



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201217784 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100125771

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/553 (2006.01)**

**G01N33/80 (2006.01)**

(30)優先權：2010/07/21 法國

1055973

2010/11/02 美國

61/409,393

(71)申請人：迪卡斯特公司 (法國) DIAGAST (FR)

法國

(72)發明人：法庫尼爾 拉瑞斯 FAUCONNIER, LAURENCE (FR)；巴爾貝瑞 伊斐絲

BARBREAU, YVES (FR)；布魯特 阿爾諾 BOULET, ARNAUD (FR)；札克奧

馬哈 ZAKHOUR, MAHA (LB)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：55 項 圖式數：18 共 105 頁

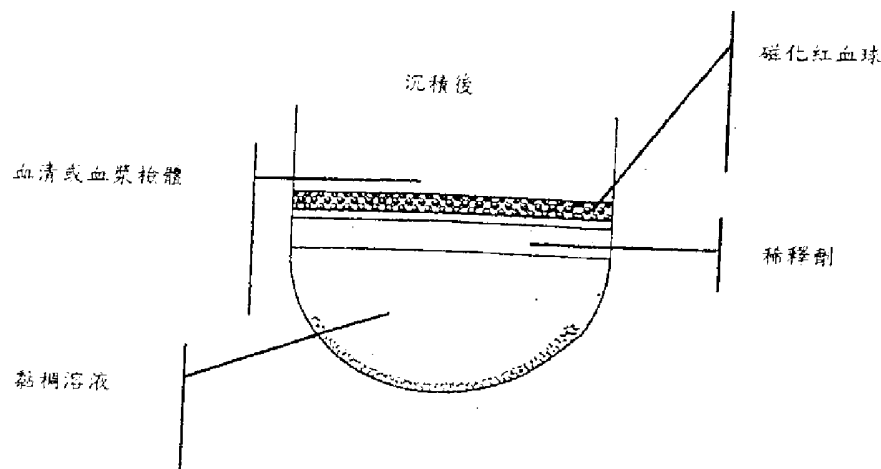
(54)名稱

用於在血型檢定及表型檢定中顯現抗體 / 抗原複合物之磁性免疫診斷方法及套組

MAGNETIC IMMUNODIAGNOSTIC METHOD AND KIT FOR THE DEMONSTRATION OF ANTIBODY/ANTIGEN COMPLEXES IN ERYTHROCYTE BLOOD GROUPING AND PHENOTYPING

(57)摘要

本發明係關於用於顯現血型及表型之抗體/抗原複合物之磁性免疫診斷方法及套組。該方法涉及研究及/或鑑定抗體或抗原，較佳是血型之抗-抗原抗體或抗原。該方法製備以抗血型糖蛋白 A 抗體包覆之磁粒之懸浮液，該抗血型糖蛋白 A 抗體能識別及特異性地磁化紅血球。本發明亦包括用於實行該方法之裝置及套組。





(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 201217784 A1

(43)公開日：中華民國 101 (2012) 年 05 月 01 日

(21)申請案號：100125771

(22)申請日：中華民國 100 (2011) 年 07 月 21 日

(51)Int. Cl. : **G01N33/553 (2006.01)**

**G01N33/80 (2006.01)**

(30)優先權：2010/07/21 法國

1055973

2010/11/02 美國

61/409,393

(71)申請人：迪卡斯特公司 (法國) DIAGAST (FR)

法國

(72)發明人：法庫尼爾 拉瑞斯 FAUCONNIER, LAURENCE (FR)；巴爾貝瑞 伊斐絲

BARBREAU, YVES (FR)；布魯特 阿爾諾 BOULET, ARNAUD (FR)；札克奧

馬哈 ZAKHOUR, MAHA (LB)

(74)代理人：洪武雄；陳昭誠

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：55 項 圖式數：18 共 105 頁

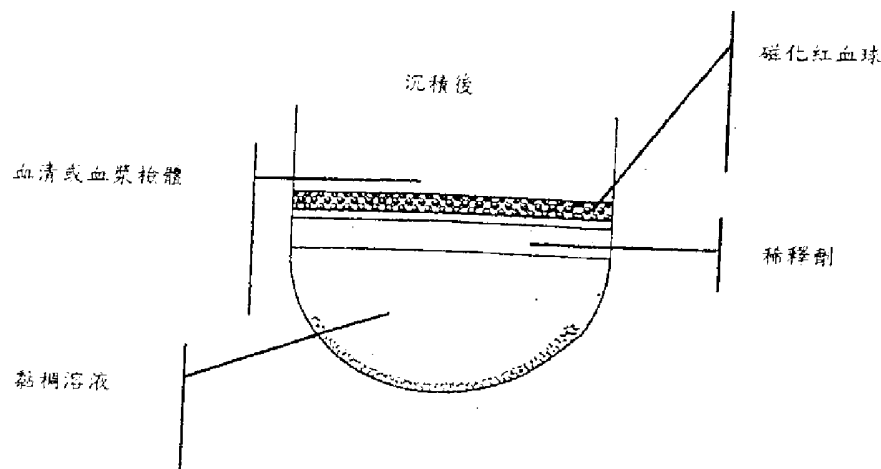
(54)名稱

用於在血型檢定及表型檢定中顯現抗體 / 抗原複合物之磁性免疫診斷方法及套組

MAGNETIC IMMUNODIAGNOSTIC METHOD AND KIT FOR THE DEMONSTRATION OF ANTIBODY/ANTIGEN COMPLEXES IN ERYTHROCYTE BLOOD GROUPING AND PHENOTYPING

(57)摘要

本發明係關於用於顯現血型及表型之抗體/抗原複合物之磁性免疫診斷方法及套組。該方法涉及研究及/或鑑定抗體或抗原，較佳是血型之抗-抗原抗體或抗原。該方法製備以抗血型糖蛋白 A 抗體包覆之磁粒之懸浮液，該抗血型糖蛋白 A 抗體能識別及特異性地磁化紅血球。本發明亦包括用於實行該方法之裝置及套組。



## 六、發明說明：

## 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於用於顯現抗體/抗原複合物之磁性免疫診斷方法。該方法涉及研究及/或鑑定抗體或抗原，較佳是血型之抗-抗原抗體或抗體。該方法利用包覆有抗血型糖蛋白 A (anti-glycophorin A) 抗體之磁粒之懸浮液，其能識別及特異性磁化紅血球。本發明亦包括用於實行該方法之裝置及套組。

## 【先前技術】

目前，輸血係藉由靜脈注射取自供體(donor)血液之濃縮紅血球製劑(即紅血球濃縮液(globular concentrates))。

輸血的主要危險在於可能將紅血球抗原及其抗體一併帶入受血者(接受輸血的人)之體內。紅血球膜抗原，尤其是血型(或系統)抗原被發現存在於紅血球(erythrocytes, 亦被稱為 red cells 或 red blood cells)之表面，其可被免疫系統識別而激發免疫反應及溶血。此等免疫反應之結果可從沒有臨床徵象之輸血不足，乃至輕微的臨床反應(焦慮、顫抖)、嚴重的臨床反應(休克、血紅素尿、腎衰竭)或劇烈的臨床反應(休克、散發性靜脈內溶血)，甚至導致死亡。

若受血者沒有對抗供體之紅血球抗原之循環抗體，即謂供體之紅血球與受血者之血液相容。在構成血型之紅血球膜抗原之所有抗原性變型之中，至目前為止在人類中已

鑑定出 20 種紅血球抗原系統：具有 A、B 及 H 抗原之 ABO 系統，具有 D、E 或 e、以及 C 或 c 抗原之恆河猴(Rhesus)系統，具有 K 或 k 抗原之凱爾(Kell)系統，達菲(Duffy)系統(Fya；Fyb)，基德(Kidd)系統(Jka、Jkb)，MNSs 系統或在實務上不常被研究之其他系統諸如盧瑟輪(Lutheran)、路易士(Lewis)等。具有相同的紅血球抗原組合之個體具有相同的血型。當使用數個抗原系統時，血型甚至變得更為複雜及多樣。

除了在病理狀況，例如在自體免疫疾病之情況之外，個體之血清可含有二類型對抗紅血球抗原之抗體：

a) 所謂的對抗 ABO 系統之抗原之常規抗體(例如在 B 型個體中之抗 A 抗體)。此等為 IgM 型免疫球蛋白，其能夠在試管中凝集紅血球。該現象被應用於藉由貝絲-文森特(Beth-Vincent)檢驗及西莫寧(Simonin)檢驗(分別為正向及反向血型檢定)來測定個體之 ABO 系統血型。貝絲-文森特檢驗可以測定紅血球所帶之抗原(抗原表型)，而西莫寧檢驗可以進行與其互補之研究，換言之，可以檢測在個體之血清中循環之抗 A 抗體及/或抗 B 抗體。在貝絲-文森特檢驗中，係使個體之紅血球與檢驗用血清或檢驗用抗體接觸。此等血清或抗體之各個對於 ABO 系統之抗原皆具有精確的特異性。所以貝絲-文森特檢驗為使用檢驗用血清進行之紅血球凝集檢驗。在西莫寧檢驗(亦被稱為反向檢驗)中，係使個體之含有對抗 ABO 系統抗原之循環抗體的血清或血漿與檢驗用紅血球接觸。該等檢驗用紅血球之各個屬

於 ABO 系統之特異性抗原群。所以，西莫寧檢驗為使用檢驗用紅血球進行之血清凝集檢驗。

b) 所謂的非常規(irregular)(或免疫性)抗體，其非必然存在於血清中且係對抗非 ABO 系統之抗原。此等最常為 IgG 型抗體，其於外來紅血球誘發抗原性刺激時出現。例如，於輸血期間對於一種或多種抗原產生免疫後，或者於懷孕期間，尤其於生產時，母體對於與母親血型不同之胎兒紅血球抗原產免疫反應時，均會誘生非常規抗體。

此等非常規抗體之篩選亦被稱為非常規凝集檢驗(IAT)。該檢驗用於檢測個體之血液中是否存在對抗各種紅血球抗原之 IgG。因此，該檢驗之目的為顯現此等抗體在檢驗用紅血球上之結合，且該檢驗用紅血球之抗原為已知。同時對許多類型之紅血球進行該方法，結果之比較可以鑑定出所存在之 IgG 之特異性。

免疫原性最強之抗原諸如恆河猴 D(RhD)發生免疫反應之危險最大，但其他恆河猴類型(E>c>e>C)之抗原、凱爾系統(K)之抗原，達菲系統之抗原(Fya、Fyb)，基德系統之抗原(Jka、Jkb)等亦會發生免疫反應。

在實務上，當進行輸血時，無法考量所有此等抗原，因為臨時無法得到完全相符的血型，尤其是一些抗原組合十分稀少。標準輸血作業只將 ABO 血型及恆河猴 D(Rh<sup>+</sup>或 Rh<sup>-</sup>)列入考量。只有在有非常規凝集素之危險之情況，才將許多其他系統列入考量，尤其是恆河猴 C 及 E 抗原以及凱爾系統抗原。所以，就此等危險情況而言，要確保供體

之血型與受血者之血型相容，將此等非常規凝集素之存在或產生危險性列入考量十分重要。

因此，在具有非常規抗紅血球抗體之受血病患中，或在危險之狀況，諸如接受多次輸血但不具有抗紅血球非常規抗體之病患中，或在懷孕婦女中，以供體之紅血球上沒有受血者之抗體所對抗或可能對抗之抗原的方式來選擇所輸入之紅血球濃縮液單位頗為重要。

對於此等病人必須強制執行該相容性檢驗以及對所有受血者，在投予紅血球濃縮液之前，預先於存在受血者之血清或血漿下使用供體之紅血球進行直接相容性檢驗。在用於 IAT 之技術中，應該既未發現凝集反應亦未發現溶血反應。

在臨床輸血實務上，對於受血者及供體，除了藉由研究常規抗體之存在與否而檢定 ABO 系統之抗原之外，尚需進行紅血球表型檢定，即研究及鑑定紅血球表面上 ABO 系統以外之血型抗原。

對於受血者及供體，可視危險狀況之程度，選擇進行下述 3 種層級之紅血球表型鑑定，以提供受血者相容的紅血球濃縮液：

- ABO 血型之測定、及標準恆河猴型(Rhesus)之測定(抗原 D 之存在與否)
- 凱爾(Kell)表型及恆河猴表型之測定(抗原 C、E、c、e 及 K 之存在與否)
- 延伸(或擴大範圍)表型之測定(達菲系統抗原(Fya、

Fyb)，基德系統抗原(Jka、Jkb)及 MNSs 系統抗原(S 及 s)之存在與否)；視危險之類型及/或在受血者之血清中所發現之非常規抗體，亦可研究其他抗原。

一般而言，表型檢定所常用之技術包含使用含有適當抗體之檢驗用血清來篩選所研究抗原之存在與否。較佳地，在此等檢驗用血清中所含之此等抗體在本質上為凝集性(IgM 或 IgA)，藉此，當待進行表型檢定之紅血球帶有與血清中所存在之抗體對應之抗原時，該等紅血球可全部或部分凝集。不過，也可使用非凝集性檢驗用抗體(IgG 型)，在此情況，凝集係由抗免疫球蛋白激發，且於離心步驟及再懸浮所得到之殘餘物後，凝集物變得可以看見(此稱為庫姆氏(Coombs)間接技術)。當使用非凝集性檢驗用抗體時，與紅血球結合之此等檢驗用抗體亦可藉由與固相結合之抗免疫球蛋白來顯現(免疫-吸附技術)。結果係用肉眼或藉由適當的裝置來讀取。

為了研究或鑑定待檢驗之病患血清或血漿檢體中之抗血型抗原抗體(ABO 系統之常規抗體或在 IAT 中之非常規抗體)，使病患之血漿或血清與紅血球(亦被稱為檢驗用紅血球)接觸，該等紅血球對於許多血型系統(ABO 系統、恆河猴系統、凱爾系統、達菲系統、基德系統、MNSs 等)具有已知的抗原性。

在 IAT 之情況，可能存在之抗體較可能為非凝集性，所用之技術為間接庫姆氏法，其係藉由使用抗免疫球蛋白來進行凝集或藉由免吸附於包覆有抗免疫球蛋白之固相來

進行。

就 IAT 而言，第 1 步驟包含使用被稱為篩選用紅血球之紅血球樣板(panel)(包含 2 種或 3 種來自不同血型之紅血球，以包括最大數目之在輸血上有重要性之抗原的方式來選擇此等紅血球)來檢測(但非鑑定)非常規抗體之存在與否。當篩選結果為陽性時，所存在之非常規抗體之特異性之鑑定係藉由被稱為鑑定用紅血球之紅血球樣板來進行，該紅血球樣板包括在眾多已知之主要血型系統中之 10 至 15 種，甚至 20 種不同表型之紅血球。

在相容性檢驗(亦被稱為交叉比對)之情況，使源自用於輸血之血袋之供體紅血球與病患之血清或血漿接觸。通常，進行離心步驟以觀察因病患血清中存在會與供體紅血球反應之抗體而產生之凝集(ABO 不相容性、或者存在 IgM 型或 IgA 型非常規抗體)。若第 1 步驟為陰性，隨後使用抗免疫球蛋白來研究非常規抗體(間接庫姆氏研究)。

在輸血領域中，用於表型檢定或 IAT 之技術有許多變型。此等技術可在蛋白石製盤(opaline plate)上、在試管中、在微量盤之孔中或在凝膠管柱中由人工執行；或者藉由配送檢體及試劑用之機器人、振搖器、培育器、離心機、自動讀取器以及適用於執行此等技術之程式而完全地自動化。

所使用之技術包括：對抗血型抗原之抗體或血型抗原之存在係依據離心後使用透明的迷你過濾管柱(葡聚糖(Sephadex™)凝膠或微珠粒)來顯現紅血球凝集而判定之技

術，其中位於迷你過濾管柱上端之開口係做為培育室，且該管柱之截留閾值(cut-off threshold)係選擇於離心後能防止凝集之紅血球通過管柱者(尤其請參見專利EP0194212或EP0755719)。

可引用之技術尚有表型檢定或 IAT，其係依據離心並接著免疫吸附之後經抗體敏化之紅血球之顯現，其中使用由凝膠或液體所構成之分隔障壁，該凝膠或液體係選擇於離心期間其密度只允許紅血球通過該障壁者；再者，反應容器之下部區域係用抗免疫球蛋白包覆，以捕集經敏化之紅血球而賦予特徵性影像(EP0058780、W098/02752)。

在表型檢定或 IAT 所用之技術之變型之中，亦可引用通常被開發來研究檢體中能夠與細胞結合之分析物之技術，其中使用磁粒，此使得離心步驟得以免除，該離心步驟係以凝集為基礎之技術諸如用於 IAT 或表型檢定之抗球蛋白技術(藉由凝集或免疫吸附於固相之間接庫姆氏法)所必需的。再者，在 IAT 之情況，必須沖洗經敏化之紅血球，以清除能夠識別在後續步驟中所用之抗免疫球蛋白之非特异性抗體。

實務上，當將此等方法完全自動化時，尤其是考量到離心的成本及笨重本質以及其之操作等，要進行離心步驟恐有困難。

磁粒曾被用於檢測配體-受器(ligand-receptor)型或抗體-抗原型之複合物多年。可引用之方法例如為在下列專利文件中所述之方法：W092/17781、EP0426170、

EP0351857、EP0528708 或 EP0230768。

因此，需要一種迅速簡單且既無需離心步驟、亦無需沖洗步驟之方法，以用於檢測含有對抗各種抗原之抗體的反應混合物(複合物)中是否存在特異性地對抗給定抗原之抗體。此種無需離心步驟及無需沖洗步驟之方法，尤其是用在 IAT 及表型檢定時，具有可在實務且可取得的支持物諸如微量盤上實行的優點且具有可完全自動化之優點。

此正為本發明之目的。

### 【發明內容】

本發明係專利 W02007/051844 之改良發明，其係將經由與特異性對抗紅血球抗原之抗體偶合之磁珠而使紅血球特異性磁化與藉由在微量盤之孔之底部包覆抗免疫球蛋白而免去沖洗步驟之方法加以組合。該方法亦稱為免疫-吸附法。

該方法係將作為障壁式濾器之黏稠溶液與沉積在該障壁式濾器上之稀釋劑加以組合，該障壁式濾器可讓未與紅血球結合之抗體自由通過，該稀釋劑含有磁珠，此等磁珠偶合有對紅血球抗原具特異性之抗體。

換言之，本發明亦允許在藉由直接凝集法之血型檢定及表型檢定中將供體或病患之紅血球磁化。在此等情況，紅血球之磁化取代了用於增加凝集之離心步驟。

在所有情況，紅血球與病患或供體之血清，或者血清試劑(serum test)(在血型檢定或表型檢定之情況)一起培育之期間，血球將被特異性抗體磁化。該磁化可使源自任

何溶液或緩衝液之任何紅血球磁化，且在磁化期間能清除血清中所存在之所有干擾成分。

本發明之原理為特異性地磁化紅血球以使其在磁場之影響下移動，因此能進行免疫-血液學檢驗所需要之所有步驟。

本發明係關於紅血球之特異性磁化之方法，亦關於其在血型檢定或表型檢定用套組中之用途，該血型檢定或表型檢定包括西莫寧(Simonin)檢驗、在 IAT 中之抗體檢測、供體與受血者之間之相容性試驗、以及直接抗球蛋白試驗。

紅血球之特異性磁化係藉由使用紅血球膜上所表現之血型抗原之特異性抗體而使磁粒與紅血球結合。該血型抗原之特異性抗體本身係共價固定於官能化之磁粒。

經由偶合有抗體之磁粒識別之標定抗原係選擇在人類紅血球表面上被高度表現之穿膜蛋白質。該穿膜蛋白質之表現沒有任何種族差異，且其在人類血漿中不會以可溶形式存在。因此，被選擇作為標定抗原之穿膜蛋白質為血型糖蛋白 A。

血型糖蛋白 A(GPA)為最豐富之紅血球唾液糖蛋白(sialoglycoprotein)，且存在於所有種族之紅血球上。於人類血漿中不存在此種糖蛋白之可溶形式。據估計，每個紅血球上之血型糖蛋白 A 之複製數目為  $1 \times 10^6$ 。

GPA 係由 131 個胺基酸之多肽鏈(成熟鏈)所構成，其分為 3 個結構域(domain)：具 72 個胺基酸之細胞外 N-端結構域、具 23 個胺基酸之疏水性跨膜結構域及具 36 個胺

