



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118294648 A

(43) 申请公布日 2024.07.05

(21) 申请号 202410723316.7

(22) 申请日 2024.06.05

(71) 申请人 亿航(苏州)生物医药有限公司  
地址 215000 江苏省苏州市工业园区金鸡湖大道88号人工智能产业园E2-201室

(72) 发明人 李振韬 赵海涛 陈卓 张欢欢  
刘云飞

(74) 专利代理机构 苏州锦尚知识产权代理事务所(普通合伙) 32502  
专利代理师 滕锦林

(51) Int. Cl.  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/533 (2006.01)  
G01N 33/543 (2006.01)

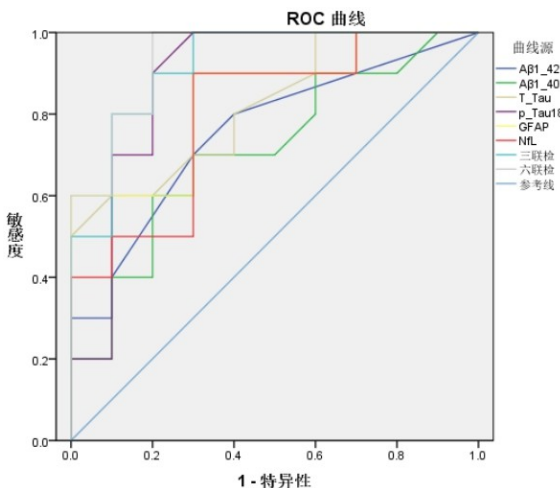
权利要求书2页 说明书19页 附图1页

(54) 发明名称

阿尔兹海默症标志物检测试剂盒及其方法

(57) 摘要

本发明涉及阿尔兹海默症标志物检测试剂盒及其方法,试剂盒包括第一试剂、第二试剂、链霉亲和素-藻红蛋白;所述第一试剂包括分别偶联了 $A\beta$  1-42、 $A\beta$  1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL捕获抗体的微球以及第一缓冲液,第二试剂包括生物素标记的检测抗体以及第二缓冲液;所述检测抗体分别抗一种相应的阿尔兹海默症标志物且对应于捕获抗体;所述第二缓冲液中含有0.1wt%~1wt%酪蛋白以及5 vol%~15 vol%动物血清。本发明的试剂盒具有高灵敏度、稳定性好、重复性好、高通量性、检测快速、准确等优点,能够对多种阿尔兹海默症相关蛋白标志物同时进行定性和定量检测。



1. 一种阿尔兹海默症标志物检测试剂盒,其特征在於,所述检测试剂盒包括第一试剂、第二试剂、链霉亲和素-藻红蛋白;

所述第一试剂包括偶联了不同捕获抗体的微球以及第一缓冲液;所述偶联了不同捕获抗体的微球含有偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体的微球、偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体的微球、偶联了微管相关Tau蛋白捕获抗体的微球、偶联了磷酸化的tau181捕获抗体的微球、偶联了胶质纤维酸性蛋白捕获抗体的微球和偶联了神经丝轻链蛋白捕获抗体的微球;

所述第二试剂包括生物素标记的检测抗体以及第二缓冲液;所述检测抗体分别抗一种相应的阿尔兹海默症标志物且对应于捕获抗体;所述第二缓冲液中含有0.1wt%~1wt%酪蛋白以及5 vol%~15 vol%动物血清。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在於,所述酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.5 wt%;  
和/或,所述动物血清的浓度为8 vol%~12vol%;  
和/或,所述动物血清为羊血清和/或牛血清。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在於,所述第二缓冲液中还含有0.1 wt%~10 wt%氯化钠以及0.05 vol%~1 vol%普罗克林300;

和/或,所述第一缓冲液中含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白、0.05~10 vol%普罗克林300;

和/或,所述第一缓冲液、所述第二缓冲液均为磷酸盐缓冲液。

4. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在於,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体和磷酸化的tau181检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~1 $\mu$ g/ml;

和/或,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、微管相关Tau蛋白检测抗体、胶质纤维酸性蛋白检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~0.5 $\mu$ g/ml;

和/或,所述第二试剂中生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体的工作浓度为0.5~2 $\mu$ g/ml。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在於,所述第一试剂中 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体、微管相关Tau蛋白捕获抗体、胶质纤维酸性蛋白捕获抗体和神经丝轻链蛋白捕获抗体的工作浓度分别且独立的为0.5~2 $\mu$ g/ml;

和/或,所述第一试剂中磷酸化的tau181捕获抗体的工作浓度为1~5 $\mu$ g/ml。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒还包括稀释缓冲液,所述稀释缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白、0.1 wt%~0.5 wt%酪蛋白、0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20、0.05 vol%~10 vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

7. 根据权利要求1~6中任一项所述的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒进一步包括反应缓冲液以及清洗缓冲液;

其中,所述反应缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.05 vol%~10 vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液;

所述清洗缓冲液为含有0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

8. 根据权利要求1~7中任一项所述的试剂盒在制备阿尔兹海默症标志物的检测产品中的应用。

9. 权利要求1~7中任一项所述的试剂盒的使用方法,其特征在於,所述方法包括:

(1) 在检测管中加入反应缓冲液、第一试剂和待测样本;

(2) 向步骤(1)的体系中加入第二试剂, 孵育;

(3) 向步骤(2)的体系中加入链霉亲和素-藻红蛋白, 孵育;

(4) 向步骤(3)的体系中加入清洗缓冲液, 离心, 取沉淀重悬, 检测荧光强度。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其特征在于, 步骤(1)中所述反应缓冲液、第一试剂和待测样本的体积比为1:(0.1~1):(0.5~2);

和/或, 所述步骤(2)中所述孵育的时间为12~24小时;

和/或, 所述步骤(3)中所述孵育的时间为0.2~1小时;

和/或, 所述步骤(2)和步骤(3)中所述孵育均在避光条件下进行。

## 阿尔兹海默症标志物检测试剂盒及其方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及体外诊断检测技术领域,特别是涉及一种阿尔兹海默症标志物检测试剂盒及其方法。

### 背景技术

[0002] 阿尔兹海默病(Alzheimer disease,AD)是一种中枢神经系统的退行性病变。目前其诊断需要进行大量的测试包括:医疗史、精神状态评估、神经心理学评估、脑核磁共振、脑脊液检查。疗史、精神状态评估、神经心理学评估受患者主观因素影响较大,并且在早期阶段难以识别,很容易被误诊。在相关的临床研究中,主要依赖于PET扫描或脑脊液检测确认A $\beta$ 病理的存在,但脑核磁共振和脑脊液检查费用较高,并且脑核磁共振由于其存在一定辐射危害,无法作为常规得检查手段,脑脊液检查需要侵入性采样手段,其成本高昂、高度依赖于专业人员,甚至有一定的侵入性,在临床实践中,难以大规模推广。血液样本采集为微创伤害性、快速、价格经济,且部分血液生物标志物在AD临床症状出现前即已发生显著变化,由此检测血液生物标志物可作为筛查AD早期患者的理想手段。

[0003] 目前,在我国境内上市的阿尔兹海默诊断试剂盒较少,且大都是基于传统酶联免疫原理的方法。但基于传统免疫检测方法—酶联免疫法的诊断试剂盒产品普遍存在检测灵敏度差以及重复性差的问题,难以实现稳定检测。

[0004] 液相芯片技术(xMAP)是一种可广泛应用于蛋白质、基因、受体/配体等多种生物反应的生物芯片技术平台,主要包括微球、探针分子、被检测物和报告分子四种成分。但基于液相芯片技术的检测AD试剂盒的检测敏感性、特异性、稳定性以及重复性仍有待提高。

