



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470832 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201910694089.9

(22)申请日 2019.07.30

(71)申请人 山东第一医科大学(山东省医学科学院)

地址 271099 山东省泰安市泰山区长城路中段619号

(72)发明人 王莹 孙保亮 孙景懿 李汉霞
候亚军 袁慧 杨明峰

(74)专利代理机构 济南泉城专利商标事务所
37218

代理人 张贵宾

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

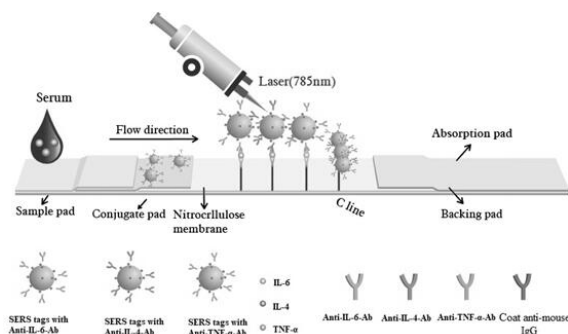
权利要求书2页 说明书5页 附图1页

(54)发明名称

同时检测IL-6、IL-4和TNF- α 的空心双金属试纸条及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及IL-6、IL-4和TNF- α 三联空心金银双金属免疫试纸条的制备方法,可有效解决IL-6、IL-4和TNF- α 的检测问题,分别制备空心金银双金属标记用的、包被检测线用的抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体分别制备抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体空心金银双金属标记物,将空心金银双金属标记物干燥、固化,将包被检测线用的抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体至左向右依次分别包被于硝酸纤维膜上,成检测线,将抗鼠免疫球蛋白抗体包被于硝酸纤维膜上,成包被膜的质控线,即成。工艺简单,新颖独特,能够快速简便、早期、有效诊断和鉴别脑卒中。



1. 一种IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条,其特征在于,所述试纸条包括底板以及样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜,所述结合垫装载有免疫空心金银双金属,所述免疫空心金银双金属以金纳米颗粒为标记物,所述空心金银双金属分别与拉曼信号分子DTNB和IL-6、IL-4和TNF- α 抗体偶联形成抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属;所述硝酸纤维素膜上包被有三条检测线和一条质控线,所述检测线包被有IL-6、IL-4和TNF- α 抗体,质控线包被有兔抗鼠IgG抗体。

2. 根据权利要求1所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条,其特征在于,所述试纸条还包括吸水纸,所述样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在底板上,两两之间相互交错重叠2 mm。

3. 权利要求1或2所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1) 将去离子水预热后与氯金酸溶液混合均匀,然后与柠檬酸钠溶液混合,得到空心金银双金属溶液,空心金银双金属溶液调节PH值后与抗体溶液混合,经过封闭和离心处理,得到空心金银双金属标记抗体溶液;

(2) 将样品垫用样品垫处理液浸泡,将结合垫用结合垫处理液浸泡,烘干;

(3) 将所述空心金银双金属标记抗体溶液喷涂于预处理后的结合垫上,并进行干燥处理;

(4) 将所述抗原溶液喷涂于所述硝酸纤维素膜的检测线上,并进行干燥处理;

(5) 将所述二抗溶液喷涂于所述硝酸纤维素膜的质控线上,并进行干燥处理;

(6) 依次将所述样品垫、干燥处理后的结合垫、干燥处理后的硝酸纤维素膜以及吸水垫固定于所述底板上表面,得到所述试纸条;

其中,所述步骤(2)中样品垫处理液为0.005 M且pH 为7.4-9.0的硼酸-硼砂缓冲液:2 wt% 氯化钠、2 wt% 曲拉通X-100、0.5 wt%牛血清白蛋白及0.5 wt%聚乙烯吡咯烷酮;结合垫处理液为0.005 M 且pH为7.4- 9.0的硼酸-硼砂缓冲液:5 wt%-10 wt% 蔗糖、2 wt% 海藻糖、0.05 wt%曲拉通X-100。

4. 根据权利要求3所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条制备方法,其特征在于,所述步骤(1)中空心金银双金属溶液制备步骤如下:将90-100毫升95-100℃去离子水与300-320微升质量分数1%氯金酸溶液混合并搅拌2分钟,得到第一混合液;将所述第一混合液与900-1000 微升1%的柠檬酸钠溶液搅拌,得到空心金银双金属溶液。

