



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 106483303 A

(43) 申请公布日 2017. 03. 08

(21) 申请号 201510524574. 3

(22) 申请日 2015. 08. 24

(71) 申请人 北京中检安泰诊断科技有限公司
地址 100024 北京市朝阳区双桥路 559 号

(72) 发明人 李海波 周晟 刘昊

(74) 专利代理机构 北京风雅颂专利代理有限公司
11403

代理人 王安娜 李翔

(51) Int. Cl.

G01N 33/80(2006. 01)

G01N 33/531(2006. 01)

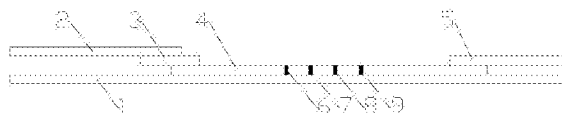
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

人类血型检测试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种人类血型检测试剂盒,包括检测条,该检测条包括金结合物垫和反应膜,金结合物垫包被有胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体和胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体;反应膜包括包被有鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的 B 抗原检测线、包被有鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的 A 抗原检测线、包被有鼠抗人 D 抗原单克隆抗体的 Rh 检测线和包被有羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线。本发明还提供了该试剂盒的制备方法包括反应膜的制备、金结合物垫的制备及切割装配等步骤。该人类血型检测试剂盒,可同时检测 ABO 及 Rh 血型,检测结果直观,并可用于检测溶血样本,具有高灵敏度、特异性与稳定性。



1. 一种人类血型检测试剂盒,其特征在于,包括检测条,所述检测条包括金结合物垫和反应膜,所述金结合物垫包被有胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体和胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体;所述反应膜包括包被有鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的 B 抗原检测线、包被有鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的 A 抗原检测线、包被有鼠抗人 D 抗原单克隆抗体的 Rh 检测线和包被有羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线。

2. 根据权利要求 1 所述的人类血型检测试剂盒,其特征在于,所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0-5.0mg/mL,所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0-5.0mg/mL,所述鼠抗人 D 抗原单克隆抗体浓度为 1.0-10.0mg/mL。

3. 根据权利要求 1 所述的人类血型检测试剂盒,其特征在于,所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 4.0-10.0mg/mL。

4. 根据权利要求 1 所述的人类血型检测试剂盒,其特征在于,还包括样本稀释液,该样本稀释液为磷酸盐缓冲液。

5. 根据权利要求 1 至 4 任意一项所述的人类血型检测试剂盒,其特征在于,所述检测条放置于长方形塑料盒中,构成检测卡,该检测卡上设有样品孔和检测孔,所述样品孔与所述检测条的所述样品垫位置对应,所述检测孔对应所述检测条的所述检测线和所述质控线。

6. 一种如权利要求 1 所述的人类血型检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

(1) 反应膜的制备:

稀释所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体和所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,并喷涂至所述反应膜上,分别形成所述 B 抗原检测线、A 抗原检测线、Rh 检测线与质控线,干燥备用;

(2) 金结合物垫的制备:

将所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体分别与胶体金进行偶联制得胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体溶液,均调整浓度,并混合为混合液,该混合液浸泡所述金结合物垫,铺金,干燥备用;

(3) 切割装配:将所述反应膜、金结合物垫、粗纤维滤纸、样品垫装配至所述反应板,切割后形成所述检测条。

7. 根据权利要求 6 所述的人类血型检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体和鼠抗人 B 抗原单克隆抗体分别通过以下步骤制备获得:

(1) 取正常人的红细胞,洗涤、离心后取上清;

(2) 悬液免疫 BALB/C 小鼠,取脾脏,获得脾淋巴细胞悬液备用;

(3) 骨髓瘤细胞与脾淋巴细胞通过聚乙二醇融合;

(4) 选择培养基初步筛选、抗原特异性筛选及有限稀释、克隆化。

8. 根据权利要求 6 或 7 所述的人类血型检测试剂盒的制备方法,其特征在于,所述胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的制备包括以下步骤:

(1) 使用碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 8.0-9.0;

- (2) 加入单克隆抗体,搅拌;
- (3) 加入 10%牛血清白蛋白溶液,搅拌;
- (4) 离心,弃去上清液;
- (5) 加入胶体金结合物稀释液,即得。

9. 根据权利要求8所述的人类血型检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(1)中使用碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 8.5。

10. 根据权利要求6所述的人类血型检测试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤(2)中所述胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体溶液,均调整浓度至 6-10 $\mu\text{g/mL}$,混合为混合液。

