

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02820525.1

[51] Int. Cl.
G01N 33/96 (2006.01)
G01N 33/80 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009年2月4日

[11] 授权公告号 CN 100458445C

[22] 申请日 2002.10.16 [21] 申请号 02820525.1

[30] 优先权

[32] 2001.10.16 [33] NZ [31] 514849

[32] 2002.1.29 [33] NZ [31] 516901

[86] 国际申请 PCT/NZ2002/000214 2002.10.16

[87] 国际公布 WO2003/034074 英 2003.4.24

[85] 进入国家阶段日期 2004.4.16

[73] 专利权人 科德生物工程有限公司

地址 新西兰奥克兰

[72] 发明人 德波拉·阿代拉·布莱克

丽莎·格威妮丝·吉利佛

斯蒂芬·迈克尔·亨利 陈 吉

[56] 参考文献

US5512485A 1996.4.30

US5677176A 1997.10.14

Electroinsertion of xeno proteins in red blood cell membranes yields a long lived protein carrier in circulation. Mouneimne Y et al. Biochimica et Biophysica Acta, Vol. 1066 . 1991

In vitro attachment of mono - and oligosaccharides to surfaceglycoconjugates of intact cells. Tolvanen M et al. Journal of Biological Chemistry, Vol. 261 No. 20. 1986

审查员 王丽华

[74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

代理人 李 勇

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 6 页

[54] 发明名称

一种用于血型测定的灵敏度控制物制备方法、由该方法制得的改造细胞及其该灵敏度控制物的应用、进行灵敏度控制的方法以及试剂盒

[57] 摘要

本发明提供了一种血型测定的灵敏度控制物制备方法，包括将一定数量的抗原溶解于水中，制得浓度确定的抗原溶液，并将此溶液与细胞接触，使抗原分子插入细胞膜内，或者将此溶液与经插入连接分子修饰的细胞接触，使抗原分子通过连接分子与细胞膜结合，得到改造细胞。淋洗改造细胞，并配成溶液，测定此溶液浓度，使其可用作血型测定的灵敏度控制物。

1. 一种用于血型测定的灵敏度控制物制备方法，包括：
 - 将已知浓度的血型相关的糖脂溶液与液态细胞混悬液接触一段时间，在可使血型相关的糖脂分子能够插入细胞膜中的温度，形成人工改造的细胞；或者
 - 将已知浓度的生物素化的血型相关的糖类溶液与经过修饰的、在膜上插入了连接分子的液态细胞混悬液接触一段时间，在可使生物素化的血型相关的糖类分子能够和连接分子结合的温度，形成人工改造的细胞；和
 - 用洗液洗涤经改造的细胞，并将洗后的改造细胞悬浮于水中，亦可选择加入一种或多种可溶性盐，得到改造细胞的溶液；和
 - 测定改造细胞的浓度，并调整浓度使其能够用于血型检测时的灵敏度控制。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其中混悬液中的待改造细胞未经任何修饰，改造后的细胞包含着直接插入细胞膜的血型相关的糖脂分子。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其中混悬液中的待改造细胞经修饰，被插入一个连接分子；改造后的细胞包含的血型相关的糖类分子系通过此连接分子才与细胞膜相连。
4. 如权利要求 3 所述的方法，其中连接分子含一个脂质尾巴和一个“桥”结构，通过此“桥”结构将抗原分子与脂质尾巴与抗原分子连接。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其中“桥”结构为生物素-卵白素桥。
6. 如权利要求 3 所述的方法，其中连接分子包括生物素化的糖脂。
7. 如前述任一权利要求所述的方法，其中的细胞是动物细胞，植物细胞，细菌细胞或者具有人工细胞膜结构的细胞或囊泡。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其中动物细胞为人类细胞。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其中人类细胞为红细胞。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其中红细胞是 O 型红细胞。
11. 如权利要求 10 所述的方法，其中血型相关的糖脂是 A 型，B 型，H 型，Lewis(Le^b或 Le^a)，或者是 Gal(alpha)鞘糖脂。

12. 如权利要求 10 所述的方法，其中生物素化的血型相关的糖类是 A 型，B 型，H 型，Lewis (Le^b 或 Le^a)，或者是 Gal(alpha) 鞘糖脂。

13. 进行抗体或检测系统的灵敏度控制的方法，包括：

- 将权利要求 1 至 12 中所述方法制备的细胞与分型用抗体或检测系统接触，使改造后细胞与抗体或检测系统发生抗原-抗体反应；
- 检测抗原-抗体反应程度；
- 测出分型用抗体或检测系统的灵敏度。

14. 如权利要求 15 所述的方法，其中抗原-抗体反应程度，由直接的凝集反应或者诱导的凝集反应来测定。

15 如权利要求 16 所述的方法，其中诱导凝集可以通过强化反应，或使用抗免疫球蛋白分子，或者使用酶反应来实现。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其中抗原-抗体反应程度通过酶标记法，放射标记法或者荧光标记法进行。

17. 通过权利要求 1-12 的任一种方法获得的灵敏度控制物的应用，用于衡量血型检测中一种或多种试剂或者检测系统的有效性。

18. 一种用于衡量血型检测中一种或多种试剂或者检测系统的有效性的试剂盒，其中试剂盒包括权利要求 1-12 中任意一个的方法制得的灵敏度控制物。

一种用于血型测定的灵敏度控制物制备方法、由该方法制得的改造细胞及其该灵敏度控制物的应用、进行灵敏度控制的方法以及试剂盒

技术领域

本发明涉及人工改造细胞的应用，这些细胞表达血型（或相关血型）抗原，可用于免疫血液学/血液学/免疫学/血清学检验的灵敏度控制。本发明尤其涉及使用一些输液用药物时的灵敏度控制，这些药物由插入 A 抗原和/或 B 抗原的细胞制备。

背景技术

血站的一项重要职能是检测血液以准确测定提供血液（或其它制品）者的血型。血液分型的知识在一些治疗过程中极为重要，例如输血、器官移植、新生儿溶血症的治疗等。尤其在输血前，供血者血型必须提前被检测出来。血型错配可造成灾难性的后果，可能导致受血者死亡。

在输血血清学中，ABO 血型系统代表了人类红细胞 (RBCs) 表面最重要的几种抗原。人类的血型归属于下列四种主要的血型之一：A，B，AB 和 O 型。各血型的红细胞分别携带 A 抗原、B 抗原、同时有 A、B 抗原、或者不表达任何抗原。针对红细胞不具有的抗原，体内天然存在其抗体，即 A 型血的人，体内存在抗 B 抗体；B 型血的人则存在抗 A 抗体；O 型血的人，则同时存在抗 A 和抗 B 抗体；AB 血型的人，则不存在任何血型抗体。在输血前，必须先进行交叉配型（既可直接用供血者血液与受血者血清进行测试，亦可根据受血者医疗纪录对供血者血液进行电子配型），以保证不将某型红细胞输入存在其抗体的受血者体内。

使用含有已知抗体的试剂检查红细胞的抗原，称为正向定型；使用携带已知抗原的红细胞检查血清中的抗体，称为反向定型。

从 1980 年代开始，单克隆抗体 (MAbs) 被使用于血液分型。相较于传统的多克隆抗血清，单克隆抗体可以增加检测的特异性、提供持久的反应性，以及在大多数情况下，可以增加检测的效能。

分型系统（例如胶卡等）以及试剂的常规质量控制在血站实验室中是必

备的，因为分型系统以及试剂有可能在运输、储藏或者在使用过程中由于污染而损失特异性和/或效能。

单克隆抗体也被用于鉴定 ABO 血型系统的各种自然变异，包括 A 和 B 型的各个亚型。为保证正确的鉴定，血站实验室中的单克隆分型试剂及其分型系统必须用红细胞标准品进行质量控制。为达成这个目的，血型抗原表达弱的红细胞更适于用作这样的比较试剂。这是因为在检测血型抗原弱表达的表现型时，抗血清的效能能够更好地表现出来。

天然存在着各种 ABO 亚型的抗原弱表达红细胞。A/B 抗原浓度在各种细胞表现型中存在变异，通常这种变异是未知的，除非开展更为深入的分析。

由于具有亚型表现型的个体的出现频率非常低，因此将抗原弱表达的红细胞作为对照试剂是难以实施的。例如，据估计 A 型血的 A_x 表现型在人群中的出现频率为 0.003%，其他亚型的频率甚至更低。因此，人造的弱表现型红细胞能用于满足此目的。

将 O 型红细胞人工改造成 A 型、B 型或者 AB 型红细胞，能够获得相似的血清学弱表现型。这些抗原的表达量可以通过改变插入条件来控制，譬如，插入抗原的浓度、和/或红细胞和待插入抗原的比例、人工合成抗原的加入量等等。插入的抗原在特定的条件下，能够在红细胞膜上保持稳定至少六周，亦有可能更长。

当前，用于检测糖基化抗原弱表达细胞的单克隆抗体，其血清学灵敏度的检测可通过几种方法进行：

1. 用天然存在的弱表达亚型细胞来检测。这种方法需要寻找此种稀有亚型，并制备该亚型细胞备用，然后用作对照。
2. 使用正常细胞进行检测。这种方法检测普通细胞，但不能指示单克隆抗体的灵敏度。
3. 稀释单克隆抗体来测定其效能。这种方法将抗体稀释，用正常抗原来进行检测。此法在缺乏真实对照时，最为常用。

鉴于天然弱表达亚型的低出现频率，其获得和供应均十分困难。此外，这些抗原弱表达细胞在个体间亦存在变异。这种天然细胞的稳定供应是困难的，甚至是不可能的。进一步说，弱表达亚型的发生频率在不同人群中

也是不同的。

正常细胞表达高水平的抗原，举例来说，在单个红细胞表面，表达多于500,000个拷贝。当检测这些细胞时，通常抗体要被稀释，以显示在低浓度时，抗体依然能够和红细胞发生反应，并给出血清学阳性结果。稀释抗体浓度来检测其灵敏度的方法较费时。其实验结果可以用于推断正常浓度时抗体能够检测出抗原的最低水平。这种有漏洞的方法很遗憾地实际应用于大多数场合。只有经常性地花费时间稀释抗体，或者使用弱表达亚型时，才可能检测出试剂本身的损坏。

在进行单克隆抗体稀释的过程中，还可以有其它问题。单克隆抗体经常是由双克隆的抗体混合而成，并经调整而显示特异的抗体特性，众所周知某些克隆在检测ABO亚型时效果可能较另外一些要好，因此抗体通常是单克隆抗体的混合物。对这样的抗体进行稀释，将会破坏其内在的抗体特性，以至于不能真实地反映抗体的表现。另外，许多单克隆抗体被混合并预先载入测试卡系统（如胶卡），因此不能再用稀释的方法进行检测。

