



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104569413 A

(43) 申请公布日 2015. 04. 29

(21) 申请号 201510013618. 6

(22) 申请日 2015. 01. 12

(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 江苏省苏州市苏州高新区科技
城科灵路 88 号

(72) 发明人 段生宝 李勇 田晶晶 王红梅
丁少华 蒙青林 陈晔洲 魏双施
刘欢 史素霞

(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 33/577(2006. 01)

G01N 33/535(2006. 01)

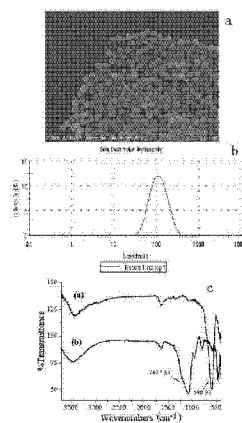
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

(54) 发明名称

一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,其特征在于,包括步骤为:(1)将磁化血小板与待检样本混合反应;(2)用磁力分离步骤(1)中已反应的磁化血小板并洗涤;(3)加入酶标抗人二抗反应;(4)加入底物显色并终止反应,得到检测结果。通过上述方式,本发明的血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,检测过程简便、高效,结果准确、可靠,对临床诊断血小板相关免疫性疾病和预防血小板输注无效具有较高的应用价值。



1. 一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,其特征在于,包括步骤为:(1)将磁化血小板与待检样本混合反应;(2)用磁力分离步骤(1)中已反应的磁化血小板并洗涤;(3)加入酶标抗人二抗反应;(4)加入底物显色并终止反应,得到检测结果。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述磁化血小板是免疫纳米磁珠通过抗人血小板单克隆抗体与血小板结合得到的。

3. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述免疫纳米磁珠的制备过程为:在 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒表面包覆 SiO_2 层得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 微球,通过硅烷化反应对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@ \text{SiO}_2$ 微球的表面修饰氨丙基三甲氧基硅烷($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OCH}_3)_3$ 、APS)得到免疫纳米磁珠,所述 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒是通过高温热解法合成的,所述 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒的大小为50~200nm且是饱和磁化强度。

4. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述磁化血小板的浓度为 $100\sim 200 \times 10^9/\text{L}$,加样体积为50~100 μL 。

5. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)中所述待检样本为患者的血清或血浆,加样体积为50~100 μL 。

6. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(2)中所述磁力为磁棒或磁粒板所具有的磁力,所述洗涤是用含体积分数为0.03~0.06%的Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤。

7. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(2)中所述酶标抗人二抗为羊抗人IgG、兔抗人IgG或鸡抗人IgG,所述酶标抗人二抗中采用的标记物为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)。

8. 根据权利要求7所述的检测方法,其特征在于,所述酶标抗人二抗中采用的标记物为碱性磷酸酶,所述碱性磷酸酶是通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗人二抗Fc段得到的。

9. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(4)中所述显色用的底物为0.5~1.5mg/mL的4-硝基苯磷酸二钠(PNPP),所述终止采用的终止液为2~3mol/L的NaOH溶液,所述检测结果的测定为:终止反应后,测定OD值,根据公式临界值(C.O.)=阴性对照平均A值+0.09判定,若待检样本A值 \geq 临界值(C.O.)为血小板抗体阳性,待检样本A值 $<$ 临界值(C.O.)为血小板抗体阴性。

10. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,步骤(1)至(4)中反应条件为在37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应30~40min。

一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检验领域,特别是涉及一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法。

背景技术

[0002] 血小板表面具有复杂的血型抗原,包括 ABO 抗原、HLA-I 抗原及 HPA 抗原(存在于血小板膜糖蛋白 GP II b/ III a, GP I a/ II a, GP I b/ IX 上)。这些抗原均可以刺激机体产生抗血小板抗体,使血小板遭破坏,导致患者血小板减少而出现紫癜、出血甚至死亡,引发的临床相关疾病包括肿瘤、白血病、特发性血小板减少症、新生儿血小板减少症及血小板输注无效等。

[0003] 血小板输血是目前治疗血小板减少症和上述多种疾病的最主要手段之一。大量研究表明,患者输注血小板前进行抗体检测和交叉配型以筛选相容性的血小板进行输注,输血有效率大于 70%,而仅 ABO 血型相同的随机输注血小板有效率低于 30%。这不仅仅浪费了宝贵的血液,而且不相容血小板使病人体内生成血小板抗体,导致免疫反应,造成输血无效,患者也几乎无例外地病情加重。

