(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 102854306 A
(43)申请公布日 2013.01.02

(21)申请号 201210274365.4

(22)申请日 2011.12.23

(62)分案原申请数据
201110438939.2 2011.12.23

(71)申请人 中国人民解放军第三〇九医院
地址 100091 北京市海淀区黑山扈路甲 17 号中国人民解放军第三〇九医院

(72)发明人 石炳毅 许晓光 黄海燕

(74)专利代理机构 北京元中知识产权代理有限责任公司 11223
代理人 王明霞

(51)Int.Cl.
G01N 33/53(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 11 页

(54)发明名称

用于预警肾移植后排斥反应的试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及一种预警试剂盒，具体讲，涉及一种移植肾排斥反应预警试剂盒及其使用方法。应用液态蛋白质芯片 luminex 检测技术对 142 例急性移植肾排斥反应病人和移植肾功能稳定的移植受者共 266 份血清中的 96 种细胞因子／趋化因子及其受体的表达水平进行了监测和综合分析，建立了一种移植肾排斥反应早期诊断系统，对急性排斥反应的预测和准确率达到 98.6%，内部交叉验证率分别为 97.1% 和 97.2%。

CN 102854306 A

1. 一种移植肾排斥反应预警试剂盒，其特征在于，所述试剂盒包括检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体，所述抗体为 sIL-1R1，sVCAM1，SICAM-1，Fracktalkine，IL-1Rα，IP10，MDC，MIP1α，SDFα β，TRAIL 和 SCF。

2. 根据权利要求 1 所述的移植肾排斥反应预警试剂盒，其特征在于，所述试剂盒还含有：

（1）96 孔滤膜板和两张封板膜；

（2）所述试剂盒中蛋白抗体的标准品；

（3）质控对照；

（4）血清基质；

（5）实验液；

（6）洗液；

（7）藻红蛋白 - 链霉亲合素标记抗体；

（8）珠子稀释液；

（9）权利要求 1 所述的检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体；

（10）预包被抗体的珠子。

3. 根据权利要求 2 所述的移植肾排斥反应预警试剂盒，其特征在于，所述试剂盒中：

（1）所述 96 孔滤膜板和两张封板膜购自 Millipore 公司，货号 MX-PLATE；

（2）所述标准品购自 Millipore 公司，货号 MXH8060,MXH8062,MXH8063,LHSP-8063 和 HSCR-8032；

（3）所述质控对照购自 Millipore 公司，货号为：MXH6060,MXH6062,MXH6063,LHSP-6063 和 HSCR-6032；

（4）所述血清基质购自 Millipore 公司，货号为：MXHSM，LHSP-SM,HSCR-SM；

（5）所述实验液购自 Millipore 公司，货号 L-AB；

（6）所述洗液购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

（7）所述藻红蛋白 - 链霉亲合素标记抗体购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9，L-SAPE3,L-SAPE10,L-SAPE11,L-SAPE6；

（8）所述珠子稀释液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

（9）检测抗体购自 Millipore 公司，货号 MXH1060，MXH1062，MXH1063，LHSP-1063,HSCR-1032；

（10）所述预包被抗体的珠子购自 Millipore 公司，货号 MXHPMX39，MXHP2PMX23,HSP，HASP-PAI1，MXH3PMX9，HSCRPMX14。

4. 权利要求 1 所述试剂盒的使用方法，其特征在于：

（1）采集全血，室温静置，1000rpm 离心 5 ～ 15 分钟收取上清，分装后冷冻保存备用；

（2）用实验液或洗涤液预湿实验板，置于振荡器振摇 5 ～ 20 分钟；吸走实验板孔中的液体，吸干实验板底；

（3）相应孔分别加入梯度稀释的标准品、质控对照和样品；

（4）在背景孔、标准品和质控对照孔中加入血清基质；

（5）每孔加入珠子；

（6）封板后将实验板振摇 4℃孵育过夜或室温下孵育 0.5 ～ 2h；吸走实验板孔中的液

体，吸干实验板底；利用洗液洗涤实验板两次；

（7）每孔加入相应的检测抗体；室温下振摇实验板 0.5 ～ 2h；

（8）每孔加入藻红蛋白 - 链霉亲合素标记抗体；室温下振摇实验板孵育 20 ～ 40min；用洗液洗涤洗扳两次；

（9）每孔加入鞘液，检测分析得到实验结果。

5. 根据权利要求 4 所述的试剂盒的使用方法，其特征在于：

（1）采集全血，室温静置 1h 后，1000rpm 离心 10 分钟收取上清，分装后 -80℃冰箱保存备用 2ml；

（2）应用 200μl 实验液或洗涤液预湿实验板，置于振荡器振摇 10 ～ 15 分钟；应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底；

（3）相应孔分别加入 25μl 梯度稀释的标准品、质控对照和样品；

（4）在背景孔、标准品和质控对照孔中加入血清基质 25μl；

（5）每孔加入 25μl 珠子；

（6）封板后将实验板置于振荡器振摇 4℃孵育过夜或室温下孵育 1h；应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底；每孔加入 200μl 洗液，应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底，洗扳两次；

（7）每孔加入 25μl 检测抗体，室温下振荡器振摇实验板 1h；

（8）每孔加入 25μl 藻红蛋白 - 链霉亲合素标记抗体，室温下振荡器振摇实验板孵育 30min；每孔加入 200μl 洗液，应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底，洗扳两次；

（9）每孔加入 150μl 鞘液，流式点阵仪检测，软件分析，得到实验结果。

6. 根据权利要求 4 所述的使用方法，其特征在于，在步骤（3）中标准品、质控对照和样品的按照 1 ：4 ～ 5 的比例逐级稀释。

7. 根据权利要求 4 所述的使用方法，其特征在于，在步骤（9）中所述的鞘液购自 luminex 公司，货号为 #40-50000。

8. 根据权利要求 4 所述的使用方法，其特征在于，在步骤（9）中所述的流式点阵仪为 luminex200，软件为 MILLIPLEX Analyst 分析。

用于预警肾移植后排斥反应的试剂盒及其使用方法

[0001] 本申请是专利申请 201110438939.2 的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及一种预警试剂盒，具体讲，涉及一种移植肾排斥预警试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0003] 全球因慢性肾功能衰竭而行透析的人数已由 1990 年的 42.6 万人增加至 2000 年的 106.5 万人，预计到 2010 年将达到 200 余万人。这一人数的增长，致使全球透析费用迅速增长，对发达国家、发展中国家均造成了巨大的经济负担。我国约有 100 万尿毒症患者，每年新增 12 万人，每年约有 50 万患者需要肾移植。目前我国已累计开展各种器官移植近 10 万例，成为世界第二器官移植大国，其中最多的是肾脏移植，累计达 8 万多例。移植受者和移植物有功能长期存活是器官移植追求的最终目标。随着手术技术的进步、组织配型技术的提高和免疫抑制剂的发展，肾移植术后 1 年存活率已大大提高，但长期预后仍有待改善。急性排斥反应的反复发作和慢性排斥反应是引起移植物失功的主要原因，长期服用免疫抑制剂所带来的毒副作用，如肾毒性、感染、诱发肿瘤等，亦影响移植物及受者的长期存活。

[0004] 反复发作的急性排斥反应与慢性排斥反应是引起移植物失功的重要原因，但临床上缺乏有效的动态监测与无创诊断手段。移植肾穿刺活检是目前最可靠的诊断方法，但具有创伤性，可引起感染、出血、甚至移植物丢失等，不易被患者接受且不利于动态观察。并且活检取材也有一定的局限性，根据 Banff 标准，许多临床怀疑移植肾排斥的患者在病理形态上可能并不能符合排斥的诊断标准。

[0005] 因此，迫切需要探索适合我国人群的、可靠的、可满足动态观察需要的移植肾排斥反应无创性诊断方法。该课题的完成将在很大程度上辅助延长患者移植后生存期，提高生存质量，减少国家医疗投入，节省家庭开支，具有极大的临床应用价值和社会、经济效益，并有助于我国移植界具有国际领先水平的自主知识产权成果的产出。

[0006] 移植肾排斥反应的无创诊断技术的研究现状：自 20 世纪 80 年代起，移植学界已开始动态观察移植受者各种血清中多种细胞因子水平及变化，探索移植排斥反应的发生机制及其诊断方法。例如 IL-6、可溶型 IL-6 受体（IL-6R）可溶性 CD30(sCD30)、肝细胞再生因子（hepatocytegrowth factor,HGF）、IL-18、转移生长因子 -β（Transforming Growth Factor Beta，TGF-β）、IL-17、颗粒酶 B、穿孔素、FasL、粒溶素、CD154、ICOS、CTLA4、PD-1 等分子与移植肾排斥反应相关。中国人民解放军第三〇九医院器官移植中心在 1994 年对 37 例肾移植受者和 55 名正常人血清 IL-6 水平的动态测定，结果表明，移植肾急性排异患者血清 IL-6 水平明显升高，而慢性排异患者 IL-6 水平无显著变化，提示血清 IL-6 水平监测是移植肾排斥反应的重要诊断指标之一；随后，又分别对血清免疫细胞抑制性受体（leukocyte-associated Ig-like receptor-1,LAIR-1），可溶型 LAIR-2 分子，HLA-G，血小板 /T 细胞活化抗原 1（platelet and T cell activation antigen 1,PTA1,CD226）和同

种异体混合淋巴细胞反应中特异性表达的 p140 等与移植肾排斥反应的相关性进行了研究和报道。然而，尽管众多科研工作者致力于筛选移植排斥特异性的生物标记，但至今尚未筛选出特异性分子应用于排斥反应的无创性诊断和鉴别诊断。目前国际上仍缺乏移植肾排斥反应的无创诊断和预警体系。

[0007] 移植排斥反应是一个非常复杂的过程，细胞免疫和体液免疫机制均参与这个过程，而且，移植物的差异，手术的影响，移植受者个体的差异以及临床上不同免疫抑制方案的应用等众多因素的参与使移植排斥反应的诊断更加复杂和困难。另外，既往研究表明，通过检测单个分子来明确诊断移植排斥反应有很大的难度。早期卵巢上皮癌的血清诊断体系的成功建立，为移植排斥反应的无创诊断提供了新的研究思路。2005 年，耶鲁大学的 Gil 等通过对已知蛋白标记的筛选，成功建立了由 Leptin，泌乳刺激素（prolactin），骨桥蛋白（osteopontin，OPN）和胰岛素样生长因子Ⅱ（IGF- Ⅱ）组成的早期卵巢上皮癌的血清诊断体系，将诊断敏感度、特异性、阳性预测值（positive predictive value，PPV）和阴性预测值（negtive predictive value，NPV）分别提高至 95%、95%、95% 和 94%。因此，在鉴定移植排斥特异性标志物的同时，对已知的移植排斥相关的生物标记进行筛选和组合，通过多分子综合分析，建立排斥反应的联合标志物群诊断和预警体系，具有更强的可行性和更高的敏感度。

[0008] Luminex 技术是一种多功能的液相芯片分析平台。它整和了有色微球（color-coded microsphere or bead）、激光技术、应用流体学、高速数字信号处理器和计算机运算法则，具有极高的检测特异性和灵敏度。微球的颜色是通过两种荧光染料染色得到的，调节两种荧光染料的比例可以获得 100 种不同颜色的微球，每种颜色的微球可以携带一种生物探针。探针通过羧基结合到微球表面，因此一个反应孔内可以完成 100 种不同的生物学反应。Luminex 技术通过鉴定微球的颜色来确定反应类型，而对反应的定量分析是通过靶物质上的报告分子完成的。它具备多参数高通量分析、节约试剂和标本、操作简单等多种优势。采用 Luminex 液态芯片系统定量检测候选分子，只需 30ul 样本即可同时检测多个指标，在 4 小时内可以完成分析，灵敏度可以达到 3pg/ml。

发明内容

[0009] 本发明的首要发明目的在于提供一种移植肾排斥反应早期诊断试剂盒；

[0010] 本发明的第二发明目的在于提供一种移植肾排斥反应预警试剂盒；

[0011] 本发明的第三发明目的在于提供以上试剂盒的使用方法；

[0012] 本发明的第四发明目的在于提供蛋白 SCF、sRAGE、CXCL7NAP2、CCL14α-HCC1、sCD40L、GCSF、GRO、IL-1Rα、MCP3、IL-20、MIP1d、IL-28A、IL-29IFNλ1 在移植肾急性排斥反应或移植肾排斥反应预警中的应用。

