[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
G01N 33/50
G01N 33/68 C12Q 1/68

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03154568.8

[43] 公开日 2004 年 9 月 1 日

[11] 公开号 CN 1525168A

[22] 申请日 1993.10.13 [21] 申请号 03154568.8
分案原申请号 93114843.X
[30] 优先权
[32] 1992.10.13 [33] US [31] 07/959，992
[32] 1993. 8.31 [33] US [31] 08/114，448
[71] 申请人 杜克大学
地址 美国北卡罗来纳
[72] 发明人 A·D·罗斯
W·J·斯特里特马特
G·S·塞尔温森 J·恩格黑尔德
D·E·施梅凯尔
[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所
代理人 唐伟杰
权利要求书 2 页 说明书 38 页 附图 3 页

[54] 发明名称 早老性痴呆的检测方法

[57] 摘要

本发明公开了对早老性痴呆实验对象的诊断和预测方法。 该方法包括测定实验对象是否存在阿朴脂蛋白 E4 型(APOE4)同型物或对 APOE4 编码的 DNA。 APOE4 的存在表明实验对象患有早老性痴呆或处于发展为早老性痴呆的危险中。

ISSN1008-4274

1.一种在体外检测、预测或筛选实验对象中早老性痴呆发病危险的方法，包括在该实验对象的离体生物样本中检测是否存在阿朴脂蛋白 E4 型同种型。

2.权利要求 1 的方法，其中所述实验对象先前未曾被诊断过患有早老性痴呆，或先前被确定为具有发生早老性痴呆的危险，或患有痴呆。

3.权利要求 1 的方法，其中所述生物样本为血液样本。

4.权利要求 1－3 之任一项的方法，其中所述对阿朴脂蛋白 E4 型同种型的检测是通过等电聚焦或通过免疫测定而完成的。

5.权利要求 4 的方法，其中所述免疫测定是采用选择性与阿朴脂蛋白 E 同种型结合的抗体而进行的。

6.一种在体外检测、预测或筛选实验对象中早老性痴呆发病危险的方法，包括在该实验对象的离体生物样本中检测是否存在编码阿朴脂蛋白 E4 型同种型的基因。

7.权利要求 6 的方法，其中所述实验对象先前未曾被诊断过患有早老性痴呆，或先前被确定为具有发生早老性痴呆的危险，或患有痴呆。

8.权利要求 6 的方法，其中所述生物样本为脑脊液样本。

9.权利要求 6－8 之任一项的方法，其中所述对编码阿朴脂蛋白 E4 型同种型的基因的检测是通过扩增编码阿朴脂蛋白 E 同种型的基因，使用合适标记的寡核苷酸探针而完成的。

10.权利要求 9 的方法，其中所述扩增步骤是通过聚合酶链式反应或通过连接酶链式反应而进行的。

11.权利要求 6－8 之任一项的方法，其中所述检测步骤包括检测该实验对象是否为编码阿朴脂蛋白 E4 型同种型的基因的纯合子。

12.检测阿朴脂蛋白 E4 型同种型或编码阿朴脂蛋白 E4 型同种型的基因的物质在制备用于诊断早老性痴呆或预测早老性痴呆患病危

险的产品中的用途。

13.权利要求 12 的用途，其中所述检测阿朴脂蛋白 E4 型同种型的物质为选择性与阿朴脂蛋白 E 同种型结合的抗体。

14.权利要求 12 的用途，其中所述检测编码阿朴脂蛋白 E4 型同种型的基因的物质是特异性与编码阿朴脂蛋白 E 同种型的基因杂交的寡核苷酸探针。

15.一种阿朴脂蛋白 E 同种型的特异性单克隆抗体，该抗体选自与阿朴脂蛋白 E3 型同种型特异性结合的单克隆抗体和与阿朴脂蛋白 E4 型同种型特异性结合的单克隆抗体。

16.权利要求 15 的抗体，其与固体载体结合。

17.权利要求 15 的抗体，其与可检测基团结合。

早老性痴呆的检测方法

本申请是申请日为 1993 年 10 月 13 日，发明名称为“早老性痴呆的检测方法”，申请号为 93114843.X 的中国发明专利申请的分案申请。

本发明涉及诊断和预测早老性痴呆（AD）的方法。老年斑和亲刚果红型(congophilic)血管病是畸型细胞外结构，该结构被发现大量存在于患早老性痴呆病人的大脑中。对这些结构的生化组成已有广泛的研究，以更好地认识这种痴呆病发病和机理的可能规律。成熟的老年斑是一种混合结构，包括由淀粉样原纤维组成的中心核，它由营养不良的轴索、轴索末端和树突、小神经胶质的纤维性的星形细胞包围，见 D. Selkoe Neuron 6, 487-498 (1991)导致亲刚果红型血管病的血管周围的老年斑的淀粉样蛋白核，是含 39 到 43 个氨基酸的肽，即所谓β－淀粉样蛋白（βA）肽，见 G、Glenner and C. Wong, Biochem. Biophys. Res. Comm. 120, 885-890(1984)。βA 肽在早老性痴呆、唐氏综合症、Dutch 类遗传性大脑出血和老年大脑中被发现，见 K. Kosik Science 256, 780-783 (1992)。Aβ是由更大的蛋白，即淀粉样蛋白前体（APP）非正常蛋白分解产生的。见 K, Beyreuther and C. Masters, Brain Path. 1, 241-251 (1991)。

老年斑和亲刚果红型血管病所含蛋白还包括βA 肽。通过使用抗体对前体蛋白的氨基端和羧基端的识别进行组织化学研究已确认了老年斑中的 APP 本身。见 F. Tagliavine et al., Neurosci. Lett. 128, 117-120 (1991); C. Joachim et al.,

Amer. Jour. Path. 138，373－384（1991）；这些蛋白在细胞外空间聚积与老年斑和 亲刚果红型 血管病相联系的机理还不清楚。

对早老性痴呆机理大量研究的同时，还需要继续寻找新途径研究和制止这种疾病。

本发明公开了诊断或预测早老性痴呆的方法，本发明的一个实施方案包括检测在实验对象中是否存在或将阿朴脂蛋白E 4型（ApoE4）同型物（isoform）编码的DNA．另一个实施方案包括检测是否存在或缺少ApoE 4 同型物。存在ApoE4 同型物 或对ApoE 4 同型物 编码的DNA表明实验对象患有早老性痴呆或处于发展为早老性痴呆的危险中。

本发明前述和其它目的以及本发明各方面情况由附图详细解释并在下面进行说明。

附图简要说明

图1 顶端的一组调查对象，表示与固定βA肽和潜伏期后的控制肽（“偶氢肽”、或“ E．H．”）结合的脑脊髓液中蛋白和；用磷酸盐缓冲的盐溶液洗脱，柱1；用5%十二烷基硫酸钠洗脱，柱2；用4摩尔浓度尿素洗脱，柱3；或用6摩尔浓度胍盐酸盐洗脱，柱4。用免疫组织化学染色对底部一组调查对象的着色表示结合的阿朴脂蛋白E。

图2．顶端的一组调查对象，表示脑脊髓液中蛋白与不同固定肽的结合。对阿朴脂蛋白E的结合。也通过免疫组织化学染色对底部一组调查对象的着色表示。

图3．表示从实验对象与ApoE4等位基因0、1和2开始反

应开始的时间。每条曲线都被ＡｐｏＥ４等位基因号标记。“大”号表示在短时间隔内的多次诊断。开始反应曲线通过Kaplan-Meier产物极限分布进行估算并可清楚地区分（Logrank 卡方＝５３．８，自由度２，Ｐ＜０．０００１）。

如上所述，本发明提供一种对实验对象患早老性痴呆进行普查（例如，诊断或预测）的方法。该方法包括检测实验对象是否出现或缺少ＡｐｏＥ４ 同型物 或对ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ。如出现这种 同型物 或ＤＮＡ则表示实验对象患有早老性痴呆或有发展成早老性痴呆的危险。合适的实验对象包括早期没有被诊断为患早老性痴呆者，早期被确定有发展为早老性痴呆危险者，以及被诊断为患早老性痴呆而想要确诊者。例如，被诊断或确定患有痴呆的病人，特别是早期临床表现正常但确定为患有痴呆发展趋向的病人，都是合适的实验对象。因此，本发明可以用于检测家族性早老痴呆（晚期发作和早期发作）以及偶发性早老性痴呆。

检测ＡｐｏＥ４或对ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ可通过任何合适的方法直接或间接地实现。各种技术是本领域技术人员公知的。一般都包括从实验对象收集含ＤＮＡ或ＡｐｏＥ的生物样品，然后从该样品检测实验对象是否存在ＡｐｏＥ４或存在对该isoform编码的ＤＮＡ。例如，检测步骤可以通过从实验对象收集ＡｐｏＥ样品（例如，从脑背髓液或任何其它含ＡｐｏＥ的体液或组织）、然后确定在ＡｐｏＥ样品中是否存在或缺少ApoE4 同型物 （例如，用等电聚积或免疫测定方法）。另外，检测步骤可以通过从实验对象收集含ＤＮＡ的生物样品、然后确定该生物样品中是否存在或缺少对ＡｐｏＥ４ 同型物 编码的ＤＮＡ来实现。该实验对象含ＤＮＡ的任何生物样品都可使用，