当前，许多实验室并不对他们的ABO分型系统抗体进行灵敏度控制。他们仅仅是依赖生产厂家提供的说明和这些抗体以往的表现。或者，实验室仅仅是使用前述的三种方法，每周或每月对一个批号的抗体进行测试。此外，有很多实验室还依赖于文献报道的结果，文献报道了某次偶然的输血，将一种弱表达亚型的血液输入血型不相容的受血者体内，提示这样的事件不是致命的。以往，交叉配型（用供血者的血液与受血者的血清反应）能够检测出错配的弱表达亚型与受血者之间的不相容性。然而，近年来，交叉配型在许多血液中心已不再进行，取而代之的是只对供血者和受血者血液进行检测。所以，正确配型显得更为重要。不对抗体进行检测将忽略一些问题，例如抗体被损坏，或由于不进行交叉配型而使得临床上重要的亚型可能被错配。这种错配将造成中等到严重程度的输血反应。

因此，对抗体灵敏度质量控制的要求是明显的。使用携带已知表达量抗原的细胞来检测抗体或检测系统，来给出一个准确的、标准的血液分型鉴定。

本发明的目的在于提供一种用于血型测定的灵敏度控制试剂，或者至少提供一个可用的备选。

发明概述

本发明的一个方面，提供了一种用于血型鉴定灵敏度控制物的制备方法，包括：

- 将已知浓度的血型相关的糖脂溶液与液态细胞混悬液接触一段时间，在可使血型相关的糖脂分子能够插入细胞膜中的温度，形成人工改造的细胞；或者
- 将已知浓度的生物素化的血型相关的糖类溶液与经过修饰的、在膜上插入了连接分子的液态细胞混悬液接触一段时间，在可使生物素化的血型相关的糖类分子能够和连接分子结合的温度，形成人工改造的细胞；和
- 用洗液洗涤经改造的细胞，并将洗后的改造细胞悬浮于水中，亦可选择加入一种或多种可溶性盐，得到改造细胞的溶液；和
- 测定改造细胞的浓度，并调整浓度使其能够用于血型检测时的灵敏度控制。

在本发明的一个具体方案中，不对混悬液中的细胞本身进行改造，改造细胞含直接插入细胞膜内的血型相关的糖脂分子。

本发明的另一个具体方案中，混悬液中的细胞膜上插入连接分子，改造细胞含由连接分子结合于细胞膜上的血型相关的糖类分子。

本发明中使用的细胞可以使用任意类型的细胞，包括动物细胞、植物细胞、细菌细胞或者拥有人造细胞膜的囊泡。然而，使用动物细胞更为理想。动物细胞中，人类的红细胞则更好。

连接分子最好具有一条脂肪链尾巴，以及一个“桥”结构连接脂肪链尾巴和抗原分子。

连接分子最好具有一个生物素化的糖脂结构。举例来说，“桥”结构可以由一个生物素-卵白素结构来实现。

血型相关的糖脂最好是 A、B、H、Lewis 或 Gal(alpha) 鞘糖脂。血型相关的生物素化的糖最好也是 A、B、H、Lewis 或 Gal(alpha)。

本发明的第二方面，提供了一个使用第一方案方法改造后的细胞系。

另一方面，本发明提供了一套检测血型鉴定抗体灵敏度质量控制的方法或系统，包括：

- 将一定量的经第一方面程序制得的灵敏度控制物与抗体或检测系统接触，在经改造细胞和抗体或血型检测系统中含有的植物凝集素之间发生抗原-抗体反应
- 检测抗原-抗体反应水平
- 鉴定抗体或血型检测系统的灵敏度

抗原-抗体反应水平可直接通过测定凝集程度，或者诱导凝集来检测。诱导凝集反应可以通过使用增强反应、使用抗-抗体或使用酶来实现。

检测方法最好是用酶标法、核素标记法或荧光标记法。

本发明的另外一方面系使用本发明第一方面的成果，对血液分型过程中使用的多种抗体或者检测系统的效果进行检验。

本发明尚提供了一个试剂盒，包含了血型测定所需要用到的各个组分，且此试剂盒中包括了一个检测抗体灵敏度的部分。

附图的简要说明

图 1 是流式细胞仪的测试结果，显示了改变含 Le^b 抗原的糖脂数量，对体内转化大鼠外周红细胞的效果，使用抗 Le^b 抗原为一抗。

图 2 是流式细胞仪的测试结果，显示了改变反应时间（1 到 12 天）对体内转化大鼠外周红细胞的效果，使用抗 Le^b 抗原为一抗。

图 3 是流式细胞仪的测试结果，显示了改变反应时间（16 到 28 天）对体内转化大鼠外周红细胞的效果，使用抗 Le^b 抗原为一抗。

图 4 是流式细胞仪的测试结果，显示了 37°C 下，改变反应时间（0 到 8 小时）对体外转化红细胞的效果，使用两种不同的抗 Le^b 抗原为一抗。

图 5 是流式细胞仪的测试结果，显示了 22°C（RT）下，改变反应时间（0 到 8 小时）对体外转化红细胞的效果，使用两种不同的抗 Le^b 抗原为一抗。

图 6 显示了改变红细胞体外改造时间后流式细胞仪的实验结果。红细胞在 4°C，与两个不同的抗 Le^b 抗体共同孵育 0 小时—7 小时。

发明详述

尽管以下阐述将主要针对鞘糖脂抗原，其他类型的抗原，包括糖脂和人工合成抗原同样被本发明所涵盖。这里的名词“抗原”亦包括经过改造的抗原，例如拥有黏附分子的抗原，使其能够与连接分子结合。举例来说，如果连接分子以生物素结尾，那么抗原就应该是一个卵白素结合的抗原。

连接分子可以是插入细胞膜内的脂肪链，所述细胞能够连接抗原和细胞膜。典型的是，一个糖链部分经过“桥”结构与脂肪链相连，譬如生物素—卵白素“桥”。其他的“桥”结构，可以是基于螯合作用结合的结构。

为了避免疑问，本文中提到的细胞溶液均指细胞悬液。

糖脂作为血型抗原可被红细胞从胞浆中摄取。这个知识部分来源于对 Lewis 系统的研究。胞浆和红细胞细胞膜之间可进行脂质交换，并且胞浆中和细胞膜内磷脂和脂肪酸的比例相似。所以，胞浆中具有 Lewis 或 ABH 结构的鞘糖脂，被吸收进入红细胞的细胞膜。

插入技术系基于已经证实的原则：糖脂抗原能够插入红细胞细胞膜而不引起细胞损伤。插入的抗原数量可以被控制，因此能够制备得具有特异抗体特性的细胞。这些细胞可以模拟天然的弱表达亚型或者非天然的表达血型抗原的细胞。

插入细胞膜的抗原数量可以根据用户的需要进行设定。不同水平的插入数量是可能的，举例来说，5%，10%，20%或1000个拷贝，5000个拷贝/个红细胞都是可行的。可以把数量设置在临床检测的阈值，在这个数量时，临床上不能检测出来，而有可能导致严重的输血反应。也可以把数量设置在肯定可以检测出弱表达亚型的水平上。这些设置可以保证 ABO 分型的有效性，因为它们使抗体的灵敏度水平变得明确了。这就可以保证更安全的进行输血措施。

本发明中的灵敏度质量控制部分在测定抗体灵敏度和/或检测系统灵敏度时，都是有用的，包括对胶卡的检测。

用于输液药物的弱表达亚型灵敏度控制，是通过 O 型细胞制备的。将一定数量的 A 和/或 B 抗原被插入，以便在抗原检测反应中给出特定的反应分数。这些反应包括板法、试管法、胶卡和微板法，和任何使用凝集反应的手动或自动平台，或者其他任何抗原检测的方法（例如，酶联免疫测定、流式细胞仪等）。

尽管本发明更倾向于使用人的红细胞，其他动物的红细胞也可以使用。作

为补充，当下文中提及红细胞时，其他细胞如血小板、白细胞、植物细胞、细胞系、细菌细胞和人造细胞膜都可以被使用。

插入抗原的红细胞既可以在体外，也可以在体内制备，既可以使用人的红细胞，也可以使用其他动物的细胞。体内制备细胞，需要将一定数量的抗原注射进入人或其他动物的循环系统，然后立刻取血或者等待一段时间。后一种方法将减少插入抗原的数量（一个天然效价）。这种体内的方法可以制备某些抗原，而对另外一些则不能。举例来说，由于动物红细胞不表达人类的 Kell、Duffy、Rhesus 和 Kidd 抗原，故可以用来制备鉴定这些抗原时需要的红细胞。

凝集反应是检测抗原的一个手段。凝集反应是由于红细胞通过抗体或植物凝集素与其他细胞上的抗原交联导致形成团块状而引起。凝集反应可以进行可视化（用肉眼）或用血型分析仪自动读数。可以根据下表对凝集反应进行手工评分：

凝集反应评分	观察值
-	未见凝集
(+)	不能决定是否凝集
Vw	非常微弱的反应—需借助光学仪器
W 或+w	微弱—非常小的团块
+	很小的团块
++	一些小团块
+++	一个大团块，周围有小团块
++++	一个单个的大团块

插入反应中 A 型抗原或 B 型抗原溶液的浓度越高，插入 O 型红细胞的抗原数量就越大，在凝集反应中，表现为红细胞与抗 A 和抗 B 抗体之间的凝集反应增强。插入反应中 A 型抗原或 B 型抗原溶液的浓度越低，插入 O 型红细胞的抗原数量就越少，表现为红细胞与抗 A 和抗 B 抗体之间的凝集反应减弱。插入抗原的数量与糖脂的浓度和/或温度和/或反应时间成正比。

红细胞可以用短链或者长链的糖脂来改造。然而，在检测抗体灵敏度时，

糖脂链的长短并不造成血清学上明显的差异。用特异的抗血清进行检测时，观察到相似的凝集反应。红细胞可以用 ABO 系统中的特异组分来进行改造。例如，可以制备表达 A 抗原（例如 ALe^b 或 A3 型）的红细胞。这些细胞在检测特定抗体的特异性时很重要，并可用于筛选单克隆抗体。

红细胞浓度和糖脂浓度之间比例的效果体现在，比例为 1: 1 和 3: 1 时，可导致高效的 O 型细胞改造，并在与抗 A 和抗 B 抗体的反应中获得强的凝集反应评分。4: 1 或者更高的比例将导致插入抗原数目的减少。在特定条件下，3: 1 的比例是最为经济的。当然，当需要制备弱表达表现型时，可以升高红细胞的比列。

浓缩的糖脂溶液可以在两小时内有效地将抗原插入红细胞膜。孵育时间更长，效果更好，尽管时间太长（超过 32 小时），可能会造成血清学损害（见例 5）。这种损害被认为是由于在 37°C 的长时间孵育导致的红细胞受损，而不是抗原的损失。

插入反应所需的时间与抗原溶液浓度和细胞溶液浓度之间的比例以及温度有关。然而，推荐抗原溶液浓度为 10mg/ml，细胞溶液浓度与之比例应为 3: 1，温度控制在 25°C，反应时间约 4 小时。

改变插入反应的条件即可控制红细胞携带的抗原数量。若需要弱表达的 A 型或 B 型细胞，则应配制低浓度的糖脂或高浓度的细胞溶液：糖脂的比例即被用于插入反应。若需要较强的凝集反应，则应配制高浓度的糖脂或低浓度的细胞溶液：糖脂比例可被用于产生最强的血清学反应。通过操纵糖脂的浓度，红细胞可被改造成携带超过 20 倍于正常抗原数量的细胞。

