



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106124769 A

(43)申请公布日 2016. 11. 16

(21)申请号 201610419961.5

(22)申请日 2016.06.13

(71)申请人 南京普朗医疗设备有限公司
地址 211100 江苏省南京市江宁区清水亭
东路989号

(72)发明人 李明明 黄宝福 淳林

(74)专利代理机构 南京申云知识产权代理事务
所(普通合伙) 32274
代理人 邱兴天

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

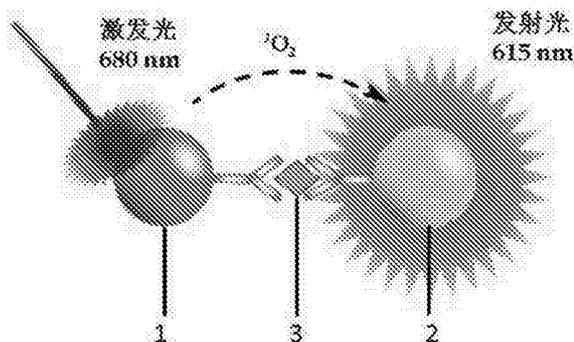
权利要求书2页 说明书9页 附图2页

(54)发明名称

一种一步均相IL-6检测试剂盒及其制备和
使用方法

(57)摘要

本发明公开了一种一步均相IL-6检测试剂盒,主要组成包括:抗IL-6抗体偶联的发光微球、抗IL-6抗体偶联的感光微球、分析缓冲液、反应孔;本发明还公开了所述一步均相IL-6检测试剂盒的制备方法,该方法包括:抗IL-6抗体偶联发光微球的制备;抗IL-6抗体偶联感光微球的制备,以及分析缓冲液的制备;最后本发明公开了一步均相IL-6检测试剂盒的使用方法;本发明的试剂盒具有灵敏度高、特异性好、检测范围宽、重复性好,操作简单,免清洗等特点,将其应用于感染的监测,可以提高脓毒血症诊断的准确率,便于临床检测使用,具有极大的市场价值。



1. 一种一步均相IL-6检测试剂盒,其特征在于,主要组成包括:抗IL-6抗体偶联的发光微球、抗IL-6抗体偶联的感光微球、分析缓冲液、反应孔。

2. 根据权利要求1所述的一步均相IL-6检测试剂盒,其特征在于,所述抗IL-6抗体为针对IL-6不同表位的单克隆抗体或多克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的一步均相IL-6检测试剂盒,其特征在于,所述反应孔为微孔板、微流控试剂盘、反应杯或反应管。

4. 权利要求1-3任一所述的一步均相IL-6检测试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

(1)抗IL-6抗体偶联发光微球的制备;

(2)抗IL-6抗体偶联感光微球的制备;

(3)分析缓冲液的制备。

5. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述抗IL-6抗体偶联发光微球的制备,包括如下步骤:

(1)将抗IL-6抗体加入到超滤管中,离心,用HEPES缓冲液洗涤,备用;将发光微球,用HEPES缓冲液清洗,离心,去除上清;

(2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

(3)加入2.0-3.0 μ I 10%质量分数Tween 20,8-12 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,震荡反应24-48小时;

(4)加8-12 μ I 65mg/mI CMO溶液到反应体系中;震荡反应0.5-1.5小时,离心,去除上清;

(5)加入150-250 μ I Tris-HCl缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

(6)最后一次离心后用PBS缓冲液和牛血清白蛋白混合液重悬微球,使用前稀释至所需浓度。

6. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述抗IL-6抗体偶联感光微球的制备,包括如下步骤:

(1)将抗IL-6抗体加入到超滤管中,离心,用HEPES缓冲液洗涤,备用;将感光微球,用HEPES缓冲液清洗,离心,去除上清;

(2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

(3)加入2.0-3.0 μ I 10%质量分数Tween 20,8-12 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,震荡反应24-48小时;

(4)加8-12 μ I 65mg/mI CMO溶液到反应体系中;震荡反应0.5-1.5小时,离心,去除上清;

