(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110174520 A
(43)申请公布日 2019.08.27

(21)申请号 201910302941.3

(22)申请日 2019.04.16

(71)申请人 骆宏
地址 510095 广东省广州市越秀区麓苑路31号广州血液中心输血研究所

(72)发明人 骆宏 罗广平

(74)专利代理机构 广州市南锋专利事务所有限公司 44228
代理人 刘嫣

(51)Int.Cl.
G01N 33/80(2006.01)
G01N 33/531(2006.01)
G01N 33/543(2006.01)

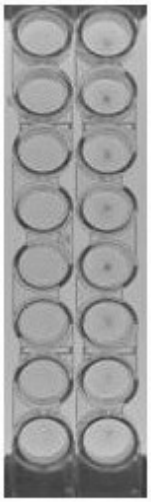
权利要求书2页 说明书10页 附图4页

(54)发明名称

一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法，属于试剂盒制备技术领域，试剂盒包括：(1)固相凝集反应微板；(2)低离子强度溶液；(3)指示系统；(4)阴性对照血清；(5)阳性对照血清；制备方法包括：(1)固相凝集反应微板的制备；(2)低离子强度溶液的制备；(3)指示系统的制备；(4)阴性对照血清制备；(5)阳性对照血清制备；通过创新性的利用单克隆抗体对红细胞的高特异性吸附、利用冷冻干燥保存技术、利用高灵敏度的二步法指示系统，切实解决目前新生儿溶血病检测方法中灵敏度低、红细胞难保存、易漏检抗体等难题，为临床一线检测工作提供一种高性价比的新生儿溶血病实验检测试剂盒。



① ②

CN 110174520 A

1.一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，其特征在于：该新生儿溶血病实验检测试剂盒，包括：

(1)固相凝集反应微板，所述的固相凝集反应微板由96孔U型底可拆卸式微板条组成，微板条的U型孔底内表面包被有高特异性的抗红细胞单克隆抗体，已筛选的合格A、B、O型红细胞通过单克隆抗体对红细胞的高特异性免疫反应，被均匀地包被在孔底内表面，经裂解后形成固定于U型孔底内表面的红细胞膜，在此基础上加入细胞膜冷冻保护液，经过冷冻干燥后制备的微板；

(2)低离子强度溶液，所述的低离子强度溶液包含甘氨酸和0.1％叠氮化钠；

(3)指示系统，所述的指示系统包括指示红细胞和抗人球蛋白试剂；

(4)阴性对照血清，是未含有不规则抗体且加入0.10％叠氮化钠的健康人血清；

(5)阳性对照血清，是包含有IgG抗-D且加入0.10％叠氮化钠的健康人血清。

2.根据权利要求1所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，所述的微板条U型孔底内表面已经包被抗红细胞单克隆抗体，其对A、B、O型红细胞的吸附作用具有高度特异性。

3.根据权利要求1所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，其特征在于：所述的红细胞膜是将包被于96孔U型底微板条的A、B、O型红细胞裂解后所得，其血型系统抗原包括：ABO血型抗原、Rh血型抗原、Kidd血型抗原、MNSs血型抗原、Duffy血型抗原、Luthran血型抗原、Lewis血型抗原、P血型抗原，用于包被的A、B、O型红细胞涵盖下列抗原：D、C、E、c、e、JK^a、JK^b、M、N、S、s、Fy^a、Fy^b、Lu^b、P1、Mur抗原。

4.根据权利要求1所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，其特征在于：所述的细胞膜冷冻保护液为8％的蔗糖溶液。

5.根据权利要求1所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，其特征在于：所述指示系统中的指示红细胞是指IgG抗-D致敏的O型RhD(+)红细胞悬液，浓度为0.2～0.6％。

6.根据权利要求1所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，其特征在于：所述指示系统中的抗人球蛋白试剂是指1:1～1:128倍稀释的羊抗人或者兔抗人IgG抗体。

7.一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒的制备方法，其特征在于：该方法包括以下步骤：

(1)固相凝集反应微板的制备；

(2)低离子强度溶液的制备；

(3)指示系统的制备；

(4)阴性对照血清的制备；

(5)阳性对照血清的制备；

具体步骤如下：

(1)筛选铺板用A、B、O型红细胞采用单克隆抗-A、抗-B、抗-D筛选出符合国家血液质量标准的A RhD(+)、B RhD(+)红细胞各3人份，各型别的3人份等量混合后洗涤6次，备用；O RhD(+)红细胞进行初筛后，要根据抗原互补原则进一步筛选特殊抗原，具体抗原谱见表1；筛选成功后，将3人份的O细胞等量混合洗涤6次，与前述筛选出A、B型红细胞共同组成铺板

用红细胞；

表1 铺板用O型红细胞抗原谱

	Rh					Kidd		Lutheran		Duffy		Kell		MNS					P	Diego
	D	C	c	E	e	Jk^a	Jk^b	Lu^a	Lu^b	Fy^a	Fy^b	K	k	M	N	S	s	Mur	P1	Di^a
O_1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+
O_2	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0
O_3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0

(2)固相凝集反应微板的制备空白微板材质为聚苯乙烯，作用是包被抗红细胞单克隆抗体、固定A、B、O型红细胞膜、容纳受检血浆、低离子液和指示系统，本身不参与化学反应，微板的条与条可拆卸；抗红细胞单克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释后，每孔中加入100μL，室温包被16小时，在此基础上，将上述(1)中的A、B、O型红细胞制备为0.1％浓度的悬液，每个微孔中加入100μL，离心5分钟后，洗涤5次，加入红细胞裂解液进行裂解；洗涤板条后，加入含8％蔗糖的冷冻保护液，50μL/孔，然后去掉孔中液体，并用吸水纸吸干残液，放入冷冻干燥机中冻干2小时，取出后装入铝箔袋中，加热密封即可；

(3)低离子强度溶液的制备

称取18克甘氨酸和1克叠氮钠用纯化水溶解后，定容至1L，再加入适量的溴甲酚紫溶液，直至溶液颜色由透明无色变为深紫色，调节溶液pH至6.8；

(4)指示系统的制备指示系统包括指示红细胞和兔或羊抗人球蛋白试剂，指示红细胞的制备过程如下：洗涤后制成压积的O型红细胞，加入等体积的IgG抗-D，37℃孵育50分钟，制得IgG抗-D致敏的红细胞，生理盐水洗涤5次后，用红细胞保存液保存，抗人球蛋白试剂的制备过程如下：将兔或羊抗人球蛋白试剂用抗体稀释液进行稀释，与致敏红细胞反应，以离心后显微镜下观察至不凝集管作为抗人球蛋白试剂的稀释倍数，该稀释倍数的抗人球试剂与已致敏的O型红细胞悬液构成本发明的指示系统；

(5)阴性对照血清的制备：筛选出与本发明所述的抗筛细胞均无凝集反应的人血清，加入叠氮化钠，终浓度为为0.10％；

(6)阳性对照血清制备：是指包含有IgG抗-D且加入0.10％叠氮化钠的人血清。

8.根据权利要求7所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒的制备方法，其特征在于：所述的微板的材质为聚苯乙烯。

