



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102365096 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 29

(21) 申请号 201080013755. 5

(22) 申请日 2010. 03. 25

(30) 优先权数据

61/211, 265 2009. 03. 25 US

61/211, 264 2009. 03. 25 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 09. 23

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2010/028698 2010. 03. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02010/111514 EN 2010. 09. 30

(71) 申请人 洛斯阿拉莫斯国家安全有限责任公司

地址 美国新墨西哥州

申请人 纽约州立大学研究基金会

(72) 发明人 理查德·鲁本斯坦

马丁·S·皮尔奇

佩里·克莱顿·格雷

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

代理人 顾晋伟 田旻

(51) Int. Cl.

A61K 39/395 (2006. 01)

G01N 33/53 (2006. 01)

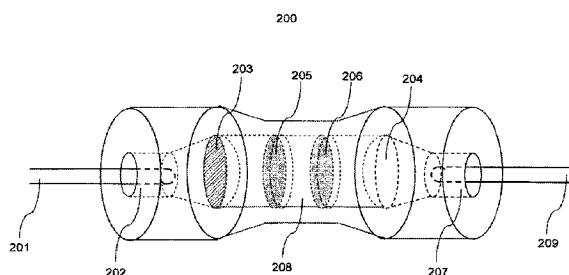
权利要求书 2 页 说明书 24 页 附图 14 页

(54) 发明名称

传染剂的快速死前检测

(57) 摘要

在怀疑含有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测 PrP^{Sc} 之存在与否的方法, 所述方法包括如下步骤: 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc}; 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc}, 以得到经标记的 PrP^{Sc}; 利用能够检测阿摩尔量之经标记 PrP^{Sc} 的仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}, 并且其中浓缩 PrP^{Sc} 与分析经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间为约 48 小时或更短。



1. 在怀疑含有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测 PrP^{Sc} 是否存在的方法,所述方法包括;
 - a. 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc};
 - b. 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc},以得到经标记的 PrP^{Sc};和
 - c. 使用能够检测阿摩尔量之经标记 PrP^{Sc} 的仪器来检测所述经标记的 PrP^{Sc}。
2. 权利要求 1 的方法,其中所述 PrP^{Sc} 是未经消化的。
3. 权利要求 1 的方法,其中浓缩所述 PrP^{Sc} 和检测所述经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间为 48 小时或更短。
4. 权利要求 1 的方法,其中浓缩所述 PrP^{Sc} 和检测所述经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间为 24 小时或更短。
5. 权利要求 1 的方法,其中所述样品包括脑组织、神经组织、血液、尿、淋巴液、脑脊液,或其组合。
6. 权利要求 1 的方法,其中所述样品包含约 0.1 阿摩尔至约 200 阿摩尔的经标记 PrP^{Sc}。
7. 权利要求 1 的方法,其中所述样品不进行种子聚合。
8. 权利要求 1 的方法,其中所述分子标记物是荧光标记物、磷光标记物、放射性同位素标记物,或其组合。
9. 权利要求 8 的方法,其中所述分子标记物是荧光标记的抗 PrP 抗体。
10. 权利要求 9 的方法,其中所述分子标记物还包含生物素化的抗 PrP 抗体。
11. 权利要求 1 的方法,其中浓缩所述 PrP^{Sc} 的步骤采用抗体、免疫沉淀、磁珠,或其组合。
12. 在怀疑含有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测 PrP^{Sc} 是否存在的方法,所述方法包括:
 - a. 通过 sPMCA 扩增所述样品中存在的 PrP^{Sc};
 - b. 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc};
 - c. 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc},以得到经标记的 PrP^{Sc};和
 - d. 使用能够检测阿摩尔量之经标记 PrP^{Sc} 的仪器来检测所述经标记的 PrP^{Sc}。
13. 权利要求 12 的方法,其中浓缩所述 PrP^{Sc} 的步骤采用分子抗体、免疫沉淀、磁珠,或其组合。
14. 权利要求 12 的方法,其中所述 PrP^{Sc} 是未经消化的。
15. 权利要求 12 的方法,其中扩增 PrP^{Sc} 和检测所述经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间为 48 小时或更短。
16. 权利要求 12 的方法,其中扩增 PrP^{Sc} 和检测所述经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间为 24 小时或更短。
17. 权利要求 12 的方法,其中所述样品包括脑组织、神经组织、血液、尿、淋巴液、脑脊液,或其组合。
18. 权利要求 12 的方法,其中所述样品包含约 0.1 阿摩尔至约 200 阿摩尔的经标记 PrP^{Sc}。
19. 权利要求 12 的方法,其中所述分子标记物为荧光标记物、磷光标记物、放射性同位素标记物,或其组合。

20. 权利要求 12 的方法,其中浓缩所述 PrP^{Sc} 的步骤通过单克隆抗体或其抗原结合部分而发生,其中所述抗体具有与杂交瘤 08-1/8E9 所产生的抗体基本上一致的重链和轻链氨基酸序列。

21. 权利要求 12 的方法,其中标记所述 PrP^{Sc} 的步骤通过如下而发生:

a. 单克隆抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体具有与杂交瘤 08-1/11F12 所产生的抗体基本上一致的重链和轻链氨基酸序列;

b. 用生物素化的单克隆抗体或其抗原结合部分标记所述捕获的 PrP^{Sc},其中所述抗体具有与杂交瘤 08-1/5D6 所产生的抗体基本上一致的重链和轻链氨基酸序列。

22. 权利要求 1 的方法,其中所述分析仪器公开于美国临时专利申请 61/211,264 中。

23. 权利要求 1 的方法,其中所述分析仪器公开于美国临时专利申请 11/634,546 中。

24. 权利要求 12 的方法,其中所述分析仪器公开于美国临时专利申请 61/211,264 中。

25. 权利要求 12 的方法,其中所述分析仪器公开于美国临时专利申请 11/634,546 中。

26. 单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合 PrP^{Sc} 并增强第二单克隆抗体与 PrP^{Sc} 的结合。

27. 单克隆抗体或其抗原结合部分,其在第二单克隆抗体与 PrP^{Sc} 结合之后以增强的方式与 PrP^{Sc} 正常结合。

28. 单克隆抗体或其抗原结合部分,其与 PrP^{Sc} 正常结合,其在第二单克隆抗体与 PrP^{Sc} 结合之后不能结合。

29. 用于检测 PrP^{Sc} 的试剂盒,其包含;

a. 第一单克隆抗体或其抗原结合部分,其结合 PrP^{Sc} 并增强第二单克隆抗体对 PrP^{Sc} 的结合;和

b. 第二单克隆抗体或其抗原结合部分,其在第一单克隆抗体与 PrP^{Sc} 结合之后以增强的方式与 PrP^{Sc} 结合。

30. 权利要求 29 的试剂盒,其中所述第一抗体具有与杂交瘤 08-1/11F12 所产生的抗体基本上一致的重链和轻链氨基酸序列,并且所述第二抗体具有与杂交瘤 08-1/5D6 所产生的抗体基本上一致的重链和轻链氨基酸序列。

31. 权利要求 29 的用于检测 PrP^{Sc} 的试剂盒,其还包含;

能够免疫沉淀 PrP^{Sc} 的第三单克隆抗体。

32. 权利要求 29 的用于检测 PrP^{Sc} 的试剂盒,其还包含;

与能够检测阿摩尔量之经标记 PrP^{Sc} 的仪器联用的至少一个瓶、皿或毛细管。

传染剂的快速死前检测

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2009 年 3 月 25 日提交的美国临时专利申请 61/211, 265 的优先权, 其通过引用整体并入本文。本申请要求 2009 年 3 月 25 日提交的美国临时专利申请 61/211, 264 的优先权, 其通过引用整体并入本文。

[0003] 联邦权利的声明

[0004] 这些发明是在由美国能源部提供的协议号为 DE-AC52-06 NA 25396 的政府资助下完成的。政府拥有本发明的部分权利。这些发明还得到美国陆军医学研究与物资指挥部 (Army Medical Research and Materiel Command) 提供的资助号为 DAMD17-03-1-0368 以及美国国立心、肺和血液研究所 (National Heart Lung Blood Institute) 提供的资助号为 HL063837 的资助。

技术领域

[0005] 本发明涉及痕量的生物和化学产物 (例如生物样品中构象改变形式的细胞朊病毒蛋白) 的快速死前检测方法。

技术背景

[0006] 传染性海绵状脑病 (TSE, transmissible spongiform encephalopathy) 或朊病毒病 (prion disease) 是哺乳动物的传染性神经退行性疾病, 包括牛海绵状脑病 (“疯牛”病)、鹿和麋鹿的慢性消耗性疾病、绵羊的羊瘙痒症和人的克雅氏病 (CJD, Creutzfeldt-Jakob disease)。TSE 可通过摄取受感染的组织或输血而在宿主之间传递。TSE 的临床症状包括人的运动协调性丧失和痴呆。其具有数月至数年的潜伏期, 但当临床症状出现之后, 其进展迅速、不可医治并最终致命。降低 TSE 风险的尝试已经导致农产品、药物、化妆品、血液和组织捐献以及生物技术产品的生产和贸易的显著改变。

[0007] TSE 与宿主编码的细胞朊病毒蛋白 (PrP^{C}) 转换为构象改变形式 (PrP^{Sc}) 相关。对来自死后动物或人的脑组织的神经病理学检查仍是 TSE 诊断的“黄金标准”, 其通常显示星形细胞增生和海绵状变化, 有时伴有含 PrP^{Sc} 的淀粉样蛋白沉积的形成。与其它技术 (Wells 和 Wilesmith, 1995 ;Gavier-Widen 等, 2005) 相比, 它非常特异但灵敏度较低。尽管通过免疫组织化学技术 (使用特异性针对 PrP 的抗体来检测 PrP^{Sc} 在淀粉样蛋白沉积中的积累 (van Keulen 等, 1995 ;1996)) 可提高显微镜观察的灵敏度, 但这些方法不适于快速、常规的分析。另外值得关注的是, 由于 TSE 相关分子在机体组织中的不均匀分布 (其在神经系统组织中的浓度总是最高, 而在容易获取的体液 (如, 血液或尿) 中的浓度却非常低), 因此 TSE 的实验室诊断变得愈发复杂。

[0008] PrP^{Sc} 具有独特的物理化学和生化特性, 例如聚集性、不溶性、蛋白酶消化抗性和富含 β 片层的二级结构。 PrP^{Sc} 的这些经变化特性之一——即对蛋白酶消化的部分抗性, 构成了大多数诊断性生化测试的基础。为了区分 PrP^{C} 和 PrP^{Sc} , 通常用蛋白酶 K (PK, proteinase K) 预处理样品。由于 PrP^{Sc} 具有部分消化抗性, 而 PrP^{C} 易于被 PK 消化, 因此预处理的结果

导致：与富含 PrP^C 的样品相比，在富含 PrP^{Sc} 的样品中 PrP^C 的干扰消除或降低。然而，同时也提出，死于 CJD 的患者的脑中大多数 PrP^{Sc} 是 PrP^{Sc} 的 PK 敏感性形式 (sPrP^{Sc})，这使得在 PrP^{Sc} 浓度非常低的死前测定中用 PK 进行处理是不切实际的。开发不需要蛋白水解处理样品的诊断性测定可消除与蛋白水解消化相关的问题以及测定灵敏度低的问题。

[0009] 目前的 PrP^{Sc} 检测方法很耗时，并在疑似患病动物表现出一种或多种疾病症状之后应用死后分析。目前的诊断性方法主要基于对 PrP^C 和 PrP^{Sc} 的物理化学差异的检测，它们是迄今为止唯一可靠的 TSE 标志物。例如，最广泛使用的诊断性测试利用脑样品中 PrP^{Sc} 的相对蛋白酶抗性并联合使用针对 PrP^{Sc} 之 PK 抗性部分的、基于抗体的检测来区分 PrP^C 和 PrP^{Sc}。尚不能通过使用常规方法（例如，聚合酶链式反应、血清学或细胞培养测定）来检测朊病毒病。尚未鉴定出传染剂特异性核酸，并且受感染的宿主不引发抗体应答。

[0010] PrP^{Sc} 与本文中讨论的三种抗体 (8E9、11F12 和 5D6) 的抗体-抗原结合事件已在 2008 年 10 月 31 日由 Chang 等人电子发表的 PrP Antibody Binding-Induced Epitope Modulation Evokes Immunocooperativity, 205 J. Neuroimmunol., 94, 94-100 中表征，其内容通过引用整体并入本文。这些抗体与 PrP^{Sc} 上的不同表位相互作用。单克隆抗体 (Mab, Monoclonal antibody) 8E9 结合 PrP^{Sc} 的 155 ~ 200 位氨基酸区域。Mab 11F12 结合 PrP^{Sc} 的 93 ~ 122 位氨基酸区域。Mab 5D6 结合 PrP^{Sc} 之尚不明确的构象表位。在构象表位的情形中，抗体不结合特异性的连续氨基酸序列，而是结合这样的蛋白质结构区域，所述区域可包括来自氨基酸一级结构的几个不连续区域的氨基酸残基。

[0011] 使用这三种抗体进行捕获酶联免疫吸附测定 (ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay)。只有使用 Mab 11F12 作为捕获试剂以及使用生物素化的单克隆抗体 5D6 作为检测物时才可成功地结合并鉴定 PrP^{Sc}。只有依此方式的抗体组合在感染 263K 的仓鼠、感染羊瘙痒病的绵羊或感染 CWD 的鹿中提供同样的结果。使用加热和 / 或十二烷基硫酸钠 (SDS) 变性，检测得到进一步地加强。据认为，这种检测加强是由 PrP^{Sc} 中抗体诱导的表位暴露所致。简言之，一种抗体 (Mab 11F12) 与 PrP^{Sc} 的结合以某种方式暴露表位，这使得第二种抗体 (Mab 5D6) 更好地结合。尚不知道这是否通过以下方式而发生：PrP 构象改变、PrP^C 重折叠成 PrP^{Sc} 和 / 或 PK 抗性形式或 sPrP^{Sc} 形式的改变，使其更容易与另外的抗体相结合。

[0012] Chang 等人在 2009 年 2 月 27 日电子发表的 Surround Optical Fiber Immunoassay (SOFIA): An Ultra-Sensitive Assay for Prion Protein Detection, 159 Journal of Virological Methods, 15, 15-22 中还公开了包绕光纤免疫测定 (SOFIA, surround optical fiber immunoassay)。SOFIA 将 Mab 捕获抗原的固有特异性与包绕光学检测技术的灵敏度相结合。为检测极低的信号水平，使用低噪的光电二极管 (photo-voltaic diode) 作为系统的检测器。SOFIA 使用激光照射容纳样品的微毛细管。随后，从所述样品收集的光通过光纤被导向传递光学器件。之后，对所述光进行光学过滤以用于检测，所述检测为测量电流并通过数字信号处理锁定放大器针对噪声而进行放大。结果利用计算机显示，并储存于设计用于数据采集的计算机软件中。

[0013] 罗丹明红 (Rhodamine Red) 可被 SOFIA 检测的浓度达到 0.1 阿克 (ag)。因此，SOFIA 显示，来自未用 PK 处理的仓鼠脑的 PrP^{Sc} 的检出限约为 10ag，并且推断，来自绵羊和鹿之脑物质的 PrP^{Sc} 的检出限约为 1 飞克 (femtogram)。然而，假定抗体反应性相同的话，

Western 印迹显示,在克当量基础上,仓鼠脑比绵羊和鹿之脑物质中的 PrP^{Sc} 高出至少 10 ~ 100 倍,即表明在后两个物种中检出的蛋白质可以为 10 ~ 100ag 的范围或更多。

[0014] 已报道蛋白质错误折叠循环扩增 (PMCA, protein misfolding cyclic amplification) 的实验室技术支持 PrP^C 向 PrP^{Sc} 的特异性重复性转换,其导致小量 PrP^{Sc} 的扩增。尽管已在唾液、血液、尿和粪便中检测到 CWD 传染剂,但是从上述物质中直接免疫检测 PrP^{Sc} 尚未成功 (Haley 等,2009a,b)。另外,针对上述某些物质中 CWD 传染剂的成功检测还需要对连续 PMCA (sPMCA, serial PMCA) 的产物进行生物测定 (Mathiason 等,2006,2009; Haley 等,2009a,b; Tamguney 等,2009)。为了利于用外周组织 (尤其是血液) 对 TSE 进行临床前检测,可通过 PMCA (Saborio 等,2001) 扩增样品中的靶标 PrP^{Sc}。已报道,PMCA 提高了对来自实验性羊瘙痒病感染的啮齿动物 (Saborio 等,2001; Deleault 等,2003; Bieschke 等,2004)、分别天然感染牛海绵状脑病和羊瘙痒病的牛和绵羊 (Soto 等,2005) 以及最近地来自患有克雅氏病的人 (Jones 等,2007) 和患有慢性消耗性疾病的鹿 (Kurt 等,2007) 的脑中 PrP^{Sc} 检测的灵敏度。另外,已报道 PMCA 在绵羊和仓鼠 (均处于疾病的终末期) 的血液中和在症状发生前的动物中 (Castilla 等,2005a,b; Saa 等,2006; Murayama 等,2007; Thorne 和 Terry,2008) 以及在尿和脑脊液中 (Atarashi 等,2007,2008; Murayama 等,2007) 检测出 PrP^{Sc},这使得该技术成为有用的诊断工具。然而,到目前为止,由于需要多轮循环从而通过免疫印迹法看到终产物,因此 PMCA 亦受到了阻碍。事实上,进行多轮 PMCA 可导致假阳性结果。经过 192 个循环,对照血液样品显示出从 PrP^C 向 PrP^{Sc} 的自发转换,因此,这在某种程度上使得该技术不足以用于诊断目的。PMCA 具有巨大的潜力,但受到多种根本上的和技术上的困难 (包括实现最佳灵敏度所需的时间长度 (约 3 周)) 的阻碍。

[0015] 当前的学说为:PrP^{Sc} 与传染性直接相关,其在脑中的积累导致神经病变和临床疾病。还假设 PrP^{Sc} 积累之速率和方式以及由此的神经病变形成之速率决定了疾病的潜伏期 (Prusiner 等,1990; Carlson 等,1994)。然而还显示,与预期不同的是,在无症状小鼠的 CNS 中可存在高水平的 PrP^{Sc} 积累和传染性 (Bueler 等,1994)。对天然和实验感染的绵羊的另一些研究 (Madec 等,2004; Bulgin 等,2006) 也已表明 PrP^{Sc} 水平、IHC 染色拓扑学、组织学病变和临床疾病的程度之间不一致。

[0016] 为了提高食品安全性,使用死前、临床前测试 (即在症状出现前进行测试) 针对所有动物筛查朊病毒病是非常有益的。然而,在症状出现前的宿主中,PrP^{Sc} 水平非常低。此外,PrP^{Sc} 在机体组织中一般不均匀分布,其在神经系统组织中的浓度总是最高,而在容易获取的体液 (如,血液和尿) 中的浓度却非常低。因此,需要这样的测试来检测极少量的 PrP, 以及区分 PrP^C 和 PrP^{Sc}。

