

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2025 年 1 月 16 日 (16.01.2025)



(10) 国际公布号
WO 2025/010959 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 21/76 (2006.01) **G01N 33/68** (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2023/141325
- (22) 国际申请日: 2023 年 12 月 23 日 (23.12.2023)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
202310864919.4 2023年7月13日 (13.07.2023) CN
- (71) 申请人: 中国科学院深圳先进技术研究院 (SHENZHEN INSTITUTES OF ADVANCED TECHNOLOGY CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) [CN/CN]; 中国广东省深圳市

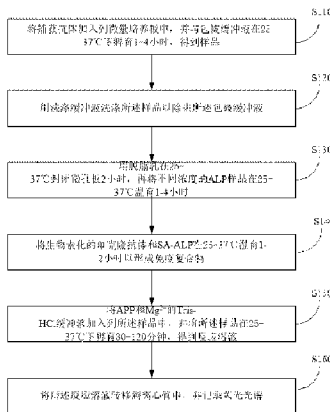
南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(72) 发明人: 马英新 (MA, Yingxin); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。毛国斌 (MAO, Guobin); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。戴俊彪 (DAI, Junbiao); 中国广东省深圳市南山区深圳大学城学苑大道 1068 号, Guangdong 518055 (CN)。

(74) 代理人: 北京中巡通大知识产权代理有限公司 (BEIJING ZHONG XUN TONG DA INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY CO., LTD.); 中国北京市西城区西直门外大街 1 号院 2 号楼 7 层 7C1, Beijing 100044 (CN)。

(54) Title: METHOD AND KIT FOR DETECTING IL-6 PROTEIN ON BASIS OF ALP-MEDIATED ELISA

(54) 发明名称: 基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒



(图4)

- S110 Add a capture antibody into a microtest plate, and incubate same with a coating buffer at 25-37°C for 1-4 hours to obtain a sample
- S120 Use a washing buffer to wash the sample so as to remove the coating buffer
- S130 Use skimmed milk at 25-37°C to block a microtest plate for 2 hours, and then incubate ALP samples having different concentrations at 25-37°C for 1-4 hours
- S140 Incubate a biotinylated monoclonal antibody and SA-ALP at 25-37°C for 1-2 hours to form an immune complex
- S150 Add a Tris-HCl buffer containing APP and Mg²⁺ into the sample, and incubate the sample at 25-37°C for 30-120 minutes to obtain a reaction solution
- S160 Transfer the reaction solution to a centrifuge tube, and record the fluorescence spectrum
- S110 Add a capture antibody into a microtest plate, and incubate same with a coating buffer at 25-37°C for 1-4 hours to obtain a sample
- S120 Use a washing buffer to wash the sample so as to remove the coating buffer
- S130 Use skimmed milk at 25-37°C to block a microtest plate for 2 hours, and then incubate ALP samples having different concentrations at 25-37°C for 1-4 hours
- S140 Incubate a biotinylated monoclonal antibody and SA-ALP at 25-37°C for 1-2 hours to form an immune complex
- S150 Add a Tris-HCl buffer containing APP and Mg²⁺ into the sample, and incubate the sample at 25-37°C for 30-120 minutes to obtain a reaction solution
- S160 Transfer the reaction solution to a centrifuge tube, and record the fluorescence spectrum

(57) Abstract: A method and kit for detecting an IL-6 protein on the basis of ALP-mediated ELISA. IL-6 is detected by ALP-catalyzed hydrolysis of APP; on the basis of alkaline phosphatase (ALP)-mediated hydrolysis of APP, the APP has high fluorescence quenching efficiency in the hydrolysis process. Changes in the fluorescence intensity of APP have a good linear relationship with the logarithm of the IL-6 protein concentration within the range of 0.005 ng/mL-5.0 ng/mL, and the detection limit is 0.001 ng/mL, which is 100 times the sensitivity of traditional pNPP-based ELISA. Furthermore, when the colorimetric signal of AP is used for detecting IL-6 by means

(81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, ME, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

of colorimetric ELISA, the detection limit is 0.1 ng/mL. The method can be used for visual detection of IL-6, with high sensitivity.

(57) 摘要: 一种基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒, 通过ALP催化的APP水解检测IL-6, 基于碱性磷酸酶(ALP)介导的APP水解, 水解过程中APP具有高荧光猝灭效率。APP荧光强度的变化与IL-6蛋白浓度的对数在0.005 ng/mL - 5.0 ng/mL范围内呈良好的线性关系, 检测限为0.001 ng/mL, 比传统的基于pNPP的ELISA灵敏度高100倍。而将AP的比色信号用于比色ELISA检测IL-6时, 检测限为0.1 ng/mL, 该方法可用于IL-6的视觉检测, 具有较高的灵敏度。

说明书

发明名称: 基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒 技术领域

[0001] 本申请涉及试剂检测技术领域，特别涉及一种基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒。

背景技术

[0002] 脑梗塞是一种严重的脑血管疾病，伴有高残疾率和高死亡率的风险，如果缺乏有效的诊断方法则会导致诊断延误以及发生严重并发症的风险增加。因此，脑梗塞的早期筛查和诊断对于提高患者的生存率和减轻家庭和社会负担至关重要。检测可准确预测脑梗塞风险和严重程度的新型生物标志物可为筛查工作提供有效帮助。最近的研究揭示了炎症反应与脑梗塞之间的潜在关系，细胞因子的浸润可导致慢性非特异性炎症，这与脑梗塞的发生发展密切相关。在急性脑梗塞患者中，血液中各种内源性细胞因子的水平显著增加。因此，测定炎性细胞因子的水平可以为诊断脑梗塞以及预后评估提供有价值的策略。白细胞介素6（IL-6）是一种在机体炎症反应中经常分泌的细胞因子。据报道，脑脊液中IL-6的水平在脑梗塞后显著增加，并且与脑梗塞的预后预测有关。因此，IL-6被认为是脑梗塞的可靠筛查和预后生物标志物。

[0003] 多年来，已经开发了不同的方法和检测手段来确定IL-6的浓度，包括酶联免疫吸附测定（ELISA），基于适配体的传感器和有机电化学晶体管等。ELISA被广泛用于分析，因为它简单，反应快速，具有强特异性，用途广泛，并且只需要简单的实验设备。比色法，荧光法，化学发光法，表面增强拉曼散射法和电化学法可与ELISA结合。基于比色和荧光的ELISA越来越受欢迎，因为它们易于操作，成本低，并且测试时间短。然而，由于体液中IL-6的量极低（浓度在pM范围内），使用常规的基于比色法的免疫传感器可能无法实现诊断脑梗塞，不具有足够低的检测限和宽的线性范围。基于荧光的分析方法的灵敏度比基于比色法的灵敏度高1-2个数量级。目前研究中基于荧光纳米探针开发了各种检测方法

，而依赖于荧光纳米探针与底物或标记酶产物的相互作用的常规荧光免疫测定易受环境干扰。

发明概述

技术问题

[0004] 鉴于此，有必要针对现有技术中存在的缺陷提供一种灵敏度高的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒。

技术方案

[0005] 为解决上述问题，本申请采用下述技术方案：

[0006] 本申请目的之一，提供了一种基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，包括下述步骤：

