



(12)实用新型专利

(10)授权公告号 CN 210323044 U

(45)授权公告日 2020.04.14

(21)申请号 201920607319.9

G01N 21/64(2006.01)

(22)申请日 2019.04.29

(ESM)同样的发明创造已同日申请发明专利

(73)专利权人 厦门稀土材料研究所

地址 福建省厦门市集美区兑山西珩路258号

(72)发明人 张云 张肖 宋良

(74)专利代理机构 浙江千克知识产权代理有限公司 33246

代理人 冷红梅

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

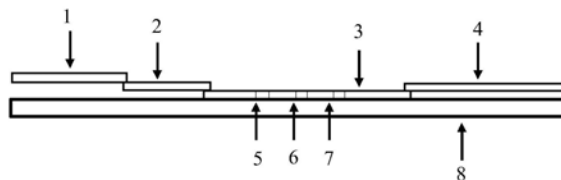
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54)实用新型名称

IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡及试剂盒

(57)摘要

本实用新型涉及一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性,利用稀土钷酸盐纳米荧光标记材料,结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡以及试剂盒。本实用新型检测卡及试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血样本中白介素6和降钙素原的含量,通过滤血膜样品垫的处理可实现样本无需预处理和稀释液稀释,利用时间分辨荧光微球检测技术,可避免样本本身荧光干扰,稀土钷酸盐纳米材料具有背景低,荧光信号强,信噪比高等优势,标记通过共价键将稀土钷酸盐纳米颗粒与抗体连接,标记产物稳定,具有检测范围宽、灵敏度高、准确度高、检测快速简便等特点。



1. 一种IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡,其特征在於所述检测卡由卡壳和设置在卡壳内的检测试纸条组成:

所述检测试纸条由底衬以及粘贴在底衬上的滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上;

所述滤血膜样品垫处喷涂有包含异嗜性抗体阻断剂的样品垫处理液;

所述玻璃纤维结合垫处设置有微球线,喷涂有时间分辨荧光微球标记的单克隆抗体IL-6 1、单克隆抗体PCT 1以及兔IgG抗体,所述时间分辨荧光微球为稀土钷酸盐纳米颗粒,粒径为 $250 \pm 50\text{nm}$;

所述硝酸纤维素膜上依次设置有检测线1、2和质控线,检测线1、2和质控线分别包被单克隆抗体IL-6 2、单克隆抗体PCT2和羊抗兔抗体,检测线1、2和质控线相互平行,间隔距离为3~5mm,其中检测线2靠近结合垫,质控线远离结合垫;

所述卡壳包括上壳和下壳,上壳上设置有加样孔和观察窗,所述加样孔对应检测试纸条的样品垫,所述观察窗对应硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,所述上壳和下壳为拼插式连接,下壳上设置有固定检测试纸条的卡口。

2. 如权利要求1所述的IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡,其特征在於,所述检测试纸条底衬尺寸为 $80*4\text{mm}$,滤血膜样品垫尺寸为 $18*4\text{mm}$,结合垫尺寸为 $15*4\text{mm}$,包被膜尺寸为 $25*4\text{mm}$,吸水纸尺寸为 $28*4\text{mm}$ 。

3. 一种IL-6/PCT联合检测时间分辨检测试剂盒,其特征在於所述试剂盒包括:

- (1) 权利要求1或2所述的IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光检测卡;
- (2) 含有定标曲线的ID卡。

IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡及试剂盒

(一) 技术领域

[0001] 本实用新型涉及一种IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光检测卡及试剂盒。

(二) 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。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,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)。当炎症反应发生后,IL-6血清浓度的升高早于其他生物标志物,浓度升高后诱导PCT和CRP的产生。患者血清中IL-6的浓度水平在感染早期快速升高,2小时内达到峰值,相比PCT和CRP更为灵敏,在感染早期更有利临床预测,动态观察IL-6水平有助于了解疾病进展并确认疗效。同时,IL-6也是评估脓毒症患者预后的优秀标志物。

[0003] 降钙素原是一种功能蛋白,是降钙素合成过程中的中间产物,是无激素活性的降钙素前肽物质。健康人血浆PCT含量极低,在正常人血中低于0.5ng/ml,当严重细菌、真菌、寄生虫感染以及脓毒症和多脏器功能衰竭时它在血浆中的水平升高。PCT反映了全身炎症反应的活跃程度,是严重细菌性炎症和真菌感染的特异性指标,而且也是脓毒症和炎症活动有关的多脏器衰竭的可靠指标。

[0004] 在脓毒症的全病程管理中,IL-6和PCT联合检测可以取长补短,提高诊断的准确率。IL-6在早期预警及评估预后方面优势突出,而PCT在辅助诊断、评估检测抗生素疗效方面非常有效。联合检测IL-6和PCT可以避免单一指标对感染类别判断的误差,提高感染的早期诊断,及时帮助临床确定患者的治疗方案,具有重要临床价值。

