



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116203251 A

(43) 申请公布日 2023.06.02

(21) 申请号 202310148574.2

(22) 申请日 2023.02.22

(71) 申请人 合肥国研汉因检测科技有限公司
地址 230000 安徽省合肥市高新区创新大道2800号创新产业园二期J1栋A座14层A4-04

(72) 发明人 祝言言 方胡兵 于小利

(74) 专利代理机构 北京华创智道知识产权代理
事务所(普通合伙) 11888
专利代理师 彭随丽

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

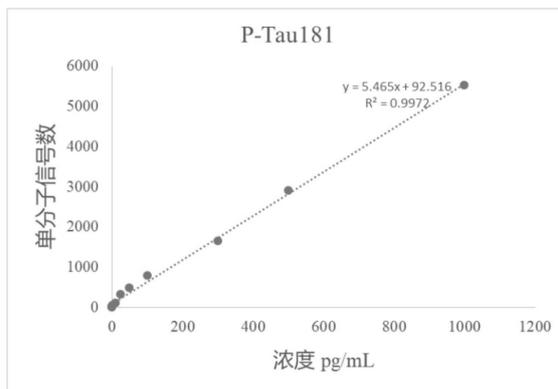
权利要求书1页 说明书12页 附图1页

(54) 发明名称

一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒

(57) 摘要

本发明属于蛋白检测技术领域,具体公开了一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,包括捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物,捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物均能够与P-Tau181和/或p-Tau217磷酸化Tau蛋白的位点结合;捕获抗体磁珠复合物包括磁珠和捕获抗体,磁珠粒径为2-3 μm;检测抗体微球复合物包括荧光微球和检测抗体;荧光微球粒径为200-400nm。本发明提供的试剂盒用于检测患者血清中P-Tau181和/或P-Tau217蛋白的表达情况,检测灵敏度可达到飞克/毫升(fg/mL)级别,线性范围可以达到0.01-1000pg/mL,检测速度快,对于鉴别阿尔兹海默症与非阿尔兹海默症,以及对于阿尔兹海默症的早期诊断具有重要意义。



1. 一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,包括捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物,捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物均能够与P-Tau181和/或p-Tau217磷酸化Tau蛋白的位点结合;捕获抗体磁珠复合物包括磁珠和捕获抗体,磁珠粒径为2-3 μm ;检测抗体微球复合物包括荧光微球和检测抗体;荧光微球粒径为200-400nm。

2. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,捕获抗体的浓度为0.05-0.3mg/mL。

3. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,根据抗体特异性特性分类,捕获抗体为多克隆抗体和单克隆抗体中的一种或两种,按照来源分类,捕获抗体为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体中的一种或两种以上。

4. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,荧光微球的材质为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯的一种或两种以上。

5. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,根据抗体特异性特性分类,检测抗体为多克隆抗体和单克隆抗体中的一种或两种,按照来源分类,检测抗体为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体中的一种或两种以上。

6. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,检测抗体浓度为0.05-0.3mg/mL。

7. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,还包括分别含有P-Tau181和/或p-Tau217磷酸化Tau蛋白的校准品和质控品,校准品用于试剂盒定标,质控品用于检测试剂盒是否稳定。

8. 根据权利要求1所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,其特征在于,还包括用于荧光微球与检测抗体偶联的标记偶联液,标记偶联液浓度为10-200mM;标记偶联液包括Tris缓冲液、磷酸缓冲液、MES缓冲液、MOPES缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上。

9. 根据权利要求1-8任一项权利要求所述的用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒的制备方法,其特征在于,包括以下步骤:

第一步、制备包被有捕获抗体磁珠复合物:

活化磁珠30-45min后,将捕获抗体和活化后的磁珠均匀混合,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;孵育结束后进行磁分离,向磁珠中加入封闭液,继续孵育,转速为800-1000rpm/min,孵育结束后进行磁分离并去除上清液;

第二步、制备检测抗体微球复合物:

活化荧光微球30-45min后,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;孵育后,将荧光微球和检测抗体均匀混合,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;加入封闭液,封闭孵育,转速为800-1000rpm/min。

一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于蛋白检测技术领域,尤其涉及一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默病(Alzheimer's disease,AD)是一种多发于65岁以上人群的神经系统退行性疾病。Tau蛋白是一种微管相关蛋白,主要分布在神经元,其次是在神经胶质细胞。正常情况下,转录后的Tau发生磷酸化修饰,有利于微管的稳定,但过度磷酸化则可导致神经组织内各种类型的细胞骨架变形、聚集,丧失正常的功能,从而导致神经退行性变。AD患者大脑中Tau蛋白过度磷酸化发生聚集导致的神经原纤维缠结是AD的标志性病理改变。

[0003] 根据磷酸位点的不同,P-Tau主要有P-Tau181、P-Tau231、P-Tau217等,检测血清中P-Tau181和P-Tau217蛋白的含量对诊断AD有着较高的临床价值。《中国阿尔兹海默病痴呆诊疗指南(2020年版)》指出,在AD鉴别诊断的常规检查流程中,应推荐血液常规、生化和血清学检查,在血液检查中P-Tau181和P-Tau217浓度可作为区分AD与非AD痴呆的生物标志物。