[0013] 为了实现本发明的第一个发明目的，采用的技术方案为：

[0014] 本发明涉及一种移植肾排斥反应早期诊断试剂盒，所述试剂盒包括检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体，所述抗体选自抗 EGF，抗 Eotaxin，抗 FGF-2，抗 Flt-3 ligand，抗 Fractalkine，抗 G-CSF，抗 GM-CSF，抗 GRO，抗 IFN-α2，抗 IFN-γ，抗 IL-10，抗 IL-12(p40)，抗 IL-12(p70)，抗 IL-13，抗 IL-15，抗 IL-17，抗 IL-1ra，抗 IL-1α，抗 IL-1β，抗 IL-2，抗 IL-3，抗 IL-4，抗 IL-5，抗 IL-6，抗 IL-7，抗 IL-8，抗 IL-9，抗 IP-10，抗 MCP-1，抗 MCP-3，

抗 MDC(CCL22),抗 MIP-1α,抗 MIP-1β,抗 PDGF-AA,抗 PDGF-AB/BB,抗 RANTES,抗 TGF-α,抗 TNF-α,抗 TNF-β,抗 VEGF,抗 sCD40L,抗 sIL-2Rα,抗 6Ckine,抗 BCA-1,抗 CTACK,抗 ENA-78,抗 Eotaxin-2,抗 Eotaxin-3,抗 I-309, 抗 IL-16,抗 IL-20,抗 IL-21,抗 IL-23,抗 IL-28a,抗 IL-33,抗 LIF,抗 MCP-2,抗 MCP-4, 抗 MIP-1d, 抗 SCF, 抗 SDF-1A+β, 抗 TARC, 抗 TPO, 抗 TRAIL, 抗 TSLP,抗 GCP2, 抗 HCC-1, 抗 I-TAC, 抗 IL-11, 抗 IL-29, 抗 Lymphotactin, 抗 M-CSF, 抗 MIG, 抗 MIP-3α, 抗 MIP-3β, 抗 NAP2, 抗 sCD30(sTNFRSF8), 抗 sEGFR, 抗 sIL-1RI(sCD121a), 抗 sIL-1RII(sCD121b), 抗 sIL-2Rα(sCD25), 抗 sIL-4R(sCD124), 抗 sIL-6R(sCD126), 抗 sRAGE, 抗 sTNFRI(sTNFRSF1A), 抗 sTNFRII(sTNFRSF1B), 抗 sVEGFR1(sFlt-1), 抗 sVEGFR2(sFlk-1), 抗 sVEGFR3(sFlt-4), 抗 sgp130, 抗 MIF, 抗 PAI-1(Total),抗 sFas,抗 sFasL,抗 sICAM-1 或抗 sVCAM-1 抗体中的至少一种,优选至少两种抗体,更优选至少 3 种抗体,再优选至少 4 种抗体,最优选至少 5 种抗体。

[0015] 本发明该技术方案的第一优选技术方案为:所述试剂盒包括检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体,所述抗体选自抗 SCF, 抗 sEGFR, 抗 sIL-2Rα,抗 sRAGE, 抗 sTNFR1, 抗 sTNFR2, 抗 sVEGFR2, 抗 sVCAM1, 抗 sFas, 抗 CCL14α-HCC1, 抗 sCD40L, 抗 Eotaxin, 抗 FGF2, 抗 Flt3ligand, 抗 Fracktalkine, 抗 GCSF, 抗 GRO, 抗 IFNγ, 抗 IL-1Rα, 抗 IL-3, 抗 IL-4, 抗 IL-6, 抗 IL-12p70, 抗 IL-13, 抗 IP10, 抗 MIP1α, 抗 VEGF, 抗 BCA-1, 抗 IL-16, 抗 MIP1d, 抗 IL-20, 抗 IL-28A, 抗 CXCL9MIG,抗 CXCL111TAC 或抗 CCL19MIP3β 中的至少一种抗体,优选至少两种抗体,更优选至少 3 种,再优选至少 4 种,最优选至少 5 种。

[0016] 本发明该技术方案的第三优选技术方案为:所述试剂盒还含有:

[0017] (1)96 孔滤膜板和两张封板膜;

[0018] (2)所述试剂盒中蛋白抗体的标准品;

[0019] (3)质控对照;

[0020] (4)血清基质;

[0021] (5)实验液;

[0022] (6)洗液;

[0023] (7)streptavidin-phycoerythrin(藻红蛋白-链霉亲合素)标记抗体;

[0024] (8)珠子稀释液;

[0025] (9)权利要求 1 所述的检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体;

[0026] (10)预包被抗体的珠子。

[0027] 本发明该技术方案的第四优选技术方案为:所述试剂盒中:

[0028] (1)所述 96 孔滤膜板和两张封板膜购自 Millipore 公司,货号 MX-PLATE;

[0029] (2)所述标准品购自 Millipore 公司,货号 MXH8060,MXH8062,MXH8063,LHSP-8063 和 HSCR-8032;

[0030] (3)所述质控对照购自 Millipore 公司,货号为:MXH6060,MXH6062,MXH6063,LHSP-6063 和 HSCR-6032;

[0031] (4)所述血清基质购自 Millipore 公司,货号为:MXHSM,LHSP-SM,HSCR-SM;

[0032] (5)所述实验液购自 Millipore 公司,货号 L-AB;

[0033] (6)所述洗液购自 Millipore 公司,货号 L-WB;

[0034] (7)所述 streptavidin-phycoerythrin 标记抗体购自 Millipore 公司,货号

L-SAPE9，L-SAPE3，L-SAPE10，L-SAPE11，L-SAPE6；

[0035] （8）所述珠子稀释液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0036] （9）检测抗体购自 Millipore 公司，货号 MXH1060，MXH1062，MXH1063，LHSP-1063，HSCR-1032；

[0037] （10）所述预包被抗体的珠子购自 Millipore 公司，货号 MXHPMX39，MXHP2PMX23，HSP，HASP-PAI1，MXH3PMX9，HSCRPMX14。

[0038] 为实现本发明的第二发明目的，采用的技术方案为：一种移植肾排斥反应预警试剂盒，所述试剂盒包括检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体，所述抗体选自抗 EGF，抗 Eotaxin，抗 FGF-2，抗 Flt-3 ligand，抗 Fractalkine，抗 G-CSF，抗 GM-CSF，抗 GRO，抗 IFN-α2，抗 IFN-γ，抗 IL-10，抗 IL-12(p40)，抗 IL-12(p70)，抗 IL-13，抗 IL-15，抗 IL-17，抗 IL-1ra，抗 IL-1α，抗 IL-1β，抗 IL-2，抗 IL-3，抗 IL-4，抗 IL-5，抗 IL-6，抗 IL-7，抗 IL-8，抗 IL-9，抗 IP-10，抗 MCP-1，抗 MCP-3，抗 MDC(CCL22)，抗 MIP-1α，抗 MIP-1β，抗 PDGF-AA，抗 PDGF-AB/BB，抗 RANTES，抗 TGF-α，抗 TNF-α，抗 TNF-β，抗 VEGF，抗 sCD40L，抗 sIL-2Rα，抗 6Ckine，抗 BCA-1，抗 CTACK，抗 ENA-78，抗 Eotaxin-2，抗 Eotaxin-3，抗 I-309，抗 IL-16，抗 IL-20，抗 IL-21，抗 IL-23，抗 IL-28a，抗 IL-33，抗 LIF，抗 MCP-2，抗 MCP-4，抗 MIP-1d，抗 SCF，抗 SDF-1A+β，抗 TARC，抗 TPO，抗 TRAIL，抗 TSLP，抗 GCP2，抗 HCC-1，抗 I-TAC，抗 IL-11，抗 IL-29，抗 Lymphotactin，抗 M-CSF，抗 MIG，抗 MIP-3α，抗 MIP-3β，抗 NAP2，抗 sCD30(sTNFRSF8)，抗 sEGFR，抗 sIL-1RI(sCD121a)，抗 sIL-1RII(sCD121b)，抗 sIL-2Rα(sCD25)，抗 sIL-4R(sCD124)，抗 sIL-6R(sCD126)，抗 sRAGE，抗 sTNFRI(sTNFRSF1A)，抗 sTNFRII(sTNFRSF1B)，抗 sVEGFR1(sFlt-1)，抗 sVEGFR2(sFlk-1)，抗 sVEGFR3(sFlt-4)，抗 sgp130，抗 MIF，抗 PAI-1(Total)，抗 sFas，抗 sFasL，抗 sICAM-1 或抗 sVCAM-1 抗体中的至少一种，优选至少两种抗体，更优选至少 3 种抗体，再优选至少 4 种抗体，最优选至少 5 种抗体。

[0039] 本发明该技术方案的第一优选技术方案为：所述试剂盒包括检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体，所述抗体选自抗 SCF，抗 sEGFR，抗 sIL-2Rα，抗 sRAGE，抗 sTNFR1，抗 sTNFR2，抗 sVEGFR2，抗 sVCAM1，抗 sFas，抗 CCL14α-HCC1，抗 sCD40L，抗 Eotaxin，抗 FGF2，抗 Flt3ligand，抗 Fracktalkine，抗 GCSF，抗 GRO，抗 IFNγ，抗 IL-1Rα，抗 IL-3，抗 IL-4，抗 IL-6，抗 IL-12p70，抗 IL-13，抗 IP10，抗 MIP1α，抗 VEGF，抗 BCA-1，抗 IL-16，抗 MIP1d，抗 IL-20，抗 IL-28A，抗 CXCL9MIG，抗 CXCL111TAC 或抗 CCL19MIP3β 中的至少一种抗体，优选至少两种抗体，更优选至少 3 种，再优选至少 4 种，最优选至少 5 种。

[0040] 本发明该技术方案的第二优选技术方案为，所述试剂盒还含有：

[0041] （1）96 孔滤膜板和两张封板膜；

[0042] （2）所述试剂盒中蛋白抗体的标准品；

[0043] （3）质控对照；

[0044] （4）血清基质；

[0045] （5）实验液；

[0046] （6）洗液；

[0047] （7）streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；

[0048] （8）珠子稀释液；

[0049] （9）权利要求 10 所述的检测移植肾排斥反应的蛋白的抗体；

[0050] （10）预包被抗体的珠子。

[0051] 本发明该技术方案的第三优选技术方案为所述试剂盒中：

[0052] （1）所述 96 孔滤膜板和两张封板膜购自 Millipore 公司，货号 MX-PLATE；

[0053] （2）所述标准品购自 Millipore 公司，货号 MXH8060, MXH8062, MXH8063, LHSP-8063 和 HSCR-8032；

[0054] （3）所述质控对照购自 Millipore 公司，货号为：MXH6060, MXH6062, MXH6063, LHSP-6063 和 HSCR-6032；

[0055] （4）所述血清基质购自 Millipore 公司，货号为：MXHSM, LHSP-SM, HSCR-SM；

[0056] （5）所述实验液购自 Millipore 公司，货号 L-AB；

[0057] （6）所述洗液购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

[0058] （7）所述 streptavidin-phycoerythrin 标记抗体购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9, L-SAPE3, L-SAPE10, L-SAPE11, L-SAPE6；

[0059] （8）所述珠子稀释液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0060] （9）检测抗体购自 Millipore 公司，货号 MXH1060, MXH1062, MXH1063, LHSP-1063, HSCR-1032；

[0061] （10）所述预包被抗体的珠子购自 Millipore 公司，货号 MXHPMX39, MXHP2PMX23, HSP, HASP-PAI1, MXH3PMX9, HSCRPMX14。

[0062] 为了实现本发明的第三个发明目的，采用的技术方案为：

[0063] 本发明的试剂盒的使用方法为：包括以下步骤：

[0064] （1）采集全血，室温静置，1000rpm 离心 5~15 分钟收取上清，分装后冷冻保存备用；

[0065] （2）用实验液或洗涤液预湿实验板，置于振荡器振摇 5~20 分钟；吸走实验板孔中的液体，吸干实验板底；

[0066] （3）相应孔分别加入梯度稀释的标准品、质控对照和样品；

[0067] （4）在背景孔、标准品和质控对照孔中加入血清基质；

[0068] （5）每孔加入珠子；

[0069] （6）封板后将实验板振摇 4℃孵育过夜或室温下孵育 0.5~2h；吸走实验板孔中的液体，吸干实验板底；利用洗液洗涤实验板两次；

[0070] （7）每孔加入相应的检测抗体；室温下振摇实验板 0.5~2h；

[0071] （8）每孔加入 streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；室温下振摇实验板孵育 20~40min；用洗液洗涤洗扳两次；

[0072] （9）每孔加入鞘液，检测分析得到实验结果。

[0073] 本发明所述的试剂盒的使用方法的第一优选技术方案为，包括以下步骤：

[0074] （1）采集全血，室温静置 1h 后，1000rpm 离心 10 分钟收取上清，分装后 -80℃冰箱保存备用 2ml；

[0075] （2）应用 200μl 实验液或洗涤液预湿实验板，置于振荡器振摇 10~15 分钟；应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底；

