



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110794131 A

(43)申请公布日 2020.02.14

(21)申请号 201910868122.5

(22)申请日 2019.09.12

(71)申请人 苏州普瑞斯生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市高新区锦峰路8号

(72)发明人 袁嘉扬 张勇

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

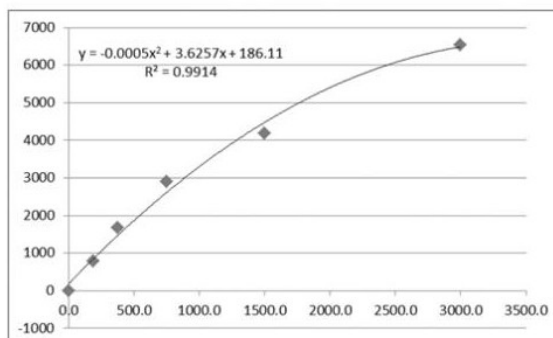
权利要求书2页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种白介素-6检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明涉及生物技术领域,涉及一种白介素-6检测试剂盒,尤其涉及一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,公开了包括试剂R1和试剂R2的组分和浓度,所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成。本发明的优点是:该方法使用的样本量较少,与其他检测方法相比具有简单、准确、快速的特点,并可在全自动生化分析仪上批量分析实现高通量检测;该试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、线性范围宽、特异性高、精密度好、检测时间短等特点,且价格低廉。



1. 一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:

第一缓冲液 6.0-12.2 g/L

第一稳定剂 0.5-2 g/L

电解质 5.8-20.0 g/L

表面活性剂 1-3 ml/L

聚乙二醇 6000 40-120 g/L

第一防腐剂 0.8-2.0 ml/L

所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:

第二缓冲液 10.00-25.30 g/L

N,N-二羟乙基甘氨酸 1.26-9.83 g/L

第二稳定剂 0.5-1.5 g/L

第二防腐剂 0.8-2.0 ml/L

胶乳微球 0.1-2.0 %

白介素-6 抗体 0.5-3.0 g/L

1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 0.01-0.3 g/L。

2. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的第一缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

3. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1的第一稳定剂以及R2中的第二稳定剂均为酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。

4. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的电解质为氯化钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁中一种或两种以上混合物。

5. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的表面活性剂为吐温20、曲拉通、聚乙烯吡咯烷酮、辛基苯基聚氧乙烯醚中的一种或几种以上混合物。

6. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R1中的第一防腐剂以及R2中的第二防腐剂均为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300、硫柳汞中的一种。

7. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2中的第二缓冲液为PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

8. 根据权利要求1所述的一种白介素-6检测试剂盒,其特征在于:所述试剂R2中的胶乳微球所选粒径为80-250nm,其表面修饰集团为羧基、羟基、醛基、氨基中的一种。

9. 如权利要求1-8中任一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,其特征在于:包括如下步骤:A)、试剂R1制备:

在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入第一缓冲液、第一稳定剂、电解质、表面活性剂、聚乙二醇6000和第一防腐剂,搅拌20-30分钟至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀后,调节pH值到8.30-10.50之间,最后定容至最终体积,存放在成品罐中,进行标识;

B)、试剂R2制备:

B1 缓冲液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入第二缓冲液,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00-7.50之间,继续搅拌5-10分钟至溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

B2 保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂和第二防腐剂,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00-7.50之间,继续搅拌5-10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

B3 胶乳微球抗体偶联物的制备:将胶乳微球以缓冲液稀释到0.1-2.0%的浓度,将白介素-6抗体以缓冲液稀释到0.5-3.0g/L的浓度,二者进行混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以缓冲液溶解到0.01-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入第二稳定剂封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14800rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬,将制备好的R2装入成品罐中,进行标识。

一种白介素-6检测试剂盒及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,涉及一种白介素-6检测试剂盒,尤其涉及一种白介素-6检测试剂盒的制备方法。

背景技术

[0002] 白介素-6 (IL-6) 是一种功能广泛的多效性细胞因子。白介素-6 不仅对B细胞有生理活性作用,对T细胞、造血干细胞、肝细胞和脑 细胞均有生理活性作用,其能够诱导B细胞分化产生免疫球蛋白,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。白介素-6的生物学功能,在抗感染、肿瘤、免疫 性疾病及免疫调节等方面均发挥重要作用。

