

分类号 R1

学号 210611S139

U D C 616-71

密级 公开

军事科学院

硕士学位论文

基于量子点标记免疫层析试纸条快速检测轻 中度颅脑损伤的方法建立及评价

Establishment and evaluation of a method for rapid detection of
mild to moderate traumatic brain injuries based on quantum dot
labeled immunochromatographic test strips

作者姓名 俞昶乐

学科专业 公共卫生

学位类型 专业学位

指导教师 徐东刚

答辩主席 邵宁生

学位授予单位 军事科学院

论文提交日期 2024 年 4 月 1 日

目 录

前言.....	1
第一章 量子点标记免疫层析试纸条检测 GFAP 方法建立	9
引言.....	9
1.1 实验材料.....	11
1.1.1 质粒、细胞、动物.....	11
1.1.2 主要试剂及材料.....	11
1.1.3 主要实验仪器.....	12
1.1.4 主要试剂的配置.....	12
1.2 实验方法.....	13
1.2.1 GFAP 小鼠单克隆抗体制备.....	13
1.2.2 GFAP 兔多克隆抗体制备.....	17
1.2.3 GFAP 抗体评价.....	19
1.2.4 GFAP 抗体对匹配.....	20
1.2.5 荧光探针制备.....	21
1.2.6 免疫层析试纸条制备.....	23
1.2.7 试纸条评价.....	24
1.3 实验结果.....	27
1.3.1 GFAP 小鼠单克隆抗体制备结果.....	27
1.3.2 GFAP 兔多克隆抗体制备结果.....	28
1.3.3 GFAP 抗体评价结果.....	29
1.3.4 GFAP 匹配抗体对确定.....	30
1.3.5 荧光探针制备方案确定.....	31
1.3.6 免疫层析试纸条制备方案确定.....	34
1.3.7 试纸条评价结果.....	37
1.4 讨论.....	40
第二章 量子点标记免疫层析试纸条检测 UCHL1 方法建立	42
引言.....	42
2.1 实验材料.....	43
2.1.1 质粒、细胞、动物.....	43
2.1.2 主要试剂及材料.....	43
2.1.3 主要实验仪器.....	44
2.2 实验方法.....	45
2.2.1 UCHL1 小鼠单克隆抗体制备.....	45
2.2.2 UCHL1 兔多克隆抗体制备.....	47

2.2.3 UCHL1 抗体评价	48
2.2.4 UCHL1 抗体对匹配	49
2.2.5 荧光探针制备	49
2.2.6 免疫层析试纸条制备	50
2.2.7 试纸条评价	50
2.3 实验结果	51
2.3.1 UCHL1 小鼠单克隆抗体制备结果	51
2.3.2 UCHL1 兔多克隆抗体制备结果	53
2.3.3 UCHL1 抗体评价结果	53
2.3.4 UCHL1 匹配抗体对确定	54
2.3.5 荧光探针制备方案确定	55
2.3.6 免疫层析试纸条制备方案确定	56
2.3.7 试纸条评价结果	59
2.4 讨论	62
第三章 基于代谢组学的轻度颅脑损伤潜在标志物筛选	63
引言	63
3.1 实验材料	65
3.1.1 实验动物	65
3.1.2 主要试剂	65
3.1.3 实验仪器	65
3.2 实验方法	65
3.2.1 轻度弥漫性闭合型颅脑损伤小鼠造模	65
3.2.2 代谢组学分析	67
3.2.3 代谢组学结果验证	69
3.3 实验结果	69
3.3.1 代谢组学数据质量评价	69
3.3.2 代谢组学结果分析	69
3.3.3 代谢差异物重复验证	75
3.4 讨论	77
第四章 结论与展望	78
4.1 结论	78
4.1.1 基于 GFAP 和 UCHL1 的 mmTBI 快速检测试纸条的研制及 应用	78
4.1.2 mTBI 潜在相关分子的初步筛选	78
4.2 展望	79
4.2.1 基于 GFAP 和 UCHL1 联合检测的 mmTBI 诊断试纸条的研 制	79
4.2.2 mTBI 潜在相关分子的靶向性筛选及验证	79

参考文献.....	80
附录 A 代谢组学显著性差异物筛选结果.....	87

表 目 录

缩略语表	VIII
表 1 美国退伍军人管理局及国防部对轻、中、重度 TBI 的分级标准	1
表 2 不同组织对 mTBI 定义阈值标准	2
表 3 人体中不同 GFAP 亚型	10
表 4 实验质粒、细胞与动物	11
表 5 实验试剂	12
表 6 实验仪器	12
表 7 GFAP 抗体筛选	20
表 8 NC 膜选择	23
表 9 小鼠血清抗体滴度测定	27
表 10 GFAP 抗体母克隆筛选结果	28
表 11 GFAP 抗体亚克隆筛选结果	28
表 12 兔血清抗体滴度测定	28
表 13 GFAP 抗体效价检测	29
表 14 GFAP 匹配抗体对筛选	30
表 15 GFAP 匹配抗体对验证	30
表 16 探针用量与划膜浓度优化	35
表 17 试纸条与 ELISA 方法临床样本诊断	39
表 18 实验质粒、细胞与动物	43
表 19 实验试剂	44
表 20 实验仪器	44
表 21 UCHL1 抗体筛选	49
表 22 试纸条划膜浓度及探针用量	50
表 23 小鼠血清抗体滴度测定	52
表 24 UCHL1 抗体母克隆筛选结果	52
表 25 UCHL1 抗体亚克隆筛选结果	53
表 26 兔血清抗体滴度测定	53
表 27 UCHL1 兔多抗效价检测	54
表 28 $L_9(3^3)$ 正交实验因素水平表	57
表 29 $L_9(3^3)$ 正交实验结果表	57
表 30 $L_9(3^3)$ 正交实验极差分析表	57

表 31 试纸条与 ELISA 方法临床样本诊断	61
表 32 TBI 血清标志物优缺点	63
表 33 主要试剂	65
表 34 实验仪器	65
表 35 实验分组	66
表 36 采样分组	67
表 37 重复验证实验分组	69
表 38 脑组织 PCA 模型参数	72
表 39 血清 PCA 模型参数	72
表 40 脑组织中筛选结果	73
表 41 血清中筛选结果	74

图 目 录

图 1 TBI 相关生物标志物.....	4
图 2 免疫层析试纸条模式图	5
图 3 相同激发光下不同粒径量子点颜色变化	6
图 4 量子点微球与抗体共价偶联原理示意图	10
图 5 试纸条检测原理及组成结构	11
图 6 GFAP 蛋白亚型序列对比	14
图 7 GFAP ₁₇₅₋₃₉₀ 重组表达质粒载体图谱	15
图 8 临床样本病人信息登记表	26
图 9 GFAP ₁₇₅₋₃₉₀ 抗原表达	27
图 10 GFAP ₁₇₅₋₃₉₀ 抗原纯化	27
图 11 GFAP 抗体特异性评价	29
图 12 匹配抗体对 OD 值随蛋白浓度的变化	31
图 13 不同粒径量子点微球发射光谱	31
图 14 不同粒径量子点微球偶联抗体 C 线荧光强度	32
图 15 不同偶联方案检测结果	32
图 16 偶联不同抗体检测结果	32
图 17 不同 pH 条件下 C 线荧光强度.....	33
图 18 偶联不同质量抗体 C 线荧光强度	33
图 19 不同样品垫检测结果	34
图 20 不同 NC 膜检测结果.....	35
图 21 T/C 达到稳定孵育时间	36
图 22 T/C 达到稳定检测时间	36
图 23 特异性评价	37
图 24 标准曲线建立	38
图 25 不同批次试纸条重复性验证	38
图 26 试纸条与 ELISA 方法的临床样本检测	39
图 27 mTBI 患者 GFAP 浓度随时间变化	40
图 28 人类 UCHL1 二级结构立体图	43
图 29 UCHL1 重组表达质粒载体图谱	45
图 30 UCHL1 抗原表达	51
图 31 UCHL1 抗原纯化	51

图 32 UCHL1 抗体特异性评价	54
图 33 不同抗体 C 线荧光强度	55
图 34 不同抗体对检测结果	55
图 35 不同 pH 下 C 线荧光强度	55
图 36 偶联不同质量抗体 C 线荧光强度	56
图 37 T/C 稳定孵育时间	58
图 38 T/C 稳定检测时间	58
图 39 试纸条特异性评价	59
图 40 标准曲线建立	60
图 41 不同试纸条重复性验证	60
图 42 试纸条与 ELISA 法临床样本检测	61
图 43 mTBI 患者 UCHL1 浓度随时间变化	61
图 44 小鼠造模示意图	67
图 45 代谢物鉴定数量及占比	70
图 46 代谢物表达量变化趋势	71
图 47 主成分分析图	72
图 48 脑组织样本差异代谢物筛选结果 Venn 图	73
图 49 血清样本差异代谢物筛选结果 Venn 图	74
图 50 脑组织与血清不同比较组代谢差异物交集	75
图 51 黄嘌呤重复验证结果	76
图 52 苯乙胺重复验证结果	76
图 53 霉酚酸酯重复验证结果	76

缩略语表

英文缩写	英文全称	中文全称
Ab	Anti-body	抗体
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
EDC	1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethylcarbodiimide hydrochloride	1-乙基-3（3-二甲基氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐
GCS	Glasgow coma scale	格拉斯哥昏迷量表
GFAP	Glial fibrillary acidic protein	胶质纤维酸性蛋白
mTBI	mild TBI	轻度创伤性颅脑损伤
mmTBI	mild to moderate TBI	轻中度创伤性颅脑损伤
MPA	Mycophenolic acid	霉酚酸
MMF	Mycophenolate mofetil	霉酚酸酯
NFL	Neurofilament light chain	神经丝轻链蛋白
NHS	N-Hydroxy succinimide	N-羟基琥珀酰亚胺
NSE	Neuron-specific enolase	神经元特异性烯醇化酶
PCA	Principal component analysis	主成分分析
PEA	Phenylethylamine	苯乙胺
QC	Quality control	质量控制样本
QDs	Quantum dots	量子点
S100B	Calcium-binding protein S100B	钙结合蛋白 S100B
TBI	Traumatic brain injury	创伤性颅脑损伤
UCHL1	Ubiquitin C-terminal hydrolase L1	泛素羧基末端水解酶 L1
UPP	Ubiquitin proteasome pathway	泛素蛋白酶体途径
XOD	Xanthine oxidase	黄嘌呤氧化酶

摘 要

创伤性颅脑损伤 (Traumatic brain injury, TBI) 一直是全球性的公共卫生难点, 其中轻中度颅脑损伤 (mild to moderate TBI, mmTBI) 占据 TBI 中的绝大多数, 它在人群中的发生率居高不下, 会造成患者行为、认知和记忆等方面的长久损害。目前临床上缺乏对于轻度 TBI (mild TBI, mTBI) 的精准定义和统一指标, 且由于外在症状不明显, mTBI 常常被忽视和漏诊, 造成患者伤害风险的增加。临床上以影像学检查结果结合格拉斯哥昏迷量表 (Glasgow coma scale, GCS) 评分对 TBI 患者进行分级诊断, 但量表评价过于主观, 对儿童及老年人不友好; 影像学检查耗费时间经济成本高, 对 mTBI 不敏感易出现假阴性结果, 受仪器与场地限制不适用于战场等复杂环境下的使用。为了实现适用于复杂环境下的 mmTBI 及时诊断, 我们利用免疫层析技术结合量子点荧光标记, 研制了以胶质纤维酸性蛋白 (Glial fibrillary acidic protein, GFAP) 与泛素羧基末端水解酶 L1 (Ubiquitin C-terminal hydrolase L1, UCHL1) 为检测标志物的量子点标记免疫层析试纸条, 利用快速检测试纸条实现对 mmTBI 的现场及时辅助诊断。另一方面, 寻找能够精准评估 mmTBI, 尤其是 mTBI 的生物标志物一直是研究热点。尽管已有大量 mTBI 潜在生物标志物的研究报道, 能够用于独立诊断 mTBI 的分子仍未被发现。我们通过构建弥漫性闭合型轻度颅脑损伤小鼠模型模拟实际场景中 mTBI 的发生, 利用代谢组学技术对比模型组与对照组小鼠脑组织与血清中代谢水平的差异, 对 mTBI 的潜在相关分子进行了初步筛选。

目的: 以 GFAP 和 UCHL1 为检测标志物, 研制基于量子点标记的免疫层析试纸条, 实现兼具灵敏度与特异性的 mmTBI 现场快速辅助诊断, 同时对 mTBI 的潜在标志物进行初步筛选。

方法: 首先对 GFAP 和 UCHL1 蛋白结构及亚型进行分析, 针对各亚型高度保守肽段进行蛋白重组表达制备免疫原, 利用抗体制备技术制备相应抗体, 与市售抗体进行对比后筛选出 GFAP 与 UCHL1 的最佳匹配抗体对。随后采用量子点微球偶联抗体制备荧光探针, 优化抗体偶联条件; 制备快速检测试纸条, 优化试纸条检测参数。得到试纸条后对试纸条进行特异性与重复性评价, 最后以临床样本对试纸条检测效果进行评价并与商品化 ELISA 检测试剂盒对比。

另一方面, 通过构建弥漫性闭合型轻度颅脑损伤小鼠模型采集脑组织及血清样本进行代谢组学分析, 筛选出代谢差异物后利用 ELISA 方法进行验证, 初步获得 mTBI 的潜在相关分子。

结果: GFAP 检测试纸条量子点微球偶联 GFAP 鼠单抗最佳 pH 为 6.0, 最佳

偶联比例为 10:1（质量比），GFAP 兔多抗和山羊抗鼠二抗分别作为试纸条 T 线与 C 线划膜，最佳划膜浓度为 1mg/mL，仅需 70 μ L 血清样本即可在 13min 内实现对 mmTBI 患者与非 TBI 患者的区分，在 51 例临床样本检测中检测灵敏度达到 95.24%，特异性达到 90%，检测效果与商品化 ELISA 检测试剂盒相当。UCHL1 检测试纸条量子点微球偶联 UCHL1 兔单抗最佳 pH 为 8.0，最佳偶联比例为 10:1（质量比），UCHL1 兔多抗和山羊抗兔二抗分别作为试纸条 T 线与 C 线划膜，最佳划膜浓度分别为 0.96mg/mL 和 0.5mg/mL，仅需 70 μ L 血清样本即可在 15min 内实现对 mmTBI 患者与非 TBI 患者的区分，在 59 例临床样本检测中检测灵敏度达到 100%，特异性达到 90%，检测效果与商品化 ELISA 试剂盒相当。

利用代谢组学技术对弥漫性闭合型轻度颅脑损伤小鼠模型进行采样分析，通过 ELISA 验证后获得黄嘌呤、苯乙胺和霉酚酸酯三种 mTBI 潜在相关分子。

结论：基于量子点标记的 GFAP 与 UCHL1 快速检测试纸条具有操作便捷、易于携带，检测迅速、结果可靠，且不受仪器与场地的限制的优势，以此建立的诊断方法能够有效实现复杂环境下 mmTBI 的准确评估，帮助患者及时介入治疗，避免严重不良后果的发生，也为将来双指标联合检测奠定基础，有助于 mmTBI 的精确诊断。

另一方面，初步筛选出了三种 mTBI 潜在相关分子，可以对其进行进一步的探索研究及验证。

关键词：轻中度创伤性颅脑损伤；胶质纤维酸性蛋白；泛素羧基末端水解酶 L1；量子点；快速诊断

Abstract

Traumatic brain injury (TBI) has always been a global public health problem, of which mild to moderate TBI (mmTBI) accounts for the majority of TBI, and its incidence remains high in the population, causing long-lasting damage to patients' behavior, cognition and memory. Currently, there is a lack of precise definition and standardized indicators for mild TBI (mTBI), and mTBI is often overlooked and underdiagnosed due to the lack of obvious external symptoms, resulting in an increased risk of harm to patients. In clinical practice, TBI patients are graded and diagnosed by imaging results combined with Glasgow coma scale (GCS) scores, but the evaluation of the scale is too subjective and unfriendly to children and the elderly; imaging examinations are time-consuming and costly, insensitive to mTBI and prone to false-negative results. Furthermore, the limitations of the instruments and sites make imaging examinations unsuitable for use in complex environments, such as battlefields. In order to achieve timely diagnosis of mmTBI in complex environments, we developed immunochromatographic test strips combined with quantum dot fluorescent labeling. GFAP (GFAP) and Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 (UCHL1) were used as the detection markers in the rapid test strips, and the strips were used to realize the on-site and timely auxiliary diagnosis of mmTBI. On the other hand, the search for biomarkers capable of accurately assessing mmTBI, especially mTBI, has been a research hot. Although a large number of studies on potential biomarkers of mmTBI have been reported, molecules that can be used to diagnose mmTBI independently remain undiscovered. We simulated the occurrence of mTBI in real scenarios by constructing a mouse model of diffuse closed mTBI, and used metabolomics technology to compare the differences in metabolic levels in brain tissues and serum between the model and control groups to preliminarily screen out potentially relevant molecules for mTBI.

Objective: To develop quantum dot-based immunochromatographic test strips using GFAP and UCHL1 as detection markers to achieve rapid on-site assisted diagnosis of mmTBI with both sensitivity and specificity, as well as preliminary screening of potential markers for mTBI.

Method: Firstly, the structure and subtypes of GFAP and UCHL1 proteins were analyzed, and the highly conserved peptides of each subtype were recombinantly expressed to prepare immunogens. The corresponding antibodies were prepared by antibody preparation technique, and the best matching antibody pairs between GFAP and UCHL1 were screened by comparing with the commercial antibodies. Subsequently, quantum dot microspheres were used to couple antibodies to prepare fluorescent probes and the antibody coupling conditions were optimized; rapid test strips were prepared

and the detection parameters of the test strips were optimized. The specificity and repeatability of the test strips were evaluated after obtaining the strips, and finally the strips were evaluated with clinical samples and compared with commercial ELISA test kits.

On the other hand, brain tissue and serum samples were collected for metabolomics analysis by constructing a mouse model of diffuse closed mild brain injury, and metabolic differentials were screened and then validated by using the ELISA method, to preliminarily obtain potentially relevant molecules of mTBI.

Result: The best pH and coupling ratio for quantum dot microspheres coupled with GFAP murine monoclonal antibody were 6.0 and 10:1 (mass ratio) respectively. The optimal concentration for GFAP rabbit poly-antibody and goat anti-mouse secondary antibody to be used as the T and C lines of the test strips for the membrane was 1mg/mL. The differentiation of patients with mmTBI from those with non TBI could be achieved in only 70 μ L of serum samples within 13min, and the sensitivity and specificity of the test strips in 51 clinical samples reached 95.24% and 90% respectively, which was comparable to that of commercialized ELISA kits. Similarly, the optimal pH and coupling ratio were 8.0 and 10:1 (mass ratio) respectively for quantum dot microspheres coupled with UCHL1 rabbit monoclonal antibody, and the UCHL1 rabbit poly-antibody and goat anti-rabbit secondary antibody were used as the T-line and C-line of the test strips with the optimal concentrations of 0.96 mg/mL and 0.5 mg/mL respectively. It only required 70 μ L of serum samples to distinguish patients with mmTBI from those without TBI in 15min, and the sensitivity and specificity of the test strips in 59 clinical samples were 100% and 90% respectively, which was on par with commercialized ELISA kits.

Three potentially relevant molecules for mTBI, xanthine, phenylethylamine and mycophenolate mofetil, were obtained after validation by ELISA using metabolomics techniques for sampling and analyzing a mouse model of diffuse closed mild brain injury.

