



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109374903 A

(43)申请公布日 2019.02.22

(21)申请号 201811167051.8

(22)申请日 2018.10.08

(71)申请人 杭州康知生物科技有限公司

地址 311100 浙江省杭州市余杭区余杭经济开发区新颜路22号201G

(72)发明人 张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童
李丹 吴滨

(74)专利代理机构 苏州中合知识产权代理事务所(普通合伙) 32266

代理人 龙涛

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

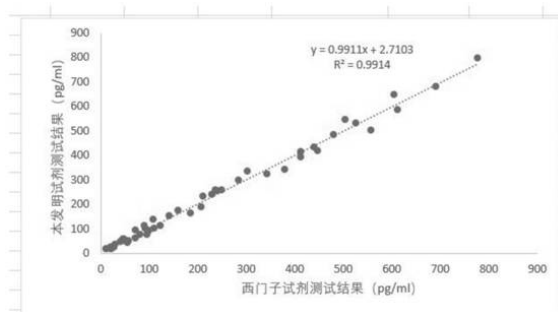
权利要求书1页 说明书14页 附图2页

(54)发明名称

一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法

(57)摘要

本发明涉及一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成,IL-6单克隆抗体溶液包含特定浓度的荧光微球,抗体与荧光微球通过生物素-亲和素偶联。本发明提供的测定方法,测定线性范围1.72~1000pg/mL,线性相关系数为0.997;灵敏度为1.72pg/ml;精密度平均CV<10%;准确度平均回收率为97.5%;干扰试验血红蛋白浓度低于181.82mg/mL,甘油三脂浓度低于18.18mg/mL,胆红素浓度低于181.82ug/mL时,测试结果偏差落在可接受范围;特异性交叉干扰试验证明不存干扰。该方法检测IL-6需时短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。



1. 一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液,其中IL-6单克隆抗体溶液中包含荧光微球标记的IL-6单克隆抗体。

2. 根据权利要求1所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜设置在样品垫和吸水垫之间,硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线。

3. 根据权利要求2所述的IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述T线上包被IL-6单抗,C线上包被羊抗鼠IgG,样本中的待测物质IL-6与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球形成免疫复合物,再与T线的IL-6捕获抗体结合,未与T线反应的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球最后与C线上的羊抗鼠IgG形成羊抗鼠IgG-IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球的免疫复合物。

4. 根据权利要求1所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述荧光微球分别是亲和素-时间分辨荧光微球、亲和素-量子点微球中的至少一种。

5. 根据权利要求1所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述IL-6单克隆抗体溶液包含荧光微球标记的IL-6单克隆抗体和特殊配制的微球保存液。

6. 根据权利要求1所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液制备方法包括以下步骤:

(1) 使用生物素标记IL-6抗体并洗去多余未标记的生物素,取亲和素-荧光微球稀释至0.1-1.0%,混匀后加入标记生物素的IL-6单抗中,混合均匀后室温反应10-30分钟;

(2) 加入0.5-2%BSA溶液,封闭反应0.5-2小时;

(3) 使用PBS缓冲液清洗,再加入荧光微球保存液重悬,即得到IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,置2-8℃保存。

7. 根据权利要求7所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:亲和素-荧光微球是亲和素-时间分辨荧光微球、亲和素-量子点微球中的至少一种。

8. 根据权利要求1所述的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,其特征在于:所述免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

(1) 采用三维点膜喷金仪,将IL-6单克隆抗体和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线T线和质控线C线,T线上包被IL-6单抗,C线上包被羊抗鼠IgG;

(2) 在干燥箱中干燥后,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装;

(3) 切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

9. 一种采用权利要求1-9中任一项所述的试剂盒进行超灵敏IL-6荧光免疫层析测定方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1) 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球稀释到工作浓度,用10mM的PBS缓冲液将IL-6标准品稀释形成系列梯度浓度的标准品,取标准品溶液,加入到层析试纸条的样本孔中,再加入荧光微球工作溶液,反应后,读取NC膜上T,C线信号并计算比值 $T/(T+C)$,将标准品溶液的浓度进行对数转换后与比值进行线性拟合,得到标准品拟合曲线;

(2) 将待测样本加入测试条的样本孔中,再加入荧光微球工作溶液,反应15分钟后,使用干式免疫荧光分析仪读取NC膜上T,C线荧光信号并计算比值 $T/(T+C)$,将比值代入到标准品拟合曲线,计算出样本中IL-6的浓度。

一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法

技术领域

[0001] 本发明属于医药领域,涉及一种IL-6荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法。

背景技术

[0002] IL-6是一种多功能的细胞因子,可由体内多种细胞分泌产生,具有调节免疫应答、造血功能及急性期相反应。

[0003] IL-6作为感染性疾病新的标志物,倍受临床关注和重视。当机体感染早期,IL-6率先升高,2小时达高峰,早于CRP和PCT,其升高水平与细菌感染严重程度密切相关。

[0004] IL-6测定还可用于感染性疾病的预后判断,当IL-6 $>1000\text{pg/mL}$ 时,提示预后不良;动态观察IL-6水平有助于了解感染性疾病的进展和患者对治疗的反应。

[0005] 血液中IL-6的含量很低(pg/mL),一般方法难于测定。目前常应用酶联免疫法、发光免疫法及荧光免疫层析法进行检测。酶联免疫法测定IL-6仅在科研中较常用;罗氏及西门子公司大型发光免疫分析仪有常规定量测定IL-6的项目,可为临床住院病人服务,但不适合门急诊及基层医院使用。

[0006] 专利申请号为CN105445466A的中国发明公开了一种白介素6的检测方法及其试剂盒,描述了一种用荧光胶乳微粒作探针测定IL-6的荧光免疫层析法,适合用于门急诊及基层医院,但该方法测定IL-6的灵敏度达不到要求,最低检测限仅为 50pg/mL ,而正常人参考值 $<7\text{pg/mL}$,容易造成漏检误诊,使临床推广应用遇到问题。

