



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114778856 B

(45) 授权公告日 2023.03.17

(21) 申请号 202210599137.8

G01N 33/533 (2006.01)

(22) 申请日 2022.05.30

G01N 21/64 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

审查员 舒霏霏

申请公布号 CN 114778856 A

(43) 申请公布日 2022.07.22

(73) 专利权人 苏州宇测生物科技有限公司

地址 215000 江苏省苏州市苏州工业园区

金鸡湖大道99号苏州纳米城西北区02

幢701室

(72) 发明人 袁爱梦 安源 官志超

(74) 专利代理机构 北京格汇专利代理事务所

(特殊普通合伙) 16088

专利代理师 张伟洋

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

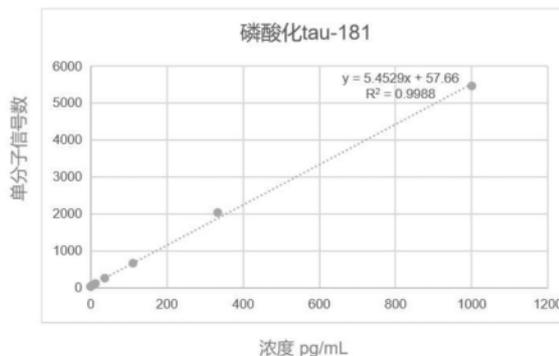
权利要求书1页 说明书18页 附图1页

(54) 发明名称

磷酸化tau蛋白检测试剂盒

(57) 摘要

本发明涉及诊断阿尔茨海默症标志物的试剂盒,尤其涉及检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,另外还涉及荧光染料和特定的磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途。所述试剂盒基于单分子检测技术及双抗夹心法来检测磷酸化tau蛋白,还涉及用于检测磷酸化tau蛋白的单分子检测系统,能够在快速检测的同时实现高的灵敏度,且CV值小,而且检测系统的成本低,能够准确测定磷酸化tau蛋白的浓度。



1. 基于单分子检测技术的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其特征在于,包含经捕获抗体包被的磁珠、和标记有荧光染料的检测抗体,

其中,所述捕获抗体和检测抗体能够分别与磷酸化tau蛋白的不同位点结合,所述磷酸化tau蛋白为磷酸化tau-181或磷酸化tau-217,

所述荧光染料含有荧光材料和载体,且粒径为180~450nm,

所述磁珠的直径为0.5~2.2 μ m,工作浓度为0.05~0.25mg/mL。

2. 如权利要求1所述的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其中,所述磁珠的直径为1~1.5 μ m。

3. 如权利要求1或2所述的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其中,所述磁珠的工作浓度为0.1~0.2mg/mL。

4. 如权利要求1或2所述的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其中,所述磁珠的表面修饰有羧基、氨基或甲苯磺酰基中的一种或多种,其中,当磁珠表面修饰有羧基时,羧基浓度为15~30微当量/克(μ eq/g)。

5. 如权利要求1或2所述的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其中,所述荧光材料为荧光素、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白、量子点或上转换纳米粒子,所述载体为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯。

6. 如权利要求1或2所述的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其中,所述试剂盒还包含磷酸化tau蛋白校准品和磷酸化tau蛋白质控品。

7. 荧光染料和磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途,其中,所述荧光染料含有荧光材料和载体,且粒径为180~450nm,

所述磁珠的直径为0.5~2.2 μ m,所述磁珠的工作浓度为0.05~0.25mg/mL,

所述磷酸化tau蛋白为磷酸化tau-181或磷酸化tau-217。

8. 如权利要求7所述的用途,其中,所述磁珠的直径为1~1.5 μ m。

9. 如权利要求7或8所述的用途,其中,所述磁珠的工作浓度为0.1~0.2mg/mL,所述荧光材料为荧光素、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白、量子点或上转换纳米粒子,所述载体为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯。

10. 一种用于检测磷酸化tau-181或磷酸化tau-217的单分子检测系统,其包括权利要求1~6中任一项所述的试剂盒、和光学成像设备,

所述光学成像设备包括光源和光学信号采集单元,并且所述检测系统不包含全内反射显微镜、近场显微镜和艾里斑聚焦检测设备,也不包含体积为纳升级别、皮升级别或飞升级别的微反应腔。

磷酸化tau蛋白检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及免疫检测领域,尤其是涉及一种检测磷酸化tau蛋白的试剂盒、及荧光染料和磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途以及用于检测磷酸化tau蛋白的单分子检测系统。

背景技术

[0002] 阿尔茨海默症(Alzheimer's disease,AD)是老年痴呆症一种常见形式,目前尚无有效疗法。该病患不仅患者自身痛苦,而且对于其家庭乃至整个社会都会造成较消极的影响。迄今为止,AD发病的确切机理尚未完全清楚。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发生磷酸化修饰而有利于微管的稳定。但过磷酸化的tau蛋白(p-htau)丧失了催化微管装配和稳定微管结构的正常生物活性,不仅与正常微管相关蛋白互相竞争,影响微管形成,且促使正常微管相关蛋白与微管分离,使微管崩解,轴突变性,影响神经递质的合成、运输、释放和摄取,造成神经细胞间的物质运输障碍,从而导致神经退行性变。

[0003] 有研究表明,tau蛋白过度磷酸化是AD脑神经元降解的重要初始步骤,tau蛋白过度磷酸化的产物磷酸化tau-181蛋白的增加,可启动血脑屏障外的磷酸化tau-181蛋白的生成,最终导致血液中磷酸化tau-181含量的增加。因此,检测血清中磷酸化tau-181蛋白的含量对诊断AD有着较高的临床价值。也有研究表明,血浆中磷酸化tau-181浓度可作为唐氏综合征患者中阿尔茨海默症的潜在生物标志物(参见非专利文献1)。另外,有研究表明,血浆磷酸化tau217作为AD早期诊断标记物,其灵敏性和特异性高,能够有效区分AD与非AD,或能提前20年诊断AD,与已知的血浆及MRI成像的生物标记物相比具有诸多优势,有望替代既往的指标成为更加精准便捷的早期诊断生物标志物,使AD早期诊断及干预成为可能(参见非专利文献2)。在中国阿尔兹海默病痴呆诊疗指南(2020年版)中也明确提到了血液中的磷酸化tau-181和磷酸化tau-217浓度可以作为AD检查的指标。