[0076] （3）相应孔分别加入 25μl 梯度稀释的标准品、质控对照和样品；

[0077] （4）在背景孔、标准品和质控对照孔中加入血清基质 25μl；

[0078] （5）每孔加入 25μl 珠子；

[0079] （6）封板后将实验板置于振荡器振摇 4℃孵育过夜或室温下孵育 1h；应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底；每孔加入 200μl 洗液，应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底，洗扳两次；

[0080] （7）每孔加入 25μl 检测抗体，室温下振荡器振摇实验板 1h；

[0081] （8）每孔加入 25μl streptavidin-phycoerythrin 标记抗体，室温下振荡器振摇实验板孵育 30min；每孔加入 200μl 洗液，应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底，洗扳两次；

[0082] （9）每孔加入 150μl 鞘液，流式点阵仪检测，软件分析，得到实验结果。

[0083] 本发明所述的试剂盒的使用方法的第二优选技术方案为，在步骤（3）中标准品、质控对照和样品的按照 1∶4 ～ 5 的比例逐级稀释。标准品和质控对照的初始浓度采用了与 Luminex 检测试剂盒 Human Cytokine/Chemokine（MPXHCYTO-60K）、Human Cytokine/Chemokine Panel II（MPXHCYP2-62K）、Human Cytokine/Chemokine Panel III（MPXHCYP3-63K）、Human Soluble Cytokine Receptor Panel（HSCR-32K-PMX 14）、Human Sepsis Panel I（HSEP-63K）中相同的浓度。

[0084] 本发明所述的试剂盒的使用方法的第三优选技术方案为，在步骤（9）中所述的鞘液购自 luminex 公司，货号为 #40-50000。

[0085] 本发明所述的试剂盒的使用方法的第四优选技术方案为，在步骤（9）中所述的流式点阵仪为 luminex200，软件为 MILLIPLEX Analyst 分析。

[0086] 本发明的第四发明目的在于提供蛋白 SCF、sRAGE、CXCL7NAP2、CCL14α-HCC1、sCD40L、GCSF、GRO、IL-1Rα、MCP3、IL-20、MIP1d、IL-28A、IL-29IFNλ1 在移植肾急性排斥反应或移植肾排斥反应预警中的应用。

[0087] 其中，所述的蛋白的筛选方法为：首先，采集肾移植受者的移植术后多个时间点的血清，并对临床病例进行分析和分组；然后应用 Luminex 系统对各组血清中 96 种细胞因子及趋化因子的表达水平进行检测；最后，统计学方法筛选出移植排斥反应相关的标志物，联合应用这些标志物群，建立以多因子综合分析为特征的移植肾排斥反应的诊断和预警体系。

[0088] 本发明应用美国密理博公司（Millipore）的 Luminex 检测试剂盒：MPXHCYTO-60K、MPXHCYP2PMX23、MPXHCYP2-62K、MPXHCYP3-63K、HSCR-32K-PMX14、HSEP-63K-06，共检测 96 种细胞因子、细胞因子受体以及趋化因子在急性排斥反应组和移植肾功能稳定组病人血清中的表达水平。具体实验过程见各试剂盒说明书。

[0089] 应用统计学分析软件 SPSS16.0 对检测数据进行正态性检验和方差齐性检验后，非正态分布资料应用 minitab15.0 进行数据转换，经数据转换后为正态分布的应用 T 检验分析急性排斥反应组和移植肾功能稳定组间表达水平有显著性差异的标记物，未能转换为正态分布的资料经非参分析的方法分析表达水平有显著性差异的标记物。分析后共得到 35 个有显著性差异的标记物：SCF，sEGFR，sIL-2Rα，sRAGE，sTNFR1，sTNFR2，sVEGFR2，sVCAM1，sFas，CCL14α-HCC1，sCD40L，Eotaxin，FGF2，Flt3ligand，Fracktalkine，GCSF，GRO，IFNγ，IL-1Rα，IL-3，IL-4，IL-6，IL-12p70，IL-13，IP10，MIP1α，VEGF，BCA-1，IL-16，MIP1d，IL-20，IL-28A，CXCL9MIG，CXCL111TAC，CCL19MIP3β。其中，蛋白 SCF，11sRAGE，

CXCL7NAP2，CCL14α-HCC1，sCD40L，GCSF，GRO，IL-1Rα，MCP3，IL-20，MIP1d，IL-28A，IL-29IFNλ1 未见有在移植肾急性排斥反应或移植肾排斥反应预警中的报道。

[0090] 下面对本发明的内容进行详细说明：

[0091] 发明人应用液态蛋白质芯片 luminex 检测技术对 142 例急性移植肾排斥反应病人和移植肾功能稳定的移植受者共 266 份血清中的 96 种细胞因子 / 趋化因子及其受体的表达水平进行了监测和综合分析，建立了含至少一种联合标志物的移植肾排斥反应预警系统和含至少一种因子联合标志物的移植肾排斥反应早期诊断系统，对急性排斥反应的预测和准确率达到 98.6%，内部交叉验证率分别为 97.1% 和 97.2%。其中，优选的，移植肾排斥反应预警系统中优选含有至少 3 种所述的蛋白抗体，移植肾排斥反应早期诊断系统含有至少 4 种所述的蛋白抗体。其中，所述试剂盒中所含有的本发明所述的蛋白因子越多，其准确度越高，但会增加实际操作中的复杂性。

[0092] 本发明所述的标记物蛋白的筛选过程为：

[0093] (1)采集肾移植受者的移植术前及术后多个时间点的血清、尿样和 PBMC，并对临床病例进行分析和分组。

[0094] (2)应用 Luminex 系统对各组血清和尿液中 96 种细胞因及趋化因子的表达水平进行检测。

[0095] (3)统计学方法(ANOVA)筛选出移植排斥反应相关的标志物，联合应用这些标志物群，建立以多因子综合分析为特征的移植肾排斥反应的诊断和预警体系。

[0096] 本发明的试剂盒是在美国密理博公司(Millipore)的 Luminex 检测试剂盒 Human Cytokine/Chemokine (MPXHCYTO-60K)、Human Cytokine/Chemokine Panel II (MPXHCYP2-62K)、Human Cytokine/Chemokine Panel III (MPXHCYP3-63K)、Human Soluble Cytokine Receptor Panel (HSCR-32K-PMX14)、Human Sepsis Panel I (HSEP-63K) 的基础上，对急性移植肾排斥反应病人和移植肾功能稳定的移植受者血清中的 96 种细胞因子 / 趋化因子及其受体的表达水平进行了分析得到的，本发明试剂盒中的试剂的大部分购自 Millipore 公司，公众可通过本发明中公开的货号从市场上购得。Luminex 检测试剂盒的原理为双抗体夹心法。

[0097] 本发明通过建立排斥反应的联合标志物群诊断和预警体系，具有更强的可行性和更高的敏感度。

附图说明：

[0098] 图 1 为实施例 2 中移植肾排斥反应早期诊断试剂盒的诊断曲线下面积图；

[0099] 图 2 为实施例 3 中移植肾排斥反应早期诊断试剂盒的诊断曲线下面积图；

[0100] 图 3 为实施例 5 中移植肾排斥反应预警试剂盒的诊断曲线下面积图；

[0101] 图 4 为实施例 6 中移植肾排斥反应预警试剂盒的诊断曲线下面积图；

[0102] 图 5 为移植肾功能稳定组和急性移植肾排斥反应组在早期诊断系统中各因子在血清中的浓度比较图，其中 0 为稳定组，1 为排斥组；

[0103] 图 6 为移植肾功能稳定组和急性移植肾排斥反应组在预警系统中各因子在血清中的浓度比较图，其中 0 为稳定组，1 为排斥组。

[0104] 以下具体实施方式仅对本发明的内容做进一步的解释和说明，并不对本发明的内

容构成限制。

具体实施方式

[0105] 实施例 1 移植肾排斥反应早期诊断试剂盒显著性差异标记物的筛选

[0106] 1、采集肾移植受者的移植术后多个时间点的血清，并对临床病例进行分析和分组。

[0107] 1.1 选取术前基础病或者并发症少，手术未发生严重并发症的移植肾受者，分别在肾移植受者移植术后 1 天、7 天、14 天、21 天、28 天、2 个月、3 个月～12 个月采集全血 2ml，室温静置 1h 后，1000rpm 离心 10 分钟收取上清，分装后 -80℃冰箱保存备用。另外随时收取急性排斥反应组患者在急性排斥反应确诊后的血清。

[0108] 1.2 根据肾移植患者血清肌酐、尿素氮、移植肾 B 超、临床表现、穿刺病理诊断结果和激素冲击治疗是否有效等综合分析和病例筛选，将收集病例分为两组：急性排斥反应组和移植肾功能稳定组。急性排斥反应组 33 例，移植肾功能稳定组 38 例。

[0109] 1.3 急性排斥反应组入组标准：

[0110] ①未发生肾移植外科并发症、感染以及其他严重并发症的肾移植患者；

[0111] ②活检穿刺病理诊断为急性排斥反应的病例；

[0112] ③未经活检穿刺的病例根据临床诊断和激素冲击治疗的有效性进行判断：肾移植患者血清肌酐 >120μmol/L，尿素氮 >8.3mmol/L，移植肾 B 超显示移植肾体积增大、血流减少、血管阻力增加，临床表现为发热，伴乏力关节酸痛、体重增加、血压升高、尿量减少和移植肾胀痛等，穿刺病理诊断结果为急性排斥反应，激素冲击治疗后血清肌酐下降 10% 以上。

[0113] 1.4 移植肾功能稳定组入组标准：

[0114] ①未发生肾移植外科并发症、感染以及其他严重并发症的肾移植患者；

[0115] ②未发生排斥反应；

[0116] ③移植肾功能恢复较快（14 天内血清肌酐降至正常（<120μmol/L））。

[0117] 2、应用 Luminex 系统对各组血清中 96 种细胞因子及趋化因子的表达水平进行检测。

[0118] 2.1 选取移植肾功能稳定组病人血清肌酐恢复正常时（肾移植术后 7 天或 14 天）的血清样本共 38 份急性排斥反应组发生排斥反应并确诊后时收取的血清 32 份；

[0119] 2.2 应用美国密理博公司（Millipore）Luminex 检测试剂盒（MPXHCYTO-60K、MPXHCYP2PMX23、MPXHCYP2-62K、MPXHCYP3-63K、HSCR-32K-PMX14、HSEP-63K-06）共检测 96 种细胞因子、细胞因子受体以及趋化因子在急性排斥反应组和移植肾功能稳定组病人血清中的表达水平；具体实验过程见各试剂盒说明书；其中，移植肾功能稳定组和急性移植肾排斥反应组早期诊断系统中各因子在血清中的浓度比较如图 5 所示，其中 0 为稳定组，1 为排斥组；

[0120] 简要实验过程为：应用 assay buffer200μl 预湿实验板，置于振荡器振摇 10 分钟后应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体，纸巾吸干实验板底后分别加入 25μl 梯度稀释的标准品、对照和样品，随后每孔加入 25μl 珠子，封板后将实验板置于振荡器振摇 4℃孵育过夜，洗板后加入检测抗体，室温振荡器振摇实验板 1h，再加入 streptavidin-phycoerythrin 标记抗体后孵育 30min，洗板后 luminex200 上机检测，

MILLIPLEX Analyst 软件分析；

[0121] 3、统计学方法筛选出移植排斥反应相关的标志物，联合应用这些标志物群，建立以多因子综合分析为特征的移植肾排斥反应的诊断体系。

[0122] 应用统计学分析软件 SPSS16.0 对检测数据进行正态性检验和方差齐性检验后，非正态分布资料应用 minitab15.0 进行数据转换，经数据转换后为正态分布的应用 T 检验分析急性排斥反应组和移植肾功能稳定组间表达水平有显著性差异的标记物，未能转换为正态分布的资料经非参分析的方法分析表达水平有显著性差异的标记物。分析后共得到35个有显著性差异的标记物：SCF, sEGFR, sIL-2Rα, sRAGE, sTNFR1, sTNFR2, sVEGFR2, sVCAM1, sFas, CCL14α-HCC1, sCD40L, Eotaxin, FGF2, Flt3ligand, Fracktalkine, GCSF, GRO, IFNγ, IL-1Rα, IL-3, IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-13, IP10, MIP1α, VEGF, BCA-1, IL-16, MIP1d, IL-20, IL-28A, CXCL9MIG, CXCL111TAC, CCL19MIP3β。