[0007] 将捕获抗体加入到微量培养板中，并与包被缓冲液在25-37℃下孵育1-4小时，得到样品；

[0008] 用洗涤缓冲液洗涤所述样品以除去所述包被缓冲液；

[0009] 用脱脂乳在25-37℃封闭微孔板1-4小时，再将不同浓度的ALP样品在25-37℃温育1-2小时；

[0010] 将生物素化的单克隆抗体和SA-ALP在25-37℃温育1-2小时以形成免疫复合物；

[0011] 将APP和Mg²⁺的Tris-HCl缓冲液加入到所述样品中，并将所述样品在25-37℃下孵育30-120分钟，得到反应溶液；

[0012] 将所述反应溶液转移到离心管中，并记录荧光光谱。

[0013] 在其中一些实施例中，在将捕获抗体加入到微量培养板中，并与包被缓冲液在25-37℃下孵育1-4小时，得到样品的步骤中，所述捕获抗体包括小鼠抗IL-6抗体，所述微量培养板为96孔微量培养板，所述包被缓冲液包括碳酸盐缓冲液。

[0014] 在其中一些实施例中，所述捕获抗体的体积为100 μL，浓度为1:100；所述包被缓冲液的浓度为50 mM，pH为9.6。

[0015] 在其中一些实施例中，在用洗涤缓冲液洗涤所述样品以除去所述包被缓冲液的步骤中，所述洗涤缓冲液为含有0.05%吐温20，pH为7.4，浓度为10 mM的PBS。

- [0016] 在其中一些实施例中，在用脱脂乳在37℃封闭微孔板2小时，再将不同浓度的ALP样品在37℃温育1小时的步骤中，所述脱脂乳的体积为300 μL，浓度为2.5% w/t；所述不同浓度的ALP样品包括0 ng/mL，0.005 ng/mL，0.01 ng/mL，0.05 ng/mL，0.5 ng/mL，1.0 ng/mL，5.0 ng/mL，10.0 ng/mL，20.0 ng/mL，25.0 ng/mL，50.0 ng/mL，100.0 ng/mL。
- [0017] 在其中一些实施例中，在将生物素化的单克隆抗体和SA-ALP在25-37℃温育1-4小时以形成免疫复合物的步骤中，所述生物素化的小鼠单克隆抗体的体积为100 μL，浓度为1:1000；所述SA-ALP的体积为100 μL，浓度为1:2000。
- [0018] 在其中一些实施例中，在将APP和Mg²⁺的Tris-HCl缓冲液加入到所述样品中，并将所述样品在25-37℃下孵育30-120分钟，得到反应溶液的步骤中，所述APP的浓度为500 μM，所述Mg²⁺浓度为1 mM，所述Tris-HCl缓冲液的体积为200 μL。
- [0019] 本申请目的之二，提供了一种试剂盒，所述试剂盒通过应用所述的ELISA检测IL-6蛋白的方法实现IL-6蛋白的检测。

有益效果

- [0020] 本申请采用上述技术方案，其有益效果如下：

- [0021] 本申请提供的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒，通过ALP（碱性磷酸酶）催化的APP水解检测IL-6，基于碱性磷酸酶（ALP）介导的APP（4-氨基苯酚磷酸酯）水解，水解过程中APP具有高荧光猝灭效率。APP荧光强度的变化与IL-6蛋白浓度的对数在0.005 ng/mL - 5.0 ng/mL范围内呈良好的线性关系，检测限为0.001 ng/mL，比传统的基于pNPP的ELISA灵敏度高100倍。而将AP（对氨基苯酚）的比色信号用于比色ELISA检测IL-6时，检测限为0.1 ng/mL，该方法可用于IL-6的视觉检测，具有较高的灵敏度。

附图说明

- [0022] 为了更清楚地说明本申请实施例的技术方案，下面将对本申请实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面所描述的附图仅仅是本申请的一些实施例，对于本领域普通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

- [0023] 图1为本申请实施例提供的基于app的比色法和荧光法双模ELISA检测IL-6过程示意图。
- [0024] 图2为本申请实施例提供的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法的步骤流程图。
- [0025] 图3中(A)表示为不同浓度APP在Tris-HCl缓冲液中的发射光谱。
- [0026] 图3中(B)表示 APP在Tris-HCl缓冲液中270 ~ 320 nm不同激发波长下的发射光谱。
- [0027] 图4中 (A)表示为添加50 U/L ALP后不同浓度APP的荧光强度变化。
- [0028] 图4中(B) 表示500 μ M APP在含有不同浓度Mg²⁺的50 U/L ALP作用下的荧光强度变化。
- [0029] 图4中(C)表示不同pH值下500 μ M APP在50 U/L ALP作用下荧光强度的变化。
- [0030] 图4中(D) 表示ALP检测反应时间的优化, ALP浓度分别为10、25、50 U/L。
- [0031] 图5中 (A)表示APP (200 μ M)对不同浓度ALP的紫外-可见吸收光谱。
- [0032] 图5中(B) 表示ALP检测对应的校准曲线。
- [0033] 图5中(C) 表示APP水解检测ALP可视化。
- [0034] 图5中(D) 表示APP (500 μ M)对不同浓度ALP的荧光光谱响应。
- [0035] 图5中(E)表示0.02 U/L ~ 1.0 U/L范围内ALP检测对应的校准曲线。
- [0036] 图5中(F) 表示2.0 U/L ~ 50.0 U/L范围内ALP检测对应的校准曲线。
- [0037] 图6中 (A)表示10 μ M pNPP对含有不同浓度Mg²⁺的10 U/L ALP的吸光度变化。
- [0038] 图6中(B)表示不同pH值下10 μ M pNPP对10 U/L ALP吸光度的变化。
- [0039] 图6中(C)表示不同浓度ALP对10 μ M pNPP紫外光谱的响应。
- [0040] 图6中(D)表示 ALP检测校准曲线。
- [0041] 图7中(A)表示为 APP浓度。
- [0042] 图7中(B)表示为Capture Ab稀释。
- [0043] 图7中(C)表示为SA-ALP用于IL-6蛋白检测。
- [0044] 图8中 (A)表示为不同浓度IL-6对APP在alp介导的ELISA中的紫外可见吸收光谱。
- [0045] 图8中(B) 表示为IL-6蛋白检测对应的校准曲线。

- [0046] 图8中(C)表示为alp介导的ELISA检测IL-6的可视化。
- [0047] 图8中(D)表示为在alp介导的ELISA中,不同浓度IL-6对APP的荧光光谱。
- [0048] 图8中(E)表示为0.005 ng/mL ~ 5.0 ng/mL范围内IL-6蛋白检测对应的校准曲线
- [0049] 图8中(F)表示为10.0 ng/mL ~ 100.0 ng/mL范围内IL-6蛋白检测对应的校准曲线。
- [0050] 图9中 (A)表示为荧光pNPP介导的ELISA传感器通过荧光强度的变化检测IL-6蛋白。
- [0051] 图9中(B)表示为 IL-6蛋白检测校准曲线。
- [0052] 图10表示为IL-6蛋白检测对其他干扰蛋白的选择性研究,包括TNF、IL-10和TGF, IL-6蛋白浓度为100 ng/mL,其他干扰蛋白浓度为1000 ng/mL。
- [0053] 图11为本实施例提供的商用ELISA试剂盒检测IL-6蛋白示意图。
- [0054] 图12表示为无症状志愿者(1-12)和脑梗死患者(13-22)样品的APP荧光强度变化响应。

本发明的实施方式

- [0055] 下面详细描述本申请的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本申请,而不能理解为对本申请的限制。
- [0056] 在本申请的描述中,需要理解的是,术语“上”、“下”、“水平”、“内”、“外”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本申请和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本申请的限制。
- [0057] 此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个该特征。在本申请的描述中,“多个”的含义是两个或两个以上,除非另有明确具体的限定。
- [0058] 为了使本申请的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本申请进行进一步详细说明。

