

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/577

G01N 33/80 G01N 33/531

A61K 39/395



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410011045.5

[43] 公开日 2005年3月23日

[11] 公开号 CN 1598585A

[22] 申请日 2004.8.18

[21] 申请号 200410011045.5

[71] 申请人 乔娜

地址 110021 辽宁省沈阳市铁西区北滑翔路
10号441单元

[72] 发明人 乔娜

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限
责任公司
代理人 陈宏伟

权利要求书2页 说明书7页

[54] 发明名称 分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定
方法及试剂盒

[57] 摘要

本发明公开一种分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定试剂盒，由生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种制成的分离物装填在柱子模型的铸型中制成分离柱，分离柱中含有滴度为1:500~1000的单克隆抗体，构成层状结构。采用分子筛作为分离技术，克服了单克隆抗体和多克隆抗体试剂操作繁杂，误判率高等缺点，具有操作简单，抗体纯度高，滴度好，易于分离，操作省时省力，成像清晰，易于判断，误判率低等优点，适用于工业化生产，作为医学临床检验具有极其广泛的前景。

ISSN 1008-4274

1、一种分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定试剂盒，其特征在于：由生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种制成的分离物装填在柱子模型的铸型中制成分离柱，分离柱中含有滴度为 1:500~1000 的单克隆抗体。

2、根据权利要求 1 所述的试剂盒，其特征在于：分离柱为多聚丙烯塑料铸型，内壁厚为 $2\pm 0.5\text{mm}$ ，分离柱直径为 $13\pm 0.5\text{mm}$ ，柱高 $5\pm 0.5\text{mm}$ ，具有可耐受高强度及部分有机溶剂及承受 $12000\times g$ 的离心压力。

3、根据权利要求 1 所述的试剂盒的制备方法，包括以下步骤制成：

1) 单克隆抗体的制备：

稳定培养的杂交细胞系的建立：采用标准的抗体制备方法将已建立的稳定培养系的小鼠形质肿瘤细胞与从人体中取出的具有表面抗原的血细胞融合，制成杂交瘤细胞系；

抗体上清大量制备：杂交瘤细胞按 1:5-15 体积比在完全培养液中，加湿培养箱 37°C ，5% CO_2 的条件下传代培养，使细胞过度生长至死亡，溶液至 $10^8\sim 10^{10}/\text{ml}$ ，收获单克隆抗体上清液，检验抗体滴度；

抗滴度的测定：采用标准的间接酶联免疫吸收测定法，终结果为 1~10mg/l，用生理盐水稀释，其滴度为 1:500~1000；

2) 分离物的制备：

将生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种，按5~10与1~2、2~5的比例混合，加水膨润后用酸碱平衡及平衡缓冲液平衡，PH7.4~6.4，加压脱气灭菌，放置稳定，制成分离物；

3) 将步骤2制得分离物装入柱子模型制成分离柱，分离柱中在加入步骤1制成的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定方法及试剂盒

技术领域：

本发明涉及一种血型鉴定方法，具体地讲是公开了一种分子筛分离单克隆抗体血型鉴定方法及试剂盒，属于临床医学检测试剂盒技术领域。

背景技术：

目前，医学临床使用的血型鉴定产品主要为以下种类：

- 1、单克隆抗体试剂液体针剂。
- 2、单克隆抗体血型鉴定卡。
- 3、多克隆抗体试剂液体针剂。

单克隆抗体液体针剂是利用高滴度的单克隆抗体，于一定体积的人体血液或血清混合，是指在玻璃片上发生凝聚反应，根据凝聚结果，认为判定血液类型。其缺点在于操作时间长，操作手续繁杂，采集血量较多，人为误判率高等缺点。

对于多克隆抗体液体针剂由于其抗体反应特异性差，所以不仅存在着单克隆抗体试剂的使用缺点，同时误判率更高，现也成为临床淘汰的血型鉴定产品。

而分离式抗体血型鉴定试剂卡或试剂盒制作工艺复杂，成本较高，并且在全血凝聚反应过程中，存在着凝血呈像弥散，界限模糊，

不易判断等不足。

发明内容:

本发明公开一种分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定方法,解决了常规的血型鉴定产品误判率高,操作繁杂等缺点。

本发明还公开了利用该方法制作的试剂盒,适用于工业化生产和医用临床。

本发明的技术解决方案如下:

1) 单克隆抗体的制备:

稳定培养的杂交细胞系的建立:采用标准的抗体制备方法将已建立的稳定培养系的小鼠形质肿瘤细胞与从人体中取出的具有表面抗原的血细胞融合,制成杂交瘤细胞系;

