



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110824157 A

(43)申请公布日 2020.02.21

---

(21)申请号 201911113475.0

(22)申请日 2019.11.14

(71)申请人 广州科方生物技术股份有限公司

地址 510530 广东省广州市高新技术产业  
开发区科学城开源大道11号C4栋五  
层、六层

(72)发明人 孙子洪

(74)专利代理机构 广州三环专利商标代理有限  
公司 44202

代理人 郝传鑫

(51)Int.Cl.

*G01N 33/531*(2006.01)

*C08J 7/16*(2006.01)

*C08L 25/06*(2006.01)

---

权利要求书2页 说明书10页

(54)发明名称

一种用于免疫层析检测试剂盒的快速分离  
红细胞的方法

(57)摘要

本发明提供一种分离从全血中分离红细胞的方法,其核心在于一种红细胞分离剂,包括以下组分:羧基聚苯乙烯微球、活性基团树枝状聚合物和抗人RBC抗体;其中所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺。本发明的红细胞分离剂是利用多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体复合物实现的,通过预先将该红细胞分离剂添加到免疫层析试剂盒的样本稀释液或其特定血液处理管中,在检验过程中该红细胞分离剂会与测试样本中的红细胞快速结合,快速形成庞大的网状结构,在重力的作用下实现快速沉降,由此得到反应需要的上清液。

1. 一种红细胞分离剂,其特征在于,包括以下组分:羧基聚苯乙烯微球、活性基团树枝状聚合物和抗人RBC抗体;其中所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺。

2. 如权利要求1所述的红细胞分离剂,其特征在于,所述羧基聚苯乙烯微球的质量浓度为1.0-5.0%,活性基团树枝状聚合物在反应体系中的浓度为0.05%-1.0%,抗人RBC抗体在反应体系中的浓度为0.05-5.0mg/mL。

3. 一种用于免疫层析检测试剂盒的快速分离红细胞的方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1:制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球;

S2:制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体红细胞分离剂;

S3:将步骤S2制备的所述红细胞分离剂添加至免疫层析检测试剂盒中的样本稀释液;或将所述涂覆在所述试剂盒的血液处理管内壁。

4. 如权利要求3所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述步骤S1制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球的方法包括以下步骤:

S1:将羧基聚苯乙烯微球加入到微球稀释液中,超声分散处理,得到均匀分散的微球悬浊液;

S2:对羧基聚苯乙烯微球进行活化处理,活化结束后离心去除上清液,得到活化的羧基聚苯乙烯微球;

S3:向活化后的羧基聚苯乙烯微球悬浊液中,滴加含有活性基团树枝状聚合物溶液,搅拌反应结束后,离心去掉上清液,得到活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球。

5. 如权利要求4所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS),其中EDC使用的反应浓度为100-800mM,NHS使用的反应浓度为100-800mM。

6. 如权利要求4所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺,反应体系中活性基团树枝状聚合物使用的反应浓度为0.05%-1.0%。

7. 如权利要求4所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述步骤S2制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体红细胞分离剂方法包括以下步骤:

S1:将活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球溶液,加入到微球稀释液中,超声分散,加入活化剂进行活化处理;

S2:活化后的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球,经离心去掉上清液,将得到的活化微球重新分散到标记稀释液中;

S3:将抗人RBC抗体加入到上述活化的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球溶液中,37℃反应1~6小时,反应结束后离心去掉上清液,得到的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-标记抗人RBC抗体复合物,即为红细胞分离剂。

8. 如权利要求7所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS),其中EDC使用的反应浓度为100-800mM,NHS使用的反应浓度为100-800mM。

9. 如权利要求7所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述抗人RBC抗体的在反

应体系中的浓度为0.05-5.0mg/mL。

10. 如权利要求3所述的快速分离红细胞的方法,其特征在于,所述步骤S3中将红细胞分离剂添加至免疫层析检测试剂盒中的样本稀释液,所述红细胞分离剂的添加量为0.05-1% (V/V) ;或将红细胞分离剂涂覆在免疫层析检测试剂盒的血液处理管内壁,所述红细胞分离剂的用量为2-20微升。

