



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107290520 B

(45)授权公告日 2019.08.02

(21)申请号 201710446028.1

G01N 33/80(2006.01)

(22)申请日 2017.06.14

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107290520 A

US 4686193 A,1987.08.11,

CN 106771268 A,2017.05.31,

US 4238473 A,1980.12.08,

(43)申请公布日 2017.10.24

JP 2000088847 A,2000.03.31,

(73)专利权人 邵超鹏

CN 103926400 A,2014.07.16,

地址 518035 广东省深圳市福田区梅岗街  
笔架山庄7-603房

CN 1438486 A,2003.08.27,

Obadiah J. Plante,等.Automated Solid-  
Phase Synthesis of Oligosaccharides.

(72)发明人 邵超鹏

《Science》.2001,第291卷

(74)专利代理机构 苏州国诚专利代理有限公司  
32293

黄菲,等.血清中高效价IgM 抗A干扰IgG  
抗A效价测定1例.《临床血液学杂志》.2013,第  
26卷(第8期),

代理人 韩凤

王玥,等.糖链的化学合成.《生命科学》  
.2011,第23卷(第6期),

(51)Int.Cl.

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

审查员 毕秀华

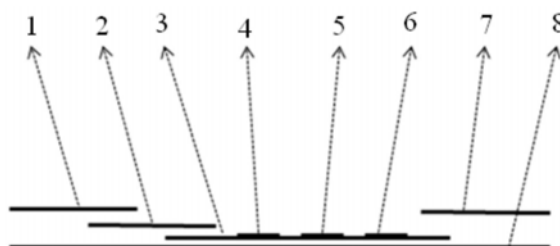
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54)发明名称

测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型  
反定型的免疫层析试纸条

(57)摘要

本发明涉及一种测定孕妇IgG抗-A和抗-B血  
型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,属于  
生物医药技术领域。其包括样品垫、示踪垫、纤维  
素膜、IgM阻滞区、IgG检测区、质控区、吸水垫和  
支撑板;所述支撑板位于底部,支撑板上设置有  
纤维素膜,纤维素膜两端分别搭接示踪垫和吸水  
垫;所述示踪垫另一端搭接样品垫。本发明可简  
易快速特异性测定人血液IgG类抗-A和抗-B抗体  
的有无及效价,取代传统的且现行的“IgM灭活+  
抗人球试验+观察凝集”的测定方式,极大地简化  
了操作步骤,缩短了耗时;亦可用于测定人血型  
的反定型。



1. 测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:

包括样品垫(1)、示踪垫(2)、纤维素膜(3)、阻滞区(4)、检测区(5)、质控区(6)、吸水垫(7)和支撑板(8);所述支撑板(8)位于底部,支撑板(8)上设置纤维素膜(3),纤维素膜(3)两端分别搭接示踪垫(2)和吸水垫(7);所述示踪垫(2)另一端搭接样品垫(1);

所述样品垫(1)上滴加待测样本,示踪垫(2)上包被示踪物;所述纤维素膜(3)上依次设有阻滞区(4)、检测区(5)和质控区(6);

当用于测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体时,所述阻滞区(4)上包被人IgM特异性结合物;所述检测区(5)上包被血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgG、蛋白A、蛋白G、人IgG特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;

当用于测定人血型反定型时,所述阻滞区(4)上包被物质为抗-人IgG特异性结合物;所述检测区(5)上包被上包埋血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgM、人IgM特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;

所述血型A抗原偶合物或血型B抗原偶合物,为人工合成的带有修饰基团的A抗原修饰物或B抗原修饰物偶联偶合物后制备出来的,具有可以固定或包被在纤维素膜上或标记示踪粒子的特性,同时A抗原偶合物具有与人抗-A抗体结合的特性,B抗原偶合物具有与人抗-B抗体结合的特性,所述修饰基团为氨基、羧基、巯基、羟基、胺和烃基中的一个或多个,所述偶合物为牛血清白蛋白BSA、卵清蛋白OVA、乙酰化白蛋白、蛋白质或多肽中的一种或多种;

所述A抗原由N-乙酰-D-半乳糖胺和D-半乳糖和L-岩藻糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺组成,B抗原由D-半乳糖和L-岩藻糖和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺组成,最后切断树脂,保留连接臂。

2. 如权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述阻滞区(4)的包被方式为做1~1000条包被物的划线、分散涂层后干燥。

3. 如权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述在同1条膜上,检测区(5)可设置1条至100条抗-A检测线、1条至100条抗-B检测线,或同时设置1条至100条抗-A检测线和1条至100条抗-B检测线。

