

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/68 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)



## [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810105953.9

[43] 公开日 2008 年 10 月 1 日

[11] 公开号 CN 101275955A

[22] 申请日 2008.5.8

[21] 申请号 200810105953.9

[71] 申请人 蔡剑平

地址 100054 北京市丰台区草桥东路 16 号楼  
4022 室

[72] 发明人 蔡剑平 郑君德 黑爱莲 戴大鹏

[74] 专利代理机构 北京德琦知识产权代理有限公司

代理人 王珍仙 徐江华

权利要求书 2 页 说明书 17 页 附图 6 页

### [54] 发明名称

辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒及其方法

### [57] 摘要

本发明提供了一种辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒及其方法。本发明基于抗氧化修复蛋白 MTH2 与老年性痴呆症，即阿尔茨海默病的相关性，在制备抗 MTH2 蛋白的抗体后，通过免疫学方法检测样本中 MTH2 蛋白的表达水平来辅助确诊老年性痴呆症。本发明提供的方法和试剂盒使得老年性痴呆症的检测和辅助确诊更加准确，具有十分积极的意义。

1、一种辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒，其中包括 mutT 同源基因 2 所表达的 MTH2 蛋白的特异性抗体作为第一抗体。

2、如权利要求 1 所述的试剂盒，进一步包括用于免疫组化反应检测所必需的试剂或用于免疫印迹法检测所必需的试剂。

3、如权利要求 2 所述的试剂盒，其中所述免疫组化反应检测所必需的试剂或免疫印迹法检测所必需的试剂包括：用标记物标记的能与所述第一抗体结合的第二抗体和检测所述标记物所必需的试剂。

4、如权利要求 3 所述的试剂盒，其中所述标记物为荧光标记、酶标记、放射性同位素标记或胶体金标记。

5、如权利要求 4 所述的试剂盒，其中所述酶标记为辣根过氧化物酶标记。

6、一种辅助确诊老年性痴呆症的方法，包括用免疫学方法检测样品中 mutT 同源基因 2 所表达的 MTH2 蛋白的水平，其中所述样品取自已经死亡的人或哺乳动物的脑组织。

7、如权利要求 6 所述的方法，其中所述免疫学方法为免疫组化法或免疫印迹法。

8、如权利要求 7 所述的方法，其中包括步骤：

制备抗 MTH2 蛋白的特异性抗体作为第一抗体；

使所述第一抗体与样品中的 MTH2 蛋白结合；和

检测与 MTH2 蛋白结合的第一抗体的水平。

9、如权利要求 8 所述的方法，其中所述检测第一抗体水平的步骤包括：

使用标记的能与所述第一抗体结合的第二抗体与第一抗体结合；和

检测与第一抗体结合的第二抗体的标记。

10、如权利要求 9 所述的方法，其中所述标记的第二抗体采用荧光标记、酶标记、放射性同位素标记或胶体金标记。

11、如权利要求 10 所述的方法，其中所述酶标记为辣根过氧化物酶标记。

12、如权利要求 6 所述的方法，其中所述哺乳动物为 SAMP8 小鼠。

13、如权利要求 8 所述的方法，其中所述免疫印迹法进一步包括：

提取样品总蛋白；

取所述总蛋白做蛋白质电泳；和

将电泳后的蛋白转移到膜上；

并且，其中所述使所述第一抗体与样品中的 MTH2 蛋白结合的步骤是将带有样品中的所述蛋白的膜与第一抗体一起孵育杂交，

其中，所述电泳条件为 200  $\mu\text{g}$  总蛋白上样，80 V 浓缩，150 V 分离；所述转膜条件为：20 mA 恒流 2h；所述杂交条件为：室温封闭 6h，1:800 稀释抗 MTH2 抗体。

## 辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒及其方法

### 技术领域

本发明涉及一种辅助诊断老年性痴呆症的试剂盒及其方法。

### 背景技术

老年性痴呆症，即阿尔茨海默氏病（简称 AD），是危害性极大的疾病，不仅造成患者记忆力减退直至完全丧失，还导致患者的生活自理能力丧失、并发症产生以致死亡。它严重影响病人的生活质量，给社会和家庭带来沉重的负担。AD 不仅危害性大，而且发病率高。据估计全世界 AD 患者接近 2000 万，在美国已成为仅次于心血管疾病、癌症和卒中的第 4 大死因；加拿大 60 岁以上的老年人中有 25% 患不同程度的痴呆；我国 AD 的发病率也与西方国家接近。但是目前国际范围内针对这一危害性大、发病率高的疾病仍无有效诊断与治疗的方法。

长期以来 AD 的诊断一直是依靠排除法，虽然老年性痴呆患者脑组织有其病理特征，但生前尚无可靠的诊断标志，缺乏有效的实验室诊断指标。目前对其诊断不仅要符合痴呆缓慢进行性发展的临床表现，在结合 CT、MRI 等辅助证据综合分析的基础上，还要必需根据病史、病程、体检和辅助检查的资料进行综合分析，排除可引起痴呆的其他躯体和脑的疾病，如血管性痴呆、脑炎后遗症性痴呆、脑外伤后遗症性痴呆等之后才能得出 AD 的临床诊断，因此其诊断和治疗存在很大的主观性和盲目性。而对 AD 的确诊除了根据临床表现做出痴呆的诊断之外，尚有赖于患者死亡后对脑组织的病理检查来帮助判断。但是 AD 和正常衰老的神经病理变化目前尚无精确的区分界线，AD 的神经病理变化都可见于正常老人，只是病变的量和范围不同，所以目前的病理学检测难以有效辅助 AD 的确诊。因此，需要寻找能够有效的用于

病理检查的方法以辅助 AD 的确诊的 AD 相关的分子标志。

## 发明内容

本发明的目的是提供一种有效的老年性痴呆症的病理学分子标志，以便在结合各种临床诊断的基础上，利用该分子标志辅助确诊老年性痴呆症。本发明的另一个目的是提供一种利用该分子标志辅助诊断老年性痴呆症的方法及其试剂盒。

本发明提供了一种提示老年性痴呆症的可能性的分子标志物，即抗氧化修复基因 mutT 同源基因 2 (mutT homologue 2, MTH2) 及其所表达的蛋白 (MTH2 蛋白)，其中 MTH2 蛋白表达水平的显著降低提示老年性痴呆症的存在。

本发明提供了一种辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒，其中包括 mutT 同源基因 2 所表达的 MTH2 蛋白的特异性抗体作为第一抗体。在本发明的优选实施方式中，该试剂盒中进一步包含用于免疫组化反应检测所必需的试剂或用于免疫印迹法检测所必需的试剂。其中所述免疫组化反应检测所必需的试剂或免疫印迹法检测所必需的试剂包括：用标记物标记的能与所述第一抗体结合的第二抗体和检测所述标记物所必需的试剂。其中所述标记可为荧光标记、酶标记、放射性同位素标记或胶体金标记。其中所述酶标记可为辣根过氧化物酶标记。

本发明还提供了一种辅助确诊老年性痴呆症的方法，包括用免疫学方法检测样品中 mutT 同源基因 2 所表达的 MTH2 蛋白的水平，其中所述样品取自已经死亡的人或哺乳动物的脑组织，特别是海马区，最好是海马的 CA1 和 CA3 区。其中所述免疫学方法可为免疫组化法或免疫印迹法。所述免疫学方法中主要包括如下步骤：