基酸之 C-端細胞質結構域。

該糖蛋白之細胞外結構域含有高比例之絲胺酸及羥丁胺酸殘基，且以約 15 個 O-聚糖及單個 N-聚糖高度糖基化。

已知血型糖蛋白 A 帶有 MNS 系統之 M 及 N 抗原。此二種抗原因核苷酸多形性而不同，該核酸多形性導致多肽鏈之 2 個胺基酸改變：第 1 個改變在該多肽鏈之位置 1 以及第 2 個改變在該多肽鏈之位置 5。就 M 抗原為陽性之個體而言，在多肽鏈之位置 1 為絲胺酸且在多肽鏈之位置 5 為甘胺酸。另一方面，表現 N 抗原之個體在多肽鏈之位置 1 為白胺酸且在多肽鏈之位置 5 為麩胺酸。

此二抗原位於所感興趣之蛋白質之 N-端附近。因此，所使用之單株抗體，其所識別之抗原決定部位(epitope)必須在該唾液糖蛋白之細胞外部分中，且與 M 及 N 二個抗原有一段距離。

完整人類 GPA 蛋白質之胺基酸序列(單字密碼)如下：  
(基因銀行登錄編號：AAA88051)

```
mygkiifvll lsaivsisas sttgvamhts tsssvtksyi
ssqtdnthkr dtyaatprah
evseisvrtv yppeeetger vqlahhfsep eitliifgvm
agvigtilli sygirrlikk
spsdvkplps ptdvplssv eienpetsdq
```

片段 AA 1-19 對應於信號肽序列及片段 20-150 (131 個胺基酸長，粗體字部分)對應於成熟鏈。

在較佳具體實施例中，與磁粒偶合之對抗血型糖蛋白

A 之單株抗體(抗 CPA)係選擇 IgG 型之鼠免疫球蛋白。該抗體係於以 A1 人類紅血球將小鼠免疫後出現。其較佳對抗血型糖蛋白 A 之胺基酸 38-44(位於上述之成熟鏈或其天然變型中)。

該單株抗體係與超順磁珠粒共價偶合。連結於磁珠之單株抗體抗 GPA 可識別在紅血球表面上之抗原，然後紅血球經由抗 GPA 而被磁化。

此等經偶合有抗紅血球抗體之磁粒敏化之紅血球會被磁場吸引，且在其表面上具有血液抗原(血型抗原及表型抗原)。該等經磁粒敏化之紅血球在免疫分析檢驗(第 1 圖)中可被用為抗原-抗體複合物之反應性撐體(reactive support)及移動性載體(moving vector)。

其他可藉由鐵磁粒子將病患之紅血球磁化之方法為已知。

專利 WO 2005/121805 述及供紅血球磁化用之極小尺寸之鐵磁粒子及其在血型檢定及表型檢定以及非常規抗體檢測(IAT 檢驗)中之用途。該紅血球磁化係藉由使紅血球與鐵磁粒子之間直接接觸，以非特異性方式達成。該方法能在磁場之影響下使病患之紅血球移動。

專利文件 EP0230768 亦述及：於磁場存在下藉由多陽離子及多陰離子使可與檢體中所含之物質結合之磁粒共凝集之方法。尤其，該文件述及將血漿從含有紅血球之全血檢體中分離，該方法包含將全血檢體及包覆有琥珀醯基化牛血清白蛋白之液態磁性物質( $\text{FeCl}_2/\text{FeCl}_3$ )接續加至置於

磁鐵上之容器中，以此方式得到之紅血球粒子之凝集物隨後被拉向磁鐵，因此得以藉由澤析(decantation)收集澄明化(clarified)之血漿。

專利 WO 02/46758 述及：藉由預先用牛血清白蛋白活化之磁粒磁化紅血球之方法，以致在紅血球表面與粒子之間產生許多非特異性及低強度的交互作用。

此等使用磁粒或經修飾之液態磁性物質磁化紅血球之技術能免除離心步驟。然而，此等技術具有在磁粒與紅血球之間發生交互作用，且在此等磁粒與存在於生物溶液中所有成分之間發生非特異性交互作用。當磁粒與紅血球接觸時，在磁粒與紅血球之間之非特異性交互作用可藉由任何其他存在之成分，尤其是來自待檢驗病患之血漿成分來修飾。

本發明具有藉由能特異性識別廣泛存在於此等紅血球表面上之抗原而使此等磁粒特異性結合在紅血球上之優點。該方法能在任何條件下磁化紅血球，而不會被磁化反應期間存在於介質(medium)中之蛋白質及/或碳水化合物成分干擾。

已知許多磁化方法，其中磁粒係藉由共價或特異性之交互作用而與標記物結合。

目前，許多診斷系統係以使用官能化磁粒為基礎。此等官能化磁粒係用於研究生物培養基中所存在之抗體或用於研究宿主中可誘生免疫反應之抗原性構造。

例如，ELISA 系統就是一例。在該系統中，官能化磁

珠實際上與抗原或抗體偶合，且用為檢測血漿中分析物(analyte)用之反應性撐體。在該磁性撐體上能夠進行沖洗步驟，但無需進行離心步驟。

或者，偶合有抗體之珠粒可被用於篩選人類血液檢體中表現 CD4 抗原之細胞群，亦即可藉由適當的抗體使鐵磁粒子特異性地結合在 CD4 陽性細胞之表面上。然後對全血施加磁場，以單離出會與磁粒交互作用之細胞群。

至於在本發明中，經磁化之紅血球係在交叉比對檢驗或直接抗球蛋白檢驗(DAT)中用為檢測非常規抗體之撐體。必須注意，該磁化過程既不會遮蓋存在於紅血球表面上之抗原，亦不會干擾對抗紅血球抗原之非常規抗體之檢測。

本發明以特異性方式磁化紅血球，而且直接將此等特異性磁化珠粒用於反應性介質(reactive medium)。

例如，為了檢測非常規抗體，可藉由偶合有抗血型糖蛋白 A(抗 GPA)之珠粒經由數種途徑進行該檢驗。

#### 【實施方式】

因此，在第一具體實施例中，本發明之目的為提供一種磁化紅血球之方法，其包含下列步驟：

- a)將抗 GPA 抗體偶合在磁粒之表面上；以及
- b)將在步驟 a)中所得之偶合有抗 GPA 之磁粒與紅血球接觸。

較佳地，抗體之偶合可藉由被動吸附(passive adsorption)、共價偶合、離子性氫結合或配體/受器型偶

合(例如抗生物素-鏈抗生物素蛋白(avidin-streptavidin))來進行,偶合之方式視所用磁粒之性質及官能化類型而定。

利用磁粒捕捉或檢選細胞之免疫診斷技術為許多刊物之主題且為精於本技術人士所熟知。

在此等技術之中,可引用者為:將磁粒官能化,因而可在磁粒表面上得到反應性基團之技術,該反應性基團於適當條件下能與適當試劑、或與待共價接枝於該粒子上之抗原反應,最常被引用之反應性基團為酸基、胺基、環氧基或醛基。

亦可引用被動吸附待結合於粒子之抗原之技術,尤其是經由充分處理得到帶正電或負電之珠粒,依所帶電性視抗原之種類及待進行之被動吸附之條件而定。

較佳地,抗 GPA 抗體為哺乳動物抗體,較佳來自鼠科或人類,且能特異性地識別由紅血球所表現之血型糖蛋白 A,較佳能對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A,更佳能對抗其膜外結構域。

以對抗位於唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A 之細胞外部分之抗原決定部位的抗 GPA 單株抗體為更佳,其中該抗原決定部位既未帶有全部 M 或 N 抗原,亦未帶有部分的 M 或 N 抗原,尤其該抗原決定部位不含來自血型糖蛋白 A 之 N-端部分之胺基酸 1-5 所構成之片段。

較佳地,本發明之磁化紅血球之方法進一步包含將在步驟 b)中所得之磁化紅血球之懸浮液以含有如下述方

法中所界定之非離子性界面活性劑之稀釋劑予以稀釋之步驟，該稀釋劑係以含有如下文界定之親水性聚合物之低離子強度稀釋劑為較佳。

在一較佳具體實施例中，本發明提供一種顯現由存在於溶液中之對抗血型或表型抗原之抗體與由紅血球（即與磁粒結合之紅血球）表現之血型或表型抗原反應所形成之特異性複合物之方法，該反應係在具有開放頂部及密封底部之反應器中進行，該反應器之直徑至少在靠近底部之區域漸減以形成傾斜壁，且該壁至少一部分包覆有抗免疫球蛋白或任何其他能與所形成複合物中之抗體結合之化合物，該方法包含下列數個步驟：

- a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，將黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中；
- b) 在該反應容器所含之該黏稠溶液之上方，使該含有或可能含有抗體之溶液與該帶有或可能帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸；
- c) 在給定的時間於該反應器中進行培育，該時間為使該等帶有紅血球之磁粒與該溶液所可能含有之對抗血型或表型抗原之抗體形成複合物所需之時間，其中該等對抗血型或表型抗原之抗體能特異性地識別該等紅血球所帶有之血型或表型抗原；
- d) 將磁場施加於該反應器並於該反應器中進行攪拌，以使該等磁粒被拉向該反應器之底部及/或傾斜壁；以及

e)用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該反應器之底部及/或在包覆有該抗免疫球蛋白或用任何其他能與該抗體結合之化合物之該反應器之該傾斜壁上所得到之影像，如此得到之影像可以顯現血型或表型抗原/抗體之特異性複合物之形成與否；

該方法之特徵為：該等帶有紅血球之磁粒為預先包覆有抗血型糖蛋白 A 抗體(抗 GPA)之磁粒，且該等紅血球係藉由抗體/抗原交互作用而與該磁粒結合。

一般而言，該特異性抗體/抗原複合物中之抗體可為 IgG、IgM、IgA 或 IgE 型抗體或者任何其他類型之抗體。

術語“能與該所形成之複合物中之抗體結合之抗免疫球蛋白”在本文中係指能識別並結合任何抗體(尤其是人類抗體)之多株或單株抗免疫球蛋白，而不管該抗體為 IgG、IgM、IgA 還是 IgE 型抗體(即全面性抗免疫球蛋白(total anti-immunoglobulin))；或者係指能識別並結合某些特定類別之抗體之多株或單株抗免疫球蛋白，尤其是特異性抗 IgG 抗體。此等抗免疫球蛋白，尤其是抗人類免疫球蛋白，為精於本技術人士所熟知且可從許多供應商獲得，所以在本文中未詳細說明，尤其是在其製法方面。

又較佳地，當該抗體為 IgG 型時，抗免疫球蛋白係以抗 IgG 為較佳，尤其是抗人類 IgG(對抗人類來源之抗體)。

又較佳地，當該抗體為 IgG 或 IM 型時，抗免疫球蛋白係以抗 IgG 與抗 IgM 之組合為較佳，尤其是抗人類 IgG 與抗人類 IgM 之組合。

術語“能與該所形成之複合物中之抗體結合之化合物”係特別指精於本技術人士所熟知用於抗體之識別及特异性結合之蛋白質 A 型化合物或蛋白質 G 型化合物。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：用於磁化紅血球之方法為上述根據本發明之磁化紅血球之方法。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，將該帶有紅血球之磁粒之懸浮液懸浮於稀釋劑中，該稀釋劑之密度大於 1 且小於該黏稠溶液之密度。

在同等較佳之具體實施例中，該本發明方法之特徵為該步驟 a) 及 b) 係如下述：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，進行：

i) 在該反應器之外製備該帶有紅血球之磁粒之懸浮液，

ii) 將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，然後充填該稀釋劑；

b) 在該稀釋劑上方，使在步驟 a)i) 中所製備之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有該抗體之溶液接觸。

在另一較佳具體實施例中，該本發明方法之特徵為該步驟 a) 及 b) 係如下述：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型

或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，

- 將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，繼而依所述順序充填該稀釋劑、該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液、及該紅血球懸浮液；

b) 在反應器中，使該可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

在另一較佳具體實施例中，該本發明方法之特徵為該步驟 a) 及 b) 係如下述：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，

i) 在該反應器之外製備包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，其中該等磁粒係懸浮在該稀釋劑中，或者使用已製備成之此種懸浮液，

ii) 將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，繼而充填在步驟 a)i) 中所製備之包覆有抗 GAP 之磁粒懸浮於該稀釋劑中之懸浮液，然後充填該紅血球懸浮液；

b) 在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

在後一較佳具體實施例中，該本發明方法之特徵為：

- 於步驟 a)i) 結束時，使該含有懸浮於稀釋劑中之磁粒之懸浮液在反應器外部與該紅血球懸浮液接觸，以形成帶有該等紅血球之磁粒懸浮於該稀釋劑中之懸浮液；以及

- 於步驟 a)ii)，將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁

之至少一部分之方式充填於該反應器中，然後充填該帶有紅血球之磁粒懸浮於稀釋劑中之懸浮液；

b)在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

在另一特佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：藉由實驗室自動化使試劑之配送自動化，該步驟 a)及 b)係如下述：

a)在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，

i)在該反應器之外部製備包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，其中該等磁粒係懸浮於該稀釋劑，或者使用已製備成之此種懸浮液，

ii)將紅血球之懸浮液充填於該反應器中，然後充填在步驟 a)i)中所製備之該包覆有抗 GAP 之磁粒懸浮於稀釋劑中之懸浮液，若需要，於攪拌後，以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填該黏稠物質，且該黏稠物質係被注射入該反應器之底部；

b)在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d)中，將磁場施加至該反應器，同時在反應器中進行攪拌(參見第 1A 及 1B 圖，其展現進行此等不同步驟之裝置之例子)。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本

發明方法：於步驟 d) 中，將磁場施加至該反應器，同時在反應器中進行攪拌(參見第 1A 及 1B 圖，其展現進行此等不同步驟之裝置之例子)。

術語“同時”係指單獨進行攪拌或施加磁場之期間不超過 20 秒。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d) 中，該磁場之施加及該攪拌同時進行之期間在 2.5 分鐘與 10 分鐘之間，該期間以在 5 分鐘與 6 分鐘之間為較佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d) 中，該磁場之施加係藉由置於該反應器之外部之磁鐵來進行，以將該等磁粒拉向該反應器之底部。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係由旋轉式攪拌構成。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係以在 250 rpm 與 750 rpm 之間之速度進行，較佳以 600rpm 之速度進行。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 c) 中，培育期間係在 10 分鐘與 30 分鐘之間，培育溫度係在 20°C 與 40°C 之間，該溫度係以 37°C ± 1°C 為較佳。

在特佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 d) 中，在反應器中之攪動係於存在磁場

下進行。

於步驟 d) 中，磁場施加步驟與在反應器中之攪拌步驟，可以任一步驟開始進行，不過同時進行磁場之施加與攪拌至少一段給定之時間。

顯然地，本發明方法之變型亦包括於本發明方法中，其中於該方法之步驟 d) 中，在反應器中進行攪拌之前進行磁場之施加，單獨施加磁場(未攪拌)之期間至多不超過 2 分鐘，以 1 分鐘 30 秒、1 分鐘或 30 秒為較佳。當在施加磁場之前進行攪拌時亦是如此，亦即單獨攪拌期間至多不超過 2 分鐘，以至多 1 分鐘 30 秒、1 分鐘或 30 秒為較佳。

本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，藉由位於反應器外部下方之磁鐵進行磁場之施加，以使此等磁粒被拉向該反應器之底部，較佳沿著反應器之縱軸拉引。

在本發明之方法之較佳具體實施例中，於步驟 d) 中，該磁鐵為永久性磁鐵，其強度在 8000 至 16000 高斯(Gauss) 之範圍內，以 10,000 至 14,000 高斯為較佳，以 11500 至 12500 高斯為更佳，以 12000 高斯為最佳。

在一較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係藉由旋轉式攪拌器進行。

術語“旋轉式攪拌器”在本文中係特指設置有組合式反應器(amalgamated reactor)或反應器組之旋轉台，例如具有 96 杯狀孔之微量盤(請參見第 1A 及 1B 圖)。

在攪拌之特定模式方面，本發明包括符合下述條件之

本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係旋轉式攪拌，當反應器在最寬點之直徑為 7 毫米時，該旋轉式攪拌成比例地具有直徑在 1.0 毫米與 2.5 毫米之間之軌道，該軌道直徑以在 1.25 毫米與 2.25 毫米之間為較佳，以在 1.5 毫米與 2 毫米之間為更佳，以 2 毫米為最佳。

術語“成比例地”意指，例如，當反應器之最寬點直徑為 7 毫米之 2 倍或一半時，上述旋轉軌道之對應直徑為 2 倍或除以 2。

術語“旋轉式攪拌之軌道”係指在旋轉過程中，反應器之最低點(即反應器之垂直中央軸之最低點)處之轉圈之直徑。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係以在 250 rpm 與 750 rpm 之間之速率，較佳地以 400 rpm 與 600 rpm 之間之速率來旋轉。

在特定具體實施例中，位於各反應器之間之磁鐵構成攪拌台之一部分(參見第 1A 及 1B 圖)。

在上述較後之例中，於攪拌期間，位於反應器下方之磁鐵之垂直中央軸遵循該反應器之垂直中央軸所形成之軌道旋轉。

在特佳具體實施例中，位於各個反應器下方之磁鐵未固定於攪拌台。在該情況，於攪拌期間，位於反應器下方之磁鐵之垂直中央軸不會移動且不會遵循該反應器之垂直中央軸所形成之軌道旋轉。

本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 c) 中，培育期間係在 10 分鐘與 30 分鐘之間，較佳在 15 分鐘與 25 分鐘之間。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 c)，培育係在 10°C 與 40°C 之間之溫度進行，該溫度係以在 25°C 與 40°C 之間為較佳，以在 30°C 與 40°C 之間為更佳，以約 37°C (37°C ± 1°C) 為特佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 b) 中，培育係在 30°C 與 40°C 之間之溫度進行，該溫度以 37°C 為較佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該等磁粒具有在 100 奈米與 3.0 微米之間之直徑，該直徑係以在 200 奈米與 1.5 微米之間為較佳；該等磁粒較佳以甲苯磺醯基、羧基、胺基、或甚至羥基官能化。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：該等磁粒含有至少 40 重量%之鐵磁 (ferromagnetic) 化合物，該鐵磁化合物之含量以在 40 重量%與 50 重量%之間為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 a) 中，預先以黏稠物質或均質凝膠充填反應器，該黏稠物質之密度為能阻止未與結合於磁粒之抗原形成複合物之抗體移往反應器之傾斜部及底部者，其中該反應器之傾斜部包覆有抗免疫球蛋白或其他能識別該步

驟 d) 中之抗體之化合物。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：該黏稠溶液具有大於 1 之密度。

更佳地，本發明之方法之特徵為該黏稠溶液係選自凝膠、PVP(聚乙烯吡咯啉酮)中之 PVP-40 或 PVP-60、30% ± 10% 之白蛋白溶液、或明膠，其中該凝膠係以選自從葡聚糖 (Sephadex™) 或從瓊脂糖 (Sephacrose™) 衍生且直徑為 20 奈米至 300 奈米之凝膠為較佳，以超細 Sephadex™ G-100™ (Sephadex™ G-100 superfine) 或者瓊脂糖 4B 或 6B (Sephacrose™ 4B 或 6B) 為更佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於第 1 步驟，該凝膠為葡聚糖或瓊脂糖 (Sephacrose™ (瑞典 Pharmacia 或 Sigma-Aldrich)，亦即 Sephacrose™ 4B 或 6B)。

在同等較佳之具體實施例中，當該黏稠溶液為凝膠型時，該凝膠係於存在牛血清白蛋白下製備以增加該凝膠溶液之密度，該牛血清白蛋白在凝膠溶液中之最終濃度係以 5% 至 15% w/v 為較佳，以 10% ± 2.5% 為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於第 1 步驟，該黏稠溶液或凝膠為葡聚糖 (Sephadex™ (瑞典 Pharmacia 或 Sigma-Aldrich))，該葡聚糖係以 G-10™、G-25™、G-50™、G-75™、G-100™、G-150™ 或 G-200™ 為較佳，其中該葡聚糖珠粒之直徑可為 20 奈米至 300 奈米。Sephadex™ 係以超細 G-100™ 為更佳。

