1\%$,并需要对靶细胞进行足够的染色。

[0068] 另一组高通量技术的目的是从血液中发现罕见的循环肿瘤细胞(CTC),例如,CTC 芯片(Nagrath, et al, 2007 Nature, 450 :1235-1239)、一种微滤膜装置(Zheng, et al, 2007 J Chromatogr A 1162, 154-161)、微孔(Talasaz, et al., 2006 ConfProc IEEE Eng Med Biol Soc, 1 :1838-1841)。有些技术能够改善检测系统的功效,例如,罕见的事件成像系统(REIS)(Kraeft, et al, 2004 Clin Cancer Res, 10 :3020-3028)和光纤阵列扫描技术(FAST)(Krivacic, et al, 2004 Proc Natl Acad Sci USA, 101 :10501-10504)。这些方法的优点在与能够快速筛选并分离罕见细胞。但是,细胞型的捕获和进一步分析受到限制。

[0069] 实验室芯片(LOC)是单细胞检测的另一种形式。许多系统都是以渠道的微制造和微环境为基础的。不同类型的 LOC 包括流式细胞仪,细胞内含物的电泳分析、使用指示剂进

行微观分析、用作小体积反应子的细胞、细胞与微环境的相互作用,和单细胞 PCR(Sims, CE and Allbritton, NL 2007 Lab Chip, 7 :423-440)。

[0070] 使用微雕刻技术进行单细胞研究及其优点

[0071] 微雕刻技术是最近研发出的一种技术,用于快速、高通量、重复筛选单个细胞。这种技术已经被用于筛选杂交瘤细胞从而生产单克隆抗体 (Love, et al, 2006 Nat Biotechnol, 24 :703-707)。这种技术也适合与调查来自 1 型糖尿病病人的人外周血单核细胞群分泌的细胞因子 (IFN- γ 和白细胞间介素 -6)、抗原特异性抗体和谱系特异性表面标记物 (Bradshaw, et al., 2008 Clin Immunol, 129 :10-18)。

[0072] 在这种技术中,微孔阵列被塑造成一种柔软的 PDMS 聚合物邮票,从而分离单一细胞 (图 1)。随后,对小孔列使用一种载玻片,这种载玻片经过针对所关心的蛋白的捕获抗体功能化。在培养某一段时间之后,从微孔邮票上分离载玻片,使用荧光标记的检测抗体研究。将带有细胞的邮票放回培养基培养或者用细胞表面标记物染色。从小孔中吸出所关心的细胞。总之,该技术适用三明治酶联免疫吸附试验 (ELISA) 来测定单细胞水平的蛋白分泌。这种技术能够提供通常由酶联免疫斑点法 (ELISpot) 和 FACS 提供的信息,除此之外,这种技术还能够跟踪单个细胞。

[0073] 免疫研究中使用的微雕刻技术

[0074] 在免疫系统中,细胞多样性和细胞的多功能性使微雕刻技术成为研究单个细胞免疫系统的有效技术。使用微雕刻技术,可以从外周血单核细胞 (PBMC) 中测定如下信息:(1) 在整个细胞群中每种细胞型的出现率;(2) 在整个细胞群中,某种细胞因子或者抗体分泌细胞的出现率;(3) 在单个细胞水平的细胞因子曲线及其动态变化;(4) 在检测之后可行的有意义的克隆;(5) 在疾病中不同种类免疫细胞的功能网络。

[0075] 上述信息还可以进一步在免疫学研究,临床诊断,疾病发展的监测,及疗效评价中使用。

[0076] 微雕刻技术的改进

[0077] 本发明提供了更高的检测灵敏性。与大量细胞培养物所使用的 ELISA 相比较,微雕刻技术的一个优势在于,细胞被捕获在一个小空间 (~ 0.1 纳升 / 细胞),从而产生高局部浓度的目标蛋白质。这里描述的方法的敏感度比基于表面的细胞因子捕获 (例如,微孔) 的敏感度高大约 10 倍。在另一个方面,与 ELISA 相比,向检测抗体上直接标记荧光显示较低的敏感度,在 ELISA 中,通过酶催化反应扩增信号。使用相同的抗体对,检测灵敏性比 ELISA 低大约 10-100 倍。分泌蛋白增加的浓度和微雕刻技术中减低的信号扩增使局部检测灵敏度与 ELISA 相比没有明显变高。

[0078] 下面的非限制性实施例对本发明进行了进一步的解释。

[0079] 实施例 1:细胞因子检测过程的优化

[0080] 优化检测从通过软平板印刷术制造的微孔列中分泌细胞因子的方案。检测不同的载玻片、封闭缓冲液和捕获抗体浓度。

[0081] 在蛋白微阵列中,聚赖氨酸和环氧化物是两种通常使用的载玻片表面。在蛋白质印迹 (western blot) 和微阵列中,牛奶和牛血清白蛋白 (BSA) 是两种通常使用的封闭缓冲剂。在载玻片表面 (聚赖氨酸或者环氧化物表面) 上定位白细胞间介素 (IL)-4 捕获抗体的梯度,2 微升 / 斑点。在室温条件下培养 2 小时后,使用 1% 的牛血清白蛋白 (BSA) 或者

在磷酸缓冲液中浓度为 3% 的非脂肪干奶粉封闭所述载玻片至少 30 分钟。向每个斑点中加入标准白细胞间介素 (IL)-4 (500pg/ 毫升) 然后在 37℃ 条件下培养 1 小时。随后, 使用与 Dylight 647 结合的 1 微克 / 毫升的白细胞间介素 (IL)-4 检测抗体作为检测试剂。对于参照物, 不加入白细胞间介素 (IL)-4 标准品。在不同的结合物中, 使用四个参数检测捕获抗体的梯度。使用牛奶封闭并涂布 10-25 微克 / 毫升捕获抗体的聚赖氨酸载玻片能够获得最好的结果, 并且, 与原始方案 (环氧化物载玻片、牛血清白蛋白 (BSA) 封闭、和 200 微克 / 毫升捕获抗体) 相比能够提供好得多的结果。在下面的实验中使用最佳混合物。

[0082] 在 GenePix 扫描器中, 使用四种激光, 将微雕刻扩展为四颜色检测。选择四种 T 细胞的细胞因子干扰素 (IFN)- γ 、白细胞间介素 (IL)-4、白细胞间介素 (IL)-10 和白细胞间介素 (IL)-17。使用四种荧光标记分别标记检测抗体: 白细胞间介素 (IL)-17-Dylight 488 (蓝色)、干扰素 (IFN)- γ -Dylight 549 (绿色)、白细胞间介素 (IL)-10-Alexa Fluor 594 (黄色) 和白细胞间介素 (IL)-4-Dylight 649 (红色)。使用单独的抗体对细胞因子标准品进行单独的细胞因子标准化, 从而检测每个抗体对的表现。标准曲线显示这四种细胞因子的敏感性是 200pg/ 毫升。多重方法是在载玻片上涂布所有四种捕获抗体的混合物, 并使用检测抗体的混合物进行检测。为了研究不同抗体和细胞因子之间可能的交叉反应, 使用捕获抗体和检测抗体的混合物, 分别对每种细胞因子制备标准曲线。所得结果显示, 在较高的浓度下, 一些细胞因子信号可相互影响。当浓度高于 16 毫微克 / 毫升时, 白细胞间介素 (IL)-10 在干扰素 (IFN)- γ 通道上有强信号; 白细胞间介素 (IL)-4 和干扰素 (IFN)- γ 在白细胞间介素 (IL)-10 通道上有一些信号。根据这一数据, 在细胞因子的浓度在 1-10 毫微克 / 毫升范围内时, 这四种颜色可以清楚的相互区别开来。

[0083] 单一细胞的多细胞因子检测

[0084] 为了检验上述方法是否能够灵敏的检测从细胞中分泌出来的多重细胞因子, 使用 PHA 刺激外周血液单核细胞 (PBMC) 24 小时, 然后装载在微孔上。印迹 2 小时后, 观察一些斑点的图像。在载玻片上发现单一的色斑, 这显示这四种颜色彼此之间区别良好。另外, 还有一些双重阳性或者多重阳性斑点, 这说明每个细胞的功能曲线是不同的。

[0085] 为了比较微雕刻技术和 ELISpot, 在两种方法中使用相同的细胞组合相同的抗体克隆株检测从细胞中分泌的细胞因子的出现率 (图 2)。在一个邮票中孔的总数是大约 80,000 个, 负载效率通常是 50%。根据这一计算, 干扰素 (IFN)- γ 的出现率在这两种方法中是相同的。比较第三者细胞因子与干扰素 (IFN)- γ , 白细胞间介素 (IL)-4 和白细胞间介素 (IL)-17 的频率是相同的, 并且微雕刻的灵敏度比 ELISpot 高。

[0086] 在这两种方法中, 白细胞间介素 (IL)-10 的出现率不一致。一种可能的解释是微雕刻中使用的白细胞间介素 (IL)-10 抗体不适用于 ELISpot。但是, ELISpot 只能检测每种细胞的单一参数, 不能对双重阳性细胞的出现率给出相关信息。表 1 显示了 ELISpot 和微雕刻技术之间的直接比较。

[0087]

表 1. 微雕刻和 ELISpot 的比较

	微雕刻技术	ELISpot
细胞	$\sim 10^5$	$\sim 10^5/\text{孔}$ *N 细胞因子
进样窗	2 小时	24 小时
总时间		至少 48 小时
分泌速率的定量确定	是	有限的
恢复细胞		否
信息	较多	较少的

[0088] 维持其细胞型从微雕刻技术中恢复的细胞

[0089] 为了确定大多数细胞在印模之后是否还存活,微雕刻检测的功能曲线是否能再生,向微孔中装入 CD4+T 细胞,并测定分泌的干扰素 (IFN)- γ 和白细胞间介素 (IL)-17。检测到三种信号:干扰素 (IFN)- γ 阳性、白细胞间介素 (IL)-17 阳性和干扰素 (IFN)- γ / IL17 双阳性。在印模期间,大部分孔包括 1-2 个细胞,其中一些孔包括三个细胞。印模之后,小孔中的细胞继续培养 2 天,大多数的细胞分裂,从小孔中挑选一些代表性的细胞并在 96 孔板中培养,在细胞生长一段时间之后,进行胞内染色,使用荧光活化的细胞分类法 (FACS) 检测表型。

[0090] 将 CD4+T 细胞装入微孔中检测白细胞间介素 (IL)-17 和干扰素 (IFN)- γ 。从小孔中收获带有信号的细胞并培养成克隆株。一些细胞保持微雕刻中检测到的细胞型。能够观察到一种双重阴性的群体。这些细胞在培养过程中已经失去了细胞因子分泌能力。或者在原来的装有 2 或 3 个细胞的孔中就存在一个这种细胞。这一结果显示:1) 通过过程最优化,使用直接荧光标记时,所述单一细胞因子的检测灵敏度小于 200pg/ 毫升;2) 在微雕刻技术中能够同时检测四种细胞因子;3) 使用微雕刻技术评价细胞因子分泌细胞的出现率,与 ELISpot 相比,能够提供更具体的信息;4) 在印刷两小时后,细胞依然存活,并且能够从小孔中回收。一些细胞还保持其原来的表型。

[0091] 实施例 2:多路细胞因子捕获

[0092] 生产微孔列的常规注射模型

[0093] 如上所述,本发明的方法包括一只注射模型过程,用于产生印模于聚二甲基硅氧烷中的薄 (1 毫米) 纳米孔列,所述聚二甲基硅氧烷附着于标准载玻片。这种标准化的制备方法能够提供改善的可再生试验和数据收集。

[0094] 用于细胞因子检测的抗体验证

[0095] 用于检测所关心的细胞因子的合适的抗体对的验证方法如下所述。如下所述,

使用不含有单细胞的试验模仿微雕刻过程,所述微雕刻过程用于检测抗体对。这种的检测试验允许识别四种不同小组,检测表明 Th 反应和特异性 Th2 和 Th1 反应的细胞因子组(白细胞间介素(IL)-4/ 白细胞间介素(IL)-10/ 白细胞间介素(IL)-17/IFN γ ; 白细胞间介素(IL)-4/ 白细胞间介素(IL)-5/ 白细胞间介素(IL)-9; IFN γ /MIP-I β /TNF α /穿孔蛋白(perforin); IFN γ / 白细胞间介素(IL)-10/ 白细胞间介素(IL)-17/ 白细胞间介素(IL)-22)。已经验证了对于两个抗体组(IgG1/IgA/IgE/IgG4; IgG1/IgA/IgG3/IgM)的检测抗体。

[0096] 来自单一细胞的四重细胞因子检测。

[0097] 下面介绍了对来自单一细胞的两组细胞因子进行的四重检测。图 3 表示了一种实验结果,所述实验显示 T 细胞反应(IFN γ / 白细胞间介素(IL)-4/ 白细胞间介素(IL)-10/ 白细胞间介素(IL)-17)的不对称性。在这一实验中,使用抗 CD3 和抗 CD28 刺激外周血液单核细胞(PBMC)。通过阴性筛选分离 CD4⁺T 细胞、用荧光表面标记物(α CD4-Alexa 647)染色并装载在微孔列上。将所得微孔列与载玻片相接触,所述载玻片被白细胞间介素(IL)-4、白细胞间介素(IL)-10、白细胞间介素(IL)-17 和 IFN γ 的抗体功能化。在培养两小时后,移出微孔列并成像。对载玻片进行染色并使用 Genepix 微阵列扫描器成像。所得图像分别与小孔相关。每个小孔的尺寸都是 50 微米 x50 微米 x50 微米。图 4 显示了一种实验结果,所述实验表明了 Th2 反应(白细胞间介素(IL)-4/ 白细胞间介素(IL)-5/ 白细胞间介素(IL)-13/ 白细胞间介素(IL)-9)的幅宽。在这一实验中,使用抗 CD3 和抗 CD28 刺激外周血液单核细胞(PBMC)。通过阴性筛选分离 CD4⁺T 细胞、并装载在微孔列上。将所得微孔列与载玻片相接触,所述载玻片被白细胞间介素(IL)-4、白细胞间介素(IL)-5、白细胞间介素(IL)-13 和白细胞间介素(IL)-9 的抗体功能化。在培养 2 小时之后,移出微孔列并成像。对载玻片进行染色并使用 Genepix 微阵列扫描器成像。所得图像分别与小孔相关。每个小孔的尺寸都是 50 微米 x50 微米 x50 微米。

[0098] 尤其显著的是,在这些实验中,白细胞间介素(IL)-4 可以被检测到。白细胞间介素(IL)-4 是一种很难通过传统的 ELISpot 检测的细胞因子。这些功能性测定还于细胞在纳米孔中的自动成像相结合。通过这种方式,单个细胞的谱系与他们的分泌曲线相匹配。已经发展出一种常用的图像分析,用于将 1728xN 频道收集的图像转化为一列与灰色标尺相结合的细胞,所述灰色标尺表明了特定表面表的标记物(例如,CD4、CD8)的表达水平。

[0099] 分裂素 - 刺激的细胞细胞因子曲线

[0100] 为了确认所述多路细胞因子试验,使用一对分裂素和 T 细胞多克隆刺激物(抗 CD3/CD8)刺激来自健康供体的外周血液单核细胞(PBMC),所述分裂素已知能够诱导细胞因子反应(美洲商陆和植物血凝素、PHA)。在刺激一定时间之后,评价微雕刻技术产生的细胞因子微阵列上的斑点数目(图 5)。这些数据表明在与刺激剂和接触时间有关的不同反应之间的不同差异。与常规 ELISpot 试验的这些活化条件相比较进一步证实了这一数据。

