



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112540180 B

(45) 授权公告日 2022.03.29

(21) 申请号 202011227418.8

G01N 33/577 (2006.01)

(22) 申请日 2020.11.06

G01N 33/535 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

G07K 16/18 (2006.01)

申请公布号 CN 112540180 A

C12N 5/20 (2006.01)

C12R 1/91 (2006.01)

(43) 申请公布日 2021.03.23

(56) 对比文件

(83) 生物保藏信息

CN 101802007 A, 2010.08.11

CCTCC C2020131 2020.09.14

CN 101367875 A, 2009.02.18

CCTCC C2020132 2020.09.14

CN 1612894 A, 2005.05.04

(73) 专利权人 华中科技大学

WO 2010012004 A2, 2010.01.28

地址 430074 湖北省武汉市洪山区珞喻路1037号

Xiaoning Zhang 等. Novel antibody against oligomeric amyloid- β : Insight into factors for effectively reducing the aggregation and cytotoxicity of amyloid- β aggregates. 《International Immunopharmacology》. 2018, 第67卷第176-185页.

(72) 发明人 骆海明 张立定

(74) 专利代理机构 华中科技大学专利中心

42201

代理人 许恒恒 李智

审查员 林晓烨

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

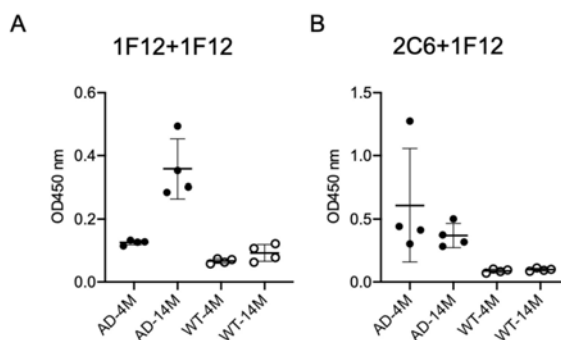
权利要求书1页 说明书8页 附图3页

(54) 发明名称

用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒

(57) 摘要

本发明属于生物技术领域,公开了一种用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,以单克隆抗体1F12、2C6为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体。本发明利用单克隆抗体1F12、2C6构建双抗夹心ELISA检测试剂盒,能够检测人淀粉样蛋白- β 单体 (hA β ₁₋₄₂)、人淀粉样蛋白- β 突变体单体 (hA β ₁₋₄₂ Arc)、人淀粉样蛋白- β 原纤维 (hA β ₁₋₄₂ protofibril)、人淀粉样蛋白- β 突变体原纤维 (hA β ₁₋₄₂ Arc protofibril),整合了抗体的特异性和ELISA高灵敏度的特点,具有准确、快速、高效、特异、灵敏的特点,适用于快速、灵敏对阿尔兹海默症的早期诊断,对于患者的及时、准确地指导药物使用具有重要意义。



1. 一种用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,以单克隆抗体1F12、2C6为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体,其中,分泌单克隆抗体1F12的杂交瘤细胞株*Hustabomab-1F12*于2020年9月14日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2020131;分泌单克隆抗体2C6的杂交瘤细胞株*Hustabomab-2C6*于2020年9月14日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2020132;

所述试剂盒能够检测以下至少一种形式的人淀粉样蛋白- β :

淀粉样蛋白- β 单体 $hA\beta_{1-42}$,即,人源淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸单体;

淀粉样蛋白- β 突变体单体 $hA\beta_{1-42}^{Arc}$,即,人源淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸后对应得到的人源淀粉样蛋白- β 突变体单体;

淀粉样蛋白- β 原纤维 $hA\beta_{1-42}^{protofibril}$,即,人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸单体经过折叠形成的纤维状原纤维;

淀粉样蛋白- β 突变体原纤维 $hA\beta_{1-42}^{Arc\ protofibril}$,即,人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸后对应得到的人源淀粉样蛋白- β 突变体单体,经过折叠形成的纤维状原纤维。

2. 如权利要求1所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以单克隆抗体1F12为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体。

3. 如权利要求1所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒以单克隆抗体2C6为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体。

4. 如权利要求1所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述检测抗体被辣根过氧化物酶HRP标记。

5. 如权利要求1所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述试剂盒还包括显色液、包被缓冲液、清洗缓冲液和终止液。

6. 如权利要求5所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述清洗缓冲液为PBS-T。

7. 如权利要求5所述双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,所述包被缓冲液为CBS缓冲液。

用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,更具体地,涉及一种用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,是一种能够用于检测不同形式人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒。

背景技术

[0002] 阿兹海默病(Alzheimer's disease, AD),又译为阿尔茨海默病,是一种神经退行性疾病,其特征是淀粉样斑块和神经原纤维缠结的大脑沉积。目前中国有老年痴呆患者500万人之多,占世界总病例数的四分之一,而且每年平均有30万新发病例。目前中国老年痴呆的患病率已随着年龄的升高呈显著增长趋势:75岁以上达8.26%,80岁以上高达11.4%;老年痴呆的患者女性多于男性,60岁以上妇女患老年痴呆,通常是相匹配男性的2到3倍。目前,阿兹海默症仍缺乏有效的早期诊断方法和治疗手段,给患者家庭和社会都带来极大的经济负担。因此,早期诊断阿尔茨海默病是极其需要的。

