

白细胞介素-6 量子点荧光免疫层析法的建立及性能验证*

唐劲松¹, 林景涛¹, 周正维¹, 任燕飞¹, 张二盈²

1. 广东省东莞市大朗医院检验科, 广东东莞 523700; 2. 深圳市金准生物工程有限公司, 广东深圳 510103

摘要:目的 研发出快速检测白细胞介素(IL)-6 的量子点荧光免疫层析法试剂盒。方法 通过量子点荧光材料标记 IL-6 抗体, 研发出一种能快速定量检测 IL-6 浓度的量子点免疫荧光层析法试剂盒, 验证其灵敏度、回收试验、精密度、特异度、稳定性及其与贝克曼化学发光 IL-6 检测试剂盒的相关性。结果 试剂盒线性范围为 10~4 000 pg/mL, 试剂盒决定系数 $R^2 \geq 0.950$; 最低检出限为 2 pg/mL; 在低、中、高浓度范围内的回收率均值分别为 95.68%、101.23%、104.45%; 批内精密度的变异系数(CV)为 2.21%~3.93%, 批间精密度的 CV 为 2.42%~5.36%; 特异度试验中交叉反应率均小于 0.1%。结论 该研究自制的试剂盒灵敏度、准确性、精密度、特异度及稳定性都较好, 能够准确、快速地完成临床样品 IL-6 浓度的定量检测。

关键词: 白细胞介素-6; 荧光免疫层析; 量子点; 胶体金法**中图分类号:** R446.6**文献标志码:** A**文章编号:** 1672-9455(2021)17-2472-04**Establishment and performance verification of interleukin-6 quantum dot fluorescence immunochromatography***TANG Jinsong¹, LIN Jingtao¹, ZHOU Zhengwei¹, REN Yanfei¹, ZHANG Erying²

1. Department of Clinical Laboratory, Dalang Hospital of Dongguan City, Dongguan, Guangdong 523700, China; 2. Shenzhen Jinzhun Biological Engineering CO. LTD, Shenzhen, Guangdong 510103, China

Abstract: **Objective** To develop a quantum dot fluorescence immunochromatography kit for the rapid detection of interleukin-6 (IL-6). **Methods** Quantum dot fluorescent material was used to detect IL-6 antibody, and a quantum dot immunofluorescence chromatography kit was developed to rapidly and quantitatively detect IL-6 concentration, and its sensitivity, recovery test, precision, specificity, stability and correlation with Beckman luminescence IL-6 kit were verified. **Results** The linear range of the kit was 10–4 000 pg/mL and the linear correlation coefficient of the kit $R^2 \geq 0.950$. Minimum detection limit was 2 pg/mL. The mean recoveries at low, medium, high concentrations were 95.68%, 101.23% and 104.45%. The coefficient of variation (CV) of intra-batch precision was 2.21%–3.93%, the inter-batch precision was 2.42%–5.36%. In the specific experiments, the cross reaction rate was less than 0.1%. **Conclusion** This self-made kit has good sensitivity, accuracy, precision, specificity and stability, and could accurately and quickly complete the quantitative detection of IL-6 concentration in clinical samples.

Key words: interleukin-6; fluorescence immunochromatography; quantum dot; colloidal gold method

白细胞介素(IL)-6 作为一种炎症因子, 当机体发生感染时迅速升高, 可在 2 h 达高峰, 其升高水平与感染的严重程度一致, 并诱导降钙素原(PCT)和 C 反应蛋白(CRP)分别在感染 2 h 和 6 h 后开始升高, 而且 IL-6 与患者预后密切相关^[1]。IL-6 即时检验(POCT) 已经开始用于临床, 且应用潜力较大。目前, 有多种 IL-6 的检测方法^[2], 较为常用的是化学发光法、酶联免疫吸附试验(ELISA)法及免疫层析法, 不同的检测方法各有优劣。量子点荧光材料是一种新型标记材料, 已经开始应用于临床, 与普通荧光材

