



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118707111 A

(43) 申请公布日 2024.09.27

(21) 申请号 202411177922.X

(22) 申请日 2024.08.27

(71) 申请人 浙江瑞硕生物技术有限公司

地址 311100 浙江省杭州市临平区东湖北路488号47幢501-2室瑞硕生物

(72) 发明人 吴迪 徐美玲 李舒然

(74) 专利代理机构 哈尔滨市晨晟知识产权代理有限公司 23219

专利代理师 刘坤

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 21/76 (2006.01)

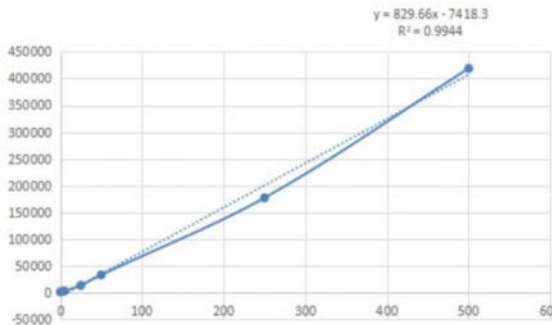
权利要求书2页 说明书11页 附图2页

(54) 发明名称

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法及其检测方法

(57) 摘要

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法及其检测方法,属于免疫检测技术领域。为解决现存的阿尔茨海默症检测试剂盒操作复杂、耗费昂贵、检测时间长、灵敏度低、精密度差的问题,本发明包括磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体、pTau-181校准品,所述磁微粒试剂为包被有pTau-181抗体的磁性微球混悬液;所述AE标记的pTau-181抗体通过吡啶酯对pTau-181抗体进行标记得到。本发明对样品的前处理要求低,前处理过程简单,能快速、高通量检测大批样品,检验方法方便易行,填补了现有技术中的空白。



1. 一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于,所述试剂盒包括磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体、pTau-181校准品,所述磁微粒试剂为包被有pTau-181抗体的磁性微球混悬液;所述AE标记的pTau-181抗体通过吡啶酯对pTau-181抗体进行标记得到。

2. 根据权利要求1所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于,所述磁微粒试剂中的磁微粒的粒径为1-3 μm ,所述磁微粒表面包裹有羧基活性基团的磁性微球;

所述pTau-181抗体的磁性微球混悬液制备时按照每50mg磁性微球加入0.5-2.5mg的pTau-181抗体进行包被,所述磁微粒试剂中pTau-181抗体与羧基磁珠的质量比为1:20-100,连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16~20h。

3. 根据权利要求2所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,其特征在于,所述AE标记的pTau-181抗体中pTau-181抗体与吡啶酯的质量比为1:1。

4. 一种权利要求1-3所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于,包括如下步骤:

步骤1. 制备磁微粒试剂;

步骤1.1. 将羧基磁珠溶液在磁微粒缓冲液的作用下进行分散处理,得到分散的羧基磁珠溶液;

步骤1.2. 将分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体进行连接反应,得到连接产物;

步骤1.3. 将连接产物置于磁场中,用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液;

步骤2. 制备AE标记的pTau-181抗体;

步骤2.1. 用0.15M的碳酸氢钠缓冲液将AE配成浓度为5mg/mL的AE溶液;

步骤2.2. 将小鼠单克隆抗pTau-181抗体和AE溶液按照质量比为1:1混合,进行链接反应,得到pTau-181抗体与AE的链接产物;

步骤2.3. 将pTau-181抗体与AE的链接产物用pH为8~9的碳酸盐缓冲液分离纯化,得到AE标记的pTau-181抗体;

步骤3. 制备pTau-181校准品:所述pTau-181校准品为含有pTau-181抗原、质量百分含量为0.5%的BSA、质量百分含量为0.05%的prolin300的Tris缓冲液;所述pTau-181抗原的浓度分别为20pg/mL和200pg/mL。

5. 根据权利要求4所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤1.1中将羧基磁珠浓缩液置于磁场内1~3min,待羧基磁珠全部沉降后除去上层清液,然后加入到磁微粒缓冲液振荡后,置于磁场中1~3min后,除去上层清液;振荡时间设置为20~30min;羧基磁珠和磁微粒缓冲液的体积比为1:2~5,分散处理次数为3次。

6. 根据权利要求5所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤1.2的互通实现方法包括如下步骤:

步骤1.2.1. 按照质量比为100:5~100:1称量分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体的,分散的羧基磁珠溶液的浓度为10~50mg/mL,设置连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16~20h;

S1.2.2. 连接反应完成后添加封闭液进行封闭,封闭液的配方为:PBS、3wt%的BSA、1wt%Tween-20、1wt%的麦芽糖、5wt%的山梨醇、2wt%的蔗糖、3wt%的甘油、0.1~0.8wt%的PEG600的混合溶液。

7. 根据权利要求6所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,其特征在于,步骤1.3中所述连接产物置于磁场的时间为5~10min,然后用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液。

8. 一种权利要求1-3所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的检测方法,其特征在于,包括如下步骤:

S1. 准备磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体;

S2. 将血清样本与步骤S1准备的AE标记的pTau-181抗体加入到磁微粒试剂中进行孵育;

S3. 孵育完成,待磁微粒试剂沉降后,除去上清液,清洗,然后加入底物溶液振荡混匀,检测相对发光强度。

9. 根据权利要求8所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的检测方法,其特征在于,步骤S2中的血清样本、AE标记的pTau-181抗体和磁微粒试剂的体积比为2:2:1。

