



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101711363 A

(43) 申请公布日 2010.05.19

(21) 申请号 200880019301.1 (51) Int. Cl.
(22) 申请日 2008.06.06 *G01N 33/80* (2006.01)
(30) 优先权数据 *G01N 33/537* (2006.01)
0755624 2007.06.08 FR *G01N 33/354* (2006.01)
60/929,052 2007.06.11 US *G01N 33/569* (2006.01)

(85) PCT申请进入国家阶段日
2009.12.08

(86) PCT申请的申请数据
PCT/EP2008/057116 2008.06.06

(87) PCT申请的公布数据
W02008/148886 EN 2008.12.11

(71) 申请人 博瑞巴斯德公司
地址 法国马恩-拉-科盖特

(72) 发明人 弗雷德里克·比菲埃 伊夫·瑞森
埃利亚内·里瓦兰 安帕鲁·圣胡安

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219
代理人 张颖 樊卫民

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图 13 页

(54) 发明名称
血液样品的多重分析

(57) 摘要
本发明涉及用于检测红细胞携带的多个抗原性分子和 / 或个体的多个抗红细胞抗体的方法, 包括使样品与可辨别的珠子相接触, 在珠子上结合有 a) 特异性针对所述抗原的抗体, 或 b) 红细胞、红细胞膜片段或血型抗原。

1. 用于鉴定红细胞携带的抗原性分子和 / 或个体的抗红细胞抗体的体外方法, 包括
 - a) 通过下列步骤鉴定生物样品中红细胞携带的多种抗原性分子
 - (i) 在允许红细胞与抗体结合并且不产生凝集的条件下将所述含有红细胞的样品, 在单一测试容器或在几个分离的测试容器中, 与多组可辨别的珠子相接触, 每组可辨别的珠子带有给定的、特异性针对红细胞携带的抗原性分子的抗体, 所述抗体在一组珠子与另一组珠子之间不同, 所述红细胞在与所述的多组珠子进行接触之前或之后被标记,
 - (ii) 除去不与所述抗体结合的红细胞, 以及
 - (iii) 鉴定与标记的红细胞结合的珠子组, 从而鉴定到由所检测的红细胞携带的抗原;
 - 和 / 或
 - b) 通过下述步骤鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,
 - (i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与红细胞或红细胞膜片段结合的条件下, 将所述样品, 在单一测试容器或在几个分离的测试容器中, 与多组可辨别的珠子相接触, 每组可辨别的珠子带有已知表型的 (1) 红细胞或 (2) 红细胞膜片段, 所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,
 - (ii) 除去不与所述红细胞或所述红细胞膜片段结合的抗体或活化的血清补体级份,
 - (iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记, 以及
 - (iv) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组, 从而鉴定存在的抗红细胞抗体。
2. 用于鉴定红细胞携带的抗原性分子和个体的抗红细胞抗体的体外方法, 包括
 - a) 通过下列步骤鉴定生物样品中红细胞携带的多种抗原性分子
 - (i) 在允许红细胞与抗体结合并且不产生凝集的条件下, 将所述含有红细胞的样品, 在单一测试容器或在几个分离的测试容器中, 与多组可辨别的珠子相接触, 每组可辨别的珠子带有给定的、特异性针对红细胞携带的抗原性分子的抗体, 所述抗体在一组珠子与另一组珠子之间不同, 所述红细胞在与所述的多组珠子进行接触之前或之后被标记,
 - (ii) 除去不与所述抗体结合的红细胞, 以及
 - (iii) 鉴定与标记的红细胞结合的珠子组, 从而鉴定到由所检测的红细胞携带的抗原;
 - 和
 - b) 通过下述步骤鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,
 - (i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与红细胞、红细胞膜片段或血型抗原结合, 并且不产生凝集的条件下, 将所述样品, 在单一测试容器或在几个分离的测试容器中, 与多组可辨别的珠子相接触, 每组可辨别的珠子带有已知表型的 (1) 红细胞, (2) 红细胞膜片段或 (3) 血型抗原, 所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,
 - (ii) 除去不与所述红细胞或所述红细胞膜片段或所述血型抗原结合的抗体或活化的血清补体级份,
 - (iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记, 以及
 - (iiii) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组, 从而鉴定存在的抗红细胞抗体。

3. 用于鉴定个体的抗红细胞抗体的体外方法,包括 (b)

(i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与血型抗原结合,并且不产生凝集的条件下,通过将生物样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,来鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,每组可辨别的珠子带有已知表型的血型抗原,它们在一组珠子与另一组珠子之间不同,

(ii) 除去不与所述血型抗原结合的抗体或活化的血清补体级份,

(iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

(iv) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的抗红细胞抗体,

珠子是超顺磁性或磁性或可磁化的珠子。

4. 用于鉴定个体的抗红细胞抗体的体外方法,包括 (b)

(i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与血型抗原结合,并且不产生凝集的条件下,通过将生物样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,来鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,每组可辨别的珠子带有已知表型的血型抗原,所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,

(ii) 除去不与所述血型抗原结合的抗体或活化的血清补体级份,

(iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

(iv) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的抗红细胞抗体,

可辨别的珠子发射发光或荧光信号。

5. 用于鉴定个体的抗红细胞抗体的体外方法,包括 (b)

(i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与血型抗原结合,并且不产生凝集的条件下,通过将生物样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,来鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,每组可辨别的珠子带有已知表型的血型抗原,所述已知表型在一组珠子与另一组珠子之间不同,

(ii) 除去不与所述血型抗原结合的抗体或活化的血清补体级份,

(iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

(iv) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的抗红细胞抗体,

抗红细胞抗体是非典型抗体。

6. 权利要求 1 或 2 的方法,其中红细胞携带的抗原性分子选自构成血型的红细胞膜抗原、红细胞携带的活化血清补体级份、以及致敏的红细胞表面上存在的抗体。

7. 权利要求 1 或 2 的方法,其中按照 (a) 鉴定抗原和按照 (b) 鉴定抗体同时并在同一个容器中进行。

8. 前述权利要求任一项的方法,其中混合物的分析通过流式细胞术来进行。

9. 前述权利要求任一项的方法,其中还包括血红蛋白的化学或酶法降解的步骤,例如溶血。

10. 前述权利要求任一项的方法,其中可辨别的珠子是超顺磁性、或磁性、或可磁化的珠子。

11. 前述权利要求任一项的方法,其中可辨别的珠子发射发光或荧光信号。
12. 权利要求 1 或 2 或 6 到 10 任一项的方法,其中可检测地标记的红细胞(根据 a)用荧光化合物标记。
13. 前述权利要求任一项的方法,其中抗体(根据 b)是通过与带有荧光、发光或放射性标记物的抗人类球蛋白抗体相接触来标记的。
14. 前述权利要求任一项的方法,其中活化血清补体级份(根据 b)是通过与带有荧光、发光或放射性标记物的抗血清补体级份抗体相接触来标记的。
15. 前述权利要求任一项的方法,包括鉴定多种抗红细胞抗体(根据 b),其中抗体是非典型抗体。
16. 前述权利要求任一项的方法,其中生物样品选自全血、血浆、血清、血细胞颗粒和任何其它血液制备物。
17. 前述权利要求任一项的方法,其中生物样品源自于具有体内被抗体致敏、和 / 或包被有血清补体级份的红细胞的个体。
18. 前述权利要求任一项的方法,其中确定了红细胞表面上和 / 或源自于所述个体的生物流体中存在的免疫球蛋白的同种型。
19. 权利要求 1 到 18 任一项的方法,还包括对根据 (b) 鉴定的抗体进行定量。
20. 同于必须输血到患者中的红细胞的交叉配血的方法,包括
 - (i) 在允许可能存在的抗体与红细胞结合的条件下,在单一测试容器中,将患者的血清或血浆样品同时与携带有必须输血的红细胞的可辨别的珠子组接触,
 - (ii) 将没有与所述红细胞结合的抗体除去,
 - (iii) 标记被结合的抗体,以及
 - (iv) 分析混合物,以便确定珠子组是否结合有抗体,珠子组的结合表明必须输血的红细胞对于患者来说并不是完全匹配的。
21. 一组用于执行权利要求 1 或 2 或 6 到 20 任一项的检测方法的反应物,包含可辨别的珠子组,每组珠子带有至少一种可以被检测的具体物理参数,并且珠子属于至少两种不同的组,一组带有特异性针对红细胞携带的抗原性分子的捕获抗体,另一组携带 (1) 红细胞, (2) 红细胞膜片段或 (3) 作为血型抗原的捕获抗原。

血液样品的多重分析

[0001] 本发明涉及红细胞类型和表现型的分析,也涉及非典型抗红细胞抗体的筛选,涉及供体与受体之间相容性的确定,并涉及包被有抗体或包被有活化的血清补体级份的红细胞的验证。

[0002] 如今,输血是静脉内供给从供血者获得的血红细胞浓缩物(血细胞浓缩物)制剂。在输血时,主要的风险与抗体及其红细胞抗原在接受者(被输血的个体)体内再结合的可能性有关。事实上,在红细胞、也被称为血红细胞的表面,存在有能够被免疫系统识别并能够引发免疫应答、使血红细胞溶血的膜抗原,特别是血型(或系统)抗原。这种免疫反应的结果,其范围可以从没有临床征兆的无效输血,到轻微临床反应(焦虑、颤抖),严重临床反应(休克、血红蛋白尿(haemoglobinurea)、肾机能不全)或导致死亡的剧烈临床反应(休克、弥散性静脉内溶血)。

[0003] 如果接受者不具有任何针对供体红细胞抗原的循环系统抗体,则供体的血红细胞被称为是与接受者的血液相容的。

[0004] 在构成血型的红细胞膜抗原的所有抗原性变异体中,到目前为止已经在人类中鉴定了超过 20 种红细胞抗原系统:具有抗原 A、B 和 H 的 ABO 系统,尤其是具有抗原 D(不存在抗原 D 被标注为 d)、C、E、c 和 e 的 Rhesus(RH) 系统,尤其是具有两种抗原 K 和 k 的 Kell(KEL) 系统,尤其是具有抗原 Fya 和 Fyb 的 Duffy(FY) 系统,尤其是具有抗原 Jka 和 Jkb 的 Kidd(JK) 系统,或者可选的其它在实践中不太经常研究的系统,例如 MNS 系统、Lewis(LE) 系统等。具有同样的红细胞抗原群集的个体属于相同的的红细胞血型。

[0005] 除了病理学情况、例如自体免疫疾病的情况之外,个体的血清可以含有两种类型的针对红细胞抗原的抗体:

[0006] -(i) 被称为典型的并针对 ABO 系统的抗原的抗体(例如在 B 型个体中的抗 A 抗体)。

[0007] -(ii) 被称为非典型的(或免疫)抗体,它在血清或血浆中的存在是与环境有关的,更具体来说针对非 ABO 系统的抗原。

[0008] “典型的”或“常规的”抗体是 M 和 / 或 A 同种型的免疫球蛋白,能够在体外凝集红细胞。这种现象被用于通过 Beth-Vincent 和 Simonin 测试确定个体的 ABO 血型(分别为正向和反向血型测定),Beth-Vincent 测试使确定个体的血红细胞所携带的抗体(抗原性表型)成为可能,而 Simonin 测试使进行互补性研究、即确定个体血清中存在的循环系统抗 A 和 / 或抗 B 抗体,成为可能。

[0009] 在 Beth-Vincent 测试中,将个体的血红细胞与具有精确的抗体特异性、针对 ABO 系统的抗原的测试血清或测试抗体相接触。因此它是使用测试血清的血红细胞凝集测试。

[0010] 在 Simonin 测试、也称为反向测试中,将个体的含有循环系统抗体的血清或血浆,与属于 ABO 系统的精确的抗原性血型的测试血红细胞或测试红细胞相接触。因此它是使用测试血红细胞的血清凝集测试。

[0011] “非典型”或“非常规”或“免疫”抗体,最常见的是 G 同种型的,它们在存在外源血红细胞的抗原性刺激时出现,例如在输血过程中针对一种或多种抗原进行免疫后,或者在

怀孕过程中,由母体针对胎儿的不属于母体血型的红细胞抗原的免疫反应所引起,特别是在分娩时。

[0012] 这些“非典型”抗体的筛选被称为非典型凝集素筛选 (AAS)。这种测试用于检测个体血液中针对各种不同红细胞抗原的抗体的存在或不存在。为此,需要设法验证这些抗体 (IgG 和 / 或 IgM) 与抗原已知的测试血红细胞的结合。使用大量类型的血红细胞进行平行操作,对结果进行的比较使得推断出存在的抗体的特异性或多种特异性成为可能。

[0013] 与免疫反应有关的风险,如果该反应涉及了最具免疫原性的抗原,则全都较高,例如 Rhesus 系统的抗原 (该系统的危险性梯度如下 :D > E > c > e > C),其次,按照免疫原性降低的次序,是 Kell 系统的 K 抗原、Duffy 系统的 Fya 和 Fyb 抗原、Kidd 系统的 Jka 和 Jkb 抗原,等等。

[0014] 在实践中,为了进行输血,不可能考虑到所有这些抗原,否则人们将永远不会在正确的时间获得正确的血型,更不必说某些抗原组合非常罕见。因此,标准的输血最通常只考虑 ABO 系统和 Rhesus D 系统 (Rh+ 或 Rh-) 中的类型。然而,在存在出现非典型凝集素的风险的形势下,需要考虑一定数量的其它系统,特别是 Rhesus C、c、E 和 e 以及 Kell,或甚至其它系统。对于这些有风险的情况来说,情况将是使供体血型的相容性服从接受者血型的相容性,考虑这些非典型凝集素的存在或出现的风险。

[0015] 因此,在带有非典型抗红细胞抗体的受体患者中,或在有风险情况下,例如特别是在不具有非典型抗红细胞抗体的多次输血患者中或在怀孕妇女中,必需要选择待输的红细胞浓缩物单位,使得供体的血红细胞必须不含有接受者的抗体所针对的或容易出现的抗原。

[0016] 目前,在输血实践中,专业人员可以采用两种态度 :

[0017] - 他们在患者的血清或血浆中系统地筛选非典型抗体的存在,如果这样的抗体存在,他们选择不含所述抗原性结构的红细胞浓缩物 (这种情况在法国最常遇到),

[0018] - 或者他们在存在接受者的血清或血浆的情况下与供体的血红细胞进行直接的交叉配血,其中应该观察不到凝集反应和 / 或溶解反应。

[0019] 在输血的临床实践中,红细胞表型定型既包括接受者也包括供体,该表型定型对应于筛选和鉴定血红细胞表面上的血型抗原 (除了具体的 ABO 系统之外,其中相应的典型抗体的存在也被筛选)。

[0020] 在接受者和供体水平上,对于给接受者提供相容的红细胞浓缩物来说,存在三种作为风险情况函数的红细胞表型水平 :

[0021] - 确定 ABO 血型表型 (或 ABO 血型) 和标准 Rhesus 表型 (存在或不存 D 抗原);

[0022] - 确定 Kell Rhesus 表型 (存在或不存在 C、E、c、e 和 K 抗原);以及

[0023] - 确定扩大的 (或拓宽的) 表型,即确定 Duffy 系统的抗原 Fya 和 Fyb、Kidd 系统的抗原 Jka 和 Jkb、MNS 系统和 Lewis 系统的抗原、以及其它根据风险和 / 或接受者血清中显示的非典型抗体的性质也可以调查的其它抗原的存在或不存在。

[0024] 一般来说,常用于表型定型的技术,包括使用含有适合抗体的测试血清,筛选所调查的抗原是否存在。优选情况下,包含在这些测试血清中的这些抗体,在性质上是凝集的 (IgM 或 IgA),因此当被表型定型的红细胞带有对应于测试血清中存在的抗体的抗原时,可以获得该红细胞的完全或部分凝集。然而,也可以使用非凝集的测试抗体 (IgG 类型的),它

们的存在利用抗免疫球蛋白抗体通过凝集来证实（“间接 Coombs”技术）。

[0025] 为了在被测试患者的血清或血浆样品中筛选和鉴定抗血型抗原的抗体，该抗体是用于 ABO 分型的典型抗体或 AAS 情况下的非典型抗体，一般来说，将患者的血清或血浆，与在一定数量的血型系统中（ABO、Rhesus、Kell、Duffy、Kidd、MNS 等）抗原性已知的测试红细胞（也称为测试血红细胞）进行接触。对于其中易于存在的抗体倾向于非凝集类型的 AAS 来说，使用的技术是间接 Coombs 类型的，通过使用抗免疫球蛋白抗体进行凝集，或通过免疫粘附在固相上，并使用包被有抗免疫球蛋白抗体的血红细胞进行显示，如专利 EP 0367468 中所描述的。

[0026] 在 AAS 的情况下，在第一步中，使用了一组“筛选性”血红细胞（两种或三种不同类型的血红细胞，其类型的选择使得包含所有在输血中对于检测（但不是鉴定）非典型抗体是否存在来说是重要的抗原）。当筛选是阳性时，再通过至少一组“鉴定性”血红细胞来鉴定存在的非典型抗体或多种抗体的特异性，鉴定性血红细胞组一般包含 10 到 15 种、或甚至 20 种不同的、在绝大多数已知血型系统中表型定型到的血红细胞。

[0027] 在交叉配血的情况下，也使用间接 Coombs 技术。因此，源自于可能用于输血的血袋的样品的供体血红细胞、接受者的血清和抗球蛋白抗体被放在一起。这样的分析只能够确定抗体是否存在，不可能确定其特异性。

[0028] 在输血领域中，用于表型定型或 AAS 的技术存在着大量的变体，这些技术可能是手动的，在乳白石板上、在试管中或微孔板的孔中、或在凝胶柱中进行，也可以是全自动的，使用分配样品和反应物的机械手、摇床、温箱、离心机和自动读数器，以及适合于所执行的技术的程序来进行。

[0029] 但是，现有技术具有一些限制。

[0030] 目前，当测定血型时，最终的结果对应于几个独立结果的汇集，这些独立结果不是使用同一个测试样品测定的。使用来自同一患者的几个测试样品，影响了测试的可靠性。此外，它需要获取较大体积的血液，这在某些患者中（例如在婴儿和患有严重贫血的患者中）可能是成问题的。

[0031] 具体来说，为了确定 ABO 血型，分析是两种类型的分析的组合和解释的结果：使用血浆或血清的血清分析，或使用血细胞颗粒的细胞分析。

[0032] 在非典型抗体筛选中，一般首先进行筛选，然后，如果结果是阳性的，再将样品分类以便鉴定抗体的特异性。这两个步骤延迟了给出结果的时间，可能引起样品的降解。此外，经常会发现样品的体积不足以继续进行研究（特别是在使用抗体混合物的情况下），使得必需从患者继续采样。这些步骤的多重性要求建立起严格的追踪程序，以避免错误。

[0033] 此外，所有基于凝集原理的分型和表型定型测试，不能用于某些只有同种型 G 的人类抗体可用的系统（例如 Duffy），因为该人类抗体不能直接凝集带有特定抗原的血红细胞。在这种情况下，使用了识别这些人类免疫球蛋白并使结合到被测试的血红细胞上的抗体之间桥接的附加反应物（AHG）。然而，这种类型的反应物不能用于具有抗体体内致敏的血红细胞的患者（自体免疫性贫血、新生儿等）的情况中，因为存在着引起非特异性凝集反应（即使在血红细胞表面上不存在所考察的抗原的情况下也会发生的凝集反应）的风险。因此，对于这类患者不可能提供表型，这导致了真正的公共卫生问题。这是因为，在这种情况下，输血医师不得不输入最大数量的抗原标志物为阴性的血红细胞，而这样的血红细胞在