[0003] 目前阿尔茨海默病的检测主要有 β -淀粉样蛋白的PET成像和基于脑脊液的A β 检测这两种方法。临床上PET每次检测价格在人民币7千至1万元之间,且设备有限,导致了患者未能及时就医,进而失去了最佳治疗时间;而脑脊液的获取需要通过腰椎穿刺,创伤较大,且很难短时间内进行多次取样。基于血液生物标志物的测试方式简单、易用,有利于对病人的筛查,但存在生物标志物浓度低,干扰信号大的缺陷。

[0004] 前期研究结果表明外周血中42个氨基酸残基的淀粉样蛋白多肽(amyloid beta₁₋₄₂, A β ₁₋₄₂)是AD很好的生物标志物。当前的检测方法主要侧重对A β ₁₋₄₂单体及可溶性寡聚体的检测,因为脑及脑脊液中A β 的可溶性寡聚体在体外和体内均显示出神经毒性和抑制突触的功能。但与淀粉样蛋白斑块负担相比,可溶性A β ₁₋₄₂ protofibrils(原纤维)与认知能力下降相关性更大。因此,具有神经毒性的可溶性A β ₁₋₄₂原纤维与AD疾病进程密切相关,是AD诊断与治疗很有吸引力的靶标。较为遗憾的是,目前针对可溶性的A β ₁₋₄₂ protofibrils的快速、灵敏、准确的检测方法还很匮乏。因此,准确、快速地检测可溶性A β ₁₋₄₂原纤维对AD病人及时准确的治疗具有重大意义。

[0005] 综上所述,开发对不同形式的人淀粉样蛋白- β ,尤其是可溶性A β ₁₋₄₂ protofibrils,具有高特异性、高灵敏度的双抗夹心ELISA检测方法,对于阿尔茨海默的早期诊断具有重大意义。

发明内容

[0006] 针对现有技术的以上缺陷或改进需求,本发明的目的在于提供一种用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,利用单克隆抗体1F12、2C6构建双抗夹心ELISA检测试剂盒,能够检测人淀粉样蛋白- β 单体(human amyloid beta peptide(1-42), hA β ₁₋₄₂)、人淀粉样蛋白- β 突变体单体(human amyloid beta peptide(1-42)E22G Arctic Mutation, hA β ₁₋₄₂Arc)、人淀粉样蛋白- β 原纤维(human amyloid beta peptide(1-42) protofibril,

hA β ₁₋₄₂ protofibril)、人淀粉样蛋白- β 突变体原纤维 (human amyloid beta peptide (1-42) E22G Arctic Mutation protofibril, hA β ₁₋₄₂ Arc protofibril)。本发明试剂盒整合了抗体的特异性和ELISA高灵敏度的特点,具有准确、快速、高效、特异、灵敏的特点,适用于快速、灵敏对阿尔兹海默症的早期诊断,对于患者的及时、准确地指导药物使用具有重要意义。

[0007] 为实现上述目的,按照本发明,提供了一种用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,其特征在于,以单克隆抗体1F12、2C6为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体,其中,分泌单克隆抗体1F12的杂交瘤细胞株Hustabomab-1F12于2020年9月14日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2020131;分泌单克隆抗体2C6的杂交瘤细胞株Hustabomab-2C6于2020年9月14日保藏于中国典型培养物保藏中心,保藏号为CCTCC NO:C2020132。

[0008] 作为本发明的进一步优选,所述试剂盒能够检测以下至少一种形式的人淀粉样蛋白- β :

[0009] 淀粉样蛋白- β 单体hA β ₁₋₄₂,即,人源淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸单体;

[0010] 淀粉样蛋白- β 突变体单体hA β ₁₋₄₂ Arc,即,人源淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸后对应得到的人源淀粉样蛋白- β 突变体单体;

[0011] 淀粉样蛋白- β 原纤维hA β ₁₋₄₂ protofibril,即,人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸单体经过折叠形成的纤维状原纤维;

[0012] 淀粉样蛋白- β 突变体原纤维hA β ₁₋₄₂ Arc protofibril,即,人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸后对应得到的人源淀粉样蛋白- β 突变体单体,经过折叠形成的纤维状原纤维。

[0013] 作为本发明的进一步优选,所述试剂盒以单克隆抗体1F12为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体。

[0014] 作为本发明的进一步优选,所述试剂盒以单克隆抗体2C6为捕获抗体,单克隆抗体1F12为检测抗体。

[0015] 作为本发明的进一步优选,所述检测抗体被辣根过氧化物酶 (HRP) 标记。

[0016] 作为本发明的进一步优选,所述试剂盒还包括显色液、包被缓冲液、清洗缓冲液和终止液。

[0017] 作为本发明的进一步优选,所述清洗缓冲液为PBS-T。

[0018] 作为本发明的进一步优选,所述包被缓冲液为CBS缓冲液。

[0019] 通过本发明所构思的以上技术方案,与现有技术相比,本发明所研发的杂交瘤细胞株Hustabomab-1F12, Hustabomab-2C6所分泌的特异性识别人淀粉样蛋白- β 单克隆抗体Hustabomab-1F12, Hustabomab-2C6,相应提供特异性抗体组,捕获抗体和检测抗体独立选自单克隆抗体1F12、2C6 (例如,可以使用2C6、1F12作为捕获抗体,1F12作为检测抗体;检测抗体可参照现有技术,标记辣根过氧化物酶;例如,可以将单克隆抗体1F12、2C6包被于96孔板上,将标记辣根过氧化物酶的单克隆抗体1F12作为二抗),能够用于检测hA β ₁₋₄₂、hA β ₁₋₄₂ Arc、hA β ₁₋₄₂ protofibrils、hA β ₁₋₄₂ Arc protofibrils,特异性识别hA β ₁₋₄₂、hA β ₁₋₄₂ Arc、hA β ₁₋₄₂ protofibrils、hA β ₁₋₄₂ Arc protofibrils,检测不同形式人淀粉样蛋白- β 。