[0017] 确保能够进行早期诊断对于真正具有价值的治疗性介入来说是关键性的。对于要进入人类食物链的动物以及血液和组织捐献者来说,可在出现任何临床症状之前可对朊病毒传染剂进行检测是必需的。因此,针对朊病毒的灵敏度更高的检测方法有持续的需求。

[0018] 发明概述

[0019] PrP^C 的构象改变形式是 PrP^{Sc}。一些人认为 PrP^{Sc} 是 TSE 中的传染剂 (朊病毒传染剂),而另一些人则不这么认为。PrP^{Sc} 可以是疾病过程的神经病变产物、传染剂的组分、传染剂本身等。不管它在疾病状态中的实际功能是什么,但明确的是 PrP^{Sc} 与疾病进程特异性地相关,并且对其的检出指示了引起朊病毒病之传染剂的感染。

[0020] 本发明提供了通过在生物样品中检测 PrP^{Sc} 来诊断朊病毒病的方法等。所述生物样品可以是脑组织、神经组织、血液、尿、淋巴液、脑脊液或其组合。不存在 PrP^{Sc} 表明未感染多达本方法检出限的传染剂。检测到 PrP^{Sc} 的存在表明感染了与朊病毒病相关的传染剂。可在疾病进展的症状出现前阶段和有症状阶段检测朊病毒传染剂的感染。

[0021] 这些及其它改进已通过使用 SOFIA (开发用于 PrP^{Sc} 检测的基于激光的免疫测定 (Chang 等, 2009)) 来实现。SOFIA 的灵敏度和特异性 (Chang 等, 2009) 使得不需要进行 PK 消化以区分正常和异常的 PrP 同工型。此外, 检测血浆中的 PrP^{Sc} 已通过有限次 PMCA 然后 SOFIA 而解决了。由于 SOFIA 的灵敏性, 可减少 PMCA 的循环数, 从而降低了 PrP^{Sc} 自发形成和检出假阳性样品的机会。

[0022] 本发明满足了前述的在症状出现前和有症状的 TSE 感染动物 (包括人) 中进行灵敏度提高的朊病毒病检测的需要, 其通过提供使用高灵敏度仪器 (与先前所述的方法相比, 该仪器需要更少的样品制备物) 连同新近开发的针对 PrP 之 Mab 的分析方法来实现。本发明方法提供的灵敏度水平足以在脑组织中检出 PrP^{Sc}。当与有限次 sPMCA 联用时, 本发明方法提供的灵敏度水平足以在死前采集的血浆、组织和其它流体中检出 PrP^{Sc}。对于脑物质来说, 样品采集和分析之间的时间可少于 24 小时。本方法将用于抗原捕获和浓缩之 Mab 的特异性与包绕光纤检测技术的灵敏度相结合。与先前所述的在脑匀浆物中检测 PrP^{Sc} 的方法不同的是, 当用于研究脑匀浆物时, 这些技术不使用种子聚合 (seeded polymerization)、扩增或酶消化 (例如, 通过蛋白酶 K (或“PK”))。这是很重要的, 因为先前的报道已表明具有不同 PK 敏感性的 PrP^{Sc} 异构体的存在降低了该测定的可靠性。该测定的灵敏性使其适于作为用于在生物流体中快速检测朊病毒的平台。除了朊病毒病之外, 本发明方法可提供针对广谱的感染和疾病的快速高通量测试方法。

[0023] 尽管已发现将约 40 个循环的 sPMCA 与免疫沉淀联用不足以通过 ELISA 或 Western 印迹检测血浆中的 PrP^{Sc}, 但是通过 SOFIA 方法却很容易测量 PrP^{Sc}。根据本发明, 用于本发明测定平台必需的有限数目的循环基本上消除了获得 PMCA 相关之假阳性结果 (例如先前报道的那些 (Thorne 和 Terry, 2008)) 的可能性。

[0024] 以下代表了本发明的一些非限制性实施方案。根据第一个实施方案, 公开了用于在怀疑具有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测是否存在 PrP^{Sc} 的方法, 其包括如下步骤: 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc}; 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc}, 以得到经标记的 PrP^{Sc}; 以及利用分析仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}。

[0025] 根据本发明的第二个实施方案, 公开了用于在怀疑具有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测是否存在 PrP^{Sc} 的方法, 其包括如下步骤: 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc}; 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc}, 以得到经标记的 PrP^{Sc}; 以及利用分析仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}。在该实施方案中, 所述 PrP^{Sc} 是未经消化的。

[0026] 根据本发明的第三个实施方案, 公开了用于在怀疑具有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测是否存在 PrP^{Sc} 的方法, 其包括如下步骤: 通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc}; 用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc}, 以得到经标记的 PrP^{Sc}; 以及利用分析仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}。浓缩 PrP^{Sc} 与分析经标记 PrP^{Sc} 之间的持续时间优选为约 48 小时或更短。

[0027] 根据本发明的另一个实施方案,公开了用于在怀疑具有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测是否存在 PrP^{Sc} 的方法,其包括如下步骤:通过 sPMCA 扩增样品中的 PrP^{Sc};通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc};用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc},以得到经标记的 PrP^{Sc};以及利用分析仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}。

[0028] 根据本发明的又一个实施方案,公开了用于在怀疑具有 PrP^{Sc} 的生物样品中检测是否存在 PrP^{Sc} 的方法,其包括如下步骤:通过 sPMCA 扩增样品中的 PrP^{Sc};通过将 PrP^{Sc} 从样品基质中尽可能地分离出来以浓缩可能存在于所述样品中的 PrP^{Sc};用至少一个分子标记物标记浓缩的 PrP^{Sc},以得到经标记的 PrP^{Sc};以及利用分析仪器来检测经标记的 PrP^{Sc}。在该实施方案中,所述生物样品是脑组织、神经组织、血液、尿、淋巴液、脑脊液或其组合。

附图说明

[0029] 图 1 是显示根据本发明一些方法适于 PrP^{Sc} 分析的仪器的一个实施方案的示意图。

[0030] 图 2 是显示根据本发明一些方法适于 PrP^{Sc} 分析之仪器的端部孔口组件(end port assembly)的一个实施方案的侧视示意图。

[0031] 图 3 是根据本发明一些方法适于 PrP^{Sc} 分析之仪器的样品容器的一个实施方案的示意图。

[0032] 图 4 是从一个侧面看图 3 之样品容器的示意图。

[0033] 图 5 是从顶部看图 3 之样品容器的示意图。

[0034] 图 6 显示使用 Mab 08-1/5D6(A)、08-1/11F12(B) 和 08-1/8E9(C) 对来自感染 263K 的仓鼠(H)、感染羊瘙痒病的绵羊(S)和感染 CWD 的鹿(D)的未处理和经 PK 处理的全脑裂解物的 Western 印迹分析。

[0035] 图 7 显示使用比色法在 OD₄₀₅ 测量抗体结合。捕获 ELISA 测定使用 Mab 11F12 作为捕获试剂和经生物素化的 5D6 作为检测试剂。来自正常的和感染的仓鼠、绵羊和鹿的脑组织匀浆物。使用未经 PK 处理和经 PK 处理的脑裂解物进行测定。

[0036] 图 8 显示在捕获 ELISA 之后对未经 PK 处理的脑匀浆物进行 Western 印迹分析。在与图 7 所述同样的条件下,使用未经生物素化的检测试剂,利用正常绵羊(NS)、感染羊瘙痒病的绵羊(SS)、正常的鹿、感染 CWD 的鹿(CWD)、正常仓鼠(NH)和感染 263K 的仓鼠(263K)进行所述捕获 ELISA。使用 Mab 8E9 进行免疫染色。

[0037] 图 9 显示使用来自未感染的和感染的仓鼠、绵羊和鹿的脑裂解物在捕获 ELISA 中互换上述捕获试剂和检测试剂的比较。将使用 5D6 作为捕获试剂和 11F12 作为生物素化的检测试剂(5D6/生物素 11F12)的研究与使用 11F12 作为捕获试剂和 5D6 作为生物素化的检测试剂(11F12/生物素 5D6)的研究进行比较。

[0038] 图 10 显示使用图 1 的仪器获得的数据,显示罗丹明红的稀释物(■)以及来自小鼠(*)、仓鼠(◆)、绵羊(▼)和鹿(●)的 rPrP(重组 PrP)的相对信号强度。

[0039] 图 11 显示使用图 1 的仪器在来自感染的仓鼠、绵羊和鹿的经 PK 处理的和未处理的正常的(空心柱)和感染的(实心柱)的脑匀浆物中检测 PrP。X 轴的数值表示对初始样品 10 倍连续稀释的程度。例如,针对仓鼠的“-10”表示样品以 1×10^{-10} 的系数进行稀释。

[0040] 图 12 显示在 Mab 8E9 免疫沉淀之后对 PrP 进行 Western 印迹分析。

[0041] 图 13 显示 PrP 经 Mab 8E9 免疫沉淀的捕获 ELISA 分析结果。

[0042] 图 14 显示 sPMCA 之后对 PrP^{Sc} 进行 Western 印迹。

[0043] 图 15 显示羊瘙痒病绵羊的第三眼睑淋巴组织的免疫组织化学。在滤泡内可见 PrP^{Sc} 免疫组化染色（红色）。

[0044] 图 16 显示在进行和不进行 sPMCA 时,使用 SOFIA 检测羊瘙痒病绵羊之血液样品中的 PrP^{Sc}。

[0045] 图 17 显示在进行和不进行 sPMCA 时,使用 SOFIA 检测 CWD 血液样品中的 PrP^{Sc}。

[0046] 发明详述

[0047] “PrP^{Sc}”应理解为是指 PrP^C 的构象改变形式。PrP^{Sc} 与疾病过程特异性地相关,对其的检出指示感染了引起朊病毒病的传染剂。TSE 应被理解为包括但不限于人类疾病克雅氏病 (CJD)、格-施-沙综合征 (Gerstmann-**Sträussler**-Scheinker, GSS)、致命性家族性失眠症 (FFI, fatal familial insomnia) 和库鲁病 (kuru), 以及上述疾病在动物中的形式: 牛海绵状脑病 (BSE, bovine spongiform encephalopathy, 常称为“疯牛病”)、慢性消耗性疾病 (CWD, chronic wasting disease) (在麋鹿和鹿中) 和羊瘙痒病 (在绵羊中)。应理解,“蛋白质的”意指朊病毒可包含蛋白质以及其它生化实体,因而并非是指所述朊病毒仅由蛋白质组成。

[0048] 涉及浓缩 PrP^{Sc} 时使用的“尽可能地分离出来”应理解为是指:通过本文所述的方法,样品中残余的任何样品基质或非 PrP^{Sc} 材料不足以被检出或干扰检测。

[0049] “经标记的 PrP^{Sc}”应理解为是指已共价或非共价地连接荧光标记物的 PrP^{Sc}。优选地,单个 PrP^{Sc} 分子上连接一个荧光标记物。

[0050] “能够检测”意指:与分析不含经标记之 PrP^{Sc} 的样品时仪器产生的背景噪声信号相比,仪器产生显著更高的信号。尽管特定样品可包含高于阿摩尔 (attomole) 的量,但应理解,分析时经标记的 PrP^{Sc} 样品要被稀释至约 0.1 阿摩尔/毫升,仪器会产生可重复的和统计学显著的信号。

[0051] “阿摩尔的量”意为 0.1 阿摩尔至 1 飞摩尔。

[0052] “死前”应理解为是指从中采集样品的生物体死亡之前。

[0053] “临床前”或“症状出现前”应理解是指从不表现出朊病毒病症状的生物体中采集样品。

[0054] “种子聚合”应理解为是指引发从 PrP^C 向 PrP^{Sc} 的转换,所述 PrP^{Sc} 具有较高的 β -折叠片层 (蛋白酶抗性的) 含量。

[0055] “酶促消化”应理解为是指通过有意引入样品中的蛋白酶降解蛋白质,所述蛋白酶在特定氨基酸之间诱导选择性切割。“酶促消化”应理解为不包括自身消化或由样品中天然存在的酶引起的消化。本文使用的“未经消化的”应理解为是指在样品制备或分析期间均不进行 PrP^{Sc} 的酶促消化。

[0056] 本发明方法包括例如从期望确定是否已发生感染的动物或人中获得样品的步骤,所述样品可含有或不含有异常的 PrP 同工型 (PrP^{Sc})。如果样品来自被感染的生物体,则该样品包含 PrP^{Sc} 和样品基质,应理解所述样品基质包括非 PrP^{Sc} 组分 (例如细胞、细胞组分、生物分子、非 PrP^{Sc} 蛋白等)。所述样品可采集自:神经组织、血液、尿、淋巴液、脑脊液、其它体液,及其组合,以及包含这些。

[0057] 一经采集,所述 PrP^{Sc} 至少被半纯化或浓缩,其通过将目的 PrP^{Sc} 与样品基质进行分

离来实现。可通过本领域技术人员已知的多种方法进行浓缩,所述方法包括但不限于使用分子抗体、免疫沉淀、磁珠、塑性表面上的抗体捕获、应用磷钨酸钠、甲醇的方法,及其组合。在一个实施方案中,通过使用单克隆抗体进行浓缩。在 SOFIA 中,使用几种 PrP 特异性 Mab,所述 Mab 最近被报道当在捕获 ELISA 中一起使用时具有协同作用 (Chang 等,PrP Antibody Binding-induced Epitope Modulation Evokes Immunocooperativity,J.of Immunology, 205 卷,1-2 期,94-100 页 (2008))。

[0058] 还可通过 Kim 等,2005 (其通过引用并入本文中) 所述的技术 (其为基于免疫沉淀的捕获测定,使用经染料标记的抗 PrP Mab 连同第二种经生物素化的抗 PrP Mab 和缀合有链霉亲和素的磁珠) 进行浓缩。该技术的变化形式包括经染料标记的抗 PrP Mab 以及直接与磁珠缀合的第二 PrP Mab。

[0059] 浓缩的样品可包含至少 0.1 阿摩尔的 PrP^{Sc} ,或至少 200 阿摩尔,或者从约 0.1 阿摩尔至约 1.0 纳摩尔、或者从约 0.1 阿摩尔至约 1 飞摩尔、或者从约 0.4 至约 1.0 阿摩尔的 PrP^{Sc} 。

[0060] 可用一个或多个荧光分子来标记经浓缩样品中的 PrP^{Sc} 以得到经标记的 PrP^{Sc} 。可通过本领域技术人员已知的多种方法进行标记,包括但不限于荧光标记、磷光标记、放射性同位素标记、生物素化以及本领域技术人员了解的其它标记方法。在一个实施方案中,所述标记是荧光标记,荧光标记物是罗丹明红。

[0061] 在一个替代性的实施方案中,可通过除荧光以外的方法检测 PrP^{Sc} ,包括但不限于磷光,红外、可见光和紫外波长的吸收,以及本领域技术人员了解的其它光谱手段。

[0062] 在一个实施方案中,随后用合适的分析仪器分析所浓缩的样品,所述仪器能够灵敏而快速地检测 PrP^{Sc} 。在一个实施方案中,所述仪器能够检出阿摩尔量的经标记 PrP^{Sc} 。在一个实施方案中,包括浓缩 PrP^{Sc} 、标记 PrP^{Sc} 和检测的步骤的时间为 48 小时或更短,或者 24 小时或更短,或者 12 小时或更短,或者 3 小时或更短。

[0063] 在一个实施方案中,可针对本发明的目的应用例如 2005 年 12 月 7 日提交的美国专利申请 No. 11/634, 546 (其通过引用整体并入本文) 所述的仪器。图 1 示意系统 100 的一个替代性实施方案。在这一实施方案中,四个线性阵列 (linear array) 101 从样品托 (sample holder) 102 延伸至端部孔口 (end port) 103,其中安置有伸长的、透明的样品容器 306。将端部孔口的远端 104 插入端部孔口组件 200 中。所述线性阵列包含多个具有第一端部和第二端部的光纤,所述多个光纤任选地被保护性的和 / 或阻隔性的鞘所包绕。光纤的数目可变,在一个实施方案中,光纤的数目为约 10 至约 100 个,或者从约 25 至约 75 个,或者为约 50 个。线性阵列的数目可变,且至少为 2 个。线性阵列的最大数目取决于样品托的尺寸,因为样品托必须足够大以向光纤的第一端部提供足够的空间来包绕并靠近 (例如,约 1mm 至约 1cm) 样品容器。在一个实施方案中,线性阵列的数目为 2 至 10 个,或者为约 4 至 6 个,或者为 4 个。在一个实施方案中,所述线性阵列呈平面阵列安置,其中相邻的线性阵列彼此之间等距定位并包绕所述样品托。当线性阵列的数目为 4 个时,相邻线性阵列彼此之间以呈 90 度角定位。线性阵列的长度可在很大范围内选择,其取决于光纤的数目和性质。其长度必须足以允许在不损害光纤完整性的前提下捆束来自每个线性阵列的光纤。原则上讲,光纤的长度没有上限,其应使得样品位于远离用于分析样品之诊断设备的位置。

[0064] 光纤的第一端部可以以基本上线性的方式沿着包含样品之容器的长度而安置。光

纤的第二端部被捆束在一起形成单个端部孔口。换句话说,来自每个线性阵列之光纤的给定长度之第二端部混杂在一起形成单个束。优选地,来自每个线性阵列之光纤的第二端部在束内随机穿插。多个光纤接收由目的分析物发出的信号,并将该信号从光纤的第一端部传递至包含光纤之第二端部的端部孔口。所述光纤具有高数值孔径 (NA),其对应于 $\sin \theta / 2$, 其中 θ 是所接收的入射光的角度 (光接收角)。在这一实施方案中, NA 可为约 0.20 至约 0.25, 且光接收角为约 20 度至约 45 度。所选择的光接收角使得基本上所有的发射信号均可被所述多个光纤拦截。这确保了对来自稀释的分析物 (例如, PrP^{Sc}) 的信号的最佳收集效率。

[0065] 在一个实施方案中,所述光纤包含熔融二氧化硅。光纤的直径可为约 50 微米至约 400 微米。

[0066] 将来自每个线性阵列的光纤进行捆束提供了多种优势。可使用单个检测器,而无需针对每个线性阵列的检测器。对于包含四个线性阵列的系统来说,这使得检测区域的大小变为四个单独检测器的 1/4。这因此显著降低了背景噪声,继而提高了信噪比,并因而降低了检出限。在一个实施方案中,检测器的尺寸为约 $0.5\text{mm} \times 0.5\text{mm}$ 至约 $1\text{mm} \times 1\text{mm}$ 。本实施方案之系统的检出限为至少 0.1 阿摩尔分析物,或者为至少 200 阿摩尔、或者为约 0.1 阿摩尔至约 1.0 微摩尔、或者为约 0.1 阿摩尔至约 1 纳摩尔、或者为约 0.4 至约 1.0 阿摩尔分析物。或者,在本实施方案中,系统的检出限为至少 0.1 阿克分析物,或者为至少 10 阿克的分析物。