料相比, 量子点荧光材料具有荧光强度高、光稳定性好、荧光寿命长、激发谱宽、发射谱窄、宽大的斯托克斯位移和生物相容性好等优点^[3]。本研究通过量子点荧光材料标记抗体, 研发出量子点免疫荧光层析法 IL-6 检测试剂盒, 从灵敏度、回收率、精密度、特异度等方面进行性能验证, 并与贝克曼化学发光法 IL-6 检测试剂盒进行对比。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 量子点荧光免疫分析仪 KF-Q001-A 由深圳市金准生物工程有限公司生产, 其他

* 基金项目: 广东省东莞市社会发展重点项目(201950715040199)。

作者简介: 唐劲松, 男, 副主任技师, 主要从事微生物检验研究。

本文引用格式: 唐劲松, 林景涛, 周正维, 等. 白细胞介素-6 量子点荧光免疫层析法的建立及性能验证[J]. 检验医学与临床, 2021, 18(17):

主要仪器包括 YXQ-LS-50A 型立式压力蒸汽灭菌器(杭州科晓化工仪器设备有限公司)、SW-CJ-2FD 型超净工作台(上海巴玖实业有限公司)、三维划膜喷金仪(上海金标生物有限公司)、DXI800 化学发光仪(美国贝克曼公司)。量子点 CdSe/ZnS、巯基丁二酸(MES)、N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、1-乙基-(3-二甲氨基丙基)碳二亚胺(EDC)、巯基甘醇单甲醚、小牛血清购于 Sigma-Aldrich(上海)贸易有限公司;IL-6 抗体购于芬兰 MEDIX 公司;IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、干扰素- γ (INF- γ) 购于英国 Abcam 公司;试纸条材料购于上海杰一生物技术有限公司;IL-6 化学发光检测试剂盒购于美国贝克曼公司。

1.2 方法 (1)水溶性量子点的制备:取油溶性量子点 CdSe/ZnS 溶解在正己烷中,制得油溶性量子点溶液,在巯基甘醇单甲醚溶液中加入油溶性量子点溶液,得到水溶性量子点。(2)量子点的偶联:取 30 μ L 量子点,加入一定量的抗 IL-6 鼠抗人单克隆抗体 I,室温孵育 3 h,12 800 r/min 离心 20 min,弃上清,加入 5% 牛血清清蛋白封闭液封闭。(3)IL-6 试剂盒的制备:①取 10 μ L 偶联有抗体的量子点,在处理好的聚酯纤维膜上喷涂,固定在结合垫上,用于检测抗原。②采用双抗夹心法原理,将 IL-6 鼠抗人单克隆抗体 II 包被在硝酸纤维素膜(NC 膜)上作为检测线(T 线),兔抗鼠 IgG,可以直接和量子点标记的单克隆抗体 I 结合,在 NC 膜上形成质控线(C 线)。③将样品垫、结合垫、NC 膜、滤纸依次粘贴在底板上,裁剪干燥的试纸条,制得检测试剂盒。

1.3 标准曲线的绘制 使用浓度分别为 0、10、50、120、250、400、800、1 600、3 000、4 000 pg/mL 的标准品,每个浓度做 10 个平行测试,以测试线荧光信号 T 与质控线荧光信号 C 的比值(T/C)为 Y 轴,样品浓度为 X 轴,进行拟合计算方程,得到标准曲线并储存在 SD 芯片中。检测标本时,通过 SD 芯片将标准曲线导入仪器,待标本和检测卡反应结束后,仪器进行检测读出光电信号值,将光电信号值代入标准曲线中,即可计算出该标本的浓度值。

1.4 性能验证

1.4.1 灵敏度试验 将 IL-6 浓度为 50 pg/mL 的标准品用 IL-6 阴性小牛血清稀释为 20、10、5、4、3、2、1 pg/mL,取 100 μ L 加入试剂卡,然后进行检测,当仪器检测不出荧光值时确定该方法的最低检出量。

1.4.2 回收试验 本试验取一定量的 IL-6 标准品添加到阴性小牛血清中,使血清中 IL-6 终浓度分别为 50、2 500、5 000 pg/mL。用试剂卡进行检测,每个浓度点重复检测 6 次。根据测得的荧光定量信号 T/C,按标准曲线反求出待测标本的浓度。计算出 IL-6 反求浓度,IL-6 添加浓度比值的百分率即为回收率。回收率越接近 100%,说明试剂卡检测越准确。

