



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102978204 A

(43) 申请公布日 2013. 03. 20

(21) 申请号 201210451344. 5

G01N 33/68 (2006. 01)

(22) 申请日 2012. 11. 12

G01N 33/53 (2006. 01)

(66) 本国优先权数据

G01N 33/543 (2006. 01)

201110357825. 5 2011. 11. 11 CN

201110360860. 2 2011. 11. 14 CN

(71) 申请人 张康

地址 美国加利福尼亚州圣迭戈市格林威洛巷 5082 号

(72) 发明人 张康 彼得·肖

(74) 专利代理机构 成都虹桥专利事务所(普通合伙) 51124

代理人 梁鑫

(51) Int. Cl.

C12N 15/11 (2006. 01)

C12Q 1/68 (2006. 01)

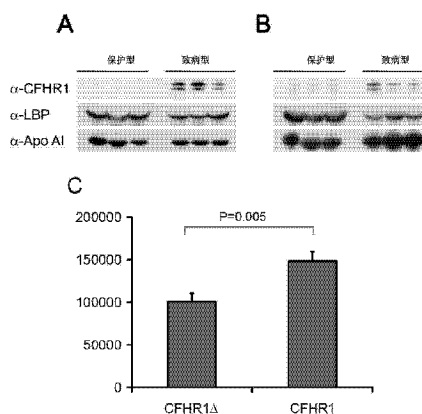
权利要求书 3 页 说明书 17 页
序列表 5 页 附图 6 页

(54) 发明名称

CFHR1 基因型、高密度脂蛋白上 CFHR1 及氧化磷酸胆碱的测定试剂盒及测定方法

(57) 摘要

本发明要解决的技术问题是提供年龄相关性黄斑变性(AMD)疾病发生、发展的诊断试剂。本发明涉及对 CFHR1 基因型鉴定、血浆样品中 CFHR1 含量测定、高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量和 CFHR1 与氧化特异性抗原结合的试剂盒及其检测方法。本发明对年龄相关性黄斑变性(AMD)疾病发生、发展的诊断提供了可靠的参照指标。创造性地确认了不同基因型 CFHR1。而本发明的工作可能会导致在预防和治疗老年黄斑退化的新策略,如通过 CFHR1 活性的抑制或对其下游的参与脉络膜形成炎症基因,包括 IL-1 的活性抑制,以期能预防和治疗老年黄斑退化。具有广阔的开发应用前景。



1. 用于从 DNA 模板中扩增 CFHR1 基因片段的引物对,包括标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座 CFHR1 扩增引物对,其序列如 SEQ ID No 1 和 SEQ ID No 2 所示:

上游引物:5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3'(SEQ ID No 1);

下游引物:5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3'(SEQ ID No 2)。

2. 用于对标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座进行基因型鉴定的引物,其序列如 SEQ ID No 3 所示:

5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAG-3'(SEQ ID No3)。

3. 权利要求 1 中所述的引物对在制备鉴定人组织样本 DNA 中 CFHR1 基因型的试剂盒中的应用。

4. 权利要求 2 中所述的引物在制备鉴定人组织样本 DNA 中 CFHR1 基因型的试剂盒中的应用。

5. 用于鉴定人组织样本 DNA 中 CFHR1 基因型的试剂盒,其特征在于:该试剂盒包含下列成分:

a、从人组织样本中提取 DNA 模板的试剂;

b、用于从 DNA 模板中扩增 CFHR1 基因片段的引物,包括标记为 rs6677604 的 CFHR1 扩增引物对,其序列如 SEQ ID No 1 和 SEQ ID No 2 所示:

上游引物:5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3'(SEQ ID No 1)

下游引物:5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3'(SEQ ID No 2);

c、用于对 DNA 扩增产物的片断进行基因型鉴定的引物序列,包括 rs6677604 标记的 CFHR1 基因型鉴定的引物序列,其序列如 SEQ ID No 3 所示:

5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAG-3'(SEQ ID No3)。

6. 根据权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于:所述的人组织样本为外周血样本。

7. 鉴定人组织样本 DNA 中 CFHR1 基因型的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

a、从人组织样本中提取和纯化 DNA 模板;

b、利用 DNA 模板扩增 CFHR1 基因片段,采用的扩增引物为标记为 rs6677604 的 CFHR1 扩增引物对:

上游引物:5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3'(SEQ ID No 1);

下游引物:5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3'(SEQ ID No 2);

c、使用基因型鉴定的引物序列对步骤 b 得到的 CFHR1 的基因片段进行扩增,得到的产物测序进行基因型 SNP 鉴定,如果其中保护性等位基因为纯合子标记为 AA;其中如果致病性等位基因为纯合子标记为 GG;其中如果保护性/致病性等位基因为杂合子标记为 AG;

所述的基因型鉴定的引物序列包括 rs6677604 标记的 CFHR1 基因型鉴定的引物序列:5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAG-3'(SEQ ID No3)。

8. 测定血浆中 CFHR1 含量的免疫印迹试剂盒,其特征在于:该试剂盒包含下列成分:

a、抗 CFHR1 的抗体;

b、CFHR1 标准品。

9. 测定血浆中 CFHR1 含量的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

a、血浆样本进行 SDS 电泳;

b、将电泳分离后的胶转印至尼龙薄膜;

c、使抗 CFHR1 抗体与薄膜上的蛋白结合；

d、测定所述抗体与 CFHR1 的结合量。

10. 一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量的试剂盒,其特征在于:该试剂盒包含下列成分:

a、抗载脂蛋白 AI 抗体;

b、抗 CFHR1 的抗体。

11. 一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量的方法,其特征在于:该方法包括以下步骤:

a、用抗载脂蛋白 AI 抗体将血浆中高密度脂蛋白俘获;

b、抗 CFHR1 的抗体与高密度脂蛋白样颗粒样品接触;

c、使抗 CFHR1 的抗体与其中的 CFHR1 结合;

d、测定抗 CFHR1 的抗体与 CFHR1 的结合量。

12. 一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的试剂盒,其特征在于:该试剂盒包含下列成分:

a、抗载脂蛋白 AI 抗体,用于将血浆中高密度脂蛋白样颗粒俘获;

b、抗磷酸胆碱的抗体,用于与含高密度脂蛋白样颗粒的样品接触。

13. 根据权利要求 10 所述的试剂盒,其特征在于:所述抗磷酸胆碱的抗体的基因含有 S107VH 重链可变区和 V-kappa 22VL 轻链可变区。

14. 一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的方法,其特征在于,该方法包括以下步骤:

a、用抗载脂蛋白 AI 抗体将血浆中高密度脂蛋白俘获;

b、抗磷酸胆碱的抗体与含高密度脂蛋白的样品接触;

c、使抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱结合;

d、测定抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱的结合量。

15. 根据权利要求 14 所述的定量检测高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的方法,其特征在于:所述的含有氧化高密度脂蛋白样品为血清、血浆、组织匀浆液或组织提取液。

16. 一种定量测定 CFHR1 与氧化特异性抗原结合的试剂盒,其特征在于:该试剂盒含有下列成分:

a、含 POVPC 的氧化特异性抗原;

b、抗 CFHR1 的抗体。

17. 一种定量测定 CFHR1 与氧化特异性抗原结合的方法,其特征在于:包含如下步骤:

a、制备含 POVPC 的氧化特异性抗原;

b、包被氧化特异性抗原在微孔板上;

c、将血浆中 CFHR1 与氧化特异性抗原结合;

d、用抗 CFHR1 的抗体测定 CFHR1 与氧化特异性抗原的结合量。

18. 根据权利要求 8、10 或 16 所述的试剂盒,其特征在于:用于制备抗 CFHR1 的抗体的多肽的序列如 SEQ ID No 4 所示。

19. 根据权利要求 8、10 或 16 所述的试剂盒,其特征在于:所述抗 CFHR1 的抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段中的任一种。

20. 根据权利要求 9、11、14 或 17 所述的方法,其特征在于:所述步骤 d 可采用化学发光免疫分析法、酶联免疫吸附试验法、生物素-亲和素系统测定法、放射免疫测定法中的至少一种方法来测定所述抗体与抗原的结合量。

21. 根据权利要求 9、11、14 或 17 所述的方法,其特征在于:还包括步骤 e,即:根据以纯化的 CFHR1 或者磷酸胆碱化合物为标准品测得的标准曲线,确定 CFHR1 的定量或高密度脂蛋白样颗粒表面的氧化特异抗原决定簇的量。

CFHR1 基因型、高密度脂蛋白上 CFHR1 及氧化磷酸胆碱的测定试剂盒及测定方法

技术领域

[0001] 本发明涉及补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 的基因型鉴定, CFHR1 在血浆中的测定方法, 含 CFHR1 高密度脂蛋白样颗粒的分离纯化, CFHR1 对氧化特异性抗原的结合, 以及高密度脂蛋白 (HDL) 上氧化磷脂的检测, 并且通过以上检测所得到的数据, 对年龄相关性黄斑变性进行预警性诊断和治疗指导。具体涉及有关的定量检测试剂盒及其检测方法。

背景技术

[0002] 年龄相关性黄斑变性 (AMD) 的发病机理涉个体的遗传变异及环境危险因素 (如氧化应激) 的相互作用。AMD 患者视力的严重损失大多是由于脉络膜新生血管 (CNV) 出血及渗出, 或湿性 AMD 引起。AMD 是老年人不可逆失明的主要原因并影响世界上数以百万的人。

[0003] 全基因组关联研究 (GWAS) 可有效推进基于分子水平的复杂性状疾病¹ 的研究。但是, 对遗传变异的性状与发病机制之间的理解仍需实质性的突破。现已发现 AMD 的发生与 1 号染色体上的补体因子 H (CFH) 区域密切相关。CFH 区域包含两个主要疾病风险单体, 一个由 rs1061170 (Y402H) 标记, 另一个由 rs2274700³⁻⁹ 标记。这两个风险单体型一起出现在 60% 以上的 AMD 患者中。

[0004] 最近的研究发现, CFH 相关蛋白 (CFHRs) 的拷贝数变异也与 AMD 相关。特别是, 由 rs6677604 标记的 CFHR1 在高密度脂蛋白上的缺失与避免 AMD^{10,12} 病变有关。CFHR1 基因位于 1 号染色体长臂 31-32 区域, 其蛋白编码与 CFH 的 C 端具有高度同源性。CFHRs 与补体系统中的其它具体效应因子相互结合起调节功能。

[0005] 研究表明, 许多老化疾病与氧化应激相关, 包括动脉粥样硬化、阿尔茨海默氏病和 AMD^{16,19}。除了全身整体性的氧化应激, 视网膜感光细胞同时还因为与局部氧化产物的接触所受到氧化应激。视网膜的感光细胞含有大量饱和脂肪酸磷脂, 如磷脂酰胆碱 (PtC) 等。这些磷脂是极容易受到氧化应激导致化学结构发生变化, 产生各种氧化磷脂 (oxPLs)。例如 1-palmitoyl-2-arachidonoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PAPC, 1-棕榈酰-2-花生四烯酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱) 是最常见视网膜磷脂之一。在氧化作用下, 其中的双键结构被打断, 从而使磷酸胆碱 (PC) 基团产生构象变化, 变为 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3-phosphocholine (POVPC, 1-棕榈酰-2-氧化戊酰-sn-甘油-3-磷酸胆碱) (图 1)。POVPC 可以由鼠天然抗体 TEPC15 (通常也叫 T15) 明确识别。相比之下, TEPC-15 却不与正常细胞膜或天然脂蛋白上的非氧化卵磷脂结合²⁰。通常, oxPLs 存在于氧化修饰的低密度脂蛋白 (oxLDL) 载体或凋亡细胞上。很多研究已经表明 oxPL 能够刺激强烈的炎症反应, 并且可以作为一个可靠的氧化应激生物标记物^{21,22}。