### 发明内容

[0005] 发明要解决的问题

本发明的目的是提供一种检测阿尔兹海默病外周血蛋白标志物的诊断试剂盒及其检测方法,该检测方法及试剂盒包括针对 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42(A $\beta$ 1-42)、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40(A $\beta$ 1-40)、微管相关Tau蛋白(T-Tau)、磷酸化的tau181(p-Tau-181)、胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经丝轻链蛋白(NfL)等六种AD标志物的联合并行检测,具有高灵敏度、高特异性、稳定性好、检测迅速、重复性好以及线性范围广等优点。

[0006] 用于解决问题的方案

本发明第一个目的在于提供一种阿尔兹海默症标志物检测试剂盒,所述检测试剂盒包括第一试剂、第二试剂、链霉亲和素-藻红蛋白;

所述第一试剂包括偶联了不同捕获抗体的微球以及第一缓冲液;所述偶联了不同捕获抗体的微球含有偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体的微球、偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体的微球、偶联了微管相关Tau蛋白捕获抗体的微球、偶联了磷酸化的tau181捕获抗体的微球、偶联了胶质纤维酸性蛋白捕获抗体的微球和偶联了神经丝轻链蛋白捕获抗体的微球;

所述第二试剂包括生物素标记的检测抗体以及第二缓冲液；所述检测抗体分别抗一种相应的阿尔兹海默症标志物且对应于捕获抗体；所述第二缓冲液中含有0.1wt%~1wt%酪蛋白以及5 vol %~15 vol%动物血清。

[0007] 优选地，所述酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.5 wt%，优选为0.1 wt%~0.3 wt%，更优选为0.2 wt%。

[0008] 优选地，所述动物血清的浓度为8 vol%~12 vol%，优选为10 vol%。

[0009] 优选地，所述动物血清为羊血清和/或牛血清，优选为羊血清。

[0010] 优选地，所述第二缓冲液中还含有0.1wt%~10wt%氯化钠以及0.05 vol%~1 vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0011] 优选地，所述第一缓冲液中含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白、0.05 vol%~10 vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0012] 优选地，所述第一缓冲液、所述第二缓冲液均为磷酸盐缓冲液。

[0013] 优选地，所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体和磷酸化的tau181检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~1 $\mu$ g/ml，优选为0.3~0.8 $\mu$ g/ml，更优选为0.5 $\mu$ g/ml。

[0014] 优选地，所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、微管相关Tau蛋白检测抗体、胶质纤维酸性蛋白检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~0.5 $\mu$ g/ml；优选为0.1~0.3 $\mu$ g/ml，更优选为0.25 $\mu$ g/ml。

[0015] 优选地，所述第二试剂中生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体的工作浓度为0.5~2 $\mu$ g/ml，优选为0.5~1.5 $\mu$ g/ml，更优选为1 $\mu$ g/ml。

[0016] 优选地，所述第一试剂中 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体、微管相关Tau蛋白捕获抗体、胶质纤维酸性蛋白捕获抗体和神经丝轻链蛋白捕获抗体的工作浓度分别且独立的为0.5~2 $\mu$ g/ml，优选为0.5~1.5 $\mu$ g/ml，更优选为1 $\mu$ g/ml。

[0017] 优选地，所述第一试剂中磷酸化的tau181捕获抗体的工作浓度为1~5 $\mu$ g/ml，优选为1~3 $\mu$ g/ml，更优选为2 $\mu$ g/ml。

[0018] 优选地，所述试剂盒还包括稀释缓冲液，所述稀释缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白、0.1wt%~0.5wt%酪蛋白、0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20、0.05 vol%~10 vol%普罗克林300(Proclin 300)的磷酸盐缓冲液。

[0019] 优选地，所述稀释缓冲液中酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.3 wt%，优选为0.2 wt%。

[0020] 优选地，所述试剂盒进一步包括反应缓冲液以及清洗缓冲液。

[0021] 优选地，所述反应缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.05 vol%~10 vol%普罗克林300(Proclin 300)的磷酸盐缓冲液。

[0022] 优选地，所述清洗缓冲液为含有0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

[0023] 本发明的第二个目的在于根据上述任一项所述的试剂盒在制备阿尔兹海默症标志物的检测产品中的应用。

[0024] 本发明的第三个目的在于提供上述任一项所述的试剂盒的使用方法，所述方法包括：

- (1) 在检测管中加入反应缓冲液、第一试剂和待测样本；
- (2) 向步骤(1)的体系中加入第二试剂，孵育；

(3) 向步骤(2)的体系中加入链霉亲和素-藻红蛋白, 孵育;

(4) 向步骤(3)的体系中加入清洗缓冲液, 离心, 取沉淀重悬, 检测荧光强度。

[0025] 优选地, 步骤(1)中所述反应缓冲液、第一试剂和待测样本的体积比为1:(0.1~1):(0.5~2)。

[0026] 优选地, 所述步骤(2)中所述孵育的时间为12~24小时。

[0027] 优选地, 所述步骤(3)中所述孵育的时间为0.2~1小时。

[0028] 优选地, 所述步骤(2)和步骤(3)中所述孵育均在避光条件下进行。

[0029] 发明的效果

本发明通过优化抗体偶联工艺、微球包被工艺及缓冲液体系优化, 解决了传统流式荧光检测中存在多标志物检测灵敏度低、重复性差以及稳定性差的问题。本发明通过利用6种蛋白标志物蛋白丰度偶联建模, 实现其临床样本分型、阿尔兹海默症早诊以及及时治疗以改善患者生存质量之目的, 同时避免患者认知损伤。本发明方法具有快速、准确、灵敏度高、重复性好、稳定性好等优点。

## 附图说明

[0030] 图1为本发明6种蛋白单靶和联合检测模型的ROC曲线分析图。

## 具体实施方式

[0031] 为使本发明的技术方案和有益效果能够更加明显易懂, 下面通过列举具体实施例的方式进行详细说明。除非另有定义, 本文所使用的技术和科学术语与本申请所属的技术领域中的技术和科学术语的含义相同。

[0032]  $A\beta 1-42$ 、 $A\beta 1-40$ 和P-Tau是目前国内外被广泛认可的AD生物标志物。血浆 $A\beta 1-42$ 含量与 $A\beta 1-42/A\beta 1-40$ 比率反映了大脑中的 $A\beta$ 病理情况, 能用于早期评估AD痴呆和轻度认知功能障碍的患病风险。Tau蛋白是微管相关蛋白, 在中枢神经系统的神经元中含量很高, 主要功能是调节轴突微管的稳定性。血浆T-Tau作为克罗伊茨费尔特-雅各布病和额颞叶痴呆的重要预测因子。血浆p-Tau-181水平可以反应AD中 $A\beta$ 与tau的病理情况, 区分阿尔兹海默病与其他神经退行性疾病(如帕金森病和血管性痴呆等), 并在整个临床进程中监测AD患者的病情进展。胶质纤维酸性蛋白(GFAP)和神经丝轻链蛋白(NfL)被认为是对于AD病理非常重要的非特异标志物。其中GFAP是星形细胞活化的标志物, 该标志物异常与更高的痴呆发病风险和更快的认知能力下降率有关。而NfL是一种轴索损伤的标志物, 在临床上用于各种疾病, 包括多发性硬化症、ALS和创伤性脑损伤。