1.4.3 精密密度试验 本试验用同一批检测试剂盒检测板内的精密密度,再选用 5 板不同批次的试剂盒进行不同批次间的板间精密密度试验。对浓度为 0、50、250、

800、4 000 pg/mL 的 IL-6 标准品进行检测,用试剂卡进行测试,每份标本重复测定 10 次。计算出每个浓度点的变异系数(CV),对批内精密度和批间精密密度进行分析。

1.4.4 特异度试验 取血清中 IL-6 常见竞争物 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-8、INF- γ 进行检测,浓度均为 1 000 pg/mL,每种物质重复进行 6 次检测。计算抗体交叉反应方法为 Abraham 法,计算公式如下:交叉反应率(%)=(S/Z)×100%,S 表示抗原类似物用试剂卡检测的浓度,Z 表示抗原类似物添加的浓度。

1.4.5 稳定性试验 试剂盒中的检测试剂卡通常保存在室温干燥阴凉的环境中。参照体外诊断胶体金试纸条的稳定性考察方法,通常试剂卡在 50 $^{\circ}$ C 烘箱中放置 1 个月进行加速破坏稳定性测试,相当于检测卡常温下保存 1 年的有效性。本研究将试剂卡在 50 $^{\circ}$ C 烘箱中分别放置 1、2、3、4 周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,检测试剂卡的稳定性。

1.4.6 相关性试验 选取广东省东莞市大朗医院临床标本 200 份,浓度为 0.00~580.42 ng/mL,分别用本研究自制试剂盒和贝克曼化学发光检测试剂盒 2 h 内完成检测,通过线性回归分析得出斜率 a ,截距 b ,决定系数(R^2)。

1.5 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据处理及统计学分析。呈正态分布、方差齐的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,相关分析采用 Pearson 相关分析法。

2 结果

2.1 标准曲线 浓度为 0、10、50、120、250、400、800、1 600、3 000、4 000 pg/mL 的 IL-6 标准品的测试结果 T/C 分别为 0.83、0.86、0.91、1.16、1.57、2.02、2.59、3.86、5.13、5.82,通过拟合软件计算,标准曲线方程 $Y=0.001\ 3X+1.164\ 8$, $R^2=0.958\ 7$,两者线性关系良好,见图 1。样品浓度在 10 pg/mL 时,荧光信号趋近于 0,样品浓度在 4 500 pg/mL 时,T/C 为 6.324 8,不再满足该线性方程,自制试剂盒的线性检测范围为 10~4 000 pg/mL。

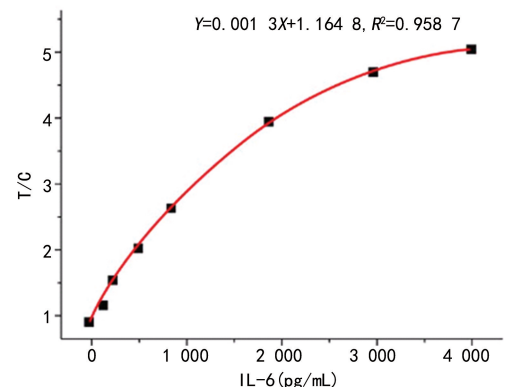


图 1 IL-6 标准曲线

2.2 灵敏度 当 IL-6 浓度分别为 20、10、5、4、3 pg/mL 时,荧光值分别为 206、154、106、43、11,荧光值随着 IL-6 浓度降低而降低,当样品浓度为 2

pg/mL 时,仪器检测不出荧光值,自制试剂盒的最低检出限为 2 pg/mL。

2.3 回收试验结果 在 50、2 500、5 000 pg/mL 浓度点包含低、中、高的浓度范围内进行添加回收试验,在 50 pg/mL 浓度的平均回收率为 95.68%,CV 为 8.57%,在 2 500 pg/mL 浓度的平均回收率为 101.23%,CV 为 6.99%,在 5 000 pg/mL 浓度的平均回收率为 104.45%,CV 为 4.76%。

