



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 208818724 U

(45)授权公告日 2019.05.03

(21)申请号 201822096206.5

(22)申请日 2018.12.13

(73)专利权人 迪亚莱博(张家港)生物科技有限
公司

地址 215600 江苏省苏州市张家港保税区
新兴产业育成中心A栋211室

(72)发明人 顾悦 蒋理国 钱梦姣 张瑜

(74)专利代理机构 苏州创元专利商标事务所有
限公司 32103

代理人 孙仿卫

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

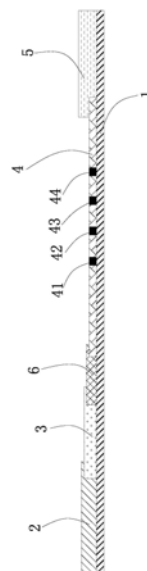
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

(54)实用新型名称

一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒

(57)摘要

本实用新型涉及一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套,检测卡包括底板和依次设于底板上的样本垫、结合垫、检测垫、吸水纸,检测垫上设置有质控线、具有PCT抗体和IL-6抗体的检测线,结合垫的上表面涂覆有荧光微球涂层,检测卡还包括设于结合垫与检测垫之间的样本流动减缓垫;该试剂盒,同时设置包被PCT、IL-6抗体的检测线和羊抗兔IgG的质控线,能够同时准确、快速地定量测定待测样本中PCT和IL-6的浓度,并且两种抗原互不干扰。相较于ELISA和化学发光法,本试剂盒操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定量测定PCT、IL-6,灵敏度高、检测范围宽、重复性好,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测的不足。



1. 一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,所述试剂盒包括检测卡和套设在所述检测卡外周的护套,所述检测卡包括底板和依次设于所述底板上的样本垫、结合垫、检测垫、吸水纸,所述检测垫上设置有质控线、具有PCT抗体和IL-6抗体的检测线,其特征在于:所述结合垫的上表面涂覆有荧光微球涂层,所述检测卡还包括设于所述结合垫与所述检测垫之间的样本流动减缓垫,所述结合垫的靠近所述样本流动减缓垫的一侧覆盖在所述样本流动减缓垫之上,所述样本流动减缓垫的靠近所述检测垫的一侧覆盖在所述检测垫之上。

2. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述样本流动减缓垫为疏水性聚酯纤维膜。

3. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述检测线包括PCT检测线、第一IL-6检测线、第二IL-6检测线。

4. 根据权利要求3所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述PCT检测线、第一IL-6检测线、第二IL-6检测线依次间隔设置,所述PCT检测线位于所述检测垫的靠近所述样本流动减缓垫的一侧,所述第二IL-6检测线位于所述检测垫的靠近所述吸水纸的一侧。

5. 根据权利要求4所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述质控线由羊抗兔IgG抗体包被于所述检测垫上构成,所述质控线位于所述第二IL-6检测线与所述吸水纸之间。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述检测垫由硝酸纤维素膜构成。

7. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述样本垫的材质为玻璃纤维。

8. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述结合垫的材质为玻璃纤维。

9. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述样本垫的靠近所述结合垫的一侧覆盖在所述结合垫之上,所述吸水纸的靠近所述检测垫的一侧覆盖在所述检测垫之上。

10. 根据权利要求1所述的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,其特征在于:所述护套包括分别位于所述检测卡上方和下方的上盖和下盖,所述上盖开设有分别与所述检测垫和样本垫对应的可视窗和加样口,所述下盖的内表面形成有用于固定所述检测卡的第一限位框和第二限位框。

一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒

技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒。

背景技术

[0002] 世纪,精准医疗、循证医学向检验科学提出了如何通过非特异性指标,辅助临床精准诊治感染。白细胞计数(WBC)、血沉(ESR)、C 反应蛋白(CRP)、白细胞介素6(IL-6)、降钙素原(PCT)等新老标志物相继登上舞台。其中,IL-6作为炎症和感染诊断的新星,与 PCT一起被称为住院患者感染诊断的「IP」组合。

[0003] 降钙素原(PCT)是降钙素前体物质,在正常生理情况下,由甲状腺滤泡旁细胞生成,在体内的含量极低。严重感染患者的PCT显著升高,并与感染的严重程度及临床预后密切相关。其在感染后2-3h即可升高,12-24h达到峰值。因此,PCT在临床上能够有效的诊断、鉴别患者早期感染程度,从而提高临床诊断率,为重症监护、放化疗、器官移植等患者提供重要的诊断依据。此外,PCT是细菌感染高特异性指标,对细菌感染的价值已经获得众多循证医学的认可。PCT对细菌感染较为特异、与细菌感染程度相关、对抗生素用药指导等均具有重要价值。

