

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/80 (2006.01)



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 00118488.1

[45] 授权公告日 2009 年 7 月 1 日

[11] 授权公告号 CN 100507568C

[22] 申请日 2000.6.8 [21] 申请号 00118488.1
[30] 优先权
[32] 1999. 6. 8 [33] US [31] 60/138136
[73] 专利权人 奥索临床诊断有限公司
地址 美国纽约州
[72] 发明人 T·J·默科利诺 K·J·雷斯
[56] 参考文献
CN2348390Y 1999.11.10
US3956477A 1976.5.11
CN2213337Y 1995.11.22
CN2290854Y 1998.9.9
WO8501354A 1985.3.28
审查员 熊 茜

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 张广育 温宏艳

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 9 页

[54] 发明名称

正向和反向 ABO 血型的同步测定

[57] 摘要

本发明公开了使用目测系统和基于荧光标记和检测系统的同步正向和反向血型试验。正向和反向试验可以分别进行，但 A 型和 B 型凝集物可被同时检测和鉴别。

1. 一种在反向试验中分析血液的方法，包括：

(a) 混合血液样品与带有 A 抗原的第一试剂红血细胞和带有 B 抗原的第二试剂红血细胞，其中该混合在单柱中进行，并且其中所述第一或第二试剂红血细胞之一被可区分性地染色；

(b) 使混合物凝集；

(c) 对混合物在单柱中进行目测或自动计算机化图象分析；和

(d) 分析目测或自动计算机化图象分析结果来确定 ABO 反向类型。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中进行目测或自动计算机化图象分析的单柱选自管和柱凝集技术的。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其中柱凝集反应技术是柱凝集反应试验和试剂盒形式的分离管。

4. 如权利要求 3 所述的方法，其中采用自动计算机化图象系统来阐明凝集反应结果。

5. 采用两个细胞群同步进行血液样品 ABO 抗体测试的方法，包括：

(a) 混合血液样品与带有第一抗原的第一组试剂红血细胞和带有第二抗原的第二组试剂红血细胞，其中该混合在单柱中进行，并且其中一组试剂红血细胞被染色；

(b) 使混合物凝集；

(c) 对混合物在单柱中进行目测或自动计算机化图象分析；和

(d) 分析目测或自动计算机化图象分析结果来确定 ABO 类型。

6. 如权利要求 5 所述的方法，其中进行目测或自动计算机化图象分析的单柱选自管和柱凝集技术的。

7. 如权利要求 6 所述的方法，其中柱凝集反应技术是柱凝集反应试验和试剂盒形式的分离管。

8. 如权利要求 7 所述的方法，其中采用自动计算机化图象系统来阐明凝集反应结果。

正向和反向 ABO 血型的同步测定

本申请中参考了许多的专利和论文。将这些专利和论文的全部公开内容引进本申请中作为参考是为了更详尽地描述在本文所描述和要求的发明以前本技术领域的技术人员已知的现有技术的状况。

本发明涉及血型测定的领域，尤其涉及正向和反向血型测定的同步测定。

血型血清学要求在涉及病人输血或器官移植之前，需要测定血液捐献者和病人受体间的血细胞相容性。血细胞相容性是由病人血清中的抗体与捐献者血细胞上的抗原不发生免疫反应来确定的。

许多不同的血型抗原被发现存在于每个个体的红血细胞的表面上。这些抗原，遗传基因的产物，以结合体存在，除了同一对双胞胎外，所有个体间的这些结合体似乎是独特的。血型检测一般是通过检测红细胞来确定哪种抗原存在，哪种抗原不存在的过程，通常采用被检测抗原的抗体进行检测。另外，当一个人在他的或她的红血细胞上没有特定的红细胞抗原时，他的或她的血清可能含有该抗原的抗体。抗体是否存在于血清中决定于人体的免疫系统以前是否被该特定抗原或与该抗原非常类似的物质激发并产生过应答反应。例如，红血细胞是 A 型的人，即红细胞上具有“A”抗原，他的或她的血清中有抗 B 抗体。因此，如果此人被输入 B 型血液，就会发生免疫反应而引起严重的临床后果。

作为另外一方面的考虑，应该注意到人体经常与花粉、食物、细菌和病毒中的抗原接触。这些“天然”抗原中的一些抗原明显地与人的血型抗原相类似，以致于它们能刺激几乎每一个接触的人来产生抗体。因此，一定的抗体应该存在于红细胞中缺少互补抗原的任何人的血清中。对于 ABO 系统，这确实如此，因此，经常对病人/捐献者的血清进行第二种确定试验。该检测血清中 ABO 血型系统中的预期抗体试验被称作“反向”血型检测。

ABO 血型系统的抗体通常是免疫球蛋白 M (IgM)。这些抗体的每个分子具有十个抗原结合位点。该 IgM 抗体足够大以致跨越了红血细胞之间的距离，因此当对其进行离心时，细胞将以“细胞-抗体-细胞-抗体”的网格形式结合在一起并将保持凝集状态。例如，如果抗-A 加到血型 A 或血型 AB 细胞中并离心

混合物，当重新悬浮时，细胞将保持凝集的形式。用同样的抗体，血型 O 和血型 B 细胞将以分离的细胞形式悬浮。由一种抗体，诸如 IgM 抗体引起的凝集，被称作直接凝集。

输血医学中，由于上述原因，最常进行的试验是测定 ABO 血型。现有技术是分别测定红细胞上的抗原 A、B，有时是 A+B 一起测定（正向型）；和确定（交叉检测）检测血清或血浆中的抗-A 和抗-B 抗体（反向型）。因此，最少采用 4 次试验，但通常采用 7 次分试验（样品红细胞上的抗原 A、B、A+B；采用 A₁、A₂、B、O 试剂红细胞，血清/血浆样品中的抗-A 和抗-B）。从这些测型操作的每一个试验中得到（正向和反向类型）的结果是一致的。因此，仅在美国，血液中心每年大约要进行 104000000 次测定血型的试验。

自 20 世纪初期以来，称作“兰斯泰纳”方法 (Landsteiner, science 73: 405 (1931)) 的普通方法与 Ashby (J. Exp. Med. 29:267(1919)) 和 Coombs (Brit. J. Exp. Pathol. 26:255(1945)) 的方法的结合是将病人的红血细胞加到含有血型抗体（如抗-A 或抗-B）的标准实验试管中，混合后使得发生抗体/抗原结合反应，然后离心。如果所测定的抗原存在，将发生抗体/抗原的结合并导致病人红血细胞的凝集。用手摇动试管来移开“结块”的细胞离心后在试管底部产生的块结。然后进行主观判断，看移开的细胞是否是“结块的”，并且看“结块”的程度。

20 世纪中叶，进行了许多努力来简化所述技术以减小试验的主观性和降低错误率。人们认识到某种程度上，相容性试验结果的持久性记录可通过利用可湿性的，即非吸收性的或有些情况下可吸收性的、至少一部分表面积上载有必需的免疫学试剂的试验载玻片或试验板来获得。在这方面，专利号为 2770572、2850430、3074853、3272319、3424558、3502437 和 3666421 的美国专利以及欧洲专利申请#0104881-A₂ 描述了这种试验板和相关仪器的选择实例。在微板上进行血型鉴定的优点包括可简单操作大量的样品，通过仪器和计算机的内部处理进行结果的搜集和处理，来对凝集反应进行客观的测定。一些带有计算机控制的自动仪器和高通过量的分光光度计读取器的昂贵的和专用的系统被引进到血库的自动操作系统中 (Chung, 等., Transfusion 33:384(1992))。

商品化的血型测定试剂盒中引进了在填充了凝胶形试剂的特殊微试管中

进行红细胞抗原与抗体反应的改进检测方法。(Lapierre, 等., *Transfusion* 30:109(1990))。为了克服以血细胞凝集反应作为血型测定终点的方法中存在的问题而使用固相技术已由 Scott 论述过了 (*Transfusion Med. Rev.* 5:60(1991))。最近, Growe 等 (*Transfusion Med. Rev.* 10:44(1996)) 报导了 RBC 抗原自动测型的完成和应用和不但适用于血液中心而且也适用于医院输血实验室的血清抗体的筛选方法。至少七种不同的具有特定测型试剂的孔被用于这些方法来测定样品的血型。用于大规模血型的测定和单个试管/孔中只有一种抗原或抗体型的测定的所有方法主要是应用了基于凝集反应的方法。专利号为 4550017 和 4748129 的美国专利中报导了使用荧光标记试剂进行的分离辨别反应已被用于血型的鉴别。

目前的方法是利用红细胞的凝集反应作为终点。如上所述, 这一反应是在试管中、载玻片表面上、微板中和柱凝集反应试验中完成的。后面的两种方法可手工或通过自动仪器完成。所有的方法都需要从细胞中分离血清(或血浆)来进行正向和反向型测定。

因此, 建立一种在单一试验中进行正向和反向型测定的方法是有意义的, 而更好地是, 在试验以前不需要分离血液样品。这种方法将使得一名血库技术人员同时测定红细胞上的血型抗原和血清中具有临床意义的抗体成为可能。这种方法将大大减少所进行的个体试验数目, 即每年减少了在血液中心进行的大约 5 千万至 1 亿次试验, 明显地节省了时间和费用。我们建立了能够区别样品红细胞(RBC)和试剂 RBC 的技术, 因此它们的凝集反应是截然不同的。另外, 本文公开的新方法使用了标记的测型抗体试剂来识别它们的反应和样品中预先形成的抗体。本发明的试验不需要分离血液样品就能完成, 因此可采用全血(WB)来完成。本文公开的试验可在自动仪器上使用, 所得的进一步的优点是不需要从血清中分离细胞。而且, 正向和反向试验的同时检测减少了分型和定型(正向和反向试验)所需的试验次数。

在本发明的荧光标记的技术方案中的正向试验中, 单克隆抗体被标记。而反向试验中, 试剂红细胞被标记。更加优越的是能够识别(目测或通过自动读取器)混合的红细胞群。例如, 反向试验可以在 1 次试验中进行而不需要 2 次试验, 导致试验次数的减少。进一步应用抗体筛选, 其中采用 2 个细胞在一个孔中一起试验来代替 2 次单独试验, 减少了试验的次数。

