



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110297086 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201910589203.1

(22)申请日 2019.07.02

(71)申请人 安徽医科大学

地址 230032 安徽省合肥市梅山路81号

(72)发明人 刘超 刘丽华 申才良 刘畅

王振振

(74)专利代理机构 安徽汇朴律师事务所 34116

代理人 刘海涵

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

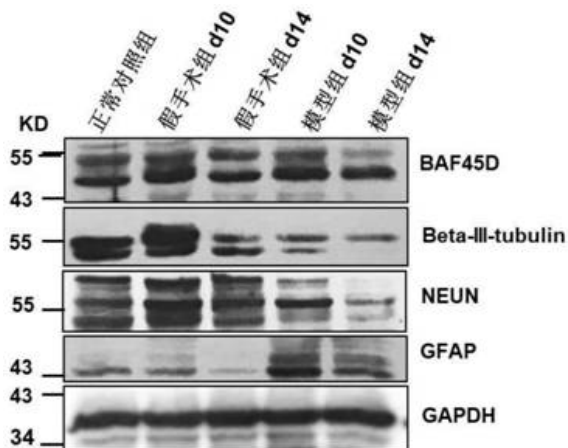
权利要求书1页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用

(57)摘要

本发明提供一种检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品及其应用,涉及病理学检测领域,本发明通过检测BAF45D蛋白在脊髓室管膜细胞中的表达量,可有效地判断对应的脊髓室管膜细胞是否为受损的脊髓细胞,从而有助于实现脊髓损伤准确检测的目的。



1. 检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用,其特征在于,所述检测BAF45D蛋白表达量为检测脊髓室管膜细胞中的BAF45D蛋白表达量。

2. 根据权利要求1上述的应用,其特征在于,所述检测BAF45D蛋白表达量为检测神经元细胞中的BAF45D蛋白表达量。

3. 根据权利要求1或2所述的应用,其特征在于,所述检测BAF45D蛋白表达量的系统包括通过免疫组化和免疫荧光方法检测BAF45D蛋白表达量所需的试剂和/或仪器。

4. 以BAF45D蛋白为标记物的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用,其特征在于,所述BAF45D蛋白为脊髓室管膜细胞中的BAF45D蛋白。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述BAF45D蛋白为神经元细胞中的BAF45D蛋白。

检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及创伤脊髓损伤的病理学检测领域,特别是涉及一种检测BAF45D 蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品及其应用。

背景技术

[0002] 脊髓损伤(Spinal cord injury,SCI)致运动、感觉和自主神经功能障碍,使病人面临多种后遗症和并发症,严重损害生活质量,目前仍缺乏有效治愈手段。Lancet Neurology 2019年最新文章报道:(截止2016年)世界范围内SCI患者约超过2700万,新增约93万例;我国脊髓损伤患者约超过370万,新增近10 万例;随着人口增长,脊髓损伤病例数逐年增高,不仅给病人带来身体和心理严重伤害,还对整个社会造成巨大经济负担;针对脊髓损伤的预防、治疗和康复是当今医学界的一大课题。近年来,干细胞技术不断进展,有望为解决这一热点和难点问题提供新的途径。目前干细胞移植治疗脊髓损伤日益受到重视,其中神经干细胞(Neural stem cell,NSC)是重要的细胞来源之一。脊髓室管膜细胞(Spinal cord ependymal cell,SCEC)属于脊髓来源神经干细胞,是脊髓损伤后细胞修复的重要资源,也是脊髓损伤后神经再生的关键。已经有报道证实脊髓内源性神经干细胞治疗脊髓损伤的较好安全性和有效性。然而,脊髓损伤后的局部微环境主要控制着脊髓室管膜细胞形成神经胶质细胞,这不利于脊髓室管膜细胞形成新的神经元。有报道称,在脊髓室管膜细胞中表达的BMP拮抗剂Noggin可以阻止脊髓室管膜细胞向胶质细胞分化,促进其向神经元分化。因此,操纵脊髓室管膜细胞,以促进脊髓室管膜细胞向神经元分化是目前的脊髓损伤后细胞治疗的关键之一。因此,了解脊髓室管膜细胞在脊髓损伤前后的变化对利用神经再生治疗脊髓损伤具有重要意义。要实现这一目标,需要找到特征性的标记物来标记脊髓室管膜细胞和神经元,特别是该标记物在脊髓损伤后脊髓室管膜细胞和神经元中的表达是否不同于正常脊髓,而明确这些表达的不同对了解脊髓损伤的病理机制和治疗都有重要意义。

