



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104741156 A

(43) 申请公布日 2015. 07. 01

(21) 申请号 201310754806. 5

G01N 33/53(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 12. 31

(71) 申请人 深圳国际旅行卫生保健中心

地址 518033 广东省深圳市福田区福田南路
8号中国检验检疫媒介实验室

申请人 深圳市第二人民医院

(72) 发明人 何建安 顾大勇 伍昌林 刘春晓

史蕾 赵纯中 徐云庆 朱奕

邵超鹏

(74) 专利代理机构 广州华进联合专利商标代理

有限公司 44224

代理人 何平

(51) Int. Cl.

B01L 3/00(2006. 01)

G01N 21/552(2014. 01)

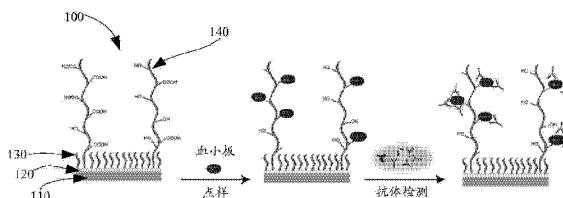
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

血小板筛选芯片及其制作方法和应用

(57) 摘要

本发明涉及一种血小板筛选芯片,其包括基板、涂覆在基板表面的金层、位于金层表面的引发剂自组装单层及位于引发剂自组装单层上的聚合物层,聚合物层的聚合物修饰有羧基,待筛选的血小板可与羧基反应而被连接在聚合物层上。通过使用上述血小板筛选芯片,可将待筛选血小板点样于芯片的特定区域,构建成高通量的血小板芯片,再利用表面等离子共振技术快速、非标记、高敏感度的特点,直接筛查待测血清样本,分析待测血清样本与待测血小板的相容性,从而筛选得到符合要求的血小板。该血小板筛选芯片成本较低,血小板筛选效率高,具有较大的市场推广潜力。



1. 一种血小板筛选芯片,其特征在于,包括基板、涂覆在所述基板表面的金层、位于所述金层表面的引发剂自组装单层及位于所述引发剂自组装单层上的聚合物层,所述聚合物层的聚合物修饰有羧基,待筛选的所述血小板可与所述羧基反应而被连接在所述聚合物层上。

2. 如权利要求 1 所述的血小板筛选芯片,其特征在于,所述基板为多孔芯片基板,所述金层涂覆在所述基板的孔底。

3. 如权利要求 1 所述的血小板筛选芯片,其特征在于,所述引发剂自组装单层的材料为硫醇引发剂。

4. 如权利要求 1 所述的血小板筛选芯片,其特征在于,所述聚合物层的聚合物单体为寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯及甲基丙烯酸羟乙酯中的至少一种。

5. 一种血小板筛选芯片的制作方法,其特征在于,包括如下步骤:

使用自组装单层技术在涂覆有金层的基板表面形成引发剂自组装单层;

无氧条件下,将含有引发剂自组装单层的基板置于聚合物单体溶液中进行聚合反应,所述聚合物单体溶液包括 0.8mmol/12mL 的 2-2' 联吡啶、5mmol/12mL 的聚合物单体、0.04mmol/12mL 的 CuCl_2 以及 0.04mM/12mL 的抗坏血酸,溶剂是体积比为 1:1 的水与甲醇的混合溶剂;

聚合反应结束后将得到的芯片清洗干净,置于含有 10mg/mL 丁二酸酐和 15mg/mL 4-二甲氨基吡啶的二甲基甲酰胺溶液中进行羧基功能化处理,在所述聚合物上修饰羧基。

6. 如权利要求 5 所述的血小板筛选芯片的制作方法,其特征在于,所述基板为多孔芯片基板,所述金层涂覆在所述基板的孔底。

7. 如权利要求 5 所述的血小板筛选芯片的制作方法,其特征在于,所述引发剂自组装单层为硫醇引发剂。

8. 如权利要求 5 所述的血小板筛选芯片的制作方法,其特征在于,所述聚合物单体为寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯及甲基丙烯酸羟乙酯中的至少一种。

9. 一种血小板的筛选方法,其特征在于,包括如下步骤:

按照如权利要求 5-8 中任一项所述的血小板筛选芯片的制作方法制作血小板筛选芯片;