[0101] 实施例 3:单细胞的多维细胞因子曲线

[0102] 淋巴细胞释放的细胞因子是测定细胞功能和对免疫反应进展影响的尺度。如下所述,通过数值模拟和实验验证,微雕刻技术作为一种用于捕获从单一细胞分泌的分泌物的技术,能够对从单一存活细胞同时释放的高达 4 中细胞因子提供定量测定的出现率和分泌速率分布。与单一参数功能性实验相比,这种多维测定更为详细且更为灵敏的分析了暴露

于刺激物的细胞的反应大小和强度。使用这一方法,在淋巴细胞中同时产生两种或者三种细胞因子时,已经证明 IFN γ 的分泌比率中值有所增加,但是其他细胞因子(白细胞间介素(IL)-2 和肿瘤坏死因子(TNF) α)并不显示相似的增加。此外,在产生这两个细胞因子的细胞中,IFN γ 和白细胞间介素(IL)-2 的分泌速率是不相关的,二白细胞间介素(IL)-2 和肿瘤坏死因子(TNF) α 显示正相关性。

[0103] 不同的功能性的反应,例如一种或者一种以上细胞因子的分泌或者增殖能力,能够区别与免疫反应性质有关的独特的淋巴细胞子集(Pantaleo and Harari, 2006 Nat Rev Immunol, 6 :41 7-423)。分析细胞子集之间的异质性要求分析方法能够多重测定个体淋巴细胞展示功能的幅度和性质(Seder, et al, 2008 Nat Rev Immunol, 8 :247-258)。

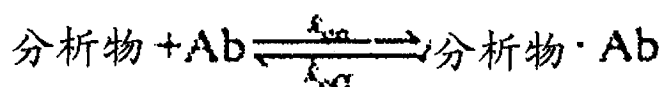
[0104] 现有的评价给细胞产生的细胞因子出现率、幅度和数量的方法

[0105] 通过直接测量分泌物确定细胞因子产生细胞的出现率,同时定量群落之间细胞的细微差距是困难的。斑点的密度表面分泌速率(Henn, et al, 2009 J Immunol, 183 :3177-3187),但是其较低的灵敏度要求整合 12-48 小时之内的信号,从而检测绝大部分的细胞因子(速率 100 分子/秒)。对多参数细胞计数进行胞内染色(ICS)是一种常见的替换手段,可用于评价通过单一细胞表达的细胞因子的数目和幅度(Kannanganat, et al, 2007 J Virol, 81 :8468-8476 ;Darrah, et al, 2007 Nat Med, 13 :843-850)。平均荧光强度(MFI)提供了胞内捕获蛋白质数量的相对测量方法,但是这些树枝很难在相互独立的样品中进行比较。此外,当禁止分泌时,使用胞内染色(ICS)测定细胞的生产能力不能精确的反应细胞分泌的细胞因子的数量。流式细胞计的两种修饰方法分别是“人工受体”和微磁珠(Manz, et al, 1995 Proc Natl Acad Sci USA, 92 :1921-1925 ;Powell and Weaver, 1990 Biotechnology (N Y), 8 :333-337),这两种修饰方法能够捕获细胞在靠近细胞外表面分泌的细胞因子。但是,在这两种过程中的物质运输分析模型表明,释放的细胞因子向大量培养基中扩散的速率限制了这些测量方法对较少分泌细胞的敏感性,并且可能引入细胞间的交叉感染(Frykman and Srienc, 1998 Biotechnol Bioeng, 59 :214-226)。在低温条件下,细胞在聚合物基质中的胶囊化作用也可能扰乱分泌。

[0106] 某些实验需要长时间的聚集细胞因子或者克服实验敏感度方面的限制,因此,这些实验在研究个体细胞释放的细胞因子的活力时有局限性。这里描述的是一种新型单一细胞分析技术,这种技术能够对个体存活细胞释放的细胞因子产生综合的定量测定。微雕刻方法(Love, et al, 2006 Nat Biotechnol, 24 :703-707)已经被改进用于分析从单一细胞分泌的多细胞因子的分泌速率,改进后的灵敏度比目前的方法要高一到两个数量级。这些数据提高了功能性反应在个体之间的分化,并显示多功能细胞中细胞因子分泌的良好动力。建模和数值模拟

[0107] 为了计算的微孔中的分析物的浓度,作如下假设:给定分析物的分泌速率是恒定的,并且所述分析物只与功能化的玻璃表面特异性结合。

[0108]



[0109] 分析物在微孔内根据时间的扩散是

[0110]
$$\frac{\partial C}{\partial t} - D \nabla^2 C = 0$$

[0111] 其中,C 是分析物在培养基中的浓度,D 是分析物的扩散系数,t 为培养时间。使用 COMSOL Multiphysics 3.3 (COMSOL AB 公司,瑞典斯德哥尔摩) 解偏微分方程,所述偏微分方程与分泌、扩散和分析物与特异性捕获抗体的结合有关。表 2 列出了在模拟过程中使用的系统参数。

[0112] 表 2:模拟系统中使用的参数值

[0113]

参数	值
孔大小	50 微米*50 微米*50 微米
细胞直径	10 微米
扩散系数 (D)	$10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$
结合速率常数(k_{on}^s)	10^5 - 10^6 /M/s
解离速率常数(k_{off}^s)	10^{-3} - 10^{-4} /s
分泌速率 (κ)	1-100 /cell/s
总结合位点的密度(θ_0)	10^{-8} - 10^{-10} mol/m^2

[0114] 外周血单核细胞的分离

[0115] 从健康参照物种抽取静脉血,放入戴绿帽并通过机构内部审核委员会认可的肝素锂管(肯德尔公司)中。在 Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare 公司) 上进行密度梯度离心从而分离外周血单核细胞。将外周血单核细胞以 106/ 毫升的密度悬浮在 RPMI1640 培养基 (Mediatech 公司) 中,补充 10% 胎牛血清,2 毫摩 L- 谷氨酰胺,10 毫摩 HEPES,100U 青霉素,100 毫克/ 毫升的链霉素,0.1 毫摩的非必需氨基酸,以及 1 毫摩的丙酮酸钠。

[0116] 用于微雕刻技术的装载细胞的微孔的制备

[0117] 对之前的描述进行一些修改,进行试验 (Love, et al., 2006 Nat Biotechnol, 24 : 703-707 ;Bradshaw, et al., 2008 CHn Immunol, 129 :10-18)。简而言之,通过向定制膜具中注入有机硅弹性体(聚二甲基硅氧烷,PDMS;道康宁公司)并在 80℃ 下固化 1 小时,来制备微孔阵列。该阵列包括 84 或者 672 个微孔(每个都是 50x50x50 立方微米)(Ogunniyi, et al., 2009 Nat Protoc, 4 :767-782)。在将阵列暴露与氧气血浆中 30 秒之后 (Harrick PDC-32G),在阵列的表面上防止细胞悬浮液(大约 2×10^5 / 毫升),然后通过重力作用,允许细胞沉积在小孔上,密度为每孔大约一个细胞。使用培养基将过量的细胞从阵列表面冲洗除去,将装载后的装置放置在涂布有捕获抗体的载玻片上,每个试验的详细细节在下面进行描述。

[0118] 从外周血液单核细胞 (PBMC) 中检测白细胞间介素 (IL)-6

[0119] 根据已经公开的方案制备聚-L-赖氨酸载玻片并用于固定捕获抗体。在硼酸盐缓冲液中稀释抗人白细胞间介素 (IL)-6 (40 微克 / 毫升, MAB206, R&D) 和抗人免疫球蛋白 G (10 微克 / 毫升, 81-7100, Invitrogen 公司) (Ogunniyi, et al., 2009 Nat Protoc, 4: 767-782), 在 25°C 条件下, 将其应用到载玻片上, 用磷酸盐缓冲盐水冲洗, 并干燥。为了刺激白细胞间介素 (IL)-6 的分泌, 向装在圆底 96 孔板中的外周血液单核细胞 (PBMC) 中分别加入 LPS (10 微克 / 毫升)、PHA (5 微克 / 毫升) 和商陆促细胞分裂素 (5 微克 / 毫升), 然后在 37°C 下, 在 5% 的 CO₂ 中培养指定的时间。在向所述微孔列中装载外周血液单核细胞 (PBMC) 之前, 使用钙黄绿素紫罗兰 AM (Invitrogen 公司) 对外周血液单核细胞 (PBMC) 进行染色。然后, 将此细胞装载的阵列在一种自动转化的落射荧光 (epifluorescence) 显微镜 (Zeiss 公司) 中成像, 所述自动转化的落射荧光 (epifluorescence) 显微镜 (Zeiss 公司) 适用于活细胞成像的装备 (温度和 CO₂ 控制)。将所得阵列面朝上固定在带有盖玻片 (带有包含特异性刺激物的培养基) 的显微镜上。然后使用包括痕量人血清 (1 : 40,000) 的培养基轻轻的冲洗孔阵列 (标记所有带有人免疫球蛋白的微孔位点) 并立即在带有捕获抗体的载玻片上使用。在杂交室中, 通过轻轻按压将结合的阵列和载玻片结合在一起 (Agilent 技术公司, G2534A) 并在 37°C 下培养。在测量进行中时, 在每个时间点收集一半的细胞进行 mRNA 定量分析。在印模之后, 使用 Alexa Fluor 488- 标记的抗人白细胞间介素 (IL)-6 (R&D 公司) 和 Alexa Fluor 700- 标记的抗人免疫球蛋白 G (Jackson 免疫研究公司) 进行检测。在微雕刻技术之后, 为了标记细胞, 向所述微孔阵列中加入 10 微克 / 毫升的 CD3-Alexa Fluor 488、CD11b-Alexa Fluor 568、和 CD14-Alexa Fluor 660。在 4°C 下培养 30 分钟之后, 用磷酸盐缓冲盐水冲洗微孔列并成像 (按照说明, 所有的抗体都使用 Alexa Fluor-NHS 酯 (Invitrogen 公司) 进行标记)。

[0120] 实时 PCR

[0121] 使用完全 RNA microprep 试剂盒 (Stratagene 公司) 从外周血液单核细胞 (PBMC) 中纯化 RNA。使用 Taqman 试剂盒, 同时随机供给六聚物, 从而制备互补 DNA (应用生物系统公司)。从应用生物系统公司购买白细胞间介素 (IL)-6 引物和探针, 并根据推荐的方式使用。

[0122] 细胞因子的多重检测

[0123] 用于多重细胞因子检测的抗体对是: IFN γ (MABTECH 公司)、白细胞间介素 (IL)-17 (eBioscience 公司)、白细胞间介素 (IL)-2 (R&D 公司)、和 TNF α (BD 公司)。为了捕获, 向载玻片上使用捕获抗体的混合物 (10 微克 / 毫升每个)。使用 PMA (10 毫微克 / 毫升) 和伊屋诺霉素 (ionomycin) (1 微克 / 毫升) 刺激外周血液单核细胞 (PBMC) 6 小时。然后用钙黄绿素紫罗兰 AM 染色, 并且如上所述, 在微孔中成像。用不含血清的培养基冲洗孔列, 然后立刻应用于包含捕获抗体的载玻片上。在印模之后, 使用抗体混合物 - 白细胞间介素 (IL)-17 (Alexa Fluor 488)、IFN γ (Alexa Fluor 555)、白细胞间介素 (IL)-2 (Alexa Fluor 594)、TNF α (Alexa Fluor 700) - 进行检测。在微雕刻技术之后, 为了标记细胞, 向微孔列中加入 10 微克 / 毫升的 CD3 (Alexa Fluor 488)、CD8 (Alexa Fluor 568) 和 CD4 (Alexa Fluor 660)。在 4°C 下培养 30 分钟之后, 用磷酸盐缓冲盐水冲洗微孔列并成像。

[0124] 数据分析

[0125] 在操作过程中, 关于图 20, 用于分析分泌产物的过程 10 包括显示的步骤。但是, 过

程 10 只是示范性的,而不是限制性的。过程 10 可以被改变,例如,通过增加步骤、删除步骤或者步骤重排来改变。印模的细胞因子 14 的微阵列可以在微阵列扫描器 15(例如, GenePix 4200AL, MDS 公司)上成像并使用所附软件(例如, GenePix 6.1)进行分析。从显微镜上收集的投射光和落射荧光显微照片可以被分析 16,从而确定存在于每个小孔 12 中的细胞的数量和谱系 18。从细胞阵列和印模的微阵列中提取的数据可以使用分配到微阵列中各个孔中的独特的标识进行匹配 20(例如,在 MS Excel 中)。过滤所得数据组 22,从而包括微阵列 12 中的位点,用于随后的分析(例如,在 Excel 或者 MATLAB(The Mathworks 公司, Natick, 麻省),该位点只包含在相应的微阵列 14 上与分泌的蛋白质向匹配的单一细胞。使用双取样的柯尔莫哥罗夫-斯米尔诺夫检验比较速率的分配,使用斯皮尔曼等级相关 24 计算共分泌相关系数。

[0126] 在操作过程中,对于图 21,通过检测细胞型 32、分泌 34 的幅度和相应因子 36 的出现率进行过程 30 从而制备免疫曲线 38,目的是提供一种临床诊断 40,将每种数据组进行整合就能够产生免疫曲线,这里的免疫曲线显示了提供被分析的细胞的受体的生理状态。

[0127] 为了评价细胞因子分泌速率进行的定量微雕刻技术

[0128] 微雕刻技术使用微制备的孔暂时性的将存活细胞限制在亚纳米升容积内,并且只产生最小的干扰作用;所述容积的内表面支持一种抗体,从而捕获从细胞中分泌的蛋白质(图 6A)。在培养(1-2 小时)之后,除去捕获表面然后使用荧光标记的抗体进行检查(Bradshaw, et al, 2008 Clin Immunol, 129:10-18)。为了确定能够允许微雕刻技术定量测定分泌的光学条件,使用一系列微分方程和数值模拟系统来模拟限制在单独容积中的单一细胞的物质运输。这种模拟系统说明三个不同的方案,描述了从表面捕获的蛋白的量和在容积内捕获的蛋白量的时间关系(图 6B)。在中间阶段(大约 30 分钟到大于等于 20 小时),在表面捕获的蛋白的量大约是细胞所分泌的蛋白质的总量。

[0129] 假设细胞持续不变的释放分析物,该模型建议捕获的分析物的量随着时间或者每个孔的细胞数目成线性增加。使用人外周血液单核细胞(PBMC)和鼠杂交瘤细胞试验验证这两个预测(图 7)。这些结果暗示,在固定时间点测定的细胞捕获的蛋白质的 MFI 是变化的,这精确的反应了分泌的蛋白质的变化,并且,因此,反应了分泌平均速率的变化(图 8)。为了将 MFI 转化为给定细胞的速率,使用包括已知量的荧光检测抗体的标准参照物将 MFI 转化成有限量的捕获分析物;用这一量除以培养时间,得到单一细胞中分泌的平均速率(图 9)。同时,该模型和数据还说明,微雕刻技术提供了一种有效的定量评价方法,评价一定时间内分泌的蛋白质的总量。

[0130] 定量分析从外周血液单核细胞(PBMC)释放的白细胞间介素(IL)-6 的出现率和大小

[0131] 为了评价我们所使用的测量方法的敏感性,在使用 LPS 刺激三个周期(3、6、和 12 小时)之后,测定人外周血液单核细胞(PBMC)释放的白细胞间介素(IL)-6 出现率和分泌速率。测定的反应显示,白细胞间介素(IL)-6 分泌细胞的出现率和每个细胞的平均分泌速率从 3 小时到 12 小时(尤其在 3 小时到 6 小时之间)呈单调增加(图 6C)。然而,编码白细胞间介素(IL)-6 的 mRNA 的表达在第 6 小时达到顶点(图 6D);这些观察结果证实了转录的时间不需要与蛋白质的分泌时间有关。大多数分泌白细胞间介素(IL)-6 的细胞是 CD11b+(44.8%)和 CD11b+CDH+(26.9%),而只有一小部分是 CD3+(4.7%)。在这些细胞