本发明的主要优点是抗原表达数量可以控制，以满足特异灵敏度的需要。例如，一个细胞可以携带与临床上重要水平相应的抗原数量。然后，如果此细胞的血清学检验呈现阳性，用户能够保证他们不会错过任何临床上重要的亚型。

另外一些细胞携带的抗原数量可以设定为抗原的特异阈值，例如，细胞可以携带不同亚型的抗原，调整到已知的灵敏度水平。这些细胞可以用来校准高灵敏度的仪器或者用于流式细胞仪的抗原定量标准曲线制定。

本方法学可使细胞做到全球化的标准化和一致性。即可用来比较不同实验室的表现或不同方法学的比较。将这种细胞用于输血血清质量保证计划能够设

定 ABO 分型的质量控制标准。

工业上强烈要求对灵敏度的控制标准。这种重要性将被放大，因为在病理学界，正在推动一场针对实验室的运动，这些实验室拥有具备多种技能的实验员，但他们却不具备丰富的输血经验。

本发明中的灵敏度控制部分，包括一个弱表达 A 型表现型和一个弱表达 B 型表现型。进一步提出，一个可以携带 Rh DCce (R1r)，另一个可以是 Rh ce (rr)。这就可以保证用于 ABO 和 RHD 分型的抗体都能够用相同的两套细胞进行质量控制。而另外一套携带弱表达 AB 抗原的细胞能够用于更为专业化的实验室。作为替补，不表达特定人类抗原的动物细胞也可以使用。例如，一些动物细胞即等同于无 Rh 抗原的人红细胞。

一些实验室卓有成效地开展 ABO 和 RhD 分型的质量控制，但另外一些则不然。一些实验室生产内部使用的用于 ABO 和 RhD 分型质量控制的细胞 (A2B R1r, 0 rr)。然而，由于供血者表现型的杂合性，使得这些产品具有一定程度的变异性。本发明的灵敏度控制部分就没有这个缺点，因为抗原表达的减弱是很精确的，也没有变异发生，且制备方便。

本发明进一步的优点是，包含抗原的用于插入反应的液体，可以挥干，并保存，在很长时间内不会损坏抗原。当需要制备小量的特定细胞（譬如 B 型细胞）时，就可以重新配置这个液体并把它加入细胞中。这种产品尚未面世

实施例

以下实施例用以简单地阐释本发明的应用，但并不限制本发明的应用。

实施例 1

糖脂插入溶液按照以下方法制备：

- 干糖脂溶于氯仿：甲醇（2：1）混合液中，并调浓度至 20mg/ml
- 200ul 的糖脂溶液被移入玻璃试管中，并用氮气挥干
- 300ul 甲醇：水（1：1）混合液被加入到挥干后的糖脂中。37℃ 水浴加热助溶。
- 玻璃试管的 100ul 处做一刻度，用氮气在 60℃ 下挥干糖脂溶液，使液面降低至此刻度以下。此步骤使原溶液中的大部分甲醇被挥干，而使糖脂溶解

在水中。

- 10ul 10×PBS 溶液（磷酸缓冲液）被加入试管中，调节盐浓度。
- 加去离子水至 100ul 刻度处。

实施例 2

按照如下方法，将糖脂插入红细胞膜：

- 40mg/ml 的糖脂插入液 5 ul 被加入玻璃培养管中
- 15ul Celpresol 和 40ul O 型红细胞被加入该玻璃管中
- 玻璃管在 37℃ 下孵育，时时震荡
- 转化后的红细胞用 0.9% 的生理盐水淋洗 6 次，然后用 Celpresol 溶液重悬，调浓度至 5%

Celpresol 是一种保存红细胞的试剂，购自 CSL Biosciences, Adelaide, 澳大利亚。不过，生理盐水或其他等渗溶液，或者其他保存细胞的试剂（如 CellStab）也可使用。

实施例 3

这个例子使用本发明方法制备的改造细胞测试了一个抗血清：

1. 转化后的红细胞用 0.9% 的生理盐水淋洗 3 次。在试管中加入 Celpresol 调红细胞悬液浓度为 5%。
2. 25ul 的红细胞悬液被加入一个小玻璃管中。再加入 25ul 的抗血清。
3. 充分混合红细胞悬液和抗血清，并用免疫离心机（immunofuge）离心 15 秒。
4. 读取凝集反应结果，并评分。

实施例 4

本例使用本发明方法制备的改造细胞测试了血清学表现型抗体。下表中列出的抗体并不完全，本发明制备的产品亦可用于其他抗体的检测。本例中使用的一些抗体已经过期，仅用于演示。

抗 A 抗体：

名称	生产厂家
Bio-Clone (Blend)	Ortho Diagnostic, USA
Biolab (human) 1	Biological Laboratories, NZ
Biolab (human) 2	Biological Laboratories, NZ
Biolab	Biological Laboratories, NZ
Epiclone 1	CSL, AUS
Epiclone 2	CSL, AUS
Epiclone 3	CSL, AUS
Epiclone 4	CSL, AUS
Gamma-clone 1	Gamma Biologicals, USA
Gamma-clone 2	Gamma Biologicals, USA
Immucor	Immucor, USA
Lorne	Lorne Laboratories, UK
MonoClone	Organon Teknika B.V. NL
Novaclone	Dominion Biologicals, Canada
Ortho	OCD, USA
Seraclone 1	Biotest AG, Dreieich
Seraclone 2	Biotest Diagnostic, Dreieich
*CSL	CSL, AUS
*XXX ₁	Confidential
*XXX ₂	Confidential

抗 B 抗体:

名称	生产厂家
Biolab (Human)	Biological Laboratory, NZ
Biolab	Biological Laboratory, NZ
BioClone (blend)	Ortho Diagnostic, USA
Epiclone 1	CSL, AUS
Epiclone 2	CSL, AUS
Gamma-clone	Gamma Biologicals, USA
Immucor	Immucor, USA
Lorne	Lorne Laboratories, UK
Monoclon	Organon Teknika B.V. NL
Novaclon	Dominion Biologicals, Canada
Seraclon	Biotest AG, Dreieich
*CSL	CSL, AUS
*XXX ₃	Confidential
*XXX ₄	Confidential
*XXX ₅	Confidential

表示正在开发中的抗体

抗 B 抗体:

名称	生产厂家
Biolab (Human)	Biological Laboratory, NZ
Biolab	Biological Laboratory, NZ
Gamma (blend)	Gamma Biologicals, USA
Immucor	Immucor, USA
Seraclon 1	Biotest Diagnostics, Dreieich
Seraclon 2	Biotest Diagnostics, Dreieich

实施例 5

糖脂插入反应所需时间，系用以下方法进行研究。180ul 0 型红细胞溶液被分别加入 60ul 的 9.6, 4.8, 2.4, 1.2 和 0.6 mg/kg 的含长的 A 型抗原链或短的 B 链的糖脂溶液中。在孵育 1, 2, 4, 8, 24 和 72 小时后，从上述溶液中移出 25ul。在获得的转化细胞上进行血清学检测。检测结果在表 1 和表 2 中列出。

表 1. 插入反应孵育时间的研究：用 Bioclone 公司生产的抗 A 抗体测试用中性 A 糖脂转化的 O 型红细胞

转化基质中									
A 型糖脂的	孵育时间 (小时)								
浓度									
(mg/ml)	1	2	4	8	24	32	48	72	
9.6	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	
4.8	+++	+++	++++	++++	++++	++++	+++	+++	
2.4	++	+++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	
1.2	-	+	+	+	++	+++	++	++	
0.6	-	-	+	+	+	++	++	++	

表 2. 插入反应孵育时间的研究：

用 XXX_s 抗 B 抗体测试用中性 B 糖脂转化的 O 型红细胞

转化基质中									
B 型糖脂的	孵育时间 (小时)								
浓度									
(mg/ml)	1	2	4	8	24	32	48	72	
9.6	+	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	
4.8	+	++	+++	+++	+++	++++	+++	+++	
2.4	-	+	+	+	++	+++	+++	+++	
1.2	-	-	-	-	-	-	++	++	
0.6	-	-	+	-	-	-	-	-	

实施例 6

使用不同体积的 O 型红细胞悬液分别与相同体积的 9.6 mg/ml 的含长的 A 型抗原链或短的 B 链进行反应。结果总结在表 3 中。红细胞悬液体积与糖脂溶液体积比为 3: 1 时, 其效率与比例为 1: 1 时相同。当比例上升至 4: 1, 5: 1 和 6: 1 时, 转化效率反而下降。

表 3. 红细胞悬液和糖脂溶液体积比例的研究。用抗 A 或抗 B 抗体测试不同体积的 O 型红细胞悬液和 A 型或 B 型糖脂反应时的效果。

红细胞悬液和糖脂 溶液体积比例	插入的 A 抗原与抗 A 抗体反应	插入的 B 抗原与抗 B 抗体反 应
1:1	++++	++++
2:1	++++	++++
3:1	++++	++++
4:1	++	+++
5:1	++	++
6:1	++	++

抗 A 抗体购自 Bioclone; 抗 B 抗体购自 CSL

实施例 7

使用本发明方法制备的转化红细胞 (插入了 A 和 B 型糖脂), 测试了大批抗 A、抗 B 和抗 AB 抗体结合红细胞的效能。红细胞在插入反应完成当天, 即被用于测试。

用不同生产厂家生产的抗 A 抗体检测插入 A 型糖脂的红细胞, 结果在表 4 中列出。

表 4. 用抗 A 抗体检测插入 A 型糖脂的红细胞, 结果按照评分高低顺序排列

生产厂家	转化基质中糖脂的浓度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
*XXX ₂	+++	++++	++++	+++	+++	++	++	++

	+							
Bio-Clone	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
	+							
Seraclone	+++	+++	+++	++	+	+	W	-
	+							
*CSL	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
	+							
Novaclone	+++	++	++	+	-	-	-	-
*XXX ₁	+++	++	++	+	+	-	-	-
Orhto	++	++	+	W	-	-	-	-
Epiclone 1	++	+	+	-	-	-	-	-
Epiclone 2	+	+	-	-	-	-	-	-
Lorne	+	W	W	-	-	-	-	-
Gamma-clone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Seraclone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Immucor	+	-	-	-	-	-	-	-
Epiclone 1	+	-	-	-	-	-	-	-
Biolab	+	-	-	-	-	-	-	-
(human) 1								
Monoclon	W	-	-	-	-	-	-	-
Biolab	-	-	-	-	-	-	-	-
Biolab(human	-	-	-	-	-	-	-	-
) 2								

* 处于开发中的抗体。

不同生产厂家提供的抗体（有些已经超过了保质期），凝集反应评分差异很大。从表4中可以看出，当插入的A糖脂浓度为9.6mg/ml时，一些抗A抗体可以有4个+或3个+的表现，而其他一些则只有1个+或没有凝集反应发生。在0.6mg/ml浓度时，只有XXX₂抗体能够检测到插入的抗原。

