

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53

G01N 33/533 G01N 33/577



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02116932.2

[43] 公开日 2003 年 6 月 11 日

[11] 公开号 CN 1423130A

[22] 申请日 2002.4.26 [21] 申请号 02116932.2
 [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 12 页 附图 7 页

[54] 发明名称 流式测定固定补体抗体的 HLA 交叉配型方法和试剂盒

[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, 在交叉配型反应中加入荧光标记的抗补体抗体或荧光标记的补体, 和一种或一种以上带有不同荧光标记的抗靶细胞特异性抗体, 对反应系统中不同的靶细胞进行双色或多色标记, 然后以流式细胞仪对特定靶细胞群进行分类鉴别并同时靶细胞表面由补体依赖性细胞毒性抗体固定的补体量进行半定量测定, 借以评估受检样品中补体依赖性细胞毒性抗体的存在及水平; 达到对发生在特定靶细胞 CDC 效应的测量, 为移植供者受者的交叉配型提供简便、快速、准确的科学依据。该方法可广泛应用于取代传统血清学 CDC HLA 交叉配型方法及其衍生出的多种其它类似方法, 如 PRA (群体反应性 HLA 抗体测定) 方法等。该方法也可直接用于对样品中

补体依赖性细胞毒性抗体或补体固定抗体 (CFAbs; Complement Fixing Antibodies) 水平的测定; 应用于生物医学基础研究和临床 CDC 效应的评估以及免疫学中补体生物活性, 补体激活机制的研究。

- 1、一种通过测定补体固定量达到对生物样品中 CFAbs 水平的半定量测量，借此评估发生在特定细胞表面 CDC 效应发生的流式细胞仪 HLA 交叉配型方法和试剂盒。该方法和试剂盒包括以下内容：
- 2、在受检样品与相应靶细胞或靶抗原成份的反应系统中，至少加入一种或一种以上与 CDC 效应过程有关的标记配体、染料或抗体。
- 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或染料，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、动物的体液，例血清、血浆、脊髓液、羊水、脑脊液、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；例人类细胞（红细胞、白细胞、各种组织细胞、各种干细胞等）、动物细胞、昆虫细胞、微生物、细菌、血小板等。
- 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和物理方法处理的死亡靶细胞（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 成分或其它抗原成分等。

- 12、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。
- 13、权利要求 2 中标记抗体的标记解释为在流式细胞仪上可被检测的所有荧光素或荧光蛋白；例：FITC、PE、Cy5、Per-CP、Cy5-PE、Cy7 等。
- 14、权利要求 2 中的染料解释为能够通过受损细胞进入细胞内使受损细胞或 / 和死亡细胞着色并能在流式细胞仪上测知的各种染料如溴化乙锭、四溴荧光素及其它具有相同作用的荧光素等。
- 15、权利要求 2 中的标记配体解释为具有荧光标记并参与 CDC 反应过程中的所有成分（包括经典补体活化途径及 C3 替代补体活化途径和 MBL 补体活化途径），尤其是各种荧光标记的 C1q、C3 等。
- 16、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、C1qrs、C2a、C2b、C3a、C3b、C4a、C4b、C4b2、iC3b、C4b2b、C4b2b3b、C3bBb、C3bnBb、C5a、C5b、C5b67、C5b ∞ 8、C5b ∞ 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。
- 17、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由分子生物学方法获得的多种直接或间接参与 CDC 反应的各种成分。
- 18、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')₂、Fab、Fv、Facb、F(abc')₂、ScFv 等。

流式测定固定补体抗体的 HLA 交叉配型方法和试剂盒

一、技术领域

免疫学器官移植分型配型。

二、发明背景

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。

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”。

在免疫排斥反应中，超急性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）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的价值。

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体内；并可与自身的 HLA 分子结合（也可与非己 HLA 分子结合）但并不激活补体，诱发免疫攻击效应。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。体外大量实验以及临床实验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，对维持生物机体健康发挥某种有益的保护作用（Protection 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 CFAs 诱发的 CDC 最终效应，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 CFAs 和 Non-CFAs；包括流式细胞仪测定结合于细胞表面的抗体测定法，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 孔微孔板测定结合 HLA 的抗体 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，即通常为 Non-CFAs，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—CFAs 与相应 HLA 的结合，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。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的结果：如接受 IVIG 抑制免疫排斥反应治疗的受者，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 CFAs 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，对移植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 抗体的组织交叉配型方法，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、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 CFAbs 浓度及 CDC 效应程度成正相关关系，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。

由于本发明采用荧光标记作为示踪物，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（数年），因此本方法具有方法学上的稳定性及很好的重复性。

由于采用流式细胞仪为分析测量工具，因此同一反应系统中，可同时对发生在同一细胞的 CDC 效应进行单或 / 和多标记相对定量测量，并可同时对发生在多种不同细胞群体的 CDC 效应进行分别测定。最后还可对收集数据进行统计学分析处理，给出科学、准确、可靠的结果；永久储存试验资料。

综上所述，本发明所建立的 CFAbs 交叉配型方法综合了现存多种交叉配型方法学上的主要优点，弥补了其不足，具有理论上的合理性，并在实际交叉配型实验中得到了与理论基础完全吻合的一致性结果。