## 一种用于免疫层析检测试剂盒的快速分离红细胞的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物制剂技术领域,具体涉及一种快速从全血中分离除去红细胞的方法。

### 背景技术

[0002] 即时检验 (Point of care testing, POCT) 是指能在病人医疗现场进行的快速检验,其核心在于满足临床治疗或家用监护所需要的快速诊断需求,及时提供准确可靠的检验结果。凭借其操作简单、反应快速的优势,POCT已逐渐成为临床医生判断病情重要的依靠手段。

[0003] 随着临床检测技术的不断发展,为了满足快速的床边检测的需求,检测试剂对血液样本种类的涵括越来越广,不仅能适用于血清血浆样本,更要适用于全血样本,以实现快速检测。然而全血样本中的红细胞对临床诊断检测会造成不明确的干扰,影响结果的准确性。特别地,在免疫层析检测中,液体的流动对免疫层析检测反应具有重要的影响。而红细胞的存在可能影响影响整个反应体系的流动过程以及影响免疫反应。因此,研发高效快速分离血液样本中红细胞的分析方法对提升免疫层析检测技术的性能具有重要意义。

[0004] 目前,从血液样本中分离红细胞得到血清或血浆的常用方法包括自然沉降和离心,前者需要较长的等待时间,后者需要使用到专用的离心设备,两者难以满足POCT快速检测的需求。因此,目前大部分能用于检测全血样本的荧光免疫层析试剂盒中,主要通过在试剂条上贴加滤血膜,或者在样本垫上添加抗 RBC抗体,来实现分离全血样本中的红细胞。然而,这些方法中,一方面,红细胞仍然存在于免疫试剂条上的反应体系中,对层析反应的流动有着明显影响。另一方面,当待测全血样本存在溶血情况时,红细胞碎片难以被截留在滤血膜或样本垫中,会随着反应液层析到硝酸纤维膜上,进而影响免疫层析反应或造成强烈的背景干扰。

[0005] 为了减少全血样本中红细胞在免疫层析检测中的影响,提高免疫诊断结果的可靠性,在样本前处理中预先把红细胞从全血样本中快速分离出是提高检测灵敏度与准确性的重要途径。为此,本发明第一次公开一种能从全血样本中快速分离红细胞的方法,且该方法能适用于目前常用的免疫层析检测方法。

### 发明内容

[0006] 本发明提出的在全血样本中快速分离红细胞的方法是利用树枝状聚合物修饰聚苯乙烯微球-抗人红细胞 (RBC) 单克隆抗体复合物实现的,通过预先将该红细胞分离剂添加到免疫层析试剂盒的样本稀释液或其特定血液处理管中,在检验过程中该红细胞分离剂会与测试样本中的红细胞快速结合,快速形成庞大的网状结构,在重力的作用下实现快速红细胞的快速沉降,由此得到反应所需的上清液。

[0007] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案为:

[0008] 一种红细胞分离剂,其包括以下组分:羧基聚苯乙烯微球、活性基团树枝状聚合

物和抗人RBC抗体；其中所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺。

[0009] 优选地，所述羧基聚苯乙烯微球的质量浓度为1.0-5.0%，活性基团树枝状聚合物在反应体系中的浓度为0.05%-1.0%，抗人RBC抗体在反应体系中的浓度为0.05-5.0mg/mL。

[0010] 优选地，所述羧基聚苯乙烯微球的直径为100~300nm。

[0011] 本发明还提一种用于免疫层析检测试剂盒的快速分离红细胞的方法，包括以下步骤：

[0012] S1：制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球；

[0013] S2：制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体红细胞分离剂；

[0014] S3：将步骤S2制备的所述红细胞分离剂添加至免疫层析检测试剂盒中的样本稀释液或将所述红细胞分离剂涂覆在免疫层析检测试剂盒的离心管内壁内。

[0015] 进一步地，所述步骤S1制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球的方法包括以下步骤：