[0005] 现有技术中炎症感染及脓毒症检测仅针对单一的炎症指标进行检测,另外IL-6检测试纸条较少,且测定IL-6/PCT的方法主要有免疫比浊法、荧光免疫层析法、胶体金法等。其中胶体金法具有操作简单快速的优点,但灵敏度低且定量不准确;免疫比浊法较为敏感、准确,可应用于全自动生化仪,但需要仪器且耗时较长,适合处理大量样本,无法满足快速检测的目的;免疫荧光法是将IL-6/PCT抗体共价结合于荧光微球表面活性基团上,通过激发后检测线是否产生荧光来判断结果,快速便捷可准确定量同时具有高灵敏度、标记物稳定等优点,在医学免疫检测领域广泛应用。

[0006] 然而在生物流体和血清中的许多复合物和蛋白本身就可以发荧光,因此使用传统的荧光素等发色团进行荧光检测时灵敏度就会严重下降,但大部分背景荧光信号是短时存在的,可利用稀土纳米材料(镧系元素螯合物)作为标记物来标记抗体或抗原。稀土纳米材料是一种广泛使用的生物标记物,与传统标记物相比,稀土掺杂纳米材料具有稳定的物理化学性质,窄带发射,长寿命等优点,从而排除激发光干扰,可通过时间分辨消除本底荧光干扰,在生物标记过程中不容易受环境影响。钷酸盐在深紫外的吸收截面较大,是优良的荧光标记材料,稀土离子掺杂的钷酸盐发光材料由于稀土离子具有丰富的能级,可以在不同能级之间跃迁,大大提高稀土钷酸盐纳米材料的光学性能。因此采用稀土钷酸盐纳米荧光

标记材料作为标记物,利用时间分辨荧光免疫技术,同时检测波长和时间两个参数进行信号分辨,可有效地排除非特异荧光的干扰,极大地提高了分析灵敏度。

(三) 发明内容

[0007] 本实用新型目的是提供一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性,利用稀土钷酸盐纳米荧光标记材料,结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光免疫层析定量检测卡以及试剂盒。

[0008] 本实用新型采用的技术方案是:

[0009] 一种IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光检测卡,包括卡壳和设置在卡壳内的检测试纸条:

[0010] 所述检测试纸条由底衬以及粘贴在底衬上的滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸组成,所述滤血膜样品垫、玻璃纤维结合垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底衬上;

[0011] 所述滤血膜样品垫处喷涂有包含异嗜性抗体阻断剂的样品垫处理液,玻璃纤维结合垫处设置有微球线,喷涂有时间分辨荧光微球标记的单克隆抗体IL-6 1、单克隆抗体PCT 1以及兔IgG抗体(含量为50~200 μ g抗体/200 μ l荧光微球),所述时间分辨荧光微球为稀土钷酸盐颗粒(组成为 $\text{LnVO}_4:\text{xEu}$,优选为 $\text{GdVO}_4:30\%\text{Eu}$), LnVO_4 为基质,其中Ln为镧、铈、钆、铽、镱中的一种或多种,基质优选为 GdVO_4 ,掺杂离子为铕(Eu^{3+}),冒号“:”表示为铕掺杂;x为摩尔百分数,范围是5%~50%,优选为30%,粒径为 $250\pm 50\text{nm}$;所述时间分辨荧光微球在基态下稳定,在250~350nm的激发光源作用下发射出波长范围在600~620nm的荧光;

[0012] 所述硝酸纤维素膜上依次设置有检测线1、2和质控线,检测线1、2和质控线分别包被单克隆抗体IL-6 2、单克隆抗体PCT2和羊抗兔抗体,检测线1、2和质控线相互平行,间隔距离为3~5mm,其中检测线2靠近结合垫,质控线远离结合垫;检测线1为单克隆抗体IL-6 2、包被浓度为0.3~2mg/ml、用量为0.5~1.5 μ l包被液量/cm膜,检测线2为单克隆抗体PCT2、包被浓度为0.3~2mg/ml、用量为0.5~1.5 μ l包被液量/cm膜,质控线中羊抗兔IgG抗体包被浓度为0.3~2mg/ml、用量为0.5~1.5 μ l包被液量/cm膜;

[0013] 所述卡壳包括上壳和下壳,上壳上设置有加样孔和观察窗,所述加样孔对应检测试纸条的样品垫,所述观察窗对应硝酸纤维素膜上的检测线和质控线,所述上壳和下壳为拼插式连接,下壳上设置有固定检测试纸条的卡口,检测试纸条可以根据需要更换,卡壳可重复利用。

[0014] 所述检测试纸条由如下方法制备:

[0015] (1) 稀土钷酸盐纳米荧光标记材料的制备方法

[0016] 在50mL圆底烧瓶中,按摩尔比例,加入2份蒸馏水,(1-x)份Ln的硝酸盐或醋酸盐或氯化物,x份Eu的硝酸盐或醋酸盐或氯化物,x为摩尔百分数,范围是5%~50%,1份原钷酸,(1-5份)柠檬酸或柠檬酸钠,用氢氧化钠调节pH值6-8,通入氮气,85 $^{\circ}\text{C}$ 反应24小时,10000rpm离心,用蒸馏水洗涤3次,干燥得到分散性好的水溶性 $\text{LnVO}_4:\text{xEu}$ 纳米荧光探针。 LnVO_4 为基质优选为 GdVO_4 ,掺杂离子为铕(Eu^{3+}),其摩尔百分数优选为30%。所述的 $\text{GdVO}_4:30\%\text{Eu}$ 材料结构为纯四方相结构,尺寸约为250nm且形貌均一,发光性能好。

