



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) **DD** (11) **235 337 A1**

4(51) G 01 N 33/543

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21)	WP G 01 N / 273 954 8	(22)	08.03.85	(44)	30.04.86
------	-----------------------	------	----------	------	----------

(71)	Akademie der Wissenschaften der DDR, 1080 Berlin, Otto-Nuschke-Straße 22/23, DD
(72)	Repke, Heinrich, Dr. sc. nat. Dipl.-Biochem.; Odarjuk, Jutta, Dipl.-Biochem.; Rossow, Norbert, Dipl.-Biol.; Hoffmann, Klaus, DD

(54) Verfahren und Träger zur Durchführung immunologischer Bestimmungen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Träger zur Durchführung immunfluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Antigene. Anwendungsgebiet ist die Immunologie. Ziel ist es, ein einfach handhabbares Verfahren zur Durchführung immunfluoreszenzoptischer Untersuchungen zu entwickeln, das es gestattet, mit einer geringen Zellzahl auszukommen. Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines wiederverwendbaren Trägers zur Durchführung des Verfahrens. Die Aufgabe wird dadurch gelöst, daß durch Anzentrifugieren der Proben die Zellen so fest an den Boden des Trägers angeheftet werden, daß sie sich auch bei späteren Waschprozessen nicht ablösen. Die vorteilhafte Dimensionierung des Trägers erlaubt einerseits eine schnelle und quantitative Auswaschung ungebundener Antikörper und andererseits eine unkomplizierte Auswertung.

Erfindungsanspruch:

1. Verfahren zur Durchführung immunologischer Bestimmungen, **gekennzeichnet dadurch**, daß Zellen in die Vertiefungen eines Trägers pipettiert, durch Zentrifugieren an den Boden des Trägers angeheftet und nachfolgend durch Umkehren des Trägers ausgewertet werden.
2. Verfahren nach Punkt 1, **gekennzeichnet dadurch**, daß die Probenoberfläche mit der Trägersoberfläche eine Ebene bildet und diese planare Fläche auch bei Auswertung der Proben, die durch Umkehren des Trägers erfolgt, erhalten bleibt.
3. Verfahren nach den Punkten 1 und 2, **gekennzeichnet dadurch**, daß pro Probe 5000 bis 20000 Zellen verwendet werden.
4. Träger zur Durchführung des Verfahrens nach den Punkten 1 bis 3, **gekennzeichnet dadurch**, daß er aus einer 1 mm starken Glasplatte besteht, auf die eine undurchsichtige, 5 mm starke Kunststoffplatte mit 12mal 8 Bohrungen, die jeweils einen Durchmesser von 5 mm aufweisen, aufgeklebt wurde, und an der an den Längs- und Querseiten, sowie in der Mitte Auflagen angebracht sind, die beim Umkehren der Platte einen Mindestabstand des Trägers vom Mikroskopierteisch und damit ein Auslaufen der Proben aus den Vertiefungen während der Probenauswertung verhindern.
5. Träger nach Punkt 4, **gekennzeichnet dadurch**, daß er wiederverwendungsfähig ist.

Hierzu 1 Seite Zeichnung

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren und einen Träger zur Durchführung immunofluoreszenzmikroskopischer Untersuchungen zum Nachweis zellulärer Antigene. Anwendungsgebiet ist die Immunologie.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Zum Nachweis von Antikörpern gegen zelluläre Antigene wird im allgemeinen der indirekte Immunfluoreszenztest angewandt. Dabei werden die Zellen mit dem zu testenden Serum inkubiert. Sofern das Serum die zu testenden Antikörper enthält, werden diese an das Antigen gebunden und in einem zweiten Schritt mit einem fluoreszenzmarkierten Antiserum gegen die nachzuweisenden Antikörper sichtbar gemacht. Die so markierten Zellen werden dann auf einen Objektträger gebracht und hinsichtlich ihrer Fluoreszenz ausgewertet. Es ist auch möglich, die Zellen gleich auf dem Objektträger zu fixieren und den gesamten Test auf dem Träger durchzuführen (DD-PS 115 388).

Es wurden bereits verschiedene Vorschläge zur Rationalisierung und Standardisierung der Immunfluoreszenztechnik unterbreitet – ein einheitliches Verfahren hat sich jedoch bisher nicht durchgesetzt. So wird nach DD-PS 115 388 vorgeschlagen, einen Träger aus Glas oder Kunststoff mit 1 bis 8 Vertiefungen zu verwenden, worin das reaktive immunologische Material durch Antrocknen und anschließende Lyophilisieren fixiert wird. Dies ist u. a. nachteilig für das screening von Klonüberständen im Rahmen der Hybridomtechnik, da hier nur eine geringe Probenzahl gleichzeitig ausgewertet werden kann. Weitere Nachteile sind die hohe Zellzahl, die für die Inkubation erforderlich ist und der relativ große Aufwand für die Fixierung des Antigens. Eine Wiederverwendung des Trägers ist ebenfalls nicht möglich.