9.根据权利要求7所述的一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒的制备方法，其特征在于：所述的微板的条与条可拆卸。

一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法,属试剂盒制备技术领域。

背景技术

[0002] 新生儿溶血病(hemolytic disease of newborn,HDN)是指由于母胎或母婴血型不合引起的同族免疫性溶血。该病发生的机理主要在于:胎儿的血型抗原一半由父亲遗传,另一半由母亲遗传。当胎儿所遗传的父源性血型抗原恰为母体所缺乏时,一旦该父源性红细胞血型抗原在妊娠的中晚期通过胎盘进入母体时,则可以刺激母体产生相应的免疫性血型抗体。这种IgG 性质的免疫性抗体又通过胎盘进入胎儿血液循环后,与含有相应抗原的胎儿红细胞相结合,导致后者被致敏。这种致敏的红细胞在胎儿肝、脾的单核-吞噬细胞系统内被破坏,从而引起胎儿或新生儿溶血病的发生,进一步导致死胎、流产或早产。胎儿出生后(即新生儿)容易出现贫血、高胆红素血症,严重者可导致核黄疸甚至危及生命安全。因此,准确的新生儿溶血病实验检测能够为临床提供足够的证据支持,并为临床及时采取对症治疗措施具有重要的参考价值。

[0003] 在现今的36个人类红细胞血型系统中,中国人群以ABO血型不合的溶血病最为常见,约占新生儿溶血病的85.3%;其次为RhD和RhE溶血病,两者约占14.6%[薛辛东,杜立中主编, 儿科学,人民卫生出版社,2005年,第一版,139.],其他的诸如抗-Di^a等也有报道[邵华,马署轩.抗-Di^a引起的新生儿溶血病1例报告,北京医学,2018,40(2):170.颜永强,斯景萍,崔毅军.抗-Di^a引起新生儿溶血病1例,临床检验与输血,2007,9(1):78—79.]。因此,无论采用何种实验检测方法,应当针对中国新生儿人群溶血性抗体的实际分布情况进行设计和检测。

[0004] 胎儿或新生儿溶血病的检测实验包括:直接抗人球蛋白实验、游离抗体检测实验、抗体释放检测实验。直接抗人球蛋白实验是利用抗人球蛋白检测患儿红细胞是否被IgG抗体致敏的一项实验。游离抗体检测实验是用特定的试剂红细胞与患儿血浆混合后孵育、洗涤,最后用抗人球蛋白进行检测。如果试剂红细胞出现凝集,则为阳性反应,表明患儿血浆中有游离的溶血性抗体;如果试剂红细胞未出现凝集,则为阴性反应,表明患儿血浆中未检出游离的溶血性抗体。抗体释放检测实验是通过热放散或酸放散将患儿红细胞上结合的抗体释放于放散液中,再用特定的试剂红细胞与放散液混合后孵育、洗涤,最后用抗人球蛋白进行检测。如果试剂红细胞出现凝集,则为阳性反应,表明放散液中有从患儿红细胞上释放的溶血性抗体;如果试剂红细胞未出现凝集,则为阴性反应,表明放散液中未检出溶血性抗体,该项实验是新生儿溶血病的确诊性实验。

[0005] 目前国内各级医疗机构主要采用保存制备的ABO红细胞试剂配以抗人球蛋白微柱凝胶卡法进行新生儿溶血病的实验检测。其原理主要是利用凝胶介质的分子筛作用,将凝胶颗粒悬浮在缓冲液中,灌入微柱卡中制得。实验时,在反应腔中分别加入ABO细胞和待检

血清或放散液，孵育一定时间后，再离心观察结果。如果受检标本含有溶血性抗体，则相应的试剂红细胞就会与之发生反应而不能通过凝胶柱的分子筛，最终滞留在凝胶柱的上层或分散于柱中；若受检血清或放散液中不含有溶血性抗体，则游离的试剂红细胞离心后可以通过分子筛而沉积在微柱的底部。该方法受试剂红细胞浓度、离心力和离心时间、凝胶粒径大小、悬浮介质中抗凝剂浓度等因素影响，造成检测的灵敏度容易受到干扰。另一方面，微柱凝胶卡价格相对较高，需要专用配套的孵育和离心设备，限制了其在多数医疗机构的应用。

[0006] 现有的常规检测方法均需要以悬浮于红细胞保存液中的抗体筛选细胞来完成实验。一方面，受制于红细胞本身的寿命和保存液的质量，试剂红细胞的保存期一般小于3个月，如果不及时使用，容易造成浪费；另一方面，试剂红细胞在保存过程中，随着红细胞的衰老，不断的会发生抗原丢失和溶血，可能导致假阴性实验结果出现。

[0007] 因此，有必要对新生儿溶血病的检测实验技术进行研究开拓。固相法是80年代初期由 Plapp FV等发明的一种技术[Plapp FV,Sinor LT,Rachel JM,等.A solid phase antibody screen.Am J Clin Pathol,1984,82:179.]。将特定的有机吸附剂包被于96孔微板，利用电荷吸附作用将需要吸附的抗原物质包被于微板孔中，最后用其检测相关的抗体物质。一方面，由于传统的吸附剂包被时间较长，且细胞铺板后还需要进行固定、保湿等步骤，相对耗时耗力；另一方面，包被的红细胞没有经过冻干步骤，使用期限只有24小时。因此，上述的缺陷影响了其在临床中的实际应用。但该法灵敏度高，通过对包被基质、包被后细胞的长期保存技术、指示系统等进行一系列的创新后，其效果将会得到极大改善。目前为止，国内外暂未见有对固相吸附原理经过创新改进后用于新生儿溶血病实验检测方面的试剂盒。

[0008] 综上所述，为克服目前新生儿溶血病实验检测的不足，临床实际检测工作中迫切需要一种操作简便、能够长期保存抗原物质、针对中国新生儿人群高频溶血性抗体且成本适当的新生儿溶血病实验检测试剂盒。

[0009] 红细胞作为一种特殊的细胞，其表面分布有大量的血型抗原分子，这些抗原分子通常具有特异性，即能够与相应的抗体发生免疫反应。当一种固相载体的表面包被了特异性的抗体分子时，红细胞表面所携带的特异性抗原分子就会被结合，这种抗原抗体之间的结合可以将红细胞强有力的固定在固相载体表面。在红细胞冷冻保护液的作用下，这种固定在固相载体表面的红细胞可以突破常规液体保存液的三个月期限，进行长期保存，且膜抗原能够长期保持稳定。

