



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110716053 A

(43)申请公布日 2020.01.21

(21)申请号 201910802831.3

(22)申请日 2019.08.28

(71)申请人 苏州才博医学科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市工业园区星湖
街218号生物纳米园A2楼423单元

(72)发明人 蔡俊超

(74)专利代理机构 苏州中合知识产权代理事务
所(普通合伙) 32266

代理人 龙涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

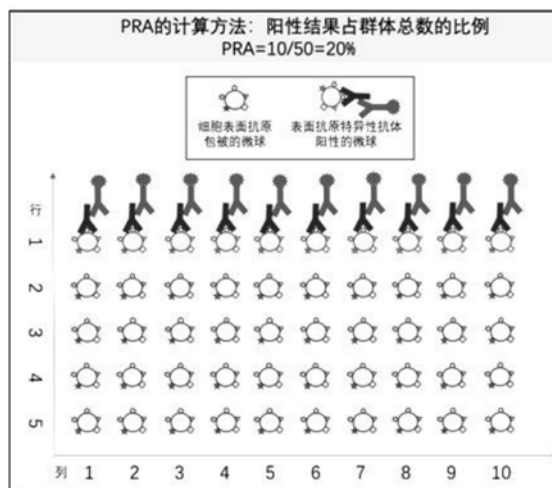
权利要求书1页 说明书4页 附图2页

(54)发明名称

检测群体反应性抗体的新方法

(57)摘要

本发明公开了检测群体反应性抗体的新方法,在移植受者潜在的供者群体中选取一定数量的有代表性的供者,采集并分离其细胞,纯化细胞表面抗原;把这些来源于潜在供者群体中不同个体细胞的纯化抗原组成一个可以代表潜在供者群体组织细胞表面抗原群体特征的抗原组合,通过抗原-抗体检测平台,用于被检生物学样本中PRA的检测。该方法即避免了以细胞为基础的PRA检测方法中受限于细胞数量和质量,以及技术人员操作问题相关的诸多缺点,也排除了以纯化的HLA蛋白抗原为基础的PRA检测法只能检测HLA抗体而漏检所有非HLA抗体的缺陷。



1. 检测群体反应性抗体的新方法,包括如下步骤:

- 1) 选取代表潜在供者群体细胞表面抗原群体特征的多个个体的细胞;
- 2) 分别纯化、分离出所选取细胞的细胞表面所有的抗原;
- 3) 将纯化的单个个体的细胞表面所有抗原分别结合到固定相的载体介质;
- 4) 根据抗原-抗体结合原理,检测群体反应性抗体。

2. 根据权利要求1所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,步骤1)中,所述细胞包括:血管内皮细胞、血细胞或其组分、或移植物的组织细胞。

3. 根据权利要求1所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,步骤2)中所述抗原包括HLA抗原和非HLA抗原。

4. 根据权利要求3所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,所述非HLA抗原包括:MIC基因编码蛋白-MIC抗原、次要组织相容性抗原、血管紧张素II一类受体、内皮素-1A类受体。

5. 根据权利要求1所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,步骤2)包括:直接纯化所选取细胞的细胞表面抗原、或将所选取的细胞体外培养扩增后再纯化其细胞表面抗原。

6. 根据权利要求1所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,步骤3)中,所述固定相的载体介质包括ELISA的平板、固相膜、流式或Luminex荧光微球、或蛋白芯片。

7. 根据权利要求1所述的检测群体反应性抗体的新方法,其特征在于,步骤4)采用的检测方法包括:酶联免疫吸附检测方法、免疫荧光抗体检测方法、免疫胶体金检测方法、化学发光免疫分析检测方法、蛋白芯片检测方法。

检测群体反应性抗体的新方法

技术领域

[0001] 本发明属于群体反应性抗体检测技术领域,涉及检测群体反应性抗体的新方法。

背景技术

[0002] 群体反应性抗体 (Panel Reactive Antibody, PRA) 是一种检测移植物受者外周血等生物学样本中是否存在特异性针对潜在供者群体排斥反应相关抗原的抗体的检测方法。PRA的检测结果是0-100%, 0%表示移植物受者样本中不存在可检测到的、针对任何潜在供者的抗体,排斥反应的危险最小;100%表示移植物受者样本中有针对所有潜在供者的抗体,排斥反应危险性最高。