人类血型检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,特别是指一种人类血型检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 血型是指血液成分(包括红细胞、白细胞、血小板及血浆蛋白)表面的抗原类型。通常所说的血型是指红细胞膜上特异性抗原类型,而与临床关系最密切,人们所熟知的是红细胞 ABO 血型系统及 Rh 血型系统。

[0003] 早期 ABO 血型及 Rh 血型实验室检测方法主要有血凝试验、微柱凝胶试验,上述方法已广泛应用于临床血型鉴定以及输血科交叉配血等。近年建立了如流式细胞技术、酶联免疫吸附试验、胶体金凝集技术等实验室检测方法。其中,血凝试验是指抗体和红细胞在液体介质中发生肉眼可见的凝集反应,主要分为玻片法、试管法、全自动微板法。微柱凝胶试验采用凝胶技术进行抗球蛋白试验,该方法可提高试验的灵敏度及特异性。目前微柱凝胶试验在国外输血领域已逐渐作为常规应用于 ABO 及 Rh 血型定型,未知血型抗体筛查以及直接抗球蛋白试验。

[0004] 然而,现有技术中血凝试验、微柱凝胶试验、胶体金凝集技术均为反定性产品,检测结果需要进行反向推断才能判定结果,且操作较为繁琐,检测过程受认为因素干扰较多。同时,流式细胞术、酶联免疫检测,需要有专业人员进行操作,并且需要特殊设备进行判读。此外,上述传统方法使用的血液样本不能出现溶血,溶血样本会干扰检测结果,导致错误判读。

发明内容

[0005] 有鉴于此,本发明的目的在于提出一种人类血型检测试剂盒,可同时检测 ABO 及 Rh 血型,检测结果直观,并可用于检测溶血样本,具有高灵敏性、特异性与稳定性。

[0006] 基于上述目的本发明提供的人类血型检测试剂盒包括检测条,所述检测条包括金结合物垫和反应膜,所述金结合物垫包被有胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体和胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体;所述反应膜包括包被有鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的 B 抗原检测线、包被有鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的 A 抗原检测线、包被有鼠抗人 D 抗原单克隆抗体的 Rh 检测线和包被有羊抗鼠 IgG 多克隆抗体的质控线。

[0007] 可选的,所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0-5.0mg/mL,所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0-5.0mg/mL,所述鼠抗人 D 抗原单克隆抗体浓度为 1.0-10.0mg/mL。

[0008] 可选的,所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 4.0-10.0mg/mL。

[0009] 可选的,还包括样本稀释液,该样本稀释液为磷酸盐缓冲液。

[0010] 较佳的,所述检测条放置于长方形塑料盒中,构成检测卡,该检测卡上设有样品孔和检测孔,所述样品孔与所述检测条的所述样品垫位置对应,所述检测孔对应所述检测条的所述检测线和所述质控线。

[0011] 基于相同的发明构思,本发明还提供了上述人类血型检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0012] (1) 反应膜的制备:

[0013] 稀释所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体和所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体,并喷涂至所述反应膜上,分别形成所述 B 抗原检测线、A 抗原检测线、Rh 检测线与质控线,干燥备用;

[0014] (2) 金结合物垫的制备:

[0015] 将所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体分别与胶体金进行偶联制得胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体溶液,均调整浓度,并混合为混合液,该混合液浸泡所述金结合物垫,铺金,干燥备用;

[0016] (3) 切割装配:将所述反应膜、金结合物垫、粗纤维滤纸、样品垫装配至所述反应板,切割后形成所述检测条。

[0017] 可选的,所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体和鼠抗人 B 抗原单克隆抗体分别通过以下步骤制备获得:

[0018] (1) 取正常人的红细胞,洗涤、离心后取上清;

[0019] (2) 悬液免疫 BALB/C 小鼠,取脾脏,获得脾淋巴细胞悬液备用;

[0020] (3) 骨髓瘤细胞与脾淋巴细胞通过聚乙二醇融合;

[0021] (4) 选择培养基初步筛选、抗原特异性筛选及有限稀释、克隆化。

[0022] 可选的,所述胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的制备包括以下步骤:

[0023] (1) 使用碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 8.0-9.0;

[0024] (2) 加入单克隆抗体,搅拌;

[0025] (3) 加入 10% 牛血清白蛋白溶液,搅拌;

[0026] (4) 离心,弃去上清液;

[0027] (5) 加入胶体金结合物稀释液,即得。

[0028] 较佳的,使用碳酸钾溶液调节胶体金 pH 值至 8.5。

[0029] 可选的,所述胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体溶液,均调整浓度至 6-10 $\mu\text{g/mL}$,混合为混合液。