更佳地，凝膠濃度，尤其就 Saphadex™ 或 Sepharose™ 而言，在 1.5% 與 6% 之間，以 2% 與 5% 之間，2.5% 與 4% 之間為較佳。就 Saphadex™ 而言，尤其就其中之 Superfine G-100™ 而言，該濃度係以 3% ± 0.5% w/v 為最佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於第 2 步驟，在沉積帶有或可能帶有該抗原之紅血球之懸浮液之前，將該含有或可能含有與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒之溶液沉積於該黏稠溶液上。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：於步驟 b) 中，當於沉積該黏稠溶液之後及沉積該稀釋劑之後，該含有或可能含有抗體之溶液可在沉積該紅血球懸浮液之前沉積。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該稀釋劑之密度小於該黏稠溶液之密度且大於該含有或可能含有抗體之溶液之密度。

在另一較佳具體實施例中，本發明之方法之特徵為：該稀釋劑為包含親水性聚合物之溶液，該親水性聚合物所具有之濃度為能將其密度調整成在血漿或血清之密度與該黏稠溶液之密度之間之密度。

在另一較佳具體實施例中，本發明之特徵為：該稀釋劑係含有親水性多糖聚合物之溶液，該親水性多糖聚合物係以 Ficoll™ 為較佳，尤其是 Ficoll™ 400，該親水性多糖聚合物之濃度為 1% 至 2.5% (w/v)，以 2% ± 0.3% 為較佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明之特徵為：該反應

器為微量盤之杯狀凹穴，該杯狀凹穴具有圓形或V形底部。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗體溶液為人類血漿或血清檢體，該檢體有待檢測是否存在特異性對抗血型或表型抗原之抗體；且其中該抗免疫球蛋白為人類抗免疫球蛋白(human anti-immunoglobulin, HAG)。

在特佳具體實施例中，本發明之方法為檢測及鑑定血清或血漿之檢體中之非常規抗體之方法(IAT)，其特徵包括檢測及鑑定其中該等經磁粒所攜帶之紅血球為O型紅血球之步驟。

在另一方面，本發明包括血型檢定及/或表型檢定之方法，其特徵為包含本發明之方法且其中該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液為血清試劑，該血清試劑含有具已知血型/表型特異性之抗體。

在本發明之另一特定方面，於直接凝集法之情況，只要可取得抗體，本發明將允許對於紅血球表面上存在之所有抗原進行類型及表型檢定。

因此，下列抗原可藉由本發明鑑定：來自ABO系統之抗原(A抗原、B抗原、A及B抗原同時表現、H抗原)、來自恆河猴系統之抗原(D、C、c、E、e抗原或Cw)、來自凱爾系統織抗原(K或k)、來自達菲系統之抗原(Fya及Fyb)、來自基德系統之抗原(Jka及Jkb)、來自MNS系統之抗原(M、N、S及s)或其他較不常被研究但亦存在之抗原，諸如路易士(Lewis)系統、路得(Lutheran)系統等。

為了血型及/或表型檢定，吾人使用包括具已知特異性之單株抗體、多株抗體或重組抗體之血清試劑，此等抗體能識別及結合於其所對抗之紅血球上抗原。

對抗血型抗原之檢驗用抗體可為在液體溶液中之形式或於微量盤中之乾燥形式。

若存在於血清試劑中之抗體為 IgM 型，所實施之檢驗將為不使用抗免疫球蛋白之凝集反應(請參見實施例 9 至 11)。

在本例中，將該偶合有抗 GPA 之磁粒與待檢定表型之紅血球及抗血清(antiserum，即血清試劑)同時培育。

在另一例中，當血清試劑為 IgG 型時，可製備含有：以對抗待檢定紅血球之 IgG 型抗體飽和之抗 IgG 型抗免疫球蛋白之試劑。在本例中，該抗 IgG 型抗免疫球蛋白具凝集性，可引起凝集反應(參見實施例，使用液體形式之 IgG 及/或 IgM 型抗體進行血液表型檢定)。

因此，本發明係關於以包含下述步驟之方法為特徵之方法：

a) 製備包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，該等磁粒係懸浮於稀釋劑中；或者可使用已製備成之此種懸浮液；

b) i) 使該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液與欲測定血型及/或表型之紅血球之懸浮液接觸，

ii) 在反應器中，使在步驟 b) 中所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與含有具已知特異性之抗體之血清試劑接觸，

iii)攪動或攪拌；

c)在給定的時間於該反應器中進行培育，該時間為使該帶有紅血球之磁粒與該血清試劑形成複合物所需之時間，

d)將磁場施加至該反應器並在該反應器中進行攪拌，以將此等磁珠拉向該反應器之底部及/或傾斜壁；以及

e)用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該反應器之底部及/或該反應器之傾斜壁所得到之影像，如此得到之影像可以顯現血型或表型抗原/抗體之特異性複合物之形成與否。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：

- 於步驟 d)，在將磁場施加至該反應器之同時，進行攪拌之步驟，以將該等磁粒拉向該反應器之底部；以及
- 於步驟 e)中，用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該反應器之底部是否得到凝集反應，該特異性凝集顯示：存在已形成之血型或表型抗原/抗體之特異性複合物。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 b) ii)中，該血清試劑為溶液或乾燥形式。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：該等磁粒具有在 100 奈米與 3.0 微米之間之直徑，該直徑係以在 200 奈米與 1.5 微米之間為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：該等磁粒含有至少 40 重量%之鐵磁化合物。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，該磁場之施加係藉由置於該反應器之外部下方之磁鐵來進行，以使該等磁粒被拉向該反應器之底部。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，該磁鐵為永久性磁鐵，其強度在 10,000 至 14,000 高斯(Gauss)之範圍內。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 b) iii) 或/及步驟 d) 中，攪拌係藉由旋轉式攪拌器進行。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，將磁場施加至該反應器並同時在反應器中進行攪拌。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 b) iii) 中，進行攪動(或攪拌)共計 5 秒至 3 分鐘之期間，該期間以 1 分鐘至 2 分鐘為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 b) iii) 中，攪拌係以 1000 至 1200 rpm 之速度進行，較佳地以 1200 rpm 之速度進行 10 秒。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，攪拌係以 500 至 800 rpm 之速度進行，該速度以 650 至 750 rpm 為較佳，以 700 rpm 為更

佳。

在較佳具體例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 c) 中，培育期間係在 2 分鐘至 30 分鐘之範圍內，以在 8 分鐘與 20 分鐘之間為較佳；培養係於 20°C 與 40°C 之間之溫度進行，以於室溫或 37°C 進行為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 中，磁化期間係在 2 分鐘 30 秒至 7 分鐘之範圍內，以 5 分鐘為較佳；磁化係於 20°C 與 40°C 之間之溫度進行，以於室溫進行為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：於步驟 d) 之後及步驟 e) 之前，以較高速度施行一系列之攪動(以 800 與 1000 rpm 之間之速度進行 1 分鐘至 2 分鐘 30 秒)，以懸浮未凝集之紅血球，視需要隨後可以較低速度進行新的攪拌步驟(再聚集步驟)(以在 350 與 550 rpm 之間之速度進行 1 分鐘至 2 分鐘)，以集合可能存在之分散小凝集物。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：當血清試劑為 IgG 型時，預先藉由將抗 IgG 型免疫球蛋白溶液與 IgG 型抗體之濃溶液混合而製成凝集試劑。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該反應器為微量盤之杯狀凹穴，其具有圓形或 V 形底部。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本

發明方法：在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液中紅血球之濃度在 0.2%與 2.5%之間，以在 0.5%與 1.5%之間為較佳，以  $1\% \pm 0.3\%$  為更佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該磁粒之濃度係在 0.001%與 0.007%之間，以在 0.003%與 0.005%之間為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗 GPA 抗體為哺乳動物抗體，以來自鼠或人類者為較佳；該抗體能特異性地識別由紅血球所攜帶之人類血型糖蛋白 A，較佳地能對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A，更佳地能對抗其膜外結構域。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗 GPA 抗體為對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A 之細胞外部分之抗原決定部位之單株抗體，該抗原決定部位只帶有部分的或完全未帶有抗原 M 或 N，尤其該抗原決定部位不含血型糖蛋白 A(成熟鏈)之 N 端胺基酸 1 至 5 所構成之片段。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗 GPA 抗體與該等磁粒偶合且該抗 GPA 抗體之濃度為在 5 微克/毫克磁粒與 25 微克/毫克磁粒之間，以  $20 \pm 3$  微克/毫克磁粒為較佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括符合下述條件之本發明方法：為了改善及/或增加該檢驗之靈敏性及特異性，該抗 GPA 抗體與該等磁粒偶合且該抗 GPA 抗體之濃度為在

1 微克/毫克磁粒與 5 微克/毫克磁粒之間，以  $2.5 \pm 0.5$  微克/毫克磁粒為較佳。

在較佳具體實施例中，根據本發明之方法之特徵為：該磁粒之懸浮液進一步包括非離子性界面活性劑，該非離子性界面活性劑以 Synperonic™ PE/F68、Tween™(20、40 或 80) 為較佳，且其濃度在 0.1% 與 1% (w/v) 之間，以 0.25% 至 0.75% (w/v) 或  $0.5\% \pm 0.15\%$  (w/v) 為較佳。

本發明亦能夠藉由使用免疫吸附於固相上之技術而進行血型檢定及/或表型檢定，該技術如在非常規抗體檢驗 (IAT) 中所述，惟病患之血清用具有已知特異性之血清試劑代替且紅血球樣板 (panel) 用待進行血型檢定或表型檢定之病患或供體之紅血球取代。

來自各種血液系統之抗原 (血型抗原或表型抗原)，視所使用之抗血清諸如抗 D、抗 Fya、抗 Jka、抗 Jkb、抗 S、抗 s 或對其他血型抗原具特異性之抗血清，可被鑑定出。

能實現表型檢定之免疫吸附技術之原理在於將供體或病患之紅血球用偶合有抗 GPA 之珠粒磁化並用感興趣之特異性抗血清敏化。抗原之存在係藉由用結合於微量盤之孔底部之抗免疫球蛋白捕捉結合在紅血球上之抗血清來顯示。

病患或供體之血型檢定及/或表型檢定係用收集在試管中之血液檢體來進行，其中在該試管中存在抗凝血劑諸如 EDTA、檸檬酸鹽或肝素 (heparin)。

1% 至 2% (以 1% 為較佳) 之紅血球懸浮液 (globular

suspension)係在試管中或在盤之圓底孔中，藉由使用 1 毫升含有與抗 GPA 偶合之磁珠之稀釋劑來稀釋 10 微升( $\mu\text{l}$ )之紅血球濃厚液而製備。在該稀釋劑中珠粒之濃度為 0.002%至 0.006%，以 0.004%為較佳，其中該稀釋劑係用低離子強度緩衝液(Liss Ficoll)稀釋糖系聚合物而製備。同時，在包覆有特異性抗 IgG 型抗球蛋白或抗球蛋白組合(抗 IgG 及抗 IgM)之 96 孔圓底微量盤之孔中，沉積具有較高密度之黏稠溶液或凝膠以在含有病患或供體之紅血球之反應介質與抗血清之間建立障壁。將先前以含有與抗 GPA 偶合之磁珠之溶液稀釋成濃度為 1%之紅血球懸浮液沉積在上述黏稠障壁之上方。然後，將感興趣之特異性抗血清加在該紅血球懸浮液上。

然後將微量盤於 37°C 培育 20 分鐘。於培育步驟期間，抗血清與可能存在於紅血球上之對應抗原結合。在該紅血球被抗血清敏化之期間，紅血球亦被存在於稀釋劑中之偶合有抗 GPA 之磁珠磁化。對於抗原具特異性之各抗體，第 1 個之結合不會阻止其他之結合。因此，來自病患或供體之帶有或未帶有紅血球抗原之紅血球可被抗 GPA 磁珠磁化且可被存在於抗血清中之抗體敏化。培育步驟結束時，將微量盤置於設有磁板之微量盤攪拌器上，將該磁板置於微量盤之孔之下方且該磁板與該孔完全吻合。於攪動及磁場之影響下，帶有或未帶有該抗血清之抗體之磁化紅血球(被偶合有抗 GPA 之磁珠磁化)，將移動通過黏稠障壁並與或未與固定在孔之底部之抗球蛋白結合。陽性反應將導致在孔

之底部形成紅血球薄膜，而陰性反應將導致在孔之底部形成清楚的紅血球球粒(pellet)。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：在帶有紅血球之磁粒懸浮液中紅血球之濃度為 0.2%至 2.5%，以在 0.5%與 1.5%之間為較佳，以  $1\% \pm 0.3\%$  為更佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：在該帶有紅血球之磁粒懸浮液中磁粒之濃度為在 0.02%與 0.2%之間，以在 0.01%與 0.009%之間為較佳，以  $0.004\% \pm 0.001\%$  為更佳。

在較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：在該帶有紅血球之磁粒懸浮液中磁粒之濃度為  $0.007\% \pm 0.001\%$ 。

在另一特佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗 GPA 抗體為哺乳動物抗體，以來自鼠或人類者為較佳；該抗體能特異性地識別由紅血球所攜帶之人類血型糖蛋白 A，較佳地能對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A，更佳地能對抗其之膜外結構域；又更佳地該抗體為對抗位於唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A 之細胞外部分之抗原決定部位的單株抗體，該抗原決定部位只帶有部分的或完全未帶有抗原 M 或 N，尤其該抗原決定部位不含來自血型糖蛋白 A 之 N 端胺基酸 1 至 5 所構成之片段。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該抗 GPA 抗體與磁粒偶合且該抗 GPA 抗體

之濃度為在 5 微克/毫克磁粒與 25 微克/毫克磁粒之間，以 20 微克/毫克磁粒為較佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：為了增加此等檢驗之靈敏度及特異性，該抗 GPA 抗體以在 1 微克/毫克磁粒與 5 微克/毫克磁粒之間之濃度與磁粒偶合，該濃度以  $2.5 \pm 0.5$  微克/毫克磁粒為較佳。

在另一較佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該磁粒之懸浮液之濃度為在 0.004% 與 0.002(w/v) 之間，以  $0.007\% \pm 0.001\%$  為更佳。該抗 GPA 抗體之偶合係在含有官能基之磁珠上進行。

此等官能基可為不同類型諸如胺基官能(-NH<sub>2</sub>)、羥基(-OH)、羧基(-COOH)或甲苯磺醯基，所有此等官能基皆為精於本技藝人士所熟知。

在該抗體與該磁珠之間所建立之交互作用可為靜電性、疏水性或共價性。

該抗體在磁珠上之共價結合係藉由在該磁珠表面上之官能基而進行。在本發明之範圍內適用之磁珠之供應商尤其包括 Ademtech(33600 Pessac, France)，其供應直徑約 100 至 500 奈米(nm)之磁粒，該磁粒可用酸或胺而予以官能化。該公司亦提供用於進行該官能化所需之操作程序(protocols)及試劑。此等磁粒係由超過 50% 之鐵磁蕊心(諸如氧化鐵)構成且該蕊心以聚苯乙烯包覆。其他供應商包括 Bioclone 公司(美國加州聖地牙哥)，其提供完整範圍之官

能化磁珠。此外，尚有 Dynal Biotech GmbH (德國漢堡市)，其提供廣範圍之 Dynabeads™，尤其是以鏈抗生蛋白 (streptavidin)、甲苯磺醯基或羧基活化之微磁珠。另一可提及之公司為 Merck Chimie SAS (94126 Fontenay-Sous-Bois, France)，其提供在某一範圍(200 奈米至 1.5 微米)內之不同粒度之微磁珠(Estapor™)，此等微磁珠係由聚苯乙烯或二乙烯基苯製成且含有高達 50%之氧化磁鐵 (ferrite)，此等微磁珠可經或未經官能化，例如可用酸、胺基或甲苯磺醯基予以官能化。此等粒子係藉由於存在鐵磁化合物下聚合苯乙烯之方法製備。

最後可提及之公司為 JSR Micro(日本)，其上市在 1 微米至 3 微米範圍內之不同尺寸之磁粒，此等磁粒經鏈抗生蛋白、羧基或甲苯磺醯基活化。來自 JSR 之磁珠係由以磁性物質包覆之蕊心粒子構成，該經磁性物質包覆之蕊心粒子用單體進一步包覆以包封該磁性物質。在此等所提出之粒子中，以尺寸為 1 微米、具有約 48%之鐵含量且羧基官能率為約 15 nm/毫克珠粒之疏水性珠粒為較佳。此等珠粒可藉由物理性吸附或化學偶合而被偶合。

本發明較佳使用超順磁性珠粒，磁粒之尺寸較佳在 200 奈米與 1.5 微米之間，且較佳為疏水性並以羧基或甲苯磺醯基官能化。

磁珠之平均鐵比率，就羧基化磁珠而言為約 45%，就甲苯磺醯基化磁珠而言為約 30%。

在本發明中珠粒 (bead) 或粒子 (particle) 具有相同意

義，皆意指「磁粒」。

官能基之官能化率可以變化，就甲苯磺醯基型珠粒而言，官能基之數目為 40 至 80 微當量/公克珠粒 ( $\mu\text{eq/g of beads}$ )，而就羧基型珠粒而言，官能基之數目為 20 至 350 微當量/公克珠粒。

在本發明中，優先於使用 ESTAPOR™ 磁珠，該等磁珠之尺寸為 200 至 300 奈米，含有至少 40% 鐵磁化合物，且羧基官能之數目為約 130 微當量/公克珠粒，產品編號為 M1-030/40。或者在採用相同的供應商下，可以使用含有甲苯磺醯基官能之磁珠，該甲苯磺醯基官能之含量為 40 至 80 微當量/公克珠粒，直徑為約 1.2 微米 ( $\mu\text{m}$ )，產品編號為 R01-24。

就本發明而言，另一較佳選擇為使用來自 JSR Micro 公司之磁珠，其之直徑為 1 微米，屬疏水型且以羧基官能化，官能化率為 17 奈莫耳/公克珠粒，產品編號為 MB100。

就以羧基官能化之珠粒而言，以物理性吸附為較佳，而較不喜化學偶合。

將此等珠粒與為 IgG2a 同型 (isotype) 之純化鼠單株抗體偶合，該抗體對血型糖蛋白 A 具特異性。

與官能性磁珠偶合之抗血型糖蛋白 A 抗體之濃度可為 5 微克/毫克珠粒至 25 微克/毫克珠粒，以濃度為 20 微克/毫克珠粒為較佳。為了改善及/或增加此等檢驗之靈敏性及特異性，更佳地將抗 GPA 抗體以在 1 微克/毫克珠粒與 5 微克/毫克珠粒之間之濃度與磁粒偶合，該濃度以  $2.5 \pm 0.5$  微

克/毫克珠粒為更佳。

於偶合結束時，含有與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒之溶液包含 PBS 緩衝液、0.1%(m/v)BSA 以及非離子界面活性劑(諸如 Synperonic™ PE/F68 型)。Synperonic™ PE/F68 為非離子疏水性界面活性劑，亦被稱為 Polyoxamer Synperonic™ F68，可從 Sigma Aldrich 公司購得，產品編號為 81 112。該聚合物係由 3 段構成，即由 2 親水性聚氧伸乙基嵌段環繞中央疏水部分而構成，該中央疏水性部分係由聚氧伸丙基嵌段構成。

當使用奈米粒子或微米粒子時，以使用界面活性劑為較佳，以避免在 pH、離子強度及溫度之特定條件下此等磁粒發生自然凝集。已證明藉由非離子兩性大分子諸如 Polyoxamer 之吸附所造成之粒子表面之改變有助於避免溶液中之磁粒凝集。

尤其當粒子在由具有高離子強度之緩衝液諸如磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)所構成之溶液中時，傾向於失去其膠體安定性而凝集。因此界面活性劑之加入能確保該膠體安定性，並避免粒子在具有高離子強度之緩衝液中凝集。

有數種類型之非離子界面活性劑諸如 Tween™ 20、60 及 80 或 Synperonic™ PE/F68 或 F127。在本發明中，優先於使用 Synperonic™ PE/F68。

為了確保對於偶合有不同抗體之珠粒之膠體安定性能發揮作用，Synperonic™ 之濃度必須大於 0.1%，小於 2.5%，若界面活性劑在此濃度範圍內，細胞將可以存活。該濃度

係以 0.5%(m/v)為較佳。

在另一特佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：該磁粒之懸浮液為含有界面活性劑之懸浮液，該界面活性劑以非離子性界面活性劑為較佳，該非離子性界面活性劑以選自 Poloxamer 類(諸如 Synperonic™ PE/F68)或選自 Tween™(20、40、60 或 80)者為較佳，且其濃度係在 0.1%與 1%(w/v)之間，以在 0.25%與 0.75%(w/v)之間或 0.5% ± 0.15% (w/v)為較佳。