发明内容

[0007] 为了克服现有技术的不足,本发明提供一种IL-6荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法,达到超灵敏($\text{IL-6} \leq 2\text{pg/mL}$)测定目标,本发明购买优质IL-6抗原;筛选了高效价的IL-6单克隆抗体;采用了生物素-亲和素放大系统;研究摸索了检测标本的最佳用量和反应检测时间。应用时间分辨荧光微球和量子点荧光微球作标记探针,建立了超灵敏IL-6荧光免疫层析测定方法。经方法学实验,该法灵敏度 1.72pg/mL ;精密度平均 $\text{CV} < 10\%$;准确度平均回收率 97.1% ;测定线性范围 $1.72 \sim 1000\text{pg/mL}$;干扰样本中血红蛋白浓度低于 181.82mg/mL ,甘油三脂浓度低于 18.18mg/mL ,胆红素浓度低于 181.82ug/mL 时,干扰样本测试结果偏差低于可接受范围的 10% ;用浓度为 200pg/mL 的IL-2、IL-4、IL-8、IL-12的样本在IL-6测试条上进行测试,不存在特异性干扰;临床样本检测结果与西门子公司大型发光免疫分析仪测定结果基本一致($r=0.9914$),既保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点,又加入了灵敏度高、稳定性好、受自然荧光干扰低等优点,同时其配套使用的设备精巧,适合医院门诊、急诊检验科使用。可广泛应用于基层医院及大医院门、急诊检验科,可以超灵敏定量测定血液中IL-6的浓度,检测时间短,操作流程简单,无需大型仪器设备。

[0008] 本发明提供了如下的技术方案:

[0009] 一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒,包括免疫层析试纸条和荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液,其中IL-6单克隆抗体溶液中包括荧光微球标记的IL-6单克隆抗

体。

[0010] 优选的是,所述试纸条包括底板、样本垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,硝酸纤维素膜设置在样品垫和吸水垫之间,硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线。

[0011] 上述任一方案优选的是,所述T线上包被IL-6单抗,C线上包被羊抗鼠IgG,样本中的待测物质IL-6与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球形成免疫复合物,再与T线的IL-6捕获抗体结合,未与T线反应的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球最后与C线上的羊抗鼠IgG形成羊抗鼠IgG-IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球的免疫复合物。抗体与荧光微球通过生物素-亲和素偶联。

[0012] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球分别是亲和素-时间分辨荧光微球、亲和素-量子点荧光微球中的至少一种。这两种都可以作为标记探针偶联IL-6单克隆抗体,且检测效果相同。

[0013] 上述任一方案优选的是,所述T线上IL-6单克隆抗体包被浓度是0.5mg/ml, C线上羊抗鼠IgG包被浓度为1.0mg/ml。

[0014] 上述任一方案优选的是,IL-6单克隆抗体溶液包含荧光微球标记的IL-6单克隆抗体和特殊配制的微球保存液。荧光微球在微球保存液中可以长时间(>1年) 保存且处于工作状态。

[0015] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球标记的IL-6单克隆抗体浓度范围是 0.1-1.0mol/L。

[0016] 上述任一方案优选的是,所述荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液制备方法包括以下步骤:

[0017] (1) 使用生物素标记IL-6抗体并洗去多余未标记的生物素,取亲和素-荧光微球稀释至0.1-1.0%,混匀后加入标记生物素的IL-6单抗中,混合均匀后室温反应10-30分钟;

[0018] (2) 加入0.5-2%BSA溶液,封闭反应0.5-2小时;

[0019] (3) 使用PBS缓冲液清洗,再加入荧光微球保存液重悬,即得到IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,置2-8℃保存。

[0020] 上述任一方案优选的是,亲和素-荧光微球是亲和素-时间分辨荧光微球、亲和素-量子点微球中的至少一种。

[0021] 上述任一方案优选的是,所述免疫层析试纸条的制备方法包括以下步骤:

[0022] (1) 采用三维点膜喷金仪,将IL-6单克隆抗体和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线T线和质控线C线,T线上包被IL-6单抗,C 线上包被羊抗鼠IgG;

[0023] (2) 在干燥箱中干燥后,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装;

[0024] (3) 切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

[0025] 本发明还提供一种采用上述的试剂盒进行IL-6荧光免疫层析测定方法,包括以下步骤:

[0026] (1) 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球稀释到工作浓度,用10mM的 PBS缓冲液将IL-6标准品稀释形成系列梯度浓度的标准品,取标准品溶液,加入到层析试纸条的样本孔中,再加入荧光微球工作溶液,反应后,读取NC膜上 T,C线荧光信号并计算比值 $T/(T+C)$,将标准品溶液的浓度进行对数转换后与比值进行线性拟合,得到标准品拟合曲线;

[0027] (2) 将待测样本加入测试条的样本孔中,再加入荧光微球工作溶液,反应 15分钟

后,使用干式免疫荧光分析仪读取NC膜上T,C线荧光信号并计算比值 $T/(T+C)$,将比值代入到标准品拟合曲线,计算出样本中IL-6的浓度。

[0028] 优选的是,所述步骤(1)中用10mM的PBS缓冲液将IL-6标准品稀释成1000、500、250、100、50、25、10、5、2pg/ml。

[0029] 本发明的超灵敏IL-6荧光免疫层析测定方法原理:本发明采用双抗体夹心法进行检测。在层析膜上T线用IL-6捕获抗体划线,C线用兔抗鼠IgG划线。检测时,同时加入样本与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,样本中的待测物质IL-6与醋酸纤维素膜上T线的IL-6捕获抗体结合,再与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球形成免疫复合物。未与T线反应的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,与C线上的兔抗鼠IgG形成兔抗鼠IgG-IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球的免疫复合物。在365nm波长激发光照射下,荧光微球发出620nm左右波长的荧光。T线上荧光的强度与待测样本中IL-6的含量成正比。根据标准品曲线,可以计算出待测样本中IL-6的含量。