用不同生产厂家生产的抗 AB 抗体检测插入 A 型糖脂的红细胞。结果在表 5 中列出。这些抗体在与转化后红细胞的反应中，也呈现不同的凝集反应评分。

表 4. 用抗 AB 抗体检测插入 A 型糖脂的红细胞

生产厂家	转化基质中糖脂的浓度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
Immucor	+++	++	++	+	+	-	-	-
Gamma-clone	+++	++	++	+	+	-	-	-
Seraclone	++	++	++	W	-	-	-	-
Biolab	++	++	++	W	-	-	-	-
Biolab (human)	++	+	+	-	-	-	-	-
Seraclone	++	+	+	-	-	-	-	-

用不同生产厂家生产的抗 B 抗体检测插入 B 型糖脂的红细胞，结果在表 6 中列出。

表 6. 用抗 B 抗体检测插入 B 型糖脂的 O 型红细胞，结果按照评分高低顺序排列

生产厂家	转化基质中 B 型糖脂的浓度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
*CSL	+++	+++	+++	+++	++	+	+	-
*XXX ₅	++	++	++	+	+	-	-	-
*XXX ₃	++	++	++	+	-	-	-	-
Bioclone	+	+	W	-	-	-	-	-
Biolab	W	-	-	-	-	-	-	-
Biolab (human	-	-	-	-	-	-	-	-

)								
Epiclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Epiclone	-	-	-	-	-	-	-	-
*XXX ₄	-	-	-	-	-	-	-	-
Novaclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Monoclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Gammaclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Seraclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Immucor	-	-	-	-	-	-	-	-
Lorne	-	-	-	-	-	-	-	-

*处于开发中的抗体

只有很少的一些抗 B 抗体能够检测到插入的 B 型抗原。在这部分抗体中，只有 Bioclone 的产品是商品化的。其他抗体尚处于开发之中。

用不同生产厂家生产的抗 AB 抗体检测插入 B 型糖脂的红细胞，结果在表 7 中列出。

表 7. 用抗 AB 抗体检测插入 B 型糖脂的 O 型红细胞

生产厂家	转化基质中 B 型糖脂的浓度 (mg/ml)							
	9.6	7.2	4.8	3.6	2.4	1.9	1.2	0.6
Biolab (human)	+++	++	++	+	+	-	-	-
)								
Biolab	+	W	W	-	-	-	-	-
Immucor	-	-	-	-	-	-	-	-
Seraclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Seraclone	-	-	-	-	-	-	-	-
Gamma-clone	-	-	-	-	-	-	-	-

只有 Biolab 生产的抗 AB 抗体能够检测到插入的 B 型抗原。这是一个抗人 A+B 抗原的多克隆抗体，目前已不再进行商品化提供。

实施例 8

含 Le^b 抗原的糖脂也可以被插入红细胞膜上。将 Le^b 糖脂悬浮于基质中，并按照不同比例与红细胞混合，37℃ 孵育 2 小时。结果列出于表 8。

表 8. 不表达 Le^b 抗原的细胞，对 Le^b 抗原的摄入量

红细胞	Le ^b : 红细胞(v:v)	与抗血清的即刻反应		与抗血清的反应一周	
		Le ^b 抗体	La ^a 抗体	Le ^b 抗体	La ^a 抗体
插入前仅携带 La ^a 抗原，不携带 La ^b 抗原					
插入前		-	++	-	++
插入后	1:2	++	++	+++	++
	1:3	++	++	+++	++
	1:5	++++	++	+++	++
	1:7	++	++	+++	++
	1:10	++	++	+++	++
插入前不携带 La ^a 抗原和 La ^b 抗原					
插入前		-	-	-	-
	1:2	+	-	++	-
	1:3	++	-	++	-
	1:5	+++	-	++++	-
	1:7	++	-	++	-
	1:10	++	-	++	-

实施例 9

本例讲述了流式细胞仪分析的程序。

流式细胞仪分析在一台 Facsort 仪器 (Becton Dickinson, San Jose, CA) 上进行, 使用 Lysis II 软件进行操作。淋洗过的大鼠红细胞用 20 倍体积的 10%福尔马林溶液固定, 并在室温下孵育过夜。固定后的细胞用 PBS 淋洗 4 遍, 在与 Lewis 抗体孵育前, 使用配制在缓冲液 1 (含 50mMNaCl 的磷酸缓冲液, PH 值 8.0) 中的 0.5%BSA 溶液, 调细胞终浓度为 5×10^6 细胞/ml。参照 Murai 等 (Clinical Chimica Acta, 1994, 226, 21-28) 的方法制定荧光标记条件。分析时, 将 100ul 固定后的红细胞悬液与 100ul 抗 Le^b 抗体 (Gamma 25-1, Gamma Biologicals inc., Tx, 用缓冲液 1 进行 1: 2 稀释) 4°C 孵育 1 小时, 用 1ml 缓冲液 1 淋洗 2 次, 然后与 100ul 生物素标记的抗鼠 IgM (E0465, Dako A/s, Denmark; 与缓冲液 2 进行 1: 400 稀释, 缓冲液 2 系含有 200 mMNaCl 的磷酸缓冲液, PH 值 8.0) 4°C 孵育 1 小时。标记好的细胞用 1ml 缓冲液 2 淋洗 2 次, 与 100ul 的链霉蛋白抗生素 (R0428 Dako A/s, 与缓冲液 3 进行 1: 15 稀释, 缓冲液 3 系含有 200 mMNaCl 的磷酸缓冲液, PH 值 7.0), 在 4°C 孵育 10 分钟, 用缓冲液 3 淋洗, 并重悬于 500ul 的缓冲液 3 中。流式细胞仪分析持续一小时, 每个样本中各有 5000 各细胞被计数。

实施例 10

大鼠外周红细胞的体内转化, 可根据下法实现。

选用体重 250-300g 的雄性同系 Lewis 大鼠。这些大鼠不表达 Le^a 或 Le^b 糖脂抗原。

糖脂乳化输液用乳剂, 含有 20%的大豆油, 1.2%的卵磷脂/蛋白, 和 22% 的甘油 (重量体积比)。

用 13.3ug/ul 的储备液连续稀释, 制备浓度范围在 0.03 到 2.0mg/150 的糖脂溶液。用 8%的水合氯醛 3.3ml/kg 麻醉动物, 手术暴露动物颈静脉, 将 150ul

上述制得的乳剂输入静脉中。然后缝合手术部位。

24 小时后取血。将动物放置于灯泡下保持体温，止血钳夹住动物尾巴，用微量注射器次入尾静脉中，取出约 50u1 血液。遂用离心方法从全血中获取红细胞，淋洗三次。其他细胞（如血小板、白细胞）亦可用其他适宜技术分离。开展血清学和流式细胞仪分析，结果见实施例 A 到 C。

实施例 A

用抗 Le^b 抗体测试体内转化得到的红细胞。给大鼠静脉注射不同剂量的 Le^b-6 糖脂。按照表 9 中列出的时间点取血。抗 Le^b 抗体与红细胞凝集反应的严重程度从无 (-) 到很强 (++++)

表 9 注射糖脂后，按时间点取血，并进行血清学检测

大鼠	Mg	1	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20
	Le ^b											
a	2.0	++++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	+++	++	++	++
b	1.0	+++	++++	+++	++++	+++	+++	++++	+++	++	++	++
c	0.50	++	++	++	++	+++	+++	+++	++	+	+	+
d	0.25	++	++	++	++	++	++	++	+	-	-	-
e	0.10	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
f	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
g	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
h	0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

大鼠	Mg	22	24	26	28	30	32	34	36
	Le ^b								
a	2.0	++	++	++	++	+	+	-	-
b	1.0	++	++	++	+	-	-	-	-
c	0.50	+	-	-	-	-	-	-	-

d	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-
e	0.10	-	-	-	-	-	-	-	-
f	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
g	0.03	-	-	-	-	-	-	-	-
h	0	-	-	-	-	-	-	-	-

实施例 B

用流式细胞仪分析体内糖脂抗原和抗 Le^b 抗体之间的反应。给不同大鼠注射不同剂量的 Le^b 糖脂抗原，一天后取血。结果见图 1。血清学结果呈阳性的区域表示为 1 个+到 4 个+。注射最大剂量（2mg）的糖脂用于转化后，即呈现黑色填充的曲线。在 2mg 曲线左侧的未填充的曲线表示糖脂数量下降时，获得的血清学结果。用于本试验的糖脂剂量为 2mg, 1mg, 0.5mg, 0.25mg, 0.13mg, 0.06mg, 0.03mg 和 0mg.

实施例 C

流式细胞仪技术，使用抗 Le^b 抗体分析体内转化的大鼠红细胞。给大鼠注射 2mg 的 Le^b 糖脂抗原，并在第 1, 2, 6, 8, 10, 12, 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 天采血。最大程度的转化可见于黑色填充的曲线。在图 2 中，结果按照抗原表达数量的降序排列，即从右向左排列时，天数分别是第 1, 2, 6, 8, 10, 12, 14 和阴性对照。在图 3 中，则是第 16, 18, 20, 22, 24, 26, 28 和阴性对照。

实施例 11

家兔外周红细胞可用以下方法进行体内转化。

按如下方法制备糖脂：将从小肠中获得的 200mg 总糖脂（Ale(a-b+)型）溶于 100ul 的热乙醇中。热的脂肪乳剂（pharmacia 出品）2ml 在经过简单的超声处理后加入前述溶液中。糖脂抗原经耳缘静脉缓慢注射。在注射前后均对家兔进行取血（大约 0.2-0.5ml），随后用抗-Lewis 抗体（抗 Le^b 抗体，Gamma Biological LBM26-1 和抗 Le^a 抗体，Gamma Biological LAM25-1）进行血清学

检测（见实施例 D）。在后期的实验中，仍可对之前的样本重新进行检测，作为对储存细胞稳定性的研究。细胞 4°C 保存在红细胞保存溶液中（Celpresol, CSL Australia）。

实施例 D

表 10. MO 家兔的血清学检测

取样日期	第 n 天	测试日期	抗 Le ^b 抗体	抗 Le ^a 抗体
前（10 月 5 日）	-1	10 月 12 日	-	-
前（10 月 5 日）	-1	10 月 8 日	-	-
注射即日（10 月 6 日）	0	10 月 12 日		
后（10 月 7 日）	1	10 月 8 日	+++	-
后（10 月 7 日）	1	10 月 12 日	+++	-
后（10 月 9 日）	3	10 月 12 日	+++	-
后（10 月 11 日）	5	10 月 12 日	+++	-
后（10 月 11 日）	5	10 月 17 日	+++	-
后（10 月 11 日）	5	10 月 24 日	+++	-
后（10 月 16 日）	11	10 月 17 日	+++	-
后（10 月 16 日）	19	10 月 25 日	+++	

表 11. BK 家兔的血清学检测

取样日期	第 n 天	测试日期	抗 Le ^b 抗体	
前（8 月 8 日）		8 月 8 日	-	
注射即日（10 月 18 日）	0			
后（10 月 19 日）	1	10 月 20 日	+++	
后（10 月 24 日）	6	10 月 25 日	+++	
后（10 月 31 日）	13	11 月 3 日	+++	

表 12. CO 家兔的血清学检测

取样日期	第 n 天	测试日期	抗 Le ^b 抗体	抗 Le ^a 抗体
前 (10 月 5 日)	-13		-	-
前 (10 月 11 日)	-7		-	-
注射即日 (10 月 18 日)	0			
后 (10 月 19 日)	1	10 月 20 日	+++	
后 (10 月 24 日)	6	10 月 25 日	+++	
后 (10 月 31 日)	13	11 月 3 日	+++	

实施例 12

大鼠红细胞的体外转化可按照以下方法进行。

正常的大鼠血浆被用于稀释糖脂抗原（其他稀释液亦可使用）。用 1ml 血浆配制含 250ug

Le^b 抗原的储备液。如有需要即可从该储备液稀释制备所需浓度的溶液。

将等体积的含有 Lewis 糖脂 (600ul) 加入等体积的经淋洗后的红细胞溶液中，并进行正确的孵育。在选定的时间间隔，75ul 的混合液被移出，并用生理盐水淋洗细胞中止反应，遂将细胞重悬于生理盐水中。在血清学检测前，细胞 4℃ 保存。血清学检测使用抗 Le^b 抗体。（见实施例 E）

实施例 E

用不同浓度的 Le^b 糖脂抗原体外转化红细胞，在不同反应时间时的血清学检测。结果见表 13。表 13.