发明内容

[0010] 本发明拟将针对红细胞抗原的单克隆抗体包被于96孔微板的内表面，利用其高度的特异性将A、B、O型红细胞分别吸附至微板孔底，经过裂解、加入细胞保护液冷冻干燥后实现长期保存；在冻干后的微板孔中加入待检测的血浆、放散液和促进反应的低离子液，就可以快速实现红细胞抗原与待检测血浆抗体之间的免疫性结合，最后通过高灵敏度的指示系统进行指示，阳性反应将在微板孔底面呈现出均匀一致的指示红细胞单层；阴性反应则将在微板孔中央底面呈现出一个圆形的指示红细胞扣。本发明创新性的利用单克隆抗体对红细胞抗原的特异性反应将红细胞固定在固相载体内表面、利用冷冻干燥技术替代常规红细

胞的保养液保存、利用高灵敏度的二步法指示系统，可以切实解决目前临床不规则抗体检测方法中灵敏度低、红细胞难以保存、常规方法漏检抗体等难题，为临床一线检测工作提供一种高性价比的新生儿溶血病实验检测试剂盒。

[0011] 本发明的一个目的是提供一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，该试剂盒能够解决现有检测方法中灵敏度低、检测用试剂红细胞保存期短、抗体漏检、操作繁琐、成本较高等问题。

[0012] 本发明的另一个目的是提供一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒的制备方法。

[0013] 本发明提供了一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒，该试剂盒包括：固相凝集反应微板、低离子溶液、阴性对照血清、阳性对照血清、指示系统；

[0014] 本发明所述的固相凝集反应微板由96孔U型底可拆卸式微板条组成，微板条材质优选聚苯乙烯，其作用是包被抗红细胞单克隆抗体、固定红细胞抗原膜、容纳受检血浆或放散液、低离子液和指示系统等，本身不参与化学反应；在包被了单克隆抗体的基础上，将A、B、O 型红细胞固定在微板条U型孔底，经过裂解、洗涤后加入细胞膜冷冻保护液，经过冷冻干燥，即为已包被A、B、O型红细胞膜的96孔U型底固相反应微板，可用于固相反应实验；与传统固相法不同的是，本发明采用对红细胞具有高度特异性的单克隆抗体作为包被基质，非传统固相所用的有机包被介质(如美兰)，对铺板的A、B、O型红细胞具有高度的吸附作用，从而将红细胞固定在U型微板孔底，形成均匀的红细胞分子单层，经过冷冻干燥后保存，不需要保湿过夜等，节省了包被时间，提高了红细胞的铺板效率；

[0015] 本发明所述的红细胞膜是将包被于96孔U型底微板条的A、B、O型红细胞裂解后所得，其血型系统抗原包括：ABO血型抗原、Rh血型抗原、Kidd血型抗原、MNSs血型抗原、Duffy血型抗原、Luthran血型抗原、Lewis血型抗原、P血型抗原等；具体的，用于包被的A、B、 O型红细胞至少应涵盖下列抗原：D、C、E、c、e、JK^a、JK^b、M、N、S、s、Fy^a、Fy^b、Lu^b、P1、 Di^a抗原；

[0016] 本发明所述的低离子强度溶液是包含了可降低离子强度的化学物质和防腐剂的一种缓冲液，主要含有甘氨酸和0.10％叠氮化钠的缓冲液；

[0017] 本发明所述的指示系统包括指示红细胞和抗人球蛋白试剂；具体的，指示红细胞是指IgG 抗-D致敏的O型RhD(+)红细胞悬液，浓度为0.2～1.0％；抗人球蛋白试剂是指1:1～1:128 倍稀释的羊抗人或者兔抗人IgG抗体；

[0018] 本发明所述的阴性对照血清是指与上述A、B、O型红细胞无凝集反应的健康人血清加入 0.10％叠氮化钠而制备；

[0019] 本发明所述的阳性对照血清是指包含有IgG抗-D且加入0.10％叠氮化钠的健康人血清。

[0020] 本发明提供了一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒制备方法，包括以下步骤：

[0021] 1.筛选铺板用A、B、O型红细胞采用单克隆抗-A、抗-B、抗-D筛选出符合国家血液质量标准的A RhD(+)、B RhD(+)红细胞各3人份，各型别的3人份等量混合后洗涤6次，备用；O RhD(+)红细胞进行初筛后，要根据抗原互补原则进一步筛选特殊抗原，具体抗原谱见表1；筛选成功后，将3人份的O细胞等量混合洗涤6次，与前述筛选出A、B型红细胞共同组成铺板用红细胞；

[0022] 表1铺板用O型红细胞抗原谱

[0023]

	Rh					Kidd		Lutheran		Duffy		Kell		MNS					P	Diego
	D	C	c	E	e	Jk^a	Jk^b	Lu^a	Lu^b	Fy^a	Fy^b	K	k	M	N	S	s	Mur	P1	Di^a
O_1	+	+	0	0	+	0	+	0	+	0	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+
O_2	+	0	+	+	0	+	+	0	+	+	+	0	+	+	+	0	+	0	+	0
O_3	+	+	0	0	+	0	+	0	+	+	0	0	+	+	0	0	+	+	0	0

[0024] 2.固相凝集反应微板的制备未包被的空白微板材质聚苯乙烯，作用是包被抗红细胞单克隆抗体、固定红细胞膜、容纳受检血浆、低离子强度溶液和指示系统等，本身不参与化学反应；更具体的，微板的条与条可拆卸；抗红细胞单克隆抗体用碳酸盐缓冲液稀释后，每孔中加入100μL，室温包被16小时；固相反应微板孔从上至下(即第1-8孔)依次标记为：Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg、Pos，在此基础上，将上述(1)中的A、B、O型红细胞制备为 0.1％浓度的悬液，每个微孔中加入对应的红细胞悬液100μL，离心5分钟后，洗涤5次，加入红细胞裂解液进行裂解。洗涤板条后，加入含8％蔗糖的冷冻保护液，50μL/孔，然后去掉孔中液体，并用吸水纸吸干残液，放入冷冻干燥机中冻干2小时，取出后装入铝箔袋中，加热密封即可；

[0025] 3.低离子强度溶液的制备称取18克甘氨酸和1克叠氮钠用纯化水溶解后，定容至1L，再加入适量的溴甲酚紫溶液，直至溶液颜色由透明无色变为深紫色，调节溶液pH至6.8；

[0026] 4.指示系统的制备指示系统包括指示红细胞和兔或羊抗人球蛋白试剂，指示红细胞的制备过程如下：洗涤后制成压积的O型红细胞，加入等体积的IgG抗-D，37℃孵育50分钟，制得IgG抗-D致敏的红细胞，生理盐水洗涤5次后，用红细胞保存液保存；抗人球蛋白试剂的制备过程如下：将兔或羊抗人球蛋白试剂用抗体稀释液进行稀释，与致敏红细胞反应，以离心后显微镜下观察至不凝集管作为抗人球蛋白试剂的稀释倍数；该稀释倍数的抗人球试剂与已致敏的O型红细胞悬液构成本发明的指示系统；

[0027] 5.阴性对照血清的制备筛选出与本发明所述的抗筛细胞均无凝集反应的健康人血清，加入叠氮化钠，终浓度为为0.10％；

[0028] 6.阳性对照血清制备是指包含有IgG抗-D且加入0.10％叠氮化钠的健康人血清。

[0029] 本发明所述基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒提供了一种新型的检测理念和技术，其优势如下：

