

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/536

G01N 33/80 C12N 9/00



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410046105.7

[43] 公开日 2005年2月23日

[11] 公开号 CN 1584596A

[22] 申请日 2004.5.31

[21] 申请号 200410046105.7

[71] 申请人 广州伟仕科技有限公司

地址 510665 广东省广州天河区中山大道建
中路3号304室伟仕公司

[72] 发明人 卢世昌 刘俊凤

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司
代理人 关 畅

权利要求书1页 说明书10页

[54] 发明名称 一种体外血型血清学实验检定使用的试剂盒

[57] 摘要

本发明公开了一种供体外血型血清学检定实验用的试剂盒。本发明的目的是提供一种稳定的在体外血型血清学检定实验中所用的木瓜凝乳蛋白酶试剂盒，包括木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂-64制剂和酶抑制剂-64溶剂。所述木瓜凝乳蛋白酶制剂含有木瓜凝乳蛋白酶，L-半胱氨酸和普鲁兰等；所述酶抑制剂-64制剂含有反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酰氨基(4-胍基)丁烷、甘露醇、海藻糖和普鲁兰等。本发明所提供的试剂盒可以简化体外血型血清学检定实验的操作规程，提高检定实验的安全性与灵敏度，可广泛用于血型抗体及相应红细胞血型抗原的筛检、鉴定、效价滴定；被抗体包被红细胞的清洗；注射用生物制品免疫性血型抗体检定。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1、一种体外血型血清学鉴定试剂盒，基本上由木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂-64 和酶抑制剂-64 溶剂组成；所述木瓜凝乳蛋白酶制剂含有木瓜凝乳蛋白酶，L-半胱氨酸和普鲁兰；所述酶抑制剂-64 含有反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷、甘露醇、海藻糖和普鲁兰。

2、根据权利要求 1 所述的体外血型血清学鉴定试剂盒，其特征在于：所述木瓜凝乳蛋白酶溶剂为 0.02—0.07mol / L 磷酸二氢钾、0.003—0.04mol/L 磷酸氢二钠的水溶液，pH5-6；所述酶抑制剂-64 溶剂为 0.02—0.07mol / L 磷酸二氢钾、0.003—0.04mol/L 磷酸氢二钠的水溶液，pH6-7。

3、根据权利要求 1 所述的体外血型血清学鉴定试剂盒，其特征在于：所述木瓜凝乳蛋白酶制剂中每 200000PU 单位的木瓜凝乳蛋白酶中 L-半胱氨酸和普鲁兰的含量分别为 0.025—0.050 mol 和 0.05—0.1 mmol。

4、根据权利要求 1 或 2 或 3 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：所述木瓜凝乳蛋白酶制剂中还含有甘露醇、海藻糖和维生素 C 盐。

5、根据权利要求 4 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：所述木瓜凝乳蛋白酶制剂中每 200000PU 单位的木瓜凝乳蛋白酶中甘露醇、海藻糖和维生素 C 盐的含量分别为 0.2—0.3mol、0.01—0.02mol 和 0.01—0.02mol。

6、根据权利要求 4 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：所述木瓜凝乳蛋白酶制剂的制备方法为：将木瓜凝乳蛋白酶、L-半胱氨酸、普鲁兰、甘露醇、海藻糖和维生素 C 盐以水溶解，除菌过滤后，经冷冻干燥得到木瓜凝乳蛋白酶试剂。

7、根据权利要求 1 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：所述酶抑制剂-64 中每 40000TU 单位的反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷中甘露醇、海藻糖和普鲁兰的含量分别为 0.2—0.3mol、0.01—0.02mol 和 0.05—0.1mol。

8、根据权利要求 1 或 2 或 7 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：所述酶抑制剂-64 的制备方法为：将反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷中甘露醇、海藻糖和普鲁兰以水溶解，除菌过滤后，经冷冻干燥得到酶抑制剂-64 试剂。

9、根据权利要求 1 所述的供体外血型血清学检定实验用试剂盒，其特征在于：木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液具有的活力效价为：1/10 分钟 10-16PU/50 μ l、或者是 10 分钟 100-160PU/50 μ l；酶抑制剂-64 试剂溶液具有的活性效价为：1/10 分钟 20-32TU/50 μ l、或者是 10 分钟 200-320TU/50 μ l。