[0004] 白介素6 (IL-6)是细胞因子网络中的重要成员,是由纤维母细胞、单核/巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、上皮细胞、角质细胞、以及多种瘤细胞所产生。在急性炎症反应中处于中心地位,可介导肝脏的急性期反应,刺激C反应蛋白(CRP)和纤维蛋白原的生成。多种感染性疾病可导致血清IL-6水平升高,而且IL-6水平与患者预后密切相关。

[0005] 检测的相对优势在于急性感染的早期发现,在炎症反应中,IL-6的升高早于其他细胞因子,也早于CRP和PCT,而且持续时间长。研究显示,细菌感染后IL-6迅速升高,PCT在2h后增加,而CRP在6h后才迅速增加。因此,IL-6可用来辅助急性感染的早期诊断。IL-6半衰期1h,能更快的反应抗生素治疗的效果及预后的判断,当感染未控制时,IL-6 持续高表达;而一旦感染控制,IL-6因其半衰期仅有1h,相比于CRP半衰期的19 h、PCT半衰期的24h,在感染控制后下降更快、幅度更大,更有利临床早期确认疗效。

[0006] 对全身感染较为敏感,对抗生素治疗监测更有价值,当IL-6>1000μg/L时提示预后不良。动态观察IL-6水平也有助于了解感染性疾病的进展和对治疗的反应。

[0007] 基于上述IL-6和PCT检测的临床意义,两者的联合检测应运而生。

[0008] 「IP」联检更易鉴别 G-/G+ 菌:研究表明,「IP」联检区分 G-/G+菌的能力远强于PCT!PCT、IL-6均明显升高,则G-菌感染的可能性大,若PCT高,而IL-6不明显,则应考虑 G+菌的可能性大。

[0009] 「IP」联检能提高医院抗生素病原学送检率:原国家卫计委《医院感染管理质量控制指标》和《重症医学专业医疗质量控制指标》(国卫办医函[2015]252 号)中将微生物培养、PCT、IL-6 作为抗菌药物治疗前病原学检测标本。

[0010] 「IP」联检利于新生儿败血症的诊断:新生儿48h内PCT有生理性升高,不易判别是否感染;而IL-6无生理性升高,与PCT联合检测诊断更为精准。IL-6的敏感性优于 PCT和

CRP,但它的特异性比PCT差,联检项目可以优势互补,各取所长。有研究显示,针对脓毒症患者联合检测PCT+IL-6+CRP、PCT+IL-6或PCT+CRP,有助于临床识别患者早期脓毒症。

[0011] 此外,遏制细菌耐药,「IP」检测优势明显,对帮助临床及时、准确地早期诊断、早期有效治疗、降低病死率,同时避免滥用抗生素,减少细菌耐药性产生价值突出。

[0012] 目前市场上已有很多炎症感染检测的试剂盒,然而大部分试剂盒或是仅仅针对单一的检测指标进行检测,检测结果的准确性低,容易造成疾病误判等情形;又或是针对PCT、CRP和SAA等进行二联、三联检测,应用范围较窄;加之,IL-6在正常机体中含量非常低(1-5pg/ml),只有在感染、创伤烧伤或其它组织损伤导致的炎症机体才会刺激IL-6的产生,因此IL-6检测试剂盒需要有很高的灵敏度,是以大大增加了研发和量化生产的难度。故而,目前市场上暂未见较为成熟且综合性能优越的联合检测PCT和IL-6的体外诊断产品。

[0013] 在目前较常用的IL-6、PCT的检测方法中,ELISA法操作程序烦琐,完成整个实验过程需三小时左右,亦需要专业免疫学技术人员在实验室中进行实验操作。化学发光法成本高,在基层医疗机构的实验室和小型门诊中较难实现该检测项目的广泛应用。虽然胶体金层析法操作简便,检测速度较快,但其只能定性或半定量检测,无法实现疗效监控及预后判断等重要作用。

发明内容

[0014] 本实用新型所要解决的技术问题是克服现有技术的不足,提供一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒;该试剂盒易于制备、操作简便、检测效率高,且灵敏度高、准确性好。

[0015] 为解决上述技术问题,本实用新型采取的技术方案如下:

[0016] 一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套,检测卡包括底板和依次设于底板上的样本垫、结合垫、检测垫、吸水纸,检测垫上设置有质控线、具有PCT抗体和IL-6抗体的检测线,结合垫的上表面涂覆有荧光微球涂层,检测卡还包括设于结合垫与检测垫之间的样本流动减缓垫,结合垫的靠近样本流动减缓垫的一侧覆盖在样本流动减缓垫之上,样本流动减缓垫的靠近检测垫的一侧覆盖在检测垫之上。

[0017] 优选地,样本流动减缓垫为疏水性聚酯纤维膜。

[0018] 优选地,检测线包括PCT检测线、第一IL-6检测线、第二IL-6检测线。单纯地调整硝酸纤维素膜上包被的IL-6抗体浓度,对检测灵敏度的提升效果并不显著。本检测卡不再局限于此,而是在硝酸纤维素膜上依次设置了2条IL-6检测线,可以明显提升检测的灵敏度。

[0019] 优选地,PCT检测线、第一IL-6检测线、第二IL-6检测线依次间隔设置,PCT检测线位于检测垫的靠近样本流动减缓垫的一侧,第二IL-6检测线位于检测垫的靠近吸水纸的一侧。

[0020] 优选地,质控线由羊抗兔IgG抗体包被于检测垫上构成,质控线位于第二IL-6检测线与吸水纸之间。

[0021] 优选地,检测垫由硝酸纤维素膜构成。

[0022] 优选地,样本垫的材质为玻璃纤维。

[0023] 优选地,结合垫的材质为玻璃纤维。

[0024] 优选地,样本垫的靠近结合垫的一侧覆盖在结合垫之上,吸水纸的靠近检测垫的一侧覆盖在检测垫之上。

[0025] 优选地,护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖和下盖,上盖开设有分别与检测垫和样本垫对应的可视窗和加样口,下盖的内表面形成有用于固定检测卡的第一限位框和第二限位框。

[0026] 由于以上技术方案的实施,本实用新型与现有技术相比具有如下优点:

[0027] 本实用新型的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,通过添加样本流动减缓垫(疏水性聚酯纤维膜),疏水性聚酯纤维膜可以减缓样本在检测卡上的流动,使得样本中的待测物质(特别是IL-6)与标记了捕获抗体的荧光微球充分结合,从而使得检测结果的重复性和检测灵敏度得到大大提高。

[0028] 本实用新型的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,同时设置PCT、IL-6抗体的检测线和羊抗兔IgG的质控线,能够同时准确、快速地定量测定待测样本中PCT和IL-6的浓度,并且两种抗原互不干扰。相较于ELISA和化学发光法,本试剂盒操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定量测定PCT、IL-6,灵敏度高、检测范围宽、重复性好,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测的不足,可为疗效监控及预后判断提供重要依据。

附图说明

[0029] 图1为本实用新型的检测卡的侧向剖面结构示意图;

[0030] 其中:1、底板;2、样本垫;3、结合垫;4检测垫;41、PCT检测线;42、第一IL-6检测线;43、第二IL-6检测线;44、质控线;5、吸水纸;6、样本流动减缓垫。

具体实施方式

[0031] 下面结合附图和具体的实施例对本实用新型做进一步详细的说明。

[0032] 如图1所示,一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套(图中未示出),检测卡包括底板1和依次设于底板1上的样本垫2、结合垫3、检测垫4、吸水纸5,检测垫4上设置有质控线44、具有PCT抗体和IL-6抗体的检测线,结合垫3的上表面涂覆有荧光微球涂层,检测卡还包括设于结合垫3与检测垫4之间的样本流动减缓垫6(样本流动减缓垫6为疏水性聚酯纤维膜),结合垫3的靠近样本流动减缓垫6的一侧覆盖在样本流动减缓垫6之上,样本流动减缓垫6的靠近检测垫4的一侧覆盖在检测垫4之上。样本垫2和结合垫3的材质均为玻璃纤维,检测垫4由硝酸纤维素膜构成。

[0033] 本例中,检测线包括PCT检测线41、第一IL-6检测线42、第二IL-6检测线43。单纯地调整硝酸纤维素膜上包被的IL-6抗体浓度,对检测灵敏度的提升效果并不显著。本检测卡不再局限于此,而是在硝酸纤维素膜上依次设置了2条IL-6检测线,可以明显提升检测的灵敏度。具体地,PCT检测线41、第一IL-6检测线42、第二IL-6检测线43依次间隔设置,PCT检测线41位于检测垫4的靠近样本流动减缓垫6的一侧,第二IL-6检测线43位于检测垫4的靠近吸水纸5的一侧。另外,质控线44由羊抗兔IgG抗体包被于检测垫4上构成,质控线44位于第二IL-6检测线43与吸水纸5之间。

