



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107817354 A

(43)申请公布日 2018.03.20

(21)申请号 201711067027.2

(22)申请日 2017.11.03

(71)申请人 太原瑞盛生物科技有限公司

地址 030000 山西省太原市尖草坪区太原  
不锈钢产业园区钢园北路10号

(72)发明人 李瑶 许殊荣 程月萍 杜爱铭  
徐兵

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

(54)发明名称

一种白介素6的化学发光检测试剂盒及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种白介素6的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：样本稀释液、包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒、标记有吖啶酯的白介素6单克隆抗体、白介素6系列标准品溶液、化学发光激发液A、化学发光激发液B、清洗液。本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系。与现有技术相比，本发明试剂盒具有灵敏度高、特异性强、反应时间短等优点。

1. 一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于:该试剂盒包括样本稀释液、包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒、标记有化学发光标记物的白介素6单克隆抗体、激发液A、激发液B、白介素6校准品溶液以及清洗液。

2. 根据权利要求1所述的白介素6化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述化学发光标记物为吖啶酯,如NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS等。

3. 根据权利要求1所述的一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的吖啶酯标记的是白介素6单克隆抗体。

4. 根据权利要求1所述的一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的磁性微粒可直接与白介素6抗体偶联,或将磁微粒与链霉亲和素偶联,同时采用生物素标记白介素6抗体。

5. 根据权利要求1所述的一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的校准品是以含有1% BSA、0.1% Triton X-100 和0.3% Proclin 的pH为7.4的磷酸盐缓冲液为基质,加入白介素6纯品配置而成的系列浓度梯度的校准品溶液。

6. 根据权利要求1所述的一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于:所述的化学发光激发液A 由 $H_2O_2$  和 $HNO_3$ 的混合液组成,化学发光激发液B由Triton X-100 和NaOH的混合液组成。

7. 根据权利要求1所述的一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其特征在于,包括以下步骤:在反应杯中加入一定量的待测样本,再加入磁微粒混悬液液和吖啶酯标记物,混匀,37℃孵育,加入清洗液去掉上清,再加入化学发光激发液A和激发液B,测定相应的发光强度RLU/s。

## 一种白介素6的化学发光检测试剂盒及其制备方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于体外诊断领域,具体是用化学发光法检测人血清中白介素6的试剂盒及其制备方法。

### 背景技术

[0002] 白介素6,全称白细胞介素-6(IL-6),是一种多效应的细胞因子,属于白细胞介素的一种。它是由纤维母细胞、单核/巨噬细胞、T淋巴细胞、B淋巴细胞、上皮细胞、角质细胞以及多种瘤细胞产生。白介素6均可由IL-1、TNF- $\alpha$ 、PDGF、病毒感染、双链RNA及cAMP等诱导正常细胞产生。白介素6能够刺激参与免疫反应的细胞增殖、分化并提高其功能。白介素6的主要作用为:促进B细胞增生分化和分泌抗体,对肝细胞、T细胞、神经组织、造血系统也具有广泛效应;具有抗癌效应,也可直接或间接增强NK细胞及CTL的杀瘤活性。因而,白介素6又有许多同义词,如 $\beta_2$ 干扰素、肝细胞刺激因子、杂交瘤细胞生长因子、B细胞分化因子等。

[0003] 白介素6在人体的防御机制中起重要的作用。同时它在多种疾病的发生中也扮演着重要的角色。检测白介素对于了解病情、判断预后、研究发病机制都有非常重要的意义。

[0004] 目前,国内开发的白介素6检测试剂盒多采用酶联免疫法。采用酶联免疫法进行检测的缺点是辣根过氧化酶或碱性磷酸标记物易失活,显色底物见光易分解,灵敏度低,对结构类似的化合物具有一定的交叉反应,造成测试结果不准确。本发明采用吡啶酯标记,具有如下优点:①反应不需要催化剂,背景发光低,信噪比高,发光反应干扰因素少;②闪光型发光,光释放快速集中、发光效率高、发光强度大;③吡啶酯分子量小,避免遮蔽抗体结合位点,提高系统整体灵敏度;④易于与蛋白质联结且联结后光子产率不减少;⑤标记物稳定,不受环境氧化剂的影响,在2-8℃下可保存数月之久。因此吡啶取代物是一类非常有效的化学发光标记物。