一种体外血型血清学实验检定使用的试剂盒

技术领域

本发明涉及酶制剂领域中的体外血型血清学检定试剂盒，特别是一种木瓜凝乳蛋白酶试剂盒。

背景技术

使用巯基蛋白酶进行红细胞血型、免疫性血型抗体检定已有近 60 年的应用历史。目前，在体外血型血清学检定实验中常用的制剂有木瓜酶、菠萝酶和无花果酶。其中木瓜酶是由多种巯基酶组成的混合酶，不同时期收获、以及用不同工艺生产的木瓜酶中各种巯基酶比例漂移值较大，酶反应动力学为一非固定常数，容易导致体外血型血清学检定实验中产生明显的“假阴性”、“假阳性”结果。

发明内容

本发明的目的是提供一种稳定的在体外血型血清学检定实验中所用的木瓜凝乳蛋白酶试剂盒。

本发明所提供的体外血型血清学检定试剂盒，由木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂-64 制剂和酶抑制剂-64 溶剂组成；所述木瓜凝乳蛋白酶制剂含有木瓜凝乳蛋白酶，L-半胱氨酸、普鲁兰、海藻糖；所述酶抑制剂-64 含有反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷、甘露醇、海藻糖和普鲁兰。

所述的木瓜凝乳蛋白酶溶剂和酶抑制剂-64 溶剂的基本配方是一样的，均为 0.02—0.07mol / L 磷酸二氢钾、0.003—0.04mol/L 磷酸氢二钠的水溶液，但在实际应用中，它们的浓度根据体外血型血清学检定实验不同阶段需要的 pH 值进行调整，前者为 pH5-6，后者为 pH6-7。

木瓜凝乳蛋白酶制剂中每 200000PU 单位的木瓜凝乳蛋白酶中 L-半胱氨酸和普鲁兰的含量分别为 0.025—0.050 mol 和 0.05—0.1 mmol。酶抑制剂-64 中每 400000TU 单位的反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷中甘露醇、海藻糖和普鲁兰的含量分别为 0.2—0.3mol、0.01—0.02mol 和 0.05—0.1mol。

为了使木瓜凝乳蛋白酶制剂更加稳定，所述木瓜凝乳蛋白酶制剂中还含有甘露醇、海藻糖和维生素 C 盐。每 200000PU 单位的木瓜凝乳蛋白酶中甘露醇、海藻糖和维生素 C 盐的含量分别为 0.2—0.3mol、0.01—0.02mol 和 0.01—0.02mol。

将木瓜凝乳蛋白酶，L-半胱氨酸、普鲁兰等辅料以水溶解，除菌过滤后，经冷冻干燥得到木瓜凝乳蛋白酶制剂。其中，提取木瓜凝乳蛋白酶的方法，包括如下步骤：

- 1) 向原料中加入壳聚糖溶液，沉淀后去除沉淀物，保留清液；
- 2) 向清液中加入硫酸铵到溶液硫酸铵饱和度为 30%—50%，去除沉淀，保留上清液；
- 3) 向上清液中加入过量酒石酸，絮凝沉淀后，去除沉淀保留上清液；
- 4) 向上清液中加入硫酸铵到溶液硫酸铵饱和度为 65—70%，收集沉淀物；
- 5) 用纯水溶解沉淀物，以截留分子量为 1—2 万道尔顿的超滤膜浓缩溶液，收集浓缩液；
- 6) 用纤维素 C-92 层析柱分离浓缩液，收集木瓜凝乳蛋白酶的洗脱液；
- 7) 以截留分子量为 1—2 万道尔顿的超滤膜浓缩木瓜凝乳蛋白酶的洗脱液，得到木瓜凝乳蛋白酶浓缩液。

为了使分离的效果更好，在所述步骤 2) 的上清液中，加入过量酒石酸之前，先加入硫酸铵到溶液硫酸铵饱和度为 50%，去除沉淀，保留上清液，再进行后续步骤。

酶抑制剂-64 制剂的制备方法为：将反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基（4-胍基）丁烷中甘露醇、海藻糖和普鲁兰以水溶解，除菌过滤后，经冷冻干燥得到酶抑制剂-64 制剂。

