



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110320367 A

(43)申请公布日 2019.10.11

(21)申请号 201910461749.9

(22)申请日 2019.05.30

(71)申请人 广州医科大学附属第一医院(广州
呼吸中心)

地址 510000 广东省广州市沿江路151号

(72)发明人 徐评议 郭文苑 陈祥 莫明树
朱晓琴 彭国优 邱杰雯 黎兴键
李哲 黄树宣 周苗苗 刘汉群

(74)专利代理机构 深圳市六加知识产权代理有
限公司 44372

代理人 李于明

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

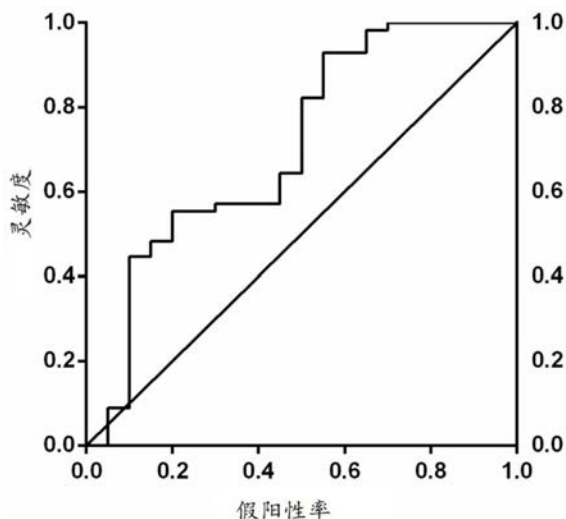
权利要求书1页 说明书7页
序列表2页 附图5页

(54)发明名称

基于LAG-3的诊断试剂盒及其在帕金森病诊断产品上的应用

(57)摘要

本发明公开了一种诊断试剂盒及其在帕金森病诊断产品中的应用。该诊断试剂盒包括：特异性抗体以及一种或者多种检测试剂；所述特异性抗体具有与LAG-3蛋白特异性结合的能力，所述检测试剂用于与所述特异性抗体配合，检测样品的LAG-3基因的表达水平。该试剂盒以LAG-3蛋白作为PD早期诊断的生物标志物，可以快速精确的检测被测试者体液（如脑脊液和血液）中的可溶性LAG-3抗体的水平，有助于判断CNS中蛋白异常沉积的水平，可辅助诊断被测试者罹患PD的风险。



1. 一种诊断试剂盒,其特征在于,包括:特异性抗体以及一种或者多种检测试剂;所述特异性抗体具有与LAG-3蛋白特异性结合的能力,所述检测试剂用于与所述特异性抗体配合,检测样品的LAG-3基因的表达水平。

2. 根据权利要求1所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述特异性抗体选自重组抗体、单克隆抗体和/或多克隆抗体。

3. 根据权利要求1所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述样品选自脑脊液。

4. 根据权利要求1所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述诊断试剂盒为电化学发光免疫检测试剂盒;所述电化学发光免疫检测试剂盒基于电化学发光反应,定量检测所述样品中的水溶性LAG-3蛋白。

5. 根据权利要求1所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述LAG-3蛋白为如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

6. 根据权利要求1所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述LAG-3蛋白选自如下蛋白质中的一种或者多种:

(1) 由SEQ ID No.1所示的氨基酸序列衍生的,并且具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有相同的功能的蛋白质;

(2) 与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成的蛋白质。

7. 根据权利要求6所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述由SEQ ID No.1所示的氨基酸序列衍生的,并且具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有相同的功能的蛋白质,具体包括:

将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列通过一个或者多个氨基酸的取代和/或缺失和/或添加而衍生的蛋白质。

8. 根据权利要求7所述的诊断试剂盒,其特征在于,所述取代和/或缺失和/或添加的氨基酸数量为1-50个。

9. 根据权利要求6所述的诊断试剂盒,其特征在于,与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有90%-95%以上同源性的氨基酸序列构成的蛋白质。

10. 一种如权利要求1-9任一项所述的诊断试剂盒在制备帕金森病临床诊断产品上的应用。

基于LAG-3的诊断试剂盒及其在帕金森病诊断产品上的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物检测技术领域,尤其涉及一种诊断试剂盒及其在制备帕金森病临床诊断产品上的应用。

背景技术

[0002] 帕金森病(PD)是一种中枢神经系统变性疾病,临床表现主要包括静止性震颤、运动迟缓、肌强直和姿势步态障碍。PD病理学的关键特征包括中枢神经系统(CNS)黑质纹状体的多巴胺能神经元(DA)的丢失、小胶质细胞异常激活和神经元的 α -突触核蛋白(α -synuclein)的沉积。沉积的 α -突触核蛋白具有类似朊蛋白特性,可感染正常的神经元致 α -synuclein在正常DA神经元异常聚集,引起DA神经元凋亡。

[0003] 为了克服传统诊断方式的缺陷,通常选择使用合适的生物学标记物来实现PD的早期诊断、提高PD诊断的准确度和敏感度。其中,有文献报道LAG-3与 α -突触核蛋白之间的特异性结合。其介导 α -突触核蛋白在神经元的传递及聚集。相关文献显示,LAG-3的胞外可溶性片段(Soluble LAG-3,sLAG-3)与大脑异常蛋白质水平密切相关,具有作为生物学标记物的潜力。

[0004] 由此,人们迫切需要提供完善的LAG-3蛋白或其相关产物的具体检测方案,实现LAG-3蛋白在PD诊断中的应用。

发明内容

[0005] 鉴于上述现有技术的不足之处,本发明的目的在于提供一种诊断试剂盒及其在帕金森病诊断产品上的应用,旨在解决现有技术中PD诊断无可靠标记物的问题。

[0006] 为了达到上述目的,本发明实施例第一方面提供一种诊断试剂盒。该诊断试剂盒包括:特异性抗体以及一种或者多种检测试剂;所述特异性抗体具有与LAG-3蛋白特异性结合的能力,所述检测试剂用于与所述特异性抗体配合,检测样品的LAG-3基因的表达水平。