[0033] 流式荧光技术是继化学发光技术以后的革新高通量荧光诊断技术, 其灵敏度远远超过传统的化学发光技术, 俗称“液相芯片”技术, 可广泛用于肿瘤免疫、自身免疫筛查以及HPV基因全分型筛查等众多领域。区别于传统免疫检测的流式荧光技术, 其利用荧光编码微球技术与鞘流技术, 可极大程度提高检测的灵敏度, 标记PE的编码微球在鞘流作用下依次通过检测管, 用不同波长的光同时激发编码微球和PE, 通过分别检测微球编码的激发光和PE表征的信号值, 对不同编码微球分别统计信号, 实现多项目联检。其低样本量、高灵敏度、高选择性和高通量性能使其成为阿尔兹海默病理想的诊断工具。

[0034] 基于此, 本发明基于流式荧光技术, 试剂盒中含有荧光强度不同(编号不同)的微

球,即包括6种偶联了捕获抗体的微球,包被 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42(A $\beta$ 1-42)捕获抗体的微球、包被了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40(A $\beta$ 1-40)捕获抗体的微球、包被了微管相关Tau蛋白(T-Tau)捕获抗体的微球、包被了磷酸化的tau181(p-Tau-181)捕获抗体的微球、包被了胶质纤维酸性蛋白(GFAP)捕获抗体的微球和包被了神经丝轻链蛋白(NfL)捕获抗体的微球。待测样本中的A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL与捕获微球、生物素标记检测抗体特异性结合后,形成双抗夹心复合物(捕获微球-待测样本-检测抗体),再与加入的藻红蛋白标记的链霉素亲和素(SA-PE)反应,通过分析复合物的荧光强度并配合标准曲线,得到待测样本的A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL的含量。

[0035] 在本申请中,同一种荧光强度的微球表面包被同一种特异性抗体。

[0036] 本发明第一个目的在于提供一种阿尔兹海默症标志物检测试剂盒,所述检测试剂盒包括第一试剂、第二试剂、链霉亲和素-藻红蛋白;

所述第一试剂包括偶联了不同捕获抗体的微球以及第一缓冲液;所述偶联了不同捕获抗体的微球含有偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体的微球、偶联了 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体的微球、偶联了微管相关Tau蛋白捕获抗体的微球、偶联了磷酸化的tau181捕获抗体的微球、偶联了胶质纤维酸性蛋白捕获抗体的微球和偶联了神经丝轻链蛋白捕获抗体的微球;

所述第二试剂包括生物素标记的检测抗体以及第二缓冲液;所述检测抗体分别抗一种相应的阿尔兹海默症标志物且对应于捕获抗体;所述第二缓冲液中含有0.1wt%~1wt%酪蛋白以及5 vol%~15 vol%动物血清。

[0037] 所述生物素标记的检测抗体含有生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体、生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、生物素标记的微管相关Tau蛋白检测抗体、生物素标记的磷酸化的tau181检测抗体、生物素标记的胶质纤维酸性蛋白检测抗体和生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体。

[0038] 在本发明中所述捕获抗体和对应的检测抗体分别结合同一抗原的不同抗原表位。其中,所述的捕获抗体和检测抗体是针对以下6种AD标志物的捕获抗体和检测抗体:A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL。

[0039] 在本申请中对SA-PE不做限制,可以使用商品化的产品,例如本申请的SA-PE购于赛默飞公司,货号S866。

[0040] 在某种实施方式中,所述酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.5 wt%,例如0.1 wt%、0.15 wt%、0.2 wt%、0.25 wt%、0.3 wt%、0.35 wt%、0.4 wt%、0.45 wt%、0.5 wt%等。

[0041] 在某种实施方式中,所述酪蛋白的浓度为0.1wt%~0.3wt%。

[0042] 在某种实施方式中,所述酪蛋白的浓度为0.2 wt%。

[0043] 在某些实施方式中,所述动物血清的浓度为8 vol %~12 vol%,例如8.5 vol%、9 vol%、9.5 vol%、10 vol%、10.5 vol%、11 vol%、11.5 vol%等。

[0044] 在某些实施方式中,所述动物血清的浓度为10 vol%。

[0045] 在某些实施方式中,所述动物血清为羊血清和/或牛血清。

[0046] 在某些实施方式中,所述动物血清为羊血清。

[0047] 在某些实施方式中,所述第二缓冲液中还含有0.1wt%~10wt%氯化钠(例如0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.5 wt%、2

wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%等)以及0.05 vol%~1 vol%普罗克林300(例如0.05 vol %、0.06 vol %、0.07 vol %、0.08 vol %、0.09 vol %、0.1 vol %、0.15 vol %、0.2 vol %、0.25 vol %、0.3 vol %、0.4vol %等)。

[0048] 在某些实施方式中,所述第二缓冲液中还含有0.5wt%~1wt%氯化钠以及0.05 vol%~0.5 vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0049] 在某些实施方式中,所述第二缓冲液中还含有0.9wt%氯化钠以及0.1vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0050] 在某些实施方式中,所述第一缓冲液中含有0.1wt%~10wt%氯化钠(例如0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.5 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%等)、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白(例如0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.5 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%等)、0.05vol%~10 vol%普罗克林300(例如0.05 vol %、0.06 vol %、0.07 vol %、0.08 vol %、0.09 vol %、0.1 vol %、0.15 vol %、0.2 vol %、0.25 vol %、0.3 vol %、0.4vol %、1 vol %、2 vol %、3 vol %、4 vol %、5 vol %等)。

[0051] 在某些实施方式中,所述第一缓冲液中含有0.5wt%~1wt%氯化钠、0.1wt%~5wt%牛血清白蛋白、0.05 vol %~0.5vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0052] 在某些实施方式中,所述第一缓冲液中含有0.9wt%氯化钠、1wt%牛血清白蛋白、0.1vol%普罗克林300(Proclin 300)。

[0053] 在某些实施方式中,所述第一缓冲液、所述第二缓冲液均为磷酸盐缓冲液。

[0054] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体和磷酸化的tau181检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~1 $\mu$ g/ml,例如0.2 $\mu$ g/ml、0.3 $\mu$ g/ml、0.4 $\mu$ g/ml、0.5 $\mu$ g/ml、0.6 $\mu$ g/ml、0.7 $\mu$ g/ml、0.8 $\mu$ g/ml、0.9 $\mu$ g/ml等。

[0055] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体和磷酸化的tau181检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.3~0.8 $\mu$ g/ml。

[0056] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42检测抗体和磷酸化的tau181检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.5 $\mu$ g/ml。

[0057] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、微管相关Tau蛋白检测抗体、胶质纤维酸性蛋白检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~0.5  $\mu$ g/ml,例如0.15 $\mu$ g/ml、0.2 $\mu$ g/ml、0.25 $\mu$ g/ml、0.3 $\mu$ g/ml、0.35 $\mu$ g/ml、0.4 $\mu$ g/ml、0.45 $\mu$ g/ml等。

[0058] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、微管相关Tau蛋白检测抗体、胶质纤维酸性蛋白检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.1~0.3  $\mu$ g/ml。

[0059] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40检测抗体、微管相关Tau蛋白检测抗体、胶质纤维酸性蛋白检测抗体的工作浓度分别且独立的为0.25 $\mu$ g/ml。

[0060] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体的工作浓度为0.5~2 $\mu$ g/ml,例如0.6 $\mu$ g/ml、0.7 $\mu$ g/ml、0.8 $\mu$ g/ml、0.9 $\mu$ g/ml、1.0 $\mu$ g/ml、1.1 $\mu$ g/ml、1.2 $\mu$ g/ml、1.3 $\mu$ g/ml、1.4 $\mu$ g/ml、1.5 $\mu$ g/ml、1.6 $\mu$ g/ml、1.7 $\mu$ g/ml、1.8 $\mu$ g/ml、1.9 $\mu$ g/ml等。