[0017] (2) 时间分辨荧光微球的活化

[0018] 超声波处理荧光微球2min后,取200 μ l荧光微球以14000rpm高速离心5~15min后,沉淀物用10~100mM,pH为5.0~7.0的MES溶液洗涤至1ml,超声波处理2min;加入10~100 μ l的20~100mg/ml碳二亚胺,混匀5~10min,再加入50~200 μ l的20~100mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀10~20min后14000rpm高速离心5~15min,沉淀用pH为5.0~7.0的MES溶液洗涤至1ml;

[0019] (3) 时间分辨荧光微球分别标记IL-6、PCT单克隆抗体IL-6 1、PCT1和兔IgG抗体的制备

[0020] 在上述活化后的荧光微球超声波处理2min后按照50~200 μ g/200 μ l分别加入IL-6、PCT单克隆抗体IL-6 1、PCT1和兔IgG,混匀1~3小时,用含0.5%BSA、0.1%甘氨酸的10~50mM、pH 7.5~8.5Tris-HCl封闭液封闭0.5~1小时后14000rpm高速离心5~15min,用含1%NaCl、0.5%BSA、0.5%蔗糖、0.1%Tween20的10~50mM、pH7.5~8.5Tris-HCl保存液洗涤并重悬至200 μ l于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0021] (4) 样品垫的制备

[0022] 用样品垫处理液(含1mg/ml异嗜性抗体阻断剂,0.5%NaCl、0.5%Twee20、0.1%BSA的20mM、pH8.0的Tris-HCl)在滤血膜上平行均匀喷涂两条线,用量为2~4 μ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0023] (5) 结合垫的制备

[0024] 在结合垫上将时间分辨荧光微球标记的IL-6、PCT单克隆抗体IL-61、PCT1和兔IgG抗体用微球稀释液(含0.5%BSA、25%蔗糖的20mM Tris-Hcl缓冲液)稀释8~30倍均匀喷涂一条线,用量为2~4 μ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0025] (6) 包被膜的制备

[0026] 分别用包被缓冲液(含2.5%蔗糖的10mM PBS缓冲液)将IL-6、PCT单克隆抗体IL-6 2、PCT2和羊抗兔IgG抗体调整浓度到0.3~2mg/ml,用量为0.5~1.5 μ l包被液量/cm膜,分别作为检测线1、2和质控线平行划于硝酸纤维素膜上进行包被,质控线、检测线和微球线间隔3~7mm,置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0027] (7) 在底衬上顺次相互搭接地粘贴样品垫、结合垫、包被膜和吸水纸得到试纸板,切割得到所述试纸条。所述检测试纸条底衬尺寸为80*4mm,滤血膜样品垫尺寸为18*4mm,结合垫尺寸为15*4mm,包被膜尺寸为25*4mm,吸水纸尺寸为28*4mm。

[0028] 本实用新型还涉及一种IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光检测试剂盒,包括:

[0029] (1) 所述的IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光检测卡;

[0030] (2) 含有定标曲线的ID卡。

[0031] 本试剂盒的检测原理是双抗体夹心法,检测人血清、血浆和全血样本中IL-6和PCT的含量。含IL-6和PCT的血液样本滴加在样本加样区,滤血膜可过滤全血中红细胞和样品中颗粒杂质并阻断样品中非特异性结合蛋白,过滤后通过毛细作用层析至结合垫,与时间分辨荧光微球标记的IL-6、PCT单克隆抗体IL-6 1、PCT1结合,形成微球抗体-抗原复合物,层析至硝酸纤维素膜上检测区,反应复合物被检测线包被的IL-6和PCT单克隆抗体IL-6 2、PCT2捕获,而多余的荧光微球标记物继续向前层析,兔IgG与固定在质控线羊抗兔结合。反应结束后,用紫外光源(285nm)对检测区扫描检测,检测线和质控线上时间分辨荧光微球发出荧光(618nm),其衰变时间也较长。利用延缓检测时间,待样品基质中自然发生的短寿命

荧光(1~10ns)全部衰变后,再测量稀土元素的特异性荧光,这样就可以完全排除特异本底荧光的干扰。通过检测线和质控线荧光强度的强弱及其比值,即可分析出样品中待测物的浓度。

[0032] 所述含有标准曲线的ID卡,是通过时间分辨荧光检测卡测定不同浓度的质控品,以质控品浓度为横坐标,以荧光信号比值作为纵坐标,绘制成标准曲线,写入并生成相应二维码信息存储在ID卡中获得。通过干式荧光免疫分析仪可读取试剂卡上对应的二维码信息并测得相应浓度。

[0033] 本实用新型的有益效果主要体现在:本实用新型检测卡及试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血样本中IL-6和PCT的含量,样本无需进行预处理和稀释液稀释,利用时间分辨荧光微球检测技术,可避免样本本身荧光干扰,标记通过共价键将微球与抗体连接,标记产物稳定,具有检测范围宽(PCT为0.05~100ng/mL,IL-6为1.5~1000pg/mL)、灵敏度高(PCT检出限0.05ng/mL,IL-6检出限为1.5pg/mL)、准确度高、检测快速简便等特点。

(四)附图说明

[0034] 图1为本实用新型的时间分辨荧光定量检测IL-6/PCT联合检测的试剂盒中检测试纸条的结构示意图;