[0003] 目前,移植临床检验中常用的PRA的检测技术主要包括以细胞为基础的、和以纯化的HLA抗原为基础的PRA检测方法 (Transplantation Reviews, Vol 18, No 4 (October), 2004: pp 192-203); SurgToday (2005) 35:605-612)。

[0004] 1. 以抗体的补体依赖性细胞杀伤作用为机理的细胞学PRA检测方法

[0005] 是在移植物受者潜在的供者群体中选取一定数量的、有代表性的潜在供者,采集其组织细胞(血管内皮细胞、血细胞或其组分、或移植物的组织细胞等)并分别加样入细胞培养平板中的培养孔中,组成一个来源于供者群体的、一定程度代表潜在供者群体移植相关抗原群体特征的细胞组合 (Panel)。随后,在补体存在的条件下,移植物受者的生物样本分别被加入潜在供者群体细胞组合中的每一个细胞培养孔中,根据抗体的补体依赖性细胞杀伤 (Complement dependent cytotoxicity, CDC) 作用机理,移植物受者生物学样本中的抗体会对表达抗体相对应的靶抗原 (包括HLA和非HLA抗原) 的细胞产生杀伤作用,导致细胞死亡。最后结果的判读是根据所有被检测的细胞群体中有多少比例的潜在供者的细胞被加入的移植物受者生物学样本中的抗体所杀伤而得出一个百分比, PRA检测结果范围是0-100%, 0%代表所有被选取的潜在供者的细胞无一被杀伤, 100%代表所有被选取的潜在供者的细胞都被杀伤。

[0006] 该方法的缺点是只能检测能激活补体的、有细胞杀伤作用的抗体,而漏检了不能激活补体但可以通过其他途径引起排斥反应的抗体,因此流式细胞技术被引入PRA的检测。

[0007] 2. 以抗体结合细胞表面抗原为机理的流式细胞PRA检测方法

[0008] 流式细胞PRA检测技术中有关潜在供者群体细胞组合的选取原理和上述 PRA检测方法类似,但结果的判读不是以细胞杀伤与否作为依据,而是根据移植物受者生物学样本中是否有抗体可以与靶细胞群中的细胞发生结合反应作为阳性判断依据,它既可检出能激活补体的、有细胞杀伤作用的抗体,又可检出非补体激活的抗体,因此,流式细胞PRA检测技术在敏感度上要高于上述的以CDC 为原理的PRA检测技术。流式细胞PRA的检测结果是0-100%, 0%代表移植物受者被检测样本中的抗体不和任何一个被选取的潜在供者的细胞发生结合反应, 100%代表移植物受者被检测样本中的抗体和所有被选取的潜在供者的细胞都发生结合反应 (ASHI Laboratory Manual, Edition 4.2.2000V. I. B. 1-8)。

[0009] 以上两种PRA检测方法都是以细胞为基础的方法,但是这两种方法受到供者群体

细胞的即时可获得性较差、细胞分离及纯化较为繁复、细胞数量和活性要求较高、对实验人员技术要求较高、干扰结果判读的因素较多等原因影响,不仅在推广应用中受到很大限制,而且在实验室间结果可比性上也有经常出现不一致,其使用的便利性较差,不易推广。

[0010] 3.以纯化的HLA抗原为基础的PRA检测技术

[0011] 随着对排斥反应相关抗原的深入研究,主要组织相容性复合物(major histocompatibility complex,MHC)基因所编码的MHC抗原,即人类白细胞抗原(Human Leukocyte Antigen,HLA)被发现是一类具有多态性的、可以引起排斥反应的主要靶抗原。基于该项发现,移植免疫学领域有相当一部分学者认为以细胞为基础的PRA检测方法检测到的阳性反应可能是由于HLA的抗体在其中起了关键性的作用。因此,随着蛋白生化技术和分子克隆技术在移植检测技术中的推广应用,以纯化的HLA抗原为基础的PRA检测方法自90年代起逐渐被广泛使用,近年来有取代以细胞为基础的PRA检测方法的趋势(Surg Today (2005) 35:605-612)。以纯化的HLA抗原为基础的PRA检测方法主要通过把从表达HLA 抗原蛋白的细胞中纯化出来的HLA抗原蛋白结合到固定相的载体介质,根据抗原抗体结合的原理,借由酶联免疫吸附实验(ELISA)、固相膜、蛋白芯片、流式微球、luminex液相芯片微球等技术平台来实现PRA的检测。