Bekannt ist auch ein Glasträger für 12 Proben mit aufgeklebten Glasringen zur Unterteilung der Reaktionsstellen, wobei eine Hitzefixierung bzw. Acetonfixierung des zu untersuchenden Materials erfolgt (DD-PS 145 133). Auch hier ist die relativ geringe Anzahl gleichzeitig auszuwertender Proben nachteilig. Dieser Träger ist in seiner anwendungsbereiten Form ebenfalls nicht wiederverwendungsfähig.

Ziel der Erfindung

Ziel der Erfindung ist es, ein einfach handhabbares Verfahren zur Durchführung immunfluoreszenzoptischer Untersuchungen zu entwickeln, das es gestattet, mit einer geringen Zellzahl auszukommen, um die Kosten für die Zellgewinnung (weniger Versuchstiere) herabzusetzen. Außerdem soll der zeitliche und materiell-technische Aufwand, der für das Anheften der Zellen an die Testplatte notwendig ist, gesenkt werden.

Ein weiteres Ziel der Erfindung besteht in der Bereitstellung eines wiederverwendbaren Trägers zur Durchführung des Verfahrens, der es ermöglicht, eine wesentlich größere Anzahl Proben gleichzeitig auszuwerten.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, immunfluoreszenzoptische Untersuchungen so durchzuführen, daß eine geringe Zellzahl ausreichend ist und der Verfahrensablauf so aufwendige Schritte wie das Antrocknen und Lyophilisieren der Proben, um die Zellen an die Testplatte anzuheften, überflüssig macht und dennoch eine gute Auswertbarkeit der Proben ermöglicht.

Eine weitere Aufgabe besteht in der Bereitstellung eines wiederverwendbaren Trägers zur Durchführung des Verfahrens, der es ermöglicht, eine größere Anzahl von Proben gleichzeitig auszuwerten.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe dadurch gelöst, daß 5000 bis 20000 Zellen in die Vertiefungen des Trägers pipettiert werden und bei 150 g für 15 Minuten zentrifugiert werden. Überraschenderweise wurde gefunden, daß die Zentrifugalkraft eine ausreichend feste Anheftung der Zellen an den Boden des Trägers bewirkt, so daß die Zellen auch bei späteren Waschprozessen nicht abgespült werden. Das zeitaufwendige Antrocknen und anschließende Lyophilisieren entfällt somit völlig.

Der erfindungsgemäß verwendete Träger besteht aus einer 1 mm starken Glasplatte (120 mm mal 85 mm), auf die eine undurchsichtige, 5 mm starke Kunststoffplatte mit 12mal 8 Bohrungen, die jeweils einen Durchmesser von 5 mm aufweisen, aufgeklebt wurde. Der Träger hat jeweils 2 Auflagen an den Längs- und Querseiten der Oberfläche, sowie zwei weitere in der Mitte der Platte (s. Abb. 1). Pro Träger (96 Proben) werden etwa 1,5 Mio Zellen benötigt. Das ist wesentlich weniger, als bei bisher üblichen Verfahren, was mit einer deutlichen Senkung der Kosten für die Zellgewinnung (weniger Versuchstiere) verbunden ist.

Nach dem Anheften der Zellen mittels Zentrifugation werden diese mit dem zu bestimmenden Antiserum und dem Fluorescein-Isothiocyant-markierten Antikörper inkubiert.

Die Dimensionierung der Vertiefungen erlaubt eine schnelle und quantitative Auswaschung ungebundener Antikörper, ohne daß eine nachweisbare Zellablösung stattfindet. Die Auswertung mit einem Fluoreszenzmikroskop erfolgt dann so, daß der Träger umgekehrt mit den Auflagen auf dem Mikroskopiertisch liegt, was ein Auslaufen der Proben verhindert. Die Flüssigkeitsoberflächen der Proben in den Vertiefungen bilden mit der Trägeroberfläche eine Ebene. Diese planaren Flüssigkeitsoberflächen bleiben infolge der günstigen Dimensionierung der Vertiefungen auch beim Umdrehen der Platte stabil, wodurch eine gleichmäßige Ausleuchtung des Gesichtsfeldes erhalten bleibt und unerwünschte Lichtbeugung vermieden wird. Die einzelne Reaktionsfelder sind leicht aufzufinden, da die Kunststoffplatte undurchsichtig ist.

Nach Beendigung des Versuches wird der Träger durch Einlegen in eine enzymhaltige Reinigungslösung gereinigt, anschließend mit Wasser und Aqua dest. gespült und ist dann für einen neuen Test verwendungsfähig.

