



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109580955 A

(43)申请公布日 2019.04.05

(21)申请号 201811392665.6

(22)申请日 2018.11.21

(71)申请人 北京利德曼生化股份有限公司

地址 100176 北京市大兴区经济技术开发区
兴海路5号

(72)发明人 郭健夫 桂颖 王义君

(74)专利代理机构 北京思元知识产权代理事务
所(普通合伙) 11598

代理人 余光军

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 21/76(2006.01)

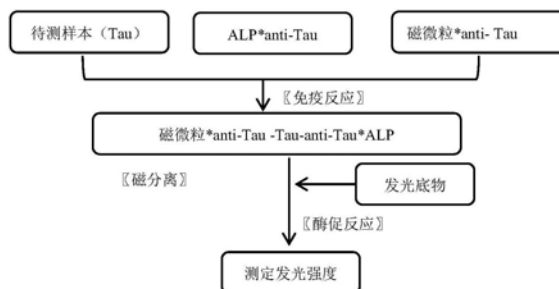
权利要求书2页 说明书7页 附图1页

(54)发明名称

用于检测Tau蛋白(TAU)的磁微粒分离化学
发光免疫测定法

(57)摘要

本发明公开了一种人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法,试剂盒组成包括:校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液,其中,校准品为含一系列浓度的Tau蛋白(TAU)抗原,用于建立标准曲线;质控品为含一定浓度Tau蛋白(TAU)抗原的缓冲液配制而成;试剂A为含一定浓度磁微粒标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液;试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液;清洗液浓缩液用于配制清洗液;发光底物液为碱性磷酸酶(ALP)催化的发光底物溶液。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度和灵敏度,使低含量物质在进行免疫结合时也能产生很强的化学发光信号,为人体Tau蛋白(TAU)的检测提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。



1. 人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 试剂盒组成包括: 校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液, 其中, 校准品为含一系列浓度的Tau蛋白 (TAU) 抗原, 用于建立标准曲线; 质控品为含一定浓度Tau蛋白 (TAU) 抗原的缓冲液配制而成; 试剂A为含一定浓度磁微粒标记的Tau蛋白 (TAU) 抗体溶液; 试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的Tau蛋白 (TAU) 抗体溶液; 清洗液浓缩液用于配制清洗液; 发光底物液为碱性磷酸酶 (ALP) 催化的发光底物溶液; 检测方法包括:

(1) 免疫反应: 将待测样品与质控品、50 μ l 试剂A、50 μ l 试剂B依次加入反应管中, 37 $^{\circ}$ C 条件下混合温育15min;

(2) 磁分离: 使磁微粒在磁场中沉降, 去上清, 加入200–500 μ l 清洗液, 去除磁场, 然后再次使磁微粒在磁场中沉降, 去除上清液; 如此重复2–4次, 以去除未结合的抗体和杂质;

(3) 读值: 加入发光底物液150 μ l, 碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

(4) 算出含量: 将待测样本的发光强度与校准品的标准曲线比对, 使用四参数Logistic 方程拟合可计算出待测样本中Tau蛋白 (TAU) 的含量。

2. 根据权利要求1所述人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述试剂A的配置方法包括: 将表面含有羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒进行磁分离, 然后用活化缓冲液清洗3次; 混悬后加入活化剂, 活化后的磁微粒溶液与Tau蛋白 (TAU) 抗体按比例混合, 使得Tau蛋白 (TAU) 抗体被共价偶联在磁微粒表面。

3. 根据权利要求2人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述活化缓冲液为摩尔浓度0.05M的 (2- (N-吗啡啉) 乙磺酸) MES, pH6.0, 所述活化剂为1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC)。

4. 根据权利要求2人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述比例为20:1。

5. 根据权利要求1人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述试剂B的配置方法包括: Tau蛋白 (TAU) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 分别加入活化剂, 除盐; 活化后的Tau蛋白 (TAU) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 按比例混合; 分离纯化, 除去未连接的Tau蛋白 (TAU) 抗体和碱性磷酸酶 (ALP), 将连接物保存于4 $^{\circ}$ C。