治疗机构中不总是可用的。

[0034] 此外,使用目前可用的技术,提供可利用的通常来自于几个测试的结果的组合的结果所需的时间,至少在 30 分钟两次的水平上,而需要输血的情况一般为紧急情况,希望能够在尽可能短的时间内确定供体与接受者之间的相容性。

[0035] 发明简述

[0036] 通过提供一种快速简单的方法,本发明解决了这些问题,该方法可以完全自动化,能够执行血红细胞的分型和表型定型、筛选非典型抗红细胞抗体、确定供体和接受者之间的相容性、以及验证包被有抗体或血清补体级份的血红细胞,方法优选使用单一样品以多重格式进行。

[0037] 因此,本发明提供了用于鉴定红细胞携带的抗原性分子、以及个体中可能存在的抗红细胞抗体的体外方法,优选为多重格式,包括使样品与可辨别的珠子相接触,在珠子上连接有 a) 特异性针对所述抗原的抗体,或 b) 红细胞、红细胞膜片段或血型抗原,接触在允许抗体与它们的抗原结合,在适合时活化血清补体级份,不产生凝集、特别是红细胞或可辨别的珠子的凝集的条件下进行。

[0038] 更具体来说,本发明的目的是用于鉴定红细胞携带的抗原性分子、和 / 或个体的抗红细胞抗体的体外方法,包括

[0039] a) 通过下列步骤鉴定生物样品中红细胞携带的多种抗原性分子:

[0040] (i) 在允许红细胞与抗体结合并且不产生凝集的条件下,将所述含有红细胞的样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子带有给定的、特异性针对红细胞携带的抗原性分子的抗体,抗体在一组珠子与另一组珠子之间不同,所述红细胞在与所述的多组珠子进行接触之前或之后被标记,

[0041] (ii) 除去不与所述抗体结合的红细胞,以及

[0042] (iii) 鉴定与标记的红细胞结合的珠子组,从而鉴定到由所检测的红细胞携带的抗原;

[0043] 和 / 或

[0044] b) 通过下述步骤鉴定生物样品中的多种抗红细胞抗体,

[0045] (i) 在允许样品中存在的抗体或活化的血清补体级份与红细胞、红细胞膜片段或血型抗原结合,并且不产生凝集的条件下,将所述样品,在单一测试容器或在几个分离的测试容器中,与多组可辨别的珠子相接触,每组可辨别的珠子带有具有已知表型的 (1) 红细胞, (2) 红细胞膜片段或 (3) 血型抗原,它们在一组珠子与另一组珠子之间不同,

[0046] (ii) 除去不与所述红细胞或所述红细胞膜片段或所述血型抗原结合的抗体或活化的血清补体级份,

[0047] (iii) 对结合的抗体和 / 或结合的活化血清补体级份进行标记,以及

[0048] (iv) 鉴定与标记的抗体或标记的活化血清补体级份结合的珠子组,从而鉴定存在的抗红细胞抗体。

[0049] 优选情况下,方式 (a) 和 / 或方式 (b) 可以在单一容器中以多重格式进行。然后最后一步 a-(iii) 或 b-(iv) 包含分析混合物以便分别鉴定哪组珠子与标记的红细胞结合,或与抗体或活化血清补体级份结合。

[0050] 本发明的另一个目的是一组用于执行上述的检测方法的反应物,包含珠子组,每

组珠子带有至少一种可以被检测的具体物理参数,并且珠子属于至少两种不同的组,一组带有特异性针对红细胞携带的抗原性分子的捕获抗体,另一组携带 (1) 红细胞, (2) 红细胞膜片段或 (3) 作为血型抗原的捕获抗原。

[0051] 发明详述

[0052] 定义:

[0053] 在本说明书中,术语“红细胞”或“血红细胞”没有差别,用于表示同样的血细胞。

[0054] 术语“多重”是指在单一容器中,使用单一信号读取系统,对单一样品的几种不同抗原-抗体类型的反应同时进行分析。

[0055] 术语“单式”是指在几个独立的容器中进行抗原-抗体类型的反应分析。但是,优选情况下,分析同时进行,并优选使用单一信号读取系统。

[0056] 表述“红细胞携带的抗原性分子”不仅表示任何在红细胞表面上在生理状态下发现的红细胞抗原、特别是血型抗原,而且表示由红细胞抗原的免疫反应产生的存在于红细胞表面上的抗原。在这种情况下,术语“红细胞携带的抗原性分子”包括由体内致敏的红细胞携带的抗体或血清补体级份的活化元件。

[0057] 因此,一般来说,红细胞携带的抗原性分子选自构成血型的红细胞膜抗原、红细胞携带的活化血清补体级份、以及致敏的红细胞表面上存在的抗体。此外,还包括吸附在红细胞上但源自于其它细胞群体的抗原性分子(特别是 Lewis 抗原性分子)。

[0058] 表述“抗红细胞抗体”是指任何与红细胞携带的抗原特异性结合的抗体。术语“结合的抗体和/或结合的活化血清补体级份的标记”是指可逆结合或直接嵌入在红细胞膜中的抗体和/或活化血清补体级份的标记。

[0059] 术语“个体”是指任何具有多种血型的动物。对于具有多种血型的动物来说,可以提到的有例如狗,到目前为止已经在其中鉴定到8种不同的血型,以及猫,有三种。当然,术语“个体”也指人类,包括胎儿阶段的人类。

[0060] 术语“生物样品”是指无论是生理性还是病理性地可能含有红细胞或抗红细胞抗体的体液或组织活体样品的任何级份。因此,对于生物样品来说,可以提到的是血液样品,特别是全血样品或血细胞颗粒样品(或血袋),或任何其它血液制剂,但是也包括含有血液的唾液、汗液、泪液、乳液或尿液。也可以使用血浆或血清样品用于抗体筛选。为了确定红细胞携带的抗原,生物样品可以包含血细胞颗粒。在方式(a)中使用的样品可以与方式(b)中使用的样品相同或不同。当样品相同时,方式(a)和方式(b)可以在同一个容器中同时进行。生物样品可以不经预处理。

[0061] 术语“抗体”是指任何完整抗体或抗体的功能性片段,它含有或由至少一个抗原结合位点组成,使得所述抗体与抗原性化合物的至少一个抗原决定簇结合。抗体片段的例子,可以提到的是 Fab、Fab' 和 F(ab')₂ 片段,以及 scFv 链(单链可变片段)、dsFv 链(双链可变片段)等。这些功能性片段具体来说可以通过遗传工程获得。

[0062] 术语“捕获抗原”是指与固相连接的抗原性片段,它能够被抗体识别,并能够与后者亲和性结合。连接于珠子的血型抗原是这样的血型抗原,它可以是通过化学方法或通过遗传重组生产的合成抗原。它也可以是从生物样品纯化的抗原。

[0063] 术语“捕获抗体”是指与固相连接的抗体或抗体的一部分,它能够通过亲和性结合留住生物样品中存在的抗原性化合物的至少一个抗原决定簇。

[0064] 用作检测工具的抗体可以是多克隆或单克隆抗体。可用于本发明的情况中的单克隆抗体或多克隆抗体的生产,是在常规技术下进行的。

[0065] 单克隆抗体可以按照Köhler和Milstein描述的淋巴细胞融合和杂交瘤培养的常规方法(Nature, 256, p. 495-497(1975))来获得。其它用于制备单克隆抗体的方法也是已知的(Harlow等主编《抗体实验指南》, Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory(1988))。可以通过免疫哺乳动物(例如小鼠、大鼠、兔或甚至人类等)并通过使用产生杂交瘤的淋巴细胞融合技术(Köhler和Milstein, 1975, 同上),来制备单克隆抗体。

[0066] 还存在着这种常规技术的替代技术。例如,可以通过表达从杂交瘤克隆的核酸来生产单克隆抗体。抗体也可以通过噬菌体展示技术,通过将抗体cDNAs导入载体、典型为丝状噬菌体(例如用于大肠杆菌的fUSE5, Scott等, (Science, 249, pp. 386-390(1990)))来生产。后者构成了文库,并在其表面上具有scFv片段。构建这些抗体文库的方案描述在Marks等(1991)(J. Mol. Biol., 222, pp. 581-597, (1991))中。

[0067] 多克隆抗体可以按照常用的方案,从用本性优选为肽的抗原免疫的动物的血清获得。

[0068] 一般来说,多肽、特别是重组多肽,或寡肽,可以用作例如免疫原。根据常规的方案,按照Benoit等描述的步骤[PNAS USA, 79, pp. 917-921(1982)],将兔用相当于1mg的肽免疫原进行免疫。

[0069] 珠子。

[0070] 珠子通常由对生物样品的成分惰性的聚合物构成;它们是固态的,在样品中不溶解。使用的聚合物可以是聚酯、聚醚、聚烯烃、聚酰胺、多糖、聚氨基甲酸酯或纤维素。也可以使用粘合剂为颗粒提供完整性和结构。

[0071] 可以将功能基团与这些聚合物掺和在一起,以便允许连接或结合生物学重要的大分子(蛋白、脂类、碳水化合物、核酸)。这些本领域技术人员已知的功能基团,可以是酰胺(-NH₂)或铵官能团(-NH₃⁺或-NR₃⁺)、醇官能团(-OH)、羧酸官能团(-COOH)或异氰酸官能团(-NCO)。最常用于将COOH官能团导入聚烯烃的单体是丙烯酸或甲基丙烯酸。

[0072] 反应物与珠子表面的连接可以通过静电吸引、亲和相互作用、疏水相互作用或共价结合来进行。共价结合是优选的。

[0073] 本发明中使用的珠子是形状大约为球形的颗粒,其尺寸可以在0.5 μm到40 μm之间,优选在4 μm到9 μm之间,更优选在5 μm到8 μm之间。

[0074] 这里使用的珠子是“可辨别的”,因为它们具有不同的标志物,使得可以通过适合的检测器将它们彼此区分开。因此,每组珠子具有不同的生理化学性质(尺寸、密度、粒度、粗糙度、吸光度、荧光、顺磁性成分),使得可以利用适合的检测器或工具,例如流式细胞仪将它们彼此区分开。

[0075] 对于用于将颗粒彼此区分开的差异性参数来说,具体来说可以通过选择不重叠的尺寸范围来使用颗粒的尺寸。

[0076] 在另一个优选实施方案中,可辨别的颗粒发射荧光信号。事实上,掺入了各种不同荧光标记物的珠子,可以通过它们的荧光光谱来区分。为此,珠子可以被一种或多种具有各种适合浓度的染料(例如荧光、发光染料等)浸渍,或者用放射性同位素、酶等类型的

标记物浸渍 (Venkatasubbarao S., “微阵列——现状与展望”, 《Microarrays-Status and prospects》Trends in Biotechnology Dec 2004, 22(12):630-637; Morgan 等, “细胞测量珠阵列:适用于生物学各种领域的多元化分析平台”, 《Cytometric bead array: a multiplexed assay platform with applications in various areas of biology》, Clin. Immunol. (2004) 100:252-266)。光的散射或发射,或其组合,也可用于区分颗粒。

[0077] 在优选实施方案中,可辨别的珠子发射发光或荧光信号。

[0078] 使用的珠子可以是超顺磁性、磁性或可磁化的。对于可用于本发明的珠子来说,可以具体提到的是在 US 6,872,578 中描述的珠子。根据特别优选的实施方案,使用的珠子是荧光和超顺磁性的。这些生理化学性质,可以使在与生物样品反应过程中将这些微粒捕获的级份与没有结合的级份分离开,成为可能。这种分离可以通过尤其是离心、过滤或磁化来进行。通过磁化进行分离是优选的,为此,可以使用含有顺磁性、铁磁性、亚铁磁性和变磁性成分的珠子。顺磁性成分是优选的,例如铁、钴、镍或金属氧化物例如 Mn_2O_3 、 Cr_2O 或 Fe_3O_4 。磁性成分的含量可以在 2% 到 50% (以重量计) 之间,优选在 3% 到 25% 之间。

[0079] 可以通过(按照)任何适合的技术将抗体连接到珠子上。它们可以通过直接共价键,或者非共价地、特别是通过被动吸附或通过亲和进行结合。直接共价连接可以通过活化珠子表面上存在的羧基,包括经例如羟基琥珀酰亚胺或碳二亚胺键合来进行。在具体的实施方案中,首先通过共价键将抗免疫球蛋白抗体连接到珠子上,然后将珠子与待连接的抗体相接触。

[0080] 红细胞、红细胞膜片段或血型抗原可以通过聚 L-赖氨酸利用非共价键合、或利用任何类型的配体例如染料类型的聚阳离子进行连接。红细胞、红细胞膜片段或合成的抗原也可以通过共价键合、特别是使用高碘酸钠连接到珠子上。

[0081] 令人吃惊地注意到,血红细胞或膜片段的连接,无论是共价的还是非共价的,都不损害珠子通过流式细胞术方法可以被辨别的性质。

[0082] 此外,有可能通过相同的方式,将与红细胞表面上存在的某些血型抗原同源的合成抗原,连接到这些珠子的表面上。这些抗原的连接不损害珠子可以被辨别的性质。这些合成的抗原可以是例如多糖。

[0083] 珠子可以通过检测器例如流式细胞仪进行测量,例如在 Luminex 的专利申请 WO 97/14028 中描述的流式细胞仪。因此,将珠子的带有反应物(抗体或红细胞或红细胞膜)的亚组暴露于生物样品,每个亚组具有一种或多种分类参数,使得能够将一个亚组的珠子与另一个亚组的珠子区分开。然后将这样的暴露于样品的珠子经过检测区(例如流式细胞仪),在那里收集与分类参数相关的数据(例如荧光发射强度),优选也收集与反应物和目标被分析物之间(即根据本发明的方法中的(a)为珠子与红细胞携带的抗原性分子之间,或根据(b)为珠子与抗体之间)形成的复合物的存在或不存在相关的数据。

[0084] 标记:

[0085] 被可检测地标记的红细胞(在方式(a)中)可以通过本领域技术人员已知的任何技术进行标记。它们可以用例如荧光化合物进行标记,例如插入到这些细胞的膜中的荧光团。它们也可以使用本身用荧光标记物官能化的配体进行标记,该配体能够识别红细胞表面上的结构。这些配体可以是例如抗体或动物或植物的凝集素。这些类型的标记可以在测试前进行,也可以不进行。

[0086] 在方式 b) 中,被标记的是抗体,或者可选地是活化血清补体级份。任何标记技术都是可能的。标记的类型也可以是混合的。

[0087] 根据具体实施方案,将抗体与带有荧光、发光或放射性标记物的抗人类免疫球蛋白抗体进行接触。

[0088] 根据另一个具体的、可选地累积的实施方案,将活化血清级份与特异性识别活化血清补体级份的抗体进行接触,所述抗体带有例如荧光、发光或放射性标记物。这样的抗体可以是单克隆的或多克隆的,并且对于本领域技术人员来说是熟知的。

[0089] 未结合反应物的除去:

[0090] 在进行分析步骤之前,在与反应物进行接触和温育期间没有被结合的反应物,应该被除去。希望除去尽可能多的未结合的反应物,以便降低背景噪音,从而获得良好的测试特异性,但是太剧烈的条件可能降低所述测试的灵敏度。因此,残余存在的未结合反应物一般是可忍受的。用于在方法的灵敏度与特异性之间获得可接受的折衷条件,可以由本领域技术人员通过常规的实验容易地确定。

[0091] 除去未结合的反应物可以利用本领域技术人员已知的任何技术来进行,例如利用重复的离心步骤进行洗涤,或利用珠子的超顺磁性性质和使用磁铁。

[0092] 优选实施方案:

[0093] 正如上面定义的,本发明的方法使得或者按照 (a) 鉴定抗原、或者鉴定抗体、或者鉴定结合的活化血清补体级份,成为可能。也可以使用几种类型的鉴定的组合。因此,根据 (a) 的抗原的鉴定和根据 (b) 的抗体的鉴定,可以同时或分别进行。根据 (b) 鉴定抗体,可以通过揭示抗体和活化血清补体级份二者来进行。

[0094] 容器可以是任何固体容器,例如试管、微孔板的孔或任何允许在自动化系统中进行反应的容器。离心容器不是必需的。

[0095] 反应物和目标被分析物的混合,在允许红细胞携带的抗原与抗体发生特异性结合、并且不凝集的条件(特别是 pH、温度、离子强度等)下进行。具体来说,基本上不存在凝集,使得使用流式细胞仪成为可能。为了避免任何凝集反应,调整珠子的量和尺寸以及样品的浓度,是有利的。凝集反应满足数学定律,具体来说它们已经在 H. E. Hart, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 17-36, K. C. Chak, Bulletin of mathematical biology, vol 42, 37-56 和 C. DeLisi, Journal of Theoretical Biology, 1974, vol 45, 555-575 页中描述过了。这些定律涉及几个参数,例如具体为反应物的尺寸以及它们的数量比率。因此,本领域技术人员可以通过使用与这些反应物有关的数学定律来选择反应条件,使得基本上不发生凝集。例如,当使用红细胞和与红细胞的尺寸相似、即大约 7 μ m 的珠子时,本领域技术人员将选择红细胞数量与珠子数量的比率在 30 到 150 之间。

[0096] 有利情况下,优选提供血红蛋白的化学或酶法降解步骤,例如溶血作用,该步骤优选在连接之后,并在抗原(根据 a) 或抗体(根据 b) 鉴定之前。

[0097] 溶血可以以各种不同方式进行。例如,可以将混合物在低克分子渗透压浓度介质中温育。术语“低克分子渗透压浓度介质”一般是指克分子渗透压浓度小于或等于 100 mosmol/L 的介质。对于适合的低克分子渗透压浓度介质来说,可以提到的是浓度为 40mM 或以下的氯化铵溶液,或蒸馏水。溶血也可以通过超声来进行。

[0098] 应用:

[0099] 本方法使得以多重格式进行红细胞表型定型和 / 或分型, 成为可能。

[0100] 通过本发明的方法的实施方案 (a) 鉴定的抗原, 可以是任何血型抗原, 即 ABO 系统的 A 抗原、B 抗原、同时表达的 A 和 B 抗原或 H 抗原, Rhesus 系统的 D、E、e 和 C 或 c 抗原, Kell 系统的 K 或 k 抗原, Duffy 系统 (Fya, Fyb), Kidd 系统 (Jka, Jkb), 或者其它在实践中较不常用但是也存在的系统, 例如 MNS、Lewis 等的抗原。

[0101] 本发明的方法的实施方案 (a), 也为使用来自具有在体内由抗体或血清补体级份致敏的红细胞的患者的生物样品, 来鉴定表型, 提供了可能性。这些患者被称作是“直接 Coombs 测试阳性的”。具体来说, 他们是例如患有溶血性贫血的新生儿或患者。这些患者的血红细胞包被有 G 型免疫球蛋白的事实, 使得不能使用意味着引入了抗人类球蛋白第二反应物的反应物。因此, 间接 Coombs 测试不能用于这样的情况中。这种特殊性极大地限制了生物学家为这种类型的患者建立完整表型的能力。事实上, 许多表型定型反应物只以 IgG 类型的特异性人类抗体的溶液的形式存在, 需要使用抗人类球蛋白第二反应物。因此, 在某些情况下, 不可能进行分析, 因此不可能给患者输血, 这当然影响了治疗程序的质量。相反, 本发明的方法不需要使用抗球蛋白第二反应物, 因此可以鉴定体内致敏的红细胞的红细胞抗原。