[0123] 实施例 2

[0124] 将实施例 1 得到的 35 个有显著性差异的标记物进行分析，对这些表达水平有显著性差异的标记物进行 logstic 回归分析后得到 4 个因子：SCF、sEGFR、sIL2Ralpha 和 Eotaxin 组成的移植肾急性排斥反应的预警诊断系统，统计学分析得到预测阳性率为 91.4。ROC 诊断曲线下面积为 97.5%，见附图 1。

[0125] 其中，试剂盒的具体组成为：

[0126] (1) 96 孔滤膜板和两张封板膜；购自 Millipore 公司，货号 MX-PLATE；

[0127] (2) 所述试剂盒中蛋白抗体的标准品；购自 Millipore 公司，货号 MXH8060, MXH8062, MXH8063, LHSP-8063 和 HSCR-8032；

[0128] (3)质控对照；购自 Millipore 公司，货号为：MXH6060, MXH6062, MXH6063, LHSP-6063 和 HSCR-6032；

[0129] (4) 血清基质；购自 Millipore 公司，货号为：MXHSM, LHSP-SM, HSCR-SM；

[0130] (5) 实验液；购自 Millipore 公司，货号 L-AB；

[0131] (6) 洗液；购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

[0132] (7)streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9, L-SAPE3, L-SAPE10, L-SAPE11, L-SAPE6；

[0133] (8) 珠子稀释液；液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0134] (9) 抗 SCF 的抗体、抗 sEGFR 的抗体、抗 sIL2Ralpha 的抗体和抗 Eotaxin 的抗体；购自 Millipore 公司，货号 MXH1060, MXH1062, MXH1063, LHSP-1063, HSCR-1032；

[0135] (10) 预包被抗体的珠子，购自 Millipore 公司，货号 L-AB；货号 MXHPMX39, MXHP2PMX23, HSP, HASP-PAI1, MXH3PMX9, HSCRPMX14。

[0136] 实施例 3：移植肾急性排斥反应早期诊断试剂盒的组成

[0137] 将实施例 1 得到的 35 个有显著性差异的标记物进行分析，对这些表达水平有显著性差异的标记物进行 logstic 回归分析后得到 14 个因子：sTNFR2、Flt3Ligand、Fractalkine、IL1ra、IL2、MDC、MIP1alpha、SDF1alphabeta、TARC、TRAIL、SCF、CCL20、MIP3alpha 和 XCL1Lymphotactin；统计学分析得到早期诊断系统预测阳性率为 98.6%，ROC 诊断曲线下面积为 99.8%，见附图 2。

[0138] 其中，试剂盒的具体组成为：

[0139] （1）96 孔滤膜板和两张封板膜；购自 Millipore 公司，货号 MX-PLATE；

[0140] （2）所述试剂盒中蛋白抗体的标准品；购自 Millipore 公司，货号 MXH8060, MXH8062, MXH8063, LHSP-8063 和 HSCR-8032；

[0141] （3）质控对照；购自 Millipore 公司，货号为：MXH6060, MXH6062, MXH6063, LHSP-6063 和 HSCR-6032；

[0142] （4）血清基质；购自 Millipore 公司，货号为：MXHSM, LHSP-SM, HSCR-SM；

[0143] （5）实验液；购自 Millipore 公司，货号 L-AB；

[0144] （6）洗液；购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

[0145] （7）streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9, L-SAPE3, L-SAPE10, L-SAPE11, L-SAPE6；

[0146] （8）珠子稀释液；液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0147] （9）抗 sTNFR2 的抗体、抗 Flt3Ligand 的抗体、抗 Fractalkine 的抗体、抗 IL1ra 的抗体、抗 IL2 的抗体、抗 MDC 的抗体、抗 MIP1alpha 的抗体、抗 SDF1alphabeta 的抗体、抗 TARC 的抗体、抗 TRAIL 的抗体、抗 SCF 的抗体、抗 CCL20 的抗体、抗 MIP3alpha 的抗体和抗 XCL1Lymphotactin 的抗体；购自 Millipore 公司，货号 MXH1060，MXH1062，MXH1063，LHSP-1063, HSCR-1032；

[0148] （10）预包被抗体的珠子，购自 Millipore 公司，货号 L-AB；货号 MXHPMX39，MXHP2PMX23, HSP，HASP-PAI1, MXH3PMX9，HSCRPMX14。

[0149] 实施例 4 移植肾排斥反应预警试剂盒的显著性差异标记物的筛选

[0150] 1、采集肾移植受者的移植术后多个时间点的血清，并对临床病例进行分析和分组。

[0151] 1.1 选取术前基础病或者并发症少，手术未发生严重并发症的移植肾受者，分别在肾移植受者移植术后 1 天、7 天、14 天、21 天、28 天、2 个月、3 个月…12 个月采集全血 2ml，室温静置 1h 后，1000rpm 离心 10 分钟收取上清，分装后 -80℃冰箱保存备用。另外随时收取急性排斥反应组患者在急性排斥反应确诊后的血清。

[0152] 1.2 根据肾移植患者血清肌酐、尿素氮、移植肾 B 超、临床表现、穿刺病理诊断结果和激素冲击治疗是否有效等综合分析和病例筛选，将收集病例分为两组：急性排斥反应组和移植肾功能稳定组。急性排斥反应组 33 例，移植肾功能稳定组 38 例。

[0153] 1.3 急性排斥反应组入组标准：

[0154] ①未发生肾移植外科并发症、感染以及其他严重并发症的肾移植患者。

[0155] ②活检穿刺病理诊断为急性排斥反应的病例

[0156] ③未经活检穿刺的病例根据临床诊断和激素冲击治疗的有效性进行判断：肾移植患者血清肌酐 >120μmol/L，尿素氮 >8.3mmol/L，移植肾 B 超显示移植肾体积增大、血流减少、血管阻力增加，临床表现为发热，伴乏力关节酸痛、体重增加、血压升高、尿量减少和移植肾胀痛等，穿刺病理诊断结果为急性排斥反应，激素冲击治疗后血清肌酐下降 10% 以上；

[0157] 1.4 移植肾功能稳定组入组标准：

[0158] ①未发生肾移植外科并发症、感染以及其他严重并发症的肾移植患者。

[0159] ②未发生排斥反应

[0160] ③移植肾功能恢复较快（14 天内血清肌酐降至正常（<120μmol/L））

[0161] 2、应用 Luminex 系统对各组血清中 96 种细胞因子及趋化因子的表达水平进行检测。

[0162] 2.1 选取移植肾功能稳定组病人血清肌酐恢复正常时(肾移植术后 7 天或 14 天)的血清样本共 38 份急性排斥反应组发生排斥反应并确诊后时收取的血清 32 份

[0163] 2.2 应用美国密理博公司(Millipore)Luminex 检测试剂盒:MPXHCYTO-60K、MPXHCYP2PMX23、MPXHCYP2-62K、MPXHCYP3-63K、HSCR-32K-PMX14、HSEP-63K-06 ;共检测 96 种细胞因子、细胞因子受体以及趋化因子在急性排斥反应组和移植肾功能稳定组病人血清中的表达水平。具体实验过程见各试剂盒说明书。其中,移植肾功能稳定组和急性移植肾排斥反应组在预警系统中各因子在血清中的浓度比较如图 6 所示,其中 0 为稳定组,1 为排斥组 ;

[0164] 简要实验过程:应用 assay buffer200μl 预湿实验板,置于振荡器振摇 10 分钟后应用负压吸引器吸走实验板孔中的液体,纸巾吸干实验板底后分别加入 25μl 梯度稀释的标准品、对照和样品,随后每孔加入 25μl 珠子,封板后将实验板置于振荡器振摇 4℃孵育过夜,洗板后加入检测抗体,室温振荡器振摇实验板 1h,再加入 streptavidin-phycoerythrin 标记抗体后孵育 30min,洗板后 luminex200 上机检测,MILLIPLEX Analyst 软件分析

[0165] 3、统计学方法筛选出移植排斥反应相关的标志物,联合应用这些标志物群,建立以多因子综合分析为特征的移植肾排斥反应预警体系。

[0166] 应用统计学分析软件 SPSS16.0 对检测数据进行正态性检验和方差齐性检验后,非正态分布资料应用 minitab15.0 进行数据转换,经数据转换后为正态分布的应用 T 检验分析急性排斥反应组和移植肾功能稳定组间表达水平有显著性差异的标记物,未能转换为正态分布的资料经非参分析的方法分析表达水平有显著性差异的标记物。分析后共得到 35 个有显著性差异的标记物 :SCF, sEGFR, sIL-2Rα , sRAGE, sTNFR1, sTNFR2, sVEGFR2, sVCAM1, sFas, CCL14α-HCC1, sCD40L, Eotaxin, FGF2, Flt3ligand, Fracktalkine, GCSF, GRO, IFNγ , IL-1Rα , IL-3, IL-4, IL-6, IL-12p70, IL-13, IP10, MIP1α , VEGF, BCA-1, IL-16, MIP1d, IL-20, IL-28A, CXCL9MIG, CXCL111TAC, CCL19MIP3β 。

[0167] 实施例 5 移植肾排斥反应预警试剂盒

[0168] 将实施例 4 得到的 35 个有显著性差异的标记物进行分析,对这些表达水平有显著性差异的标记物进行 logstic 回归分析后得到 3 个因子 :IL-1Rα , sCD40L 和 IL-20 组成的移植肾急性排斥反应的预警诊断系统,统计学分析得到预测阳性率为 91.4。ROC 诊断曲线下面积为 97.5%,见附图 3。

[0169] 其中,试剂盒的具体组成为 :

[0170] (1)96 孔滤膜板和两张封板膜 ;购自 Millipore 公司,货号 MX-PLATE ;

[0171] (2)所述试剂盒中蛋白抗体的标准品 ;购自 Millipore 公司,货号 MXH8060, MXH8062, MXH8063, LHSP-8063 和 HSCR-8032 ;

[0172] (3)质控对照 ;购自 Millipore 公司,货号为 :MXH6060, MXH6062, MXH6063, LHSP-6063 和 HSCR-6032 ;

[0173] (4)血清基质 ;购自 Millipore 公司,货号为 :MXHSM, LHSP-SM, HSCR-SM ;

[0174] (5)实验液 ;购自 Millipore 公司,货号 L-AB ;

[0175] （6）洗液；购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

[0176] （7）streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9，L-SAPE3，L-SAPE10，L-SAPE11，L-SAPE6；

[0177] （8）珠子稀释液；液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0178] （9）抗 IL-1Rα 的抗体，抗 sCD40L 的抗体和抗 IL-20 的抗体；购自 Millipore 公司，货号 MXH1060，MXH1062，MXH1063，LHSP-1063，HSCR-1032；

[0179] （10）预包被抗体的珠子，购自 Millipore 公司，货号 L-AB；货号 MXHPMX39，MXHP2PMX23，HSP，HASP-PAI1，MXH3PMX9，HSCRPMX14。

[0180] 实施例 6 移植肾排斥反应预警试剂盒

[0181] 将实施例 4 得到的 35 个有显著性差异的标记物进行分析，对这些表达水平有显著性差异的标记物进行 logstic 回归分析后得到 11 个因子：sIL-1R1，sVCAM1，SICAM-1，Fracktalkine，IL-1Rα，IP10，MDC，MIP1α，SDFα β，TRAIL 和 SCF 组成的移植肾急性排斥反应的预警诊断系统，统计学分析得到预测阳性率为 98.6%，ROC 诊断曲线下面积为 99.8%。，见附图 4。

[0182] 其中，试剂盒的具体组成为：

[0183] （1）96 孔滤膜板和两张封板膜；购自 Millipore 公司，货号 MX-PLATE；

[0184] （2）所述试剂盒中蛋白抗体的标准品；购自 Millipore 公司，货号 MXH8060，MXH8062，MXH8063，LHSP-8063 和 HSCR-8032；

[0185] （3）质控对照；购自 Millipore 公司，货号为：MXH6060，MXH6062，MXH6063，LHSP-6063 和 HSCR-6032；

[0186] （4）血清基质；购自 Millipore 公司，货号为：MXHSM，LHSP-SM，HSCR-SM；

[0187] （5）实验液；购自 Millipore 公司，货号 L-AB；

[0188] （6）洗液；购自 Millipore 公司，货号 L-WB；

[0189] （7）streptavidin-phycoerythrin 标记抗体；购自 Millipore 公司，货号 L-SAPE9，L-SAPE3，L-SAPE10，L-SAPE11，L-SAPE6；

[0190] （8）珠子稀释液；液购自 Millipore 公司，货号 LBD；

[0191] （9）抗 sIL-1R1 的抗体，抗 sVCAM1 的抗体，抗 SICAM-1 的抗体，抗 Fracktalkine 的抗体，抗 IL-1Rα 的抗体，抗 IP10 的抗体，抗 MDC 的抗体，抗 MIP1α 的抗体，抗 SDFα β 的抗体，抗 TRAIL 的抗体和抗 SCF 的抗体；购自 Millipore 公司，货号 MXH1060，MXH1062，MXH1063，LHSP-1063，HSCR-1032；