[0007] 可选地,所述特异性抗体选自重组抗体、单克隆抗体和/或多克隆抗体。

[0008] 可选地,所述样品选自脑脊液。

[0009] 可选地,所述诊断试剂盒为电化学发光免疫检测试剂盒;所述电化学发光免疫检测试剂盒基于电化学发光反应,定量检测所述样品中的水溶性LAG-3蛋白。

[0010] 可选地,所述LAG-3蛋白为如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0011] 可选地,所述LAG-3蛋白选自如下蛋白质中的一种或者多种:

[0012] (1)由SEQ ID No.1所示的氨基酸序列衍生的,并且具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有相同的功能的蛋白质;

[0013] (2)与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0014] 可选地,所述由SEQ ID No.1所示的氨基酸序列衍生的,并且具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有相同的功能的蛋白质,具体包括:

[0015] 将SEQ ID No.1所示的氨基酸序列通过一个或者多个氨基酸的取代和/或缺失和/或添加而衍生的蛋白质。

[0016] 可选地,所述取代和/或缺失和/或添加的氨基酸数量为1-50个。

[0017] 可选地,与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有90%-95%以上同源性的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0018] 本发明实施例第二方面提供一种如上所述的诊断试剂盒在制备帕金森病临床诊断产品上的应用。

[0019] 本发明实施例提供的检测试剂盒以LAG-3蛋白作为PD早期诊断的生物标志物,可以快速精确的检测被测试者体液(如脑脊液和血液)中的可溶性LAG-3抗体的水平,有助于判断CNS中蛋白异常沉积的水平,可辅助诊断被测试者罹患PD的风险。

[0020] 进一步地,基于sLAG-3水平的监控结果,可及时告知该病患者病情进展,督促患者及时就医,避免病情进一步恶化,保障患者生命安全。

附图说明

[0021] 一个或多个实施例通过与之对应的附图中的图片进行示例性说明,这些示例性说明并不构成对实施例的限定,附图中具有相同参考数字标号的元件表示为类似的元件,除非有特别申明,附图中的图不构成比例限制。

[0022] 图1为本发明实施例1的使用MSD-ECL检测血浆可溶性LAG-3蛋白含量的示意图;

[0023] 图2为本发明实施例1的使用MSD-ECL检测脑脊液可溶性LAG-3蛋白与突触核蛋白含量的示意图;

[0024] 图3为本发明实施例1的脑脊液可溶性LAG-3蛋白与突触核蛋白水平的相关性的示意图;

[0025] 图4为本发明实施例1的脑脊液可溶性LAG-3水平鉴别PD与正常老年人的ROC曲线;

[0026] 图5为本发明实施例1的脑脊液可溶性LAG-3水平鉴别PD与正常老年人的灵敏度和准确度示意图;

[0027] 图6为本发明实施例1的ELISA和MSD-ECL检测同一标本数据的对比示意图。

[0028] 人LAG-3蛋白的氨基酸序列(NCBI的reference number为NP_002277.4)为:MWEAQ FLGLLFLQLWVAPVKPLQPGAEVPPVWAQEGAPALPCSPITPLQDLSLLRRAGVTWQHQPDSGPPAAAPGHPLA PGPHPAAPSSWGPRPRRYTVLSVGPGLRSGRLPLQPRVQLDERGRQRGDFSLWLRPARRADAGEYRAAVHLRDRA LSCRLRLRLGQASMTASPPGSLRASDWVILNCSFSRPDRPASVHWFRNRGQGRVPVRESPPHHHLAESFLFLPQVSP MDSGPWGCILTYRDGFNVSIMYNLTVLGLPPTPLTVYAGAGSRVGLPCRLPAGVGTRSFLLTAKWTPPGGGPDLLV TGDNGDFTLRLEDVSQAQAGTYTCHIHLQEQLNATVTLAIITVTPKSFSGPSLGLKLLCEVTPVSGQERFVWSSL DTPSQRFSFGPWLEAQEAQLLSQPWQCQLYQGERLLGAAYFTELSSPGAQRSGRAPGALPAGHLLLFLILGVLSL LLLVTGAFGFHLWRRQWRPRRFSALEQGIHPPQAQSKIEELEQEPEPEPEPEPEPEPEPEPEQL (SEQ ID No.1)

具体实施方式

[0029] 为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确,以下参照附图并举实施例对本发明进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0030] 除非另有说明,否则本说明书中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。

[0031] 本发明实施例中揭露的数值及其数值范围是近似值,而并非确定值。在误差或者实验条件允许的情况下,可以包括在误差范围内的所有值。本发明实施例中提供的数值范围用于表示在混合物中的组分的相对量以及其他方法实施例中列举的温度或者其他参数的范围。

[0032] 在本说明书中,“诊断帕金森病(PD)”或者“评估帕金森病”既包括判断受试者是否已经患有帕金森病、也包括判断受试者是否存在患有帕金森病的风险。从疾病的状态变化来分,可以包括疾病的缓解以及疾病的完全治愈等情况。

[0033] 如背景技术中所记载的, α -突触核蛋白被认为是PD的致病物质。 α -突触核蛋白自身聚合能力强,可以形成比 α -突触核蛋白单体毒性更强的寡聚体和纤维。因此,判断一种基因或其表达产物是否与帕金森病之间的相关关系可以通过检测基因或其表达产物与 α -突触核蛋白之间的相互关系来间接的确定。

[0034] 为了实现诊断或评估帕金森病,申请人创造性的提供了一种诊断试剂盒。该诊断试剂盒包括:特异性抗体以及一种或者多种检测试剂。

[0035] 其中,所述特异性抗体具有与LAG-3蛋白特异性结合的能力,所述检测试剂用于与所述特异性抗体配合,检测样品的LAG-3基因的表达水平。

[0036] LAG-3又称CD223,是属于免疫球蛋白超家族的细胞膜蛋白。申请人经过实验证实,其与帕金森病之间具有一定的相关性,可以作为PD早期诊断的分子标志物,用于为临床医师提供预防和治疗时的指引。

[0037] 在本说明书中,术语“抗体”是指通常由两对相同的多肽链(每对具有一条“轻”(L)链和一条“重”(H)链)组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分为 κ 和 λ 轻链。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ,并且分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。