10. 根据权利要求9所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的检测方法,其特征在于,步骤S3中检测相对发光强度后,经高、低值两点校准品进行定标校准,拟合生成新的工作曲线,用于样本测定;将pTau-181质控品作为样本,利用工作曲线进行浓度拟合,得到相应质控品浓度,观察拟合质控品浓度为标准浓度值的 $\pm 30\%$ 。

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法及其检测方法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测技术领域,具体涉及一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法及其检测方法。

背景技术

[0002] 阿尔兹海默症(Alzheimer's disease,AD)是一种起病隐匿、呈缓慢渐进性加重的神经系统退行性疾病,常见于65岁以上老年人,发病率随年龄增长而显著增加。AD特征性病理改变目前被广泛接受的致病假说有: $A\beta$ 聚集假说、Tau蛋白异常假说、胆碱能假说、神经炎症假说等,其中Tau蛋白的磷酸化修饰在该疾病进程中至关重要,Tau和APP可以在多个位点发生磷酸化修饰,根据不同的磷酸化位点主要分为T-tau、pTau-181、pTau-217、pTau-231。这些生物标志物也可以更快、更少地在血浆中进行测量,并可为阿尔茨海默症的早期诊断提供形成的重要依据。

[0003] 目前AD的诊断方法主要是联合诊断,包括:神经心理学评估,认知损伤测试;脑部老年斑块和Tau蛋白PET扫描;脑部核磁共振(MRI)和脑脊液(CSF)标志物, $A\beta$ 沉积,磷酸化tau蛋白检测等。但是,由于AD早期症状不明显,当对病症做出明确诊断时,患者多到达病程晚期,多数神经元出现死亡,如果能在病人发病早期进行快速诊断或使潜在病人提前发现风险,针对性地进行治疗或预防,能有助于患者病程滞留在轻微智力损伤阶段(mild cognitive impairment,MCI)而减缓恶化,从而保证病人生活质量和减轻社会负担。因此,如何提供一种pTau-181的检测试剂和检测方法是本领域技术人员亟需解决的问题。

发明内容

[0004] 本发明要解决的问题是现存的阿尔茨海默症检测试剂盒操作复杂、耗费昂贵、检测时间长、灵敏度低、精密度差、缺少对阿尔茨海默症的准确预测能力等问题,提出一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒及其制备方法及其检测方法。

[0005] 为实现上述目的,本发明通过以下技术方案实现:

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体、pTau-181校准品,所述磁微粒试剂为包被有pTau-181抗体的磁性微球混悬液;所述AE标记的pTau-181抗体通过吡啶酯对pTau-181抗体进行标记得到的。

[0006] 进一步的,所述磁微粒试剂中的磁微粒的粒径为1-3 μ m,所述磁微粒表面包裹有羧基活性基团的磁性微球;

所述pTau-181抗体的磁性微球混悬液制备时按照每50mg磁性微球加入0.5-2.5mg的pTau-181抗体进行包被,所述磁微粒试剂中pTau-181抗体与羧基磁珠的质量比为1:20-100,连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16~20h。

[0007] 进一步的,所述AE标记的pTau-181抗体中pTau-181抗体与吡啶酯的质量比为1:1。

[0008] 一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

步骤1. 制备磁微粒试剂;

步骤1.1. 将羧基磁珠溶液在磁微粒缓冲液的作用下进行分散处理,得到分散的羧基磁珠溶液;

步骤1.2. 将分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体进行连接反应,得到连接产物;

步骤1.3. 将连接产物置于磁场中,用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液;

步骤2. 制备AE标记的pTau-181抗体;

步骤2.1. 用0.15M的碳酸氢钠缓冲液将AE配成浓度为5mg/mL的AE溶液;

步骤2.2. 将小鼠单克隆抗pTau-181抗体和AE溶液按照质量比为1:1混合,进行链接反应,得到pTau-181抗体与AE的链接产物;

步骤2.3. 将pTau-181抗体与AE的链接产物用pH为8~9的碳酸盐缓冲液分离纯化,得到AE标记的pTau-181抗体;

步骤3. 制备pTau-181校准品:所述pTau-181校准品为含有pTau-181抗原、质量百分含量为0.5%的BSA、质量百分含量为0.05%的prolin300的Tris缓冲液;所述pTau-181抗原的浓度分别为20pg/mL和200pg/mL。

[0009] 进一步的,步骤1.1中将羧基磁珠浓缩液置于磁场内1~3min,待羧基磁珠全部沉降后除去上层清液,然后加入到磁微粒缓冲液振荡后,置于磁场中1~3min后,除去上层清液;振荡时间设置为20~30min;羧基磁珠和磁微粒缓冲液的体积比为1:2~5,分散处理次数为3次。

[0010] 进一步的,步骤1.2的互通实现方法包括如下步骤:

步骤1.2.1. 按照质量比为100:5~100:1称量分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体的,分散的羧基磁珠溶液的浓度为10~50mg/mL,设置连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16~20h;

S1.2.2. 连接反应完成后添加封闭液进行封闭,封闭液的配方为:PBS、3wt%的BSA、1wt%Tween-20、1wt%的麦芽糖、5wt%的山梨醇、2wt%的蔗糖、3wt%的甘油、0.1~0.8wt%的PEG600的混合溶液。

[0011] 进一步的,步骤1.3中所述连接产物置于磁场的时间为5~10min,然后用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液。

[0012] 一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的检测方法,包括如下步骤:

S1. 准备磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体;

S2. 将血清样本与步骤S1准备的AE标记的pTau-181抗体加入到磁微粒试剂中进行孵育;

