

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200910064063.2

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2009年7月22日

[11] 公开号 CN 101487842A

[22] 申请日 2009.1.13

[21] 申请号 200910064063.2

[71] 申请人 郑州安图绿科生物工程有限公司

地址 450016 河南省郑州市经济技术开发区  
第五大街经北一路87号

[72] 发明人 娄斌 安维 付光宇 胡英会  
苗拥军 仝娟子 张文星 吴学炜

[74] 专利代理机构 郑州异开专利事务所(普通合伙)

代理人 韩华

权利要求书1页 说明书3页

[54] 发明名称

结核分枝杆菌的快速筛查方法

[57] 摘要

本发明公开了一种结核分枝杆菌的快速筛查方法,包括下述步骤:第一步:标本液化,取病人痰标本加入液化处理试剂使其完全液化;第二步:标本的富集和纯化,取结核分枝杆菌的特异抗体包被在磁性微珠上,然后将其加入到经过液化处理的病人标本中,充分搅动使其完全结合在免疫磁珠上,用冲洗液冲洗后,得到处理好的待测磁珠;第三步:发泡实验,将待测磁珠用磷酸盐缓冲液稀释混匀,进行发泡试验,如果标本在室温下不产生气泡,则标本即为结核阴性;如果标本在室温下产生气泡而经过68度20分钟处理后经发泡试验产生气泡则标本也为阴性,不产生气泡则标本为结核分枝杆菌阳性。整个检测过程简单、易掌握,准确率高,保证了结核病人的及时治疗。

1、一种结核分枝杆菌的快速筛查方法，其特征在于：它包括下述步骤：

第一步：标本液化

取病人痰标本和液化处理试剂按 1:2-4 的比例混合，使标本完全液化；

第二步：标本的富集和纯化

取结核分枝杆菌的特异抗体包被在磁性微珠上，形成包被有鼠抗结核分枝杆菌特异性膜抗体的免疫磁珠，然后将其加入到第一步经过液化处理的病人标本中，充分搅动使其完全结合在免疫磁珠上；收集上述免疫磁珠，用冲洗液冲洗后，得到处理好的待测磁珠；

第三步：发泡实验

将第二步处理好的待测磁珠用磷酸盐缓冲液稀释混匀，平分为两部分备用；将其中一部分加入到发泡试剂中缓慢混合均匀，3 分钟后观察，如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则直接将标本判为结核阴性；如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡产生，则将另一部分置于 68 度水浴中处理后，再将其加入到发泡试剂中缓慢混合均匀，3 分钟后观察，如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡则可将标本判为结核阴性；如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则可将标本判为结核阳性。

2、根据权利要求 1 所述的结核分枝杆菌的快速筛查方法，其特征在于：所述的液化处理试剂为重量比为 1-5%的碱和 0.5-5% N-乙酰-L-半胱氨酸的混合液。

3、根据权利要求 1 所述的结核分枝杆菌的快速筛查方法，其特征在于：所述的冲洗液为 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液和 0.5-1%吐温-20 的混合液。

4、根据权利要求 1 所述的结核分枝杆菌的快速筛查方法，其特征在于：所述的发泡试剂为 1-5%过氧化氢和 0.5-5%吐温-80 的混合液。

## 结核分枝杆菌的快速筛查方法

### 技术领域

本发明涉及一种医学检测方法，尤其是涉及一种代替常规镜检的结核分枝杆菌的快速筛查方法。

### 背景技术

作为一种古老的传染病，结核病的疫情在全球呈上升趋势。据 WHO 估计，目前全世界约有 20 亿人感染结核杆菌，每年有 800 万新发病例和 300 万人的死亡。在我国，根据 2000 年第四次全国结核病调查估算，全国约有 5.5 亿结核病例，将近全国人口的一半。我国目前结核病的形式严峻，尽快建立先进的诊断技术和治疗措施，是一个紧迫的任务，不仅关系到千万人身心健康，也是关系到国民生计和国家经济发展的重要问题。

当前各医院及医疗机构在结核病的临床检验中使用的方法为：抗酸染色（荧光染色）、胸透、PCR、酶联免疫和培养法等。抗酸染色是当前检验肺结核的标准方法，但该方法灵敏度偏低，往往因为人为因素造成漏检；胸透的特异性不强；PCR 虽然灵敏度高特异性强，但其对操作人员及环境要求较高，一般的基层医疗机构难以开展；酶联免疫法是最近几年才发展起来的新方法，但目前还没有一个公认的好的标示物，造成各生产厂家的试剂盒存在这样或那样的缺点；培养法虽然是当前公认的检查结核分枝杆菌的金标准，但由于结核分枝杆菌生长缓慢，需一个月的时间，严重影响了患者的及时治疗。