- [0059] 请参阅图1及图2，本实施例提供的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，包括下述步骤S110至步骤S160，以下详细说明各个步骤的实现方式。
- [0060] 步骤S110：将捕获抗体加入到微量培养板中，并与包被缓冲液在25-37℃下孵育1-4小时，得到样品。
- [0061] 在本实施例中，所述捕获抗体包括小鼠抗IL-6抗体，所述微量培养板为96孔微量培养板，所述包被缓冲液包括碳酸盐缓冲液。
- [0062] 在本实施例中，所述捕获抗体的体积为100 μ L，浓度为1:100；所述包被缓冲液的浓度为50 mM，pH为9.6。
- [0063] 步骤S120：用洗涤缓冲液洗涤所述样品以除去所述包被缓冲液。
- [0064] 在本实施例中，所述洗涤缓冲液为含有0.05%吐温20，pH为7.4，浓度为10 mM的PBS。
- [0065] 步骤S130：用脱脂乳在25-37℃封闭微孔板1-4小时，再将不同浓度的ALP（肠碱性磷酸酶）样品在25-37℃温育1-2小时。
- [0066] 在本实施例中，所述脱脂乳的体积为300 μ L，浓度为2.5% w/t；所述不同浓度的ALP样品包括0 ng/mL，0.005 ng/mL，0.01 ng/mL，0.05 ng/mL，0.5 ng/mL，1.0 ng/mL，5.0 ng/mL，10.0 ng/mL，20.0 ng/mL，25.0 ng/mL，50.0 ng/mL，100.0 ng/mL。
- [0067] 步骤S140：将生物素化的单克隆抗体和SA-ALP在25-37℃温育1-2小时以形成免疫复合物。
- [0068] 在本实施例中，所述生物素化的小鼠单克隆抗体的体积为100 μ L，浓度为1:1000；所述SA-ALP的体积为100 μ L，浓度为1:2000。
- [0069] 步骤S150：将APP（4-氨基苯酚磷酸酯）和Mg²⁺的Tris-HCl缓冲液加入到所述样品中，并将所述样品在25-37℃下孵育30-120分钟，得到反应溶液。
- [0070] 在本实施例中，所述APP的体积为500 μ M，所述Mg²⁺浓度为1 mM，所述Tris-HCl缓冲液的体积为200 μ L。
- [0071] 可以理解，在实际中实验条件可以根据情况进行优化，包括APP浓度，活化剂（MgCl₂）浓度，酶促反应时间，反应缓冲液的pH值和反应时间，以实现最佳的ALP检测性能。结果显示，在APP浓度为500 μ M时有最大荧光信号比。

[0072] 可以理解,适当浓度的 Mg^{2+} 可用于改善ALP(ELISA中常用的标记酶)活性并增加系统的稳定性。

[0073] 步骤S160:将所述反应溶液转移到离心管中,并记录荧光光谱。

[0074] 本申请提供的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法及试剂盒,通过ALP催化的APP水解检测IL-6,基于碱性磷酸酶(ALP)介导的APP水解,水解过程中APP具有高荧光猝灭效率。APP荧光强度的变化与IL-6蛋白浓度的对数在0.005 ng/mL - 5.0 ng/mL范围内呈良好的线性关系,检测限为0.001 ng/mL,比传统的基于pNPP的ELISA灵敏度高100倍。而将AP(对氨基苯酚)的比色信号用于比色ELISA检测IL-6时,检测限为0.1 ng/mL,该方法可用于IL-6的视觉检测,具有较高的灵敏度。

[0075] 以下结合具体实施例对本申请上述技术方案进行详细说明。

[0076] 实施例

[0077] 本实施例中涉及的化学品及物料如下:

[0078] APP, 盐酸trizma(Tris-HCl)和 $MgCl_2$ 购于Sigma。化合物pNPP购于上海阿拉丁公司。SA-ALP购于北京博奥森公司。人IL-6重组蛋白,小鼠抗IL-6抗体,小鼠抗IL-6抗体(生物素修饰)和IL-6 ELISA试剂盒购于义翘神州。小牛肠碱性磷酸酶(ALP)购自新英格兰实验室。

[0079] 仪器和表征:

[0080] 使用Hitachi F-7100 FL分光光度计测试荧光光谱。在Hitachi系统(U-3900H)上记录UV-vis吸收光谱。用于实验的微孔板恒温振荡器购自Allshe ng(MB100-4A)。使用从Perkin Elmer(VICTOR Nivo)获得的酶标仪进行商用ELISA检测。

[0081] 临床样本分析:

[0082] 所有临床样本均来自柳州市中医医院收治的患者,从所有登记的患者中收集脑脊液。将样品置于抗凝管中并在室温下以4000 rpm离心。离心(离心时间:10分钟)后,将上清液收集在离心管中并作为等分试样储存在 $-80^{\circ}C$ 下进行测试。每个样品,包括12个阳性和10个阴性。检测过程完成后,对实验废物进行灭菌。

[0083] ALP响应分析:

- [0084] 将不同浓度（0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 U/L）的ALP样品与含有APP（500 μ M）的Tris缓冲液（20 mM, pH 9.5）混合Mg²⁺（1 mM）。将反应溶液在37℃下孵育90分钟，然后记录荧光光谱。在310 nm的激发波长下，在320 – 450 nm的波长范围记录荧光光谱。将不同浓度（0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0 U/L）的ALP样品与含有APP（200 μ M）和Mg²⁺（1mM）的Tris缓冲液（20 mM, pH 9.5）混合。将反应溶液在37℃下孵育90分钟，随后记录吸收光谱。在250 – 350nm的波长范围记录UV–vis吸收光谱。将不同浓度（0, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 U/L）的ALP样品与含有pNPP（10 μ M）和Mg²⁺（1 mM）的Tris缓冲液（20 mM, pH 9.5）混合。然后将反应溶液在37℃下孵育30分钟。随后，记录UV–vis吸收光谱。在250 – 600nm的波长范围记录吸收光谱。
- [0085] 基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白：
- [0086] 将捕获抗体（100 μ L, 1:100）加入到96孔微量培养板中，并与包被缓冲液（50 mM碳酸盐缓冲液, pH 9.6）在37℃下孵育2小时。除去包被缓冲液，用洗涤缓冲液（含有0.05%吐温20, pH 7.4, 10 mM的PBS）洗涤样品三次。然后用脱脂乳（300 μ L, 2.5% w/t）在37℃封闭微孔板2小时。接着，将不同浓度（0, 0.005, 0.01, 0.05, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0, 20.0, 25.0, 50.0, 100.0 ng/mL）在37℃温育1小时。之后，将生物素化的小鼠单克隆抗体（100 μ L, 1:1000）和SA-ALP（100 μ L, 1:2000）在37℃温育1小时以形成免疫复合物。将含有200 μ M APP和Mg²⁺（1 mM）的Tris-HCl缓冲液（200 μ L）加入到样品中，并将样品在37℃下孵育90分钟。将反应溶液转移到离心管中，并记录荧光光谱。使用商业IL-6 ELISA试剂盒检测IL-6，该方法用作灵敏度比较的对照。
- [0087] APP的特征
- [0088] 在本实施例中，我们观察到APP通常用作ALP的底物并通过去磷酸化过程以产生AP，表现出良好的荧光性质。图3中（A）显示在360 nm处存在显着高强度的荧光峰，并且荧光强度与APP的浓度正相关。当激发波长为310 nm时可记录到最大荧光，如图3中（B）所示。这些发现表明APP的荧光特性可用于开发新的比色和荧光双模式ELISA方法，以实现IL-6的灵敏检测。