[0192] （10）预包被抗体的珠子，购自 Millipore 公司，货号 L-AB；货号 MXHPMX39，MXHP2PMX23，HSP，HASP-PAI1，MXH3PMX9，HSCRPMX14。

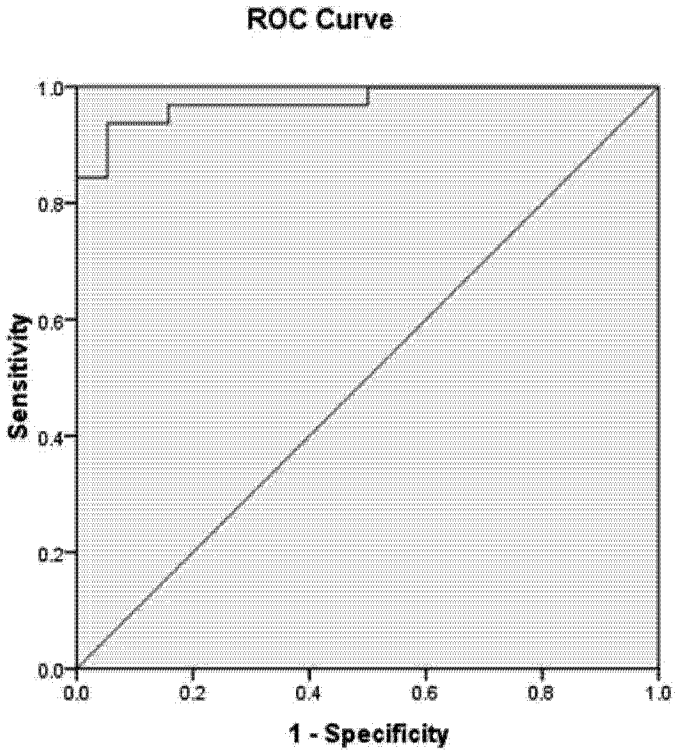

ROC Curve
Sensitivity
1 - Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

图 1

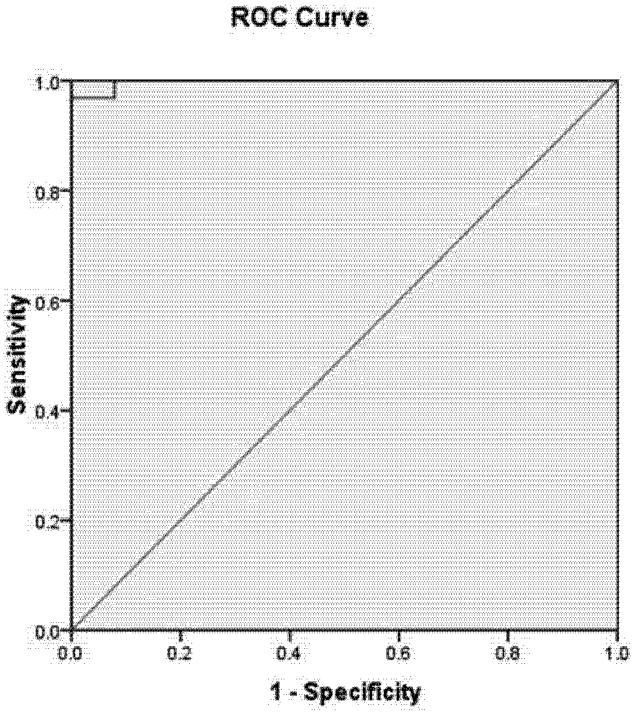

ROC Curve
Sensitivity
1 - Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

图 2

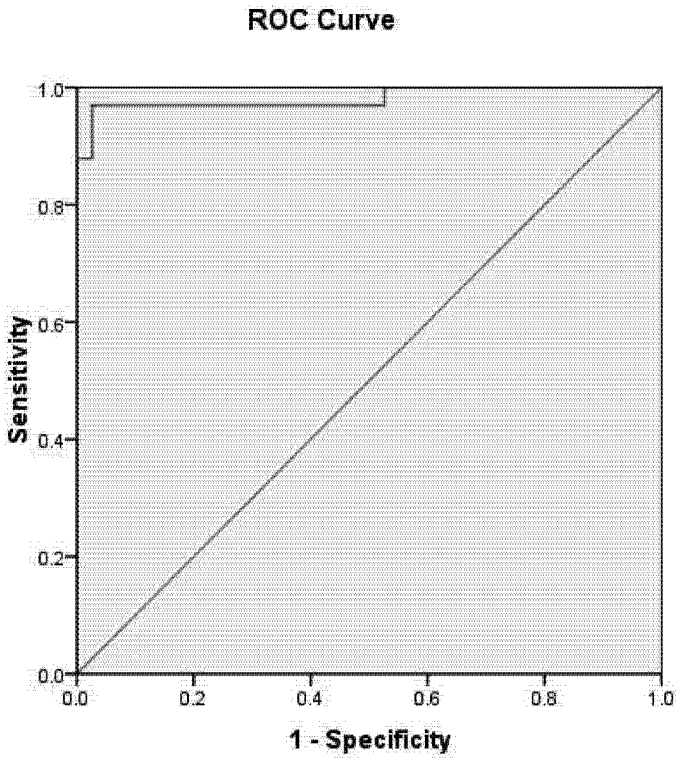

ROC Curve
Sensitivity
1 - Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

图 3

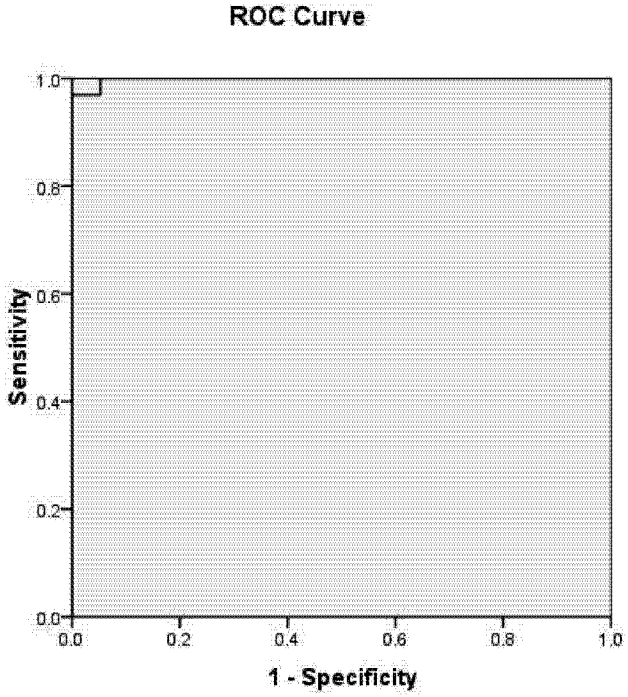
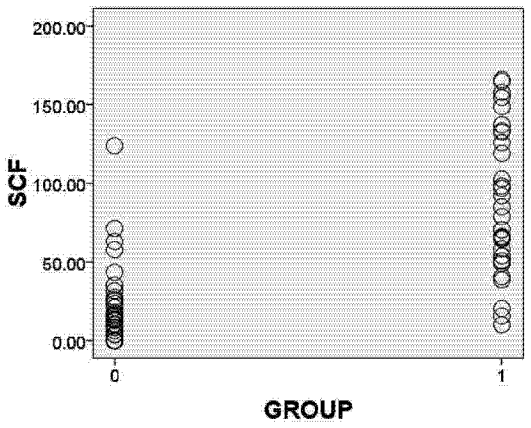
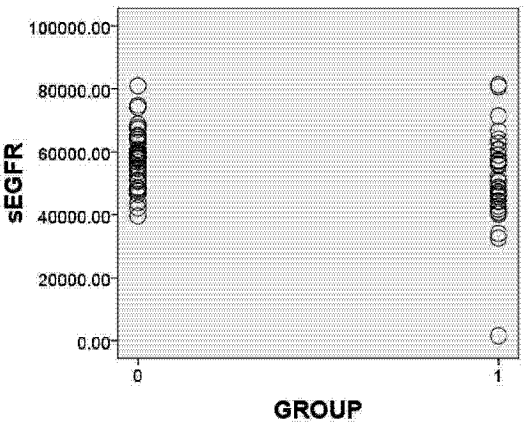
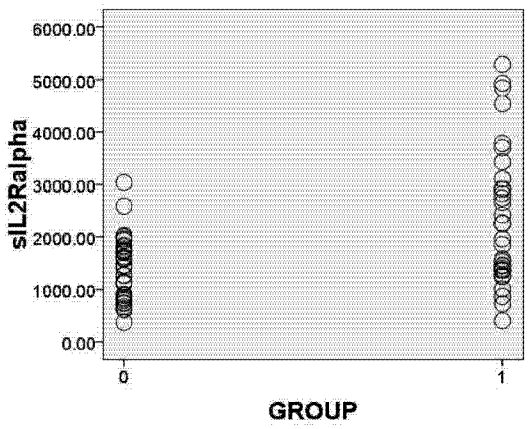
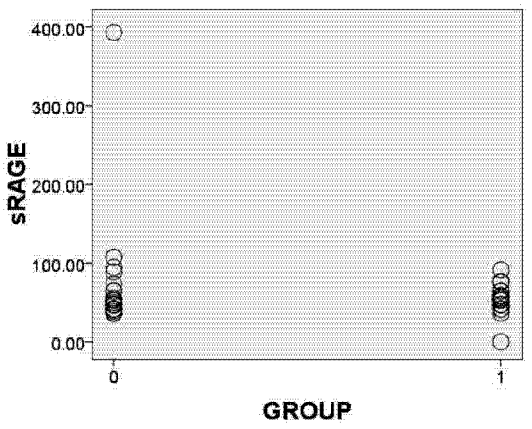

ROC Curve
Sensitivity
1 - Specificity
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0

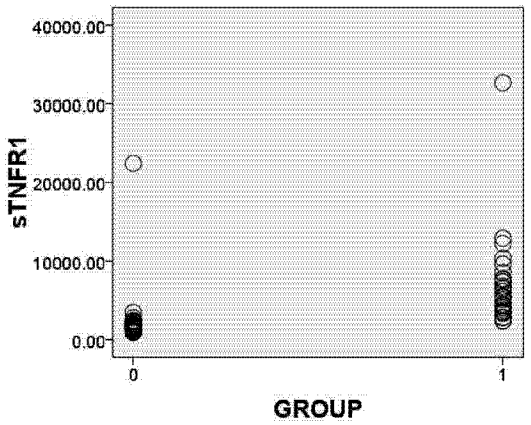
图 4

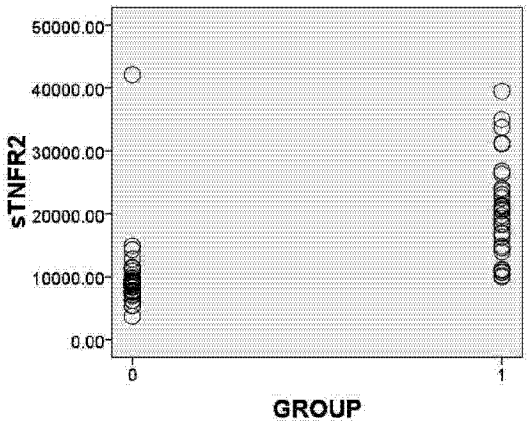

SCF
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
1
GROUP

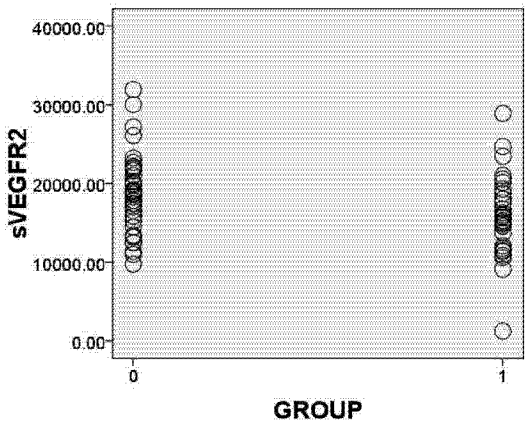

sEGFR
100000.00
80000.00
60000.00
40000.00
20000.00
0.00
0
1
GROUP

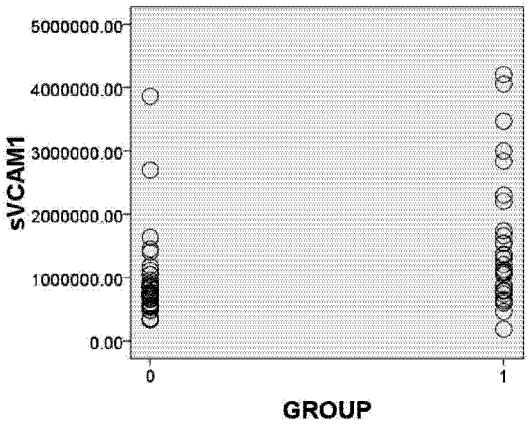

sIL2Ralpha
6000.00
5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
0.00
0
1
GROUP