[0004] 目前临床上对P-Tau181和/或P-Tau217的检测方法主要有放射免疫测定法(Radioimmunoassay,RIA)、均相酶免疫检测法、酶联免疫法、高效液相色谱法、气相色谱法、气相色谱和质谱联用法(GC-MS)、化学发光和免疫层析等。放射免疫测定法所需试剂半衰期短,费用高,需要专门的设备,成本高,且具有放射性,对人体危害大,废物处理困难,有时还会出现交叉反应、假阳性反应等缺点。均相酶免疫检测法操作复杂,对操作人员要求高。酶联免疫法存在自动化程度低且操作复杂,耗时长等缺点。高效液相色谱法、气相色谱法,以及气相色谱和质谱联用法所需仪器昂贵,对试剂质量要求高,不适用于临床检验。

[0005] 对于纳米磁珠免疫检测和免疫层析检测方法,申请公开号为CN114002435A的中国发明专利申请记载采用纳米磁珠作为载体,将检测抗体与酶连接在一起,然后显色和终止,其操作复杂,耗时长,易出错,检测灵敏度低,仅在纳克/毫升(ng/mL)级别。同时,专利还记载了胶体金免疫层析检测方法,需要进行烧金,操作过程复杂。

[0006] 另外,申请公开号为CN113533746A的中国发明专利申请记载一种P-Tau蛋白化学发光检测试剂盒及其制备方法,采用化学修饰的方法将氨基和羧基修饰到磁珠表面,采用竞争法的反应原理,加入激发底物,通过检测相对光强度进行定量检测,但其灵敏度也只达到纳克/毫升级别。

发明内容

[0007] 本发明的目的在于提供一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,以至少解决上述技术问题之一。

[0008] 本发明目的之一在于提供:一种用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒,包括捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物,捕获抗体磁珠复合物和检测抗体微球复合物均能够与P-Tau181和/或p-Tau217磷酸化Tau蛋白的位点结合;捕获抗体磁珠复合物包括磁珠和捕获

抗体,磁珠粒径为2-3 μm ;检测抗体微球复合物包括荧光微球和检测抗体;荧光微球粒径为200-400nm。

[0009] Tau蛋白的氨基酸序列可以在NCBI上查询(Uniprot:P10636);具体为:Ser-Gly-Thr-Gly-Pro-Glu-Asp-Thr-Glu-Gly-Gly-Arg-His-Ala-Pro(SGTGP EDTEG GRHAP)。

[0010] P-Tau181蛋白和P-Tau217蛋白的氨基酸序列相同,但被检测位点不同,P-Tau181是检测Tau蛋白第181位苏氨酸磷酸化位点;P-Tau217是检测Tau蛋白第217位苏氨酸磷酸化位点。

[0011] 优选地,捕获抗体浓度为0.05-0.3mg/mL,优选浓度为0.1mg/mL。捕获抗体的浓度高,会出现非特异结合,磁珠团聚以及成本增加问题;捕获抗体浓度低,会出现灵敏度降低的问题。

[0012] 优选地,根据抗体特异性特性分类,捕获抗体为多克隆抗体和单克隆抗体中的一种或两种,按照来源分类,捕获抗体为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体中的一种或两种以上。当采用鼠源单克隆抗体时,捕获抗体与抗原的结合效率较佳,检测的灵敏度较佳。

[0013] 优选地,荧光微球的材质为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯的一种或两种以上,优选为聚苯乙烯微球。二氧化硅本身不易溶胀,无法将染料(荧光素)包裹在其内,荧光强度不稳定。聚丙烯酰胺偶联抗体后,其灵敏度能达到0.091ng/mL,但较聚苯乙烯偶联抗体后的灵敏度低。

[0014] 荧光微球内包裹的染料为荧光素、量子点、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白或上转换纳米粒子。采用荧光素为染料的荧光微球的荧光强度高,能与背景信号分开,有利于在最终结果分析时的信号采集,能显著提高检测的精密度。进一步优选荧光微球内包裹的染料为异硫氰酸荧光素(FITC)。

[0015] 异硫氰酸荧光素(fluorescein isothiocyanate,FITC)为黄色或橙黄色结晶粉末,易溶于水和酒精溶剂,具有高吸收率、优异的荧光量子产率和良好的水溶性,稳定性佳,与蛋白质结合力优良,并且人眼对黄绿色较为敏感,方便观察,最大吸收光波长为490-495nm,最大发射光波长为520-530nm,呈现明亮的黄绿色荧光,在冷暗干燥处也可保存多年。在大量的荧光染料中,FITC由于其高吸收性,出色的荧光量子产率和良好的水溶性而成为最受欢迎的荧光团之一。像其他荧光素衍生物一样,FITC产生可检测的信号,而无需其他试剂进行检测。该功能使FITC在检测蛋白质或抗体的位置和活化,鉴定蛋白质或抗体复合物的形成和构象变化以及监测体内生物过程方面极为灵活

[0016] 量子点是一种纳米级别的半导体,通过对量子点施加一定的电场或光压,便会发出特定频率的光,而发出的光的频率会随着这种半导体尺寸的改变而变化,因而通过调节这种纳米半导体的尺寸就可以控制其发出的光的颜色,具体原理是由于这种纳米半导体拥有限制电子和电子空穴(Electron hole)的特性。

[0017] 稀土元素是化学元素周期表中镧系元素—镧(La)、铈(Ce)、镨(Pr)、钕(Nd)、钷(Pm)、钐(Sm)、铕(Eu)、钆(Gd)、铽(Tb)、镝(Dy)、钬(Ho)、铒(Er)、铥(Tm)、镱(Yb)、镱(Lu),钇(Y)和钪(Sc),共17种元素,均是非常活泼的金属,性质极为相似,常见化合价+3,其水合离子大多有颜色,易形成稳定的配化合物。

