



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103760333 B

(45) 授权公告日 2016. 03. 16

(21) 申请号 201410006059. 1

CN 1499978 A, 2004. 05. 26,

(22) 申请日 2009. 10. 13

WO 2009/069017 A1, 2009. 06. 04,

(62) 分案原申请数据

CN 101402671 A, 2009. 04. 08,

200910206522. 6 2009. 10. 13

审查员 贾静

(73) 专利权人 艾博生物医药(杭州)有限公司

地址 310018 浙江省杭州市杭州经济技术开发区12号大街(东)198号

(72) 发明人 刘毅 刘杰 马天涯 吴银飞
高飞

(74) 专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

代理人 徐关寿 黎双华

(51) Int. Cl.

G01N 33/537(2006. 01)

G01N 33/566(2006. 01)

(56) 对比文件

CN 1499978 A, 2004. 05. 26,

US 5939331 A, 1999. 08. 17,

CN 101275942 A, 2008. 10. 01,

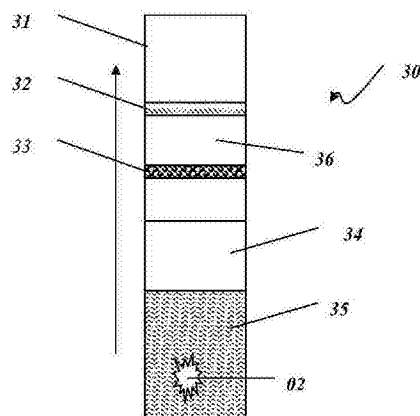
权利要求书1页 说明书13页 附图1页

(54) 发明名称

一种分离血液样本中红细胞的方法以及运用

(57) 摘要

本发明涉及一种从血液样品中分离红细胞的装置和方法,以及检测血液样本中被分析物质的检测装置和方法。使用这些装置和方法可以有效分离血液样品中的红细胞,从而能够减少红细胞对液体流动的阻碍作用和对反应背景的干扰。并且使用该方法 and 装置不会对检测的结果带来不利影响。



1. 一种从血液样品中分离红细胞的方法,包括:让血液样品和一种结合血液样品中纤维蛋白的受体接触;从血液样品中分离出纤维蛋白受体来分离血液样品中的红细胞。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:该方法还包括让血液样品和一种结合血液样品中红细胞的受体接触。
3. 根据权利要求2所述的方法,其特征在于:所述的结合纤维蛋白的受体和结合红细胞的受体被固定在一个支持液体流动的载体上。
4. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于:所述的纤维蛋白受体包括纤维蛋白的单克隆或多克隆抗体或抗体片段。
5. 根据权利要求3所述的方法,其特征在于:所述的载体为层析载体。
6. 一种从血液样品中分离红细胞的方法,包括:提供一种载体,让血液样品从该载体上流过,其中,该载体上处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体;通过分离出纤维蛋白受体来分离血液样品中的红细胞。
7. 根据权利要求6所述的方法,其特征在于:该载体上还包括结合红细胞的受体。
8. 根据权利要求6所述的方法,所述的受体包括单克隆、多克隆抗体或抗体片段。
9. 根据权利要求6-8之一所述的方法,其特征在于:所述的载体为层析载体。
10. 一种检测血液样品中被分析物质的方法,包括:提供一种层析载体,让血液样品从层析载体上流过;测量血液样品中被分析物质的含量,其中该层析载体上固定一种结合血液样品中纤维蛋白的受体,通过分离出纤维蛋白受体来分离血液样品中的红细胞。
11. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述的载体上还包括结合红细胞的受体。
12. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,所述的受体包括抗体或抗体片段。
13. 根据权利要求10所述的方法,其特征在于,在该层析载体的下游还包括一个检测样本中被分析物质的检测区域。

一种分离血液样本中红细胞的方法以及运用

[0001] 本申请是申请号为 200910206522.6、申请日 2009 年 10 月 13 日的中国专利申请的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明是关于分离全血样本中红细胞的装置和方法,更具体的讲,是关于一种检测装置,他应用分离全血中纤维蛋白来分离红细胞的方法以及装置来减少红细胞对检测结果的干扰。

背景技术

[0003] 现代临床诊断方法通常是对血液样品进行的。不幸的,红细胞对许多诊断检测有干扰作用。这就需要先把红细胞从血液样品中分离出去,然后再进一步对样品进行检测或化验。另一方面,在层析检测装置中,特别是免疫检测装置中,红细胞可能阻止液体流动,液体流动对于这种检测装置上发生反应是必不可少的。基于这种原因和其他一些原因,许多检测都用血浆或血清进行,这就需要从全血中分离出血浆或血清。

[0004] 有许多现有技术可用在全血样品中使红细胞与血浆分离。离心是一种惯用的手段。另外,在专利和公开的专利申请中也披露过一些方法,例如美国专利 5939331、6673629、4594327、4678757、5558834、6818180,美国公开专利申请 2006/0029923、2004/0202783。总结起来,这些分离的方法主要包括物理和化学方法来分离全血样品中的红细胞。这些用于使红细胞与血浆分离的技术许多是昂贵的、复杂的,可能导致红细胞不完全分离。特别是对那些被放置了很久时间,并产生了凝血的全血样本来讲,现有技术不能很好的进行分离。特别地,在层析免疫检测装置中,这种凝血样本会引起非特异性的结合或很高的背景干扰,导致丧失检测的灵敏度,而且还能够堵塞层析载体从而阻碍血清或血浆在上流动,导致检测无效。特别对一些需要在很短时间内就可以得出检测结果的装置来讲,这一缺点更为致命。这就需要一种试剂和包括有该试剂的装置和方法,用于分离全血样本中的红细胞,而这种装置和方法对检测系统没有不利的影响。