发明内容

[0003] 本发明主要解决的技术问题是提供一种检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用,以为明确脊髓损伤的病理机制和治疗提供指导方法。

[0004] 本发明提供一种检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用,所述检测BAF45D蛋白表达量为检测脊髓室管膜细胞中的BAF45D蛋白表达量。

[0005] 进一步,所述检测BAF45D蛋白表达量为检测神经元细胞中的BAF45D蛋白表达量。

[0006] 进一步,所述检测BAF45D蛋白表达量的系统包括通过免疫组化和免疫荧光方法检测BAF45D蛋白表达量所需的试剂和/或仪器。

[0007] 本发明还提供一种以BAF45D蛋白为标记物的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用,所述BAF45D蛋白为脊髓室管膜细胞中的BAF45D 蛋白。

[0008] 进一步,所述BAF45D蛋白为神经元细胞中的BAF45D蛋白。

[0009] 本发明相比于现有技术具有以下优点:

[0010] 本发明通过检测BAF45D蛋白在脊髓室管膜细胞中的表达量,可有效地判断对应的脊髓室管膜细胞是否为受损的脊髓细胞,从而有助于实现脊髓损伤准确检测的目的。

附图说明

[0011] 图1.大鼠脊髓损伤后后肢运动功能评分的变化图;

[0012] 图2.免疫组织化学检测大鼠脊髓损伤后脊髓室管膜细胞表达BAF45D蛋白的变化图;

[0013] 图3.免疫荧光双标检测大鼠脊髓损伤后室管膜细胞同时表达BAF45D和GFAP 蛋白的变化图;

[0014] 图4.是免疫荧光双标检测大鼠脊髓损伤后神经元同时表达BAF45D和NEUN 蛋白的变化图;

[0015] 图5.是western blot检测大鼠脊髓损伤后表达神经元和神经胶质细胞相关蛋白的变化图。

具体实施方式

[0016] 下面对本发明的实施例作详细说明,本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施,给出了详细的实施方式和具体的操作过程,但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

[0017] 实施例1

[0018] 1.方法

[0019] 1.1大鼠脊髓损伤模型建立

[0020] 取体重180g~220g SD大鼠,随机分组,称重,按照0.33ml/100g 10%水合氯醛腹腔注射麻醉。以第10胸椎(T10)为中心,用推子推去大鼠背部皮肤。俯卧位固定大鼠四肢及头部。用碘伏消毒背部皮肤,以T10为中心,纵行切开4 cm左右背部皮肤,分离皮下筋膜,切开脊椎两旁肌肉,暴露T10棘突及椎板。用微型咬骨钳咬去T10棘突及椎板,充分暴露脊髓。将一重10g铁锤底部以高2 cm(2~2.5cm)处自由落体,撞击在大鼠硬膜囊上,观察到大鼠双下肢抽动,迅速伸直及回缩,打击局部脊髓由白色变为暗红色淤血水肿。用温生理盐水清洗手术野,依次缝合肌肉,筋膜和皮肤。用酒精擦除大鼠背部手术切口处血迹。待老鼠麻醉醒后,放入笼子继续饲养。术后行BBB评分,12h按压大鼠膀胱辅助排尿,待大鼠自主排尿功能恢复,术后连续3天注射抗生素,预防感染。

[0021] 1.2采用BBB评分方法检测大鼠后肢运动功能

[0022] 术后第二天进行旷场试验(设置直径至少2m的空间)。按照双盲原则,测试时间为单只4分钟,观察动物的臀、膝、踝关节行走、躯干运动及其协调情况,评判动物后肢各关节活动。

[0023] BBB评分标准如下:

- [0024] 0分:无可见后肢运动
- [0025] 1分:一或两个关节轻微运动,通常为髋和/或膝关节
- [0026] 2分:一个关节广泛活动或一个关节广泛活动且有另一关节轻微活动
- [0027] 3分:两个关节广泛活动
- [0028] 4分:后肢全部三个关节可轻微活动
- [0029] 5分:两个关节轻微活动,第三个关节可广泛活动
- [0030] 6分:两个关节广泛活动,第三个关节可轻微活动
- [0031] 7分:后肢全部三个关节可广泛活动
- [0032] 8分:非承重情况下可以爪掌面着地
- [0033] 9分:间或爪掌面承重支撑或爪背面承重移动,无爪掌面支撑移动
- [0034] 10分:偶见爪掌面承重移动;无前后肢协调动作
- [0035] 11分:可较多的见到掌面承重移动,但无前后肢协调动作
- [0036] 12分:可较多的见到掌面承重移动,偶见前后肢协调动作
- [0037] 13分:常见掌面承重移动,可常见前后肢协调动作
- [0038] 14分:有持续性掌面承重移动和前后肢协调动作;或出现常见的掌面移动,持续型前后肢协调动作,偶有爪背侧移动

[0039] 2. 结果

[0040] 参考图1(图中D0,D1,D3,D7,D10,D14分别代表脊髓损伤后的不同时间。正常对照组,假手术组和脊髓损伤组的后肢功能评分的统计结果见图。和正常组和假手术组比较,脊髓损伤组的后肢功能评分(BBB scores)明显下降 (**,P<0.01),正常组与假手术组相比较,术后一天假手术组BBB评分无明显差异,损伤组BBB评分明显降低(P<0.01),提示造模成功。

[0041] 实施例2

[0042] 1. 方法、

[0043] 1.1石蜡包埋

[0044] 1.1.1取材取新鲜组织(要求死后不超过6h,否则组织发生自溶),动手取大小约3mm×5mm×2mm组织块。

[0045] 1.1.2固定常用固定液有10%中性甲醛、4%多聚甲醛等。固定时间视组织大小和性质确定,一般24-48小时。

[0046] 1.1.3冲洗首先将组织块从固定液中取出,放入脱水框。再将脱水框移置自来水龙头下,流水冲洗约10小时,目的是停止固定液对组织的作用,同时去除固定液,以免影响染色。

[0047] 1.1.4脱水脱水酒精的浓度必须由低浓度逐级升高浓度。在控制面板上设置脱水时间,一般从70%酒精(150min)→80%酒精(110min)→90%酒精(110 min)→95%酒精I(110min)→95%酒精II(110min)→再到100%酒精I(100min)→100%酒精II(100min)。

[0048] 1.1.5透明透明剂最常用是二甲苯。通常采取的方法是:二甲苯I(40min)→二甲苯II(40min)。

[0049] 1.1.6浸蜡将透明组织移入已熔化的石蜡中,使熔化的石蜡能浸透到组织中,浸蜡温度不能超过60℃,通常采取的方法是:→石蜡I(30min)→石蜡 II(1h)→石蜡III(1h)。

[0050] 1.1.7包埋首先将脱水框放入融化的蜡盘中,将石蜡液注满包埋框,用镊子取一组织块,放入包埋框底部,注意在放置过程中保持平稳,组织块切面朝下;待石蜡液即将凝固时,贴上纸质标签,以便于辨认组织。

[0051] 1.1.8切片,切片步骤在切片机上完成。首先固定石蜡块,调节切片厚度,一般设置在4微米左右,然后进行切片,将切好的切片放入45摄氏度漂烘仪内进行展片。

[0052] 1.1.9裱片待蜡片展平后,用一干净的载玻片进行裱片,放入切片架上。

[0053] 1.1.10烤片将裱好的切片放置90℃温箱2 min进行烤片,使切片粘贴牢固,待用。

[0054] 1.2免疫组化实验

[0055] 1.2.1脱蜡将烤好的切片放入二甲苯脱蜡。依次经过二甲苯I (15min,37℃) →二甲苯II (15min,37℃) →100%酒精I (10min) →100%酒精II (10min) →90%酒精 (10min) →80%酒精 (5min) →70%酒精 (5min) →再放入蒸馏水中。