Le ^b	孵育时间 (小时)								
浓度	0.5	1	2	4	8	12	24	36	48
25	++	+++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	+++
12.5	++	++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++
6.3	+	++	+++	+++	++++	++++	++++	+++	++
3.2	-	+	++	++	+++	+++	++++	++	+
1.6	-	-	+	+	++	++	++	+	-
0.8	-	-	-	-	+	+	+	-	-
0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-

浓度=ug Le^b 抗原/ml 大鼠血浆

实施例 13

用流式细胞仪技术分析温度的动力学效应。

在本实验中，首先检验了流式细胞仪方法的灵敏度。使用敏感细胞与不同浓度的 Le^b 抗原在 37°C 下孵育 3 小时，检验流式细胞仪方法的灵敏度。结果显示流式细胞仪技术在检测高浓度糖脂 (>100ug/ml) 转化的细胞时，最为可靠，孵育期间的凝集反应评分可达 3 个+到 4 个+ (结果未给出)。结合这些实验结果，使用含 250ug/ml (25ug/管) 的转化溶液进行转化反应，最长反应时间为 8 小时，反应温度设置为 4°C，22°C 和 37°C，并用流式细胞仪检测。实验结果在实施例 F1 和 F2 中给出。

实施例 F1

37°C下用 Le^b 抗原体外转化人 Le(a-b-) 红细胞。用两种不同的抗 Le^b 抗体经流式细胞仪检测其反应性。结果在图 4 中列出。黑色填充的曲线代表阴性对照，例如未转化的细胞。未填充曲线向左侧延伸代表反应时间减少，向右延伸代表反应时间延长。结果按序排列，从坐至右是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8 小时。

实施例 F2

22°C下用 Le^b 抗原体外转化人 Le(a-b-) 红细胞。用两种不同的抗 Le^b 抗体经流式细胞仪检测其反应性。结果在图 5 中列出。黑色填充的曲线代表阴性对照，例如未转化的细胞。未填充曲线向左侧延伸代表反应时间减少，向右延伸代表反应时间延长。结果按序排列，从坐至右是 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 和 8 小时。

4°C下用 Le^b 抗原体外转化人 Le(a-b-) 红细胞。用两种不同的抗 Le^b 抗体经流式细胞仪检测其反应性。结果在图 6 中列出。黑色填充的曲线代表阴性对照，例如未转化的细胞。未填充曲线向左侧延伸代表反应时间减少，向右延伸代表反应时间延长。结果按序排列，从坐至右是 0, 1, 3, 5 和 7 小时。

实施例 14

按照下法，明确如何制备干燥的糖脂抗原及其 PBS 盐，以及如何重新配置其溶液：

实施例 G1

按以下方法制备糖脂样品，并将其干燥：

- 用氯仿：甲醇（2：1）溶液溶解糖脂，并调浓度为 50mg/ml
- 500ul 溶解后的糖脂被转移到玻璃试管中。500ul 磷酸缓冲液（PBS）或者 50ul 10×PBS 随后加入。然后加入小量甲醇，以利于形成单相溶液。

- 70°C下用氮气挥干溶液。在挥干过程中，溶液可周期性地分成两相，因此需不时加入少量甲醇，使之变回单相，有利于挥发。用这种办法即可使糖脂溶液完全挥发。或者，可将糖脂溶液冻存于零下 85°C冰箱中冻干。

实施例 G1

按以下方法将干燥的糖脂重新配置称溶液：

- 加 500ul 去离子水到干燥的糖脂样品，形成一个 50mg/ml 的糖脂的 PBS 溶液。将试管超声 2 分钟，保证样品完全溶解。然后可用 1×PBS 工作液将此溶液稀释到所需浓度。

实施例 15

以下是一个备选的，甚至是更好的将抗原插入红细胞的方法，因为它利用了前文提及的 3: 1 的比例。

- 20ul 10mg/ml 的 A 型糖脂抗原溶液和 60 ul 淋洗过的 O 型红细胞被加入到一个 Eppendorf 管中
- 25°C水浴加热四小时，每隔一小时混匀一次（室温时，插入步骤效果较 37°C时有所下降，但与 37°C时相比较，其发生的溶血现象可以忽略不计）
- 转化后细胞用 3×PBS 溶液淋洗，并用细胞保存溶液调成适宜于血清学实验的浓度

表 14 中列出了插入糖脂后 1 天，25 天和 62 天后，保存在 4°C的转化细胞的血清学实验结果。

表 14. 用抗 Le^b 抗体 (SCR A40-1-2/A40-1-1) 和 Seraclone 出品的抗 A 抗体 (KIL 2901 E6-2/ E6-3) 进行转化后红细胞的血清学检验。注：Le^b糖脂用高效液相色谱仪 (HPLC) 进行了纯化，而 A 型糖脂则没有，因此还有其他的脂类杂质。

糖脂浓度 (mg/ml)	Le ^b			A	
	第 1 天	第 25 天	第 62 天	第 1 天	第 25 天
10	++++	Nd	++/+++	+++	++
5	++++	Nd	++/+++	++	++
2	+++	Nd	+ / ++	0	+
1	++++	Nd	++	0	+
0.1	+++	++	0	0	Nd
0.01	++	++	0	0	Nd
0.001	++	++	0	0	Nd
0.0001	++	0	0	0	Nd
阴性对照	0	0	0	0	0

Nd 表示 不能测出

实施例 16

实施例 H1

细胞凝集反应使用 Diamed-ID 微型分型系统结合传统的试管血清学反应进行。实验中使用的胶卡是 NaCl，酶反应和冷凝集反应胶卡，事先不用任何抗血清或其他抗体进行预处理。使得此胶卡可用于特异性抗血清的检测。

表 15 和表 16 显示了用这个系统检测凝集反应的结果。

表 15. 用 Diamed-ID 微型分型系统检测 A 型糖脂提前 8 天预处理的 O 型红细胞的凝集反应。实验中使用的抗体是 Seraclone 出品的抗 A 抗体（实验 KIL2202 E16-1）。

泳道/培养孔	转化用糖脂浓度 mg/ml	评分
188-1	阴性对照	无反应（未转化的红细胞）
185-0	10	+++
185-1	5	+++
185-2	2	++

185-3	1	0
185-4	0.1	0

表 16. 用 Diamed-ID 微型分型系统检测 A 型糖脂提前 17 天预处理的 O 型红细胞的凝集反应。实验中使用的抗体是 Seraclone 出品的抗 A 抗体(实验 KIL2202 E41-2)。

泳道/培养孔	转化用糖脂浓度 mg/ml	评分
8-1	对照	++++
185-0	10	+++
185-1	5	++
185-2	2	0
185-3	1	0
190-1	0	无反应(未转化的红细胞)

实施例 H2

使用试管法和 Diamed 系统开展对比实验，以检验两种方法的表现。实验中使用 Seraclone 和 Alba-clone 出品的抗 A 抗体，观察它们在使用两种方法检测时，其血清学特征是否相同。表 17 列出了实验结果。

表 17. 使用两种不同的抗 A 抗体-- Seraclone 和 Alba-clone 出品，所得的凝集反应结果。细胞和抗体使用试管法和 Diamed 进行实验。

		A 糖脂浓度(mg/ml)				
		10	5	2	1	0
试管法						
	Seraclone	3+	2+	0	0	0
	Alba-clone	3+	2+	0	0	0

Diamed						
	Seraclone	3+	2+	1+	+w	0
	Alba-clone	2+	2+	0	0	0

实施例 17

糖脂插入的稳定性用以下方法进行。

采用不同浓度的 A 型糖脂对两套细胞进行转化。一套细胞在转化后第 1 周和第 6 周进行凝集反应，另一套则每周进行凝集反应。表 18 显示了试管法和 Diamed 系统测得的凝集反应结果。每周均作测试的那套细胞，分别保存在两种保存液—CellStab 和 Celpresol 中，以观察这两种的液体的表现。所有细胞均保存在平底培养瓶中。凝集反应和溶血反应显示两种保存液体的表现并无显著差异。任何时刻，细胞不发生或仅发生极微量的溶血反应。

表 18. 不同浓度糖脂转化细胞后凝集反应结果。转化后 29 天始，使用 Alba-clone 出品的抗 A 抗体，其余时间均使用 Seraclone 出品的抗体（在表 17 中，可见这两种抗体的效果相等）。

		10	5	2	1	0.1	阴性对照
长期测试							
第 1 天	试管法	4+	3+	2+	1+	+w	0
	Diamed	3+	3+	+w	0	0	0
第 17 天	试管法	3+	2+	0	0	Nd	0
	Diamed	3+	2+	1+	0	nd	0
每周测试							
第 1 天	试管法	3+	nd	2+	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0

第 8 天	试管法	1+	nd	2+	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
第 15 天	试管法	1+	nd	0	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	2+	nd	0	0
第 22 天	试管法	3+	nd	0	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
第 29 天	试管法	1+.w	nd	0	nd	2+	0
	Diamed	4+	nd	3+	nd	0	0
第 36 天	试管法	4+	nd	2+	nd	0	0
	Diamed	4+	nd	3+	nd	0	0
第 43 天	试管法	4+	nd	3+	nd	0	0
	Diamed	3+	nd	0	nd	0	0
第 49 天	试管法	1+	nd	nd	nd	nd	0
	Diamed	nd	nd	nd	nd	nd	0
第 57 天	试管法	2+	nd	nd	nd	nd	0
	Diamed	2+	nd	nd	nd	nd	0

