



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113358881 B

(45) 授权公告日 2021. 11. 30

(21) 申请号 202110911380.4

审查员 苗君叶

(22) 申请日 2021.08.10

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113358881 A

(43) 申请公布日 2021.09.07

(73) 专利权人 首都医科大学附属北京天坛医院  
地址 100070 北京市丰台区南四环西路119号

(72) 发明人 施福东 金薇娜 李昕岷 田德财 魏常娟

(74) 专利代理机构 北京开阳星知识产权代理有限公司 11710

代理人 丁继恩 要然

(51) Int. Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

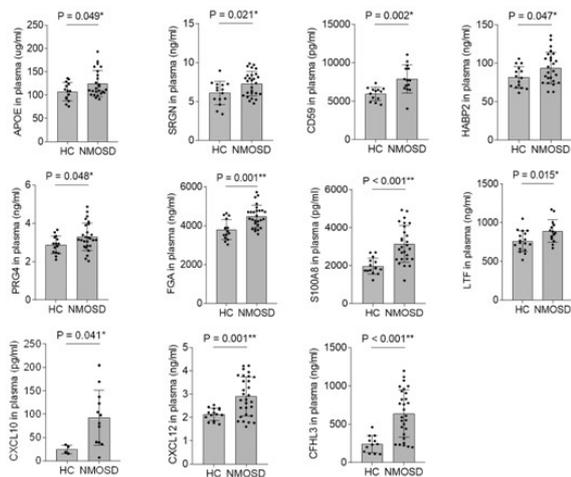
权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物及其应用

(57) 摘要

本发明公开了用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物及其应用。通过制备能够检测分析所述生物标志物表达水平的试剂或试剂盒,对受试者的外周血或血浆外泌体中的相应生物标志物进行检测,可实现对视神经脊髓炎谱系疾病的预测和监测,不仅能够预测受试者患视神经脊髓炎谱系疾病的发病风险,还能监测患者或受试者视神经脊髓炎谱系疾病的复发。本发明提供用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物,有助于更好地了解NMOSD的病理生理,从而改善NMOSD患者的临床服务。



1. 以下蛋白中的任意一种作为视神经脊髓炎谱系疾病生物标志物在制备视神经脊髓炎谱系疾病预测或监测试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,所述蛋白包括:SRGN,HABP2,PRG4,FGA,S100A8,LTF,CFHR3;所述生物标志物来自外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白。

2. 以下蛋白中的任意多种作为视神经脊髓炎谱系疾病生物标志物在制备视神经脊髓炎谱系疾病预测或监测试剂或试剂盒中的应用,其特征在於,所述蛋白包括:SRGN,HABP2,PRG4,FGA,S100A8,LTF,CFHR3,APOE,CD59,CXCL10,CXCL12;所述生物标志物来自外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白。

3. 根据权利要求2所述应用,其特征在於,所述蛋白为联合生物标志物组SRGN/FGA,SRGN/HABP2,SRGN/PRG4或S100A8/CXCL12/CFHL3。

## 用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物及其应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物标志物技术,尤其涉及可用于NMOSD分析的生物标志物。

### 背景技术

[0002] 视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSD)是一种中枢神经系统免疫性脱髓鞘疾病,主要为视神经、脊髓同时或相继受累的急性或亚急性脱髓鞘病变。长期以来,对NMOSD是一种独立疾病或为多发性硬化(multiple sclerosis,MS)的一种变异型存有争议。自Lennon等(2004)在视神经脊髓炎疾病(neuromyelitis optica,NMO)患者血清中发现水通道蛋白4(aquaporin-4,AQP4)抗体以来,NMOSD作为与MS不同的独立疾病,一种以体液免疫为主的中枢神经系统自身免疫性疾病已得到普遍的公认。发生机制是致敏B淋巴细胞产生的特异性抗体结合补体,沉积并破坏星形胶质细胞表面AQP4,同时巨噬细胞、嗜酸粒细胞等固有免疫细胞趋化渗出,分泌炎症因子,继而导致髓鞘脱失、轴索和脑组织坏死。临床主要表现为视神经炎与急性横贯性脊髓炎,可能单次发作或多次发作,其间隔期可能是几周、数月甚至几年。虽然有根据小规模临床研究或专家共识推荐的治疗方案(包括糖皮质激素、丙种球蛋白、硫唑嘌呤以及利妥昔单抗等),但是由于缺乏针对NMOSD的大样本随机双盲对照临床试验,迄今尚无NMOSD最佳的治疗方案。

[0003] 由于临床表现的异质性、复发后神经系统残疾的严重程度以及治疗反应的差异性,迫切需要可靠、敏感的NMOSD发病、复发和进展生物标志物。检测血清中的AQP4抗体(AQP4-IgG)可支持血清阳性NMOSD的诊断。然而,尚不清楚AQP4-IgG水平是否与疾病活动、严重程度、对治疗的反应或长期结果相关。此外,血清阴性NMOSD患者的生物标志物尚未确定和验证。因此,建立和验证可用于预测NMOSD预后和复发的生物标志物具有广阔的前景。

