



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102978204 B

(45)授权公告日 2018.06.08

(21)申请号 201210451344.5

(22)申请日 2012.11.12

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102978204 A

(43)申请公布日 2013.03.20

(66)本国优先权数据
201110357825.5 2011.11.11 CN
201110360860.2 2011.11.14 CN

(73)专利权人 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 1/6883(2018.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

审查员 徐浩

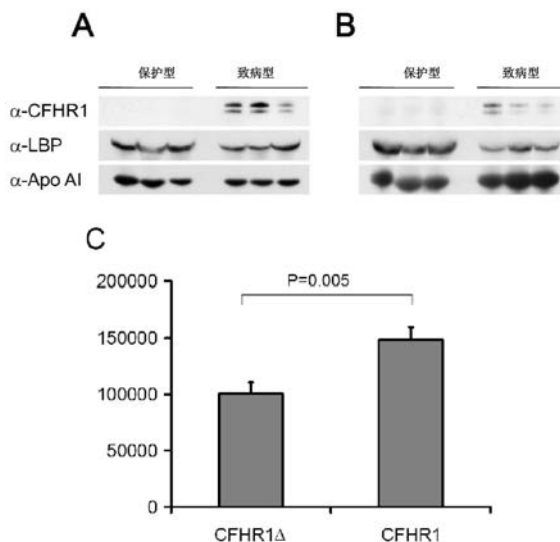
权利要求书1页 说明书17页
序列表5页 附图6页

(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. 定量检测离体样品中高密度脂蛋白样颗粒上CFHR1结合量的试剂在制备检测年龄相关性黄斑变性疾病的发生、发展或者推断检测年龄相关性黄斑变性疾病发生几率的试剂盒中的用途；所述的定量检测离体样品中高密度脂蛋白样颗粒上CFHR1结合量的试剂中包括以下成分：

- a、抗载脂蛋白AI抗体；
- b、抗CFHR1的抗体。

2. 根据权利要求1所述的用途，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。

3. 根据权利要求2所述的用途，其特征在于：用于制备所述抗CFHR1的抗体的多肽的序列如SEQ ID No 4所示。

4. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于所述的定量检测离体样品中高密度脂蛋白样颗粒上CFHR1结合量的试剂的使用方法为：

- 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。

5. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于所述的检测年龄相关性黄斑变性疾病的发生、发展或者推断检测年龄相关性黄斑变性疾病发生几率的试剂盒中还包括有定量检测离体样品中高密度脂蛋白样颗粒上氧化特异性抗原的试剂。

6. 根据权利要求4所述的用途，其特征在于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试剂包括有抗磷酸胆碱的抗体，用于与含高密度脂蛋白样颗粒的样品接触。

7. 根据权利要求6所述的用途，其特征在于：所述试剂盒的使用方法还包括以下步骤：

a、用抗载脂蛋白AI抗体将血浆中高密度脂蛋白俘获后还用抗磷酸胆碱的抗体与含高密度脂蛋白的样品接触；b、使抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱结合；c、测定抗磷酸胆碱的抗体与氧化磷酸胆碱的结合量。

8. 根据权利要求1或5所述的用途，其特征在于：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。

9. 根据权利要求1或5所述的用途，其特征在于：还包括根据以纯化的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的步骤。