包括组织样品和血液样品，其中血细胞是十分方便的来源。要确定对ApoE4 同型物 编码的DNA是否存在，可通过由合适检测基因标记的寡核苷酸探针来进行，或通过如聚合酶链反应或连接酶链反应这样的放大作用来进行（放大作用的产物可以用标记过的寡核苷酸探针检测）。进一步来说，检测步骤可以包括检测实验对象对将ApoE4 isoform 编码的基因是杂合子的还是纯合子的。已知多种不同寡核苷酸探针检验可以实现本发明。见，例如,美国专利号4,302,204Wahl等；美国专利号4，358，535，Falkow等：美国专利号4,563,419，Ranki 等：以及美国专利号4，994，373，Stavrianopoulos 等。（申请人特别想把这里所列的所有已公开的美国专利作为参考资料）。

选择的核酸顺序或目标核酸顺序的放大可以通过任何合适的方法实现。见generally D. Kwoh and 7. Kwoh, Am. Biotechnol. Lab. 8, 14-25 (1990)。合适的放大技术的例子包括但不限于，聚合酶链反应，连接酶链反应，线置换放大（见generally G. Walker et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89, 392-396 (1992); G. Walker et al. Nucleic Acids Res. 20, 1691-1696 (1992)，转录碱基放大(见D. Kwoh et al., Proc Natl. Acad Sci. USA 86, 1173-1177 (1989)，自持顺序复制(or"3SR")（见J. Guatelli et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA87,1874-1878 (1990)，QB 复制酶体系(见 P. Lizardi et al., Bio Technology 6, 1197-1202 (1988))，核酸序列一碱基放大（or "NASBA"）（见 R. Lewis, Genetic Engineering News 12 (9), 1 (1992))，修复链反应(or "RCR")(见 R. Lewis,Supra),

boomerang DNA 放大(or "BDA")(见 R. Lewis, Supra).聚合酶链反应是当前的优选方法。

通常，如前文一样ＤＮＡ放大技术包括使用一个探针、一对探针或两对探针，它们专门与对ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ相结合，但在相同杂化条件下不与将ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ３编码的ＤＮＡ结合，这些探针作为ＡｐｏＥ４ ＤＮＡ放大的一个或多个引物或作为放大作用的一部分（同样，也可以使用专门与对ＡｐｏＥ２编码的ＤＮＡ结合的一个探针、一对探针或两对探针，但在同样杂化条件下该探针不与对ＡｐｏＥ３或ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ结合，这些探针作为放大ＡｐｏＥ２ ＤＮＡ的一个或多个引物或作为放大反应的一部分；也可以使用专门与对ＡｐｏＥ３编码的ＤＮＡ结合的一个探针、一对探针或两对探针，但在相同杂化条件下不与对ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ结合，这些探针作为放大ＡｐｏＥ３ ＤＮＡ的一个或多个引物或作为放大反应的一部分）。

通常，用于检测对ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ之寡核苷酸探针是与一对ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ结合之寡核苷酸探针，但该探针在相同杂化条件下不与将ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ３编码的ＤＮＡ结合。寡核苷酸探针用一个合适的可检测基因标记，如下面给出的相关的抗体。同样，一个用于检测将ＡｐｏＥ２编码的ＤＮＡ寡核苷酸探针是与对ＡｐｏＥ２编码的ＤＮＡ结合之寡核苷酸探针，该探针在相同杂化条件下不与对ＡｐｏＥ３或ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ结合。而用于检测对ＡｐｏＥ３编码的ＤＮＡ之寡核苷酸探针是与对ＡｐｏＥ３编码的ＤＮＡ相结合之寡核苷酸探针，该探针在相同杂化条件下不与对ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ４编码的ＤＮＡ结合。

聚合酶链反应（PCR）可依照已知技术完成。见美国专利：4，683，195；4，683，202；4，800，159；和4，965，188。通常，PCR包括，首先，对要检测的每个特定顺序链（strand），在杂化条件下用寡核苷酸引物处理核酸样品（如在热稳定的DNA聚合酶存在下），以便对每一核酸链互补的扩大产物与数种引物进行合成从而足以与要杂化的每一特定顺序链互补，故当至每一引物合成的扩大产物从其补体中分离后，可以作为合成其它引物扩大产物的样板，如果要检测的一种或数种顺序出现了，在变性条件下处理样品，将引物扩大产物从它们的样板中分离。循环重复这些步骤直到达到想要的放大程度。检测放大的顺序列可以通过向反应产物中加入能够杂合反应产物的寡核苷酸探针实现（例如，本发明的寡核苷酸探针），该探针载有可检测的标记，然后用已知技术检测该标记。

连接酶链反应（LCR）也可以依照已知技术完成。见，例如，R. Weiss, Science 254, 1292 (1991)。通常，该反应是用两对寡核苷酸探针实现的：一对探针与被检测顺序的一个链相结合；另一对探针与被检测顺序的另一链相结合。每对都与它相对映的链完全重叠。该反应的实现，首先，将被检测的顺序链变性（例如，分离），然后在热稳定连接酶存在下让该链与两对寡核苷酸探针反应，这样每对寡核苷酸探针被连接在一起，然后分离反应产物，并循环重复上述过程直到该顺序列放大到所需程度。按以上描述的关于PCR类似方法完成检测。

很容易理解这里描述的检测步骤可以直接或间接实现。因此，举个例子，如果实验对象的ApoE2或ApoE3也被检测，则可以

确定实验对象对ＡｐｏＥ４不是纯合子的；如果实验对象ＡｐｏＥ２和ＡｐｏＥ３两者同时被检测，则可以确定实验对象既不是ApoE4 纯合子也不是杂合子。

对于等电聚合和对偶基因检测技术两种中任何一种，确定样品中存在或缺少ＡｐｏＥ４ is同型物的步骤可以用选择性地与ApoE4结合的抗体经抗体检验完成（也就是，与ＡｐｏＥ４结合的抗体在相同结合条件下基本不与ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ３结合）。如果想要确定病人精确的ＡｐｏＥ补体，并且要确定病人对ＡｐｏＥ４是纯合子的或杂合子的，则与ＡｐｏＥ２和ＡｐｏＥ３选择性结合的抗体也可以使用（也就是，与ＡｐｏＥ２结合但在相同结合条件下基本不与ＡｐｏＥ３或ＡｐｏＥ４结合的抗体；与ＡｐｏＥ３结合但在相同结合条件下基本不与ＡｐｏＥ２或ＡｐｏＥ４结合的抗体）。

用于选择性地与ＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３和ＡｐｏＥ４结合的抗体可以用任何合适的技术培养。例如，单 克隆 （monoclonal）抗体可以在杂种（hybridoma ）细胞链依照Kohler和Milstein的技术培养，Nature 265, 495-97 (1975)。ＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３或ApoE4可以从被确定为纯合子的病人获得，然后用S. Rall等 Methods in Enzymol. 128, 273 (1986)描述的技术进行纯化，并对单 克隆 抗体或多克隆（Polyclonal）抗体培养用作免疫原（immunogen ）。纯化的ＡｐｏＥ 同型物 可以通过重组法得到以表示生物活性的同型物 。甚至一个免疫原片段可以用作免疫原。单细胞系Fab 片段可以用通过本领域技术人员熟知的重组技术在大肠杆菌中（Escherichia Coli）从已知顺序生产。见，例如，W. Huse, Science 246, 1275-81 (1989)(recombinant Fab techiques)；P.

Wenham et al., Lancet 337, 1158 (1991)(Apo PCR Primers). 对ApoE亚定型编码的DNA可以通过引用一直接致突变而获得并转变成另外种。见，例如，7. KunKel et al., Methods in Enzymol. 154, 367-382 (1987)；7. KunKel, U.S. Patent No. 4,873,192。

这里所用术语“抗体”是指所有类型的免疫球蛋白，包括免疫球蛋白G（IgG），免疫球蛋白M（IgM），免疫球蛋白A(IgA)，免疫球蛋白D（IgD）和免疫球蛋白E（IgE）。抗体可以是单细胞系或多细胞系的，并且可以是任何原始种，包括（例如）小鼠、大鼠、兔、马或人，或可以是嵌合抗体，并包括抗体片段，例如Fab、F(ab')$_2$ 和Fv片段，以及IgG以外抗体得到的相应片段。

通常，抗体测定可以是均一测定试验或不均一测定，均一测定中，免疫反应通常包括特定抗体标记分析物（analyte），以及感兴趣的样品。标记产生的信号直接或间接地由抗体标记分析物（analyte）的结合而改变。免疫反应和范围检测两者在均一溶液中实现。免疫化学标记包括使用自由基、放射性同位素、荧光染料、酶、噬菌体、辅酶等。

不均一测定中，反应物通常是样品，本发明的抗体和为了产生检测信号的方法。可以使用以上描述的类似样品。抗体通常被固定在载体上，如珠、平皿或载玻片，并与在液相含抗原悬浮样品接触。然后将载体和液相分开并用产生可检测信号的方法检查载体相或液相的这种信号。该信号与样品中的分析物的存在有关。产生可检测信号的方法包括使用放射性标记、荧光标记、酶标记、如此等等。例如，如果被检测抗原含第二个结合位置，结合到该位置上的抗体能形成一个可

检测基团并在分离步骤前加到了液相反应溶液中。在固体载体上的可检测基团的存在表示试验样品中抗原的存在。合适的免疫测定法例子有放射免疫测定、免疫荧光法、酶一连接免疫测定，如此等等。

本领域技术人员将熟悉大量特定的免疫测定程序以及它们的变化，这对实现这里公开的方法很有用见generally E. Maggio, Enzyme-Immunoassay, (1980)(CRC Press, Inc., Boca Raton, FL);见also U.S. Patent No. 4,727,022 to Skold et al. titled "Methods for Modulating Ligand-Receptor Interactions and their Application," U.S. Patent No. 4,659,678 to Forrest et al., U.S. Patent No. 4,376,110 to David et al., U.S. Patent No. 4,275,149 to Litman et al., U.S. Patent No. 4,233,402 to Maggio et al., 以及 U.S. Patent No. 4,230,767 to Boguslaski et al.