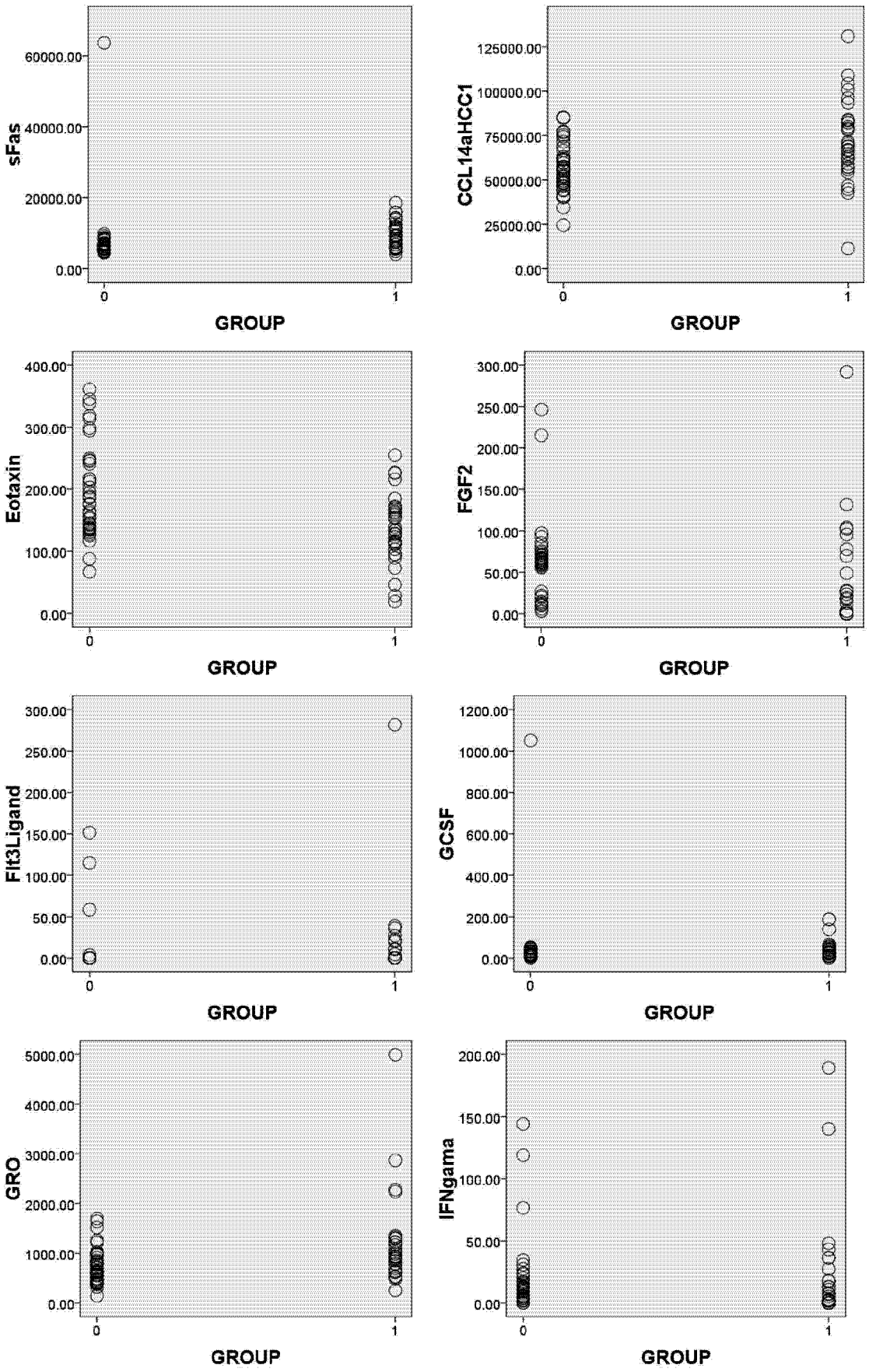

sRAGE
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP

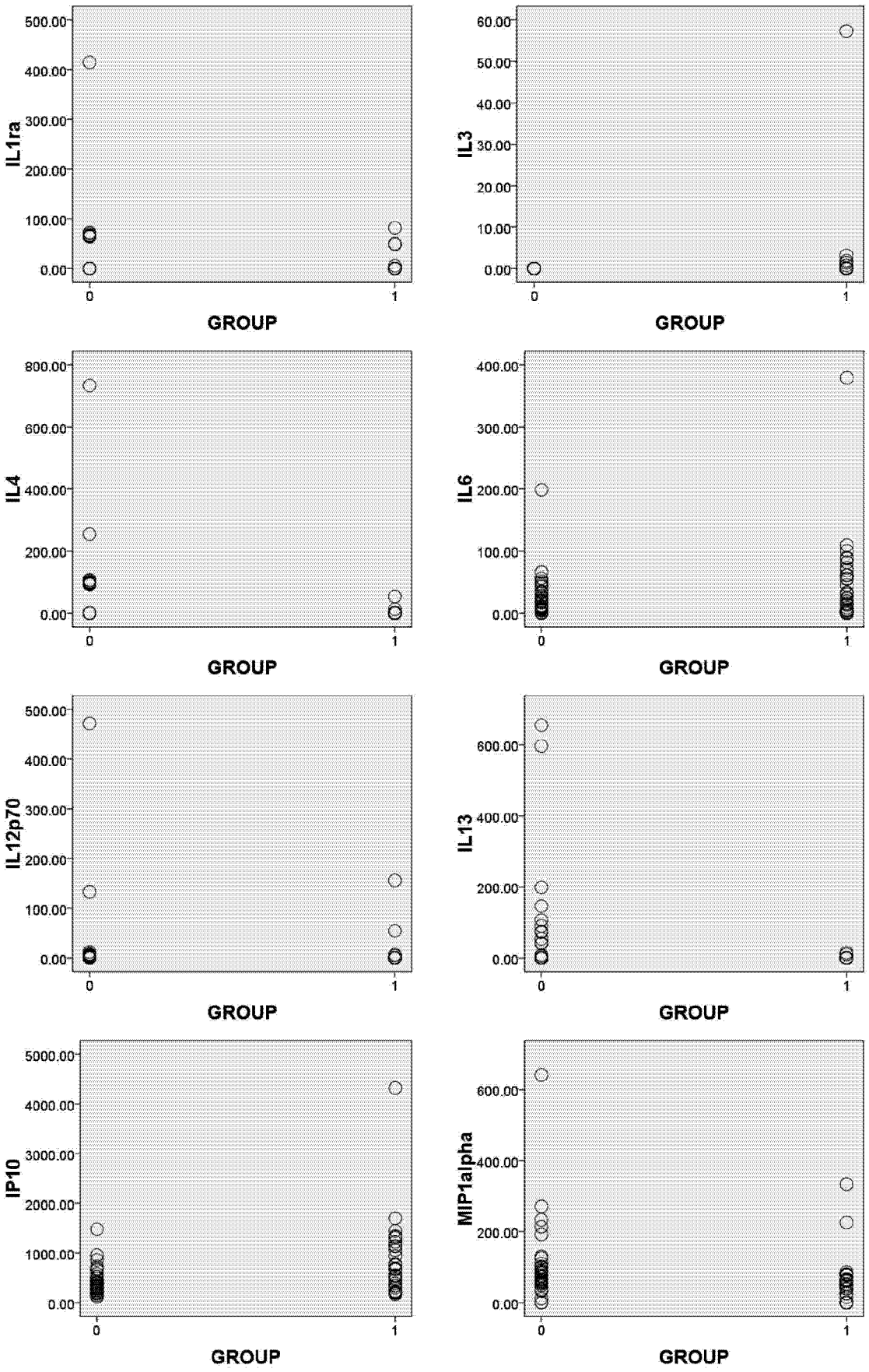

sTNFR1
40000.00
30000.00
20000.00
10000.00
0.00
0
1
GROUP

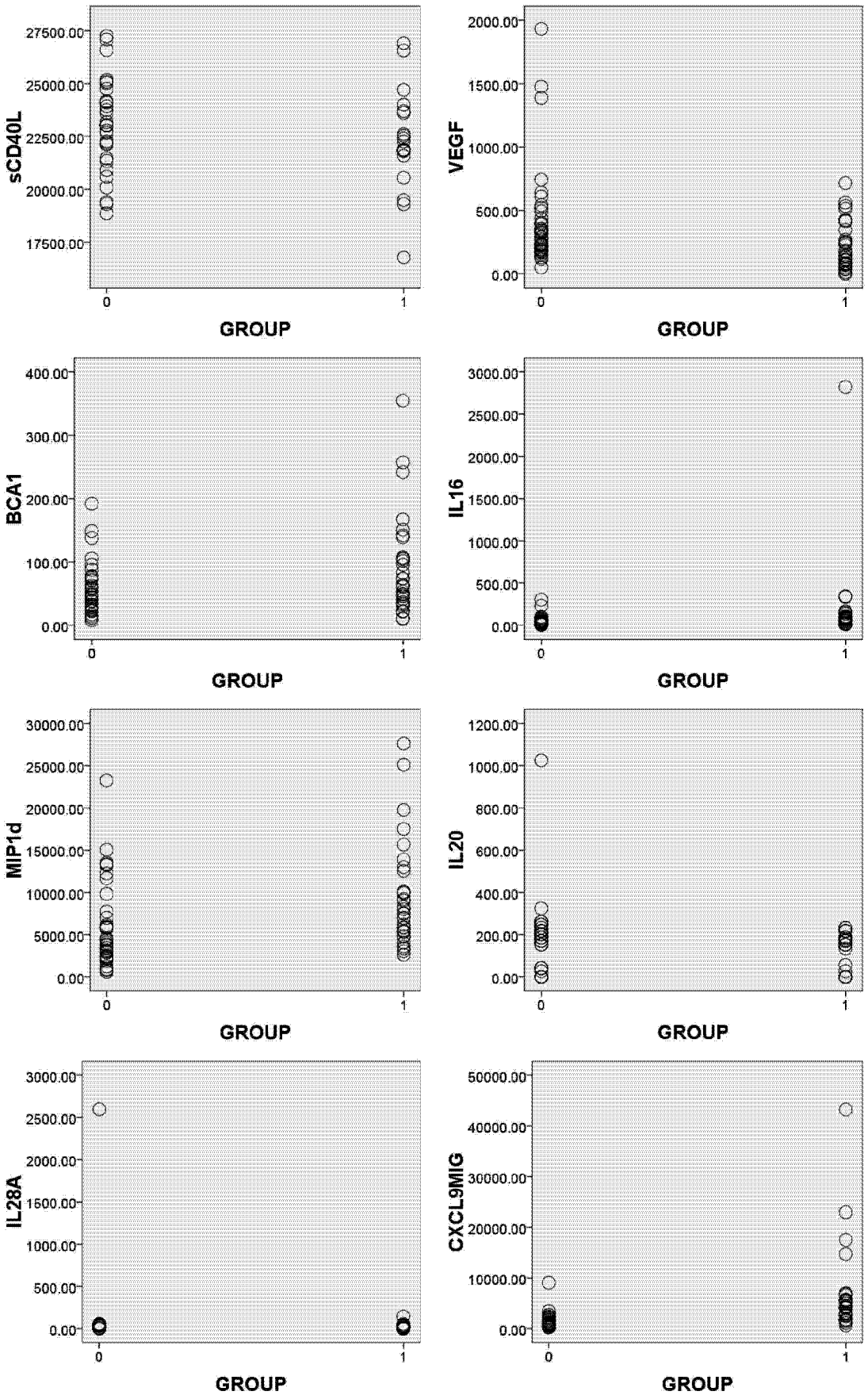

sTNFR2
50000.00
40000.00
30000.00
20000.00
10000.00
0.00
0
1
GROUP


sVEGFR2
40000.00
30000.00
20000.00
10000.00
0.00
0
1
GROUP


sVCAM1
5000000.00
4000000.00
3000000.00
2000000.00
1000000.00
0.00
0
1
GROUP


sFas
60000.00
40000.00
20000.00
0.00
0
1
GROUP
CCL14aHCC1
125000.00
100000.00
75000.00
50000.00
25000.00
0.00
0
1
GROUP
Eotaxin
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP
FGF2
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
1
GROUP
Flt3Ligand
300.00
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
1
GROUP
GCSF
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP
GRO
5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
0.00
0
1
GROUP
IFNgama
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
1
GROUP