发明内容

[0005] 为了解决以上问题,本发明提供一种从血液样品中分离红细胞的试剂以及该试剂的一些运用,使用该试剂可以有效地从血液样品中分离红细胞。

[0006] 一方面,本发明涉及一种从血液样本中分离红细胞的一种方法。具体的讲,包括,让血液样本和一种结合血液中纤维蛋白的受体反应,除去血液样本中的纤维蛋白受体。在另一个实施方式中,该方法包括,提供一种载体,载体上包括一种结合纤维蛋白的受体,让血液样本流过该载体。

[0007] 另一方面,本发明还涉及一种检测血液样品中被分析物质的检测装置,这种装置包括一个载体,载体上包括一个检测区域,在检测区域上游处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体。优选地,载体为层析载体。更优选的,在检测区域的上游包括样本接受区域,在

样本接受区域上处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体。

[0008] 另一方面,本发明还提供一种用于检测全血样本中被分析物质的一种方法。此方法优选地应用本发明的层析载体装置中。具体的讲,此方法包括,提供一种层析载体,层析载体上包括一个样本接受区域,其中,在样本接受区域上处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体;使血液样品流过样本接受区域;检测血液样本中是否存在被分析物质。

[0009] 在以上所有实施方式中,结合纤维蛋白的受体包括纤维蛋白的抗体,结合红细胞的受体包括抗红细胞的抗体,抗体可以是单抗或多抗,也可以是抗体片段;载体可以是层析载体或非吸水性载体等;结合纤维蛋白的受体可以被固定在载体上。。

[0010] 有益效果:利用本发明的技术,可以有效的去处血液样本里的红细胞,而不管血液样本是新鲜的还是已经产生凝血的样本,增长了被检测样品的使用时间。另外,使用了能够结合纤维蛋白的受体的红细胞分离装置或检测血液样本中被分析物质的检测装置可以延长使用寿命。

附图说明

[0011] 图1为本发明的一个具体实施方式,在检测装置10中,包括一个过滤层11来接受样本并让样本通过该层以及一个反应层12,在反应层上处理有还原反应底物,和手持柄13,其中在过滤层11上处理有结合血液样本中纤维蛋白的多克隆抗体和结合红细胞的多克隆抗体。当把全血样本01施加到样本过滤层11上后,处理在过滤层11上的纤维蛋白抗体和红细胞抗体一起把红细胞拦截在过滤层上,让血浆通过过滤层到达反应层12上,如果样本中存在被分析物质,例如血糖,在反应层12的下表面直接可以观察到颜色变化。

[0012] 如图2描绘了本发明一个优选的具体实施方式,在检测装置30中,构成样本接受区域35的载体材料为玻璃纤维,构成检测区域31的材料为硝酸纤维素膜并位于样本接受区域的下游,含有被标记物质的区域34位于样本接受区域35和检测区域31的之间。在检测区域上包括固定有被固定的特异结合分子带33和检测结果控制分子带32;在玻璃纤维载体上包括红细胞表面抗原的多克隆抗体和纤维蛋白的多克隆抗体,其中样本接受区域35,标记区域34和检测区域31之间相互连接可以让液体从样本接受区域35流到检测区域31上进行反应。

[0013] 标记说明:检测装置10,30;血液样本01,02;过滤层11;反应层12;手持柄13;样本接受垫35,标记垫34,检测区域(检测线)36,控制线32,硝酸纤维素膜36,吸水层31。

具体实施方式

[0014] 下面对本发明涉及的结构或这些所使用的技术术语做进一步的说明。

[0015] 检测

[0016] 检测表示化验或测试一种物质或材料是否存在,比如,但并不限于此,化学物质、有机化合物、无机化合物、新陈代谢产物、药物或者药物代谢物、有机组织或有机组织的代谢物、核酸、蛋白质或聚合物。另外,检测表示测试物质或材料的数量。进一步说,化验还表示免疫检测,化学检测、酶检测等。

[0017] 纤维蛋白和纤维蛋白的受体

[0018] 纤维蛋白原是发现最早的一种凝血因子。呈伸长的椭球体,是由三对多肽链(一对

α 链、一对 β 链、一对 γ 链)以二硫键连接而成的二聚物,其分子量约为 34 万道尔顿。在肝脏中合成后进入血浆,以溶解形式存在。每 100ml 人血浆中含量约 0.3g。纤维蛋白是一种高度不溶的蛋白质多聚体,是像细针一样的晶状物。纤维蛋白原转变为纤维蛋白是整个血凝过程中最基本的变化,要经过 3 个环节:①纤维蛋白原的水解在凝血酶作用下,纤维蛋白原分子中的两条 α 链和两条 β 链每条都有一个肽键断裂,结果形成纤维蛋白单体,并同时释放出两对小分子的纤维蛋白多肽(即纤维蛋白多肽 A 和 B,分子量合计约为 9000 道尔顿)。因此,最后形成的纤维蛋白的分子量比纤维蛋白原小些。②纤维蛋白单体的聚集。在 Ca^{2+} 的参与下,若干纤维蛋白单体聚合成可溶性的纤维蛋白多聚体。③血凝块的形成在纤维蛋白酶和 Ca^{2+} 的作用下,不同的纤维蛋白分子的 α 链之间形成交键,使纤维蛋白转变为最终的不溶性的纤维蛋白多聚体。形成中的纤维蛋白相互交错重叠并网罗血细胞,使原来呈溶胶状的血液转变成凝胶状的血凝块。