[0102] 在体内致敏的红细胞表面上存在的抗体或活化血清补体级份, 本身能够构成红细胞携带的、可以使用本发明的方法的实施方案 (a) 鉴定的抗原。

[0103] 有利情况下, 本发明的方法还可以确定红细胞表面上存在的免疫球蛋白的同种型。因为某些同种型比其它同种型更危险, 因此能够指明发现的抗体的性质是有利的, 从而使临床医生指导他或她的治疗程序。因此, 根据实施方案 b, 通过使用特异性针对免疫球蛋白同种型的抗体的标记物, 可以确定非典型抗体的同种型。

[0104] 本发明的方法的实施方案 (a), 也可以揭示多个血红细胞群体, 即不同表型的血红细胞 (双重群体), 这有时在多次输血的患者中, 当他们经历过多次不与他们的血型完全匹配的输血时, 会遇到。

[0105] 本发明的方法也使通过发现同样由患者 / 植入物合成的非常少量血红细胞, 来监测骨髓移植, 成为可能。

[0106] 本发明的方法也使在适合时作为 Kleihauer 测试的替代物, 鉴定来自母亲的血样中存在的胎儿血红细胞, 成为可能。

[0107] 此外, 方法使得例如通过分析荧光信号来定量确定样品中位于红细胞表面上的抗原的比例, 成为可能。

[0108] 本发明的方法也对可能的抗体进行量化。因此, 获得的结果可以是数字形式的, 可用于利用电子数据处理系统来帮助解释。

[0109] 此外, 本发明的方法提供了鉴定多种抗红细胞抗体的可能性 (根据 b)。总的来说, 方法使得鉴定任何用于 Simonin 逆向测试的抗 ABO 血型特异性, 或在筛选非典型抗体的情况下任何其它的特异性, 成为可能。一般来说, 这些抗体能够与它们的抗原稳定地结合, 即不仅与它们的抗原结合, 而且保持与它的连接, 特别是在执行本发明的方法的条件下。这些抗体可以通过本发明的方法的实施方案 (b) 来鉴定。

[0110] 此外, 现在已经公知, 某些具体的抗红细胞抗体, 由于它们的同种型以及与温度相关的可变的反应性, 不能与它们相应的抗原保持连接。另一方面, 这些抗体能够活化构成补

体系统的所有蛋白,特别是血清级份 C1q、C3 和 C4。这种活化的结果导致形成了修饰的蛋白,例如 C3b、C3dg 和 C3d 蛋白,其中在后两者的情况下,保持锚定在红细胞膜上,但是起始抗体从红细胞表面清除了。但是,这种复杂的过程,与抗体和红细胞抗原的最初结合的起始的、特异的反应直接相关。本发明的方法的实施方案 (b),鉴定了活化的血清级份,使得鉴定起始抗体成为可能。

[0111] 有利的是,本发明的方法还使确定患者、例如怀孕女性的血清中存在的免疫球蛋白同种型,成为可能。这主要对监测胎儿贫血有利。这是因为,目前已经证实,新生儿溶血症的严重性取决于母亲中存在的针对孩子红细胞的抗原决定簇的抗体的同种型 (Lambin 等, Transfusion, 2002, vol 42, pp1537-1546)。因为某些同种型比其它同种型更加危险,因此能够指明发现的抗体的性质是有利的,从而使临床医生指导他或她的治疗程序。

[0112] 此外,特别有利的是,本发明的方法允许使用单一测试样品,通过在同一个容器中同时执行本发明的方法的实施方案 (a) 和 (b) 以确定个体血液中存在红细胞携带的红细胞抗原和抗红细胞抗体,来完全确定个体 ABO 系统的血型。

[0113] 此外,根据本发明的方法的具体实施方案,后者的执行是为了验证交叉配血。因此,这是交叉匹配所有血型抗原 (不仅仅是 ABO) 的问题。在这种情况下, (i) 将患者的血清或血浆样品同时地、优选在单一测试容器中,与携带有必须输血的红细胞的可辨别的珠子组,在允许可能存在的抗体与红细胞结合的条件下进行接触, (ii) 将没有与所述红细胞结合的抗体除去, (iii) 将结合的抗体标记,特别是使用例如用荧光标记物标记的抗球蛋白抗体,然后 (iv) 分析混合物,优选通过流式细胞仪,以便确定珠子组是否结合有抗体,珠子组的结合表明必须输血的红细胞不与患者完全匹配。

[0114] 由于本发明方法的高度可靠性,这样的应用时可能的。

[0115] 有利的是,方法使得在仅仅几分钟内获得完整的、可靠的结果成为可能。更具体来说,有可能在少于 1 小时、或甚至少于 30 分钟内给出完整的结果。

[0116] 此外,本发明的方法具有非常好的灵敏度,至少与目前市场化的技术、例如凝胶柱过滤相当。

[0117] 本发明的方法还使显著减少所取的测试样品体积成为可能。目前,反应一般对于每次测试来说使用 25 μ l 测试样品来进行,即在使用 20 种不同红细胞和 3 种筛选红细胞的 AAS 的情况下,575 μ l 测试样品。为了执行本发明的方法,例如仅仅 50 到 100 μ l 就已足够。

[0118] 下面的图和实施例对本发明进行了说明,但不对其范围构成限制。

附图说明

[0119] 图 1 是流程图,显示了抗体在 Luminex[®] 珠子上的直接固定化。

[0120] 图 2 是流程图,显示了通过亲和将抗体固定化在 Luminex[®] 珠子上。

[0121] 图 3 是流程图,显示了用荧光膜内化合物标记各种不同表型的红细胞。

[0122] 图 4 是流程图,显示了利用聚 L- 赖氨酸将红细胞固定化在 Luminex[®] 珠子上的步骤。

[0123] 图 5A 到 5D 显示了红细胞的多重表型定型。

[0124] 图 6 是流程图,显示了来自“直接 Coombs 阳性”患者的红细胞的同时进行的鉴

定和多重表型定型。

[0125] 图 7 是流程图,显示了抗 D 抗体的多重检测。

[0126] 图 8 是显示了抗 D 抗体的多重校正的图。

[0127] 图 9 是显示了来自 Centre de Référence pour les Groupes Sanguins(CNRGS) [血型参比中心] 的参比血清中抗 D 抗体的单式校正的图。

[0128] 图 10 是流程图,显示了抗 D 和抗 Fya 抗体的多重检测。

[0129] 图 11 是流程图,显示了血细胞颗粒或全血类型的样品上的多重分型。

实施例

[0130] 实施例 1:表型定型和分型

[0131] 本分析的目的是利用特异的单克隆抗体,鉴定来自供体或患者的血红细胞表面上存在的血型抗原 (ABO、RH、Duffy、Kidd、Lewis 血型等)。

[0132] 为了证明使用本发明的技术进行血红细胞表型定型 / 分型的可能性,使用荧光珠子来固定化抗血红细胞抗体。因此抗原特异性不同的抗体可以结合到具有不同颜色的珠子的各种不同区域。

[0133] 对于红血球细胞来说,它们用与 Bio-Rad 公司以商品名“Bioplex200”销售的装置的报告激光波长相容的荧光化合物进行标记。

[0134] 在标记后,将血红细胞与致敏的珠子温育。因此有可能检测到与珠子连接的血红细胞,从而确定它们的抗原特异性。

[0135] 1.1- 材料与反应物

[0136] - 珠子:

[0137] 使用的珠子由 Luminex 制造 (Luminex Corp., Austin Texas, United States)。它们是直径为 $8\mu\text{m}$ 的超顺磁性珠子,由聚苯乙烯和甲基丙烯酸 (COOH 官能团) 构成。

[0138] 在本实施例中,使用了具有各种不同的珠子区域 19、21、32、34 (内标珠子 (ISB))、71 和 98 (空白珠子 (BB)) 的荧光超顺磁性珠子。

[0139] 将具有珠子区域 34 的珠子 (ISB) 用罗丹明衍生物官能化,用作内部荧光对照。这些珠子将产生 5000 到 15000RFI 之间的荧光值。

[0140] 将区域 98 的 BB 珠子用牛血清白蛋白饱和。这些珠子既不能结合抗原,也不能结合抗体,因此被用于验证不存在非特异性结合。这些珠子将产生低于 1000RFI 的荧光值。

[0141] - 抗人类免疫球蛋白单克隆 IgG 抗体,克隆 125A15 (Bio-Rad)。

[0142] - 抗人类 IgM(mu) 多克隆抗体 (Bio-Rad)。

[0143] - 抗 D IgG (克隆 H2D5D2F5), 抗 Fya IgG (克隆 5T72A13F5A93) 和抗 S IgM (克隆 MS94) 单克隆抗体 (Bio-Rad, Millipore)。

[0144] - PKH26 细胞标记试剂盒 (Sigma)。

[0145] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 和“Stabiliss”编号 86550 销售的稀释介质。

[0146] - 以名称“ScanGel Coombs”编号 86432 销售的用于非典型抗体筛选的凝胶卡 (Bio-Rad)。

[0147] - 以名称“ScanGelRhK”编号 86428 和“ScanGel Neutral”编号 86430 销售的凝胶

卡 (Bio-Rad)。

[0148] - 以名称“ScanPanel”编号 86593 和“ScanCell”编号 86595 销售的,用于通过凝胶卡技术进行非典型抗体筛选的表型确定的血红细胞 (Bio-Rad)。

[0149] - 保存在 SAG-MAN 介质中的浓缩的表型确定的血红细胞颗粒 (EFS Nord de France)。

[0150] - 源自于患者样品的直接 Coombs 阳性和 / 或阴性的血红细胞。

[0151] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠,150mM NaCl,0.1% (v/v)proclin)。

[0152] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。

[0153] -PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠,2.7mM KCl,136mMNaCl)。

[0154] 1.2- 流程

[0155] 1.2.1. 用血型抗体致敏珠子

[0156] 抗体在珠子表面的固定化可以根据两种不同的原理来进行。在第一种情况下,抗体通过共价键直接固定化在珠子上 (图 1)。第二种方法包括通过亲和非共价地进行抗血红细胞抗体的固定化。在这种情况下,连接利用在第一步中通过共价键与珠子结合的抗免疫球蛋白抗体来进行 (图 2)。在显示的实施例中选择了这种方法。

[0157] 具有珠子区域 19、21 和 32 的珠子被用于抗人类免疫球蛋白抗体的共价固定化。具有珠子区域 71 的荧光珠子被用于抗人类 IgM 抗体的共价固定化。出现在珠子表面上的羧基基团根据包括羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的技术进行活化。因此蛋白可以通过它们的胺基被固定化。

[0158] 这样制备的珠子在 +4°C 下,以 3mg/ml 的浓度储存在含有 10% (w/v)BSA、0.5% (v/v)Tween 20 和 0.09% (w/v) 叠氮化钠的 pH7.4 的 PBS 中。

[0159] 带有固定化的抗人类免疫球蛋白抗体的珠子可以用抗 D IgG 或抗 Fya IgG 血型抗体致敏。事实上,抗免疫球蛋白抗体允许 IgGs 通过它们的 Fc 片段结合。因此,血型抗体使用该原理非共价固定化在珠子上。每个珠子区域被具有不同特异性的抗体致敏。选择的抗免疫球蛋白抗体对人类免疫球蛋白具有高度亲和性,从而允许这种结合随时间稳定。

[0160] 未纯化的抗 D 和抗 Fya 抗体分别以 30 和 10 μ g/ml 的终浓度与用 80 μ g/ml 抗 Fc 抗体功能化的珠子一起使用。

[0161] 使用血型抗体的致敏在 pH 7.4 的 PBS 中,在 37°C 下搅拌进行 1 小时。

[0162] 致敏后,将珠子洗涤几次,然后 +4°C 储存在 pH7.4 的 PBS 中。

[0163] 带有固定化的抗 mu 抗体的珠子可以用抗 S IgM 致敏。事实上,抗 mu 抗体允许结合 IgMs。该抗 mu 多克隆抗血清的亲和性足以确保结合随时间稳定。将未纯化的抗 S 抗体固定化在用 40 μ g/ml 抗 mu 抗体功能化的珠子上。致敏在 pH 7.4 的 PBS 中,在 37°C 下搅拌进行 1 小时。致敏后,将珠子洗涤几次,然后 +4°C 储存在 pH7.4 的 PBS 中。

[0164] 在与血红细胞温育之前 (自身测试),将用血型抗体致敏的珠子与对照的区域 34 珠子 (ISB) 和对照的区域 98 珠子 (BB) 进行混合。

[0165] 1.2.2. 血红细胞的标记

[0166] 血红细胞用荧光化合物的标记可以使用各种原理来进行。在本实施例中,血红细胞使用 PKH26 进行标记,它是插入到血红细胞膜中的荧光团。因此,可以按照相同的步骤标记各种不同表型的血红细胞 (图 3)。

[0167] PKH26 是由 Sigma 公司销售的荧光探针。该探针在 551nm 处具有最大激发,在 567nm 处具有最大发射。

[0168] 试剂盒包含荧光探针,该探针具有长的脂族链,使其可以插入到细胞膜的脂质层中,试剂盒还包含不含盐、缓冲液或有机溶剂的等渗水性稀释剂。该稀释剂能够将细胞存活性、标记物溶解性和标记效率维持在高水平。

[0169] 用 PKH26 标记血红细胞使用制造商推荐的步骤来进行。将这样标记的血红细胞在 Stabiliss 缓冲液中稀释,在 +4°C 下储存在暗处。

[0170] 通过按照凝胶技术进行表型定型分析,验证了标记的血红细胞随时间的质量、存活性和稳定性。将标记的血红细胞的抗原完整性与未标记的血红细胞进行比较。通过使用来自 Bio-Rad 的“Bioplex 200”装置进行荧光测定,研究了荧光标记本身的质量和稳定性。

[0171] 1. 2. 3. 血型抗体珠子与血红细胞温育

[0172] 为了证实根据本发明的技术进行分型的可行性并验证其特异性,发明人以单一的方式进行了反应。在这种情况下,将用血型抗体官能化的珠子与各种不同表型的血红细胞单独进行温育。

[0173] 在多重反应的情况下,将不同血液样品单独与具有不同的珠子区域并用不同特异性抗体致敏的珠子进行接触。这种类型的实验可以验证在同样的测试样品中检测几种抗原性血型特异性的可能性。

[0174] 将致敏的珠子与血红细胞混合,以获得大约 50 到 150 的血红细胞 / 珠子比率。将混合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。

[0175] 温育后,将珠子 - 血红细胞复合物用蒸馏水洗涤几次。

[0176] 1. 2. 4. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”自动装置通过流式细胞术进行测量

[0177] 在最后一次洗涤后以及测量之前,将复合物用 185 μ l “包被液体”介质稀释。对于每个测试,将 25 μ l 悬浮液自动注射到装置中。测量通过捕获每种区域的 250 个珠子来进行。

[0178] 对于每个分型 / 表型定型系列来说,进行了系统对照,以证实所研究的反应的特异性。

[0179] 1. 3. 单式 / 多重表型定型 / 分型实施例

[0180] 本系列测试的目的是证实在单一和 / 或多种方式中对血红细胞进行表型定型 / 分型的可行性。选择 D、Fya 和 S 抗原作为模型。用抗人类免疫球蛋白或抗 mu 链抗体致敏的珠子被用于固定化抗 D、抗 Fya 和抗 S 抗体。

[0181] 1. 3. 1. RH D 阳性血红细胞的单一表型定型

[0182] 将用抗 D 抗体致敏的珠子与用 PKH26 标记的 Rh D 阳性和 Rh D 阴性血红细胞进行温育,使用的血红细胞数 / 珠子数比率为 150。

[0183] 使用了两种 RH D 阳性血红细胞和两种 RH D 阴性血红细胞。将每种样品双份注射到装置中。

[0184] RH D 阳性血红细胞产生大约 21000 到 25000RFI 的强烈阳性信号,而 RH D 阴性血红细胞显示出 40 到 400RFI 之间的阴性信号。

[0185] ISB 34 对照珠子给出大约 6500RFI 的信号, BB 98 对照珠子给出低于 1000RFI 的

信号,证实了结果的有效性。进行的各种不同的阴性对照显示出 15 到 400RFI 之间的信号,证实了反应的特异性。RH D 阳性和 RH D 阴性红细胞事实上不与没有抗 D 抗体的珠子结合。

[0186] 这些结果证实了非常清楚地辨别 RH D 阳性和 RH D 阴性红细胞、从而鉴定红细胞表面上的 D 抗原的可能性。

[0187] Fya 和 S 红细胞的单一表型定型可以根据同样的原理,使用同种型 G 特异性或同种型 M 特异性的抗体来进行。

[0188] 1. 3. 2. D、Fya 和 S 红细胞的多重表型定型

[0189] 多重表型定型的原理概述在图 5A 到 5D 中。

[0190] 在这种情况下,将用抗 D 抗体致敏的区域 19 珠子,与用抗 Fya 抗体致敏的区域 21 珠子,也与用抗 S 抗体致敏的区域 71 珠子进行混合。

[0191] 将该珠子的混合物与具有不同的 D、Fya 和 S 表型的红细胞温育 :D+Fya+S+/D+Fya-S-/D-Fya+S-/D-Fya-S-/D-Fya-S+/D-Fya+S+/D+Fya-S+/D+Fya+S-。使用的红细胞数 / 珠子数比率是 50。

[0192] 当用给定抗体致敏的珠子与具有相应抗原特异性的红细胞结合时,获得了 13000 到 29000RFI 之间的阳性信号。

[0193] 在测量到的荧光信号与用于执行测试的红细胞的表型之间,观察到了极好的关联性。

[0194] 当用抗体致敏的珠子与不带有相应抗原的红细胞进行接触时,获得了低于 1000RFI 的信号。

[0195] 此外,用没有用抗体致敏的珠子进行的对照,产生了与所用的红细胞无关的阴性信号。

[0196] 这些结果证明了测量到的信号是特异性的 :珠子 - 红细胞的结合只在包含了抗原 - 抗体对的情况下才发生。

[0197] 使用对照珠子 ISB 34(11000RFI) 和 BB 98(低于 1000RFI) 获得的结果证实了分析的有效性。

[0198] 测试内变异系数在 1% 到 10% 之间,证明了令人满意的测试内可重复性。

[0199] 这些结果证明了根据本发明的技术进行红细胞的三参数多重表型定型的可行性。

[0200] 1. 3. 3. 直接 Coombs 阳性 (CD+) 红细胞的多重表型定型

[0201] 根据图 6 中描述的原理,使用微珠的多重方法可以同时鉴定 CD+ 的性质并对红细胞进行表型定型。

[0202] 将用抗 Fc 抗体致敏的区域 32 珠子与分别用抗 D、抗 Fya 和抗 S 抗体致敏的区域 19、21 和 71 珠子混合。在体内用抗体致敏的 CD+ 红细胞,可以与区域 32 珠子携带的抗人类免疫球蛋白结合,从而可以鉴定 CD+ 的特征。此外,根据红细胞膜上存在的特异性,这些红细胞也能结合携带有特异性针对 D、Fya 和 S 抗原的抗体的区域 19、21 和 71 珠子。