(5)加入150-250 μ I Tris-HCl缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

(6)最后一次离心后用PBS缓冲液和牛血清白蛋白混合液重悬微球,使用前稀释至所需浓度。

7. 根据权利要求4所述的制备方法,其特征在于,所述分析缓冲液的制备,包括如下步骤:将HEPES 0.1-2g、BSA 0.1-5g、Casein 0.1-5g、NaCl 0.5-3g、Triton X-100 0.01-1mI加入蒸馏水溶解后,制成分析缓冲液。

8. 根据权利要求5所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)中所述抗IL-6抗体与发光微

球与的质量比为1:(1-100)。

9. 根据权利要求6所述的制备方法,其特征在于,步骤(1)所述抗IL-6抗体与感光微球的质量比为1:(1-100)。

10. 权利要求1-3任一所述的一步均相IL-6检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

(1) 在试剂盒的反应孔中加入样品、抗IL-6抗体偶联的发光微球和抗IL-6抗体偶联的感光微球,混合反应5-60分钟;

(2) 激发光照射反应孔,测量每个反应孔发光量获得光信号值;

(3) 绘制IL-6浓度与光信号值的标准曲线,利用步骤(2)测得的光信号值,通过标准曲线计算IL-6含量。

一种一步均相IL-6检测试剂盒及其制备和使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及IL-6含量检测领域,具体涉及一种一步均相IL-6检测试剂盒及其制备和使用方法。

背景技术

[0002] 急性时相蛋白(acute phase protein,APP)是与感染性炎症紧密相关的一类特异性蛋白。近年来,大量研究表明,多种正负性急性期蛋白与感染性炎症均具有显著的相关性,且比检测白细胞、血沉、酶活性与含量变化等方法更加准确和可靠,可作为感染性炎症的炎症标志物。

[0003] 白介素-6(IL-6)是于1982年首次由Content等从鼠成纤维细胞中检测到的。是一种由多种组织细胞产生(主要是巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞),具有多种复杂生理功能的、由184个氨基酸组成、分子量为26kD的多肽类细胞因子。当机体发生炎症反应和感染时,病毒、内毒素、肿瘤坏死因子(TNF)、血小板源生长因子等多种细胞因子可以诱导机体产生IL-6。IL-6生物学作用非常广泛,它可以诱导B细胞的分化并产生免疫球蛋白;促进T细胞的增殖生长;促进骨髓造血干细胞的增殖;增强血细胞的分化及其抗癌效应等。并且现已确认是一种重要的促炎细胞因子,具有调节免疫应答、免疫期反应的作用,并参与机体炎症反应和抗感染的作用。研究表明,IL-6与临床呼吸系统疾病、肾脏疾病、肿瘤、妊娠期高血压等许多疾病有着广泛的联系。业已证明,在感染时,IL-6与多种细胞因子协同构成炎性细胞网络,参与创伤和多种炎症性疾病的病理过程,且IL-6能预测器官功能不全的发生和预后,已被研究人员和临床医生所认可,认为在感染性疾病中IL-6是比CRP更为敏感的诊断指标。相关文献报道肺炎患儿IL-6升高的原因可能是由于患儿的气管黏膜受到细菌或病毒侵袭后,局部黏膜的SIgA水平降低,导致局部黏膜的清除能力降低,使体内的细胞因子通过血液运输到达机体的各个部位,进而造成血清IL-6水平的增高。IL-6是否与机体的T、B淋巴细胞调节紊乱有关,尽管很多学者已通过大量的实验证实了细胞因子IL-6在小儿肺炎中的作用,但因小儿肺炎的发病机制较复杂,其中免疫学机制起着重要的作用,所以它们的确切作用还不够明确,深入探索其发病机制,为临床医务工作者提供肺炎患儿的诊断、治疗和预防等多方面的理论依据仍需要进行进一步的研究。

[0004] 目前用于检测IL-6的方法主要是酶联免疫吸附试验(ELISA)。ELISA法采用辣根过氧化物酶(horseradish peroxidase,HRP)或碱性磷酸酶标记抗体,并催化底物产生颜色变化,具有操作简单,试剂稳定期长的特点,但ELISA法的检测灵敏度较低,线性范围窄,目前主要应用于传染性疾病预防等对检测灵敏度要求较低的项目。