[0019] 在我们的实验中,我们惊讶地发现,利用结合纤维蛋白的受体去除血液样本中的纤维蛋白可以有效的分离出红细胞。特别的,当这种结合纤维蛋白的受体和结合红细胞的受体配合使用情况下,可以更好的使血液中的红细胞得到分离。并且,这种去除红细胞的技术不管对新鲜的血液还是对已经产生凝血的血液样本同样有效。

[0020] 分离方法

[0021] 一方面,本发明涉及一种从全血样本中分离红细胞的一种方法。具体的讲,包括,让全血样本和一种结合血液中纤维蛋白的受体反应,除去血液样本中的纤维蛋白受体。在一个具体的实施例子里,可以用抗纤维蛋白的抗体作为受体来结合或捕获血液样本里的纤维蛋白单体或纤维蛋白多聚体,抗纤维蛋白的抗体可以是多克隆抗体、单克隆抗体或抗体片段。这种受体还可以是自然合成或人工合成的其他可以结合纤维蛋白的受体,这里所说的结合可以是“特异”的结合,也可以是非“特异”的结合。这种结合纤维蛋白的受体只要可以结合血液样本中的纤维蛋白就可以了。一个比较简单的例子,先让血液样本和抗纤维蛋白的抗体接触,然后通过分离血液样本中抗纤维蛋白的抗体来分离血液样本中红细胞。在一个更优先的实施方式中,让血液样本和抗红细胞的抗体接触,再让该血液样本和抗纤维蛋白的抗体接触,然后通过分离血液样本中抗纤维蛋白的抗体来分离样本中的红细胞。在另一个实施方式中,也可以让血液样本同时和抗纤维蛋白的抗体和抗红细胞的抗体接触,然后通过同时分离样本中的抗纤维蛋白的抗体和抗红细胞的抗体来分离样本中的红细胞。这里所说的“分离”是指通过物理或化学的方式来直接或间接地让抗纤维蛋白的抗体从血液样本中分离开来。例如,可以直接用一种抗纤维蛋白受体的抗体来分离,也可以是其它的方式,例如在一些载体上固定一些结合纤维蛋白的抗体或抗红细胞的抗体,然后让全血样本流过该载体。

[0022] 载体、含有载体的分离装置

[0023] 在另一个实施方式中,该方法包括,提供一种载体,载体上包括一种结合纤维蛋白的受体,让血液样本流过该载体。另外,本发明还涉及一种分离全血样本中红细胞的装置,该装置包括一个载体,其中在载体上处理有结合纤维蛋白受体。这种载体可以由吸水性,又叫“层析载体”或非吸水性材料构成或组成。

[0024] 非吸水性的材料包括,但不限于,塑料、玻璃、陶瓷和其他金属材料。例如,可先让结合纤维蛋白的受体,例如抗体,固定在塑料表面上,然后让血液样本和塑料表面上的受体

接触,这样血液里的纤维蛋白就被固定在塑料表面的受体捕获,从而导致血液里的纤维蛋白从血液样本中分离,这样红细胞也被分离出来。在一个优选的实施方式中,提供这样一种非吸水性的材料,其中结合红细胞的抗体和结合纤维蛋白的抗体同时被固定处理在这些材料上,让血液样本流过非吸水性的材料表面。

[0025] 另一方面,这种载体也可以是层析载体,这里所说的层析载体是指任何适合的多孔性,有吸收能力的材料或毛细材料。这种材料本身有一定的吸收能力,液体通过毛细作用可以在上流动,例如一些滤纸,玻璃纤维素,聚脂膜,尼龙膜,硝酸纤维素膜,醋酸纤维素,天然原料(例如棉花)织物和合成原料(尼龙)织物;以及多孔凝胶等等。在一个优先的实施方式中,当用这些支持液体流动的载体时候,可以先把结合纤维蛋白的受体固定处理在这些载体上,让其不可因为液体的流动而被溶解在液体里。当让血液样本被施加到这些载体上的时候,血液样本中的纤维蛋白分子被它的受体结合而被聚集在载体上,随着血液样本的继续流动,样本中的纤维蛋白就被分离开来。在另一个优选的实施方式中,在这些载体上还可以处理有一种或几种结合红细胞的受体,这些受体可以聚集血液样本中的红细胞,这些红细胞的受体可以被处理在纤维蛋白受体的上游,例如固定处理在载体上。处理结合纤维蛋白的受体和结合红细胞的受体在载体上的位置可以和纤维蛋白受体位于同一位置,还可以分别位于上下或前后,或者是其它的位置;当血液样本流过载体的时候,血液样本可以同时和纤维蛋白的受体和红细胞的受体同时接触;也可以是血液样本先和纤维蛋白的受体接触然后再和红细胞的受体接触,或者先和红细胞的受体接触然后再和纤维蛋白的受体接触。如何把这些受体处理并让其固定在载体上是本领域的公知常识。并且,本领域的技术人员应该理解到,载体可以是单一材料构成或者由一种以上的材料构成(例如,可以由不同的材料构成不同的部位,区或层),只要这些多层的材料处于液流相互接触的状态,从而使液体能够在这些材料间通过。例如,这种载体接受样本后可以让液体样本垂直通过,如图1所示,或水平通过载体,如图2所示,也可以是其他的形式。

