(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 110520736 B
(45)授权公告日 2022.07.22

(21)申请号 201980001171.7
(22)申请日 2019.07.15
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110520736 A
(43)申请公布日 2019.11.29
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.07.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/095958 2019.07.15
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/007738 ZH 2021.01.21
(73)专利权人 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所
地址 215163 江苏省苏州市高新区科技城科灵路88号
(72)发明人 李勇 唐玉国 王红梅 段生宝 丁少华 陈晔洲 魏双施 李剑平
(74)专利代理机构 北京远大卓悦知识产权代理有限公司 11369
专利代理师 韩飞
(51)Int.Cl.
G01N 33/80(2006.01)
G01N 33/544(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/532(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件
CN 102901828 A,2013.01.30
WO 2006004332 A1,2006.01.12
AU 6368486 A,1987.04.16
US 4661445 A,1987.04.28
US 4275053 A,1981.06.23

审查员 叶志东

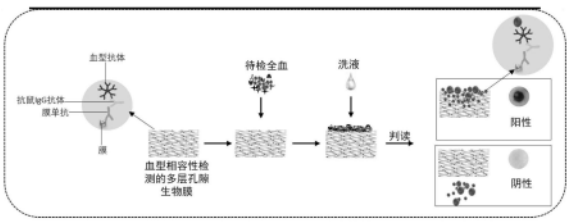
权利要求书2页 说明书10页 附图3页

(54)发明名称

一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体、制备方法、应用

(57)摘要

本发明提供了一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体，包括生物多层孔隙膜、与生物多层孔隙膜结合的特异性抗生物多层孔隙膜抗体、与膜抗体结合的交联抗体。还提供了功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法，利用生物多层孔隙膜的免疫原性及多层多孔性，结合抗体-抗原和抗体-抗体特异性结合进行制备。本发明提供的功能化生物多层孔隙膜免疫载体可以用于制备血型相容性检测的免疫载体，进而可以被安装在血型检测卡中进行血型检测。本发明还提供了血型检测卡进行血型检测的方法。本发明提供的用于血型相容性检测的免疫载体可以用于红细胞正定型、反定型、抗体筛检、抗体鉴定等，可实现快速、准确检测红细胞ABO、Rh、MNS、Kell、Kidd等多种血型系统血型。



CN 110520736 B

1.一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体,其特征在于,包括:

生物多层孔隙膜;

特异性抗生物多层孔隙膜抗体,所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性结合从而依附在所述生物多层孔隙膜的表面;

交联抗体,所述交联抗体与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联结合在一起;

其中,所述交联抗体一Fab端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联,另一Fab端能够与特异性抗体结合。

2.根据权利要求1所述的一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体,其特征在于,所述特异性生物多层孔隙膜抗体包括鼠源单抗、羊源多抗、兔源单抗/多抗、鸡源多抗;所述交联抗体包括抗鼠多抗、抗羊多抗、抗兔多抗、抗鸡多抗;所述能够与交联抗体Fab端结合的特异性抗体为鼠源单抗、羊源多抗、兔源单抗/多抗、鸡源多抗。

3.一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片,然后将膜片浸入处理液中,在40-70℃水浴中浸泡2-4小时,制得生物多层孔隙膜;

S2、将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合,洗液清洗,再与交联抗体进行偶联后,洗液清洗,用封闭液封闭后再用洗液清洗,制得如权利要求1所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体;

其中,所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体为能够与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性反应的抗体;

所述交联抗体Fab一端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联,另一Fab端能够与特异性抗体结合。

4.一种用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体,其特征在于,包括:

权利要求1或2所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体;

红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原,通过与所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上的所述交联抗体进行特异性结合而依附在所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上;

其中,所述致敏红细胞血型抗原为特异性结合了非血型抗体的红细胞膜抗体的红细胞血型抗原。

5.根据权利要求4所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体,其特征在于,所述红细胞血型抗体包括IgM型、IgG型、IgM-IgG型混合型的红细胞ABO、Rh、MNS、Kell、Kidd血型系统的血型抗体,所述红细胞血型抗体效价大于1:32。

6.根据权利要求4所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体,其特征在于,所述致敏红细胞血型抗原包括致敏A型红细胞抗原、致敏B型红细胞抗原、致敏不规则抗体筛检红细胞抗原、致敏红细胞谱细胞抗原。

7.一种用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

S1、将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片,然后将膜片浸入处理液中,在40-70℃水浴中浸泡2-4小时,制得生物多层孔隙膜;

S2、将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合,洗液清洗,再与交联抗体进行偶联后,洗液清洗,用封闭液封闭后再用洗液清洗,制得如

权利要求1所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体；

S3、将红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原与所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上的所述交联抗体进行特异性结合，制得如权利要求4所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体；

其中，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体为能够与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性反应的抗体；

所述交联抗体一Fab端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联，另一Fab端能够与特异性抗体结合，所述特异性抗体为能够与交联抗体Fab端结合的红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原；

所述致敏红细胞血型抗原为特异性结合了非血型抗体的红细胞膜抗体的红细胞血型抗原。

8.根据权利要求7所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法，其特征在于，还包括步骤致敏红细胞血型抗原的制备，如下：用非血型抗体的红细胞膜抗体与新鲜红细胞反应，待出现1+凝集强度时，用低渗溶液将红细胞裂解，离心收集获得致敏红细胞抗原。

9.一种血型检测卡，其特征在于，包括：

固相塑料载体，所述固相塑料载体包括卡槽外壳和卡槽内壳，所述卡槽外壳与所述卡槽内壳可拆卸连接；

权利要求4-6任意一项所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体，所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体位于所述固相塑料载体卡槽外壳的底部；

吸水棉，位于固相塑料载体卡槽内壳的底部；

隔离膜，放置在所述吸水棉的上方。

10.根据权利要求9所述的血型检测卡，其特征在于，所述固相塑料载体的制备材料包括聚乙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯-丙烯腈；所述固相塑料载体，还包括检测孔，所述检测孔包括双孔、三孔、多孔；所述隔离膜包括滤纸、纤维素纤维、玻璃纤维垫、多孔高分子材料制成的纤维垫或试纸；所述吸水棉包括棉浆垫、滤纸。

11.根据权利要求9所述的血型检测卡，其特征在于，所述血型检测卡的保存或检测温度为4-50℃。

12.一种血型的检测方法，其特征在于，包括以下步骤：

将待检测血型样品加入到如权利要求9-11任意一项所述的血型检测卡的检测孔中，放置至少1分钟；洗液冲洗，观察检测孔的显色情况，显色为红色则为阳性，显色为本色则为阴性；

其中，待检测血型样品与血型检测卡中的所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体发生了抗原抗体特异性反应，为阳性；反之，为阴性。

13.权利要求1或2所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体在制备血型相容性检测产品中的应用。