[0067] 图 2 示意本实施方案之端部孔口组件的一个实施方案。将包含成束光纤的单个端部孔口远端 104 插入到端部孔口组件 200 的入口 202。通过光纤,信号经端部孔口组件 200 传递至出口 207,并随后被传递到传出光纤 208,其继而与检测器相连。传出光纤 208 的直径可为约 300 微米至约 500 微米,且优选为约 400 微米。因此,所述端部孔口组件将单个端部孔口光耦合至检测器。所述端部孔口组件可包含第一透镜 203,其用作使入射信号准直。所述端部孔口组件还可包含第二透镜 204,其用作将传出信号会聚成适合传出光纤 208 的 NA。所述端部孔口组件还可包含至少一个陷波滤波器 (notch filter) 205 和至少一个带通滤波器 (bandpass filter) 206。

[0068] 合适的检测器的非限制实例包括光二极管检测器、光电倍增管 (photo-multiplier)、电荷耦合装置、光子计数器、光谱仪,及其任何组合。

[0069] 图 3 示意本实施方案之合适的样品托 102 的一个实施方案。设置了隔挡物 (spacer) 303,从而为伸长的、透明的容器 306 提供空间以穿过样品托 300。在一个实施方案中,样品托 300 为毛细管,并可由玻璃、石英或本领域技术人员已知的任何其它合适材料制成。仅作为举例,所述毛细管可容纳 100 微升液体。设置隔挡物 303 还提供了使光纤的第一端部包绕并靠近透明容器的狭缝 304 或空间。隔挡物 302 被顶端板 305 和底端板 302 固定到位,所述顶端板和底端板利用紧固物 301 (例如螺钉) 连接至隔挡物 303。

[0070] 所捕获的发出信号通过光检测器转化成电信号,并传递至分析仪 (未显示),所述分析仪接收电信号并分析样品中是否存在分析物。分析仪的实例是本领域技术人员公知的。所述分析仪可包括使得能够进行电信号之相灵敏度检测的锁定放大器 (lock-in amplifier),或本领域已知的用于分析由本文所述不同类型之光检测器产生的电信号的任何其它方法。

[0071] 可针对收集来自报告分子的光对开发用于这些测定的仪器进行优化。在基于荧光的测定中,目前使用的染料具有接近或高于 90% 的量子效率。在一个实施方案中,所述染料是罗丹明红 X (Invitrogen Corp., Carlsbad CA)。此外,对跨导前置放大器 (transconductance pre-amplifier) 和锁定检测器装置进行优化以便于低信号 / 低噪声检测。首先,选择用于光斩波器 (optical chopper) 的合适的调制频率,其应当与线频率或环境中其它电来源的噪声不接近。此外,锁定放大器应当采用线滤波 (line filtering)。在一个实施方案中,调制频率为 753Hz,且锁定放大器设置在 60Hz 和 120Hz 滤波。基于预期的信号水平来选择跨导前置放大器的灵敏度,并使前置放大器的输入阻抗最大化,并在一个实施方案中设定为 1nA/V。在一个实施方案中,带通滤波器的频率中心为斩波频率,例如 753Hz。

实施例

[0072] 1. 组织样品的采集

[0073] 按照 Chang, B. 等, " PrP Antibody Binding-Induced Epitope Modulation Evokes Immunocooperativity, " J. Neuroimmunol. 205 卷, 1-2 期, 94-100 页 (2008) 的描述采购并扩增感染 263K 羊瘙痒病的仓鼠品系。从感染了羊瘙痒病的绵羊和感染了 CWD 的白尾鹿的临床患病期间收集脑,并在 -80°C 冷冻。类似地,收获来自未感染之动物的脑并冷冻。按照 D. R. Brown 等, " Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase, " Biochem J. 344 卷 1-5 页 (1999) 的描述,将鹿、仓鼠、小鼠和绵羊 PrP 的全长编码区克隆进 pET-23 载体中,从而得到无标签的蛋白质 (rPrP)。表达和纯化与 C. E. Jones 等, " Preferential Cu²⁺ coordination by His⁹⁶ and His¹¹¹ induces β -sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of the prion protein, " J. Biol. Chem. 279 页, 32018-32027 (2004) 的操作步骤基本相同。

[0074] 使用在磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中制备的 20% 羊瘙痒病绵羊脑匀浆物 (来自临床和免疫组织化学阳性动物的 7 份羊瘙痒病脑的混合物) 进行实验性口服感染。所有未感染的动物都被安置在隔离的无羊瘙痒病的设施中。绵羊之羊瘙痒病的临床症状包括:轻微的头顶部震颤发展到全身震颤、摩擦导致的羊毛脱落、啃咬肢端、高度敏感和步态异常。

[0075] 商业公司 (Gene Check, Inc., Greeley, CO) 进行了绵羊的基因分型。

[0076] 对于 IHC 而言,在水中清洗经福尔马林固定的第三眼睑组织 15 分钟,并在 99% 甲酸中浸泡 1 小时。用水清洗 3 小时后,在 Microm STP 120 中,所述组织被石蜡包埋,并切成 4 微米用于封片。使载玻片干燥至少 24 小时,脱石蜡并随后使用 Ventana (Ventana Medical Systems Inc., Oro Valley, AZ) 的专利试剂 (朊病毒增强溶液和抗 PrP 抗体) 和 Benchmark LT 自动化系统进行免疫染色。

[0077] 对于采血 (经 IACUC 批准) 而言,束缚动物并用针插入颈静脉。采血 (使用柠檬酸钠作为抗凝剂) 之后,立即将血液的一半冷冻并运走。4°C 下,将剩余一半的所收集全血样品低速离心 15 分钟。取出血浆,冷冻并利用干冰运送。

[0078] 白尾鹿的饲养和取样方案是经 Colorado Division of Wildlife's (CDOW) IACUC 批准的。使用罐装浓缩牛奶和已有方案 (Wild 和 Miller 1991; Wild 等 1994) 用奶瓶饲喂来自几个放养来源的新生白尾鹿的幼鹿。在整个研究中,除了采集样品期间之外,鹿被

限制在生物安全围场中。在所有的围场中,提供自由摄取的食物、水和补充剂。在约 6 月龄时,将约 0.5g 同种的、合并的、经感染的脑物质置于舌根来口服接种白尾鹿幼鹿;先前的分析显示这种接种混合物 (inoculum pool) 是感染性的,并且每克脑组织含有约 $6 \mu\text{g}$ PrP^{CWD} (Raymond 等 2000 ;Wolfe 等 2007)。所有鹿均由对识别 CWD 之临床症状富有经验的兽医来评估,并主观地对行为改变、身体状况变差、共济失调、流涎或烦渴进行打分。用于本研究在五只鹿在本源朊病毒蛋白基因第 96 位密码子处的甘氨酸和丝氨酸是杂合的,在感染后 253 或 343 天 (dpi, day post infection) 的扁桃体活检中有 PrP^{CWD} 积累 (Wolfe 等 2007),并在 891 至 1774dpi 时的尸检中被证实为朊病毒感染。

[0079] 891dpi 时,从所述五只接种的白尾鹿中采集血样。取样时,其中一只动物 (BC04) 处于临床慢性消耗疾病的终末期,两只 (N204 和 W1004) 显示身体状况有些差,而另外两只 (I304、K304) 临床上正常。对于取血样来说,用甲苯噻嗪 (xylazine) 使鹿镇静,对覆盖颈静脉的皮肤进行无菌处理,通过颈静脉穿刺将血液收集进入经柠檬酸钠处理的塑料袋中。冷却血袋,并连夜运走用于处理。

[0080] 2. 单克隆抗体的制备

[0081] 使用最初由 Hilmert 和 Diringer (1984) 报道并由 Rubenstein 等 (1994) 改良的方法,从感染 263K 的仓鼠脑中分离出由含有第 90-231 位氨基酸 (aa) (PrP_{90-231}) 之核心蛋白构成的经 PK 处理的 PrP^{Sc} 。使用盐酸胍溶解该材料,按照先前的描述 (Kang 等, 2003) 进行提取和甲醇沉淀,并用作抗原。免疫 $\text{PrP}^{-/-}$ 小鼠,并按照先前描述的 ELISA (Kascsak 等, 1987) 监测其免疫应答。其中一只经免疫的小鼠用于制备杂交瘤。此小鼠在融合前 4 天通过静脉内途径接受磷酸盐缓冲盐水 (“PBS”) 中抗原的最后一次免疫。将脾细胞与表达降低水平之细胞表面 PrP^{C} 的 SP2/0 骨髓瘤细胞系融合 (Kim 等, 2003)。按照先前的描述 (Kascsak 等, 1987) 通过 ELISA 筛选杂交瘤,所得到的细胞通过有限稀释被克隆 3 次。使用一次性生物反应瓶 (Integra Biosciences, Switzerland) 进行大规模 Mab 生产,使用蛋白 G 免疫亲和层析 (Pierce, Rockford, IL) 从培养基中纯化出抗体。利用微量 BCA 蛋白质测定 (Pierce) 来测定蛋白质,并用小鼠 Mab 分型试剂盒 (Pierce) 进行分型。使用 EZ-link 生物素化试剂盒 (Pierce) 对每种 Mab 进行生物素化。

[0082] 使用溶解的 PrP^{Sc} 作为免疫原和低 PrP 表达的 SP2/0 骨髓瘤细胞系制备多种 Mab。选择这些 Mab 中的三种 (即 08-1/5D6 (5D6)、08-1/11F12 (11F12) 和 08-1/8E9 (8E9)) 用于本研究,并分别分型为 IgG1、IgG2b 和 IgG2b。所有这三种 Mab 均各自与正常的和疾病相关的 PrP 同工型反应。

[0083] 全脑裂解物的 Western 印迹 (图 6) 表明,所有这三种 Mab 都与来自感染 263K 的仓鼠、感染羊瘙痒病的绵羊和感染 CWD 的鹿的未经蛋白酶处理的脑样品以及经 PK 处理的 PrP^{Sc} 反应 (图 6)。使用未处理的和经 PK 处理的部分纯化的 PrP^{Sc} 制备物也观察到类似的结果 (数据未显示)。这些 Mab 也对正常的和异常的 PrP 同工型以及分离自感染有 ME7、139A 和 22L 的羊瘙痒病小鼠品系的小鼠脑和感染有 CJD 的人脑的经 PK 处理的 PrP^{Sc} 以及来自所有受试物种 (包括牛) 的未感染脑物质的 PrP^{C} 有免疫反应性 (数据未显示)。

[0084] 通过间接 ELISA,所述三种 Mab 对纯化自 263K 感染的仓鼠脑的经 PK 处理的 PrP^{Sc} 有免疫反应性。反应性程度取决于变性处理的程度。单独使用加热或 SDS 处理提高免疫反应性,而这两种处理联用得到最高水平的抗体结合和免疫反应性 (表 1),大致为两种处理

的加和作用,这提示表位暴露是受多种机制影响的。令人感兴趣的是,尽管 5D6 结合构象表位,但当 PrP 变性时该 Mab 的反应性并未损失,相反却得到增强。先前有报道 (Tayebi 等, 2004) 热变性不足以破坏 PrP^{Sc} 的多聚体结构。另外,通过 ELISA, Mab 对来自未感染脑的 PrP^C 和非变性脑匀浆物中的总 PrP (正常和异常的 PrP 同工型) 具有同等的免疫反应性。用 SDS 和热变性后,免疫反应性同等地增强约 2 倍。PK 处理和变性之后,因为蛋白水解消化而存在较少的外源性脑蛋白结合,PrP^{Sc} 的免疫反应性额外提高 3 倍 (数据未显示)。

[0085] 为了提高 PrP 检测的特异性和灵敏度,使用了包括生物素化检测抗体的捕获 ELISA 测定。如所预期地,对于每种生物素化的 Mab 来说,每个抗体分子与 5 ~ 6 个生物素结合。另外,如通过使用部分纯化的经 PK 处理的 PrP^{Sc} 进行间接 ELISA 所评估地, Mab 的生物素化不干扰或降低其免疫反应性 (数据未显示)。因此,检测抗体的结合和反应性上的任何差异都不是物理生物素化过程的结果。使用经 PK 处理的已用 SDS 和热变性的 PrP^{Sc} 检测了多种 Mab 组合,每种抗体均作为捕获试剂和作为检测试剂来进行评估 (表 2)。仅有一种抗体组合,即 Mab 11F12 作为捕获试剂和生物素化 5D6 作为检测试剂的组合成功地结合并鉴定出 PrP^{Sc}。无论 PrP^{Sc} 是否来自 263K 感染的仓鼠、羊瘙痒病绵羊或感染 CWD 的鹿,结果都是相同的。然后,使用 11F12-5D6Mab 组合的捕获 ELISA 测定用于评价其在来自未感染的和感染的仓鼠、绵羊和鹿中的全部的和经 PK 处理的脑匀浆物中检测 PrP 的能力 (图 7)。与上述的利用纯化的仓鼠脑 PrP^{Sc} 进行的间接 ELISA 测定的结果类似,用捕获 ELISA 测定检测 PrP 也取决于表位可用性,并由对脑裂解物的最初处理而确定。与未感染的脑物质相比,来自感染动物的未处理之脑裂解物显示出信号强度的略微 (1.5 倍) 增加,而单独使用去污剂或热变性导致 4 至 7 倍的增加。意料之中地,当联合使用 SDS 和加热处理时,达到了 PrP^{Sc} 检测的最高水平 (大于 10 倍)。另外,SDS 的浓度增加超过 1% 降低了 PrP^{Sc} 的可检测性,这很可能是因为抗体-抗原结合的抑制和 / 或逆转所致。如下文所示地,这种苛刻的变性处理不足以完全破坏 PrP 的构象。先前有报道称,羊瘙痒病的传染性以及可能地 PrP^{Sc} 构象的某些方面可在经过 SDS、加热和 SDS-PAGE 处理后的纯化的 PrP^{Sc} 制备物中维持 (Brown 等, 1990 ; Rubenstein 等, 1994)。

[0086] 通过捕获 ELISA,可从来自全部三个物种的未经 PK 处理的正常脑匀浆物中检出 PrP^C。在所有情况下,信号强度 (~ 0.25-0.3) 不超过背景 (~ 0.12-0.15) 的两倍。将该材料从孔中洗脱并用 Western 印迹进行检测。与上述直接从未经 PK 处理的脑匀浆物中检测 PrP^C 的结果不同的是,所洗脱样品的 Western 印迹结果仅检出 IgG 轻链和重链。PrP^C 不可检测是由于结合物质的低水平所导致的。PK 消化后,ELISA 值降至背景水平,这表明 PrP^C 被清除了。通过捕获 ELISA 测定,可在来自 263K 感染的仓鼠、羊瘙痒病和 CWD 绵羊的经 PK 处理的脑匀浆物中很容易地检测到 PrP^{Sc}。令人感兴趣的是,利用未经 PK 处理的同时含有 PrP^C 和 PrP^{Sc} 的脑匀浆物进行的捕获 ELISA 测定显示出高于 PrP^C 所致信号强度 (通过未经 PK 处理的正常组织来测定) 和 PrP^{Sc} 所致信号强度 (通过经 PK 处理的感染组织来测定) 之总和的信号强度 (图 7)。增加的信号强度可能是因为 sPrP^{Sc} 的存在和结合所导致。另一种解释是蛋白质 (可能是全长 PrP^{Sc}) 与捕获 Mab 的结合诱导了抗原的空间改变,导致针对第二 Mab 的表位更易接近。这一过程被称为“正免疫协同性”。

[0087] 如图 7 所示,用本研究中使用的给定 Mab 组合,正免疫协同性的程度是物种依赖性的。与仅从 PrP^C 和 PrP^{Sc} 组合计算得出的结果相比,来自感染 CWD 的鹿的 PrP^{Sc} 与 5D6 的结

合显示了高出 58% 的最大水平,而羊瘙痒病绵羊的 PrP^{Sc} 显示了 46% 的增加。来自 263K 感染的仓鼠的 PrP^{Sc} 显示了最低的、却依然显著的 40% 的增加。图 7 中的数值是根据每个物种的六份单独样品的三次读数,并表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。

[0088] 抗体诱导的 PrP^{Sc} 空间重排和 / 或构象改变可通过显示 11F12-5D6 所捕获物质具有针对另一 PrP 特异性 Mab 的改变的表位而加以证实。利用未经 PK 处理的、经 SDS 和加热变性的 PrP^{Sc} 进行捕获测定。然后,与生物素化的 Mab 8E9、链霉亲和素 - 碱性磷酸酶和底物一起孵育。没有高于背景的信号表明 Mab 8E9 的表位不再可获得或不再可接近。然而,从微量滴定孔中洗脱 11F12-5D6 所捕获的物质并然后用 Mab 8E9 进行 Western 印迹和免疫染色,显示出强的 PrP^{Sc} 染色,这表明 Mab 8E9 表位又再次可获得 (图 8)。可能是 SDS-PAGE 样品缓冲液的处理以及在 SDS 存在下进行电泳改变了 11F12-5D6 与 PrP^{Sc} 的结合,并逆转了抗体诱导的 PrP^{Sc} 改变,从而再一次使 8E9 结合成为可能。

[0089] 尽管利用 Western 印迹和间接 ELISA 测定 Mab 8E9 能够直接结合 PrP^C 和 PrP^{Sc},但是在捕获 ELISA 测定中用 8E9 替代 5D6 却导致 PrP 的不可检出 (其表明生物素化的 8E9 不与抗原结合)。另外,11F12-5D6 抗体对的 PrP^{Sc} 特异性不仅由于这些特异性 Mab 的存在所致,也由于结合事件的顺序所导致。当与 11F12-生物素化 5D6 组合 (11F12/生物素 5D6) 相比时,交换所述抗体的顺序 (即,使用 5D6 作为捕获试剂,使用生物素化的 11F12 作为检测试剂 (5D6/生物素 11F12)) 导致对来自未经 PK 处理的脑裂解物的最小 PrP^{Sc} 结合 (图 9)。通过比较 PrP 信号和背景信号的差异获得信噪 (S/N) 比,所述 PrP 信号是在使用感染的脑裂解物的捕获测定中获得的,所述背景信号获自来自仓鼠、绵羊和鹿的脑组织的未感染材料 ($S/N = (S - S_0) / (3 \sigma S_0)$; 其中 S = 信号, S_0 = 平均背景信号, σS_0 = 背景信号的标准偏差)。小于 1 的 S/N 比值表明 Mab 的结合非常弱,以致所测量的信号包含显著量的噪声。另一方面,等于 1 或大于 1 的 S/N 表明测量中的噪声并不显著,表明测量结果中的大部分功率是特异性 Mab 结合的结果。当 S/N 比值增加时,置信水平指数增加。对于 5D6/生物素 11F12 对来说,仓鼠、绵羊和鹿的 S/N 比值分别为约 0.6、0.1 和 0.3,表明 Mab 的结合是非特异性的。然而,对于 11F12/生物素 5D6 组合来说, S/N 比值为约 19 (仓鼠)、28 (绵羊) 和 42 (鹿)。这些比值表明高度显著的特异性 Mab 结合特性。图 9 中的值基于对每个物种的六份单独样品的三次读数,所计算的 ELISA 结果以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。将感染样品的增加的抗体结合 (根据 OD₄₀₅) 与未感染的对照相比较。对感染样品的信号功率与对照样品的功率 (噪声) 计算得到的信噪比 (S/N) 以对数作图。