[0030] 有益效果

[0031] (1)本发明通过构建IL-6抗原和制备IL-6单克隆抗体,研制了相关试剂盒,建立了IL-6荧光免疫层析测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成。IL-6单克隆抗体溶液包含特定浓度的量子点荧光微球,抗体与荧光微球通过生物素-亲和素偶联。

[0032] (2)试纸条包括依次相连的底板、样品垫、硝酸纤维素膜和吸水垫,底板设置在最下部;硝酸纤维素膜和吸水垫之间为硝酸纤维素膜;所述硝酸纤维素膜上依次设置检测T线和质控C线;所述T线上包被IL-6单克隆抗体,C线上包被羊抗鼠IgG。

[0033] (3)测定时,同时加入样本与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,样本中的待测物质IL-6与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球形成免疫复合物,再与硝酸纤维素膜上T线的IL-6捕获抗体结合。未与T线反应的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,与C线上的羊抗鼠IgG形成羊抗鼠IgG-IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球的免疫复合物。在365nm波长激发光照射下,荧光微球发出620nm左右波长的荧光。T线上荧光的强度与待测样本中IL-6的含量成正比。根据标准品曲线,可以计算出待测样本中IL-6的含量。

[0034] (4)本发明提供的测定方法,测定线性范围1.72~1000pg/mL,线性相关系数为0.997;灵敏度为1.72pg/ml;精密度平均 $CV < 10\%$;准确度平均回收率为97.5%;干扰试验血红蛋白浓度低于181.82mg/mL,甘油三脂浓度低于18.18mg/mL,胆红素浓度低于181.82ug/mL时,测试结果偏差落在可接受范围;特异性交叉干扰试验用浓度为200pg/ml的IL-2、IL-4、IL-8、IL-12时,不存在特异性交叉干扰;与西门子特定蛋白分析仪测定结果高度相关($r=0.9914$)。该方法检测IL-6需时短,检测结果准确,操作流程简单,无需大型仪器设备,适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

[0035] (5)经方法学实验,干扰样本测试结果偏差低于可接受范围的10%;用浓度为200pg/mL的IL-2、IL-4、IL-8、IL-12的样本在IL-6测试条上进行测试,不存在特异性干扰;临床样本检测结果与西门子公司大型发光免疫分析仪测定结果基本一致($r=0.9914$)。

[0036] (6)既保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点,又有灵敏度高、稳定性好、受自然荧光干扰低等优点,同时其配套使用的设备精巧,适合医院门诊、急诊检验科使用。可广泛应用于基层医院及大医院门、急诊检验科,可以超灵敏定量测定血液中IL-6的浓度,

检测时间短,操作流程简单,无需大型仪器设备.

附图说明

- [0037] 图1是IgG4荧光免疫层析试纸条;箭头所指分别为加样的位置和层析方向;
[0038] 图2是IL-6定量测定标准曲线;
[0039] 图3是与西门子发光免疫分析仪测定结果相关性。
[0040] 附图标记说明
[0041] 1、样本垫;2、硝酸纤维素膜;3、T线;4、C线;5、吸水垫。

具体实施方式

[0042] 为了进一步了解本发明的技术特征,下面结合具体实施例对本发明进行详细地阐述。实施例只对本发明具有示例性的作用,而不具有任何限制性的作用,本领域的技术人员在本发明的基础上做出的任何非实质性的修改,都应属于本发明的保护范围。

[0043] 下述实施例中所述实验方法,如无特殊说明,均为常规方法,所述试剂和材料,如无特殊说明,均可从商业途径获得。

[0044] 实施例1:IL-6单克隆抗体制备方法

[0045] 以IL-6全长序列蛋白(杭州贤至生物科技有限公司)作为免疫蛋白,取4-6周龄雌性Balb/c小鼠,基础免疫每只小鼠皮下多点注射福氏完全佐剂乳化的100ug 重组蛋白,共400ul/只。20天后进行第二次加强免疫,方法为取80ug重组蛋白用福氏不完全佐剂乳化,共400ul/只,皮下多点注射。第三次加强免疫在15天以后,方法与第二次加强免疫相同。15天后,处死小鼠,取其脾脏制备细胞悬液,与生长状态良好的sp2/0(小鼠骨髓瘤细胞),通过聚乙二醇(Sigma公司)使融合。另外,再加入等体积的饲养细胞,混匀后分置于96孔细胞板(200μL/孔),于37℃、5%二氧化碳培养箱培养。5天后,半保留换液,10天后采用间接酶联免疫吸附法检测96孔细胞培养板中培养杂交瘤细胞的上清。具体方法如下:

[0046] 免疫蛋白经包被液稀释后(终浓度为100pg/mL),以100μL/孔加入酶标板(无锡国盛生物工程有限公司),4℃包被12小时后通过DEM-3型洗板机(中山大学达安基因股份有限公司)用洗涤液洗涤1次;加入封闭液,200μL/孔,37℃封闭1 小时,洗板机洗板1次;加待检细胞培养上清、阳性对照血清及阴性对照样本,100 μL/孔,37℃孵育35min后,洗涤液洗涤3次;加HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗鼠IgG,100μL/孔,37℃孵育35分钟后,洗涤液洗涤四次;每孔加显色液A 和显色液B各50μL,37℃避光显色10分钟后,加终止液终止反应,50μL/孔,酶标仪450nm波长空白孔校零后读取OD值。相关溶液配方如下:

