



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107389925 B

(45)授权公告日 2019.03.29

(21)申请号 201710628310.1

(22)申请日 2017.07.28

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107389925 A

(43)申请公布日 2017.11.24

(73)专利权人 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心

地址 200127 上海市浦东新区东方路1678号

(72)发明人 宁铂涛

(74)专利代理机构 上海卓阳知识产权代理事务所(普通合伙) 31262

代理人 周春洪

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 21/78(2006.01)

G01N 21/77(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56)对比文件

CN 205080139 U,2016.03.09,说明书第5-16段,图3.

CN 203101391 U,2013.07.31,说明书第6-22段.

CN 101208602 A,2008.06.25,全文.

CN 1522304 A,2004.08.18,全文.

WO 0233408 A1,2002.04.25,全文.

程璐等. 脓症患者血清IL-6及IL-10浓度变化与预后的相关性研究.《程璐等,东南大学学报(医学版)》.2014,第33卷(第4期),441-445.

审查员 周洋

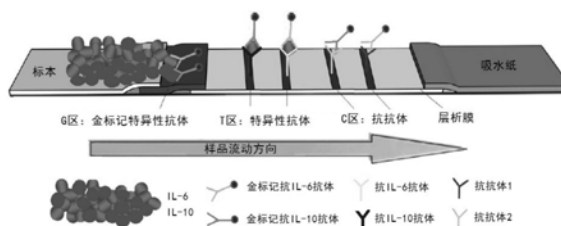
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

## (54)发明名称

用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒

## (57)摘要

本发明涉及一种用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒,所述试剂盒包括免疫层析试纸条,及位于试纸条上的金胶垫、硝酸纤维膜;所述金胶垫上的金标抗体由抗IL-6抗体和抗IL-10抗体组成,所述硝酸纤维膜上从左至右依次为包被抗IL-6抗体的检测线、包被抗IL-10抗体的检测线、包被羊抗鼠抗体的质控线。本发明还提供用于检测结果判断的标准比色卡,用于对比区分早期脓毒症、严重脓毒症、革兰阴性菌感染和革兰阳性菌感染。本发明的试剂盒具有稳定、简单、快速、准确、无污染和费用低等优点,可批量化生产,提高脓毒症的早期快速诊断效率,降低患者经济负担,降低脓毒症的病死率,具有显著的经济效益。



1. 用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒,包括IL-6和IL-10二联免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板、样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,其特征在于,所述金胶垫上的金标抗体由抗IL-6抗体和抗IL-10抗体组成,所述硝酸纤维膜上从左至右依次为包被抗IL-6抗体的检测线、包被抗IL-10抗体的检测线、包被羊抗鼠抗体的质控线;

所述试剂盒还包括用于检测结果判断的标准比色卡,所述标准比色卡包括IL-6比色卡和IL-10比色卡,所述IL-6比色卡包括两个浓度梯度的颜色,分别为227.7pg/mL和40.6pg/mL;所述IL-10比色卡包括三个浓度梯度的颜色,分别为96.0pg/mL、42.0pg/mL和20.0pg/mL;

所述试剂盒还包含操作说明,所述操作说明记载以下内容:免疫层析试纸条的检测方法与标准比色卡的颜色进行对比,判断检测样本IL-6和IL-10浓度,(1)当IL-6大于40.6pg/mL和IL-10大于20.0pg/mL为脓毒症;(2)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于42.0pg/mL为严重脓毒症;(3)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于96.0pg/mL为革兰阴性菌感染;(4)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10小于96.0pg/mL为革兰阳性菌感染。

## 用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测技术领域,具体地说,是脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒。