选择性地与ＡｐｏＥ 同型物 结合的抗体（也就是，在相同结合条件下，与ＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３或ＡｐｏＥ４中一个结合的基本上不与其它的结合）依照已知的技术如沉淀法结合到适于诊断测定的固体载体上（例如，珠、平皿载玻片或由如胶乳或聚苯乙烯材料形成的凹孔）。与ＡｐｏＥ 同型物 结合的抗体同样用已知技术与能检测的基团结合，如放射标记（例如，^{35}S，^{125}I，^{131}I），酶标记（例如，辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶）和荧光标记（例如，荧光素）。

实现抗体测定的诊断用具可以用几个途径制备。一种实施方案中，检定用具包括（ａ）与ＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３或ＡｐｏＥ４结合的抗体结合到固体载体上，（ｂ）与ＡｐｏＥ２、ＡｐｏＥ３或ApoE4

结合的第二种抗体与能检测基团结合。试剂还包括辅助试剂，例如缓冲剂和蛋白质固定剂，例如多糖和类似物。如果需要，诊断用具进一步包括：产生信号系统的其它组成要素，该系统中的能检测的基团是一个组成要素（例如：酶基质）；在试验中减少、背景干扰的试剂；控制剂；实施试验的设备，如些等等。第二种实施方案的试验用具包括（a）如上的抗体，（b）抗体与能检测基团结合的特定结合配偶体。同样还包括上述辅助试剂。试验用具可以以任何合适的方式包装，典型的是每种组成要素单独用容器分装，附一个完成试验的说明书。

本发明由以下非限制性实施例进一步详细说明。

实施例1

脑脊髓阿朴脂蛋白E（Apolipoprotein E）与固定的β－淀粉状蛋白前体蛋白片断结合

βA肽（Bachem）、其它肽或乙醇胺被用共价键固定到Immobilon Av亲合膜上（微孔）。这种膜是化学活性亲水微孔膜，它通过氨基和硫羟基共价固定肽和蛋白质。βA肽或控制肽以1mg肽／100μl的浓度溶入蒸馏水中。10毫升该溶液（含100毫克肽应用于13mm直径的Immobilon 盘，并且在室温下过液培养至干。肽对于膜上的功能结合基团大大过量。通过在2.0摩尔浓度（M）乙醇胺、1.0M $NaHCO_3$、PH9.5条件下培养该膜使Immobilon Av 膜上的反应活性基团成块制备控制膜。这些膜保存在－20℃干燥器内。使用这些膜前用磷酸盐缓冲溶液洗涤。12-28 水疗模拟肽和偶氢（even-hydr ）。肽通过用应用生物科学（Applied Bio-Science）430A型肽合成仪经标准f-Mco合成法合成。氨基酸

由阻断基团保护，并在手工卵裂前去掉保护并洗涤。肽的纯度用反相高效液相色谱检验。

ＣＳＦ蛋白质与固定肽结合

Immobilon AV膜先与βＡ肽键合，与乙醇胺，或与水模拟（hydromimic）或肽偶氢（even-hydvo）肽结合后与１００μｌ脑脊髓液（先以０．２２μ过滤器过滤）、５０μｌ磷酰盐缓冲的盐溶液、ＰＨ７．３，在室温培养３０分钟。培养后，膜移入微孔过滤漏斗(Swinnex) 并用３．０ml磷酸盐缓冲的盐溶水洗涤，然后用700μｌ５％十二烷基硫酸钠洗涤（ＳＤＳ）。将膜从过滤漏斗中移出，切成两半并置入１５０μｌ Laemmli缓冲液中(2% 十二烷基硫酸钠5% β-巯基乙醇，PH 6.8)并沸腾５分钟以溶解剩余蛋白质。45μｌ Laemmli缓冲液和溶解了的蛋白装入Rio-Rad Minigel仪的每个十孔道中，并装入含４０％聚丙烯酰胺积层凝胶和含１２％聚丙烯酰胺的分离凝胶以及２％ＳＤＳ。

ＡｐｏＥ的免疫测定

电泳移动的蛋白质用标准Western 转移技术（transfer techniques）转移到Immobilon P上。当膜转移在Blotto中（在三羟甲基氨基甲烷（Tris）缓冲的盐溶液中有５％干奶，ＰＨ７．６，以及０．５％特威恩－２０（Pierce）（Tween-20）于室温培养１小时后，膜在兔一抗人体（rabbit-anti-human）阿朴脂蛋白Ｅ(apolipoprotein E)抗体与Blotto比为1:1,000稀释液(由Dr. Joel Morrisett, Dept. of Medicine, Baylor College of Med., Houston, Tx.提供)中于４０℃过夜培养，然后在Blotto中洗涤五次.该膜于室温暴露于结合在马-萝卜过氧化酶的山羊－抗一兔（goat-

anti-rabbit）次级抗体的1：10，000稀释液1小时，然后在Blotto洗涤7次.然后马-萝卜过氧化酶用 增强的化学发光检测盒(Amersham)显影，并在Hyperfilm Ecl (Amersham)上感光。

脑脊髓液样品

脑脊髓液是经同意对人实验对象临床诊断腰穿刺得到，并保存于－80℃。

结果

脑脊髓液含多种蛋白质，经培养和用磷酸盐缓冲的盐溶液洗涤后，它们与固定的βA肽和控制肽结合，见图1、顶部、柱1。图1、底部、柱1表示在滞留蛋白中的是阿朴脂蛋白E。柱2：从两种固定肽用5%十二烷基硫酸钠洗脱下来的多种蛋白质；柱3：经4摩尔浓度尿素洗脱：柱4：经6摩尔浓度胍盐酸盐洗脱。然后，胍盐酸盐不能从$\beta A_{(1-28)}$肽上洗脱阿朴脂蛋白E，但能洗脱先与控制肽结合几乎所有阿朴脂蛋白E，如图1柱4底部所示。

图2给出阿朴脂蛋白E与各种固定肽的结合。脑脊髓液中的阿朴脂蛋白E以高亲和力与固定的$\beta A_{(1-40)}$、$\beta A_{(1-28)}$及$\beta A_{(12-28)}$结合，接着培养并用PBS和5%十二烷基硫酸钠洗涤。“12－28偶氢（even－hyolro）肽”与$\beta A_{(12-28)}$含同样的氨基酸，但含不同的水疗法外形（hydnopalhic profile）。阿朴脂蛋白E不与如图2底部所示的固定肽结合。与$\beta A_{(12-28)}$相比含不同氨基酸的12－28水疗法模拟肽，具有与$\beta A_{(12-28)}$非常相似的水疗外形，并也和阿朴脂蛋白E结合。

实施例 2

早老性痴呆和对照病人的ＣＳＦ中ＡｐｏＥ免疫测定 。

从早老性痴呆病人和对照病人得到的脑脊髓液，含有免疫反应活性的阿朴脂蛋白Ｅ。每个对照的ＣＳＦ中阿朴脂蛋白Ｅ与固定的βＡ$_{(1-28)}$结合。然而，早老性痴呆病人脑脊髓液样品中的阿朴脂蛋白Ｅ，被证明与βＡ肽结合明显的不同。

实施例 3

用等电聚积法鉴别在早老性痴呆ＣＳＦ样中的ＡｐｏＥ 同型物：

对上面提到的确定与βＡ肽结合是否不同可以通过阿朴脂蛋白Ｅ的不均匀性本身来解释，ＣＳＦ蛋白通过等电聚积被分辨，免疫反应活性的阿朴脂蛋白Ｅ被目测识别，脑脊髓液(ＣＳＦ)蛋白经３０μｌＣＳＦ与等体积的氯仿：甲醇为２：１（Ｖ／Ｖ）混合液搅拌进行去脂。然后将去脂ＣＳＦ 用标准技术在垂直板胶仪（Biarad Minigel）中的尿素、Polacrylamide胶与Biaracl两性电解质PH３－１０上等电聚积。接下来进行电泳试验，蛋白质被用Western 技术转移到Immob：lon Ｐ上并用如上所述方法检测。多种阿朴脂蛋白Ｅ isoforms用等电聚积法检测。