[0016] S1：将羧基聚苯乙烯微球加入到微球稀释液中，超声分散处理，得到均匀分散的微球悬浊液；

[0017] S2：对羧基聚苯乙烯微球进行活化处理，活化结束后离心去除上清液，得到活化的羧基聚苯乙烯微球；

[0018] S3：向活化后的羧基聚苯乙烯微球悬浊液中，滴加具有活性基团树枝状聚合物溶液，搅拌反应结束后，离心去掉上清液，得到的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球。

[0019] 优选地，所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)，其中EDC使用的反应浓度为100-800mM，NHS使用的反应浓度为100-800mM。

[0020] 优选地，所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺，反应体系中活性基团树枝状聚合物使用的反应浓度为0.05%-1.0%。

[0021] 进一步地，所述步骤S2制备活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体红细胞分离剂方法包括以下步骤：

[0022] S1：将活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球溶液，加入到微球稀释液中，超声分散，加入活化剂进行活化处理；

[0023] S2：活化后的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球，经离心去掉上清液，将得到的活化微球重新分散到标记稀释液中；

[0024] S3：将抗人RBC抗体加入到上述活化的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球溶液中，37℃反应1~6小时，反应结束后离心去掉上清液，得到的活性基团树枝状聚合物修饰的聚苯乙烯微球-标记抗人RBC抗体复合物，即为红细胞分离剂。

[0025] 优选地，所述活化剂为1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)，其中EDC使用的反应浓度为100-800mM，NHS使用的反应浓度为100-800mM。

[0026] 优选地,所述抗人RBC抗体的在反应体系中的浓度为0.05-5.0mg/mL。

[0027] 优选地,所述步骤S3中将红细胞分离剂添加至免疫层析检测试剂盒中的样本稀释液,所述红细胞分离剂的添加量为0.05-1% (V/V)。

[0028] 本发明的有益效果:

[0029] (1) 本发明的红细胞分离剂以聚苯乙烯微球为载体,将大量的抗RBC抗体交联到微球上。一方面,在分离全血样本的红细胞的过程中,得益于微球的增敏效应,使红细胞分离剂能与红细胞快速结合,把大量的红细胞捕获凝集在一起,形成分子量巨大的聚集体,在重力的作用下快速沉降,由此得以将全血样本中的红细胞与检测成分分离。另一方面,聚苯乙烯微球具有良好的生物相容性,保障了交联在微球上的抗RBC抗体的生物活性。

[0030] (2) 本发明红细胞分离剂在聚苯乙烯微球为载体上修饰了活性基团丰富的活性基团树枝状聚合物,经其修饰,微球载体表面具有更多的活性基团,能够负载更多抗RBC抗体,使红细胞分离剂对红细胞具有更好的结合能力。此外,树枝状聚合物能丰富聚苯乙烯微球表面的三围空间结构,扩展抗RBC抗体之间的空间,一方面降低红细胞分离剂同时与大量红细胞结合过程中的空间位阻效应,提高结合效率;另一方面,能有效减小被捕获的红细胞之间的相互挤压,避免红细胞破碎造成溶血,减少对检测结果的不利影响。

[0031] (3) 本发明红细胞分离方法能简单应用到免疫层析检测中,无需额外的实验仪器,操作简单便捷,适合快速诊断的要求。

## 具体实施方式

[0032] 为了更加简洁明了的展示本发明的技术方案、目的和优点,下面结合具体实施例对本发明做进一步的详细描述。

[0033] 实施例1

[0034] 本实施的红细胞分离其特征包括:羧基聚苯乙烯微球3.0%、多聚赖氨酸 0.05%、抗人RBC抗体0.05mg/mL。制备方法如下:

[0035] S1、制备多聚赖氨酸修饰的聚苯乙烯微球

[0036] ①取1.0mL 3.0%羧基聚苯乙烯微球,加入到9.0mL微球稀释液中,超声分散处理10min,得到均匀分散的微球悬浊液;