[0006] 有研究人员发现, 一部分的 CFHR1 存在于血浆中一种特殊的高密度脂蛋白样颗粒上。该颗粒包含载脂蛋白 A (ApoAI)、脂多糖结合蛋白 (LBP) 和磷脂²³。由于此高密度脂蛋白样颗粒仅占小于 HDL 总量的 1%, 因此推测它不是脂质转运的结构组件。相反, 它可能具有调节功能, 可能是参与和细菌内毒素的结合来调节炎症反应。然而, CFHR1 在此高密度脂蛋

白样颗粒中的确切作用尚没有被充分探讨,尤其是在 AMD 的研究中。

[0007] 研究者已经在 AMD 患者的视网膜玻璃膜疣和 Bruch 膜中检测到了被氧化修饰的蛋白质和脂 24。作为天然防御机制的一部分,CFHRs 可能参与这种氧化应激的调节。有报道称 CFHR1 缺失(CFHR1 Δ)对于 AMD 风险有保护作用^{10,11}。但是,其对于 AMD 风险的影响机制在很大程度上还是未知的。

发明内容

[0008] 本发明要解决的第一个技术问题是提供用于从 DNA 模板中扩增 CFHR1 基因片段的引物对。

[0009] 本发明的技术方案是用于从 DNA 模板中扩增 CFHR1 基因片段的引物对,包括标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座 CFHR1 扩增引物对:

[0010] 上游引物:5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3' (SEQ ID No 1)

[0011] 下游引物:5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3' (SEQ ID No 2);

[0012] 在此基础上,本发明还提供了用于对标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座进行基因型鉴定的引物,其核苷酸序列:

[0013] 5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAG-3' (SEQ ID No 3)。该引物主要是将上述 CFHR1 扩增引物对的扩增产物进行测序,以测得 CFHR1 上标记为 rs6677604 的 SNP 基因座的序列,进而得到样本的基因型。

[0014] 本发明要解决的一个技术问题是提供一种用于鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因型的试剂盒,该试剂盒包含下列成分:

[0015] a、从人组织样本中提取 DNA 模板的试剂;

[0016] b、用于从 DNA 模板中扩增 CFHR1 基因片段的引物,包括扩增标记为 rs6677604 的 CFHR1 扩增引物对:

[0017] 上游引物:5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3' (SEQ ID No 1)

[0018] 下游引物:5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3' (SEQ ID No 2);

[0019] c、用于对 DNA 扩增产物的片断进行基因型鉴定的引物序列,包括标记为 rs6677604 的 CFHR1 基因型鉴定的引物序列:

[0020] 5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAG-3' (SEQ ID No 3)。

[0021] 其中,上述试剂盒中所述的人组织样本为外周血样本。

[0022] 本发明提供的标记为 rs6677604 的 CFHR1 扩增引物对可应用于制备鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因型的试剂盒。

[0023] 本发明提供的标记为 rs6677604 的 CFHR1 基因型鉴定的引物可应用于制备鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因型的试剂盒。

[0024] 本发明提供的鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因型的试剂盒可用于检测年龄相关性黄斑变性(AMD)患者 CFHR1 基因型。

[0025] 本发明还提供了一种鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因型的方法,该方法包括以下步骤:

[0026] a、从人组织样本中提取和纯化 DNA 模板;

[0027] b、利用 DNA 模板扩增补体因子 H 相关蛋白 1 (CFHR1) 基因片段,采用的扩增引物

为 rs6677604 标记的 CFHR1 扩增引物对：

[0028] 上游引物：5'-GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3' (SEQ ID No 1)；

[0029] 下游引物：5'-GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3' (SEQ ID No 2)；

[0030] c、使用基因型鉴定的引物序列对步骤 b 得到的补体因子 H 的基因片段进行扩增，得到的产物测序进行基因型 SNP 鉴定，如果其中保护性等位基因为纯合子标记为 AA；其中如果致病性等位基因为纯合子标记为 GG；其中如果保护性 / 致病性等位基因为杂合子标记为 AG。

[0031] 其中所述的基因型鉴定的引物为 5'-TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAA TGCGAG-3' (SEQ ID No 3)。

[0032] 本发明还提供了一种测定血浆中 CFHR1 含量的免疫印迹试剂盒，该试剂盒包含下列成分：

[0033] a、抗 CFHR1 的抗体；

[0034] b、CFHR1 标准品。

[0035] 其中用于制备抗 CFHR1 抗体的多肽为：CPTVQNAHILSRQMS (SEQ ID No 4)。

[0036] 其中所述抗 CFHR1 的抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段中的任一种。

[0037] 本发明还提供了测定血浆中 CFHR1 含量的方法，包括以下步骤：

[0038] a、将血浆样本进行 SDS 电泳；

[0039] b、将电泳分离后的胶转印至尼龙薄膜；

[0040] c、使抗 CFHR1 抗体与薄膜上的蛋白结合；

[0041] d、测定所述抗体与 CFHR1 的结合量。

[0042] 其中，上述方法中所述的步骤 d 可采用化学发光免疫分析法、酶联免疫吸附试验法、生物素一亲和素系统测定法、放射免疫测定法中的至少一种方法来检测所述抗体与 CFHR1 的结合量。

[0043] 其中，上述方法中还可包括步骤 e，即：根据以 CFHR1 标准品测得的标准曲线，测定血浆中的 CFHR1 量。

[0044] 本发明还提供一种从血浆中分离纯化含 CFHR1 的高密度脂蛋白的试剂盒，该试剂盒包含下列成分：溴化钾，比重计，离心管和透析膜。

[0045] 本发明还提供一种从血浆中分离纯化含 CFHR1 的高密度脂蛋白的方法，该方法包括以下步骤：

[0046] a、将外周血进行血浆分离

[0047] b、用溴化钾将血浆调整至 1.027 克 / 毫升

[0048] c、45,000RPM 离心 18 小时

[0049] d、丢弃上层液后，提取中层液体

[0050] e、用溴化钾将其调整至 1.065 克 / 毫升

[0051] f、45,000RPM 离心 18 小时

[0052] g、上层液体，放入透析袋；

[0053] h、用 PBS 透析后测定蛋白浓度

[0054] 本发明还提供了一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量的试剂盒，该

试剂盒包含下列成分：

[0055] a、抗载脂蛋白 AI 抗体,用于将血浆中高密度脂蛋白样颗粒俘获；

[0056] b、抗 CFHR1 的抗体,用于与含高密度脂蛋白样颗粒的样品接触。

[0057] 其中用于制备抗 CFHR1 抗体的多肽序列为 :CPTVQNAHILSRQMS (SEQ ID No 4)。

[0058] 其中所述抗 CFHR1 的抗体为单克隆抗体、多克隆抗体或单链抗体可变区片段中的任一种。

[0059] 本发明同时提供了一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量的方法,包括以下步骤：

[0060] a、用抗载脂蛋白 AI 抗体将血浆中高密度脂蛋白俘获；

[0061] b、将抗 CFHR1 的抗体与含高密度脂蛋白样颗粒的样品接触；

[0062] c、使抗 CFHR1 的抗体与其中的 CFHR1 结合；

[0063] d、测定抗 CFHR1 的抗体与 CFHR1 的结合量。

[0064] 其中,上述方法中所述的步骤 d 可采用化学发光免疫分析法、酶联免疫吸附试验法、生物素一亲和素系统测定法、放射免疫测定法中的至少一种方法来检测所述抗体与 CFHR1 的结合量。

[0065] 为了使检测结果更为准确,可以通过使用纯化的 CFHR1 标准品与抗 CFHR1 的抗体制备得到标准曲线,然后通过标准曲线来获得待测样品中高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量。因此,上述方法中还可包括步骤 e,即:根据以 CFHR1 标准品测得的标准曲线,测定氧化高密度脂蛋白样颗粒表面的 CFHR1 量。

[0066] 本发明提供了一种定量检测高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的试剂盒,该试剂盒包含下列成分：

[0067] a、抗载脂蛋白 AI 抗体,用于将血浆中高密度脂蛋白样颗粒俘获；

[0068] b、抗磷酸胆碱的抗体,用于与含高密度脂蛋白样颗粒的样品接触。

[0069] 其中,上述试剂盒中所述抗磷酸胆碱的抗体的编码基因含有 S107VH 重链可变区和 V-kappa 22VL 轻链可变区。

[0070] 本发明同时提供了一种定量检测含高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的方法,包括以下步骤：

[0071] a、用抗载脂蛋白 AI 抗体将血浆中高密度脂蛋白俘获；

[0072] b、将抗磷酸胆碱的抗体与高密度脂蛋白的样品接触；

[0073] c、使所述抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱结合；

[0074] d、测定所述抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱的结合量。

[0075] 其中,上述方法中所述的步骤 d 可采用化学发光免疫分析法、酶联免疫吸附试验法、生物素一亲和素系统测定法、放射免疫测定法中的至少一种方法来检测所述抗体与氧化磷酸胆碱的结合量。

[0076] 其中,上述方法还可包括步骤 e,即:根据以磷酸胆碱化合物为标准品测得的标准曲线,测定氧化高密度脂蛋白表面的氧化特异抗原决定簇的量。

[0077] 其中,上述方法中所述的抗体的编码基因含有 S107VH 重链可变区和 V-kappa 22VL 轻链可变区。

[0078] 其中,上述方法中所述的含有氧化高密度脂蛋白样品为血清、血浆、组织匀浆液或

组织提取液。

[0079] 本发明还提供一种定量测定补体因子H相关蛋白1与氧化特异性抗原结合的试剂盒,该试剂盒含有下列成分:

[0080] a、含POVPC的氧化特异性抗原;

[0081] b、抗CFHR1的抗体。

[0082] 本发明同时提供一种定量测定补体因子H相关蛋白1与氧化特异性抗原结合的方法,包含下列操作步骤:

[0083] a、制备含POVPC的氧化特异性抗原;

[0084] b、包被氧化特异性抗原在微孔板上;

[0085] c、将血浆中CFHR1与氧化特异性抗原结合;

[0086] d、用抗CFHR1的抗体测定CFHR1与氧化特异性抗原的结合量。

[0087] 其中,上述方法中所述的步骤d可采用化学发光免疫分析法、酶联免疫吸附试验法、生物素-亲和素系统测定法、放射免疫测定法中的至少一种方法来检测所述CFHR1与氧化特异性抗原的结合量。

[0088] 其中,上述方法还可包括步骤e,即:根据以CFHR1为标准品测得的标准曲线,测定CFHR1与氧化特异性抗原的结合量。

[0089] 本发明中CFHR1标准品可采用以下方式获得:将CFHR1重组质粒转染真核生物体外表达系统,该质粒表达后,然后通过亲和层析纯化得到CFHR1标准品。

[0090] 本发明中外周血基因组DNA的提取与纯化,可以通过本领域熟知的生物工程方法制备,可使用Qiagen公司的血液DNA纯化试剂盒。

[0091] 在本发明的定量检测含高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的方法中,所述抗载脂蛋白AI抗体和抗磷酸胆碱的抗体可从市场上购买也可通过本领域熟知的生物工程方法制备。例如,购自Sigma化学公司的抗人体ApoAI抗体Anti-humanApoAI(HDL)和TEPC15即可用做本发明方法中的抗体。此外,可以用常规免疫学方法制备抗载脂蛋白AI抗体(即用纯化人载脂蛋白B注射山羊制备抗血清纯化IgG的方法),或者用生物工程方法制备抗磷酸胆碱的抗体,优选编码所述抗磷酸胆碱的抗体的基因含有S107VH重链可变区和V-kappa22VL轻链可变区。在检测过程中,为了使检测结果更为准确,可以通过不同量的磷酸胆碱化合物标准品与抗磷酸胆碱的抗体的结合获得标准曲线,测定氧化高密度脂蛋白表面的氧化特异抗原决定簇的量。