14.权利要求1或2所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体在制备用于检测和分析病原微生物细胞抗原抗体、细菌细胞抗原抗体、肿瘤细胞抗原抗体的产品中的应用。

一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体、制备方法、应用

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域，特别涉及一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体、制备方法以及应用。

背景技术

[0002] 血液供者和受者之间不相容的血型会导致严重的溶血性输血反应，血型相容性检测是确保安全输血的最重要途径之一，相容(Compatible)即和谐共存，指病人血清中不存在与输入的红细胞抗原相对应的特异性抗体，不发生免疫反应称为相容性输血。反之称为不相容输血，即病人血清中存在与输入的红细胞抗原相对应的特异性的抗体，发生免疫反应，输入病人体内的红细胞受损以至溶血。红细胞(Red Blood Cell)表面的特定抗原和血清中的抗体决定了血型，输血前血型相容性检测不仅包括ABO正反定型、RhD血型定型、受血者血清中不规则抗体检测、临床有意义抗体的检测和鉴定以及交叉配血试验等。

[0003] 血型检测最传统的金标准检测方法是试管法，试管法需要繁琐的离心和洗涤步骤，以及细胞悬浮液的制备。其它常规的血型检测方法包括玻片法、微柱凝胶免疫检测法(Micrcolumn gel immunoassay，MGIA)以及微孔板固相检测法等。玻片检测技术是一种廉价、快速的血型方法。但是这种方法对检测弱抗原亚群不够敏感，而且只能进行正定型检测。MGIA可进行正定型和反定型检测，而且能够避免清洗步骤，但是待检样品中纤维蛋白原或明显的白细胞增多，则会导致假阳性结果，同时需要孵化和离心步骤，因此不适用发展落后的地区，特别是在大多数发展中国家，不方便用作床边检测血型。此外，原材料凝胶颗粒的高价格垄断和有限的检测通量也是限制MGIA在临床和血站进一步广泛使用的不利因素。微孔板固相检测法则提高了检测的灵敏度，但也同样需要复杂的孵育和洗涤步骤。除上述方法外，由于纤维滤纸具有可以过滤出红细胞并保留凝集红细胞的纤维特性，因此滤纸用于检测血型的方法得到了广泛的报道。滤纸检测技术主要是通过物理吸附将抗体固定到滤纸上，吸附能力有限，所以检测的敏感性较低，在临床上没有得到广泛的应用。此外，IgG类的单克隆抗体不能作为固定抗体在这类纤维纸上使用，因为即使有阳性反应，但没有凝集，阳性反应的红细胞(红细胞)仍将被冲走，导致假阴性反应的发生，同时受抗体保存条件限制，不适用于野外紧急条件使用。

发明内容

[0004] 为了克服现有技术的不足，本发明的一个目的是提供一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体，包括生物多层孔隙膜、通过抗原抗体特异性结合而依附在所述生物多层孔隙膜的表面的特异性抗生物多层孔隙膜抗体、与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联结合在一起的交联抗体，本发明提供的功能化生物多层孔隙膜免疫载体可以通过偶联或者抗体抗原特异性结合再与红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原结合，从而进一步用于血型检测；本发明提供的功能化生物多层孔隙膜免疫载体还可以根据需要，选择相应的特异性捕获抗体，进行免疫反应或继续进行免疫选择和结合，从而用于检测和分析病原微生物细胞

抗原抗体、细菌细胞抗原抗体、肿瘤细胞抗原抗体以及各种细胞抗原抗体。

[0005] 本发明提供一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体，包括：

[0006] 生物多层孔隙膜；

[0007] 特异性生物多层孔隙膜抗体，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性结合从而依附在所述生物多层孔隙膜的表面；

[0008] 交联抗体，所述交联抗体与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联结合在一起；

[0009] 其中，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体为能够与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性反应的抗体；

[0010] 所述交联抗体一Fab端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联，另一Fab端能够与特异性抗体结合。

[0011] 优选地，所述特异性生物多层孔隙膜抗体包括鼠源单抗、羊源多抗、兔源单抗/多抗、鸡源多抗；所述交联抗体包括抗鼠多抗、抗羊多抗、抗兔多抗、抗鸡多抗；所述能够与交联抗体Fab端结合的特异性抗体包括鼠源单抗、羊源多抗、兔源单抗/多抗、鸡源多抗。

[0012] 本发明的第二个目的是提供一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法，包括以下步骤：

[0013] S1、将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片，然后将膜片浸入处理液中，在40-70℃水浴中浸泡2-4小时，制得生物多层孔隙膜；

[0014] S2、将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合，洗液清洗，再与交联抗体进行偶联后，洗液清洗，用封闭液封闭后再用洗液清洗，制得如上所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体；

[0015] 其中，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体为能够与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性反应的抗体；

[0016] 所述交联抗体一Fab端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联，另一Fab端能够与特异性抗体结合。

[0017] 优选地，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体用稀释液稀释为终浓度1-100μg/ml；所述交联抗体用稀释液稀释为终浓度1-100μg/ml；其中，所述稀释液为0.01mol/L，PH 7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；

[0018] 优选地，所述处理液为含有1％牛血清白蛋白的0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；

[0019] 优选地，所述洗液为0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；

[0020] 优选地，所述封闭液为用0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液配制的5％脱脂奶粉；其中，单位％表示100ml溶液中的溶质的质量。

[0021] 本发明的第三个目的是提供一种用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体，包括：

[0022] 本发明如上所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体；

[0023] 红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原，通过与所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上的所述交联抗体进行特异性结合而依附在所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上；

[0024] 其中，所述致敏红细胞血型抗原为特异性结合了非血型抗体的红细胞膜抗体的红细胞血型抗原。

[0025] 优选地，所述红细胞血型抗体包括IgM型、IgG型、IgM-IgG型混合型的红细胞A、B、Rh、MNS、Kell、Kidd血型的抗体，所述红细胞血型抗体效价大于1:32。

[0026] 优选地，所述致敏红细胞血型抗原包括致敏A型红细胞抗原、致敏B型红细胞抗原、致敏不规则抗体筛检红细胞抗原、致敏红细胞谱细胞抗原。

[0027] 本发明的第四个目的是提供一种用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法，包括以下步骤：

[0028] S1、将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片，然后将膜片浸入处理液中，在40-70℃水浴中浸泡2-4小时，制得生物多层孔隙膜；

[0029] S2、将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合，洗液清洗，再与交联抗体进行偶联后，洗液清洗，用封闭液封闭后再用洗液清洗，制得如上所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体；

[0030] S3、将红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原与所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上的所述交联抗体进行特异性结合，制得如上所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体；

[0031] 其中，所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体为能够与所述生物多层孔隙膜发生抗原抗体特异性反应的抗体；