### 背景技术

[0002] 脓毒症是各级医院常见的严重感染性疾病,其感染源绝大部分为细菌。严重脓毒症的病死率更是居高不下,可高达30-50%,中国每年死于脓毒症的人数近100万。脓毒症治疗成功的关键是早期诊断、早期干预,因此,如何早期快速的诊断脓毒症是决定脓毒症预后的关键因素。IL-6是Th-2细胞分泌的促炎因子,促进B细胞增殖分化和分泌抗体,促进T细胞分化成CTL,作为内源性致热源参与炎症反应,引起白细胞升高并促进肝脏合成急性时相蛋白(CRP)。IL-10是Th-2细胞分泌的抗炎因子,在病原菌抗原呈递过程中抑制细胞因子和趋化因子的释放,阻止抗原呈递的过程,同时它还抑制了T细胞的克隆增殖,从而起到对抗炎症反应的作用。通过流式细胞术检测,研究者发现IL-6、IL-10在脓毒症的早期(感染一小时内)就异常升高,其对细菌感染预测值的特异性和敏感性均优于传统的CRP ( $p < 0.001$ ),IL-6和IL-10在各种病毒感染组中明显低于细菌感染组 ( $p < 0.001$ ),IL-6和IL-10能区分脓毒症和重症脓毒症,其升高水平与病人死亡率呈正相关。因此,IL-6、IL-10对细菌感染的脓毒症的诊断有着重要的意义,但是流式细胞术分析费用昂贵、技术要求高,难以普及到基层医院。胶体金免疫层析法是将特异性的抗原或抗体以条带状固定在膜上,胶体金标记试剂(抗体或单克隆抗体)吸附在结合垫上,当待检样本加到试纸条一端的样本垫上后,通过毛细作用向前移动,溶解结合垫上的胶体金标记试剂后相互反应,再移动至固定的抗原或抗体的区域时,待检物与金标试剂的结合物又与之发生特异性结合而被截留,聚集在检测带上,可通过肉眼观察到显色结果。以胶体金作为示踪标志物应用于抗原抗体的免疫标记技术,具有稳定、简单、快速、准确、无污染和费用低等独特优点。

[0003] 中国专利200680021670.5公开了一种脓毒症的诊断方法,具体包括预测具有发展脓毒症危险的个体中脓毒症发展形成的方法,通过评价个体的生物标记谱中的特征,如这些特征满足特定数值集,则该个体可能发展为脓毒症;该专利还提供了预测具有发展脓毒症阶段危险的个体中脓毒症阶段发展形成及诊断个体中脓毒症的方法,其中生物标记包括IL-6和IL-8。现有技术中尚未发现利用IL-6和IL-10组合,通过胶体金免疫层析法诊断脓毒症,并对脓毒症严重程度进行分级方面的研究。

### 发明内容

[0004] 本发明的目的是针对现有技术中的不足,提供脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒。

[0005] 为实现上述目的,本发明采取的技术方案是:

[0006] 一种用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒,包括IL-6

和IL-10二联免疫层析试纸条,所述免疫层析试纸条包括底板、样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层和吸水纸层,其特征在于,所述金胶垫上的金标抗体由抗IL-6抗体和抗IL-10抗体组成,所述硝酸纤维膜上从左至右依次为包被抗IL-6抗体的检测线、包被抗IL-10抗体的检测线、包被羊抗鼠抗体的质控线。

[0007] 作为本发明的一个优选实施方案,所述试剂盒还包括用于检测结果判断的标准比色卡,所述标准比色卡包括IL-6比色卡和IL-10比色卡,所述IL-6比色卡包括两个浓度梯度的颜色,分别为227.7pg/mL和40.6pg/mL;IL-10比色卡包括三个浓度梯度的颜色,分别为96.0pg/mL、42.0pg/mL和20.0pg/mL。

[0008] 作为本发明的一个优选实施方案,所述试剂盒还包含操作说明,所述操作说明记载以下内容:免疫层析试纸条的检测结果与标准比色卡的颜色进行对比,判断检测样本IL-6和IL-10浓度,(1)当IL-6大于40.6pg/mL和IL-10大于20.0pg/mL为脓毒症;(2)当IL-6大于227.7pg/mL,IL-10大于42.0pg/mL为严重脓毒症;(3)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于96.0pg/mL为革兰阴性菌感染;(4)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10小于96.0pg/mL为革兰阳性菌感染。

