



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107014992 A

(43)申请公布日 2017.08.04

(21)申请号 201611006650.2

(22)申请日 2016.11.10

(71)申请人 王毅

地址 421001 湖南省衡阳市华新开发区解
放大道35号南华附二

申请人 曹劲松

(72)发明人 王毅 曹劲松 刘罗根 章运生

(51)Int.Cl.

G01N 33/538(2006.01)

G01N 21/31(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种定量检测人血型抗体浓度方法的建立

(57)摘要

本发明公开了一种运用免疫比浊法定量检测人抗A、抗B血型抗体浓度的方法,为临床体外检测试剂技术领域。本方法中所应用试剂包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、标准品1、标准品2。具体方法为:将人血型抗原特异性三糖偶联于KLH上,制备成KLH-A或KLH-B蛋白干粉,可有效的提高血型抗原的纯度单一性、保存的长久性,且经以0.01M pH7.4的PBS溶解制备成的试剂R1(有效成分为KLH-A)和试剂R2(有效成分为KLH-B)具有准确的样品浓度,最终将其与试剂R3和检测样品混合,与标准品对照后可定量样品中血型抗体的浓度。经与临床常用的血型抗体检测方法相比发现,本发明中所述方法能将检测结果量化,具有直观、准确的特点,且可有效排除试剂稳定性、人为因素等对检测结果的影响,因而有利于本发明中所阐述的血型抗体定量检测方法在临床检测方面的推广应用。

1. 一种基于免疫比浊法的人血型抗体定量检测方法, 其特征在于, 包含试剂R1、试剂R2、试剂R3、校准品1和校准品2。其中试剂R1组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.008-0.012mg/ml的钥孔戚血蓝素偶联血型A抗原 (KLH-A); 试剂R2组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.008-0.012mg/ml的钥孔戚血蓝素偶联血型B抗原 (KLH-B); 试剂R3组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.15M的NaCl、40-60g/L的PEG-8000; 校准品1为鼠抗人血型A抗原抗体试剂; 校准品2为鼠抗人血型B抗原抗体试剂。

2. 根据权利要求1所述, 人血型抗体A的定量检测是通式公式计算而实现的, 其公式为:
 $y = -21819x^3 + 1644x^2 - 0.9588x + 0.0426$, y表示浓度, x表示吸光值。

3. 根据权利要求1所述, 人血型抗体B的定量检测是通过公式计算而实现的, 其公式为:
 $y = -12735x^3 + 1543.2x^2 - 50.649x + 0.5213$, y表示浓度, x表示吸光值。

4. 根据权利要求1所述, 其特征在于, 所述的试剂R1中的血型A抗原、试剂R2中的血型B抗原分别为偶联至钥孔戚血蓝素的血型A抗原特异性三糖、偶联至钥孔戚血蓝素的血型B抗原特异性三糖。

5. 根据权利要求1中所述, 试剂R1和试剂R3、试剂R2和试剂R3使用时的比例分为R1:R3=5:94、R2:R3=5:94。

一种定量检测人血型抗体浓度方法的建立

技术领域

[0001] 本发明涉及一种运用免疫比浊法定量检测人外周血中抗A、抗B血型抗体浓度的方法,属于临床体外检测试剂技术领域。

背景技术

[0002] 血型抗原作为人体三大抗原之一,其不仅分布在红细胞膜上,也存在于肝、肾等组织细胞和血管内皮细胞表面。依红细胞膜上抗原物质的异同,国际输血学会公布的血型分型系统就多达30种,其中ABO血型系统作为主要且常用的血型分型方法,广泛的应用于人体输血、器官移植等方面。

[0003] ABO血型系统包含四种血型,即A型、B型、AB型和O型。四种不同血型人群在血型抗原和血型抗体方面的差别主要在于:A型血的红细胞膜上表达血型A抗原,B淋巴细胞表达血型B抗原抗体,血浆预存一定浓度的血型B抗原抗体;B型血的红细胞膜上表达血型B抗原,B淋巴细胞表达血型A抗原抗体,血浆中预存一定浓度的血型A抗原抗体;AB型血的红细胞膜上表达血型A抗原和血型B抗原,B淋巴细胞不表达血型抗原抗体,血浆中无预存的血型抗原抗体;O型血的红细胞膜上不表达血型抗原,B淋巴细胞表达血型A抗原抗体和血型B抗原抗体,血浆中预存一定浓度的血型A抗原抗体和血型B抗原抗体。