[0047] 包被液:Na₂CO₃1.59g,NaHCO₃2.93g,加双蒸水定容至1000mL (pH9.6)。

[0048] 封闭液:Na₂HPO₄·12H₂O 2.68g,NaH₂PO₄·2H₂O 0.39g,NaCl 8.5g,20g牛血清白蛋白,加双蒸水定容至1000mL (pH7.4)。

[0049] 洗涤液:Na₂HPO₄·12H₂O 2.68g,NaH₂PO₄·2H₂O 0.39g,NaCl 8.5g,Tween-20 0.5mL,加双蒸水定容至1000mL (pH7.4)。

[0050] 显色液A:200mg TMB溶于100mL无水乙醇,加双蒸水定容至1000mL。

[0051] 显色液B:柠檬酸2.1g,Na₂HPO₄·12H₂O 71g,加双蒸水定容至1000mL。

[0052] 使用时:1mL显色液A+1mL显色液B+0.4μL 30%H₂O₂

[0053] 终止液:2M H₂SO₄, 21.7mL浓H₂SO₄加双蒸水定容至1000mL。

[0054] 对于检测阳性的杂交瘤细胞克隆,再使用有限稀释法进行亚克隆,挑选单个细胞培养并通过间接酶联免疫吸附法检测。经过连续两次全阳性亚克隆,单克隆细胞株。

[0055] 取6-8周龄的健康Ba1b/c雄鼠,腹腔注射液体石蜡,每只500 μ L,3天后腹腔注射单克隆细胞(约 1×10^6 个/只),6-8天后,小鼠腹部鼓起,收集腹水。用磁珠法抗体纯化试剂盒(苏州海狸生物医学工程有限公司),通过样品处理,磁珠预处理,抗体吸附,磁珠洗涤,抗体洗脱,抗体中和一系列步骤,得到的即为纯化的IL-6单克隆抗体。

[0056] 实施例2:IL-6单抗-生物素-亲和素-时间分辨荧光微球制备

[0057] 将IL-6单抗原0.1mol/L的pH=7.6PBS缓冲液稀释至2mg/ml,称取1.0mg的EZ-LinkTM Sulfo-NHS-Biotin(ThermoScientific,货号:21217),加入227 μ l的纯化水溶解,配制成10mM的生物素溶液。在100 μ l的IL-6单抗中,加入配制的10mM的生物素溶液2.7 μ l,混匀后室温反应30分钟,加入到50kd截留分子量的超滤管中,4000rpm离心5分钟,加入100 μ l的PBS缓冲液后再次离心。重复2次,弃去滤液。将超滤管倒转后加入100 μ l的PBS缓冲液,4000rpm离心5分钟,收集滤液,即为标记生物素的IL-6单抗。取50 μ l的亲和素-时间分辨荧光微球,加入200 μ l的PBS缓冲液,将荧光微球含量稀释至1.0%,混匀后加入100 μ l的标记生物素的IL-6单抗中,混合均匀后室温反应30分钟后加入50 μ l的2%BSA溶液,封闭反应1小时后15000rpm离心10分钟,弃去上清液,加入200 μ l的PBS缓冲液重悬,15000rpm离心30分钟,弃上清,再加入200 μ l的荧光微球保存液重悬,超声处理5秒,停10秒,重复3次。即得到IL-6单抗-生物素-亲和素-时间分辨荧光微球,置2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0058] 实施例3:IL-6单抗-生物素-亲和素-量子点荧光微球制备

[0059] 将IL-6单抗原0.1mol/L的pH=7.6PBS缓冲液稀释至2mg/ml,称取1.0mg的EZ-LinkTM Sulfo-NHS-Biotin(ThermoScientific,货号:21217),加入227 μ l的纯化水溶解,配制成10mM的生物素溶液。在100 μ l的IL-6单抗中,加入配制的10mM的生物素溶液2.7 μ l,混匀后室温反应30分钟,加入到50kd截留分子量的超滤管中,4000rpm离心5分钟,加入100 μ l的PBS缓冲液后再次离心。重复2次,弃去滤液。将超滤管倒转后加入100 μ l的PBS缓冲液,4000rpm离心5分钟,收集滤液,即为标记生物素的IL-6单抗。取20 μ l的亲和素-量子点荧光微球,加入180 μ l的PBS缓冲液,将荧光微球含量稀释至1.0%,混匀后加入100 μ l的标记生物素的IL-6单抗中,混合均匀后室温反应30分钟后加入50 μ l的2%BSA溶液,封闭反应1小时后15000rpm离心10分钟,弃去上清液,加入200 μ l的PBS缓冲液重悬,15000rpm离心30分钟,弃上清,再加入200 μ l的荧光微球保存液重悬,超声处理5秒,停10秒,重复3次。即得到IL-6单抗-生物素-亲和素-量子点荧光微球,置2-8 $^{\circ}$ C保存。

[0060] 实施例4:包被IL-6捕获抗体和兔抗鼠IgG的免疫层析试纸条的制备

[0061] 一种免疫层析试纸条,试纸条包括底板、样本垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫5,样本垫1、硝酸纤维素膜2和吸水垫5设置在底板上部,所述的样本垫1和吸水垫5之间为硝酸纤维素膜2,硝酸纤维素膜2上依次设置检测T线3和质控C线4,T线3上包被IL-6单抗,C线4上包被羊抗鼠IgG。样本中的待测物质IL-6与IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球形成免疫复合物,再与硝酸纤维素膜上T线的IL-6捕获抗体结合。未与T线反应的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球,与C线上的羊抗鼠IgG形成羊抗鼠IgG-IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球的免疫复合物。

[0062] T线上IL-6单克隆抗体包被浓度是0.5mg/ml;C线上羊抗鼠IgG包被浓度为1.0mg/ml。

[0063] 免疫层析试纸条,其制备方法为:采用三维点膜喷金仪,将IL-6单克隆抗体和羊抗鼠IgG分别包被在硝酸纤维素膜上,分别作为检测线(T线)和质控线(C线)。在干燥箱中37℃干燥2h,将样本垫、硝酸纤维素膜、吸水垫和PVC粘性底板组装好后,切割成试纸条,加干燥剂于常温下密封保存。