对视觉系统的细胞染色被应用到现有的血型试验平板中，其中采用了试管、微板、载玻片和柱凝集技术（CAT），以及试验平板如 Vitros™ 250、750 或 950（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY）玻片方法，

Vyas 等在专利号为 5776711 的美国专利中公开了一种“同步”ABO 和 RH(D) 血液测型或抗体筛选方法。然而，为了减少测定 ABO 血型的试验次数而进行了类似的尝试后，本发明同时进行了样品红细胞 ABO 的测型和对应于 A 和/或 B 抗原的抗体存在的测定。另外，本发明使用的是全血而不是分离的血清和红细胞组分。本发明中标记的试剂红细胞的使用也不同于 Vyas 等的合成珠子的使用。

ABO 血型的同步分析可采用合适的荧光色素来标记试剂红血细胞并选择出标记了荧光色素的合适单克隆抗体。细胞和凝集物可在显微镜载玻片或类似的物体上通过激光扫描血细胞计数器进行测定。载玻片上的细胞被扫描激光光源照射。通常，所使用的激光光源包括蓝色氩离子激光和/或红色氦-氖激光。荧光和光散射可通过使用激光扫描血细胞计数器（Compucyte, Cambridge, MA）来进行测定。

正向和反向试验的同步测定中激光扫描血细胞计数器的使用如下所述。当一个细胞或细胞簇（凝集物）被激光束扫描时照射光被细胞或细胞簇散射并且散射的强度与细胞（或凝集物）的大小和形状有关。例如，单个红细胞比小凝集物散射的光少，而小凝集物比大凝集物散射的光少。

而且，当一个细胞或细胞簇（凝集物）被激光束扫描时，照射光可使和细胞结合的荧光色素发出荧光。如果每个细胞的荧光色素较均匀地与试剂红细胞结合，荧光强度则与凝集物的大小有关。例如，单个红细胞发出的荧光比小凝集物少，而小凝集物发出的荧光比大凝集物少。

在鉴别不同类型的凝聚物方面，散射光和荧光的结合使用比单使用其中的任何一种光更可靠。

除了这两种参量外，结合了荧光素的单克隆抗体也可被用于标记需要测定的细胞（和凝集物）。通过照射激光束照射细胞而发射出的荧光给出关于这些单克隆抗体与细胞或凝集物结合的其它信息来区分细胞或凝集物的亚群。

ABO 同步测定的五个参量的（正向散射，侧向散射，和三个荧光通道）点图分析如图 1A-D 所示。

本技术领域的技术人员可以看出流式细胞仪或荧光显微镜也能用来进行 ABO 血型的同步分析。

在流式细胞仪中，要测定的细胞和凝集物被引入快速移动的液流中心并成单行匀速流出小孔。通过周围的液层作用，颗粒以流体动力学的形式被集中到液流的中心。液流中的细胞通过测量站，在此细胞被光源照射并且测量是以每分钟 2.5×10^2 到 10^6 个细胞的速度进行。激光源被用于细胞的测量；一般使用的激光源包括氩离子激光（UV, 蓝和绿光）、氦激光（黄和红光）、氦-镉激光（UV 和蓝光）、和氦-氖激光（红光）。荧光和光散射能通过使用流式细胞仪，例如，CytoronAbsolute™ 流式细胞仪（Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Raritan, NJ）来测定。

在荧光显微镜中，细胞和凝集物是在显微镜载玻片或类似物体上计数测量的。细胞通常以白光源或基本上单色光源进行照射。在此，激光源也可被用作单色光源。凝集物的存在可以采用白光进行分析，有关的荧光分析采用单色光和合适的滤光片。目测或自动读取可用于这些读取中的一种或两种。

目测技术可被用于本文的正向和反向血型测定中。使用柱凝集试验（CAT）的这种方法可采用一个 BioVue™ 盒（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY）。这种盒包括加入了微粒基质的柱子。这种基质上覆盖了分散在缓冲液中的合适血液测型抗体，形成了初始反应带。

CAT 可采用自动读取器系统来翻译凝集结果。实施 CAT 的 ortho AutoVue™（Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Rochester, NY）全自动化系统中有一个这种读取器。自动读取器是一个由 CCD（充电的耦合装置）单色视频照相机、和图像处理板、和一个 IBM-兼容 PC 组成的计算机控制图像系统。读取器首先需要数字化的反应图像并通过图像处理软件进行处理来获得反应的特性，然后这些特性被用于反应分类程序。这些特性被用来将反应分成负和正两类，并转化成七种常规反应类型或级别中的一种。鉴定分析，一种线性统计模式鉴别工具，是用来区别负和弱反应的。

然而 CAT 中使用的另一种读取器是 BioVue™ 读取器 2（Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, NY）。这种读取器有一个用于十二个 BioVue™ 盒的自动装载器和一个卤素灯源，并且图像分析特性允许在 RBC 波长基础上鉴定细胞，由此转化成凝集反应结果。通过 CCD 照相机和数字板获得图像。

本发明提供了一种分析血液的方法，包括 (a) 使血液样品与抗-A 和抗-B 的抗体反应，其中抗体结合了检测标记；(b) 使血液样品与带有标记了的 A 抗原和标记了的 B 抗原的试剂红血细胞反应；(c) 将样品进行血细胞计数分析；和 (c) 分析血细胞计数的分析结果来确定 ABO 血型。血液样品可以是全血并且上述步骤 (a) 和 (b) 中使用的血液样品可以是相同的未分离样品，或可以是来源于同一病人的样品的不同部分。与抗体结合的检测标记物可以是荧光标记物如 FITC、BODIPY、藻胆蛋白（包括藻红蛋白）、藻胆蛋白的能量转化偶联物、多甲藻素叶绿酸蛋白、Cascade Blue、AMCA、活性吲哚羰花青、TRITC、别藻蓝蛋白 (APC)、藻青素 (PC)、和吲哚二羰花青 (Cy5™)。相反，标记了的 A 抗原和标记了的 B 抗原可以是选自 FITC、BODIPY、藻胆蛋白（包括藻红蛋白）、藻胆蛋白的能量转化偶联物、多甲藻素叶绿酸蛋白、Cascade Blue、AMCA、活性吲哚羰花青、TRITC、别藻蓝蛋白 (APC)、藻青素 (PC)、和吲哚羰花青 (Cy5™) 组成的一组荧光染料。

本发明还提供了血液分析试剂盒，该盒包括 (a) 第一个含有标记了的抗-A、和抗-B 的抗体的容器；和 (b) 第二个含有标记了的试剂红血细胞的容器，其中该标记了的试剂红血细胞带有标记了的血型 A 抗原和标记了的血型 B 抗原。抗-A 抗体可含有 IgM-FITC，并且抗-B 抗体可含有 IgM-FITC。试剂红血细胞是血型 A1、A2、B 和/或 O，并且可以用选自于下列荧光染料组的染料进行荧光标记，该染料组由活性染料（例如荧光素异硫氰酸酯 (FITC)）、亲脂性染料（例如步花青 540 或 DiIC₁₈(3)-DS）、活性亲脂性染料、与膜结构反应的染料、和结合了荧光染料的单克隆抗体组成，这些单克隆抗体与红细胞上的共同结构反应（例如抗-血型糖蛋白-PE 偶联物）。优选地，荧光染料是 DiIC₁₈(3)-DS。试剂盒可另外含有一个柱凝集技术 (CAT) 盒如 BioVue™ 盒。

本发明用于同步进行正向和反向 ABO 测型的方法，包括 (a) 血液样品与抗-A 和抗-B 抗体反应，其中抗体结合了检测标记；(b) 血液样品与带有标记的 A 抗原和标记的 B 抗原的试剂红血细胞反应；(c) 样品进行血细胞计数或荧光显微分析；和 (d) 分析血细胞计数或荧光显微分析的结果来确定 ABO 类型。进一步用来分析血液的方法包括 (a) 血液样品与抗-A 和抗-B 抗体反应；(b) 血液样品与带有 A 抗原的试剂红血细胞和带有 B 抗原的试剂红血细胞反应；(c) 样品进行目测分析；和 (d) 分析目测分析的结果来确定 ABO 类型。(b)

步骤中的试剂红血细胞可以被染色。所述方法可通过柱凝集技术来进行并且结果可通过自动读取器如 Ortho AutoVue™ 系统自动读取器或 Ortho BioVue™ 读取器 2 而自动读取。

图 1 是同步正向和反向 ABO 血型测型的四色激光扫描血细胞计数分析的图示说明。

图 1A 表示抗-B FITC 和 A 标记的 RBC 与 A 型全血的正向 (X-轴) 和侧向 (Y-轴) 散射 (分别是绿色的最大象素和桔黄色的最大象素)。在凝集物区域中的侧向散射图中没有测到结果。而且, 在绿色相对于桔黄色的图中, 从侧向散射中也没有得到进行进一步分析的结果。

图 1B 表示抗-B FITC 和 A 标记的 RBC 与 B 型全血的正向 (X-轴) 和侧向 (Y-轴) 散射 (分别是绿色的最大象素和桔黄色的最大象素)。在凝集物区域中的侧向散射图中测到了结果。当在绿色相对于桔黄色的图中进一步分析了这些结果后, 我们确定存在试剂细胞 (桔黄色阳性) 的凝集物, 也存在试验 rbc (绿色阳性) 的凝集物。还测到了一些具有混合荧光 (混合的绿色和桔黄色) 的凝集物。

图 1C 表示抗-B FITC 和 A 标记的 RCB 与 AB 型全血的正向 (X-轴) 和侧向 (Y-轴) 散射 (分别是绿色的最大象素和桔黄色的最大象素)。在凝集物区域中的侧向散射图中测到了结果。当在绿色相对于桔黄色的图中进一步分析了这些结果后, 我们没有发现试剂细胞 (桔黄色阳性) 的凝集物, 但确定存在试验 rbc (绿色阳性) 的凝集物。还测到了一些具有混合荧光 (混合的绿色和桔黄色) 的凝集物。

图 1D 表示抗-B FITC 和 A 标记的 RCB 与 O 型全血的正向 (X-轴) 和侧向 (Y-轴) 散射 (分别是绿色的最大象素和桔黄色的最大象素)。在凝集物区域中的侧向散射图中测到了结果。当在绿色相对于桔黄色的图中进一步分析了这些结果后, 我们发现了试剂细胞 (桔黄色阳性) 的凝集物, 但没有发现试验 rbc (绿色阳性) 的凝集物。