制备抗 MTH2 蛋白的特异性抗体作为第一抗体；使所述第一抗体与样品中的 MTH2 蛋白结合；和检测与 MTH2 蛋白结合的第一抗体的水平。

其中所述检测第一抗体水平的步骤包括：使用标记的能与所述第一抗体结合的第二抗体与第一抗体结合，和检测与第一抗体结合的第二抗体的标记。其

中所述标记的第二抗体采用荧光标记、酶标记、放射性同位素标记或胶体金标记。其中所述酶标记为辣根过氧化物酶标记。其中所述哺乳动物为 SAMP8 小鼠。

上述免疫印迹法具体包括如下主要步骤：提取样品总蛋白；取所述总蛋白做蛋白质电泳；将电泳后的蛋白转移到膜上；将带有样品中所述蛋白的膜与抗 MTH2 的特异性抗体一起孵育杂交；和检测结合到所述 MTH2 蛋白的所述抗 MTH2 的特异性抗体；其优选的实验条件分别为：电泳：200  $\mu$ g 总蛋白上样，80 V 浓缩，150 V 分离；转膜：20 mA 恒流 2h；杂交：室温封闭 6h，1:800 稀释抗 MTH2 抗体。

所述免疫组化法的步骤主要包括：封闭非特异性结合位点；加入抗 MTH2 蛋白的特异性抗体，使该抗体与样品中的 MTH2 蛋白结合；检测结合到样品中 MTH2 蛋白上的抗 MTH2 蛋白的抗体，从而测得样品中 MTH2 蛋白的存在情况。

其中所述抗 MTH2 抗体可为标记过的抗体，通过检测其标记物来测得样品中 MTH2 的存在情况。

所述检测结合到样品中 MTH2 蛋白上的抗 MTH2 抗体的方法还可为：用标记好的第二抗体与所述第一抗体结合，然后检测与第一抗体结合的第二抗体上的标记物，从而测得样品中 MTH2 的存在情况。

所述免疫组化法的步骤还可包括：在封闭步骤之前对样品的初步处理，使样品中的 MTH2 蛋白暴露并尽可能去除可能影响检测的各种杂质。

上述标记物为荧光标记、酶标记、放射性同位素标记或胶体金标记等免疫组化中常用的标记方法。所述酶标记可为辣根过氧化物酶标记。

采用本发明的方法或试剂盒检测待测样本中的 MTH-2 蛋白水平并与正常样本比较，如果待测样本的 MTH2 蛋白水平显著低于其对应的正常的水平，即，具有统计学意义上的显著性差异，则提示待测样本可能来自患有 AD 的人或动物。

本发明还提供了所述方法在检测与确诊老年性痴呆症中的应用，以及所述

试剂盒在检测与确诊老年性痴呆症中的应用。

与现有方法相比,本发明的具有客观、准确、针对性强的优点,弥补了现在没有严格的AD与正常衰老的神经病理区分界线的不足,可以作为辅助诊断中的病理检测中的分子标志。并且其优选的免疫学方法检测灵敏、操作简单、迅速,特别适用于病理检查。

通过本发明的检测方法,选用了在老年性痴呆病程中特异性蛋白分子MTH2,通过操作简单、技术成熟的免疫印迹和免疫组化方法,可以在很短的时间内检测到其特征性表达是否显著下降,从而有针对性的提示了老年性痴呆的发病。另外,本发明的测定是基于目的蛋白的表达量下降,而现有技术中用到的作为分子标志的相关蛋白的表达水平在AD患者中显示为增加,本发明这种下降的指标更具显著性,从而增加了检测和辅助诊断的准确性。

#### 附图说明

图1为说明SAMR1、SAMP8小鼠海马中MTH2的表达情况的免疫组化结果的显微镜照片,其中,R1列指不同月龄SAMR1小鼠海马25倍放大图,P8列指不同月龄SAMP8小鼠海马25倍放大图,对照组为未用MTH2抗体孵育的空白对照,标尺:200 μm(25×);

图2A为说明不同月龄SAMR1和SAMP8小鼠海马CA1区MTH2蛋白的表达的免疫组化结果的显微镜照片,其中对照组未用MTH2抗体孵育;R1列表示SAMR1小鼠表达的MTH2蛋白的免疫组化结果;P8列为SAMP8小鼠表达的MTH2蛋白的免疫组化结果;标尺为10 μm;

图2B为说明不同月龄SAMR1和SAMP8小鼠海马CA1区MTH2蛋白的表达的免疫组化结果的光密度值的统计分析图,\*表示 $P<0.05$ ,SAMP8小鼠与同月龄SAMR1鼠比较MTH2蛋白的表达具有显著性差异;#表示 $P<0.05$ ,SAMP8小鼠与同品系1月龄小鼠比较MTH2蛋白的表达有显著性差异;R1指SAMR1小鼠,P8指SAMP8小鼠;

图3A为说明不同月龄SAMR1和SAMP8小鼠海马CA3区MTH2蛋白

的表达的免疫组化结果的显微镜照片;其中对照组为未用 MTH2 抗体孵育的空白对照;R1 列为 SAMR1 小鼠 MTH2 蛋白表达;P8 列为 SAMP8 小鼠 MTH2 蛋白表达;标尺为 10  $\mu\text{m}$ ;

图 3B 为不同月龄 SAMR1 和 SAMP8 小鼠海马 CA3 区 MTH2 蛋白的表达的免疫组化结果的光密度值的统计分析图,\*表示  $P<0.05$ : SAMP8 小鼠与同月龄 SAMR1 小鼠比较 MTH2 蛋白表达有显著性差异;#表示  $P<0.05$ : SAMP8 小鼠与同品系 1 月龄小鼠比较 MTH2 蛋白表达有显著性差异;R1 指 SAMR1 小鼠,P8 指 SAMP8 小鼠;

图 4 为说明人海马组织 CA1 区 MTH2 蛋白的免疫组化结果的显微镜照片,其中显示了已经死亡的 AD 患者和年龄相匹配的未患 AD 的正常人对照组海马 CA1 区 MTH2 蛋白表达的 100 倍放大图和 400 倍放大图,对照组用抗体稀释液代替抗 MTH2 蛋白抗体孵育;

图 5A 为 MTH2 在 SAMR1 和 SAMP8 小鼠海马中表达的免疫印迹结果;结果显示 MTH2 蛋白在分子量约 20kD 处可见单一条带,作为内对照的  $\alpha$ -微管蛋白的表达在两系小鼠各月龄组均一致;

图 5B 为 MTH2 在 SAMR1 和 SAMP8 小鼠海马中表达的免疫印迹结果的光密度值的统计分析图,R1 指 SAMR1 小鼠,P8 指 SAMP8 小鼠;\* $P<0.05$ : SAMP8 小鼠与同龄 SAMR1 小鼠比较有显著性差异;# $P<0.05$ : SAMP8 小鼠与同品系 1 月龄小鼠比较有显著性差异。

#### 具体实施方式

研究表明,衰老伴随有人脑组织的萎缩和认知功能的下降,而 AD 患者的脑萎缩比正常人更为迅速,其功能损害程度也更加严重。虽然 AD 发病的分子机制目前仍不清楚,但是 AD 的氧化应激学说已为越来越多的研究者所认可<sup>[2]</sup>。

活性氧、自由基作为细胞代谢过程中的正常中间产物,不仅可以氧化脂质和蛋白质,还可造成 DNA<sup>[3]</sup>的氧化损伤。在 DNA 的氧化损伤中 8-oxo-G 是最重要的致突变物质<sup>[4]</sup>,它与胞嘧啶核苷和腺嘌呤核苷配对的效率几乎是相等的<sup>[5]</sup>,从

而导致了DNA突变及其转录的错误<sup>[6]</sup>。由于占体重2-3%的脑组织的耗氧量占人体总耗氧量的20%<sup>[7]</sup>，因此神经元对氧化应激尤为敏感。研究发现AD患者脑组织中8-oxo-G的含量显著高于正常对照组<sup>[8]</sup>，这不但证明了DNA氧化损伤与AD致病的相关性，也提示DNA氧化修复机制缺陷可能在AD致病过程中可能起重要作用。

