

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610041612.0

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/00 (2006.01)
G01N 21/00 (2006.01)

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1996015A

[22] 申请日 2006.1.6

[21] 申请号 200610041612.0

[71] 申请人 林 远

地址 710075 陕西省西安市西安高新技术产
业开发区高新一路25号创新大厦N309
室

共同申请人 郑 芳

[72] 发明人 林 远 郑 芳

权利要求书5页 说明书9页 附图4页

[54] 发明名称

流式细胞仪生物芯片：免疫监测及药物研发

[57] 摘要

本发明涉及流式细胞仪和微载体生物芯片，对器官移植免疫反应和药物的免疫调节作用进行高通量分析的技术，材料和试剂盒。其特征是：一种对人体无副作用的体内T细胞激活技术；一种筛选潜在免疫调节药物的动物实验技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-细胞分析技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析技术；一个流式细胞仪临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的细胞、蛋白和基因数据库，以及相应的试剂盒。

1. 本发明专利一种涉及流式细胞仪和微载体生物芯片，对器官移植免疫反应和药物的免疫调节作用进行高通量分析的技术，材料和试剂盒。其特征是：一种对人体无副作用的体内 T 细胞激活技术；一种筛选潜在免疫调节药物的动物实验技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-细胞分析技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析技术；一个流式细胞仪临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的细胞、蛋白和基因数据库，以及相应的试剂盒。
2. 根据权利要求 1 所述的一种对人体无副作用的体内 T 细胞激活技术，其特征是是给排斥疑似患者注射一个适当剂量的临床常规使用的免疫调节剂，包括（但不限于）抗 CD3 抗体、抗胸腺免疫球蛋白（ATG）和抗淋巴细胞免疫球蛋白（ALG）。注射前和注射至少 2 小时后分别采集外周血标本，做白细胞介素分析；注射至少 6 小时后采集外周血标本，做 T 淋巴母细胞和白细胞膜抗原表达分析。该方法亦可用于其它免疫系统紊乱患者的免疫状态测定，包括（但不限于）HIV 感染和临床患者、免疫功能低下、以及自身免疫疾病患者。
3. 根据权利要求 1 所述的一种筛选潜在免疫调节药物的动物实验技术，其特征是给实验动物（如小鼠）注射至少一个适当剂量的白细胞（T 细胞、B 细胞或单核细胞）群特异性活化因子。T 细胞特异性活化因子包括（但不限于）Con A、PHA、抗 CD3 抗体；B 细胞特异性活化因子包括（但不限于）PWA、抗 CD40 抗体、CD40L、抗 IgM 抗体、TNP—ficol 或异种抗原；单核/巨噬细胞特异性活化因子包括（但不限于）LPS, TNF- α 和 IFN- γ 。注射前和注射至少 2 小时后分别采集外周血标本，做白细胞介素分析；注射至少 6 小时后采集外周血标本，做 T 淋巴母细胞和白细胞膜抗原表达分析。在注射细胞活化因子的同时，给动物至少一种免疫抑制剂治疗，则可对潜在免疫抑制药物进行筛选。在注射细胞活化因子前后的不同时间，使用免疫抑制剂，可对免疫抑制剂的药效学、药代学和药动学进行分析。
4. 作为权利要求 3 的另一途径，在注射白细胞（T 细胞、B 细胞或单核细胞）群特异性活化因子之前，给实验动物（如小鼠）输入一个适当剂量的、细胞内探针标记的自体白细胞或白细胞亚群。细胞内探针是特异性与细胞内蛋白或 DNA 结合、在体内环境存在数周或数月、并随着细胞每一次分裂而对倍减弱的荧光物质。包括（但不限于）5-(and -6)- carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester（CFSE），绿色荧光蛋白基因 green fluorescent protein (GFP)，半乳糖激酶基因（ β -galactosidase），荧光素酶基因（luciferase），CMAC

(7-amino-4-chloromethylcoumarin)、CMHC(4-chloromethyl-7-hydroxy-coumarin)和CMF2HC(4-chloromethyl-6,8-difluoro-7-hydroxycoumarin),绿色荧光氯甲基衍生物(CMFDA:5-chloromethylfluorescein diacetate)、BODIFY(8-chloromethyl-4,4-difluoro-1,3,5,7-tetramethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene),橙色荧光CMTMR(5-(and-6)-((4-chloromethyl)benzoyl)amino)、Acridine(3,6-bis(Dimethylamino)、Bisbenzimidazole,和红色荧光CMTPX,等。在注射细胞活化因子的同时,给动物至少一种免疫抑制剂治疗,则可对潜在免疫抑制药物进行筛选。在注射细胞活化因子前后的不同时间,使用免疫抑制剂,可对免疫抑制剂的药效学、药代学、药动学和药理学进行分析。

5. 根据权利要求1所述的一种对临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-细胞分析技术,其特征是使用流式细胞分析和免疫荧光技术,测定白细胞激活、增生和膜表面抗原表达。收集外周白细胞(血液、脾和淋巴结),借流式细胞仪对探针标记白细胞的荧光母峰值和子峰值测定;用单色、双色、多色单克隆抗体荧光染色,测定白细胞膜表面抗原表达。包括(但不限于)MHC-class I、II分子;粘附分子VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD134、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin;白细胞介素受体IL-2R、TNF- α 受体等。在注射细胞活化因子的同时,给动物至少一种免疫抑制剂治疗,既可对潜在免疫调节药物的作用做出评估

6. 根据权利要求1所述的一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析技术,其特征是使用流式细胞仪-微载体生物芯片,测定外周血可溶性免疫相关因子及基因表达。将外周血样本与微载体-捕获蛋白探针共培养,再加入荧光标记的检测蛋白探针,测定可溶性蛋白分子。包括(但不限于)MHC-class I、II分子;粘附分子VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD134、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin;白细胞介素及受体IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α ;趋化细胞因子及受体MCP-1、MIP-1、RANTES、CCR-1、CCR-2、CCR3、CCR-4、CCR-5;细胞因子perforin(细胞穿孔素)、granzam B(颗粒素酶B)等;将RT、PCR、或RT-PCR扩增的靶核酸单链产物,与微载体-捕获核酸探针共培养,再加入荧光标记的检测核酸探针,测定靶核酸单链包括(但不限于)白细胞介素及受体IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α ;粘附分子VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD134、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin。