[0004] 目前已知的P-Tau蛋白检测方法主要有放射免疫测定法(RIA)、均相酶免疫检测法、酶联免疫法(ELISA)、高效液相色谱法、气相色谱法和气相色谱和质谱联用法(GC-MS)、化学发光免疫双抗体夹心法等。其中,关于放射免疫测定法,试剂的半衰期短,污染大,费用高,有时会出现交叉反应、假阳性反应,组织样品处理不够迅速,不能灭活降解酶和盐及pH有时会影响结果。关于酶联免疫法,目前有市售的检测试剂盒,但操作步骤烦琐,易出错,实验耗时4个小时以上,特异性较差,经常会出现假阳性、假阴性的结果判读。关于色谱法,目前商品化非常少,因需要专业的设备,且灵敏度低,只适合于实验室分析。关于化学发光免疫双抗体夹心法,有专利文献1记载,采用多臂聚乙二醇-氨基对磁性微球本体进行化学修饰,再将含羧基的线性高分子聚合物共价偶联到前述经化学修饰的磁性微球表面,处理步骤复杂,并且灵敏度只达到ng/mL级别;专利文献2记载了一种磁微粒分离化学发光免疫测定法,采用竞争法的反应模式,利用化学发光检测技术与磁微粒免疫分离技术相结合的原理,定量检测人血清或血浆样品中的Tau蛋白(TAU)含量,但其灵敏度同样只达到ng/mL级

别。

[0005] 单分子检测技术因其原理上的突破,与现有的ELISA、化学发光方法相比,灵敏度极高,因而在研究应用单分子技术来检测生物标志物。本申请的发明人提出了一种单分子检测方法(参见专利文献3),其中,使用了原位信号增强纳米粒子和磁珠,基于双抗夹心法,对cTnI抗原、IL-6抗原、DNA等进行了单分子检测,但未提及如何检测磷酸化tau蛋白,也未关注磁珠的直径、浓度等对磷酸化tau蛋白检测的影响。

[0006] 在体外诊断现有的主流免疫学平台中,电化学发光已经是灵敏度最高的检测平台,其已获FDA批准的用于脑脊液(Cerebrospinal Fluid,CSF)中P-tau181检测的试剂盒最低检测限为8pg/mL(参见中国医疗网med.china.com.cn)。

[0007] 现有技术文献

[0008] 非专利文献

[0009] 非专利文献1:“Phosphorylated tau181 in plasma as a potential biomarker for Alzheimer’s disease in adults with Down syndrome”,Alberto Lleo等人,nature communication,12,4304(2021);

[0010] 非专利文献2:“Discriminative Accuracy of Plasma Phospho-tau217 for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders”,Oskar Hansson等人,《JAMA》,2020年7月;

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献1:CN113533746A;

[0013] 专利文献2:CN109580955A;

[0014] 专利文献3:CN111771126A

发明内容

[0015] 发明要解决的课题

[0016] 专利文献1~2的检测灵敏度均较低,只有ng/ml级别。专利文献3未提及如何检测磷酸化tau蛋白,也未关注磁珠的直径、浓度等对磷酸化tau蛋白检测的影响。本申请的发明人尝试将专利文献3的单分子检测方法用于磷酸化tau蛋白试剂盒的开发,但由于磷酸化tau蛋白与该文献中记载的cTnI抗原、IL-6抗原、DNA等完全不同,在将cTnI抗原、IL-6抗原、DNA等的检测体系应用于磷酸化tau蛋白的检测时出现灵敏度低的状况,检测限只能达到约90pg/mL。另外,需要说明,缩短检测时间和提高检测灵敏度之间存在trade-off关系,难以同时实现检测时间的缩短和灵敏度的提高。

[0017] 为了解决上述课题,申请人针对捕获抗体的种类、检测抗体的种类、荧光染料种类、体系的pH、磁珠的基团种类等均反复进行了优化,但灵敏度仍然较低,最低检测限只能达到75pg/mL。关于磁珠的工作浓度,在免疫检测领域中,为了提高捕获效率,通常选择的浓度在0.5mg/mL以上。故本申请的发明人在初始优化过程中同样使磁珠的工作浓度为0.5mg/mL以上(在专利文献3中也是采用该工作浓度)。然而,如前文所述的,本申请的发明人在使用以往的常见体系来构建试剂盒并测定磷酸化tau蛋白的浓度时,检测下限只能达到75pg/mL,无法满足对于阿尔茨海默症的检测要求。

[0018] 本发明是鉴于上述问题而做出的,目的在于提供能够在快速检测的同时实现高的

灵敏度且CV值小的磷酸化tau蛋白试剂盒。

[0019] 用于解决课题的手段

[0020] 为了解决上述课题,本申请的发明人反复进行了深入研究,突破了以往的常规思路,结果发现了一种能够在快速检测的同时实现高的灵敏度且CV值小的磷酸化tau蛋白试剂盒。

[0021] 本申请的一个技术方案如下。

[0022] 检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其特征在于,包含经捕获抗体包被的磁珠、和标记有荧光染料的检测抗体,

[0023] 其中,所述捕获抗体和检测抗体能够分别与磷酸化tau蛋白的不同位点结合,

[0024] 所述荧光染料含有荧光材料和载体,且粒径为180~450nm,

[0025] 所述磁珠的直径为0.3~5 μ m,所述磁珠的工作浓度为0.01mg/mL以上且小于0.5mg/mL。

[0026] 优选地,磁珠的直径为0.5~2.2 μ m,优选为0.8~2 μ m,更优选为1~1.5 μ m。

[0027] 优选地,磁珠的工作浓度为0.05~0.25mg/mL,优选为0.08~0.22mg/mL,更优选为0.1~0.2mg/mL。

[0028] 优选地,磁珠的表面修饰有羧基、氨基或甲苯磺酰基中的一种或多种,优选修饰有羧基,其中,当磁珠表面修饰有羧基时,羧基浓度为15~30微当量/克(μ eq/g)。

[0029] 优选地,所述试剂盒还包含磷酸化tau蛋白校准品和磷酸化tau蛋白质控品,所述磷酸化tau蛋白为磷酸化tau-217、磷酸化tau-181。

[0030] 优选地,荧光材料为荧光素、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白、量子点以及上转换纳米粒子,载体为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯。

[0031] 本申请的另一个技术方案如下。

[0032] 荧光染料和磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途,其中,所述荧光染料含有荧光材料和载体,且粒径为180~450nm,

[0033] 所述磁珠的直径为0.3~5 μ m,所述磁珠的工作浓度为0.01mg/mL以上且小于0.5mg/mL。

[0034] 优选地,磁珠的直径为0.5~2.2 μ m,优选为0.8~2 μ m,更优选为1~1.5 μ m。

[0035] 优选地,磁珠的工作浓度为0.05~0.25mg/mL,优选为0.08~0.22mg/mL,更优选为0.1~0.2mg/mL。

[0036] 优选地,荧光材料为荧光素、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白、量子点以及上转换纳米粒子,载体为二氧化硅、聚丙烯酰胺或聚苯乙烯。

[0037] 本发明的又一技术方案如下。

[0038] 用于检测磷酸化tau蛋白的单分子检测系统,其包括上述的试剂盒、和光学成像设备,

[0039] 所述光学成像设备包括光源和光学信号采集单元,并且所述检测系统不包含全内反射显微镜、近场显微镜和艾里斑聚焦检测设备,也不包含体积为纳升级别、皮升级别或飞升级别的微反应腔。

