



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109696552 B

(45) 授权公告日 2022.10.14

(21) 申请号 201711007207.1

(22) 申请日 2017.10.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109696552 A

(43) 申请公布日 2019.04.30

(66) 本国优先权数据
201710984825.5 2017.10.20 CN

(73) 专利权人 成都蓝璐生物技术有限公司
地址 610093 四川省成都市高新区天府大道中段177号

(72) 发明人 邓杰 丁维俊 夏巍

(74) 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司 11112
专利代理师 丁业平 常海涛

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 106568750 A, 2017.04.19

CN 1532286 A, 2004.09.29

CN 102411056 A, 2012.04.11

CN 105085629 A, 2015.11.25

CN 1932517 A, 2007.03.21

UA 58385 U, 2011.04.11

审查员 朱昀瑶

权利要求书1页 说明书12页 附图2页

(54) 发明名称

用于脑中风的发光ELISA体外诊断试剂盒以及体外检测设备

(57) 摘要

本发明提供一种用于发光ELISA的体外诊断试剂盒,包括:体液样品稳定化用水溶液,该体液样品中含有神经损伤标志性蛋白成分,在该体液样品稳定化用水溶液中,溶质包括人血清、动物血清白蛋白、无机碱金属盐、Tris碱、蛋白变性剂以及非离子型表面活性剂,该水溶液的pH值为6.7~7.6;以及,任选地包括的抗所述神经损伤标志性蛋白成分的抗体(例如,抗神经胶质细胞原纤维酸性蛋白(glial fibrillary acidic protein,GFAP)抗体)。还提供一种体外检测设备。在使用发光ELISA法从体液样品(例如,外周血液)中检测神经细胞损伤标志物蛋白成分GFAP时,本发明的体外诊断试剂盒和体外检测设备的准确性和可重复性极高,可以将体液中pg级别的GFAP稳定而准确地检测出来。

1. 一种用于脑中风诊断或预后评价的体外检测设备,包括发光ELISA测定仪、以及用于脑中风的发光ELISA体外诊断试剂盒,其中所述用于脑中风的发光ELISA体外诊断试剂盒包括:

体液样品稳定化用水溶液,所述体液样品为含有神经胶质细胞原纤维酸性蛋白GFAP作为神经损伤标志性蛋白成分的人外周血血清;

以及,

抗所述神经损伤标志性蛋白成分的抗体,其中所述的抗所述神经损伤标志性蛋白成分的抗体为抗神经胶质细胞原纤维酸性蛋白GFAP抗体,该抗GFAP抗体包括:

捕捉抗体,和

探测抗体;

其中所述捕捉抗体和所述探测抗体为分别针对GFAP蛋白不同抗原表位的抗GFAP抗体,

以及其中100ml所述体液样品稳定化用水溶液由10体积%~50体积%的人血清、0.1~5.0质量/体积%的牛血清白蛋白、0.05~5.0体积%的吐温-20、0.05~0.25mM的尿素、110~150mM的氯化钠、2.0~3.0mM的氯化钾、15~25mM的Tris碱、以及无菌蒸馏水组成,该水溶液的pH值为6.7~7.6。

2. 根据权利要求1所述的用于脑中风诊断或预后评价的体外检测设备,其中所述ELISA测定仪的探测灵敏度小于10pg。

用于脑中风的发光ELISA体外诊断试剂盒以及体外检测设备

技术领域

[0001] 本发明涉及生物学检测领域,具体地说,涉及一种针对脑卒中(脑中风)患者的体液样品稳定化用水溶液、体外检测试剂盒、以及检测系统。

背景技术

[0002] 脑卒中俗称中风,由脑血管阻塞或破裂导致的脑损伤引起,危害十分严重。流行病学研究发现,当今我国中风的致残率排名第一,病死率排名第二,仅次于癌症。没有哪种疾病能够像中风一样,瞬间令人口眼歪斜、四肢麻木、瘫痪在床,让人失去生活尊严。目前,我国每年新增中风病例超过370万,存活的脑卒中患者近2000万人,且患者数量处于急速上升期。高血压、糖尿病、心脏病都是脑中风的危险因素,中老年人是中风高危人群。因此,需要建立快速而准确的诊断脑卒中的方法。

[0003] 当今脑中风的诊断方法以影像学为主,精确度低、费用高昂,给社会卫生事业带来重大负担。加之中风患者病情变化迅速、个体差异明显,给诊断与治疗带来巨大困难。

[0004] 除影像学诊断外,在诊断脑中风的方法中,还有一种利用ELISA检测脑脊液中神经胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)含量的方法。GFAP是中枢神经系统含量最高的蛋白之一。急性缺血性脑卒中直接造成大量的神经细胞死亡,而死亡的神经细胞则分解并释放出大量的结构蛋白,其中包括GFAP。因血脑屏障的原因,GFAP大都滞留在脑脊液。要检测脑脊液中的GFAP,通常采用脊髓穿刺的方法。但是,该方法给患者再次造成严重身心痛苦,给社会和家庭带来巨大经济负担。

[0005] 作为检测脑脊液中GFAP的一种方法,较为普遍的是酶联免疫吸附检测(ELISA)法,其基本原理是利用抗原、抗体的特异性反应,用已知抗原或抗体检测未知抗原或抗体。由于ELISA试验方法具有敏感、特异、经济、简便、安全等特点,目前在疾病的诊断和疗效观察以及预防医学等方面应用尤为广泛。

[0006] 作为一种测定微量抗原、抗体的经典方法,ELISA法广泛应用于临床检验诊断,其技术成熟,用途广泛,分析灵敏度高、分析特异性好,操作简单。基本操作过程为:第一步,将抗原(或抗体)包被于固相载体(如聚苯乙烯塑料酶标板)上,放4℃冰箱过夜。第二步,用缓冲液洗包被板三次,加待测标本后放37℃温箱(或室温)反应1~2.5小时。第三步,用缓冲液洗板三次,加酶标抗体后置37℃温箱(或室温)反应1~2.5小时。第四步,用缓冲液洗板三次,加底物液显色,硫酸中止反应,上机判断结果。