7. 根据权利要求 6 所述的流式细胞仪-微载体生物芯片, 是用高聚分子微粒作为微载体, 承载蛋白、核酸捕获探针, 先后与待测靶分子和银光标记的。一种微载体结合至少一种靶核酸单链-探针。流式细胞分析时, 根据微载体的不同直径和不同内置荧光, 以及探针的不同荧光, 在单一试管内同时分析多种靶核酸单链, 形成高通量式分析模式。

8. 根据权利要求 1 所述的一个流式细胞仪临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的细胞、蛋白分子和基因数据库, 包括正常情况下、免疫抑制状态下、排斥反应时、免疫活化剂注射后, 外周血白细胞膜表面抗原、可溶性免疫相关因子、免疫相关因子基因的表达强度、概率, 以及与排斥反应相关系数和诊断标准。

9. 根据权利要求 1 所述的一个流式细胞仪临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的试剂盒, 包括 (但不限于) 以下免疫相关因子的蛋白及基因检测试剂盒:

粘附分子:

- 跨膜分子 (Transmembrane Molecules) : CD44, CDH1 (E-cadherin), HAS1, ICAM1, ITGA1 (integrin a1), ITGA2 (integrin a2 / LFA1 β), ITGA2B (integrin a2 β), ITGA3 (integrin a3), ITGA4 (integrin a4 / LVA-4), ITGA5 (integrin a5), ITGA6 (integrin a6), ITGA7 (integrin a7), ITGA8 (integrin a8), ITGA9 (integrin a9), ITGA10 (integrin a10), ITGA11 (integrin a11), ITGAL (integrin aL / LFA1a / CD11a), ITGAM (integrin aM), ITGAV (integrin aV), ITGAX (integrin aX), ITGB1 (integrin β 1), ITGB2 (integrin β 2), ITGB3 (integrin β 3 / CD61), ITGB4 (integrin β 4), ITGB5 (integrin β 5), ITGB6 (integrin β 6), ITGB7 (integrin β 7), ITGB8 (integrin β 8), MMP14, MMP15, MMP16, MMP17, MMP24, NCAM1, PECAM1, SELE (ELAM-1 / E-selectin), SELL (L-selectin), SELP (P-selectin), SGCE, SPG7, VCAM1;
- 细胞间粘附分子 (Cell-Cell Adhesion) : CD23, CD30, CD69, CD134, CDCD44, CDH1 (E-cadherin), COL11A1, COL14A1, COL19A1, COL6A2, COL8A2, CTNND1 (catenin d1), ICAM1, ITGA8, VCAM1;
- 细胞-基质间粘附分子 (Cell-Matrix Adhesion) : ADAMTS13, CD44, ITGA1 (integrin a1), ITGA2 (integrin a2 / LFA1 β), ITGA2B (integrin a2 β), ITGA3 (integrin a3), ITGA4 (integrin a4 / LVA-4), ITGA5 (integrin a5), ITGA6 (integrin a6), ITGA7 (integrin a7), ITGA8 (integrin a8), ITGA9 (integrin a9), ITGA10 (integrin a10), ITGA11 (integrin a11), ITGAL (integrin aL / LFA1a / CD11a), ITGAM (integrin aM), ITGAV (integrin aV), ITGAX (integrin aX), ITGB1 (integrin β 1), ITGB2 (integrin β 2), ITGB3 (integrin β 3 / CD61), ITGB4 (integrin β 4), ITGB5 (integrin β 5), ITGB6 (integrin β 6), ITGB7 (integrin β 7), ITGB8 (integrin β 8), SGCE, SPP1 (OPN /

osteopontin), THBS3 (TSP-1).

白细胞介素:

- 白细胞介素和趋化细胞因子 (Cytokines and Chemokines) : C5, CCL1 (I-309), CCL2 (mcp-1), CCL3 (MIP-1a), CCL4 (MIP-1b), CCL5 (RANTES), CCL7 (mcp-3), CCL8 (mcp-2), CCL11 (eotaxin), CCL13 (mcp-4), CCL15 (MIP-1d), CCL16 (HCC-4), CCL17 (TARC), CCL18 (PARC), CCL19, CCL20 (MIP-3a), CCL21 (MIP-2), CCL23 (MPIF-1), CCL24 (MPIF-2/ eotaxin-2), CCL25 (TECK), CCL26, CX3CL1 (fractalkine), CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL5 (ENA-78 / LIX), CXCL6 (GCP-2), CXCL9, CXCL10 (IP-10), CXCL11 (I-TAC / IP-9), CXCL12 (SDF1), CXCL13, CXCL14, IFNA2, IFNG, IL10, IL11, IL12A, IL12B, IL13, IL15, IL16, IL17, IL17C, IL18, IL1A, IL1B, IL2, IL20, IL21, IL22, IL3, IL4, IL5, IL6, IL8, IL9, LTA, LTB, MIF, PF4, SCYE1 (endothelial monocyte-activating cytokine), SPP1, TNF, TNFSF5, XCL1 (lymphotactin).
- 白细胞介素和趋化细胞因子受体 (Cytokine Receptors and Chemokine Receptors) : BLR1 (CXCR5), CCR1, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CCR9, CX3CR1, CXCR4, IL10RA, IL10RB, IL11RA, IL12RB1, IL12RB2, IL13RA1, IL13RA2, IL15RA, IL17R, IL18R1, IL1R1, IL1R2, IL1RN, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL5RA, IL6R, IL6ST, IL8RA, IL8RB, IL9R, XCR1 (CCXCR1).
- 淋巴介素及受体 (Interleukins & Receptors) : IL10, IL10RA, IL10RB, IL11, IL11RA, IL12A, IL12B, IL12RB1, IL12RB2, IL13, IL13RA1, IL13RA2, IL15, IL15RA, IL16, IL17, IL17C, IL17R, IL18, IL18R1, IL1A, IL1B, IL1R1, IL1R2, IL1RN, IL2, IL20, IL21, IL22, IL2RA, IL2RB, IL2RG, IL3, IL4, IL5, IL5RA, IL6, IL6R, IL6ST, IL8, IL8RA, IL8RB, IL9, IL9R, TOLLIP.
- 肿瘤坏死因子配体及受体 (TNF Ligands & Receptors) : LTA (LT-a), LTB (LT-b), TNF (TNF-a), TNFRSF1A (TNFR1), TNFRSF1B (TNFR2), TNFSF5.