生物体具有完善的机制以对抗活性氧、自由基对DNA的氧化损伤。大肠杆菌MutM的表达产物DNA糖苷酶可识别并切除DNA链上错误的8-oxo-G；MutY基因编码的腺嘌呤DNA糖苷酶则通过清除与8-oxo-G错误配对的A来修复氧化损伤；核苷酸代谢池中的8-oxo-dGTP可被MutT降解为8-oxo-dGMP，使其在DNA复制时不能被利用。人类也有类似的机制，人体内与大肠杆菌MutM、MutY和MutT相对应的蛋白分别为hOGG1、MYH和hMTH1。

目前的研究结果显示AD患者脑组织各区域hOGG1的表达均明显降低<sup>[9]</sup>，海马CA1、CA3区hMTH1的表达量也显著减少<sup>[10]</sup>。最近我们克隆成功了新的抗氧化修复基因MTH2，其表达产物具有与MTH1相同的、将变异源性物质8-oxo-dGTP水解为8-oxo-dGMP的活性，从而可抑制8-oxo-dGTP在DNA复制时的错误掺入，起到了预防DNA突变发生的作用。

本研究的免疫印迹实验结果显示MTH2在对照组（SAMR1）小鼠海马内持续高表达，而在快速老化小鼠（SAMP8小鼠）海马内随月龄增加而显著下降，自8月龄开始显著低于同品系1、4月龄的表达及同龄对照鼠的表达，而且MTH2蛋白表达量下降的结果同步于SAMP8小鼠学习记忆能力下降的结果。对SAMP8小鼠学习记忆能力增龄性变化的研究结果显示，SAMP8小鼠的学习记忆能力随月龄增长而显著减退；与同龄对照组相比，8、12月龄的SAMP8小鼠出现明显衰老特征，表现出学习记忆能力明显减退<sup>[11]</sup>。

以上结果提示海马神经元细胞中MTH2蛋白表达量的下降可能是促进SAMP8小鼠快速老化的一个重要原因。为证实这一结论，进一步用免疫组化的方法，对快速老化动物模型SAMP8海马CA1和CA3区MTH2的表达分别进行了研究，并用临床病理已确诊的AD病例进行了验证。研究结果表明，MTH2蛋白

水平与老年性痴呆症呈现负相关，即老年性痴呆症患者的MTH2蛋白表达水平明显下降。MTH2蛋白的表达水平可以作为检测和辅助诊断老年性痴呆症的一种有效指标。

本说明书中术语“免疫学方法”是指基于抗原抗体反应的检测方法，包括免疫组化、免疫印迹等方法。

术语“免疫组化相关试剂”是指常规免疫组化检测所需的各种试剂，例如各种缓冲液、显色液、酶反应底物等。例如对于辣根过氧化物酶标记来说，其底物溶液可为二氨基联苯胺(DAB)溶液。

术语“免疫印迹相关试剂”是指常规免疫印迹检测所需的各种常规试剂，例如各种缓冲液等，如电泳缓冲液、洗涤用的 TBS-T 缓冲液等。

术语“标记”指免疫学方法中常用的各种标记方法，例如：荧光标记，即将抗体上标记例如 FITC 等荧光素，通过检测荧光的强度来确定目的蛋白的量；酶标记，即将抗体用如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶等酶标记，再加入其相应的底物之后检测其显色反应或发光反应（辣根过氧化物酶在  $H_2O_2$  存在下氧化化学发光物质鲁米诺（氨基苯二酰一胍），用于免疫印迹，用照相底片来感光来检测；或更优选使用 ECL 溶液作为底物进行化学发光反应并检测曝光）；放射标记，例如  $I^{125}$  标记的二抗、 $I^{125}$  标记的金黄色葡萄球菌蛋白 A（可以与 IgG 的 Fc 区特异性结合，代替二抗）等；胶体金标记；以及利用生物素等的其他改进的使检测更加灵敏的标记方法，例如生物素-链霉菌抗生物素蛋白-辣根过氧化物酶法、卵白素-生物素-辣根过氧化物酶法等等。

在本发明的一个实施方式中，采用免疫学方法来检测样品中MTH2蛋白的水平。首先制备抗MTH2的特异性抗体，在本发明的一个实施方式中，设计特定引物，克隆并表达纯化MTH2蛋白。然后用该MTH2蛋白免疫动物制备其特异性抗体。然后利用该抗体检测样品中MTH2蛋白水平与对照比较是否有显著性下降，从而辅助确诊AD。

所述免疫组化的方法可以包括已知的各种常规免疫组化方法，这是本领域

技术人员早已掌握的。如：可以采用标记好的抗MTH2特异性抗体与样品中的MTH2蛋白相结合，该标记可以用例如荧光标记，然后在紫外光下检测荧光强度，从而推测样品中MTH2蛋白的水平。

在一个优选的实施方式中，在抗MTH2特异性抗体（第一抗体）与样品中的MTH2蛋白相结合之后，用标记好的针对该抗MTH2抗体的二抗再与之结合，进而检测该二抗上的标记物以获得样品中MTH2蛋白的水平。其中所述二抗的标记方法可为荧光标记、酶标记、反射标记和胶体金标记，优选采用酶标记，更优选采用辣根过氧化物酶标记。最优选，先用生物素标记的二抗与一抗结合，再用辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素与二抗结合，底物溶液采用DAB溶液。另一优选的实施方式中，可采用卵白素-生物素-辣根过氧化物酶复合物（ABC）法进行所述免疫组化检测。

在本发明的另一个实施方式中，采用免疫印迹的方法来检测AD相关蛋白——MTH2蛋白的水平。其中已知的免疫印迹技术均可用于本发明所述的方法中。在一个优选的实施方式中，免疫印迹法中采用标记好的金黄色葡萄球菌蛋白A与已经结合到样品中的MTH2蛋白上的特异性一抗相结合，优选所述蛋白A用 $I^{125}$ 标记，然后通过放射自显影方式检测。

在更优选的实施方式中，所述免疫印迹法中采用碱性磷酸酶或者更优选采用辣根过氧化物酶标记的二抗。当为辣根过氧化物酶标记时，其检测方法为在 $H_2O_2$ 存在下，氧化化学发光物质鲁米诺，然后在化学增强剂的存在下，将膜放在照相底片上进行显影检测。更优选使用ECL溶液作为底物进行化学发光反应并检测曝光。

应说明的是，本领域技术人员可明确地了解到各种常规的免疫组化技术和免疫印迹技术均可用于本发明中，在此不再对各种常规的免疫组化技术和免疫印迹技术一一描述，本领域技术人员可以理解其中所做的各种变通也落在本发明的保护范围之内。

下面结合具体实施例来说明本发明。

### 实施例 1 MTH2 基因的克隆

含有全长小鼠MTH2基因cDNA的I.M.A.G.E.克隆(克隆号1432009)购于KURABO公司。根据GenBank EST数据库(No. AA987002)用PCR方法扩增获得小鼠MTH2全长cDNA。

引物:

T2P: (5'-TGCTCTAGATGGCCGCTAACG-3');

T2R (5'-CCCAAGCTTCAAGGAGTCTTCG-3')。

用工具酶 XbaI 和 HindIII 切割后插入载体 pTT100 中,从而构建 pTT100::mMTH2 质粒。用引物 T2Pxa (5'-ATAGAAGGTAGAATGGCCGCTAACGCAGAG-3') 和 T2R 扩增 pTT100::mMTH2 质粒,将 His-tags 标签的编码序列引入 mMTH2 基因的末端 5' 产生融合基因。扩增产物克隆入 pQE30UA 载体。

