

[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 33/569 G01N 33/531



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02124072.8

[43] 公开日 2003 年 9 月 24 日

[11] 公开号 CN 1444044A

[22] 申请日 2002.6.18 [21] 申请号 02124072.8

[71] 申请人 帕弗瑞生物技术(北京)有限公司

地址 100176 北京市亦庄经济技术开发区宏  
达北路 12 号创新大厦 B 座三区三层

[72] 发明人 陈 格

权利要求书 2 页 说明书 10 页 附图 5 页

[54] 发明名称 以酶联免疫测定为基础的 HLA 补体依赖性细胞毒性抗体检测方法和试剂盒

[57] 摘要

本发明根据免疫学中补体依赖性细胞毒性 (Complement - dependent Cytotoxicity, CDC) 反应原理, 建立了一种测定 HLA 补体依赖性细胞毒性抗体 (Complement Fixing Antibodies; CFAs) 测定的体外酶联免疫反应方法及试剂盒。该反应系统由固相的 HLA 抗原或具有 HLA 抗原的靶细胞以及液相酶标配体组成。受检样品中的 CFAs 与固相 HLA 抗原或靶细胞的 HLA 抗原结合并同时固定存在于反应系统中的酶标记补体或以酶标抗补体抗体与固定于 HLA 抗原 - CFAs 复合物中的补体结合, 然后加入相应的酶底物产生酶学显色反应; 由于该显色信号的强度与样品中的 CFAs 浓度呈正比关系, 因此通过测定这种酶学显色的光密度吸光值 (Optical Density; OD) 即可达到对样品 CFAs 有无及其相对含量

的测量。在以细胞为基础的反应系统中, 引入针对细胞表面特征性标记 (如 CD 等) 的抗体, 用以识别分离特定细胞群体, 可实现对发生在该细胞群体 CDC 效应的特异性测量。

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

**权利要求:**

- 1、一种通过测定补体结合率达到对样品 CFAbs 或 CDC 效应测定的免疫学方法及试剂盒。该方法或试剂盒包括以下内容:
- 2、在受检样品与相应的靶细胞或靶抗原的反应系统中,至少加入一种或一种以上与 CDC 效应过程有关或/和具有和靶细胞其它表面特性蛋白分子结合的标记配体或抗体成分。
- 3、权利要求 1 中 CFAbs 解释为任何来源的具有固定或结合补体能力的抗体成分。
- 4、权利要求 2 中的标记配体或标记抗体解释为以下两类:  
第一类:直接或间接参与 CDC 反应的各种成分或/和其相应的抗体,其能反映 CDC 效应过程的任一阶段或状态。  
第二类:能够反映或鉴定靶细胞特征,或具有对靶细胞进行鉴别分类的各种配体或抗体成分。
- 5、权利要求 4 中的所述及的两类配体或抗体可同时或单独使用;但在反应测量系统中,必须包括至少一种标记配体或抗体,借以反映 CDC 的发生过程。
- 6、权利要求 2 中的 CDC 效应过程解释为由具有固定补体作用的抗体和第一个补体成分结合于靶细胞或靶抗原开始到形成最终免疫复合物,或补体膜攻击复合物(MAC; C5b-9)至细胞死亡的全过程。
- 7、权利要求 2 中,受检样品包括任何一种可能含有 CFAbs 的生物样品;包括人、动物的所有体液成分;例血清、血浆、脑脊液、脊髓液、羊水、唾液、尿液等。
- 8、权利要求 2 中,靶细胞解释为任何一种能与 CFAbs 结合的经人工处理或天然存在的真核或原核生物细胞以及血液有形成分:例人类细胞(红细胞、白细胞、各种组织细胞、各种干细胞等)、血小板、动物细胞、昆虫细胞、微生物、细菌等。
- 9、权利要求 8 中的“人工处理”进一步解释为:经分子生物学方法改变细胞遗传特征或细胞生物学方法改造的细胞(如基因重组、转基因、细胞融合、体外培养的细胞系等)。
- 10、权利要求 4 中的“人工处理”进一步解释为包括经化学、生物和物理方法处理的无生物活性的靶细胞(如化学试剂固定、物理冷冻干燥等)。
- 11、权利要求 2 中,靶抗原成份解释为:任何能与 CFAbs 结合的生物抗原成份;尤其是指以固相形式存在的抗原。例通过化学方法连接或直接通过物理吸附包被在固相颗粒表面的多种 HLA 成份或其它抗原成份等。
- 12、权利要求 2 中的靶抗原成份进一步解释为通过化学、生物物理方法合成、生物合成、分

子生物学方法重组、修饰或经纯化天然存在的任何生物抗原成分及其多肽、多肽片段、蛋白分子等。

- 13、权利要求 2 中的标记抗体解释为抗 CDC 效应过程中所有参与成分（如抗 HLA 抗体、补体及其复合物、各种因子、受体等）的抗体；以及特异性抗靶细胞抗体和抗固相颗粒表面 HLA 靶抗原的抗体。
- 14、权利要求 2 中标记抗体或标记配体的标记解释为能被相应仪器所测定的任何酶学显色反应、化学发光反应、生物发光反应、时间延迟发光反应、电致发光反应、多种荧光物质以及放射性同位素标记等。
- 15、权利要求 2 中的细胞表面特性蛋白解释为任何能够反映该类细胞特性的蛋白成分：如细胞表面的各种受体和抗原成分（如血型抗原 ABO 系统等）、淋巴细胞表面抗原、白细胞表面抗原、各种 CD 抗原、HLA 抗原等。
- 16、权利要求 2 中的靶抗原、配体以及抗体成分进一步解释为以液相形式或固相形式存在于反应系统之中：如配体或抗体通过直接（或间接）物理吸附或化学连接到固相材料上；如微孔板、膜、固相颗粒等任何有形材料。
- 17、权利要求 2 中的标记配体进一步解释为：C1(C1q、C1r、C1s、)、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9；C1qrs、 $\overline{C1qrs}$ 、C2a、C2b、C3a、C3b、C4a、C4b、C4b2、iC3b、 $\overline{C4b2b}$ 、 $\overline{C4b2b3b}$ 、 $\overline{C3bBb}$ 、 $\overline{C3bnBb}$ 、C5a、C5b、C5b67、C5b $\sphericalangle$ 8、C5b $\sphericalangle$ 9；C1-抑制因子、C4-结合蛋白、D 因子、B 因子、P 因子（备解素）、I-因子、H-因子、S-蛋白；Ba、Bb、MBP、MCP、DAF(CD55)、CR1、CR2、CR3、CR4、CR5、C3aR、C2aR、C4aR、C1qR、CD59 等。
- 18、权利要求 2 中的标记配体来源解释为人源性、动物源性以及天然存在的经纯化或未经纯化的或通过化学合成、分子生物学方法获得的各种直接或间接参与 CDC 反应的各种成分。
- 19、权利要求 2 中的标记抗体解释为任何来源的单克隆和多克隆抗体的完整分子及其片段，包括人源性、动物源性、植物源性或通过基因工程方法获得的完整抗体分子、嵌合抗体分子（Chimeric Abs）、单链抗体分子及其片段如 F(ab')<sub>2</sub>、Fab、Fv、Facb、F(abc')<sub>2</sub>、ScFv 等。