[0038] 在轻链和重链内,可变区和恒定区通过大约12或更多个氨基酸的“J”区连接,重链还包含大约3个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。

[0039] 重链恒定区由3个结构域(CH1、CH2和CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如,效应细胞)和经典补系统的第一组分(C1q)的结合。

[0040] VH和VL区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR)),其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各VH和VL由按下列顺序:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4从氨基末端至羧基末端排列的3个CDR和4个FR组成。各重链/轻链对的可变区(VH和VL)分别形成抗体结合部位。氨基酸至各区域或结构域的分配遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1987and1991)),或Chothia&Lesk(1987)J.Mol.Biol.196:901-917;Chothia等人(1989)Nature 342:878-883的定义。

[0041] 在本说明书中,所述特异性抗体不受任何特定的产生抗体的方法限制。例如重组

抗体、单克隆抗体和多克隆抗体。该特异性抗体还可以是不同种型的抗体,例如,IgG(例如,IgG1,IgG2,IgG3或IgG4亚型),IgA1,IgA2,IgD,IgE或IgM抗体。

[0042] 在本实施例中,特异性抗体的特异性结合能力来自于“抗原结合部分”。该抗原结合部分是指全长抗体的一个或多个部分,所述部分保持结合抗体所结合的相同抗原(例如,LAG-3)的能力与完整抗体竞争对抗原的特异性结合。

[0043] 具体可通过重组DNA技术或通过完整抗体的酶促或化学断裂产生抗原结合部分。在一些实施例中,抗原结合部分包括Fab Fab'、F(ab')₂、Fd、Fv、dAb和互补决定区(CDR)片段、单链抗体(例如,scFv)、嵌合抗体、双抗体(diabody)和这样的多肽,其包含足以赋予多肽特异性抗原结合能力的抗体的至少一部分

[0044] 应当说明的是,该特异性抗体或者其片段只需要能够保留与LAG-3特异性结合的能力即可(即抗原结合部分)。本领域技术人员可以根据实际情况的需要,选择使用任何合适的方法或者技术手段来制备获得所述特异性抗体或者其片段。

[0045] 基于本发明实施例公开的发明思想,本领域技术人员可以应用该诊断试剂盒,特异性的定量检测LAG-3蛋白或者LAG-3基因的表达水平用以辅助诊断PD,评估罹患帕金森病的风险。

[0046] 在一些实施例中,可以检测被测试者脑脊液中的sLAG-3,并根据脑脊液LAG-3水平是否正常来帮助判断CNS中小胶质细胞的状态和 α -突触核蛋白的情况,辅助诊断被测试者罹患PD的风险。

[0047] LAG-3的胞外可溶性片段(Soluble LAG-3,sLAG-3)可以在脑脊液和外周血等体液中被检测到。当然,来自不同体液样本的sLAG-3含量可能代表了不同的含义。根据申请人的实验数据,令人惊喜的发现,脑脊液中的sLAG-3含量与PD之间呈现出非常强的相关关系。

[0048] 应当说明的是,本发明实施例提供的诊断试剂盒具体可以基于任何合适的原理并采用任何合适的方式实现对LAG-3蛋白的定量检测。任何基于对LAG-3蛋白进行特异性检测,用以进行PD早期诊断的试剂盒或者相关的检测设备、装置或其试剂组合均属于本发明公开的诊断试剂盒的其中一种实现形式。

[0049] 在较佳实施例中,所述诊断试剂盒为电化学发光免疫检测试剂盒;所述电化学发光免疫检测试剂盒基于电化学发光反应,定量检测所述样品中的水溶性LAG-3蛋白。

[0050] 电化学发光免疫检测(ECL)是一种在电极表面由电化学引发的特异性化学发光反应,实际上包括了电化学和化学发光两个过程。

[0051] 其中,化学发光剂三联吡啶钌和电子供体三丙胺(TPA)在阳电极表面同时各失去一个电子发生氧化反应。二价的三联吡啶钌被氧化成三价,后者是一种强氧化剂。TPA被氧化成阳离子自由基TPA^{•+}。

[0052] 后者很不稳定,自发地失去一个质子(H⁺),形成自由基TPA[•],这是一种非常强的还原剂。这两个高反应基团在电极表面迅速反应,三价的三联吡啶钌被还原形成激发态的二价三联吡啶钌,能量来源于三价的三联吡啶钌和TPA[•]之间存在的高电化学电位差。

[0053] TPA[•]自身被氧化成二丙胺和丙醛。接着激发态的二价三联吡啶钌衰减成基态的三联吡啶钌,同时发射一个波长620nm的光子。这一过程在电极表面周而复始地进行,产生许多光子,使光信号得以增强。

[0054] 在实际操作过程中,可以使用MSD公司提供的ECL检测技术。其在multi-spot微孔

板的电极表面通电后,电化学激发SULFO-TAGTM标记物(能够与LAG-3蛋白特异性结合的抗体)发出强光后,获取其光谱曲线和强度值从而实现可溶性LAG-3的快速检测。

[0055] 在应用传统的双抗体夹心法的免疫学方法(例如酶联免疫吸附法ELISA)时,存在着诸如含量极微的蛋白,其灵敏度尚不足以检测,实验操作步骤繁多,实验耗时较长以及在实验操作过程中容易出现误差,导致对同一样品重复测量实验结果变异度偏大等的缺陷。

[0056] 但在实际应用过程中,临床样品中的可溶性LAG-3浓度非常低(1pg/mL~100pg/mL),因此,可溶性LAG-3的检测需兼顾灵敏度与特异性。

[0057] 因此,与传统采用双抗体夹心法的免疫学方法进行可溶性LAG-3检测的方法相比,该ECL检测试剂盒可以克服在特异性或者灵敏度上的缺陷,具有敏感度高、特异性强和操作简单便捷的优点,适合于临床推广应用。

[0058] 在一些实施例中,所述LAG-3蛋白为如SEQ ID No.1所示的氨基酸序列组成的蛋白质。在另一些实施例中,所述LAG-3蛋白还可以选自如下蛋白质中的一种或者多种:

[0059] (1)由SEQ ID No.1所示的氨基酸序列衍生的,并且具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有相同的功能的蛋白质。

[0060] 在一些实施例中,该衍生的具有相同功能的蛋白质可以是SEQ ID No.1所示的氨基酸序列通过一个或者多个氨基酸的取代和/或缺失和/或添加而衍生的蛋白质。

[0061] 典型的,所述取代和/或缺失和/或添加的氨基酸数量为1-50个。较佳的是,可以控制在1-30个之间。更佳的是选自1-20个。在最佳实施例中,控制在1-10个氨基酸。

[0062] (2)与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列具有80%以上同源性的氨基酸序列构成的蛋白质。

[0063] 同源性又可以被称为序列同一性,表明了两个氨基酸序列之间的相近程度。在较佳的实施例中,可以是具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列90%-95%以上同源性的氨基酸序列。在另一些实施例中,具体可以选择是具有与SEQ ID No.1所示的氨基酸序列96%、97%、98%、99%同源性的氨基酸序列构成的多肽。

[0064] 应当说明的是,特定蛋白质中的一个或多个氨基酸的修饰不会影响蛋白质的功能。本领域技术人员可以理解,改变单个氨基酸或小百分比的氨基酸或对氨基酸序列的个别添加、缺失、插入、替换是保守修饰。

[0065] 蛋白质的改变产生具有相似功能的蛋白质,提供功能相似的氨基酸的保守替换表是本领域公知的。

[0066] 在本发明实施例提供了检测脑脊液中的LAG-3蛋白的诊断试剂盒,并且揭示了LAG-3的基因表达水平与帕金森病的相关性。由此,通过本发明实施例提供的诊断试剂盒,可对脑脊液的sLAG-3进行检测,并进一步用于判断受试者是否患有帕金森病或者判断受试者是否存在患有帕金森病的风险,从而指导临床医师给受试者提供预防方案或者治疗方案。

[0067] 进一步地,该诊断试剂盒基于电化学发明免疫检测原理进行脑脊液sLAG-3含量的检测,具有更好的灵敏度以及特异性,整体操作简便,非常适合于在临床推广应用。

[0068] 以下结合具体实例,详细描述本发明实施例提供的诊断试剂盒及其在PD早期诊断上的使用效果。应当说明的是,为了陈述简便,在具体实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Sambrook等人,分子克隆:实验室手册(New York:Cold Spring

HarborLaboratoryPress,1989)中所述的条件,或按照试剂或者设备制造厂商所建议的条件执行。

[0069] 实施例1:

[0070] 1) 外周血和脑脊液样本的收集:

[0071] 作为实验组的PD患者来自广州医科大学附属第一医院,共78例,年龄介乎57-66岁,所有病例被诊断为PD,其诊断标准参照帕金森病的UK脑库临床诊断标准。

[0072] 作为对照组的对照人群共56例,选自广州医科大学附属第一医院常规体检人群,所有入试者均排除血脂代谢、神经系统慢性退行性疾病等疾病,年龄介乎55-68岁。

[0073] 所有研究对象均签署了对该检测项目的知情同意书,并且提供了外周血和脑脊液用于基因的检测。

[0074] 2) 构建测定脑脊液和血液LAG-3蛋白的检测试剂盒:

[0075] 21) 使用两种不同的针对人LAG-3蛋白的细胞外部分的单克隆抗LAG-3抗体(使用抗人LAG-3单克隆生物素抗体作为捕获抗体,和SULFO-TAG检测抗人LAG-3单克隆抗体作为检测抗体)定量测定可溶性LAG-3的含量。

[0076] 22) 1%BSA PBS缓冲液稀释150×LAG-3生物素抗体至1×,在96小点孔链亲和素板(MSD Catalog#L45SA-2)上每孔加入25ul生物素抗体,25℃室温400rpm振荡器上振荡包埋2h。

[0077] 23) 用Wash Buffer (0.05%Tween20 in PBS,PH=7.2)清洗3遍后,在25℃备用。

[0078] 3) 构建测定突触核蛋白的检测试剂盒:

[0079] 31) 1%BSA PBS缓冲液稀释150×LAG-3生物素抗体至1×,在96小点孔链亲和素板(MSD Catalog#L45SA-2)上每孔加入25ul生物素抗体,25℃600rpm振荡器上包埋1h。

[0080] 32) 用Wash Buffer (0.05%Tween20 in PBS,PH=7.2)清洗3遍后,在25℃备用。

[0081] 4) 血清和脑脊液中可溶性LAG-3的测定(所有试验中均使用可溶性人LAG-3-FC作为标准品):

[0082] 41) 取全血或脑脊液250μl(或0.25g)至RNase-Free过滤柱中,13000rpm离心2分钟,收集上清液。

[0083] 42) 在包被待测板中加入25μl新鲜复温好的CSF、血清和标准品,25℃600rpm振荡器孵育1h,用Wash Buffer清洗后加入至50μl终浓度为可溶性LAG-3蛋白抗体的SULFO-TAG检测抗体25℃600rpm振荡器孵育1h。

[0084] 43) 用Wash Buffer清洗后,加入150μl Read Buffer(MSD Catalog#R92TG-1)后上机读数。

[0085] 5) 血清和脑脊液中可溶性α-突触核蛋白的测定(所有试验中均使用人α-synuclein-FC作为标准品)

[0086] 51) 取全血或脑脊液250μl(或0.25g)至RNase-Free过滤柱中,13000rpm离心2分钟,收集上清液。

[0087] 52) 在包被待测板中加入25μl新鲜复温好的CSF、血清和标准品,25℃600rpm振荡器孵育1h,用Wash Buffer清洗后加入至50μl终浓度为α-syn蛋白抗体的SULFO-TAG检测抗体25℃600rpm振荡器孵育1h。

[0088] 53) 用Wash Buffer清洗后,加入150μl Read Buffer(MSD Catalog#R92TG-1)后上

机读数。

[0089] 6) 统计方法:

[0090] 每个实验重复3次,数据都是以平均值±标准差的方式来表示,采用SPSS21.0统计软件进行统计分析。两者之间的差异采用t检验,认为当 $P<0.05$ 时具有统计学意义。

[0091] 7) 实验结果:

[0092] 如图1所示,与正常人群相比,对照组的血液可溶性LAG-3有下降趋势,但差异无统计学意义($P<0.05$)。

[0093] 如图2所示,与正常人群相比,对照组的脑脊液可溶性LAG-3和突触核蛋白的水平显著下降,差异有统计学意义($P<0.05$)。

[0094] 如图3所示,脑脊液可溶性LAG-3蛋白量和突触核蛋白水平呈正相关,差异有统计学意义($P<0.05$)。

[0095] 如图4所示,脑脊液可溶性LAG-3用作PD诊断的ROC曲线($AUC=0.92$)。

[0096] 如图5所示,脑脊液可溶性LAG-3用作PD诊断时的灵敏度和准确度。

[0097] 通过以上实验结果显示,与正常人群相比,帕金森病患者脑脊液的可溶性LAG-3水平增高,并且与 α -突触核蛋白之间具有较强的相关关系,表明通过测定受试者脑脊液和血液中可溶性LAG-3的水平有助于判断受试者罹患帕金森病的风险,可以将LAG-3作为评估PD病症的分子标志物。

[0098] 如图6所示,通过ELISA和MSD-ECL方法的对同一个样本的检测结果的比较结果显示:ELISA的检测率为70%,ECL方法的检测率为100%。而且ECL方法检测的数值均比ELISA数值高,提示ECL方法具有更好的灵敏度。

[0099] 综上所述,本发明实施例提供了一种诊断试剂盒及其应用。该诊断试剂盒定量检测脑脊液的可溶性LAG-3蛋白含量。在PD诊断时,依靠生物分子标记物可更及时、特异以及灵敏的进行判断,能够实现帕金森病的早期诊断,降低帕金森病的死亡率。

[0100] 可以理解的是,对本领域普通技术人员来说,可以根据本发明的技术方案及本发明构思加以等同替换或改变,而所有这些改变或替换都应属于本发明所附的权利要求的保护范围。

序列表

<120> 基于LAG-3的诊断试剂盒及其在帕金森病诊断产品上的应用

<141> 2019-05-29

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 2

<211> 525

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

```

Met Trp Glu Ala Gln Phe Leu Gly Leu Leu Phe Leu Gln Pro Leu Trp
1           5           10           15
Val Ala Pro Val Lys Pro Leu Gln Pro Gly Ala Glu Val Pro Val Val
          20          25          30
Trp Ala Gln Glu Gly Ala Pro Ala Gln Leu Pro Cys Ser Pro Thr Ile
          35          40          45
Pro Leu Gln Asp Leu Ser Leu Leu Arg Arg Ala Gly Val Thr Trp Gln
          50          55          60
His Gln Pro Asp Ser Gly Pro Pro Ala Ala Ala Pro Gly His Pro Leu
65          70          75          80
Ala Pro Gly Pro His Pro Ala Ala Pro Ser Ser Trp Gly Pro Arg Pro
          85          90          95
Arg Arg Tyr Thr Val Leu Ser Val Gly Pro Gly Gly Leu Arg Ser Gly
          100         105         110
Arg Leu Pro Leu Gln Pro Arg Val Gln Leu Asp Glu Arg Gly Arg Gln
          115         120         125
Arg Gly Asp Phe Ser Leu Trp Leu Arg Pro Ala Arg Arg Ala Asp Ala
          130         135         140
Gly Glu Tyr Arg Ala Ala Val His Leu Arg Asp Arg Ala Leu Ser Cys
145         150         155         160
Arg Leu Arg Leu Arg Leu Gly Gln Ala Ser Met Thr Ala Ser Pro Pro
          165         170         175
Gly Ser Leu Arg Ala Ser Asp Trp Val Ile Leu Asn Cys Ser Phe Ser
          180         185         190
Arg Pro Asp Arg Pro Ala Ser Val His Trp Phe Arg Asn Arg Gly Gln
          195         200         205
Gly Arg Val Pro Val Arg Glu Ser Pro His His His Leu Ala Glu Ser
210         215         220

```

Phe	Leu	Phe	Leu	Pro	Gln	Val	Ser	Pro	Met	Asp	Ser	Gly	Pro	Trp	Gly	
225						230				235					240	
Cys	Ile	Leu	Thr	Tyr	Arg	Asp	Gly	Phe	Asn	Val	Ser	Ile	Met	Tyr	Asn	
					245				250					255		
Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Pro	Thr	Pro	Leu	Thr	Val	Tyr	Ala	
					260				265					270		
Gly	Ala	Gly	Ser	Arg	Val	Gly	Leu	Pro	Cys	Arg	Leu	Pro	Ala	Gly	Val	
					275				280					285		
Gly	Thr	Arg	Ser	Phe	Leu	Thr	Ala	Lys	Trp	Thr	Pro	Pro	Gly	Gly	Gly	
					290				295					300		
Pro	Asp	Leu	Leu	Val	Thr	Gly	Asp	Asn	Gly	Asp	Phe	Thr	Leu	Arg	Leu	
305					310					315					320	
Glu	Asp	Val	Ser	Gln	Ala	Gln	Ala	Gly	Thr	Tyr	Thr	Cys	His	Ile	His	
					325					330					335	
Leu	Gln	Glu	Gln	Gln	Leu	Asn	Ala	Thr	Val	Thr	Leu	Ala	Ile	Ile	Thr	
					340					345					350	
Val	Thr	Pro	Lys	Ser	Phe	Gly	Ser	Pro	Gly	Ser	Leu	Gly	Lys	Leu	Leu	
					355					360					365	
Cys	Glu	Val	Thr	Pro	Val	Ser	Gly	Gln	Glu	Arg	Phe	Val	Trp	Ser	Ser	
					370					375					380	
Leu	Asp	Thr	Pro	Ser	Gln	Arg	Ser	Phe	Ser	Gly	Pro	Trp	Leu	Glu	Ala	
385					390					395					400	
Gln	Glu	Ala	Gln	Leu	Leu	Ser	Gln	Pro	Trp	Gln	Cys	Gln	Leu	Tyr	Gln	
					405					410					415	
Gly	Glu	Arg	Leu	Leu	Gly	Ala	Ala	Val	Tyr	Phe	Thr	Glu	Leu	Ser	Ser	
					420					425					430	
Pro	Gly	Ala	Gln	Arg	Ser	Gly	Arg	Ala	Pro	Gly	Ala	Leu	Pro	Ala	Gly	
					435					440					445	
His	Leu	Leu	Leu	Phe	Leu	Ile	Leu	Gly	Val	Leu	Ser	Leu	Leu	Leu	Leu	
					450					455					460	
Val	Thr	Gly	Ala	Phe	Gly	Phe	His	Leu	Trp	Arg	Arg	Gln	Trp	Arg	Pro	
465					470					475					480	
Arg	Arg	Phe	Ser	Ala	Leu	Glu	Gln	Gly	Ile	His	Pro	Pro	Gln	Ala	Gln	
					485					490					495	
Ser	Lys	Ile	Glu	Glu	Leu	Glu	Gln	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	
					500					505					510	
Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Pro	Glu	Gln	Leu				
					515					520					525	