6. 根据权利要求5人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, Tau蛋白 (TAU) 抗体加入的活化剂为2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT), 碱性磷酸酶 (ALP) 加入的活化剂为Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)。

7. 根据权利要求5人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述比例为1:1。

8. 根据权利要求5人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 所述除盐为使用Sephadex G25凝胶柱子除盐, 所述分离纯化为使用Superdex200凝胶层析柱分离纯化。

9. 根据权利要求1人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法, 其特征在于, 建立标准曲线的方法包括:

(1) 免疫反应: 将不同浓度的50 μ l 的校准品分别与质控品、50 μ l 试剂A、50 μ l 试剂B依次

加入反应管中,37℃条件下混合温育15min;

(2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200-500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

(3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

(4) 根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合,获得Tau蛋白 (TAU) 浓度-发光值标准曲线。

10. 根据权利要求9人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,校准品的系列浓度分别为0ng/ml,0.8ng/ml,2.5ng/ml,9.5ng/ml,25ng/ml,50ng/ml。

用于检测Tau蛋白 (TAU) 的磁微粒分离化学发光免疫测定法

技术领域

[0001] 本发明属于免疫检测分析技术领域,提供了用于检测Tau蛋白 (TAU) 的磁分离化学发光免疫测定法,适用于人血清Tau蛋白 (TAU) 定量检测。

背景技术

[0002] Tau蛋白又称微管结合蛋白 (Microtubulue Association Protein,MAP),存在于正常脑组织神经元轴突中,具有合成和稳定神经元细胞骨骼的作用。正常脑中Tau蛋白的细胞功能是与微管蛋白结合促进其聚合形成微管;与形成的微管结合,维持微管稳定性,降低微管蛋白分子的解离,并诱导微管成束。正常脑中Tau蛋白分子含2-3个磷酸基,而阿尔茨海默症 (AD) 患者脑中的Tau蛋白则异常过度磷酸化,每分子Tau蛋白可含5-9个磷酸基,并丧失正常生物功能。

[0003] 在细胞内,Tau蛋白可以被修饰,其中最重要的是磷酸化,而Tau蛋白的功能取决于其磷酸化水平。有数据显示,可溶性Tau蛋白过度磷酸化后转为不可溶,过度磷酸化的Tau蛋白,最终可形成NFT。

[0004] 同时有研究表明AD致病的主要原因是由于大脑中Tau蛋白过度磷酸化导致神经纤维缠结 (neuro fibrillary tangles,NFT) 和大脑中 β 淀粉样蛋白 (Bamyloid, $A\beta$) 大量沉积构成老年斑,进而导致神经元功能异常。

[0005] 有报道显示,轻度认知障碍患者脑脊液Tau蛋白水平明显增高。Hampel等报道,脑脊液中磷酸化Tau蛋白是阿尔兹海默症的最佳检测标志物。有动物实验发现,持续低灌注使大鼠海马Tau蛋白发生过度磷酸化,并使其在神经细胞内聚集,造成大鼠的认知功能障碍。这些研究表明,Tau蛋白与认知功能密切相关。故作为一种神经系统特异性蛋白,Tau蛋白在脑损伤后可从神经细胞释放到脑脊液,进一步通过被破坏的血脑屏障渗漏到外周血。因此,脑脊液、外周血Tau蛋白浓度在一定程度上可以反应脑损伤程度。

[0006] 也有研究表明,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P-Tau-181蛋白的增加,可启动血脑屏障外的P-Tau-181蛋白的生成,最终导致血液中P-Tau-181含量的增加。因此,检测血清中P-Tau-181蛋白的含量对诊断AD有着较高的临床价值。