图 2 是同步正向和反向测型试验的预测结果示意图。图 2A 表示标记了的 A 型试剂 RBCs 和标记抗-B 与 A 型全血的混合没有产生凝集反应。

图 2B 是标记了的 A 型试剂 RBCs 和标记抗-B 与 B 型全血的混合产生了 B RBCs 与抗-B (绿色) 和抗-A-A 型试剂细胞 (桔黄色) 的凝集物的示意图。

图 2C 是标记了的 A 型试剂 RBCs 和标记抗-B 与 AB 型全血的混合产生了 AB RBC-抗-B (绿色) 的凝集物的示意图。

图 2D 是标记了的 A 型试剂 RBCs 和标记抗-B 与 O 型全血的混合产生了抗-A 试剂细胞 (桔黄色) 的凝集物的示意图。

图 3 是绿色凝集物、桔黄色凝集物和混合的桔黄色/绿色凝集物的示意图, 其中每一种凝集物将在绿色相对于桔黄色的最大象素图谱上呈现不同的散射。

图 4 是桔黄色凝集物、绿色凝集物、和混合的桔黄色/绿色凝集物在绿色相对于桔黄色最大象素图谱上的相对位置的示意图。

图 5 是桔黄色凝集物、绿色凝集物、和混合的桔黄色/绿色凝集物在绿色相对于桔黄色最大象素散射图谱上的相对位置 (密度) 的示意图。

图 6 是 CAT 系统中 B 血清反向试验目测的示意图。标记了的试剂 A 和 B 细胞与 B 血清混合, 产生了褐色凝集物, 离心后, 发现该凝集物在 CAT 系统中的凝胶柱的顶部; 未反应的标记试剂 B 细胞则被发现在柱的底部。

根据本发明, 同步正向和反向 ABO 血型检测以不同的技术方案进行了描述。本发明可与柱凝聚试验 (CAT) 反应和以 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Rochester, New York 盒的形式生产和销售的、商标为 BIOVUE™ 的分离管一起使用。结果可以采用计算机化的图像系统 AutoVue™ 自动读取器, 或 BioVue™ 读取器 2 来测定, 两种系统如上所述。

本文公开的进行试验的其它方法是采用了试管、微板、载玻片和试验平板如 Vitros™ 载玻片方法。结果也可采用流式细胞仪如, CytoronAbsolute™ 或激光扫描血细胞计数器或上述列举的方法来测定。

一般用于反向测型试验的试剂 RBCs 在其表面上具有 A₁、A₂、B 或没有 ABO 抗原 (A₁ 型、A₂ 型、B 型、O 型)。这些细胞用于检测引起试剂 RBCs 的凝集反应的反应抗体。在正向型试验中, 单克隆抗-A 和抗-B 被用来检测在样品红细胞表面上的它们各自对应的抗原存在。

本发明也教导了同步测定其它血型抗原的存在, 包括, 例如, D、C、E、c、e、M、N、S、s、P₁、Le^a、Le^b、K、k、Js^a、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b、Lu^a、和 Lu^b、和其它多种血型抗原。本发明的方法能进行正向或反向型血型试验的荧光或视觉检测, 在一个优选的技术方案中, 能同步进行正向和反向血型试验。

荧光检测系统

在荧光检测的技术方案中, 试剂 RBCs、单克隆抗-A (从小鼠单克隆 IgM 纯化的) 或抗-B 抗体 (也是从小鼠单克隆 IgM 纯化的)、或所有三种, 被荧光染料标记, (1) 试剂 RBCs 与循环抗体的凝集物; 和 (2) 单克隆抗-A 或抗-B 抗体与 RBC 表面抗原的凝集物可通过使用 488 nm 的激光, 例如使用计算机细胞激光扫描血细胞计数器进行检测。或者, 抗血清不需进行荧光标记, 但可利用光散射进行检测。结果可进一步通过激光流式细胞仪, 例如使用 Ortho CytoronAbsolute™ 流式细胞仪进行检测。也可以使用荧光显微镜。

对于同步正向和反向型试验, 在有 A 型全血的情况下, 试验过程中使用了标记了的 B 型试剂 RBCs 和 FITC 标记了的抗-A。见图 1A 和 2A。见例 1。FITC-标记的抗-A 能够凝集全血样品中的 A 型红细胞而产生绿色的凝集物。全血的血浆中的抗-B 能够凝集桔黄色的标记的试剂 B 型 RBCs, 而产生桔黄色的凝集物。采用 B、AB 和 O 型全血也可进行类似的试验。见图 1B-D 和 2B-D。

基于绿色和/或桔黄色凝集物的出现, 可观察到与四种主要 ABO 血型的每一种相关的四种不同的反应模式。见表 1。因此, 在一种试验中, ABO 血型通过同步的正向和反向测型试验进行测定。相反, 在有 A、B、AB 或 O 型全血存在的情况下, 标记了的 A₁ 型试剂 RBCs 和 FITC 标记了的抗-B 混合在一起。再次观察到了基于出现的绿色和/或桔黄色凝集物的四种不同的凝集反应模式, 每一种模式对应于一种特定的 ABO 血型。因此为了测定和确定 ABO 血型需要进行两种试验。见表 1。一些具有混合荧光的凝集物 (混合的绿色和桔黄色) 被测定出来。见图 3-5。这些凝集物产自于未标记细胞的凝集物上或附近的标记的细胞的俘获/邻近或产生于标记的细胞的凝集物上或附近的标记抗体的俘获或邻近。混合的绿色/桔黄色凝集物的存在并不干扰结果的阐明。采用试验 2 产生的对应于每一种 ABO 血型的数据表如表 1 所示。

表 1
测定和确定 ABO 血型的反应模式

全血样品 类型	试验 1		试验 2	
	FITC 抗-A (绿色 凝集物)	桔黄色 试剂 B 细胞 (桔黄色 凝集物)	FITC 抗-B (绿色 凝集物)	桔黄色 试剂 A ₁ 细胞 (桔黄色 凝集物)
A	+	+	0	0
B	0	0	+	+
AB	+	0	+	0
O	0	+	0	+

表 1 中的结果是由计算机细胞激光扫描血细胞计数器测出的。然而，也设计了其它检测凝集物的方法，这些方法可以有标记的抗血清也可以没有标记的抗血清，包括但并不限于上述讨论的方法。尽管本文所述的各种试验可单独进行，或任意组合进行，但本发明优选的方法是同步进行正向和反向试验。

荧光染料用来标记试剂细胞（用于反向测定）和单克隆抗-A 和抗-B 的抗体（用于正向检测）。用于标记试剂细胞的优选的荧光标记包括 1, 1'-二十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吡啶羧花青-5, 5'-二磺酸 (DiIC₁₈(3)DS)。当用 488 nm 的兰氩激光激发时这种染料使得细胞发出桔黄色荧光。用于这一技术方案的其它荧光标记物包括活性染料（例如荧光素异硫氰酸酯 (FITC)）、亲脂性染料（例如步花青 540）、活性亲脂性染料（DiI 的氯甲基苯甲酰氨基和甲基苯甲酰氨基的衍生物、DiI 的磺化衍生物和 DiO 的磺化衍生物），与膜结构发生作用的染料，和结合了荧光染料的单克隆抗体，这些单克隆抗体与红细胞上的共同结构具有反应活性（例如抗-血型糖蛋白-PE 偶联物）。

标记单克隆抗体优选的荧光标记物包括荧光素异硫氰酸酯 (FITC)。当用 488 nm 的兰氩激光激发时，FITC 标记物使得结合了这种抗体的任何细胞发出绿色荧光。FITC 属于蛋白-活性的、可用 488 nm 的兰氩激光激发的低分子量荧光染料中的一员，其中任何一种这种染料可用于本发明单克隆抗体的标记。这类染料的另一个例子是 BODIPY，（分子探针，Eugene, OR），当用这种激光激

发时，其也能发出绿色荧光。其它潜在的有用荧光色素包括藻胆蛋白（例如，藻红素（PE）、藻胆蛋白的能量转化偶联物（例如，DuoChrome™(Becton Dickinson, San Jose, CA)、CY5™(Ortho-Clinical Diagnostic, Inc., Raritan, NJ)和其它)、和多甲藻素叶绿素蛋白（PerCP™(Becton Dickinson, San Jose, CA)）。前面的染料都采用 488 nm 的氩氦激光激发，但其它激发波长光源和发光染料的结合也是可行的。一些例子包括：采用紫外光激发的 Cascade 蓝和 7-氨基-4-甲基香豆素-3-乙酸（AMCA）；采用绿光激发的藻红素、活性吖啶羧花青（Cy3™）、和四甲基若丹明异硫氰酸酯（TRITC）；采用红光激发的别藻蓝蛋白（APC）、藻青素（PC）、和吖啶二羧花青（Cy5™）。

作为所述荧光检测系统的替换，不需要用荧光标记物（FITC）标记抗血清。凝集物的检测可以通过将光散射设置在适合于这种大小和类型粒子的位置上测定，如本技术领域的技术人员所知的。

反向试验条件

为了优化凝集反应的结果，首先要确定标记试剂 RBC 和标记单克隆抗体与全血的有效比例。因此凝集反应的结果被最大化并且不采用过量标记。确定合适的试验比例而降低了假阴性的概率，所以特异性得到了改进。

RBCs 的标记

对于使用 DiIC₁₈(3)-DS 标记试剂 RBC 的反向试验，试剂 RBCs 相对于全血的理想比例是根据试剂 RBCs 的这种比例特异凝集全血中的相应抗体的能力来确定的。尤其是，标记 A₁ 试剂 RBCs 被以不同的比例与 B 型全血混合。以 5%、10%和 40%的试剂 RBC 悬浮液进行试验来确定有效的试剂 RBC 浓度。采用了 2μM 的 DiI-DS 的溶液。通过 CytoronAbsolute™ 流式细胞仪分析标记的 RBCs，并且测了平均荧光值。大约 5%到大约 10%的 RBC 浓度是有效的，最优选地是大约 5%的 RBC 悬浮液，这是由于使用较低浓度的 RBCs，平均荧光值较亮。然而，可以使用能够提供充分可测荧光或高于背景的可测荧光物质数量的试剂 RBCs 的浓度，并且从实用的角度出发，浓度可高到不被禁止的浓度，例如试剂的体积。表 2 表示在所用 DiI-DS 的浓度下，通过对不同比例的试剂 RBCs 进行试验所获得的平均荧光值。

