



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103487587 A

(43) 申请公布日 2014. 01. 01

(21) 申请号 201310422863. 3

(22) 申请日 2013. 09. 16

(71) 申请人 哈德逊(天津)生物技术有限责任公司

地址 300308 天津市滨海新区空港经济区
(综合保税区)航空产业支持中心 A246

(72) 发明人 邹潮

(74) 专利代理机构 天津市鼎和专利商标代理有限公司 12101

代理人 冯舜英

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书18页 附图2页

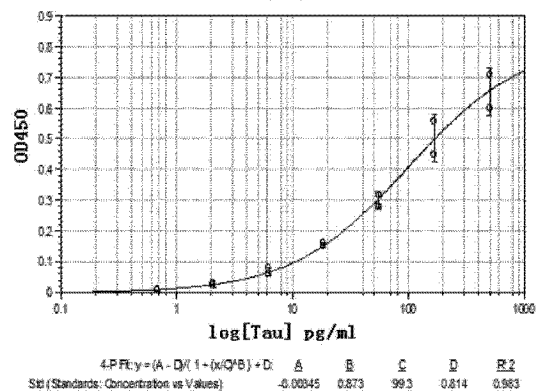
(54) 发明名称

老年痴呆症体外检测用检测板及其检测试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种老年痴呆症体外检测用检测板及其检测试剂盒,检测板含有多个检测区或检测槽,检测区或检测槽上含有下述任何两种或两种以上组合的生物标志物的蛋白,或其所对应的受体蛋白或特异抗体,或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物: Tau, Aβ, TNF-α, IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP 6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。本发明可用于体外血液检测,简单、安全、成本低,多种生物标志物同时检测提高诊断准确率,尤其适合于老年痴呆症的早期筛查。

Tau 标准曲线



1. 一种老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：检测板含有多个检测区或检测槽，检测区或检测槽上含有下述任何两种或两种以上组合的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物：Tau, A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL8, IGFBP6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

2. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在检测板的检测区上或检测槽内。

3. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物，是预先固定在检测板的检测区上或检测槽内。

4. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物，是在使用时加入到检测板的检测区上或检测槽内。

5. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合：A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL8, IGFBP6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

6. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 A β 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合：Tau, TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL8, IGFBP6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

7. 根据权利要求 1 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和 A β 以及下述生物标志物中任何一种或以上的组合：TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL8, IGFBP6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的 Tau 包括所有 Tau 异构体的中任何一种 Tau。

9. 根据权利要求 1 或 2 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在检测板的同一个检测区上或检测槽内。

10. 根据权利要求 1 或 2 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在同一个或不同的检测板的不同的检测区上或检测槽。

11. 根据权利要求 1、5 或 6 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：所述的生物标志物的蛋白包括其完整的蛋白或蛋白片段或含有个别氨基酸变异或缺失的该类生物标志物蛋白，或仅含该类生物标志物部分氨基酸序列的偶联蛋白。

12. 根据权利要求 2 所述的老年痴呆症体外检测用检测板，其特征是：检测板是一酶标盘，所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在酶标盘的检测槽内。

-
13. 一种含有权利要求 1-12 任一项所述的检测板的老年痴呆症体外检测试剂盒。

老年痴呆症体外检测用检测板及其检测试剂盒

技术领域

[0001] 本发明涉及一种老年痴呆症体外检测用检测板及其检测试剂盒。具体地说,是一种老年痴呆症相关的多种生物标志物的体外血液检测用检测板及其检测试剂盒。

背景技术

[0002] 据估计,全球有 2600 万人患老年痴呆症(英译名:为阿尔茨海默氏症,简称:AD)患者。老年痴呆症是危害极大的老年精神疾病,目前医学界还没有找到治愈这种病的办法。虽然这种疾病可长达 20 年,平均而言,AD 患者被诊断后还能存活 8 至 10 年。这种疾病通常始于 60 岁以后,随着年龄的增大发病率急剧增大。美国人年龄 65 岁以上的有百分之十得 AD,年龄在 85 岁以上的有百分之五十的人得 AD。老年痴呆症在早期阶段难以识别,很容易被误诊。

[0003] 根据阿尔茨海默氏症协会和美国的研究认为早期诊断是至关重要。因为这时大部分病变进展缓慢。早期诊断,早期治疗,可以相当大地延缓病变发生,维护病人的正常生活水平。早期准确诊断还有助于区分真老年痴呆症病人与其它拟似老年痴呆症(如抑郁症,药物的副作用,滥用药物,维生素缺乏,脱水,膀胱感染或甲状腺问题)的病人,避免误诊造成的不必要的,可能有害的治疗。

[0004] 目前诊断阿尔茨海默氏症,涉及大量的测试包括:医疗史,精神状态评估,物理检查,神经学检查,神经心理学评估,脑核磁共振,实验室测试(抽脑脊髓检查);因此,目前老年痴呆症的诊断不但费用高,而且不适合于早期筛查;有必要开发一种适合于在体外对早期 AD 患者和正常人进行早期筛查的方法。

发明内容

[0005] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种老年痴呆症体外检测用检测板及其检测试剂盒。

[0006] 为了解决上述技术问题,本发明采用的技术方案是:使用一种可用于老年痴呆症体外血液或体液检测的检测板,所述检测板上含有多个检测区或检测槽,检测板的形式包括但不限于:酶标盘或生物芯片的基片或免疫印迹膜或磁珠等。所述检测板可以和相关的检测试剂配套制成多种不同类型(如 ELISA, 生物芯片, RT-PCR 等)的老年痴呆症体外检测试剂盒。

[0007] 所述检测板的检测区或检测槽上含有下述任何两种或两种以上组合的生物标志物的蛋白,或其所对应的受体蛋白或特异抗体,或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物: Tau, A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0008] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在检测板的检测区上或检测槽内。

[0009] 所述的生物标志物的蛋白包括完整的蛋白或蛋白片段或仅含该类生物标志物部

分氨基酸序列的偶联蛋白。

[0010] 所述的生物标志物的蛋白,或其所对应的受体蛋白或特异抗体,或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物,是预先固定在检测板的检测区上或检测槽内。

[0011] 所述的生物标志物的蛋白,或其所对应的受体蛋白或特异抗体,或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物,是在使用时加入到检测板的检测区上或检测槽内。

[0012] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合 :A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL - 8, IGFBP - 6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0013] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 A β 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合 :Tau, TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL - 8, IGFBP - 6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0014] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和 A β 以及下述生物标志物中任何一种或以上的组合 :TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL - 8, IGFBP - 6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0015] 所述的 Tau 包括所有 Tau 异构体中的任何一种 Tau。

[0016] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在检测板的同一个检测区上或检测槽内。

[0017] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在同一个或不同的检测板的不同的检测区上或检测槽。

[0018] 所述的生物标志物的蛋白包括其完整的蛋白或蛋白片段或含有个别氨基酸变异或缺失的该类生物标志物蛋白,或仅含该类生物标志物部分氨基酸序列的偶联蛋白。

[0019] 检测板是一酶标盘,所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在酶标盘的检测槽内。

[0020] 一种含上述的检测板的老年痴呆症体外检测试剂盒,包括但不限于 :ELISA, 生物芯片, RT-PCR 等不同类型的老年痴呆症体外检测试剂盒。

[0021] 上述的老年痴呆症体外检测试剂盒的检测方法,包括但不限于 :基于抗原 - 抗体反应或受体蛋白 - 配体反应原理,使用包括竞争酶联免疫吸收或双抗夹心酶联免疫吸收等技术来测定人的血液或脑脊液或淋巴液或组织切片或尿液或其它体液中多种生物标志物含量,进而判定既得或潜在的老年痴呆症相关的疾病。