5. 根据权利要求3所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条制备方法,其特征在于,所述空心金银双金属标记抗体溶液采用如下步骤制备:

使用 10^{-3} mol/L的DTNB与空心金银双金属偶联,加入EDC和NHS活化,EDC、NHS与空心金银双金属的摩尔比为2:2:1-5:5:1,室温活化30-35 min;活化结束后,使用含PBS的溶液洗涤空心金银双金属,加入IL-6、IL-4和TNF- α 抗体,室温反应1-2 h,然后用1 wt% BSA、pH=7.4的PBS溶液37 °C封闭30 min;封闭结束后,用PBS溶液重新分散空心金银双金属,4-5℃保存备用。

6. 根据权利要求3所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条制备方法,其特征在于,所述抗体溶液与抗原溶液中的抗体和抗原为IL-6、IL-4和TNF- α 抗体与抗原,所述二抗溶液中的二抗为羊抗鼠二抗。

7. 根据权利要求3所述IL-6、IL-4和TNF- α 炎症因子三联免疫试纸条制备方法,其特征在于,所述空心金银双金属标记抗体溶液的浓度为1-100微升/毫升,所述抗原溶液的浓度为0.05-10毫克/毫升,所述二抗溶液的浓度为0.05-10毫克/毫升。

8. 一种免疫试纸条,其特征在于,采用权利要求书2-6任意一项所述制备方法得到。

9. 权利要求8所述试纸条的检测方法,其特征在于,将血液样品滴加至样品垫上,静置,基于所述检测线和质控线的显色结果,确定样品中待测物的含量。

10. 根据权利要求9所述试纸条的检测方法,其特征在于,所述待测物为IL-6、IL-4和TNF- α 中的至少一种。

同时检测IL-6、IL-4和TNF- α 的空心双金属试纸条及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于医学检测技术领域,涉及一种同时检测IL-6、IL-4和TNF- α 的空心双金属试纸条及其制备方法。

背景技术

[0002] 神经炎症反应是脑缺血后造成脑组织损伤的最重要的病理生理机制之一。脑缺血后免疫炎症反应主要包括外周血中性粒细胞等白细胞在脑实质内的浸润,巨噬细胞(Microphage)、小胶质细胞(Microglia)等内源性炎性细胞的激活,以及TNF- α 、IL-4、IL-6等一系列炎症因子的分泌和释放。大量研究表明抑制脑梗死后免疫炎症级联反应的药物可以有效减少脑损伤,发挥神经保护作用。目前,神经炎症机制已成为缺血性卒中治疗研究的关键性靶点。在脑缺血后神经炎症机制中,Microglia的活化具有极其关键的作用。在缺血性脑损伤的急性期和恢复期,缺血核心区和半暗带区均可见激活的Microglia,其活化后M2型可通过清除细胞碎片和刺激神经血管重塑来促进脑损伤后的修复,但是过度激活的M1型会促进大量细胞毒性分子的释放,例如炎症分子NO及促炎性因子TNF- α , IL-6, IL-4等,加重脑损伤。目前研究提示,作为多功能细胞因子以及炎症标志物,参与体内多种反应,在人体的健康中扮演着重要的角色,是应用于感染性疾病早期诊断筛查的一个重要手段。因此,血液中含量的测定对炎症反应、感染性疾病、肿瘤等多种疾病的诊断及治疗有着重要的指导作用。因此,血液中测定对于多种疾病的诊断以及预后具有重要的意义。理想的检测的方法需具备以下特点:灵敏度高、特异型好、操作简单、快速、方便携带、成本较低、自动化检测。但目前市场上还没有具备以上所有特点的检测方法。使用传统的放射免疫法会对操作人员的健康造成一定的威胁,并且放射性的标志物会对环境产生污染,改进的化学发光检测方法可以实现自动化但是仪器价格昂贵,限制了其应用以及推广,市面上常见的ELISA方法操作较为复杂并且所需时间长,不能及时进行临床的诊断。

