



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00113747.6

[45] 授权公告日 2004 年 3 月 3 日

[11] 授权公告号 CN 1140801C

[22] 申请日 2000.3.1 [21] 申请号 00113747.6
 [71] 专利权人 胡 军
 地址 710032 陕西省西安市长乐西路四军大
 西京医院心脏外科
 [72] 发明人 胡 军
 审查员 石剑平

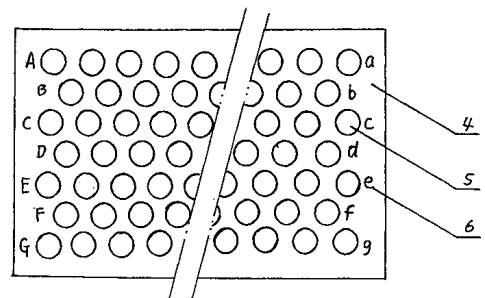
[74] 专利代理机构 中国科学院西安专利中心
 代理人 任 越

权利要求书 2 页 说明书 11 页 附图 2 页

[54] 发明名称 检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法

[57] 摘要

一种检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法，本发明是利用含有已知 HLA 抗原的标准细胞株与受者淋巴细胞在体外进行细胞培养 2 - 28 小时，然后通过免疫学检测方法测定淋巴细胞的反应性；为器官移植后了解受体对供体器官的免疫状态提供动态监测手段，为受者免疫抑制剂服用剂量的临床调整提供依据，并可以在临床症状出现前预知排斥反应的发生，使器官移植的成功率大为提高；具有无痛苦、时间短、费用低、特异性强、可信度高的优点。



1. 一种检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法, 其特征在于, 将受者外周血T淋巴细胞用细胞培养液制备成细胞悬液, 取用含有已知HLA 抗原的标准细胞株制备的细胞测定板, 将细胞悬液按1: 0.5--10的靶/效比加至细胞板各孔中, 进行细胞培养2--28小时; 然后测定淋巴细胞的反应性。

2. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 所述的检测是用显微镜对各孔的淋巴细胞进行有无转化的观察, 并通过细胞计数得到转化率。

3. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 所述的培养液为含有被标记的胸腺嘧啶的培养液, 在细胞培养6--28小时期间, 标记的胸腺嘧啶参与细胞内 DNA 合成, 使细胞核在普通显微镜或是荧光显微镜下能直观地呈现有某种明显特征。

4. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 在细胞培养2--6小时后, 取各孔等量的上清液分别置入另一空白测定板对应的培养孔内, 进行脱氢酶检测的酶促反应, 反应终止后在480nm--630nm波长范围内选取最大吸收值的波长, 用该波长的光读取各孔溶液的光吸收值。

5. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 在细胞培养6--16 小时后, 给细胞板各孔分别加入等量的四唑盐 (MTT) 溶液, 继续培养2--6小时, 培养结束后, 取各孔的上清液在480nm--630nm波长范围内选取MTT溶液有最大吸收值的波长, 用该波长的光读取各孔溶液的光吸收值。

6. 根据权利要求5所述的检测方法, 其特征在于, 在培养结束后除去上清液, 给各孔加入等量的二甲基亚砷 (DMSO), 使细胞内的甲臞结晶溶出, 在480nm--630nm 波长范围内选取最大吸收值波长, 用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值。

7. 根据权利要求1所述的检测方法, 其特征在于, 制备细胞板所用的标准细胞株内均含有由MTT还原而成的等量的甲臞结晶, 在该细胞板按所述细胞培养后, 可采用MTT测定法对各孔的培养物进行检测。

8. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于, 所述的MTT测定法为, 经3--8小时的细胞培养后, 在细胞板各孔中加入等量的氧化剂, 继续培养1--4小时, 该氧化剂能将破碎靶细胞中的甲臆结晶氧化成MTT, 培养结束后分别吸取各孔的上清液, 在480nm--630nm 波长范围内选取MTT溶液有最大吸收值的波长, 用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值。

9. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于, 所述的MTT测定法为, 经4--10小时的细胞培养后, 除去上清液, 给各孔加入等量的DMSO溶液, 使未破碎靶细胞中的甲臆结晶溶出, 吸取各孔的上清液, 在480nm--630nm波长范围内选取最大吸收值的波长, 用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值。

10. 根据权利要求7所述的检测方法, 其特征在于, 所述的MTT测定法为, 经4--10小时的细胞培养后, 在细胞板各孔中加入等量的有机溶剂, 使破碎靶细胞中的甲臆结晶溶解, 吸取各孔的上清液, 在480nm--630nm波长范围内选取最大吸收值的波长, 用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值。