[0032] 所述交联抗体一Fab端能与所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体偶联，另一Fab端能够与特异性抗体结合，所述特异性抗体为能够与交联抗体Fab端结合的红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原；

[0033] 所述致敏红细胞血型抗原为特异性结合了非血型抗体的红细胞膜抗体的红细胞血型抗原。

[0034] 优选地，还包括步骤致敏红细胞血型抗原的制备，具体制备致敏红细胞血型抗原的步骤如下：用非血型抗体的红细胞膜抗体与新鲜红细胞反应，待出现1+凝集强度时，用低渗溶液将红细胞裂解，离心收集获得致敏红细胞抗原。

[0035] 优选地，所述低渗溶液为0.1％-0.7％Nacl溶液；

[0036] 优选地，所述离心的转速为12000rpm，离心时间为5min。

[0037] 本发明的第五个目的是提供一种血型检测卡，包括：

[0038] 固相塑料载体，所述固相塑料载体包括卡槽外壳和卡槽内壳，所述卡槽外壳与所述卡槽内壳可拆卸连接；

[0039] 如上所述的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体，所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体位于所述固相塑料载体卡槽外壳的底部；

[0040] 吸水棉，位于固相塑料载体卡槽内壳的底部；

[0041] 隔离膜，放置在所述吸水棉的上方。

[0042] 优选地，所述固相塑料载体的制备材料包括聚乙烯、聚乙烯、聚苯乙烯、苯乙烯-丁二烯-丙烯腈；所述固相塑料载体，还包括检测孔，所述检测孔包括双孔、三孔、多孔；所述隔离膜包括滤纸、纤维素纤维、玻璃纤维垫、多孔高分子材料制成的纤维垫或试纸；所述吸水棉包括棉浆垫、滤纸。

[0043] 优选地，所述血型检测卡的保存或检测所需温度为4-50℃。

[0044] 本发明的第六个目的是提供一种血型的检测方法，包括以下步骤：

[0045] 将待检测血型样品加入到如上所述的血型检测卡的检测孔中，放置至少1分钟；洗液冲洗，观察检测孔的显色情况，显色为红色则为阳性，显色为本色则为阴性；

[0046] 其中，待检测血型样品与血型检测卡中的所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体发生了抗原抗体特异性反应，为阳性；反之，为阴性。

[0047] 优选地，所述洗液为含有0.05％-0.5％Tween-20的缓冲液，洗液PH值为7.0-7.2，用量为200-1000μl。

[0048] 本发明的第七个目的是提供一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体在制备血型检测产品中的应用。

[0049] 本发明的第八个目的是提供一种功能化生物多层孔隙膜免疫载体在制备用于检测和分析病包括但不限于原微生物细胞抗原抗体、细菌细胞抗原抗体、肿瘤细胞抗原抗体的产品中的应用。

[0050] 本发明中，功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备原理是所述特异性抗生物多层孔隙膜抗体的Fab段结合所述生物多层孔隙膜，Fc段游离向外；交联抗体的其中一个Fab段能结合特异性抗生物多层孔隙膜抗体游离Fc段，交联抗体的另一个Fab段能结合与生物多层孔隙膜特异性抗体同种属的特异性抗体，形成功能化的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0051] 本发明中，用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备原理是先通过本发明所提供的功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备方法制备得到功能化生物多层孔隙膜免疫载体，在通过功能化生物多层孔隙膜免疫载体上结合的交联抗体与红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原发生偶联或抗原抗体特异性结合反应制得，可用于血型检测。

[0052] 本发明提供的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体，能够实现快速、准确检测红细胞ABO、Rh、MNS、Kell、Kidd等多种血型系统的血型，可同时进行正定型、反定型、抗体筛检、抗体鉴定等红细胞血型相容性检测，还可根据即时检测需要进行项目选择，以适合医院、家庭以及野外紧急等多种血型以及其它检测要求。

[0053] 本发明利用生物多层孔隙膜的免疫原性以及多层多孔性，利用抗原抗体特异性的亲和结合相互作用等生物学技术将厚棉布、羊毛织物，蚕茧(真丝织物)，或者植物纤维织物制备成具有生物学活性的亲水性生物多层孔隙膜；亲水性生物多层孔隙膜通过与生物多层孔隙膜特异性抗体偶联后再与交联抗体结合制备成功能化生物多层孔隙膜免疫载体，功能化生物多层孔隙膜免疫载体偶联红细胞血型抗体或者致敏红细胞血型抗原后制备成血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体，用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体与隔离膜、吸水棉以及塑料外壳，按顺序组装形成血型检测卡，用于血型相容性检测。红细胞与载体上的抗体若是发生反应，无论是否凝集，都会被载体上的抗体捕获，当膜在洗涤后呈红色时，为阳性结果。相反，如果红细胞和载体上的抗体之间没有特异性抗原抗体反应时，用洗液洗涤时，红细胞穿过多孔隙生物膜并被吸水棉吸走，膜显示本色，为阴性结果，从而实现快速进行血型正定型检测。对于其它血型相容性检测，则是将待检测血浆或者血清加入到反应孔中后，血样中的血型抗体与生物多层孔隙膜上偶联的致敏红细胞血型抗原反应，加入反定型细胞或者筛检细胞或者谱细胞，洗液冲洗后，发生抗原抗体反应的红细胞被捕获固定在多孔隙生物膜上冲洗不掉，生物多层孔隙膜显红色，没发生抗原抗体反应的红细胞经冲洗液冲洗通过多孔隙膜被吸水棉吸走，生物多层孔隙膜膜显示本色，从而实现反定型检测、抗体筛检以及抗体鉴定。

[0054] 相比现有技术，本发明的有益效果在于：

[0055] (1)本发明所采用生物多层孔隙膜来自于厚棉布、羊毛织物、蚕茧(真丝织物)、植物纤维织等天然材料，利用这些天然材料的免疫原性，与其相应的生物多层孔隙膜抗体偶联，再与交联抗体结合制备成了功能化生物多层孔隙膜免疫载体，相对于传统ELISA(酶联免疫吸附)实验中96孔板塑料表面的无序、非特异性结合，特异性生物多层孔隙膜载体表面抗原抗体特异性结合更牢固，位点更明确，特异性更好。

[0056] (2)本发明所采用的生物多层孔隙膜，是多层膜，因此与红细胞血型抗原或致敏红细胞血型抗体结合的表面积大，远大于传统ELISA实验中96孔板微孔表面积，使反应敏感性增强。

[0057] (3)本发明所提供的血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体能够特异性结合待检测血型样品中的血型抗原或血型抗体，吸附能力高且牢固，缩短血型检测的时间，提高血型检测的灵敏度。

[0058] (4)本发明所提供的的血型检测卡，是将固相法和凝集法结合，实现对血型相容性检测，多层孔隙膜的多孔性特点可实现将未反应的红细胞直接冲走，同时尽可能多的捕获发生阳性反应的单个红细胞，截留凝集反应的凝集块，使检测更为敏感、特异、准确。