[0022] 含上述的检测板的老年痴呆症体外分子检测试剂盒,使用 RT-PCR,包括 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 技术来测定人的血液或脑脊液或淋巴液或组织切片或尿液或其它体液中所述生物标志物的 mRNA 含量,进而判定既得或潜在的老年痴呆症相关的疾病。

[0023] 本发明的有益效果是 :通过简单的抽血,然后在体外对受检者血液中与老年痴呆症相关的多种生物标志物进行检测分析,以诊断受检者是否患有老年痴呆症,或是否有潜在危险患老年痴呆症。体外检测、安全、检测成本低、多标志同时检测比较,提高诊断准确率、尤其是适于早期筛查。

附图说明

[0024] 图 1 是本发明的生物标志物 Tau 的标准曲线。

[0025] 图 2 是本发明的生物标志物 A β 的标准曲线。

[0026] 图 3 是本发明的生物标志物 TNF- α 的标准曲线。

具体实施方式

[0027] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细说明：

[0028] 本发明的老年痴呆症体外检测用检测板，检测板含有多个检测区或检测槽，检测区或检测槽上含有下述任何两种或两种以上组合的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物：Tau, A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0029] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在检测板的检测区上或检测槽内。

[0030] 所述的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物，是预先固定在检测板的检测区上或检测槽内。

[0031] 所述的生物标志物的蛋白，或其所对应的受体蛋白或特异抗体，或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物，是在使用时加入到检测板的检测区上或检测槽内。

[0032] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合：A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0033] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 A β 和下述生物标志物中任何一种或以上的组合：Tau, TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0034] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体或根据其所对应的 mRNA 而设计的 DNA 引物的组合是含有 Tau 和 A β 以及下述生物标志物中任何一种或以上的组合：TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 和 PDGF-BB。

[0035] 所述的 Tau 包括所有 Tau 异构体中的任何一种 Tau。

[0036] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在检测板的同一个检测区上或检测槽内。

[0037] 所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被包含在同一个或不同的检测板的不同的检测区上或检测槽。

[0038] 所述的生物标志物的蛋白包括其完整的蛋白或蛋白片段或含有个别氨基酸变异或缺失的该类生物标志物蛋白，或仅含该类生物标志物部分氨基酸序列的偶联蛋白。

[0039] 检测板是一酶标盘，所述的生物标志物的蛋白或其所对应的受体蛋白、特异抗体的组合被直接或间接地包被在酶标盘的检测槽内。

[0040] 一种含上述的检测板的老年痴呆症体外检测试剂盒。

[0041] 上述的老年痴呆症体外检测试剂盒的检测方法，基于抗原-抗体反应或受体蛋

白-配体反应原理,使用包括竞争酶联免疫吸收或双抗夹心酶联免疫吸收等技术来测定人的血液或脑脊液或淋巴液或组织切片或尿液或其它体液中多种生物标志物含量,进而来判断既得或潜在的老年痴呆症相关的疾病。

[0042] 上述的检测板的老年痴呆症体外分子检测试剂盒,基于PCR原理,使用RT-PCR,包括TaqMan荧光定量RT-PCR技术来测定人的血液或脑脊液或淋巴液或组织切片或尿液或其它体液中所述生物标志物的mRNA含量,进而来判断既得或潜在的老年痴呆症相关的疾病。

[0043] 本发明所涉及的生物标志物: Tau, A β , TNF- α , IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18及PDGF-BB均为人生物标志物。为了避免歧义,具体定义如下:

[0044] 1. Tau, 全名: Microtubule-Associated Protein Tau, 包括所有的Tau蛋白异构体(Isoforms)中任何一种Tau蛋白; 别称: MAPT, DDPAC; FTDP-17; MAPTL; MSTD; MTBT1; MTBT2; PPND; 其基因序列号分别为 Isoform1: NM_016835.4, Isoform2: NM_005910.5, Isoform3: NM_016834.4, Isoform4: NM_016841.4, Isoform5: NM_001123067.3, Isoform6: NM_001123066.3。

[0045] 2. A β , 全名: Amyloid β -protein(β -淀粉样蛋白), 别称: Amyloidbeta, Abeta; A β 由淀粉样前体蛋白(APP)其基因序列号为: NM_000484, 水解而成的36-42个氨基酸肽。

[0046] 3. TNF- α , 全名: (肿瘤坏死因子-alpha), 别称: TNF; DIF; TNF-alpha; TNFA; TNFSF2; 其基因序列号为: NM_000594。

[0047] 4. IL-11, 全名: 白细胞介素11, 别称: IL11, AGIF; 其基因序列号为: NM_000641。

[0048] 5. IL-6, 全名: 白细胞介素6, 别称: IL6, BSF2, HGF, HSF, IFNB2; 其基因序列号为: NM_000600。

[0049] 6. ANGPT2, 全名: 人血管生成素2基因, 别称: AGPT2, ANG2; 其基因序列号为: NM_001118887.1, (BC143902)。

[0050] 7. TRAIL-R4, 全名: 肿瘤坏死因子受体超家族成员10D, 别称: TNFRSF10D, CD264, DCR2, TRAILR4, TRUNDD; 其基因序列号为: NM_003840, (HQ448394)。

[0051] 8. IL-8, 全名: 白细胞介素8, 别称: IL8, CXCL8, GCP-1, GCP1, LECT, LUCT, LYNAP, MDNCF, MONAP, NAF, NAP-1, NAP1; 基因序列号: NM_000584, (DQ890564)。

[0052] 9. IGFBP6, 全名: 胰岛素样生长因子结合蛋白6, 别称: IGF-BP6, IBP-6; 其基因序列号为: NM_002178, (DQ896243)。

[0053] 10. ICAM-1, 全名: 细胞间黏附分子-1, 别称: ICAM1; BB2, CD54, P3.58; 其基因序列号为: NM_000201。

[0054] 11. CCL18, 全名: 趋化因子配体18(或巨噬细胞炎症蛋白18), 别称: SCYA18, DC-CK1, PARC, AMAC-1, DCCK1, MIP-4, CKb7; 其基因序列号为: NM_002988

[0055] 12. PDGF-BB, 全名: 人血小板衍生生长因子-BB, 是PDGF-B的二聚体, 别称: PDGFB, PDGF-2, PDGF2, SIS, SSV, c-sis; 其基因序列号为: NM_002608。

[0056] 下面通过实施例进行详细说明:

[0057] 1. 所述的生物标志物相关蛋白的抗原制备:

[0058] 本发明的老年痴呆症体外试剂盒，所述各生物标志物的抗原可以按公知的基因重组方法或天然组织提取方法来获得。所述各生物标志物相关蛋白抗原在用作免疫前得先纯化，然后与弗氏完全佐剂（第一次免疫）或与弗氏不完全佐剂（后续免疫）一起乳化后用于免疫接种。

[0059] 本发明所述生物标志物相关抗原也可以是按所列生物标志物中的任一氨基酸序列人工合成的多肽。

[0060] 本发明所述生物标志物相关抗原可以是含有上述所列氨基酸序列的整个蛋白或仅含有上述所列相关蛋白的部分氨基酸序列多肽。

[0061] 本发明所述生物标志物相关抗原也可以是含有在上述所列任一氨基酸序列中引入个别氨基酸变异或缺失的序列。

[0062] 上述各种生物标志物相关抗原也可以进一步与载体蛋白（比如 BSA, KLH）相偶联，以提高免疫原性。

[0063] 本发明所述生物标志物相关抗原还可以是基于 DNA 的疫苗，它可以在免疫动物体内按基因表达程序产生含有上述所列生物标志物相关氨基酸序列的部分或完整的蛋白。