[0007] 作为ELISA发展的最新技术,发光ELISA将发光基团耦联到探测抗体,直接测量其所发光量来对抗原进行定量,既减少了酶/底物反应带来的附加干扰,又在极大程度上提高了探测灵敏度。

[0008] 无论是通过影像学诊断还是ELISA脑脊液检测,目前,脑中风诊断的主要难点有:早期无症状或轻度症状,难以检测;实时诊断难以区分出血性中风或缺血性中风;长期治疗无法判断受损细胞类型和/或治疗效果,造成中风诊断水平普遍低下。因此,早期诊断、快速诊断、精确诊断,特别是无需脊髓穿刺获取脑脊液就能完成这样的诊断,对于降低脑中风患

者的致残率和死亡率具有特别重要的作用。

发明内容

[0009] 本发明人对脑中风患者的体液样品特别是外周血进行了长期而深入的研究,结果发现,也有极微量($<100\text{pg/mL}$)的GFAP进入外周血液系统。基于该发现,本发明提供了一种技术手段,对以外周血为代表的体液进行发光ELISA检测,测定该外周血血清中的标志性蛋白成分(例如GFAP)的浓度,以此实现对脑卒中的诊断,同时还能避免高危险性的脊髓穿刺。

[0010] 发光ELISA的特点是具有识别微弱信号的能力,其灵敏度为传统的、以酶催化为基础的ELISA的10~1,000倍。这种检测灵敏度的大幅提高,对检测系统分辨信号真假阳性的能力提出了极高的要求,尤其是检测试剂的作用。

[0011] 为了使发光ELISA在增强信号的同时能够降低噪音从而显著降低假阳性,本发明第一方面提供一种针对发光ELISA的体液样品稳定化用水溶液,该体液样品中含有神经损伤标志性蛋白成分,在该体液样品稳定化用水溶液中,溶质包括人血清、动物血清白蛋白、无机碱金属盐、Tris碱、蛋白变性剂以及非离子型表面活性剂,该水溶液的pH值为6.7~7.6。

[0012] 优选的是所述体液样品稳定化用水溶液的pH值为7.0~7.4。

[0013] 所述动物血清白蛋白来自牛、羊、马、兔、鸡,并且优选为牛血清白蛋白。

[0014] 优选的是,在每100ml所述体液样品稳定化用水溶液中,人血清的浓度为10体积%~50体积%;牛血清白蛋白的浓度为0.1质量/体积%~10质量/体积%;无机碱金属盐的浓度为110mM~200mM;Tris碱的浓度为10mM~25mM;蛋白变性剂的浓度为0.01mM~0.5mM,以及非离子型表面活性剂的浓度为0.05体积%~5.0体积%。

[0015] 无机碱金属盐优选选自碱金属盐酸盐;蛋白变性剂选自尿素和十二烷基硫酸钠;所述非离子型表面活性剂选自吐温-20,吐温-40,吐温-60,吐温-80和Triton X-100。

[0016] 优选的是,所述无机碱金属盐为氯化钠和氯化钾,所述蛋白变性剂为尿素,所述非离子表面活性剂为吐温-20。

[0017] 更优选的是,在每100ml所述体液样品稳定化用水溶液中,所述人血清的浓度为10体积%~35体积%;所述牛血清白蛋白的浓度为0.5质量/体积%~5质量/体积%;吐温-20的浓度为0.1体积%~3.0体积%;尿素的浓度为0.05mM~0.25mM;氯化钠的浓度为110mM~150mM;氯化钾的浓度为2.0mM~3mM;以及Tris碱的浓度为15mM~25mM。

[0018] 所述氯化钠、氯化钾和所述Tris碱的至少一部分以Tris缓冲盐水的形式提供。

[0019] 所述神经损伤标志性蛋白成分选自神经胶质细胞原纤维酸性蛋白(GFAP)、神经丝蛋白(NFP)、神经丝蛋白重链(NF-H)、神经丝蛋白中链(NF-M)、神经丝蛋白轻链(NF-L)以及神经烯醇化酶。

[0020] 所述体液为血液、血清、脑脊液、组织液、尿液、唾液或者汗液,优选为人外周血血清。更优选的是,所述人外周血血清中含有GFAP作为所述神经损伤标志性蛋白成分;进一步更优选的是,每毫升所述人外周血血清中所含的GFAP为pg级水平。

[0021] 所述人外周血血清来自无症状志愿者、轻微症状的脑中风患者、脑中风急性期患者、脑中风恢复期患者、或脑中风后遗症期患者。

[0022] 所述发光ELISA为双抗体夹心法ELISA。

[0023] 本发明第二方面提供一种用于发光ELISA的体外诊断试剂盒,包括上述第一方面所述的体液样品稳定化用水溶液,以及任选地包括的抗所述神经损伤标志性蛋白成分的抗体。

[0024] 所述的抗所述神经损伤标志性蛋白成分的抗体优选为抗GFAP蛋白抗体。

[0025] 所述抗GFAP蛋白抗体包括:捕捉抗体和探测抗体;其中所述捕捉抗体和所述探测抗体为分别针对GFAP蛋白不同抗原表位的抗GFAP抗体。

[0026] 优选的是,所述探测抗体上耦联有发光基团。

[0027] 所述发光基团的发光方式包括化学方式或者物理方式,所述化学方式优选包括酶催化或者化学发光,所述物理方式优选包括电致发光、荧光、以及荧光共振能量转移中的任意一者。

[0028] 优选的是,所述捕捉抗体为单克隆抗体或多克隆抗体,并且所述探测抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。

[0029] 所述多克隆抗体来自小鼠、兔、鸡、羊、豚鼠、驴、马中的任意一者。

[0030] 本发明的体外诊断试剂盒可以用于脑中风、出血性脑障碍、创伤性脑障碍、神经退行性疾病(阿尔茨海默病、脑血管性痴呆症、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、肌肉萎缩性轴突硬化症等)的体外诊断。优选的是,所述体外诊断试剂盒用于脑中风的诊断。

[0031] 本发明第三方面提供一种用于脑中风诊断或预后评价的体外检测设备,包括发光ELISA测定仪、以及根据上述第二方面所述的用于发光ELISA的体外诊断试剂盒。

