

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2018.07.021

白细胞介素-6 快速定量荧光免疫层析试纸条的制备及特性研究

张文琪¹, 何小维^{1△}, 李 凯², 刘晓云³, 李文美²

(1. 华南理工大学食品科学与技术学院, 广州 510000; 2. 广州万孚生物技术股份有限公司, 广州 510000; 3. 南方医科大学公共卫生与预防医学学院, 广州 510000)

摘要:目的 利用免疫荧光技术研制一种快速、高灵敏度定量检测血清中白细胞介素-6(IL-6)的方法。方法 本研究对试剂盒的灵敏度、准确度、特异性和稳定性进行了初步的性能评价。结果 本方法的标准曲线线性关系良好, $r^2=0.965$, 检测线和定量限分别为 8.49、25.28 pg/mL, 添加回收试验测得其回收率平均值分别为 96.51%、102.46%、103.06%, 且制备试纸条的批间和批内精密度均小于 15.00%, 与 7 种竞争物交叉反应率小于 0.10%。结论 本试验制备的 IL-6 定量荧光免疫层析试纸条的灵敏度高, 特异性好, 稳定性好, 有较为广泛的应用前景。

关键词: 白细胞介素-6; 免疫荧光定量层析法; 检测**中图法分类号:** R318.6**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2018)07-0958-04

Significance of rapid and quantitative detection of Interleukin-6 based on fluorescence immunochromatography assay

ZHANG Wenqi¹, HE Xiaowei^{1△}, LI Kai², LIU Xiaoyun³, LI Wenmei²

(1. College of Food Science and Technology, South China University of Technology, Guangzhou, Guangdong 510000, China; 2. Guangzhou Wondfo Biotech Co. Ltd., Guangzhou, Guangdong 510000, China; 3. School of Public Health and Preventive Medicine, Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong 510000, China)

Abstract: **Objective** To study a rapid and quantitative method to detect Interleukin-6(IL-6) by immunofluorescence technique. **Methods** The sensitivity and accuracy of strip associated with precision, specificity, stability properties were preliminarily evaluated. **Results** The standard curve showed a good linear ($r^2=0.965$), LOD and LOQ of the strip were 8.49 pg/mL and 25.28 pg/mL. The average recoveries were 96.51%, 102.46% and 103.06%, respectively. The precision of intra-assay and inter-assay were less than 15.00%. And the cross-reaction with 7 competitors was less than 0.10%. **Conclusion** IL-6 immunochromatographic strip offered by our lab has better sensitivity, specificity and stability, as well as wide application prospect.

Key words: interleukin-6; immunofluorescence quantitative chromatography; detection

白细胞介素(IL)-6 在人体健康中扮演着重要的角色。通常情况下, 血浆中的 IL-6 会随着年龄的增长其水平逐渐降低, 当成长为健康成年人时血浆中 IL-6 水平将低于 10.00 pg/mL^[1]。虽然人在健康的情况下 IL-6 在血清中水平很低, 但是在某些疾病状态下血液中 IL-6 的水平异常升高, 如在炎症反应的早期阶段^[2], IL-6 的水平可以增加至 10 000 倍, 因此, IL-6 是一项有用的促炎细胞因子标记物。目前发现, IL-6 已与多种疾病相关, 例如已发现佩吉特病和多发性骨髓瘤患者与 IL-6 水平的升高有良好的线性关系^[3]。冠心病作为炎症反应疾病中的一种, 已有研究表明, 动脉粥样硬化的各个阶段都有慢性炎症反应的参与^[4-5]。IL-6 的急剧升高会引起急性炎症反应^[6], 也

与损伤、感染、压力、脑死亡和其他情况相关^[7-9]。因此, 监控人体内的 IL-6 水平具有重要意义。

目前, IL-6 比较经典的检测方法有酶联免疫吸附试验(ELISA)^[10]、化学发光法^[11]、免疫胶体金法^[12]。LUO 等^[11]研究了运用化学发光免疫方法检测人源 IL-6, 该方法检测 IL-6 的范围为 4.00~625.00 pg/mL, 最低检出限为 0.50 pg/mL。IDA 等^[12]用传统的 ELISA 对人的 IL-6 检测方法进行了研究, 检测限可达 9.50 pg/mL, 但是检测时间较长, 需要 4.5 h。MAN 等^[13]将胶体金作为标志物并运用免疫层析的技术检测 IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α), 直接观察结果无需仪器读取, 肉眼可见 IL-6 的最低检测限为 62.50 ng/mL。荧光胶乳免疫层析技术与免疫放射方