### 实施例 2 MTH2 蛋白的表达、纯化和兔抗鼠 MTH2 抗体的制备与鉴定

用实施例 1 中制备的 pQE30-mMTH2 转化 *E. Coli* M15 细胞,制备 His-tag 小鼠 MTH2 融合蛋白。用亲和柱层析法分离获得该融合蛋白。用约 200  $\mu\text{g}$  MTH2 融合蛋白免疫家兔制备抗 MTH2 的抗血清,4 周后加强 1 次 (100  $\mu\text{g}$ ),此后每隔 1 周加强 1 次共 3 次。经硫酸铵沉淀法获得免疫球蛋白后,用亲和色谱法纯化洗脱,并经 Tris 缓冲溶液透析获得特异性兔抗鼠 MTH2 抗体,即一抗。取纯化融合蛋白经 SDS-PAGE 电泳后转移至硝酸纤维素膜上,用制备的兔抗鼠 MTH2 抗体按常规免疫印迹步骤鉴定抗体的特异性,可在约 20 kDa 处见单一条带。

### 实施例 3 免疫组化法检测模型小鼠 MTH2 蛋白表达水平

#### 1. 试剂

0.2 M PB 溶液, pH 值 7.2 ~ 7.4, 高压灭菌,另根据需要稀释该 PB 溶液至所需浓度; 0.1 M PBS: 0.1 M PB 中加入氯化钠,使氯化钠浓度为 0.8% (g/ml), 高压灭菌,另根据需要稀释该 PBS 溶液; 4% 多聚甲醛(PFA)溶液, pH 7.2 ~ 7.4, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存; PB 蔗糖溶液: 取一定量蔗糖溶于 0.1 M PB 中制备所需浓度的 PB 蔗糖溶液,现用现配; 标本保护液: 量取 25 ml 乙二醇和 25 ml 甘油,加 0.1 M PB 定容

至100 ml,  $-20^{\circ}\text{C}$ 保存; 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 溶液: 1 ml 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 加去离子水至10 ml,  $4^{\circ}\text{C}$ 避光保存。其余免疫组化用试剂购自中杉金桥生物技术有限公司。

## 2. 动物处理

1、4、8、12月龄的SAMR1和SAMP8品系小鼠每组各8只, 其中SAMR1小鼠为老化速度正常的对照小鼠, SAMP8小鼠为老年痴呆症模型小鼠(即快速老化模型小鼠)。

用1%戊巴比妥钠(30 mg/kg)腹腔注射小鼠麻醉。剪开小鼠胸腔暴露心脏后迅速经左心室插入针头并固定, 迅速剪开右心耳后快速灌注 $4^{\circ}\text{C}$  0.1 M PB约50 ml。继续灌注 $4^{\circ}\text{C}$ 预冷的4% PFA溶液约100 ml。冰上快速剥离脑组织, 置于4% PFA溶液 $4^{\circ}\text{C}$ 继续固定过夜。将脑组织置于15% PB蔗糖溶液, 待其沉落底部后转移至20% PB蔗糖溶液, 再次沉落底部后转移至30% PB蔗糖溶液并保存其中。用水包埋组织块, 冰冻切片机 $40\ \mu\text{m}$ 连续冠状切片。将切片置于标本保护液中 $-20^{\circ}\text{C}$ 保存。

## 3. 免疫组化

挑选两侧海马形状对称, 能够完整显示海马各区的切片进行实验, 挑选的切片转移至24孔培养板内。用0.01 M PBS(如非特别注明, 下述用于洗涤的PBS均为0.01M)洗切片3遍, 每次3 min, 以洗掉残留在切片上的标本保护液。0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 避光孵育切片30 min以消除内源性过氧化物酶。用0.01 M PBS洗涤, 每次3 min, 共洗3次, 以去除残留的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。

封闭用正常山羊血清室温孵育1 h, 以封闭非特异性位点。吸弃封闭液后滴加实施例2中制备的兔抗鼠MTH2抗体(1:200 稀释), 之后置 $4^{\circ}\text{C}$ 冰箱内孵育过夜(空白对照组仅用抗体稀释液代替抗体孵育)。用0.01 M PBS充分洗涤, 每次3 min, 共洗3次, 以去掉未结合的一抗。用生物素标记的羊抗兔IgG(第二抗体)室温孵育1 h。0.01 M PBS洗去二抗后加辣根过氧化物酶标记的链霉卵白素室温孵育1 h。

PBS充分洗涤后用DAB显色, 严格控制显色时间: MTH2检测显色1分35sec后PBS中止显色。PBS洗去DAB后小心将切片裱到载玻片上, 室温晾干30 min。

常规梯度脱水二甲苯透明：75%、85%、95%、100%和100%乙醇各5 sec 梯度脱水；二甲苯透明三次，每次10min，每次换用新鲜的二甲苯。中性树胶封片后室温晾干长期保存。

#### 4. 小鼠海马组织中MTH2表达的结果

##### 1) 海马CA1区和CA3区MTH2表达的定位

参见图1，MTH2在胞浆和胞核均有表达，但主要在胞浆表达；海马不同区域均有表达，尤以CA1和CA3区表达明显，而仅用抗体稀释液孵育的空白对照组则未见阳性着色（见图1对照组）。

##### 2) 海马CA1区MTH2表达的免疫组化结果的平均光密度分析

参见图 2A，可见 1 月龄、4 月龄 SAMP8 小鼠与同月龄 SAMR1 小鼠相比 MTH2 表达的差异不是很明显，而 8 月龄以后的 SAMP8 小鼠的 MTH2 蛋白表达水平明显低于同月龄的 SAMR1 小鼠的 MTH2 蛋白表达水平。

从定量的平均光密度分析结果来看，见图 2B，其中\*指 SAMP8 小鼠与同月龄 SAMR1 小鼠比较，MTH2 的表达具有显著性差异 ( $P<0.05$ )；#指 SAMP8 小鼠与同品系 1 月龄小鼠比较 MTH2 的表达有显著性差异 ( $P<0.05$ )。

统计学分析表明，SAMR1 系不同月龄组间 MTH2 表达量没有显著性差异 ( $P>0.05$ ) (见图 2A)，而 SAMP8 系 MTH2 表达从 8 月龄开始随月龄增加而显著降低 ( $P<0.05$ ) (见图 2A: 8 月龄; 图 2B)，持续下降至 12 月龄 ( $P<0.05$ )，(见图 2A: 12 月龄; 图 2 B)，即 8 月龄显著低于 4 月龄，12 月龄显著低于 8 月龄 ( $P<0.05$ )。与月龄匹配对照组相比，1 月龄、4 月龄 SAMR1 与 SAMP8 间 MTH2 的表达量没有显著差异 ( $P>0.05$ )，当达到 8 月龄时 MTH2 在两系之间表达量的差异达到显著性水平 ( $P<0.05$ )，8 月和 12 月龄 SAMP8 鼠分别显著低于同龄 SAMR1 鼠。

##### 3) 海马 CA3 区 MTH2 表达的免疫组化结果的平均光密度分析

统计学分析表明，SAMR1 系不同月龄组间 MTH2 表达量无显著性差异 ( $P<0.05$ ) (见图 3A 和 B: R1 列)，SAMP8 鼠 MTH2 表达也从 8 月龄开始显著下降 ( $P<0.05$ ) (见图 3 A: 8 月龄; 图 3: B)，但之后下降缓慢，稳定在 8 月龄的低水平表

达, 即12月龄和8月龄相比表达无显著性差异( $P>0.05$ ) (见图3 A: 12月龄; 图3 B)。1月龄、4月龄的SAMR1与SAMP8间MTH2的表达量没有显著差异( $P>0.05$ ), 当达到8月龄时MTH2在两系表达量差异显著 ( $P<0.05$ ), 8月和12月龄SAMP8鼠分别显著低于同月龄的SAMR1鼠。