[0034] 进一步地,样本垫2的靠近结合垫3的一侧覆盖在结合垫3之上,吸水纸5的靠近检测垫4的一侧覆盖在检测垫4之上。护套包括分别位于检测卡上方和下方的上盖和下盖,上

盖开设有分别与检测垫4和样本垫2对应的可视窗和加样口,下盖的内表面形成有用于固定检测卡的第一限位框和第二限位框。

[0035] 本实用新型的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒的生产工艺包括如下部分:

[0036] (一)标记PCT、IL-6捕获抗体和兔IgG抗体于荧光微球,3种抗体的标记方法一致,可同时进行,具体步骤如下:

[0037] 1、配制50mg/ml EDC溶于10mM PBS缓冲液。2、将20ul的200nm荧光微球加入至80ul 10mM PBS缓冲液中,震荡混匀,共配制3支。3、在荧光微球溶液(2)中加入2.5ul EDC活化溶液(1),震荡混匀,置于摇床活化15min,活化条件:室温,250rpm。4、用10mM PBS缓冲液分别配制3种抗体溶液,终浓度均为0.2mg/ml,配制体积各100ul。5、将活化后的荧光微球溶液(3)置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。6、将0.2mg/ml的3种抗体溶液(4)分别加入至3支荧光微球(5)中,震荡混匀。超声3min,再次震荡混匀后置于摇床孵育2小时,孵育条件:室温,250rpm。7、将20ul 封闭液(1%牛血清白蛋白溶于10mM PBS缓冲液)加入至孵育后的荧光微球溶液(6)中,置于摇床封闭2小时,封闭条件:室温,250rpm。8、将封闭好的荧光微球溶液(7)置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。9、将500ul 10mM PBS缓冲液加入至(8),复溶荧光微球,震荡混匀后置于离心机,15000rpm,离心15min,弃上清。10、将200ul微球保存液(0.1%BSA溶于10mM PBS缓冲液)加入至(9),复溶荧光微球,震荡混匀并超声3min,置于2-8℃保存。

[0038] (二)PCT、IL-6检测抗体、羊抗兔IgG抗体包被于硝酸纤维素膜(NC膜):

[0039] 1、配制检测线、质控线溶液:使用10mM PBS缓冲液分别配制3种抗体溶液,终浓度均为2mg/ml。2、将硝酸纤维素膜(NC膜)贴于底板,使用划膜喷金仪,将2mg/ml的3种抗体溶液(1)以1ul/cm的划膜速率划于NC膜。其中,PCT检测线、羊抗兔IgG质控线各划1条,IL-6检测线划2条,其特定的排布顺序详见上述检测卡结构,不可任意变动。3、将经过上述处理的NC膜置于37℃烘箱烘烤2小时。

[0040] (三)样本垫封闭

[0041] 1、配制封闭液:使用50 mM Tris缓冲液配制,终浓度为1%BSA、0.2% Tween 20、0.5%蔗糖、0.1mg/ml抗红细胞抗体。2、将上述封闭液均匀涂抹于样本垫,置于37℃烘箱烘烤2小时。

[0042] (四)结合垫封闭及荧光微球喷涂

[0043] 1、配制封闭液:使用50 mM Tris缓冲液配制,终浓度为1%BSA、0.2% Tween 20、0.5%蔗糖。2、将上述封闭液均匀涂抹于结合垫,置于37℃烘箱烘烤2小时。3、配制荧光微球溶液:使用微球保存液(0.1%BSA溶于10mM PBS缓冲液)配制,终浓度为0.02%SF PCT标记微球、0.02%SF IL-6标记微球、0.005%SF 兔IgG标记微球。4、使用划膜喷金仪,将荧光微球溶液(3)以2ul/cm的速率喷涂于结合垫,并将其置于37℃烘箱烘烤2小时。

[0044] (五)检测卡制作

[0045] 1、NC膜置于37℃烘箱烘烤2小时后取出,分别将吸水纸、样本垫、结合垫、疏水性聚酯纤维膜贴于底板上的相应位置。2、按固定尺寸裁切,将裁切后的检测卡置于护套下盖中的相应位置(吸水纸一端置于第一限位框内,样本垫一端置于下第二限位框内),安装护套上盖,按压固定。