10. 根据权利要求1或5所述的用途，其特征在于：所述的离体样品为含有氧化高密度脂蛋白的血清、血浆、组织匀浆液或组织提取液样品。

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-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-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-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-kappa 22VL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预孵育,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/B₀,其中B₀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所设立的分类型得到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 0.5μl
- [0160] Purified PCR mix 1μl
- [0161] SnapShot primer (n) 0.2μl × n
- [0162] H2O to Total 5μl
- [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] TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAGAGGAAAGGACTCACAGCTACTGTGGAGGTAT TGTGCTTTGG
- [0169] CFHR1rs6677604致病性基因型(G)的鉴定序列为 (SEQ ID No 6):
- [0170] TGAACACATGACTTACATAGTTGCCCTGAGAAAATGCGAGGGGAAAGGACTCACAGCTACTGTGGAGGTATTGTGCTTTGG
- [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);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戚血蓝蛋白(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Fugene 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的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的血浆样本则缺乏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 $^{\circ}$ 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Fugene 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Fugene 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)调整后来进行计算。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	GAGTCAACGGATTTGGTCGT (SEQ ID No 7)	GACAAGCTTCCC GTTCTCAG (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)	TGGGTATCTCAGGCATCTCC (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)	GGAAGGTT CAGGTTGTTTTCTGC (SEQ ID No 18)
hu IL-8	TCTGCAGCTCTGTGTGAAGG (SEQ ID No 19)	AATTCTGTGTTGGCGCAGT (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伤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Student t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 A2005;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 Genet2006;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 Genet2011;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 CFHR1and 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 Ophthalmol1996;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 Sci1993;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 Biol1971;49:303-18.
- [0281] 44.Sun M,Finnemann SC,Febbraio M,et al.Light-induced oxidation of photoreceptor outer segment phospholipids generatesligands 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.

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
[0001]	<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	
	gaatccatca 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	

	<210> 9	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu MCP-1 的上游引物	
	<400> 9	
	tctgtgctg 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 ggccacaatg	20
	<210> 11	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0003]	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu VEGF 的上游引物	
	<400> 11	
	tccecggtata agtcctggag	20
	<210> 12	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu VEGF 的下游引物	
	<400> 12	
	acaaatgctt tctcegetct	20
	<210> 13	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu IL-1A 的上游引物	
	<400> 13	
	aatgagccc tcaatcaaag	20

	<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	
	gggcctcaag gaaaagaatc	20
	<210> 16	
	<211> 20	
	<212> DNA	
[0004]	<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	
	aaatteggta catcctcgac gg	22
	<210> 18	
	<211> 23	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu IL-6 的下游引物	
	<400> 18	

	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	
[0005]	tctgcagetc tgtgtgaagg	20
	<210> 20	
	<211> 20	
	<212> DNA	
	<213> artificial	
	<220>	
	<223> 扩增 hu IL-8 的下游引物	
	<400> 20	
	aatttctgtg ttggcgcagt	20