[0061] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体的工作浓度为0.5~1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0062] 在某些实施方式中,所述第二试剂中生物素标记的神经丝轻链蛋白检测抗体的工作浓度为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0063] 在某些实施方式中,所述第一试剂中 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体、微管相关Tau蛋白捕获抗体、胶质纤维酸性蛋白捕获抗体和神经丝轻链蛋白捕获抗体的工作浓度分别且独立的为0.5~2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,例如0.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、0.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.9 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等。

[0064] 在某些实施方式中,所述第一试剂中 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体、微管相关Tau蛋白捕获抗体、胶质纤维酸性蛋白捕获抗体和神经丝轻链蛋白捕获抗体的工作浓度分别且独立的为0.5~1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0065] 在某些实施方式中,所述第一试剂中 $\beta$ 淀粉样蛋白1-42捕获抗体、 $\beta$ 淀粉样蛋白1-40捕获抗体、微管相关Tau蛋白捕获抗体、胶质纤维酸性蛋白捕获抗体和神经丝轻链蛋白捕获抗体的工作浓度分别且独立的为1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0066] 在某些实施方式中,所述第一试剂中磷酸化的tau181捕获抗体的工作浓度为1~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,例如1.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.7 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、1.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、2.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、3.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、4.8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 等。

[0067] 在某些实施方式中,所述第一试剂中磷酸化的tau181捕获抗体的工作浓度为1~3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0068] 在某些实施方式中,所述第一试剂中磷酸化的tau181捕获抗体的工作浓度为2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

[0069] 在优选的示例中,所述第一试剂的制备方法包括:

(1) 分别将不同编号的微球活化后与相应的捕获抗体混合,20 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h~3h;

(2) 洗涤后置于0.5~5wt%的BSA中,20 $^{\circ}\text{C}$ ~40 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1h~3h,结束后保存于0.5~5wt%的BSA中;

(3) 混合步骤(2)制备得到的偶联了不同捕获抗体并用第一缓冲液稀释,即得所述第一试剂。

[0070] 在某些实施方式,A $\beta$ 1-42的捕获抗体、A $\beta$ 1-40的捕获抗体、T-Tau的捕获抗体、p-Tau-181的捕获抗体、GFAP的捕获抗体和NfL的捕获抗体与微球的比例分别且独立的为每10<sup>9</sup>个微球上包被0.01~0.5mg A $\beta$ 1-42的捕获抗体、0.01~0.5mg A $\beta$ 1-40的捕获抗体、0.01~0.5mg T-Tau的捕获抗体、0.01~0.5mg p-Tau-181的捕获抗体、0.01~0.5mg GFAP的捕获抗体和0.01~0.5mg NfL的捕获抗体。

[0071] 在某些实施方式,A $\beta$ 1-42的捕获抗体、A $\beta$ 1-40的捕获抗体、T-Tau的捕获抗体、p-Tau-181的捕获抗体、GFAP的捕获抗体和NfL的捕获抗体与微球的比例分别为每10<sup>9</sup>个微球上包被0.05mg A $\beta$ 1-42的捕获抗体、0.1mg A $\beta$ 1-40的捕获抗体、0.1mg T-Tau的捕获抗体、0.1mg p-Tau-181的捕获抗体、0.1mg GFAP的捕获抗体和0.05mg NfL的捕获抗体。

[0072] 在优选的示例中,所述第一试剂的制备方法包括:

- (1) 将不同编号的微球活化后与相应的捕获抗体混合,37℃下孵育2h;
- (2) 洗涤后置于1wt%的BSA中,37℃下孵育2h,结束后保存于1wt%的BSA中;
- (3) 混合步骤(2)制备得到的偶联了不同捕获抗体并用第一缓冲液稀释,即得所述第一试剂。

[0073] 在本发明中链霉亲和素-藻红蛋白(SA-PE)可与生物素特异性结合,形成带藻红蛋白(PE)荧光素标记的检测抗体,通过液相芯片仪的绿色激光激发藻红蛋白进行荧光检测。

[0074] 在优选的示例中,所述第二试剂的制备方法包括:

- (1) 将不同的检测抗体与活化的生物素混合,20℃~40℃下孵育20min~60min;
- (2) 纯化步骤(1)制备的生物素-检测抗体的偶联物,混合并用第二缓冲液稀释,即得所述第二试剂。

[0075] 在某些实施方式中,A $\beta$ 1-42的检测抗体、A $\beta$ 1-40的检测抗体、T-Tau的检测抗体、p-Tau-181的检测抗体、GFAP的检测抗体和NfL的检测抗体与活化的生物素的摩尔比分别且独立的为1:10~40、1:10~40、1:10~40、1:10~40、1:10~40、1:10~40。

[0076] 在某些实施方式中,A $\beta$ 1-42的检测抗体、A $\beta$ 1-40的检测抗体、T-Tau的检测抗体、p-Tau-181的检测抗体、GFAP的检测抗体和NfL的检测抗体与活化的生物素的摩尔比分别且独立的为1:10~30、1:10~30、1:15~35、1:10~30、1:10~30、1:10~30。

[0077] 在某些实施方式中,A $\beta$ 1-42的检测抗体、A $\beta$ 1-40的检测抗体、T-Tau的检测抗体、p-Tau-181的检测抗体、GFAP的检测抗体和NfL的检测抗体与活化的生物素的摩尔比分别且独立的为1:20、1:20、1:30、1:20、1:20、1:20。

[0078] 在优选的示例中,所述第二试剂的制备方法包括:

- (1) 将不同的检测抗体与活化的生物素混合,37℃下孵育40min;
- (2) 纯化步骤(1)制备的生物素-检测抗体的偶联物,混合并用第二缓冲液稀释,即得所述第二试剂。

[0079] 在某些实施方式中,所述试剂盒还包括稀释缓冲液,所述稀释缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠(例如0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.5 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%等)、0.1wt%~10wt%牛血清白蛋白(例如0.2 wt%、0.3 wt%、0.4 wt%、0.5 wt%、0.6 wt%、0.7 wt%、0.8 wt%、0.9 wt%、1 wt%、1.5 wt%、2 wt%、2.5 wt%、3 wt%、3.5 wt%等)、0.1 wt%~0.5 wt%酪蛋白(例如0.1 wt%、0.15 wt%、0.2 wt%、0.25 wt%、0.3 wt%、0.35 wt%、0.4 wt%、0.45 wt%、0.5 wt%等)、0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20(0.06 vol%、0.07 vol%、0.08 vol%、0.09 vol%、0.1 vol%、0.12 vol%、0.14 vol%、0.16 vol%、0.18 vol%等)、0.05 vol%~10 vol% 普罗克林300(例如0.05 vol %、0.06 vol %、0.07 vol %、0.08 vol %、0.09 vol %、0.1 vol %、0.15 vol %、0.2 vol %、0.25 vol %、0.3 vol %、0.4 vol %等)的磷酸盐缓冲液。

[0080] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液为含有0.1wt%~5wt%氯化钠、0.1wt%~5wt%牛血清白蛋白、0.1 wt%~0.3 wt%酪蛋白、0.05 vol%~0.15 vol%吐温-20、0.05 vol%~5vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

[0081] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液为含有0.1wt%~1wt%氯化钠、0.1wt%~2wt%牛

血清白蛋白、0.1 wt%~0.3 wt%酪蛋白、0.05~0.15 vol%吐温-20、0.05vol%~0.5vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

[0082] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液为含有0.9wt%氯化钠、2wt%牛血清白蛋白、0.2 wt%酪蛋白、0.1vol%吐温-20、0.1vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