发明内容

[0005] 发明目的:针对现有IL-6免疫检测方法存在的问题,本发明提供一种可用于定量检测的一步均相IL-6检测试剂盒;本发明还提供一种一步均相IL-6检测试剂盒的制备方法和使用方法。

[0006] 技术方案:为了实现上述目的,如本发明所述一种一步均相IL-6检测试剂盒,主要组成包括:抗IL-6抗体偶联的发光微球、抗IL-6抗体偶联的感光微球、分析缓冲液、反应孔。

[0007] 所述发光微球表面活性基团为醛基、羧基、氨基等,发光微球带有发光化合物和镧系元素化合物的高分子,发光化合物可以是Dioxene(二氧杂环己烯)或Thioxene(二甲基噻吩)的衍生物等,镧系元素化合物可以是Eu(TTA)₃/TOP0或Eu(TTA)₃/Phen等,发光微球大小为100-300nm,该发光微球可由铂金埃尔默公司购得。

[0008] 所述感光微球表面活性基团为醛基、羧基、氨基等,感光微球带有光激发产生单线态氧的染料,如酞菁染料、叶绿素等,感光微球大小为100-300nm,该感光微球可由铂金埃尔默公司购得。

[0009] 进一步地,所述抗IL-6抗体(通过常规免疫学方法制备)为针对IL-6不同表位的单克隆抗体或多克隆抗体。

[0010] 进一步地,所述反应孔为微孔板、微流控试剂盘、反应杯或反应管。

[0011] 本发明所述的一步均相IL-6检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

[0012] (1)抗IL-6抗体偶联发光微球的制备;

[0013] (2)抗IL-6抗体偶联感光微球的制备;

[0014] (3)分析缓冲液的制备。

[0015] 进一步地,所述抗IL-6抗体偶联发光微球的制备,包括如下步骤:

[0016] (1)将抗IL-6抗体加入到超滤管中,离心,用HEPES缓冲液洗涤,备用;将发光微球,用HEPES缓冲液清洗,离心,去除上清;

[0017] (2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

[0018] (3)加入2.0-3.0 μ I 10%质量分数Tween 20,8-12 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,震荡反应24-48小时;

[0019] (4)加8-12 μ I 65mg/ml CM0溶液到反应体系中;震荡反应0.5-1.5小时,离心,去除上清;

[0020] (5)加入150-250 μ I Tris-HCl缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0021] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液和牛血清白蛋白混合液重悬微球,使用前稀释至所需浓度。

[0022] 进一步地,所述抗IL-6抗体偶联感光微球的制备,包括如下步骤:

[0023] (1)将抗IL-6抗体加入到超滤管中,离心,用HEPES缓冲液洗涤,备用;将感光微球,用HEPES缓冲液清洗,离心,去除上清;

[0024] (2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

[0025] (3)加入2.0-3.0 μ I 10%质量分数Tween 20,8-12 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,震荡反应24-48小时;

[0026] (4)加8-12 μ I 65mg/ml CM0溶液到反应体系中;震荡反应0.5-1.5小时,离心,去除上清;

[0027] (5)加入150-250 μ I Tris-HCl缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0028] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液和牛血清白蛋白混合液重悬微球,使用前稀释至所需浓度。

[0029] 进一步地,所述分析缓冲液的制备,包括如下步骤:将HEPES 0.1-2g、BSA 0.1-5g、

Casein 0.1-5g、NaCl 0.5-3g、Triton X-100 0.01-1mI加入蒸馏水溶解后,制成分析缓冲液。

[0030] 进一步地,步骤(1)中所述抗IL-6抗体与发光微球与的质量比为1:(1-100)。

[0031] 进一步地,步骤(1)所述抗IL-6抗体与感光微球的质量比为1:(1-100)。

[0032] 进一步地,使用分析缓冲液稀释抗IL-6抗体偶联的发光微球浓度为10-200 μ g/ml;稀释抗IL-6抗体偶联的感光微球浓度为10-200 μ g/ml。