[0018] 稀土螯合物是一些稀土元素 Sm^{3+} 、 Dy^{3+} 、 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} ,尤其是 Eu^{3+} 、 Tb^{3+} 同一些有机化合物如 β -二酮化合物、菲罗啉类化合物、水杨酸类化合物、联吡啶类化合物等所形成的螯合

物,在紫外光的照射下发出很强的荧光,最主要的特点是激发波长具有配体的特性即随配体的变化而变化,发射光的波长具有镧系元素的性质,即不随配体的变化而变化,有利于多种稀土离子标记进行多分析物同时监测。

[0019] 荧光蛋白优选为绿色荧光蛋白,绿色荧光蛋白(GFP)是一种 β -桶状蛋白1,由238个氨基酸组成,分子量约为27kDa,激发波长为488nm,并在约507nm处有一个发射峰。GFP从水晶水母Aequorea victoria分离而来,可通过能量转移,将水母发光蛋白通过化学作用发出的蓝色荧光转变为绿色荧光。

[0020] 上转换纳米颗粒(UCNP)含有无机晶体基质的晶格中有镧系元素、过渡金属或铜系元素掺杂离子,能够在受到低能量光激发的情况下,发射出高能量的光,即经波长长、频率低的光激发,材料发射出波长短、频率高的光。

[0021] 优选地,根据抗体特异性特性分类,检测抗体为多克隆抗体和单克隆抗体中的一种或两种,按照来源分类,检测抗体为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体中的一种或两种以上。

[0022] 优选地,检测抗体浓度优选为0.05-0.3mg/mL,进一步优选浓度为0.1mg/mL。检测抗体的浓度高,会出现非特异结合,荧光微球团聚以及成本增加问题;检测抗体浓度低,会出现灵敏度降低和荧光微球团聚问题。

[0023] 优选地,还包括分别含有P-Tau181和/或p-Tau217磷酸化Tau蛋白的校准品和质控品,校准品用于试剂盒定标,质控品用于检测试剂盒是否稳定。

[0024] 优选地,还包括用于荧光微球与检测抗体偶联的标记偶联液,标记偶联液浓度为10-200mM;标记偶联液包括Tris缓冲液、磷酸缓冲液、MES缓冲液、MOPES缓冲液、HEPES缓冲液、甘氨酸缓冲液中的一种或两种以上。

[0025] 荧光微球表面修饰有羧基、氨基或甲苯磺酰基中的一种或两种以上,优选修饰有羧基的荧光微球。在荧光微球上修饰羧基,有助于进一步增强信号,进一步提高灵敏度。荧光微球表面的修饰基团为羧基时,活化剂为NHS、SulfoNHS、EDC中的一种或两种以上。

[0026] 本发明目的之二在于提供上述用于检测磷酸化Tau蛋白的试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0027] 第一步、制备包被有捕获抗体磁珠复合物:

[0028] 活化磁珠30-45min后,将捕获抗体和活化后的磁珠均匀混合,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;孵育结束后进行磁分离,向磁珠中加入封闭液,继续孵育,转速为800-1000rpm/min,孵育结束后进行磁分离并去除上清液;

[0029] 第二步、制备检测抗体微球复合物:

[0030] 活化荧光微球30-45min后,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;孵育后,将荧光微球和检测抗体均匀混合,孵育1-3h,转速为800-1000rpm/min;加入封闭液,封闭孵育,转速为800-1000rpm/min。

[0031] 本发明的有益效果在于:

[0032] 1、本发明通过控制磁珠粒径、磁珠工作浓度和磁珠表面修饰基团,发现当磁珠的粒径为2-3 μ m,试剂反应背景大大减少,检测灵敏度显著提高。当磁珠的粒径为1.5 μ m时,试剂盒的检测灵敏度和准确度最佳。磁珠粒径与灵敏度有关,当磁珠粒径过大时,会出现遮挡荧光点,灵敏度下降的问题;当磁珠粒径过小时,会出现团聚,灵敏度和准确度均下降的问题。

[0033] 磁珠工作浓度越高,磁珠用量就越多,成本就会越高。当磁珠工作浓度为0.2-1mg/mL时,能够在保证提高整个试剂盒的灵敏度和准确度的同时,保证较低的生产成本。荧光微球的工作浓度为1-1.5mg/mL。荧光微球的工作浓度与成本和准确度有关,荧光微球浓度越低,其成本越低;浓度过高可能会造成非特异结合,增加清洗难度,浓度过低,可能造成信号减少,影响准确度和灵敏度。

[0034] 磁珠表面修饰有羧基、氨基和甲苯磺酰基中的一种或两种以上,优选修饰有羧基的磁珠。磁珠表面的修饰基团为羧基时,活化剂为N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)、SulfoNHS、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)中的一种或两种以上。荧光微球粒径进一步优选为150-300nm,可显著提高灵敏度和准确度。

[0035] 羧基浓度为10-35 μ eq/g,羧基浓度>35 μ eq/g,会造成非特异性反应,降低灵敏度,且抗体用量会增加,成本增加;羧基磁珠<10 μ eq/g,会造成抗体偶联量降低,导致灵敏度下降,需要增加磁珠用量,造成成本增加。优选羧基浓度为10 μ eq/g。

[0036] 2、本发明通过控制荧光微球粒径及表面修饰的基团,发现当微球粒径处于150-300nm之间时,流动速度和灵敏度较佳。荧光微球的粒径与流动速度和检测灵敏度有关,当微球粒径过大时,会出现流动速度减低,检测的灵敏度降低,当微球粒径过小时,会出现流动速度提高,使得抗原抗体无法充分结合形成双抗体夹心结构。当采用200nm羧基荧光微球检测灵敏度和准确度最佳。