[0004] 单一组学数据分析通常用来解释某种特征性的生化指标与某些疾病之间的关联,但无法说明其中复杂的因果关系。技术的进步催生了“组学时代”,这使得我们能够在不同的分子水平上收集和整合数据和信息。这些多组学数据的整合意味着可以同时研究成千上万的蛋白质(蛋白质组学)、基因(基因组学)、RNA(转录组学)和代谢物(代谢组学)。人工智能将提供对复杂生物系统的新见解,并揭示所有分子水平之间的相互作用网络。这种方法将多个分子水平的实验数据与计算模型相结合,并将系统作为一个整体进行处理,以利于进行诊断、预后或治疗价值的数据识别。

[0005] 生物标记物可提示NMOSD病理生理过程,对NMOSD的发生风险具有预测价值,为临床诊断及治疗提供依据。但是至今尚无公认的对NMOSD发病及疾病进展预测价值高的生物标记物,无法满足临床需求。因此,寻找可快速准确的预测疾病发生、发展及预后的生物学标记物具有重要的临床应用前景。与此同时,通过组学技术获得的数据信息与临床信息整合将有助于更好地了解NMOSD病理过程,寻找NMOSD新的干预靶点,从而改善NMOSD患者的临床管理。

## 发明内容

[0006] 为了解决现有技术中存在的问题,本发明的目的是提供用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物及其具体应用。

[0007] 为了实现本发明目的,本发明的技术方案如下:

[0008] 第一方面,本发明提供了以下蛋白中的任意一种或多种作为视神经脊髓炎谱系疾病生物标志物在制备视神经脊髓炎谱系疾病预测或监测试剂或试剂盒中的应用,所述蛋白包括:APOE,SRGN,NACA,HABP2,BLVRB,PRG4,S100A8,S100A9,TRAP5,IGFBP5,ST13,FST,LTF,CFHR3,CALD1,PRDX1,PRDX4,PRDX5,GRB2,PLXNB2,TIMP1,TOLLIP,DUSP3,MTPN,ARHGDIB,Wdr44,DBI,HSPB1,THBS1,MAPRE2,FLNA,RAB11A,SRI,IgLL1,TLN1。

[0009] 进一步地,所述视神经脊髓炎谱系疾病生物标志物还包括CD59,FGA,CXCL10,CXCL12,PDGFA,CCL5中的任意一种或多种。

[0010] 所述“一种或多种”的含义为:可选自前述蛋白中的一种、两种、三种、或更多种。在本发明所列的蛋白范围内,选取任意数量的任意蛋白进行排列组合均属于本发明的保护范围。

[0011] 更为优选,本发明所述的生物标志物来自外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白。

[0012] 第二方面,本发明提供一种视神经脊髓炎谱系疾病预测或监测试剂,所述试剂包括检测受试者外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白中以下至少一种生物标志物表达水平的试剂:

[0013] APOE,SRGN,NACA,HABP2,BLVRB,PRG4,S100A8,S100A9,TRAP5,IGFBP5,ST13,FST,LTF,CFHR3,CALD1,PRDX1,PRDX4,PRDX5,GRB2,PLXNB2,TIMP1,TOLLIP,DUSP3,MTPN,ARHGDIB,Wdr44,DBI,HSPB1,THBS1,MAPRE2,FLNA,RAB11A,SRI,IgLL1,TLN1。

[0014] 进一步地,所述试剂还包括检测受试者外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白中以下至少一种生物标志物表达水平的试剂:CD59,FGA,CXCL10,CXCL12,PDGFA,CCL5。

[0015] 所述试剂为可检测受试者外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白中所述生物标志物表达水平或表达谱的试剂。

[0016] 第三方面,本发明提供了含有前述预测或监测试剂的试剂盒。

[0017] 第四方面,本发明提供了一种视神经脊髓炎谱系疾病预测或监测系统,包括:

[0018] (1)检测来自受试者生物测试样品中的生物标志物,包括权利要求4或5所述的预测或监测试剂;

[0019] (2)将检测到的生物标志物的表达水平与所述生物标志物的正常或参照表达水平进行对比。

[0020] 进一步地,根据所述系统的对比结果,可对受试者视神经脊髓炎谱系疾病的患病风险进行预测或对该疾病的发生进行监测。

[0021] 当生物标志物的表达水平相对于正常或参照表达水平存在差异,且差异表达变化如表1所示时,表明受试者具有视神经脊髓炎谱系疾病发生或复发的风险。

表1

蛋白	蛋白中文名称	NCBI 登陆号	差异表达结果
APOE	载脂蛋白 E	348	上调
SRGN	血清甘油	5552	上调
NACA	新生多肽相关复合物	4666	上调
HABP2	透明质酸结合蛋白 2	3026	上调
BLVRB	核黄素还原酶	645	上调
PRG4	蛋白聚糖 4	10216	上调
TRAP5 (ACP5)	抗酒石酸酸性磷酸酶 5	54	上调
IGFBP5	胰岛素样生长因子结合蛋白 5	3488	上调
ST13	热休克蛋白 70 相互作用蛋白	6767	上调
FST	卵泡抑制蛋白	10468	上调
LTF	乳铁蛋白	4057	上调
CFHR3	补体因子 H 相关蛋白 3	10878	上调
CALD1	钙调素结合蛋白	800	上调
S100A8	钙结合蛋白	6279	上调
S100A9	钙结合蛋白	6280	上调
CD59	CD59 糖蛋白	966	上调
FGA	纤维蛋白原 $\alpha$ 链	2243	上调
CXCL10	C-X-C 基序趋化因子	3627	上调
CXCL12	C-X-C 基序趋化因子	6387	上调
PRDX1	硫氧还蛋白过氧化物酶	5052	下调