[0089] 基于ALP催化APP水解的比色和荧光双模测定：

[0090] 在本实施例中，通过分析UV-vis吸收和荧光光谱来验证使用ALP分析APP水解过程的可行性。我们优化了几个实验条件，包括APP浓度，活化剂（ MgCl_2 ）浓度，酶促反应时间，反应缓冲液的pH值和反应时间，以实现最佳的ALP检测性能。结果显示，在APP浓度为 $500\ \mu\text{M}$ 时有最大荧光信号比（图4中（A））。据报道，适当浓度的 Mg^{2+} 可用于改善ALP活性并增加系统的稳定性。如图4中（B）所示， $1\ \text{mM}\ \text{Mg}^{2+}$ 用于后续实验，因为 Mg^{2+} 浓度的进一步增加不会导致荧光强度的显着变化。在pH值为9.5时记录荧光强度的最大变化（图4中（C）），并且基于ALP的催化的最佳反应时间为90分钟（图4中（D））。

[0091] 比色和荧光双模式ALP活性测定在最佳条件下进行。如图5中A所示，ALP浓度的增加导致290 nm处吸收强度的增加。在290 nm处的吸收强度变化（ ΔA_{290} ）与ALP浓度的对数之间获得了良好的线性关系（范围：0.5 – 25.0 U/L；图5中B）。图5中D显示ALP浓度的增加导致APP的荧光强度逐渐降低，并且荧光强度的变化集中在360 nm（ ΔF_{360} ）。荧光强度的变化与ALP浓度的对数在0.02 – 1.0 U/L和2.0 – 100.0 U/L的范围内表现出良好的线性关系（图5中E和2F）。比色和荧光读出模式的检测限分别计算为0.1和0.005 U/L（ $3\sigma/S$ ）。结果表明，荧光模式的灵敏度高于比色模式的灵敏度。

[0092] 通过基于pNPP水解的常规ALP检测方法用于与双模式检测方法的灵敏度对比。在ALP检测过程中，化合物pNPP通常用作底物，检测原理涉及无色pNPP的去磷酸化和催化，产生黄色对硝基苯酚（PNP）。优化实验参数，包括pNPP浓度，活化剂（ MgCl_2 ）浓度和反应缓冲液的pH。图6中A–D显示，当pNPP浓度为 $10\ \mu\text{M}$ ， Mg^{2+} 浓度为 $1\ \text{mM}$ ，缓冲液的pH为9.5时，观察到400 nm处吸光度的最大变化。在最佳条件下，pNP在400 nm处的吸光度随着ALP浓度的增加而增加，400 nm处吸收强度的变化（ ΔA_{400} ）与ALP浓度的对数（范围：0.5 – 50.0 U/L）有很好的相关性。检测限为0.1 U/L。我们提出的荧光模式的灵敏度是基于比色模式的pNPP水解的灵敏度的20倍，还进行了视觉ALP检测方法。如图5中C所示，ALP浓度从0增加到150 U/L导致微孔板颜色从无色变为黄色变为深棕色，表明该方法可以有效地用于肉眼检测。

[0093] 用于IL-6检测的双模式ELISA

[0094] 当APP用于ALP检测时，可以实现高检测灵敏度，因此APP可用于ALP介导的ELISA。本实施例提供了一种基于ALP介导的APP水解过程的双模式ELISA传感器用于IL-6检测。这种双模式ELISA的方法的开发遵循常规ELISA的程序，检测过程涉及固定捕获抗体（捕获Ab），不同浓度的IL-6，生物素修饰的检测抗体（生物素-Ab1），和SA-ALP。通过特异性抗原-抗体免疫反应和SA-生物素相互作用在96孔板上形成夹心免疫复合物。APP用作ALP催化的底物以产生AP，这有助于比色和荧光读出信号的产生。首先，我们优化了检测过程中的各组分，如图7中（A）所示，在APP浓度为500 μ M时记录最大荧光强度比，我们还优化了捕获抗体和SA-ALP的使用。如图7中（B）和（C）所示，当捕获抗体以1:200的比例稀释并且SA-ALP以1:2000的比例稀释时，观察到荧光强度的最大变化。这些优化的参数用于后续实验。在比色模式下，随着IL-6浓度从0.5增加到75.0 ng/mL，290 nm处吸收强度的变化程度显著增加（图8中（A））。在吸收强度的变化和IL-6浓度的对数之间建立了良好的线性关系（图8中（B）），比色模式下IL-6检测的检测限为0.1 ng/mL。荧光模式下，APP荧光的猝灭伴随着IL-6浓度的相应增加（图8中（D））。如图8中（E）和（F）所示，在360 nm处荧光强度的变化与IL-6蛋白浓度的对数（0.005 - 5.0 ng/mL和10 - 100 ng/mL）呈良好的线性关系。检测限为0.001 ng/mL，显著低于比色模式下的检测限。此外，进行视觉IL-6检测方法用于分析，如图8中C所示，随着IL-6浓度从0增加到500 ng/mL，无色微孔板变黄并随后变深棕色，表明该方法肉眼检测IL-6的高潜力。

细则 91,
05.03.2024

[0095] 使用ALP最常用的底物pNPP用于ALP介导的ELISA。如图9中（A）所示，pNPP在310 nm处的吸光度降低，并且pNP在400 nm处的吸光度随着IL-6浓度从0.5增加到200 ng/mL而增加，检测限为0.1 ng/mL。这项工作中的荧光模式检测方法比传统的基于pNPP的ELISA方法灵敏100倍。

[0096] 用其他非特异性蛋白质（包括肿瘤坏死因子（TNF），白细胞介素-10（IL-10）和转化生长因子（TGF））加入ELISA检测方法中，以研究该方法对IL-6检测的选择性。如图10所示，即使非特异性蛋白质的浓度是IL-6浓度的十

倍，也没有观察到非特异性蛋白质的荧光强度的明显变化。此外，在系统中同时存在IL-6和干扰蛋白的情况下，观察到的荧光性质的变化与系统中单独存在IL-6时观察到的变化相似，这表明非特异性蛋白质对IL-6产生的反应几乎没有影响。因此，开发的基于双模式ELISA的方法可以特异性识别和检测IL-6，请参阅图11为本实施例提供的商用ELISA试剂盒检测IL-6蛋白示意图。

[0097] 使用临床样本进行验证

[0098] 为了评估临床样本中IL-6检测方法的可靠性，我们利用所构建的ELISA方法检测了来自于柳州市中医医院神经内科接受诊断和治疗的22名志愿者的脑脊液样本中的IL-6，样本获自诊断患有脑梗塞或非脑梗塞的患者，其通过数字减影血管造影（DSA）进行诊断。按照本研究设计的荧光模式检测方法检测实际样品中的IL-6。图12所示，结果表明阴性组（由12名未患脑梗塞的志愿者组成）APP荧光变化程度显著低于阳性组（由10名脑梗塞患者组成）。结果表明10例脑梗死患者中的IL-6的浓度明显高于12例无症状患者的IL-6浓度。结果还显示，IL-6浓度与脑梗塞严重程度呈正相关。因此，可以推断，所开发的ELISA方法可以有效地区分具患有脑梗塞的患者和非脑梗塞患者。该方法还可用于将脑梗塞的严重程度准确分类为轻度，中度或重度。

[0099] 可以理解，APP的优异荧光性质和基于ALP催化的APP水解过程中APP的荧光强度显著降低。该发现也被用于ALP检测和基于ELISA的IL-6检测，具有显著的灵敏度。APP水解过程与ALP的响应程度比常规pNPP水解过程中与ALP的响应程度高20倍。此外，基于ALP催化的APP水解反应的IL-6检测方法的灵敏度比传统的基于pNPP的ELISA的灵敏度高100倍。所开发的ELISA传感器可用于分析临床样品，并且可以使用该传感器将脑梗塞患者的样品与无症状志愿者的样品区分开。观察到按照该方法测定的IL-6浓度与通过DSA测定的脑梗塞的严重程度正相关。

[0100] 可以理解，以上所述实施例的各技术特征可以进行任意的组合，为使描述简洁，未对上述实施例中的各个技术特征所有可能的组合都进行描述，然而，只要这些技术特征的组合不存在矛盾，都应当认为是本说明书记载的范围。