[0064] 配制划膜稀释液:在950ul水中加入50ul异丙醇,混合均匀。得到5%异丙醇溶液,使用前用0.2um的滤膜过滤。

[0065] C线溶液配制:C线使用兔抗鼠IgG(杭州贤至生物科技有限公司),配制前将其4000rpm离心5分钟,取上清液用划膜稀释液稀释到1.0mg/ml,混匀。

[0066] T线溶液配制:T线使用IL-6捕获抗体(杭州贤至生物科技有限公司),配置前将其4000rpm离心5分钟,取上清液用划膜稀释液稀释到0.5mg/ml。

[0067] 划线:在三维划膜仪(金标公司,HM3030)上,分别设置C线溶液的量0.9ul/cm,T线溶液的量1ul/cm。初始化仪器后分别用C线和T线溶液在硝酸纤维素膜(NC膜)上进行划线,划膜结束后将硝酸纤维素膜(NC膜)置37℃过夜烘干。

[0068] 组装:将吸水纸,划线NC膜,样本垫依次组装在PVC粘性底板上,切割成条后装入试纸条卡盒中,加干燥剂保存在湿度≤20%的环境中。图1为荧光免疫层析试纸。

[0069] 实施例5:标准曲线的建立

[0070] 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球按照1:500稀释到工作浓度。用10mM的PBS缓冲液将IL-6蛋白稀释成1000、500、250、100、50、25、10、5、2、0pg/ml,形成系列梯度浓度的标准品。取50ul标准品溶液,加入到上述条件的层析试纸条的样本孔中,再加入50ul的荧光微球工作溶液,反应15分钟后,使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算比值T/(T+C),结果如表1所示。

[0071] 表1 T/(T+C)结果计算

[0072]

样本浓度pg/ml	T/(T+C)
1000	0.819
500	0.738
250	0.635
100	0.521
50	0.424
25	0.358
10	0.251
5	0.183
2	0.079

[0073] 将标准品溶液的浓度进行对数转换后与比值进行线性拟合,得到一个标准品拟合曲线方程:

[0074] $Y=0.2749x-0.0188, R^2=0.9971$, IL-6定量测定标准曲线如图2所示。

[0075] 实施例6:试剂盒灵敏度评估

[0076] 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球用稀释液稀释至工作浓度(1:500稀释),取50u1的10mMPBS作为空白样本,加入到本发明的试纸条样本孔,再加入50u1 工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算测量值 $T/(T+C)$,重复测试20次。并计算20次测试结果的平均值M和标准偏差SD。再计算M+2SD的值,如表2所示。

[0077] 表2 M+2SD结果计算

#	T/(T+C)	#	T/(T+C)
1	0.038	11	0.035
2	0.033	12	0.023
3	0.039	13	0.024
4	0.033	14	0.035
5	0.042	15	0.025
6	0.041	16	0.034
7	0.034	17	0.035
8	0.036	18	0.034
9	0.041	19	0.024
10	0.037	20	0.042
平均值 M		0.034	
标准偏差 SD		0.006	
变异系数 CV		17.45%	
M+2SD		0.046	

[0080] 将M+2SD的数值代入到拟合的标准品曲线,计算其对应的浓度值,结果为 1.72pg/ml,即试剂盒的灵敏度为1.72pg/ml。

[0081] 实施例7:试剂盒批内精密性评估

[0082] 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球稀释至工作浓度(1:500),用IL-6蛋白配制成高(800pg/ml)、中(200pg/ml)、低(20pg/ml)三个不同浓度的样本。取50u1样本,加入到本发明试纸条的样本孔,再加入50u1工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算测量值 $T/(T+C)$,每个浓度重复测试10次,如表3所示。

[0083] 表3不同样本T/(T+C)结果计算

#	T/(T+C)		
	高值样本 (800pg/ml)	中值样本 (200pg/ml)	低值样本 (20pg/ml)
1	0.762	0.612	0.337
2	0.782	0.608	0.349
3	0.775	0.602	0.323
4	0.781	0.610	0.351
5	0.769	0.639	0.326
6	0.773	0.613	0.361
7	0.796	0.604	0.345
8	0.782	0.617	0.359
9	0.773	0.596	0.348
10	0.764	0.625	0.339

[0085] 将T/(T+C)比值代入标准品拟合曲线方程,分别计算其对应的浓度值,并计算 10次测试的浓度值平均值M和标准偏差SD。根据公式变异系数CV(%) =SD/M*100%,分别计算高、中、低三个不同浓度样本的CV(%)值,并计算其平均CV(%)值,如表4所示。

[0086] 表4平均CV(%)值结果计算

#	代入拟合曲线计算浓度值		
	高值样本 (800pg/ml)	中值样本 (200pg/ml)	低值样本 (20pg/ml)
1	691.80	196.97	19.69
2	817.94	190.48	21.77
3	771.37	181.15	17.51
4	811.12	193.70	22.14
5	733.57	246.95	17.95
6	758.56	198.63	24.07
7	919.70	184.21	21.05
8	817.94	205.39	23.67
9	758.56	172.27	21.59
10	703.48	219.63	20.02
平均值 M	778.40	198.94	20.94
标准偏差 SD	66.77	21.40	2.18
变异系数 CV (%)	8.58%	10.76%	10.42%
平均 CV (%)	9.92%		

[0088] 高、中、低三个样本的批内CV(%)值分别为8.58%,10.76%,10.42%,平均CV(%)值为9.92%。

[0089] 实施例8:试剂盒批间精密性评估

[0090] 将IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球稀释至工作浓度(1:500),用IL-6蛋白配制成高(800pg/ml)、中(200pg/ml)、低(20pg/ml)三个不同浓度的样本。取50u1样本,加入到本发明试纸条的样本孔,再加入50u1工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上