法相比,操作安全无污染、无需专业操作员操作;与化学发光法、ELISA 相比,设备价格低廉、操作简便等;与免疫胶体金方法相比,本试验制备的灵敏度更高的试剂盒进行定量操作,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 人重组 IL-6 蛋白(美国 Fitzgerald 公司);IL-6 抗体 A1、IL-6 抗体 A2、胶乳封闭液、胶乳保存液、喷垫工作液、样本稀释(广州万孚生物技术有限公司);IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、TNF- α 、干扰素 γ (英国 Abcam 公司);小牛血清(美国 Sigma 公司);荧光微球(美国 Bangslab 公司);玻璃纤维素膜、硝酸纤维素膜(美国 Millipore 公司)。喷膜机(Iso Flow 型,美国 Biodot 公司);喷垫机(HGS510,杭州峰航科技有限公司);切条机(HGS201,杭州峰航科技有限公司);荧光定量检测仪(飞测 II,广州万孚生物技术有限公司);超纯水机(Milli-Q,美国 Millipore 公司);电热恒温鼓风干燥箱(DGG-9123A 型,上海森信试验仪器有限公司)。

1.2 试验原理 本试验采用双抗夹心法定量检测血清中 IL-6 水平。将待测血清和样本稀释液按照一定比例混合后加入加样孔中,血清中的 IL-6 抗原会和样品垫上的荧光标记 IL-6 抗体结合形成复合物,并通过层析作用逐渐在硝酸纤维素膜(NC 膜)上移动到固定在 NC 膜上检测区(T 线)的包被 IL-6 抗体结合,质控区(C 线)的抗体也会和荧光胶乳中的物质结合。当检测卡插入荧光检测仪后,仪器会自动读取检测卡上 T 线和 C 线的荧光信号强度,通过 T/C 荧光信号强度则可计算出待测血清中 IL-6 的水平。

1.3 方法

1.3.1 试剂卡制备 将 IL-6 抗体和羊抗兔 IgG 喷于包被膜的 T 线和 C 线上,两带间隔 4 mm,置于 50 ℃ 的干燥箱中干燥 48 h。将制备的免疫荧光胶乳和标记荧光微球的兔 IgG 工作液稀释后用喷垫机进行喷垫,置于 50 ℃ 烘箱中干燥 24 h,密封保存。用切条机得到宽度为 4 mm 的试纸条,将试纸条装入特定的塑料检测卡中,用压卡机压紧检测卡上下盖,后置于干燥房待用。

1.3.2 样本检测 检测在室温下进行,取 75 μ L 血清样本,与 100 μ L 实验室研制的样本稀释液充分混匀 1 min,取 75 μ L 的混合液加入试剂卡中,层析反应 15 min 后将检测卡插入荧光定量检测仪中,读取荧光信号 T、C 值,计算出相应的 T/C, T/C 越高则样本中 IL-6 水平越高。

1.3.3 荧光免疫层析试纸条性能评价

1.3.3.1 标准曲线的建立 取 8 个配制的标准品水平点,平行测定 10 次,检测低、中、高水平的标准品在试纸卡的荧光信号 T/C。标准品水平的对数值为变

量,对应检测的荧光信号 T/C 为因变量,构建拟合计算方程式,并绘制确定最终的标准曲线。

1.3.3.2 灵敏度试验 对确定的 20 份阴性血清样本进行测试,重复测定 6 次。检测限(LOD)等于标准曲反求值的平均值加上 3 倍标准偏差。定量限(LOQ)等于标准曲线反求水平的平均值加上 10 倍的标准偏差。

1.3.3.3 添加回收试验 配制 IL-6 水平分别为 10.00、500.00、1 000.00 pg/mL 的标准品,重复检测 6 次。根据测得的荧光定量信号 T/C,标准曲线反求出待测样本的水平。添加回收率越接近 100.00%则表示检测方法越准确。

1.3.3.4 精密度试验 本试验用同一批试纸条检测批内的精密度,再选用 3 种不同批次的试纸条进行不同批次间的批间精密度试验,每个水平点重复测定 10 次。计算出每个水平点的平均变异系数(CV)值,对批次内的精密度和批间内的精密度进行分析。