[0064] 2. 本发明的生物标志物相关抗体或受体蛋白的制备：

[0065] 本发明的老年痴呆症体外检测试剂盒，所述各生物标志物相关的抗体可以按公知的多克隆抗体制备方法或单克隆抗体制备方法来获得。

[0066] 本发明的老年痴呆症体外检测试剂盒，所述各生物标志物相关的受体蛋白可以按公知的基因重组方法或天然组织提取方法来获得。

[0067] 3. 老年痴呆症相关的多生物标志物筛查用检测试剂盒的制备例：

[0068] 1) 所述的检测试剂盒含有，但不局限于：检测板、示踪液、阳性对照、阴性对照、样品稀释液、洗涤液、显色液。

[0069] 2) 检测板制备：

[0070] 用间接包被法固定生物标志物特异的抗体。首先，用 PBS 缓冲液将兔抗鼠的抗体稀释至浓度 0.1 μ g/ml-30 μ g/ml，再添加 100 μ l 该抗体稀释液到 96-孔酶标板的孔内，在室温下孵育 1-4 小时或低温（4-8 $^{\circ}$ C）下孵育 10-24 小时；用 PBS+0.1%吐温 20 的洗液冲洗酶标板孔 3-5 次；然后，在酶标板的孔内添加 200 μ l 的 2% BSA-PBS 封闭液，室温下孵育 1-4 小时，再用 PBS+0.1%吐温 20 的洗液冲洗酶标板孔 3-5 次；

[0071] 其次，用 PBS 缓冲液配制浓度为 0.1 μ g/ml-10 μ g/ml 的下述 12 个生物标志物特异的鼠抗体溶液，按酶标板布局表（表 1）所示，在酶标板上 1-12 列的孔内分别添加 100 微升下述生物标志物特异的抗体溶液：

[0072] Tau（列 1），A β （列 2），TNF- α （列 3），IL-11（列 4），IL-6（列 5），ANG-2（列 6），TRAIL-R4（列 7），IL-8（列 8），IGFBP-6（列 9），ICAM-1（列 10），CCL18（列 11），PDGF-BB（列 12）；

[0073] 在室温下孵育 0.5-4 小时（或低温（4-8 $^{\circ}$ C）孵育 10-24 小时），用 PBS+0.1%吐温 20 洗液冲洗酶标板孔 3-5 次；然后，45 $^{\circ}$ C 下干燥，将该盘抽真空密封于铝袋内，储存在低温干燥冰箱备用。

[0074] 3) 阳性对照液制备：

[0075] 阳性对照是用纯化的并经准确定量过的各生物标志物按临床诊断要求的检出界

限浓度制备（各生物标志物阳性对照浓度不尽相同）。为示例方便，本实施例仅以 100pg/ml（并非临床诊断要求的检出界限浓度）做示范，配置 2 倍的工作浓度。将各个生物标志物：Tau, A β , TNF-a, IL-11, IL-6, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18, PDGF-BB) 溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里配成 100pg/ml 浓度的阳性对照，分装、低温储存备用。

[0076] 4) 阴性对照液：

[0077] 定量用：阴性对照液是含 1% BSA 的 PBS 溶液；低温储存备用。

[0078] 定性用：将年轻（18-28 岁）正常人血清溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里配成等同于定性检测时的样品血清浓度，比如：10%，低温储存备用。

[0079] 5) 样品稀释液：

[0080] 样品稀释液是含 1% BSA 的 PBS 溶液；制备：将 1 克 BSA 蛋白溶解于 100 毫升 PBS 缓冲液，低温储存备用。

[0081] 6) 示踪剂：

[0082] 示踪剂是标记分子与纯化的生物标志物共价偶联物，如：HRP-Tau。所述的标记分子是常用的过氧化氢酶 (HRP)，也可以是碱性磷酸酶 (AP) 或荧光分子、量子点等。示踪剂可以按公知的方法制备。比如通过 EDC 介导羧基与胺基反应来获得。例：将 EDC、HRP、Tau 蛋白按摩尔数 20 : 4 : 1 溶解于 PBS 缓冲液，并在室温反应 2 小时，然后通过透析去除游离的 EDC；也可进一步通过 HPLC 纯化获得高纯度 HRP-Tau 偶联物。按照此法制备示踪剂：HRP-Tau, HRP-A β , HRP-TNF-a, HRP-IL-11, HRP-IL-6, HRP-ANG-2, HRP-TRAIL-R4, HRP-IL-8, HRP-IGFBP-6, HRP-ICAM-1, HRP-CCL18, HRP-PDGF-BB；将各示踪剂分别溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里配成每毫升 0.3 微克的浓度，备用。

[0083] 7) 洗涤液：

[0084] 将 1 克吐温 20 (Tween20) 溶解于 1 升的 PBS 溶液配成 0.1% 的浓度，备用。

[0085] 8) 显色液：

[0086] 常用显色液有两种，其一是：过氧化氢酶用显色底物溶液：将 TMB (3,3',5,5'-四甲基联苯胺) 以 0.2mg/ml 的浓度溶于 10mM (pH4) 柠檬酸缓冲液，再加 0.03% 过氧化氢 (H₂O₂)，避光低温储存备用。适于测定波长：370nm 或 450nm (用等量 1M 硫酸终止后)；其二是：碱性磷酸酶用显色底物溶液：将 pNPP (对硝基苯磷酸盐) 以 10mmol / L 的浓度溶于含 1mmol / L MgCl₂ 的 0.1mol / L 二乙醇胺缓冲液 (pH9.8)，避光低温储存备用。适于测定波长：405nm。本实施例使用过氧化氢酶底物 TMB 显色液。

[0087] 4. 老年痴呆症相关的多生物标志物筛查用检测试剂盒的检测方法例：

[0088] 1) 加样：按表 1 所示，在检测板（预包被的酶标板）的列 1-12 的孔内分别添加 50u1 下述示踪剂：HRP-Tau (列 1)，HRP-A β (列 2)，HRP-TNF-a (列 3)，HRP-IL-11 (列 4)，HRP-IL-6 (列 5)，HRP-ANG-2 (列 6)，HRP-TRAIL-R4 (列 7)，HRP-IL-8 (列 8)，HRP-IGFBP-6 (列 9)，HRP-ICAM-1 (列 10)，HRP-CCL18 (列 11)，HRP-PDGF-BB (列 12)；

[0089] 2) 按表 1 所示，再分别在 A, B, C, D, E, F, G 和 H 行的孔内添加 50u1 阳性对照液，阴性对照液，待测试样 1-6；在室温下孵育 3 小时 (也可在 4-8℃ 孵育 10-24 小时)；

[0090] 表 1, 酶标板布局：

[0091]

	Tau	A β	TNF- α	IL-11	IL-6	ANG-2	TRAIL-R 4	IL-8	IGFBP6	ICAM- 1	CCL18	PDGF-B B
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照	阳性对照
B	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照	阴性对照
C	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1	试样 1
D	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2	试样 2
E	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3	试样 3
F	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4	试样 4
G	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5	试样 5
H	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6	试样 6

注：各生物标志物的抗体包被和示踪剂添加的位置如表上方指示；阳性对照、阴性对照及各待测试样位置如表中所指示。试样 1、2 为轻度 AD 患者组血清，试样 3、4 为重度 AD 患者组血清，试样 5、6 为健康组血清。

[0092]

