



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104330551 A

(43) 申请公布日 2015.02.04

(21) 申请号 201410652746.0

(22) 申请日 2014.11.17

(71) 申请人 南方医科大学南方医院
地址 510000 广东省广州市广州大道北
1838 号
申请人 广州华亘朗博药业有限公司

(72) 发明人 郭志刚 龚爱华

(74) 专利代理机构 广州市越秀区哲力专利商标
事务所(普通合伙) 44288
代理人 汤喜友

(51) Int. Cl.
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/533(2006.01)
G01N 21/76(2006.01)

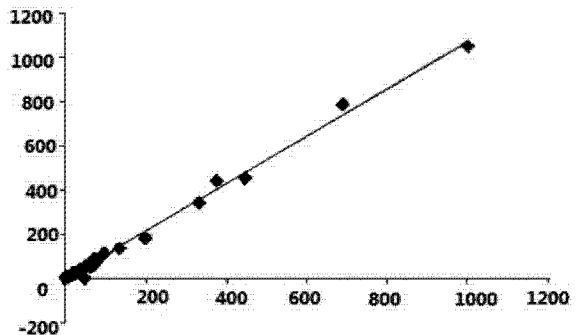
权利要求书2页 说明书8页 附图1页

(54) 发明名称

一种白介素 6 定量测定试剂盒及其制备方法

(57) 摘要

本发明公开了一种白介素 6 定量测定试剂盒,属于医疗器械生物类免疫体外诊断领域。该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物。本发明还公开了该试剂盒的制备方法与使用该试剂盒检测白介素 6 的方法。本发明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,使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度,以新型化学发光底物 ALPS 为底物,提高了试剂盒的灵敏度和特异性性能。本发明的检测试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽,可配合半自动、全自动仪器使用。



1. 一种白介素 6 定量测定试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物;所述磁微粒试剂是将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制成,所述发光底物是将 ALPS 溶解于发光底物缓冲液中制成。

2. 根据权利要求 1 所述的白介素 6 定量测定试剂盒,其特征在于:该试剂盒还包括清洗液,所述清洗液的配置方法将 12.12g 的 Tris、5.82g 的氯化钠、50mL 的 Tween-20、50mL 的曲拉通-100,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解。

3. 如权利要求 1 所述的一种白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:分别配制白介素 6 校准品、白介素 6 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物;将白介素 6 校准品、白介素 6 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内,得到白介素 6 的定量测定试剂盒。

4. 根据权利要求 3 所述的白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:所述校准品、质控品、抗试剂按照如下方法制备而成:

A、校准品、质控品的配制:

用校准品缓冲液溶解白介素 6,配置白介素 6 校准品和白介素 6 质控品;其中,所述校准品缓冲液是通过在 1L 新生牛血清中加入 0.01g ~ 0.05g 的四环素和 0.1g ~ 0.5g 的硫酸新霉素,完全溶解后经过 0.22 μm 滤膜处理制备而成;

B、抗试剂的配制:

1) 抗试剂缓冲液的制备:

将 12.12mg ~ 60.57mg 的 Tris、0.01g ~ 0.05g 的四环素、1g ~ 5g 的绵羊血清、3g ~ 10g 的新生牛血清、1g ~ 5g 的马血清加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,制得抗试剂缓冲液;

2) 将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 标记抗体加入到所述抗试剂缓冲液中充分搅拌至完全溶解。

5. 根据权利要求 3 所述的白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于所述抗试剂是按照以下步骤制备:

1) 异硫氰酸荧光素与白介素 6 抗体偶联,获得异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体:

首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液,然后按照质量比为白介素 6:异硫氰酸荧光素溶液 = 1:1.1 的二者转移到棕色玻璃瓶里,室温下搅拌 1 ~ 2 小时;充分反应后使用 pH 为 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体;

2) 碱性磷酸酶与白介素 6 抗体偶联,获得碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体:

首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,按照摩尔比为碱性磷酸酶:白介素 6 = 1:2 ~ 1:10 的二者转移至棕色玻璃瓶中,室温下搅拌 4 ~ 5 小时,充分反应后使用 pH 为 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体;

