



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107402308 A

(43)申请公布日 2017. 11. 28

(21)申请号 201710478825.8

(22)申请日 2017.06.21

(71)申请人 北京科跃中楷生物技术有限公司

地址 100161 北京市丰台区望园西里17号
201室

(72)发明人 柳静 张黎 詹先发

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240

代理人 韩建伟 金田蕴

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

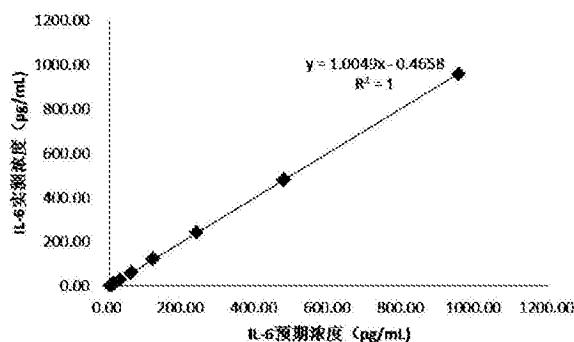
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

IL-6定量检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种IL-6定量检测试剂盒及其制备方法。其中,该IL-6定量检测试剂盒包括:偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,反应稀释液试剂和IL-6校准品。应用本发明的检测试剂盒,可以在现有多种生化分析仪上进行血清样本检测,操作简便快速,出具检测结果只需约10~15分钟,便于炎症、脓毒症早期诊断,更适合在各级基层医疗机构普及和应用。



1. 一种IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,包括:偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,反应稀释液试剂和IL-6校准品。

2. 根据权利要求1所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包含:偶联有IL-6抗体的磁微球和基质溶液,其中,所述基质溶液包括:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~200g/L,表面活性剂0.1~10mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和10~50mmol/L的磷酸盐缓冲液,所述基质溶液pH值为7.0~9.0。

3. 根据权利要求2所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述偶联有IL-6抗体的磁微球所用的磁微球为顺磁性微球,粒径为100~200nm,所述偶联有IL-6抗体的磁微球在所述基质溶液中的质量浓度为1~4mg/mL。

4. 根据权利要求2所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为牛血清白蛋白和/或酪蛋白;所述促凝剂为蔗糖和/或聚蔗糖-400;所述表面活性剂为吐温-20和/或曲拉通X-100;防腐剂为ProcIn300。

5. 根据权利要求2所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包含:所述稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白和5g/L的酪蛋白,所述促凝剂为100g/L的蔗糖和50g/L的聚蔗糖-400,所述表面活性剂为1mL/L的吐温-20和1mL/L的曲拉通X-100,所述防腐剂为1mL/L的ProcIn300,25mmol/L磷酸盐缓冲液,所述基质溶液pH值为7.4,所述偶联有IL-6抗体的磁微球在所述基质溶液中的质量浓度为2mg/mL。

6. 根据权利要求2所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述偶联有IL-6抗体的磁微球中IL-6抗体与磁微球是采用EDC-NHS法偶联的。

7. 根据权利要求1所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述反应稀释液试剂包含:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~50mL/L,表面活性剂0.1~3mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和磷酸盐缓冲液10~50mmol/L,所述反应稀释液试剂的pH值为7.0~9.0。

8. 根据权利要求7所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述稳定剂为牛血清白蛋白,所述促凝剂为聚乙二醇8000,所述表面活性剂为吐温-20,防腐剂为ProcIn300。

9. 根据权利要求8所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述反应稀释液试剂包含:稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白,促凝剂为20mL/L聚乙二醇8000,表面活性剂为1mL/L的吐温-20,防腐剂为1mL/L的ProcIn300,缓冲溶液为25mmol/L的磷酸盐缓冲液,所述反应稀释液试剂的pH值为7.4。

10. 根据权利要求1所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述IL-6校准品包含:pH7.4的50mmol/L的磷酸盐缓冲液、重组人源IL-6、10g/L的牛血清白蛋白和1mL/L的防腐剂。

11. 根据权利要求10所述的IL-6定量检测试剂盒,其特征在于,所述IL-6校准品的浓度范围为0~1000pg/mL。

12. 一种如权利要求1至11中任一项所述的IL-6定量检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括配制偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,配制反应稀释液试剂和配制IL-6校准品的步骤;

其中,配制所述偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包括:制备偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液、制备IL-6抗体与磁微球偶联物以及将所述偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液与所述IL-6抗体与磁微球偶联物混合制得所述配制偶联有IL-6抗体的磁微球试剂;

配制所述反应稀释液试剂包括：取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤，最终用相应的缓冲液定容，密封保存备用；

配制所述IL-6校准品包括：配制校准品稀释液以及不同浓度梯度的校准品。

13. 根据权利要求12所述的制备方法，其特征在于，配制所述偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液具体包括：

取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤，最终用相应的缓冲液定容，密封保存备用；

其中，稳定剂0.5~20g/L，促凝剂2~200g/L，表面活性剂0.1~10mL/L，防腐剂0.5~5g/L和10~50mmol/L磷酸盐缓冲液，所述基质溶液pH值为7.0~9.0；

