



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107144694 A

(43)申请公布日 2017.09.08

(21)申请号 201710197679.1

G01N 33/68(2006.01)

(22)申请日 2017.03.29

G01N 21/64(2006.01)

(71)申请人 武汉海吉力生物科技有限公司

G01N 21/76(2006.01)

地址 430206 湖北省武汉市东湖技术开发区  
高新大道858号生物医药园二期  
A82-1栋

G01N 33/52(2006.01)

(72)发明人 张诗冉 丁晓莉 路春桃 黄俊  
赵平锋

(74)专利代理机构 北京汇泽知识产权代理有限公司  
11228

代理人 张瑾

(51)Int.Cl.

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页  
序列表7页

(54)发明名称

用于检测结核感染T细胞的抗原、试剂盒及应用

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测结核感染T细胞的抗原,该抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26所示,任取SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的八条多肽,协同ESAT-6和CFP-10多肽及衍生物共同作用,特异性刺激结核分枝杆菌感染的T细胞能特异性的分泌IFN- $\gamma$ ,增加检测的灵敏度。本发明提供了一种新的可用于结核感染T细胞的检测试剂盒,使用该试剂盒,直接对外周血进行抗原刺激,无需分离外周血单个核细胞,检测具有较高的灵敏度和特异性,且操作简便,检测成本较低,具有较高的临床应用价值。

1. 一种用于检测结核感染T细胞的抗原组合物,其特征在于,该抗原组合物包括ESAT-6、CFP-10和含有氨基酸序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中所示的任八条多肽或任八条以上多肽的组合。

2. 如权利要求1所述的抗原组合物,其特征在于,所述的八条多肽或任八条以上多肽的组合采用与所述SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中任一所示序列具有85%同源性的多肽,或用ESAT-6-CFP-10替换所述ESAT-6、CFP-10。

3. 如权利要求2所述的抗原组合物,其特征在于,所述ESAT-6的氨基酸序列如SEQ ID NO.27所示,所述CFP-10的氨基酸序列如SEQ ID NO.28所示,所述ESAT-6-CFP-10的氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示。

4. 一种用于检测结核感染T细胞的试剂盒,其特征在于,包括如权利要求1-3任一所述的抗原组合物和检测 $\gamma$ -干扰素的试剂。

5. 如权利要求4所述的试剂盒,其特征在于,所述检测 $\gamma$ -干扰素的试剂包括酶联免疫检测试剂、化学发光法检测试剂、免疫荧光检测试剂。

6. 如权利要求4所述试剂盒的应用,其特征在于,用于检测T细胞经过所述的抗原组合物刺激后分泌的细胞因子,所述细胞因子为 $\gamma$ -干扰素。

7. 如权利要求6所述试剂盒的应用,其特征在于,所述淋巴细胞来源于外周血、脑脊液、胸水或腹水。

8. 如权利要求6所述试剂盒的应用,其特征在于,所述抗原组合物中所述ESAT-6和CFP-10或所述ESAT-6-CFP-10的终浓度为4~200 $\mu$ g/mL,所述多肽的终浓度为40~1000 $\mu$ g/mL。

9. 如权利要求6所述试剂盒的应用,其特征在于,所述检测 $\gamma$ -干扰素的试剂还包括用磷酸盐缓冲液作阴性对照,其检测结果记为N;用所述抗原组合物作为体外刺激物,其检测结果记为T;用外源凝集素和牛血清白蛋白作阳性对照,其检测结果记为P。

10. 如权利要求9所述试剂盒的应用,其特征在于,对于所述 $\gamma$ -干扰素的含量,检测结果 $T-N \geq 0.15 \sim 0.5 \text{ IU/mL}$ ,判断感染结核分枝杆菌;检测结果 $T-N < 0.15 \sim 0.5 \text{ IU/mL}$ ,判断未感染结核分枝杆菌。

## 用于检测结核感染T细胞的抗原、试剂盒及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,具体而言,涉及用于检测结核感染T细胞的抗原、试剂盒及应用。

### 背景技术

[0002] 结核病是主要经呼吸道传播的、严重危害我国和全世界的重要传染病之一。据世界卫生组织,全世界有17-20亿的结核分枝杆菌感染者,每年至少200万人死于本病[谢建平,结核分枝杆菌功能基因组研究的方法学,微生物通报.2001.28(5):92-97]。因此,准确筛检感染者的方法在结核病的防治甚至最终的消灭中扮演极其重要的作用。

[0003] 现有的诊断技术对结核分枝杆菌感染者的诊断非常难。近几十年来,临床上采用结核菌素试验(TST)来诊断结核分枝杆菌感染者。但TST活性成份是纯蛋白衍生物(purified protein derivative of tuberculin, PPD),是结核分枝杆菌培养上清液的粗提物,含有200多种成分,与卡介苗(Bacillus Calmette-Guerin, BCG)接种和环境分枝杆菌感染存在交叉反应。TST检测结果可被现在临床广泛使用的疫苗—卡介苗免疫所干扰[P.Andersen, et al. Lancet 356 (2000) 1099-1104]。从1921年及明卡介苗到现在为止,全世界已有35亿人接种卡介苗。因此TST对感染者的诊断价值受到很大的影响,导致TST诊断的准确性较低,因此无法根据其结果判断是否真正存在结核分枝杆菌感染。

[0004] 对结核病病人的诊断技术中,痰涂片抗酸染色或痰菌培养,培养困难,耗时较长;肺部x射线检查肺部病理改变,也仅在具有典型的临床症状后才能诊断;其他血清学诊断方法和分子诊断方法缺乏特异性,假阳性率较高。有关研究人员指出,不同诊断性检查方法的敏感性和特异性如下:分枝杆菌培养(分别为73%和100%);PCR(分别为42%和100%);胸部X线(分别为67%~77%和66%~76%);结核菌素试验(分别为94%和20%);血清学(分别为33%和87%)。由此可见,现有的结核分枝杆菌检测方法的敏感性和特异性无法同时达到最优。

[0005] 结核分枝杆菌感染人体后,首先会被人体的免疫系统识别,激活机体的T细胞免疫应答,分泌产生 $\gamma$ 干扰素( $\text{IFN-}\gamma$ ),后者发挥抗结核感染作用。部分T细胞转化为免疫记忆细胞,当再次与结核分枝杆菌相遇后,会再次分泌产生 $\text{IFN-}\gamma$ ,发挥抗结核感染作用。抗原特异的 $\text{IFN-}\gamma$ 产生量与机体是否感染或发病密切相关。因此,如果采用结核分枝杆菌特异的抗原在体外刺激感染者和患者的T细胞,可诱导这些T细胞产生高水平的结核分枝杆菌特异的 $\text{IFN-}\gamma$ ,而非结核分枝杆菌感染者或非结核病患者产生的 $\text{IFN-}\gamma$ 的量与未用抗原刺激产生的量相近,从而实现诊断的目的。由此可见,寻找并发现结核分枝杆菌特异性抗原,对发展新一代的诊断试剂具有重要价值和意义。

[0006] 1996年,Stover等通过减数杂交的方法确定了BCG在体外传代过程中丢失的域,定义为缺失区(Region of Difference, RD),RD区域存在于结核分枝杆菌中,而在BCG和大多数环境分枝杆菌中缺失[程渝,李茂全.结核分枝杆菌的实验室诊断进展.国外医学临床生物化学和检验学分册.2002;23(6):342-343.]。其中,RD1区域编码的早期分抗原靶6KD

(early secreting antigen target 6KD, ESAT-6) 和培养滤液蛋白10KD (c $\mu$ Ltufiltrate protein 10KD, CFP-10) 是两种小分子量分泌蛋白, 它们是T细胞最主要的抗原之一, 可以诱导较强的细胞免疫反应。