[0037] ②在快速搅拌下,向上述均匀分散的微球悬浊液中加入10倍浓度的1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 活化剂,对羧基聚苯乙烯微球进行活化处理10-120min。活化反应体系中,EDC使用的反应浓度为100mM,NHS使用的反应浓度为100mM。

[0038] ③活化结束后,反应液进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清液,用清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分散到9.0mL微球保存液中。

[0039] ④在快速搅拌下,向活化后的羧基聚苯乙烯微球悬浊液中,逐滴加入10倍浓度的多聚赖氨酸溶液,搅拌反应0.5-12.0h;反应体系中多聚赖氨酸使用的反应浓度为0.05%。

[0040] ⑤反应结束后,进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清液,用清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球重新分散到1.0mL微球保存液中,在2-8℃环境中保存待用。

- [0041] S2、制备多聚赖氨酸修饰的聚苯乙烯微球标记抗人RBC抗体的红细胞分离剂
- [0042] ①取1.0mL上述多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球溶液,加入到9.0mL微球稀释液中,超声分散10min,加入EDC/NHS活化剂进行活化处理,搅拌反应10-120min。活化反应中体系,EDC使用的反应浓度为100mM,NHS使用的反应浓度为100mM。
- [0043] ②活化后的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球经13000r/min离心20min,去掉上清液,用清洗液清洗,离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分散到9.0mL标记稀释液中。
- [0044] ③在快速搅拌下,将抗人RBC抗体加入到上述活化的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球溶液中,37℃反应1小时。标记反应体系中,抗人RBC抗体的整体浓度为0.05mg/mL。
- [0045] ④反应结束后,反应溶液进行13000r/min离心20min,去掉上清液,用清洗液清洗,清洗步骤反复进行3次,得到的聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球标记抗人RBC抗体,重新分散到5.0mL标记物保存液中,在2-8℃环境中保存待用。
- [0046] 实施例2
- [0047] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的多聚赖氨酸的浓度为0.1%。
- [0048] 实施例3
- [0049] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的活性基团树枝状聚合物为树枝状聚酰胺胺,其浓度为0.1%。
- [0050] 实施例4
- [0051] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的活性基团树枝状聚合物为聚丙烯亚胺正三十二烷胺,其浓度为0.1%。
- [0052] 实施例5
- [0053] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的抗人RBC抗体在反应体系中的浓度为1mg/mL。
- [0054] 实施例6
- [0055] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的抗人RBC抗体在反应体系中的浓度为3mg/mL。
- [0056] 实施例7
- [0057] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的抗人RBC抗体在反应体系中的浓度为5mg/mL。
- [0058] 实施例8
- [0059] 本实施例与实施例1的唯一区别在于,本实施使用的活化剂EDC使用的反应浓度为800mM,NHS使用的反应浓度为800mM。
- [0060] 实施例9将本发明的红细胞分离剂用于肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)荧光免疫层析检测试剂盒
- [0061] 肌酸激酶同工酶MB(CK-MB)荧光免疫层析检测试剂盒由荧光免疫层析检测试剂卡与样本稀释液组成,该试剂盒可检测的样本包括血清、血浆、全血。本实施例中,将本发明的红细胞分离剂直接添加到样本稀释液中,所述分离剂会快速与样本中的红细胞进行反应,促进红细胞的凝集,使红细胞快速沉降。
- [0062] 本实施例中,为了充分验证本发明红细胞分离剂的效果,对制备过程中使用的抗

RBC抗体浓度设置四个方案，

[0063] ①取1.0mL 3.0%羧基聚苯乙烯微球,加入到9.0mL微球稀释液中,超声 分散处理10min,得到均匀分散的微球悬浊液;聚苯乙烯微球直径约为300nm, 其表面基团为羧基。

[0064] ②在快速搅拌下,向上述均匀分散的微球悬浊液中加入10倍浓度的1-(3- 二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 活化 剂,对羧基聚苯乙烯微球进行活化处理30min;活化过程中,EDC使用的反应 浓度为200mM,NHS使用的反应浓度为200mM。