2.4 精密度检测结果 分别用同一批次和 5 个批次 IL-6 荧光定量免疫层析试剂卡检测 0、50、250、800、4 000 pg/mL 5 个浓度点的血清,每个浓度检测 10 次。同一批次内板内各浓度点 T/C 的 CV 范围为 2.21%~3.93%。5 批次混合后测得的板间各浓度点 T/C 的 CV 为 2.42%~5.36%。同一批次的板内和 5 个批次板间的 CV 均小于 15%。

2.5 特异度检测结果 对待测浓度为 10 000 ng/mL 的竞争物 IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-4、IL-8、INF-γ 进行检测,结果表明竞争物 IL-4、INF-γ 在试验中并未检测到;IL-1α、IL-1β、IL-2、IL-8 的交叉反应率均小于 0.1%,见表 1,试剂盒与这些竞争物的交叉反应率低,表明特异度良好。

表 1 试剂盒交叉反应测试结果		
干扰物	测得浓度 (pg/mL)	交叉反应率 (%)
IL-1α	5.56	0.06
IL-1β	3.11	0.03
IL-2	5.64	0.06
IL-4	0.00	0.00
IL-8	4.21	0.04
INF-γ	0.00	0.00

2.6 试剂卡稳定性试验结果 荧光定量免疫层析试剂卡的稳定性试验结果见表 2,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、高浓度的荧光信号 T/C 基本没变化。

表 2 试剂卡稳定性试验结果						
编号	浓度 (pg/mL)	即刻 T/C	1 周 T/C	2 周 T/C	3 周 T/C	4 周 T/C
1	0	0.932 4	0.938 9	0.932 2	0.933 2	0.938 7
2	50	0.943 5	0.945 5	0.941 1	0.938 7	0.933 2
3	250	1.268 4	1.262 2	1.260 8	1.259 4	1.258 3
4	800	1.987 1	1.964 3	1.961 1	1.958 9	5.209 3
5	4 000	5.223 6	5.220 9	5.219 4	5.214 9	1.957 1

2.7 相关性试验结果 自制试剂盒检测的 200 份血清标本结果与贝克曼化学发光检测试剂盒检测值相近,对在 0~600 pg/mL 范围内的高、中、低浓度临床标本进行回归分析,回归方程为 $Y=0.989\ 4X+2.998\ 5$, $R^2=0.997\ 1$,见图 2。 $R^2>0.95$,两种测试方法测试值相关性良好。