[0007] 目前已知的Tau蛋白 (TAU) 检测方法主要有RIA (radioimmunoassay放射免疫测定法) 法、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)。但是,这些方法都存在一定的缺陷,RIA法污染大、ELISA法自动化程度低且操作复杂繁琐,高效液相色谱法、气相色谱法和气相色谱和质谱联用法不适合广泛用于临床检测。

[0008] 因此,目前尚需一种污染小、灵敏度高、操作简单、自动化程度高、特异性好、成本低的Tau蛋白 (TAU) 的快速定量检测方法。

发明内容

[0009] 本发明旨在开发一种灵敏度高、无污染、操作简单、特异性好并且成本低廉的Tau蛋白 (TAU) 的快速定量检测方法。

[0010] 基于上述目的,本发明提供一种人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,试剂盒组成包括:校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液,其中,校准品为含一系列浓度的Tau蛋白 (TAU) 抗原,用于建立标准曲线;质控品为含一定浓度Tau蛋白 (TAU) 抗原的缓冲液配制而成;试剂A为含一定浓度磁微粒标记的Tau蛋白 (TAU) 抗体溶液;试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的Tau蛋白 (TAU) 抗体溶液;清洗液浓缩液用于配制清洗液;发光底物液为碱性磷酸酶 (ALP) 催化的发光底物溶液;检测方法包括:

[0011] (1) 免疫反应:将待测样品与质控品、50 μ l试剂A、50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

[0012] (2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200–500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2–4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0013] (3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶 (ALP) 催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度 (RLU);

[0014] (4) 算出含量:将待测样本的发光强度与校准品的标准曲线比对,使用四参数 Logistic 方程拟合可计算出待测样本中Tau蛋白 (TAU) 的含量。

[0015] 另一方案,所述人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述试剂A的配置方法包括:将表面含有羧基 (COOH-) 活性基团的磁微粒进行磁分离,然后用活化缓冲液清洗3次;混悬后加入活化剂,活化后的磁微粒溶液与Tau蛋白 (TAU) 抗体按比例混合,使得Tau蛋白 (TAU) 抗体被共价偶联在磁微粒表面。

[0016] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述活化缓冲液为摩尔浓度0.05M的 (2- (N-吗啡啉) 乙磺酸) MES, pH6.0, 所述活化剂为1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC)。

[0017] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述比例为20:1。

[0018] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述试剂B的配置方法包括: Tau蛋白 (TAU) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 分别加入活化剂,除盐;活化后的Tau蛋白 (TAU) 抗体、碱性磷酸酶 (ALP) 按比例混合;分离纯化,除去未连接的Tau蛋白 (TAU) 抗体和碱性磷酸酶 (ALP),将连接物保存于4 $^{\circ}$ C。

[0019] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于, Tau蛋白 (TAU) 抗体加入的活化剂为2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT), 碱性磷酸酶 (ALP) 加入的活化剂为 Succinimidyl 4- (N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC)。

[0020] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述比例为1:1。

[0021] 另一方案,人体Tau蛋白 (TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,所述除盐为使用Sephadex G25凝胶柱子除盐,所述分离纯化为使用Supperdex200凝胶层析柱分离纯化。

[0022] 另一方案,人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,建立标准曲线的方法包括:

[0023] (1)免疫反应:将不同浓度的50 μ l的校准品分别与质控品、50 μ l试剂A、50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

[0024] (2)磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200–500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2–4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0025] (3)读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶(ALP)催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度(RLU);

[0026] (4)根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合,获得Tau蛋白(TAU)浓度-发光值标准曲线。

[0027] 另一方案,人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法,其特征在于,校准品的系列浓度分别为0ng/ml,0.8ng/ml,2.5ng/ml,9.5ng/ml,25ng/ml,50ng/ml。

[0028] 上述步骤表明,本发明采用的竞争法的反应模式,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,确保了检测的灵敏度,由于实验采用竞争法不存在HOOK效应,无污染、特异性强、操作简单、并且对样品的前处理要求低、可快速高通量检测大批量样本,便于临床试剂应用。本发明为临床检测人血清中的Tau蛋白(TAU)提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