表 2

	平均荧光值
阴性对照	28
5% RBCs	75
10% RBCs	83
40% RBCs	45

DiI-DS 的浓度范围

在本发明的反向型试验中, 为了确定有效的 DiI-DS 浓度范围, 在 5% 的 RBC 悬浮液中测试了五种不同的 DiI-DS 的终浓度。使用 CytoronAbsolute™ 对这些细胞进行了分析。测量了平均荧光值和 %CV (变化系数)。从 5 微摩尔到 40 微摩尔的 DiI-DS 浓度试验结果为阳性, 或在这一技术方案中, 采用低于 20% 的百分 CV 能产生足够亮度信号的任何浓度都是可行的。由于采用最小的 CV 产生最亮的信号, 所以四十微摩尔的溶液是优选的。见表 3

表 3

	平均荧光值	%CV
40 μ M	186	7
20 μ M	169	10
10 μ M	138	17
5 μ M	119	20
2 μ M	65	35
阴性对照	28	52

反向测型-DiI 标记的 RBCs 和全血 (WB)

下一步是确定反应条件, 其中桔黄色的标记 A 型试剂 rbcS 在 B 型或 O 型全血中凝集, 但在 A 型或 AB 型全血中不凝集。相反地, 也确定出了标记 B 型试剂 RBCs 与 A 型或 O 型全血形成桔黄色的凝集物, 但与 B 型或 AB 型全血不形成凝集物。有色凝集物是通过在计算机细胞激光扫描血细胞计数器上在 488 nm 的蓝氩激光下的最大象素图谱上的桔黄色和绿色信号的相对位置进行测量的。

全血相对于标记的 RBCs 的比例是通过制备不同的混合物并采用标准的血库血清学技术进行测定的。结果既可采用肉眼测视也可采用显微测视。5% 的悬

浮液可用于全血试验。可观察到凝集反应；然而，我们发现 RBCs 混合物中的 RBCs 的浓度不足以给出稳定的凝集反应结果。见表 4。

表 4

5% A 型 DiI-DS	全血体积	A 型全血*	O 型全血
25 μ L	5 μ L	阴性	阳性
25 μ L	25 μ L	阴性	阳性
40 μ L	10 μ L	阴性	阳性

*阴性对照

5%标记的 RBC 悬浮液被浓缩到 40%并将其中的 5 μ L 加到 5 μ L 的全血中。结果很好，观察到了凝集反应，因此没有再进行其它比例的试验。

正向测型试验-FITC 标记的抗体和全血

同样地，对于使用标记的单克隆抗体的正向测型试验，基于标记的抗体的比例特异地凝集全血中对应的细胞抗原的能力，首先需要测定标记的抗体相对于全血的合适比例。尤其是，用 A 型全血滴定 FITC 标记的抗-A 来确定反应条件，该反应条件是：在 A 型或 AB 型的全血中形成绿色凝集物而在 B 型或 O 型全血中不形成凝集物。另外，再确定标记的抗-B 与 B 型或 AB 型全血形成绿色凝集物而不与 A 型或 O 型全血形成凝集物的反应条件。有色凝集物通过在计算机细胞激光扫描血细胞计数器上在 488 nm 的蓝氩激光下的最大象素图谱上的桔黄色和绿色信号的相对位置进行测量。

下一步确定的是荧光标记物相对于抗体的比例。标记的抗体部分是以 3 种不同的稀释度、以 50 μ L 的体积与全血进行试验。见表 5。

表 5

全血：体积/型	FITC 抗-A：体积/ DiI	反应级别
10 μ L 的 A 型	50 μ L 的 1: 10	2+**
10 μ L 的 A 型	50 μ L 的 1: 100	1+
10 μ L 的 O*型	50 μ L 的 1: 10	阴性
10 μ L 的 O*型	50 μ L 的 1: 100	阴性
5 μ L 的 A 型	50 μ L 的 1: 50	3+
5 μ L 的 A 型	50 μ L 的 1: 100	2+

*阴性对照

**如 AABB 技术手册所定义的级别系统，第 12 版；607 页。

采用 LSC, A 型 1:100 的稀释度给出了最好的结果, 因此被选出作进一步的试验。基于这些结果, 50 μ L 的 FITC: 抗体以 1:100 的稀释度和 5 μ L 的 DiI-DS 标记的 RBCs 作进一步的试验。然而, 所使用的标记物: 抗体的范围可以是能在背景 (在低端) 和前区 (在顶端) 上产生可测荧光的任何浓度。

目测系统

改变红细胞颜色的能力使得能够通过目测或分光光度测定法 (通过吸收或反射) 同时检测 2 个细胞群, 即, 不需要检测荧光。例如, 受氰化物或叠氮化物的作用, 红细胞由亮红色转化为褐色。然后从褐色凝集物可以目测出红色凝集物。虽然本技术方案中改变红细胞血红蛋白固有的颜色也是可行的, 但简单地将有色基附着到或结合到红细胞上能够检测到其光谱特性的变化。

在目测技术方案中, 通过柱凝集方法 (CAT) 来进行正向和反向试验, 例如, 通过采用 BioVue™ 盒。利用柱凝集试验装置, 如本文描述的通过使用填加了本发明的基质的圆柱形装置来进行正向血型测型分析。含有抗血清的单克隆抗体或多克隆抗体被分散在生理学上相容的缓冲液中, 然后加到微粒基质中来浸湿这些微粒基质, 并从基质向进口扩展以形成初始反应带。这种抗体的合适用量可由本技术领域的技术人员根据抗体的抗原亲和性和特异性、按常规方法进行优化。抗体被分散到缓冲液中, 该缓冲液中也可含有本领域已知的合适添加剂, 诸如高分子量的聚合物等, 来增强它们的活性和避免非特异性结合。

这些实例包括聚乙烯、葡聚糖、明胶、和聚乙二醇。也可加入低分子量聚合物来增加溶液的浓度。

在这一实例中, 如果加入相对 B 型血细胞的抗体, 病人样品中的 B 型血细胞将与抗体结合, 在基质顶部附近形成捕获的凝集细胞层。在这个实例中, A 型细胞不凝集并被离心到装置的底部。通常, 病人细胞中可能含有弱反应的突变体。遍布在柱基质中的较小的散射凝集物表示中等程度的反应, 而阴性反应是在基质柱的底部形成扣状体。图 6 表示采用柱凝集反应方法的反向试验, 其中试剂 A 和 B 细胞分别被标记。按照产品说明将样品血清输送到柱的顶部, 然后按照所述方法温育柱管并离心。试剂 A 型细胞与存在的抗 A 抗体发生凝集, 而试剂 B 细胞则流到柱底, 表明样品血清是 B 型。

试剂 RBC (Affirmgen® A₁ 和 B 型细胞, Ortho-Clinical Diagnostics, Raritan, NJ) 用 0.2% 浓度的叠氮钠 (NaN₃) 进行处理。NaN₃ 减

少血红蛋白中的铁离子，导致颜色由普通的红色变为深褐色或栗色。源于同一份 Affirmgen 的未经处理的细胞被用作对照。未处理的对照和处理的试验细胞分别与 BioVue™ 反向盒中的 B 型血清按照产品说明（10 μ L 3-5% 的红细胞和 40 μ L 血清；然后按照厂家说明在 BioVue 离心机中离心 5 分钟）进行实验。B 血清将凝集 A₁ 细胞但不凝集 B 细胞。除了未处理细胞是红色、处理过的细胞是褐色，未发现未处理的与处理的细胞的凝集物之间有其它的不同。参见本文中的实施例 2 和表 6。

通过所述目测系统对凝集反应结果进行的自动测定可利用本文描述的两系统 AutoVue™ 自动读取器计算机化图像系统或 BioVue™ 读取器 2 来完成。

如本文所公开的，如果需要肉眼观察凝集物，优选的是先采用适合于实现目测凝集反应的染料对附着在细胞上的任何无色细胞或无色颗粒进行染色。红血细胞的血红蛋白能自然提供这种合适的颜色，所以不需要染色。直接凝集反应实验可利用上述 ABO 红血细胞来完成，还可利用含有 D、C、E、c、e、M、N、S、s、P₁、Le^a、Le^b、K、k、Js^a、Fy^a、Fy^b、Jk^a、Jk^b、Lu^a、和 Lu^b 抗原等的血细胞。类似地，当血清用来检测对应于特殊抗原或含有抗原的细胞的抗体的存在时，它们可与已知抗原进行混合。如果未知血清含有对应于所提供的已知抗原的抗体时，当它们从基质中流动或流下时，将产生凝集反应物并被截留下来。而阴性血清将不发生反应，也没有凝集物被截留下来。

在血液血清学一文中详尽地阐明了本发明的方法的应用。然而，应当理解的是在本发明可行性范围内进行的同步正向和反向测型结合分析包括任何与粒子结合的结合配体，这种粒子在正向和反向试验中，由于配体与其结合底物结合的结果而进行反应。例如，通常采用从样品 RBC's 中分离出的血浆或血清进行的“抗体筛选试验”能够采用全血与本文公开的标记试剂红细胞来进行。另外，血清或血浆也可被使用，但通过混合 1 未标记试剂红细胞和 1 标记试剂红细胞使得抗体筛选或抗体鉴定所需进行的试验次数减少了 50%。尽管红细胞正向和反向测型系统已被进行了说明，但本技术领域的技术人员将会理解其它系统也能以这种方式进行优化。

下列实施例只是用来说明但不是对本发明保护范围的限制。

实施例 1

荧光检测技术方案

组 A-试剂制备

通过往 DiI-DS 的 1mg 小瓶中加入 1mL 的乙醇(Sigma, St Louis MO), 并充分混合来制备亲脂性的、荧光膜标记物、1, 1'-二十八烷基-3, 3, 3', 3'-四甲基吲哚羰花青-5, 5'-二磺酸 (DiI-DS) (Molecular Probes Inc., Eugene, OR) 的储存溶液, 浓度为 1mg/ mL。该储存溶液可在室温下避光保存多达 6 个月。

