



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103424548 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 04

(21) 申请号 201310314711. 1

(22) 申请日 2013. 07. 20

(71) 申请人 天津中新科炬生物制药有限公司  
地址 300457 天津市开发区第 6 大街 65 号

(72) 发明人 李洲 杨发青 王朝南

(51) Int. Cl.

G01N 33/569 (2006. 01)

G01N 33/531 (2006. 01)

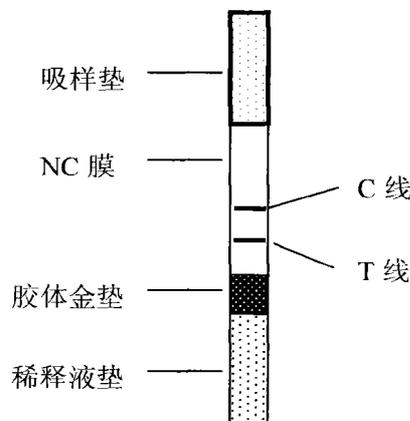
权利要求书1页 说明书4页 附图1页

## (54) 发明名称

一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法

## (57) 摘要

一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法,其特征在于检测卡由内部的结核分枝杆菌抗体检测试纸和外部的配套专用卡壳组成。试纸由含有胶体金标记的抗人 IgG 抗体或 SPA 的胶体金垫、包被有 TB38、TB16、Lam 三种结核特异性混合抗原 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。卡壳内部用来放置检测试纸,上盖的下部对应稀释液垫部分设置了稀释液孔;中间部分应对试纸 NC 膜中下部分设置了视窗口;中上部分应对试纸 NC 膜上部设置了样品孔。检测时在样品孔加入样本,样本从上至下层析,稀释液孔加入稀释液,使样本和胶体金由下至上层析。15 分钟完成检测。具有操作简便、快速、适合现场检测和经济实用等优点。



1. 一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡,其特征在於检测卡由内部的结核分枝杆菌(TB) 抗体检测试纸和外部的配套专用卡壳组成。

2. 根据权利要求1所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於试纸由含有胶体金标记的抗人IgG抗体或SPA的胶体金垫、包被有TB38、TB16、Lam三种结核特异性混合抗原(T线)和抗鼠IgG(C线)的NC膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。试纸的宽度为3-5mm,总长度为7-9cm。稀释液垫、胶体金垫、NC膜和吸样垫从塑料底板一端依次排列至另一端。稀释液垫长度2-2.5cm;胶体金垫长度为0.6-1cm;NC膜长度2-3cm,吸样垫长度为1.5-2.5cm。

3. 根据权利要求1所述的快速检测卡,其特征在於配套专用卡壳包含上盖和下盖两个部分,卡壳内部用来放置TB抗体检测试纸。卡壳上盖的下部对应稀释液垫部分设置了稀释液孔,用于滴加样本稀释液,卡壳上盖的中间部分应对试纸NC膜中下部分设置了视窗口,用于观察NC膜上的C、T线,判定结果。卡壳上盖的中上部分应对试纸NC膜上部设置了样品孔,用于加入检测样本。

4. 根据权利要求1和2所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於所述NC膜是一种由硝酸纤维素构成的多孔结构的膜,孔径为6-12 $\mu\text{m}$ 。稀释液垫为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

5. 根据权利要求1所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於抗原的包被方法为:以0.01M pH7.4磷酸盐缓冲液(PBS)将TB38、TB16和Lam混合抗原配制成合适的浓度,优选混合抗原浓度为TB38、TB16和Lam为0.5、0.3和0.1mg/ml,在喷膜仪在NC膜上以1.2-1.5 $\mu\text{l}/\text{cm}$ 的参数进行划线,包被T线,同时在NC膜上部包被1-2mg/ml的抗鼠IgG作为C线。干燥,备用。

6. 根据权利要求1和2所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於标记胶体金颗粒的方法为:取100ml胶体金液放在烧杯内,用0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>调至pH7.0-8.0,按100ml胶体金液加入1mg抗人IgG或SPA,室温搅拌1小时,封闭,12000rpm离心30分钟,弃上清,用工作液复溶至60ml,按每毫升溶液铺20cm<sup>2</sup>的比例分别均匀地铺在胶体金垫上,干燥备用。