中分泌速率的分配没有显著差别,这表明他们具有相似的分泌能力。

[0132] 其次,检验白细胞间介素 (IL)-6 分泌速率的分配,从而辨别将外周血液单核细胞 (PBMC) 暴露到不同的刺激源之后个体之间的反应差别。测量结果显示,来自相同供体的细胞反应在不同的刺激作用之后,其出现率和大小 (速率) 都显示显著的变化,因此,这些反应的结合对于个体是独特的 (图 6E)。例如,在用 PHA 刺激之后,供体 1 和供体 2 显示相似的反应细胞出现率,但是分泌速率的分布是相当不同的 ($p < 0.001$)。对于供体 2,只有两种刺激作用条件能够产生相似的速率分配 ($p = 0.8622$)。这些结果表明,通过测定出现率和速率分配区别的免疫反应性比单参数测定 (出现率) 更加可靠。

[0133] 来自单一细胞的多重细胞因子的同时检测

[0134] 微雕刻结束的分析模型表明,从相同的细胞中可以独立地检测出多种细胞因子,假设用来捕获和检测的抗体对具有足够的特异性。四对商业可获得的抗体对被用于同时检测白细胞间介素 (IL)-17、IFN γ 、白细胞间介素 (IL)-2 和 TNF α ,然后,在用 PMA/伊屋诺霉素 (ionomycin) 刺激之后,通过定量微雕刻技术测定在人外周血液单核细胞 (PBMC) 中的反应幅度。存在于阵列中的活细胞显示大范围的功能性反应,包括一个、两个、或者三个细胞因子 (图 10A 和图 11)。对于分泌细胞因子结合物的细胞 (每 100,000 个细胞最少 48 种),分析对于每种细胞因子的分泌速率 (图 10B)。IFN γ 的释放是最有活力的 (3.8-120 分子/秒),而对于其他细胞因子的速率通常小于 20 分子/秒。IFN γ 和白细胞间介素 (IL)-2+ 细胞包括 CD4 和 CD8T 细胞;虽然每种谱系的出现率不同,他们分泌的速率分配是相似的 (图 12)。这些数据表明,象期望的那样,CD4 和 CD8T 细胞的分泌能力不存在显著差异。

[0135] 通过 ICS 分析多功能性细胞表明,能够产生双重细胞因子或者三重细胞因子的细胞与只产生单一细胞因子的细胞相比,当分泌被阻断时,在细胞内部表达更多量的细胞因子 (Darrah, et al, 2007 Nat Med, 13:843-850)。在实验中,在单一生产细胞和二重/三重生产细胞之间,对于 IFN γ 的分泌速率分配是变化的 (图 10B)。当细胞共分泌白细胞间介素 (IL)-2 或者白细胞间介素 (IL)-2/TNF α 时,IFN γ 的分泌速率中值增加 2.2 倍。但是,对于其他细胞因子的分泌速率并没有显著的改变。这些数据进一步分析,从而确定在二重和三重生产细胞中分泌的速率是否与多重细胞因子相关 (图 13A、B)。对于双重分泌细胞,IFN γ 和 TNF α 的分泌速率之间具有正相关性。对于三重分泌细胞,IFN γ /TNF α 和 IL-2/TNF α 的分泌速率之间也具有正相关性。相反,无论在双重分泌细胞和三重分泌细胞中,IFN γ 和 IL-2 的分泌速率并不相关。这些结果与先前的关于细胞因子共表达的研究结果相一致:IL-2 和 TNF α 的基因被共同的转录因子共调节 (Decker, et al, 2003 Nucleic Acids Research, 31:911-921)。而 IFN γ 和白细胞间介素 (IL)-2 是分别调节的 (Penix, et al, 1993 J Exp Med, 178:1483-1496)。在 IFN γ +/白细胞间介素 (IL)-2+CD4 和 CD8 T 细胞之间出现率和速率的相关性不存在显著差异,而 IFN γ +/TNF α +CD8T 细胞的出现率大约是 CD4 T 细胞的两倍 (图 13C)。这些结果显示,微雕刻技术通过 ICS 中模糊的多功能细胞展现敏锐的分泌活力。

[0136] 这里描述了一种定量方法,使用微雕刻技术产生从独立生存的淋巴细胞中释放的细胞因子的多维曲线。该方法的技术优势在于:1) 这产生了一种分泌功能的定量测定方法,能够在各个样品之间进行交叉比较,和 2) 与其他分泌实验 (ELISpot、表面捕获相比较),物质运输的机理将该方法的灵敏度增加了一个数量级 (表 3) (Frykman, et al.,

Biotechnol Bioeng, 59 :214-226)。这些特点能够最小化在测量之前和测量期间的对细胞的扰乱。此外,从单一细胞释放的单独细胞因子的分泌速率分布增加了多功能细胞分析的维度。将成像的细胞技术与这些测量值相结合,产生单细胞数据的综合,这一综合包括细胞的谱系以及分泌的细胞因子的数目和速率。这些数据改善了异质性细胞子集的区别,这对于评价疫苗反应和理解慢性疾病的病理学是至关重要的,尤其当临床样品中可利用的细胞数目不满足独立的常用分析方法时(例如,婴儿、组织活体检测样品)。

[0137] 表 3:检测 5 种细胞因子的实验限制

[0138]

细胞因子	荧光标记物	检测限制 (molecule/s)
IL-6	Alexa Fluor 488	0.52-0.67
IL-17	Alexa Fluor 488	0.48-0.63
IFN γ	Alexa Fluor 555	3.80-4.11
IL-2	Alexa Fluor 594	0.76-3.10
TNF α	Alexa Fluor 700	1.75-2.00

测定每种检测抗体上使用的特定荧光标记物的检测限制,并定义为平均值上的三个标准差(SD)。这些数值比之前计算的人工受体试验的相关数值低至少10倍,并且,在大多数条件下,比微胶囊试验的相关数值也低。

[0139] 实施例 4:使用微雕刻技术对过敏进行过敏性试验和诊断

[0140] 确定不同种类的 Th 细胞的细胞因子分泌曲线和不同免疫球蛋白亚类秘密 B 细胞的出现率。这些信息被用于诊断过敏原的灵敏度和检测过敏免疫治疗过程中的免疫变化。

[0141] 研发出三种检测芯片。这三种芯片包括:Th 组:白细胞间介素(IL)-17(Th17)、白细胞间介素(IL)-10(Treg)、白细胞间介素(IL)-4(Th2)、和干扰素(IFN)- γ (Th1)。这些事 CD4+T 细胞四个亚类代表性的细胞因子。Th2 组:白细胞间介素(IL)-4、白细胞间介素(IL)-5、白细胞间介素(IL)-13 和白细胞间介素(IL)-9,这是过敏症中四种重要的 Th2 细胞因子。抗体组:IgE、IgG1、IgG4 和 IgA,四种过敏症的免疫球蛋白分子亚类。

[0142] 确定适用于 Th2 组的抗体对,以及他们的标准曲线和交叉反应检测。

[0143] 为了调节免疫球蛋白分泌,使用过敏原对载玻片进行功能化从而捕获过敏原特异性抗体。使用四种抗-人免疫球蛋白同种型抗体(抗人 IgE、抗人 IgG1、抗人 IgG4、和抗人 IgA)作为检测抗体。使用人 IgE、IgG1、IgG4 和 IgA 标准品用于检测市售抗-人免疫球蛋白同种型抗体的特异性。

[0144] 所述抗体芯片的目的是在单一试验中调节四种不同的免疫球蛋白同种型。然而,当在玻璃表面直接包覆过敏原是可能损失或者减弱过敏原肽的免疫性。做为选择,在四种不同的载玻片上分别使用一种抗-人免疫球蛋白抗体。使用荧光标记的过敏原并用作检测试剂。

[0145] 使用花生过敏模型用于研究细胞对花生治疗的反应。从患有花生过敏症和不患有花生过敏症的患者中获得血液样品。从各个血液样品中分离外周血液单核细胞 (PBMC), 并用与临床诊断中使用的相同的花生提取物进行刺激。使用 Th、Th2 和抗体芯片检验外周血液单核细胞 (PBMC) 的反应。进行时间进程研究和过敏原梯度研究, 确定最佳的体外刺激条件。对患有花生过敏症的主体的过敏原特异性免疫球蛋白的出现率和细胞因子曲线进行统计学分析, 并与不患有花生过敏症的主体的曲线进行比较。这两个群体之间的显著差别被认为是过敏症的诊断方法。选择性的, 在不同的疾病阶段或者在治疗期间的细胞因子曲线和免疫球蛋白分泌被分析, 用于研究在过敏症发展期间免疫系统的变化, 并探测微雕刻技术在临床试验上的潜在应用。

[0146] 这里研究的微雕刻技术的扩张能够以很高的效率进行单一细胞的多重分析, 尤其是在免疫研究领域。

[0147] 单一细胞的特征帮助更好的理解免疫细胞网络, 并动态跟踪疾病发展期间细胞行为的变化。这种技术使用低成本的材料, 标准的过程和较短的操作时间, 从而在临床诊断中提供更好的时机。此外, 过敏性研究, 本方法的扩展还可以用于自身免疫和传染性的疾病中。

[0148] 其他的实施方案

[0149] 增加所述细胞因子检测灵敏度并且扩增每个实验的细胞因子数目。

[0150] 为了增加实验的敏感性, 使用滚环扩增 (RCA) (Schweitzer, et al, 2002 Nat Biotechnol, 20 :359-365) 来检测每个实验的多重细胞因子。RCA 的优点在于, 它能够将单一信号从一种抗体中变成一种可扩增的 DNA 分子 (图 14)。除了用不同的荧光盐水标记检测抗体之外, 检测抗体还能够用不同的引入进行标记 (图 15)。使用两个部分构造环状 DNA。一个部分是一种保守序列, 其与环状 DNA 是相同的。另一个部分是每种细胞因子的检测抗体相结合的特异性引物的互补物。

[0151] 在使用检测抗体之后, 向系统中加入环状 DNA 并扩增相应的循环, 其中, 附着于检测抗体的引物被延长。在最后, 除去反应试剂, 并加入带有荧光基团的报道基因序列。

[0152] 每个实验可检测出的细胞因子数目还取决于使用的荧光盐水和仪器中使用的干扰激光和过滤器。目前, 使用 GenePix 扫描器和四种激光 :488 纳米、532 纳米、594 纳米和 635 纳米。使用标准过滤器, 从仪器中检测四种颜色, 然后, 与其他过滤器结合使用, 可以额外使用两种或者三种其他颜色的荧光基团, 例如, Alexa Fluor 700、Alexa Fluor 750、或者 Qdot。

[0153] 然而、为了减少不同荧光光谱的重叠, 对荧光颜色的空间是有限制的。DNA 序列具有较高的多样性有点, 根据 RCA 设计一种连续标记的方案, 从而扩增细胞因子的数目。如图 16 所示, 在 RCA 反应之后, 根据每次扫描使用的颜色能够成批的检测信号。例如, 加入带有不同颜色的报道基因序列。在扫描之后, 从载玻片上除去第一组荧光分子。一个方法是将双链 DNA 切开, 这回从系统中去掉检测序列。另一个方法是在报道基因 DNA 和荧光基团之间使用一种可裂解的连接体, 从而在检测之后裂解荧光基团 (Ju, et al, 2006 Proc Natl Acad Sci USA, 103 :19635-19640)。在系统中, 冲洗除去荧光分子之后, 在系统上使用第二组报道基因, 从而杂交另一组 DNA 序列。由于第一组荧光基团已经被除去了, 所以可以使用相同的颜色标记第二组报道基因序列。

[0154] 在一种微雕刻系统中,在单一细胞因子检测过程中首先进行 RCA。使用 Schweitzer 等人公布的环状 DNA 和引物序列 (Schweitzer et al, 2002 Nat Biotechnol, 20 : 359-365)。

[0155] 环状 DNA :5' -CTC AGC TGT GTA ACA ACA TGA AGA TTG TAG GTC AGA ACT

[0156] CAC CTG TTA GAA ACT GTG AAG ATC GCT TAT TAT GTC CTA TC-3'

[0157] 引物 :5' -CAC AGC TGA GGA TAG GAC AT-3'

[0158] 报道基因 :5' -ATG TCC TAT CCT CAG CTG TG-3'

[0159] 在扩增过程中使用的两个温度是 45℃ 和 37℃。这一扩增步骤被整合并由洗涤机器进行,从而在印模之后所有的步骤都是自动进行的。开始使用一个扩增步骤从而最优化过程(反应浓度和时间)并确定所述检测灵敏度。

[0160] 使用上述研发的相同的细胞因子模型,在检测后使用两种方法去掉所述荧光基因:1) 使用一种可裂解的连接体结合荧光基团和报道基因 DNA。一个选择是光可裂解的 2-硝苯甲基连接体,这种连接体可以使用激光辐射 10 秒裂解(355 纳米)(Seo, et al, 2005 Proc Natl Acad Sci USA, 102 :5926-5931)。另一个选择是烯丙基连接体,这种连接体可以在三十秒内通过钯催化除去(Ju, et al, 2006 Proc Natl Acad Sci USA, 103 :19635-19640 ;Bi, et al, 2006 J Am Chem Soc, 128 :2542-2543)。2) 使用核酸内切酶消化双链 DNA。其优势在于没有发现序列特异性核酸内切酶能够裂解与 DNA 部分结合的报道基因。如果核酸内切酶不能被使用或者过于昂贵,就使用序列特异性限制性核酸内切酶。在这种情况下,在引物、环状 DNA 和报道基因的设计中要考虑裂解位点。使用上述方法评价荧光基团除去作用的功效,并且所得最佳的结果在随后的步骤中使用。

[0161] 设计用于多重细胞因子检测的环状 DNA 并应用于使用连续标记的多重细胞因子检测。根据上面显示的第一组序列设计另外三组引物、环状 DNA 和报道基因。总体策略是改变引物序列、报道基因和与引物互补的环状 DNA 部分,同时保持环状 DNA 的其他部分不变(如图 15 所示)。四种荧光基团分别与四个报道基因相结合。四种引物分别与四种检测抗体相结合。在该步骤中使用与初步研究中相同的荧光基团和抗体组。在检测步骤中,同时加入四种报道基因从而调节多重细胞因子检测的敏感度。通过在不同时间增加每种报道基因然后在扫描之后去掉来检测连续的标记。其目的的测定能够用于我们的系统检测的最大重复。另外,设计另外四种或者八种引物从而将每个实验中的细胞因子的总数扩展到八个或者 12 个。

[0162] 在一些实施方案中,上述步骤在计算机程序中,使用标准程序进行。设计这种程序从而在可编程的计算机上执行,可编程的计算机包括一只电子信息处理器、一种数据存储系统(包括记忆和/或存储单元)、至少一个输入设备和至少一个输出设备,例如,一种显示器或者打印机。在一些实施方案中,在获得数据(例如,细胞因子结合数据)的时候需要用到密码,在进行这里描述的功能时需要用到密码,或者为了产生输出信息(例如,评价过敏症状态)时需要用到密码,密码被用于一种或一种以上输出装置。每种计算机程序可以在更高级的程序语言或者面向对象的程序设计语言中执行,或者在装备或者计算机语言中执行。此外,所述语言还可以是一种编译语言或者解释语言。每种计算机程序可以储存在一种电脑可读的存储介质中(例如,在只读光盘机或者软磁盘中),当通过电脑阅读时,可以在计算机中进行信息处理,从而进行这里描述的分析。

[0163] 在操作中,关于图 21,用于计算免疫曲线 38 和提供临床诊断 (40) 的过程 30 包括确定的细胞型 (32),确定的分泌幅度 (34) 和确定反应因子 (36) 的出现率。

[0164] 表 4.