发明内容

[0003] 本发明旨在至少在一定程度上解决现有技术中存在的技术问题至少之一。为此,本发明提出了制备试纸条的方法、试纸条、联检试纸条以及利用试纸条或者联检试纸条检测样品中待测物的方法。利用本发明制备试纸条的方法所得到的试纸条能够有效地检测样品中待测物含量,且灵敏度高,可以准确地对待测物含量较低的样品进行检测,例如血液。

[0004] 为了达到上述目的,本发明是采用下述的技术方案实现的:

一种可定量检测血液中IL-6、IL-4和TNF- α 的免疫层析试纸条,所述试纸条包括底板以及样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜,所述结合垫装载有免疫空心金银双金属,所述免疫空心金银双金属以金纳米颗粒为标记物,所述空心金银双金属分别与拉曼信号分子DTNB和IL-6、IL-4和TNF- α 抗体偶联形成抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属;所述硝酸纤维素膜上包被有三条检测线和一条质控线,所述检测线包被有IL-6、IL-4和TNF- α 抗体,质控线

包被有兔抗鼠IgG抗体。

[0005] 作为优选,所述试纸条还包括吸水纸,样品垫、结合垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次粘贴在底板上,两两之间相互交错重叠2 mm。

[0006] 制备上述可定量检测血液中IL-6、IL-4和TNF- α 的免疫层析试纸条的方法,包括如下步骤:

(1)将空心金银双金属经过预处理后,分别与拉曼信号分子DTNB和IL-6、IL-4和TNF- α 抗体偶联,制备得到抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属;

(2)将样品垫用样品垫处理液浸泡,将结合垫用结合垫处理液浸泡,烘干;

(3)将步骤(1)得到的抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属喷涂在步骤(2)处理过的结合垫上,烘干;

(4)在硝酸纤维素膜上包被一条检测线和一条质控线,其中检测线包被有IL-6、IL-4和TNF- α 抗体,质控线包被有兔抗鼠IgG抗体;

(5)将步骤(2)所述的样品垫、步骤(3)所述的结合垫和步骤(4)所述的硝酸纤维素膜以及吸水纸部分重叠,组装。

[0007] 所述步骤(1)中的空心金银双金属为金纳米颗粒;步骤(1)具体操作步骤为:使用 10^{-3} mol/L的DTNB与空心金银双金属偶联,加入EDC和NHS活化,EDC、NHS与空心金银双金属的摩尔比为2:2:1-5:5:1,室温活化30 min;活化结束后,使用含PBS的溶液洗涤空心金银双金属,加入IL-6、IL-4和TNF- α 抗体,室温反应1 h,然后用1 wt% BSA、pH=7.4的PBS溶液37 °C封闭30 min;封闭结束后,用PBS溶液重新分散空心金银双金属,4 °C保存备用。

[0008] 其特征在于,所述步骤(2)中样品垫处理液为0.005 M且pH 为7.4-9.0的硼酸-硼砂缓冲液:2 wt% 氯化钠、2 wt% 曲拉通X-100、0.5 wt%牛血清白蛋白及0.5 wt%聚乙烯吡咯烷酮。

[0009] 所述步骤(2)中结合垫处理液为0.005 M 且pH为7.4- 9.0的硼酸-硼砂缓冲液:5 wt%-10 wt% 蔗糖、2 wt% 海藻糖、0.05 wt%曲拉通X-100。

[0010] 所述步骤(3)的喷涂方法为将制备好的抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属使用定量喷膜装置或微量移液器以30 μ L/cm的量均匀涂于结合垫上,然后置于25-37 °C烘箱中干燥后加入干燥剂封存备用。

[0011] 所述步骤(4)具体操作如下:使用抗体稀释液分别将IL-6、IL-4和TNF- α 抗体和兔抗鼠多克隆IgG抗体的浓度调整至0.5-2 mg/mL,然后将两者用划膜仪以1 μ L/cm的量将上述IL-6、IL-4和TNF- α 抗体和IgG抗体以0.5 cm的间隔均匀一致地喷印于硝酸纤维素膜上,分别作为检测线和质控线,晾干后加入干燥剂封存备用。