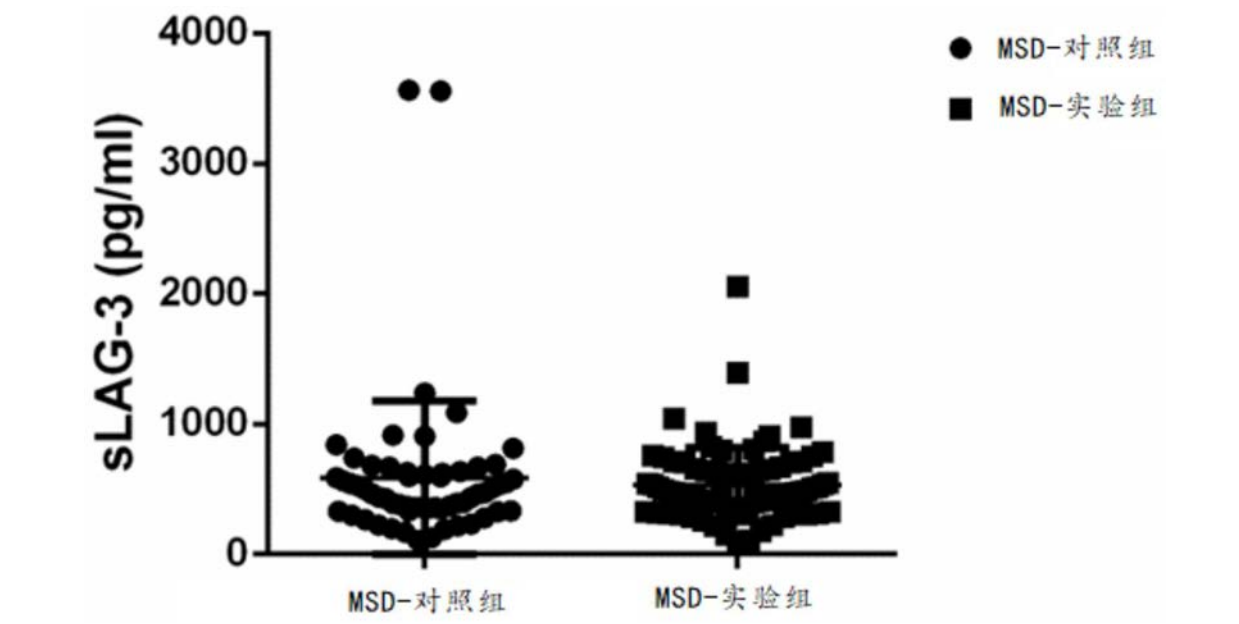


图1

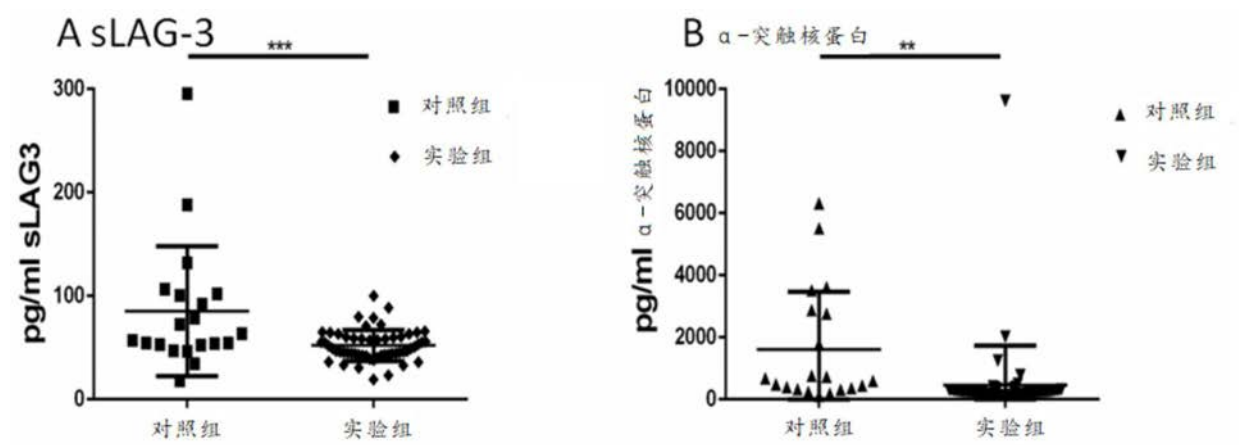


图2

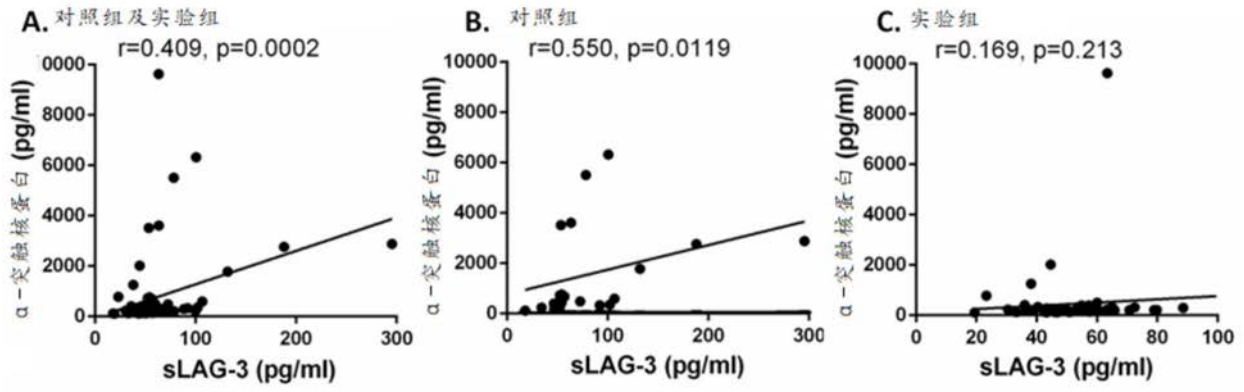


图3

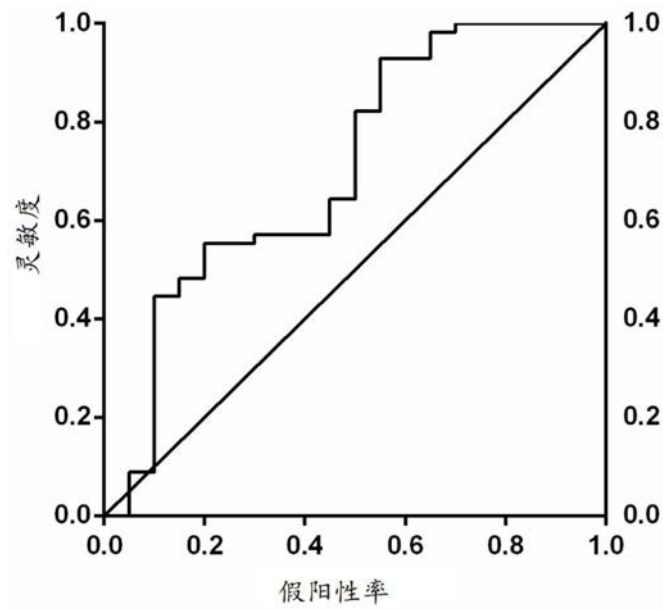


图4

敏感性	95%置信区间		特异性	95%置信区间		似然比
< 18.74	0	0.0% to 6.375%	95	75.13% to 99.87%	0	
< 21.40	1.786	0.04520% to 9.553%	95	75.13% to 99.87%	0.3571	
< 26.92	3.571	0.4355% to 12.31%	95	75.13% to 99.87%	0.7143	
< 31.70	5.357	1.119% to 14.87%	95	75.13% to 99.87%	1.071	
< 33.12	7.143	1.980% to 17.29%	95	75.13% to 99.87%	1.429	
< 33.85	8.929	2.963% to 19.62%	95	75.13% to 99.87%	1.786	
< 35.20	8.929	2.963% to 19.62%	90	68.30% to 98.77%	0.8929	
< 36.25	10.71	4.035% to 21.88%	90	68.30% to 98.77%	1.071	
< 37.31	12.5	5.176% to 24.07%	90	68.30% to 98.77%	1.25	
< 38.64	14.29	6.375% to 26.22%	90	68.30% to 98.77%	1.429	
< 39.77	16.07	7.622% to 28.33%	90	68.30% to 98.77%	1.607	
< 41.25	17.86	8.910% to 30.40%	90	68.30% to 98.77%	1.786	