[0009] IL-6、IL-10指标对细菌感染的脓毒症的诊断有着重要的意义,但是目前普遍采用的流式细胞术分析费用高、设备购置昂贵、技术要求高、检测时间较长(实际需要2天);胶体金免疫层析法有稳定、简单、快速、准确、无污染和费用低等独特优点;该检测技术不但临床检测费用便宜,而且能够在20分钟左右完成检测,更为重要的是不要基层医院购置昂贵设备、对基层医院的检测员也没有高技术要求。

[0010] 本发明的IL-6和IL-10组合的二联免疫胶体金试剂盒,对脓毒症的早期、快速诊断,以及抗生素的合理使用有着重要的意义,并且指导脓毒症的早期治疗,进而降低脓毒症的临床病死率。

[0011] 本发明的二联免疫胶体金试剂盒不仅能提高我国脓毒症的早期快速诊断效率,更能促进企业对试剂盒的批量化生产,从而更广泛的应用到各级医院,必将提高脓毒症的早期诊断率,降低病人的经济负担,降低脓毒症的病死率,并给社会带来一定的经济效益。

[0012] 本发明优点在于:

[0013] 1、本发明的二联胶体金免疫层析试剂盒可实现对脓毒症早期、快速诊断。

[0014] 2、本发明的二联胶体金免疫层析试剂盒对指导抗生素的合理使用有着重要的意义。

[0015] 3、本发明的二联胶体金免疫层析试剂盒可用于指导脓毒症的早期治疗,进而降低脓毒症的临床病死率。

[0016] 4、本发明的试剂盒与现有技术比较具有稳定、简单、快速、准确、无污染和费用低等独特优点。

## 附图说明

[0017] 附图1是抗原检测原理图。

[0018] 附图2是二联胶体金免疫层析试剂盒结构示意图。

[0019] 附图3是二联胶体金免疫层析试剂盒检测过程示意图。

## 具体实施方式

[0020] 下面结合具体实施方式,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。此外应理解,在阅读了本发明记载的内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0021] 实施例1 IL-6和IL-10胶体金免疫层析试剂盒的制备

[0022] 1.1 确定IL-6和IL-10诊断脓毒症的临界值

[0023] (1) IL-6大于40.6pg/mL和IL-10大于20.0pg/mL设定为脓毒症。

[0024] (2) IL-6大于227.7pg/mL,IL-10大于42.0pg/mL设定为严重脓毒症。

[0025] (3) IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于96.0pg/mL设定为革兰阴性菌感染。

[0026] (4) IL-6大于227.7pg/mL和IL-10小于96.0pg/mL设定为革兰阳性菌感染。

[0027] IL-6设定两个浓度梯度227.7pg/mL和40.6pg/mL;IL-10设定三个浓度梯度96.0pg/mL、42.0pg/mL和20.0pg/mL。

[0028] 1.2 枸橼酸三钠还原法制备胶体金

[0029] 取0.01%氯金酸水溶液100ml加热至沸,搅动下准确加入1%柠檬酸三钠水溶液0.7ml,金黄色的氯金酸水溶液在2分钟内变为紫红色,继续煮沸15分钟,冷却后以蒸馏水恢复到原体积,即为胶体金溶胶。

[0030] 1.3 胶体金的鉴定:分光光度计扫描吸收峰时光波长来估计金颗粒的大小。

[0031] 1.4 免疫胶体金制备

[0032] 1.4.1 蛋白质的处理

[0033] ①透析除盐:将蛋白质置入透析袋中然后直接放入双蒸水或极低浓度的盐水(0.005mol/l NaCl,pH7.0)透析。

[0034] ②去除蛋白质中的沉淀:以100000r/min 4℃离心60min取上清液,调整蛋白质浓度至1mg/ml即可用于标记。

[0035] 1.4.2 蛋白质最适用量的选择

[0036] 将待标记的蛋白质储存液作系列稀释后,分别取0.1ml(含蛋白质5~40ug)加到1ml胶体金溶液中,另设一管不加蛋白质的对照管,5分钟后加入0.1ml 10%NaCl溶液,混匀后静置2小时,不稳定的金溶胶将发生聚沉,能使胶体金稳定的最适蛋白量再加10%即为最佳标记蛋白量。