例一、直接交叉配型方法：

- 1、在反应试管中加入一定量器官移植供者（以下简称供者）的有核细胞；
- 2、在上述试管中加入一定量器官移植受者（以下简称受者）的血清；
- 3、经温育一定时间后，以洗涤液对细胞进行洗涤；
- 4、将细胞重新悬浮在含有至少一种荧光标记抗补体抗体（如 FITC-抗 C1q 和 / 或 C3 抗体等）的缓冲液中；
- 5、加入含有至少一种另一荧光标记的抗细胞表面蛋白成分的抗体（如 PE-抗 CD3 抗体、PerCP 抗 CD19 或 CD20 抗体）的缓冲液；
- 6、经温育一定时间后，对细胞进行洗涤；
- 7、将细胞悬浮在一定缓冲液中；

- 8、以流式细胞仪对细胞样品进行收集、分析，最后对样品中特定的各细胞群表面抗补体抗体的荧光强度结果进行相应分析计算，与正常对照样品比较，给出交叉配型的半定量结果；
- 9、交叉配型结果可表达为：T 淋巴细胞交叉型阴性或阳性；B 淋巴细胞交叉配型阴性或阳性；巨噬细胞交叉配型阴性或阳性；单个核细胞交叉配型阴性或阳性；中性粒细胞交叉配型阴性或阳性等。

例二、 间接交叉配型方法（一）

- 1、将受体血清经 56℃ 处理 30 分钟处理灭活补体；
- 2、步骤同例一中 1、2，但与例一步骤 2 中不同的是加入一定量经补体灭活处理的受者血清；
- 3、再加入一定量的补体成分（为人类补体或动物补体，通常为 C1q 或 C3）；
- 4、以下步骤同例一中步骤 3、4、5、6、7、8、9。

间接交叉配型方法（二）

- 1、同间接交叉配型方法（一）中 1、2；
- 2、在上述反应中加入一定量荧光标记的补体成分；
- 3、步骤同例一中步骤 6、7、8、9。

例三、 固相 HLA 抗原颗粒测定 CFAs 的流式细胞仪方法（一）

- 1、在反应试管中加入一定量包被有已知特定 HLA 抗原如 HLA—I 类、HLA—II 类的固相颗粒；
- 2、再加一定量的补体成分；
- 3、同例一中步骤 3、4，但此时“细胞”为 HLA 包被的颗粒；
- 4、将上述颗粒混悬于含有一定量荧光标记的抗补体抗体的缓冲液中；
- 5、同例一中步骤 6、7、8，其中“细胞”为 HLA 抗原包被的固相颗粒；
- 6、根据固相颗粒包被的 HLA 抗原成分不同，结果可表示为：HLA—I 类 CFAs 或 / 和 HLA—II 类 CFAs 阴性或 / 和阳性。

注：* 上述同一反应系统中固相颗粒可为一种或一种以上，不同大小，分别包被有已知特定的纯化 HLA 抗原颗粒或同一大小但含不同标记（如含荧光不同）的一种或一种以上的颗粒并分别包被已知特定的纯化 HLA 抗原，借此在流式细胞仪上获得分类测定。

固相 HLA 抗原颗粒测定 CFAs 的流式细胞仪方法（二）

- 1、同例三步骤 1；
- 2、再加入荧光标记的补体，如 FITC—C1q 或 / 和 FITC—C3 等；
- 3、同例三中步骤 5、6。

例四、 抗血管内皮细胞的 CFAs 流式细胞仪测定方法

方法（一）：

- 1、在试管中加入一定数量人血管内皮细胞（如培养的细胞系）；
- 2、同例一中步骤 2、3、4、5、6、7、8；
- 3、交叉配型结果表达为：内皮细胞交叉配型阴性或阳性。

方法（二）：

- 1、将受者血清经 56℃ 处理 30 分钟灭活补体；
- 2、同例四方法（一）中的步骤 1；
- 3、加入一定量步骤 1 中的经补体灭活处理的血清；
- 4、加入一定量的补体成分（如 C1q、C3 等）；
- 5、同例一中步骤 3、4、5、6、7、8；
- 6、同例四方法（一）中步骤 3。

方法（三）：

- 1、同例四方法中步骤 1、2、3；
- 2、加入一定量荧光标记的补体成分（如 C1q、C3 等）；
- 3、同例一中步骤 6、7、8；
- 4、同例四方法（一）中步骤 3。

三、发明内容

本发明所建立的方法为一种 HLA-CFAs 测定的流式细胞仪组织交叉配型方法，其通过测定由 CFAs 所固定在细胞膜表面补体的存在及其水平，达到对 HLA-CFAs 及其所诱发 CDC 效应程度的测量。该方法除可用于器官移植中供者、受者的交叉配型外；根据相同原理及其方法学，可用于其它任何一种需要评估 CDC 效应或补体其它效应的类似试验，具有方法学的通用性。

本发明所建立的 CDC-FXM 方法试剂盒包括以下主要组成部分：

（一）、样品：

- 1、液相部分：包括可能含有 CFAs 或含有引起补体固定的任何蛋白或其它成分的液体，如所有生物体液、组织、细胞提取液或人为配制的类似液体。
- 2、固体成分：为可能导致 CFAs 或补体直接或间接结合其上的任何具有一定几何形态的物质成分。包括一种或一种以上相同或不同几何形态的固体成分存在于同一反应系统，并可在流式细胞仪上进行分类鉴别测定的任何人工合成或天然存在的非生物固体成分和生物固体成分；如人工合成不同大小的球状颗粒或相同大小但带有在流式细胞仪上可测量的不