[0035] 其中:1、样品垫;2、结合垫;3、包被膜;4、吸水纸;5、检测线2;6、检测线1;7、质控线;8、底衬。

[0036] 图2为本实用新型的时间分辨荧光定量检测IL-6/PCT联合检测的试剂盒中检测卡的结构示意图;

[0037] 其中:9、二维码;10、加样孔;11、观察窗。

[0038] 图3为本实用新型实施例1所制备的试剂盒IL-6标准曲线。

[0039] 图4为本实用新型实施例1所制备的试剂盒PCT标准曲线。

[0040] 图5为本实用新型实施例1所制备的试剂盒与罗氏免疫比浊法检测IL-6试剂盒检测结果相关性比较。

[0041] 图6为本实用新型实施例1所制备的试剂盒与罗氏免疫比浊法检测PCT试剂盒检测结果相关性比较。

(五)具体实施方式

[0042] 下面结合具体实施例对本实用新型进行进一步描述,但本实用新型的保护范围并不限于此:

[0043] 实施例1:IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光免疫层析定量检测试剂盒的制备

[0044] IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光免疫层析定量检测试剂盒,采用双抗体夹心法免疫层析原理,检测人血清、血浆和全血样本中IL-6和PCT。由时间分辨荧光检测卡和含有定标曲线的ID卡组成。

[0045] 如图1所示,底衬8上顺次搭接样品垫1、结合垫2、包被膜3以及吸水纸4,样品垫1是加样区,用于吸取待测检测样本,结合垫2有微球线,包被膜3上设有检测线和质控线。

[0046] 结合垫2上微球线上使用特定的激发光(285nm)/发射光(618nm)波长的稀土钆酸盐纳米颗粒(GdVO₄:30%Eu)(直径约250nm)标记的单克隆抗体IL-6 1、单克隆抗体PCT 1以

及兔IgG抗体(100 μ g抗体/200 μ l荧光微球),检测线包被分别包被单克隆抗体IL-6 2(1.5mg/ml)、单克隆抗体PCT2(1mg/ml),质控线包被浓度为1mg/ml的羊抗兔IgG抗体(PCT 1单克隆抗体采购自厦门同仁心生物科技有限公司,IL-6 1单克隆抗体采购自南京瀚睿生物科技有限公司,PCT 2单克隆抗体采购自厦门同仁心生物科技有限公司,IL-6 2单克隆抗体采购自南京瀚睿生物科技有限公司,羊抗兔IgG抗体来自长沙博优生物科技有限公司)。微球线用量为4 μ l包被液量/cm样品垫、检测线和质控线用量为1 μ l包被液量/cm膜。

[0047] 在该实施例中,时间分辨荧光定量检测IL-6/PCT联合检测的试剂盒的制备包括以下步骤:

[0048] 1. 稀土钒酸盐纳米荧光标记材料的制备方法

[0049] 在50ml圆底烧瓶中,加入水20ml,0.35mmol Gd(NO₃)₃,0.15mmol Eu(NO₃)₃,2mmol柠檬酸钠,0.5mmol原钒酸钠,通入氮气,85 $^{\circ}$ C反应24小时,10000rpm离心,用蒸馏水洗涤3次,干燥得到分散性好的水溶性GdVO₄:30%Eu纳米荧光探针,所述的GdVO₄:30%Eu材料结构为纯四方相结构,尺寸约为250nm且形貌均一,发光性能好。该稀土钒酸盐的化学式为GdVO₄:30%Eu,冒号“:”表示为Eu³⁺掺杂。其中,GdVO₄为基质,Eu³⁺为激活离子;冒号“:”表示为Eu³⁺掺杂;其摩尔百分数为30%。

[0050] 2. 时间分辨荧光微球的活化

[0051] 超声波处理荧光微球2min后,取200 μ l荧光微球以14000rpm高速离心15min后,沉淀物用100mM,pH为6.0的MES溶液洗涤至1ml,超声波处理2min;加入50 μ l的100mg/ml碳二亚胺,混匀5min,再加入100 μ l的100mg/ml N-羟基琥珀酰亚胺,混匀15min后14000rpm高速离心15min,沉淀用pH为6.0的MES溶液洗涤至1ml。

[0052] 3. 时间分辨荧光微球标记单克隆抗体IL-6 1和单克隆抗体PCT1以及兔IgG抗体的制备

[0053] 在上述活化后的荧光微球超声波处理2min后按照100 μ g/200 μ l分别加入单克隆抗体IL-6 1、单克隆抗体PCT 1、兔IgG单克隆抗体,混匀2小时,用含0.5%BSA、0.1%甘氨酸的50mM、pH8.0Tris-HCl封闭液封闭1小时后14000rpm高速离心15min,用含1%NaCl、0.5%BSA、0.5%蔗糖、0.1%Tween20的50mM、pH8.0的Tris-HCl保存液中缓冲液洗涤两次并超声处理重悬至200 μ l于4 $^{\circ}$ C避光保存。

[0054] 4. 样品垫的制备

[0055] 用样品垫处理液(含1mg/ml异嗜性抗体阻断剂(菲鹏生物股份有限公司),0.5%NaCl、0.5%Tween、0.1%BSA的20mM、pH8.0的Tris-HCl)在滤血膜样品垫上平行均匀喷涂两条线,用量为4 μ l液量/cm样品垫,置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0056] 5. 结合垫的制备