[0083] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液中酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.5 wt%,例如0.15 wt%、0.2 wt%、0.25 wt%、0.3 wt%、0.35 wt%、0.4 wt%、0.45 wt%等。

[0084] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液中酪蛋白的浓度为0.1 wt%~0.3 wt%。

[0085] 在某些实施方式中,所述稀释缓冲液中酪蛋白的浓度为0.2 wt%。

[0086] 在某些实施方式中,所述试剂盒还包括校准品,利用所述稀释缓冲液分别将混合过的6种阿尔兹海默症标志物稀释成不同浓度的校准品。

[0087] 在本发明中,各种标志物校准品和试剂来自市售或者是根据已知的方法合成,除非另有指明,市售厂家包括但不限于赛默飞、Abcam及R&D Systems等公司。

[0088] 在某些实施方式中,所述试剂盒进一步包括反应缓冲液以及清洗缓冲液。

[0089] 在某些实施方式中,所述反应缓冲液为含有0.1wt%~10wt%氯化钠、0.05~10 vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

[0090] 在某些实施方式中,所述反应缓冲液为含有0.9wt%氯化钠、0.1 vol%普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

[0091] 在某些实施方式中,所述清洗缓冲液为含有0.05 vol%~0.2 vol%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

[0092] 在某些实施方式中,所述清洗缓冲液为含有0.1 vol%吐温-20的磷酸盐缓冲液。

[0093] 在本申请中,所述磷酸盐缓冲液为PBS。

[0094] 本发明的第二个目的在于根据上述任一项所述的试剂盒在制备阿尔兹海默症标志物的检测产品中的应用。

[0095] 本发明的第三个目的在于提供上述任一项所述的试剂盒的使用方法,所述方法包括:

- (1) 在检测管中加入反应缓冲液、第一试剂和待测样本;
- (2) 向步骤(1)的体系中加入第二试剂,孵育;
- (3) 向步骤(2)的体系中加入链霉亲和素-藻红蛋白,孵育;
- (4) 向步骤(3)的体系中加入清洗缓冲液,离心,取沉淀重悬,检测荧光强度。

[0096] 在某些实施方式中,步骤(1)中所述反应缓冲液、第一试剂和待测样本的体积比为1:(0.1~1):(0.5~2),例如1:0.2:1、1:0.3:1、1:0.4:1、1:0.5:1、1:0.6:1、1:0.8:1等。

[0097] 在某些实施方式中,所述步骤(2)中所述孵育的时间为12~24小时,例如14小时、16小时、18小时、20小时、22小时、24小时等。

[0098] 在某些实施方式中,所述步骤(3)中所述孵育的时间为0.2~1小时,例如0.4小时、0.6小时、0.8小时、1小时等。

[0099] 在某些实施方式中,所述步骤(2)和步骤(3)中所述孵育均在避光条件下进行。本申请提供的方法相比PE直接标记检测抗体试剂生物素的标记噪比更高、更为简单易操作,批间稳定性更好控制。

[0100] 本申请还提供了联合A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL六种外周血标

志物预测阿尔兹海默症的预测模型,根据构建的逻辑回归方程,判断是否患有阿尔兹海默症。逻辑回归方程为:

$$Y = -0.208 * A\beta_{42} - 0.026 * A\beta_{40} + 0.566 * T\text{-Tau} + 1.598 * p\text{-Tau}_{181} + 0.03 * GFAP + 0.054 * NfL - 2.214$$

,截断值为0.84893,将待测样本中各标志物的含量带入上述方程,结果高于截断值则预测为阿尔兹海默症患者,反之则为健康。

[0101] 下面通过具体实施例对本发明作进一步的说明,本文中若未特殊说明,“%”代表质量百分比。下述实施例中的材料和试剂,如无特殊说明,均为本领域常用材料或试剂,均可从商业途径得到或由已知方法合成。下列实施案例中未注明条件的实验方法,通常按照常规实验条件或相关试剂(盒)的制造厂商所建议的条件进行。

## 实施例

[0102] 本发明提供一种阿尔兹海默症标志物检测试剂盒,检测试剂盒包括第一试剂、第二试剂、链霉亲和素-藻红蛋白、稀释缓冲液、反应缓冲液以及清洗缓冲液。阿尔兹海默症标志物为 $A\beta_{1-42}$ 、 $A\beta_{1-40}$ 、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL。

[0103] 第一试剂的制备方法:

第一试剂包括偶联了不同捕获抗体的微球以及第一缓冲液。

[0104] (1) 分别将 $A\beta_{1-42}$ 的捕获抗体、 $A\beta_{1-40}$ 的捕获抗体、T-Tau的捕获抗体、p-Tau-181的捕获抗体、GFAP的捕获抗体和NfL的捕获抗体通过商品化的纯化柱(赛默飞;货号:89882)进行纯化去除叠氮化钠及相关化合物,收集纯化后的6种捕获抗体;

(2) 将 $A\beta_{1-42}$ 的捕获抗体、 $A\beta_{1-40}$ 的捕获抗体、T-Tau的捕获抗体、p-Tau-181的捕获抗体、GFAP的捕获抗体和NfL的捕获抗体分别与经EDC活化过的微球按照相应的比例进行混合,并于37°C孵育2小时;

(3) 洗涤后用含1%BSA的封闭液进行37°C孵育2小时,结束后保存于含1%BSA的封闭液中,得到捕获抗体-包被微球;

(4) 配制含有0.9wt%氯化钠、1wt%牛血清白蛋白、0.1vol% 普罗克林300的磷酸盐缓冲液;

(5) 混合步骤(3)制备得到的偶联了不同捕获抗体并用步骤(4)制备的缓冲液稀释,即得第一试剂。

[0105] 第二试剂的制备方法:

第二试剂包括生物素标记的检测抗体以及第二缓冲液。

[0106] (1) 分别将 $A\beta_{1-42}$ 的检测抗体、 $A\beta_{1-40}$ 的检测抗体、T-Tau的检测抗体、p-Tau-181的检测抗体、GFAP的检测抗体和NfL的检测抗体通过商品化的纯化柱(赛默飞;货号:89882)进行纯化去除叠氮化钠及相关化合物,收集纯化后6种检测抗体;

(2) 将步骤(1)制备6种不同检测抗体分别与商品化的生物素 NHS(赛默飞;货号:21336)按照摩尔比进行混合,并于25°C孵育45min,孵育结束后将生物素-检测抗体的偶联物通过纯化柱进行纯化得到生物素化的检测抗体;

(3) 配制含有0.9wt%氯化钠、0.2wt%酪蛋白、10vol%羊血清、0.1 vol % 普罗克林300的磷酸盐缓冲液;

(4) 混合纯化步骤(2)制备的生物素-检测抗体的偶联物并用步骤(3)制备的缓冲

液稀释,即得所述第二试剂。

[0107] 校准品的制备:

(1) 配制稀释缓冲液:含有0.9 wt%氯化钠、2wt%牛血清白蛋白、0.2wt%酪蛋白、0.1 vol%吐温-20、0.1 vol% 普罗克林300的磷酸盐缓冲液;

(2) 取6种相应AD标志物,用步骤(1)制备的缓冲液按一定的比例稀释制备成6个标准品,分别为标准品S1、标准品S2、标准品S3、标准品S4、标准品S5及标准品S6,标准品中A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau181、GFAP、NfL抗原浓度如下表所示,即为校准品,见表1。