[0040] 本发明的效果

[0041] 本发明的检测磷酸化tau蛋白的试剂盒能够在快速检测的同时实现高的灵敏度,

且CV值小。本申请的发明人发现,在用于磷酸化tau蛋白的检测时,一些实施方式中,针对磷酸化tau-217的灵敏度可达到0.15pg/mL,在一些实施方式中,针对磷酸化tau-217的灵敏度可达到0.1pg/mL。在一些实施方式中,针对磷酸化tau-181的灵敏度可达到0.2pg/mL,在一些实施方式中,针对磷酸化tau-181的灵敏度可达到0.15pg/mL,在另一些实施方式中,针对磷酸化tau-181的灵敏度可达到0.08pg/mL。而且,本申请能够在保证较高灵敏度的基础上以较短的时间(仅用5分钟左右的孵育时间,从进样到结果输出大约5分40秒)实现对磷酸化tau蛋白的检测,从而极大地缩短临床上的检测时间。另外, CV值均小于10%,一些实施方式中,针对磷酸化tau-181的检测CV值为8以下、6以下、甚至为2以下,针对磷酸化tau-217的检测CV值为7以下、5以下、甚至为3以下。此外,本发明能够以血清等作为样本进行磷酸化tau蛋白的检测,而无需使用取自脑脊液的样本,对患者的损伤小。

[0042] 与专利文献1~2的化学发光免疫测定法相比,本发明的基于单分子检测方法的试剂盒能够实现明显优异的检测灵敏度,同时缩短检测时间。与专利文献3相比,本发明突破以往的单分子检测技术的一般认识,针对磁珠的直径和工作浓度进行调节,能够以显著优异的灵敏度对磷酸化tau蛋白进行单分子检测。

附图说明

[0043] 图1为实施例1中得到的标准曲线,其中,纵坐标为单分子信号数;

[0044] 图2为实施例18中得到的标准曲线。

具体实施方式

[0045] <试剂盒>

[0046] 本申请的第一实施方式涉及检测磷酸化tau蛋白的试剂盒,其特征在于,包含经捕获抗体包被的磁珠、标记有荧光染料的检测抗体(所述试剂盒可以还包含磷酸化tau蛋白校准品和磷酸化tau蛋白质控品),

[0047] 其中,所述捕获抗体和检测抗体能够分别与磷酸化tau蛋白的不同位点结合,

[0048] 所述荧光染料含有荧光材料和载体,且粒径为180~450nm,

[0049] 所述磁珠的直径为0.3~5 μ m,所述磁珠的工作浓度为0.01mg/mL以上且小于0.5mg/mL。

[0050] 本发明中,磁珠的直径为0.3~5 μ m、同时工作浓度为0.01mg/mL以上且小于0.5mg/mL是重要的。直径需要严格控制在0.3~5 μ m的范围内,例如为0.4 μ m、0.5 μ m、0.6 μ m、0.7 μ m、0.8 μ m、0.9 μ m、1 μ m、1.1 μ m、1.2 μ m、1.3 μ m、1.4 μ m、1.5 μ m、1.6 μ m、1.7 μ m、1.8 μ m、1.9 μ m、2.0 μ m、2.1 μ m、3 μ m、3.5 μ m、4 μ m、4.5 μ m,优选为0.5~2.2 μ m,更优选为0.8~2 μ m,进一步优选为1~1.5 μ m。工作浓度需要严格控制在0.01mg/mL以上且小于0.5mg/mL的范围内,例如为0.02mg/mL、0.04mg/mL、0.05mg/mL、0.06mg/mL、0.07mg/mL、0.08mg/mL、0.09mg/mL、0.10mg/mL、0.11mg/mL、0.12mg/mL、0.13mg/mL、0.14mg/mL、0.15mg/mL、0.16mg/mL、0.17mg/mL、0.18mg/mL、0.19mg/mL、0.20mg/mL、0.21mg/mL、0.22mg/mL、0.23mg/mL、0.24mg/mL、0.3mg/mL、0.35mg/mL、0.40mg/mL、0.45mg/mL、0.48mg/mL,优选为0.05~0.25mg/mL,更优选为0.08~0.22mg/mL,进一步优选为0.1~0.2mg/mL。

[0051] 合适尺寸的磁珠可以通过购买市售品而获得,合适的磁珠工作浓度可以通过对缓

冲液、磁珠偶联液、磁珠封闭液、磁珠保存液等的添加体积进行调节而获得。

[0052] 磁珠在免疫检测中作为固相载体发挥作用,用于检测样品与试剂的分离和清洗,本领域中,以往通常认为抗体种类、荧光染料等对检测灵敏度影响较大,而磁珠本身的尺寸大小、工作浓度不会对灵敏度造成非常显著的影响。然而,本申请的发明人发现,在检测磷酸化tau蛋白的试剂盒体系中,磁珠的尺寸大小、工作浓度控制在本发明的特定范围内时能够获得显著优异的技术效果。

[0053] 磁珠的表面修饰有能够与抗体进行共价偶联的活性官能团,例如羟基、羧基、氨基、琥珀酰亚胺酯基、磺酰基(如甲苯磺酰基)及它们的衍生基团中的一种或多种,优选羧基、氨基、甲苯磺酰基,更优选羧基。当磁珠表面修饰有羧基时,羧基浓度为15~30微当量/克($\mu\text{eq/g}$),优选为20~25微当量/克,更优选为22~24微当量/克。羧基浓度可以通过将磁珠置于溶剂等中,再使用氢氧化钠溶液等碱性溶液进行滴定来求出。

[0054] 磁珠在与捕获抗体偶联前进行清洗及活化处理,在与捕获抗体偶联后进行清洗及封闭处理。

[0055] 捕获抗体按照抗体特异性特性分类,可以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,可以为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体以及羊驼源抗体中的一种或多种。

[0056] 检测抗体按照抗体特异性特性分类,可以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,可以为鼠源抗体、兔源抗体、羊源抗体以及羊驼源抗体中的一种或多种。

[0057] 本发明的荧光染料是在原位(in-situ)将荧光信号增强至能够被常规光学成像设备检测到的水平的材料,其含有荧光材料和载体这两部分。

[0058] 所述荧光染料中,载体发挥非常重要的作用,例如,可以结合更多的荧光材料,使得发光信号更强;为官能化修饰提供位点,能够结合大量抗体,提高反应活性;为常规荧光显微镜实现单分子检测提供可能性,如果没有载体则无法实现单分子检测。所述载体按照材料分类,可以为二氧化硅、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺、聚(甲基)丙烯酸甲酯、葡聚糖、琼脂糖以及无机金属化合物中的一种或多种。所述载体按照结构分类,可以为中空结构、核壳结构、多孔结构、合金结构以及水凝胶结构中的一种或多种。其中,从使荧光材料均匀分布、使荧光材料的亮度高的观点考虑,载体优选为二氧化硅、聚丙烯酰胺、聚苯乙烯和葡聚糖。