[0203] 使用了大约 40 的红细胞数 / 珠子数比率来验证本方法。

[0204] ISB 34 和 BB 98 对照珠子产生了预期的信号,即分别为大约 13000RFI 和低于 1000RFI,证实了结果的有效性。

[0205] 使用用抗人类免疫球蛋白抗体致敏的区域 32 珠子,两种 CD+ 血红细胞产生了高于 30000RFI 的阳性信号。使用该同样的珠子区域,两种 CD 阴性血红细胞就它们本身而言产生了低于 500RFI 的阴性信号。这些结果证明了使用事先结合到给定珠子区域的珠子上的抗球蛋白抗体,利用其特异性结合鉴定 CD+ 血红细胞的可能性。

[0206] 此外,结果还证实了 CD+ 血红细胞的红细胞抗原的多重表型定型,可以与 CD+ 本性的鉴定同时进行。事实上,一种 CD+ 血红细胞的表型被定型为 D+Fya-S-,另一种为 D+Fya+S+。

[0207] 按照常规技术,使用 IgM 类型的抗 S 抗体,验证了这两个样品的 S 表型。获得的结果与根据新技术获得的结果完全关联。

[0208] 另一方面,对于抗 Fya 表型来说,不能执行该同样的分析。事实上,没有 IgM 类型的用于血红细胞表型定型的反应物。

[0209] 但是,对于被分析的 CD+ 血红细胞的 Fya 表型,观察到了差异,这证实了结果的有效性,并使排除非特异性结合的现象成为可能。

[0210] 对于大多数样品来说,变异系数在 1% 到 5% 之间,显示出令人满意的测试内可重复性。

[0211] 实施例 2:非典型抗体筛选——单一和多重方法

[0212] 非典型抗体筛选 (AAS) 一般按照最灵敏的方法进行 (通过由 Bio-Rad 公司销售的“ScanGel”级的凝胶、由 Diamed 公司以名称“Diamed ID”销售的凝胶进行过滤,或者按照微孔板格式的免疫吸附方法,由 Immucor 公司销售的**Capture**[®]级)。在前两种情况下,使用了表型已知的血红细胞,并将它们与待检测的血清或血浆样品温育。可能存在的特异性抗体,结合在血红细胞的表面上。然后使用含有抗人类免疫球蛋白抗体的反应物显示它们。在阳性反应的情况下,形成了血红细胞凝集物。如果反应是阴性的,血红细胞是游离的,不形成凝集物。通过使用具有或不具有各种抗原的血红细胞组,可以确定样品中存在的抗体的特异性。

[0213] 本系列试验的目的是使用其上经聚 L- 赖氨酸 (PLL) 固定化有表型已知的血红细胞的珠子,按照本发明的技术,使用流式细胞仪,进行 IgG 类型的血型抗体的检测。

[0214] 使用藻红蛋白 (PE) 标记的抗 Fc 抗体结合物来检测结合的非典型抗体。

[0215] 2.1- 材料和反应物

[0216] - 具有珠子区域 17、21、32 和 36 的荧光超顺磁性珠子

[0217] 珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。

[0218] 区域 34 (内标珠子 (ISB)) 和区域 98 (空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。

[0219] 分子量为 70000-130000 的聚 L- 赖氨酸 (PLL)。

[0220] - 结合有藻红蛋白 (PE) 的抗人类免疫球蛋白单克隆 IgG 抗体,克隆 125A15 (Bio-Rad), 结合比例为每当量 PE, 2 当量抗体。

[0221] - 抗 D (克隆 H2D5D2F5) 和抗 Fya (克隆 5T72A13F5A93) 单克隆 IgG 抗体 (Bio-Rad)。

[0222] - 抗 RH1 抗体国家标准品 (Centre de Référence pour les Groupes Sanguins [血型参比中心], 法国)。

[0223] - 以名称“ScanCell”和“ScanPanel”销售的用于非典型抗体筛选的表型已定型的血红细胞 (Bio-Rad)。

- [0224] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) proclin)。
- [0225] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。
- [0226] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。
- [0227] 2.2- 流程
- [0228] 2.2.1. 用 PLL 致敏珠子
- [0229] 将区域 17、21、22 和 36 中性珠子与 25 μ g/ml PLL, 在 pH7.4 的 PBS 中, 在环境温度下搅拌温育 18 小时。在该步骤结束时, 将珠子在 pH7.4 的 PBS 中洗涤, 然后用于固定化血红细胞。
- [0230] 2.2.2. 血红细胞固定化在珠子上
- [0231] 通过将 PLL 包被的珠子与血红细胞进行混合来制备珠子-血红细胞反应物, 其中血红细胞数/珠子数比率等于 100。温育在 pH7.4 的 PBS 中, 在环境温度下搅拌进行 5 分钟。每个珠子区域被用于固定化单一类型的已知和不同表型的血红细胞。在该步骤结束时, 将珠子-PLL-血红细胞反应物用 pH7.4 的 PBS 洗涤, 然后用蒸馏水洗涤。将这样制备的珠子-血红细胞反应物在 +4 $^{\circ}$ C 下储存在 pH7.4 的 PBS 中。
- [0232] 利用 PLL 将血红细胞固定化在珠子上的原理概述在图 4 中。
- [0233] 血红细胞通过 PLL 的结合足够牢固, 使得它们在测试和分析过程中不会分离。
- [0234] 在与被筛选的抗体温育前, 将珠子-PLL-血红细胞反应物与区域 34 (ISB) 和区域 98 (BB) 对照珠子进行混合。
- [0235] 2.2.3. 珠子-PLL-血红细胞反应物与抗体的反应
- [0236] 在单一反应的情况下, 单独使用珠子-血红细胞反应物并与不同的抗体温育, 以便验证反应的特异性。
- [0237] 为了执行多重反应, 将用各种不同的已知表型的血红细胞致敏的珠子进行混合, 然后与待检测的抗体或多种抗体温育。
- [0238] 在与珠子-PLL 血红细胞反应物温育前, 将待测量的抗体在富含蛋白的缓冲液 (0.15M NaCl, 60g/l BSA) 中或在 pH7.4 的 PBS 中进行稀释。
- [0239] 在所有情况下, 将 125 μ l 珠子-PLL-血红蛋白反应物与 125 μ l 抗体混合, 然后在 37 $^{\circ}$ C 下搅拌温育 60 分钟。
- [0240] 温育后, 将复合物洗涤几次。
- [0241] 2.2.4. 使用 PE 标记的抗 Fc 抗体显示复合物
- [0242] 为了检测珠子-PLL-血红细胞抗体复合物, 使用了用 PE 标记的特异性针对人类免疫球蛋白 Fc 片段的抗体。该抗体结合物以在 pH7.4 的 PBS 中 60 μ g/ml 的浓度使用, 并与复合物在 37 $^{\circ}$ C 下搅拌温育 15 分钟。然后将复合物用蒸馏水洗涤。
- [0243] 2.2.5. 测量
- [0244] 在最后一次洗涤后以及测量之前, 将复合物用 185 μ l 包被液体处理。对于每个测试, 将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子来进行。
- [0245] 对于每个系列来说, 进行了系统对照, 以证实所研究的反应的特异性。对于每种被测试的抗体来说, 使用不带有相应抗原特异性的表型确定的血红细胞进行阴性对照。
- [0246] 2.3- 单式/多重 AAS 实施例
- [0247] 2.3.1. 抗 D 单克隆抗体在富含蛋白的介质中的多重检测

[0248] 使用各种不同区域的、用表型已知的血红细胞致敏的珠子混合物来检测抗体。

[0249] 用 PLL 包被的区域 17 珠子被用于固定化表型为 D、CC、ee 的血红细胞。将表型为 D、cc、EE 的血红细胞固定化在区域 32 珠子上,将表型为 d、cc、ee 的血红细胞固定化在区域 36 珠子上。

[0250] 包被有 D 阴性血红细胞的区域 36 珠子用作阴性对照,以验证反应的特异性。

[0251] 将致敏的珠子混合,然后与以各种不同浓度制备在 0.15M NaCl 缓冲液、60g/l BSA 中的抗 D 单克隆抗体温育。检测使用 PE 标记的抗 Fc 抗体结合物进行。

[0252] 该方法的原理概述在图 7 中。

[0253] 结果在图 8 中给出。

[0254] 观察到了对于不具有 D 抗原的血红细胞(珠子 36)的应答表现出对应于阴性应答的小于或等于 1000RFI 的值。另一方面,对于支持有具有 D 抗原的血红细胞的珠子(珠子 32 和 17)来说,获得的值要高得多(大约为 2000 到超过 7000RFI)。此外,阳性信号与掺入的抗 D 抗体的浓度相关,本格式的检测极限是大约 5ng/ml。

[0255] 对于同样浓度的抗 D 抗体来说,可以注意到阳性率随着连接在珠子表面上的血红细胞的表型而变化。这种现象在免疫血液学中是已知的,与 D 抗原的抗原性表达的差异有关。

[0256] 这些结果证明了使用所考察的多重格式进行检测的特异性。

[0257] 此外,区域 34 和 98 对照珠子给出了预期的信号水平,即分别大约为 11000RFI 和低于 1000RFI。

[0258] 2.3.2. 参比抗 D 多克隆抗体在参比血清中的单一检测

[0259] 使用了 CNRGS[国立血型参比中心(National Blood Group Reference Centre)]抗 D 抗体国家参比标准品来进行抗 D 抗体在接近血浆的富含蛋白介质中的单一检测。

[0260] 将表型为 D、cc、EE 的血红细胞固定化在区域 32 珠子上。使用固定化在区域 21 珠子上的表型为 d、cc、ee 的血红细胞分别进行阴性对照。标准品在含有 60g/l BSA 的 0.15M NaCl 缓冲液中稀释。

[0261] 图 9 中给出的结果显示,在存在 RH D 表型的血红细胞的情况下,参比抗体可以在低于 1ng/ml 的浓度检测到。动态范围线性扩展到至少 100ng/ml,在存在带有 RH D 阴性血红细胞的珠子的情况下获得的结果低于 650RFI。

[0262] 对照珠子(ISB 和 BB)的值使得验证观察到的结果成为可能。

[0263] 2.3.3. 几种单克隆血型抗体的多重检测

[0264] 在这种情况下,将区域 17 珠子用表型为 D、CC、ee、Fya-b+ 的血红细胞致敏,将区域 32 珠子用表型为 dd、cc、ee、Fya+b- 的血红细胞致敏,将区域 21 珠子用表型为 D、cc、EE、Fya-b+ 的血红细胞致敏。

[0265] 将三种类型的珠子混合,然后与分开使用或作为混合物的抗 D 和抗 Fya 单克隆抗体温育。所有步骤在 pH7.4 的 PBS 中进行。该方法的原理在图 10 中给出。

[0266] 区域 34 和 98 内部对照珠子产生了预期的信号水平,即分别为大约 11000RFI 和低于 1000RFI。在珠子致敏过程中使用的血红细胞的表型,与反应混合物中存在的抗体之间,观察到了完全的关联。因此,当抗 D 和抗 Fya 抗体在存在带有相应抗原的血红细胞的情况下温育时,观察到了大约为 6000 到 25000RFI 的阳性信号。抗体与不带有相应抗原的血红

细胞的温育产生了低于 1000RFI 的阴性信号。反应是特异的。

[0267] 这些结果证实了所调查的用于进行同样样品中存在的几种抗体的多重检测的方法的有效性。

[0268] 实施例 3:交叉配血

[0269] 本分析的目的是在将一个或多个血细胞浓缩物从供体输血到接受者的情况下,确保存在完全的供体-接受者相容性,并且在适合时,证实与接受者血清中针对供体血红细胞携带的血型结构的抗体的存在相关的不相容性。

[0270] 为了证实在本发明的技术中进行交叉配血的可能性,使用了荧光珠子通过聚 L-赖氨酸 (PLL) 来固定化供体的血红细胞。这种固定化通过将珠子与供体血红细胞临时直接接触最短时间 (5 分钟) 来进行。

[0271] 然后将这些珠子放置在接受者的血浆或血清中。可能存在的接受者针对供体抗原的抗体,通过用藻红蛋白 (PE) 标记的抗 Fc 抗体结合物来检测。

[0272] 3.1. 材料与反应物

[0273] - 具有珠子区域 38 的荧光超顺磁性珠子

[0274] 珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。

[0275] 区域 34 (内标珠子 (ISB)) 和区域 98 (空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。

[0276] - 分子量为 70000-130000 的聚 L-赖氨酸 (PLL)。

[0277] - 结合有藻红蛋白 (PE) 的抗人类 IgG 小鼠 IgG 单克隆抗体克隆 125A15 (Bio-Rad), 结合比例为每当量 PE, 2 当量抗体。

[0278] - 保存在 SAG-MAN 介质中的表型确定的血红细胞浓缩物 (EFSNord de France)。

[0279] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 销售的稀释介质。

[0280] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) proclin)。

[0281] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。

[0282] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。

[0283] 3.2. 流程

[0284] 3.2.1. 用 PLL 致敏珠子

[0285] 通过将区域 38 中性珠子与 50 μ g/ml PLL, 在 pH7.4 的 PBS 中, 在环境温度下搅拌温育 18 小时, 制备了珠子-PLL 反应物。在该步骤结束时, 将珠子-PLL 反应物在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中洗涤, 然后用于固定化供体血红细胞。

[0286] 3.2.2. 供体血红细胞在珠子上的临时固定化

[0287] 将珠子-PLL 反应物与各种不同供体的血红细胞进行接触, 每个供体分别处理。

[0288] 将 25 微升珠子-PLL 反应物与 25 μ l 在 ScanLiss 中稀释的供体血红细胞进行混合, 血红细胞数量与珠子数量的比率等于 100。温育在环境温度下搅拌进行 5 分钟。

[0289] 温育后, 将珠子-PLL-血红细胞复合物用蒸馏水洗涤几次, 然后加入到 25 μ l pH 7.4 的 PBS-BSA 10g/l 中。

[0290] 利用 PLL 将血红细胞固定化在珠子上的原理概述在图 4 中。

[0291] 血红细胞通过 PLL 的连接足够牢固, 防止了它们在测试和分析过程中的分离。

[0292] 然后将这样制备的珠子-PLL-血红细胞复合物和区域 34 和区域 98 对照珠子, 与待测试的样品进行温育。

[0293] 3. 2. 3. 珠子 -PLL- 血红细胞复合物与抗体的反应

[0294] 将 25 微升珠子 -PLL- 血红蛋白复合物与 50 μ l 待测试的患者血浆或血清混合, 然后在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。

[0295] 温育后, 将复合物用 pH7. 4 的 PBS 缓冲液洗涤几次。

[0296] 3. 2. 4. 使用 PE 标记的抗 Fc 抗体对复合物进行观察

[0297] 为了检测珠子 -PLL- 血红细胞 - 抗体复合物, 使用了用 PE 标记的特异性针对人类免疫球蛋白 Fc 片段的抗体。该抗体结合物以在 pH7. 4 的 PBS 中 5 μ g/ml 的浓度使用, 并与复合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。然后将复合物用 pH7. 4 的 PBS 缓冲液洗涤几次。

[0298] 3. 2. 5. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”装置进行流式细胞术测量

[0299] 在最后一次洗涤后以及测量之前, 将复合物用 35 μ l 包被液体处理。对于每个测试, 将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子来进行。

[0300] 使用了各种不同的供体血红细胞。对于每个供体的血红细胞来说, 测试了阴性对照以证实所研究的反应的特异性。

[0301] 3. 3. 交叉配血实施例

[0302] 使用 PLL 包被的区域 38 珠子固定化来自三个不同供体的血红细胞: 一个供体表型为 D、cc、kk、SS, 一个供体表型为 dd、CC、kk, 一个供体表型为 dd、cc、K+、ss。每个供体 - 接受者对被独立测试。

[0303] 将致敏的珠子与已知表现抗 D、抗 c、抗 K 或抗 S 反应的各种不同血清温育。这些血清代表了可能潜在地显示出与所选的供体血红细胞不相容的交叉配血的接受者的血清。选择这些血清以便与在结构、抗原呈递以及血红细胞上的抗原密度方面不同的血液抗原系统进行反应。

[0304] 还测试了 12 个供体血浆并用作阴性对照, 以便证实反应的特异性。

[0305] 检测使用 PE 标记的抗 Fc 抗体结合物进行。

[0306] 结果在下面的表 I 中给出。

[0307] 表 I : 交叉配血

[0308]

接受者血浆/血清	供体血红细胞	预期结果	观察结果	输血危险
抗 D 血清 No. 42	供体 0R2R2 (D)	+	+	不相容
	供体 0rr (dd)	-	-	相容
抗 c 血清 No. 62	供体 0R2R2 (cc)	+	+	不相容
	供体 0R1R1 (CC)	-	-	相容
	供体 0rr (cc)	+	+	不相容
抗 K 血清 No. 70	供体 0R2R2 (kk)	-	-	相容
	供体 0R1R1 (kk)	-	-	相容
	供体 0rr (K+)	+	+	不相容
抗 S 血清 No. 54	供体 0R2R2 (SS)	+	+	不相容
	供体 0rr (ss)	-	-	相容

[0309] 12 个供体血浆使得能够将平均阴性值确定为低于 1100RFI。

[0310] 没有显示出与供体血红细胞的不相容性的血清产生的值为低于 1000RFI, 样品值 / 平均阴性值比率接近于 1。

[0311] 另一方面, 与供体血红细胞显示出不相容性的血清给出的结果为大约 3000 到 27000RFI, 样品值 / 平均阴性值比率为大约 3 到 27。

[0312] 此外, 区域 34 和 98 对照珠子给出了预期信号水平, 即分别为大约 8000RFI 和低于 1000RFI。

[0313] 本方法能够在 Rhesus、Kell 或 MNS 系统这样的不同血液系统中清楚地证明供体 / 接受者的不相容性。

[0314] 实施例 4: 反向 (“血清” 或 “Simonin”) ABO 血型分型测试

[0315] 本分析的目的是为了显示在血液样品中, 针对 A 和 / 或 B 血型抗原的天然抗体的存在或不存在。本分析的结果, 与直接分析中获得的结合相组合, 能够建立起样品的 ABO 血型。在反向 ABO 血型分型中使用的样品可以是血清、血浆或全血样品。