[0093] 3) 洗板：在酶标板的每个孔内添加 300u1 PBS 缓冲液，反复冲洗 2-5 次，把酶标板倒扣甩在吸水纸上。

[0094] 4) 显色及读盘：在酶标板的每个孔内添加 100u1 TMB 显色液，室温下孵育，直到适当的颜色深度出现为止，加入 100u11M 硫酸溶液，终止发色。在 450nm 波长下读盘测各个孔的 OD 值，结果如表 2 所示：

[0095] 表 2, 试样 1-6 多生物标志物筛查结果：

[0096]

标志蛋白	Tau	A β	TNF- α	IL-11	IL-6	ANG-2	TRAIL-R4	IL-8	IGFBP6	ICAM-1	CCL18	PDGF-BB
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
阳性对照	0.072	0.11	0.066	0.072	0.086	0.081	0.102	0.061	0.12	0.072	0.079	0.0932
阴性对照	0.228	0.331	0.313	0.231	0.352	0.312	0.345	0.371	0.361	0.193	0.291	0.278
试样 1	0.119	0.281	0.2367	0.186	0.258	0.191	0.23	0.234	0.253	0.119	0.201	0.27
试样 2	0.125	0.265	0.279	0.197	0.263	0.202	0.225	0.216	0.234	0.16	0.196	0.268
试样 3	0.099	0.21	0.235	0.145	0.301	0.102	0.189	0.167	0.201	0.111	0.106	0.275
试样 4	0.102	0.189	0.258	0.165	0.31	0.122	0.201	0.178	0.198	0.103	0.113	0.281
试样 5	0.217	0.323	0.306	0.243	0.361	0.331	0.33	0.352	0.373	0.188	0.286	0.291
试样 6	0.191	0.342	0.351	0.311	0.328	0.306	0.355	0.369	0.355	0.201	0.295	0.283

[0097]

[0098] 5) 结果分析:比较各样品在每一个生物标志物下的 OD 值与其对应的阳性对照,阴性对照的 OD 值(或颜色深浅程度)以确定该被检样品中对某生物标志物是阳性还是阴性。由于是竞争性结合,在正常情况下,阳性对照 OD 值较低(不显色或极微显色),阴性对照 OD 值较高(终止发色前显深蓝色,终止发色后显较深黄色);被检样品的 OD 值越高(颜色越深)越趋于阴性,OD 值越低(颜色越浅)越趋于阳性。如果某一被检样品的 OD 值明显比阴性对照低(颜色比阴性对照浅),说明该被检样品为阳性;如果某一被检样品的 OD 值明显比阴性对照相同或略高(颜色与阴性对照相同或略深)说明该被检样品为阴性。

[0099] 本实施例的粗筛实验结果显示:试样 1、2(轻度 AD 患者组)和试样 3、4(重度 AD 患者组)中,生物标志物蛋白:Tau, A β , IL-11, ANG-2, TRAIL-R4, IL-8, IGFBP-6, ICAM-1, CCL18 的含量明显比试样 5、6(健康对照组)高,而生物标志物蛋白:TNF- α , IL-6, PDGF-BB 没有显著差别。

[0100] 5. 老年痴呆症相关的生物标志物定量用检测试剂盒的制备例:

[0101] 所述的定量用检测试剂盒含有,但不局限于:检测板、生物标志物标准液、反应液、亲和素探测液、样品稀释液、洗涤液、显色液。本实施例仅以 3 个生物标志物:Tau, A β , TNF- α 为例,其余标志物的检测可以以此类推。

[0102] 1) 检测板制备:

[0103] 本检测板制备采用直接包被法:用 PBS 缓冲液将下述 3 个鼠抗待测生物标志物的单克隆抗体稀释至浓度 5 μ g/ml,按表 2 所示位置分别添加 100 μ l 到 96-孔酶标板的孔内,在室温下孵育 4 小时或低温(4-8 $^{\circ}$ C)下孵育 12 小时;用 PBS+0.1%吐温 20 洗液冲洗酶标板孔 3-5 次;然后,在酶标板的孔内添加 200 μ l 的 2% BSA-PBS 封闭液,在室温下孵育 4 小时,用 PBS+0.1%吐温 20 洗液冲洗酶标板孔 3-5 次,然后,45 $^{\circ}$ C 下干燥,将该盘抽真空密封于铝袋内,储存在低温干燥冰箱备用。

[0104] 如酶标板布局表 2 所示, 3 个鼠单克隆抗体及添加位置分别是: Tau 单抗 (列 1-4), A β 单抗 (列 5-8), TNF- α 单抗 (列 9-12)。

[0105] 表 3, 酶标板布局:

[0106]

	Tau				A β				TNF- α			
	Tau 标准液		试样		A β 标准液		试样		TNF- α 标准液		试样	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1000	1000	试样 1	试样 1	1000	1000	试样 1	试样 1	1000	1000	试样 1	试样 1
B	333	333	试样 2	试样 2	333	333	试样 2	试样 2	333	333	试样 2	试样 2
C	111	111	试样 3	试样 3	111	111	试样 3	试样 3	111	111	试样 3	试样 3
D	37.0	37.0	试样 4	试样 4	37.0	37.0	试样 4	试样 4	37.0	37.0	试样 4	试样 4
E	12.3	12.3	试样 5	试样 5	12.3	12.3	试样 5	试样 5	12.3	12.3	试样 5	试样 5
F	4.12	4.12	试样 6	试样 6	4.12	4.12	试样 6	试样 6	4.12	4.12	试样 6	试样 6
G	1.37	1.37	试样 7	试样 7	1.37	1.37	试样 7	试样 7	1.37	1.37	试样 7	试样 7
H	0.00	0.00	试样 8	试样 8	0.00	0.00	试样 8	试样 8	0.00	0.00	试样 8	试样 8

注: 各生物标志物的抗体包被的位置和示踪剂添加的位置如表上方所示; 每个浓度的标准物以及每个试样在各个标志物区内测两次, 位置如表中所示; 各生物标志物标准液及其浓度(单位: pg/ml) 分别表示在表中各区分的左 2 纵列 (列 1-2, 列 5-6, 列 9-10)。

试样 1 和 2 为轻度 AD 患者血清, 试样 3 和 4 为重度 AD 患者血清, 试样 5 和 6 为关节炎患者血清, 试样 7 和 8 为健康人血清。

[0107] 生物标志物标准液制备:

[0108] 使用纯化的并经准确定量的各生物标志物, 将 Tau, A β , TNF- α 各生物标志物溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里, 配成 10ng/ml 的浓度, 低温储存备用。

[0109] 2) 反应液配制: 分别将 3 个生物素标记的多克隆抗体: 兔抗 Tau-bio, 兔抗 A β -bio, 兔抗 TNF- α -bio, 溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里, 配成 50ug/ml 的浓度并分别装在不同的试剂瓶里, 低温储存备用。生物素标记抗体可以按公知的方法制备, 比如通过 EDC 介导羧基与胺基反应来获得。例: 将 EDC、生物素、兔抗 Tau 抗体按摩尔数 20:15:1 溶解于 PBS 缓冲液, 并在室温反应 2 小时, 然后通过透析去除游离的 EDC 和生物素; 也可进一步通过 HPLC 纯化获得高纯度 Tau-bio 偶联物。

[0110] 3) 亲和素探测液配制: 将亲和素标记的过氧化氢酶 (可以通过市场购得) 溶解于含 1% BSA 的 PBS 溶液里, 配成 50ug/ml 的浓度, 低温储存备用。

[0111] 4) 样品稀释液是含 1% BSA 的 PBS 溶液; 制备: 将 1 克 BSA 蛋白溶解于 100 毫升

PBS 缓冲液，低温储存备用。

[0112] 5) 洗涤液：含 0.1%Tween-20 的 PBS 溶液。

[0113] 6) 显色液：将 TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)以 0.2mg/ml 的浓度溶于 10mM(pH4) 柠檬酸缓冲液，再加 0.03% 过氧化氢 (H₂O₂)，避光低温储存备用。适于测定波长：370nm 或 450nm(用等量 1M 硫酸终止后)。

