

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

G01N 33/53

G01N 33/533

C12Q 1/68



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410075851.9

[43] 公开日 2005 年 12 月 21 日

[11] 公开号 CN 1710423A

[22] 申请日 2004. 12. 30

[21] 申请号 200410075851.9

[71] 申请人 山东大学齐鲁医院

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路  
107 号

[72] 发明人 邹 雄 张 义 杨晓静 秦绪珍  
庄学伟 单宁宁 王洪春

[74] 专利代理机构 山东济南齐鲁科技专利事务所有  
限公司

代理人 宋永丽

权利要求书 4 页 说明书 8 页

[54] 发明名称 单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法

[57] 摘要

本发明公开了一种单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，取脏器移植病人外周血，分离淋巴细胞，提取淋巴细胞总模板核糖核酸，对外周血淋巴细胞总模板核糖核酸进行鉴定，对人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 特异性引物进行筛选，然后进行一步法一管扩增体系，以上、下游引物作为内参照，然后对扩增产物进行电泳扫描及序列分析，最后采用与上述引物相对应的荧光探针检测人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 抗原表达强度的高低。它可以通过检测脏器移植病人的外周血单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 的抗原表达强度，以达到根据该强度的高低，确定病人用药量，以此提高脏器移植的成功率及病人的身体健康状况等。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，取脏器移植病人外周血，分离淋巴细胞，提取淋巴细胞总模板核糖核酸，对外周血淋巴细胞总模板核糖核酸进行鉴定，其特征在于：对人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 特异性引物进行筛选得出：人白细胞抗原 A 的上游引物 5' -CTACCCTGCGGAGATCAC-3'，下游引物 5' -AGAGAACCAGGCCAGCAAT-3'，或人白细胞抗原 B 的上游引物 5' -CACACTGACCTGGCAGCGGGAT-3'；下游引物 5' -AGAGCCCTGGGCACTGTCGCT-3'，然后进行一步法一管扩增体系，以  $\beta$  -肌动蛋白作为内参照，其上游引物 5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3'、下游引物 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3'，反应体系 20-30ul，其中逆转录酶 0.2-1.5 ul，耐热扩增酶 0.1-0.4 ul，脱氧核苷酸 0.1-0.5 ul，氯化镁 1-4 ul，缓冲液 1-6 ul，余量是去核糖核酸酶的双蒸水，目的片段人白细胞抗原 A 的上下游引物或人白细胞抗原 B 的上下游引物各 0.4-2 ul，内参照上游引物 5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'、下游引物 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' 各 0.1-1 ul，模板核糖核酸 4-20 ul，多聚酶链反应仪反应参数为 40-42 °C 20-40min，90-96 °C 2-5min，90-96 °C 0.5-3min，52-60 °C 0.5-3min，70-75 °C 0.5-3min,3-10 个循环；90-96 °C 5-30sec，60-65 °C 10-60sec，30-45 个循环，70-75 °C 3-15min，

然后对扩增产物进行电泳扫描及序列分析，最后采用与上述引物相对应的荧光探针检测人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 信使核糖核酸表达强度的高低。

2、根据权利要求 1 所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：一步法一管扩增体系中各参数是，以  $\beta$ -肌动蛋白作为内参照，其上游引物 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3'、下游引物 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC - 3'，反应体系 25ul，其中逆转录酶 1 ul、耐热扩增酶 0.2 ul，脱氧核苷酸 0.2 ul，氯化镁 2.5 ul，缓冲液 2.5 ul，其余是去核糖核酸酶的双蒸水，多聚酶链反应仪反应参数为 42°C 30min, 95°C 3min, 94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1min, 5 个循环; 94°C 10sec, 62°C 30sec, 33 个循环, 72°C 5min。

3、根据权利要求 1 或 2 所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 A 的上游引物 5' - GGAGAGGAGCAGAGATACAC - 3'，下游引物 5' - AGAACCAGGCCAGCAATG - 3'。

4、根据权利要求 1 或 2 所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 A 的上游引物 5' - GGAGAGGAGCAGAGATACAC - 3'，下游引物 5' - ACCAGGCCAGCAATGATG - 3'。

5、根据权利要求1或2所述的单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原A的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原A的上游引物5'—TGGAGAGGAGCAGAGATACACC—3'，下游引物5'—TCACGGCAGCGACCACAG—3'。

6、根据权利要求1或2所述的单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原A的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原A的上游引物5'—CCCATCTCTGACCATGAG—3'，下游引物5'—GGTGTATCTCTGCTCCTC—3'。

7、根据权利要求1或2所述的单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原B的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原B的上游引物5'—GGGCAGCTGTGGTGCCT—3'，下游引物5'—CACTGTCGCTGCACGCAGCCT—3'。

