



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101957370 A

(43) 申请公布日 2011. 01. 26

(21) 申请号 200910158167. X

(22) 申请日 2009. 07. 15

(71) 申请人 英科新创(厦门)科技有限公司

地址 361022 福建省厦门市海沧新阳工业区
新光路 332 号

(72) 发明人 汪大明 林永志 王保丹 周汉博

(51) Int. Cl.

G01N 33/551 (2006. 01)

G01N 33/558 (2006. 01)

G01N 33/532 (2006. 01)

G01N 33/80 (2006. 01)

权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 1 页

(54) 发明名称

快速检测人血型抗体的方法及检测条

(57) 摘要

本发明涉及用于免疫检测人血型抗体的方法,特别是涉及快速检测人血型抗体的检测方法及所使用的检测条。所说的方法包括在固相载体上预包被有血型抗原,并在附着于该载体一端的纤维垫上固定信号标记的血型抗原。滴加样品后,如果待测样品中含有可以与血型抗原结合的抗体,便会在固相载体上观察到肉眼可见的免疫复合物,反之,则没有肉眼可见的免疫复合物形成,从而借以检测样品中的血型抗体。

1. 检测人血型抗体的方法,该方法包括在固相载体上预包被有血型抗原,并在附在该载体一端的纤维垫上固定信号标记的血型抗原,滴加样品后,如果待测样品中含有可以与血型抗原结合的抗体,便会在固相载体上观察到肉眼可见的免疫复合物,反之,则没有肉眼可见的免疫复合物形成,从而借以检测样品中的血型抗体。

2. 根据权利要求1的方法,其中所说的固相载体选自硝酸纤维素薄膜,或者其他的可以固定抗原、并可进行免疫层析的薄膜。

3. 根据权利要求1的方法,所说的纤维垫可以是玻璃纤维垫,或者其它的可以在其上面冻干信号标记物、并且在加入样本后又容易释放信号标记物的、由多孔高分子材料制成的纤维垫。

4. 根据权利要求1的方法,所说的信号标记选自胶体金、彩色聚苯乙烯乳胶或其他有色的无机纳米颗粒。

5. 根据权利要求1的方法,所说的待检血样标本为体积约 20-100 μ l 的新鲜人的血清或血浆。

6. 根据权利要求1的方法,所说的血型抗原,是采用表面活性剂或低渗压溶液溶胀红细胞后离心得到的,和 / 或用有机溶剂处理红细胞膜后得到的。

7. 根据权利要求1的方法,其中样本中的血型抗体,是根据待检血清迁移并被包被在硝酸纤维素膜上的红细胞膜表面抗原捕获,然后与信号标记物形成夹心复合物而显现的。

8. 用于完成根据权利要求1所述方法的检测条,所说的检测条由加样垫、固定有信号标记物的纤维素垫、防水胶布、包被有血型抗原并且可以显现对照线和检测线的硝酸纤维素膜、吸水垫、以及用做背衬的聚酯板组成。

快速检测人血型抗体的方法及检测条

发明领域

[0001] 本发明涉及免疫检测人血型抗体的方法,特别是涉及快速检测人血型的反定型检测方法,以及完成所述方法时所使用的检测条。

[0002] 发明背景

[0003] 血型鉴定的原理是基于抗原-抗体反应产生的细胞凝集。使用血型定型试剂检测红细胞表面抗原称为正定型方法;相反,使用红细胞表面抗原检测血清中的相应抗体则称之为反定型方法。为了避免因为血型不相容性,导致的继发性溶血性输血反应,有必要对红细胞表面抗原以及血清或血浆中抗体两方面进行检测,以确保临床输血的安全。《中华人民共和国药典 2005 版》公布的健康献血员血型监测标准中明确指出,须使用国家药品监督管理局批准的抗 A、抗 B 血型定型试剂进行检测。而且,ABO 血型检测结果,应以正、反定型法鉴定均合格为准。