Conclusion: The quantum dot-labeled GFAP and UCHL1 test strips are user-friendly and easy to carry with rapid and reliable results, and free from instrument and site limitations. The diagnostic method established in this way can effectively realize accurate assessments of mmTBI in complex environments, contribute to timely medical treatments of patients to avoid serious adverse consequences, and also lay the foundation for the future combination of dual index detection, which will be helpful for an accurate diagnosis of mmTBI.

Meanwhile, three potentially relevant molecules of mTBI were preliminarily screened, which can be further explored for research and validation.

Key words: mmTBI, GFAP, UCHL1, quautum dot, rapid diagnosis

前 言

1、创伤性颅脑损伤

创伤性颅脑损伤（traumatic brain injury, TBI），指头部受到撞击或外力冲击导致正常脑部功能结构遭到破坏，是世界范围内致残和致死的主要原因之一，给全球公共卫生造成了巨大的负担。从机理上讲，TBI 通常起源于由外部打击直接导致的原发性损伤，进而逐步发展为继发性损伤；继发性发病机制包括分子、化学及炎症级联反应，涉及兴奋性神经递质的释放，可导致暂时性或永久性神经功能缺损，从而导致患者在行为、认知和记忆方面的损害^[1, 2]。据估计，每年有 5000 万至 6000 万人遭受 TBI，造成的全球经济损失高达 4000 亿美元^[3]。在欧美，平均每年每 10 万人中就有新增 TBI 患者 811 至 979 人^[4]。在中国这一水平有所下降，我国每年每 10 万人中新增 TBI 患者为 55.4 至 64.1 人^[5]，但由于我国人口基数庞大，因此每年新增 TBI 患者的绝对数量远超大多数国家，给社会和家庭造成了严重负担。与普通人群相比，TBI 更多发于军人、运动员、老人及儿童。据统计，在伊拉克与阿富汗战争中超过半数士兵遭受了 TBI，已成为该战役参战士兵的“标志性创伤”^[6]；在乌克兰战争中，热武器的使用使得 TBI 不仅在士兵中常见，也波及到了大量平民造成不同程度的脑损伤^[7]。运动员由于职业原因容易遭受反复头部撞击导致 TBI，尤其是脑震荡的发生；老人与儿童由于生理机能原因易遭受 TBI 外，TBI 所导致的不良结果发生率也更为显著^[8]。

2009 年美国退伍军人管理局及国防部按照 TBI 的严重程度将 TBI 分为轻度（mild）、中度（moderate）和重度（severe）三类^[9]，判断标准由患者的脑部影像学检查结果、格拉斯哥昏迷量表（Glasgow Coma Scale, GCS）评分结合临床表现症状共同划分（表 1）。其中临床表现症状包括遭受 TBI 后①意识丧失（Loss of Consciousness, LOC）的持续时间；②定向障碍、思维迟钝、神志不清等意识/精神状态的改变（Alteration of consciousness/mental state, AOC）时间；③失忆症状（Post-traumatic amnesia, PTA）的持续时间。

表 1 美国退伍军人管理局及国防部对轻、中、重度 TBI 的分级标准

指标	轻度	中度	重度
脑部成像	正常	正常或异常	正常或异常
GCS 评分	13-15	9-12	< 9
LOC 持续时间	0-30min	30min-24h	> 24h
AOC 持续时间	≤24h	> 24h	> 24h
PTA 持续时间	≤1d	1-7d	> 7d

注：如果患者符合表中特定严重程度的任何标准，则将其分级为该程度 TBI；如果患者符合多个严重程度类别的标准，则将其分级为较高严重程度 TBI。

在大量发生的 TBI 中，轻中度颅脑损伤（mild to moderate TBI, mmTBI）占据绝大多数。在欧洲，到医院就诊的 TBI 患者中超过 90% 被诊断为 mmTBI^[3]，在中国这一比例则维持在 80% 左右^[5]。这一特点同样体现在军人群体。伊拉克和阿富汗战争中，遭受脑部损伤的美军 90%~95% 被诊断为 mmTBI^[10]，根据美国国防和退伍脑损伤中心统计，mmTBI 占军事相关脑损伤的 82.4%^[11]，是现役军人中最常见的脑损伤类型。在 TBI 导致的损伤中，最低程度的轻度 TBI（mild TBI, mTBI）也依然会对患者造成持久的不良影响。与普通人相比，患有 mTBI 的人群中风风险增加了 50%^[12]，失眠患病率明显提高^[11]，患痴呆^[13]、情绪障碍和神经退行性疾病等后遗症的概率增加^[14]，并容易在长期内造成认知表现的改变^[15]。大约 50% 到医院就诊的 mTBI 患者在受伤后 6 个月内仍不能恢复到脑损伤前的健康水平^[3]。

由于 mTBI 外在表现轻微甚至无症状，常常容易被忽视或漏诊，造成患者病情的延误导致后续伤害风险的增加，因此针对 mTBI 的及时诊断显得尤其重要。自 1993 年美国康复医学大会（the American Congress of Rehabilitation Medicine, ACRM）对 mTBI 进行了定义后，随着临床实践研究，针对 mTBI 的定义在 1993 年至 2019 年间由不同组织进行过多次更新^[16]，判断标准略有不同，但在某些诊断特征上是一致的（表 2）。结合 mTBI 的诊断特征，目前临床上对 mmTBI 的诊断金标准依靠 GCS 量表评分与影像学检查结果共同完成。但在实践过程中，GCS 量表评分主观性强，对于老人及儿童不友好；影像学检查中 CT 对轴索损伤不敏感，在 mTBI 的诊断中容易出现假阴性，相比之下 MRI 准确性较 CT 有所提高，但出于时间成本和经济成本考虑患者基本不会选择^[17, 18]。在目前的诊断标准下，有 90%~95% 的 TBI 患者 CT 扫描结果正常无颅内损伤，增加了不必要的电离辐射风险^[3]。此外，对于如军事人员、战时场合等特殊人员和复杂环境下，影像学检测受仪器和场地的限制，无法在复杂环境下紧急应用。因此，研制出一种不受仪器与场地限制、检测经济成本小、时间成本低、可实现对 mmTBI 快速判断的诊断方法成为了研究的热点。

表 2 不同组织对 mTBI 定义阈值标准

	ACRM (1993)	CDC (2003)	WHO (2005)	CDE (2010)	VA/DoD (2016)	CISG (2017)	ONF (2018)
CT 或 MRI 可显示创伤相关的颅内病变	是	是	是	是	否	否	是
局灶性神经缺陷	是	是	是	是	是	是	是
意识丧失	是	是	是	是	是	是	是

续表 2 不同组织对 mTBI 定义阈值标准

	ACRM (1993)	CDC (2003)	WHO (2005)	CDE (2010)	VA/DoD (2016)	CISG (2017)	ONF (2018)
精神状态下降	是	是	是	是	是	是	是
逆行性遗忘	是	是	否	是	是	未提及	是
创伤后失忆	是	是	是	是	是	是	是
意识混乱/定向障碍 (GCS 量表评分<15)	是	是	是	是	是	是	是
意识混乱/定向障碍(主观判断)	是	是	未提及	是	是	是	未提及
眩晕(主观判断)	是	否	否	未提及	是	是	未提及
思维下降	未提及	否	否	是	是	是	是
躯体症状	否	否	否	否	否	是	是
认知或情绪症状	否	否	否	否	否	是	否

注:

ACRM: American Congress of Rehabilitation Medicine 美国康复医学大会;

CDC: Centers for Disease Control and Prevention 疾病控制和预防中心;

WHO: World Health Organization Collaborating Centre Task Force on Mild Traumatic Brain Injury 世界卫生组织轻度创伤性脑损伤合作中心工作队;

CDE: Demographics and Clinical Assessment Working Group of the International and Interagency Initiative toward Common Data Elements for Research on Traumatic Brain Injury and Psychological Health 创伤性脑损伤和心理健康研究共同数据要素国际和机构间倡议的人口统计和临床评估工作组;

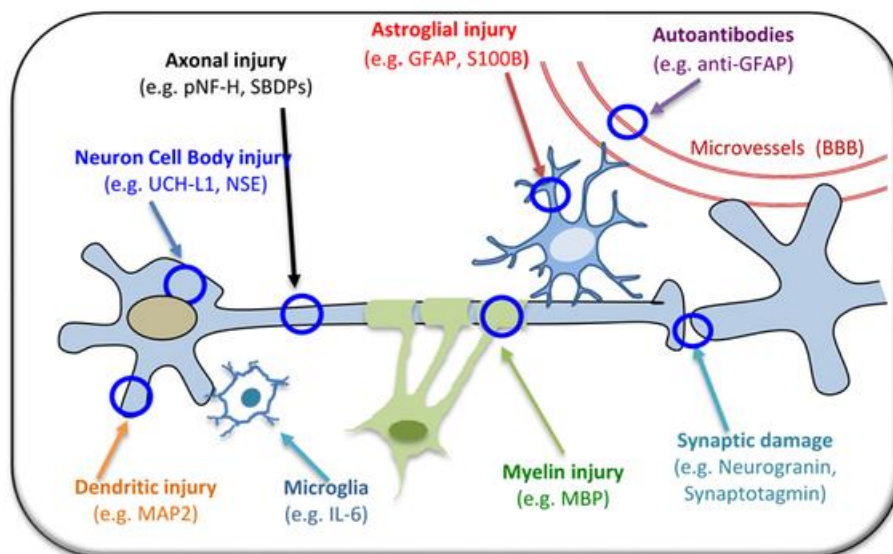
VA/DoD: the Department of Veterans Affairs and the Department of Defense 美国退伍军人管理局及国防部;

CISG: Concussion in Sport Group 脑震荡运动研究小组;

ONF: Ontario Neurotrauma Foundation 安大略神经创伤基金会。

2、mmTBI 生物标志物

生物标志物作为一类可被客观测量与评价的指标, 它的出现或浓度改变能够真实反映患者的病生理状态, 判断疾病的发生、发展和预后, 大大弥补了传统诊断方式的不足。基于 mmTBI 的病生理特点, 许多蛋白分子已经被作为候选标志物研究。到目前为止, 与神经元、轴突、星形胶质细胞和脑血管损伤相关的蛋白分子最有希望^[19] (图 1), 如与神经元和轴突损伤相关的泛素羧基末端水解酶 L1 (UCHL1)、神经元特异性烯醇化酶 (NSE)、Tau 蛋白以及神经丝轻链蛋白 (NFL) 等; 与星形胶质细胞和脑血管损伤相关的钙结合蛋白 B (S100B) 和胶质纤维酸性蛋白(GFAP)等。其中 GFAP 和 UCHL1 得到了较为普遍的认可。

图 1 TBI 相关生物标志物^[19]

GFAP 是中枢神经系统成熟星形胶质细胞的中间丝蛋白，在急性中枢神经系统损伤性疾病中能够反映星形胶质细胞的激活^[20, 21]，其在血液中的水平变化可以有效辅助判断 TBI 的受损程度。据报道，GFAP 在区分 mTBI 患者与非 TBI 对照组方面具有出色的准确性，可以较好区分 CT 阴性和阳性患者^[22]。进一步研究显示，血清 GFAP 在显示 CT 阴性的 mTBI 患者中，具有区分 MRI (+) /CT (-) 患者的能力^[20]。GFAP 浓度的升高表明存在结构性脑损伤，而 CT 无法对其进行检测，因此 CT 检测阴性并不能排除 mTBI 的可能。相比之下，GFAP 具有更高的诊断准确性。

UCHL1 也被称为神经元特异性蛋白 PGP9.5 和 Parkin 5，主要存在于中枢和周围神经系统的神经元及轴突中，其表达差异会导致错误折叠蛋白的产生增加和降解受损，这恰好是部分神经退行性疾病和 TBI 的典型特征之一^[23, 24]。因此，UCHL1 在血液中的水平变化可以有效辅助判断 TBI 的受损程度。据报道，UCHL1 在区分 mTBI 患者与非 TBI 患者中的灵敏度高达 95%^[22]，在预测 mmTBI 患者的 CT 表现方面具有较高的准确性 (AUC = 0.77, mmTBI 患者 347 例，对照 179 例)，但是在评估所有 TBI 患者 CT 表现水平时准确度略有下降 (AUC = 0.67, TBI 患者 595 例，对照 256 例)^[25]。

综上，通过对血清中 GFAP 和 UCHL1 的浓度检测可以实现 mmTBI 的辅助诊断。因此，如何建立血清 GFAP 与 UCHL1 的快速检测方法成为研究的重点。

3、免疫层析技术

免疫层析技术是 20 世纪末出现的一种新型免疫分析方式，因其操作简单、读取方便、检测迅速等优势被广泛应用于现场即时检测，在临床疾病诊断、环境污

染检测、药物研究、食品安全监督、有毒有害物质检测等领域不断发展。该技术结合了免疫反应与固相色谱分析，以带有标记物的抗原抗体特异性结合为基础，通过毛细作用在固相膜上富集带有标记物的检测样本，通过对标记物的分析实现待测样本的定性或定量分析，一般在 5~20min 内便可得到直观的检测结果。除操作简便、检测迅速的优势外，该方法还具有成本低廉、使用安全、无需专业人员和复杂检测仪器的优势，已成为应用最广的样品筛查检测手段之一。

实现免疫层析技术检测的载体为免疫层析试纸条，根据抗原抗体结合方式的不同，可分为竞争免疫层析法和双抗夹心免疫层析法两种。竞争免疫层析适用于检测单一抗原表位的小分子抗原或者半抗原，如黄曲霉素^[26]、伏马毒素^[27]等，常用于食品安全中毒素残留的检测；双抗夹心免疫层析则多用于检测具有多个抗原表位的大分子抗原，如致病菌^[28]、病毒^[29]、蛋白^[30]等，常用于疾病的诊断。免疫层析试纸条主要由样品垫、结合垫、硝酸纤维素（NC）膜、检测线（T 线）、质控线（C 线）、吸水垫、聚氯乙烯（PVC）底板等部分组成，待测样品滴入样品垫后开始向吸水垫方向进行层析，首先在结合垫中与事先喷涂的量子点标记抗体反应，随后通过检测线对结合强度进行判断，再经过质控线对反应体系进行判断，从而得出分析结果。

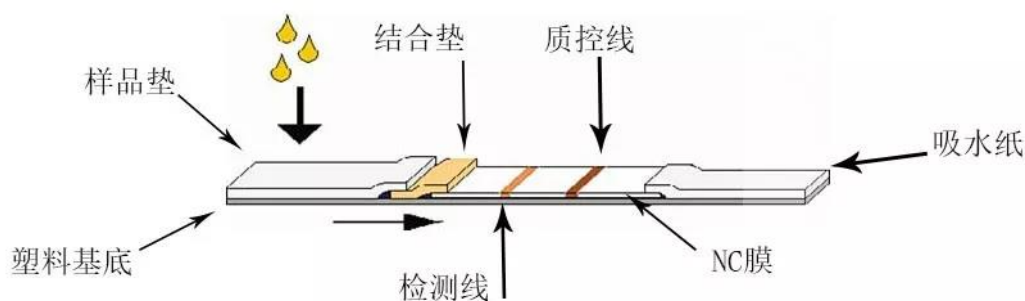


图 2 免疫层析试纸条模式图

在这一过程中，标记物的选择格外重要，一种高灵敏度、强稳定性的标记物将大幅提高检测性能。胶体金是其中应用最早、使用最广泛的经典标记物，它是一类表面带有阴性电荷的纳米级别的金颗粒，在弱碱性环境下可与带有阳性电荷的蛋白分子相吸附，形成牢固结合的复合物，出现肉眼可见的斑点，为诊断提供显色媒介。但是在追求高灵敏度、定量检测和多元检测的技术发展趋势下，以胶体金为标记物的诊断检测灵敏度偏低、易受环境因素影响，只能用于待测物的初筛或定性判断，无法进行定量分析。随着纳米技术的不断发展和新材料的应用，量子点、镧系元素、稀土金属元素等新型标记材料的出现使得免疫层析检测灵敏度不断提高，检测性能不断增强。其中，量子点被认为是免疫层析中最有前途的

荧光半导体纳米材料^[31]。

量子点(quantum dots, QDs)是一类直径在 10nm 左右的荧光纳米材料,通常由 II-VI、III-V、IV-VI 族原子构成,如 CdSe、CdTe、CdS 等。基于量子尺寸效应^[32],当量子点的粒子半径接近或小于其激子波尔半径时,粒子费米能级附近的电子能将由准连续变为分立能级,表现在吸收光谱上则会形成具有结构特征的吸收峰,从而显示出独特的光学特性,如较高的斯托克位移、较宽的吸收光谱、窄而对称的发射光谱和高效且稳定的发光效率^[33, 34]等。量子点还可以通过改变自身化学成分、形状大小等组成因素,实现对吸收光谱和发射光谱的调谐^[35],如使发射波长覆盖整个可见光区或者使同一激发光在不同半径的量子点上发射出不同光谱,从而实现多组分的联合检测。

与传统有机荧光染料相比,①量子点激发光谱宽而发射光谱窄且对称分布,单一光源可同时激发不同半径的量子点发射出不同颜色的荧光,实现多组分同时检测;②量子点光化学稳定性高,荧光光谱几乎不受环境因素如溶剂、PH 值、温度等影响,荧光稳定性更强;③量子点具有高量子产率及高荧光强度,可以更高效地提供荧光信号,增强检测结果的灵敏度,显著降低检测方法的检出限。

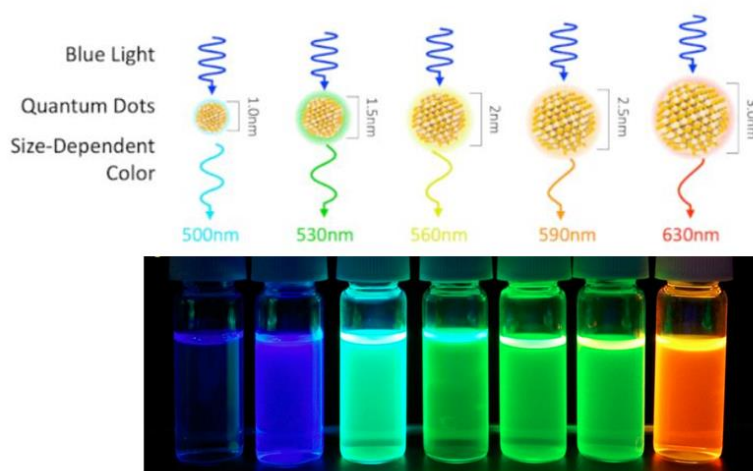


图3 相同激发光下不同粒径量子点颜色变化

4、量子点的偶联与修饰

作为潜力强大的荧光信号标记物,量子点需要与抗体进行偶联以示结果信号。通常水相合成的量子点表面带有如羧基、氨基等亲水官能团,可以直接在水溶液中与生物分子进行连接。抗体作为大分子蛋白,其裸露片段表面带有氨基、巯基、醛基等多种结构末端,可以为量子点的偶联提供结合位点。

量子点与抗体的偶联可分为共价偶联与非共价偶联两大类:

共价偶联通过使用交联剂作为中间反应载体使量子点的表面基团与抗体表面

基团相连。交联剂是一类小分子化合物，分子量一般在 200~600Da 之间，具有 2 个或多个针对特殊基团（氨基、巯基等）的反应末端，起到桥梁作用促进反应的发生。交联剂可以和不同分子的对应基团分别偶联从而将这些分子结合在一起。如羧基化 QDs 与抗体（antibody, Ab）偶联，使用的交联剂是 1-乙基-3（3-二甲氨基丙基）碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）^[36]或 N-羟基硫代琥珀酰亚胺（sulfo-NHS），该方法是量子点偶联中最常用的方法^[37]；表面带有末端氨基的 QDs，可与 Ab 上的巯基通过交联剂琥珀酰亚胺-4-环己烷-1-碳酸酯（SMCC）^[38]或 4-（N-马来酰亚胺甲基）环己烷-1-羧酸磺酸基琥珀酰亚胺酯钠盐（sulfo-SMCC）偶联^[39]。此外，羟基化 QDs 在反应缓冲体系 pH8.5 的条件下，利用双官能团交联剂 N-（p-马来酰亚胺苯）异氰酸酯（PMPI），可与 Ab 的巯基连接^[40]。