对SAMP8小鼠学习记忆能力增龄性变化的研究结果显示, SAMP8小鼠的学习记忆能力随月龄增长而显著减退; 与同龄对照组相比, 8、12月龄的SAMP8小鼠出现明显衰老特征, 表现出学习记忆能力明显减退<sup>[11]</sup>, 即表现为老年性痴呆的症状。而上述对MTH2蛋白表达的结果表明, 在其表现为老年性痴呆症状的同时, (8月龄、12月龄), MTH2蛋白的表达水平明显降低, 从而证明了MTH2蛋白与老年性痴呆症的相关性。

#### 实施例 4 免疫组化检测AD病人海马中MTH2表达情况

##### 1. 试剂

各免疫组化所用试剂购于中杉金桥生物技术有限公司。

##### 2. 海马标本准备

从北京医院病理尸体解剖标本中取临床病理确诊AD病例和年龄匹配的正常死亡人的石蜡包埋海马组织, 6  $\mu\text{m}$ 石蜡切片。37 $^{\circ}\text{C}$ 烤片2 h后室温保存。

##### 3. 免疫组化步骤

将石蜡切片脱蜡至水, 0.3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ 室温15 min清除细胞内的过氧化物酶。PBS洗3次, 洗去残留的 $\text{H}_2\text{O}_2$ 。正常山羊血清室温封闭2 h。兔抗小鼠MTH2抗体1:50稀释, 4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜孵育。PBS洗3次, 洗弃残留的抗体。生物素标记山羊抗兔IgG室温孵育1 h。PBS洗3次。用HRP标记的链酶卵白素室温孵育1 h。PBS洗3次。DAB显色, PBS洗3次终止显色。常规梯度脱水二甲苯透明。中性树脂封片。

##### 4. AD海马组织中MTH2表达的结果

参见图4的100倍放大图, 可见正常组海马组织中MTH2的表达明显高于AD组。进一步经400倍放大可见MTH2主要在胞浆表达, 且正常组中表达量明显高于AD病例组。而未经抗MTH2抗体孵育的空白对照组无任何阳性染色,

结果见图 4。

该结果进一步验证了 MTH2 蛋白的表达情况与 AD 的相关性，即 AD 病人中的 MTH2 蛋白表达水平明显降低。

## 实施例 5 SAM 小鼠海马中 MTH2 蛋白的免疫印迹检测

### 1. 动物处理

SAMR1 和 SAMP8 品系 1、4、8、12 月龄组动物每组 8 只，1% 戊巴比妥钠(30 mg/kg, i.p.) 麻醉后断头。冰上迅速分离海马放入预先标记好的冻存管中，液氮迅速冷冻保存备用。

### 2. 组织匀浆

从液氮中取出组织，将适量组织块(200~300 mg)放在一平皿中并加入适量裂解液，用剪刀剪碎组织块。用 4℃ 预冷的 PBS 洗涤组织，4℃，3,000 g 离心 5min。弃上清，纸巾上轻扣，如有需要，多次重复洗涤至上清基本无血红蛋白的红色，以清除血红蛋白，减少其对组织总蛋白的影响。

按 5 倍组织体积加入预冷的裂解液，玻璃匀浆器中进行组织匀浆(以上步骤均需冰上操作)。10,000 g，4℃ 离心 15 min，取上清。留取少量(10 μl)做蛋白浓度测定。

其余蛋白溶液立即加入 1/4 总蛋白体积的 5×SDS 上样缓冲液。沸水中煮蛋白 5min。-20℃ 保存。

### 3. 蛋白浓度测定

使用 BCA™ 蛋白检测试剂盒测定蛋白质浓度，按其说明书操作。

### 4. 蛋白质电泳

取总蛋白溶液根据测得的蛋白浓度稀释，后做 SDS-PAGE 电泳。根据目的蛋白分子量选择 12% 的分离胶，5% 的积层胶。

### 5. 转膜:

根据凝胶大小，切 6 张 Whatman 3 MM 滤纸和 1 张硝酸纤维素滤膜(NC 膜)。将预冷的转移缓冲液倒入小盒。依次放入 3 张 3 MM 滤纸，NC 膜，3 张

3 MM 滤纸。浸泡 5min。然后取 3 张 3 MM 滤纸放在石墨板上，玻璃棒赶走气泡；将凝胶从电泳槽中取出，放到一盘纯水中。用小镊子撬开玻璃板，凝胶在水中漂洗后沿溴酚蓝上沿切去凝胶下方没有蛋白的多余凝胶。之后在转移缓冲液中略微漂洗后放在滤纸上，对齐后赶走气泡。将 NC 膜放到胶上，赶走气泡，将最后 3 张 3 MM 滤纸放到 NC 膜上，赶气泡。接通电源，按照  $0.65 \text{ mA/cm}^2$  稳流电转 2h。转膜完成之后切断电源，去掉滤纸，NC 膜在去离子水中漂洗。

## 6. 杂交

NC 膜转移到杂交袋中，根据滤膜面积以  $0.1 \text{ ml/cm}^2$  (每张膜约 10 ml 左右) 的量加入封闭液，尽可能排除气泡后封口，摇床上摇动 2h。用封闭液稀释第一抗体至合适的浓度，封闭结束后，将硝酸纤维素滤膜转移至另一杂交袋中，按  $0.1 \text{ ml/cm}^2$  加第一抗体溶液，尽量去除袋内所有气泡，用封膜机封上开口后  $4^\circ\text{C}$  摇床孵育过夜。剪开塑料袋，弃去反应液，TBS-T 洗 5 次，每次 10min。用封闭液稀释 HRP 标记二抗，浓度为 1:2000。室温温育 2h 后 TBS-T 洗膜 5 次，每次 10min。

## 7. 曝光

按每平方厘米 NC 膜 0.125 ml 反应液等量混合 ECL 反应液 A 和 B，将 NC 膜取出后在滤纸上稍沾以吸弃多余的水，蛋白面向上放置在保鲜膜上，将 ECL 反应液均匀加到膜上，静置 5min。弃反应液后将 NC 膜转移到暗匣中压片，所有 X 光片曝光均 5min。显影 5min 后水漂洗一次，定影 5min，最后室温晾干保存。

## 8. 蛋白质电泳及免疫印迹法检测的条件优化

### 1) 转膜条件优化:

MTH2: 分别 20 mA 恒流 1 h, 2 h, 3 h, 过夜。最后选得最优为 2h。

### 2) 裂解液优化选择

因不同的组织裂解液的裂解能力有强有弱，对抗蛋白酶降解的能力也不同，可能需要针对组织作适当调整，故优化裂解液条件。

配方: 0.25 M NaCl

0.05 M Tris-Cl (pH 7.6)  
0.005 M EDTA (pH 8.0)  
1% NP-40  
0.05 M NaF  
1  $\mu\text{g/ml}$  Aprotinin  
100  $\mu\text{g/ml}$  PMSF

此外，也可以使用华特生蛋白提取试剂盒 RIPA 和华特生蛋白提取试剂盒全细胞裂解液。优选使用本发明的配方，因为自己配制的裂解液的效果与上述商购试剂盒无明显差异，但成本远远低于试剂盒。

### 3) 上样量条件选择

目前关于 MTH2 蛋白在小鼠及其他动物体内的表达情况尚未见文献报道，本研究中通过对上样量进行细致的优化，最终选择 200  $\mu\text{g}$  总蛋白上样以检测 MTH2 的表达。

优化后的条件为：200  $\mu\text{g}$  总蛋白上样，80 V 浓缩，150 V 分离，20 mA 恒流转膜 2h。室温封闭 6 h 后兔抗小鼠 MTH2 1:800 稀释，山羊抗兔 IgG-HRP 二抗 1:2000 稀释。