[0004] 目前,国内外等待器官移植的患者人数一直居高不下,其主要原因是血型相容性器官的高度缺乏。基于此,ABO血型不相容器官移植(ABO blood group incompatibility organ transplantation,ABOi-OT)在全球的成功开展,成为了解决器官来源紧缺的一条重要途径。而术前清除受者体内预存血型抗体并控制术后血型抗体浓度反弹,成为影响ABOi-OT的主要障碍。因此,监测并定量检测ABOi器官移植前后血型抗体的浓度成为ABOi-OT手术方案制定的重要依据。

[0005] 目前,临床实验室检测血型抗体的方法主要有高效液相色谱法(HPLC)和盐水介质法、抗球蛋白介质法、低离子聚凝胺介质法、微柱凝胶检测卡等。其中,HPLC虽然为定量检测方法,但因需要的设备复杂且昂贵,难以在临床实验室被广泛使用;其余检测方法——尤其是目前临床常用的微柱凝胶检测卡,均为半定量检测方法,难以提供定量的结果,且对检测结果的判定易受试剂稳定性、人为因素等影响。而本发明中所运用的血型抗体免疫比浊法是基于血型抗体-血型抗原的特异性结合反应,其形成的免疫复合物在340nm波长有吸收峰值。该方法不需要昂贵的设备,且可实现自动化、大批量标本检测,符合在临床检测应用的基本要求。此外,本发明中将人工合成血型抗原特异性三糖偶联于钥孔戚血蓝素,可以确保检测用试剂的纯度单一性、浓度的确定性、保存的长久性,更提高了此方法在临床检测方面的推广应用。

发明内容

[0006] 针对目前临床人血型抗体浓度测定方法的不足,本发明提供了一种定量检测血型检测抗体浓度的方法,与微柱凝胶检测卡相比,结果更具客观性,有利于本发明中所阐述的

血型抗体定量检测方法在临床检测方面的推广应用。

[0007] 1. 本发明所用试剂及组成

[0008] 一种基于免疫比浊法的人血型抗体定量检测方法,其特征在于,包含试剂R1、试剂R2、试剂R3、校准品1和校准品2。其中试剂R1组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.008-0.012mg/ml的钥孔戚血蓝素偶联血型A抗原(KLH-A);试剂R2组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.008-0.012mg/ml的钥孔戚血蓝素偶联血型B抗原(KLH-B);试剂R3组成为0.01M pH 7.4的PBS缓冲液、0.15M的NaCl、40-60g/L的PEG-8000。

[0009] 本发明所采用的KLH-A、KLH-B为Alberta Innovates Techenology Futures公司合成,校准品1(鼠抗人血型A抗原抗体试剂)和校准品2(鼠抗人血型B抗原抗体试剂)购自Abcam公司。

[0010] 2. 本发明中血型抗体定量检测方法建立

[0011] 1. 人血型抗原的特异性结合位点为红细胞膜上的特异性三糖,此侧链为糖基转移酶催化特异性三糖基团偶联至细胞膜上蛋白,如红细胞膜上的Band 3、Band 4.5蛋白,肾脏组织的vWF、PLVAP、PECAM1蛋白。因此,本发明中为保证抗原的纯度及抗原性,人工合成血型A和B抗原特异性三糖后,将之偶联于KLH蛋白上(KLH-A, KLH-B)。

[0012] 2. 检测常用的人血型抗原抗体均为鼠抗人血型抗原抗体血浆,含有多种细胞培养液蛋白成份。因此,本发明中运用PAGE电泳结合western-blotting技术,鉴定并分析鼠抗人血型A、B抗体浓度,具体操作及结果如下:

[0013] 血型抗体实际中有效成份的鉴定

[0014] 将1 μ l鼠抗人血型A抗原抗体血浆或4 μ l鼠抗人血型B抗原抗体血浆经8%胶浓度的PAGE电泳后,300mA恒流冰浴电转90min,TBS洗膜5min $\times$ 3次,羊抗鼠IgM-HRP(1:2000)常温孵育40min,TBS洗膜10min $\times$ 2次,ECL发光分析。

[0015] 结果如图1所示,鼠抗人血型A抗原抗体血浆和鼠抗人血型B抗原抗体血浆中均存在多种非IgM分子,且两份血浆抗体中只有鼠抗人血型A抗原抗体或鼠抗人血浆B抗原抗体与羊抗鼠IgM-HRP结合反应。

[0016] 血型抗体试剂试剂中有效成份浓度的分析

[0017] 以BSA为标准品,通过PAGE电泳分离0.5 μ g、1 μ g、2 μ g、4 μ g、8 μ gBSA蛋白,考斯亮蓝染色并充分脱色后,运用PDQuest软件分析聚丙烯酰胺凝胶中各浓度BSA条带灰度值,并建立蛋白量-灰度值标准曲线。在次基础上,分别取1 μ l鼠抗人血型A抗原抗体或1 μ l鼠抗人血型B抗原抗体,经8%胶浓度的PAGE电泳并充分考马斯亮蓝染色脱色后,以PDQuest软件分析其灰度值,并依据标准曲线计算鼠抗人血型A抗原抗体和鼠抗人血型B抗原抗体的浓度。每组数据均重复三次。

[0018] 结果如图2所示,BSA蛋白含量-灰度值标准曲线的相关系数为0.9952,曲线结果可信。经计算分析,鼠抗人血型A抗原抗体和鼠抗人血型B抗原抗体的浓度分别为0.90 μ g/ μ l和0.57 μ g/ μ l。

[0019] 3. 在上述结果的基础上,运用免疫比浊法分析鼠抗人血型B抗原抗体与KLH-B抗原的结合速率曲线,以确定最佳的检测时间,所用检测仪器为BioPhotometer Plus核酸蛋白定量检测仪(本发明 λ_{340nm} 吸光值的测定均用此型号仪器),具体操作及结果如下:

[0020] 为验证当前实验条件下,最佳的吸光值测定时间点。本发明选取实际R2和校准品2

作为测定对象,以确定本发明所应采取的最佳检测时间点。

[0021] 首先,取5支小试管,每管加入生理盐水0.1ml,在第1管中加入0.1ml标准品2,混匀后吸取0.1ml加入第2管,依此类推,至第5管,最后弃去0.1ml。接着,以100 μ l的试剂R2调零后,将99 μ l的试剂R2与1 μ l稀释后的样品混合,从第3min开始,每分钟检测混合样品在 λ_{340nm} 的吸光值,直至第10min。每组数据重复三次,取其平均值建立鼠抗人血型抗原抗体与抗原结合速率曲线。

[0022] 结果如图3所示,鼠抗人血型B抗原抗体和KLH-B的结合速率在第5min达到最大值,之后结合速率变化逐渐降低。因此,为能更好的反应抗原-抗体的结合情况,本发明将采取第5min时作为检测时间点。所取检测时间点与相关报道相符。

[0023] 4. 进一步通过运用免疫比浊法制定鼠抗人血型A抗原抗体与KLH-A、鼠抗人血型B抗原抗体与KLH-B的抗体浓度-吸光值标准曲线(抗原抗体结合曲线呈三次函数关系),具体操作及结果如下:

[0024] 血型A抗原抗体与血型A抗原的结合标准曲线

[0025] 首先,取5支小试管,每管加入生理盐水0.1ml,在第1管中加入0.1ml标准品1,混匀后吸取0.1ml加入第2管,依此类推,至第5管,最后弃去0.1ml。接着,以100 μ l的试剂R1调零后,将99 μ l的试剂R1与1 μ l稀释后的样品混合,室温孵育5min后,于 λ_{340nm} 检测其吸光值。每组数据重复三次后,取其平均值建立血型A抗原抗体与血型A抗原的结合标准曲线。