4. 如权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述阻滞区(4)能够设置或不设置;当不设置时,用于检测IgM与IgG混合抗-A和抗-B抗体判读人血型反定型,和用于测定预先已灭活IgM抗体的样本实现特异性测定IgG抗-A和抗-B抗体。

5. 如权利要求3所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:当设置多条抗-A检测线或多条抗-B检测线时,样本无需预先稀释或低滴度稀释后即可直接测定抗-A或抗-B抗体的效价,并根据预先的设定和阳性条带的数目判读结果;当设置1条抗-A检测线或1条抗-B检测线时,首先测定预先稀释好的样本,然后根据不同稀释度样本的检测结果判读抗-A或抗-B抗体的效价;抗-A和抗-B抗体的检测线能够同时设置在同一条膜上,或单独设置在不同的膜上;在同一条膜上的检测区(5)除设置抗-A和抗-B检测线外,也能够同时设置如乙肝表面抗原或多个其它抗原或抗体的检测线。

6. 如权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述质控区(6)包埋能与示踪物结合的抗-抗体或凝集素或蛋白。

7. 如权利要求6所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述检测区(5)和质控区(6)可同时设置,当同一条膜上有多条检测线时,质控区(6)可设立也可以不设立。

8. 如权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,其特征是:所述示踪垫(2)上结合有示踪物;所述示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物,示踪粒子结合物是血型A抗原偶合物、血型B抗原偶合物、人IgM的特异性结合物、或人IgG的特异性结合物中的一种或多种。

9. 权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条的应用,其特征是:当免疫层析试纸条用于测定人血型反定型时,具体通过使用高纯度的单一的血型A抗原偶合物和血型B抗原偶合物特异性测定抗-A和抗-B抗体实现。

10. 如权利要求9所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条的应用,其特征是:所述特异性测定IgG类抗体是通过下列3种方式中的一种或多种来实现的:

a、在纤维素膜(3)上设置阻滞区(4)阻止IgM继续层析或延缓继续层析;

b、使用特异性人IgG抗体的反应物标记上示踪粒子,使示踪物只与样本中的待检IgG类抗体结合,并在检测区(5)显现出阳性反应;

或c、在检测区(5)包被只与人IgG特异性结合的反应物;

所述特异性测定抗-A和抗-B抗体是通过使用高纯度的单一的血型A抗原偶合物和血型B抗原偶合物,通过抗原抗体特异性反应来实现的。

11. 权利要求1所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条的检测方法,其特征是:样本为血清或血浆,或为按特定效价或稀释度稀释后的稀释液,或上述样本进行了IgM抗体灭活处理后的处理液,或稀释液进行了IgM抗体灭活后的溶液,每次检测的加样量为1 $\mu$ L至1000 $\mu$ L,根据结果的阴性或阳性以及样本的稀释度可判读IgG、IgM与IgG混合抗-A和抗-B抗体的有无、效价或用于人ABO血型的反定型,当样本为全血或手指血时,试纸条组装样品垫(1)使用全血样本垫,当样本为血清或血浆时,使用血清样本垫。

## 测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,可用于测定孕妇产前IgG抗-A和抗-B抗体及效价的测定,预测新生儿溶血病;也可用于鉴定个体血型的反定型,属于生物医药技术领域。

### 背景技术

[0002] 众多发明专利采用免疫层析试纸条技术建立特定的检测方法,它们的技术基本相同,不同的是,或检测对象不同,或检测目的不同。

[0003] 数个发明专利或实用新型专利,包括被驳回或未授权的专利申请资料,均阐述采用免疫层析试纸条技术测定人血型的反定型,但这些专利申报至今并无相应的产品出现,原因是实践和理论上都存在技术缺陷或障碍,这些专利陈述用于检测血型抗体的抗原,为红细胞或红细胞膜提取物或红细胞溶血溶液等,事实上,其一,这些物质很难稳定、均匀地固定在纤维素膜上,其二,也是最关键的一点,红细胞血型抗原有200多种,采用免疫层析检测时根本无法保证特异性检测抗-A和抗-B来鉴定ABO血型的反定型。

[0004] 目前反定型常用的凝集法之所以可以检测抗-A和抗-B抗体,是因为一般人血液中只有抗-A和抗-B抗体能在盐水中凝集红细胞,但当采用免疫层析法检测时,样本中的任何抗体都可以与固定在膜上的或示踪物上的红细胞物质上的相应抗原结合。