[0007] 对于儿童或者免疫低下样本, 有文献报道, 仅以ESAT-6和CFP-10或其多肽作为刺激原, 其灵敏度约为73.5%–88.9%孙琳, ELISPOT检测技术在儿童结核病诊断中的应用, 标记免疫分析与临床. 2008. 6: 349–353; 钟华清, 干扰素- $\gamma$  释放试验在儿童结核感染中的应用价值, 检验医学. 2016. 3: 176–179; 李海, 应用酶联免疫斑点法快速诊断儿童结核分枝杆菌感染的研究, 中国妇幼保健, 2012. 11: 1703–1706]。对于一些特殊样本, 如儿童、免疫低下及新近感染样本, ESAT-6和CFP-10多肽及衍生物试剂盒结核分枝杆菌样本检出依然不高, 不能满足临床需求。

## 发明内容

[0008] 针对现有检测方法对于一些特殊样本, 如儿童、免疫低下及新近感染结核分枝杆菌样本的检出不足, 本发明的目的在于提供一种用于检测结核分枝杆菌感染T细胞的抗原组合物, 该抗原组合物协同ESAT-6和CFP-10多肽及衍生物共同作用, 特异性刺激结核分枝杆菌感染的新鲜全血, 能特异性的分泌IFN- $\gamma$ , 增加检测灵敏度, 有效提高检出率, 有效避免漏检。

[0009] 一种用于检测结核感染T细胞的抗原组合物, 该抗原组合物包括ESAT-6、CFP-10和含有氨基酸序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中所示的任八条多肽或任八条以上多肽的组合。

[0010] 如上所述的抗原组合物, 优选地, 所述的八条多肽或任八条以上多肽的组合采用与所述SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中任一所示序列具有85%同源性的多肽, 或用ESAT-6–CFP-10替换所述ESAT-6、CFP-10。

[0011] 如上所述的抗原组合物, 优选地, 所述ESAT-6的氨基酸序列如SEQ ID NO.27所示, 所述CFP-10的氨基酸序列如SEQ ID NO.28所示, 所述ESAT-6–CFP-10的氨基酸序列如SEQ ID NO.29所示。

[0012] 如上所述的抗原组合物, 优选地, 所述多肽是人工合成的或是天然分离的。

[0013] 一种用于检测结核感染T细胞的试剂盒, 包括如上所述的抗原组合物和检测 $\gamma$ -干扰素的试剂。

[0014] 如上所述的试剂盒, 优选地, 所述检测 $\gamma$ -干扰素的试剂包括酶联免疫吸附试剂、化学发光法检测试剂、免疫荧光检测试剂。

[0015] 如上所述试剂盒的应用, 用于检测T细胞经过如上所述的抗原组合物刺激后分泌的细胞因子, 所述细胞因子为 $\gamma$ -干扰素。

[0016] 如上所述试剂盒的应用, 优选地, 所述T细胞来源于外周血、脑脊液、胸水或腹水。

[0017] 如上所述试剂盒的应用, 优选地, 所述抗原组合物中所述ESAT-6和CFP-10或所述ESAT-6–CFP-10的终浓度为4~200 $\mu$ g/mL, 所述多肽的终浓度为40~1000 $\mu$ g/mL。

[0018] 如上所述试剂盒的应用, 优选地, 所述检测 $\gamma$ -干扰素的试剂还包括用磷酸盐缓冲液作阴性对照, 其检测结果记为N; 用所述抗原组合物作为体外刺激物, 其检测结果记为T; 用外源凝集素和牛血清白蛋白作阳性对照, 其检测结果记为P。

[0019] 如上所述试剂盒的应用,优选地,对于所述 $\gamma$ -干扰素的含量,检测结果 $T-N \geq 0.15 \sim 0.5 \text{ IU/mL}$ ,判断感染结核分枝杆菌;检测结果 $T-N < 0.15 \sim 0.5 \text{ IU/mL}$ ,判断未感染结核分枝杆菌。

[0020] 本发明提供的用于检测结核T细胞的抗原及试剂盒,具有以下特点:

[0021] (1) 对于免疫低下样本阳性检出率高,灵敏度高。针对现有检测方法对于一些特殊样本,如儿童、免疫低下及新近感染样本或潜伏感染者的检出不足,本发明提供用于敏感性和特异性高的结核分枝杆菌感染的抗原多肽组合,该多肽组合合并ESAT-6和CFP-10可实现对结核病病人或早期感染者或潜伏感染者(未出现结核病病症)的快速、特异的检测,在阻断结核病的传播和流行,以及对结核病的控制具有重大意义。采用本发明的多肽组合结合ESAT-6和CFP-10进行新鲜全血样本刺激,具有良好的诊断符合率。

[0022] (2) 检测用时短,操作方便,诊断快速。与传统结核分枝杆菌检测相比,利用本发明提供的多肽组合物合并IFN- $\gamma$ 的特异性抗原蛋白检测用时短,诊断快速。传统结核分枝杆菌培养诊断需时间1-2月,TST检测需要3天,本发明全部检测时间在1-2天内可完成。

[0023] (3) 对结核分枝杆菌感染能进行早期检测。由于结核分枝杆菌一旦感染人体,首先就被机体的免疫系统所识别,激活体液和细胞免疫应答,发病时间在感染后1-2个月,因此,利用本发明提供的多肽池合并全血IFN- $\gamma$ 的特异性抗原蛋白的细胞免疫学检测方法即可快速做出诊断,诊断出样本是否感染结核分枝感染。而现有的技术中,X光片诊断只有在感染者肺部出现明显的病理改变后才可做出诊断,这通常需要很长的时间。抗原抗体检测也只有在疾病症状处于活动期的情况下检测,但环境中分枝杆菌广泛存在,其与结核分枝杆菌的共同抗原,可干扰实验的诊断结果。可见,本发明对结核分枝杆菌新近感染或免疫低下者的早期检测有重要意义,对结核病的控制和消灭具有积极的意义。

[0024] 本发明还提供了一种用于结核分枝杆菌感染检测的方法,实验证明,本发明可直接利用外周血进行抗原刺激,无需分离外周血单个核细胞,实验数据表明本发明用于结核分枝杆菌感染检测具有较高的灵敏度和特异性,有效避免假阴性,且操作简便,检测成本较低,具有较高的临床应用价值。

## 具体实施方式

[0025] 本发明的具体原理:机体感染结核分枝杆菌后,血液中所形成的“记忆性”T淋巴细胞,其会在再次接触结核分枝杆菌的特异性抗原时,产生和分泌相应的细胞因子( $\gamma$ -干扰素)。通过对 $\gamma$ -干扰素的定量检测,可以判断是否存在针对结核分枝杆菌特异性的T淋巴细胞免疫反应。

[0026] 根据这个原理,选取存在于结核分枝杆菌,但在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的ESAT-6、CFP-10及特异性多肽,应用基因工程技术将ESAT-6和CFP-10融合表达,和特异性多肽片段共同成为检测试剂盒中应用的结核分枝杆菌特异性刺激抗原,与新鲜采取的淋巴细胞充分混合后孵育,收集血浆,应用双抗体夹心酶联免疫法原理检测淋巴细胞中 $\gamma$ -干扰素的浓度,计算样品中 $\gamma$ -干扰素的浓度,从而判断是否感染结核分枝杆菌。本发明提供的特异性多肽,合并ESAT-6和CFP-10组成试剂盒的特异性刺激部分,可以提高对一些特殊样本,如儿童、免疫低下及新近感染样本的检出率。其中,淋巴细胞来源于外周血、脑脊液、胸水或腹水,本发明以肝素抗凝全血为例来说明本发明。