[0020] 基于本发明中用于检测人淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA检测试剂盒,在检测时,检

测方法可优选包括如下步骤:

[0021] (1) 将捕获抗体稀释到CBS中,并包被在96孔板上;

[0022] (2) 将待测样品中添加到包被有1F12,2C6的96孔板中于室温反应40min,然后弃上清液,加入PBS-T洗涤3次;

[0023] (3) 加入100 μ L辣根过氧化物酶标记的小鼠单克隆抗体1F12,室温反应40min;

[0024] (4) 弃上清液,然后加入PBS-T洗涤3次,加入100 μ L显色液,37 $^{\circ}$ C避光反应15min,然后加入2摩尔H₂SO₄终止,测OD_{450 nm}吸光度。

[0025] 直接通过肉眼观察液体颜色变化,判断是否存在人淀粉样蛋白- β ,检测方法为常规操作。以1F12-1F12夹心ELISA为例,如果1F12-1F12夹心ELISA结果显示黄色,则说明样品中含有人淀粉样蛋白- β 原纤维,检测结果为阳性;不出现黄色,则说明样品中不含有淀粉样蛋白- β 原纤维,检测结果为阴性;如果2C6-1F12夹心ELISA结果为阳性,但1F12-1F12夹心ELISA检测结果为阴性,则说明样品中仅含有人淀粉样蛋白- β 单体。

[0026] 本发明中人淀粉样蛋白- β 的双抗夹心ELISA试剂盒在检测人淀粉样蛋白- β 方面具有良好的积极效果,能够取得以下有益效果:

[0027] (1) 本发明采用的双抗夹心ELISA技术具有操作简便、快速等特点,适合于基层推广应用;此外,检测结果可以通过肉眼直接观察和判定结果,仅需100min,无需昂贵的仪器如正电子发射计算机断层显像、核磁共振成像等进行淀粉样蛋白- β 的诊断;

[0028] (2) 本发明的双抗夹心ELISA对比其他检测方法能够实现对不同形式的可溶性的人淀粉样蛋白- β 的高灵敏度、高特异性的检测。针对可溶性的hA β ₁₋₄₂单体及神经毒性最强的hA β ₁₋₄₂protofibrils,本发明所建立的双抗夹心ELISA对hA β ₁₋₄₂protofibrils、hA β ₁₋₄₂Arc protofibrils检测灵敏度高达113pg/mL(1F12-1F12),而对hA β ₁₋₄₂、hA β ₁₋₄₂Arc的检测灵敏度可达到226pg/mL(2C6-1F12);

[0029] (3) 基于双抗夹心ELISA的敏感、特异,成本低廉,便于操作等诸多优势,本发明在一定程度上提高了我国阿兹海默综合症的检测能力,为阿兹海默综合症的临床实时快速诊断提供技术基础,对提高我国医疗机构对阿兹海默综合症的病情监控和快速检测水平,以及普及先进技术在基层检验检疫机构的推广应用均具有重要意义。

附图说明

[0030] 图1中的A为不同抗体对检测A β ₁₋₄₂的最佳组合图;B为不同抗体对检测A β ₁₋₄₂protofibrils的最佳组合图。抗体组合2C6+1F12表示2C6为捕获抗体,1F12为标记抗体(即,加号“+”前的对应捕获抗体,加号“+”后的对应标记抗体;下同);1F12+2C6表示为1F12为捕获抗体,2C6为标记抗体。

[0031] 图2中的A为1F12,2C6最适包被缓冲液的优化结果图;B、C、D、E,分别为针对A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₂Arc、A β ₁₋₄₂Protofibrils、A β ₁₋₄₂Arc Protofibrils的抗原最适孵育时间的优化图;F、G、H、I,分别为针对A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₂Arc、A β ₁₋₄₂Protofibrils、A β ₁₋₄₂Arc Protofibrils的信号抗体最适孵育时间的优化图。

[0032] 图3中的A为所建立双抗夹心ELISA检测A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₂Arc的标准曲线;B为所建立双抗夹心ELISA检测A β ₁₋₄₂protofibrils、A β ₁₋₄₂Arc protofibrils的标准曲线;C为双抗夹心ELISA(2C6+1F12)特异性检测A β ₁₋₄₂、A β ₁₋₄₂Arc的结果图;D为双抗夹心ELISA(1F12+1F12)特