[0012] 和传统的以细胞为基础的PRA检测方法相比,以纯化的HLA抗原为基础的 PRA检测方法具有检测方法快速方便、靶抗原明确、敏感度高等优点。但是其致命的缺点是只能检测由HLA抗体引起的PRA阳性反应,而漏检了除了HLA抗体外的其他所有的移植排斥相关抗原的抗体(Transplantation Reviews,Vol 18,No 4 (October),2004:pp 192-203)。

发明内容

[0013] 针对上述问题,本发明提供了检测群体反应性抗体的新方法,解决了纯化 HLA抗原检测法只能检测HLA抗体引起的PRA阳性反应的问题。

[0014] 为了实现上述目的,本发明采用以下技术方案:

[0015] 检测群体反应性抗体的新方法,包括如下步骤:

[0016] 1)选取代表潜在供者群体细胞表面抗原群体特征的多个个体的细胞;

[0017] 2)分别纯化、分离出所选取细胞的细胞表面所有的抗原;

[0018] 3)将纯化的单个个体的细胞表面所有抗原分别结合到固定相的载体介质;

[0019] 4)根据抗原-抗体结合原理,检测群体反应性抗体。

[0020] 进一步地,步骤1)中,所述细胞包括:血管内皮细胞、血细胞或其组分、或移植物的组织细胞等,但不局限于此。

[0021] 进一步地,步骤2)中所述抗原包括HLA抗原和非HLA抗原。

[0022] 更进一步地,所述非HLA抗原包括:主要组织相容性复合体I类分子链相关基因,即MIC基因编码蛋白-MIC抗原、次要组织相容性抗原(minor histocompatibility antigens)、血管紧张素II一类受体(AT1R)、内皮素-1A类受体(ETAR)等,但不局限于此。

[0023] 进一步地,步骤2)包括:直接纯化所选取细胞的细胞表面抗原、或将所选取的细胞体外培养扩增后再纯化其细胞表面抗原。

[0024] 进一步地,步骤3)中,所述固定相的载体介质包括ELISA的平板、固相膜、流式或Luminex荧光微球、或蛋白芯片等,但不局限于此。

[0025] 进一步地,步骤4)采用的检测方法包括:酶联免疫吸附检测方法、免疫荧光抗体检测方法、免疫胶体金检测方法、化学发光免疫分析检测方法、蛋白芯片检测方法,但不局限于此。

[0026] 本发明是在移植受者潜在的供者群体中选取一定数量的有代表性的供者,采集并分离其细胞,纯化细胞表面所有抗原;把这些来源于潜在供者群体中不同个体细胞的纯化抗原(细胞表面含HLA和非HLA抗原)组成一个可以代表潜在供者群体组织细胞表面抗原群体特征的抗原组合,利用固相免疫学抗原-抗体结合反应原理,体外检测被检生物学样本中PRA。

[0027] 本发明具有如下有益效果:

[0028] 和细胞学PRA检测方法相比,本发明可以同时测定HLA和非HLA抗体引起的 PRA阳性反应,但是本发明可以避免细胞学检测方法的诸多缺点,比如细胞的即时可获得性较差、细胞分离及纯化较为繁复、细胞数量和活性要求较高、对实验人员技术要求较高、干扰结果判读的因素较多等。

[0029] 和目前常用的以纯化HLA抗原检测PRA的方法相比,本发明具有人为因素影响小、敏感度和稳定性高、易于推广的优点,但是本发明解决了纯化HLA抗原检测法只能检测HLA抗体引起的PRA阳性反应而漏检非HLA抗体引起的PRA阳性反应的问题。