T,C线荧光信号并计算测量值 $T/(T+C)$,分别用三个批次的试剂条重复测试10次,如表5-表7所示。

[0091] 表5高值样本测量值 $T/(T+C)$

[0092]	#	高值样本 (800pg/ml)		
		第一批	第二批	第三批
	1	691.80	783.57	829.43
	2	817.94	735.73	745.37
	3	771.37	715.18	712.45
	4	811.12	831.65	842.74
	5	733.57	735.12	720.96
[0093]	6	758.56	710.25	723.45
	7	919.70	796.62	767.63
	8	817.94	847.77	854.64
	9	758.56	843.73	865.76
	10	703.48	815.77	840.64
	平均值 M	783.417		
	标准偏差 SD	59.1056		
	变异系数 CV (%)	7.54%		

[0094] 表6中值样本测量值 $T/(T+C)$

[0095]	#	中值样本 (200pg/ml)		
		第一批	第二批	第三批
	1	196.97	203.85	178.34
	2	190.48	197.53	189.36
	3	181.15	176.12	202.36
	4	193.70	213.26	174.73
	5	246.95	186.90	206.33
[0095]	6	198.63	171.54	189.42
	7	184.21	187.31	225.46
	8	205.39	206.43	182.44
	9	172.27	177.66	227.17
	10	219.63	191.95	173.54
	平均值 M	195.034		
	标准偏差 SD	18.2730		
	变异系数 CV (%)	9.37%		

[0096] 表7低值样本测量值 $T/(T+C)$

		低值样本 (20pg/ml)			
#		第一批	第二批	第三批	
[0097]	1	19.69	20.59	18.74	
	2	21.77	18.44	19.59	
	3	17.51	21.42	19.37	
	4	22.14	16.86	20.91	
	5	17.95	19.37	17.55	
[0098]	6	24.07	17.41	16.36	
	7	21.05	20.23	20.36	
	8	23.67	21.31	19.35	
	9	21.59	16.31	19.28	
	10	20.02	19.03	21.84	
	平均值 M		19.793		
	标准偏差 SD		1.9935		
	变异系数 CV (%)		10.07%		

[0099] 高、中、低三个不同浓度样本批间CV (%)分别为7.54%, 9.37%, 10.07%, 平均CV (%)为9.00%

[0100] 实施例9: 试剂盒准确度评估

[0101] 配制三个回收样本: 用IL-6蛋白配制成浓度为500pg/ml和5000pg/ml两个浓度的溶液。取临床样本3-4份混合均匀后平均分成3份, 每份体积1ml, 在第一份样本中加入0.1ml的PBS缓冲液, 在第二份样本中加入0.1ml的500pg/ml的IL-6蛋白溶液, 在第三份样本中加入0.1ml的5000pg/ml的IL-6蛋白溶液。

[0102] 取50ul回收样本, 加入到本发明试纸条的样本孔, 再加入50ul工作浓度的IL-6 单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司, FIC-S100)读取NC膜上T, C线荧光信号并计算测量值T/(T+C), 并代入标准品拟合曲线计算其浓度值, 如表8所示。

[0103] 表8浓度值计算结果

[0104]

	T/(T+C)	浓度值 (pg/ml)
回收样本1	0.402	33.93
回收样本2	0.501	77.75
回收样本3	0.718	478.57

[0105] 根据公式: 回收率 = 回收浓度 ÷ 加入浓度 × 100%, 计算样本的回收率, 如表9 所示。

[0106] 表9回收率结果计算

[0107]

	测定浓度pg/ml	加入浓度pg/ml	回收浓度pg/ml	回收率%
回收样本1	33.93	\	\	\
回收样本2	77.75	45.45	43.81	96.4%

回收样本3	478.57	454.54	444.64	97.8%
-------	--------	--------	--------	-------

[0108] 平均回收率(%) = (96.4%+97.8%) ÷ 2 = 97.1%

[0109] 其中:回收样本2中的加入浓度 = 500 * (0.1 / (0.1+1)) = 45.45 (pg/ml),

[0110] 回收样本3中的加入浓度 = 5000 * (0.1 / (0.1+1)) = 454.54 (pg/ml)

[0111] 实施例10:试剂盒干扰物质评估

[0112] 配制干扰实验样本:用血红蛋白配制1000mg/ml,2000mg/ml,5000mg/ml三个浓度,用甘油三脂配制100mg/ml,200mg/ml,500mg/ml三个浓度,用胆红素配制1mg/ml,2mg/ml,5mg/ml三个浓度。取4-5临床样本混合,分别在1ml的混合样本中加入100u1的干扰样本,配制成含不同浓度干扰物质的干扰实验样本,在另外一份混合样本中加入100u1的PBS缓冲液作为基础样本。取50u1干扰样本或基础样本,加入到本发明试纸条的样本孔,再加入50u1工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算测量值T/(T+C),并代入标准品拟合曲线计算其浓度值,并计算干扰样本与基础样本的浓度偏差,如表10-表12所示。

[0113] 表10血红蛋白浓度偏差计算

	血红蛋白浓度 (mg/ml)	T/(T+C)	计算浓度值 (pg/ml)	与基础样本偏差
[0114] 基础样本	--	0.402	33.93	
干扰样本 1	90.91	0.404	34.50	1.69%
干扰样本 2	181.82	0.406	35.09	3.41%
干扰样本 3	454.55	0.428	42.18	24.33%

[0115] 表11甘油三脂浓度偏差计算

	甘油三脂浓度 (mg/ml)	T/(T+C)	计算浓度值 (pg/ml)	与基础样本偏差
[0116] 基础样本	--	0.402	33.93	
干扰样本 1	9.09mg/ml	0.399	33.09	-2.48%
干扰样本 2	18.18mg/ml	0.394	31.73	-6.49%
干扰样本 3	45.45mg/ml	0.375	27.06	-20.25%