3) 将步骤 1) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体和和步骤 2) 中获得的碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体加入含有表面活性剂的 Tris 盐缓冲液中,充分搅拌后获得所述抗试剂;所述表面活性剂为 Tween 20、Triton X-100、Bronidox 中的一种或多种,

表面活性剂的添加量为 0.01%~0.5%。

6. 根据权利要求 3 所述的白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于所述磁微粒试剂是按照以下步骤制备的:

1) 将充分混匀后的羧基磁珠浓缩液放入反应瓶中,将该反应瓶在磁场内放置 15min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积 2~5 倍的磁微粒缓冲液,震荡清洗 20~30min;再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清;重复清洗羧基磁珠 3 遍;最后将羧基磁珠溶液定容到 10~50mg/mL,混匀待用;所述磁微粒缓冲液的配置方法是将 12.12mg 的 Tris、5.82mg 的氯化钠、50g 的甲基纤维醚加入到 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得;

2) 连接反应:按照质量比羧基磁珠溶液:抗异硫氰酸荧光素抗体=100:1 的比例在步骤 1) 所制得的羧基磁珠溶液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在 2~8°C 内保持混匀状态反应 18 小时;

3) 反应瓶在磁场中放置 15min,待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液洗 3 遍,随后定容至 10mg/mL,2~8°C 保存,制得所需待用磁微粒试剂。

7. 根据权利要求 3 所述的白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,其特征在于:所述发光底物是用相当于 ALPS 体积 4~10 倍的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS 制备而成的;所述发光底物缓冲液的配置方法是将 12.12g~121.14g 的 Tris、5.82g 的氯化钠、0.03g 的光泽精加入到 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调节 pH 至 9.5 即得。

8. 利用权利要求 1 或 2 所述的白介素 6 定量测定试剂盒检测白介素 6 的方法,其特征在于该方法包括以下步骤:

1) 取三支试管分别加 15 μ L 白介素 6 的校准品、15 μ L 白介素 6 的质控品、15 μ L 待测样本;

2) 每支试管中加入 60 μ L 抗试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置于 37°C 下水浴 5min;

3) 每支试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置 37°C 下水浴 5min;

4) 将试管在磁分离器上沉淀 2min,缓慢地倒转试管和磁分离器,倒出上清液;把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起,放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

6) 重复步骤 5) 一次;

7) 每支试管中加入 200 μ L 发光底物,振荡混匀 3s,用化学发光仪检测发光强度。

一种白介素 6 定量测定试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗器械生物类免疫体外诊断领域,具体涉及一种基于磁微粒分离化学发光法定量检测血液中白介素 6 的试剂盒及其制备方法,以及应用该试剂盒定量检测血液中白介素 6 的方法。

背景技术

[0002] 白介素 6(IL-6) 是一种细胞因子,属于白细胞介素的一种,能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能。激活的淋巴细胞、单核巨噬细胞、骨髓细胞和部分肿瘤细胞可以合成和分泌 IL-6,其作为一种机体在免疫应答中产生的重要介质,具有多种生物学活性。

[0003] IL-6 及其受体与炎症性疾病的有关,它是多功能炎性细胞因子,是炎性介质网络的关键成份,在炎症反应中起重要作用。IL-6 水平上升可作为炎症反应的早期指标,并可用于评估系统性炎症反应综合征的严重程度(SIRS)。IL-6 与多种肿瘤发生、发展关系密切,它通过干预细胞的黏附性和活动力、血栓形成、肿瘤特异性抗原的表达及肿瘤细胞的增殖,从而影响肿瘤的进展。IL-6 的脐带血是早产儿预测早发性败血症最显著变量,而 IL-6 在母体血液是表示宫内环境,故同样可用于识别怀孕。童年期较高的血 IL-6 水平与日后罹患抑郁及精神病的风险升高相关。体内 IL-6 的水平上升,可以导致多种疾病如:甲状腺疾病、免疫异常性疾病、脓毒血症、肾小球肾炎的肾小球增殖,克罗恩病(CD)和 Castleman 氏病等。