实施例 19

生物素化的神经节苷脂(BioG)制备。

神经节苷脂(BioG)的制备系参考 Wilchek 和 Bayer(1987)的方法基础上加以改良。

- 从猪脑中提纯的神经节苷脂用 PBS 重新配成溶液，并用超声助溶。
- 用高碘酸钠氧化神经节苷脂的含硅铝离子的残基
- 溶液透析 24 小时，去处反应中形成的过氧化物
- 用生物素-氨癸酰基酰肼 (Sigma B-3770) 与氧化的神经节苷脂孵育 1 小时
- 所得溶液继续用水透析过夜，以去处多余的生物素-氨癸酰基酰肼
- 所得溶液用旋转蒸发的方法挥干，并用 50%的甲醇-水混合液重新配制。并用氮气在负压干燥器中过夜，进一步挥干。

- 神经节苷脂样品 (50mg/ml) 可以用 PBS 工作液稀释至所需浓度

卵白素的制备。

- 卵白素用 PBS 工作液溶解并稀释至 1mg/ml。

生物素化的糖的制备。

- 冰冻干燥的生物素化的糖从 Syntesome 购得。
 1. A-PAA-生物素批号 = Syntesome Cat No 165-BP
 2. B-PAA-生物素批号 = Syntesome Cat No 186-BP
- 生物素化的糖用去离子水重悬并调浓度为 1mg/ml, 并可用 PBS 工作液稀释至所需浓度。

转化方法

人工转化的程序, 分为三个连续的步骤。第一步, 将生物素化的神经节苷脂插入到红细胞膜上; 接着将卵白素连接到与神经节苷脂结合的生物素上; 最后将生物素化的糖 (如 A-PAA 或 B-PAA) 连接到卵白素分子上。开始的实验均使用 A-PAA。

生物素化的神经节苷脂的插入

- 生物素化的神经节苷脂 BioG (20ul, 0.01 mg/ml, 用于 A-PAA 的连接), 和淋洗过的 O 型红细胞 (60ul) 被加入到 Eppendorf 管中。
- 25°C 水浴孵育 Eppendorf 管四小时, 每隔一小时混匀一次 (室温下插入反应 (室温时, 插入步骤效果较 37°C 时有所下降, 但与 37°C 时相比较, 其发生的溶血现象可以忽略不计))
- 转化后的红细胞用 3×PBS 淋洗。

卵白素的连接。

- 40ul, 1mg/ml 的卵白素加入 Eppendorf 管中, 此管含有上述步骤制得的淋洗过的连有生物素化神经节苷脂的红细胞
- 室温孵育 30 分钟, 每隔 10 分钟混匀一次。
- 卵白素-生物素化神经节苷脂-红细胞用 3×PBS 淋洗

生物素化糖的连接

- 60ul, 0.001mg/ml 的生物素化糖加入 Eppendorf 管中, 此管含有上述步骤制得的淋洗过的卵白素-生物素化神经节苷脂-红细胞
- 室温孵育 30 分钟, 每隔 10 分钟混匀一次。
- 卵白素-生物素化神经节苷脂-A-PAA-红细胞用 3×PBS 淋洗, 并用 Celpresol 重悬, 调浓度为 5%, 用于血清学实验。

实施例 20

开展抗体滴度实验, 使用抗 A 抗体, 验证使转化后红细胞能够产生凝集反应阳性时, 所需生物素化神经节苷脂和生物素化糖的最小浓度。结果显示在表 19 和表 20 中。

表 19. 用 Seraclone 出品的抗 A 抗体, 进行抗体滴度实验, 验证所需生物素化糖 A-PAA 的最小浓度。

生物素化神经节苷脂的浓度 (mg/ml)	生物素化糖 A-PAA 的浓度 (mg/ml)					
	0.01	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0
0.03	++++	++++	+++	++	+	0
0.02	++++	++++	+++	++	++	0
0.01	+++	+++	++	+	++	0

表 20. 升高生物素化神经节苷脂的浓度, 再进行抗体滴度实验。实验显示, 缺少生物素化神经节苷脂和生物素化糖 A-PAA 两者之一, 或者全部缺失, 都将显示阴性结果。抗 A 抗体系 Seraclone 出品。

生物素化神经节 苷脂的浓度 (mg/ml)	生物素化糖 A-PAA 的浓度 (mg/ml)					
	0.01	0.005	0.0025	0.0012	0.0006	0
6	++++	++++	++	+	(+)	(+)
3	++++	++++	++	+w	(+)	(+)
1.5	++++	++++	++	Vw	0	0
0.75	++++	+++	++	Vw	0	0
0.4	++++	+++	++	0	0	0
0	0	0	0	0	0	0

实施例 21

生物素化神经节苷脂浓度的稳定性用下法进行。用上文建立的方法, 控制生物素化糖 A-PAA 的浓度为 0.01 和 0.0025mg/ml, 生物素化神经节苷脂浓度分别为 0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.12mg/ml 和 0.05mg/ml。取 0.01mg/ml 的细胞溶液每周进行血清学实验。在实验过程中, 未见溶血现象。

表 21. 本表列举了使用不同浓度生物素化神经节苷脂和生物素化糖浓度时, 进行血清学反应时的凝集反应结果。第一天之后, 使用 Albaclone 出品的抗 A 抗体, 其他抗体均系 Seraclone 出品的抗 A 抗体 (表 6 显示了这两种抗体的血清学等效性)。

		生物素化神经节苷脂的浓度 (mg/ml)				
		0.5	0.25	0.12	0.05	0
生物素化糖浓度 (0.0025mg/ml)						
第一天	试管法	1+	1+	2+	2+	0
	Diamed	2+	2+	2+	2+	0
生物素化糖浓度 (0.0025mg/ml)						
第一天	试管法	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 8 天	试管法	nd	nd	nd	Nd	Nd
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 15 天	试管法	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 22 天	试管法	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 29 天	试管法	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 36 天	试管法	4+	4+	4+	4+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 43 天	试管法	4+	4+	4+	2+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 49 天	试管法	4+	4+	4+	2+	0
	Diamed	4+	4+	4+	4+	0
第 56 天	试管法	4+	4+	4+	3+	0
	Diamed	4+	4+	4+	3+	0

nd 表示不能测出

用试管法进行比较试验证明, Seraclone 和 Albaclone 出品的抗 A 抗体的血清学表现相同。转化细胞系使用表 22 中列出的生物素化神经节苷脂的浓度,

和 0.01mg/ml 的生物素化糖浓度。

表 22. 试管法检验两种不同的抗 A 抗体—Seraclone 和 Albaclone 出品一的凝集反应结果。

抗体	生物素化神经节苷脂浓度 (mg/ml)				
	0.5	0.25	0.12	0.05	0
Seraclone	4+	4+	4+	4+	0
Albaclone	4+	4+	4+	4+	0

实施例 22

使用 0.5, 0.25, 0.12mg/ml 的生物素化神经节苷脂和 10, 7.5ug/ml 的生物素化糖转化红细胞, 然后用几个过期的抗体进行滴度试验。使用的抗体列出在表 23 中, 滴度试验结果列出在表 24 中。

表 23. 生物素化神经节苷脂-卵白素-生物素化 A 型三糖系统转化的红细胞, 进行比较性试验时, 使用的抗体列表。

编号	抗 A 抗体		
	生产厂家	批号	保质期限
I	Albaclone, SNBTS	Z0010680	1.2.03
II	Bioclone	01102	-
III	Bio Labs	8606	4.87
IV	Epiclone, CSL	20901	11.93
V	Gamma Clone	AM30-1	19.7.93
VI	Immucor	1A6137A	22.4.93
VII	Lorne Labs	60086D	8.01
VIII	Nova Clone	NA00503	8.5.93
IX	Organon	112Z15A	19.12.93
X	Seraclone	132051	29.5.93

表 24. 抗体比较试验的凝集反应结果

生物素化 神经节苷 脂	生物 素化 糖	抗 A 抗体									
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
mg/ml	ug/ml										
0.5	10	2+	1+	0	+w	0	0	0	0	+w	2+
	7.5	3+	2+	1+	2+	2+	2+	+w	0	1+	4+
	5	3+	3+	1+	1+	0	0	0	+w	2+	2+
0.25	10	4+	2+	0	0	0	0	0	0	0	4+
	7.5	3+	2+	0	1+	0	0	0	0	1+	4+
	5	4+	2+	0	+w	0	0	0	0	+w	4+
0.12	10	3+	1+	0	0	0	0	0	0	+w	2+
	7.5	1+	1+	0	2+	0	0	0	0	0	3+
	5	+w	+w	0	0	0	0	0	0	0	+w
0.05	10	+w	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
	7.5	2+	+w	0	0	0	0	0	0	0	2+
	5	+w	0	0	0	0	0	0	0	0	1+
阴性对照		0	0	(+)	0	0	0	0	0	0	0
阳性对照		4+	4+	4+	4+	4+	+4	+4	4+	4+	4+

I- Albaclone II- Bioclone III- Bio Labs IV- CSLV- Gamma Clone VI- Immucor

VII- Lorne Labs VIII- Nova Clone IX- Organon X- Seraclone

这其中的一些抗体也用 Diamed 系统进行了检测，部分结果列于表 25，26，27。

表 25. 采用特定浓度的生物素化神经节苷脂和生物素化糖进行转化后的红细胞，与抗体进行凝集反应，用 Diamed 微型分型系统进行检测。使用的抗体系 Albaclone 出品的抗 A 抗体（实验 KIL2403 E93-1-1）

泳道/培养孔	生物素化神经节苷脂 (mg/ml) 生物素化糖 (ug/ml)	评分
04-2	阳性对照—A 型红细胞	++++

66-1-1	0.5mg/ml, 10ug/ml	++
66-1-2	0.25mg/ml, 10ug/ml	+++
66-1-3	0.12 mg/ml, 10ug/ml	++
66-1-4	0.05 mg/ml, 10 ug/ml	0
66-4	阴性对照—O型红细胞	0

表 26 采用特定浓度的生物素化神经节苷脂和生物素化糖进行转化后的红细胞，与抗体进行凝集反应，用 Diamed 微型分型系统进行检测。使用的抗体体系 Albaclone 出品的抗 A 抗体（实验 KIL2403 E93-1-2）

泳道/培养孔	生物素化神经节苷脂 (mg/ml) 生物素化糖 (ug/ml)	评分
04-2	阳性对照—A型红细胞	++++
66-1-1	0.5mg/ml, 7.5ug/ml	++++
66-1-2	0.25mg/ml, 7.5ug/ml	+++
66-1-3	0.12 mg/ml, 7.5ug/ml	++
66-1-4	0.05 mg/ml, 7.5ug/ml	0
66-4	阴性对照—O型红细胞	0

表 27. 采用特定浓度的生物素化神经节苷脂和生物素化糖进行转化后的红细胞，与抗体进行凝集反应，用 Diamed 微型分型系统进行检测。使用的抗体体系 Seraclone 出品的抗 A 抗体（实验 KIL2403 E93-2-3）

泳道/培养孔	生物素化神经节苷脂 (mg/ml) 生物素化糖 (ug/ml)	评分
04-2	阳性对照—A型红细胞	++++
66-1-1	0.5mg/ml, 5ug/ml	+++
66-1-2	0.25mg/ml, 5ug/ml	+++
66-1-3	0.12 mg/ml, 5ug/ml	0
66-1-4	0.05 mg/ml, 5ug/ml	0