### 发明内容

本发明的目的在于提供一种检测方便且准确率高的结核分枝杆菌的快速筛查方法。

为实现上述目的，本发明可采取下述技术方案：

本发明所述的结核分枝杆菌的快速筛查方法，包括下述步骤：

第一步：标本液化

取病人痰标本和液化处理试剂按 1:2-4 的比例混合，使标本完全液化；

### 第二步：标本的富集和纯化

取结核分枝杆菌的特异抗体包被在磁性微珠上，形成包被有鼠抗结核分枝杆菌特异性膜抗体的免疫磁珠，然后将其加入到第一步经过液化处理的病人标本中，充分搅动使其完全结合在免疫磁珠上；收集上述免疫磁珠，用冲洗液冲洗后，得到处理好的待测磁珠；

### 第三步：发泡实验

将第二步处理好的待测磁珠用磷酸盐缓冲液稀释混匀，平分为两部分备用：将其中一部分加入到发泡试剂中缓慢混合均匀，3 分钟后观察，如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则直接将标本判为结核阴性；如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡产生，则将另一部分置于 68 度水浴中处理后，再将其加入到发泡试剂中缓慢混合均匀，3 分钟后观察，如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡则可将标本判为结核阴性；如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则可将标本判为结核阳性。

所述的液化处理试剂为重量比为 1-5%的碱 (NaOH) 和 0.5-5%N-乙酰-L-半胱氨酸的混合液。

所述的冲洗液为 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液和 0.5-1%吐温-20 的混合液。

所述的发泡试剂为 1-5%过氧化氢和 0.5-5%吐温-80 的混合液。

本发明的优点在于采用纳米免疫磁性微珠分离纯化标本中的结核分枝杆菌，用冲洗液冲洗磁珠去除杂菌，用快速发泡试剂对经过磁珠处理的标本进行发泡检测，整个检测过程简单、易掌握，结果准确，可以明显提高结核病痰检的阳性率，将临床检验人员从繁重的镜鉴工作中解放出来，保证了结核病人的及时治疗。

### 具体实施方式

本发明所述的结核分枝杆菌的快速筛查方法，包括下述步骤：

#### 第一步：标本液化

取病人痰标本和重量比为 2% NaOH 和 0.5% N-乙酰-L-半胱氨酸的混合液（液

化处理试剂)按 1:3 的比例混合处理 10 分钟左右,使标本完全液化;

### 第二步:标本的富集和纯化

取结核分枝杆菌的特异抗体抗 LAM、抗 mpt64 或抗 TBGL 等多克隆抗体包被在磁性微珠上,形成包被有鼠抗结核分枝杆菌特异性膜抗体的纳米免疫磁珠,然后将 10-100ug 的纳米免疫磁珠加入到第一步经过完全液化处理的病人标本中,充分搅动使其完全结合在纳米免疫磁珠上;收集上述纳米免疫磁珠,用 pH 值 7.4 磷酸盐缓冲液和 0.5%吐温-20 混合液(磁珠冲洗液)冲洗三遍后,得到处理好的吸附有结核分枝杆菌的磁珠;

### 第三步:发泡实验

将第二步处理好的待测磁珠加入磷酸盐缓冲液 1ml 稀释混匀,平分为两部分备用:从其中一部分中取 100 微升加入到 2%氢氧化氢和 0.5%吐温-80 混合液 3ml 中缓慢混合均匀,3 分钟后观察,如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则直接将标本判为结核阴性,即痰标本中不含结核分枝杆菌;如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡产生,则将另一部分置于 68 度水浴中处理 20 分钟,从中取出 100 微升加入到 3ml 上述快速发泡试剂中缓慢混合均匀,3 分钟后观察,如果发泡试剂管壁周围有小的均匀气泡则可将标本判为结核阴性,即痰标本中不含结核分枝杆菌;如果发泡试剂管壁周围没有小的均匀气泡则可将标本判为结核阳性,即痰标本中含有结核分枝杆菌。

专利名称(译)	结核分枝杆菌的快速筛查方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101487842A</a>	公开(公告)日	2009-07-22
申请号	CN200910064063.2	申请日	2009-01-13
[标]申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	郑州安图绿科生物工程有限公司		
[标]发明人	娄斌 安维 付光宇 胡英会 苗拥军 仝娟子 张文星 吴学炜		
发明人	娄斌 安维 付光宇 胡英会 苗拥军 仝娟子 张文星 吴学炜		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
代理人(译)	韩华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种结核分枝杆菌的快速筛查方法，包括下述步骤：第一步：标本液化，取病人痰标本加入液化处理试剂使其完全液化；第二步：标本的富集和纯化，取结核分枝杆菌的特异抗体包被在磁性微珠上，然后将其加入到经过液化处理的病人标本中，充分搅动使其完全结合在免疫磁珠上，用冲洗液冲洗后，得到处理好的待测磁珠；第三步：发泡实验，将待测磁珠用磷酸盐缓冲液稀释混匀，进行发泡试验，如果标本在室温下不产生气泡，则标本即为结核阴性；如果标本在室温下产生气泡而经过68度20分钟处理后经发泡试验产生气泡则标本也为阴性，不产生气泡则标本为结核分枝杆菌阳性。整个检测过程简单、易掌握，准确率高，保证了结核病人的及时治疗。