[0026] 这种通过分离血液样本中纤维蛋白能够分离或除去红细胞的原因可能是,纤维蛋白的受体,例如抗纤维蛋白的抗体,通过结合纤维蛋白分子让单个纤维蛋白分子聚集起来,形成一个聚集网,该网相互交错并网络住样本中的红细胞,通过分离纤维蛋白的受体从而间接的分离样本中的红细胞。在另一个优选的实施方式中,当有结合红细胞的受体,例如红细胞表面抗原的抗体,存在的情况下,红细胞受体可以使单个的红细胞聚集在一起形成“红细胞小团”,同时在有纤维蛋白分子形成的网络状织物的时候,可以网络住这些“红细胞小团”而不容易被血液样本溶解或带走,这样可以更好地分离血液样本中的红细胞。在一个更优先的实施方式中,这种结合纤维蛋白的受体为多克隆抗体并且被固定处理在层析载体上,另外,在层析载体上还固定处理有结合红细胞表面抗原的多克隆抗体,当把血液样本施加到这种层析载体上时,处理在载体上的红细胞抗体结合或捕获样品中的红细胞形成“红细胞小团”,同时载体上的纤维蛋白抗体结合或捕获样品中的纤维蛋白形成纤维蛋白分子网络,这种蛋白分子网络可以网住这些比单个红细胞体积更大的“红细胞小团”从而可以更有效的阻碍红细胞继续向前流动,这样可以有效的从血液样本中分离出红细胞。这种利用处理在载体上纤维蛋白的受体分离红细胞的方法可以通过让受体直接固定在载体上得以实现,也可以间接地来分离纤维蛋白。例如,把抗纤维蛋白抗体的抗体(简称纤维蛋白二抗)处理并固定在载体上,先让血液样本和抗纤维蛋白的抗体混合反应,然后把该混合溶液施

加到处理有二抗的载体上,该二抗抗体捕获纤维蛋白抗体,从而间接的捕获纤维蛋白。同样道理,也可以把抗红细胞抗体的抗体(简称红细胞二抗)处理并固定在载体上来间接捕获血液样品中的红细胞。在一个优选的方式中,把抗纤维蛋白的抗体和抗红细胞的抗体直接固定处理在载体上。

[0027] 检测装置

[0028] 另一方面,本发明还涉及一种检测全血样品中被分析物质的检测装置,这种装置包括一个载体,载体上包括一个检测区域,在检测区域上游处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体。优选地,载体为层析载体;更优选的,在该载体上还包括一个位于检测区域上游的样本接受区域;在样本接受区域上处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体。任何检测系统都可以用于本发明的目的。优选的是层析免疫检测系统,包括但不限于水平流动系统、垂直液流系统、和检测棒。下面将描述一些已知的检测系统。

[0029] 一般来讲,对于层析载体试剂条上至少安排一个样本接受区域和一个检测区域,检测区域上包括一些特异分子或化学物质,通过他们可以检测到样本中是否存在被分析物质或数量。当将被检测的样品液施加到样本接受区域的时候,借助毛细作用它将沿着层析载体移动,并且在检测区域通过结合反应(如免疫学反应)的作用,积累预先安排在层析载体上的带有标记的被标记物质,这种积累作用与样本中被分析物质的存在或含量成正比(例如,双抗体夹心法)或反比(竞争法),这种通过测定带有标记物质的存在或含量,就可以检测出样品液中是否存在或含量多少。当然,检测区域上也可以是纯化学性质低物的颜色反应,例如氧化还原反应等等,通过检测区域上颜色的深浅来测量被分析物质有无或数量,利用这一原理的检测装置常见的有血糖检测试剂条等,例如在美国专利 6818180 中所描述的那样。在一个具体的实施例子中,样本接受区域与被标记物质处于相同的位置,优选地是在被标记物质的上游(把通过毛细作用引起液体流动的方向称为“上游”,相反的方向称为“下游”)。当让样品液体(怀疑含有被分析物质)和样品接受区域接触时,样品液借助毛细作用,沿层析载体连同被分析物质一同向下游流动。通常被分析物质为一种化合物,它以特定的方式结合于固定在检测区域上的检测分子。例如,被分析物质为一种抗原,被标记的物质为该抗原的第一抗体,固定在检测区域的分子为该抗原的另一个抗体分子。利用这些原理来检测样本中是否存在被分析物质的装置和方法为现有技术,不是本发明的重点。本发明可以用于任何血液样品,包括血清和血浆,但是优先的是用含有红细胞的全血样本。

[0030] 如果希望以理想的灵敏度进行检测,优选地是对血液样本中所需被分析物进行检测前将红细胞除去。因此,根据本发明的检测装置,让结合纤维蛋白的受体被固定处理在层析载体上,优选地处理在样本接受区域上。之所以是优选,是因为血液样本一旦施加到样本接受区域上,这种处理可以有效将血液样品中的红细胞除去,而减少血清或血浆在以后沿着载体流动的最少干扰,从而使血清或血浆在以后的流动速度不受影响,另外降低了背景干扰。如图 2 描绘了本发明一个优选的具体实施方式,在检测装置 30 中,构成样本接受区域 35 的载体材料为玻璃纤维,构成检测区域 31 的材料为硝酸纤维素膜并位于样本接受区域的下游,含有被标记物质的区域 34 位于样本接受区域 35 和检测区域 31 的之间。在检测区域上包括固定有被固定的特异结合分子带 33 和检测结果控制分子带 32;在玻璃纤维载体上包括红细胞表面抗原的多克隆抗体和纤维蛋白的多克隆抗体,其中样本接受区域 35,标记区域 34 和检测区域 31 之间相互连接可以让液体从样本接受区域 35 流到检测区域 31