## 9. 结果分析

根据以上条件，对各月龄组 SAMR1 和 SAMP8 小鼠海马中 MTH2 的表达进行研究，免疫印迹的结果照片请见图 5A。

用 Scion Image 软件，对 SAMR1 和 SAMP8 小鼠海马 MTH2 表达的条带进行灰度分析定量。统计学分析表明，SAMR1 对照组内比较方差分析  $P > 0.05$ ，提示各月龄组之间无显著性差异；SAMP8 实验组组内比较方差分析  $P < 0.05$ ，提示 SAMP8 小鼠海马中 MTH2 的表达随月龄增加而显著降低，其中 4 月龄表达量显著低于 1 月龄，8 月龄显著低于 4 月龄，而 12 月龄又显著低于 8 月龄，至 12 月龄海马总蛋白中 MTH2 的表达量已极少。参见图 5B。

对同月龄 SAMR1 与 SAMP8 组间 t 检验统计表明，两品系之间的差异从 4 月龄即开始表现出显著性，此后差异迅速扩大。灰度分析结果显示，8 月龄

SAMP8 海马中 MTH2 的量下降为 1 月龄鼠的 43%，而 12 月龄鼠仅为 1 月龄鼠的 4.3%。该结果与免疫组化的结果一致。

在实施例 3 和 5 中，通过对 AD 动物模型的研究可以看出，MTH2 在对照组小鼠海马 CA1 和 CA3 区神经元胞浆内持续高表达，而在快速老化小鼠海马内随月龄增加而显著下降，且 MTH2 蛋白表达量下降 SAMP8 小鼠学习记忆能力的下降同步。免疫组化结果与免疫印迹研究的结果相符合，进一步提示海马神经元细胞中 MTH2 蛋白表达量的下降与 SAMP8 小鼠的快速老化及学习记忆能力的减退的相关性。

而在实施例 4 中，通过对 AD 患者海马标本的研究，可以看出相似的变化趋势，即 AD 组中 MTH2 的表达明显低于正常对照组，进一步证实了对动物模型研究的结论，即 MTH2 表达量下降与痴呆的发生有明显的相关性。

综上所述，免疫组化检测结果和免疫印迹结果均显示，海马中 MTH2 表达量下降是老年性痴呆有用的诊断标志。所以，本发明所述的免疫学方法检测可以用来确诊 AD。

应理解的是，虽然在本说明书中结合具体实施方式和具体实验条件解释了本发明，但是这些具体实施方式和条件仅仅为说明的目的，而非用于限制本发明的范围，在本领域技术人员公知的范围内对实验条件所作的各种改变也落在本发明所保护的范围内。

#### 参考文献

- [1] Cai JP, Ishibashi T, Takagi Y, et al. Mouse MTH2 protein which prevents mutations caused by 8-oxoguanine nucleotides. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003,305:1073-1077.
- [2] 黄艳, 董志. 氧化应激和阿尔茨海默病. *中国临床药理学与治疗学*, 2005, 10(5):485-488.
- [3] Wang S, Xiong J, Xie C, et al. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of Neurochemistry*, 2005, 93, 953-962.
- [4] Demple B, Harrison L. Repair of oxidative damage to DNA: enzymology and biology. *Annu Rev Biochem*, 1994, 63:915-948.
- [5] Maki H, Sekiguchi M. MutT protein specifically hydrolyses a potent mutagenic substrate

- for DNA synthesis. *Nature*, 1992, 355(6357):273-275.
- [6] Shibutani S, Takeshita M, Grollman AP. Insertion of specific bases during DNA synthesis past the oxidation-damaged base 8-oxodG. *Nature*, 1991, 349(6308):431-434.
- [7] Zhu X, Raina AK, Lee HG, et al. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res*, 2004, 1000:32-39.
- [8] Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 1994, 36:747-751.
- [9] Lovell MA, Xie C, Markesbery WR. Decreased base excision repair and increased helicase activity in Alzheimer's disease brain. *Brain Res*, 2000, 855(1):116-123.
- [10] Furuta A, Iida T, Nakabeppu Y, et al. Expression of hMTH1 in the hippocampi of control and Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 2001, 12(13):2895-2899.
- [11] 蔡剑平, 黑爱莲. 快速老化痴呆模型小鼠 SAMP8 学习记忆能力的增龄性变化. *中国神经免疫学和神经病学杂志*, 2005, 12(4):219-222.

