



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106222137 A

(43)申请公布日 2016.12.14

(21)申请号 201610711060.3

(22)申请日 2016.08.24

(71)申请人 南昌大学

地址 330031 江西省南昌市红谷滩新区学府大道999号

(72)发明人 胡萍 魏强 辛洪波 何晶晶

(74)专利代理机构 南昌市平凡知识产权代理事务所 36122

代理人 夏材祥

(51)Int.Cl.

C12N 5/0781(2010.01)

G01N 33/53(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法

(57)摘要

一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法,是利用已辐照的3T3-CD40L细胞作为饲养层细胞,10%FBS的IMDM作为基础培养液,IL-2、IL-21作为生长因子,体外诱导记忆B细胞活化成浆细胞并分泌抗体的过程。本发明所述培养方法操作简单,成本较低,所需记忆B细胞数量少,活化效率以及活化质量高。

1. 一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法,其特征是:

(1)记忆性B细胞的获取:无菌环境下采集志愿者的全血,用淋巴细胞分离液从新鲜的抗凝全血中分离出人外周血单核细胞,再使用人记忆性B细胞磁珠分选试剂盒从外周血单核细胞中分离出记忆性B细胞;

(2)记忆性B细胞的体外活化培养:将分选所得的记忆B细胞按照0细胞/孔、5细胞/孔、20细胞/孔的密度接种96孔细胞培养板,10%FBS的IMDM作为基础培养液,培养液中含30ng/mL的IL-2和60ng/mL的IL-21以及5000cGy 的⁶⁰Co照射灭活的3T3-CD40L细胞以10000/孔作为饲养层细胞,在37℃,5%CO₂条件下培养13d,让记忆性B细胞活化成为可以分泌抗体的浆细胞;

(3)ELISA检测记忆性B细胞体外活化成浆细胞后分泌性的IgG抗体:收集步骤(2)中的细胞培养上清,使用Goat Anti-Human Kappa 蛋白和Goat Anti-Human Lambda蛋白包被酶标板,采用酶联免疫吸附测定方法检测记忆性B细胞的培养基上清,确定IgG抗体的分泌量;

具体步骤如下:

(A)用50μL/孔包被液将Goat Anti-Human Kappa 蛋白和Goat Anti-Human Lambda蛋白,各100ng/孔,包被酶标板,4℃过夜,洗板机洗板5遍,洗液为含0.05% Tween的PBS;

(B)用封闭液200μL /孔,37℃封闭2h,洗板5遍;

(C)分别在对应孔中加入细胞培养上清,或者梯度稀释的IgG标准品,同时用水或PBS作为阴性对照,50μL/孔,37℃放置1h,洗板5遍;

(D)分别在对应孔中加入1:5000稀释的HRP标记的Goat Anti-Human IgG,以及1:10000稀释的Goat x-human IgG-Fc Fragment HRP Conjugated 50μL/孔,37℃放置45min,洗板5遍;

(E)加入显色液100μL/孔,室温避光显色15min;

(F)加入2moI/L硫酸50μL/孔,终止显色反应,检测OD_{450nm},参考波长为630nm,表5为ELISA检测细胞培养上清IgG的OD值。

2. 根据权利要求1所述的一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法,所述记忆B细胞是任意一种有潜力转化成浆细胞并分泌抗体的人记忆B细胞。

一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞培养方法。

背景技术

[0002] 记忆性B细胞是初次免疫应答后克隆消除保留下来的高亲和力细胞,它是机体重要的免疫细胞,在体液免疫中扮演着十分重要的角色,对浆细胞的产生、抗体的生成以及持久的免疫保护起关键的作用。记忆性B细胞的长期免疫记忆机制在临床治疗、疫苗研制以及全人源单抗药物研发方面起着重要的指导作用。由于人外周血淋巴细胞中浆细胞数量少,提取困难,即使能少量的被提取,但其提取方法繁琐,成本高,获得率低,不适宜推广,因此体外活化外周血记忆B细胞的研究成为了热点。

[0003] 在20世纪80年代,就有研究者使用人类同种异体辅助性T细胞来诱导B细胞增殖、分化。2002年,Bernasconi等发现TLR9激动剂CpG与IL-15可促进类别转换的记忆B细胞增殖。2004年,Crotty等应用美洲商陆丝裂原(PWM)、葡萄球菌A蛋白(SAC)以及CpG激活了记忆B细胞。2007年,Ertesvag等证实维生素A酸(RA)可增强CpG介导的CD27+记忆B细胞的增殖。2009年,Pinna等使用TLR7/8激动剂R848、IL-2、CD40L转染细胞可选择性地活化记忆B细胞。2011年,Wand等运用活化的树突状细胞、T细胞和B细胞之间相互作用诱导了抗原特异性抗体的产生。这些组合均不同程度的活化了记忆B细胞。