将制作好的所述血小板筛选芯片置于 0.2mol/L N-羟基琥珀酰亚胺和 0.1mol/L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的水溶液中进行活化修饰;

将待筛选的血小板点样在活化修饰处理后的所述血小板筛选芯片上;

将点样后的所述血小板筛选芯片固定在表面等离子共振仪的流动池中,通入 PBS 缓冲液直至获得稳定的基线,通入封闭试剂封闭残余的活化基团,最后通入血清样本,通过表面等离子共振仪直接检测血清样本与血小板的相互作用结果,从而筛选得到符合要求的小血小板。

10. 如权利要求 9 所述的血小板的筛选方法,其特征在于,所述封闭试剂为浓度 1mol/L、pH8.0 的乙醇胺溶液。

血小板筛选芯片及其制作方法和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是涉及一种血小板筛选芯片及其制作方法和应用。

背景技术

[0002] 输注血小板可预防和治疗血小板减少或血小板功能缺陷引起的出血等疾病,但患者多次输血后,易产生血小板相关抗体,导致血小板输注无效(PTR)。因此,在血小板输注前,对患者进行血小板抗体的检测,选择适当血小板输注是非常必要的。特别是血小板抗体阳性患者进行交叉配型以筛选相容性供者,可显著提高血小板输注的疗效。目前检测血小板抗体与交叉配型实验主要是MASPA法和Capture-P法,这些方法使用的进口试剂昂贵,检验成本较高,增加了患者的负担;同时检测的时间较长,步骤较多,对结果的可靠性产生一定影响。

发明内容

[0003] 基于此,有必要提供一种在血小板输注时,可快速进行输注血小板配型实验且成本较低的血小板筛选芯片及其制作方法和应用。

[0004] 一种血小板筛选芯片,包括基板、涂覆在所述基板表面的金层、位于所述金层表面的引发剂自组装单层及位于所述引发剂自组装单层上的聚合物层,所述聚合物层的聚合物修饰有羧基,待筛选的所述血小板可与所述羧基反应而被连接在所述聚合物层上。

[0005] 在其中一个实施例中,所述基板为多孔芯片基板,所述金层涂覆在所述基板的孔底。

[0006] 在其中一个实施例中,所述引发剂自组装单层的材料为硫醇引发剂。

[0007] 在其中一个实施例中,所述聚合物层的聚合物单体为寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯及甲基丙烯酸羟乙酯中的至少一种。

[0008] 一种血小板筛选芯片的制作方法,包括如下步骤:

[0009] 使用自组装单层技术在涂覆有金层的基板表面形成引发剂自组装单层;

[0010] 无氧条件下,将含有引发剂自组装单层的基板置于聚合物单体溶液中进行聚合反应,所述聚合物单体溶液包括0.8mmol/12mL的2-2'联吡啶、5mmol/12mL的聚合物单体、0.04mmol/12mL的CuCl₂以及0.04mM/12mL的抗坏血酸,溶剂是体积比为1:1的水与甲醇的混合溶剂;

[0011] 聚合反应结束后将得到的芯片清洗干净,置于含有10mg/mL丁二酸酐和15mg/mL4-二甲氨基吡啶的二甲基甲酰胺溶液中进行羧基功能化处理,在所述聚合物上修饰羧基。

[0012] 在其中一个实施例中,所述基板为多孔芯片基板,所述金层涂覆在所述基板的孔底。

[0013] 在其中一个实施例中,所述引发剂自组装单层为硫醇引发剂。

[0014] 在其中一个实施例中,所述聚合物单体为寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯及甲基丙烯酸羟乙酯中的至少一种。

[0015] 一种血小板的筛选方法,包括如下步骤:

[0016] 按照上述任一实施例所述的血小板筛选芯片的制作方法制作血小板筛选芯片;

[0017] 将制作好的所述血小板筛选芯片置于 0.2mol/L N-羟基琥珀酰亚胺和 0.1mol/L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐的水溶液中进行活化修饰;

[0018] 将待筛选的血小板点样在活化修饰处理后的所述血小板筛选芯片上;

[0019] 将点样后的所述血小板筛选芯片固定在表面等离子共振仪的流动池中,通入 PBS 缓冲液直至获得稳定的基线,通入封闭试剂封闭残余的活化基团,最后通入血清样本,通过表面等离子共振仪直接检测血清样本与血小板的相互作用结果,从而筛选得到符合要求的小血小板。