免疫调节药物靶蛋白:

- 受体 (Receptors) : B7, CD2, CD28, CD3G, CD3Z, CD86 (B7-2), IL2RA, IL2RB, IL2RG, IFNAR1, ITGAL (CD11a), ITGB1 (CD29), TNFRSF5 (CD40), TNFSF5 (CD40L), ADRB1, ADRB2, BDKRB1, BDKRB2, CD4, CYSLTR1, HRH1, HRH2, HRH3, HTR3A (Serotonin), ICAM1, IL1R1, IL1R2, IL13, ITGAM, ITGB2, LTB4R, MC2R, PTAFR, PTGDR, PTGER2, PTGER3, PTGFR, TNFRSF1A, VCAM1;
- 酶 (Enzymes) : DHFR, IMPDH1, IMPDH2, PPP3CA, PPP3CB, PPP3CC, PPP3R1, A2M, ADPRT, ALOX5, ALOX12, CASP1, CASP3, COL6A3, GZMH (C-esterase), HPGD, KLK1, KNG (Kinin), LTA4H, LTC4S, MAPK1, MAPK3, MAPK8, MAPK14, NOS2A, PDE4A, PDE4B, PLA2G1B, PLA2G2A, PLA2G2D, PLA2G4C,

PLA2G5, PLA2G7, PLA2G10, PLCG1, PLCG2, PTGIS, PTGS1, PTGS2, TBXAS1.

- 活性因子和激素 (Factors & Hormones) : CSF2, CSF3, FKBP1A, FKBP1B, FKBP12, FTAP1 (mTOR), IFNA1, PPIA, Raptor, ANXA1, HMGB1, NFKB1, TNF, TNFSF13B (BAFF), WT1.

流式细胞仪生物芯片：免疫监测及药物研发

所属技术领域

本发明涉及使用流式细胞仪及微载体生物芯片，对移植免疫反应和药物的免疫调节作用进行高通量分析的技术，材料和试剂盒。

背景技术

20世纪60年代以来，免疫学、遗传学和分子生物学的飞速发展，使人类对器官移植排斥反应的认识有了重大突破。新型免疫抑制剂的使用有效地控制了移植排斥反应的发生率，引发了器官移植划时代的进步。然而，在非特异性免疫抑制的条件下，所有同种移植受者均处于过度免疫抑制和免疫抑制不足的威胁之下。免疫抑制不足可导致移植物的排斥，甚至功能丧失；过度免疫抑制却导致机体免疫力低下，增加了各种感染的危险。使用先进的医学生物学技术，监测器官移植后患者的免疫状态，对排斥反应的早期诊断、病情发展、疗效观察及减少并发症具有重要意义。

细针穿刺活检的病理学研究，为免疫排斥反应的早期诊断提供了形态学依据。大量免疫组化研究显示，在发生排斥反应的器官（如心脏、肝脏、肾脏）内部，浸润的免疫细胞以及器官的实质细胞，如血管内皮细胞、肾小管上皮细胞等，表达上调的MHC-class I、II分子或新增表达的MHC-class II分子；粘附分子VCAM-I、ICAM-I、B7-1/2、CD69、CD28、CD44、CD40、CD40L、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin；白细胞介素及受体IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α ；趋化细胞因子及受体MCP-1、MIP-1、RANTES、CCR-1、CCR-2、CCR3、CCR-4、CCR-5；细胞毒性因子perforin（细胞穿孔素）、granzam B（颗粒素酶B）。然而，免疫组化慢、不敏感、特异性差，并经常由于取材部位不正确而漏诊。

对穿刺活检的样本作RT-PCR分析，测定样本白细胞介素/因子mRNA的表达，特别是IL-2、IL-6、IL-15、INF- γ 、perforin和granzam B的基因表达，对排斥反应的早期诊断价值很大。许多移植中心通过细针穿刺活检-RT-PCR分析，对排斥反应性质和程度分级，以此作为依据制定免疫抑制治疗的方案，取得了良好效果。但是，毕竟作为一种有创伤的检测手段，细针穿刺活检-RT-PCR分析的常规临床使用受到限制。

用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定血中可溶性的分子, 包括 MHC-class I、II 分子; 粘附分子 VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD132、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin; 白细胞介素及受体 IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α ; 趋化细胞因子及受体 MCP-1、MIP-1、RANTES、CCR-1、CCR-2、CCR3、CCR-4、CCR-5; 细胞因子 perforin (细胞穿孔素)、granzam B (颗粒素酶 B) 等。这些可溶性的分子在排斥反应发生时显著性增高, 并与排斥反应的强度密切相关。该方法作为排斥反应的非创伤性检测, 具有临床价值。

测定外周血 T 细胞免疫活性的改变, 例如 T 细胞膜表面兴奋性分子的表达, 阳性率不高。因为 T 细胞的活化和增生, 主要发生在淋巴结、脾脏、piece' s 结等外周淋巴器官。外周循环中的 T 细胞一般为静息或记忆淋巴细胞。近几年来, 美国斯坦福大学 Morris 教授和其它研究中心的学者, 用全血试验 (Whole Blood Assay; WBA) 测定受体的免疫状态。原理是对全血标本用细胞培养液作适当稀释, 加促分裂因子 (抗 CD3/CD28 抗体、Con A、PHA 等), 培养 24-48 小时。结果阅读与混合淋巴细胞培养相似, 包括 H³、BrdU 摄取、和 MTT 测试法。由于接受免疫抑制治疗患者血中的免疫抑制药物的作用, T 细胞增生受到抑制。从某种意义上, 全血试验反映了接近人体生理条件下的免疫状态, 对排斥反应有辅助诊断价值。但是, 全血试验的周期长, 若希望对排斥反应的早期诊断有所帮助, 仍需改进。

本发明涉及使用自主知识产权的技术产品: 流式细胞仪-细胞探针 (美国专利申请号 US2004/0077859;、流式细胞仪-微载体临床诊断芯片 (中国专利申请号 200510041973.0)、流式细胞仪-微载体核酸芯片 (中国专利申请号 200510096393.1)、及流式细胞仪-细胞内分子探针技术 (中国专利申请号 200510016348.0), 建立连续化、集成化、微量免疫分析系统, 用于排斥反应等免疫相关疾病的临床监测, 以及新型免疫调节剂的筛选和开发。