按照《中国生物制品规程》中规定的质控标准，对本发明的木瓜凝乳蛋白酶试剂盒进行卫生学、物理学、化学、生物学，血液免疫学等方面检测，结果表明本发明完全符合要求。可广泛用于人类 ABO-IgG 抗-A、IgG 抗-B，Rh-抗-D、抗-C、抗-E、抗-c、抗-e，Kell-抗-K、抗-K，kiad-抗-JK^a、抗-JK^b，Lewis-抗-Le^a、抗-Le^b、抗-Le^{ab}，P-抗-P₁ 等血型抗体及相应红细胞血型抗原进行筛检、检定、效价滴定；被抗体包被红细胞的清洗；注射用生物制品免疫性血型抗体检定。

本发明由于采用了上述技术方案，具有以下优点：1.在体外血型血清学检定实验中，利用本发明的具有标准化活力的木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液对红细胞膜的水解修饰作用，使之在较短的时间内具备识别相应血型抗体——发生免疫凝集反应的能力，克服传统的蛋白酶一步实验方法中酶对红细胞、抗体的同期水解效应。2.在木瓜凝乳蛋白酶试剂完成对红细胞膜的水解修饰作用后；使用酶抑制剂-64 快速抑制其酶活性，克服蛋白酶实验中蛋白酶对红细胞的过度性水解效应——产生“假阳性”反应；以及对血型抗体的水解效应——产生“假阴性”反应，具有简化实验操作过程，提高检定实验的安全性与灵敏度。3.普鲁兰为一线性高分子物质，作为一种稳定-分散剂使用，可增加制品的稳定性；形成检定实验所必要的胶体保护，防止红细胞渗透性溶血，杜绝“试剂型-假阳性”实验结果的发生。4.依据检定实验不同阶段的技术需要，设计具有相应的 pH、离子强度的专用溶剂，以保证实验检定具有足够的灵敏度。

具体实施方式

实施例 1、木瓜凝乳蛋白酶活力效价测定

一、配制溶液

1) 0.067mol/L pH5.5 磷酸盐溶液

配方

磷酸二氢钾 0.064mol

磷酸氢二钠 0.003mol

将上述溶质溶解于 900ml 纯水中，用纯水稀释至 1000ml 定容。

2) 样品溶液

取标明活力效价 ≥ 400 PU/瓶、 ≥ 1000 PU/瓶、 ≥ 2000 PU/瓶的木瓜凝乳蛋白酶制剂各 1 瓶，加入 0.067mol/L pH5.5 磷酸盐溶液 2 毫升、5 毫升、10 毫升溶解，混合均匀。

3) 底物溶液

称取磷酸氢二钠 0.93 mol, 磷酸二氢钠 0.06 mol, 用蒸馏水溶解，稀释至 1000ml 定容。

称取偶氮化白蛋白 2.0g, 溶解于 100ml 上述磷酸盐溶液中。

二、木瓜凝乳蛋白酶制剂活力效价测定

1) 将样品溶液，底物溶液预热至 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

2) 将底物溶液 1.0ml, 样品溶液 100 μ l 注入试管中，混合均匀，置 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 水浴反应 10 分钟。