所述稳定剂为牛血清白蛋白和/或酪蛋白；所述促凝剂为蔗糖和/或聚蔗糖-400；所述表面活性剂为吐温-20和/或曲拉通X-100；防腐剂为ProcIn300。

14. 根据权利要求12所述的制备方法，其特征在于，制备IL-6抗体与磁微球偶联物具体包括：将磁微球、EDC与NHS按质量比为1:1:1，并加入pH 5.0的50mmol/L的MES溶液，使磁微球质量浓度为4mg/mL，放置在垂直旋转仪上活化，25℃室温避光反应30min，将活化后的磁微球与IL-6单克隆抗体质量比80:1进行混合，放置在垂直旋转仪上标记，25℃室温避光反应3h，将反应后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次，磁力分离去上清后，加入含有甘氨酸、5g/L牛血清白蛋白、0.5mL/L曲拉通X-100、pH 7.4的磷酸盐缓冲液，使磁微球质量浓度为4mg/mL，放置在垂直旋转仪上终止，25℃室温避光反应2h，将终止后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次，加入所述基质溶液，使偶联了IL-6抗体的磁微球质量浓度为10mg/mL，2~8℃保存。

15. 根据权利要求12所述的制备方法，其特征在于，将所述偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液与所述IL-6抗体与磁微球偶联物混合，使偶联有IL-6抗体的磁微球终浓度为1~4mg/mL。

IL-6定量检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及定量检测技术领域,具体而言,涉及一种IL-6定量检测试剂盒及其制备方法。

背景技术

[0002] 白细胞介素6(interleukin-6,IL-6)是由212个氨基酸组成的糖蛋白,机体受炎症刺激后由T细胞、B细胞、单核巨噬细胞及内皮细胞等分泌。IL-6是一种多效应细胞因子,它有多种生物学活性,包括介导前感染反应和细胞保护功能。IL-6参与许多疾病的发生和发展,其血浆水平与炎症、病毒感染、自身免疫疾病密切相关,它的变化比CRP更早。目前认为是炎症、脓毒症的早期敏感性“警示”标志物及慢性炎症的量化标志物。

[0003] 目前IL-6的检测方法主要有化学发光免疫分析法和电化学发光免疫分析法。两种方法均采用双抗体夹心法,不同之处为标记物不同:化学发光法为碱性磷酸酶;电化学发光法为钌。化学发光免疫检测方法代表试剂有:美国贝克曼公司的白介素6测定试剂盒(化学发光法),该试剂盒主要组成部分为包被有羊抗大鼠IgG的顺磁性微粒,山羊抗人IL-6碱性磷酸酶(牛)结合物;英国西门子公司的白介素-6测定试剂盒(化学发光法),该试剂盒主要组成部分有包被有单克隆鼠抗IL-6抗体的包被珠,碱性磷酸酶(小牛肠)标记的多克隆羊抗IL-6抗体。电化学发光免疫检测方法代表试剂为德国罗氏的白介素6检测试剂盒(电化学发光法),该试剂盒主要组成部分为包被链霉亲和素的磁珠微粒、生物素化的抗白介素-6抗体、钌标记的抗白介素-6抗体。

[0004] 化学发光法及电化学发光法能够准确、快速检测出结果,但该方法仪器成本相对较高,需要特定的化学发光仪器,并且对实验室操作人员的要求相对较高,因此在临床上无法真正普及和使用,只有一些相对较大的实验室才具备相应的条件。

[0005] 因此,临床需要研发一种敏感性高、特异性强、操作简便快捷,低成本的适合临床推广的IL-6的检测方法。

发明内容

[0006] 本发明旨在提供一种IL-6定量检测试剂盒及其制备方法,以解决现有技术中IL-6定量检测成本高、操作复杂的技术问题。

[0007] 为了实现上述目的,根据本发明的一个方面,提供了一种IL-6定量检测试剂盒。该IL-6定量检测试剂盒包括:偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,反应稀释液试剂和IL-6校准品。

[0008] 进一步地,偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包含:偶联有IL-6抗体的磁微球和基质溶液,其中,基质溶液包括:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~200g/L,表面活性剂0.1~10mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和10~50mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.0~9.0。

[0009] 进一步地,偶联有IL-6抗体的磁微球所用的磁微球为顺磁性微粒,粒径为100~200nm,偶联有IL-6抗体的磁微球在基质溶液中的质量浓度为1~4mg/mL。

[0010] 进一步地,稳定剂为牛血清白蛋白和/或酪蛋白;促凝剂为蔗糖和/或聚蔗糖-400;

表面活性剂为吐温-20和/或曲拉通X-100;防腐剂为ProcIn300。

[0011] 进一步地,偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包含:稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白和5g/L的酪蛋白,促凝剂为100g/L的蔗糖和50g/L的聚蔗糖-400,表面活性剂为1mL/L的吐温-20和1mL/L的曲拉通X-100,防腐剂为1mL/L的ProcIn300,25mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.4;偶联有IL-6抗体的磁微球在基质溶液中的质量浓度为2mg/mL。