[0316] 为了证实在本发明的技术中执行这种应用的可能性, 使用了荧光珠子通过聚 L- 赖氨酸 (PLL) 来固定化已知 ABO 血型的血红细胞。

[0317] 然后将这些珠子与待测试的样品进行接触。使用用藻红蛋白 (PE) 标记的抗人类免疫球蛋白抗体结合物来检测抗体的存在。

[0318] 4.1. 材料和反应物

[0319] - 具有珠子区域 38 和 71 的荧光超顺磁性珠子

[0320] 珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。

- [0321] 区域 34(内标珠子 (ISB)) 和区域 98(空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。
- [0322] - 分子量为 70000-130000 的聚 L- 赖氨酸 (PLL)。
- [0323] - 与藻红蛋白 (PE) 结合的抗人类 IgM 山羊多克隆抗体 7374V (Bio-Rad)。
- [0324] - 用 EDTA 处理的来自样品的 A 型和 B 型红细胞 (EFS-Rungis)。
- [0325] - 用 EDTA 处理的来自样品的血浆和全血样品 (EFS-Rungis)。
- [0326] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 销售的稀释介质。
- [0327] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) proclin)。
- [0328] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。
- [0329] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。
- [0330] 4.2. 流程
- [0331] 4.2.1. 用 PLL 致敏珠子
- [0332] 将区域 38 和区域 71 中性珠子与 50 μ g/ml PLL, 在 pH7.4 的 PBS 中, 在环境温度下搅拌温育 18 小时。在该步骤结束时, 将珠子在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中洗涤, 然后用于固定化红细胞。
- [0333] 4.2.2. 来自样品的红细胞在珠子上的固定化
- [0334] 通过将 PLL 包被的珠子与在 ScanLiss 中稀释的红细胞进行混合来制备珠子-红细胞反应物, 其中红细胞数与珠子数的比率等于 100。温育在环境温度下搅拌进行 5 分钟。每个珠子区域被用于固定化单一类型的已知血型的红细胞。在该步骤结束时, 将珠子-PLL-红细胞反应物用蒸馏水洗涤几次。将这样制备的珠子-红细胞反应物在 +4°C 下储存在 pH7.4 的 PBS-BSA 10g/l 中。
- [0335] 利用 PLL 将红细胞固定化在珠子上的原理概述在图 4 中。
- [0336] 红细胞通过 PLL 的连接足够牢固, 防止了它们在测试和分析过程中的分离。
- [0337] 在与被筛选的抗体温育前, 将珠子-PLL-红细胞反应物与区域 34 (ISB) 和区域 98 (BB) 对照珠子进行混合。
- [0338] 4.2.3. 珠子-PLL-红细胞反应物与抗体的反应
- [0339] 在这种情况下, 待测试的样品是血浆或全血。
- [0340] 将 25 微升珠子-PLL-红细胞反应物与 50 μ l 待测试样品进行混合, 然后在 22°C 下搅拌温育 15 分钟。
- [0341] 温育后, 将复合物用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤几次。
- [0342] 4.2.4. 使用 PE 标记的抗免疫球蛋白抗体对复合物进行观察
- [0343] 为了检测珠子-PLL-红细胞-抗体复合物, 使用了用 PE 标记的特异性针对人类免疫球蛋白的抗体。该抗体结合物以在 pH7.4 的 PBS 中 5 μ g/ml 的浓度使用, 并与复合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。然后将复合物用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤几次。
- [0344] 4.2.5. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”装置进行流式细胞术测量
- [0345] 在最后一次洗涤后以及测量之前, 将复合物用 35 μ l 包被液体处理。对于每个测试, 将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子来进行。
- [0346] 使用了各种不同的已知血型的红细胞。对于每种红细胞来说, 测试了阴性对照以证实所研究的反应的特异性。
- [0347] 4.3. 在血浆或全血类型的样品中进行血型 ABO 血型分型测试的实施例

[0348] 使用几种不同区域的、用已知并且不同血型的血红细胞致敏的珠子来检测抗体。用 PLL 包被的区域 38 珠子被用于固定化 A 型血红细胞。用 PLL 包被的区域 71 珠子被用于固定化 B 型血红细胞。

[0349] 将致敏的珠子混合,然后与 A、B、AB 和 O 型的血浆或全血类型的样品温育,以测试阳性情况和阴性情况;阴性情况使得可以对于每种珠子 -PLL- 血红细胞反应物验证反应的特异性。检测使用 PE 标记的抗人类免疫球蛋白抗体结合物进行。

[0350] 结果在下面的表 II 中给出:

[0351] 表 II:在血浆或全血类型的样品中的血清 ABO 血型分型测试

样品		反应物	
		R38/GR A 珠子	R71/GR B 珠子
血型 O	血浆类型	+	+
	全血类型	+	+
血型 A	血浆类型	-	+
	全血类型	-	+
血型 B	血浆类型	+	-
	全血类型	+	-
血型 AB	血浆类型	-	-
	全血类型	-	-

[0353] 不具有针对存在的血红细胞(珠子 -PLL- 血红细胞反应物)的抗体的样品,显示出低于 1000RFI 的值。

[0354] 另一方面,对于具有针对存在的血红细胞的抗体的样品来说,获得的值要高得多(从 2900 到 19000RFI)。

[0355] 对于任何类型的样品都获得了这些结果,不论它是血浆还是全血类型的。

[0356] 此外,区域 34 和 98 对照珠子给出了预期的信号水平,即分别为大约 8000RFI 和低于 1000RFI。

[0357] 这些结果证实了所考察的方法,对于在血浆或全血类型的样品中进行天然抗体检测的有效性。

[0358] 实施例 5:全血中的血型分型

[0359] 在实施例 1 中,通过使用荧光珠子固定化抗血红细胞抗体,并用与“Bioplex 200”装置(Bio-Rad)的报告激光波长相容的荧光化合物标记样品的血红细胞,证实了本发明的技术进行血红细胞分型的可能性。

[0360] 这些试验的目的是显示在分型应用中使用的样品可以是血细胞颗粒样品,但是也可以是全血样品。

[0361] 5.1- 材料和反应物

[0362] - 具有珠子区域 36 和 52 的荧光超顺磁性珠子

- [0363] 珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。
- [0364] 区域 34 (内标珠子 (ISB)) 和区域 98 (空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。
- [0365] - 抗鼠 IgG 山羊多克隆抗体, 编号 115-005-164 (Jackson Imm. Lab.)
- [0366] - 抗鼠 IgM 山羊多克隆抗体, 编号 115-005-020 (Jackson Imm. Lab.)
- [0367] - 抗 B 单克隆 IgG 抗体, 克隆 X9 (Bio-Rad)。
- [0368] - 抗 A 单克隆 IgM 抗体, 克隆 15750F7 (Bio-Rad)。
- [0369] - 用 EDTA 处理的血细胞颗粒和全血样品 (EFS-Rungis)。
- [0370] - PKH26 细胞标记试剂盒 (Sigma)。
- [0371] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 和“Stabiliss”编号 86550 销售的稀释介质。
- [0372] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠, 150mM NaCl, 0.1% (v/v) proclin)。
- [0373] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。
- [0374] PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。
- [0375] 5.2- 流程
- [0376] 5.2.1. 使用针对血型的抗体致敏珠子
- [0377] 将抗体固定化在珠子表面上的原理概述在图 2 中。
- [0378] 区域 36 珠子被用于共价固定化抗鼠 IgG 抗体。
- [0379] 区域 52 荧光珠子被用于共价固定化抗鼠 IgM 抗体。珠子表面上存在的羧基按照涉及羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的技术进行活化。
- [0380] 因此蛋白可以通过它们的胺基固定化。
- [0381] 将这样制备的珠子在 +4°C 下, 以 3mg/ml 的浓度储存在含有 10% (w/v) BSA、0.5% (v/v) Tween 20 和 0.09% (w/v) 叠氮化钠的 pH7.4 的 PBS 中。
- [0382] 携带有固定化的抗鼠 IgG 的珠子可以使用抗 B 抗体致敏。携带有固定化的抗鼠 IgM 的珠子可以使用抗 A 抗体致敏。事实上, 抗免疫球蛋白可以通过它们的 Fc 片段结合免疫球蛋白。因此, 使用这种原理将抗红细胞抗体非共价固定化在珠子上。每个珠子区域用不同特异性的抗体致敏。选择的抗免疫球蛋白抗体对于鼠免疫球蛋白具有高度亲和性, 使得这种结合随时间稳定。
- [0383] 未纯化的抗 A 和未纯化的抗 B 分别以 165 和 640 μ g/ml 的最终浓度, 与使用 40 μ g/mg 抗 Fc 功能化的珠子一起使用。
- [0384] 使用抗红细胞抗体的致敏在 pH7.4 的 PBS 中, 在 37°C 下搅拌进行 1 小时。
- [0385] 致敏后, 将珠子用 pH7.4 的 PBS 洗涤几次, 然后于 +4°C 下储存在 StabiLiss 中。
- [0386] 在与红细胞温育之前, 将用抗红细胞抗体致敏的珠子与区域 34 对照珠子 (ISB) 和区域 98 对照珠子 (BB) 进行混合。
- [0387] 5.2.2. 血红细胞的标记
- [0388] 血红细胞的标记按照实施例 1 使用 PKH26 进行 (图 3)。
- [0389] 用 PKH26 标记红细胞使用制造商推荐的步骤来进行。在血细胞颗粒样品的情况下, 将这样标记的红细胞在 StabiLiss 缓冲液中直接稀释, 或者在全血样品的情况下, 在将它们 StabiLiss 中稀释之前, 先在它们的血浆中稀释到 40% (v/v)。将稀释的样品在 +4°C 下储存在暗处。

[0390] 5.2.3. 抗血红细胞抗体 - 珠子和血红细胞的温育

[0391] 在这种情况下待测试的样品是血细胞颗粒或全血, 血红细胞含量上升到 40%。

[0392] 将致敏的珠子与样品混合, 以获得 50 到 100 的血红细胞数 / 致敏珠子数比率。混合物的温育在 StabiLiss 中, 在 22°C 下搅拌进行 15 分钟。

[0393] 温育后, 将珠子 - 血红细胞复合物用蒸馏水洗涤几次。

[0394] 5.2.4. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”装置进行流式细胞术测量

[0395] 在最后一次洗涤后以及测量之前, 将复合物用 35 μ l 包被液体处理。对于每个测试, 将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子来进行。

[0396] 对于每种致敏的珠子来说, 测试了阴性对照, 以验证所研究的反应的特异性。

[0397] 5.3- 在血细胞颗粒或全血类型的样品上进行多重分型的实施例

[0398] 多重分型的原理概述在图 11 中。

[0399] 将用抗 B 抗体致敏的区域 36 珠子与用抗 A 抗体致敏的区域 52 珠子、ISB 34 对照珠子和 BB 98 对照珠子混合。

[0400] 将该珠子混合物与血型为 O、A、B 或 AB 的样品温育, 血红细胞数 / 致敏的珠子数的比率为大约 50。

[0401] 结果在下面的表 III 中给出。

[0402] 表 III : 在血细胞颗粒或全血类型的样品上进行的多重分型

样品		多重反应物	
		R52/抗 A 珠子	R36/抗 B 珠子
血型 O	血细胞颗粒类型	-	-
	全血类型	-	-
血型 A	血细胞颗粒类型	+	-
	全血类型	+	-
血型 B	血细胞颗粒类型	-	+
	全血类型	-	+
血型 AB	血细胞颗粒类型	+	+
	全血类型	+	+

[0404] 使用珠子 - 抗 A 抗体反应物, A 阳性血红细胞产生的信号大于 30000RFI, 而 A 阴性血红细胞给出的信号为 30 到 50RFI。

[0405] 同样地, 使用珠子 - 抗 B 反应物, B 阳性血红细胞产生的信号大于 30000RFI, 而 B 阴性 B 血红细胞给出的信号为 30 到 50RFI。

[0406] 使用不论是血细胞颗粒形式还是全血形式的任何类型的样品, 都获得了这些结果。

[0407] 此外,区域 34 和区域 98 对照珠子给出了预期的信号水平,即分别为大约 7500RFI 和低于 1000RFI。

[0408] 这些结果证实了所考察的方法在血细胞颗粒或全血类型的样品中进行血型分型的有效性。

[0409] 实施例 6:非典型抗体筛选和鉴定——使用 10 种血红细胞的鉴定组的多重方法

[0410] 非典型抗体筛选 (AAS) 一般分两步进行:第一步在有限的血红细胞组上进行,其目的在于指明针对血型抗原的非典型抗体是否存在,而不能鉴定它们。当检测到抗体存在时,进行第二个步骤,以鉴定所讨论的抗体或多种抗体的特异性。该第二个步骤使用一组 10 种或以上的血红细胞来进行,数量取决于待鉴定的抗体混合物的复杂性。为了执行两个步骤,需要至少 350 μ l 的样品体积。本测试的目的是显示在单一测试中,使用待测试的血浆或血清单一测试样品 (50 到 100 μ l),直接鉴定样品中存在的非典型抗体的可行性。

[0411] 为了证实本发明的技术中这种应用的可行性,使用荧光珠子通过聚 L-赖氨酸 (PLL) 固定化血红细胞组。珠子区域的数量与组中血红细胞的种类数相同,每种珠子区域用于固定化组中具有已知和不同的表型的单一类型的血红细胞。

[0412] 将这些珠子混合并与待测试的样品接触,使用藻红蛋白 (PE) 标记的抗人类免疫球蛋白抗体结合物来检测非典型抗体。

[0413] 6.1- 材料与反应物

[0414] - 具有珠子区域 6、8、36、38、52、71、79、81、94 和 96 的荧光超顺磁性珠子

[0415] 珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。

[0416] 区域 34 (内标珠子 (ISB)) 和区域 98 (空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。

[0417] - 分子量为 70000-130000 的聚 L-赖氨酸 (PLL)。

[0418] - 结合有藻红蛋白 (PE) 的抗人类免疫球蛋白小鼠 IgG 单克隆抗体,克隆 125A15 (Bio-Rad)。

[0419] - 储存在 SAG-MAN 介质中的表型已知的血细胞浓缩物 (EFSNord de France)。

[0420] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 销售的稀释介质。

[0421] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠,150mM NaCl,0.1% (v/v) proclin)。

[0422] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。

[0423] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠, 2.7mM KCl, 136mM NaCl)。

[0424] - EDTA 处理的血浆样品 (EFS-Rungis)。

[0425] - 具有下列特异性的非典型血型抗体的血清样品:抗 D 抗体、抗 Jka 抗体、抗 Kell 抗体。

[0426] 6.2- 流程

[0427] 6.2.1. 用 PLL 致敏珠子

[0428] 通过将区域 6、8、36、38、52、71、79、81、94 或 96 的中性珠子与 50 μ g/ml PLL, 在 pH7.4 的 PBS 中,在环境温度下搅拌温育 18 小时,来制备珠子-PLL 反应物。在该步骤结束时,将珠子-PLL 复合物在 pH7.4 的 PBS 缓冲液中洗涤,然后用于固定化供体血红细胞。

[0429] 6.2.2. 血红细胞在珠子上的固定化

[0430] 通过将 PLL 包被的珠子与一组在 ScanLiss 中稀释的血红细胞进行混合,来制备珠子-PLL-血红细胞反应物,其中血红细胞数/珠子数比率等于 100。温育在环境温度下搅拌

进行 5 分钟。使用了 10 种具有已知和不同表型的血红细胞来建立鉴定组。每个珠子区域被用于固定化该组中单一类型的血红细胞。

[0431] 温育后,将珠子 -PLL- 血红细胞反应物用蒸馏水洗涤几次,然后放置在 pH7.4 的 PBS-BSA 10g/l 中。

[0432] 利用 PLL 将血红细胞固定化在珠子上的原理概述在图 4 中。

[0433] 血红细胞通过 PLL 的连接足够牢固,防止了它们在剩余的测试和分析过程中的分离。

[0434] 将这样制备的珠子 -PLL- 血红细胞反应物与区域 34 和区域 98 对照珠子进行混合,然后与待测试的样品温育。

[0435] 6.2.3. 珠子 -PLL- 血红细胞反应物与抗体的反应

[0436] 从不同血红细胞分别制备的珠子 -PLL- 血红细胞反应物混合物,构成了用于鉴定抗体的组。将 25 μ l 该组反应物与 100 μ l 待测试样品(血浆或血清)混合,然后在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。

[0437] 温育后,将复合物用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤几次。

[0438] 6.2.4. 使用 PE 标记的抗 Fc 抗体对复合物进行观察

[0439] 为了检测珠子 -PLL- 血红细胞-抗体复合物,使用了 PE 标记的特异性针对人类免疫球蛋白 Fc 片段的抗体。该抗体结合物以在 pH7.4 的 PBS 中 1 μ g/ml 的浓度使用,并与复合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。然后将复合物用 pH7.4 的 PBS 洗涤几次。

[0440] 6.2.5. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”装置进行流式细胞术测量

[0441] 在最后一次洗涤后以及测量之前,将复合物用 35 μ l 包被液体处理。对于每个测试,将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过每种区域捕获 250 个珠子的荧光信号来进行。

[0442] 6.3. 用于鉴定血浆和 / 或血清中非典型抗体的特异性的 AAS 的实施例

[0443] 使用 PLL 包被的不同区域的珠子固定化 10 种具有已知和不同表型的血红细胞:表型为 D、kk、Jka+b+ 的血红细胞固定化在区域 6 珠子上,表型为 D、Kk、Jka+b- 的血红细胞固定化在区域 8 珠子上,表型为 D、kk、Jka+b- 的血红细胞固定化在区域 36 珠子上,表型为 D、kk、Jka+b- 的血红细胞固定化在区域 38 珠子上,表型为 D、Kk、Jka+b+ 的血红细胞固定化在区域 52 珠子上,表型为 dd、Kk、Jka-b+ 的血红细胞固定化在区域 71 珠子上,表型为 dd、kk、Jka-b+ 的血红细胞固定化在区域 79 珠子上,表型为 dd、Kk、Jka+b+ 的血红细胞固定化在区域 81 珠子上,表型为 dd、kk、Jka-b+ 的血红细胞固定化在区域 94 珠子上,表型为 dd、kk、Jka+b+ 的血红细胞固定化在区域 96 珠子上。

[0444] 将致敏的珠子混合,然后与具有各种不同特异性的非典型血型抗体(抗 D 抗体、抗 Kell 抗体、抗 Jka 抗体)的各种不同血清,或用于重现抗体混合物这些血清的混合物进行温育。这些血清代表了可能潜在具有针对组中的血红细胞的抗体的阳性样品。它们的选择是为了检测在结构、抗原呈递以及血红细胞上的抗原密度方面不同的血型抗原系统。

[0445] 也测试了 8 种不具有非典型抗体的供体血浆,并用作阴性对照,以便验证反应的特异性。

[0446] 检测使用 PE 标记的抗人类 Fc 结合物来进行。

[0447] 结果在下表 IV 中给出。

[0448] 8 个供体血浆使得能够将平均阴性值确定为低于 1100RFI。

[0449] 不具有针对组中的血红细胞的抗体的血清,产生的值低于 1000RFI。

[0450] 另一方面,具有针对组中的血红细胞携带的抗原的抗体的血清,给出的结果为大约 2000 到 31000RFI,样品值 / 平均阴性值比率为大约 15 到 207。

[0451] 此外,区域 34 和 98 对照珠子给出了预期信号水平,即分别为大约 8000RFI 和小于或等于 1000RFI。

[0452] 本方法能够在 Rhesus、Kell 或 Kidd 系统这样的不同血液系统中清楚地证明非典型抗体的存在,并鉴定它们的特异性。

[0453]

表 IV: 用于在血浆和/或血清中鉴定非典型型抗体的特异性的 AAS

反应物 (珠子-PLL-红血球混合物)	样品													
	8 个阴性血浆		抗 D 血清 No.42		抗 Jka 血清 No.65		抗 Kell 血清 No.70		抗 D (No.42) + 抗 Jka (No.65) 血清		抗 D (No.42) + 抗 Kell (No.70) 血清		抗 Jka (No.65) + 抗 Kell (No.70) 血清	
珠子区域	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果	预期结果	观察结果
区域 6	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
区域 8	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
区域 36	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
区域 38	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
区域 52	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
区域 71	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+
区域 79	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
区域 81	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
区域 94	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
区域 96	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+

[0454] 实施例 7:同时进行的血细胞 ABO 分型测试和血清 ABO 分型测试, Ag-Ab combo

[0455] 在实施例 1 和 3 中,通过使用荧光珠子固定化抗血红细胞抗体,并用与“Bioplex

200”装置 (Bio-Rad) 的报告激光的波长相容的荧光化合物标记样品的血红细胞,证明了使用本发明的技术执行血红细胞上抗原的筛选的可能性。同样地,在实施方案 2、4 和 6 中,通过使用荧光珠子经聚 L- 赖氨酸 (PLL) 固定化血红细胞,并使用藻红蛋白 (PE) 标记的抗人类免疫球蛋白抗体结合物检测样品中针对存在的血红细胞的抗体的存在,证实了使用本发明的技术检测典型和非典型抗体的可能性。这些试验的目的是显示本发明的技术能够在同一个容器中筛选抗原和筛选抗体。

[0456] 为了证明这种双重测定的可行性,进行了多重测试,将用于检测待测试样品中血红细胞携带的 A 和 / 或 B 抗原的荧光珠子,与结合有已知 ABO 血型的血红细胞、用于检测待测试样品中存在的抗 A 和 / 或抗 B 抗体的荧光珠子相混合。待测试的样品是全血类型的样品。使用了上述的两种可视化系统:使用用于检测血红细胞表面上的抗原的荧光化合物标记样品的血红细胞,以及使用用于检测待测试样品的血浆中的抗体的 PE 标记的抗人类免疫球蛋白第二抗体。

[0457] 7.1- 材料与反应物

[0458] - 具有珠子区域 6、56、71、81 和 94 的荧光超顺磁性珠子珠子在 +4°C 下储存在 pH 7.4 的 PBS 缓冲液中。

[0459] 区域 34 (内标珠子 (ISB)) 和区域 98 (空白珠子 (BB)) 对照荧光珠子。

[0460] - 抗鼠 IgG 山羊多克隆抗体,编号 115-005-164 (Jackson Imm. Lab.)