[0030] 1.本发明将抗红细胞单克隆抗体包被于96孔微板孔底作为包被基质，创新性的利用其对 A、B、O型红细胞抗原发生的免疫结合反应，从而将红细胞固定在U型微板孔底，形成均匀的红细胞分子单层，基质包被时间缩短，且固定的红细胞经过裂解、冷冻干燥后，不需要过夜保湿固定等繁琐步骤，大大提高了红细胞的包被效率，传统的低性能包被基质(如美兰等) 容易造成铺板的红细胞的缺边和趋中现象，导致红细胞分子单层厚薄不均，干扰后续的实验结果(图1)；

[0031] 2.发明中所述的包被了红细胞膜的微板条保存周期长达6个月，是常规红细胞保存时间的2倍，储存方便，避免了因红细胞保存时间短而造成的试剂浪费；制备特殊的两步法指示系统进行终点指示，提高了检测灵敏度，对低效价抗体的检出优于目前常用的抗人

球微柱凝胶卡法，避免了漏检低效价抗体而导致的漏诊；

[0032] 3.针对中国新生儿溶血病中ABO溶血病为主的实际情况，铺板用的A、B细胞均采用3人份等量混合，以提高抗-A、-B的检出能力；针对中国新生儿溶血病高频的特殊抗体抗-D、-E、-Di^{a}抗体，特别加筛了D(+)、E(+)的O型红细胞(O2号细胞)和Di^a(+)的O型红细胞(O1号细胞)作为入选细胞之一，避免了目前市面上随机混合的红细胞因缺乏上述抗原导致对应的抗体漏检而引发的漏诊问题(图7)；

[0033] 4.本发明所述的检测方法，操作过程简单且不需要专用设备，微板条可以灵活拆卸，既可实现单人份检测，也可实现规模检测，从而降低检测成本，具有较好的临床应用价值。

附图说明

[0034] 图1固相凝集法不同基质材料制备红细胞单层的效果对比图，微板条①和②分别为单克隆抗体基质与美兰基质包被，板条①制备的细胞单层均匀一致，无裂隙或缺边；板条②制备的细胞单层厚薄不均，有缺边和细胞趋中现象；

[0035] 图2固相凝集法和微柱凝胶卡法凝集强度判断标准图示；

[0036] 图3冻干前后固相反应微板红细胞膜的抗原性测试，图中①、②板条分别为冷冻干燥前、后的微板条；微板条从上至下第1-3孔分别标记为Ac、Bc、Oc，分别加入IgG抗-A、-B、-D检测红细胞膜单层的A、B、D抗原，第4-6孔作为第1-3孔的复检孔、第7孔为Neg(阴性对照)、第8孔为Pos(阳性对照)，冻干前、后A、B、D抗原检测均呈现4+凝集，说明冷冻干燥后红细胞膜抗原保持稳定；

[0037] 图4保存期内试剂盒膜抗原的稳定性稳定性测试，采用人源IgG抗-A(效价为1)、IgG 抗-B(效价为1)、IgG抗-D(效价为1)测试冻干后保存期内的细胞膜抗原稳定性。①、②、③号条分别为冻干保存2个月、4个月、6个月的微板条，各微板条的第1-3孔依次标记为 Ac、Bc、Oc，分别加入效价为1的IgG抗-A、IgG抗-B、IgG抗-D用以测试对应的细胞膜A 抗原、B抗原、D抗原；第4-6孔作为第1-3孔的复检孔；Neg(阴性对照孔)、Pos(阳性对照孔)。2个月、4个月、6个月的微板条对低效价的抗体均能有效检出，且各抽检时间段对应的检测孔凝集强度没有差别，表明各抗体检测的对应细胞膜抗原稳定；

[0038] 图5保存期内试剂盒检测灵敏度测试(与微柱凝胶卡法对比)，①图：采用倍比稀释的人源抗-D测试冻干后保存2个月的试剂盒灵敏度。图中试剂盒微板条从上至下依次测试稀释度为4、8、16、32、64、128倍的人源抗-D，凝集强度均达到4+，可测及的末管抗-D稀释度为128。微柱凝胶卡从左至右依次采用新鲜O型RhD(+)红细胞测试稀释度为4、8、16、32、 64、128倍的人源抗-D，凝集强度介于3+^{s}～1+^{s}之间，可测及的末管抗-D稀释度为64；②图：采用倍比稀释的人源抗-D测试冻干后保存4个月的试剂盒灵敏度。图中试剂盒微板条从上至下依次测试稀释度为4、8、16、32、64、128倍的人源抗-D，凝集强度均达到4+，可测及的末管抗-D稀释度为128。微柱凝胶卡从左至右依次采用新鲜O型RhD(+)红细胞测试稀释度为4、8、16、32、64、128倍的人源抗-D，凝集强度介于3+^{s}～1+之间，可测及的末管抗-D稀释度为64；③图：采用倍比稀释的人源抗-D测试冻干后保存6个月的试剂盒灵敏度。图中试剂盒微板条从上至下依次测试稀释度为4、8、16、32、64、128倍的人源抗-D，凝集强度均达到4+，可测及的末管抗-D稀释度为128。微柱凝胶卡从左至右依次采用新鲜O型RhD(+)红细胞测试稀释度为

4、8、16、32、64、128倍的人源抗-D，凝集强度介于2+^{s}～1+之间，可测及的末管抗-D稀释度为32；

[0039] 图6试剂盒与微柱凝胶卡在新生儿溶血病实验检测中的检测结果比较，试剂盒中微板条自上而下第1-8孔分别标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)。标记的前3孔Ac、Bc、Oc分别用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc用于检测放散液中的抗体；微柱凝胶卡从左至右依次标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc，前3孔Ac、 Bc、Oc分别用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc用于检测放散液中的抗体。①图为母婴ABO血型不合新生儿溶血病，固相法检出血浆和放散液中游离IgG抗-B，凝集强度4+，微柱凝胶卡的凝集强度则为3+；②图为母婴RhD血型不合新生儿溶血病，固相法检出血浆和放散液中游离IgG抗-D，凝集强度4+，微柱凝胶卡的凝集强度则介于2+～4+；

[0040] 图7试剂盒与市售ABO细胞检测抗-Di^{a}新生儿溶血病的结果比较，试剂盒中微板条自上而下第1-8孔分别标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)。标记的前3孔Ac、Bc、Oc分别用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc用于检测放散液中的抗体；微柱凝胶卡从左至右依次标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc，前3孔Ac、 Bc、Oc分别加入对应的市售红细胞后用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc 分别加入对应的市售红细胞后用于检测放散液中的抗体。试剂盒微板条的第3孔和第6孔(即含有Di^{a}抗原的Oc细胞孔)均呈现3+的阳性反应，而微柱凝卡的市售Oc细胞孔均呈阴性。