[0059] 所述荧光染料中的荧光材料也是实现单分子检测所必须的。所述荧光材料可以为荧光染料分子、稀土元素、稀土螯合物、荧光蛋白、量子点以及上转换纳米粒子中的一种或多种。荧光材料优选为荧光素类(如异硫氰酸荧光素)、罗丹明类(如罗丹明绿、罗丹明B等)、香豆素类、量子点类(如CdS、CdSe、CdTe、ZnSe)、稀土元素(如Eu、Ce)及其配合物等。所述荧光材料通过共价修饰、螯合作用、空间包裹、疏水作用以及静电吸附作用中的一种或多种而吸附或包裹于载体表面或内部。需要说明,从有利于光学成像识别和提高灵敏度的观点考虑,优选的是,荧光材料被均匀地包裹于载体的内部。

[0060] 本申请中,荧光染料优选为二氧化硅包裹荧光染料分子(如荧光素)而成的荧光粒子、聚丙烯酰胺包裹荧光染料分子(如荧光素)而成的荧光粒子、聚苯乙烯包裹量子点而成的荧光粒子、聚苯乙烯包裹稀土元素或稀土螯合物而成的荧光粒子、葡聚糖包裹荧光蛋白而成的荧光粒子以及交联琼脂糖包裹量子点而成的荧光粒子等。

[0061] 本发明中,荧光染料的粒径需要控制在180~450nm范围内,若荧光染料的粒径小于180nm,例如150nm,则在常规光学成像设备中检测不到任何信号,若粒径大于450nm,例如为460nm,则检测灵敏度较低,难以达到临床所要求的灵敏度。需要说明的是,所述粒径可以是一次粒径,也可以是二次粒径。所述二次粒径是指一级颗粒与二级颗粒团聚后形成的粒径。

[0062] 标记有荧光染料的检测抗体可以通过下述步骤制备。

[0063] (1) 制备荧光染料的稀释液

[0064] 取缓冲液a(如碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液PBS或硼酸盐缓冲液)将荧光染料稀释成规定浓度;

[0065] (2) 制备标记孵育液

[0066] 将活化剂溶解于PBS缓冲液中,制成溶解有活化剂的缓冲溶液。将该溶液加入经稀释的荧光染料中,混匀后离心,加入缓冲溶液而制成标记孵育液,备用。

[0067] (3) 制备标记工作液

[0068] 将检测抗体原液加入上述标记孵育液中,混匀后孵育1小时。

[0069] (4) 将标记工作液封闭

[0070] 取封闭液加入上述标记工作液中,混匀后孵育1小时。

[0071] (5) 洗涤标记工作液

[0072] (6) 保存标记工作液

[0073] 取标记分散液加入离心管中并混匀,按生产总体积需求吸取标记保存液加入离心管中,混匀后置于冰箱中于2~8℃进行保存。

[0074] 所谓工作浓度,是指实际使用时的浓度。许多溶液配制成浓度高的母液进行保存,在实际使用时根据需要将其稀释后使用。

[0075] 关于上述活化剂,例如,磁珠表面的修饰基团为羧基时,活化剂可以为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)等中的一种或多种,修饰基团为氨基时,活化剂可以为琥珀酰亚胺4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸盐(SMCC)、Sulfo-SMCC等。

[0076] 以检测磷酸化tau-181的试剂盒为例,质控品可以包括磷酸化tau-181质控品水平1(20±2pg/mL)和磷酸化tau-181质控品水平2(400±40pg/mL),校准品可以包括磷酸化tau-181校准品水平C0(0pg/mL)、磷酸化tau-181校准品水平C1(10±1pg/mL)和磷酸化tau-181校准品水平C2(500±50pg/mL)。以检测磷酸化tau-217的试剂盒为例,质控品可以包括磷酸化tau-217质控品水平1(20±2pg/mL)和磷酸化tau-217质控品水平2(200±20pg/mL),校准品可以包括磷酸化tau-217校准品水平C0(0pg/mL)、磷酸化tau-217校准品水平C1(10±1pg/mL)和磷酸化tau-217校准品水平C2(500±50pg/mL)。

[0077] 另外,试剂盒中,需要但未提供的物品包括反应杯、洗液、废杯盒和流通池护理液等。

[0078] <荧光染料和磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途>

[0079] 本发明还涉及荧光染料和磁珠在制备检测磷酸化tau蛋白的试剂盒中的用途,其中,所述荧光染料和磁珠的详细情况如<试剂盒>一栏中所述。本申请的发明人首次将特定的荧光染料和磁珠应用于磷酸化tau蛋白的单分子免疫检测中,基于单分子检测技术和双

抗夹心技术,能够在快速检测的同时实现高的灵敏度,并且变异系数(CV)低于10%。

[0080] <用于检测磷酸化tau蛋白的单分子检测系统>

[0081] 所述检测系统包括上述的试剂盒、和光学成像设备,所述光学成像设备包括光源和光学信号采集单元,并且所述检测系统不包含全内反射显微镜、近场显微镜和艾里斑聚焦检测设备,也不包含体积为纳升级别、皮升级别或飞升级别的微反应腔。

[0082] 本发明中,所述光学成像设备主要包括以下部件:激发光源、物镜、滤光片、感光元件、数据采集模块、数据处理模块以及二向色镜(若为正置显微镜,则也可以没有二向色镜)。其中,所述激发光源是用于将反应后的样品激发出光学信号的光学发射装置。所述物镜用于待测样品的信号采集和放大。所述二向色镜用于激发光路的反射和样品光学信号的采集。所述滤光片用于激发光波段的过滤和样品发射光信号的过滤。所述感光元件用于样品光学信号的采集。所述数据采集模块配置为接收感光元件捕获的光学信号,并转换为数字信号。所述数据处理模块配置为数字信号的转换以及光学图像的形成和处理。

[0083] 在该设备的一些实施方式中,所述激发光源包括气体激光器、固体激光器、半导体激光器、液体激光器以及自由电子激光器中的一种或几种。在该设备的一些实施方式中,所述物镜按照倍率分类,包括1X、2X、4X、5X、10X、20X、40X、50X以及100X中的一种或几种;所述物镜按照场曲校正分类,包括平面物镜或曲面物镜。在该设备的一些实施方式中,所述感光元件包括CCD(Charge Coupled Device,电荷耦合装置)或CMOS(Complementary Metal-Oxide Semiconductor,互补金属氧化物半导体)中的一种或两种。

[0084] 本发明的光学成像设备为常规的光学成像设备(即未突破光学衍射极限的光学成像设备)即可,无需全内反射荧光显微镜、落射荧光显微镜、扫描近场光学显微镜、共聚焦荧光显微镜等昂贵的、突破了光学衍射极限的成像设备。

[0085] 实施例

[0086] 以下,举出实施例和比较例进一步详细地说明本发明,但本发明并不限于此。关于荧光染料的粒径的测定、单分子成像和标准曲线绘制方法,参见本申请人申请的专利文献3的实施例部分。