[0032] 优选的是,所述发光ELISA测定仪为高灵敏度的测定仪,其探测灵敏度低于10皮克。

[0033] 本发明的有益技术效果:

[0034] 1、本发明的体液样品稳定化用水溶液能够有效降低基质效应的干扰,提高信噪比,提升检测结果的准确性和重复性,尤其适用于发光ELISA。

[0035] 2、本发明的体外诊断试剂盒可以精确地检测脑中风患者的外周血液中GFAP蛋白浓度,可用于脑中风的临床诊断、早期筛查,还可用于治疗疗效监控以及预后与复发风险评估。

[0036] 3、本发明可有效避免高危险性的脊髓穿刺。通过技术创新,基于检测外周血液中微量GFAP而诊断脑卒中,并且能够大幅降低检测费用。

附图说明

[0037] 图1示出了试验例2中脑中风病人以及健康对照人群的血清样本中GFAP含量差异。

[0038] 图2示出了脑中风病人血清样本中GFAP含量随发病时间延长而升高的状况。

[0039] 图3为MSD GFAP ELISA标准曲线。

具体实施方式

[0040] 以下通过具体实施方式的描述对本发明作进一步说明,但这并非是对本发明的限制。本领域技术人员根据本发明的基本思想,可以做出各种修改或改进,但是只要不脱离本发明的基本思想,均在本发明的范围之内。

[0041] 一. 体液样品稳定化用水溶液

[0042] 虽然本发明人发现脑中风患者的体液中也存在微量的GFAP蛋白存在,但是由于该标志蛋白在体液中的含量极其微少,一般为pg级别,同时在体液中又存在大量的非抗原成分,所以无法采用常规ELISA法完成检测。

[0043] 针对上述问题,本发明人发现,如果采用特定的体液样品稳定化用水溶液对体液样品进行适当的稀释,则可以非常显著地屏蔽掉待测体液样品中的干扰成分,使信/噪比极大地提高,从而可以稳定而且可靠地利用体液样品进行脑中风的发光ELISA检测。

[0044] 本发明第一方面提供一种用于稀释脑中风患者体液从而检测其中的GFAP蛋白含量的体液样品稳定化用水溶液。在本发明中,所述体液样品可以包括血液、尿液、唾液、汗液、组织液、脑脊液等。从GFAP的含量、样品的采集和处理的难易程度等方面考虑,优选所述的体液样品为血液。该血液可以是新鲜血液,也可以是干化血样。特别优选的是,该血液样品为脑中风患者或疑似患者的新鲜全血静置后离心获得的外周血血清。

[0045] 本发明的用于发光ELISA的体液样品稳定化用水溶液中,溶质包括人血清、动物血清白蛋白、无机碱金属盐、Tris碱、蛋白变性剂以及非离子型表面活性剂,该水溶液的pH为6.7~7.6。

[0046] 所述动物血清白蛋白可以来自除了人之外的其它哺乳类动物,更优选来自牛、羊、马、兔、鸡等,并且进一步更优选为牛血清白蛋白。

[0047] 所述无机碱金属盐可以为碱金属盐酸盐、碱金属硫酸盐和碱金属磷酸盐。在每100ml所述体液样品稳定化用水溶液中,无机碱金属盐的浓度可以在110~200mM范围内,更优选在120~150mM范围内。

[0048] 所述蛋白变性剂可以为尿素或者十二烷基硫酸钠。在每100ml所述体液样品稳定化用水溶液中,蛋白变性剂的浓度可以在0.01~0.5mM范围内,更优选在0.05~0.25mM范围内。

[0049] 所述非离子型表面活性剂可以为吐温-20,吐温-40,吐温-60,吐温-80和Triton X-100。在每100ml所述体液样品稳定化用水溶液中,非离子型表面活性剂的浓度可以在0.05~5.0体积%范围内,更优选在0.1~3.0体积%范围内。

[0050] 优选地,所述体液样品稳定化用水溶液为血清样品稳定化用水溶液。

[0051] 在一个特别优选的实施方式中,100ml所述体液样品稳定化用水溶液由10体积%~50体积%的人血清、0.1~5.0质量/体积%的牛血清白蛋白、0.05~5.0体积%的吐温-20、0.05~0.25mM的尿素、110~150mM的氯化钠、2.0~3.0mM的氯化钾、15~25mM的Tris碱、以及无菌蒸馏水组成。该稳定化用水溶液优选用于待检血液样品的稀释。使用该血液样品稳定化用水溶液可以使血液样品处理、稀释一次完成,操作简便,并有效降低了血清中其他成分的干扰。

[0052] 例如,该体液样品稳定化用水溶液可以如下制备:

[0053] 准备少量无菌蒸馏水,按容积10~50%比例加入正常人血清(BioreclamationIVT,USA),按0.1~5.0质量/体积%比例加入牛血清白蛋白(Sigma,USA),按容积0.05~5.0%比例加入吐温20(Sigma-Aldrich,USA),按重量0.05~0.25mM比例加入尿素(Sigma-Aldrich,USA),按重量110~150mM比例加入氯化钠(Sigma-Aldrich,USA),按重量2.0~3.0mM比例加入氯化钾(Sigma-Aldrich,USA),按重量15~25mM比例加入Tris碱(Sigma-Aldrich,USA),最后加入无菌蒸馏水混合均匀使得总体积为100ml。

[0054] 二. 体外诊断试剂盒

[0055] 本发明第二方面提供一种用于发光ELISA的体外诊断试剂盒, 优选采用ELISA双抗体夹心法来检测GFAP蛋白。

[0056] ELISA法是一种常见的抗体或抗原测定方法。ELISA法主要包括抗原的分离与净化、抗血清的制备和抗血清反应三个环节。ELISA主要是基于相关联的酶对抗原-抗体免疫复合物发生酶催化反应进行测定。对于抗原的检测, ELISA常用的有直接法测定抗原、竞争法测定抗原、双抗体夹心法测定抗原等方法。