上进行反应。

[0031] 图 1 描绘了本发明的另一个优选的具体实施方式,在检测装置 10 中,包括一个过滤层 11 来接受样本并让样本通过该层和反应层 12,在反应层上处理有还原反应底物,和手持柄 13,其中在过滤层上处理有结合血液样本中纤维蛋白的多克隆抗体和结合红细胞的多克隆抗体。当把全血样本 01 施加到样本接受层 11 上后,处理在过滤层 11 上的纤维蛋白抗体和红细胞抗体一起把红细胞拦截在过滤层上,让血浆通过过滤层到达反应层 12 上,如果样本中存在被分析物质,例如血糖,在反应层 12 的下表面直接可以观察到颜色变化。关于本发明涉及去除血液样本中红细胞方法的应用不仅局限与以上具体实施方式的列举,还可以被运用到其他任何检测系统中去,例如可以被运用到美国专利 6818180 图 1 所描绘的检测装置中去,具体的讲,可以被处理到多孔性膜 1 的表层 5 上来分离通过孔 21 施加的全血样本。该领域的一般技术人员可以理解,本发明所描述的方法或装置中都可以和现有技术中其它分离红细胞的方法,结构或试剂结合使用,例如与美国专利 6818180 总所描述的那样的结构和试剂结合使用。

[0032] 检测方法

[0033] 另一方面,本发明还提供一种用于检测全血样本中被分析物质的一种方法。此方法优选地应用本发明的层析载体装置中。具体的讲,此方法包括,提供一种载体,载体上包括一个样本接受区域,其中,在样本接受区域上处理有结合血液样本中纤维蛋白的受体;使血液样品流过样本接受区域;检测血液样本中是否存在被分析物质。优选的,在样本接受区域上还处理有结合红细胞的抗体。优选的,在样本接受区域的下游还包括一个检测区域,该检测区域包括一个被固定处理的特异结合分子,让流过样本接受区域的样本流过检测区域。载体可以是层析载体或非吸水性载体。

[0034] 下面的实施例将进一步说明本发明,但无论如何不应理解为对本发明范围的限制。

[0035] 实验

[0036] 实验 1,利用抗纤维蛋白抗体来分离血液样本红细胞在检测 CTI(心肌钙蛋白)中的应用

[0037] 本实验,包括以下其他实验中所用的抗纤维蛋白的多抗购买于北京三博远志生物技术有限公司,地址北京市海淀区东北旺南路 26 号,批号为 G11135796J162;使用的抗红细胞的单抗买于 Genclonn 公司,地址为中国浙江杭州天目山路 198 号,古荡经济园区,批号为 ME060822-1-0419;使用的抗红细胞的多抗购买于 Genclonn 公司,地址为杭州天目山路 198 号,古荡经济园区,批号为 Q05920-1113。除了额外标出的地方,可以通过现有技术所描述的方法制造 CTI 检测试剂条。本实验参照图 2 来说明如何制备和组装试剂条。

[0038] 1. 抗纤维蛋白的抗体的配置和处理样本接受垫 35

[0039] 样本接受垫为玻璃纤维,先在上面处理 Tris 缓冲溶液,对玻璃纤维做如下几个不同的处理。

[0040] 1),只在玻璃纤维上处理抗纤维蛋白多抗(100 个,每个处理 20 个)。抗纤维蛋白的多克隆抗体按照比例 1:50,1:100,1:200,1:300,1:400 稀释,并均匀地处理到玻璃纤维上,分别为处理 A,B,C,D,E。

[0041] 2),同时在玻璃纤维上处理抗红细胞和纤维蛋白的多抗(50 个,每个处理 10 个)。

把(1)中的 A, B, C, D, E 分为 2 组, 每组 10 个, 再在其中一组的每个玻璃纤维上处理抗红细胞的多克隆抗体, 抗红细胞抗体的稀释比例为 1 : 10, 分别为 G=1 : 50 (抗纤维蛋白多抗) + 1 : 10 (抗红细胞多抗); H=1 : 100 (抗纤维蛋白多抗) + 1 : 10 (抗红细胞多抗), I=1 : 200 (抗纤维蛋白多抗) + 1 : 10 (抗红细胞多抗), J=1 : 300 (抗纤维蛋白多抗) + 1 : 10 (抗红细胞多抗), K=1 : 400 (抗纤维蛋白多抗) + 1 : 10 (抗红细胞多抗)。

[0042] 3), 只在玻璃纤维上处理 1 : 10 的红细胞多抗, 处理为 F (10 个)。

[0043] 最后在 37℃烘箱里烘干处理好的玻璃纤维备用。

[0044] 2. 标记垫的准备 34

[0045] 用常用的胶体金乳胶, 平均粒径为 20-40nm 纳米。标记兔抗 CTI 的单抗和鼠抗人 IgG 多抗, 并用机器均匀的喷洒在聚脂膜上, 并在 37℃的烘箱下烘干处理好的标记垫。

[0046] 3. 硝酸纤维膜的准备 36

[0047] 首先由一个微处理器控制的微量调节注射器把羊抗鼠 IgG 多抗 (1.3mg/ml, 作为检测结果控制线 32) 处理到硝酸纤维素膜上, 然后再把鼠抗 CTI 单抗 (浓度为 4.0mg/ml) 处理到硝酸纤维素膜作为检测线 33, 作为被分析物结合区域。喷量都为 1.1 μ l/cm。完成后, 硝酸纤维素膜立即在 45℃干燥 (2 小时) 来固定抗体试剂。

[0048] 4. 试剂条的组装

[0049] 按照图 2 所描绘的式样组装检测 CTI 的试剂条, 让玻璃纤维作为样品吸收垫 35 并叠加在标记垫 34 上, 同时让标记垫叠加在硝酸纤维膜 36 上; 以及吸水滤纸 31 叠加在硝酸纤维膜上组成如图 2 所示的试剂条。

[0050] 5. 血液样本的准备

[0051] 准备 20 个全血样本 (储存在 2-8℃, 采集时间都超过 7 天)