[0020] 在其中一个实施例中,所述封闭试剂为浓度 1mol/L、pH8.0 的乙醇胺溶液。

[0021] 通过使用上述血小板筛选芯片,可将待筛选血小板点样于芯片的特定区域,构建成高通量的血小板芯片,再利用表面等离子共振技术 (SPR) 技术快速、非标记、高敏感度的特点,直接筛查待测血清样本,分析待测血清样本与待测血小板的相容性,从而筛选得到符合要求的小血小板。该血小板筛选芯片成本较低,血小板筛选效率高,具有较大的市场推广潜力。

附图说明

[0022] 图 1 为利用血小板筛选芯片进行的小血小板抗体快速筛选和配型的方法的基本流程图;

[0023] 图 2 为实施例部分的小血小板阵列芯片图,利用点样仪将 24 个机采血小板和 PBS(对照点)点样于芯片的特定,构成 5×5 的矩阵;

[0024] 图 3 为利用血小板筛选芯片检测待测血清样本结果,其中,图 3a 为血清样本与带筛选的血小板有相互作用过程,即阳性,图 3b 为血清样本与带筛选血小板无相互作用过程,即阴性;

[0025] 图 4 为利用血小板筛选芯片检测血小板抗体的结果;

[0026] 图 5 为利用 Capture-P 固相捕获法检测血小板抗体的结果。

具体实施方式

[0027] 下面主要结合附图及具体实施例对血小板筛选芯片及其制作方法和应用作进一步详细的说明。

[0028] 如图 1 所示,一实施方式的血小板筛选芯片 100 包括基板 110、涂覆在基板 110 表面的金层 120、位于金层 120 表面的引发剂自组装单层 130 及位于引发剂自组装单层 130 上的聚合物层 140。

[0029] 本实施方式的基板 110 可以为多孔芯片基板,多孔形成点阵,如 5*5 点阵、6*6 点阵等。金层 120 涂覆在多孔基板的孔底。

[0030] 本实施方式的引发剂自组装单层 130 为硫醇引发剂。

[0031] 聚合物层 140 的聚合物修饰有羧基,待筛选的血小板可与羧基反应而被连接在聚

合物层上。进一步,在本实施方式中,聚合物层 140 的聚合物单体为寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯(如 OEGMA526 等)及甲基丙烯酸羟乙酯中的至少一种。

[0032] 本实施方式还提供了一种血小板筛选芯片的制作方法,其包括如下步骤:

[0033] 步骤一:使用自组装单层技术在涂覆有金层的基板表面形成引发剂自组装单层。

[0034] 步骤二:无氧条件下,将含有引发剂自组装单层的基板置于聚合物单体溶液中进行聚合反应,聚合物单体溶液包括 0.8mmol/12mL 的 2-2' 联吡啶、5mmol/12mL 的聚合物单体、0.04mmol/12mL 的 CuCl_2 以及 0.04mM/12mL 的抗坏血酸,溶剂是体积比为 1:1 的水与甲醇的混合溶剂。

[0035] 步骤三:聚合反应结束后将得到的芯片清洗干净,置于含有 10mg/mL 丁二酸酐和 15mg/mL 4-二甲氨基吡啶(DMAP)的二甲基甲酰胺(DMF)溶液中进行羧基功能化处理,在聚合物上修饰羧基。

[0036] 此外,本实施方式还提供了一种血小板的筛选方法,包括如下步骤:

[0037] 步骤一:按照上述任血小板筛选芯片的制作方法制作血小板筛选芯片。

[0038] 步骤二:将制作好的血小板筛选芯片置于 0.2mol/L N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)和 0.1mol/L 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)的水溶液中进行活化修饰。

[0039] 步骤三:将待筛选的血小板点样在活化修饰处理后的血小板筛选芯片上。

[0040] 步骤四:将点样后的血小板筛选芯片固定在表面等离子共振仪的流动池中,通入 PBS 缓冲液直至获得稳定的基线,通入封闭试剂封闭残余的活化基团,最后通入血清样本,通过表面等离子共振仪直接检测血清样本与血小板的相互作用结果,从而筛选得到符合要求的小血小板。