[0057] 在结合垫上将时间分辨荧光微球标记的单克隆抗体IL-6 1和单克隆抗体PCT 1以及兔IgG抗体用微球稀释液(含0.5%BSA、25%蔗糖的20mM Tris-HCl缓冲液)按12%、6%、3%的比例稀释后均匀喷涂一条线(即微球线),用量为4 μ l液量/cm样品垫。置于烘箱中,37 $^{\circ}$ C烘干过夜。

[0058] 6. 包被膜的制备

[0059] 分别用包被缓冲液(含2.5%蔗糖的10mM PBS缓冲液)将单克隆抗体IL-6 2、单克隆抗体PCT 2和羊抗兔抗体分别调整浓度到1.5mg/ml、1mg/ml、1mg/ml用量为1 μ l包被液量/

cm膜,分别作为检测线1、2和质控线平行划于硝酸纤维素膜上进行包被,质控线、检测线间隔4mm,在湿度<30%,温度37℃烘箱中晾干10小时,封袋,备用;

[0060] 7.在底衬(尺寸为80*300mm)上顺次相互搭接地粘贴样品垫(尺寸为18*300mm,滤血膜材质)、结合垫(15*4mm,玻璃纤维材质)、包被膜(尺寸为25*300mm,硝酸纤维素材质)和吸水纸(尺寸为28*300mm)得到试纸板,按照要求切割成4mm宽度的试纸条。

[0061] 本实用新型检测试纸条,在使用时,试纸条组装在由塑料上壳和塑料下壳插合而成的塑料外壳中(下壳上设置有供上壳插入的卡槽),塑料上壳设有两个开孔,加样孔10和观察窗11,加样孔10对应于所述的检测IL-6/PCT试纸条的样品垫1,塑料下壳上设置有固定检测试纸条的卡口,观察窗11对应于所述检测IL-6/PCT试纸条的检测线5、6和质控线7,该检测IL-6/PCT试纸条可以从该塑料外壳中取出。

[0062] 本实用新型试剂盒中,每盒均含有标准曲线的ID卡(同批次标准曲线相同),通过时间分辨荧光检测卡测定不同浓度的质控品,以质控品浓度为横坐标,以荧光信号比值作为纵坐标,绘制成标准曲线,写入ID卡并生成二维码,通过干式荧光免疫分析仪可读取试剂卡上对应的二维码信息并测得相应浓度。

[0063] 实施例2:IL-6/PCT联合检测时间分辨荧光免疫层析定量检测试剂盒的定量检测

[0064] 1.标准曲线的绘制

[0065] 按实施例1制备好的时间分辨荧光检测卡加入不同浓度IL-6抗原质控品(1000pg/mL、800pg/mL、400pg/mL、200pg/mL、100pg/mL、7pg/mL、1.5pg/mL和PCT抗原质控品(100ng/mL、60ng/mL、20ng/mL、2ng/mL、1ng/mL、0.5ng/mL、0.05ng/mL)共7个浓度,每个浓度设三个重复,IL-6/PCT抗原用小牛血清分别稀释得到1000pg/mL和100ng/mL的质控品母液,再用小牛血清稀释到不同质控品浓度),层析15min后,通过广州蓝勃生物科技有限公司生产的AFS-1000型干式荧光免疫分析仪读取C、T线荧光信号及C/T值,实验结果及分析见表1:

[0066]	IL-6 质控品 (pg/mL)	1000	800	400	200	100	7	1.5
--------	---------------------	------	-----	-----	-----	-----	---	-----

[0067]	样本信号 T1/C 值	1	1.1809	0.8832	0.5421	0.2386	0.1349	0.0198	0.0120
		2	1.2257	0.8659	0.5124	0.2632	0.1251	0.0198	0.0127
		3	1.2245	0.8874	0.5781	0.2630	0.1332	0.0207	0.0117
Mean			2.027	1.2104	0.8788	0.5442	0.2549	0.1311	0.0201
SD			0.077	0.0255	0.0114	0.0329	0.0141	0.0052	0.0005
PCT 质控品 (ng/mL)			100	60	20	2	1	0.5	0.05
[0067]	样本信号 T2/C 值	1	1.9702	1.1268	0.5056	0.2030	0.1129	0.0957	0.0840
		2	1.9240	1.1251	0.5111	0.2053	0.1146	0.0928	0.0728
		3	1.9371	1.1219	0.4947	0.2002	0.1186	0.0991	0.0752
Mean			1.9438	1.9438	1.1246	0.5038	0.2028	0.1154	0.0959
SD			0.0238	0.0238	0.0025	0.0083	0.0026	0.0029	0.0032

[0068] 以IL-6和PCT质控品浓度和样本信号T1/C和T2/C平均值分别绘制标准曲线,曲线数据见表1,标准曲线如图3、4所示。其中IL-6R1值为0.9963,PCT R2值为0.9987,通过该标线对样品中所含IL-6和PCT浓度进行浓度定量测定。

[0069] 2.时间分辨荧光试纸卡性能测试。

[0070] 最低检出限:用零值样本进行重复测定20次,计算20次结果的均值M与标准差SD,以空白均值加两倍标准差报告方法的检测限(M+2SD),IL-6结果为1.38pg/mL,符合灵敏度1.5pg/mL。PCT结果为0.04ng/mL,符合灵敏度0.05ng/mL