[0165]

显示了Th1、Th2和Th-17细胞型的表型曲线			
细胞型	Th1	Th2	Th-17
表面表型:			
CD3	+	+	+
CD4	+	+	+
IFN- γ R	+		
IL-12R β 2	+ 被 IFN- γ 上调	-	+
IL-23R	+		+ 被 IFN- γ 下调
Tim-3	+	-	?
细胞因子曲线:			
IFN- γ	+	-	-
IL-2	+	+/-	-
IL-4	-	+	-
IL-5	-	+	-
IL-6		+/-	+
IL-10	-	+ (m)	-
IL-12	-	-	-
IL-13	-	+	-
IL-17A	-	-	+
IL-17F	-	-	+
IL-22	-	-	+
IL-25	-	+	-
IL-31	-	+	-
IL-33	-	+	-
TNF- α	+	-	+

[0166] 其他的实施方式也包含在所附权利要求书中。

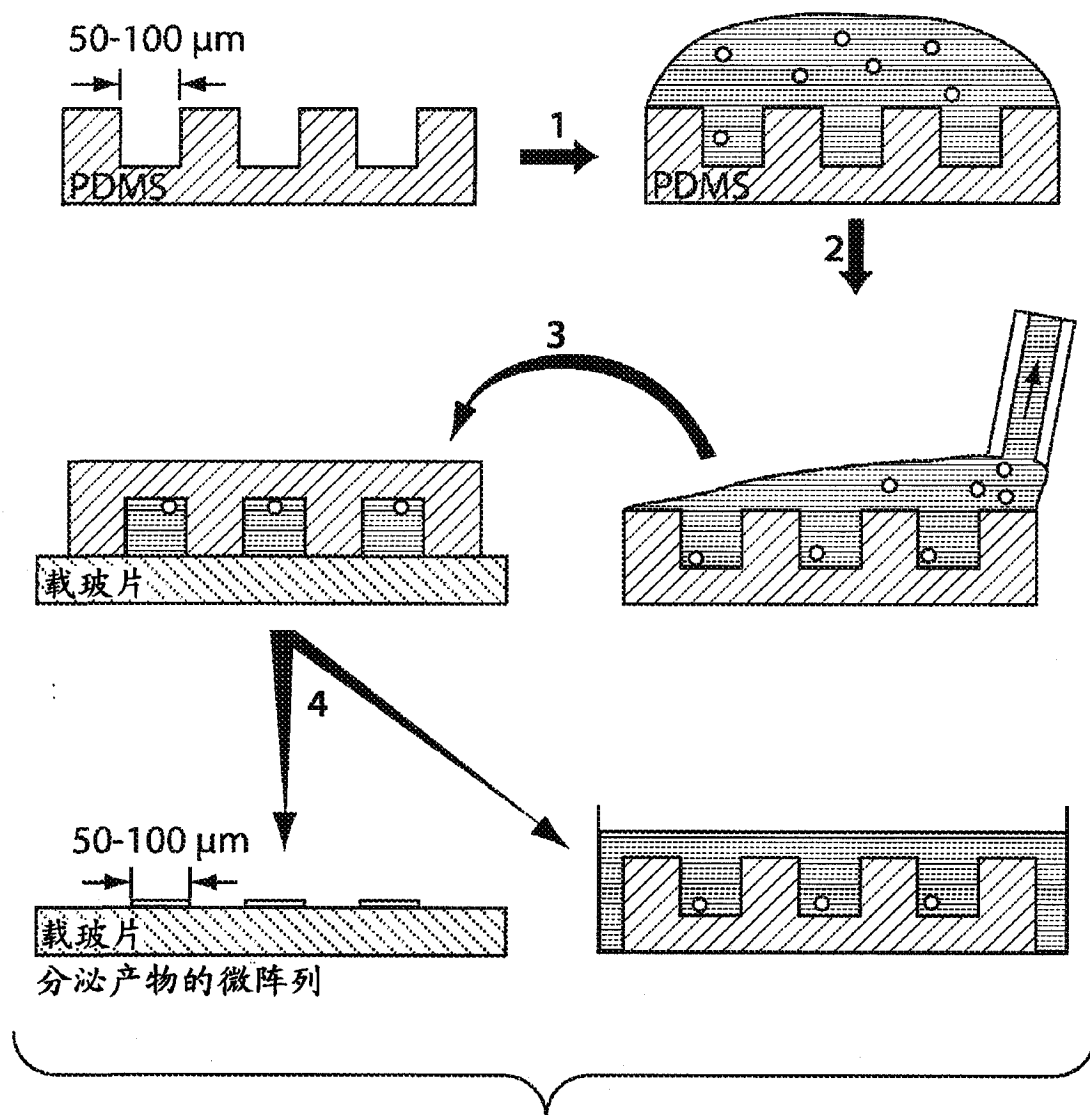


图 1

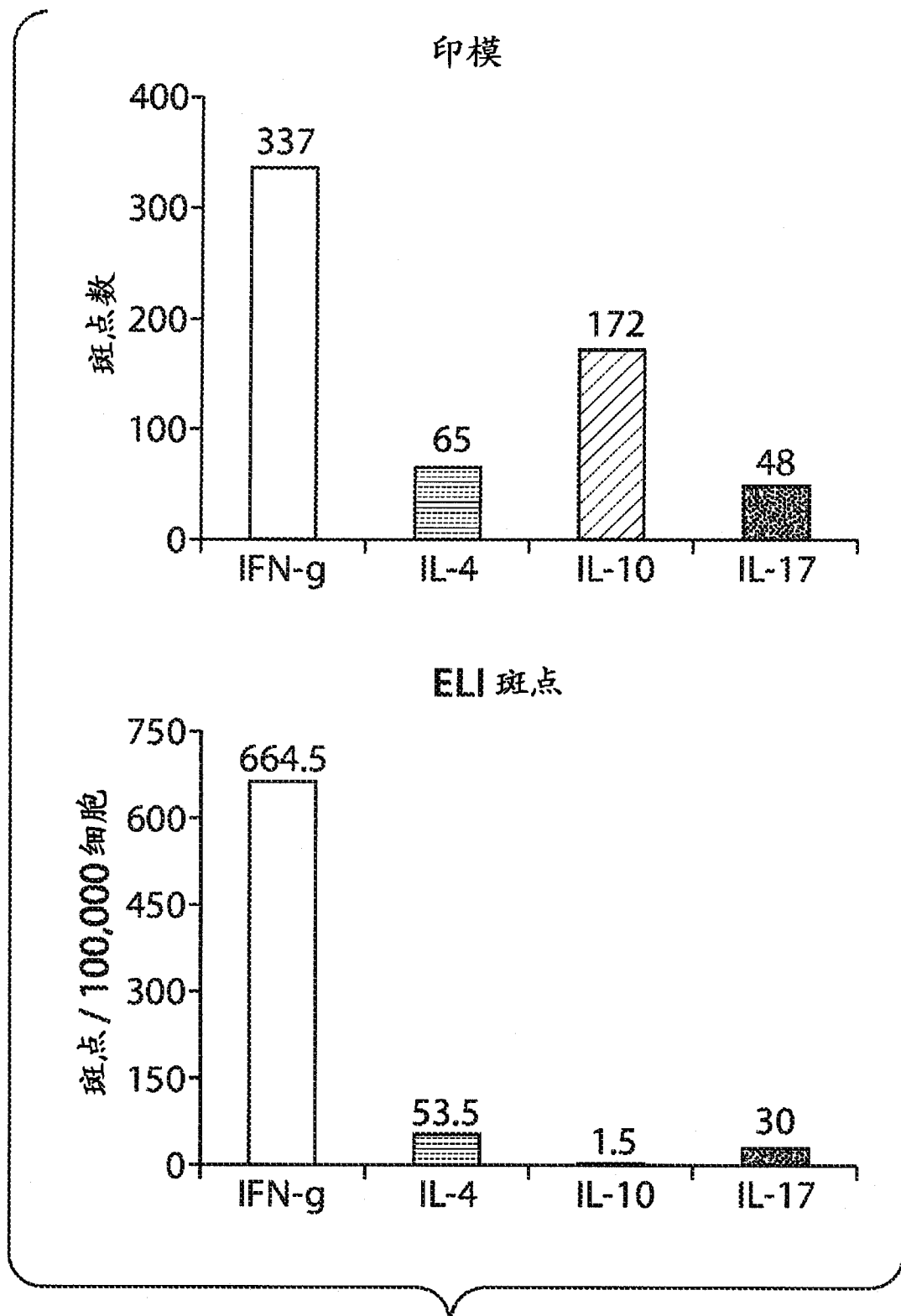


图 2

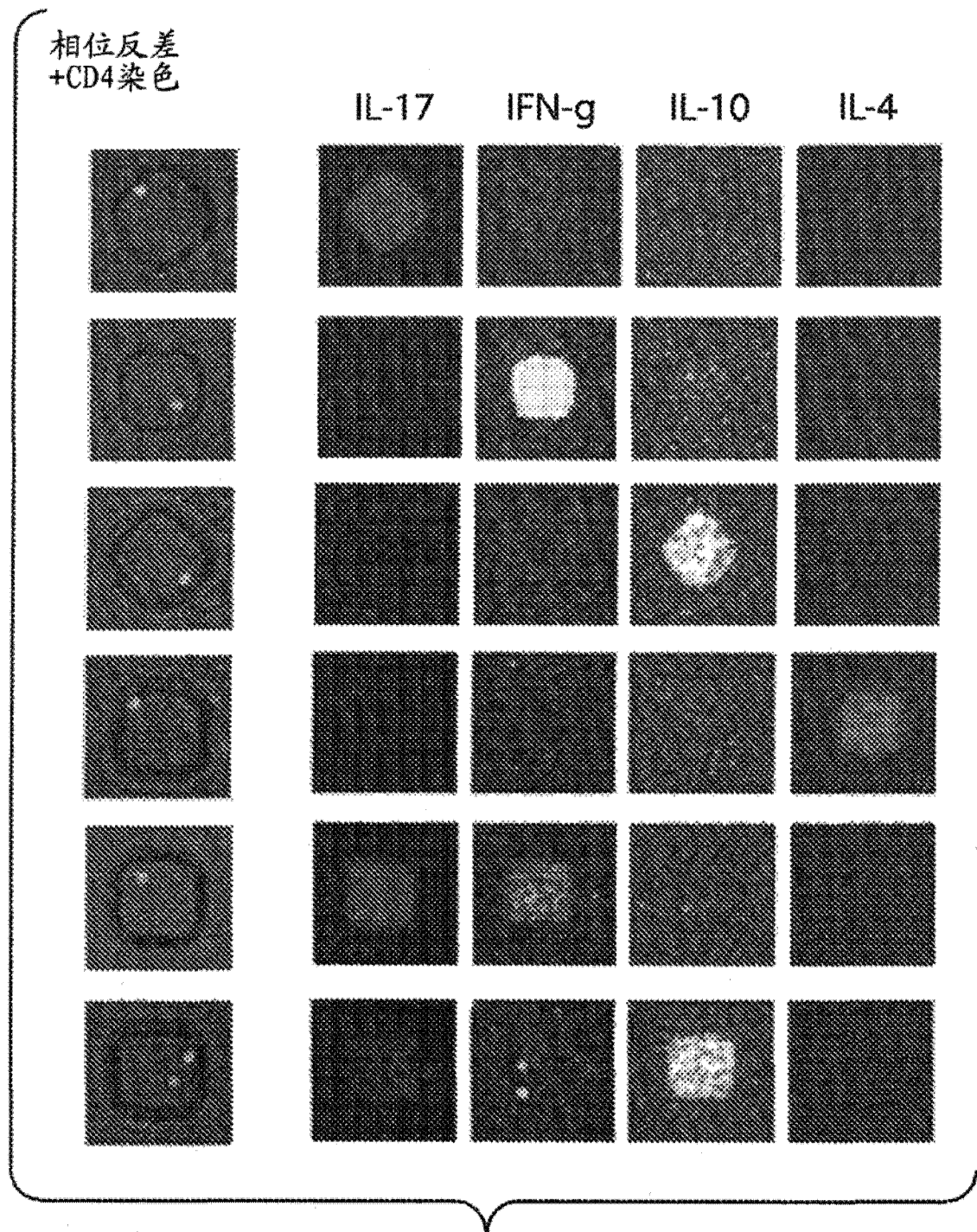


图 3

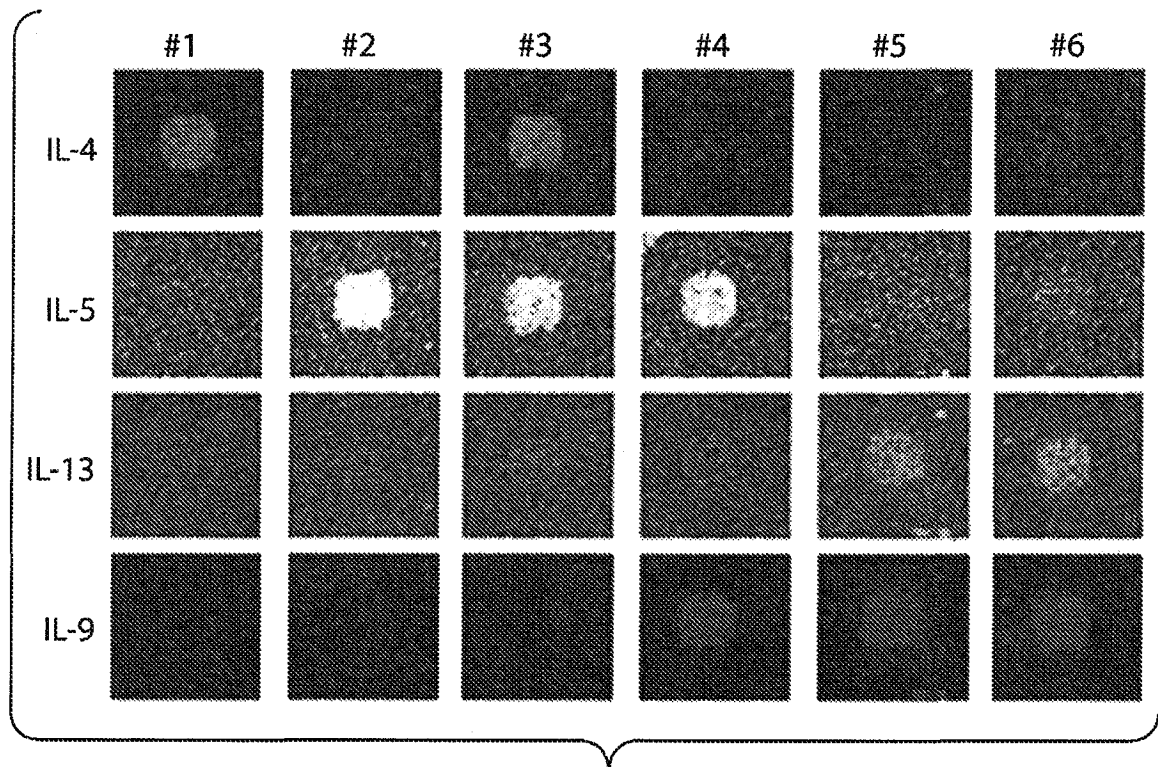


图 4

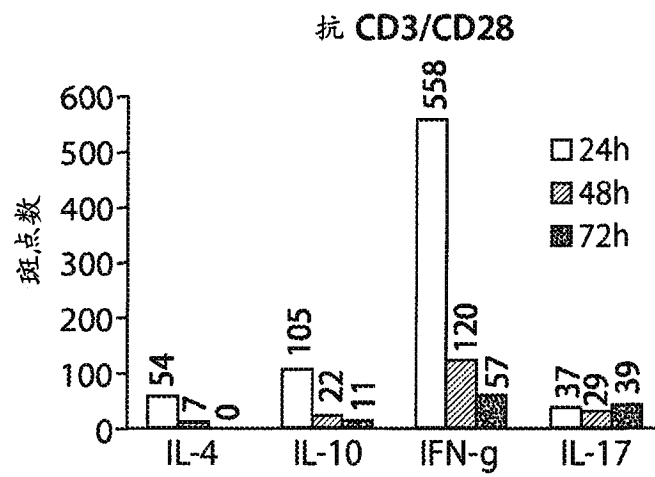


图 5A