[0037] 在荧光微球上修饰羧基能够实现与捕获抗体的结合,荧光微球上的羧基经活化后能与抗体上的氨基结合,形成检测抗体微球复合物。

[0038] 3、本发明通过标记偶联液的浓度及种类,发现采用50mM HEPES pH7.4的溶液时,检测抗体与荧光微球的偶联效率最高;当标记偶联液浓度过高时,偶联效率降低,当标记偶联液浓度过低时,会造成活化不充分,偶联效率降低。

[0039] 本发明研发得到的试剂盒,能够快速检测血清样本中的Tau蛋白,灵敏度高且重复性佳,使用过程简单方便,1小时即可检测出结果,试剂盒线性范围广(0.01-1000pg/mL),检测灵敏度可达到飞克/毫升(fg/mL)级别,用于检测患者血清中P-Tau181和/或P-Tau217蛋白的表达情况,对于鉴别阿尔兹海默症与非阿尔兹海默症,以及对于阿尔兹海默症的早期诊断具有重要意义。

[0040] 本发明可以用血清作为样本进行检测,样本来源简单易取,不需要进行活体穿刺即可进行检测。无需底物催化,降低假阳性率,减少污染。本发明能够实现对阿尔茨海默病进行早期筛查,可实现对血液中的标志物进行检测,无需病人的脑脊液,避免损伤病人。

[0041] 4、具体检测原理:

[0042] (1) 常规免疫荧光法采用一种固相载体包被抗体再与抗原结合,而本发明提供的试剂盒在免疫荧光法的基础上进行改进,捕获抗体磁珠复合物、检测抗体微球复合物均能与抗原结合,捕获抗体和检测抗体均能够与磷酸化Tau蛋白上的位点结合,具有一定的信号增强效果,灵敏度更高。

[0043] (2) 常规免疫荧光法多采用酶促发光,相对定量,本发明所采用的免疫荧光法通过对微球荧光点进行检测,能够实现绝对定量。

[0044] (3) 常规免疫荧光法多采用固相载体(酶标板),比表面积比液相载体(磁珠)小,结合到的抗体量少,能够识别的抗原也就相对应的减少,灵敏度低,重复性差;本发明从原理

上进行突破,与目前常用的ELISA和化学发光相比,灵敏度提高了3个数量级(从纳克/毫升级别提升到了飞克/毫升级别),通过采用信号增强的荧光纳米粒子和磁性粒子,实现高灵敏度,检测速度快,线性范围广等优点。

[0045] 5、试剂盒的制备方法中:

[0046] (1) 第一步中,当孵育时间 $>3h$,会造成磁珠团聚,孵育时间 $<1h$,孵育时间过短,会造成抗体和磁珠未完全结合,降低偶联效率,优选孵育时间为 $2h$ 。

[0047] 第二步中,当孵育时间 $>3h$,实验时间太长,长时间的偶联并不会增加偶联效率,反而会造成磁珠团聚,孵育时间 $<1h$,孵育时间过短,会造成抗体和荧光微球未完全结合,抗体偶联不充分,降低偶联效率,优选孵育时间为 $2h$ 。

[0048] (2) 加封闭液前,转速 $>1000rpm/min$,转速过快,会造成磁珠(或荧光微球)不能均匀分散,无法与抗体充分结合,偶联效率降低,转速 $<800rpm/min$,转速过慢,会造成磁珠(或荧光微球)团聚,偶联效率降低。优选转速为 $800rpm/min$,能使磁珠(或荧光微球)均匀的分散开,与抗体充分结合。加封闭液后,转速 $>1000rpm/min$,转速过快,会造成磁珠(或荧光微球)不能均匀分散,封闭液无法与磁珠(或荧光微球)未结合抗体的位点结合,封闭效率降低,后期检测会出现非特异性反应,影响灵敏度;转速 $<800rpm/min$,转速过慢,会造成磁珠(或荧光微球)团聚,封闭效率降低,加入封闭液后的优选转速为 $800rpm/min$,能使磁珠(或荧光微球)均匀的分散开,且与抗体充分结合。

[0049] (3) 当磁珠活化时间 $>45min$,活化时间过长,会导致活化形成的中间体不稳定,降低抗体的偶联效率,当磁珠活化时间 $<30min$,活化时间过短,会使的羧基活化不充分,影响后续抗体的偶联。荧光微球的活化时间为 $30-45min$ 的与磁珠相同。优选磁珠和荧光微球的活化时间均为 $30min$ 。

附图说明

[0050] 图1为实施例1中得到的标准曲线,横坐标为浓度,纵坐标为单分子信号数;

[0051] 图2为实施例29中得到的标准曲线,横坐标为浓度,纵坐标为单分子信号数。

具体实施方式

[0052] 下面通过具体实施方式进一步详细说明:

[0053] 实施例1:一种用于检测磷酸化Tau蛋白P-Tau181的试剂盒

[0054] 1、试剂盒组份

[0055] 表1试剂盒组份

组份	原料试剂	原料参数
试剂 1: 捕获抗体磁珠复合物	磁珠、磁珠偶联液、捕获抗体、EDC	磁珠粒径 1.5 μ m; 磁珠的工作浓度为 0.25mg/mL。磁珠的表面修饰有羧基, 羧基浓度为 10 μ eq/g; 捕获抗体为鼠源单克隆捕获抗体, 能够减少抗体的非特异性吸附
试剂 2: 检测抗体微球复合物	荧光微球、检测抗体、EDC、NHS、BSA 封闭液	荧光微球粒径 200nm; 荧光微球浓度 1mg/ml; 检测抗体为鼠源单克隆检测抗体, 能够减少抗体的非特异性吸附
标记偶联液、磁珠清洗液、标记保存液、BSA 封闭液等	HEPES、盐酸	浓度为 50mM 的 HEPES pH7.4 缓冲液为标记偶联液
校准品	NaCl、CaCl ₂ 、BSA、明胶、proclin300、P-Tau181 抗原	用过滤后的校准品基质将 P-Tau181 抗原作适当比例稀释, 使其浓度符合试剂测试需求, 作为 P-Tau181 抗体检测试剂盒校准品
质控品	NaCl、CaCl ₂ 、BSA、明胶、proclin300、P-Tau181 抗原	用过滤后的质控品基质将 P-Tau181 抗原作适当比例稀释, 使其浓度符合试剂测试需求, 作为 P-Tau181 抗体检测试剂盒校准品

[0057] 2、试剂盒用途:

[0058] 用于检测人体血清中磷酸化Tau蛋白P-Tau181的表达情况, 检测灵敏度可达到飞克/毫升 (fg/mL) 级别, 对于阿尔兹海默症的早期鉴别诊断具有重要意义。

[0059] 3、制备试剂盒的原料:

[0060] 表1制备试剂盒的原料

序号	名称	厂家及货号
1	羧基磁珠	购自江苏为度生物技术有限公司, 粒径为 1.5 μ m
2	磁珠清洗液 (PBST 溶液)	自制
3	P-Tau181 捕获抗体/检测抗体	迈川 (广州) 生物科技有限公司, AB1032
4	P-Tau181 抗原	迈川 (广州) 生物科技有限公司, AG3001
5	1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐 (EDC)	英潍捷基 (上海) 贸易有限公司, PG82079
6	标记偶联液 (50mM HEPES, pH=7.4)	自制
[0061] 7	标记保存液 (0.9%NaCl、0.2%FBS 溶于 50mM PBS, pH=7.4)	自制
8	标记缓冲液 (pH7.4)	自制
9	荧光微球	江苏为度生物技术有限公司, FG0100CA/FG0200CA
10	N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, 56485
11	磁珠偶联液 (0.1M MES 缓冲液)	自制
12	酪蛋白封闭液	阿拉丁, S304898
13	BSA 封闭液 (0.1%BSA 溶于 20mM PBS, pH =7.4)	西格玛奥德里奇 (上海) 贸易有限公司, A1933

[0062] 4、用于检测磷酸化Tau蛋白P-Tau181的试剂盒的制备方法,包括以下步骤:

[0063] 第一步、制备试剂1:P-Tau181捕获抗体磁珠复合物:

[0064] (1)取100 μ l 3mg/mL羧基磁珠(粒径1.5 μ m,工作浓度为0.25mg/mL),使用磁珠偶联液清洗3次,移除磁珠偶联液。磁珠偶联液的配制方法:21.32g MES于烧杯中,加入800mL纯化水搅拌至溶解,用盐酸调节pH值至6.0,倒入容量瓶中定容至1L,置于4 $^{\circ}$ C保存。磁珠偶联液用于使磁珠上的羧基处于易于修饰的状态。

[0065] (2)称取EDC和NHS,分别配制成浓度为20mg/ml的活化溶液,加入到(1)中,25 $^{\circ}$ C下,恒温摇床上活化30min。

[0066] (3)取0.1mg的P-Tau181捕获抗体(0.1mg/mL),加入到(2)的羧基磁珠中,混合均匀,在25 $^{\circ}$ C下恒温摇床,孵育2h,转速800rpm/min。本实施例优选采用P-Tau181鼠源单克隆捕获抗体,能够减少抗体的非特异性吸附。

[0067] (4)孵育结束后,加入20mM PBS缓冲液清洗,在涡旋仪上混匀后置于磁力架上进行磁分离,再用磁珠清洗液清洗羧基磁珠3次。

[0068] (5)向羧基磁珠中加入100 μ l 10mg/ml的酪蛋白封闭液,于恒温摇床上孵育1h,转速800rpm/min,磁分离后去除上清液。

[0069] (6) 加入封闭液, P-Tau181捕获抗体磁珠复合物的储存浓度为2mg/mL, 工作浓度为0.2mg/mL, 4℃保存。

[0070] 第二步、制备试剂2:P-Tau181检测抗体微球复合物:

[0071] (1) 取200 μ l羧基修饰的荧光微球(粒径200nm, 工作浓度1mg/mL), 使用标记偶联液清洗3次, 12000rpm离心15min。羧基浓度为60 μ mol/g。标记偶联液配制方法: 称取HEPES于烧杯中, 加入800mL纯化水搅拌至溶解, 用盐酸调节pH值至7.4, 倒入容量瓶中定容至1L, 浓度为50mM, 置于4℃保存。标记偶联液主要用于荧光微球羧基的活化和抗体的偶联。

[0072] (2) 称取EDC和NHS, 浓度溶解成15mg/ml, 加到(1)溶液中。25℃下, 滚轴孵育器上活化30min。本实施例优选选择EDC和NHS两步法活化, 提高抗体偶联效率, 避免活化中间体的失活。

[0073] (3) 取0.05mg的P-Tau181检测抗体(0.1mg/mL), 加入到(2)的荧光微球中, 混合均匀, 在25℃下, 滚轴孵育器上孵育2h, 转速800rpm/min。

