



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103323586 A

(43) 申请公布日 2013. 09. 25

(21) 申请号 201310234706. X

(22) 申请日 2013. 06. 14

(71) 申请人 中国科学院苏州生物医学工程技术
研究所

地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城科
灵路 88 号

(72) 发明人 王红梅 李勇 段生宝 丁少华
田晶晶 陈焜洲 史素霞 李冬

(74) 专利代理机构 苏州广正知识产权代理有限
公司 32234

代理人 刘述生

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

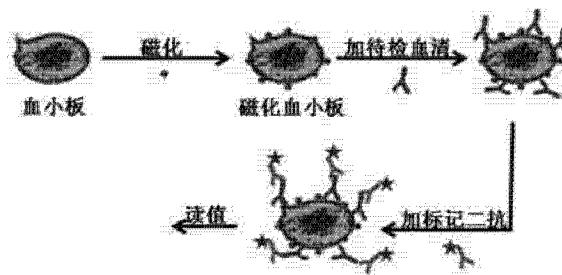
权利要求书1页 说明书6页 附图1页

(54) 发明名称

一种血小板磁化免疫标记分析方法

(57) 摘要

本发明公开了一种血小板磁化免疫标记分析方法，将血小板与磁珠混匀，磁化血小板得到悬液，将磁化血小板悬液与检测样本混匀孵育后并洗涤，加入标记二抗孵育得到混合液，施加磁力使混合液分层，取上层反应液直接测定或将下层中的磁化血小板洗涤后测定结果即双相互补性免疫分析。通过上述方式，本发明提供的一种血小板磁化免疫标记分析方法，用于血小板相关抗原抗体检测及交叉配血，施加磁力使洗涤不需要离心，操作简便，取上层反应液直接测定的标记抗体吸附试验克服了免疫标记技术的非特异性吸附，减少封闭和洗涤的过程，耗时短。本发明可对大量样本进行检测，易于自动化，双相的两种检测结果可以相互验证，提高检测结果的准确性。



1. 一种血小板磁化免疫标记分析方法,其特征在于,包括步骤为:

(1) 将收集的血小板与磁珠混匀,对所述血小板进行磁化,得到具有磁性的磁化血小板悬液;

(2) 将所述磁化血小板悬液与检测样本混匀后进行孵育并洗涤,再加入标记二抗孵育得到混合液,施加磁力使所述混合液分层,所述磁化血小板位于所述混合液的下层,取所述混合液的上层反应液直接测定或将所述混合液下层中的所述磁化血小板洗涤后测定结果。

2. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,所述血小板为抗体筛检用的正常人血小板、交叉配型用的供者血小板或抗原分型用的待检血小板。

3. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,步骤(2)中的测定方法中所述标记二抗为酶类物质、化学发光类物质或荧光类物质,所述标记二抗的加入体积为40-100 μ l,当二抗标记为酶类物质时,在测定前加入相应底物显色并用酶标仪测定光密度值,当二抗标记为化学发光类物质时,在测定前加入相应底物显色并用化学发光分析仪测定光密度值,当二抗标记为荧光物质时,用荧光光谱仪直接测定光密度值。

4. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,所述磁珠的制备过程为将铁盐溶液和聚乙二醇4000在惰性气体存在下混合并搅拌,再加入氨水溶液产生黑褐色沉淀。

5. 根据权利要求4所述的分析方法,其特征在于,所述铁盐溶液是由六水三氯化铁和四水氯化亚铁溶解得到。

6. 根据权利要求1或3所述的分析方法,其特征在于,所述磁化和洗涤过程用pH值为6-7的0.2M磷酸盐缓冲液,所述磁珠的大小为10-500nm,所述洗涤的血小板在磁化前配制成 $100-200 \times 10^9/L$,所述磁珠配制成体积百分比为30-50%的悬液,所述洗涤的血小板和所述磁珠的体积比为1-2:1。

7. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,所述检测样本包括待检样本、阴性样本、阳性样本和空白样本。