[0022]

	PRDX4	硫氧还蛋白过氧化物酶	10549	下调
	PRDX5	硫氧还蛋白过氧化物酶	25824	下调
	GRB2	生长因子受体结合蛋白	2885	下调
	PLXNB2	神经丛蛋白 B2	23654	下调
	TIMP1	金属蛋白酶抑制剂 1	7076	下调
	TOLLIP	tol1 相互作用蛋白	54472	下调
	DUSP3	双特异性蛋白磷酸酶 3	1845	下调
	MTPN	肌营养蛋白	136319	下调
	ARHGD1B	Rho-GDP 解离抑制剂 2	397	下调
	Wdr44	wd 重复蛋白 44	54521	下调
[0023]	DBI	酰基辅酶 A 结合蛋白	1622	下调
	HSPB1	热休克蛋白 $\beta$ -1	3315	下调
	THBS1	血小板反应蛋白-1	7057	下调
	MAPRE2	微管相关蛋白 rp/eb 家族成员 2	10982	下调
	FLNA	丝胶素-A	2316	下调
	RAB11A	ras 相关蛋白 rab-11a	8766	下调
	SRI	可溶性抗药性相关钙结合蛋白	6717	下调
	IGLL1	免疫球蛋白 lambda 样多肽 1	3543	下调
	TLN1	踝蛋白-1	7094	下调
	PDGFA	血小板衍生生长因子 $\alpha$ 亚单位	5154	下调
	CCL5	c-c 基序趋化因子 5 亚型 1	6352	下调

[0024] 作为优选,所述生物测试样品为外周血浆或星形胶质细胞来源的外泌体蛋白。

[0025] 本发明的有益效果在于:

[0026] 本发明提供了用于NMOSD预测或复发监测的生物标志物及其应用。凭借这些生物标志物,可制备用于视神经脊髓炎谱系疾病预测或复发监测的试剂或试剂盒,以预测受试者患视神经脊髓炎谱系疾病的风险,或监测患者或受试者视神经脊髓炎谱系疾病的复发。

[0027] 本发明提供的生物标志物组,有助于更好地了解NMOSD的病理生理,将为诊断和预后提供新的机会,从而改善NMOSD患者的临床服务。

## 附图说明

[0028] 此处的附图被并入说明书中并构成本说明书的一部分,示出了符合本发明的实施例,并与说明书一起用于解释本发明的原理。

[0029] 为了更清楚地说明本发明实施例或现有技术中的技术方案,下面将对实施例或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍,显而易见地,对于本领域普通技术人员而言,在不付出创造性劳动性的前提下,还可以根据这些附图获得其他的附图。

[0030] 图1为本发明所述的41种生物标志物在NMOSD患者与健康人的外周血浆和星形胶质细胞来源的外泌体蛋白质组学鉴定中的差异表达结果;其中,包括19种上调蛋白和22种下调蛋白。

[0031] 图2为实施例4中采用酶联免疫吸附测定筛选的差异表达蛋白。

[0032] 图3为实施例4中SRGN,FGA,PRG4,CXCL12,S100A8,CD59蛋白浓度与NMOSD急性期临

床残障程度的进展相关情况。

[0033] 图4为实施例5中联合生物标志物组SRGN/FGA, SRGN/HABP2, SRGN/PRG4, S100A8/CXCL12/CFHL3的检测特异性、灵敏度。

### 具体实施方式

[0034] 在本发明中,词语“包含”、“具有”、“包括”或“含有”是指包括在内的或开放式的,并不排除额外的、未引述的元件或方法步骤。与此同时,“包含”、“具有”、“包括”或“含有”也可以表示封闭式的,排除额外的、未引述的元件或方法步骤。

[0035] 在本发明中,术语“约”表示:一个值包括测定该值所使用的装置或方法的误差的标准偏差。

[0036] 虽然所公开的内容支持术语“或”的定义仅为替代物以及“和/或”,但除非明确表示仅为替代物或替代物之间相互排斥外,权利要求中的术语“或”是指“和/或”。

[0037] 在本发明中,术语“视神经脊髓炎谱系疾病(NMOSD)”是一种中枢神经系统免疫性脱髓鞘疾病,主要表现为视神经、脊髓同时或相继受累的急性或亚急性脱髓鞘病变。

[0038] 在本发明中,术语“生物标记物(Biomarker)”也被称为“生物标志物”,是指可以标记系统、器官、组织、细胞及亚细胞结构或功能的改变或可能发生的改变的生化指标。其可用于疾病诊断、判断疾病分期或者用来评价新药或新疗法在目标人群中的安全性及有效性等用途。

