



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105259354 B

(45)授权公告日 2017.05.10

(21)申请号 201510780209.9

G01N 33/569(2006.01)

(22)申请日 2015.11.13

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105259354 A

(43)申请公布日 2016.01.20

(73)专利权人 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)

(56)对比文件

CN 104020297 A,2014.09.03,全文.

CN 102033129 A,2011.04.27,全文.

WO 2008113119 A1,2008.09.25,

CN 104569390 A,2015.04.29,

CN 104569390 A,2015.04.29,

CN 102246040 A,2011.11.16,权利要求6、

7、14-16,说明书0036段,图4.

CN 103048460 A,2013.04.17,

CN 102175873 A,2011.09.07,权利要求1、

3,说明书0039-0066段.

CN 103940990 A,2014.07.23,

审查员 刘彦宁

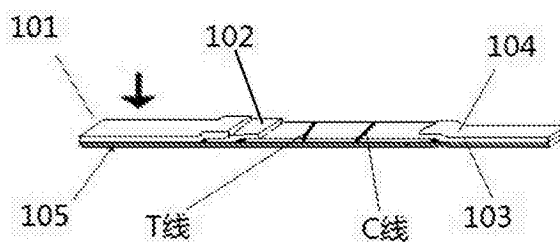
权利要求书3页 说明书18页 附图1页

(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,为共价连接了鼠抗 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。



1. 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,为共价连接了鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体的发光微粒和保存液的混合物;

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;

高分子微粒的官能团或者二氧化硅微粒的官能团与鼠抗 γ -干扰素单克隆抗体共价连接;

所述高分子微粒选自聚苯乙烯微粒或脲醛树脂微粒;所述的发光物质为镧系稀土元素;

所述发光微粒的粒径为100-400nm,所述的发光微粒的光发射波段为350-820nm;

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缓冲液;

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;

(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沉淀物发光微粒/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沉淀物发光微粒/mlMES缓冲液;

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；步骤 (4) 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，为共价连接了鼠抗 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。

2. 根据权利要求1所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒，其特征在于，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。

3. 根据权利要求1所述的结核T细胞释放 γ -干扰素检测试剂盒，其特征在于，所述镧系稀土元素为铈、铽、铈、镝或钆。

4. 根据权利要求1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 -干扰素检测试剂盒，包括检测试剂盒；

所述检测试剂盒包括底板 (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线为鼠抗 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。

5. 根据权利要求4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。

6. 根据权利要求4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。

7. 根据权利要求4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,所述的样品垫为玻璃纤维膜。

8. 根据权利要求4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。

9. 根据权利要求1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中的培养液由结核分枝杆菌特异性混合多肽和A1M-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/LA1M-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个多肽为P52-75aa、P72-95aa,CFP-10蛋白的2个多肽为P76-90aa、P71-85aa;

所述的ESAT-6蛋白的多肽序列如下:

P52-75aa:awggsgsea yqgvqqkwa 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。

10. 根据权利要求9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。

11. 根据权利要求1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中的培养液由A1M-V培养基组成,用于测试样本时作为空白对照。

12. 根据权利要求1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中的培养液由植物凝集素和A1M-V培养基组成,其用量的质量体积配比为:10~20mg植物凝集素/LA1M-V培养基。

13. 根据权利要求1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 -干扰素溶液,重组人 γ -干扰素的含量为25~100pg/mL。

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、婴幼儿及营养不良、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连接了鼠抗 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连接,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铈、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铈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,对抗体共价连接工作不利,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 \pm 10nm、620 \pm 10nm、525 \pm 10nm或680 \pm 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,为所述的共价连接了鼠抗 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共价连接了鼠抗 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共价连接了鼠抗 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(1.4)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1.0u1/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A1M-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/LA1M-V培养基,优选20mg结核分枝杆菌特异性混合多肽/LA1M-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 yqgvqqkwa 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A1M-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A1M-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A1M-V培养基组成,其用量的质量体积配比为:10~20mg植物凝集素/LA1M-V培养基,优选15mg植物凝集素/LA1M-V培养基;

[0081] 所述的植物凝集素为植物血球凝集素,它具有凝集红细胞,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:外源凝集素(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10-100uL,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,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30-100uL,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,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 ≥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：

	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
[0109]	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 Meridian 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;	

	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
[0112]	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、100-1000 μ l	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

	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
[0113]	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1.5mlMES缓冲液,充分混匀。

[0117] 2) 将步骤(1)的产物放入温度为4 $^{\circ}$ C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0.5mlMES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 $^{\circ}$ C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2mlMES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 $^{\circ}$ C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0.5mlMES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 $^{\circ}$ C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,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±1mm,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≤25rh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AM1-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50u1/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AM1-V培养基按照50u1/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AM1-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50u1/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1FN- 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1FN- 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50u1及标准品稀释液50u1, 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70u1, 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50u1;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]

> 400	< 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	
	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50u1,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70 μ l,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50 μ l,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70 μ l,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 :

