



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105445466 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 30

(21) 申请号 201610033851. 5

(22) 申请日 2016. 01. 19

(71) 申请人 苏州市博纳泰科生物技术有限公司
地址 215123 江苏省苏州市苏州工业园区星湖街 218 号生物纳米园 B2 楼 208 室

(72) 发明人 张鹏 张华 张金林 廖平璋

(74) 专利代理机构 江苏圣典律师事务所 32237
代理人 王玉国

(51) Int. Cl.

G01N 33/577(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

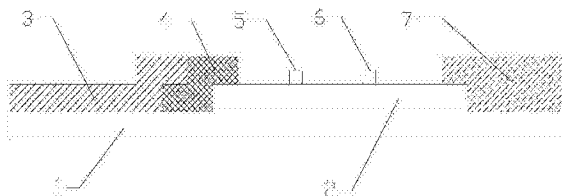
权利要求书2页 说明书9页 附图1页

(54) 发明名称

一种白介素 6 的检测方法及其试剂盒

(57) 摘要

本发明揭示了一种白介素 6 的检测方法及其试剂盒,将荧光胶乳微粒先与白蛋白进行偶联,然后再与白介素 6 单克隆抗体进行偶联,制备得到探针垫。将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在 PVC 衬板上,将白介素 6 单克隆抗体和兔 IgG 分别包被在硝酸纤维素膜的检测线和控制线上,经干燥、切割后得到免疫层析试纸条,从而制得白介素 6 的检测试剂盒。本发明的白介素 6 的检测方法及其试剂盒具有灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低等优点。



1. 一种白介素6的检测方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 探针垫的制备:在荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂反应,离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒;

将白蛋白和羊抗兔IgG分别与活化的荧光胶乳微粒偶联反应,得到白蛋白荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒;将白蛋白荧光胶乳微粒溶液加入活化剂反应,离心、洗涤后得到活化的白蛋白荧光胶乳微粒;

将白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒偶联反应,得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒;

将白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒混合得到混合荧光胶乳微粒,随后用荧光探针微球稀释液稀释,均匀喷在玻璃纤维上,烘干得到探针垫;

2) 免疫层析试纸条的制备:将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上,将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线和控制线上,经干燥、切割后得到免疫层析试纸条;

3) 样品稀释液的制备:样品稀释液为含有白蛋白、表面活性剂、分散剂和防腐剂的缓冲液;

4) 样品检验:取待检测的血清、血浆或全血样品加入至样品稀释液中,待混合均匀后加入至免疫层析试纸条上进行免疫层析反应;随后在荧光检测器下采用与荧光胶乳微粒相对应的发射光波长进行荧光检测。

2. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法,其特征在于:所述步骤1)中,在发射光波长为500nm~590nm的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,室温下反应0.5h~2h,离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒,其中,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:6~1:1,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为1:100~5:100;优选的,所述步骤1)中,在发射光波长为500nm~590nm的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺,室温下反应1h,离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒,其中,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:3,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为1:100。

3. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法,其特征在于:所述白蛋白包括人血清白蛋白、牛血清白蛋白、羊血清白蛋白和鼠血清白蛋白中的任意一种。

4. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法,其特征在于:所述步骤1)中,白蛋白与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100,混合后室温下偶联反应1h~5h,得到白蛋白荧光胶乳微粒;羊抗兔IgG与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100,混合后室温下偶联反应1h~5h,得到羊抗兔IgG荧光胶乳微粒;白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100,混合后室温下偶联反应1h~5h,得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒;优选的,所述步骤1)中,白蛋白与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100,混合后室温下偶联反应3h,得到白蛋白荧光胶乳微粒;羊抗兔IgG与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100,混合后室温下偶联反应3h,

得到羊抗兔IgG荧光胶乳微粒；白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100，混合后室温下偶联反应3h，得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒。

5. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法，其特征在于：所述步骤1)中，按2:1~6:1的比例混合白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒，得到混合荧光胶乳微粒，将混合荧光胶乳微粒用荧光探针微球稀释液稀释2~6倍，以2 μ l/cm~6 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为0.7cm~1.3cm的玻璃纤维上，在37 $^{\circ}$ C下干燥2h~6h得到探针垫。

6. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法，其特征在于：所述步骤1)中，所述荧光探针微球稀释液为包括蔗糖、牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液；所述缓冲液包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种，所述表面活性剂为吐温20或吐温80。

7. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法，其特征在于：所述步骤3)中，所述缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种；所述表面活性剂为吐温20、吐温80、曲拉通X-100或聚乙二醇；所述防腐剂为叠氮钠或procline；所述分散剂为聚乙烯吡咯烷酮10K、聚乙烯吡咯烷酮40K或聚乙烯醇。

8. 根据权利要求1所述的一种白介素6的检测方法，其特征在于：所述步骤2)中，将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上，采用划膜喷金机将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在层析试纸的检测线和控制线上，37 $^{\circ}$ C干燥12h~36h后经切条机切割得到3mm~5mm宽度的免疫层析试纸条；优选的，将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上，采用划膜喷金机将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在层析试纸的检测线和控制线上，37 $^{\circ}$ C干燥24h后经切条机切割得到4mm宽度的免疫层析试纸条。