[0012] 进一步地,偶联有IL-6抗体的磁微球中IL-6抗体与磁微球是采用EDC-NHS法偶联的。

[0013] 进一步地,反应稀释液试剂包含:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~50mL/L,表面活性剂0.1~3mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和磷酸盐缓冲液10~50mmol/L,反应稀释液试剂的pH值为7.0~9.0。

[0014] 进一步地,稳定剂为牛血清白蛋白,促凝剂为聚乙二醇8000,表面活性剂为吐温-20,防腐剂为ProcIn300。

[0015] 进一步地,反应稀释液试剂包含:稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白,促凝剂为20mL/L聚乙二醇8000,表面活性剂为1mL/L的吐温-20,防腐剂为1mL/L的ProcIn300,缓冲溶液为25mmol/L的磷酸盐缓冲液,反应稀释液试剂的pH值为7.4。

[0016] 进一步地,IL-6校准品包含:pH7.4的50mmol/L的磷酸盐缓冲液、重组人源IL-6、10g/L的牛血清白蛋白和1mL/L的防腐剂。

[0017] 进一步地,IL-6校准品的浓度范围为0~1000pg/mL。

[0018] 根据本发明的另一方面,提供了一种IL-6定量检测试剂盒的制备方法。该制备方法包括配制偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,配制反应稀释液试剂和配制IL-6校准品的步骤;其中,配制偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包括:制备偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液、制备IL-6抗体与磁微球偶联物以及将偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液与IL-6抗体与磁微球偶联物混合制得配制偶联有IL-6抗体的磁微球试剂;配制反应稀释液试剂包括:取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性剂、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22μm微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容,密封保存备用;配制IL-6校准品包括:配制校准品稀释液以及不同浓度梯度的校准品。

[0019] 进一步地,配制偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液具体包括:取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22μm微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容,密封保存备用;其中,稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~200g/L,表面活性剂0.1~10mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和10~50mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.0~9.0;稳定剂为牛血清白蛋白和/或酪蛋白;促凝剂为蔗糖和/或聚蔗糖-400;表面活性剂为吐温-20和/或曲拉通X-100;防腐剂为ProcIn300。

[0020] 进一步地,制备IL-6抗体与磁微球偶联物具体包括:将磁微球、EDC与NHS按质量比为1:1:1,并加入pH 5.0的50mmol/L的MES溶液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,25℃室温避光反应30min,将活化后的磁微球与IL-6单克隆抗体质量比80:1进行混合,放置在垂直旋转仪上标记,25℃室温避光反应3h,将反应后的磁微球用pH7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次,磁力分离去上清后,加入含有甘氨酸、5g/L牛血清白蛋白、0.5mL/L曲拉通X-100、pH 7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,25℃室温避光反应2h,将终止后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-

HCl洗液洗涤3次,加入基质溶液,使偶联了IL-6抗体的磁微球质量浓度为10mg/mL,2~8℃保存。

[0021] 进一步地,将偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液与IL-6抗体与磁微球偶联物混合,使偶联有IL-6抗体的磁微球终浓度为1~4mg/mL。

[0022] 应用本发明的检测试剂盒,可以在现有多数生化分析仪上进行血清样本检测,操作简便快速,出具检测结果只需约10~15分钟,便于炎症、脓毒症早期诊断,更适合在各级基层医疗机构普及和应用。

附图说明

[0023] 构成本申请的一部分的说明书附图用来提供对本发明的进一步理解,本发明的示意性实施例及其说明用于解释本发明,并不构成对本发明的不当限定。在附图中:

[0024] 图1示出了根据实施例1的IL-6定量检测试剂盒的线性范围验证;以及

[0025] 图2示出了根据实施例1的IL-6定量检测试剂盒与市售IL-6化学发光检测试剂盒检测结果的相关性比较。

具体实施方式

[0026] 需要说明的是,在不冲突的情况下,本申请中的实施例及实施例中的特征可以相互组合。下面将参考附图并结合实施例来详细说明本发明。

[0027] 针对现有技术中IL-6定量检测成本高、操作复杂的技术问题,根据本发明一种典型的实施方式,提供一种IL-6磁微球免疫比浊检测方法及其检测试剂盒,其主要目的是用于检测人血清样本中IL-6的含量。其原理是以超顺磁微球为载体,将IL-6抗体与磁微球进行偶联,在生化分析仪的检测装置内,样品中的IL-6蛋白与偶联后的磁微球接触,使磁微球产生聚集,形成磁微球-抗体-抗原-抗体-磁微球复合物,反应液出现浊度,当抗体浓度固定时,形成的免疫复合物的量随着样本中IL-6量的增加而增加,反应液的浊度也随之增加。当入射光照射不同浊度的反应液时可被不同程度的吸收,而这种吸光度的变化幅度与待检样本中IL-6的含量在一定范围内成正比相关,通过测定反应液吸光度的变化量与已知IL-6浓度的校准品,即可得出待检样本中IL-6的含量。