[0057] 双抗体夹心法是目前测定抗原最常见的解决方案。在双抗体夹心法中, 将已知抗体吸附在微量滴定板(塑料板)上的小孔里, 洗涤一次; 加待测抗原(例如, 含有GFAP蛋白的待测血清), 发生特异性抗原-抗体结合; 然后把未结合的多余抗体洗除; 加入与待测抗原呈特异反应的预先与酶或发光基团耦联了的探测抗体, 使形成“夹心”; 加入酶的底物, 或必要的发光诱导剂。底物被酶降解后会产生有色物质, 或者发光基团会产生可见光或荧光, 借助相应ELISA测定仪可对颜色或光进行定量检测, 从而可以确定抗原的有无及数量。

[0058] 本发明人发现, 脑中风患者的体液中神经损伤标志性蛋白(例如GFAP)的含量极其微少, 一般为pg级别, 为了精确地检测其含量, 本发明提供一种发光ELISA诊断试剂盒。

[0059] 具体而言, 本发明的发光ELISA诊断试剂盒包含根据上述第一方面所述的样品稳定化用水溶液, 还包含捕捉抗体、探测抗体、根据需要的相应的酶底物, 以及使用说明书等。

[0060] 在本发明的发光ELISA诊断试剂盒中, 在探测抗体上耦联有发光基团。与传统ELISA不同的是, 发光ELISA的反应载体为不透明的板(下文中, 有时简称为“酶标板”), 发光系统是光子吸收, 检测仪器利用的是光电倍增管的光子吸收, 发光ELISA的灵敏度更高。

[0061] 所述发光基团的发光方式可以包括化学方式或者物理方式。所述化学方式包括酶催化或者化学发光, 所述物理方式包括电致发光、荧光、或者荧光共振能量转移。

[0062] 化学发光免疫检测方法具有特异性强、稳定快速、检测范围宽、操作简单等优点。化学发光系统的原理在于将酶作用于发光底物。发光底物在酶的作用下, 底物发生化学反应并释放出大量的能量, 产生激发态的中间体。这种激发态中间体, 当其回到稳定的基态时, 可同时发射出光子。利用发光信号测量仪器即可测量光量子产额, 该光量子产额与样品中的待测物质的量成正比。由此可以建立标准曲线并计算样品中待测物质的含量。具体说来, 可以采用辣根过氧化物酶(HRP)催化鲁米诺(Luminol)底物发光系统。

[0063] 作为化学发光溶液的一个例子, 例如, 准备含有鲁米诺、对甲苯酚的三(羟甲基)氨基甲烷溶液作为A液, 另准备含有柠檬酸、无水 Na_2HPO_4 、过氧化氢脲的溶液作为B液, 在使用前将A液与B液按1:1混匀。

[0064] 电致化学发光(electrogenenerated chemiluminescence, ECL)是发光物质在电极表面经过电化学和化学反应后形成高能的激发态, 再经驰豫而产生光的过程。常见的ECL试剂有9, 10-二苯基蒽(DPA)、钌联吡啶($\text{Ru}(\text{bpy})_3^{2+}$)、过氧化草酸酯、鲁米诺和量子点等。

[0065] 荧光以及荧光共振能量转移(fluorescence resonance energy transfer, FRET)作为一种能在生物活体和体外检测纳米级距离变化的工具, 在生物大分子相互作用、免疫分析、核酸检测等方面有广泛的应用。FRET具有灵敏度高、适用广泛、分析速度快等优点。其中, 量子点(QDs)所具有的独特光学性质(宽吸收、窄发射、抗光漂白及荧光可调), 使其非常适合用于FRET研究。

[0066] 本发明的用于发光ELISA的体外诊断试剂盒优选采用小鼠GFAP单克隆抗体作为捕捉抗体。在此,术语“捕捉抗体”是指包被于固相的酶标板(例如,微量滴定板)上的抗体。此外,所述体外诊断试剂盒还优选包含鸡源GFAP多克隆抗体作为探测抗体。在此,术语“探测抗体”是指试剂盒中可与待测抗原结合并且未包被于固相酶标板上的特异性抗体。“捕捉抗体”和“探测抗体”可以各自采用市售产品,或者利用本领域的常规技术,采用杂交瘤细胞技术或免疫动物制备而得。

[0067] 本发明的用于发光ELISA的体外诊断试剂盒可以用于创伤性脑损伤或者原发性脑损伤的快速诊断。举例来说,本发明的体外诊断试剂盒可以用于脑中风、出血性脑障碍、创伤性脑障碍、神经退行性疾病(阿尔茨海默病、脑血管性痴呆症、帕金森病、亨廷顿氏舞蹈病、肌肉萎缩性轴突硬化症等)等疾病的快速诊断。

[0068] 优选的是,本发明的用于发光ELISA的体外诊断试剂盒可以用于对脑中风患者的血清中的GFAP蛋白进行检测。

[0069] 在本发明的试剂盒中,还可以包含检测所需的任何试剂或工具,例如预包被板、洗涤液、显色剂、终止液等。如果试剂盒中包括了固相的酶标板(例如,微量滴定板),优选该酶标板是微孔经过所述捕捉抗体包被过的预包被板。

[0070] 三. 体外检测系统

[0071] 本发明还提供一种用于脑中风诊断或预后评价的体外检测设备,其包括发光ELISA测定仪、以及根据上述第二方面所述的用于发光ELISA的体外诊断试剂盒。

[0072] 对于本发明中所用的发光ELISA测定仪,例如,包括但不限于美国Meso Scale Discovery的MSD ELISA Imagers,美国PerkinElmer公司的AlphaLISA,美国Quanterix公司的Simoa HD1。

[0073] 具体地,如果采用脑中风病人的血液为待检体液样品,那么使用该ELISA测定仪进行检测时的基本操作步骤包括:

[0074] 待测血清的制备

[0075] 静脉抽取脑中风病人血液;室温状态下放置1~2h,使血细胞和血清自然分层分离;将血清按2:1~1:10比例与所述血清样品稳定化用水溶液混合均匀,备用。

[0076] 酶联免疫吸附

[0077] 准备48或96孔微量滴定板(酶标板)。将GFAP单克隆抗体吸附在微量滴定板上的小孔里,用PBS洗涤一次;向微量滴定板小孔中加入如上制备的稀释后的脑中风病人血清;然后把未结合的多余抗体洗除;接着向小孔中加入已事先与发光基团耦联的探测抗体,该耦联探测抗体优选为动物来源的抗血清(即,多克隆抗体)。然后洗涤该酶标板的小孔3-4次。