DiI-DS 的实验溶液通过用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS) (Sigma) 稀释储存溶液到 80 μ M 而制得。弃掉未使用的实验溶液。

组 B-红血细胞 (RBC) 的荧光标记

采用 Vacutainer 腺嘌呤柠檬酸盐葡萄糖 (ACD) 保存试管 (Becton-Dickinson, Franklin Lakes, NJ) 从血型是 A₁、B 和 O 的捐献者身上收集全血。RBCs 在大约 3000 X g 下离心分离 5 分钟并在 3 到 5mL 的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Gibco) 中洗涤两次, 并且每次洗涤后, 在大约 3000 X g 下离心分离 3 到 5 分钟。以 HBSS 作为稀释液来制备 A 型 5% 的 RBC 悬浮液。

等体积 (0.1 到 5mL) 的 5% 的 RBC 悬浮液和 DiI-DS 实验溶液在一支试管中进行混合并在 37°C 下温育 30 分钟, 避光保存。每十分钟手摇一次试管。标记的 RBCs 用 3 到 5 mL 的 PBS 洗涤三次, 在大约 3000 X g 下离心分离 5 分钟并重新悬浮在 HBSS 中成为 5% 的溶液。

通过装有免疫计数 II™ 软件的 CytoronAbsolute™ 流式细胞仪 (Ortho-Clinical Diagnostics, Inc., Raritan, NJ) 确定桔黄色荧光。

基于光散射参数, 对 RBCs 进行了门控, 并且测量到了与门控的 RBC 结合的荧光。并且在背景上的荧光的测量结果表明标记充分。用等体积的 PBS (0.1 到 5mL) 代替荧光标记物温育相同的 RBCs 作为阴性对照同时进行试验。

组 C-荧光素异硫氰酸酯 (FITC) 标记抗体

小鼠单克隆抗-A、克隆 MH04、和小鼠单克隆抗-B、克隆 NB10.5A5 是以组织培养形式从 Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. 生产装置中获得的。单克隆抗体被部分纯化并用标准方法进行了浓缩。

用 PH 值为 9.5 的碳酸盐缓冲液透析纯化了抗-A 和抗-B, 并按照标准方法用 FITC 进行标记。采用尺寸排阻层析将 FITC 标记的抗体从没有被 FITC 标记的抗体中分离出来。在 280nm 和 492nm 下测定各部分的吸收值。每一部分的 F/P (荧光素/蛋白) 摩尔比例采用下列公式计算:

$$F=A495/0.15$$

$$P=[A280-(A495 \times 0.32)]/1.2$$

$$F/P \text{ 比例}=(F/P) \times 2.39$$

具有最高的 F/P 比例的三个部分被用在本发明的荧光同步正向和反向试验的技术方案中。

抗-A 部分	F/P 比例	抗-B 部分	F/P 比例
3	20	3	36
4	26	4	20
5	32	5	12

组 D-全血 (WB) 中的同步正向/反向测型试验和试验阐明-激光扫描血细胞计数器 (LSC)

我们制备了以抗-B FITC 标记的抗体稀释的 DiI-DS A 型标记 RBCs。用 0.5mL 含有 2% 的小牛血清白蛋白和 1% 叠氮钠的 PBS 将抗体稀释到 1:100。九个体积的稀释抗体与一个体积的标记细胞相混合。在下列亚组 1 至 4 中, 55 μ L 的标记细胞/抗体混合物被加到 5 μ L 的全血中。用 Clay-Adams (Parsippany, NJ) 血清离心机以大约 3500rpm 的转速将试管离心 15 秒钟。RBCs 被轻轻重新悬浮起来。通过将 3 μ L 的反应混合物加到 7 μ L 的 PBS 中, 来制备载玻片, 然后盖上盖玻片。

采用 LSC (Compucyte, Cambridge, MA) 对载玻片进行分析。

亚组-1

采用本文组-D 的材料和方法, 对 A 型全血进行实验。由于 A 型全血不含对应于 A 红细胞的抗体, 所以与标记的试剂红细胞不形成凝集物。另外, 由于 A 型全血细胞不带有 B 抗原, 所以与抗-B FITC 不形成凝集物。图 1A 表示抗-B FITC 和 A 型标记的 RBCs 与 A 型全血的正向 (X-轴) 和侧向 (Y-轴) 散射 (分别是绿色最大象素和桔黄色最大象素)。如所示, 在凝集物区域的侧向散射图中没有检测到什么结果。而且, 从侧向散射图中没有得到用来在绿色相对于桔黄色的图上作进一步分析的结果。

亚组-2

采用本文组-D 的材料和方法, 对 B 型全血接着进行实验。由于 B 型全血含对应于 A 型红细胞的抗体, 所以能与标记的试剂红细胞形成凝集物。另外,

由于B型全血细胞表达B抗原,所以与抗-B FITC形成凝集物。图1B表示抗-B FITC和A型标记的RBCs与B型全血的正向(X-轴)和侧向(Y-轴)散射(分别是绿色最大象素和桔黄色最大象素)。凝集物区域的侧向散射图中检测到了结果。如所示,当在绿色相对于桔黄色的图上进一步分析这些结果时,我们确认既产生了试剂细胞的凝集物(桔黄色阳性),也产生了试验RBCs的凝集物(绿色阳性)。

亚组-3

采用本文组-D的材料和方法,对AB型全血接着进行实验。由于AB型全血不含对应于A红细胞的抗体,所以与标记的试剂红细胞不形成凝集物。然而,由于AB型全血细胞表达B抗原,所以与抗-B FITC形成凝集物。图1C表示抗-B FITC和A型标记的RBCs与AB型全血的正向(X-轴)和侧向(Y-轴)散射(分别是绿色最大象素和桔黄色最大象素)。凝集物区域的侧向散射图中检测到了结果。如所示,当在绿色相对于桔黄色的图上进一步分析这些结果时,我们没有观察到试剂细胞的凝集物(桔黄色阳性),但确认存在试验RBCs的凝集物(绿色阳性)。

亚组-4

最后,采用本文组-D的材料和方法,对O型全血进行实验。由于O型全血含对应于A型红细胞的抗体,所以与标记的试剂红细胞形成凝集物。然而,由于O型全血细胞不表达B抗原,所以与抗-B FITC不形成凝集物。图1D表示抗-B FITC和A型标记的RBCs与O型全血的正向(X-轴)和侧向(Y-轴)散射(分别是绿色最大象素和桔黄色最大象素)。凝集物区域的侧向散射图中检测到了结果。如所示,当在绿色相对于桔黄色的图上进一步分析这些结果时,我们观察到了试剂细胞的凝集物(桔黄色阳性),但没有观察到试验RBCs rbc的凝集物(绿色阳性)。

实施例2

目测技术方案

组A-有色红细胞的制备

A₁和B红细胞型的商品制剂(Affirmagen[®])是从Ortho-Clinical Diagnostics, Inc. (Raritan, NJ)购买的。从小瓶中取出A₁型RBCs的两个1mL等份试样,并放入分开的试管中。其中一个等份的试样与20 μ L的10%的叠氮

钠混合 (Mallinckrodt, Paris, KY)。另一个等份试样不进行处理并用作对照。将每支试管盖好并在室温下温育 16 小时。经过夜处理后, 叠氮钠处理的 RBC 呈褐色, 而未经处理的对照细胞仍保持红色。

组 B-反向 BioVue 柱试验-双柱试验

在标准 BioVue™ 反向盒中采用一只柱中加入 10 μ L 的 A1 型细胞和 40 μ L 的 B 型血清和另一只柱中加入 10 μ L 的 B 型细胞和 40 μ L 的 B 型血清(表 6 中的柱 3 和柱 4)对叠氮钠处理的细胞进行试验。对照细胞, 未经处理的 A1 型和 B 型细胞, 分别在柱 1 和柱 2 中进行试验。按照生产厂家的说明书进行离心后, 在珠柱的顶部观察到了凝集的 A1 细胞、未经处理的对照细胞(柱 1)和处理的试验细胞(柱 3), 这表明 B 型血清中存在着抗-A。在柱的底部观察到了未凝集的 B 细胞、未经处理的对照细胞(柱 2)和处理的试验细胞(柱 4), 这表明没有抗-B。未经处理的对照细胞呈红色而经处理的试验细胞呈褐色。这些结果表明对 A1 型和 B 型细胞进行处理并不降低它们在珠柱中的凝集能力。

组 C-反向 BioVue 柱试验-单柱试验

在实施例 2 的组 B 中, A1 型和 B 型细胞分别在单独的柱中进行试验来确定样品的反向型。接下来, 在一只柱中将 10 μ L 的未经处理的 A1 型细胞(红)和 10 μ L 的经处理的 B 型细胞(褐色)与 40 μ L 的 B 型血清进行混合。离心后, 观察到两种不同的细胞群。在珠柱的顶部观察到了凝集的(A1)细胞和在柱(表 6 中的柱 5)的底部观察到了未凝集的褐色(B)细胞。结果表明 1 个柱(1 个试验)可代替正常的 2 个柱来测定正确的反向血型。另外, 按照此组 B 对经处理的 10 μ L A1 型细胞和未经处理的 10 μ L B 型细胞进行试验并且所得结果能检测出凝集的褐色(A1)细胞和未凝集的红(B)细胞(表 6 中的柱 6)。

由组 B 和 C 得到的结果如表 6 所示。见图 6。

表 6
2 个不同的细胞群的目测和鉴别
BioVue 反向柱标号

	1	2	3	4	5	6
RBC(每种 10 μ L)	A ₁ 未处理	B 未处理	A ₁ 处理	B 处理	A ₁ 未处理 + B 处理	A ₁ 处理 + B 未处理
离心后观察到的反应	4+	0	4+	0	3 - 4 + 混合的	3 - 4 + 混合的
描述	珠柱 顶部 的红 细胞	珠柱 底部 的红 细胞	珠柱 顶部 的褐色 细胞	珠柱 底部 的褐色 细胞	珠柱 顶部 的红 细胞和 底部 的褐色 细胞 柱中 没有 细胞 散射	珠柱 顶部 的褐色 细胞和 底部 的红 细胞 柱中 没有 细胞 散射