发明内容

本发明涉及使用流式细胞仪及微载体生物芯片, 在生理或接近生理的条件下, 对器官移植免疫反应和药物的免疫调节作用进行高通量分析的技术, 材料和试剂盒。

本发明的具体内容之一, 是一种对人体无副作用的体内 T 细胞激活技术。给接受器官移植患者注射一个适当剂量的临床常规使用的免疫调节剂, 引发一过性 T 细胞白细胞介素释放及 T 细胞活化状态。

本发明的另一具体内容, 是一种筛选潜在免疫调节药物的动物实验技术。方法一, 给

实验动物（如小鼠）注射一个适当剂量的白细胞（T细胞、B细胞或单核细胞）群特异性活化因子，引发外周血白细胞活化；方法二，给实验动物（如小鼠）输入细胞内探针标记的自体白细胞或白细胞亚群。然后，注射一个适当剂量的白细胞群特异性活化因子，引发外周血白细胞活化和增生；这一过程在免疫抑制治疗下进行，则可对潜在免疫抑制药物的作用进行评估。

本发明的另一具体内容，是一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-细胞分析技术。使用流式细胞分析和免疫荧光技术，测定白细胞激活、增生和膜表面抗原表达。

本发明的另一具体内容，是一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析技术。使用流式细胞仪-微载体生物芯片，测定外周血可溶性免疫相关因子及基因表达。以高聚分子微粒作为生物探针（捕获探针）的载体，识别样品中的待测因子（例如抗原、抗体、白细胞介素和核酸）；再用荧光标记的探针（检测探针）对其标记，产生可经流式细胞仪处理的微载体-待测因子复合物。使用不同的微载体和探针系统的组合，对一个微量标本中的多项指标在同一试管中分析，形成‘高通量’式分析系统。

本发明的另一具体内容，是一个流式细胞临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的细胞、蛋白分子和基因数据库，以及相应的试剂盒。

附图说明

图 1. 使用流式细胞仪-微载体生物芯片测定器官移植患者外周血白细胞介素。将承载 IL-2、IL-5、IL-6、IFN- γ 捕获探针（抗体）的微载体与肾移植患者血清（20 μ L）共培养（4 $^{\circ}$ C，30 分钟）；PBS 离心洗涤一次，加入荧光标记的探测探针（抗体）（4 $^{\circ}$ C，30 分钟）；PBS 离心洗涤一次后进行流式细胞分析。无排斥患者的 IL-2、IL-5、IL-6、IFN- γ 均在正常值范围（左列）；排斥疑似患者除 IFN- γ 外，IL-6 显著升高（>20 倍），IL-5、IL-2 明显升高（>5 倍）。

图 2. 使用流式细胞仪-微载体生物芯片测定器官移植患者 T 细胞活化后外周血白细胞介素。给患者注射一个治疗剂量的 OKT3，2 小时后取外周血作白细胞介素测定。将承载 IL-2、IL-5、IL-6、IFN- γ 捕获探针（抗体）的微载体与肾移植患者血清（20 μ L）共培养（4 $^{\circ}$ C，30 分钟）；PBS 离心洗涤一次，加入荧光标记的探测探针（抗体）（4 $^{\circ}$ C，30 分钟）；PBS 离心洗涤一次后进行流式细胞分析。无排斥患者的 IL-2、IL-5、IL-6、IFN- γ 与 OKT3 注射前相比，无明显变化（左列）；排斥疑似患者所有 4 项指标均显著升高（>20 倍）（右列）。

图 3. 使用流式细胞仪测定免疫调节药物对小鼠外周血 T 淋巴母细胞的抑制。给小鼠注

射一个适当剂量的 T 细胞促分裂因子 Con A 及免疫抑制剂环孢霉素 (CsA), 12 小时后取外周血, 溶解红细胞, 用抗 TCR (PE 标记) 单克隆抗体标记 T 细胞。用流式细胞仪正向光衍射比电子密度确定白细胞群 (左上图); 用荧光频道 2 (T 细胞) 比正向光衍射 (体积增大的淋巴母细胞), 测定 T 淋巴母细胞 (右上图)。T 淋巴母细胞在 PBS 对照组显著增多 (右下图), 在 CsA 治疗组增生受抑制 (左下图)。

图 4. 使用流式细胞仪测定免疫调节药物对小鼠外周血 T 细胞膜表面抗原的抑制。给小鼠注射一个适当剂量的 T 细胞促分裂因子 Con A 及免疫抑制剂环孢霉素 (CsA), 12 小时后取外周血, 溶解红细胞, 用抗 TCR (PE 标记) 和膜表面兴奋性抗原单克隆抗体 (FITC 标记) 双染 T 细胞。T 细胞膜表面 CD69、CD25 和 CD71 表达在 PBS 对照组明显升高 (下排), 在 CsA 治疗组受抑制 (上排)。

具体实施方式

本发明的具体实施方式之一, 通过流式细胞仪-微载体生物芯片, 检测排斥疑似患者的外周血中的可溶性免疫相关因子及基因表达。包括 MHC-class I、II 分子; 粘附分子 VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD134、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin; 白细胞介素及受体 IL-1、IL-2、IL-3、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-13、IL-15、IFN- γ 、TNF- α ; 趋化细胞因子及受体 MCP-1、MIP-1、RANTES、CCR-1、CCR-2、CCR3、CCR-4、CCR-5; 细胞因子 perforin (细胞穿孔素)、granzam B (颗粒素酶 B) 等。

本发明的另一具体实施方式, 是给排斥疑似患者注射一个适当剂量的临床常规免疫调节药, 例如抗 CD3 抗体 OKT3。OKT3 引发一过性 T 细胞白细胞介素释放及 T 细胞活化状态, 然后使 T 细胞进入抑制状态。注射前和注射至少 2 小时后分别采集外周血标本, 通过流式细胞仪-微载体生物芯片, 检测排斥疑似患者的外周血中的可溶性免疫相关因子及基因表达; 注射至少 6 小时后采集外周血标本, 做 T 淋巴母细胞分析和细胞膜抗原表达分析。后者包括 MHC-class I、II 分子; 粘附分子 VCAM-I、ICAM-I, B7-1/2、CD23、CD30、CD28、CD44、CD40、CD40L、CD69、CD71、CD134、LFA-1、LFA-3、E-selectin、P-selectin; 白细胞介素受体 IL-2R、TNF- α 受体等。