[0078] 抗原含量测定

[0079] 洗涤后,如有需要向酶标板的小孔中加入所述发光基团诱导物(例如化学发光的酶底物等),该诱导物可导致发光基团产生颜色或发光。加入底物后,立即将酶标板放入相应的高灵敏度ELISA检测仪,读取信号数据。

[0080] 通过对血清样品进行稀释并使用高灵敏度的发光ELISA检测仪,本发明采用ELISA法对抗GFAP抗体进行检测,可检测脑中风患者血清中的pg级别的GFAP蛋白含量。

[0081] 本发明人的实验研究发现,脑中风后大脑损伤造成的血清GFAP蛋白含量异常增加。血清GFAP蛋白水平直接反映了由中风造成的大脑损伤程度、损伤细胞类型(是缺血性还

是出血性脑细胞受损),可作为中风患者疗效评价与制定康复方案的重要参考指标。根据该蛋白含量,本发明能够用于诊断脑中风患者脑细胞受损类型与相对数量,能够诊断无症状或轻微症状的脑中风、脑中风急性期、脑中风恢复期、脑中风后遗症期等。本发明还能够用于脑中风预警与疗效及病程监测,指导中风预防与体检检测。

[0082] 除血液样品外,本发明的用于脑中风诊断或预后评价的体外检测设备也适用于检测其他体液样品,例如脑脊液、组织液、尿液、唾液、汗液等。

[0083] 以下通过例子的方式进一步解释或说明本发明的内容,但这些例子不应被理解为本发明的保护范围的限制。

[0084] 实施例

[0085] 制备例1

[0086] 体液样品稳定化用水溶液1的制备

[0087] 准备50mL无菌蒸馏水,加入10mL正常人血清 (BioreclamationIVT,USA),1g牛血清白蛋白 (Sigma,USA),2mL吐温20 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为0.05mM的尿素 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为110mM的氯化钠 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为2.0mM的氯化钾 (Sigma-Aldrich,USA),以及最终浓度为10mM的Tris碱 (Sigma-Aldrich,USA),最后加入余量无菌蒸馏水混合均匀并定容至100mL。

[0088] 制备例2

[0089] 体液样品稳定化用水溶液2的制备

[0090] 准备50mL无菌蒸馏水,加入20mL正常人血清 (BioreclamationIVT,USA),2g牛血清白蛋白 (Sigma,USA),2mL吐温20 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为0.08mM的尿素 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为125mM的氯化钠 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为2.3mM的氯化钾 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为15mM的Tris碱 (Sigma-Aldrich,USA),最后加入余量无菌蒸馏水混合均匀并定容至100mL。

[0091] 制备例3

[0092] 体液样品稳定化用水溶液3的制备

[0093] 准备50mL无菌蒸馏水,加入30mL正常人血清 (BioreclamationIVT,USA),2g牛血清白蛋白 (Sigma,USA),2mL吐温20 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为0.1mM的尿素 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为137mM的氯化钠 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为2.7mM的氯化钾 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为19mM的Tris碱 (Sigma-Aldrich,USA),最后加入无菌蒸馏水混合均匀并定容至100mL。

[0094] 制备例4

[0095] 体液样品稳定化用水溶液4的制备

[0096] 准备20mL无菌蒸馏水,加入50mL正常人血清 (BioreclamationIVT,USA),1g绵羊血清白蛋白 (Sigma,USA),5mL吐温20 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为0.25mM的尿素 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为150mM的氯化钠 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为3mM的氯化钾 (Sigma-Aldrich,USA),最终浓度为25mM的Tris碱 (Sigma-Aldrich,USA),最后加入无菌蒸馏水混合均匀并定容至100mL。

[0097] 制备例5

[0098] GFAP捕捉抗体(小鼠GFAP单克隆抗体)溶液的制备

[0099] 将小鼠GFAP单克隆抗体 (Abcam, 抗GFAP小鼠单克隆抗体2A5) 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 稀释到1 μ g/mL, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0100] 制备例6

[0101] 探测抗体 (兔多克隆抗体) 的制备

[0102] 将兔源多克隆抗体 (Abcam, 抗GFAP, ab7260) 按厂家说明与MSD的磺基标签NHS酯 (SULFO-Tag-NHS-Ester) 偶联 (MSD, R91A0-1), 4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0103] 试验例1 本发明检测血清GFAP蛋白的功效试验

[0104] 1、实验方法

[0105] (1) MSD ELISA GFAP试剂盒检测步骤:

[0106] 准备一个96孔MSD ELISA酶标板, 用于包被GFAP捕捉抗体。具体程序是: 将30 μ L抗体溶液 (1 μ g/mL, 小鼠GFAP单克隆抗体, 按照制备例5的制备方法制得) 加入酶标板孔内, 轻微摇动使抗体均匀铺于孔底部。放置于4 $^{\circ}$ C过夜, 从而将抗体固定在孔底。用120 μ L PBS将酶标板孔洗涤2次, 去除未固定的抗体等成分。将120 μ L封闭液 (3% BSA/PBS) 加入每个酶标板孔中, 将酶标板放置于微孔板震荡器以200~500RPM速度在室温下混合1小时。

[0107] 准备标准牛GFAP蛋白样品 (US Biological Life Sciences, Bovine GFAP)。将标准牛GFAP蛋白样品用制备例1中得到的体液样品稳定化用水溶液1稀释至步骤(2)所设定的8个浓度梯度。将两份25 μ L稀释后的样品加入相邻的两个酶标板孔 (作为重复样本), 将酶标板放置于微孔板震荡器上以200~500RPM速度在室温下混合1小时。

[0108] 提前将探测抗体 (兔源GFAP多克隆抗体) 进行偶联 (Sulfo-tag, 依照MSD公司产品手册; 4 $^{\circ}$ C保存)。

[0109] 实验之前将偶联探测抗体用溶液 (该溶液是通过用三羟甲基氨基甲烷缓冲液溶解2%牛血清白蛋白和0.2%吐温20而得到的) 稀释至2 μ g/mL, 将25 μ L该抗体稀释液加入酶标板孔, 将酶标板放置于微孔板震荡器以200~500RPM速度在室温下混合1小时。