[0037] 1.4.3 标记步骤

[0038] ①用0.1mol/L  $K_2CO_3$ 或0.1mol/L HCl调节金溶胶至所需pH(标记SPA时调到pH6.0)。

[0039] ②于100ml金溶胶中加入最佳标记量的蛋白质溶液(体积为2~3ml),搅拌2~3分钟。

[0040] ③加入5ml 1%PEG20000溶液。

[0041] ④于10000~100000g离心30~60分钟(根据粒径大小选择不同离心条件),小心吸去上清液(切忌倾倒)。

[0042] ⑤将沉淀悬浮于一定体积含0.2~0.5mg/ml PEG20000的缓冲液中,离心沉淀后,再用同一缓冲液恢复,浓度以 $A_{1cm}/540nm=1.5$ 左右为宜,以0.5mg/ml叠氮钠防腐,置4℃保

存。

[0043] ⑥包被后的金溶胶也可浓缩后于Sephadex G-200柱进行凝胶层析分离纯化,以含0.1%BSA的缓冲溶液洗脱。用IgG包被的金溶胶洗脱液pH为8.2。

[0044] 1.4.4 铺金

[0045] ①按每张玻纤可以铺金36ml计算金标液的体积;

[0046] ②按计算好的体积在每张玻纤上铺金,并用圆形试管刮均匀。

[0047] ③30%湿度以下,37~40℃干燥18~24小时,如不立即使用,加干燥剂铝箔袋封存。

[0048] ④储存:保存过程中严格防潮,以后打开和使用一定要在30%湿度以下。

[0049] ⑤膜包被:以“252”泵速(对应速度2.7ul/cm),将质控线液和检测线液均匀地划在膜上,质控线划在距膜顶端 $12.1 \pm 0.1$ cm处,检测线划在距膜顶端 $12.5 \text{cm} \pm 0.1$ cm处,质控线与检测线相距 $5 \text{mm} \pm 1 \text{mm}$ 。

[0050] ⑥30%湿度以下,37~40℃干燥18~24小时,如不立即使用,加干燥剂铝箔袋封存。

[0051] ⑦储存:保存过程中严格防潮,以后打开和使用一定要在30%湿度以下。

[0052] ⑧样品垫的准备:按每张玻纤可以铺液36ml计算全血样品垫处理液的体积;

[0053] ⑨按计算好的体积在每张玻纤上铺液,并用圆形试管刮均匀。

[0054] ⑩30%湿度以下,37~40℃干燥18~24小时,如不立即使用,加干燥剂铝箔袋封存。

[0055] ⑪储存:保存过程中严格防潮,以后打开和使用一定要在30%湿度以下。

[0056] ⑫组装:将包被好的NC膜贴在塑料大卡上。

[0057] ⑬各组成部分的切割:各组分用切割机切割成以下大小:

[0058] 金标垫:6mm×310mm;样品垫:15mm×310mm;吸水垫:20mm×310mm;不干胶纸:13mm×310mm

[0059] ⑭层压:将上述切割好的材料进行贴膜制成IL-6和IL-10抗体胶体金试纸条。

[0060] 1.5 制备标准比色卡:应用IL-6和IL-10标准品,确定胶体金在IL-6设定两个浓度梯度227.7pg/mL和40.6pg/mL,IL-10设定三个浓度梯度96.0pg/mL、42.0pg/mL和20.0pg/mL的相对颜色深度,每批免疫层析胶体金试剂盒做一份标准的比色卡,用于检测结果的判断。