< 42.38	19.64	10.23% to 32.43%	90	68.30% to 98.77%	1.964	
< 42.71	21.43	11.59% to 34.44%	90	68.30% to 98.77%	2.143	
< 43.01	23.21	12.98% to 36.42%	90	68.30% to 98.77%	2.321	
< 43.32	25	14.39% to 38.37%	90	68.30% to 98.77%	2.5	
< 43.51	26.79	15.83% to 40.30%	90	68.30% to 98.77%	2.679	
< 43.98	28.57	17.30% to 42.21%	90	68.30% to 98.77%	2.857	
< 44.39	30.36	18.78% to 44.10%	90	68.30% to 98.77%	3.036	
< 44.56	32.14	20.29% to 45.96%	90	68.30% to 98.77%	3.214	
< 44.64	33.93	21.81% to 47.81%	90	68.30% to 98.77%	3.393	
< 44.93	35.71	23.36% to 49.64%	90	68.30% to 98.77%	3.571	
< 45.34	37.5	24.92% to 51.45%	90	68.30% to 98.77%	3.75	
< 45.50	39.29	26.50% to 53.25%	90	68.30% to 98.77%	3.929	
< 45.78	41.07	28.10% to 55.02%	90	68.30% to 98.77%	4.107	
< 46.11	42.86	29.71% to 56.78%	90	68.30% to 98.77%	4.286	
< 46.46	44.64	31.34% to 58.53%	90	68.30% to 98.77%	4.464	
< 46.81	44.64	31.34% to 58.53%	85	62.11% to 96.79%	2.976	