66-4	阴性对照—O型红细胞	0
------	------------	---

对O型红细胞进行人工改造，使用PAA接头将一个生物素化的B型三糖与红细胞连接。生物素化神经节苷脂浓度为0.5mg/ml, 0.25mg/ml, 0.12mg/ml和0.05mg/ml, B型三糖-PAA复合物的浓度为10ug/ml, 7.5ug/ml和5ug/ml。实验中使用的B型抗体列表见于表28, 试验结果见表29。

表28. 生物素化神经节苷脂-卵白素-生物素化B型三糖系统转化的红细胞, 进行比较性试验时, 使用的抗体列表。

编号	抗B抗体		
	生产厂家	批号	保质期限
I	Albaclone, SNBTS	Z0110600	27.4.03
II	Bioclone	01103	-
III	Bio Labs	8625	7.87
IV	Epiclone, CSL	23801	5.00
V	Epiclone, CSL	20801	11.93
VI	Lorne Labs	61003A	8.01
VII	Organon	112X19B	16.12.93
VIII	Ortho Clinical Diagnostics	BBB589A	21.11.99

表 29. 抗 B 抗体比较试验的凝集反应结果

生物素化 神经节苷 脂	B 型生 物素 化 三 糖	抗 B 抗体							
		mg/ml	ug/ml	I	II	III	IV	V	VI
0.5	10	2+	3+	1+	+w	0	2+	0	4+
	7.5	0	0	2+	0	0	0	0	0
	5	0	0	+1	0	0	0	0	2+
0.25	10	2+	2+	1+	0	0	3+	0	4+
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	1+	0	0	0	0	2+
0.12	10	0	0	0	0	0	0	0	2+
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	1+
	5	0	0	+w	0	0	0	0	2+
0.05	10	0	0	0	0	0	0	0	+w
	7.5	0	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0	+w
阴性对照		0	0	0	0	0	0	0	0
阳性对照	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+	4+

I- Albaclone II- Bioclone III- Bio Labs IV & V-CSL VI- Lorne Labs

VII- Ortho Clinical Diagnostics VIII- Organon

尽管前文以实施例的形式阐述本发明,但只要不违背权利要求允许的范围,作变动和修改亦被认可。而且,针对某些特点,若存在已知的等价观点时,只要在详细说明中述及,这些等价观点亦可被包括入本发明中。