IL1ra
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP
IL3
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
1
GROUP
IL4
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP
IL6
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP
IL12p70
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP
IL13
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP
IP10
5000.00
4000.00
3000.00
2000.00
1000.00
0.00
0
1
GROUP
MIP1alpha
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP


sCD40L
27500.00
25000.00
22500.00
20000.00
17500.00
0
1
GROUP
VEGF
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP
BCA1
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP
IL16
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP
MIP1d
30000.00
25000.00
20000.00
15000.00
10000.00
5000.00
0.00
0
1
GROUP
IL20
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP
IL28A
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP
CXCL9MIG
50000.00
40000.00
30000.00
20000.00
10000.00
0.00
0
1
GROUP

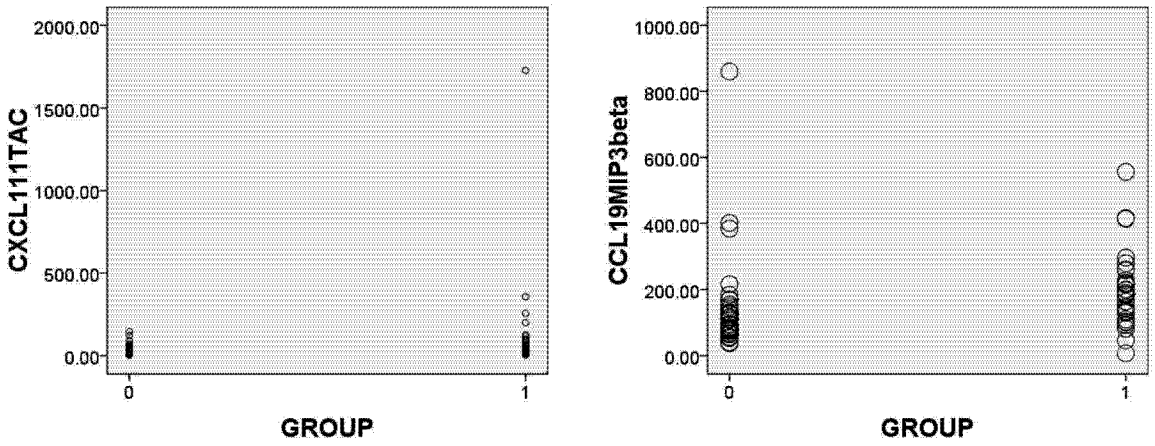
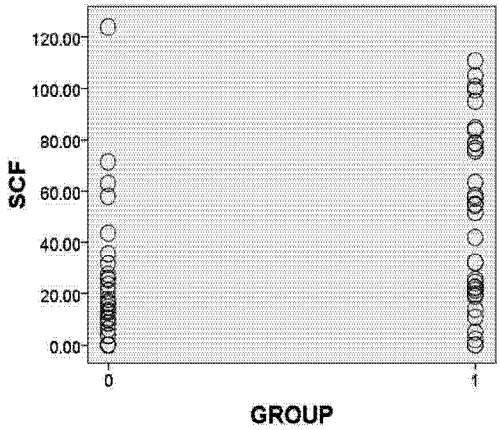
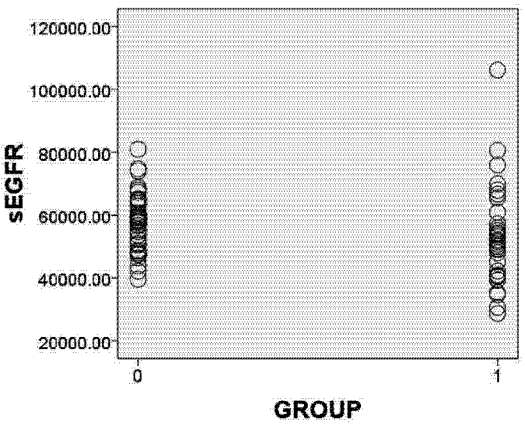
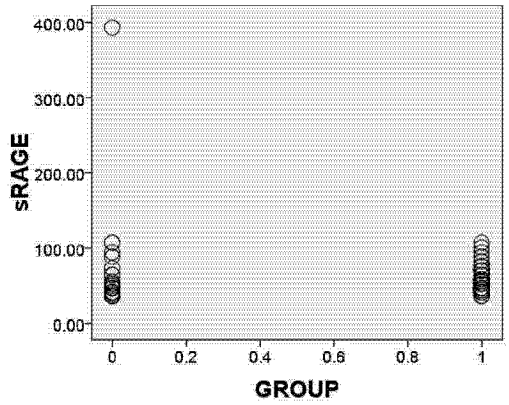
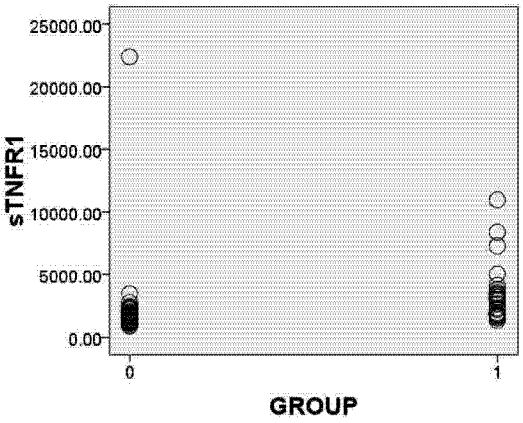

CXCL111TAC
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP
CCL19MIP3beta
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP

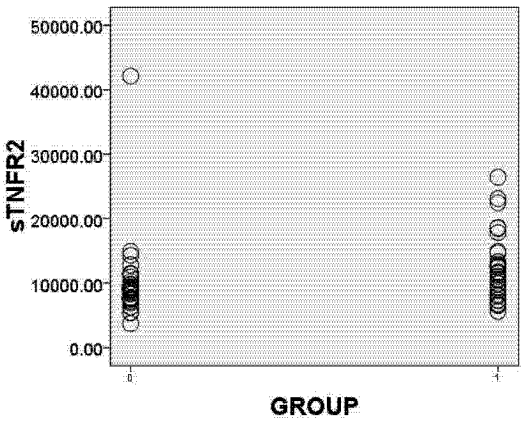
图 5

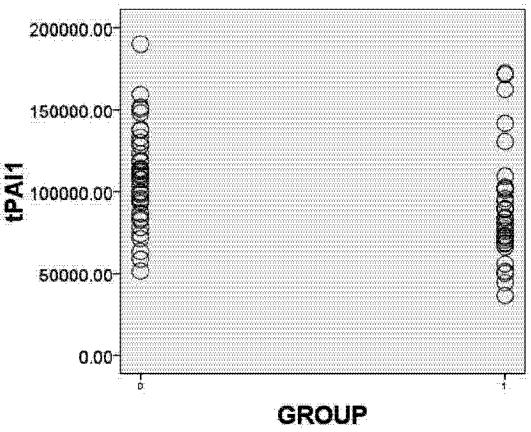

SCF
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
0
1
GROUP

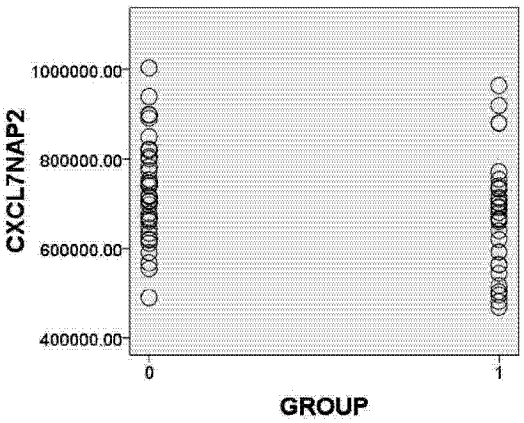

sEGFR
120000.00
100000.00
80000.00
60000.00
40000.00
20000.00
0
1
GROUP

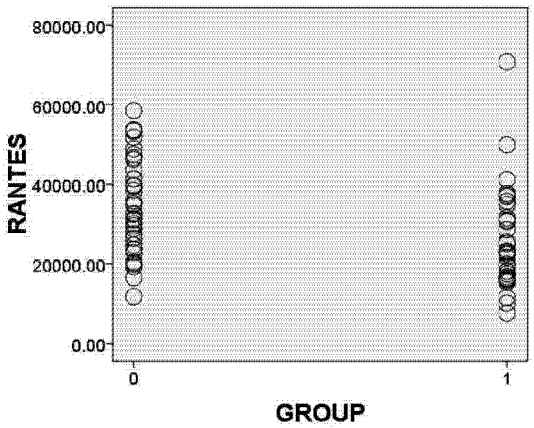

sRAGE
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
0.2
0.4
0.6
0.8
1
GROUP