异性检测 $A\beta_{1-42}$ protofibrils、 $A\beta_{1-42}$ Arc protofibrils的结果图。

[0033] 图4为本发明所建立双抗夹心ELISA (1F12+1F12) 与双抗夹心ELISA (2C6+1F12) 的检测结果图;其中,A为所建立双抗夹心ELISA (1F12+1F12) 检测APP/PS1、C57小鼠血清中 $A\beta$ protofibrils的结果图;B为所建立双抗夹心ELISA (2C6+1F12) 检测APP/PS1、C57小鼠血清的 $A\beta_{1-42}$ 和 $A\beta$ protofibrils的结果图;其中AD-4M对应4月龄大的APP/PS1小鼠,AD-14M对应14月龄大的APP/PS1小鼠,WT-4M对应4月龄大的C57小鼠,WT-14M对应14月龄大的C57小鼠。

具体实施方式

[0034] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,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例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。此外,下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

[0035] 为便于下文指代,现将主要缩写的含义解释如下:

[0036] 人淀粉样蛋白- β 单体 (human amyloid beta peptide (1-42), $hA\beta_{1-42}$):也即淀粉样蛋白- β 单体,是人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸单体,简写成: $hA\beta_{1-42}$;

[0037] 人淀粉样蛋白- β 突变体单体 (human amyloid beta peptide (1-42) E22G Arctic Mutation, $hA\beta_{1-42}$ Arc):也即淀粉样蛋白- β 突变体单体,是人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸得到的人淀粉样蛋白- β 突变体单体,简写成: $hA\beta_{1-42}$ Arc;

[0038] 人淀粉样蛋白- β 原纤维 (human amyloid beta peptide (1-42) protofibril, $hA\beta_{1-42}$ protofibril):也即淀粉样蛋白- β 原纤维,是人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸经过折叠形成的纤维状原纤维,简写成: $hA\beta_{1-42}$ protofibril;

[0039] 人淀粉样蛋白- β 突变体原纤维 (human amyloid beta peptide (1-42) E22G Arctic Mutation protofibril, $hA\beta_{1-42}$ Arc protofibril):也即淀粉样蛋白- β 突变体原纤维,是人淀粉样蛋白- β 1-42位氨基酸第22位氨基酸由谷氨酸突变成甘氨酸后经过折叠形成的纤维状原纤维,简写成: $hA\beta_{1-42}$ Arc protofibril。

[0040] 准备工作:抗人源淀粉样蛋白- β 特异性单克隆抗体的制备

[0041] 1、抗原的制备

[0042] 将采用现有技术已知方法合成的人源淀粉样蛋白- β ($hA\beta_{1-42}$ (E22G)),溶于10mM NaOH,并用PBS稀释至终浓度为50 μ M。结果:SDS-PAGE结果表明,合成的多肽纯度良好,电泳条带均一。

[0043] 2、小鼠单克隆抗体的制备

[0044] 2.1、小鼠的免疫

[0045] 取100 μ L制备好的抗原与等体积的弗氏完全佐剂进行混合后进行第一次免疫;第一次免疫14天后进行第二次免疫,取100 μ L制备好的抗原与等体积的弗氏不完全佐剂进行混合后免疫;第三次免疫与第二次相同,间隔14天。第三次免疫后,取100 μ L制备好的抗原进行尾静脉加强免疫。

[0046] 3.2、细胞融合筛选阳性克隆

[0047] 加强免疫3天后,收集小鼠的脾细胞与SP2/0细胞进行融合,用含有20%血清的HAT

培养基培养融合的细胞,一周后半量更换HT培养基;细胞融合12后天进行第一次ELISA检测,取阳性孔进行第一次亚克隆;第一次亚克隆14天,进行第二次ELISA检测,取阳性孔进行第二次亚克隆;第二次亚克隆14天,进行第三次ELISA检测;如果经过3次亚克隆后,ELISA检测结果均为阳性,则说明已经成为单克隆,扩大培养后冻存于液氮中。

[0048] 3.3、制备及纯化腹水

[0049] 取3只6-7周龄的雌性Balb/c小鼠腹腔注射0.5mL的无菌液体石蜡,一周后每只小鼠腹腔注射 10^8 个杂交瘤细胞;一周后,进行腹水的收集;利用protein A Sepharose柱进行腹水的纯化。

[0050] 结果:细胞融合后,将融合成功的孔进行ELISA检测,检测结果;经过3轮亚克隆,成功筛选出2株抗 β_{1-42} 的单抗细胞株命名为1F12,2C6。将它们分别保藏于中国典型培养物保藏中心(CCTCC),其中,1F12株的保藏编号为:CCTCC No C2020131,分类命名为:Hustabomab-1F12(杂交瘤细胞株),保藏时间为:2020年9月14日;2C6株的保藏编号为:CCTCC No C2020132,分类命名为:Hustabomab-2C6(杂交瘤细胞株),保藏时间为:2020年9月14日;保藏单位均为:中国典型培养物保藏中心;保藏地址是:湖北省武汉市武昌珞珈山武汉大学保藏中心。

[0051] 实施例1:筛选检测人淀粉样蛋白- β 单体、原纤维抗体对

[0052] 1、筛选检测人淀粉样蛋白- β 单体抗体对

[0053] ①包被捕获抗体:用CBS缓冲液稀释单克隆抗体1F12,2C6至终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$,然后每孔加入 $100\mu\text{L}$,于 4°C 包被过夜;

[0054] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入 $200\mu\text{L}$ 的封闭液,于 37°C 封闭2h;