[0101] 以上仅为本申请的较佳实施例而已，仅具体描述了本申请的技术原理，这些描述只是为了解释本申请的原理，不能以任何方式解释为对本申请保护范围的限制。基于此处解释，凡在本申请的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进，及本领域的技术人员不需要付出创造性的劳动即可联想到本申请的其他具体实施方式，均应包含在本申请的保护范围之内。

权利要求书

- [权利要求 1] 一种基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，其特征在于，包括下述步骤：
- 将捕获抗体加入到微量培养板中，并与包被缓冲液在25-37℃下孵育1-4小时，得到样品；
- 用洗涤缓冲液洗涤所述样品以除去所述包被缓冲液；
- 用脱脂乳在25-37℃封闭微孔板1-4小时，再将不同浓度的ALP样品在25-37℃温育1-2小时；
- 将生物素化的单克隆抗体和链霉亲和素修饰的碱性磷酸酶在25-37℃温育1-2小时以形成免疫复合物；
- 将APP和Mg²⁺的Tris-HCl缓冲液加入到所述样品中，并将所述样品在25-37℃下孵育30-120分钟，得到反应溶液；
- 将所述反应溶液转移到离心管中，并记录荧光光谱。
- [权利要求 2] 如权利要求1所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，其特征在于，在将捕获抗体加入到微量培养板中，并与包被缓冲液在25-37℃下孵育1-4小时，得到样品的步骤中，所述捕获抗体包括小鼠抗IL-6抗体，所述微量培养板为96孔微量培养板，所述包被缓冲液包括碳酸盐缓冲液。
- [权利要求 3] 如权利要求2所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，其特征在于，所述捕获抗体的体积为100 μL，浓度为1:100；所述包被缓冲液的浓度为50 mM，pH为9.6。
- [权利要求 4] 如权利要求1所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，其特征在于，在用洗涤缓冲液洗涤所述样品以除去所述包被缓冲液的步骤中，所述洗涤缓冲液为含有0.05%吐温20，pH为7.4，浓度为10 mM的PBS。
- [权利要求 5] 如权利要求1所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法，其特征在于，在用脱脂乳在37℃封闭微孔板2小时，再将不同浓度的ALP样品在37℃温育1小时的步骤中，所述脱脂乳的体积为

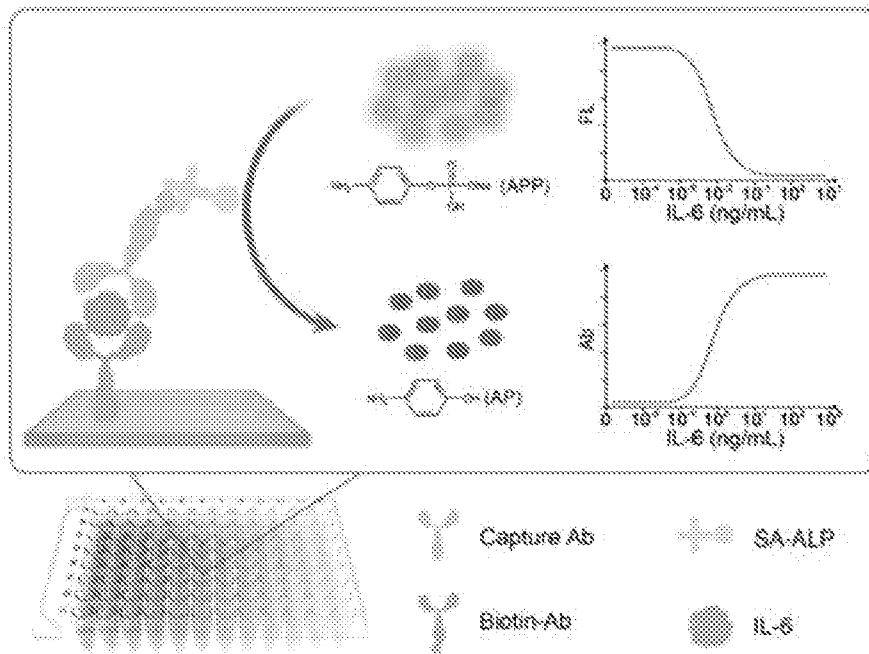
300 μ L, 浓度为2.5% w/t; 所述不同浓度的ALP样品包括0 ng/mL, 0.005 ng/mL, 0.01 ng/mL, 0.05 ng/mL, 0.5 ng/mL, 1.0 ng/mL, 5.0 ng/mL, 10.0 ng/mL, 20.0 ng/mL, 25.0 ng/mL, 50.0 ng/mL, 100.0 ng/mL。

[权利要求 6] 如权利要求1所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法, 其特征在于, 在将生物素化的单克隆抗体和SA-ALP在25-37°C温育1-2小时以形成免疫复合物的步骤中, 所述生物素化的小鼠单克隆抗体的体积为100 μ L, 浓度为1:1000; 所述SA-ALP的体积为100 μ L, 浓度为1:2000。

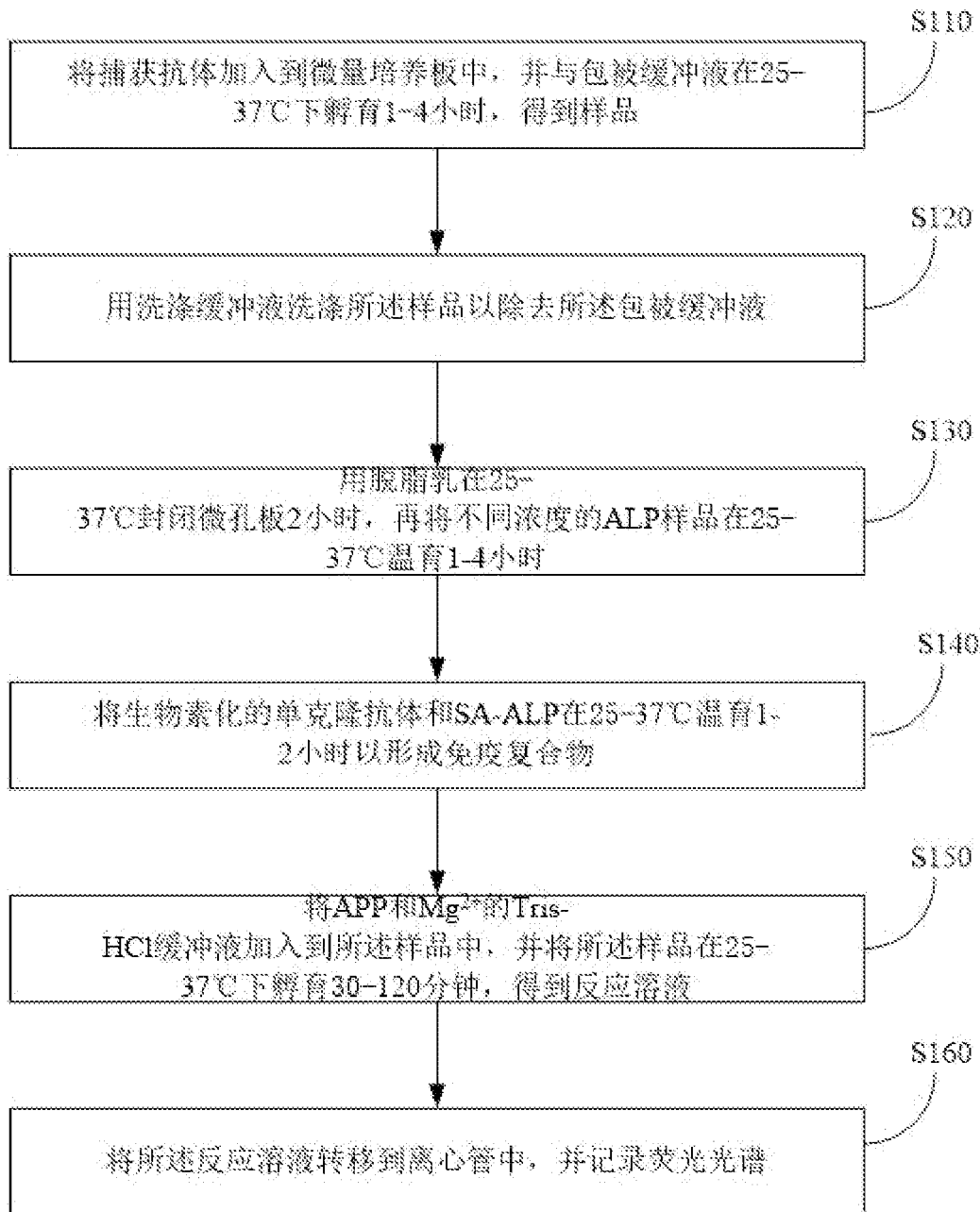
[权利要求 7] 如权利要求1所述的基于ALP介导的ELISA检测IL-6蛋白的方法, 其特征在于, 在将APP和 Mg^{2+} 的Tris-HCl缓冲液加入到所述样品中, 并将所述样品在25-37°C下孵育30-120分钟, 得到反应溶液的步骤中, 所述APP的浓度为500 μ M, 所述 Mg^{2+} 浓度为1mM, 所述Tris-HCl缓冲液的体积为200 μ L。