[0039] 在本发明中,术语“诊断”和类似术语是指特定疾病的鉴定。

[0040] 在本发明中,受试者(例如患者)的“风险评估”、“风险分类”、“风险鉴定”或“风险分级”是指评价包括生物标记物的因子以预测包括疾病发作或疾病进展的未来事件发生的风险,以便可以在更加知情的基础上做出关于受试者的治疗决定。

[0041] 在本发明中,术语“预测”和相关术语是指特定病症(例如视神经脊髓炎谱系疾病)的可能结果的描述。

[0042] 本发明的实施方式包括“监测”可能有患视神经脊髓炎谱系疾病风险的受试者。该受试者可以是未被诊断为有视神经脊髓炎谱系疾病的患者,但由于各种临床或医学评估,可能有患视神经脊髓炎谱系疾病的风险。

[0043] 在本发明中,“样品”、“生物样品”,“测试样品”、“样本”、“来自受试者的样品”和“患者样品”可以互换使用,并且可以是血液、组织、尿液、血清、血浆、羊水、脑脊液、胎盘细胞或组织、内皮细胞、白细胞或单核细胞的样品。以本文所讨论的某种方式或本领域已知的其它方式可以用于直接从患者获得样品,或者可以(例如通过过滤、蒸馏、提取、浓缩、离心,干扰组分的灭活和添加试剂等)预处理样品以改变样品的特性。

[0044] 在本发明中,“标记”和“可检测标记”通常是指直接或间接连接到分析物结合分子(例如其抗体或分析物反应性片段)或分析物以使分析物结合分子(例如其抗体或分析物反应性片段、核酸探针等)与分析物之间发生反应的可检测部分,并且如此标记的分析物结合分子(例如其抗体或分析物反应性片段)或分析物被称为“可检测标记的”。标记可以(例如通过视觉或仪器手段)产生可检测的信号。在一些方面,标记可以是任何产生信号的部分,并且有时在本文中称为报告基团。如本文所用,标记(或信号产生部分)产生可测量的信号,该信号可通过外部手段检测(例如通过测量电磁辐射),并且依赖于所采用的系统,信号水

平可以变化到标记在固体支持物(例如电极、微粒或珠子)环境中的程度。

[0045] 在本发明中,检测生物标记物的水平的方法包括Western印迹分析,蛋白/肽功能测定,免疫组织化学分析,ELISA分析。示例性的,上述方法可以用于检测蛋白。

[0046] 在本发明中,通过外周血浆和星形胶质细胞来源外泌体的蛋白质组学鉴定出的,可以用于预测视神经脊髓炎谱系疾病的19种上调蛋白和22种下调蛋白都是现有技术中已知的蛋白。具体来说,

[0047] “APOE”的含义是“载脂蛋白E”;“SRGN”的含义是“血清甘油”;“CD59”的含义是“CD59糖蛋白,是补体膜攻击复合物(MAC)作用的有效抑制剂。”;“NACA”的含义是“新生多肽相关复合物”;“HABP2”的含义是“透明质酸结合蛋白2”;“BLVRB”的含义是“核黄素还原酶”;“PRG4”的含义是“蛋白聚糖4”;“FGA”的含义是“纤维蛋白原 $\alpha$ 链”;“S100A8/A9”的含义是“钙结合蛋白S100-A8/A9”;“TRAP5”的含义是“抗酒石酸酸性磷酸酶5”;“IGFBP5”的含义是“胰岛素样生长因子结合蛋白5”;“ST13”的含义是“热休克蛋白70相互作用蛋白”;“FST”的含义是“卵泡抑制蛋白”;“LTF”的含义是“乳铁蛋白”;“CFHR3”的含义是“补体因子H相关蛋白3”;“CXCL10”和“CXCL12”的含义分别是“C-X-C基序趋化因子10和C-X-C基序趋化因子12”;“CALD1”的含义是“钙调素结合蛋白”;“PRDX1”的含义是“”,“PRDX1、PRDX4和PRDX5”的含义是“过氧化物酶-1、过氧化物酶-4和过氧化物酶-5,为硫醇特异性过氧化物酶,催化过氧化氢和有机氢过氧化物还原为水和醇。”;

[0048] “GRB2”的含义是“生长因子受体结合蛋白”;“PLXNB2”的含义是“神经丛蛋白B2”;“TIMP1”的含义是“金属蛋白酶抑制剂1”;“TOLLIP”的含义是“toll相互作用蛋白”;“DUSP3”的含义是“双特异性蛋白磷酸酶3”;“MTPN”的含义是“肌营养蛋白”;“ARHGDI B”的含义是“Rho-GDP解离抑制剂2”;“Wdr44”的含义是“wd重复蛋白44”;DBI的含义是“酰基辅酶A结合蛋白”;“PDGFA”的含义是“血小板衍生生长因子 $\alpha$ 亚单位”;“HSPB1”的含义是“热休克蛋白 $\beta$ -1”;THBS1的含义是“血小板反应蛋白-1”;“CCL5”的含义是“c-c基序趋化因子5亚型1”;“MAPRE2”的含义是“微管相关蛋白rp/eb家族成员2”;“FLNA”的含义是“丝胺素-A”;“RAB11A”的含义是“ras相关蛋白rab-11a”;“SRI”的含义是“可溶性抗药性相关钙结合蛋白”;“IGLL1”的含义是“免疫球蛋白lambda样多肽1”;“TLN1”的含义是“踝蛋白-1”。