[0004] 虽然上述组合均成功的活化了记忆B细胞,但它们或多或少存在以下缺点:活化效率不高,活化质量低下,操作繁杂,成本昂贵。针对目前体外活化记忆B细胞的不足,本发明中,我们利用IL-2、IL-21、饲养细胞以及少量的记忆B细胞,在体外高效活化了记忆B细胞,为制备高亲和力、治疗性全人源单克隆抗体药物提供了牢固的研究基础。

发明内容

[0005] 本发明的目的在于针对目前体外活化记忆B细胞的不足,提供一种人记忆性B细胞的体外活化培养方法。

[0006] 本发明是利用辐照的3T3-CD40L细胞作为饲养层细胞,10%FBS的IMDM作为基础培养液,IL-2、IL-21作为生长因子,体外诱导记忆B细胞活化成浆细胞并分泌抗体的过程。

[0007] 本发明所述制备方法包括下列步骤:

[0008] 1. 记忆性B细胞的获取:无菌环境下采集志愿者的全血,用淋巴细胞分离液从新鲜的抗凝全血中分离出人外周血单核细胞,再使用人记忆性B细胞磁珠分选试剂盒从外周血单核细胞中分离出记忆性B细胞。

[0009] 2. 记忆性B细胞的体外活化培养:将分选所得的记忆B细胞按照0细胞/孔、5细胞/孔、20细胞/孔的密度接种96孔细胞培养板,10%FBS的IMDM作为基础培养液,培养液中含30ng/mL的IL-2和60ng/mL的IL-21以及5000cGy的⁶⁰Co照射灭活的3T3-CD40L细胞以10000/孔作为饲养层细胞,在37℃,5%CO₂条件下培养13d,让记忆性B细胞活化成为抗体分泌细胞,收集上清用于下一步检测。

[0010] 3.ELISA检测记忆性B细胞体外活化培养后的分泌性抗体IgG:收集步骤(2)中的细胞培养上清,使用Goat Anti-Human Kappa蛋白和Goat Anti-Human Lambda蛋白包被酶标板,采用酶联免疫吸附测定方法检测记忆性B细胞的培养基上清,确定IgG抗体的分泌量;

[0011] 具体步骤如下:

[0012] (A)用包被液(50 μ L/孔)将Goat Anti-Human Kappa蛋白和Goat Anti-Human Lambda蛋白(各100ng/孔)包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜,洗板机洗板5遍,洗液为含0.05%Tween的PBS;

[0013] (B)用封闭液200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h,洗板5遍;

[0014] (C)分别在对应孔中加入细胞培养上清,或者梯度稀释的IgG标准品,同时用水或PBS作为阴性对照,50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1h,洗板5遍;

[0015] (D)分别在对应孔中加入1:5000稀释的HRP标记的Goat Anti-Human IgG,以及1:10000稀释的Goat x-human IgG-Fc Fragment HRP Conjugated 50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置45min,洗板5遍;

[0016] (E)加入显色液100 μ L/孔,室温避光显色15min;

[0017] (F)加入2moI/L硫酸50 μ L/孔,终止显色反应,检测OD450nm,参考波长为630nm,表5为Elisa检测细胞培养上清IgG的OD值。

[0018] 本发明的有益效果:使用辐照的3T3-CD40L细胞作为饲养层细胞,10%FBS的IMDM作为基础培养液,IL-2、IL-21作为生长因子,体外诱导记忆B细胞活化并分化为分泌抗体的浆细胞的过程。本发明的优点是:操作简单,成本较低,所需记忆B细胞数量少,活化效率以及活化质量高。

具体实施方式

[0019] 1.记忆性B细胞的获取:无菌环境下采集志愿者的全血,用淋巴细胞分离液从新鲜的抗凝全血中分离出人外周血单核细胞,再使用人记忆性B细胞磁珠分选试剂盒从外周血单核细胞中分离出记忆性B细胞,表1为人外周血单个核细胞数目;表2为B淋巴细胞数目;表3为记忆性B淋巴细胞数目。

[0020] 2.记忆性B细胞的体外活化培养:将分选所得的记忆B细胞按照0细胞/孔、5细胞/孔、20细胞/孔的密度接种96孔细胞培养板,10%FBS的IMDM作为基础培养液,培养液中含30ng/mL的IL-2和60ng/mL的IL-21以及5000cGy的⁶⁰Co照射灭活的3T3-CD40L细胞以10000/孔作为饲养层细胞,在37 $^{\circ}$ C,5%CO₂条件下培养13d,让记忆性B细胞活化成为抗体分泌细胞,收集上清用于下一步检测。

[0021] 3.ELISA检测记忆性B细胞体外活化培养后的分泌性抗体IgG,其中表4为Elisa检测一抗布局,具体步骤如下:

[0022] (A)用包被液(50 μ L/孔)将Goat Anti-Human Kappa蛋白和Goat Anti-Human Lambda蛋白(各100ng/孔)包被酶标板,4 $^{\circ}$ C过夜。洗板机洗板5遍。洗液为含0.05%Tween的PBS;

[0023] (B)用封闭液200 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C封闭2h,洗板5遍;

[0024] (C)分别在对应孔中加入细胞培养上清,或者梯度稀释的IgG标准品,同时用水或PBS作为阴性对照,50 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C放置1h。洗板5遍;

[0025] (D)分别在对应孔中加入1:5000稀释的HRP标记的Goat Anti-Human IgG,以及1:10000稀释的Goat x-human IgG-Fc Fragment HRP Conjugated 50μL/孔,37℃放置45min,洗板5遍;

[0026] (E)加入显色液100μL/孔,室温避光显色15min;

[0027] (F)加入2moI/L硫酸50μL/孔,终止显色反应,检测OD450nm,参考波长为630nm,表5为Elisa检测细胞培养上清IgG的OD值。

[0028] 表1

[0029]

样品编号	细胞数目
1号	2.6×10^7
2号	4.5×10^7
3号	3.16×10^7

[0030] 表2

[0031]

样品编号	细胞数目
1号	2.4×10^6
2号	3.82×10^6
3号	2.9×10^6

[0032] 表3

[0033]

样品编号	细胞数目
1号	0.9×10^5
2号	1.5×10^5
3号	1.2×10^5

[0034] 表4

[0035]

样本	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水	水
B	水	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	PBS
C	水	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	B(0)	PBS
D	水	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	PBS
E	水	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	B(5)	PBS
F	水	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	PBS
G	水	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	B(20)	PBS
H	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS	PBS

[0036] 表5

[0037]

值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.118	0.132	0.124	0.218	0.08	0.122	0.151	0.098	0.08	0.097	0.108	0.102
B	0.122	0.118	0.117	0.113	0.117	0.133	0.119	0.118	0.116	0.123	0.127	0.124
C	0.104	0.127	0.126	0.115	0.112	0.138	0.121	0.123	0.128	0.122	0.113	0.114
D	0.102	2.765	2.821	3.19	2.924	2.718	2.832	2.934	2.932	2.957	2.962	0.108
E	0.098	2.853	2.893	3.032	2.982	2.912	2.892	2.833	2.901	2.892	2.831	0.103
F	0.099	2.914	3.213	3.384	3.075	2.859	2.881	3.185	2.956	3.122	2.998	0.097
G	0.103	2.995	2.983	2.984	2.975	2.959	2.983	2.895	2.946	3.107	3.198	0.094
H	0.113	0.102	0.094	0.129	0.094	0.107	0.072	0.118	0.074	0.088	0.082	0.091

。

专利名称(译)	一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法		
公开(公告)号	CN106222137A	公开(公告)日	2016-12-14
申请号	CN201610711060.3	申请日	2016-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	南昌大学		
申请(专利权)人(译)	南昌大学		
当前申请(专利权)人(译)	南昌大学		
[标]发明人	胡萍 魏强 辛洪波 何晶晶		
发明人	胡萍 魏强 辛洪波 何晶晶		
IPC分类号	C12N5/0781 G01N33/53		
CPC分类号	C12N5/0635 C12N2501/2302 C12N2501/2321 C12N2502/13 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种体外活化人记忆性B细胞成浆细胞的培养方法，是利用已辐照的3T3-CD40L细胞作为饲养层细胞，10%FBS的IMDM作为基础培养液，IL-2、IL-21作为生长因子，体外诱导记忆B细胞活化成浆细胞并分泌抗体的过程。本发明所述培养方法操作简单，成本较低，所需记忆B细胞数量少，活化效率以及活化质量高。

值	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.118	0.132	0.124	0.218	0.08	0.122	0.151	0.098	0.08	0.097	0.108	0.102
B	0.122	0.118	0.117	0.113	0.117	0.133	0.119	0.118	0.116	0.123	0.127	0.124
C	0.104	0.127	0.126	0.115	0.112	0.138	0.121	0.123	0.128	0.122	0.113	0.114
D	0.102	2.765	2.821	3.19	2.924	2.718	2.832	2.934	2.932	2.957	2.962	0.108
E	0.098	2.853	2.893	3.032	2.982	2.912	2.892	2.833	2.901	2.892	2.831	0.103
F	0.099	2.914	3.213	3.384	3.075	2.859	2.881	3.185	2.956	3.122	2.998	0.097
G	0.103	2.995	2.983	2.984	2.975	2.959	2.983	2.895	2.946	3.107	3.198	0.094
H	0.113	0.102	0.094	0.129	0.094	0.107	0.072	0.118	0.074	0.088	0.082	0.091