具体实施方式

[0041] 下面结合实施的实例对本发明做进一步的解释。应当理解：所举的实施例仅用于解释本发明，而不是限于本发明的保护范围。

[0042] 实施例1新生儿溶血病实验检测试剂盒的制备

[0043] 1.筛选铺板用A、B、O型红细胞采用单克隆抗-A、抗-B、抗-D筛选出符合国家血液质量标准的A RhD(+)、B RhD(+)红细胞各3人份，各型别的3人份分别等量混合后洗涤6次，备用。O RhD(+)红细胞进行初筛后，要根据抗原互补原则进一步用单克隆抗体筛选特殊抗原，具体抗原谱见表1；筛选成功后，将3人份的O细胞等量混合洗涤6次，与前述筛选出A、B 型红细胞共同组成铺板用红细胞组；

[0044] 2.固相凝集反应微板的制备

[0045] (1)将抗红细胞单克隆抗体用碳酸盐包被液稀释至100ug/mL，取出空白的96孔反应微板，每孔中加入100μL，室温包被16小时，甩干微孔中的液体后，用纯化水洗涤3次，最后一次用吸水纸吸干微孔中的残液；

[0046] (2)将洗涤后备用的A、B、O型红细胞用生理盐水制备成0.1％的悬液；已包被抗红细胞单克隆抗体的微板条第1-8孔依次标记为：Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)，按标记加入对应的红细胞悬液，其中个Neg和Pos孔加入O型红细胞悬液，每个微孔中加入100μL，平板离心机离心5分钟后，用生理盐水洗涤5次，甩干板条中的液体，最后一次用吸水纸吸干微孔中的残液；

[0047] (3)于上述包被红细胞单层的微板条加入0.45％的低渗盐水，50μL/孔，进行红细胞单层的裂解；甩干微孔中的液体，用生理盐水洗涤板条5次，甩干板条中的液体，最后一次用吸水纸吸干微孔中的残液；

[0048] (4)于上述微板条中加入红细胞抗原膜保护液(8％的蔗糖溶液),50μL/孔,甩干,并用吸水纸吸干微孔中的残液,放入冷冻干燥机冻干2小时,取出后,装入铝箔袋中,加热密袋口后,放在4℃冰箱备用;

[0049] 3.低离子溶液的制备

[0050] 称取18克甘氨酸和1克叠氮钠用纯化水溶解后,定容至1L,再加入适量的溴甲酚紫溶液,直至溶液颜色由透明无色变为深紫色,调节溶液pH至6.8;

[0051] 4.指示系统的制备

[0052] (1)致敏红细胞的制备:在洗涤后的O型压积红细胞中加入等体积的IgG抗-D,37℃孵育50分钟,制得IgG抗-D致敏的红细胞。生理盐水洗涤5次后,用红细胞保存液配制成0.4％的悬浮液,即为致敏红细;

[0053] (2)抗人球蛋白试剂:兔或羊抗人球蛋白试剂用抗体稀释液进行梯度倍比稀释(如:1:1、1:16、1:32、1:64、1:128等),与上述的致敏红细胞反应,以离心后显微镜下观察至不凝集管作为抗人球蛋白试剂的稀释倍数。该稀释倍数的抗人球试剂与已致敏的O型红细胞构成本发明的指示系统;

[0054] 5.阴性对照血清的制备:筛选出与本发明所述的抗筛细胞均无凝集反应的健康人血清,加入叠氮化钠,终浓度为0.10％;

[0055] 6.阳性对照血清制备:筛选出包含有IgG抗-D的健康人血清,加入0.10％叠氮化钠即可。

[0056] 实施例2冻干前后固相凝集反应微板红细胞膜的抗原性测试

[0057] 选取人源IgG抗-A、IgG抗-B、IgG抗-D对本发明试剂盒中的A细胞膜抗原、B细胞膜抗原、O细胞膜的D抗原进行检测,以评估冷冻干燥后红细胞膜的抗原性是否发生变化。实验结果表明,冻干前后的微板条对上述抗体的检出结果一致,均为4+,表明红细胞膜的抗原性在冻干前后没有发生任何变化,结果见图3;具体操作方法如下:

[0058] 1.将实施例1中制备的试剂盒取出1条微板条后,平衡至室温,将第1-8孔分别标记为 Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照),此冻干条为实验条;实验条标记的前3孔Ac、Bc、Oc分别用于IgG抗-A、抗-B、抗-D检测,后3孔Ac、Bc、Oc作为前 3孔的复孔测试;另外制备1条微板,按实施例1的步骤(2)进行,去除第4步,即不进行冻干步骤,其余标记和操作同实验条;

[0059] 2.在上述各孔中分别加入2滴(100μL)低离子溶液,并按照对应标记分别加入1滴(50μL)IgG抗-A、抗-B、抗-D,Neg孔加入阴性对照血清,Pos孔加入阳性对照血清,低离子强度溶液由紫色变为青绿色或浅绿色,如仍为紫色则可能漏加了待检标本;

[0060] 3.将微板条用封口胶封好,轻轻混匀后,置于37℃水浴箱中孵育15分钟;

[0061] 4.取出孵育完毕的微板条,撕去封口胶,甩干孔中液体,用生理盐水洗涤5次;最后一次洗涤后,将微板条倒置于吸水纸上吸干残余液体;

[0062] 5.加入1滴(50μL)羊/兔抗人IgG后,即刻加入1滴(50μL)指示红细胞,轻轻振荡混;

[0063] 6.将微板条放入平板离心机中,200g离心5分钟,判定结果。

[0064] 实施例3保存期内试剂盒膜抗原的稳定性和检测灵敏度与抗人球微柱凝胶卡对比测试

[0065] 1.红细胞膜抗原稳定性测试实施例1中制备的试剂盒放置于2～8℃冰箱保存,分

别于保存期内的2个月、4个月、6个月取样进行试剂盒的抗原稳定性测试测试。抗原稳定性测试选择中国新生儿人群常见的溶血性抗体IgG抗-A、IgG抗-B，IgG抗-D对相应的红细胞A、B、D膜抗原进行测试；结果显示：本发明制备的试剂盒在保存6个月内，包被于U型孔底的红细胞A、B、D膜抗原能够被相应的人源IgG抗-A、IgG抗-B，IgG抗-D检测出，且各抽检时间段检测的凝集强度没有差异，充分显示了试剂盒红细胞膜抗原良好的稳定性。具体结果见图4；

[0066] 固相凝集法：

[0067] (1)将保存期内的试剂盒取出微板条后，平衡至室温，自上而下将第1-8孔分别标记为 Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)；标记的前3孔Ac、Bc、Oc分别用于检测IgG抗-A、IgG抗-B，IgG抗-D，后3孔Ac、Bc、Oc作为前3孔的平行重复测试；

[0068] (2)在上述各孔中分别加入2滴(100μL)低离子溶液，并在相应标记的微板孔中分别加入1滴(50μL)待检的IgG抗-A、IgG抗-B、IgG抗-D、阴、阳性对照血清；低离子强度溶液由紫色变为青绿色或浅绿色，如仍为紫色则可能漏加了待检标本；

