



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114034872 A

(43) 申请公布日 2022.02.11

(21) 申请号 202210030521.6

(22) 申请日 2022.01.12

(71) 申请人 山东大学齐鲁医院

地址 250012 山东省济南市历下区文化西路107号

申请人 山东中鸿特检生物科技有限公司

(72) 发明人 王谦 王静 赵凤 高洪琪

张春杰 胡晓明 杨小蕾

(74) 专利代理机构 济南圣达知识产权代理有限公司

公司 37221

代理人 李箐

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页

(54) 发明名称

用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒及其应用

(57) 摘要

本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒及其应用。所述试剂盒包括通过检测血清和血浆中T-tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231的联合检测达到阿尔茨海默症早期诊断的目的。检测范围宽、灵敏度高、精密度好,并适用于全自动化学发光仪,操作简单,适合临床大量检测血清和血浆的需求,为阿尔茨海默症早期诊断提供更加准确、更具有个性化的指导意见。

1. 一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒,其特征在於,所述试剂盒中包括:试剂A,试剂B和底物液;试剂A包括:A1:生物素标记的用于识别T-tau位点的单克隆抗体;A2:生物素标记的用于识别p-Tau-181位点的单克隆抗体;A3:生物素标记的用于识别p-Tau-217位点的单克隆抗体;A4:生物素标记的用于识别p-Tau-231位点的单克隆抗体;

试剂B包括:标记吡啶酯的用于识别tau蛋白N 1-17位点单克隆抗体;

其中,生物素标记的单克隆抗体与链霉亲和素磁珠结合。

2. 如权利要求1所述的用于阿尔茨海默症的早期诊断的试剂盒,其特征在於,所述底物液包括底物液A和底物液B;底物液A为过氧化氢溶液,所述底物液B为氢氧化钠溶液。

3. 权利要求1或2所述的试剂盒在阿尔茨海默症早期诊断中的应用。

4. 一种血清和血浆中T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231的联合检测方法,其特征在於,所述方法包括采用权利要求1或2所述试剂盒进行检测。

用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,具体涉及一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒及其应用。

背景技术

[0002] 公开该背景技术部分的信息仅仅旨在增加对本发明的总体背景的理解,而不必然被视为承认或以任何形式暗示该信息构成已经成为本领域一般技术人员所公知的现有技术。

[0003] 阿尔茨海默症(Alzheimer's Disease,AD),又称原发性老年痴呆,是一种致命的神经退行性疾病,属于最为常见的痴呆症类型,约有50%~70%的痴呆症属于此类痴呆;它的主要症状为记忆力衰退、认知能力下降、行为能力下降、生活能力下降等,还可能引起抑郁症、焦虑症等多种并发症,危害很大。目前 AD 的主要诊断手段是神经心理学量表、影像学检查、生物标志物检测等。神经心理学量表评估受试者的认知功能,现主要采用简易精神状态量表、特利尔认知评估量表、长谷川痴呆量表等量表,但由于受试者教育程度及个人理解能力不同,测试结果浮动大;神经影像学检测主要有磁共振成像(MRI)、正电子发射(PET)、计算机断层扫描(CT)等,也都是AD诊断的有力证据,CT可以直接显示AD患者脑萎缩现象,但由于软组织分辨力不佳,使其价值有限,MRI 和 PET 价格昂贵,不适合人群筛查。

[0004] 脑脊液(CSF)生物标志物是目前公认的AD标志物来源,脑脊液检查可用于排除罕见的、可逆的认知障碍疾病,也可帮助对AD进行积极的分子诊断。但是CSF隔离和侵入性操作,限制了这些生物标记物在早期AD的诊断中使用。目前针对AD发病机制所涉及的血液生物标志物研究涉及多个标志物,包括A β 、Tau蛋白、P-Tau蛋白等;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。

[0005] 然而发明人发现,现有技术中存在的针对阿尔茨海默症的检测试剂盒,往往存在以下问题:试剂盒操作程序复杂,耗费昂贵、检测时间长、灵敏度低、精密度差、线性范围窄,不能实现自动化和批量测定,无法实现特异性检测,缺少对阿尔茨海默症的准确预测能力等问题;而且完全不适用于临床诊断,临床应用意义非常有限。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒及其应用,本发明中将磁微粒和化学发光技术相结合,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、缺少对阿尔茨海默症的准确预测能力等问题,对于阿尔茨海默症的大范围早期筛查有着重要的应用价值和意义。