[0027] 以下结合实施例对本发明作进一步说明,但是本发明的保护范围并不限于这些实施例。凡是不背离本发明构思的改变或等同替代均包括在本发明的保护范围之内。下列实施例中未注明具体条件的实验方法是按常规实验方法;试验试剂如无特别说明均为市售购买产品。以下所用的市售试剂盒为武汉海吉力生物科技有限公司的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒(酶联免疫法);本发明所涉及的结核感染样本为志愿者病例的筛选标准为:根据卫生部发布的《肺结核诊断标准》国家标准(WS288-2008),临床表现症状、体征及胸部影像学检查诊断为肺结核的患者,其中细菌学阳性或阴性结核病患者是指临床诊断为结核病的患者中,经细菌学检查(痰涂片抗酸染色显微镜检查和/或罗氏固体培养基细菌固体培养)阳性或阴性的结核病患者;以及肺外结核(如骨结核、肾结核、肠结核、淋巴结核等)患者。健康样本为健康志愿者,其筛选标准为:无结核临床症状、无其他疾病或感染。

[0028] 实施例1多肽刺激有效性筛选

[0029] 为了实现本发明的目的,本发明筛选的多肽为致病结核分枝杆菌的特异性蛋白质来自:Ag85B、Mpt64、RV1985C、RV1989c、Rv3425,筛选这些蛋白质中能针对淋巴细胞的结合位点的多肽,筛选的多肽均能特异性刺激结核分枝杆菌感染的病人新鲜全血特异性的分泌 $\gamma$ -干扰素(IFN- $\gamma$ )。通过反复的临床验证实验,这些多肽合并ESAT-6和CFP-10能提高检测灵敏度,该合并刺激剂可特异性作用于结核分枝杆菌感染样本的全血中的淋巴细胞表位,通过检测全血中释放的细胞因子IFN- $\gamma$ ,从而间接地反应机体是否感染过结核分枝杆菌。发明人通过大量试验研究,最终获得核苷酸序列如SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26所示的特异性多肽片段,任取其中的八种多肽与ESAT-6和CFP-10或ESAT-6-CFP-10结合使用,配制成刺激剂溶液,用于刺激新鲜全血,检测刺激后全血中的 $\gamma$ -干扰素,可判断全血是否感染结核分枝杆菌。

[0030] 本发明的多肽片段,其氨基酸序列如下所示,这些多肽片段可通过人工合成的或是天然分离,本实施例及以下实施例中用的多肽是通过人工合成的,其中,SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.6来自Ag85B、SEQ ID NO.7~SEQ ID NO.10来自Mpt64、SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.16来自RV1985C、SEQ ID NO.17~SEQ ID NO.21来自RV1989c、SEQ ID NO.22~SEQ ID NO.26来自Rv3425。

[0031] SEQ ID NO.1:RLWVYCGNGTPNEL

[0032] SEQ ID NO.2:LMIGTAAAVVLPGL

[0033] SEQ ID NO.3:VQFQSGGNNSPAVY

[0034] SEQ ID NO.4:MPVGGQSSFYSDWY

[0035] SEQ ID NO.5:SAAILGSMAGSSAM

[0036] SEQ ID NO.6:PAFEWYYQSGLSIV

[0037] SEQ ID NO.7:YQSAIPPRGTQAVV

[0038] SEQ ID NO.8:IQMSDPAYNINISL

[0039] SEQ ID NO.9:KSLENYIAQTRDKF

[0040] SEQ ID NO.10:MLVTAVVLLCCSGV

[0041] SEQ ID NO.11:RKAFFRAITRPTHF

[0042] SEQ ID NO.12:MVDPLDGPQLAAL

[0043] SEQ ID NO.13:KLDSPHIIARITDTV

[0044] SEQ ID NO.14:RLAAQTALLESEAL  
[0045] SEQ ID NO.15:ITIAVNADSMATWF  
[0046] SEQ ID NO.16:REKPCRATTAGIPL  
[0047] SEQ ID NO.17:LLFPAIYLADSAQA  
[0048] SEQ ID NO.18:AVLDLTTPQAREAV  
[0049] SEQ ID NO.19:KMLEAAYRLHTIDV  
[0050] SEQ ID NO.20:TAYEQRTRPGQLQL  
[0051] SEQ ID NO.21:GRWNPLLFPAILYL  
[0052] SEQ ID NO.22:RELAYSVETTAESL  
[0053] SEQ ID NO.23:VSWTRSALSDDLPRW  
[0054] SEQ ID NO.24:LSDLPRWREPPQIY  
[0055] SEQ ID NO.25:SLFFASGQLRELAY  
[0056] SEQ ID NO.26:ALSDLPRWREPPQI。

[0057] 需要说明的是,与上述序列具有85%同源性的多肽均可实现本发明的目的。且用ESAT-6-CFP-10替换ESAT-6、CFP-10的检测效果相同。

[0058] 本发明所用的ESAT-6序列为SEQ ID NO.27:  
MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLD EGKQSLTKLAAAWGGSGSEA  
YQGVQQKWDATATELNNALQNLARTISEAGQAMASTE GNV TGMFA;CFP-10序列为SEQ ID NO.28:  
MAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAVVR FQEAANKQKQELDEISTNIR  
QAGVQYSRAD EEQQQALSSQM GF;ESAT-6-CFP-10序列为SEQ ID NO.29:  
MTEQQWNFAGIEAAASAIQGNVTSIHSLLD EGKQSLTKLAAAWGGSGSEA YQGVQQKWDATATELNNALQNLARTIS  
EAGQAMASTE GNV TGMFANVAMAEMKTDAATLAQEAGNFERISGDLKTQIDQVESTAGSLQGQWRGAAGTAAQAAVVR  
FQEAANKQKQELDEISTNIRQAGVQYSRAD EEQQQALSSQM GF。

[0059] 实施例2检测试剂盒制备

[0060] 用于检测结核感染的T细胞的试剂盒,包括如上实施例1中所述的抗原组合物和检测 $\gamma$ -干扰素的试剂,其中,检测 $\gamma$ -干扰素的试剂包括酶联免疫检测试剂、化学发光法检测试剂、免疫荧光检测试剂。下面具体介绍这几种试剂盒:

[0061] 一种体外释放酶联免疫法检测机体是否感染结核分枝杆菌的检测试剂盒,该试剂盒以实施例1中的ESAT-6和CFP-10或ESAT-6-CFP-10分别与SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的任意八条多肽或八条以上的组合为结核分枝杆菌特异性刺激抗原,(即ESAT-6和CFP-10与实施例1中SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的特异性多肽,或ESAT-6-CFP-10与实施例1中SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的特异性多肽作为结核分枝杆菌特异性刺激抗原),与新鲜采取的肝素抗凝全血充分混合后孵育,收集血浆,应用双抗体夹心酶联免疫法原理检测人血浆中 $\gamma$ -干扰素的浓度,计算样品中 $\gamma$ -干扰素的浓度,从而判断是否感染结核分枝杆菌,首先,采集全血,分装于刺激培养管中(刺激部分(阴性对照培养管(N)、结核刺激培养管(T)、阳性对照培养管(P)),培养之后,用检测部分检测 $\gamma$ 干扰素含量。其由以下成分组成:刺激部分包括:阴性对照培养管(N):浓度为20mM的磷酸盐缓冲液、结核刺激培养管(T):终浓度为4~200 $\mu$ g/mL的ESAT-6-CFP-10融合抗原或ESAT-6和CFP-10分别与浓度为40~1000 $\mu$ g/mL的实施例1中所述的SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26任意八条多肽、阳性对照培养管(P)

为浓度为0.5mg/mL~5mg/mL的外源凝集素,10%的牛血清白蛋白;检测部分包被酶标板、 $\gamma$ -干扰素校准品、校准品稀释液、酶标试剂、浓缩洗涤液、显色剂A液、显色剂B液和终止液,其中,酶标板包被有抗人 $\gamma$ -干扰素抗体、 $\gamma$ -干扰素校准品含有重组人 $\gamma$ -干扰素和牛血清白蛋白、校准品稀释液为浓度为加有酪蛋白(钠)的磷酸盐缓冲液、酶标试剂为辣根过氧化物标记的抗人 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体和牛血清、浓缩洗涤液(20倍比):为含有吐温-20的磷酸盐缓冲液、显色剂A液为过氧化氢、显色剂B液为四甲基联苯胺盐酸,终止液为10%硫酸。