7. 根据权利要求1所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於检测卡装配方法为:在相对湿度小于30%的条件下,取塑料底板,将已包被的NC膜粘贴在底板的中部,在NC膜T线一侧粘贴胶体金垫,在胶体金垫另一侧粘贴稀释液垫;在NC膜C线一侧粘贴吸样垫;各粘贴组分接口相互叠压1-2mm,粘贴好的大板切成3-5mm宽的试纸条。放置于卡壳下盖的槽中,然后盖上上盖,压紧,完成装配。

8. 根据权利要求1所述的TB抗体快速检测卡,其特征在於检测方法为:检测时将少量(3-10 $\mu\text{l}$ )被检样本如血清、血浆、全血、胸水、腹水或脑脊液等加入到对应NC膜加样孔中,样本将在NC膜上由上至下层析,经过NC膜的C、T线,然后在稀释液孔加入样品稀释液,稀释液将溶解胶体金,在NC膜上由下至上层析,推动样本回流,并在NC膜上形成免疫反应。在15分钟内根据C、T线的出现情况判定检测结果,实现对TB抗体的快速检测。

## 一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明专利是涉及医学临床诊断技术领域,特别是涉及一种以免疫胶体金快速检测方法制备的一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法。

### 背景技术

[0002] 结核病是由结核杆菌 (tubercle bacillus) 感染引起的慢性传染病。结核菌可能侵入人体全身各种器官,但主要侵犯肺脏,称为肺结核病 (pulmonary tuberculosis)。

[0003] 全球现有 6 亿人,感染有结核杆菌。大多数的受感染者没有病症,称为潜伏结核感染,但其中约 5-10% 的潜伏感染者会发展至活动性结核;若无适当治疗,一个活动病例平均每年可使 10 ~ 15 人新受感染,病例本人的死亡率则超过 50%。

[0004] 结核病目前的主要的检测或诊断方法有:

[0005] 1、痰结核菌检查:痰涂片检查或痰结核菌培养。是结核病诊断的确诊方法之一,检查简便易行,准确性较高,但这种方法诊断的阳性率很低,灵敏度在 40% 以下,若培养则需 6-8 周时间,诊断时间过长。

[0006] 2、结核病的影像学诊断:如胸部 X 射线和 CT 等。X 射线可以早期发现结核病,确定病灶的部位、性质、范围,了解发病情况及用于治疗效果的判断,胸部 CT 可以发现较小的或隐蔽部位的病变,可以弥补一般 X 线检查的不足。X 线检查对肺结核病的初筛、诊断等起重要辅助作用,但存在需要大型设备,费用较高,胸片存在 20% 左右的低读率和读过率。

[0007] 3、分子生物学技术诊断:主要指结核杆菌聚合酶链反应 (PCR) 方法,该方法的灵敏度很高,但存在较高的假阳性,特异性差,并且诊断费用较高。

[0008] 4、免疫学诊断:免疫学诊断有结核菌素纯蛋白衍化物 (PPD) 试验和抗体诊断等方法。PPD 试验较为传统的诊断方法之一,在临床上经常使用。该试验阳性是感染过结核菌的证据之一,不能很好的区分现症感染和既往感染。抗体诊断方法:检测血清中抗 TB 免疫球蛋白 (IgG) 抗体,该方法的灵敏度为 60% -80%,特异性为 90%。是结核临床诊断上常用的方法之一,抗体诊断试剂主要为 ELISA 试剂和免疫层析胶体金快速诊断试剂。

[0009] 免疫层析胶体金技术是新型的诊断技术,基本原理如下:利用胶体金标记一种抗原或抗体,在试剂的 NC 膜上包被相应的配对抗原或抗体,检测时当样品中含相应的特异性抗体或抗原时,胶体金标记颗粒和样品中配体相结合形成复合物,然后在 NC 膜上层析,再被包被抗原或抗体捕获,形成肉眼可见的检测 T 线,从而实现检测。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