[0007] 为了实现上述目的,本发明的技术方案如下所述:

本发明第一方面,提供一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒,所述试剂盒中包括:试剂A,试剂B和底物液;

试剂A包括:A1:生物素标记的用于识别T-Tau位点的单克隆抗体;
A2:生物素标记的用于识别p-Tau-181位点的单克隆抗体;
A3:生物素标记的用于识别p-Tau-217位点的单克隆抗体;
A4:生物素标记的用于识别p-Tau-231位点的单克隆抗体;
试剂B包括:标记吡啶酯的用于识别Tau蛋白N 1-17位点单克隆抗体;
其中,生物素标记的单克隆抗体与链霉亲和素磁珠结合。

[0008] 在一种或多种实施方式中,所述底物液包括底物液A和底物液B,底物液A为过氧化氢溶液,所述底物液B为氢氧化钠溶液。

[0009] 工作原理:采用双抗体夹心法并利用磁微粒化学发光免疫分析方法对样本中T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231的含量进行定量测定。反应的技术原理为:生物素标记的单克隆抗体(分别识别T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217或p-Tau-231位点)与链霉亲和素磁珠结合,并同校准品、质控品或者样本中的被检测物质(T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217或p-Tau-231)和标记吡啶酯的单克隆抗体(识别Tau蛋白N 1-17位点)三者,形成抗体-抗原-抗体夹心复合物,在外加磁场中直接沉淀,将免疫反应形成的复合物与未结合的其他物质分离。去上清后清洗沉淀的复合物,加入化学发光底物液A和B。吡啶酯在碱性条件下被催化裂解,形成不稳定的激发态中间体,当激发态中间体回到基态时便发出光子,形成发光反应,即可使用发光仪检测反应的发光强度。发光强度与样本中被检测物质的含量呈正比,使用四参数Logistic方程拟合可计算出样本中被检测物质的浓度。

[0010] 本发明的第二方面,提供第一方面所述的试剂盒在阿尔茨海默症早期诊断中的应用。

[0011] 在本发明的第三方面,提供一种用于阿尔茨海默症早期诊断的系统,包括检测模块、数据处理模块和结果显示模块;其中所述检测模块用于利用第一方面所述的试剂盒检测样本中待检测物的含量,所述数据处理模块内置logistic regression回归算法,用于基于所述标志物的检测结果以及患者信息计算患者患有阿尔茨海默症的概率及所述结果显示模块用于输出计算结果热图。

[0012] 本发明第四方面,提供一种T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231的联合检测方法,所述方法包括采用上述试剂盒进行检测。

[0013] 本发明的具体实施方式具有以下有益效果:

本发明提供了一种用于阿尔茨海默症的早期诊断的试剂盒,第一种试剂盒采用T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231等多种标志物联检的方式以提高阿尔茨海默症早期诊断和筛查的特异性及灵敏度;采用生物素和链霉亲和素高亲和力和多级放大效应,本发明的试剂盒以及分析方法更高的检测敏感度、特异性、稳定性;采用链霉亲和素磁珠与抗体-生物素标记物提前预包被的方法,简化了检测的流程和时间;采用独特的缓冲体系提高试剂的稳定性和检测的重复性。

[0014] 本发明检测人血清样本,实现了创伤小、易操作、检测准确、能够实现自动化、更适用于人群筛查和早期诊断的检测试剂盒;磁微粒与化学发光技术相结合,检测范围宽、灵敏度高、精密度好,并适用于全自动化学发光仪,操作简单,适合临床大量检测血清的需求。

[0015] 本发明试剂盒结果可以与大量长期的临床信息结合(如患者年龄、APOE携带情况、受教育程度、APP蛋白及 γ 分泌酶的突变情况),为阿尔茨海默症早期诊断提供更加准确、更

具有个性化的指导意见。

具体实施方式

[0016] 应该指出,以下详细说明都是例示性的,旨在对本申请提供进一步的说明。除非另有指明,本申请使用的所有技术和科学术语具有与本申请所属技术领域的普通技术人员通常理解相同含义。