[0062] 一种体外释放化学发光法检测机体是否感染结核分枝杆菌的试剂盒,本试剂盒以ESAT-6-CFP-10或ESAT-6和CFP-10分别与实施例1中的特异性多肽为结核分枝杆菌特异性刺激抗原,与新鲜采取的肝素抗凝全血充分混合后孵育,收集血浆,应用双抗体夹心免疫法原理检测人血浆中 $\gamma$ -干扰素的浓度,计算样品中 $\gamma$ -干扰素的浓度,从而判断是否感染结核分枝杆菌,首先采集全血,分装于刺激培养管中(刺激部分(阴性对照培养管(N)、结核刺激培养管(T)、阳性对照培养管(P)),进行培养,之后用检测部分检测 $\gamma$ 干扰素含量。其由以下成分组成:刺激部分:阴性对照培养管(N)中为浓度为20mM的磷酸盐缓冲液、结核刺激培养管(T)为终浓度为4~200 $\mu$ g/mL ESAT-6-CFP-10融合抗原或ESAT-6和CFP-10分别与浓度为40~1000 $\mu$ g/mL的实施例1中SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的任意八条多肽,和浓度为20mg/mL~100mg/mL的人血白蛋白、阳性对照培养管(P)为0.5mg/mL~5mg/mL的外源凝集素,10%的牛血清白蛋白;检测部分包被发光板、 $\gamma$ -干扰素校准品、校准品稀释液、酶标试剂、浓缩洗涤液、发光剂A液和发光剂B液,其中,发光板为可拆卸微孔板条发光板包被有抗人 $\gamma$ -干扰素抗体, $\gamma$ -干扰素校准品为含有重组人 $\gamma$ -干扰素和牛血清白蛋白,校准品稀释液为含有酪蛋白(钠)的磷酸盐缓冲液、酶标试剂为辣根过氧化物标记的抗人 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体和牛血清、浓缩洗涤液(20倍)含有吐温20的磷酸盐缓冲液、发光剂A液为过氧化脲和发光剂B液为鲁米诺。

[0063] 一种体外释放免疫荧光法检测机体是否感染结核分枝杆菌的检测试剂盒,本试剂盒以ESAT-6和CFP-10或ESAT-6-CFP-10分别与SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26中的特异性多肽为结核分枝杆菌特异性刺激抗原,与新鲜采取的肝素抗凝全血充分混合后孵育,收集血浆,应用双抗体夹心免疫法原理检测人血浆中 $\gamma$ -干扰素的浓度,计算样品中 $\gamma$ -干扰素的浓度,从而判断是否感染结核分枝杆菌,首先采集全血,分装于刺激培养管中(刺激部分(阴性对照培养管(N)、结核刺激培养管(T)、阳性对照培养管(P)),培养之后用检测部分检测 $\gamma$ 干扰素含量。其由以下成分组成:刺激部分(阴性对照培养管(N):浓度为20mM的磷酸盐缓冲液、结核刺激培养管(T):终浓度为4~200 $\mu$ g/mL的ESAT-6-CFP-10融合抗原或ESAT-6和CFP-10分别与40~1000 $\mu$ g/mL的实施例1中SEQ ID NO.1~SEQ ID NO.26任意八条多肽、阳性对照培养管(P)为浓度为0.5mg/mL~5mg/mL的外源凝集素,10%的牛血清白蛋白,检测部分包括:测试卡、荧光免疫试剂、ID芯片,其中,测试卡的T线包被有抗人 $\gamma$ -干扰素抗体,C线包被羊抗兔抗体;荧光免疫试剂为荧光微球标记的抗人 $\gamma$ -干扰素单克隆抗体,兔IgG抗体,含有酪蛋白(钠)的Tris-HCl缓冲液保存。

[0064] 实施例3用本发明试剂盒对体外全血检测的检测方法

[0065] 采用实施例2中制备的试剂盒进行检测,先进行体外全血刺激:在检测前,要确保恒温培养箱37 $^{\circ}$ C,将阴性对照培养管(N)、结核刺激培养管(T)、阳性对照培养管(P)进行3000~5000转/分钟离心1分钟,分别在3种培养管上做好标记,可加上样本编号或姓名。然

后打开生物安全柜的紫外灯,照射15~20分钟。

[0066] 1、采集:采用静脉穿刺术,使用肝素锂抗凝的真空采血管采集全血标本,采集量不低于4mL。

[0067] 2、分装:将采集全血样本的采血管颠倒混匀5~10次,按1mL/管顺序分装于“N”、“T”、“P”管中。

[0068] 3、培养:将培养管轻柔颠倒混匀5~10次,迅速放入37℃恒温培养箱培养16~24小时,培养过程中保持培养管直立。

[0069] 4、离心:将培养后的培养管于3000~5000转/分钟离心2分钟,取血浆于EP管中(注意不可吸到细胞层),做好标记,为待检血浆样品,血浆可于4℃条件保存一周,-20℃可保存一年。采用三种检测试剂盒时,刺激部分相同。

[0070] 下面分别介绍三种试剂盒检测部分的使用:

[0071] (一).体外释放酶联免疫法

[0072] 使用前,请将试剂盒平衡至室温(约30分钟)。将液体试剂轻轻振荡混合,使用后立即密封,放回2~8℃保存。未用完的微孔板条须盖上封板膜与干燥剂一起用自封袋密封,试剂盒开封后于2~8℃保存不超过1个月。复溶后的 $\gamma$ -干扰素校准品稀释为各浓度后可于2~8℃保存不超过1个月。

[0073] 1、标准曲线的准备

[0074]  $\gamma$ -干扰素校准品工作液的配制:根据标签上标示的体积,向装有 $\gamma$ -干扰素校准品(冻干粉)的西林瓶中加入对应的校准品稀释液,混匀,配制成80IU/mL的 $\gamma$ -干扰素校准品工作液。应注意:溶解不同批次 $\gamma$ -干扰素校准品所需加入校准品稀释液的体积可能不同。

[0075] 取6个1.5mLEP管,分别标记为SD1、SD2、SD3、SD4、SD5和SD6,SD1管中加入900 $\mu$ L校准品稀释液(酶联),SD2~SD6每管加入300 $\mu$ L校准品稀释液(酶联)。

[0076] 取100 $\mu$ L的80IU/mL的干扰素校准品工作液(西林瓶中),加入到900 $\mu$ L的SD1中,震荡混匀,得到8IU/mL工作液。

[0077] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD1,加入到300 $\mu$ L的SD2中,震荡混匀,得到4IU/mL工作液。

[0078] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD2,加入到300 $\mu$ L的SD3中,震荡混匀,得到2IU/mL工作液。

[0079] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD3,加入到300 $\mu$ L的SD4中,震荡混匀,得到1IU/mL工作液。

[0080] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD4,加入到300 $\mu$ L的SD5中,震荡混匀,得到0.5IU/mL工作液。

[0081] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD5,加入到300 $\mu$ L的SD6中,震荡混匀,得到0.25IU/mL工作液。

[0082] 2、1 $\times$ 洗涤液的制备:将20mL的浓缩洗涤液(20倍)加入装有380mL的纯水的烧杯中,混匀,备用。

[0083] 3、加样

[0084] (1)标准曲线:各取50 $\mu$ L的SD1、SD2、SD3、SD4、SD5和SD6,按顺序加入板孔中,平行做两孔。

[0085] (2)样品:每孔加入50 $\mu$ L待检血浆样品,轻微震荡混匀。注意:血浆样品在温育前需要混合均匀,以保证 $\gamma$ -干扰素在包被板孔内均匀分布。

