

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/80 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810051267.8

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101382540A

[22] 申请日 2008.10.15

[21] 申请号 200810051267.8

[71] 申请人 李 勇

地址 130012 吉林省长春市高新开发区晨光街433号

[72] 发明人 李 勇 段生宝 李 东 童 军  
邵慧波

[74] 专利代理机构 吉林长春新纪元专利代理有限公司

代理人 白冬冬

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

### [54] 发明名称

血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒

### [57] 摘要

一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒，属于生物技术领域。本发明的目的是提供一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒。包括：U型反应板、血小板、指示细胞、抗人IgG、低离子介质、抗血小板血清、阴性对照血清、阳性对照血清。本发明灵敏度高，检测过程耗时短(<1h)，方法简便易行，结果易于判定，可同时对大量样本进行检测，易于自动化。



1、一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒，其特征是：

- a、U型反应板：其内表面已包被抗血小板单克隆抗体试剂；
- b、血小板：从新鲜EDTA抗凝血中提取或直接采用机采血小板；
- c、指示细胞：其表面已致敏人IgG；
- d、抗人IgG：用人丙种球蛋白免疫产蛋母鸡，从鸡蛋中提取抗人IgG；
- e、低离子介质：能增强抗原抗体反应；
- f、抗血小板血清：含已知血小板特异性抗体；
- g、阴性对照血清：与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清，其血清中不含有抗血小板抗体；
- h、阳性对照血清：与上述检测试剂发生反应的健康成年人血清，其血清中含有抗血小板抗体。

2、根据权利要求1所述的血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒用于检测血小板抗原、抗体及进行血小板输注前的交叉配型。

## 血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒

技术领域：

本发明属于生物技术领域。

背景技术：

血小板抗体是由异体或自身血小板抗原作用机体而产生的，包括同种异体抗体、自身抗体、同种抗体、药物依赖性抗体和非特异性抗体五类，这些抗体作用于人体血小板可导致血小板发生破坏并引起胎母同种异体免疫血小板减少症（FMAIT）、血小板输注无效症（PTR）、输血后紫癜（PTP）等多种血小板免疫疾病。

同检测红细胞抗体的血清学方法相比，临床检测血小板抗体的实验方法出现较晚。1987年 Kiefel 发明了单克隆抗体固着血小板抗原分析(MAIPA)法，凭借其高灵敏度和特异性成为检测血小板抗体的“金标准”。但该试验耗时长；技术要求高；如果待检血清中抗血小板抗体与鼠单克隆抗体识别同一抗原决定簇则出现假阴性反应，这些缺点也限制了它的广泛应用。近二十年，尽管出现了很多新方法如：单克隆抗体固相血小板抗体试验（MASPAT）、抗原捕获试验（ACE）、修饰的抗原捕获试验（MACE）和微柱凝胶免疫分析技术（MGIA）等，然而各自都有其缺陷和不足，在临床应用中尚缺乏一种灵敏度高、特异性和稳定性好的简便方法。

抗人球蛋白实验是检查不规则抗体的一种有效的检测方法。本实验分为直接和间接两种。直接实验主要检查细胞上是否结合了不规则抗体，而间接实验是检查血清中是否有游离的不规则抗体。

目前采用抗人球蛋白试验检测血小板抗原抗体反应，通常是将抗人球蛋白试剂进行酶标记或荧光标记，通过显色反应或测定荧光强度来判定结果。此类方法通常存在以下缺点和不足：

1. 需要反复洗涤和多次孵育过程，操作繁琐，耗时长。
2. 每次只能检测少量的样本，很难开展大量样本的检测。
3. 技术要求高，一般由实验室高年资技术人员操作或示范，技术普及难度大。
4. 观察结果时间短，实验结果无法保存，一旦出现医疗纠纷难以判定责任。

发明内容：

本发明的目的是提供一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒。

本发明的试剂盒包括：

- a、U型反应板：其内表面已包被抗血小板单克隆抗体试剂；
- b、血小板：从新鲜EDTA抗凝血中提取或直接采用机采血小板；
- c、指示细胞：其表面已致敏人IgG；
- d、抗人IgG：用人丙种球蛋白免疫产蛋母鸡，从鸡蛋中提取抗人IgG；
- e、低离子介质：能增强抗原抗体反应；

f、抗血小板血清：含已知血小板特异性抗体；

g、阴性对照血清：与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清，其血清中不含有抗血小板抗体；

h、阳性对照血清：与上述检测试剂发生反应的健康成年人血清，其血清中含有抗血小板抗体。

本发明用于检测血小板抗原、抗体及进行血小板输注前的交叉配型。

本发明灵敏度高，检测过程耗时短(<1h)，方法简便易行，结果易于判定，可同时对大量样本进行检测，易于自动化。

附图说明：

图 1 是本发明反应板对照图，其中 A 是血小板与反应板中血小板单克隆抗体结合并形成的血小板单层，B 空白反应板对照；

图 2 是本发明固相抗人球蛋白试验检测血小板抗体结果图，其中阳性反应为指示细胞铺满反应孔底部，而阴性反应为指示细胞在反应孔底部中间形成红细胞聚集，弱阳性反应格局介于两者之间。