[0041] 其中,封闭试剂可以为浓度 1mol/L、pH8.0 的乙醇胺溶液。

[0042] 通过使用上述血小板筛选芯片,可将待筛选血小板点样于芯片的特定区域,构建成高通量的血小板芯片,再利用表面等离子共振技术(SPR)技术快速、非标记、高敏感度的特点,直接筛查待测血清样本,分析待测血清样本与待测血小板的相容性,从而筛选得到符合要求的小血小板。该血小板筛选芯片成本较低,血小板筛选效率高,具有较大的市场推广潜力。

[0043] 以下为具体实施例部分:

[0044] 1、仪器和材料

[0045] 1.1 仪器:

[0046] SPR 分析仪(美国, Plexra)、离心机(长春博研公司, BYL 型)

[0047] 2.2 试剂与样本来源

[0048] AB 型健康人血清(阴性对照),通用型 O 型血小板冻干粉(长春博德,批号:20120923),血小板抗体阳性血清(阳性对照,长春博德,批号:20120916),血小板配型患者血清由深圳市第二人民医院血液科提供,机采血小板由深圳市血液中心提供。

[0049] 2、血小板筛选芯片的制作及血小板的筛选

[0050] 2.1 制作方法

[0051] 利用自组装单层技术在镀金的芯片表面形成硫醇引发剂(ω -mercaptoundecyl bromoisobutyrate)的自组装单层,然后在惰性气氛的手套箱中加入无氧的反应溶液。芯片表面引发剂引发单体(寡聚乙二醇甲基丙烯酸酯或甲基丙烯酸羟乙酯)聚合,并在芯片表

面不断生长。本实施例的反应溶液的配制过程如下：称取 2-2' 联吡啶 (12.5mg, 0.08mmol) 和单体 OEGMA526 (2.62g, 5mmol)，加入 1mL CuCl_2 (0.04mmol) 水溶液以及 5mL H_2O 和 5mL 甲醇搅拌并作无氧处理，再加入 1mL 抗坏血酸 (0.04mmol)， Cu^{2+} 配合物不断地被还原成活性配合物 Cu^+ 。聚合反应时间为 30min。当反应达到预期时间后，将芯片取出，用甲醇和蒸馏水各淋洗三遍。将高分子修饰的芯片浸泡在含有丁二酸酐 (10mg/mL) 和 DMAP (15mg/mL) 的 DMF 反应溶液中进行羧基功能化，即制得本实施例所需的血小板筛选芯片。

[0052] 2.2 高通量血小板芯片的制备

[0053] 将上述制得的血小板筛选芯片置于 NHS (0.2mol/L) 和 EDC (0.1mol/L) 的水溶液中活化修饰 30 分钟。利用点样仪或手工点样将带筛选的血小板 (用 PBS 缓冲溶液稀释 8 倍) 点样于活化的芯片上，室温下放置 1 小时，即获得高通量的血小板阵列芯片。

[0054] 2.3 血小板抗体筛选和快速配型

[0055] 将高通量血小板阵列芯片固定于 SPR 的流动池中，通入 PBS 缓冲溶液 (10mmol/L, pH=7.4) 直到获得稳定的基线，通入封闭试剂乙醇氨 (1mol/L, pH=8.0) 溶液 10 分钟，封闭残余的活化基团。最后通入待检测的血清样本，SPR 直接监测样本于捐献者的血小板相互作用情况。芯片使用再生试剂甘氨酸 (10mmol/L, pH=2.0) 溶液处理 10 分钟后可以重复使用。

[0056] 3. 结果

[0057] 3.1 高通量血小板阵列芯片的制备

[0058] 血小板抗体快速筛选和配型的方法的实验基本流程如图 1 所示，首先在芯片的特定区域，利用点样技术或手动点样方式将血小板固定于高分子修饰的芯片表面，制备成高通量的血小板阵列芯片。如果患者血清与捐献者的血小板有相互作用，说明配型不相容，否则配型相符合。

[0059] 利用点样技术将深圳市第二人民医院血液科提供血小板样品 (24 个) 和 PBS 对照点点样于高分子修饰的 SPR 芯片上，制备成 5×5 的点阵。点样的实际效果图如图 2 所示，其中 24 个血小板样品点较为明显，而 PBS 对照点则于背景相当，说明血小板可以有效的固定于芯片的特定位置。