实施例 4

早老性痴呆病人血细胞中的对ＡｐｏＥ４型 同型物 编码的ＤＮＡ检测。

阿朴脂蛋白Ｅ的大众联合调查是由８５个患家族早老性痴呆实验对象的血样完成的，其中早老性痴呆的诊断是经尸体解剖证实的。

血样中的基因组的DNA经标准技术萃取并用Techne HI-TEMP 96凹板和 P.Wenham et al. ,Lamcet337，1158（1991）所述的前体在 stratagene SCS -96或 Techne MW-Z 热循环器中通过聚合酶链反应放大。聚合酶链反应始末计录基本上如 Wenham et al. supra , and J. Hixson and D. Vernier ,J. Lipid Res. 31，545（1990）中所述。每个放大反应包含20ng基因组的DAN，1.0微微 mol／μl 前体，10%二甲亚砜（sigma）、200μm dNTP（pharmacia）、2.0MC：（$\alpha-^{32}P$）dCTP（800Ci／mol在10mM Tricine中，NEN Research Products）0.05单位／μl Taq DNA聚合酶和添加1X培养缓冲液（ Boehringer Mannheim）到最终体积为15μl。在94℃ 5分钟开始变性后，接着在65℃进0.5分钟35循环退火，在70℃扩展1.5分钟．在94℃变性0.5分钟，最后在70℃扩展10分钟。放大后，5单位Hhal（Pharmacia）直接加到每个凹孔中，板在37℃至少培养3小时。每个反应液取3μl置于6%非变性胶（0.4mm厚x43cm长）并在恒定电流（45mA）下电泳1小时。电泳后，上述胶被转移到Whatman 3M色谱纸上，干燥并用Kodak XAR-5胶片放射自显影。

数据在下面表1给出。结果显示其它非普通4型 同型物 与正常人群相比与早老性痴呆高度相关。普通人群的阿朴脂蛋白E的4型同型物 基因频率是16%，而早老性痴呆病人检出的基因频率是51%。

表 1

正常人和早老性痴呆病人的ＡｐｏＥ同型物

阿朴脂蛋白Ｅ同型物（各种染色体）	病人群体	
	早老性痴呆	正常人群
2/2	0%	1%
3/3	20.7%	60%
4/4	24.4%	3%
2/3	3.6%	12%
2/4	3.6%	2%
3/4	47.6%	23%

根据显示检测对阿朴脂蛋白Ｅ 4型 同型物 编码的ＤＮＡ有利于预测和诊断家族性早老性痴呆。

实施例 5

ＡｐｏＥ４迟发性家族早老性痴呆和散发性早老性痴呆的联系。

这些数据进一步涉及到ＡｐｏＥ４等位基因（ＡｐｏＥ－ｅ４）在迟发性家族早老痴呆和散发性早老性痴呆的发病机理。

家族性：基因组DNA研究的血样如前所述取至家族。(J.Murrell et al., 第17页9-14行)。所有被单独诊断为可能是早老性痴呆病人.（ＡＰ）的样品是由Duke大学Joseph a 和Kathleen Bryan早老性痴呆病研究中心（ＡＤＲＣ）记忆错乱诊所、Toronto 大学神经变性中

心、Nasschusetts Geneval 医院经神病部和Harvard 医学院的经神学家和有关的诊断人员测试的。这些临床诊断是依据NINCDS-ADRDA标准进行的（C. Mckhann et al., Neurology 34, 393-944 (1984)。这些Duke家谱主要是迟发性ＡＤ家族，３５个家族的平均年龄为６６．１±１０．３。三个家族可以分类为早发性（Ｍ＜６０年）ＡＤ家族。一种家 族用Ａｐｐ７１７ Valile突变分离(A. Goate et al., Nature 349, 704-706 (1991))、第二种用Ａｐｐ７１７ Val-Phe 突变分离(I. Murrell et al., Science 254, 97-99 (1991)、其它的与染色体１４标记连接的最大优势对数值为３．５（G. Schellenberg et al., Science 258, 668-671 (1992) 和 P. St. George-Hyslop et al., Nature Genet 2, 330-334(1992)。Toronto家谱被主要分类为早发性家族（１７个家族中的１３个）。其中五个家族中每个家族与染色体１４连接的优势对数值大于３．０（Ｐ．Ｈ．Ｓｔ．George-Hyslop et al., Nature Genet 2, 330-334 (1992))同时第六家谱有App 17 Val-ile 突变(H. Karlinsky et al., Neurology 42, 1445-1453(1992))。家族和基因型数据ＰＥＤＩＧＥＮＥ™系统处理（C. Haynes et al., Genet. Epidemiol. 3, 235-239(1986)).

在Duke. Toronto 和Boston中被诊断为可能为AD散发性病例的基因组DNA在过去6年已被储存(banked).散发性AD病人被定义为没有已知家族AD或痴呆史．散发性的和可能性AD病人代表1992年11月所有的在Toronto 和Duke贮藏所储存的DNAs，其中排除在Bryan ADRC 记忆错乱诊所于1992年8月进行的预期系列。 这些个体的DNA 在任何感兴趣的ApoE 同型物 已随机收集。不是所有的在这些诊所评价的散

发性AD病人都被常规蓄存的。已注意到在很专业的ＡＤ诊所对这组诊断为可能性ＡＤ的准确度范围可期望在８０－９０%。脑ＤＮＡ是从经尸体解剖进一步记实的高加索ＡＤ病例得到的，这些高加索病例储存在Duke的Kathleen Bryan脑贮藏所、Toronto 大学和Harvard医学院贮藏所。６个黑人或美洲印地安人的尸体解剖被排除为散发性ＡＤ尸解系列，因为与对照组的相关分析很敏感。研究中用了两个对照组。第一组是来自Centre d' Etude dlu Polymorphisme Humain(CEPH)参考家族91个不相关祖辈(J. Dausett et al., Genomics 6, 575-577(1990))。这些家族被收集作人体基因绘图（mapping）其特征是具有能作ＤＮＡ绘图（mapping）的祖辈、父辈、许多孙辈。祖辈代表欧洲和美洲背景的高加索老龄一对照组（aged-Controls）的随机组，类似于迟发性ＦＡＤ家族和尸解验证的散发性ＡＤ人群。二十一对高加索病人配偶参与可能是ＡＤ病人前展分析，并且对照组也用配偶。

基因组ＤＮＡ

依照已知技术(M. Pericak-Vance et al., Neurology 36, 1418-1423 (1986) and M. Pericak-Vance et al., Exp Neurol 102, 271-279 (1988))或GENEPURE 341™ 核酸萃取者提供的始末记录（Applied Biosystems）通过转型淋吧母细胞得到高分子量的ＤＮＡ。由脑组织得到的基因组ＤＮＡ的分离是通过在液氮中研碎约３００ｍｇ冷冻的脑组织、加４ｍｌ溶胞作用缓冲液（Applied Biosystems）和１mg蛋白酶Ｋ（Applied Biosystems），并且在用ＧＥＮＥＰＵＲＥ ３４１™ 萃取前于３７℃温和摇动过夜。

ＡｐｏＥ同型物的放大和限制

基因组ＤＮＡ在Techne MW-2热循环器中用HITEMP ９６-凹板(Techne)和由P. Wenhan et al., Lancet 337, 1158-1159(1991)描述的前体经聚合酶链反应(PCR) 放大。PCR始末记录是基于Wenham et al.,和 J. Hixsonetal., J. Lipid Res. 31, 545-548 (1990)所描述的内容。每个放大反应包括２０ｎｇ基因组ＤＮＡ，1.0微微摩尔／μl前体，１０％二甲亚砜（Sigma），２００μM dNTP（Pharmacia）. 1.0 μci（α-^{32}P）dCTP 800Ci/mol in 10mM Tricine, NEN Research Products), 0.05单位/μl Taq DNA聚合酶，并加1X 缓冲液(Boehringer Mannheim)至最终体积15μl。最初在９４℃变性５分钟，接着在６５℃ ３５循环退火0.5 分钟，在７０℃扩展１．５分钟，于９４℃变性０．５分钟，最后在７０℃扩展１０分钟。放大后，在每凹孔中（Well）直接加入５单位HhaI（Gibco），该板在３７℃至少培养３小时。每个凹孔加入１５μl ２Ｘ型Ⅲ终止染料（J. Sambrook et al., Cold Spring Harbor Laboratory Press B. 24 (1989)），每个反应取３μl置于６％非变性聚丙烯酰胺胶体上（０．４ｍｍ厚ｘ４３ｃｍ长）并在恒定电流（４５ｍＡ）电泳１小时。电泳后，这些胶转移到Whatman 3M 色谱纸上，干燥，用Kodak XAR-5胶片放射自显１小时。每个放射自显影由两个不同的观察者单独阅读。

统计分析：对照组和ＡＤ组的等位基因（allele）频率是通过计算等位基因和计算样本比率评价的。对早发性和迟发性ＦＡＤ家族的等位基因评价是用从每个家族随机选择一个患者来计算的。两个比率相比较的Ｚ统计被算出（R. Elston and W. Johnson, Essentials of Biostastics, (1987) and G. Schellenberg et al., J.