本发明的另一具体实施方式, 给实验动物 (如小鼠) 注射至少一个适当剂量的白细胞群 (T 细胞、B 细胞或单核细胞) 特异性活化因子。T 细胞特异性活化因子包括 ConA、PHA、

抗 CD3 抗体；B 细胞特异性活化因子包括 PWA、抗 CD40 抗体、CD40L、抗 IgM 抗体、TNP-ficol 和异种抗原；单核/巨噬细胞特异性活化因子包括 LPS, TNF- α 和 IFN- γ 。注射前和注射至少 2 小时后分别采集外周血标本，做白细胞介素分析；注射至少 6 小时后采集外周血标本，做 T 淋巴母细胞和白细胞膜抗原表达分析。在注射细胞活化因子的同时，给动物至少一种免疫抑制剂治疗，则可对潜在免疫抑制药物进行筛选。在注射细胞活化因子前后的不同时间，使用免疫抑制剂，可对免疫抑制剂的药效学、药代学和药动学进行分析。

本发明的另一具体实施方式，给实验动物（如小鼠）输入细胞内探针（如 5-(and 6)-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester CFSE）标记的自体白细胞或白细胞亚群。然后，注射至少一个适当剂量的白细胞（T 细胞、B 细胞）群特异性活化因子，引发白细胞活化、增生。随着细胞的每一次分裂，CFSE-标记的细胞荧光强度对倍递减；至少 12 小时后采集外周血或脾白细胞样本，用流式细胞仪检测其荧光强度。在注射细胞活化因子的同时，给动物至少一种免疫抑制剂治疗，则可对潜在免疫抑制药物进行筛选。

本发明的另一具体实施方式，使用流式细胞分析和免疫荧光技术，测定白细胞激活、增生和膜表面抗原表达。用流式细胞仪正向光衍射和电子密度，以及单克隆抗体染色，测定 T 淋巴母细胞及细胞分裂、增生；用双色、多色单克隆抗体荧光染色，测定白细胞膜表面抗原表达。

本发明的另一具体实施方式，使用流式细胞仪-微载体生物芯片，测定外周血可溶性免疫相关因子及基因表达，建立临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析系统。将外周血样本与微载体-捕获蛋白探针共培养，再加入荧光标记的检测蛋白探针，测定可溶性蛋白分子；将 RT、PCR、或 RT-PCR 扩增的靶核酸单链产物，与微载体-捕获核酸探针共培养，再加入荧光标记的检测核酸探针，测定靶核酸单链。使用不同直径和自身荧光强度的微载体，以及不同波长荧光的探测探针，可在同一试管对一个微量样本的多项指标同时分析，即高通量分析。

本发明的另一具体实施方式，建立器官移植免疫监测数据库，包括外周血 T 淋巴母细胞数据库、白细胞膜表面抗原数据库、可溶性免疫相关因子数据库和白细胞基因数据库，及提供临床免疫监测和免疫调节药物筛选的试剂盒。

1. 流式细胞仪-细胞分析系统举例:

根据本发明的具体实施方式之一, 使用流式细胞分析和免疫荧光技术, 测定白细胞激活、增生和膜表面抗原表达。将排斥疑似患者、OKT3 治疗患者的外周血白细胞, 或体内激活的小鼠外周血(或脾)白细胞, 与标记不同荧光的白细胞特异性抗体和抗白细胞膜表面分子抗体共培养(4° C, 30 分钟), 用磷酸缓冲液(PBS)离心洗涤离心一次, 进行流式细胞仪分析。

例 1. T 细胞膜表面分子测定试剂盒

T 细胞特异性抗体	抗 T 细胞膜表面分子抗体
抗 TCR 抗体-PE (或抗 CD3-PE)	抗 CD23-FITC
	抗 CD30-FITC
	抗 CD25-FITC
	抗 CD69-FITC
	抗 CD71-FITC
	抗 CD134-FITC

例 2. B 细胞膜表面分子测定试剂盒

B 细胞特异性抗体	抗 T 细胞膜表面分子抗体
抗 B 细胞抗体-PE (或抗 IgM-PE)	抗 B7-1-FITC
	抗 B7-2-FITC
	抗 ICAM-1-FITC
	抗 MHC class-I FITC
	抗 MHC class II-FITC

例 3. 单核/巨噬细胞膜表面分子测定试剂盒

B 细胞特异性抗体	抗 T 细胞膜表面分子抗体
抗单核/巨噬抗体-PE	抗 B7-1-FITC
	抗 B7-2-FITC
	抗 CD11b-FITC
	抗 ICAM-1-FITC
	抗 MHC class-I FITC

	抗 MHC class II-FITC
--	---------------------

2. 流式细胞仪-蛋白分子芯片举例:

根据本发明的具体实施方式之一,使用流式细胞仪-微载体蛋白芯片,测定外周血可溶性免疫相关因子。将排斥疑似患者、OKT3 治疗患者的血清,或体内激活的小鼠血清,与微载体-捕获蛋白探针共培养(4° C, 30 分钟),用磷酸缓冲液(PBS)离心洗涤离心一次;再加入荧光标记的检测蛋白探针共培养(4° C, 30 分钟);用磷酸缓冲液(PBS)离心洗涤离心一次,进行流式细胞仪分析,测定可溶性蛋白分子;使用不同直径和自身荧光强度的微载体,以及不同波长荧光的探测探针,可在同一试管对一个微量样本的多项指标同时分析。

例 1. 白细胞介素检测试剂盒 1

微载体直径(μm)	捕获蛋白分子探针	探测蛋白分子探针-荧光
3	抗 I1-2 抗体	抗 I1-2 抗体-FITC
4	抗 I1-4 抗体	抗 I1-4 抗体-FITC
5	抗 I1-5 抗体	抗 I1-5 抗体-FITC
6	抗 I1-6 抗体	抗 I1-6 抗体-FITC
8	抗 I1-7 抗体	抗 I1-7 抗体-FITC
10	抗 I1-8 抗体	抗 I1-8 抗体-FITC

例 2. 白细胞介素检测试剂盒 2

微载体直径(μm)	捕获蛋白分子探针	探测蛋白分子探针-荧光
3	抗 I1-10 抗体	抗 I1-10 抗体-FITC
4	抗 I1-12 抗体	抗 I1-12 抗体-FITC
5	抗 I1-15 抗体	抗 I1-15 抗体-FITC
6	抗 TNF-α 抗体	抗 TNF-α 抗体-FITC
8	抗 IFN-γ 抗体	抗 IFN-γ 抗体-FITC
10	抗 TGF-β 抗体	抗 TGF-β 抗体-FITC