[0114] 6. 老年痴呆症相关的生物标志物定量用检测试剂盒的检测方法。

[0115] 本实施例的检测方法以实施例 5 所述的老年痴呆症相关生物标志物定量用检测试剂盒为基础，并以 3 个生物标志物：Tau, A β , TNF- α 的检测方法为例加以阐述，其余标志物的检测方法可以以此类推。

[0116] 1) 加标准液及待测样品(每个浓度的标志物标准对照和样品测两次)：

[0117] 用样品稀释液适当(比如 1:1) 稀释待测样品(最好包含一阴性样品)并编号 1-8, 每个稀释后样品量不少于 400u1; 将生物标志物溶液：Tau, A β , TNF- α 用样品稀释液分别以 3X 逐级稀释成：1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1 及 0pg/ml 的 8 个梯度浓度，并按酶标板布局表 2 所示在酶标板相应位置的孔中分别添加 100u1/ 孔，既：

[0118] •在 A1 孔至 H1 孔, A2 孔至 H2 孔, 分别添加 Tau 标准液的浓度：1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1 及 0pg/ml;

[0119] •在 A5 孔至 H5 孔, A6 孔至 H6 孔, 分别添加 A β 标准液的浓度：1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1 及 0pg/ml;

[0120] •在 A9 孔至 H9 孔, A10 孔至 H10 孔, 分别添加 TNF- α 标准液的浓度：1000, 333, 111, 37, 12, 4, 1 及 0pg/ml;

[0121] 再按酶标板布局表 2 所示，

[0122] •在列 3-4 的各孔 (A3, A4 孔至 H3, H4 孔) 内，分别添加 100u1 事先稀释好的待测样品 1-8;

[0123] •在列 7-8 的各孔 (A7, A8 孔至 H7, H8 孔) 内，分别添加 100u1 事先稀释好的待测样品 1-8;

[0124] •在列 11-12 的各孔 (A11, A12 孔至 H11, H12 孔) 内，分别添加 100u1 事先稀释好的待测样品 1-8;

[0125] 在室温下孵育 2 小时或 4-8 $^{\circ}$ C 孵育 12 小时。

[0126] 2) 洗板：倒空酶标板，洗板 3-5 次：在酶标板的每个孔内添加 300u1 洗涤液，反复冲洗 2-5 次，把酶标板倒扣甩在吸水纸上。

[0127] 3) 添加反应液：

[0128] ●在列 1-4 的各孔内，各添加 100u1 兔抗 Tau-bio 反应液，

[0129] ●在列 5-8 的各孔内，各添加 100u1 兔抗 A β -bio 反应液，

[0130] ●在列 9-12 的各孔内，各添加 100u1 兔抗 TNF- α -bio 反应液，

[0131] 在室温下孵育 1-2 小时或 4-8 $^{\circ}$ C 孵育 12 小时。

[0132] 4) 洗板：倒空酶标板，洗板 3-5 次：在酶标板的每个孔内添加 300u1 洗涤液，反复冲洗 2-5 次，把酶标板倒扣甩在吸水纸上。

[0133] 5) 添加亲和素探测液：在酶标板的每个孔内添加 100u1 亲和素探测液；在室温下孵育 1-2 小时。

[0134] 6) 洗板：倒空酶标板，洗板 3-5 次：在酶标板的每个孔内添加 300u1 洗涤液，反复冲洗 2-5 次，把酶标板倒扣甩在吸水纸上。

[0135] 7) 显色：在酶标板的每个孔内添加 100u1 TMB 溶液，室温下孵育，直到理想的颜色梯度出现为止（观察加标准液的列），加入 100u11M HCL 停止发色；在 450nm 波长下检测吸光度。本例检测结果如下表所示：

[0136] 表 4, 各标志物标准对照和样品的吸光度检测结果：

[0137]

	Tau OD450				A β OD450				TNF- α OD450			
	Tau 标准液		试样		A β 标准液		试样		TNF- α 标准液		试样	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.76	0.65	0.22	0.18	0.91	0.79	0.59	0.61	1.02	0.82	0.251	0.267
B	0.61	0.5	0.194	0.15	0.7	0.75	0.58	0.53	0.71	0.67	0.32	0.34
C	0.33	0.37	0.31	0.38	0.49	0.61	0.62	0.55	0.52	0.4	0.392	0.362
D	0.21	0.2	0.29	0.3	0.38	0.33	0.59	0.65	0.28	0.208	0.31	0.397
E	0.13	0.11	0.08	0.06	0.18	0.13	0.208	0.26	0.13	0.11	0.53	0.58
F	0.08	0.072	0.11	0.09	0.071	0.08	0.17	0.19	0.08	0.09	0.67	0.61
G	0.056	0.059	0.096	0.072	0.057	0.062	0.28	0.13	0.063	0.065	0.191	0.221
H	0.056	0.05	0.062	0.091	0.059	0.051	0.2	0.083	0.052	0.059	0.153	0.181

酶标板布局如表2所示。试样1和2为轻度AD患者血清，试样3和4为重度AD患者血清，试样5和6为类风湿性关节炎（RA）患者血清，试样7和8为健康人血清。

[0138] 8) 结果分析：通过电脑计算，制作生物标志物的标准曲线，再通过与标准曲线比较，计算出被测样品中该生物标志物的浓度。每一个生物标志物有一个标准曲线。

[0139] ●根据 A1、A2 孔至 H1、H2 孔所测吸光度的平均值及相应的标准液浓度，制作生物标志物 Tau 的标准曲线（见图 1），再将 A3、A4 孔至 H3、H4 孔所测得的样品吸光度与 Tau 标准曲线比较，并考虑被测样品的稀释倍数计算出各个被测样品中 Tau 的浓度（见表 3）。

[0140] 表 5, Tau 蛋白检测结果：

[0141]

Sample	Wells	adj OD450	[Tau] pg/ml	Mean	Std. Dev.
样品 1	A3	0.167	21.533	18.166	4.762
	A4	0.127	14.798		
样品 2	B3	0.141	17.028	13.737	4.655
	B4	0.097	10.445		
样品 3	C3	0.257	41.547	52.596	15.625
	C4	0.327	63.644		
样品 4	D3	0.237	36.412	37.668	1.776
	D4	0.247	38.923		
样品 5	E3	0.027	2.392	1.537	1.209
	E4	0.007	0.683		
样品 6	F3	0.057	5.486	4.423	1.503
	F4	0.037	3.361		
样品 7	G3	0.043	3.973	2.82	1.63
	G4	0.019	1.668		
样品 8	H3	0.009	0.837	2.149	1.856
	H4	0.038	3.461		

[0142] ●根据 A5、A6 孔至 H5、H6 孔所测吸光度的平均值及相应的标准液浓度，制作生物标志物 A β 的标准曲线(见图 2)，再将 A7、A8 孔至 H7、H8 孔所测得的样品吸光度与 A β 标准曲线比较，并考虑被测样品的稀释倍数计算出各个被测样品中 A β 的浓度(见表 4)。

[0143] 表 6, A β 蛋白检测结果：

[0144]