[0004] 目前在英国、法国和美国等少数发达国家,临床一般应用昂贵的试验程序、繁杂的 HLA 和血小板基因分型技术对患者 HLA-I 基因和血小板血型即 HPA 基因全系列谱抗原基因定型,选择合适血型的献血员血小板,之后再对少数患者应用。

[0005] 而在我国,至今没有建立血小板献血员库,临床很难开展血型基因型相容性血小板输血,只有少数临床机构采用血清学方法进行血小板抗体检测和交叉配型,但效果仍不理想。其主要原因在于现有检测方法仍存在诸多缺点和不足,如血小板抗体检测“金标准”方法-单克隆抗体固着血小板抗原分析技术(The monoclonal antibody immobilization of platelet antigen assay, MAIPA)需要将血小板裂解,易引起抗原结构破坏而出现抗体漏检,同时操作步骤繁琐,样本检测量受限。而常见的红细胞免疫吸附试验(solid-phase red cell adherence, SPRCA)对实验操作人员技术要求高,弱阳性结果有时难以判定,并且所采用的指示红细胞保存时间短,难以推广应用。

发明内容

[0006] 本发明主要解决的技术问题是提供一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,该检测方法简便、高效,结果准确、可靠。

[0007] 为解决上述技术问题,本发明采用的一个技术方案是:提供一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,包括步骤为:(1)将磁化血小板与待检样本混合反应;(2)用磁力分离步骤(1)中已反应的磁化血小板并洗涤;(3)加入酶标抗人二抗反应;(4)加入底物显色并终止反应,得到检测结果。

[0008] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述磁化血小板是免疫纳米磁珠通过抗人血小板单克隆抗体与血小板结合得到的。

[0009] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述免疫纳米磁珠的制备过程为:在 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒表面包覆 SiO_2 层得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 微球,通过硅烷化反应对 $\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{SiO}_2$ 微球的表面修饰氨丙基三甲氧基硅烷($\text{NH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-Si(OCH}_3)_3$ 、APS)得到免疫纳米磁珠,所述 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒是通过高温热解法合成的,所述 Fe_3O_4 纳米磁性颗粒的大小为50~200nm且是饱和磁化强度。

[0010] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述磁化血小板的浓度为 $100\sim 200\times 10^9/\text{L}$,加样体积为50~100 μL 。

[0011] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)中所述待检样本为患者的血清或血浆,加样体积为50~100 μL 。

[0012] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(2)中所述磁力为磁棒或磁粒板所具有的磁力,所述洗涤是用含体积分数为0.03~0.06%的Tween-20的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤。

[0013] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(2)中所述酶标抗人二抗为羊抗人IgG、兔抗人IgG或鸡抗人IgG,所述酶标抗人二抗中采用的标记物为辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)。

[0014] 在本发明一个较佳实施例中,所述酶标抗人二抗中采用的标记物为碱性磷酸酶,所述碱性磷酸酶是通过戊二醛法或过碘酸法交联在抗人二抗Fc段得到的。

[0015] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(4)中所述显色用的底物为0.5~1.5mg/mL的4-硝基苯磷酸二钠(PNPP),所述终止采用的终止液为2~3mol/L的NaOH溶液,所述检测结果的测定为:终止反应后,测定OD值,根据公式临界值(C.O.)=阴性对照平均A值+0.09判定,若待检样本A值 \geq 临界值(C.O.)为血小板抗体阳性,待检样本A值 $<$ 临界值(C.O.)为血小板抗体阴性。

[0016] 在本发明一个较佳实施例中,步骤(1)至(4)中反应条件为在37 $^\circ\text{C}$ 下反应30~40min。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明的血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法,检测过程简便、高效,结果准确、可靠,对临床诊断血小板相关免疫性疾病和预防血小板输注无效具有较高的应用价值。

附图说明

[0018] 为了更清楚地说明本发明实施例中的技术方案,下面将对实施例描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,下面描述中的附图仅仅是本发明的一些实施例,对于本领域普通技术人员来讲,在不付出创造性劳动的前提下,还可以根据这些附图获得其它的附图,其中:

图1为免疫纳米磁珠的表征结果图,a为SEM电镜图、b为粒径分布图、c为红外光谱图;

图2为血小板和磁化血小板的SEM电镜图,a为血小板的SEM电镜图、b为磁化血小板的SEM电镜图。

具体实施方式

[0019] 下面将对本发明实施例中的技术方案进行清楚、完整地描述,显然,所描述的实

例仅是本发明的一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其它实施例,都属于本发明保护的范围。

[0020] 实施例一:抗人血小板单克隆抗体杂交瘤细胞株的建立及单抗的制备与纯化

一、小鼠免疫

1、采集新鲜 O 型全血,900rpm 离心 10min,提取上层富血小板血浆。然后 3800rpm 离心 10min,弃上清,留取压积血小板,用 0.01M PBS 缓冲液(含 0.5% EDTA)洗涤 2 次并最终调节血小板浓度至 10^8 /mL。

[0021] 2、取 0.5 ml 上述血小板悬液通过腹腔、背部皮下等途径多点免疫小鼠,共免疫 4 次,间隔期为 10 天。

[0022] 3. 融合前 2 天用 0.2 ml 血小板悬液经鼠尾静脉加强注射 1 次。

[0023] 二、细胞融合

1、取免疫后的小鼠脾脏,制备脾细胞悬液,并将小鼠脾细胞和培养好的 NS1 骨髓瘤细胞按体积比为 10:1 的比例混合。

[0024] 2、采用质量比 50% PEG 4000 作融合剂,将小鼠脾细胞和 NS1 骨髓瘤细胞进行融合。

[0025] 3、融合细胞悬于含体积比为 20% 新生牛血清的选择培养基内培养数日。

[0026] 三、克隆筛选

1、将兔抗人血小板多抗用 0.05M pH 为 9.6 的碳酸盐缓冲液稀释至 $10 \mu\text{g/ml}$,包被酶标板 $100 \mu\text{L/孔}$,在 4°C 下过夜。

[0027] 2、次日用含体积分数为 0.03~0.06% 的 Tween-20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗涤 5 次,控干。

[0028] 3、加入 $50 \mu\text{L/孔}$ O 型血小板悬液,200g 离心 5min 后洗涤 3 次。

[0029] 4、加入待检的细胞培养上清, 37°C 下孵育后采用间接 ELISA 法进行检测。

[0030] 5、Cutoff 值设为阴性对照值的 2.1 倍,高于 Cutoff 值为阳性结果。

[0031] 6、选取检测结果阳性孔内的融合细胞经有限稀释法进行多次单克隆培养。待单细胞生长成亚克隆后再进行测定,阳性克隆扩大后液氮冷冻保存。

[0032] 四、单抗制备及纯化

1、培养经克隆筛选的杂交瘤细胞株,注射至经致敏的小鼠腹腔内,每只约 10^6 个细胞。

[0033] 2、观察小鼠腹腔,并在约 5~10 天内采集小鼠腹水。

[0034] 3、取小鼠腹水,边搅拌边缓慢加入等体积比的饱和硫酸铵溶液,搅拌 1h 后在 4°C 下静置过夜。

[0035] 4、次日将已沉淀的小鼠腹水离心,收集沉淀并用少量生理盐水溶解。然后采用 G-25 凝胶层析柱去除其中的硫酸铵。

[0036] 5、继续采用 DEAE-52 阴离子交换层析柱纯化单抗,并用不同浓度的 NaCl 溶液洗脱。

[0037] 6、采用 SDS-PAGE 电泳和间接 ELISA 法进行纯化抗体的纯度和效价测定。

[0038] 实施例二:功能磁珠的制备

一、 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒的合成

1、取 1.35 g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、1.50 g PEG 4000 和 1.00 g 尿素,加入至 40 mL 乙二醇中,搅拌并使之完全溶解;

2、将混合液加入至反应釜的聚四氟乙烯内衬中,然后将反应釜封闭,并置于 200℃ 环境条件下反应 8 h;

3、冷却后取出反应物,用无水乙醇重复洗涤 3 次,然后用去离子水洗涤 3 次,最后用去离子水重悬产物,得到 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,室温保存备用。

