



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105259354 A

(43) 申请公布日 2016. 01. 20

(21) 申请号 201510780209. 9

G01N 33/533(2006. 01)

(22) 申请日 2015. 11. 13

(71) 申请人 夏晶

地址 519000 广东省珠海市珠海大道 1 号华
发新城 9 栋 302 室

(72) 发明人 夏晶 陶正杰

(74) 专利代理机构 上海金盛协力知识产权代理
有限公司 31242

代理人 罗大忱

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/569(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

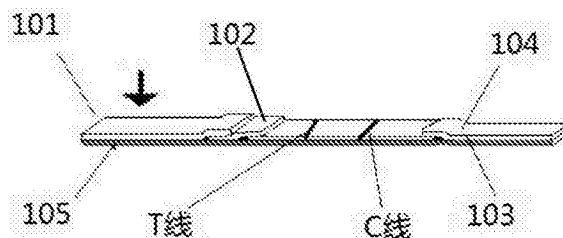
权利要求书5页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒及其
使用方法

(57) 摘要

本发明公开了一种结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒及其使用方法,所述检测试剂盒,包括结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液、结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件、测试培养管 T、本底对照培养管 N、阳性对照培养管 P 和 γ -干扰素质控品,结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液,为共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒和保存液的混合物。用于定量检测血浆样本中结核 T 细胞释放 γ -干扰素的含量,本发明将荧光免疫定量分析法通过引入光激发发光技术与纳米微球技术,不仅成功的解决了以上试剂盒操作复杂,对技术人员要求高的缺点,并且缩短了检测时间,具有灵敏度、特异性较高的优点。



1. 共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒, 其特征在于, 所述的发光微粒, 为填充有发光物质的、表面带有官能团的的高分子微粒或者二氧化硅微粒, 高分子微粒的官能团或者二氧化硅微粒与鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体共价联接。

2. 根据权利要求 1 所述的发光微粒, 其特征在于, 高分子微粒的官能团为羧基、醛基或氨基。

3. 根据权利要求 1 所述的发光微粒, 其特征在于, 所述高分子化合物选自聚苯乙烯或脲醛树脂。

4. 根据权利要求 1~3 任一项所述的发光微粒, 其特征在于, 所述的发光物质选自量子点或者荧光染料。

5. 根据权利要求 4 所述的发光微粒, 其特征在于, 所述的荧光染料为镧系稀土元素、异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻叶绿素蛋白或碘化丙啶。

6. 根据权利要求 5 所述的荧光染料为镧系稀土元素为铕、铽、铈、镨或钐。

7. 根据权利要求 4 所述的发光微粒, 其特征在于, 发光微粒的粒径为 100-400nm。

8. 根据权利要求 4 所述的发光微粒, 其特征在于, 所述的发光微粒的光发射波段为 350-820nm。

9. 根据权利要求 8 所述的发光微粒, 其特征在于, 所述的发光微粒的光发射波段为 $532 \pm 10\text{nm}$ 、 $620 \pm 10\text{nm}$ 、 $525 \pm 10\text{nm}$ 或 $680 \pm 10\text{nm}$ 。

10. 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒, 其特征在于, 包括: (1) 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液、(2) 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件、(3) 测试培养管 T、(4) 本底对照培养管 N、(5) 阳性对照培养管 P 和 (6) γ -干扰素质控品;

所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液, 为权利要求 1~9 任一项所述的共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒和保存液的混合物。

11. 根据权利要求 10 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒, 其特征在于, 所述结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的含量为 10~320ug 共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒 /ml 保存液。

12. 根据权利要求 11 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒, 其特征在于, 所述的保存液为一种混合物, 以 0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液为载体, 含有如下浓度的组分: 聚乙烯吡咯烷酮 4~6mg/ml, 蔗糖 80~120mg/ml, 海藻糖 20~30mg/ml, 牛血清白蛋白 50~150mg/ml, 叠氮钠 0.05~0.15mg/ml。

13. 根据权利要求 10 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒, 其特征在于, 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件, 包括检测试剂卡;

所述检测试剂卡包括底板 (105)、样品垫 (101)、缓冲垫 (102)、反应膜 (103) 和吸水纸 (104);

所述的反应膜 103 包括反应膜层和划在上侧面的测试线 T 线和质控线 C 线, 所述的测试线 T 为鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体, 所述的质控 C 线为羊抗鼠抗体, 所述的反应膜 (103) 的底侧面复合在底板 (105) 的中部;

所述的吸水纸 (104) 一端复合在所述的底板 (105) 的端部, 另一端压在所述的反应膜 (103) 的端部上;

所述的缓冲垫(102)是由处理液浸泡过的缓冲垫膜干燥制成;所述的缓冲垫(102)的一端复合在底板(105)上,并被样品垫(101)的一端盖住,另一端压在反应膜(103)上;

所述的样品垫101是由处理液浸泡过的样品垫干燥制成,所述的样品垫(101)的一端与底板105复合,另一端压在所述的缓冲垫102上。

14. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的检测试剂卡还包括塑料卡壳,所述的塑料卡壳上表面设有测试孔和信号窗,所述的检测试剂卡安置在所述的塑料卡壳中。

15. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件,还包括检包括干燥剂和铝箔袋,所述的铝箔袋包裹在所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡和干燥剂外。

16. 根据权利要求13所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的反应膜层为硝酸纤维膜;所述的吸水纸的材质为玻璃纤维和纤维素混合物;所述的缓冲垫膜为聚酯纤维膜,所述的样品垫膜为玻璃纤维膜。

17. 根据权利要求13所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,用于所述的缓冲垫(102)的处理液,为0.1%-1%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮和0.1%-1%(v/v)吐温20的纯水溶液;所述的处理液与缓冲垫102的用量为:0.5-5ml处理液/cm²缓冲垫102;

用于所述的样品垫的处理液为0.1%-1%(w/v)聚乙烯吡咯烷酮的纯水溶液,所述的处理液与样品垫的用量比为:0.5-5ml处理液/cm²样品垫。

18. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的测试培养管T由结核分枝杆菌特异性混合多肽和AIM-V培养基组成,其用量的质量体积配比为:15~25mg结核分枝杆菌特异性混合多肽/LAIM-V培养基;

所述的结核分枝杆菌特异性混合多肽为ESAT-6蛋白和CFP-10蛋白的多肽片段混合物,其中ESAT-6蛋白的2个多肽P52-75aa、P72-95aa和CFP-10蛋白的2个多肽P76-90aa、P71-85aa;

所述的ESAT-6蛋白的多肽序列如下:

P52-75aa:awggsgsea yqgvqqkwda atelnnalq nlart

P72-95aa:lartiseag qamastegnv tgmfa

CFP-10蛋白的多肽序列如下:

P76-90aa:irqag vqysradeeq

P71-85aa:eistnirqag vqysr。

19. 根据权利要求18所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,4个多肽用量的质量比为1:1:1:1。

20. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的本底对照培养管N由AIM-V培养基组成,用于测试样本时作为空白对照。

21. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的阳性对照培养管P由植物凝集素和AIM-V培养基组成,其用量的质量体积配比为:10~20mg植物凝集素/LAIM-V培养基。

22. 根据权利要求10所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述

的 γ -干扰素质控品,为高浓度重组人 γ -干扰素溶液和低浓度重组人 γ -干扰素溶液,所述的高浓度重组人 γ -干扰素溶液,重组人 γ -干扰素的含量为 100 ~ 400pg/mL,所述的低浓度重组人 γ -干扰素,重组人 γ -干扰素的含量为 25 ~ 100pg/mL;所述的 γ -干扰素质控品用于 γ -干扰素的定量计算,来评估试剂的有效性。

23. 根据权利要求 10 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,其特征在于,所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的制备方法,包括如下步骤:

(1) 置换发光微粒溶液:

将发光微粒溶液与 MES 缓冲液混合后,置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转/小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物发光微粒,发光微粒溶液与 MES 缓冲液的用量比为:0.3-0.5ml 发光微粒溶液/ml MES;

所述的发光微粒溶液中,发光微粒的含量为:0.1 ~ 2g 发光微粒/100ml 发光微粒溶液;

在所述的沉淀物发光微粒中,再加入微量 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得清洗后的发光微粒悬浮液;

MES 缓冲液的加入量为:8 ~ 12mg 发光微粒/mlMES 缓冲液;

(2) 微粒活化:

在步骤 (1) 获得的发光微粒悬浮液中,加入溶解有 NHS 的 MES 缓冲液,再加入溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液,反应 20 ~ 40 分钟;MES 缓冲液溶解的 NHS 中,NHS 的含量为 3 ~ 7mg/ml, MES 缓冲液溶解的 EDAC 中,EDAC 的含量为 3 ~ 7mg/ml;

发光微粒悬浮液与溶解有 NHS 的 MES 缓冲液的用量比:2 ~ 3ml 发光微粒悬浮液/ml 溶解有 NHS 的 MES 缓冲液;

发光微粒悬浮液与溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液的用量比:4 ~ 6ml 发光微粒悬浮液/ml 溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液,优选的为 5ml 发光微粒悬浮液/ml 溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液;