S3. 孵育完成,待磁微粒试剂沉降后,除去上清液,清洗,然后加入底物溶液振荡混匀,检测相对发光强度。

[0013] 进一步的,步骤S2中的血清样本、AE标记的pTau-181抗体和磁微粒试剂的体积比为2:2:1。

[0014] 进一步的,步骤S3中检测相对发光强度后,经高、低值两点校准品进行定标校准,拟合生成新的工作曲线,用于样本测定;将pTau-181质控品作为样本,利用工作曲线进行浓度拟合,得到相应质控品浓度,观察拟合质控品浓度为标准浓度值的 $\pm 30\%$ 。

[0015] 本发明的有益效果:

本发明所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,所述pTau-181试剂盒使用磁珠为固相,使免疫反应更接近液相,反应更充分和迅速,而且使结合的免疫复合物更加容易分离,降低了非特异性吸附。本发明使用的AE标记抗体试剂为单克隆抗体混合物,使免疫反应的亲和力更高,而且单抗的生产批间差异相对小,更容易保证产品的批间稳定。

[0016] 一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,为快速、准确的pTau-181检测提供了可能,本发明对样品的前处理要求低,前处理过程简单,能快速、高通量检测大批样品,检验方法方便易行,填补了现有技术中的空白。

[0017] 一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,将化学发光技术与免疫磁微粒相结合,提供了一种接近均相的反应体系,具有更高的检测灵敏度、特异性、精确度和准确性,并达到了较佳的性能参数。试剂盒中的磁微粒试剂、AE标记抗体、校准品是该反应体系下的最优配方,给试剂盒的使用效期及检测性能提供了有力保障。

附图说明

[0018] 图1为本发明实施例1的标准曲线数据图;
图2为本发明实施例2的标准曲线数据图;
图3为本发明实施例3的标准曲线数据图。

具体实施方式

[0019] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及具体实施方式,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施方式仅用以解释本发明,并不用于限定本发明,即所描述的具体实施方式仅仅是本发明一部分实施方式,而不是全部的具体实施方式。通常在此处附图中描述和展示的本发明具体实施方式的组件可以以各种不同的配置来布置和设计,本发明还可以具有其他实施方式。

[0020] 因此,以下对在附图中提供的本发明的具体实施方式的详细描述并非旨在限制要求保护的本发明的范围,而是仅仅表示本发明的选定具体实施方式。基于本发明的具体实施方式,本领域技术人员在没有做出创造性劳动的前提下所获得的所有其他具体实施方式,都属于本发明保护的范围。

[0021] 为能进一步了解本发明的发明内容、特点及功效,兹例举以下具体实施方式,并配合附图1-附图3详细说明如下:

[0022] 实施例1:

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

步骤1. 制备磁微粒试剂;

步骤1.1. 将羧基磁珠溶液在磁微粒缓冲液的作用下进行分散处理,得到分散的羧基磁珠溶液;

进一步的,步骤1.1中将羧基磁珠浓缩液置于磁场内1min,待羧基磁珠全部沉降后除去上层清液,然后加入到磁微粒缓冲液振荡后,置于磁场中1min后,除去上层清液;振荡时间设置为20~30min;羧基磁珠和磁微粒缓冲液的体积比为1:2,分散处理次数为3次;

步骤1.2. 将分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体进行连接反应,得到连接产物;进一步的,步骤1.2的互通实现方法包括如下步骤:

步骤1.2.1. 按照质量比为100:5称量分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体的,分散的羧基磁珠溶液的浓度为10mg/mL,设置连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16h;

S1.2.2. 连接反应完成后添加封闭液进行封闭,封闭液的配方为:PBS、3wt%的BSA、1wt%Tween-20、1wt%的麦芽糖、5wt%的山梨醇、2wt%的蔗糖、3wt%的甘油、0.1wt%的PEG600的混合溶液;

步骤1.3. 将连接产物置于磁场中,用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液;

进一步的,步骤1.3中所述连接产物置于磁场的时间为1-3min,然后用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液;

进一步的,将连接产物置于磁场的时间为1-3min,冲洗的次数为3次;连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液的浓度为10mg/mL;

步骤2. 制备AE标记的pTau-181抗体;

步骤2.1. 用0.15M的碳酸氢钠缓冲液将AE配成浓度为5mg/mL的AE溶液;

步骤2.2. 将小鼠单克隆抗pTau-181抗体和AE溶液按照质量比为1:1混合,进行链接反应,得到pTau-181抗体与AE的链接产物;

步骤2.3. 将pTau-181抗体与AE的链接产物用pH为8的碳酸盐缓冲液分离纯化,得到AE标记的pTau-181抗体;

步骤3. 制备pTau-181校准品:所述pTau-181校准品为含有pTau-181抗原、质量百分含量为0.5%的BSA、质量百分含量为0.05%的prolin300的Tris缓冲液;所述pTau-181抗原的浓度分别为20pg/mL和200pg/mL。

[0023] 进一步的,所述pTau-181抗原的购买厂家和型号为苏州仁端生物医药科技有限公司,RDP002;

进一步的,所述小鼠单克隆抗pTau-181抗体的购买厂家和型号为西宝生物科技(上海)股份有限公司,EKN0456A。

[0024] 实施例2:

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

步骤1. 制备磁微粒试剂;

步骤1.1. 将羧基磁珠溶液在磁微粒缓冲液的作用下进行分散处理,得到分散的羧基磁珠溶液;

进一步的,步骤1.1中将羧基磁珠浓缩液置于磁场内2min,待羧基磁珠全部沉降后除去上层清液,然后加入到磁微粒缓冲液振荡后,置于磁场中2min后,除去上层清液;振荡时间设置为20min;羧基磁珠和磁微粒缓冲液的体积比为1:3,分散处理次数为3次;