[0005] 因此过往专利阐述的人血型反定型方法,并不能制备出免疫层析试纸条产品用于检测ABO血型抗体,特别是无法保证准确率。

[0006] 即便是新近有申请陈述使用人工合成的血型A抗原和B抗原,同样在理论上和实践行不通的,因为A抗原和B抗原的化学本质为多糖,其无法包被在纤维素膜上,也不能直接偶联蛋白或多肽。

[0007] 孕妇产前血清免疫性即IgG抗-A、抗-B抗体及效价的测定是预测ABO血型新生儿溶血病的产前常规检测项目,观察效价的变化,可为下一步医疗行为和决策提供依据。目前世界范围内包括我国,产前IgG抗-A、抗-B抗体的测定,均是采用抗人球蛋白试验测定法,基本流程为:先将被检样本血清或血浆与一定量的二巯基乙醇(2-ME)或二硫苏糖醇(DTT)等在37℃孵育1~2小时左右并不时摇动以灭活IgM抗体,然后取出混合物倍比稀释,接着将每管稀释液分别与制备好的3~5%的A型和B型红细胞在37℃孵育0.5~1小时使IgG抗-B或抗-A与红细胞结合,取出每个反应管用生理盐水洗涤红细胞3遍,然后加入抗人球蛋白抗体(二抗)混合离心,最后用显微镜观察凝集判读结果。由于测定过程过于复杂,目前大多医院均采用微柱凝胶卡方法,可以省略红细胞洗涤和显微镜判读结果的步骤,但整个过程依然耗时、步骤繁琐、费用高。

[0008] 申请人从事血型研究20多年,一直认为临床实验室孕妇产前血清IgG抗-A、抗-B抗体效价的测定,耗费了常规岗位工作人员过多的时间和精力,且差错或失准时常发生,因此传统的测定方法亟待改进或被替代。

[0009] 免疫层析试纸条技术广泛用于各种抗原、抗体的检测,经过反复构思和验证,本专利克服多方面的技术障碍,成功用免疫层析试纸条技术测定孕妇产前免疫性IgG抗-A和抗-B抗体效价和人血型反定型。

### 发明内容

[0010] 本发明的目的在于克服上述不足之处,提供一种测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体和人血型反定型的免疫层析试纸条。

[0011] 按照本发明提供的技术方案,测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条,包括样品垫、示踪垫、纤维素膜、阻滞区、检测区、质控区、吸水垫和支撑板;所述支撑板位于底部,支撑板上设置纤维素膜,纤维素膜两端分别搭接示踪垫和吸水垫;所述示踪垫另一端搭接样品垫;

[0012] 所述样品垫上滴加待测样本,示踪垫上包被示踪物;所述纤维素膜上依次设有阻滞区、检测区和质控区;

[0013] 当用于测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体时,所述阻滞区上包被人IgM特异性结合物;所述检测区上包被血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgG、蛋白A、蛋白G、人IgG特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;

[0014] 当用于测定人血型反定型时,所述阻滞区上包被物质为人IgG特异性结合物;所述检测区上包被血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgM、人IgM特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种。

[0015] 所述阻滞区的包被方式为做1~1000条包被物的划线、分散涂层或浸泡包被物后干燥。

[0016] 所述在同1条膜上,检测区可设置1条至100条抗-A检测线、1条至100条抗-B检测线,或同时设置1条至100条抗-A检测线和1条至100条抗-B检测线。

[0017] 所述阻滞区可设置或不设置;当不设置时,可检测IgM与IgG混合抗-A和抗-B抗体,为实现特异性测定孕妇IgG抗-A和抗-B抗体的目的,需要预先采用传统化学方法灭活IgM抗体,然后测定处理后的样本。

[0018] 当设置多条抗-A检测线或多条抗-B检测线时,样本无需预先稀释或低滴度稀释后即可直接测定抗-A或抗-B抗体的效价,并根据预先的设定和阳性条带的数目判读结果;当设置1条抗-A检测线或1条抗-B检测线时,首先测定预先稀释好的样本,然后根据不同稀释度样本的检测结果判读抗-A或抗-B抗体的效价;抗-A和抗-B抗体的检测线能够同时设置在同一条膜上,或单独设置在不同的膜上;在同一条膜上的检测区除设置抗-A和抗-B检测线外,也能够同时设置如乙肝表面抗原或多个其它抗原或抗体的检测线。

[0019] 所述质控区包埋能与示踪物结合的抗体或凝集素或蛋白。

[0020] 所述检测区和质控区可同时设置,当同一条膜上有多条检测线时,质控区可设立也可以不设立。

[0021] 所述示踪垫上结合有示踪物;所述示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物,示踪粒子结合物是血型A抗原偶合物、血型B抗原偶合物、人IgM的特异性结合物、或人IgG的特异性结合物中的一种或多种。