[0090] 3. 免疫测定

[0091] 为制备 10% 脑匀浆物,在 1mM 苯甲磺酰氟 (PMSF) 存在下 (如果要用蛋白酶 K (PK) 处理匀浆物,则从裂解缓冲液中省去 PMSF),在 10 倍体积的冰冷裂解缓冲液 (10mM Tris-HCl、150mM NaCl、1% IgepalTM CA-630 (Nonidet P-40)、0.5% 脱氧胆酸盐、5mM EDTA, pH 8.0) 中匀浆脑组织。以 1,000 $\times$ g 离心 10 分钟后,分装上清液并储存于 -80 $^{\circ}$ C。

[0092] 用于捕获测定的方案和试剂描述于 Chang, B. 等, " PrP Antibody Binding-Induced Epitope Modulation Evokes Immunocooperativity, " J. Neuroimmunol. 205 卷, 1-2 期, 94-100 页 (2008) 中,其内容通过引用整体并入本文。如下文所述,本文中使用的产生鼠单克隆抗体的杂交瘤细胞系已如所示进行了保藏。对于捕获 ELISA 测定来说,在室温下,用亲和纯化的 11F12 捕获单克隆抗体 (Mab) (5 μ g/ml) 包被 96

孔板 2 ~ 3 小时。在 4℃ 下,用 PBS 中的 3% 牛血清白蛋白 (Sigma) 过夜封闭所述经包被的孔。用 PBST 将所述孔清洗三次。抗原是添加了终浓度为 1% 的 PMSF 的未经 PK 处理或经 PK 处理 (100 μ g/ml PK, 50℃, 30 分钟) 的脑裂解物。用 1% SDS (终浓度) 处理所有样品, 100℃ 下加热 10 分钟, 并以 16,000 $\times$ g 离心 5 分钟。以 10 倍系列稀释上清液, 每孔中加入 100 μ l。在 37℃ 下孵育板 1 小时。将孔用 PBST 清洗三次, 加入 100 μ l 生物素化的 5D6 检测剂 Mab (5 μ g/ml)。60 分钟后, 用 PBST 洗所述孔, 并于 37℃ 下加入 100 μ l 链霉亲和素缀合的碱性磷酸酶 (1 : 5,000) 60 分钟。向每孔中添加 PNPP (磷酸 4- 硝基苯二钠盐六水合物) (Sigma) 底物溶液 (100 μ l), 60 分钟后, 在 OD₄₀₅ 用 ELISA 读数仪 (Bio-Tek, Vermont, NY) 测量产物。

[0093] 对于激光分析来说, 用生物素化的 Mab 5D6 孵育, 然后添加链霉亲和素缀合的罗丹明红 (1 : 1000)。37℃ 下孵育 60 分钟后, 用 PBST 清洗孔, 并在 100℃ 下用 100 μ l 的 1N NaOH 处理 10 分钟, 并随后在室温下振摇 20 分钟。所述材料被置于 100 μ l Microcap™ (Drummond Scientific, Broomall, PA) 微毛细管中, 所述微毛细管随后被插入特别设计的管状样品托中用于激光激发和发射检测。计算相对于初始的脑组织稀释度。如图例中所述, 每个值 (数据点) 表示来自多个测定的平均值 $\pm$ 标准偏差 (SD)。

[0094] Western 印迹

[0095] 如上所述, 在裂解缓冲液中制备 10% 的脑匀浆物。低速 (2000 $\times$ g, 10 分钟) 离心样品。将 10 微升上清液与最终的 1 $\times$ 样品缓冲液混合, 在 100℃ 下加入 4 分钟, 并用 12% 丙烯酰胺凝胶进行 SDS- 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE), 转移到硝酸纤维素膜上, 并以 NBT 和 BCIP 为底物使用链霉亲和素缀合的碱性磷酸酶 (Kascsak 等, 1986) 或者按照先前所述 (LaFauci 等, 2006) 利用 super signal west femto 最高灵敏度底物 (Pierce) 通过辣根过氧化物酶缀合的山羊抗小鼠 IgG (Pierce™) 进行免疫染色。对于 SDS-PAGE 之前经 PK 消化的样品, 50℃ 下, 将低速离心得到的 40 μ l 上清液与 100 μ g/ml PK (终浓度) 孵育 30 分钟, 然后添加 1% PMSF、1 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲液, 并在 100℃ 下加热 5 分钟。

[0096] 5. 免疫沉淀

[0097] 用 PBS 将 MagnaBind 蛋白 G 珠 (Pierce) 清洗 3 次, 用 50 μ l PBS 重悬, 向 200 μ l 的 10% 脑匀浆物中添加总体积 1.2ml PBS 中的 50 μ g Mab 8E9 (10mg/ml)。室温下混合 1 小时后, 利用磁场分离磁珠, 用含有 0.2% 吐温 20 的 PBS (PBST) 洗 3 次, 并随后重悬于 600 μ l PBS 中。在 100℃ 下加热 10 分钟并以 16,000 $\times$ g 微量离心 3 分钟后, 将上清液用于捕获 ELISA。

[0098] 对于血液样品来说, 将 magnaBind 蛋白 G 珠重悬于 100 μ l PBS 中, 然后添加总体积为 5ml 的 PBS 中的 100 μ g Mab 8E9, 并在室温下混合 1 小时。用 PBST 清洗所述珠, 用含有 500 μ l 血浆的 5ml PBS 重悬, 并再孵育 1 小时。如上针对脑的描述来分离所述珠, 用 PBST 清洗, 加热, 并通过捕获 ELISA 分析经微量离心的上清液。

[0099] 6. 蛋白质错误折叠循环扩增 (PMCA, protein misfolding cyclic amplification)

[0100] 作为用于脑和血液 sPMCA 的 PrP^C 来源, 对来自正常仓鼠、绵羊和鹿的 10% (重量/体积) 脑匀浆物 [在含有 150mM NaCl、1.0% Triton X-100、4mM EDTA 和完全蛋白酶抑制剂混合物 (complete protease inhibitor cocktail) (Calbiochem) 的 PBS 中制备] 进行离

心 ($1,500\times g$, 30 秒), 并迅速冷冻上清液。将来自 263K 感染的仓鼠、羊瘙痒病绵羊和 CWD 鹿的脑匀浆物的 $500\mu l$ 等份的 10 倍系列稀释物 (10^{-8} 至 10^{-11}) 与来自对应物种的 $100\mu l$ 的 10% 正常脑上清液混合, 并振摇孵育 (37°C 下 1 小时)。然后对各样品进行超声 (28W 输出功率), 然后添加额外的 $100\mu l$ 的 10% 正常脑匀浆物, 并孵育 (37°C 下振摇孵育 1 小时)。这被定义为一个扩增循环。每轮 5 个循环之后, 通过从初始反应管中移出 $500\mu l$ 的 PMCA 反应混合物至新的管并添加 $100\mu l$ 的 10% 正常的脑匀浆物来继续进行 PMCA。与上述针对脑的 PMCA 类似, 利用 $500\mu l$ 等份的未稀释之羊瘙痒病绵羊或 CWD 鹿的血浆进行 PMCA。PMCA 之后, 以 $2,000\times g$ 离心样品 10 分钟。对于脑样品来说, 用蛋白酶 K (PK) ($100\mu g/ml$) 消化 $200\mu l$ 上清液 (50°C , 30 分钟), 然后添加 1% 蛋白酶抑制剂混合物和 1% SDS。 100°C 下加热样品 10 分钟, 用 Western 印迹法 (Chang 等 2009) 分析 $10\mu l$ 等分试样。对于血液来说, 在 PMCA 之后, 不处理或者用 PK 处理 $500\mu l$ 经扩增的血液样品, 然后在 Western 印迹或 SOFIA 分析之前, 用 Mab 8E9 进行免疫沉淀。对于全部 PMCA 样品来说, 相对于初始的未稀释脑或血液样品来表示稀释度。对未进行 PMCA 的血液样品进行免疫沉淀, 并如上所述进行类似处理 (但不进行超声处理和 37°C 孵育循环)。

[0101] 7. SOFIA

[0102] 用捕获 Mab 11F12 ($100\mu l$, $5\mu g/\text{孔}$) 在室温下包被 96 孔高结合板 (Costar, NY) 3 小时, 并在 4°C 用 TBS 中的酪蛋白过夜封闭。将蛋白 G 磁珠和 Mab 8E9 混合 60 分钟, 用 PBST 清洗 3 次, 沉淀被重悬于 $800\mu l$ PBS 中。离心血液样品 ($800\times g$, 5 分钟), 并将 $800\mu l$ 上清液与 SDS (1% 终浓度) 混合, 在 100°C 下加热 10 分钟, 与 G 珠-Mab 8E9 混合 60 分钟, 并用 PBST 清洗 3 次。清洗过的最终沉淀用 $800\mu l$ PBS 重悬, 并加热 10 分钟。以 $16,000\times g$ 离心 5 分钟后, 向每孔添加 $100\mu l$ 上清液。室温下孵育 (1 小时) 并用 PBST 清洗, 加入 $100\mu l$ 生物素化的 Mab 5D6 ($2\mu g/\text{孔}$) 1 小时, 然后进行清洗并与 $100\mu l$ 链霉亲和素-罗丹明红-X 缀合物 (Invitrogen) 一起孵育 1 小时。用 PBST 清洗 4 次后, 添加 $100\mu l$ 的 1N NaOH, 并加热该板 (100°C , 10 分钟), 室温下混合 30 分钟, 并用等摩尔量的 HCl 中和。对 $90\mu l$ 等分试样进行分析。

[0103] 8. 仪器

[0104] 所述装置是围绕常用的一次性 100 微升微毛细管 (Drummond Scientific Co., Broomall, PA) 而设计的样品托。通过沿毛细管轴向会聚来自固态倍频 Nd:YAG 激光器 (Beam of Light Tech. TM, Clackamas, OR) 的暂短调制光来激发样品, 功率一般为 30mW, 连续波的波长为 532nm, 该波长与罗丹明的吸收峰很好地匹配。光纤组件被设计成包含 4 个线性阵列, 其跨越毛细管长度的约 1/3, 且彼此之间围绕毛细管的周长呈 90 度定位。由于光纤的大数值孔径 (0.22, 或接受角为 $\sim 23^{\circ}$), 光纤的这种定位导致对样品视野的完全覆盖。4 个线性阵列收集的光被捆绑在一起 (即, 捆束或合并), 并会聚进入传递光学系统, 所述传递光学系统中安置了全息陷波滤波器 (holographic notch filter) (Kaiser Optical Systems Inc. Ann Arbor, MI) 和带通滤波器 (Omega Optical, Inc. Brattleboro, VT)。这些分别用于消除来自激发光源的散射光和对报告染料的荧光检测进行频带限制 (band-limit)。光随后会被会聚回单个、多模式的 400 微米光纤 (Thorlabs TM, Inc. Newton, NJ) 并偶联至单个低噪声光电二极管检测器 (United Detector Technology, Hawthorne, CA) (其被安置于直接位于检测电子器件的前置放大器上的 BNC 连接器上)。信号检测采用相灵敏的或“锁定”的检测

方案。用光学斩波器 (Thorlabs Inc.) 调制激发源, 以产生针对检测系统的参考频率。所述二极管检测器被安置在跨导前置放大器 (Stanford Research Systems, Inc. Sunnyvale, CA) 的输入端, 以降低总的线阻抗并消除与这些低水平信号相匹配的阻抗的难题。随后用锁定放大器 (Stanford Research Systems) 检测所述信号, 通过 LabView™ (National Instruments Inc., Austin, TX) 进行数据采集。该程序由电子条形图表组成, 其支持锁定放大器的电压读数, 所述读数周期性地将测量值的历史数据呈现给操作者, 并以 ASCII 文件存储带有时间印记的数值。应当选定锁定放大器的时间常数, 以提供十分之几赫兹的频带宽。为进行这些测量, 选定了 3 秒的时间常数。在获得稳定读数的过程中 (在该情形下为 3 至 30 秒), 所述锁定需要多个时间常数。加载新样品之后, 在信号稳定后 (20 至 30 秒) 记录测量值。对激发源的调制和锁定检测器的参考频率为 753Hz, 选择该频率用以使环境噪声最小化。除了以线频率过滤, 锁定放大器还使用两倍线频率过滤, 以调制频率带通过滤前置放大器信号。对于所述样品来说, 选定 1nA/V 的前置放大器灵敏度, 得到 1M Ohm 的输入阻抗。在进行测量时, 保留一系列启动操作, 包括: 所有电子器件 (激光器、锁定放大器、前置放大器) 预热 15 分钟, 目测检查暗信号水平以确保系统正确地电接地, 测量激光器的功率以检查稳定性和输出水平, 目测检查激光器排列。使用装有经蒸馏的去离子水的毛细管来检查基线信号的对照测量值。

[0105] 通过测量浓度递减的罗丹明红的荧光信号发射来测试仪器的灵敏度极限。浓度为 0.01 阿克 (ag) [20 阿摩尔 (am)] 时, 罗丹明红是可检测的 (图 10)。通过使用来自鹿、仓鼠、小鼠和绵羊的全长重组 PrP (rPrP) 进行测定来进行特异性和灵敏度的测定。无论测试什么物种, 可检测的极限 $\geq 10\text{ag}$ rPrP。再看图 10, 数据是利用图 1 中的仪器获取的, 其中向 100 μl 微毛细管中加入罗丹明红 (■) 的水稀释物, 并记录包绕光纤荧光信号发射。基于只有水时的荧光信号发射来计算相对信号强度。在来自小鼠 (*)、仓鼠 (◆)、绵羊 (▼) 和鹿 (●) 的情形中, 用 1% PrP^{-/-} 脑匀浆物稀释 rPrP, 并进行 SOFIA。基于单独使用 rPrP 稀释物 (1% PrP^{-/-} 脑匀浆物) 进行的类似测定来计算相对荧光信号强度。针对每个 rPrP 浓度, 在 1nA/V 的前置放大设置下, 一式三份进行测定, 以信号强度 (与对照相比的增加百分比) 的平均值 $\pm$ SD 对数据进行作图。

[0106] 检测来自正常和感染的仓鼠、鹿和绵羊的脑匀浆物是否可用于本发明的方法。10% 脑匀浆物的 Western 印迹证实初始材料中存在 PrP^{Sc}。在 PK 处理之前的 10% 脑匀浆物中清晰地显示典型的 PrP 条带模式, 在 PK 消化后, 条带向较低分子大小的 PrP^{Sc} 特征性地移动, 伴有 PrP^C 从正常仓鼠脑物质中清除, 作为完全蛋白水解消化的确证。来自临床动物的经去污剂提取的脑匀浆物的系列稀释物已证明 Western 印迹法对 PrP^{Sc} 的检出限为约 $10^{-3} \sim 10^{-4}$, 而用捕获 ELISA 检测 PrP^{Sc} 在另外进行 $10^1 \sim 10^2$ 倍稀释的情况下仍是灵敏的 (数据未显示)。相比之下, 使用同样的 Mab 和脑匀浆物, 本文中报道的测定的灵敏度比 Western 印迹法和捕获 ELISA 高出至少 5 个数量级。使用本发明的方法, 使用信号与基线的比值 (S/B) 来评估脑匀浆物中 PrP 的可检测性。已确定, 大于 1.1 的 S/B 比值表明存在 PrP。通过本发明的方法测定来自仓鼠、绵羊和鹿的正常和感染的脑组织的、经 PK 处理的和未处理的脑匀浆物的系列稀释物 (图 11)。数值表示为以来自样品的罗丹明红荧光发射信号 (S) 与来自只有稀释物 (1% PrP^{-/-} 脑匀浆物或匀浆缓冲液) 荧光发射的背景基线信号 (B) 的比值。数据表示为三次独立实验的平均值 $\pm$ SD, 每次独立实验都在 1nA/V 的前置放大器设置下针

对每个脑匀浆稀释物一式三份进行。如预期地,经 PK 处理后,无论测试浓度如何,来自正常脑组织的所有样品的 S/B 比值均低于 1.1,表明不存在 PrP^C。如总的信号输出或 S/B 比值高于 1.1 所证明地,来自感染仓鼠的经 PK 处理的脑匀浆物的 10 倍系列稀释物的蛋白酶抗性 PrP^{Sc} 在 10⁻¹¹ 稀释时是可检出的,而来自绵羊和鹿的可检测稀释度为 10⁻¹⁰。此外,对于仓鼠以及绵羊和鹿来说,来自 PK 处理的脑匀浆物的最大 PrP^{Sc} 检测范围为 10⁻⁷ ~ 10⁻⁸ 稀释。

[0107] 在 10 倍系列稀释未经 PK 处理的正常脑匀浆物的情形中,对于仓鼠来说,用 SOFIA 可检测 PrP^C 的稀释度为 10⁻¹¹,对于鹿和绵羊来说则为 10⁻¹⁰ (峰值检测 10⁻⁶ ~ 10⁻⁷ 稀释),而后 S/B 比值都降至 1.1 以下。来自感染 263K 的仓鼠、感染羊瘙痒病的绵羊和感染 CWD 的鹿的未经 PK 处理的脑组织的 S/B 比值也表明 PrP 的存在情况。来自感染组织的系列稀释脑匀浆物都显示:对于绵羊和鹿来说 10⁻¹¹ 稀释 (峰值检测为 10⁻⁷) 以及对于仓鼠来说 10⁻¹³ 稀释 (峰值检测为 10⁻⁸) 时 S/B 值大于 1.1。这些结果表明,来自未经蛋白酶处理的感染脑组织的 PrP 可被稀释至超过 PrP^C 可检测性水平来稀释,但仍然维持对总 PrP^{Sc} 的检测能力。这些结果进一步提示,在临床疾病期的感染脑中,与 PrP^C 相比,总 PrP^{Sc} 至少多出 1log。支持这一点的是,以前已报道过,在羊瘙痒病感染的脑中有 PrP^{Sc} 的积累并达到高于 PrP^C 10 倍的浓度。使用以前发表过的针对感染 263K 的仓鼠的数据 (R. Atarashi 等 " Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein, " Nature Meth. vol. 4 (2007) 645-650 页),针对来自未经 PK 处理的仓鼠脑中的 PrP^{Sc},SOFIA 的检出限为约 10ag。从来自仓鼠数据的直接推测提示,可从绵羊和鹿的脑物质中检出 1 飞克 PrP^{Sc}。然而,假定抗体反应性相同,对稀释样品的 Western 印迹表明,在克当量基础上,与绵羊和鹿的脑物质相比,在仓鼠脑中有至少多出 10 ~ 100 倍的 PrP^{Sc} (数据未显示),这表明在前两种物种中蛋白质的检出可以在 10 ~ 100ag 或更低的范围内。