[0065] ③活化结束后,反应液进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清 液,用清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分散 到9.0mL微球保存液中。

[0066] ④在快速搅拌下,向活化后的羧基聚苯乙烯微球悬浊液中,逐滴加入10倍 浓度的多聚赖氨酸溶液,其使用的反应浓度为0.5%,搅拌反应3.0h。

[0067] ⑤反应结束后,进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清液,用 清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯 微球重新分散到1.0mL 微球保存液中。

[0068] ⑦取1.0mL上述多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球溶液,加入到9.0mL微球 稀释液中,超声分散10min,加入EDC/NHS活化剂进行活化处理,搅拌反应 30min;活化反应中体系,EDC使用的反应浓度为400mM,NHS使用的反应 浓度为400mM。

[0069] ⑧活化后的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球经13000r/min离心20min,去掉 上清液,用清洗液清洗,离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分 散到9.0mL标记稀释液中。

[0070] ⑨在快速搅拌下,将抗人RBC抗体加入到上述活化的多聚赖氨酸修饰聚苯 乙烯微球溶液中,37℃反应3小时;标记反应体系中,依据设计的四个方案, 抗人RBC抗体使用的反应浓度分别为0.2mg/mL、0.5mg/mL、1.0mg/mL和 2.0mg/mL。

[0071] ⑩反应结束后,反应溶液进行13000r/min离心20min,去掉上清液,用清 洗液清洗,清洗步骤反复进行3次,得到的聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球标记抗 人RBC抗体,重新分散到5.0mL标记物保存液中,在2-8℃环境中保存待用。

[0072] 将上述步骤制备得到的红细胞分离剂添加到CK-MB免疫层析检测试剂盒 的样本稀释液中,添加的体积比例为0.5%。将50微升的全血样本加入到200 微升上述样本稀释液中,用移液器吹打混匀3次,静止放置,观察红细胞凝集 沉降情况,结果见表1。

[0073] 表1:红细胞沉降时间

[0074]

抗人 RBC 抗体 使用浓度 (mg/mL)	方案 1	方案 2	方案 3	方案 4	
	0.2	0.5	1.0	2.0	
红细胞沉降分离时间/s	样本 1	110	82	52	32
	样本 2	115	85	53	33
	样本 3	106	81	50	32
	样本 4	101	77	47	31
	样本 5	111	92	53	32
	样本 6	100	77	46	29
	样本 7	104	90	49	30
	样本 8	102	77	47	30
	样本 9	103	79	49	31
	样本 10	101	78	48	29

[0075] 根据表1中的实验数据分析可得,本发明的红细胞分离剂能适用于肌酸激 酶同工酶MB(CK-MB) 荧光免疫层析检测试剂盒,在全血样本稀释过程中快 速完成红细胞分离。随着抗人RBC抗体的使用浓度不断升高,所得的红细胞分 离剂分离沉降红细胞所用时间逐渐缩短。根据表1中的实验数据分析,本专利 提出的分离红细胞方法的分离时间远小于常规全血中红细胞自然沉降所需的时间。而且本发明的高效红细胞分离剂在该案例的使用过程中,无需额外的工具 与操作,相对于常规的电动离心分离,该方法更加简单可靠,适用于POCT的 床边诊断需求。

[0076] 为验证本发明的红细胞分离剂在肌酸激酶同工酶MB荧光免疫层析检测试 剂盒上的使用效果,使用上述方案3分离后得到的上清液进行免疫层析检测, 分析结果的准确性与重复性。其中,对照方案A使用的肌酸激酶同工酶MB荧 光免疫层析检测试剂盒的性能指标与方案3的相同,唯一不同之处在于,对照 方案A中,在荧光免疫层析检测试剂卡制备过程中是将抗RBC抗体固化在样本 垫上,利用样本垫上的抗RBC抗体对全血检测过程中的红细胞进行分离,结果 见表2。