[0028] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种IL-6定量检测试剂盒。该试剂盒包括:偶联有IL-6抗体的磁微球试剂,反应稀释液试剂和IL-6校准品。

[0029] 应用本发明的检测试剂盒,可以在现有多数生化分析仪上进行血清样本检测,操作简便快速,出具检测结果只需约10~15分钟,便于炎症、脓毒症早期诊断,更适合在各级基层医疗机构普及和应用。

[0030] 优选的,偶联有IL-6抗体的磁微球试剂包含:偶联有IL-6抗体的磁微球和基质溶液,其中,基质溶液包括:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~200g/L,表面活性剂0.1~10mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和10~50mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.0~9.0。

[0031] 优选的,偶联有IL-6抗体的磁微球所用的磁微球为顺磁性微球,粒径为100~200nm,偶联有IL-6抗体的磁微球在基质溶液中的质量浓度为1~4mg/mL。

[0032] 偶联IL-6抗体的磁微球的粒径大小对于检测的灵敏度以及线性范围等有着非常显著的影响。小粒径的磁微球使试剂具有宽的检测范围,可以检测高浓度范围内待检测物

的含量,但粒径不宜过小,否则会造成反应速度变慢,且制备较为复杂,难度较高;而大粒径的磁微粒使试剂具有较高的灵敏度,可以检测到低浓度范围内待检测物的含量,但粒径也不宜过大,会造成偶联物聚集沉降进一步影响测定结果。由此,本发明中为保证所制备的检测试剂盒使得抗原抗体反应试验能够在一个较宽的范围内进行,并且能够保证有高灵敏度和高准确性,所采用的超顺磁性纳米微球的粒径优选为100~200nm。

[0033] 优选的,偶联有IL-6抗体的磁微粒试剂包含:稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白和5g/L的酪蛋白,促凝剂为100g/L的蔗糖和50g/L的聚蔗糖-400,表面活性剂为1mL/L的吐温-20和1mL/L的曲拉通X-100,防腐剂为1mL/L的ProcIn300,25mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.4;偶联有IL-6抗体的磁微粒在基质溶液中的质量浓度为2mg/mL。

[0034] 根据本发明一种典型的实施方式,偶联有IL-6抗体的磁微粒中IL-6抗体与磁微粒是采用EDC-NHS法偶联的。

[0035] 根据本发明一种典型的实施方式,反应稀释液试剂包含:稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~50mL/L,表面活性剂0.1~3mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和磷酸盐缓冲液10~50mmol/L,反应稀释液试剂的pH值为7.0~9.0。优选的,稳定剂为牛血清白蛋白,促凝剂为聚乙二醇8000,表面活性剂为吐温-20,防腐剂为ProcIn300。更优选的,反应稀释液试剂包含:稳定剂为5g/L的牛血清白蛋白,促凝剂为20mL/L聚乙二醇8000,表面活性剂为1mL/L的吐温20,防腐剂为1mL/L的ProcIn300,缓冲溶液为25mmol/L的磷酸盐缓冲液,反应稀释液试剂的pH值为7.4。

[0036] 根据本发明一种典型的实施方式,IL-6校准品包含:pH7.4的50mmol/L的磷酸盐缓冲液、重组人源IL-6、10g/L的牛血清白蛋白,防腐剂为1mL/L的ProcIn300。

[0037] 优选的,IL-6校准品的浓度范围为0~1000pg/mL。

[0038] 根据本发明一种典型的实施方式,提供一种IL-6定量检测试剂盒的制备方法。该制备方法包括配制偶联有IL-6抗体的磁微粒试剂,配制反应稀释液试剂和配制IL-6校准品的步骤;其中,配制偶联有IL-6抗体的磁微粒试剂包括:制备偶联有IL-6抗体的磁微粒的基质溶液、制备IL-6抗体与磁微粒偶联物以及将偶联有IL-6抗体的磁微粒的基质溶液与IL-6抗体与磁微粒偶联物混合制得配制偶联有IL-6抗体的磁微粒试剂;配制反应稀释液试剂包括:取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性剂、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容,密封保存备用;配制IL-6校准品包括:配制校准品稀释液以及不同浓度梯度的校准品。

[0039] 优选的,配制偶联有IL-6抗体的磁微粒的基质溶液具体包括:取pH7.4磷酸盐缓冲液加入稳定剂、促凝剂、表面活性、防腐剂充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容,密封保存备用;其中,稳定剂0.5~20g/L,促凝剂2~200g/L,表面活性剂0.1~10mL/L,防腐剂0.5~5mL/L和10~50mmol/L磷酸盐缓冲液,基质溶液pH值为7.0~9.0;稳定剂为牛血清白蛋白和/或酪蛋白;促凝剂为蔗糖和/或聚蔗糖-400;表面活性剂为吐温-20和/或曲拉通X-100;防腐剂为ProcIn300。其中,稳定剂、促凝剂、表面活性剂中每两种组分之间没有配比限定,均为协同效果;ProcIn300主要活性成分为2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(MCI)和5-氯-2-甲基-4-异噻唑啉-3-酮(CMCI),中文名称:ProcIn300防腐剂。