11. 根据权利要求10所述的检测方法, 其特征在于, 所述的有机溶剂可以是甲醇、乙醇、苯甲醇、甲醛、乙醛、戊二醛、二甲苯中的任一种。

12. 根据权利要求1--11所述的任一种检测方法, 其特征在于, 所述细胞测定板的结构为, 细胞板上培养孔的直径为3--6mm, 深为5--15mm, 在各孔外周边设置有凸起的边棱, 其孔底为平底, 底与周壁呈斜面连接; 并在盖下沿内侧壁与细胞板本体对应的二侧壁之间设置有两级卡紧机构, 卡紧机构为横向的凹槽凸棱结构, 当把盖盖在本体上压下, 使二侧的凸棱分别卡入第一条凹槽时, 盖上的密封垫不能将培养孔盖严, 而继续将盖压下, 使凸棱卡入第二条凹槽时, 密封垫则能将培养孔密封。

检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法

本发明属于器官移植后受体对供体器官排斥程度的检测方法，是利用标准细胞株在体外通过检测受体外周血T淋巴细胞的杀伤功能和增殖反应能力，来确定受体排斥移植器官的反应状态，从而为临床提供参考依据。

引起器官移植后排斥反应的主要因素是供体和受体之间的抗原差异。在同种异体器官移植中引起排斥反应的抗原是一定的和有限的，其引起排斥反应的主要因素是HLA抗原（人体淋巴细胞抗原，亦称白细胞抗原）的差异。目前在整个人群中存在的HLA血清学抗原总数，截止1991年已鉴定出161个，其中I类抗原122个，II类抗原39个。能够引起混合淋巴细胞反应主要是II类抗原，能够引起CTL杀伤活性的主要是I类抗原。《移植免疫学》陈实主编，湖北科技出版社1998年10月出版。对于这些HLA抗原可以通过在人群中筛选或是利用基因工程的方法来建立标准细胞株，即建立已知遗传背景和稳定表达某个或某几个HLA抗原的标准细胞株。美国莱德姆公司和美国pel-freez公司均已完成该项工作，并已将所生产的标准细胞株形成商品投入市场，称为PRA（特定细胞群反应抗体）测定板；其主要用途是：作为抗原载体在器官移植前，用于检测受体抗HLA抗原的抗体水平及特异性，从而预测超急性排斥反应发生的可能性，为挑选供体提供依据。

混合淋巴细胞反应是已建立几十年、在免疫学中常用于检测机体对某个或某几个抗原的特异性细胞免疫状态的方法。在器官移植领域，早期常用于移植前对供、受体的HLA抗原匹配情况进行检测，以预测移植器官的存活质量及发生排斥的可能性。但由于操作复杂、稳定性和重复性差、时间长（一般需5--7天才能出结果），对尸体供器官者难以应用，在其他一些更好的HLA分型技术出现后，逐渐淘汰了该方法。《细胞和分子免疫学》金伯泉主编，世界图书出版公司1995年8月出版(P230)。

预处理淋巴细胞分型试验 (<<细胞和分子免疫学>>P230)：为克服混合淋巴细胞反应在分型工作中的缺点，有人建立了该方法。其基本步骤是取已知含有某个或某几个HLA抗原的细胞作为刺激细胞，分离不含该抗原的T淋巴细胞作为反应细胞，放在一起进行混合淋巴细胞反应，经9—14天培养，反应细胞的分裂增殖逐渐停止，最后该反应细胞即成为被某个或某几个HLA抗原致敏的记忆细胞，称为预处理（预致敏）细胞，于液氮中保存备用。分型时复苏这些细胞作为反应细胞，被检者的淋巴细胞作为刺激细胞，当该刺激细胞上含有与预致敏处理时刺激细胞上相同的HLA抗原时，经预处理的反应细胞会表现出一种迅速的回忆反应，在20—30小时内迅速发生增殖反应，从而确定被检者淋巴细胞上是否含有该抗原。

细胞毒性T淋巴细胞杀伤试验(CTL)也已建立几十年，在免疫学中常用于检测机体被某个或某几个存在于细胞表面的抗原的致敏状态。<<免疫学和免疫学检测>>陶义训主编，人民卫生出版社1989年10月出版(P250)。最近几年杀伤细胞活性的测定也被用于器官移植排斥反应的监测，但由于个体之间的差异，该试验目前只限于对来自供体的细胞作为靶细胞进行一对一的检测，而只有活体供器官移植才能不断地提供靶细胞用于检测，所以该方法目前只用于活体供器官移植的检测，否则无靶细胞来源，故难以广泛应用。

目前，全世界接受器官移植的患者每年以一万多例的速度增加，在接受器官移植后，受者需长期服用免疫抑制剂。服用该药的剂量过大不仅导致费用增加，且受者易患感染性疾病及恶性肿瘤等，剂量过小又会导致移植器官被排斥而失去功能。如何对具体的个体选择合适的用药剂量是长期以来困扰临床医生的难题。多年来指导用药的金指标均是活检穿刺，但由于活检穿刺费用高且痛苦，不易为病人接受，而且穿刺本身具有危险性，不宜多做 (<<移植免疫学>>P200)，故有许多病人移植后在医生未察觉的情况下突然因排斥反应而使移植器官失去功能导致死亡。