[0077] 表2 上述方案的肌酸激酶同工酶MB荧光免疫层析检测试剂盒的检测结果

检测结果 [0078]	方案 3		对照方案 A	
	CK-MB (ng/mL)	变异系数 CV	CK-MB (ng/mL)	变异系数 CV
样本 1	3.78	8.25%	3.62	9.73%
样本 2	0.57	6.27%	0.37	6.96%
样本 3	18.73	6.32%	19.01	9.02%
样本 4	47.02	6.87%	43.44	7.05%
样本 5	1.54	7.12%	1.21	6.38%
样本 6	8.18	6.66%	6.77	6.89%
样本 7	60.11	5.94%	55.09	8.49%
样本 8	1.75	6.23%	1.46	7.83%
样本 9	6.13	7.88%	4.83	8.07%
样本 10	1.20	6.56%	0.99	9.96%

[0079] 由表2结果可见,在样本稀释液中加入了本发明的红细胞分离剂,CK-MB 荧光免疫层析检测试剂盒能准确地检测全血样本中的CK-MB含量,结果与常规 对照方案A的检测结果基本一致。分析上述结果发现,使用本发明红细胞分离 剂的方案3的检测结果的重复性更好,CV优于常规对照方案。这是因为红细胞 分离剂能在样本稀释处理阶段就把红细胞分离除去,加到荧光免疫层析试机卡 上的反应液对层析流动的影响较小,同时也避免了层析过程中少量红细胞溶血 造成的背景干扰。

[0080] 综上可见,在肌酸激酶同工酶MB荧光免疫层析检测试剂盒的应用上,本 发明的红细胞分离剂能在样本稀释处理阶段快速凝集分离红细胞,降低反应液 对层析流动的影响,降低反应液的背景干扰。

[0081] 实施例9将本发明的红细胞分离剂用于心肌肌钙蛋白 (cTnI) 荧光免疫层析 定量测定试剂盒

[0082] 本实施例将本发明的红细胞分离剂应用到心肌肌钙蛋白 (cTnI) 的荧光免疫 层析定量测定试剂盒中。其中,该心肌肌钙蛋白 (cTnI) 的荧光免疫层析定量测 定试剂盒由荧光免疫层析检测试剂卡组成,无样本稀释液,属于一步法加样。该试剂盒可检测的样本包括 血清、血浆、全血。本实施例中,将本发明的红细胞分离剂涂覆在前处理全血样本的离心管

中。在测试前,仅需要简单地把全血 样本加到该管中,摇匀,静置,即可实现全血样本中红细胞的简单快速分离。得到上清的血浆可直接用于心肌肌钙蛋白(cTnI)的荧光免疫层析定量测定试剂 盒。

[0083] 本实施例中,对制备过程中使用的抗RBC抗体浓度设置四个方案,具体如 下:

[0084] ①取1.0mL 3.0% 羧基聚苯乙烯微球,加入到9.0mL微球稀释液中,超声 分散处理10min,得到均匀分散的微球悬浊液;聚苯乙烯微球直径约为100nm, 其表面基团为羧基。

[0085] ②在快速搅拌下,向上述均匀分散的微球悬浊液中加入10倍浓度的1- (3- 二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC) /N-羟基丁二酰亚胺 (NHS) 活化 剂,对羧基聚苯乙烯微球进行活化处理30min;活化过程中,EDC使用的反应 浓度为400mM,NHS使用的反应浓度为400mM。

[0086] ③活化结束后,反应液进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清 液,用清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分散 到9.0mL微球保存液中。

[0087] ④在快速搅拌下,向活化后的羧基聚苯乙烯微球悬浊液中,逐滴加入10倍 浓度的多聚赖氨酸溶液,其使用的反应浓度为1.0%,搅拌反应3.0h。

[0088] ⑤反应结束后,进行离心处理,13000r/min离心20min,去掉上清液,用 清洗液清洗,该离心清洗步骤反复进行3次,得到的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯 微球重新分散到1.0mL 微球保存液中。