[0071] 线性范围:IL-6取1.5~1000pg/mL之间7个浓度值,每个浓度重复测量三次,将测定浓度平均值与理论浓度进行线性分析,得到线性方程 $y=1.0375x-9.4498$, $r=0.9949$,表明本实用新型试剂盒在1.5~1000pg/mL线性范围内相关性很好。PCT取0.05~100ng/mL之间7个浓度值,每个浓度重复测量三次,将测定浓度平均值与理论浓度进行线性分析,得到线性方程 $y=0.9657x+0.1272$, $r=0.9994$,表明本实用新型试剂盒在0.05~100ng/mL线性范围内相关性很好。

[0072] 精密性:取三批实施例1中所制时间分辨荧光定量检测IL-6/PCT试剂盒,IL-6质控品分别检测800、5pg/mL重复性质控品,每批试剂盒用重复性质控品平行检测10次,800pg/mL浓度三批批内CV分别为8.98%、6.55%、7.43%,三批批间CV为7.99%,5pg/mL浓度三批批内CV分别为9.33%、9.63%、7.98%,三批批间CV为8.92%,均在10%以内。PCT质控品分别检测28、0.6ng/mL重复性质控品,每批试剂盒用重复性质控品平行检测10次,28ng/mL浓

度三批批内CV分别为8.17%、8.94%、9.53%，三批批间CV为9.07%，0.6ng/mL浓度三批批内CV分别为9.97%、10.04%、8.71%，三批批间CV为9.27%，均在10%以内。

[0073] 准确度：IL-6选择浓度为5pg/mL的质控物为检测样本，分为体积相同3份，在其中2份样本中分别加入500pg/mL和30pg/mL的准确度质控品，制成2个不同加入浓度的回收样本，计算加入的待测物的浓度。在另一份样本中加入同样量的无被测物的溶液，制成基础样本。对样本进行3次重复分析，取其均值进行计算。计算回收率=（分析样品浓度-基础样品浓度）/加入浓度×100%。回收样本500pg/mL的回收率为98.83%，30pg/mL的回收率为107.08%，平均回收率为102.96%。偏差在10%以内。PCT选择浓度为0.75ng/mL的质控物为检测样本，分为体积相同3份，在其中2份样本中分别加入60ng/mL和5ng/mL的准确度质控品，制成2个不同加入浓度的回收样本，计算加入的待测物的浓度。回收样本60ng/mL的回收率为93.81%，5ng/mL的回收率为93.13%，平均回收率为93.47%。偏差在10%以内。

[0074] 3. 临床样本检测

[0075] 采集医院检测IL-6和PCT的血浆样本各200份，用本实用新型的试剂盒分别和罗氏电化学发光法检测IL-6、PCT试剂盒进行检测比较。本实用新型试剂盒中，取血浆样本80μl加入到检测卡加样孔中，层析15min后通过广州蓝勃生物科技有限公司生产的AFS-1000型干式荧光免疫分析仪读取浓度，同一样本分别采用对比系统罗氏电化学发光法检测IL-6、PCT试剂盒进行浓度检测。两种方法检测结果进行线性分析，如图5、6所示，其相关性很好，IL-6 $r=0.9869$ ， $P>0.05$ ，平均相对偏差小于10%，PCT $r=0.9850$ ， $P>0.05$ ，平均相对偏差小于10%，结果符合临床分析要求，适合用于临床检测。