1.3.3.5 特异性试验 本试验将一定量的 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、TNF- α 、干扰素 γ 添加到阴性小牛血清中,分别配制成水平为 10 000.00 pg/mL 的竞争物标准溶液,重复测定 6 次,计算出每个竞争物的交叉反应率。交叉反应率(%)=(S/Z)×100% (S 表示抗原类似物用试剂卡测定的水平,Z 表示抗原类似物添加的水平)。

1.3.3.6 稳定性试验 将试剂卡在 50 ℃ 烘箱中分别放置 7、14、21、30 d 后取出放入干燥房内,与干燥房内常温放置的试剂卡进行对比,如稳定性不变则相当于试剂卡可以常温保存 1 年,样本稀释液使用 4 ℃ 保存,检测试剂卡的稳定性。

1.3.3.7 临床样本检测 取广州中山大学附属第三医院岭南医院、广东省第二人民医院日常检测临床样本,选取临床样本共计 100 例,患者的血清用的是 SI-EMENSIMMULITE1000 仪器检测。在实验室用研制的同批次 IL-6 荧光定量免疫层析试剂卡进行检测,并对其检测值进行线性回归分析。

2 结果

2.1 标准曲线的建立 用制备的标准品 0.00、20.00、44.00、85.00、161.00、385.00、500.00、842.00 pg/mL 按 1.3.3.4 中的步骤加入试剂卡中,每个水平点平行测定 10 次。用荧光定量检测仪测定每张试剂卡的荧光信号 T/C,用标准品水平的对数值作为 X 轴,对应的荧光信号平均 T/C 作为 Y 轴。其中标准曲线方程为: $Y=0.731+1.246X-1.561X^2+0.564X^3$, $r^2=0.965$,线性关系良好。

2.2 灵敏度试验结果 对 20 份确定的阴性血清样本进行检测,标准曲线反求检测结果的平均值为 1.30 pg/mL,标准偏差为 2.40,因此,LOD 值为 8.49

pg/mL,大于则判定为阳性,低于则判为阴性。LOQ 值为 25.28 pg/mL。因此,本试验研究试剂盒的检测范围为 8.49~848.00 pg/mL。

2.3 添加回收试验结果 本试验用添加回收试验测定 IL-6 荧光定量试剂卡的检测准确性,当回收率越接近 100.00%,说明此试剂卡检测越准确。在 10.00、500.00、1 000.00 pg/mL 水平点包含低、中、高的水平范围内进行添加回收试验,在 10.00 pg/mL 的回收率平均值为 96.51%,CV 为 9.60%;在 500.00 pg/mL 的回收率平均值为 102.46%,CV 为 8.57%;在 1 000.00 pg/mL 的回收率平均值为 103.06%,CV 为 2.59%。

2.4 精密度试验结果 批内精密度结果见表 1,批内各水平点 T/C 的 CV 范围为 4.07%~7.72%。3 批次混合后测得的批间精密度结果见表 2,批间各水平点 T/C 的 CV 为 3.86%~6.70%。同一批次的批内和 3 个批次的批间的 CV 均小于 15.00%。

表 1 批内精密度试验结果 (n=10)

样本编号 (T/C)	平均 (pg/mL)	标准偏差	CV (%)
0	0.56	0.033	5.89
20	0.72	0.036	4.98
44	0.90	0.053	5.94
85	1.22	0.064	5.29
161	1.80	0.073	4.07
385	2.82	0.146	5.18
500	3.45	0.267	7.72
842	4.62	0.229	4.95

表 2 批间精密度试验结果 (n=10)

样本编号 (T/C)	平均 (pg/mL)	标准偏差	CV (%)
0	0.55	0.032	5.78
20	0.71	0.027	3.86
44	0.90	0.048	5.36
85	1.24	0.052	4.20
161	1.91	0.094	4.91
385	2.97	0.199	6.70
500	3.70	0.241	6.52
842	4.62	0.281	6.08

2.5 特异性试验结果 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒对待测水平为 10.00 pg/mL 的竞争物 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、TNF- α 、干扰素 γ 进行检测,结果表明竞争物 IL-4、TNF- α 、干扰素 γ 在试验中并未检测到;IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-8 的交叉反应率均小于 0.10%。