9. 一种应用权利要求1所述的白介素6的检测方法的试剂盒，其特征在于：包括试剂盒体以及稀释液瓶，所述试剂盒体包括PVC衬板以及固定在所述PVC衬板上的样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜和吸水纸，所述样品垫搭接在所述探针垫上，所述探针垫和所述吸水纸分别搭接在所述硝酸纤维素膜的两侧，所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和控制线，所述检测线和控制线内分别包被有白介素6单克隆抗体和兔IgG；所述稀释液瓶中存放有样品稀释液。

10. 根据权利要求9所述的试剂盒，其特征在于：还包括壳体，所述壳体上设置有加样孔、检测窗口、编码区域和把手，所述加样孔位于所述样品垫处，所述检测窗口位于所述检测线和控制线处，所述编码区域位于检测窗口和把手之间，所述把手位于所述吸水纸处。

一种白介素6的检测方法及其试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于激素检测技术领域,尤其涉及一种白介素6的检测方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 白细胞介素-6,简称白介素6(IL-6),是一种细胞因子,属于白细胞介素的一种。它是由纤维母细胞、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。IL-1、TNF- α 、PDGF、病毒感染、双链RNA及cAMP等,均可诱导正常细胞产生白介素6。白介素6能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能。白介素6(IL-6)是肝细胞产生急性期蛋白的最重要的调节物,天然状态下是分子量为23-30KD的蛋白质,有不同程度的糖基化和多聚化,这种不匀性与活力及组织特异性有一定关系。除巨噬细胞外,IL-6可由许多其他细胞分泌,如纤维母细胞、内皮细胞等。人IL-6与C-反应蛋白(急性反应蛋白之一)、血清淀粉酶A、纤维蛋白原、肌球蛋白、铜兰蛋白相互联系。IL-6在肝外亦有广泛作用,在肝脏,IL-6的作用是通过与其高亲和力的特异性细胞表面受体结合而完成的。IL-6受体(IL-6R)属免疫球蛋白超家族,IL-6R中仅一80KD的部分为与IL-6结合所必需,配体/受体复合物与膜糖蛋白(gp130)结合,参与生长信号的信息转导。IL-6对肝细胞蛋白质合成的分子效应发生在RNA转录水平。星状细胞是肝脏中IL-6的主要来源。细菌脂多糖是其有效的刺激剂。慢性肝病中IL-6水平上升,可导致一系列免疫功能紊乱及免疫病理反应,如上所述,IL-6又可称为肝细胞刺激因子,可促进多种细胞增殖和分化,并通过分泌负反馈环路抑制细胞增殖。

[0003] 目前,国内白介素6的检测主要采用进口试剂和免疫组化试剂,国内开发的试剂盒多采用化学发光方法和酶联免疫法,这些方法检测步骤多,引进的影响因素较多,检测结果易造成偏差。

[0004] 荧光层析免疫分析方法是一种微量分析方法,根据荧光强度,对物质进行定性或定量分析,具有高灵敏度、选择性强、需样量少和操作简便等优点。中国专利公布号为CN104330551A的发明专利,公布了一种基于化学发光法的免疫荧光定量检测白介素6的试剂盒,以异硫氰酸荧光素标记的白介素6包被抗体和碱性磷酸酶标记的白介素6标记抗体制备抗试剂,以抗异硫氰酸荧光素抗体偶联羧基磁珠制得磁微粒试剂,双夹心法结合白介素6,以新型化学发光底物ALPS为底物,用化学发光仪检测发光强度进行定量。然而该试剂盒的制备步骤较复杂,需要成本较高,检测时需要水浴、分离等过程,操作多,耗时长。中国专利公布号为CN103969438A的发明专利,采用定量夹心酶联免疫方法检测白介素6。然而该方法检测步骤有酶标板的包被及封闭、标准品或被检血清的处理、单克隆抗体检测,检测过程中孵化时间长、洗板次数多,需要配套设备和专业人员。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种白介素6的检测方法及其试剂盒,具有灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低等优点。

[0006] 本发明通过如下技术方案实现上述目的：

[0007] 一种白介素6的检测方法，包括以下步骤：

[0008] 1) 探针垫的制备：在荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂反应，离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒；

[0009] 将白蛋白和羊抗兔IgG分别与活化的荧光胶乳微粒偶联反应，得到白蛋白荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒；将白蛋白荧光胶乳微粒溶液加入活化剂反应，离心、洗涤后得到活化的白蛋白荧光胶乳微粒；

[0010] 将白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒偶联反应，得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒；

[0011] 将白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒混合得到混合荧光胶乳微粒，随后用荧光探针微球稀释液稀释，均匀喷在玻璃纤维上，烘干得到探针垫；

[0012] 2) 免疫层析试纸条的制备：将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上，将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线和控制线上，经干燥、切割后得到免疫层析试纸条；

[0013] 3) 样品稀释液的制备：样品稀释液为含有白蛋白、表面活性剂、分散剂和防腐剂的缓冲液；

[0014] 4) 样品检验：取待检测的血清、血浆或全血样品加入至样品稀释液中，待混合均匀后加入至免疫层析试纸条上进行免疫层析反应；随后在荧光检测器下采用与荧光胶乳微粒相对应的发射光波长进行荧光检测。

[0015] 进一步的，所述步骤1)中，在发射光波长为500nm~590nm的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺，室温下反应0.5h~2h，离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒，其中，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:6~1:1，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为1:100~5:100；优选的，所述步骤1)中，在发射光波长为500nm~590nm的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液中加入活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺，室温下反应1h，离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒，其中，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:3，1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与荧光胶乳微粒的重量比为1:100。