[0060] 3.2 血小板抗体筛选和配型

[0061] 利用 SPR 芯片技术进行血小板交叉配合试验。将血小板阵列芯片安装于 SPR 仪器上，直接检测患者血清中是否有相关抗体，实验结果如下。当患者血清含有捐献者的血小板的对应抗体时，SPR 显示较为强烈的信号变化，通入血清样品的前面基线存在较为明显的差异，如图 3a 所示。当患者血清没有相应的血小板抗体时，通入样品的前后基线值没有明显的变化，如图 3b 所示。

[0062] 3.3 SPR 技术与 Capture-P 固相捕获法筛选血小板抗体对比分析

[0063] 对 186 例临床大量输注血小板的血液病患者血清，分别运用 SPR 芯片技术和 Capture-P 固相捕获法检测，结果如图 4、图 5。如表 1 所示，经过 χ^2 检验， $\chi^2=0.20$ ， $P>0.05$ ，两种方法无显著性差异，阳性一致性 97.3%，阴性一致性为 99.3%，总一致性为 97.3%。

[0064] 表 1186 份样本用两种血小板抗体检测方法的结果比较

[0065]

SPR 技术	Capture-P 固相捕获法		合计
	阳性	阴性	
阳性	34	2	36
阴性	3	147	150
合计	37	149	186

[0066] 注： $\chi^2=0.20 < 3.84$ ； $P > 0.05$ 。

[0067] 本实施例将芯片技术和表面等离子共振技术 (SPR) 引起入血小板抗体的检测与配型的研究上,取得了较好的预期成果,充分体现了 SPR 技术快速、非标记、高通量、高敏感度的特点。经初步研究发现,SPR 技术检测血小板抗体的稳定性与敏感度均较高,同时与 Capture-P 固相捕获法检测血小板抗体的结果进行了对比研究,它们阳性与阴性结果的一致性均在 95% 以上,总有效率也是 95% 以上,同时 SPR 技术克服了指示细胞保存期短的问题,可以快速大量检测;并且现已研发或可购买到血小板谱抗原较全面的血小板,作为点样抗原,让 SPR 技术的实验应用方面更加简便,直接筛查血小板抗体、通过配合试验选择与受者相合的血小板显得更加容易。此外,该方法将传统的血小板的配型实验的时间由原来的 4.5 小时缩短为 0.5 小时,检测成本也大大降低,具有较大的临床推广潜力。