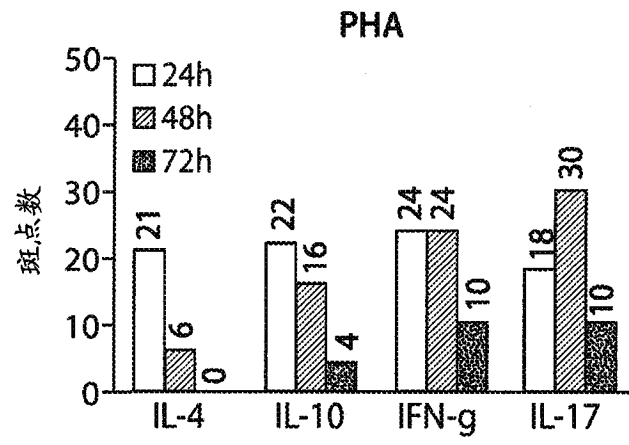


图 5B

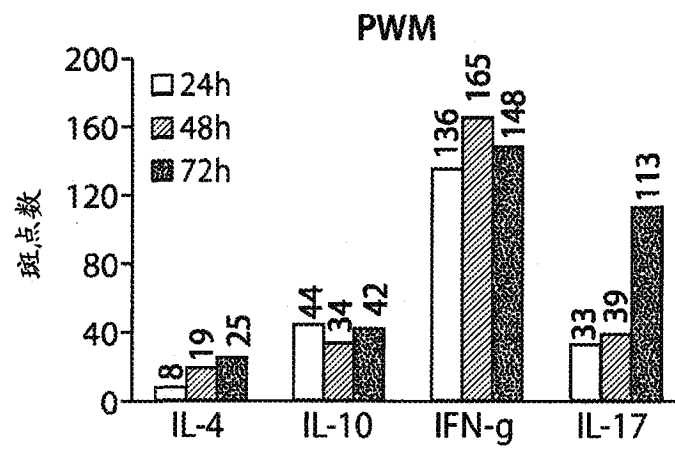


图 5C

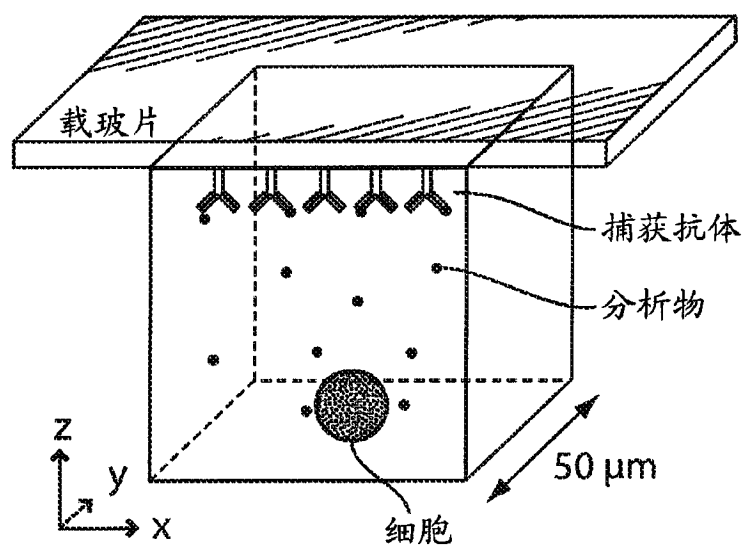


图 6A

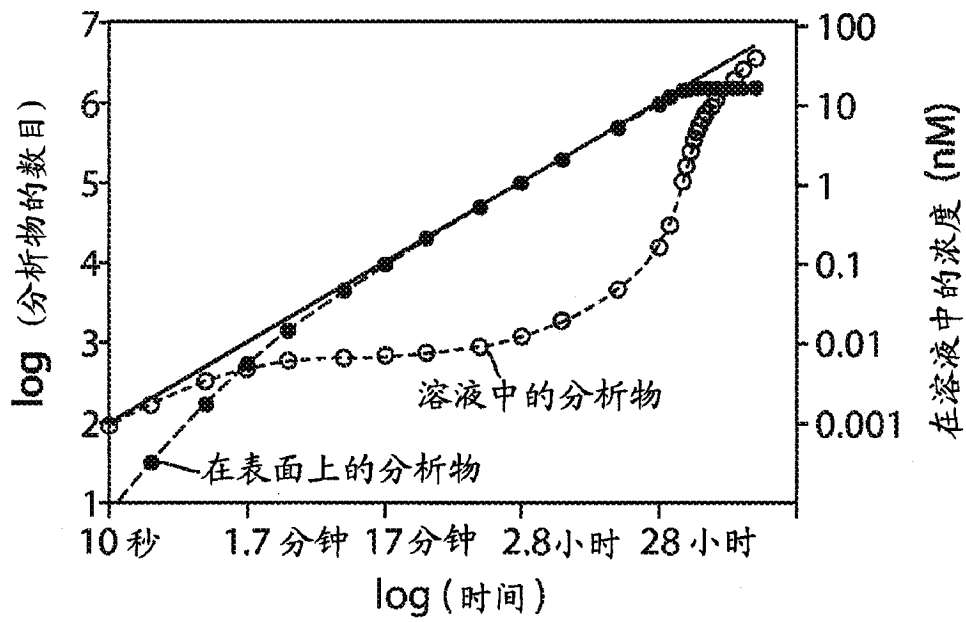


图 6B

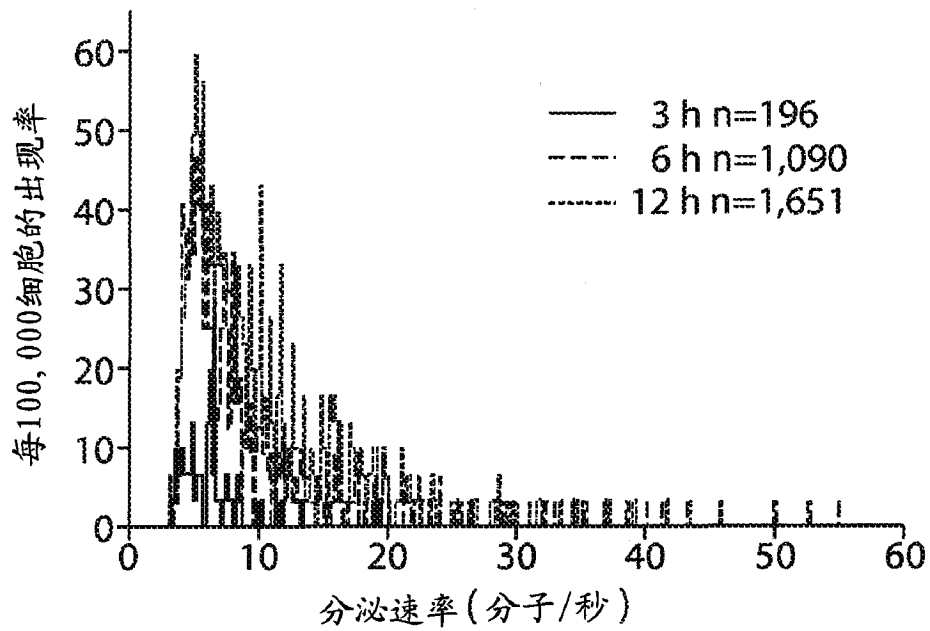


图 6C

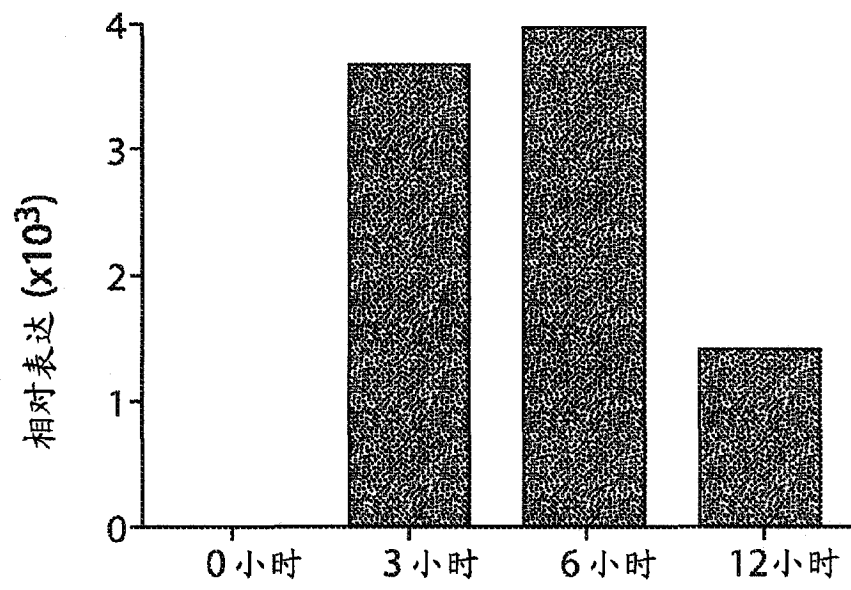


图 6D

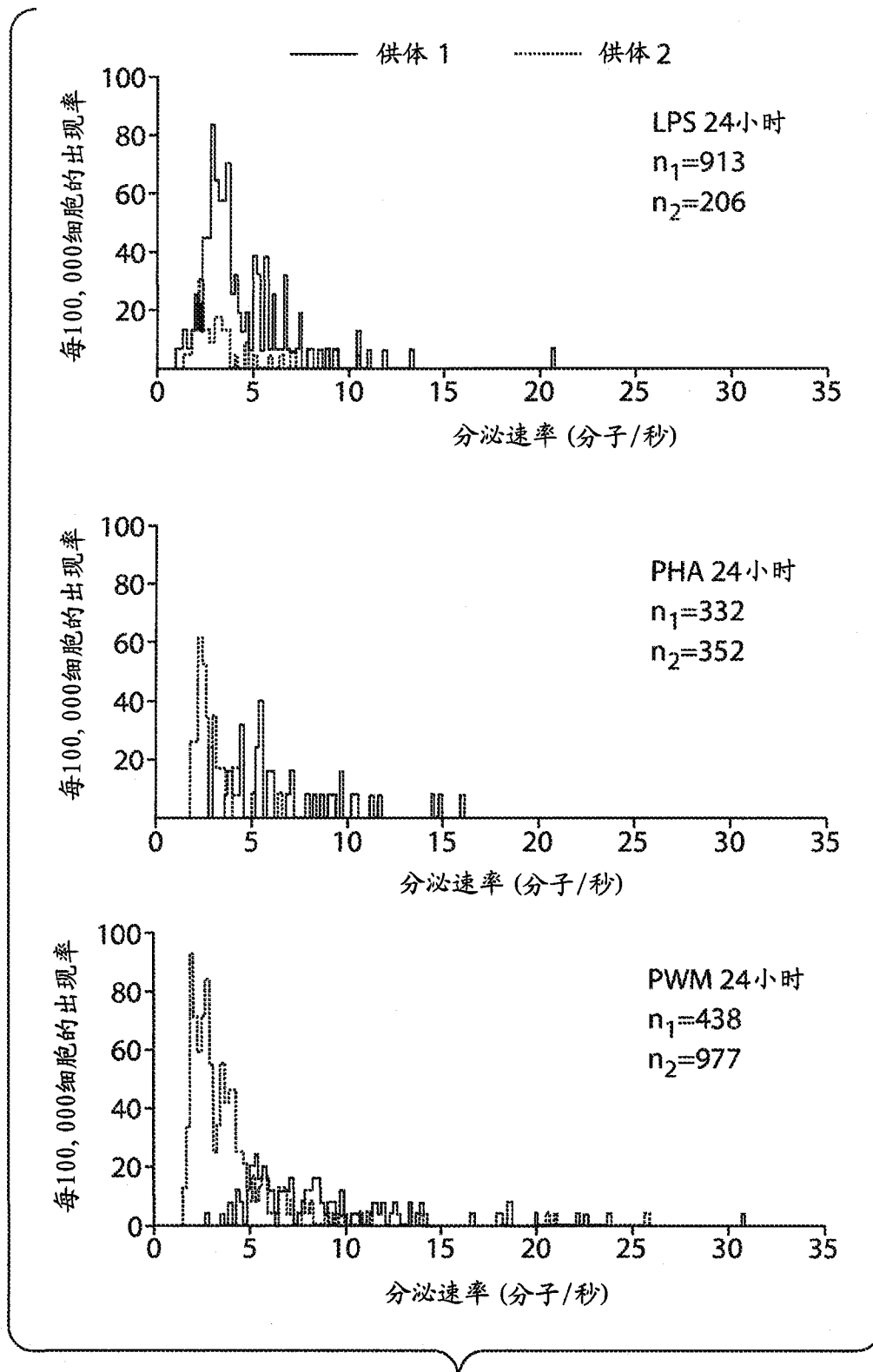


图 6E

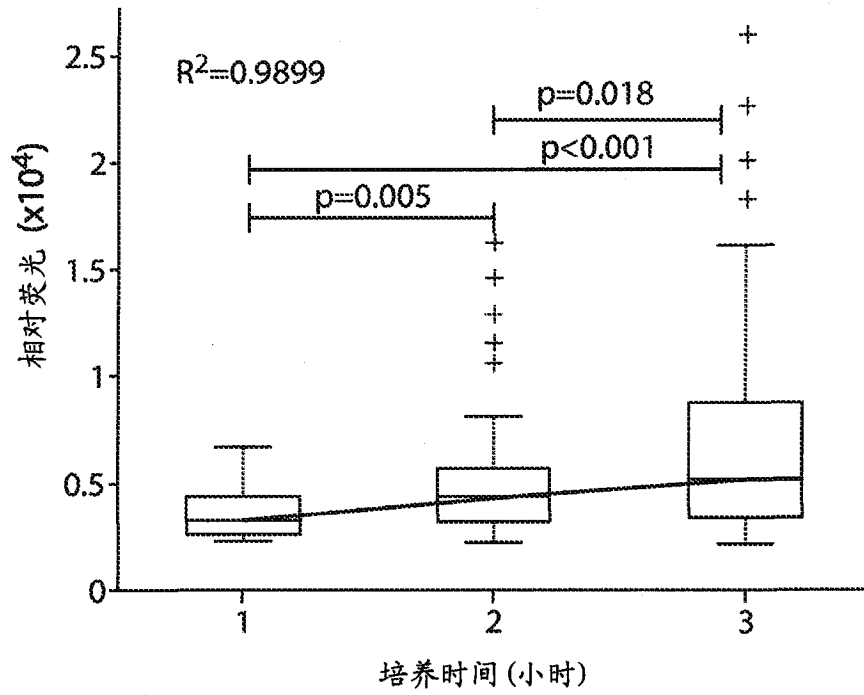


图 7A

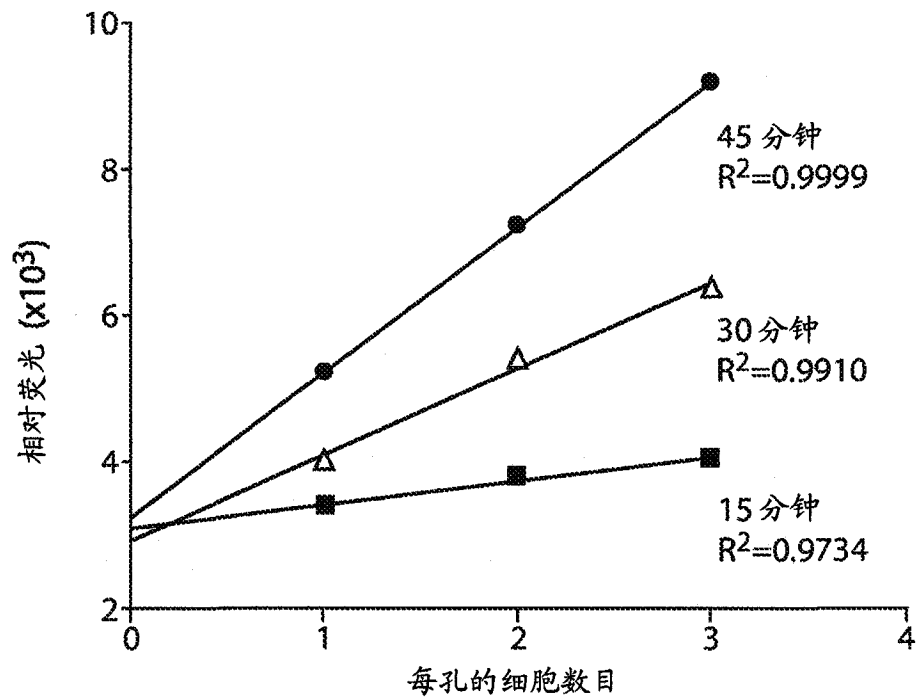


图 7B

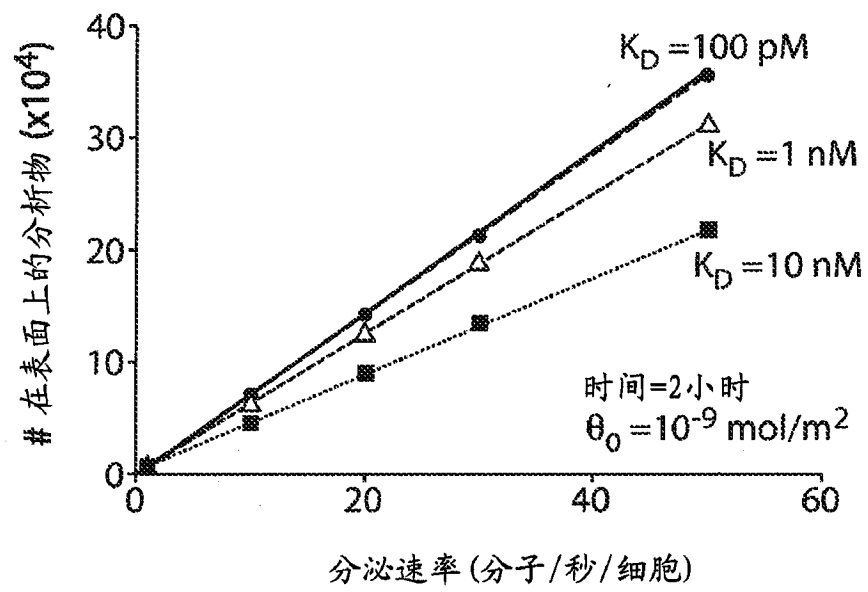


图 8

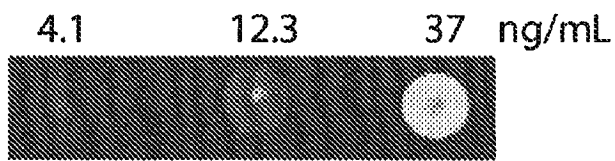


图 9A

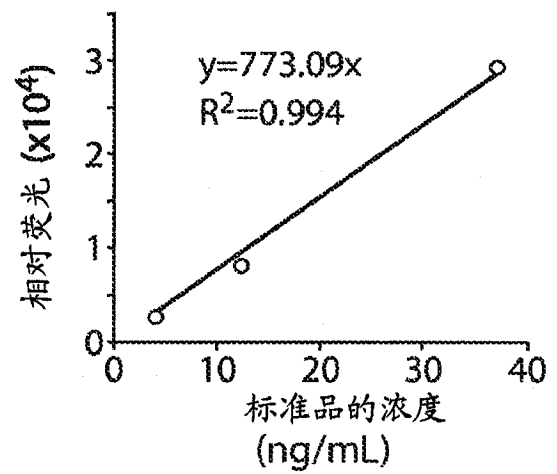


图 9B

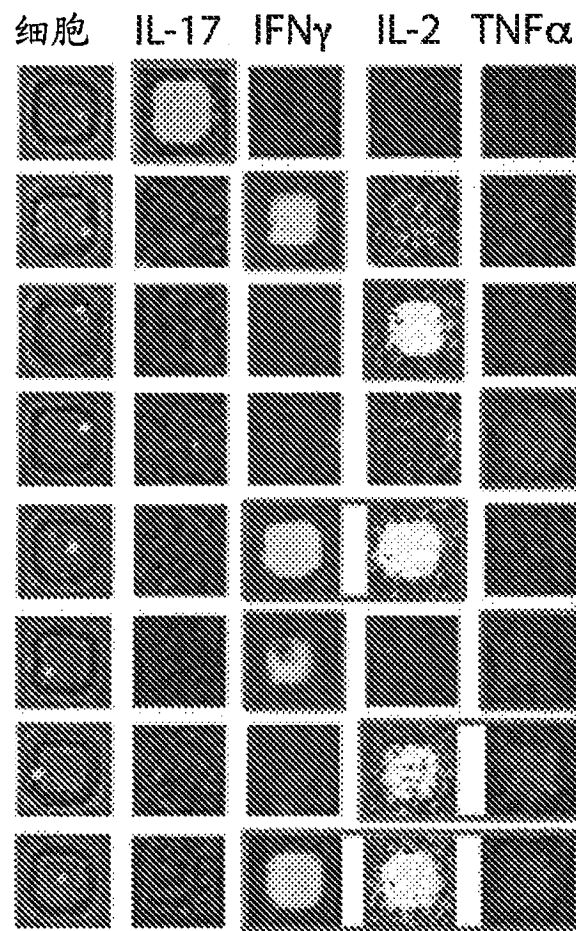


图 10A