[0056] 1.2.2热修复抗原:将切片浸入0.01摩尔枸橼酸盐缓冲液中 (PH 6.0),微波炉高火加热8分钟后断电,间隔3分钟后,再次高火加热3分钟。

[0057] 1.2.3待切片完全冷却后,将其放入石盒中,用1×PBS液冲洗5分钟,重复3次。注意在冲洗时,1×PBS液不要对着组织块,以免造成组织损害。

[0058] 1.2.4 1×PBS液冲洗完成后,需将切片上的液体先甩干,再用滤纸将组织块周围的液体吸干;然后滴加3%H₂O₂,盖上石盒盖,室温30min以灭活内源性酶。

[0059] 1.2.5接下来用1×PBS液冲洗5min,重复3次。

[0060] 1.2.6冲洗完成后,用移液枪吸取适量一抗,滴加于组织上将组织完全覆盖 (小鼠或兔IgG)。滴加完成后,将石盒置于4℃冰箱过夜。

[0061] 1.2.7第二天将石盒从冰箱取出,37℃孵育30min复温,1×PBS液冲洗5 min,重复5次。

[0062] 1.2.8滴加通用型二抗 (或山羊抗兔或山羊抗小鼠IgG/HRP聚合物),37℃ 30min。

[0063] 1.2.9用1×PBS液冲洗5min,重复5次。

[0064] 1.2.10DAB显色,镜下控制,自来水冲洗终止反应。

[0065] 1.2.11再放入苏木精复染2min,自来水冲洗;

[0066] 1.2.12烤干,封片。

[0067] 1.2.13显微镜下观察结果。

[0068] 观察结果如图2,由图中A-B,正常大鼠脊髓室管膜细胞表达丰富的BAF45D。B图是A图中方框内结构的放大。C-D,脊髓损伤模型大鼠脊髓室管膜细胞表达 BAF45D明显减少。G-H,BAF45D阳性细胞数在脊髓损伤模型组明显减少。

[0069] 1.3免疫荧光实验

[0070] 1.3.1脱蜡

[0071] 1.3.2热抗原修复。

[0072] 1.3.3 1×PBS洗5次,每次5min。

[0073] 1.3.4山羊血清封闭1小时。

[0074] 1.3.5一抗4℃孵育过夜。

[0075] 1.3.6 1×PBS洗5次,每次5min。

[0076] 1.3.7荧光二抗室温孵育1h,1×PBS洗5次,每次5min。

[0077] 1.3.8 DAPI 孵育 3min, 1×PBS 洗 5 次, 每次 5min。

[0078] 1.3.9 封片。

[0079] 2. 结果

[0080] 结合图 3 (A-H, 正常大鼠脊髓室管膜细胞同时表达 BAF45D (红色) 和神经干细胞标记蛋白 GFAP (绿色)。E, F, G 和 H 分别是 A, B, C 和 D 中方框内结构的高倍图。I-P, 脊髓损伤模型大鼠脊髓室管膜细胞表达 BAF45D 减少, 表达 GFAP 增加。M, N, O 和 P 分别是 I, J, K 和 L 中方框内结构的高倍图) 和图 4 (A-H, 正常大鼠脊髓神经元特别是核内表达丰富的 BAF45D (红色), 同时表达 NEUN (绿色)。E, F, G 和 H 分别是 A, B, C 和 D 中方框内结构的高倍图。I-P, 脊髓损伤模型大鼠神经元特别是核内 BAF45D 明显减少, NEUN 表达明显减少。M, N, O 和 P 分别是 I, J, K 和 L 中方框内结构的高倍图) 可知, 正常大鼠脊髓室管膜细胞表达丰富的 BAF45D。脊髓损伤模型大鼠脊髓室管膜细胞表达 BAF45D 明显减少。正常大鼠脊髓室管膜细胞同时表达 BAF45D 和神经干细胞标记蛋白 GFAP。脊髓损伤模型大鼠脊髓室管膜细胞表达 BAF45D 减少, 表达 GFAP 增加。正常大鼠脊髓神经元特别是核内表达丰富的 BAF45D, 同时表达 NEUN。脊髓损伤模型大鼠神经元特别是核内 BAF45D 蛋白和 NEUN 蛋白表达明显减少。