[0059] (5)本发明所提供的血型检测卡，由于天然蛋白对生物分子具有保护作用，所以本发明的检测卡中最主要生物活性组分都被保护，偶联在生物多层孔隙膜载体上的抗原抗体，保存温度在4-50℃，可保持稳定的抗原活性以及抗体效价，检测卡的稳定性强，保存温度限制小，可常温保存，受户外条件限制小，更适合在恶劣环境中使用。

[0060] (6)本发明的一些优选方案中，血型检测卡结构中包括的所述隔离膜、吸水垫、塑料外壳和内壳，其基质均为常见耗材，易保存，成本低，可获得性高。

[0061] (7)本发明的一些优选方案中，所采用的隔离膜包括但不限于滤纸、纤维素纤维、玻璃纤维垫或者多孔高分子材料制成的纤维垫或试纸，其高分子材料性能以及多孔性可有效分离红细胞防止反渗，使检测背景清晰，准确快速进行血型结果判读。

[0062] (8)本发明的一些优选方案中，所采用的吸水垫可为棉浆垫、滤纸或其他致密的吸水性材料，可有效吸取多余液体，便于立即观察反应结果，缩短血型检测时间，1分钟进行血型判断，实现POCT(即时检测)血型检测。

[0063] (9)本发明所提供的血型检测卡，所采用的垂直渗滤法，可极大减少血液层析以及清洗所需时间，简化操作步骤，缩短检测时间。

[0064] (10)本发明所提供的血型检测卡，用于检测正定型待检测血型样品时，所需待检血型样品的量为5-50μl的人新鲜全血，检测所需血量少，节约样本量。

[0065] (11)本发明的一些优选方案中，所提供的血型检测卡采取的固相塑料载体上的检测孔包括但不限于双孔、三孔、多孔，可根据需要检测红细胞ABO、Rh、Kell、Kidd等已经发现并被国际输血协会承认的血型系统以及反定型、抗体筛检和抗体鉴定。

[0066] (12)本发明所提供的检测方法，结果判定可以采用肉眼进行人工判读，同时也可以结合常规光谱检测进行自动判断。人工判读时，阳性结果与阴性结果区别在于有无红色，颜色差异明显，可快速准确判断。结合常规光谱检测时，可实现血型的批量化检测，以满足大量样本血型检测需求。

[0067] (13)本发明所提供的功能化生物多层孔隙膜免疫载体，除了用于血型检测，还可

根据需要，选择相应的特异性捕获抗体，进行免疫反应，或者继续进行免疫连接和结合，用于包括但不限于病原微生物、细菌、肿瘤以及各种细胞抗原抗体免疫实验检测和分析。

[0068] 上述说明仅是本发明技术方案的概述，为了能够更清楚了解本发明的技术手段，并可依照说明书的内容予以实施，以下以一些实施例来详细说明。本发明的具体实施方式由以下实施例详细给出。

附图说明

[0069] 此处所说明的附图用来提供对本发明的进一步理解，构成本申请的一部分，本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明，并不构成对本发明的不当限定。在附图中：

[0070] 图1为本发明ABO正定型及RhD检测原理图；

[0071] 图2为本发明的ABO反定型检测原理图；

[0072] 图3为本发明的功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备工艺流程图；

[0073] 图4为本发明的用于血型相容性检测的多层孔隙膜免疫载体的制备工艺

[0074] 流程图；

[0075] 图5为本发明的血型检测卡结构分解图；

[0076] 图6为本发明一实施例中的ABO正定型检测结果图。

[0077] 其中，图中：1、卡槽外壳；2、卡槽内壳；3、第一检测孔；4、第二检测孔；5、第三检测孔；6、凹槽。

具体实施方式

[0078] 为了可以更充分地理解本文描述的发明，阐述以下实施例。应当理解这些实施例仅用于说明性目的并且不应被理解为以任何方式限制本发明。

[0079] 先对本文中所使用的的一些术语进行解释。

[0080] “致敏红细胞”是指不完全抗体或自身抗体与红细胞表面抗原结合或附着在红细胞膜上使其致敏。

[0081] “红细胞谱细胞”指一组携有绝大多数临床有意义血型抗原的，用于红细胞血型鉴定的多人份红细胞。

[0082] “非血型抗体的红细胞膜抗体”是指红细胞膜抗体但不是针对红细胞血型系统的抗体。

[0083] 为了可以更充分地理解本文描述的发明，阐述以下实施例。

[0084] 实施例1

[0085] 如图3所示，功能化生物多层孔隙膜免疫载体的制备，包括如下步骤：

[0086] 1)制备生物多层孔隙膜

[0087] 首先将蚕茧(真丝织物)从长轴方向剪开，去除蚕蛹、杂丝及其他杂质。用纯水清洗两遍，放入100℃水中浸泡15min，取出后室温晾干。然后用打孔器打成5-9mm圆形生物多层孔隙膜。加入处理液浸泡蚕片，50℃水浴中孵育2小时。用真空干燥机真空除气泡一次，所有圆形生物多层孔隙膜都沉入处理液底部，50℃水浴中继续孵育2小时，洗液洗涤2次，制备得到所需生物多层孔隙膜。

[0088] 2)制备功能化生物多层孔隙膜免疫载体

[0089] 向步骤1)中洗好的生物多层孔隙膜中加入终浓度20μg/ml抗蚕丝蛋白抗体(抗体用量约200μl/片)室温振荡反应2小时,4℃过夜。洗液洗涤3次,通过商业途径可采购的HRP-anti-mouse Ig(G+A+M)检测鉴定,37℃反应1小时后,洗液洗涤3次,加入200μl/片的沉淀性底物显色15min,膜片完全显深紫色。向偶联好蚕丝蛋白抗体的生物多层孔隙膜中加入羊抗鼠IgG交联抗体,终浓度20μg/ml,室温振荡反应2小时,4℃过夜。洗液洗涤3次,用HRP-anti-GST检测鉴定,37℃反应1小时后,37℃用封闭液封闭2小时,洗液洗涤3次,膜片完全显深紫色,制备得到功能化生物多层孔隙膜免疫载体;其中,在偶联和封闭过程中需将膜完全浸泡。

[0090] 实施例2

[0091] 如图4所示,用于人ABO、Rh(D)血型正定型检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备,包括如下步骤:

[0092] 1)按照实施例1所述方法制备功能化生物多层孔隙膜免疫载体;