抗体上清大量制备:杂交瘤细胞按 1:8~15 的体积比在 DMEM 或 MEM, alpha-MEM, RPMI-1640 等完全培养液中,加湿培养箱 37℃, 5% CO₂ 的条件下传代培养,使细胞过度生长至死亡,溶液至 10⁸⁻¹⁰/ml,收获单克隆抗体上清液,检验抗体滴度;

抗滴度的测定:采用标准的间接酶联免疫吸收测定法,终结果为 1~10mg/l,用生理盐水稀释,其滴度为 1: 500~1000;

2) 分离物的制备:

将生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种,按 5~10 与 1~2、2~5 的比例混合,加水膨润后用酸碱平衡及平衡缓冲液平衡,PH7.4~6.4,加压脱气灭菌,放置稳定,制成分离物;

3) 将步骤 2 制得分离物装入柱子模型制成分离柱,分离柱中在

加入步骤 1 制成的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

本发明的试剂盒包括：由生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种制成的分离物装填在柱子模型的铸型中制成分离柱，分离柱中含有滴度为 1：500~1000 的单克隆抗体。

分离柱为多聚丙烯塑料铸型，内壁厚为 $2 \pm 0.5\text{mm}$ ，分离柱直径为 $13 \pm 0.5\text{mm}$ ，柱高 $5 \pm 0.5\text{mm}$ ，可承受 $12000 \times g$ 的离心压力。

该试剂盒为 ABO 式血型判定试剂盒，其产品为 A、B 式两种，从凝聚与非凝聚反应上可判断定为 A、B、O 或 AB，本发明不仅在即 A（A 型）即 B（B 型）或即 A，又 B 的 AB 型，和非 A 非 B 的 O 型等类型上分离清晰，同时每一呈像组中又详细分为五个亚类，即阳性++++，阳性+++，阳性++，阳性+，阴性。因而提高了判断的有效性和显著性。每一血样的凝聚反应必须属于其中某一亚型。通过 A、B 分别操作，不存在任何机会的误判。

本发明与同类产品的操作比较试验，见下表 1：

表 1

	使用血量 ml	操作步骤	操作时间
本发明血型鉴定试剂盒	20-40	采血、加样、离心、判读	1 分钟
血型鉴定卡	20-40	采血、加样、混合、离心、判读	3 分钟
多克隆抗体针剂	100-200	采血、加样、混合、等待凝聚、判读	5 分钟以上
单克隆抗体针剂	50-100	采血、加样、混合、等待凝聚、判读	3-5 分钟

本发明与同类产品的检定结果比较，将被测试人血样品 12 个，分别用上述同类产品进行检测，结果见下表 2：

表 2

	有效样品	显著有效样品（个）	无效样品

	(个)		(个)
本发明血型 鉴定试剂盒	12	12	0
血型鉴定卡	12	11	0
多克隆抗体 针剂	11	9	1
单克隆抗体 针剂	9	7	2

本发明的积极效果在于：采用分子筛作为分离技术，克服了单克隆抗体和多克隆抗体试剂操作繁杂，误判率高等缺点，具有操作简单，抗体纯度高，滴度好，易于分离，操作省时省力，成像清晰，易于判断，误判率低等优点，适用于工业化生产，作为医学临床检验具有极其广泛的前景。

具体实施方式：

通过以下实施例进一步举例描述本发明，并不以任何方式限制本发明，在不背离本发明的技术解决方案的前提下，对本发明所作的本领域普通技术人员容易实现的任何改动或改变都将落入本发明的权利要求范围之内。

实施例 1

1) 单克隆抗体的制备：

稳定培养的杂交细胞系的建立：采用标准的抗体制备方法将已建立的稳定培养系的小鼠形质肿瘤细胞与从人体中取出的具有表面抗原的血细胞融合，制成杂交瘤细胞系；

抗体上清大量制备：杂交瘤细胞按 1: 10 在 DMEM 完全培养液中，加湿培养箱 37℃，5% CO₂ 的条件下传代培养，使细胞过度生长

至死亡，溶液至 110/ml，收获单克隆抗体上清液，检验抗体滴度；

抗滴度的测定：采用标准的间接酶联免疫吸收测定法，终结果为 1~10mg/l，用生理盐水稀释，其滴度为 1：500~1000；

2) 分离物的制备：

将生物活性珠 S-X 4 5 份，葡聚糖凝胶 S-200HR 2 份，琼脂糖凝胶 CL-4B 3 份混合，加水膨润后，用 0.2mol/L 盐酸或 0.5mol/L 氢氧化钠酸碱平衡及平衡缓冲液平衡，PH7.4~6.4，加压脱气灭菌，放置稳定，制成分离物；