8. 根据权利要求7所述的分析方法,其特征在于,所述磁化血小板悬液与所述待检样本、所述阴性样本、所述阳性样本和所述空白样本的反应体积比为1-3:1:1:1:1。

9. 根据权利要求1所述的分析方法,其特征在于,步骤(2)中所述洗涤次数为2-4次,所述孵育时间为20-45min,所述上层清液的体积为35-95 μ l,所述显色时间为5-30min。

一种血小板磁化免疫标记分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于检测血小板抗原抗体及交叉配型的方法,特别是涉及一种血小板磁化免疫标记分析方法。

背景技术

[0002] 血小板抗体是由异体或自身血小板抗原作用机体而产生的,包括同种异体抗体、自身抗体、同种抗体、药物依赖性抗体和非特异性抗体五类,这些抗体作用于人体血小板可导致血小板发生破坏并引起胎母同种异体免疫血小板减少症、原发性血小板减少症、血小板输注无效症、输血后紫癜等多种血小板免疫疾病。血小板输注是治疗各种血小板减少引起的出血性疾病的有效措施,随着血小板输注量及输注次数的增加,患者体内免疫相关性血小板抗体的产生随之增加,为了防止血小板抗体的产生及提高血小板输注疗效,开展血小板抗体筛选及输血前血小板交叉配型试验成为必要。

[0003] 目前,临床普遍采用固相红细胞黏附试验(solid-phase red cell adherence, SPRCA)和单克隆抗体固着血小板抗原分析试验(The monoclonal antibody immobilization of platelet antigen assay, MAIPA)方法进行血小板抗体筛选及交叉配型。

[0004] SPRCA法主要采用完整血小板进行抗体筛检和交叉配型,不能进行血小板抗体特异性鉴定,且试验结果须肉眼判断,因而弱阳性难以判定。同时,指示系统采用新鲜红细胞,保存时间短,不利于临床推广应用。

[0005] MAIPA法是血小板抗体特异性鉴定的“经典”方法,然而,MAIPA的缺点亦不可忽视。鼠单克隆抗体-血小板糖蛋白分子-人血清抗体三者复合物的形成是该实验的基础,倘若鼠单克隆抗体和人血清抗体识别的抗原位点相同或相近,则两者会产生竞争作用而导致假阴性结果。同时,MAIPA试验进行抗体检测和鉴别需要一组针对血小板不同糖蛋白分子及同一糖蛋白分子上不同位点的鼠单克隆抗体,而这些抗体极难获得,至今也仅能购买到一小部分。此外,该方法操作时间长(约8h),技术要求高,各个实验室的检测结果差异较大等不足也限制了其在临床上的应用。因此,通过上述检测方法诊断或判断血小板减少性疾病是否由血小板特异性抗体引起是片面的。

[0006] 其它的血小板抗体检测方法还包括:流式细胞术、修饰的抗原捕获ELISA等,这些方法都各有其优缺点,均难以广泛应用于临床实践。因此,到目前为止,国际上尚缺乏血小板抗体检测的“金标准”方法。

发明内容

[0007] 本发明主要解决的技术问题是提供一种血小板磁化免疫标记分析方法,该方法操作简便、检测结果准确。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种血小板磁化免疫标记分析方法,包括步骤为:

(1) 将收集的血小板与磁珠混匀, 对所述血小板进行磁化, 得到具有磁性的磁化血小板悬液;

(2) 将所述磁化血小板悬液与检测样本混匀后进行孵育并洗涤, 再加入标记二抗孵育得到混合液, 施加磁力使所述混合液分层, 所述磁化血小板位于所述混合液的下层, 取所述混合液的上层反应液直接测定或将所述混合液下层中的所述磁化血小板洗涤后测定结果。

[0009] 在本发明一个较佳实施例中, 所述血小板为抗体筛检用的正常人血小板、交叉配型用的供者血小板或抗原分型用的待检血小板。

[0010] 在本发明一个较佳实施例中, 步骤(2)中的测定方法中所述标记二抗为酶类物质、化学发光类物质或荧光类物质, 所述标记二抗的加入体积为 40-100 μ l, 当二抗标记为酶类物质时, 在测定前加入相应底物显色并用酶标仪测定光密度值, 当二抗标记为化学发光类物质时, 在测定前加入相应底物显色并用化学发光分析仪测定光密度值, 当二抗标记为荧光物质时, 用荧光光谱仪直接测定光密度值。