[0093] 2)功能化生物多层孔隙膜免疫载体偶联红细胞血型抗体

[0094] 向步骤1)所得的功能化生物多层孔隙膜免疫载体中分别加入效价为128的通过商业途径可采购的单克隆抗-A,抗-B,4℃过夜。20-25℃室温晾干,4℃保存备用,制得用于人ABO血型检测的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0095] 向另一部分生物多层孔隙膜免疫载体中加入单克隆抗人IgG终浓度20μg/ml,4℃过夜后,洗液洗涤3次,加入效价为512抗-D,4℃过夜。室温20-25℃晾干,4℃保存备用,制得用于人Rh(D)血型检测的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0096] 实施例3

[0097] 用于人ABO血型反定型检测的生物多层孔隙膜免疫载体的制备,包括如下步骤:

[0098] 1)按照实施例1所述方法制备功能化生物多层孔隙膜免疫载体。

[0099] 2)致敏红细胞血型抗原的制备

[0100] 取新鲜A型、B型和O型红细胞,分别用生理盐水配制成50%红细胞悬液,分别对应加入等体积的单克隆抗A、抗B和抗H(效价8),室温反应5分钟,此时红细胞将出现细沙状凝集(凝集强度1+),加入5倍体积的低渗溶液(0.1%-0.7%Nacl溶液),室温静置1分钟后12000rpm离心5分钟。弃去上清,收集获得致敏红细胞血型抗原,并用生理盐水悬浮至原体积。

[0101] 3)功能化生物生物多层孔隙膜免疫载体与致敏红细胞血型抗原发生抗体-抗体特异性结合制备用于人ABO血型反定型检测的生物多层孔隙膜免疫载体

[0102] 向步骤1)所得的功能化生物多层孔隙膜免疫载体中加入步骤2)制备的致敏A型、B型和O型红细胞抗原,4℃反应过夜。取出,20-25℃晾干,4℃保存备用,制得用于人ABO血型反定型检测的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0103] 实施例4

[0104] 用于红细胞血型抗体筛检的的生物多层孔隙膜免疫载体的制备,包括如下步骤:

[0105] 1)按照实施例1所述方法制备功能化生物多层孔隙膜免疫载体。

[0106] 2)不规则抗体筛检红细胞抗原的制备

[0107] 取分别来自3个人的不规则抗体筛检红细胞I、II、III,分别用生理盐水配制成50%红细胞悬液,分别加入等体积的单克隆抗H(效价8),室温反应5分钟,此时红细胞将出

现细沙状凝集(凝集强度1+)，加入5倍体积的低渗溶液(0.1％-0.7％Nacl溶液)，室温静置1分钟后12000rpm离心5分钟。弃去上清，收集获得致敏不规则抗体筛检红细胞抗原I、II、III。并用生理盐水悬浮至原体积。

[0108] 3)功能化生物多层孔隙膜免疫载体和不规则抗体筛检红细胞抗原发生抗体-抗体特异性结合

[0109] 向步骤1)制得的功能化生物多层孔隙膜免疫载体中加入步骤2)制备的不规则抗体筛检红细胞抗原I、II、III，4℃反应过夜。取出，20-25℃晾干，4℃保存备用，制得用于红细胞血型抗体筛检的的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0110] 实施例5

[0111] 用于红细胞血型抗体鉴定的的生物多层孔隙膜免疫载体的制备，包括如下步骤：

[0112] 1)按照实施例1所述方法制备功能化生物多层孔隙膜免疫载体。

[0113] 2)致敏红细胞谱细胞抗原的制备

[0114] 取12组红细胞谱细胞，分别用生理盐水配制成50％红细胞悬液，分别加入等体积的单克隆抗H(效价8)，室温反应5分钟，此时红细胞将出现细沙状凝集(凝集强度1+)，加入5倍体积的低渗溶液(0.1％-0.7％Nacl溶液)，室温静置1分钟后12000rpm离心5分钟。弃去上清，收集获得12组致敏红细胞谱细胞抗原，并用生理盐水悬浮至原体积。

[0115] 3)功能化生物多层孔隙膜免疫载体和致敏红细胞谱细胞抗原发生抗原抗体特异性结合

[0116] 向12份步骤1)制得的功能化生物多层孔隙膜免疫载体偶联中分别加入步骤2)制备的12组红细胞谱细胞抗原，4℃反应过夜。取出，20-25℃晾干，4℃保存备用，制得用于红细胞血型抗体鉴定的生物多层孔隙膜免疫载体。

[0117] 应当解释的，实施例1-5中，所述特异性生物多层孔隙膜抗体用稀释液稀释为终浓度1-100μg/ml；所述交联抗体用稀释液稀释为终浓度1-100μg/ml；其中，所述稀释液为0.01mol/L，PH 7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；

[0118] 所述处理液为含有1％牛血清白蛋白的0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；所述洗液为0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液；所述封闭液为用0.01mol/L，PH为7.0-7.2的磷酸盐缓冲液配制的5％脱脂奶粉；其中，单位％表示100ml溶液中的溶质的质量。

[0119] 实施例6

[0120] 如图5所示，一种血型检测卡，包括聚乙烯材质的固相塑料载体，所述固相塑料载体包括卡槽外壳1和卡槽内壳2，卡槽外壳1和卡槽内壳2可拆卸地连接；所述血型检测卡卡槽外壳1还设有第一检测孔3、第二检测孔4、第三检测孔5；所述第一检测孔3、第二检测孔4、第三检测孔5的底部放置实施例2-实施例5任一实施例所制备得到的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体；所述卡槽内壳2设有与第一检测孔3、第二检测孔4、第三检测孔5相对应的3个凹槽6，所述凹槽6的底部放置吸水棉，所述吸水棉为棉浆垫；所述吸水棉上放置隔离膜，所述隔离膜为玻璃纤维垫。

[0121] 应当理解的，所述检测孔的数量不仅仅局限于为3个，根据检测卡检测对象和检测条件具体设置，可以为双孔、三孔、多孔。

[0122] 实施例7

[0123] ABO正定型及RhD血型检测及检测结果

[0124] 采用实施例6所提供的血型检测卡，检测孔的数量为3，第一检测孔3、第二检测孔4、第三检测孔5底部分别装有实施例2所制备的偶联了抗-A、抗-B、抗-D的生物多层孔隙膜免疫载体；

[0125] 取新鲜全血，向第一检测孔3、2、3中分别滴加10μl全血，室温放置1分钟。每孔分别滴加3滴冲洗液(PH值为7.0的0.05％Tween-20的缓冲液)，然后观察红细胞分布情况并判定检测结果，检测原理如图1所示。

[0126] 如图6所示，图6为本实施例检测卡的显示结果。发生抗原抗体反应的RBC被捕获固定阻滞在多孔隙生物膜上冲洗不掉，检测孔中有红细胞富集呈现红色，为阳性结果；反之，没发生抗原抗体反应的RBC经冲洗液冲洗通过多孔隙膜被吸水棉吸走，检测孔无红细胞富集呈现为本色，则为阴性结果。其中，若检测孔底部的用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体中结合有抗-A，则检测孔本色为蓝色；结合有抗-B，则检测孔本色为黄色；结合有抗-D，则检测孔本色为无色。最后按照出现阳性结果的检测孔标识判定结果。