[0086] (3) 每孔加入酶标试剂50 $\mu$ L。

[0087] 4、温育:轻轻混合均匀,于37℃的恒温培养箱中温育2小时。

[0088] 5、洗涤:甩掉孔内的液体,每孔加入300 $\mu$ L的1 $\times$ 洗涤液洗涤,拍干,重复5次。

[0089] 6、显色:每孔加入显色剂A、B液各50 $\mu$ L,轻轻振荡混匀;或者每孔加入100 $\mu$ L显色剂混合液(显色剂混合液临用前配制,取等体积的显色剂A液与显色剂B液混合均匀)。

[0090] 7、温育:于37℃的恒温培养箱中避光温育15分钟。

[0091] 8、终止:每孔加入50 $\mu$ L终止液。

[0092] (二). 体外释放化学发光法

[0093] 使用前,将试剂盒平衡至室温(约30分钟)。将液体试剂轻轻振荡混合,使用后立即密封,放回2~8℃保存。复溶后的 $\gamma$ -干扰素校准品稀释为各浓度后可于2~8℃保存不超过1个月。

[0094] 1、标准曲线的准备

[0095]  $\gamma$ -干扰素校准品工作液的配制:根据标签上标示的体积,向装有 $\gamma$ -干扰素校准品(冻干粉)的西林瓶中加入校准品稀释液(发光),混匀,配制成80IU/mL的 $\gamma$ -干扰素校准品工作液。

[0096] 取6个1.5mLEP管,分别标记为SD1、SD2、SD3、SD4、SD5和SD6,SD1管中加入900 $\mu$ L校准品稀释液(发光),SD2~SD6每管加入300 $\mu$ L校准品稀释液(发光)。

[0097] 取100 $\mu$ L的80IU/mL的干扰素校准品工作液(西林瓶中),加入到900 $\mu$ L的SD1中,震荡混匀,得到8IU/mL工作液。

[0098] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD1,加入到300 $\mu$ L的SD2中,震荡混匀,得到4IU/mL工作液。

[0099] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD2,加入到300 $\mu$ L的SD3中,震荡混匀,得到2IU/mL工作液。

[0100] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD3,加入到300 $\mu$ L的SD4中,震荡混匀,得到1IU/mL工作液。

[0101] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD4,加入到300 $\mu$ L的SD5中,震荡混匀,得到0.5IU/mL工作液。

[0102] 更换新吸头,取300 $\mu$ L的SD5,加入到300 $\mu$ L的SD6中,震荡混匀,得到0.25IU/mL工作液。

[0103] 2、1 $\times$ 洗涤液的制备:将20mL的浓缩洗涤液(20倍)加入装有380mL的纯水的烧杯中,混匀,备用。

[0104] 3、加样

[0105] (1) 样品:每孔加入50 $\mu$ L待检血浆样品,轻微震荡混匀。注意:血浆样品在温育前需要混合均匀,以保证 $\gamma$ -干扰素在发光板孔内均匀分布。

[0106] (2) 标准曲线:各取50 $\mu$ L的SD1、SD2、SD3、SD4、SD5和SD6,按顺序加入板孔中,平行做两孔。空白对照1孔(加校准品稀释液(发光) 50 $\mu$ L)。

[0107] (3) 每孔加入酶标试剂50 $\mu$ L。

[0108] 4、温育:轻轻混合均匀,于37℃的恒温培养箱中温育1小时。

[0109] 5、洗涤:甩掉孔内的液体,每孔加入300 $\mu$ L的1 $\times$ 洗涤液洗涤,使用洗板机洗涤6次,最后一次拍干。

[0110] 6、发光:每孔加入100 $\mu$ L发光剂混合液。

[0111] 7、温育:避光于室温或37℃的恒温培养箱中反应5分钟。

[0112] 8、测定：在10分钟内用化学发光免疫分析仪读取发光值(RLU)。

[0113] (三). 体外释放免疫荧光法

[0114] 1、取出所需测试卡和荧光免疫试剂，将荧光免疫试剂10 $\mu$ L/管分装到EP管中，平衡至室温(约30分钟)。

[0115] 2、检查/插入ID芯片到仪器中，读取数据，确保试剂盒与ID芯片批号相匹配。

[0116] 3、分别取每例样本“N”、“T”、“P”血浆100 $\mu$ L，加入到分装好的荧光免疫试剂中，做好标记，混合均匀，为待测样本。

[0117] 4、取100 $\mu$ L混合均匀的待检样本加入到测试卡的加样孔中，每个样本需点三张测试卡，分别是“N”、“T”、“P”刺激血浆。

[0118] 5、测试卡于室温水平放置25~30分钟，将测试卡插入到荧光免疫分析仪的样本卡槽中，按键开始扫描。确保测试卡方向正确并使其完全插入。

[0119] 6、从荧光免疫分析仪的显示屏幕上读取数据或者直接打印结果。

[0120] 对由结核感染样本50例，其中65岁年龄及以上样本20例，健康样本20例，采集的全血样本。采用本发明的试剂盒与市售试剂盒进行检测。市售试剂盒为武汉海吉力生物科技有限公司的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒(酶联免疫法)。其中结核刺激培养管中采用分别用：刺激剂1(ESAT-6和CFP-10浓度各为10 $\mu$ g/mL，混合8条多肽(SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.18，各100 $\mu$ g/mL)、刺激剂2(ESAT-6和CFP-10浓度各为3 $\mu$ g/mL，混合8条多肽(SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.18，浓度各为100 $\mu$ g/mL)、市售试剂盒刺激剂分别与全血样本混合均匀后于37 $^{\circ}$ C烘箱20 $\pm$ 4小时，6000rpm离心1min，取上清分别用上述检测方法进行检测。

[0121] 根据统计学软件选择刺激剂1的阳性判断值：当检测结果T-N $\geq$ 0.25IU/mL，可判断感染结核分枝杆菌，检测结果T-N<0.25IU/mL，可判断未感染结核分枝杆菌

[0122] 根据统计学软件选择刺激剂2的阳性判断值：当检测结果T-N $\geq$ 0.5IU/mL，可判断是感染结核分枝杆菌，检测结果T-N<0.5IU/mL，可判断未感染结核分枝杆菌。

[0123] 对50例阳性样本和20例健康的未感染的阴性样本的检测结果显示如表1、2、3所示。

[0124] 表1. 体外释放酶联免疫法检测结果

[0125]

|      | 刺激剂1         | 刺激剂2         | 市售试剂盒        |
|------|--------------|--------------|--------------|
| 阳性样本 | 48/50 (96%)  | 48/50 (96%)  | 45/50 (90%)  |
| 阴性样本 | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) |

[0126] 表2. 体外释放化学发光法检测结果

[0127]

|      | 刺激剂1         | 刺激剂2         | 市售试剂盒        |
|------|--------------|--------------|--------------|
| 阳性样本 | 48/50 (96%)  | 48/50 (96%)  | 45/50 (90%)  |
| 阴性样本 | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) |

[0128] 表3. 体外释放免疫荧光法检测结果

[0129]

|      | 刺激剂1        | 刺激剂2        | 市售试剂盒       |
|------|-------------|-------------|-------------|
| 阳性样本 | 49/50 (98%) | 49/50 (98%) | 45/50 (90%) |

|      |              |              |              |
|------|--------------|--------------|--------------|
| 阴性样本 | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) | 20/20 (100%) |
|------|--------------|--------------|--------------|

[0130] 检测结果说明本发明制备的试剂盒,随ESAT-6和CFP-10刺激剂浓度的增加,其T刺激值会有所增加,因此结果判断值有一定的变化,故参考值会存在一定范围,所以,检测结果 $T-N \geq 0.15 \sim 0.5 IU/mL$ ,判断为感染结核分枝杆菌;检测结果 $T-N < 0.15 \sim 0.5 IU/mL$ ,判断为未感染结核分枝杆菌。本发明制备的试剂盒灵敏度比现有技术的检测市售试剂盒的灵敏度高。