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

[0216] 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)“Quantiferon-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。

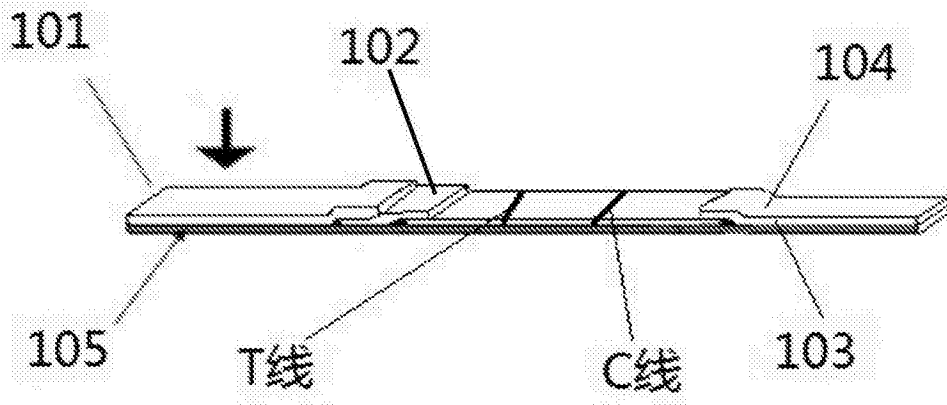


图1

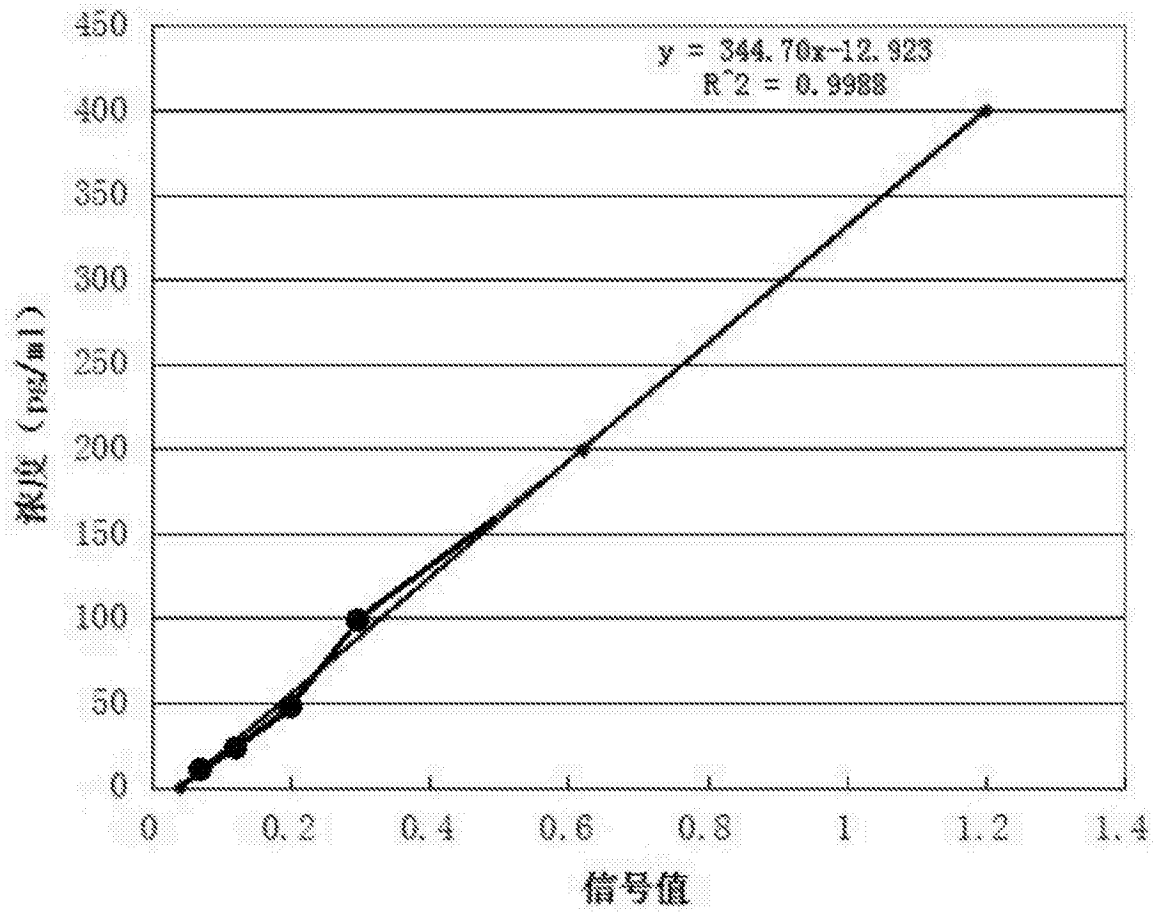


图2

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	CN105259354B	公开(公告)日	2017-05-10
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		
审查员(译)	刘彦宁		
其他公开文献	CN105259354A		
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。