[0068] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,本发明的保护范围应以所附权利要求为准。

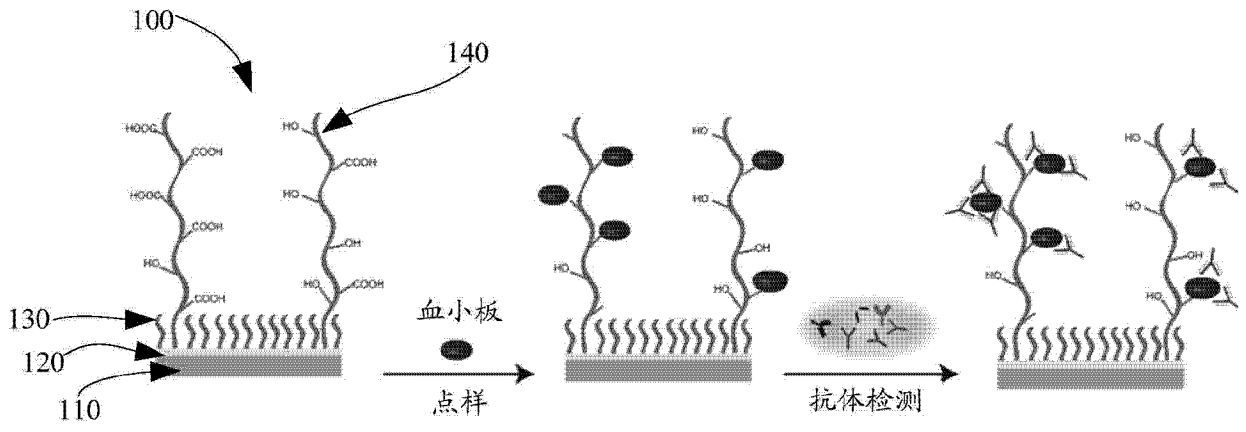


图 1

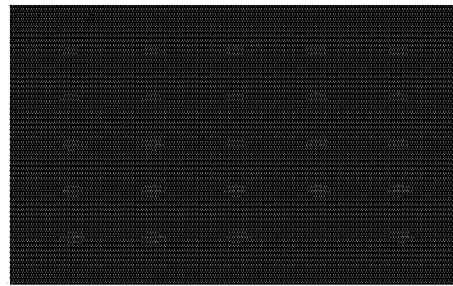


图 2

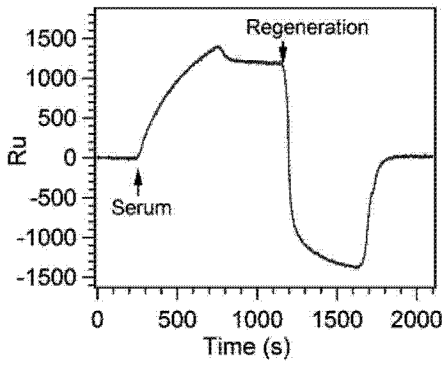


图 3a

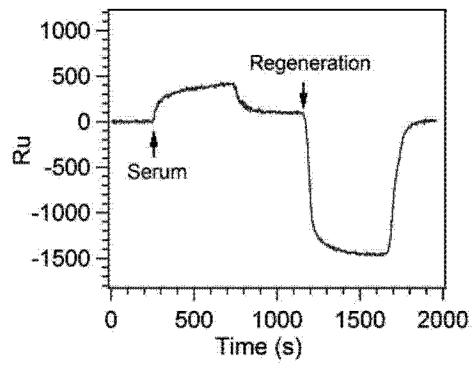


图 3b

图 3

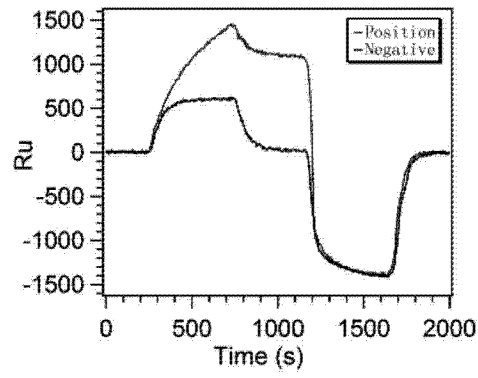


图 4

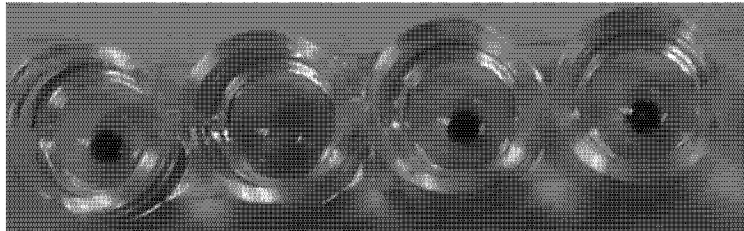


图 5

专利名称(译)	血小板筛选芯片及其制作方法和应用		
公开(公告)号	CN104741156A	公开(公告)日	2015-07-01
申请号	CN201310754806.5	申请日	2013-12-31
[标]申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心 深圳市第二人民医院		
申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心 深圳市第二人民医院		
当前申请(专利权)人(译)	深圳国际旅行卫生保健中心 深圳市第二人民医院		
[标]发明人	何建安 顾大勇 伍昌林 刘春晓 史蕾 赵纯中 徐云庆 朱奕 邵超鹏		
发明人	何建安 顾大勇 伍昌林 刘春晓 史蕾 赵纯中 徐云庆 朱奕 邵超鹏		
IPC分类号	B01L3/00 G01N21/552 G01N33/53		
代理人(译)	何平		
其他公开文献	CN104741156B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种血小板筛选芯片，其包括基板、涂覆在基板表面的金层、位于金层表面的引发剂自组装单层及位于引发剂自组装单层上的聚合物层，聚合物层的聚合物修饰有羧基，待筛选的血小板可与羧基反应而被连接在聚合物层上。通过使用上述血小板筛选芯片，可将待筛选血小板点样于芯片的特定区域，构建高通量的血小板芯片，再利用表面等离子共振技术快速、非标记、高敏感度的特点，直接筛查待测血清样本，分析待测血清样本与待测血小板的相容性，从而筛选得到符合要求的血小板。该血小板筛选芯片成本较低，血小板筛选效率高，具有较大的市场推广潜力。