[0092] 在本发明中“磷酸胆碱”(Phosphocholine)指的是磷脂酰胆碱(卵磷脂)的两条脂肪酸尾巴被去掉后所余下的结构部分。

[0093] 本发明的检测抗原与抗体结合量的方法基于抗原抗体间反应的特异性和标记物检测的灵敏性,是一种免疫标记测定方法。即采用酶、荧光剂、放射性同位素、发光剂或电子致密物质标记抗体或抗原,进行抗原抗体间的特异性反应,从而能定量检测抗体或抗原的量。其中将抗原特异性抗体标记后进行检测的方法是直接法,采用标记的第二抗体对检测结果进行放大的方法为间接法。

[0094] 在本发明的方法中,采用直接化学发光免疫分析法、间接化学发光免疫分析法、直接放射免疫测定法、间接放射免疫测定法、直接酶联免疫吸附试验法、间接酶联免疫吸附试验法、直接生物素-亲和素系统测定法、间接生物素-亲和素系统测定法中的任一种来完

成。而上述这些直接法和间接法又分别可进一步地分为夹心法和非夹心法。

[0095] 双抗体夹心法可如下完成：先将抗磷酸胆碱抗体固定在固相载体上，加入含有氧化低密度脂蛋白的样品，使二者接触，再加入抗 ApoB 抗体（或称抗 LDL 抗体，Sigma），使之与氧化低密度脂蛋白接触，测定抗 ApoB 抗体的量而定量氧化低密度脂蛋白的含量。或者，先将抗 ApoB 抗体固定在固相载体上，加入含有氧化低密度脂蛋白的样品，使二者接触，再加入抗磷酸胆碱抗体，使之与氧化低密度脂蛋白接触，测定抗磷酸胆碱抗体的量而定量氧化低密度脂蛋白的含量。

[0096] 本发明中的鉴定人组织样本 DNA 中补体因子 H 相关蛋白 1（CFHR1）基因型的试剂盒可用于检测年龄相关性黄斑变性（AMD）患者 CFHR1 基因型。

[0097] 本发明中的测定血浆样品中 CFHR1 含量的试剂盒可用于检测血浆样品中 CFHR1 含量。

[0098] 本发明中的从血浆中分离纯化含 CFHR1 的高密度脂蛋白的试剂盒可用于分离纯化血浆中含 CFHR1 的高密度脂蛋白。

[0099] 本发明中的定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量的试剂盒可用于检测血浆样品中高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 的结合量。

[0100] 本发明中的检测血浆样品中高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的试剂盒可用于检测血浆样品中高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原。

[0101] 本发明中的检测血浆样品中 CFHR1 蛋白与氧化特异性抗原结合的试剂盒可用于检测血浆样品中 CFHR1 蛋白与氧化特异性抗原的结合。

[0102] 本发明所述的任一试剂盒均可用于检测年龄相关性黄斑变性（AMD）疾病的发生、发展。

[0103] 通过我们建立的计算公式，我们可以推断出 AMD 发病的几率。

[0104] 本发明的有益效果在于：创造性地确认了不同基因型 CFHR1 通过氧化应激影响 AMD 风险的新机制和 CFHR1 在这一调节过程中的作用。开发出不同基因型 CFHR1 的检测试剂盒和检测方法。这些发现可能会导致在预防和治疗老年黄斑退化的新策略，如通过 CFHR1 活性的抑制或对其下游的参与脉络膜形成炎症基因，包括 IL-1 的活性抑制，以期能预防和治疗老年黄斑退化。本发明的试剂盒具有广阔的开发应用前景。

附图说明

[0105] 图 1、为天然与氧化磷脂的结构图

[0106] 1A 为天然的磷酸胆碱的分子结构；1B 为氧化的磷酸胆碱的分子结构，其中箭头所指的虚线椭圆框内所示为 T15 抗氧化磷脂抗体的抗原决定簇。

[0107] 图 2、CFHR1 缺失 rs6677604 基因型的鉴定图谱

[0108] 2A 为纯和保护性基因型（AA）；2B 为杂和基因型（AG）；2C 为纯和致病性基因型（GG）。

[0109] 图 3、为高密度脂蛋白样颗粒的组成部分

[0110] 3A 为 Westernblot 检测人血浆；

[0111] 3B 为 Westernblot 检测相应的所分离纯化的高密度脂蛋白样颗粒；

[0112] rs6677604 与纯合子 AA 基因型的样本被标示成“保护型”；rs6677604 纯合子 GG 基

因型的样本被标示成“风险型”。

[0113] 3C、显示高密度脂蛋白样颗粒含有氧化磷脂(oxPL);纵坐标表示高密度脂蛋白样颗粒上氧化磷脂的值,数据以相对光单位(RLU)表示,平均值 $\pm$ SEM。

[0114] 图4、重组补体因子H相关蛋白1(rCFHR1)能够特异性地与氧化磷脂结合

[0115] 4A显示rCFHR1能够与POVPC-BSA,氧化低密度脂蛋白(oxLDL)呈剂量依赖性结合,但却不能够与天然LDL和BSA结合。Nat-LDL表示非氧化的,天然的低密度脂蛋白。

[0116] 4B显示oxLDL能够竞争性抑制rCFHR1与POVPC-BSA的结合。将rCFHR1与不断增加浓度的竞争剂预先孵育,然后添加到一个包被POVPC-BSA的微孔板,再以抗CFHR1抗体检测结合到板上的CFHR1。数据表示为 B/B_0 ,其中 B_0 是没有竞争剂时CFHR1与抗原的结合值。图A和B均为三次实验结果的平均值。

[0117] 4C和4D:血浆中oxPL(C)或CRP(C-反应蛋白)(D)的水平与CFHR1rs6677604基因型相关(CFHR1 Δ , N=8与CFHR1, N=82)。数据表示为平均相对光单位(RLU) $\pm$ SEM。

[0118] 4E和4F:高密度脂蛋白样颗粒刺激炎症性基因表达。图E,将保护型(rs6677604AA, CFHR1 Δ , N=4),或风险型(rs6677604GG, CFHR1, N=4)基因型的高密度脂蛋白样颗粒处理的ARPE-19细胞,然后用定量PCR测定所示基因的表达。图F表示用氧化低密度脂蛋白处理ARPE-19细胞在有无rCFHR1存在(N=4)的条件下IL-1A的表达。相对mRNA水平用GAPDH的水平进行调整后,相对于未经处理的样品进行比对。Nat-LDL表示非氧化的,天然的低密度脂蛋白。

[0119] 图5、含CFHR1高密度脂蛋白样颗粒促进CNV的形成

[0120] 5A和5C:视网膜下注射含CFHR1高密度脂蛋白样颗粒诱导CNV的。用isolectin染色(绿,5A)可以查看到新生血管性活动(箭头);而巨噬细胞在视网膜下腔的浸润(箭头)则通过F4/80阳性染色(红色,5B)观察所确定。合并后的图像显示isolectin和F4/80染色标记新生血管和巨噬细胞浸润共存于注射部位附近(5C)。细胞核用DAPI(蓝色)反染色显示。

[0121] 5D和5E为阴性对照面板,显示天然低密度脂蛋白注射后没有促进CNV新生血管的活动(5D)或巨噬细胞的浸润(5E)。尺寸把:100微米。

[0122] 图6、oxPL,载脂蛋白AI和CFHR1在AMD共同存在于患者玻璃膜疣

[0123] 免疫组化显示,当AMD患者的眼睛切片被如下抗体免疫染色的结果:无抗体(6A),抗oxPL抗体(6B),抗载脂蛋白AI(6C)抗体,和抗CFHR1抗体(6D)。尺寸把:50微米。

[0124] 图7、激光诱导脉络膜CNV实验结果

[0125] 7A表示脉络膜新生血管(CNV)在野生型和IL-1受体敲除小鼠的面积大小比较;7B表示脉络膜新生血管(CNV)在野生型小鼠中加入IL-1抑制剂与没有抑制剂的面积大小比较;

[0126] 7A和7B中的纵坐标表示新生血管面积(μm^2)

[0127] 7C和7D为7A中野生型和IL-1受体敲除小鼠的面积的代表性影像;7E和7F为7B中入IL-1抑制剂与没有抑制剂的面积的代表性影像。

具体实施方式

[0128] 本发明中,最初在1560个无血缘关系的欧洲人后裔白种人个体中的CFH

rs1061170C/T 和 CFHR1 rs6677604A/G 的基因分型,包括 886 个 AMD 病人和 674 个正常对照组。我们的研究结果表明 rs1061170 和 rs6677604 的单核苷酸多态性与 AMD 高度相关 ($p=4.53 \times 10^{-16}$ 和 4.98×10^{-10} , 表 1)。单核苷酸多态性 rs1061170 将对 missense CFH Y402H 变异编码,并在之前显示出与 AMD 强烈关联^{3,5-7}。CFHR1 表达是否缺失可以通过 rs6677604 基因座上的 SNP 来检测。若要确定是否与带有 AMD 的 rs6677604 关联是独立于 rs1061170, 我们执行逐步回归分析。即在对 rs1061170 调后节, rs6677604 仍然强烈关联 AMD 风险 ($p=1.16 \times 10^{-3}$)。为了进一步验证这一发现,使用来自密歇根、梅奥、AREDS、宾夕法尼亚州 (MMAP) 群体研究的独立群体 (国家眼科研究所, Accession :phs000182. v2. p1) 来进行同样的分析。在 MMAP 的数据集中, SNP rs10801555 作为 rs1061170 代理 SNP ($r^2=0.99$)⁹。如所料,遗传协会 MMAP 数据的分析显示, rs10801555 与 AMD 强烈关联。调节 rs10801555 之后发现,在 MMAP 群集中 rs6677604 仍然与 AMD 大大相关联 ($p=2.38 \times 10^{-6}$, 表 2)。同时,这些结果确定与 AMD 风险与 CFHR1 相关联并独立于 CFH Y402H。究由四川大学华西医院和圣地亚哥加利福尼亚大学的机构审查委员会批准。所有参与者都提供了书面的知情同意文档,都进行了标准的眼部检查,包括视力测量,扩张狭缝灯显微镜、彩色摄影和荧光素眼底血管造影。湿性 AMD 的诊断是基于根据 AREDS 所设立的分类得到 CNV 的存在²⁵。

[0129] 表 1CFH rs1061170) 和 CFHR1 (rs6677604) 的单核苷酸多态性与 AMD 高度相关
[0130]

致病型等位基因频率					相对调节后频率	
SNP	致病型 等位基因	病人数 (N=886)	正常人数 (N=674)	P 值	rs1061170	rs6677604
rs1061170	C	0.563	0.411	4.53×10^{-16}		$p = 1.05 \times 10^{-9}$
rs6677604	G	0.879	0.793	4.98×10^{-10}	$p = 1.16 \times 10^{-3}$	

[0131] 表 2MMAP 样本中 CFH (rs1061170) 和 CFHR1 (rs6677604) 的单核苷酸多态性与 AMD 高度相关
[0132]