Neurogenet. 4, 97-108(1987))。Z极值与标准正态分布或然率相比建议舍弃两组等位基因频率相等这样的无效假设。为了在不同人群进行ApoE等位基因频率比较，也就是，AD组相对对照组，以及对照组间比较，进行的比较如下：1）CEPH对照组与配偶对照组比较；2）CEPH对照组与文献对照组比较；3）CEPH对照组和迟发性组比较；4）CEPH对照组与早发性组比较；5）CEPH对照组与临床散发性AD组比较；以及6）CEPH对照组与尸解确证散发性AD组比较。对ApoE患病－血缘－成员（APM）连锁分析是依照现有技术进行的（M. Pericak-Vance et al., Am. J. Hum. Genet. 48, 1034-1050 (1991) and D. Weeks et al., Am. J. Hum. Genet. 42, 315-326 (1988))。两点优势对数值是用LINKAGE™ Program Package (Version 5.0) (G. Lanthrop et al., Am. J. Hum. Genet. 36, 460-465(1984) and G. Lanthrop et al., Proc. Natl Acad. Sci VSA 81, 3443-3446 (1984) 计算机程序计算的。发病年龄（age-of-onset）和用于计算优势对数值的疾病参数如从前描述的（M. Pericak-Vanceet al., Supra）。

结果：表2表示ApoE e4等位基因频率三个对照比率评价：1）CEPH参照家族91个祖辈；2）21对配偶取自连续前展性研究确定的散发性，可能性AD病人；3）文献中类似人群代表性对照系列（G. Lanthrop et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 3443-3446 (1984))。表2还给出的是ApoE e4等位基因频率对一些不同的早老性痴呆病人组评价：1）在Duke和Toronto/Boston 迟发性FAD系列中随机选择的一个患病个体；2）在Duke和Toronto/Boston早发性FAD 系列中随机选择的一个患病个体；3）

在Duke和Toronto/Boston诊所诊断为可能性AD的散发性病人的储存DNA样品；4）来自Duke和Toronto/Boston 176个尸解确证散发性AD病人DNA。

与前面实施例1－4一致，在主要为迟发性FAD家族随机选择的病人的ApoE e4等位基因频率与CEPH对照组的频率有显著性差异；0.50±0.06与0.16±0.027比较（等位基因频率评价±标准误差，Z＝2.44，P＝0.014）。同样，这里出现的Duke和Toronto/Boston迟发性FAD系列与CEPH对照组有显著性差异（P＝0.000017）。Toronto/Boston和Duke的早发性FAD系列的ApoE－e4频率（0.19±0.069）与CEPH对照的频率没有显著差异（P＝0.069）。统计分析证明散发性（可能的）AD（P＝0.00031）和尸解确证散发性AD（P＜0.00001）的ApoE－e4等位基因频率与CEPH对照组相比有很高的显著性差异。

表 2

ApoE－e4等位基因频率评价

人群		e4等位基因	Z[2]	P值
正常对照组				
CEPH[3]	(182)	0.16+0.027		
配偶[4]	(42)	0.10+0.046	0.59	0.56
Menzel[5]	(2000)	0.14+0.008	0.71	0.48
早老性痴呆(AD)				
LOAD[6]	(72)	0.42+0.058	4.30	0.000017
EOAD[7]	(32)	0.19+0.069	0.40	0.069
临床散发性				
AD[8]	(138)	0.36+0.042	4.17	0.00031
尸解散发性				
AD[9]	(352)	0.40+0.026	6.49	<0.00001

1．等位基因频率评价±标准误差；染色数目的计算在圆括号内。

2．Z值是相对CEPH对照组。

3．来自Centre D' Etude du Polymorphism Humain (CEPH) 91个不相关祖辈。

4．在Bryan ADRC Memory Disorders Clinic, Duke大学的配偶对照组。

5．在H. Menzel et al., Apolipoprotein E Polymorphism

and Coronary Artery Disease, Arteriosclerosis 3, 310-315 (1983)。

6．“LOAD”的意思是迟发性AD；从32个Duke和4个Toronto/Boston迟发性FAD 家族随机选择的一个患者。

7．“EOAD”的意思是早发性AD；从13个Toronto/Boston和3个Duke早发性FAD 家族随机选择的一个患者。

8．39个Duke和30个Toronto/Boston散发性(可能的)AD病人。

9．143个Duke和33个Toronto/Boston尸解确证散发性AD实验对象。

实施例6

在死后组织中淀粉样蛋白β－肽沉积与阿朴脂蛋白E的联系。

在本实施例中，一系列从已知ApoE基因型患散发性迟发性AD病人的脑组织被测定，确定含ApoE－e4等位基因AD组织是否有淀粉样沉淀的明显图案。已发现病人脑组织对APOE－e 4是纯合子的。与ApoE e3纯合子相比较出现血管淀粉样沉积增加和淀粉粉样蛋白数量和密度增加以及神经炎斑（neuritio plaque）增加。免疫细胞化学研究发现，在有一或二个ApoE－e 4等位基因的病人中，β－肽显著增加。三个主要ApoE基因型研究（e3／3，e3／4，e4／4）表明在性别、发病年龄或病期方面没有出现统计学上显著性差异。和对ApoE－e3等位基因为纯合子的病例相比，与一或二个ApoE－e4等位基因相关的迟发性Ad 病例有明显的神经病理学表型。

病例选择；143 例患迟发性早老性痴呆（AD）的尸解确证病

例，符合 NIT 和 CERAD 标准，（ C. Mckham et., Neurology 34, 939－944（1984）和 S. Mirra et al., Neurology 41, 479－486（1991））和未患病家族成员或其它神经病例是通过 Duke 大学 Kathleen Brgan 脑贮藏所得到并作 ApoE 基因型分析。这些病例是在1985到1992年之间储存的。这143病例的平均死亡年龄为77．2±8．9，平均患病年限为8．6±4．2年，并且63%病人是女性。

ApoE 基因型

通过从每个病例的约300mg冷冻脑组织分离获得基因组DNA。每个病人的ApoE基因型是通过以上所描述的，即与ApoE前体性生聚合酶链反应放大以及用放射自显影测定法的 HhaI 限制性同型物实现的。被证实的 ApoE 基因型；47例 ApoE e3／3，64例ApoE e3／4，23例 ApoEe4／4，3例 ApoE e2／3和6例 ApoE e2／4。

神经病理学分析；

死亡身龄、病期、性别、脑重量、在脑管血中淀粉样蛋白沉积形成（用刚果红染料）和对神经炎斑密度的描述、神经原纤维缠结（变性的King’s 银白染色［ B. Lloyd et al. , J. Histotech 8,155－156（1985）］）数量等信息来自原始神经病理学报告。给出了100个病例的神经炎斑（nauritic plaque）数量和95个病例 的神经原纤维缠结数量。每个数量代表一个单独显微镜视野在该区域断面发现的最受影响面积。空斑（Plaque）用10倍目镜计数（视野2.92mm^2），缠结用20倍目镜（视野0．72mm^2）计数。空斑计算在100个10倍视野截断面。在ApoE基因型分析前，

所有这些数据在病人病历记录中记录1至5年。

对用刚果红染料染色的血管淀粉样蛋白物质的分析。

按年代选择53个病人，预先染过刚果红染料的载玻片将这些病例整理。当17个ApoE基因型e 4／4病（总共23个病人）病人；20个ApoE基因型e 3／3（总共49个病人）病人；16个ApoE基因型e 3／4（总共65个病人）选出后停止选择。53个尸解报告中的40个特别提到血管淀粉样蛋白，在基因型之前完成的盲观察组成一组。出现血管淀粉样蛋白的按三个水平分级；没有明显淀粉样蛋白沉积出现（0级），微量淀粉样蛋白沉积其中包括一个阳性管（1级），容易识别的血管淀粉样蛋白（2级）。另外，从53个病例得到的经刚果红染色的前额皮层、在内鼻皮层海马趾玻片经三个观定者用同样的分级标准确定其血管淀粉样蛋白。观察结果独立分析，双盲技术为平均内级别协议（inter-raten agrement）的 8.5% 。

免疫细胞化学法

海马区石蜡块、前额脑叶和额骨脑叶（Lobe）当从7个ApoE e 4／4病例、8个ApoE e 3／3 病例、和4个ApoE e 3／4病例得到的。选择是在没有神经病理学报告知识情况下随机进行。切成6－8微米石蜡片并装在（mounted ）作免疫细胞化学试验的载玻片上。切片被脱蜡、用90%甲酸处理3分钟、洗涤，然后用对淀粉蛋白β－肽免疫定位的单克隆抗体培养（抗体在S. Ikeda et al., Prog. Clin. Biol. Res. 317, 313-323 (1989) 描述，由Drs. George Glenner and David Allsop 赠）。切片平行地与相同抗体稀释液反应、用ABC法进行酶检测步骤(Vectorstain, Burlingame, (A). 脱水后用盖玻片覆盖Permount.使用半一邻接切片

（Semi-adjacent Sections）（没用甲酸处理），用单克隆系抗体(1:1000稀释)与164kd-神经丝蛋白(SMI-34, Sternberger-Meyer Immunocy to Chemicals, Inc) 结合确证神经炎斑，在Western blots(由Dr. Joel Morrisett, Baylor Collcge of Medicine赠)上用多细胞系抗体(1:20000稀释液) 与人类ApoE结合确认ApoE2. ApoE3和ApoE4 同型物 。在这些实施方案中平行的对照组不染色。

对免疫细胞化学物质分析

选出每个切片上空斑密度最大的区域，图示分析是通过用规定的０．２５ｍｍ² 正方形划分成１６０个相等格子的显画器（Camera Lucida）画出空斑外缘完成的。计算任何格子包含的所有或免疫反应活性空斑的任何部分，总体被划分成实际基因型。这些方法的内级别（inter-rate）可靠度是８５％，在同一切片上分离的各区域方差为１５％。有代表性的区域用Zeiss 显微照相机摄相。

统计分析

数据被输入Statgraphics软件包，用方差分析描述各变量间的联系。含１４３个病例的主集、含５３个病例的子集或以上用刚果红优择的ＡｐｏＥ ｅ３／３、ｅ３／４、ｅ４／４基因型较小子集或关于死亡年龄、性别比例或脑重量免疫细胞化学分析较小子集等各集合之间不存在显著性差异。为了比较空斑和神经原纤维缠结数目，使用了Kruskal-Wallis一步法(one-Way) 分析，因为对于正态分布用观察法不合适。