[0003] 研究表明,在发生外伤、外科手术,应激反应,感染,脑死亡, 肿瘤产生以及其他情况的急性炎症反应过程中,白介素-6会快速产生。连续监测重症监护病人血清或血浆中白介素-6的含量,能有效评估系 统性炎症反应综合征 (SIRS) 的严重程度,脓毒血症以及脓毒血症性 休克的预后情况。白介素-6能作为脓毒血症的早期预警指标,同时白 介素-6在慢性炎症反应中也扮演着重要角色。

[0004] 目前国内,白介素-6的检测在临床应用上主要以国外进口试剂 和酶联免疫吸附试验法 (ELISA) 为主,进口试剂价格昂贵,对于患 者来说经济负担较大,不利于基层推广;而ELISA方法检测灵敏度较 低,线性范围较窄,检测过程耗时长,并且通常只适用手工操作,不 利于全自动检测仪器的检测,从而限制了该方法的推广应用。目前, 具有自主知识产权的国产白介素-6免疫化学发光试剂盒比较少,因此, 提供一种分析灵敏度高且线性范围较宽的白介素-6国产试剂盒在临 床上应用上具有重要的现实意义。

发明内容

[0005] 本发明的目的是:针对上述不足,提供稳定性好、灵敏度高、线 性范围宽、特异性高、精密度好、检测时间短的一种白介素-6检测 试剂盒及其制备方法。

[0006] 为达到上述目的,本发明采用的技术方案是:

[0007] 一种白介素-6检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1 的各组分及浓度包括:

	第一缓冲液	6.0-12.2 g/L
	第一稳定剂	0.5-2 g/L
[0008]	电解质	5.8-20.0 g/L
	表面活性剂	1-3 ml/L
	聚乙二醇 6000	40-120 g/L
	第一防腐剂	0.8-2.0 ml/L

[0009] 所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:

[0010]	第二缓冲液	10.00-25.30 g/L
	N,N-二羟乙基甘氨酸	1.26-9.83 g/L
	第二稳定剂	0.5-1.5 g/L
[0011]	第二防腐剂	0.8-2.0 ml/L
	胶乳微球	0.1-2.0 %
	白介素-6 抗体	0.5-3.0 g/L

[0012] 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐0.01-0.3g/L。

[0013] 试剂R1中的第一缓冲液包括PBS缓冲液、HEPES缓冲液、MES 缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

[0014] 试剂R1的第一稳定剂以及R2中的第二稳定剂均为酪蛋白、甘露醇、牛血清白蛋白中的一种或几种以上混合物。

[0015] 试剂R1中的电解质为氯化钠、氯化钾、氯化镁、硫酸镁中一种或两种以上混合物。

[0016] 试剂R1中的表面活性剂为吐温20、曲拉通、聚乙烯吡咯烷酮、辛基苯基聚氧乙烯醚中的一种或几种以上混合物。

[0017] 试剂R1中的第一防腐剂以及R2中的第二防腐剂均为叠氮钠、Proclin-950、Proclin-300、硫柳汞中的一种。

[0018] 试剂R2中的第二缓冲液为PBS缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸 缓冲体系、MES缓冲液、Tris缓冲液中的一种或几种。

[0019] 试剂R2中的胶乳微球所选粒径为80-250nm,其表面修饰基团为羧基、羟基、醛基、氨基中的一种。

[0020] 一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂 R1制备:

[0021] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液

保持中速转动状态,边搅拌边投入第一缓冲液、第一稳定剂、电解质、表面活性剂、聚乙二醇6000和第一防腐剂,搅拌 20-30分钟至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀后,调节pH值到8.30-10.50之间,最后定容至最终体积,存放在成品罐中,进行标识;

[0022] B)、试剂R2制备:

[0023] B1缓冲液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入第二缓冲液,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到 6.00-7.50之间,继续搅拌5-10分钟至溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0024] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂和第二防腐剂,搅拌20-30分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00-7.50之间,继续搅拌5-10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0025] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:将胶乳微球以缓冲液稀释到 0.1-2.0%的浓度,将白介素-6抗体以缓冲液稀释到0.5-3.0g/L的浓度,二者进行混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以缓冲液溶解到0.01-0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入第二稳定剂封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14800rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬,将制备好的R2装入成品罐中,进行标识。

[0026] 与现有技术相比,本发明所达到的技术效果是:该发明首次实现在生化分析仪上检测白介素-6的含量,其检测范围可达到1.5-3000 pg/mL;该方法使用的样本量较少,与其他检测方法相比具有简单、准确、快速的特点,并可在全自动生化分析仪上批量分析实现高通量检测;该试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、线性范围宽、特异性高、精密度好、检测时间短等特点,且价格低廉,可广泛应用大、中、小医院。