一旦偶合後，將此等珠粒以 1%(m/v)之濃度貯存在含 PBS(0.3M)+ 0.1% (w/v) BSA + 0.5 (w/v) synperonic™ PE/F68 之溶液中，直至用最終稀釋劑將其稀釋時為止。

在另一特佳具體實施例中，本發明包括以下述為特徵之本發明方法：為了改善及/或增加偶合有抗 GPA 之磁粒之安定性，非離子性界面活性劑之濃度在 0.5%與 10%(w/v)之間，以存在 5%(w/v)之非離子界面活性劑為較佳。

然後將該珠粒用最終稀釋劑稀釋成濃度為 0.004%，或較佳地，0.007%，該最終稀釋劑將分布在黏稠溶液(亦被稱為過濾式障壁或凝膠)上，該黏稠溶液係在 AHG 上方。

該用於稀釋偶合有抗血型糖蛋白 A 之珠粒之最終稀釋劑具有大於 1 之密度，且較佳由低離子強度之緩衝液(LISS 或 BFI 緩衝液)及親水性聚合物所組成，該親水性聚合物係以親水性多糖為較佳，尤其是 Ficoll™ 400。該多糖在低離子強度緩衝液中之濃度係以 2%為較佳。該低離子強度之緩衝液為精於免疫血液學技術之人士所熟知，其能促進並

加速抗體與紅血球之間之反應。

如適當，可於存在最終濃度在 1.5%與 6%(w/v)之間之血清白蛋白下製造該緩衝液，以賦予該介質 (medium) 某一黏度並控制紅血球朝向微量盤之顯示部分之行進速度。使用含有白蛋白之緩衝液之缺點為傾向於形成泡沫。

所以，優先於用不會呈現任何泡沫之化合物代替白蛋白。吾等選擇 Ficoll™ 400，其為糖之聚合物，十分容易被水合且在溶液中特別安定。其為合成產物，由於其用在許多細胞分離之生物操作程序 (biological protocol) 中，所以其之再現性 (reproducibility) 已獲得證明。因此，Ficoll™ 400 之密度可以再現；其為無色，而且因其之結構不會與水自由地交互作用，所以不會產生泡沫。其所用之濃度為能使溶液之密度等於由 3%白蛋白所得到者。其提供行進中之紅血球必要且充足之緩衝作用 (cushion)。含有 2% Ficoll™ 400 之稀釋劑之密度等於 1.013 公克/立方釐米 ( $\text{g}/\text{cm}^3$ )。

用於稀釋磁粒懸浮液之稀釋劑之較佳組成物之例子為：

就 1 公升而言：

- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0.213 公克
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  : 0.240 公克
- $\text{NaCl}$  : 1.788 公克
- 甘胺酸 : 18.05 公克
- $\text{Na Azid}$  : 0.9 公克

- Ficoll 400 : 20 公克

莫耳滲透壓濃度(Osmolarity) : 310 +/- 20 mOsm

pH : 6.75 +/- 0.1

在一些應用中，尤其當涉及改善反應之靈敏度及速度(不過不會增加檢驗之非特異性)時，可使用低離子強度緩衝液 ISB，其亦被稱為 LISS 緩衝液(LISS 為低離子強度溶液(Low Ionic Strength Solution)之簡稱)。

精於本技藝人士當知緩衝液或鹽溶液係指在細胞生物學，尤其是免疫血液學領域中常用來防止紅血球溶裂(尤其是就 IAT 或表型檢定應用而言)之緩衝液。此等緩衝液或溶液可為，例如，具 6.8 與 7.5 之間之生理 pH 值之緩衝液，可調整緩衝劑成分之莫耳濃度，以使所得到之最終溶液在滲透壓方面與 0.9% NaCl(接近 0.15M NaCl)溶液之莫耳濃度相似。尤其，可提及者為精於本技藝人士所熟知之 PBS 型磷酸鹽緩衝液(pH 7.0-7.4)，但非限定於此。

在本文中對於 ISB 或 LISS 緩衝液之組成未加以說明，因為在免疫血液學領域熟知此等緩衝液，尤其是其在加強凝集反應上之能力。此等緩衝液可從血液學用試劑之供應商取得(例如，可非限定性地列舉具有下列組成之 LISS 緩衝液：16 公克/公升之甘胺酸、0.03M NaCl 及 0.015M 磷酸鹽，pH 6.7)。

在另一較佳具體實施例中，進行本發明以實施供體與受體之間之相容性檢驗，或直接庫姆氏(Coombs)檢驗。

在另一態樣，本發明係關於顯現由存在於溶液中之對

抗血型或表型抗原之抗體與紅血球所攜帶之血型或表型抗原之間之反應所形成之特異性複合物之套組(kit)，該套組尤其適合用於進行非常規抗體檢驗(IAT)或相容性檢驗、或者表型檢定；該套組之特徵在於其包括：

a) 試劑，該試劑含有：包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，該磁粒之懸浮液以如同在本發明方法之一中所界定者為較佳。

在一較佳具體實施例中，本發明係關於以下述為特徵之本發明之套組：其進一步包含：

b)-反應器或一組反應器，該反應器或該等反應器具有開放頂部及密封底部，該反應器之直徑至少在靠近該底部之區域漸減以形成傾斜壁，且該傾斜壁之至少部分包覆有抗免疫球蛋白或任何其他能與所形成之該複合物中之抗體結合之化合物；

- 含有黏稠溶液之容器，或者若需要，該等反應器之各個以該黏稠物質部分充填，該黏稠物質係如在本發明之方法之一中所界定者；

c) 若需要，含有稀釋劑之容器，該稀釋劑為包括親水性聚合物之溶液，該親水性聚合物以具有多糖本質為較佳，以 Ficoll™ 為更佳，以 Ficoll™ 400 為特佳，其濃度在 1% 與 2.5% (w/v) 之間，以 2% ± 0.3% 為較佳；

d) 若需要，至少一個磁鐵或一組磁鐵，該磁鐵或該等磁鐵係位於該或該等反應器之外部下方並與旋轉式攪拌器耦接。

在另一較佳具體實施例中，該本發明之套組之特徵為進一步含有具有已知表型之檢驗用紅血球之懸浮液，該等紅血球將與該磁粒懸浮液中之磁粒偶合，該紅血球懸浮液以來自 O 型為較佳，且該等紅血球之濃度係在 0.2% 與 2.5% 之間，以在 0.5% 與 1.5% 之間為較佳，以  $1\% \pm 0.3\%$  為更佳。

更佳地，本發明係關於以下述為特徵之本發明套組：該黏稠物質以及若需要該磁粒或該磁化紅血球懸浮液，或若需要該磁鐵及該旋轉式攪拌器，具有如在本發明之方法中所界定之特徵，此等黏稠溶液或其他化合物及元件之較佳範圍亦如在本發明之方法中所特定者。

在較佳具體實施例中，該本發明之套組之特徵為進一步含有具有已知表型之檢驗用紅血球之懸浮液，該等紅血球將與該磁粒之懸浮液中之磁粒偶合，該紅血球懸浮液以來自 O 型為較佳，且該等紅血球之濃度係在 0.2% 與 2.5% 之間，以在 0.5% 與 1.5% 之間為較佳，以  $1\% \pm 0.3\%$  為更佳。

在較佳具體實施例中，本發明之套組係用於血型檢定或表型檢定，其特徵為進一步含有具已知特異性之血清試劑，該血清試劑係呈溶液或乾燥形式。

在本文中，紅血球之對應英文可為「erythrocytes」、「red cell」及「red blood cell」，皆係指相同的血液細胞。

更佳地，本發明係關於具有下述特徵之本發明套組：該反應器為微量盤之杯狀凹穴，其以具有圓形底部（半球形）或 V 形底部者為較佳，該微量盤以由 96 個杯狀凹穴構成為

最佳。

下文之圖式及標題以及下述實施例係意圖例示說明本發明而非以任何方式限定其範圍。

### 實施例 1：材料及方法

A) 抗血型糖蛋白 A 與經甲苯磺醯基活化之磁珠偶合之實施例

(請參見第 8 圖)

抗血型糖蛋白 A 與取自 ESTAPOR™(產品編號：R01-24) 之經甲苯磺醯基活化之磁粒之偶合可於 0.1M 硼酸鈉緩衝液(pH9.5)或於 0.1M 磷酸鹽緩衝液(pH7.4)中進行。

在偶合之前，利用磁鐵將經甲苯磺醯基活化之磁粒在所選之偶合緩衝液中沖洗 2 次。該偶合係藉由將珠粒再懸浮於偶合緩衝液(硼酸鹽或磷酸鹽)中並加入濃度為 10 微克/毫克珠粒之抗體而進行。抗體之偶合係於存在 3M 硫酸銨下進行。

- 使用磁鐵將 25 毫克之甲苯磺醯基化磁粒(即 250 微升珠粒，濃度為 10%w/v)在 0.1M 磷酸鹽緩衝液(pH7.4)或 0.1M 硼酸鈉緩衝液(pH9.5)中沖洗 2 次；
- 一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並將珠粒連同 10 微克之抗血型糖蛋白 A 一起再懸浮；
- 將 250 微升之 3M 硫酸銨加至珠粒之懸浮液中，以使硫酸銨之最終濃度為 1.5M；

- 藉由渦轉將珠粒充分地再懸浮；
- 在緩慢的傾斜旋轉下於室溫培育 24 至 48 小時；
- 於偶合結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並將珠粒再懸浮於封阻緩衝液中，該封阻緩衝液含有 0.3M 磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)以及 0.5% BSA (w/v)；
- 在緩慢的傾斜旋轉下於室溫培育 2 小時；
- 於封阻步驟結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並用保存溶液再懸浮珠粒，該保存溶液含有 0.3M PBS 連同 0.1% (w/v) BSA 及 0.5% (w/v) Synperonic™ PE/F68。與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒在保存緩衝液中之最終濃度為 1%(w/v)。將珠粒貯存於 4°C 直至使用。

B) 抗血型糖蛋白 A 與取自 ESTAPOR™ 之羧基化磁珠偶合之實施例

抗 GPA 與羧基化磁珠(產品編號：M1-030/40)偶合之較佳方法係藉由物理性吸附。

所使用之抗 GPA 之濃度為 5 微克至 25 微克/毫克珠粒，以 10 微克抗 GPA/毫克珠粒為較佳。

抗 GPA 與羧基化磁珠之偶合係如下述進行：

- 使用磁鐵將 25 毫克之羧基化磁粒(即 250 微升之 10%w/v 珠粒懸浮液)在 1 毫升之 10mM 磷酸鹽緩衝液(pH6)中沖洗 2 次；

- 於沖洗步驟結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並用 1.5 毫升之 20 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.5) 將珠粒再懸浮；
- 立即加入抗 GPA 並使其濃度成為 10 微克/毫克珠粒；
- 藉由渦轉充分混合；
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時；
- 將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管放置在磁鐵上，用 20 mM 磷酸鹽緩衝液 (pH 7.5) 沖洗 3 次；
- 於沖洗步驟結束時，將珠粒再懸浮於封阻緩衝液中，該封阻緩衝液含有 0.3M 磷酸鹽緩衝食鹽水 (PBS) 以及 0.5% BSA (w/v)；
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時；
- 於封阻步驟結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並用保存溶液再懸浮珠粒，該保存溶液含有 0.3M PBS 連同 0.1% (w/v) BSA 及 0.5% (w/v) Synperonic™ PE/F68。與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒在保存緩衝液中之最終濃度為 1% (w/v)。將珠粒貯存於 4°C 直至使用。

C) 抗血型糖蛋白 A 與取自 JSR Micro 之羧基化磁珠偶合之實施例

抗 GPA 與取自 JSR Micro 之羧基化磁珠偶合之較佳方法係藉由物理性吸附(產品編號: Magnospheres MB100)。

所使用之抗 GPA 之濃度為 5 微克至 25 微克/毫克珠粒, 以 20 微克抗 GPA/毫克珠粒為較佳。

抗 GPA 與 5 毫克之羧基化磁珠之偶合係如下述進行:

- 使用磁鐵將 5 毫克之羧基化磁粒(即 50 微升之 10%w/v 珠粒)在 200 微升之 50mM MES 緩衝液(2-(N-嗎啉基)乙磺酸)(pH6.2)中沖洗 2 次;
- 於沖洗步驟結束時, 將試管置於磁鐵上, 一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清, 小心地用移液器移出上清液;
- 立即加入抗 GPA, 並使其濃度為 20 微克/毫克珠粒;
- 藉由渦轉充分混合;
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時;
- 將試管置於磁鐵上, 一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清, 小心地用移液器移出上清液;
- 將試管放置在磁鐵上, 用 50 mM MES 緩衝液(pH6.2)沖洗珠粒 3 次;
- 於沖洗步驟結束時, 將珠粒再懸浮於封阻緩衝液中, 該封阻緩衝液為含有 0.5%BSA(w/v)之 0.3M 磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS);
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時;
- 於封阻步驟結束時, 將試管置於磁鐵上, 一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清, 小心地用移液器移出上清液;
- 將試管移離磁鐵並用保存溶液再懸浮珠粒, 該保存溶液

含有 0.3M PBS、0.1% (w/v) BSA 及 0.5% (w/v) Synperonic™ PE/F68。與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒在保存緩衝液中之最終濃度為 1%(w/v)。將珠粒貯存於 4°C 直至使用為止。

#### D) 偶合珠粒在稀釋劑中之稀釋

一旦珠粒與抗 GPA 偶合，將此等直接在稀釋劑 Liss 及 Ficoll™ 2%(w/v) 中稀釋，然後分布在黏稠溶液或凝膠之頂部。在該稀釋劑中珠粒之濃度係在 0.005% 與 0.02% 之間，以 0.004% 為較佳。

#### 實施例 2: 傾斜壁及杯狀凹穴底部用抗人類免疫球蛋白 (AHG) 包覆

杯狀凹穴用之塑膠之化學性質及物理化學性質使得杯狀凹穴可用一層人類抗免疫球蛋白 (單株或多株 HAG 型) 覆蓋，該人類抗免疫球蛋白能特異性結合於可能形成之任何特異性複合物之抗體上，只要該複合物中之抗體係來自人類。

再者，應注意該 HAG 組成可包括對抗補體型血清蛋白質決定子 (complement-type serum protein determinants) 之抗體。

使用固相或 ELISA (酶鍵連免疫吸附分析) 型技術將未以 AHG 包覆之容器內壁表面用習用飽和劑予以飽和。

舉例言之，濃度在 1 微克/毫升與 10 微克/毫升之間之 AHG 溶液係以 0.2M 碳酸鹽緩衝液 (pH 9.6) 來製備。將該溶液分布在圓底 Maxisorp NUNC U8 型微量盤之各杯狀凹穴中，在每凹穴中加入 75 微升。然後將盤於 4°C 培育整夜。

然後將杯狀凹穴用磷酸鹽緩衝溶液沖洗(PBS 2.5mM, pH 7.4), 以去除未直接吸附在塑膠上之任何蛋白質。

然後將杯狀凹穴用白蛋白溶液(30 公克/公升, 溶於 PBS 緩衝液)處理, 每杯狀凹穴用 100 微升。

於室溫培育 2 小時後, 將杯狀凹穴再次用磷酸鹽緩衝液沖洗。

### 實施例 3:

第 1 法: 在分開的孔穴中用偶合有抗 GPA(抗血型糖蛋白 A)之磁珠將紅血球磁化

(磁化的原理, 請參見第 9 圖; 方法 1, 請參見第 10 圖)

非常規抗體之檢測包含使用具已知表型之紅血球(被稱為樣板(panel))。樣板由細胞之 3 種互補表型組成。在 96-孔圓底微量盤之 3 個孔中沉積 5 微升之偶合有抗 GPA 之珠粒, 然後在各孔中加入 45 微升之以貯存緩衝液稀釋成 1%之紅血球樣板。將該二成分混合後, 紅血球立即被磁化且準備用於下述步驟。

在包覆有特異性抗人類球蛋白(抗 IgG)或抗人類球蛋白之混合物(抗 IgG 及抗 IgM)之 96-孔圓底微量盤之 3 個孔中, 沉積密度大於 1 之黏稠溶液或凝膠, 以在含有紅血球及待檢驗血清之反應介質與抗球蛋白之間形成障壁。

在該障壁之頂部沉積密度大於 1 之黏稠稀釋劑, 在其上沉積經由抗 GPA 而磁化之紅血球, 以及待檢驗之取自病患或供體之血清或血漿。

然後將微量盤於 37°C 培育 20 分鐘。於該培育期間,

可能存在於於血清中之紅血球抗體將與攜帶該抗原之磁化紅血球結合。於培育結束時，將微量盤置於設有磁板之旋轉式攪拌器上，於施加磁場同時攪拌之期間，在表面帶有或未帶有抗紅血球抗體之磁化紅血球將被牽引通過黏稠溶液並與或未與包覆在底部上之 AHG 結合。

於磁場下之最終攪拌係由下述 2 階段組成：第一攪拌階段使磁化且敏化之紅血球被抗球蛋白捕獲，該階段係於 500 rpm 持續 2 分鐘 30 秒至 4 分鐘，以於 500 rpm 持續 3 分鐘為較佳；而第二攪拌階段係允許藉由形成球粒而顯示陰性反應，該階段係於 600 rpm 持續 30 秒至 2 分鐘，以於 600 rpm 持續 1 分鐘為較佳。

在陽性反應之情況，被病患或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞與 AHG 結合並於孔之底部形成薄層之紅血球。

在陰性反應之情況，被病患或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞將於孔之底部形成球粒(參見第 3 圖)。

#### 實施例 4

第 2 法：在被血清或血漿敏化期間紅血球用偶合有抗 GPA 之磁珠磁化。各成分(element)係接續沉積。

(請參見第 11 圖)

在包覆有特異性抗人類球蛋白(抗 IgG)或抗人類球蛋白之混合物(抗 IgG 及抗 IgM))之 96-孔圓底微量盤之 3 個孔中，沉積密度大於 1 之黏稠溶液或凝膠，以在含有此等紅血球及血清試劑之反應介質與抗球蛋白之間形成障壁。

在該黏稠障壁或凝膠之頂部沉積稀釋劑，繼而沉積偶

含有抗 GPA 之磁珠，然後沉積以紅血球之貯存緩衝液稀釋至 1% 之紅血球，最後沉積待檢驗之病患(或供體)之血清或血漿。

然後將微量盤於 37°C 培育 20 分鐘。於該培育期間，偶含有抗 GPA 之磁珠將與紅血球結合；對於可能存在於待檢驗之血清或血漿中之各種非常規抗體而言，該步驟為相同。各抗體有各自的抗原特異性，一抗體與紅血球之結合不會干擾另一抗體之結合。

因此，帶有抗原之紅血球可被磁化及被可能存在於病患血漿中之抗體敏化。於培育結束時，將微量盤置於設有磁板之旋轉式攪拌器上，於施加磁場同時攪拌之期間，帶有或未帶有非常規抗體之紅血球將被牽引通過黏稠溶液並與或未與包覆在底部上之 AHG 結合。於施加磁場下之最終攪拌係由下述 2 階段組成：第一攪拌階段使磁化且敏化之紅血球被抗球蛋白捕獲，該階段於 500 rpm 持續 2 分鐘 30 秒至 4 分鐘，以於 500 rpm 持續 3 分鐘為較佳；而第二攪拌階段係允許藉由形成球粒而顯示陰性反應，該階段於 600 rpm 持續 30 秒至 2 分鐘，以於 600 rpm 持續 1 分鐘為較佳。

如同在先前之實施例中，於陽性反應之情況，被病患或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞與 AHG 結合並於孔之底部形成薄層之紅血球。於陰性反應之情況，被病患或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞將於孔之底部形成球粒。

在該方法中，無需在分開的孔中進行紅血球之磁化，因為磁化(經由抗 GPA 抗體)為特異性，於稍後步驟中不會

發生干擾，所以紅血球被病患之血漿敏化可獨立地發生。

實施例 5：

第 3 法：在被血清或血漿敏化期間紅血球用偶合有抗 GPA 之磁珠磁化。偶合有抗 GPA 之磁珠以稀釋劑稀釋(請參考第 12 圖)