[0033] 本发明所述的一步均相IL-6检测试剂盒的使用方法,包括如下步骤:

[0034] (1)在试剂盒的反应孔中加入样品、抗IL-6抗体偶联的发光微球和抗IL-6抗体偶联的感光微球,混合反应5-60分钟;

[0035] (2)激发光照射反应孔,测量每个反应孔发光量获得光信号值;

[0036] (3)绘制IL-6浓度与光信号值的标准曲线,利用步骤(2)测得的光信号值,通过标准曲线计算IL-6含量。

[0037] 有益效果:由现有技术相比,本发明的一步均相IL-6检测试剂盒具有如下优点:本发明所得试剂盒能利用IL-6的抗体,以氧通道化学发光技术为平台,针对脓毒血症诊断的IL-6快速检测,本发明的试剂盒检测快速准确、范围宽、灵敏度高、特异性好、重复性好、免清洗;同时本发明的试剂盒的制备方法简单,无污染,并且试剂盒使用方法操作简单,将其应用于感染的监测,可以提高脓毒血症诊断的准确率,便于临床检测使用,具有极大的市场价值。

附图说明

[0038] 图1是本发明实施例3提供的IL-6检测试剂盒原理示意图;

[0039] 图2是本发明实施例3提供的IL-6检测试剂盒检测线性范围图;

[0040] 图3是本发明实施例3试剂盒与罗氏IL-6试剂盒的检测结果相关性比较图。

具体实施方式

[0041] 以下结合附图和实施例对本发明作进一步说明。

[0042] 实施例1

[0043] 抗IL-6抗体偶联发光微球的制备:

[0044] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将0.1mg发光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0045] (2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

[0046] (3)加入2.0 μ I 10%Tween 20,8 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,37 $^{\circ}$ C震荡反应24小时;

[0047] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CM0,加8 μ I溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应0.5小时,离心,去除上清;

[0048] (5)加入150 μ I Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0049] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0050] 抗IL-6抗体偶联感光微球的制备:

[0051] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将0.1mg感光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0052] (2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

[0053] (3)加入2.0 μ l 10%Tween 20,8 μ l 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ l,37 $^{\circ}$ C震荡反应24小时;

[0054] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加8 μ l溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应0.5小时,离心,去除上清;

[0055] (5)加入150 μ l Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0056] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0057] 分析缓冲液的制备:将HEPES 0.1g、BSA 0.1g、Casein 0.1g、NaCl 0.5g、Triton X-100 0.01ml加入90ml蒸馏水溶解后调节pH到7.4,水补足到100ml,制成分析缓冲液。

[0058] 使用分析缓冲液稀释抗IL-6抗体偶联的发光微球浓度为10-200 μ g/ml;稀释抗IL-6抗体偶联的感光微球浓度为10-200 μ g/ml。

[0059] 上述抗IL-6抗体偶联发光微球、抗IL-6抗体偶联感光微球、分析缓冲液再加入微孔板组成本发明所述的试剂盒。

[0060] 实施例2

[0061] 抗IL-6抗体偶联发光微球的制备:

[0062] (1)将0.1mg抗IL-6多克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将10mg发光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0063] (2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

[0064] (3)加入3 μ l 10%Tween 20,12 μ l 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ l,37 $^{\circ}$ C震荡反应48小时;

[0065] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加12 μ l溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1.5小时,离心,去除上清;

[0066] (5)加入250 μ l Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0067] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0068] 抗IL-6抗体偶联感光微球的制备:

[0069] (1)将0.1mg抗IL-6多克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将10mg感光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0070] (2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

[0071] (3)加入3 μ l 10%Tween 20,12 μ l 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ l,37 $^{\circ}$ C震荡反应48小时;

[0072] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加12 μ l溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1.5

小时,离心,去除上清;

[0073] (5)加入250 μ I Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0074] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0075] 分析缓冲液的制备:将HEPES 2g、BSA 5g、Casein 5g、NaCl 3g、Triton X-100 1ml加入90ml蒸馏水溶解后调节pH到7.4,水补足到100ml,制成分析缓冲液。