[0108] 9. 血液中 PrP^{Sc} 的检测

[0109] 使用 Mab 8E9 的免疫沉淀作为连接 PMCA 和 SOFIA 的桥梁,所以,检测该 Mab 在 PrP 免疫沉淀中的应用。对来自未感染的和 263K 感染的仓鼠 (未感染:感染 (%)-100 : 0、90 : 10、70 : 30、50 : 50) 的多种比值的 10% 脑匀浆物混合物进行免疫沉淀,并通过 Western 印迹分析 (图 12)。以不同比例组合 10% 正常脑匀浆物 (NBH, normal brain homogenate) 和感染 263K 的仓鼠脑匀浆物 (263K BH) (泳道 1、5- 只有 NBH;泳道 2、6-90 μ L NBH 和 10 μ L 263K BH;泳道 3、7-70 μ L NBH+30 μ L 263K BH;泳道 4、8-50 μ L NBH+50 μ L 263K BH),并用 Mab 8E9 进行免疫沉淀。免疫沉淀的样品为未处理的 (泳道 1-4) 或在用 Mab 11F12 进行 Western 印迹和免疫染色之前用 PK 处理的 (泳道 5-8)。在未经 PK 消化时,无论脑匀浆物比值如何,所有样品都表现出类似的免疫染色强度 (泳道 1-4)。当与仅含有经 PK 处理的感染 263 的脑匀浆物 (未显示数据) 直接相比时,经 PK 处理的免疫沉淀 (泳道 5-8) 的 Western 印迹表现出类似的免疫染色。这些结果表明, Mab 8E9 免疫沉淀 PrP^C 和 PrP^{Sc},且 PrP^C 的存在不抑制或降低 PrP^{Sc} 免疫沉淀最大值。为了定量和定性评估所分离的 PrP,用 Mab 8E9 免疫沉淀物进行捕获 ELISA,所述免疫沉淀物来自正常和感染 263 的仓鼠的 PK 未处理的脑匀浆物的组合 (图 13)。所述捕获 ELISA 使用与 SOFIA 相同的 Mab 对 (11F12 为捕获 Mab, 5D6 为检测剂 Mab)。正常脑:感染脑的组合的 Mab 8E9 免疫沉淀之后,捕获 ELISA 引起 ELISA 信号强度增加,这是因为起始混合物中感染脑物质水平增加。因为所述脑物质未经蛋白酶消化,所以每种混合物包含单独的 PrP^C 或者 PrP^C 和 PrP^{Sc} 之混合物,如 Western

印迹所证实的那样（图 12）。然而，用捕获 ELISA 进行的免疫沉淀分析表明增加的信号强度依赖于 PrP^{Sc} 而非 PrP^{C} 的存在。这指出了这些特异性 Mab 的用途和用于 PrP^{Sc} 检测的方法。尽管免疫沉淀 - 捕获 ELISA 模式可以很容易地检测来自感染 263K 的仓鼠、羊瘙痒病绵羊和 CWD 鹿的脑来源的 PrP^{Sc} ，但无法在来自临床动物的血液中检出 PrP^{Sc} 。

[0110] 以前已经报道了在连续 PMCA (sPMCA) 之后在来自感染 263K 的仓鼠血液和羊瘙痒病绵羊样品中检测 PrP^{Sc} 的能力。然而， PrP^{Sc} 检测所需的大数目的 PMCA 循环数使得该技术在诊断测定中并不实用。在血液中检测 PrP^{Sc} 的问题已经通过联合 sPMCA、随后的免疫沉淀经扩增的靶标以及用灵敏的 SOFIA 测定而得以解决 (Chang 等, 2009)。使用仓鼠脑评价并验证了 sPMCA (图 14)。对仓鼠脑匀浆物的稀释物进行 7、14 和 40 个循环的 PMCA (泳道 7-10)，同时，以类似的方式处理同样的样品，只是不超声处理 (泳道 3-6)。用 Mab 11F12 对 10 μL 等份的每种样品进行 Western 印迹分析。对照样品是感染 263K 的仓鼠脑匀浆物的 10^{-2} 稀释物，在进行 Western 印迹分析之前不用 (泳道 1) 和用 (泳道 2) PK 消化。使用正常仓鼠脑匀浆物作为 PrP^{C} 来源，对 $10^{-8} \sim 10^{-11}$ 稀释 (相对于初始的脑组织) 的 10% 感染 263K 的仓鼠脑匀浆物进行 sPMCA。7 个循环的 sPMCA 之后，在所有的稀释物中都无法检测到 PrP^{Sc} ，但完成 14 个循环后，在 10^{-8} 稀释的样品中可以检出 (图 14，泳道 10)。40 个循环的 sPMCA (sPMCA₄₀) 之后，在受试的感染 263K 的脑匀浆物的所有稀释物中均可以检出 PK 抗性的 PrP^{Sc} (图 14，泳道 7-10)。类似地，平行处理稀释的仓鼠脑匀浆物 (只是省去 PMCA 超声步骤)，未显示任何 PrP^{Sc} 扩增，正像不存在 PK 抗性的 PrP^{Sc} 免疫染色所证实地 (图 3，泳道 3-6)。比较不进行 PMCA (10^{-6} ，相对于初始脑组织) 和 sPMCA₄₀ 检测之后的 PrP^{Sc} 的检出限，并考虑所分析的样品大小，估计 PMCA 导致了 10^4 倍的扩增。

[0111] 使用来自临床动物的稀释的绵羊脑或 CWD 脑匀浆物 (以及相应物种的未感染的脑匀浆物作为 PrP^{C} 的来源) 进行类似的 PMCA 实验表明，采用 28 个循环的 PMCA，在感染脑的 10^{-8} 稀释下，使用 Western 印迹对扩增的 PrP^{Sc} 有了最初的检出。与仓鼠脑相比，对于来自绵羊和鹿脑的 PrP^{Sc} 的最初检出需要增加循环数是由初始脑组织中起始 PrP^{Sc} 的量较少所导致的。如预期地，sPMCA₄₀ 结束时，增加的免疫染色强度和 PK 抗性之 PrP^{Sc} 的检出限证明了来自羊瘙痒病绵羊和 CWD 鹿脑匀浆物中的 PrP^{Sc} 得以扩增。与感染的仓鼠脑相比，尽管绵羊和鹿脑组织含有较少的 PrP^{Sc} ，但相对于初始的 PrP^{Sc} 水平，扩增水平仍约为 4log (未显示)。

[0112] 对来自羊瘙痒病绵羊和 CWD 鹿的血浆进行 sPMCA₄₀。绵羊的样品由三组 (表 3，组 1-3) 羊瘙痒病绵羊组成，在采血时，基于是否存在临床症状和第三眼睑淋巴滤泡的 PrP^{Sc} 免疫组织化学 (IHC) (图 15) 进行区分。在采血时组 3 中的所有动物均未表现出临床症状，其最终发展为临床疾病。将未感染的绵羊组 (表 3，组 4) 进行安置，并维持在隔离的无羊瘙痒病区域。CWD 样品由多只实验性感染的 (口服途径) 临床前和临床白尾鹿 (表 4) 组成。对所有绵羊和 CWD 样品分别进行 sPMCA₄₀，并在 PK 消化后用 Western 印迹法分析。对血浆进行 sPMCA₄₀ 后，在用 Mab 8E9 免疫沉淀浓缩 PrP^{Sc} 之前或之后，对经 PK 处理的 PMCA 产物的 Western 印迹未显示任何 PrP^{Sc} 。添加多聚腺苷酸 [poly (A)] (已报道其促进来自绵羊血液之低水平 PrP^{Sc} 的快速检测 (Thorne 和 Terry, 2008)) 并未将扩增效率提高至能够检测经 sPMCA₄₀ 的来自羊瘙痒病绵羊或 CWD 鹿血浆中 PrP^{Sc} 的程度。sPMCA₄₀ 后来自绵羊血液的 PrP^{Sc} 的不能检出与所用的绵羊基因型无关 (数据未显示)。也即， PrP^{Sc} 来源和正常绵羊脑 PrP^{C} 之间绵羊基因型的配对不足以增加通过免疫印迹对扩增产物的检出。因为 Western 印迹未

提供任何信息,因此不清楚 PrP^{Sc} 是否起初就存在于来自 CWD 和包含羊瘙痒病的三组绵羊的任何动物的血液中,或者是否 PMCA 能成功地在仅 40 个循环后检出扩增的 PrP^{Sc},而 Western 印迹的灵敏度则不足以检出。已报道,由于明显自发产生的 PrP^{Sc},对绵羊血液进行 PMCA 可导致假阳性结果 (Thorne 和 Terry, 2008)。因此,使用包绕光纤免疫测定 (SOFIA) (Chang 等, 2009) 检测未处理的和经 PK 处理的、经 Mab 8E9 免疫沉淀的 sPMCA₄₀ 产物中的 PrP^{Sc},而非继续增加 PMCA 循环数。我们的研究证明,在不进行 sPMCA₄₀ 时,用 SOFIA 从羊瘙痒病绵羊和未感染绵羊之血浆样品中得到的读数是近似的,且接近基线水平 (图 16)。在 sPMCA₄₀ 之前,单个样品的 SOFIA 信号强度 (样品 / 背景) 范围为 0.5 ~ 0.9 (组 1)、0.7 ~ 1.2 (组 2)、0.8 ~ 1.3 (组 3) 和 0.6 ~ 1.1 (组 4)。因为以前对 SOFIA 动态范围的研究 (Chang 等, 2009) 证明 PK 未处理的临床绵羊脑 PrP^{Sc} 在飞摩尔范围内是可检测的 (Chang 等, 2009),因此在羊瘙痒病绵羊血浆样品中的 PrP^{Sc} 水平很可能低于可检出范围。为了使 PrP^{Sc} 水平扩增至 SOFIA 的动态范围内,进行了 sPMCA₄₀ 以及随后的 Mab 8E9 免疫沉淀。在经免疫沉淀的 sPMCA₄₀ 产物中可以用 SOFIA 检出未经 PK 处理的 PrP^{Sc} (图 16)。sPMCA₄₀ 之后,对照组 (组 4) 的单个样品的信号强度的范围 (0.7 ~ 1.2) 与 PMCA 之前的样品没有显著性差别。然而,无论其临床表现如何,所有三个羊瘙痒病绵羊组的 SOFIA 信号强度范围都彼此相近 (组 1 : 4.3-4.8, 组 2 : 4.4-5.1, 组 3 : 4.8-5.3),并显著大于 PMCA 之前值 (pre-PMCA) 以及未感染样品 (组 4)。当考虑到疾病的证实依赖于被羊瘙痒病感染的绵羊、但不依赖于临床症状和神经病变的存在时 (因为所有三组受试绵羊均存在 PrP^{Sc}) (图 16),就会理解本方法的价值。PrP^{Sc} 扩增也与基因型相容性无关,因为当使用来自 ARQ/ARQ 或 ARQ/VRQ 绵羊的正常脑匀浆物时,与任何感染的绵羊血浆样品的扩增无差异。另外,没有必要使用 PK 消化来区分 PrP^C 和 PrP^{Sc},因为无论在免疫沉淀和免疫测定分析之前 sPMCA₄₀ 产物为未处理的 (图 16) 或经 PK 处理的 (未显示),SOFIA 的结果都是相同的。根据与绵羊羊瘙痒病相关的临床症状的出现和免疫组织化学 (IHC),通过将血浆样品分为 3 组得到了图 16 中的数据。对每种血浆样品进行 PMCA₄₀ (■) 或不进行 PMCA 孵育 (□)。每种样品或是未处理的或是经 PK 消化的,然后进行 Mab 8E9 免疫沉淀,并用 SOFIA 分析 PrP^{Sc}。一式三份地测定来自 3 组中每一个的血浆样品,且综合每个组中所有样品的数据,并表示为平均值 ± 标准偏差。

[0113] 在获自多个临床前和临床鹿 CWD 病例的血浆中进行了类似的研究 (图 17)。类似于上述绵羊血浆样品,在不进行 sPMCA₄₀ 时,对 CWD 样品进行 SOFIA 获得的信号与未感染对照的没有差异,其本身接近背景。此外,PK 抗性的 PrP^{Sc} 不能被 sPMCA₄₀ 后的捕获 ELISA 或 Western 印迹所检出。然而,在 sPMCA₄₀ 产物进行免疫沉淀之后,用 SOFIA 可从全部临床前和临床的 CWD 血液中检出 PrP^{Sc} (图 17)。此外,与羊瘙痒病的绵羊样品类似,SOFA 值有赖于从感染动物来源的样品,但用 SOFIA 对疾病的验证是不依赖于患病动物的临床状态的。图 17 中的数据通过对来自五个 CWD 病例的每种血浆样品进行 sPMCA₄₀ (■) 或维持不进行 PMCA (□) 而得到的。所有样品或是未消化的或是经 PK 处理的,随后进行 Mab 8E9 免疫沉淀和 SOFIA。显示 PK 未处理样品的结果,其值表示为一式三份测定的平均值 ± SD。在 4 个未感染鹿的血浆样品的情形中,一式三份地分析 4 个样品中的每一个,4 个样品综合的结果表示为平均值 ± SD。在本发明的全部实施方案中,除非另外特别说明,所有百分比均为占总组成重量的百分比。

[0114] 除非另外特别说明,所有比值均为重量比值。所有范围是开放式的并且可进行组

合。有效位的数目不表示对所示数量的限制,也不表示测量的精确度。除非另外特别指明,所有数字表示的量都理解为被词语“约”所修饰。

[0115] 发明详述中引用的所有文献的相关部分均通过引用并入本文;对任何文献的引用不应解释为承认其为本发明的现有技术。如果本文中术语的含义或定义在某种程度上与通过引用并入本文的文献中的同一术语的含义或定义相冲突时,以本文中的含义或定义为准。

[0116] 尽管已举例说明并描述了本发明的具体实施方案,但是很明显地,对于本领域专业人员来说,可以在不偏离本发明的精神和范围的前提下进行多种其它改动和修改。因此,其旨在囊括所附权利要求覆盖的本发明范围内的所有这些改动和修改。

[0117] 参考文献列表

[0118] Atarashi, R. et al. “Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking,” *Nat. Methods* 5, 211-212 (2008).

[0119] Bieschke, J. et al., “Autocatalytic self-propagation of misfolded prion protein,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 12207-12211 (2004).

[0120] Brown, P. et al. “Conservation of infectivity in purified fibrillary extracts of scrapie-infected hamster brain after sequential enzymatic digestion or polyacrylamide gel electrophoresis,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 87, 7240-7244 (1990)

[0121] Brown, D. R. et al., “Normal prion protein has an activity like that of superoxide dismutase,” *Biochem. J.* 344, 1-5 (1999). Erratum in: *Biochem. J.* 345, 767 (2000).

[0122] Bueller, H. et al., “High prion and PrP^{Sc} levels but delayed onset of disease in scrapie-inoculated mice heterozygous for a disrupted PrP gene,” *Mol. Medicine* 1, 19-30 (1994).

[0123] Bulgin, M. S. et al., “Association between incubation time and genotype in sheep experimentally inoculated with scrapie-positive brain homogenate,” *Am. J. Vet. Res.* 67, 498-504 (2006)

[0124] Carlson, G. A. et al., “Prion isolate specified allotypic interactions between the cellular and scrapie prion proteins in congenic and transgenic mice,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91, 5690-5694 (1994).

[0125] Castilla, J. et al. “In vitro generation of infectious scrapie prions,” *Cell* 121, 195-206 (2005a).

[0126] Castilla, J. et al. “Detection of prions in blood,” *Nat. Medicine*. 11, 982-985 (2005b).

[0127] Chang, B. et al. “Surround optical fiber immunoassay (SOFIF): more than an ultra-sensitive assay for PrP detection,” *J. Virol. Methods* 159, 15-22 (2009).

[0128] Chang, B. et al. “PrP antibody binding-induced epitope modulation evokes immunocooperativity,” *J. Neuroimmunol.* 205, 94-100 (2008).

[0129] Deleault, N. R. et al., “Protease-resistant prion protein amplification

reconstituted with partially purified substrates and synthetic polyanions,” J. Biol. Chem. 280, 26873–26879 (2003).

[0130] Gavier-Widen, D. et al., “Diagnosis of transmissible spongiform encephalopathies in animals: a review,” J. Vet. Diagn. Invest. 17, 509–527 (2005).

[0131] Haley, N. J. et al. “Detection of sub-clinical CWD infection in conventional test-negative deer long after oral exposure to urine and feces from CWD+deer,” PLoS One 4, e7990 (2009).

[0132] Haley, N. J. et al., “Detection of CWD prions in urine and saliva of deer by transgenic mouse bioassay,” PLoS One 4, e4848 (2009).

[0133] Hilmert, H. and Diringer, H. “A rapid and efficient method to enrich SAF-protein from scrapie brains of hamster,” Biosci. Rep. 2, 165–70 (1984).

[0134] Houston, F. et al. “Transmission of BSE by blood transfusion in sheep,” Lancet 356, 999–1000 (2000).

[0135] Jones, C. E. et al. “Preferential Cu²⁺ coordination by His96 and His111 induces beta-sheet formation in the unstructured amyloidogenic region of prion protein,” J. Biol. Chem. 279, 32018–27 (2004).

[0136] Jones, M. et al. “In vitro amplification and detection of variant Creutzfeldt-Jakob disease PrP(Sc),” J. Pathol. 213, 21–26 (2007).

[0137] Kang, S. C. et al. “Guanidine hydrochloride extraction and detection of prion proteins in mouse and hamster prion diseases by ELISA,” J. Pathol. 199, 534–41 (2003).

[0138] Kascsak, R. J. et al. “Immunological comparison of scrapie-associated fibrils isolated from animals infected with four different scrapie strains”. J. Virol. 59, 676–683 (1986).

[0139] Kascsak, R. J. et al. “Mouse polyclonal and monoclonal antibody to scrapie-associated fibril proteins,” J. Virol. 61, 3688–3693 (1987).

[0140] Kim, J. I. et al. “Comparison of PrP transcription and translation in two murine myeloma cell lines,” J. Neuroimmunol. 140 :137–142 (2003).

[0141] Kocisko, D. A. et al., “Cell-free formation of protease-resistant prion protein” Nature 370, 471–474 (1994).

[0142] Kurt, T. D. et al. “Efficient in vitro amplification of chronic wasting disease PrP^{Sc},” J. Virol. 81, 9605–9608 (2007).

[0143] LaFauci, G. et al. “Passage of chronic wasting disease prion into transgenic mice expressing Rocky Mountain elk (*Cervus elaphus nelsoni*) PrP^C,” J. Gen. Virol. 87, 3773–3780 (2006).

[0144] Llewelyn, C. A. et al. “Possible transmission of variant CJD disease by blood transfusion,” Lancet 363, 417–421 (2004).