[0052] 6. 检测过程

[0053] 在每个处理的样本接受垫上滴加 100 μ l 的全血样本, 并记录控制线条 (C 线) 出现的时间, 控制线出现时间的快慢可以说明液体在试剂条上流动的速度。按照预先设置的标准, 在 5 分钟之内要出现控制线为合格, 在 10 分钟内需要完成检测, 即血液样本需要流过硝酸纤维膜然后到达吸水滤纸; 否则为不合格产品。选用 F 和 J 处理来进行灵敏度和特异性检测。用阴性样本配置成阳性标本, 让待检测的 CTI 的浓度为 0.5ng/ml, 记录检测结果。特异性检测, 用标准的阴性样本 20 个来检测这些试剂条。另外, 如果出现红色背景也被判为不合格产品。

[0054] 实验结果

[0055] 表 1, C 线出现的时间测定

[0056]

Time NO.	控制线出现的时间											
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1		2'15	4'45	4'40	4'10	4'35	4'30	4'	3'45	3'45	3'	3'30
2		2'45	4'30	2'10	4'15	2'20	3'40	2'10	4'20	2'25	3'15	4'30
3		4'45	3'10	4'20	3'45	4'15	4'30	3'40	3'40	3'30	2'20	3'20
4		2'20	2'45	2'25	2'20	2'30	2'20	4'30	3'40	3'30	2'35	3'10
5		3'50	3'40	3'50	3'20	3'50	3'45	3'30	3'	3'20	2'45	3'20
6		2'20	2'45	2'15	4'10	2'10	4'30	4'30	4'20	4'30	3'30	2'30
7		2'20	2'15	2'20	2'10	2'25	2'10	4'30	4'10	4'	3'40	3'30
8		4'	3'45	3'30	3'	3'40	3'40	3'30	3'10	3'20	2'45	4'30
9		6'	2'35	2'30	2'30	4'30	4'40	2'20	3'30	3'	2'10	3'
10		2'15	2'20	2'10	2'20	2'15	3'40	3'20	3'	3'	3'	3'

[0057] 注意：在表1的结果中，在F, H, I 处理中带有下划线的数字中虽然控制线出现的时间都小于5分钟，但是他们都没有在10分钟内完成反应，也被判断为不合格产品。

[0058] 表2：不合格率

[0059]

NO.		处理					处理	处理				
		A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
		70%	60%	60%	40%	50%	30%	10%	10%	10%	0%	10%

[0060] 表3：灵敏度（“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果）

[0061]

NO.	结果	处理 F	处理 J
1		+	+
2		+	+
3		+	+

[0062] 表4：特异性检测（“+”表示阳性结果，“-”表示阴性结果）

[0063]

NO.	结果	处理 F	处理 J
1		-	-

[0064]

2	-	-
3	-	-
4	-	-
5	-	-
6	-	-
7	-	-
8	-	-
9	-	-
10	-	-
11	-	-
12	-	-
13	-	-
14	-	-
15	-	-
16	-	-
17	-	-
18	-	-
19	-	-
20	-	-

[0065] 7. 分析和结论

[0066] 由上面的实验结果可以看出,利用抗纤维蛋白的抗体可以分离血液样本中的红细胞,大大降低血液对层析载体阻塞的几率,提高血液分离的效率,并且对检测本身并不带来不利的影响。另外,如果与抗红细胞的抗体结合使用,作用更为明显。

[0067] 实验 2,利用抗纤维蛋白抗体来分离血液样本红细胞在检测 PSA(前列腺特异抗原)中的应用

[0068] 同样参照附图 2 来说明如何组装该实验的试剂条。和实验 1 相比,结构没有太大的差异,所用的红细胞抗体和纤维蛋白的抗体批号和来源相同。只是所检测的被分析物质不同和在样本接受垫上做不同的处理。

[0069] 1. 抗纤维蛋白的抗体的配置和处理样本接受垫

[0070] 样本接受垫为玻璃纤维,先在上面处理 Tris 缓冲溶液,对玻璃纤维做如下几个不同的处理。

[0071] 1),处理 1。在玻璃纤维处理抗纤维蛋白和抗红细胞的多克隆抗体。抗纤维蛋白的抗体按照比例 1:300,稀释,并均匀地处理到玻璃纤维上。

[0072] 2),处理 2。在玻璃纤维上处理抗红细胞的多克隆抗体(购买于 Genclonn 公司,与实验 1 中所用的为同一批号)。红细胞多克隆抗体的稀释比例为 1:10 最后在 37℃烘箱里烘干处理好的玻璃纤维备用。

[0073] 3),对照处理 CK。在玻璃纤维上处理抗红细胞的单克隆抗体(购买于 Genclonn 公司,批号为:与实验 1 中所用的为同一批号),稀释比例为 1:75。

[0074] 2. 标记垫的准备 34

[0075] 用常用的胶体金乳胶,粒径为 20-40nm 纳米。标记兔抗 PSA 的单抗体和鼠抗人 IgG

多抗用机器均匀的喷洒在聚脂膜上,并在 37℃ 的烘箱下烘干处理好的标记垫。

[0076] 3. 硝酸纤维膜的准备 36

[0077] 首先由一个微处理器控制的微量调节注射器把羊抗鼠 IgG 多抗 (1.3mg/ml, 作为检测结果控制线 32) 处理到硝酸纤维素膜上, 然后再把鼠抗 PSA 单抗 (浓度为 4.0mg/ml) 处理到硝酸纤维素膜作为检测线 31, 作为被分析物结合区域。喷量都为 1.1 μ l/cm。完成后, 硝酸纤维素膜立即在 45℃ 干燥 (2 小时) 来固定抗体试剂。