[0081] 实施例 3

[0082] 1. 方法

[0083] 1.1 免疫印迹实验

[0084] 按照实施例 1

[0085] 步骤如下:

[0086] 1.1.1 蛋白样本的制备:

[0087] ①称取样本: 正常组、假手术组 10d、14d、脊髓损伤组 10d、14d 各 0.1g。

[0088] ②配置裂解液: 取 6ml RIPA 裂解液, 向其中加入 PIC (1:250) 和 PMSF (1:1000)。

[0089] ③剪碎脊髓, 向每个研磨管加入 1ml 配置好的裂解液, 冰上研磨裂解 40min, 然后 4 度离心 15000r 15min, 收集上清液。

[0090] ④利用 BCA 法测定蛋白浓度

[0091] 1.1.2 SDS-PAGE 电泳 (聚丙烯酰胺凝胶电泳)

[0092] ①将配置好的 12% (15%) 分离胶、5% 浓缩胶灌入到清理好的玻璃板中。

[0093] ②上样: 5×SDS 上样缓冲液稀释至终浓度为 1×, 然后分别加到正常组、假手术组 10d、14d、脊髓损伤组 10d、14d 组织裂解液中, 100℃ 水浴 5min, 待冷却后, 分别加入到 5 个泳道, 每个泳道 30μL, Marker 上样 5μL。

[0094] ③电泳: 先用 120V 电压使样本跑出浓缩胶, 之后用 150V 电压跑出分离胶。电泳至溴酚兰刚跑出即可终止电泳, 进行转膜。

[0095] 1.1.3 转膜

[0096] ①在加有转膜液的搪瓷盘里放入转膜用的夹子、两块海绵垫、一支玻棒、4 张滤纸和甲醇激活的 PVDF 膜。

[0097] ②制作三明治: 向夹子里铺一张海绵、两张滤纸、胶、PVDF 膜、两张滤纸、一张海绵 (此过程防止气泡产生)。

[0098] ③将制作好的三明治放入转膜槽中, 要使夹的黑面对槽的黑面, 夹的白面对槽的红面。由于电转移时会产热, 故在槽的一边放一块冰来降温, 调节电流至 200mA, 转膜 2h。

[0099] 1.1.4抗原-抗体反应

[0100] ①转膜结束后取出PVDF膜,用7.5%脱脂牛奶室温封闭1h。

[0101] ②用1×TBST配置好一抗加到PVDF膜上,4℃过夜。

[0102] ③次日取出PVDF膜,用1×TBST清洗5次,每次5min。

[0103] ④用1×TBST配置好相应的二抗加到皿里,然后PVDF膜放入其中,室温摇床快摇2h。

[0104] 5、化学发光,显影,定影

[0105] ①将A和B两种试剂(ECL发光液)等体积混合,然后加到PVDF膜上,室温,避光,反应3min。

[0106] ②曝光显影,一般压片时间根据信号的强弱决定。

[0107] 2. 结果

[0108] 如图5,与正常对照组和加手术组比较,模型大鼠第14天BAF45D表达明显减少。神经元标记蛋白beta-III-tubulin和Neun也在造模后第14天明显减少。而星型胶质细胞标记蛋白GFAP明显增加,假手术组SD大鼠脊髓中BAF45D、beta-III-Tubulin、NEUN、GFAP表达较正常组无明显差异,脊髓损伤组SD大鼠脊髓中BAF45D、beta-III-Tubulin、NEUN表达较正常组减少,脊髓损伤组(术后10天,术后14天)SD大鼠脊髓中GFAP表达较正常组增加。

[0109] 由上述实验可以得出,通过检测BAF45D蛋白在脊髓室管膜细胞表达量可有效地判断对应脊髓室管膜细胞供体是否脊髓受损,进而有助于实现对脊髓受损的有效和准确的判断,为对了解脊髓损伤的病理机制和治疗都有重要意义。