3) 加入 5%三氯乙酸溶液 1ml, 混合。

4) 1000 \times g 离心反应液 5 分钟，吸取上清液 1ml。

5) 加入 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 1ml, 混合。

6) 在 430nm 下测定样品 OD 值。

在上述条件下，水解产物在 430nm 产生 0.002 的吸光值的改变为一个活力效价单位 (PU)。

三、产品的活力效价单位标示方法与规格

产品的活力效价单位的标示可以从如下二种方法中任意选择。

1、活力效价标示方法 I

PU = 每瓶酶制剂 1/10 分钟所具有的活力效价单位。

2、活力效价标示方法 II

PU = 每瓶酶制剂 10 分钟所具有的活力效价单位。

实施例 2、酶抑制剂-64 活性效价测定

一、配制溶液

1) 0.067mol/L pH5.5 磷酸盐溶液

配方

磷酸二氢钾 0.064mol

磷酸氢二钠 0.003mol

将上述溶质溶解于 900ml 纯水中，用纯水稀释至 1000ml 定容。

2) 木瓜凝乳蛋白酶溶液

取活力效价为 ≥ 400 PU/瓶的木瓜凝乳蛋白酶制剂 1 瓶，用 2 毫升 0.067mol/L pH5.5 磷酸盐溶液溶解，混合均匀。

3) 0.067mol/L pH7.0 磷酸盐溶液

配方

磷酸二氢钾 0.027 mol

磷酸氢二钠 0.040 mol

用纯水溶解上述溶质，稀释至 1000ml 定容。

4) 样品溶液

取活性效价 800TU/瓶、2000TU/瓶、4000TU/瓶的酶抑制剂—64 制剂 1 瓶，加入 0.067mol/L pH7.0 磷酸盐溶液 2ml、5ml、10ml 溶解，混合均匀。

5) 底物溶液

称取磷酸氢二钠 13.2g、磷酸二氢钾 6.8g，用蒸馏水溶解，稀释至 1000ml 定容。

称取偶氮化白蛋白 2.0g，溶解于 100ml 磷酸盐溶液中。

二、酶抑制剂—64 制剂活性效价测定

1) 将样品溶液，木瓜凝乳蛋白酶溶液，底物溶液预热至 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 。

2) 取样品溶液 $50\mu\text{l}$ ，木瓜凝乳蛋白酶溶液 $150\mu\text{l}$ 注入试管中，混合均匀，室温放置 5 分钟。（样品）

3) 向上述试管加入底物溶液 1.0ml，置 $37 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 水浴反应 10 分钟。

4) 加入 5%三氯乙酸溶液 1ml，混合。

5) $1000\times\text{g}$ 离心反应液 5 分钟，吸取上清液 1ml。

6) 加入 0.5mol/L 氢氧化钠溶液 1ml，混合。

7) 另取木瓜凝乳蛋白酶溶液 $150\mu\text{l}$ ，底物溶液 1.0ml 注入试管中，混合均匀，按 4)——6) 所示方法进行实验。（对照）

8) 在 430nm 下测定样品 OD 值。

在上述条件下，与对照相比，样品在 430nm 产生 0.002 的消光值的改变为一个酶

抑制剂-64 活性效价单位(TU)。

三、产品的活性效价单位的标示与规格

产品的活性效价单位标示可以从如下二种方法中任意选择。

活性效价标示方法 I

TU =每瓶酶抑制剂-64 制剂 1/10 分钟所具有的活性效价单位。

活性效价标示方法 II

TU =每瓶酶抑制剂-64 制剂 10 分钟所具有的活性效价单位。

实施例 2、木瓜凝乳蛋白酶的提取

取 1000g 的番木瓜果浆冰冻物，用微波加热融化，加入 1000ml 0.02mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH5.5)，在匀浆器中匀浆。

加入 1%壳聚糖溶液 100ml，匀浆搅拌，室温静置 2 小时后过滤，去除沉淀，保留滤液。

向滤液中加入硫酸铵至 35%饱和度，室温静置 60 分钟，在 2—8℃、10000×g 离心 20 分钟，去除沉淀；向离心上清液中加入硫酸铵至 50%饱和度，室温静置 60 分钟，在 2—8℃、10000×g 离心 20 分钟，去除沉淀；在上清液中加入过量酒石酸溶液，调节 pH 至 <2.5，室温静置 60 分钟。10000×g 离心 20 分钟，弃去沉淀物；最后再向上清液中加入硫酸铵至 70%饱和度，室温静置 60 分钟，10000×g 离心 20 分钟，收集沉淀物。

将沉淀物用 200ml 纯水溶解，然后用截留分子量为 1 万的聚砜中空纤维超滤膜超滤，在超滤过程中分次加入 2-8℃水，在 0.1MPa 的条件下循环超滤 1h，得到超滤浓缩液。