[0074] (4) 加入100 μ l 20mg/ml的BSA封闭液, 于滚轴孵育器上孵育1h, 转速800rpm/min。BSA封闭液配制方法: 称取1g的BSA(0.1%牛血清白蛋白)于烧杯中, 加入20mM PBS(pH7.4)搅拌置溶解, 倒入容量瓶中定容至1L, 置于4℃保存。

[0075] (5) 封闭结束后, 18000rpm离心20min, 加入标记保存液4℃保存, 得到P-Tau181检测抗体微球复合物的储存浓度为1mg/mL, 工作浓度为0.1mg/mL。标记保存液的配制方法: 称取9g的NaCl(氯化钠)和2g的FBS(胎牛血清)于烧杯中, 加入50mM PBS(pH7.4)搅拌置溶解, 倒入容量瓶中定容至1L, 得到2%加入封闭液, 置于4℃保存。标记保存液用于保存检测抗体微球复合物。

[0076] 第三步、制备校准品

[0077] (1) 配制校准品基质: 20mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, 0.5%BSA, 0.1%明胶和0.01% proclin300。

[0078] (2) 配制校准品基质后, 用0.22 μ m微孔滤膜过滤, 微孔滤膜的孔过大会导致大粒径的杂质过滤不掉, 起不到过滤作用, 微孔滤膜的孔过小会将溶液中的有效物质过滤出去。

[0079] 用过滤后的校准品基质将P-Tau181抗原作适当比例稀释, 使其浓度符合试剂测试需求, 作为P-Tau181抗体检测试剂盒校准品, 例如可稀释成0pg/mL、10pg/mL和500pg/mL, 分别对应校准品1、校准品2和校准品3。

[0080] 第四步、制备质控品

[0081] (1) 配制质控品基质: 20mM NaCl, 0.1mM CaCl₂, 0.5%BSA, 0.1%明胶和0.01% proclin300。

[0082] (2) 配制质控品基质后, 用0.22 μ m微孔滤膜过滤。用过滤后的质控品基质将P-Tau181抗原作适当比例稀释, 使其浓度符合试剂测试需求, 作为P-Tau181抗体检测试剂盒质控品, 例如可稀释成20pg/mL和400pg/mL, 分别对应质控品1和质控品2。

[0083] 5、用于检测磷酸化Tau蛋白P-Tau181的试剂盒的检测方法, 包括以下步骤:

[0084] (1) 将P-Tau181的抗原浓度用标记缓冲液分别稀释为0、0.1、1、10、25、50、100、300、500以及1000pg/mL; 1%标记缓冲液的配制方法: 称取1g的BSA(0.1%牛血清白蛋白)于烧杯中, 加入20mM PBS(pH 7.4)搅拌置溶解, 倒入容量瓶中定容至1L, 置于4℃保存。血液样本与标记缓冲液的比例优选为1:2-1:8。标记缓冲液用于稀释血液样本。

[0085] (2)取40 μ l试剂1加入到反应杯中,再加入5 μ l血液样本(此过程相当于对血液样本的稀释),每个校准品浓度取5 μ l到不同反应杯中,分别取40 μ l试剂1加入到反应杯中,在25 $^{\circ}$ C下,恒温摇床上孵育30min。此过程为捕获抗体与抗原进行识别结合。

[0086] (3)孵育结束后,使用20mM PBS缓冲液清洗3次,清洗主要是去除多余的抗原;分别加50 μ l试剂2加入到反应杯中,在25 $^{\circ}$ C下,恒温摇床上孵育30min。此过程为检测抗体与抗原进行识别结合,最终形成双抗体夹心结构。

[0087] (4)将步骤(3)中孵育结束的磁珠,用20mM PBS缓冲液清洗3次后,清洗主要是去除多余的检测抗体,再用加入封闭液重悬磁珠。

[0088] (5)样品检测分析

[0089] 从步骤(4)中取10 μ l液体,加入微流控芯片中,置于单分子荧光免疫分析仪中,完成样品的检测和结果分析。每个浓度点重复10次,根据结果绘制标准曲线,计算每个点的CV值(%)。

[0090] 实施例2-7

[0091] 实施例2-7与实施例1的区别主要在于磁珠粒径和磁珠工作浓度,测试实施例1-7灵敏度(检测下限)和CV值(%),具体如下表2所示。实施例1拟合的校准曲线斜率见图1。

[0092] 表2实施例2-7与实施例1的区别

	实施例1	实施例2	实施例3	实施例4	实施例5	实施例6	实施例7
[0093] 磁珠粒径 (μ m)	1.5	2.7	2	1	3	3	3
磁珠工作浓度 (mg/mL)	0.2	0.25	0.25	0.25	0.5	0.75	1
磁珠羧基浓度 (nmol/mg)	10	10	10	10	10	10	10
灵敏度 (pg/mL)	0.01	0.08	0.14	0.96	0.091	0.46	0.75
CV值 (%)	2	3	4	6	5	3	2

[0094] 注:CV值(%)主要反应数据的离散程度,越小越佳,3%以下最佳。

[0095] 图1为实施例1中得到的标准曲线,横坐标为浓度,纵坐标为单分子信号数。可以根据图1标准曲线查出待测物质的含量。 R^2 是指一系列已知含量(浓度/量)的物质与仪器响应/信号之间的关系, R^2 越接近1,相关性越佳。实施例1-7中,实施例1制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度最小。