3) 将步骤 2 制得分离物装入柱子模型制成分离柱，分离柱中在加入步骤 1 制成的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

实施例 2

抗体上清大量制备：将实施例 1 制备的杂交瘤细胞按 1：8 体积比在 MEM 完全培养液中，加湿培养箱 37℃，5%CO₂ 的条件下传代培养，使细胞过度生长至死亡，溶液达 90/ml，收获上清并检验抗体滴度。

抗滴度的测定：采用标准的间接酶联免疫吸收测定法，终结果为 1~10mg/l，用生理盐水稀释，其滴度为 1：500~1000。

分离物的制备：

将生物活性珠 S-X 8 8 份，葡聚糖凝胶 S-300HR 5 份混合，加水膨润后用 0.5mol/L 氢氧化钠酸碱平衡及平衡缓冲液平衡，PH7.4~6.4，加压脱气灭菌，放置稳定，装入柱子模型制成分离柱，分离柱中在加入上述的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

实施例 3

抗体上清大量制备：将实施例 1 制备的杂交瘤细胞按 1: 12 体积比在 alpha-MEM 完全培养液中，加湿培养箱 37℃，5% CO₂ 的条件下传代培养，使细胞过度生长至死亡，溶液达 100/ml，收获上清并检验抗体滴度。

抗滴度的测定：采用标准的间接酶联免疫吸收测定法，终结果为 1~10mg/l，用生理盐水稀释，其滴度为 1: 500~1000。

分离物的制备：

将生物活性珠 S-X 12 8 份，葡聚糖凝胶 S-400HR 5 份混合，加水膨润后用 0.5mol/L 氢氧化钠酸碱平衡及平衡缓冲液平衡，PH7.4~6.4，加压脱气灭菌，放置稳定，装入柱子模型制成分离柱，分离柱中在加入上述的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

实施例 4

抗体上清大量制备：将实施例 1 制备的杂交瘤细胞按 1: 15 体积比在 RPMI-1640 完全培养液中，加湿培养箱 37℃，5%CO₂ 的条件下传代培养，使细胞过度生长至死亡，溶液达 90/ml，收获上清并检验抗体滴度。

抗滴度的测定：采用标准的间接酶联免疫吸收测定法，终结果为 1~10mg/l，用生理盐水稀释，其滴度为 1: 500~1000。

分离物的制备：

将生物活性珠 S-X 8 8 份，葡聚糖凝胶 S-300HR 5 份混合，加水膨润后用 0.2mol/L 盐酸酸碱平衡及平衡缓冲液平衡，PH7.4~6.4，

加压脱气灭菌，放置稳定，装入柱子模型制成分离柱，分离柱中在加入上述的单克隆抗体上清液，制成试剂盒。

专利名称(译)	分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定方法及试剂盒		
公开(公告)号	CN1598585A	公开(公告)日	2005-03-23
申请号	CN200410011045.5	申请日	2004-08-18
[标]申请(专利权)人(译)	乔娜		
申请(专利权)人(译)	乔娜		
当前申请(专利权)人(译)	乔娜		
[标]发明人	乔娜		
发明人	乔娜		
IPC分类号	A61K39/395 G01N33/531 G01N33/577 G01N33/80		
代理人(译)	陈宏伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开一种分子筛分离式单克隆抗体血型鉴定试剂盒，由生物活性珠与葡聚糖凝胶及琼脂糖凝胶中的一种或两种制成的分离物装填在柱子模型的铸型中制成分离柱，分离柱中含有滴度为1:500~1000的单克隆抗体，构成层状结构。采用分子筛作为分离技术，克服了单克隆抗体和多克隆抗体试剂操作繁杂，误判率高等缺点，具有操作简单，抗体纯度高，滴度好，易于分离，操作省时省力，成像清晰，易于判断，误判率低等优点，适用于工业化生产，作为医学临床检验具有极其广泛的前景。

表1

	使用血量 ml	操作步骤	操作时间
本发明血型鉴定试剂盒	20-40	采血、加样、离心、判读	1分钟
血型鉴定卡	20-40	采血、加样、混合、离心、判读	3分钟
多克隆抗体针剂	100-200	采血、加样、混合、等待凝聚、判读	5分钟以上
单克隆抗体针剂	50-100	采血、加样、混合、等待凝聚、判读	3-5分钟