[0022] 所述A抗原偶合物或B抗原偶合物,为人工合成的带有修饰基团的A抗原修饰物或B

抗原修饰物通过合成酶法或化学合成法偶联物后制备出来的,具有可以固定或包被在纤维素膜上或标记示踪粒子的特性,同时A抗原偶合物具有与人抗-A抗体结合的特性,B抗原偶合物具有与人抗-B抗体结合的特性,所述A抗原修饰物或B抗原修饰物为带有修饰基团的单糖、二糖、三糖、四糖、五糖、六糖或多糖链,修饰基团是在人工合成A抗原糖链或B抗原糖链时连接上去的,或先合成A抗原糖链或B抗原糖链后再通过生物酶或化学修饰连接修饰基团,人工合成可以手工方法为主完成,也可以通过多糖合成仪完成或协助完成,所得到的A抗原修饰物具有人血型A抗原特性或部分特性,B抗原修饰物具有B抗原的特性或部分特性,所述修饰基团为氨基、羧基、巯基、羟基、胺和烃基中的一个或多个,所述偶合物为牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、乙酰化白蛋白、蛋白质或多肽中的一种或多种;

[0023] A抗原偶合物或B抗原偶合物的合成,也可以通过构建单元策略或固相合成法合成糖蛋白的方式实现,先对BSA或OVA或蛋白质或多肽中的某个或多个氨基酸进行糖基化,然后再逐个连接单糖合成具有A抗原或B抗原特性的糖链,或直接连接具有A抗原或B抗原特性的糖链,制备出具有A抗原和B抗原特性或部分特性的糖蛋白,即可等同于所述A抗原偶合物或B抗原偶合物一样使用;

[0024] A抗原偶合物或B抗原偶合物也可以委托它方实验室合成,也可以委托它方实验室合成A抗原修饰物或B抗原修饰物,然后自行偶联偶合物的方式制备;所述免疫层析试纸条用于特异性测定人血液中的IgG类抗体,和特异性测定抗-A和抗-B抗体;

[0025] 当免疫层析试纸条用于测定人血型反定型时,具体通过使用高纯度的单一的血型A抗原偶合物和血型B抗原偶合物特异性测定抗-A和抗-B抗体实现;具体通过下列3种方式中的一种或多种来实现的;

[0026] a、在纤维素膜上设置IgM阻滞区阻止IgM继续层析或延缓继续层析;

[0027] b、使用特异性人IgG抗体的反应物标记上示踪粒子,使示踪物只与样本中的待检IgG类抗体结合,并在检测区显现出阳性反应;

[0028] 或c、在IgG检测区包被只与人IgG特异性结合的反应物。

[0029] 所述测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条的检测方法,具体步骤为:样本为血清或血浆,或为按特定效价或稀释度稀释后的稀释液,或上述样本进行了IgM抗体灭活处理后的处理液,或稀释液进行了IgM抗体灭活后的溶液,每次检测的加样量为1 $\mu$ L至1000 $\mu$ L,根据结果的阴性或阳性以及样本的稀释度可判读IgG、IgM、IgM与IgG混合抗-A和抗-B抗体的有无、效价或人ABO血型的反定型,当样本为全血或手指血时,试纸条组装样品垫使用全血样本垫,当样本为血清或血浆时,使用血清样本垫。

[0030] 本发明将免疫层析试纸技术应用于孕妇产前免疫性血型抗体的测定、利用免疫阻滞原理联合特异性结合作用替代传统的化学灭活IgM的方式实现特异性测定IgG、使用高纯度的A抗原偶合物或B抗原偶合物实现特异性测定抗-A和抗-B抗体以及设计血型抗原糖链修饰然后偶合蛋白或多肽的方案实现人工合成多糖ABO血型抗原能在纤维素膜上稳定包被或标记示踪粒子,真正实现了采用免疫层析试纸技术测定血型抗体,可用于测定孕妇产前IgG抗-A和抗-B抗体效价或鉴定个体ABO血型的反定型等。

[0031] 本发明的有益效果:本发明成功实现采用免疫层析试纸条技术特异测定孕妇产前免疫性IgG抗-A和抗-B抗体和效价,国内外未见,替代传统抗人球方法的显著效果至少包括:

- [0032] 1) 传统方法整个过程耗时4小时左右,本法只需要十数分钟;
- [0033] 2) 传统方法操作步骤繁琐,本法只需要2~3步,大大简化了操作流程;
- [0034] 3) 本方法使检测成本降低;
- [0035] 4) 传统方法抗-A和抗-B抗体必须分开测定,本法2种抗体可一步同时完成测定;
- [0036] 5) 传统方法灭活IgM抗体耗时长且使用有毒或有臭味的化学物质,本申请利用免疫阻滞作用,结合IgG分子量远小于IgM的特性和使用人IgG特异性示踪物的方式,实现特异性测定IgG的目的,简单快速无污染;
- [0037] 6) 本法使用A抗原偶合物或B抗原偶合物捕获抗-A或抗-B抗体,其具有高亲和力,大大提高了检测的灵敏度,使产品可用于测定被高度稀释后的样本,即实现测定样本的抗体效价,灵敏度与传统方法相近,但结果判读更直观。
- [0038] 相比以往血型反定型或抗体测定的专利资料,本法真正实现可制造用于特异性血型抗体测定的产品:
- [0039] 1) 以往专利使用红细胞膜提取物或人工合成血型抗原作为检测抗体的物质,事实上无法保证免疫层析实验中特异性检测抗-A和抗-B抗体或包被NC膜或标记示踪粒子,因此是不能制备出相应的产品;
- [0040] 2) 本发明不直接使用人工合成A和B抗原,而是采取合成A抗原修饰物和B抗原修饰物后,利用修饰基团制备出A抗原偶合物和B抗原偶合物,使其具备可包被性能或可标记性能,实现可制备试纸条产品检测抗-A和抗-B抗体或测定血型反定型;
- [0041] 3) A抗原偶合物和B抗原偶合物具有高纯度,检测时不受样本中其它血型抗体非特异性结合的影响,实现特异性测定抗-A和抗-B抗体;
- [0042] 4) 本法测定血型反定型时,增加IgG抗体阻滞区,通过测定IgM抗-A和抗-B抗体来判读个体的反定型,从而与经典ABO血型反定型方法一致,排除了IgG抗体的干扰,结果正确率大大提高。

## 附图说明

- [0043] 图1是本发明结构示意图。
- [0044] 附图标记说明:1、样品垫;2、示踪垫;3、纤维素膜;4、阻滞区;5、检测区;6、质控区;7、吸水垫;8、支撑板。

## 具体实施方式

- [0045] 实施例1测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条
- [0046] 包括样品垫1、示踪垫2、纤维素膜3、阻滞区4、检测区5、质控区6、吸水垫7和支撑板8;所述支撑板8位于底部,支撑板8上黏有纤维素膜3,纤维素膜3两端分别搭接示踪垫2和吸水垫7;所述示踪垫2另一端搭接样品垫1;
- [0047] 所述样品垫1上滴加待测样本,示踪垫2上包被示踪物;所述纤维素膜3上依次设有阻滞区4、检测区5和质控区6;
- [0048] 所述阻滞区4上包被人IgM特异性结合物;所述检测区5上包被血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgG、蛋白A、蛋白G、人IgG特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;

[0049] 所述阻滞区4的包被方式为做1~1000条包被物的划线、分散涂层或浸泡包被物后干燥;

[0050] 所述IgM阻滞区4可设置或不设置;当不设置时,可检测IgM与IgG混合抗-A和抗-B抗体,为实现特异性测定孕妇IgG抗-A和抗-B抗体的目的,需要预先采用传统化学方法结合特定温度孵育的方式灭活IgM抗体,然后测定处理后的样本;

[0051] 所述在同1条膜上,检测区5可设置1条至100条抗-A检测线、1条至100条抗-B检测线,或同时设置1条至100条抗-A检测线和1条至100条抗-B检测线;

[0052] 所述检测区5包埋血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgG、蛋白A、蛋白G、人IgG特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;在同1条膜上,IgG检测区5可设置1条至100条抗-A检测线、1条至100条抗-B检测线,或同时设置1条至100条抗-A检测线和1条至100条抗-B检测线;

[0053] 当设置多条抗-A检测线或多条抗-B检测线时,样本无需预先稀释或低滴度稀释后即可直接测定抗-A或抗-B抗体的效价,当设置1条抗-A检测线或1条抗-B检测线时,可测定预先稀释好的样本然后根据不同稀释度样本的检测结果判读抗-A或抗-B抗体的效价,抗-A和抗-B抗体的检测线可以同时设置在同一条膜上,也可以单独设置在不同的膜上,在同一条膜上的IgG检测区5除设置抗-A和抗-B检测线外,也可增加检测如乙肝表面抗原或多个其它抗原或抗体的检测线;

