



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109030829 A

(43)申请公布日 2018.12.18

(21)申请号 201810694904.7

(22)申请日 2018.06.29

(71)申请人 南京航思生物科技有限公司

地址 210000 江苏省南京市江宁区芝兰路
18号(江宁高新园)

(72)发明人 曹丹

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页 附图1页

(54)发明名称

一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法

(57)摘要

本发明涉及化学发光免疫分析,具体是一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法;所述试剂盒采用的检测溶液包含DNA1-IL-6抗体1偶联物、DNA2-IL-6抗体2偶联物、标记吖啶酯(AE)的DNA3、限制性内切酶和氧化石墨烯,所述DNA1与DNA2有6个碱基互补,所述DNA3含2个酶切位点,且分别有9个碱基和DNA1、DNA2互补配对,DNA3通过 $\pi-\pi$ 堆积作用吸附在氧化石墨烯表面,其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭;本方法为均相免疫分析方法,操作简单,同时大大缩短了分析时间,可在5-10分钟内完成单个样品的测定,结合邻位触击效应和化学发光分子信标,通过免疫反应诱发石墨烯淬灭机制的开关,从而释放化学发光信号,无需洗涤及分离纯化步骤。



1. 一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒,其特征在于:所述试剂盒采用的检测溶液包含DNA1- IL-6抗体1 偶联物、DNA2- IL-6抗体2 偶联物、标记吡啶酯的DNA3、限制性内切酶和氧化石墨烯,所述DNA1与DNA2有6个碱基互补,所述DNA3含2个酶切位点,且分别有9个碱基和DNA1、DNA2互补配对,DNA3通过 π - π 堆积作用吸附在氧化石墨烯表面,其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭。

2. 根据权利要求1所述的一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒,其特征在于:所述DNA1 含有53个碱基,3' 端修饰巯基,通过偶联剂琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯,与IL-6抗体1上的氨基共价结合,形成DNA1-IL-6抗体1偶联物。

3. 根据权利要求1所述的一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒,其特征在于:所述DNA2 含有51个碱基,5' 端修饰巯基,通过偶联剂SMCC与IL-6抗体2上的氨基共价结合,形成DNA2- IL-6抗体2偶联物。

4. 根据权利要求1所述的一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒,其特征在于:所述DNA3含有22个碱基,5' 端修饰吡啶酯(AE),从5' 端开始的3-9 及12-18 碱基位点的碱基序列都为CCTCAGC,可被限制性内切酶Nt.BbvCI 识别,从而剪切其形成的双链;

DNA3从5' 端开始的1-9与DNA2从3' 端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补;

DNA3从3' 端开始的5-13与DNA1从5' 端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒的使用方法,其特征在于:所述使用方法包括以下步骤:

(1) 将样品溶液和检测溶液混合,并在37℃条件下温育5-10 分钟;

(2) 加入化学发光底物,通过化学发光检测仪进行光信号采集;

(3) 从标准曲线求出样品中IL-6的浓度。

6. 根据权利要求5所述的一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒的使用方法,其特征在于:所述发光底物为过氧化氢和氢氧化钠。

一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明涉及化学发光免疫分析,具体是一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法。

背景技术

[0002] 化学发光免疫分析(chemiluminescence immunoassay, CLIA),是将具有高灵敏度的化学发光测定技术与高特异性的免疫反应相结合,用于各种抗原、半抗原、抗体、激素、酶、脂肪酸、维生素和药物等的检测分析技术。按是否存在分离清洗步骤,分为异相化学发光法和均相化学发光法。目前,在体外诊断检测领域,国内外检测产品基本都使用异相化学发光法。国外厂家包括罗氏、雅培、贝克曼、西门子、索林和希斯美康等,国内厂家包括新产业、安图、迈克、迈瑞、泽成、长光华医等。异相化学发光法依赖于物理分离,分离典型的要求是关键的反应物被固定化到一些固体基材上,以使得一些物理过程例如过滤、沉积、聚结或者磁力分离可以被采用;并且还要求洗涤步骤,以便除去游离的成分。故异相化学发光法整个分析过程步骤多、耗时长、操作复杂、成本高,大多情况下需要专业技术人员操作专用仪器。而均相化学发光免疫分析无需分离和清洗步骤,在纯液相条件下直接进行化学发光检测,操作简便快速,适合现场检测。