### 发明内容

[0005] 本发明提供了一种具有较高灵敏度和特异性的白介素6的检测试剂盒。

[0006] 为实现上述目的,本发明提供如下技术方案:

一种白介素6的化学发光检测试剂盒及制备方法,该试剂盒包括样本稀释液、包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒、标记有化学发光标记物的白介素6单克隆抗体、激发液A、激发液B、白介素6校准品溶液以及清洗液。

[0007] 所述化学发光标记物为吡啶酯,如:NSP-DMAE-NHS、NSP-SA-NHS等。

[0008] 所述样本稀释液为pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含1%牛血清白蛋白、0.1%TritonX-100和0.3% Proclin。

[0009] 所述磁珠的表面修饰基团可以为羧基、氨基、链霉亲和素-生物素或对甲苯磺酰基,磁珠粒径可为1.5~3 $\mu$ m。

[0010] 所述白介素6单克隆抗体是待检白介素6的特异性单克隆抗体。

[0011] 所述的吡啶酯与抗体的摩尔比为5~10:1,优选摩尔比为7.4:1。

[0012] 所述的磁微粒可直接与白介素6抗体偶联,也可将磁微粒与链霉亲和素偶联,同时采用生物素标记白介素6抗体。

[0013] 所述的白介素6的化学发光检测试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

1) 制备样品稀释缓冲液:所述样本稀释液为pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含1%牛血清白蛋白、0.1%TritonX-100和0.3% Proclin。

[0014] 2) 制备包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒:将羧基化的磁微粒溶液磁分离后去上清,用MES缓冲液重悬,加入EDC溶液,在垂直旋转仪上活化,将活化后的磁微粒与白介素6抗体放置在垂直旋转仪上偶联,磁分离去上清,洗涤3次,再加入含1%BSA的缓冲液进行封闭,最后将磁微粒悬液置于2-8℃保存。

[0015] 3) 制备吡啶酯标记的白介素6单克隆抗体:取白介素6单克隆抗体10μg,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为60μL,再加入1μL吡啶酯母液,震荡混匀,室温避光反应30min,反应后加入40μL含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,混匀,室温避光反应30min。反应后将产物移至透析袋,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2-8℃避光透析,每间隔2h换一次PBS,至少更换3次,最后一次透析过夜,以去除未标记的吡啶酯。将标记物取出,按实际体积加入10%牛血清白蛋白至其终浓度为0.1%,加入等体积甘油,混匀,-20℃避光保存。

[0016] 4) 制备白介素6抗原标准品溶液:用含有1%BSA、0.1%TritonX-100、0.3% Proclin、pH为7.4的磷酸盐缓冲液稀释白介素6纯品至浓度为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、150pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL白介素6抗原标准品溶液。

[0017] 5) 制备激发液:激发液包括激发液A和激发液B。其中激发液A为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和HNO<sub>3</sub>的混合液,其中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>质量分数为0.05-5%,HNO<sub>3</sub>浓度为0.05-2.5 mol/L;激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液,其中Triton X-100的浓度为0.05-2.0 mol/L,NaOH的浓度为0.05-1.0 mol/L。

[0018] 6) 制备清洗液:清洗液是含有表面活性剂TritonX-100和生物防腐剂Proclin的磷酸盐缓冲液。

[0019] 所述的吡啶酯溶于DMSO或DMF中,且所配制溶液的最终浓度为1-10mmol/L,优选浓度为6.5 mmol/L。

[0020] 本发明所述白介素6检测试剂盒采用的原理是双抗体夹心法,具体是通过磁微粒偶联单克隆抗体与样本中的抗原特异性结合,再与吡啶酯标记的单克隆抗体结合形成复合物,最后利用吡啶酯所产生的光子检测被测物浓度。