[权利要求 8] 一种试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒通过应用权利要求1至7任一项所述的ELISA检测IL-6蛋白的方法实现IL-6蛋白的检测。

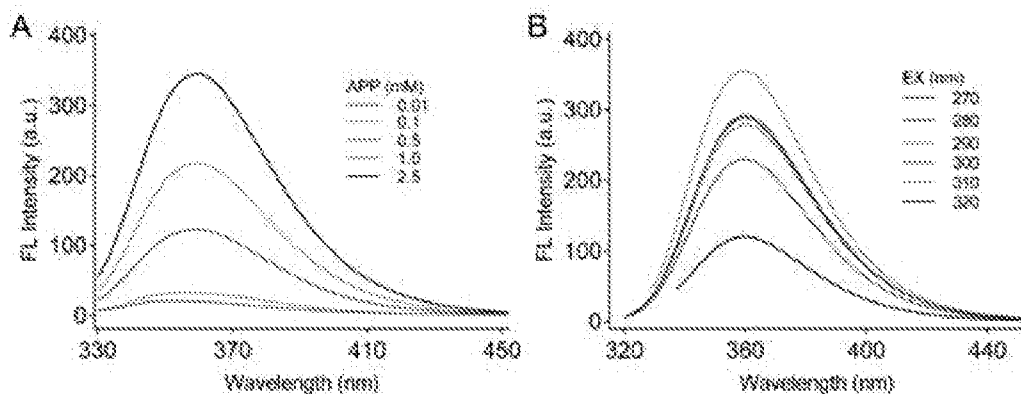
[图 1]



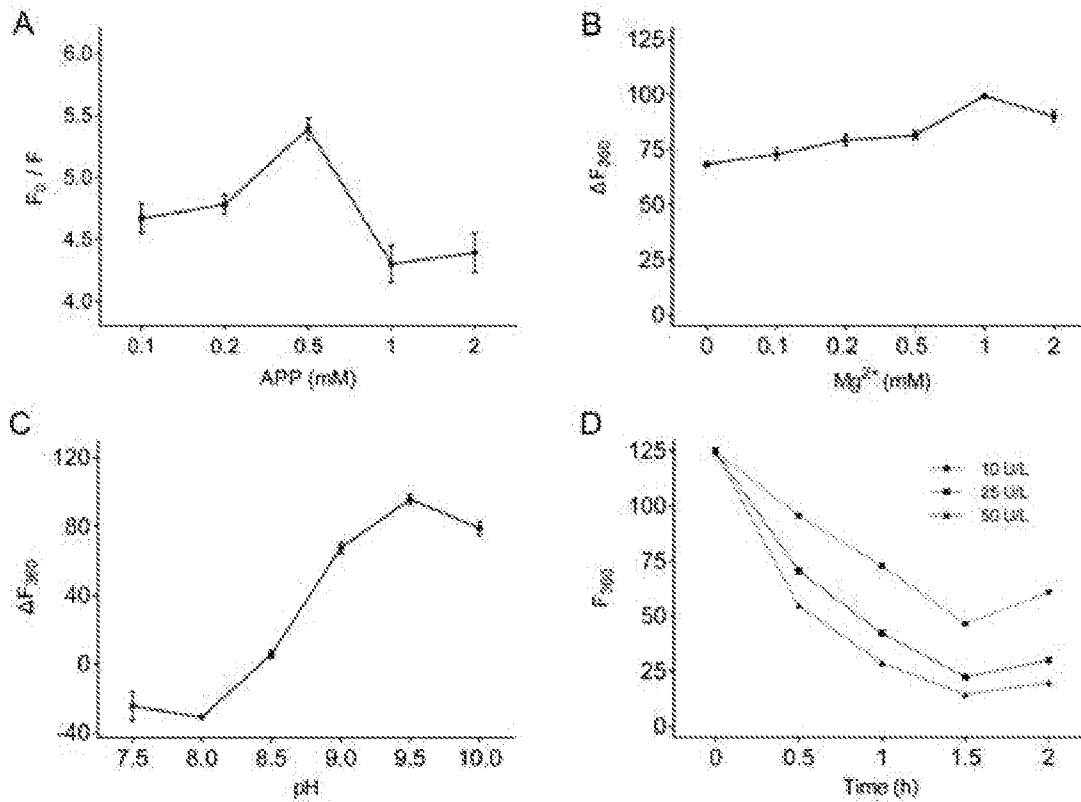
[图 2]



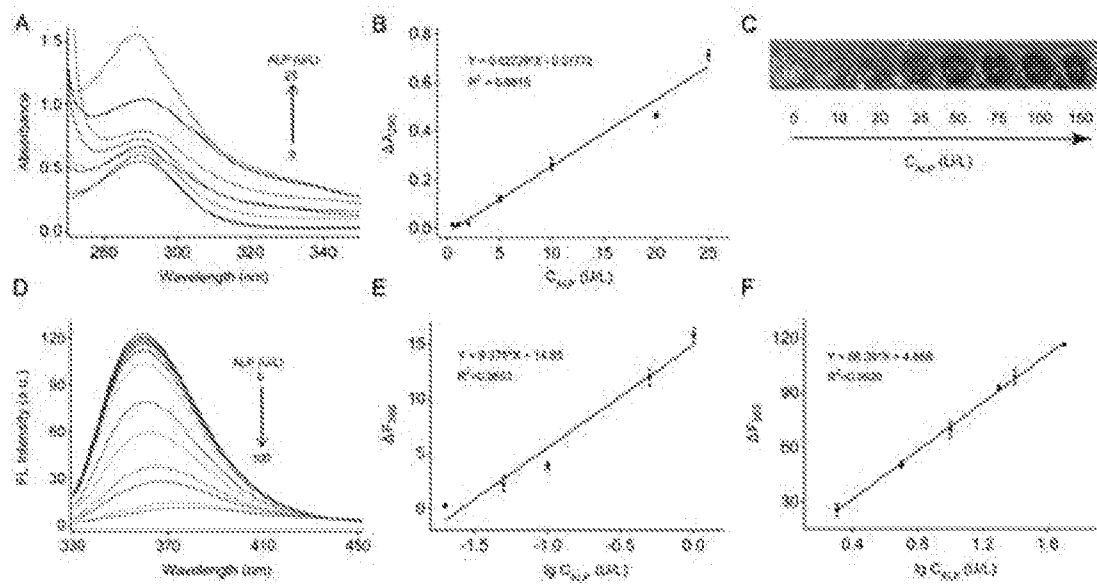
[图 3]