[0108] 表1

项目	S1 标准品组成	S2 标准品组成	S3 标准品组成	S4 标准品组成	S5 标准品组成	S6 标准品组成
	浓度 (pg/ml)	浓度 (pg/ml)	浓度 (pg/ml)	浓度 (pg/ml)	浓度 (pg/ml)	浓度 (pg/ml)
A $\beta$ 1-42	0	30	90	600	1500	3000
A $\beta$ 1-40	0	80	240	1600	4000	8000
T-Tau	0	5	15	40	80	160
p-Tau181	0	10	30	200	500	1000
GFAP	0	100	300	2000	5000	10000
NfL	0	80	240	1600	4000	8000

[0109] 链霉亲和素-藻红蛋白选购自赛默飞公司,货号S866。

[0110] 配制反应缓冲液:含0.9 wt%氯化钠、0.1 vol %普罗克林300磷酸盐缓冲液。

[0111] 配制10 $\times$ 清洗缓冲液:含0.1vol%吐温-20磷酸盐缓冲液。

[0112] 本发明还提供了阿尔兹海默症标志物检测试剂盒的使用方法,所述方法包括:

- (1) 向管中加入20 $\mu$ L反应缓冲液;
- (2) 向所有管中加入10 $\mu$ L捕获微球混合液(第一试剂);
- (3) 向检测管中加入20 $\mu$ L样本;
- (4) 向所有管中加入10 $\mu$ L检测抗体试剂(第二试剂),室温震荡避光孵育18 $\pm$ 1h;
- (5) 向所有管中加入20 $\mu$ L SA-PE(工作浓度为200 $\mu$ g/mL),室温震荡避光孵育0.5h;
- (6) 向每管中加入300 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬,5min 500g离心去上清2次,小心去掉上清液体;

(7) 根据上样需求,向每管中加入150 $\mu$ L-300 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬;

(8) 上机检测,得到复合物荧光强度,根据各标志物的标准曲线计算得到样本中A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau181、GFAP、NfL的蛋白含量。

[0113] 各标志物的标准曲线建立及线性回归的相关系数(r)方法具体如下参见实施例6。

[0114] 实施例1

本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法,对抗体偶联微球和抗体标记生物素的比例分别进行优化,分别检测A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau181、GFAP、NfL抗原校准品S1-S6,比较线性r,结果如表2。

[0115] 表2

标志物 \ 线性 r	抗体偶联微球比例			抗体标记生物素比例		
	0.05mg/1x10 <sup>9</sup>	0.1mg/1x10 <sup>9</sup>	0.2mg/1x10 <sup>9</sup>	1: 10	1: 20	1: 30
Aβ1-42	0.9972	0.9952	0.9965	0.9956	0.9972	0.9966
Aβ1-40	0.9906	0.9945	0.9865	0.9901	0.9945	0.9928
T-Tau	0.9824	0.9843	0.9725	0.9843	0.9850	0.9733
p-Tau-181	0.9821	0.9931	0.9925	0.9912	0.9917	0.9931
GFAP	0.9908	0.9928	0.9825	0.9856	0.9928	0.9920
NfL	0.9995	0.9945	0.9965	0.9994	0.9995	0.9925

[0116] 试验结果显示,根据线性r值,Aβ1-42、Aβ1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL与捕获微球的最佳标记比例分别是0.05mg/1x10<sup>9</sup>、0.1mg/1x10<sup>9</sup>、0.1mg/1x10<sup>9</sup>、0.1mg/1x10<sup>9</sup>、0.1mg/1x10<sup>9</sup>和0.05mg/1x10<sup>9</sup>;Aβ1-42、Aβ1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL检测抗体与生物素的最佳比例(摩尔)分别是1:20、1:20、1:20、1:30、1:20和1:20。

#### [0117] 实施例2

为了提高试剂的信噪比,本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法,对捕获试剂和检测试剂的工作浓度分别进行优化,检测校准品S1-S6,比较信噪比S5/S1,结果如表3。

[0118] 表3

标志物 \ 信噪比	捕获试剂工作浓度			检测试剂工作浓度		
	0.5μg/ml	1μg/ml	2μg/ml	0.25μg/ml	0.5μg/ml	1μg/ml
Aβ1-42	1562	1721	1621	1544	1721	1225
Aβ1-40	1214	1347	1025	1352	1347	958
T-Tau	1401	1456	1034	1476	1456	954
p-Tau-181	1128	1321	1452	1356	1452	852
GFAP	958	1012	856	1023	1012	852
NfL	214	225	204	221	221	225

[0119] 试验结果显示,根据信噪比S5/S1,捕获试剂(第一试剂)中Aβ1-42、Aβ1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL捕获抗体的工作浓度分别为1μg/ml、1μg/ml、1μg/ml、2μg/ml、1μg/ml和1μg/ml;检测试剂(第二试剂)中Aβ1-42、Aβ1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL检测抗体工作浓度分别为0.5μg/ml、0.25μg/ml、0.25μg/ml、0.5μg/ml、0.25μg/ml和1μg/ml。

#### [0120] 实施例3

本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法,通过优化第二缓冲液中的组分,配制第二试剂,其他试剂和条件不变检测校准品S1-S6,比较本底信号发光值与信噪比,结果如表4。

[0121] 表4



项目	0.1%酪蛋白		0.2%酪蛋白		0.4%酪蛋白	
	S1 荧光强度	S5/S1 信噪比	S1 荧光强度	S5/S1 信噪比	S1 荧光强度	S5/S1 信噪比
A $\beta$ 1-42	89	1565	56	1752	42	1425
A $\beta$ 1-40	92	1224	58	1437	53	1106
T-Tau	115	901	73	1246	52	1002
p-Tau181	102	1157	62	1242	60	1121
GFAP	230	962	135	1053	110	850
NfL	92	214	77	232	79	132

[0122] 试验结果显示,根据本底S1平均荧光强度及信噪比S5/S1数据比较,含A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL检测抗体第二试剂的第二缓冲液中酪蛋白添加量为0.2%时有较优检测效果。

#### [0123] 实施例4

本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法,配制第二试剂,其他试剂和条件不变检测标准品S1与标准品S4,每个校准品重复10孔,比较CV值,结果如表5,其中%为体积比。

#### [0124] 表5

CV		10%羊血清	10%牛血清	10%明胶
A $\beta$ 1-42	S1	8.84%	10.5%	10.7%
	S4	3.64%	8.76%	6.68%
A $\beta$ 1-40	S1	10.76%	15.32%	24.2%
	S4	1.55%	2.8%	6.8%
T-Tau	S1	8.9%	10.5%	20.35%
	S4	3.38%	8.6%	7.8%
p-Tau181	S1	8.3%	19.68%	10.7%
	S4	1.76%	2.54%	10.4%
GFAP	S1	5.6%	8.99%	10.35%
	S4	2.76%	5.25%	3.68%
NfL	S1	5.64%	16.67%	19.87%
	S4	1.26%	5.33%	1.76%

[0125] 实验结果表明,含10%羊血清配制成的第二缓冲液有较优的发光值、重复性好。

#### [0126] 实施例5

本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法,优化稀释缓冲液的组分,具体为通过筛选添加不同蛋白质、糖类与醇类的稀释缓冲液,测试其放置37℃ 3天后的偏差,结果如表6,其中对照组为不含有甘油、海藻糖或者酪蛋白,只含有氯化钠、牛血清白蛋白和普罗克林300的磷酸盐缓冲液。

#### [0127] 表6

添加剂	对照	5%甘油	5%海藻糖	0.2%酪蛋白
	偏差	偏差	偏差	偏差
Aβ1-42	-15%	-21%	-15%	-10%
Aβ1-40	-30%	-35%	-15%	-8%
T-Tau	7%	2%	17%	7%
p-Tau181	-23%	-13%	-19%	-5%
GFAP	2%	5%	4%	2%
NfL	-56%	-50%	-45%	-12%