## 以酶联免疫测定为基础的 HLA 补体依赖性细胞毒性抗体检测方法和试剂盒

### 一、技术领域

本发明以免疫酶学反应为方法学基础，通过测定 CFAbs 固定补体量实现对样品中 CFAbs 测量的一种 CDC 效应评估方法。特别涉及器官移植免疫中 HLA 血清方法学的基本测定原理。

### 二、技术背景

组织器官移植中排斥反应是生物机体免疫系统对外来移植物（非己）产生的免疫应答反应。当移植物细胞表面的蛋白成分（非己抗原）与受者免疫系统接触时，通过免疫识别这些非己抗原成分并激发受者体液免疫系统、细胞免疫系统对移植物发动免疫攻击，破坏、排斥非己移植物，导致组织器官移植失败。

组织器官移植中，受者免疫系统通过 MHC（组织相容性复合物）识别机制对移植物 MHC 表型及短肽复合物进行双重免疫识别。在人类 MHC 称为人类白细胞抗原（HLA），如果移植供者与受者 HLA 型别不相符合，则受者免疫系统将移植物识别为非己并对其发生免疫应答，导致“免疫排斥反应”。

在这种免疫排斥反应中，超急性免疫排斥反应主要由受者体液免疫成分即受者体内在移植前已经存在的，针对供者 HLA 的抗体分子所介导。这些抗体由受者怀孕、接受输血、器官移植等使其免疫系统接触非己 HLA 分子而产生。这类抗体的特征是能迅速与供者 HLA 结合并通过固定补体，激活补体系统发生级联反应，诱发 CDC 效应。这种超急性免疫排斥反应发生异常迅速，通常为几分钟到数小时；而急性、慢性免疫排斥反应则由受者的体液免疫及细胞免疫系统同时介入。因此，为了预防器官移植中免疫排斥反应的发生，除尽量选择 HLA 型别与受者 HLA 型别相匹配的供者外，在移植前利用供者淋巴细胞与受者血清进行交叉配型，以鉴别受者体内是否存在针对供者 HLA 的抗体是预防超急性排斥反应发生的关键。同时，在器官移植后，对受者体内 HLA 抗体的检测，包括 PRA（群体反应性 HLA 抗体）动态测定对急性、慢性排斥反应发生的监测以及移植后受者生存期限的预测具有极其重要价值。

根据抗体是否能够固定激活补体，诱发 CDC 效应与否，人类 HLA 抗体主要可分为两类：一类为与相应的 HLA 结合后可固定补体并激活补体系统诱发 CDC 效应，该类 HLA 抗体称为补体依赖性细胞毒性抗体（Complement-dependent Cytotoxic Antibodies; CDC-Abs）或补体

固定性 HLA 抗体 (CFAbs; Complement Fixing Antibodies); 其在诱发免疫排斥反应中的作用已十分明确, 是直接导致免疫排斥反应尤其是超急性免疫排斥反应的体液免疫成分; 而另一类 HLA 抗体, 虽能与 HLA 发生特异性结合, 但并不固定补体, 不激发 CDC 效应, 称为非补体固定抗体 (Non-CFabs; Non-Complement Fixing Antibodies)。此类抗体甚至在机体免疫系统没有接触任何非己 HLA 的情况下, 以天然形式存在于人类身体内; 并可与自身 (Autologous) 或外来 (Allogeneic) 非己 HLA 分子结合, 但并不激活补体, 诱发免疫 CDC 攻击效应。迄今, 人们对这类抗体的作用并不十分明了。但多数学者认为, 这些抗体属于一种天然抗体 (Natural Antibody) 成分, 对生物体具有保护作用。美国、法国等曾对此作过较为深入的研究, 体外、体内大量实验以及临床实验结果都获得完全一致结论: 即正常人体内存在天然抗体, 由于其具有免疫调节功能, 对维持正常生物机体健康发挥着某种有益的保护作用 (Protective Effects) 并可有效地应用于抑制器官移植中的免疫排斥反应。

目前, 国际上对 HLA 抗体测定的方法分为两类: 一类为 Terasaki's 微量淋巴细胞毒性试验, 简称为 CDC 血清学方法, 是一种普遍认为经典的标准 CDC 测定方法。该方法以 CDC 诱发的淋巴细胞死亡率作为评判标准, 其主要特征是直接测定由 CFabs 诱发的 CDC 最终效应-细胞死亡, 为一种 CDC 生物效应测定方法。该方法已广泛应用于临床器官移植的交叉配型以及 PRA 测定; 但其存在费时长、技术复杂、实验条件不易控制等很多缺点。另一类方法可同时测定 CFabs 和 Non-CFabs; 包括流式细胞仪测定结合于细胞表面的 IgG 抗体测定法, 或以纯化的 HLA 包被固相颗粒的抗 HLA 抗体测定法; 以及使用纯化 HLA 包被 96 孔微孔板测定与 HLA 结合的 IgG 抗体 ELISA 方法等。这些方法最大的缺点是忽略了天然 HLA 抗体的存在 (Non-CFabs), 它们并不引起 CDC 效应; 相反, 这些抗体与相应的 HLA 结合后, 可封闭该 HLA 抗原位点, 阻止 HLA 毒性抗体-CFabs 与相应 HLA 结合, 从而阻断随之发生的 CDC 效应, 使受者产生对移植物的免疫耐受。因此, 上述这类方法在检测方法学原理上存在明显缺陷, 不能区别作用完全不同的以上两类抗体。这就是为什么许多实验室经常得出令人难以解释或与 CDC 血清学相互矛盾的结果, 甚至与受者临床转归完全相反结果: 如接受正常人免疫丙种球蛋白 (Intravenous Immunoglobulin Gamma; IVIG) 免疫抑制治疗的器官移植受者, 上述方法结果持续阳性, 而临床病人病情正常或转好。另外, 在临床器官移植中, 该类方法结果经常出现假阳性引起对供者选择的误导, 致使某些急待器官移植的患者错过移植机会而病情恶化甚至死亡。