2.6 稳定性试验结果 荧光定量免疫层析试剂卡的稳定性见图 1,试剂卡放在 50℃烘箱中加速破坏 1、2、3、4 周在标准品测试的情况下的反应曲线与常温保

存的试剂卡基本吻合,低、中、高水平的荧光信号 T/C 基本没变化。

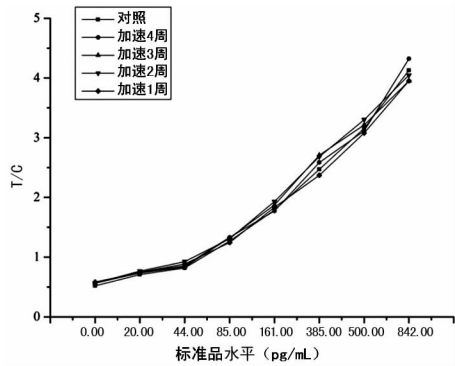


图 1 IL-6 荧光定量免疫层析试剂卡稳定性

2.7 临床样本检测结果 将 100 份血清临床样本分别在 SIEMENS IMMULITE1000 IL-6 试剂盒与研制的 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒中进行测定,见图 2。其中相关方程为 $Y = 0.657X - 10.048$, $r^2 = 0.965$,Y 表示 SIEMENS IMMULITE1000 IL-6 试剂盒测定的临床水平值,X 表示 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒测定的临床水平值,回归方程中 $r^2 = 0.965$,实验室研制 IL-6 试剂盒与化学发光试剂盒的 $r^2 > 0.950$ 。

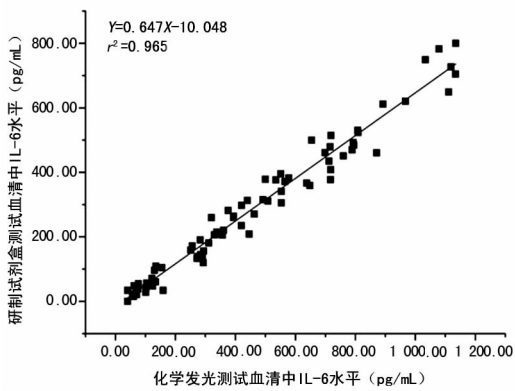


图 2 IL-6 荧光定量免疫层析法与化学发光法的相关性分析

3 讨论

目前在市面还没有相应的 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒的开发,因此,研究 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒具有重要意义。目前通常市场上检测 IL-6 的常用检测方法仪器成本较高,耗费时间较长、操作麻烦。因此,可以进一步建立用于商业用途的 IL-6 荧光定量免疫层析试剂盒。

本试验研制的 IL-6 荧光定量免疫层析试剂卡的定量反应曲线线性与化学发光法相关性良好, $r^2 = 0.965$,说明标准曲线线性关系、精密度良好,LOD 为 8.49 pg/mL,LOQ 为 25.28 pg/mL,对 10.00、500.00、1 000.00 pg/mL 水平进行添加回收试验,测得其回收率平均值分别为 96.51%、102.46%、103.

06%,批内以及批间的精密度均小于 15.00%,试纸条和 7 种竞争物没有交叉反应,说明准确性、特异性均良好,试纸条的稳定性良好。试剂卡放在 50℃烘箱中加速破坏 1、2、3、4 周在标准品测试的情况下的反应曲线与常温保存的试剂卡基本吻合,低、中、高水平的荧光信号 T/C 基本没变化。说明荧光定量免疫层析试剂卡经加速破坏测试后,稳定性良好,可以常温放置 1 年。

因此,本试验研制的 IL-6 荧光免疫层析试剂盒可以快速、定量地检测血清中的 IL-6 水平,然而目前该方法仍处于研究阶段,还需要进一步的研究实现商业化。

参考文献

[1] SONG M C, KELLUM J A. Interleukin-6[J]. Crit Care Med, 2005, 33(12): S463-S465.

[2] KE L, XIANG Y, XIA W, et al. A prognostic model predicts the risk of distant metastasis and death for patients with nasopharyngeal carcinoma based on pre-treatment interleukin 6 and clinical stage[J]. Clin Immunol, 2016, 164: 45-51.

[3] WANG F M, SARMA SIK A, HIRUMA Y, et al. Measles virus nucleocapsid protein, a key contributor to Paget's disease, increases IL-6 expression via down-regulation of FoxO3/Sirt1 signaling[J]. Bone, 2013, 53(1): 269-276.

[4] 程辉, 蔡鑫. 白细胞介素-6 与冠心病的相关性研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(4): 475-476.