[0069] (3)将微板条用封口胶封好，轻轻混匀后，置于37℃水浴箱中孵育15分钟；

[0070] (4)取出孵育完毕的微板条，撕去封口胶，甩干孔中液体，用生理盐水洗涤5次；最后一次洗涤后，将微板条倒置于吸水纸上吸干残余液体；

[0071] (5)加入1滴(50μL)羊/兔抗人IgG后，即刻加入1滴(50μL)指示红细胞，轻轻振荡混匀；

[0072] (6)将微板条放入平板离心机中，200g离心5分钟，判定结果。

[0073] 2.灵敏度测试实施例1中制备的试剂盒放置于2～8℃冰箱保存，分别于保存期内的2 个月、4个月、6个月取样进行试剂盒的灵敏度对比测试；采用人源抗-D进行梯度倍比稀释后检测；结果发现，本发明制备的试剂盒在保存6个月内，各测试时间段的灵敏度无差异，且优于常规的微柱凝胶卡法2个梯度，对比检测结果见图5；具体操作方法如下表述：

[0074] 固相凝集法：

[0075] (1)取试管6支，分别标记为2、4、8、16、32、64、128，每支试管中加入200μL抗体稀释液。将离心好的人源抗-D吸取200μL加入标记为2的试管中，轻轻吹打混匀，然后转移200μL该试管中的稀释液至标记为4的试管中，重复上述操作，依次转移直至最后一管(即标记为64的试管)；上述操作完成后所制备的液体即为梯度倍比稀释的人源抗-D，稀释倍数分别为2、4、8、16、32、64、128倍；

[0076] (2)将保存期内的试剂盒取出1条微板条后，平衡至室温，自上而下将第1-8孔分别标记为4、8、16、32、64、128、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)；

[0077] (3)在上述各孔中分别加入2滴(100μL)低离子溶液，并分别加入1滴(50μL)对应的待检标本和阴、阳性对照血清至相应的孔中；低离子强度溶液有紫色变为青绿色或浅绿色，如仍为紫色则可能漏加了待检标本；

[0078] (4)将微板条用封口胶封好，轻轻混匀后，置于37℃水浴箱中孵育15分钟；

[0079] (5)取出孵育完毕的微板条，撕去封口胶，甩干孔中液体，用生理盐水洗涤5次；最后一次洗涤后，将微板条倒置于吸水纸上吸干残余液体；

[0080] (6)加入1滴(50μL)羊/兔抗人IgG后，即刻加入1滴(50μL)指示红细胞，轻轻振荡混匀；

[0081] (7)将微板条放入平板离心机中，200g离心5分钟，判定结果。

[0082] 微柱凝胶卡法具体操作如下：

[0083] (1)取出微柱凝胶卡，使用前应肉眼观察卡内凝胶有无干裂、气泡或异物现象，如有，则视为无效卡；若反应腔部分或封口处有气泡或液滴时，必须在使用前离心2分钟；

[0084] (2)在卡微柱下方依次标记为4、8、16、32、64、128，向上述标记好的微柱管中分别加入0.8％的O型RhD(+)红细胞50uL；

[0085] (3)上述各管中分别加入与标记相对应试管中的稀释液25uL；

[0086] (4)置于专用孵育器中37℃孵育15分钟后取出，置于专用离心机中，1030rpm离心10 分钟；

[0087] (5)离心结束后，取出微柱凝胶卡观察，判定结果并记录。

[0088] 实施例4试剂盒与微柱凝胶卡在新生儿溶血病实验检测中的检测结果比较

[0089] 选取中国新生儿人群中有代表性的溶血病病例，ABO血型不合溶血病1例、RhD血型不合溶血病1例；用本项目发明的固相凝集法试剂盒与微柱凝胶卡法进行平行对比检测，以测试两者之间的检测效能是否有差异；结果表明，两者均能正确诊断ABO和RhD溶血病，但本发明的试剂盒灵敏度更高，显示更加明确，见图6；具体操作方法如下：

[0090] 固相凝集法：

[0091] (1)从实施例1中制备的试剂盒中取出微板条后，平衡至室温，自上而下将第1-8孔分别标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)。标记的前3孔Ac、 Bc、Oc分别用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc用于检测放散液中的抗体；

[0092] (2)在上述各孔中分别加入2滴(100μL)低离子溶液，并在相应标记的微板孔中分别加入1滴(50μL)待检的血浆或放散液、阴、阳性对照血清；低离子强度溶液由紫色变为青绿色或浅绿色，如仍为紫色则可能漏加了待检标本；

[0093] (3)将微板条用封口胶封好，轻轻混匀后，置于37℃水浴箱中孵育15分钟；

[0094] (4)取出孵育完毕的微板条，撕去封口胶，甩干孔中液体，用生理盐水洗涤5次；最后一次洗涤后，将微板条倒置于吸水纸上吸干残余液体；

[0095] (5)加入1滴(50μL)羊/兔抗人IgG后，即刻加入1滴(50μL)指示红细胞，轻轻振荡混匀；

[0096] (6)将微板条放入平板离心机中，200g离心5分钟，判定结果。

[0097] 微柱凝胶卡法操作如下：

[0098] (1)取出微柱凝胶卡，使用前应肉眼观察卡内凝胶有无干裂、气泡或异物现象，如有，则视为无效卡；若反应腔部分或封口处有气泡或液滴时，必须在使用前离心2分钟；

[0099] (2)在微柱卡下方从左至右依次标记为Ac，Bc，Oc，向上述标记好的微柱管中分别加入 0.8％的A型、B型、O型红细胞50uL；

[0100] (3)上述各管中分别加入待检的血浆或放散液25uL；

[0101] (4)置于专用孵育器中37℃孵育15分钟后取出，置于专用离心机中，1030rpm离心10 分钟；

[0102] (5)离心结束后，取出微柱凝胶卡观察，判定结果并记录。

[0103] 实施例5试剂盒与常规市售ABO细胞在抗-Di^a新生儿溶血病实验检测中的检测结果比较

[0104] 选取母婴Di^a血型不合溶血病1例，用本项目发明的固相凝集法试剂盒与常规的市

售ABO 红细胞进行平行对比检测，以测试两者之间的检测效能是否有差异；结果表明，本试剂盒能够检出抗-Di^a抗体，而常规市售的ABO细胞未能检测出抗-Di^a抗体，见图7；具体操作方法如下：

[0105] 固相凝集法：

[0106] (1)从实施例1中制备的试剂盒中取出微板条后，平衡至室温，自上而下将第1-8孔分别标记为Ac、Bc、Oc、Ac、Bc、Oc、Neg(阴性对照)、Pos(阳性对照)；标记的前3孔Ac、Bc、Oc分别用于检测新生儿血浆中的游离抗体，后3孔Ac、Bc、Oc用于检测放散液中的抗体；

[0107] (2)在上述各孔中分别加入2滴(100μL)低离子溶液，并在相应标记的微板孔中分别加入1滴(50μL)待检的血浆或放散液、阴、阳性对照血清；低离子强度溶液由紫色变为青绿色或浅绿色，如仍为紫色则可能漏加了待检标本；