[0017] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本申请的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、器件、组件和/或它们的组合。

[0018] 在本发明的一种实施方式中,提供了一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒,所述试剂盒包括:试剂A,试剂B和底物液;试剂A包括:A1:生物素标记的用于识别T-Tau位点的单克隆抗体;A2:生物素标记的用于识别p-Tau-181位点的单克隆抗体;A3:生物素标记的用于识别p-Tau-217位点的单克隆抗体;A4:生物素标记的用于识别p-Tau-231位点的单克隆抗体;试剂B包括:标记吡啶酯的用于识别Tau蛋白N 1-17位点单克隆抗体;生物素标记的单克隆抗体与链霉亲和素磁珠结合。

[0019] 在本发明的一种或多种实施方式中,所述底物液包括底物液A与底物液B;底物液A为过氧化氢溶液;底物液B为NaOH溶液,提供碱性过氧化氢环境。

[0020] 在本发明的一种或多种实施方式中,所述试剂盒还包含校准品;

所述校准品为全段磷酸化的Tau蛋白,用校准品缓冲液稀释,并分别使用T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231对其进行赋值后冻干,制备成复合通用校准品。

[0021] 本发明的一种实施方式中,提供了一种上述试剂盒的制备方法,所述制备方法包括:

试剂A的制备方法如下:将T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体与生物素以摩尔比为1:10-1:40的量进行混匀,室温下混匀反应1-4 h后将反应物置于PBS缓冲液中进行透析得到生物素标记的单克隆抗体;将生物素标记的单克隆抗体加入链霉亲和素磁性微球的缓冲体系中,生物素化蛋白与链霉亲和素磁性微球偶联比例为10-30 μ g:1mg。

[0022] 试剂B的制备方法如下:将Tau蛋白N 1-17位点的单克隆抗体与吡啶酯按照摩尔比为1:10-1:40进行混匀,室温下反应2-4 h后加入赖氨酸终止偶联反应,将反应产物置于PBS缓冲液中进行透析得到。

[0023] 优选地,所述Tau蛋白N 1-17位点的单克隆抗体采用硼酸盐缓冲液溶解,浓度为1-3 mg/ml。

[0024] 优选地,所述吡啶酯的浓度为2-10 mg/ml。

[0025] 优选地,所述赖氨酸的浓度为100-500 mg/ml,投入量为5-40倍的抗体量。

[0026] 优选地,加入赖氨酸后混匀时间为15 min-2 h。

[0027] 优选地,所述反应产物透析次数为2~4次。

[0028] 在本发明的实施方式中,所述用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒的使用方法为:将待处理后的样品与试剂A混合孵育5-15 min,使用清洗液清洗后将试剂B加入反应体

系中继续孵育5-15 min,通过外加磁场进行清洗后加入底物液A和底物液B后对发光信号进行检测。

[0029] 下面结合具体的实施例对本发明做进一步的解释和说明。

[0030] 实施例1

本实施例中,提供一种用于阿尔茨海默症早期诊断的试剂盒,所述试剂盒中包括:试剂A1(T-Tau磁性微球工作液)、A2(p-Tau-181磁性微球工作液)、A3(p-Tau-231磁性微球工作液)、A4(p-Tau-217四种磁性微球工作液)、试剂B1(识别tau蛋白N 1-17位点的单克隆抗体配制的吡啶酯工作液)、校准品(通用的复合校准品,用于建立标准曲线)。

[0031] 步骤一:缓冲液的配置

1. 磁性微球的缓冲体系的配制方法

在0.15 M的PBS缓冲体系中,调节pH为7.3,加入3% BSA、2% 海藻糖、0.05%磁性微球分散剂、0.25%吐温20、0.05% Proclin 300,充分混匀至完全溶解,加入适量纯化水定量,搅拌混匀1 h,调节pH为7.3。使用过滤装置将其过滤,4℃下保存备用。

[0032] 2. 吡啶酯缓冲液的配制方法

在0.05M的MES缓冲体系中,调节pH为6.0,加入0.8% BSA、2% 蔗糖、0.25%吐温20、0.05% Proclin 300,充分混匀至完全溶解,加入适量纯化水定量,搅拌混匀1 h,验证pH是否为6.0。使用过滤装置将其过滤,4℃下保存备用。