[0055] ③加入抗原:封闭完成后,每孔用PBS-T洗涤3次,然后每孔加入 $1\mu\text{g}$ 人淀粉样蛋白- β 单体,室温孵育2h;弃上清,每孔用PBS-T洗涤3次;

[0056] ④加入酶标抗体:每孔加入 $100\mu\text{L}$ HRP标记的1F12,2C6,室温反应1h;

[0057] ⑤显色:反应结束后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入 $100\mu\text{L}$ TMB,于 37°C 反应15min;

[0058] ⑥终止:每孔加入 $50\mu\text{L}$ 2摩尔 H_2SO_4 终止反应,然后在酶标仪上读取OD450;

[0059] 结果:在2组不同抗体组合中,2C6+1F12组合检测人淀粉样蛋白- β 单体效果最好,其结果如图1中的A。

[0060] 2、筛选检测人淀粉样蛋白- β 原纤维抗体对

[0061] ①包被捕获抗体:用CBS缓冲液稀释单克隆抗体1F12,2C6至终浓度为 $10\mu\text{g}/\text{mL}$,然后每孔加入 $100\mu\text{L}$,于 4°C 包被过夜;

[0062] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入 $200\mu\text{L}$ 的封闭液,于 37°C 封闭2h;

[0063] ③加入抗原:封闭完成后,每孔用PBS-T洗涤3次,然后每孔加入 $1\mu\text{g}$ 人淀粉样蛋白- β 原纤维,室温孵育2h;弃上清,每孔用PBS-T洗涤3次;

[0064] ④加入酶标抗体:每孔加入 $100\mu\text{L}$ HRP标记的1F12,2C6,室温反应1h;

[0065] ⑤显色:反应结束后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入 $100\mu\text{L}$ TMB,于 37°C 反应15min;

[0066] ⑥终止:每孔加入50 μ L 2摩尔H₂SO₄终止反应,然后在酶标仪上读取OD450;

[0067] 结果:在2组不同抗体组合中,1F12+1F12组合检测人淀粉样蛋白- β 原纤维效果最好,其结果如图1中的B。

[0068] 实施例2:双抗夹心ELISA反应体系的优化

[0069] 1、捕获抗体最佳工作缓冲液的确定

[0070] 为了确保捕获抗体的最佳工作环境,分别用PBS、CBS、TBS三种缓冲液对捕获抗体进行稀释,进行ELISA,具体步骤如下:

[0071] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用PBS、CBS、TBS分别稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被过夜;

[0072] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0073] ③加入抗原:封闭完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入100 μ L用PBS稀释至10 μ g/mL,hA β ₁₋₄₂,hA β ₁₋₄₂protofibril多肽,于室温反应2h;

[0074] 其余步骤参考实施例1;

[0075] 结果:ELISA的结果表明,在3种常规的缓冲液中CBS包被抗体的活性最高,如图2中的A所示。

[0076] 2、抗原最佳孵育时间的确定

[0077] 为了确保抗原被捕获抗体完全捕获,对抗原孵育最佳时间进行优化,孵育时间分5min、10min、15min、20min、30min、40min,具体步骤如下:

[0078] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用CBS稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被12h;

[0079] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0080] ③加入抗原:封闭完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入100 μ L用PBS稀释至10 μ g/mL,hA β ₁₋₄₂,hA β ₁₋₄₂Arc,hA β ₁₋₄₂protofibrils,hA β ₁₋₄₂Arc protofibrils多肽,于37 $^{\circ}$ C,室温反应5min、10min、15min、20min、30min、40min;

[0081] 其余参考实施例1;

[0082] 结果:鉴于A β ₁₋₄₂在37 $^{\circ}$ C聚集形成多聚体,导致错误的分析A β ₁₋₄₂。此外,室温孵育40min的检测结果与37 $^{\circ}$ C孵育时间为30min结果无显著性差异。因此更推荐室温孵育40min(图2中的B至E)。

[0083] 3、信号抗体(HRP-1F12)最佳孵育温度、时间的确定

[0084] 信号抗体充分与抗原结合形成双抗夹心的“三明治”结构,是保证双抗夹心ELISA的阳性的前提。因此,摸索信号抗体与抗原完全结合的条件是充分必要的。本实验从孵育时间进行优化。优化的条件如下:孵育时间分别采用5min、10min、15min、20min、30min、40min进行优化,具体步骤如下:

[0085] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用CBS分别稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被12h;

[0086] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0087] ③加入抗原:封闭完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入100 μ L用PBS稀释至10 μ g/mL hA β_{1-42} ,hA β_{1-42} Arc,hA β_{1-42} protofibrils,hA β_{1-42} Arc protofibrils于室温孵育30min;

[0088] ④加入信号抗体:反应结束后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入100 μ L,终浓度为15 μ g/mL用封闭液稀释的HRP标记的1F12抗体,于37 $^{\circ}$ C,室温分别反应5min、10min、15min、20min、30min、40min;

[0089] 其余步骤参考实施例1;

[0090] 结果:鉴于A β_{1-42} 在37 $^{\circ}$ C聚集形成多聚体,A β_{1-42} protofibrils聚集形成fibrils导致错误的分析A β_{1-42} ,A β_{1-42} protofibrils。此外,室温孵育40min的检测结果与37 $^{\circ}$ C孵育时间为30min结果无显著性差异。因此更推荐室温孵育40min(图2中的F至I)。实施例3:双抗夹心ELISA的灵敏度、特异性评价