目前所有测定 HLA 抗体的方法另一明显不足是所需时间较长, 这在尸体供者器官移植中是导致移植失败的首要原因。

综上所述, 组织交叉配型在器官移植前, 对受者体内已经存在的 CFabs 测定, 是决定器

官移植成败的关键因素之一；在器官移植后，是监测受者有无免疫排斥的重要指标；同时，对接受移植后受者的病情转归具有预测作用。

目前，国际上普遍使用的上述测定 HLA 抗体的各种方法，均不能充分满足以上要求。因此，建立一种简便、快速、准确、灵敏、特异、稳定的 CFAs 测定的标准化方法成为器官移植中的迫切需要。

本发明根据 CDC 效应的基本原理，在免疫酶学反应方法学基础上，建立了一种通过测定 CFAs 固定补体量实现对 CDC 效应评估的测量方法。由于 CFAs 结合相应细胞 HLA 抗原和固定补体为 CDC 效应的最初始阶段，而 CFAs 固定补体的量与 CDC 效应强度（细胞死亡）具有直接正相关关系；因此，测定 CFAs 的补体固定量可直接用于 CDC 效应的评估。同时，本方法在反应系统中引入针对细胞表面特征性抗原的固相抗体，用于识别、分离特定的细胞群，可选择性地在多种细胞混合反应体系中对发生在某种特定细胞群体的 CDC 效应进行测定。这种 CFAs 测定方法摒弃了现存各种 HLA 抗体测定方法的多种缺陷，具有高灵敏度，高特异性以及经济、简便、快速等独到特点。

\* 相关文献：

- 1、Patel R, Terasaki PI., N Engl J Med 1969;280:735-9
- 2、Garovoy MR, et al., Transplant Proc 1983;15:1939-41
- 3、Christiaans MH, et al., Transplantation 1996;15:1341-1347
- 4、Karuppan ss, et al., Transplantation 1992;53:666-673
- 5、Chia D, et al., Tissue Antigens 1991;37:49-55
- 6、(IgA) Koka P., Transplantation 1993;56:207-211

\*相关专利

美国专利号	时 间	名 称	发 明 者
5948627	Sept., 1999	Lmmunobead Flow Cytometric Detection of anti-HLA Panel-reactive Antibody	Lee; Jar-How Pei; Rui
6150122	Nov., 2000	Kit and Composition for Lmmunobead Flow Cytometric Detection of anti-HLA Panel-reactive Antibody	Lee; Jar-How Pei; Rui
6046031	April4, 2000	Process for Identifying Specific Antibodies Associated with HLA	Tidey; Leigh Ann et al.
6171585	Jan. 9, 2001	IVIG Immunosuppression in HLA-sensitized Transplant Recipients	Jordan; Stanley C. Tyan; Dolly B.

### 三、发明内容

本发明根据 CDC 效应的基本原理，在免疫酶学反应方法学基础上，建立了一种通过测定 CFAbs 固定补体量实现对 CDC 效应评估的测量方法。由于 CFAbs 结合相应细胞 HLA 抗原和固定补体为 CDC 效应的最初始阶段，而 CFAbs 固定补体的量与 CDC 效应强度（细胞死亡）具有直接正相关关系；因此，测定 CFAbs 的补体固定量可直接用于 CDC 效应的评估。同时，本方法在反应系统中引入针对细胞表面特征性抗原的固相抗体，用于识别、分离特定的细胞群，可选择性地在多种细胞混合反应体系中对发生在某种特定细胞群体的 CDC 效应进行测定。这种 CFAbs 测定方法摒弃了现存各种 HLA 抗体测定方法的多种缺陷，具有高灵敏度，高特异性以及经济、简便、快速等独到特点。

本发明所建立 CFAbs 免疫测定方法及试剂盒包括以下主要组成部分：

(一) 固相成分：根据固相方式及成分不同可有如下选择：

1、固相抗体：可直接将针对细胞表面抗原（如 CD 抗原系列等）受体或结合在细胞表面的其它成分（如抗体、补体等）连接在微孔板表面，借以捕获分离特定细胞。对该细胞表面的 CFAbs 进行测定。

亦可将上述成分连接在磁珠表面，以磁铁吸附磁珠达到对特定细胞的选择性分离。

2、固相抗原：主要是指经纯化的 HLA 抗原；将已知型别（如 HLA—A、B、C、D（DR、DQ、DP）及其亚型等）或 HLA I 型或/和 II 型的混合 HLA 抗原连接在微孔板或固相颗粒（如塑料、多聚化合物、磁颗粒等）表面，作为 CFAbs 结合的靶物质成分。

(二) 信号放大检测系统

1、示踪标记物：通常为各种标记的配体、抗体或补体成分，尤其是指酶学标记（HRP、AP 等氧化酶）。

2、酶学底物或化学发光剂：

通常为 HRP，AP 等氧化酶的相应底物，如 OPD，4—CN，ABTS，PNPP，TMB 等；或可利用上述酶作为化学发光（鲁米诺及其衍生物）、生物发光的催化剂和其它发光增强剂共同催化、增强化学发光信号，以获得 CFAbs 检测的高灵敏度。

(三) 对照样品

1、阳性对照：根据具体检测要求设定，通常为含已知 HLA 型别 CFAbs 的单人血清或混合

血清；该血清也可根据需要进行适当稀释。阳性对照一般设3个剂量点，分别位于标准曲线的高、中、低三个剂量区。

2、阴性对照：通常为正常人男性，AB血型，从未接受过输血、器官移植的个体血清；该血清来源可为同一个体或多个个体的混合血清。

#### (四) 标准品

由一系列（一般为5—6个）已知含量的CFAbs血清制成。在完成检测后；以该系列的检测信号值（如OD值；发光单位等）为纵坐标对CFAbs剂量值（横坐标）制作标准曲线；作为样品CFAbs含量定量计算依据，给出更为精确的结果。

#### (五) 其它

包括洗涤缓冲液、样品稀释液、反应容器（如试管、微孔板等）、检测药盒说明书等其它与检测有关的材料、物品。

本发明根据免疫学CDC的发生原理，即CDC发生必须由HLA抗体结合于相应的靶细胞，继而固定第一种补体成分激活补体的经典途径或/和旁路途径，在一系列酶和多种因子的参与下，发生补体激活的级联反应，直至形成膜攻击物（MAC），使生物细胞膜受损，形成小孔导致细胞内渗透压降低，细胞溶解、死亡。由于CFAbs固定补体的相对数量与样品中CFAbs浓度及CDC效应程度成直接正相关关系，因此，测定HLA—CFAbs固定补体的水平或测量补体活化途径中任一因子或补体本身及其复合物，一方面可直接反映HLA—CFAbs的有无或相对浓度；另一方面可间接反映CDC效应或细胞损伤、死亡的相对程度及数量。

由于本发明测定的对象为CDC发生最初始阶段的HLA—CFAbs—补体复合物成分，因此该方法需要的反应时间相对现存的方法为最短。

由于本发明方法学中的信号检测可根据实际应用需要，采用酶学、荧光、化学发光、时间分辨发光、电致发光、生物发光甚至放射性同位素等作为示踪信号放大检测手段，因此具有极高的灵敏度。

