



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110596382 A

(43)申请公布日 2019.12.20

(21)申请号 201910872009.4

(22)申请日 2019.09.16

(71)申请人 南京拜睿生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江宁区科学园
大学城芝兰路18号5号楼208室(江宁
高新园)

(72)发明人 张代民 张立竹 张玉虎 洪涛

(74)专利代理机构 南京常青藤知识产权代理有
限公司 32286

代理人 仲晖

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

(54)发明名称

一种结核病诊断试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明提供一种结核病诊断试剂盒及其制备方法,属于医学检测技术领域,所述试剂盒包括链霉亲和素包被的固相载体、生物素标记的抗原、发光物质标记的抗原、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、浓缩洗涤液和底物液,其中所述固相载体为超顺磁性磁珠,结合杆菌抗原为重组抗原蛋白。本发明的试剂盒采用链霉亲和素包被的固相载体,链霉亲和素与生物素分子之间具有较强的亲和力,也能结合更多的发光物质,有助于检测信号的放大,提高分析的灵敏度,本发明采用重组抗原蛋白,相对于一般的单一抗原法,具有更高的灵敏度,也有助于拓宽检测范围。

1. 一种结核病诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括链霉亲合素包被的固相载体、生物素标记的抗原、发光物质标记的抗原、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、浓缩洗涤液和底物液,其中所述固相载体为超顺磁性磁珠,结合杆菌抗原为重组抗原蛋白。

2. 根据权利要求1的一种结核病诊断试剂盒,其特征在于,所述发光物质为可以和底物作用产生化学发光的物质,所述发光物质包括吖啶酯、吖啶磺酰胺、碱性磷酸酶、N-(4-氨基)-N-乙基异鲁米诺或鲁米诺。

3. 根据权利要求1的一种结核病诊断试剂盒,其特征在于,所述重组抗原蛋白为以下融合蛋白:ESAT-6—连接肽—CPF-10或ESAT-6—连接肽—38KD,其中连接肽为不影响ESAT-6和CPF-10的免疫原性的短肽或不影响ESAT-6和38KD的免疫原性的短肽。

4. 根据权利要求1的一种结核病诊断试剂盒,其特征在于,所述试剂盒通过酶联免疫吸附试验进行检测。

5. 一种结核病诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:将链霉亲合素包被固相载体;配制结核病人阳性对照血清和正常人对照血清;制备重组抗原蛋白,以生物素标记重组抗原蛋白;以发光物质标记重组抗原蛋白;配制浓缩洗涤液和底物液;分装上述样品并组装成成品。

6. 根据权利要求5的一种结核病诊断试剂盒的制备方法,其特征在于,将链霉亲合素包被固相载体的具体方法为:

S1、将PBS缓冲液与链霉亲合素混匀制成包被液;

S2、取磁珠原液,取反应缓冲溶液清洗磁珠,然后重悬于包被液中,4-10℃条件下过夜反应;

S3、反应完成后用磁珠清洗液清洗三次,最后重悬于磁珠储存液中。

一种结核病诊断试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测技术领域,具体涉及一种结核病诊断试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 结核病是全球最主要的传染性疾病之一,全球约三分之一人口感染结合分枝杆菌,每年约900-1000万新发病例,约180万人死于结核病,而我国结核病患者的的人数位居全球第三位,被WHO列为全球22个结核病高负担国家之一。

[0003] 目前,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,例如结核菌涂片检查虽然简单易行,但阳性率低,而结核菌培养检测结果可信度高,但耗时长,不能满足临床要求。降低结核病死亡率的关键是早期诊断,有效的早期诊断检测手段有助于及时准确地制定治疗方案。随着分子生物学技术的迅速发展,免疫诊断技术检测血清中的结核抗体,具有简单快捷、无需精密仪器、易于推广等优点,但是有些试剂盒会存在假阳性高、灵敏度低等问题。

[0004] 因此,急需一种能够解决现有问题的结核病诊断试剂盒及其制备方法。

发明内容

[0005] 本发明的目的是针对现有技术的不足,提供一种结核病诊断试剂盒及其制备方法,该试剂盒制备方法简单,且该试剂盒采用链霉亲和素包被的固相载体,链霉亲和素与生物素分子之间具有较强的亲和力,也能结合更多的发光物质,有助于检测信号的放大,提高分析的灵敏度,本发明采用重组抗原蛋白,相对于一般的单一抗原法,具有更高的灵敏度,并不影响特异性,也有助于拓宽检测范围。

[0006] 本发明提供了如下的技术方案:

[0007] 一种结核病诊断试剂盒及其制备方法,所述试剂盒包括链霉亲和素包被的固相载体、生物素标记的抗原、发光物质标记的抗原、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、浓缩洗涤液和底物液,其中所述固相载体为超顺磁性磁珠,结合杆菌抗原为重组抗原蛋白。

[0008] 优选的,所述发光物质为可以和底物作用产生化学发光的物质,所述发光物质包括吖啶酯、吖啶磺酰胺、碱性磷酸酶、N-(4-氨基丁基)-N-乙基异鲁米诺或鲁米诺。

[0009] 优选的,所述重组抗原蛋白为以下融合蛋白:ESAT-6—连接肽—CPF-10或ESAT-6—连接肽—38KD,其中连接肽为不影响ESAT-6和CPF-10的免疫原性的短肽或不影响ESAT-6和38KD的免疫原性的短肽。

[0010] 优选的,所述试剂盒通过酶联免疫吸附试验进行检测。

[0011] 一种结核病诊断试剂盒的制备方法,包括如下步骤:将链霉亲和素包被固相载体;配制结核病人阳性对照血清和正常人对照血清;制备重组抗原蛋白,以生物素标记重组抗原蛋白;以发光物质标记重组抗原蛋白;配制浓缩洗涤液和底物液;分装上述样品并组装成成品。