致病型等位基因频率					相对调节后频率	
SNP	致病型 等位基因	病人数 (N=886)	正常人数 (N=674)	P 值	rs10801555	rs6677604
rs10801555	A	0.604	0.352	7.23×10^{-82}		$p = 2.86 \times 10^{-34}$
rs6677604	G	0.906	0.793	6.02×10^{-34}	$p = 2.38 \times 10^{-6}$	

[0133] 实施例一本发明试剂盒的组成及使用

[0134] 1、基因分型试剂盒的使用

[0135] a、从人组织样本中提取 DNA 模板

[0136] b、外周血基因组 DNA 作为测定模板的制备；

[0137] 测定模板的制备的方法为：

[0138] 10XNEB Buffer 1ul

[0139] dNTP (10uM) 0.25ul

- [0140] Primer-F(10uM) 0.25ul
[0141] Primer-R(10uM) 0.25ul
[0142] NEB Taq(5U/ul) 0.05ul
[0143] DNA(25-50ng/ul) 1-1.5ul
[0144] H2O 补充至 10ul
[0145] PCR:95 度 5min
[0146] 95 度 30s
[0147] 58 度 30s,
[0148] 72 度 30s 30-32cycle
[0149] 72 度 5min
[0150] 电泳验证 PCR 是否成功。
[0151] 本发明中 DNA 模版制备的引物为：
[0152] rs6677604 标记的 CFHR1
[0153] 上游引物：5' -GATGGAAGACACCAGAGCAGAT-3' (SEQ ID No 1)
[0154] 下游引物：5' -GAATCCATCAGCTTCTACCATT-3' (SEQ ID No 2)。
[0155] c、基因型鉴定引物的制备；基因型鉴定的引物序列：
[0156] 5' -TGAACACATG ACTTACATAG TTGCCCTGAG AAAATGCGAG-3' ;(SEQ ID No 3)
[0157] d、DNA 扩增产物片断的基因型鉴定
[0158] 本发明中 SNPs 测定的反应为：
[0159] SNaPShot mix 0.5 μ l
[0160] Purified PCR mix 1 μ l
[0161] SnapShot primer(n) 0.2 μ l × n
[0162] H2O to Total 5 μ l
[0163] 96°C 10sec
[0164] 50°C 5sec
[0165] 60°C 30sec
[0166] 25cycles
[0167] CFHR1rs6677604 保护性基因型(A) 的鉴定序列为 (SEQ ID No 5)：
[0168] TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAGAGGAAAGGACTCACAGCTACT
GTGGAGGTAT TGTGCTTTGG
[0169] CFHR1rs6677604 致病性基因型(G) 的鉴定序列为 (SEQ ID No 6)：
[0170] TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAGGGGAAAGGACTCACAGCTACTGTGGAGGT
ATTGTGCTTTGG
[0171] 2、测定受试血浆样品中 CFHR1 含量
[0172] a、将外周血进行血浆分离；
[0173] b、患者的血浆样本进行 SDS 电泳；
[0174] c、将电泳分离后的胶转印至尼龙薄膜；
[0175] d、带有来自于人类 CFHR1 序列(CPTVQNAHILSRQMS) 的多肽，被合成并连接到匙孔凝集素蛋白 (KLH)。之后，此 CFHR1 肽-KLH 复合体被用来进行免疫接种兔 (由 Genemed

Synthesis, 圣安东尼奥市, 德克萨斯州执行); 由 ELISA 分析所得到的带有最强 CFHR1 亲和性的血清被用于该研究;

[0176] e、使抗 CFHR1 抗体与薄膜上的蛋白结合;

[0177] f、以纯化的 CFHR1 为标准品测得的标准曲线, 确定 CFHR1 的定量。

[0178] 结果见图 3A, 带有致病性基因型的血浆中含有 ApoAI、CFHR1 和 LBP (图 3A 右), 而带有纯合保护基因型的血浆样本则缺乏 CFHR1 (图 3A 左)。

[0179] 3、从血浆中分离纯化含 CFHR1 的高密度脂蛋白 23, 27

[0180] a、将外周血进行血浆分离;

[0181] b、用溴化钾将血浆调整至 1.027 克 / 毫升;

[0182] c、45,000RPM 离心 18 小时;

[0183] d、丢弃上层液后, 提取中层液体;

[0184] e、用溴化钾将其调整至 1.065 克 / 毫升;

[0185] f、45,000RPM 离心 18 小时;

[0186] g、上层液体, 放入透析袋, 用 PBS 透析 (含 2, 6- 二叔丁基对甲酚);

[0187] h、通过牛血清白蛋白 BSA (Bovine Serum Albumin) 试验 (Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL) 对总蛋白质浓度进行定量。

[0188] 4、定量检测高密度脂蛋白样颗粒上 CFHR1 结合量

[0189] a、带有来自于人类 CFHR1 序列的多肽 (CPTVQNAHILSRQMS), 被合成并连接到匙孔藤血蓝蛋白 (KLH) 上。之后, 此 CFHR1 肽 -KLH 复合体被用来进行免疫接种兔 (由 Genemed Synthesis, 圣安东尼奥市, 德克萨斯州执行); 由 ELISA 分析所得到的带有最强 CFHR1 亲和性的血清被用于该研究;

[0190] b、兔抗人 ApoAI (Sigma, St. Louis, MO) 将血浆中高密度脂蛋白俘获;

[0191] c、抗 CFHR1 的抗体与高密度脂蛋白样颗粒样品接触;

[0192] d、使抗 CFHR1 的抗体与其中的 CFHR1 结合;

[0193] e、测定抗 CFHR1 的抗体与 CFHR1 的结合量;

[0194] f、通过使用以下抗体进行免疫组化分析: 兔子抗 -CFHR1 (产生如上文所述), 山羊 anti-rabbit HRP (SouthernBiotech, 伯明翰, 阿拉巴马州), biotinylated anti-human ApoAI (Abcam, 剑桥, 马萨诸塞州), biotinylated anti-human LBP (R&D 系统, Minneapolis, MN, USA)、streptavidin-HRP (Cell Signaling, Danvers, MA, USA)。

[0195] 5、定量检测高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原

[0196] a、兔抗人 ApoAI (Sigma, St. Louis, MO) 将血浆中高密度脂蛋白俘获;

[0197] b、单克隆抗 oxPL 鼠 IgA 抗体 TEPC 15 (Sigma, St. Louis, MO) 与含高密度脂蛋白的样品接触;

[0198] c、单克隆抗 oxPL 鼠 IgA 抗体 TEPC 15 与氧化磷酸胆碱结合;

[0199] d、测定单克隆抗 oxPL 鼠 IgA 抗体 TEPC 15 与氧化磷酸胆碱的结合量。

[0200] 6、测定补体因子 H 相关蛋白 1 与氧化特异性抗原结合

[0201] 编码人 CFHR1 的 cDNA 被亚克隆到哺乳动物细胞表达载体 pRK5¹⁴, 该构建体采用 Eugene 6 工具包被转染到 HEK293 细胞 (剪切过的人腺病毒 5 (Ad5) 转染的人胚肾细胞形成的永生化细胞) (Roche, Indianapolis, IN, USA)。然后收集含 rCFHR1 蛋白的培养基介质, 并

使用 Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA, USA) 进行富集。

[0202] 7、Westernblot 检测 CFHR1

[0203] 将保护 (rs6677604AA) 或风险 (rs6677604GG) 基因型的患者的血浆样本用 4-12% 梯度胶进行 SDS 电泳;将电泳分离后的胶转印至尼龙薄膜;使抗 CFHR1 抗体与薄膜上的蛋白结合;加入结合过氧化物酶的第二抗体;加入底物得到 CFHR1 信号(图 3A)。

[0204] 采用梯度超速离心法从血浆中分离高密度脂蛋白样颗粒,经 Westernblot 检测 CFHR1 后,结果显示高密度脂蛋白样颗粒上包含 CFHR1、LBP 和 ApoAI 等成分²³。图 3B 的 WesternBlot 显示从含致病性基因型血浆样本中分离的高密度脂蛋白样颗粒,含有 ApoAI、CFHR1 和 LBP (图 3B 右),而带有纯合保护基因型血浆样本则缺乏 CFHR1 (图 3B 左)。

[0205] 8、高密度脂蛋白样颗粒含有氧化磷脂检测

[0206] a、氧化磷脂 1-palmitoyl-2- (5'-oxo-valeroyl)-sn-glycero-3- 卵磷脂 (POVPC) 从 Avanti Polar Lipids, Inc. (Alabaster, Alabama) 购买。如前所述的方法²⁸,将 POVPC 与 BSA 进行共价偶联。由于磷脂在血浆中溶解度低,通常与蛋白质以脂蛋白形式共存,如在低密度脂蛋白 (LDL) 中的 ApoB。因此,在这项研究中选择 LDL 作为天然和氧化磷脂的载体。从正常血脂水平的捐助者的血浆中通过多次超速离心分离 LDL²⁹。OxLDL 通过氧化剂 (10 μ M CuSO₄) 来孵化低密度脂蛋白 (1mg/mL) 在 37°C 经过 18 小时制备生成,使在 LDL 表面的磷脂被氧化成 oxPL³⁰。未氧化的天然 LDL (即 LDL 上的磷脂为天然磷脂) 被用作对照组。

[0207] b、包被氧化特异性抗原在微孔板上。

[0208] c、编码人的 CFHR1 的 cDNA 被亚克隆到哺乳动物细胞表达载体 pRK5¹⁴,该构建载体采用 Eugene 6 工具包被转染到 HEK293 细胞 (Roche, Indianapolis, IN)。收集含 rCFHR1 蛋白的培养基介质,并使用 Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) 进行富集。

[0209] d、通过 ELISA 以检查 rCFHR1 与 POVPC 的结合。POVPC 表示氧化磷脂酰胆碱,是在视网膜中最丰富的磷脂³¹。观察到 CFHR1 以剂量相关的方式结合到 POVPC-BSA 和 oxLDL,而不与天然 LDL or BSA 载体相结合(图 4A)。为了进一步研究是否 CFHR1 专门与氧化磷脂相互作用,进行了竞争性抑制法检测 rCFHR1 结合到固定化的 POVPC-BSA。结果显示 rCFHR1 与 POVPC-BSA 的结合能够特异性的被 oxLDL 所抑制,而不被天然的 LDL 或 BSA 抑制(图 4B)。这些结果表明 CFHR1 择优与氧化磷脂结合。

[0210] e、将血浆中 CFHR1 与氧化特异性抗原结合。

[0211] f、用抗 CFHR1 的抗体测定 CFHR1 与氧化特异性抗原的结合量。

[0212] 实施例二和人类 AMD 有关的病理学实验及结果

[0213] 1、人类 AMD 眼的免疫组织化学

[0214] 玻璃膜疣是 AMD 的标志,并已证实它积累各种油脂和蛋白质³⁵。为了调查 CFHR1 的参与和人类 AMD 发病机制中的氧化应激,本发明中对含 AMD 玻璃膜疣的人眼剖面进行免疫组织化学实验。

[0215] a、带有来自于人类 CFHR1 序列 (CPTVQNAHILSRQMS) 的多肽,被合成并连接到匙孔血蓝蛋白 (KLH)。之后,此 CFHR1 肽-KLH 复合体被用来进行免疫接种兔 (由 Genemed Synthesis, 圣安东尼奥市, 德克萨斯州执行);

[0216] b、将来自 85 岁男性 AMD 捐助者的眼睛用多聚甲醛固定,进行切片;