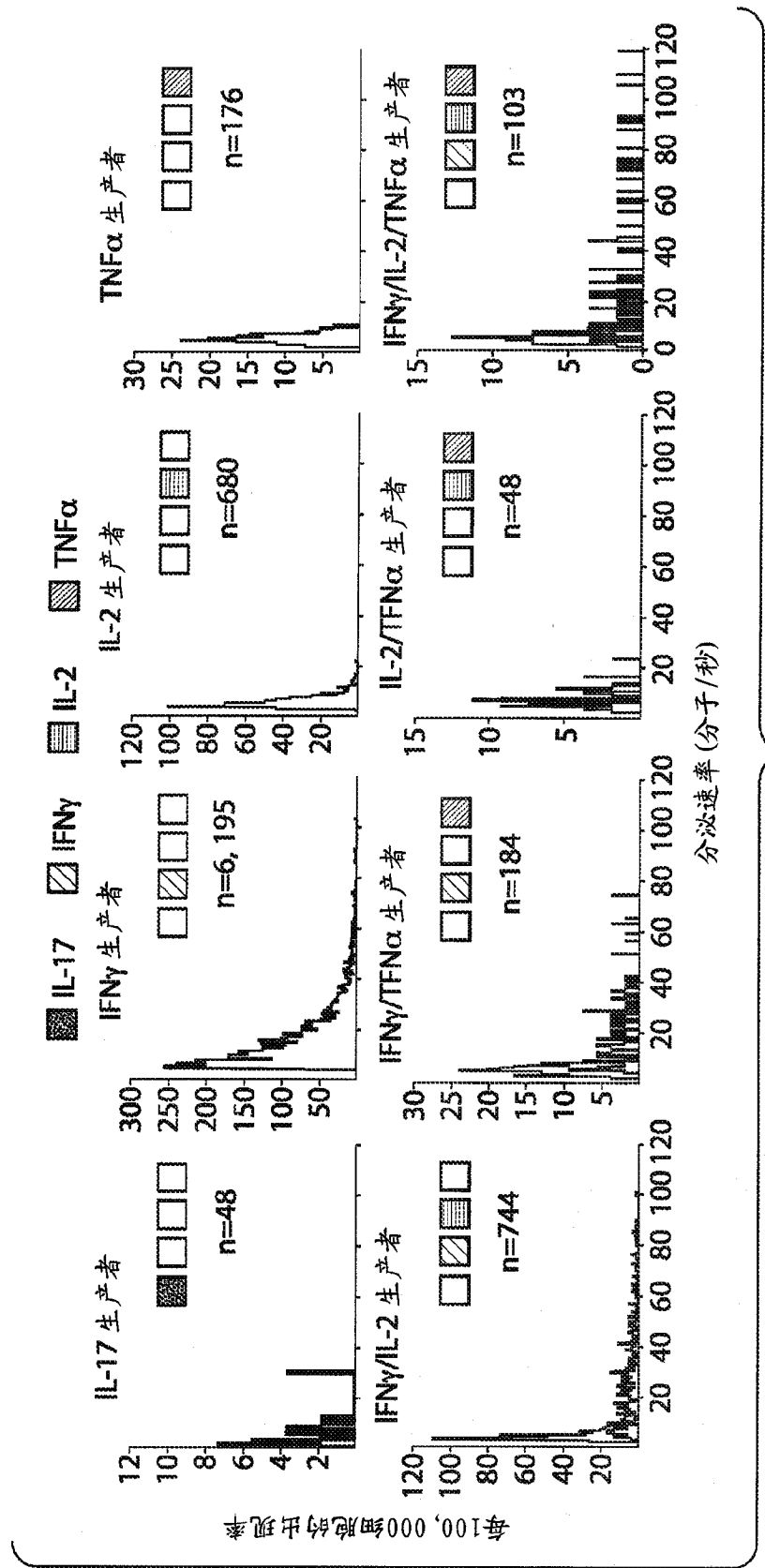


图 10B

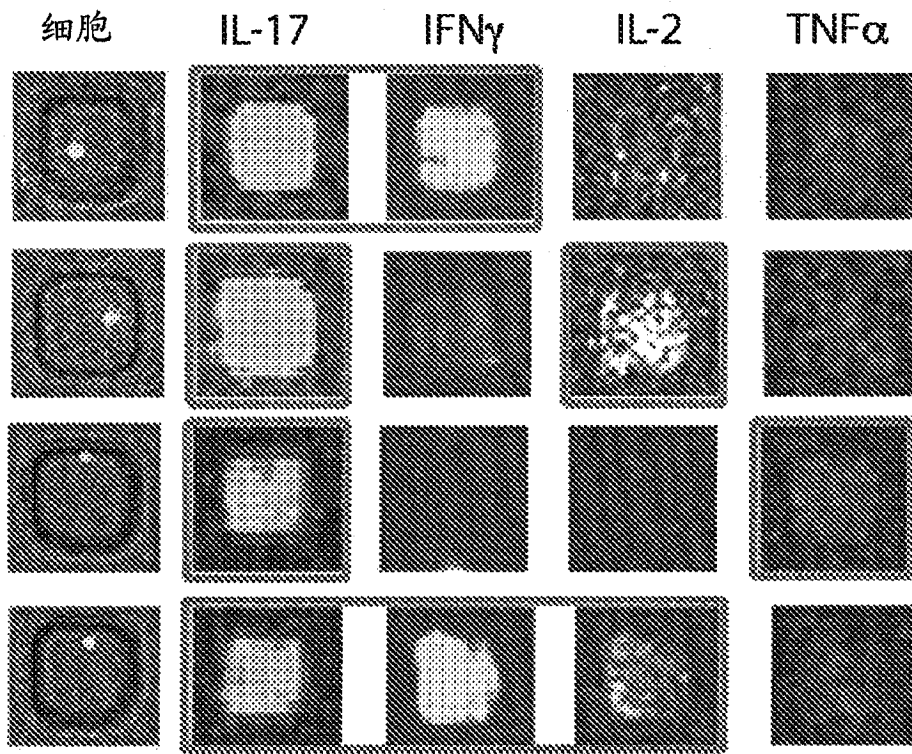


图 11

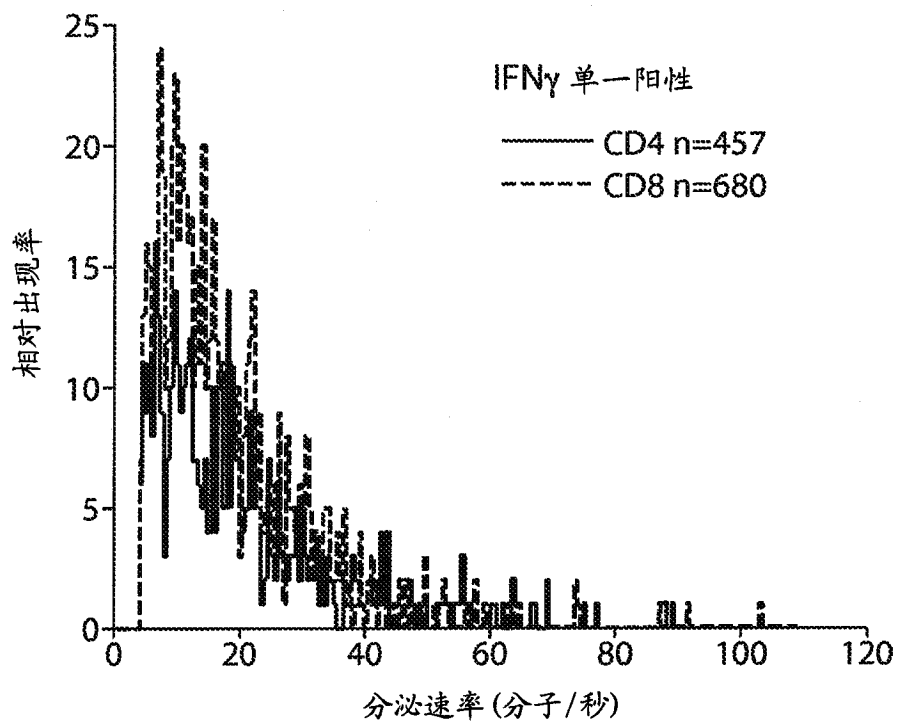


图 12A

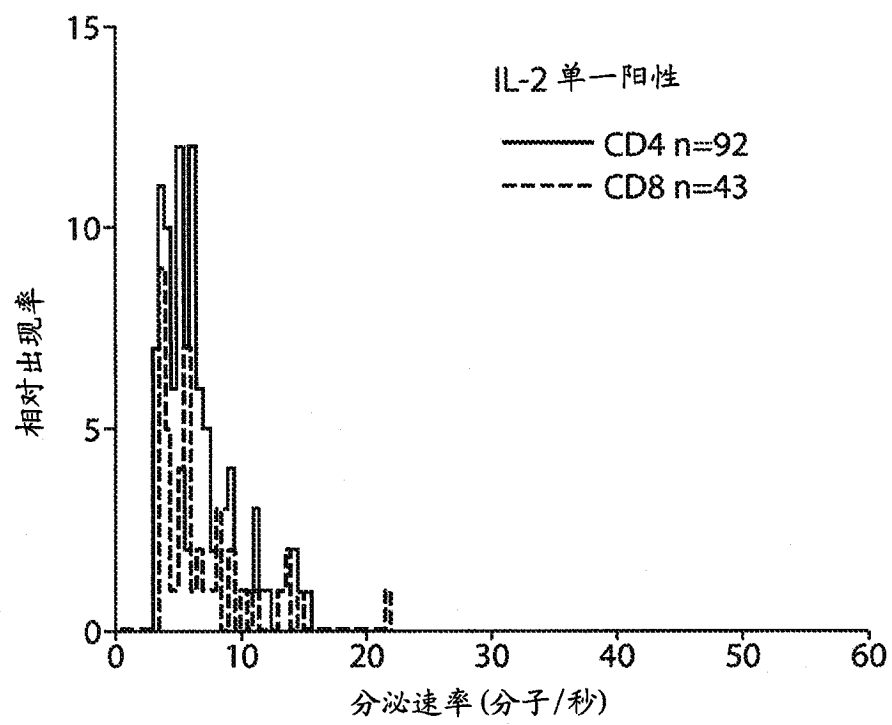


图 12B

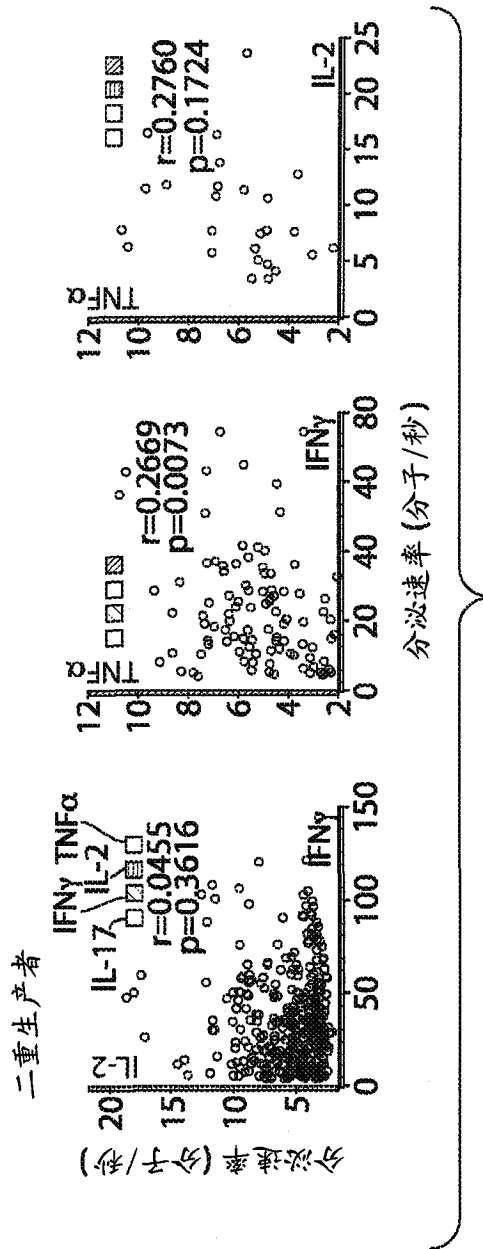


图 13A

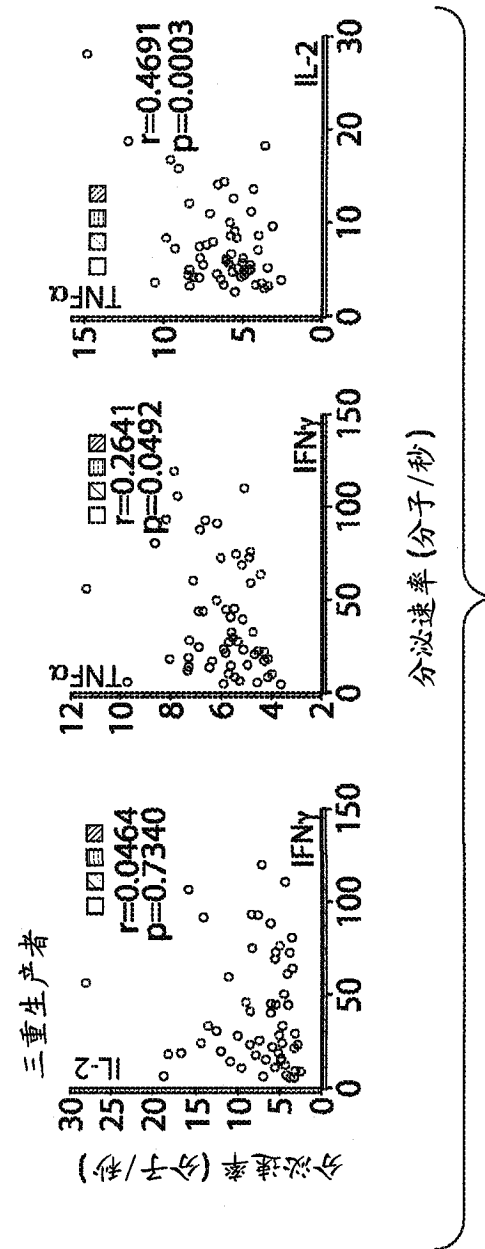


图 13B

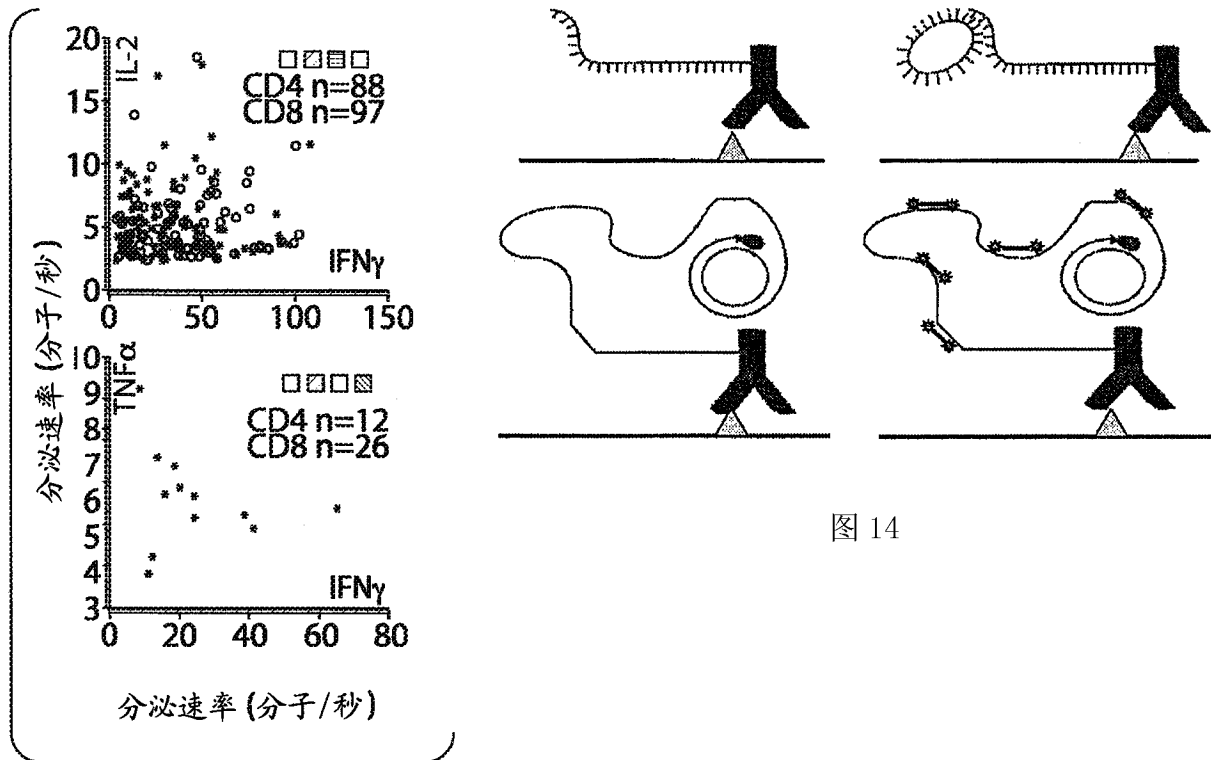


图 14

图 13C

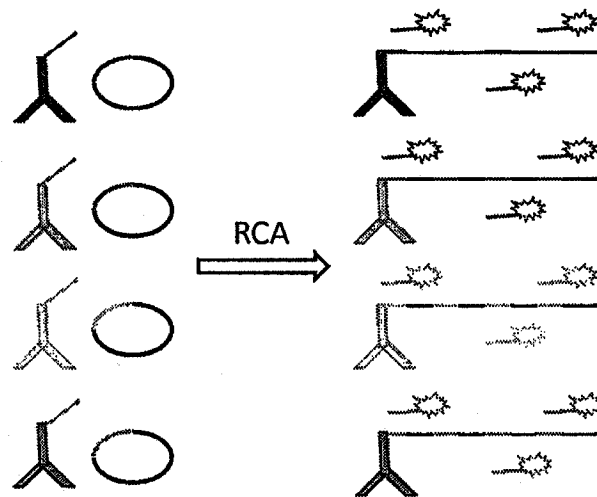


图 15

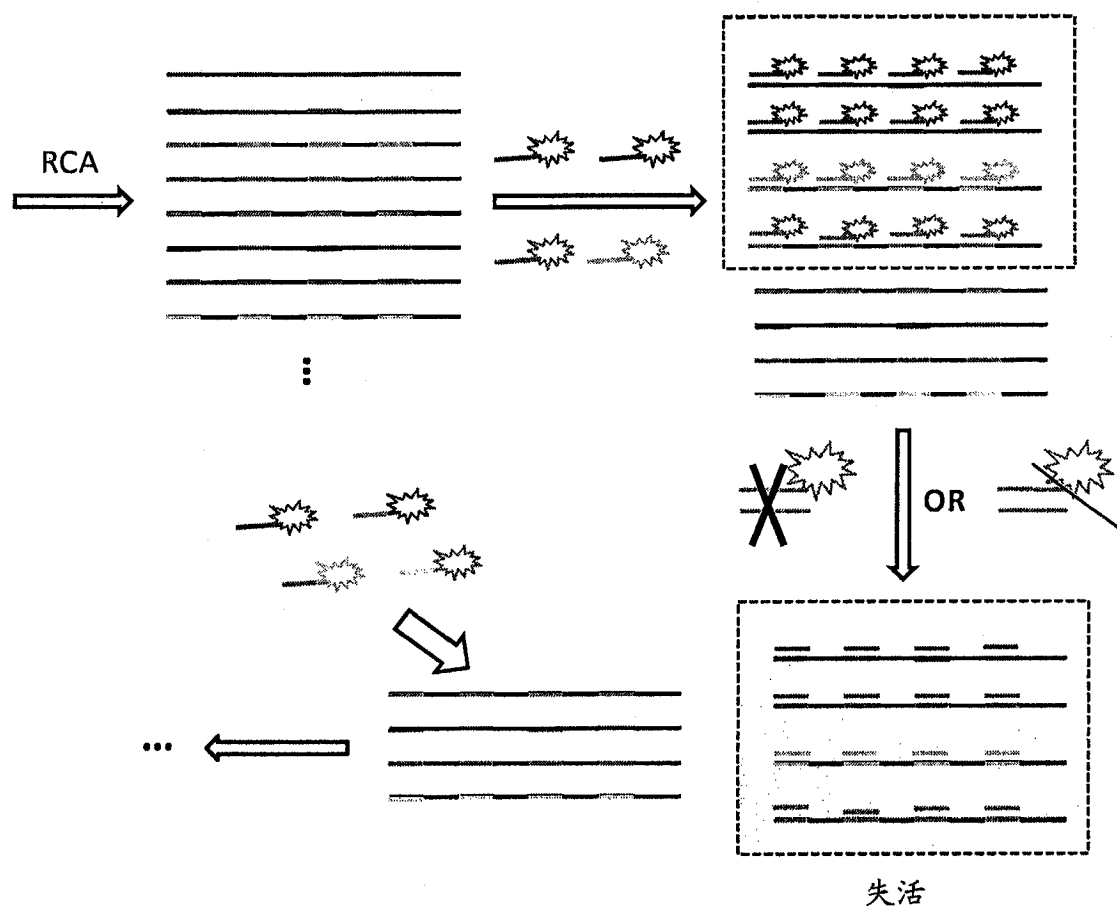
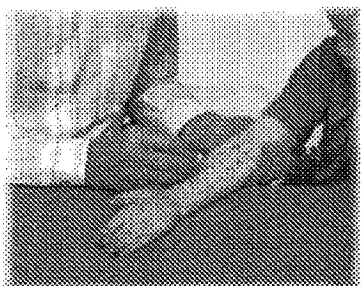


图 16

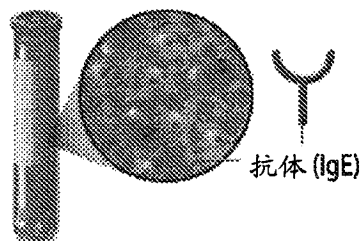
问题

现有的过敏检测

血液试验检测过敏性抗体、或者IgE的水平，所述过敏性抗体或者IgE在实验室中与一系列过敏原混合生产的



经皮（皮肤点刺）测试



-IgE的血清试验（RAST或ELISA）

皮肤试验