[0145] Madec, J.-Y. et al. “Abnormal prion protein in genetically resistant sheep from a scrapie-infected flock,” J. Gen. Virol. 85, 3483–3486 (2004).

- [0146] Mathiason, C. K. et al., "Infectious prions in the saliva and blood of deer with chronic wasting disease," *Science* 314, 133-136 (2006).
- [0147] Mathiason, C. K. et al., "Infectious prions in pre-clinical deer and transmission of chronic wasting disease solely by environmental exposure," *PLoS One* 4, e5916 (2009).
- [0148] Murayama, Y. et al., "Urinary excretion and blood level of prions in scrapie-infected hamsters," *J. Gen. Virol.* 88, 2890-2898 (2007).
- [0149] Peden, A. H. et al. "Preclinical vCJD after blood transfusion in a PRNP codon 129 heterozygous patient" *Lancet* 364, 527-529 (2004).
- [0150] Prusiner, S. B. et al., "Transgenic studies implicate interactions between homologous PrP isoforms in scrapie prion replication," *Cell* 63, 673-686 (1990).
- [0151] Raymond, G. J. et al. "Evidence of a molecular barrier limiting susceptibility of humans, cattle, and sheep to chronic wasting disease" *EMBO* 19, 4425-4430 (2000).
- [0152] Rubenstein R. et al. "Concentration and distribution of infectivity and PrPSc following partial denaturation of a mouse-adapted and a hamster-adapted scrapie strain." *Arch. Virol.* 139, 301-311 (1994).
- [0153] Saa, P. et al., "Presymptomatic detection of prions in blood," *Science* 313, 92-94 (2006).
- [0154] Saborio, G. P. et al., "Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding," *Nature* 411, 810-813 (2001).
- [0155] Soto, C. et al., "Pre-symptomatic detection of prions by cyclic amplification of protein misfolding," *FEBS Lett.* 579, 638-642 (2005).
- [0156] Tamguney, G. et al., "Asymptomatic deer excrete infectious prions in faeces," *Nature* 461, 529-532 (2009).
- [0157] Tayebi, M. et al. "Disease-associated prion protein elicits immunoglobulin M responses in vivo," *Mol. Med.* 10, 104-111 (2004).
- [0158] Thorne, L. & Terry, L. A., "In vitro amplification of PrPSc derived from the brain and blood of sheep infected with scrapie," *J. Gen. Virol.* 89, 3177-3184 (2008).
- [0159] van Keulen, L. J., et al. "Immunohistochemical detection of prion protein in lymphoid tissues of sheep with natural scrapie," *J. Clin. Microbiol.* 34, 1228-1231 (1996).
- [0160] van Keulen, L. J., et al. "Immunohistochemical detection and localization of prion protein in brain tissue of sheep with natural scrapie," *Vet. Pathol.* 32, 299-308 (1995).
- [0161] Wells, G. A. and Wilesmith, J. W., "The neuropathology and epidemiology of bovine spongiform encephalopathy," *Brain Pathol.* 5, 91-103 (1995).

[0162] Wild, M. A. and Miller, M. W., "Bottle-raising wild ruminants in captivity," Colorado Division of Wildlife, Outdoor Facts 114(1991).

[0163] Wild, M. A. et al., "Comparison of growth rate and milk intake of bottle-raised and dam-raised bighorn sheep, pronghorn antelope and elk neonates" J. Wildlife Management 58, 340-347(1994).

[0164] Wolfe, L. L. et al. "PrPCWD in rectal lymphoid tissue of deer (*Odocoileus* spp.)," J. Gen. Virol. 88, 2078-2082(2007).

[0165] 变性处理对 PrP^{Sc} 免疫反应性的比较¹

[0166]

处理	信号强度 ²		
	5D6	11F12	8E9
未处理	0.314 ± 0.017	0.339 ± 0.009	0.303 ± 0.110
SDS ³	1.229 ± 0.019	1.599 ± 0.182	1.324 ± 0.251
加热 ⁴	1.228 ± 0.018	1.085 ± 0.124	1.427 ± 0.331
SDS + 加热	1.232 ± 0.008	1.548 ± 0.112	1.821 ± 0.252

[0167] ¹ 按照材料和方法部分的描述,从临床的仓鼠脑中纯化 PrP^{Sc} 并进行 PK 处理,所述仓鼠感染了可感染仓鼠的 263K 羊瘙痒病株。

[0168] ² 用间接 ELISA 测定在 OD₄₀₅ 测量信号强度。

[0169] ³ 添加 SDS 至终浓度 1%。

[0170] ⁴ 在 100°C 下加热样品 5 分钟。

[0171] 表 1

[0172] 第 I 页

[0173] 用于捕获 ELISA 检测的 Mab 对分析¹

[0174]

捕获 Mab	检测 Ab (生物素化的)		
	11F12	5D6	8E9
11F12	..	+	..
5D6	..	..	..
8E9	..	..	..

[0175] ¹ 使用从感染 263K 的仓鼠脑中纯化的经 PK 处理的 PrP^{Sc} 分析 Mab 对。

[0176] 捕获 ELISA 测定前,用 SDS 和加热处理 PrP^{Sc}。使用前,所有 Mab 都稀释至 5 μg/ml 的浓度。

[0177] 表 2

[0178] 第 II 页

[0179] 绵羊羊瘙痒病的疾病进展和采血的描述和时间进程。*

[0180]

组 1: 临床 +, IHC -						
ID #	基因型	感染 [†]	IHC (dpi) [‡]	采血 (dpi)	临床 症状 (dpi)	死亡 (dpi)
3040	ARQ/ARR	E	Neg.	2019	1936	2290
4102	ARQ/ARQ	E	Neg.	1565	1145	1885
4110	ARQ/ARQ	E	Neg.	1565	1413	1885
6034	ARQ/VRR	E	Neg.	783	604	1100
组 2: 临床 +, IHC +						
5027	ARQ/VRQ	N	800	1303	883	1320
5033	ARQ/VRQ	N	801	1304	884	1321
5066	ARQ/VRQ	N	792	1295	875	1574
6004	ARQ/VRQ	N	779	931	925	1249
6026	ARQ/VRQ	N	402	926	926	1085
组 3: 临床 -, IHC +						
6006	ARQ/VRQ	N	732	934	> 934	1080
6014	ARQ/VRQ	N	778	930	> 930	1250
6024	ARQ/VRQ	E	631	783	> 783	1243
6050	ARQ/VRQ	E	259	783	> 783	1243
6060	ARQ/VRQ	E	581	783	> 783	945
6066	ARQ/VRQ	N	393	917	> 917	1076
组 4: 未感染						
3058	ARQ/ARQ					
5202	ARQ/VRQ					
5215	ARQ/VRQ					
5240	ARQ/VRQ					
5255	ARQ/VRQ					
7204	ARQ/VRQ					
7212	ARQ/VRR					

[0181] * 根据采血时的临床症状和第三眼睑淋巴滤泡免疫组织化学 (IHC) 对动物进行分组。

[0182] [†]E- 实验性 (口服) 感染, N- 假定出生时发生的天然感染 (Dextor 等, 2009)。

[0183] [‡]感染后的天数

[0184] [§] 在采血时, 所有动物都是临床阴性的, 但在死亡时都表现出临床症状。

[0185] 表 3

[0186] 第 III 页

[0187] 白尾鹿 CWD 采血、疾病进展和临床表现的描述和时间进程

[0188]

ID #	IHC (dpi)	采血		死亡	
		dpi	动物状态	dpi	原因
BC04	253	891	临床的CWD	891	临床的CWD
W1004	253	891	细微的变化	981	出血性疾病 (临床前)
N204	253	891	细微的变化	1012	出血性疾病 (临床前)
I304	343	891	临床前	1182	临床的CWD
K304	253	891	临床前	1774	临床的CWD