[0217] c、使用兔抗人 CFHR1IgG 抗体,兔抗人 ApoAI (Sigma, St. Louis, MO, USA) 和单克隆抗 oxPL 鼠 IgA 抗体 TEPC 15 (Sigma, St. Louis, MO) 作为第一抗体,之后是与碱性磷酸酶 (Sigma, St. Louis, MO) 或过氧化物酶耦合的第二抗体 (Vector Lab, Burlingame, CA)。使用 VectorStainEliteABC 试剂盒并用碱性磷酸酶底物包用于 CFHR1 和 ApoAI 染色,使用 VectorStain Quick VIP 试剂盒并用过氧化物酶底物用于 oxPL 检测 (Vector Labs, Burlingame, CA, USA)。图像用 Zeiss Observer A1 显微镜捕获,结果见图 6。

[0218] 从图 6 中观察到的 oxPL (图 6B),ApoAI (图 6C) 和 CFHR1 (图 6D) 的存在,它们都共存于疣和 Bruch 膜。即 oxPL,载脂蛋白 AI 和 CFHR1 在 AMD 共同存在于患者玻璃膜疣。2、CFHR1 的高密度脂蛋白样颗粒对细胞刺激和基因表达检测方法

[0219] a、cDNA 编码人的 CFHR1 被亚克隆到哺乳动物细胞表达载体 pRK5¹⁴,然后,该构建体采用 Eugene 6 工具包被转染到 HEK293 细胞 (Roche, Indianapolis, IN)。然后收集含 rCFHR1 蛋白的培养基介质,并使用 Amicon Ultra (Millipore, Billerica, MA) 进行富集;

[0220] b、人 ARPE 19 细胞(人视网膜色素上皮细胞)在 24 孔培养板中生长到 90%confluency,然后是 24 小时在无血清培养基中孵化;

[0221] c、血清饥饿之后,添加透析过的,含有或缺失 rCFHR1 的高密度脂蛋白样颗粒对细胞进行刺激;

[0222] d、细胞在 37℃ 下进行 6 小时孵化后,所有 RNA 使用 RNeasy 试剂盒(QIAGEN Inc., Valencia, CA)进行提取,并使用 SuperScript III First Strand Synthesis(QIAGEN Inc., Valencia, CA)转换为 cDNA;

[0223] e、所有定量逆转录-聚合酶链反应实验使用了 Power SYBR Green qPCR Master Mix,并用 7500 实时聚合酶链反应检测系统(Applied Biosystems, Foster City, CA)进行分析。相对的 mRNA 量通过 GAPDH (甘油醛-3-磷酸脱氢酶)调整后来计算。使用的 Primers 列于表 3 中;

[0224] f、定量 PCR 分析显示在风险等位基因组中的炎性细胞因子和趋化因子,包括 huIL-1A、huIL-1B、huIL-6、huIL-8 和 hu 单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)的表达水平(CFHR1 正值)明显高于保护组(CFHR1 Δ),hu VEGF (人血管内皮生长因子的编码基因)在两种基因型中表达差异不大(图 4E);

[0225] g、为了验证 CFHR1 在通过 oxPL 提高炎症刺激中的作用,通过缺少或存在 rCFHR1 的 oxLDL 对 ARPE-19 细胞进行刺激。研究发现,天然低密度脂蛋白没有刺激作用,而 oxLDL 诱发炎症基因 IL-1A 的表达高于 LDL 诱导后的 2.3 倍。rCFHR1 的加入进一步增强 IL-1A 的表达,达到 LDL 诱导后的 25.8 倍(图 4F)。图中数据显示 CFHR1 有助于通过 oxPL 加强 APRE-19 的炎症反应刺激。

[0226] 表 3qPCR 检测 ARPE-19 细胞中相关基因表达的引物

[0227]

基因	上游引物 (5'-3')	下游引物 (5'-3')
HuGAPDH	GAGTCAACGGATTGTCGT (SEQ ID No 7)	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG (SEQ ID No 8)
hu MCP-1	TCTGTGCCTGCTGCTCATAG (SEQ ID No 9)	AGATCTCCTTGGCCACAATG (SEQ ID No 10)
hu VEGF	TCCCGGTATAAGTCCTGGAG (SEQ ID No 11)	ACAAATGCTTTCTCCGCTCT (SEQ ID No 12)
hu IL-1A	AATGACGCCCTCAATCAAAG (SEQ ID No 13)	TGGGTATCTCAGGCAICTCC (SEQ ID No 14)
hu IL-1B	GGGCCTCAAGGAAAAGAATC (SEQ ID No 15)	TTCTGCTTGAGAGGTGCTGA (SEQ ID No 16)
hu IL-6	AAATTCGGTACATCCTCGACGG (SEQ ID No 17)	GGAAGGTTTCAGGTGTTTTCTGC (SEQ ID No 18)
hu IL-8	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG (SEQ ID No 19)	AATTTCTGTGTTGGCGCAGT (SEQ ID No 20)

[0228] 3、氧化磷脂导致小鼠视网膜的脉络膜 CNV 样特征

[0229] 通过刺激视网膜色素上皮释放趋化因子如 MCP-1 和 IL-8 可能补充循环单核细胞到视网膜的氧化损坏之处并导致单核巨噬细胞的分化。对 C57BL/6 小鼠进行带 CFHR1 的高密度脂蛋白样粒子的视网膜下注射。所使用的 CFHR1 的高密度脂蛋白样粒子制备方法参照实施例一中从血浆中分离纯化含 CFHR1 的高密度脂蛋白。

[0230] 组织学分析显示注射部位的脉络膜 CNV 标记(图 5)。研究发现在脉络膜病变组织的异常血管生成(箭头, 图 5A) 和(箭头, 图 5B) 与脉络膜病变组织(图 5C) 同一处的巨噬细胞浸润, 相同数量的天然低密度脂蛋白注射并未造成脉络膜新生血管或巨噬细胞浸润(图 5D-F)。

[0231] 4、统计分析

[0232] 初始遗传关联分析是通过为在所有情况下和对照组中的每个 SNP 建立等位基因计数的 2×2 表和基因型计数的 2×3 表来进行的。此后, 分别进行皮尔逊 χ^2 统计计算, 通过将 χ^2 统计比作带有 1 或 2 的自由度的 χ^2 分布的 p-values 计算以进行等位基因和基因型的测试。软件包 SPSS (SPSS, Inc., Chicago, IL) 用来进行逐步逻辑回归分析。通过比较具有两个 SNP 项的模型与仅具有单一 SNP (一个被调出) 的模型的适合度从而对条件模型进行了测试。每个条件模型的意义使用卡方统计信息确定。只有带有两个 SNPs 的基因型数据的个人被纳入这项测试。

[0233] 进行 Studentt 测试评估小鼠 CNV 的差异, 带有不同基因型血浆的 oxPL 和 CRP 分析, 以及基因表达 q-PCR 分析。P<0.05 被视为有差异 (*)。P<0.01 (**) 和 P<0.001 (***) 被认为是具有显著差异。

[0234] 阐明 AMD 风险与 1 号染色体上的复杂 CFH 区域的关联是对人类遗传学和生物学的一个挑战。虽然广泛的遗传关联研究表明, 该染色体区域存在的多态性在, 包括 CFH

SNPsrs1061170 (Y402H)³⁻⁹ 和 CFHR1 复制数变异赋予 AMD 重大的风险^{9,11}, 但是由 CFHR1 调制的疾病风险机制仍然在很大程度上未知。本发明示明了 CFHR1 结合到 oxPL 以形成包含 oxPL、CFHR1、LBP 和 ApoAI 的高密度脂蛋白样颗粒, 它可以刺激炎症和导致异常血管生成。CFHR1 与 oxPL 相互作用确定 CFHR1 在 AMD 发病机制中一个新的功能方面。这种相互作用导致激活视网膜色素上皮和巨噬细胞炎症反应水平和异常血管生成。目前大多数人都公认氧化应激对 AMD 发病起重要的作用³⁶⁻³⁹。视网膜感光细胞外节片段中拥有含量最高的多不饱和脂肪酸, 大多以磷脂酰胆碱 (PtC) 和磷脂酰乙醇胺 (PE)^{40,41} 的形式, 并经过大约每两周一次的快速翻转, 释放大量的 PUFA- 含膜片段^{42,43}。这些 PUFAs 都受到强氧化应激, 因为暴露在高氧含量外层视网膜和阳光的刺激^{36,37,44}, 可以想象眼睛中在局部生成的这些氧化的产物和 / 或系统性氧化应激的加和可以进一步影响 AMD 风险。本发明阐明了, oxPL 结合到含 CFHR1 高密度脂蛋白样颗粒形式, 会造成随后的刺激和产生炎性细胞因子和单核细胞高敏产物, 导致视网膜色素上皮和巨噬细胞炎症反应。按照这些研究结果, 高密度脂蛋白样粒子的视网膜下注射吸引巨噬细胞, 并导致形成的脉络膜 CNV (图 5)。

[0235] 进一步的, 用含 CFHR1 的高密度脂蛋白样颗粒刺激 ARPE-19 细胞, 导致 IL-1A 表达的增加 (图 7E)。激光诱导脉络膜 CNV 实验中, 使用 IL-1R^{-/-} 小鼠与 IL-1 受体拮抗剂, 验证了脉络膜 CNV 形成中的 IL-1 通路的重要性。这一结果表明 CFHR1 增强白细胞介素-1A 的表达可以通过炎症刺激影响 AMD。此前的研究表明 CRP (全身性炎症的另一种标记)^{14, 33, 34} 与 AMD 的关联。通过研究过相同的血浆样品中的相对 CRP 水平 (常规的 ELISA 测定 C- 反应蛋白的方法), 结果 (图 4D) 表明 rs6677604 保护基因型血浆 CRP 水平比那些有风险基因型 (P=0.00087) 显著降低, 表明了较低水平的全身性炎症。本发明的生物标志研究进一步加强这一概念, 因为带有 CFHR1 Δ 的血浆样本 (保护基因型) 显示较低级的全身性炎症用较低的 oxPL 和 CRP 血浆水平的作为证明。

[0236] 总之, 本发明表明, 通过氧化应激影响 AMD 风险的新机制和调节这一过程 CFHR1 的作用。这些发现可能会导致在预防和治疗老年黄斑退化的新策略, 如通过 CFHR1 活性的抑制或对其下游的参与脉络膜形成炎症基因, 包括 IL-1 的活性抑制, 以期能预防和治疗老年黄斑退化。

[0237] 参考文献

[0238] 1. Manolio TA, Brooks LD, Collins FS. A HapMap harvest of insights into the genetics of common disease. *J Clin Invest* 2008;118:1590-605.

[0239] 2. Friedman DS, O' Colmain BJ, Munoz B, et al. Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* 2004;122:564-72.

[0240] 3. Klein RJ, Zeiss C, Chew EY, et al. Complement factor H polymorphism in age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:385-9.

[0241] 4. Maller J, George S, Purcell S, et al. Common variation in three genes, including a noncoding variant in CFH, strongly influences risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38:1055-9.

[0242] 5. Haines JL, Hauser MA, Schmidt S, et al. Complement factor H variant increases the risk of age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:419-21.