[0089] ⑦取1.0mL上述多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球溶液,加入到9.0mL微球 稀释液中,超声分散10min,加入EDC/NHS活化剂进行活化处理,搅拌反应 30min;活化反应中体系,EDC使用的反应浓度为400mM,NHS使用的反应 浓度为400mM。

[0090] ⑧活化后的多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球经13000r/min离心20min,去掉 上清液,用清洗液清洗,离心清洗步骤反复进行3次,得到的活化微球重新分 散到9.0mL标记稀释液中。

[0091] ⑨在快速搅拌下,将抗人RBC抗体加入到上述活化的多聚赖氨酸修饰聚苯 乙烯微球溶液中,37℃反应3小时;标记反应体系中,依据设计的四个方案, 抗人RBC抗体使用的反应浓度分别为0.5mg/mL、1.0mg/mL和2.0mg/mL。

[0092] ⑩反应结束后,反应溶液进行13000r/min离心20min,去掉上清液,用清 洗液清洗,清洗步骤反复进行3次,得到的聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球标记抗 人RBC抗体,重新分散到5.0mL标记物保存液中,在2-8℃环境中保存待用。

[0093] 取10微升上述步骤制备得到的高效红细胞分离剂溶液加入到所述试剂盒的 离心管中,震荡离心管,使红细胞分离剂均匀涂覆在离心管内壁,即得到全血 样本处理管。取200微升全血样本加入到上述全血样本处理管中,上下颠倒摇 匀8次,静止放置,观察红细胞凝集沉降情况,结果见表3。

[0094] 表3:红细胞沉降时间

[0095]	抗人 RBC 抗体 使用浓度 (mg/mL)	方案 5	方案 6	方案 7	方案 8
		0.5	1.0	2.0	3.0
[0096]	红细胞 完成沉 降分离 的时 间 /s	样本 1	206	138	87
		样本 2	197	132	84
		样本 3	183	120	71
		样本 4	188	120	77
		样本 5	184	118	75
		样本 6	203	140	88
		样本 7	184	118	74
		样本 8	197	132	84
		样本 9	202	137	86
		样本 10	189	119	78

[0097] 根据表3中的实验数据分析可得,本发明的红细胞分离剂能直接与全血样本作用,通过简单便捷的混匀操作,就能加速全血样本中的红细胞凝集沉降,实现红细胞在全血样本中的快速分离,适用于一步法加样的荧光免疫层析试剂盒。随着抗人RBC抗体的使用浓度不断升高,所得的红细胞分离剂分离沉降红细胞的所用时间越短。在本专利所提出的反应浓度范围内,所得红细胞分离剂的效果随抗人RBC抗体的使用浓度增高而增强。根据表3中的实验数据所示,上述方案中,分离全血中的红细胞的完成时间为1-3min,稍长于本发明红细胞分离剂在样本稀释液中的应用,但仍远快于常规自然沉降所需的时间,满足心肌肌钙蛋白(cTnI)荧光免疫层析定量测定试剂盒快速检测的要求。

[0098] 为了验证本发明的高效红细胞分离剂在cTnI荧光免疫层析定量测定试剂盒上的使用效果,使用上述方案7分离后得到的上清液进行免疫层析检测,分析结果的准确性与重复性。其中,对照方案B和C使用的cTnI荧光免疫层析定量测定试剂盒的性能指标与方案7的相同,唯一不同之处在于,对照方案B中,在荧光免疫层析检测试剂卡制备过程中把抗RBC抗体固化在样本垫上,并利用样本垫上的抗RBC抗体对全血检测过程中的红细胞进行分离;而对照方案C中,先通过离心处理全血样本,再直接检测离心分离等到的血浆样本。上述方案的cTnI荧光免疫层析定量测定试剂盒的测试结果如表4所示。

[0099] 表4 上述方案的cTnI荧光免疫层析定量测定试剂盒的检测结果

[0100]