[0040] 优选的,配制偶联有IL-6抗体的磁微粒试剂具体包括:制备偶联有IL-6抗体的磁微粒的基质溶液:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白5g,酪蛋白5g,

蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 1mL,曲拉通X-100 1mL,ProcIin300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用缓冲液定容至1000mL,即制成基质溶液,密封保存备用;制备IL-6抗体与磁微球偶联物:将磁微球、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH 5.0的50mmol/L的MES溶液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,25℃室温避光反应30min,将活化后的磁微球与IL-6单克隆抗体质量比80:1进行混合,放置在垂直旋转仪上标记,25℃室温避光反应3h,将反应后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次,磁力分离去上清后,加入含有甘氨酸、5g/L牛血清白蛋白、0.5mL/L曲拉通X-100、pH 7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,25℃室温避光反应2h,将终止后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次,加入基质溶液,使偶联了IL-6抗体的磁微球质量浓度为10mg/mL,2~8℃保存;偶联有IL-6抗体的磁微球的试剂制备:将偶联了IL-6抗体的磁微球与基质溶液按照比例混合,制成检测试剂盒所需要的偶联了IL-6抗体的磁微球的试剂。

[0041] 优选的,将偶联有IL-6抗体的磁微球的基质溶液与IL-6抗体与磁微球偶联物混合,使偶联有IL-6抗体的磁微球终浓度为1~4mg/mL(基质溶液与IL-6抗体与磁微球偶联物的混合比例:2.5~10:1)。

[0042] 优选的,配制IL-6校准品具体包括:1)校准品稀释液的配制:①量取纯化水200mL于配液容器中;②称量NaH₂PO₄·2H₂O 1.25g溶于配液容器中,混匀;③称量Na₂HPO₄·12H₂O 15.04g溶于配液容器中,混匀;④用0.45 μ m滤膜过滤;⑤加纯化水至所需体积的3/4,混匀;⑥称取牛血清白蛋白10g溶于配液容器中,混匀;⑦量取生物防腐剂1mL溶于配液容器中,混匀;⑧用纯化水定容至1000mL;⑨测定pH值为7.4;2)将重组人源IL-6蛋白用校准品稀释液配制成不同浓度梯度的校准品,校准品的浓度分别为0pg/mL、5pg/mL、20pg/mL、100pg/mL、500pg/mL和1000pg/mL。

[0043] 下面将结合实施例进一步说明本发明的有益效果。

[0044] 实施例1

[0045] 制备IL-6定量检测试剂盒

[0046] 具体步骤如下:

[0047] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白5g,聚乙二醇8000 20mL,吐温-20 1mL,ProcIin300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0048] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白5g,酪蛋白5g,蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 1mL,曲拉通X-100 1mL,ProcIin300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0049] (3)制备IL-6抗体与磁微球偶联物:将磁微球、EDC与NHS的质量比为1:1:1,并加入pH 5.0的50mmol/L的MES溶液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上活化,25℃室温避光反应30min。将活化后的磁微球与IL-6单克隆抗体质量比80:1进行混合,放置在垂直旋转仪上标记,25℃室温避光反应3h。将反应后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次,磁力分离去上清后,加入含有甘氨酸、5g/L牛血清白蛋白、0.5mL/L曲拉通X-100、pH 7.4的磷酸盐缓冲液,使磁微球质量浓度为4mg/mL,放置在垂直旋转仪上终止,25

℃室温避光反应2h。将终止后的磁微球用pH 7.2的25mmol/L的Tris-HCl洗液洗涤3次,加入基质溶液,使偶联了IL-6抗体的磁微球质量浓度为10mg/mL,2~8℃保存。

[0050] (4)偶联了IL-6抗体的磁微球试剂的制备:将偶联了IL-6抗体的磁微球与基质溶液按照一定比例混合(使偶联了IL-6抗体的磁微球终浓度为2mg/mL),制成检测试剂盒所需要的偶联了IL-6抗体的磁微球的试剂;

[0051] (5)IL-6校准品的制备:

[0052] ①校准品稀释液的配制:①量取纯化水200mL于配液容器中;②称量磷酸二氢钠($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) 1.25g溶于配液容器中,混匀;③称量磷酸氢二钠($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 15.04g溶于配液容器中,混匀;④用0.45 μm 滤膜过滤;⑤加纯化水至所需体积的3/4,混匀;⑥称取牛血清白蛋白(BSA) 10g溶于配液容器中,混匀;⑦量取生物防腐剂(ProcIn300) 1.0mL溶于配液容器中,混匀;⑧用纯化水定容至1000mL;⑨测定pH值为7.4。

[0053] ②将市售的重组人源IL-6蛋白用校准品稀释液配制成不同浓度梯度的校准品,采用食品药品监督管理局批准上市的商品化试剂盒进行标定,每个浓度梯度检测3次,取检测结果的平均值,分别定值为0pg/mL(校准品稀释液,未添加IL-6蛋白),5pg/mL,20pg/mL,100pg/mL,500pg/mL,1000pg/mL。

[0054] (6)反应稀释液试剂、偶联了IL-6抗体的磁微球的试剂和IL-6校准品的分装:将上述步骤所得组分按照相应规格用合适的容器进行分装、贴签即为半成品。

[0055] (7)成品组装:抽出三盒经过特异性、精密性、灵敏度及稳定性检定合格才能组装成IL-6定量检测试剂盒。

[0056] 实施例2.