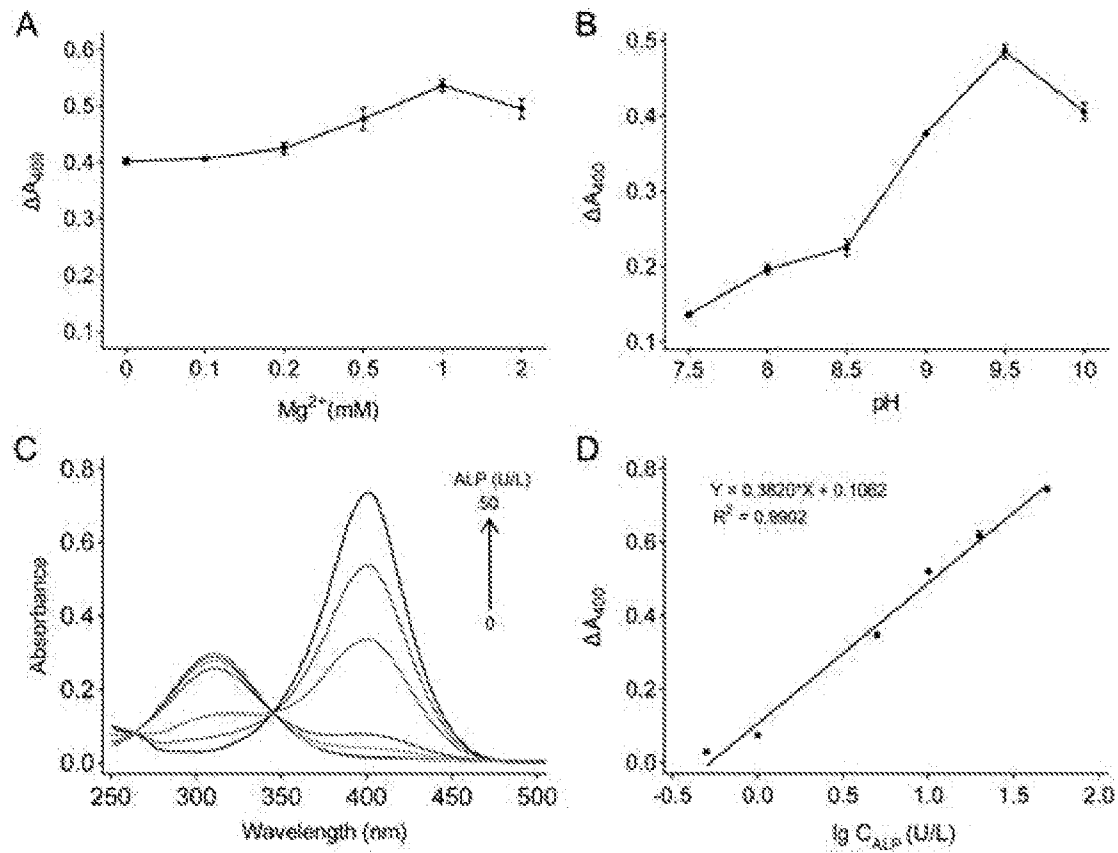
[图 4]



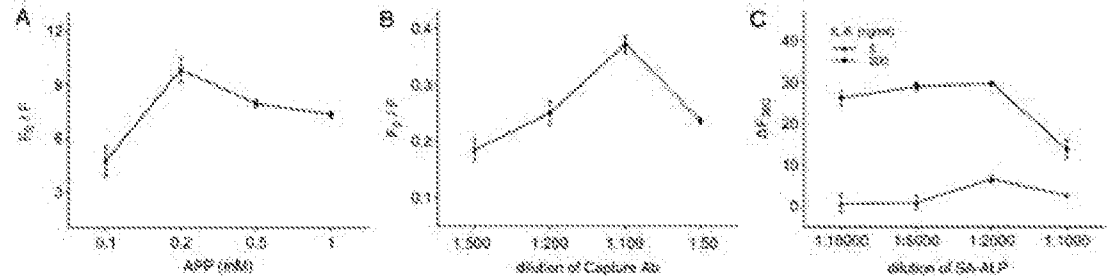
[图 5]



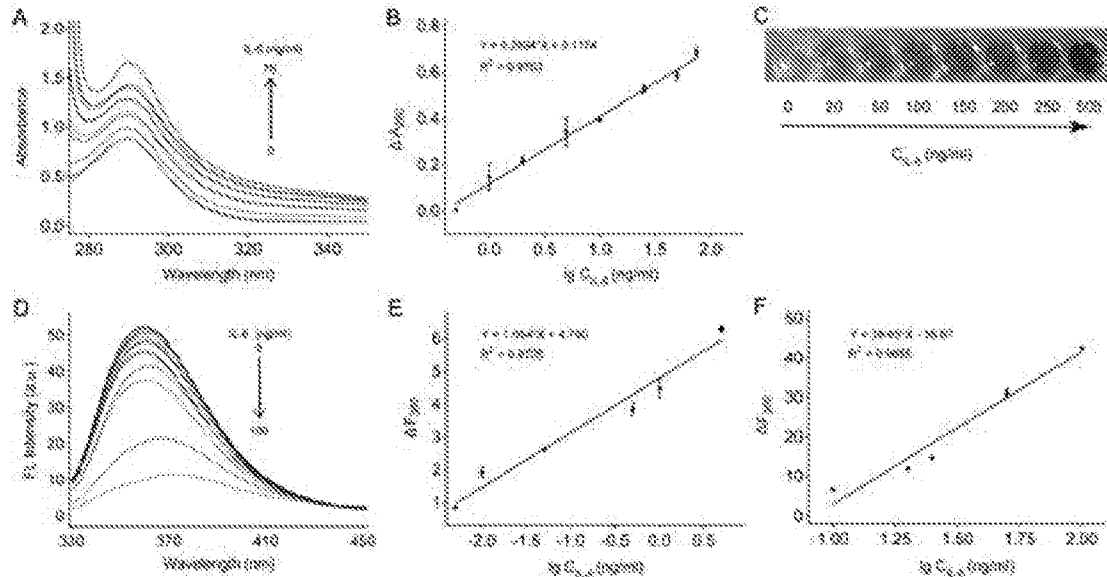
[图 6]



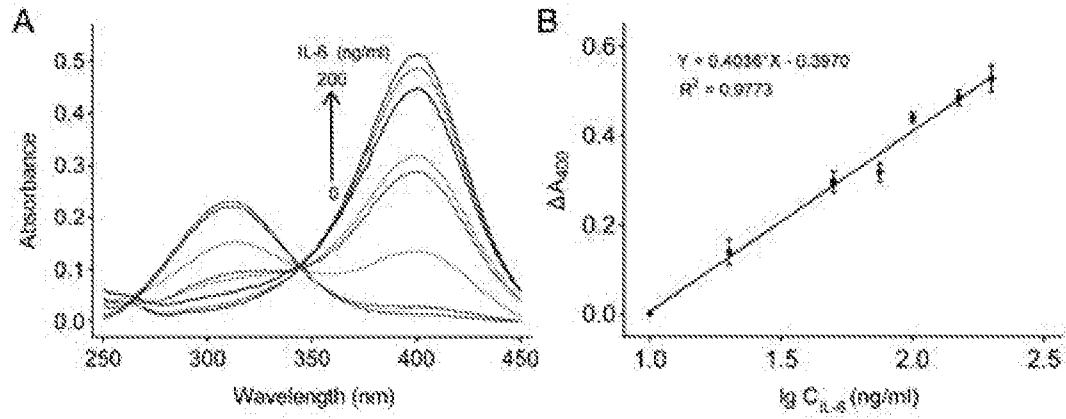
[图 7]