Sample	Wells	Adj OD	[A β] pg/ml	Mean	Std. Dev.
样品 1	A7	0.535	135.3	142.9	10.9
	A8	0.555	150.6		
样品 2	B7	0.525	128.3	113.8	20.5
	B8	0.475	99.3		
样品 3	C7	0.565	159.2	134.5	34.9
	C8	0.495	109.9		
样品 4	D7	0.535	135.3	162.0	37.9
	D8	0.595	188.8		
样品 5	E7	0.153	16.6	20.2	5.1
	E8	0.205	23.8		
样品 6	F7	0.115	12.1	13.3	1.6
	F8	0.135	14.4		
样品 7	G7	0.225	26.9	17.5	13.3
	G8	0.075	8.1		
样品 8	H7	0.145	15.6	9.8	8.2
	H8	0.028	4.0		

[0145] ●根据 A9、A10 孔至 H9、H10 孔所测吸光度的平均值及相应的标准液浓度，制作生物标志物 TNF- α 的标准曲线(见图 3)，再将 A11、A12 孔至 H11、H12 孔所测得的样品吸光度与 TNF- α 标准曲线比较，并考虑被测样品的稀释倍数计算出各个被测样品中 TNF- α 的浓度(见表 5)。

[0146] 表 7, TNF- α 蛋白检测结果：

[0147]

Sample	Wells	Adj OD	[TNFa]pg/ml	Mean	Std. Dev.
样品 1	A11	0.251	38.5	40.7	3.1
	A12	0.267	42.8		
样品 2	B11	0.320	59.0	55.8	4.6
	B12	0.300	52.6		
样品 3	C11	0.302	53.2	56.1	4.1
	C12	0.320	59.0		
样品 4	D11	0.310	55.8	62.1	8.9
	D12	0.347	68.4		
样品 5	E11	0.530	160.4	179.4	26.8
	E12	0.580	198.3		
样品 6	F11	0.670	290.6	257.9	46.3
	F12	0.610	225.1		
样品 7	G11	0.191	23.9	25.0	1.6
	G12	0.201	26.1		
样品 8	H11	0.153	16.1	18.9	4.0
	H12	0.181	21.8		

[0148] 本实施例的实验结果显示:轻度 AD 患者血清(样品 1 和 2)和重度 AD 患者血清(样品 3 和 4)中,Tau 蛋白和 A β 蛋白明显比健康对照组(样品 7 和 8)高,重度 AD 患者血清中这两个蛋白又略高于轻度 AD 患者血清;TNF- α 蛋白在轻度 AD 患者血清和重度 AD 患者血清略高于健康人血清中的含量;类风湿性关节炎(RA)患者血清(样品 5 和 6)中,Tau 蛋白和 A β 蛋白水平和健康人血清基本相近,但 TNF- α 蛋白水平显著高于 AD 患者血清和健康人血清中的含量。

[0149] 7. 老年痴呆症相关的生物标志物检测板制备方法比较:

[0150] 本实施例以实施例 5 中所述的老年痴呆症相关的生物标志物定量用检测试剂盒的制备例为参照,对比两种不同的检测板制备方法对检测结果影响。

[0151] 除检测板制备中生物标志物的包被方法不同外,本实施例所述的检测试剂盒的制备方法其它方面完全与本实施例 5 中所述的定量用检测试剂盒的制备方法相同。检测板制备:

[0152] 1). 完全按照实施例 5 中所述的方法制备检测板。3 个生物标志物的鼠单克隆抗

体 :Tau 单抗、Aβ 单抗、TNF-a 单抗,是分别包被在酶标板的不同检测槽上。

[0153] 2). 按照下述方法制备检测板,3 个生物标志物的鼠单克隆抗体 :Tau 单抗、Aβ 单抗、TNF-a 单抗,是包被在酶标板的相同检测槽上,既每个检测槽上都包被有这三个生物标志物的单克隆抗体 :

[0154] 同样采用直接包被法 :用 PBS 缓冲液将下述 3 个鼠抗待测生物标志物的单克隆抗体 :Tau 单抗、Aβ 单抗、TNF-a 单抗,分别稀释至浓度 15ug/ml, 每个抗体制备 4ml,然后将这 3 个单抗稀释液混合,每个单抗的最终浓度为 5ug/ml。取混合液 100u1 添加到 96- 孔酶标板每个孔内, 在室温下孵育 4 小时或低温 (4-8℃) 下孵育 12 小时 ; 用 PBS+0.1%吐温 20 洗液冲洗酶标板孔 3-5 次 ; 然后, 在酶标板的孔内添加 200u1 的 2% BSA-PBS 封闭液, 在室温下孵育 4 小时, 用 PBS+0.1%吐温 20 洗液冲洗酶标板孔 3-5 次, 然后, 45℃ 下干燥, 将该盘抽真空密封于铝袋内, 储存在低温干燥冰箱备用。

[0155] 检测结果结果比较 :

[0156] 使用上述两种检测板进行检测时所需的其它试剂的制备方法完全按照实施例 5 中所述的方法进行,检测方法完全按实施例 6 中所述的方法进行。检测结果如下 :

[0157] ●使用 3 个单抗分别包被在不同检测槽上的检测板检测结果如实施例 6 中表 4 所示 ;

[0158] ●使用 3 个单抗一起包被在相同检测槽上的检测板检测结果如下表 8 所示 ;

[0159] 表 8, 3 个单抗一起包被在相同检测槽上的检测板检测结果 :

[0160]

	Tau OD450				Aβ OD450				TNF-a OD450			
	Tau 标准液		试样		Aβ 标准液		试样		TNF-a 标准液		试样	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.75	0.63	0.21	0.16	0.91	0.79	0.53	0.53	1.08	0.84	0.241	0.254
B	0.59	0.52	0.19	0.14	0.7	0.75	0.53	0.50	0.72	0.68	0.301	0.314
C	0.30	0.34	0.30	0.35	0.49	0.61	0.61	0.59	0.50	0.42	0.372	0.359
D	0.20	0.21	0.26	0.28	0.38	0.33	0.58	0.63	0.212	0.206	0.321	0.385
E	0.11	0.12	0.07	0.07	0.178	0.12	0.22	0.24	0.132	0.115	0.531	0.552
F	0.09	0.075	0.12	0.08	0.069	0.077	0.18	0.15	0.081	0.089	0.62	0.618
G	0.060	0.058	0.086	0.062	0.056	0.061	0.23	0.17	0.067	0.064	0.181	0.201
H	0.055	0.057	0.060	0.081	0.055	0.058	0.2	0.081	0.058	0.056	0.143	0.151

[0161] 结果分析 :对比表 4 和表 8 两种检测板检测结果,发现使用两种检测板的检测结果基本相似,提示 :两种检测板都可以用于检测老年痴呆症生物标志物,前者制备时更省成本(因使用较少包被原料),但检测时各生物标志物在检测板上位置受限,必须对号入座。而

对后者来说,可以在检测板上任何位置进行检测相关的生物标志物,具有一定的通用性,但制备时使用较多包被原料,成本相对较高。

[0162] 8. 老年痴呆症相关的双联生物标志物检测试剂盒制备及其检测方法例:

[0163] 所述的检测试剂盒含有,但不局限:检测板、示踪液、阳性对照、阴性对照、洗涤液和显色液。

[0164] 1) 双联生物标志物检测板制备:

[0165] 取一硝酸纤维素膜并切成 5mm 宽 15mm 长的小条,至少准备三条,将小条的某一端标记为上端,另一端为下端。用 PBS 缓冲液将生物标志物蛋白 A β 和 TNF-a 分别稀释至浓度 10ug/ml,再分别在滴加或划线于硝酸纤维素膜的中上端和中下端(每滴或每条线 2-5ul),凉干,将该硝酸纤维素膜小条用 5 毫升的 2% BSA-PBS 封闭液在室温下浸泡 1-4 小时,再用 PBS+0.1%吐温 20 的洗液洗涤 3 次,凉干,既成 A β 和 TNF-a 双联生物标志物检测板,抽真空密封于铝袋内,储存在低温干燥冰箱备用。