[0016] 进一步的，所述白蛋白包括人血清白蛋白、牛血清白蛋白、羊血清白蛋白和鼠血清白蛋白中的任意一种。

[0017] 进一步的，所述步骤1)中，白蛋白与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100，混合后室温下偶联反应1h~5h，得到白蛋白荧光胶乳微粒；羊抗兔IgG与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100，混合后室温下偶联反应1h~5h，得到羊抗兔IgG荧光胶乳微粒；白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100，混合后室温下偶联反应1h~5h，得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒；优选的，所述步骤1)中，白蛋白与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100，混合后室温下偶联反应3h，得到白蛋白荧光胶乳微粒；羊抗兔IgG与活化的荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100，混合后室温下偶联反应3h，得到羊抗兔IgG荧光胶乳微粒；白介素6单克隆抗

体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒的混合比例为0.12:100,混合后室温下偶联反应3h,得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒。

[0018] 进一步的,所述步骤1)中,按2:1~6:1的比例混合白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒,得到混合荧光胶乳微粒,将混合荧光胶乳微粒用荧光探针微球稀释液稀释2~6倍,以2 μ l/cm~6 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为0.7cm~1.3cm的玻璃纤维上,在37 $^{\circ}$ C下干燥2h~6h得到探针垫。

[0019] 进一步的,所述步骤1)中,所述荧光探针微球稀释液为包括蔗糖、牛血清白蛋白和表面活性剂的缓冲液;所述缓冲液包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述表面活性剂为吐温20或吐温80。

[0020] 进一步的,所述步骤3)中,所述缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种;所述表面活性剂为吐温20、吐温80、曲拉通X-100或聚乙二醇;所述防腐剂为叠氮钠或procline;所述分散剂为聚乙烯吡咯烷酮10K、聚乙烯吡咯烷酮40K或聚乙烯醇。

[0021] 进一步的,所述步骤2)中,将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上,采用划膜喷金机将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在层析试纸的检测线和控制线上,37 $^{\circ}$ C干燥12h~36h后经切条机切割得到3mm~5mm宽度的免疫层析试纸条;优选的,将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上,采用划膜喷金机将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在层析试纸的检测线和控制线上,37 $^{\circ}$ C干燥24h后经切条机切割得到4mm宽度的免疫层析试纸条。

[0022] 一种应用上述的白介素6的检测方法的试剂盒,包括试剂盒体以及稀释液瓶,所述试剂盒体包括PVC衬板以及固定在所述PVC衬板上的样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜和吸水纸,所述样品垫搭接在所述探针垫上,所述探针垫和所述吸水纸分别搭接在所述硝酸纤维素膜的两侧,所述硝酸纤维素膜上设置有检测线和控制线,所述检测线和控制线内分别包被有白介素6单克隆抗体和兔IgG;所述稀释液瓶中存放有样品稀释液。

[0023] 进一步的,还包括壳体,所述壳体上设置有加样孔、检测窗口、编码区域和把手,所述加样孔位于所述样品垫处,所述检测窗口位于所述检测线和控制线处,所述编码区域位于检测窗口和把手之间,所述把手位于所述吸水纸处。

[0024] 与现有技术相比,本发明的一种白介素6的检测方法及其试剂盒的有益效果是:

[0025] 1)本发明利用荧光免疫层析方法,实现了白介素6的体外定性定量检测;

[0026] 2)本发明的荧光免疫层析方法中,检测线区域包被有能与白介素6形成复合物的白介素6单克隆抗体,配套探针则使用2种荧光胶乳微粒标记的白介素6单克隆抗体;控制线区域包被有兔IgG抗体,配套探针使用羊抗兔IgG抗体标记的2种荧光胶乳微粒,控制线与检测线独立反应,互不影响和干扰,利用控制线信号可以准确判定探针在分散在混合液体中的质量,用来校正检测线信号;

[0027] 3)本发明中荧光胶乳微粒先与白蛋白进行偶联,然后再与白介素6单克隆抗体进行偶联,得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒,减少了检测过程中双夹心结构的空间阻力,增加灵敏度,使其能检测更低浓度的白介素6;

[0028] 4)本发明将探针放在样品垫的末端,探针垫和样品垫做成一体式,有利于增强样品垫对血清、血浆和全血的处理能力,减少它们之间的检测差别;

[0029] 5)本发明制备的白介素6检测试剂盒,检测灵敏度高,可检测血清样本中0.05ng/ml的白介素6;检测仪器简单,操作简单,无需专业操作人员;检测快速,10~20分钟即可得到检测结果;试剂盒储存方便。

附图说明

[0030] 图1是本发明的免疫层析试纸条的结构示意图;

[0031] 图2是本发明的试剂盒的结构示意图。

具体实施方式

[0032] 本发明的一种白介素6的检测方法,包括以下步骤:

[0033] 1)探针垫制备:

[0034] 将发射光波长为500nm~590nm的带有羧基或氨基的荧光胶乳微粒溶液加入活化剂1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(Sulfo-NHS),室温下反应0.5h~1h,其中,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐与N-羟基琥珀酰亚胺的重量比为1:6~1:1,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)与荧光胶乳微粒的重量比为1:100~5:100,离心、洗涤后得到活化的荧光胶乳微粒;