[0033] 3. 校准品缓冲液的配制方法

在0.15 M的PBS缓冲体系中,添加5%糖类,添加1.5%BSA,10 mM EDTA、1.5%甘露醇,充分混匀1 h后,调节pH为8.2,加入0.1%表面活性剂,1‰的防腐剂充分混匀1 h后,验证pH为8.2,用过滤装置将其过滤,4℃保存。

[0034] 步骤二:试剂A1、A2、A3、A4的制备

1. 生物素与T-tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体采用以下步骤偶联

用CB缓冲液将T-tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体稀释成2 mg/mL,与配制浓度为35 mg/mL的生物素,按照摩尔比为1:20的量进行混匀,室温下混匀反应2 h,最后将反应物用透析袋置于PBS缓冲液中透析,每两个小时换一次透析液,反复3次,透析所得溶液4℃保存待用。

[0035] 2. 链霉亲和素磁珠与生物素化的T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体采用以下步骤偶联:

用Tris-HCl缓冲液将链霉亲和素磁性微球洗涤2次,去上清,使用Tris-HCl缓冲液进行复溶,并加入生物素化的T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体,生物素化蛋白与链霉亲和素磁性微球偶联比例为20 μg:1mg,室温混匀1.5 h。使用Tris-HCl缓冲液将反应后的磁性微球洗涤3次,去上清,并用含有蛋白的PBS缓冲溶液复溶至存储浓度3 mg/mL。

[0036] 3. 试剂A1、A2、A3、A4-磁珠工作液制备方法

将包被有T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体的磁性微球母液分别进行稀释,使T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231单克隆抗体的终浓度为0.75 mg/mL,4℃保存备用。

[0037] 步骤三:试剂B的制备

识别Tau蛋白N 1-17位点的单克隆抗体与吡啶酯采用以下步骤偶联:

用硼酸盐缓冲液将识别Tau蛋白N 1-17位点的单克隆抗体稀释成2 mg/mL,与配制浓度为6 mg/mL的吡啶酯,按照摩尔比为1:20的量进行混匀,室温下混匀反应3 h;然后加入配制好的300 mg/mL的赖氨酸终止液进行终止,赖氨酸的投入量为20倍的抗体量,混匀反应1 h,最后将反应物用透析袋置于PBS缓冲液中透析,每两个小时换一次透析液,反复3次,透析所得溶液4℃保存待用。

[0038] 步骤四:校准品的配制

校准品是全段磷酸化的Tau蛋白,用校准品缓冲液稀释,并分别使用T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217、p-Tau-231对其进行赋值后冻干,制备成复合通用校准品。

[0039] 步骤五:所述的检测T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231含量的试剂盒的使用方法

全自动磁微粒化学发光仪取磁性微球工作液60 uL至孵育杯中,然后加入60 uL校准品、质控品或者样本,37℃下孵育10 min,采用400 uL的清洗液清洗3次后加入70 uL 吡啶酯工作液,37℃下孵育10 min,采用400 uL的清洗液清洗3次,最后加入化学发光底物A和B各100 uL,检测发光值,根据校准品曲线,分别计算T-Tau、p-Tau-181、p-Tau-217和p-Tau-231的浓度最后通过数据处理模块,计算出阿尔茨海默症风险系数。

[0040] 本实施例中,针对上述阿尔茨海默症早期诊断试剂盒的准确性进行了考察,考察项目包括精密度、检测限及灵敏度,考察结果如下:

(1)精密度:用三批试剂盒联合检测阿尔茨海默症早期检测的试剂盒分别测试高低水平样本,平行测定10次,计算测定结果,批间精密度CV应<10%。

[0041] 表1批间精密度结果

精密度	总 Tau		p-Tau-181	
	3 批 (10 pg/mL)	3 批 (200 pg/mL)	3 批 (2.5pg/mL)	3 批 (50pg/mL)
均值	10.049	210.235	2.705	55.474
SD	0.516	5.31	0.166	2.8
CV	5.14%	2.53%	6.12%	5.05%

精密度	p-Tau-217		p-Tau-231	
	3 批 (2.5 pg/mL)	3 批 (50 pg/mL)	3 批 (2.5pg/mL)	3 批 (50pg/mL)
均值	2.849	54.935	2.817	54.706
SD	0.151	2.885	0.164	2.847
CV	8.81%	5.25%	5.82%	5.20%