< 46.90	46.43	32.99% to 60.26%	85	62.11% to 96.79%	3.095
< 46.91	48.21	34.66% to 61.97%	85	62.11% to 96.79%	3.214
< 48.16	48.21	34.66% to 61.97%	80	56.34% to 94.27%	2.411
< 49.42	50	36.34% to 63.66%	80	56.34% to 94.27%	2.5
< 50.15	51.79	38.03% to 65.34%	80	56.34% to 94.27%	2.589
< 51.34	53.57	39.74% to 67.01%	80	56.34% to 94.27%	2.679
< 52.20	55.36	41.47% to 68.66%	80	56.34% to 94.27%	2.768
< 52.69	55.36	41.47% to 68.66%	75	50.90% to 91.34%	2.214
< 53.12	55.36	41.47% to 68.66%	70	45.72% to 88.11%	1.845
< 53.62	57.14	43.22% to 70.29%	70	45.72% to 88.11%	1.905
< 54.04	57.14	43.22% to 70.29%	65	40.78% to 84.61%	1.633
< 54.33	57.14	43.22% to 70.29%	60	36.05% to 80.88%	1.429
< 54.59	57.14	43.22% to 70.29%	55	31.53% to 76.94%	1.27
< 55.07	58.93	44.98% to 71.90%	55	31.53% to 76.94%	1.31
< 55.37	60.71	46.75% to 73.50%	55	31.53% to 76.94%	1.349
< 55.65	62.5	48.55% to 75.08%	55	31.53% to 76.94%	1.389
< 56.42	64.29	50.36% to 76.64%	55	31.53% to 76.94%	1.429
< 57.12	64.29	50.36% to 76.64%	50	27.20% to 72.80%	1.286
< 57.40	66.07	52.19% to 78.19%	50	27.20% to 72.80%	1.321
< 58.09	67.86	54.04% to 79.71%	50	27.20% to 72.80%	1.357
< 58.65	69.64	55.90% to 81.22%	50	27.20% to 72.80%	1.393
< 58.93	71.43	57.79% to 82.70%	50	27.20% to 72.80%	1.429
< 59.61	73.21	59.70% to 84.17%	50	27.20% to 72.80%	1.464
< 60.23	75	61.63% to 85.61%	50	27.20% to 72.80%	1.5
< 60.52	76.79	63.58% to 87.02%	50	27.20% to 72.80%	1.536
< 61.92	78.57	65.56% to 88.41%	50	27.20% to 72.80%	1.571
< 63.34	80.36	67.57% to 89.77%	50	27.20% to 72.80%	1.607
< 63.55	82.14	69.60% to 91.09%	50	27.20% to 72.80%	1.643
< 64.15	82.14	69.60% to 91.09%	45	23.06% to 68.47%	1.494
< 64.79	83.93	71.67% to 92.38%	45	23.06% to 68.47%	1.526
< 65.08	85.71	73.78% to 93.62%	45	23.06% to 68.47%	1.558
< 65.50	87.5	75.93% to 94.82%	45	23.06% to 68.47%	1.591
< 68.29	89.29	78.12% to 95.97%	45	23.06% to 68.47%	1.623
< 71.62	91.07	80.38% to 97.04%	45	23.06% to 68.47%	1.656
< 72.59	92.86	82.71% to 98.02%	45	23.06% to 68.47%	1.688
< 75.56	92.86	82.71% to 98.02%	40	19.12% to 63.95%	1.548
< 78.66	92.86	82.71% to 98.02%	35	15.39% to 59.22%	1.429
< 79.35	94.64	85.13% to 98.88%	35	15.39% to 59.22%	1.456
< 84.17	96.43	87.69% to 99.56%	35	15.39% to 59.22%	1.484
< 90.34	98.21	90.45% to 99.95%	35	15.39% to 59.22%	1.511
< 96.06	98.21	90.45% to 99.95%	30	11.89% to 54.28%	1.403
< 100.3	100	93.63% to 100.0%	30	11.89% to 54.28%	1.429
< 101.5	100	93.63% to 100.0%	25	8.657% to 49.10%	1.333
< 104.5	100	93.63% to 100.0%	20	5.733% to 43.66%	1.25
< 119.4	100	93.63% to 100.0%	15	3.207% to 37.89%	1.176
< 160.1	100	93.63% to 100.0%	10	1.235% to 31.70%	1.111
< 241.8	100	93.63% to 100.0%	5	0.1265% to	1.053

图5

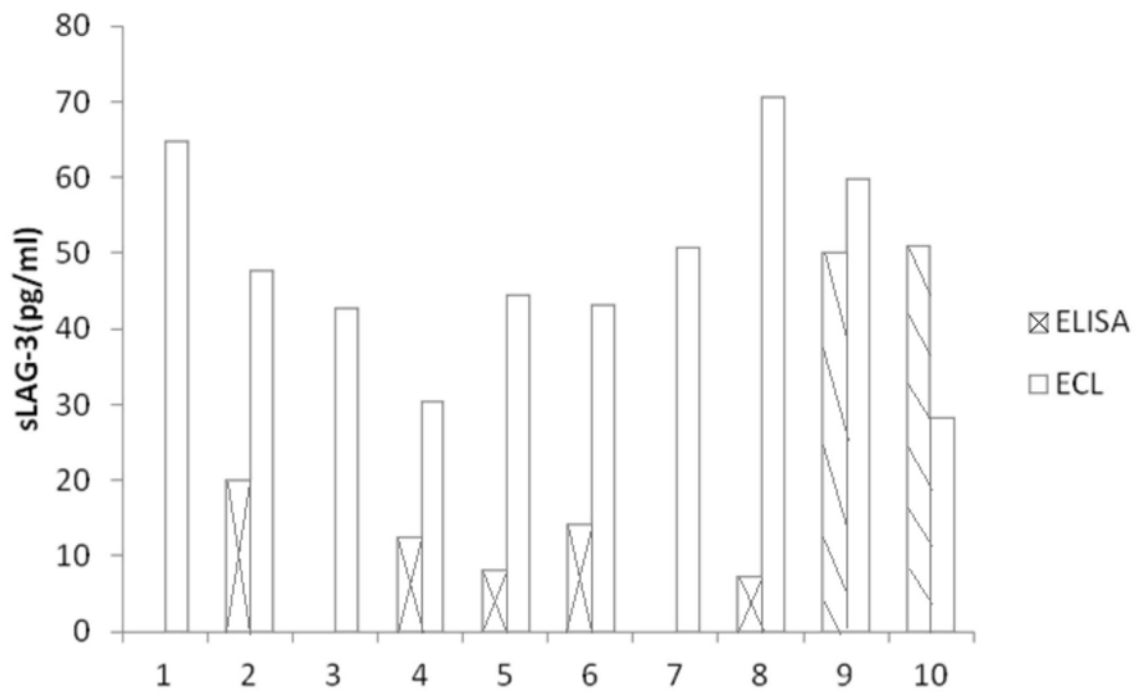


图6