步骤1.2. 将分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体进行连接反应,得到连接产物;进一步的,步骤1.2的互通实现方法包括如下步骤:

步骤1.2.1. 按照质量比为100:3称量分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体的,分散的羧基磁珠溶液的浓度为10mg/mL,设置连接反应的温度为室温,连接反应的时间为18h;

S1.2.2. 连接反应完成后添加封闭液进行封闭,封闭液的配方为:PBS、3wt%的

BSA、1wt%Tween-20、1wt%的麦芽糖、5wt%的山梨醇、2wt%的蔗糖、3wt%的甘油、0.5wt%的PEG600的混合溶液；

步骤1.3. 将连接产物置于磁场中,用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液；

进一步的,步骤1.3中所述连接产物置于磁场的时间为1-3min,然后用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液；

进一步的,将连接产物置于磁场的时间为1-3min,冲洗的次数为3次;连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液的浓度为10mg/mL；

步骤2. 制备AE标记的pTau-181抗体；

步骤2.1. 用0.15M的碳酸氢钠缓冲液将AE配成浓度为5mg/mL的AE溶液；

步骤2.2. 将小鼠单克隆抗pTau-181抗体和AE溶液按照质量比为1:1混合,进行链接反应,得到pTau-181抗体与AE的链接产物；

步骤2.3. 将pTau-181抗体与AE的链接产物用pH为8的碳酸盐缓冲液分离纯化,得到AE标记的pTau-181抗体；

步骤3. 制备pTau-181校准品:所述pTau-181校准品为含有pTau-181抗原、质量百分含量为0.5%的BSA、质量百分含量为0.05%的prolin300的Tris缓冲液;所述pTau-181抗原的浓度分别为20pg/mL和200pg/mL。

[0025] 实施例3:

一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法,包括如下步骤:

步骤1. 制备磁微粒试剂；

步骤1.1. 将羧基磁珠溶液在磁微粒缓冲液的作用下进行分散处理,得到分散的羧基磁珠溶液；

进一步的,步骤1.1中将羧基磁珠浓缩液置于磁场内3min,待羧基磁珠全部沉降后除去上层清液,然后加入到磁微粒缓冲液振荡后,置于磁场中3min后,除去上层清液;振荡时间设置为30min;羧基磁珠和磁微粒缓冲液的体积比为1:5,分散处理次数为3次；

步骤1.2. 将分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体进行连接反应,得到连接产物；

进一步的,步骤1.2的互通实现方法包括如下步骤:

步骤1.2.1. 按照质量比为100:1称量分散的羧基磁珠溶液和pTau-181抗体的,分散的羧基磁珠溶液的浓度为10mg/mL,设置连接反应的温度为室温,连接反应的时间为20h；

S1.2.2. 连接反应完成后添加封闭液进行封闭,封闭液的配方为:PBS、3wt%的BSA、1wt%Tween-20、1wt%的麦芽糖、5wt%的山梨醇、2wt%的蔗糖、3wt%的甘油、0.8wt%的PEG600的混合溶液；

步骤1.3. 将连接产物置于磁场中,用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液；

进一步的,步骤1.3中所述连接产物置于磁场的时间为1-3min,然后用磁微粒缓冲液冲洗,制得连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液；

进一步的,将连接产物置于磁场的时间为1-3min,冲洗的次数为3次;连接有pTau-181抗体的磁微粒溶液的浓度为10mg/mL；

步骤2. 制备AE标记的pTau-181抗体；

步骤2.1. 用0.15M的碳酸氢钠缓冲液将AE配成浓度为5mg/mL的AE溶液;

步骤2.2. 将小鼠单克隆抗pTau-181抗体和AE溶液按照质量比为1:1混合,进行链接反应,得到pTau-181抗体与AE的链接产物;

步骤2.3. 将pTau-181抗体与AE的链接产物用pH为8的碳酸盐缓冲液分离纯化,得到AE标记的pTau-181抗体;

步骤3. 制备pTau-181校准品:所述pTau-181校准品为含有pTau-181抗原、质量百分含量为0.5%的BSA、质量百分含量为0.05%的prolin300的Tris缓冲液;所述pTau-181抗原的浓度分别为20pg/mL和200pg/mL。

[0026] 实施例4:

基于实施例1至实施例3所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法制备的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒,所述试剂盒包括磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体、pTau-181校准品,所述磁微粒试剂为包被有pTau-181抗体的磁性微球混悬液;所述AE标记的pTau-181抗体通过吡啶酯对pTau-181抗体进行标记得到。

[0027] 进一步的,所述磁微粒试剂中的磁微粒的粒径为1-3 μ m,所述磁微粒表面包裹有羧基活性基团的磁性微球;

所述pTau-181抗体的磁性微球混悬液制备时按照每50mg磁性微球加入0.5-2.5mg的pTau-181抗体进行包被,所述磁微粒试剂中pTau-181抗体与羧基磁珠的质量比为1:20-100,连接反应的温度为室温,连接反应的时间为16~20h。

[0028] 进一步的,所述AE标记的pTau-181抗体中pTau-181抗体与吡啶酯的质量比为1:1。

[0029] 实施例5:

基于实施例1至实施例3所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法制备的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的应用,包括如下步骤:

S1. 准备磁微粒试剂、AE标记的pTau-181抗体;

S2. 将血清样本与步骤S1准备的AE标记的pTau-181抗体加入到磁微粒试剂中进行孵育;