非共价偶联主要包括生物素-亲和素系统、适配体中间蛋白连接和静电吸附。亲和素与生物素间具有强亲和力，该结合迅速、专一、稳定，并具有多级放大效应。羧基化 QDs 表面带有负电荷，可与表面带有高正电荷的链霉亲和素通过静电相互作用结合，此时结合了亲和素的 QDs 便可以与生物素化的 Ab 形成 QDs-亲和素-生物素-Ab 的连接系统间接连接。与生物素-亲和素系统类似，适配体中间蛋白同时具有亮氨酸拉链结构域和 G 蛋白结构域，其中亮氨酸拉链结构域带有正电荷，可以与带负电的量子点通过静电结合，G 蛋白结构域则可结合抗体的 Fc 区域，以此形成量子点与抗体的偶联。此外，有报道表明带负电的量子点与带正电的生物分子可直接通过静电吸引相连接，无需依靠其他试剂，已成功应用于细胞成像。

量子点独特的光学特性赋予了它广阔的应用空间和应用前景，但是单个量子点尺寸小、荧光强度有限，用于生物标记时暴露在复杂的生理环境中，容易破坏量子点的荧光稳定性。随着量子点修饰技术的不断发展，量子点微球和磁珠量子点微球应运而生。

微球是一类由高分子材料如聚苯乙烯等聚合而成的直径在纳米至微米尺度范围的球型粒子。通过聚合包载法、物理吸附法、溶胀法等方法，量子点可以被吸附或包载于微球的表面和内部形成量子点微球^[41]。由于量子点与抗体偶联后会对荧光特性造成影响，导致量子点荧光的减弱甚至淬灭，造成荧光效率的下降，量子点微球将大量量子点包裹在微球内部，保护了量子点的核心，提高了量子点的稳定性及对外界环境的耐受性，同时因为单个微球内部包裹大量量子点，量子点微球的荧光信号强度可达到单个量子点的数万倍^[42]，可以进一步提高试纸条的检测灵敏度。此外经微球修饰后量子点粒径变大，为抗体的偶联提供了更多的分子修饰位点。Changhua Zhou^[43]等人通过对量子点微球修饰，实现了该量子点微球在

不同 pH 值、不同盐浓度和 80℃热处理条件下均表现出较高的稳定性，且基于该量子点微球标记的试纸条对甲胎蛋白的检出限达到 0.1ng/mL，是市售胶体金标记试纸条的 200 倍。

磁珠量子点微球进一步将磁性材料与量子点微球相结合，通过微球包载技术^[44]将磁珠与量子点共同包载于微球内部，或利用静电吸附原理^[45]将量子点吸附于磁珠表面形成磁珠量子点微球。由于磁珠是具有磁性的微球，结合了磁珠的生物分子表现出磁性，而一般的生物分子几乎不表现出任何磁性，因此通过磁场作用，磁珠量子点微球可实现对待测物的分离浓缩，满足检测中低背景值、高灵敏度的需求，非常适用于多组分复杂样本的检测分析。Liang Guo^[44]等人利用超声乳化法将 Fe₃O₄ 磁性纳米粒子与量子点包裹于微球中，制备出荧光强度比单一量子点强 226 倍的磁性荧光微球，以此标记物制作荧光探针制备的免疫层析试纸条可实现对黄曲霉素 B1 的快速检测，检测限在提取液中为 2.84pg/mL，在样本原液中为 48.69pg/mL，优于已报道的荧光微球免疫层析检测。

5、选题目的和意义

mmTBI 作为全球性的健康危害之一仍然存在诊断指标不够精确、医疗检测成本高等困难，而在军人等特殊群体中更是存在对于复杂环境下 mmTBI 快速诊断的迫切需求。因此，本研究以 GFAP 和 UCHL1 为血清标志物，通过量子点标记的免疫层析技术实现对 mmTBI 的辅助诊断，降低医疗检测成本，实现复杂环境下的快速诊断需求。另外，本课题组已于前期建立了模拟轻度颅脑损伤场景的弥漫性闭合型轻度颅脑损伤小鼠模型，通过对模型组小鼠与对照组小鼠血清和脑组织的代谢组学分析，初步筛选出其他潜在的 mTBI 分子标志物，为 mTBI 的精确诊断提供新的参考依据。

第一章 量子点标记免疫层析试纸条检测 GFAP 方法建立

引言

GFAP 是一种特异性表达于中枢神经系统星形胶质细胞的Ⅲ型中间丝蛋白，它与微管和微丝一起构成星形胶质细胞的细胞骨架，被认为是星形胶质细胞完全分化成熟的标记物^[46]。GFAP 在中枢神经系统中发挥着极其重要的作用，作为细胞骨架蛋白家族的一员，除了参与构成大脑的神经元外，GFAP 还能够抑制成熟大脑中神经元的增殖，形成隔离受损组织的物理屏障，参与小脑运动学习，调节脑缺血后的血流，支持髓鞘形成，并为大脑提供机械强度^[47]。此外，GFAP 还可作为中枢神经系统损伤的生物标志蛋白，如外力造成的急性中枢性损伤、神经退行性疾病中的阿尔兹海默症、帕金森等^[48-50]。在 mmTBI 中，颅脑损伤会引发星形胶质细胞破裂，导致 GFAP 及其裂解产物释放进入蛛网膜下腔脑脊液，脑脊液中的 GFAP 进一步通过静脉系统直接释放到血液中，或者在脑脊液循环中扩散穿透血脑屏障进入全身血液^[51]。

研究表明，不同程度 TBI 患者的血清 GFAP 水平始终会高于正常人水平，且与 TBI 受损程度成正相关^[52]。Linda^[53]等人在一项大样本跟踪实验中发现，遭受 mmTBI 的患者平均 GFAP 血清水平大于 0.25ng/mL，而正常人血清中 GFAP 水平在 0.1ng/mL 上下。Metting^[54]等人对 CT (-) 与 CT (+) 的 mTBI 患者血清 GFAP 水平进行研究，发现当患者血清 GFAP 水平高于 0.23ng/mL 时能区别两组患者，其灵敏度为 75%，特异度为 62%。另外，用 MEDLINE、SCOPUS 和 EMBASE 三个数据库进行 meta 分析评估 GFAP 对 CT 成像异常的预测价值时，发现 GFAP 的最佳阈值为 0.63ng/mL，此时 GFAP 的检测灵敏度为 71%，特异性为 71%，当降低 GFAP 检测阈值时，检测灵敏度增加，检测特异性降低^[55]。

据报道，人体中 GFAP 存在 7 个不同亚型^[46]，分别是 α 、 γ 、 δ/ϵ 、 κ 、 $\Delta 135$ 、 $\Delta 163$ 和 $\Delta \text{exon}6$ （表 3），它们通过不同的 mRNA 剪切表达产生，在脑区不同部位存在丰度表达差异，其中 GFAP- α 在星形胶质细胞中表达最为丰富。与其他中间丝蛋白结构类似，GFAP 同样具有头部、杆状区域和尾域结构，在这 7 种不同亚型中，它们的中间杆状区域具有高度保守性，头部和尾域则存在不同的剪切修饰，被认为是与其他蛋白相互作用的区域。

表 3 人体中不同 GFAP 亚型

GFAP 亚型	蛋白长度 (aa)
α	432
γ	≥ 321
δ/ϵ	431
κ	438
$\Delta 135$	374
$\Delta 163$	≤ 366
Δexon6	≤ 347

我们通过查阅 GenBank 库中 GFAP 蛋白序列，优化筛选出 GFAP 各亚型的保守区域肽段（175-390 肽段），以 pET24a 质粒为载体构建重组质粒表达蛋白获得免疫原，随后按照单克隆抗体常规制备流程免疫 BALB/c 小鼠获得 GFAP 鼠单克隆抗体；另外选取 GFAP 蛋白序列中不同肽段进行多肽合成，以 KLH 标签偶联肽段作为免疫原对新西兰大白兔进行免疫注射，获得 GFAP 兔多克隆抗体。利用双抗夹心 ELISA 法进行免疫层析。

与单量子点相比，量子点微球将量子点吸附或包载于微球的表面和内部，保护了量子点的核心，在提高量子点稳定性的同时放大了荧光信号强度，使试纸条检测灵敏度进一步提高^[42]，因此选择量子点微球作为荧光标记物进行荧光探针的制备。量子点微球表面的羧基可通过共价偶联方式与抗体裸露片段的氨基结合，其中最常用的方法是使用交联剂 1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺盐酸盐（EDC）和 N-羟基琥珀酰亚胺（NHS）作为中间反应载体使基团相连（图 4）。

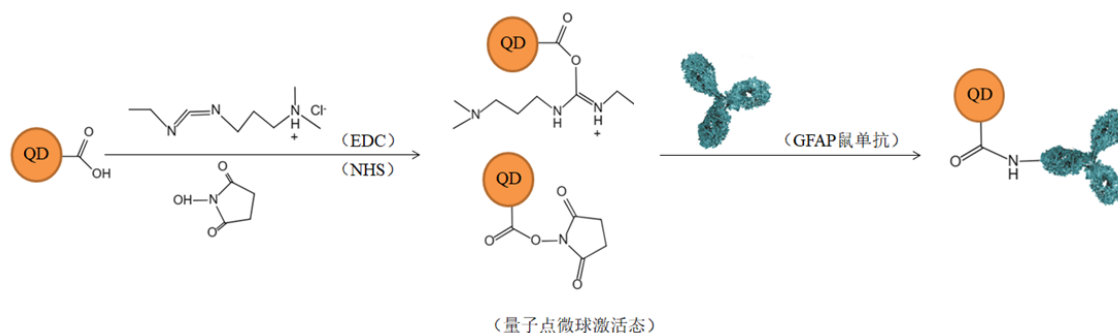


图 4 量子点微球与抗体共价偶联原理示意图

我们采用量子点微球作为荧光标记物，以 EDC 和 NHS 为交联剂采用共价偶联方法将量子点微球与 GFAP 鼠单抗偶联获得荧光探针。以 GFAP 兔多抗作为检测线（T 线）、山羊抗小鼠二抗作为质控线（C 线）在 NC 膜上包被划膜，将样品垫、NC 膜和吸水垫各部分组装在 PVC 底板切割成试纸条对样品进行检测（图 5）。评价试纸条检测特异性和重复性，以不同浓度 GFAP 蛋白血清建立标准曲线，用

收集到的临床样本评价试纸条对 mmTBI 的诊断效果，最终研制出基于 GFAP 的免疫层析试纸条实现对 mmTBI 的快速诊断。

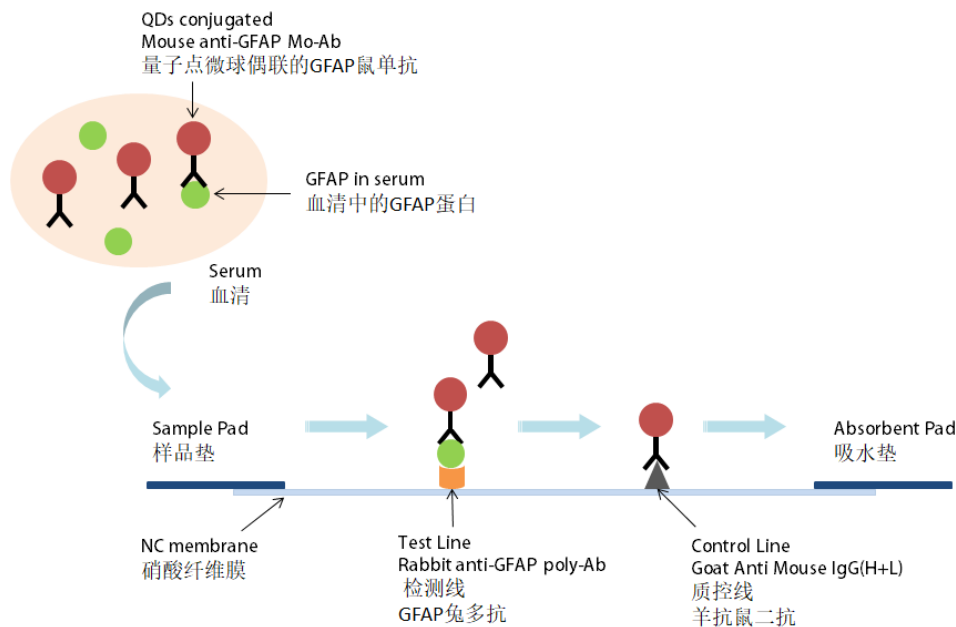


图 5 试纸条检测原理及组成结构

1.1 实验材料

1.1.1 质粒、细胞、动物

表 4 实验质粒、细胞与动物

材料	公司
Pet24a 质粒（含目的基因）	苏州博特龙免疫技术有限公司
BL21（DE3）感受态细胞	苏州博特龙免疫技术有限公司
小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0	苏州博特龙免疫技术有限公司
BALB/c 小鼠	邳州市东方养殖有限公司
新西兰大白兔	邳州市东方养殖有限公司

1.1.2 主要试剂及材料

表 5 实验试剂

试剂	公司
弗氏不完全佐剂	苏州博奥龙科技有限公司
山羊抗小鼠二抗（HRP）	苏州博奥龙科技有限公司
山羊抗兔二抗（HRP）	苏州博奥龙科技有限公司
显色液	苏州博奥龙科技有限公司
预活化层析介质（巯基偶联专用）	苏州博奥龙科技有限公司
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
GFAP 全长蛋白	Abcam
牛血清白蛋白	Abcam
山羊抗小鼠二抗	北京义翘神州科技股份有限公司
1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺	Sigma
N-羟基琥珀酰亚胺	Sigma
量子点微球	上海昆道生物技术公司
人血清	Gemini
NC 膜	深圳市德优平科技有限公司
样品垫、吸水垫、PVC 板	上海杰一生物科技有限公司
人 GFAP ELISA 免疫检测试剂盒	江苏酶免实业有限公司

1.1.3 主要实验仪器

表 6 实验仪器

仪器	公司
酶标仪	瑞士 TECAN 生物有限公司
SDS-PAGE 蛋白电泳仪	北京六一仪器厂
凝胶成像分析仪	北京赛智创业科技有限公司
恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司
冷冻离心机	Sigma
免疫荧光分析仪	广州蓝勃生物科技有限公司
划膜仪	上海捷宁生物科技有限公司
裁条机	上海捷宁生物科技有限公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司

1.1.4 主要试剂的配置

选择性培养基:

RPMI 1640, 含 10% FBS、HAT 培养基添加剂 (1×)、10% Clone Easy, 在超净工作台无菌配置后封口膜封口, 4℃ 保存。

细胞裂解液:

在 1mL Tris-HCl (1M, pH6.8) 中加入 4 mL 10% SDS 和 40μL EDTA (0.5M, pH8.0), 最后加入蒸馏水定容至 20mL, 4℃ 保存。

ELISA 包被液 (0.05M, pH9.6):

称取 Na_2CO_3 1.59g, NaHCO_3 2.93g, 加蒸馏水至 1000 mL, 4℃ 保存。

PBS (0.01M, pH7.4):

称取 NaCl 8.0g, KH_2PO_4 0.2g, KCl 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, 溶于 900mL 蒸馏水中, 调节 pH 至 7.4, 定容至 1000mL, 4℃ 保存。

PBST:

在 PBS 中加入 0.05% Tween-20, 充分溶解后 4℃ 保存。

Binding Buffer:

称取 Na_2HPO_4 1.32g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.11g, NaCl 14.61g 和咪唑 0.17g, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 用 0.22 μm 过滤器过滤缓冲液, 4℃ 保存。

Elution Buffer:

称取 Na_2HPO_4 1.32g, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.11g, NaCl 14.61g 和咪唑 17.02g, 溶于 500 mL 蒸馏水中, 用 0.22 μm 过滤器过滤缓冲液, 4℃ 保存。

LB 液体培养基:

称取酵母提取物 5g, 蛋白胨 10g 和 NaCl 10g, 加入 800 mL 蒸馏水充分搅拌后定容至 1L, 高压蒸汽灭菌冷却至室温后加入相应抗生素, 4℃ 保存。

LB 固体培养基:

在液体 LB 培养基中加入 15g 琼脂糖, 高压蒸汽灭菌, 待冷却至室温后加入相应抗生素, 4℃ 保存。

IPTG 溶液 (100 mg/mL):

称取 IPTG 5g, 加入 40mL 蒸馏水, 充分溶解后定容至 50mL, 用 0.22 μm 的滤膜过滤除菌, 分装成 1mL/管, -20℃ 保存。

1.2 实验方法

1.2.1 GFAP 小鼠单克隆抗体制备

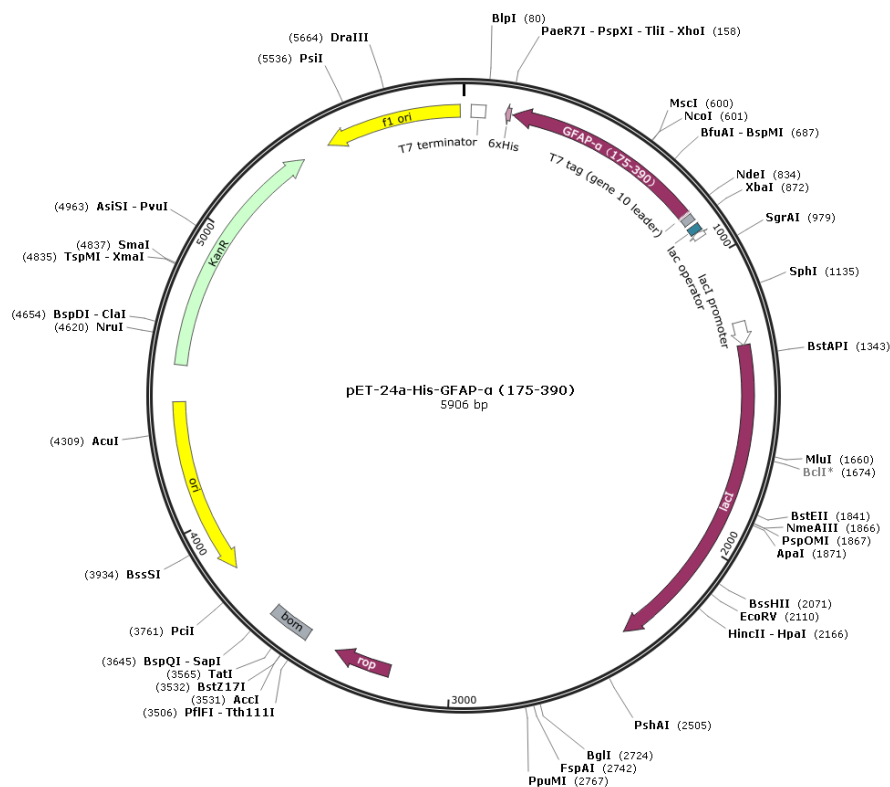
1.2.1.1 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 抗原表达

查询 GenBank 库中 GFAP 蛋白序列,可查询得到 GFAP- α 、GFAP- δ/ε 、GFAP- κ 三种亚型序列。对比三种亚型序列(图 6)得到共有序列段 1-390。首先采用 1-174 肽段(包含两个完整的外显子基因段)进行质粒重组诱导蛋白表达,发现表达蛋白浓度极低,无法纯化作为抗原进行动物免疫,故该肽段抗原表达失败。