[0096] 实施例8-17

[0097] 实施例8-17与实施例1的主要区别在于微球粒径和微球工作浓度,测试实施例8-17灵敏度和CV值(%),具体如下表3所示:

[0098] 表3实施例8-17的主要区别

	实施例8	实施例9	实施例10	实施例11	实施例12	实施例13	实施例14	实施例15	实施例16	实施例17
[0099] 微球粒径 (nm)	200	300	200	200	200	200	200	200	200	200

[0100]	微球工作浓度(mg/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	微球羧基浓度($\mu\text{mol/g}$)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
	标记偶联液(pH7.4)	50mM HEPES	50mM HEPES	20mM 硼酸-硼砂	20mM Tris	20mM PBS	20mM MOPEs	20mM HEPES	100mM HEPES	20mM MES	0.1M MES
	灵敏度(pg/mL)	0.012	0.094	1	100	50	10	0.1	1	3	5
	CV值(%)	2	3	6	8	6	9	4	3	5	4

[0101] 实施例8-17中,实施例8制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度最小。

[0102] 实施例18-28

[0103] 实施例18-28与实施例1的主要区别在于检测抗体浓度,样本与标记缓冲液比例,测试实施例18-28灵敏度和CV值(%),具体如下表4所示:

[0104] 表4实施例18-28的主要区别

	实施 例 18	实施 例 19	实施 例 20	实施 例 21	实施 例 22	实施 例 23	实施 例 24	实施 例 25	实施 例 26	实施 例 27	实施 例 28
[0105]	检测抗体浓度(mg/mL)	0.05	0.08	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	样本与标记缓冲液比例	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6
	灵敏度	1	0.9	0.01	0.025	1	3	0.012	0.54	0.075	5
	CV值(%)	4	5	3	3	2	5	5	2	3	6

[0106] 实施例18-28中,实施例20制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度较小。

[0107] 实施例29-一种用于检测磷酸化Tau蛋白P-Tau217的试剂盒

[0108] 本实施例与实施例1的区别仅在于检测是用于检测人体血清中磷酸化Tau蛋白P-Tau217的表达情况,检测灵敏度可达到飞克/毫升(fg/mL)级别,对于阿尔兹海默症的早期鉴别诊断具有重要意义。

[0109] 试剂盒的主要组成成分、用途、检测原理、制备方法、检测方法与实施例1基本相同。

[0110] P-Tau217捕获抗体/检测抗体购买自迈川(广州)生物科技有限公司,货号为AB1034.P-Tau217抗原购买自迈川(广州)生物科技有限公司,货号为AG3002。

[0111] 实施例30-35

[0112] 实施例30-35与实施例29的主要区别在于微球粒径和微球工作浓度,测试实施例29-35灵敏度和CV值(%),具体如下表5所示:实施例29拟合的校准曲线斜率见图2。

[0113] 表5实施例29-35的主要区别

	实施例 29	实施例 30	实施例 31	实施例 32	实施例 33	实施例 34	实施例 35
[0114] 磁珠粒径 (μm)	1.5	2.7	1.6	1	3	3	3
磁珠工作浓度 (mg/mL)	0.2	0.25	0.25	0.25	0.5	0.75	1
磁珠羧基浓度 (nmol/mg)	10	10	10	10	10	10	10
灵敏度 (pg/mL)	0.01	0.08	0.14	0.96	0.091	0.46	0.75
CV 值 (%)	3	3	4	6	5	3	2

[0115] 实施例29-35中,实施例29制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度较小。

[0116] 磁珠羧基浓度是指一个磁珠表面修饰的羧基官能团的浓度,不同的磁珠粒径,羧基的含量也不同。

[0117] 实施例36-45

[0118] 实施例36-45与实施例35的主要区别在于微球粒径和微球工作浓度,测试实施例36-45灵敏度和CV值(%),具体如下表6所示:

[0119] 表6实施例36-45的主要区别

	实施 例 36	实施 例 37	实施 例 38	实施 例 39	实施 例 40	实施 例 41	实施 例 42	实施 例 43	实施 例 44	实施 例 45
[0120] 微球粒径 (nm)	200	400	200	200	200	200	200	200	200	200
微球工作 浓 度 (mg/mL)	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

[0121] 微球羧基 浓 度 ($\mu\text{mol/g}$)	60	60	60	60	60	60	60	60	60	60
标记偶联 液($\text{pH}6.0$)	50mM HEPE S	50mM HEPE S	20m M 硼 酸-硼 砂	20m M Tris	20m M PBS	20mM MOPE S	20mM HEPE S	100m M HEPE S	20m M MES	0.1 M ME S
灵 敏 度 (pg/mL)	0.012	0.094	1	100	50	10	0.1	1	3	5
CV 值(%)	2	3	6	8	6	9	4	3	5	4

[0122] 实施例36-45中,实施例36制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度较小。

[0123] 实施例46-56

[0124] 实施例46-56与实施例35的主要区别在于抗体浓度和样本与缓冲液比例,测试实施例46-56灵敏度和CV值(%),具体如下表7所示:

[0125] 表7实施例46-56的主要区别

	实施 例 46	实施 例 47	实施 例 48	实施 例 49	实施 例 50	实施 例 51	实施 例 52	实施 例 53	实施 例 54	实施 例 55	实施 例 56
[0126] 抗体浓度 (mg/mL)	0.05	0.08	0.1	0.2	0.3	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
样本与标记 缓冲液比例	1:8	1:8	1:8	1:8	1:8	1:2	1:3	1:4	1:5	1:6	1:7
灵敏度	1.5	1	0.011	0.025	1.1	3	0.015	0.44	0.065	6	3
CV 值 (%)	4	5	3	3	2	5	5	2	3	6	3