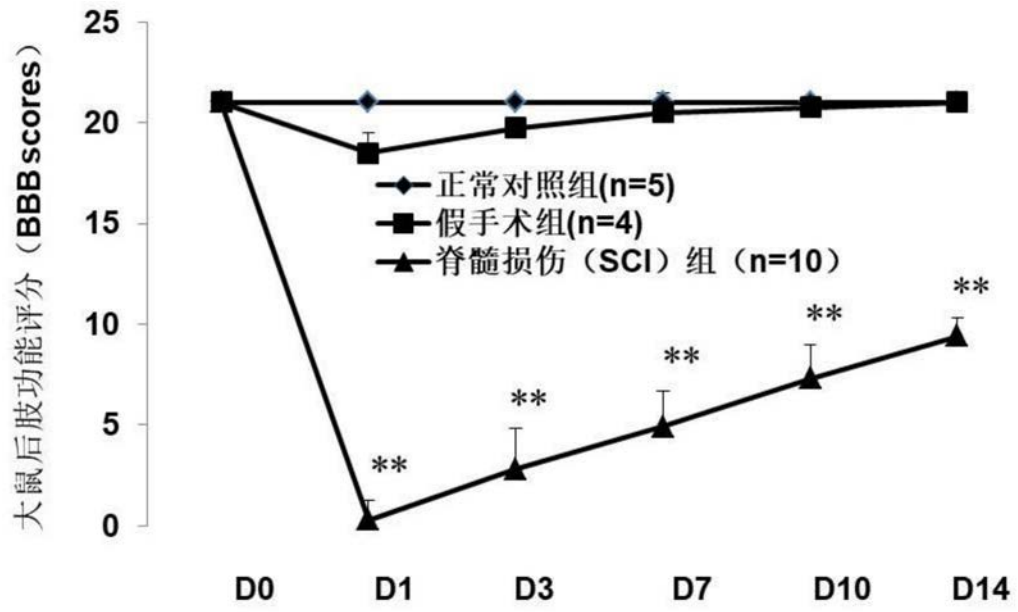


图1

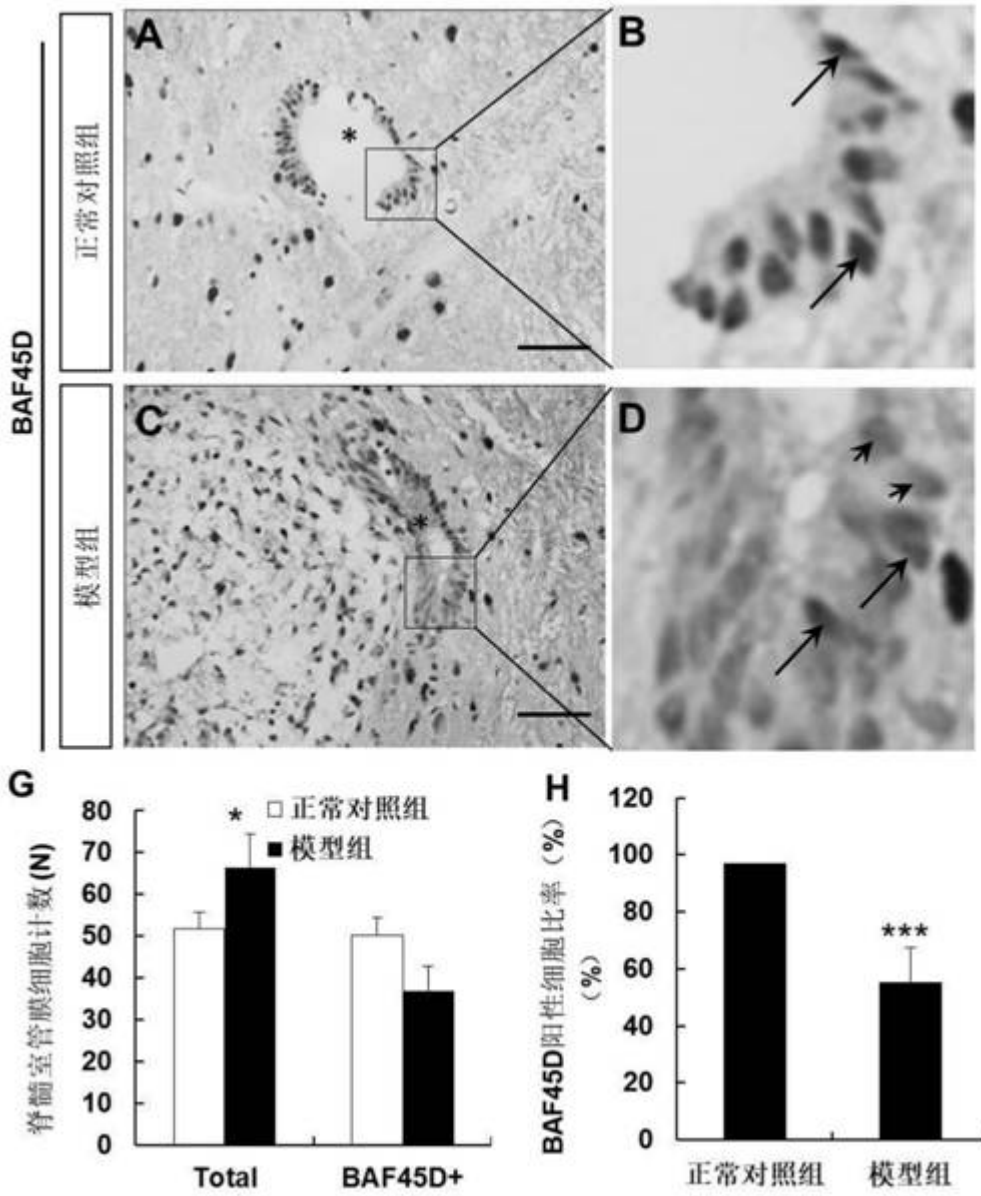


图2

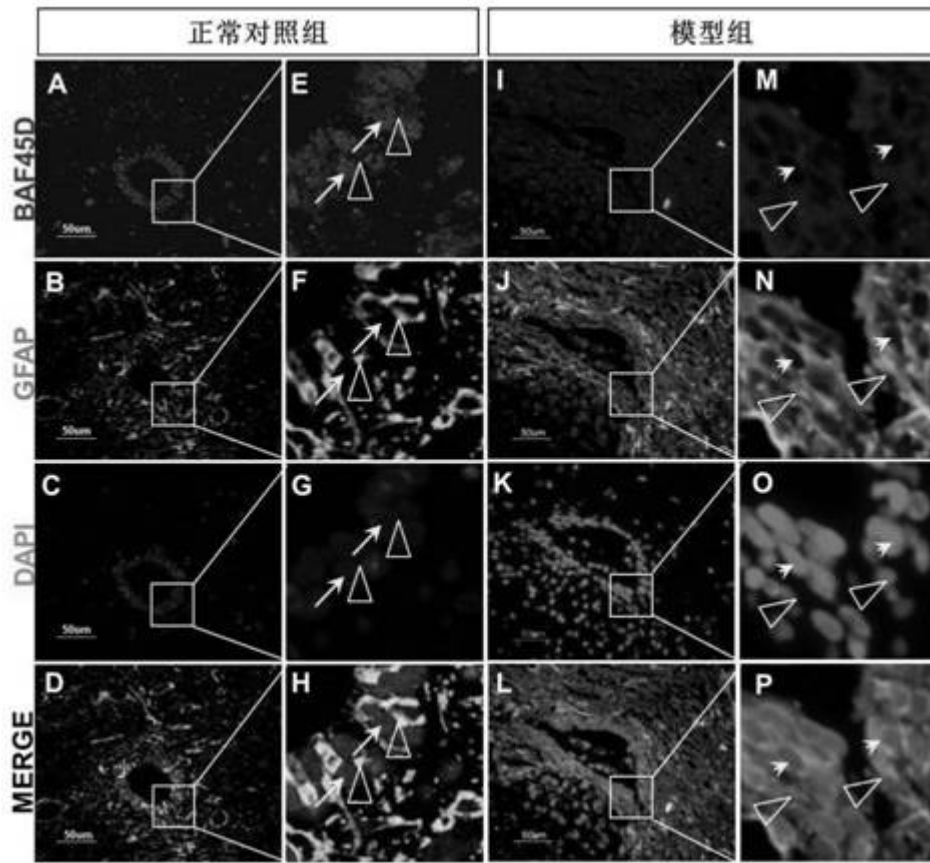


图3

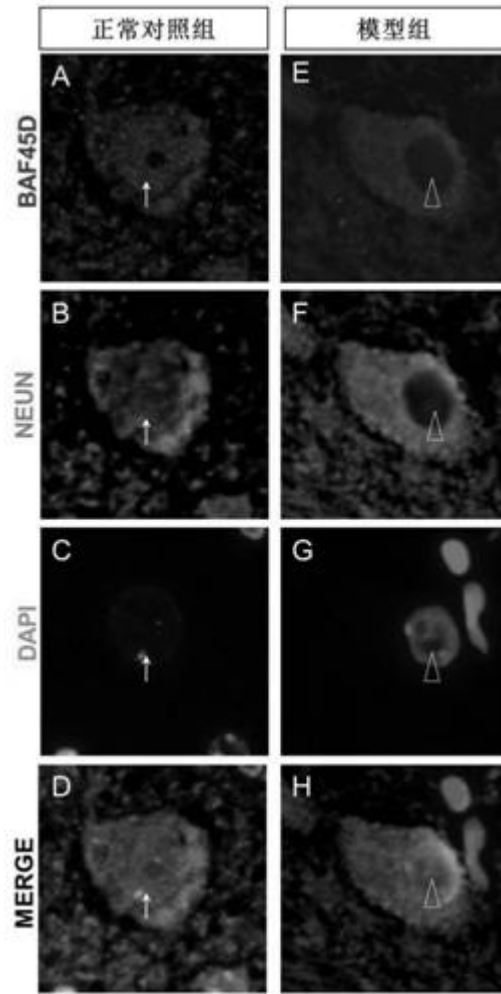


图4

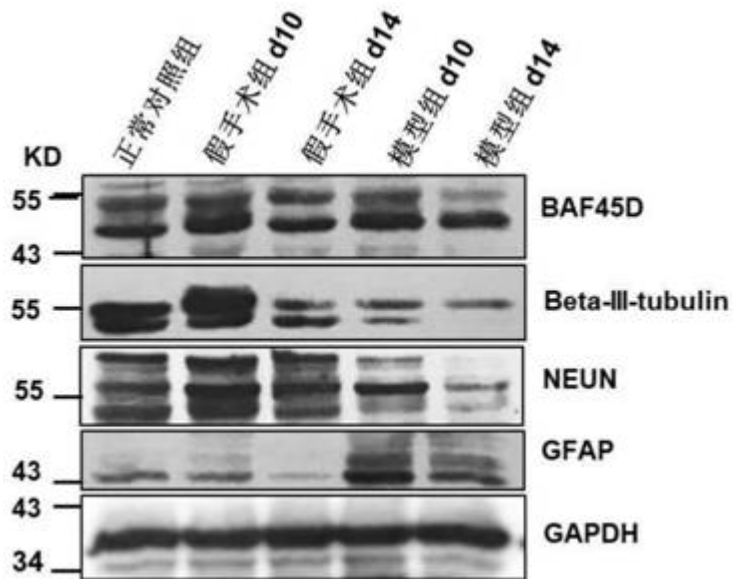


图5

专利名称(译)	检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品中的应用		
公开(公告)号	CN110297086A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201910589203.1	申请日	2019-07-02
[标]申请(专利权)人(译)	安徽医科大学		
申请(专利权)人(译)	安徽医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	安徽医科大学		
[标]发明人	刘超 刘丽华 申才良 刘畅 王振振		
发明人	刘超 刘丽华 申才良 刘畅 王振振		
IPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/68		
代理人(译)	刘海涵		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种检测BAF45D蛋白表达量的系统在制备鉴定或辅助鉴定脊髓是否受损的产品及其应用，涉及病理学检测领域，本发明通过检测BAF45D蛋白在脊髓室管膜细胞中的表达量，可有效地判断对应的脊髓室管膜细胞是否为受损的脊髓细胞，从而有助于实现脊髓损伤准确检测的目的。