[0011] 在本发明一个较佳实施例中, 所述磁珠的制备过程为将铁盐溶液和聚乙二醇 4000 在惰性气体存在下混合并搅拌, 再加入氨水溶液产生黑褐色沉淀。

[0012] 在本发明一个较佳实施例中, 所述铁盐溶液是由六水三氯化铁和四水氯化亚铁溶解得到。

[0013] 在本发明一个较佳实施例中, 所述磁化及洗涤过程用 pH 值为 6-7 的 0.2M 磷酸盐缓冲液, 所述磁珠的大小为 10-500nm, 所述洗涤的血小板在磁化前配制成 100-200 $\times 10^9$ /L, 所述磁珠配制成体积百分比为 30-50% 的悬液, 所述洗涤的血小板和所述磁珠的体积比为 1-2:1。

[0014] 在本发明一个较佳实施例中, 所述检测样本包括待检样本、阴性样本、阳性样本和空白样本。

[0015] 在本发明一个较佳实施例中, 所述磁化血小板悬液与所述待检样本、所述阴性样本、所述阳性样本和所述空白样本的反应体积比为 1-3:1:1:1:1。

[0016] 在本发明一个较佳实施例中, 步骤(2)中所述洗涤次数为 2-4 次, 所述孵育时间为 20-45min, 所述上层清液的体积为 35-95 μ l, 所述显色时间为 5-30min。

[0017] 本发明的有益效果是: 本发明的血小板磁化免疫标记分析方法, 用于血小板抗原抗体检测和进行血小板输注前的交叉配型, 采用了磁标记物实验法, 磁力的加入使洗涤过程不需要离心, 操作简便, 取上层反应液直接测定, 克服了免疫标记技术的非特异性吸附, 减少了封闭和洗涤的过程, 检测过程小于 1 小时, 耗时短, 结果易于判定, 能同时对大量样本进行检测, 易于自动化, 双相互补性免疫分析使两种检测实验结果可以相互验证, 提高检测结果的准确性。

附图说明

[0018] 图 1 是本发明血小板磁化免疫标记分析方法一较佳实施例的原理示意图。

具体实施方式

[0019] 下面结合附图对本发明的较佳实施例进行详细阐述, 以使本发明的优点和特征能更易于被本领域技术人员理解, 从而对本发明的保护范围做出更为清楚明确的界定。

[0020] 实施例一：

本发明提供一种血小板磁化免疫标记分析方法，能用于血小板抗体的筛检，包括步骤为：

(1) 磁珠的制备

0.85g、3.1 mmol 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.30g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 在氮气保护下溶在 200 mL 水中。加入适量表面活性剂，在强力搅拌下，将 1.5 mol/L 氨水溶液缓慢加入到上述溶液中，当溶液的 pH 升高至 6~7 时，溶液中产生大量的黑色 Fe_3O_4 粒子；继续加氨水至 pH=8，使水解完全。在 80℃ 下陈化 0.5 小时。将生成的固体分离，用蒸馏水洗 3 次，然后在超声作用下将其分散在 100 mL 蒸馏水中，得到 Fe_3O_4 的胶体溶液收集备用。

[0021] (2) 样本采集和处理

1) 正常人血小板：a：从新鲜 EDTA 抗凝血中提取：取新鲜 EDTA 抗凝全血在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min，取上层体积的 2/3 部分的富血小板血浆；b：直接采用机采血小板：直接将机采血小板在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min 富集备用。

[0022] 2) 待检样本：抽取患者静脉血，用 EDTA 抗凝，速度在 1500 rpm 条件下离心 10min，分离血浆得到。

[0023] 3) 配制生理盐水及磷酸盐缓冲液。

[0024] (3) 阴性样本：是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清，其血清中不含有抗血小板抗体。