[0035] 应当说明的是:a)发射光波长为500nm~590nm荧光胶乳微粒在市场上容易获得,因而在保证检测精度的前提下,经济性和适用性较高;b)EDC与荧光胶乳微粒的重量比小于1:100时,胶乳微粒的活化率很低,偶联微球上抗体的结合很少,检测时的灵敏度低;EDC与荧光胶乳微粒的重量比大于5:100时,胶乳微粒的活化率随EDC量增加而增加的幅度有限,成本升高,最佳比例为1:100;c)EDC与Sulfo-NHS的重量比大于1:1,活化的胶乳微粒易水解,降低了活化效率;EDC与Sulfo-NHS的重量比小于1:6,胶乳微粒的活化率已达到饱和,成本上升,最佳比例为1:3;d)活化时间小于0.5h,活化的效率不高,浪费原材料;活化时间大于2h,活化的速度小于活化物质水解的速度,降低了活化效率,最佳活化时间1h。

[0036] 将白蛋白与活化的荧光胶乳微粒的按比例0.05:100~0.2:100混合,室温下偶联反应1h~5h,得到白蛋白荧光胶乳微粒;将羊抗兔IgG与活化的荧光胶乳微粒按比例0.05:100~0.2:100混合,室温下偶联反应1h~5h,得到羊抗兔IgG荧光胶乳微粒;将白蛋白荧光胶乳微粒溶液加入活化剂反应,离心、洗涤后得到活化的白蛋白荧光胶乳微粒;白介素6单克隆抗体与活化的白蛋白荧光胶乳微粒的混合比例为0.05:100~0.2:100,混合后室温下偶联反应1h~5h,得到白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒。

[0037] 应当说明的是:a)抗体与荧光胶乳微粒的重量比小于0.05:100时,偶联效率高,但是浪费胶乳微粒,胶乳微粒的大部分活化点未结合抗体;大于0.2:100时,胶乳微粒的大部分活化点已被结合,继续增加抗体的量对偶联效率无明显影响,浪费抗体,最佳比例为0.12:100;b)反应时间与偶联率有关,时间过短小于1小时,则抗体与胶乳微粒的结合较少,不经济;时间过长大于5小时,则偶联率增加有限,浪费时间,最佳反应时间3h。

[0038] 按2:1~6:1的比例混合白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒和羊抗兔IgG荧光胶乳微粒,得到混合荧光胶乳微粒,将混合荧光胶乳微粒用荧光探针微球稀释液稀释2~6倍,以2 μ l/cm~6 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为0.7cm~1.3cm的玻璃纤维上,在37 $^{\circ}$ C下干燥2h~6h,得到探针垫。荧光探针微球稀释液为含有蔗糖、BSA和表面活性剂的缓冲液;所述缓冲液

包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,所述表面活性剂为吐温20、吐温80。

[0039] 应当说明的是:a)探针保存在样品稀释液中易团聚,将其用荧光探针微球稀释液稀释喷在玻璃纤维上干燥制成探针垫,荧光探针微球稀释液的组分可以使得探针均匀分散,避免探针之间的团聚;探针垫上的探针在缓慢释放时,能够减缓免疫反应,让反应时间更长,检测信号更强。b)喷金速度过慢会导致探针溶液过少,在玻璃纤维上分散不均匀,喷金速度过快会导致玻璃纤维过早饱和,探针溶液渗透到喷金平台上,造成实验误差,放大批内差。c)探针垫的干燥时间不易过长,在制成免疫层析试纸条后还需要继续干燥,本步骤只需要将水分充分干燥。

[0040] 2)免疫层析试纸条制备:将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上,采用划膜喷金机将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在层析试纸的检测线(T线)和控制线(C线)上,37℃干燥12h~36h后经切条机切割得到3mm~5mm宽度的免疫层析试纸条;

[0041] 应当说明的是:a)传统的定性免疫层析技术采用包被羊抗鼠抗体作为控制线,随着血清中白介素6或一些抗鼠源抗体阻断剂的增加,控制线上的信号随之降低,其信号值就不能用于计算,测试线的信号的准确性也没有了参考依据。本发明采用兔IgG抗体和羊抗兔抗体作为控制线配对,C线与T线的反应独立进行,无交叉影响,能避免C线与T线彼此竞争探针微粒而产生的重复性偏差;b)干燥时间小于12h,抗体在硝酸纤维素膜上的结合效率低,产品检测信号会随保存时间的延长产生变化,导致白介素6的检测限升高和检测不稳定;干燥时间大于36h,抗体容易失活,导致检测的灵敏度降低,最佳的干燥时间为24h;c)试纸条的宽度小于3mm时,切割机的精密度对试纸条的影响较大,会降低检测结果的重复性,试纸条的宽度大于5mm时,会增加检测卡的成本,最优化的试纸条宽度为4mm。

[0042] 3)样品稀释液制备:样品稀释液为含有牛血清白蛋白、表面活性剂、分散剂和防腐剂的缓冲液;缓冲液包括PBS缓冲液、Tris缓冲液、甘氨酸缓冲液、MES缓冲液、HEPES缓冲液中的一种或几种,表面活性剂为吐温20、吐温80、曲拉通X-100或聚乙二醇,防腐剂为叠氮钠或procline,分散剂为聚乙烯吡咯烷酮10K、聚乙烯吡咯烷酮40K或聚乙烯醇;