8、根据权利要求1或2所述的单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原B的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原B的上游引物5'—CTGCCGAAGCCCCTCACCCCTCT—3'，下游引物5'—AGGACCAGACCCAGGACA—3'。

9、根据权利要求1或2所述的单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，其特征在于：对人白细胞抗原B的

---

特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 B 的上游引物 5' -  
GCCGTCTTCCCAGTCCACCGT - 3' , 下游引物 5' -  
ATGCCACGATGGGGACGGT-3' 。

## 单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法

### 技术领域

本发明涉及分子生物学、免疫学检测方法，特别涉及单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法。

### 背景技术

随着医学领域科学技术的进步，能够移植的脏器不断增加，随之进行脏器移植的病人越来越多。脏器移植病人的免疫状态决定移植的成功与否及合并症是否发生，当病人出现排斥反应时应能及时处理，否则易导致移植失败，药物用量过小不能达到控制排斥反应的目的，如果药物用量过大，则易使免疫抑制过度，细菌病毒感染，肿瘤发生。而目前尚未有能够准确检测脏器移植病人免疫状态的任何方法，因此，脏器移植的病人所有抗免疫抗排斥的用药量，均是根据估值或经验确定，无法根据病人的自身情况准确确定用药量。在目前这种状态下，直接影响脏器移植的成功率、移植后病人的寿命及病人身体的健康状况等。

### 发明内容

本发明的目的是提供一种单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法，它可以通过检测脏器移植病人的外周血单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 的信使核糖核酸表达强度，以达到根据该强度的高低，确定病人用药量，以此提高脏器移植的成功率及病

人的身体健康状况等。

本发明为实现上述目的, 通过以下技术方案来实现: 单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 取脏器移植病人外周血, 分离淋巴细胞, 提取淋巴细胞总模板核糖核酸, 对外周血淋巴细胞总模板核糖核酸进行鉴定, 对人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 特异性引物进行筛选得出: 人白细胞抗原 A 的上游引物 5' - CTACCCTGCGGAGATCAC-3' , 下游引物 5' - AGAGAACCAGGCCAGCAAT-3' , 或人白细胞抗原 B 的上游引物 5' - CACACTGACCTGGCAGCGGGAT-3' ; 下游引物 5' - AGAGCCCTGGGCACTGTCGCT-3' , 进行一步法一管扩增体系, 以  $\beta$  - 肌动蛋白作为内参照, 其上游引物 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3' 、下游引物 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' , 反应体系 20-30ul, 其中逆转录酶 0.2-1.5 ul, 耐热扩增酶 0.1-0.4 ul, 脱氧核苷酸 0.1-0.5 ul, 氯化镁 1-4 ul, 缓冲液 1-6 ul, 余量是去核糖核酸酶的双蒸水, 目的片段人白细胞抗原 A 的上下游引物或人白细胞抗原 B 的上下游引物各 0.4-2 ul, 以  $\beta$  - 肌动蛋白作为内参照, 上游引物 5' - GTGGGGCGCCCCAGGCACCA - 3' 、下游引物 5' - CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' 各 0.1-1 ul, 模板核糖核酸 4-20 ul, 多聚酶链反应仪反应参数为 40-42°C 20-40min, 90-96°C 2-5min, 90-96°C 0.5-3min, 52-60°C 0.5-3min, 70-75°C 0.5-3min, 3-10 个循环; 90-96°C 5-30sec, 60-65°C 10

—60sec, 30—45 个循环, 70—75°C 3—15min, 然后对扩增产物进行电泳扫描及序列分析, 最后采用与上述引物相对应的荧光探针检测人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 信使核糖核酸表达强度的高低。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 其一步法一管扩增体系中各参数可以是, 以  $\beta$ -肌动蛋白作为内参照, 其上游引物 5'—GTGGGGCGCCCCAGGCACCA—3'、下游引物 5'—CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC—3', 反应体系 25ul, 其中逆转录酶 1 ul、耐热扩增酶 0.2 ul, 脱氧核苷酸 0.2 ul, 氯化镁 2.5 ul, 缓冲液 2.5 ul, 其余是去核糖核酸酶的双蒸水, 多聚酶链反应仪反应参数为 42°C 30min, 95°C 3min, 94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1min, 5 个循环; 94°C 10sec, 62°C 30sec, 33 个循环, 72°C 5min。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 A 的上游引物 5'—GGAGAGGAGCAGAGATACAC—3', 下游引物 5'—AGAACCAGGCCAGCAATG—3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 A 的上游引物 5'—GGAGAGGAGCAGAGATACAC—3', 下游引物 5'—ACCAGGCCAGCAATGATG—3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗

原 A 的上游引物 5' -TGGAGAGGAGCAGAGATACACC-3', 下游引物 5' -TCACGGCAGCGACCACAG-3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 A 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 A 的上游引物 5' -CCCATCTCTGACCATGAG-3', 下游引物 5' -GGTGTATCTCTGCTCCTC-3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 B 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 B 的上游引物 5' -GGGCAGCTGTGGTGCCT-3', 下游引物 5' -CACTGTCGCTGCACGCAGCCT-3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 B 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 B 的上游引物 5' -CTGCCGAAGCCCCTCACCTCT-3', 下游引物 5' -AGGACCAGACCCAGGACA-3'。

所述的单个核细胞人白细胞抗原 A 或 B 检测移植病人免疫状态的方法, 对人白细胞抗原 B 的特异性引物进行筛选得出人白细胞抗原 B 的上游引物 5' -GCCGTCTTCCCAGTCCACCGT-3', 下游引物 5' -ATGCCACGATGGGGACGGT-3'。

本发明的积极效果在于: 为脏器移植病人免疫状态的强弱提供了一种准确的检测方法, 使医生可以根据脏器移植病人自身的免疫状态确定抗排斥的药量, 从而避免了因用药量过大或过小产生的移植失败、细菌病毒感染、肿瘤发生等严重后果。采用本发明的检测方法,

能够准确掌握脏器移植病人免疫状态的强弱，提高脏器移植成功率及病人的身体健康状况。

#### 具体实施方式

本发明的检测方法如下：

首先取外周血淋巴细胞（PBL）进行分离

无菌抽取移植病人外周血 2ml，EDTA-K<sub>2</sub> 防凝。3000rpm/min 离心 10min（普通离心机），4 小时内完成。

以无菌吸管仔细吸取白细胞层，稀释后缓慢加入盛有 2ml 淋巴细胞分离液的无菌管中，3000 rpm/min 离心 25min（普通离心机）。

以无菌吸管小心吸取单个核细胞至一灭菌 Ependoff 管中，5000 rpm/min 离心 4min（普通离心机）吸弃上清液（-80℃可长期保存）。

对淋巴细胞总模板核糖核酸（RNA）进行提取，（以下均为冰上操作，所有器材预先用去核糖核酸酶的双蒸水处理）

取出冻存的淋巴细胞加入 50 ul TE 溶解沉淀，然后加入 150 ul 白细胞裂解液（深圳匹基生物公司生产），反复吹打至细胞完全裂解。在裂解的细胞混合液中加入 50 ul 氯仿抽提 RNA，冰浴 5—7min，15000 rpm/min 离心 10min（高速冷冻离心机）。

离心后可见混合液分为三层，吸取最上层无色水相，加入等体积的异丙醇沉淀 RNA，-20℃放置 20—60min，13000 rpm/min 离心 10min（4℃，高速冷冻离心机）。

弃去上清液（注意离心方向），加入 300ul 预致冷的 75%乙醇（去核糖核酸酶的双蒸水配制），13000 rpm/min（4℃，高速冷冻离心机）

离心 10min 去盐，轻弃上清（注意离心方向），吸水纸上吸干。

13000 rpm/min 离心（高速冷冻离心机）10 秒钟，将管壁残余液体甩至底部，以无菌吸头吸干残液，加入适量的去核糖核酸酶的双蒸水溶解 RNA。

对外周血淋巴细胞总 RNA 进行鉴定

提取的外周血淋巴细胞总 RNA，在 UA-2450 紫外分光光度计上测定 260nm 和 280nm 波长下 RNA 的吸光度，将提取的 RNA 在 1.5% 低熔点琼脂糖凝胶变性电泳，可见 5s, 18s, 28s 三条清晰条带，表明所提 RNA 浓度较纯，且 RNA 完整无裂解，可用于逆转录聚合酶链反应（RT-PCR）。

选取人白细胞抗原 A（HLA-A）或人白细胞抗原 B（HLA-B）特异性引物

提取的 RNA 以不同的引物，即：人白细胞抗原 A 上游引物 5' - CTACCCTGCGGAGATCAC-3'，下游引物 5' - AGAGAACCAGGCCAGCAAT-3'，这是本发明方法人白细胞抗原 A 较好的一对引物，以下各对引物均可等同使用，并可达到本发明所述的检测效果，上游引物 5' - GGAGAGGAGCAGAGATACAC-3'，下游引物 5' - AGAACCAGGCCAGCAATG-3'。或上游引物 5' - TGGAGAGGAGCAGAGATACACC - 3'，下游引物 5' - TCACGGCAGCGACCACAG - 3'。或上游引物 5' - CCCATCTCTGACCATGAG - 3'，下游引物 5' - GGTGTATCTCTGCTCCTC-3'。本发明人白细胞抗原 B 的特异性引