[0110] 将酶标板用TBST洗涤液 (该洗涤液是通过用三羟甲基氨基甲烷缓冲液 (TBS) 将吐温20按容积稀释到0.2%而制得的) 洗4次。将150 μ L MSD发光液 (1X) (其是通过将4xMSD发光液 (MSD Read Buffer (4x) Cat#R92TC) 用无菌蒸馏水稀释而得到的) 加入酶标板孔, 立即将ELISA盘放入MSD Imager 2400读取信号数据并参照MSD Benchwork预设程序, 自动计算浓度。

[0111] (2) MSD ELISA GFAP标准曲线的制作以及灵敏度 (Lower Limit of Detection; LLOD) 的测量: 用体液样品稳定化用水溶液1将标准牛GFAP蛋白按照以下梯度浓度进行稀释: 0, 2.5, 9.8, 39.1, 156.3, 625, 2500和10,000 (pg/mL)。依照上述步骤(1)计算相关的浓度和最低测量浓度, 制作标准曲线。

[0112] (3) MSD GFAP ELISA试剂盒的稳定性及精度测量:

[0113] 依照实验步骤(1)和(2)进行3次实验以获取3个独立的标准曲线测量值。每个实验之间相隔8个月。通过比较3个实验的结果得到了试剂盒的至少两年的检测稳定性及测量精度。

[0114] 2、实验结果

[0115] (1) MSDGFAP ELISA标准曲线及灵敏度:

[0116] 依照实验步骤(1)和(2)进行3次实验。

[0117] 3次实验结果显示,其线性范围广,灵敏度高。3次实验对血液GFAP蛋白的检测灵敏度(最低检测浓度;LLOD)分别为17.9、21.1和20.8pg/mL,均低于22pg/mL的浓度,具有极大的临床诊断价值。实验结果示于表1以及附图3。

[0118] 表1:MSD GFAP ELISA标准曲线及灵敏度

[0119] 实验1

标准浓度 (pg/mL)	ELISA 信号	变异系数	测量浓度	最低检测 浓度
10,000.0	18081	1.5	10021.4	17.9pg/mL
2,500.0	4798	5.0	2482.1	
625.0	1273	6.3	620.8	
156.3	427	1.5	162.9	
39.1	210	0.3	39.6	
9.8	146	21.9	7.4	
2.5	162	11.8	10.6	
0.0	147	7.7	3.3	

[0121] 实验2

标准浓度 (pg/mL)	ELISA 信号	变异系数	测量浓度	最低检测 浓度
10,000.0	15229	1.4	9967.6	21.1pg/mL
2,500.0	3854	1.8	2557.0	
625.0	953	13.1	597.6	
156.3	350	1.2	166.9	
39.1	178	4.0	36.6	
9.8	145	3.9	9.9	
2.5	136	7.3	4.1	
0.0	134	4.2	2.0	

[0123] 实验3

标准浓度 (pg/mL)	ELISA 信号	变异系数	测量浓度	最低检测 浓度
10,000.0	18042	14.8	10204.4	20.8pg/mL
2,500.0	4067	4.0	2420.7	
625.0	1123	3.8	634.3	
156.3	392	1.6	152.5	
39.1	247	4.0	49.1	
9.8	191	5.2	5.7	
2.5	185	1.5	1.0	
0.0	186	2.7	1.9	

[0125] (2)MSDGFAP ELISA试剂盒的稳定性及精度:

[0126] 根据相隔4个月的6次独立的实验结果显示,本发明的GFAP试剂盒具有高度稳定的检测结果以及检测准确性。6次独立的实验结果计算的相对误差(Relative Error;RE)和变异系数(Coefficient of variation;CV)在156pg/mL以上的浓度范围内均低于10%。实验结果示于表2。

[0127] 表2:MSD GFAP ELISA试剂盒的稳定性及精度

标准浓度 (pg/mL)	测量值					
	实验 1	实验 2	实验 3	实验 4	实验 5	实验 6
10,000.0	10021.4	9967.6	10238.9	10001.9	10234.3	10204.4
2,500.0	2482.1	2557.0	2440.7	2492.4	2426.2	2420.7
625.0	620.8	597.6	602.0	642.5	614.4	634.3
156.3	162.9	166.9	175.2	144.2	170.0	152.5
39.1	39.6	36.6	53.7	45.5	35.4	49.1
9.8	7.4	9.9	8.3	12.9	12.6	5.7
2.5	10.6	4.1	6.4	4.6	7.3	1.0
0.0	3.3	2.0	0.0	0.0	1.8	1.9

[0129] 6次实验的统计结果:

标准浓度 (pg/mL)	实验 1~实验 6			
	平均值	S.D.	RE(%)	CV(%)
10,000.0	10111.4	143.6	1.1	1.3
2,500.0	2469.9	59.0	-1.2	2.1
625.0	618.6	12.3	-1.0	2.8
156.3	161.9	6.3	3.8	7.4
39.1	43.3	9.1	11.1	18.7
9.8	9.5	1.3	-3.4	29.5
2.5	5.7	3.3	127.5	129.6
0.0	1.5	1.7	NA	NA

[0131] 试验例2 MSD ELISA法检测脑中风患者血清GFAP含量

[0132] 1、实验方法

[0133] (1) 中风病人征集条件:

[0134] ①纳入标准:患者年龄40~85岁,入院时间在发病48h内;采用CT等经典方法诊断为缺血性或出血性急性脑卒中。

[0135] ②排除标准:伴有精神疾病或严重意识障碍或语言交流障碍,不能完成检查;既往3个月内有严重头部外伤或卒中发病史;既往14d内非压迫部位动脉穿刺,或接受重大手术;颅内动静脉畸形或动脉瘤。

[0136] ③样本采集方法:每个病例收集3~5个血清样本,具体包括:

[0137] 急性期:卒中发生后7天内:隔天采集血清样本1次,共计2~3次;

[0138] 恢复期:卒中发生后8~30天:采集血清样本1次;后遗症期:采集血清样本1次。

[0139] 将34个脑中风病人,以及25个年龄、性别相匹配的正常人纳入实验。

[0140] (2) 血液样品采集及处理:

[0141] 以入院时间为0h,在0,8小时、24小时、72小时(第3天)、120小时(第5天)、192小时(第8天)和240小时(第10天),分别收集病人1mL血样。正常人血样于早晨8点收集。室温静置1~2h后,分离血清,采用低温冷冻干燥仪制成干粉后,保存备用。

[0142] (3) 血液样品GFAP蛋白含量检测:

[0143] 将干化血样用1mL纯净水溶解。将样品与制备例1中所制备的样品稳定化用水溶液1按1:1比例混合,在2个酶标板孔中分别加入25 μ L稀释样品(作为重复样本),依照试验例1中的实验步骤(1)检测样品中的GFAP含量。

[0144] 2、实验结果

[0145] 本发明对总共67个血液样品(其中,42个样品属于中风病人和25个样品属于健康人)的检测结果显示,脑中风病人组的血液GFAP含量的平均值为79.81pg/mL,明显高于健康人对照组的平均值2.72pg/mL。检测结果示于表3和附图1。并且发现,如图2所示,随着脑中风发生后时间的加长,血液中GFAP的含量呈下降趋势。

[0146] 表3:脑中风病人及健康人对照组的血液GFAP含量

[0147]

样品代码	病况	时间(小时)	GFAP (pg/ml)	CV	样品代码	病况	时间(小时)	GFAP (pg/ml)	CV
1	中风	0	2.5	141.4	35	中风	240	0.0	NaN
2	中风	0	0.0	NaN	36	中风	240	14.8	9.8
3	中风	0	970.1	28.0	37	中风	240	0.0	NaN
4	中风	0	15.4	141.4	38	中风	240	2.1	141.4
5	中风	0	1032.1	7.5	39	中风	240	9.7	10.1
6	中风	0	0.0	NaN	40	中风	240	0.0	NaN
7	中风	0	759.1	NaN	41	中风	240	0.0	NaN
8	中风	0	0.0	NaN	42	中风	240	13.8	14.1
9	中风	8	0.0	NaN	43	健康	N/A	0.0	NaN
10	中风	8	168.7	5.0	44	健康	N/A	0.0	NaN
11	中风	8	18.4	22.7	45	健康	N/A	0.0	NaN
12	中风	8	69.9	20.3	46	健康	N/A	14.5	20.7
13	中风	8	16.1	10.0	47	健康	N/A	0.0	NaN
14	中风	24	0.1	141.4	48	健康	N/A	30.8	7.5
15	中风	24	0.0	NaN	49	健康	N/A	0.0	NaN
16	中风	24	0.0	NaN	50	健康	N/A	0.0	NaN
17	中风	24	0.0	NaN	51	健康	N/A	4.3	141.4
18	中风	24	103.0	16.7	52	健康	N/A	0.0	NaN
19	中风	72	0.0	NaN	53	健康	N/A	0.0	NaN
20	中风	72	0.0	NaN	54	健康	N/A	0.0	NaN
21	中风	72	0.0	NaN	55	健康	N/A	0.0	NaN
22	中风	72	61.3	0.8	56	健康	N/A	2.2	141.4
23	中风	120	0.0	NaN	57	健康	N/A	0.0	NaN
24	中风	120	6.6	7.5	58	健康	N/A	0.0	NaN
25	中风	192	0.0	NaN	59	健康	N/A	7.7	36.8
26	中风	192	0.0	NaN	60	健康	N/A	0.0	NaN
27	中风	192	0.0	NaN	61	健康	N/A	0.0	NaN
28	中风	192	26.2	18.5	62	健康	N/A	0.0	NaN
29	中风	192	0.0	NaN	63	健康	N/A	0.0	NaN
30	中风	192	0.0	NaN	64	健康	N/A	5.4	141.4
31	中风	192	0.0	NaN	65	健康	N/A	0.0	NaN
32	中风	192	62.3	7.7	66	健康	N/A	0.0	NaN
33	中风	240	0.0	NaN	67	健康	N/A	3.2	141.4
34	中风	240	0.0	NaN					

[0148] 本发明采用发光ELISA法检测脑中风患者血清GFAP蛋白含量,获得极高的灵敏度。本发明能够精确测定脑中风病人外周血液中由中风引起的GFAP蛋白含量变化水平,弥补了

传统影像法或脑脊液分析法的缺陷,并且可进行无症状或轻微症状的中风诊断。本发明的推广应用,可望降低脑中风发病率、指导制定中风治疗方案、评估中风疗效、减轻中风后遗症。因此,具有重要而广泛的临床诊断学价值。