[0025] 阳性样本：是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂发生反应的健康成年人血清，其血清中含有抗血小板抗体。

[0026] (4) 血小板磁化

磷酸盐缓冲液将富集血小板悬浮至 $200 \times 10^9 / \text{L}$ ，取 1ml 血小板悬液置试管中，振荡条件下加入 1ml 体积百分比为 50% 的磁珠，连续振荡 2min，再用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次，每次用 2ml 并悬浮至终体积 1ml 得到磁化血小板悬液。

[0027] (5) 样品检测

取 100ul 所述磁化血小板悬液置于 96 孔酶标板孔中，分别加入 50ul 待检样本、50ul 阴性样本和 50ul 磷酸盐缓冲液，振荡 1min，将所述酶标板在 37℃ 水浴下孵育 30min，再用磷酸盐缓冲液混匀洗涤 3 次，每次用 150ul，加入用生理盐水稀释 8000 倍的 60ul 碱性磷酸酶标二抗，在 37℃ 下孵育 20min 得到混合液。

[0028] (6) 加底物显色

取混合液的上层清液 55ul，加入 55ul 对硝基苯磷酸二钠，在室温下避光显色 5~10min，测 $A_{405\text{nm}}$ 值。

[0029] 本实施例的原理为：磁化好的血小板与待检样本孵育反应后，若血清中不含有血小板抗体则经过洗涤可去除，若含有血小板抗体则此抗体与磁化的血小板结合，加入酶标二抗并孵育反应后，抽取上层清液加入底物显色，用酶标仪测 $A_{405\text{nm}}$ 值，从而可以检测血小板抗体，用于血小板抗体筛检，用的是酶标抗体吸附法。

[0030] 实施例二：

本发明提供一种血小板磁化免疫标记分析方法，能用于血小板的交叉配型，包括步骤为：

(1) 磁珠制备

0.85g、3.1 mmol 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.30g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 在氮气保护下溶在 200 mL 水中。加入适量表面活性剂,在强力搅拌下,将 1.5 mol/L 氨水溶液缓慢加入到上述溶液中,当溶液的 pH 升高至 6~7 时,溶液中产生大量的黑色 Fe_3O_4 粒子;继续加氨水至 pH=8,使水解完全。在 80°C 下陈化 0.5 小时。将生成的固体分离,用蒸馏水洗 3 次,然后在超声作用下将其分散在 100 mL 蒸馏水中,得到 Fe_3O_4 的胶体溶液收集备用。

[0031] (2) 样本采集与处理

1) 供者血小板 :a :从新鲜 EDTA 抗凝血中提取 :取新鲜 EDTA 抗凝全血在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min,取上层体积的 2/3 部分的富血小板血浆 ;b :直接采用机采血小板 :直接将机采血小板在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min 富集备用。

[0032] 2) 受者样本 :抽取受者静脉血,用 EDTA 抗凝,速度在 1500 rpm 条件下离心 10min,分离血浆得到。

[0033] 3) 配制生理盐水及磷酸盐缓冲液。

[0034] (3) 阴性样本 :是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清,其血清中不含有抗血小板抗体。

[0035] 阳性样本 :是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂发生反应的健康成年人血清,其血清中含有抗血小板抗体。

[0036] (4) 血小板的磁化

用磷酸盐缓冲液将富集血小板悬浮至 $200 \times 10^9/\text{L}$;取 1ml 血小板悬液置试管中,振荡条件下加入 1ml 体积百分比为 50% 的磁珠,连续振荡 2min ;再每次用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,每次用 2ml 并形成压积,制成 2ml 悬液备用。

[0037] (5) 样品检测

取 100ul 所述悬液置于 96 孔酶标板孔中,分别加入 50ul 受者样本、50ul 阴性样本、50ul 阳性样本和 50ul 磷酸盐缓冲液,振荡 1min,将所述酶标板在 37°C 水浴下孵育 30min,再用磷酸盐缓冲液混匀洗涤 3 次,每次用 150ul,加入用生理盐水稀释 8000 倍的 60ul 酶标二抗,在 37°C 下孵育 20min 得到混合液,将所述混合液用磷酸盐缓冲液洗涤三次,每次用 150ul,最后一次洗涤后抽干液体。