进一步的,步骤S2中的血清样本、AE标记的pTau-181抗体和磁微粒试剂的体积比为2:2:1。

[0030] S3. 孵育完成,待磁微粒试剂沉降后,除去上清液,清洗,然后加入底物溶液振荡混匀,检测相对发光强度。

[0031] 进一步的,步骤S3中检测相对发光强度后,经高、低值两点校准品进行定标校准,拟合生成新的工作曲线,用于样本测定;将pTau-181质控品作为样本,利用工作曲线进行浓度拟合,得到相应质控品浓度,观察拟合质控品浓度为标准浓度值的 $\pm 30\%$ 。

[0032] 进一步的,AE标记抗体试剂为连接有pTau-181抗体的吡啶酯溶液,由于该链接反应时间太长效率太低,在上机测试时容易产生非特异性结合,因此需要对其进行进一步纯化处理,可有效缩短反应时间,提高效率。

[0033] 处理方法为:将标记好抗体的吡啶酯溶液在碳酸盐缓冲液的作用下进行分散处理,得到稀释液;将稀释液加入G25凝胶分离柱中进行分离纯化。

[0034] 1.G-25脱盐柱,是一种简单、快速、高效地使用G-25基质分离大分子量物质与小分子量物质的预包装即用型层析柱,俗称脱盐柱,主要用于去除蛋白质、核酸、多肽、多糖等样品的盐离子、去垢剂、小分子染料、缓冲剂等杂质。

[0035] 1.脱盐柱使用的填料为Beyodex™ G-25 Medium,该基质是葡聚糖(Dextran)经环氧氯丙烷交联剂通过醚键交联形成的三维网状筛孔结构的高分子聚合物,与Sephadex G-25 Medium的性能基本一致。填料粒径为70-250 μm ,可分离分子量>5kDa的蛋白质或其它大分子样品,柱床体积为8.3ml,建议上样量为1-2.5ml,本产品的功能和使用方法与Cytiva的PD-10 Desalting Column一致,适用于重力法或离心法。

[0036] 2.脱盐柱在分离样品时,体积较大的大分子不能进入基质网状筛孔而被阻隔在基质凝胶之外,随着流动溶液沿着基质凝胶颗粒间的缝隙移动,下移速度较快,先被洗脱出柱;体积较小的分子或离子可以进入基质网状筛孔从而进入凝胶内部,随着流动溶液在凝胶颗粒的网孔内移动,因此小分子量物质在基质内停留时间更长,下移速度较慢,后被洗脱出柱,这种分离纯化方式被称为尺寸排阻层析(Size-exclusion chromatography, SEC),也常被叫做分子筛层析(Molecular sieve chromatography, MSC)或凝胶过滤层析(Gel filtration chromatography, GFC)

pTau-181抗体检测盒的检测方法同实施例1。

[0037] 对本发明中实施例1-3所述的一种阿尔兹海默症pTau181化学发光免疫分析试剂盒的制备方法制备的阿尔兹海默症的磁微粒化学发光免疫分析试剂盒的性能指标进行测试:

1.线性

线性范围(0-500)pg/mL,相关系数 $r \geq 0.9900$ 。

[0038] 操作方法如下:

将接近线性范围上限的血清或血清替代物,用样本稀释液按一定的比例稀释成五个浓度,使用化学发光测定仪对稀释前后的5个浓度样本分别进行3次重复测定,计算平均值,根据平均值和稀释比例用四参数拟合曲线,并计算线性相关系数 r (1~1/100和RLU平均值这一列进行的X/Y轴直线拟合得到),其结果应 ≥ 0.9900 。测试的具体数值如表1所示:

表1:

	F点稀释比例	实例1RLU	实例2RLU	实例3RLU
线性	1	419141	513310	533310
	1/2	176822	245023	285023
	1/10	32345	52475	92475
	1/20	12856	20127	50127
	1/100	2301	4285	14285
	S0	646	307	2307
	R^2	0.9944	0.9994	0.9957

[0039] 根据上表,得到实施例1在低值样本检测时发光值过低,猜测是抗体包被封闭时配方不正确引起的现象,因此在实施例2中增加PEG600的浓度,结果比较理想,实施例3继续增加PEG600浓度,空白本底发光值明显增加,猜测是过浓非特异性结合严重。可得:实施例2方案曲线上升平稳且在线性范围内有较好的趋势走向,最符合要求。

[0040] 测定的实施例1-3反应曲线线性相关系数(r)分别为:0.9944、0.9994、0.9957,均>0.9900,明显优于现有技术,其中实施例2的效果最好。

[0041] 2. 准确度(回收率)

本发明中实施例1-3中的回收率在85~115%范围内。

[0042] 操作方法如下:

将已知浓度的pTau-181的样品A,加入到与规定的待测样本基质相同的样品B中,所加入A的体积不宜超过总体积(A+B)的10%,平行测定3次,根据公式(1)计算:

$$\text{回收率}(R) = \frac{C \times (V_0 + V) - C_0 \times V_0}{V \times C_s} \times 100\% \quad (1)$$

式中:

R:回收率;

V:样品A液的体积;

V_0 :样品B液的体积;

C:样品B液加入A液后的检测浓度;

C_0 :样品B液的浓度;

C_s :样品A液的浓度。

[0043] 数据案例($V=0.1\text{mL}$, $V_0=0.9\text{mL}$, $C_0=0\text{pg/mL}$, $C_s=200\text{pg/mL}$,其中V和 V_0 按上述方法为1:9的关系即可, C_0 与 C_s 分别为校准品中高浓度点与低浓度点的浓度):测试结果如表2所示:

表2

准确度	实施例 1 RLU	实施例 2 RLU	实施例 3 RLU
	12912	13975	14199
	管 2 实测浓度	管 1 实测浓度	管 3 实测浓度
	17.6	19.12	21.37
	86.40%	97.00%	100.17%

[0044] 测定的实施例1-3准确度(回收率)分别为:97.00%、86.40%、100.17%,均在85~115%范围内,符合要求。其中实施例2最好。

[0045] 3. 最低检测限(灵敏度)

最低检测限 $\leq 5\text{pg/mL}$ 。

[0046] 操作方法如下:

用零浓度校准品或样本稀释液作为待测样本,重复测定20次。得出20次测量结果的RLU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 $M+2SD$ 的RLU值代入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限,如表3所示:

表3:

S0	267	208	261	239	305
	259	248	326	260	292
	205	219	212	273	302
	251	339	362	293	235
RLU	267.80	RLU+2SD	355.95	检测限	2.55

[0047] 实施例2测定的pTau-181样本稀释液的平均发光值M=267.80,SD=44.80,将(M+2SD)的值带入此次反应曲线,得其灵敏度为:2.55pg/mL(<5pg/mL),符合要求。

[0048] 4.重复性

变异系数CV≤8%。操作方法如下:

取质控品1(20pg/mL)和质控品2(200ng/mL)作为待测样本,用化学发光测定仪对待测样本中的pTau-181含量分别进行10次重复测定。按公式(2)计算变异系数(CV)。

[0049]
$$CV = \frac{SD}{\bar{x}} \times 100\% \dots\dots\dots (2)$$

式中: \bar{x} —10次测试结果的平均值;

SD—10次测试结果的标准差;

CV—变异系数;

实施例1的数据如表4所示:

表4

重复性	质控 1	RLU	拟合浓度 pg/ml	质控 2	RLU	拟合浓度 pg/ml
	管 1	10060	20.03	管 1	124826	215.476
	管 2	10718	20.57	管 2	112446	198.73
	管 3	10156	20.11	管 3	119746	205.832
	管 4	10452	20.29	管 4	121918	210.668
	管 5	10618	20.51	管 5	117590	204.296
	管 6	10061	20.03	管 6	112417	194.742
	管 7	10429	20.27	管 7	114789	201.168
	管 8	11126	24.09	管 8	115785	203.486
	管 9	10328	20.21	管 9	114771	200.866
	管 10	10044	20.02	管 10	114582	200.076
	质控 1 拟合浓度 \bar{X}		20.61	质控 2 拟合浓度 \bar{X}		203.534
质控 1 拟合浓度 SD		1.24	质控 2 拟合浓度 SD		6.00	
质控 1 拟合浓度 CV		6.00%	质控 2 拟合浓度 CV		2.95%	

[0050] 实施例2数据如表5所示:

表5

重复性	质控 1	RLU	拟合浓度 pg/ml	质控 2	RLU	拟合浓度 pg/ml
	管 1	13764	21.47	管 1	202336	209.47
	管 2	12831	20.46	管 2	191271	203.094
	管 3	13367	21.34	管 3	195600	204.698
	管 4	13342	21.29	管 4	190397	200.686
	管 5	12741	20.12	管 5	191899	200.924
	管 6	13486	21.84	管 6	196467	201.634
	管 7	12775	20.63	管 7	190221	200.576
	管 8	12876	20.72	管 8	207083	208.938
	管 9	12741	20.35	管 9	193476	202.888
	管 10	11708	19.58	管 10	200120	207.676
	质控 1 拟合浓度 \bar{X}		20.78	质控 2 拟合浓度 \bar{X}		204.06
	质控 1 拟合浓度 SD		0.70	质控 2 拟合浓度 SD		3.47
	质控 1 拟合浓度 CV		3.35%	质控 2 拟合浓度 CV		1.70%

[0051] 实施例3数据如表6所示：

表6

重复性	质控 1	RLU	拟合浓度 pg/ml	质控 2	RLU	拟合浓度 pg/ml
	管 1	40565	20.07	管 1	247642	206.752
	管 2	43906	23.46	管 2	233449	193.682
	管 3	41018	21.31	管 3	226385	191.148
	管 4	43783	23.33	管 4	240464	201.73
	管 5	42619	22.97	管 5	235919	196.542
	管 6	40024	20.01	管 6	241162	202.904
	管 7	42051	22.62	管 7	241546	203.288
	管 8	40059	20.02	管 8	226661	191.296
	管 9	41648	21.43	管 9	241829	203.574
	管 10	41130	21.36	管 10	245199	204.066
	质控 1 拟合浓度 \bar{X}		21.66	质控 2 拟合浓度 \bar{X}		199.4982
	质控 1 拟合浓度 SD		1.37	质控 2 拟合浓度 SD		5.78
	质控 1 拟合浓度 CV		6.32%	质控 2 拟合浓度 CV		2.90%

[0052] 分析：实施例1-3检测质控品1.2各十次，计算CV。实施例1方案测定的质控品1SD为：1.24，CV为：6.00%；质控品2SD为：6.00，CV为：2.95%；实施例2方案测定的质控品1SD为：0.70，CV为：3.35%；质控品2SD为：3.47，CV为：1.70%；实施例3方案测定的质控品1SD为：1.37，CV为：6.32%；质控品2SD为：5.78，CV为：2.90%。所有CV均<8%。