本发明将主题名称确定为“检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法”，是为了区别于疾病的诊断方法。其中特定抗原是指引起受体内排斥反应的供体抗原，而对特定抗原的反应性是指受体淋巴细胞对特定抗原的反应状态。

本发明的目的是提供一种在器官移植后、检测受体血液中T淋巴细胞对特定抗原

反应性的方法，该方法通过对受者外周血T淋巴细胞的检测，为了解受体对供体器官的免疫状态提供动态的监测手段，从而为受者免疫抑制剂服用剂量的临床调整提供依据，并可以在临床症状出现前预知排斥反应的发生，而且具有无痛苦、时间短、费用低、特异性强、可信度高的优点。

本发明所提供的检测方法，是利用含有已知HLA抗原的标准细胞株与受者外周血T淋巴细胞在体外进行混合淋巴细胞反应，来确定受者机体内有无排斥反应的发生。其特点为，把受者外周血T淋巴细胞用细胞培养液制成细胞悬液；再取用含有已知HLA抗原的标准细胞株制备的细胞测定板，将细胞悬液按1:0.5-10的靶/效比加至细胞测定板各孔中，进行细胞培养2--28小时；然后通过免疫学检测方法测定淋巴细胞的反应性。

所述的检测可以用显微镜对各孔的淋巴细胞进行有无转化的观察，并可以通过细胞计数得到转化率，来确定受者机体内有无排斥反应。所述的培养液可以采用含有被标记的胸腺嘧啶的无血清培养液，在细胞培养6--28小时期间，标记的胸腺嘧啶参与细胞内DNA(脱氧核糖核酸)合成，使细胞核在普通显微镜或是荧光显微镜下能直观地呈现有某种明显特征。

以上是通过形态观察来检测淋巴细胞的反应性。在这种以含有各种HLA-I类和II类抗原的标准细胞株作为刺激细胞，以受者淋巴细胞为预致敏反应细胞的混合淋巴细胞反应中，只有当反应细胞在受者机体内确实已被致敏的情况下，其在体外再遇到供体抗原时才会迅速地出现细胞转化和增殖反应，即反应细胞转化为淋巴母细胞，其转化细胞变大、细胞浆增多、出现空泡、核仁明显、染色质疏松，从形态上很容易区分；若在培养液中加入有标记的胸腺嘧啶，则使细胞核的形态区分更容易。由于细胞板上各孔的标准细胞株都含有特定的某个或某几个HLA抗原，所以根据转化(或增殖)细胞出现孔所在位置即能确定引起排斥反应的供体抗原类型。在对各孔转化细胞计数后得到转化率，把含有供体抗原各孔的平均转化率减去不含有供体抗原各孔的平均转化率，所得值即能反映出机体内排斥反应的状态。这种形态观察的方法虽然方便经济，能很快得到结果，但难免受人为因素的影响，而且细胞计数工作量很大，所以本发明还可以用仪器进行检测，以排除人为因素，减少工作量。

本发明的检测方法还可以按以下方式进行,按上述细胞培养2-6小时后,吸取各孔等量的上清液分别置入另一空白测定板的对应培养孔内,进行脱氢酶检测的酶促反应,反应终止后在480nm--630nm波长范围内选取最大吸收值的波长,用该波长的光分别读取各孔溶液的光吸收值,由这些吸收值可确定受者体内排斥反应的水平。脱氢酶是细胞内所含酶类之一,正常情况下不能透过细胞膜;在含有供体抗原的靶细胞(标准细胞株)受到已被致敏的效应细胞(T淋巴细胞)攻击损伤后,细胞膜的通透性改变,脱氢酶可释放至介质中,通过酶促反应可测得各孔脱氢酶的含量,由此推测被杀伤细胞的量;在该方法中应设置有自然释放和最大释放二个对照组,其可以选择不含有供体抗原的4-10个孔为对照孔;由于受者在移植手术前后做有许多的检测,依据历次检测资料可以基本确定能引起排斥反应的供体HLA抗原类型的大致范围,由此确定出应该含有供体抗原的孔位置,和不应含有供体抗原的孔位置。用(本次检测)含有供体抗原孔的平均吸收值减去自然释放对照组平均吸收值的差,除以最大释放对照组平均吸收值减去自然释放对照组平均吸收值的差,其商值即能反映出受者体内排斥反应的水平,值越高说明杀伤细胞越多,排斥反应越强烈。