附图说明

[0027] 图1是本发明实施例4中胶乳微球间接偶联白介素-6抗体定标曲线图。其中X轴表示标准品浓度,Y轴表示吸光度。

[0028] 图2是本发明实施例4中线性范围测定图。

具体实施方式

[0029] 下面结合附图及实施例对本发明作进一步描述:

[0030] 实施例一:

[0031] 本发明的一种白介素-6检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液的三羟甲基氨基甲烷,含量为6.0g/L,作为第一稳定剂的牛血清白蛋白,含量为0.5 g/L,作为电解质的氯化钠,含量为5.8g/L,作为表面活性剂的吐温20,含量为1ml/L,聚乙二醇6000,含量为40g/L,作为第一防腐剂的Proclin-950,含量为0.8ml/L;

[0032] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及胶乳

微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为第二稳定剂的牛血清白蛋白、作为第二防腐剂的 Proclin-950构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,浓度为10.00g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,浓度为1.26g/L,牛血清白蛋白,浓度为0.5g/L,Proclin-950,浓度为0.8ml/L,胶乳微球,浓度为0.1%,白介素-6抗体,浓度为0.5g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,浓度为0.01 g/L。

[0033] 试剂R2中的胶乳微球所选粒径为80nm,其表面修饰集团为羧基、羟基、醛基、氨基中的一种。

[0034] 一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂 R1制备:

[0035] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入三羟甲基氨基甲烷、牛血清白蛋白、氯化钠、吐温20、聚乙二醇6000和Proclin-950,搅拌20分钟至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀后,调节pH值到8.30,最后定容至最终体积,存放在成品罐中,进行标识;

[0036] B)、试剂R2制备:

[0037] B1缓冲液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌20分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00,继续搅拌5分钟至溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0038] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸、牛血清白蛋白和Proclin-950,搅拌20分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.00之间,继续搅拌5分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0039] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:将胶乳微球以缓冲液稀释到0.1 的浓度,将白介素-6抗体以缓冲液稀释到0.5g/L的浓度,二者进行混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以缓冲液溶解到0.01g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入牛血清白蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14800rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬,将制备好的R2装入成品罐中,进行标识。

[0040] 实施例二:

[0041] 本发明的一种白介素-6检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液的三羟甲基氨基甲烷,含量为9g/L,作为第一稳定剂的甘露醇,含量为1.2g/L,作为电解质的氯化钾,含量为12g/L,作为表面活性剂的曲拉通,含量为2ml/L,聚乙二醇6000,含量为40-120g/L,作为第一防腐剂的Proclin-300,含量为1.4ml/L;

[0042] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为第二稳定剂的甘露醇、作为第二防腐剂的Proclin-300构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水

合物,浓度为18g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,浓度为5g/L,甘露醇,浓度为1g/L,Proclin-300,浓度为1.4ml/L,胶乳微球,浓度为1%,白介素-6抗体,浓度为2g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,浓度为0.2g/L。

[0043] 试剂R2中的胶乳微球所选粒径为160nm,其表面修饰集团为羧基、羟基、醛基、氨基中的一种。

[0044] 一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂 R1制备:

[0045] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入三羟甲基氨基甲烷、甘露醇、氯化钾、曲拉通、聚乙二醇6000和Proclin-300,搅拌25分钟至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀后,调节pH值到9.3,最后定容至最终体积,存放在成品罐中,进行标识;

[0046] B)、试剂R2制备:

[0047] B1缓冲液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌25分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.5,继续搅拌7分钟至溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0048] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸、甘露醇和Proclin-300,搅拌25分钟至物料完全溶解,调节pH值到6.5,继续搅拌7分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0049] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:将胶乳微球以缓冲液稀释到1%的浓度,将白介素-6抗体以缓冲液稀释到2g/L的浓度,二者进行混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以缓冲液溶解到0.2g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入Proclin-300封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14800rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬,将制备好的R2装入成品罐中,进行标识。

[0050] 实施例三:

[0051] 本发明的一种白介素-6检测试剂盒,包括试剂R1和试剂R2,所述试剂R1的各组分及浓度包括:作为第一缓冲液的三羟甲基氨基甲烷,含量为12.2g/L,作为第一稳定剂的酪蛋白,含量为2g/L,作为电解质的氯化镁,含量为20.0g/L,作为表面活性剂的聚乙烯吡咯烷酮,含量为3ml/L,聚乙二醇6000,含量为120g/L,作为第一防腐剂的叠氮钠,含量为2.0ml/L;