[0117] 表12胆红素浓度偏差计算

	胆红素浓度 (ug/ml)	T/(T+C)	计算浓度值 (pg/ml)	与基础样本偏差
[0118] 基础样本	--	0.402	33.93	
[0119] 干扰样本 1	90.91ug/ml	0.400	33.37	-1.66%
干扰样本 2	181.82ug/ml	0.408	35.68	5.15%
干扰样本 3	454.55ug/ml	0.432	43.62	28.56%

[0120] 干扰样本中血红蛋白浓度低于181.82mg/ml,甘油三脂浓度低于18.18mg/ml,胆红素浓度低于181.82ug/ml时,干扰样本测试结果偏差低于可接受范围的10%。

[0121] 实施例11:试剂盒分析特异性评估

[0122] 配制特异性分析评估样本:分别用IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-12蛋白配制浓度为

200pg/ml的样本。取50u1特异性分析评估样本,加入到本发明试纸条的样本孔,再加入50u1工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液,同时用PBS 缓冲液做空白对照。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算测量值 $T/(T+C)$,并代入标准品拟合曲线计算其浓度值,如表13所示。

[0123] 表13浓度值计算结果

[0124]

分析特异性样本	T/(T+C)	计算浓度值 (pg/ml)
PBS	0.028	1.48
IL-2	0.054	1.84
IL-4	0.079	2.27
IL-6	0.612	196.97
IL-8	0.047	1.74
IL-12	0.062	1.97

[0125] 用浓度为200pg/ml的IL-2、IL-4、IL-8、IL-12的样本在IL-6测试条上进行测试,测定结果与空白样本的测定结果接近。说明与这几个蛋白不存在特异性干扰。

[0126] 实施例12:与西门子试剂相关性评估

[0127] 收集50例临床血清样本(西门子化学发光免疫分析仪测定IL-6的样本),用本发明的测试条进行对比测试。测试方法:取50u1样本,加入到本发明试纸条的样本孔,再加入50u1工作浓度的IL-6单抗-生物素-亲和素-荧光微球溶液。反应15分钟后使用干式免疫荧光分析仪(苏州和迈精密仪器有限公司,FIC-S100)读取NC膜上T,C线荧光信号并计算测量值 $T/(T+C)$,将其代入标准品拟合曲线计算其浓度值。将测试结果与用西门子化学发光免疫分析仪的IL-6试剂盒测试的浓度值进行相关性分析,如表14所示。

[0128] 表14相关性分析结果

[0129]

样本#	西门子试剂结果 (pg/ml)	本发明测试条结果 (pg/ml)
1	56.8	52.1
2	123.5	113.9
3	12.5	17.4
4	30.6	36.8
5	28.45	24.21
6	44.87	49.31
7	250.23	256.27
8	692	680
9	240.51	255.89
10	12.56	16.34
11	20.32	25.37
12	557.57	500.43
13	56.82	51.64
14	379.56	342.53
15	343.89	323.17
16	447.52	418.25
17	303.78	333.56
18	48.21	58.12
19	186.56	163.59
20	20.28	18.82
21	612.42	585.27
22	526.79	530.91
23	480.98	485.26
24	100.54	90.39
25	211.46	231.65
26	91.89	101.92
27	97.56	94.67
28	207.34	187.49
29	160.51	175.15
30	285.21	299.87
31	230.21	240.31
32	141.65	151.23
33	91.18	111.23
34	72.54	62.43
35	111.60	101.50
36	505.32	545.29
37	22.27	18.73
38	441.32	432.74
39	71.38	95.69

[0130]	40	109.01	139.63
	41	96.54	76.49
	42	46.02	56.31
	43	236.21	256.73
	44	413.56	393.41
	45	54.89	44.61
	46	777.52	797.34
	47	604.78	646.53
	48	413.12	415.03
	49	80.56	75.32
	50	40.58	46.49