样本类型	方案 7		对照方案 B		对照方案 C	
	全血		全血		血浆	
检测结果	cTnI (ng/mL)	CV	cTnI (ng/mL)	CV	cTnI (ng/mL)	CV
样本 1	0.13	7.07%	0.20	9.14%	0.15	4.41%
样本 2	0.54	4.58%	0.37	6.14%	0.60	7.01%
样本 3	11.72	4.86%	9.72	8.97%	12.60	4.89%
样本 4	0.31	6.24%	0.24	8.87%	0.35	6.29%
样本 5	0.06	4.17%	0.11	7.00%	0.06	5.92%
样本 6	40.02	6.59%	40.92	8.89%	42.87	6.27%
样本 7	8.67	5.11%	7.65	8.41%	8.42	5.57%
样本 8	0.82	4.79%	1.14	9.84%	0.88	4.65%
样本 9	3.54	7.17%	3.29	9.15%	3.69	5.62%
样本 10	1.74	6.38%	2.08	6.30%	1.87	6.32%

[0101] 由上述结果可见,方案7对全血样本的cTnI检测结果与对照方案C的检测结果整体一致,说明本发明的红细胞分离剂适用于一步法加样的cTnI荧光免疫层析定量测定试剂盒,检测结果具有良好的准确性。比较分析方案7与对照方案B的cTnI检测结果可见,利用本发明红细胞分离剂的方案7相对于对照方案B具有更好的准确性。因为,方案7中在加样前利用红细胞分离剂快速分离沉降全血样本中的红细胞,检测过程中加到试剂卡上的血浆与离心分离得到的血浆基本一致,保障了检测结果的准确性。而对照方案B是把全血样本直接加样到试剂卡上,这无法避免不同患者全血样本中血浆与红细胞比值差异导致的检测结果偏差。此外,与对照方案B相比,方案7的检测结果具有良好的重复性,与离心血浆的检测结果的重复性一致。由此可见,方案7有效避免了红细胞对免疫层析过程的流动影响及背景干扰,且红细胞分离剂不会对检测体系引入额外的干扰。而相较于对照方案C,方案7的操作简单,无需电动的离心设备,在快速检测中具有更好的适用性。

[0102] 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,但并不能因此而理解为对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,本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

专利名称(译)	一种用于免疫层析检测试剂盒的快速分离红细胞的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110824157A</a>	公开(公告)日	2020-02-21
申请号	CN201911113475.0	申请日	2019-11-14
[标]申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	广州科方生物技术股份有限公司		
[标]发明人	孙子洪		
发明人	孙子洪		
IPC分类号	G01N33/531 C08J7/16 C08L25/06		
CPC分类号	C08J7/16 C08J2325/06 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a>	<a href="#">SIPO</a>	

#### 摘要(译)

本发明提供一种分离从全血中分离红细胞的方法，其核心在于一种红细胞分离剂，包括以下组分：羧基聚苯乙烯微球、活性基团树枝状聚合物和抗人RBC抗体；其中所述活性基团树枝状聚合物为多聚赖氨酸、树枝状聚酰胺胺或聚丙烯亚胺正三十二烷胺。本发明的红细胞分离剂是利用多聚赖氨酸修饰聚苯乙烯微球-抗人RBC抗体复合物实现的，通过预先将该红细胞分离剂添加到免疫层析试剂盒的样本稀释液或其特定血液处理管中，在检验过程中该红细胞分离剂会与测试样本中的红细胞快速结合，快速形成庞大的网状结构，在重力的作用下实现快速沉降，由此得到反应需要的上清液。

抗人 RBC 抗体 使用浓度 (mg/mL)	方案 1	方案 2	方案 3	方案 4	
	0.2	0.5	1.0	2.0	
红细胞沉降分离时间/s	样本 1	110	82	52	32
	样本 2	115	85	53	33
	样本 3	106	81	50	32
	样本 4	101	77	47	31
	样本 5	111	92	53	32
	样本 6	100	77	46	29
	样本 7	104	90	49	30
	样本 8	102	77	47	30
	样本 9	103	79	49	31
	样本 10	101	78	48	29