[0076] 使用分析缓冲液稀释抗IL-6抗体偶联的发光微球浓度为10-200 μ g/ml;稀释抗IL-6抗体偶联的感光微球浓度为10-200 μ g/ml。

[0077] 上述抗IL-6抗体偶联发光微球、抗IL-6抗体偶联感光微球、分析缓冲液再加入微流控试剂盘组成本发明所述的试剂盒。

[0078] 实施例3

[0079] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将1mg发光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0080] (2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

[0081] (3)加入2.5 μ I 10% Tween 20,10 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,37 $^{\circ}$ C震荡反应36小时;

[0082] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加10 μ I溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1小时,离心,去除上清;

[0083] (5)加入200 μ I Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0084] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0085] 抗IL-6抗体偶联感光微球的制备:

[0086] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将1mg感光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0087] (2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

[0088] (3)加入2.5 μ I 10% Tween 20,10 μ I 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ I,37 $^{\circ}$ C震荡反应36小时;

[0089] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加10 μ I溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1小时,离心,去除上清;

[0090] (5)加入200 μ I Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0091] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0092] 分析缓冲液的制备:将HEPES 1.0g、BSA 2.5g、Casein 2.5g、NaCl 1.75g、Triton X-100 0.5ml加入90ml蒸馏水溶解后调节pH到7.4,水补足到100ml,制成分析缓冲液。

[0093] 使用分析缓冲液稀释抗IL-6抗体偶联的发光微球浓度为10-200 μ g/ml;稀释抗IL-6抗体偶联的感光微球浓度为10-200 μ g/ml。

[0094] 上述抗IL-6抗体偶联发光微球、抗IL-6抗体偶联感光微球、分析缓冲液再加入反

应杯组成本发明所述的试剂盒。

[0095] 实施例4

[0096] 抗IL-6抗体偶联发光微球的制备:

[0097] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将5mg发光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0098] (2)将抗体溶液加入到发光微球中,重悬;

[0099] (3)加入2.5 μ l 10%Tween 20,10 μ l 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ l,37 $^{\circ}$ C震荡反应36小时;

[0100] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加10 μ l溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1小时,离心,去除上清;

[0101] (5)加入200 μ l Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0102] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0103] 抗IL-6抗体偶联感光微球的制备:

[0104] (1)将0.1mg抗IL-6单克隆抗体加入到超滤管中,离心10分钟,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复洗涤6次后,抗体稀释到1mg/ml备用。将5mg感光微球,用HEPES缓冲液(pH7.4)重复清洗两次,离心,去除上清;

[0105] (2)将抗体溶液加入到感光微球中,重悬;

[0106] (3)加入2.5 μ l 10%Tween 20,10 μ l 400mM NaCNBH₃,加入HEPES缓冲液将体积补足到200 μ l,37 $^{\circ}$ C震荡反应36小时;

[0107] (4)用800mM NaOH配制65mg/ml CMO,加10 μ l溶液到反应体系中;37 $^{\circ}$ C震荡反应1小时,离心,去除上清;

[0108] (5)加入200 μ l Tris-HCl(pH8.0)缓冲液重悬,离心,去除上清,重复一次;

[0109] (6)最后一次离心后用PBS缓冲液(pH7-8)和牛血清白蛋白混合液重悬微球,终浓度5mg/ml,使用前稀释至所需浓度。

[0110] 分析缓冲液的制备:将HEPES 1.0g、BSA 2.5g、Casein 2.5g、NaCl 1.75g、Triton X-100 0.5ml加入90ml蒸馏水溶解后调节pH到7.4,水补足到100ml,制成分析缓冲液。

[0111] 使用分析缓冲液稀释抗IL-6抗体偶联的发光微球浓度为10-200 μ g/ml;稀释抗IL-6抗体偶联的感光微球浓度为10-200 μ g/ml。

[0112] 上述抗IL-6抗体偶联发光微球、抗IL-6抗体偶联感光微球、分析缓冲液再加入反应管组成本发明所述的试剂盒。

[0113] 实施例5

[0114] 试剂盒的使用方法:

[0115] (1)在试剂盒的反应孔中加入样品、抗IL-6抗体偶联的发光微球和抗IL-6抗体偶联的感光微球,混合反应5分钟;