[0127] 图6为显色孔显色情况，由于图6不是彩图，色彩观察不明显，本实施例的颜色显示结果还可以参表1。

[0128] 表1检测结果显色情况表

[0129]

血型 / 检测孔含有的抗体	人A血型，RhD（+）	人B血型，RhD（+）	人O血型，RhD（+）	人AB血型，RhD（+）
抗-A	红色	蓝色	蓝色	红色
抗-B	黄色	红色	黄色	红色
抗-D	红色	红色	红色	红色

[0130] 实施例8

[0131] ABO反定型检测

[0132] 采用实施例6所提供的血型检测卡，检测孔的数量为3，第一检测孔3、第二检测孔4、第三检测孔5底部分别装有实施例3所制得的特异性结合了致敏红细胞A血型抗原、致敏红细胞B血型抗原、致敏红细胞H抗原的生物多层孔隙膜免疫载体；

[0133] 取新鲜待检样本(血浆或血清)，向第一检测孔3、2、3中分别滴加一滴样本，室温放置1分钟。向对应孔中分别加入1滴ABO反定型红细胞，室温放置1分钟。然后再向相应孔中分别滴加每孔分别滴加3滴冲洗液(PH值为7.0的0.05％Tween-20的缓冲液)，观察红细胞分布情况并判定检测结果，检测原理如图2所示。

[0134] 发生抗原抗体反应的红细胞被捕获固定在多孔隙生物膜上冲洗不掉，检测孔中有红细胞富集呈现红色，则为阳性结果；反之，没发生抗原抗体反应的红细胞经冲洗液冲洗通过多孔隙膜被吸水棉吸走，检测孔无红细胞富集呈现为膜本色，则为阴性结果。最后按照出现阳性结果的检测孔标识判定ABO反定型结果。

[0135] 实施例9

[0136] 不规则抗体筛检

[0137] 采用实施例6所提供的血型检测卡，检测孔的数量为3，第一检测孔3、第二检测孔

4、第三检测孔5底部分别装有实施例4分别用3个人的不规则抗体筛检红细胞I、II、III所制得的用于红细胞血型抗体鉴定的生物多层孔隙膜免疫载体；

[0138] 取新鲜待检样本(血浆或血清)，向检测孔中分别滴加一滴样本，室温放置1分钟。向对应孔中分别加入1滴不规则抗体筛检红细胞I、II、III，室温放置1分钟。然后再向相应孔中分别滴加每孔分别滴加3滴冲洗液(PH值为7.0的0.05％Tween-20的缓冲液)，观察红细胞分布情况并判定检测结果，检测原理如图2所示。

[0139] 发生抗原抗体反应的RBC被捕获固定在多孔隙生物膜上冲洗不掉，检测孔中有红细胞富集呈现红色，则为阳性结果；反之，没发生抗原抗体反应的RBC经冲洗液冲洗通过多孔隙膜被吸水棉吸走，检测孔无红细胞富集呈现为本色，则为阴性结果。最后按照出现阳性结果的检测孔标识判定抗体筛检结果。

[0140] 实施例10

[0141] 红细胞抗体鉴定

[0142] 采用实施例6所提供的血型检测卡，检测孔的数量为12，第一检测孔3-12底部分别装有实施例5分别使用12组致敏红细胞谱细胞抗原制得的用于红细胞血型抗体鉴定的生物多层孔隙膜免疫载体；

[0143] 取新鲜待检样本(血浆或血清)，向12个检测孔中分别滴加一滴样本，室温放置1分钟。向对应孔中分别加入1滴红细胞谱细胞，室温放置1分钟。然后再向相应孔中分别每孔分别滴加3滴冲洗液，观察红细胞分布情况并判定检测结果，检测原理如图2所示。

[0144] 发生抗原抗体反应的红细胞被捕获固定在多孔隙生物膜上冲洗不掉，检测孔中有红细胞富集呈现红色，则为阳性结果；反之，没发生抗原抗体反应的红细胞经冲洗液冲洗通过多孔隙膜被吸水棉吸走，检测孔无红细胞富集呈现为本色，则为阴性结果。最后按照出现阳性结果的检测孔标识判定抗体鉴定结果。

[0145] 本发明公开的检测方法有利于促进临床红细胞血型相容性检测，包括红细胞正定型、反定型、抗体筛检、抗体鉴定等，可实现快速、准确检测红细胞ABO、Rh、MNS、Kell、Kidd等多种血型系统血型，还可根据POCT检测(即时检测)需要进行不同检测项目选择，以适合医院、家庭以及野外紧急等多种血型检测情况。

[0146] 本发明所提供的检测卡的保存或检测所需温度为4℃-50℃，克服现有的血型检测产品对保存或检测温度的严格要求。

[0147] 尽管本发明的实施方案已公开如上，但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用，它完全可以被适用于各种适合本发明的领域，对于熟悉本领域的人员而言，可容易地实现另外的修改，因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下，本发明并不限于特定的细节和这里示出的实施例。