本发明的检测方法还可以按下述方式完成,按上述细胞培养6-16小时后,在细胞板各孔中分别加入等量的四唑盐(MTT)溶液,继续培养2-6小时,这时可以通过测定上清液中MTT存留量或是测定转化细胞中MTT的转化量来确定反应细胞的转化情况。A.吸取各孔的上清液,在480nm-630nm波长范围内选取MTT溶液有最大吸收值的波长,用该波长的光分别读取各孔溶液的光吸收值;由于该方法是测定培养液中MTT的存留量,故吸收值高的孔无增殖反应,应视为对照孔,而吸收值低的孔所含抗原会被认定为供体抗原,其在受者体内有排斥反应发生,将对照孔的平均吸收值减去含有供体抗原孔的平均吸收值,所得值越高说明受体淋巴细胞的增殖越活跃。B.在除去上清液的细胞板各孔中加入等量的二甲基亚砷(DMSO),使转化细胞内的甲臆结晶溶出,在480nm-630nm波长范围内选取最大吸收值的波长,用该波长的光分别读取各孔上清液的光吸收值;由于该方法是测定转化细胞内MTT转化为甲臆类物质的含量,故光吸收值低的孔无增殖反应,可视为自然对照孔;而光吸收值高的孔所含抗原为供体抗原其在受体体内有排斥反应发生;将含有供体抗原孔的平均光吸收值减去对照孔

的平均光吸收值，所得值越高说明受体淋巴细胞的增殖越活跃。

本发明的检测方法还可以按以下方式完成，所述细胞测定板上的标准细胞株在制备时可用MTT处理，使各细胞内均含有由MTT还原而成的等量的甲臆结晶；在该细胞板按上述混合淋巴细胞反应进行细胞培养时，也是以标准细胞株为靶细胞的杀伤试验过程，故可以通过杀伤细胞活性测定来得到检测结果，所以本发明还可以采用MTT测定法通过杀伤细胞活性测定，来确定受者体内有无排斥反应，在杀伤试验中以含有供体抗原的孔为试验反应孔，以不含有供体抗原的孔为对照孔，进行杀伤细胞活性测定。这种测定有三种方法。

①经细胞培养3-8小时后，在细胞测定板各孔加入等量的氧化剂，继续培养1-4小时，该氧化剂能将破碎靶细胞中的甲臆结晶氧化成MTT，培养结束后分别收集各孔的上清液，在480nm-630nm波长范围内选取最大吸收值的波长，用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值；该方法是测定破碎细胞中的甲臆类物质含量，光吸收值高的孔其含量就多，说明该孔被杀伤的破碎细胞就多，该孔所含抗原为供体抗原，其在受者体内引起了排斥反应，将所有含有供体抗原孔的平均吸收值减去所有不含供体抗原孔的平均吸收值，所得数值越大说明排斥反应越强烈。

②经细胞培养4-10小时后，去除上清液，给各孔加入等量的DMSO溶液，使未破碎靶细胞中的甲臆结晶溶出，将各孔上清液分别吸出，在480nm-630nm波长范围内选取最大吸收值的波长，用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值；由于预致敏的受体淋巴细胞在增殖培养过程中对含有供体抗原的标准细胞株(靶细胞)有杀伤破碎作用，那么存活的靶细胞越多，则破碎的越少；而该方法就是对存活靶细胞的量进行测定，光吸收值低的孔存活靶细胞就少，其被杀伤的靶细胞就多，也说明该孔所含抗原为供体抗原，其在受者机体内引起了排斥反应；将所有不含供体抗原孔的平均光吸收值减去所有含有供体抗原孔的平均值，所得值越大说明受者体内排斥反应越强烈。

③经细胞培养4-10小时后，在细胞板各孔中加入等量的有机溶剂，使破碎靶细胞中的甲臆结晶溶解，分别吸出各孔的上清液，在480-630nm波长范围内选取最大光吸收值的波长，用该波长的光读取各孔上清液的光吸收值，用各孔的光吸收值即可确定受者机体内有无排斥反应发生。其与方法①的作用机理基本相同。所述的有机溶剂应

选择能够溶解甲醚类物质、但又不能进入细胞内的有机试剂,如可以选择甲醇、乙醇、苯甲醇、甲醛、乙醛,戊二醛、二甲苯中的任一种。

本发明的另一个目的是对现有细胞(培养)测定板的结构进行改进,使之在测定使用时更为方便合理。

本发明所设计的细胞测定板是由细胞板本体和盖构成,在细胞板本体上规律设置有若干培养孔和给各孔定位的标记,在盖上设置有与孔对应的密封垫;其特点在于,所述培养孔的直径为3-6mm,深为5-15mm,并在各孔外周边设置有凸起的边棱,其孔底为平底,底与周壁呈斜面连接,在盖下沿内侧壁与细胞板本体对应的二侧壁之间设置有两级卡紧机构,卡紧机构为横向的凹槽凸棱结构,当把盖盖在本体上压下,使二侧的凸棱分别卡入第一条凹槽时,盖上的密封垫不能将培养孔盖严,而继续将盖压下,使凸棱卡入第二条凹槽时,密封垫则能将培养孔密封。