[0054] 所述质控区6包埋能与示踪物结合的抗体或凝集素或蛋白。

[0055] 实施例2人血型反定型的免疫层析试纸条

[0056] 结构同实施例1,当用于测定人血型反定型时,所述阻滞区4上包被物质为人IgG特异性结合物;所述检测区5上包被血型A抗原偶合物、B抗原偶合物、抗人IgM、人IgM特异性结合物或示踪物的反应物中的一种或多种;

[0057] 当阻滞区上包被抗-人IgG抗体或蛋白A或蛋白G或人IgG特异性结合物中的一种或多种时,同时使用人IgM抗体的特异性反应物标记示踪粒子,此时可特异性测定IgM抗-A和抗-B抗体;

[0058] IgG检测区5和质控区6可同时设置,当同一条膜上有1条或多条检测线时,质控区可设立也可以不设立;

[0059] 所述A抗原偶合物或B抗原偶合物,为人工合成的带有修饰基团的A抗原修饰物或B抗原修饰物偶联偶联物后制备出来的,具有可以固定或包被在纤维素膜上或标记示踪粒子的特性,同时A抗原偶合物具有与人抗-A抗体结合的特性,B抗原偶合物具有与人抗-B抗体结合的特性,所述修饰基团为氨基、羧基、巯基、羟基、胺和烃基中的一个或多个,所述偶合物为牛血清白蛋白(BSA)、卵清蛋白(OVA)、乙酰化白蛋白、蛋白质或多肽中的一种或多种。

[0060] 实施例3一种测定孕妇血清或血浆IgG抗-A和抗-B抗体效价的免疫层析试纸条方法(蛋白A金标法),主要步骤如下:

[0061] 1、样品垫1选用血清样品垫;

[0062] 2、示踪物和示踪垫2的制作:示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物,示踪粒子选用胶体金,示踪粒子结合物为蛋白A,将胶体金标记蛋白A后即为示踪物,然后将示踪物分散吸附于玻璃纤维垫冻干即示踪垫2;

[0063] 3、A抗原修饰物和B抗原修饰物的制备:采用固相合成法,连接臂选用氨基,载体选

择树脂,将一个全保护的糖基供体(供体带有一个离去基)在活化剂的作用下与含有一个游离羟基的连接臂偶联,然后使偶联的糖基供体脱保护,再偶联第二个糖基供体,如此反复,从还原端向非还原端合成,直至合成三糖链或多糖链,本实施例合成六糖链,A抗原由N-乙酰-D-半乳糖胺和D-半乳糖和L-岩藻糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺组成,B抗原由D-半乳糖和L-岩藻糖和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺和D-半乳糖和N-乙酰-D-葡萄糖胺组成,最后切断树脂,保留连接臂;

[0064] 4、偶合物包括A抗原偶合物和B抗原偶合物的制备:采用戊二醛法,偶联物选择牛血清白蛋白(BSA)或高品质卵清蛋白(OVA),本实施例选择BSA,将A抗原修饰物和B抗原修饰物分别与BSA混合于磷酸盐缓冲液PBS中,缓慢滴加1%戊二醛,置振荡器中轻微振荡数小时,然后透析去掉游离多余的戊二醛;

[0065] 5、纤维素膜阻滞区4和检测区5和质控区6的制备:纤维素膜选用硝酸纤维素膜,依次划分阻滞区、检测区和质控区,在阻滞区包埋抗人 $\mu$ 链单克隆抗体,在膜上划线2条;在检测区同样划线2条,分别包被A抗原偶合物和B抗原偶合物;质控区划线1条,包埋抗蛋白A抗体;

[0066] 6、试纸条的组装:按附图组装,然后将2个或多个组装好的试纸条同向并排扣合在1个组装盒里;

[0067] 7、加样检测:将孕妇血清或血浆用生理盐水稀释成1:64、1:128、1:256、1:512和1:1024,分别加样在5个试纸条的样品垫上;

[0068] 8、结果判读:待质控区出现可见条带时,A抗原偶合物和B抗原偶合物检测线阳性结果的最高稀释度为所测样本抗-A或抗-B的效价。

[0069] 实施例4一种测定孕妇血清或血浆IgG抗-A和抗-B抗体效价的免疫层析试纸条方法(抗人IgG单抗金标法),主要步骤如下:

[0070] 1、样品垫1选用血清样品垫;

[0071] 2、示踪物和示踪垫2的制作:示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物,示踪粒子选用胶体金,示踪粒子结合物为鼠抗人IgG单抗,将胶体金标记鼠抗人IgG后即为示踪物,然后将示踪物分散吸附于玻璃纤维垫冻干即示踪垫2;