[0116] (2)激发光照射反应孔,测量每个反应孔发光量获得光信号值。

[0117] (3)绘制IL-6浓度与光信号值的标准曲线,利用步骤(2)测得的光信号值,通过标准曲线计算IL-6含量。

[0118] 试验例6

[0119] 本发明试剂盒方法学评价:

[0120] 1、线性

[0121] 配制浓度为0ng/ml, 1pg/ml, 5pg/ml, 20pg/ml, 100pg/ml, 500ng/ml, 1000pg/ml, 的IL-6标准品溶液。在反应孔中分别加入5 μ l标准品、加入20 μ l偶联IL-6抗体的发光微球(终浓度10 μ g/ml), 加入20 μ l偶联IL-6抗体的感光微球(终浓度10 μ g/ml), 室温暗处温育15分钟。温育后, 激发光照射反应孔, 测量每个反应孔发光量获得光信号值。

[0122] 如上用本发明实施例3所制备的IL-6含量检测试剂盒对其进行检测, 绘制各检测试剂盒标准工作曲线(见附图2)。从附图2可以看出本发明所制备的检测试剂盒能保持良好的线性, IL-6浓度为1000pg/mL时方法无Hook效应。

[0123] 2、准确度

[0124] 准确性测量是指用已知量IL-6标准品加入到正常人的血清标本中, 测量加入后浓度值与加入的理论值进行比较, 计算IL-6的回收率。检测结果如下:

样 本 编号	加入 IL-6 浓度 (pg/ml)	测量 IL-6 的浓度 (pg/ml)	回收率 (%)
[0125] 1	10	9.76	97.6
2	50	48.92	97.84
3	100	102.60	102.60
4	200	205.78	102.89

[0126] 3、精密度

[0127] 选取3份不同浓度的标本, 分别按照本发明所述的方法重复测量20次。根据20次的测量结果, 计算平均偏差C.V. %值。

批内差异			批间差异		
平 均 值 (pg/ml)	CV 值 (%)	次 数	平 均 值 (pg/ml)	CV 值 (%)	次 数
[0128] 10.52	5.26	20	9.31	6.12	20
63.25	4.58	20	58.31	5.18	20
186.47	4.21	20	175.62	4.48	20

[0129] 4、分析灵敏度

[0130] 分析灵敏度的定义为: 是指在统计学意义上能与零剂量区分的量。重复20次测量零剂量点, 计算其平均值(X)和标准差(SD), 以X+2SD的计算的浓度值即为该试剂盒的分析灵敏度。本发明试剂盒的分析灵敏度为0.1pg/ml。

[0131] 5、特异性

[0132] 检测本发明的氧通道化学发光免疫分析试剂在干扰性物质(溶血、高血脂、高胆红素)存在的情况下检测标本的准确性。将血红蛋白溶液(5mg/ml)分别取适量加入到1ml的IL-6阳性血清标本中, 使血清中血红蛋白的含量分别为1mg/ml、0.5mg/ml。将甘油三酯溶液

(5mg/ml)分别取适量加入到1ml的IL-6阳性血清标本中,使血清中甘油三酯的含量分别为1mg/ml、0.5mg/ml。将胆红素溶液(5mg/ml)分别取适量加入到1ml的IL-6阳性血清标本中,使血清中胆红素的含量分别为50 μ g/ml、25 μ g/ml。对加入了血红蛋白、甘油三酯和胆红素的IL-6阳性标本进行测定,在反应孔中每孔分别加入5 μ l含加入了血红蛋白、甘油三酯和胆红素的IL-6阳性标本,加入20 μ l偶联抗IL-6抗体的发光微球(终浓度10 μ g/ml),加入20 μ l偶联IL-6抗体的感光微球(终浓度10 μ g/ml),室温暗处温育15分钟。温育后,激发光照射反应孔,测量每个反应孔发光量获得光信号值。将理论浓度与实测浓度的比值作为回收率,回收率在96.79%-104.09%之间。表明IL-6氧通道化学发光试剂在检测血清样本时不受血红蛋白、甘油三酯、胆红素的干扰。