[0091] 3.1双抗夹心ELISA的灵敏度

[0092] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用CBS分别稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被12h;

[0093] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0094] ③加入抗原:每孔加入100 μ L不同浓度的hA β_{1-42} 、hA β_{1-42} Arc;hA β_{1-42} protofibrils、hA β_{1-42} Arc protofibrils于室温孵育40min。

[0095] 其余步骤参考实施例1;

[0096] 结果:双抗夹心ELISA对hA β_{1-42} 、hA β_{1-42} Arc;hA β_{1-42} protofibrils、hA β_{1-42} Arc protofibrils最低检测线分别为226pg/mL、113pg/mL;图3中的A、图3中的B为双抗夹心ELISA检测不同形式A β_{1-42} 多肽的标准曲线。

[0097] 3.2双抗夹心ELISA的特异性检测

[0098] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用CBS分别稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被12h;

[0099] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0100] ③加入抗原:分别将加入100 μ L 1mg/mL P-Tau^{396,404}、Cis-tau、Trans-tau、ZIKV-NS1、BSA、Skim milk蛋白

[0101] 其余步骤参考实施例1;

[0102] 结果:从双抗夹心ELISA结果可以看出,建立的双抗夹心ELISA能特异的与不同形式A β_{1-42} 多肽反应,其特异性的检测结果如图3中的C、图3中的D所示;

[0103] 实施例4:应用双抗夹心ELISA检测不同月龄APP/PS1鼠血

[0104] ①包被捕获抗体:将1F12,2C6抗体用CBS分别稀释至10 μ g/mL,然后每孔加入100 μ L的抗体于4 $^{\circ}$ C包被12h;

[0105] ②封闭:包被完成后,弃孔中液体,PBS-T洗涤3次后,每孔加入200 μ L的封闭液,于37 $^{\circ}$ C封闭2h;

[0106] ③加入抗原:分别将加入50 μ L 4月龄APP/PS1、C57小鼠血清,14月龄APP/PS1转基因小鼠血清、C57小鼠血清,室温孵育40min;

[0107] 其余步骤参考实施例1；

[0108] 结果：从双抗夹心ELISA (1F12+1F12) 结果可以看出仅在14月龄APP/PS1转基因小鼠血清中检出了淀粉样蛋白- β 多聚体，表明14月龄APP/PS1转基因小鼠血清中主要以多聚体的形式存在；在4月龄APP/PS1转基因小鼠血清中双抗夹心ELISA (2C6+1F12) 有阳性信号，而在双抗夹心ELISA (1F12+1F12) 没有信号，表明4月龄APP/PS1转基因小鼠血清中主要以单体的形式存在(分别如图4中的A和图4中的B所示)。

[0109] 可见，基于本发明，建立了淀粉样蛋白- β 双抗夹心ELISA快速检测方法，能够快速准确的检测不同形式淀粉样蛋白- β 。本发明尤其可以将单克隆抗体Hustabomab-2C6和辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体Hustabomab-1F12，应用于制备 $hA\beta_{1-42}$ 、 $hA\beta_{1-42}Arc$ 、 $hA\beta_{1-42}protofibril$ 、 $hA\beta_{1-42}Arc protofibril$ 检测试剂；另外，也可以将单克隆抗体Hustabomab-1F12和辣根过氧化物酶标记的单克隆抗体Hustabomab-1F12应用于制备 $hA\beta_{1-42}protofibril$ 、 $hA\beta_{1-42}Arc protofibril$ 检测试剂，得到相应的淀粉样蛋白- β 免疫检测试剂盒。例如，2C6+1F12组合可用于检测单体和多聚体；1F12+1F12组合可用于检测多聚体。试剂盒还可包括配套说明书，辅助试剂；辅助试剂例如：常规显色液、PBS-T、终止液。