[0004] 由于红细胞血型抗体与溶血性输血反应、新生儿溶血病及器官移植后的免疫排斥反应等有着密切关系,所以对红细胞血型抗体的检测越来越引起重视,其检测技术也在不断发展。国际输血协会 (ISBT) 在 1999 年报告中称,红细胞血型为:25 个血型系统、270 余种抗原 [1],还有一些血型集合和血型系列。血型抗体主要以 IgM、IgG 和 IgA 等形式存在,由相应的血型抗原刺激产生,最常见的免疫途径是血型不合的输血和妊娠,以及同种异体间的组织器官移植。根据对红细胞的凝集反应,红细胞血型抗体可以分为:(1) 完全抗体。这些抗体能够在盐水介质中凝集相应的红细胞所以又称为盐水抗体,它们主要是分子量较大的 IgM;(2) 不完全抗体。这类抗体主要是分子量较小的 IgG,其虽然能够结合红细胞上的抗原,但在盐水介质中不能使红细胞凝集。根据这些抗体的特性,适用的检测相应抗体的方法在不断产生,不断地改进和发展。

[0005] 目前,检测红细胞血型抗体的方法有盐水介质凝集试验、胶体介质凝集试验、酶处理红细胞凝集试验、抗球蛋白试验、低离子凝聚胺试验和微管凝胶检测试验等。

[0006] 大多数的血型抗体的检验,都是以有活力的红细胞表面血型抗原作为标准抗原。然而,新鲜红细胞不易保存,特别是红细胞表面血型抗原的抗原性随保存时间延长而逐渐下降。这类试剂不仅需要 2-8℃ 保存,且最长保存期只有 3 至 6 个月。同时,考虑到长途运输对红细胞抗原活性的影响等因素,致使这些已有方法的检测成本通常很高,从而限制了红细胞做为血型抗体检验试剂的应用。

[0007] 因此,长期以来,如何保持红细胞的抗原性,使其满足血型抗体检验实验的需求,是生命科学所面临的一个重大难题。为了长时间保存红细胞,人们采取低温冷冻(在低温冰箱和液氮中)技术,但低温冷冻难以大量保存红细胞。而且红细胞冷冻时间越长,其抗原性越弱,难以满足反定型实验的要求。另外,也有人将细胞膜包被到磁性粒子上,以更长久地保持细胞膜抗原的抗原性(参见专利:200810051319.1)。但如此保存的红细胞膜抗原在作为血型抗体检验分析试剂的应用时,也存在着复溶后效期短、保存条件苛刻(约 2-8℃)、需要配备仪器等缺陷。

[0008] 总之,目前常用的反定型鉴定方法存在效期较短、手工劳动强度大,成本高,检测

结果受主观操作偏差影响较大,以及存在污染的可能性等问题。而且,传统的反定型检测试剂仍不适用于快速便携式的检测的需要,因此,有必要对传统的反定型血型检测方法做出实质性的改进。

发明内容

[0009] 本发明的一个目的是提供一种检测人血型抗体的方法,该方法包括在固相载体上预包被有血型抗原,并在附在该载体上的纤维垫上固定信号标记的血型抗原,滴加样品后,如果待测样品中含有可以与血型抗原结合的抗体,便会在固相载体上观察到肉眼可见的免疫复合物,反之,则没有肉眼可见的免疫复合物形成,从而借以检测样品中的血型抗体。

[0010] 根据本发明的方法,其中所说的固相载体选自硝酸纤维素薄膜,或者其他的可以固定抗原、并可进行免疫层析的薄膜。

[0011] 根据本发明的方法,所说的垫可以是玻璃纤维垫,或者其它的可以在其上面冻干信号标记物、并且在加入样本后又容易释放信号标记物的、由多孔高分子材料制成的纤维垫。

[0012] 根据本发明的方法,所说的信号标记选自胶体金、彩色聚苯乙烯乳胶或其他有色的无机纳米颗粒。

[0013] 根据本发明的方法,所说的待检血样标本为体积约 20-100 μ l 的人新鲜血清或血浆。

[0014] 根据本发明的方法,所说的血型抗原是采用表面活性剂或低渗压溶液溶胀红细胞后离心得到的,和 / 或用有机溶剂处理红细胞膜后得到的。

[0015] 根据本发明的方法,其中检测样本中的血型抗体,是基于待检血清迁移并被包被的红细胞膜表面抗原捕获,然后与信号标记物形成夹心复合物而显现的。

[0016] 简单地说,该方法包括,使用硝酸纤维素膜作为包被血型抗原和免疫层析的载体,利用与信号物质交联的特异性的红细胞抗原,或处理过的红细胞膜检测样品中血型抗体的存在,借以判断被检样品的血型。