	1	10	20	30	40	50	60
GFAP- α	M	E	R	R	R	I	T
GFAP- δ	M	E	R	R	I	T	S
GFAP- κ	M	E	R	R	I	T	S
	70	80	90	100	110	120	
GFAP- α	G	F	K	E	T	R	A
GFAP- δ	G	F	K	E	T	R	A
GFAP- κ	G	F	K	E	T	R	A
	130	140	150	160	170	180	
GFAP- α	R	E	L	R	L	D	Q
GFAP- δ	R	E	L	R	L	D	Q
GFAP- κ	R	E	L	R	L	D	Q
	190	200	210	220	230	240	
GFAP- α	L	A	R	L	D	E	R
GFAP- δ	L	A	R	L	D	E	R
GFAP- κ	L	A	R	L	D	E	R
	250	260	270	280	290	300	
GFAP- α	Q	Y	E	A	M	A	S
GFAP- δ	Q	Y	E	A	M	A	S
GFAP- κ	Q	Y	E	A	M	A	S
	310	320	330	340	350	360	
GFAP- α	G	T	N	E	S	L	E
GFAP- δ	G	T	N	E	S	L	E
GFAP- κ	G	T	N	E	S	L	E
	370	380	390	400	410		
GFAP- α	I	E	I	A	T	Y	R
GFAP- δ	I	E	I	A	T	Y	R
GFAP- κ	I	E	I	A	T	Y	R
	420	430					
GFAP- α	E	V	I	K	E	S	K
GFAP- δ	Q	I	V	N	G	T	P
GFAP- κ	Q	G	K	G	I	Q	L

图 6 GFAP 蛋白亚型序列对比

最终采用 175-390 亚型共有肽段用于进行抗原表达,重组表达方案载体图谱如图 7 所示:

图 7 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 重组表达质粒载体图谱

质粒重组蛋白表达操作步骤如下：

- (1) 将表达质粒（含目的基因）转化到 BL21（DE3）感受态细胞中，37℃倒置过夜培养；
- (2) 挑取单菌落于 5mL 的 LB 培养基中，37℃，250rpm 条件下过夜培养 18h，作为种子液；
- (3) 将种子液按 1:100 转接到新鲜的 200mL LB 培养基中，37℃，250rpm 条件培养，当菌液 OD₆₀₀=0.6 时，补加 IPTG 诱导剂，18℃继续诱导培养；
- (4) 低温离心收集菌体；
- (5) 将菌体用裂解液重悬后进行超声破碎；
- (6) 低温离心超声后的样品，分别取上清液和沉淀用 SDS-PAGE 凝胶电泳进行蛋白分析。

蛋白纯化操作步骤如下：

将上述步骤获得的上清液，用 0.45μm 滤膜过滤，通过 Ni 亲和层析柱进行蛋白纯化。

- (1) 用 5 倍柱体积的去离子水洗涤，去除空气和 20%乙醇；
- (2) 8 倍柱体积 Binding Buffer 平衡柱子；

- (3) 将样品以 0.5mL/min 的速度流穿镍柱;
- (4) 用 Binding Buffer 平衡柱子;
- (5) 用 Elution Buffer 洗脱;
- (6) 收集洗脱的蛋白于 4℃透析 4h, 用超滤法(超滤管)浓缩, 获得抗原蛋白, 于-80℃储存。
- (7) 用 SDS-PAGE 凝胶电泳对所获得的蛋白纯度进行分析。

1.2.1.2 动物免疫

将抗原 14.1μL 与 PBS 35.9μL、免疫佐剂 50μL 均匀混合, 按照每剂 100μL 用量于第 0 d 通过左后肢腓肠肌注射的方法对 BALB/c 小鼠进行初次免疫, 抗原注射剂量为 100μL/只; 第 14 d 按照相同操作方法对小鼠进行加强免疫; 第 22 d 对小鼠进行尾尖采血并分离血清, 用 ELISA 法测定血清抗体滴度, 以健康小鼠(未免疫小鼠)血清作为阴性对照, 选取最佳免疫小鼠进行细胞融合。

ELISA 操作步骤如下:

- (1) 用包被液将抗原稀释至 1μg/mL, 按照 100μL/孔加入酶标板, 37℃孵育 1h;
- (2) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 200μL/孔加入封闭液, 4℃过夜后弃去封闭液;
- (3) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 100μL/孔加入用 PBS 倍比稀释的待测血清, 同时设阴性对照组, 37℃孵育 1h;
- (4) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 100μL/孔加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:5000 稀释), 37℃孵育 1h;
- (5) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 100μL/孔加入 TMB 显色液, 室温放置 1~5min;
- (6) 按照 50μL/孔加入终止液终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处光密度值, 以实验孔/阴性对照孔大于 2.1 且数值不小于 0.2 判定为阳性。

1.2.1.3 细胞融合

- (1) 分别将 1×10^8 小鼠脾细胞和 2×10^7 骨髓瘤细胞重悬于 25mL 无血清培养基中(用 50mL 离心管), 1000rpm 离心 10min, 弃去上清;
- (2) 轻拍管底充分打散沉淀, 将离心管置于 37℃水浴中保温至融合开始;
- (3) 将 1mL 经过 37℃预热的 50% PEG 1450 匀速加入上述离心管中(1min 内加完)并用移液器枪头不断搅拌 2min;
- (4) 依次将 1mL 经过 37℃预热的培养基匀速加入上述离心管中(1min 内加完)并用移液器枪头不断搅拌; 将 3mL 经过 37℃预热的培养基匀速加入上述离心管中(3min 内加完)并用移液器枪头不断搅拌; 将 10mL 经过 37℃预热的培养基匀速加入上述离心管中并用移液器枪头不断搅拌, 随后 37℃孵育 5min;

(5) 离心弃去上清, 用选择性培养基重悬细胞, 常规方法培养细胞, 3~5d 后显微镜下观察杂交瘤细胞增殖情况。

1.2.1.4 细胞筛选

母克隆细胞株筛选:

融合后观察细胞生长状态, 筛选并标记每孔中仅有单克隆细胞团生长的孔。抽取各单克隆孔细胞上清各 100 μ L, 利用间接 ELISA 方法进行效价测定。

ELISA 操作步骤如下:

- (1) 用包被液将抗原稀释至 1 μ g/mL, 按照 100 μ L/孔加入酶标板, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;
- (2) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 200 μ L/孔加入封闭液, 37 $^{\circ}$ C 孵育 2h;
- (3) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 取含有单克隆抗体的细胞上清按照 100 μ L/孔加入酶标板, 用空白培养基做阴性对照, 用免疫小鼠的血清做阳性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;
- (4) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 100 μ L/孔加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗(1:5000 稀释), 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h;
- (5) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液, 室温放置 1~5min;
- (6) 按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处光密度值, 以实验孔/阴性对照孔大于 2.1 且数值不小于 0.2 判定为阳性。

亚克隆细胞株筛选:

挑选母克隆细胞中 ELISA 结果呈阳性的细胞株用有限稀释法做亚克隆筛选, 每株母克隆细胞铺一块 96 孔板。10~14d 后进行第一次亚克隆 ELISA 筛选, 操作步骤同母克隆筛选。对筛选出的亚克隆细胞进行第二次 ELISA 筛选, 操作步骤中将包被抗原改为 GFAP 全长蛋白, 其余操作步骤相同。

将筛选出的细胞株表达的抗体使用 protein A 亲和层析柱进行抗体纯化, 最终得到 GFAP 鼠单抗。

1.2.2 GFAP 兔多克隆抗体制备

1.2.2.1 GFAP 多肽抗原表达

为尽可能避免兔抗与鼠抗有相同的抗原表位结合位点, 在兔多抗的制备中, 采用除 175-390 肽段外的 GFAP 其余肽段对质粒进行基因重组诱导表达。

对不同亚型 GFAP 末端特异性序列进行重组蛋白表达制备抗体 (GFAP- α 391-432 肽段, GFAP- ε 391-429 肽段、GFAP- κ 391-436 肽段), 将重组质粒转化到 BL21 (DE3) 感受态细胞中进行表达, 蛋白表达步骤与 1.2.1.1 中相同。经 SDS-PAGE 凝胶电泳分析, 发现蛋白在上清液与沉淀中均有表达。对上述所获得的

蛋白进行纯化，蛋白纯化步骤与 1.2.1.1 中相同。用 SDS-PAGE 凝胶电泳对所获得的蛋白纯度进行分析，显示蛋白纯度 $>90\%$ 。以该抗原对新西兰大白兔进行免疫注射并检测血清中抗体滴度，发现兔血清中抗体浓度极低，不满足细胞融合条件，故以该抗原进行兔多抗制备失败。

最终采取小分子多肽作为抗原进行动物免疫制备抗体。所采用的小分子多肽序列如下：

多肽 1: RRSYVSSGEMMVGGLAPGRRLLGPGTR-Cys, 通过 SMCC 偶联 KLH 标签；

多肽 2: NAGFKETRASERAEMMELNDRFASYIEKVRFLEQQNKA-Cys, 通过 SMCC 偶联 KLH 标签。

1.2.2.2 动物免疫

按照 1:1 的比例将抗原与弗氏不完全佐剂混合，新西兰大白兔注射剂量为 1mL/只（即抗原 500 μ L+弗氏不完全佐剂 500 μ L）。

于第 0 d 通过背部皮下多点注射对新西兰大白兔进行免疫；第 20 d 按照相同操作方式进行二次免疫；第 40 d 按照相同操作方式进行三次免疫；第 60 d 按照相同操作方式进行四次免疫；第 70 d 预取血后，ELISA 检测抗血清效价达到要求，颈动脉采全血并分离血清，用 ELISA 法测定血清抗体效价，以健康大白兔（未进行免疫）血清作为阴性对照，选取免疫效果最佳的大白兔血清进行抗体亲和纯化。

ELISA 操作步骤如下：

（1）用包被液将抗原稀释至 2 μ g/mL，按照 100 μ L/孔加入酶标板，4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。

（2）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 200 μ L/孔加入封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h；

（3）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，将血清倍比稀释后按照 100 μ L/孔加入酶标板，用健康大白兔血清做阴性对照并设置空白对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

（4）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗（1:5000 稀释），37 $^{\circ}$ C 孵育 45min；

（5）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液，室温放置 5~10min；

（6）按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450nm 处光密度值，以实验孔/阴性对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定效价。

1.2.2.3 抗体亲和纯化

对效价最佳的兔子血清进行抗体亲和纯化，操作步骤如下：

（1）将纯化柱固定于铁架台上，从 4 $^{\circ}$ C 冰箱取出 NHS 填料，摇匀后将 1mL 填料加至纯化柱中；

(2) 流出贮存液后先用预活化层析介质中的 A 液（活化液，约 200~300ml）冲洗柱子，随后用 B 液（偶联液，约 50~60ml）冲洗柱子，进行纯化柱的激活；

(3) 将 10mg 抗原用 100 μ L DMSO 溶解，随后加入 B 液混匀并加至柱料中（体积约 2mL）；

(4) 密封柱子，放置摇床缓慢孵育，室温孵育 3h；

(5) 弃去抗原流出液，用 50mL 蒸馏水清洗填料，随后用封闭液进行封闭（封闭液稀释 10 倍），放置摇床 4℃孵育过夜。

(6) 弃去封闭液，用 50mL 蒸馏水清洗填料，随后按照酸液、蒸馏水、碱液、蒸馏水重复交替洗涤 8 次；

(7) 用洗杂液清洗柱子，加入用 0.22 μ m 滤膜过滤后的 10mL 血清于摇床缓慢孵育，室温 2h；

(8) 收集流穿液，用 2 个柱体积的洗杂液洗涤柱子，在 100 μ L 蛋白检测液中加一滴洗杂流穿液，检测是否洗涤干净；

(9) 加入 2mL 洗脱液悬浮柱料后静置 2~4min，使其充分作用后将抗体洗脱下来，用事先加有中和液（10mL 洗脱液加入 1mL 中和液）的离心管收集，重复 5 次共收集 10mL 洗脱液，直至蛋白检测液检测抗体都洗脱下来。

通过以上步骤，得到 GFAP 兔多克隆抗体。

1.2.3 GFAP 抗体评价

1.2.3.1 抗体特异性评价

本研究制备 GFAP 抗体目的在于检测血清中 GFAP 蛋白含量，因此以人血清、大鼠血清和小鼠血清对制备所得的抗体进行特异性评价。在人血清中加入 GFAP 蛋白作为阳性对照，同时设置无血清包被孔作为空白对照，以制备获得的抗体作为一抗，采用 ELISA 方法对抗体特异性进行评价。

ELISA 操作步骤如下：

(1) 用人血清将 GFAP 蛋白浓度配置成 10 μ g/mL；

(2) 使用包被缓冲液将 GFAP 蛋白血清、人血清、大鼠血清和小鼠血清稀释 1000 倍后按照 100 μ L/孔加入酶标板，37℃孵育 2h；

(3) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 200 μ L/孔加入封闭液，4℃孵育过夜；

(4) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，分别用 PBS 将 GFAP 鼠单抗和 GFAP 兔多抗稀释 5000 倍后按照 100 μ L/孔加入酶标板，37℃孵育 1h；

(5) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔分别对应加入 HRP 标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗（1:5000 稀释），37℃孵育 1h；

(6) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液，室温放置 5~10min；

(7) 按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450nm 处光密度值，以实验孔/空白对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定阳性。

1.2.3.2 抗体效价检测

采用 ELISA 方法对制备所得 GFAP 鼠单抗与 GFAP 兔多抗进行效价检测，并且分别与商品化抗体进行对比。

ELISA 操作步骤如下：

(1) 使用包被缓冲液将 GFAP 蛋白浓度配置成 1 μ g/mL，按照 100 μ L/孔加入酶标板，37℃ 孵育 2h；

(2) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 200 μ L/孔加入封闭液，4℃孵育过夜；

(3) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，分别用 PBS 将 GFAP 鼠单抗、GFAP 兔多抗和商品化抗体倍比稀释后按照 100 μ L/孔加入酶标板，37℃孵育 1h；

(5) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔分别对应加入 HRP 标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗（1:5000 稀释），37℃孵育 1h；

(6) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液，室温放置 5~10min；

(7) 按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450nm 处光密度值，以实验孔/阴性对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定效价。

1.2.4 GFAP 抗体对匹配

除制备的 GFAP 鼠单抗和兔多抗外，选购常见的商品化 GFAP 抗体（表 7），以兔抗作为捕获抗体包被于酶标板鼠抗作为检测抗体进行检测，或者以鼠抗作为捕获抗体包被于酶标板兔抗作为检测抗体进行检测，筛选出合适的匹配抗体对。

表 7 GFAP 抗体筛选

类别	品牌	货号
GFAP 兔单抗	CST	E4L7M
GFAP 鼠单抗	CST	GA5
GFAP 兔重组单抗	Abcam	ab68428
GFAP 鼠重组单抗	Abcam	ab279289
GFAP 兔多抗	武汉三鹰	16825-1-AP
GFAP 鼠单抗	武汉三鹰	60190-1-LG

双抗夹心 ELISA 操作步骤如下：

(1) 使用包被缓冲液将捕获抗体稀释 1000 倍，按照 100 μ L/孔加入酶标板，37℃ 孵育 2h；

(2) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 200 μ L/孔加入封闭液，4℃孵育过夜；

(3) 1×PBST 洗板 3 次, 用 PBS 将 GFAP 蛋白倍数稀释, 按照 100μL/孔加入酶标板, 同时设置空白对照组 (不加 GFAP 蛋白), 37℃ 孵育 1h;

(4) 1×PBST 洗板 4 次, 用抗体稀释液将检测抗体稀释 1000 倍, 按照 100μL/孔加入酶标板, 37℃ 孵育 1h;

(5) 1×PBST 洗板 4 次, 用抗体稀释液将 HRP 标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗稀释 5000 倍, 按照 100μL/孔分别加入对应孔中, 37℃ 孵育 1h;

(6) 1×PBST 洗板 4 次, 按照 100μL/孔加入 TMB 显色液, 室温放置 5~10min;

(7) 按照 50μL/孔加入终止液终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处光密度值, 根据 OD 值对匹配抗体对进行筛选。

1.2.5 荧光探针制备

1.2.5.1 量子点微球粒径选择

量子点微球的粒径会对荧光信号强度造成影响。将粒径分别为 100、120 和 160nm 的三种量子点微球用纯水 50 倍稀释后以 365nm 波长进行激发, 在 580nm 至 660nm 波长范围内间隔 1nm 进行发射光谱扫描, 观察不同粒径量子点微球的荧光信号强度; 将三种不同粒径的量子点微球偶联相同质量抗体, 等量上样于划膜后的试纸条, 经荧光分析仪检测比较 C 线荧光强度。选择荧光强度最大的量子点微球粒径进行后续实验。每组实验平行重复三次, 每次读数连续读取三遍取平均值, 以下实验相同。

1.2.5.2 抗体偶联方案选择

EDC 和 NHS 在水溶液中容易水解失活, 需现用现配, 且在 pH6.0 时活性最佳。EDC 与 NHS 用量越大, 量子点微球激活效果越好, 但过量交联剂会导致清洗不够彻底, 影响与抗体的偶联效果。一般而言 EDC 与 NHS 用量为羧基浓度的 1~1.5 倍。通过文献查阅^[30, 56, 57], 按照 10μL (100μg) 量子点微球加入 1.2mgEDC 和 0.4mgNHS 的比例, 对以下三种偶联方法进行尝试:

一步偶联法: 即量子点微球的激活与抗体的偶联同时进行。

具体操作步骤如下:

(1) 取 10μL 量子点微球加入 100μL MES 溶液中, 依次加入 1.2mgEDC、0.4mgNHS 和 10μg 抗体, 37℃ 孵育 1h;

(2) 在溶液中加入 1mgEDC 和 100μL 封闭液 (含 1%BSA 的 MES 溶液) 继续 37℃ 孵育 1h;

(3) 将上述溶液以 10000rpm 离心 10min, 弃上清;

(4) 将沉淀用 PBS 清洗一遍, 于 100μL PBS 溶液中重悬, 得到量子点微球

偶联抗体。

两步偶联法：即分别进行量子点微球的激活和抗体的偶联。

具体操作步骤如下：

(1) 取 10 μ L 量子点微球加入 100 μ L MES 溶液中，依次加入 1.2mgEDC 和 0.4mgNHS，37 $^{\circ}$ C 孵育 30min；

(2) 将上述溶液以 10000rpm 离心 10min 弃上清，沉淀用 PBS 清洗一遍，于 100 μ L PBS 中重悬；

(3) 在溶液中加入 10 μ g 抗体，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

(4) 将上述溶液以 10000rpm 离心 10min 弃上清，沉淀在 100 μ L 封闭液（含 1%BSA 的 PBS 溶液）中重悬，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h，得到量子点微球偶联抗体。

抗腹水偶联法：操作步骤与一步偶联法类似，以抗腹水代替抗体进行偶联。由于抗腹水中本身含有大量杂蛋白，因此无需封闭步骤。

具体操作步骤如下：

(1) 取 10 μ L 量子点微球加入 300 μ L 抗腹水中，依次加入 1.2mgEDC 和 0.4mgNHS，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

(2) 将上述溶液以 10000rpm 离心 10min，弃上清；

(3) 将沉淀用 PBS 清洗一遍，于 100 μ L PBS 溶液中重悬，得到量子点微球偶联抗体。

用 PBS 配置 10ng/mL GFAP 蛋白溶液作为阳性样本，设置阴性对照组。将三种不同偶联方法制备获得的荧光探针加入样本中检测，等量上样于划膜后的试纸条，经荧光分析仪检测得到 T 线与 C 线荧光强度比值 T/C，比较阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，比值越大说明该方案偶联效果越好。