向上述溶液中加入 100ml 0.2mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH5.5)，混匀。用该磷酸钾缓冲液预先平衡纤维素 CM-92 色谱柱，然后以 5ml / min 的速度，将溶液上柱，以 0.7mol/L 磷酸钠缓冲液 (pH5.5) 为洗脱液，收集木瓜凝乳蛋白酶洗脱液，用截留分子量为 1 万的聚砜中空纤维超滤膜浓缩洗脱液。

向浓缩液加入普鲁兰 0.1 mmol、L-半胱氨酸 0.025 mol，冷冻干燥得到木瓜凝乳蛋白酶干燥物 30g，用实施例 1 的方法测定酶活为 750PU/mg/分钟。

实施例 3、木瓜凝乳蛋白酶试剂盒的制备

一、木瓜凝乳蛋白酶制剂

配方：

普鲁兰 0.05 mmol

甘露醇	0.3 mol
海藻糖	0.02 mol
抗坏血酸钠	0.02 mol
L-半胱氨酸	0.05 mol
木瓜凝乳蛋白酶	200000PU

定量称取上述溶质，溶解于纯水中，定容至 1000ml，用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌，然后按每瓶 2000PU 规格分装至洁净西林瓶。用冷冻干燥机迅速降温至-40 $^{\circ}$ C，维持 4 小时；然后启动干燥干燥程序，以每小时升温 5 $^{\circ}$ C 速率减压干燥，将被冻结产品升温 33 $^{\circ}$ C 维持 3 小时，停止减压，密封包装，得到木瓜凝乳蛋白酶制剂。

二、木瓜凝乳蛋白酶溶剂

配方：

磷酸二氢钾	0.064 mol
磷酸氢二钠	0.003 mol

用纯水溶解上述溶质，调解 pH 至 5.5，定容至 1000ml，用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌，然后按每瓶 10ml 分装至至聚乙烯瓶内，密封。

三、酶抑制剂-64 制剂

配方：

反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基(4-胍基)丁烷	40000TU
普鲁兰	0.05 mmol
甘露醇	0.3 mol
海藻糖	0.02 mol

定量称取上述溶质，溶解于纯水中，定容至 1000ml，用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌。然后按每瓶 4000TU 规格分装至洁净西林瓶。用冷冻干燥机迅速降温至-40 $^{\circ}$ C，维持 4 小时；然后启动干燥干燥程序，以每小时升温 5 $^{\circ}$ C 速率减压干燥，将被冻结产品升温 33 $^{\circ}$ C 维持 3 小时，停止减压，密封包装，得到成品酶抑制剂-64 制剂。

四、酶抑制剂-64 溶剂

配方：

磷酸二氢钾	0.027 mol
磷酸氢二钠	0.040 mol

用纯水溶解上述溶质，调解 pH 至 7.0，定容至 1000ml，用 0.2 μ m 微孔滤膜过滤除菌，然后按每瓶 10ml 分装至聚乙烯瓶内，密封。

将上述制造的木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂-64 制剂、

酶抑制剂-64 溶剂集中包装在一个试剂盒中，标示：木瓜凝乳蛋白 2000PU/瓶、木瓜凝乳蛋白酶溶剂 10ml、酶抑制剂-64 4000TU/瓶、酶抑制剂-64 溶剂 10ml，并配以使用说明书后即可出厂。

使用前用木瓜凝乳蛋白酶溶剂溶解木瓜凝乳蛋白酶制剂，形成木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液，用 2%的偶氮化白蛋白溶液检测活力效价。依照体外血型血清学实验检定灵敏度的评价标准，每 50 μ l 木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液应具有活力效价单位按照上述的活力效价标示方法 I 计算为 10-16PU；按照上述的活力效价标示方法 II 计算为 100-160PU。

使用前用酶抑制剂-64 溶剂溶解酶抑制剂-64 制剂，形成酶抑制剂-64 试剂溶液，用 2%的偶氮化白蛋白溶液、木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液检测活性效价。依照体外血型血清学实验检定安全性的评价标准，每 50 μ l 的酶抑制剂-64 试剂溶液应具有活性效价单位按上述的活性效价标示方法 I 计算为 20-32TU；按上述的活性效价标示方法 II 计算为 200-320TU。