[0030] 从上面所述可以看出,本发明提供的人类血型检测试剂盒具有快速、简便、不需特殊设备,适用广泛,特异性好,灵敏度高。可同时检测 ABO 和 Rh 血型。整个操作时间仅需 3-5 分钟,检测结果直观,适用于临床检测、现场调查等。并且,本发明可对溶血样本进行检测,溶血样本与未溶血样本检测结果无明显差异,有效控制临床应用过程中因溶血造成的错误判读,避免患者后期诊疗过程中输入错误血型的高危风险。

附图说明

[0031] 图 1 为本发明实施例人类血型检测试剂盒中检测条的结构示意图;

[0032] 图 2 为本发明实施例人类血型检测试剂盒中检测卡的结构示意图。

具体实施方式

[0033] 为使本发明的目的、技术方案和优点更加清楚明白，以下结合具体实施例，并参照附图，对本发明进一步详细说明。

[0034] 实施例 1：人类血型检测试剂盒

[0035] 在本实施例中，所述人类血型检测试剂盒，包括检测条或检测卡、样本稀释液。图 1 为本发明实施例人类血型检测试剂盒中检测条的结构示意图，如图 1 所示，所述检测条包括反应板 1，以及粘附于所述反应板上 1 的样品垫 2、金结合物垫 3、反应膜 4、粗纤维滤纸 5。在本实施例中，所述金结合物垫 3 包被有胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体和胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体。

[0036] 在本实施例中，所述反应膜 4 为硝酸纤维素膜，包括 B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7，Rh 检测线 8、质控线 9。B 抗原检测线 6 包被有鼠抗人 B 抗原单克隆抗体，A 抗原检测线 7 包被有鼠抗人 A 抗原单克隆抗体，Rh 检测线 8 包被有鼠抗人 D 抗原单克隆抗体。

[0037] 在本实施例中，所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0–5.0mg/mL。较佳地，所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体浓度为 1.5mg/mL。该鼠抗人 A 抗原单克隆抗体是无色澄清透明溶液；用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定，上样量为 10 μ L 时，该鼠抗人 A 抗原单克隆抗体显示为重链和轻链各一条带。

[0038] 在本实施例中，所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的浓度为 1.0–5.0mg/mL。较佳地，所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体浓度为 1.5mg/mL。鼠抗人 B 抗原单克隆抗体是无色澄清透明溶液，用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定，上样量为 10 μ L 时，该鼠抗人 B 抗原单克隆抗体显示为重链和轻链各一条带。

[0039] 在本实施例中，所述鼠抗人 D 抗原单克隆抗体浓度为 1.0–10.0mg/mL。较佳地，所述鼠抗人 D 抗原单克隆抗体浓度为 1.5mg/mL。该鼠抗人 D 抗原单克隆抗体是无色澄清透明溶液。用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 测定，上样量为 10 μ L 时，该抗体显示为重链和轻链各一条带。可选地，该单克隆抗体购自北京万域美澜科技有限公司。

[0040] 在本实施例中，所述质控线 9 包被有羊抗鼠 IgG 多克隆抗体。作为一个较佳的实施例，所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被前为无色透明液体，浓度为 4.0–10.0mg/mL。较佳地，所述羊抗鼠 IgG 多克隆抗体浓度为 4mg/mL。可选地，该单克隆抗体购自北京万域美澜科技有限公司。

[0041] 在本实施例中，所述样本稀释液为 20mM，pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液。

[0042] 图 2 为本发明实施例人类血型检测试剂盒中检测卡的结构示意图，如图 2 所示，作为一个可选的实施例，所述检测条放置于特定的长方形塑料盒中，构成所述检测卡，该检测卡上设有一样品孔 10 和检测孔 11。所述样品孔 10 用于滴加实验样品，与所述检测条的样品垫 2 位置对应；检测孔 11 对应检测条的 B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7、Rh 检测线 8 和质控线 9，通过检测孔 11 可以观察到所述反应膜 4 上 B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7、Rh 检测线 8 和质控线 9 的变化。

[0043] 实施例 2：人类血型检测试剂盒的制备方法

[0044] 在反应膜 4 上，利用鼠抗人 B 抗原单克隆抗体包被 B 抗原检测线 6，鼠抗人 A 抗原单克隆抗体包被 A 抗原检测线 7，鼠抗人 D 抗原单克隆抗体包被 Rh 检测线 8，重组幽门螺杆菌

菌抗原包被作为检测线 ;利用羊抗鼠 IgG 多克隆抗体包被质控线 9 ;标记胶体金的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、标记胶体金的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、标记胶体金的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体混合包被金结合物垫 3, 组装即得检测条。

[0045] (1) 反应膜的制备 :