例 3. 可溶性粘附分子及白细胞介素受体检测试剂盒

微载体直径 (μM)	捕获蛋白分子探针	探测蛋白分子探针-荧光
3	抗 CD23 抗体	抗 CD23 抗体-FITC
4	抗 CD30 抗体	抗 CD30 抗体-FITC
5	抗 ICAM-1 抗体	抗 ICAM-1 抗体-FITC
6	抗 VCAM-1 抗体	抗 VCAM-1 抗体-FITC
8	抗 IL-2R 抗体	抗 IL-2R 抗体-FITC
10	抗 TNF- α R 抗体	抗 TNF- α R 抗体-FITC

3. 流式细胞仪-核酸分子芯片举例:

根据本发明的具体实施方式之一, 使用流式细胞仪-微载体核酸芯片, 测定免疫相关因子基因。将排斥疑似患者、OKT3 治疗患者外周血白细胞, 或体内激活的小鼠外周血(脾)白细胞核酸, 经 RT、PCR、或 RT-PCR 扩增, 产生的靶核酸单链与微载体-捕获核酸探针杂交, 再加入荧光标记的检测核酸探针, 测定靶核酸单链。使用不同直径和自身荧光强度的微载体, 以及不同波长荧光的探测探针, 可在同一试管对一个微量样本的多项指标同时分析, 即高通量分析。

例 1. 白细胞介素基因检测试剂盒 1

微载体直径 (μM)	捕获核酸分子探针	探测核酸分子探针-荧光
3	IL-2 cDNA 探针	IL-2 cDNA 探针-FITC
4	IL-4 cDNA 探针	IL-4 cDNA 探针-FITC
5	IL-5 cDNA 探针	IL-5 cDNA 探针-FITC
6	IL-6 cDNA 探针	IL-6 cDNA 探针-FITC
8	IL-7 cDNA 探针	IL-7 cDNA 探针-FITC
10	IL-8 cDNA 探针	IL-8 cDNA 探针-FITC