同标记球状颗粒等；生物体内的各种固体成分包括各种细胞、血小板、细菌等。

(二)、标记示踪物：

反应系统中，至少包含一种可被流式细胞仪测量的标记，通常为各种荧光标记的所有补体成分，以及参与或与补体激活级联反应的各种直接成分或间接成分；或针对上述成分的各种荧光标记抗体。反应系统中如采用荧光补体成分作为示踪物，可直接对结合在固相颗粒或细胞表面的标记补体进行直接测量；如在反应系统中使用标记的抗补体或抗其它参与补体反应的成分抗体，可实现对 CFAbs 固定补体的间接测量。如在反应系统中，使用一种或多种不同与以上荧光标记的针对细胞膜表面特征性成分（如 CD 系列标记、受体等）的抗体便可实现在流式细胞仪上对同一反应系统中的不同成分进行分类测量，（如 T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、巨噬细胞、肿瘤细胞、杂交瘤细胞、各种干细胞、基因重组细胞等）。

四、具体实施方式

本发明建立的典型方法学大致分为以下主要步骤（以 HLA 交叉配型为例）：

一、反应系统设定：

- (一)、温育反应：受者血清（含各种抗体成分和补体 C1q、C3 等）与供者有核细胞（包括淋巴细胞、巨噬细胞、多形核中性粒细胞、单核细胞等）共同温育 5 分钟以上，温育温度控制在零上 1℃到 50℃之间。通常为 4℃或室温（25℃±）或 37℃。通过温育，受者血清中的 HLA 抗体结合于供者细胞表面的 HLA 分子，受者血清中的补体成分可选择性地固定在结合在细胞膜表面 CFAbs 的特定区域。
- (二)、洗涤：洗涤液可选用含有不影响细胞形态、活性和不具有解离细胞—CFAbs—补体复合物的生理性缓冲液。通过洗涤、离心、吸弃上清可去除存在于液相中的各种游离蛋白成分，尤其是抗体、可溶性抗原—抗体复合物，游离补体等，经过洗涤，反应系统只剩下细胞等其它固体成分。
- (三)、标记：小心将细胞沉淀部分混悬在含有 FITC—抗 C1q 或 / 和抗 C3 抗体（或 F(ab)、F(ab')₂ 片段）、PE—抗 CD3 抗体和 / 或 PerCP—抗 CD19（或 CD20）抗体的缓冲液中；继续温育。此时，反应系统中 FITC—抗 C1q 或 / 和抗 C3 抗体，可与步骤（二）中细胞—CFAbs—补体三联合物中的补体结合，形成四联复合物；作为反映结合在细胞表面 CFAbs 的半定量指标；而 PE—抗 CD3 抗体和 PerCP—抗 CD19（或 CD20）抗体分别可与 T、B 淋巴细胞结合，借以鉴别区分这两群不同特征的淋巴细胞。
- (四)、洗涤：同步骤（二），此时通过洗涤去除液相中所有未被结合的游离荧光标记抗体成分，至此，交叉配型的反应基本完成。

(五)、测定：将细胞小心悬浮在含有 2%Formadyhyde 的磷酶缓冲液中，使用流式细胞仪进行细胞收集、同时对各细胞表面的不同荧光标记强度信号进行测量并储存收集的相应图形、原始数据。

(六)、分析、结果判定：以阴性对照的平均值(可为 FITC 荧光强度的 Channel Value 或 Channel Shift；在正式实验前业已确定)加上两个标准差 ($X+2SD$) 为阴性上限，高出此上限者，可判定为 T 或 / 和 B 淋巴细胞交叉配型阳性；低于此上限者，判定为 T 或 / 和 B 淋巴细胞交叉配型阴性。

二、 阴性对照和阴性上限设定：

血清为采自从未接受输血、移植的正常健康男性的 AB⁻血清，血清可来自同一个体或多个个体的混合血清。该血清可经 56℃，30 分钟的补体灭活处理，也可不经处理。细胞可来自血清的同一群体或不同的正常人群体，但样本数目必须超过 10 个以上，计算交叉配型获得的抗补体荧光强度值的平均值 (X) 和标准差 (SD)，以 $X+2SD$ 作为阴性结果判定上限。

三、 阳性对照设定：

可选用多个高 PRA 的血清样品混合，目的为尽可能最大限度地包含针对所有 HLA 型别的 CFABs。通过预试验，分别设三种不同 CFABs 的阳性质控对照；即高、中、低 CFABs 浓度血清，其中低 CFABs 宜设在约 50 个 Channel Shifts 左右。

四、自身对照设定：

由受者自身血清加自身单个核细胞组成的反应系统；通过与上述正常阴性对照比较，以判定受者体内自身 CFABs 的存在与否。该指标可作为预测排斥反应发生的参考。

说明 1、CFABs 的型别鉴别：

如需鉴别交叉配型阳性反应中的抗体型别，可以 DTT 对血清进行处理（降解 IgM）；再进行交叉配型，如果结果转为阴性，则 CFABs 为 IgM 型；反之为 IgG 型。

说明 2、上述交叉配型中，可将步骤（一）至步骤（三）合并，即在反应系统中同时加入血清、细胞及上述各种荧光标记抗体或在血清、细胞、荧光抗补体抗体温育后，不经洗涤，直接加入荧光标记的抗 CD3 或 / 和抗 CD19 或 CD20 抗体。

说明 3、根据需要，利用不同荧光抗体组合，可实现单独的 T 或 B 淋巴细胞交叉配型。

说明 4、以上只是例举交叉配型的基本步骤，实际应用过程中可根据本专利中所述及的基本原理以及具体检测对象以及研究、观察目的不同，在方法学上进行相应的调整。因此，具体实验条件及步骤并不局限于本专利中所述及的举例。