[0061] 1.6 结构说明 请参见图1和图2,图1为抗原检测原理图,图2为IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒结构示意图。该试剂盒设有底板1,底板上依次覆盖样品垫2、金胶垫3、硝酸纤维膜层4和吸水纸层5。所述底板1是PVC底板,样品垫2的材料是玻璃纤维。金胶垫3的制作:将上述制备好的抗IL-6金标抗体和抗IL-10金标抗体溶液喷点在1cm宽的玻璃纤维膜上,干燥。硝酸纤维膜层4的制作:将二抗喷点在硝酸纤维膜(NC膜)上,作为质控线(C1、C2)。将抗IL-10抗体喷点在距离质控线1cm处作为检测线1(T1线),将抗IL-6抗体喷点在距离质控线2cm处作为检测线2(T2线)。于37摄氏度干燥,将上述的样品垫、金胶垫、硝酸纤维膜层、吸水纸层依次组装在底板上,切成4mm宽的试纸条,装入检测试剂盒中。

[0062] 1.7 检测方法

[0063] 1、取50μl的血液样本加在试纸条的加样区处;

[0064] 2、10min后观察记录结果,将检测区T线和C线与试剂盒附带的标准比色卡进行对比,根据颜色深浅判断检测样本中IL-6和IL-10浓度。检测结果判断标准如下:(1)当IL-6大于40.6pg/mL和IL-10大于20.0pg/mL为脓毒症;(2)当IL-6大于227.7pg/mL,IL-10大于42.0pg/mL为严重脓毒症;(3)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于96.0pg/mL为革兰阴性菌感染;(4)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10小于96.0pg/mL为革兰阳性菌感染。

#### [0065] 1.8 检测原理

[0066] 请参照图3,图3为二联胶体金免疫层析试剂盒检测过程示意图。如图所示,将血液样本6滴加在样品垫2上,由于层析作用,液体沿层析方向7向吸水纸层5方向流动,当流经金胶垫3时,金标抗体便会被溶解,并与血液中的IL-6和IL-10结合,形成金标复合物。随液体继续迁移,在流经检测线(T1、T2)时,金标复合物与检测线上的抗IL-6抗体和抗IL-10抗体结合而凝聚显色;流经质控线(C1、C2)时,复合物与二抗结合而凝聚显色。如质控线不显色则表明检测无效,如检测线显色表明样本中含有IL-6和IL-10。将两条检测线的颜色与试剂盒附带的标准比色卡进行对比,根据颜色深浅判断检测样本中IL-6和IL-10浓度。检测结果判断标准如下:(1)当IL-6大于40.6pg/mL和IL-10大于20.0pg/mL为脓毒症;(2)当IL-6大于227.7pg/mL,IL-10大于42.0pg/mL为严重脓毒症;(3)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10大于96.0pg/mL为革兰阴性菌感染;(4)当IL-6大于227.7pg/mL和IL-10小于96.0pg/mL为革兰阳性菌感染。

#### [0067] 实施例2 试剂盒临床标本的检测验证

[0068] (1)脓毒症的诊断参考2015中国儿童脓毒性休克专家共识:脓毒症诊断:发热(肛温 $>38.5^{\circ}\text{C}$ )或低体温(肛温 $<35^{\circ}\text{C}$ )、心动过速(低体温者可以无心心动过速),伴以下至少一个脏器功能异常:意识改变、低氧血症、血清乳酸增高或洪脉。

[0069] (2)采用脓毒症患者的全血进行测试,测试条带的颜色和标准比色卡进行对比,以及和临床病人流式细胞术检测的细胞因子绝对值进行同步对照,进一步验证免疫胶体金试剂盒的准确性、可靠性和快速性。

[0070] (3)对本发明快速诊断IL-6和IL-10胶体金免疫层析试剂盒准确性进一步做大样本的验证,收集临床志愿者,包括32例脓症患者、28例严重脓症患者、15例革兰阴性菌感染患者、15例革兰阳性菌感染患者,采集志愿者全血,利用实施例1制备的胶体金免疫层析试剂盒检测志愿者脓症患者患病情况,结果显示本发明的试剂盒准确度大于98%

[0071] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员,在不脱离本发明方法的前提下,还可以做出若干改进和补充,这些改进和补充也应视为本发明的保护范围。