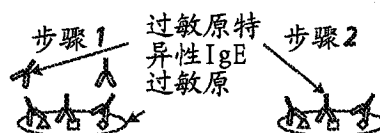
- 过敏原组的多针扎伤
- 测定短期和长期免疫反应
- 表面炎症的定量评价
- 婴幼儿和家长的惨痛经历
- 通常在儿童病史中使用单一数据点

免疫吸附试验

- 微创取血（5毫升样品）
- 测定IgE抗体的血清滴定度
- 抗体的泛特异性并发症和其他病症提升的水平（艾滋病毒，皮肤病，寄生虫）
- 不可预计的-单一参数
- 时间挑战的相关性

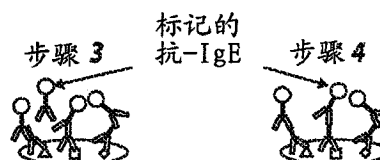
食物挑战

- 使用不同食物（怀孕能够诱导反应的食物）进行的双盲试验
- 不能对有严重（过敏）反应病史的病人使用



与过敏原碟一起培养血清样品。在这一步骤中，对多种过敏性成分具有特异性的IgE分子与过敏原碟相结合

使用含有去污剂的缓冲液洗涤除去未能特异性结合的蛋白质。只有与IgE特异性结合的蛋白质留在碟上。



该碟子与标记的抗-人IgE抗体一起培养，其中，所述抗体在碟子上与IgE特异性结合。标记的抗体结合量与碟子上存在的IgE的量成正比。

使用包含去污剂的缓冲液洗涤未结合的抗体



通过标记抗体与酶底物（EIA）的反应，或者通过计算放射活性（RAST）定量特异性IgE。

图 17-1

过敏的免疫基础

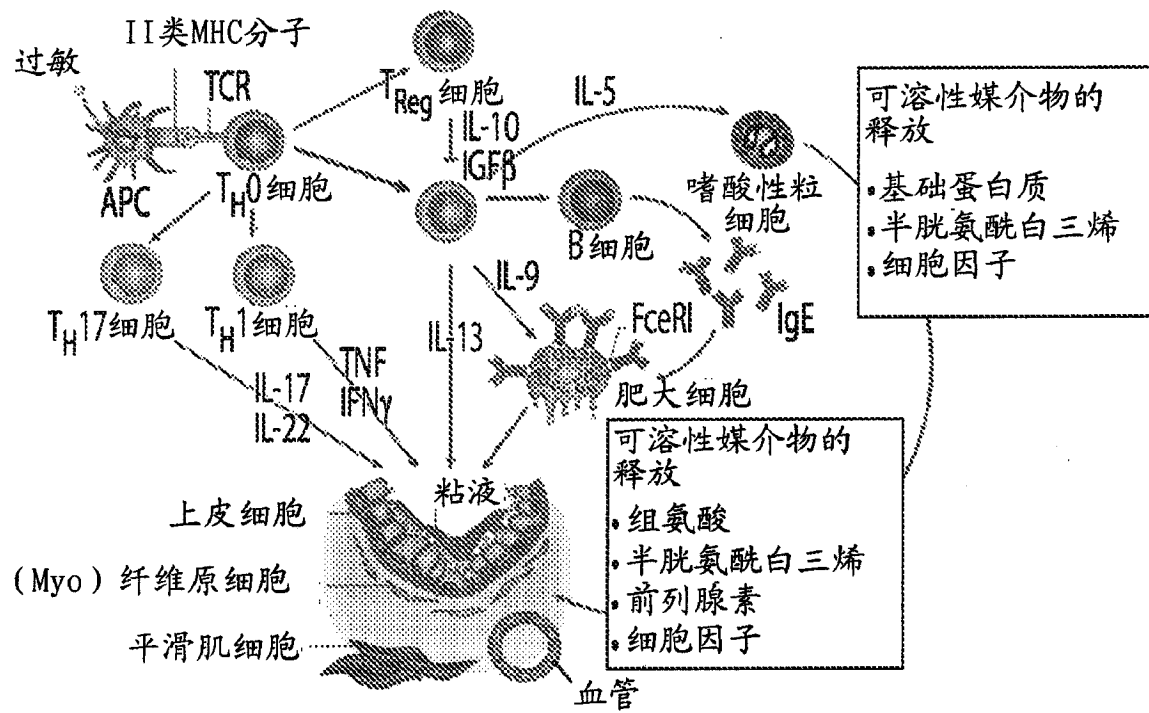
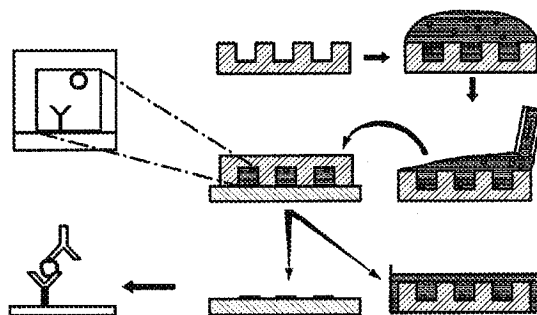