[5] HERING L, HERSE F, VERLOHREN S, et al. Trophoblasts reduce the vascular smooth muscle cell proatherogenic response[J]. Hypertension, 2008, 51(2): 554-559.

[6] 张灵玲. APOM、IL-6 等炎症反应指标与细菌感染的相关性分析及联合诊断研究[D]. 成都: 成都中医药大学,

2015.

[7] SARKAR S, KESWANI T, SENGUPTA A, et al. Differential modulation of glial cell mediated neuroinflammation in Plasmodium berghei ANKA infection by TGF beta and IL 6[J]. Cytokine, 2017, 99: 249-259.

[8] FENG M, SUN T, ZHAO Y, et al. Detection of serum interleukin-6/10/18 levels in sepsis and its clinical significance[J]. J Clin Lab Anal, 2016, 30(6): 1037-1043.

[9] RETTIG T C, VERWIJMEREN L, DIJKSTRA I M, et al. Postoperative interleukin-6 level and early detection of complications after elective major abdominal surgery[J]. Ann Surg, 2016, 263(6): 1207-1212.

[10] YIN B, ZHENG W, DONG M, et al. An enzyme-mediated competitive colorimetric sensor based on Au@Ag bimetallic nanoparticles for highly sensitive detection of disease biomarkers[J]. Analyst, 2017, 142(16): 2954-2960.

[11] LUO L, ZHANG Z, HOU L, et al. The study of a chemiluminescence immunoassay using the peroxyoxalate chemiluminescent reaction and its application[J]. Talanta, 2007, 72(4): 1293-1297.

[12] IDA N, SAKURAI S, HOSAKA T, et al. An enzyme-linked immunosorbent assay for the measurement of human interleukin-6[J]. J Immunol Methods, 1990, 132(2): 279-284.

[13] MAN Y, LV X, IQBAL J, et al. Microchip based and immunochromatographic strip assays for the visual detection of interleukin-6 and of tumor necrosis factor alpha using Gold nanoparticles as labels [J]. Microchimica Acta, 2015, 182(3/4): 597-604.

(收稿日期: 2017-09-11 修回日期: 2017-11-25)

(上接第 957 页)

[5] 张珊, 杨晓巍, 刘晓磊, 等. 运动健康管理 2 型糖尿病基层防治研究进展[J]. 中国预防医学杂志, 2016, 17(10): 772-775.

[6] 吴秀继, 姚敏, 何启军, 等. 血清铁蛋白检测在 2 型糖尿病患者中的应用价值[J]. 中华全科医学, 2016, 14(10): 1716-1718.

[7] 何昆, 王宪娟. 二甲双胍联合米格列醇治疗 2 型糖尿病患者的临床效果[J]. 医学综述, 2016, 22(19): 3906-3909.

[8] 史治宙, 廖庆辉, 郭中秋, 等. 维格列汀与二甲双胍对出诊 2 型糖尿病的疗效[J]. 热带医学杂志, 2016, 16(9): 1159-1162.

[9] 刘小阳, 刘超, 郑桃林, 等. 首次确诊的中老年 2 型糖尿病患者动脉粥样硬化影响因素的相关性研究[J]. 中国循环杂志, 2016, 31(9): 874-877.

[10] 冷蔚玲, 梁自文. 达格列净对糖尿病血管并发症的影响研究进展[J]. 医学综述, 2016, 22(18): 3628-3632.

[11] 张彦昂, 楚艳贞. 阿托伐他汀对改善冠心病合并有或无糖尿病患者动脉弹性的临床观察[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(14): 116-117.

[12] 吕敏. 缺血性脑卒中患者与糖尿病血脂及颈动脉斑块的相关性分析[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2016, 18(24): 50-51.

[13] 董剩勇, 王曼柳, 孙晓楠, 等. 体脂率评估心血管危险因素研究[J]. 中国全科医学, 2015, 18(36): 4416-4421.

[14] 王景, 黄烨, 陈可冀, 等. 2 型糖尿病血糖波动状态与血管内皮损伤, 血小板活化及 PKCβ1 表达的相关性[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(10): 1184-1190.

[15] 张红蕊, 房辉, 刘春梅, 等. 新诊断 2 型糖尿病患者血清硫氧还蛋白, 硫氧还蛋白相互作用于颈动脉粥样硬化的相关性[J]. 中国现代医学杂志, 2016, 26(18): 49-54.

(收稿日期: 2017-08-25 修回日期: 2017-10-27)