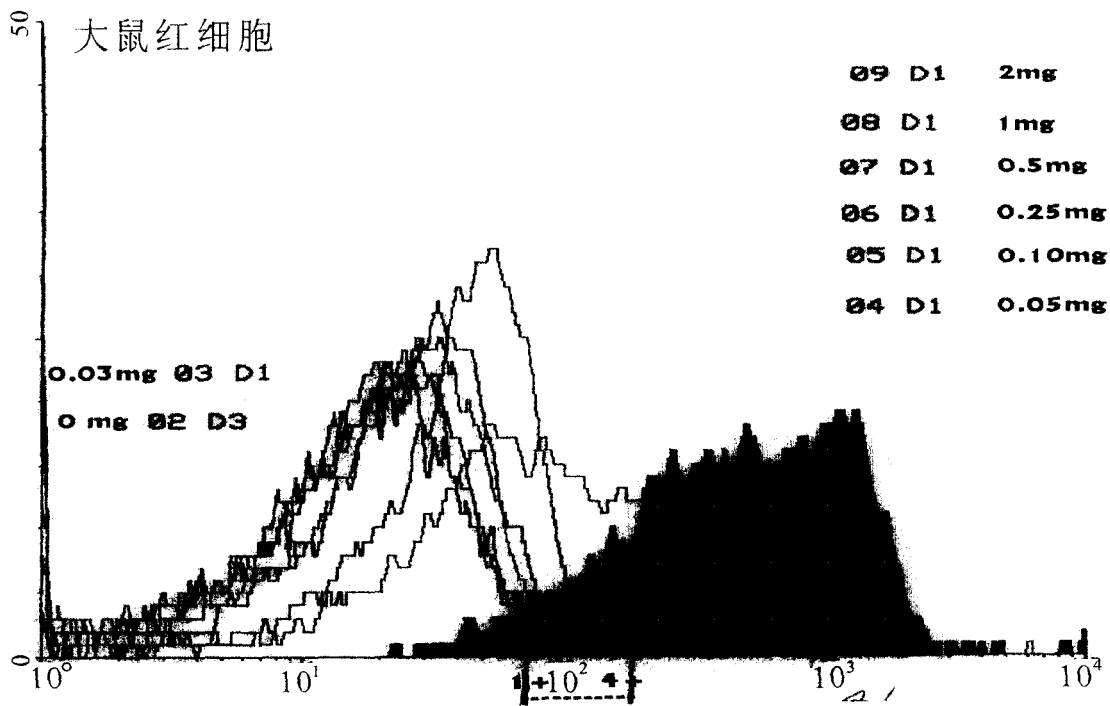


图1

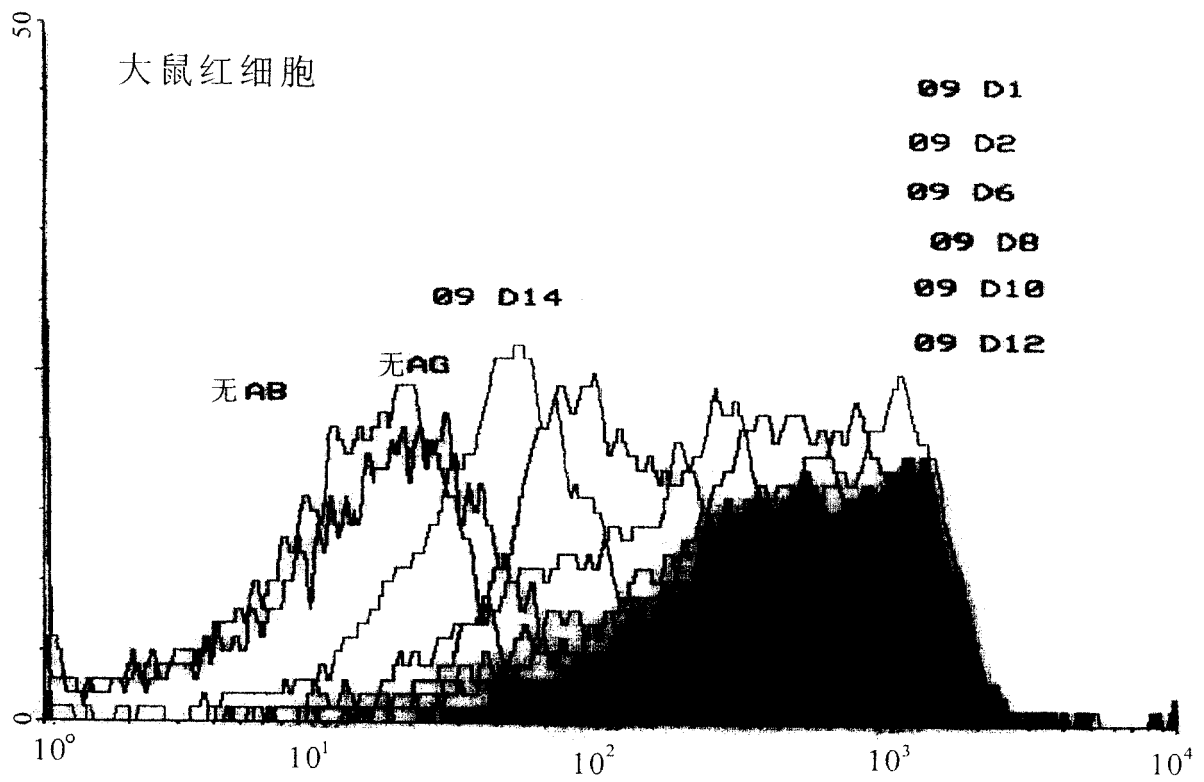


图2

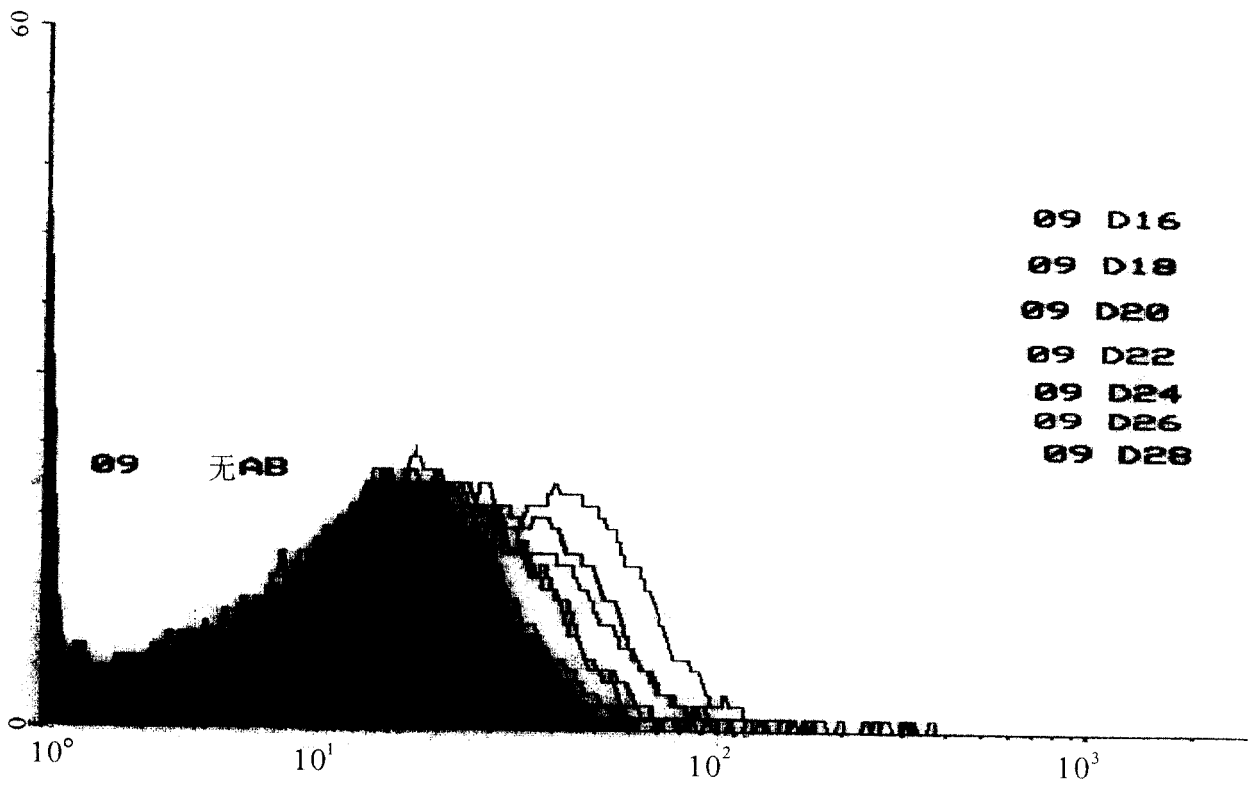


图3

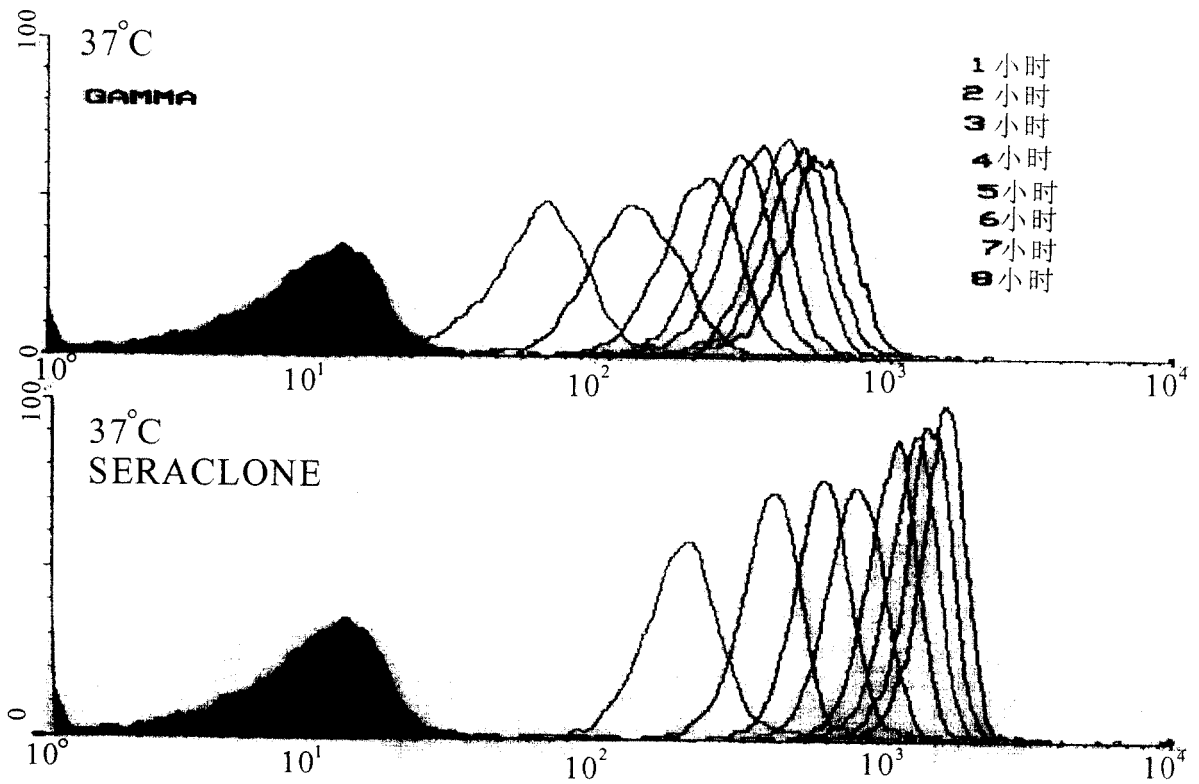


图4

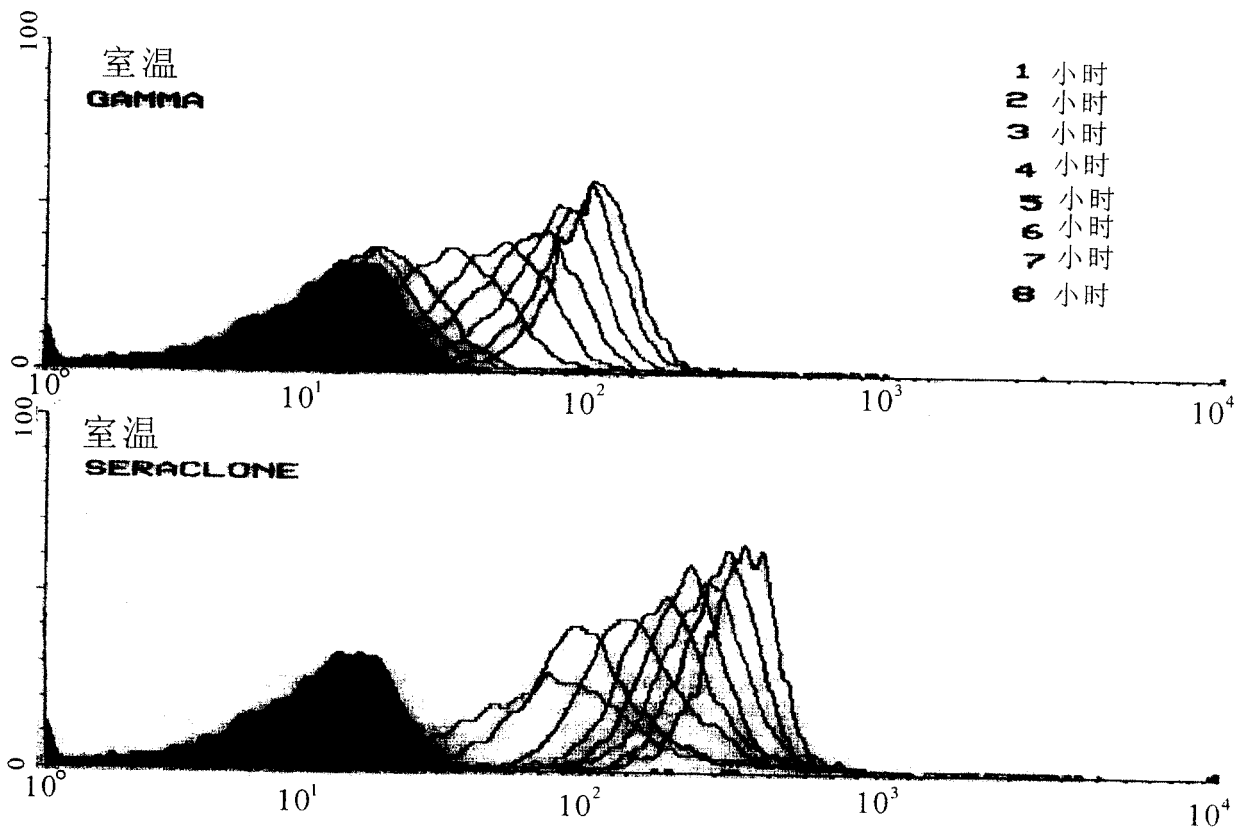


图5

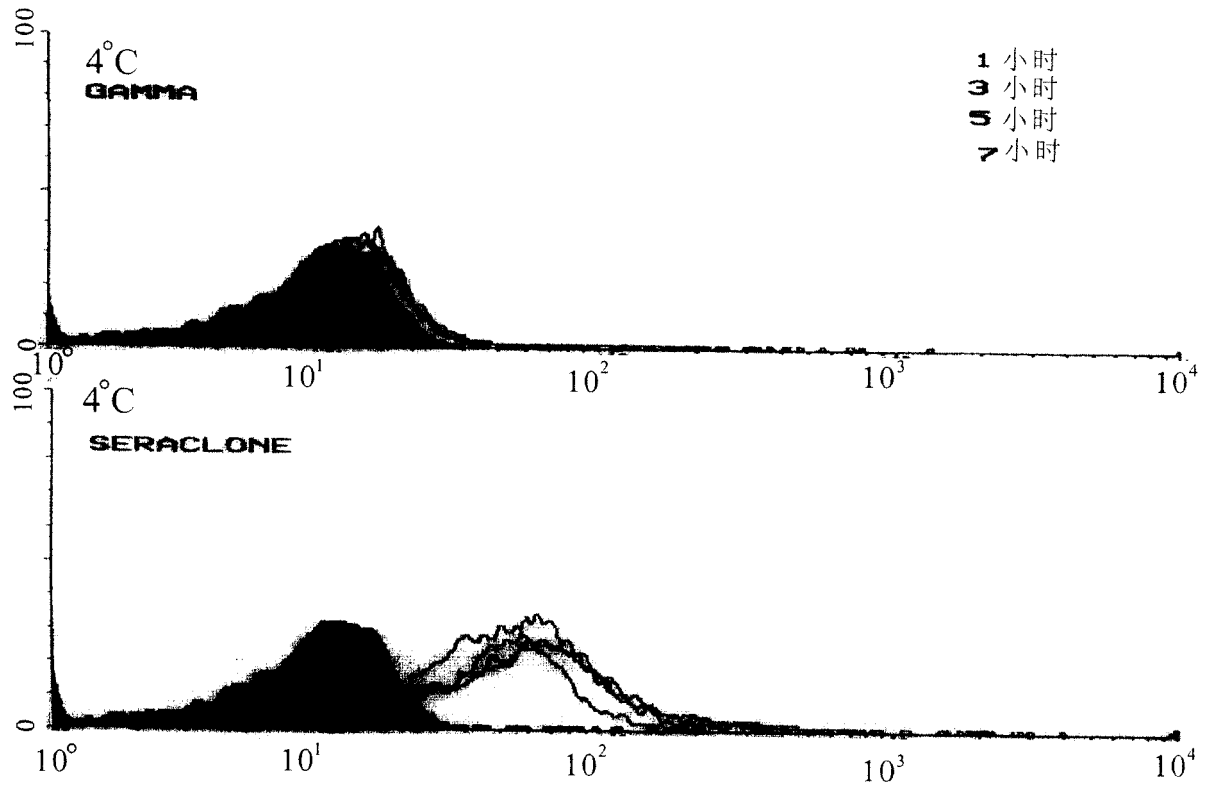


图6

专利名称(译)	一种用于血型测定的灵敏度控制物制备方法、由该方法制得的改造细胞及其该灵敏度控制物的应用、进行灵敏度控制的方法以及试剂盒		
公开(公告)号	CN100458445C	公开(公告)日	2009-02-04
申请号	CN02820525.1	申请日	2002-10-16
当前申请(专利权)人(译)	科德生物工程有限公司		
[标]发明人	德波拉阿代拉布莱克 丽莎格威妮丝吉利佛 斯蒂芬迈克尔亨利 陈吉		
发明人	德波拉·阿代拉·布莱克 丽莎·格威妮丝·吉利佛 斯蒂芬·迈克尔·亨利 陈吉		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/80 G01N33/53 C12N5/00 G01N33/543		
CPC分类号	C12N5/0006 G01N33/80 G01N33/96 C12N2503/00 Y10T436/10 Y10T436/107497 Y10T436/25		
代理人(译)	李勇		
审查员(译)	王丽华		
优先权	514849 2001-10-16 NZ 516901 2002-01-29 NZ		
其他公开文献	CN1571927A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种血型测定的灵敏度控制物制备方法，包括将一定数量的抗原溶解于水中，制得浓度确定的抗原溶液，并将此溶液与细胞接触，使抗原分子插入细胞膜内，或者将此溶液与经插入连接分子修饰的细胞接触，使抗原分子通过连接分子与细胞膜结合，得到改造细胞。淋洗改造细胞，并配成溶液，测定此溶液浓度，使其可用作血型测定的灵敏度控制物。

74] 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
代理人 李 勇

权利要求书 2 页 说明书 39 页 附图 6 页