[0004] 在国内,白介素 6(IL-6) 检测临床上主要以国外进口试剂和免疫组化试剂应用为主,国外进口试剂价格非常昂贵,给患者带来很大的经济负担,不利于在基层普及。具有自主知识产权的国产白介素 6(IL-6) 免疫化学发光检测试剂盒目前还较少,也仅停留在 96 孔微孔板式技术水平上。该技术灵敏度较低、线性窄、特异性较差,也不利于高通量的全自动检测。

[0005] 因此,有待开发对白介素 6(IL-6) 检测灵敏度高与可靠性并能降低检测成本的检测技术。

发明内容

[0006] 针对现有技术的不足,本发明的目的旨在提供一种白介素 6 定量测定试剂盒,该试剂盒能够有效提高检测灵敏度及可靠性,并降低成本,延长有效期。

[0007] 实现本发明的目的可以通过采取如下技术方案达到:

[0008] 一种白介素 6 定量测定试剂盒,其包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物;该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物;所述磁微粒试剂是将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制成,所述发光底物是将 ALPS 溶解于发光底物缓冲液中制成。

[0009] 另一方面,本发明还提供了这种白介素 6 定量测定试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0010] 分别配制白介素 6 校准品、白介素 6 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物；将白介素 6 校准品、白介素 6 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内，得到白介素 6 的定量测定试剂盒。

[0011] 本试剂盒的异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体为能与人体内白介素 6 抗原特异结合的单克隆抗体，所述碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体为能与白介素 6 抗原特异结合的单克隆抗体。包被抗体和标记抗体除能与白介素 6 抗原特异性结合外，配对使用时可与抗原形成“三明治”夹心结构。

[0012] 具体地，所述白介素 6 定量测定试剂盒按照如下方法制备而成：

[0013] A、白介素 6 校准品、白介素 6 质控品的配制方法如下：

[0014] 用标准品缓冲液溶解白介素 6，配置白介素 6 校准品、白介素 6 质控品；其中，所述校准品缓冲液是通过在 1L 新生牛血清中加入 0.01g ~ 0.05g 的四环素和 0.1g ~ 0.5g 的硫酸新霉素，完全溶解后经过 0.22 μm 滤膜处理制备而成；

[0015] B、抗试剂的制备方法如下：

[0016] 1) 抗试剂缓冲液的制备：

[0017] 将 12.12mg ~ 60.57mg 的 Tris、0.01g ~ 0.05g 的四环素、1g ~ 5g 的绵羊血清、3g ~ 10g 的新生牛血清、1g ~ 5g 的马血清加入 1L 纯化水中，充分搅拌至完全溶解，制得抗试剂缓冲液；

[0018] 2) 异硫氰酸荧光素与白介素 6 偶联，获得异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体：

[0019] 首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液，使用分光光度计在 495nm 处读取吸光值，来调整浓度，然后按照白介素 6 抗体与异硫氰酸荧光素的质量之比为 1:1.1，将二者同时转移到棕色玻璃瓶中，室温下搅拌 1 ~ 2 小时，充分反应后使用 pH 为 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液进行平衡，然后使用凝胶层析分离纯化得到异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体；紫外监测，记录仪记录纯化图谱，同时注意确认含有连接物的试管，注意、避光防护；

[0020] 3) 碱性磷酸酶与白介素 6 抗体偶联，获得碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体：

[0021] 首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 1.0 ~ 5.0mg/mL 的碱性磷酸酶溶液，可以根据分光光度计在 280nm 处读取吸光值，将碱性磷酸酶的吸光值应该在一定的范围内。然后按照碱性磷酸酶与白介素 6 的摩尔比为 1:2 ~ 1:10 的量将二者转移至棕色瓶中，室温下搅拌 4 ~ 5 小时，充分反应后使用 pH 为 8 ~ 9 的碳酸氢盐缓冲液平衡，然后使用凝胶层析分离纯化得到的碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体；注意含有连接物的试管的避光防护。