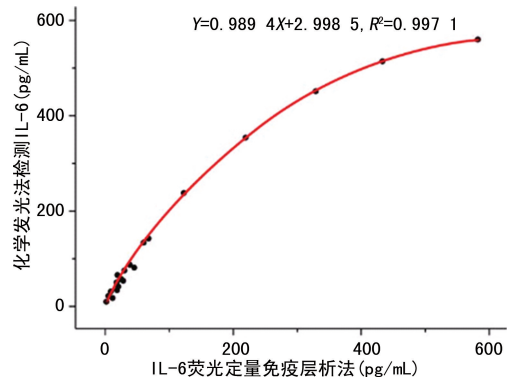


图 2 荧光定量免疫层析法与化学发光法检测 IL-6 的相关性分析

3 讨论

IL-6 在体内的作用比较广泛,对免疫炎症反应、肝脏急性蛋白合成、造血功能、骨代谢都有调节作用。有研究证明,IL-6 是确定全身炎症反应综合征患者疾病严重程度最重要的细胞因子^[4]。大量研究证明,IL-6 参与新型冠状病毒肺炎的“细胞因子炎症风暴”,可加重病情恶化^[5-6]。《新型冠状病毒肺炎诊疗方案(试行第八版)》将 IL-6 作为病情恶化的炎症反应指标,本课题组有研究证明新型冠状病毒肺炎不同类型患者体内 IL-6 比较,差异有统计学意义($P<0.05$)^[7]。快速、特异地检测血液中 IL-6 对多种疾病的早期诊断、治疗及预后有很好的作用。研究一种灵敏度高、特异度高、检测速度快、操作简单的 IL-6 定量检测试剂盒具有广阔的应用前景^[8-9]。IL-6 化学发光检测试剂盒主要由罗氏和贝克曼等公司生产,此类产品检测需大型仪器,试剂价格昂贵、检测时间较长,且需要专业人员操作,国内一些生产企业也进行了相关产品的开发,但技术上以 ELISA 法为主,灵敏度及特异度较高,但存在操作烦琐、检测时间长等问题^[10-11]。本研究通过量子点标志荧光抗体,建立得到 IL-6 的量子点荧光免疫层析法,自制试剂盒线性范围较宽,灵敏度高,达到 pg/mL 级别。张文琪^[12]研究显示,胶体金定量法检测 IL-6 的检测限为 8.494 pg/mL,试剂盒的检测范围为 25.278~848.000 pg/mL,可见,无论是灵敏度还是检测范围,量子点 IL-6 试剂盒都优于胶体金定量法。本研究结果显示,自制试剂盒的准确性、精密度、特异度及稳定性都较好。本研究自制试剂盒与贝克曼化学发光检测试剂盒同时进行 200 份临床标本检测并进行比对,结果基本一致,表明这两种测试方法测试值相关性良好。本研究自制试剂盒所用的主要试剂均为国产和自制所得,生产成本低,未来在市场上的售价也将低于其他诊断试剂,且荧光检测仪器便携,在患者身旁 18 min 内即可完成检测,而且建立的方法比市场上的 ELISA 试剂盒更方便、快捷,操作人员不需要太多的专业技能,比市场上胶体金免疫层析法试剂盒更灵敏,检测范围更广,稳定性更好。表明本研究建立的 IL-6 荧光免疫层析法的初步应用比较成功,临床推广应用(下转第 2478 页)

参考文献

[1] KATHERINE F, PHILIPPE G, ALIMUDDIN Z, et al. The global tuberculosis epidemic and progress in care, prevention, and research: an overview in year 3 of the End TB era[J]. *Lancet Respir Med*, 2018, 6(4): 299-314.

[2] ADAM M, PHILIPPE G, CHARALAMBOS S, et al. Global epidemiology of tuberculosis and progress toward meeting global targets-worldwide, 2018 [J]. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 2020, 69(11): 281-285.

[3] 王晓君, 李月华, 易凤莲, 等. 1990—2017 年中国结核病流行与控制情况[J]. *中华流行病学杂志*, 2020, 41(6): 856-860.

[4] 林雪峰, 支晓阳. GeneXpertMTB/RIF 实时荧光定量 PCR 系统在肺结核诊断及利福平耐药检测中的应用[J]. *中国卫生检验杂志*, 2017, 27(6): 853-856.

[5] BLAKEMORE R, STORY E, HELB D, et al. Evaluation of the analytical performance of the Xpert MTB/RIF assay[J]. *J Clin Microbiol*, 2010, 48(7): 2495-2501.

[6] DERENDINGER M, DOLBY T, SIMPSON J, et al. Diagnostic accuracy and utility of fluorotype MTBDR, a new molecular assay for multidrug-resistant tuberculosis[J]. *J Clin Microbiol*, 2018, 56(9): 1-13.

[7] 中国疾病预防控制中心. 中国结核病防治规划 痰涂片镜检质量保证手册[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004: 21-30.

[8] World Health Organization. Policy statement: automated real-time nucleic acid amplification technology for rapid and simultaneous detection of tuberculosis and rifampicin resistance: Xpert MTB/RIF System[S]. Geneva: World Health Organization, 2011.

[9] 刘斌, 刘君, 裴豪, 等. 结核分枝杆菌实验室及其药敏检测

技术进展[J]. *中华医院感染学杂志*, 2020, 30(15): 2396-2400.

[10] GHULAM R, ARIF M K, RAZA M, et al. Detection of Mycobacterium tuberculosis in AFB smear-negative sputum specimens through MTB culture and GeneXpert® MTB/RIF assay [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419827174.

[11] GELETA D A, MEGERSA Y C, GUDETA A N, et al. Xpert MTB/RIF assay for diagnosis of pulmonary tuberculosis in sputum specimens in remote health care facility [J]. *BMC Microbiol*, 2015, 15: 220.

[12] TANG T, LIU F, LU X, et al. Evaluation of GeneXpert MTB/RIF for detecting Mycobacterium tuberculosis in a hospital in China[J]. *J Int Med Res*, 2017, 45(2): 816-822.