[0166] 2) 阳性对照液制备:

[0167] 阳性对照是用纯化的并经准确定量过的 A β 和 TNF-a 按临床诊断要求的检出界限浓度制备。为示例方便,本实施例仅以 100pg/ml (并非临床诊断要求的检出界限浓度)做示范。将 A β 和 TNF-a 溶解于含 1% HSA 的 PBS 溶液里配成各含 100pg/ml 浓度的阳性对照液,1 毫升分装、低温储存备用。

[0168] 3) 阴性对照液制备:

[0169] 将年轻(18-28 岁)正常人血清,或其溶解于 PBS 溶液里配成等同于定性检测时的样品血清比例,比如:20%,1 毫升分装、低温储存备用。

[0170] 4) 示踪剂制备:

[0171] 抗 A β 抗体和 TNF-a 受体蛋白 TNFR 的制备参考实施方案 2 所述。示踪剂是标记分子过氧化氢酶(HRP)与纯化的生物标志物的抗体共价偶联物:HRP-抗 A β 抗体,HRP-TNFR(共价偶联物的制备方法参考实施例 3)。将各示踪剂分别溶解于含 1% HSA 的 PBS 溶液里配成每毫升 0.3 微克的浓度,备用。

[0172] 5) 洗涤液制备:

[0173] 将 1 克吐温 20(Tween20) 溶解于 1 升的 PBS 溶液配成 0.1% 的浓度,备用。

[0174] 6) 显色液:

[0175] 使用市售的超敏化学荧光试剂(含试剂-A 和试剂 B),避光低温储存备用。

[0176] 7) 检测方法例:

[0177] 按下述比例分别制备混合液 3 份:

[0178] A. 阴性对照液 1 毫升 + 示踪剂 HRP-抗 A β 抗体 0.5 毫升 + 示踪剂 HRP-TNFR0.5 毫升;

[0179] B. 阳性对照液 1 毫升 + 示踪剂 HRP-抗 A β 抗体 0.5 毫升 + 示踪剂 HRP-TNFR0.5 毫升;

[0180] C. 待测样品血清 1 毫升 + 示踪剂 HRP-抗 A β 抗体 0.5 毫升 + 示踪剂 HRP-TNFR0.5 毫升;

[0181] 分别将上述各混合液在室温下温和摇荡孵育 2 小时;

[0182] 取 A β 和 TNF-a 双联生物标志物检测板 3 条,分别标记为:a、b、c,再分别将其浸泡

入混合液 A、B、C 中，室温下温和摇荡孵育 1 小时，取出检测板，将其浸泡入 10 毫升洗涤液，摇荡清洗 5 分钟，更换新洗涤液重复清洗 3-5 次。

[0183] 各取 2 毫升超敏化学荧光试剂 -A 和超敏化学荧光试剂 -B 并相混合成显色液，置于合适的容器中，把漂洗过的检测板一端接触一张干净的滤纸或纸巾，使其表面残留水分被吸掉。用上述混合好的超敏化学荧光试剂溶液润湿膜表面（带有蛋白质的那个表面必须充分润湿），将检测板一端接触干净滤纸或纸巾使其表面的残液被吸掉，然后在检测板（带蛋白质面朝上）上盖上一透明塑料薄膜，在暗室中，将 X 光片轻压在被盖着的检测板表面，并适当地暴光一段时间，通常是 5 秒钟到 5 分钟。在避光条件下显影 X 光片，或者使用自动显影仪器显影。

[0184] 8) 结果分析：

[0185] 由于是竞争性反应，阴性显色，阳性不显色或微显色。检测结果：检测板 a 为阴性对照显清晰上下两条带，检测板 b 为阳性对照仅显微弱上下两条带。检测板 c 仅上端显微弱一条带（比阴性对照浅），下端几乎不显色，说明该样品血清中 A β 为弱阳性（上端一条为 A β ），TNF-a 为强阳性（下端一条为 TNF-a）。

[0186] 9. 老年痴呆症相关的生物标志物 mRNA 检测试剂盒制备及其检测方法例：

[0187] 本实施方案使用 RT-PCR 技术来检测样品中老年痴呆症相关的特异生物标志物（此实施例中仅以 Tau 和 TNF-a 为例）的 mRNA 表达量。所述的检测试剂盒含有，但不局限：检测板、2X 反转录反应液、1.5XPCR 反应液、质控 RNA，阴性对照，无 RNase 蒸馏水（RNase Free dH₂O）。

[0188] 1), 检测板制备：

[0189] 根据 GenBank 数据库上已公布的 Tau (NM_001123066.3) cDNA 序列的前 18 碱基和 TNF-a (NM_000594) cDNA 序列的前 18 碱基，分别合成的 5' 端同源引物，Tau 上游 PCR 引物：5'-atggctgagccccgccag 和 TNF-a 上游 PCR 引物：5'-atgagcactgaaagcatg。质控上游 PCR 引物 (Control F-1Primer 5' -CTGCTCGCTTCGCTACTTGA) 购自 TAKARA 公司。下游 PCR 引物采用通用的 Oligo dT-Adaptor Primer (见下述反转录反应液)。

[0190] 取一 8 孔 PCR 用塑胶条，标记各孔位置 A-H，按下表位置分别在 A 孔和 E 孔各加入 20pmol 的质控上游 PCR 引物 (Control F-1Primer)，在 B 孔和 C 孔各 20pmol 的 Tau 上游 PCR 引物，在 F 孔和 G 孔各加入 20pmol 的 TNF-a 上游 PCR 引物，在 D 孔和 H 孔为空白不加任何引物，在 55℃ 下干燥后密封于铝袋内，储存在低温冰箱备用。也可以不用干燥，现配现用，PCR 引物加到检测板后就进行后续实验。

[0191] 表 9, 检测板上各反应孔中加入的引物和样品布局：

[0192]

A	B	C	D	E	F	G	H
质控	Tau 引	Tau 引	空白	质控	TNF-a	TNF-a	空白
引物	物	物	无引物	引物	引物	引物	无引物
质控	阴性对照	样品	样品	质控	阴性对照	样品	样品

[0193] 2), 无 RNase 蒸馏水 (RNase Free dH₂O)：

[0194] 购自 TAKARA 公司。也可用经高温灭菌并检验无 RNase 活性的超纯水。

[0195] 3), 2X 反转录反应液 :

[0196] 用 RNase Free dH₂O 配制 2X 反转录反应液 :MgCl₂(10mM), 2×RT 缓冲液(由 TAKARA 公司的 10X Buffer 稀释而成), dNTP Mixture(2mM), RNase Inhibitor(2U/ul), AMV Reverse Transcriptase(0.5U/ul), Oligo dT-Adaptor Primer(0.25uM)。本反应液中的试剂和酶均购自 TAKARA 公司。

[0197] 4), 1.5X PCR 反应液 :

[0198] 用 RNase Free dH₂O 配制 1.5X PCR 反应液 :1.5×PCR Buffer(由 TAKARA 公司的 5X PCR Buffer 稀释而成), TaKaRa Ex Taq HS (0.06U/ul)(购自 TAKARA 公司)。

[0199] 5), 样品 RNA 制备 :

[0200] 全血 RNA 的提取采用 Vivantis 公司提供的 GF-1Blood Total RNA Extraction Kit 及其方法进行。每个样品需总 RNA 量不少于 500ng。

[0201] 6), 阴性样品 RNA 制备 :

[0202] 以年轻(18-28 岁)正常人血清为阴性血样, 其 RNA 的提取方法同上述 4)。

[0203] 7), 质控 RNA 制备 :