采用最佳偶联方案分别偶联等量筛选出的两组匹配抗体对中的检测抗体，以所匹配的捕获抗体划膜，上样于试纸条后进行检测，比较阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，筛选出最佳匹配抗体对。

1.2.5.3 偶联缓冲液 pH 优化

EDC 与 NHS 在 pH6.0 时活性最佳，因此选择 MES (pH6.0) 为量子点微球激活缓冲液。两步偶联法将量子点微球激活步骤和与抗体偶联步骤分别进行，不同抗体有不同的最佳偶联 pH 条件。配置三种 pH 分别为 6.0、7.0 和 8.0 的 PBS 缓冲液作为抗体偶联缓冲液，取 10 μ L 量子点微球标记相同质量抗体，在试纸条上等量上样观察 C 线荧光强度，选择 C 线荧光强度最大时的 pH 值作为抗体偶联条件。

1.2.5.4 抗体偶联比例优化

抗体偶联比例变化会对试纸条的检测灵敏度产生直接影响。取 10 μ L 量子点微球，分别偶联 8、9、10、11 和 12 μ g 抗体，在试纸条上等量上样观察 C 线荧光强度，选择 C 线荧光强度最大时偶联抗体的质量为抗体最佳偶联比例。

1.2.6 免疫层析试纸条制备

1.2.6.1 样品垫及 NC 膜选择

样品垫能够分离过滤样品中的杂质，平衡待测样品的 pH 值和盐离子强度，使样品在层析过程中保持一定的均一性和可控性，是免疫层析试纸条的重要组成部分。通过文献查阅^[28]，在通用样品垫、血清样品垫和预处理样品垫中进行选择。其中预处理操作如下：将样品垫浸泡于含 0.5%BSA、5%蔗糖和 2%Tween-20 的 Tris 碱（0.02M，pH8.5）中，5min 后于 70℃烘箱烘干备用。

分别用 PBS 及人血清配置 1ng/mL GFAP 蛋白作为阳性样本，设置阴性对照组，测量阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，选择比值最大的样品垫进行试纸条制备。

NC 膜是免疫层析过程中进行抗原抗体反应的载体，它的选择对于试纸条检测灵敏度及检测特异性具有显著影响。一定范围内，NC 膜的爬速越快，试纸条检测时间越短。但爬速过快会导致抗原抗体反应时间缩短，造成检测灵敏度降低；爬速过慢会增加非特异性结合的可能，导致本底增大。因此选择合适的 NC 膜极为重要。

对市面上主流的 NC 膜（表 8）进行选择，用人血清配置 0.2ng/mL GFAP 蛋白作为阳性样本，设置阴性对照组，测量阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，选择比值最大的 NC 膜进行试纸条制备。

表 8 NC 膜选择

品牌	型号	爬速（s/4cm）
印度 MDI	MDI90	90 $\pm$ 15
德国 Sartorius	CN95	95-97
深圳德优平	NC120	120-125
美国 Millipore	Millipore135	130-135
深圳德优平	NC140	140-145
印度 MDI	MDI150	150 $\pm$ 20

1.2.6.2 探针用量及抗体划膜浓度优化

分别以 GFAP 兔多抗和山羊抗小鼠二抗作为检测线 (T 线) 和质控线 (C 线), 以 $1\mu\text{L}/\text{cm}$ 的速度划膜, 将荧光探针加入待测样品孵育后滴入试纸条进行检测。用人血清配置 $1\text{ng}/\text{mL}$ GFAP 蛋白作为阳性样本, 设置阴性对照组, 测量阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ 。

在预实验中固定 T 线与 C 线划膜抗体浓度, 发现增加上样量会使比值增大, 但反应时间增加; 增加探针用量会使比值增大, 但探针用量过大会导致阴性本底增大, 盖过阳性样本。固定上样量及探针用量, 发现当 C 线浓度一定时, 随着 T 线浓度增加, T 线荧光强度增大 C 线荧光强度减小, 比值增加; 当 T 线浓度一定时, 随着 C 线浓度增加, C 线荧光强度增大, 比值减小。

结合预实验结果, 考虑经济效益与反应时间, 固定上样量为 $70\mu\text{L}$, C 线划膜浓度过量固定为 $1\text{mg}/\text{mL}$ 。按照探针用量为 $1\mu\text{L}$ 、 $2\mu\text{L}$ 和 $3\mu\text{L}$, 兔多抗稀释倍数为 3 倍、4 倍和 5 倍对探针用量及 T 线划膜浓度进行优化, 选择检测结果比值最大的组合为最佳探针用量与 T 线划膜浓度。

1.2.6.3 试纸条检测时间优化

检测时间为抗体孵育时间与试纸条检测时间的总耗时。按照优化后条件, 用人血清配置 $1\text{ng}/\text{mL}$ GFAP 蛋白作为阳性样本, 在 $70\mu\text{L}$ 阳性样本中加入荧光探针分别孵育 2~6min, 观察 T/C 比值, 选择比值达到稳定的最短时间为孵育所需时间; 在 $70\mu\text{L}$ 阴性样本中加入荧光探针, 于 1~30min 内每 1min 进行一次测量观察 T/C 比值, 选择比值达到稳定的最短时间为试纸条检测所需时间。

1.2.7 试纸条评价

1.2.7.1 特异性评价

当人体遭受 TBI 后, 血清中除了 GFAP 外还会有其他蛋白因子水平上升。选择 TBI 后同样在血清中水平上升的白细胞介素-6 (IL-6)、白细胞介素-8 (IL-8)、泛素羧基末端水解酶 L1 (UCHL1) 和髓鞘碱性蛋白 (MBP) 4 种蛋白因子, 按照 $1\text{ng}/\text{mL}$ 蛋白浓度配置成待测样本于试纸条上进行检测, 观察与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$, 对试纸条的检测特异性进行评价。

1.2.7.2 重复性评价

用人血清分别配置浓度为 $0.1\text{ng}/\text{mL}$ 、 $0.15\text{ng}/\text{mL}$ 、 $0.2\text{ng}/\text{mL}$ 、 $0.5\text{ng}/\text{mL}$ 和 $1\text{ng}/\text{mL}$ 的 GFAP 阳性样本, 设置阴性对照, 在荧光检测仪中进行检测, 计算阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ 并建立标准曲线, 利用 t 检验确定检出下限。实验重复平行 5 次, 每次读数连续读取 3 遍取平均值。

抽取制备的 3 个不同批次试纸条, 每个批次试纸条用阴性血清进行本底调零

（既确定 T_0/C_0 ）后，利用标准曲线对 1ng/mL GFAP 蛋白样本进行重复性验证，计算 CV 值。每个批次平行检测 4 次，共检测 12 次。

1.2.7.3 临床样本评价

对于区分 mTBI 患者与健康人的 GFAP 血清浓度阈值在不同文献中有不同报道，目前并无统一判定标准。总体而言，当降低 GFAP 检测阈值时，检测灵敏度增加但检测特异性下降；反之则检测灵敏度下降而检测特异性上升。分别采用试纸条和人 GFAP ELISA 检测试剂盒对收集到的 30 例健康人血清样本与 21 例 mmTBI 患者血清样本进行检测。临床样本由重庆第二大学附属医院提供，血清采集后立刻-80℃冻存，于 3 个月内进行检测，检测时仅冻融 1 次。

选择入组病例时填写病人信息登记表（图 8），选择除 TBI 外无其他疾病损伤的患者，按照 GCS 评分 15~13 分为轻度 TBI、12~9 分为中度 TBI 进行分组纳入，得到 mmTBI 患者血清样本。

通过 ROC 曲线作图和约登指数分析得到对应的 GFAP 浓度检测阈值，比较两种不同诊断方法的灵敏度、特异度、ROC 曲线下面积等指标对试纸条检测效果进行评价。

观察轻度 TBI 患者血清中 GFAP 浓度水平随时间的变化，确定 GFAP 最佳检测时间。

病人信息登记表

编号:

姓名:	性别:	年龄:	病历号:			
初步诊断						
简要病史						
	是否存在缺血性或出血性梗死 () 是否存在痴呆、慢性精神病或活跃的中枢神经系统病变 () 是否饮酒 () 备注: 是: √; 否: ×					
	创伤至接受 CT 扫描时间 20 年 月 日 时 分			创伤至采血时间 20 年 月 日 时 分		
头颅 CT 表现	CT 编号:					
GCS 评分	6 分	5 分	4 分	3 分	2 分	1 分
睁眼反应 (E)			☐ 自动睁眼	☐ 呼唤睁眼	☐ 刺痛睁眼	☐ 不能睁眼
语言反应 (V)		☐ 回答切题	☐ 回答错误	☐ 言语错乱	☐ 只能发音	☐ 无言语
运动反应 (M)	☐ 遵嘱动作	☐ 刺痛定位	☐ 刺痛躲避	☐ 刺痛屈曲	☐ 刺痛过伸	☐ 刺痛无反应
总分						

图 8 临床样本病人信息登记表

1.3 实验结果

1.3.1 GFAP 小鼠单克隆抗体制备结果

1.3.1.1 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 抗原表达

对重组质粒诱导蛋白表达后进行验证，SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果（图 9）显示，蛋白在上清液和沉淀中均有表达。将表达蛋白进行纯化后用 SDS-PAGE 凝胶电泳对蛋白纯度进行验证，结果（图 10）显示，蛋白纯化效果良好，蛋白纯度>90%。

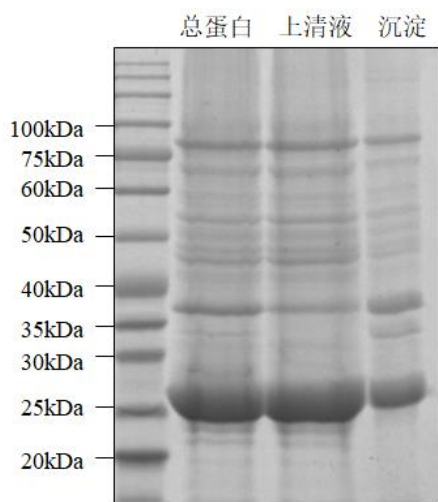


图 9 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 抗原表达

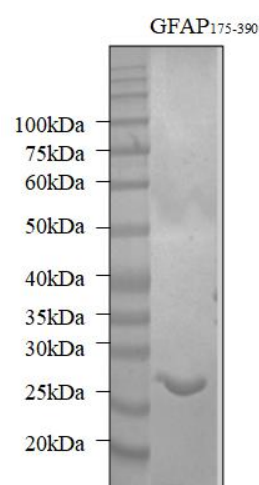


图 10 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 抗原纯化

1.3.1.2 动物免疫

将 GFAP₁₇₅₋₃₉₀ 抗原注射至小鼠体内进行动物免疫，用 ELISA 方法对小鼠血清抗体滴度进行检测，结果（表 9）显示，2 号小鼠血清抗体滴度最佳，选择该小鼠进行细胞融合。

表 9 小鼠血清抗体滴度测定

	2.5K	5K	10K	20K	40K	80K	160K	320K
小鼠 1	1.305	1.308	1.305	1.264	1.072	0.816	0.547	0.27
小鼠 2	1.179	1.299	1.381	1.099	1.115	1.098	0.861	0.608
小鼠 3	1.174	1.192	1.042	1.069	0.825	0.599	0.38	0.26
小鼠 4	1.128	1.195	1.207	1.018	0.89	0.642	0.365	0.227
小鼠 5	1.121	1.117	1.023	1.056	0.897	0.753	0.52	0.339
阴性	0.007	0.008	0.016	0.007	0.007	0.008	0.007	0.01

注：2.5K 即稀释倍数为 2.5×10^3 倍，其余一致。

1.3.1.3 细胞筛选

将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合后利用 ELISA 法进行细胞筛选，经过一次母克隆细胞筛选（表 10）与两次亚克隆细胞筛选后（表 11）得到 GFAP 单克隆抗体细胞株 9G6E5，使用 protein A 亲和层析柱进行抗体纯化，最终得到 GFAP 鼠单抗。

表 10 GFAP 抗体母克隆筛选结果

克隆号	OD 值
1A6	1.4704
2C1	1.8628
3H11	2.6296
4F2	2.5609
5E9	0.4454
7F10	2.1206
8H5	0.3878
9G6	1.8132
10D9	1.3229

表 11 GFAP 抗体亚克隆筛选结果

克隆号	第一次亚克隆筛选 OD 值	第二次亚克隆筛选 OD 值
1A6G4	1.5710	0.7506
2C1E6	1.0256	0.8911
4F2H12	2.0006	1.4263
5E9E6	2.2612	1.5823
7F10D11	1.9566	1.5261
8H5A9	2.7359	0.3577
9G6E5	1.9337	1.7882
10D9E4	1.2514	0.2271

1.3.2 GFAP 兔多克隆抗体制备结果

将多肽合成抗原注射至新西兰大白兔体内进行动物免疫，用 ELISA 方法对兔血清抗体滴度进行检测，结果（表 12）显示，1 号兔子效价在 2.56×10^5 ，2 号兔子效价在 1.28×10^5 ，3 号、4 号兔子效价均在 5.12×10^5 ，其中 3 号兔子血清效价最高，对该兔血清进行抗体亲和纯化，最终得到 GFAP 兔多抗。

表 12 兔血清抗体滴度测定

抗原	序号	空白	阴性	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K
----	----	----	----	----	----	----	----	-----	-----	-----	------	------	------

多肽 1	兔 1	0.027	0.022	1.832	1.612	1.799	1.628	1.264	1.024	0.859	0.571	0.317	0.121
多肽 1	兔 2	0.07	0.038	1.46	1.234	1.047	0.717	0.642	0.487	0.346	0.288	0.187	0.071
多肽 2	兔 3	0.019	0.02	1.871	1.737	1.66	1.421	1.552	1.766	1.276	1.14	0.793	0.572
多肽 2	兔 4	0.023	0.027	2.08	1.963	1.608	1.394	0.882	0.834	0.708	0.561	0.343	0.299

注：1K 即稀释倍数为 1×10^3 倍，其余一致。

1.3.3 GFAP 抗体评价结果

1.3.3.1 抗体特异性评价结果

采用 ELISA 法包被人血清、大鼠血清和小鼠血清对抗体特异性进行评价，实验设置 3 组复孔。结果（图 11）显示，GFAP 鼠单抗与 GFAP 兔多抗在血清中均具有较好特异性。

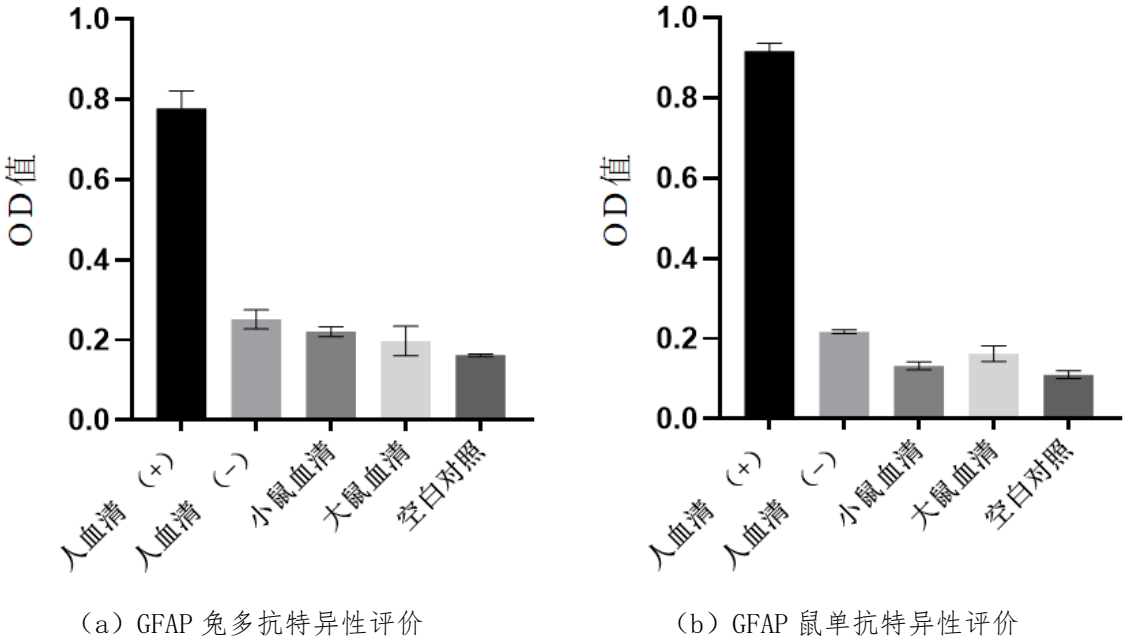


图 11 GFAP 抗体特异性评价

1.3.3.2 抗体效价检测

采用 ELISA 法对 GFAP 抗体进行效价检测并与商品化抗体对比，结果（表 13）显示，GFAP 鼠单抗在 10^7 稀释倍数时仍对抗原具有较好结合能力，效价与商品化抗体相当；GFAP 兔多在 10^6 稀释倍数时仍对抗原具有较好结合能力，效价与商品化抗体相当。

表 13 GFAP 抗体效价检测

空白	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7
----	--------	--------	--------	--------	--------

GFAP 鼠单抗	0.1215	>4	>4	>4	2.4365	0.7873
GFAP 商品化鼠单抗	0.1945	>4	>4	>4	2.0621	0.6245
GFAP 兔多抗	0.0473	2.3659	2.6913	1.7179	0.5082	0.0501
GFAP 商品化兔多抗	0.0484	1.6949	1.7323	1.1919	0.7109	0.1903

1.3.4 GFAP 匹配抗体对确定

按照双抗夹心 ELISA 对不同抗体对进行匹配筛选，每组实验做 2 组复孔取均值。结果（表 14）显示，存在两组匹配抗体对具有较高的检测灵敏度、较低的检测本底以及较稳定的浓度梯度变化，即以武汉三鹰兔多抗为捕获抗体，以武汉三鹰鼠单抗为检测抗体的匹配抗体对；以制备兔多抗为捕获抗体，以制备鼠单抗为检测抗体的匹配抗体对。

表 14 GFAP 匹配抗体对筛选

捕获抗体	检测抗体	GFAP 浓度 ng/mL				
		10	1	0.5	0.1	空白
CST 鼠单抗	CST 兔单抗	0.6425	0.2264	0.2456	0.9431	0.8663
CST 兔单抗	CST 鼠单抗	0.3041	0.3046	1.3155	1.5824	0.4439
Abcam 鼠单抗	Abcam 兔单抗	1.1160	1.0993	0.3589	0.4627	1.2047
Abcam 兔单抗	Abcam 鼠单抗	0.0647	0.0781	0.0984	0.5081	1.0324
武汉三鹰鼠单抗	武汉三鹰兔多抗	0.2266	0.2324	0.4817	0.9071	1.0239
武汉三鹰兔多抗	武汉三鹰鼠单抗	0.4174	0.2413	0.1586	0.1448	0.1367
制备鼠单抗	制备兔多抗	0.4034	0.2922	0.2129	0.2064	0.1504
制备兔多抗	制备鼠单抗	1.9448	1.2629	1.3652	0.9964	0.4037

进一步优化检测条件对筛选出的匹配抗体对进行重复检测（表 15），以 GFAP 蛋白浓度为横坐标，检测 OD 值为纵坐标作图（图 12），可以看出所筛选出的匹配抗体对拥有较好检测线性关系，检测灵敏度可达 0.1ng/mL。

表 15 GFAP 匹配抗体对验证

捕获抗体	检测抗体	GFAP 浓度 ng/mL				

		10	1	0.5	0.1	空白
武汉三鹰兔多抗	武汉三鹰鼠单抗	2.8193	0.4003	0.2709	0.1331	0.0926
制备兔多抗	制备鼠单抗	1.8341	0.2353	0.1472	0.0953	0.0859