[0043] 应当说明的是:a)牛血清白蛋白有流动封闭的作用,能与人血清或血浆中的杂蛋白结合,封闭硝酸纤维素膜上的空白位点,降低探针在膜上的残留和非特异性结合,减少假阳信号;b)表面活性剂能够改善待检测样品和探针的亲水性,使得样品和探针在NC膜上的结合和分布更均匀,避免了基底信号波动和免疫反应不均匀对信号的影响;c)防腐剂延迟或抑制微生物的生长,避免样品稀释液的腐败;d)缓冲液用于调节免疫反应的反应环境,降低不同人血清的差异和血清血浆的差异对反应体系的影响。

[0044] 4)样品检验:取待检测的血清、血浆或全血样品加入样品稀释液中,待混合均匀后滴加至免疫层析试剂卡上进行免疫层析反应;随后在荧光检测器下采用与荧光胶乳微粒相对应的发射光波长进行荧光检测。混合液体渗透到样品垫上,混合液体经玻璃纤维过滤杂质和处理后到达探针垫,其中的白介素6与探针上的白介素6单克隆抗体结合成复合物,复合物顺着硝酸纤维素膜渗透到检测线上,与固定在检测线上的白介素6单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线上的白介素6单克隆抗体与探针中的白介素6单克隆抗体,其在白介素6上的表位不同;剩余的抗原-荧光标记的抗体复合物、未结合的标记有荧光胶乳

微粒的白介素6单克隆抗体、以及标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG继续渗透到控制线,标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG会与控制线上固定的兔IgG结合形成抗原-抗体复合物;荧光检测器下荧光检测时,仅在控制线上检测到信号,才能证明检测结果是有效的。

[0045] 如图1至2所示,是根据本发明的白介素6的检测方法制备得到的白介素6荧光免疫层析检测试剂盒,包括试剂盒体以及稀释液瓶,试剂盒体包括PVC衬板1以及固定在PVC衬板上的样品垫3、探针垫4、硝酸纤维素膜2和吸水纸7。

[0046] 样品垫3搭接在探针垫4上,探针垫4和吸水纸7分别搭接在硝酸纤维素膜2的两侧,硝酸纤维素膜2上设置有检测线5和控制线6,检测线5和控制线6内分别包被有白介素6单克隆抗体和兔IgG。探针垫4为由白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒经喷金干燥制得。稀释液瓶中存放有样品稀释液。试剂盒还包括壳体9,壳体9上设置有加样孔8、检测窗口10、编码区11和把手12,加样孔8位于样品垫3处,检测窗口10位于检测线5和控制线6处,编码区11位于检测窗口10和把手12之间,把手12位于吸水纸7处。

[0047] 使用时,取待检测的血清、血浆或全血样品,混合均匀后加入到加样孔8中即可;随后在荧光检测器下采用与荧光胶乳微粒对应的发射光波长进行荧光检测。混合液体渗透到样品垫3上,经玻璃纤维过滤杂质和处理后到达探针垫4,其中的白介素6与探针垫4上的白介素6单克隆抗体结合成复合物,复合物顺着硝酸纤维素膜2渗透到检测线5上,与固定在检测线5上的白介素6单克隆抗体形成双抗体夹心的新复合物,检测线5上的白介素6单克隆抗体与探针垫4上的白介素6单克隆抗体,其在白介素6上的表位不同;剩余的抗原-荧光标记的抗体复合物、未结合的标记有荧光胶乳微粒的白介素6单克隆抗体、以及标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG继续渗透到控制线6,标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG会与控制线6上固定的兔IgG结合形成抗原-抗体复合物;荧光检测器下荧光检测时,仅在控制线6上检测到信号,才能证明检测结果是有效的。

[0048] 本发明的检测用荧光检测器,包含激发检测模块、前置放大模块、控制分析模块以及软件系统。其中激发检测模块的光源为发射波长为400nm~600nm的发光二极管,前置放大模块为一前置放大电路。

[0049] 实施例1:

[0050] 本实施例的一种白介素6的荧光免疫层析检测方法,依次包括以下步骤:

[0051] 第一步:探针垫的制备

[0052] 取200 μ l发射光波长为590nm的荧光胶乳微粒溶液(含羧基)用pH6.0MES缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用pH6.0MES缓冲液稀释,加入5mg EDC和15mg Sulfo-NHS混匀后,在室温下反应活化30min,离心分离后,沉淀继续用pH6.5MES缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用pH6.5MES缓冲液稀释,加入100 μ g牛血清白蛋白,室温下反应3h,加入含牛血清白蛋白的乙醇胺溶液封闭,继续反应1h,离心后沉淀用pH7.4PBS缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白沉淀即牛血清白蛋白荧光胶乳微粒,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG沉淀即羊抗兔IgG荧光胶乳微粒,将沉淀重悬在200 μ l pH7.4PBS缓冲液中,加入0.6 μ l proclin,在4 $^{\circ}$ C下保存;按同样的方法将标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白活化偶联胸苷激酶1单克隆抗体得到标记有荧光胶乳微粒的胸苷激酶1单克隆抗体沉淀,将沉淀重悬在200 μ l pH7.4PBS缓冲液中,加入0.6 μ l proclin,在4 $^{\circ}$ C下保存。