[0003] 现阶段国外仅有西门子一家使用纯态氧介导的均相化学发光法(光激化学发光)产品上市,检测需要特殊的LOCI模块。LOCI技术是一步式化学发光夹心免疫检测方法,试剂中含有两种合成珠试剂和一种生物素化的单克隆抗体。第一种珠试剂(敏感珠)包被有链霉亲和素,并含有光敏染料;第二种珠试剂(化学珠)包被另一种抗体,并含有化学发光染料;样本和化学珠及生物素化抗体进行孵育后形成夹心复合物;然后加入敏感珠,与生物素结合后形成聚集的免疫复合物;复合物在680nm光照射下其中的敏感珠会产生单线态氧,单线态氧弥散到化学珠后可引发化学发光反应,在612nm波长下测量反应所产生的化学发光信号。该方法对设备要求高,标记材料特殊,不易获取。

[0004] 邻位触击效应通过免疫反应使一对与抗体偶联的DNA间距离拉近,进而引发DNA组装、触发级联DNA组装并产生检测信号,使对蛋白质的检测转化为对DNA的检测。通过与各种DNA信号放大技术相结合,可实现对蛋白质的灵敏检测。按该方法可均相进行,简单、快速、灵敏。

[0005] 氧化石墨稀(GO)是一种单原子厚度的二维碳材料,其宽范围的能量转移性质使其具有良好的淬灭性能,是一种很好的能量受体。我们发现氧化石墨烯能有效地淬灭吖啶酯与过氧化氢之间的化学发光。淬灭机理为该化学发光体系中的发光体与氧化石墨烯之间的光电子转移或长程共振能量转移。

[0006] 白细胞介素6(Interleukin-6, IL-6)是一种糖蛋白,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

早期敏感性标志物及慢性炎症的量化标志物,有效地指导抗生素的使用。不同动物的IL-6外显子的相似性非常的低,表明IL-6存在不同的种属特异性,这也许随着生存环境和免疫系统进步不同而产生的不同进化,以适应自身所存在的环境,发挥更好的生物学效应。

发明内容

[0007] 本发明的目的是:提供一种简单、快速、灵敏的一步式均相化学发光免疫分析犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用的技术方案如下:

一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒,所述试剂盒采用的检测溶液包含DNA1- IL-6抗体1 偶联物、DNA2- IL-6抗体2 偶联物、标记吡啶酯的DNA3、限制性内切酶和氧化石墨烯,所述DNA1与DNA2有6个碱基互补,所述DNA3含2个酶切位点,且分别有9个碱基和DNA1、DNA2互补配对,DNA3通过 π - π 堆积作用吸附在氧化石墨烯表面,其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭。

[0009] 进一步的,所述DNA1 含有53个碱基,3' 端修饰巯基,通过偶联剂琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯,与IL-6抗体1上的氨基共价结合,形成DNA1-IL-6抗体1偶联物。

[0010] 进一步的,所述DNA2 含有51个碱基,5' 端修饰巯基,通过偶联剂SMCC与IL-6抗体2上的氨基共价结合,形成DNA2- IL-6抗体2偶联物;

进一步的,所述DNA3含有22个碱基,5' 端修饰吡啶酯(AE),从5' 端开始的3-9 及12-18碱基位点的碱基序列都为CCTCAGC,可被限制性内切酶Nt.BbvCI 识别,从而剪切其形成的双链;

DNA3从5' 端开始的1-9与DNA2从3' 端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补;

DNA3从3' 端开始的5-13与DNA1从5' 端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补。

[0011] 一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒的使用方法,所述使用方法包括以下步骤:

- (1) 将样品溶液和检测溶液混合,并在37℃条件下温育5-10 分钟;
- (2) 加入化学发光底物,通过化学发光检测仪进行光信号采集;
- (3) 从标准曲线求出样品中IL-6的浓度。

[0012] 进一步的,所述发光底物为过氧化氢和氢氧化钠。

[0013] 采用本发明的技术方案的有益效果是:

本发明结合邻位触击效应和化学发光检测技术,通过氧化石墨烯淬灭化学发光,同时引入内切酶循环放大策略,提出一种简单、快速、灵敏的一步式均相化学发光免疫分析方法。相比于现有的免疫分析方法,具有以下特点:

(1) 本方法为均相免疫分析方法,可通过样品与检测溶液的直接混合完成蛋白质的一步式检测,操作简单,同时大大缩短了分析时间,可在5-10 分钟内完成单个样品的测定。