- [0243] 6. Hageman GS, Anderson DH, Johnson LV, et al. A common haplotype in the complement regulatory gene factor H(HF1/CFH) predisposes individuals to age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:7227-32.
- [0244] 7. Edwards AO, Ritter R, 3rd, Abel KJ, Manning A, Panhuysen C, Farrer LA. Complement factor H polymorphism and age-related macular degeneration. *Science* 2005;308:421-4.
- [0245] 8. Li M, Atmaca-Sonmez P, Othman M, et al. CFH haplotypes without the Y402H coding variant show strong association with susceptibility to age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38:1049-54.
- [0246] 9. Raychaudhuri S, Ripke S, Li M, et al. Associations of CFHR1-CFHR3 deletion and a CFH SNP to age-related macular degeneration are not independent. *Nat Genet* 2010;42:553-5;author reply 5-6.
- [0247] 10. Hughes AE, Orr N, Esfandiary H, Diaz-Torres M, Goodship T, Chakravarthy U. A common CFH haplotype, with deletion of CFHR1 and CFHR3, is associated with lower risk of age-related macular degeneration. *Nat Genet* 2006;38:1173-7.
- [0248] 11. Fritsche LG, Lauer N, Hartmann A, et al. An imbalance of human complement regulatory proteins CFHR1, CFHR3 and factor H influences risk for age-related macular degeneration (AMD). *Hum Mol Genet* 2010;19:4694-704.
- [0249] 12. Zhao J, Wu H, Khosravi M, et al. Association of genetic variants in complement factor H and factor H-related genes with systemic lupus erythematosus susceptibility. *PLoS Genet* 2011;7:e1002079.
- [0250] 13. Hazen SL. Oxidized phospholipids as endogenous pattern recognition ligands in innate immunity. *J Biol Chem* 2008;283:15527-31.
- [0251] 14. Yu J, Wiita P, Kawaguchi R, et al. Biochemical analysis of a common human polymorphism associated with age-related macular degeneration. *Biochemistry* 2007;46:8451-61.
- [0252] 15. Zipfel PF, Edey M, Heinen S, et al. Deletion of complement factor H-related genes CFHR1 and CFHR3 is associated with atypical hemolytic uremic syndrome. *PLoS Genet* 2007;3:e41.
- [0253] 16. Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med* 2002;8:1218-26.
- [0254] 17. Brewer GJ. Iron and copper toxicity in diseases of aging, particularly atherosclerosis and Alzheimer's disease. *Exp Biol Med (Maywood)* 2007;232:323-35.
- [0255] 18. Beatty S, Koh H, Phil M, Henson D, Boulton M. The role of oxidative stress in the pathogenesis of age-related macular degeneration. *Surv Ophthalmol* 2000;45:115-34.
- [0256] 19. Hollyfield JG, Bonilha VL, Rayborn ME, et al. Oxidative damage-induced inflammation initiates age-related macular degeneration. *Nat Med* 2008;14:194-8.
- [0257] 20. Shaw PX, Horkko S, Chang MK, et al. Natural antibodies with the T15

idiotype may act in atherosclerosis, apoptotic clearance, and protective immunity. *J Clin Invest* 2000;105:1731-40.

[0258] 21. Chou MY, Hartvigsen K, Hansen LF, et al. Oxidation-specific epitopes are important targets of innate immunity. *J Intern Med* 2008;263:479-88.

[0259] 22. Tsimikas S, Brilakis ES, Miller ER, et al. Oxidized phospholipids, Lp(a) lipoprotein, and coronary artery disease. *N Engl J Med* 2005;353:46-57.

[0260] 23. Park CT, Wright SD. Plasma lipopolysaccharide-binding protein is found associated with a particle containing apolipoprotein A-I, phospholipid, and factor H-related proteins. *J Biol Chem* 1996;271:18054-60.

[0261] 24. Crabb JW, Miyagi M, Gu X, et al. Drusen proteome analysis: an approach to the etiology of age-related macular degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14682-7.

[0262] 25. Group A-REDSR. The Age-Related Eye Disease Study (AREDS): design implications. AREDS report no. 1. *Control Clin Trials* 1999;20:573-600.

[0263] 26. Yang Z, Stratton C, Francis PJ, et al. Toll-like receptor 3 and geographic atrophy in age-related macular degeneration. *N Engl J Med* 2008;359:1456-63.

[0264] 27. Park C T, Wright SD. Fibrinogen is a component of a novel lipoprotein particle: factor H-related protein (FHRP)-associated lipoprotein particle (FALP). *Blood* 2000;95:198-204.

[0265] 28. Pegorier S, Stengel D, Durand H, Croset M, Ninio E. Oxidized phospholipid: POVPC binds to platelet-activating-factor receptor on human macrophages. Implications in atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2006;188:433-43.

[0266] 29. Havel RJ, Eder HA, Bragdon JH. The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum. *J Clin Invest* 1955;34:1345-53.

[0267] 30. Palinski W, Yla-Herttuala S, Rosenfeld ME, et al. Antisera and monoclonal antibodies specific for epitopes generated during oxidative modification of low density lipoprotein. *Arteriosclerosis* 1990;10:325-35.

[0268] 31. Fliesler SJ, Anderson RE. Chemistry and metabolism of lipids in the vertebrate retina. *Prog Lipid Res* 1983;22:79-131.

[0269] 32. Ahmadi N, Tsimikas S, Hajsadeghi F, et al. Relation of oxidative biomarkers, vascular dysfunction, and progression of coronary artery calcium. *Am J Cardiol* 2010;105:459-66.

[0270] 33. Seddon JM, Gensler G, Milton RC, Klein ML, Rifai N. Association between C-reactive protein and age-related macular degeneration. *JAMA* 2004;291:704-10.

[0271] 34. Kikuchi M, Nakamura M, Ishikawa K, et al. Elevated C-reactive protein levels in patients with polypoidal choroidal vasculopathy and patients with neovascular age-related macular degeneration. *Ophthalmology* 2007;114:1722-7.

- [0272] 35. Ebrahimi KB, Handa JT. Lipids, lipoproteins, and age-related macular degeneration. *J Lipids* 2011;2011:802059.
- [0273] 36. Vingerling JR, Hofman A, Grobbee DE, de Jong PT. Age-related macular degeneration and smoking. The Rotterdam Study. *Arch Ophthalmol* 1996;114:1193-6.
- [0274] 37. Cruickshanks KJ, Klein R, Klein BE. Sunlight and age-related macular degeneration. The Beaver Dam Eye Study. *Arch Ophthalmol* 1993;111:514-8.
- [0275] 38. Group A. A randomized, placebo-controlled, clinical trial of high-dose supplementation with vitamins C and E, beta carotene, and zinc for age-related macular degeneration and vision loss: AREDS report no. 8. *Arch Ophthalmol* 2001;119:1417-36.
- [0276] 39. Schutt F, Bergmann M, Holz FG, Kopitz J. Proteins modified by malondialdehyde, 4-hydroxynonenal, or advanced glycation end products in lipofuscin of human retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003;44:3663-8.
- [0277] 40. Bell MV, Tocher DR. Molecular species composition of the major phospholipids in brain and retina from rainbow trout (*Salmo gairdneri*). Occurrence of high levels of di-(n-3) polyunsaturated fatty acid species. *Biochem J* 1989;264:909-15.
- [0278] 41. Gulcan HG, Alvarez RA, Maude MB, Anderson RE. Lipids of human retina, retinal pigment epithelium, and Bruch's membrane/choroid: comparison of macular and peripheral regions. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1993;34:3187-93.
- [0279] 42. Young RW. The renewal of photoreceptor cell outer segments. *J Cell Biol* 1967;33:61-72.
- [0280] 43. Young RW. The renewal of rod and cone outer segments in the rhesus monkey. *J Cell Biol* 1971;49:303-18.
- [0281] 44. Sun M, Finnemann SC, Febbraio M, et al. Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generates ligands for CD36-mediated phagocytosis by retinal pigment epithelium: a potential mechanism for modulating outer segment phagocytosis under oxidant stress conditions. *J Biol Chem* 2006;281:4222-30.

[0001]

SEQUENCE LISTING

- <110> 张, 康
<120> CFHR1 基因型、高密度脂蛋白上 CFHR1 及氧化磷酸胆碱的测定试剂盒及测定方法
<130> A120625K
<150> CN201110360860.2
<151> 2011-11-14
<150> CN201110357825.5
<151> 2011-11-11
<160> 20
<170> PatentIn version 3.3
- <210> 1
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 扩增标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座 CFHR1 的上游引物
<400> 1
gatggaagac accagagcag at 22
- <210> 2
<211> 22
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 扩增标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座 CFHR1 的下游引物
<400> 2
gaatccateca gcttctacca tt 22
- <210> 3
<211> 40
<212> DNA
<213> artificial
<220>
<223> 对标记为 rs6677604 的 CFHR1 上 SNP 基因座进行基因型鉴定的引物
<400> 3
tgaacacatg acttacatag ttgccctgag aaaatgcgag 40
- <210> 4
<211> 15
<212> PRT
<213> artificial

[0002]

<220>

<223> 用于制备抗 CFHR1 抗体的多肽

<400> 4

Cys Pro Thr Val Gln Asn Ala His Ile Leu Ser Arg Gln Met Ser

1 5 10 15

<210> 5

<211> 81

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> CFHR1 rs6677604 保护性基因型 (A) 的鉴定序列

<400> 5

tgaacacatg acttacatag ttgccctgag aaaatgcgag aggaaaggac tcacagctac 60

tgtggaggta ttgtgctttg g 81

<210> 6

<211> 81

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> CFHR1 rs6677604 致病性基因型 (G) 的鉴定序列

<400> 6

tgaacacatg acttacatag ttgccctgag aaaatgcgag gggaaaggac tcacagctac 60

tgtggaggta ttgtgctttg g 81

<210> 7

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 扩增 HuGAPDH 的上游引物

<400> 7

gagtcaacgg atttggtcgt 20

<210> 8

<211> 20

<212> DNA

<213> artificial

<220>

<223> 扩增 HuGAPDH 的下游引物

<400> 8

gacaagcttc ccgttctcag 20

[0003]

<210>	9	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu MCP-1 的上游引物	
<400>	9	
	tctgtgcctg ctgctcatag	20
<210>	10	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu MCP-1 的下游引物	
<400>	10	
	agatctcctt ggcacaaatg	20
<210>	11	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu VEGF 的上游引物	
<400>	11	
	tcccgtata agtcctggag	20
<210>	12	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu VEGF 的下游引物	
<400>	12	
	acaaatgctt tctccgtctt	20
<210>	13	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-1A 的上游引物	
<400>	13	
	aatgacgccc tcaatcaaag	20

[0004]

<210>	14	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-1A 的下游引物	
<400>	14	
	tgggtatctc aggcattctcc	20
<210>	15	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-1B 的上游引物	
<400>	15	
	gggccteaag gaaaagaatc	20
<210>	16	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-1B 的下游引物	
<400>	16	
	ttctgcttga gagtgctga	20
<210>	17	
<211>	22	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-6 的上游引物	
<400>	17	
	aaattcggta catctctgac gg	22
<210>	18	
<211>	23	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-6 的下游引物	
<400>	18	

[0005]

ggaaggttca ggttgtttc tgc		23
<210>	19	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-8 的上游引物	
<400>	19	
tctgcagctc tgtgtgaagg		20
<210>	20	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	artificial	
<220>		
<223>	扩增 hu IL-8 的下游引物	
<400>	20	
aattttctgtg ttggcgcagt		20