(3) 然后将步骤 (2) 的产物置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转/小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物,在沉淀物发光微粒中加入 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得发光微粒悬浮液;沉淀物发光微粒与 MES 缓冲液的质量体积比为:1 ~ 4mg 发光微粒/mlMES 缓冲液;

再将发光微粒悬浮液置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转/小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物发光微粒,在沉淀物发光微粒中加入 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得活化后的发光微粒悬浮液;沉淀物发光微粒与 MES 缓冲液的质量体积比为:8 ~ 12mg/ml;

所述 MES 缓冲液为吗啉乙磺酸的水溶液,用 NaOH 调 pH 至 5.5-6.7,缓冲液终浓度为 0.03 ~ 0.07mol/L;

(4) 抗体共价:

将鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体加入到步骤 (3) 的活化后的发光微粒悬浮液中,反应 1 ~ 3 小时;

鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体与步骤 (3) 的产物中的发光微粒的质量比为 0.5 ~ 2 : 10,鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体浓度为 1 ~ 5mg/ml;

当鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体浓度大于 5mg/ml 时,先用 MES 缓冲液稀释至 1 ~ 5mg/

ml。

(5) 微粒封闭：

在步骤(4)的产物中,加入封闭剂,反应0.5~2小时,反应好后将产物置于温度为2~8℃的冷冻离心机中,16000~20000转/小时的速度,离心5~15分钟,收集沉淀物；

所述的封闭剂选自含有150-300mg/ml牛血清白蛋白的纯水溶液,优选200mg/ml牛血清白蛋白的纯水溶液；步骤(1.3)的产物与封闭剂的用量比:2-4ml产物:1ml封闭剂；

(6) 清洗产物：

在步骤(5)沉淀物中加入磷酸盐缓冲溶液,再进行超声分散5~15分钟,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中,再将发光微粒悬浮液置于温度为2~8℃的冷冻离心机中,16000~20000转/小时的速度,离心5~15分钟,收集沉淀物,为共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒；

步骤(5)的沉淀物与磷酸盐缓冲溶液的质量体积比为:1~4mg沉淀物/ml磷酸盐缓冲溶液；

(7) 稀释分装：

将保存液加入步骤(6)中的沉淀物,超声分散5~15分钟,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中,并稀释,即为所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液。

24. 根据权利要求23所述的方法,其特征在于,保存液为一种混合物,以0.01mol/LpH7.4的磷酸盐缓冲溶液为载体,含有如下浓度的组分：

聚乙烯吡咯烷酮4~6mg/ml,蔗糖80~120mg/ml,海藻糖20~30mg/ml,牛血清白蛋白50~150mg/ml,叠氮钠0.05~0.15mg/ml。

25. 根据权利要求10~24任一项所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒的应用,其特征在于,用于定量检测血浆样本中结核T细胞释放 γ -干扰素的含量,从而定性判断是否感染结核分枝杆菌。

26. 根据权利要求25所述的应用,其特征在于,使用方法,包括如下步骤：

(1) 用肝素抗凝的真空采血管,采集不少于4mL的全血标本,1.5~2.5小时内按1mL/管分别分装到“N”、“P”、“T”培养管中,使全血标本与培养管内容物混匀后,35~37℃培养20~24小时,培养过程中保持培养管直立；

(2) 培养后的“N”、“P”和“T”培养管,以3000~5000转/分钟离心5~15分钟,优先选择10分钟；

(3) 分别从“N”、“P”、“T”培养管中,等量取出血浆,取样范围为10-100uL,优选50uL；分别等量将血浆滴加入3支结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液管中,充分混匀,并反应5-30分钟,同时依次对结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒溶液管进行“N”、“P”、“T”标记；

(4) 反应结束后再进行取样,取样范围可为30-100uL,优选70uL；等量取出血浆与结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的混合液,分别等量将混合液滴加入3块结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的加样孔中,并再反应10-60分钟,同时依次对结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡进行“N”、“P”、“T”标记；

(5) 将反应好的检测试剂卡按照“N”、“P”、“T”的顺序分别插入含有 γ -干扰素标准曲线的荧光免疫定量分析仪中进行检测,仪器显示“阳性”、“阴性”、“不确定”三种结果中的一

个,从而获得结果。

结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及结核 T 细胞释放 γ -干扰素的检测试剂盒,具体涉及基于荧光免疫定量分析原理的结核 T 细胞释放 γ -干扰素的检测试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 结核病是一个全球性的严重公共卫生问题,据世界卫生组织报告,2009 年有 170 万人死于结核病,其中 38 万人合并 HIV 感染,死亡率为 35%,约有 940 多万的结核病新增病例,其中 110 万人合并 HIV 感染,非洲是全球结核病感染率最高的地区,而亚洲则是结核病患者最多的地区。目前全世界约有 33% 的人口存在潜伏性结核感染,而且由于多重耐药结核菌株的出现,结核病已对很多国家构成严重的健康威胁,因此如何快速正确的诊断结核病是非常重要的。目前在临床上对结核病的诊断主要依据临床症状,胸部 X 光片及细菌学检查,这些传统的诊断方法费时且检测率低,延误了早期发现及早期治疗的最佳时机。多年来人们一直希望能找到一种快速的实验室诊断方法。随着对 IFN- γ 在调节结核感染引起的细胞介导的免疫反应中起到的关键性作用的不断了解,人们逐步认识到 γ -干扰素释放试验(interferon gamma release assays, IGRAs) 可用于结核感染的诊断。

[0003] 早期人们发现结核分枝杆菌可以刺激体内 T 细胞产生免疫反应,所以利用结核分枝杆菌的纯化抗原(Tuberculin purified protein derivate, PPD) 做成结核菌素皮肤试验(Tuberculin skin test, TST) 可快速诊断结核病。然而随着人们对诊断方法的深入研究,发现结核菌素试验存在诸多缺点:1) TST 中使用的纯蛋白衍生物 PPD 的某些抗原成分与卡介苗和大多数环境中非结核分枝杆菌的抗原成分相同,易发生交叉反应,使 TST 出现较高的假阳性率,诊断特异性较低。TST 与卡介苗接种及排菌结核患者密切接触程度有关,而不能区别健康人群与感染者。2) TST 对免疫抑制的患者特别是合并 HIV 感染、重症疾病者、年幼儿童及营养不良、器官移植者,缺乏足够的灵敏度。3) TST 要求检测人员操作规范,若不慎注入皮下或表皮深部组织,则可降低检测的准确性。4) 需要受试者回访,在结果的解释上也存在主观依赖性。5) 由于结核病是一种感染性免疫病,在对病人做结核菌素皮肤试验后可能会激发记忆性免疫反应。6) 部分受试者近期免疫可能受抑制,导致皮试试验假阴性。

[0004] 1993 年 Andersen 等首先发现早期分泌抗原靶 6ku 蛋白(early secretory antigenic target 6ku protein, ESAT-6) 和培养滤液蛋白(culture filtrate protein, CFP-10) 是由 RD1 区编码,该区只存在于结核分枝杆菌复合群和少数致病性分枝杆菌基因组中,所有卡介苗菌株及大多数非致病性分枝杆菌基因组中均缺乏该区域。于是利用 ESAT-6 和 CFP-10 作为特异性抗原刺激感染了结核分枝杆菌的机体中具有免疫活性的 T 淋巴细胞产生特异性的细胞因子 IFN- γ , 并用 ELASE 检测 IFN- γ 的浓度来诊断结核感染。因此,用 ESAT-6 和 CFP-10 作为结核分枝杆菌感染的特异性 T 细胞刺激抗原可提高诊断结核感染的特异性。

[0005] 为了增加结核病检测的特异性及灵敏度,近年来随着比较基因组学,分子生物学和免疫学的发展,出现了以 T 细胞为基础的 γ -干扰素释放试验(interferon-gamma

release assays, IGRAs)。γ-干扰素释放试验是利用结核分枝杆菌特异或非特异抗原在体外刺激受检者全血或外周血单个核细胞(PBMC),使T淋巴细胞产生大量IFN-γ,然后用酶联免疫吸附法(ELISA)或酶联免疫斑点法(ELISPOT)检测IFN-γ浓度或计数分泌IFN-γ细胞的方法。目前IGRA已经开始在英、美、日本等国用于活动性结核病和潜伏性结核感染者的诊断,HIV合并结核感染的检测,区别结核感染者与BCG接种以及耐药结核菌感染的快速检测等。但由于澳大利亚的酶联免疫法产品 Quanti FERON-TB GOLD(Cellestis Ltd.,Carnegie,Victoria,Australia)与英国的酶联斑点法产品 T-SPOT.TB test(Oxford Immunotec,Abingdon,UK)存在操作技术要求高,试剂盒价格昂贵等缺点,限制了其在经济发展水平低的发展中国家的应用。

