



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101692092 A

(43) 申请公布日 2010.04.07

(21) 申请号 200910093266.4

(22) 申请日 2009.09.24

(71) 申请人 首都医科大学宣武医院
地址 100053 北京市宣武区长椿街 45 号

(72) 发明人 陈彪 徐胜利

(74) 专利代理机构 北京华科联合专利事务所
11130

代理人 王为

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/52(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

C12N 15/70(2006.01)

C12P 21/02(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

C07K 1/30(2006.01)

C12R 1/19(2006.01)

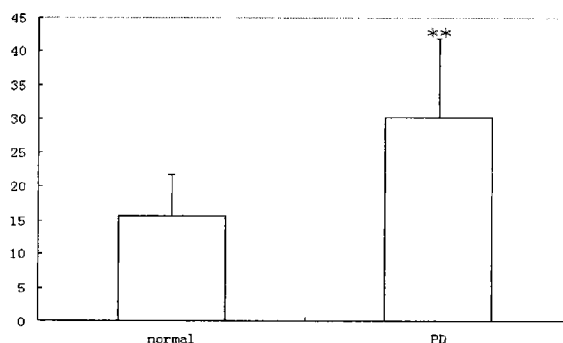
权利要求书 2 页 说明书 4 页 附图 2 页

(54) 发明名称

定量检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种定量检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的方法,本发明用抗原:重组人 α -突触核蛋白和抗体:兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体制备成试剂盒,用抗原抗体反应原理检测帕金森病人和正常健康人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在数量并进行比较,试剂盒采用显色反应来判断人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在与否和数量多少。



1. 定量检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的试剂盒，其特征在于所述试剂盒包括：人 α -突触核蛋白和抗人 α -突触核蛋白抗体。

2. 权利要求 1 的试剂盒，其特征在于，还含有以下辅助试剂，

抗原稀释液：0.05M 碳酸缓冲液

抗体与血清稀释液：10% BSA/PBS

洗板液：0.1% (v/v)Tween-20/PBS

封闭液：10% BSA/PBS

标记二抗：AP- 山羊抗兔 IgG；AP- 山羊抗人 IgG

显色底物：p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System 96 孔 ELISA 板。

3. 一种人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的定量检测方法，其特征在于，用人 α -突触核蛋白和抗人 α -突触核蛋白抗体进行反应，用反应结果的显色程度来检测人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在和数量。

4. 权利要求 3 的检测方法，其特征在于，包括用权利要求 2 的试剂盒进行检测的步骤。

5. 权利要求 4 的检测方法，其特征在于，所述用权利要求 2 的试剂盒进行检测包括以下步骤：

1) 包板：人 α -突触核蛋白 10 μ g/ml，碳酸缓冲液溶解 100 μ l/孔包被 96 孔 ELISA 板，4 $^{\circ}$ C，24 小时；

2) 洗板：用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS 或 PBS-T 200 μ l/孔洗板 3 次，每次 5 分钟；

3) 封闭：采用含 10% BSA/PBS 200 μ l/孔封闭 1 小时；

4) 加样：在 96 孔板的 1~3 列加入从 1:10000~1:640000 不同稀释度的兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体 100 μ l/孔，20%山羊正常血清/PBS 稀释，每个稀释度 3 个做 3 个复孔。9~12 列加入稀释的人血清样本 100 μ l/孔，1:100，20%山羊正常血清/PBS 稀释，每个样本做 3 个复孔。4 $^{\circ}$ C，过夜；

5) 洗板：用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS 或 PBS-T 200 μ l/孔洗板 3 次，每次 5 分钟；

6) 加入标记二抗：在 1~3 列的兔多抗样本加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG 100 μ l/孔，1:5000，10% BSA/PBS 稀释，9~12 列人血清样本加入碱性磷酸酶标记山羊抗人 IgG 100 μ l/孔，1:5000，10% BSA/PBS 稀释，室温孵育 1 小时；