[0053] 得到以下结论：所有CV均<8%，比较SD发现实施例2方案重复性更稳定，偏差更小，且符合要求。

[0054] 综上所述，本发明公开的一种阿尔兹海默症pTau181磁微粒化学发光免疫分析试剂盒，具有更高的检测灵敏度、特异性、精确度和准确性，并达到了较佳的性能参数。试剂盒中的磁微粒试剂、AE标记抗体、校准品是该反应体系下的最优配方，给试剂盒的检测性能提供了有力保障。

[0055] 需要说明的是，术语“第一”和“第二”等之类的关系术语仅仅用来将一个实体或者操作与另一个实体或操作区分开来，而不一定要求或者暗示这些实体或操作之间存在任何这种实际的关系或者顺序。而且，术语“包括”、“包含”或者任何其他变体意在涵盖非排他

性的包含,从而使得包括一系列要素的过程、方法、物品或者设备不仅包括那些要素,而且还包括没有明确列出的其他要素,或者是还包括为这种过程、方法、物品或者设备所固有的要素。在没有更多限制的情况下,由语句“包括一个……”限定的要素,并不排除在包括所述要素的过程、方法、物品或者设备中还存在另外的相同要素。

[0056] 虽然在上文中已经参考具体实施方式对本申请进行了描述,然而在不脱离本申请的范围的情况下,可以对其进行各种改进并且可以用等效物替换其中的部件。尤其是,只要不存在结构冲突,本申请所披露的具体实施方式中的各项特征均可通过任意方式相互结合起来使用,在本说明书中未对这些组合的情况进行穷举性的描述仅仅是出于省略篇幅和节约资源的考虑。因此,本申请并不局限于文中公开的特定具体实施方式,而是包括落入权利要求的范围内的所有技术方案。