[0052] 所述试剂R2由作为第二缓冲液的2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成,其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、作为第二稳定剂的酪蛋白、作为第二防腐剂的叠氮钠构成,胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成,各组分的浓度为:2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,浓度为25.30g/L,N,N-二羟乙基甘氨酸,浓度为9.83g/L,酪蛋白,浓度为1.5g/L,叠氮钠,浓度为2.0ml/L,胶乳微球,浓度为2.0%,白介素-6抗体,浓度为3.0g/L,1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐,浓度为0.3g/L。

[0053] 试剂R2中的胶乳微球所选粒径为250nm,其表面修饰集团为羧基、羟基、醛基、氨基

基中的一种。

[0054] 一种白介素-6检测试剂盒的制备方法,包括如下步骤:A)、试剂 R1制备:

[0055] 在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入三羟甲基氨基甲烷、酪蛋白、氯化镁、聚乙烯吡咯烷酮、聚乙二醇6000和叠氮钠,搅拌30分钟至物料完全溶解、溶液清澈透明、配液罐底部无沉淀后,调节pH值到10.50,最后定容至最终体积,存放在成品罐中,进行标识;

[0056] B)、试剂R2制备:

[0057] B1缓冲液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入2-(N-吗啉)乙磺酸一水合物,搅拌30分钟至物料完全溶解,调节pH值到7.50,继续搅拌10分钟至溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0058] B2保存液的制备:在配液罐中先加入部分纯化水于磁力搅拌器上,调节搅拌子至中档转速,使溶液保持中速转动状态,边搅拌边投入N,N-二羟乙基甘氨酸、酪蛋白和叠氮钠,搅拌30分钟至物料完全溶解,调节pH值到7.50,继续搅拌10分钟至全部物料完全溶解,溶液清澈透明,配液罐底部无沉淀,定容至最终体积,溶液存放备用,进行标识;

[0059] B3胶乳微球抗体偶联物的制备:将胶乳微球以缓冲液稀释到2.0%的浓度,将白介素-6抗体以缓冲液稀释3.0g/L的浓度,二者进行混匀,将1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐以缓冲液溶解到0.3g/L的浓度,边摇匀边滴加入上述混合溶液中,室温反应120分钟,加入酪蛋白封闭,振荡混匀,室温反应60分钟,将混合液以14800rpm的转速离心30分钟,吸去上清,加入保存液,超声重悬,重复离心清洗3次,最后一次离心去上清后,加入保存液,超声重悬,将制备好的R2装入成品罐中,进行标识。

[0060] 实施例四:

[0061] 胶乳微球间接偶联白介素-6抗体,使用标准品进行定标,结果如表1和图1所示。

[0062] 表1:胶乳微球间接偶联白介素-6抗体定标结果:

校准品浓度 (pg/mL)	dOD
0.0	-2
187.5	783
375.0	1679
750.0	2905
1500.0	4192
3000.0	6538

[0063]

[0064] 选取待测样本用生理盐水进行稀释,产生接近于方法线性范围低限浓度水平的样本,一般为4个浓度水平,分别为:1.0pg/mL、1.2 pg/mL、1.5pg/mL和2.0pg/mL,每个浓度水平样本重复测定10次,以 $CV \leq 8\%$ 为可接受界值,由数据中选取CV值等于或小于可接受界值的最低浓度水平做为检测范围低限,结果如表2所示。

[0065] 选取待测样本用生理盐水进行稀释,产生接近于方法线性范围高限浓度水平的样本,一般为4个浓度水平,分别为:2500pg/mL、3000 pg/mL、3500pg/mL和4000pg/mL,每个浓度水平样本重复测定10次,以 $CV \leq 8\%$ 为可接受界值,由数据中选取CV值等于或小于可接受界值的最高浓度水平做为检测范围高限,结果如表3所示。

[0066] 表2:

[0067]

理论浓度 (pg/mL)	1.0	1.2	1.5	2.0
1	0.9	1.3	1.4	2.0
2	1.0	1.1	1.6	1.9
3	0.9	1.0	1.5	2.1
4	1.0	1.3	1.6	2.2
5	0.9	1.1	1.6	2.0
6	0.9	1.1	1.6	1.9
7	0.8	1.2	1.5	2.2
8	1.0	1.3	1.6	2.2
9	0.8	1.3	1.6	2.2
10	0.8	1.3	1.4	2.1
均值	0.9	1.2	1.5	2.1
SD	0.08	0.12	0.08	0.12
CV%	9.07%	9.62%	5.48%	5.91%