[0046] (六)检测样本时,吸取70ul样本,滴加至加样口,计时10min,将卡条插入免疫荧光分析仪,检测并读取数据及检测结果。

[0047] 综上所述,本实用新型的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,通过添加样本流动减缓垫(疏水性聚酯纤维膜),疏水性聚酯纤维膜可以减缓样本在检测卡上的流动,使得样本中的待测物质(特别是IL-6)与标记了捕获抗体的荧光微球充分结合,从而使得检测结果的重复性和检测灵敏度得到大大提高。本实用新型在硝酸纤维素膜上依次设置了2条IL-6检测线,可以明显提升检测的灵敏度。

[0048] 本实用新型的快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒,同时设置PCT、IL-6抗体的检测线和羊抗兔IgG的质控线,能够同时准确、快速地定量测定待测样本中PCT和IL-6的浓度,并且两种抗原互不干扰。相较于ELISA和化学发光法,本试剂盒操作简单,耗时短,成本低。本试剂盒可以定量测定PCT、IL-6,灵敏度高、检测范围宽、重复性好,弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测的不足,可为疗效监控及预后判断提供重要依据。

[0049] 以上对本实用新型做了详尽的描述,其目的在于让熟悉此领域技术的人士能够了解本实用新型的内容并加以实施,并不能以此限制本实用新型的保护范围,凡根据本实用新型的精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本实用新型的保护范围内。

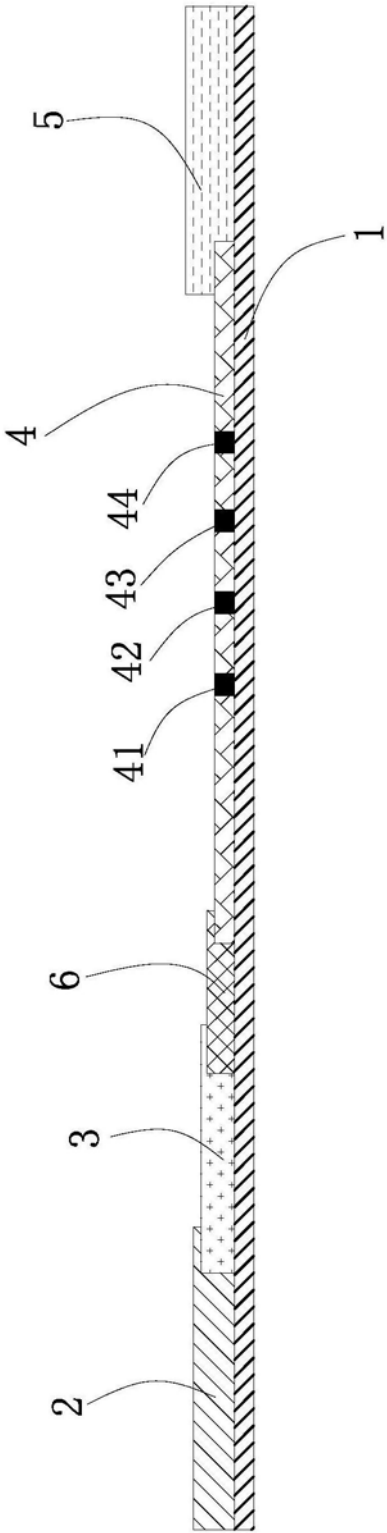


图1

专利名称(译)	一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒		
公开(公告)号	CN208818724U	公开(公告)日	2019-05-03
申请号	CN201822096206.5	申请日	2018-12-13
[标]发明人	顾悦 蒋理国 张瑜		
发明人	顾悦 蒋理国 钱梦姣 张瑜		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种快速定量检测IL-6和PCT的免疫荧光层析试剂盒，试剂盒包括检测卡和套设在检测卡外周的护套，检测卡包括底板和依次设于底板上的样本垫、结合垫、检测垫、吸水纸，检测垫上设置有质控线、具有PCT抗体和IL-6抗体的检测线，结合垫的上表面涂覆有荧光微球涂层，检测卡还包括设于结合垫与检测垫之间的样本流动减缓垫；该试剂盒，同时设置包被PCT、IL-6抗体的检测线和羊抗兔IgG的质控线，能够同时准确、快速地定量测定待测样本中PCT和IL-6的浓度，并且两种抗原互不干扰。相较于ELISA和化学发光法，本试剂盒操作简单，耗时短，成本低。本试剂盒可以定量测定PCT、IL-6，灵敏度高、检测范围宽、重复性好，弥补了胶体金免疫层析法无法定量检测的不足。