[0026] 血型B抗原抗体与血型B抗原的结合标准曲线

[0027] 首先,取5支小试管,每管加入生理盐水0.1ml,在第1管中加入0.1ml标准品2,混匀后吸取0.1ml加入第2管,依此类推,至第5管,最后弃去0.1ml。接着,以100 μ l的试剂R2调零后,将99 μ l的试剂R2与1 μ l稀释后的样品混合,室温孵育5min后,于 λ_{340nm} 检测其吸光值。每组数据重复三次后,取其平均值建立血型B抗原抗体与血型B抗原的结合标准曲线。

[0028] 结果如图4和图5所示,图4为鼠抗人血型A抗原抗体与KLH-A结合标准曲线,曲线的相关系数为0.9957,结果真实可信;图5为鼠抗人血型B抗原抗体与KLH-B结合标准曲线,曲线的相关系数为0.9966,结果真实可信。

[0029] 5. 最后与微柱凝胶检测卡比较,以验证本发明中所用血型抗体定量检测方法对正常人外周血中血型抗体浓度测定的准确性。

附图说明

[0030] 图1. 鼠抗人血型A、B抗原抗体的鉴定。(A) 鼠抗人血型A抗原抗体的western-blotting分析,Lane 1.Marks,Lane 2.PAGE分析,Lane 3.western-blotting分析,二抗为羊抗鼠血型抗原IgM-HRP(1:2000);(B) 鼠抗人血型B抗原抗体的western-blotting分析,Lane 1.Marks,Lane 2.PAGE分析,Lane 3.western-blotting分析,二抗为羊抗鼠血型抗原IgM-HRP(1:2000)。

[0031] 图2. BSA标准蛋白浓度-灰度值曲线分析。(A) PAGE电泳,Lane 1.0.5 μ gBSA,Lane2.1 μ g BSA,Lane 3.2 μ g BSA,Lane 4.4 μ g BSA,Lane 5.8 μ g BSA;(B) BSA蛋白量-灰度值分析

[0032] 图3. 血型B抗原与鼠抗人血型B抗原抗体结合时间速率-变化曲线图

[0033] 图4. 人血型A抗原抗体标准曲线分析

[0034] 图5.人血型B抗原抗体标准曲线分析

具体实施方式

[0035] 实施例一.与微柱凝胶检测卡比较,验证本发明中所用血型抗体浓度定量检测方法的准确性。

[0036] 1.微柱凝胶检测卡分别验证A、B型健康人血浆中血型抗体的效价。

[0037] 首先,取5支小试管,每管加入生理盐水0.1ml。在第1管中加入0.1ml A型或B型血血浆,混匀后吸取0.1ml加入第2管,依此类推,至第5管,最后弃去0.1ml。接着,每管微柱凝胶检测卡中加一定量标准A型血或B型血红细胞生理盐水悬液(3%稀释)和检测用B血型血浆或A型血血浆,37℃孵育15min。于1000rpm离心10min后,取出检测卡,肉眼观察结果。

[0038] 2.免疫比浊法测定A、B型健康人血浆中血型抗体的浓度

[0039] 首先,取5支小试管,每管加入生理盐水0.1ml。在第1管中加入0.1ml A型或B型血血浆,混匀后吸取0.1ml加入第2管,依此类推,至第5管,最后弃去0.1ml。接着,以100 μ l的试剂R2调零后,将99 μ l的试剂R1与1 μ l稀释后的样品混合,室温孵育5min后,于 λ_{340nm} 检测其吸光值。

[0040] 结果如表1和表2所示:

[0041] 表1.微柱凝胶检测卡和免疫比浊法分析A型血血浆中血型抗体

[0042]

	微柱凝胶检测卡					免疫比浊法 (μ g/ μ l)				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
样本1	++++	+++	++	+	+	0.598	0.280	0.137	0.058	0.026
样本2	++++	+++	++	+	-	0.226	0.108	0.05	0.022	0.009
样本3	++++	+++	++	+	-	0.130	0.062	0.031	0.015	0.008