7) 洗板：用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS 或 PBS-T 200 μ l/孔洗板 3 次，每次 5 分钟；

8) 显色：加入显色底物：p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System，100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C，30 分钟；

9) 终止显色反应：3N NaOH 100 μ l/孔终止显色反应；

10) 检测吸光度：酶标仪 405nm 测吸光度；

11) 抗体单位值计算。

6. 一种帕金森病的诊断方法，其特征在于，包括以下步骤：

步骤 1、人 α -突触核蛋白的制备

- 步骤 2、抗 α -突触核蛋白多克隆抗体的制备
- 步骤 3、帕金森病人和正常健康人血清的制备
- 步骤 4、血清中自体 α -突触核蛋白抗体的检测
- 步骤 5、比较检测结果。

7. 权利要求 6 的诊断方法，其特征在于，包括使用权利要求 2 的诊断试剂盒对人血清中自体 α -突触核蛋白抗体进行检测的步骤。

8. 权利要求 1 的试剂盒，其中人 α -突触核蛋白的制备如下：

pGEX-h α -SYN 重组质粒常规转化 BL21 感受态细胞，取 1 菌落植入 10ml 2×YTA-amp 液体培养基（每升含 16g 蛋白胨、10g 酵母提取物、5g NaCl 和 0.1g 氨苄青霉素）37℃振荡过夜，预培养后转移至 1 升新鲜的 2×YTA-amp 培养基中，37℃振荡培养 3h 后加 IPTG 诱导蛋白表达，继续培养 4h 后收获细菌，以冰冷 PBS 悬浮细菌，超声破碎细菌后离心，上清经谷胱甘肽-Sephrose 亲和层析纯化得到 GST-h α -SYN 融合蛋白，再经凝血酶分解、酶切过柱纯化得到重组人 α -突触核蛋白。

9. 权利要求 1 的试剂盒，其中抗人 α -突触核蛋白抗体的制备如下：

家兔 4 只，免疫前采血，制备血清备用；2ml α -突触核蛋白溶液与等量的经充分震荡的福氏完全佐剂充分乳化；每只动物接受 0.8ml 乳化后的抗原溶液皮下注射，初次免疫 14 天后，采血制备抗血清，检测免疫效果；初次免疫 4 周后，动物接受强化免疫，2 周后，采血制备抗血清；采取硫酸铵盐析法分离纯化抗体。

10. 权利要求 1 的试剂盒，其特征在于，使用过程中，血清样品的采集方法如下：收集静脉血在采血管中，避免溶血；缓慢地上下振荡采血管 5 次，使血液中的凝结块混匀；室温垂直放置 1 小时，使血液凝结；室温下，用离心机以 2000g 离心 10 分钟；吸取上清液，分装到对应的已标记样品管中。

定量检测人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体的方法

技术领域：

[0001] 本发明涉及一种人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体的检测方法，该方法可用于帕金森病的诊断。

背景技术：

[0002] 帕金森病 (Parkinsons disease, PD) 是一种发病率仅次于老年痴呆的老年神经退行性疾病，其主要病理特征以中脑黑质致密部多巴胺能神经元进行性丢失和残留神经细胞浆内出现嗜酸性包涵体，称路易小体。 α - 突触核蛋白是构成路易小体的主要成分，主要以聚集体的形式存在。在帕金森病的发病过程中，高水平的 α - 突触核蛋白可形成对多巴胺能神经元具有毒性的变构形式，而这种变构形式有可能在多巴胺能神经元死亡的局部微环境形成可导致自体抗体产生，进而在帕金森病人的血清中出现自体 α - 突触核蛋白抗体水平增高。到目前为止，只有一篇文献报道了在希腊的家族性帕金森病人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体水平增高，而且存在着病例少和定量方法不完善等缺陷。目前，帕金森病的诊断主要依靠运动症状和医生的经验，有较高的误诊率。临床病理研究表明，在散发性帕金森病的诊断中，至少有 24% 的误诊率。此外，由于帕金森病患者黑质多巴胺能神经元死亡特征表现为进行性死亡，只有当黑质多巴胺能神经元死亡达到了 70% 左右时，才开始出现运动症状，而这时已经是黑质多巴胺能神经元死亡的晚期。此时除了补充多巴胺的对症疗法外，并无根治疗法，势必严重影响病人的生活质量和给社会和家庭增加沉重的负担。因此早期发现、诊断帕金森病对于及时治疗、保护多巴胺能神经元、延缓病情、改善患者的生活质量具有十分重要的意义。