由于本发明利用受者自身血清中存在的补体作为反应测量对象，且反应系统主要组成部分为受者血清成分和供者细胞；因此，最能真实地模拟受者体内的生理内环境。

由于血清中CFAbs及补体成分在低温状态下，活性能得以长期保存（至少数年），因此本方法具有方法学上的稳定性以及很好的可重复性。

由于本方法采用“双识别系统”；即可利用针对同一靶细胞上两种不同抗原成分的特异性抗体；同时达到对特定靶细胞的鉴别选择和示踪作用：如利用针对靶细胞抗原1（细胞特征性CD抗原）的固相抗体达到对靶细胞的鉴别、分离；利用针对靶细胞抗原2（HLA抗原或补

体)的标记抗体作为 CFAbs 的示踪信号检测手段,实现了对特定靶细胞鉴别、分离和 CFAbs 信号检测的同步进行,从而简化了实验步骤和缩短了实验周期,提高了方法学的检测特异性。

由于本发明的 CFAbs 测定法可利用最为常见的 ELISA 方法作为检测“技术平台”,不需要其他复杂昂贵的仪器设备(如流式细胞仪等),方法学简便容易掌握,故具有其成本低廉,实用性强的特点且能在短时间内完成大样本的同时测定。

本发明根据 CDC 效应的发生原理,以免疫反应方法学为基础,结合酶学显色或发光信号的高灵敏度检测特点,建立了通过测定靶细胞表面或固相靶物质表面补体固定量的 CFAbs 测定法。由于 CDC 发生过程中从 CFAbs 结合细胞表面 HLA 抗原、补体固定、激活到可被体外测量的 CDC 终末效应—细胞死亡出现,需要较长时间,而本发明通过测定 CDC 最早期(初始诱发效应)阶段所形成的 HLA—CFAbs—补体复合作为评价样品中 CFAbs 水平以及 CDC 效应程度的指标;因此缩短了检测周期,显著提高了方法学的稳定性和灵敏度。由于本方法以最为普通应用的酶联免疫方法学为基础,具有操作简便,不需特殊仪器设备和专门培训技术人员的优点;本发明的另一显著特点是能利用样品本身含有的补体成分,模拟生物体内生理微环境,通过测定 HLA CFAbs 固定补体的早期免疫学结合效应反映 CDC 免疫生物学的终末效应,并能同步对多种细胞混合样品中的某一特定细胞群进行选择性的分离,达到对发生在该特定细胞群体 CDC 效应的测量。同时,该方法可在短时间内完成大样本 CFAbs 的同时测定。发明中所建立的 CFAbs 测定方法或试剂盒具有国际上现存所有其它方法所不具有的独特优点。因此,以上方法及其试剂盒可广泛应用于取代 HLA 传统血清学细胞毒性反应测定,如血清学 HLA 分型(Serology HLA Typing); HLA 交叉配体(HLA Cross Match),群体反应性 HLA 抗体测定(Panel Reactive Antibodies, PRA)以及 ABO 血型配型等多种血清学方法;同时,也可直接应用于对样品中 CFAbs 的水平测定,为生物医学中 CDC 免疫学效应的评估以及补体生物活性、补体激活机制研究提供一种经济、快速、简便、灵敏的特异性方法。

#### 四、具体实施方式

##### 例一: T 淋巴细胞 HLA 交叉配型细胞酶联免疫学方法

(Cellular ELISA; CELISA)

- (一) 在反应系统中加入一定量抗 CD3 抗体包被的免疫磁珠、供者的有核细胞、受者的血清或血浆混匀。
- (二) 在一定温度条件下温育一定时间(30 分钟—3 小时),此时:如受者血清或血浆中存在

CFAbs, 可与供者有核细胞表面的 HLA 结合继而固定受者样品中自身的补体 C1q 或 C3 分子; 形成 HLA-CFabs-C1q 三联复合物, 与此同时, 磁珠固相的抗人 CD3 抗体特异性地与 T 淋巴细胞表面的 CD3 分子结合。

- (三) 以磁铁与反应容器外部接触, 形成一有效磁场通过吸附免疫磁珠对 T 淋巴细胞进行吸附分离, 吸弃未被吸附的其它细胞成分和液相成分。
- (四) 以含一定量蛋白的缓冲液如含 2%BSA 的磷酸缓冲液对分离的 T 淋巴细胞进行洗涤, 进一步去除残留的其它细胞成分和非特异蛋白成分。
- (五) 移去磁铁, 将分离的 T 淋巴细胞混悬于含有一定量 HRP 标记的抗 C1q 或 C3 抗体 (HRP-C1qAb 或 HRP-C3Ab) 的缓冲液中, 继续温育 (条件同步骤二); 此时 HRP-C1qAb 与步骤 (二) 中 “三联复合物” 的 C1q 或 C3 结合形成 “四联复合物”。
- (六) 重复步骤 (三) (四), 去除游离的 HRP-C1qAb 或 HRP-C3Ab; 并将细胞小心悬浮在小量缓冲液中。
- (七) 在上述细胞悬液中加入一定量的 HRP 底物, 由四联复合物中的 HRP 催化显色反应。
- (八) 以酶标仪 (ELISA Reader) 对上述样品进行光密度吸收值测量, 获得 OD 值 (Optical Density)。
- (九) 将样品 OD 值与正常对照 OD 值进行比较; 高出正常对照样品上限 OD 值定义为 T 淋巴细胞 HLA 交叉配型阳性; 反之定义为阴性。

## 例二、B 淋巴细胞 HLA 交叉配型 CELISA 方法

- (一) 将例一步骤 (一) 中的抗 CD3 抗体包被的免疫磁珠改为抗人 CD19 或 CD20 抗体包被的免疫磁珠。其它成分相同。
- (二) 同例一步骤 (二), 但不同的是, 磁珠固相的抗 CD19 或 CD20 抗体与 B 淋巴细胞表面的 CD19 或 CD20-分子结合。
- (三) 同例一步骤 (三-九), 但上述步骤中的 T 淋巴细胞均改为 B 淋巴细胞。

说明 1: 上述例一和例二以连接有不同 CD 抗体的免疫磁珠分离相应的 T 或 B 淋巴细胞, 也可采用以 CD 抗体直接连接在微孔板上实现对 T 或 B 淋巴细胞的识别分离并对其细胞膜表面的 CFabs 进行测定。

说明 2: 上述例一、例二中的 HRP-C1qAb 或 HRP-C3Ab 可替换为 HRP-hlgGAb, 对结合在 T 或 B 淋巴细胞表面的总 IgG 进行测量, 达到对 CFabs 和 Non-CFabs 的同时测定。