[0049] 在本发明中,可以用于诊断视神经脊髓炎谱系疾病的19种上调蛋白和22种下调蛋白都是现有技术中已知的蛋白均可以通过现有技术中已知的检测蛋白的方法,例如通过制备相应的抗体,进而进行检测。

[0050] 本发明中采用的分子生物学方法,均可以参见“最新分子生物学实验方法汇编(Current Protocols in Molecular Biology,Wiley出版)”,“分子克隆实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual,冷泉港实验室出版)”等公开出版物中记载的相应方法。

[0051] 实施例中采用的所有试剂,除非另有强调,否则均可以通过商业途径购买获得。

[0052] 为了能够更清楚地理解本发明的上述目的、特征和优点,下面将对本发明的方案进行进一步描述。需要说明的是,在不冲突的情况下,本发明的实施例及实施例中的特征可以相互组合。

[0053] 在下面的描述中阐述了很多具体细节以便于充分理解本发明,但本发明还可以采用其他不同于在此描述的方式来实施;显然,说明书中的实施例只是本发明的一部分实施

例,而不是全部的实施例。

[0054] 下面将结合实施例对本发明的优选实施方式进行详细说明。需要理解的是以下实施例的给出仅是为了起到说明的目的,并不是用于对本发明的范围进行限制。本领域的技术人员在不背离本发明的宗旨和精神的情况下,可以对本发明进行各种修改和替换。

[0055] 实施例1:NMOSD患者及健康对照组的临床资料收集

[0056] 本研究纳入自2018年10月至2019年11月首都医科大学附属北京天坛医院住院患者。NMOSD患者入组标准:(1)发病年龄位于18-80之间;(2)根据2015年Wingerchuk NMOSD诊断标准明确诊断为NMOSD患者;(3)血AQP4抗体阳性;(4)本次为急性发作:(a)新出现的或较前明显恶化的视神经炎、横突性脊髓炎或急性脑损伤等神经系统症状(即患者必须在症状发作后7天内就诊)。(b)新发症状必须持续至少48小时以上,并且不能归因于其他临床因素(例如发烧,感染,受伤,对伴随药物的不良反应)。(c)新发症状必须符合由临床医师确认的感觉、运动或视敏度损害的客观临床体征。(d)发作性症状的单一发作(例如强直性痉挛)不被视为急性发作。(e)临床查体无明显变化,疲劳,情绪变化,膀胱/大便尿急或失禁的感觉症状不足以确定是否存在急性发作。纳入临床信息包括:患者一般基本信息及临床特点,Kurtzke's Expanded Disability Status Scale (EDSS)评分,血及脑脊液相关指标,急性期治疗方案。随访资料包括:发病时、发病后3月、6月、1年EDSS评分,复发次数,血常规及生化指标,以及影像学资料,以及缓解期治疗方案。

[0057] 实施例2:NMOSD患者及健康对照组的样本收集和储存

[0058] 1、血浆的收集:外周血收集于含抗凝剂EDTA或肝素的紫色管中,样本采集后30min内离心,3000rpm 10min,2-8℃。收集上层血浆,分批储存于-80℃。样本避免反复冻融。注意:样本应充分离心,避免溶血或颗粒存在。

[0059] 2、外周血浆中外泌体的提取

[0060] 采用免疫吸附法提取血浆中星形胶质细胞来源的外泌体。

[0061] 2.1磁珠(Beads)包被抗体

[0062] 1)取100ug星形胶质细胞表面谷氨酸转运体抗体(EAAT2-IgG)加入超滤管中,反复洗涤;

[0063] 2)将8-10ul 终浓度为10mM 生物素(Biotin)加入IgG中,室温下静置1-2小时;

[0064] 3)将IgG-Biotin全部加入Beads中,室温下放入360°摇床摇2小时;

[0065] 4)将与抗体结合后的磁珠(IgG-Beads)上下翻倒20次,放入磁力架上,静置1min吸出上清液,加1ml PBS,重复上述步骤3次后,加入1ml 0.1%PBSA;

[0066] 5)以2mg Beads : 6ul 10 mM Biotin比例加入适量10 mM Biotin,于室温下Vortex震荡2小时。

[0067] 2.2提取外泌体

[0068] 1) 取出样本,加入适量的蛋白酶抑制剂(PIC);

[0069] 2) 2000G,4℃,15min离心取上清;14000G,4℃,30min离心取上清;

[0070] 3) 取500ul样本加入100ul IgG-Beads中,4℃下360°旋转20小时;

[0071] 2.3 洗脱外泌体

[0072] 1)向结合IgG-Beads后的样本中加入70ul 0.1mol/L甘氨酸(PH=3.0),于室温下震荡15分钟;

[0073] 2)放入磁力架,静置1min,留取上清,向上清中加入5ul 1mmol/L Tris(PH=7.0),重复上述步骤1次;

[0074] 2.4外泌体定量

[0075] 1)NTA颗粒示踪(Nanosight)