在本方法中(比其他二法佳)，珠粒直接用待沉積在濾器上之稀釋劑稀釋。因此沉積步驟之數目減少，且含有與抗血型糖蛋白 A 偶合之珠粒之稀釋劑被視為試劑。

如前述，在包覆有特異性抗人類球蛋白(抗 IgG)或抗人類球蛋白之混合物(抗 IgG 及抗 IgM))之 96-孔圓底微量盤之 3 個孔中，引進密度大於 1 之黏稠溶液或凝膠，其可做為含有紅血球及待檢驗血清之反應介質與抗球蛋白之間之障壁。將含有與抗 GPA 偶合之珠粒之稀釋劑沉積在黏稠障壁或凝膠之頂部。然後將以紅血球之貯存緩衝液稀釋至 1%之紅血球沉積在含有磁珠之稀釋劑上，最後將待檢驗之病患(或供體)之血漿或血清沉積在紅血球上。

在較佳具體實施例中，於將紅血球沉積在密度大於 1 之黏稠障壁之頂部之前，已先與含有與抗 GPA 偶合之珠粒之稀釋劑混合。然後將血漿或血清加至紅血球-稀釋劑-磁珠之混合物中。

在自動化具體實施例中，以下述為較佳：在包覆有特異性抗人類球蛋白(抗 IgG)或抗人類球蛋白之混合物(抗 IgG 及抗 IgM))之 96-孔圓底微量盤之 3 個孔中，沉積紅血球以及含有磁珠之稀釋劑。藉由將該盤置於自動攪拌器上

而將該二成分混合。於攪拌結束後，高密度之黏稠障壁係藉由將自動注射器之尖端置於孔之底部而被注射在紅血球-稀釋劑-磁珠之混合物之下方，因此可避免 AHG 被非特異性抗體飽和，而使由紅血球及含有磁珠之稀釋劑所形成之混合物較少保留在黏稠障壁之上方。

此提供具有不同密度之二分明的(distinct)相：第一相為在 AGH 上方之較高密度凝膠，以及第二相為含有與抗 GPA 偶合之磁珠之稀釋劑與紅血球之混合物。然後將待檢驗之病患血漿置於該混合物之上。

然後將微量盤於 37°C 培育 20 分鐘。於該培育期間，可能存在於於受檢血漿中之非常規抗體將與紅血球結合。該帶有抗原之紅血球可被磁化且可被可能存在於於病患血漿中之抗體敏化。各抗體有各自的抗原特異性，一抗體與紅血球之結合不會干擾另一抗體之結合。

於培育結束時，將微量盤置於設有磁板之旋轉式攪拌器上，於施加磁場同時攪拌之期間，帶有或未帶有非常規抗體之紅血球將被牽引通過黏稠溶液並與或未與包覆在底部上之 AHG 結合。於施加磁場下之最終攪拌係由下述 2 階段組成：第一攪拌階段使磁化且敏化之紅血球被抗球蛋白捕獲，該階段於 500 rpm 持續 2 分鐘 30 秒至 4 分鐘，以於 500 rpm 持續 3 分鐘為較佳；而第二攪拌階段係允許藉由形成球粒而顯示陰性反應，該階段於 600 rpm 持續 30 秒至 2 分鐘，以於 600 rpm 持續 1 分鐘為較佳。

如同在先前之實施例中，於陽性反應之情況，被病患

或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞與 AHG 結合並於孔之底部形成薄層之紅血球。於陰性反應之情況，被病患或供體血清(或血漿)敏化之磁化細胞將於孔之底部形成球粒。

所有此等磁化方法可應用於其他檢驗，諸如供體與受體之間之相容性檢驗。

在本例中，來自輸血袋之供體細胞，在置於含有與抗 GPA 偶合之磁珠之稀釋劑上方之前，預先以低離子強度之緩衝液稀釋至 1%。

在被懷疑在活體內已被非常規抗體敏化之病患之情況(尤其是在胎兒-母體不相容之情況或自體免疫溶血性疾病之情況)所進行之直接庫姆氏檢驗，亦與上述相同。

在此等情況，在活體內已被敏化之紅血球，在置於含有與抗 GPA 偶合之磁珠之稀釋劑上方之前，預先以低離子強度之緩衝液稀釋至 1%。

實施例 6：使用第 3 法檢測非常規抗體之檢驗(請參考第 4 圖)

將與抗 GPA 偶合之珠粒加至被沉積在黏稠障壁或凝膠(亦被稱為 Nanolys™)上之稀釋劑(亦被稱為 Liss Ficoll)中而將其直接稀釋，其中該凝膠為在含 10%白蛋白之 Liss 溶液中之超細 Sephadex™ G-100，其濃度為 3%。細胞(紅血球)係來自 O 型病患之原始集血管且以低離子強度緩衝液稀釋成 1%者，或者來自 O 型紅血球之樣板(panel)且以貯存緩衝液稀釋成 1%者。

所使用之抗血清(待檢驗血清)來自病患且含有非常規

抗體諸如抗 D<sup>+</sup>、抗 C<sup>+</sup>、抗 E<sup>+</sup>。該檢體係以不同之稀釋度來進行檢驗。

預期結果係藉由使用相同的細胞(紅血球)及相同的抗血清，按照已商業化之技術進行該等檢驗而得到。

操作程序(protocol)：

在包覆有人類抗球蛋白(抗 IgG)(亦被稱為 ScreenLys™)之 96 孔圓底微量盤之孔中，沉積 50 微升之 Nanolys™，然後加入 50 微升之含有與抗 GPA 偶合之磁珠之 Liss Ficoll。加入 15 微升之被稀釋成 1% 之紅血球且最終加入 15 微升待檢驗之血清或血漿。將該微量盤置於培育器中並保持 37°C 共計 20 分鐘，然後將該微量盤置於設有磁鐵板之攪拌器上，其中該等磁鐵精確地固定在微量盤之各孔下方。於磁場下之最終攪拌係由 2 階段組成：於 500 rpm 攪拌 3 分鐘，繼而於 600 rpm 攪拌 1 分鐘。

實施例 7：使用檢測非常規抗體之檢驗滴定來自 CNRGS(法國國家血型參考中心)之抗 D(請參見第 5 圖)

使用取自 CNRGS 之抗 D 標準品之系列稀釋液作為被檢驗之抗血清，其中 O 型紅血球樣板(panel)以保存緩衝液稀釋成 1%。

該抗 D 標準品之滴定可以顯示出上述方法之檢測閾值。

操作程序：

在 ScreenLys™(包覆有人類抗球蛋白(抗 IgG)之盤)之孔中，沉積 50 微升之 Nanolys™，然後將 50 微升之含有與

抗 GPA 偶合之磁珠之 Liss Ficoll 加至 Nanolys™ 上。加入 15 微升之被稀釋成 1% 之紅血球且最終加入 15 微升之待檢驗抗 D 之各稀釋液。將該盤於 37°C 培育共計 20 分鐘，然後置於設有磁鐵板之攪拌器上，其中該等磁鐵精確地固定在微量盤之各孔下方。於磁場下之最終攪拌係由 2 階段組成：於 500 rpm 持續 3 分鐘，繼而於 600 rpm 持續 1 分鐘。

結果顯示非常規抗體之檢測靈敏且能檢測低達 1.26 奈克/毫升 (ng/ml) 之抗 D。

該磁化方法在靈敏度及特異性上皆與已商業化之方法相當。

**實施例 8：對 O 型紅血球供體所進行之交叉比對檢驗(相容性檢驗)(請參見第 6 及 7 圖)**

檢驗收集在含 EDTA 之試管中之取自供體之 O 型紅血球與取自病患而可能含有或不含非常規抗紅血球抗體之血漿或血清之間之相容性。

將結果列於下文。

操作程序：

將取自原始試管供體之 10 微升紅血球濃厚液以 1 毫升低離子強度緩衝液稀釋，以形成 1% 紅血球懸浮液。在 ScreenLys™ (包覆有抗人類球蛋白(抗 IgG)之盤)之孔中，沉積 50 微升之 Nanolys™，然後將 50 微升之含有與抗 GPA 偶合之磁珠之 Liss Ficoll 加至 Nanolys™ 上。加入 15 微升之被稀釋成 1% 之紅血球且最終加入 15 微升之待輸血病患之血漿或血清。將該盤於 37°C 培育共計 20 分鐘，然後

置於設有磁鐵板之攪拌器上，其中該等磁鐵精確地固定在微量盤之各孔下方。於施加磁場下之最終攪拌係由 2 階段組成：於 500 rpm 攪拌 3 分鐘，繼而於 600 rpm 攪拌 1 分鐘。

藉由此使用偶合有對紅血球具特異性之抗體之磁珠進行磁化之方法所得之結果清楚顯示該方法能夠測定供體與受體在不同血液系統中之血液相容性。

**實施例 9：使用 IgM 型凝集性抗體進行血型檢定/表型檢定，包括進行西莫寧檢驗**

#### A) 凝集方法

在進行檢驗之前，磁化溶液藉由將偶合有抗 GPA 之磁珠以含有 0.1%BSA(w/v)及 0.5% Synperonic™ PE/F68 之 0.3M 磷酸鹽緩衝液稀釋而製備。偶合有抗 GPA 之磁珠之濃度可從 0.001%變化至 0.004%，以 0.003%為較佳。在直接檢驗或貝絲-文森特檢驗之情況中，將對於來自 ABO 系統之紅血球抗原(抗 A、抗 B、抗 AB)、來自恆河猴(Rhesus)系統之紅血球抗原(D、C、c、E、e)、來自凱爾(Kell)系統之抗原具特異性之單株抗體在 96 孔微量盤之圓形底孔中乾燥。

對於收集在含抗凝血劑諸如 EDTA、檸檬酸鹽或肝素之試管中之血液檢體，進行該個體之紅血球上感興趣抗原之類型檢定。

濃度在 0.5%與 1.2%之間(以 1%為較佳)之紅血球懸浮液(globular suspension)係在試管或微量盤之圓形底孔

中藉由以 1 毫升之低離子強度緩衝液，尤其是 LISS 緩衝液稀釋 10 微升之紅血球球粒(globular pellet)而製備。在上述含有乾燥抗血清之 96 孔微量盤之圓形底孔中，沉積 10 微升之磁化溶液，於其中加入 30 微升之 1%紅血球懸浮液。

在進行直接檢驗之同時，在未使用之相鄰孔中進行西莫寧檢驗：在 4 個未使用孔中沉積 10 微升之磁化溶液，該磁化溶液含有與抗 GPA 偶合之磁珠；然後在此等磁珠中加入 15 微升之檢驗用紅血球之懸浮液，該檢驗用紅血球具有已知之血型諸如 A1、A2、B 或 O 型，且預先用具低離子強度之貯存緩衝液稀釋成濃度為 1%；最後加入 25 微升之待檢定表型之病患或供體之血漿。

此等成分藉由將微量盤置於自動微量盤攪拌器上而均質化。攪動速度可在 500 與 800 rpm 之間變化，以在 650 與 750 rpm 之間為較佳，以 700 rpm 為更佳。攪動之期間可在 1 分鐘與 2 分鐘之間變化，以 1 分鐘 30 秒為較佳。

然後將微量盤於室溫培育 2 分鐘至 15 分鐘，以 10 分鐘為較佳。

各抗體對抗原具特異性，一抗體之結合不會阻止另一抗體之結合。因此，帶有紅血球抗原之紅血球可被偶合有抗 GPA 之磁珠磁化且被孔中之乾燥抗血清敏化。

於培育步驟結束時，將微量盤置於設有 96 個磁鐵之板上，此等磁鐵被精確地固定在微量盤之各孔之下方。於該磁場之影響下，被敏化且被偶合有抗 GPA 之磁珠磁化之紅

血球將被拉至此等孔之底部且若存在對應於抗血清之抗原將形成球粒。於室溫之磁化時間可在 3 分鐘與 7 分鐘之間變化，以 5 分鐘為較佳。

然後將微量盤置於攪拌器上，以懸浮未凝集之紅血球（即 RBC），即對於被篩選之抗原而言為陰性之紅血球。下述攪動順序可使未凝集之紅血球再懸浮及使紅血球凝集物顯現：首先，於磁化後相當強烈地攪拌以將紅血球拉離孔之底部。該攪拌係以 800 與 1000 rpm 之間之速度進行 1 分鐘至 2 分鐘 30 秒，較佳於 900 rpm 進行 1 分鐘 45 秒。於攪拌結束時，未凝集之紅血球被分散形成均質之懸浮液，而表現被篩選之抗原之紅血球形成緻密之凝集物。

然而，就較低度表現之抗原而言，於攪拌結束時所形成之凝集物較小且較分散，需要所謂的「再聚集」攪拌，以使所有分散的小凝集物集合而在孔之底部形成完整、有清楚邊界之凝集物。該所謂的「再聚集」攪拌係以低速度（即在 350 與 550 rpm 之間）進行 30 秒至 1 分鐘，以於 450 rpm 進行 45 秒為較佳。該「再聚集」攪拌對於陰性紅血球或對於強凝集物沒有影響。然後，微量盤可藉由裸眼或藉由設有照相機之自動讀取機來讀取。

陽性反應將導致在孔之底部存在 1 個或多個凝集物，而陰性反應將導致形成紅血球之均質懸浮液。

實施例 10：使用 DUOLYS 型微量盤對於 8 名病患進行 ABO 血型檢定及 Rh-K 表型檢定；該等檢驗包括使用 A1 型及 B 型檢驗用紅血球進行之西莫寧檢驗

A) 試劑

- 含有血型之乾燥抗體之 DuoLys 微量盤；
- 一瓶磁化溶液，該磁化溶液含有與抗 GPA 偶合之磁珠並以 0.3M 磷酸鹽緩衝液 + 0.1% BSA(w/v) + 0.5% synperonic™(w/v)PE/F68 稀釋成 0.004%；
- 檢驗用 A1 型紅血球之懸浮液，其以貯存緩衝液稀釋成 1%；
- 檢驗用 B 型紅血球之懸浮液，其以貯存緩衝液稀釋成 1%；
- 8 個取自病患之血液檢體，其收集在含抗凝血劑 EDTA 之試管中。

B) 操作程序：下述係就各個血液檢體而言

- 在第 1 至 12 排孔之各個中沉積 10 微升之磁化溶液；
- 在第 1 至 10 排孔中沉積 30 微升之以 Liss 稀釋至 1% 之紅血球懸浮液；
- 在第 11 排孔中：沉積 5 微升之檢驗用 A1 型紅血球之懸浮液；
- 在第 12 排孔中：沉積 5 微升之檢驗用 B 型紅血球之懸浮液；
- 在第 11 及 12 排孔中，沉積 25 微升之取自各病患之血漿；
- 於 700 rpm 攪動該微量盤 1 分鐘 30 秒；
- 於室溫培育該微量盤共計 10 分鐘；
- 於磁鐵板上磁化該微量盤共計 5 分鐘；

- 攪動：於 900 rpm 進行 1 分鐘 45 秒 + 於 450 rpm 進行 45 秒；

- 用裸眼及藉由照相機讀取。

### C) 結果(請參見第 13 圖)

使用與紅血球特異性抗體偶合之磁珠進行磁化之方法所得到之結果清楚顯示：在使用乾燥抗血清之情況，包括反向檢驗(西莫寧檢驗)，有測定血型及 Rh-K 表型之能力。實施例 11：藉由凝集技術進行之血液表型檢定，其中使用 IgG 及/或 IgM 型抗體

本發明亦能夠利用液體形式之 IgG 型及/或 IgM 型抗體進行紅血球之血型檢定/表型檢定。當抗血清為 IgG 型時，「凝集」試劑係從抗 IgG 型抗免疫球蛋白製備，該抗 IgG 型抗免疫球蛋白預先以對被研究抗原為具特異性之抗 IgG 型之濃溶液飽和。

因此，在血液表型檢定期間，使用該液體「凝集」試劑，例如任何其他表型檢定試劑。

於實施該檢驗之前，凝集試劑係藉由將抗 IgG 型抗免疫球蛋白與含有 IgG 型抗紅血球抗體之未經純化之單株抗體濃縮物一起培育而製備。

濃度在 0.5%與 1.2%之間(以 1%為較佳)之紅血球懸浮液係在試管或微量盤之圓形底孔中藉由以 1 毫升之低離子強度緩衝液，尤其是 LISS 緩衝液稀釋 10 微升之紅血球濃厚液而製備。

在具 96 孔微量盤之各圓形底孔中，沉積 10 微升之磁

化溶液，於其中加入 15 微升之 1%紅血球懸浮液以及 25 微升之 IgG 型或 IgM 型抗 RBC 「凝集」試劑。

此等成分係藉由將該微量盤置於微量盤攪拌器上而均質化。攪動之速度可從 1000 rpm 變化至 1200 rpm，以 1200 rpm 為較佳。攪動之期間可從 5 秒變化至 1 分鐘，以 10 秒為較佳。然後將該微量盤於 37°C 培育 10 分鐘至 30 分鐘，以 20 分鐘為較佳。

各抗體對於抗原具特異性，一抗體之結合不會阻止另一抗體之結合。因此，帶有紅血球抗原之紅血球可被偶合有抗 GPA 之磁珠磁化且被沉積在孔底部之 IgM 或 IgG 型之抗血清敏化。

於培育步驟結束時，將微量盤置於含有 96 個電磁鐵之板上，精確地調整此等電磁鐵使其位在該微量盤之各孔之下方。於該磁場之影響下，被敏化且被偶合有抗 GPA 之磁珠磁化之紅血球將被拉至此等孔之底部，若存在對應於抗血清之抗原，則將形成凝集物。於室溫之磁化時間可從 5 分鐘變化至 15 分鐘，以 5 分鐘為較佳。

然後將微量盤置於攪拌器上，以再度懸浮未凝集之紅血球，即對於被研究之抗原而言為陰性之紅血球。下述攪動順序可使未凝集之紅血球再懸浮及使紅血球凝集物顯現：首先，於磁化後相當強烈地攪拌以將紅血球拉離孔之底部。該攪拌係以 500 與 1000 rpm 之間之速度進行 1 分鐘至 2 分鐘 30 秒，較佳於 700 rpm 進行 1 分鐘 30 秒。於攪動結束時，未凝集之紅血球被分散形成均質之懸浮液，而

表現被研究之抗原之紅血球形成緻密之凝集物。就較低度表現之抗原而言，於攪拌結束時所形成之凝集物較小且較分散，需要所謂的「再聚集」攪拌，以使所有分散的小凝集物集合而在孔之底部形成完整、有清楚邊界之凝集物。該所謂的再聚集攪拌係以低速度(即在 350 與 550 rpm 之間)進行 30 秒至 1 分鐘，以於 450 rpm 進行 45 秒為較佳。該再聚集攪拌對於陰性 RBC 或對於強凝集物沒有影響。然後，該微量盤可藉由裸眼或藉由設有照相機之自動讀取機來讀取。

#### A) 試劑

- 一瓶磁化溶液，該磁化溶液含有與抗 GPA 偶合之磁珠並以含 0.1% BSA(w/v)及 0.5% synperonic™(w/v) PE/F68 之 0.3M PBS 稀釋成 0.005%；
- 一瓶抗 Jkb 多株抗體(純株(clone)P.143，IgM 型)之溶液
- 一瓶抗 S「凝集」試劑：1 毫升之 AGH (濃度=1.8 毫克/毫升) + 20 毫升之抗 S(純株 P3S13JS123，IgG 型)濃溶液；
- 一瓶抗 s「凝集」試劑：1 毫升之 AGH (濃度=1.8 毫克/毫升) + 20 毫升之抗 s(純株 P3YAN3，IgG 型)濃溶液；
- 5 個取自病患之血液檢體，其收集在含 EDTA 型抗凝血劑之試管中。

#### B) 操作程序：下述係就各血液檢體而言

- 在具 96 個圓形底孔之微量盤之 3 個孔中沉積 10 微

升之磁化溶液；

- 在該 3 個孔中加入 15 微升之以 Liss 稀釋至 1% 之紅血球懸浮液；

- 在該 3 個孔之各個中分別加入 25 微升之抗 Jkb 試劑、抗 S 試劑及抗 s 試劑；

- 於 1200 rpm 攪拌該微量盤 10 秒；

- 於 37°C 培育該微量盤 20 分鐘；

- 於磁鐵板上磁化該微量盤 10 分鐘；

- 攪拌：於 700 rpm 進行 1 分鐘 30 秒 + 於 450 rpm 進行 45 秒；

- 用裸眼及藉由照相機讀取。

### C) 結果(請參見第 14 圖)

使用與紅血球特異性抗體偶合之磁珠進行磁化之方法所得到之結果清楚顯示：有測定供體或病患之不同血液系統中之延伸(extended)表型之能力。

實施例 12：對 8 名供體進行延伸表型檢定：使用抗 Fya、抗 Fyb、抗 Jka、抗 Jkb、抗 S 及抗 s 抗血清並採用免疫-吸附技術

試劑

- 由糖系聚合物及低離子強度緩衝液所組成之稀釋劑，在其中與抗 GPA 偶合之珠粒被稀釋。珠粒在該稀釋劑中之濃度為 0.004%；

- 抗 Fya 人類單株抗體(純株 DGFYA02, IgG 型)；

- 抗 Fyb 人類單株抗體；

- 抗 Jka 人類單株抗體(純株 P3HT7, IgM 型);
- 抗 Jkb 人類單株抗體(純株 P.143, IgM 型);
- 抗 S 人類單株抗體(純株 P3S13JS123, IgG 型);
- 抗 s 人類單株抗體(純株 P3YAN3, IgG 型);
- 陰性對照組;
- Nanolys;
- 8 個供體血液檢體, 其收集在含 EDTA 型抗凝血劑之試管中。