## 例三、HLA Class I / II CFabs 的 ELISA 测定方法

- (一) 以一定浓度纯化的 HLA Class I 或/和 Class II 抗原包被微孔板 37℃温育 1—4 小时或 4℃过夜，吸弃包被液。
- (二) 以含有一定量非特异性蛋白（如 BSA，脱脂奶粉、小牛血清等）的缓冲液（封闭液）对微孔板进行封闭，时间、温度同步步骤（一），然后吸弃剩余封闭液。
- (三) 在相应微孔板内分别加入：阴性对照血清、阳性对照血清、本底缓冲液和受检血清各 50 微升（也可为经缓冲液稀释后的血清）。
- (四) 将上述微孔板置 37℃或 4℃温育 30 分钟—3 小时或 4℃过夜。
- (五) 吸弃反应液，以含有一定浓度去垢剂（如吐温—20；NP—40 等）的洗涤液对微孔板各孔进行洗涤，通常洗涤 3 次，然后吸弃最后一次洗涤液。
- (六) 在各孔里加入含有一定浓度 HRP 标记的抗人 C1q 抗体，继续温育，条件同步步骤（四）。
- (七) 重复步骤（五）。
- (八) 在各孔内加入一定量 HRP 的底物（如：PNPP 等）。
- (九) 以酶标仪对各孔的 OD 值进行测量，并收集、记录结果。
- (十) 结果判定：如 OD 值大于正常值上限；则结果表示为 HLA—Class I 或/和 Class II CFABs 检测结果阳性；反之为检测结果阴性。

#### 例四：HLA—I 或 / 和 HLA—II 免疫磁珠 ELISA 方法

- (一) 在微孔板各孔中加入包被（或连接）有 HLA—I 或 / 和 HLA—II 抗原的磁珠。
- (二) 同例三中步骤（三）、（四）
- (三) 将微孔板置于一磁板上数分钟；使免疫磁珠吸附在微孔底部或一侧。然后吸弃液体部分；在各孔中加入洗涤液，然后重复上述磁板吸附和吸弃步骤 2—3 次，吸弃最后一次洗涤液。
- (四) 同例三步骤（八）、（九）、（十）。

#### 例五：群体反应性 HLA CFABs 测定方法（CFABs—PRA）

- (一) PRA 板制备：选择已知多种 HLA 型别的细胞，按一定数目（ $0.01-3 \times 10^6$  / 孔）分别加入微孔板各孔；作为 CELISA 反应的靶细胞；或以纯化的 HLA 各型别抗原分别包被微孔板或免疫磁珠作为固相反应材料。
- (二) 在以上 PRA 板各孔里分别加入一定量的同一受检样品血清，与相应的靶细胞或固相靶抗原温育；温育条件同例三步骤（四）。
- (三) 对上述细胞孔或固相 HLA 抗原孔进行洗涤；如细胞可采用离心；磁珠采用磁场分离；微

孔板可直接洗涤等。

- (四) 在上述各反应孔内加入 HRP-C1qAb 或 HRP-C3Ab 继续温育(条件同上), 然后进一步洗涤(条件同上)。
- (五) 在上述各反应中加入一定量 HRP 底物, 然后对各孔进行 OD 值测定。
- (六) 结果判定: OD 值高于正常值上限者判定为 CFAbs 阳性; 然后计算阳性反应孔占总 PRA 反应孔数的百分率; 计算公式如下:

$$\text{CFAbs 阳性孔数} \div \text{总 PRA 孔数} \times 100 = (\text{PRA}\%)$$

例: CFAbs 阳性孔数为 25; 而总 PRA 孔数为 50; 则 PRA% 为 50%。

#### 例六: 总 HLA-I 和 HLA-II 的 CFAbs 测定

- (一) 以纯化混合的 HLA-I 或 / 和 HLA-II 抗原包被微孔板或磁珠, 然后依照上述举例中的相应条件, 可实现对总 HLA-I 或 / 和 II 的 CFAbs 测定。
- (二) HLA-I 的 CFAbs 测定也可利用混合的人血小板作为固相 HLA-I 来源。
- (三) 以上 HLA-I 或 II 抗原应包括在统计学上 >95% 以上的 HLA 型别。

#### 例七: HLA-B27 的 CFAbs 测定

- (一) 以纯化的 B27 抗原包被微孔板或磁珠, 然后依照上述举例中相应条件, 实现对 B27 的 CFAbs 测定。
- (二) 已知 B27 型别的细胞亦可作为 B27 抗原的靶细胞来源, 直接用于 CFAbs 的测定。