对ＡｐｏＥ ｅ３或ｅ４是纯合子的散发性ＡＤ病人脑组织中β－肽淀粉样蛋白沉淀免疫定位。

散发性迟发ＡＤ病人脑组织的β－肽免疫细胞化学研究证明ApoE

e 3 / 3病例和ApoE e 4／4病例的免疫染色的脑皮层切片始终不同（数据未给出）。ApoE e 3／3病例切片的β－肽免疫反应性显现很小直至不存在血管染色和微弱免疫反应的空斑，而ApoE e 4／4病例切片的脑表面上丰富的免疫反应血管和强的免疫反应的空斑以及实质细胞中的血管被染得很黑。差别明显到这样一个程度，β－肽免疫染色的ApoE e 4／4脑组织切片能在没有显微镜的情况下与ApoE e 3／3脑组织切片区分。

对ApoE e 3或e 4是纯合子的AD病人脑组织之ApoE免疫定位

用已有报导（J. Diedrich et al., J. Virol. 65, 4759-4768 (1991); and Y. Namba et al., Brain Res. 541, 163-166 (1991) 之描述观察脑血管神经细胞、神经胶质细胞、老年斑和神经原纤维（neurofibrillary ）缠结的ApoE免疫反应性。类似于β－肽免疫反应性，ApoE免疫反应性在甲酸处理后增强。ApoE e 3／3病例ApoE免疫反应性与ApoE e 4／4相比在定位或强度方面没有大的区别（注意针对ApoE的多细胞系抗血清检测ApoE 3和ApoE 4两种 i 同型物 ）。特别地，ApoE e 4／4病例和ApoE e 3／3病例中的大多数较大脑血管是ApoE免疫反应活性的。

e 3／3，e 4／4和e 3／4 ApoE基因型血管淀粉样蛋白范围－尸解报告回顾性分析

53个病例中的40个，在尸解报告中清楚注明了是否存在经刚果红染色的血管淀粉样蛋白。尸解报告中对血管淀粉样蛋白沉积量的回顾性分级，揭示出血管淀粉样蛋白与ApoE e 4等位基因数量

显著相关（P＜0．0001）。特别是，对于ApoE e3／3病例没有提到血管淀粉样蛋白对e3／4病例有微量血管淀粉样蛋白，对大多数e4／4病例观察到大量血管淀粉样蛋白（见下面表3．A．1）。

刚果红染色物质前瞻性分析

前瞻性考察总共53个病例的血管淀粉样蛋白变性范围，进行刚果红染色的海马和前额皮层切片双盲（试验）回顾。该分析证实刚果红阳性的淀粉样蛋白血管病的出现和53个病例中ApoE e4等位基因的剂量有很显著性相关（表3．A．1）。这种淀粉样变性血管不必出现在给定ApoE e4／4纯合子外皮区所有各处，但经常在如海马裂纹这样的深沟处占有优势。

β－肽免疫反应活性的血管分析

当来自53个病人这一系列的一个子集的切片被对β－肽具免疫反应和类似地定出级别，血管淀粉样蛋白的数量和ApoE e4等位基因剂量是同样在统计学上显著相关（表3．C．1）。ApoE e4纯合子中淀粉样血管包括被斑点样聚积的淀粉样蛋白包围的皮层板中柔脑膜（leptomeningeal）血管和大小血管（Plaque-Like angiopathy of Scholze [W. Scholze, Z. Gesamte Neurol. Psych. 162, 694-715 (1938)]）。

与ApoE e3纯合子相比ApoE e4纯合子的神经炎斑数增加在五个外皮层区的四个中，在银白染色的物质中神经炎斑平均数在ApoE e4纯合子中比在ApoE e3纯合子中大（表1．A．2）。Keuskal-Wallis一步法分析表明平均神经炎斑数在三个区域与ApoE－e4等位基剂量显著相关：前额皮、上颞皮、顶骨皮，

并且这种相关在海马的CAL子或边界显著。神经炎斑数与发病时间无关。

ApoE e4纯合子与ApoE e3纯合子相比其神经原纤维缠结数稍稍增加

在以上出现的所有五个外皮层区中，ApoE-e4纯合子与ApoE-e3纯合子相比，其神经原纤维缠结平均数更大（表3.A.3）。ApoE e4/4病例与ApoE e3/3病例相比，所有五个区神经原纤维缠结平均数增加的或然率为3%（非参数成对样品试验）。每单位面积的平均数差异不显著，并且对于Kruskal-Wallis试验不显著。然而，对于病人所有集合和各ApoE基因型子集的发病时间，每个外皮层区的神经原纤维缠结平均数变化显著（P<0.01）。考虑到与ApoE-e4相关的发病时间呈上升趋势，ApoE-e4纯合子中神经原纤维缠结平均数的增加是显然的。

散发性AD病例淀粉样蛋白沉淀的免疫细胞化学分析

对于散发性AD的ApoE-e4纯合子所示的沉粉样蛋白沉淀比ApoE-e3纯合子的要大大增加，该增加包括血管淀粉蛋白沉淀和老年斑的沉积。为了对其差异定性和定量，一个对ApoE-e4是纯合子的7个病人的集合与一个对ApoE-e3是纯合子的8个病人的集合相比较。四个杂合子（ApoE-e3/4）也被考查，以确定可能的ApoE剂量的影响。脑皮层低倍观察显示，β-肽免疫反应性的ApoE e3纯合子外皮切片与e4纯合子的相比较，被观察的所有β-肽免疫反应性完全不同（数据未给出）。这种差异即使当从给定外皮区得到的β-肽免疫染色切片在显微镜视野搜索使用最大浓度免疫反应空斑时仍能发现。ApoE e4/4病例中的

空斑比在ApoE e3／3病例观察到的更多，常在包括血管时更大而且更黑。

空斑的β－肽免疫反应性定量分析

得自十五个散发性AD病例的前额皮层切片被进行免疫反应而对β－肽定位，并对每个病例在显微镜视野所包含β－肽免疫反应空斑的最大密度作定量分析（表3．B．2）。ApoE e4／4纯合子被强β－肽免疫反应斑覆盖的平均面积为ApoE e3／3纯合子的7倍，这是很显著的（P＜0．002）。ApoE e3／4病例居中。

几个ApoE e3／3病例中，也出现弱的免疫反应空斑，其数量比ApoE e4／4病例显著地高（P＝0．04）。虽然如此，但ApoE e4／4纯合子被所有β－肽免疫反应的空斑覆盖的平均总面积为ApoE e3／3纯合子型的两倍(表3．B．2)。

表 3

散发性AD病人的神经病理学和免疫化学特性

ApoE基因型	e3/3	e3/4	e4/4
死亡年龄(年)	76.4	79.1	75.8 NS
发病时间(年)	7.7	8.5	9.0 P=.06
A.尸解报告数据			
亲刚果红淀粉样血管病，平均级(0=无，1=微量，2=出现)			
报告	0.27	0.80	1.29 P<.0001
综述	0.40	1.16	1.76 P<.0001
	n=20	n=16	n=17
神经炎斑：平均空斑每低倍视野W/10X目镜 (2.92mm^2)			
前额皮层	59	81	87 P<.0003
上颞皮层	62	77	87 P<.009
顶骨皮层	61	68	86 P<.007
鼻内皮层	27	30	25 P=.69
海马(CAI)	12	13	18 P=.13
	n=30	n=48	n=22

表 3（续）

散发性ＡＤ病人的神经病理学和免疫化学特性

神经原纤维缠结：平均数目每高倍视野W/20X目镜(0.72mm²)			
前额皮层	6	7	8 P=.34
上颞皮层	7	9	13 P=.16
顶骨皮层	7	10	8 P=.15
鼻内皮层	31	35	42 P=.22
海马(CAI)	26	37	48 P=.07
	n=28	n=46	n=21
B. 免疫细胞化学研究			
β-肽免疫反应的血管：平均级(0=无，1=微量，2=出现)			
	0.50	0.50	2.00 P<.0001
	n=8	n=4	n=7
β-肽免疫反应空斑所占面积%			
强免疫反应的	4.5	9.4	31.7 P<.002
弱免疫反应的	12.9	4.0	6.1 P=.04
总斑	17.4	13.4	37.8 P<.008
	n=8	n=4	n=7

神经炎斑范围

来自以上病例中的八个前额皮层半邻接（Semi-adjacent）切片被免疫染色，用神经丝蛋白抗体（ＳＭＩ－３４）试验ＡｐｏＥ－

ｅ３纯合子与ＡｐｏＥ－ｅ４纯合子之间神经炎斑密度是否不同。ＳＭＩ－３４免疫反应显示出神经炎突和神经原纤维缠结轴索。神经炎斑可以被他们包括的神经炎突鉴定。

虽然被神经炎斑（被ＳＭＩ－３４免疫反应确定）覆盖的数目和总面积比淀粉样斑（被β－肽免疫反应确定）小（数据未给出），对这八个病例斑检测的两种方法比较，半邻接切片斑面积测量显示出显著相关和线性相关（Ｐ＜０．００６，ｒ＝０．７３）。在ＡｐｏＥ－ｅ４纯合子中被神经炎斑覆盖的面积也明显比ＡｐｏＥ－ｅ３纯合子中大（Ｐ＜．０２）