[0012] 所述抗体稀释液为含有1 wt%-2 wt%蔗糖的0.01 M,pH为7.2- 7.6的磷酸盐缓冲液;所述步骤(4)具体操作为:将IL-6、IL-4和TNF- α 抗体分别稀释为1.5 mg/mL,将IgG抗体稀释为0.5 mg/mL,使用划膜仪以1 μ L/cm的量将四者以0.5 cm的间隔均匀一致地喷印于硝酸纤维素膜上,室温晾干,加入干燥剂封存,4 °C保存备用。

[0013] 利用本发明的试纸条对血液中IL-6、IL-4和TNF- α 进行检测,在IL-6、IL-4和TNF- α 双阳性的基础上,进一步判断脑卒中发生率及预后监测,以提高对脑卒中的发生早期确诊率及预后监测。在该检测试纸条中,将IL-6、IL-4和TNF- α 抗体分别共价偶联于纳米颗粒上,将与IL-6、IL-4和TNF- α 抗体的各自配对抗体分别包被于硝酸纤维素膜上作为检测线,将兔

抗鼠IgG抗体包被于硝酸纤维素膜上作为质控线,按照常规免疫层析法的方法进行标本的检测,再利用拉曼信号检测仪进行检测。本方法结合了拉曼和免疫层析法的现有优点,既能实现标本中的显色反应,及微量待检物的检测,又大大缩短检测时间;即可实现单人份的检测,也可以进行批量标本检测;既能定性分析,又能利用拉曼信号检测仪的检测即时得到定量结果。该试纸条制备工艺简单,操作性强,省时省力,方便实用。

[0014] 与现有技术相比,本发明的优点和积极效果在于:

1. 本发明以空心金银双金属颗粒制备的免疫空心金银双金属作为检测探针与免疫层析检测技术相结合,能够实现对IL-6、IL-4和TNF- α 的快速、定量检测。

[0015] 2. 通过对试纸条的改进,首次创造性地将空心金银双金属免疫层析技术引入IL-6、IL-4和TNF- α 的联合检测中,结合拉曼信号检测仪,可实现对IL-6、IL-4和TNF- α 的单人份定量检测,具有快速、简便、实用、高特异性及高灵敏度的特点,显著提高了脑卒中检测的精确性,即在IL-6、IL-4和TNF- α 双阳性的基础上,可进一步判断脑卒中发生率,以提高对脑卒中的发生的早期诊断率及预后监测,具有较好的临床应用意义。

[0016] 3. 通过拉曼信号检测系统的引进,可实现对脑卒中标志物的微量检测,使得试纸条的灵敏度比传统的免疫层析技术提高了100倍;

4. 本发明操作简便,适合大规模生产,定量检测所需的设备也已上市,因此,该空心金银双金属免疫层析试纸条可广泛应用于医院、体检等大批量使用单位、一些基层诊所等小批量、单人份的单位以及医疗资源匮乏的地区使用;本发明对于脑卒中病人血液中标志物IL-6、IL-4和TNF- α 水平的定量检测有着积极的意义。

附图说明

[0017] 图1为本发明的免疫层析试纸条的结构示意图。

[0018] 图2为添加不同量的IL-6、IL-4和TNF- α 变化图。

具体实施方式

[0019] 为了能够更清楚地理解本发明的上述目的、特征和优点,下面结合具体实施例对本发明做进一步说明。需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0020] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但是,本发明还可以采用不同于在此描述的其他方式来实施,因此,本发明并不限于下面公开说明书的具体实施例的限制。

[0021] 实施例1,如图1和图2所示,本实施例提供免疫层析试纸条的制备和检测。

[0022] 在具体实施例中,所采用IL-6、IL-4和TNF- α 配对抗体均为单克隆抗体技术制备的单抗。利用双抗体夹心检测IL-6、IL-4和TNF- α 抗原的原理检测标本,当待测标本中含有IL-6、IL-4和TNF- α 抗原时,抗原分别会先和结合垫上的偶联IL-6、IL-4和TNF- α 抗体的空心金银双金属结合,随着层析的进行,结合物向前移动到达IL-6、IL-4和TNF- α 抗体检测线处,IL-6、IL-4和TNF- α 抗原会再次和包被抗体结合形成双抗体夹心复合物而聚集在检测线处,另外,未结合的偶联IL-6、IL-4和TNF- α 抗体的空心金银双金属会继续前行,到达质控线C处时,会和兔抗鼠IgG抗体结合,故在C处同样会出现空心金银双金属聚集。整个反应在5分钟