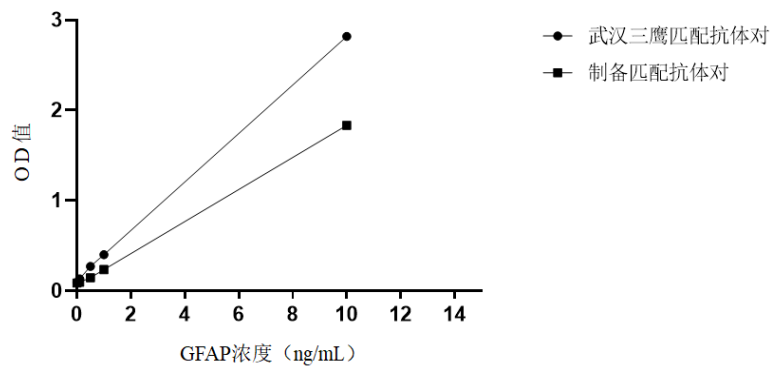


图 12 匹配抗体对 OD 值随蛋白浓度的变化

1.3.5 荧光探针制备方案确定

1.3.5.1 量子点微球粒径确定

量子点微球的发射光谱显示（图 13），量子点微球荧光信号强度随粒径增加而增大，160nm 粒径的量子点微球荧光信号强度最大。偶联相同抗体后的 C 线荧光强度结果显示（图 14），160nm 粒径的量子点微球偶联抗体后 C 线荧光强度最大。因此选择 160nm 粒径的量子点微球进行实验。

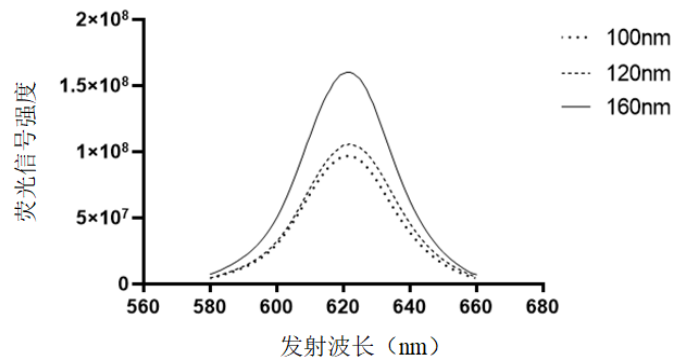


图 13 不同粒径量子点微球发射光谱

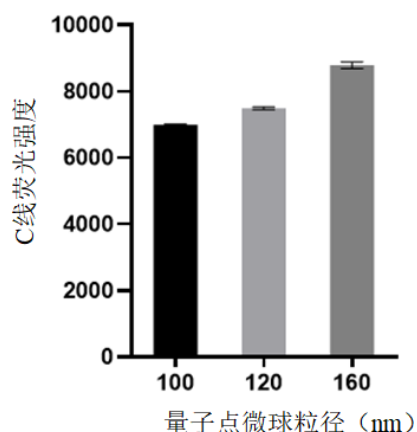


图 14 不同粒径量子点微球偶联抗体 C 线荧光强度

1.3.5.2 抗体偶联方案确定

采用三种不同偶联方案得到阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，结果（图 15）表明，两步偶联法所得比值最大，抗体偶联效果最佳。

采用两步偶联法分别偶联商品化 GFAP 鼠单抗和制备获得的 GFAP 鼠单抗，在相同条件下对样本进行试纸条检测，结果（图 16）显示偶联制备获得的 GFAP 鼠单抗检测效果更好。猜测由于商品化抗体储存液中含有甘油、保护剂等额外物质影响偶联效率，制备获得的 GFAP 鼠单抗中仅有 PBS 作为储存液，偶联效率更佳。

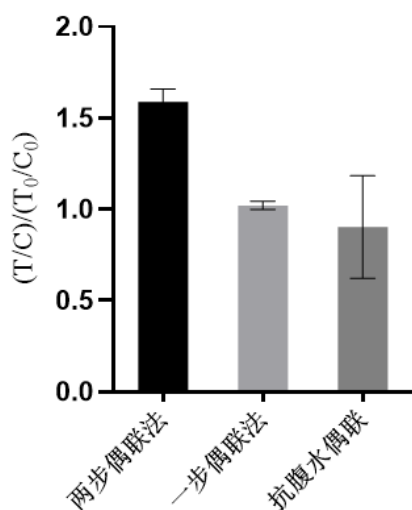


图 15 不同偶联方案检测结果

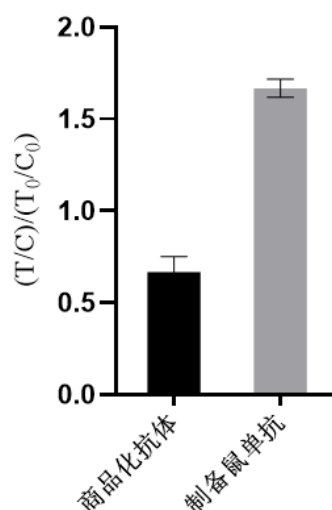


图 16 偶联不同抗体检测结果

1.3.5.3 偶联缓冲液 pH 确定

比较不同偶联 pH 条件下检测的 C 线荧光强度，发现当 pH 值为 6.0 时 C 线荧光强度最大（图 17），此时量子点微球抗体偶联效果最佳。

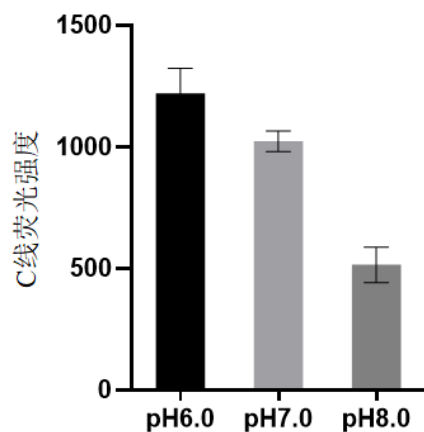


图 17 不同 pH 条件下 C 线荧光强度

1.3.5.4 抗体偶联比例确定

比较偶联不同质量抗体时的 C 线荧光强度，结果（图 18）显示，当偶联抗体质量为 10 μ g 时 C 线读数最大，为最佳抗体偶联比例。当偶联抗体质量小于 10 μ g 时偶联未饱和，C 线荧光强度较低；当偶联抗体质量大于 10 μ g 时，受空间位阻影响，偶联效率降低，C 线荧光强度减小。

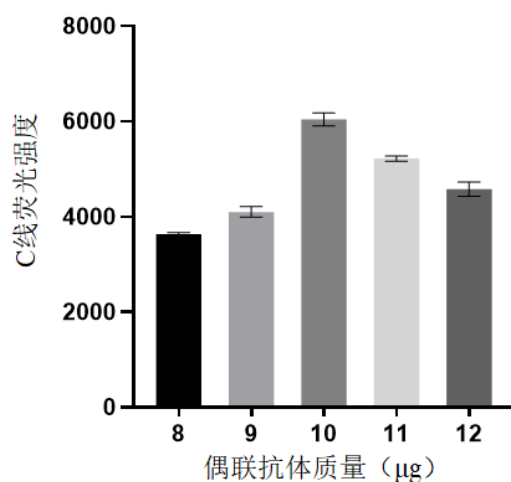


图 18 偶联不同质量抗体 C 线荧光强度

1.3.5.5 荧光探针制备方案

综合上述优化条件，最终得到荧光探针制备方案如下：

取 10 μ L 量子点微球，加入 40 μ L MES（0.1M，pH6.0）溶液中混匀，随后加入 1.2mgEDC 和 0.4mgNHS 在 37 $^{\circ}$ C 水浴条件下孵育 30min 进行量子点微球的激活。

以 12000rpm 转速离心 10min 弃去上清液，加入 80 μ L PBS 缓冲液（0.01M，pH6.0）在 25W 条件下超声 1min（超声 5s，间歇 5s）洗涤，重复洗涤 2 次。

取 10 μ g GFAP 鼠单抗加入 80 μ L PBS 缓冲液中混匀后加入清洗完成的量子点中，37 $^{\circ}$ C 水浴孵育 2.5h。用 PBS 缓冲液配置 3%BSA 封闭液，取 40 μ L 加入孵育完成后的偶联溶液中（封闭液终浓度为 1%），37 $^{\circ}$ C 水浴条件下继续孵育 30min。以 12000rpm 转速离心 10min，获得量子点微球偶联抗体，于 400 μ L PBS 溶液中重悬（0.01M，pH7.8，含 1%BSA），储存于 4 $^{\circ}$ C 备用。

1.3.6 免疫层析试纸条制备方案确定

1.3.6.1 样品垫及 NC 膜选择

比较不同样品垫在 PBS 和人血清中阳性样本与阴性样本 T/C 的比值结果，结果（图 19）显示在 PBS 中通用样品垫比值最大，在血清中血清样品垫比值最大。考虑试纸条应用场景为对血清中 GFAP 的检测，采用血清样品垫进行试纸条的制备，同时后续检测样本均改为人血清。

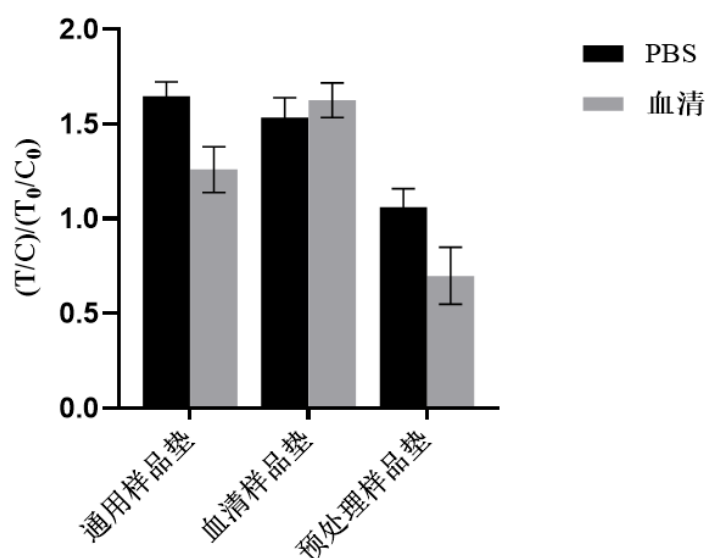


图 19 不同样品垫检测结果

比较不同 NC 膜在人血清中阳性样本与阴性样本 T/C 的比值结果，结果（图 20）显示深圳德优平 NC120 型号的 NC 膜检测效果最佳。

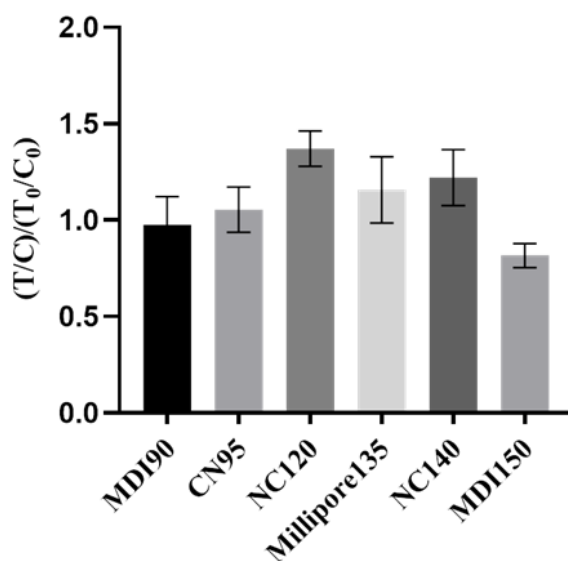


图 20 不同 NC 膜检测结果

1.3.6.2 探针用量及抗体划膜浓度确定

对探针用量及兔抗划膜浓度进行优化, 结果(表 16)显示, 当探针用量为 2 μ g, 兔抗稀释倍数为 4 倍时检测效果最佳。

表 16 探针用量与划膜浓度优化

兔抗稀释 倍数	探针量 (μ L)					
	1		2		3	
	(T/C)/(T₀/C₀)	均值	(T/C)/(T₀/C₀)	均值	(T/C)/(T₀/C₀)	均值
3×	3.237	3.166	2.472	2.600	1.446	1.482
	3.392		2.785		1.604	
	2.870		2.544		1.396	
4×	2.486	2.687	3.765	3.746	2.418	2.410
	2.721		3.809		2.469	
	2.854		3.664		2.343	
5×	2.213	2.144	2.946	2.609	1.959	1.787
	2.048		2.604		1.538	
	2.171		2.279		1.863	

1.3.6.3 试纸条检测时间确定

结果显示, 在阳性样本中加入荧光探针孵育, 5min 后 T/C 比值达到稳定(图 21); 在阴性样本中加入荧光探针进行检测, 8min 后 T/C 比值基本保持不变(图 22)。选择该孵育时间与检测时间作为样本检测条件, 检测总耗时为 13min。

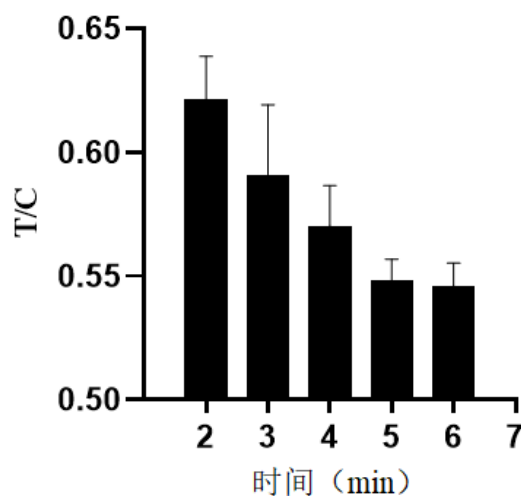


图 21 T/C 达到稳定孵育时间

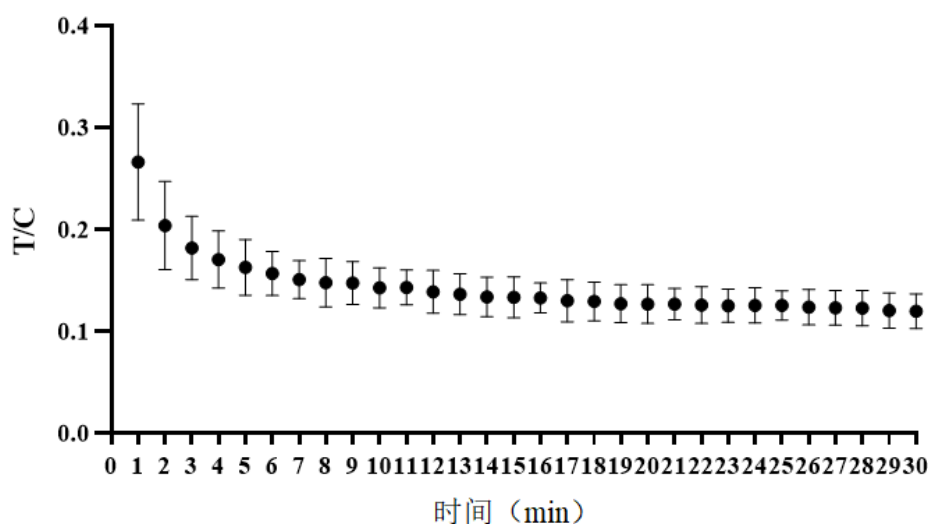


图 22 T/C 达到稳定检测时间

1.3.6.4 试纸条制备方案

综合上述优化条件，最终得到试纸条制备及检测方案如下：

将 NC 膜贴于背板，GFAP 兔多抗与羊抗鼠二抗稀释至 1mg/mL，以 1 μ L/cm 的速度利用划膜机在 NC 膜上分别作为检测线（T 线）和质控线（C 线）划膜，两线间隔 6mm，于烘箱中 37 $^{\circ}$ C 烘干。将样品垫与吸水垫按照 2mm 的重叠与 NC 膜组装，裁剪成 4mm 宽度的试纸条，放入铝箔袋中于 4 $^{\circ}$ C 密封干燥储存。

取待测样品 70 μ L 加入 2 μ L 量子点微球偶联抗体，孵育 5min 后滴入试纸条中进行荧光检测，8min 后在免疫荧光分析仪中进行读数，观察 T 线与 C 线的读数比

值 (T/C)。检测时以 C 线出现读数为检测有效, 若 C 线无读数则该检测无效。

1.3.7 试纸条评价结果

1.3.7.1 特异性评价结果

选择含不同蛋白因子样本进行检测, 结果 (图 23) 显示, 除 GFAP 外其余蛋白检测结果与阴性对照接近, GFAP 蛋白检测结果则明显高于阴性对照, 说明本试纸条针对 GFAP 蛋白拥有较好的检测特异性。

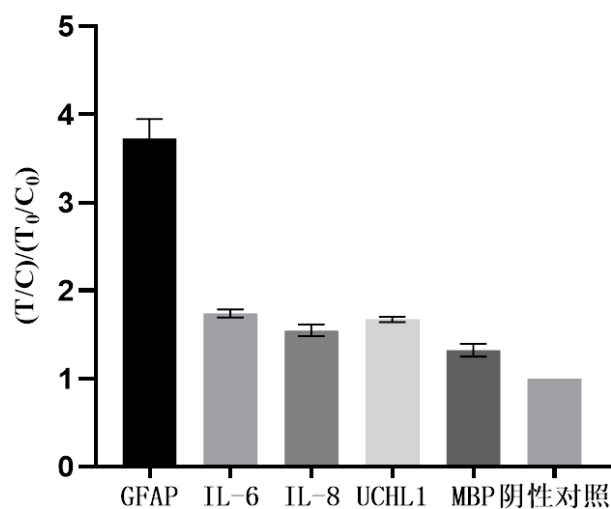


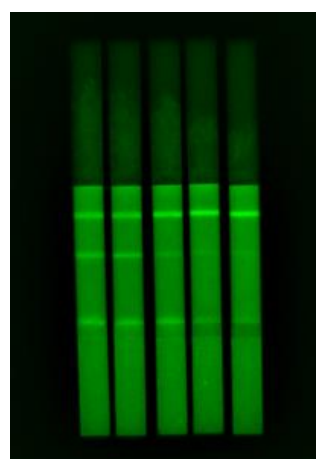
图 23 特异性评价

1.3.7.2 重复性评价结果

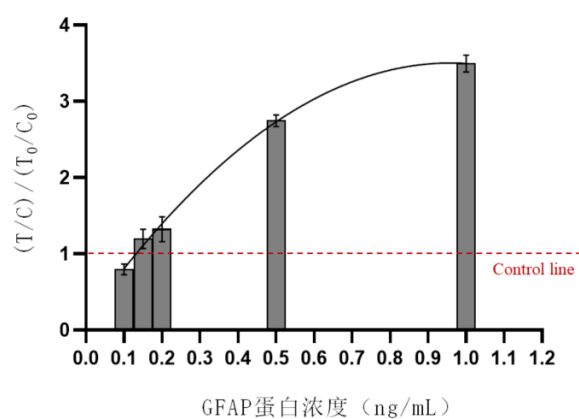
对不同浓度的 GFAP 血清进行检测后获得标准曲线, 将蛋白浓度取以 10 为底对数后得到标准曲线方程: $y=2.814\lg x+3.499$ ($R^2=0.978$)。将 0.15ng/mL 蛋白浓度所得 T/C 值与阴性对照 T/C 值进行比较, t 检验结果显示具有统计学差异 ($P=0.0223$), 0.1ng/mL 蛋白浓度时已低于本底值, 因此检出下限为 0.15ng/mL (图 24)。对 1ng/mL GFAP 血清标准品进行重复检测, CV 值为 10.7%, 表明本试纸条具有良好重复性 (图 25)。