[0131] 以西门子化学发光免疫分析仪试剂的测试结果为横坐标,本发明试剂条的测量值为纵坐标绘制标准曲线,两组结果的相关性为0.9914,如图3所示。

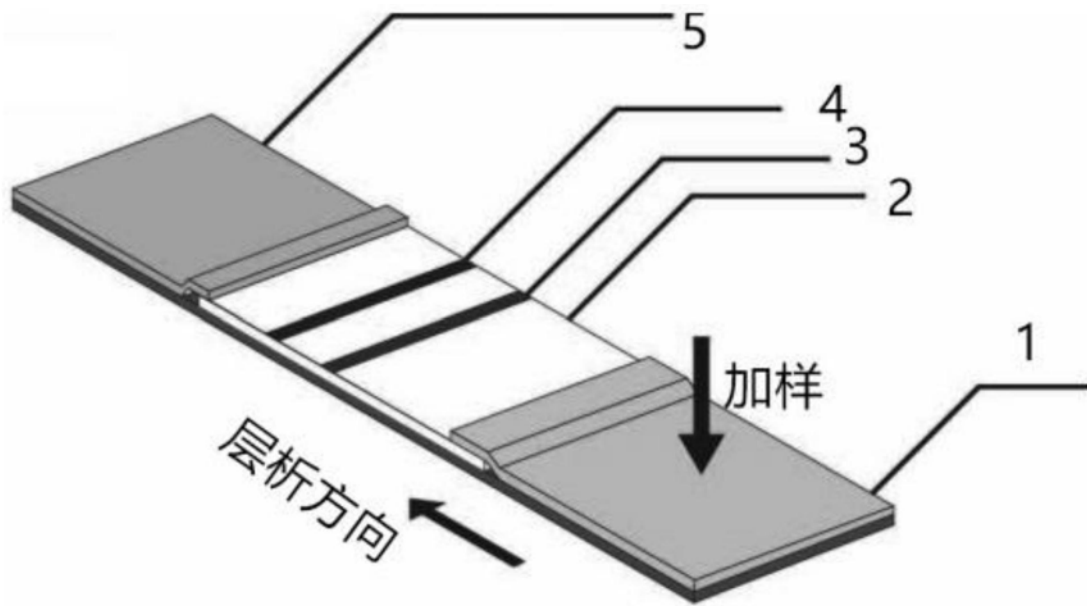


图1

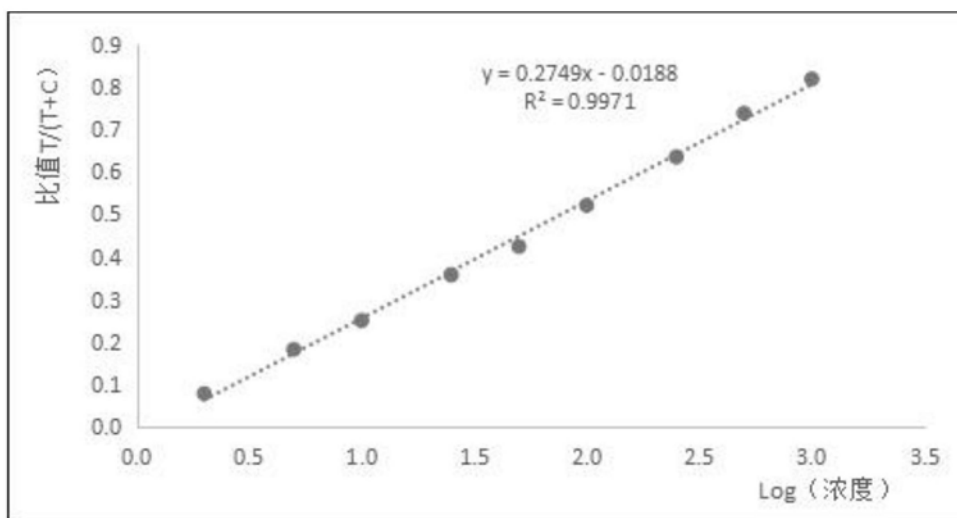


图2

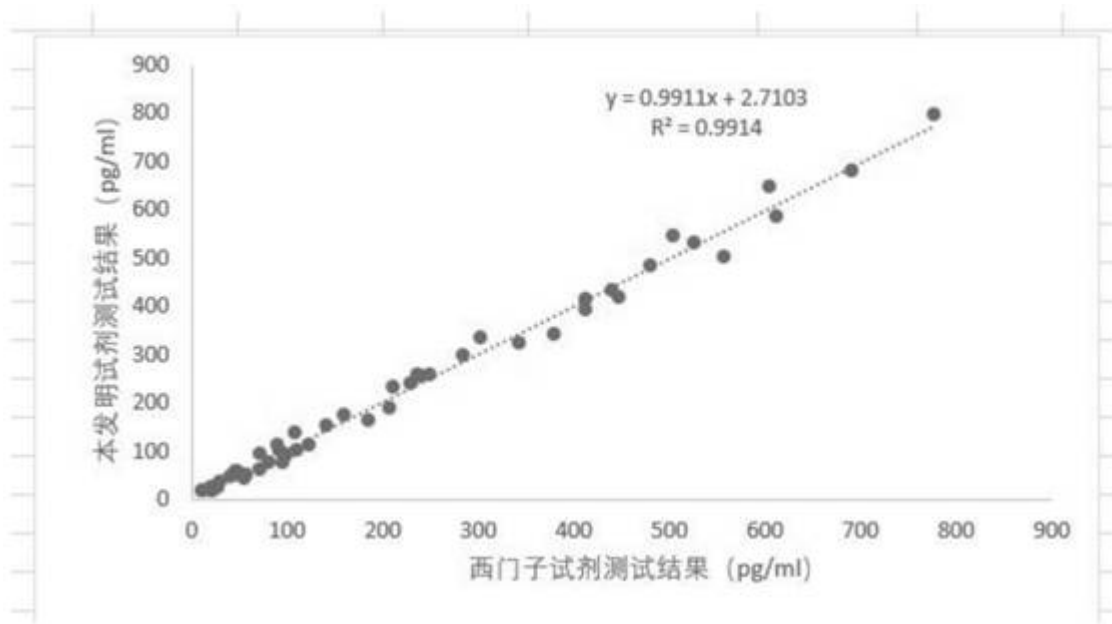


图3

专利名称(译)	一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒及测定方法		
公开(公告)号	CN109374903A	公开(公告)日	2019-02-22
申请号	CN201811167051.8	申请日	2018-10-08
[标]发明人	张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童 李丹 吴滨		
发明人	张乐之 余铭恩 胡祥叶 王立童 李丹 吴滨		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6893 G01N33/533 G01N33/54326		
代理人(译)	龙涛		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种超灵敏IL-6荧光免疫层析测定试剂盒和测定方法。试剂盒由荧光微球标记的IL-6单克隆抗体溶液和免疫层析试纸条组成，IL-6单克隆抗体溶液包含特定浓度的荧光微球，抗体与荧光微球通过生物素-亲和素偶联。本发明提供的测定方法，测定线性范围1.72~1000pg/mL,线性相关系数为0.997；灵敏度为1.72pg/ml；精密度平均CV<10%；准确度平均回收率为97.5%；干扰试验血红蛋白浓度低于181.82mg/mL，甘油三脂浓度低于18.18mg/mL，胆红素浓度低于181.82ug/mL时，测试结果偏差落在可接受范围；特异性交叉干扰试验证明不存干扰。该方法检测IL-6需时短，检测结果准确，操作流程简单，无需大型仪器设备，适用于基层医院及大医院门、急诊检验科。