由上述可以看出,虽然本发明检测方法中大部分检测手段为免疫学中常规实验方法,但是以标准细胞株测定板为工具,利用预致敏的原理在移植后检测受者机体内排斥反应的发生还尚无先例。与现有混合淋巴细胞反应不同的是,本发明是利用预致敏的受者淋巴细胞,从而使刺激反应成为回忆反应,大大缩短了反应时间;现有的预致敏淋巴细胞分型试验是用体外制备的预致敏淋巴细胞测定供体或受体细胞上是否含有某种抗原,而本发明是以受者的淋巴细胞为预致敏反应细胞,以标准细胞株为刺激细胞来检测受者体内的免疫状态,二者从形式上看似相同,但所用工具和对象以及目的是不同的;而与现有的淋巴细胞杀伤试验不同的是,本发明是以标准细胞株为靶细胞,无需供体提供靶细胞来源,并减少了制备操作的麻烦。本发明是把传统的混合淋巴细胞反应与预致敏细胞分型试验结合,利用二者的时间差完成检测。其能将检测时间从传统概念的三天以上,缩短在三十小时之内完成,最快可在4-5小时得到检测结果;并且不需由供体提供靶细胞,也不需考虑供体的存活、以及有无靶细胞来源,甚至有无供体抗原类型的资料对检测都无影响;并为标准细胞株测定板的使用开辟了新的领域,也为器官移植后受者体内免疫状态的动态监测提供了手段,使临床医生可在临床症状出现前预知排斥反应的发生,为受者免疫抑制剂服用剂量的临床调整提供依据,能使器官移植的成功率大为提高。与已有的检测方法相比,本发明具

有无痛苦、时间短、费用低、可信度高、特异性强的优点。

附图1为淋巴细胞转化的形态特征示意图，图中1为未转化细胞的形态，2为转化过渡细胞的形态，3为淋巴母细胞的形态。

附图2为细胞测定板（不带盖）正面视图，附图3为本发明所设计细胞测定板（带盖）侧面剖视图，图中4为细胞板本体，5为细胞板培养孔，6为培养孔的定位标记，7为细胞板的盖，8为凸棱，9为密封垫，10为凹槽。

以下结合附图先叙述细胞培养测定板的技术实施方案及效果。

参见附图3，其为本发明所设计细胞（培养）测定板的一种实例，细胞板本体可以采用透明的玻璃、有机玻璃、或是塑料一次成型；而盖子可以采用有机玻璃、或塑料制作，可以将盖与密封垫和凸棱（或是凹槽）一次成型，也可以将胶皮制作的密封垫和凸棱粘贴于其上。细胞板上培养孔按行列有规律地排列，培养孔的容积应在0.05-0.5ml，容积的大小应视测试的需要而定，可划分成几种容积规格的测定板；培养孔的底为平底，且与周壁呈斜面连接，以消除孔底的边棱拐角，使细胞能铺平，又使清洗更方便；在各培养孔外周边设置有凸起边棱（图中未画出），以防止细胞板表面液体的流入，并能使盖紧后更密封，其可与本体一次成型；在本体与盖下沿对应的二侧壁横向设置有二条凹槽，其凹槽与盖下沿的凸棱匹配，使盖在下压时两侧下沿的凸棱能分别卡入本体上第一条凹槽，此时密封垫与培养孔之间留有间隙，便于培养时的气体交换，在将盖继续下压，使凸棱卡入第二条凹槽时，密封垫则能将培养孔完全密封；可以看出，若将凸棱设置在本体上，而将二条凹槽设在盖下沿，其使用会更方便。本发明所设计的细胞测定板，能使其使用更为方便合理。

由前述的各种检测方法可以看出，本发明为移植器官免疫状态的监测所提出的各种检测方法，都是在同一免疫学原理下对不同阶段的不同反应对象可以采用的不同检测手段。具体地讲，就是以标准细胞株为靶细胞（刺激细胞），以受体淋巴细胞为预致敏的效应细胞（反应细胞），由于细胞板上标准细胞株几乎包含了已知所有能引起排斥反应的HLA抗原，而受者体内若有排斥反应发生则使其淋巴细胞成为预致敏的记忆细胞，在体外检测时遇到含有供体抗原的标准细胞株，淋巴细胞受到刺激后会作出迅速的回忆反应，一方面淋巴细胞会大量转化为淋巴母细胞并发生增殖（其间

可采用形态观察、或是增殖DNA标记、或是用MTT 测定方法检测增殖细胞来验证)，另一方面标准细胞株作为靶细胞会受到淋巴母细胞的攻击杀伤（其间可采用脱氢酶释放试验、或是对已经MTT处理过的标准细胞株进行MTT测定法验证检测）。这就是本发明技术方案的总框架，以下结合实施例详细说明本发明各检测方法的实施方案。

为节省材料，发明人在实施例实验中对一些实例中的弃用材料，在其他实例中进行了利用，这种利用以及包括因利用所采取的必要处理，不应被视为是该检测方法的必要环节，除非这种利用在临床的实际检测中确实有必要这样做。

实例1. 标准细胞株测定板的制备：虽然莱姆德公司生产的标准细胞株测定板含有各种HLA抗原，由于其培养孔太小、细胞数量少，不能直接用于本发明的检测。取本发明设计的细胞测定板（64孔、孔径5mm、孔深15mm），购买莱姆德公司生产的60种标准细胞株，按其制备方法制成标准细胞株测定板，每孔含有细胞4万个（本发明检测方法可以允许每孔细胞含量在2-20万个范围）。其中多余的4个孔只加标准细胞做为实例4的最大释放对照组。