[0078] 4. 试剂条的组装

[0079] 按照图 2 所描绘的式样组装检测 PSA 的试剂条, 让玻璃纤维作为样品吸收垫并与标记垫叠加, 同时让标记垫和硝酸纤维膜以及吸水滤纸叠加组成如图 2 所示的试剂条。

[0080] 5. 血液样本的准备

[0081] 准备 20 个 7 全血样本 (储存在 2-8℃, 采集时间超过 7 天)。

[0082] 6. 检测过程

[0083] 在每个处理的样本接受垫上滴加 40ul 的全血样本并滴加 40ul 的全血磷酸缓冲溶液帮助跑板, 并记录控制线条 (C 线) 出现的时间, 控制线出现时间的快慢可以说明液体在试剂条上流动的速度。按照标准, 在 3 分钟之内要出现控制线为合格, 在 5 分钟内要完成检测, 即血液样本需要流过硝酸纤维膜然后到达吸水滤纸, 否则为不合格产品。选用对照和处理 1 来进行灵敏度和特异性检测。用阴性样本配置成阳性标本, 让待检测的 PSA 的浓度为 2ng/ml, 4ng/ml, 10ng/ml, 20ng/ml, 记录检测结果。特异性检测, 用标准的阴性样本 20 个来检测这些试剂条。

[0084] 7. 检测结果

[0085] 表 1 : 对照和处理 2 的控制线出现的时间比较 (秒)

[0086]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	合格率
CK	-*	-	72	60	-	-	-	-	-	-	20%
处理 2	-	163	74	134	-	136	-	-	124	-	50%

[0087] 表 2 : 处理 1 和处理 2 的控制线出现的时间比较 (秒)

[0088]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	平均时间
处理 2	110	-	170	90	129	100	100	92	67	81	116	148	149	87	124
处理 1	103	80	120	96	63	82	84	122	67	64	105	140	116	84	94

[0089] 注: “-” 表示在 3 分钟内样本不能到达控制线, * 表示在 5 分钟内仍然不能完成检测。

[0090] 表 3 : 处理 1 和对照的灵敏度比较

[0091]

	2ng/ml		4ng/ml		10ng/ml		20ng/ml	
CK	G2	G2	G4	G4-5	G5-6	G6	G7	G7
处理 1	G2	G2	G4-5	G4-5	G6	G6	G7	G7

[0092] “G”表示 T 线 / 检测线的颜色,后面的数字越大,表示颜色越深。

[0093] 表 4 :处理 1 和对照的特异性比较

[0094]

	阴性标本	临床标本
对照 CK	G1 100%	G1 100%
处理 1	G1 100%	G1 100%

[0095] 结论

[0096] 由上面的实验结果可以看出,利用抗纤维蛋白的抗体可以分离血液样本中的红细胞,大大降低血液对层析载体阻塞的几率,提高血液分离的效率,并且对检测本身并不带来不利的影响。另外,如果与抗红细胞的抗体结合使用,作用更为明显。

[0097] 实验 3,加速稳定性实验。

[0098] 用实验 1 中的处理 F 和 J 来做加速稳定性实验,用来检验产品的最长有效时间。方法:把处理 F 和 J 的样品放在 55℃ 下处理,并按照下表 1 所列的天数进行灵敏度,特异性,每次用 10 个产品进行,在每个处理的样本接受垫上滴加 100ul 的全血样本,并记录控制线条(C 线)出现的时间。

[0099] 表 1,稳定性试验天数和检测时间对照表

[0100]

Temperature	Day	Day	Day	Day	Day	Day	Day
	0*	7	14	21	30	35	40
55℃	X	X	X	X	X	X	X

[0101] “X”表示在 55℃ 的情况下需要进行实验进行验证。

[0102] 实验结果

[0103] 0 天

[0104] 表 2-1 处理 F 的结果

[0105]

NO.	阴性样本	0.5ng/ml	5ng/ml	C 线出现的时间
1	-	3+	5.5+	4' 15"
2	-	3+	5.5+	3' 45"
3	-	3+	6+	4' 15"
4	-	3.5+	5.5+	3' 15"
5	-	3+	6+	3' 10"
6	-	3+	5.5+	3' 35"
7	-	3.5+	6+	4' 35"
8	-	3+	5.5+	2' 40"
9	-	3+	6+	4' 35"
10	-	3+	6+	4' 15"

[0106] 表 2-2 处理 J 的结果

[0107]

NO.	阴性样本	0.5ng/ml	5ng/ml	C 线出现的时间
1	-	3+	5.5+	3' 25"

2	-	3. 5+	5. 5+	3' 15"
3	-	3+	6+	4'
4	-	3. 5+	5. 5+	2' 45"
5	-	3+	5. 5+	3' 10"
6	-	3+	5. 5+	3' 05"
7	-	3. 5+	6+	3' 45"
8	-	3+	5. 5+	2' 30"
9	-	3+	6+	3' 45"
10	-	3+	6+	3' 20"

[0108] 表 3 第七天的实验结果

[0109]

	F	J
阴性样本	- , - , -	- , - , -
0. 5ng/ml	3+ , 3+ , 3. 5+	3+ , 3+ , 3+
5ng/ml	6+ , 6+ , 6+	6+ , 6+ , 6+
C 线出现的时间	4' 20" , 3' 35" , 4' 50"	3' 35" , 2' 45" , 3' 20"

[0110] 表 4, 第 14 天的实验结果 :

[0111]

	F	J
阴性样本	- , - , - , -	- , - , - , -
0. 5ng/ml	3+ , 3. 5+ , 3. 5+	3+ , 3+ , 3. 5+
5ng/ml	6. 5+ , 6+ , 6+	6+ , 6+ , 6+
C 线出现的时间	4' 50" , 4' 25" , 4' 45"	3' 30" , 3' 15" , 3' 30"