发明内容

[0006] 本发明的目的是提供一种结核T细胞释放γ-干扰素检测试剂盒及其使用方法,以克服现有技术存在的上述缺陷。

[0007] 本发明首先涉及一种共价联接了鼠抗γ-干扰素单克隆抗体的发光微粒,所述的发光微粒,为填充有发光物质的表面带有官能团的高分子微粒或者二氧化硅微粒,优选的高分子微粒的官能团为羧基、醛基或氨基;

[0008] 高分子微粒的官能团或者二氧化硅微粒与鼠抗γ-干扰素单克隆抗体共价联接,填充不同的发光物质的高分子微粒或者二氧化硅微粒,可在不同波段的光激发下,可发射出不同波段的光,比较常用的高分子化合物如:聚苯乙烯、脲醛树脂等材料,可根据微粒的采购成本及采购难易程度或者配套荧光免疫定量分析仪的激发光源等因素,选择采购合适发射波段的发光微粒;

[0009] 所述的发光物质选自量子点或者荧光染料;

[0010] 所述的荧光染料为镧系稀土元素、异硫氰酸荧光素、四乙基罗丹明、四甲基异硫氰酸罗丹明、藻红蛋白、多甲藻叶绿素蛋白或碘化丙啶;

[0011] 所述的镧系稀土元素铕、铽、铈、镝或钐等;

[0012] 研究发现,由于结核T细胞释放γ-干扰素检测实验中,γ-干扰素释放的量比较低,须在5-400pg/mL的浓度范围将其检出,采用发光物质镧系稀土元素铕的发光微粒作为标记物,具有激发光(365nm)和发射光(610nm)的相互抗干扰性强,本底较低,所以能识别出样本中低浓度的γ-干扰素;

[0013] 研究还发现,由于最终的检测反应是在硝酸纤维膜上进行,发光微粒的粒径(微粒的平均粒径)太大(>400nm),会造成发光微粒在硝酸纤维膜上较难液相流动,影响检测效果,微粒的粒径太小(<100nm),会使制备过程中的清洗工作比较困难,对抗体共价联接工作不利,因此发光微粒的粒径选择最好在100-400nm之间,较好为150-300nm,优选200nm;

[0014] 所述的发光微粒的光发射波段为350-820nm,优选的为532±10nm、620±10nm、525±10nm或680±10nm;

[0015] 发光微粒的表面官能团可以联接任何蛋白质的基团,但最常用的主要有羧基或醛基或氨基表面官能团的微粒。使用不同表面官能团的微粒,联接抗体的反应方式和反应条件也不相同。可根据微粒的采购成本及采购难易程度或者使用喜好等因素,选择相应表面

官能团的微粒,并用合适的反应条件作为鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体联接的方法;

[0016] 所述的鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体为公知的物质,可采用商业化产品;

[0017] 本发明所述的所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,包括:

[0018] (1) 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液、(2) 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件、(3) 测试培养管 (T)、(4) 本底对照培养管 (N)、(5) 阳性对照培养管 (P) 和 (6) γ -干扰素质控品;

[0019] (1) 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液,为所述的共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒和保存液的混合物,是独立包装的,可装在试管、塑料管或反应杯中;所述结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的含量为 10 ~ 100ug 共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒 /ml 保存液,优选的含量为 50ug 共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒 /ml 保存液。

[0020] 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的制备方法,包括如下步骤:

[0021] (1.1) 置换发光微粒溶液:

[0022] 将发光微粒溶液与 MES 缓冲液混合后,置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转 / 小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物发光微粒,发光微粒溶液与 MES 缓冲液的用量比为:0.3-0.5ml 发光微粒溶液 /ml MES,优选 0.35ml 发光微粒溶液 /ml MES;

[0023] 所述的发光微粒溶液中,发光微粒的含量为:0.1 ~ 2g 发光微粒 /100ml 发光微粒溶液,优选 1g 发光微粒 /100ml 发光微粒溶液;

[0024] 在上所述的沉淀物发光微粒中,再加入微量 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得清洗后的发光微粒悬浮液;

[0025] MES 缓冲液的加入量为:8 ~ 12mg 发光微粒 /mlMES 缓冲液;

[0026] 所述的发光微粒溶液为商业化产品,所述的发光微粒,可采用商业化产品,如美国 Bangs Laboratories 公司货号为 FC02F 的产品;

[0027] (1.2) 微粒活化:

[0028] 在步骤 (1.1) 获得的发光微粒悬浮液中,加入溶解有 NHS 的 MES 缓冲液,再加入溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液,反应 20 ~ 40 分钟;MES 缓冲液溶解的 NHS 中,NHS 的含量为 3 ~ 7mg/ml,MES 缓冲液溶解的 EDAC 中,EDAC 的含量为 3 ~ 7mg/ml;

[0029] 发光微粒悬浮液与溶解有 NHS 的 MES 缓冲液的用量比:2 ~ 3ml 发光微粒悬浮液 /ml 溶解有 NHS 的 MES 缓冲液,优选的为 2.5ml 发光微粒悬浮液 /ml 溶解有 NHS 的 MES 缓冲液;

[0030] 发光微粒悬浮液与溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液的用量比:4 ~ 6ml 发光微粒悬浮液 /ml 溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液,优选的为 5ml 发光微粒悬浮液 /ml 溶解有 EDAC 的 MES 缓冲液;

[0031] (1.3) 然后将步骤 (1.2) 的产物置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转 / 小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物,在沉淀物发光微粒中加入 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得发光微粒悬浮液;发光微粒与 MES 缓冲液的质量体积比为:1 ~ 4mg 发光微粒 /mlMES 缓冲液,优选 2.5mg 发光微粒 /mlMES 缓冲液;

[0032] 再将发光微粒悬浮液置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,以 16000 ~ 20000 转 /

小时的速度离心 5 ~ 15 分钟后,收集沉淀物发光微粒,在沉淀物发光微粒中加入 MES 缓冲液,再超声分散 5 ~ 15 分钟,获得活化后的发光微粒悬浮液;发光微粒与 MES 缓冲液的质量体积比为:8 ~ 12mg/ml,优选 10mg/ml;

[0033] 所述的 NHS 的化学名称为 N- 羟基丁二酰亚胺,可采用商业化产品;

[0034] 所述的 EDAC 的化学名称为乙基 [3-(二甲氨基) 丙基] 碳二亚胺盐酸盐,可采用商业化产品;

[0035] 所述 MES 缓冲液为吗啉乙磺酸的水溶液,用 NaOH 调 pH 至 5.5 ~ 6.7,优选 pH 为 6.0;缓冲液终浓度为 0.03 ~ 0.07mol/L,优选 0.05mol/L;

[0036] (1.4) 抗体共价:

[0037] 将鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体加入到步骤 (1.3) 的活化后的发光微粒悬浮液中,反应 1 ~ 3 小时;

[0038] 鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体与步骤 (1.3) 的产物中的发光微粒的质量比为 0.5 ~ 2 : 10,鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体浓度为 1 ~ 5mg/ml;

[0039] 当鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体浓度大于 5mg/ml 时,先用 MES 缓冲液稀释至 1 ~ 5mg/ml。

[0040] (1.5) 微粒封闭:

[0041] 在步骤 (1.4) 的产物中,加入封闭剂,反应 0.5 ~ 2 小时,反应好后将产物置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,16000 ~ 20000 转/小时的速度,离心 5 ~ 15 分钟,收集沉淀物;

[0042] 所述的封闭剂选自含有 150-300mg/ml 牛血清白蛋白的纯水溶液,优选 200mg/ml 牛血清白蛋白的纯水溶液;步骤 (1.3) 的产物与封闭剂的用量比:2-4ml 产物:1ml 封闭剂,优选 3ml 产物:1ml 封闭剂;

[0043] (1.6) 清洗产物:

[0044] 在步骤 (1.5) 沉淀物中加入磷酸盐缓冲溶液,再进行超声分散 5 ~ 15 分钟,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中,再将发光微粒悬浮液置于温度为 2 ~ 8℃ 的冷冻离心机中,16000 ~ 20000 转/小时的速度,离心 5 ~ 15 分钟,收集沉淀物,为共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒;

[0045] 步骤 (1.5) 沉淀物与磷酸盐缓冲溶液的质量体积比为:1 ~ 4mg 沉淀物/ml 磷酸盐缓冲溶液,优选 2.5mg 沉淀物/ml 磷酸盐缓冲溶液;

[0046] 所述的磷酸盐缓冲溶液为 0.01mol/L pH 值为 7.4。

[0047] (1.7) 稀释分装:

[0048] 将保存液加入步骤 (1.6) 中的沉淀物,超声分散 5 ~ 15 分钟,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中,所得的发光微粒悬浮液再用保存液进行稀释,即为所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液;

[0049] 步骤 (1.6) 沉淀物与保存液的质量体积比为:2 ~ 8mg 沉淀物/ml 保存液,优选 5mg 沉淀物/ml 保存液;

[0050] 发光微粒悬浮液与保存液的稀释用量比:1ml 发光微粒悬浮液/25 ~ 200ml 保存液,优选 1ml 发光微粒悬浮液/100ml 保存液;