小结：

本发明所建立的测定固定补体抗体的 HLA 交叉配型流式细胞仪方法综合了抗 IgG 流式细

胞仪交叉配型方法灵敏度高、稳定重复性好、多标记分类测量以及传统 CDC 血清学交叉配型方法能够直接测定 CDC 免疫学生物效应的特点；以 CDC 效应的诱发机制为基础，通过测定 CDC 效应的最早期（初始诱发效应）阶段所形成的靶细胞 HLA-CFAs-补体复合物作为评价样品中 CFAs 水平以及 CDC 效应程度的指标。由于 CDC 发生过程中，从补体毒性抗体（CFAs）结合，补体固定到可被体外测量的 CDC 终末效应——细胞死亡出现，需要较长时间；因此，本发明方法学的显著特点是能够利用样品自身具有的补体成分，模拟生物体内生理微环境，通过测定 HLA CFAs 固定补体的早期免疫学结合效应反映 CDC 免疫学生物的终末效应；并能够在同一反应系统对多种细胞群体的 CFAs 进行多标记分类分析测定。因此，上述方法（试剂盒）具有国际上现存所有类似方法所不具有的独特优点。可广泛应用于 HLA 领域中的交叉配型、PRA 测定等，以及免疫学中补体及 CDC 效应的研究。

增：附图说明

图 1，图中显示共 117 例 HLA 交叉配型两种方法的单盲配型结果。CDC-FXM 与传统 CDC 血清学方法结果一致的共 109 例，两种方法结果均为阳性者 26 例；两种方法结果均为阴性者 83 例。在传统 CDC 血清学方法结果阴性的样品，CEC-FXM 检出 8 例阳性；证实传统 CDC 血清学方法的假阴性结果高达 7%。

图 2，将含有 CFABs 的血清 1:4 稀释，经 56° C，30 分钟补体灭活处理。然后分别加入不同量的人 C1q，观察 CDC-FXM 结果出现阳性时所需 C1q 的浓度。结果表明：使 CDC-FXM 阳性的 C1q 浓度为 3 μ g/ml（正常 C1q 血清平均浓度为 75 μ g/ml）。

图 3，将含有 CFABs 的血清 Protein-G 亲和层析法提取纯化全部 IgG 成分，然后在 CDC-FXM 反应中分别按不同剂量回加纯化的 IgG，观察引起 CDC-FXM 阳性时所需 IgG 浓度。

结果表明：

- 1、 CDC-FXM 阳性血清经去除 IgG 后，单独补体不能结合于细胞表面；即 CDC-FXM 测定的补体结合率直接反映了 CFABs 与靶细胞的结合率，并存在正相关关系。
- 2、 使 CDC-FXM 结果转为阳性时的 IgG 浓度为 0.4mg/ml（正常人血清 IgG 浓度平均值为：12.5mg/ml）。

图 4，利用固相包被有纯化 HLA 抗原的塑料小珠，分别与一定量的 IVIG 反应，利用荧光标记的抗人 IgG 抗体在流式细胞仪上检测与 HLA 抗原 IgG (IVIG) 含量。结果表明：在 IgG 明显低于正常生理浓度平均值 (<10mg/ml) 时，仍能导致极显著的 IgG 与纯化 HLA 抗原的结合。

图 5，利用 CDC-FXM，IgG-FXM，CDC 血清学交叉配型法分别对同一接受 IVIG 治疗的器官移植病人进行测定：结果显示：IVIG 治疗前，三种方法的交叉配型结果均为阳性；而 IVIG 治疗后，病人排斥反应受到 IVIG 抑制，临床病情好转，但 IgG-FXM 极呈阳性；而 CDC-FXM 和 CDC 血清学结果呈阴性，与临床观察一致。

图 6，在含 CFABs 的血清中加入不同量的 IVIG；与相应靶细胞反应；同时以流式细胞仪平行测定靶细胞表面固定的补体及 IgG 含量。结果显示：IVIG 对 CFABs 固定补体的能力具有极强的抑制作用，但对 IgG 的结合无显著影响。上述结果与临床使用 IVIG 有效抑制器官移植中免疫排斥反应的结果相吻合；即 IVIG 可通过与靶细胞结合，封闭 CFABs 结合位点从而达到抑制免疫排斥中的 CDC 杀伤效应。

图 7, 分别以 Protein-G 亲和层析法提取纯化两名正常人的 IgG, 然后与包被有纯化 HLA 抗原的固相颗粒反应, 以荧光标记的抗人 IgG 抗体, 在流式细胞仪上检测 IgG 与 HLA 抗原的结合率。

结果显示: 多次怀孕生产(三次)的正常女性(53 岁)和从未接受任何输血、器官移植的正常青年男性(20 岁)的纯化 IgG 均能与 HLA 抗原发生显著性结合效应。该结果进一步证实: 正常人在没有接受任何外来 HLA 刺激前, 其体内已经存在天然的 HLA 抗体(Natural HLA Antibody)成分。

表 1: CDC-FXM 方法的特异性鉴定结果(见下页)

表 2: CDC-FXM 批间批内差异质控结果

表 3: 三种交叉配型方法比较

表 2: CDC-FXM 批间批内差异质控结果

CDC-FXM QC RESULT

QC	N	CV%		
		QC-L	QC-M	QC-H
Inter-Assay	10	1.88	3.61	4.2
Intra-Assay	17	4.6	6.2	3

Sheet1

表1: CDC—FXM方法的特异性鉴定结果

SPECIFICITY OF C1q FIXING ANTIBODY FLOW CROSSMATCH

(CHANNEL SHIFT)