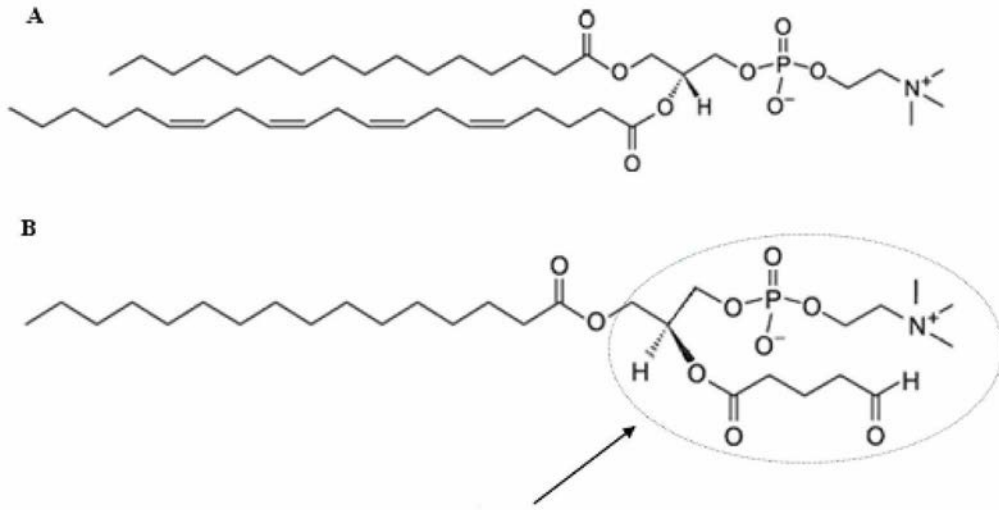


图1

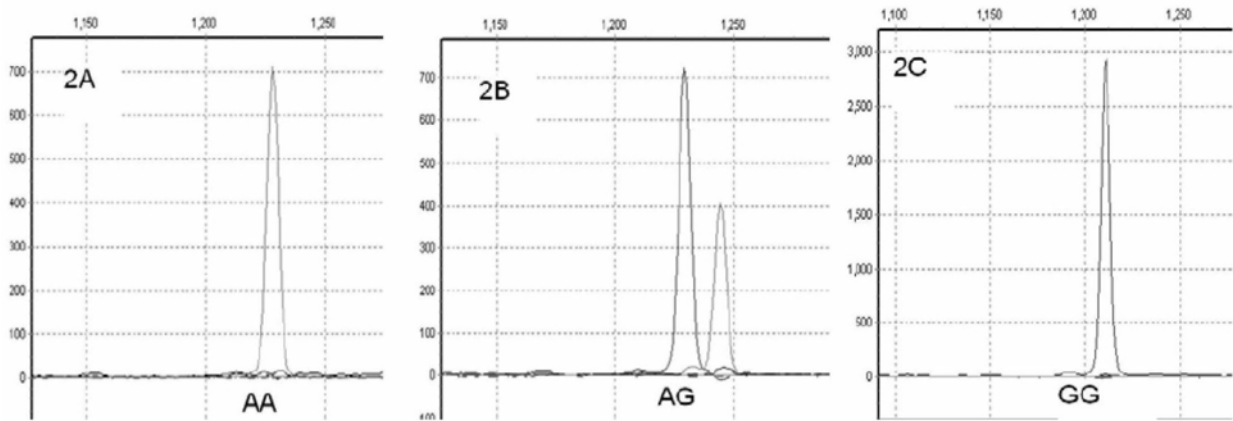