[0131] 实施例4特异性多肽合并ESAT-6和CFP-10刺激效果

[0132] 对实施例1中多肽的不同组合进行检测,均获得较好的检测效果,下面例举对实施例1中的多肽不同组合检测的几种情况,来说明检测效果。

[0133] 配制结核刺激剂3~6(下面浓度均为终浓度):

[0134] 结核刺激剂3配方为ESAT-6和CFP-10各 $10 \mu g/mL$ ,多肽SEQ ID NO.1~8各 $100 \mu g/mL$ ;结核刺激剂4配方为ESAT-6和CFP-10各 $10 \mu g/mL$ ,多肽SEQ ID NO.6~13各 $100 \mu g/mL$ ;结核刺激剂5配方为ESAT-6和CFP-10各 $10 \mu g/mL$ ,多肽SEQ ID NO.11~18各 $100 \mu g/mL$ ;结核刺激剂6配方为ESAT-6和CFP-10各 $10 \mu g/mL$ ,多肽SEQ ID NO.19~26各 $100 \mu g/mL$ 。

[0135] 取20例样本,结核感染样本10例,健康样本10例,其中年龄65岁以上12例,男12例,女8例,采用上述配方配置的结核刺激剂3~6,进行实施例3中所述方法的检测。同时对20例样本,采用市售试剂盒进行检测,检测结果如表4、5、6所示。市售试剂盒为武汉海吉力生物科技有限公司的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒(酶联免疫法)。

[0136] 表4.特异性多肽合并ESAT-6和CFP-10酶联免疫法检测结果

[0137]

|             | 刺激剂 3 | 刺激剂 4 | 刺激剂 5 | 刺激剂 6 | 市售试剂盒 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 9     | 9     | 10    | 9     | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10    | 10    | 10    | 10    | 10    |

[0138] 表5.特异性多肽合并ESAT-6和CFP-10化学发光法检测结果

[0139]

|             | 刺激剂 3 | 刺激剂 4 | 刺激剂 5 | 刺激剂 6 | 市售试剂盒 |
|-------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 10    | 9     | 9     | 9     | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10    | 10    | 10    | 10    | 10    |

[0140] 表6.特异性多肽合并ESAT-6和CFP-10免疫荧光法检测结果

[0141]

|  | 刺激剂 3 | 刺激剂 4 | 刺激剂 5 | 刺激剂 6 | 市售试剂盒 |
|--|-------|-------|-------|-------|-------|
|--|-------|-------|-------|-------|-------|

[0142]

|             |    |    |    |    |    |
|-------------|----|----|----|----|----|
| 10 阳性样本检出例数 | 10 | 9  | 9  | 10 | 8  |
| 10 阴性样本检出例数 | 10 | 10 | 10 | 10 | 10 |

[0143] 检测结果说明本发明的检测方法及试剂盒,灵敏度比现有技术的检测市售试剂盒的灵敏度高。

[0144] 实施例5特异性多肽合并ESAT-6-CFP-10刺激效果

[0145] 本实施例中采用的是ESAT-6-CFP-10和特异性多肽SEQ ID NO.1~26中任8条及以上的组合,来说明检测效果。具体地:

[0146] 配制结核刺激剂7~10(下面的浓度为终浓度):

[0147] 结核刺激剂7配方为ESAT-6-CFP-10,10 $\mu$ g/mL,多肽SEQ ID NO.1~8各100 $\mu$ g/mL;结核刺激剂8配方为ESAT-6-CFP-10,10 $\mu$ g/mL,多肽SEQ ID NO.6~13各100 $\mu$ g/mL;结核刺激剂9配方为ESAT-6-CFP-10,10 $\mu$ g/mL,多肽SEQ ID NO.11~18各100 $\mu$ g/mL;结核刺激剂10配方为ESAT-6-CFP-10,10 $\mu$ g/mL,多肽SEQ ID NO.19~26各100 $\mu$ g/mL。

[0148] 取20例样本,结核感染样本10例,健康样本10例,其中年龄65岁以上11例,男12例,女8例,采用上述配方配置的结核刺激剂7~10,进行实施例3中所述方法的检测。同时对20例样本,采用市售试剂盒进行检测,检测结果如表7、8、9所示。用 $\gamma$ 干扰素检测试剂盒(酶联免疫法)检测做对照。

[0149] 表7.混合多肽合并ESAT-6-CFP-10酶联免疫法检测结果

[0150]

|             | 刺激剂 7 | 刺激剂 8 | 刺激剂 9 | 刺激剂 10 | 市售试剂盒 |
|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 9     | 9     | 10    | 10     | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10    | 10    | 10    | 10     | 10    |

[0151] 表8.混合多肽合并ESAT-6-CFP-10化学发光法检测结果

[0152]

|             | 刺激剂 7 | 刺激剂 8 | 刺激剂 9 | 刺激剂 10 | 市售试剂盒 |
|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 10    | 9     | 9     | 9      | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10    | 10    | 10    | 10     | 10    |

[0153] 表9.混合多肽合并ESAT-6-CFP-10免疫荧光法检测结果

[0154]

|             | 刺激剂 7 | 刺激剂 8 | 刺激剂 9 | 刺激剂 10 | 市售试剂盒 |
|-------------|-------|-------|-------|--------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 10    | 9     | 10    | 10     | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10    | 10    | 10    | 10     | 10    |

[0155] 检测结果说明本发明的检测方法及试剂盒,灵敏度比现有技术的检测市售试剂盒的灵敏度高。

[0156] 实施例6合并混合多肽检测灵敏度和特异性

[0157] 样本:结核感染样本20例,结核阴性样本20例。

[0158] 采集全血样本,分别用刺激剂11 (ESAT-6 (10 $\mu$ g/mL) 和CFP-10 (10 $\mu$ g/mL) +混合多肽 (SEQ ID NO.6~SEQ ID NO.13))、刺激剂12 (ESAT-6-CFP-10+混合多肽 (SEQ ID NO.6~SEQ ID NO.13))、刺激剂13 (ESAT-6 (10 $\mu$ g/mL) 和CFP-10 (10 $\mu$ g/mL))、刺激剂14 (ESAT-6-CFP-10 (10 $\mu$ g/mL)) 和刺激剂15 (市售试剂盒) 各20 $\mu$ L于无菌培养管中,每管加入1mL新鲜采集全血刺激,按实施例3中所述的方法进行检测,市售试剂盒按其说明书进行操作。检测结果见表10、11、12。

[0159] 表10.合并混合多肽灵敏度和特异性酶联免疫法检测结果

[0160]

|                                    | 20 例阳性样本<br>检出例数 | 灵敏度 | 20 例阴性样本<br>检出例数 | 特异性  |
|------------------------------------|------------------|-----|------------------|------|
| 刺激剂 11 (ESAT-6 和<br>CFP-10+混合多肽)   | 19               | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 12<br>(ESAT-6-CFP-10+混合多<br>肽) | 19               | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 13 (ESAT-6 和<br>CFP-10)        | 17               | 85% | 20               | 100% |
| 刺激剂 14<br>(ESAT-6-CFP-10)          | 18               | 90% | 20               | 100% |
| 刺激剂 15 (市售试剂盒)                     | 17               | 85% | 20               | 100% |

[0161] 表11.合并混合多肽灵敏度和特异性化学发光法检测结果

[0162]

|                                    | 20 例阳性样本<br>检出例数 | 灵敏度 | 20 例阴性样本<br>检出例数 | 特异性  |
|------------------------------------|------------------|-----|------------------|------|
| 刺激剂 11 (ESAT-6 和<br>CFP-10+混合多肽)   | 19               | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 12<br>(ESAT-6-CFP-10+混合多<br>肽) | 19               | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 13 (ESAT-6 和<br>CFP-10)        | 17               | 85% | 20               | 100% |
| 刺激剂 14<br>(ESAT-6-CFP-10)          | 17               | 85% | 20               | 100% |
| 刺激剂 15 (市售试剂盒)                     | 17               | 85% | 20               | 100% |