[0038] (6) 加底物显色

加入 100ul 对硝基苯磷酸二钠,在室温下避光显色 5~10min,测 $A_{405\text{nm}}$ 值。

[0039] 本实施例的原理为 :磁化好的供者血小板与受者血清样本孵育反应后,若受者血清中不含有针对供者血小板抗体则经过洗涤可去除,若含有血小板抗体则此抗体与磁化的血小板结合,加入酶标二抗,孵育反应后抽取上清加入等体积底物显色,用酶标仪测 $A_{405\text{nm}}$ 值。从而可以检测受者血清中是否有针对供者血小板的抗体,本发明用于血小板输注前交叉配型。

[0040] 实施例三 :

本发明提供一种血小板磁化免疫标记分析方法,能用于血小板抗原分型,包括步骤为 :

(1) 磁珠制备

0.85g、3.1 mmol 的 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、0.30g $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 在氮气保护下溶在 200 mL 水中。加入

适量表面活性剂,在强力搅拌下,将 1.5 mol/L 氨水溶液缓慢加入到上述溶液中,当溶液的 pH 升高至 6~7 时,溶液中产生大量的黑色 Fe_3O_4 粒子;继续加氨水至 pH=8,使水解完全。在 80℃ 下陈化 0.5 小时。将生成的固体分离,用蒸馏水洗 3 次,然后在超声作用下将其分散在 100 mL 蒸馏水中,得到 Fe_3O_4 的胶体溶液收集备用。

[0041] (2) 样本采集与处理

1)待检血小板 :a :从新鲜 EDTA 抗凝血中提取 :取新鲜 EDTA 抗凝全血在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min,取上层体积的 2/3 部分的富血小板血浆 ;b :直接采用机采血小板 :直接将机采血小板在速度为 1500rpm 的条件下离心 10min 富集备用。

[0042] 2) 特异性抗体 :抗 HPA 抗原的单克隆抗体或人血清抗体。

[0043] 3) 配制生理盐水及磷酸盐缓冲液。

[0044] (3) 阴性样本 :是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清,其血清中不含有抗血小板抗体。

[0045] 阳性样本 :是经国家规定的转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病五项指标检测合格且与上述检测试剂发生反应的健康成年人血清,其血清中含有抗血小板抗体。

[0046] (4) 血小板的磁化

用磷酸盐缓冲液将富集血小板悬浮至 $200 \times 10^9/\text{L}$;取 1ml 血小板悬液置试管中,振荡条件下加入 1ml 体积百分比为 50% 的磁珠,连续振荡 2min ;再每次用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次,每次用 2ml 并形成压积,制成 2ml 悬液备用。

[0047] (5) 样品检测

取 100ul 所述悬液置于 96 孔酶标板孔中,分别加入 50ul 特异性抗体、50ul 阴性样本和 50ul 磷酸盐缓冲液,振荡 1min,将所述酶标板在 37℃ 水浴下孵育 30min,再用磷酸盐缓冲液混匀洗涤 3 次,每次用 150ul,加入用生理盐水稀释 8000 倍的 60ul 酶标二抗,在 37℃ 下孵育 20min 得到混合液,将所述混合液用磷酸盐缓冲液洗涤三次,每次用 150ul,最后一次洗涤后抽干液体。

[0048] (6) 加底物显色

加入 100ul 对硝基苯磷酸二钠,在室温下避光显色 5~10min,测 $A_{405\text{nm}}$ 值。

[0049] 本实施例的原理为 :磁化好的待检血小板与已知特异性抗体孵育反应后,若待检血小板不含有针对已知特异性抗体的抗原,加入的酶标二抗不能结合到血小板上,则经过洗涤可去除,加入底物不会显色 ;若含有针对该特异性抗体的抗原,则此抗体与磁化的血小板上抗原结合,加入酶标二抗孵育反应后加入底物会显色,用酶标仪测 $A_{405\text{nm}}$ 值。从而可以确定待检血小板含有针对特异性抗体的抗原,本发明用于血小板抗原分型。