[0014] (2) 结合邻位触击效应和化学发光分子信标,通过免疫反应诱发石墨烯淬灭机制的开关,从而释放化学发光信号,无需洗涤及分离纯化步骤。

[0015] (3) 结合限制性内切酶循环策略,在位进行信号放大,提高检测灵敏度,使其更适于低丰度蛋白质的检测。

[0016] (4) 采用双识别或多识别机制,可大大地降低交叉反应机率,同时无固相载体的

非特异性吸附,具有非常高的特异性。

[0017] (5) 引入氧化石墨烯作为能量受体,构建了一种通用性强、简单成本低的分析平台。

附图说明

[0018] 下面结合附图和实施例对本发明进一步说明。

[0019] 图1为本发明的均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒的检测原理示意图。

[0020] 图2是邻位触击效应诱导免疫复合物形成示意图。

具体实施方式

[0021] 现在结合附图对本发明作进一步详细的说明。这些附图均为简化的示意图,仅以示意方式说明本发明的基本结构,因此其仅显示与本发明有关的构成。

[0022] 如图1所示,本发明的原理在于:该方法的检测溶液包含DNA1-IL-6抗体1偶联物、DNA2-IL-6抗体2偶联物、标记吖啶酯(AE)的DNA3、限制性内切酶(Nt.BbvCI)和氧化石墨烯(GO)。设计的DNA3含2个酶切位点,且分别有9个碱基和DNA1、DNA2互补配对。当没有目标蛋白质存在时,DNA3通过 π - π 堆积作用吸附在GO表面,其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭,表现为“信号关闭”。在有目标蛋白存在时,两个Ab-DNA复合物上的抗体同时被识别,使DNA1和DNA2足够接近而形成邻位复合物,并能与DNA3杂交。一旦形成双链,Nt.BbvCI就能够从特定位点切割,释放出邻位复合物,释放出的邻位复合物再与另一个DNA3杂交,引发第二轮循环切割。如此,每一分子邻位复合物都可以产生大量的AE标记的短链DNA,这些短链DNA几乎不会被GO吸附,在检测溶液中加入化学发光底物,可获得放大的化学发光(CL)信号。基于邻位杂交反应调控CRET,本发明构建了一种“信号打开”的方法来实现蛋白质的高灵敏度、高特异性检测。

[0023] DNA1含有53个碱基,3'端修饰巯基,通过偶联剂琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯(SMCC),与抗体1上的氨基共价结合,形成DNA1-抗体1偶联物。DNA2含有51个碱基,5'端修饰巯基,通过偶联剂SMCC与抗体2上的氨基共价结合,形成DNA2-抗体2偶联物。DNA1与DNA2有6个碱基互补。

[0024] DNA3含有22个碱基,5'端修饰吖啶酯(AE),从5'端开始的3-9及12-18碱基位点的碱基序列都为CCTCAGC,可被限制性内切酶Nt.BbvCI识别,从而剪切其形成的双链。DNA3从5'端开始的1-9与DNA2从3'端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补;DNA3从3'端开始的5-13与DNA1从5'端开始的1-9碱基位点的碱基完全互补,如图2所示。

[0025] DNA3通过 π - π 堆积作用吸附在GO表面,其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭。

[0026] 上述检测溶液与含有待测目标蛋白质的样品溶液混合,在37℃恒温条件下进行反应后产生大量AE修饰的短链DNA,加入化学发光底物过氧化氢和氢氧化钠,产生化学发光信号。

[0027] 图1为本发明的均相化学发光免疫分析方法示意图。

[0028] 结合附图1,说明基于邻位触击效应和氧化石墨烯淬灭吖啶酯化学发光的均相免疫分析方法对目标蛋白质(IL-6)的检测

1、配置检测溶液：将DNA1-IL-6抗体1偶联物、DNA2-IL-6抗体2偶联物、修饰AE的DNA3、限制性内切酶和GO混合，使它们的最终浓度分别为10nM、10nM、0.1 μ M、80U/mL和20 μ g/ml。

[0029] 2、将50 μ L 不同浓度的校准溶液或者含有目标蛋白质(IL-6) 的待测溶液与100 μ L 检测溶液混合，37 $^{\circ}$ C条件下温育5-10 分钟。

[0030] 3、在温育后的溶液中加入200 μ L 化学发光底物，并立即检测该溶液的化学发光信号，检测时间3s。根据记录的化学发光值，获得目标蛋白质检测的校准曲线和待测溶液中目标蛋白质的浓度。