[0057] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0058] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 50mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白20g,聚乙二醇8000 50mL,吐温-20 3mL,ProcIn300 5mL充分混匀并溶解后用0.22 μm 微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0059] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 50mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白20g,酪蛋白20g,蔗糖200g,聚蔗糖-400 200g,吐温-20 10mL,曲拉通X-100 10mL,ProcIn300 5mL充分混匀并溶解后用0.45 μm 微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0060] 其余步骤均与实施例1相同。

[0061] 实施例3

[0062] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0063] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 10mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白0.5g,聚乙二醇8000 2mL,吐温-20 0.1mL,ProcIn300 0.5mL充分混匀并溶解后用0.22 μm 微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0064] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 10mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白0.5g,酪蛋白0.5g,蔗糖2g,聚蔗糖-400 2g,吐温-20 0.1mL,曲拉通X-1000.1mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μm 微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0065] 其余步骤均与实施例1相同。

[0066] 实施例4

[0067] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0068] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 50mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白10g,聚乙二醇8000 20mL,吐温-20 2mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0069] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 50mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白10g,酪蛋白10g,蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 5mL,曲拉通X-1005mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0070] 其余步骤均与实施例1相同。

[0071] 实施例5

[0072] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0073] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 20mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白2g,聚乙二醇8000 20mL,吐温-20 0.5mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0074] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 20mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白2g,酪蛋白2g,蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 0.5mL,曲拉通X-1000.5mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0075] 其余步骤均与实施例1相同。

[0076] 对比例1

[0077] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0078] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入聚乙二醇800020mL,吐温-20 1mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0079] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 1mL,曲拉通X-100 1mL,ProcIn300 1mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0080] 其余步骤均与实施例1相同。

[0081] 对比例2

[0082] 制备白细胞介素6定量检测试剂盒

[0083] (1)制备反应稀释液试剂:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白25g,聚乙二醇8000 20mL,吐温-20 4mL,ProcIn300 5mL充分混匀并溶解后用0.22 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,密封保存备用。

[0084] (2)制备偶联了IL-6抗体的磁微球的基质溶液:取800mL 25mmol/L pH7.4磷酸盐缓冲液加入牛血清白蛋白25g,酪蛋白25g,蔗糖100g,聚蔗糖-400 50g,吐温-20 12mL,曲拉通X-100 12mL,ProcIn300 5mL充分混匀并溶解后用0.45 μ m微孔滤膜过滤,最终用相应的缓冲液定容至1000mL,即制成的基质溶液,密封保存备用。

[0085] 其余步骤均与实施例1相同。

[0086] 实验例1的IL-6定量检测试剂盒的使用方法

[0087] IL-6定量检测试剂盒检测样品中IL-6含量的检测方法具体操作如下：

[0088] 1. 自4℃冰箱中取出试剂盒，室温平衡15分钟；

[0089] 2. 设置仪器参数：检测波长500nm，并将试剂和样本放在指定的位置上；

[0090] 3. 向5μL待检样本（校准管以校准品做样品，空白以蒸馏水为样品）中加入240μL的反应稀释液试剂，充分混匀，于37℃温育5分钟；

[0091] 4. 再向混合体系中加入60μL的偶联了IL-6抗体的磁微球的试剂，混匀；

[0092] 5. 37℃温育1分钟后，测定各管吸光度A1，4分钟后测定各管吸光度A2，计算吸光度的差值 $\Delta A = A2 - A1$ ；

[0093] 6. 校准品管重复测定2次，以每管2次测得的吸光度差值的平均值 ΔA 为纵坐标，对应的校准品浓度为横坐标，采用多点非线性校准模式绘出“浓度-吸光度”标准曲线，以各待测血清吸光度变化值在标准曲线上计算出该血清样本中IL-6的浓度。

[0094] 实验例2

[0095] 实施例1的IL-6检测试剂盒的性能分析

[0096] 实施例1的试剂盒检测范围为0~1000pg/mL，剂量-反应曲线相关系数(r)的绝对值不低于0.9900。如要准确的测定样品中IL-6的含量，样品中IL-6的浓度值应不超过0~1000pg/mL的浓度范围，超出此范围的测定结果是通过校准品曲线外延得出的计算结果。