[0076] 2)TEM 电镜观测形貌

[0077] 3)Western blot 检测外泌体特异性蛋白

[0078] 3、外泌体蛋白的提取

[0079] 1)向外泌体样品中加入适量无 SDSL3、终浓度含 EDTA 的 1XCocktail,置于冰上5分钟,加入终浓度10mM DTT;

[0080] 2)冰浴超声2分钟,25,000g,4℃离心 15分钟,取上清;

[0081] 3)加终浓度为10mM DTT,56℃中水浴1小时;

[0082] 4)加入终浓度 55mM IAM,暗室放置 45min;

[0083] 5)25000g,4℃离心 15min 取上清,上清即为蛋白液。

[0084] 实施例3:蛋白组学技术分析,筛选出差异表达蛋白,得到预后评估生物标记物的检测组合

[0085] 1、本发明采用下一代非标记定量蛋白质组学技术完成分析,在数据非依赖型采集(Data independent acquisition,DIA)模式下,它能够提供无与伦比的蛋白质组覆盖,同时实现每个样本大量蛋白质的精确、高度可重复的定量。DIA流程提供一个理想的差异表达蛋白质组定性分析或海量样品的蛋白质组定量平台。DIA流程基于三个必要步骤:

[0086] 1)构建谱图库:谱图库收集了样本所有可检测的非冗余的高质量肽段信息(MS/MS谱图),作为后续数据分析的肽段鉴定模板。其中包含描述肽段谱峰特性的碎片离子强度和保留时间。谱图库利用对感兴趣的样品进行data dependent acquisition(DDA)检测采集的数据构建。

[0087] 2)DIA 模式下获取大量样本数据:Data independent acquisition(DIA,又称SWATH)模式利用最新的高分辨质谱实现在质量数和保留时间上同时采集肽段离子特性。与传统的提取单一离子进行碎裂分析的方法相比,DIA模式下质谱被设定为宽母离子窗口循环采集并同时碎裂多种肽段离子的分析方式。实现了将样品中所有可检测的蛋白质谱峰信息完整采集,从而能够高重复性的分析大量样本。

[0088] 3)数据分析,在基于DIA的发现式的蛋白质组研究中,如何更好地进行蛋白质检测和定量目前依然是个巨大的挑战。采集肽段的信息虽然十分完整,但发现高度卷积。在这一步,采用Spectronaut进行有效地去卷积,从而对数据进行精确地鉴定和定量分析。

[0089] 2、筛选出的差异表达蛋白结果如下(表2):

表2 NMOSD蛋白组检测结果

疾病	NMOSD						
	蛋白组						
上调	APOE	SRGN	CD59	NACA	HABP2	BLVRB	PRG4
	FGA	S100A8	S100A9	TRAP5	IGFBP5	ST13	FST
	CFHR3	CXCL10	CXCL12	CALD1	LTF		
下调	PRDX1	PRDX4	PRDX5	GRB2	PLXNB2	TIMP1	TOLLIP
	DUSP3	MTPN	ARHGDI	Wdr44	DBI	PDGFA	HSPB1
	THBS1	CCL5	MAPRE2	FLNA	RAB11A	SRI	IGLL1
	TLN1						

[0090]

[0091] 在NMOSD中,外周血浆和星形胶质细胞来源的外泌体蛋白质组学鉴定出19种上调蛋白和22种下调蛋白,其倍数变化 $> 2$ , $P < 0.05$ ;所有失调的蛋白主要与信号传导及免疫系统调节有关,包括免疫及炎症反应、细胞增值及修复、细胞粘附连接等(图1)。

[0092] 实施例4:筛选出的差异表达蛋白进行ELISA定量验证

[0093] 本实施例应用具有高特异性、高灵敏度的酶联免疫吸附(ELISA)技术对上述目标蛋白进行验证。从验证的结果来看,NMOSD患者血浆中APOE,SRGN,CD59,HABP2,PRG4,FGA,S100A8,LTF,CXCL10和CXCL12蛋白浓度显著高于健康对照血浆中蛋白浓度(图2),与实施例3中得到的结果相近。其中SRGN,FGA,PRG4,CXCL12,S100A8蛋白浓度的升高促进NMOSD急性期临床残障程度的进展,而CD59蛋白则在NMOSD急性期起到保护作用(图3)。

[0094] 实施例5

[0095] 本实施例对上述目标蛋白进行筛选,联合生物标志物组SRGN/FGA,SRGN/HABP2,SRGN/PRG4,S100A8/CXCL12/CFHL3的联合检测效果(特异性、灵敏度等)优于其中各单一生物标志物的检测效果,并具有统计学意义。其中S100A8/CXCL12/CFHL3组为检测效率最高的联合生物标志物组(图4)。“检测效率最高”表现为:利用更少的生物标志物,在更低的检测成本和更简单的检测操作下,达到更高的灵敏度和准确率。

[0096] 以上所述仅是本发明的具体实施方式,使本领域技术人员能够理解或实现本发明。对这些实施例的多种修改对本领域的技术人员来说将是显而易见的,本文中所定义的一般原理可以在不脱离本发明的精神或范围的情况下,在其它实施例中实现。因此,本发明将不会被限制于本文所述的这些实施例,而是要符合与本文所公开的原理和新颖特点相一致的最宽的范围。