[0087] 1、磁珠的粒径的测定

[0088] 磁珠的粒径采用显微镜法或纳米粒度仪(如AccuSizer 780A7000SIS)进行测定。

[0089] 2、磁珠的羧基浓度测定

[0090] 将磁珠置于溶剂中,使用氢氧化钠溶液进行滴定而求出,单位为微当量/克($\mu\text{eq/g}$)。

[0091] 3、试剂盒的主要组成

[0092] 以磷酸化tau-181的50人份/盒为例,主要组成如下。

[0093] 试剂瓶(两腔)

[0094] 腔位1:包被磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液,1.4mL;

[0095] 腔位2:标记有荧光染料的磷酸化tau-181检测抗体溶液,0.7mL。

[0096] 质控品:

[0097] 磷酸化tau-181质控品水平1($20 \pm 2\text{pg/mL}$) $\times 3$

[0098] 磷酸化tau-181质控品水平2($400 \pm 40\text{pg/mL}$) $\times 3$

[0099] 校准品:

- [0100] 磷酸化tau-181校准品水平C0 (0pg/mL) × 1
- [0101] 磷酸化tau-181校准品水平C1 (10 ± 1pg/mL) × 1
- [0102] 磷酸化tau-181校准品水平C2 (500 ± 50pg/mL) × 1
- [0103] 以磷酸化tau-217的50人份/盒为例,主要组成如下。
- [0104] 试剂瓶(两腔)
- [0105] 腔位1: 包被磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液, 1.4mL;
- [0106] 腔位2: 标记荧光染料的磷酸化tau-217检测抗体溶液, 0.7mL。
- [0107] 质控品:
- [0108] 磷酸化tau-217质控品水平1 (20 ± 2pg/mL) × 3
- [0109] 磷酸化tau-217质控品水平2 (200 ± 20pg/mL) × 3
- [0110] 校准品:
- [0111] 磷酸化tau-217校准品水平C0 (0pg/mL) × 1
- [0112] 磷酸化tau-217校准品水平C1 (10 ± 1pg/mL) × 1
- [0113] 磷酸化tau-217校准品水平C2 (500 ± 50pg/mL) × 1
- [0114] 制备例1: (包含直径为1.5μm、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒1的制备)
- [0115] 1、实验组分
- [0116] 羧基活化磁珠(购自Merck)、磷酸化tau-181捕获抗体(自制)、磷酸化tau-181检测抗体(自制)、硅烷偶联剂(APTES)、包裹有异硫氰酸荧光素(FITC)的二氧化硅微球、包裹有荧光染料的聚丙烯酰胺、待测血清样本、PBS缓冲液、1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)、微球保存液、样品稀释液、PBS洗液、标记封闭液(0.02%NaCl、0.5%BSA溶于10mM PBS, pH=7.4)、标记分散液(0.02%NaCl、0.2%BSA溶于10mM PBS, pH=7.4)、标记保存液(0.01%NaCl、0.2%BSA溶于10mM PBS, pH=7.4)、磁珠清洗液(PBST溶液)、交联剂溶解液(DMSO)、磁珠偶联液(TRIS缓冲液)、磁珠封闭液(0.03%NaCl、0.2%BSA和0.01%PC300溶于10mM PBS, pH=7.4)和磁珠保存液(0.4%NaCl、0.3%BSA和0.02%PC300溶于10mM PBS, pH=7.4)。
- [0117] 2、包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液的制备
- [0118] (1) 取90μL 5mg/mL的经羧基活化的磁珠(购自Merck, 直径为1.5μm, 羧基浓度为22微当量/克), 使用10mM PBS缓冲液清洗5次, 移除缓冲液。
- [0119] (2) 取75μg的磷酸化tau-181捕获抗体, 加入到(1)的磁珠中, 混合均匀, 在25℃下, 于滚轴孵育器上孵育3h, 转速: 70rpm/min。
- [0120] (3) 加入磁珠清洗液清洗, 混匀后置于磁力架上, 进行磁分离。
- [0121] (4) 向包被管中加入磁珠封闭液, 于滚轴孵育器上孵育1h, 转速: 80rpm/min, 磁分离后去除上清液。
- [0122] (5) 取磁珠保存液加入离心管, 混匀后得到包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液, 磁珠工作浓度为0.15mg/mL。
- [0123] 3、标记有荧光染料的磷酸化tau-181检测抗体溶液的制备
- [0124] (1) 制备荧光染料的稀释液
- [0125] 取40μL缓冲液PBS将20μL荧光染料(包裹有FITC的二氧化硅微球, 粒径为250nm) 稀释;

[0126] (2) 制备标记孵育液

[0127] 将0.004g活化剂EDC溶解于40 μ L的PBS缓冲液中,制成溶解有活化剂的缓冲溶液。将该溶液加入经稀释的荧光染料中,混匀后离心,加入缓冲溶液而制成标记孵育液,备用。

[0128] (3) 制备标记工作液

[0129] 将30 μ g的磷酸化tau-181检测抗体原液加入上述标记孵育液中,混匀后孵育1小时。

[0130] (4) 将标记工作液封闭

[0131] 取28 μ L标记封闭液加入上述标记工作液中,混匀后孵育1小时。

[0132] (5) 洗涤标记工作液

[0133] (6) 保存标记工作液

[0134] 取标记分散液加入离心管中并混匀,按生产总体积需求吸取标记保存液加入离心管中,混匀后置于冰箱中于2~8 $^{\circ}$ C进行保存。

[0135] 4、将上述步骤中制得的包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液、标记有荧光染料的磷酸化tau-181检测抗体溶液和磷酸化tau-181的质控品和校准品配合,构成试剂盒1。

[0136] 制备例2:(包含直径为0.5 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒2的制备)

[0137] 除了选择直径为0.5 μ m的磁珠(同样购自Merck,以下相同)以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒3。

[0138] 制备例3:(包含直径为0.8 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒3的制备)

[0139] 除了选择直径为0.8 μ m的磁珠以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒3。

[0140] 制备例4:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒4的制备)

[0141] 除了选择直径为1.2 μ m的磁珠以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒4。

[0142] 制备例5:(包含直径为2.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒5的制备)

[0143] 除了选择直径为2.2 μ m的磁珠以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒5。

[0144] 制备例6:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.05mg/mL的磁珠的试剂盒6的制备)

[0145] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.05mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒6。

[0146] 制备例7:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.1mg/mL的磁珠的试剂盒7的制备)

[0147] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.1mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒7。

[0148] 制备例8:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.2mg/mL的磁珠的试剂盒8的制备)

[0149] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.2mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒8。

[0150] 制备例9:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.25mg/mL的磁珠的试剂盒9的制备)

[0151] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.25mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒9。

[0152] 制备例10:(包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为12微当量/克的磁珠的试剂盒10的制备)

[0153] 除了使磁珠的羧基浓度为12微当量/克(购自Merck,以下相同)以外,与制备例4同

样地操作,得到试剂盒10。

[0154] 制备例11: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为32微当量/克的磁珠的试剂盒11的制备)

[0155] 除了使磁珠的羧基浓度为32微当量/克以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒11。

[0156] 制备例12: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为15微当量/克的磁珠的试剂盒12的制备)