具体实施方式：

本发明的试剂盒包括：

a、U 型反应板：其内表面已包被抗血小板单克隆抗体试剂；

U 型反应板制备：采用 96 孔 U 型反应板，用 pH9.6，0.05M 碳酸盐缓冲液将纯化的血小板单克隆抗体配制成 10ug/ml 浓度，按 100ul/孔加入反应孔中，置 4℃冰箱中包被过夜，次日取出，用含有 0.05%吐温的 pH7.2，0.01M 磷酸盐缓冲液洗涤 5 次，拍干，置-20℃

保存备用。

b、血小板：从新鲜 EDTA 抗凝血中提取或直接采用机采血小板；

取新鲜 EDTA 抗凝全血 1500rpm 离心 10min,取上层 2/3 富血小板血浆进行实验或直接用生理盐水将机采血小板作 5-10 倍稀释后得到血小板悬液使用。

c、指示细胞：其表面已致敏人 IgG；

指示细胞的制备：

(1) 取新鲜 O 型抗凝全血 (D+)，用生理盐水洗涤 3 次。

(2) 将洗涤完的压积红细胞和效价为 16~64 的人 IgG (抗 D) 等体积混合，37°C 水浴孵育 30 分钟。

(3) 用生理盐水洗涤上述致敏细胞三次后，用红细胞保护液将其配制成 0.2~0.5% 浓度。

d、抗人 IgG：用人丙种球蛋白免疫产蛋母鸡，从鸡蛋中提取抗人 IgG；

抗人 IgG 的制备及提取方法：用人丙种球蛋白免疫产蛋母鸡，至效价合格后收集鸡蛋，用反复冻融法从鸡蛋中提取抗人 IgG。

e、低离子介质：能增强抗原抗体反应；

低离子介质的配制：称取 NaCl 10.875g, 甘氨酸 9g 于 500ml 烧杯中，加入 400ml 去离子水溶解后，加入 5.65ml 0.15M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  和 4.35ml 0.15M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 充分混匀后，2.5ml 10%  $\text{NaN}_3$ ，混匀后用去离子水定容至 500ml, 最后用 NaOH 调节 pH 至 6.7。

f、抗血小板血清：含已知血小板特异性抗体；

血小板特异性抗体：血小板特异性抗原分为 16 个系统，特异性抗体是指针对其中的某个或某些抗原而产生的抗体。

g、阴性对照血清：经国家规定的五项指标（转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病）检测合格且与上述检测试剂不发生反应的健康成年人血清，表明其血清中不含有抗血小板抗体。

h、阳性对照血清：经国家规定的五项指标（转氨酶、乙肝、丙肝、梅毒、艾滋病）检测合格的健康成年人，且与上述检测试剂发生反应的人血清，表明其血清中含有抗血小板抗体。

制备及提取包被用抗血小板单克隆抗体的方法：采用全血小板免疫小鼠并制备鼠抗人血小板单克隆抗体，经硫酸铵沉淀及亲和层析提纯得到包被用抗人血小板单克隆抗体。

抗血小板单克隆抗体的包被量为 1 $\mu$ g/孔。

本发明的原理：血小板经离心洗涤后可与反应板中的血小板单抗结合并形成血小板单层。加入血清在板中经过孵育后，若血清中不含有血小板抗体则经过洗涤可去除，若含有血小板抗体则此抗体与反应板中的血小板结合，加入抗人 IgG 及指示细胞，经离心后指示细胞结合到血小板单层上。因此阳性反应为指示细胞铺满反应孔底部，而阴性反应为指示细胞在反应孔底部中间形成红细胞聚集。从而可检测血小板抗体及进行血小板交叉配型。