[0003] 本发明研究出检测人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体的方法，可用于对帕金森病的诊断，是筛选帕金森病高危人群和临床诊断帕金森病的重要手段。

发明内容：

[0004] 本发明提供一种帕金森病的诊断方法，其中包括人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体的检测方法。

[0005] 本发明用抗原 (重组人 α - 突触核蛋白) 和抗体 (兔抗人 α - 突触核蛋白多克隆抗体) 制备成试剂盒，用抗原抗体反应原理检测帕金森病人和正常健康人血清中的自体 α - 突触核蛋白抗体的存在数量并进行比较，试剂盒采用显色反应来判断人血清中的自体 α - 突触核蛋白抗体的存在与否和数量多少。

[0006] 本发明的帕金森病的诊断方法包括以下步骤：

[0007] 步骤 1、人 α - 突触核蛋白的制备

[0008] 步骤 2、抗 α - 突触核蛋白多克隆抗体的制备

[0009] 步骤 3、帕金森病人和正常健康人血清的制备

[0010] 步骤 4、人血清中自体 α - 突触核蛋白抗体的检测

[0011] 步骤 5、比较检测结果

[0012] 本发明的疾病诊断方法包括使用诊断试剂对人血清中自体 α -突触核蛋白抗体进行检测。

[0013] 因此本发明包括诊断试剂盒。

[0014] 本发明的诊断试剂盒的组成包括：

[0015] 抗原(重组人 α -突触核蛋白)

[0016] 抗体(兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体)

[0017] 本发明的试剂盒还包括以下辅助组成成分用于抗原抗体的反应测定。

[0018] 抗原稀释液(0.05M 碳酸缓冲液, pH 9.6)

[0019] 抗体与血清稀释液(10% BSA/PBS)

[0020] 洗板液(0.1% (v/v)Tween-20/PBS)

[0021] 封闭液(10% BSA/PBS)

[0022] 标记二抗(AP-山羊抗兔 IgG ; AP-山羊抗人 IgG)

[0023] 显色底物(p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System, Sigma)96 孔 ELISA 板。

[0024] 本发明的试剂盒,各试剂分别包装,优选使用包装管,每个包装管中装入试剂的量以够一个样本使用量为基本量,可以扩大到 10 个,100 个,1000 个样本的使用量。

[0025] 本发明还包括的人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的检测方法,该方法包括以下步骤:

[0026] 抗原(重组人 α -突触核蛋白)和抗体(兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体)进行反应,根据反应显色的差异判断人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在与否和数量多少。

[0027] 采用本发明试剂盒进行检测的方法如下:

[0028] 1)包板:人 α -突触核蛋白(10 μ g/ml,碳酸缓冲液溶解)100 μ l/孔包被 96 孔 ELISA 板,4 $^{\circ}$ C,24 小时。

[0029] 2)洗板:用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS(PBS-T)200 μ l/孔洗板 3 次,每次 5 分钟。

[0030] 3)封闭:采用含 10% BSA/PBS 200 μ l/孔封闭 1 小时。

[0031] 4)加样:在 96 孔板的 1~3 列加入从 1:10000~1:640000 不同稀释度的兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体 100 μ l/孔(20%山羊正常血清/PBS 稀释),每个稀释度 3 个做 3 个复孔。9~12 列加入稀释的人血清样本 100 μ l/孔(1:100,20%山羊正常血清/PBS 稀释),每个样本做 3 个复孔。4 $^{\circ}$ C,过夜。