[0012] 优选的,将链霉亲和素包被固相载体的具体方法为:

- [0013] S1、将PBS缓冲液与链霉亲合素混匀制成包被液；
- [0014] S2、取磁珠原液，取反应缓冲溶液清洗磁珠，然后重悬于包被液中，4-10℃条件下过夜反应；
- [0015] S3、反应完成后用磁珠清洗液清洗三次，最后重悬于磁珠储存液中。
- [0016] 本发明的有益效果是：
- [0017] 本发明采用链霉亲和素包被的固相载体，并配有生物素标记的抗原、发光物质标记的抗原，链霉亲和素以同源四聚体的形式存在，与生物素分子之间具有较强的亲和力，也能结合更多的发光物质，有助于检测信号的放大，提高分析的灵敏度；本发明采用重组抗原蛋白，如ESAT-6—连接肽—CPF-10或ESAT-6—连接肽—38KD，ESAT-6、CPF-10和38KD对结核病的血清诊断具有灵敏度高、特异性高的优点，本发明相对于一般的单一抗原法，本发明制备的试剂盒具有更高的灵敏度，并不影响特异性，也有助于拓宽检测范围。

具体实施方式

[0018] 实施例1

[0019] 将链霉亲合素包被超顺磁性磁球；配制结核病人阳性对照血清和正常人对照血清；制备重组抗原蛋白，以生物素标记重组抗原蛋白；以碱性磷酸酶标记重组抗原蛋白；配制浓缩洗涤液和底物液；分装上述样品并组装成成品。

[0020] 其中，重组抗原蛋白为ESAT-6—连接肽—38KD，连接肽为不影响ESAT-6和38KD的免疫原性的短肽。

[0021] 其中，将链霉亲合素包被超顺磁性磁球的具体方法为：

[0022] S1、将PBS缓冲液与链霉亲合素混匀制成包被液；

[0023] S2、取磁珠原液，取反应缓冲溶液清洗磁珠，然后重悬于包被液中，5℃条件下过夜反应；

[0024] S3、反应完成后用磁珠清洗液清洗三次，最后重悬于磁珠储存液中。

[0025] 实施例2

[0026] 将链霉亲合素包被超顺磁性磁球；配制结核病人阳性对照血清和正常人对照血清；制备重组抗原蛋白，以生物素标记重组抗原蛋白；以吡啶酯标记重组抗原蛋白；配制浓缩洗涤液和底物液；分装上述样品并组装成成品。

[0027] 其中，重组抗原蛋白为ESAT-6—连接肽—CPF-10，连接肽为不影响ESAT-6和CPF-10的免疫原性的短肽。

[0028] 其中，将链霉亲合素包被超顺磁性磁球的具体方法为：

[0029] S1、将PBS缓冲液与链霉亲合素混匀制成包被液；

[0030] S2、取磁珠原液，取反应缓冲溶液清洗磁珠，然后重悬于包被液中，5℃条件下过夜反应；

[0031] S3、反应完成后用磁珠清洗液清洗三次，最后重悬于磁珠储存液中。

[0032] 将实施例1和实施例2以及常规ELISA试剂盒对血样样品进行检测，常规ELISA试剂盒使用的抗原为单一抗原ESAT-6，检测样本包括临床确诊的活动性结核病人血清150例，非结核性疾病患者血清150例，以及正常人对照血清150例，具体的检测结果如表1所示。

[0033] 表1检测结果对比

	实施例 1		实施例 2		常规 ELISA 试剂盒	
	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
[0034] 活动性结核病人血清	145	96.7%	144	96.0%	136	90.7%
非结核性疾病患者血清	6	4.0%	7	4.7%	11	7.3%
正常人对照血清	0	0	0	0	0	0

[0035] 从检测数据可以看出,本发明的试剂盒对活动性结核病人的阳性检出率较高,对非结核性疾病患者的阳性检出率也明显少于常规的ELISA试剂盒,可见本发明的试剂盒,相比常规的ELISA试剂盒,更适合于结核病的检测,检测效果更准确。

[0036] 以上仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,尽管参照前述实施例对本发明进行了详细的说明,对于本领域的技术人员来说,其依然可以对前述各实施例所记载的技术方案进行修改,或者对其中部分技术特征进行等同替换。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

专利名称(译)	一种结核病诊断试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110596382A	公开(公告)日	2019-12-20
申请号	CN201910872009.4	申请日	2019-09-16
[标]发明人	张代民 张立竹 张玉虎 洪涛		
发明人	张代民 张立竹 张玉虎 洪涛		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/5695		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种结核病诊断试剂盒及其制备方法，属于医学检测技术领域，所述试剂盒包括链霉亲和素包被的固相载体、生物素标记的抗原、发光物质标记的抗原、结核病人阳性对照血清、正常人对照血清、浓缩洗涤液和底物液，其中所述固相载体为超顺磁性磁珠，结合杆菌抗原为重组抗原蛋白。本发明的试剂盒采用链霉亲和素包被的固相载体，链霉亲和素与生物素分子之间具有较强的亲和力，也能结合更多的发光物质，有助于检测信号的放大，提高分析的灵敏度，本发明采用重组抗原蛋白，相对于一般的单一抗原法，具有更高的灵敏度，也有助于拓宽检测范围。

	实施例1		实施例2		常规ELISA试剂盒	
	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率	阳性数	阳性率
活动性结核病人血清	145	96.7%	144	96.0%	136	90.7%
非结核性疾病患者血清	6	4.0%	7	4.7%	11	7.3%
正常人对照血清	0	0	0	0	0	0