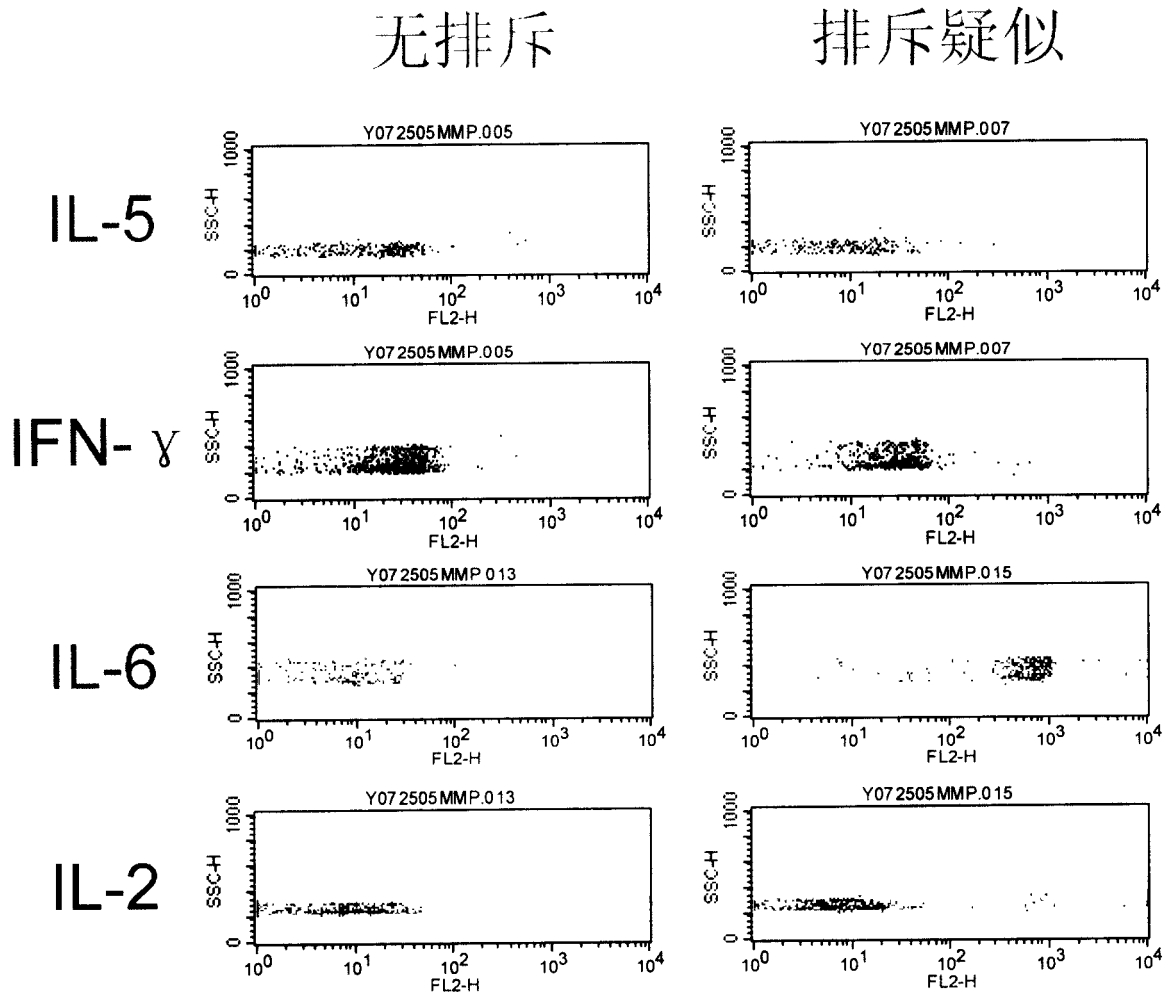
例 2. 白细胞介素基因检测试剂盒 2

微载体直径 (μM)	捕获核酸分子探针	探测核酸分子探针-荧光
3	IL-10 cDNA 探针	IL-10 cDNA 探针-FITC

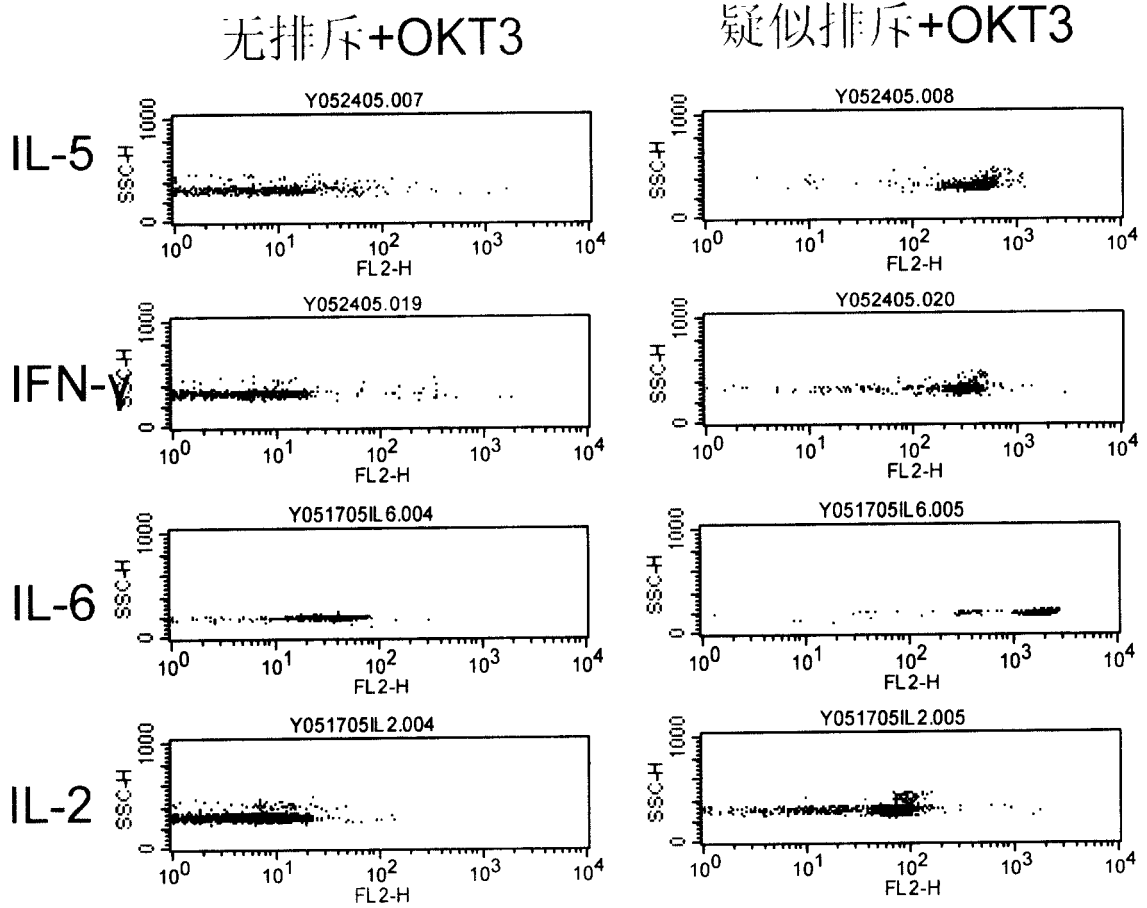
4	I1-12 cDNA 探针	I1-12 cDNA 探针-FITC
5	I1-15 cDNA 探针	I1-15 cDNA 探针-FITC
6	TNF- α cDNA 探针	TNF- α cDNA 探针-FITC
8	IFN- γ cDNA 探针	IFN- γ cDNA 探针-FITC
10	TGF- β cDNA 探针	TGF- β cDNA 探针-FITC

3. 可溶性粘附分子及白细胞介素受体基因检测试剂盒

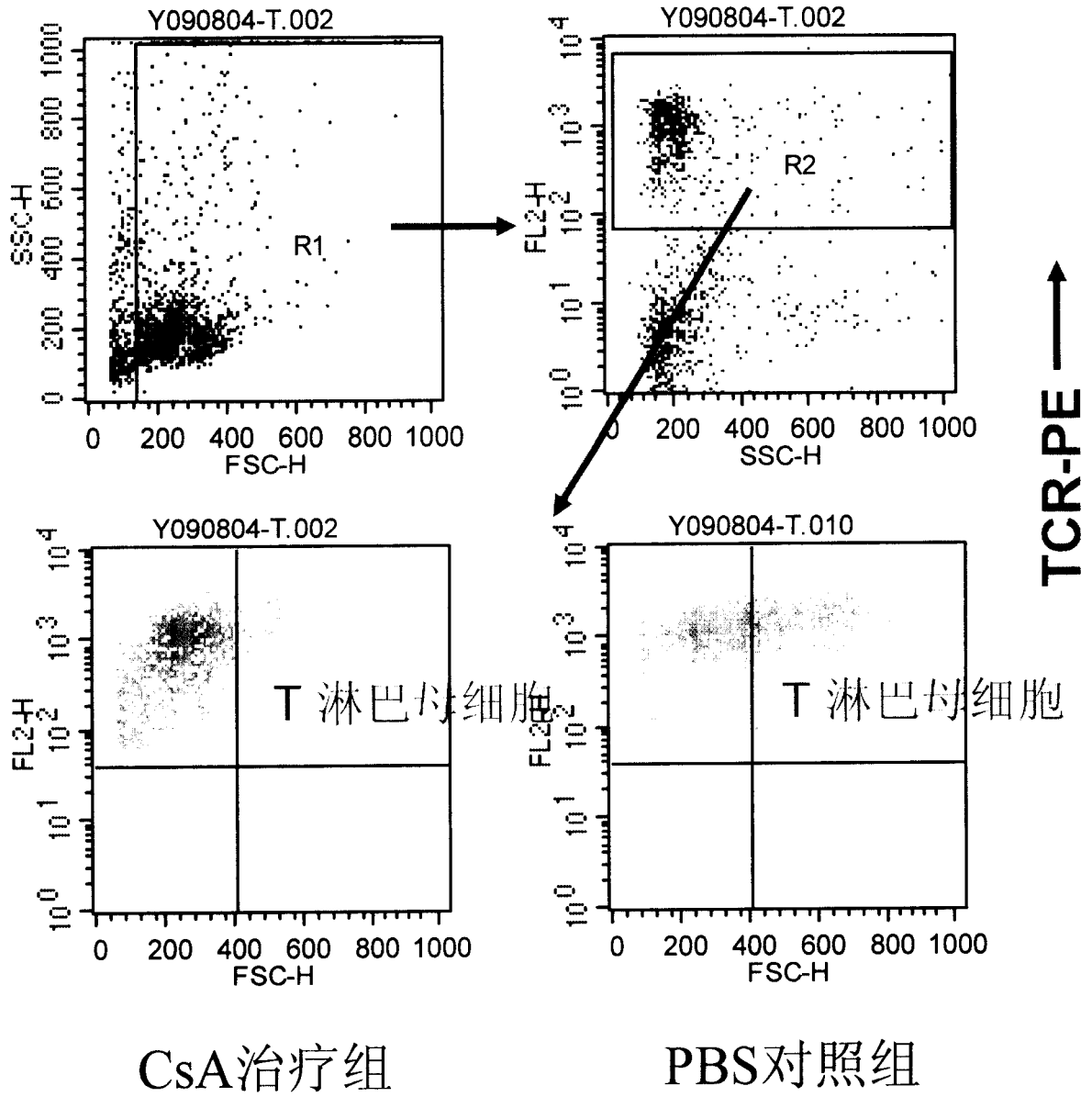
微载体直径 (μM)	捕获核酸分子探针	探测核酸分子探针-荧光
3	CD23 cDNA 探针	CD23 cDNA 探针-FITC
4	CD30 cDNA 探针	CD30 cDNA 探针-FITC
5	ICAM-1 cDNA 探针	ICAM-1 cDNA 探针-FITC
6	VCAM-1 cDNA 探针	VCAM-1 cDNA 探针-FITC
8	IL-2R cDNA 探针	IL-2R cDNA 探针-FITC
10	TNF- α R cDNA 探针	TNF- α R cDNA 探针-FITC