上述举例仅为部分 CFAbs 测定方法的实际应用实例; 因此, 根据本发明的基本测定原理衍生出的其它方法应包含在发明所述及范围之内。

---

## 五、附图说明

图一：检测固定补体抗体的细胞 ELISA 方法，Tc/Bc HLA 交叉配型法。

图二：检测固定补体抗体的免疫磁珠细胞 ELISA 方法，Tc/Bc HLA 交叉配型法。

图三：检测固定补体抗体的 ELISA 方法，群体反应性抗体 ELISA 法。

图四：检测固定补体抗体的免疫磁珠 ELISA 方法，群体反应性抗体 ELISA 法。

图五：细胞毒性抗体(CFABs)和非细胞毒性抗体(Non-CFABs)在 CDC 效应发生中的作用机制。

检测固定补体抗体的细胞 ELISA 方法 (一): Tc/Bc HLA 交叉配型

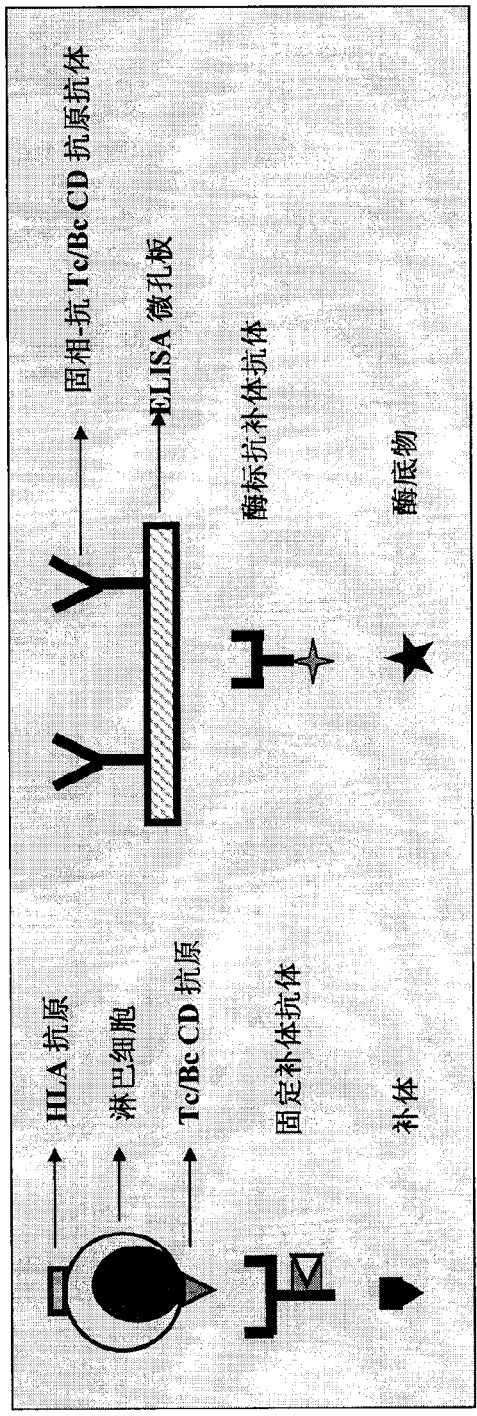
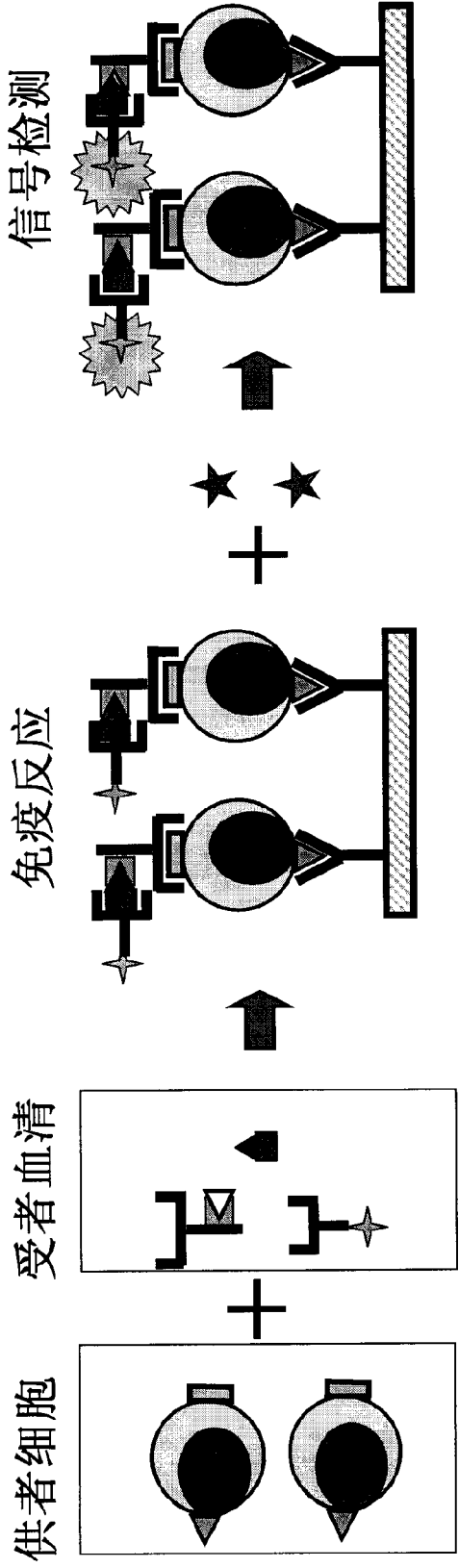
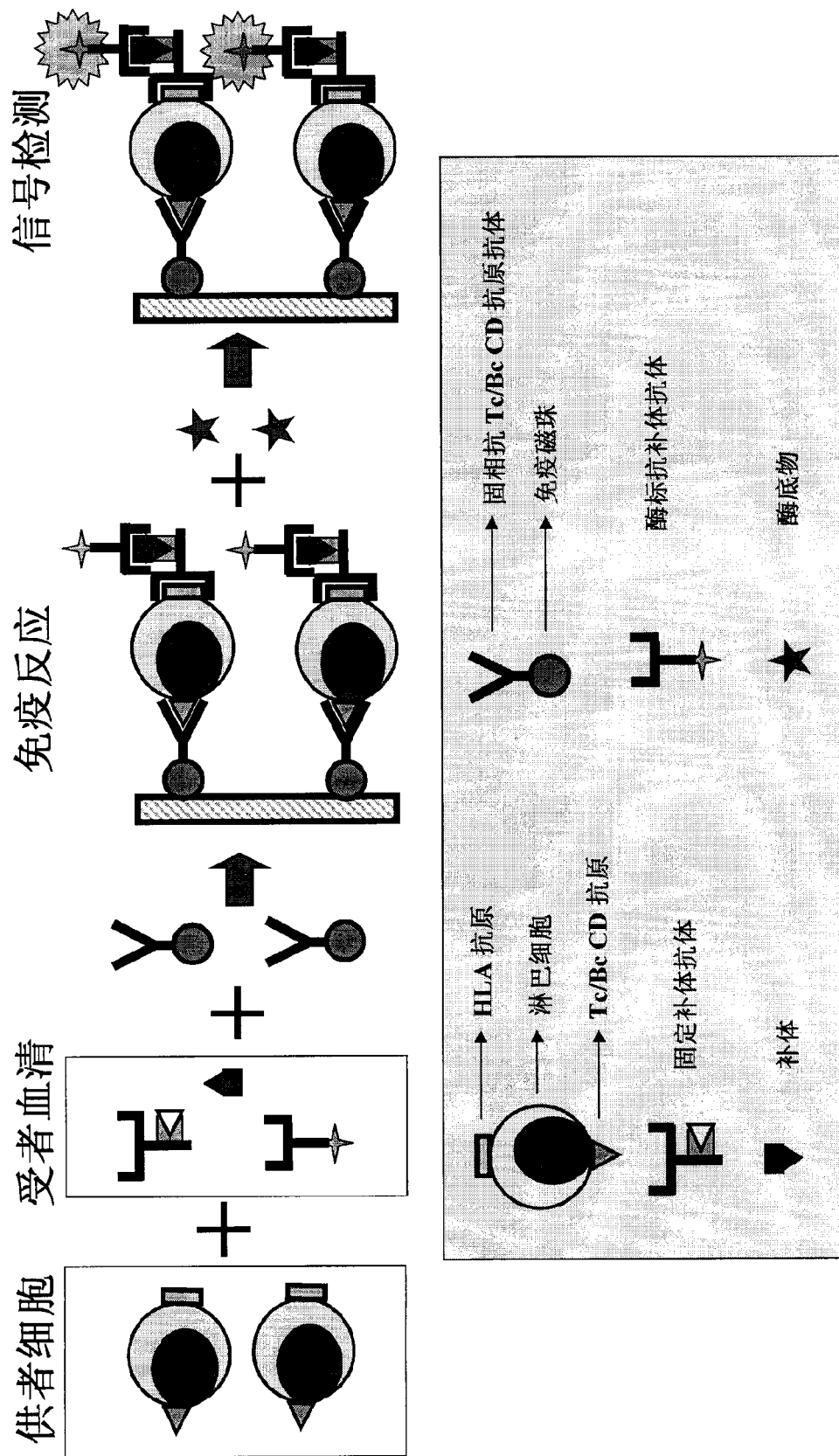