**B)操作程序：下述係就各供體而言**

在檢驗之前, 將與抗 GPA 偶合之珠粒加至稀釋劑(亦被稱為 Liss Ficoll)中而將其直接稀釋。

將來自 8 名供體之各個之紅血球以含有與抗 GPA 偶合之珠粒之稀釋劑稀釋成 1%。此等不同的稀釋液係在試管或在具有 96 個圓底深孔之微量盤之孔中製備。在以 IgG 型及 IgM 型人類抗球蛋白(抗 IgG)包覆之具有 96 個圓底孔之微量盤(亦被稱為 CrossLys™)之 7 個孔中沉積 50 微升之黏稠障壁或凝膠(亦被稱為 Nanolys™)。在 Nanolys™之上, 沉積 55 微升之以含有該珠粒之稀釋劑稀釋成 1%之紅血球懸浮液。最後, 將 10 微升之各抗血清沉積在該紅血球懸浮液之上方。然後將該微量盤於 37°C 培育 20 分鐘。於培育步驟結束時, 將該微量盤置於設有磁鐵板之攪拌器上, 此等磁鐵被精確地固定在該微量盤之各孔之下方。於施加磁場同時攪拌下, 帶有或未帶有非常規抗體之紅血球將被牽引通過該黏稠溶液, 並與或不與包覆在底部上之 AHG 結合。於

磁場存在下之最終攪拌由下述 2 階段構成：第一攪拌階段允許磁化及敏化之紅血球被抗球蛋白捕捉，該階段係於 500 rpm 持續 3 分鐘；而第二階段則係允許藉由形成球粒而顯示陰性反應，該階段係於 600 rpm 持續 1 分鐘。

在陽性反應之情況，用抗血清敏化之磁化紅血球 (magnetized cells) 將與 AHG 結合並於孔之底部形成薄層之紅血球。在陰性反應之情況，於孔之底部經抗血清敏化之磁化紅血球形成球粒。

預期結果藉由使用相同的紅血球及相同的抗血清，按照已商業化之技術進行該等檢驗而得到。

C) 預期結果：見下表

	Fya	Fyb	Jka	Jkb	S	s	CTL
病患#1	1	1	0	1	0	1	0
病患#2	1	0	1	1	0	1	0
病患#3	1	1	1	0	0	1	0
病患#4	0	0	1	0	1	1	0
病患#5	1	0	0	1	0	1	0
病患#6	0	1	0	1	1	1	0
病患#7	1	1	1	1	0	1	0
病患#8	0	1	1	1	0	1	0

所得到之結果：請參見第 15 圖

使用與紅血球特異性抗體偶合之磁珠進行磁化之方法所得到之結果清楚顯示：該方法有測定供體或病患之不同

血液系統中之延伸表型之能力。

實施例 13：48 名供體之表型(弱 D 抗原)檢定：使用 2 種不同抗 D 純株之混合物(第 4 圖)並採用免疫吸附技術

A) 試劑

- 由糖系聚合物及低離子強度緩衝液所組成之稀釋劑，在其中與抗 GPA 偶合之珠粒被稀釋。珠粒在該稀釋劑中之濃度為 0.004%；
- 抗 D 之混合物(純株 ESD1 及純株 P3X35)；
- Nanolys；
- 48 個供體血液檢體，其收集在含 EDTA 型抗凝血劑之試管中。

B) 操作程序：下述係就各供體而言

弱 D 檢驗可用如同延伸表型檢定之操作程序來進行。

C) 預期結果：見下表

	抗D	抗D	抗D	抗D	抗D	抗D
A	D-	D-	D+	D+	D-	Dw 類型2
B	Dw 類型1	D-	D+	D+	D+	DMH
C	D-	D-	D+	D-	D+	D+
D	Dw 類型3	D+	D+	D+	D+	D+
E	D-	D-	DAU	D+	D+	D+
F	D-	D-	D+	D-	D+	Dw 類型3
G	D-	D+	D+	Dw 類型3	D+	D+
H	Dw 類型3	D-	D VII	D+	D+	D+

#### D) 所得到之結果

使用與紅血球特異性抗體偶合之磁珠進行磁化之方法所得到之結果清楚顯示：該方法有測定供體之弱 D 表型之能力。

實施例 14：藉由減少與磁粒偶合之抗 GPA 濃度來改善此等檢驗之靈敏度及特異性

A) 抗血型糖蛋白 A 與得自 JSR Micro 之羧基化磁珠偶合

抗 GPA 與得自 JSR Micro 之羧基化磁珠(產品編號：Magnosphere MB100)偶合之較佳方法係藉由物理性吸附。

為了增加此等檢驗之特異性及靈敏度，所用之抗 GPA 之濃度為 2 至 5 微克/毫克珠粒，以 2.5 微克之抗 GPA/毫克之珠粒為較佳。

抗 GPA 與 5 毫克羧基化磁珠之偶合係如下述進行：

- 使用磁鐵將 5 毫克之羧基化磁粒(50 微升之 10%w/v 珠粒)在 200 微升之 50mM MES(2-(N-嗎啉基)乙磺酸)緩衝液(pH6.2)中沖洗 2 次；
- 於沖洗步驟結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 立即加入抗 GPA，其濃度為 2.5 微克/毫克珠粒；
- 藉由渦轉充分混合；
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時或於 4°C 培育 24 小時；
- 將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管放置在磁鐵上，用 50 mM MES 緩衝液(pH6.2)沖洗珠粒 3 次；
- 於沖洗步驟結束時，將珠粒再懸浮於封阻緩衝液中，該封阻緩衝液含有 0.3M 磷酸鹽緩衝食鹽水(PBS)及 0.5% BSA (w/v)；
- 於緩斜攪動下於室溫培育 2 小時；
- 於封阻步驟結束時，將試管置於磁鐵上，一旦珠粒已向磁鐵移行且該液體變為澄清，小心地用移液器移出上清液；
- 將試管移離磁鐵並用保存溶液再懸浮珠粒，該保存溶液含有 0.3M PBS、0.1%(w/v)BSA 及 0.5% (w/v) Synperonic™

PE/F68。為了增加與抗 GPA 偶合之磁粒之安定性，吾等優先於將其於存在高濃度（諸如 5%(w/v)之 Synperonic™ PE/F68(界面活性劑)下貯存。與抗血型糖蛋白 A 偶合之磁珠在保存緩衝液中之最終濃度為 1%(w/v)。將磁珠貯存於 4°C 直至使用。

B)在稀釋劑中將偶合的珠粒稀釋

一旦珠粒與抗 GPA 偶合，將此等直接在稀釋劑 Liss 及 Ficoll™ 2%(w/v)中稀釋，然後分布在黏稠溶液或凝膠之頂部。在該稀釋劑中珠粒之濃度係在 0.005%與 0.02%之間，以  $0.007 \pm 0.001\%$  (w/v)為較佳。

實施例 15：在對於 O 型紅血球供體所進行之交叉比對檢驗（相容性檢驗）中之比較研究顯示藉由減少與磁粒偶合之抗 GPA 之濃度可改善此等檢驗之靈敏度及特異性（請參見第 17 圖）

檢驗保存在含 SAGM 之血袋中之取自供體之 O 型紅血球，與取自病患而可能含有或不含非常規抗紅血球抗體之血漿或血清、或者與具已知特異性之抗血清之不同稀釋液之間之相容性。

該檢驗包含：與磁珠偶合之抗 GPA 之 2 不同濃度之間之比較研究，其中磁珠在最終稀釋劑中之濃度為 0.007%。

結果如下述。

操作程序：

將取自原始試管供體之 10 微升紅血球濃厚液以 1 毫升之低離子強度緩衝液稀釋，以形成 1%紅血球懸浮液。在

CrossLys™(包覆有 2 種人類抗球蛋白(抗 IgG 及抗 IgM)之盤)之孔中，沉積 50 微升之 Nanolys™，然後將 50 微升之含有與抗 GPA 偶合之磁珠之 Liss Ficoll 加至 Nanolys™上。加入 15 微升之被稀釋成 1%之紅血球且最終加入 15 微升之待輸血病患之血漿或血清。將該盤於 37°C 培育共計 20 分鐘，然後置於設有磁鐵板之攪拌器上，其中該等磁鐵精確地固定在微量盤之各孔下方。於存在磁場下之最終攪拌係由 2 階段組成：於 500 rpm 攪拌 3 分鐘，繼而於 600 rpm 攪拌 1 分鐘。

與磁珠偶合之抗 GPA 之 2 種濃度之間比較研究顯示當所偶合之抗 GPA 之濃度較低時，陽性反應程度增加。同時，當該濃度較低(即每毫克珠粒含 2.5 微克)時，陰性反應也變得較具特異性及分辨性。

實施例 16：當磁粒於存在高濃度之非離子性界面活性劑：Synperonic™ PE/F68 下貯存時，比較研究顯示此等磁粒之安定性增加；該研究係以供體之 O 型紅血球交叉比對檢驗來進行

檢驗保存在含 SAGM 之血袋中之取自供體之 O 型紅血球與取自病患而可能含有或不合非常規抗紅血球抗體之血漿或血清或者與具已知特異性之抗血清之不同稀釋液之間之相容性。

該檢驗包含：偶合磁珠在以最終溶液稀釋之前，於 2 種不同貯存條件下之比較研究。

結果如下述。

操作程序：

將取自原始試管供體之 10 微升紅血球濃厚液以 1 毫升之低離子強度緩衝液稀釋，以形成 1%紅血球懸浮液。在 CrossLys™(包覆有 2 種人類抗球蛋白(抗 IgG 及抗 IgM)之盤)之孔中，沉積 50 微升之 Nanolys™，然後將 50 微升之含有與抗 GPA 偶合之磁珠之 Liss Ficoll 加至 Nanolys™上。加入 15 微升之被稀釋成 1%之紅血球且最終加入 15 微升之待輸血病患之血漿或血清。將該盤於 37°C 培育共計 20 分鐘，然後置於設有磁鐵板之攪拌器上，其中該等磁鐵精確地固定在微量盤之各孔下方。於存在磁場下之最終攪拌係由 2 階段組成：於 500 rpm 攪拌 3 分鐘，繼而於 600 rpm 攪拌 2 分鐘。

於二種貯存條件，即存在 0.5%或 5% Synperonic 界面活性劑下之比較研究顯示：當此等磁珠在以最終溶液稀釋之前，於存在 5% Synperonic 界面活性劑下貯存時，磁珠之安定性較佳。該研究清楚顯示：於存在 5% Synperonic 界面活性劑下貯存之珠粒，貯存於 37°C 者之陽性反應及陰性反應與貯存於 4°C 者相似。而當偶合珠粒於存在 0.5% Synperonic 界面活性劑下貯存時，於 37°C 所有反應皆下降。

#### 【圖式簡單說明】

第 1A 及 1B 圖：攪拌台(Teleshake™)之頂視圖(第 1A 圖)及側視圖(第 1B 圖)，該攪拌台係由位於微量盤下方之軟鐵板所構成，各磁鐵以疊列在各微量盤杯狀凹穴下方之

形式磁性地固定於該軟鐵板。

(1) 塑膠間隔物，以使磁鐵之間具有良好的間隔；(2) 可使微量盤楔入 Teleshake 之元件；(3) Teleshake 之楔形壁 (wedge)，其可讓微量盤楔入；(4) 疊列磁鐵；(5) 微量盤；(6) 塑膠間隔物；(7) 軟鐵板，磁鐵磁性地固定於其上；(8) 厚紙板，將 Teleshake 與磁鐵堆疊物構成之磁場隔開；(9) Teleshake 旋轉盤。

第 2A 及 2B 圖：於杯狀凹穴之傾斜壁(部分)及基底用抗免疫球蛋白包覆後之圓底(U 形底)杯狀凹穴式反應器，在加入黏稠溶液及各種溶液及試劑之前之圖(第 2A 圖)。於杯狀凹穴之傾斜壁(部分)及基底用抗免疫球蛋白包覆後之圓底(U 形底)杯狀凹穴式反應器，在加入黏稠溶液、在稀釋劑中之磁化紅血球懸浮液、及待檢驗之血漿或血清之後之圖(第 2B 圖)。

第 3 圖：顯示與紅血球所帶抗原之陽性免疫吸附反應(形成特異性複合物，該特異性複合物吸附於以抗免疫球蛋白包覆之傾斜壁)之影像之圖(左圖)，以及顯示與紅血球所帶抗原之陰性免疫吸附反應(未形成特異性複合物)之影像之圖(右圖)。

第 4 圖：使用第 3 法所進行之非常規抗體檢驗(IAT)。

第 5 圖：用非常規抗體檢驗滴定取自 CNRGS(法國國家血型參考中心)之抗 D。

第 6 及 7 圖：用 O 型血液實施之交叉比對檢驗(相容性檢驗)。

第 8 圖：抗血型糖蛋白 A(GPA)於磁珠上之偶合。

第 9 圖：人類紅血球藉由包覆在磁珠上之抗血型糖蛋白(GPA)而磁化之原理。

第 10 至 12 圖：在非常規抗體檢驗中使用與抗 GPA 偶合之珠粒磁化紅血球之 3 種方法。

第 13 圖：用於對 8 名病患進行血型檢定(包括西莫寧檢驗)及表型檢定之凝集方法。

第 14 圖：用於對 5 名病患進行延伸表型檢定之凝集方法。

第 15 圖：用於對 8 名供體進行延伸表型檢定之免疫吸附方法。

第 16 圖：用於對 48 名供體進行弱 D 表型檢定之免疫吸附方法。

第 17 圖：藉由減少與磁粒偶合之抗 GPA 之濃度改善交叉比對檢驗之靈敏度及特異性。比較研究。

第 18 圖：與抗 GPA 偶合之磁粒於貯存期間，於存在 2 種濃度(0.5% vs 5%)之非離子性界面活性劑下之安定性研究。

**【主要元件符號說明】**

無。

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※申請案號：100(25771)

G01N 33/553 (2006.01)

※申請日：100.7.21 ※IPC 分類：

G01N 33/80 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

用於在血型檢定及表型檢定中顯現抗體/抗原複合物之磁性  
免疫診斷方法及套組

MAGNETIC IMMUNODIAGNOSTIC METHOD AND KIT FOR THE  
DEMONSTRATION OF ANTIBODY/ANTIGEN COMPLEXES IN  
ERYTHROCYTE BLOOD GROUPING AND PHENOTYPING

## 二、中文發明摘要：

本發明係關於用於顯現血型及表型之抗體/抗原複合物之磁性免疫診斷方法及套組。該方法涉及研究及/或鑑定抗體或抗原，較佳是血型之抗-抗原抗體或抗原。該方法製備以抗血型糖蛋白 A 抗體包覆之磁粒之懸浮液，該抗血型糖蛋白 A 抗體能識別及特異性地磁化紅血球。本發明亦包括用於實行該方法之裝置及套組。

三、英文發明摘要：

The current invention relates to a magnetic immunodiagnostic method for the demonstration of antibody/antigen complexes of blood group and phenotype. Such a method involves the research and/or identification of antibodies or antigens, preferably anti-antigen antibodies or antigens of a blood group. This method implements a suspension of magnetic particles coated with an anti-glycophorin A antibody that can recognize and specifically magnetize erythrocytes. The invention also includes a device and kit for carrying out one such method.

## 七、申請專利範圍：

1. 一種用於顯現由存在於溶液中之對抗血型或表型抗原之抗體與紅血球所帶有之血型或表型抗原反應所形成之特異性複合物之方法，該紅血球係結合於磁粒上，該反應係在反應器中發生，該反應器具有開放頂部及密封底部，該反應器之直徑至少在靠近底部之區域漸減以致形成傾斜壁，且該傾斜壁係至少部分以抗免疫球蛋白或任何其他能與該所形成之複合物中之抗體結合之化合物包覆，該方法包含下述數個步驟：
  - a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，將黏稠溶液以覆蓋該反應器之該傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中；
  - b) 在該反應容器所含之該黏稠溶液上方，使該含有或可能含有抗體之溶液與該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸；
  - c) 在給定的時間於該反應器中進行培育，該給定的時間為使該等帶有紅血球之磁粒與該溶液所可能含有之對抗血型或表型抗原之抗體形成複合物所需之時間，其中該等對抗血型或表型抗原之抗體能特異性地識別該等紅血球所帶有之血型或表型抗原；
  - d) 將磁場施加於該反應器並攪拌該反應器，以使該等磁粒被拉向該反應器之底部及/或傾斜壁；以及
  - e) 用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該

反應器之底部及/或在包覆有該抗免疫球蛋白或任何其他能與該抗體結合之化合物之該反應器之該傾斜壁上所得到之影像，該所得到之影像可以顯現血型或表型抗原/抗體之特異性複合物之形成與否，其特徵為，該等帶有紅血球之磁粒為預先包覆有抗血型糖蛋白 A 抗體(抗 GPA)之磁粒，且該紅血球係藉由抗體/抗原型之交互作用而與該磁粒結合。

2. 如申請專利範圍第 1 項所述之方法，其中，在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前，將該帶有紅血球之磁粒之懸浮液懸浮於稀釋劑中，該稀釋劑之密度大於 1 且小於該黏稠溶液之密度。
3. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中，該步驟 a) 及 b) 係如下：
  - a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前：
    - i) 在該反應器之外製備該帶有紅血球之磁粒之懸浮液，
    - ii) 將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，然後充填該稀釋劑；以及
  - b) 在該稀釋劑上方，使在步驟 a) 之 i) 中所製備之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有該抗體之溶液接觸。

4. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中，該步驟 a) 及 b) 係如下：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前：

將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，然後依序充填該稀釋劑、該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液、及該紅血球懸浮液；以及

b) 在反應器中，使該可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

5. 如申請專利範圍第 2 項所述之方法，其中，該步驟 a) 及 b) 係如下：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前：

i) 在該反應器之外製備該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，其中該等磁粒係懸浮在該稀釋劑中，或者使用已製備成之此種懸浮液，

ii) 將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，繼而充填在步驟 a) 之 i) 中所製備之該包覆有抗 GAP 之磁粒懸浮於稀釋劑而成之懸浮液，然後充填該紅血球懸浮液；以及

b) 在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接

觸。

6. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中，

於步驟 a) 之 i) 結束時，使該含有懸浮於稀釋劑中之磁粒之懸浮液在反應器外部與該紅血球懸浮液接觸，以形成帶有該等紅血球之磁粒懸浮於該稀釋劑中之懸浮液；

於步驟 a) 之 ii) 中，將該黏稠溶液以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分之方式充填於該反應器中，然後充填該帶有紅血球之磁粒懸浮於稀釋劑中之懸浮液；以及

b) 在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。

7. 如申請專利範圍第 5 項所述之方法，其中，在較佳自動化具體實施例，即藉由實驗室自動化而配送自動化之一部分中，該步驟 a) 及 b) 係如下：

a) 在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與該可能含有對抗血型或表型抗原之抗體之溶液接觸之前：

i) 在該反應器之外部製備包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，其中該等磁粒係懸浮於該稀釋劑，或者使用已製備成之此種懸浮液，

ii) 將紅血球之懸浮液充填於該反應器中，然後充填在步驟 a) 之 i) 中所製備之該包覆有抗 GAP 之磁粒懸浮於稀釋劑中之懸浮液，若需要，於攪拌後，以覆蓋該反應器之傾斜壁之至少一部分