[0051] 所述的保存液为一种混合物,以 0.01mol/L pH7.4 的磷酸盐缓冲溶液为载体,含有

如下浓度的组分：

[0052] 聚乙烯吡咯烷酮 4 ~ 6mg/ml, 蔗糖 80 ~ 120mg/ml, 海藻糖 20 ~ 30mg/ml, 牛血清白蛋白 50 ~ 150mg/ml, 叠氮钠 0.05 ~ 0.15mg/ml；

[0053] 优选的, 含有如下浓度的组分：

[0054] 聚乙烯吡咯烷酮 5mg/ml, 蔗糖 100mg/ml, 海藻糖 25mg/ml, 牛血清白蛋白 100mg/ml, 叠氮钠 0.1mg/ml；

[0055] (2) 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件的是独立包装的, 包括检测试剂卡；

[0056] 所述的检测试剂卡包括底板、样品垫、缓冲垫、反应膜和吸水纸；

[0057] 所述的反应膜包括反应膜层和划在上侧面的测试线 T 线和质控线 C 线, 所述的测试线 T 为鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体, 所述的质控 C 线为羊抗鼠抗体, 所述的反应膜的底侧面复合在底板的中部；所述的鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体和羊抗鼠抗体均为公知的物质, 可采用商业化产品；所述的反应膜层优选硝酸纤维膜；

[0058] 所述的吸水纸一端复合在所述的底板的端部, 另一端压在所述的反应膜的端部上, 所述的吸水纸的材质为玻璃纤维和纤维素混合物；

[0059] 所述的缓冲垫是由处理液浸泡过的缓冲垫膜干燥制成, 所述的处理液与缓冲垫的用量为: 0.5-5ml 处理液 / cm² 缓冲垫；所述的处理液为 0.1% -1% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮和 0.1% -1% (v/v) 吐温 20 的纯水溶液；所述的缓冲垫的一端复合在底板上, 并被样品垫的一端盖住, 另一端压在反应膜上, 所述的缓冲垫膜优选聚酯纤维膜；

[0060] 所述的样品垫是由处理液浸泡过的样品垫干燥制成, 所述的处理液与样品垫的用量比为: 0.5-5ml 处理液 / cm² 样品垫；所述的处理液为 0.1% -1% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮的纯水溶液, 所述的样品垫的一端与底板复合, 另一端压在所述的缓冲垫上, 所述的样品垫膜优选玻璃纤维膜；

[0061] 所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的制备方法, 包括如下步骤：

[0062] (1-1) 样品垫: 将玻璃纤维膜浸泡或喷上含有 0.1% -1% (w/v) 的聚乙烯吡咯烷酮溶液, 在不高于 37℃ 干燥 4 ~ 8 小时；

[0063] (1-2) 缓冲垫: 将聚酯纤维膜浸泡或喷上含有 0.1% -1% (w/v) 的聚乙烯吡咯烷酮溶液和 0.1% -1% (v/v) 的吐温 20 溶液, 在不高于 37℃ 干燥至 4 ~ 8 小时；

[0064] 术语“1% w/v”, 指的是 100 毫升溶剂, 1 克溶质, 具体的如 1% w/v 的聚乙烯吡咯烷酮溶液, 指的是 100 毫升纯化水, 1 克聚乙烯吡咯烷酮, 下同；

[0065] 术语“1% v/v”, 指的是 100 毫升溶剂, 1 毫升溶质, 具体的如 1% v/v 的吐温 20 溶液, 指的是 100 毫升纯化水, 1 毫升吐温 20, 下同；

[0066] (1-3) 反应膜: 将硝酸纤维膜贴在底板的中部上, 再将浓度为 0.35-3mg/ml 的鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体和浓度为 0.35-3mg/ml 羊抗鼠抗体, 以 1.0ul/cm 的喷量划在硝酸纤维膜上, 形成测试 T 线和质控 C 线, 然后置于不高于 37℃ 下干燥 1 ~ 2 小时；

[0067] (1-4) 将样品垫、缓冲垫、反应膜和吸水纸依次贴合在底板上, 其中样品垫、缓冲垫、反应膜和吸水纸重叠 1-2mm, 再裁剪成同等尺寸的小试纸条, 然后将小试纸条安置在塑料卡壳中, 即为所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡；

[0068] 将所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡与所述的干燥剂密封包装于铝箔

袋中,即可获得所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件;

[0069] (3) 所述的测试培养管(T) 由结核分枝杆菌特异性混合多肽和 AIM-V 培养基组成,其用量的质量体积配比为:15 ~ 25mg 结核分枝杆菌特异性混合多肽 /LAIM-V 培养基,优选 20mg 结核分枝杆菌特异性混合多肽 /LAIM-V 培养基;

[0070] 所述的结核分枝杆菌特异性混合多肽为 ESAT-6 蛋白和 CFP-10 蛋白的多肽片段混合物,其中 ESAT-6 蛋白的 2 个多肽 P52-75aa、P72-95aa 和 CFP-10 蛋白的 2 个多肽 P76-90aa、P71-85aa,这 4 个多肽用量的质量比为 1:1:1:1,用于测试样本时刺激样本中 T 细胞 γ -干扰素的释放;

[0071] 所述的 ESAT-6 蛋白和 CFP-10 蛋白的多肽片段混合物,可由专业的多肽合成技术人员合成获得,如上海吉尔多肽有限公司;

[0072] ESAT-6 蛋白的多肽序列如下:

[0073] P52-75aa:awggsgsea yqgvqqkwda atelnnalq nlart

[0074] P72-95aa:lartiseag qamastegnv tgmfa

[0075] CFP-10 蛋白的多肽序列如下:

[0076] P76-90aa:irqag vqysradeeq

[0077] P71-85aa:eistnirqag vqysr

[0078] 所述的 AIM-V 培养基,为无血清细胞培养基(细胞治疗级),可向美国 LifeTechnology 购买,品牌 Gibco;

[0079] (4) 所述的本底对照培养管(N) 由 AIM-V 培养基组成,用于测试样本时作为空白对照;

[0080] (5) 所述的阳性对照培养管(P) 由植物凝集素和 AIM-V 培养基组成,其用量的质量体积配比为:10 ~ 20mg 植物凝集素 /LAIM-V 培养基,优选 15mg 植物凝集素 /LAIM-V 培养基;

[0081] 所述的植物凝集素为植物血球凝集素,它具有凝集红血球,促进淋巴球(主要是 T 细胞)的幼化和分裂的作用,诱导 T 细胞释放 γ -干扰素。用于测试样本时作为阳性对照,可向美国 Sigma 公司购买,商品名:外源凝聚素(菜豆),货号:L9017;

[0082] (6) 所述的 γ -干扰素质控品,为高浓度重组人 γ -干扰素溶液和低浓度重组人 γ -干扰素溶液,所述的高浓度重组人 γ -干扰素溶液,重组人 γ -干扰素的含量为 100 ~ 400pg/mL,所述的低浓度重组人 γ -干扰素,重组人 γ -干扰素的含量为 25 ~ 100pg/mL;所述的 γ -干扰素质控品用于 γ -干扰素的定量计算,来评估试剂的有效性;

[0083] 本发明所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒,利用了刺激 T 细胞释放 γ -干扰素试验为基础、结合光激发光技术与纳米微球技术,采用双抗体夹心法,通过侧向流免疫层析进行检测,可用于定量检测血浆样本中结核 T 细胞释放 γ -干扰素的含量,从而定性判断是否感染结核分枝杆菌,使用方法:

[0084] (1) 用肝素抗凝的真空采血管,采集不少于 4mL 的全血标本,1.5 ~ 2.5 小时内按 1mL/管分别分装到“N”、“P”、“T”培养管中,使全血标本与培养管内容物混匀后,35 ~ 37℃ 培养 20 ~ 24 小时,培养过程中保持培养管直立;

[0085] (2) 培养后的“N”、“P”和“T”培养管,以 3000 ~ 5000 转/分钟离心 5 ~ 15 分钟,优先选择 10 分钟;

[0086] (3) 分别从“N”、“P”、“T”培养管中,等量取出血浆,取样范围为 10-100u1,优选 50u1;分别等量将血浆滴加入 3 支结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液管中,充分混匀,并反应 5-30 分钟,优选 15 分钟,同时依次对结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒溶液管进行“N”、“P”、“T”标记;

[0087] (4) 反应结束后再进行取样,取样范围可为 30-100u1,优选 70u1;等量取出血浆与结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的混合液,分别等量将混合液滴加入 3 块结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的加样孔中,并再反应 10-60 分钟,优选 30 分钟,同时依次对结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡进行“N”、“P”、“T”标记;

[0088] (5) 将反应好的检测试剂卡按照“N”、“P”、“T”的顺序分别插入含有 γ -干扰素标准曲线的荧光免疫定量分析仪中进行检测,仪器的激发光照射在检测试剂卡上,并测量每个检测试剂卡发光光子量获得光信号值,仪器上会显示“阳性”、“阴性”、“不确定”三种结果中的一个;