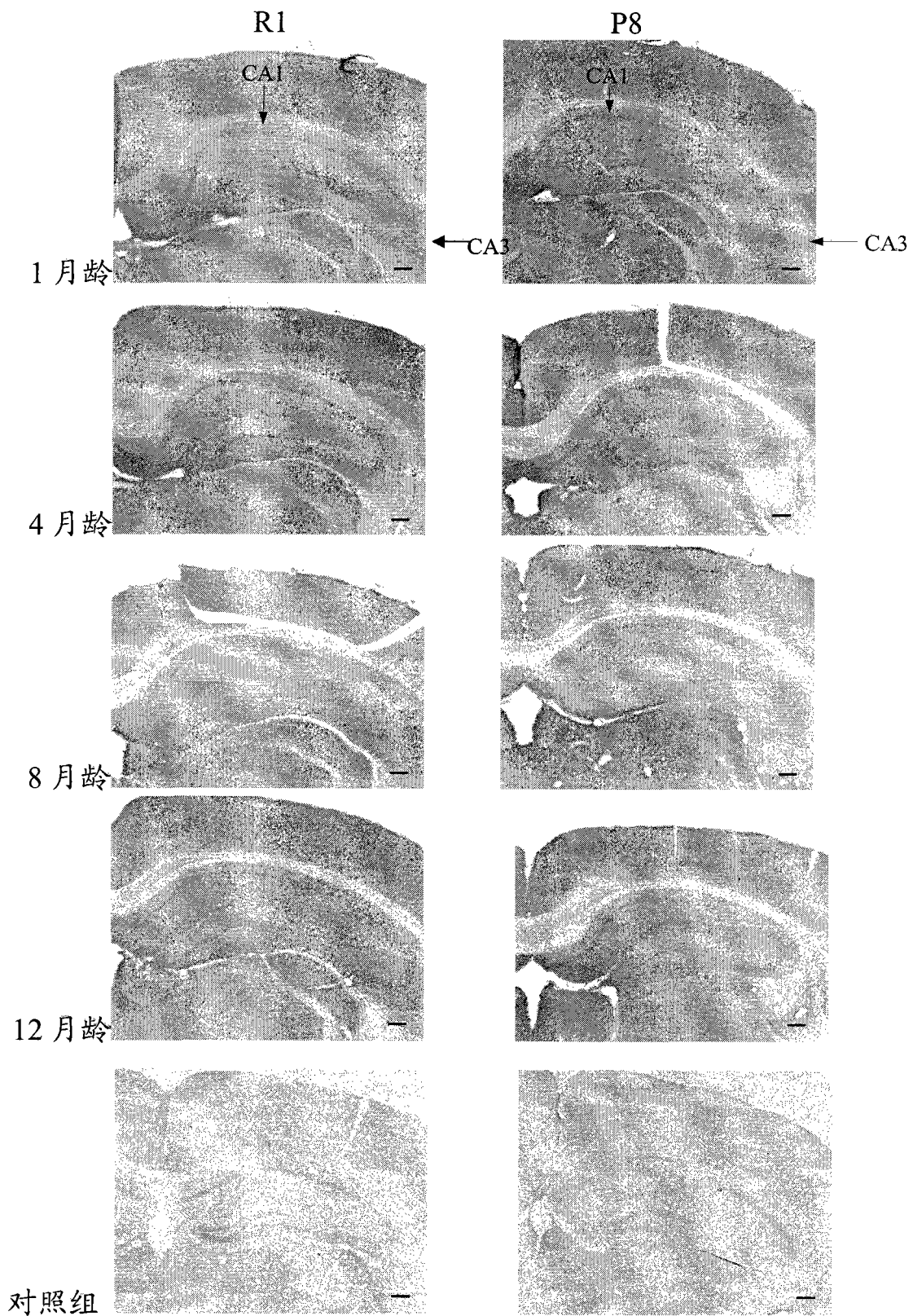


图 1

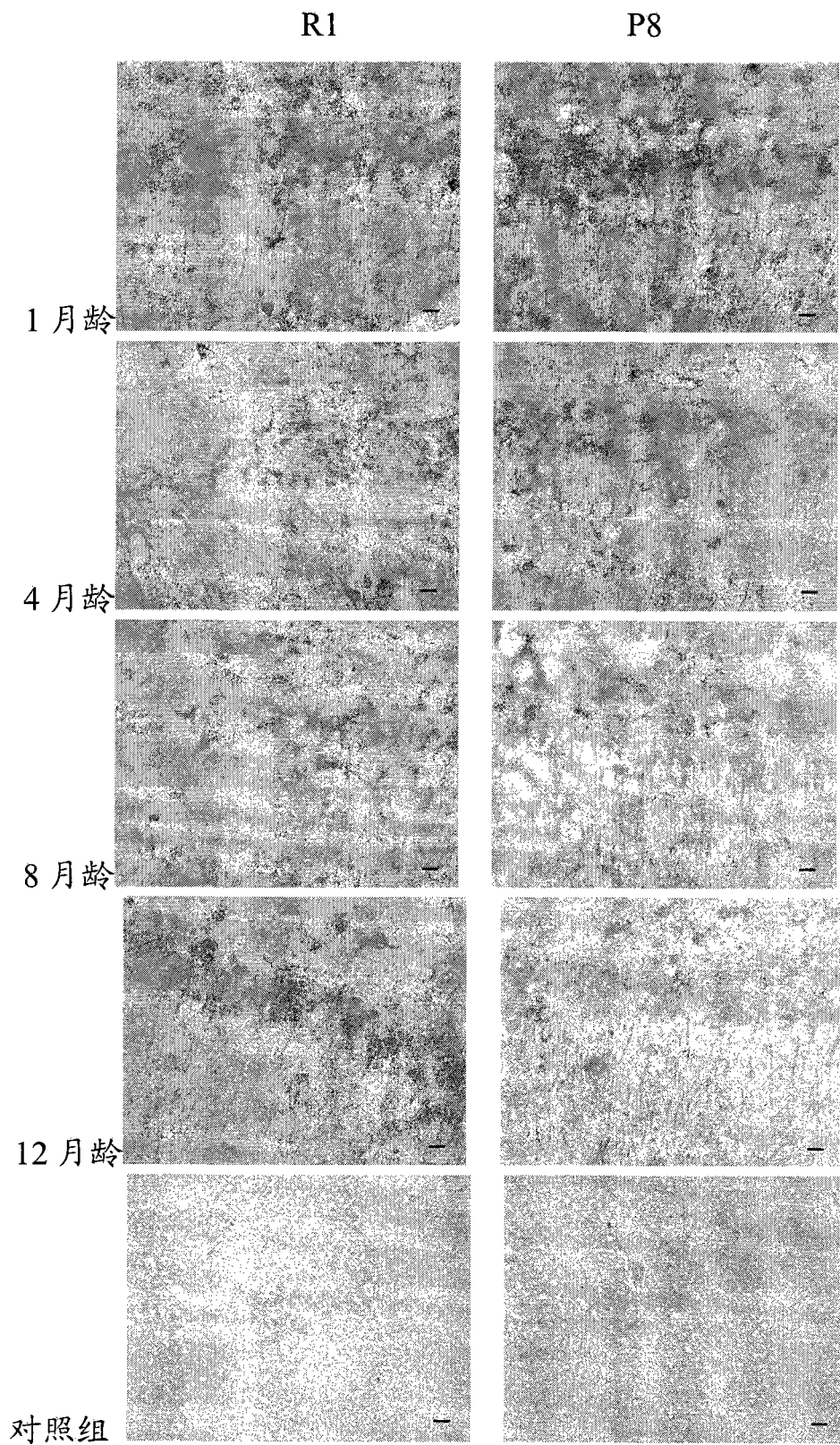


图 2A

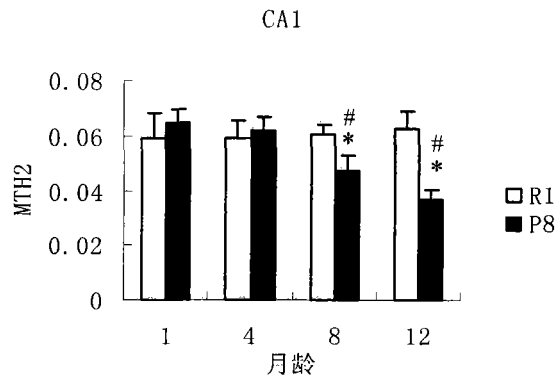


图 2B

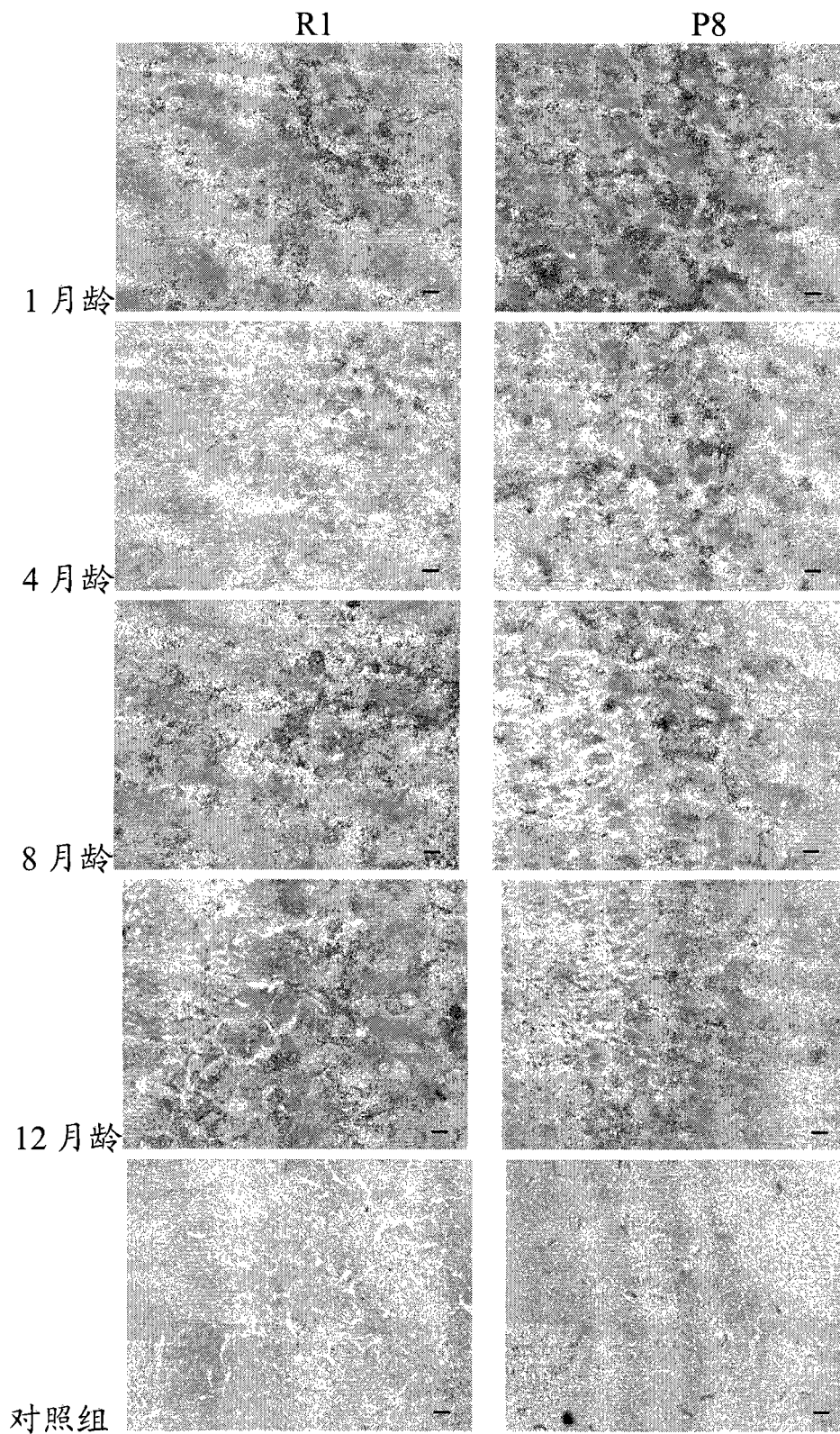


图 3A

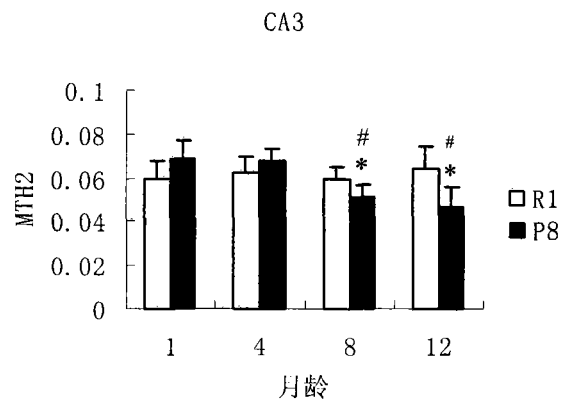


图 3 B

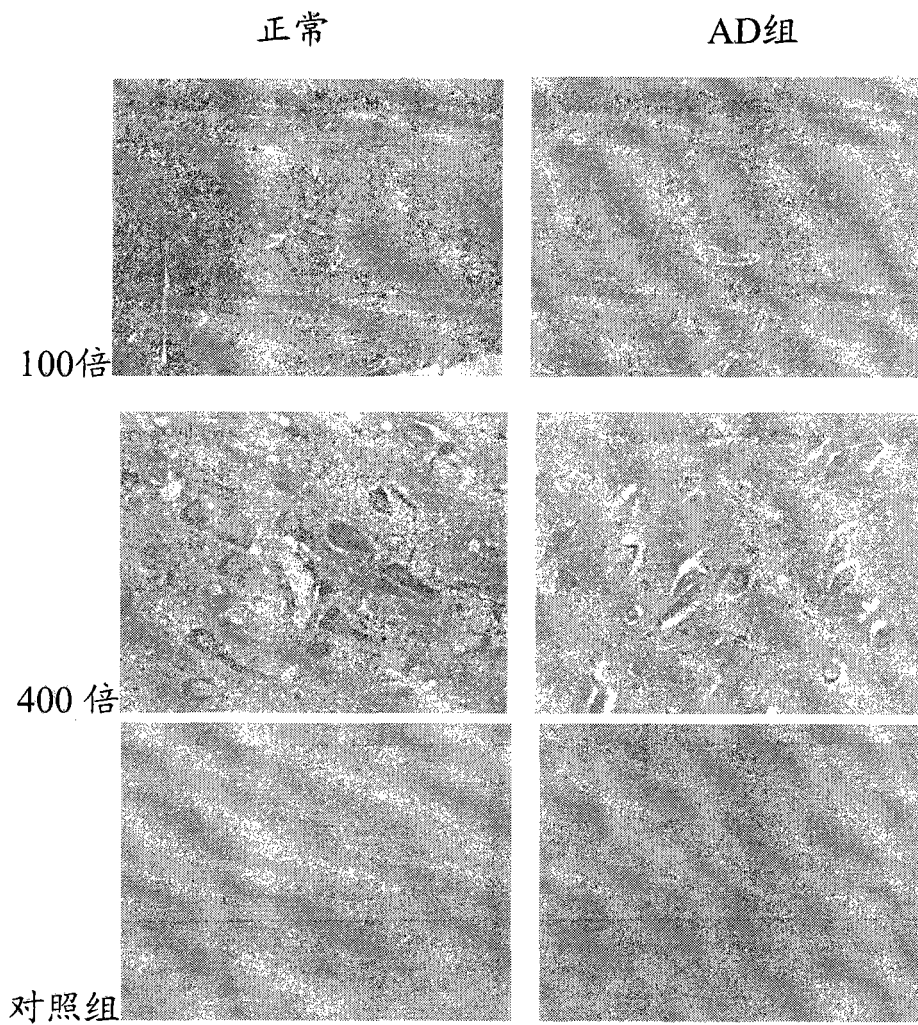


图 4

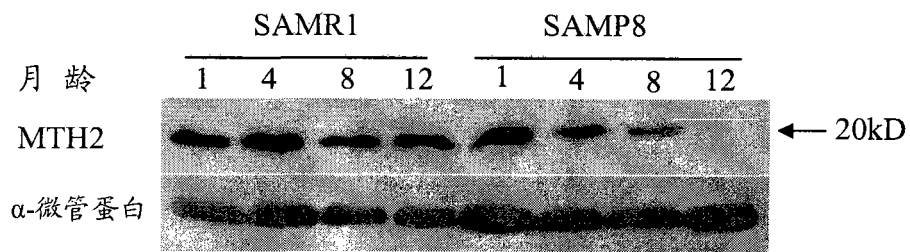


图 5A

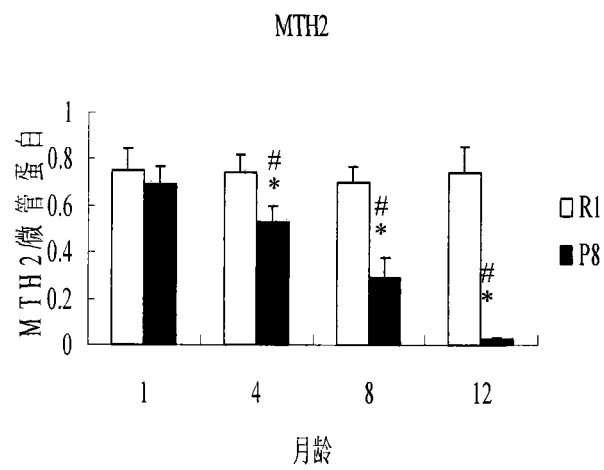


图 5B

专利名称(译)	辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒及其方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101275955A</a>	公开(公告)日	2008-10-01
申请号	CN200810105953.9	申请日	2008-05-08
[标]申请(专利权)人(译)	蔡剑平		
申请(专利权)人(译)	蔡剑平		
当前申请(专利权)人(译)	蔡剑平		
[标]发明人	蔡剑平 郑君德 黑爱莲 戴大鹏		
发明人	蔡剑平 郑君德 黑爱莲 戴大鹏		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/53		
代理人(译)	徐江华		
其他公开文献	CN101275955B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种辅助确诊老年性痴呆症的试剂盒及其方法。本发明基于抗氧化修复蛋白MTH2与老年性痴呆症，即阿尔茨海默病的相关性，在制备抗MTH2蛋白的抗体后，通过免疫学方法检测样本中MTH2蛋白的表达水平来辅助确诊老年性痴呆症。本发明提供的方法和试剂盒使得老年性痴呆症的检测和辅助确诊更加准确，具有十分积极的意义。