[0031] 以上述依据本发明的理想实施例为启示，通过上述的说明内容，相关工作人员完全可以在不偏离本项发明技术思想的范围内，进行多样的变更以及修改。凡在本发明的精神和原则之内，所做的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。本项发明的技术性范围并不局限于说明书上的内容，必须要根据权利要求范围来确定其技术性范围。

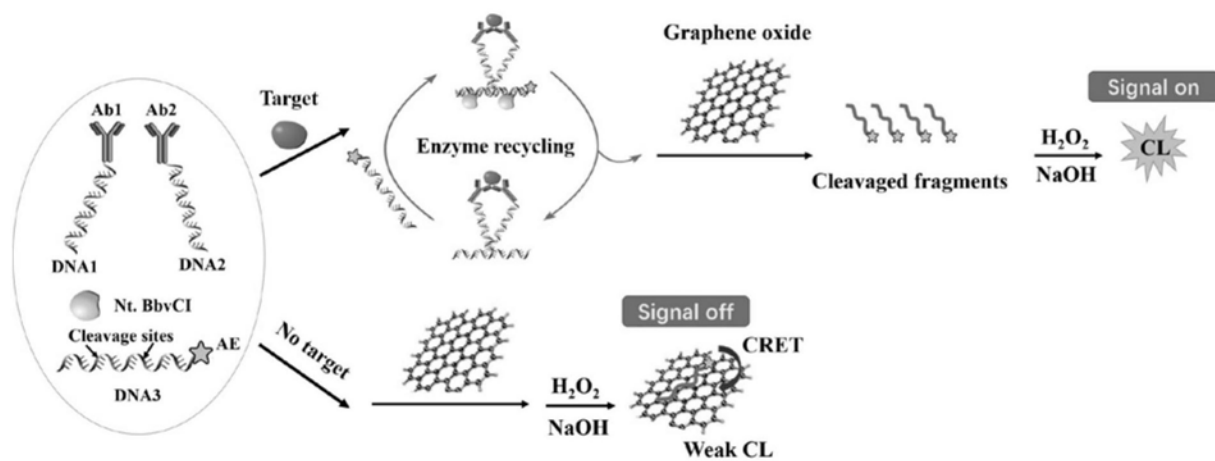


图1

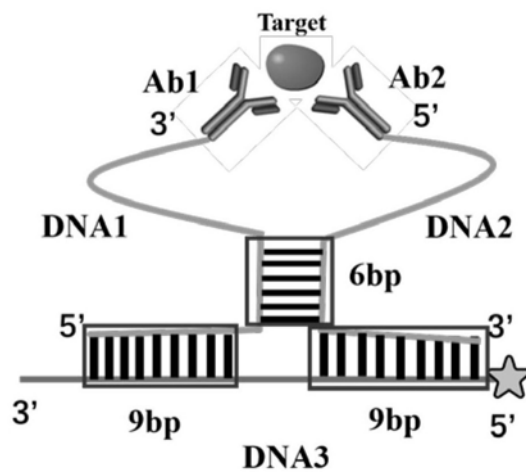


图2

专利名称(译)	一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法		
公开(公告)号	CN109030829A	公开(公告)日	2018-12-18
申请号	CN201810694904.7	申请日	2018-06-29
[标]发明人	曹丹		
发明人	曹丹		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6854 G01N21/76 G01N33/53		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及化学发光免疫分析，具体是一种均相化学发光法检测犬IL-6的定量试剂盒及其使用方法；所述试剂盒采用的检测溶液包含DNA1-IL-6抗体1偶联物、DNA2-IL-6抗体2偶联物、标记吡啶酯（AE）的DNA3、限制性内切酶和氧化石墨烯，所述DNA1与DNA2有6个碱基互补，所述DNA3含2个酶切位点，且分别有9个碱基和DNA1、DNA2互补配对，DNA3通过 π - π 堆积作用吸附在氧化石墨烯表面，其末端标记的AE的化学发光因发生CRET而被淬灭；本方法为均相免疫分析方法，操作简单，同时大大缩短了分析时间，可在5-10分钟内完成单个样品的测定，结合邻位触击效应和化学发光分子信标，通过免疫反应诱发石墨烯淬灭机制的开关，从而释放化学发光信号，无需洗涤及分离纯化步骤。