[0017] 具体操作中,可将同一硝酸纤维素薄膜分为两个区带,即硝酸纤维素薄膜近端 A 区带 - 包被了相应的已知抗原的检测线区带,和远端 B 区带 - 包被了相应抗体的对照线区带。预先干燥信号标记物、将其固定在容易释放的硝酸纤维素薄膜 A 区带下端的纤维垫上。硝酸纤维素膜的上端放置吸水滤纸等强吸水的材料(参见图 1 和实施例 1),以保证试剂和待检样品向一个方向迁移。在干燥并固定有信号标记物的纤维垫的下端,连接有亲水的加样垫(参见图 1)。当操作者将待检样品滴加到加样垫上时,即可通过纤维素膜向前迁移。当流经 A 区带后,如果样品中存在有相应的抗体,即可被包被在此处的红细胞膜表面抗原捕获,并与信号标记物形成夹心复合物,出现可观察的反应条带,从而可判定为抗体阳性;如果待检样品不含有相应的抗体,则在此区域便无复合物形成,因此无条带呈现,即可判定为抗体阴性。抵达 B 区带的对照条带时,应该也出现肉眼可见的反应条带。如果在 B 区带无反应条带出现,则该试条可能因样品保存不当等原因而导致活性丧失。

[0018] 根据本发明的一个优选实施方案,其中所说的固定血型抗体的方法可以是物理吸附或者化学交联等方法。根据本发明的方法,其中所说的固相载体选自硝酸纤维素薄膜,或者其他的可以固定抗原、并可进行免疫层析的薄膜。

[0019] 根据本发明的一个优选实施方案,其中检测结果的判断可以是肉眼观察,或者利用光学信号或者电信号采集仪器获得。

[0020] 本发明的一个目的是提供一种检测人血型抗体的方法。简单地说,本发明的方法包括:在硝酸纤维素膜载体的近侧预先包被A或B血型抗原,并在附于硝酸纤维素膜上的玻璃纤维垫处,固定胶体金标记的A或B血型抗原。加入待测血清或血浆样品后,被检样品首先与固定在玻璃纤维垫上的胶体金标记的血型抗原结合,层析后继续与固定在纤维素膜上的血型抗原结合,形成免疫复合物。因此,观察检测线上是否有抗原-抗体复合物形成,即可判断被检样品的血型。

[0021] 本发明进一步提供了用于反定型检测人血型抗体的检测条。所说的检测条由加样垫、固定有信号标记物的纤维垫、防水胶布、包被有血型抗原并且可以显现对照线和检测线的硝酸纤维素膜、吸水垫、以及用来做背衬的聚酯板组成(参见图1)。

[0022] 可按下述方法制备血型抗原、在载体材料上固定血型抗原、信号标记物等检测试剂,以及将各元件组装成本发明的检测条:

[0023] 1) 血型抗原的提取:采用表面活性剂或低渗压溶液溶胀红细胞后离心,和/或用有机溶剂处理红细胞膜。然后收集所得到的糖脂成分,并用亲和层析方法纯化,即得到所需的糖类血型抗原抽提物。

[0024] 2) 将血型抗原抽提物直接或者间接地固定在硝酸纤维素膜1的A区带上,并将抗血型抗原的相应血型抗体固定在硝酸纤维素膜的B区带上(参见图1)。由于其中固定化抗原/抗体内添加有选自蔗糖、海藻糖、聚乙烯吡咯烷酮及其组合物的蛋白保护剂,所以本发明所使用固定方法对血型抗原抗体的生物活性影响不大。

[0025] 3) 按常规方法,使血型抗原与胶体金或其他信号物质偶联,并将其以合适的浓度干燥并固定在玻璃纤维垫上,成为信号标记物纤维垫。

[0026] 4) 组装检测条,所需组件包括步骤2)的硝酸纤维素膜1,步骤3)的信号标记物纤维垫2,以及上端吸水纸3,下端加样垫4,聚酯板背衬5,将这些组分按照图1所示的模式结构组装,即得到本发明的用于检测血型抗体的胶体金检测条。