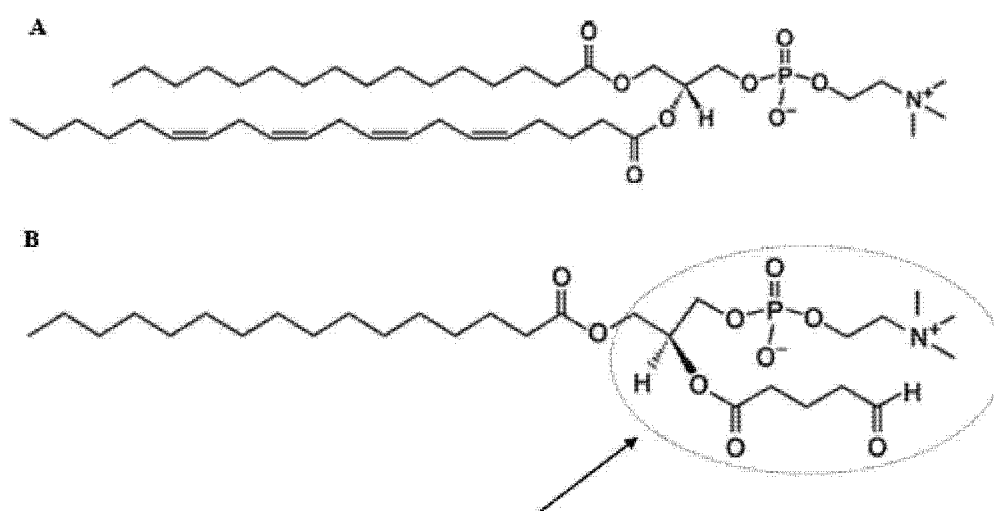


图 1

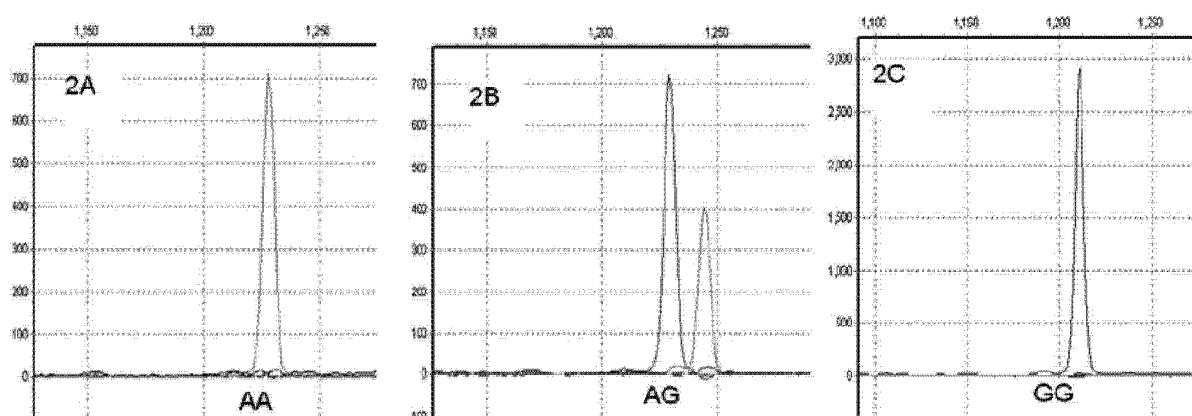


图 2

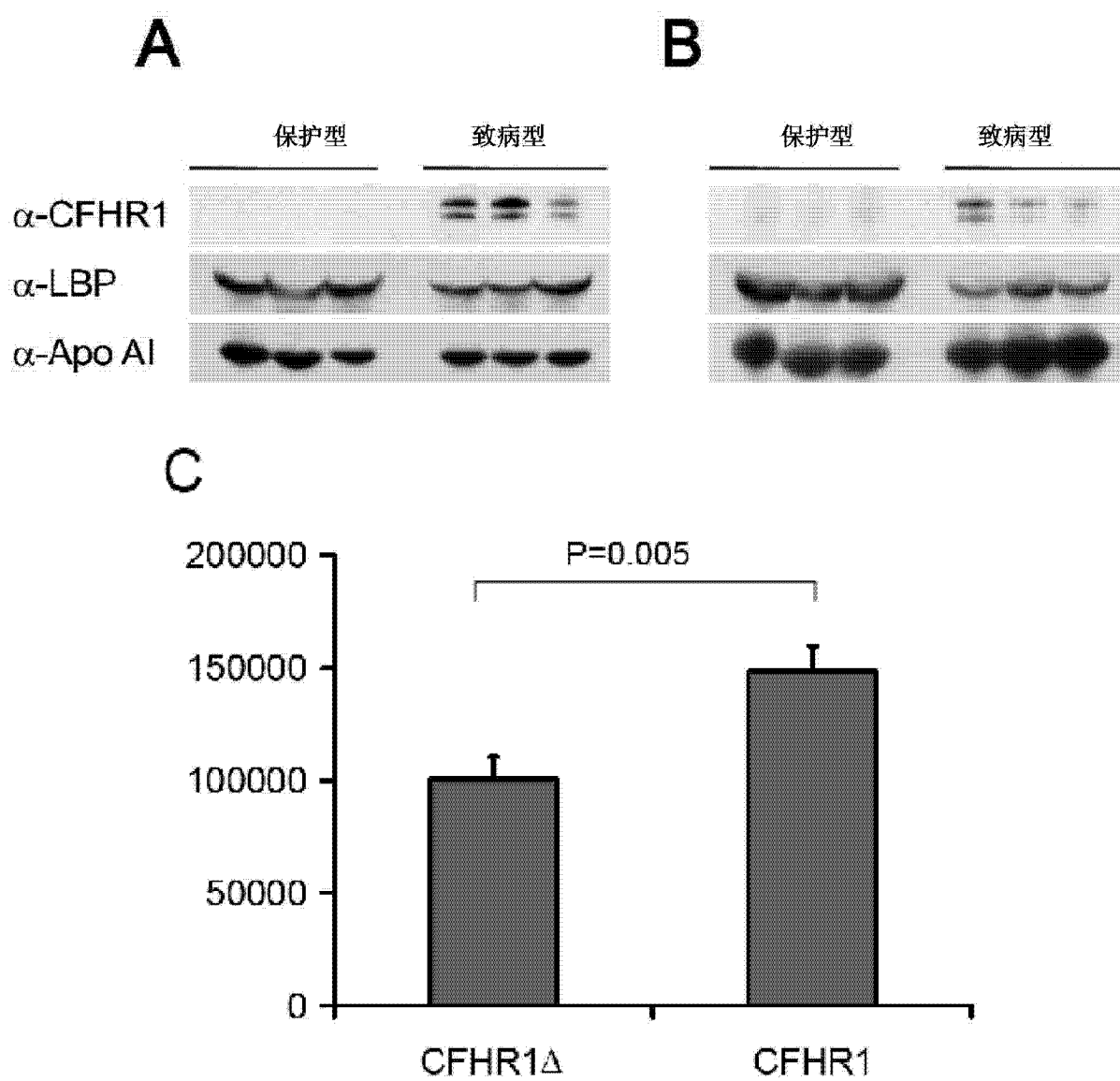


图 3

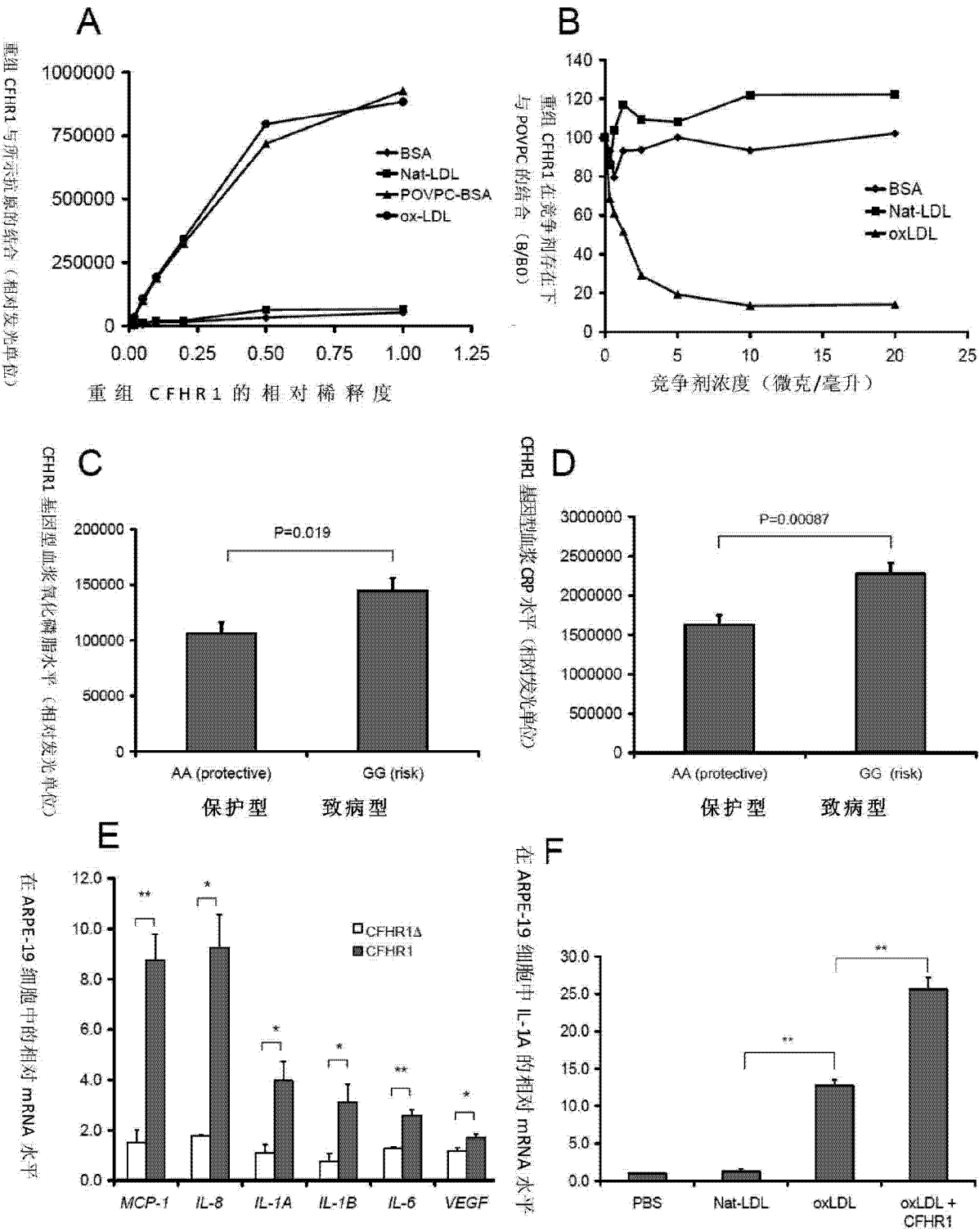


图 4

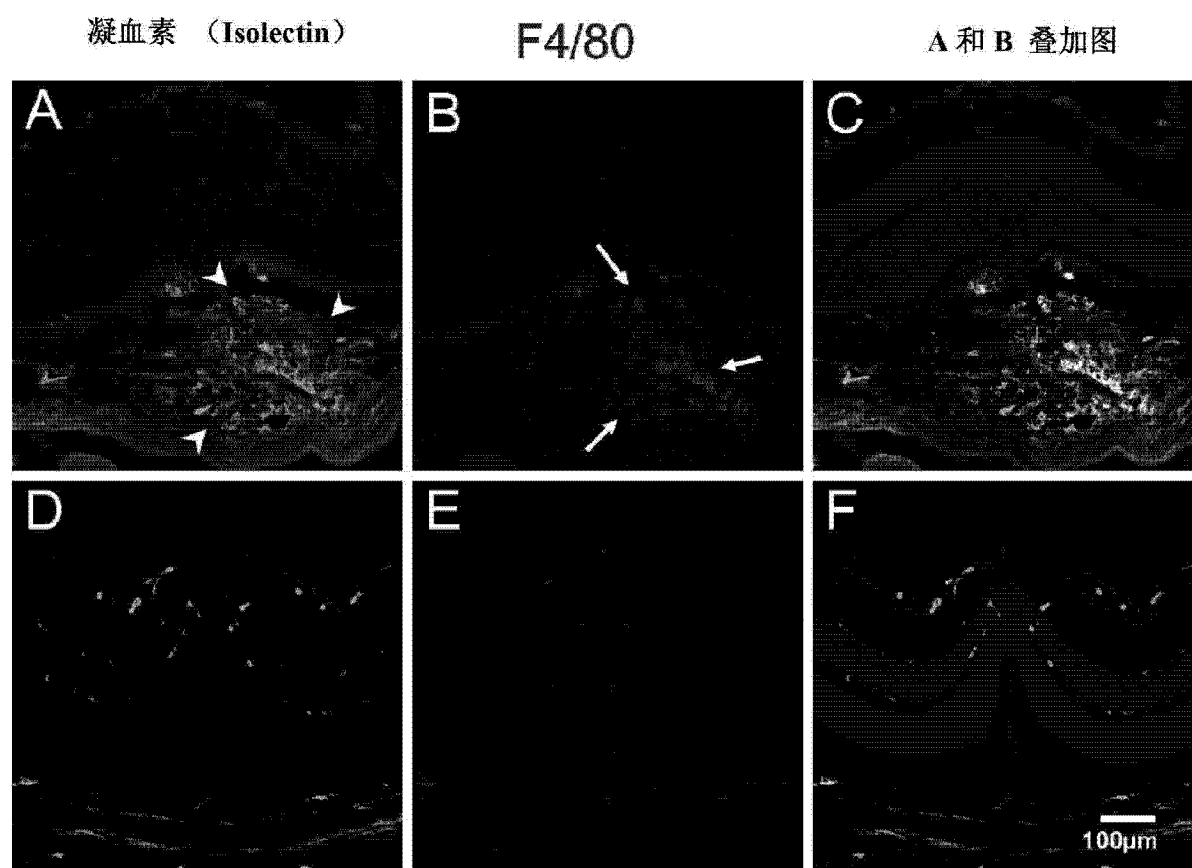


图 5

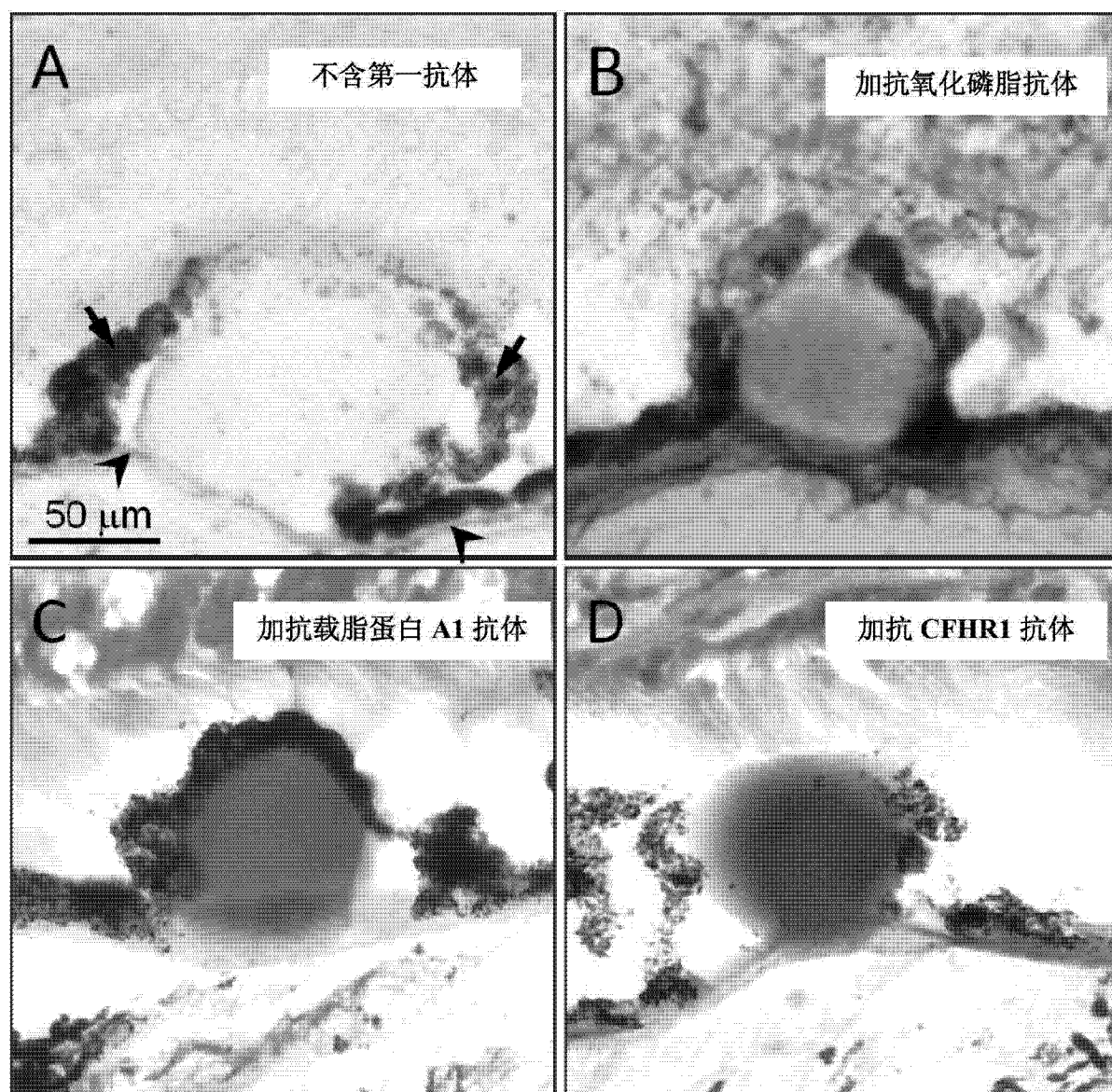


图 6

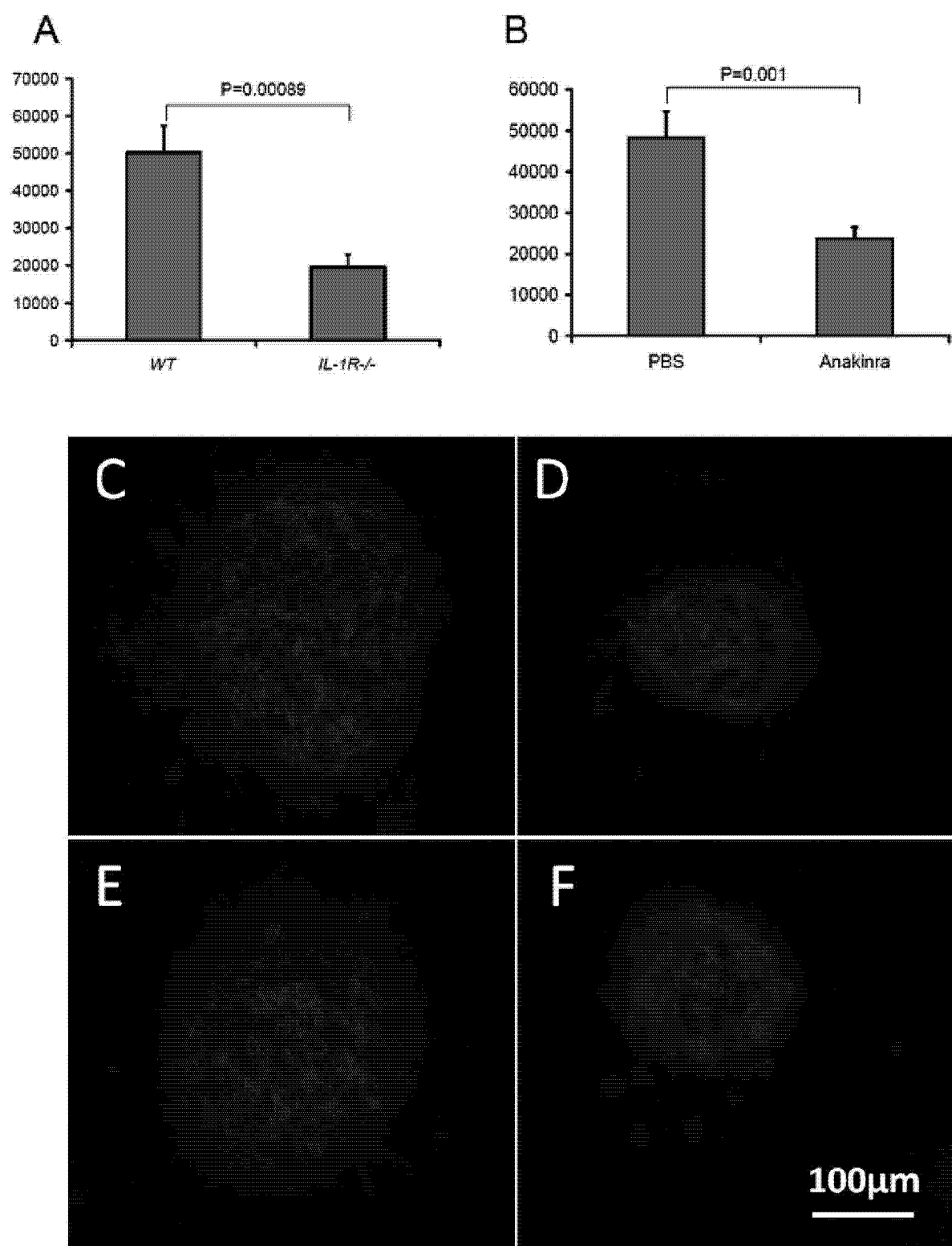


图 7

专利名称(译)	CFHR1基因型、高密度脂蛋白上CFHR1及氧化磷酸胆碱的测定试剂盒及测定方法		
公开(公告)号	CN102978204A	公开(公告)日	2013-03-20
申请号	CN201210451344.5	申请日	2012-11-12
[标]申请(专利权)人(译)	张康		
申请(专利权)人(译)	张康		
当前申请(专利权)人(译)	张康		
[标]发明人	张康 彼得肖		
发明人	张康 彼得.肖		
IPC分类号	C12N15/11 C12Q1/68 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	梁鑫		
优先权	201110360860.2 2011-11-14 CN 201110357825.5 2011-11-11 CN		
其他公开文献	CN102978204B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明要解决的技术问题是提供年龄相关性黄斑变性 (AMD) 疾病发生、发展的诊断试剂。本发明涉及对CFHR1基因型鉴定、血浆样品中CFHR1含量测定、高密度脂蛋白样颗粒上CFHR1结合量和CFHR1与氧化特异性抗原结合的试剂盒及其检测方法。本发明对年龄相关性黄斑变性 (AMD) 疾病发生、发展的诊断提供了可靠的参照指标。创造性地确认了不同基因型CFHR1。而本发明的工作可能会导致在预防和治疗老年黄斑退化的新策略，如通过CFHR1活性的抑制或对其下游的参与脉络膜形成炎症基因，包括IL-1的活性抑制，以期能预防和治疗老年黄斑退化。具有广阔的开发应用前景。