[0089] 荧光免疫定量分析仪检测到检测试剂卡发射光的信号值,根据机内的标准曲线得出 γ -干扰素的含量,不同厂家生产的荧光免疫定量分析仪, γ -干扰素的标准曲线输入方式或设定方式也不同,可根据不同厂家生产的荧光免疫定量分析仪的说明书确定;

[0090] 上述步骤中,将反应好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡按照“N”、“P”、“T”的顺序分别插入荧光免疫定量分析仪中进行检测,仪器根据 γ -干扰素的标准曲线首先获得的是检测试剂卡“N”、“P”、“T”相应的反应数据,仪器中的程序再对“N”、“P-N”、“T-N”、“N/4”的值进行分析,再根据下表中的判断方法,得出样本是否感染结核分枝杆菌的结果,仪器上会显示“阳性”、“阴性”、“不确定”三种结果中的一个,不同厂家生产的荧光免疫定量分析仪生成结果的方式也可不同。

[0091]

N ()	P-N	T-N	结果判定	结果解释
≤ 400	任何值	≥ 14 并且 $\geq N/4$	阳性	感染结核分枝杆菌 (结核活动期感染、潜伏感染或隐性感染)
	≥ 20	< 14	阴性	未感染结核分枝杆菌
	≥ 20	≥ 14 但 $< N/4$	阴性	
	< 20	< 14	不确定	不能确定是否感染结核分枝杆菌
	< 20	≥ 14 但 $< N/4$	不确定	
> 400	任何值	任何值	不确定	

[0092] 因选择微粒粒径大小不同、发光量不同、微粒表面官能团不同、微粒发射光波段不同,会造成检测结果有小范围的差异,但分析方法与上述分析方法一致,分析方法表格中的数据可进行适当的调整。

[0093] 本发明的技术原理:

[0094] 本发明的结核 T 细胞释放 γ -干扰素的检测试剂盒,是通过结核分枝杆菌特异性混合多肽 ESAT-6、CFP-10 作为特异性抗原刺激感染了结核分枝杆菌的机体中具有免疫活性的 T 淋巴细胞产生特异性的细胞因子 IFN- γ ,并结合光激发免疫技术来检测 IFN- γ 的浓度来诊断结核感染。光激发免疫技术是一种利用化学发光物质发射的光波进行免疫测定的方法,该技术整合了高分子微球技术,有机合成,蛋白质化学与临床检测相关领域的研

究。

[0095] 其次利用结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液灵敏度较高的特点,与样品充分混匀反应,样品中释放 γ -干扰素可被轻易捕捉到。再结合侧向流免疫层析技术具有操作简单、反应快速的优点,将反应好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液与样本的混合液滴加入结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡测试孔,被包被在硝酸纤维膜测试线上的鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体捕捉到,结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液发光微粒与血浆样品中的 γ -干扰素都留在了硝酸纤维膜测试线上,再通过荧光免疫定量分析仪对硝酸纤维膜测试线、质控线上发光微粒的发光强度进行检测得出结果,发光微粒的发光强度和样本中的 γ -干扰素含量成正比。

[0096] 本发明的有益效果是:

[0097] 荧光免疫定量分析法通过引入光激发技术与纳米微球技术,不仅成功的解决了以上试剂盒操作复杂,对技术人员要求高的缺点,并且缩短了检测时间,灵敏度、特异性较高的优点。

附图说明

[0098] 图 1 为结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件结构示意图。

[0099] 图 2 为标准曲线。

具体实施方式

[0100] 参见图 1,参见图 1,所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡是独立包装的,包括检测试剂卡,优选的,还包括干燥剂和铝箔袋,所述的铝箔袋包裹在所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡和干燥剂外。

[0101] 所述的检测试剂卡包括底板 105、样品垫 101、缓冲垫 102、反应膜 103 和吸水纸 104;

[0102] 所述的反应膜 103 包括反应膜层和划在上侧面的测试线 T 线和质控线 C 线,所述的测试线 T 为鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体,所述的质控 C 线为羊抗鼠抗体,所述的反应膜 103 的底侧面复合在底板 105 的中部;所述的鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体和羊抗鼠抗体均为公知的物质,可采用商业化产品;所述的反应膜层优选硝酸纤维膜;

[0103] 所述的吸水纸 104 一端复合在所述的底板 105 的端部,另一端压在所述的反应膜 103 的端部上,所述的吸水纸 104 的材质为玻璃纤维和纤维素混合物;

[0104] 所述的缓冲垫 102 是由处理液浸泡过的缓冲垫膜干燥制成,所述的处理液与缓冲垫 102 的用量为:0.5-5ml 处理液/cm²缓冲垫 102;所述的处理液为 0.1%-1% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮和 0.1%-1% (v/v) 吐温 20 的纯水溶液;所述的缓冲垫 102 的一端复合在底板 105 上,并被样品垫 101 的一端盖住,另一端压在反应膜 103 上,所述的缓冲垫膜优选聚酯纤维膜;

[0105] 所述的样品垫 101 是由处理液浸泡过的样品垫干燥制成,所述的处理液与样品垫 101 的用量比为:0.5-5ml 处理液/cm²样品垫 101;所述的处理液为 0.1%-1% (w/v) 聚乙烯吡咯烷酮的纯水溶液,所述的样品垫 101 的一端与底板 105 复合,另一端压在所述的缓冲垫 102 上,所述的样品垫膜优选玻璃纤维膜;

[0106] 优选的,还包括塑料卡壳,所述的塑料卡壳上表面设有测试孔和信号窗,所述的检测试剂卡安置在所述的塑料卡壳中,并与干燥剂一起放置在铝箔袋中;

[0107] 下面结合实施例进一步阐释本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明,而并非限制发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法及未说明配方的试剂均为按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆:试验手册(New York:Gold Spring Harbor Laboratory Press,1989)中所述的条件或者制作商建议的条件进行或者配置。

[0108] 实验中仪器原料来源及试剂配方:

[0109]

原料及试剂	厂家
重组结核分枝杆菌特异性多肽 ESAT-6	上海吉尔多肽有限公司
重组结核分枝杆菌特异性多肽 CFP-10	上海吉尔多肽有限公司
重组人 IFN- γ 标准品(冻干粉)	美国 Mabtech 公司
植物凝集素	sigma

[0110]

鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体	芬兰 Hytest 公司
-----------------------	--------------

[0111] 发光微粒溶液:质量固含量 1% 的羧基发光微粒溶液(激发光波段 365nm, 发射光波段 610nm), 高分子化合物聚苯乙烯, 发光物质为镧系稀土元素铕, 美国 Bangs Laboratories 公司, 粒径为 200nm;

[0112]

羊抗鼠抗体	上海捷宁生物
AIM-V 培养基 Gibco	美国 LifeTechnology
牛血清白蛋白	sigma
MES 缓冲液	美国 AMRESCO 公司
PBS 缓冲液	国药集团化学试剂有限公司
EDAC	国药集团化学试剂有限公司
NHS	国药集团化学试剂有限公司
Tween-20	国药集团化学试剂有限公司
聚乙烯吡咯烷酮 K30	国药集团化学试剂有限公司
proclin-300	国药集团化学试剂有限公司
烧杯 200ml	四川蜀玻（集团）有限责任公司
量筒 100ml 200ml	四川蜀玻（集团）有限责任公司
硝酸纤维膜 密理博 135	上海捷宁生物
玻璃纤维膜 密理博 203000	上海捷宁生物
聚酯膜 奥斯龙 6613	上海捷宁生物
吸水纸 CF6	GE 医疗集团
PVC 底板 J-b6	上海捷宁生物
塑料卡壳 c-9	上海捷宁生物
铝箔袋 6.5cm*12cm	上海捷宁生物
硅胶干燥剂 1 克	乳山市环宇化工有限公司
塑料离心管 0.2、2ml	南通海伦生物医学器材制造有限公司
玻璃瓶 5ml	南通海伦生物医学器材制造有限公司
冷冻离心机 TGL-20M	上海卢湘仪离心机仪器有限公司
移液器 0.5-10 μ l、10-100 μ l、100-1000ul	大龙兴创实验仪器（北京）有限公司
混匀仪 MX-RD-E	大龙兴创实验仪器（北京）有限公司

[0113]

电子天枰 FA1204B	上海精科实业有限公司
恒温培养箱 DNP-9052E	上海精宏实验设备有限公司
划膜仪 HGS510	杭州峰航科技有限公司
切条机 HGS201	杭州峰航科技有限公司
高压灭菌锅 SYQ-DSX-280A	上海申安医疗器械厂
超声波清洗机 PS-D40A	东莞市洁康超声波设备有限公司
超净工作台 SJ-CJ-2FDQ	苏州苏洁净化设备有限公司
封口机 FR-900 型	上海申越包装机械制造有限公司
荧光免疫定量分析仪	南通利贝尔检测技术开发有限公司

[0114] 实施例 1

[0115] 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的制备：

[0116] 1) 取 500 μ l 固含量为 1% 的 200nm 羧基发光微粒溶液（发光微粒 5mg），置于 2ml 离心管中，加入 1.5ml MES 缓冲液，充分混匀。