[0032] 5)洗板:用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS(PBS-T)200 μ l/孔洗板 3 次,每次 5 分钟。

[0033] 6)加入标记二抗:在 1~3 列的兔多抗样本加入碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG100 μ l/孔(1:5000,10% BSA/PBS 稀释),9~12 列人血清样本加入碱性磷酸酶标记山羊抗人 IgG 100 μ l/孔(1:5000,10% BSA/PBS 稀释),室温孵育 1 小时。

[0034] 7)洗板:用含 0.1% (v/v)Tween-20 的 PBS(PBS-T)200 μ l/孔洗板 3 次,每次 5 分钟。

[0035] 8)显色:加入显色底物(p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System,

Sigma)100 μ l/ 孔, 37 $^{\circ}$ C, 30 分钟。

[0036] 9) 终止显色反应: 3N NaOH 100 μ l/ 孔终止显色反应。

[0037] 10) 检测吸光度: 酶标仪 405nm 测吸光度。

[0038] 11) 抗体单位值计算

[0039] 将最高稀释度 1 : 640000 设置为含 1 抗体单位, 依次 1 : 320000 为 2 抗体单位, 1 : 160000 为 4 抗体单位, 1 : 80000 为 8 抗体单位, 1 : 40000 为 16 抗体单位, 1 : 20000 为 32 抗体单位, 1 : 10000 为 64 抗体单位。根据各抗体单位的平均吸光度, 作出标准曲线。根据线性相关公式, 可计算出血清样本含自体抗人 α -突触核蛋白抗体的相对量。如: 80314 血清 3 个复孔的吸光度分别是 0.84973, 0.86223, 0.69677。吸光度均值为 0.80291。根据公式可计算出该血清中自体人 α -突触核蛋白抗体的相对量是 37.27744。

[0040] 本发明的试剂盒, 其中重组人 α -突触核蛋白的制备如下:

[0041] pGEX-h α -SYN 重组质粒(由美国帕金森氏病研究所馈赠)常规转化 BL21 感受态细胞, 取 1 菌落植入 10ml 2 \times YTA-amp 液体培养基(每升含 16g 蛋白胨、10g 酵母提取物、5g NaCl 和 0.1g 氨苄青霉素)37 $^{\circ}$ C 振荡过夜, 预培养后转移至 1 升新鲜的 2 \times YTA-amp 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h 后加 IPTG(最终浓度 0.1mmol/L)诱导蛋白表达, 继续培养 4h 后收获细菌, 以冰冷 PBS 悬浮细菌, 超声破碎细菌后离心, 上清经谷胱甘肽-Sephrose 亲和层析纯化得到 GST-h α -SYN 融合蛋白, 再经凝血酶分解、酶切过柱纯化得到重组人 α -突触核蛋白。冷冻干燥, -80 $^{\circ}$ C 保存待用。BCA 法定量 α -突触核蛋白。Western Blot 鉴定重组 α -突触核蛋白(图 1)。兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体的制备如下:

[0042] 家兔 4 只, 免疫前采血, 制备血清备用。2ml α -突触核蛋白溶液(1mg/ml)与等量的经充分震荡的福氏完全佐剂充分乳化。每只动物接受 0.8ml 乳化后的抗原溶液皮下注射, 初次免疫 14 天后, 采血制备抗血清, 检测免疫效果。初次免疫 4 周后, 动物接受强化免疫, 2 周后, 采血制备抗血清。采取硫酸铵盐析法分离纯化抗体, Western Blot 检测抗体的特异性和敏感性(图 2)。

[0043] 在使用本发明的试剂盒时, 需要采集帕金森病人和正常健康人对照血清, 所述对照血清的制备方法如下:

[0044] 收集静脉血在采血管(BD 公司)中, 避免溶血。缓慢地上下振荡采血管 5 次, 使血液中的凝结块混匀。室温(25 $^{\circ}$ C)垂直放置 1 小时, 使血液凝结。(血液必须精确凝结 1 小时, 否则, 样品凝结时间不同可能会导致差异)。室温下, 用离心机以 2000g 离心 10 分钟。吸取上清液, 分装(10 μ l/ 管)到对应的已标记样品管中。立即冻存血清样品于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱。避免反复冻融。

[0045] 在本发明的试验中, 其中使用的试剂和原材料包括: pGEX-h α -SYN 重组质粒均可从市场上购买得到, 属于公知技术。

附图说明:

[0046] 图 1 为 96 孔 ELISA 板示意图。

[0047] 图 2 为标准曲线图

[0048] 图 3 为重组人 α -突触核蛋白的鉴定

[0049] 图 4 为兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体的鉴定

[0050] 图 5 为帕金森病人血清中自体 α -突触核蛋白抗体含量明显高于正常健康对照

[0051] 本发明的方法操作简单，灵敏度高，检测费用少，成本低，结果准确，可提前诊断，具有良好的医用效果。

具体实施方式：

[0052] 以下通过实施例进一步说明本发明，但不作为对本发明的限制。

[0053] 实施例 1

[0054] 1. 原核表达、纯化和鉴定重组人 α -突触核蛋白

[0055] WESTERN BLOT 结果显示，50 ~ 1000ng 的纯化后的重组人 α -突触核蛋白与小鼠抗人单克隆抗体(3D5)结合后，显示了大小不等的阳性条带，蛋白分子量的大小大约为 18kD 左右，与人 α -突触核蛋白分子量一致，证明重组表达的蛋白为以人 α -突触核蛋白(图 3)。

[0056] 2. 兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体生产

[0057] 采用重组表达的人 α -突触核蛋白免疫家兔后，收获的抗血清进行的 WESTERN BLOT 结果显示，抗血清可在 1 : 30000 的稀释度明显显示重组表达的人 α -突触核蛋白，表明该兔抗血清和抗原有很好的亲和力；而大鼠脑匀浆的结果显示，在 1 : 10000 的稀释度，该抗体仅显示了与 α -突触核蛋白分子量大小吻合的一个条带，表明该抗血清有较好的特异性。

[0058] 实施例 2

[0059] 试剂盒的制备：

[0060] 试剂盒构成：96 孔 ELISA 板(康宁公司)、包被抗原(重组人 α -突触核蛋白)、标准抗体(兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体)、抗原稀释液(0.05M 碳酸缓冲液，pH 9.6)、抗体与血清稀释液(10% BSA/PBS)、洗板液(0.1% (v/v)Tween-20/PBS)、封闭液(10% BSA/PBS)、标记二抗(AP-山羊抗兔 IgG；AP-山羊抗人 IgG)、显色底物(p-Nitrophenyl Phosphate Liquid Substrate System, Sigma)有关稀释液，洗板液，封闭液，标记二抗，显色底物的组成和配制方法属于公知技术。

[0061] 实施例 3

[0062] 血清样本中自体人 α -突触核蛋白抗体的检测

[0063] 采用相对定量 ELISA 法，对 116 例临床诊断的帕金森病人和 78 例健康对照血清中自体 α -突触核蛋白抗体进行了检测。结果显示帕金森病人血清中自体 α -突触核蛋白抗体含量为 30.3 ± 11.69 抗体单位，帕金森病人中血清中自体 α -突触核蛋白抗体最高值为 64.72567；而正常健康对照血清该抗体含量为 15.7 ± 5.99 抗体单位，最高值为 27.665。帕金森病人血清中自体 α -突触核蛋白抗体含量明显高于正常健康对照 ($p < 0.01$)。图 5. 相对定量 ELISA 法检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体含量。 ** $p < 0.01$ 。