CELL ID	CELL TYPING	HOLDEN	WALLAU	AFRAM	ADUBIFA	NOORI	RIVAS	ELIZABETH	MARY
06FP82119	A2+; A11+	B51+	B51+	A11+	*A11+	A2+	A2+	*A2+	A2+
LF28291	A11+	19	13	287	137	593	269	232	672
K16297	A2+	8	16	217	187	7	7	8	7
K16355	A2+; B51+	3	19	24	1	578	306	124	666
M17563	A2+; B52+	662	302	20	9	660	492	374	549
		692	301	7	4	544	290	68	520

表 3：三种交叉配型方法比较

交叉配型方法 比较指标	CDC 血清学方法 (Terasaki's)	流式细胞仪 抗 IgG 法	流式 CFAs 测定法
检测抗体	CFAs	Non-CFAs 和 CFAs	CFAs
测量指标	细胞死亡率 (CDC 终末效应)	IgG 结合率	CFAs 结合率 (CDC 初始效应)
补体	动物源(兔)	不涉及	受者 血清自身补体
模拟受者生理 内环境条件	不接近	接近	最接近
活性细胞	>85%	≥50%	≥50%
灵敏度	低	高	高
特异性	好	不好	好
时间	长(>3 小时)	较长(±2 小时)	短(<40 分钟)
稳定性	不好	好	好
重复性	不好	好	好
假阳性	高	高	最低
假阴性	高	低	低
T,B 淋巴细胞 交叉配型	需预先纯化细胞	不需要(直接荧光 标记分类)	不需要(直接荧光 标记分型)
IVIg 治疗的病人样品	适合	不适合 (出现假阳性)	适合
人为因素的引入	多	少	少