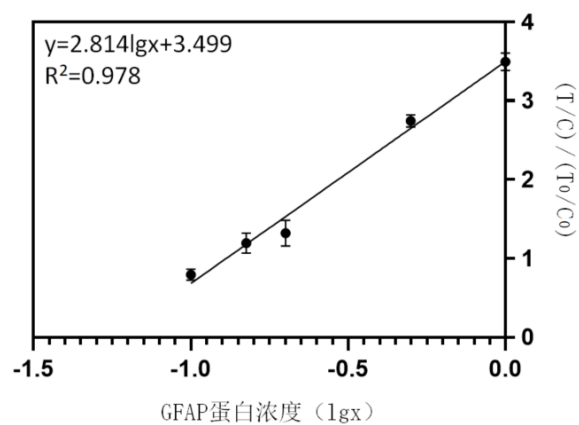
(a) 荧光分析仪



(b) 从左至右依次为 1、0.5、0.2、0.1ng/mL
GFAP 样本及阴性对照



(c) 不同浓度蛋白检测标准曲线



(d) 蛋白浓度取 lgx 后标准曲线

图 24 标准曲线建立

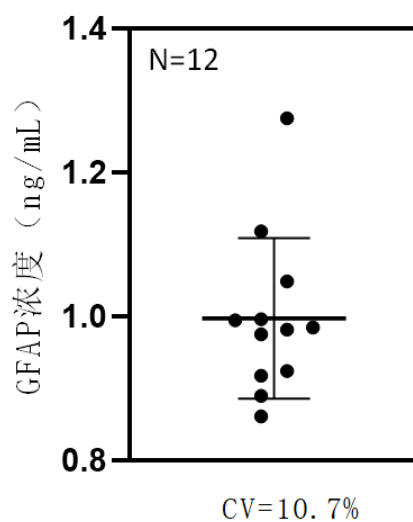
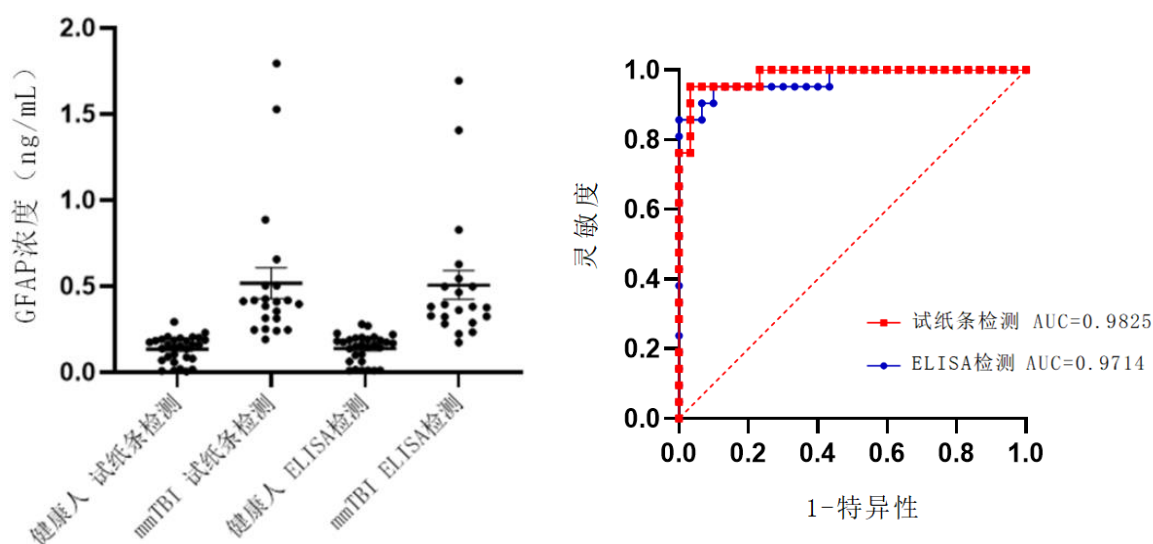


图 25 不同批次试纸条重复性验证

1.3.7.3 临床样本评价

分别采用试纸条和 ELISA 检测试剂盒对收集到的 30 例健康人血清样本和 21 例 mmTBI 患者血清样本进行检测并建立 ROC 曲线（图 26），根据约登指数分析得出当 GFAP 浓度阈值为 0.235ng/mL 时，试纸条检测约登指数最大为 0.919；当 GFAP 浓度阈值为 0.221ng/mL 时，ELISA 检测约登指数最大为 0.852。

以该浓度阈值分别得到两种检测方法的临床样本诊断结果（表 17），其中试纸条检测特异性为 96.67%（29/30），灵敏度为 95.24%（20/21）；ELISA 检测特异性为 90%（27/30），灵敏度为 95.24%（20/21），二者 ROC 曲线下面积分别为 0.9825 和 0.9714。采用 MedCalc 软件对二者的 AUC 面积进行假设检验比较(DeLong test)，得到 $P=0.5012>0.5$ ，因此认为试纸条检测效果与商品化 ELISA 试剂盒相当，但其检测时间仅为 13min，显著优于商品化 ELISA 试剂盒检测所需时间。



(a) 试纸条与 ELISA 方法 GFAP 浓度

(b) 试纸条与 ELISA 方法 ROC 曲线

图 26 试纸条与 ELISA 方法的临床样本检测

表 17 试纸条与 ELISA 方法临床样本诊断

	试纸条		ELISA	
	健康人	mmTBI 患者	健康人	mmTBI 患者
阳性	1	20	3	20
阴性	29	1	27	1
合计	30	21	30	21

根据受伤至采血时间对 mTBI 患者与健康人血清中 GFAP 浓度随时间作图，

结果（图 27）表明，GFAP 血清浓度在 mTBI 后 6~10h 会有一个显著提升，随后开始下降，因此该时间段可作为 GFAP 用于评估 mTBI 的最佳检测窗口。

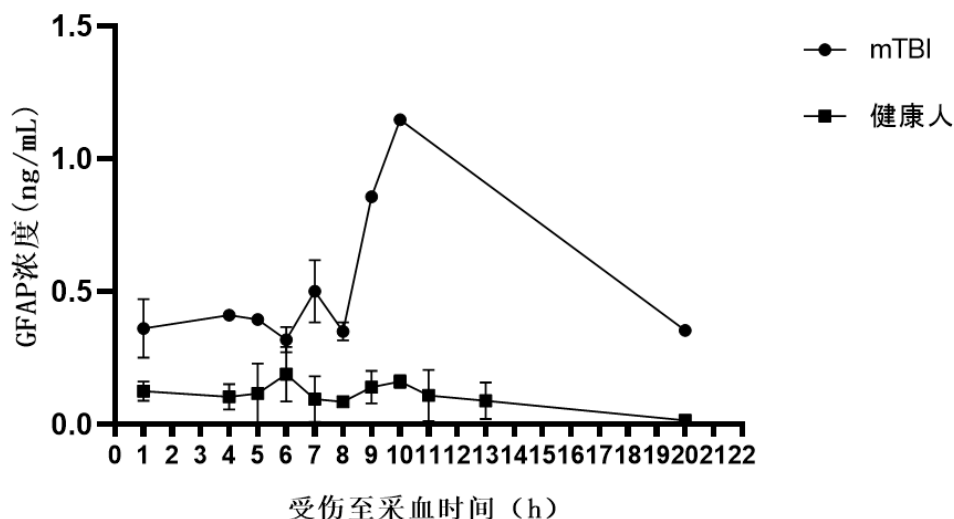


图 27 mTBI 患者 GFAP 浓度随时间变化

1.4 讨论

在大量发生的 TBI 中 90%以上为 mTBI^[58]，但是截至目前为止，临床上依然缺乏对于 mTBI 的标准化定义和精准指标^[59]。mTBI 通常病情较轻，外在表现不明显，常常容易被忽视和漏诊造成病情的延误导致后续伤害风险的增加，因此对 mTBI 的及时诊断变得至关重要。传统影像学检查往往无法精准诊断 mTBI，相比之下 GFAP 作为生物标志物能够客观反映患者的病生理状态，判断疾病的发生、发展和预后，具有较好的敏感性和特异性，可以弥补传统诊断方式的不足。

人体 GFAP 的各亚型当中，GFAP- α 在星形胶质细胞中表达最为丰富^[46]，最能够密切反应 TBI 后脑部受损情况；GFAP- δ/ϵ 具有一个新的 C 端尾域结构，与神经退行性疾病密切相关^[60]，这正是 TBI 的典型后遗症之一；GFAP- κ 则与神经细胞的生长发育相关，可能成为儿童脑内神经元的特征标志^[61]。我们通过筛选出 GFAP 各亚型保守区段进行了 GFAP 单抗制备，在最大程度上实现了血清中 GFAP 浓度的检测。通常 GFAP 会在 mmTBI 后 1h 内释放，随后持续升高，于 20h 左右达到峰值，72h 后逐渐下降并在血液中维持数月^[53]。从临床样本的检测来看，GFAP 在 TBI 后 10h 内为最佳检测窗口期。作为 mmTBI 辅助诊断标志物，GFAP 浓度在患

者中随时间变化的稳定性较强，允许在伤后 24h 内进行准确采样^[55]，受采样时间限制较小，可以在现实场景中得到较好应用。

免疫层析技术结合了抗原抗体特异性反应和色谱层析优势，操作简便，易于携带，是最常用的现场快速检测技术。量子点微球作为荧光标记物与传统胶体金相比，荧光强度更大、检测灵敏度更高、特异性更强，具有吸收光谱宽而发射光谱窄的独特优势，在多标志物的联合检测上表现出巨大的潜力。与操作步骤繁琐、耗费时间较久的 ELISA 检测相比，我们研制的试纸条操作便捷，结果可靠，仅需 13min 即可完成检测，无需借助大型分析仪器且不受场地限制，大幅提高了检测效率，可帮助官兵有效实现复杂环境下 mmTBI 的快速诊断。随着 mmTBI 生物标志物的研究进展，本试纸条以量子点免疫层析技术所建立的检测方法同样适用于其他生物标志物的检测，并且在多指标联合检测中拥有巨大潜力。

本研究同时也存在一定局限性，主要表现在临床样本数量较少，其次血清中 GFAP 浓度阈值的选择也会对诊断结果产生一定影响。下一步我们将扩大临床样本采集数量，进一步提高对于 mmTBI 诊断的精确性。

第二章 量子点标记免疫层析试纸条检测 UCHL1 方法建立

引言

泛素羧基末端水解酶 L1 (UCHL1) 也被称为神经元特异性蛋白 PGP9.5 和 Parkin5, 是一种在神经元中高度表达的蛋白, 占脑总蛋白的 1%以上^[62]。UCHL1 广泛参与了泛素蛋白酶体途径 (UPP), 它通过泛素化标记折叠异常的蛋白质, 并将其转运到蛋白酶体进行降解^[63]。UPP 是神经元去除异常蛋白的主要机制之一, 可以防止潜在毒性蛋白在神经元内的积累。如果没有持续有效的 UPP 运作, 有毒的细胞内蛋白积累可能会威胁到神经元的生存导致神经退行性疾病如帕金森病和阿尔茨海默病的发生^[64]。UCHL1 通过与神经元细胞骨架蛋白、轴突蛋白和突触蛋白的相互作用在 UPP 机制中发挥功能, 而这些功能与 TBI 引起的弥漫性轴索损伤和突触功能受损有关。研究表明, 血液和脑脊液中 UCHL1 浓度的升高与 TBI 受损程度成正相关^[65, 66], 这使得 UCHL1 作为 TBI 的生物标志物具有了临床价值。

据报道, UCHL1 在区分 mTBI 患者与非 TBI 患者中的灵敏度高达 95%^[22], 在预测 mmTBI 患者的 CT 表现方面具有很高的准确性 (AUC = 0.77, mmTBI 患者 347 例, 对照 179 例), 但是在评估所有 TBI 患者 CT 表现水平时准确度略有下降 (AUC = 0.67, TBI 患者 595 例, 对照 256 例)^[25]。以时间为因素评价 UCHL1 对 CT (+) / (-) 患者的检测结果, UCHL1 在 25h 内的总体检测准确性一般 (AUC = 0.606), 但对于 mTBI 患者, 在损伤后的第一个 8 小时内 (0~8h) 检测正确率较高 (AUC = 0.712)^[67]。

UCHL1 是一种含有 223 个氨基酸的蛋白, 其蛋白结构中半胱氨酸 90、天冬氨酸 176 和组氨酸 161 组成了活性结构域, 在所有物种中都高度保守 (图 26)。到目前为止人类基因中只鉴定出了两种 UCHL1 蛋白序列变体 I93M 和 S18Y, 其中 I93M 极为罕见, 被认为可能与帕金森疾病相关^[68]。

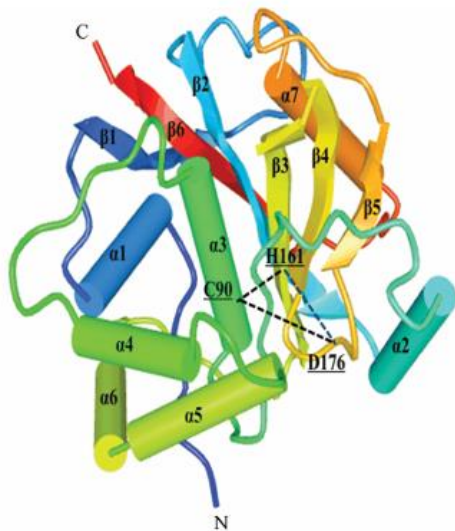


图 28 人类 UCHL1 二级结构立体图

参考 GFAP 免疫层析试纸条制备方法，我们采用量子点微球作为荧光标记物，以 EDC 和 NHS 为交联剂采用共价偶联方法将量子点微球与 UCHL1 兔单抗偶联获得荧光探针，以 UCHL1 兔多抗作为检测线（T 线）、山羊抗兔二抗作为质控线（C 线）在 NC 膜上包被划膜，将样品垫、NC 膜和吸水垫各部分组装在 PVC 底板切割成试纸条对样品进行检测。评价试纸条检测特异性和重复性，以不同浓度 UCHL1 蛋白血清建立标准曲线，用收集到的临床样本评价该试纸条对 mmTBI 的诊断效果，最终研制出基于 UCHL1 的免疫层析试纸条实现对 mmTBI 的快速诊断。

2.1 实验材料

2.1.1 质粒、细胞、动物

表 18 实验质粒、细胞与动物

材料	公司
Pet24a 质粒（含目的基因）	苏州博特龙免疫技术有限公司
BL21（DE3）感受态细胞	苏州博特龙免疫技术有限公司
小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0	苏州博特龙免疫技术有限公司
BALB/c 小鼠	邳州市东方养殖有限公司
新西兰大白兔	邳州市东方养殖有限公司

2.1.2 主要试剂及材料

表 19 实验试剂

试剂	公司
弗氏不完全佐剂	苏州博奥龙科技有限公司
山羊抗小鼠二抗 (HRP)	苏州博奥龙科技有限公司
山羊抗兔二抗 (HRP)	苏州博奥龙科技有限公司
显色液	苏州博奥龙科技有限公司
SulfoLink 蛋白质固定试剂盒	Thermo
SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒	上海碧云天生物技术有限公司
山羊抗兔二抗	北京义翘神州科技股份有限公司
UCHL1 兔单抗	MyBioSource
UCHL1 全长蛋白	苏州近岸蛋白质科技股份有限公司
牛血清白蛋白	Abcam
1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳酰二亚胺	Sigma
N-羟基琥珀酰亚胺	Sigma
量子点微球	上海昆道生物技术公司
人血清	Gemini
NC 膜	深圳市德优平科技有限公司
样品垫、吸水垫、PVC 板	上海杰一生物科技有限公司
人 UCHL1 ELISA 免疫检测试剂盒	武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司

2.1.3 主要实验仪器

表 20 实验仪器

仪器	公司
酶标仪	瑞士 TECAN 生物有限公司
SDS-PAGE 蛋白电泳仪	北京六一仪器厂
凝胶成像分析仪	北京赛智创业科技有限公司
恒温培养箱	上海精宏实验设备有限公司
冷冻离心机	Sigma
免疫荧光分析仪	广州蓝勃生物科技有限公司
划膜仪	上海捷宁生物科技有限公司
裁条机	上海捷宁生物科技有限公司
超声破碎仪	宁波新芝生物科技股份有限公司

2.2 实验方法

2.2.1 UCHL1 小鼠单克隆抗体制备

2.2.1.1 UCHL1 抗原表达

由于 UCHL1 蛋白相对分子质量较小, 氨基酸数目在 233aa 左右, 且蛋白序列高度保守, 不同活性位点同源性高达 90%, 因此选择对 UCHL1 蛋白全长进行抗原表达。根据 GenBank 库中 UCHL1 蛋白序列, 优化后表达序列如下:

MLQKPMELNPEMLNKVLSRLGVAGQWRFVDVLGLEEESLGSPAPACALL
LLFPLTAQHENFRKKQIEELKGQEVSPKVYFMKQTIGNSCGTIGLIHAVANNQDK
LGFEDGSVLKQFLSETEKMSPEDRAKCFEKNEAIQAAHDAVAQEGQCRVDDKV
NFHFILFNNVDGHLIELDGRMPFPVNHGASSEDTLKDAAKVCREFTEREQGE
VRFSVALCKAA

重组表达方案载体图谱如图 29 所示:

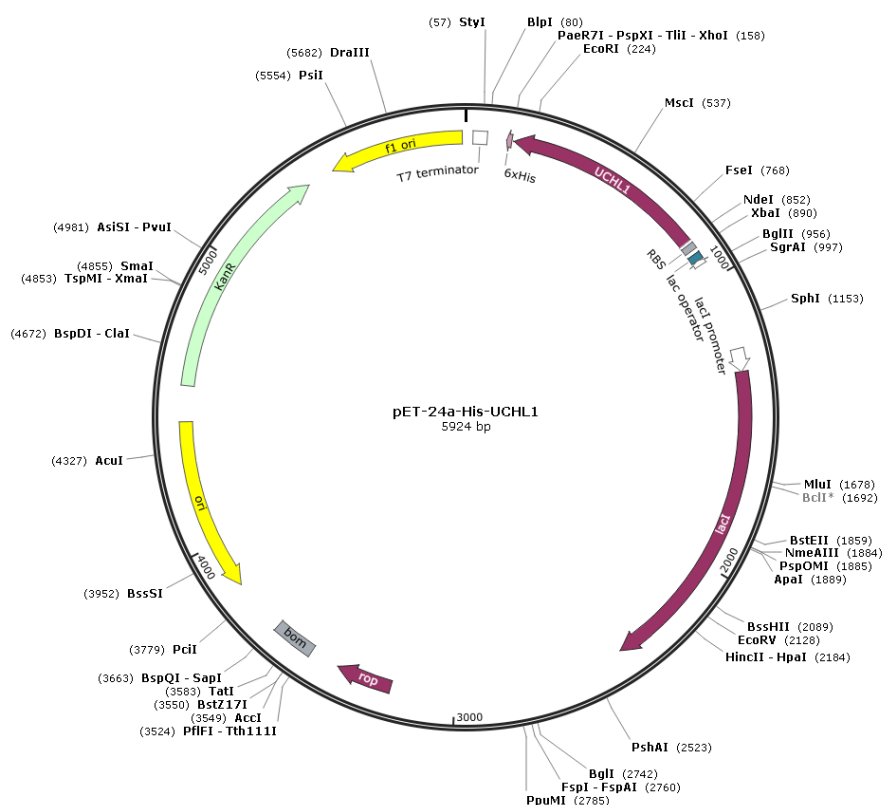


图 29 UCHL1 重组表达质粒载体图谱

质粒重组蛋白表达操作步骤同 1.2.1.1。

2.2.1.2 动物免疫

将抗原 47.2 μ L 用 PBS 2.8 μ L 补足, 按照 1:1 比例与免疫佐剂混合, 于第 0 d

通过左后肢腓肠肌注射的方法对 BALB/c 小鼠进行初次免疫，抗原注射剂量为 100 μ L/只；第 14 d 按照相同操作方法对小鼠进行加强免疫；第 22 d 对小鼠进行尾尖采血并分离血清，用 ELISA 法测定血清抗体滴度，以健康小鼠（未免疫小鼠）血清作为阴性对照，选取最佳免疫小鼠进行细胞融合。