[0163] 表12. 合并混合多肽灵敏度和特异性免疫荧光法检测结果

[0164]

|                                    | 20 例阳性<br>样本检出例<br>数 | 灵敏度 | 20 例阴性样本<br>检出例数 | 特异性  |
|------------------------------------|----------------------|-----|------------------|------|
| 刺激剂 11 (ESAT-6 和<br>CFP-10+混合多肽)   | 19                   | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 12<br>(ESAT-6-CFP-10+混合多<br>肽) | 19                   | 95% | 20               | 100% |
| 刺激剂 13 (ESAT-6 和<br>CFP-10)        | 18                   | 90% | 20               | 100% |
| 刺激剂 14(ESAT-6-CFP-10)              | 18                   | 90% | 20               | 100% |
| 刺激剂 15 (市售试剂盒)                     | 17                   | 85% | 20               | 100% |

[0165] 上述检测结果说明本发明制备的试剂盒用于检测结核分枝杆菌感染的全血,其检测灵敏度可达95%,灵敏度和特异性较强,有效避免现有技术检测的假阴性和漏检。

[0166] 实施例7本发明的试剂盒灵敏度和特异性检测

[0167] 样本:结核感染样本100例,其中65岁年龄及以上样本21例,6岁以下年龄样本数18例,HIV样本51例,男56例,女44例。结核阴性样本50例,其中65岁年龄及以上样本20例,6岁以下年龄样本数7例,HIV样本23例,男26例,女24例。

[0168] 采集全血样本,分别用刺激剂(ESAT-6和CFP-10+混合多肽(SEQ ID NO.11~SEQ ID NO.18,各100 $\mu$ g/mL)、市售试剂盒刺激,混合均匀后于37 $^{\circ}$ C烘箱20 $\pm$ 4小时,混合血液后,6000rpm离心1min,取上清分别用实施例2制备的体外释放酶联免疫法的检测试剂盒、体外

释放化学发光法的检测试剂盒)和体外释放免疫荧光法的检测试剂盒按照实施例3中的方法进行检测,,市售试剂盒按其说明书进行操作。检测结果见表13~18。

[0169] 表13.结核感染样本酶联免疫法检测结果

[0170]

|              |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|--------------|-----|-------|-------|
| 结核阳性样本 100 例 | 老年人 | 20/21 | 19/21 |
|              | 儿童  | 17/18 | 14/18 |
|              | HIV | 49/51 | 46/51 |
|              | 其它  | 10/10 | 10/10 |
| 灵敏度          |     | 96%   | 89%   |

[0171] 表14.健康样本酶联免疫法检测结果统计

[0172]

|             |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|-------------|-----|-------|-------|
| 结核阴性样本 50 例 | 老年人 | 19/20 | 19/20 |
|             | 儿童  | 7/7   | 7/7   |
|             | HIV | 22/23 | 21/23 |
| 特异性         |     | 96%   | 94%   |

[0173] 表15.结核感染样本化学发光法检测结果统计

[0174]

|              |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|--------------|-----|-------|-------|
| 结核阳性样本 100 例 | 老年人 | 20/21 | 19/21 |
|              | 儿童  | 18/18 | 14/18 |
|              | HIV | 49/51 | 46/51 |
|              | 其它  | 10/10 | 10/10 |
| 灵敏度          |     | 97%   | 89%   |

[0175] 表16健康样本化学发光法检测结果统计

[0176]

|             |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|-------------|-----|-------|-------|
| 结核阴性样本 50 例 | 老年人 | 19/20 | 19/20 |
|             | 儿童  | 7/7   | 7/7   |
|             | HIV | 22/23 | 21/23 |
| 特异性         |     | 96%   | 94%   |

[0177] 表17结核感染样本免疫荧光法检测结果统计

[0178]

|              |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|--------------|-----|-------|-------|
| 结核阳性样本 100 例 | 老年人 | 20/21 | 19/21 |
|              | 儿童  | 18/18 | 14/18 |
|              | HIV | 50/51 | 46/51 |
|              | 其它  | 10/10 | 10/10 |
| 灵敏度          |     | 98%   | 89%   |

[0179] 表18健康样本免疫荧光法检测结果统计

[0180]

|             |     | 刺激剂   | 市售试剂盒 |
|-------------|-----|-------|-------|
| 结核阴性样本 50 例 | 老年人 | 19/20 | 19/20 |
|             | 儿童  | 7/7   | 7/7   |
|             | HIV | 21/23 | 21/23 |
|             |     |       |       |
| 特异性         |     | 94%   | 94%   |

[0181] 上述结果表明本发明的试剂盒对儿童、免疫低下及新近感染结核分枝杆菌样本的检出率较高,灵敏度和特异性较强,有效避免现有技术检测的假阴性和漏检。本发明对结核分枝杆菌新近感染或免疫低下者的早期检测有重要意义,对结核病的控制和消灭具有积极的意义。

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 武汉海吉力生物科技有限公司

&lt;120&gt; 用于检测结核感染T细胞的抗原、试剂盒及应用

&lt;130&gt;

&lt;160&gt; 29

&lt;170&gt; PatentIn version 3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 1

Arg Leu Trp Val Tyr Cys Gly Asn Gly Thr Pro Asn Glu Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 2

Leu Met Ile Gly Thr Ala Ala Ala Val Val Leu Pro Gly Leu

1 5 10

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 3

Val Gln Phe Gln Ser Gly Gly Asn Asn Ser Pro Ala Val Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

&lt;400&gt; 4

Met Pro Val Gly Gly Gln Ser Ser Phe Tyr Ser Asp Trp Tyr

1 5 10

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 14

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工合成

<400> 5

Ser Ala Ala Ile Gly Leu Ser Met Ala Gly Ser Ser Ala Met

1 5 10

<210> 6

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 6

Pro Ala Phe Glu Trp Tyr Tyr Gln Ser Gly Leu Ser Ile Val

1 5 10

<210> 7

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 7

Tyr Gln Ser Ala Ile Pro Pro Arg Gly Thr Gln Ala Val Val

1 5 10

<210> 8

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 8

Ile Gln Met Ser Asp Pro Ala Tyr Asn Ile Asn Ile Ser Leu

1 5 10

<210> 9

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 9

Lys Ser Leu Glu Asn Tyr Ile Ala Gln Thr Arg Asp Lys Phe

1 5 10

<210> 10

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 10

Met Leu Val Thr Ala Val Val Leu Leu Cys Cys Ser Gly Val

1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 11

Arg Lys Ala Phe Arg Arg Ala Ile Thr Arg Pro Thr His Phe

1 5 10

<210> 12

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 12

Met Val Asp Pro Gln Leu Asp Gly Pro Gln Leu Ala Ala Leu

1 5 10

<210> 13

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 13

Lys Leu Asp Ser Pro Ile Ile Ala Arg Ile Thr Asp Thr Val

1 5 10

<210> 14

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 14

Arg Leu Ala Ala Gln Thr Ala Leu Leu Glu Ser Glu Ala Leu

1 5 10

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 15

Ile Thr Ile Ala Val Asn Ala Asp Ser Met Ala Thr Trp Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 16

Arg Glu Lys Pro Cys Arg Ala Thr Thr Ala Gly Ile Pro Leu  
1 5 10  
<210> 17  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工合成  
<400> 17  
Leu Leu Phe Pro Ala Ile Tyr Leu Ala Asp Ser Ala Gln Ala  
1 5 10  
<210> 18  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工合成  
<400> 18  
Ala Val Leu Asp Leu Thr Thr Pro Gln Ala Arg Glu Ala Val  
1 5 10  
<210> 19  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工合成  
<400> 19  
Lys Met Leu Glu Ala Ala Tyr Arg Leu His Thr Ile Asp Val  
1 5 10  
<210> 20  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工合成  
<400> 20  
Thr Ala Tyr Glu Gln Arg Thr Arg Pro Gly Gln Leu Gln Leu  
1 5 10  
<210> 21  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工合成  
<400> 21  
Gly Arg Trp Asn Pro Pro Leu Leu Phe Pro Ala Ile Tyr Leu  
1 5 10  
<210> 22  
<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 22