图2

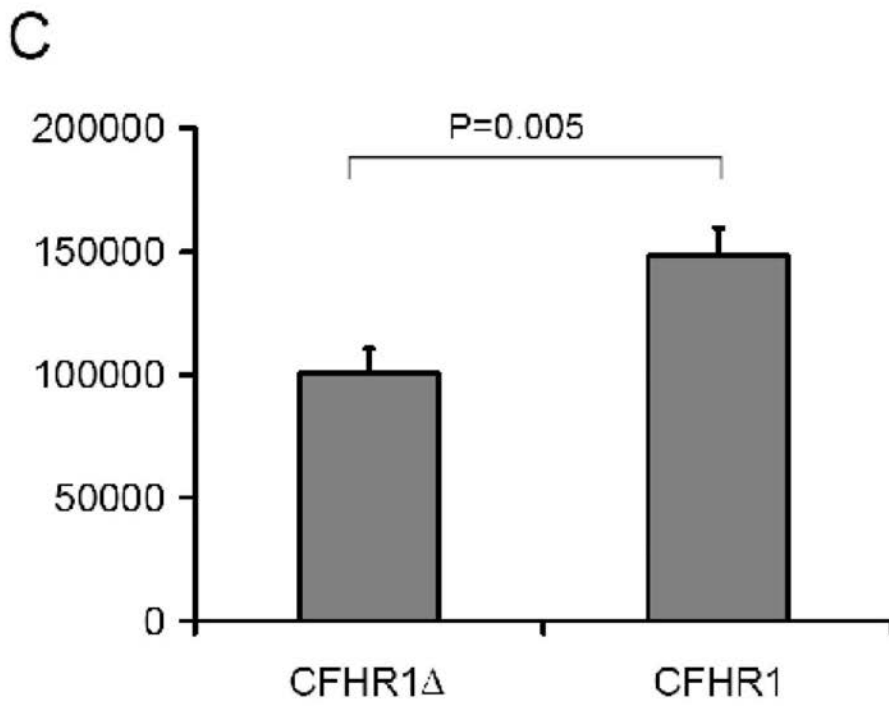
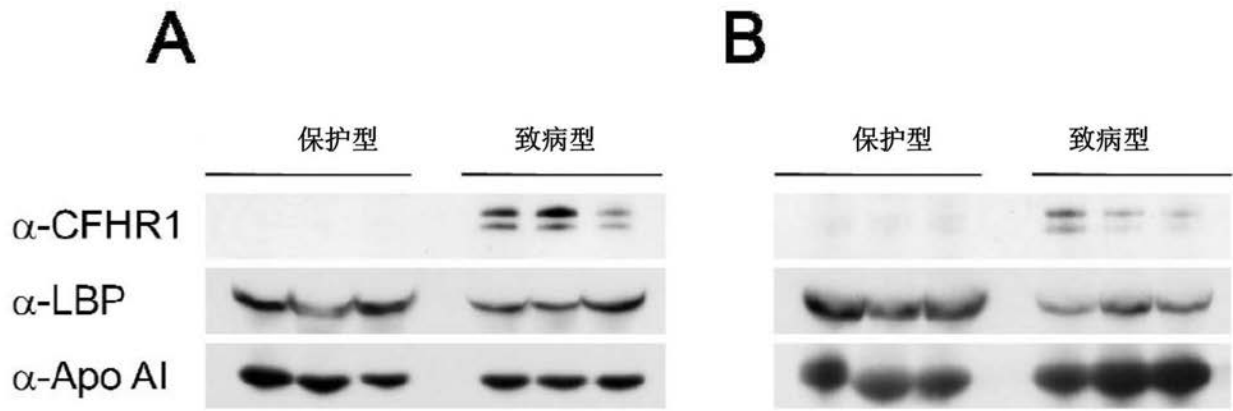