[0127] 实施例46-56中,实施例48制备试剂盒的灵敏度最佳,且数据离散程度较小。

[0128] 实施例1-56中,实施例1、实施例20、实施例36、实施例48制备试剂盒的灵敏度均较佳,其中实施例1最佳。

[0129] 以上详细描述了本发明的较佳具体实施例。应当理解,本领域的普通技术人员无需创造性劳动就可以根据本发明的构思作出诸多修改和变化。因此,凡本技术领域中技术人员依本发明的构思在现有技术的基础上通过逻辑分析、推理或者有限的实验可以得到的技术方案,皆应在由权利要求书所确定的保护范围内。

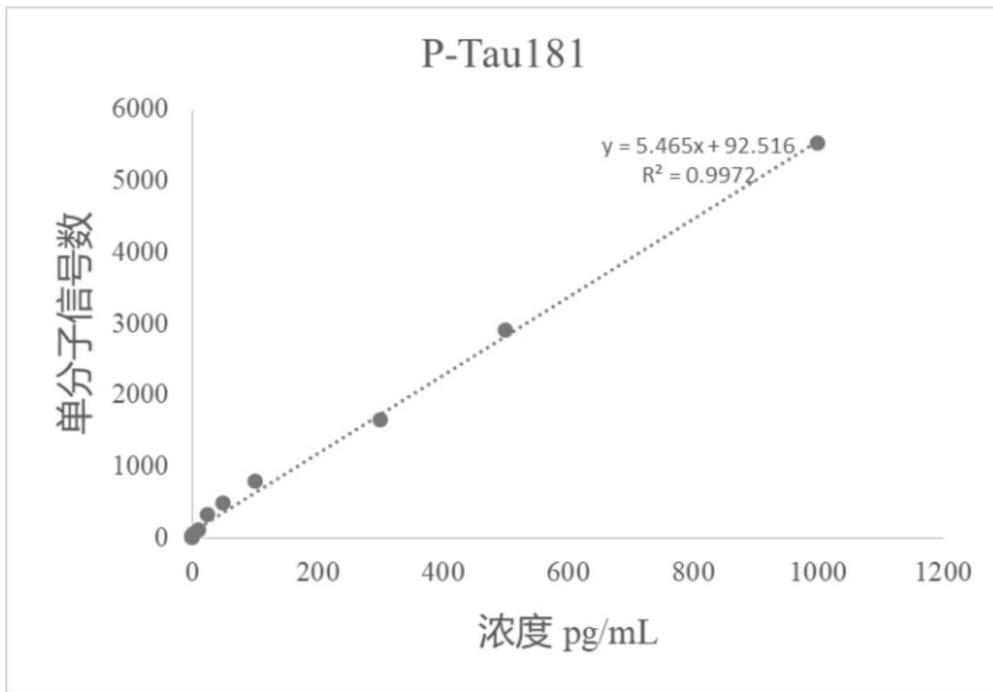


图1

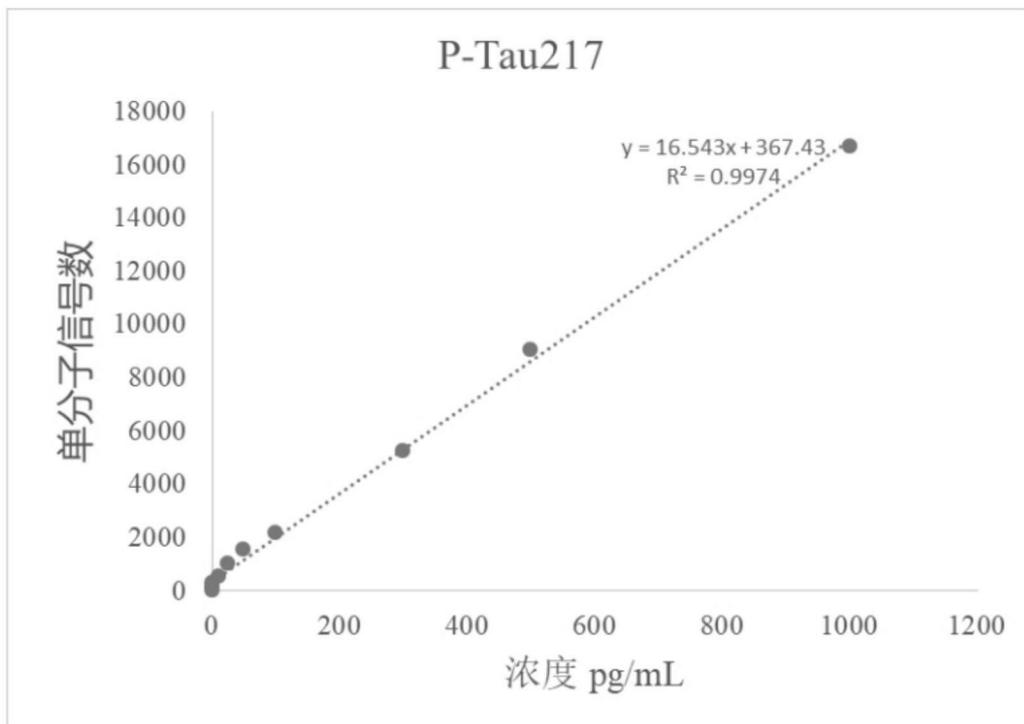


图2