[0046] 用包被稀释液分别将鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体稀释至最佳包被浓度 0.5-1.5mg/mL ;用包被稀释液将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体稀释至最佳包被浓度 1-3mg/mL ;用点膜机将 4 种包被液分别喷到反应膜 4 上, 喷点量为 0.1 μ L/mm, 分别形成所述 B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7、Rh 检测线 8 和质控线 9 ;将已包被的反应膜 4 于 37℃ 干燥 3 小时, 并于室温保存。

[0047] 较佳地, 用包被稀释液分别将鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体稀释至最佳包被浓度 1mg/mL ;用包被稀释液将羊抗鼠 IgG 多克隆抗体稀释至最佳包被浓度 2mg/mL。在该浓度时, 反应膜质控线和检测线显色效果较好, 且灵敏度, 特异性较好。

[0048] 所述包被稀释液为 0.05M 的磷酸盐缓冲液。所述包被稀释液为无色、澄清、透明液体且无悬浮物。将该缓冲液用纯化水两倍稀释, 用 PH 计测定 PH 值为 7.3-7.5。将该缓冲液用纯化水两倍稀释, 用电导率仪测定电导率为 9000-14000 μ S/cm。

[0049] 鼠抗人 A 抗原单克隆抗体和鼠抗人 B 抗原单克隆抗体通过以下步骤制备获得 :

[0050] 1) 取正常人的红细胞, 洗涤、离心后取上清 ;

[0051] 2) 悬液免疫 BALB/C 小鼠, 取脾脏, 获得脾淋巴细胞悬液备用 ;

[0052] 3) 骨髓瘤细胞与脾淋巴细胞通过聚乙二醇融合 ;

[0053] 4) 选择培养基初步筛选、抗原特异性筛选及有限稀释、克隆化。

[0054] 具体地, 所述鼠抗人 A 抗原单克隆抗体通过以下方法制备获得 :

[0055] 取正常人的 A 型红细胞, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次 1000r/min 离心 10min 取上清。将上清 (悬液) 用生理盐水稀释至 10% 的悬液免疫 BALB/C 小鼠 (腹腔注射 0.5mL/只) 共 3 次, 每次间隔 10 天, 最后一次注射 3 天后小鼠拉颈处死, 无菌取脾脏, 培养液洗一次, 脾脏研碎, 过不锈钢筛网。离心, 细胞用培养液洗 2 次。脾淋巴细胞悬液备用。

[0056] 取对数生长 SP2/0 骨髓瘤细胞离心, 用无血清培养液洗涤 2 次后用于融合。按 1:5 的比例混合脾淋巴细胞与骨髓瘤细胞, 用无血清不完全培养液洗 1 次, 离心 1000rpm, 10min ;弃上清, 吸净残留液体。在 90s 内于 37℃ 水浴中加入 0.2mL 50% 聚乙二醇 4000 (PEG4000), 37℃ 继续温育 90s, 然后 1000r/min 离心 6min, 用无血清 RPMI1640 培养基终止其反映, 然后离心 10min (1000r/min), 去上清, 加入 20% 1640-HAT 培养基 40mL, 混匀后加入 4 块 96 孔组织培养板中, 置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养, 10-15 天后, 用 A、B、O 三型红细胞检测培养孔上清的凝集情况, 筛选出对 A 型细胞凝集、对 B、O 型细胞不凝集的阳性孔, 然后用有限稀释法克隆化。

[0057] 腹腔注射 0.5mL 液体石蜡于 BALB/C 鼠, 1-2 周后腹腔注射杂交瘤细胞, 接种细胞 7-10 天后 (小鼠濒于死亡之前) 处死小鼠, 用无菌注射器抽提腹水。1000r/min 10min 离心后取上清进行冻存包藏。

[0058] 具体地, 所述鼠抗人 B 抗原单克隆抗体通过以下方法制备获得 :

[0059] 取正常人的 B 型红细胞, 用生理盐水洗涤 3 次, 每次 1000r/min 离心 10min 取上清。

将上清（悬液）用生理盐水稀释至 10% 的悬液免疫 BALB/C 小鼠（腹腔注射 0.5mI/ 只）共 3 次，每次间隔 10 天，最后一次注射 3 天后小鼠拉颈处死，无菌取脾脏，培养液洗一次，脾脏研碎，过不锈钢筛网。离心，细胞用培养液洗 2 次。脾淋巴细胞悬液备用。