附图说明

[0029] 图1为本发明人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法流程图。

具体实施方式

[0030] 本发明的目的在于提供一种具有检测范围宽、灵敏度高、操作简便的检测人体Tau蛋白(TAU)管式磁微粒分离化学发光免疫检测方法。

[0031] 本发明的上述目的通过以下技术方案实现:

[0032] 人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法原理如下:

[0033] 本发明为双抗体夹心法,应用磁微粒分离技术与化学发光免疫分析系统相结合定量检测血清样本中Tau蛋白(TAU)的含量。如图1所示,反应的技术原理为:磁微粒连接的Tau蛋白(TAU)抗体与碱性磷酸酶(ALP)(AP)标记的Tau蛋白(TAU)抗体同待测样本或校准品或质控品中的Tau蛋白(TAU)发生免疫反应,结合形成“三明治”结构的复合物。随后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磁分离。去上清后清洗沉淀的复合物,加入酶促化学发光底物。底物在酶作用下被催化裂解,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Tau蛋白(TAU)的浓度成正比,使用四参数Logistic方程拟合可计算出样本中Tau蛋白(TAU)的含量。

[0034] 测定人体Tau蛋白(TAU)含量的磁微粒化学发光检测试剂盒的组成

[0035] 本发明生成的人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫测定的试剂盒组成包括:1、校准品(含一系列浓度的Tau蛋白(TAU)抗原,用于建立标准曲线);2、质控品(含一定浓度Tau蛋白(TAU)抗原的缓冲液配制而成);3、试剂A(含一定浓度磁微粒标记的Tau蛋白

(TAU) 抗体溶液); 4、试剂B(含一定浓度碱性磷酸酶(ALP) 标记的Tau蛋白(TAU) 抗体溶液); 5、清洗液浓缩液(用于配制清洗液); 6、底物溶液(酶催化的发光底物)。

[0036] 下面通过具体实施例对本发明进行详细说明,但并不限定本发明。

[0037] 试剂

[0038] 本发明检测试剂盒中的所有组分均能通过商业途径从生物试剂或化学试剂公司购买得到。本发明中所用标记碱性磷酸酶(ALP) 抗体为Fitzgerald公司生产, 货号为70R-34649; 标记磁微粒抗体为Fitzgerald公司生产, 货号为70R-32554; 抗原为上海领潮公司生产, 货号为:L2B006; 碱性磷酸酶(ALP) 购自英国BBI公司, 型号为:ALPI12G; SMCC购自thermo fisher scientific公司, 货号为:22360; 2-IT购自thermo fisher scientific公司, CAS: 4781-83-3; 货号为:26101; 羧基修饰微粒购自thermo fisher scientific公司; EDC购自SIMGA公司, CAS:25952-53-8, 货号:E7750。发光底物、清洗浓缩液均来自北京利德曼生化股份有限公司成品试剂盒。

[0039] 实施例1:磁微粒标记Tau蛋白(TAU) 抗体

[0040] 取20mg羧基修饰微粒溶液, 将具有超顺磁性, 粒径均匀, 表面含有羧基(COOH-) 活性基团的磁微粒在磁场作用下沉降(磁分离) 10分钟, 去上清, 沉降的磁微粒用活化缓冲液摩尔浓度0.05M的(2-(N-吗啡啉) 乙磺酸)MES, pH6.0缓冲液清洗3次, 每次用量2ml。

[0041] 将洗涤后磁微粒用1.0ml活化缓冲液摩尔浓度0.05M的(2-(N-吗啡啉) 乙磺酸)MES, pH6.0的缓冲液充分混悬后加入活化剂1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl] carbodiimide hydrochloride (EDC), 室温混悬反应30分钟, EDC反应摩尔浓度为7.5mM。