[0022] 4) 将步骤 2) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体和和步骤 3) 中获得的碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体，加入含有表面活性剂的 Tris 盐缓冲液，充分搅拌后获得所述抗试剂；所述表面活性剂为 Tween 20、Triton X-100、Bronidox 中的一种或多种，表面活性剂的添加量为 0.01% ~ 0.5%。

[0023] C、磁微粒试剂的制备：

[0024] 将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制得磁微粒试剂。

[0025] 1) 取一定体积的充分混匀后的羧基磁珠浓缩液至反应瓶中，将该反应瓶在磁场中

放置 15min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积 2~5 倍的磁微粒缓冲液,混匀 20-30min;再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清;重复清洗羧基磁珠 3 遍。最后将羧基磁珠溶液定容到 10-50mg/mL,混匀待用;所述磁微粒缓冲液的配置方法是将 12.12mg 的 Tris,5.82mg 的氯化钠,50g 的甲基纤维醚加入到 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得;该磁珠缓冲液含多种去垢剂,能够有效地清除非特异性吸附,提高检测特异性;

[0026] 2) 连接反应:按照质量比羧基磁珠溶液:抗异硫氰酸荧光素抗体=100:1 的比例在步骤 1) 所制得的羧基磁珠溶液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在 2~8℃ 内保持混匀状态反应 18 小时;

[0027] 3) 反应瓶在磁场中放置 15min,待羧基磁珠沉降后用磷酸缓冲液清洗 3 遍,然后定容至 10mg/mL,2~8℃ 保存,制得所需磁微粒试剂。

[0028] D、发光底物的制备:将 ALPS 溶解于发光底物缓冲液中制备发光底物;

[0029] 用相当于 ALPS 体积 4~10 倍的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS,所述发光底物缓冲液的配置方法是将 12.12g~121.14g 的 Tris、5.82g 的氯化钠、0.03g 的光泽精加入到 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调节 pH 至 9.5 即得。

[0030] 进一步的,本发明的白介素 6 定量测定试剂盒,该试剂盒还包括清洗液,该清洗液主要用于在检测过程中清洗与磁微粒试剂反应后的样品,清洗液的具体组分可以参照所属领域的常规操作进行。通常是磷酸二氢钠、氯化钠、Tween20 和 ProcLin300 的混合溶液,在试剂盒制品中可以浓缩清洗液的形式存在,检测时适当稀释后使用。优选的清洗液的配置方法是将 12.12g 的 Tris、5.82g 的氯化钠、50mL 的 Tween-20、50mL 的曲拉通-100,加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解。

[0031] 再一方面,本发明还提供了利用这种白介素 6 定量测定试剂盒检测白介素 6 的方法,该方法包括步骤:

[0032] 1) 取三支试管分别加 15 μ L 白介素 6 的校准品、15 μ L 白介素 6 的质控品、15 μ L 待测样本;

[0033] 2) 每支试管中加入 60 μ L 抗试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置 37℃ 下水浴 5min;

[0034] 3) 每支试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,置 37℃ 下水浴 5min;

[0035] 4) 将三支试管在磁分离器上沉淀 2min,缓慢地倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起放在滤纸上,用力拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0036] 5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液,用塑料薄膜覆盖试管,轻轻振荡试管 30s,混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器,倒出上清液,把倒转的试管连同磁分离器一起放在滤纸上,用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0037] 6) 重复步骤 5) 一次;

[0038] 7) 每支试管中加入 200 μ L 发光底物溶液,振荡混匀 3s,用化学发光仪检测发光强度。

[0039] 本发明的试剂盒中未详细提及的试剂组分(例如清洗液、一些必要的缓冲液等)、

试剂盒的外包装以及各试剂组分的独立包装容器等均可以按照所属领域的常规操作进行,符合相关行业规定即可。本发明的方法中未详细提及的操作步骤也可参照所属领域的常规操作进行,例如在检测前可将各试剂放至室温(18~25℃),加样前充分混匀;所用检测仪器设备例如化学发光类测定仪的使用按照说明书操作进行;本发明中,未特别注明单位的比例与含量,固体组分为质量比例与含量,液体组分为体积比例与含量。

[0040] 本发明的有益效果在于:

[0041] 1、本发明以碱性磷酸酶为标记酶,通过化学反应标记抗体,并使用凝胶层析分离纯化,提高了反应的灵敏度;

[0042] 2、本发明以抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基磁珠偶联制得磁微粒试剂,使免疫反应更容易混匀和分离,而且大大提高了反应速度;

[0043] 3、本发明以ALPS(N-乙基-N-(3-丙磺基)苯胺钠盐)为底物,该底物是辉光性底物,灵敏度高,可以快速达到平台期,平台稳定期长且信号较强,有利于信号的检测,提高了最终试剂盒的灵敏度和特异性性能;并进一步优化了化学发光增强体系,保证了终产品的信号灵敏度高和稳定性好、变异小;

[0044] 4、本试剂盒稳定性良好,有效期可至一年以上;

[0045] 5、本试剂盒在临床研究与国外进口试剂的符合相关性高达95%以上,且费用仅为其1/5,使用成本低。

附图说明

[0046] 图1是白介素6的标准曲线;

[0047] 图2是白介素6定量测定试剂盒与进口检测试剂的检测效果相关性曲线。

具体实施方式

[0048] 下面结合附图与实施例对本发明做具体说明。

[0049] 实施例1:各种缓冲液的配置,具体如下:

[0050] 1、Tris盐缓冲液

[0051] 将12.12g的Tris、5.82g的氯化钠,加入1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解,用盐酸调整最终pH为7.5。

[0052] 2、校准品缓冲液的制备

[0053] 在1L新生牛血清中加入0.01g四环素和0.1g硫酸新霉素,充分溶解后经过0.22μm滤膜处理制备而成。

[0054] 3、抗试剂缓冲液

[0055] 将30.5mg的Tris、0.03g的四环素、3g的绵羊血清、8g的新生牛血清、3g的马血清加入1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得;

[0056] 4、磁微粒缓冲液

[0057] 将12.12mg的Tris、5.82mg的氯化钠、50g的甲基纤维醚加入1L纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得。

[0058] 5、发光底物缓冲液

[0059] 将50.21g的Tris、5.82g的氯化钠、0.03g的光泽精加入1L纯化水中,充分搅拌至

完全溶解,用盐酸调节缓冲液的 pH 至 9.5 即得;

[0060] 6、清洗液浓缩液的配置

[0061] 将 12.12g 的 Tris、5.82g 的氯化钠、50mL 的 Tween-20、50mL 的曲拉通-100 加入 1L 纯化水中,充分搅拌至完全溶解即得。

[0062] 实施例 2:白介素 6 定量测定试剂盒的制备

[0063] 1、校准品和质控品的制备

[0064] 首先用标准品缓冲液溶解白介素 6,配置成如表 1 所示的目标浓度的校准品和质控品;本实施例所用的白介素 6 采购自生产厂家 fitzgerald 公司。

[0065] 表 1 校准品和质控品的制备

[0066]

试剂名称	校准品 A	校准品 B	校准品 C	校准品 D	校准品 E	校准品 F	质控品 Q1	质控品 Q2
目标浓度 pg/mL	0	30	100	200	400	800	100	400

[0067] 2、抗试剂的制备方法如下:

[0068] 1) 异硫氰酸荧光素与白介素 6 抗体偶联,获得异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体:

[0069] 首先用抗试剂缓冲液将异硫氰酸荧光素配制成浓度为 2.5mg/mL 的异硫氰酸荧光素溶液,然后按照质量比为白介素 6:异硫氰酸荧光素溶液=1:1.1 将二者转移到棕色玻璃瓶里,室温下搅拌 1~2 小时;充分反应后使用 pH 为 8~9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体;

[0070] 2) 碱性磷酸酶与白介素 6 抗体偶联,获得碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体:

[0071] 首先用抗试剂缓冲液将碱性磷酸酶配制成浓度为 2.5mg/mL 的碱性磷酸酶溶液,按照摩尔比为碱性磷酸酶:白介素 6=1:2 的二者转移至棕色玻璃瓶中,室温下搅拌 4~5 小时,充分反应后使用 pH 为 8~9 的碳酸氢盐缓冲液平衡,然后使用凝胶层析分离纯化得到碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体;紫外监测,记录仪记录纯化图谱,注意、避光防护;