图3

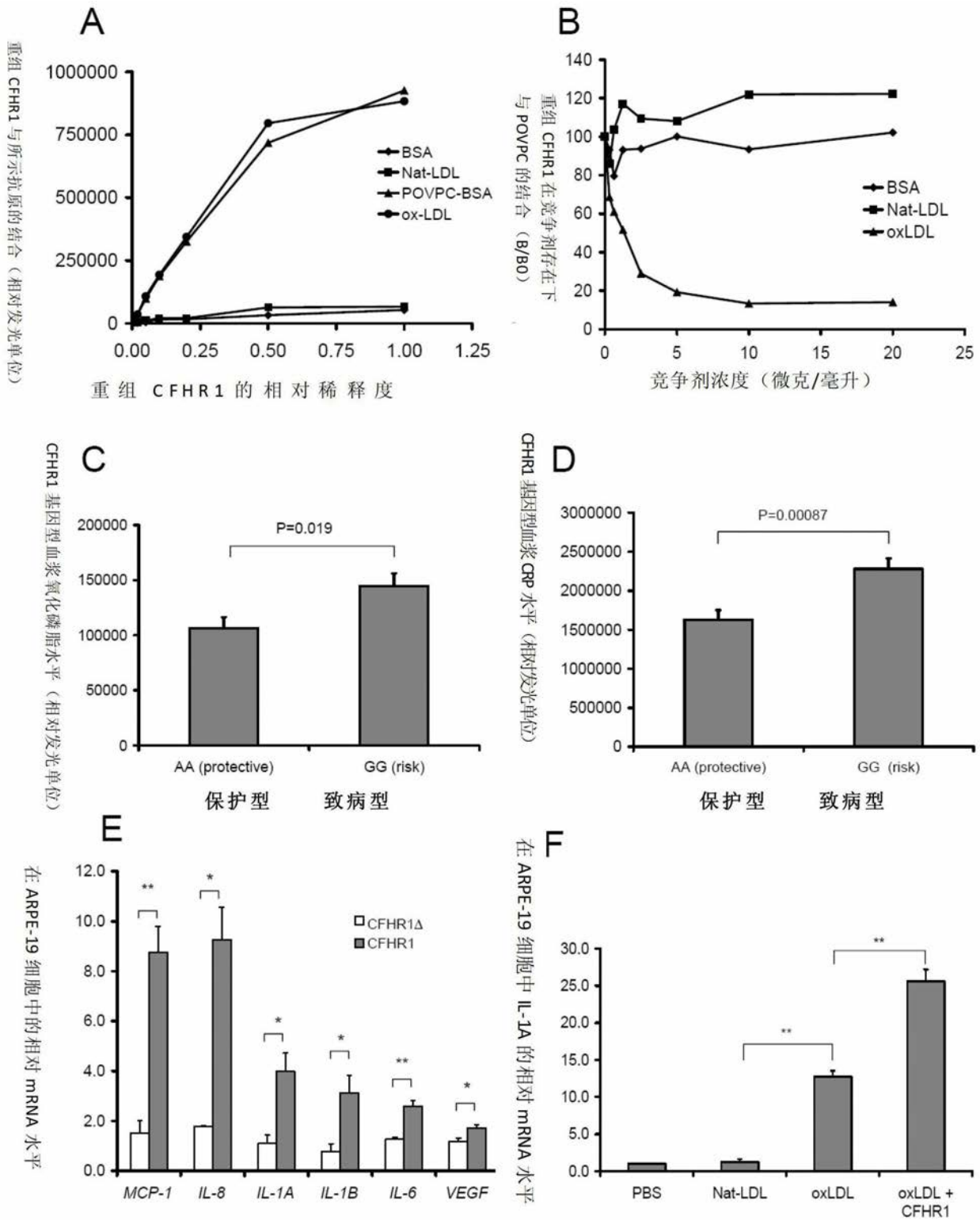


图4

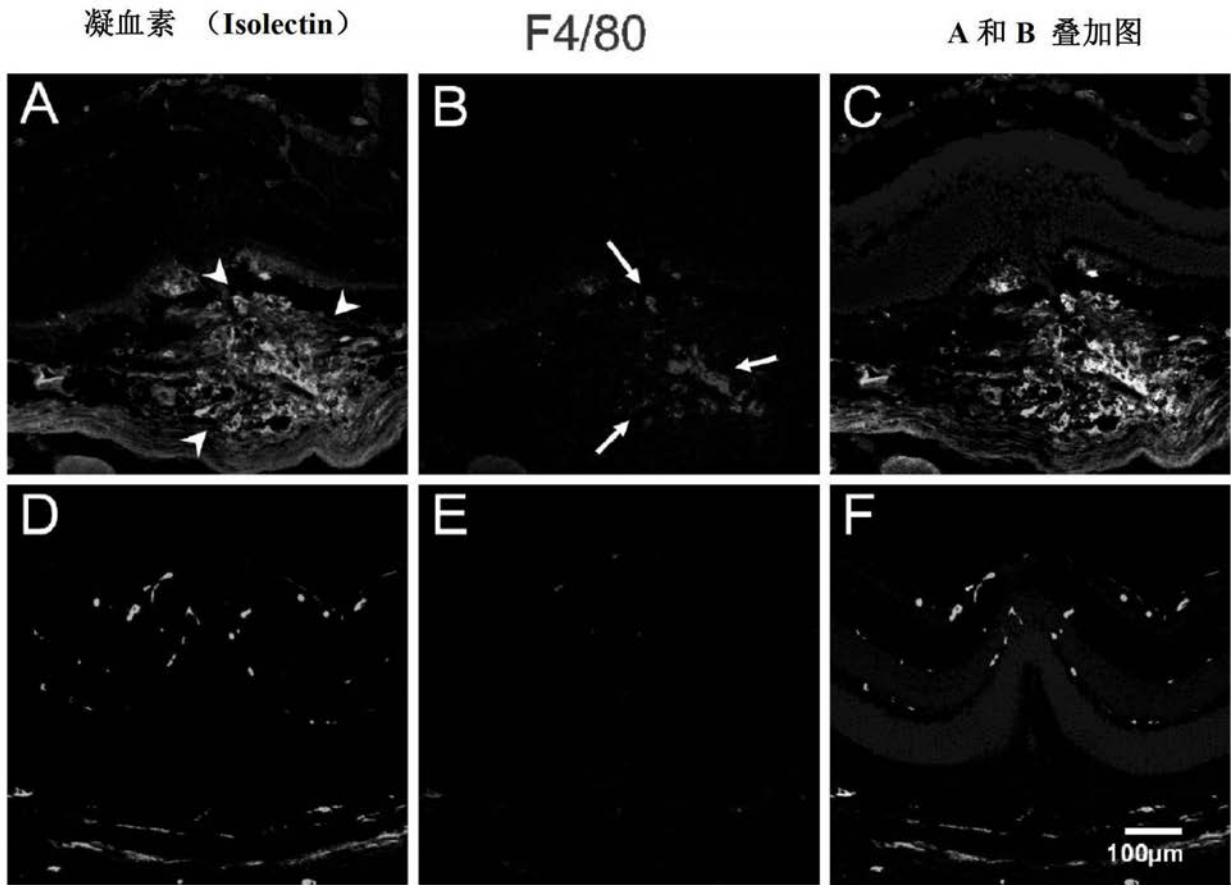


图5

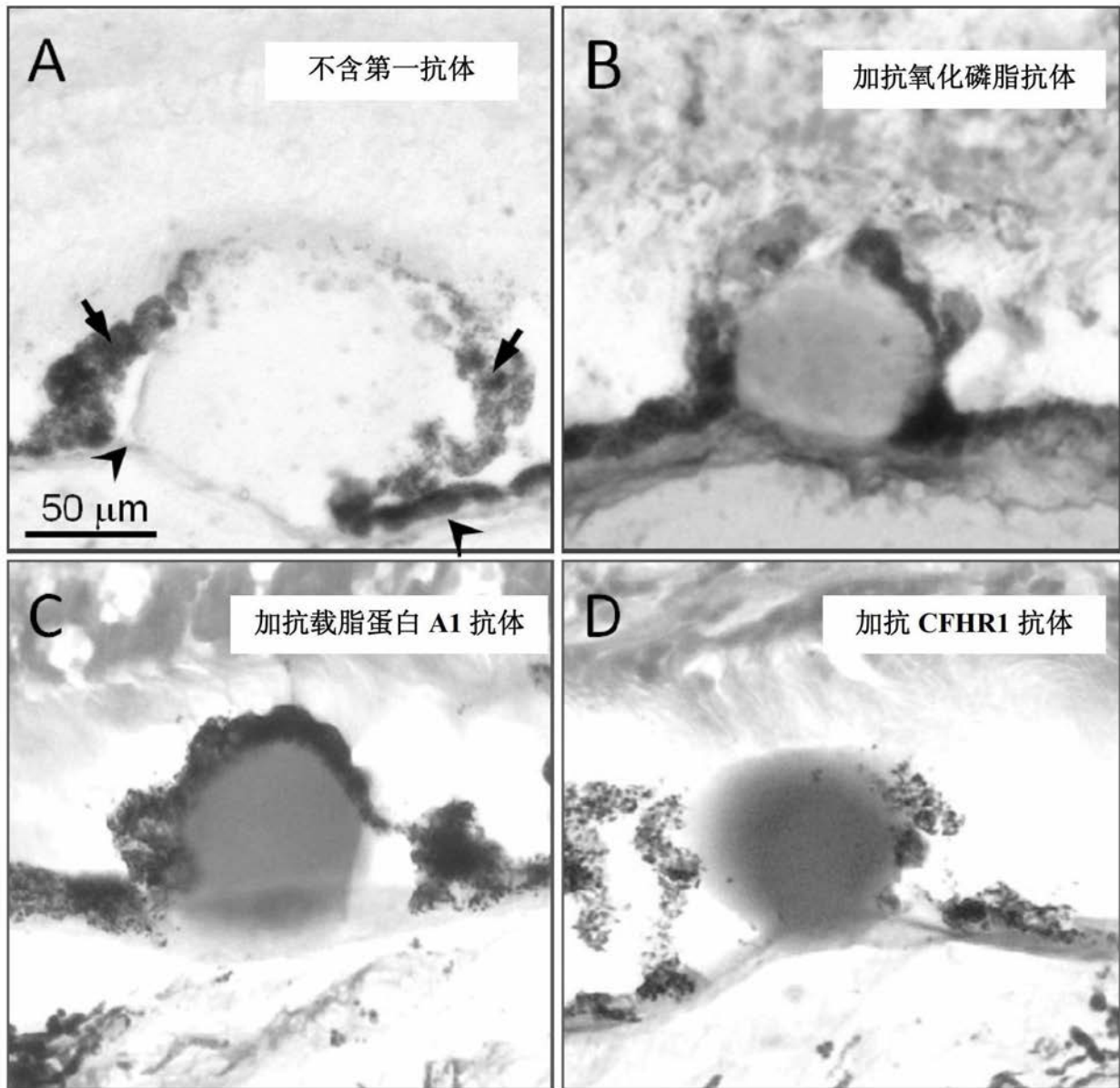


图6