注释: 所有的柱含有 40 μ L 的 B 血清和所示的红细胞。

Untr, 未经处理对照细胞

Tr, NaN₃ 处理的细胞

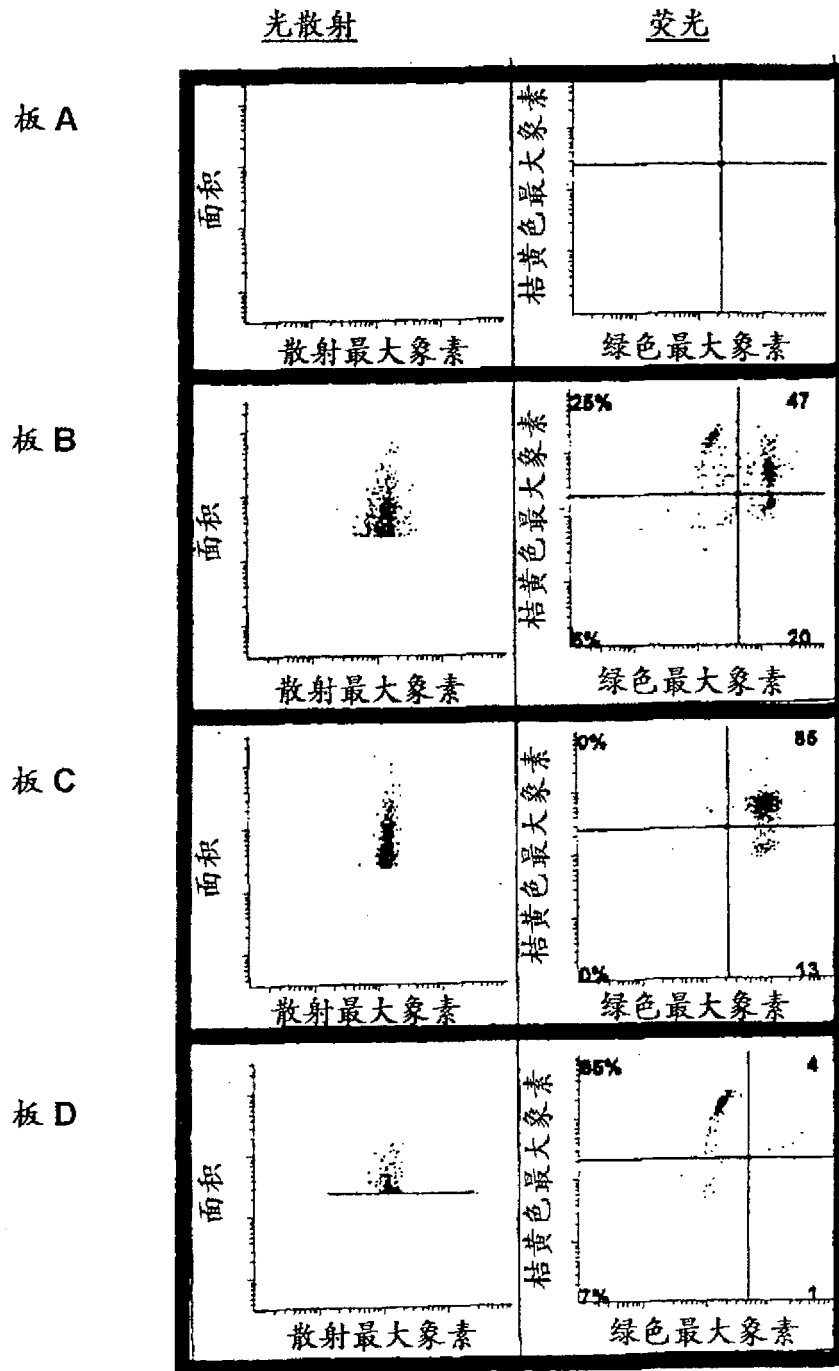
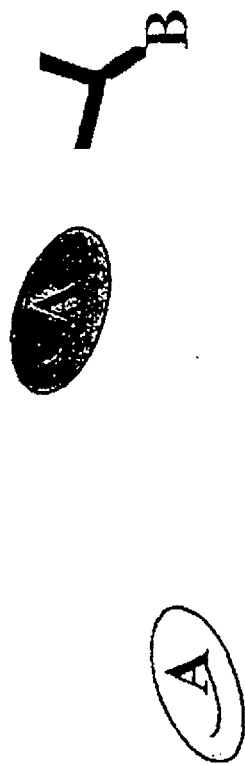