[0060] 取对数生长 SP2/0 细胞离心，用无血清培养液洗涤 2 次后用于融合。按 1:5 的比例混合脾细胞与骨髓瘤细胞，用无血清不完全培养液洗 1 次，离心 1000rpm, 10min；弃上清，吸净残留液体。在 90s 内于 37℃ 水浴中加入 0.2mI 50% PEG4000, 37℃ 继续温育 90s, 然后 1000r/min 离心 6min, 用无血清 RPMI1640 培养基终止其反映，然后离心 10min (1000r/min)，去上清，加入 20% 1640-HAT 培养基 40mI, 混匀后加入 4 块 96 孔组织培养板中，置于 37℃, 5% CO₂ 培养箱中培养，10-15 天后，用 A、B、O 三型红细胞检测培养孔上清的凝集情况，筛选出对 B 型细胞凝集、对 A、O 型细胞不凝集的阳性孔，然后用有限稀释法克隆化。

[0061] 腔注射 0.5mI 液体石蜡于 BALB/C 鼠，1-2 周后腹腔注射杂交瘤细胞，接种细胞 7-10 天后（小鼠濒于死亡之前）处死小鼠，用无菌注射器抽提腹水。1000r/min 10min 离心后取上清进行冻存包藏。

[0062] (2) 金结合物垫的制备：

[0063] 分别将鼠抗人 B 抗原单克隆抗体、鼠抗人 A 抗原单克隆抗体、鼠抗人 D 抗原单克隆抗体与胶体金进行偶联制得胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体溶液、胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体溶液。将上述 3 种胶体金标记的单克隆抗体溶液分别按混合后最佳浓度 6-10 μ g/mL 调整并混合，以 1-3mL/ 条，浸泡所述金结合物垫，铺金，37℃ 干燥 3 小时，并于室温保存。

[0064] 较佳地，所述 3 种胶体金标记的单克隆抗体溶液分别按混合后最佳浓度 8 μ g/mL 调整并混合，以 1.5mL/ 条，浸泡所述金结合物垫，铺金。该浓度时试纸条的特异性和敏感性较好，灵敏度较高。

[0065] 在本实施例中，胶体金标记的鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的制备步骤如下：

[0066] 1) 用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.0-9.0；

[0067] 2) 加入 6-20 μ g/mL 鼠抗人 B 抗原单克隆抗体，搅拌 40 分钟；

[0068] 3) 再加入 10% 的牛血清白蛋白至终浓度为 1%，搅拌 15 分钟；

[0069] 4) 12000rpm/min, 4℃ 离心 15 分钟，小心弃去上清液；

[0070] 5) 加入原体积（原体积以胶体金体积计算）的 1/2 体积的胶体金结合物稀释液。

[0071] 较佳地，步骤 1) 中用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.5。该 PH 值试纸条效果较好，稳定性好。

[0072] 较佳地，步骤 2) 中，加入 10 μ g/mL 鼠抗人 B 抗原单克隆抗体。该浓度时胶体金与鼠抗人 B 抗原单克隆抗体结合充分，且稳定，原料利用率高，制备出的试纸条稳定、效果佳。

[0073] 在本实施例中，胶体金标记的鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的制备步骤如下：

[0074] 1) 用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.0-9.0；

[0075] 2) 加入 6-20 μ g/mL 鼠抗人 A 抗原单克隆抗体，搅拌 40 分钟；

[0076] 3) 再加入 10% 的牛血清白蛋白至终浓度为 1%，搅拌 15 分钟；

[0077] 4) 12000rpm/min, 4℃ 离心 15 分钟，小心弃去上清液；

[0078] 5) 加入原体积（原体积以胶体金体积计算）的 1/2 体积的胶体金结合物稀释液。

[0079] 较佳地，步骤 1) 中用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.5。该 PH 值试纸条效

果较好,稳定性好。

[0080] 较佳地,步骤 2) 中,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 鼠抗人 A 抗原单克隆抗体。该浓度时胶体金与鼠抗人 A 抗原单克隆抗体结合充分,且稳定,原料利用率高,制备出的试纸条稳定、效果佳。

[0081] 在本实施例中,胶体金标记的鼠抗人 D 抗原单克隆抗体的制备步骤如下:

[0082] 1) 用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.0-9.0;

[0083] 2) 加入 6-20 $\mu\text{g/mL}$ 鼠抗人 D 抗原单克隆抗体,搅拌 40 分钟;

[0084] 3) 再加入 10% 的牛血清白蛋白至终浓度为 1%,搅拌 15 分钟;

[0085] 4) 12000rpm/min, 4℃ 离心 15 分钟,小心弃去上清液;