[0117] 2) 将步骤 (1) 的产物放入温度为 4℃ 的冷冻离心机，以 18000 转 / 小时的速度离心 10 分钟，离心结束后，收集沉淀物；

[0118] 3) 在步骤 2) 中生成的沉淀物中，加入 0.5ml MES 缓冲液，放入超声波清洗器超声分散 10 分钟，获得发光微粒悬浮液；

[0119] 4) 分别称取 EDAC 和 NHS 置于容器中，加入 MES 缓冲液，配制成 5mg/ml 的溶液，所述 MES 缓冲液为吗啉乙磺酸的水溶液，用 NaOH 调 pH 至 6.0，缓冲液终浓度为 0.05mol/L；

[0120] 5) 在步骤 3) 中生成的发光微粒悬浮液中加入 NHS 溶液 0.2ml，混匀；再加入 EDAC 溶液 0.1ml，混匀；然后置于转盘上面，旋转反应 30 分钟；

[0121] 6) 然后置于温度为 4℃ 的冷冻离心机中，以 18000 转 / 小时的速度进行离心 10 分钟，离心结束后，收集沉淀物；

[0122] 7) 在步骤 6) 中生成的沉淀物中加入 2ml MES 缓冲液，再放入超声波清洗器超声分散 10 分钟；然后置于温度为 4℃ 的冷冻离心机中，以 18000 转 / 小时的速度进行离心 10 分钟，离心结束后，收集沉淀物；

[0123] 8) 重复步骤 7) 一次；

[0124] 9) 在步骤 8) 中生成的沉淀物中加入 0.5ml MES 缓冲液，再放入超声波清洗器超声分散 10 分钟，使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中，再次获得发光微粒悬浮液；

[0125] 10) 将鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体加入到步骤 9) 中生成的发光微粒悬浮液中，置于转盘上面，并旋转反应 2 小时，鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体与步骤 1) 发光微粒的质量比为 1:10，鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体浓度为 3mg/ml；

[0126] 11) 封闭：在步骤 10) 生成的产物中，加入 200 μ l 封闭剂（浓度为 200mg/ml 的牛血清白蛋白纯水溶液），混匀，置于转盘上，旋转反应 1 小时；

[0127] 12) 将步骤 11) 中生成的产物置于温度为 4℃ 的冷冻离心机中，以 18000 转 / 小时的速度进行离心 10 分钟，离心结束后，用移液器将发光微粒中的上清液去除，收集沉淀物。

[0128] 13) 在步骤 12) 中生成的沉淀物中加入 2ml 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲溶液，再

放入超声波清洗器进行 10 分钟超声波,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中。

[0129] 14) 将步骤 13) 中生成的发光微粒悬浮液置于冷冻离心机中,以 18000 转/小时的速度进行离心 10 分钟,离心结束后,收集沉淀物;

[0130] 15) 重复步骤 13)、14) 一次;

[0131] 在步骤 15) 中生成的沉淀物中加入 1ml 保存液缓冲液,再放入超声波清洗器超声分散 10 分钟,使得发光微粒重新均匀悬浮于溶液中,获得发光微粒悬浮液,并标识发光微粒悬浮液浓度为 5mg/ml,将浓度为 5mg/ml 的发光微粒悬浮液用保存液进行 1:100 稀释,分装在 200ul 的塑料管中,每支装 50ul,2-8℃保存,获得所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液。

[0132] 所述的保存液为一种混合物,以 0.01mol/L pH7.4 磷酸盐缓冲溶液为载体,含有如下浓度的组分:

[0133] 聚乙烯吡咯烷酮 5mg/ml,蔗糖 100mg/ml,海藻糖 25mg/ml,牛血清白蛋白 100mg/ml,叠氮钠 0.1mg/ml;

[0134] 实施例 2 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件的制备

[0135] 结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的结构如图 1 所示。

[0136] (1) 样品垫:将玻璃纤维膜长*宽 (30*1.2cm) 放入 50ml 0.1% (w/v) 的聚乙烯吡咯烷酮溶液中充分浸泡,再放入恒温干燥箱 30℃,6 小时烘干待用;

[0137] (2) 样品缓冲垫:将聚酯纤维膜长*宽 (30*1.5cm) 放入 50ml 处理液中充分浸泡,处理液为含 0.5% (w/v) 的聚乙烯吡咯烷酮溶液、0.5% (v/v) 吐温 20 的水溶液,再放入恒温干燥箱 30℃,6 小时烘干待用;

[0138] (3) 反应膜:将硝酸纤维膜长*宽 (30*2.5cm) 贴在 PVC 底板 (长*宽=30*6cm) 中间部位上,再用划膜喷金机,将浓度为 1mg/ml 鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体和浓度为 0.7mg/ml 羊抗鼠抗体,以 1.0ul/cm 的喷量均匀划在硝酸纤维膜上,形成测试线 (T 线) 和质控线 (C 线),T 线与 C 线的间距为 7 ± 1 mm,再将硝酸纤维膜放入恒温干燥箱内进行 30℃干燥 1.5 小时待用。

[0139] (4) 在室温 10-35℃,湿度 ≤ 25 rh 的条件下,将吸水纸、缓冲垫和样品垫依次贴合在底板上,形成长*宽 (30*6cm) 的复合大板,其中衔接部分需要重叠 1-2mm,再使用切条机,将长度为 30cm 的复合大板以 0.4cm 的宽度等量裁成 75 份小试纸条,小试纸条的长*宽 (6*0.4cm),然后再装入塑料卡壳中,并和一个干燥剂一起装入铝箔袋中密封,即为所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡;

[0140] 将所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡与所述的干燥剂装入铝箔袋中密封包装,即可获得所述的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件,4-30℃保存。

[0141] 实施例 3

[0142] 测试培养管 (T)、本底对照培养管 (N)、阳性对照培养管 (P) 的制备:

[0143] 将所用到的烧杯、量筒、试剂瓶、2ml 的离心管、移液器枪头、磷酸盐缓冲溶液放入高压灭菌锅进行灭菌处理。

[0144] (1) 测试培养管 (T):

[0145] (1.1) 在超净工作台中,将 1ml 已灭菌的磷酸盐缓冲溶液加入到 10mg 结核分枝杆菌特异性混合多肽,其中 ESAT-6 蛋白的 2 个多肽 P52-75aa、P72-95aa 和 CFP-10 蛋白的 2

个多肽 P76-90aa、P71-85aa,这 4 个多肽用量的质量比为 1:1:1:1 试剂瓶中,颠倒混匀,溶解 15 分钟,配制成 10mg/ml 的结核分枝杆菌特异性混合多肽母液;

[0146] (1.2) 取结核分枝杆菌特异性混合多肽母液 0.6ml 和已灭菌的磷酸盐缓冲溶液 29.4ml 转移至灭菌后的试剂瓶中,轻轻搅拌混匀,配制成 200ug/ml 的结核分枝杆菌特异性混合多肽工作液;

[0147] (1.3) 量取结核分枝杆菌特异性混合多肽工作液 17.5ml 和 AMI-V 培养基 157.5ml 转移至试剂瓶中,轻轻搅拌混匀,制成测试培养液。

[0148] (1.4) 在超净工作台中将测试培养液按照 50ul/管的量分装到已灭菌的 2ml 离心管中,制成测试培养管 (T),2-8℃ 保存。

[0149] (2) 本底对照培养管 (N):

[0150] 在超净工作台中将 175ml 的 AMI-V 培养基按照 50ul/管的量分装到已灭菌的 2ml 离心管中,制成本底对照培养管 (N),2-8℃ 保存;

[0151] (3) 阳性对照培养管 (P):

[0152] (3.1) 在超净工作台中将 1ml 已灭菌的磷酸盐缓冲溶液加入到 10mg 植物凝集素试剂瓶中,颠倒混匀,溶解 15 分钟,配制成 10mg/ml 的植物凝集素母液;

[0153] (3.2) 取植物凝集素母液 0.3ml 和已灭菌的磷酸盐缓冲溶液 59.7ml 转移至灭菌后的试剂瓶中,轻轻搅拌混匀,配制成 50ug/ml 的植物凝集素工作液;

[0154] (3.3) 量取植物凝集素工作液 52.5ml 和 AMI-V 培养基 122.5ml 转移至试剂瓶中,轻轻搅拌混匀,制成阳性对照培养液;

[0155] (3.4) 在超净工作台中将阳性对照培养液按照 50ul/管的量分装到已灭菌的 2ml 离心管中,制成阳性对照培养管 (P),2-8℃ 保存。

[0156] 实施例 4 γ -干扰素标准品、质控品的制备

[0157] γ -干扰素标准品、质控品稀释液的配置:

[0158] (1) 标准品稀释液的配置

[0159] 称取牛血清白蛋白 10g 至试剂瓶中,称取加入 988.8g 的 10mM pH 7.4 的磷酸盐缓冲溶液,搅拌至完全溶解;再量取 0.2ml 的 proclin-300 加入上述试剂瓶中,搅拌至完全溶解,配置成标准品、质控品稀释液。