[0097] (1)分析灵敏度的检测

[0098] 用实施例1所制备的检测试剂盒中的校准品稀释液(S0)作为空白样本，按照所述的检测方法重复检测20次，计算空白样本的均值及标准差，以空白样本检测均值加上两个标准差反带入标准曲线，得到的浓度值即为本试剂盒的分析灵敏度，其分析灵敏度为2pg/mL。

[0099] (2)线性范围验证

[0100] 取一份临床高值混合血清，浓度接近1000pg/mL(956pg/mL)，用实施例1中的校准品稀释液将高值混合血清样本按照1/2、1/4、1/8、1/16、1/32、1/64、1/128、1/256进行倍比稀释，共同组成9个浓度水平的样本组，用实施例1中的试剂盒进行检测，每个样本检测三次，一次实验内完成，分别计算三次测定结果的平均值。以稀释浓度(X)为横坐标，以测定结果的平均值(Y)为纵坐标，计算线性回归方程及线性回归方程的相关系数(r)，经计算得出线性回归方程为 $Y = 1.004X - 0.465$ ，相关系数 $r = 0.9999$ ，结果表明试剂盒在5~1000pg/mL线性范围内相关性较好，结果如表1和图1所示。

[0101] 表1

[0102]

梯度稀释倍数	测值 (pg/mL)			
	1	2	3	平均值
原倍	954.27	963.95	960.66	959.63
2	477.29	482.78	480.23	480.10
4	242.48	243.03	239.37	241.63
8	119.67	120.62	121.73	120.67
16	57.69	58.46	59.13	58.43
32	28.84	29.23	27.56	28.55
64	14.42	13.91	13.83	14.05
128	6.90	6.88	6.87	6.88
256	3.42	3.46	3.68	3.52

[0103] (3)精密性的检测

[0104] 用实施例1的试剂盒对两份不同浓度的血清样本各重复测定10次,分别计算两份样本的均值和标准差,以均值/标准差计算两份样本的变异系数CV,结果显示两份样本的分析内变异系数分别为3.11%和2.93%(见表2)

[0105] 表2.精密性检测结果

[0106]

序号	样本 1 测值 (pg/mL)	样本 2 测值 (pg/mL)
1	13.98	162.83
2	14.24	165.08
3	14.65	156.43
4	13.98	163.10
5	13.19	154.25
6	14.32	155.44
7	13.57	163.66
8	14.09	156.12

[0107]	9	14.54	156.21
	10	14.22	166.69
	均值 (AVE)	14.08	159.98
	标准偏差 (SD)	0.438	4.686
	变异系数 (CV%)	3.11%	2.93%

[0108] (4)方法学比对

[0109] 用化学发光法原理检测IL-6结果准确可靠,已被广泛认可,由于目前市场上没有用磁微球免疫比浊法检测IL-6的市售试剂,所以选择采用化学发光法原理检测IL-6的市售进口试剂作为对比试剂。

[0110] 收集进口IL-6化学发光试剂盒检测过的血清样本100例,其中阳性反应样本61例,阴性反应样本39例。用实施例1的试剂盒对样本进行测定,对所有样本结果进行线性回归分析,计算试剂盒与市售IL-6化学发光检测试剂盒检测结果的相关系数(r)。结果显示,两种试剂盒检测结果的相关系数 $r=0.9981$,线性回归方式为 $y=0.992x-0.264$ (见图2)。

[0111] (5)稳定性

[0112] 将本发明实施例1~5所制备的检测试剂盒与对比例1~2所制备的检测试剂盒分别置于37℃热处理15天后取出,在生化分析仪上按照检测方法检测市售进口IL-6化学发光试剂盒定值为15.43pg/mL和165.18pg/mL的两份血样,每份血样重复测定四次,计算检测结果与市售进口试剂定值结果的相对偏差以及测值变化率,试验结果见表3。从试验结果可见,本发明检测试剂盒的热稳定较好,且要优于对比例检测试剂盒。

[0113] 表3.各检测试剂盒稳定性比对实验结果

[0114]

		实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	对比例1	对比例2
1#定值样本 (15.43pg/mL)	2~8℃	15.74	13.94	14.01	16.83	14.13	15.57	13.05
	37℃放置 15 天	15.14	13.33	12.67	16.01	13.15	13.64	12.47
	测值变化率	3.81%	4.34%	9.53%	4.91%	6.98%	12.41%	4.50%
	2~8℃测值相对偏差	-1.98%	9.67%	9.22%	-9.09%	8.41%	-0.93%	15.40%
	37℃测值相对偏差	1.90%	13.59%	17.87%	-3.73%	14.80%	11.60%	19.20%
2#定值样本 (165.18pg/mL)	2~8℃	168.66	149.86	151.83	181.17	153.79	166.61	139.30
	37℃放置 15 天	164.37	141.59	137.82	173.43	144.07	141.24	132.67

[0115]