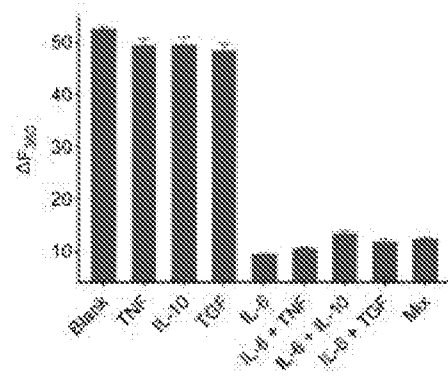
[图 8]



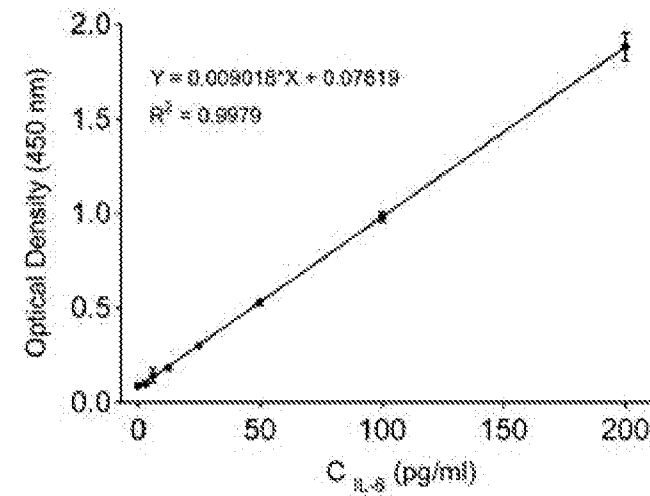
[图 9]



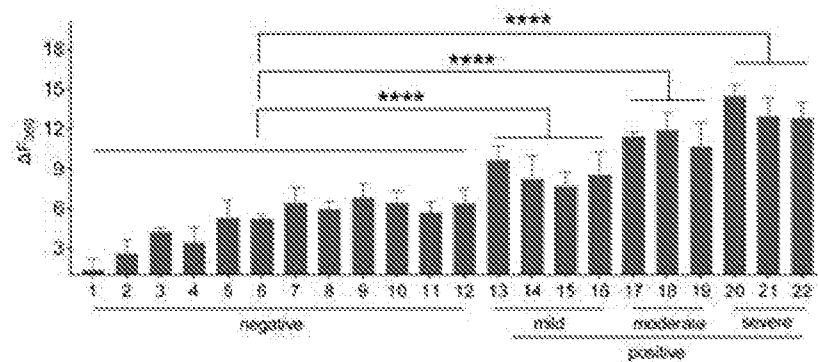
[图 10]



[图 11]



[图 12]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141325

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N21/76(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC:G01N21/-,G01N33/-,C07K16/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS, CNTXT, CNKI, ENTXT, VEN, CJFD: 碱性磷酸酶, ALP, 酶联免疫吸附测定, ELISA, 白细胞介素6, IL-6, 缓冲液, 孵育, 单克隆抗体, 链霉亲和素, 免疫复合物, APP, 4-氨基苯酚磷酸酯, 荧光, 试剂盒, buffers, incubation, monoclonal antibodies, streptavidin, immune complexes, fluorescence, kits

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 103048465 A (TARCINE BIOMED (BEIJING) INC.) 17 April 2013 (2013-04-17) entire document	1-8
A	CN 103941021 A (SHENZHEN GOLDSITE DIAGNOSTICS INC.) 23 July 2014 (2014-07-23) entire document	1-8
A	CN 104330551 A (NANFANG HOSPITAL OF SOUTHERN MEDICAL UNIVERSITY et al.) 04 February 2015 (2015-02-04) entire document	1-8
A	CN 104515855 A (NI RUNZHOU) 15 April 2015 (2015-04-15) entire document	1-8
A	CN 111257308 A (HUANGSHI LANTU BIOTECH CO., LTD.) 09 June 2020 (2020-06-09) entire document	1-8
A	US 2022396615 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO., LTD.) 15 December 2022 (2022-12-15) entire document	1-8



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 March 2024

Date of mailing of the international search report

01 April 2024

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2023/141325

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	何农跃 等 (HE, Nongyue et al.). "人血清中cTnI的化学发光酶免疫分析研究——实验条件的优化 (Chemiluminescent Enzyme Immunoassay for Cardiac Troponin I Detection: Optimization of Experimental Parameters)" <i>高等学校化学学报 (Chemical Journal of Chinese Universities)</i> , No. 02, 15 March 2007 (2007-03-15), pages 242-245	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2023/141325

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103048465	A	17 April 2013	None			
CN	103941021	A	23 July 2014	None			
CN	104330551	A	04 February 2015	None			
CN	104515855	A	15 April 2015	None			
CN	111257308	A	09 June 2020	None			
US	2022396615	A1	15 December 2022	EP	3722311	A1	14 October 2020
				EP	3722311	A9	23 February 2022
				EP	3722311	A4	08 June 2022
				WO	2019109947	A1	13 June 2019

A. 主题的分类

G01N21/76(2006.01)i; G01N33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC:G01N21/-,G01N33/-,C07K16/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNABS, CNTXT, CNKI, ENTXT, VEN, CJFD: 碱性磷酸酶, ALP, 酶联免疫吸附测定, ELISA, 白细胞介素6, IL-6, 缓冲液, 孵育, 单克隆抗体, 链霉亲和素, 免疫复合物, APP, 4-氨基苯酚磷酸酯, 荧光, 试剂盒, buffers, incubation, monoclonal antibodies, streptavidin, immune complexes, fluorescence, kits

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 103048465 A (同昕生物技术(北京)有限公司) 2013年4月17日 (2013 - 04 - 17) 全文	1-8
A	CN 103941021 A (深圳市国赛生物技术有限公司) 2014年7月23日 (2014 - 07 - 23) 全文	1-8
A	CN 104330551 A (南方医科大学南方医院 等) 2015年2月4日 (2015 - 02 - 04) 全文	1-8
A	CN 104515855 A (倪润洲) 2015年4月15日 (2015 - 04 - 15) 全文	1-8
A	CN 111257308 A (黄石市蓝图生物科技有限公司) 2020年6月9日 (2020 - 06 - 09) 全文	1-8
A	US 2022396615 A1 (NANJING GENSCRIPT BIOTECH CO LTD) 2022年12月15日 (2022 - 12 - 15) 全文	1-8

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“D” 申请人在国际申请中引证的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“p” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2024年3月25日

国际检索报告邮寄日期

2024年4月1日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

授权官员

张丽

电话号码 (+86) 010-62085020

PCT/ISA/210 表(第2页) (2022年7月)

C. 相关文件		
类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	何农跃 等. "人血清中cTnI的化学发光酶免疫分析研究——实验条件的优化" 高等学校化学学报, 第02期, 2007年3月15日 (2007 - 03 - 15), 242-245页	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2023/141325

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	103048465	A	2013年4月17日	无			
CN	103941021	A	2014年7月23日	无			
CN	104330551	A	2015年2月4日	无			
CN	104515855	A	2015年4月15日	无			
CN	111257308	A	2020年6月9日	无			
US	2022396615	A1	2022年12月15日	EP	3722311	A1	2020年10月14日
				EP	3722311	A9	2022年2月23日
				EP	3722311	A4	2022年6月8日
				WO	2019109947	A1	2019年6月13日