[0027] 根据本发明的一个优选实施方案,其中检测条上滴加的待测样品是体积大约为20-100 μ l的人新鲜血清或血浆。所说的待检样品被滴加在检测条的加样垫上(图1)。

[0028] 根据本发明的方法,其中所说的固相载体选自硝酸纤维素薄膜,或者其他的可以固定抗原、并可进行免疫层析的薄膜。

[0029] 根据本发明的检测条,所说的垫可以是玻璃纤维垫,或者其它的可以在其上面冻干信号标记物、并且在加入样本后又容易释放信号标记物的、由多孔高分子材料制成的垫。

[0030] 根据本发明的检测条,所说的信号标记选自胶体金、彩色聚苯乙烯乳胶或其他有色的无机纳米颗粒。

[0031] 根据本发明的检测条,所说的待检血样标本为体积约20-100 μ l的人新鲜血清或血浆。

[0032] 根据本发明的检测条,所说的血型抗原是采用表面活性剂或低渗压溶液溶胀红细胞后离心得到的,和/或用有机溶剂处理红细胞膜后得到的。

[0033] 根据本发明的检测条,其中检测样本中的血型抗体,是基于待检血清迁移并被包被在硝酸纤维素膜上的红细胞膜表面抗原捕获,然后与信号标记物形成夹心复合物而显现

的。

[0034] 根据本发明的检测条,其中也可使用能够直接或间接发出可计量的光、电、电磁波或射线的其他信号物质,例如彩色颗粒、荧光素、量子点等。但本发明中,优选的信号物质是使用胶体金。

[0035] 根据本发明的一个优选实施方案,其中所说的胶体金的是以柠檬酸钠还原四氯化金而制备的。但所说的信号物质不只限于使用如此制成的胶体金材料,也可以使用其他彩色信号物质,例如彩色聚苯乙烯乳胶、有色的无机纳米颗粒等。

[0036] 根据本发明的一个优选实施方案,其中所说的血型抗原是用十二烷基磺酸钠(SDS)溶胀,并用乙醇加热处理(70℃,30分钟)的血型抗原。

[0037] 根据本发明的一个优选实施方案,检测所采用的免疫反应方法为夹心法,但也可以采用竞争法,间接法等其他免疫分析方法。

[0038] 在进行ABO血型抗体的检测的实际操作中,可以将检测抗A、抗B的两条检测条组合到同一块聚酯板背衬上,分别在两个检测条上加样并检测ABO血型抗体。如果仅抗A的检测条结果为阳性,该血样为B型;如果仅抗B的检测条结果为阳性,该血样为A型;如果抗A、抗B的检测条结果均为阳性,该血样为O型;如果两个检测条都为阴性,该血样为AB型。

[0039] 本发明的人血型抗体检测方法及检测条,特别适合于血站血型抗体筛查、街头采血以及临床血型反定型自检使用。通过快速免疫层析反应及简单方便的结果判读,达到对血型抗体快速简单准确的鉴定。该方法操作简单、方便易行(仅需一步加样操作),而且易于保存检测结果。按照本发明的方法,其全部检测过程通常不超过20分钟。特别是,本发明的方法及检测条灵敏度高,不受红细胞表面电荷排斥的影响,因而不需要添加抗人IgG试剂。通过标记的血型抗原与人体血液中血型抗体的特异性结合,有血型抗原-抗体反应而导致的红细胞凝集,能够准确地确定血型抗体的种类。该检测条也可适用于常温保存,有效期长,而且不需要特殊仪器配套使用。另外,本发明方法的检测结果很容易判读。因此,与现有的血型抗体检测试剂相比,大大降低了操作的复杂程度以及试剂和检测成本。

附图说明

[0040] 图1显示本发明血型抗体检测条的模式图(侧视图与正视图)。其中1为硝酸纤维素膜,2为信号标记物纤维垫,3为吸水垫,4为加样垫,5为聚酯板背衬。

[0041] 图2显示使用基于本发明的检测条,检测人ABO血型抗体的阳性和阴性检测结果。检测条上分别以C代表对照线和T代表检测线,S代表加样区。在检测线位置,有胶体金免疫复合物反应条带出现,表示被检样本中存在相应的血型抗体。检测线未显现,表示被检样本中不存在相应的血型抗体。如果对照线位置无反应条带出现,则表明检测条失效。