[0157] 除了使磁珠的羧基浓度为15微当量/克以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒12。

[0158] 制备例13: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为30微当量/克的磁珠的试剂盒13的制备)

[0159] 除了使磁珠的羧基浓度为30微当量/克以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒13。

[0160] 制备例14: (包含直径为0.3 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒14的制备)

[0161] 除了选择直径为0.3 μm 的磁珠以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒14。

[0162] 制备例15: (包含直径为5 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒15的制备)

[0163] 除了选择直径为5 μm 的磁珠以外,与制备例1同样地操作,得到试剂盒15。

[0164] 制备例16: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.01mg/mL的磁珠的试剂盒16的制备)

[0165] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.01mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒16。

[0166] 制备例17: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.48mg/mL的磁珠的试剂盒17的制备)

[0167] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.48mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到试剂盒17。

[0168] 比较制备例1: (包含直径为0.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的比较试剂盒1的制备)

[0169] 除了选择直径为0.2 μm 的磁珠(羧基浓度为22微当量/克)以外,与制备例1同样地操作,得到比较试剂盒1。

[0170] 比较制备例2: (包含直径为5.1 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的比较试剂盒2的制备)

[0171] 除了选择直径为5.1 μm 的磁珠(羧基浓度为22微当量/克)以外,与制备例1同样地操作,得到比较试剂盒2。

[0172] 比较制备例3: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.009mg/mL的磁珠的比较试剂盒3的制备)

[0173] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.009mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到比较试剂盒3。

[0174] 比较制备例4: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.5mg/mL的磁珠的比较试剂盒4的制备)

[0175] 除了使包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.5mg/mL以外,与制备例4同样地操作,得到比较试剂盒4。

[0176] 实施例1:使用制备例1中得到的试剂盒1基于单分子检测技术对磷酸化tau-181的浓度进行测定

[0177] (1) 将磷酸化tau-181的浓度分别稀释为0、0.46、1.37、4.12、12.35、37、111、333以及1000pg/mL。

[0178] (2) 按AST-Dx90全自动荧光免疫分析仪的要求将样本、试剂按顺序装载至指定位置,准备就绪后启动测试,设备自动将样本送入上样位置,同时将反应杯载入孵育盘中,取样针从样本管中吸取25 μ L (1) 中得到的各浓度的样品加入反应杯,试剂针从试剂盒1中吸取25 μ L 包被有磷酸化tau-181捕获抗体的磁珠溶液(试剂1)加入反应杯,混匀孵育3min,试剂1中修饰表面特异性抗体的磁珠能够识别捕获样本中含量极低的靶标分子。

[0179] (3) 试剂针从试剂盒1中吸取10 μ L 标记有荧光染料的磷酸化tau-181检测抗体(试剂2)加入反应杯,混匀孵育2min,试剂2中含有修饰检测抗体的单分子信号标记物,能够将靶标分子转化为单分子信号。

[0180] (4) 检测针将反应体系转移至流通池中,利用磁分离将磁珠吸引至流通池底部并平铺于检测孔的表面,洗涤去除其他组分,使用普通荧光显微镜(购自Olympus)进行单分子成像,联合使用单分子计数模式和荧光强度积分模式来完成后续单分子计数统计和分析。需要说明,孵育时间为5分钟,从进样至输出结果的时间为5分40秒。

[0181] (5) 完成一系列浓度检测,每个浓度点重复6次,根据检测结果绘制标准曲线,计算每个点的CV%值。

[0182] 检测结果如图1所示,可知该实施例中,磷酸化tau-181的检测范围为0.16pg/mL~1000pg/mL(需要说明,该试验主要是为了测定检测下限,并不意味着检测上限只有1000pg/mL,实际上高浓度时通常线性度更好),在该区间内与单分子信号数有关的单分子信号数值与样品浓度呈良好的线性关系(R^2 为0.9988,十分接近1),其检测下限可达0.16pg/mL, CV%值为3%。

[0183] 针对上述制备例2~17、比较制备例1~4(对应比较例1~4)中得到的各试剂盒,与实施例1同样地操作(孵育时间均为5分钟,从进样至输出结果的时间均为5分40秒),得到检测下限和CV%值,将检测下限和CV%值的结果分别示于表1和表2中。

[0184] 此外,申请人还对荧光染料分别为聚丙烯酰胺包裹荧光素而成的粒子、聚苯乙烯包裹稀土元素(铈)而成的荧光粒子以及交联琼脂糖包裹量子点(硫化镉)而成的荧光粒子的情况进行了实验。具体而言,在实施例1中将二氧化硅包裹荧光素而成的荧光染料替换为上述几种荧光染料,结果发现灵敏度也较为优异(部分染料的最低检测限也能够达到0.08pg/mL左右,尤其是聚丙烯酰胺包裹荧光素而成的粒子)。

[0185] [表1]

[0186]

	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	实 施 例 8	实 施 例 9	实 施 例 10	实 施 例 11	实 施 例 12	实 施 例 13
磁珠直 径 (μm)	1.5	0.5	0.8	1.2	2.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2

[0187]

磁珠工 作浓 度 (mg/mL)	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.0 5	0.1	0.2	0.2 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5
磁珠羧 基浓 度 (微当 量/克)	22	22	22	22	22	22	22	22	22	12	32	15	30
灵敏度 (以检 测下 限表 示, pg/mL)	0.1 6	0.7	0.6 5	0.0 8	0.7 4	0.9	0.1 3	0.1 4	0.6 8	0.9 5	0.9 8	0.1 8	0.2 0
CV%值	3	5	4	2	6	6	4	3	6	6	5	3	3

[0188]

[表2]

	实 施 例 14	实 施 例 15	实 施 例 16	实 施 例 17	比 较 例 1	比 较 例 2	比 较 例 3	比 较 例 4
[0189] 磁珠直径 (μm)	0.3	5	1.2	1.2	0.2	5.1	1.2	1.2
磁珠工作 浓度 (mg/mL)	0.15	0.15	0.01	0.48	0.15	0.15	0.009	0.5
磁珠羧基 浓度 (微当量/ 克)	22	22	22	22	22	22	22	22
灵敏度	2.5	3	4	3.2	95	100	105	80
[0190] (以检测 下限表示, pg/mL)								
CV%值	8	8	9	8	16	12	17	14

[0191] 制备例18: (包含直径为 $1.5\mu\text{m}$ 、工作浓度为 0.15mg/mL 的磁珠的试剂盒18的制备)

[0192] 1、实验组分

[0193] 除了替换为磷酸化tau-217的捕获抗体和检测抗体外,与制备例1的组分类似。

[0194] 2、包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液的制备

[0195] (1) 取 $90\mu\text{L}$ 的 5mg/mL 的经羧基活化的磁珠(购自Merck,直径为 $1.5\mu\text{m}$,羧基浓度为22微当量/克),使用 14mM PBS缓冲液清洗5次,移除缓冲液。