[0189] 扁桃体活检的 PrP^{Sc} 免疫组织化学

[0190] 表 4

[0191] 第IV页

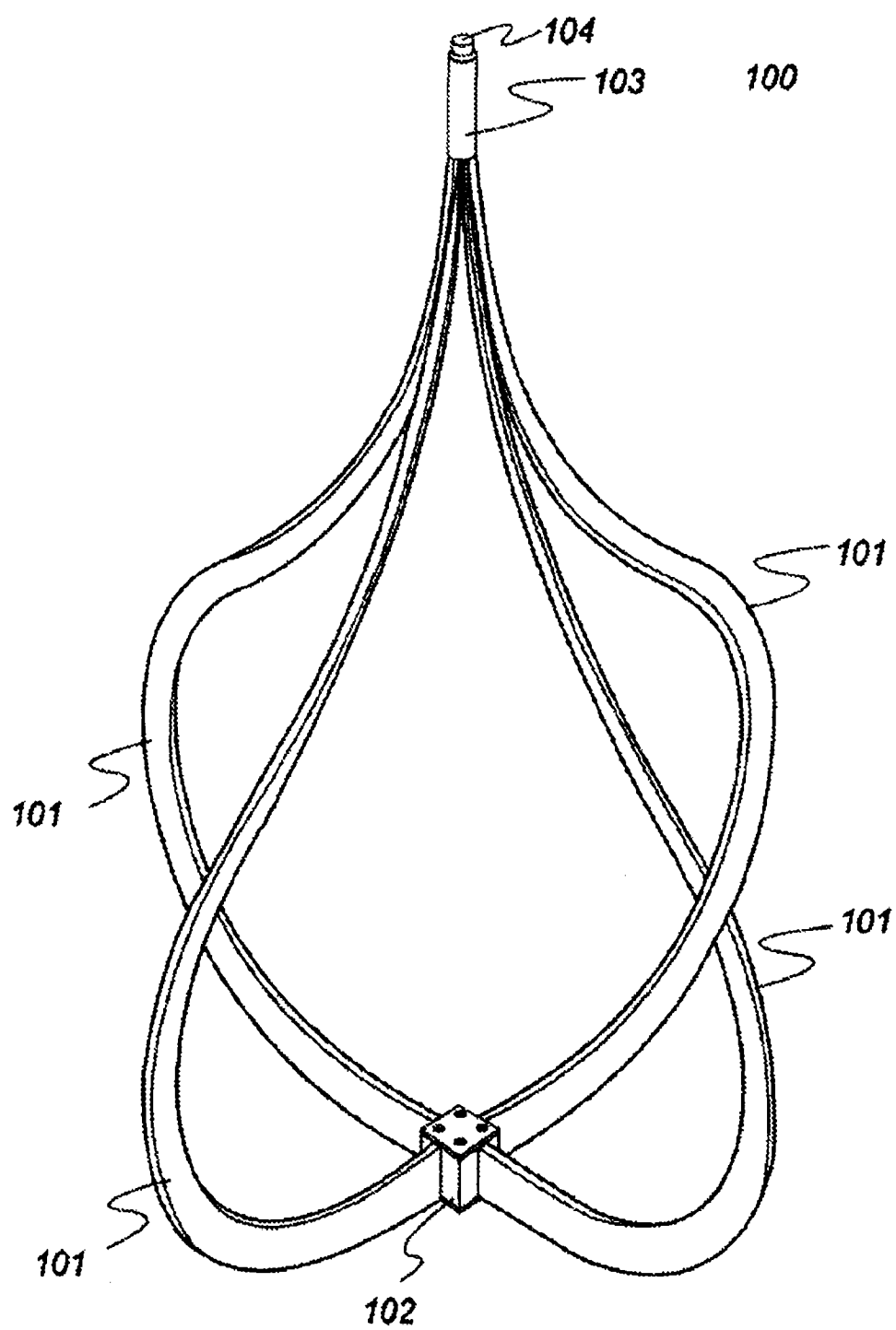


图 1

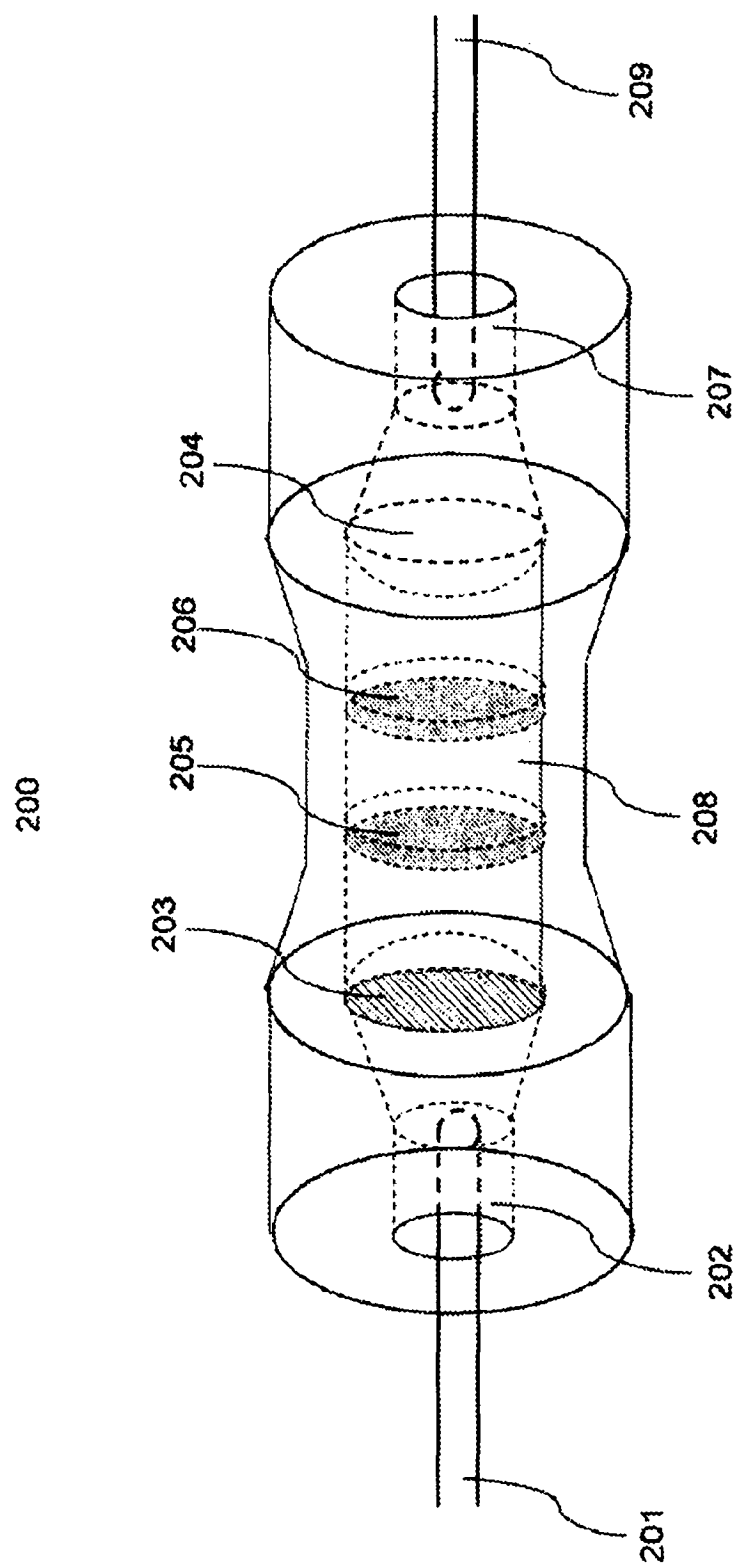


图 2

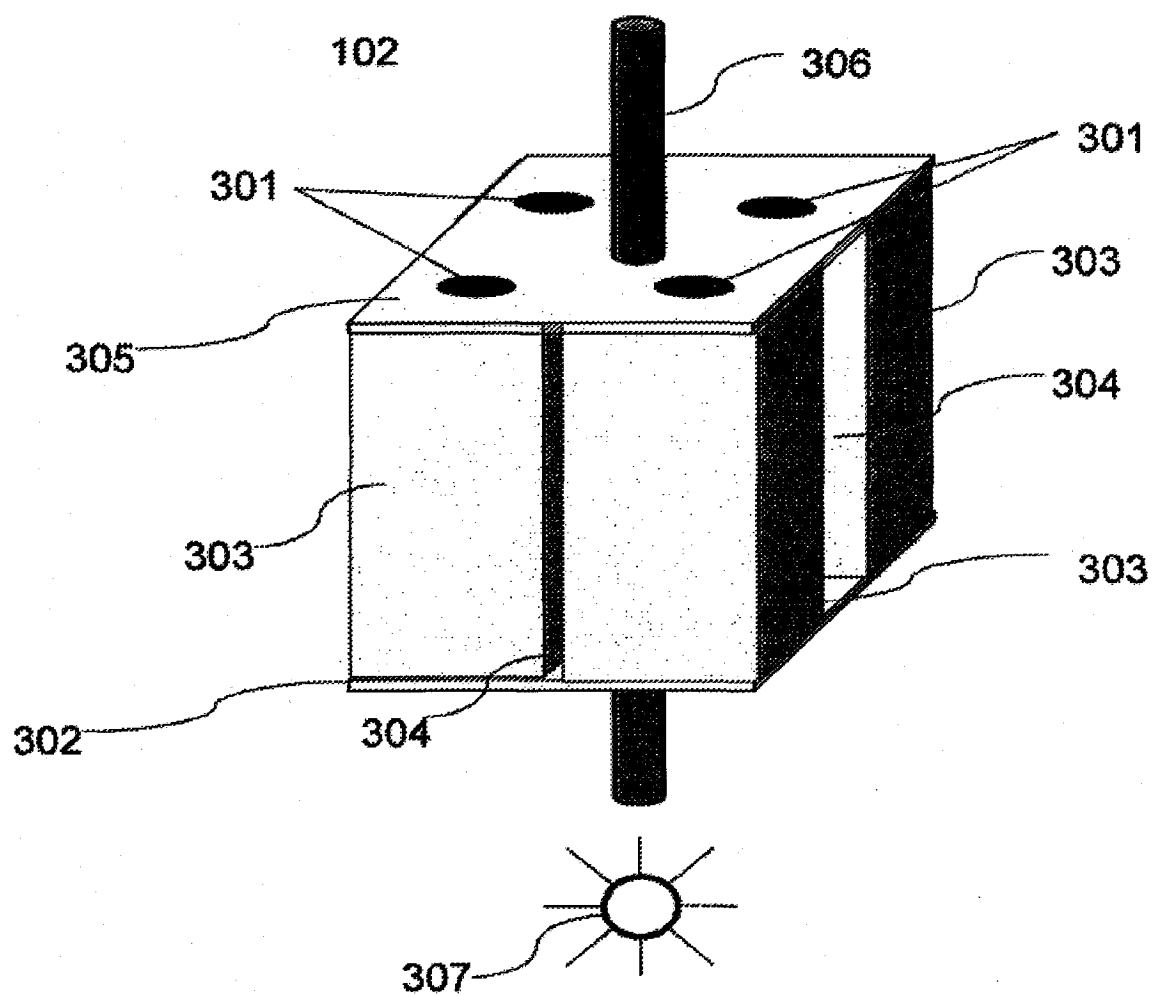


图 3

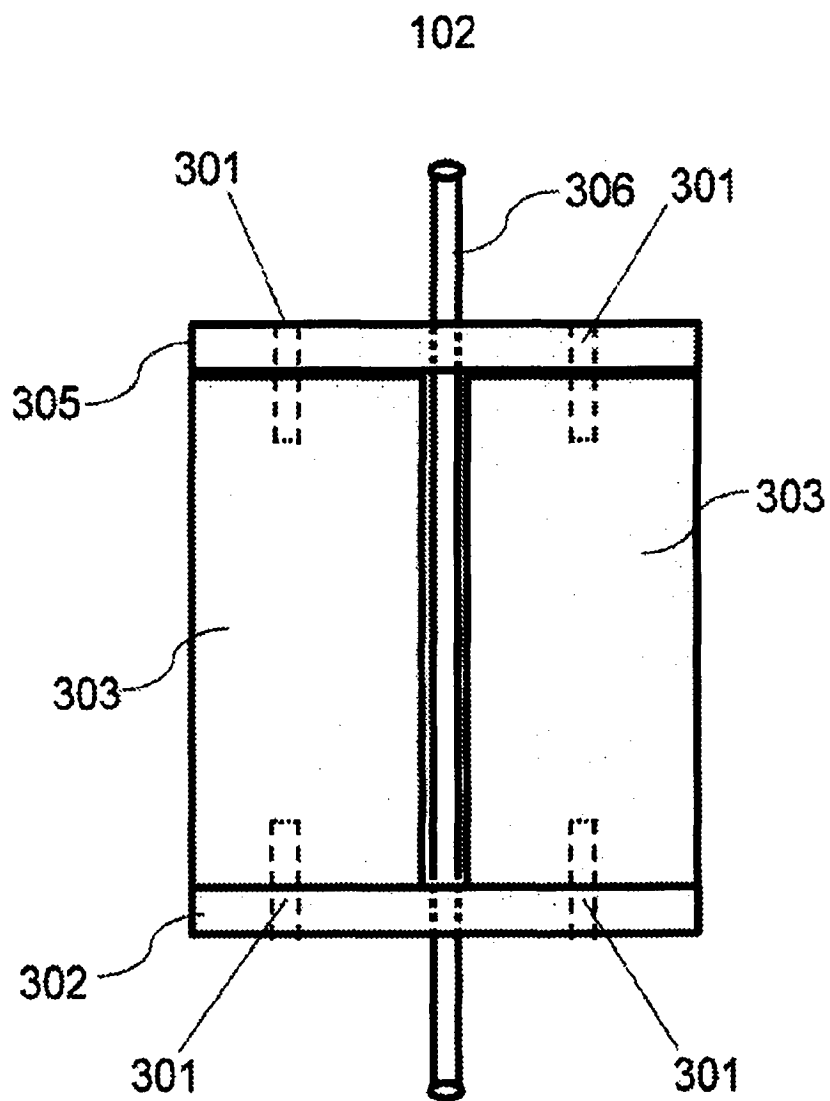


图 4

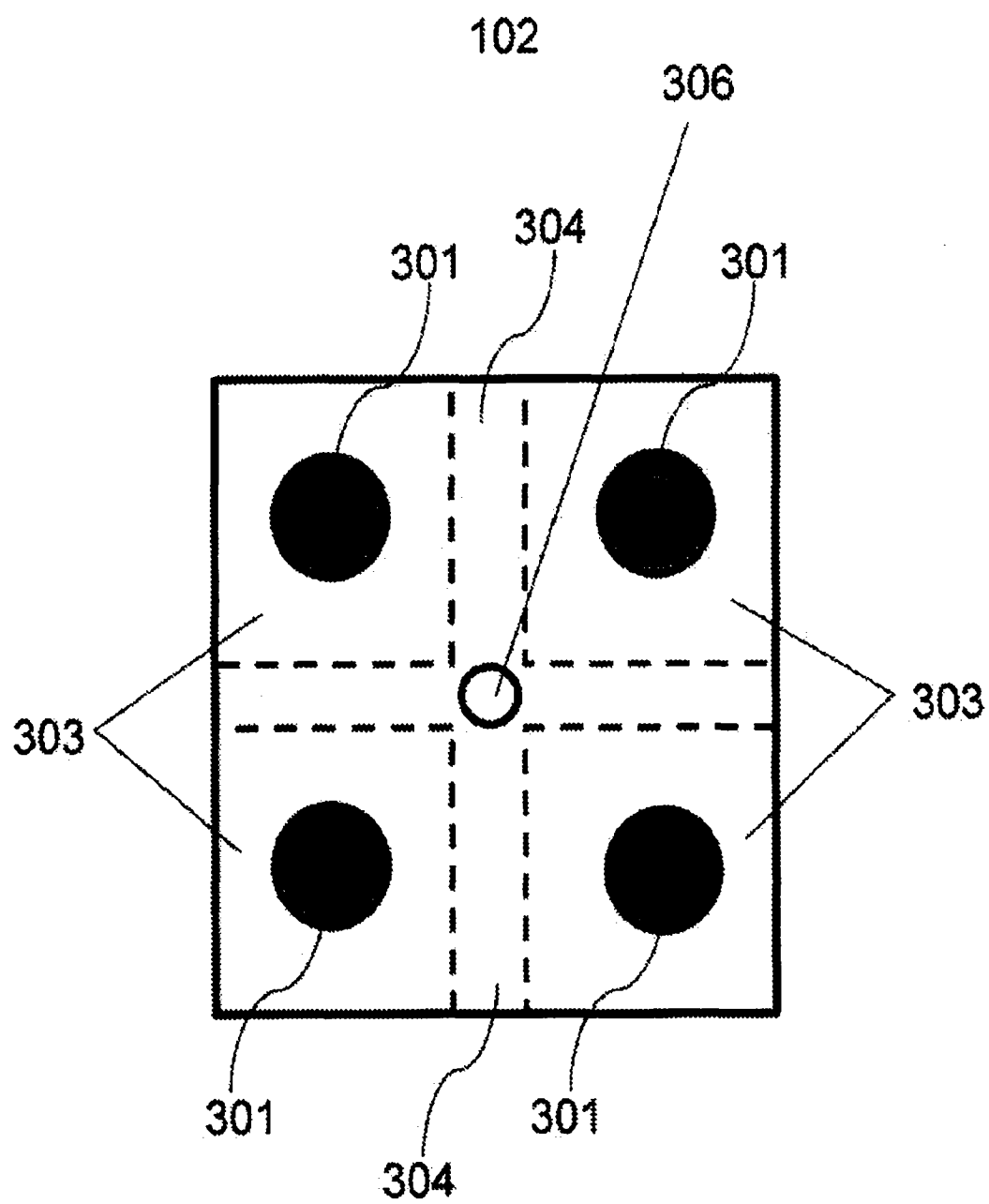


图 5

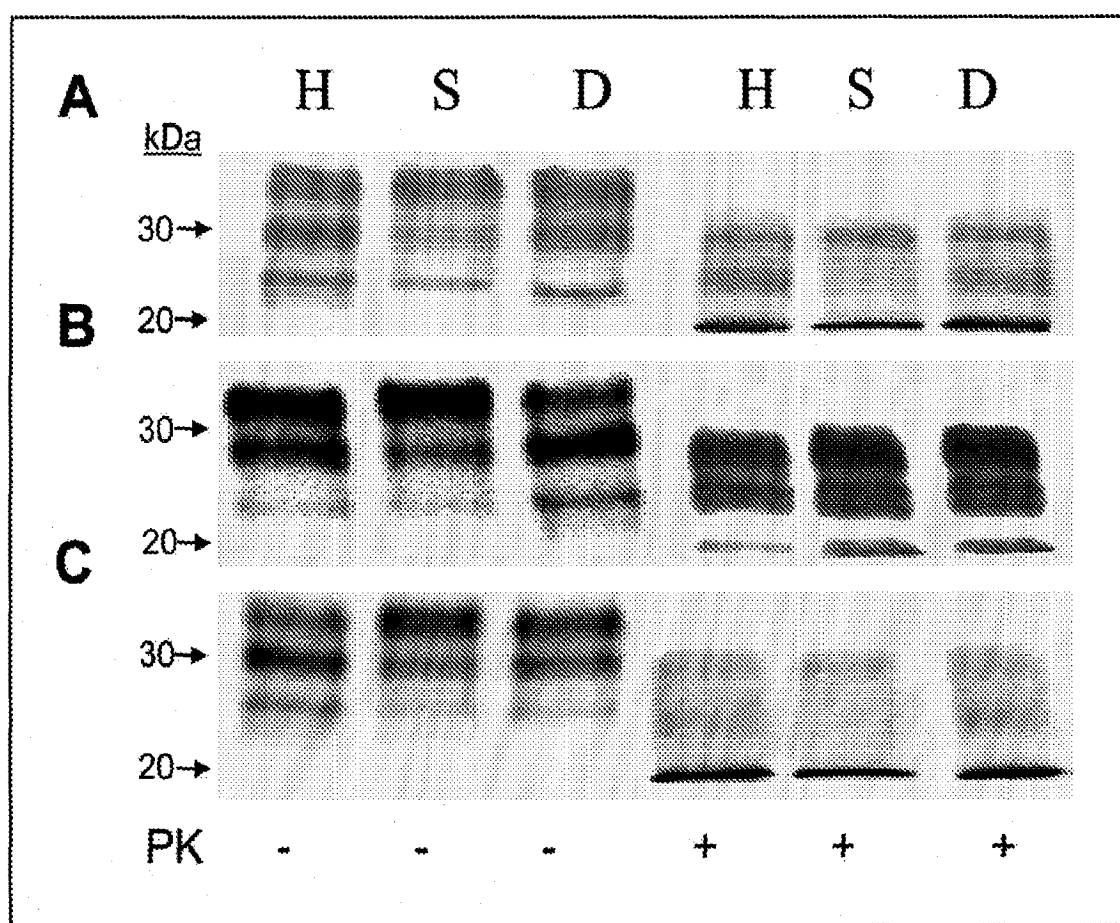


图 6

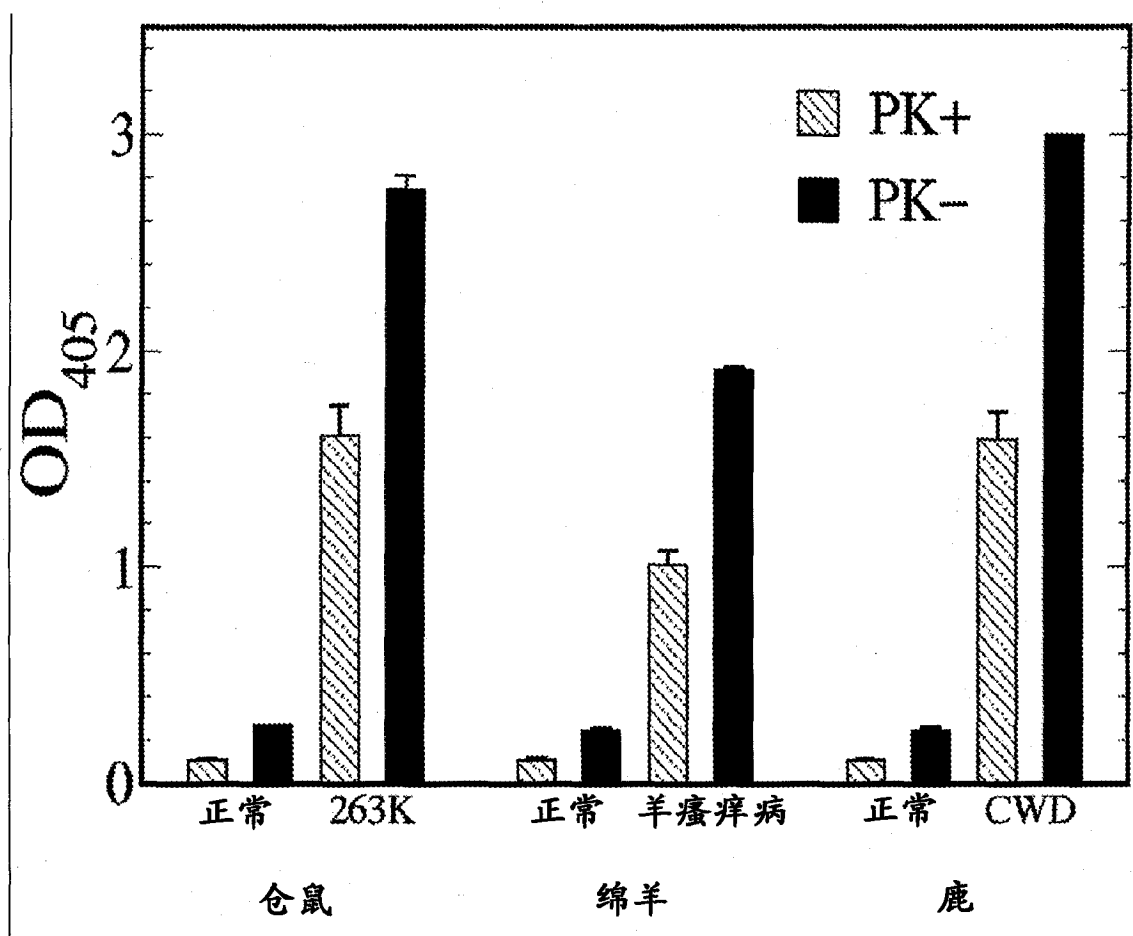


图 7

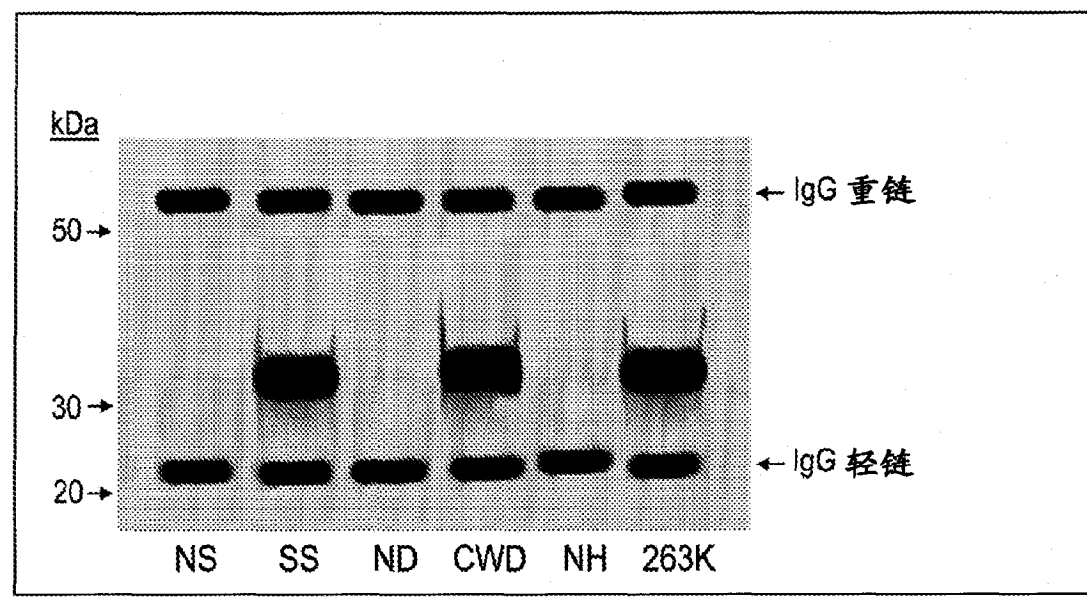


图 8

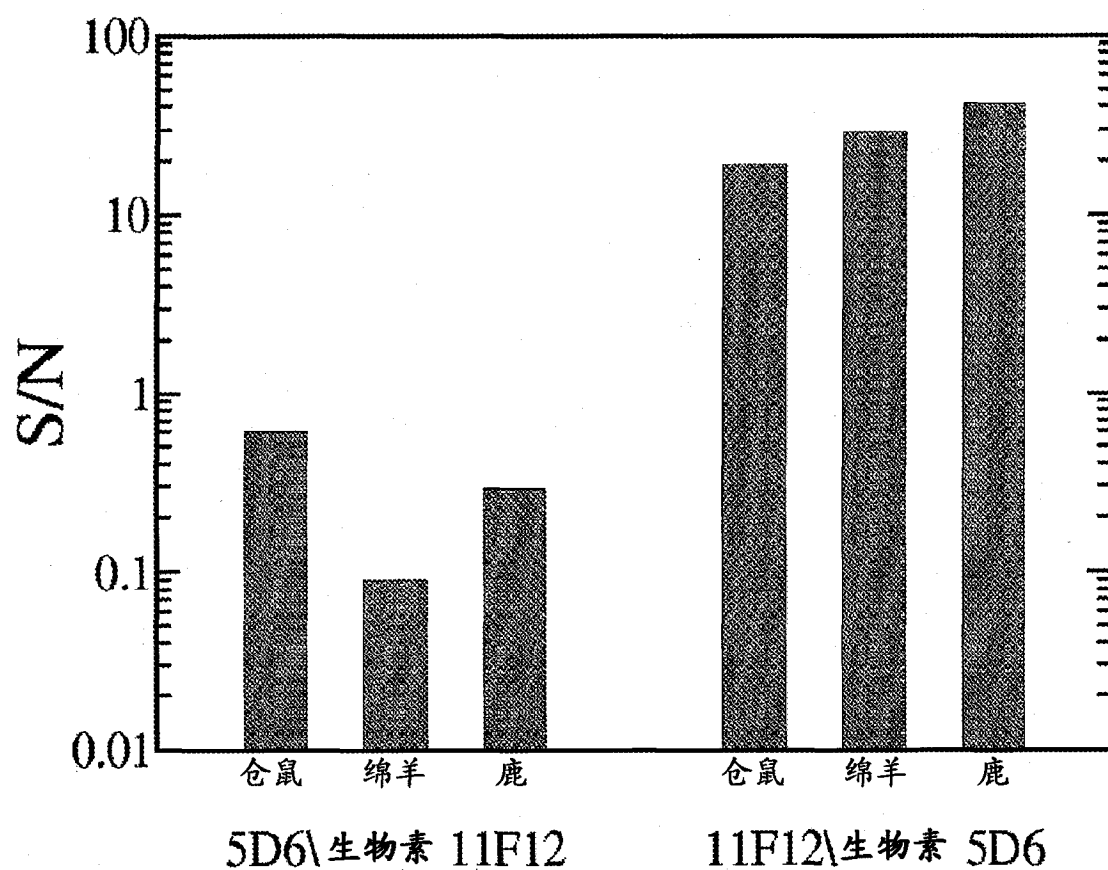