图 1

A型全血

标记的试剂抗体和细胞



没有凝集反应

图 2A

B型全血

标记的试剂抗体和细胞

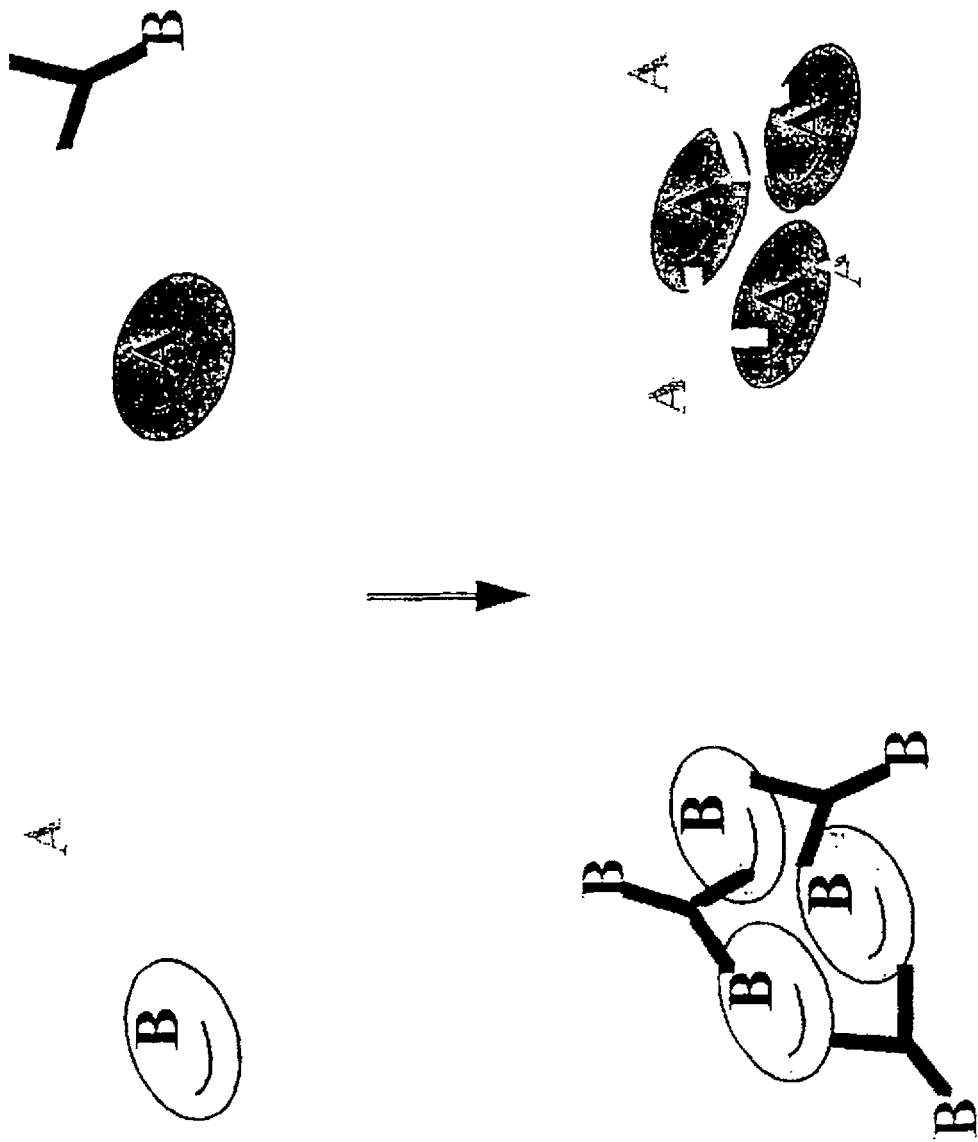


图 2B

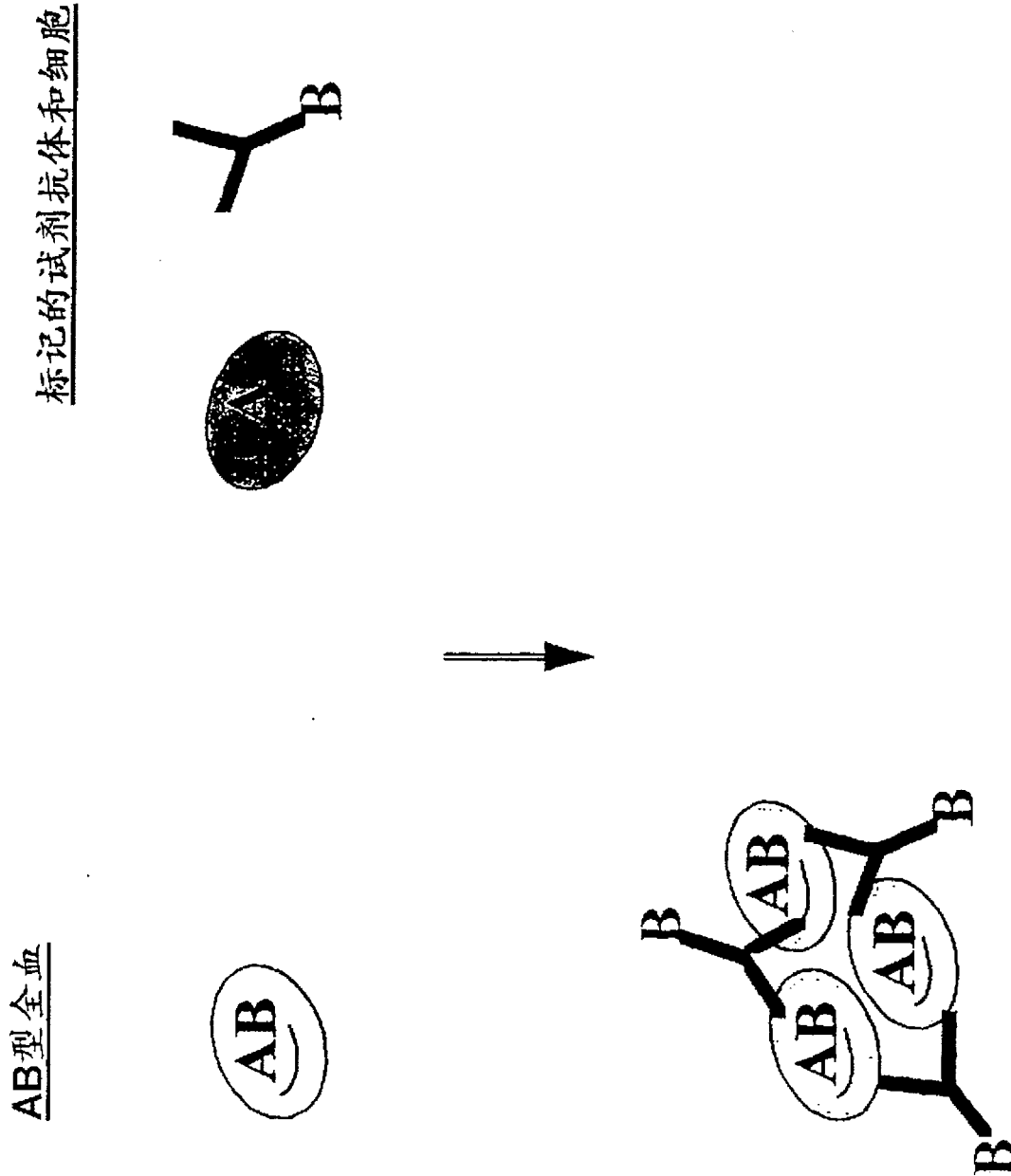


图 2C

标记的试剂抗体和细胞

O型全血

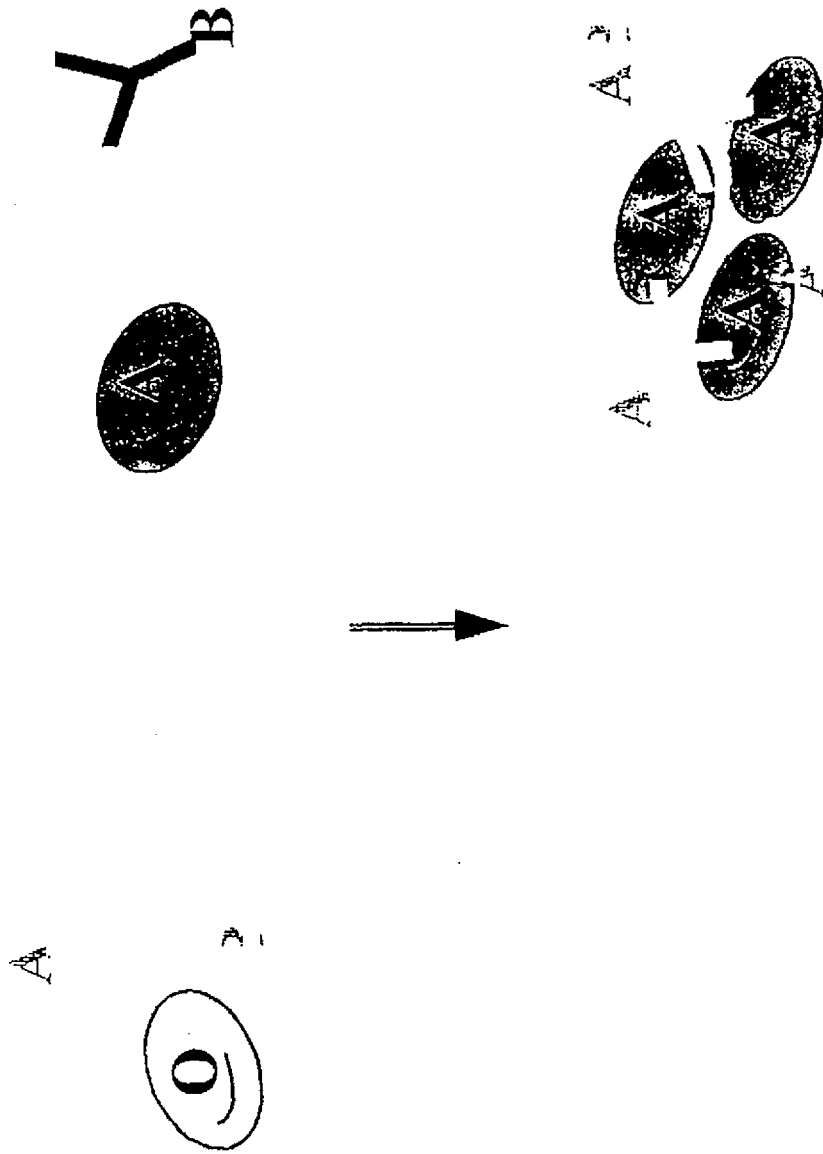


图 2D

混合的桔黄色/绿色凝集物

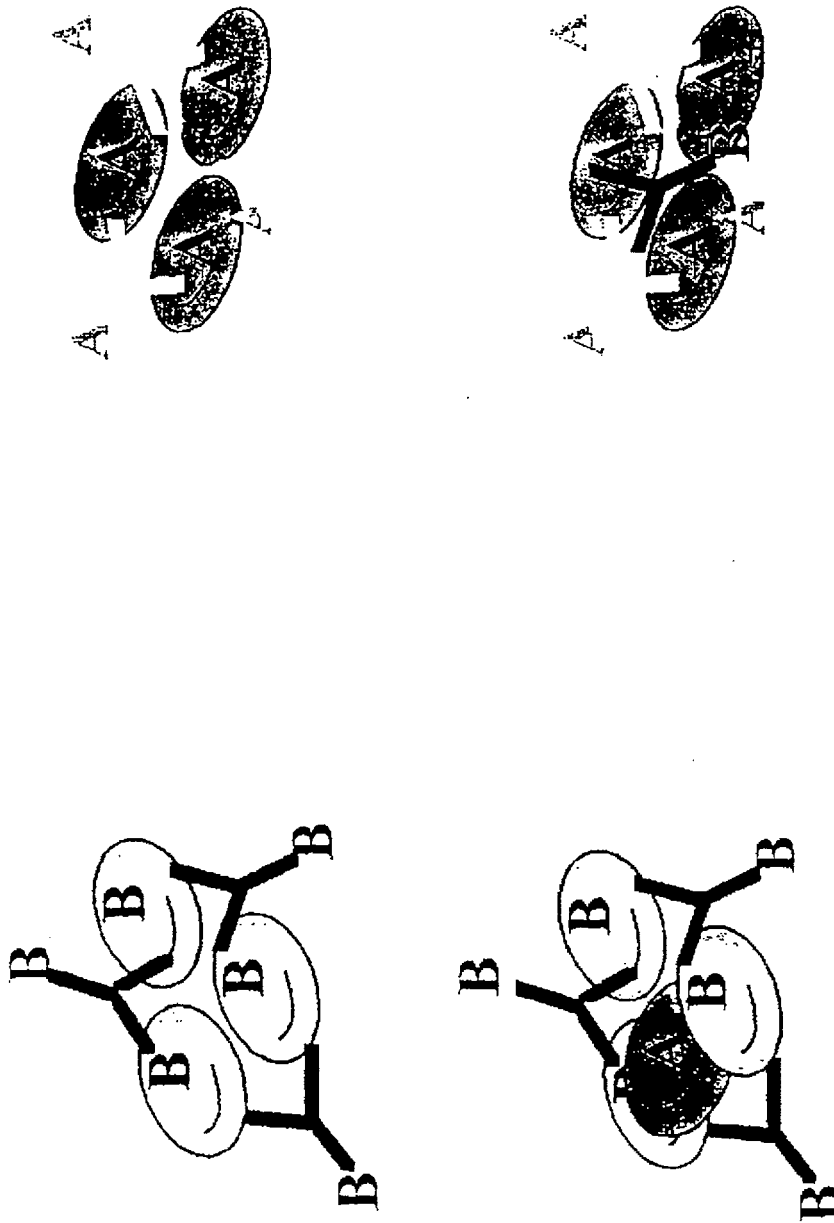


图 3

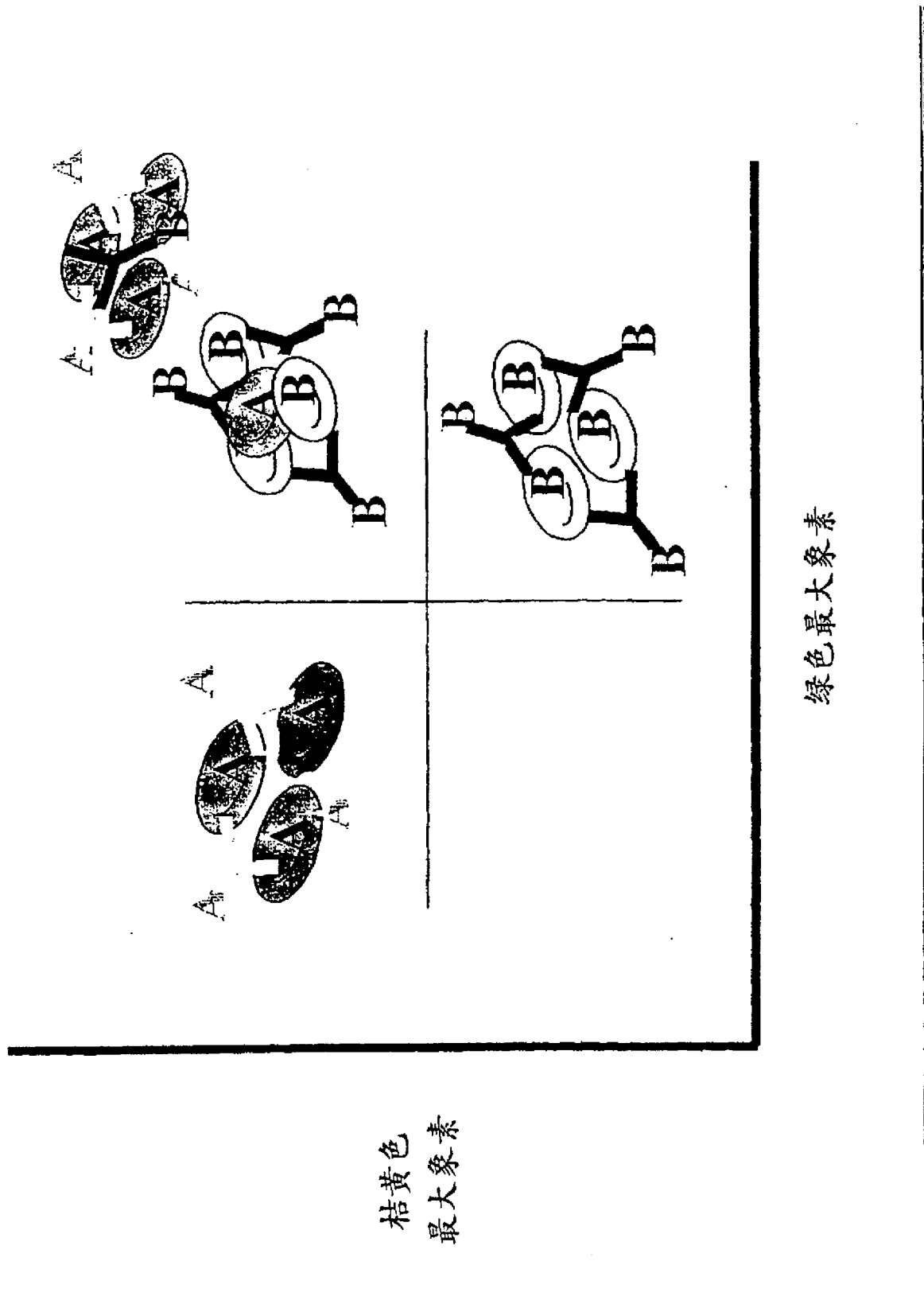


图 4

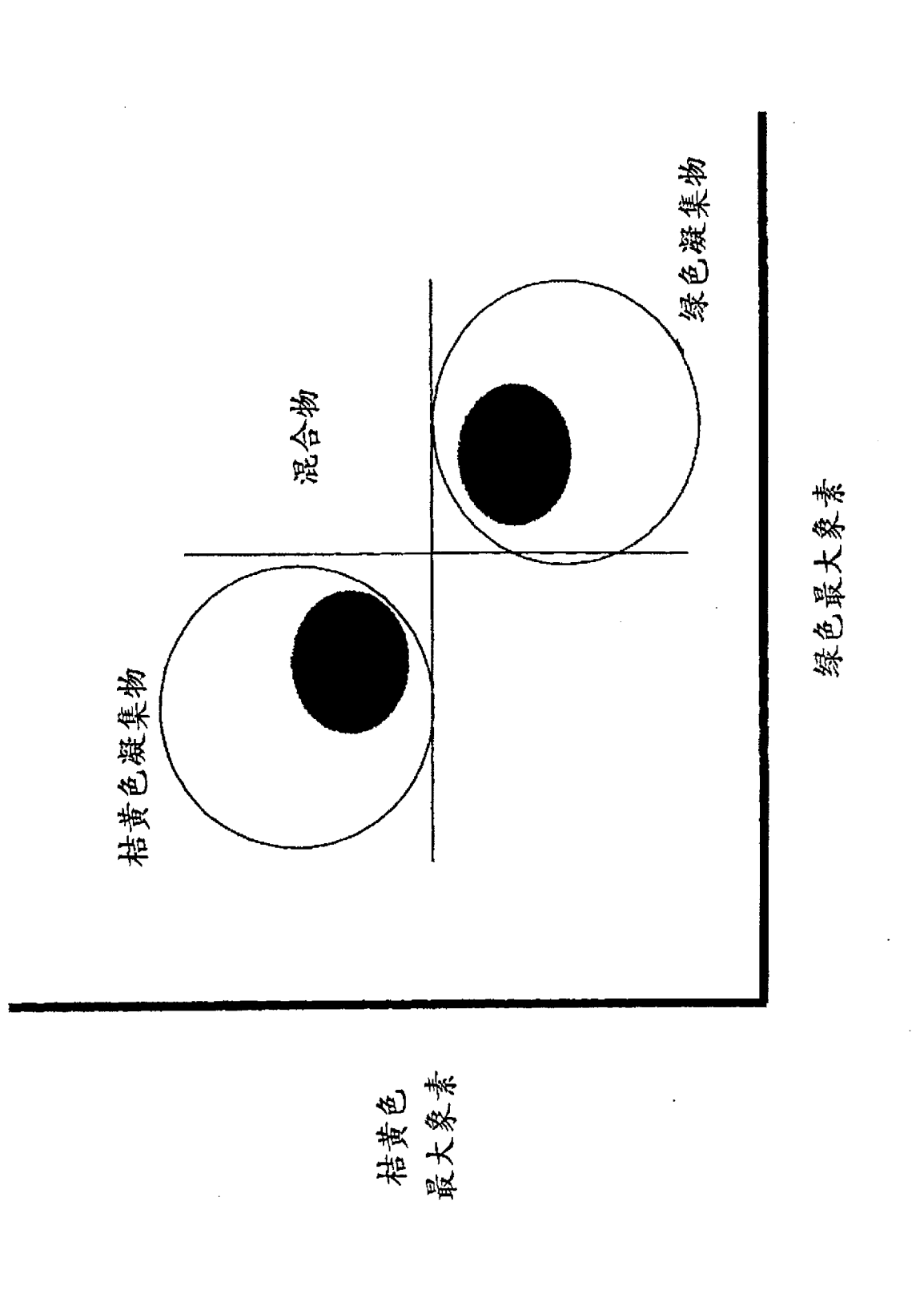


图 5

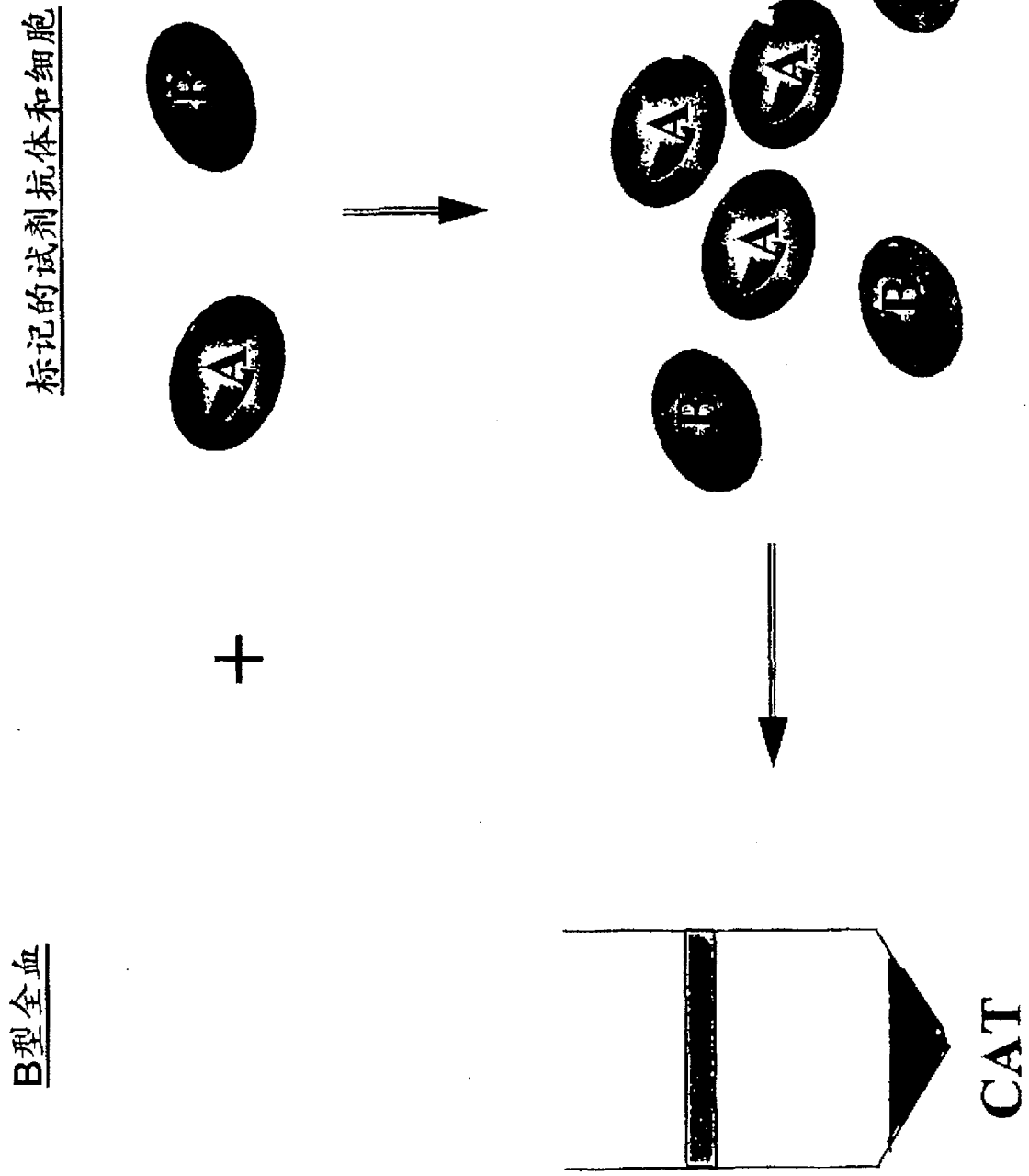


图6

专利名称(译)	正向和反向ABO血型的同步测定		
公开(公告)号	CN100507568C	公开(公告)日	2009-07-01
申请号	CN00118488.1	申请日	2000-06-08
[标]申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	奥索临床诊断有限公司		
[标]发明人	TJ默科利诺 KJ雷斯		
发明人	T·J·默科利诺 K·J·雷斯		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/53 G01N15/00 G01N21/64 G01N21/82 G01N33/49 G01N33/533 G01N33/536 G01N33/555 G01N33/567 G01N33/577 G01N33/58		
CPC分类号	Y10S436/807 Y10S435/973 G01N33/80 G01N33/582 Y10T436/25375		
审查员(译)	熊茜		
优先权	60/138136 1999-06-08 US		
其他公开文献	CN1276527A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了使用目测系统和基于荧光标记和检测系统的同步正向和反向血型试验。正向和反向试验可以分别进行，但A型和B型凝集物可被同时检测和鉴别。