[0039] 二、 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性复合微粒的制备及氨基化修饰

1、取 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,用去离子水配制成 0.1%~0.3%(w/v) 浓度,超声处理 10 min;

2. 取 30mL 上述 Fe_3O_4 磁性纳米颗粒,然后加入 50 mL 无水乙醇、2mL 氨水、500 μL 正硅酸乙酯 (TEOS),在 200 rpm 搅拌条件下反应 5 h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性,得到 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性复合颗粒。

[0040] 3. 用无水乙醇配制 0.1%~0.3% (w/v) 浓度的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性复合颗粒,用冰乙酸调节溶液 pH 值至 4.0,取 20mL 上述溶液加入至 30 mL 10% 3-氨基丙基三乙氧基硅烷 (APTES) 乙醇溶液中,在 200 rpm 搅拌条件下反应 3 h,反应完成后将产物用去离子水洗涤至中性,得到氨基化修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性复合微粒。

[0041] 三、功能磁珠的制备

1. 用乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH 为 6.0) 洗涤氨基化修饰的 $\text{Fe}_3\text{O}_4@SiO_2$ 磁性复合颗粒,并配制成 1%~5% (w/v) 浓度的悬液。

[0042] 2. 取 2mL 上述磁性颗粒悬液,加入 100 μL 浓度为 10%(w/v) 的 1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)-碳化二亚胺 (EDC) 溶液和 100 μL 10% (w/v) 的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 溶液,室温 150 rpm 涡旋振荡反应 3h,然后用去离子水洗去过量的 EDC 和 NHS,并最终悬浮至 2mL。

[0043] 3. 用乙酸-乙酸钠缓冲溶液 (pH 为 6.0) 稀释抗人血小板单克隆抗体至 1mg/mL,向活化后的磁性颗粒悬液中加入 100~200 μL 上述抗人血小板单克隆抗体。室温 150 rpm 涡旋振荡反应过夜,然后用 0.01M PBS 缓冲液洗涤 3 次,并最终悬浮至 2mL。

[0044] 四、磁化血小板的制备

1、提取混合 O 型正常人血小板,经 0.01M PBS 缓冲液 (含质量比 0.5% EDTA) 洗涤 2 次后调节血小板浓度至 $100\sim 200 \times 10^9/\text{L}$ 。

[0045] 2、取 1mL 上述血小板悬液,加入等体积的功能磁珠悬液,在 37℃ 下孵育 30min,然后磁力吸附分离磁化血小板并洗涤 3 次。

[0046] 3、用含体积比 3%~5% 兔血清的 0.01M PBS 缓冲液悬浮上述磁化血小板至 1mL,得到磁化血小板,备用或冻干保存。

[0047] 实施例三:血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法的建立

1、取 50~100 μL 磁化血小板悬液,加入等体积的待检样本 (血清或血浆) 及样本稀释液,在 37℃ 下孵育 30min。

[0048] 2、磁力吸附分离磁化血小板,得到血小板抗原抗体复合物,并用 PBST 洗涤缓冲液洗涤 5 次。

[0049] 3、加入酶标抗人二抗 50 μL / 孔,在 37℃ 下孵育 30min。

[0050] 4、磁力吸附分离磁化血小板反应复合物,并用 PBST 洗涤缓冲液洗涤 5 次。

[0051] 5、加入 0.5-1.5mg/mL 的 4-硝基苯磷酸二钠(4-Nitrophenyl phosphate, PNPP), 50 μ L / 孔, 37°C 孵育 15~30min。

[0052] 6、加入终止液 2~3mol/L NaOH 溶液, 50 μ L / 孔。

[0053] 7、测量结果。根据公式临界值(C. O.) = 阴性对照平均 A 值 + 0.09 判定结果。若样品 A 值 \geq 临界值(C. O.) 为血小板抗体阳性, 样品 A 值 $<$ 临界值(C. O.) 为血小板抗体阴性。

[0054] 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它相关的技术领域, 均同理包括在本发明的专利保护范围内。