[0086] 5) 加入原体积(原体积以胶体金体积计算)的 1/2 体积的胶体金结合物稀释液。

[0087] 较佳地,步骤 1) 中用 0.1M 碳酸钾溶液调节胶体金 PH 值至 8.5。该 PH 值试纸条效果较好,稳定性好。

[0088] 较佳地,步骤 2) 中,加入 10 $\mu\text{g/mL}$ 鼠抗人 D 抗原单克隆抗体。该浓度时胶体金与鼠抗人 D 抗原单克隆抗体结合充分,且稳定,原料利用率高,制备出的试纸条稳定、效果佳。

[0089] 以上所述胶体金结合物稀释液是将磷酸氢二钠 5.372g、磷酸二氢钠 0.78g、牛血清白蛋白 5g、氯化钠 8.5g、酪蛋白 0.5g 溶于 1L 去离子水中,混匀制备而成。

[0090] (3) 切割装配:在内包间内将反应膜、金结合物垫、粗纤维滤纸、样品垫装配成反应板,再用切割机切成 4mm 宽的检测条组装成成品。

[0091] 实施例 3:人类血型检测试剂盒的检测方法

[0092] 1. 检测前准备:检验前将试剂盒和样本恢复至室温。实验湿度应小于 60%,实验温度为 18-30℃。

[0093] 2. 样本准备:全血为指尖采血或者采用静脉采血。全血样本采集后不做保存,即采即用。

[0094] 3. 检测条检测方法

[0095] (1) 从原包装铝箔袋中取出检测条,平置于台面上;

[0096] (2) 取 20 μL 全血,加到检测条样品垫 2 处,再加样本稀释液 100 μL (约 2-3 滴);

[0097] (3) 3-5 分钟内判读结果,10 分钟后检验结果无效。

[0098] (4) 检测结果判定:

[0099] ABO 血型系统判定(B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7、质控线 9 有参照意义):

[0100] A 型血:质控线 9 和 A 抗原检测线 7 位置各出现一条红色条带。

[0101] B 型血:质控线 9 和 B 抗原检测线 6 位置各出现一条红色条带。

[0102] AB 型血:质控线 9、A 抗原检测线 7 和 B 抗原检测线 6 位置各出现一条红色条带。

[0103] O 型血:只在质控线 9 位置出现一条红色条带。

[0104] 无效:质控线 9 位置没有出现红色条带。

[0105] RhD 血型系统判定(Rh 检测线 8、质控线 9 有参照意义):

[0106] RhD 阳性血:质控线 9 和 Rh 检测线 8 位置各出现一条红色条带。

[0107] RhD 阴性血:只在质控线 9 位置出现一条红色条带。

[0108] 无效:质控线 9 位置没有出现红色条带

[0109] 4. 检测卡检测方法

[0110] (1) 从铝箔袋中取出检测卡,放在水平工作台面上平置,并做好样本标记;

- [0111] (2) 取 20 μL 全血样本,直接加入到加样孔 10 中,再加样本稀释液 100 μL (约 2-3 滴);
- [0112] (3) 3-5 分钟内判读结果,10 分钟后检验结果无效。
- [0113] (4) 检测结果判定:
- [0114] ABO 血型系统判定(B 抗原检测线 6、A 抗原检测线 7、质控线 9 有参照意义):
- [0115] A 型血:质控线 9 和 A 抗原检测线 7 位置各出现一条红色条带。
- [0116] B 型血:质控线 9 和 B 抗原检测线 6 位置各出现一条红色条带。
- [0117] AB 型血:质控线 9、A 抗原检测线 7 和 B 抗原检测线 6 位置各出现一条红色条带。
- [0118] O 型血:只在质控线 9 位置出现一条红色条带。
- [0119] 无效:质控线 9 位置没有出现红色条带。
- [0120] RhD 血型系统判定(Rh 检测线 8、质控线 9 有参照意义):
- [0121] RhD 阳性血:质控线 9 和 Rh 检测线 8 位置各出现一条红色条带。
- [0122] RhD 阴性血:只在质控线 9 位置出现一条红色条带。
- [0123] 无效:质控线 9 位置没有出现红色条带
- [0124] 实施例 4:人类血型检测试剂盒有效性验证
- [0125] 1. 阴性、阳性符合率检测:
- [0126] (1) 检测 10 份 A 型血液质控样本(Rh 型阳性),A 型及 Rh 型结果检测结果均为阳性,B 型为阴性。
- [0127] (2) 检测 10 份 B 型血液质控样本(Rh 型阳性),B 型及 Rh 型结果检测结果均为阳性,A 型为阴性。
- [0128] (3) 检测 10 份 AB 型血液质控样本(Rh 型阳性),A 型、B 型及 Rh 型结果检测结果均为阳性。
- [0129] (4) 检测 10 份 O 型血液质控样本(Rh 型阳性),A 型、B 型及 Rh 型结果均为阴性。
- [0130] (5) 检测 4 份 Rh 型阴性血液质控样本(A、B、AB、O 型各一支),Rh 型结果均为阴性。其中 A 型 Rh 型阴性血液质控样本 A 型检测结果为阳性,B 型为阴性;B 型 Rh 型阴性血液质控样本 B 型检测结果为阳性,A 型为阴性;AB 型 Rh 型阴性血液质控样本 A 型、B 型检测结果均为阳性;O 型 Rh 型阴性血液质控样本 A 型、B 型检测结果均为阴性。
- [0131] 2. 灵敏度检测:
- [0132] (1) A 型最低检出限质控样本检测,最低检出限样本原液,按 1:4 稀释后检测,A 型检测结果为阳性。
- [0133] (2) B 型最低检出限质控样本检测,最低检出限样本原液,按 1:4 稀释后检测,B 型检测结果为阳性。
- [0134] (3) Rh 型最低检出限质控样本检测,最低检出限样本原液,按 1:4 稀释后检测,Rh 型检测结果为阳性。
- [0135] 3. 精密性检测:
- [0136] 选择 AB 型及 Rh 型阳性的样本作为精密性质控样本检测,采用 10 个检测卡平行测定精密性质控样本,各检测卡相同血型检测线显色速度及强度一致,均一性无差别。
- [0137] 4. 特异性检测:
- [0138] 红细胞 A 型抗原、B 型抗原与 D 型抗原间无干扰。