图 9

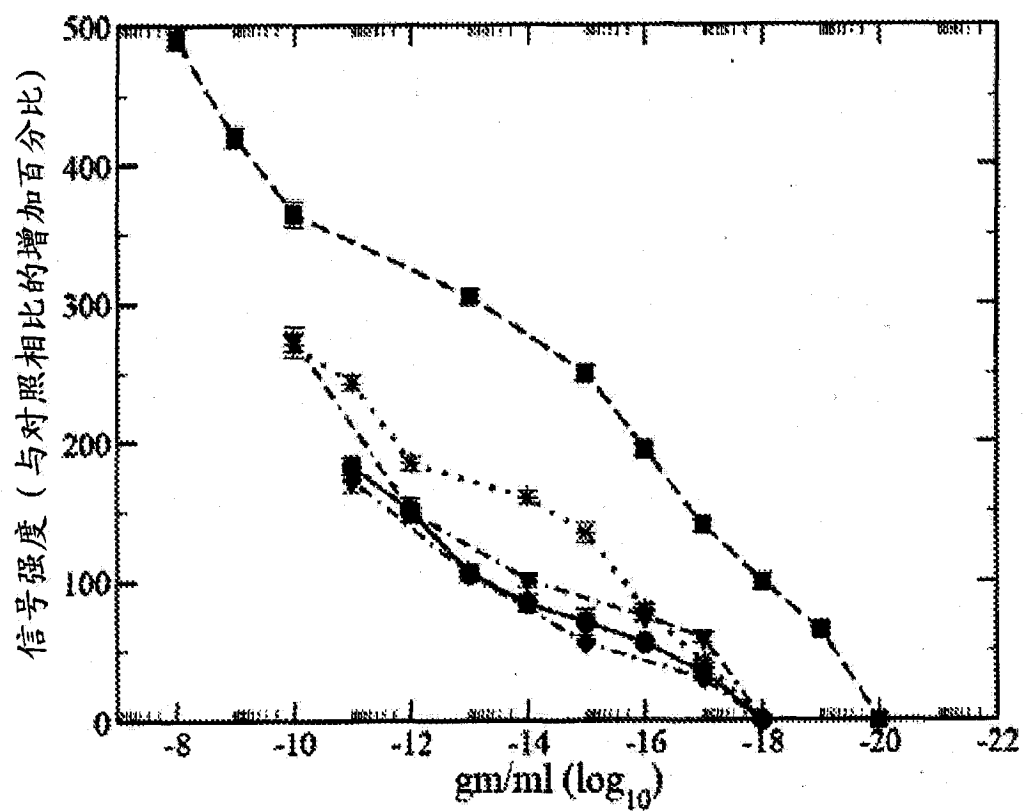


图 10

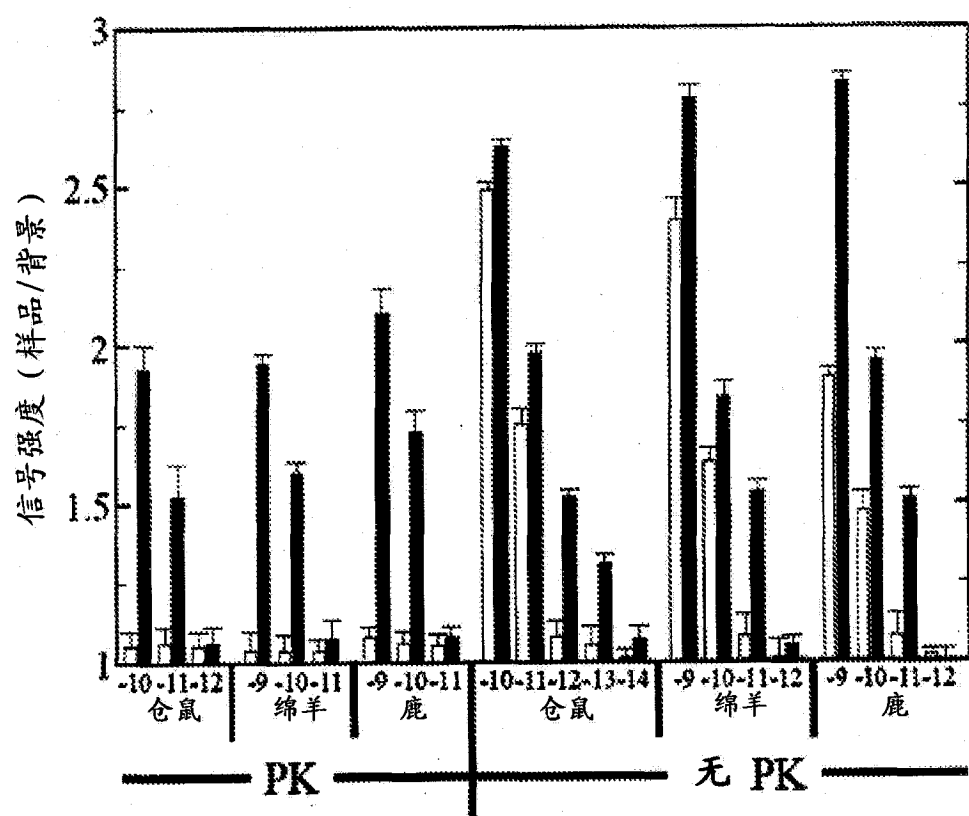


图 11

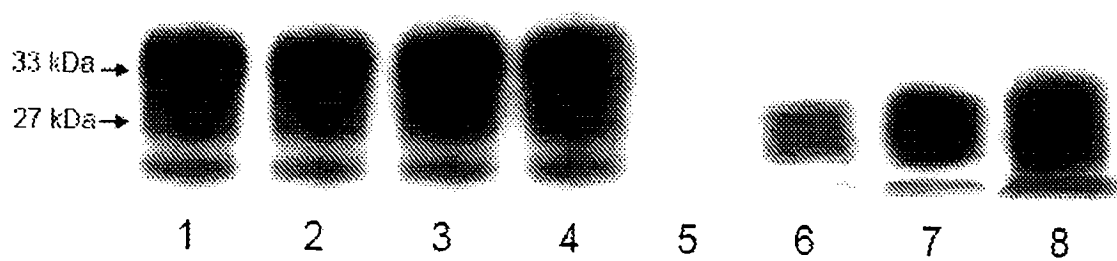
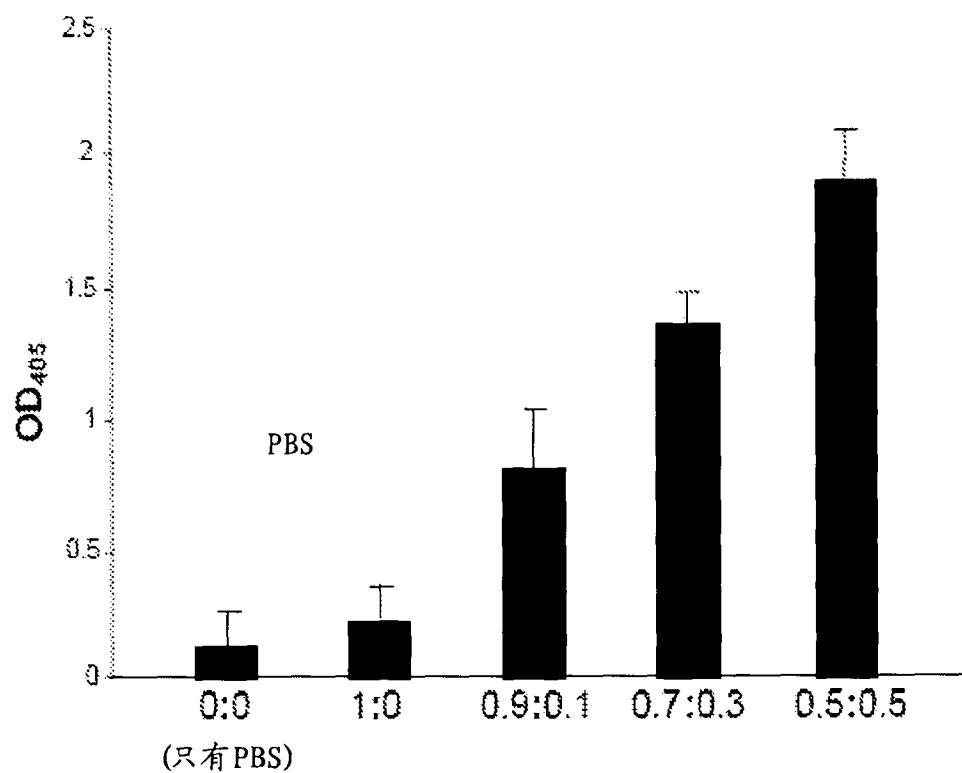


图 12



10%仓鼠脑匀浆物* (正常: 263K)

图 13 * 未经 PK 处理捕获 Mab :11F12 ;检测 Mab :5D6 三次测定的平均值 $\pm$ SD

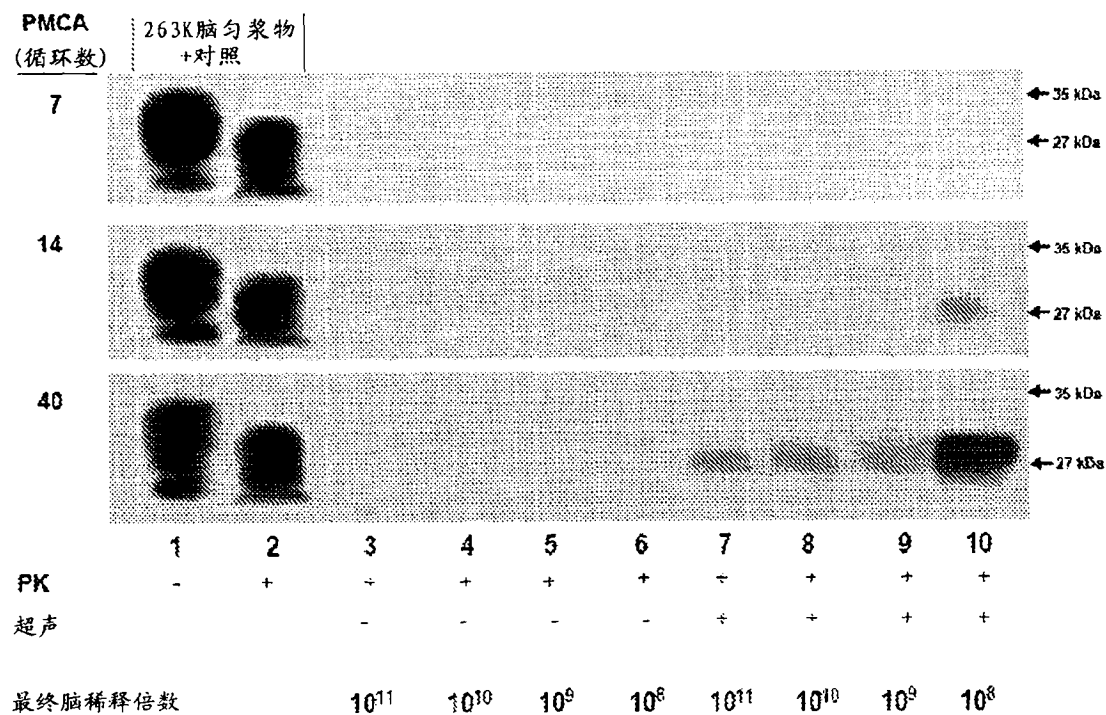


图 14

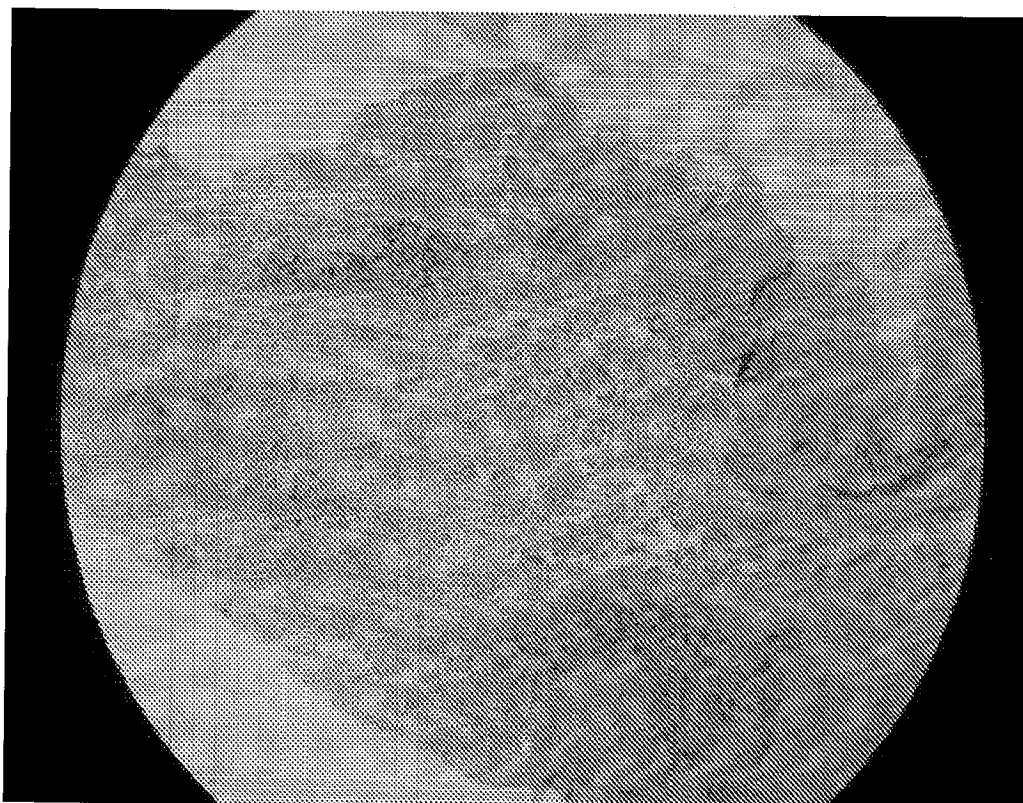


图 15

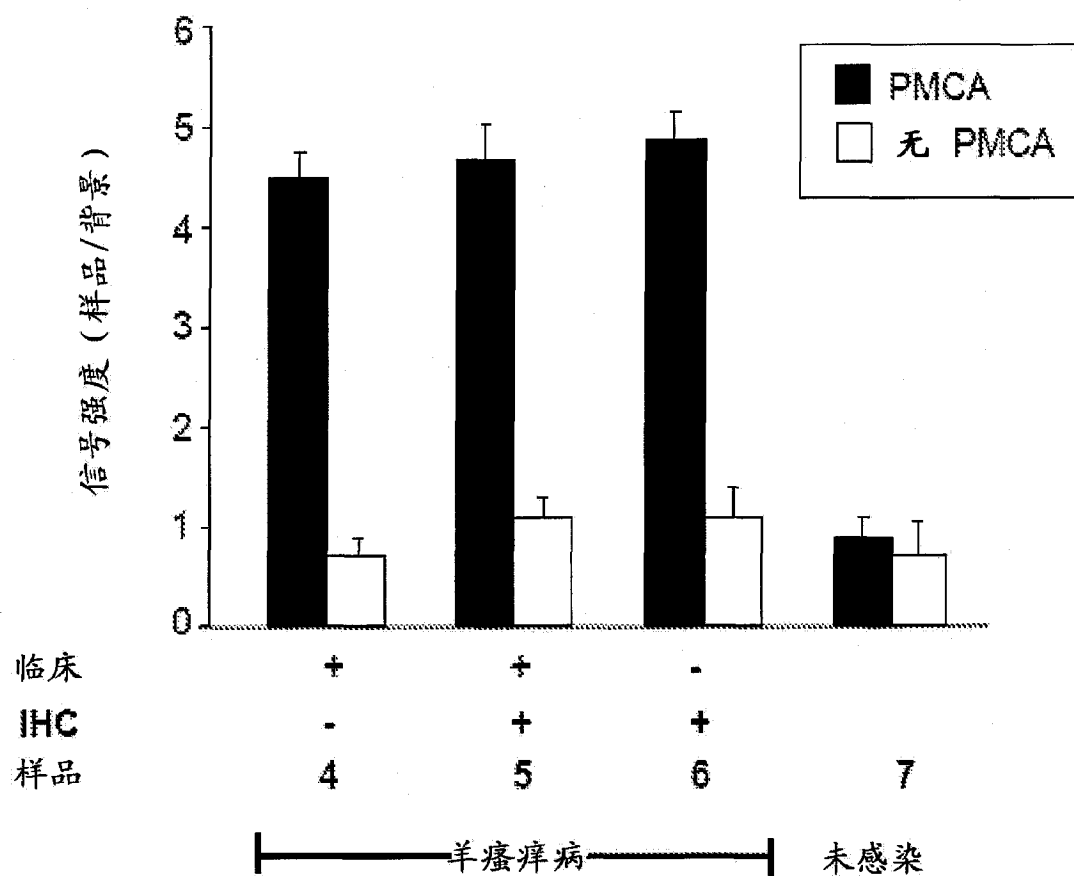


图 16

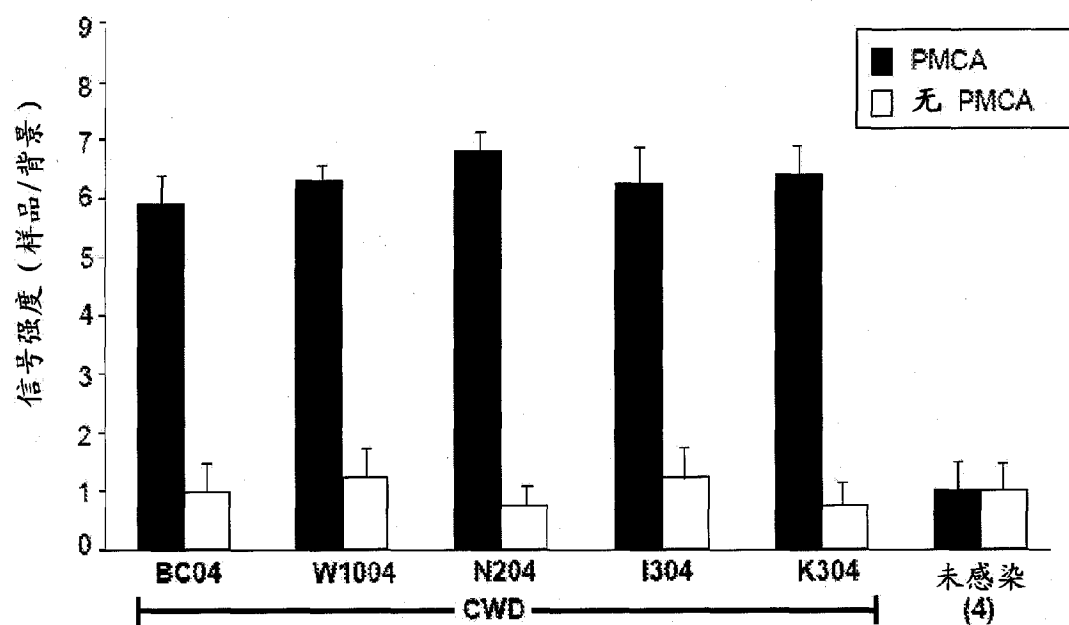


图 17