实例2. 反应细胞形态观测检测：在器官移植后，取受者外周血分离T淋巴细胞，用含有20%人AB血清的1640培养液（也可选择DMEM培养液），制成每毫升含有1百万个细胞的细胞悬液，取实例1制备的细胞板，在各孔中加入0.1ml的细胞悬液（靶/效比为1:2.5），将细胞板置入CO₂浓度为5%的CO₂孵箱，在36-38℃条件下培养2-28小时，在此期间可随时通过显微镜观察细胞有无转化，反应细胞转化与否的形态特征可参见附图1。若要进行细胞计数可参见沈关心等主编的《现代免疫学实验技术》（湖北科技出版社1998年10月出版）中的方法进行。

实例3. 标记细胞的形态观察检测：在器官移植后，取受者外周血分离T淋巴细胞，用含有0.2mmol荧光标记胸腺嘧啶的无血清培养液，制成每毫升含有40万个细胞的细胞悬液，取实例1制备的细胞板，在各孔中加入0.1ml的细胞悬液（靶/效比为1:1）将细胞板置入CO₂浓度为5%的CO₂孵箱，在37℃条件下培养10-28小时，在此期间可随时通过荧光显微镜观察细胞核有无荧光。虽然在已有技术中有各种各样的标记物和标记方法，但本发明需要的是能从形态直观得到的标记表现，如铁蛋白标记和胶体金标记（可使核变黑），荧光素标记和发光物质标记（可使核发光）。

实例 4. 靶细胞脱氢酶释放检测: 取实例 2 中孵箱培养 2 小时的细胞板, 给只有标准细胞的对照组 4 个孔加入 0.1ml 的 1%NP-40 (非离子型去污剂) 溶液; 再将细胞板继续培养 2 小时取出, 吸取各孔上清液 0.1ml 分别置入另一空白测定板 (无细胞株) 对应的培养孔内, 每孔加入新配制的底物溶液 0.1ml, 在室温避光反应 15 分钟, 给每孔加入 30 μ l 的柠檬酸终止液 (1mol/L) 终止反应, 用酶联检测仪 (华东电子管厂生产) 在 570nm 波长处读取各孔的光吸收值, 选取不含供体抗原各孔的平均光吸收值为自然释放对照组的光吸收值, 按前述方法进行计算。本方法可以是对单一脱氢酶 (乳酸脱氢酶、或是苹果酸脱氢酶、或是谷氨酸脱氢酶) 的释放检测, 也可以是对各种脱氢酶的释放检测, 区别在于其底物溶液中含有那种反应底物, 可以是乳酸钠、苹果酸钠、谷氨酸钠中的任一种或是几种。本例选用的是 LDH 底物溶液 (含乳酸钠), 有关底物溶液的配制和酶促反应的操作参见《现代免疫学实验技术》P311。

实例 5. 转化细胞的 MTT 检测: 取实例 4 中被吸取上清液后弃置的细胞板, (应将其中最大释放对照组的 4 个孔剔除), 给各孔分别补充 0.1ml 的培养液后置入孵箱内继续培养 6 小时, 取出细胞板给各孔加入 10 μ l MTT 的 PBS 溶液 (浓度为 5mg/ml), 再置入孵箱继续培养 4 小时取出, 吸取各孔的上清液, 用酶联检测仪在 480nm 波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。

实例 6. 转化细胞的 MTT 检测: 取实例 5 中被吸取上清液后弃置的细胞板, 将剩余上清液去除干净, 给各孔分别加入 0.2ml 的 DMSO, 振荡 5 分钟后, 用酶联检测仪在 490nm 波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。本方法在 630nm 波长处也有吸收峰值, 也可用该波长读取光吸收值; 还可以在这二个波长处都取值计算, 具体计算和判断参见《上海免疫学杂志》1996 年第 5 期 “MTT 比色分析法的改良及初步应用” 一文。

实例 7. 使标准细胞株内含有由 MTT 还原而成的甲臞结晶的细胞板制备: 在标准细胞株培养即将完成前, 给各细胞培养液中加入 MTT 使其浓度为 0.25mg/ml, 继续培养 4 小时, 再按原方法进行制板, 所制细胞板上各细胞内均含有等量的甲臞结晶。也可以对现有细胞板用 MTT 进行处理。有关本例中用 MTT 对标准细胞株的处理, 以及其他各例中 MTT 的检测操作可参见《现代免疫学实验技术》一书。

实例 8. 靶细胞的 MTT 检测: 取实例 7 制备的细胞板, 将实例 2 中制备的受体淋巴

细胞悬液分别给各孔加入0.1ml(靶/效比为1:2.5),将细胞板置入孵箱内培养4小时取出,给各孔分别加入20 μ l的双氧水(浓度为1%),置入孵箱内继续培养2小时取出,用酶联检测仪在480nm波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。本例中氧化剂的选择为:能将甲臆结晶氧化成MTT、对正常细胞无影响、且无色的试剂;对其加入量及浓度无严格要求,够用就行,但要求各孔的加入量应一致。