[0010] 目前利用胶体金技术检测结核抗体的试剂已有部分报道。但本专利拟公开检测卡试剂在设计和检测方法上均和目前报道的不同。主要体现在 4 个方面:1) 检测卡的加样孔设置在检测卡的中上部;2) 采用了 TB16, TB38 和 Lam 三种抗原混合包被检测线,使得产品的性能提高。3) 加样孔设置在检测卡的中上部,利用 NC 膜分离血清,可以直接检测全血样本,无需作任何前处理。4) 加样孔设置在检测卡的中上部,实现了不同的反应原理,样本将先和抗 T 线上的抗原反应,样本中无关的 IgG 绝大部分会被稀释液洗涤,不和胶体金标记的

抗体反应,消除倒沟效应,这和所有从下部加样的试剂反应原理不同。

## 发明内容

[0011] 本发明目的是提供一种新型一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法,用来检测血清、血浆和全血样本中的 TB 抗体。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。发明内容如下:

[0012] 一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡,其特征在于检测卡由内部的结核分枝杆菌 (TB) 抗体检测试纸和外部的配套专用卡壳组成。

[0013] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于试纸由含有胶体金标记的抗人 IgG 抗体或 SPA 的胶体金垫、包被有 TB38、TB16、Lam 三种结核特异性混合抗原 (T 线) 和抗鼠 IgG (C 线) 的 NC 膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。试纸的宽度为 3-5mm,总长度为 7-9cm。稀释液垫、胶体金垫、NC 膜和吸样垫从塑料底板一端依次排列至另一端。稀释液垫长度 2-2.5cm;胶体金垫长度为 0.6-1cm;NC 膜长度 2-3cm,吸样垫长度为 1.5-2.5cm。

[0014] 所述的快速检测卡,其特征在于配套专用卡壳包含上盖和下盖两个部分,卡壳内部用来放置 TB 抗体检测试纸。卡壳上盖的下部对应稀释液垫部分设置了稀释液孔,用于滴加样本稀释液,卡壳上盖的中间部分应对试纸 NC 膜中下部分设置了视窗口,用于观察 NC 膜上的 C、T 线,判定结果。卡壳上盖的中上部分应对试纸 NC 膜上部设置了样品孔,用于加入检测样本。

[0015] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于所述 NC 膜是一种由硝酸纤维素构成的多孔结构的膜,孔径为 6-12 $\mu$ m。稀释液垫为玻璃纤维膜或无纺布,吸样垫为吸水滤纸。

[0016] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于抗原的包被方法为:以 0.01M pH7.4 磷酸盐缓冲液 (PBS) 将 TB38、TB16 和 Lam 混合抗原配制成合适的浓度,优选混合抗原浓度为 TB38、TB16 和 Lam 为 0.5、0.3 和 0.1mg/ml,在喷膜仪在 NC 膜上以 1.21.5 $\mu$ l/cm 的参数进行划线,包被 T 线,同时在 NC 膜上部包被 1-2mg/ml 的抗鼠 IgG 作为 C 线。干燥,备用。

[0017] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于标记胶体金颗粒的方法为:取 100ml 胶体金液放在烧杯内,用 0.2M K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 调至 pH7.0-8.0,按 100ml 胶体金液加入 1mg 抗人 IgG 或 SPA,室温搅拌 1 小时,封闭,12000rpm 离心 30 分钟,弃上清,用工作液复溶至 60ml,按每毫升溶液铺 20cm<sup>2</sup> 的比例分别均匀地铺在胶体金垫上,干燥备用。

[0018] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于检测卡装配方法为:在相对湿度小于 30% 的条件下,取塑料底板,将已包被的 NC 膜粘贴在底板的中部,在 NC 膜 T 线一侧粘贴胶体金垫,在胶体金垫另一侧粘贴稀释液垫;在 NC 膜 C 线一侧粘贴吸样垫;各粘贴组分接口相互叠压 1-2mm,粘贴好的大板切成 3-5mm 宽的试纸条。放置于卡壳下盖的槽中,然后盖上上盖,压紧,完成装配。