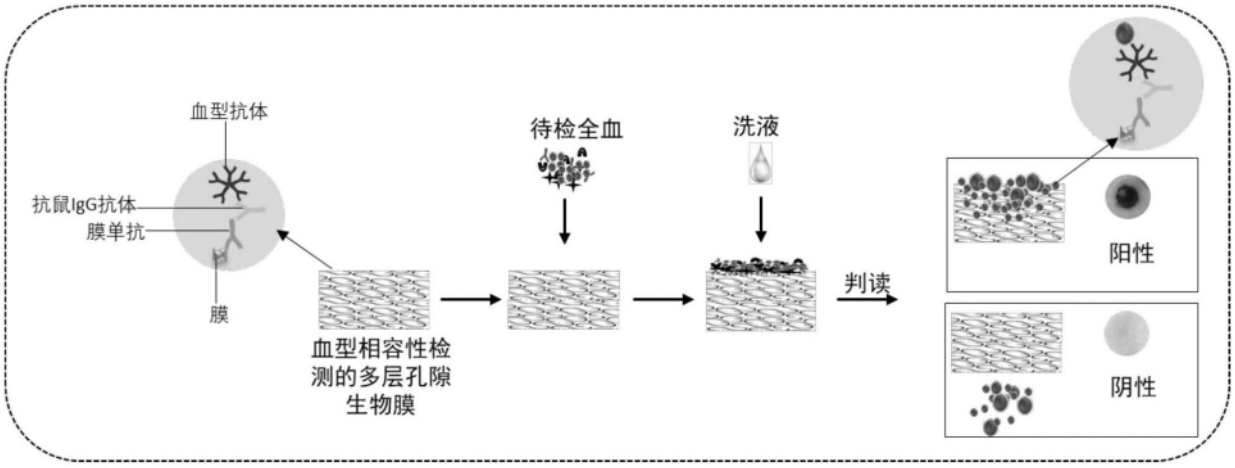

血型抗体
抗鼠IgG抗体
膜单抗
膜
血型相容性检测的多层孔隙生物膜
待检全血
洗液
判读
阳性
阴性

图1

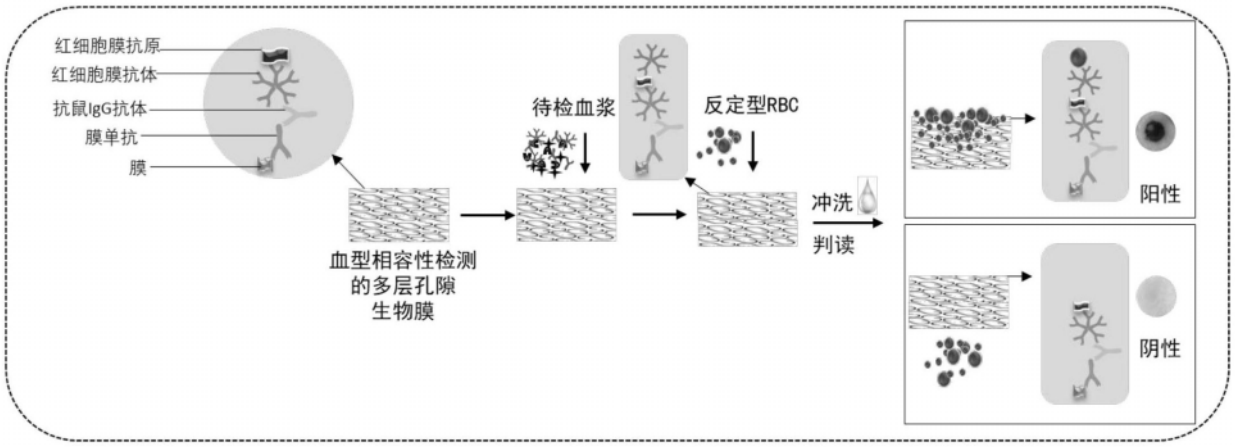

红细胞膜抗原
红细胞膜抗体
抗鼠IgG抗体
膜单抗
膜
血型相容性检测的多层孔隙生物膜
待检血浆
反定型RBC
冲洗
判读
阳性
阴性

图2

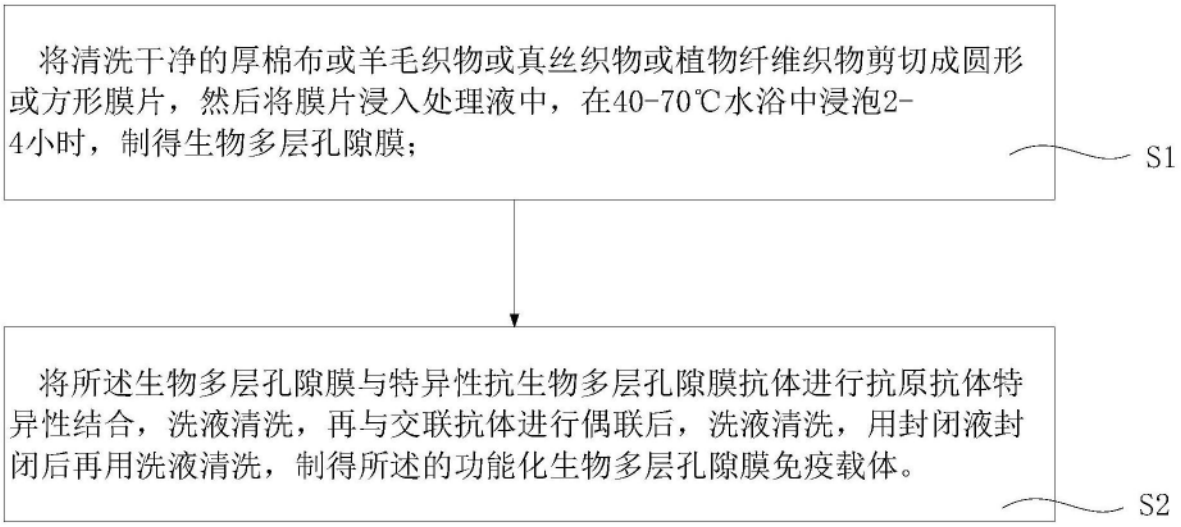

将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片，然后将膜片浸入处理液中，在40-70℃水浴中浸泡2-4小时，制得生物多层孔隙膜；
S1
将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合，洗液清洗，再与交联抗体进行偶联后，洗液清洗，用封闭液封闭后再用洗液清洗，制得所述的功能化生物多层孔隙膜免疫载体。
S2