Eine vorzugsweise Verwendungsform des Verfahrens und des zugehörigen Trägers ist die Testung von Hybridomüberständen hinsichtlich der Produktion monoklonaler Antikörper. Durch die gleichartige Anordnung der Vertiefungen in Zellkulturplatten und dem erfindungsgemäßen Träger ist ein schnelles Übertragen der Überstände in die entsprechenden Vertiefungen des Trägers möglich. Damit wird auch die aufwendige Beschriftung der Einzelproben überflüssig, da die Lage jeder Probe auf beiden Platten identisch ist. Somit wird einerseits der zeitliche Aufwand reduziert und andererseits werden vergleichbare Bedingungen für die Testung aller Proben gewährleistet.

Ausführungsbeispiel

Pro Vertiefung werden 5000 bis 20000 Rattenmastzellen, enthalten in 50 µl isotonischem Phosphatpuffer (PBS) pipettiert. Die Träger werden 15 min bei 150 g zentrifugiert. Anschließend werden pro Vertiefung 50 µl Klonüberstände aus der Zellkulturplatte auf die Testplatte übertragen und 60 min bei 37°C oder 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Platten werden vorsichtig in PBS gespült (Eintauchen der Platten und horizontale Bewegung in der Lösung). Durch Überstreichen der Vertiefungsreihen mit einer an Wasserstrahlvakuum angeschlossenen Pasteurpipette wird der Überstand 25–30 µl abgesaugt. Danach wird 20 µl Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Ziege-Anti-Maus-Globulin einpipettiert. Die Träger werden weitere 30 min bei 37°C bzw. 4°C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die quantitative Eliminierung ungebundener Antikörper erfolgt durch Spülen der Platten in PBS (bei 3maligem Wechsel) in oben beschriebener Weise.

Anschließend wird die Oberfläche des Trägers mittels einer Pasteurpipette über Wasserstrahlvakuum flüssigkeitsfrei gesaugt, ohne den PBS-Überstand aus den Vertiefungen zu entfernen. Die Flüssigkeitsoberfläche der Vertiefungen wird danach mit Hilfe einer 200 µl Mikroliterspritze so aufgefüllt, daß sie mit der Oberfläche der Platte eine Ebene bildet. Die Flüssigkeitsoberfläche bleibt beim Umdrehen der Platte stabil und planar, wodurch eine gleichmäßige Ausleuchtung des Gesichtsfeldes erhalten bleibt. Die Auswertung erfolgt durch ein Fluoreszenzmikroskop, wobei die Glasoberfläche der Platte nach oben zeigt.

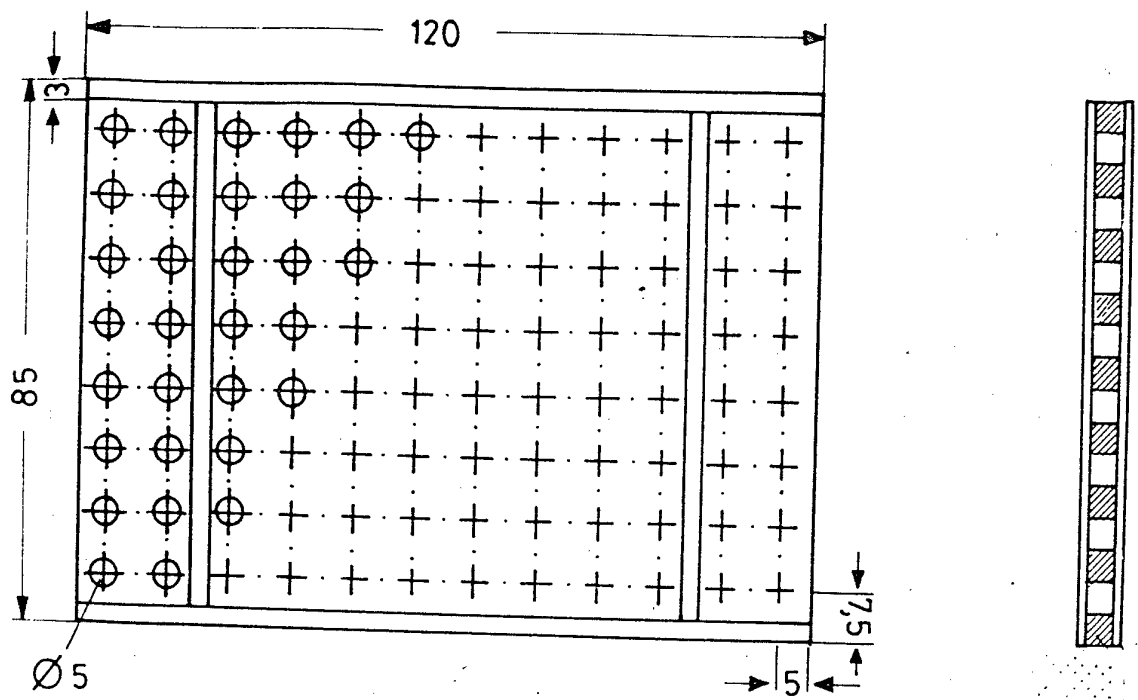


Abb.1