实施例 4、木瓜凝乳蛋白酶试剂盒的制备

生产过程与实施例 3 基本相同，只是产品规格有差别。

一、木瓜凝乳蛋白酶制剂

配方：

普鲁兰	0.048 mmol
甘露醇	0.3 mol
海藻糖	0.02 mol
抗坏血酸钠	0.02 mol
L-半胱氨酸	0.05 mol
木瓜凝乳蛋白酶	200000PU

每瓶按 1000PU 规格分装至洁净西林瓶，冷冻干燥。

二、木瓜凝乳蛋白酶溶剂

配方：

磷酸二氢钾	0.064 mol
磷酸氢二钠	0.003 mol

按每瓶 5ml 规格分装，密封。

三、酶抑制剂-64 制剂

配方：

反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基(4-胍基)丁烷	40000TU
--------------------------	---------

普鲁兰	0.01 mmol
甘露醇	0.2 mol
海藻糖	0.01 mol

按每瓶 2000TU 规格分装，冷冻干燥。

四、酶抑制剂—64 溶剂

配方：

磷酸二氢钾	0.027 mol
磷酸氢二钠	0.040 mol

按每瓶 5ml 分装，密封。

将上述制造的木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂—64 制剂、酶抑制剂—64 溶剂集中包装在一个试剂盒中，标示：木瓜凝乳蛋白 1000PU/瓶、木瓜凝乳蛋白酶溶剂 5ml、酶抑制剂-64 2000TU/瓶、酶抑制剂—64 溶剂 5ml，并配以使用说明书后即可出厂。

使用前用木瓜凝乳蛋白酶溶剂溶解木瓜凝乳蛋白酶制剂，形成木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液，用 2% 的偶氮化白蛋白溶液检测活力效价。依照体外血型血清学实验检定灵敏度的评价标准，每 50 μ l 木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液应具有活力效价单位按照上述的活力效价标示方法 I 计算为 10-16PU；按照上述的活力效价标示方法 II 计算为 100-160PU。

使用前用酶抑制剂—64 溶剂溶解酶抑制剂—64 制剂，形成酶抑制剂—64 试剂溶液，用 2% 的偶氮化白蛋白溶液、木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液检测活性效价。依照体外血型血清学实验检定安全性的评价标准，每 50 μ l 的酶抑制剂—64 试剂溶液应具有活性效价单位按上述的活性效价标示方法 I 计算为 20-32TU；按上述的活性效价标示方法 II 计算为 200-320TU。

实施例 5、木瓜凝乳蛋白酶试剂盒的制备

生产过程与实施例 3 基本相同，只是产品规格有差别。

一、木瓜凝乳蛋白酶制剂：

配方：

普鲁兰	0.048 mmol
甘露醇	0.3 mol
海藻糖	0.02 mol
抗坏血酸钠	0.02 mol
L-半胱氨酸	0.05 mol

木瓜凝乳蛋白酶 200000PU

每瓶 400PU 规格分装，冷冻干燥。

二、木瓜凝乳蛋白酶溶剂

配方：

磷酸二氢钾 0.064 mol

磷酸氢二钠 0.003 mol

按每瓶 2ml 规格分装，密封。

三、酶抑制剂—64 制剂

配方：

反式-环氧琥珀酰-L-亮氨酸氨基(4-胍基)丁烷 40000TU

普鲁兰 0.01 mmol

甘露醇 0.2 mol

海藻糖 0.01 mol

按每瓶 800TU 规格分装，冷冻干燥。

四、酶抑制剂—64 溶剂

配方：

磷酸二氢钾 0.027 mol

磷酸氢二钠 0.040 mol

按每瓶 2ml 规格分装，密封。

将上述制造的木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂—64 制剂、酶抑制剂—64 溶剂集中包装在一个试剂盒中，标示：木瓜凝乳蛋白 400PU/瓶、木瓜凝乳蛋白酶溶剂 2ml、酶抑制剂-64 800TU/瓶、酶抑制剂—64 溶剂 2ml，并配以使用说明书后即可出厂。