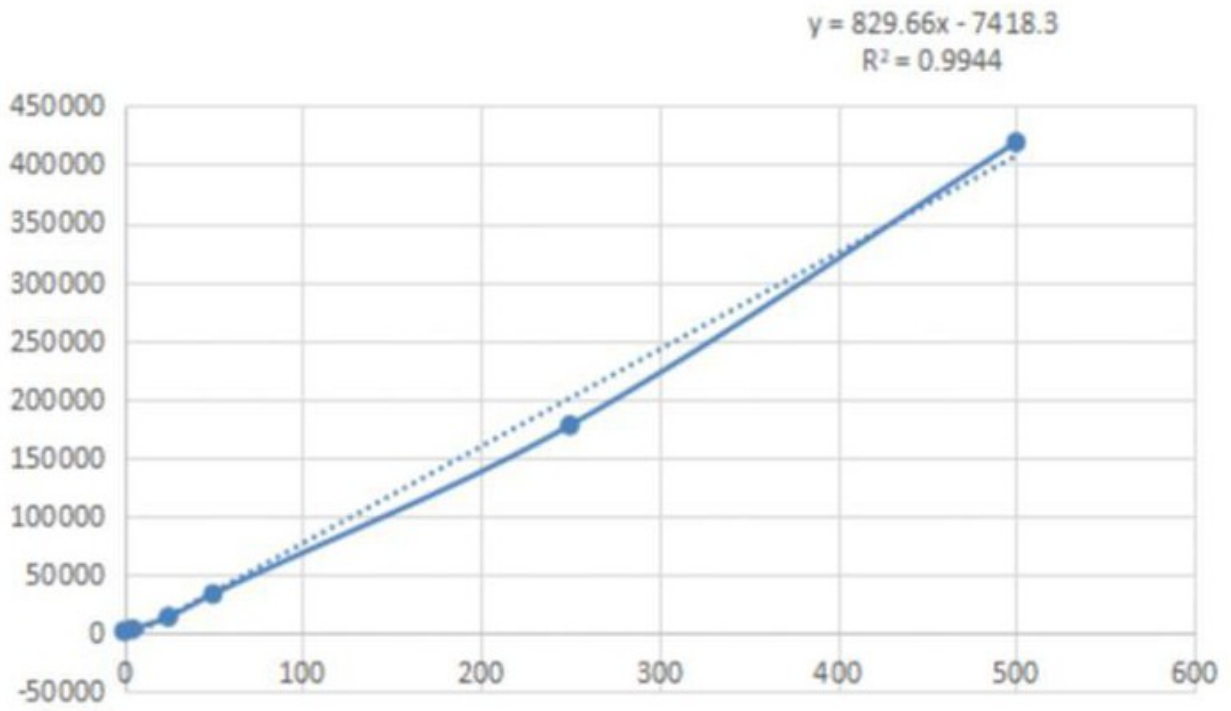


图 1

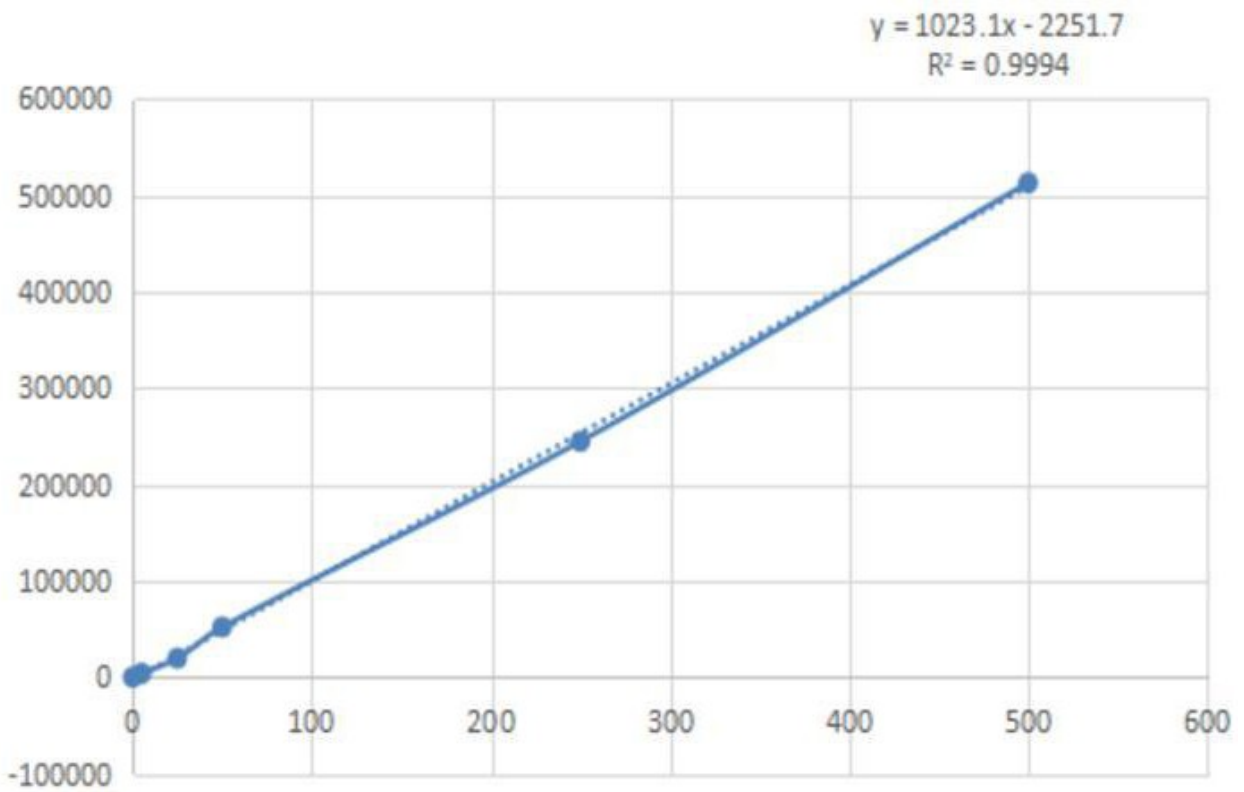


图 2

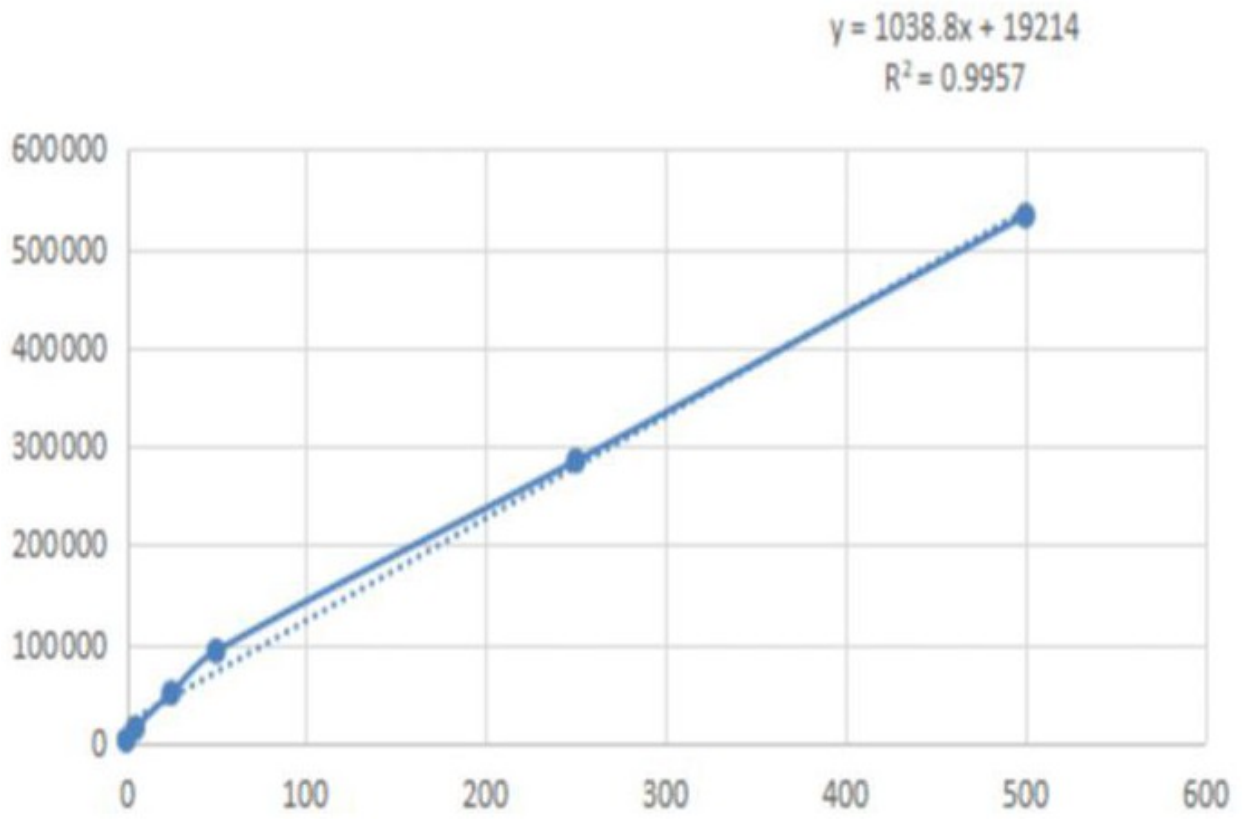


图 3