[0042] 取1.0mg的Tau蛋白(TAU) 抗体, 浓缩至2.5mg/mL。

[0043] 将浓缩至2.5mg/mL的Tau蛋白(TAU) 抗体按1.0mg的Tau蛋白(TAU) 抗体加入20mg活化后的磁微粒溶液混合, 轻摇混匀, 在4℃混悬条件下反应6.5小时, 使得Tau蛋白(TAU) 抗体被共价偶联在磁微粒表面, 制得试剂A。

[0044] 实施例2:碱性磷酸酶(ALP) 标记Tau蛋白(TAU) 抗体

[0045] 取1.0mg的Tau蛋白(TAU) 抗体, 浓缩至2.5mg/mL, 加入浓度为13.76mg/mL的活化剂2-Iminothiolane hydrochloride (2-IT) 溶液5μL, 室温反应15分钟。使用Sephadex G25凝胶柱子除盐, 收集活化后的抗体。

[0046] 取1.2mg碱性磷酸酶(ALP), 浓缩至2.5mg/mL, 加入浓度为6.69mg/mL的活化剂Succinimidyl 4-(N-maleimidomethyl) cyclohexane-1-carboxylate (SMCC) 溶液12μL, 室温反应15分钟。使用Sephadex G25凝胶柱子除盐, 收集活化后的碱性磷酸酶(ALP)。

[0047] 将活化后Tau蛋白(TAU) 抗体与碱性磷酸酶(ALP) 按1.0mg的Tau蛋白(TAU) 抗体加入1.0mg碱性磷酸酶(ALP) 的比例混合, 放置4℃下反应18小时。

[0048] 使用Supperdex200凝胶层析柱分离纯化, 除去未连接的Tau蛋白(TAU) 抗体和碱性磷酸酶(ALP), 将连接物保存于4℃, 制得试剂B。

[0049] 实施例3:人体Tau蛋白(TAU) 磁微粒分离化学发光免疫检测方法

[0050] (1) 免疫反应:将实施例1的50μl的校准品系列(浓度分别为0, 0.8, 2.5, 9.5, 25, 50ng/ml) 分别与质控品、实施例1的50μl试剂A、实施例2的50μl试剂B依次加入反应管中, 37℃条件下混合温育15min;

[0051] (2) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降, 去上清, 加入200-500μl清洗液, 去除磁场, 然

后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0052] (3) 读值:加入发光底物液150 μ l,碱性磷酸酶(ALP)催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度(RLU);

[0053] (4) 根据检测的数值使用四参数Logistic方程拟合,获得Tau蛋白(TAU)浓度-发光值标准曲线。

[0054] (5) 将50 μ l的待测样品与实施例1的50 μ l试剂A、实施例2的50 μ l试剂B依次加入反应管中,37 $^{\circ}$ C条件下混合温育15min;

[0055] (6) 磁分离:使磁微粒在磁场中沉降,去上清,加入200-500 μ l清洗液,去除磁场,然后再次使磁微粒在磁场中沉降,去除上清液;如此重复2-4次,以去除未结合的抗体和杂质;

[0056] (7) 读值:加入发光底物液150 μ l,ALP催化底物发光后采用利德曼自研化学发光检测仪测定相对发光强度(RLU);

[0057] (8) 将待测样本的发光强度与步骤(4)的标准曲线比对,使用四参数Logistic方程拟合可计算出待测样本中Tau蛋白(TAU)的含量。

[0058] 实施例4:试剂盒性能测试

[0059] 检测本试剂盒的灵敏度、线性范围、准确性、精密度。具体操作步骤如下:

[0060] 一、试剂准备:

[0061] 实验前,先取出试剂A(磁微粒标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液)、试剂B(碱性磷酸酶(ALP)标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液)、校准品、发光底物。

[0062] 二、仪器准备:

[0063] 本试剂盒适用于北京利德曼生化股份有限公司CI1000、CI2000全自动化学发光免疫分析仪、英国IDS型化学发光免疫分析仪。

[0064] 三、操作步骤:

[0065] 1、剂量-反应曲线线性:用试剂盒最高浓度点校准品(F点)用该项目校准品稀释液倍比稀释到接近该项目分析灵敏度,形成若干浓度点样本。试剂盒定标后测试梯度样本,每个稀释浓度测试3次,分别求出测定结果的均值(y_i)。以稀释浓度(x_i)为自变量,以测定结果均值(y_i)为因变量求出线性回归方程。按公式(1)计算线性回归的相关系数(r)。

[0066]
$$r = \frac{\sum[(x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})]}{\sqrt{\sum(x_i - \bar{x})^2 \sum(y_i - \bar{y})^2}} \dots\dots\dots (1)$$

[0067]

[0068] 合格标准:1.0-200ng/ml内, $r > 0.9900$ 。

[0069] 2、准确度:新配制并检验合格的试剂(包括STD,R1,R2,M)放入37 $^{\circ}$ C温箱共放置7天(可超过7天)。若干天取出试剂,定标后(用4 $^{\circ}$ C保存合格校准品)检测试剂准确性,质控偏差小于20%。

[0070] 合格标准:校准品降幅小于10%,试剂盒降幅小于50%,准确度符合要求。

[0071] 3、最低检测限:用零浓度校准品作为样本进行检测,重复测定20次,得出20次测量结果的相对发光强度(RLU)值,计算其平均值(M)和标准差(SD),得出M+2SD,根据零浓度校准品和相邻校准品之间的浓度-RLU进行两点回归拟合得出一次方程,将M+2SD(正反应)或M-2SD(负反应)的RLU值带入上述方程中,求出对应的浓度值,即为最低检测限。

[0072] 4、精密度:分析方法(分析内):用高、低两个水平浓度的质控血清或新鲜人血清检测试剂,重复测试10次,按以下公式计算测定结果的均值($\bar{X}$)和变异系数(CV)。

$$[0073] \quad \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$[0074] \quad CV = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{(\bar{X})^2 (n-1)}}$$

[0075] 式中: X_i ——待测血清样本的测定结果; $\bar{X}$ ——待测血清样本的均值; n ——测定次数,此处为10。

[0076] 分析方法(分析间):分三次实验,用高、低两个水平浓度的质控血清或新鲜人血清检测试剂,重复测试10次,每一样本均得到30个结果,按以下公式计算测定结果的均值($\bar{X}$)和变异系数(CV)。

$$[0077] \quad \bar{X} = \frac{\sum X_i}{n}$$

$$[0078] \quad CV = \sqrt{\frac{\sum (\bar{X} - X_i)^2}{(\bar{X})^2 (n-1)}}$$

[0079] 式中: X_i ——待测血清样本的测定结果; $\bar{X}$ ——待测血清样本的均值; n ——测定次数,此处为30。

[0080] 合格标准:分析内:不大于10%;分析间:不大于15%。

[0081] 5、特异性:按试剂盒产品标准要求,配制一定浓度的交叉反应物作为样本用试剂盒进行检测,检测结果与样本配制浓度的比值(%)即为对该样本的交叉反应率。

[0082] 合格标准: $<1.0\%$ 。

[0083] 性能指标检测结果:

[0084] 1、剂量-反应曲线线性:使用四参数Logistic方程拟合,在0.5-500ng/mL范围内,剂量-反应曲线相关系数 $r \geq 0.99$ 。

[0085] 2、准确度:通过稀释回收评价其准确度,所得结果稀释回收率在85%-115%之间。

[0086] 3、最低检测限: $<0.05\text{ng/mL}$ 。

[0087] 4、精密度:分析内 $\leq 8\%$,分析间 $\leq 10\%$ 。

[0088] 5、特异性:交叉率均小于0.1%。

[0089] 上述步骤表明,本发明采用的竞争法的反应模式,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,确保了检测的灵敏度,由于实验采用竞争法不存在HOOK效应,无污染、特异性强、操作简单、并且对样品的前处理要求低、可快速高通量检测大批量样本,便于临床试剂应用。本发明为临床检测人血清中的Tau蛋白(TAU)提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