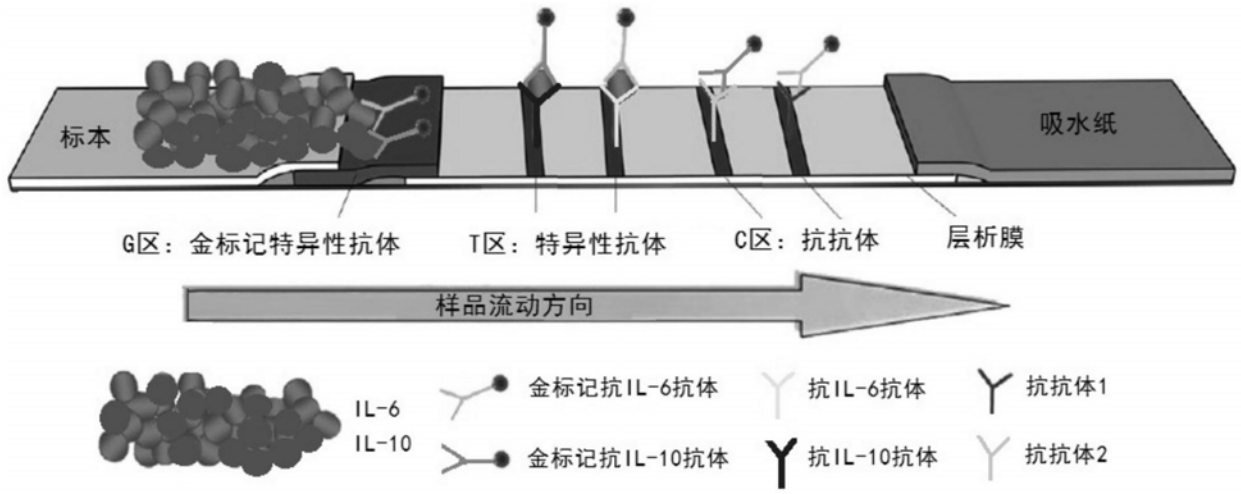


图1

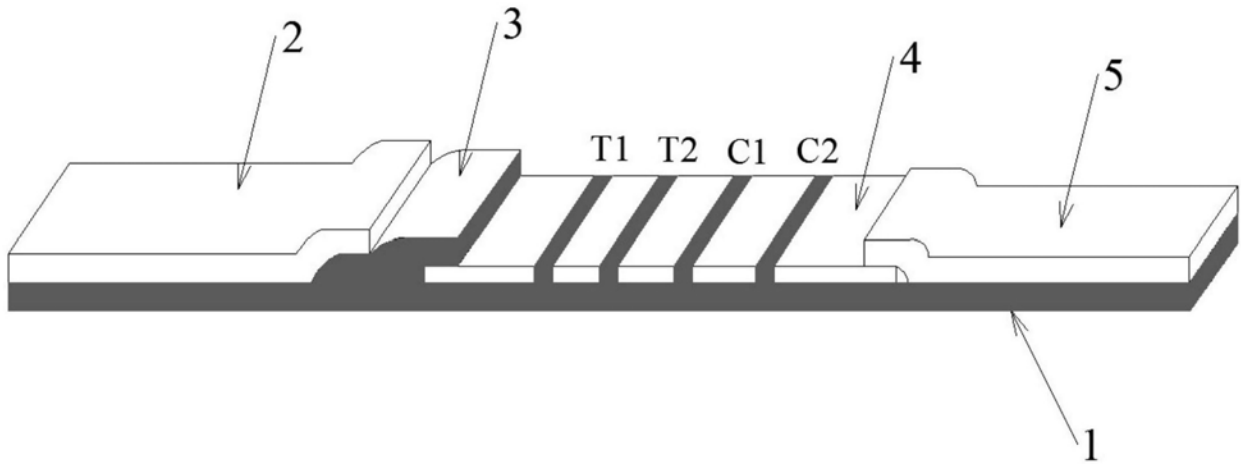


图2

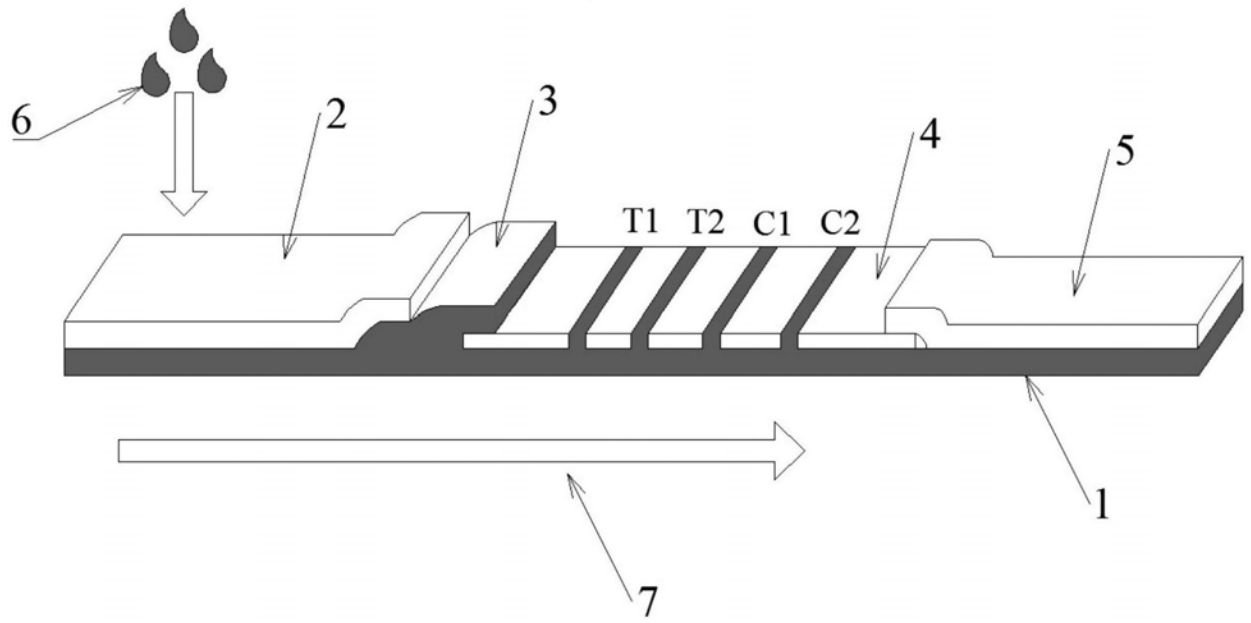


图3

专利名称(译)	用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN107389925B</a>	公开(公告)日	2019-03-29
申请号	CN201710628310.1	申请日	2017-07-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心		
[标]发明人	宁铂涛		
发明人	宁铂涛		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/569 G01N33/68 G01N21/78 G01N21/77 G01N33/532		
CPC分类号	G01N21/77 G01N21/78 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/56911 G01N33/6869 G01N2021/7759 G01N2333/195 G01N2333/7155		
代理人(译)	周春洪		
审查员(译)	周洋		
其他公开文献	CN107389925A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种用于脓毒症快速诊断的IL-6和IL-10二联胶体金免疫层析试剂盒，所述试剂盒包括免疫层析试纸条，及位于试纸条上的金胶垫、硝酸纤维膜；所述金胶垫上的金标抗体由抗IL-6抗体和抗IL-10抗体组成，所述硝酸纤维膜上从左至右依次为包被抗IL-6抗体的检测线、包被抗IL-10抗体的检测线、包被羊抗鼠抗体的质控线。本发明还提供用于检测结果判断的标准比色卡，用于对比区分早期脓毒症、严重脓毒症、革兰阴性菌感染和革兰阳性菌感染。本发明的试剂盒具有稳定、简单、快速、准确、无污染和费用低等优点，可批量化生产，提高脓毒症的早期快速诊断效率，降低患者经济负担，降低脓毒症的病死率，具有显著的经济效益。