实施例７

ＡｐｏＥ４基因剂量与早老性痴呆危险的关系

本实施例确定ＡＤ危险增加量和通过参照迟发性AD家族中ApoE４等位基因确定发病早期年龄。危险从２０％增加到９０％，同时随着ＡｐｏＥ４等位基因数增加平均发病年龄从８４岁减少到６８岁。这些数据表明ＡｐｏＥ４基因量是迟发性ＡＤ的主要危险因素，年龄为８０岁时ＡｐｏＥ４的纯合性实际上是引起ＡＤ的充分因素。

４６个家族中的４个经测试为早发性家族；两个有染色体２１ＡＰＰ突变，两个与染色体１４连接。这些家族中ＡｐｏＥ４频率没有提高。４２个迟发性家族的成员，有已知的ＡｐｏＥ基因型，他们被诊断患ＡＤ或在６０岁后没有患ＡＤ，对该成员作了评价。在参加我们的研究前，得到了每个实验对象的同意，必要的时侯也得到他们的法律监护人的同意。所有的研究始末记录得到Duke University Medical Center Institutional Reviem Board 认可。对于患或

非患病实验对象的统计描述在表4给出。平均来说，不管患病（P＝0．02）或未患病（P＝0．13），妇女寿命比男人长。

从表4看到，90%以上的临床诊断的病例被尸解证实。当家族成员经尸解确证诊断为AD，临床检测的预测值接近100%。4个诊断为AD的实验对象和30个在60岁前检测的实验对象被排除分析。迟发性家族不与染色体21或染色体14连接，与预先连接到早发性AD的区域有19%重合。对AD和ApoE估计的最大二点（two-Point）优势对数值在6%重合时为2．61。

表 4

对患或非患病实验对象的统计描述

患病实验对象(n=95)			
	发病年龄		
	n	平均值	(SD)
男性	34	71.8	(8.4)
女性	61	70.4	(8.0)
未患病实验对象(n=139)			
	死亡年龄		
	n	平均值	(SD)
男性	62	77.7	(8.0)
女性	77	82.6	(9.0)

ApoE4等位基因数增加的患病个体的比例，对于基因型为2／3或3／3的比例为20%，基因型为2／4或3／4的实验对象为47%，对于4／4基因型实验对象为91%（表5）。这种增加趋势十分显著（希(Chi)平方＝33．1，自由度为1，P<0.00001）（G. Koch et al., Analysis of Categorical Data (les Presses de L' Universite de Montreal, Motreal, 1985) and SAS Institute, Inc., SAS/STAT用户指南(User' s Guide), Release 6.03 Edition (SAS Institute, Cary NC, 1988)。女人较男人患病者多（P＝0．04）。这说明女人患AD的危险更大。

表 5

各种ApoE基因型患者百分数

ApoE基因型	%男患者（n）	%女患者（n）
2/2	……(0)	……(0)
2/3	28.6(7)	11.1(9)
3/3	7.1(28)	28.6(49)
2/4	50.0(2)	0.0(3)
3/4	38.3(47)	54.5(66)
4/4	91.7(12)	90.9(11)

如表6所示，对每种增加ApoE4等位基因，AD危险增加因

为2．84（95%置信区间（CI）2．03至3．96）（D．R．Cox 等人，*存活数据分析* (Chapman and Hall, London, 1984) and L. Wei et al., JASA 84,1065 (1989)。因此，4／4基因型实验对象患病可能性为2／3或3／3基团型实验对象患病可能性的8倍以上。如对0，1和2 ApoE4 等位基因实验对象分别估计时，一致的证据是（没有达到统计显著性）女人比男人处于更高危险中。对于0、1和2 ApoE4基因量，女人超过男人危险性分别为1．33（95% CI 0．42至4.26）、1．39（95% CI 0．76至2．55）和1．30（95% CI 0．50至3．38）。

表 6

患者实验对象的百分数和根据ApoE4等位基因数的相对危险性

基因量	男		女		混合群		危险
	%患病	(n)	%患病	(n)	%患病	(n)	比值
0	11.4	(35)	25.9	(58)	20.4	(93)	1.00
1	38.8	(49)	52.2	(69)	46.6	(118)	2.84+
2	91.7	(12)	90.9	(11)	91.3	(23)	8.07+

表6中危险评价是通过对从允许男人和女人危险不同的Cox 成比例危险模型获得的评价参数取幂得到（SAS Institute Inc., *存活数据分析* (Chapman and Hall, London,

1984)，和SAS Institute Inc.，SAS 技术报告(Technical Report) P-217，SAS/STAT软件(Software)：The PHREG Procedure，Version 6 (SAS Institute Inc.，Cary NC，1991))。'+'号表示危险与参照值1 相比有显著差异。年龄在60到75之间每个实验对象的情况被假定为成比例危险，对于年龄75的几乎所有2 ApoE－e4等位基因型人诊断后情况没有给出。对成比例危险模型甚至对相关个体相关危险结果评价，如果不是全有效，也是统计学上一致的。(L. Wei et al.，JASA 84，1065 (1989))。因此，危险评价是大约评价，这将由从一个家族的很大集合只抽取一个人而得出该结论。

Mantel-Haenszel 相关性统计(SAS Institnte，Inc.，SAS/STAT User's Guide，Release 6.03 Edition (SAS Institute，Cary NC，1988)，and D. R. Cox 等人，*存活数据分析* (Chapman and Hall，London，1984))，以家族分层，用来评价ApoE4基因增加使危险增加趋势。患病实验对象比例明显随ApoE4基因量而增加(希平方＝33.4，自由度为1，P＜0.00001)。

下面判断发病年龄是否与ApoE4基因量相关。发病分布是由患病实验对象的发病年龄和最后检测未发病的实验对象年龄构成，发病分布对每个基因量是明显的(希平方＝53.84，自由度为2，P＜0.00001)(R. G. Miller Jr.，Survival Analysis) (Whiley，New York，1981)，和SAS Institute Inc.，SAS User's Guide: Statistics，Version 5 Edition (SAS Institute，Cary NC，1985)) (图3)。每个增加的ApoE4等

位基因转向更年轻的发病年龄；对于1ApoE4等位基因的实验对象平均的发病年龄为84.3（SE1.3）岁，对于2ApoE4等位基因的实验对象为68.4（1.2）岁。女性的发病年龄要比男性早（P=0.04）。

同样，存活分布是由已知实验对象死亡的死亡年龄和其它实验对象最后检测时年龄构成，不考虑发病情况。ApoE4基因量与存活相关（P=0.004）；对于0ApoE4等位基因实验对象生存年龄为84.9（SE=1.3）岁；对于1ApoE4等位基因实验对象生存年龄为78.8（SE0.8）岁、对于2ApoE4等位基因实验对象生存年龄为78.1（SE1.4）岁。1或2ApoE4等位基因的早死亡主要是由于这些实验对象的高频率和AD病早发性造成（P=0.001）。

不考虑1或2ApoE4等位基因实验对象生存期短这一点，比较各种ApoE4等位基因致使早发病情况，使我们怀疑大多数诊断AD和大多数流行病例是与1或2ApoE4等位基因实验对象相关的。对于2ApoE4等位基因实验对象平均发病年龄和平均存活年龄的差异是9.7年，对于1ApoE4等位基因实验对象为3.1年，对于0ApoE4等位基因实验对象为0.6年。

以前报导中关于AD连锁遗传靠近ApoE部位的标记可能是由于AD和ApoE4等位联系造成的。虽然这些标记没有出现ApoE失去平衡，他们的隔离可以仿效家族中连锁遗传至少隔离一个ApoE4等位基因（D. A. Greenberg, Am. J. Hum. Genet 52, 135-143 (1993)）。关于ApoE部位的AD连锁遗传的有力但不明确的数据（2=2.61，0=0.06）也支持这种解释。

认识到在我们的血统股的95个患病对象的19和Saunders 等所描述的176个尸解确证的散发性AD病例中的64个不含有ApoE4等位基因，这一点是重要的（R. G. Miller Jr., 存活分析 (Wiley, New York, 1981))。42个迟发性家族中的12个含有0ApoE4等位基因的患病者。潜在的可以提供资料的大量连锁遗传家族中，这种趋向是最大的并以模拟研究为基础，这一事实强烈地说明关于危险存在的其它基因源。一但ApoE4 等位基因的影响包括在频率分析中，其它的基因就会被鉴定。