[0461] - 抗鼠 IgM 山羊多克隆抗体,编号 115-005-020 (Jackson Imm. Lab.)

[0462] - 抗 B 单克隆 IgG 抗体,克隆 X9 (Bio-Rad)。

[0463] - 抗 A 单克隆 IgM 抗体,克隆 15750F7 (Bio-Rad)。

[0464] - 结合有藻红蛋白 (PE) 的抗人类 IgM 山羊多克隆抗体,编号 709-116-073 (Jackson Imm. Lab.)。

[0465] - PKH26 细胞标记试剂盒 (Sigma)。

[0466] - 分子量为 70000-130000 的聚 L- 赖氨酸 (PLL)。

[0467] - 用 EDTA 处理的全血样品 (EFS-Rungis)。

[0468] - 由 Bio-Rad 公司以名称“ScanLiss”编号 86442 和“Stabiliss”编号 86550 销售的稀释介质。

[0469] - 包被液或缓冲液 (10mM 磷酸钠,150mM NaCl,0.1% (v/v) proclin)。

[0470] - 牛血清白蛋白 (BSA) (Millipore)。

[0471] - PBS 缓冲液, pH 7.4 (7mM 磷酸钠,2.7mM KCl,136mM NaCl)。

[0472] 7.2- 流程

[0473] 7.2.1. 反应物的制备

[0474] 7.2.1.1 用于检测抗原的反应物的制备:用针对血型的抗体致敏珠子

[0475] 在珠子表面上固定化抗体的原理概述在图 2 中。

[0476] 区域 6 珠子用于共价固定化抗鼠 IgG。

[0477] 区域 56 荧光珠子用于共价固定化抗鼠 IgM。珠子表面上存在的羧基根据包含羟基琥珀酰亚胺和碳二亚胺的技术进行活化。

[0478] 因此,蛋白可以通过它们的胺基被固定化。

[0479] 这样制备的珠子在 +4°C 下,以 3mg/ml 的浓度储存在含有 10% (w/v) BSA、0.5%

(v/v) Tween 20 和 0.09% (w/v) 叠氮化钠的 pH7.4 的 PBS 中。

[0480] 带有固定化的抗鼠 IgG 的珠子可以用抗 B 抗体致敏。带有固定化的抗鼠 IgM 的珠子可以用抗 A 抗体致敏。因此, 抗红细胞抗体使用该原理非共价固定化在珠子上。每个珠子区域被具有不同特异性的抗体致敏。选择的抗免疫球蛋白允许结合随时间稳定。

[0481] 未纯化的抗 A 和未纯化的抗 B 分别以 165 和 649 $\mu\text{g/ml}$ 的终浓度使用。

[0482] 使用抗红细胞抗体的致敏在 pH 7.4 的 PBS 中, 在 37°C 下搅拌进行 1 小时。

[0483] 致敏后, 将珠子用 pH7.4 的 PBS 缓冲液洗涤几次, 然后于 +4°C 储存在 pH7.4 的 PBS-BSA 10g/l 中。

[0484] 7.2.1.2 用于检测抗体的反应物的制备: 使用 PLL 致敏珠子以及已知血型 and 已知表型的红细胞的固定化

[0485] 将区域 71、区域 81 和区域 94 的中性珠子与 50 $\mu\text{g/ml}$ PLL, 在 pH7.4 的 PBS 中, 在环境温度下搅拌温育 18 小时。在该步骤结束时, 将珠子用 pH7.4 的 PBS 洗涤, 然后用于固定化红细胞。

[0486] 通过将 PLL 包被的珠子与在 ScanLiss 中稀释的红细胞进行混合, 来制备珠子-PLL-红细胞反应物, 其中红细胞数与珠子数的比率等于 100。温育在环境温度下搅拌进行 5 分钟。每个珠子区域被用于固定化单一类型的血型已知的红细胞。该步骤结束时, 将珠子-PLL-红细胞反应物用蒸馏水洗涤几次。这样制备的珠子-红细胞反应物在 +4°C 下, 储存在 pH7.4 的 PBS-BSA 10g/l 中。

[0487] 利用 PLL 将红细胞固定化在珠子上的原理概述在图 4 中。

[0488] 红细胞通过 PLL 的连接足够牢固, 防止了它们在测试和分析过程中的分离。

[0489] 7.2.2. 标记待测试样品的红细胞

[0490] 红细胞的标记按照实施例 1 中的描述使用 PKH26 进行 (图 3)。

[0491] 用 PKH26 标记红细胞, 使用制造商推荐的方案来进行, 将这样标记的红细胞在它们的血浆中稀释到 40% (v/v)。

[0492] 7.2.3. 待测试样品与血型抗原-珠子和红细胞-珠子的温育待测试的样品是全血。

[0493] 将 50 微升待测试的样品与 25 μl 用已知表型的红细胞致敏的珠子 (珠子-PLL-红细胞反应物) 混合, 在 22°C 搅拌温育 10 分钟。

[0494] 然后加入 25 微升用抗红细胞抗体致敏的珠子 (珠子-抗红细胞抗体反应物), 在 22°C 搅拌温育 5 分钟。

[0495] 温育后, 将反应物用 PBS 缓冲液洗涤几次。

[0496] 7.2.4. 阳性复合物的检测

[0497] 被珠子-抗红细胞抗体反应物结合的红细胞 (珠子-抗体-红细胞复合物) 的检测, 由事先标记的样品的红细胞提供。

[0498] 为了检测样品的抗体与珠子-PLL-红细胞反应物的结合 (珠子-PLL-红细胞-抗体复合物), 使用了 PE 标记的特异性针对人类免疫球蛋白的抗体。该抗体结合物以在 pH7.4 的 PBS 中 5 $\mu\text{g/ml}$ 的浓度使用, 并与复合物在 37°C 下搅拌温育 15 分钟。然后将复合物用 pH7.4 的 PBS 洗涤几次。

[0499] 7.2.5. 使用来自 Bio-Rad 公司的“Bioplex 200”装置进行流式细胞术测量

[0500] 在最后一次洗涤后以及测量之前,将复合物用 35 μ l 包被液体处理。对于每个测试,将 25 μ l 悬浮液注射到装置中。测量通过捕获每种区域的 250 个珠子来进行。

[0501] 对于每种致敏的珠子,测试了阴性样品,以便验证所研究反应的特异性。

[0502] 7.3- 多重直接和间接 ABO 血型分型的实施例

[0503] PLL 包被的区域 94 珠子用于固定化 A1 血型血红细胞,PLL 包被的区域 71 珠子用于固定化 B 血型血红细胞,PLL 包被的区域 81 珠子用于固定化 O 血型血红细胞。将这些用已知表型的血红细胞致敏的珠子混合。

[0504] 将用抗 B 抗体致敏的区域 6 珠子与用抗 A 抗体致敏的区域 56 珠子、ISB 34 对照珠子和 BB 98 对照珠子混合。

[0505] 测试了血型为 A、B、AB 和 O 的全血样品。

[0506] 样品的血红细胞被事先标记,以便检测它们是否被抗血红细胞抗体-珠子结合。结合到血红细胞-珠子上的样品的抗体,使用 PE 标记的抗人类免疫球蛋白抗体结合物进行检测。

[0507] 结果在下面的表 V 中给出:

[0508] 表 V:多重检测和间接 ABO 血型分型

[0509]

多重测试					
抗原检测			抗体检测		
样品	R56/抗 A 珠子	R6/抗 B 珠子	R94/GR A1	R71/GR B	R81/GR O
			珠子	珠子	珠子
血型 O	-	-	+	+	-
血型 A	+	-	-	+	-
血型 B	-	+	+	-	-
血型 AB	+	+	-	-	-

[0510] 血细胞测试(抗原检测)的结果:

[0511] 珠子-抗 A 和珠子-抗 B 反应物分别与 A 阳性血红细胞和 B 阳性血红细胞反应:阳性样品产生高于 28000RFI 的阳性信号,而阴性样品给出低得多的信号,为 1800 到 8300RFI。

[0512] 血清测试(抗体检测)的结果:

[0513] 不含有针对存在的血红细胞的抗体的血清产生的值低于 1800RFI,平均阴性值为 1020RFI。

[0514] 具有针对由珠子-PLL-A1 血红细胞和珠子-PLL-B 血红细胞反应物提供的血红细胞的抗体的样品,给出的阳性信号为 3000 到 8200RFI,样品值对平均阴性值的比率为大约 3 到 8。

[0515] 此外,区域 34 和 98 对照珠子给出了预期信号水平,即分别为大约 8000RFI 和小于 1400RFI。

[0516] 这些结果证明了在同一个容器中,使用全血样品的单一测试样品,执行抗原和抗体的多重检测的可行性。

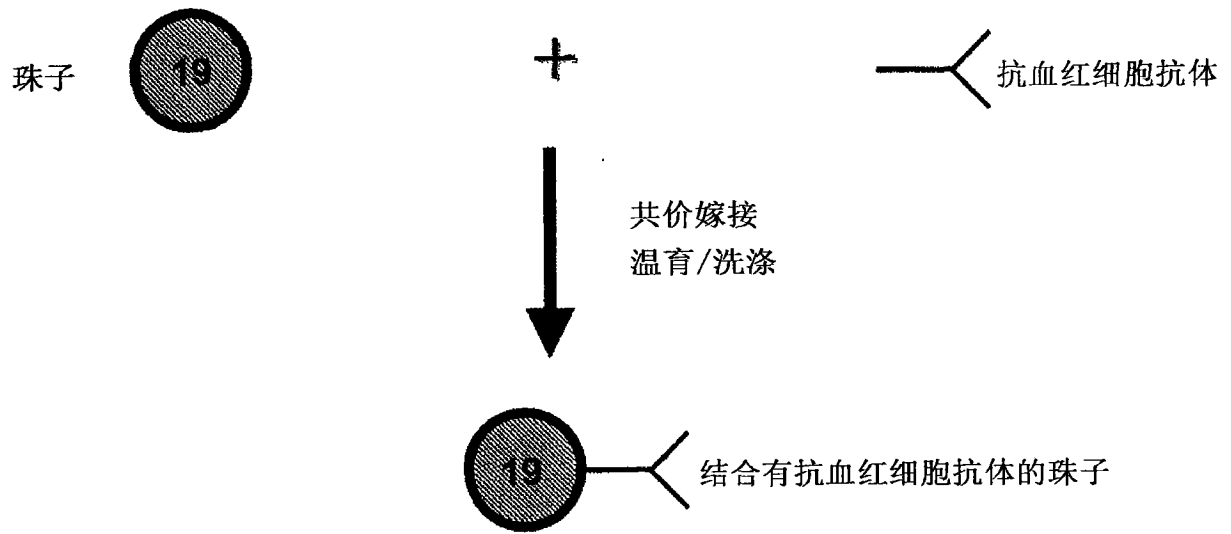


图 1

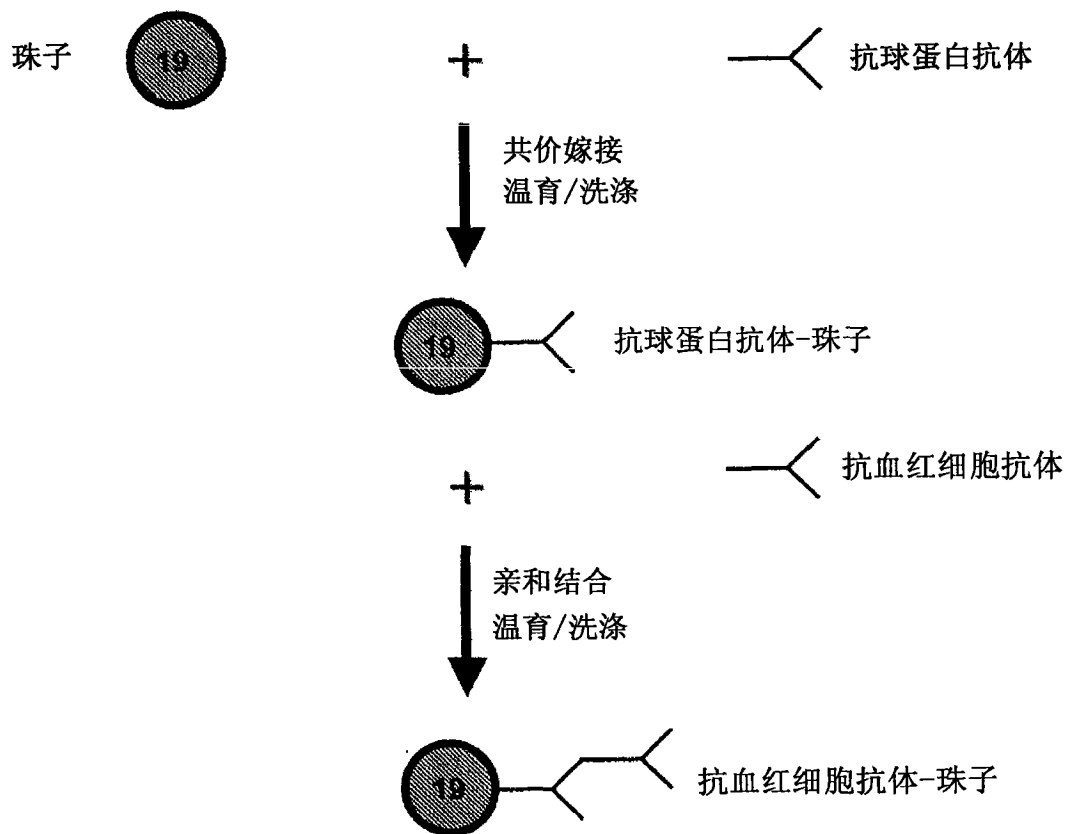


图 2

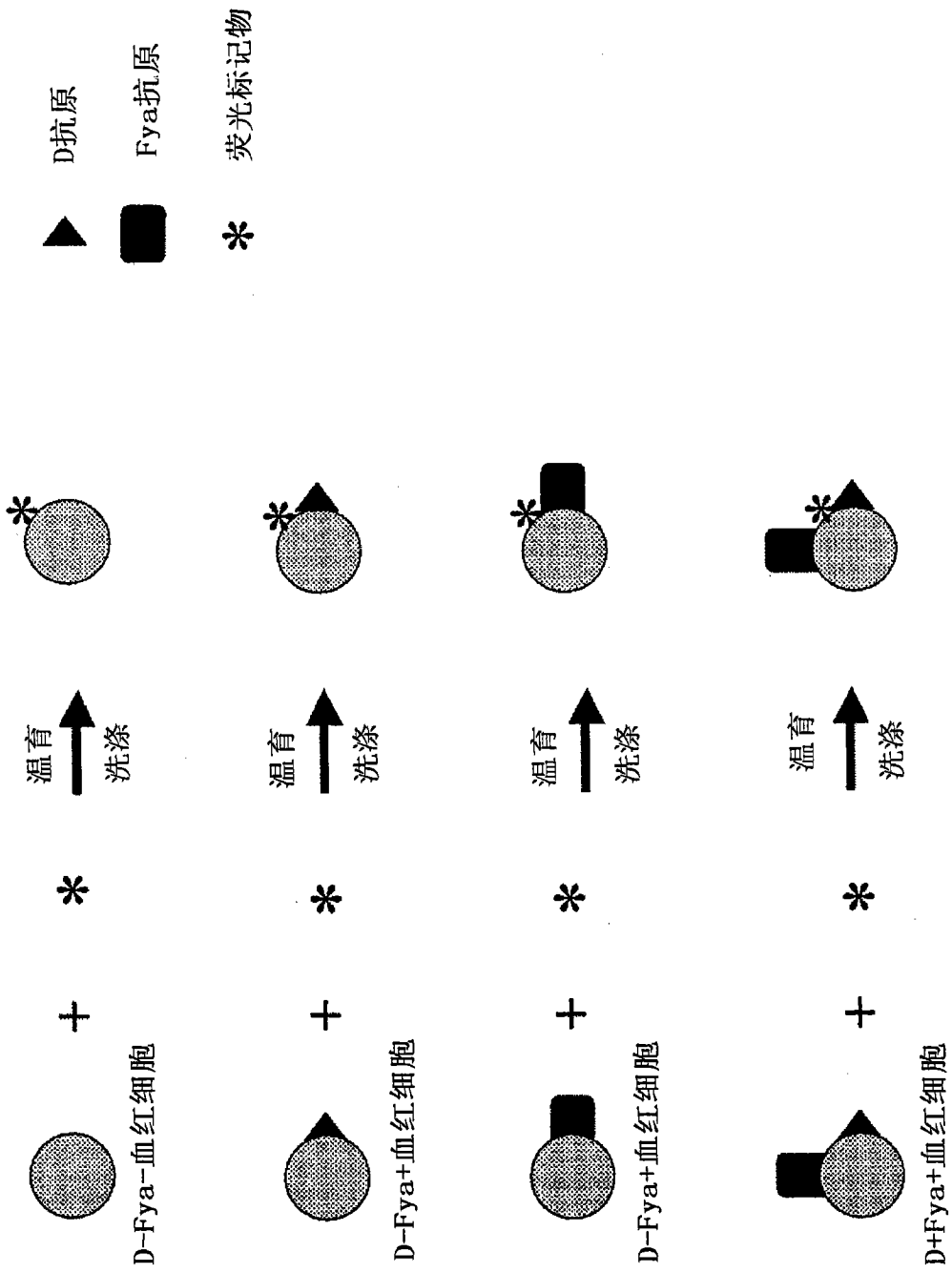
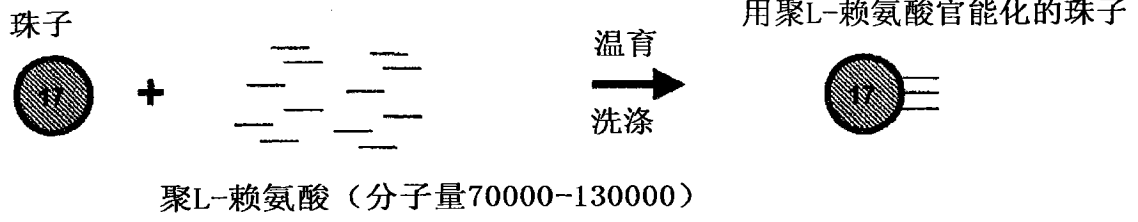