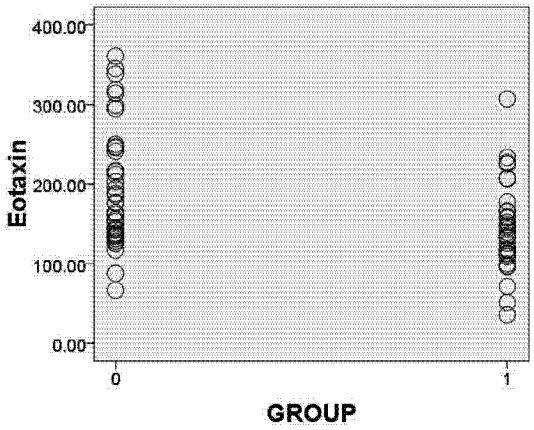

sTNFR1
25000.00
20000.00
15000.00
10000.00
5000.00
0.00
0
1
GROUP

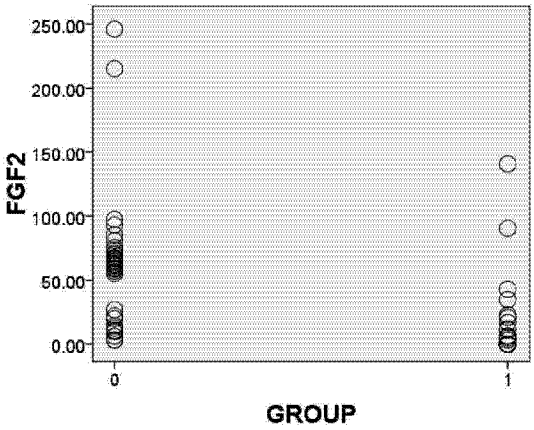

sTNFR2
50000.00
40000.00
30000.00
20000.00
10000.00
0.00
GROUP

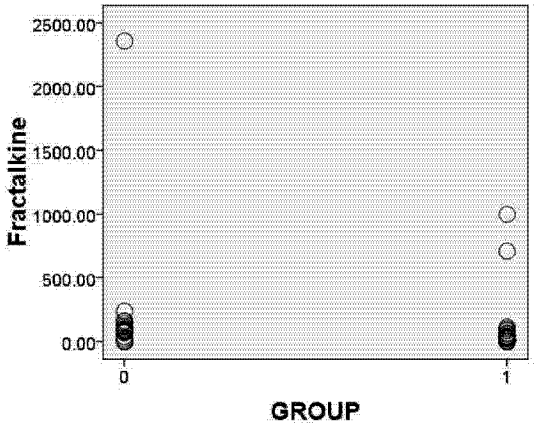

tPAI1
200000.00
150000.00
100000.00
50000.00
0.00
GROUP

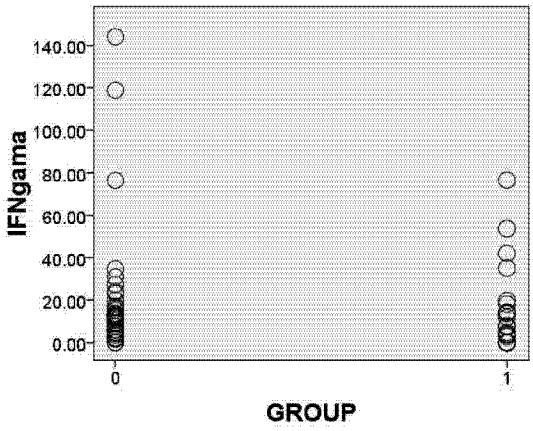

CXCL7NAP2
1000000.00
800000.00
600000.00
400000.00
0
1
GROUP

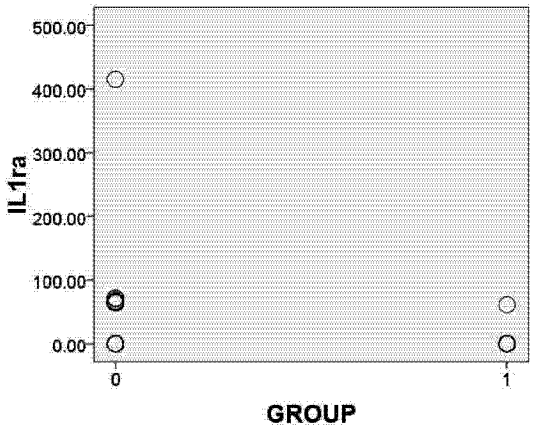

RANTES
80000.00
60000.00
40000.00
20000.00
0.00
0
1
GROUP

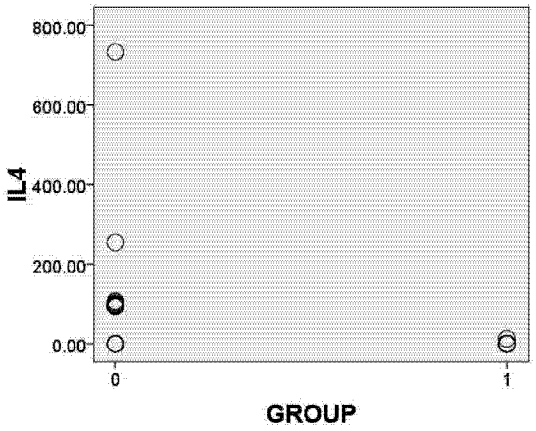

Eotaxin
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP

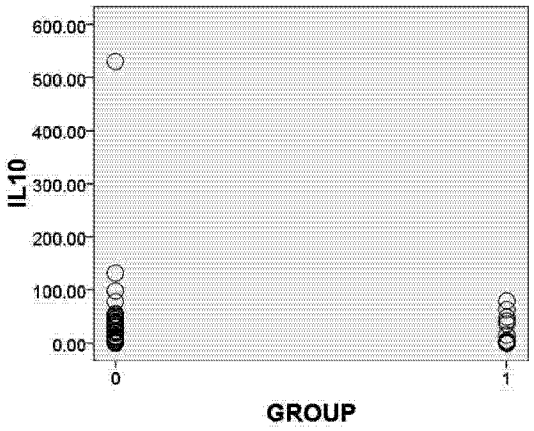

FGF2
250.00
200.00
150.00
100.00
50.00
0.00
0
1
GROUP

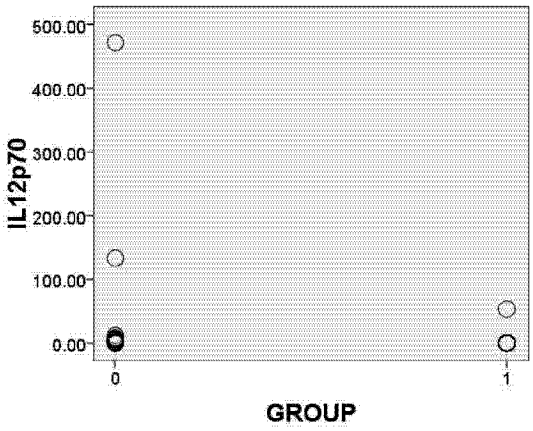

Fractalkine
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP

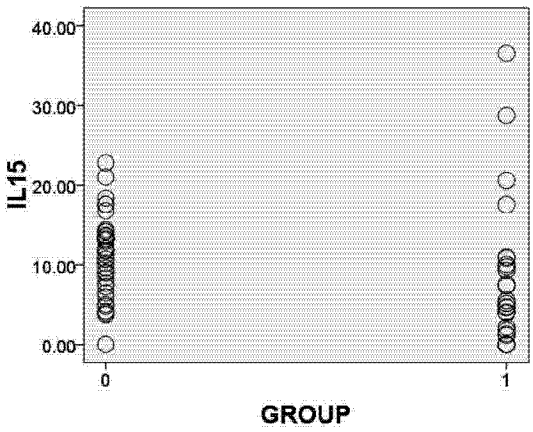

IFNgama
140.00
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
0
1
GROUP

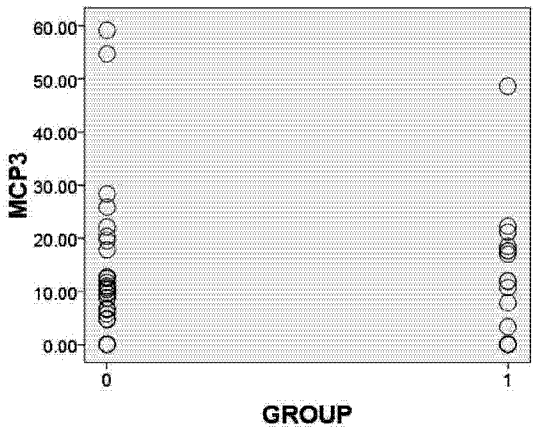

IL1ra
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP

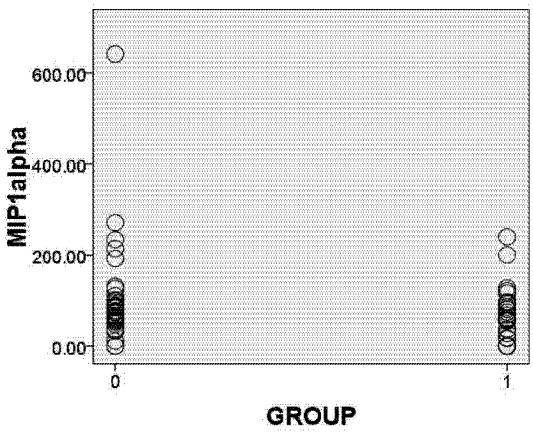

IL4
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP

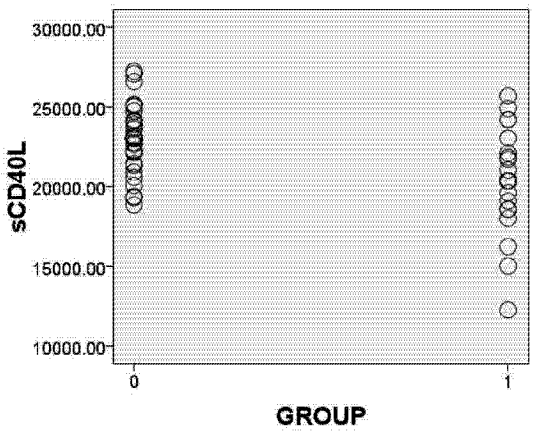

IL10
600.00
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP

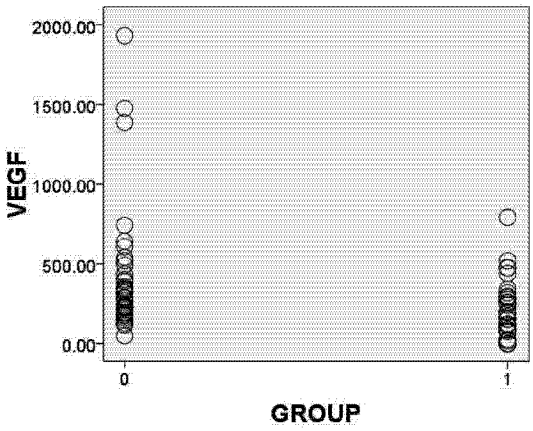

IL12p70
500.00
400.00
300.00
200.00
100.00
0.00
0
1
GROUP

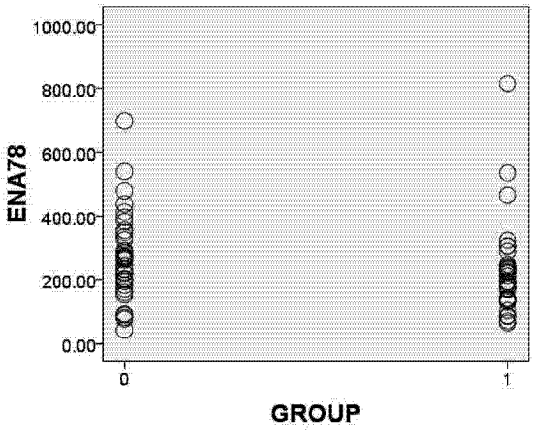

IL15
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
1
GROUP

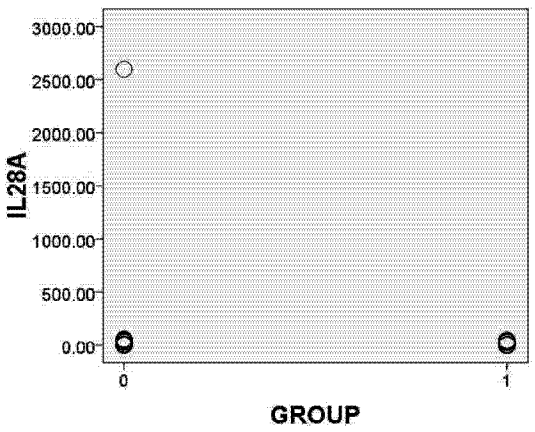

MCP3
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
0
1
GROUP

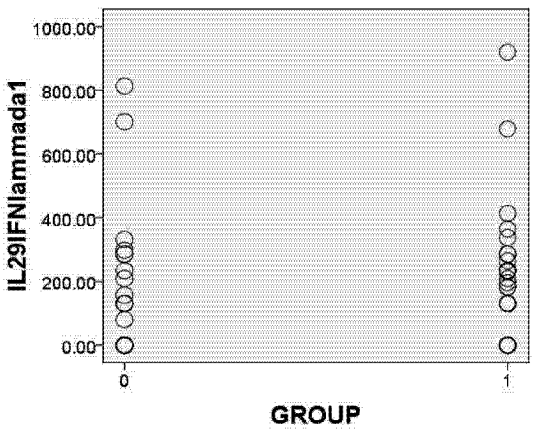

MIP1alpha
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP


sCD40L
30000.00
25000.00
20000.00
15000.00
10000.00
0
1
GROUP


VEGF
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP


ENA78
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP


IL28A
3000.00
2500.00
2000.00
1500.00
1000.00
500.00
0.00
0
1
GROUP


IL29IFNlammada1
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
0
1
GROUP

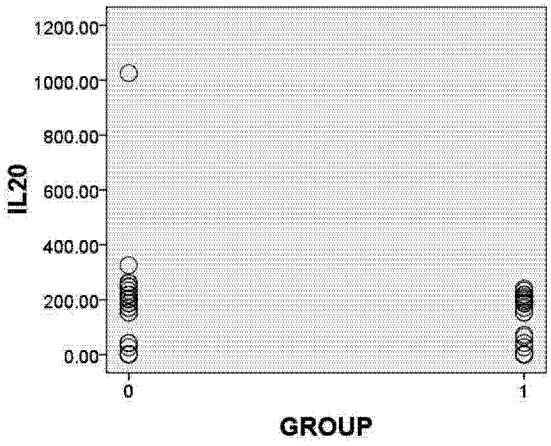
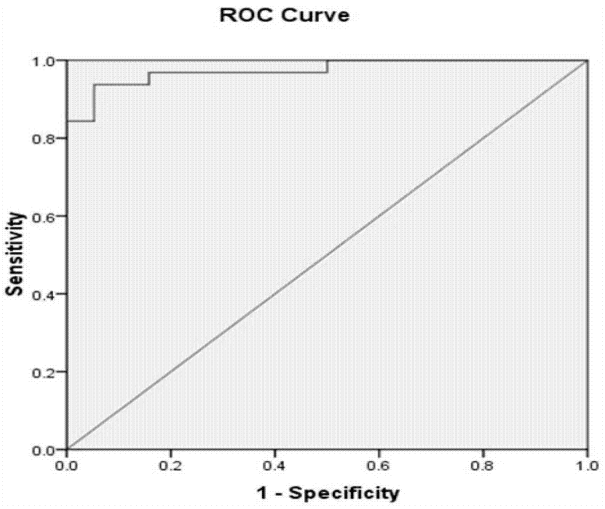


图 6

专利名称(译)	用于预警肾移植后排斥反应的试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN102854306A	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN201210274365.4	申请日	2011-12-23
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军第三〇九医院		
[标]发明人	石炳毅 许晓光 黄海燕		
发明人	石炳毅 许晓光 黄海燕		
IPC分类号	G01N33/53		
代理人(译)	王明霞		
其他公开文献	CN102854306B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种预警试剂盒，具体讲，涉及一种移植肾排斥反应预警试剂盒及其使用方法。应用液态蛋白质芯片luminex检测技术对142例急性移植肾排斥反应病人和移植肾功能稳定的移植受者共266份血清中的96种细胞因子/趋化因子及其受体的表达水平进行了监测和综合分析，建立了一种移植肾排斥反应早期诊断系统，对急性排斥反应的预测和准确率达到98.6%，内部交叉验证率分别为97.1%和97.2%。