[0139] 检测含内源性干扰物质和潜在交叉反应物质的样本,结果如下:

[0140] 高甘油三酯 ($<10\text{mmol/L}$) 的样本、高胆红素 ($<200\text{ }\mu\text{mol/L}$) 的样本、以及溶血样本不会对本发明造成干扰。

[0141] 抗核抗体、抗线粒体抗体,抗双链 DNA 抗体、乙型肝炎病毒表面抗原、丙型肝炎病毒、梅毒螺旋体、艾滋病毒、戊型肝炎病毒为阳性的样本不会对本发明造成干扰。

[0142] 5. 稳定性检测:

[0143] 在长期稳定性实验过程中, $4\sim 30^{\circ}\text{C}$ 干燥避光保存 14 月依然可以满足产品性能指标要求;加速稳定性实验过程中, 37°C 条件下, 16 天后检测结果依然可以满足产品性能指标要求。

[0144] 6. 溶血样本检测:采用溶血样本进行上述实验,依然符合上述结果。

[0145] 本发明提供的人类血型检测试剂盒具有以下优势,

[0146] (1) 同时检测 ABO 和 Rh 血型

[0147] 本发明提供的人类血型检测试剂盒的反应膜具有包被有鼠抗人 B 抗原单克隆抗体的 B 抗原检测线、包被有鼠抗人 A 抗原单克隆抗体的 A 抗原检测线和包被有鼠抗人 D 抗原单克隆抗体的 Rh 检测线,可同时对 ABO 和 Rh 血型定型。

[0148] (2) 检测结果直观

[0149] 本发明提供的人类血型检测试剂盒通过“双抗体夹心法”直接检测细胞表面 A 抗原、B 抗原、D 抗原,检测线变色即表明存在相应抗原,代表为该血型。避免了传统方法检测结果需要进行反向推断才能判定结果,且操作较为繁琐,检测过程受认为因素干扰较多等问题。

[0150] (3) 操作简便、快捷

[0151] 本发明提供的人类血型检测试剂盒操作快速、简便、不需特殊设备,准确和灵敏度高等特点,整个操作时间仅需 3-5 分钟。

[0152] (4) 可用于溶血样本的检测

[0153] 由于本发明提供的人类血型检测试剂盒直接检测细胞表面抗原,进而可进行溶血样本的检测,溶血样本与未溶血样本检测结果无明显差异,有效控制临床应用过程中因溶血造成的错误判读,避免患者后期诊疗过程中输入错误血型的高危风险。

[0154] 可见,本发明提供的人类血型检测试剂盒具有快速、简便、不需特殊设备,适用广泛,特异性好,灵敏度高。可同时检测 ABO 和 Rh 血型。整个操作时间仅需 3-5 分钟,检测结果直观,适用于临床检测、现场调查等。并且,本发明可对溶血样本进行检测,溶血样本与未溶血样本检测结果无明显差异,有效控制临床应用过程中因溶血造成的错误判读,避免患者后期诊疗过程中输入错误血型的高危风险。