[0160] (2) 标准品配置

[0161] 标准品高值母液 (1ng/ml) 的配置:称重法称取 1g 去离子水至 Mabtech IFN- γ 标准品 (冻干粉) 瓶中,复溶,得到浓度为 1ug/ml。

[0162] 称重法称取标准品稀释液 999g 复溶的 Mabtech IFN- γ 标准品 (1ug/ml) 1g,充分混匀,得到标准品母液 (1ng/ml)。

[0163] 标准品配置:采用称量法,参见表 1 进行称量。

[0164] 表 1 标准品配置称量表

[0165]

标准品	量值 (pg/ml)	标准品稀释液 (g)	高值母液 (g)
水平 6	400	6	4

水平 5	200	5	5(水平 6)
水平 4	100	5	5(水平 5)
水平 3	50	5	5(水平 4)
水平 2	25	5	5(水平 3)
水平 1	12.5	5	5(水平 2)

[0166] 表 1 中配置所得 γ -干扰素浓度为 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12.5pg/ml 的溶液为标准品, 可用于标准曲线定标。

[0167] (3) 质控品配置

[0168] 采用称量法, 参照表 2 进行称量。

[0169] 表 2 质控品配置称量表

[0170]

内部质控品	量值 (pg/ml)	标准品稀释液 (g)	高值母液 (g)
水平 1	200	8	2
水平 2	50	7.5	2.5(水平 1)

[0171] 将表 2 中所得的 γ -干扰素浓度为 200pg/ml、50pg/ml 的溶液分装在玻璃瓶中, 每瓶装 2ml, 作为质控品使用, 即可获得所述的 γ -干扰素质控品, 用于定量检测 γ -干扰素, 来评估试剂的有效性。

[0172] 实施例 5

[0173] 标准曲线制备:

[0174] (1) 分别依次等量吸取实例 4 中配制好的 6 个不同浓度的标准品溶液 50ul 及标准品稀释液 50ul, 滴加入实例 1 中制备好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬液中, 并做好相应标记, 充分混匀并反应 15 分钟。

[0175] (2) 分别依次等量吸取步骤 (1) 中反应好的 7 个混合液 70ul, 分别滴加入 7 个实施例 2 制备好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的加样孔中, 并做好标记, 反应 30 分钟。

[0176] (3) 依次将步骤 (2) 中反应好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡放入到南通利贝尔检测技术开发有限公司生产的荧光免疫定量分析仪中, 并检测相应的荧光信号值, 并记录数据:

[0177] (4) 重复步骤 (1)-(3) 的步骤 10 次, 并计算每个浓度相对应的 10 次信号值的平均值, 如下:

[0178]

浓度 (pg/ml)	400	200	100	50	25	12.5	0
10 次荧光信号平均值	1.2	0.62	0.3	0.2	0.12	0.067	0.4

[0179] (5) 以 400pg/ml, 200pg/ml, 100pg/ml, 50pg/ml, 25pg/ml, 12.5pg/ml, 0pg/ml 这 7 个浓度的值为 y 轴, 以各浓度相对应的 10 次信号值的平均值为 x 轴, 做图, 见图 2。

[0180] (6) 将步骤 (5) 中所获得的标准曲线输入到南通利贝尔检测技术开发有限公司生产的荧光免疫定量分析仪中, 在以后的样本测试中, 荧光免疫定量分析仪将根据每次测得结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的荧光信号值, 按照制备好的标准曲线自动生成浓度值。

[0181] 实施例 6

[0182] 采用实施例 1 ~ 5 制备的产物;

[0183] (B) 检测:

[0184] (1) 用设有肝素抗凝的真空采血管, 采集 4mL 的全血样本, 2 小时内按 1mL/管分别滴加入实施例 3 制备的“N”、“P”、“T”培养管中, 使全血样本与培养管内容物混匀后, 37℃ 培养 22 小时, 培养过程中保持培养管直立;

[0185] (2) 培养后的“N”、“P”和“T”培养管, 以 4000 转/分钟离心 10 分钟;

[0186] (3) 分别从“N”、“P”、“T”培养管中, 等量取出血浆, 取样 50 μ l; 分别等量将血浆滴加入 3 支实施例 1 制备的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液管中, 充分混匀, 并反应 15 分钟, 同时依次对结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒溶液管进行“N”、“P”、“T”标记;

[0187] (4) 反应结束后再进行取样, 取样 70 μ l; 等量取出血浆与结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的混合液, 分别等量将混合液滴加入实施例 2 制备的 3 块结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的加样孔中, 并再反应 30 分钟, 同时依次对结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡进行“N”、“P”、“T”标记;

[0188] (5) 将反应好的检测试剂卡按照“N”、“P”、“T”的顺序分别插入已有标准曲线荧光免疫定量分析仪中进行检测, 仪器将对应生成“N”、“P”、“T”检测卡的浓度数值, 再根据下表的判断方法进行分析, 显示出相对应的最终结果“阳性”、“阴性”或者“不确定”三个结果中的一个。

[0189] 单位为: pg/ml

[0190]

N ()	P-N	T-N	结果判定	结果解释
≤ 400	任何值	≥ 14 并且 $\geq N/4$	阳性	感染结核分枝杆菌 (结核活动期感染、潜伏感染或隐性感染)
	≥ 20	< 14	阴性	未感染结核分枝杆菌
	≥ 20	≥ 14 但 $< N/4$	阴性	

[0191]

	<20	<14	不确定	不能确定是否感染结核分枝杆菌
	<20	≥ 14 但 $< N/4$	不确定	
>400	任何值	任何值	不确定	

[0192] 实施例 7

[0193] 评价方法及其结果：

[0194] (1) 阳性参考品符合率

[0195] 将 20 例临床确诊的结核患者样本按照实施例 6 的步骤进行操作,检测结果为:其中 10 例菌阴结核患者样本检测结果均为阴性,其中 10 例菌阳结核患者样本 9 例为阳性,1 例为不确定,阳性符合率为 90%,阳性符合率 $\geq 75\%$ 。

[0196] (2) 阴性参考品符合率：

[0197] 将 20 份无结核病临床症状的健康志愿者血样按照实施例 6 的步骤进行操作,检测结果为:其中 18 份样本为阴性,2 份样本为不确定,阴性符合率为 90%,阴性符合率应 $\geq 75\%$ 。

[0198] (3) 批内精密性

[0199] (3.1) 用同一批号试剂盒,对高浓度质控品 200pg/ml 和低浓度质控品 50pg/ml 分别重复检测 10 次,分别等量吸取高浓度质控品和低浓度质控品 50ul,滴加入 3 支结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液管中,充分混匀,并反应 15 分钟；

[0200] (3.2) 反应结束后再进行取样,等量取出质控品与结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的混合液 70ul,再将混合液滴加入 3 块结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡的加样孔中,并再反应 30 分钟；

[0201] (3.3) 将反应好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡放入到南通利贝尔检测技术开发有限公司生产的荧光免疫定量分析仪进行检测,得出相应的数据,计算测定结果的平均值 (X) 和标准差 (S),根据公式 $CV = S/X \times 100\%$ 得出变异系数 (CV)：

[0202]

浓度 (pg/ml)	200	50
平均值 (pg/ml)	209.3	55
标准差	15.75	6.2
批内精密度 CV(%)	7.5	11.2

[0203] 批内精密度测定结果的变异系数 CV(%) $\leq 15\%$ 。

[0204] (4) 批间精密度：

[0205] (4.1) 采用 3 个批号试剂盒,每个批号的试剂盒分别对高浓度质控品 200pg/ml 和低浓度质控品 50pg/ml 分别重复检测 10 次,分别定量吸取高浓度质控品和低浓度质控品 50ul,滴加入 3 支结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液管中,充分混匀,并反应 15 分钟；

[0206] (4.2) 反应结束后再进行取样,等量取出质控品与结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液的混合液 70ul,再将混合液滴加入 3 块结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡

的加样孔中,并再反应 30 分钟;

[0207] (4.3) 将反应好的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡放入到南通利贝尔检测技术开发有限公司生产的荧光免疫定量分析仪进行检测,得出相应的数据,计算每批试剂盒测定结果的平均值 (X) 和标准差 (S),根据公式 $CV = S/X \times 100\%$ 得出变异系数 (CV):

[0208]

批号	批号 1		批号 2		批号 3	
浓度(pg/ml)	200	50	200	50	200	50
平均值(pg/ml)	210.3	53	205	52	207	48
标准差	14.75	6.2	13.6	4.3	16.5	5.2
批内精密度 CV(%)	7	11.7	6.6	8.2	8	10.8

[0209] 使用 3 个不同批次的产品测定结果的变异系数 $CV(\%) \leq 20\%$ 。

[0210] (5) 最低检出量

[0211] 将实例 4 中标准品稀释液作为零浓度标准品进行检测,重复测定 10 次,按实施例 5 中 (1)-(3) 的检测步骤进行操作。计算结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡荧光信号值 (M 值) 的均值和标准差 (SD),根据零浓度标准品和相邻标准品之间的浓度-信号值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将 $M+2SD$ 的信号值代入上述方程,求出对应的浓度:

[0212]

浓度 (pg/ml)	0
荧光信号平均值 (M 值)	0.0398
SD	0.0064
M+2SD	0.0526
公式 $y = 462.96x - 18.519$	对应浓度为 5.83pg/ml

[0213] 最低检出量不高于 6pg/ml。

[0214] (6) 线性范围:

[0215] 采用已知含有 γ -干扰素浓度为 380pg/ml 人血浆样本中按 1:2 的比例稀释为 6 种浓度,380pg/ml、190pg/ml、95pg/ml、47.5pg/ml、23.75pg/ml、11.875pg/ml。按实例 7(3.1)-(3.3) 中的步骤进行检测,将每个浓度 (x_i) 重复测定 3 次,算出各浓度 3 次测量值的平均值 (y_i) 根据以下公式计算回归系数 r :

[0216]

$$r = \frac{n \sum_{i=1}^n x_i y_i - \sum_{i=1}^n x_i \sum_{i=1}^n y_i}{\sqrt{\left[n \sum_{i=1}^n x_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n x_i \right)^2 \right] \left[n \sum_{i=1}^n y_i^2 - \left(\sum_{i=1}^n y_i \right)^2 \right]}}$$

[0217] 式中：

[0218] y_i ——某浓度 γ -干扰素人血浆样本 3 次测量值的平均值

[0219] x_i ——某 γ -干扰素人血浆样本浓度

[0220] n —— γ -干扰素浓度呈梯度的人血浆样本样本数

[0221] 试剂（盒）线性区间在 12.5 ~ 400pg/mL 范围内, $r = 0.985$, 具有良好的线性相关性。

[0222] (7) 准确性：

[0223] 选用已知含有 γ -干扰素浓度为 220pg/ml 和 36pg/ml 的人血浆样本进行检测, 按照试剂（盒）说明书的步骤分别进行 3 次测量, 结果记为 T, 根据公式: 测量偏差 = (T-理论值)/理论值 $\times 100\%$, 测量偏差 $\leq \pm 10\%$ 。

[0224]

浓度 (pg/ml)	220	36
测定值 (pg/ml)	240	41
	226	42
	235	32
测量偏差	6.2%	6.4%

[0225] 实施例 8

[0226] 比对实验：

[0227] 采用澳大利亚生产的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒（酶联免疫法）“Quanti FERON-TB GOLD in Tub”作为对照试剂与南通利贝尔检测技术开发有限公司生产的结核 T 细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒（免疫荧光法）对 120 例人全血样本进行检测比对, 其中阳性样本为 39 例, 阴性样本为 73 例, 不确定样本为 8 例, 检测结果如下：

[0228]

南通利贝尔试剂	澳大利亚试剂盒			合计
	阳性	阴性	不确定	
阳性	39	0		39
阴性	0	72	0	72
不确定		1	8	9
合计	39	73	8	120

[0229] 阳性符合率： $39/39 \times 100\% = 100\%$

[0230] 阴性符合率： $72/73 \times 100\% = 98.6\%$

[0231] 不确定符合率： $8/8 \times 100\% = 100\%$

[0232] 总符合率： $(39+72+8)/120 = 99.2\%$

[0233] 这两种试剂检测结果不一致的仅有 1 例样本,检测结果高度一致。

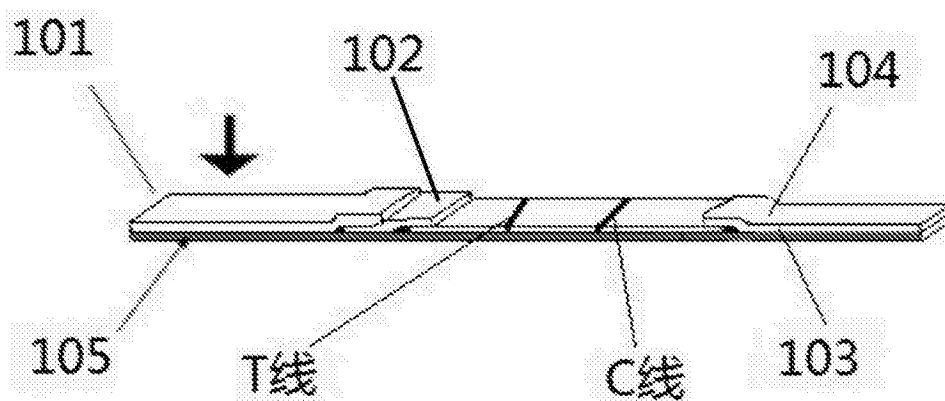


图 1

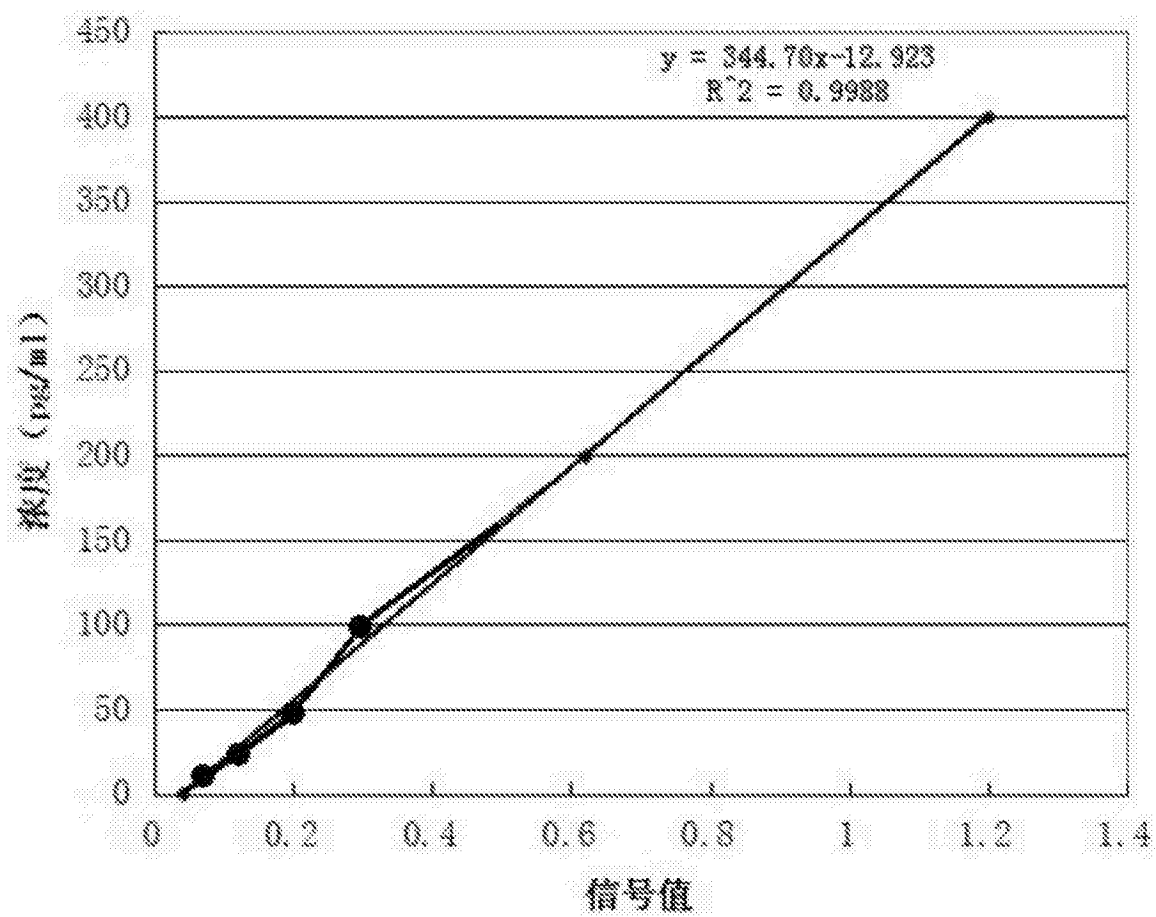


图 2

专利名称(译)	结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN105259354A	公开(公告)日	2016-01-20
申请号	CN201510780209.9	申请日	2015-11-13
[标]申请(专利权)人(译)	夏晶		
申请(专利权)人(译)	夏晶		
当前申请(专利权)人(译)	夏晶		
[标]发明人	夏晶 陶正杰		
发明人	夏晶 陶正杰		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/569 G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/577 G01N33/6866 G01N2333/57		
其他公开文献	CN105259354B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒及其使用方法，所述检测试剂盒，包括结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液、结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂卡组件、测试培养管T、本底对照培养管N、阳性对照培养管P和 γ -干扰素质控品，结核T细胞释放 γ -干扰素检测微粒悬浮液，为共价联接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒和保存液的混合物。用于定量检测血浆样本中结核T细胞释放 γ -干扰素的含量，本发明将荧光免疫定量分析法通过引入光激发光技术与纳米微球技术，不仅成功的解决了以上试剂盒操作复杂，对技术人员要求高的缺点，并且缩短了检测时间，具有灵敏度、特异性较高的优点。