图 3

用聚L-赖氨酸官能化珠子



血红细胞固定化

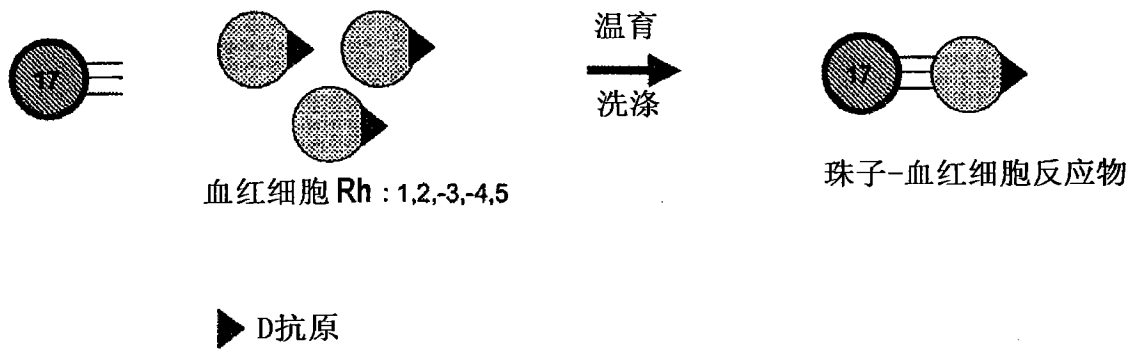


图 4

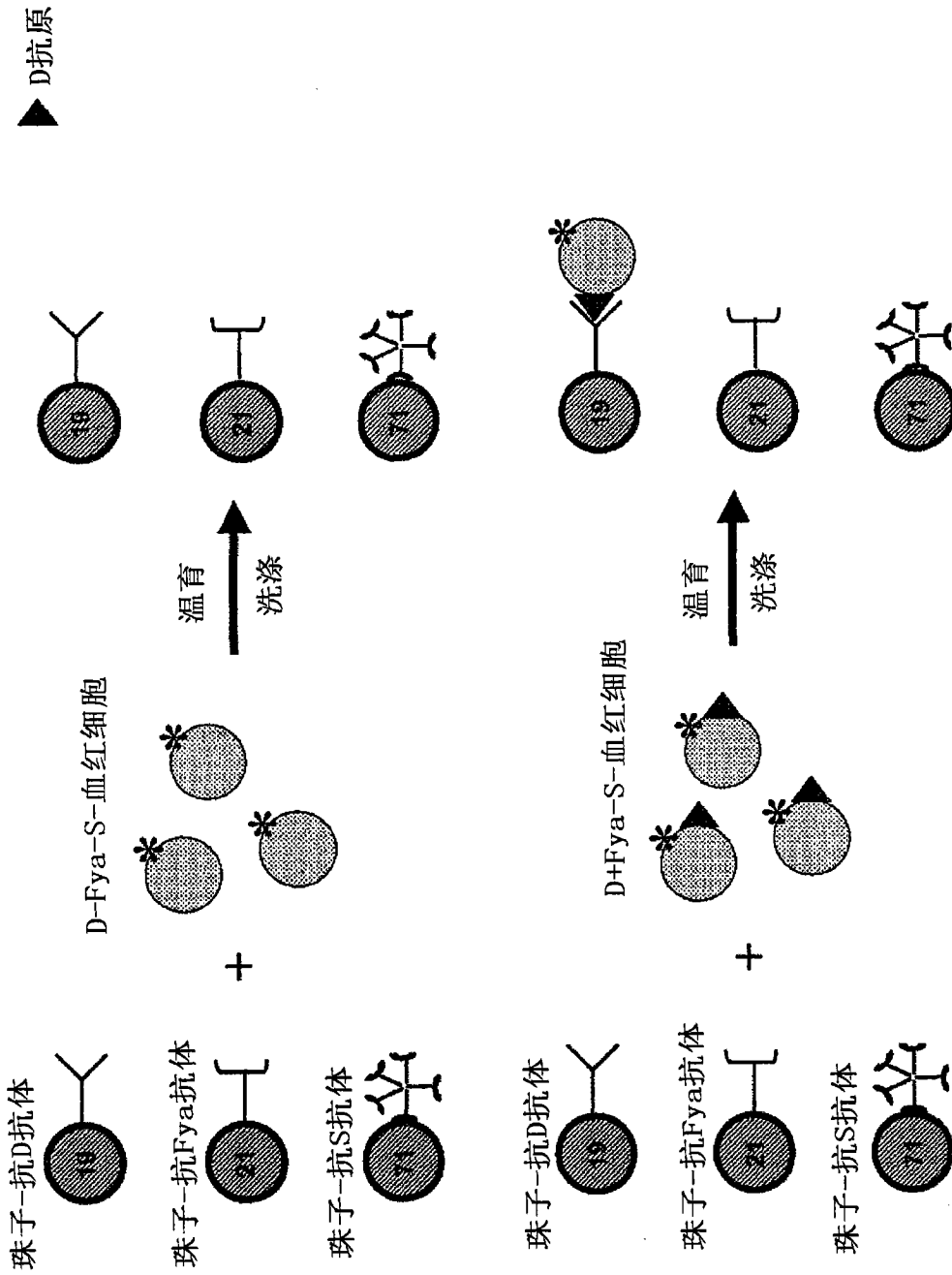


图 5a

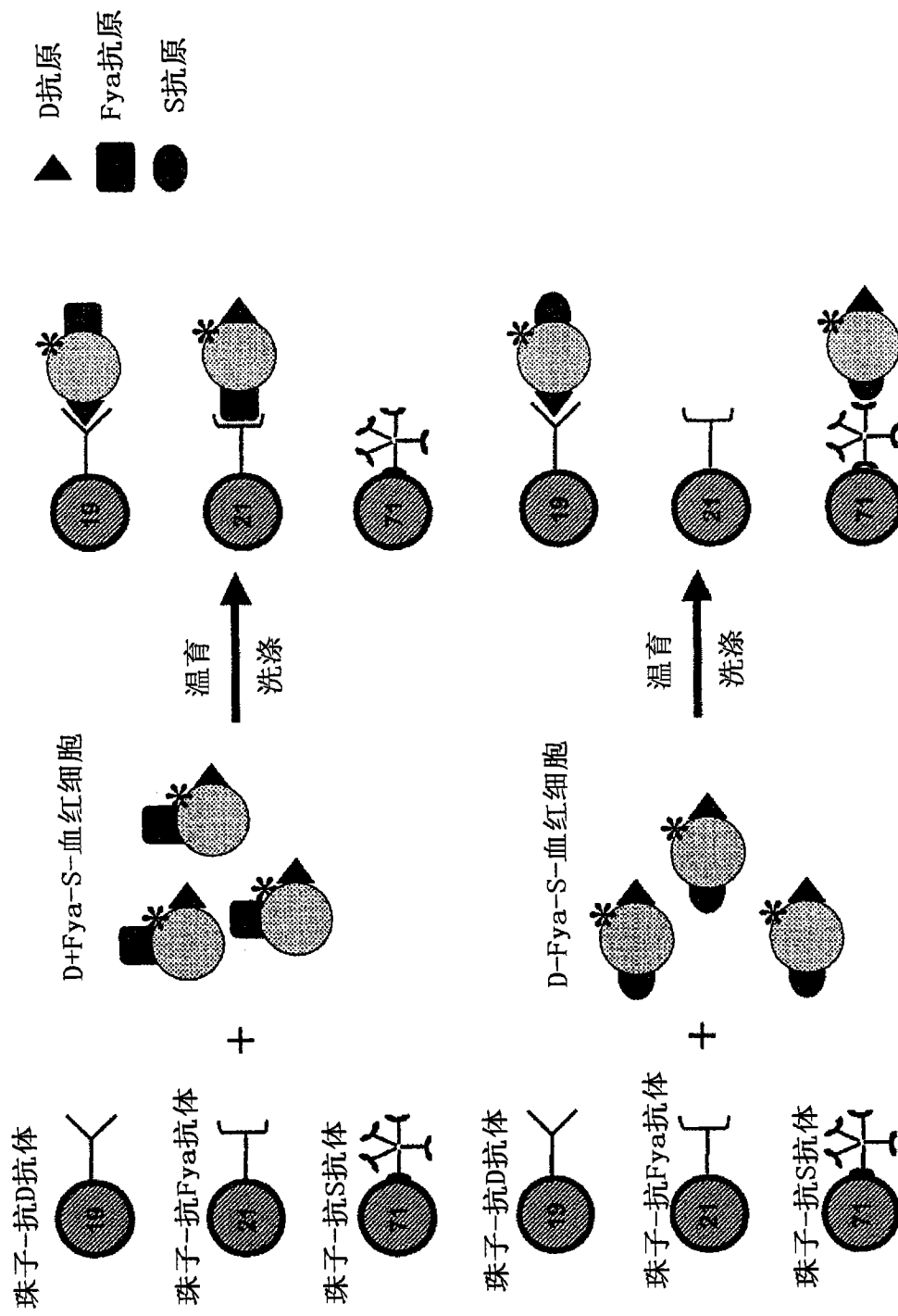


图 5b

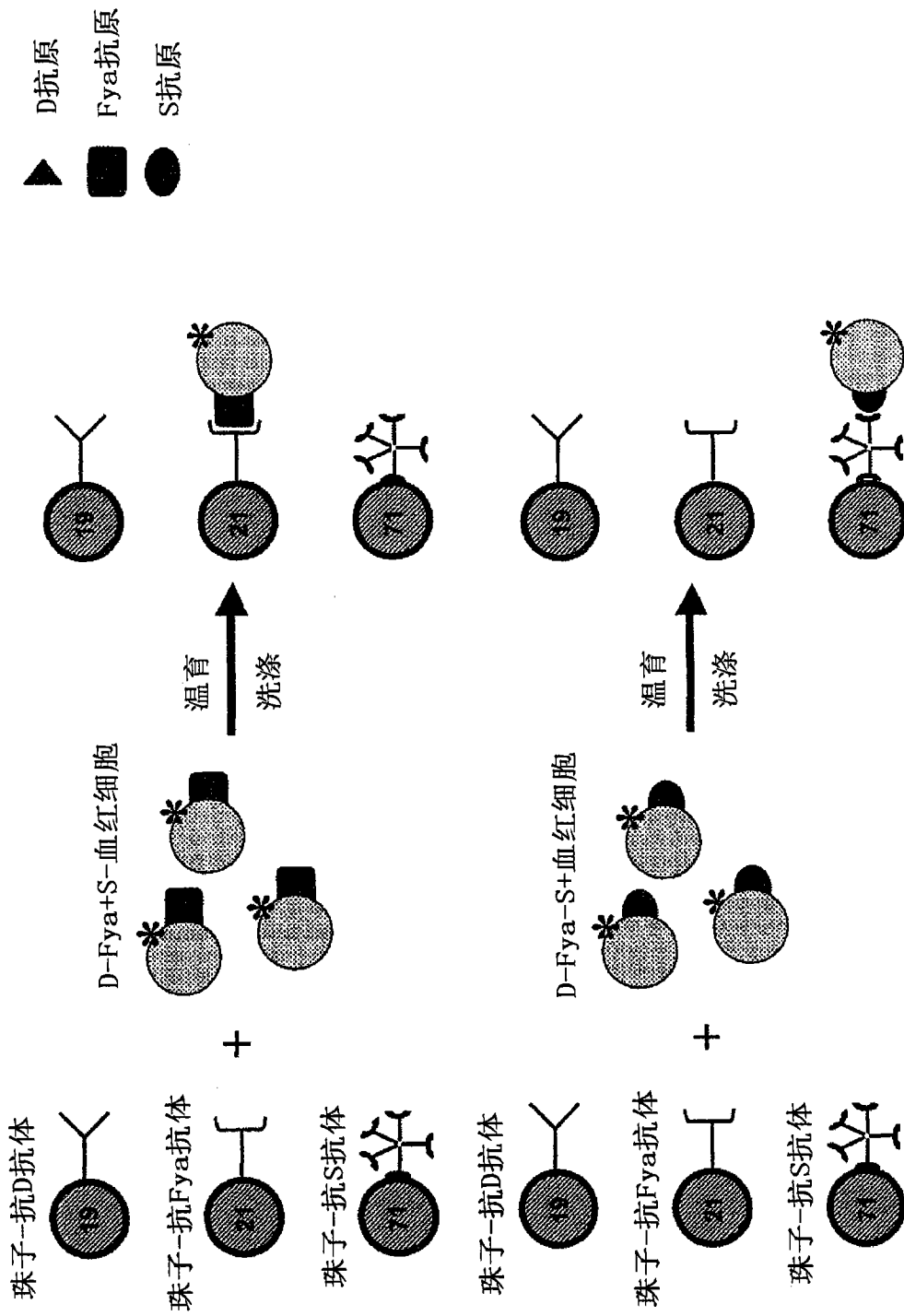


图 5c

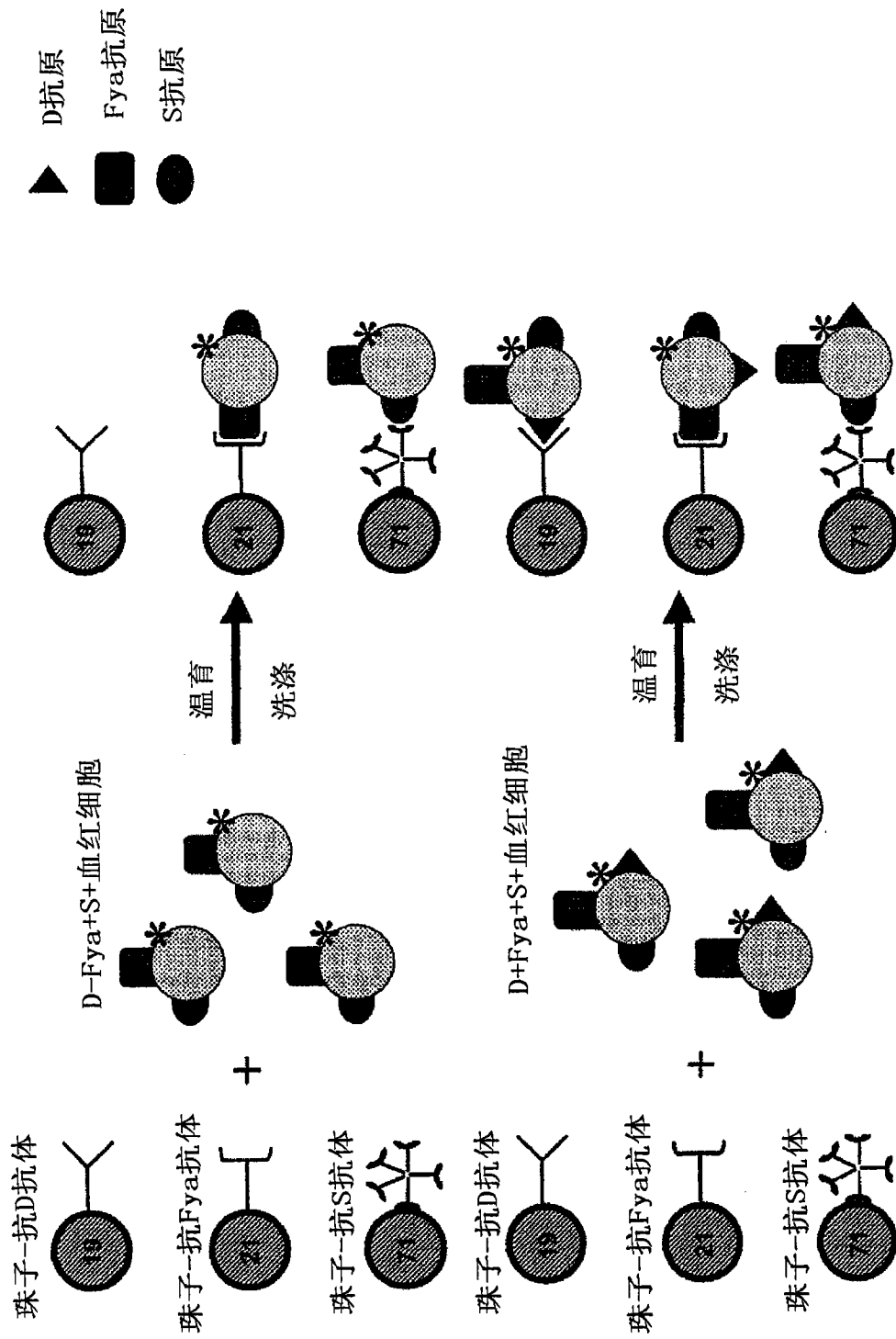


图 5d

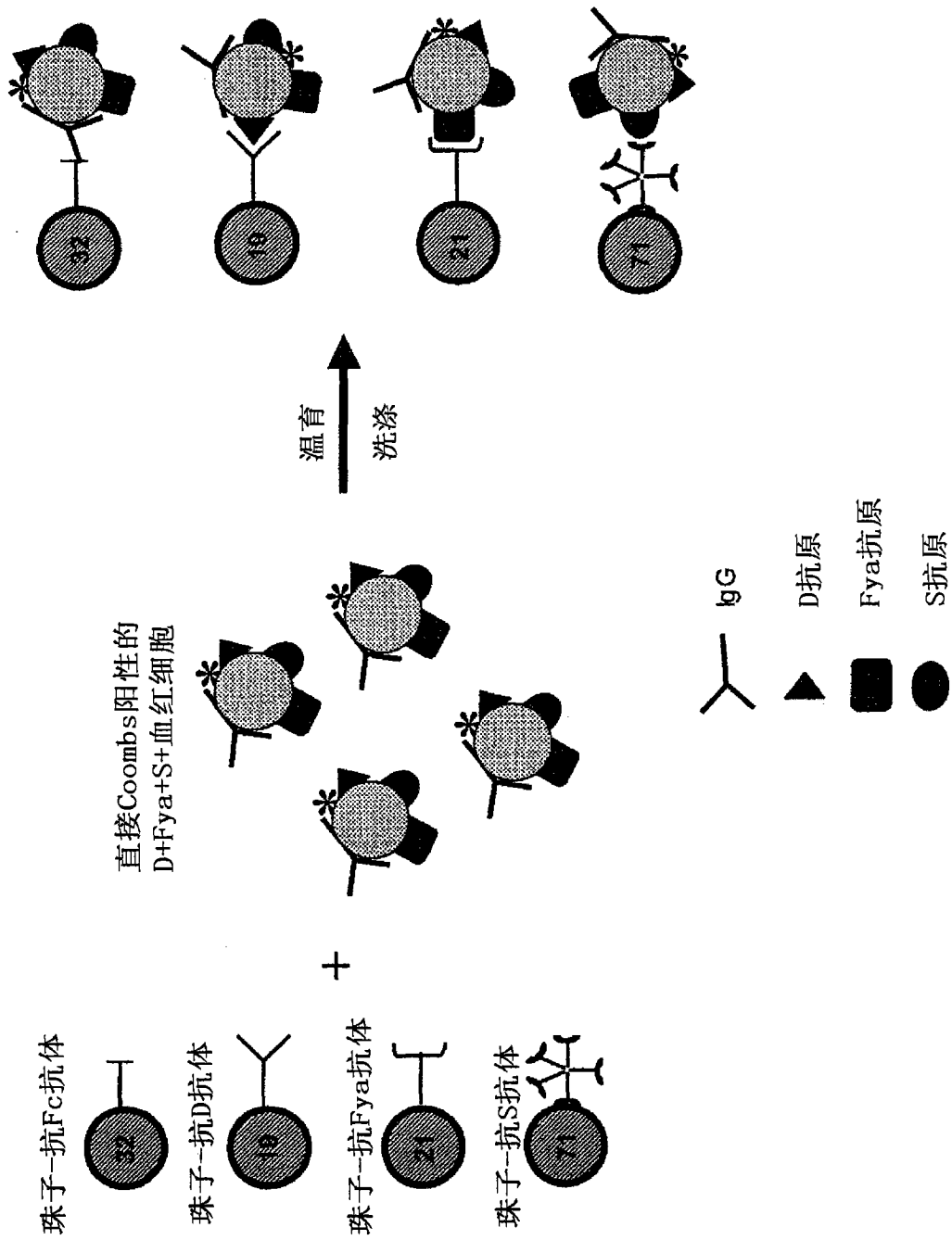


图 6

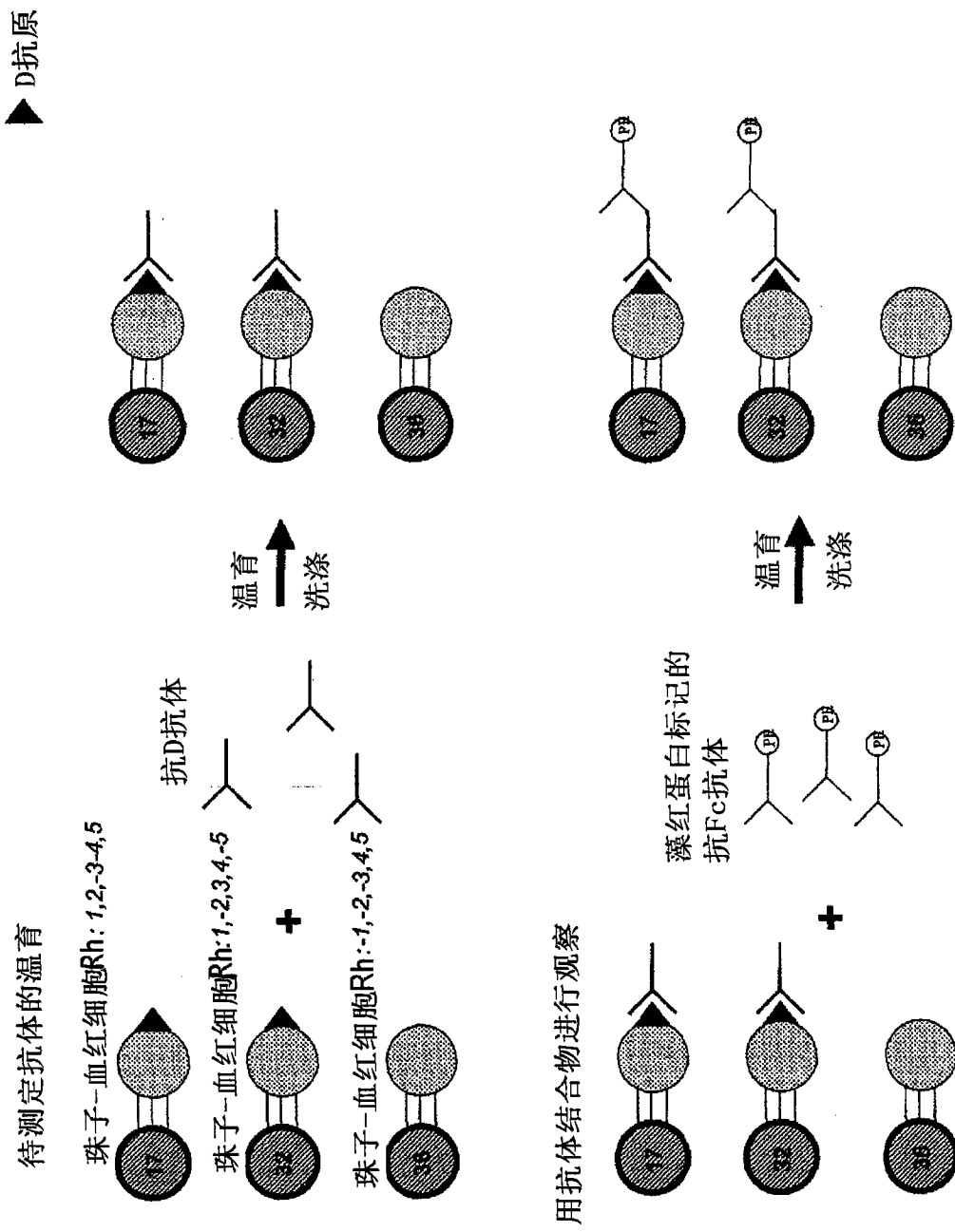


图 7

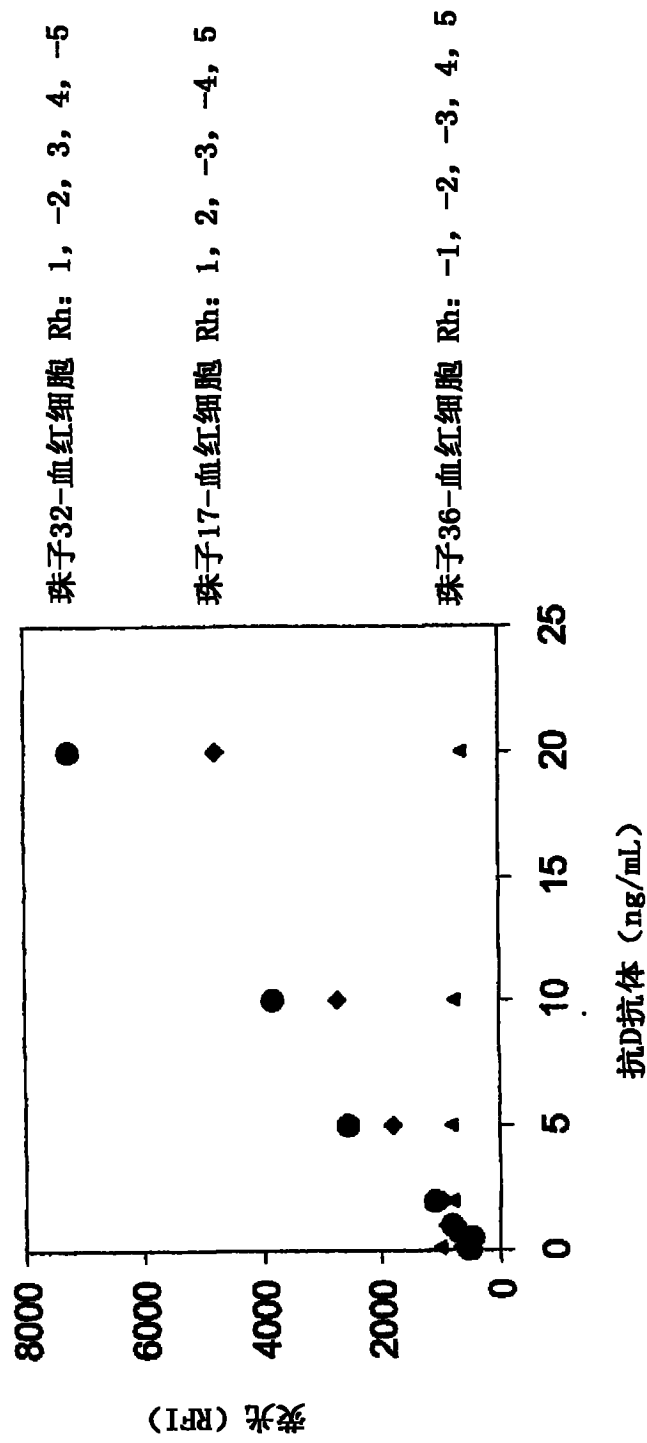


图 8

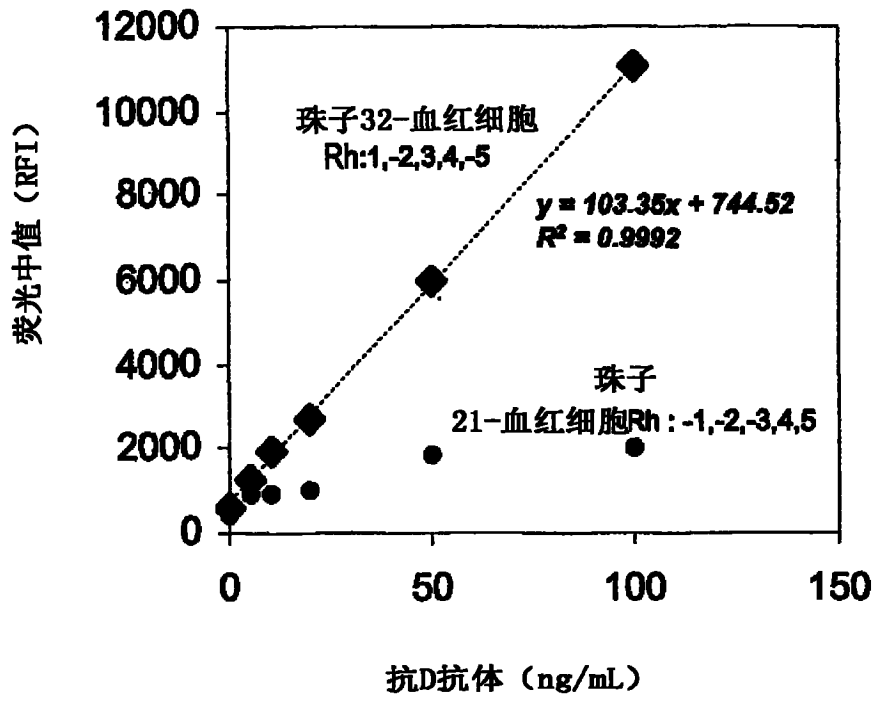


图 9

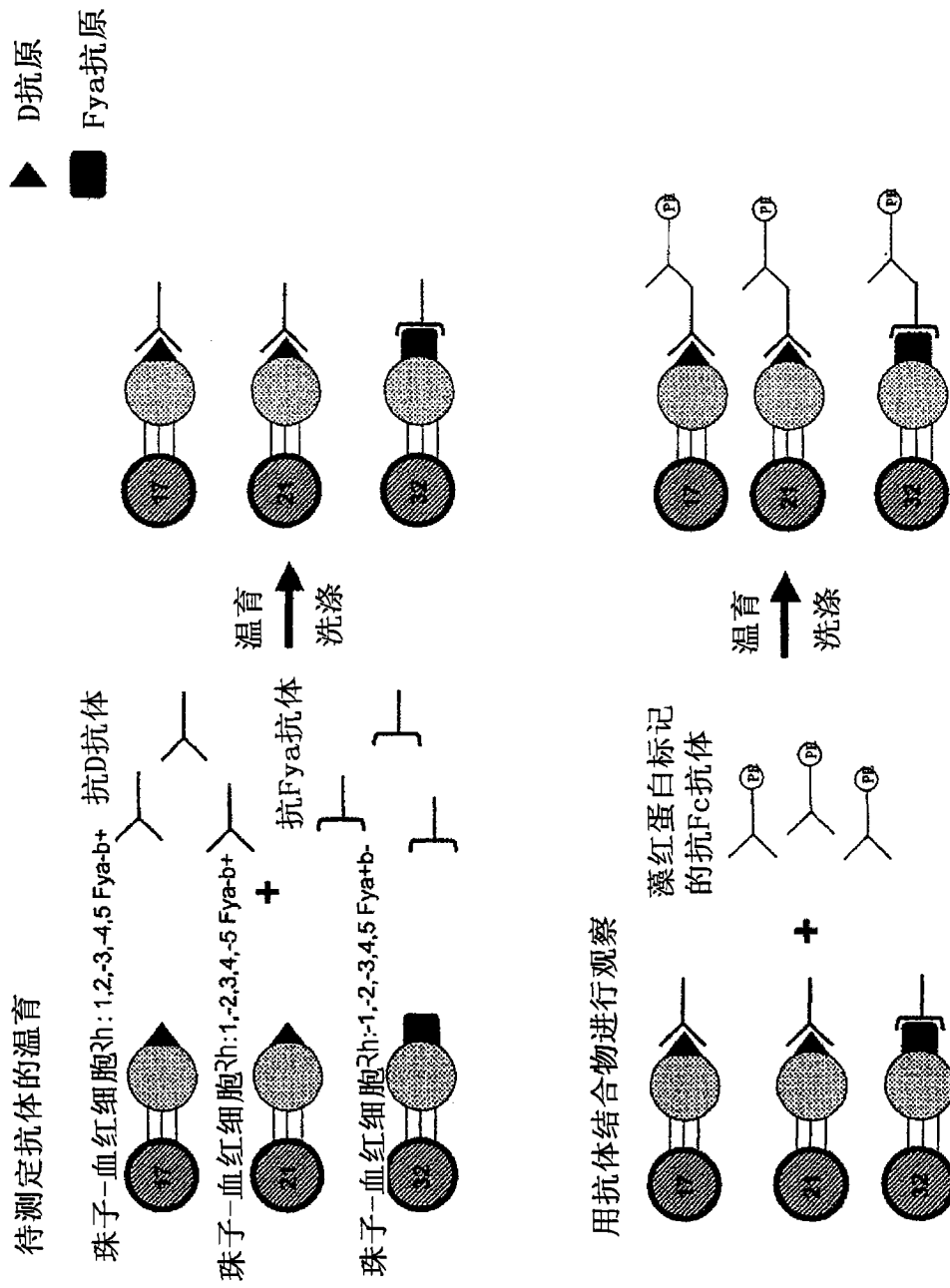


图 10

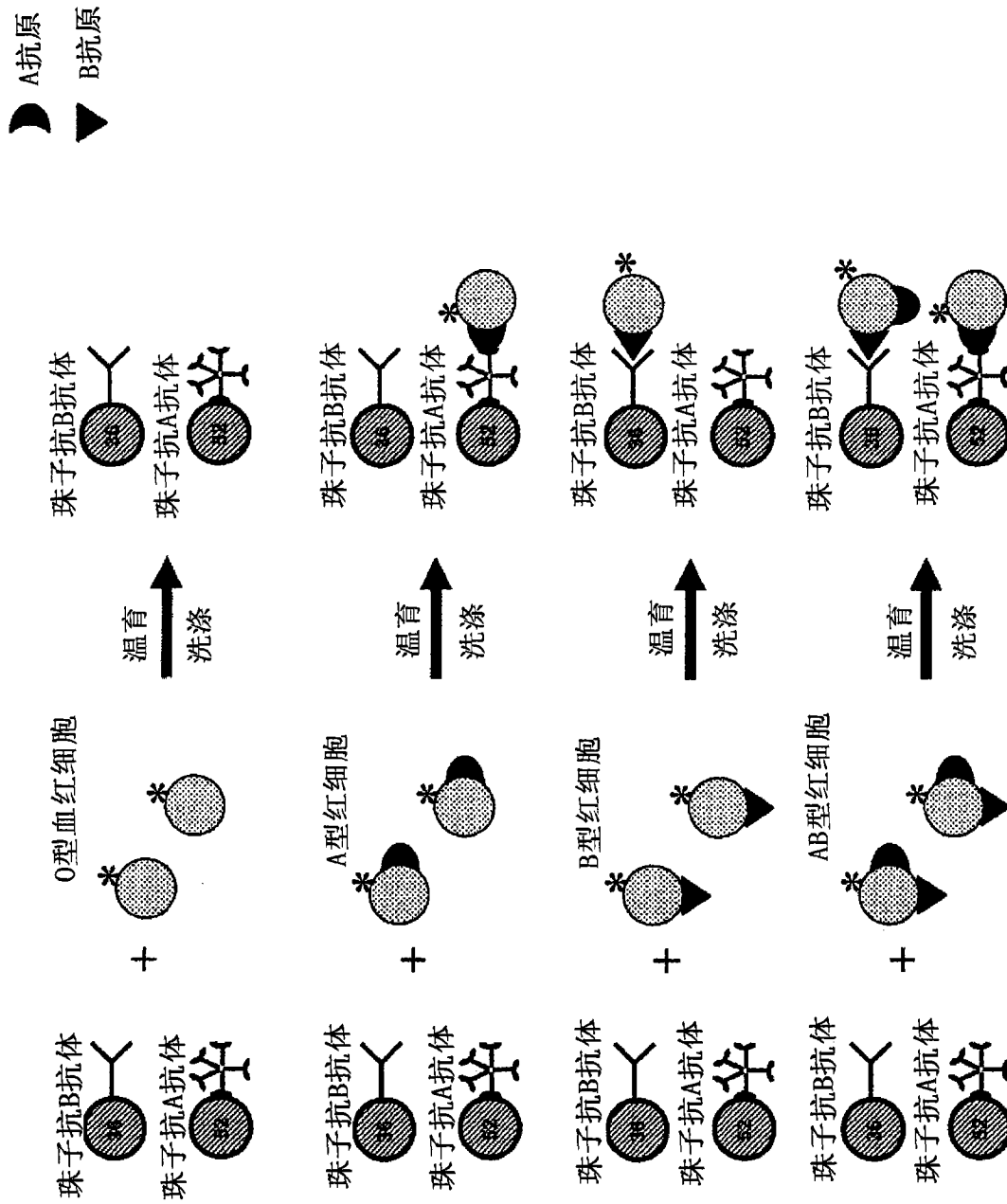


图 11

专利名称(译)	血液样品的多重分析		
公开(公告)号	CN101711363A	公开(公告)日	2010-05-19
申请号	CN200880019301.1	申请日	2008-06-06
[标]申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
当前申请(专利权)人(译)	博瑞巴斯德公司		
[标]发明人	弗雷德里克比菲埃 伊夫瑞森 埃利亚内里瓦兰 安帕鲁圣胡安		