[0128] 实验结果表明,在稀释液缓冲液体系中添加0.2%酪蛋白,37℃热加速3天后,标准品荧光强度偏差在±15%以内,仍有较优检测性能。

[0129] 实施例6

本实施例根据上述检测试剂盒的使用方法建立标准曲线。

[0130] 标准曲线建立:

1. 制备上述6个校准品S1-S6;
2. 取出向管中加入20μL反应缓冲液;
3. 向所有管中加入10μL捕获微球混合液;
4. 向校准品管中加入10μL校准品;
5. 向所有管中加入10μL检测抗体试剂;
6. 室温震荡避光孵育18±1h;
7. 向所有管中加入20μL SA-PE (工作浓度为200μg/mL);
8. 室温震荡避光孵育0.5h;
9. 向每管中加入300μL 1×洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬,5min 500g离心去上清2次,小心去掉上清液体;
10. 根据上样需求,向每管中加入150μL-300μL 1×洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬;
11. 上机检测,得到复合物荧光强度,计算得到标准曲线。具体如下:以稀释浓度(x<sub>i</sub>)为自变量,以测定结果均值(y<sub>i</sub>)为因变量求出线性回归方程。按下面公式计算线性回归的相关系数(r):

$$r = \frac{\sum [(x_i - \bar{x}_i)(y_i - \bar{y}_i)]}{\sqrt{\sum (x_i - \bar{x}_i)^2 \sum (y_i - \bar{y}_i)^2}}$$

[0131] 本试剂盒6种标志物的标准曲线如下:

Aβ42标准曲线(表7):在(0-8000)pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应≥0.9900。

[0132] 表7



A $\beta$ 42 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	57.12
80	190.4
240	658.24
1600	12120.32
4000	45168.32
8000	99297.68

[0133] A $\beta$ 40标准曲线(表8) : (0-3000) pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应 $\geq$  0.9900。

[0134] 表8

A $\beta$ 40 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	68
90	432.48
600	9539.04
1500	36424.88
3000	90019.76

[0135] tTau标准曲线(表9) : (0-1000) pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应 $\geq$  0.97800。

[0136] 表9

tTau 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	70.72
10	830.96
30	3337.44
200	27756.24
500	62259.44
1000	99578.56

[0137] pTau181标准曲线(表10):在(0-160) pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应 $\geq 0.9900$ 。

[0138] 表10

pTau181 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	66.33
5	3534.65
15	12308.01
40	32920.43
80	57911.28
160	95556.22

[0139] GFAP标准曲线(表11):在(0-10000) pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应 $\geq 0.9900$ 。

[0140] 表11

GFAP 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	136
100	3102.16
300	8582.96
2000	47334.8
5000	90517.52
10000	148237.28

[0141] NfL标准曲线(表12):NfL在(0-8000) pg/mL的测量范围内,试剂盒的相关系数(r)应 $\geq 0.9900$ 。

[0142] 表12

NfL 标准曲线	
标准品浓度 (pg/ml)	MFI
0	74.8
80	180.88
240	444.72
1600	2605.76
4000	7066.56
8000	15246.96

[0143] (3) 样本检测:收集20例临床血浆样本,其中包括健康体检人群10例和AD患者10例,AD患者的简易智能精神状态检查量表评分均 $< 10$ 分,并且依据美国国立神经病及语言障碍和卒中研究所、阿尔兹海默病及相关疾病协会推荐的AD诊断标准进行诊断确认。

- [0144]
1. 向管中加入 $20\mu\text{L}$ 反应缓冲液;
  2. 向所有管中加入 $10\mu\text{L}$ 捕获微球混合液(第一试剂);
  3. 向管中加入 $20\mu\text{L}$ 样本;
  4. 向所有管中加入 $10\mu\text{L}$ 检测抗体试剂(第二试剂);
  5. 室温震荡避光孵育 $18 \pm 1\text{h}$ ;
  6. 向所有管中加入 $20\mu\text{L}$ LSA-PE(工作浓度为 $200\mu\text{g}/\text{mL}$ );

7. 室温震荡避光孵育0.5h;
8. 向每管中加入300 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬,5min 500g离心去上清2次,小心去掉上清液体;
9. 根据上样需求,向每管中加入150 $\mu$ L-300 $\mu$ L 1 $\times$ 洗涤缓冲液,通过涡旋将微球重悬;
10. 上机检测,得到复合物荧光强度,根据各标志物的标准曲线计算得到样本中A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau181、GFAP、NfL的蛋白含量,6种蛋白含量检测结果及组间比较见表13,其中蛋白含量单位为pg/ml。

[0145] 表13

	P 值	健康组平均值	AD 组平均值	差值	标准误差	t 比率	df	q 值
A $\beta$ 1-42	0.043856	38.36	24.92	13.44	6.201	2.167	18	0.044294
A $\beta$ 1-40	0.105598	299.4	393.4	-94	55.17	1.704	18	0.088878
T-Tau	0.01354	7.8	18.1	-10.3	3.763	2.737	18	0.022792
p-Tau181	0.000718	1.57	4.11	-2.54	0.6241	4.07	18	0.003628
GFAP	0.006866	84.51	172.2	-87.69	28.75	3.052	18	0.017336
NfL	0.020348	41.04	82.98	-41.94	16.48	2.544	18	0.025689

[0146] 6种蛋白鉴别AD痴呆与正常老年人的ROC曲线分析结果见表14和图1。

[0147] 单蛋白指标即可将样本区分,但单蛋白指标特异性差,存在误判,故对测得的六种蛋白标志物含量进行建模分析,检测结果如表14和图1所示。

[0148] 表14

	面积	标准误差	95%置信区间
A $\beta$ 1-42	0.82	0.94	0.636-1
A $\beta$ 1-40	0.755	0.116	0.524-0.983
T-Tau	0.86	0.088	0.687-1
p-Tau181	0.88	0.08	0.723-1
GFAP	0.9	0.075	0.754-1
NfL	0.88	0.078	0.728-1
三联检 (A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40/p-Tau181)	0.92	0.055	0.657-1
六联检	0.95	0.045	0.862-1

[0149] 生物标志物与临床样本结果一致性分析:用本试剂盒检测临床AD样本和正常人样本,通过SPSS软件分别统计每个标志物、三联检组合(A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40/p-Tau181)、六联检组合检测临床样本的ROC曲线下AUC值,比较不同组合结果与临床样本的一致性。

[0150] 和三联检相比,本试剂盒增加了阿尔兹海默症检测标志物的种类。六个标志物在区分临床AD样本时ROC曲线下的AUC值分别为:A $\beta$ 1-42为0.755、A $\beta$ 1-40为0.710、T-Tau为0.820、p-Tau181为0.885、GFAP为0.840、NfL为0.8400。三联检A $\beta$ 1-42/A $\beta$ 1-40/p-Tau181组合的AUC值为0.920,六联检组合的AUC值为0.940,六联检可以提高阿尔兹海默症的诊断灵敏度和特异性。

[0151] 通过判别分析建立如下判别函数,并计算判别函数分,函数分判读公式如下:

$$Y = -0.208 * A\beta_{42} - 0.026 * A\beta_{40} + 0.566 * T\_Tau + 1.598 * p\_Tau_{181} + 0.03 * GFAP + 0.054 * NfL - 2.214,$$

截断值为0.84893,特异性为0.9,敏感性为0.8。

[0152] 临床样本验证:

临床分组	判别预测归类		合计
	健康人	AD 患者	
健康人	9 (90%)	1	10
AD 患者	2	8 (80%)	10

## [0153] 实施例7

用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的MFI值(相对发光值),计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,根据零浓度校准品和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所对应的RLU值带入上述一次方程中,求出对应的浓度值,即为空白限。

$$LOB = M + kSD_k$$

$$[0154] \quad k = \frac{1.645}{1 - \left( \frac{1}{4(n - N)} \right)}$$

[0155] LOB为空白限;

M为空白样本检测结果的均值;

$SD_k$ 为空白样本检测结果的标准差;

n为空白样本的检测次数;

N为空白样本的数量;

n-N为估计的 $SD_k$ 的自由度。

[0156] 计算得出 $A\beta 1-42$ 的空白限为2.5pg/mL、 $A\beta 1-40$ 的空白限为2.5pg/mL、T-Tau的空白限为1.5pg/mL、p-Tau181的空白限为1.0pg/mL、GFAP的空白限为2.5pg/mL、NfL的空白限为2.5pg/mL。

## [0157] 实施例8

分别取抗原 $A\beta 1-42$ 、 $A\beta 1-40$ 、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL纯品,用稀释缓冲液配制成浓度为500pg/mL、1000pg/mL、1000pg/mL、150pg/mL、1000pg/mL和500pg/mL的标准溶液。按体积1:9的比例加入到稀释缓冲液中,重复测定3次,按照公式下方公式分别计算回收率。

$$[0158] \quad R = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\%$$

[0159] 式中:R-回收率;

V -加入标准溶液的体积;

$V_0$ -样本的体积;

C -样本加入标准溶液后的测定浓度;

$C_0$ -样本的测定浓度;

$C_s$ -标准溶液的浓度。

[0160] 计算得出, $A\beta 1-42$ 的回收率为105.2%、 $A\beta 1-40$ 的回收率为99.2%、T-Tau的回收率为98.9%、p-Tau181的回收率为88.7%、GFAP的回收率为110.2%、NfL的回收率为103.5%。

## [0161] 实施例9

分别取抗原 $A\beta 1-38$ 、 $A\beta 1-43$ 、 $TNF\alpha$ 与IP-10纯品分别用样品稀释液稀释至1000pg/

ml,检测A $\beta$ 1-42、A $\beta$ 1-40、T-Tau、p-Tau-181、GFAP和NfL含量,与理论浓度做比值分析,即交叉反应率(见表15)。

[0162] 表15

交叉反应物	理论浓度	交叉反应率
A $\beta$ 1-38	1000pg/ml	<1%
A $\beta$ 1-43	1000pg/ml	<1%
TNF $\alpha$	1000pg/ml	<1%
IP-10	1000pg/ml	<1%

[0163] A $\beta$ 1-38、A $\beta$ 1-43、TNF $\alpha$ 和IP-10与试剂盒的交叉反应率均小于1%。

[0164] 本发明提供的试剂盒具有信噪比高、稳定性好、重复性好、特异性强、准确度高、通量高以及线性范围广等优点。同时能够对6种阿尔兹海默症相关蛋白标志物同时进行定性和定量检测,6种蛋白标志物联合检测的综合诊断特异性为90%,显著高于单一蛋白标志物的诊断准确率。本发明的标志物联检具有更高的特异性或敏感度;对比传统影像学检测手段,在特异性90%条件下,其诊断的敏感度可达到80%,远远高于市场上的同类产品。

[0165] 应当理解,以上实施例均为示例性的,不用于包含权利要求所包含的所有可能的实施方式。在不脱离本公开的范围的情况下,还可以在以上实施例的基础上做出各种变形和改变。同样的,也可以对以上实施例的各个技术特征进行任意组合,以形成可能没有被明确描述的本发明的另外的实施例。因此,上述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,不对发明专利的保护范围进行限制。

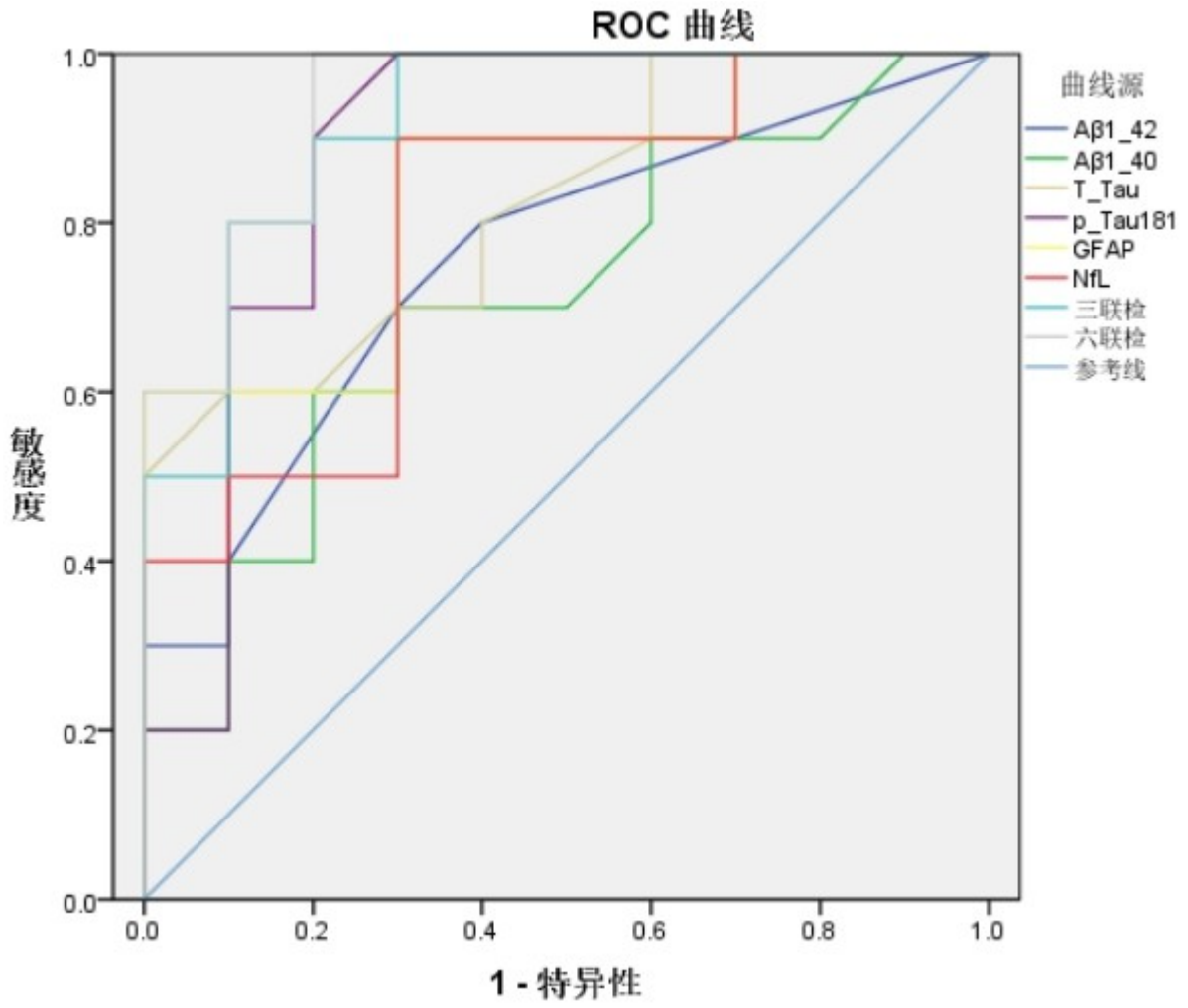


图 1