[0021] 本发明具有以下优点:

以磁分离化学发光技术为检测手段,同时采用吡啶酯标记技术进行检测以建立一种检测白介素6的直接化学发光试剂盒。吡啶酯具有分子量小、对结合反应的空间位阻作用少、背景发光低、信噪比高、无需酶的参与、发光效率高、标记稳定、可提高系统整体灵敏度的明显优势。

[0022] 本发明对样本前处理要求低,样本在提取、稀释等处理后即可用于检测,并可实现大批量自动化检测。

[0023] 综上,本发明试剂盒操作简单方便,具有发光值稳定、灵敏度高、检测快速方便、准确性高、重复性好、特异性强等优点。

## 具体实施方式

[0024] 以下通过具体实施方式对本发明的技术方案进行进一步的说明和描述。

[0025] 实施例1:试剂盒的组建及制备

1) 试剂盒组建

组建一种白介素6的化学发光检测试剂盒,其含有下列组分:

样本稀释液;

包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒;

标记有化学发光标记物的白介素6单克隆抗体;

激发液A、激发液B;

白介素6校准品溶液,浓度分别为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、150pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL;

清洗液。

[0026] 2) 样本稀释液的制备

具体为pH为7.4的磷酸盐缓冲液,内含1%牛血清白蛋白、0.1%TritonX-100和0.3%防腐剂Proclin。

[0027] 3) 制备包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒混悬液

将羧基化的磁微粒溶液磁分离后去上清,用MES缓冲液重悬,加入EDC溶液,在垂直旋转仪上活化,将活化后的磁微粒与白介素6抗体放置在垂直旋转仪上偶联,磁分离去上清,洗涤3次,再加入含1%BSA的缓冲液进行封闭,最后将磁微粒悬液置于2-8℃保存。

[0028] 4) 制备吡啶酯标记的白介素6单克隆抗体

取白介素6单克隆抗体10μg,加入含NaCl的磷酸盐缓冲液至体积为60μL,再加入1μL吡啶酯母液,震荡混匀,室温避光反应30min,反应后加入40μL含NaCl和甘氨酸的磷酸盐缓冲液,混匀,室温避光反应30min。反应后将产物移至透析袋,透析液为pH为7.4的20mM PBS缓冲液,2-8℃避光透析,每间隔2h换一次PBS,至少更换3次,最后一次透析过夜,以去除未标记的吡啶酯。将标记物取出,按实际体积加入10%牛血清白蛋白至其终浓度为0.1%,加入等体积甘油,混匀,-20℃避光保存。

[0029] 5) 激发液A和激发液B的制备

激发液A为H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>和HNO<sub>3</sub>的混合液,其中H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>质量分数为0.05-5%,HNO<sub>3</sub>浓度为0.05-2.5 mol/L;

激发液B为Triton X-100和NaOH的混合液,其中Triton X-100的浓度为0.05-2.0 mol/L,NaOH的浓度为0.05-1.0 mol/L。

[0030] 6) 白介素6校准品溶液的制备

用含有1%BSA、0.1%TritonX-100、0.3%防腐剂Proclin、pH为7.4的磷酸盐缓冲液稀释白介素6纯品至浓度为0pg/mL、10pg/mL、50pg/mL、150pg/mL、600pg/mL、1000pg/mL;

的白介素6抗原标准品溶液。

[0031] 7) 清洗液的制备

清洗液为含有表面活性剂1%TritonX-100和生物防腐剂0.3%Proclin的pH7.4的磷酸盐缓冲液。

**[0032] 实施例2:实际样本中白介素6的检测**

本发明白介素6定量检测试剂盒的使用操作程序如下:

**试剂盒的检测**

1) 将待测样本50 $\mu$ L、磁微粒混悬液150 $\mu$ L、吡啶酯标记物150 $\mu$ L,依次加入反应管,振荡混匀,37 $^{\circ}$ C孵育15 min。

**[0033]** 2) 分离,清洗5次。

**[0034]** 3) 将洗涤后的反应容器充分振荡使磁微粒散开。

**[0035]** 4) 加入100 $\mu$ L化学发光激发液A,1 s后加入100  $\mu$ L化学发光激发液B,测量其相对发光强度,样本中降钙素原的含量与其相对发光强度成一定比例关系。

**[0036] 实施例3:试剂盒的性能指标****1) 试剂盒的灵敏度**

用试剂盒中0 ng/mL校准品作为待测样本,重复测定20次,得出20次测量结果的RLU值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出  $M+2SD$  所对应RLU值,根据零浓度校准品与相邻校准品之间的浓度-RLU值结果进行两点回归拟合得出一次方程,将  $M+2SD$  的RLU 值带入上述方程中,求出对应的浓度值。按检测方案中最低检测限检测方法,重复3次实验,最后求出本试剂盒对白介素6的分析灵敏度为3.8 pg/mL。

**[0037] 2) 精密度测定**

用白介素6试剂盒测试浓度为50pg/mL和600pg/mL的样本,每个浓度重复测试10次,计算试剂盒精密度,结果表明该试剂盒CV均小于5%。

**[0038] 3) 稳定性**

取白介素6检测试剂盒进行常规贮存稳定性试验,2-8 $^{\circ}$ C放置分别按时间1,3,5,7,9,11,12,13,14,15个月进行检测;开盖稳定性试验分别按2-8 $^{\circ}$ C放置0天、7天、14天、16天、18天、20天、22天、24天、26天、28天、30天、32天进行测定。结果显示白介素6检测试剂盒贮存于2-8 $^{\circ}$ C、避光环境中,有效期为12个月。开盖贮存于2-8 $^{\circ}$ C、避光环境中,有效期为30天。

**[0039]** 对于本领域技术人员而言,显然本发明不限于上述示范性实施例的细节,而且在不背离本发明的精神或基本特征的情况下,能够以其他的具体形式实现本发明。因此,无论从哪一点来看,均应将实施例看作是示范性的,而且是非限制性的,本发明的范围由所附权利要求而不是上述说明限定,因此旨在将落在权利要求的等同要件的含义和范围内的所有变化囊括在本发明内。

**[0040]** 此外,应当理解,虽然本说明书按照实施方式加以描述,但并非每个实施方式仅包含一个独立的技术方案,说明书的这种叙述方式仅仅是为清楚起见,本领域技术人员应当将说明书作为一个整体,各实施例中的技术方案也可以经适当组合,形成本领域技术人员可以理解的其他实施方式。

专利名称(译)	一种白介素6的化学发光检测试剂盒及其制备方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN107817354A</a>	公开(公告)日	2018-03-20
申请号	CN201711067027.2	申请日	2017-11-03
[标]发明人	李瑶 许殊荣 程月萍 杜爱铭 徐兵		
发明人	李瑶 许殊荣 程月萍 杜爱铭 徐兵		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/577 G01N33/543 G01N33/532 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6869 G01N21/76 G01N33/532 G01N33/54326 G01N33/577		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明公开了一种白介素6的化学发光检测试剂盒及其制备方法。该试剂盒包括：样本稀释液、包被有白介素6单克隆抗体的磁性微粒、标记有吖啶酯的白介素6单克隆抗体、白介素6系列标准品溶液、化学发光激发液A、化学发光激发液B、清洗液。本发明试剂盒将化学发光技术与免疫磁微粒相结合，提供了一种接近均相的反应体系。与现有技术相比，本发明试剂盒具有灵敏度高、特异性强、反应时间短等优点。