[0090] 本发明提供的人体Tau蛋白(TAU)含量的磁微粒化学发光检测试剂盒可以与全自动化学发光分析仪联用,操作步骤极大简化,加大了检测速度和检测通量,提高了检测效率,同时避免了人为操作导致的误差。

[0091] 所属领域的普通技术人员应当理解:以上任何实施例的讨论仅为示例性的,并非

旨在暗示本发明的范围(包括权利要求)被限于这些例子;在本发明的思路下,以上实施例或者不同实施例中的技术特征之间也可以进行组合,并存在如上所述的本发明的不同方面的许多其它变化,为了简明它们没有在细节中提供。因此,凡在本发明的精神和原则之内,所做的任何省略、修改、等同替换、改进等,均应包含在本发明的保护范围之内。

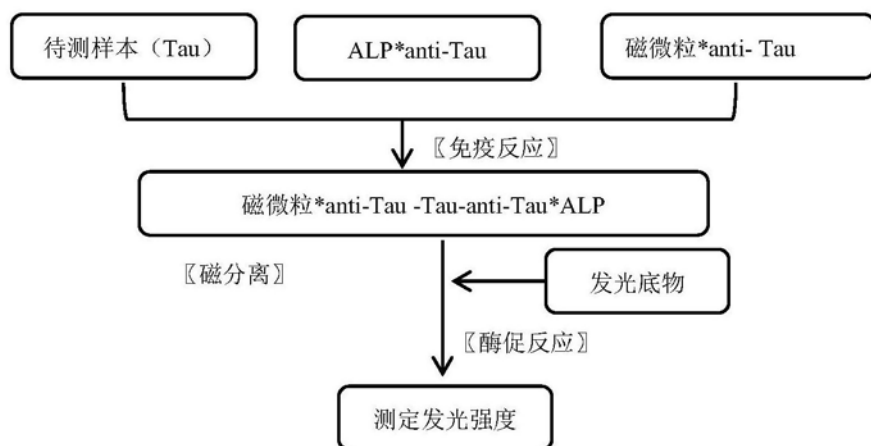


图1

专利名称(译)	用于检测Tau蛋白(TAU)的磁微粒分离化学发光免疫测定法		
公开(公告)号	CN109580955A	公开(公告)日	2019-04-05
申请号	CN201811392665.6	申请日	2018-11-21
[标]申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京利德曼生化股份有限公司		
[标]发明人	郭健夫 桂颖 王义君		
发明人	郭健夫 桂颖 王义君		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/535 G01N33/58 G01N21/76		
CPC分类号	G01N33/6896 G01N21/76 G01N33/535 G01N33/54326 G01N33/581 G01N2800/2821		
代理人(译)	余光军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种人体Tau蛋白(TAU)磁微粒分离化学发光免疫检测方法，试剂盒组成包括：校准品、质控品试剂A、试剂B、清洗液浓缩液、发光底物液，其中，校准品为含一系列浓度的Tau蛋白(TAU)抗原，用于建立标准曲线；质控品为含一定浓度Tau蛋白(TAU)抗原的缓冲液配制而成；试剂A为含一定浓度磁微粒标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液；试剂B为含一定浓度碱性磷酸酶标记的Tau蛋白(TAU)抗体溶液；清洗液浓缩液用于配制清洗液；发光底物液为碱性磷酸酶(ALP)催化的发光底物溶液。本发明极大地提高了免疫反应的信号强度和灵敏度，使低含量物质在进行免疫结合时也能产生很强的化学发光信号，为人体Tau蛋白(TAU)的检测提供了一种更准确、精确、方便、快捷和简单的方法。