Arg Glu Leu Ala Tyr Ser Val Glu Thr Thr Ala Glu Ser Leu

1 5 10

<210> 23

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 23

Val Ser Trp Thr Arg Ser Ala Leu Ser Asp Leu Pro Arg Trp

1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 24

Leu Ser Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu Pro Pro Gln Ile Tyr

1 5 10

<210> 25

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 25

Ser Leu Phe Phe Ala Ser Gly Gln Leu Arg Glu Leu Ala Tyr

1 5 10

<210> 26

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工合成

<400> 26

Ala Leu Ser Asp Leu Pro Arg Trp Arg Glu Pro Pro Gln Ile

1 5 10

<210> 27

<211> 95

<212> PRT

<213> ESAT-6

<400> 27

Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser

|                                                                 |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |
| Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly |    |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |    |
| Lys Gln Ser Leu Thr Lys Leu Ala Ala Ala Trp Gly Gly Ser Gly Ser |    |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |    |
| Glu Ala Tyr Gln Gly Val Gln Gln Lys Trp Asp Ala Thr Ala Thr Glu |    |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |    |
| Leu Asn Asn Ala Leu Gln Asn Leu Ala Arg Thr Ile Ser Glu Ala Gly |    |    |    |
| 65                                                              | 70 | 75 | 80 |
| Gln Ala Met Ala Ser Thr Glu Gly Asn Val Thr Gly Met Phe Ala     |    |    |    |
| 85                                                              | 90 | 95 |    |

&lt;210&gt; 28

&lt;211&gt; 100

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; CFP-10

&lt;400&gt; 28

|                                                                 |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| Met Ala Glu Met Lys Thr Asp Ala Ala Thr Leu Ala Gln Glu Ala Gly |    |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |
| Asn Phe Glu Arg Ile Ser Gly Asp Leu Lys Thr Gln Ile Asp Gln Val |    |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |    |
| Glu Ser Thr Ala Gly Ser Leu Gln Gly Gln Trp Arg Gly Ala Ala Gly |    |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |    |
| Thr Ala Ala Gln Ala Ala Val Val Arg Phe Gln Glu Ala Ala Asn Lys |    |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |    |
| Gln Lys Gln Glu Leu Asp Glu Ile Ser Thr Asn Ile Arg Gln Ala Gly |    |    |    |
| 65                                                              | 70 | 75 | 80 |
| Val Gln Tyr Ser Arg Ala Asp Glu Glu Gln Gln Gln Ala Leu Ser Ser |    |    |    |
| 85                                                              | 90 | 95 |    |

Gln Met Gly Phe

100

&lt;210&gt; 29

&lt;211&gt; 198

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; ESAT-6-CFP-10

&lt;400&gt; 29

|                                                                 |    |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|----|
| Met Thr Glu Gln Gln Trp Asn Phe Ala Gly Ile Glu Ala Ala Ala Ser |    |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 | 15 |
| Ala Ile Gln Gly Asn Val Thr Ser Ile His Ser Leu Leu Asp Glu Gly |    |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |    |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Lys | Gln | Ser | Leu | Thr | Lys | Leu | Ala | Ala | Ala | Trp | Gly | Gly | Ser | Gly | Ser |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Glu | Ala | Tyr | Gln | Gly | Val | Gln | Gln | Lys | Trp | Asp | Ala | Thr | Ala | Thr | Glu |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Asn | Asn | Ala | Leu | Gln | Asn | Leu | Ala | Arg | Thr | Ile | Ser | Glu | Ala | Gly |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Gln | Ala | Met | Ala | Ser | Thr | Glu | Gly | Asn | Val | Thr | Gly | Met | Phe | Ala | Asn |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |
| Val | Ala | Met | Ala | Glu | Met | Lys | Thr | Asp | Ala | Ala | Thr | Leu | Ala | Gln | Glu |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Asn | Phe | Glu | Arg | Ile | Ser | Gly | Asp | Leu | Lys | Thr | Gln | Ile | Asp |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gln | Val | Glu | Ser | Thr | Ala | Gly | Ser | Leu | Gln | Gly | Gln | Trp | Arg | Gly | Ala |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Gly | Thr | Ala | Ala | Gln | Ala | Ala | Val | Val | Arg | Phe | Gln | Glu | Ala | Ala |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Asn | Lys | Gln | Lys | Gln | Glu | Leu | Asp | Glu | Ile | Ser | Thr | Asn | Ile | Arg | Gln |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |
| Ala | Gly | Val | Gln | Tyr | Ser | Arg | Ala | Asp | Glu | Glu | Gln | Gln | Gln | Ala | Leu |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Ser | Gln | Met | Gly | Phe |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| 195 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

|                |                                                                                                                                  |         |            |
|----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------|------------|
| 专利名称(译)        | 用于检测结核感染T细胞的抗原、试剂盒及应用                                                                                                            |         |            |
| 公开(公告)号        | <a href="#">CN107144694A</a>                                                                                                     | 公开(公告)日 | 2017-09-08 |
| 申请号            | CN201710197679.1                                                                                                                 | 申请日     | 2017-03-29 |
| [标]申请(专利权)人(译) | 武汉海吉力生物科技有限公司                                                                                                                    |         |            |
| 申请(专利权)人(译)    | 武汉海吉力生物科技有限公司                                                                                                                    |         |            |
| 当前申请(专利权)人(译)  | 武汉海吉力生物科技有限公司                                                                                                                    |         |            |
| [标]发明人         | 张诗冉<br>丁晓莉<br>路春桃<br>黄俊<br>赵平锋                                                                                                   |         |            |
| 发明人            | 张诗冉<br>丁晓莉<br>路春桃<br>黄俊<br>赵平锋                                                                                                   |         |            |
| IPC分类号         | G01N33/569 G01N33/577 G01N33/535 G01N33/68 G01N21/64 G01N21/76 G01N33/52                                                         |         |            |
| CPC分类号         | G01N21/6428 G01N21/763 G01N33/52 G01N33/535 G01N33/5695 G01N33/577 G01N33/6866 G01N2021/6439 G01N2333/35 G01N2333/57 G01N2800/12 |         |            |
| 代理人(译)         | 张瑾                                                                                                                               |         |            |
| 其他公开文献         | CN107144694B                                                                                                                     |         |            |
| 外部链接           | <a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>                                                                                   |         |            |

#### 摘要(译)

本发明公开了一种用于检测结核感染T细胞的抗原，该抗原的氨基酸序列如SEQ ID NO.1～SEQ ID NO.26所示，任取SEQ ID NO.1～SEQ ID NO.26中的八条多肽，协同ESAT-6和CFP-10多肽及衍生物共同作用，特异性刺激结核分枝杆菌感染的T细胞能特异性的分泌IFN- $\gamma$ ，增加检测的灵敏度。本发明提供了一种新的可用于结核感染T细胞的检测试剂盒，使用该试剂盒，直接对外周血进行抗原刺激，无需分离外周血单个核细胞，检测具有较高的灵敏度和特异性，且操作简便，检测成本较低，具有较高的临床应用价值。

|             | 刺激剂3 | 刺激剂4 | 刺激剂5 | 刺激剂6 | 市售试剂盒 |
|-------------|------|------|------|------|-------|
| 10 阳性样本检出例数 | 9    | 9    | 10   | 9    | 8     |
| 10 阴性样本检出例数 | 10   | 10   | 10   | 10   | 10    |