内可进行完全,一般反应10分钟后即可置于拉曼信号检测仪中检测,检测线及质控线都会有相应的拉曼信号值。然后,将检测值带入拟合曲线中计算可得出定量结果。

[0023] 可定量检测血液中IL-6、IL-4和TNF- α 的免疫层析试纸条的制备方法本实施例的试纸条的制备方法包括以下步骤:

1、免疫空心金银双金属的制备:

1)将99 mL双蒸水煮沸加入300 μ L的1%的氯金酸溶液,搅拌5分钟,使其充分混匀,再加入900 μ L柠檬酸三钠1%,继续搅拌加热,至变为酒红色后停止加热,搅拌至冷却。4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0024] 2) 硼酸-硼砂(BS)封闭缓冲液的配制:用0.05 M硼砂和0.2 M硼酸以4:1(v:v)比例配制0.2 M pH=9.0的BS缓冲液,用超纯水稀释至0.005 M,加入BSA、吐温20,终浓度为1 wt%、0.05 wt%,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌后置4 $^{\circ}$ C保存备用,有效期为一周。

[0025] 3) 硼酸-硼砂(BS)保存缓冲液的配制:用0.05 M硼砂和0.2 M硼酸以4:1(v:v)比例配制0.2 M pH=9.0的BS缓冲液,用超纯水稀释至0.005 M,加入BSA、吐温20、NaN₃,终浓度为1 wt%、0.05 wt%、0.05 wt%,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌后置4 $^{\circ}$ C保存备用,有效期为一周。

[0026] 4) 抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属的制备:使用PBS缓冲液洗涤空心金银双金属,EDC和NHS的加入量均为空心金银双金属羧基化程度摩尔量的2倍,室温反应30 min,使用PBS缓冲液洗涤空心金银双金属充分洗涤后,以20-40 μ g anti-IL-6、IL-4、TNF- α -mAb/mg空心金银双金属的量加入适量anti-IL-6、IL-4、TNF- α -mAb,室温反应1-2小时,使用含1 wt% BSA的pH=7.4的PBS缓冲液洗涤空心金银双金属充分洗涤后,37 $^{\circ}$ C封闭30分钟,最后,使用含0.05 wt% 吐温20、1 wt% BSA、0.05 % NaN₃的0.005 M pH=9.0的BS缓冲液重悬空心金银双金属,4 $^{\circ}$ C保存备用。。

[0027] 2、硝酸纤维素膜包被抗体的制备:

1) 抗体稀释液的配制:0.01 M, pH=7.4的磷酸盐(PBS)缓冲液为包被缓冲液,加入蔗糖,终浓度为1 wt%,0.22 μ m微孔滤膜过滤除菌后置4 $^{\circ}$ C保存备用,有效期为一周。

[0028] 2) 硝酸纤维素膜包被抗体的制备:使用含1 wt%蔗糖的0.01 M pH=7.4的PBS缓冲液将IL-6抗体稀释为1.5 mg/mL,将兔抗鼠IgG抗体稀释为0.5 mg/mL,使用划膜仪以1 μ L/cm的量将两者以0.4 cm的间隔均匀一致地喷印于2.5 cm宽硝酸纤维素膜上,室温晾干,加入干燥剂封存,4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0029] 3、样品垫的处理:

将15 mm长样品垫放于样品垫处理液中浸透2小时,之后于25 $^{\circ}$ C-37 $^{\circ}$ C烘箱中烘干12 h。

[0030] 样品垫处理液是含2 wt% NaCl、2 wt% TritonX-100、0.5 wt% BSA及0.5 wt% PVP的0.005 M pH=9.0的BS缓冲液。