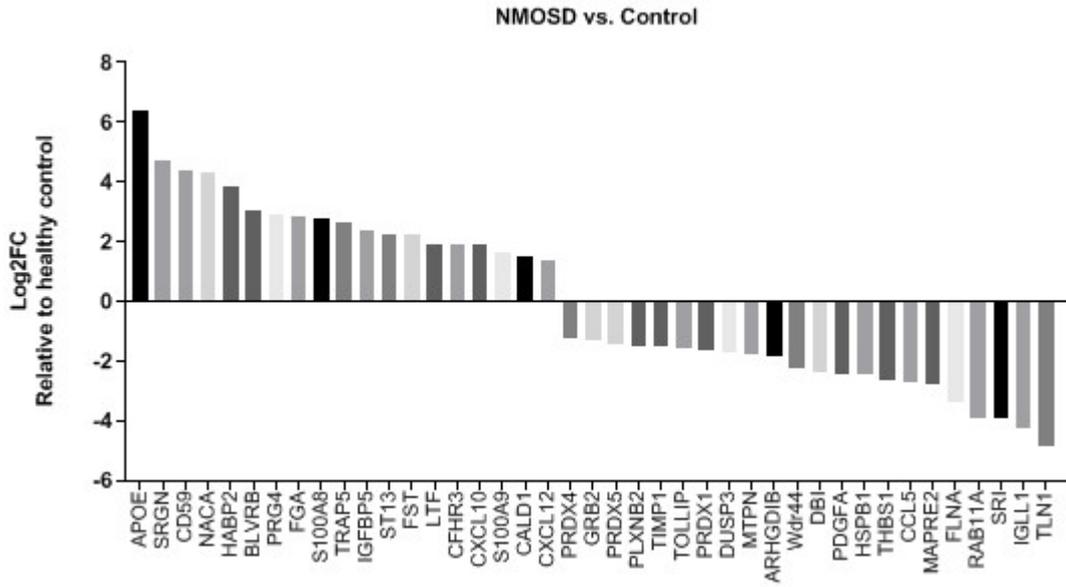


图1

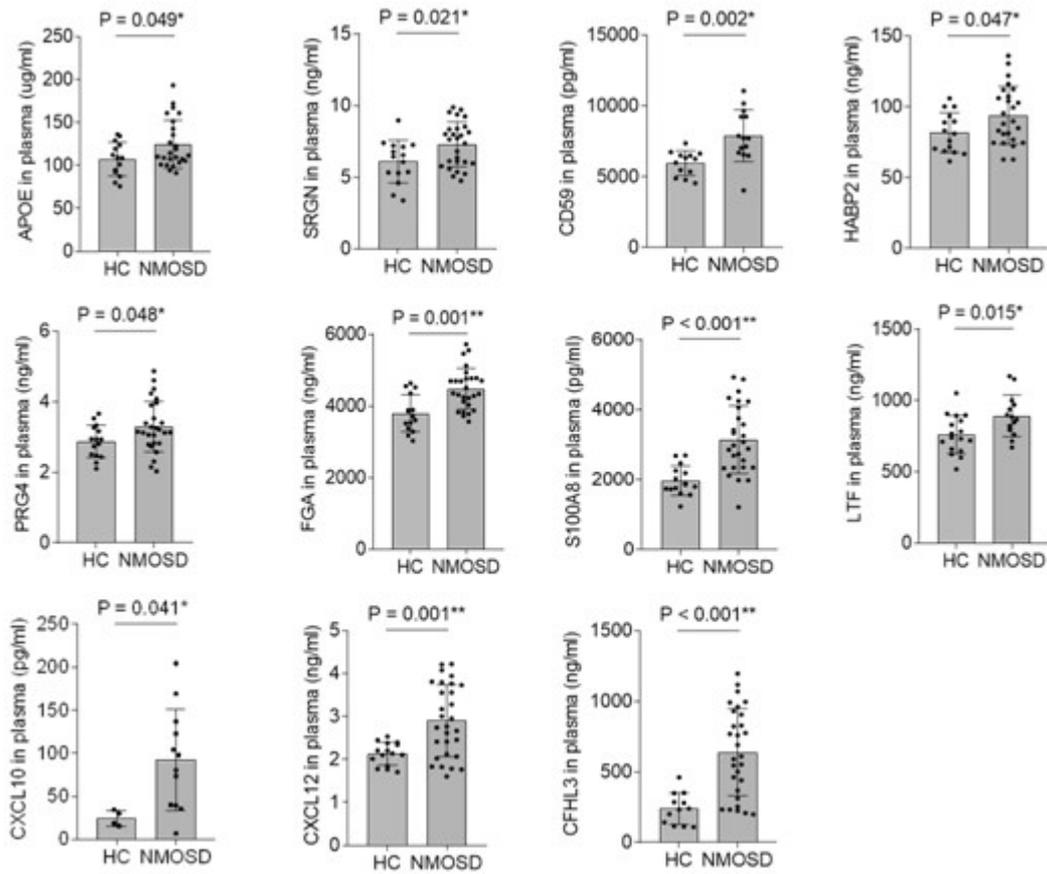


图2