图 1

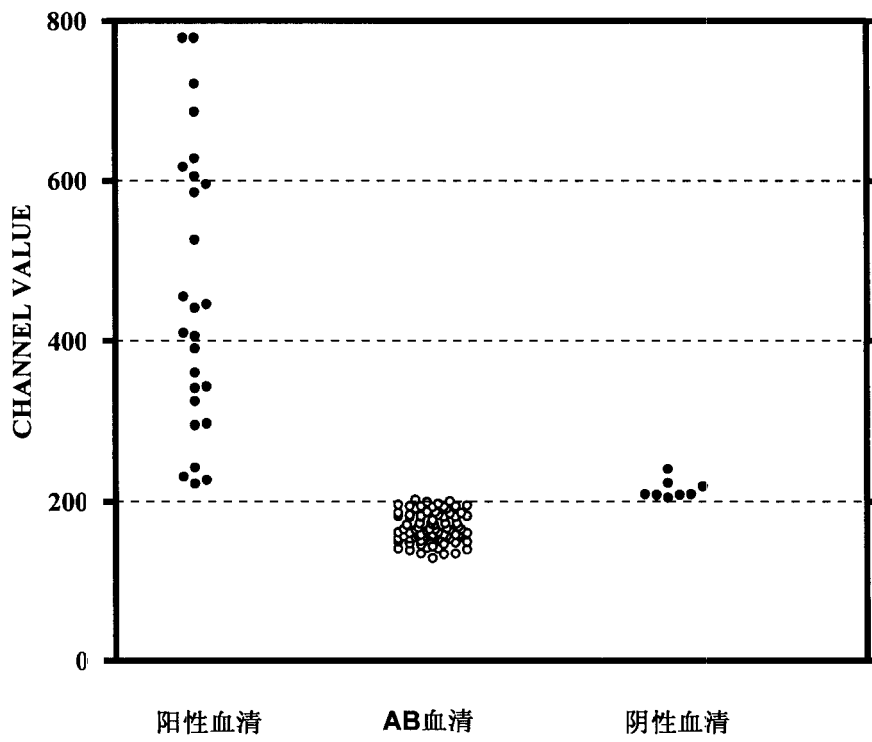


图 2

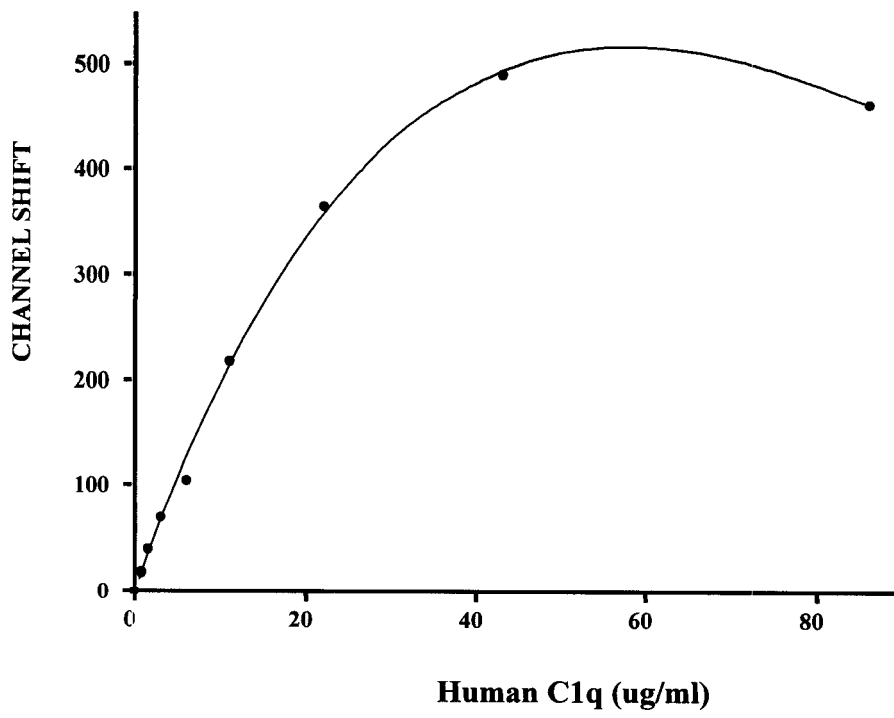


图 3

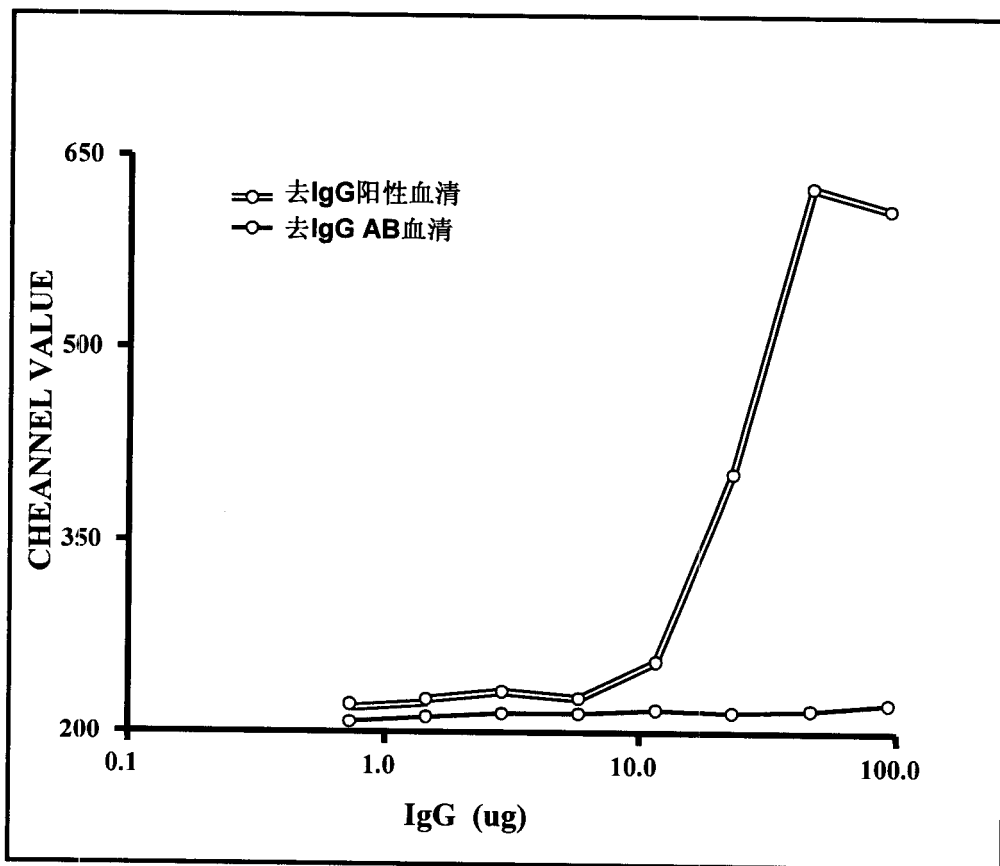


图 4

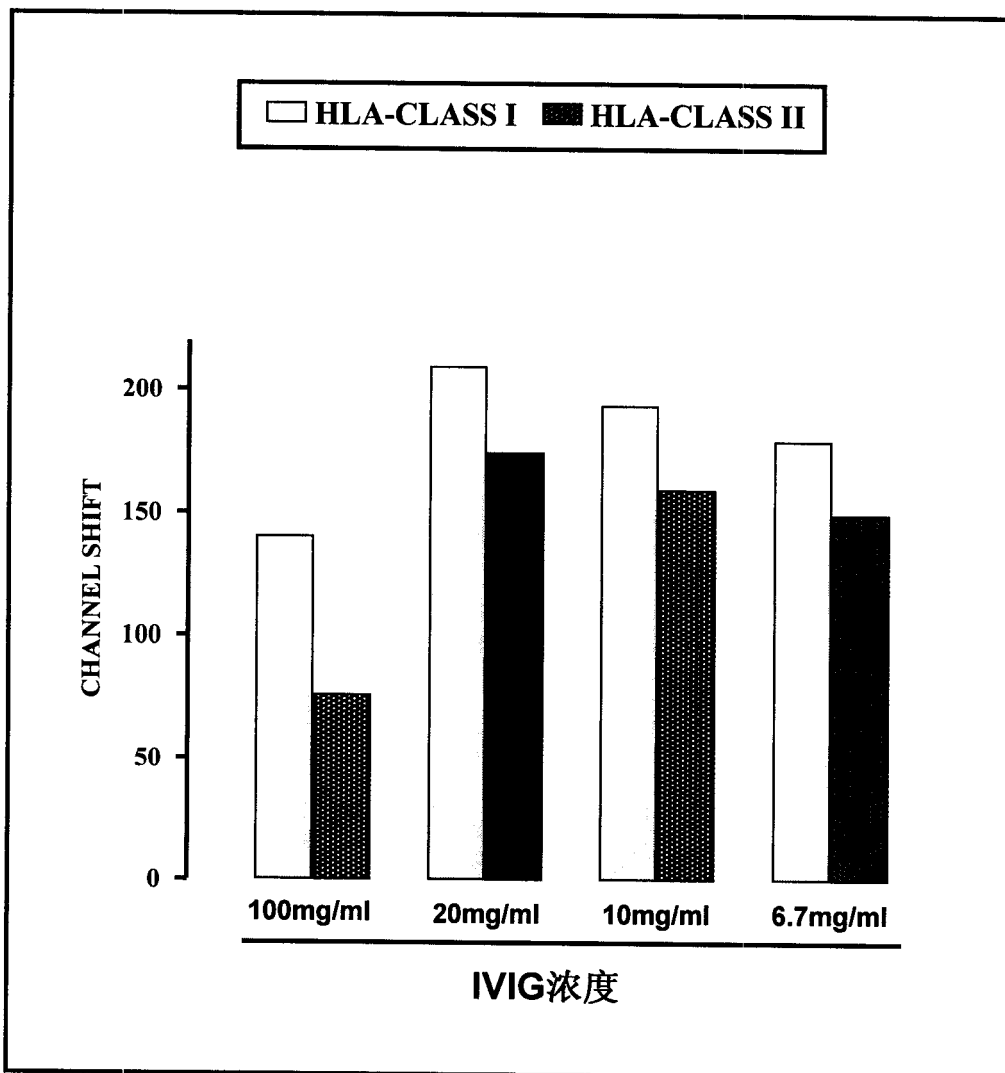


图 5

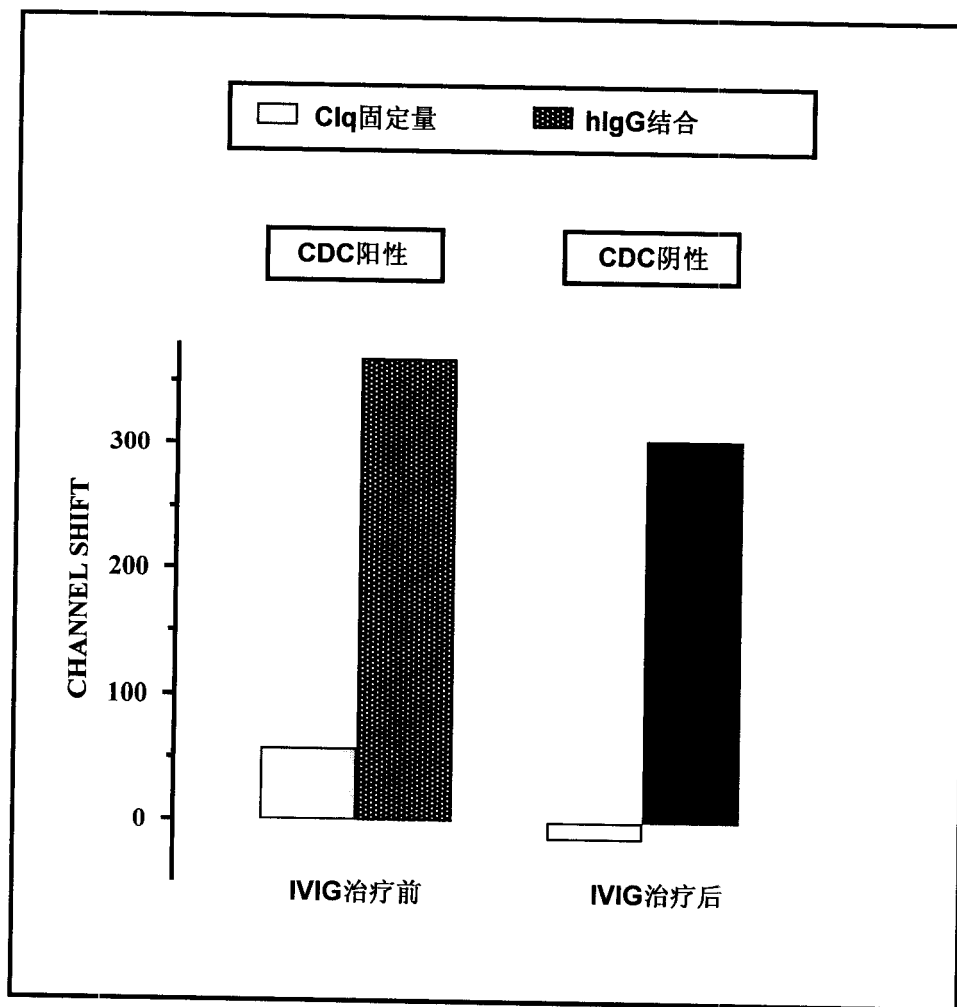


图 6

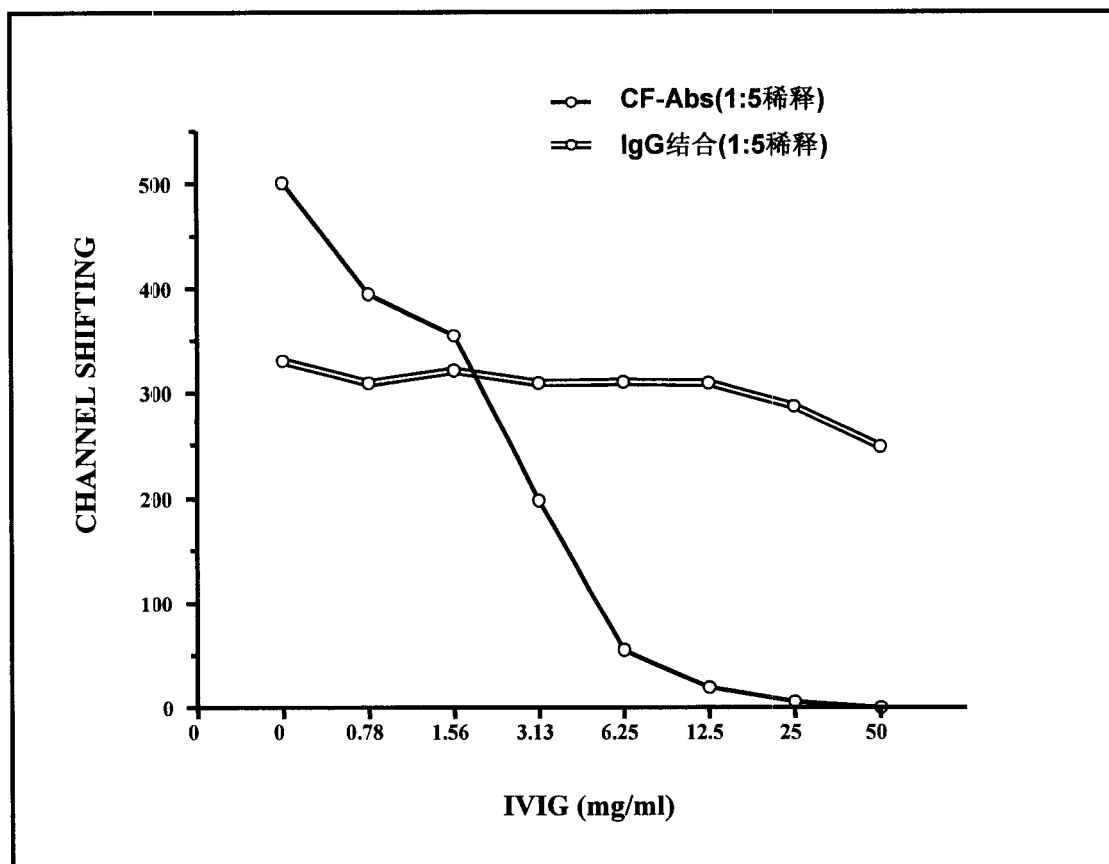
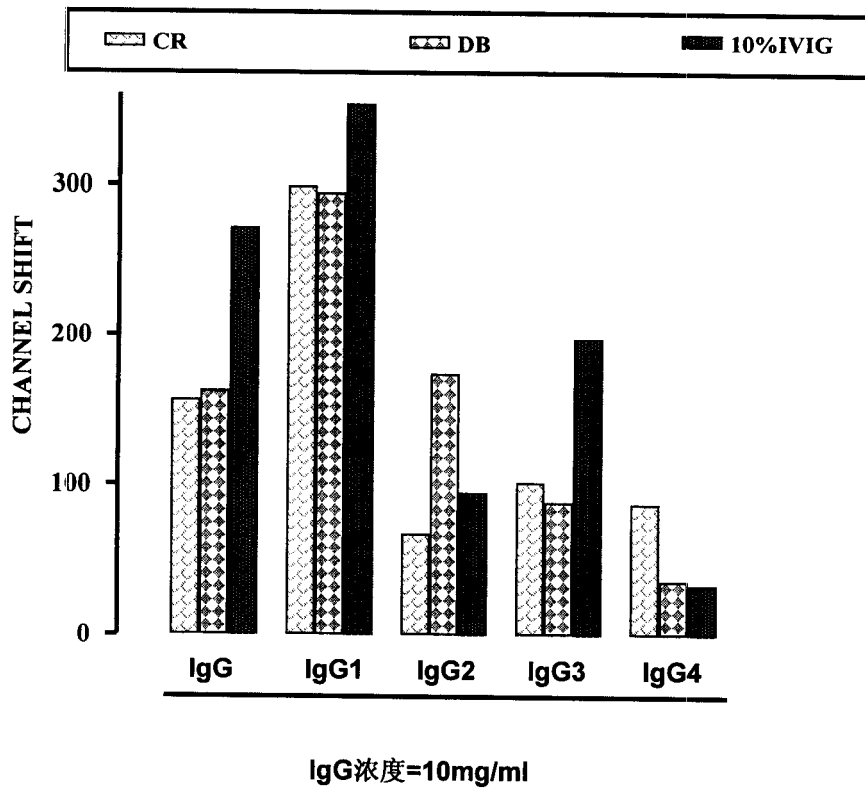


图 7