本发明用于检测血小板抗原、抗体及进行血小板输注前的交叉配型。

实施例 1：

### 血小板抗原检测：

前提是用户准备含血小板特异性抗体的抗血清。

1、将试剂盒平衡至室温(18-25°C)。30×浓缩洗涤液用蒸馏水按1:29 稀释成工作洗涤液。

2、根据实验量取出反应板条，标记阳性对照、阴性对照及待检样品孔，未使用的板条应储存于自封袋中，加入干燥剂密封后，2-8°C储存。

3、向反应孔中加入 1 滴（50ul）待检血小板悬液，轻摇反应板（约 10 秒）使反应孔中的保护剂充分溶解。

4、用平板离心机将反应板以 50g 离心 5 分钟，使血小板固定在微孔底部。

5、轻轻倒出未结合的血小板，并用滴管滴加工作洗涤液清洗 3 次，洗涤过程中轻摇微孔板，然后再轻轻甩掉洗涤液。最后一次洗涤后将反应板倒置于吸水纸上吸干残余液体。

6、立即向每个反应孔中加入 2 滴（100ul）低离子强度溶液（1 分钟内），并向相应孔中加入 1 滴(50ul) 含血小板特异性抗体的抗血清，阳性对照及阴性对照。7、将反应孔用封口胶纸封好，轻摇混匀后置于湿盒中 37°C水浴孵育 30 分钟或气浴孵育 35 分钟。

8、取出已孵育完毕的反应板，弃去封口胶纸。按步骤 5 洗涤反应板 5 次。

9、立即加入 1 滴（50ul）抗人 IgG 试剂及 1 滴（50ul）指示红细胞，轻轻振荡混匀。

10、将反应板以 200g 离心 5 分钟。

11、将待检孔与对照孔的结果进行比较，判读并记录试验结果。

指示细胞平铺在反应板的底部为阳性，说明待检血小板上具有与已知抗血清相应的抗原；在反应孔的底部形成细胞聚集为阴性，说明待检血小板上无与已知抗血清相应的抗原。

实施例 2：

血小板抗体检测：

1、将试剂盒平衡至室温(18-25°C)。30×浓缩洗涤液用蒸馏水按 1:29 稀释成工作洗涤液。

2、根据实验量取出反应板条，标记阳性对照、阴性对照及待检样品孔，未使用的板条应储存于自封袋中，加入干燥剂密封后，2-8°C 储存。

3、向反应孔中加入 1 滴（50ul）三人份混合 O 型血小板悬液，轻摇反应板（约 10 秒）使反应孔中的保护剂充分溶解。

4、用平板离心机将反应板以 50g 离心 5 分钟，使血小板固定在微孔底部。

5、轻轻倒出未结合的血小板，并用滴管滴加工作洗涤液清洗 3 次，洗涤过程中轻摇微孔板，然后再轻轻甩掉洗涤液。最后一次洗涤后将反应板倒置于吸水纸上吸干残余液体。

6、立即向每个反应孔中加入 2 滴（100ul）低离子强度溶液（1 分钟内），并向相应孔中加入 1 滴(50ul)待检者血清或血浆，阳性对照及阴性对照。

7、将反应孔用封口胶纸封好，轻摇混匀后置于湿盒中 37℃水浴孵育 30 分钟或气浴孵育 35 分钟。

8、取出已孵育完毕的反应板，弃去封口胶纸。按步骤 5 洗涤反应板 5 次。

9、立即加入 1 滴（50ul）抗人 IgG 试剂及 1 滴（50ul）指示红细胞，轻轻振荡混匀。

10、将反应板以 200g 离心 5 分钟。

11、将待检孔与对照孔的结果进行比较，判读并记录试验结果。

指示细胞平铺在反应板的底部为阳性，说明待检血清中含有抗血小板抗体；指示细胞在反应孔的底部形成细胞聚集为阴性，说明待检血清中不含有抗血小板抗体。反应格局介于二者之间的为弱阳性。

实施例 3：

血小板交叉配型：

1、将试剂盒平衡至室温(18-25℃)。30×浓缩洗涤液用蒸馏水按 1:29 稀释成工作洗涤液。

2、根据实验量取出反应板条，标记阳性对照、阴性对照及待检样品孔，未使用的板条应储存于自封袋中，加入干燥剂密封后，2-8℃储存。

3、向反应孔中加入 1 滴（50ul）供者血小板悬液，轻摇反应板（约 10 秒）使反应孔中的保护剂充分溶解。

4、用平板离心机将反应板以 50g 离心 5 分钟，使血小板固定在微孔底部。

5、轻轻倒出未结合的血小板，并用滴管滴加工作洗涤液清洗 3 次，洗涤过程中轻摇微孔板，然后再轻轻甩掉洗涤液。最后一次洗涤后将反应板倒置于吸水纸上吸干残余液体。

6、立即向每个反应孔中加入 2 滴（100ul）低离子强度溶液（1 分钟内），并向相应孔中加入 1 滴（50ul）受血者血清或血浆，阳性对照及阴性对照。7、将反应孔用封口胶纸封好，轻摇混匀后置于湿盒中 37℃水浴孵育 30 分钟或气浴孵育 35 分钟。