附图说明

[0030] 图1为本发明检测试剂制备示意图。

[0031] 图2为本发明检测结果判读示意图。

[0032] 图3为本发明PRA的计算方法示意图。

具体实施方式

[0033] 下面用实施例结合附图对本发明作进一步描述,但以下实施例不应视为对本发明保护范围的限定。

[0034] 实施例

[0035] 本实施例中,检测群体反应性抗体的新方法,主要包括以下步骤:

[0036] 1) 根据潜在的移植物来源群体的特征,选取一定数量的、代表潜在供者群体细胞表面抗原群体特征的多个个体的组织细胞,如血管内皮细胞、血细胞或其组分、或移植物的组织细胞等。

[0037] 2) 分别从选取的个体细胞或经体外扩增培养后的个体的组织细胞表面纯化、分离出细胞表面所有的抗原(含HLA抗原及其他非HLA抗原),如图 1A所示。

[0038] 根据不同的细胞来源,细胞表面的非HLA抗原包括但不限于下列种类:主要组织相容性复合体I类分子链相关基因,即MIC基因编码蛋白-MIC抗原、次要组织相容性抗原(minor histocompatibility antigens)、血管紧张素II 一类受体(AT1R)、内皮素-1A类受体(ETAR)等。

[0039] 3) 通过共价或非共价结合的方式,将纯化的单个个体的细胞表面所有抗原分别结合到固定相的载体介质,以流式或Luminex荧光微球为例,来源于1号供者的细胞表面抗原被包被与对应的1号荧光微球,以此类推;同号同质的微球等载体介质也可以等比例分成不

同小组分别包被不同个体来源的抗原后并为一个大组,如图1B所示。

[0040] 固定相的载体介质还可以包括ELISA的平板、固相膜、流式或Luminex 荧光微球、或滴定板、滤膜和载玻片等检测用的芯片载体等。

[0041] 4) 检测结果的判读:结合了纯化的细胞表面抗原的载体介质与待检测的样本反应,以包被了纯化的细胞表面抗原的流式或Luminex荧光微球为例,在被标记的靶抗体特异性2抗的指示作用下,表面没有结合抗原特异性抗体的微球也无继发的标记2抗的结合,显示标记抗体的阴性结果(图 2A);而结合了抗原特异性抗体的荧光微球有继发的标记2抗结合,显示标记抗体的阳性反应(图2B)。

[0042] 5) PRA的计算方法:某一检测样本中的抗体和由50组抗原包被的微球群体的抗原抗体结合反应的结果如图3所示,图中包含5行10列共计50 组不同的荧光微球为一个群体,其中每一组微球(以单个微球代表)表面包被了来源于单个潜在供体细胞表面的纯化抗原,50组抗原包被的微球代表了有50个个体组成的一个群体的细胞表面抗原组合。