干扰性物质	IL-6 (pg/ml)	回收率 (%)
血红蛋白 (mg/ml)		
0.00	125.36	100
0.5	123.62	98.61
1.0	121.81	97.17
甘油三酯 (mg/ml)		
0.00	118.32	100
0.5	116.11	98.13
1.0	114.52	96.79
胆红素 (μ g/ml)		
0.00	152.66	100
25.00	155.28	101.72
50.00	158.91	104.09

[0133] 6、相关性

[0134] 如图3所示,与罗氏诊断IL-6化学发光试剂盒的相关性为: $y=0.9976x-0.9217$, $R^2=0.9952$

[0135] 本发明与现有方法和产品相比,具有检测灵敏度高、特异性好、成本较低,对检测仪器要求低的优点。

[0136] 本发明的原理(见附图1)是通过在均相条件下将偶联了抗IL-6抗体的带有酞菁染料的感光微球1,包被有二甲基噻吩、葱等活性分子且带有铈螯合物、偶联了抗IL-6抗体的发光微球2混合。此时偶联了抗IL-6抗体感光微球1和偶联了抗IL-6抗体的发光微球2迅速地识别检测样本3的目标分子而形成免疫夹心复合物。在激光(波长为680nm)的照射下,感光微球上的光敏剂将周围环境中的氧气转化为更为活跃的单线态氧。单线态氧扩散至发光微球,与其上的化学发光剂反应,进一步激活了同样在发光微球上的荧光基团,使之发出荧光,波长为615nm。单线态氧的半衰期为4 μ s,在溶液中的扩散距离为200nm左右。如果生物分子不存在相互作用,单线态氧无法扩散到发光微球,则不会有荧光信号产生。