[0110] 本发明中所用的试剂均可采用市售试剂。室温为20~25℃。

[0111] 本领域的技术人员容易理解，以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

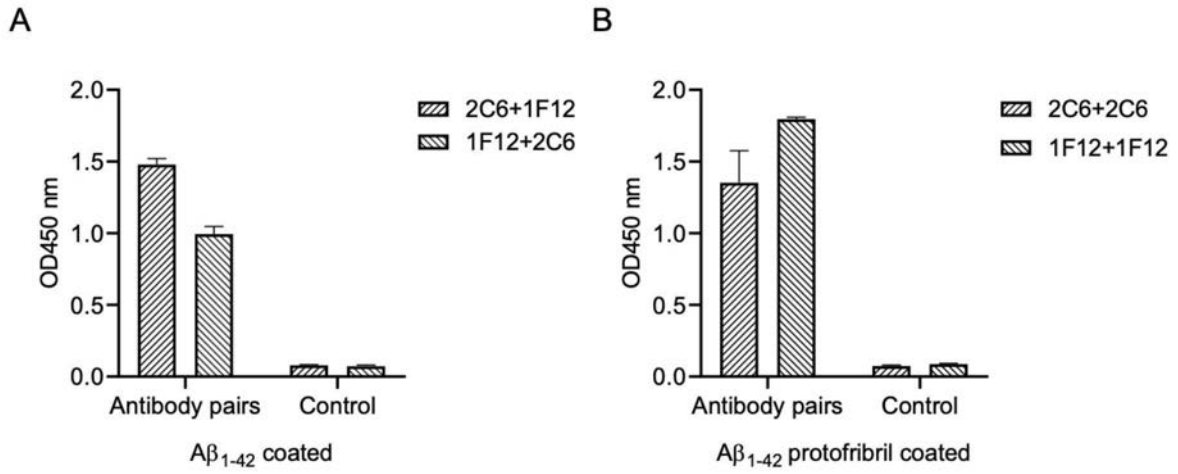