[0068] 当样本浓度低于1.2pg/mL时, $CV > 8\%$;当样本浓度高于1.5 pg/mL时, $CV < 8\%$;故线性范围低限定为1.5pg/mL。

[0069] 表3:

[0070]

理论浓度 (pg/mL)	2500	3000	3500	4000
1	2407.1	2967.6	3937.6	4392.6
2	2366.7	2934.9	3226.5	4445.0
3	2424.4	2801.6	3395.7	4374.0
4	2353.0	3142.9	3672.6	3523.1
5	2407.6	3067.8	3951.7	4090.8
6	2347.3	3194.6	3094.4	4350.5
7	2497.5	2901.3	3944.5	3577.9
8	2397.0	3123.3	3033.2	4385.5
9	2500.8	2899.9	3457.1	3780.7
10	2441.8	3092.6	3682.6	4401.8
均值	2414.3	3012.7	3539.6	4132.2
SD	53.93	128.87	351.27	366.99
CV%	2.23%	4.28%	9.92%	8.88%

[0071] 当样本浓度高于3500pg/mL时, CV>8%;当样本浓度低于3000 pg/mL时, CV<8%;故线性范围高限定为3000pg/mL。

[0072] 综上所述,该发明的线性范围可做到1.5-3000pg/mL。

[0073] 实施例五:

[0074] 精密度CV检测:

[0075] 胶乳微球间接偶联白介素-6抗体,对五个样本本重复检测10次,检测结果如表4所示:

[0076] 表4:

[0077]

1	1.7	84.4	393.4	1497.2	2879.9
2	1.8	83.3	370.5	1403.0	2689.6

3	1.7	76.4	368.0	1405.0	2909.0
4	1.6	80.0	380.3	1442.2	2719.9
5	1.9	76.8	386.8	1469.1	2854.7
6	1.9	79.6	388.2	1470.8	2979.3
7	1.7	79.6	359.6	1416.3	2726.9
8	1.9	75.1	400.0	1421.1	2703.7
9	1.9	79.4	391.3	1438.2	2779.2
10	1.7	77.4	396.6	1465.0	2971.6
均值	1.8	79.2	383.5	1442.8	2821.4
SD	0.11	2.95	13.44	31.86	111.52
CV	6.38%	3.73%	3.51%	2.21%	3.95%

[0078] 精密度CV较小,8%以内。

[0079] 现有的白介素-6试剂与本发明的相关性测试:

[0080] 对照试剂与本发明试剂盒按照各自的参数同时检测20例临床血清,对测定结果进行相关性分析,结果如图所示, $R^2 > 0.95$,符合临

[0081]

序号	对照试剂	本发明测
----	------	------

[0082]

	测值	值
1	1256.6	1631.8
2	2287.7	2325.8
3	124.9	197.7
4	2992.6	2792.1
5	1.6	1.9
6	904.4	968.1
7	773.8	831.4
8	41.7	53.9
9	540.0	580.9
10	375.6	430.3
11	1811.4	2102.1
12	382.5	457.2
13	2065.2	2142.3
14	1071.5	1120.1
15	183.9	242.6
16	564.1	599.8
17	1280.3	1316.6
18	17.7	24.8
19	643.9	711.3
20	98.6	152

[0083] 综上所述：与现有技术相比，本发明所达到的技术效果是：该发明首次实现在生化分析仪上检测白介素-6的含量，其检测范围可达 到1.5-3000pg/mL；该方法使用的样本

量较少,与其他检测方法相比具有简单、准确、快速的特点,并可在全自动生化分析仪上批量分析实现高通量检测;该试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、线性范围宽、特异性高、精密度好、检测时间短等特点,且价格低廉,可广泛应用大、中、小医院。

[0084] 上述实施例只为说明本发明的技术构思及特点,其目的在于让熟悉此项技术的人士能够了解本发明的内容并据以实施,并不能以此限制本发明的保护范围。凡根据本发明精神实质所作的等效变化或修饰,都应涵盖在本发明的保护范围之内。