具体实施方案

[0042] 下列实施例旨在进一步举例描述本发明,这些实施例并不以任何方式限制本发明。在不背离本发明技术解决方案的前提下,对本发明所作的任何改动或者改变,都将落入本发明的待批权利要求范围之内。

[0043] 实施例1:检测人ABO血型抗体的检测条的制备和使用

[0044] 1) 血型抗原的提取:用含有1%十二烷基磺酸钠的10mM磷酸缓冲液溶胀红细胞,

并用有机溶剂乙醇处理(70°C, 30 分钟)。去除蛋白后,收集糖脂,并采用亲和层析分离,得到所需的 A 型和 B 型糖类血型抗原提取物。

[0045] 2) 将血型抗原 A/B 直接或者间接固定在硝酸纤维素膜 1 的 A 区带上,并将相应的抗血型抗体(抗 A/抗 B)固定在硝酸纤维素膜的 B 区带上(参见图 1);其中所采用的固定方法对抗原/抗体的生物活性影响不大,同时固定化抗原/抗体内添加蔗糖做为蛋白保存剂。

[0046] 3) 血型抗原 A/B 与胶体金信号物质偶联后,将其干燥并固定在玻璃纤维垫上,制成信号标记物纤维垫。

[0047] 4) 组装检测条,所需组件包括步骤 2 的硝酸纤维素膜 1,步骤 3 的纤维垫 2,上端吸水纸 3,加样垫 4。将这些组分按照附图 1 的结构模式组装成胶体金检测条。然后高温干燥,保存备用。

[0048] 具体操作中,首先在一宽度约 5-10cm 的长方形的聚酯板背衬中央粘贴约 20mm 宽的、预先由血型抗原 A 或 B 包被好的硝酸纤维素膜。然后两边依次压边贴上 6mm 宽的胶体金垫、样品垫和约 30mm 宽的吸水垫。最后在胶体金垫和硝酸纤维素膜的交接处用防水胶布粘贴,以防止贴垫翻起以及加样和冲洗液的漫延。将各层均粘贴好的聚酯板切成 3mm 宽的条,即得到本发明的到长约 5-10cm,宽约 3mm 的检测条(参见图 1)。

[0049] 将固定有 A 抗原和 B 抗原的两条检测条装到一个二联卡内,从而组装成可以在市场上销售的 ABO 血型抗体检测条。

[0050] 5) 样本检测:

[0051] 在检测条的加样窗口上滴加约 50 μ l 血清或者血浆样品。滴加待检测样本后,于 5-20 分钟内观察检测结果。

[0052] 6) 结果判读:

[0053] 如果仅抗 A 的检测条结果为阳性,该血样为 B 型;如果仅抗 B 的检测条结果为阳性,该血样为 A 型;如果抗 A、抗 B 的检测条结果均为阳性,该血样为 O 型;如果两个检测条都为阴性,该血样为 AB 型。

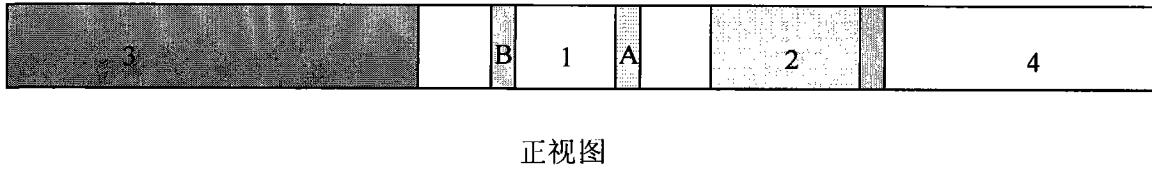
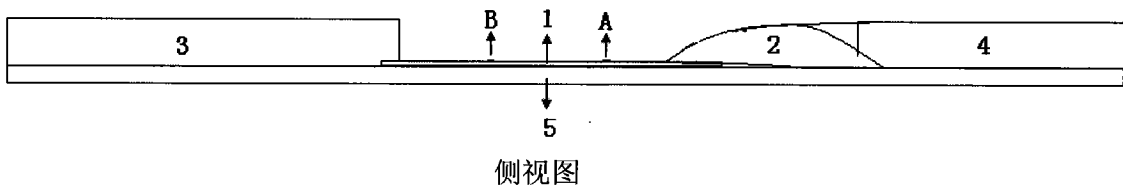