[0112] 表 5, 第 21 天的实验结果

[0113]

	F	J
阴性样本	- , - , - , -	- , - , - , -
0. 5ng/ml	3+ , 3. 5+ , 3. 5+	3+ , 3+ , 3. 5+
5ng/ml	6. 5+ , 6+ , 6+	6+ , 6+ , 6+
C 线出现的时间	5' 20" , 4' 45" , 4' 10"	3' 40" , 3' 10" , 3' 35"

[0114] 表 6, 第 30 天的实验结果 :

[0115]

	F	J
阴性样本	- , - , - , -	- , - , - , -
0. 5ng/ml	3+ , 3. 5+ , 3. 5+	3+ , 3+ , 3. 5+
5ng/ml	6. 5+ , 6+ , 6+	6+ , 6+ , 6+
C 线出现的时间	6' 20" , 4' 35" , 4' 25"	3' 50" , 3' 25" , 3' 45"

[0116] 表 7, 第 35 天的实验结果 ::

[0117]

	F	J
Negative	- , - , - , -	- , - , - , -
0. 5ng/ml	3+ , 3. 5+ , 3. 5+	3+ , 3+ , 3. 5+
5ng/ml	6. 5+ , 6+ , 6+	6+ , 6+ , 6+
C 线出现的时间	5' 10" , 5' 15" , 4' 50"	2' 55" , 2' 35" , 2' 50"

[0118] 表 8, 第 40 天的实验结果 :

[0119]

	F	J
阴性样本	- , - , - , -	- , - , - , -

[0120]

0.5ng/ml	3+, 3.5+, 3.5+	3+, 3+, 3.5+
5ng/ml	6.5+, 6+, 6+	6+, 6+, 6+
C 线出现的时间	5' 10", 4' 25", 5' 50"	3' 15", 2' 55", 3' 35"

[0121] 注：“-”表示阴性结果；数字加“+”表示结果为阳性，数字越大，表示检测线条的颜色越深。

[0122] 结论

[0123] 从以上实验结果可以明显看出，当在样本接受垫上添加了抗纤维蛋白的抗体的时候，产品的有效使用时间可以达到 2 年，同时减少了样本到达 C 线的时间。

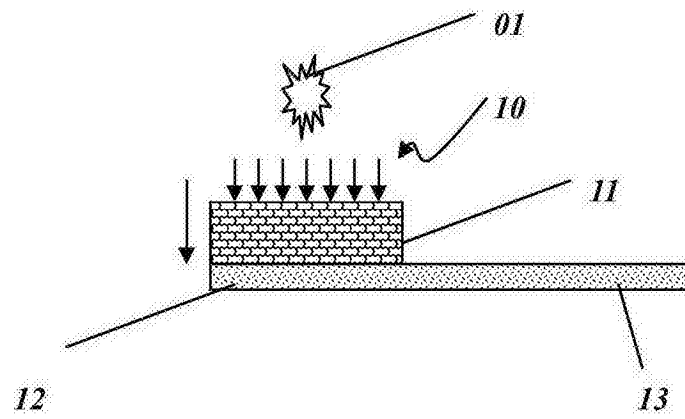


图 1

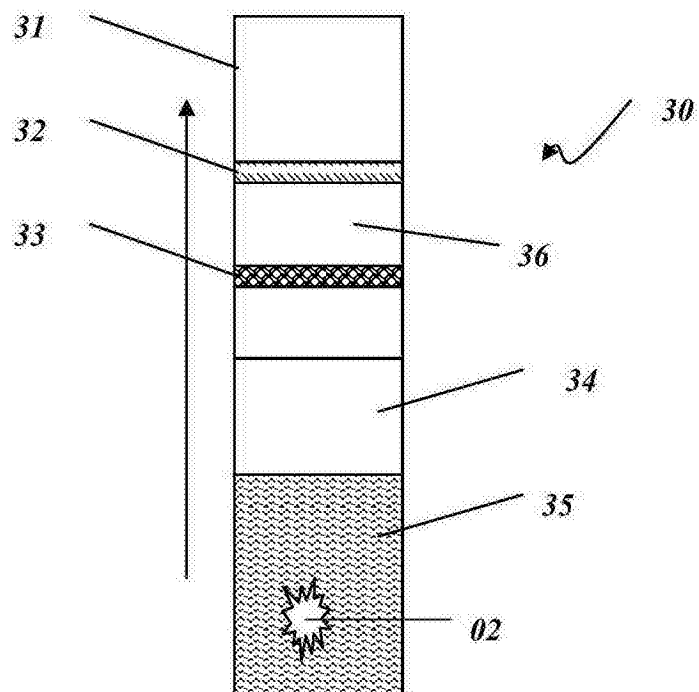


图 2

专利名称(译)	一种分离血液样本中红细胞的方法以及运用		
公开(公告)号	CN103760333B	公开(公告)日	2016-03-16
申请号	CN201410006059.1	申请日	2009-10-13
[标]申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	艾博生物医药(杭州)有限公司		
[标]发明人	刘毅 刘杰 马天涯 吴银飞 高飞		
发明人	刘毅 刘杰 马天涯 吴银飞 高飞		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/5005 G01N33/566		
审查员(译)	贾静		
其他公开文献	CN103760333A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种从血液样品中分离红细胞的装置和方法，以及检测血液样本中被分析物质的检测装置和方法。使用这些装置和方法可以有效分离血液样品中的红细胞，从而能够减少红细胞对液体流动的阻碍作用和对反应背景的干扰。并且使用该方法 and 装置不会对检测的结果带来不利影响。