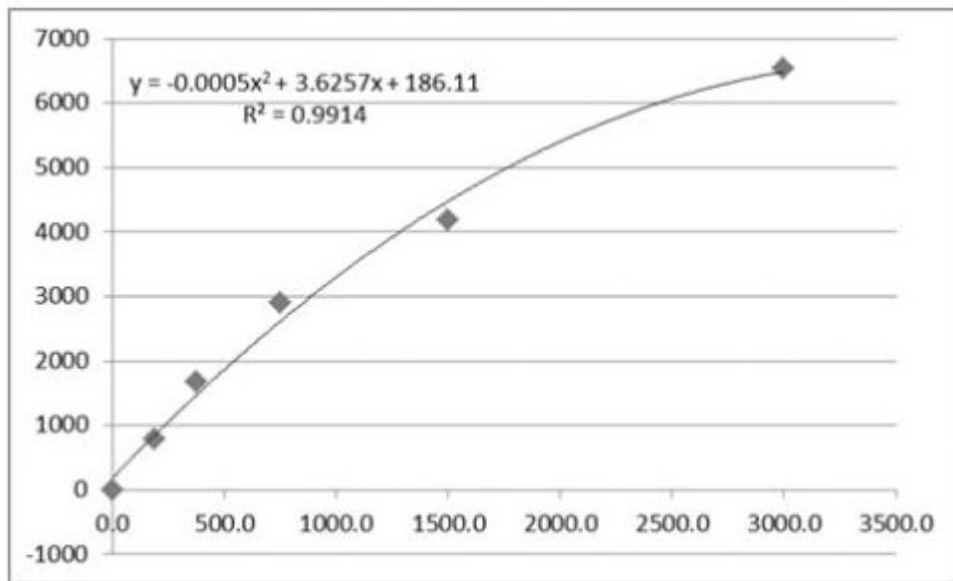


图1

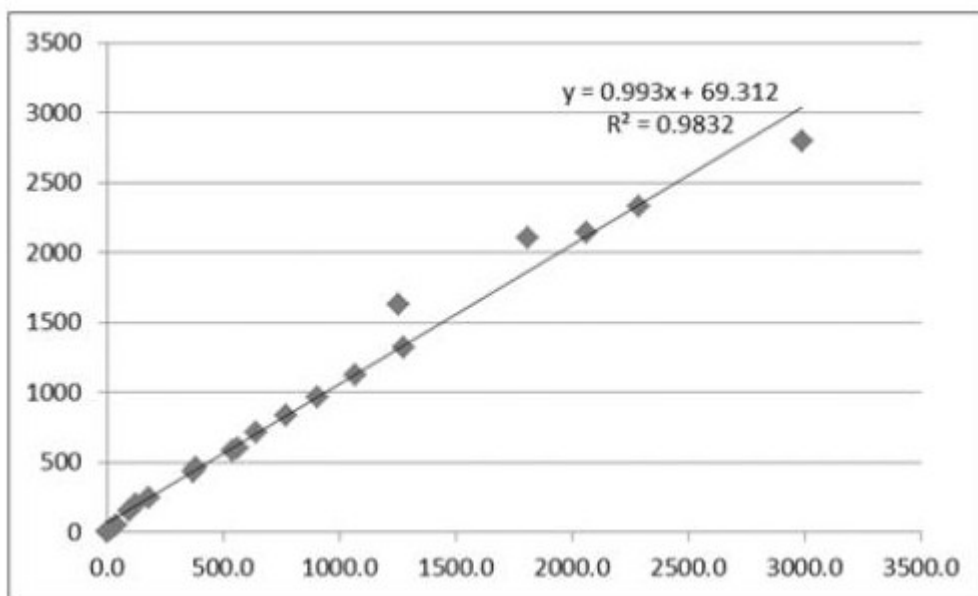


图2

专利名称(译)	一种白介素-6检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	CN110794131A	公开(公告)日	2020-02-14
申请号	CN201910868122.5	申请日	2019-09-12
[标]发明人	袁嘉扬 张勇		
发明人	袁嘉扬 张勇		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/53 G01N33/531		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及生物技术领域，涉及一种白介素-6检测试剂盒，尤其涉及一种白介素-6检测试剂盒的制备方法，公开了包括试剂R1和试剂R2的组分和浓度，所述试剂R2由第二缓冲液、保存液以及胶乳微球抗体偶联物组成，其保存液由N,N-二羟乙基甘氨酸、第二稳定剂、第二防腐剂构成，胶乳微球抗体偶联物由胶乳微球、白介素-6抗体、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐构成。本发明的优点是：该方法使用的样本量较少，与其他检测方法相比具有简单、准确、快速的特点，并可在全自动生化分析仪上批量分析实现高通量检测；该试剂盒具有稳定性好、灵敏度高、线性范围宽、特异性高、精密度好、检测时间短等特点，且价格低廉。