实例9.靶细胞的MTT检测:取实例8中被吸取上清液后弃置的细胞板,将上清液去除干净,给各孔分别加入150 μ l的DMSO,振荡10分钟后,用酶联检测仪在630nm波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。本例的读值和计算可以参照实例6。

实例10.靶细胞的MTT检测:取实例7制备的细胞板,用实例2制备的淋巴细胞悬液,给各孔加入0.1ml(靶效比为1:3)的细胞悬液,将细胞板置入孵箱内培养8小时后取出,给各孔分别加入0.1ml的乙醇,振荡5分钟,用酶联检测仪在570nm波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。本例的读值和计算可参照实例6;能够替代乙醇的有机溶剂前面已有叙述,这里不再一一举例。

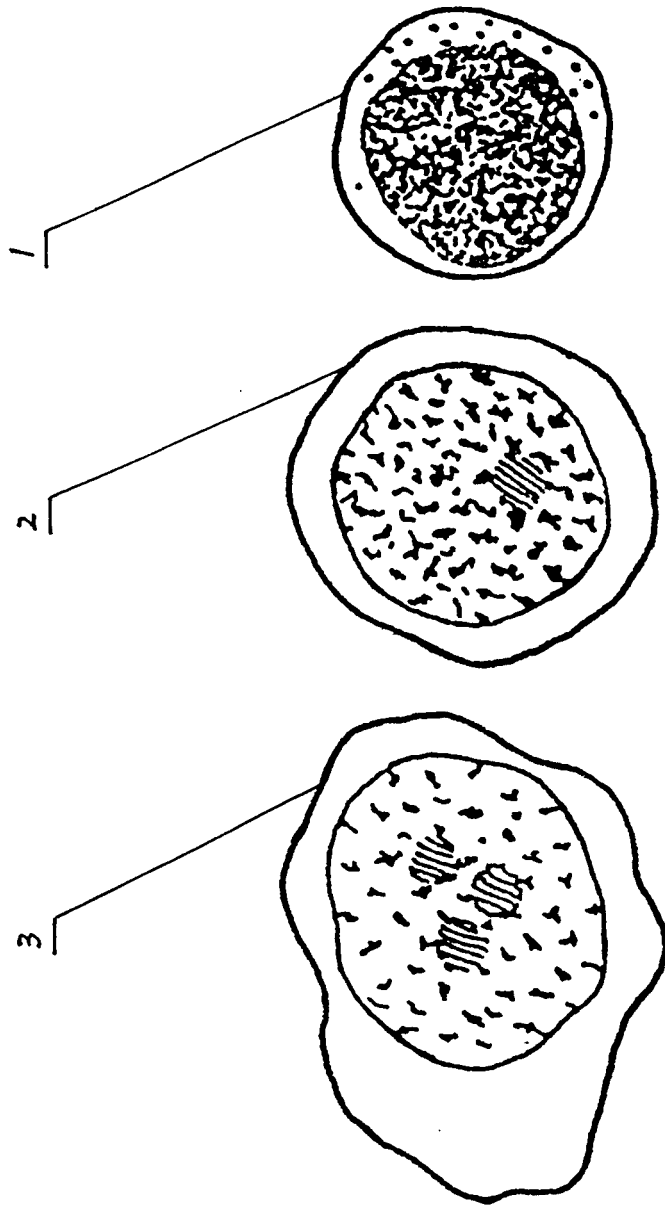
实例11.耐受检测:可以将实例2、3、4、5、6、8、9、10各例中弃置的细胞板洗去试剂(保留细胞)补充0.2ml的培养液,置入孵箱内继续培养3-5天取出,给各孔加入MTT(5mg/ml)溶液20 μ l,继续培养2-6小时,去除上清液,给各孔加入0.2ml的DMSO,在490nm或630nm波长处分别读取各孔上清液的光吸收值。若含供体抗原各孔的光吸收值明显低于不含供体抗原各孔的光吸收值,则说明受体对供体器官已产生耐受,可在本发明的定期监测之下减量或停用免疫抑制剂;若含供体抗原各孔的光吸收值明显高于不含供体抗原各孔的光吸收值,则说明有急性排斥反应(与前述30小时以内的检测结果一致时),或慢性排斥反应(与前述30小时以内的检测结果不一致时)。

本发明人通过大量的实验认为,本发明各检测方法中的细胞培养的时间与受者淋巴细胞的致敏程度有关,致敏程度高时(有急性排斥反应)在检测中短时间的培养就有反应,而致敏程度低时(在排斥反应的初期)在检测中则需较长的培养时间,这在实际检测中可根据临床经验掌握。用本发明检测方法得到的数值虽然能证明受者体内有无排斥反应以及排斥反应的程度,但不能用该数值直接量化排斥反应,而对排斥反应