[0196] (2) 取 $76\mu\text{g}$ 的磷酸化tau-217捕获抗体,加入到(1)的磁珠中,混合均匀,在 25°C 下,于滚轴孵育器上孵育3h,转速: 80rpm/min 。

[0197] (3) 加入磁珠清洗液清洗,混匀后置于磁力架上,进行磁分离。

[0198] (4) 向包被管中加入磁珠封闭液,于滚轴孵育器上孵育1h,转速: 80rpm/min ,磁分离后去除上清液。

[0199] (5) 取磁珠保存液加入离心管,混匀后得到包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液,磁珠工作浓度为 0.15mg/mL 。

[0200] 3、标记有荧光染料的磷酸化tau-217检测抗体溶液的制备

[0201] (1) 制备荧光染料的稀释液

[0202] 取 $35\mu\text{L}$ 缓冲液PBS将 $15\mu\text{L}$ 荧光染料(包裹有FITC的二氧化硅微球,粒径为 250nm)稀释;

[0203] (2) 制备标记孵育液

[0204] 将 0.004g 活化剂EDC溶解于 $35\mu\text{L}$ 的PBS缓冲液中,制成溶解有活化剂的缓冲溶液。

将该溶液加入经稀释的荧光染料中,混匀后离心,加入缓冲溶液而制成标记孵育液,备用。

[0205] (3) 制备标记工作液

[0206] 将24 μ g的磷酸化tau-217检测抗体原液加入上述标记孵育液中,混匀后孵育1小时。

[0207] (4) 将标记工作液封闭

[0208] 取封闭液加入上述标记工作液中,混匀后孵育1小时。

[0209] (5) 洗涤标记工作液

[0210] (6) 保存标记工作液

[0211] 取标记分散液加入离心管中,混匀后离心,按生产总体积需求吸取标记保存液加入离心管中,混匀后置于冰箱中于2~8 $^{\circ}$ C进行保存。

[0212] 4、将上述步骤中制得的包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液、标记有荧光染料的磷酸化tau-217检测抗体溶液和主要组成部分中的质控品和校准品配合,构成试剂盒18。

[0213] 制备例19: (包含直径为0.5 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒19的制备)

[0214] 除了选择直径为0.5 μ m的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒19。

[0215] 制备例20: (包含直径为0.8 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒20的制备)

[0216] 除了选择直径为0.8 μ m的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒20。

[0217] 制备例21: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒21的制备)

[0218] 除了选择直径为1.2 μ m的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒21。

[0219] 制备例22: (包含直径为2.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒22的制备)

[0220] 除了选择直径为2.2 μ m的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒22。

[0221] 制备例23: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.05mg/mL的磁珠的试剂盒23的制备)

[0222] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.05mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒23。

[0223] 制备例24: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.1mg/mL的磁珠的试剂盒24的制备)

[0224] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.1mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒24。

[0225] 制备例25: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.2mg/mL的磁珠的试剂盒25的制备)

[0226] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.2mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒25。

[0227] 制备例26: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.25mg/mL的磁珠的试剂盒26的制备)

[0228] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.25mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒26。

[0229] 制备例27: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为12微当量/克的磁珠的试剂盒27的制备)

[0230] 除了使磁珠的羧基浓度为12微当量/克以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒27。

[0231] 制备例28: (包含直径为1.2 μ m、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为32微当量/克的磁珠的试剂盒28的制备)

- [0232] 除了使磁珠的羧基浓度为32微当量/克以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒28。
- [0233] 制备例29: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为15微当量/克的磁珠的试剂盒29的制备)
- [0234] 除了使磁珠的羧基浓度为15微当量/克以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒29。
- [0235] 制备例30: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL且羧基浓度为30微当量/克的磁珠的试剂盒30的制备)
- [0236] 除了使磁珠的羧基浓度为30微当量/克以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒30。
- [0237] 制备例31: (包含直径为0.3 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒31的制备)
- [0238] 除了选择直径为0.3 μm 的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒31。
- [0239] 制备例32: (包含直径为5 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的试剂盒32的制备)
- [0240] 除了选择直径为5 μm 的磁珠以外,与制备例18同样地操作,得到试剂盒32。
- [0241] 制备例33: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.01mg/mL的磁珠的试剂盒33的制备)
- [0242] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.01mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒33。
- [0243] 制备例34: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.48mg/mL的磁珠的试剂盒34的制备)
- [0244] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.48mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到试剂盒34。
- [0245] 比较制备例5: (包含直径为0.25 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的比较试剂盒5的制备)
- [0246] 除了选择直径为0.25 μm 的磁珠(羧基浓度为22微当量/克)以外,与制备例18同样地操作,得到比较试剂盒5。
- [0247] 比较制备例6: (包含直径为5.2 μm 、工作浓度为0.15mg/mL的磁珠的比较试剂盒6的制备)
- [0248] 除了选择直径为5.2 μm 的磁珠(羧基浓度为22微当量/克)以外,与制备例18同样地操作,得到比较试剂盒6。
- [0249] 比较制备例7: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.009mg/mL的磁珠的比较试剂盒7的制备)
- [0250] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.009mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到比较试剂盒7。
- [0251] 比较制备例8: (包含直径为1.2 μm 、工作浓度为0.5mg/mL的磁珠的比较试剂盒8的制备)
- [0252] 除了使包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液中的磁珠工作浓度为0.5mg/mL以外,与制备例21同样地操作,得到比较试剂盒8。
- [0253] 实施例18: 使用制备例18中得到的试剂盒18基于单分子检测技术对磷酸化tau-217的浓度进行测定
- [0254] (1) 将磷酸化tau-217的浓度分别稀释为0、0.46、1.37、4.12、12.35、37、111、333以

及1000pg/mL。

[0255] (2) 按AST-Dx90全自动荧光免疫分析仪的要求将样本、试剂按顺序装载至指定位置,准备就绪后启动测试,设备自动将样本送入上样位置,同时将反应杯载入孵育盘中,取样针从样本管中吸取25 μ L (1) 中得到的各浓度的样品加入反应杯,试剂针从试剂盒1中吸取25 μ L 包被有磷酸化tau-217捕获抗体的磁珠溶液(试剂1)加入反应杯,混匀孵育3min,试剂1中修饰表面特异性抗体的磁珠能够识别捕获样本中含量极低的靶标分子。

[0256] (3) 试剂针从试剂盒1中吸取10 μ L 标记有荧光染料的磷酸化tau-217检测抗体(试剂2)加入反应杯,混匀孵育2min,试剂2中含有修饰检测抗体的单分子信号标记物,能够将靶标分子转化为单分子信号。

[0257] (4) 检测针将反应体系转移至流通池中,利用磁分离将磁珠吸引至流通池底部并平铺于检测孔的表面,洗涤去除其他组分,使用普通荧光显微镜(购自Olympus)进行单分子成像,联合使用单分子计数模式和荧光强度积分模式来完成后续单分子计数统计和分析。需要说明,孵育时间为5分钟,从进样至输出结果的时间为5分40秒。