图 1

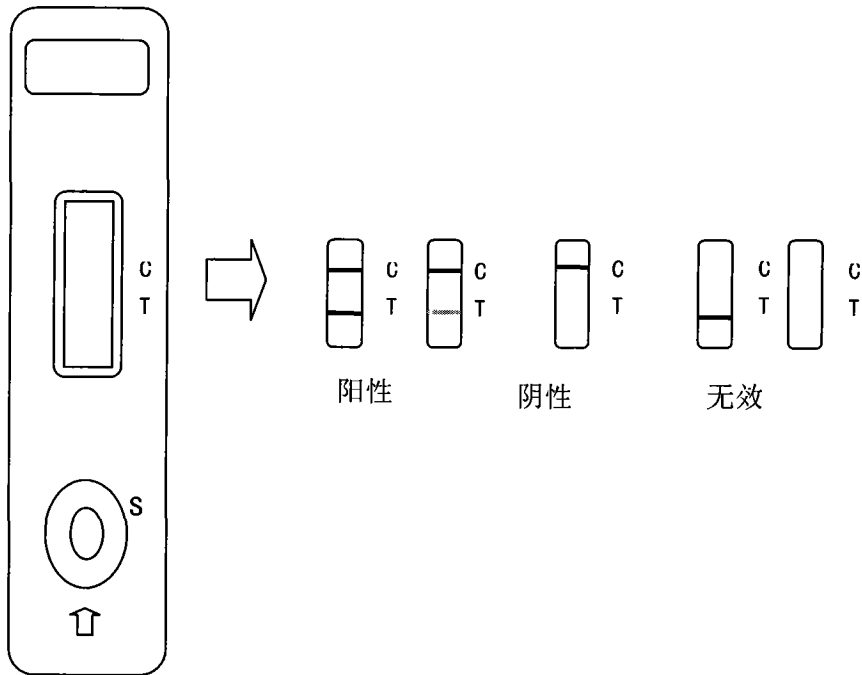
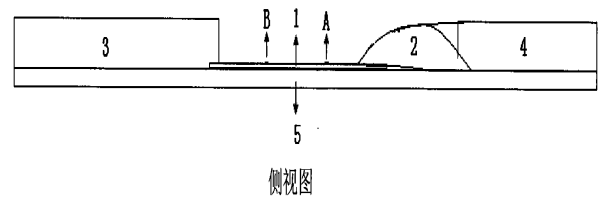


图 2

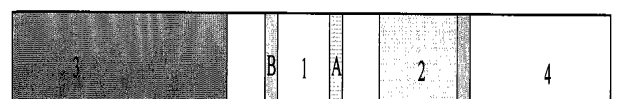
专利名称(译)	快速检测人血型抗体的方法及检测条		
公开(公告)号	CN101957370A	公开(公告)日	2011-01-26
申请号	CN200910158167.X	申请日	2009-07-15
[标]申请(专利权)人(译)	英科新创(厦门)科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	英科新创(厦门)科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	英科新创(厦门)科技有限公司		
[标]发明人	汪大明 林永志 王保丹 周汉博		
发明人	汪大明 林永志 王保丹 周汉博		
IPC分类号	G01N33/551 G01N33/558 G01N33/532 G01N33/80		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于免疫检测人血型抗体的方法，特别是涉及快速检测人血型抗体的检测方法及所使用的检测条。所说的方法包括在固相载体上预包被有血型抗原，并在附着于该载体一端的纤维垫上固定信号标记的血型抗原。滴加样品后，如果待测样品中含有可以与血型抗原结合的抗体，便会在固相载体上观察到肉眼可见的免疫复合物，反之，则没有肉眼可见的免疫复合物形成，从而借以检测样品中的血型抗体。



侧视图



正视图