之方式充填該黏稠物質，且該黏稠物質係被注射入該反應器之底部；以及

- b) 在該反應器中，使該含有或可能含有抗體之溶液與所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液接觸。
8. 如申請專利範圍第 1 至 7 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，將磁場施加至該反應器，同時在反應器中進行攪拌。
9. 如申請專利範圍第 1 至 8 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，該磁場之施加及該攪動同時進行 2.5 分鐘至 10 分鐘之期間，且該期間以 5 分鐘至 6 分鐘為較佳。
10. 如申請專利範圍第 1 至 9 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，該磁場之施加係藉由位於該反應器之外部或下方之磁鐵來進行，以使該等磁粒被拉向該反應器之底部。
11. 如申請專利範圍第 10 項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，該磁鐵為永久性磁鐵，且其強度在 10,000 至 14,000 高斯(Gauss)之範圍內。
12. 如申請專利範圍第 1 至 11 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，攪拌係藉由旋轉式攪拌器進行。
13. 如申請專利範圍第 12 項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，攪拌係以 250 至 750 rpm 之速度進行，較佳以 600 rpm 之速度進行。

14. 如申請專利範圍第 1 至 13 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 c) 中，培育期間係在 10 分鐘至 30 分鐘之範圍內，培育溫度係在 20°C 與 40°C 之間，以 37°C ± 1°C 為較佳。
15. 如申請專利範圍第 1 至 14 項中任一項所述之方法，其中，該磁粒具有在 100 奈米 (nm) 與 3.0 微米 ( $\mu\text{m}$ ) 之間之直徑，且該直徑係以在 200 奈米與 1.5 微米之間為較佳。
16. 如申請專利範圍第 1 至 15 項中任一項所述之方法，其中，該等磁粒含有至少 40 重量%之鐵磁 (ferromagnetic) 化合物。
17. 如申請專利範圍第 1 至 16 項中任一項所述之方法，其中，該黏稠物質具有大於 1 之密度。
18. 如申請專利範圍第 1 至 17 項中任一項所述之方法，其中，該黏稠物質係選自凝膠、PVP (聚乙烯吡咯啉酮) 中之 PVP-40 或 PVP-60、30% ± 10% 之白蛋白溶液、或明膠，其中，該凝膠係以選自從葡聚糖 Sephadex™ 或從瓊脂糖 Sepharose™ 衍生且直徑為 20 奈米至 300 奈米之凝膠為較佳，並以超細 G-100™ 或者 Sepharose™ 4B 或 6B 為更佳。
19. 如申請專利範圍第 1 至 18 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 b) 中，當沉積該黏稠溶液之後及沉積該稀釋劑之後，該含有或可能含有抗體之溶液可在沉積該紅血球懸浮液之前沉積。

20. 如申請專利範圍第 1 至 19 項中任一項所述之方法，其中，該稀釋劑之密度大於該黏稠溶液之密度且大於該含有或可能含有抗體之溶液之密度。
21. 如申請專利範圍第 1 至 20 項中任一項所述之方法，其中，該反應器為微量盤之杯狀凹穴，且該杯狀凹穴具有圓形或 V 形底部。
22. 如申請專利範圍第 1 至 21 項中任一項所述之方法，其中，該抗體溶液為人類血漿或人類血清檢體，該檢體有待檢測是否存在特異性對抗血型或表型抗原之抗體，且該抗免疫球蛋白為人類抗免疫球蛋白(HAG)。
23. 如申請專利範圍第 1 至 22 項中任一項所述之方法，其係用於人類血漿或血清之非常規抗體檢驗(IAT)，其特徵在於包括該等由磁粒所攜帶之紅血球為 O 型紅血球之步驟。
24. 一種血型檢定及/或表型檢定之方法，其中，該方法包含下列步驟：
- a) 製備包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液，其中該等磁粒係懸浮於稀釋劑中，或者可使用已製備成之此種懸浮液；
  - b)
    - i) 使該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液與待測定血型或表型之紅血球之懸浮液接觸，
    - ii) 在反應器中，使在步驟 b) 中所形成或形成中之該帶有紅血球之磁粒之懸浮液與含有具已知特異性之抗體之血清試劑接觸，

iii) 攪動或攪拌；

c) 在給定的時間於該反應器中進行培育，該給定的時間為使該帶有紅血球之磁粒與該血清試劑形成複合物所需之時間；

d) 將磁場施加至該反應器並在該反應器中進行攪拌，以將此等磁粒拉向該反應器之底部及/或傾斜壁；以及

e) 用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該反應器之底部及/或該反應器之傾斜壁所得到之影像，該所得到之影像可以顯現血型或表型抗原/抗體之特異性複合物之形成與否。

25. 如申請專利範圍第 24 項所述之血型檢定及/或表型檢定之方法，其中，

於步驟 d) 中，在將磁場施加至該反應器之同時進行攪拌之步驟，以將該等磁粒拉向該反應器之底部；以及

於步驟 e) 中，用裸眼及/或用任何其他適當的讀取系統讀取在該反應器之底部是否得到凝集反應，該特異性凝集顯示具有已形成之血型或表型抗原/抗體之特異性複合物存在。

26. 如申請專利範圍第 24 及 25 項中任一項所述之血型檢定及/或表型檢定之方法，其中，在步驟 b) 之 ii) 中，該血清試劑為溶液或乾燥形式。

27. 如申請專利範圍第 24 至 26 項中任一項所述之方法，其

- 中，該磁粒具有在 100 奈米與 3.0 微米之間之直徑，且該直徑係以在 200 奈米與 1.5 微米之間為較佳。
28. 如申請專利範圍第 24 至 27 項中任一項所述之方法，其中，該等磁粒含有至少 40 重量%之鐵磁化合物。
29. 如申請專利範圍第 24 至 28 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，該磁場之施加係藉由位於該反應器之外部下方之磁鐵來進行，以使該等磁粒被拉向該反應器之底部。
30. 如申請專利範圍第 24 至 29 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，該磁鐵為永久性磁鐵，其強度在 10,000 至 14,000 高斯(Gauss)之範圍內。
31. 如申請專利範圍第 24 至 30 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 b) 之 iii) 或/及步驟 d) 中，攪拌係藉由旋轉式攪拌器進行。
32. 如申請專利範圍第 24 至 31 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，將磁場施加至該反應器並同時在反應器中進行攪拌。
33. 如申請專利範圍第 24 至 32 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 b) 之 iii) 中，進行攪動(或攪拌)共計 5 秒至 3 分鐘之期間，且該期間以 1 分鐘至 2 分鐘為較佳。
34. 如申請專利範圍第 24 至 33 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 b) 之 iii) 中，攪拌係以 1000 至 1200 rpm 之速度，且較佳以 1200 rpm 之速度進行 10 秒。
35. 如申請專利範圍第 24 或 25 項所述之方法，其中，於步

- 驟 d) 中，攪拌係以 500 至 800 rpm 之速度進行，該速度以 650 至 750 rpm 為較佳，且以 700 rpm 為更佳。
36. 如申請專利範圍第 24 至 35 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 c) 中，培育期間係在 2 分鐘至 30 分鐘之範圍內，且以在 8 分鐘與 20 分鐘之間為較佳；培養係於 20°C 與 40°C 之間之溫度進行，且以於室溫或 37°C 進行為較佳。
37. 如申請專利範圍第 24 至 36 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 中，磁化期間係在 2 分 30 秒至 7 分鐘之範圍內，且以 5 分鐘為較佳；磁化係於 20°C 與 40°C 之間之溫度進行，且以於室溫進行為較佳。
38. 如申請專利範圍第 24 至 37 項中任一項所述之方法，其中，於步驟 d) 之後及步驟 e) 之前，以較高速度施行一系列之攪動(以 800 與 1000 rpm 之間之速度進行 1 分鐘至 2 分 30 秒)，以懸浮未凝集之紅血球，並視需要隨後以較低速度(350 至 550 rpm)進行新的攪拌步驟(再聚集步驟)1 分鐘至 2 分鐘，以聚集可能存在之分散小凝集物。
39. 如申請專利範圍第 24 至 38 項中任一項所述之方法，其中，當該血清試劑為 IgG 型時，預先藉由混合抗 IgG 型免疫球蛋白溶液與含有 IgG 型抗體之濃縮溶液之血清試劑而製成凝集試劑。
40. 如申請專利範圍第 1 至 21 項中任一項所述之方法，其中，就血型檢定及/或表型檢定而言，該可能含有對抗

血型或表型抗原之抗體之溶液為含有具已知血型/表型特異性之抗體之血清試劑。

41. 如申請專利範圍第 24 至 40 項中任一項所述之方法，其中，該反應器為微量盤之杯狀凹穴，且該杯狀凹穴具有圓形或 V 形底部。
42. 如申請專利範圍第 24 至 41 項中任一項所述之方法，其中，在該帶有紅血球之磁粒之懸浮液中，紅血球之濃度係在 0.2%與 2.5%之間，以在 0.5%與 1.5%之間為較佳，以  $1\% \pm 0.3\%$  為更佳。
43. 如申請專利範圍第 24 至 42 項中任一項所述之方法，其中，該磁粒之濃度係在 0.001%與 0.007%之間。
44. 如申請專利範圍第 24 至 42 項中任一項所述之方法，其中，該磁粒之濃度為  $0.007\% \pm 0.001\%$ 。
45. 如申請專利範圍第 24 至 44 項中任一項所述之方法，其中，該抗 GPA 抗體為哺乳動物抗體，以來自鼠或人類者為較佳，該抗體能特異性地識別由紅血球所攜帶之人類血型糖蛋白 A，較佳地能對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A，更佳地能對抗其膜外結構域(domain)。
46. 如申請專利範圍第 45 項所述之方法，其中，該抗 GPA 抗體為對抗唾液糖蛋白類血型糖蛋白 A 之細胞外部分之抗原決定部位(epitope)之單株抗體，該抗原決定部位帶有部分的或完全未帶有抗原 M 或 N，尤其該抗原決定部位不含血型糖蛋白 A(成熟鏈)之 N 端胺基酸 1 至 5 所構成之片段。

47. 如申請專利範圍第 24 至 46 項中任一項所述之方法，其中，該抗 GPA 抗體與該等磁粒偶合，且該抗 GPA 抗體之濃度為在 5 微克/毫克磁粒與 25 微克/毫克磁粒之間，以  $20 \pm 3$  微克/毫克磁粒為較佳。
48. 如申請專利範圍第 24 至 46 項中任一項所述之方法，其中，該抗 GPA 抗體與該等磁粒偶合，且該抗 GPA 抗體之濃度為在 1 微克/毫克磁粒與 5 微克/毫克磁粒之間，以 2.5 微克/毫克磁粒為較佳。
49. 如申請專利範圍第 24 至 48 項中任一項所述之方法，其中，該磁粒之懸浮液進一步包括非離子性介面活性劑，該非離子性介面活性劑以 Synperonic™ PE/F68、Tween™ (20、40 或 80) 為較佳，且該非離子性介面活性劑之濃度係在 0.1% 與 1% (w/v) 之間，以 0.25% 至 0.75% (w/v) 為較佳，或  $0.5\% \pm 0.15\%$  (w/v)。
50. 如申請專利範圍第 24 至 48 項中任一項所述之方法，其中，該磁粒之懸浮液進一步包括非離子性介面活性劑，該非離子性介面活性劑以 Synperonic™ PE/F68、Tween™ (20、40 或 80) 為較佳，且該非離子性介面活性劑之濃度係在 0.5% 與 10% (w/v) 之間，以  $5\% \pm 0.15\%$  (w/v) 為較佳。
51. 一種用於顯現由存在於溶液中之對抗血型或表型抗原之抗體與紅血球所攜帶之血型或表型抗原反應所形成之特異性複合物之套組，該套組尤其適合用於非常規抗體檢驗 (IAT)、交叉比對檢驗、直接庫姆氏 (Coombs) 檢

驗、血型檢定及/或表型檢定，其特徵在於包括：

含有包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液的試劑。

52. 如申請專利範圍第 48 項所述之套組，其中，該包覆有抗 GPA 之磁粒之懸浮液係如在申請專利範圍第 1 至 50 項中任一項所述之方法中所界定，該包覆有抗 GPA 之磁粒以懸浮於如申請專利範圍第 1 至 50 項中任一項所述之方法中所界定之稀釋劑中為佳，該稀釋劑係以含有親水性聚合物之溶液為更佳，該親水性聚合物較佳地具有多糖性質，以 Ficoll™ 為較佳，以 Ficoll™ 400 為更佳，該親水性聚合物之濃度係在 1% 與 2.5% (w/v) 之間，以  $2\% \pm 0.3\%$  為較佳。

53. 一種用於顯現由存在於溶液中之對抗血型或表型抗原之抗體與紅血球所攜帶之血型或表型抗原反應所形成之特異性複合物之套組，該套組尤其適合用於非常規抗體檢驗(IAT)、交叉比對檢驗、血型檢定或表型檢定，其特徵在於包括：

a) 含有包覆有抗 GPA 之磁粒懸浮於如在申請專利範圍第 1 至 50 項中任一項所述之方法中所界定之稀釋劑而成之懸浮液的試劑，該稀釋劑係以含有親水性聚合物之溶液為較佳，該親水性聚合物以具有多糖性質為較佳，以 Ficoll™ 為更佳，以 Ficoll™ 400 為特佳，該親水性聚合物之濃度係在 1% 與 2.5% (w/v) 之間，以  $2\% \pm 0.3\%$  為較佳；

b) 若需要，一個反應器或一組反應器，該反應器或該

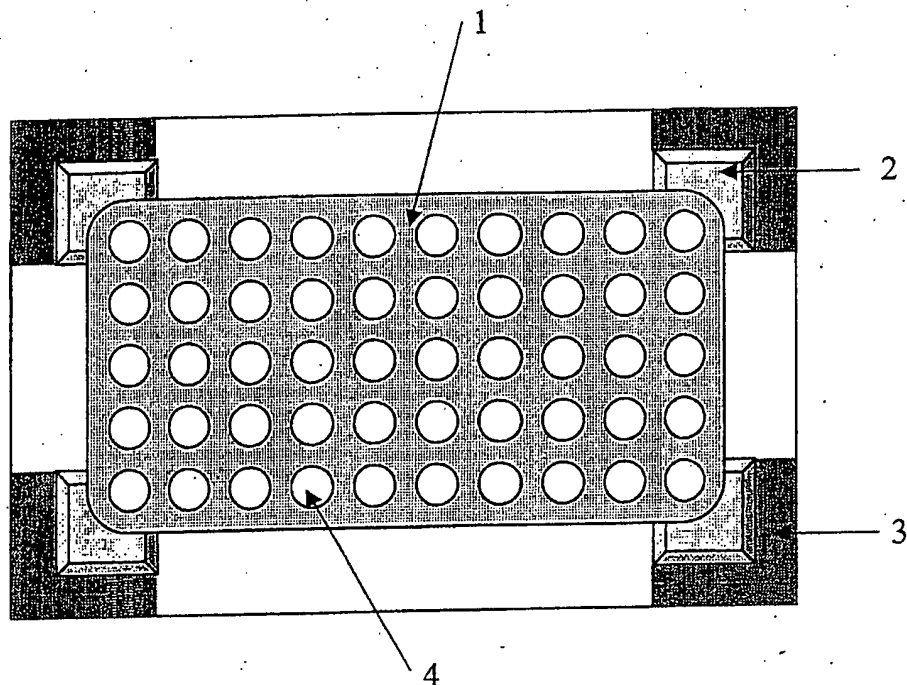
等反應器具有開放頂部及密封底部，該反應器之直徑至少在靠近該底部之區域漸減，以形成向下延伸至底部之傾斜壁，且該傾斜壁之至少部分包覆有抗免疫球蛋白或任何其他能與所形成之該複合物中之抗體結合之化合物；

- c) 若需要，含有黏稠溶液之容器，或者若需要，該等反應器之各個係以該黏稠物質部分充填，該黏稠物質係如在申請專利範圍第1至47項中任一項所述之方法中所界定者；
- d) 若需要，至少一個磁鐵或一組磁鐵，該磁鐵或該等磁鐵係位於該反應器或該等反應器之外部或下方，並與旋轉式攪拌器耦接。

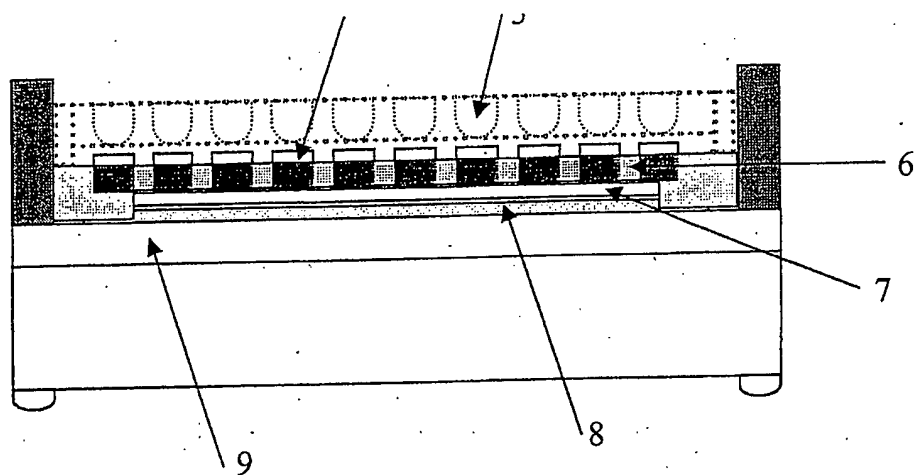
54. 如申請專利範圍第51至53項中任一項所述之套組，進一步包含具有已知表型之檢驗用紅血球懸浮液，該等紅血球將與該懸浮液之磁粒偶合，該紅血球懸浮液以來自O型者為較佳，且該等紅血球之濃度係在0.2%與2.5%之間，以在0.5%與1.5%之間為較佳，以 $1\% \pm 0.3\%$ 為更佳。

55. 如申請專利範圍第48至50項中任一項所述之套組，其係用於血型檢定或表型檢定，並進一步含有血清試劑，該血清試劑為溶液或乾燥形式，且具有已知的特異性。

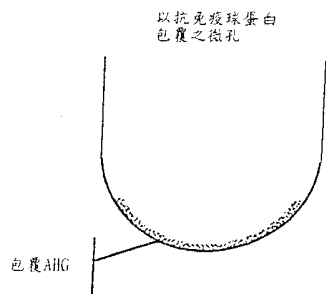
八、圖式



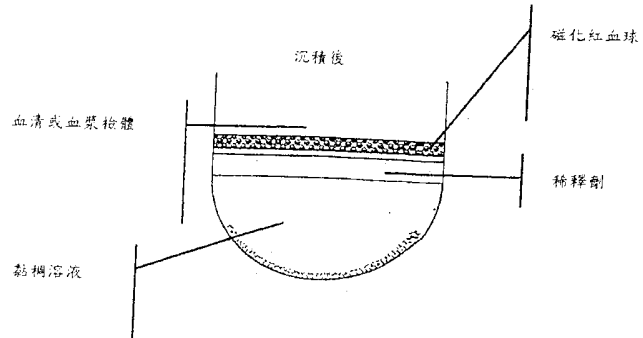
第 1A 圖



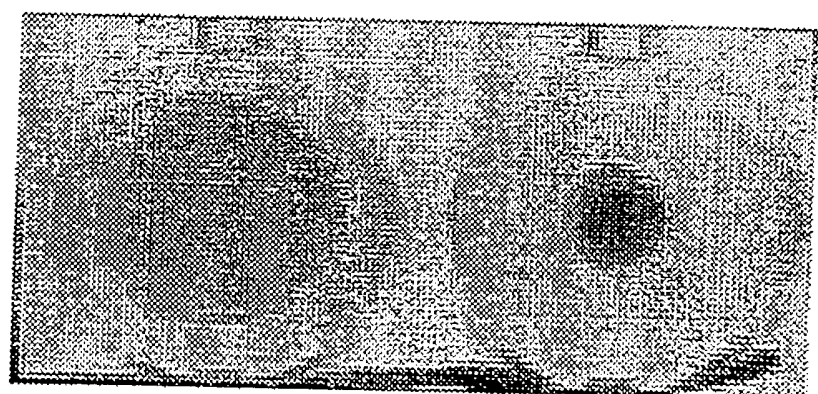
第 1B 圖



第 2A 圖



第 2B 圖



陽性反應

陰性反應









第 3 圖

	抗-D, C, E 1:2	抗-D, C, E 1:4	抗-D, C, E 1:8	抗-D, C, E 1:16	抗-D, C, E 1:32	抗-D, C, E 1:64	抗-D, C, E 1:28	AB血清
預期結果	3+	3+	3+	2+	2+	2+	2+	Neg
0型紅血球樣板 所得到之結果								
病患0型紅血球 所得到之結果								