[0108] (3)将微板条用封口胶封好，轻轻混匀后，置于37℃水浴箱中孵育15分钟；

[0109] (4)取出孵育完毕的微板条，撕去封口胶，甩干孔中液体，用生理盐水洗涤5次。最后一次洗涤后，将微板条倒置于吸水纸上吸干残余液体；

[0110] (5)加入1滴(50μL)羊/兔抗人IgG后，即刻加入1滴(50μL)指示红细胞，轻轻振荡混匀；

[0111] (6)将微板条放入平板离心机中，200g离心5分钟，判定结果。

[0112] 微柱凝胶卡法操作如下：

[0113] (1)取出微柱凝胶卡，使用前应肉眼观察卡内凝胶有无干裂、气泡或异物现象，如有，则视为无效卡；若反应腔部分或封口处有气泡或液滴时，必须在使用前离心2分钟；

[0114] (2)在微柱卡下方从左至右依次标记为Ac，Bc，Oc，向上述标记好的微柱管中分别加入 0.8％的A型、B型、O型红细胞50uL；

[0115] (3)上述各管中分别加入待检的血浆或放散液25uL；

[0116] (4)置于专用孵育器中37℃孵育15分钟后取出，置于专用离心机中，1030rpm离心10 分钟；

[0117] (5)离心结束后，取出微柱凝胶卡观察，判定结果并记录。

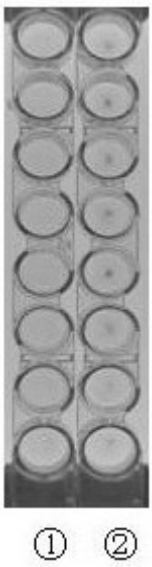
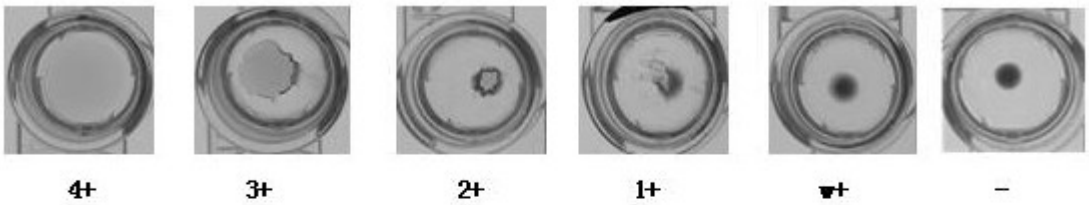


图1



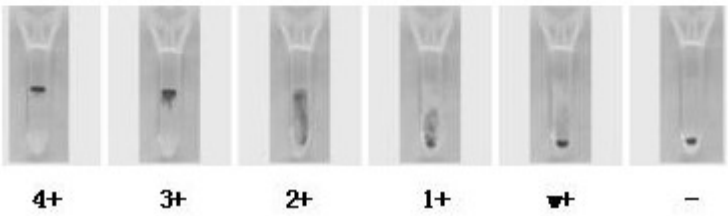


图2

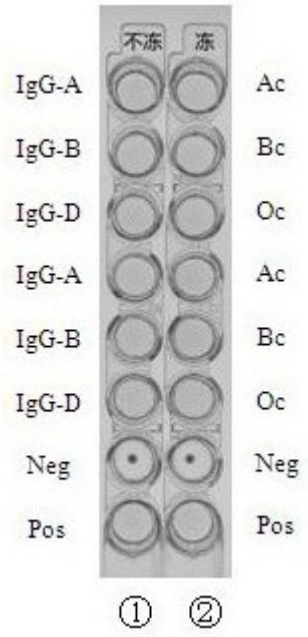

不冻
冻
IgG-A
IgG-B
IgG-D
IgG-A
IgG-B
IgG-D
Neg
Pos
Ac
Bc
Oc
Ac
Bc
Oc
Neg
Pos
①
②

图3

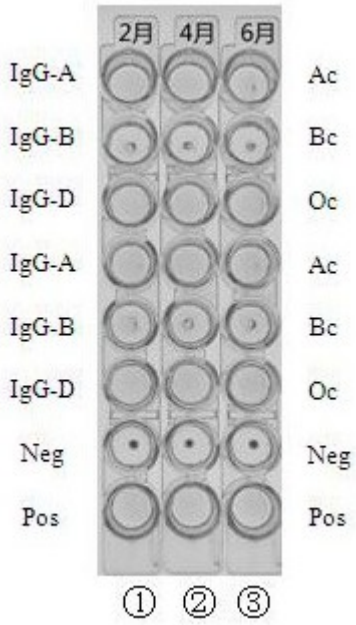

2月
4月
6月
IgG-A
IgG-B
IgG-D
IgG-A
IgG-B
IgG-D
Neg
Pos
Ac
Bc
Oc
Ac
Bc
Oc
Neg
Pos
①
②
③