[0155] 所属领域的普通技术人员应当理解:以上任何实施例的讨论仅为示例性的,并非旨在暗示本公开的范围(包括权利要求)被限于这些例子;在本发明的思路下,以上实施例或者不同实施例中的技术特征之间也可以进行组合,步骤可以以任意顺序实现,并存在如上所述的本发明的不同方面的许多其它变化,为了简明它们没有在细节中提供。因此,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何省略、修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

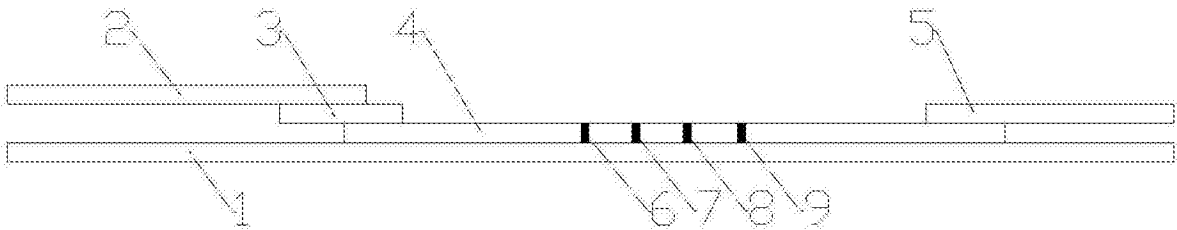


图 1

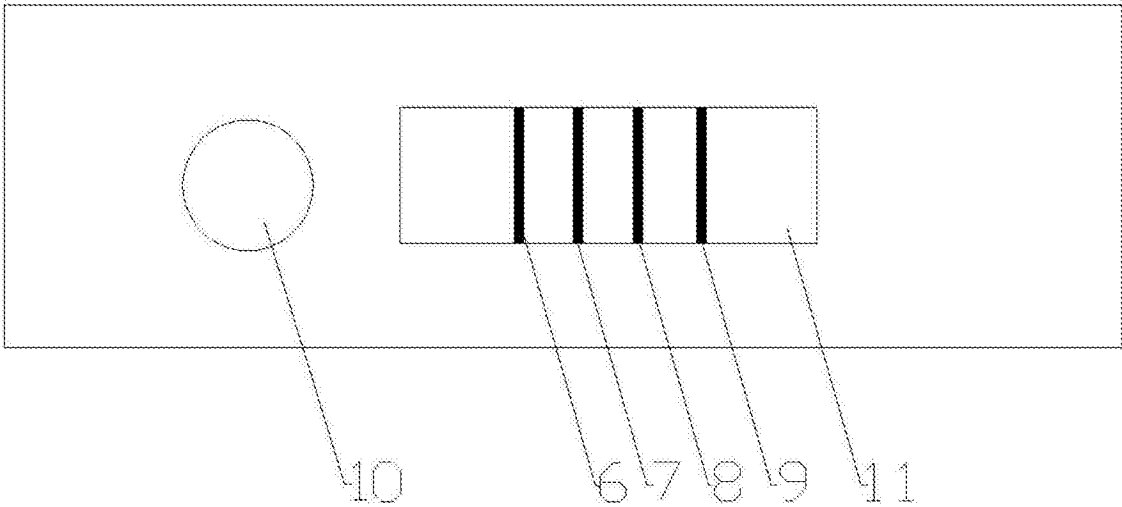


图 2

专利名称(译)	人类血型检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN106483303A	公开(公告)日	2017-03-08
申请号	CN201510524574.3	申请日	2015-08-24
[标]申请(专利权)人(译)	北京中检安泰诊断科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京中检安泰诊断科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京中检安泰诊断科技有限公司		
[标]发明人	李海波 周晟 刘昊		
发明人	李海波 周晟 刘昊		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/80 G01N33/531		
代理人(译)	王安娜 李翔		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人类血型检测试剂盒，包括检测条，该检测条包括金结合物垫和反应膜，金结合物垫包被有胶体金标记的鼠抗人A抗原单克隆抗体、胶体金标记的鼠抗人B抗原单克隆抗体和胶体金标记的鼠抗人D抗原单克隆抗体；反应膜包括包被有鼠抗人B抗原单克隆抗体的B抗原检测线、包被有鼠抗人A抗原单克隆抗体的A抗原检测线、包被有鼠抗人D抗原单克隆抗体的Rh检测线和包被有羊抗鼠IgG多克隆抗体的质控线。本发明还提供了该试剂盒的制备方法包括反应膜的制备、金结合物垫的制备及切割装配等步骤。该人类血型检测试剂盒，可同时检测ABO及Rh血型，检测结果直观，并可用于检测溶血样本，具有高灵敏性、特异性与稳定性。