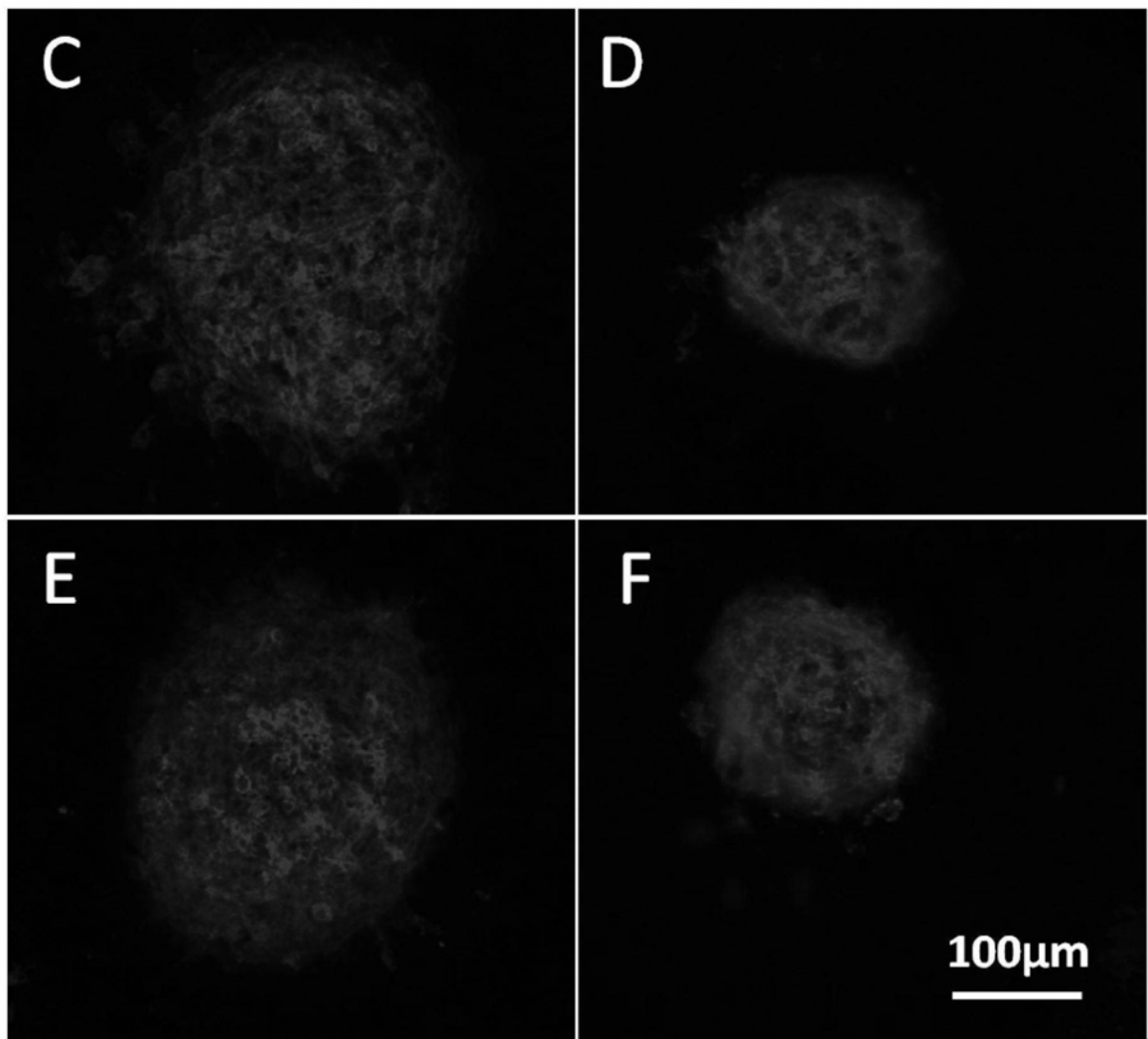
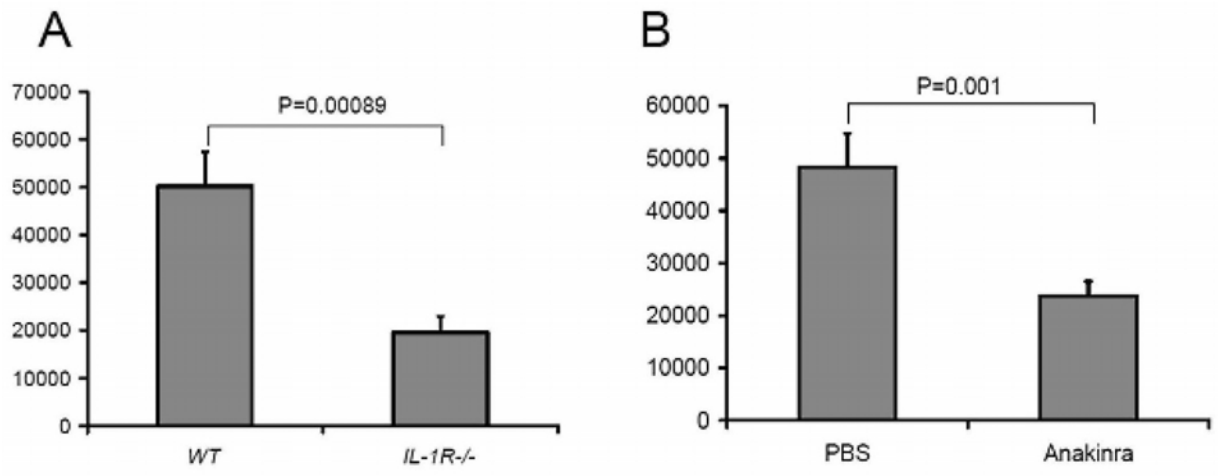


图7

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	CN102978204B	公开(公告)日	2018-06-08
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 C12Q1/6883 G01N33/68 G01N33/53 G01N33/543		
代理人(译)	梁鑫		
审查员(译)	徐浩		
优先权	201110360860.2 2011-11-14 CN 201110357825.5 2011-11-11 CN		
其他公开文献	CN102978204A		
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。