[0031] 4、结合垫的处理

将10 mm长样品垫放于样品垫处理液中浸透2小时,之后于30 $^{\circ}$ C烘箱中烘干12 h。

[0032] 结合垫处理液是含5 wt%蔗糖、2 wt%海藻糖、0.05 wt% TritonX-100的0.005 M pH=9.0的BS缓冲液。

[0033] 5、结合垫的制备

将制备好的抗IL-6、IL-4和TNF- α 免疫空心金银双金属以1:1的比例,1.5 mg/mL,12 μ L的量使用微量移液器分别以30 μ L/cm的量均匀涂于处理好的结合垫上,然后置于30 $^{\circ}$ C烘箱中干燥后加入干燥剂封存备用。

[0034] 6、试纸条的组装及切割

将硝酸纤维素膜(长25 mm)、结合垫(长10 mm)、样品垫(长15 mm)和吸水纸(长25 mm)依次粘贴上在背衬板上,并且相邻垫子间互相交错重叠2 mm,组装好后用自动切割机切割成宽3 mm的成品试纸条,装入检测卡槽,装入铝箔袋加入干燥剂密封保存,备用。

[0035] 实施例2

除了免疫空心金银双金属的制备步骤中:EDC和NHS的加入量均为空心金银双金属羧基化程度摩尔量的5倍,其它步骤同实施例 1。

[0036] 实施例3

除了结合垫制备步骤中,所用结合垫处理液中蔗糖的含量为10 wt%,其它步骤同实施例1。

[0037] 应用实施例1

本发明的检测卡的使用方法

1. 加样

从包装盒中取出单人份的检测卡,撕开铝箔包装袋,将其置于平整桌面,用微量移液器吸取70 μ L血清标本加入检测卡的加样孔内,等待反应进行20分钟。

[0038] 2. 检测

将检测卡放到拉曼光谱分析仪中,运行仪器,仪器会自动读取检测卡的条形码信息,进行检测并即时显示测量结果。

[0039] 从图2可以看出,本发明对于脑卒中病人血液中标志物IL-6、IL-4和TNF- α 的检测具有非常高的灵敏度。

[0040] 以上所述,仅是本发明的较佳实施例而已,并非是对本发明作其它形式的限制,任何熟悉本专业的技术人员可能利用上述揭示的技术内容加以变更或改型为等同变化的等效实施例应用于其它领域,但是凡是未脱离本发明技术方案内容,依据本发明的技术实质对以上实施例所作的任何简单修改、等同变化与改型,仍属于本发明技术方案的保护范围。