[0043] 图中显示第1行所有10组微球都呈现有抗体结合到微球表面抗原的阳性反应,因此该PRA计算结果 $=10/50=20\%$ 。

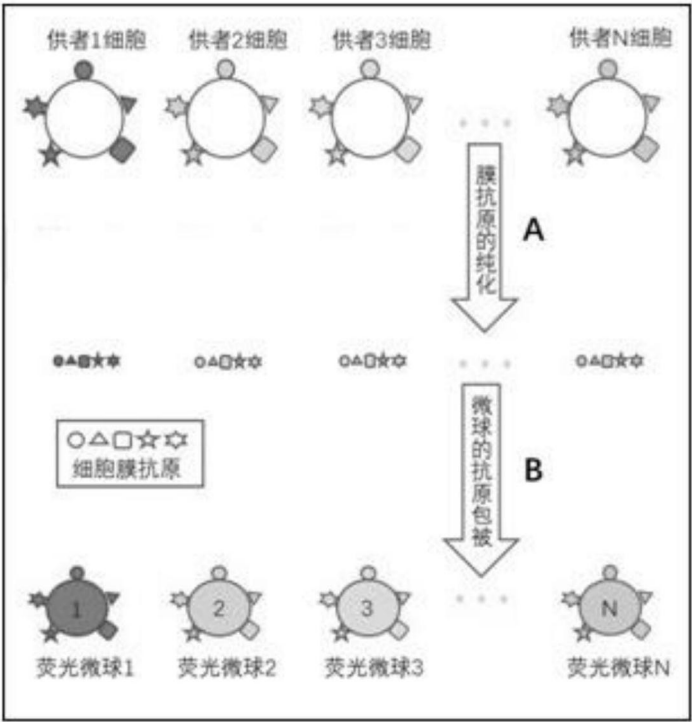


图1

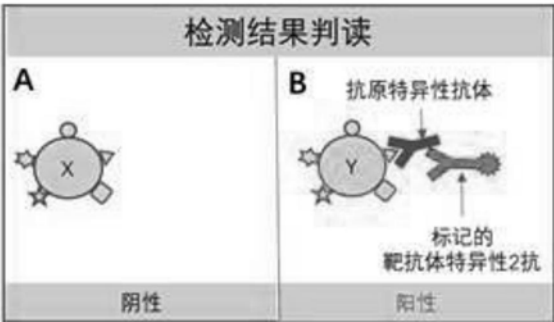


图2

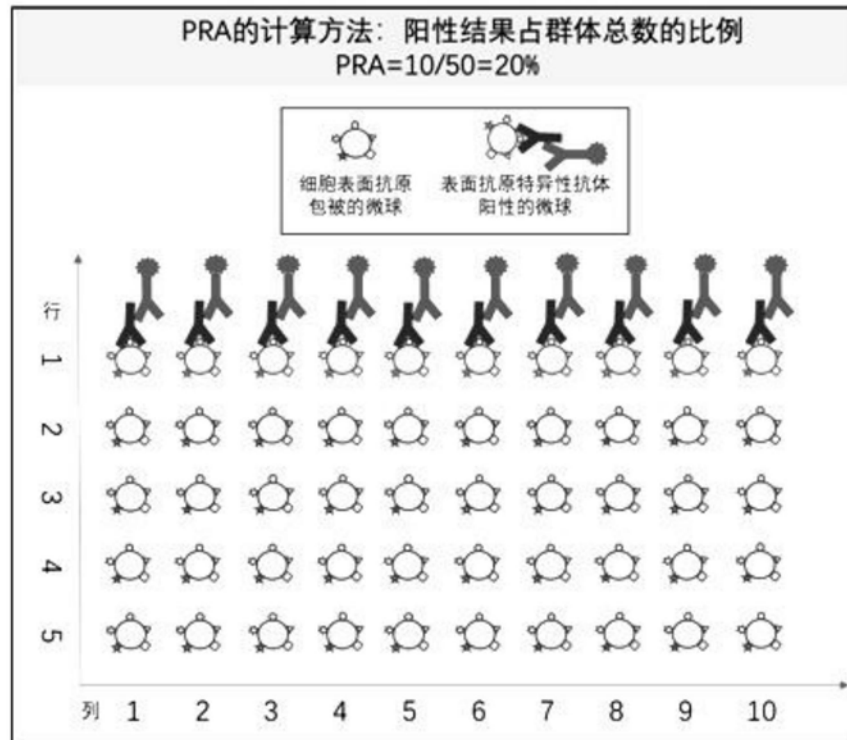


图3

专利名称(译)	检测群体反应性抗体的新方法		
公开(公告)号	CN110716053A	公开(公告)日	2020-01-21
申请号	CN201910802831.3	申请日	2019-08-28
[标]发明人	蔡俊超		
发明人	蔡俊超		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/58 G01N33/535 G01N33/533 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/535 G01N33/58 G01N33/581 G01N33/582 G01N33/6854		
代理人(译)	龙涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了检测群体反应性抗体的新方法，在移植受体潜在的供者群体中选取一定数量的有代表性的供者，采集并分离其细胞，纯化细胞表面抗原；把这些来源于潜在供者群体中不同个体细胞的纯化抗原组成一个可以代表潜在供者群体组织细胞表面抗原群体特征的抗原组合，通过抗原-抗体检测平台，用于被检生物学样本中PRA的检测。该方法即避免了以细胞为基础的PRA检测方法中受限于细胞数量和质量，以及技术人员操作问题相关的诸多缺点，也排除了以纯化的HLA蛋白抗原为基础的PRA检测法只能检测HLA抗体而漏检所有非HLA抗体的缺陷。