[0019] 所述的 TB 抗体快速检测卡,其特征在于检测方法为:检测时将少量 (3-10 $\mu$ l) 被检样本如血清、血浆、全血、胸水、腹水或脑脊液等加入到对应 NC 膜加样孔中,样本将在 NC 膜上由上至下层析,经过 NC 膜的 C、T 线,然后在稀释液孔加入样品稀释液,稀释液将溶解胶体金,在 NC 膜上由下至上层析,推动样本回流,并在 NC 膜上形成免疫反应。在 15 分钟内根据 C、T 线的出现情况判定检测结果,实现对 TB 抗体的快速检测。

[0020] 本发明的有益效果是:提供一种利用免疫胶体金技术制备一种结核分枝杆菌抗体

快速检测卡及其检测方法,适用于对人血清、血浆和全血或其它样本中 TB 抗体的检测,并适合临床上单人份检测。具有操作简便、反应快速、敏感性高、特异性强、适合现场检测和经济实用等优点。

#### 附图说明:

[0021] 图 1 是结核分枝杆菌抗体快速检测卡结构图

[0022] 图 2 是结核分枝杆菌抗体快速检测试纸结构图

#### 具体实施方式

[0023] 实施例:结核分枝杆菌抗体快速检测卡制备及检测

[0024] 1 主要材料

[0025] 1.1 TB 抗原 TB38、TB16 和 Lam 抗原,从有资质的供应商处购买;鼠抗人 IgG 抗体,羊抗鼠 IgG:自制;氯金酸:Sigma 公司产品;NC 膜:Millipore 公司产品;水解酪蛋白,聚乙二醇 PEG20000:Sigma 产品。其它常用试剂均为分析纯试剂。

[0026] 1.2 临床样本由公司在相关医院获得,共 200 份,其中阴性血清样本 50 份,血浆样本 20 份,全血样本 30 份,阳性血清样本 50 份,血浆样本 20 份,全血样本 30 份。

[0027] 1.3 卡壳、比色卡:由本公司设计,相关公司按要求生产、提供。

[0028] 2 方法

[0029] 2.1 鼠抗体 IgG 抗体胶体金标记采用氯金酸-柠檬酸三钠法制备直径为 30-40nm 的胶体金溶液,取三份胶体金溶液,分别用 0.2M  $K_2CO_3$  将溶液调到 pH7.0、pH7.5 和 pH8.0,然后将胶体金缓慢搅拌,按每 ml 溶液加入 5ug、10ug、20ug 将鼠抗人 IgG 抗体加入到胶体金溶液中,继续搅拌 30 分钟,再加入到终浓度为 0.5% 的 PEG2000 和 0.5% 的水解酪蛋白进行封闭,标记结束后以 10000rpm 离心,弃上清,沉淀按 50% 原体积复溶至不同配比的胶体金工作液中 (pH8.0, 含水解酪蛋白,羊血清,蔗糖和表面活性剂)。然后将标已胶体金溶液按 1ml 溶液铺 20cm<sup>2</sup> 的比例加样于无纺布上,在温度 20-25℃,相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 3-5 小时,制成胶体金垫。

[0030] 2.2 NC 膜包被用 0.01M pH7.4PBS 将 TB38、TB16 和 Lam 抗原配制成不同浓度及比例的混合物,羊抗鼠 IgG 分别稀释成 1mg/ml、2mg/ml,然后用喷膜仪在 NC 膜上按 1.2ul/cm 进行分别划线包被,包被完成后将 NC 膜在在温度 20-25℃,相对湿度在 < 30% 的干燥间干燥 3-5 小时。

[0031] 2.3 在相对湿度小于 30% 的条件下,取塑料底板,将已包被的 NC 膜粘贴在底板的中部,在 NC 膜 T 线一侧粘贴胶体金垫,在胶体金垫另一侧粘贴稀释液垫;在 NC 膜 C 线一侧粘贴吸样垫;各粘贴组分接口相互叠压 1-2mm,粘贴好的大板切成 3-5mm 宽的试纸条放置于卡壳下盖的槽中,然后盖上上盖,压紧,完成装配。

[0032] 2.4 检测卡工艺参数调试将浓度不同标记、包被的试剂进行组合配对,制备小样利用质控抗体对试剂进行测试,寻找最佳组合。

[0033] 2.5 检测方法将少量被检血清、血浆或全血样本 (3-10ul) 加入到对应 NC 膜加样孔中,样本将在 NC 膜上由上至下层析,经过 NC 膜的 C、T 线,然后在稀释液孔加入样品稀释液,稀释液将溶解胶体金,在 NC 膜上由下至上层析,推动样本回流,并在 NC 膜上形成免疫反