[0072] 3、A抗原修饰物和B抗原修饰物的制备:同实施例3;

[0073] 4、偶合物包括A抗原偶合物和B抗原偶合物的制备:同实施例3;

[0074] 5、纤维素膜阻滞区4、检测区5和质控区6的制备:纤维素膜选用硝酸纤维素膜,依次设置阻滞区和检测区和质控区,在阻滞区包埋抗人 $\mu$ 链单克隆抗体,在膜上划线2条;在检测区同样划线2条,分别包被A抗原偶合物和B抗原偶合物;质控区划线1条,包埋兔抗鼠免疫球蛋白血清;

[0075] 6、试纸条的组装:按附图组装;

[0076] 7、加样检测:将孕妇血清或血浆用生理盐水或PBS稀释成1:64、1:128、1:256、1:512和1:1024,分别加样在5个试纸条的样品垫上;

[0077] 8、结果判读:待质控区出现可见条带时,A抗原偶合物和B抗原偶合物检测线阳性结果的最高稀释度为所测样本抗-A或抗-B的效价。

[0078] 实施例5一种使用手指血测定ABO血型反定型的免疫层析试纸条方法,主要步骤如下:

- [0079] 1、样本垫1选用全血样本垫；
- [0080] 2、示踪物和示踪垫2的制作：示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物，示踪粒子选用胶体金，示踪粒子结合物为鼠抗人IgM抗体以及鼠抗人IgG抗体，将胶体金标记示踪粒子结合物后即示踪物，将示踪物分散吸附于玻璃纤维垫冻干即示踪垫；
- [0081] 3、A抗原修饰物和B抗原修饰物的制备：同实施例3；
- [0082] 4、偶合物包括A抗原偶合物和B抗原偶合物的制备：同实施例3；
- [0083] 5、纤维素膜阻滞区4、检测区5和质控区6的制备：纤维素膜选用硝酸纤维素膜，不设置阻滞区，在检测区设检测线2条，分别包埋B抗原偶合物和A抗原偶合物，质控区设质控线1条，包埋兔抗鼠免疫球蛋白血清；
- [0084] 6、试纸条的组装：按附图组装；
- [0085] 7、加样检测：加手指血1滴或50微升，直接加样在样品垫上；
- [0086] 8、结果：待质控区出现可见条带时，B抗原偶合物检测线阳性和A抗原偶合物检测阴性时为A型，反之为B型，均阳性为O型，均阴性为AB型。
- [0087] 实施例6：一种测定孕妇血清或血浆IgG抗-A和抗-B抗体效价的免疫层析试纸条方法(蛋白A包被法)，主要步骤如下：
- [0088] 1、该例须抗-A和抗-B抗体分开在不同的试纸条上检测，样品垫1均选用血清样品垫；
- [0089] 2、A抗原修饰物和B抗原修饰物的制备：同实施例3；
- [0090] 3、偶合物包括A抗原偶合物和B抗原偶合物的制备：同实施例3；
- [0091] 4、示踪物和示踪垫2的制作：示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物，示踪粒子选用胶体金，检测抗-A的试纸条，示踪粒子结合物为A抗原偶合物，检测抗-B的试纸条，示踪粒子结合物为B抗原偶合物，分别将胶体金标记A抗原偶合物或B抗原偶合物后即示踪物，然后将示踪物分散吸附于玻璃纤维垫冻干即示踪垫；
- [0092] 5、纤维素膜阻滞区4、检测区5和质控区6的制备：纤维素膜选用硝酸纤维素膜，不设立阻滞区，只设立检测区和质控区，检测抗-A的试纸条，在检测区设置检测线1条，包被蛋白A；质控区划线1条，包埋抗BSA抗体。检测抗-B的试纸条，在纤维素膜设立检测区和质控区，所有包被物均与检测抗-A的试纸条相同；
- [0093] 6、示踪垫上的示踪物和IgG检测区包被的蛋白A使用浓度的调整，将购买的或本实验室制备的示踪物和蛋白A分别按1:1、1:2、1:4等倍比稀释，并分别制备不同的示踪垫和包被不同的检测区，组装成不同的试纸条，取采用传统方法测定好效价为1:64、1:128、1:256、1:512和1:1024等的样本，然后按效价稀释成不同稀释度的稀释液，在不同的试纸条上加样检测，直至获得结果与传统方法相同，即选用该浓度的示踪物和蛋白A制备试纸条；
- [0094] 7、试纸条的组装：检测抗-A和检测抗-B的试纸条均按附图组装；
- [0095] 8、加样检测：将孕妇血清或血浆用生理盐水或PBS稀释成1:64、1:128、1:256、1:512和1:1024，分别加样在5个检测抗-A的试纸条和5个检测抗-B的试纸条的样品垫上；
- [0096] 9、结果判读：待试纸条的质控区出现可见条带时，检测抗-A的试纸条检测线阳性结果的最高稀释度为所测样本抗-A的效价，检测抗-B的试纸条检测线阳性结果的最高稀释度为所测样本抗-B的效价。
- [0097] 实施例7：一种测定孕妇血清或血浆IgG抗-A和抗-B抗体效价的免疫层析试纸条方