[0043] 表2.微柱凝胶检测卡和免疫比浊法分析B型血血浆中血型抗体

[0044]

	微柱凝胶检测卡					免疫比浊法 (μ g/ μ l)				
	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32
样本1	++++	+++	++	+	+	0.735	0.353	0.185	0.086	0.041
样本2	++++	+++	++	+	+	0.324	0.154	0.083	0.043	0.019
样本3	++++	+++	++	+	-	0.194	0.092	0.048	0.022	0.010

[0045] 表1和表2中所述数据显示,与微柱凝胶检测卡相比,伴随血浆的倍比稀释,免疫比浊法测定的数据呈现接近2倍的递比减少,说明本发明中所用免疫比浊法亦能很好的反应血型抗体的变化趋势,且可以以定量化的结果显示样品中血型抗体的浓度,并能在一定程度上排除试剂稳定性、人为因素等对结果造成的误判。

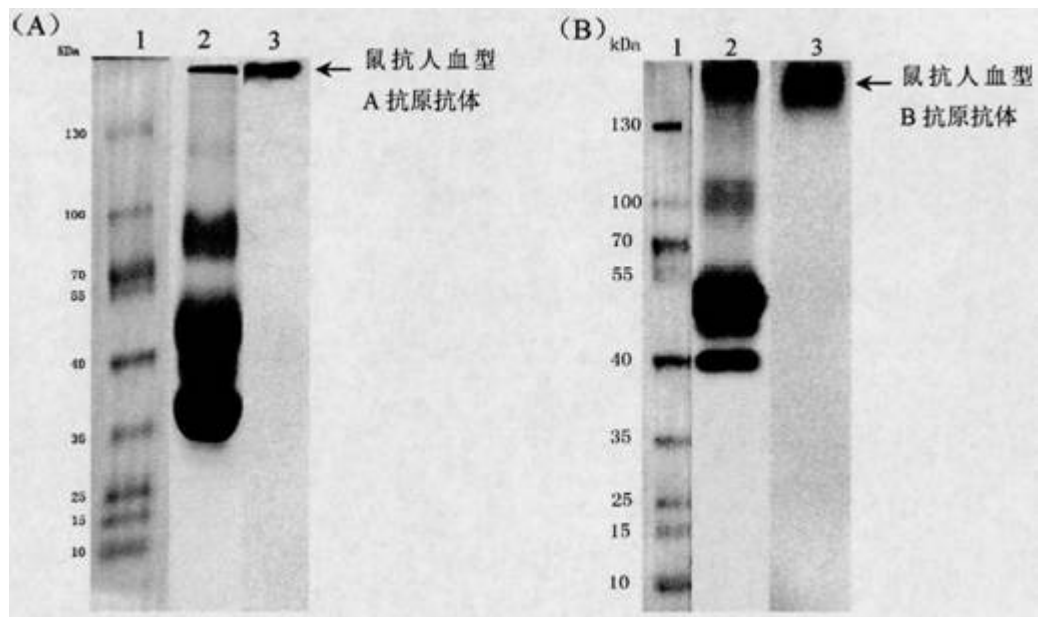