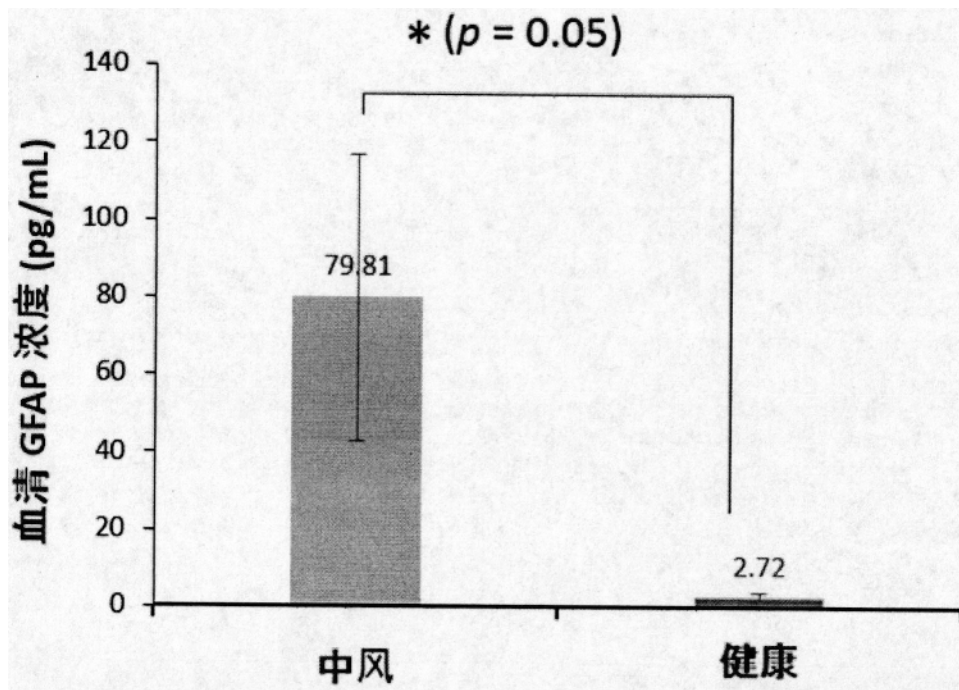


图1

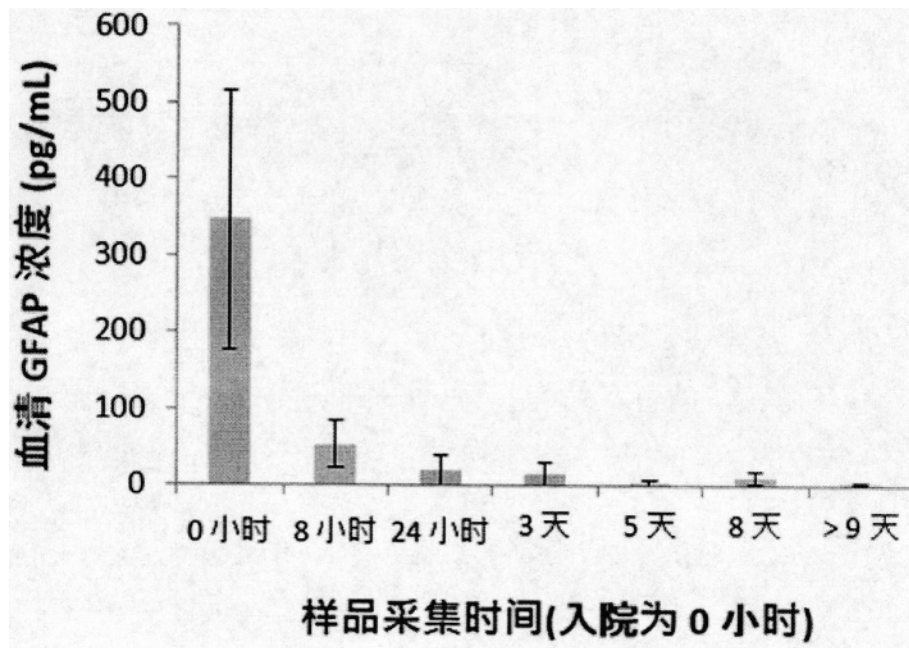


图2

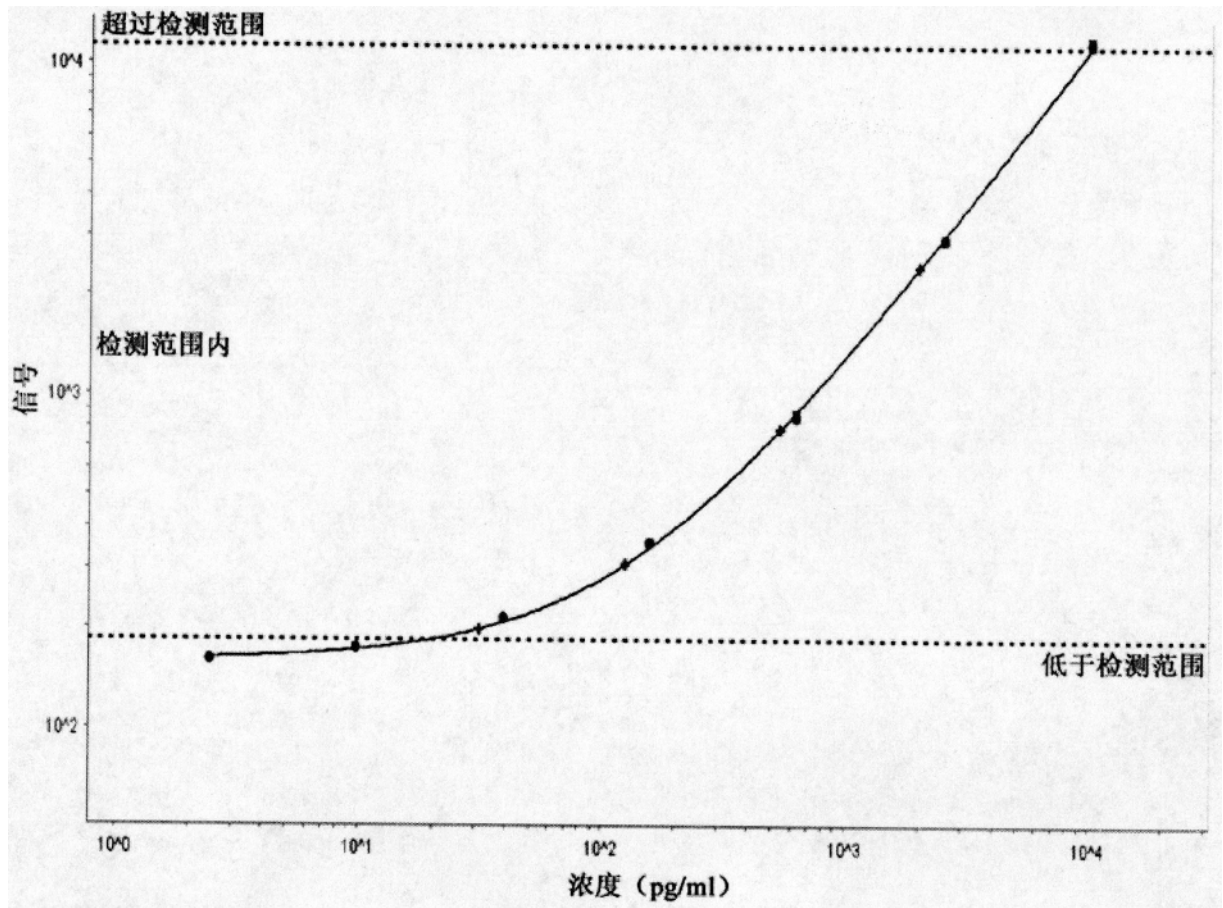


图3