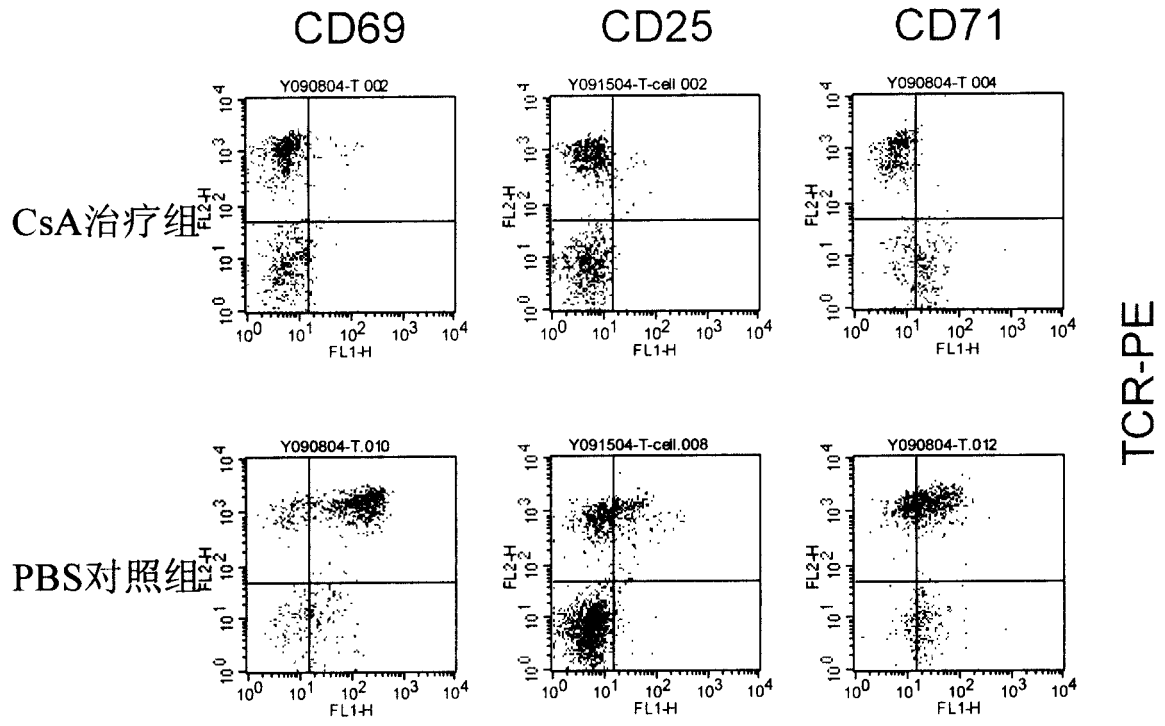
附图一.



附图二



附图三

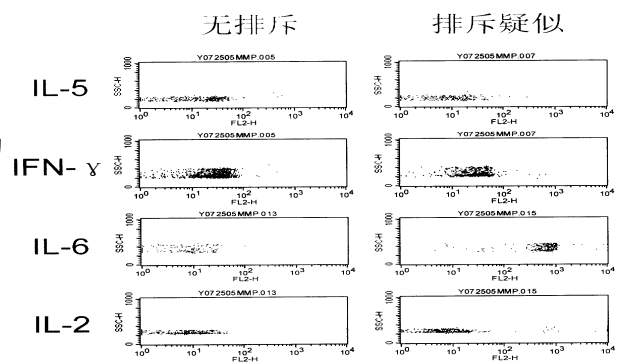


附图四

专利名称(译)	流式细胞仪生物芯片：免疫监测及药物研发		
公开(公告)号	CN1996015A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200610041612.0	申请日	2006-01-06
[标]申请(专利权)人(译)	林远 郑芳		
申请(专利权)人(译)	林远 郑芳		
当前申请(专利权)人(译)	林远 郑芳		
[标]发明人	林远 郑芳		
发明人	林远 郑芳		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/00 G01N21/00		
外部链接	Espacenet	SIPO	

摘要(译)

本发明涉及流式细胞仪和微载体生物芯片，对器官移植免疫反应和药物的免疫调节作用进行高通量分析的技术，材料和试剂盒。其特征是：一种对人体无副作用的体内T细胞激活技术；一种筛选潜在免疫调节药物的动物实验技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-细胞分析技术；一种临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的流式细胞仪-分子分析技术；一个流式细胞仪临床免疫监测和潜在免疫调节药物筛选的细胞、蛋白和基因数据库，以及相应的试剂盒。



附图一。