以上实施例是对本发明的说明，不是对本发明的限制。本 发明通过以下权利要求限定，权利要求的等同物也包括其中。

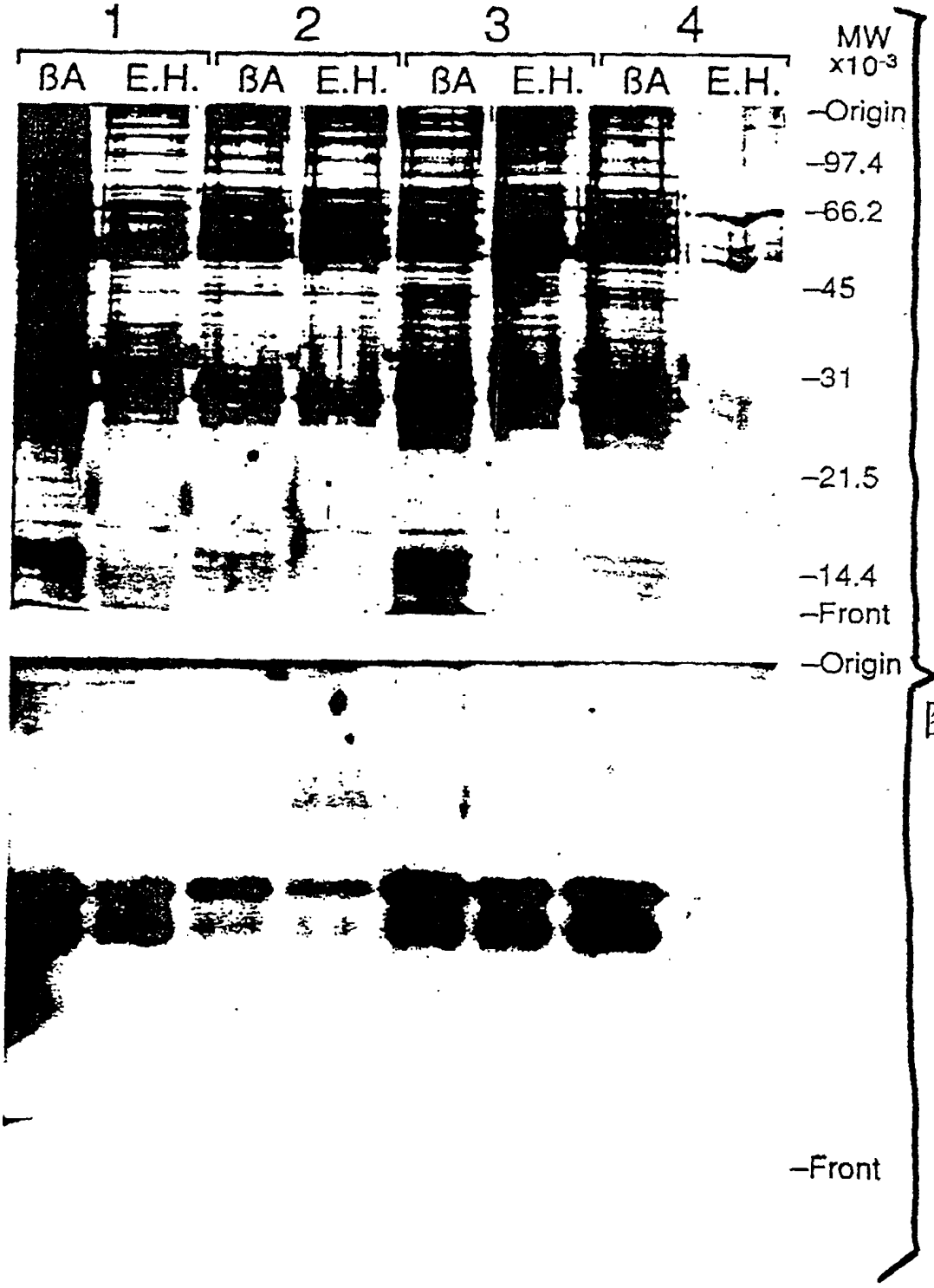

1
2
3
4
βA E.H. βA E.H. βA E.H. βA E.H.
MW x10-3
–Origin
–97.4
–66.2
–45
–31
–21.5
–14.4
–Front
–Origin
–Front

图1

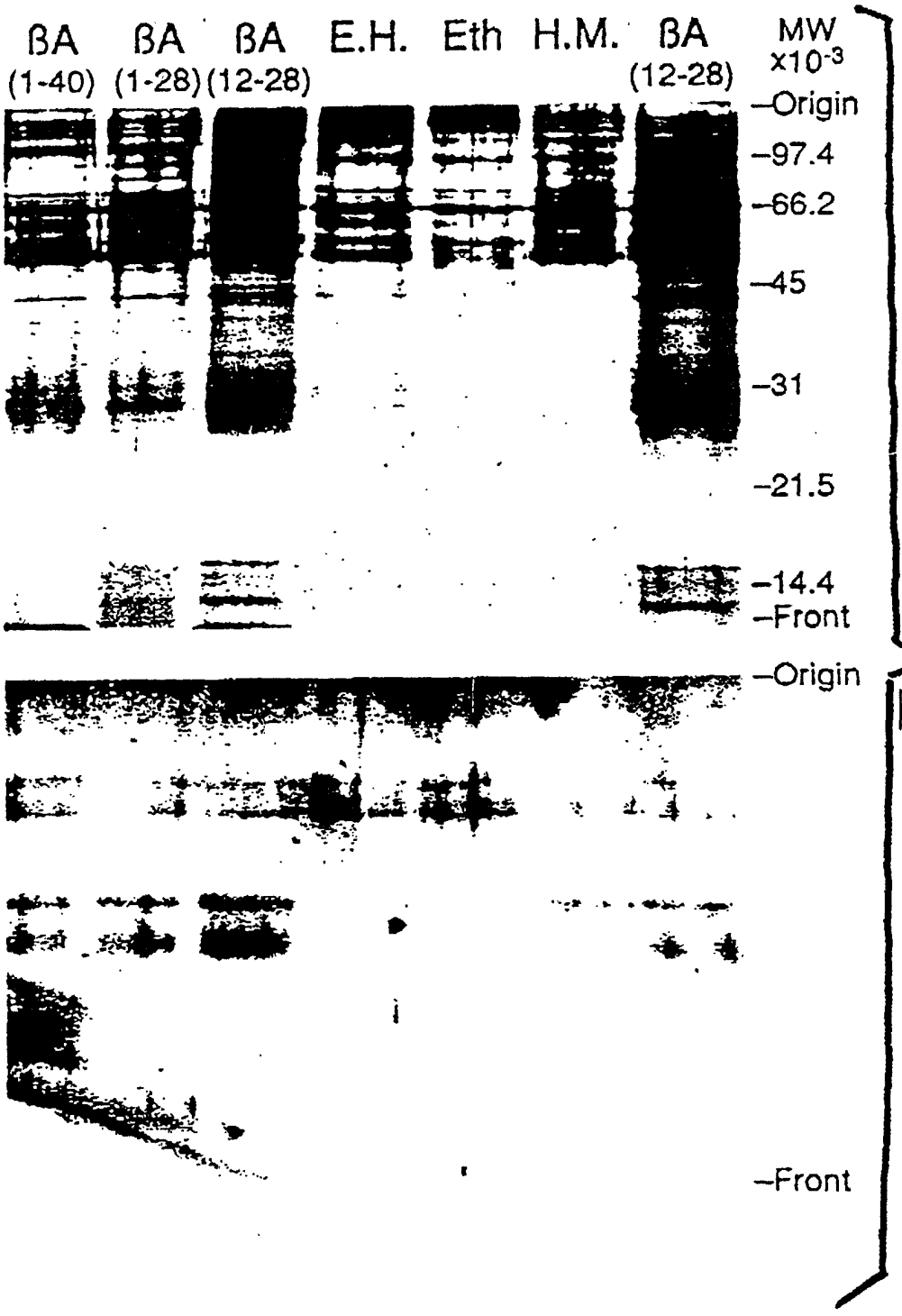

βA (1-40)
βA (1-28)
βA (12-28)
E.H.
Eth
H.M.
βA (12-28)
MW x10-3
Origin
97.4
66.2
45
31
21.5
14.4
Front
Origin
Front

图2

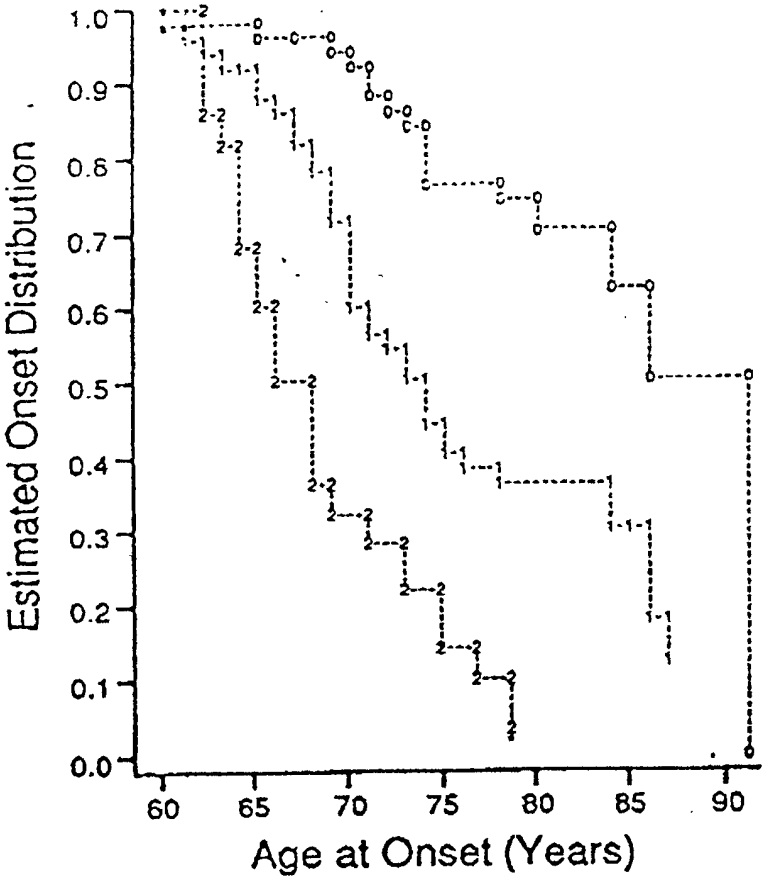

Estimated Onset Distribution
1.0
0.9
0.8
0.7
0.6
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
60
65
70
75
80
85
90
Age at Onset (Years)

图 3