[0050] 本发明用于血小板抗原抗体检测及进行血小板输注前的交叉配型,其中抗原抗体检测包括抗体筛检,抗体鉴定,效价分析,抗原分型等,本实验主要是进行血小板的抗体筛检以及血小板抗原分型,抗体筛检就是利用正常人血小板可筛检待检血清是否有针对血小板抗原的抗体,抗原分型则是利用已知的包括单克隆抗体、多克隆抗体及基因工程制备的抗体等特异性抗体检测待检血小板上是否具有针对该抗体的血小板抗原,本发明是对反应上清检测和反应物(磁化血小板)检测的双相互补性免疫分析,双相互补免疫分析法的创新点就是一个系统内可同时进行双相检测,两种实验结果可相互验证提高了检测结果的准确性。优点是比传统的免疫分析方法更简便,而且检测过程中也减少了洗涤的步骤,操作简便

快捷。同时解决了此类免疫分析技术中检测某些血液样本时封闭困难的问题,克服了免疫标记技术的非特异性吸附的缺点。

[0051] 以上所述仅为本发明的实施例,并非因此限制本发明的专利范围,凡是利用本发明说明书及附图内容所作的等效结构或等效流程变换,或直接或间接运用在其他相关的技术领域,均同理包括在本发明的专利保护范围内。

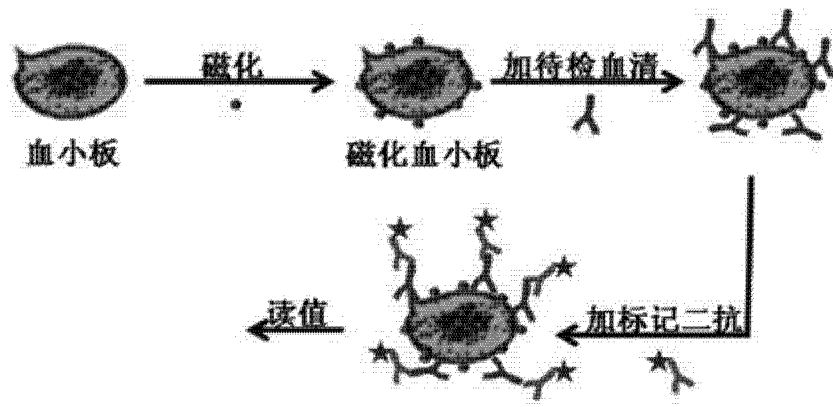


图 1

专利名称(译)	一种血小板磁化免疫标记分析方法		
公开(公告)号	CN103323586A	公开(公告)日	2013-09-25
申请号	CN201310234706.X	申请日	2013-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院苏州生物医学工程技术研究所		
申请(专利权)人(译)	中国科学院苏州生物医学工程技术研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院苏州生物医学工程技术研究所		
[标]发明人	王红梅 李勇 段生宝 丁少华 田晶晶 陈焯洲 史素霞 李冬		
发明人	王红梅 李勇 段生宝 丁少华 田晶晶 陈焯洲 史素霞 李冬		
IPC分类号	G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血小板磁化免疫标记分析方法，将血小板与磁珠混匀，磁化血小板得到悬液，将磁化血小板悬液与检测样本混匀孵育后并洗涤，加入标记二抗孵育得到混合液，施加磁力使混合液分层，取上层反应液直接测定或将下层中的磁化血小板洗涤后测定结果即双相互补性免疫分析。通过上述方式，本发明提供的一种血小板磁化免疫标记分析方法，用于血小板相关抗原抗体检测及交叉配血，施加磁力使洗涤不需要离心，操作简便，取上层反应液直接测定的标记抗体吸附试验克服了免疫标记技术的非特异性吸附，减少封闭和洗涤的过程，耗时短。本发明可对大量样本进行检测，易于自动化，双相的两种检测结果可以相互验证，提高检测结果的准确性。