程度的量化需对该受者历次检测结果的对比和长期检测积累的经验来判断。本发明在临床的实际应用中，在毫无经验的情况下，最好在一次检测中使用两种方法并行检测，以使检测结果能够对比验证，即在本发明中选择二种不同的方法（一种是对效应细胞的检测，一种是对靶细胞的检测）同时检测，在积累有丰富经验后即可用一种方法进行。

本发明的特异性表现在，用一块标准细胞测定板不但可测出受体内CD8阳性T淋巴细胞及体内的NK细胞对供体细胞的特异性杀伤活性，又可测定受体体内的CD4阳性T淋巴细胞在供体抗原刺激下的特异性转化增殖能力，在检测方法中不但含供体抗原的多个孔可相互对照，而且CD8亚群的特异性杀伤活性和CD4亚群的特异性增殖能力又可作为不同实验方法间的对照，使该方法用于监测排斥反应不但特异、敏感，而且可靠。

本发明检测方法不仅可以用于同种器官移植后免疫状态的监测，也可以用于异种器官移植后免疫状态的监测，只要能得到含有各种抗原的该种动物的标准细胞株。



1.

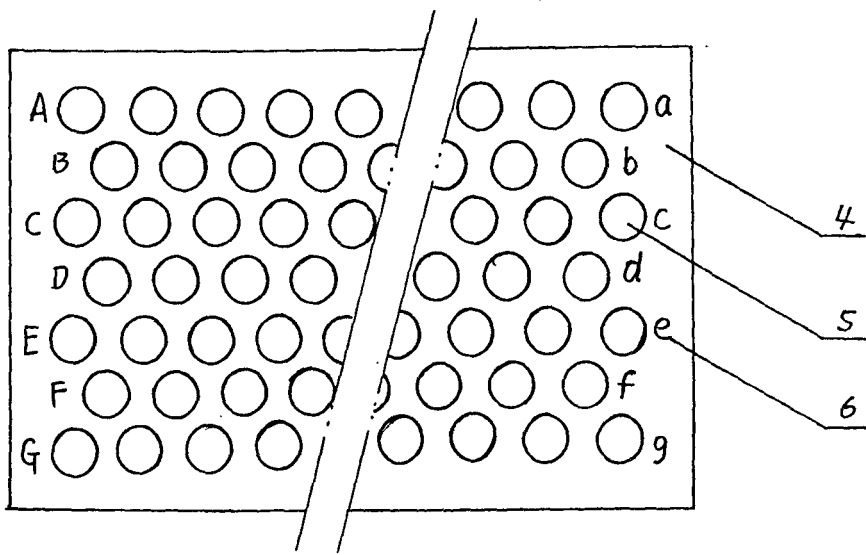


图 2.

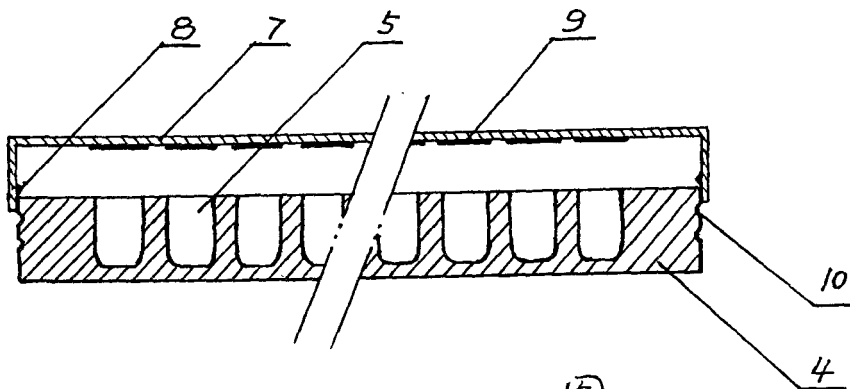


图 3

专利名称(译)	检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法		
公开(公告)号	CN1140801C	公开(公告)日	2004-03-03
申请号	CN00113747.6	申请日	2000-03-01
[标]申请(专利权)人(译)	胡军		
申请(专利权)人(译)	胡军		
当前申请(专利权)人(译)	胡军		
[标]发明人	胡军		
发明人	胡军		
IPC分类号	G01N33/53 C12N5/10 C12N15/09 C12Q1/02 C12Q1/32 G01N21/78 G01N33/48 G01N33/50 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/56972 G01N33/5091		
代理人(译)	任越		
其他公开文献	CN1311437A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种检测血液中淋巴细胞对特定抗原反应性的方法，本发明是利用含有已知HLA抗原的标准细胞株与受者淋巴细胞在体外进行细胞培养2-28小时，然后通过免疫学检测方法测定淋巴细胞的反应性；为器官移植后了解受体对供体器官的免疫状态提供动态监测手段，为受者免疫抑制剂服用剂量的临床调整提供依据，并可以在临床症状出现前预知排斥反应的发生，使器官移植的成功率大为提高；具有无痛苦、时间短、费用低、特异性强、可信度高的优点。