从上表数据可知,三批试剂盒测定同一份精密度样本,批间精密度<10%,表明不同批次的试剂盒之间的差异很小,测量结果具有重复性

(2)线性范围:按照本发明试剂盒的说明书要求,在全自动化学发光仪器上分别检测各项目线性梯度样本,将每一浓度的样本重复检测三次,计算平均值,并计算每个项目线性范围内相关系数应 ≥ 0.99 。

[0042] 表2线性范围测定实验结果

总 Tau								
浓度 (pg/mL)	0.5	2.5	5	10	50	100	200	400
测值平均值	0.47	2.41	5.11	9.67	47.34	97.35	213.65	387.23
相关系数	0.9988							
p-Tau-181								
浓度 (pg/mL)	0.625	1.25	2.5	5	10	50	100	200
测值平均值	0.613	1.13	2.41	4.32	9.64	52.84	97.63	194.68
浓度 (pg/mL)	2.5	5	10	50	100	200	400	
测值平均值	2.41	5.11	9.67	47.34	97.35	213.65	387.23	
相关系数	0.9998							
p-Tau-217								
浓度 (pg/mL)	0.625	1.25	2.5	5	10	50	100	200
测值平均值	0.587	1.04	2.27	4.16	9.29	48.27	91.34	189.64
相关系数	0.9998							
p-Tau-231								
浓度 (pg/mL)	0.625	1.25	2.5	5	10	50	100	200
测值平均值	0.594	1.11	2.36	4.08	9.14	46.32	93.68	192.35
相关系数	0.9999							

由表2中计算出剂量-反应曲线的线性来看,各项目在线性范围内相关系数均 ≥ 0.99 ,均符合要求。

[0043] (3)最低检测限:选择低浓度样本进行倍比稀释,配制成一系列低浓度样本,测定并计算每个浓度样本的批间CV, CV最接近20%的样本所具有的分析物含量为功能灵敏度。

[0044] 从下表3可以看出,该试剂盒的最低检测限不大于0.05 pg/mL,能够准确检测出各项目。

[0045] 表3灵敏度实验结果

灵敏度	总 Tau		
	第一批 (pg/mL)	第二批 (pg/mL)	第三批 (pg/mL)
功能灵敏度	0.037	0.032	0.031
灵敏度	p-Tau-181		
	第一批 (pg/mL)	第二批 (pg/mL)	第三批 (pg/mL)
功能灵敏度	0.032	0.035	0.028
灵敏度	p-Tau-217		
	第一批 (pg/mL)	第二批 (pg/mL)	第三批 (pg/mL)
功能灵敏度	0.027	0.019	0.024
灵敏度	p-Tau-231		
	第一批 (pg/mL)	第二批 (pg/mL)	第三批 (pg/mL)
功能灵敏度	0.016	0.028	0.019

(4)该实施例试剂盒的临床验证

为了判断该实施例试剂盒用于检测阿尔茨海默症早期检测的适用性,取来自医院正常人样本228例,已确认的阿尔茨海默症患者血清47例,已确认的认知障碍患者血清41例,分别用该实施例试剂盒进行检测,检测结果见表4;

验证结果表明,该实施例试剂盒对于阿尔茨海默症患者的阳性率高达97.87%,对于健康人的阳性率为1.32%,对于认知障碍阳性率为2.44%,明显优于其他组合检测项目。说明该实施例试剂盒可以突出对阿尔茨海默症患者的鉴别诊断,具有较好的临床实用性。

[0046] 表4 临床样本测定结果

样本背景		正常人	阿尔茨海默症患者	认知障碍
例数		228	47	41
阳性率 (%)	总 Tau	7.46%	74.47%	7.32%
	总 Tau+p-Tau-181	6.58%	80.85%	4.88%
	总 Tau+p-Tau-181+p-Tau-217	3.95%	89.36%	4.88%
	总 Tau+p-Tau-181+p-Tau-217+p-Tau-231	1.32%	97.87%	2.44%

以上所述仅为本发明的优选实施例而已,并不用于限制本发明,对于本领域的技术人员来说,本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内,所作的任何修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。