[0072] 3) 将步骤 1) 中获得的异硫氰酸荧光素标记的白介素 6 包被抗体和和步骤 2) 中获得的碱性磷酸酶标记的白介素 6 标记抗体加入含有 0.1% Tween 20 的 Tris 盐缓冲液中,充分搅拌后获得所述抗试剂;

[0073] 3、磁微粒试剂的制备:将抗异硫氰酸荧光素抗体与羧基偶联制得磁微粒试剂;

[0074] 1) 取 10mL 的充分混匀后的羧基磁珠浓缩液至反应瓶中,将该反应瓶在磁场放置 15min,待羧基磁珠全部沉降后吸去上清,向反应瓶中加入相当于反应瓶中羧基磁珠体积 5 倍的磁微粒缓冲液,震荡清洗 20~30min;再将反应瓶置于磁场中 15min 后吸去上清。重复清洗羧基磁珠 3 遍。最后将羧基磁珠溶液定容到 10-50mg/mL,混匀待用;

[0075] 2) 连接反应:按照质量比羧基磁珠溶液:抗异硫氰酸荧光素抗体=100:1 的比例在步骤 1) 所制得的羧基磁珠溶液中加入抗异硫氰酸荧光素抗体,在 2~8°C 内保持混匀状态反应 18 小时;

[0076] 3) 反应瓶在磁场中放置 15min, 待羧基磁珠沉降后用磁微粒缓冲液清洗 3 遍, 随后定容至 10mg/mL, 2 ~ 8°C 保存, 制得所需待用磁微粒试剂。

[0077] 4、发光底物的制备:

[0078] 用相当于 ALPS 体积 7 倍的发光底物缓冲液充分溶解 ALPS。

[0079] 5、将白介素 6 校准品、白介素 6 质控品、抗试剂、磁微粒试剂、发光底物独立地置于包装容器内, 得到白介素 6 的定量测定试剂盒。

[0080] 实施例 3: 利用实施例 2 所述的白介素 6 定量测定试剂盒检测白介素 6 的方法, 该方法包括步骤:

[0081] 1) 取三支试管分别加 15 μ L 白介素 6 的校准品、15 μ L 白介素 6 的质控品、15 μ L 待测样本;

[0082] 2) 每支试管中加入 60 μ L 抗试剂, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 置 37°C 下水浴 5min;

[0083] 3) 每支试管中加入 30 μ L 磁微粒试剂, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 置 37°C 下水浴 5min;

[0084] 4) 将试管在磁分离器上沉淀 2min, 缓慢地倒转试管和磁分离器, 倒出上清液, 把倒转的试管连同磁分离器一起放在滤纸上, 用力拍击磁分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0085] 5) 每支试管中加入 300 μ L 清洗液, 用塑料薄膜覆盖试管, 轻轻振荡试管 30s, 混匀后缓慢的倒转试管和磁分离器, 倒出上清液, 把倒转的试管连同分离器一起放在滤纸上, 用力拍击分离器底部以除去粘在管壁上的所有液滴;

[0086] 6) 重复步骤 5) 一次;

[0087] 7) 每支试管中加入 200 μ L 发光底物溶液, 振荡混匀 3s, 用化学发光仪检测发光强度;

[0088] 8) 数据的处理:

[0089] 通过四参数非线性拟合校准品的浓度值和发光值获得标准曲线的四参数 Logistic 方程: $Y = 350.4984 + (4283133.6431 - 350.4984) / (1 + (X/68.2067)^{-1.3246})$ ($R = 0.999025$), 标准曲线如图 1 所示, 其中, 横轴代表校准品的浓度值, 纵轴代表发光值。

[0090] 临床数据:

[0091] 1、为了评价本发明的白介素 6 定量测定试剂盒的稳定性和准确性, 每隔 2 个月对本实施例的试剂盒性能进行测定。

[0092] 测试结果如表 2 所示。由表 2 可以看出: 白介素 6 与发光值的相关性连续 15 个月保持在 0.99 以上, 本发明的试剂盒的最低检测限和准确度的相对偏差以及每批次的质控品的变异系数也符合国家标准。表 2 的数据表明本发明的白介素 6 定量测定试剂盒的有较好的稳定性和准确性。

[0093] 表 2 白介素 6 定量测定试剂盒分析性能和稳定性表

[0094]

测试参数	测试值								
	0月	3月	6月	9月	12月	13月	14月	15月	
外观	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	合格	
曲线相关系数	0.9937	0.9956	0.9995	0.9945	0.9965	0.9956	0.9963	0.9987	
最低检测限 (pg/mL)	2.1	1.6	2.3	1.8	2.1	1.3	1.8	1.5	
准确度 (%)	96.3	97.5	102.2	103.1	93.2	97.4	102.8	102.3	
重复性 (%)	Q1	3.1	3.9	4.6	4.5	2.3	3.6	4.7	2.3
	Q2	4.7	5.2	3.9	5.3	4.5	5.1	4.3	4.7

[0095] 2、白介素 6 定量测定试剂盒与进口检测试剂检测效果的比较

[0096] 选取 240 份标本,将标本中的低中高值分离后,对低中高值样本进行单独的线性回归分析,得到了线性回归方程 $y = 0.958x + 1.43$, $R^2 = 0.984$ 。该回归曲线方程如图 2 所示,其中横轴代表对照测值,纵轴代表参考测值。图 2 表明,本发明的试剂盒性能可靠,灵敏度高,线性范围宽,可配合全自动仪器使用。

[0097] 3、采用本实施例的白介素 6 定量测定试剂盒,对 150 份正常人样本进行检验;用 SPSS 19.0 for windows 软件对正常人样本的测定结果进行正态性检验,数据整体分布基本属于非正态分布。

[0098] 表 3 白介素 6 定量测定试剂盒正态性检验表

[0099]

项目	自由度	p 值
正常人血清	150	0.01

[0100] 4、白介素 6 定量测定试剂盒临床参考值范围;以正常人样本检测值的双侧 95 百分位数作为参考值。

[0101] 表 4 白介素 6 定量测定试剂盒临床参考值范围表

[0102]

项目	95%位点参考值 (pg/mL)
正常人血清	0-7

[0103] 可以看出,本发明的试剂盒性能可靠,灵敏度高,线性范围宽,可配合全自动仪器使用。

[0104] 上述实施例仅为本发明优选的实施案例,不能以此来限定本发明所要求保护的范
围,本领域的技术人员在本发明的基础上所做的任何非实质性的及替换均属于本发明要求
保护的范