专利名称(译)	流式测定固定补体抗体的HLA交叉配型方法和试剂盒		
公开(公告)号	CN1423130A	公开(公告)日	2003-06-11
申请号	CN02116932.2	申请日	2002-04-26
[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		
当前申请(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 G01N33/533 G01N33/577		
外部链接	Espacenet SIPO		

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,在交叉配型反应中加入荧光标记的抗补体抗体或荧光标记的补体,和一种或一种以上带有不同荧光标记的抗靶细胞特异性抗体,对反应系统中不同的靶细胞进行双色或多色标记,然后以流式细胞仪对特定靶细胞群进行分类鉴别并同时靶细胞表面由补体依赖性细胞毒性抗体固定的补体量进行半定量测定,借以评估受检样品中补体依赖性细胞毒性抗体的存在及水平;达到对发生在特定靶细胞CDC效应的测量,为移植供者受者的交叉配型提供简便、快速、准确的科学依据。该方法可广泛应用于取代传统血清学CDC HLA交叉配型方法及其衍生出的多种其它类似方法,如PRA(群体反应性HLA抗体测定)方法等。该方法也可直接用于对样品中补体依赖性细胞毒性抗体或补体固定抗体(CFAs; Complement Fixing Antibodies)水平的测定;应用于生物医学基础研究和临床CDC效应的评估以及免疫学中补体生物活性,补体激活机制的研究。