[0053] 将白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒按体积比2:1混

合,混合胶乳微粒与2倍体积的荧光探针微球稀释液漩涡混合,得到探针溶液,以 $4\mu\text{l}/\text{cm}$ 的速度均匀喷在宽度为 1cm 的玻璃纤维上,在 37°C 下干燥 4h 得到探针垫。

[0054] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0055] 在衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、探针垫、样品垫和吸水纸,样品垫搭接在探针垫上,探针垫和吸水纸搭接在硝酸纤维素膜上,并且紧密相连。分别将白介素6单克隆抗体和兔IgG用包被液分别配制成 $1\text{mg}/\text{ml}$ 和 $1\text{mg}/\text{ml}$ 的抗体包被液。将白介素6单克隆抗体包被液和兔IgG包被液以 $1\mu\text{l}/\text{cm}$ 的线速包被在硝酸纤维素膜上对应的检测线和控制线上,检测线和控制线间隔 6mm ,在湿度 $<30\%$ 条件下 37°C 烘干 24h 后,制成荧光免疫层析试纸板。

[0056] 用切条机将制备好的荧光免疫层析试纸板纵向切成 4mm 宽的荧光免疫层析试纸条,将其放入卡壳内经压壳机处理得到免疫层析检测卡。

[0057] 第三步:样品稀释液的配制

[0058] 取 0.02M pH7.0的PBS缓冲液 1L ,加入 8ml 吐温20, 5.1g 牛血清白蛋白, 3g 聚乙烯吡咯烷酮10K和 0.19g 叠氮钠,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0059] 第四步:样品检测

[0060] 1)线性、检测限和精密度评估:

[0061] 采用阴性牛血清作为稀释液,将白介素6标准品配制成浓度为 10 、 9 、 8 、 7 、 6 、 5 、 4 、 3 、 2 、 1 和 $0\text{ng}/\text{ml}$ 的标准品溶液,取标准品 $100\mu\text{l}$ 加入 $100\mu\text{l}$ 样品稀释液,吹打 15 次后取 $100\mu\text{l}$ 加入到加样孔中, 15 分钟后采用荧光检测器检测。结果表明,线性的相关系数 r^2 大于 0.99 ,检测限为 $0.05\text{ng}/\text{ml}$,各浓度的检测变异系数均小于 8% 。

[0062] 2)线性参数的验证:

[0063] 采用低值人血清和高值人血清,配制浓度为 10 、 8 、 6 、 4 和 $2\text{ng}/\text{ml}$ 的白介素6人血清溶液,每个样本重复 4 次,结果表明, r^2 大于 0.99 ,最高检测范围可达到 $10\text{ng}/\text{ml}$ 。

[0064] 3)准确度的评估

[0065] 采用白介素6浓度为 $0.1\text{ng}/\text{ml}$ 的人血清样本作为基础样本,加入同体积不同浓度的白介素6标准物人血清,配制成浓度为 7 、 5 、 3 和 $2\text{ng}/\text{ml}$ 的白介素6人血清溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本进行 4 次重复检测分析,并进行计算。结果表明,回收率在 90% - 110% 范围内。

[0066] 实施例2:

[0067] 本实施例的一种白介素6的荧光免疫层析检测方法,依次包括以下步骤:

[0068] 第一步:探针垫的制备

[0069] 取 $100\mu\text{l}$ 发射光波长为 500nm 的荧光胶乳微粒溶液(含氨基)用pH6.5MES缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用pH6.5MES缓冲液稀释,加入 1mg EDC和 6mg Sulfo-NHS混匀后,在室温下反应活化 1h ,离心分离后,沉淀继续用pH6.5MES缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用pH6.5MES缓冲液稀释,加入 $200\mu\text{g}$ 牛血清白蛋白,室温下反应 5h ,加入含牛血清白蛋白的乙醇胺溶液封闭,继续反应 1h ,离心后沉淀用pH7.4PBS缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白沉淀即牛血清白蛋白荧光胶乳微粒,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG沉淀即羊抗兔IgG荧光胶乳微粒,将沉淀重悬在 $200\mu\text{l}$ pH7.4PBS缓冲液中,加入 $0.6\mu\text{l}$ proclin,在 4°C 下保存;按同样的方法将标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白活化偶联胸苷激酶1单克隆抗体得到标记有荧光胶乳微粒的胸苷激酶1单克隆抗体沉淀,将

沉淀重悬在200 μ l pH7.4PBS缓冲液中,加入0.6 μ l proclin,在4 $^{\circ}$ C下保存。

[0070] 将白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒按体积比6:1混合,混合胶乳微粒与6倍体积的荧光探针微球稀释液漩涡混合,得到探针溶液,以6 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为1.3cm的玻璃纤维上,在37 $^{\circ}$ C下干燥6h得到探针垫。

[0071] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0072] 在衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、探针垫、样品垫和吸水纸,样品垫搭接在探针垫上,探针垫和吸水纸搭接在硝酸纤维素膜上,并且紧密相连。分别将白介素6单克隆抗体和兔IgG用包被液分别配制成1mg/ml和1mg/ml的抗体包被液。将白介素6单克隆抗体包被液和兔IgG包被液以1 μ l/cm的线速包被在硝酸纤维素膜上对应的检测线和控制线上,检测线和控制线间隔6mm,在湿度<30%条件下37 $^{\circ}$ C烘干36h后,制成荧光免疫层析试纸板。