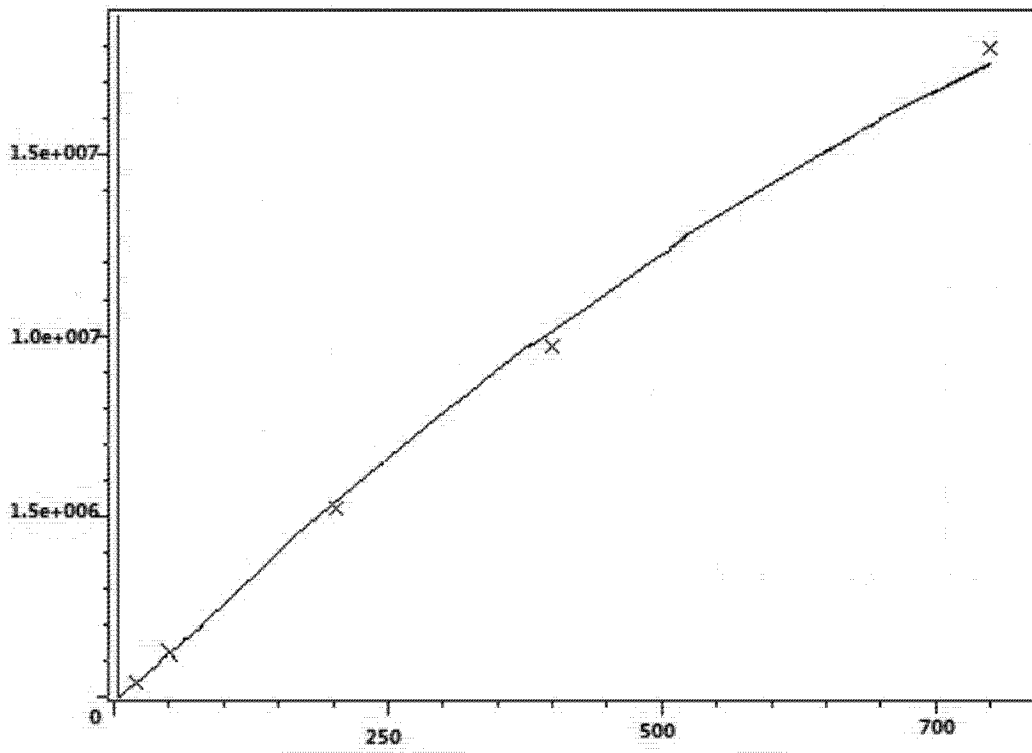


图 1

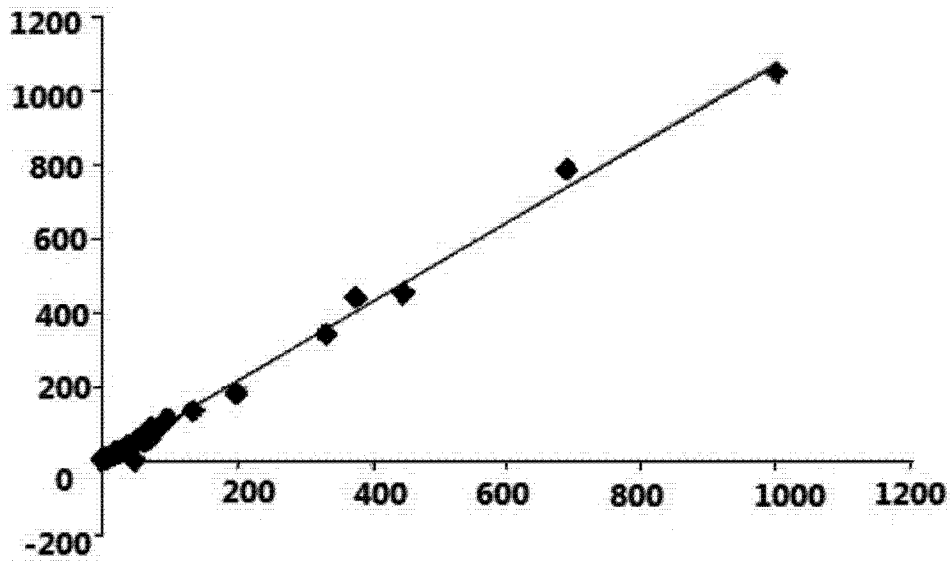


图 2

专利名称(译)	一种白介素6定量测定试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN104330551A	公开(公告)日	2015-02-04
申请号	CN201410652746.0	申请日	2014-11-17
[标]申请(专利权)人(译)	南方医科大学南方医院 广州华亘朗博药业有限公司		
申请(专利权)人(译)	南方医科大学南方医院 广州华亘朗博药业有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南方医科大学南方医院 广州华亘朗博药业有限公司		
[标]发明人	郭志刚 龚爱华		
发明人	郭志刚 龚爱华		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N21/76		
CPC分类号	G01N21/76 G01N33/533		
其他公开文献	CN104330551B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种白介素6定量测定试剂盒，属于医疗器械生物类免疫体外诊断领域。该试剂盒包括校准品、质控品、抗试剂、磁微粒试剂和发光底物。本发明还公开了该试剂盒的制备方法与使用该试剂盒检测白介素6的方法。本发明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，使免疫反应更容易混匀和分离，而且大大提高了反应速度，以新型化学发光底物ALPS为底物，提高了试剂盒的灵敏度和特异性性能。本发明的检测试剂盒性能可靠、灵敏度高、线性范围宽，可配合半自动、全自动仪器使用。