[0137] 以上实施例仅用以说明本材料的技术实施方案而非限制,尽管参照较佳实施例对

本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

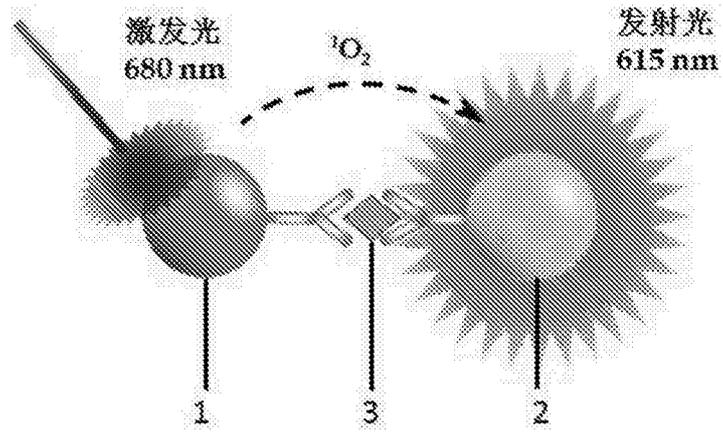


图1

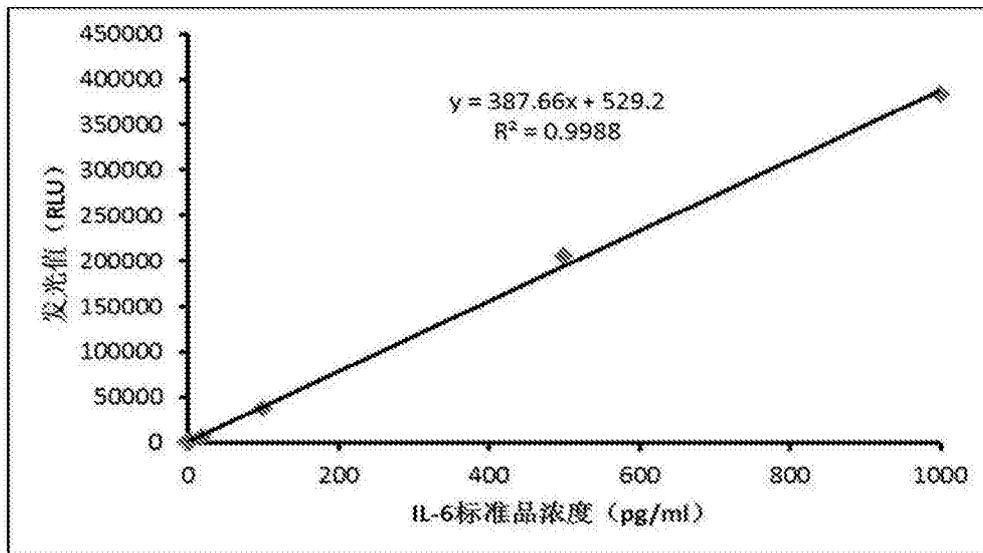


图2

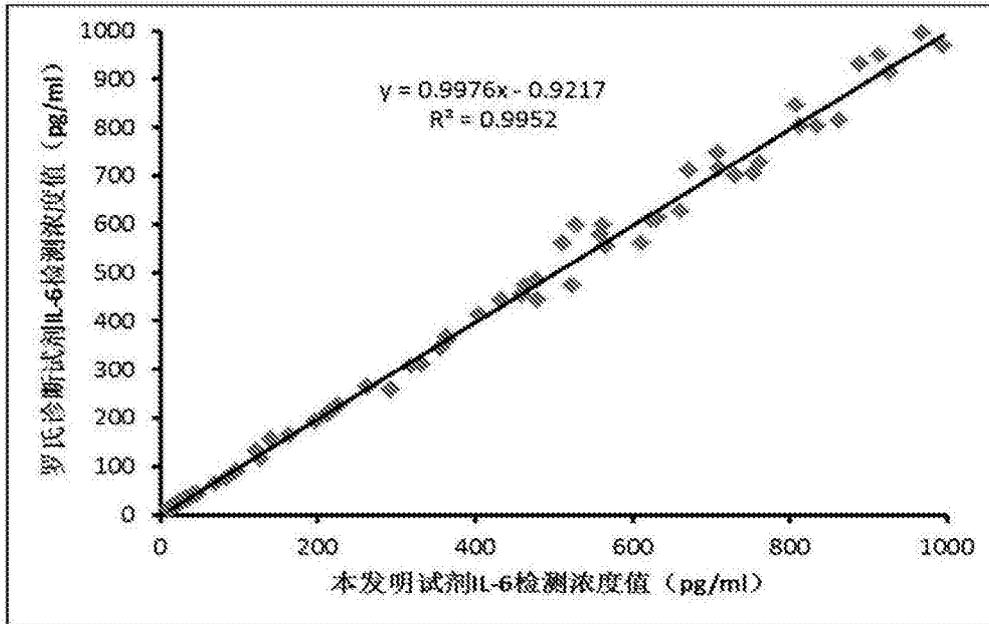


图3

专利名称(译)	一种一步均相IL-6检测试剂盒及其制备和使用方法		
公开(公告)号	CN106124769A	公开(公告)日	2016-11-16
申请号	CN201610419961.5	申请日	2016-06-13
[标]申请(专利权)人(译)	南京普朗医疗设备有限公司		
申请(专利权)人(译)	南京普朗医疗设备有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	南京普朗医疗设备有限公司		
[标]发明人	李明明 黄宝福 淳林		
发明人	李明明 黄宝福 淳林		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/531 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6869 G01N21/763 G01N33/531 G01N33/54313 G01N2333/5412		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种一步均相IL-6检测试剂盒，主要组成包括：抗IL-6抗体偶联的发光微球、抗IL-6抗体偶联的感光微球、分析缓冲液、反应孔；本发明还公开了所述一步均相IL-6检测试剂盒的制备方法，该方法包括：抗IL-6抗体偶联发光微球的制备；抗IL-6抗体偶联感光微球的制备，以及分析缓冲液的制备；最后本发明公开了一步均相IL-6检测试剂盒的使用方法；本发明的试剂盒具有灵敏度高、特异性好、检测范围宽、重复性好，操作简单，免清洗等特点，将其应用于感染的监测，可以提高脓毒血症诊断的准确率，便于临床检测使用，具有极大的市场价值。