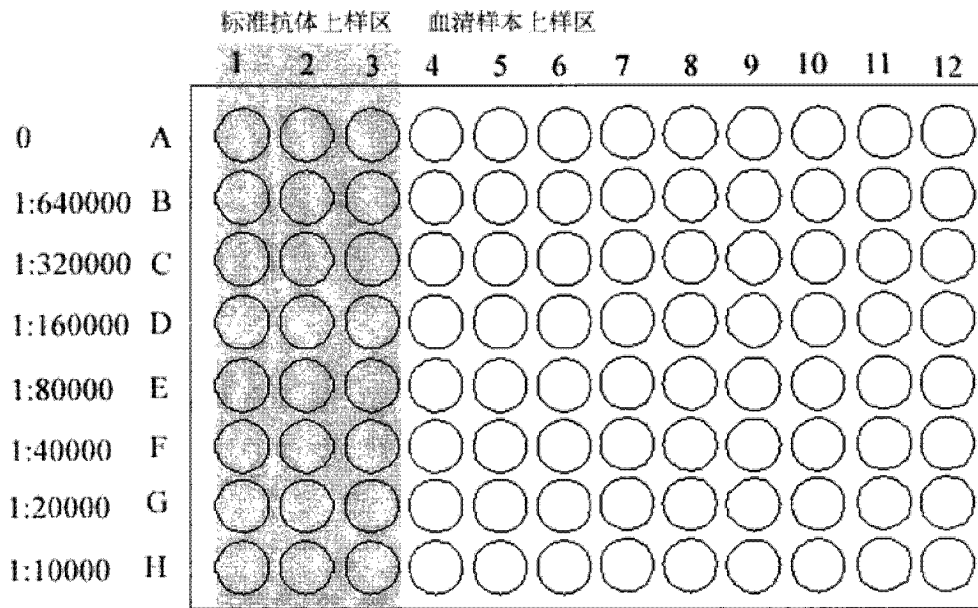


图 1

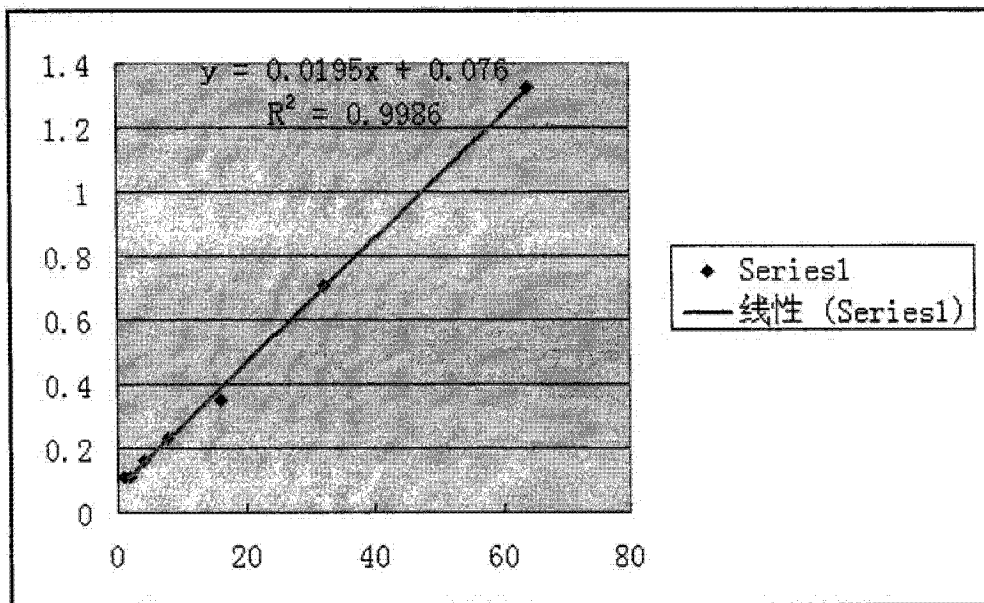
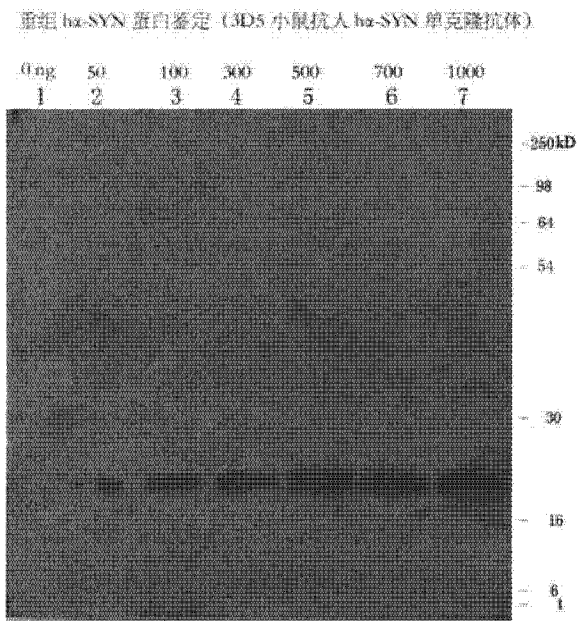