[0204] 本实施例中的质控 RNA(购自 TAKARA 公司)是以 pSPTet3 质粒(质粒中的 SP6 启动子下游插入长约 1.4kb 的 pBR322 来源的 DNA 片段, 其 DNA 片段上含有抗四环素基因)为模板由 SP6RNA 聚合酶经体外转录而得到的质控 RNA(约 1.4kb)是带有 30 个 A 碱基的具有 Poly(A)+ 尾的 RNA。

[0205] 8), 检测方法 :

[0206] ①. 反转录反应 :按表 9 所示位置, 分别取约 10ul 量(需总 RNA 量约 500ng)的质控 RNA 加入到 A 和 E 孔, 阴性对照 RNA 加入到 B 和 F 孔、样品 RNA 加入到 C、D、G 和 H 孔, 再向每个孔中加入 2X 反转录反应液 10ul, 加 RNase Free dH₂O 调各孔总量至 20ul, 混匀, 按以下条件在 PCR 仪上进行反转录反应 :30°C 10min, 45°C 30min, 95°C 5min, 5°C 5min。

[0207] ②. PCR 反应 :再向检测板上每个孔中加入 40ul 的 1.5X PCR 反应液, 按以下条件继续在 PCR 仪上进行 30 次循环扩增反应 :30Cycles[94°C 30sec, 55°C 30sec, 72°C 2min]。

[0208] ③. 反应完成后, 分别从各反应孔取 10ul 反应液, 通过琼脂糖凝胶电泳分析 RT-PCR 扩增产物。

[0209] 9), 结果分析 :

[0210] 通过观察琼脂糖凝胶电泳 RT-PCR 扩增产物所在电泳带位置及其量的多寡, 来比较、判断检测结果。电泳结果显示 :质控孔有明显的 1.2kb DNA 产物, 空白孔没有明显的 DNA 产物, 说明该实验正常。再比较阴性对照和样品的 DNA 产物, 发现 :B 和 F 孔仅有微弱 DNA 产物, C 孔的 DNA 产物位置正确, 其量明显高于 B 孔, G 孔的 DNA 产物位置正确, 其量也明显高于 F 孔, 这说明被检样品中 Tau 和 TNF- α 的 mRNA 表达均为阳性。

[0211] 以上所述的各实施例仅用于说明本发明的技术思想及特点, 其目的在于使本领域内的技术人员能够理解本发明的内容并据以实施, 不能仅以本实施例来限定本发明的专利范围, 即凡本发明所揭示的精神所作的同等变化或修饰, 仍落在本发明的专利范围内。

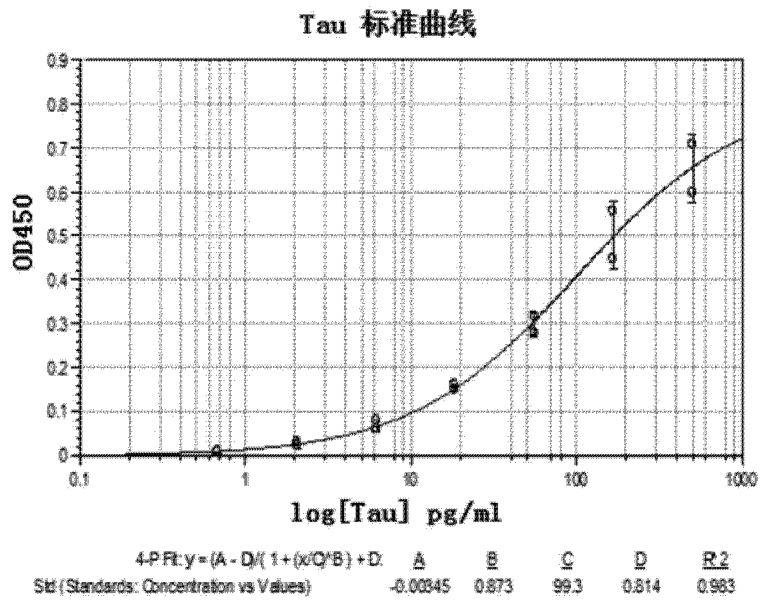


图 1

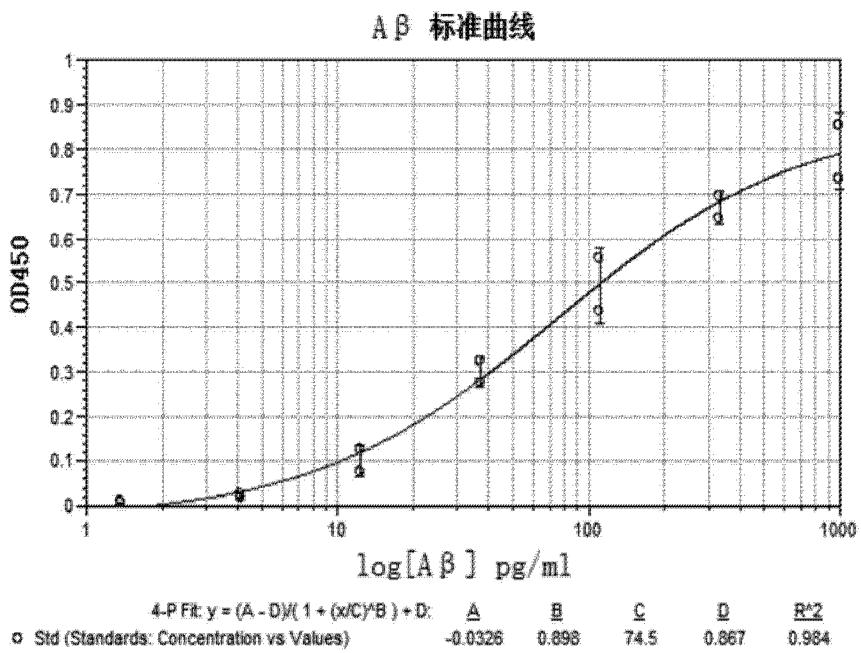


图 2

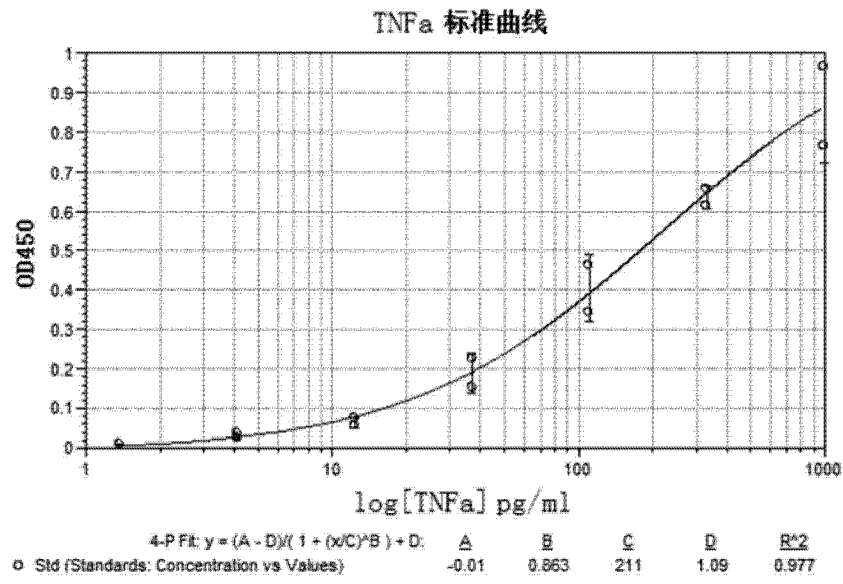


图 3