测值变化率	2.54%	5.52%	9.23%	4.27%	6.32%	15.23%	4.76%
2~8℃测值相对偏差	-2.11%	9.28%	8.08%	-9.68%	6.90%	-0.87%	15.67%
37℃测值相对偏差	0.49%	14.28%	16.57%	-5.00%	12.78%	14.49%	19.68%

[0116] 从以上的描述中,可以看出,本发明上述的实施例实现了如下技术效果:应用本技术可以准确可靠、简便快速的检测出人血清中IL-6含量,特别适合在各级基层医疗机构普及和应用。

[0117] 以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

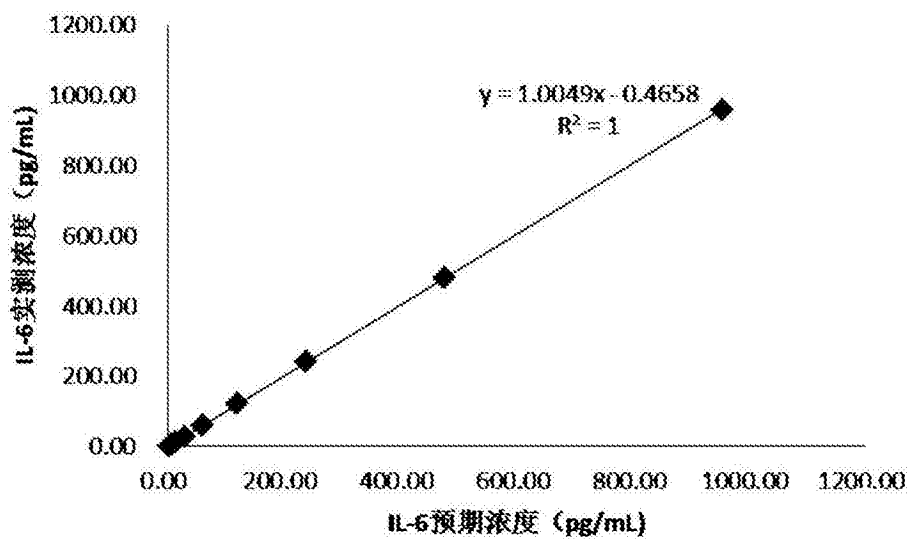


图1

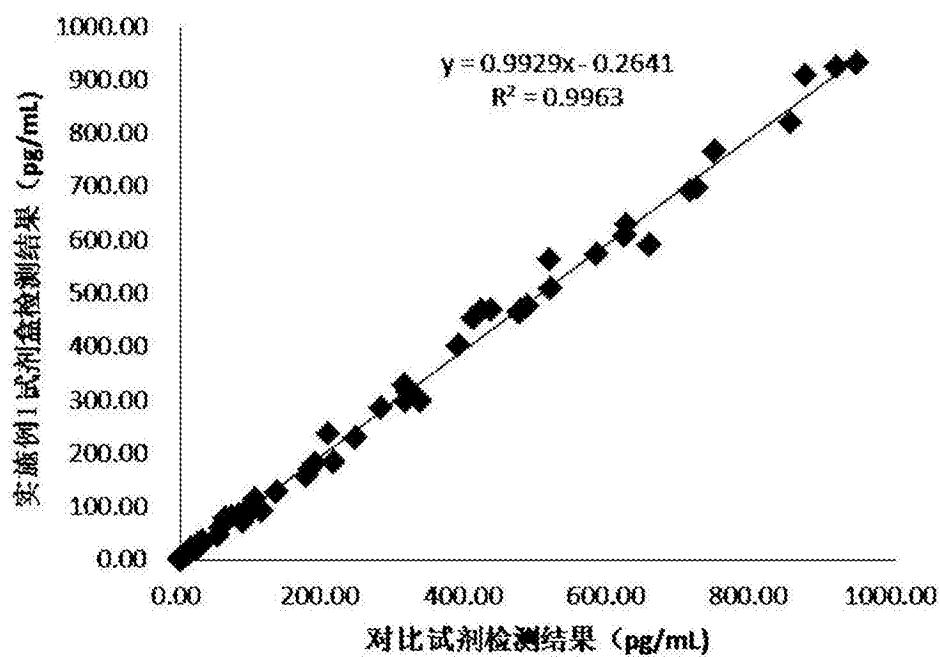


图2

专利名称(译)	IL-6定量检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN107402308A	公开(公告)日	2017-11-28
申请号	CN2017110478825.8	申请日	2017-06-21
[标]发明人	柳静 张黎 詹先发		
发明人	柳静 张黎 詹先发		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/6869 G01N33/531 G01N33/54326 G01N33/54333		
代理人(译)	韩建伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种IL-6定量检测试剂盒及其制备方法。其中，该IL-6定量检测试剂盒包括：偶联有IL-6抗体的磁微球试剂，反应稀释液试剂和IL-6校准品。应用本发明的检测试剂盒，可以在现有多种生化分析仪上进行血清样本检测，操作简便快速，出具检测结果只需约10~15分钟，便于炎症、脓毒症早期诊断，更适合在各级基层医疗机构普及和应用。