发明人	弗雷德里克·比菲埃 伊夫·瑞森 埃利亚内·里瓦兰 安帕鲁·圣胡安		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/537 G01N33/354 G01N33/569		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N33/537 G01N33/80 G01N33/54333 Y10T436/101666 Y10T436/25125		
代理人(译)	张颖		
优先权	2007055624 2007-06-08 FR 60/929052 2007-06-11 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于检测红细胞携带的多个抗原性分子和/或个体的多个抗红细胞抗体的方法，包括使样品与可辨别的珠子相接触，在珠子上结合有 a) 特异性针对所述抗原的抗体，或 b) 红细胞、红细胞膜片段或血型抗原。

接受者血浆/血清	供体血细胞	预期结果	观察结果	输血危险
抗 D 血清 No. 42	供体 0R2R2 (D)	+	+	不相容
	供体 0rr (dd)	-	-	相容
抗 c 血清 No. 62	供体 0R2R2 (cc)	+	+	不相容
	供体 0R1R1 (CC)	-	-	相容
	供体 0rr (cc)	+	+	不相容
抗 K 血清 No. 70	供体 0R2R2 (kk)	-	-	相容
	供体 0R1R1 (kk)	-	-	相容
	供体 0rr (K+)	+	+	不相容
抗 S 血清 No. 54	供体 0R2R2 (SS)	+	+	不相容
	供体 0rr (ss)	-	-	相容