法(抗人IgG单抗金标竞争法),主要步骤如下:

[0098] 1、样品垫1选用血清样品垫;

[0099] 2、示踪物和示踪垫2的制作:示踪物包括示踪粒子和示踪粒子结合物,示踪粒子选用胶体金,示踪粒子结合物为鼠抗人IgG单抗,将胶体金标记鼠抗人IgG后即示踪物,然后将示踪物分散吸附于玻璃纤维垫冻干即示踪垫2;

[0100] 3、A抗原修饰物和B抗原修饰物的制备:同实施例3;

[0101] 4、偶合物包括A抗原偶合物和B抗原偶合物的制备:同实施例3;

[0102] 5、纤维素膜阻滞区4、检测区5和质控区6的制备:纤维素膜选用硝酸纤维素膜,不设置阻滞区;在检测区同样划线2条,分别包被A抗原偶合物和B抗原偶合物;质控区划线1条,包埋兔抗鼠免疫球蛋白血清;

[0103] 6、试纸条的组装:按附图组装;

[0104] 7、加样检测:将孕妇血清或血浆用生理盐水或PBS稀释成1:64、1:128、1:256、1:512和1:1024,分别加样在5个试纸条的样品垫上;

[0105] 8、结果判读:待质控区出现可见条带时,A抗原偶合物和B抗原偶合物检测线阳性结果的最高稀释度为所测样本抗-A或抗-B的效价。

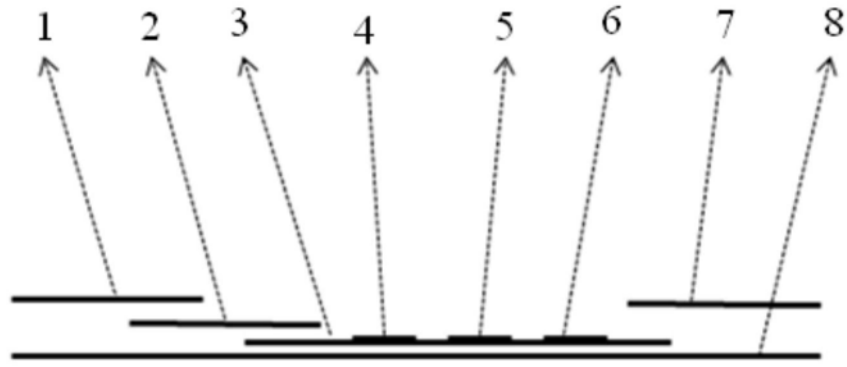


图1

专利名称(译)	测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条		
公开(公告)号	<a href="#">CN107290520B</a>	公开(公告)日	2019-08-02
申请号	CN2017110446028.1	申请日	2017-06-14
[标]申请(专利权)人(译)	邵超鹏		
申请(专利权)人(译)	邵超鹏		
当前申请(专利权)人(译)	邵超鹏		
[标]发明人	邵超鹏		
发明人	邵超鹏		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/80		
CPC分类号	G01N33/532 G01N33/558 G01N33/58 G01N33/80		
代理人(译)	韩凤		
其他公开文献	CN107290520A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种测定孕妇IgG抗-A和抗-B血型抗体或人血型反定型的免疫层析试纸条，属于生物医药技术领域。其包括样品垫、示踪垫、纤维素膜、IgM阻滞区、IgG检测区、质控区、吸水垫和支撑板；所述支撑板位于底部，支撑板上设置有纤维素膜，纤维素膜两端分别搭接示踪垫和吸水垫；所述示踪垫另一端搭接样品垫。本发明可简易快速特异性测定人血液IgG类抗-A和抗-B抗体的有无及效价，取代传统的且现行的“IgM灭活+抗人球试验+观察凝集”的测定方式，极大地简化了操作步骤，缩短了耗时；亦可用于测定人血型的反定型。