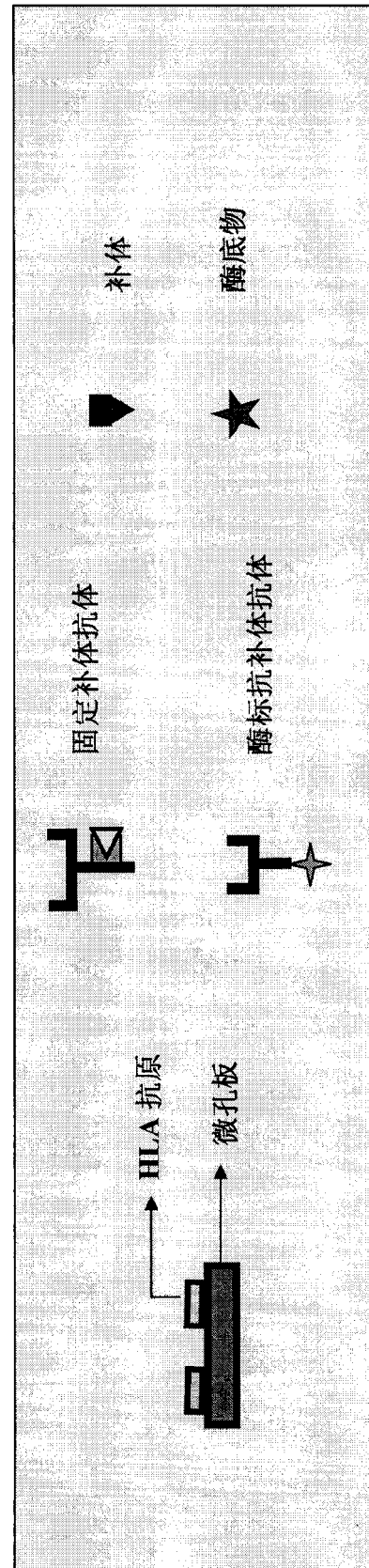
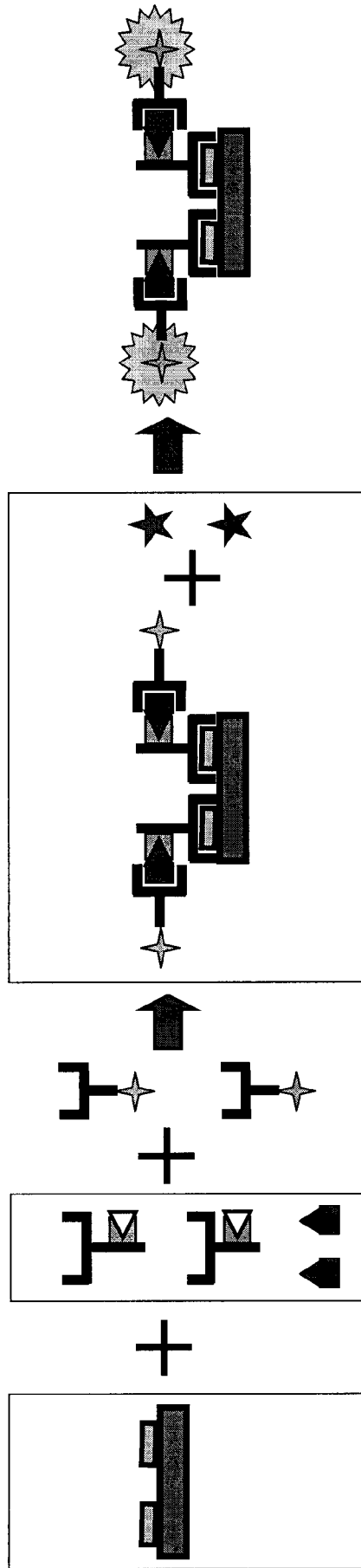
图 1

检测固定补体抗体的免疫磁珠细胞 ELISA方法 (二) : Tc/Bc HLA 交叉配型



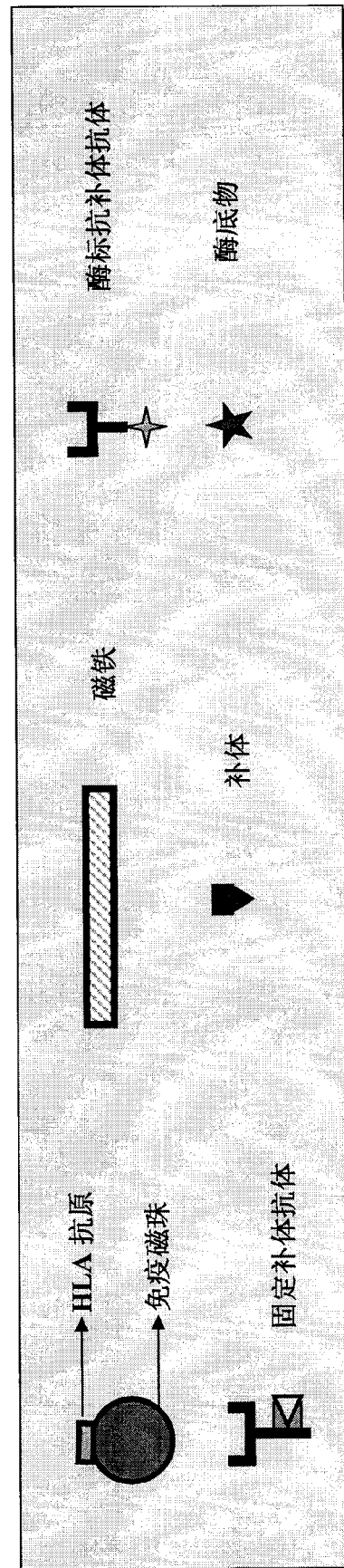
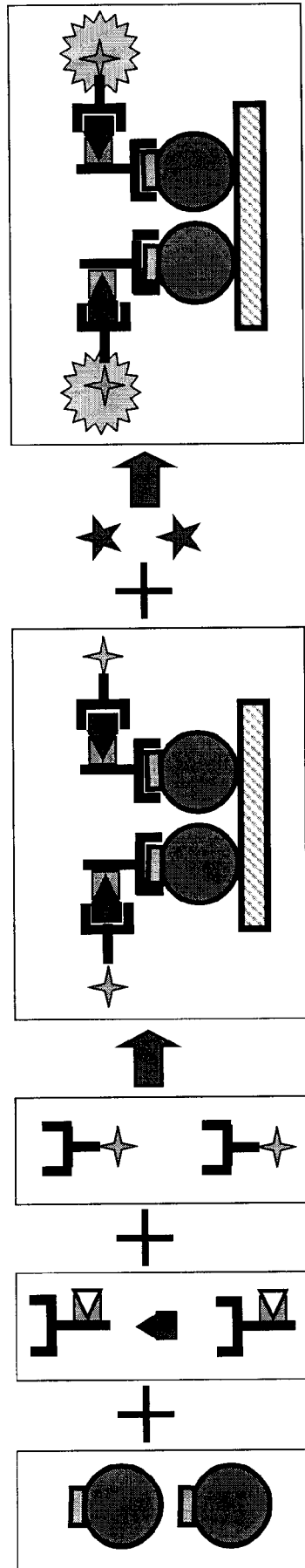
图二