图 17-2

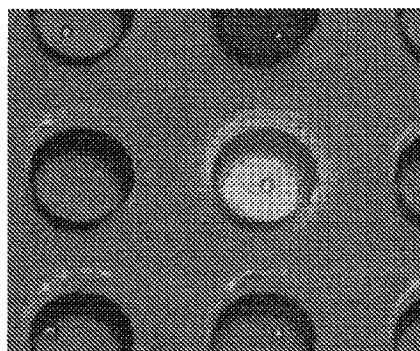
微雕刻技术的执行



微雕刻方法的示意图

它如何工作

- 悬浮在媒介物中的细胞沉积在大的微孔阵列上，所述微孔阵列在聚（二甲基硅氧烷）载玻片上模压而成，并允许从悬浮液中沉降到微孔中，密度为大约1细胞/微孔。
- 然后将装载的微孔插入载玻片中，所述载玻片涂布有一种特异性捕获试剂（例如，抗-细胞因子）。
- 在培养一段时间之后，除去微孔并应用一种第二载玻片，所述第二载玻片涂布有一种不同的捕获试剂（例如，抗-IgG和抗-IgM）。
- 使用荧光标记的检测试剂和基于激光的荧光扫描仪检查所得微阵列。
- 在印模之后，在微孔中的细胞可以进行原位染色，用于随后的免疫荧光成像。



Nature Biotechnology, 24, 703-707 (2006)

Clinical Immunology, 129, 10-18 (2008)

Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 17902-17907 (2008)

J. Immunol. Methods, in press (2008)

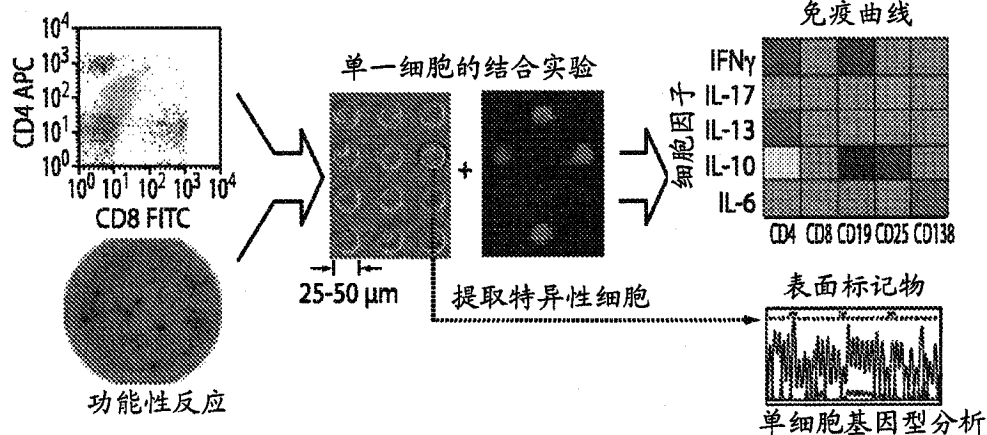
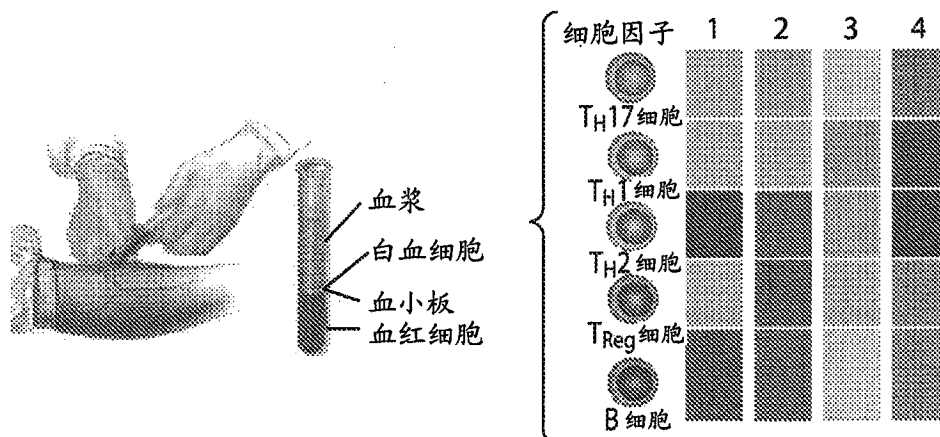


图 18

过敏性反应的溶液曲线



阐明过敏个体的独特的免疫曲线

- 从病人体内吸取全血，并分离所感兴趣的细胞。
- 用过敏原刺激细胞并用于微雕刻技术。
- 所得细胞微阵列读作“过敏阵列”，其能够针对所关心的抗原的反应性提供特异性数据。

该诊断的优点：

- 制备完整的过敏曲线只需要小体积的血液，因此可以对儿童/婴儿进行过敏实验。
- 在一段时间内进行诊断，从而评价病人在一段时间内的反应性，以及有效的测量免疫治疗的功效。
- 来自“过敏阵列”的数据被用于预计对相关过敏原的交叉反应性。

特异性IgE捕获

(Hitachi, Alerchek, Immulite)

- 过敏原的限制性数目
- 不可放大 (\$2 / 过敏原)

免疫CAP

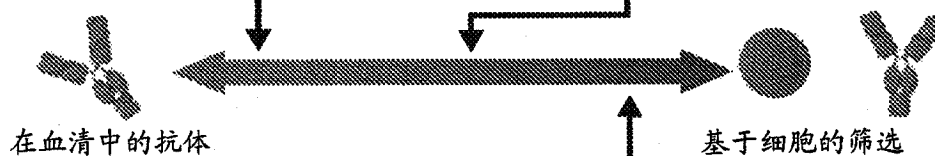
(Phadia, Quest Diagnostic)

- 高敏感性
- 小文库 (< 20 过敏原)
- 大体积 (5毫升样品)
- 不明确-需要跟进
- 对细胞没有数据

ELISPOT assays

(AID, MAbTech)

- ab产生细胞上的数据，
- 大过敏原文库的试验
- 对ab产生细胞类型没有数据
- 低敏感性和处理量
- ~每个过敏原250,000个细胞



改进的过敏症检测

- 细胞和IgE/IgG4的结合试验
- 高通量和高含量
- 数字敏感性
- 低体积，低成本
- ~每个过敏原10,000个细胞

图 19

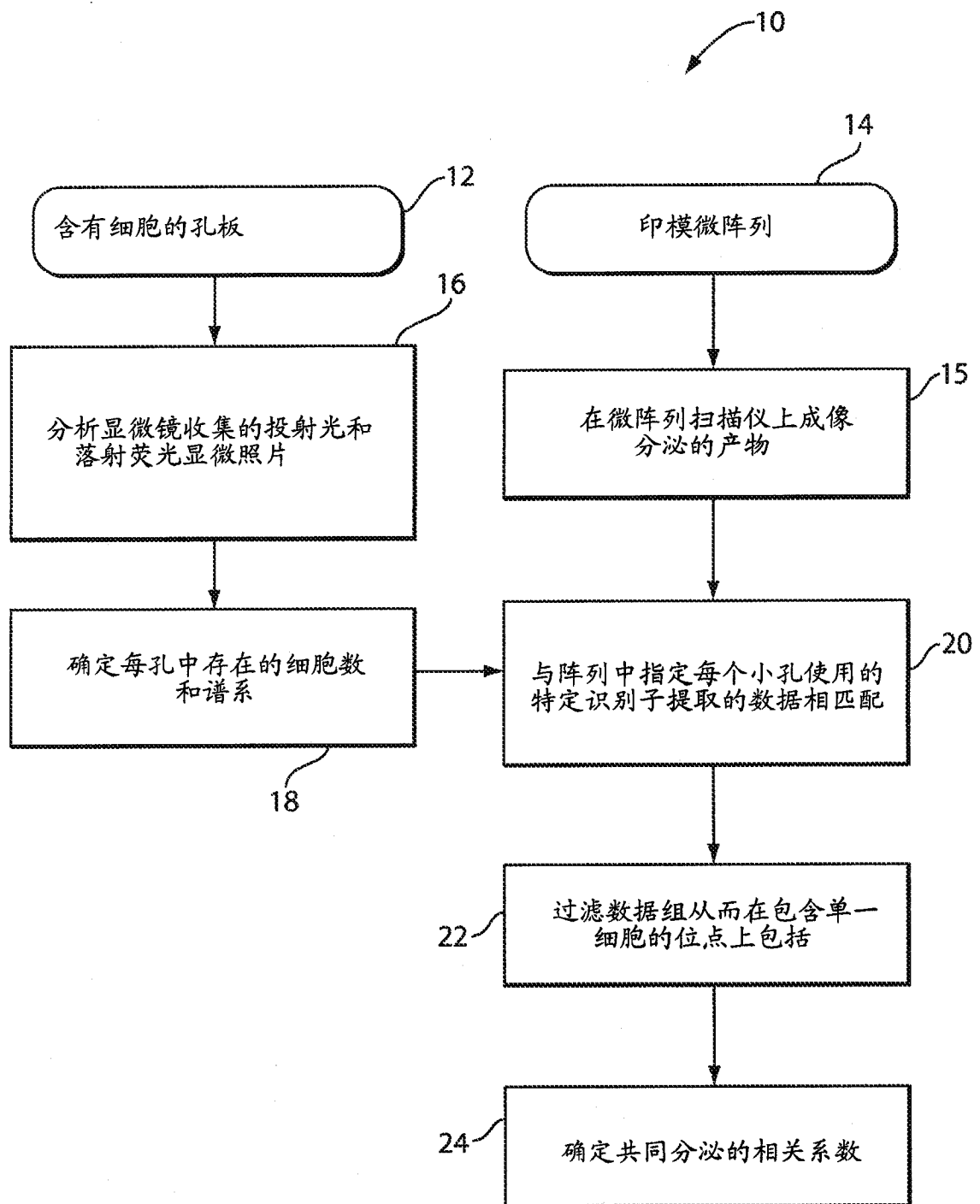


图 20

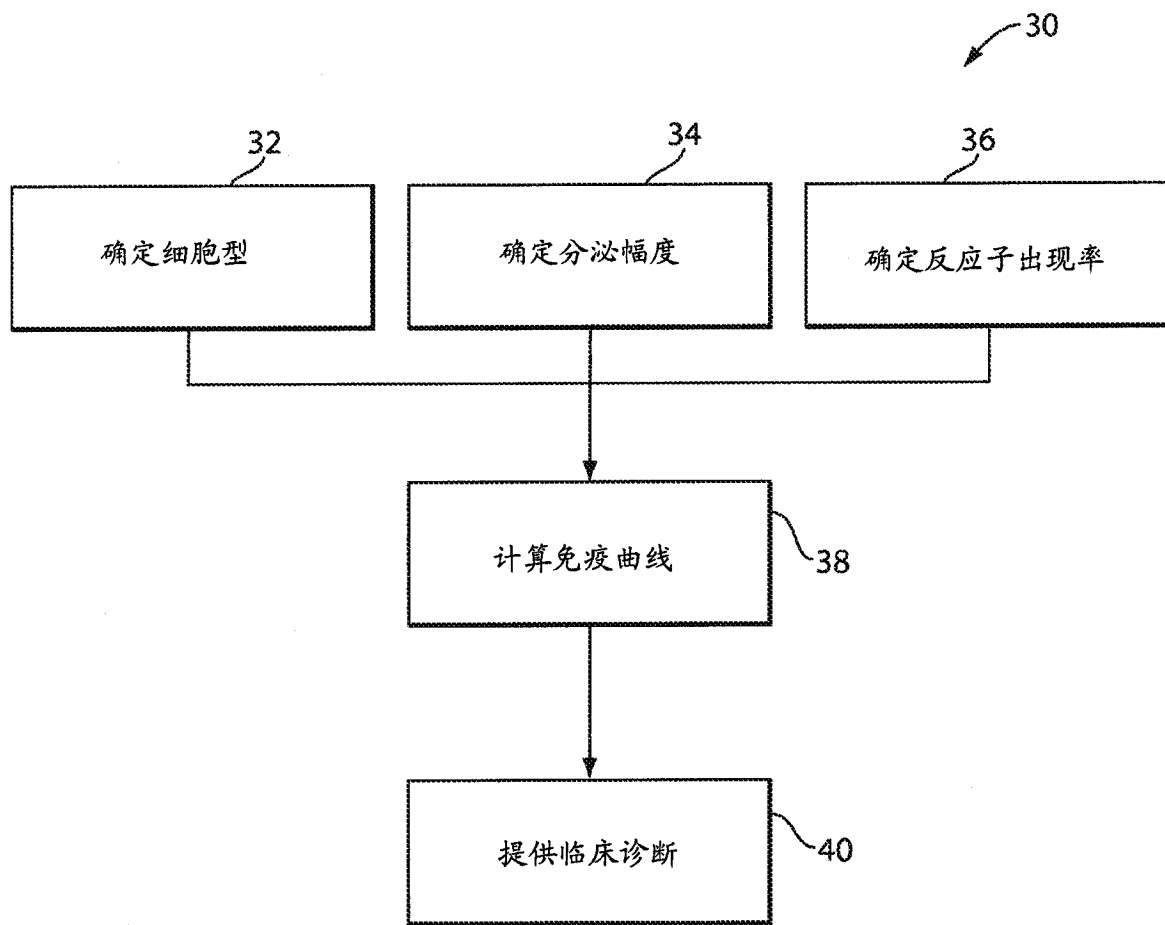


图 21

专利名称(译)	诊断过敏反应的方法		
公开(公告)号	CN102308213B	公开(公告)日	2014-10-29
申请号	CN200980156181.4	申请日	2009-12-04
[标]申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
当前申请(专利权)人(译)	麻省理工学院		
[标]发明人	JC洛夫 韩庆 V特瑞珀拉恩尼		
发明人	J·C·洛夫 韩庆 V·特瑞珀拉恩尼		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/54366 G01N33/6854 G01N33/5047 G01N33/6863		
优先权	61/120033 2008-12-04 US		
其他公开文献	CN102308213A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种单一细胞中多重细胞因子检测方法，其目的是产生疾病的免疫曲线。