[0258] (5) 完成一系列浓度检测,每个浓度点重复6次,根据检测结果绘制标准曲线,计算每个点的CV%值。

[0259] 检测结果如图2所示,可知该实施例中,磷酸化tau-217的检测范围为0.15pg/mL~1000pg/mL(需要说明,该试验主要是为了测定检测下限,并不意味着检测上限只有1000pg/mL,实际上高浓度时通常线性度更好),在该区间内与单分子信号数有关的单分子信号数与样品浓度呈良好的线性关系(R^2 为0.9996,十分接近1),其检测下限可达0.15pg/mL,CV%值为6%。

[0260] 针对上述制备例、比较制备例(对应比较例5~8)中得到的各试剂盒,与实施例18同样地操作,得到检测范围、检测下限和CV%值,将检测下限和CV%值的结果分别示于表3和表4中。

[0261] 此外,申请人还对荧光染料分别为聚丙烯酰胺包裹荧光素而成的粒子、聚苯乙烯包裹稀土元素(铕)而成的荧光粒子、葡聚糖包裹荧光蛋白(GFP)而成的荧光粒子以及交联琼脂糖包裹量子点(硫化镉)而成的荧光粒子的情况进行了实验。具体而言,在实施例1中将二氧化硅包裹荧光素而成的荧光染料替换为上述几种荧光染料,结果发现灵敏度也较为优异(部分染料的最低检测限也能够达到0.1pg/mL左右,尤其是聚丙烯酰胺包裹荧光素而成的粒子)。另外,对磁珠粒径为2.8 μ m的情况(其他条件与实施例18相同)也进行了试验,灵敏度大约为1.5pg/mL,CV值大约为8。

[0262] [表3]

	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	实 施 例 29	实 施 例 30
[0263] 磁珠直 径 (μm)	1.5	0.5	0.8	1.2	2.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
磁珠工 作浓度 (mg/m	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.0 5	0.1	0.2	0.2 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5	0.1 5
L)													
磁珠羧 基浓度 (微当 量/克)	22	22	22	22	22	22	22	22	22	12	32	15	30
[0264] 灵敏度 (以检 测下限 表示, pg/mL)	0.1 5	0.7 5	0.6	0.1	0.6 5	0.8 5	0.1 4	0.1 5	0.8 5	0.8	0.7	0.1 5	0.2
CV%值	6	5	4	3	6	6	5	3	4	5	6	5	5

[0265] [表4]

	实 施 例 31	实 施 例 32	实 施 例 33	实 施 例 34	比 较 例 5	比 较 例 6	比 较 例 7	比 较 例 8
[0266] 磁珠直径 (μm)	0.3	5	1.2	1.2	0.25	5.2	1.2	1.2
磁珠工作 浓度 (mg/mL)	0.15	0.15	0.01	0.48	0.15	0.15	0.009	0.5
磁珠羧基 浓度 (微当量/ 克)	22	22	22	22	22	22	22	22
灵敏度 (以检测 下限表示, pg/mL)	3	4	5	3	120	150	160	140
[0267] CV%值	9	8	9	8	21	18	17	24

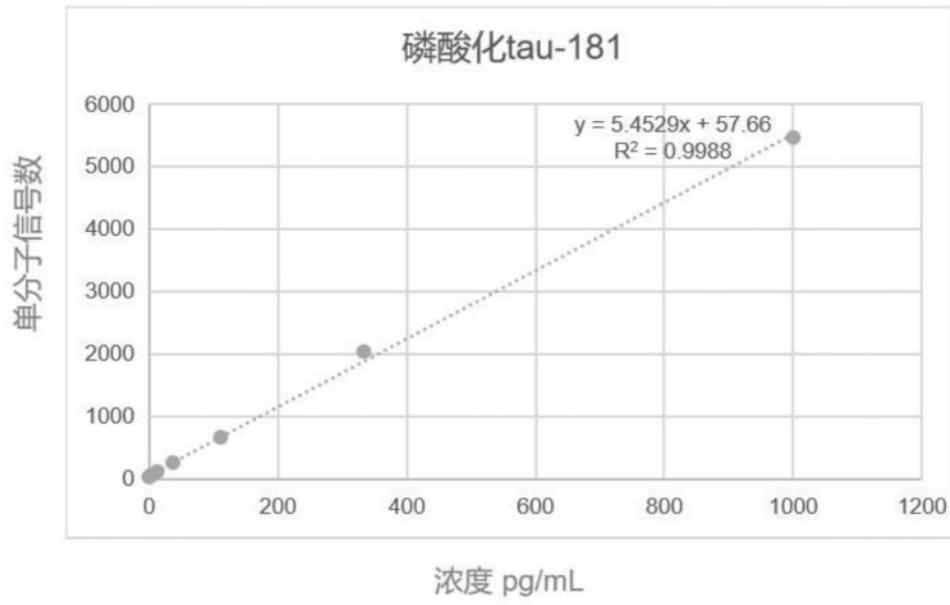


图1

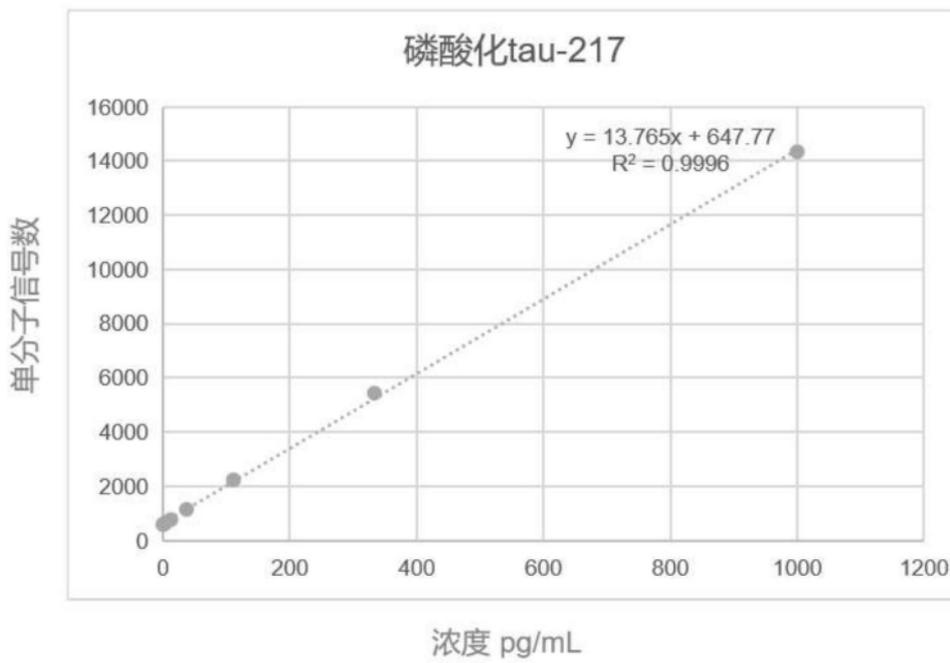


图2