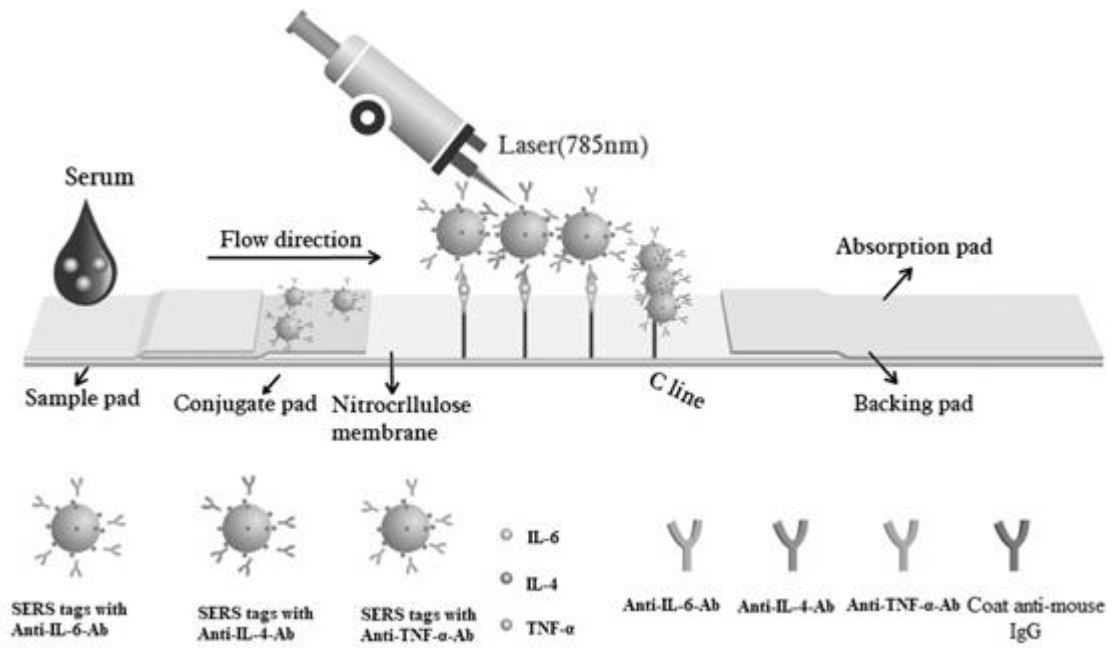


图1

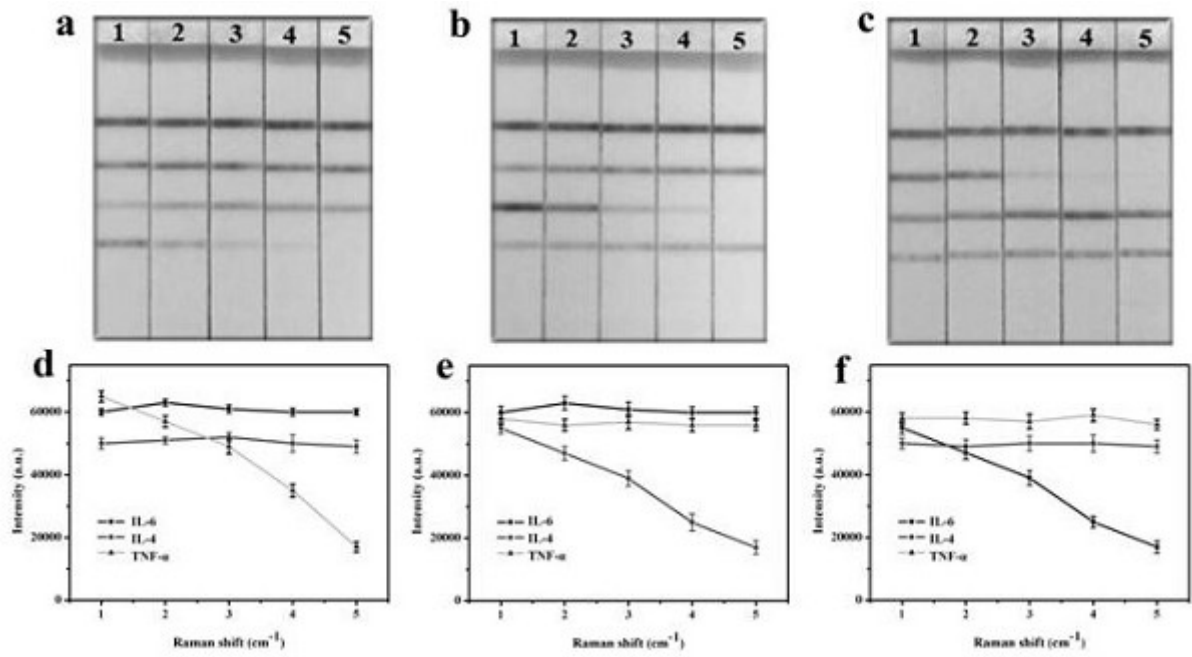


图2

专利名称(译)	同时检测IL-6、IL-4和TNF- α 的空心双金属试纸条及其制备方法		
公开(公告)号	CN110470832A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201910694089.9	申请日	2019-07-30
[标]发明人	王莹 孙保亮 孙景懿 李汉霞 候亚军 袁慧 杨明峰		
发明人	王莹 孙保亮 孙景懿 李汉霞 候亚军 袁慧 杨明峰		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/558		
代理人(译)	张贵宾		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及IL-6、IL-4和TNF- α 三联空心金银双金属免疫试纸条的制备方法，可有效解决IL-6、IL-4和TNF- α 的检测问题，分别制备空心金银双金属标记用的、包被检测线用的抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体分别制备抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体空心金银双金属标记物，将空心金银双金属标记物干燥、固化，将包被检测线用的抗IL-6、IL-4和TNF- α 蛋白质偶联物单克隆抗体至左向右依次分别包被于硝酸纤维膜上，成检测线，将抗鼠免疫球蛋白抗体包被于硝酸纤维膜上，成包被膜的质控线，即成。工艺简单，新颖独特，能够快速简便、早期、有效诊断和鉴别脑卒中。