图 2



兔抗人 hα-SYN 多克隆抗体鉴定

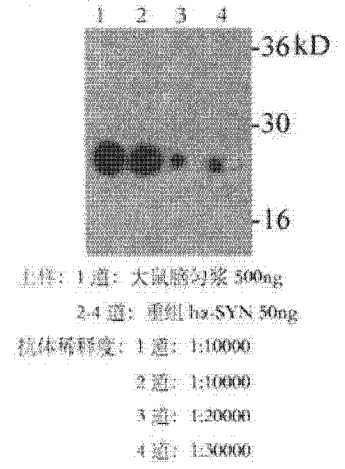


图 4

图 3

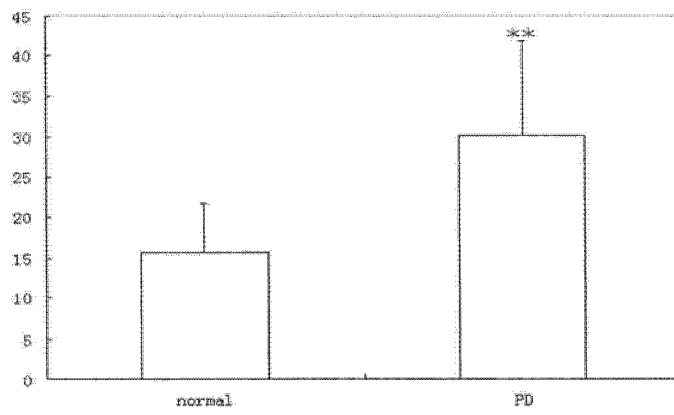


图 5

专利名称(译)	定量检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的方法		
公开(公告)号	CN101692092A	公开(公告)日	2010-04-07
申请号	CN200910093266.4	申请日	2009-09-24
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学宣武医院		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学宣武医院		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学宣武医院		
[标]发明人	陈彪 徐胜利		
发明人	陈彪 徐胜利		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/543 G01N33/52 G01N33/531 C12N15/70 C12P21/02 C07K16/18 C07K1/30 C12R1/19		
代理人(译)	王为		
其他公开文献	CN101692092B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种定量检测人血清中自体 α -突触核蛋白抗体的方法，本发明用抗原：重组人 α -突触核蛋白和抗体：兔抗人 α -突触核蛋白多克隆抗体制备成试剂盒，用抗原抗体反应原理检测帕金森病人和正常健康人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在数量并进行比较，试剂盒采用显色反应来判断人血清中的自体 α -突触核蛋白抗体的存在与否和数量多少。