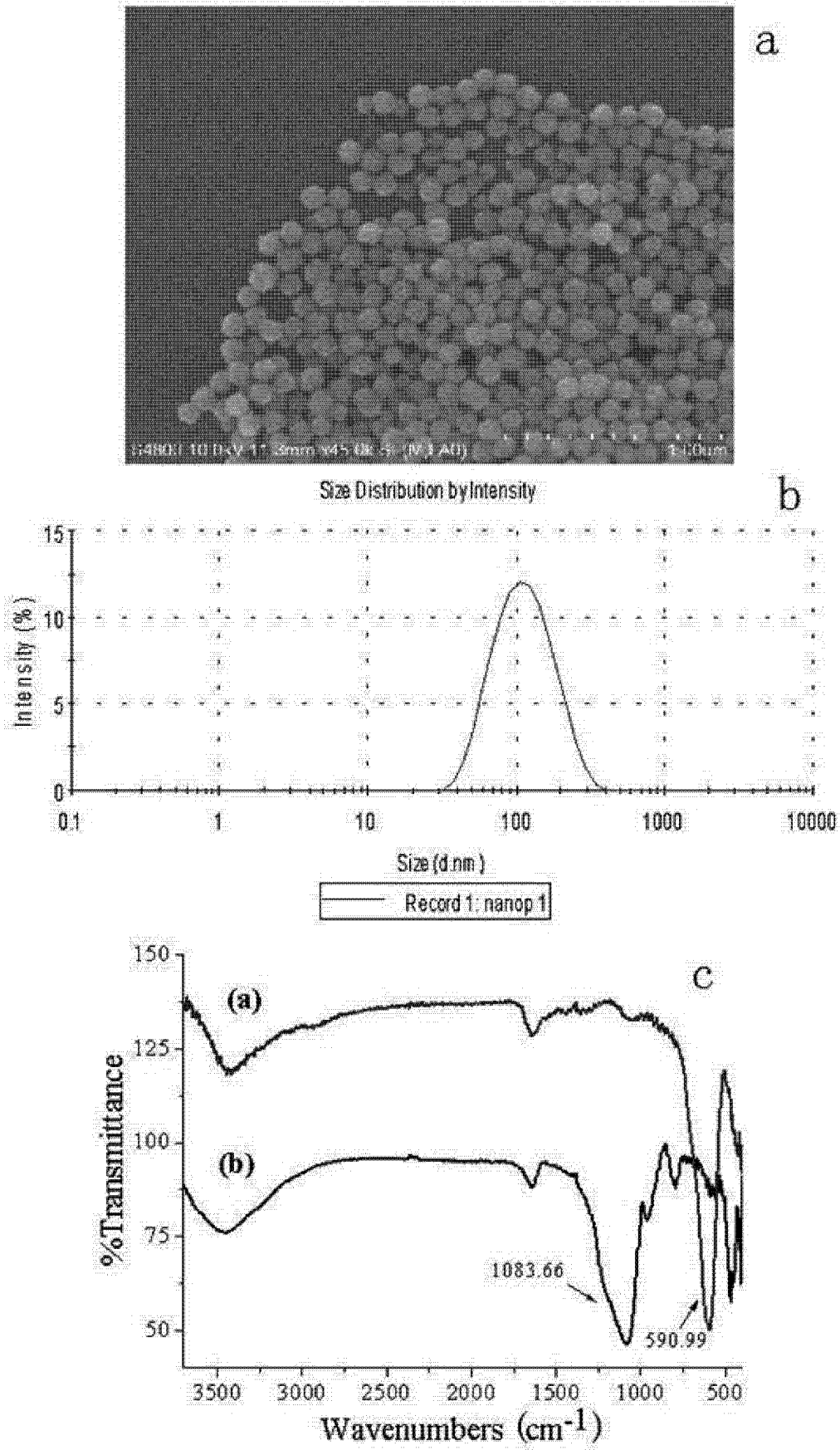


图 1

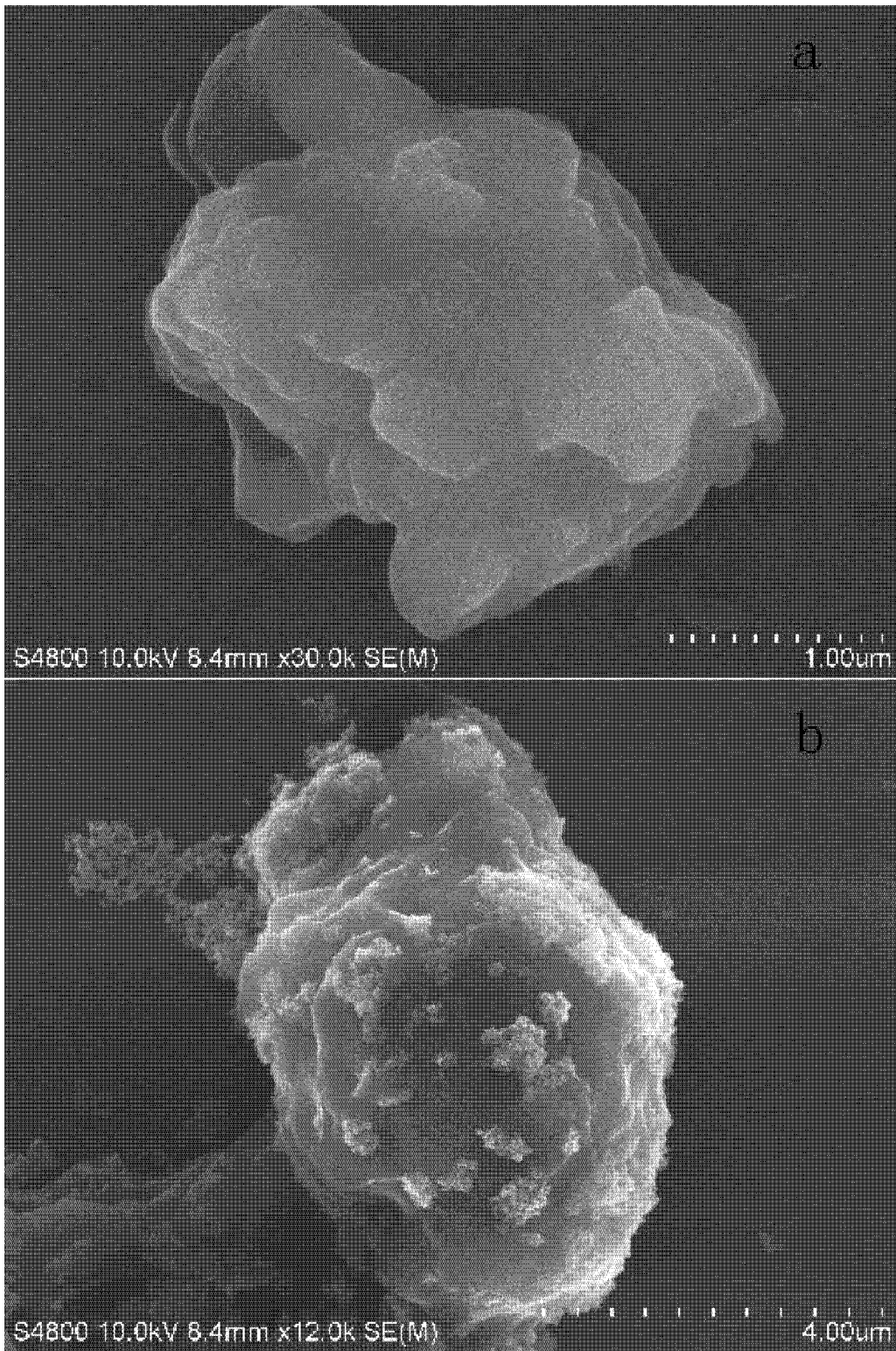


图 2

专利名称(译)	一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法		
公开(公告)号	CN104569413A	公开(公告)日	2015-04-29
申请号	CN201510013618.6	申请日	2015-01-12
[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	段生宝 李勇 田晶晶 王红梅 丁少华 蒙青林 陈晔洲 魏双施 刘欢 史素霞		
发明人	段生宝 李勇 田晶晶 王红梅 丁少华 蒙青林 陈晔洲 魏双施 刘欢 史素霞		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/535		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法，其特征在于，包括步骤为：(1)将磁化血小板与待检样本混合反应；(2)用磁力分离步骤(1)中已反应的磁化血小板并洗涤；(3)加入酶标抗人二抗反应；(4)加入底物显色并终止反应，得到检测结果。通过上述方式，本发明的血小板抗体检测的免疫纳米磁珠酶联免疫检测方法，检测过程简便、高效，结果准确、可靠，对临床诊断血小板相关免疫性疾病和预防血小板输注无效具有较高的应用价值。