图4

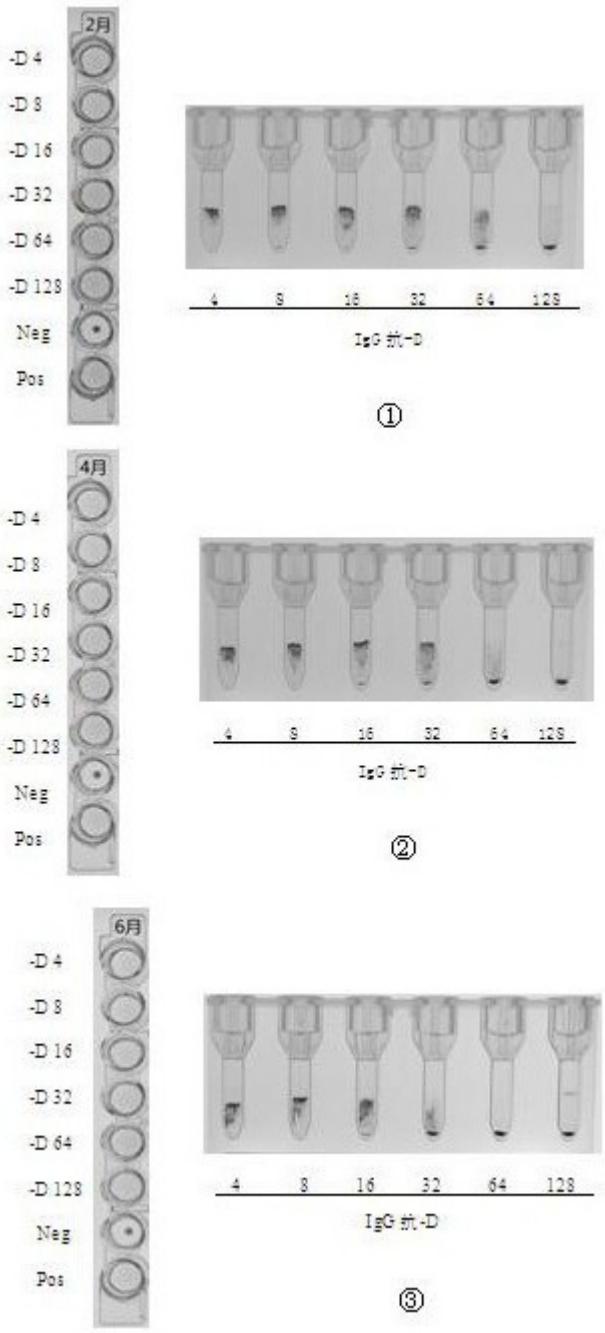

2月
-D 4
-D 8
-D 16
-D 32
-D 64
-D 128
Neg
Pos
4 8 16 32 64 128
IgG 抗-D
①
4月
-D 4
-D 8
-D 16
-D 32
-D 64
-D 128
Neg
Pos
4 8 16 32 64 128
IgG 抗-D
②
6月
-D 4
-D 8
-D 16
-D 32
-D 64
-D 128
Neg
Pos
4 8 16 32 64 128
IgG 抗-D
③

图5

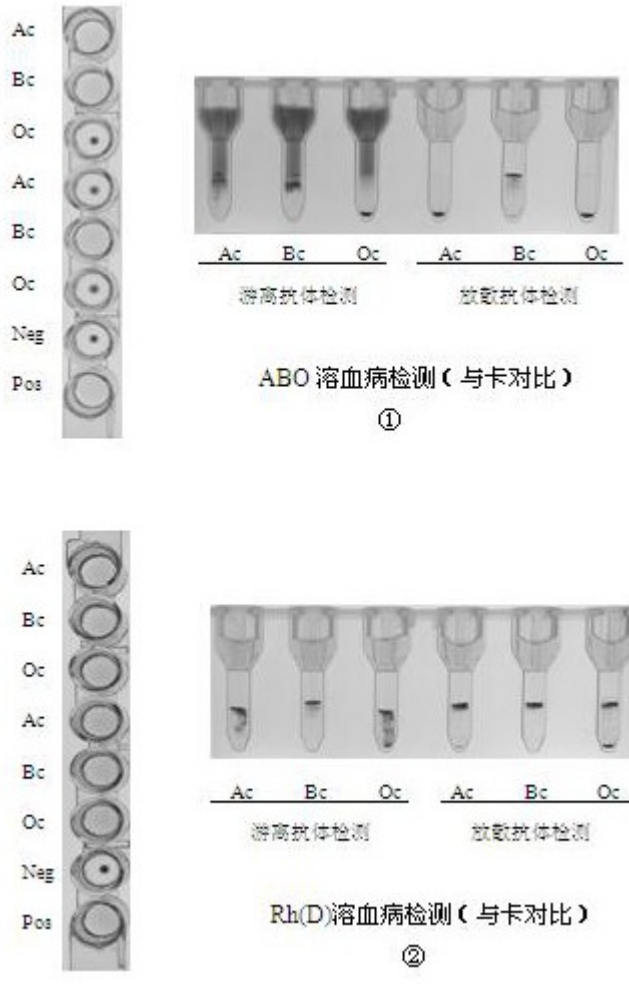

Ac
Bc
Oc
Ac
Bc
Oc
Neg
Pos
Ac Bc Oc Ac Bc Oc
游离抗体检测
放散抗体检测
ABO 溶血病检测（与卡对比）
①
Ac
Bc
Oc
Ac
Bc
Oc
Neg
Pos
Ac Bc Oc Ac Bc Oc
游离抗体检测
放散抗体检测
Rh(D)溶血病检测（与卡对比）
②

图6

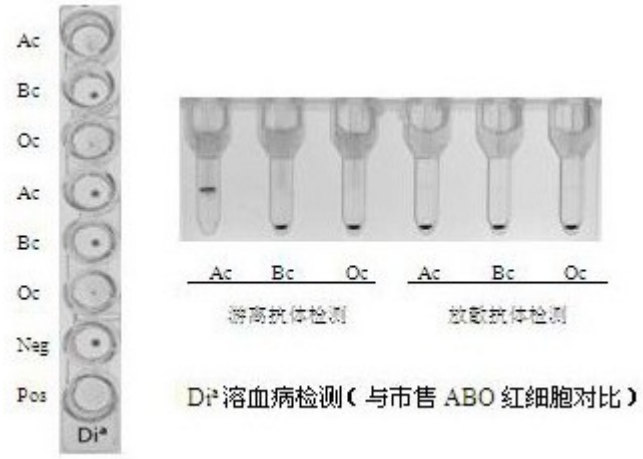
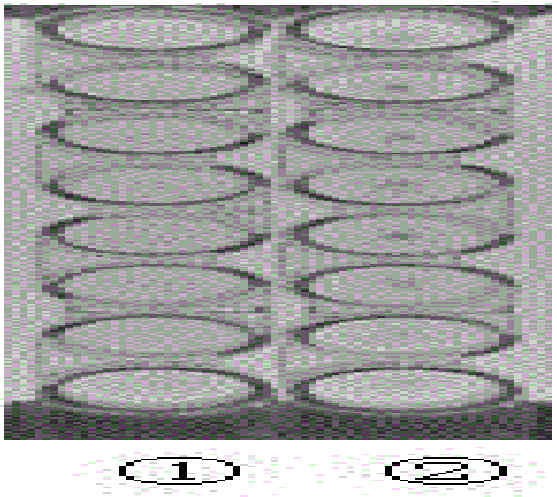

Ac
Bc
Oc
Ac
Bc
Oc
Neg
Pos
Di*
Ac Bc Oc Ac Bc Oc
游离抗体检测
放散抗体检测
Di* 溶血病检测（与市售 ABO 红细胞对比）

图7

专利名称(译)	一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110174520A	公开(公告)日	2019-08-27
申请号	CN201910302941.3	申请日	2019-04-16
[标]申请(专利权)人(译)	骆宏		
申请(专利权)人(译)	骆宏		
当前申请(专利权)人(译)	骆宏		
[标]发明人	骆宏 罗广平		
发明人	骆宏 罗广平		
IPC分类号	G01N33/80 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/54306 G01N33/80		
代理人(译)	刘媛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种基于固相凝集技术的新生儿溶血病实验检测试剂盒及其制备方法，属于试剂盒制备技术领域，试剂盒包括：（1）固相凝集反应微板；（2）低离子强度溶液；（3）指示系统；（4）阴性对照血清；（5）阳性对照血清；制备方法包括：（1）固相凝集反应微板的制备；（2）低离子强度溶液的制备；（3）指示系统的制备；（4）阴性对照血清制备；（5）阳性对照血清制备；通过创新性的利用单克隆抗体对红细胞的高特异性吸附、利用冷冻干燥保存技术、利用高灵敏度的二步法指示系统，切实解决目前新生儿溶血病检测方法中灵敏度低、红细胞难保存、易漏检抗体等难题，为临床一线检测工作提供一种高性价比的新生儿溶血病实验检测试剂盒。