物即：上游引物 5' -GGGCAGCTGTGGTGCCT-3'，下游引物 5' -CACTGTCGCTGCACGCAGCCT-3'，这是本发明方法人白细胞抗原 B 中较好的一对引物，以下各对引物均可达到本发明所述检测效果。或上游引物 5' -CTGCCGAAGCCCCTCACCTCT-3'，下游引物 5' -AGGACCAGACCCAGGACA-3'，或上游引物 5' -GCCGTCTTCCCAGTCCACCGT - 3'，下游引物 5' -ATGCCACGATGGGGACGGT-3'，组合置于 RT-PCR 反应体系中扩增，扩增产物以 2%琼脂糖凝胶电泳，筛选与预期 279bp 片段相吻合的特异性引物。

采用一步法一管扩增体系

以  $\beta$ -肌动蛋白作为内参照，反应体系 25ul，其中：逆转录酶 1 ul，耐热扩增酶 0.2ul、脱氧核苷酸 0.2ul、氯化镁 2.5ul，缓冲液 2.5ul，余量是去核糖核酸酶的双蒸水。

目的片段人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 的上下游引物各 1 ul，内参照以上游引物 5' -GTGGGGCGCCCCAGGCACCA-3'、下游引物 5' -CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC-3' 各 0.3 ul RNA10 ul 多聚酶链反应仪的反应参数：42°C 30min, 95°C 3min, 94°C 1min, 57°C 1min, 72°C 1min, 5 个循环；94°C 10sec, 62°C 30sec, 33 个循环, 72°C 5min。

或以  $\beta$ -肌动蛋白作为内参照，反应体系 20ul，其中：逆转录酶 0.2ul，耐热扩增酶 0.1ul、脱氧核苷酸 0.1ul、氯化镁 1ul，缓冲液 1ul，余量是去核糖核酸酶的双蒸水。

目的片段人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 的上下游引物各 0.4ul 内参照以上游引物 5'—GTGGGGCGCCCCAGGCACCA—3'、下游引物 5'—CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC—3' 各 1ul RNA10 ul, 多聚酶链反应仪的反应参数: 40°C 20min, 90°C 2min, 90°C 0.5min, 52°C 0.5min, 70°C 0.5min, 3 个循环; 90°C 5sec, 60°C 10sec, 30 个循环, 70°C 3min。

或以 β-肌动蛋白作为内参照, 反应体系 30ul, 其中: 逆转录酶 0.5ul, 耐热扩增酶 0.4ul、脱氧核苷酸 1.5ul、氯化镁 4ul, 缓冲液 6ul, 余量是去核糖核酸酶的双蒸水。

目的片段人白细胞抗原 A 或人白细胞抗原 B 上下游引物各 2ul, 内参照上游引物 5'—GTGGGGCGCCCCAGGCACCA—3'、下游引物 5'—CTCCTTAATGTCACGCACGATTTC—3' 各 1ul, RNA20ul, 多聚酶链反应仪的反应参数: 42°C 40min, 96°C 5min, 96°C 3min, 60°C 3min, 75°C 3min, 10 个循环; 96°C 30sec, 65°C 60sec, 45 个循环, 75°C 15min。

将上述扩增产物进行电泳扫描及序列分析

多聚酶链反应扩增产物 2%琼脂糖凝胶电泳后, 在凝胶成像系统上扫描分析。HLA—A 或 HLA—B 互补脱氧核糖核酸在全自动测序抗原仪上测序, 并用 Blastn 服务器对序列进行查询和比较。采用与本发明上述引物相对应的荧光探针检测 HLA—A 或 HLA—B 信使核糖核酸表达强度, 这个强度的高低, 与脏器移植病人免疫状态相对应, 以此确定脏器移植病人免疫状态的强弱, 为抗排斥用药量提供了准确的依据。

专利名称(译)	单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN1710423A</a>	公开(公告)日	2005-12-21
申请号	CN200410075851.9	申请日	2004-12-30
[标]申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
申请(专利权)人(译)	山东大学齐鲁医院		
[标]发明人	邹雄 张义 杨晓静 秦绪珍 庄学伟 单宁宁 王洪春		
发明人	邹雄 张义 杨晓静 秦绪珍 庄学伟 单宁宁 王洪春		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种单个核细胞人白细胞抗原A或B检测移植病人免疫状态的方法，取脏器移植病人外周血，分离淋巴细胞，提取淋巴细胞总模板核糖核酸，对外周血淋巴细胞总模板核糖核酸进行鉴定，对人白细胞抗原A或人白细胞抗原B特异性引物进行筛选，然后进行一步法一管扩增体系，以上、下游引物作为内参照，然后对扩增产物进行电泳扫描及序列分析，最后采用与上述引物相对应的荧光探针检测人白细胞抗原A或人白细胞抗原B抗原表达强度的高低。它可以通过检测脏器移植病人的外周血单个核细胞人白细胞抗原A或B的抗原表达强度，以达到根据该强度的高低，确定病人用药量，以此提高脏器移植的成功率及病人的身体健康状况等。