使用前用木瓜凝乳蛋白酶溶剂溶解木瓜凝乳蛋白酶制剂，形成木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液，用 2%的偶氮化白蛋白溶液检测活力效价。依照体外血型血清学实验检定灵敏度的评价标准，每 50 μ l 木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液具有的活力效价单位按照上述的活力效价标示方法 I 计算应为 10-16PU；按照上述的活力效价标示方法 II 计算为 100-160PU。

使用前用酶抑制剂—64 溶剂溶解酶抑制剂—64 制剂，形成酶抑制剂—64 试剂溶液，用 2%的偶氮化白蛋白溶液、木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液检测活性效价。依照体外血型血清学实验检定安全性的评价标准，每 50 μ l 的酶抑制剂—64 试剂溶液应具有的活性效价单位按照上述的活性效价标示方法 I 计算为 20-32TU；按照上述的活性效价标

示方法 II 计算为 200-320TU。

实施例 6、利用本发明试剂盒进行血型抗体特异性鉴定实验

利用本发明试剂盒进行血型抗体特异性鉴定实验的步骤为：

1、取试管, 标记 I、II、III、IV、V、VI、VII、VIII、IX、X、XI, 依次置试管架排列。

2、向上述试管加入与其标记相符合的 3%血型谱细胞悬液 50 μ l, 木瓜凝乳蛋白酶试剂溶液 50 μ l, 混合均匀。

3、将试管移入 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 水浴孵育 5 分钟。

4、向全部试管各加入酶抑制剂-64 试剂溶液 50 μ l; 向全部试管各加入血清标本 50 μ l, 或红细胞放散液 100 μ l, 混合均匀。

5、将试管移入 37 \pm 0.5 $^{\circ}$ C 水浴孵育 7 分钟。

6、将试管移入离心机, 120 \times g 离心 1 分钟。

7、轻轻摇动试管, 悬浮红细胞, 肉眼观察实验鉴定结果。依据受检血清在不同血型谱细胞产生的凝集与否, 判定受检血清的血型抗体特异性。

经采用室温盐水实验、37 $^{\circ}$ C 盐水实验、间接抗人球蛋白实验等血型抗体特异性鉴定实验方法与本发明的实验方法作为平行试验, 对产自 Immucor 的人源型 Rh-抗-D、抗-C、抗-E、抗-c、抗-e、Kell-抗-K、抗-k、kiad-抗-JK^a、抗-JK^b、Lewis-抗-Le^a、抗-Le^b、抗-Le^{a+b}、P-抗-P₁ 等血型抗体血清, 以及临床样本血清进行抗体特异性鉴定。实验结果表明, 本实验方法对上述血型抗体的实验鉴定准确率为 100%。

专利名称(译)	一种体外血型血清学实验检定使用的试剂盒		
公开(公告)号	CN1584596A	公开(公告)日	2005-02-23
申请号	CN200410046105.7	申请日	2004-05-31
[标]发明人	卢世昌 刘俊凤		
发明人	卢世昌 刘俊凤		
IPC分类号	C12N9/00 G01N33/536 G01N33/80		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN1260569C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种供体外血型血清学检定实验用的试剂盒。本发明的目的是提供一种稳定的在体外血型血清学检定实验中所用的木瓜凝乳蛋白酶试剂盒，包括木瓜凝乳蛋白酶制剂、木瓜凝乳蛋白酶溶剂、酶抑制剂 - 64 制剂和酶抑制剂 - 64 溶剂。所述木瓜凝乳蛋白酶制剂含有木瓜凝乳蛋白酶，L - 半胱氨酸和普鲁兰等；所述酶抑制剂 - 64 制剂含有反式 - 环氧琥珀酰 - L - 亮氨酸氨基(4 - 胍基)丁烷、甘露醇、海藻糖和普鲁兰等。本发明所提供的试剂盒可以简化体外血型血清学检定实验的操作规程，提高检定实验的安全性与灵敏度，可广泛用于血型抗体及相应红细胞血型抗原的筛检、鉴定、效价滴定；被抗体包被红细胞的清洗；注射用生物制品免疫性血型抗体检定。