图1

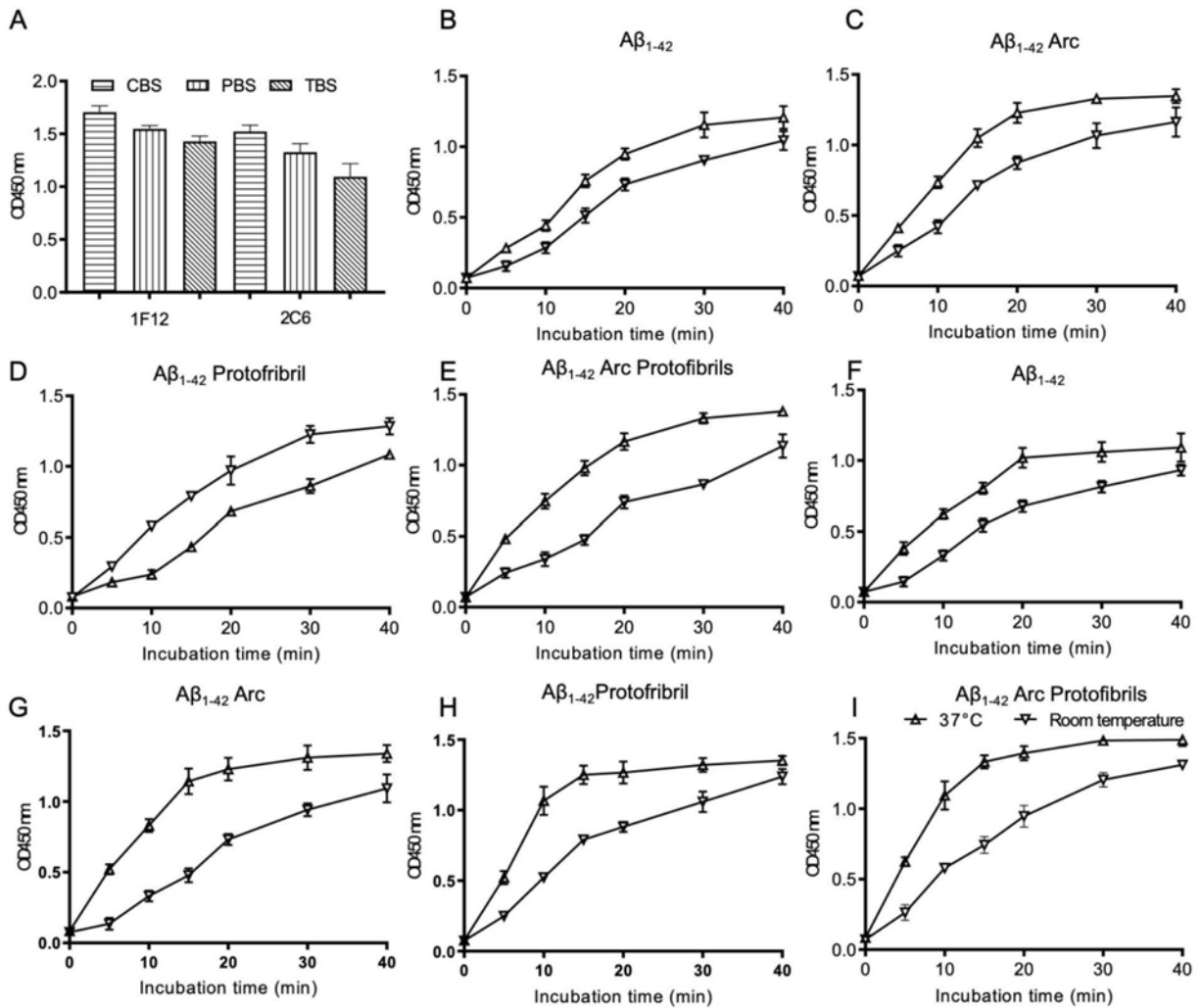


图2

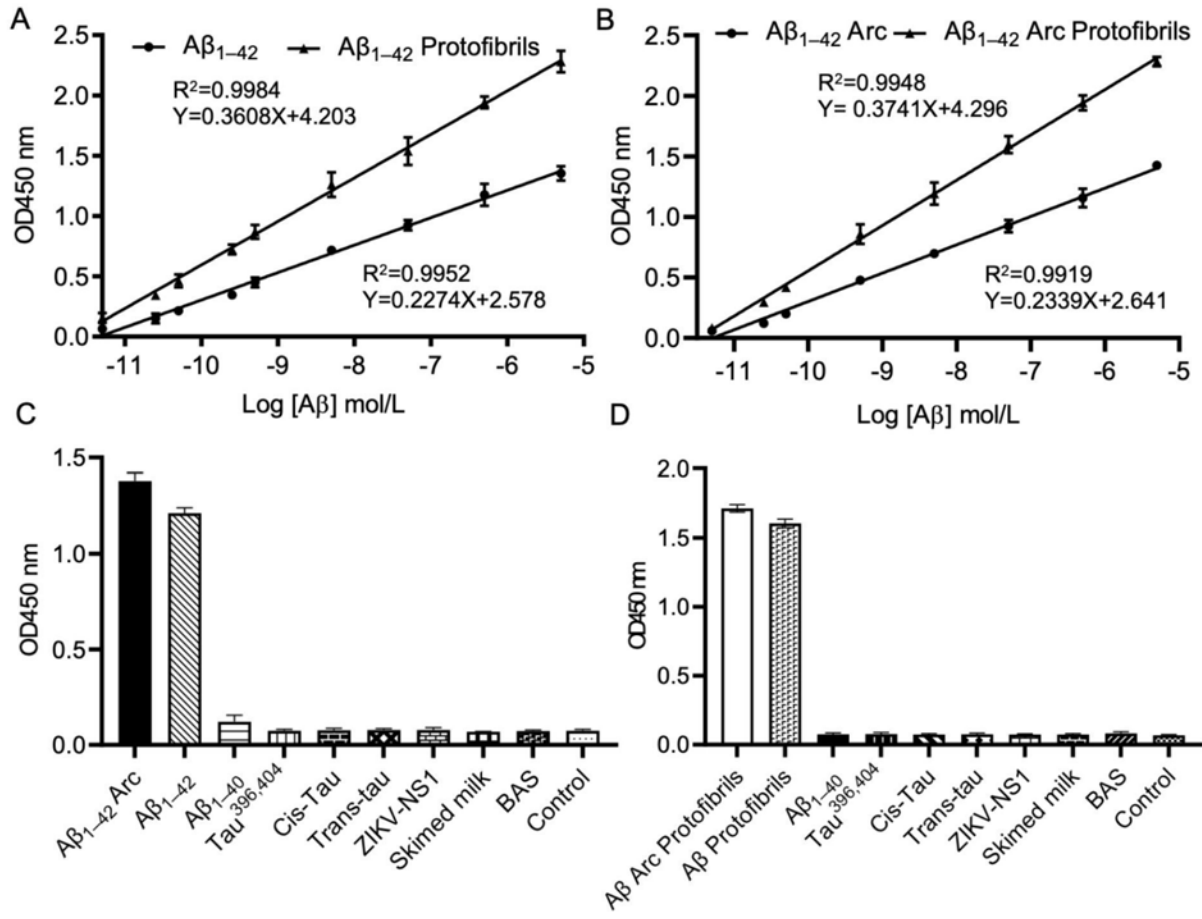


图3

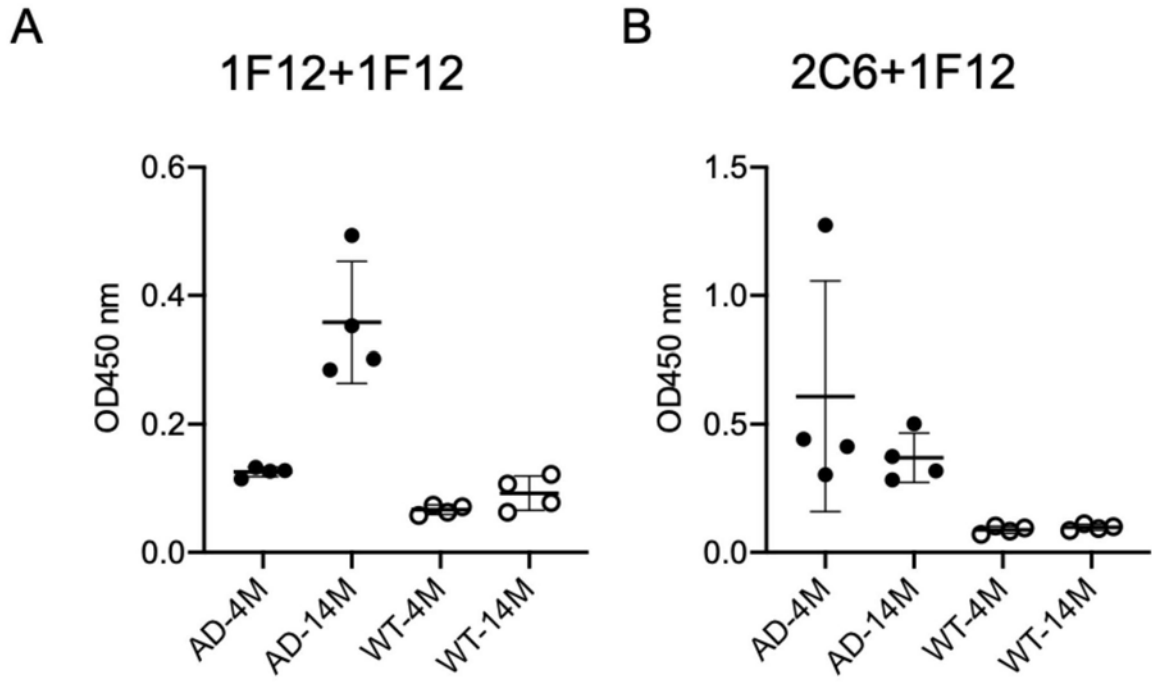


图4