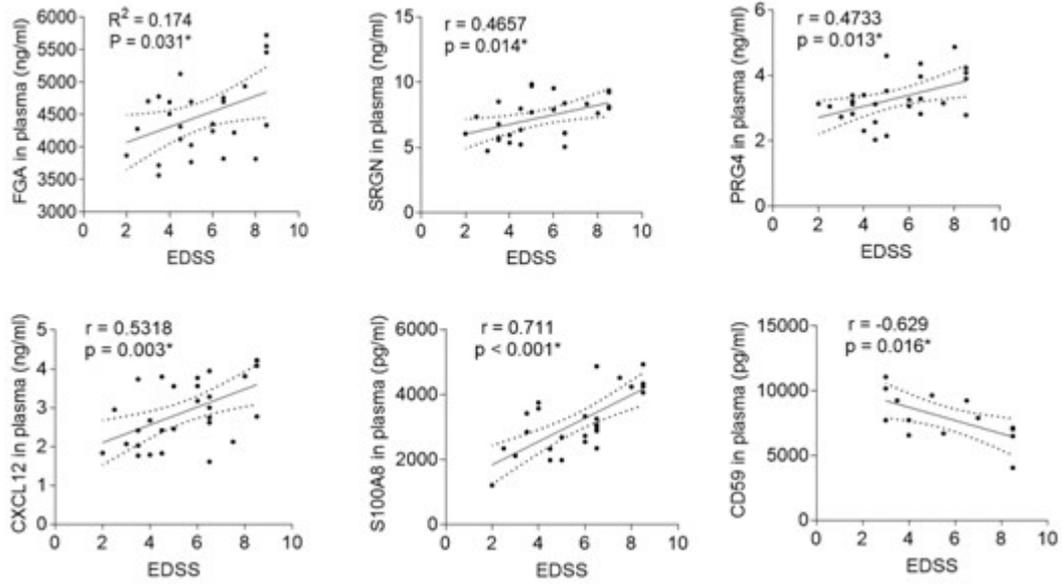


图3

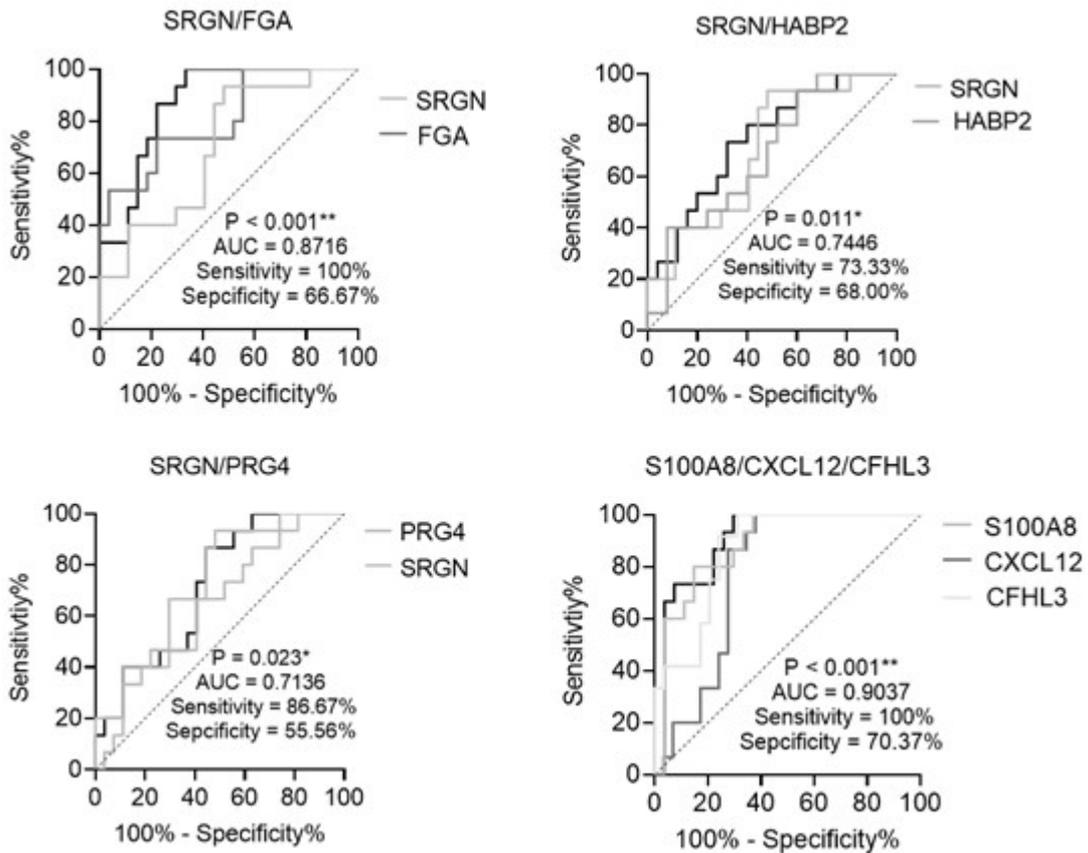


图4