应。在 15 分钟内根据 C、T 线的出现情况判定检测结果，

[0034] 2.6 临床样本检测试剂制备完成后，按检测方法对所有临床样本进行检测，并分析检测结果。

[0035] 3 结果

[0036] 3.1 试纸参数确定根据小样的检测结果，确定了鼠抗人 IgG 的最佳标记 pH 值为 7.0-8.0；最佳标记量为 10ug/ml 胶体金溶液；最佳的胶体金工作液为 0.1M Tris 盐缓冲液，pH 8.0，含 0.5% 水解酪蛋白、5% 蔗糖，1% Tween20；最佳包抗原的浓度为 TB38、TB16 和 Lam 为 0.5、0.3 和 0.1mg/ml 的混合抗原。检测结果的最佳判定时间为 10-15 分钟。但以上参数在制备不同批次产品时因生物原料活性变化可能需要适当调整。

[0037] 3.2 临床样本检测对 100 份临床阴性样本进行检测，血清、血浆和全血检测的总符合率为 92.00% (84.79%~96.10%)，不同类型样本无明显差异；对 100 份临床阳性样本进行检测，血清、血浆和全血检测的总符合率为 79.00% (69.95%~85.90%)，不同类型样本无明显差异；一致性检验 Kappa 值为 0.71。根据文献资料，可以判定检测卡的性能良好，同时具有操作简便、反应快速、适合现场检测和经济实用等优点，适合用于个人自测或临床检测。

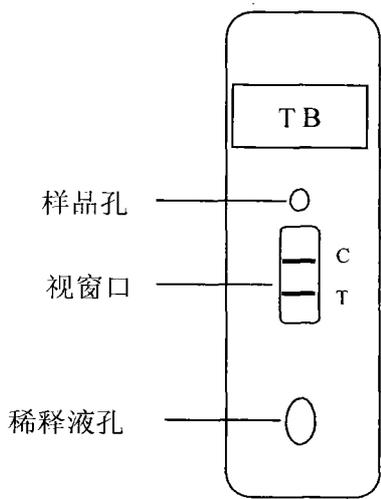


图 1

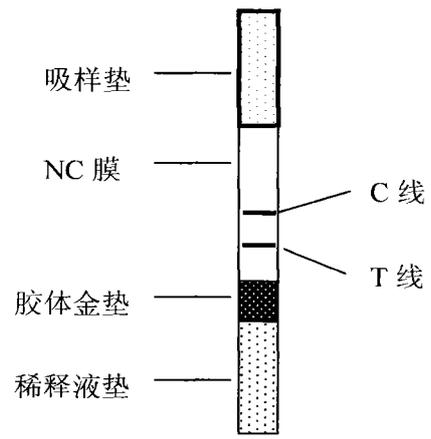


图 2

专利名称(译)	一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN103424548A</a>	公开(公告)日	2013-12-04
申请号	CN201310314711.1	申请日	2013-07-20
[标]申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	天津中新科炬生物制药有限公司		
[标]发明人	李洲 杨发青 王朝南		
发明人	李洲 杨发青 王朝南		
IPC分类号	G01N33/569 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

一种结核分枝杆菌抗体快速检测卡及其检测方法，其特征在于检测卡由内部的结核分枝杆菌抗体检测试纸和外部的配套专用卡壳组成。试纸由含有胶体金标记的抗人IgG抗体或SPA的胶体金垫、包被有TB38、TB16、Lam三种结核特异性混合抗原(T线)和抗鼠IgG(C线)的NC膜、样品垫、吸样垫和塑料底板组成。卡壳内部用来放置检测试纸，上盖的下部对应稀释液垫部分设置了稀释液孔；中间部分应对试纸NC膜中下部分设置了视窗口；中上部分应对试纸NC膜上部设置了样品孔。检测时在样品孔加入样本，样本从上至下层析，稀释液孔加入稀释液，使样本和胶体金由下至上层析。15分钟完成检测。具有操作简便、快速、适合现场检测和经济实用等优点。