[0073] 用切条机将制备好的荧光免疫层析试纸板纵向切成5mm宽的荧光免疫层析试纸条,将其放入卡壳内经压壳机处理得到免疫层析检测卡。

[0074] 第三步:样品稀释液的配制

[0075] 取0.015M pH7.0的PBS缓冲液1L,加入10ml吐温80,5.0g牛血清白蛋白,3g聚乙烯吡咯烷酮40K和300 μ l procline,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0076] 第四步:样品检测

[0077] 1)线性、检测限和精密度评估:

[0078] 采用阴性牛血清作为稀释液,将白介素6标准品配制成浓度为10、9、8、7、6、5、4、3、2、1和0ng/ml的标准品溶液,取标准品100 μ l加入100 μ l样品稀释液,吹打15次后取100 μ l加入到加样孔中,15分钟后采用荧光检测器检测。结果表明,线性的相关系数 r^2 大于0.99,检测限为0.05ng/ml,各浓度的检测变异系数均小于8%。

[0079] 2)线性参数的验证:

[0080] 采用低值人血清和高值人血清,配制浓度为10、8、6、4和2ng/ml的白介素6人血清溶液,每个样本重复4次,结果表明, r^2 大于0.99,最高检测范围可达到10ng/ml。

[0081] 3)准确度的评估

[0082] 采用白介素6浓度为0.1ng/ml的人血清样本作为基础样本,加入同体积不同浓度的白介素6标准物人血清,配制成浓度为7、5、3和2ng/ml的白介素6人血清溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本进行4次重复检测分析,并进行计算。结果表明,回收率在90%-110%范围内。

[0083] 实施例3:

[0084] 本实施例的一种白介素6的荧光免疫层析检测方法,依次包括以下步骤:

[0085] 第一步:探针垫的制备

[0086] 取300 μ l发射光波长为540nm的荧光胶乳微粒溶液(含羧基)用pH6.0MES缓冲液洗涤离心分离三次后,沉淀用pH6.0MES缓冲液稀释,加入15mg EDC和15mg Sulfo-NHS混匀后,在室温下反应活化45min,离心分离后,沉淀继续用pH6.5MES缓冲液洗涤三遍,随后沉淀用pH6.5MES缓冲液稀释,加入150 μ g牛血清白蛋白,室温下反应1h,加入含牛血清白蛋白的乙醇胺溶液封闭,继续反应1h,离心后沉淀用pH7.4PBS缓冲液洗涤四次,得到标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白沉淀即牛血清白蛋白荧光胶乳微粒,同理可以得到标记有荧光胶乳微粒的羊抗兔IgG沉淀即羊抗兔IgG荧光胶乳微粒,将沉淀重悬在200 μ l pH7.4PBS缓冲液中,

加入0.6 μ l proclin,在4 $^{\circ}$ C下保存;按同样的方法将标记有荧光胶乳微粒的牛血清白蛋白活化偶联胸苷激酶1单克隆抗体得到标记有荧光胶乳微粒的胸苷激酶1单克隆抗体沉淀,将沉淀重悬在200 μ l pH7.4PBS缓冲液中,加入0.6 μ l proclin,在4 $^{\circ}$ C下保存。

[0087] 将白介素6单克隆抗体荧光胶乳微粒与羊抗兔IgG荧光胶乳微粒按体积比4:1混合,混合胶乳微粒与4倍体积的荧光探针微球稀释液漩涡混合,得到探针溶液,以2 μ l/cm的速度均匀喷在宽度为0.7cm的玻璃纤维上,在37 $^{\circ}$ C下干燥2h得到探针垫。

[0088] 第二步:免疫层析检测卡的制备

[0089] 在衬板上依次粘贴硝酸纤维素膜、探针垫、样品垫和吸水纸,样品垫搭接在探针垫上,探针垫和吸水纸搭接在硝酸纤维素膜上,并且紧密相连。分别将白介素6单克隆抗体和兔IgG用包被液分别配制成1mg/ml和1mg/ml的抗体包被液。将白介素6单克隆抗体包被液和兔IgG包被液以1 μ l/cm的线速包被在硝酸纤维素膜上对应的检测线和控制线上,检测线和控制线间隔6mm,在湿度<30%条件下37 $^{\circ}$ C烘干12h后,制成荧光免疫层析试纸板。

[0090] 用切条机将制备好的荧光免疫层析试纸板纵向切成3mm宽的荧光免疫层析试纸条,将其放入卡壳内经压壳机处理得到免疫层析检测卡。

[0091] 第三步:样品稀释液的配制

[0092] 取0.01M pH7.2的PBS缓冲液1L,加入5ml吐温20,4.9g牛血清白蛋白,3.1g聚乙烯醇和0.2g叠氮钠,超声直至固体全部溶解,混匀。

[0093] 第四步:样品检测

[0094] 1)线性、检测限和精密度评估:

[0095] 采用阴性牛血清作为稀释液,将白介素6标准品配制成浓度为10、9、8、7、6、5、4、3、2、1和0ng/ml的标准品溶液,取标准品100 μ l加入100 μ l样品稀释液,吹打15次后取100 μ l加入到加样孔中,15分钟后采用荧光检测器检测。结果表明,线性的相关系数 r^2 大于0.99,检测限为0.05ng/ml,各浓度的检测变异系数均小于8%。

[0096] 2)线性参数的验证:

[0097] 采用低值人血清和高值人血清,配制浓度为10、8、6、4和2ng/ml的白介素6人血清溶液,每个样本重复4次,结果表明, r^2 大于0.99,最高检测范围可达到10ng/ml。

[0098] 3)准确度的评估

[0099] 采用白介素6浓度为0.1ng/ml的人血清样本作为基础样本,加入同体积不同浓度的白介素6标准物人血清,配制成浓度为7、5、3和2ng/ml的白介素6人血清溶液;另一份样本加入相同体积的阴性人血清,对回收样本和基础样本进行4次重复检测分析,并进行计算。结果表明,回收率在90%-110%范围内。

[0100] 以上所述的仅是本发明的一些实施方式。对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明创造构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。

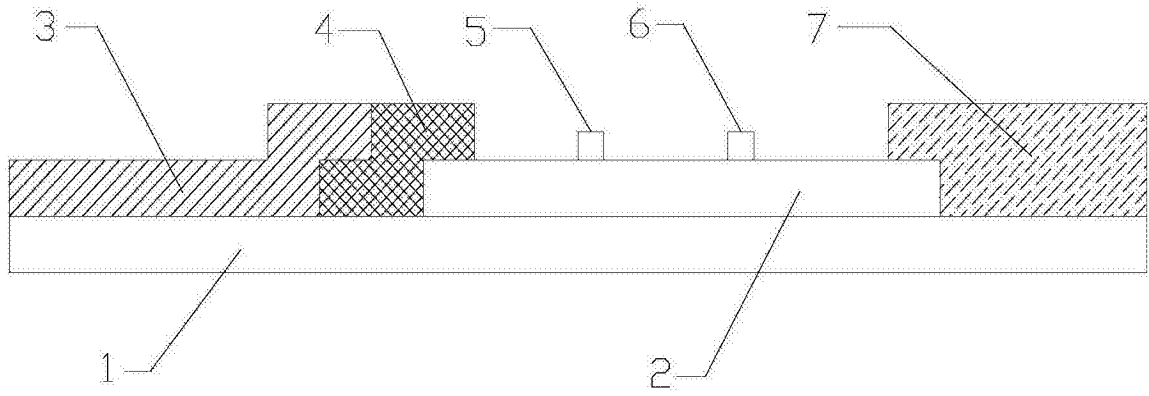


图1

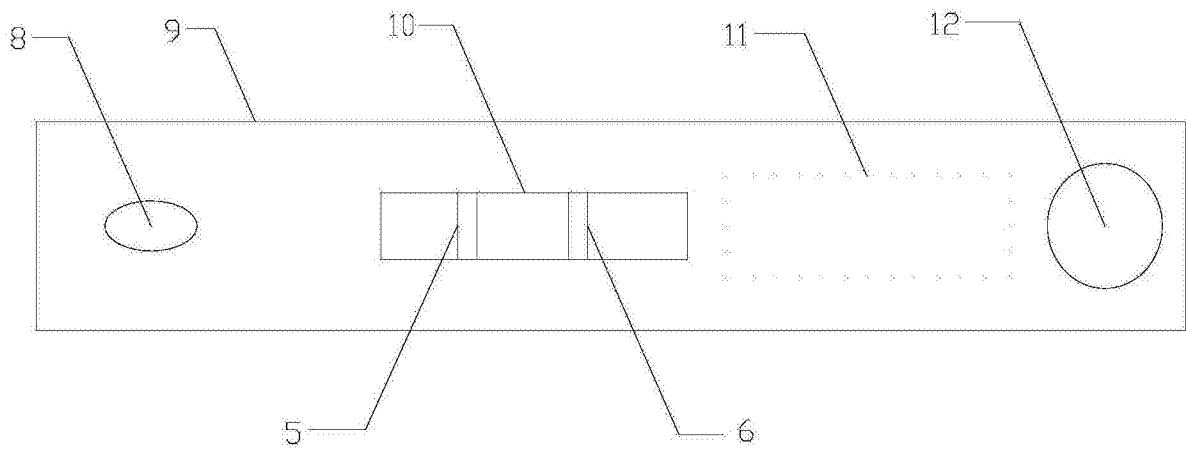


图2

专利名称(译)	一种白介素6的检测方法及其试剂盒		
公开(公告)号	CN105445466A	公开(公告)日	2016-03-30
申请号	CN201610033851.5	申请日	2016-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏州市博纳泰科生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	苏州市博纳泰科生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	苏州市博纳泰科生物技术有限公司		
[标]发明人	张鹏 张华 张金林 廖平璋		
发明人	张鹏 张华 张金林 廖平璋		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
CPC分类号	G01N33/577 G01N33/533 G01N33/558		
代理人(译)	王玉国		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明揭示了一种白介素6的检测方法及其试剂盒，将荧光胶乳微粒先与白蛋白进行偶联，然后再与白介素6单克隆抗体进行偶联，制备得到探针垫。将样品垫、探针垫、硝酸纤维素膜、吸水纸依次贴在PVC衬板上，将白介素6单克隆抗体和兔IgG分别包被在硝酸纤维素膜的检测线和控制线上，经干燥、切割后得到免疫层析试纸条，从而制得白介素6的检测试剂盒。本发明的白介素6的检测方法及其试剂盒具有灵敏度高、准确度高、操作简单、成本低等优点。