检测固定补体抗体的 ELISA 方法 (三): 群体反应性抗体 ELISA 法

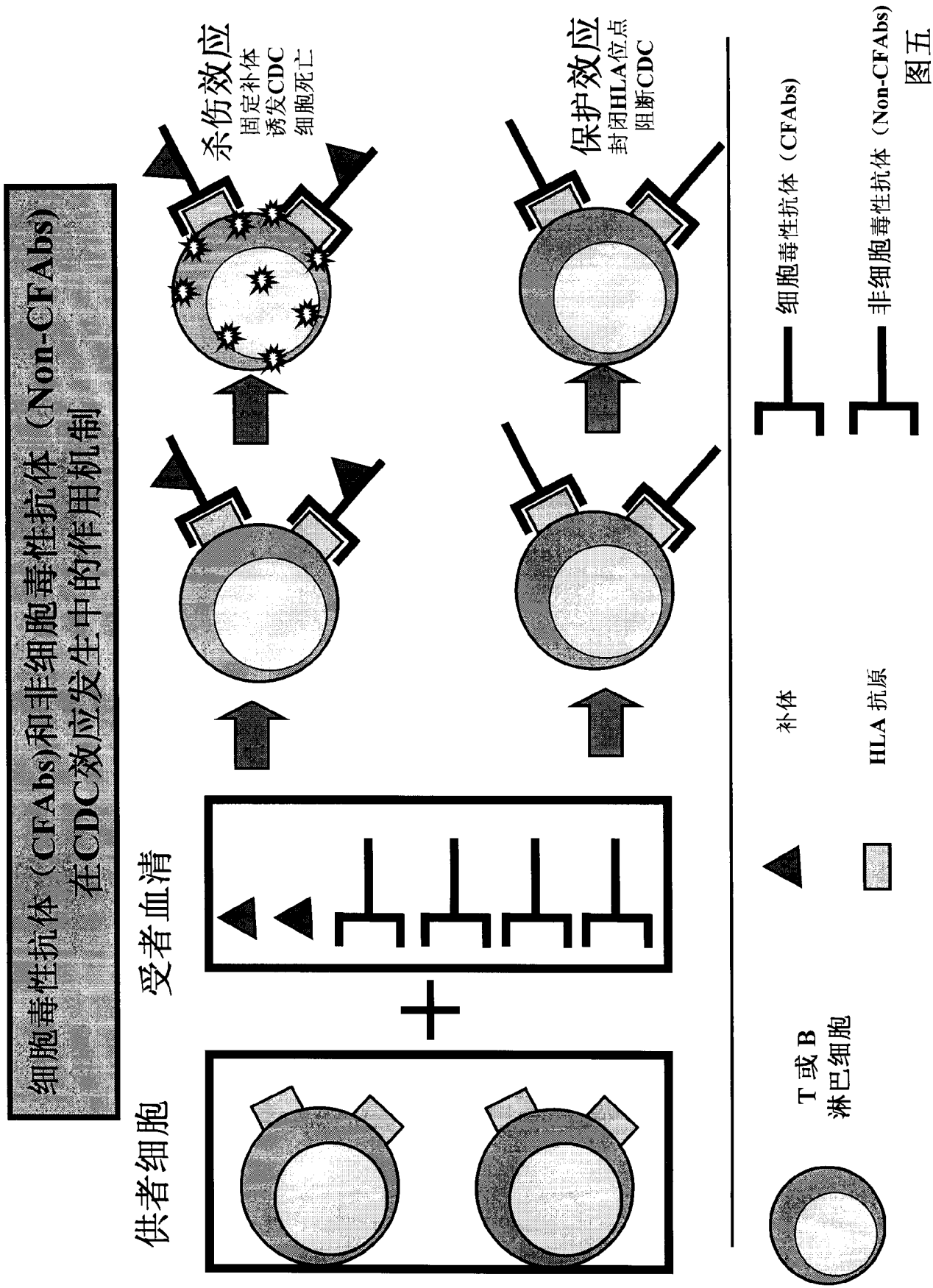


三图

检测固定补体抗体的免疫磁珠 ELISA方法 (四): 群体反应性抗体 ELISA法



图四



专利名称(译)	以酶联免疫测定为基础的HLA补体依赖性细胞毒性抗体检测方法和试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1444044A</a>	公开(公告)日	2003-09-24
申请号	CN02124072.8	申请日	2002-06-18
[标]申请(专利权)人(译)	帕弗瑞生物技术(北京)有限公司		
申请(专利权)人(译)	帕弗瑞生物技术(北京)有限公司		
[标]发明人	陈格		
发明人	陈格		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/531 G01N33/569		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明根据免疫学中补体依赖性细胞毒性(Complement - dependent Cytotoxicity, CDC)反应原理,建立了一种测定HLA补体依赖性细胞毒性抗体(Complement Fixing Antibodies; CFAs)测定的体外酶联免疫反应方法及试剂盒。该反应系统由固相的HLA抗原或具有HLA抗原的靶细胞以及液相酶标配体组成。受检样品中的CFAs与固相HLA抗原或靶细胞的HLA抗原结合并同时固定存在于反应系统中的酶标记补体或以酶标抗补体抗体与固定于HLA抗原 - CFAs复合物中的补体结合,然后加入相应的酶底物产生酶学显色反应;由于该显色信号的强度与样品中的CFAs浓度呈正比关系,因此通过测定这种酶学显色的光密度吸光值(Optical Density; OD)即可达到对样品CFAs有无及其相对含量的测量。在以细胞为基础的反应系统中,引入针对细胞表面特征性标记(如CD等)的抗体,用以识别分离特定细胞群体,可实现对发生在该细胞群体CDC效应的特异性测量。

检测固定补体抗体的细胞 ELISA方法 (一): Tc/Bc HLA交叉配型