[13] 吕纯芳, 吴健虹, 卢留珠, 等. 国产实时荧光定量 PCR 试剂与 GeneXpert MTB/RIF 检测结核分枝杆菌的对比分析[J]. *中国防痨杂志*, 2020, 42(1): 60-65.

[14] 孟兴法, 范国津, 蒋银, 等. 基层医院开展 GeneXpert MTB 技术在结核病早期诊断中的可行性研究[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(24): 3027-3029.

[15] UDDIN M K, RAHMAN A, ATHER M F, et al. Distribution and frequency of rpo B mutations detected by Xpert MTB/RIF assay among beijing and non-beijing rifampicin resistant mycobacterium tuberculosis isolates in bangladesh [J]. *Infect Drug Resist*, 2020, 13: 789-797.

[16] TERZI H A, AYDEMIR O, KARAKECE E, et al. Comparison of the GeneXpert® MTB/RIF test and conventional methods in the diagnosis of mycobacterium tuberculosis[J]. *Clin Lab*, 2019, 65(1): 10. 7754.

(收稿日期: 2020-12-16 修回日期: 2021-04-09)

(上接第 2474 页)

将具有广阔的空间。但考虑到检测的临床标本相对数量较少, 下一步将与化学发光检测试剂盒进行大量血清标本比对试验, 将对自制试剂盒灵敏度、特异度, 及其与其他化学发光检测试剂盒的一致性和符合率进行进一步研究。

量子点荧光免疫层析法 IL-6 试剂盒的开发旨在为临床上检测 IL-6 提供更加简便、快捷的检测方法, 对 IL-6 的早期诊断及临床检验具有重要价值。

参考文献

[1] 付俊, 罗宇鸿. 白细胞介素 6、超敏 C-反应蛋白、血清降钙素原在早期感染诊断中的意义分析[J/CD]. *临床医药文献电子杂志*, 2018, 5(A2): 194-199.

[2] 张莹莹, 张丽丽, 杨庆辉. 白细胞介素-6 与肿瘤坏死因子-α 在心房颤动中的作用研究进展[J]. *心血管病学进展*, 2020, 41(2): 132-135.

[3] 王超. Cu-Fe-S 基量子点的制备与光学/光电性质研究[D]. 长春: 吉林大学, 2019.

[4] 史晓朋, 秦历杰, 杨蕾, 等. 白细胞介素-6 联合 CD4⁺ T 淋巴细胞检测对评估新型冠状病毒肺炎严重程度及预后的价值[J]. *中华危重病急救医学*, 2020, 32(10): 1165-1170.

[5] ZUMLA A, HUI D S, AZHAR E I, et al. Reducing mor-

tality from 2019-nCoV: host-directed therapies should be an option[J]. *Lancet*, 2020, 395(10224): e35-e36.

[6] 陈成, 张小容, 鞠振宇, 等. 新型冠状病毒肺炎引发细胞因子风暴的机制及相关免疫治疗研究进展[J]. *中华烧伤杂志*, 2020, 36(6): 471-475.

[7] 唐劲松, 宣春, 林景涛, 等. C-反应蛋白、白细胞介素-6 及降钙素原检测在新冠肺炎中的临床意义[J]. *实用医学杂志*, 2020, 36(7): 839-841.

[8] VALENT P. KIT D816V and the cytokine storm in mastocytosis: production and role of interleukin-6[J]. *Haematologica*, 2020, 105(1): 5-6.

[9] 张丽, 孙胜利, 陈倩, 等. 白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子测定试剂盒在仪器 IMMULITE1000 化学发光分析仪的性能验证[J]. *中国卫生检验杂志*, 2018, 28(23): 2897-2900.

[10] 刘传志, 李伟, 刘桂莹, 等. 降钙素原荧光免疫层析方法的建立[J]. *生物工程学报*, 2018, 34(3): 440-448.

[11] TANG J S, WU L L, LIN J T, et al. Development of quantum dot-based fluorescence lateral flow immunoassay strip for rapid and quantitative detection of serum interleukin-6[J]. *J Clin Lab Anal*, 35(5): e23752.

[12] 张文琪. 荧光定量免疫层析法检测白细胞介素 6 的建立及应用[D]. 广州: 华南理工大学, 2017.

(收稿日期: 2020-11-17 修回日期: 2021-04-09)