图1

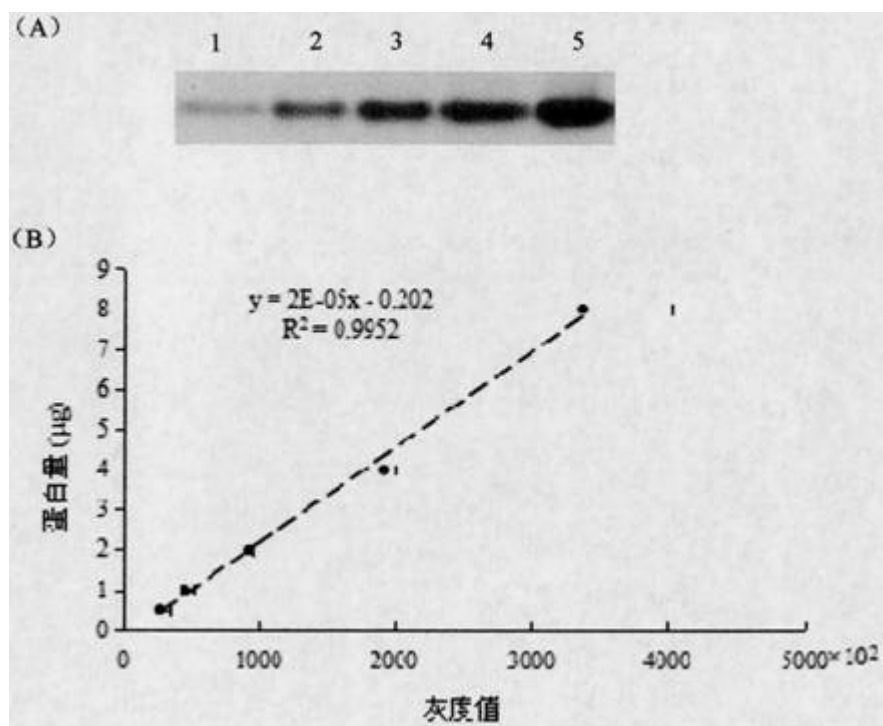


图2

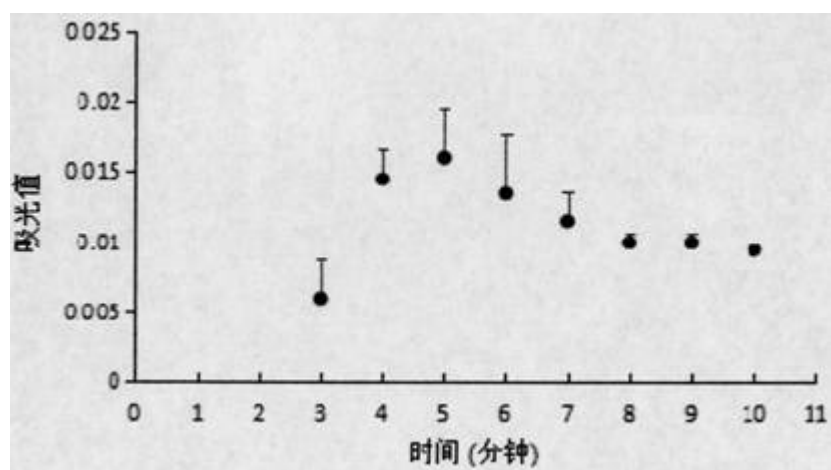


图3

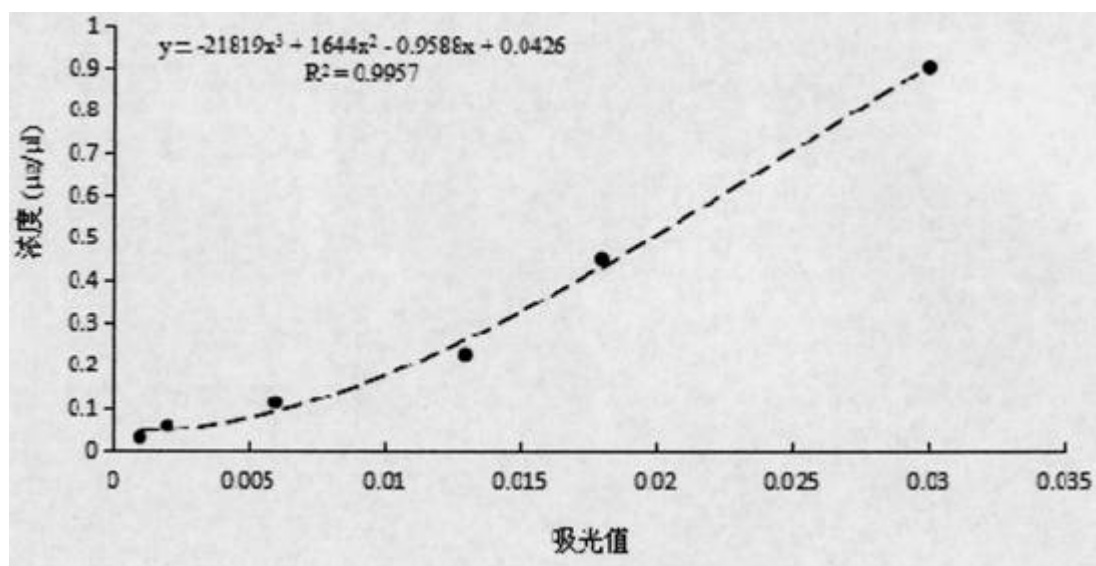


图4

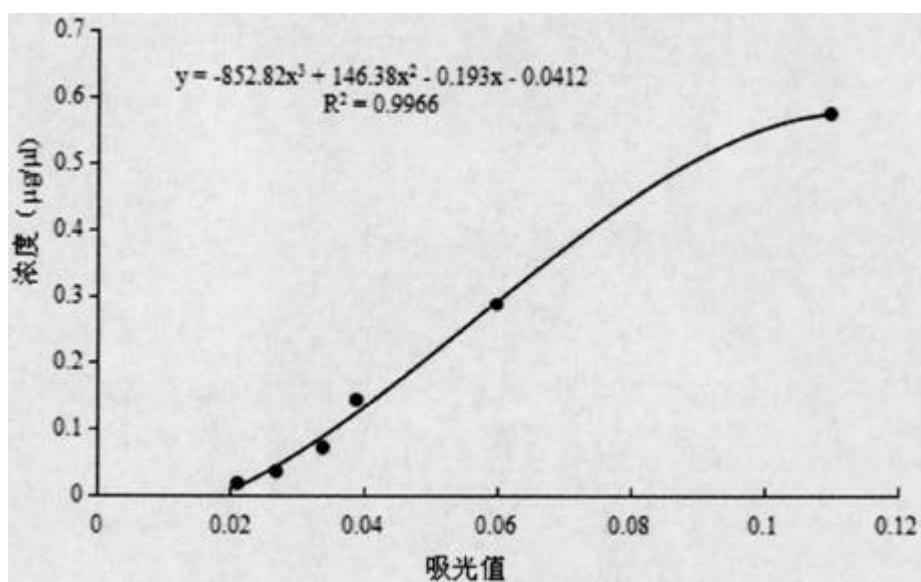


图5

专利名称(译)	一种定量检测人血型抗体浓度方法的建立		
公开(公告)号	CN107014992A	公开(公告)日	2017-08-04
申请号	CN201611006650.2	申请日	2016-11-10
[标]申请(专利权)人(译)	王毅 曹劲松		
申请(专利权)人(译)	王毅 曹劲松		
当前申请(专利权)人(译)	王毅 曹劲松		
[标]发明人	王毅 曹劲松 刘罗根 章运生		
发明人	王毅 曹劲松 刘罗根 章运生		
IPC分类号	G01N33/538 G01N21/31		
CPC分类号	G01N21/31 G01N33/538		
其他公开文献	CN107014992B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种运用免疫比浊法定量检测人抗A、抗B血型抗体浓度的方法，为临床体外检测试剂技术领域。本方法中所应用试剂包括试剂R1、试剂R2、试剂R3、标准品1、标准品2。具体方法为：将人血型抗原特异性三糖偶联于KLH上，制备成KLH-A或KLH-B蛋白干粉，可有效的提高血型抗原的纯度单一性、保存的长久性，且经以0.01M pH7.4的PBS溶解制备成的试剂R1(有效成分为KLH-A)和试剂R2(有效成分为KLH-B)具有准确的样品浓度，最终将其与试剂R3和检测样品混合，与标准品对照后可定量样品中血型抗体的浓度。经与临床常用的血型抗体检测方法相比发现，本发明中所述方法能将检测结果量化，具有直观、准确的特点，且可有效排除试剂稳定性、人为因素等对检测结果的影响，因而有利于本发明中所阐述的血型抗体定量检测方法在临床检测方面的推广应用。