第 4 圖

抗-D	RBC O1 (R1R1)	RBC O2 (R2R2)	RBC O3 (rr)
抗-D 20 ng/ml			
抗-D 10 ng/ml			
抗-D 5 ng/ml			
抗-D 2,5 ng/ml			
抗-D 1,25 ng/ml			
陰性			

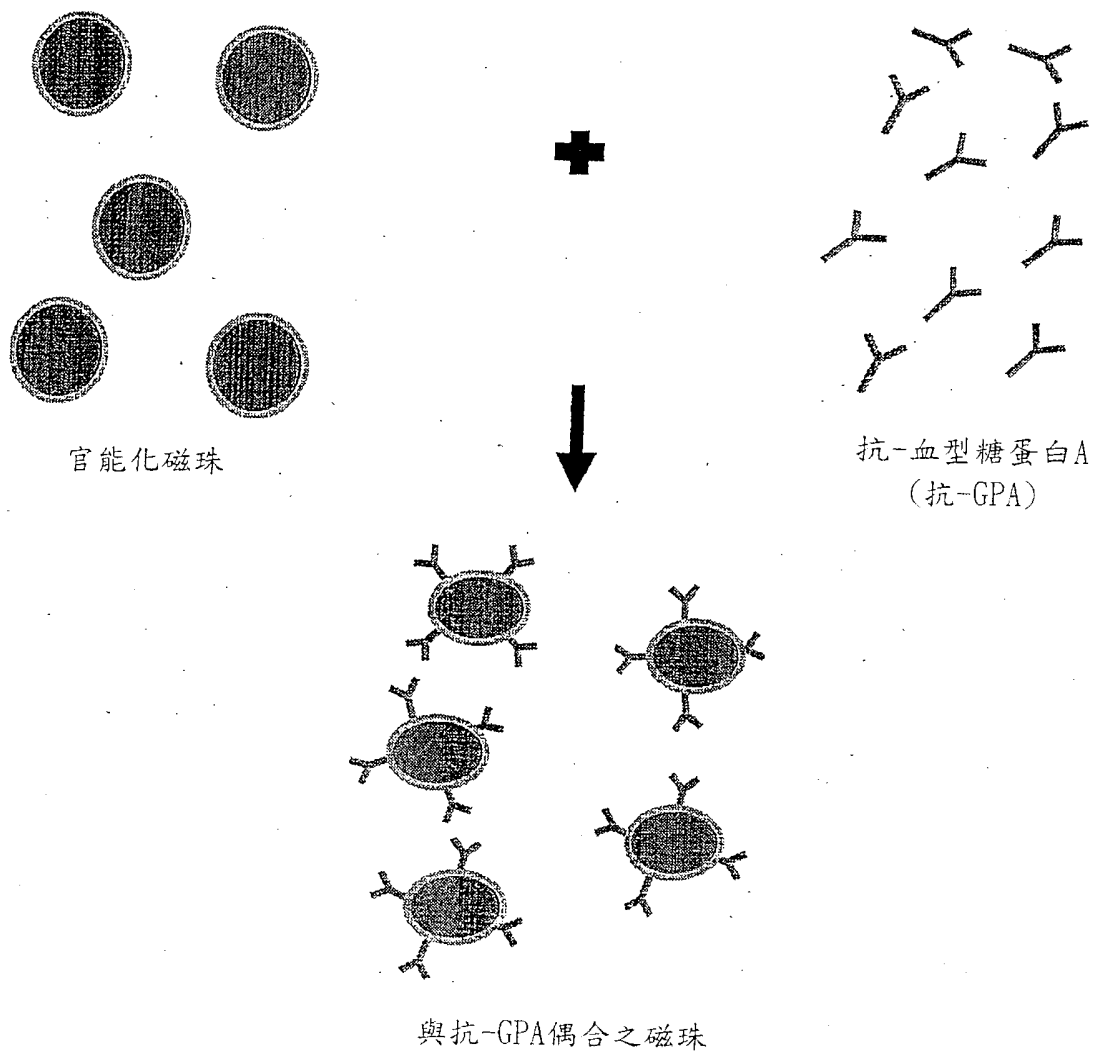
第 5 圖

病患血漿或血清	RBC供體	預期結果	得到之結果	相容性
抗-D+C+E	O (DCee)	3+		不相容
	O (DCcEe)	3+		不相容
抗-K	O (DCee)	陰性		相容
	O (DCcEe)	陰性		相容
抗-E	O (DCee)	陰性		相容
	O (DCcEe)	1+		不相容
抗-Jka	O (DCee)	陰性		相容
	O (DCcEe)	1+		不相容

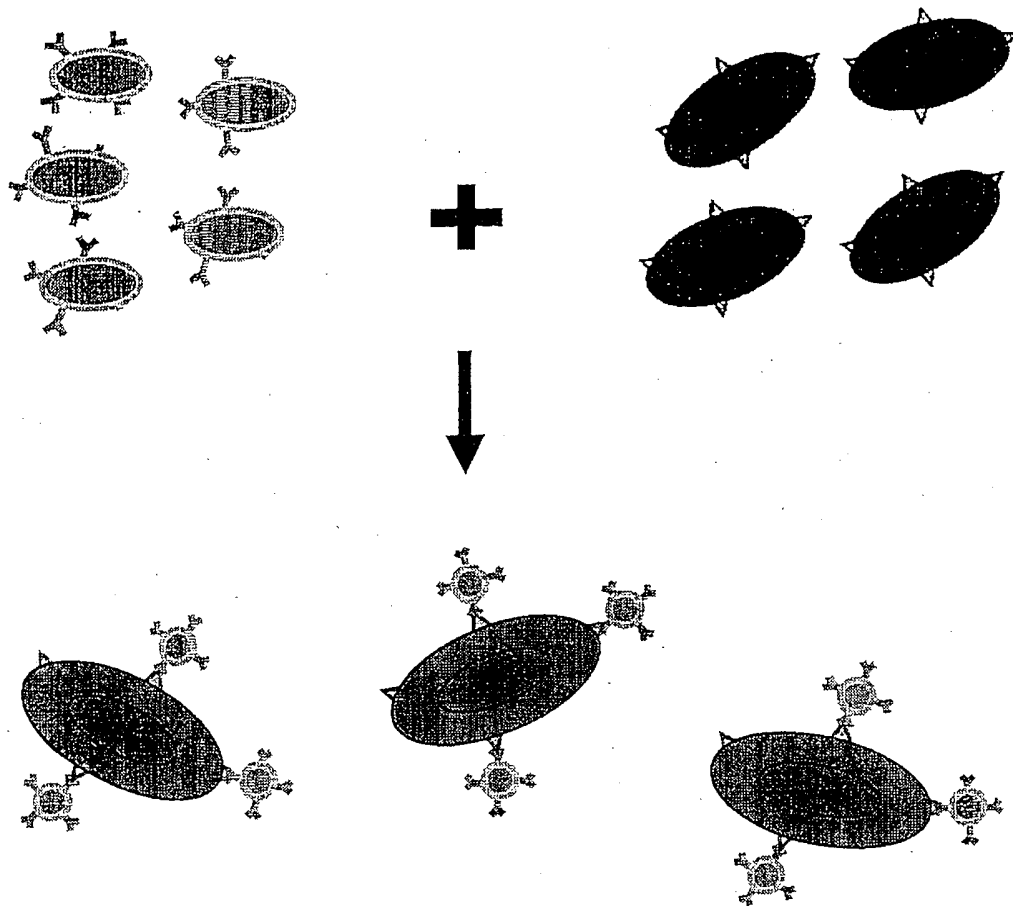
第 6 圖

病患血漿或血清	RBC供體	預期結果	得到之結果	相容性
1號病患	O 1	陰性		相容
2號病患	O 2	陰性		相容
3號病患	O 3	陰性		相容
4號病患	O 4	陰性		相容
5號病患	O 5	陰性		相容
6號病患	O 6	陰性		相容
7號病患	O 7	陰性		相容
8號病患	O 8	陰性		相容

第 7 圖

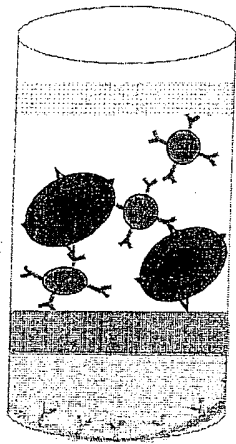


第 8 圖



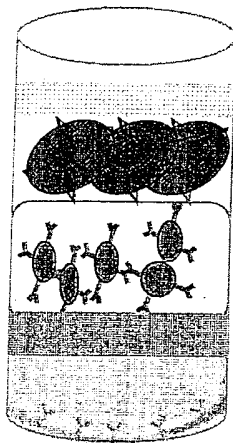
第 9 圖

第 1 磁化法



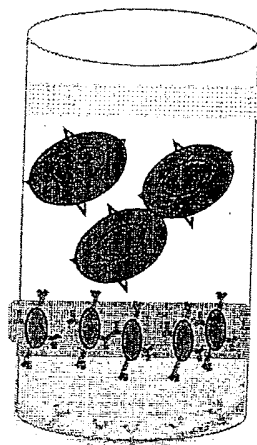
第 10 圖

第 2 磁化法

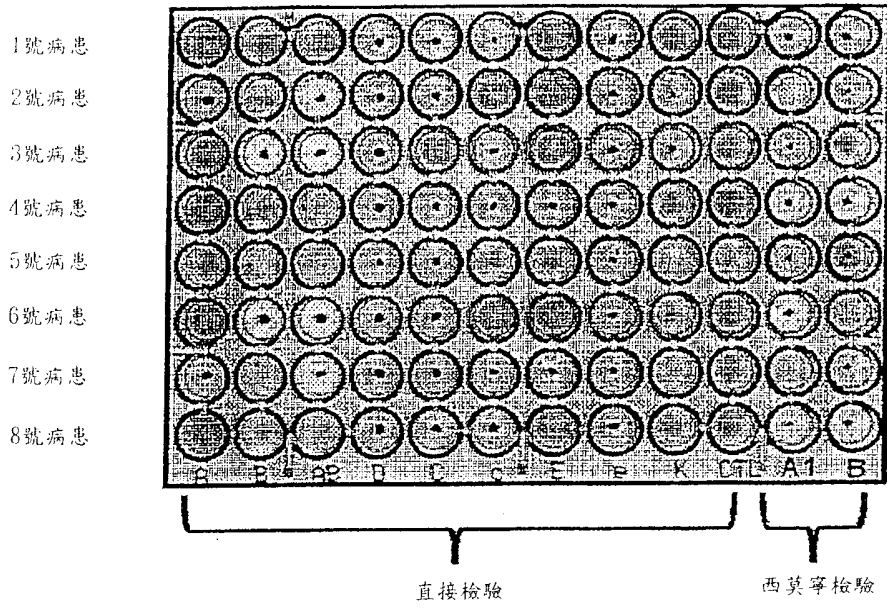


第 11 圖

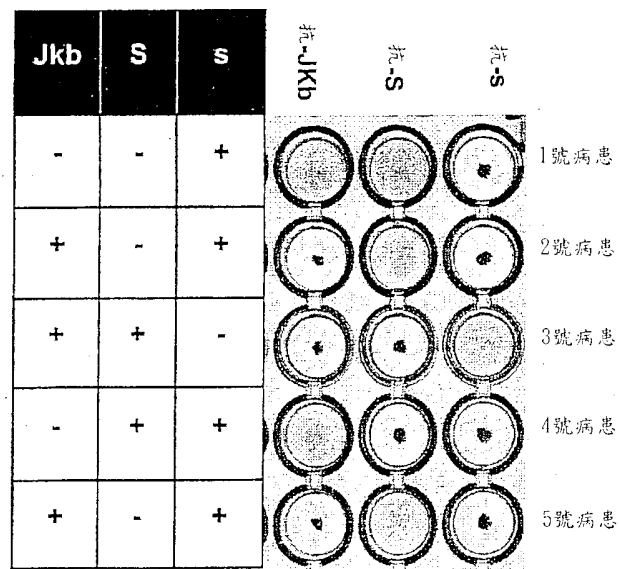
第 3 磁化法



第 12 圖



第 13 圖



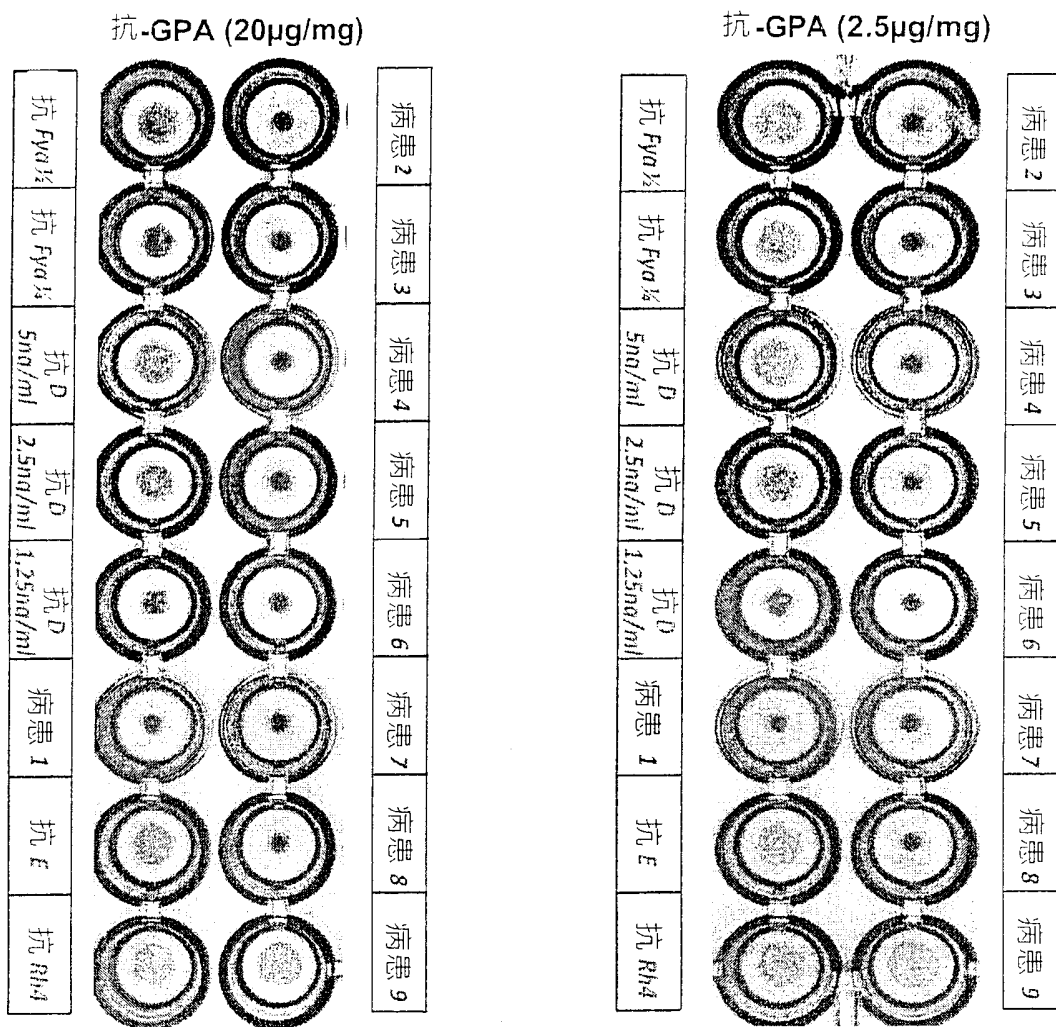
第 14 圖

	抗-Fya	抗-PYb	抗-Jka	抗-Jkb	抗-S	抗-s	對照
1號病患							
2號病患							
3號病患							
4號病患							
5號病患							
6號病患							
7號病患							
8號病患							

第 15 圖

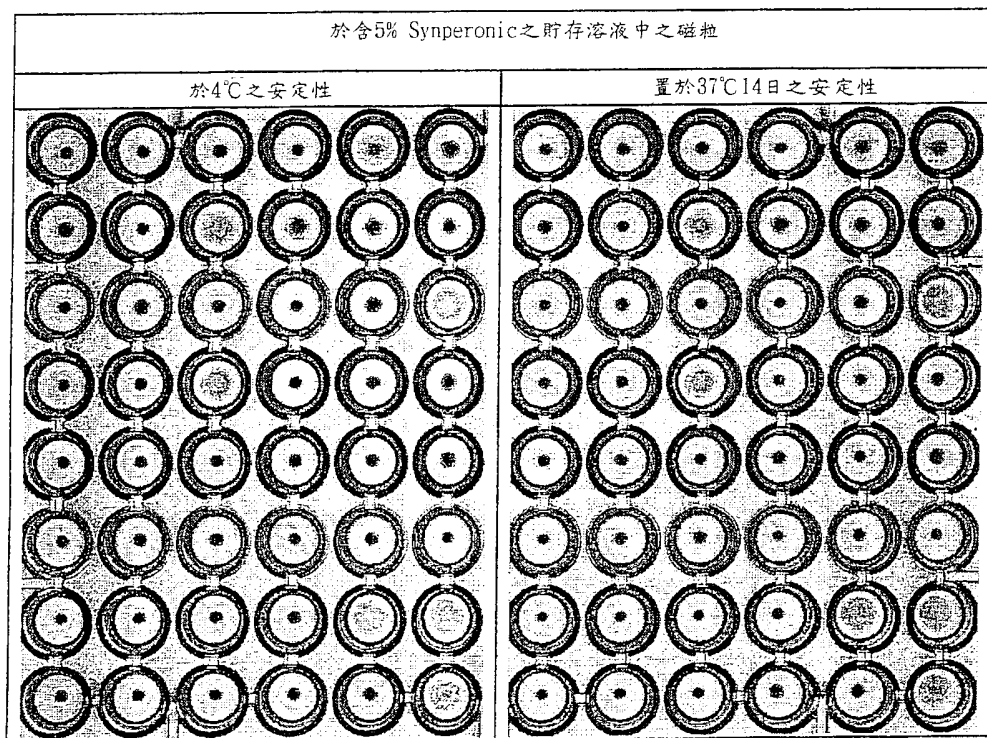
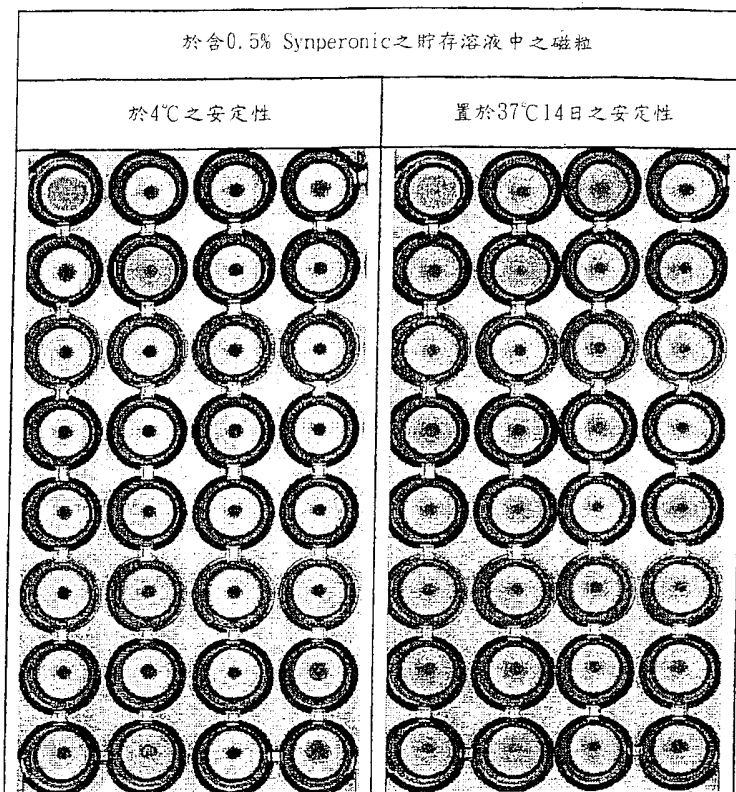
	抗-D	抗-D	抗-D	抗-D	抗-D	抗-D
A						
B						
C						
D						
E						
F						
G						
H						

第 16 圖



第 17 圖

於含5% Synperonic之貯存溶液中之磁粒



第 18 圖

四、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第 2B 圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

該代表圖無元件符號及其所代表之意義。

五、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

本案無化學式。