图3

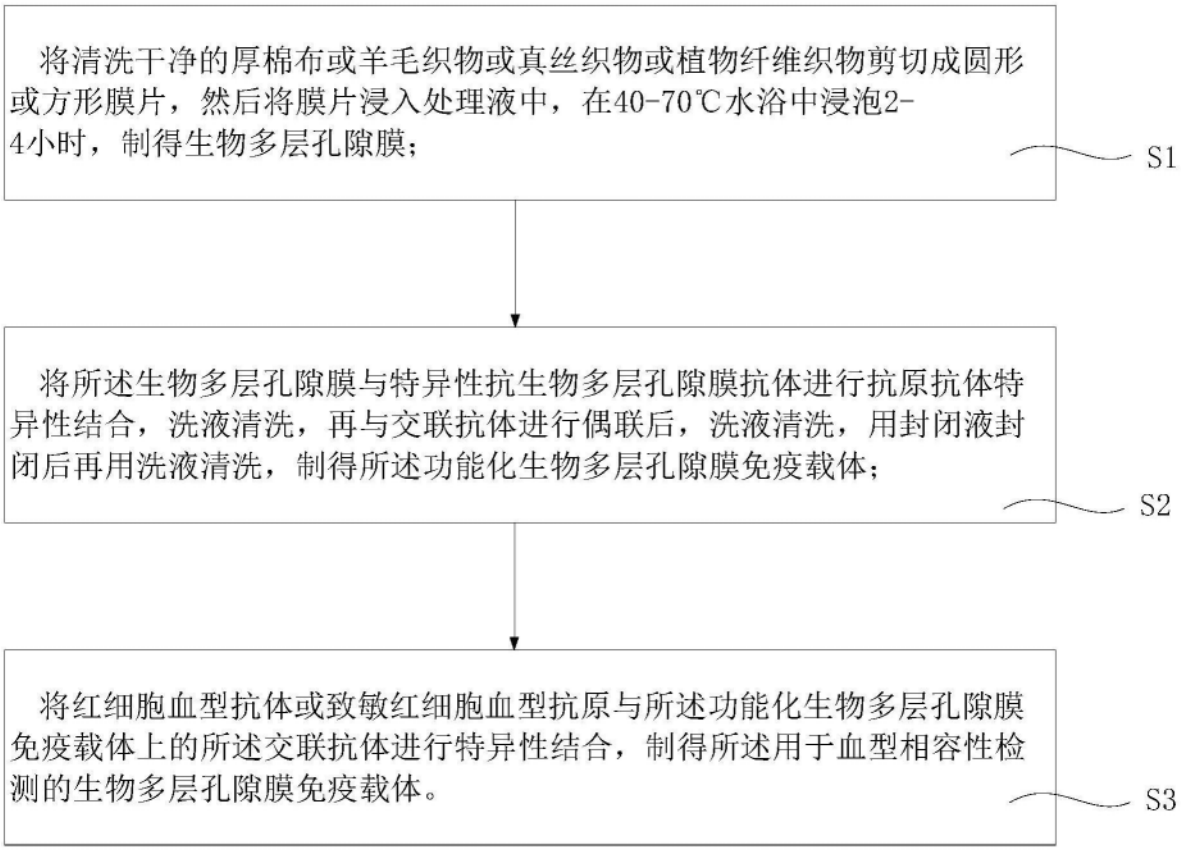

将清洗干净的厚棉布或羊毛织物或真丝织物或植物纤维织物剪切成圆形或方形膜片，然后将膜片浸入处理液中，在40-70℃水浴中浸泡2-4小时，制得生物多层孔隙膜；
S1
将所述生物多层孔隙膜与特异性抗生物多层孔隙膜抗体进行抗原抗体特异性结合，洗液清洗，再与交联抗体进行偶联后，洗液清洗，用封闭液封闭后再用洗液清洗，制得所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体；
S2
将红细胞血型抗体或致敏红细胞血型抗原与所述功能化生物多层孔隙膜免疫载体上的所述交联抗体进行特异性结合，制得所述用于血型相容性检测的生物多层孔隙膜免疫载体。
S3

图4

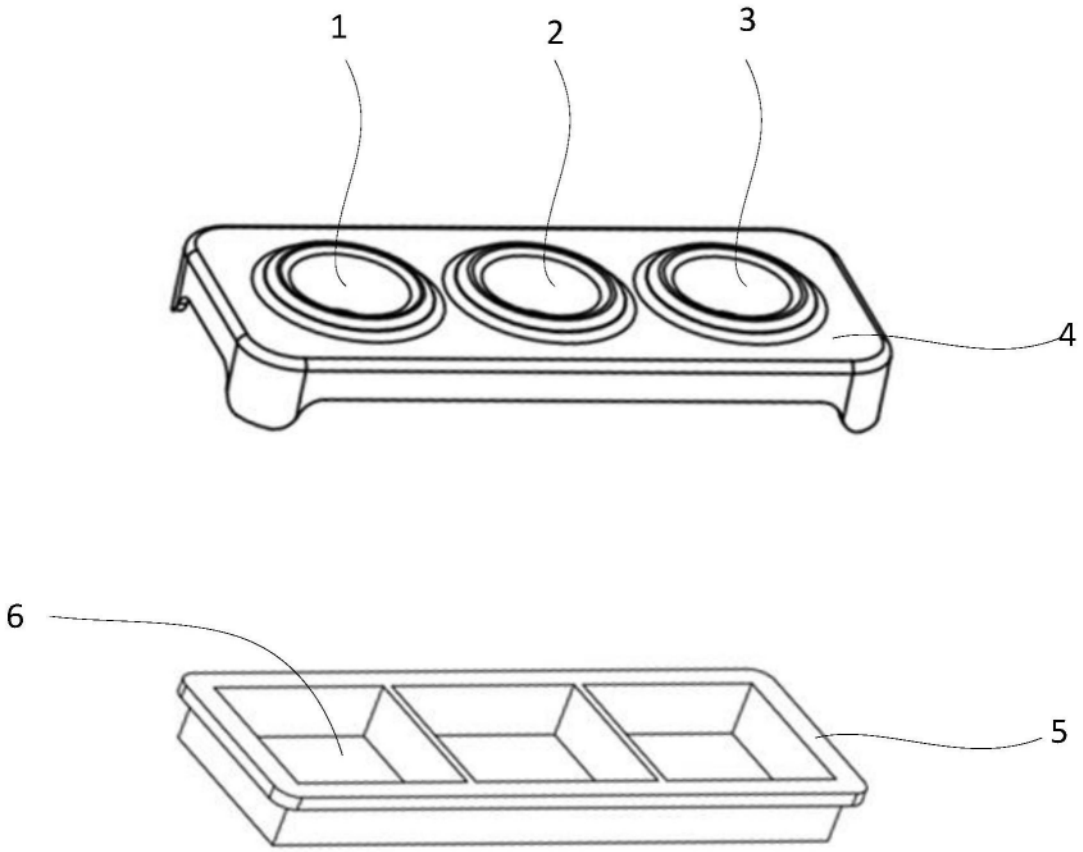

1
2
3
4
6
5

图5

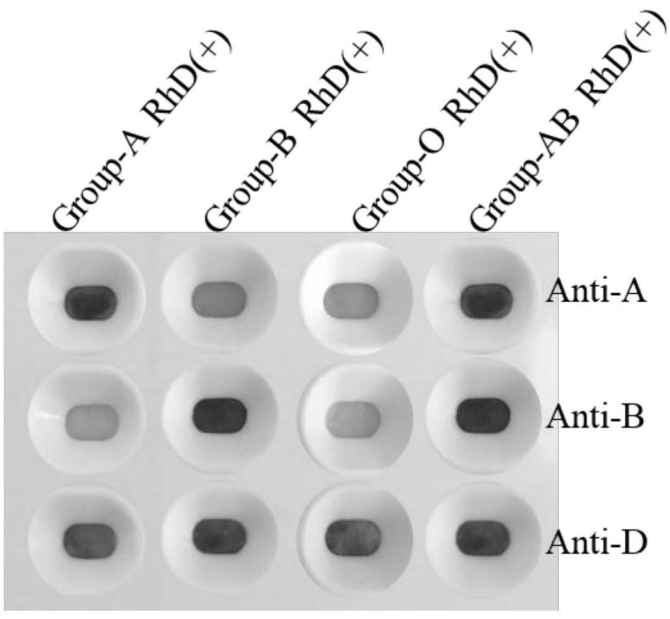

Group-A RhD(+)
Group-B RhD(+)
Group-O RhD(+)
Group-AB RhD(+)
Anti-A
Anti-B
Anti-D

图6