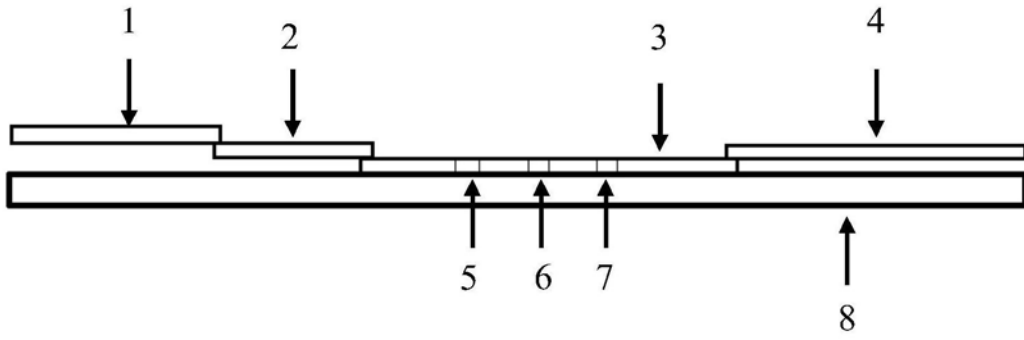


图1

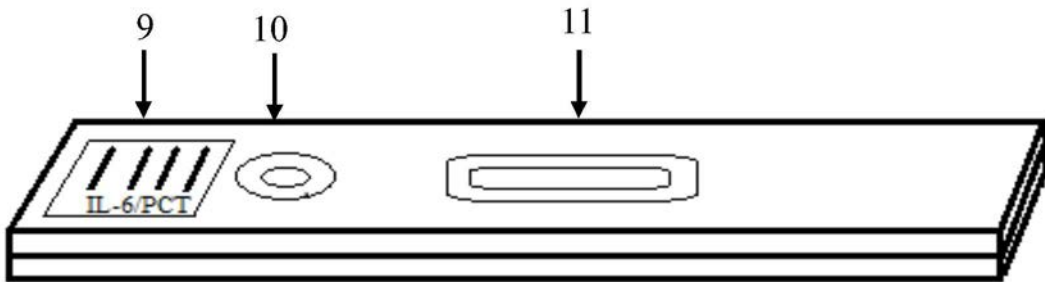


图2

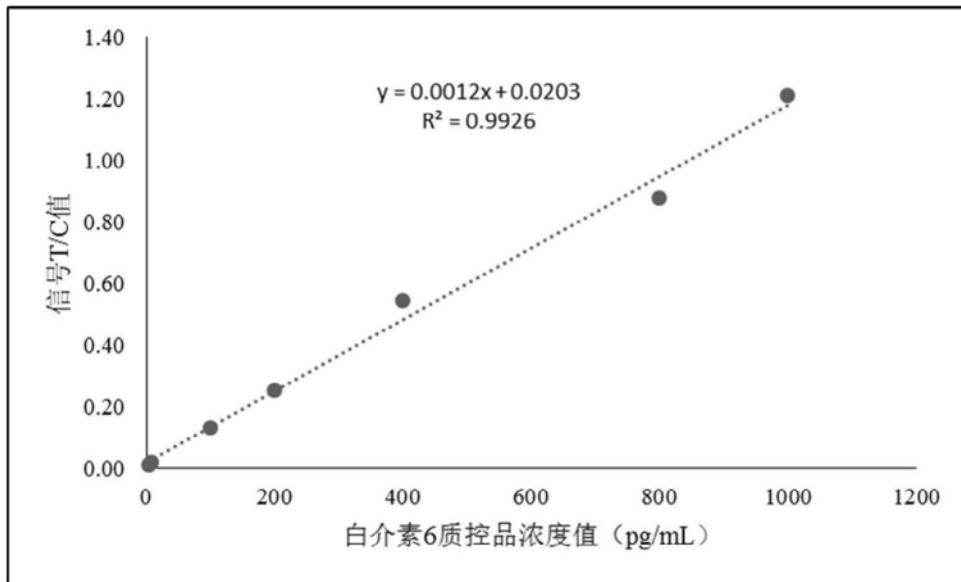


图3

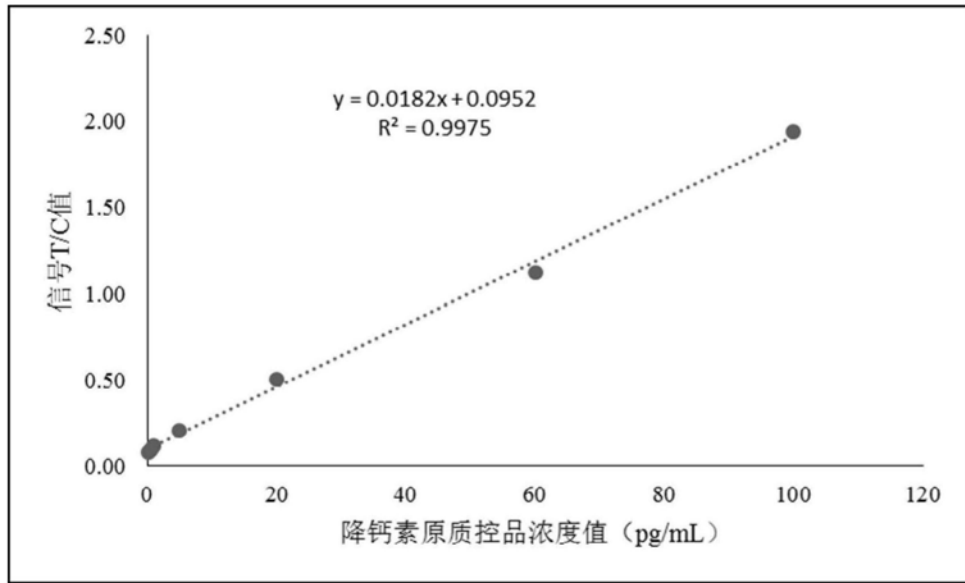


图4

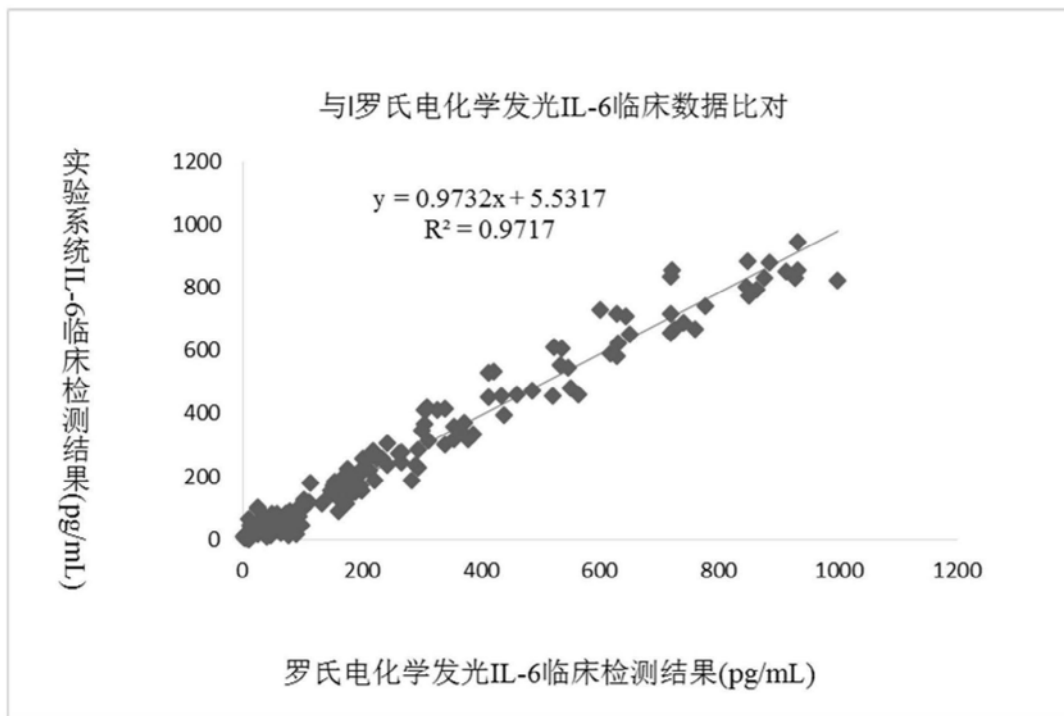


图5

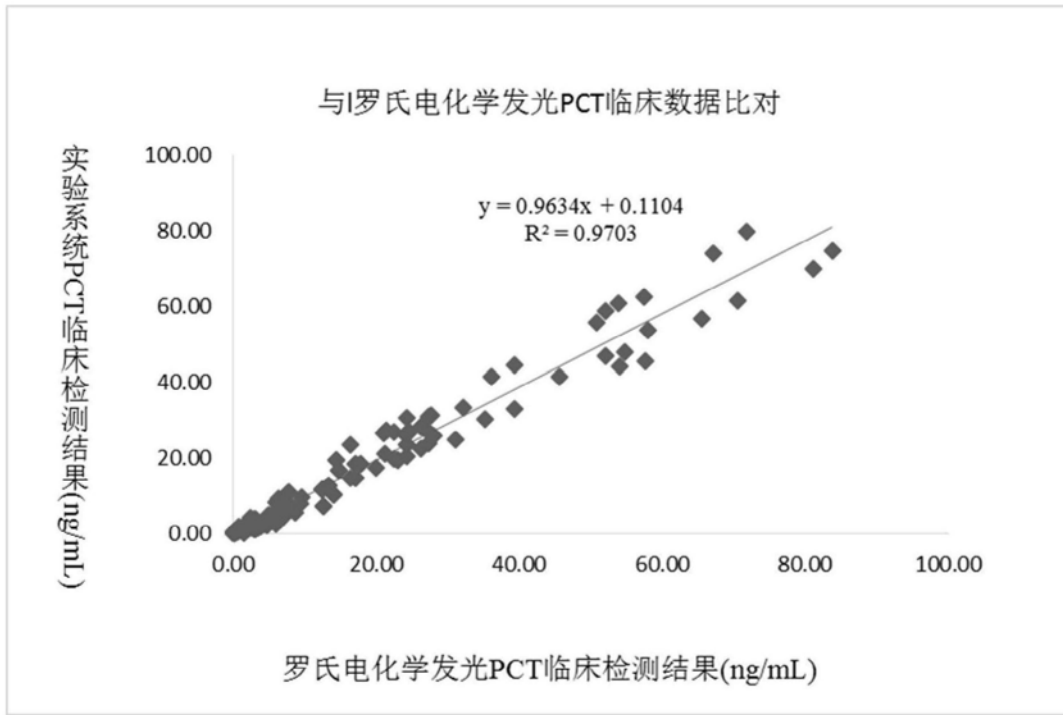


图6

专利名称(译)	IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡及试剂盒		
公开(公告)号	CN210323044U	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201920607319.9	申请日	2019-04-29
[标]申请(专利权)人(译)	厦门稀土材料研究所		
申请(专利权)人(译)	厦门稀土材料研究所		
当前申请(专利权)人(译)	厦门稀土材料研究所		
[标]发明人	张云 张肖 宋良		
发明人	张云 张肖 宋良		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533 G01N33/58 G01N33/577 G01N33/558 G01N21/64		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本实用新型涉及一种利用时间分辨荧光免疫层析技术的灵敏性，利用稀土钷酸盐纳米荧光标记材料，结合干式免疫荧光分析仪实现高灵敏度、可准确定量、简便快捷的IL-6/PCT联合检测时间分辨检测卡以及试剂盒。本实用新型检测卡及试剂盒能够准确定量检测人血清、血浆和全血样本中白介素6和降钙素原的含量，通过滤血膜样品垫的处理可实现样本无需预处理和稀释液稀释，利用时间分辨荧光微球检测技术，可避免样本本身荧光干扰，稀土钷酸盐纳米材料具有背景低，荧光信号强，信噪比高等优势，标记通过共价键将稀土钷酸盐纳米颗粒与抗体连接，标记产物稳定，具有检测范围宽、灵敏度高、准确度高、检测快速简便等特点。