8、取出已孵育完毕的反应板，弃去封口胶纸。按步骤 5 洗涤反应板 5 次。

9、立即加入 1 滴（50ul）抗人 IgG 试剂及 1 滴（50ul）指示红细胞，轻轻振荡混匀。

10、将反应板以 200g 离心 5 分钟。

11、将待检孔与对照孔的结果进行比较，判读并记录试验结果。

指示细胞平铺在反应板的底部为阳性，介于二者之间的为弱阳性，这说明供受者血小板不合；若指示细胞在反应孔的底部形成细胞聚集为阴性，说明供受者血小板相合。

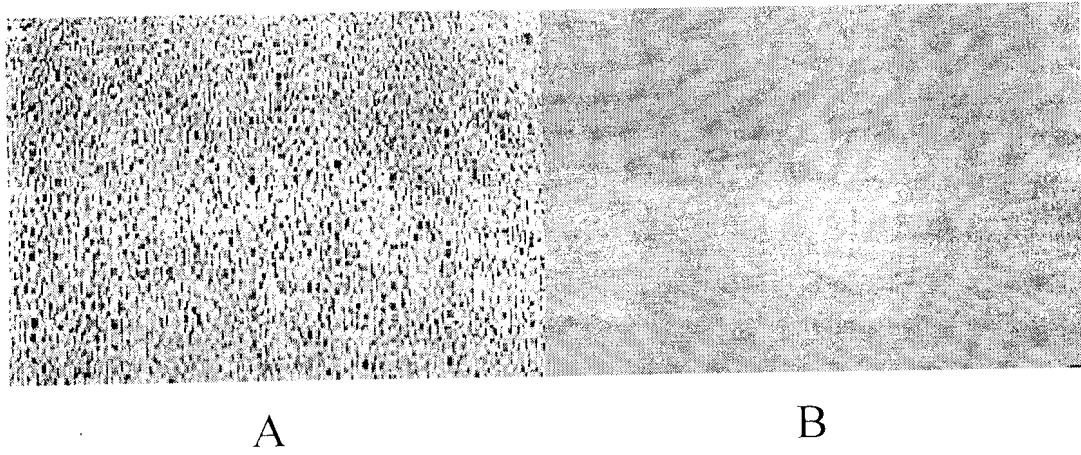


图 1

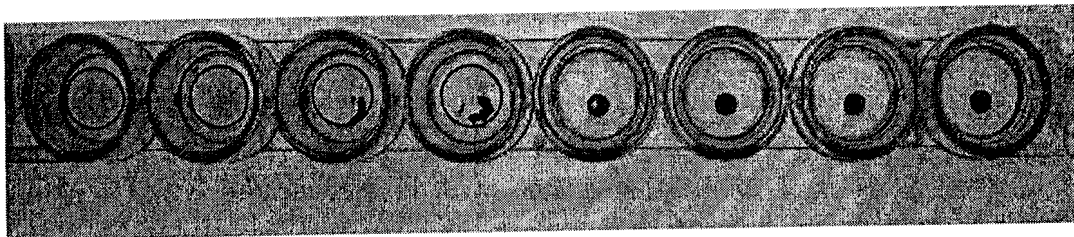


图 2

专利名称(译)	血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101382540A</a>	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200810051267.8	申请日	2008-10-15
[标]申请(专利权)人(译)	李勇		
申请(专利权)人(译)	李勇		
当前申请(专利权)人(译)	长春博德生物技术有限责任公司		
[标]发明人	李勇 段生宝 李东 董军 邵慧波		
发明人	李勇 段生宝 李东 董军 邵慧波		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/80		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒，属于生物技术领域。本发明的目的是提供一种血小板抗原抗体检测和交叉配型的固相抗人球蛋白试剂盒。包括：U型反应板、血小板、指示细胞、抗人IgG、低离子介质、抗血小板血清、阴性对照血清、阳性对照血清。本发明灵敏度高，检测过程耗时短(< 1h)，方法简便易行，结果易于判定，可同时对大量样本进行检测，易于自动化。