ELISA 操作步骤同 1.2.1.2。

2.2.1.3 细胞融合

(1) 分别将 1×10^8 小鼠脾细胞和 2×10^7 骨髓瘤细胞重悬于 25mL 无血清培养基中（用 50mL 离心管），1000rpm 离心 10min，弃去上清；

(2) 轻拍管底充分打散沉淀，将离心管置于 37 $^{\circ}$ C 水浴中保温至融合开始；

(3) 将 1mL 经过 37 $^{\circ}$ C 预热的 50% PEG 1450 匀速加入上述离心管中（1min 内加完）并用移液器枪头不断搅拌 2min；

(4) 依次将 1mL 经过 37 $^{\circ}$ C 预热的培养基匀速加入上述离心管中（1min 内加完）并用移液器枪头不断搅拌；将 3mL 经过 37 $^{\circ}$ C 预热的培养基匀速加入上述离心管中（3min 内加完）并用移液器枪头不断搅拌；将 10mL 经过 37 $^{\circ}$ C 预热的培养基匀速加入上述离心管中并用移液器枪头不断搅拌，随后 37 $^{\circ}$ C 孵育 5min；

(5) 离心弃去上清，用选择性培养基重悬细胞，常规方法培养细胞，3~5d 后显微镜下观察杂交瘤细胞增殖情况。

2.2.1.4 细胞筛选

母克隆细胞株筛选：

融合后观察细胞生长状态，筛选并标记每孔中仅有单克隆细胞团生长的孔。抽取各单克隆孔细胞上清各 100 μ L，利用间接 ELISA 方法进行效价测定。

ELISA 操作步骤如下：

(1) 用包被液将抗原稀释至 1 μ g/mL，按照 100 μ L/孔加入酶标板，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

(2) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 200 μ L/孔加入封闭液，37 $^{\circ}$ C 孵育 2h；

(3) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，取含有单克隆抗体的细胞上清按照 100 μ L/孔加入酶标板，用空白培养基做阴性对照，用免疫小鼠的血清做阳性对照，37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

(4) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 HRP 标记的山羊抗小鼠二抗（1:5000 稀释），37 $^{\circ}$ C 孵育 1h；

(5) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液，室温放置 1~5min；

(6) 按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450nm 处光密度值，以实验孔/阴性对照孔大于 2.1 且数值不小于 0.2 判定为阳性。

亚克隆细胞株筛选：

挑选母克隆细胞中 ELISA 结果呈阳性的细胞株用有限稀释法做亚克隆筛选，每株母克隆细胞铺一块 96 孔板。10~14d 天后进行第一次亚克隆 ELISA 筛选，操作步骤同母克隆筛选。对筛选出的亚克隆细胞进行第二次 ELISA 筛选，操作步骤同母克隆筛选。

2.2.2 UCHL1 兔多克隆抗体制备

2.2.2.1 动物免疫

UCHL1 兔多克隆抗体制备抗原与鼠单克隆制备抗原相同。按照 1:1 的比例将抗原与弗氏不完全佐剂混合，新西兰大白兔注射剂量为 1mL/只（即抗原 500 μ L+弗氏不完全佐剂 500 μ L）。

于第 3 d 通过背部皮下多点注射对新西兰大白兔进行免疫；第 18 d 按照相同操作方式进行二次免疫；第 28 d 按照相同操作方式进行三次免疫；第 38 d 按照相同操作方式进行四次免疫；第 45 d 对大白兔进行耳中动脉采血并分离血清，以免疫前大白兔血清作为阴性对照，用 ELISA 检测血清抗体滴度。

ELISA 操作步骤如下：

- （1）用包被液将抗原稀释至 2 μ g/mL，按照 60 μ L/孔加入酶标板，4℃ 孵育过夜。
- （2）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 250 μ L/孔加入封闭液，37℃ 孵育 1h；
- （3）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，将血清用封闭液倍比稀释后按照 60 μ L/孔加入酶标板，用免疫前大白兔血清做阴性对照并设置空白对照，37℃ 孵育 2h；
- （4）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 60 μ L/孔加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗（1:5000 稀释），37℃ 孵育 1h；
- （5）1 $\times$ PBST 洗板 3 次，按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液，室温放置 5~10min；
- （6）按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应，用酶标仪测定 450nm 处光密度值，以实验孔/阴性对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定效价。

2.2.2.2 抗体亲和纯化

- （1）将纯化柱固定于铁架台上，取出蛋白质固定试剂盒中的填料，摇匀后将 2mL 填料加至纯化柱中；
- （2）流出贮存液后用 10mL 偶联液洗涤柱子去除贮存液，再用 20mL 偶联液平衡柱子；
- （3）将 3mg 抗原用偶联液溶解后加至柱料中（体积约 4mL）；
- （4）密封柱子，放置摇床缓慢孵育，室温孵育 3h；
- （5）弃去抗原流出液，用偶联液清洗填料，随后用封闭液进行封闭，放置摇

床 4℃孵育过夜。

(6) 弃去封闭液, 用 10mL 偶联液清洗柱子, 加入用 0.22 μ m 滤膜过滤后的 10mL 血清于摇床缓慢孵育, 室温 2h;

(7) 收集流穿液, 用 2 个柱体积的洗杂液洗涤柱子, 在 100 μ L 蛋白检测液中加一滴洗杂流穿液, 检测是否洗涤干净;

(8) 加入 2mL 洗脱液悬浮柱料后静置 2~4min, 使其充分作用后将抗体洗脱下来, 用事先加有中和液 (10mL 洗脱液加入 1mL 中和液) 的离心管收集, 重复 5 次共收集 10mL 洗脱液, 直至蛋白检测液检测抗体都洗脱下来。

通过以上步骤, 得到 UCHL1 兔多克隆抗体。

2.2.3 UCHL1 抗体评价

2.2.3.1 抗体特异性评价

以人血清、大鼠血清和小鼠血清对制备所得的抗体进行特异性评价。在人血清中加入 UCHL1 蛋白作为阳性对照, 同时设置无血清包被孔作为空白对照, 以制备获得的抗体作为一抗, 采用 ELISA 方法对抗体特异性进行评价。

ELISA 操作步骤如下:

(1) 用人血清将 UCHL1 蛋白浓度配置成 10 μ g/mL;

(2) 使用包被缓冲液将 UCHL1 阳性血清、人血清、大鼠血清和小鼠血清稀释 1000 倍后按照 100 μ L/孔加入酶标板, 37℃孵育 2h;

(3) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 200 μ L/孔加入封闭液, 4℃孵育过夜;

(4) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 分别用 PBS 将 GFAP 鼠单抗和 GFAP 兔多抗稀释 10000 倍后按照 100 μ L/孔加入酶标板, 37℃孵育 1h;

(5) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 100 μ L/孔分别对应加入 HRP 标记的山羊抗小鼠和山羊抗兔二抗 (1:5000 稀释), 37℃孵育 1h;

(6) 1 $\times$ PBST 洗板 3 次, 按照 100 μ L/孔加入 TMB 显色液, 室温放置 5~10min;

(7) 按照 50 μ L/孔加入终止液终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处光密度值, 以实验孔/空白对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定阳性。

2.2.3.2 抗体效价检测

采用 ELISA 方法对制备所得 UCHL1 抗体进行效价检测并与商品化抗体进行对比。

ELISA 操作步骤如下:

(1) 使用包被缓冲液将 UCHL1 蛋白浓度配置成 25ng/mL, 按照 100 μ L/孔加入酶标板, 37℃孵育 2h;

(2) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 200μL/孔加入封闭液, 4℃孵育过夜;

(3) 1×PBST 洗板 3 次, 分别用 PBS 将 UCHL1 抗体和商品化抗体倍比稀释后按照 100μL/孔加入酶标板, 37℃孵育 1h;

(5) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 100μL/孔加入对用 HRP 标记的二抗 (1:5000 稀释), 37℃孵育 1h;

(6) 1×PBST 洗板 3 次, 按照 100μL/孔加入 TMB 显色液, 室温放置 5~10min;

(7) 按照 50μL/孔加入终止液终止反应, 用酶标仪测定 450nm 处光密度值, 以实验孔/阴性对照孔大于 2.5 且数值不小于 0.2 判定效价。

2.2.4 UCHL1 抗体对匹配

选购常见的商品化 UCHL1 抗体 (表 21) 结合制备得到的 UCHL1 兔多抗, 参考第一章中荧光探针制备方案, 直接在试纸条上进行抗体对匹配筛选。将单抗与量子点微球相偶联, 以多抗为检测线 (T 线), 对应二抗为质控线 (C 线) 在试纸条上划膜。配置浓度为 1ng/mL 的 UCHL1 阳性样本进行检测, 比较阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$, 筛选出比值最大的匹配抗体对。每组实验平行重复三次, 每次读数连续读取三遍取平均值, 以下实验相同。

表 21 UCHL1 抗体筛选

类别	品牌	货号
UCHL1 兔单抗	华安生物	ET1702-83
UCHL1 兔单抗	义翘神州	11663-R104
UCHL1 兔单抗	MybioSource	MBS8105587
UCHL1 山羊多抗	Thermo	PA5-19350

2.2.5 荧光探针制备

参考第一章中荧光探针制备方案, 对 UCHL1 抗体偶联条件进行优化。

2.2.5.1 偶联缓冲液 pH 优化

配置 pH 分别为 6.0、7.0 和 8.0 的 PBS 缓冲液作为抗体偶联缓冲液, 取 10μL 量子点微球标记相同质量抗体, 在试纸条上等量上样观察 C 线荧光强度, 选择 C 线荧光强度最大时的 pH 值作为抗体偶联条件。

2.2.5.2 抗体偶联比例优化

取 10μL 量子点微球, 分别偶联 8、9、10、11 和 12μg 抗体, 在试纸条上等量上样观察 C 线荧光强度, 选择 C 线荧光强度最大时偶联抗的体质量为抗体最佳偶联比例。

2.2.6 免疫层析试纸条制备

参考第一章中免疫层析试纸条制备方案，制备 UCHL1 检测试纸条。

2.2.6.1 试纸条划膜浓度及探针用量优化

根据前期实验结果，按照表 22 所示对兔抗划膜浓度（T 线）、二抗划膜浓度（C 线）及荧光探针用量三个因素分别设置三个水平的正交实验，选择最佳因素水平作为试纸条优化参数。用人血清配置 1ng/mL UCHL1 蛋白作为阳性样本，设置阴性对照组，检测阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ 作为实验结果，通过 SPSSAU 统计网站对正交实验结果进行极差分析，筛选出最优因素水平作为最佳划膜比例及探针用量。

表 22 试纸条划膜浓度及探针用量

因素	兔抗浓度（mg/mL）	二抗浓度（mg/mL）	探针用量（ μ L）
水平 1	0.64	0.5	2.5
水平 2	0.96	0.75	3
水平 3	1.28	1	3.5

2.2.6.2 试纸条检测时间确定

按照优化后条件，用人血清配置 1ng/mL UCHL1 蛋白作为阳性样本，在 70 μ L 阳性样本中加入荧光探针分别孵育 2~6min，观察 T/C 比值，选择比值达到稳定的最短时间为孵育所需时间；在 70 μ L 阴性样本中加入荧光探针，于 2~25min 内间隔 1min 进行一次测量观察 T/C 比值，选择比值达到稳定的最短时间为试纸条检测所需时间。试纸条检测时间为二者的总耗时。

2.2.7 试纸条评价

2.2.7.1 特异性评价

选择 TBI 后同样在血清中水平上升的白细胞介素-6（IL-6）、白细胞介素-8（IL-8）、胶质纤维酸性蛋白（GFAP）和髓鞘碱性蛋白（MBP）4 种蛋白因子，按照 1ng/mL 蛋白浓度配置成待测样本于试纸条上进行检测，观察与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ 。

2.2.7.2 重复性评价

用人血清分别配置浓度为 0.1ng/mL、0.2ng/mL、0.5ng/mL、0.8ng/mL 和 1ng/mL 的 UCHL1 阳性样本，设置阴性对照，在荧光检测仪中进行检测，计算阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ 并建立标准曲线，利用 t 检验确定检出下限。实验重复平行 5 次，每次读数连续读取 3 遍取平均值。

抽取制备的 3 个不同批次试纸条，每个批次试纸条用阴性血清进行本底调零（既确定 T_0/C_0 ）后，利用标准曲线对 1ng/mL UCHL1 蛋白样本进行重复性验证，计算 CV 值。每个批次平行检测 4 次，共检测 12 次。

2.2.7.3 临床样本评价

分别采用试纸条和人 UCHL1 ELISA 检测试剂盒对收集到的 30 例健康人血清样本与 29 例 mmTBI 患者血清样本进行检测。临床样本由重庆第二大学附属医院提供，血清采集后立刻-80℃冻存，于 3 个月内进行检测，检测时仅冻融 1 次。其中 mmTBI 患者的入组标准及病人信息登记表与 1.2.7.3 相同。

通过 ROC 曲线作图和约登指数分析得到对应的 UCHL1 浓度检测阈值。比较两种不同诊断方法的灵敏度、特异度、ROC 曲线下面积等指标对试纸条检测效果进行评价。

观察轻度 TBI 患者血清中 UCHL1 浓度水平随时间的变化，确定 UCHL1 最佳检测时间。

2.3 实验结果

2.3.1 UCHL1 小鼠单克隆抗体制备结果

2.3.1.1 UCHL1 抗原表达

对重组质粒诱导蛋白表达后进行验证，SDS-PAGE 凝胶电泳分析结果（图 30）显示，蛋白在上清液和沉淀中均有表达。将表达蛋白进行纯化后用 SDS-PAGE 凝胶电泳对蛋白纯度进行验证，结果（图 31）显示，蛋白纯化效果良好，蛋白纯度>90%。

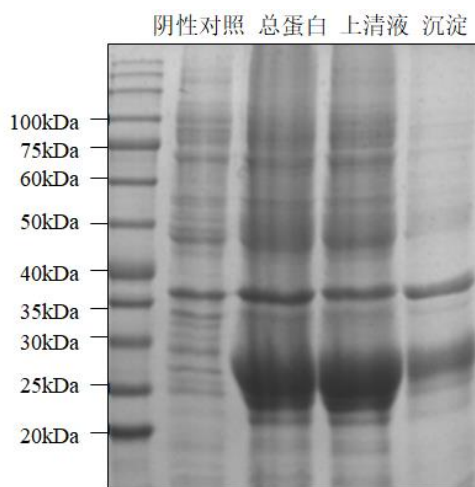


图 30 UCHL1 抗原表达

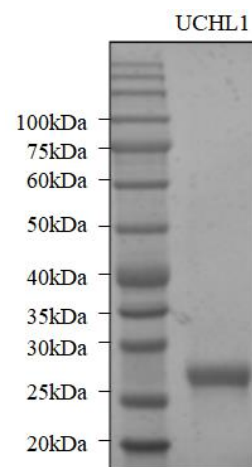


图 31 UCHL1 抗原纯化

2.3.1.2 动物免疫

用 UCHL1 抗原免疫小鼠, 结果(表 23)显示, 1 号小鼠血清抗体滴度在 5×10^3 , 2 号小鼠血清抗体滴度在 1.6×10^5 , 3 号小鼠血清抗体滴度在 8×10^4 , 4 号小鼠血清抗体滴度在 2×10^4 , 5 号小鼠血清抗体滴度在 5×10^3 , 其中 2 号小鼠血清抗体滴度最高, 选择进行细胞融合。

表 23 小鼠血清抗体滴度测定

	625	1. 25K	2. 5K	5K	10K	20K	40K	80K	160K	320K	640K	1280K
小鼠 1	1.671	1.16	0.762	0.325	0.145	0.068	0.12	0.055	0.032	0.023	0.023	0.018
小鼠 2	2.766	2.379	2.026	1.847	1.319	0.791	0.498	0.427	0.236	0.153	0.115	0.065
小鼠 3	2.559	2.429	2.063	2.073	1.414	0.729	0.413	0.244	0.166	0.104	0.094	0.044
小鼠 4	2.425	2.068	1.682	1.058	0.555	0.269	0.153	0.09	0.065	0.042	0.039	0.028
小鼠 5	2.163	1.189	0.516	0.278	0.123	0.057	0.039	0.032	0.019	0.015	0.018	0.019

注: 1K 即稀释倍数为 1×10^3 倍, 其余一致。

2.3.1.3 细胞筛选

将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞融合后利用 ELISA 法进行细胞筛选, 经过一次母克隆细胞筛选(表 24)与两次亚克隆细胞筛选后(表 25)得到 UCHL1 单克隆抗体细胞株 10B6F1, 使用 protein A 亲和层析柱进行抗体纯化, 最终得到 UCHL1 鼠单抗。

表 24 UCHL1 抗体母克隆筛选结果

克隆号	OD 值
1A11	2.8143
2H4	2.7249
3A6	3.8283
4A4	3.0098
5F10	2.3266
6H7	2.6386
7E 9	2.4901
8H12	2.5451
9H5	1.6593
10B6	2.4102

表 25 UCHL1 抗体亚克隆筛选结果

克隆号	第一次亚克隆筛选 OD 值	第二次亚克隆筛选 OD 值
2H4B7	1.1720	0.8635
2H4G9	1.8273	0.2110
3A6B6	2.2385	1.8849
3A6D3	1.9031	0.4592
4A4C9	2.1102	1.1298
4A4D7	1.7813	1.2028
10B6E7	2.2439	0.0751
10B6F1	1.1881	1.9741

2.3.2 UCHL1 兔多克隆抗体制备结果

用 UCHL1 抗原对新西兰大白兔进行免疫，用 ELISA 法检测兔血清抗体滴度。结果（表 26）显示，1 号、2 号兔子血清抗体滴度均在 5.12×10^5 ，且相差不大。对该兔血清进行抗体亲和纯化，最终得到 UCHL1 兔多抗。

表 26 兔血清抗体滴度测定

序号	空白	500	1K	2K	4K	8K	16K	32K	64K	128K	256K	512K	1024K
免疫前兔 1	0.037	0.409	0.193	0.376	0.188	0.137	0.175	0.093	0.093	0.039	0.032	0.032	0.042
免疫后兔 1	0.047	2.318	2.172	2.208	2.206	1.928	2.117	1.916	1.658	1.421	0.935	0.583	0.032
免疫前兔 2	0.029	0.430	0.403	0.471	0.198	0.159	0.142	0.083	0.052	0.057	0.045	0.033	0.036
免疫后兔 2	0.053	2.435	2.163	2.161	1.942	1.877	1.654	1.287	1.126	0.986	0.735	0.568	0.064

注：1K 即稀释倍数为 1×10^3 倍，其余一致。

2.3.3 UCHL1 抗体评价结果

2.3.3.1 抗体特异性评价

以人血清、大鼠血清和小鼠血清包被酶标板采用 ELISA 法对 UCHL1 抗体特异性进行评价，设置 3 组复孔。结果（图 32）显示，UCHL1 鼠单抗特异性不佳，在阳性样本中 OD 值偏小，在杂蛋白血清中 OD 值偏大；UCHL1 兔多抗在血清中具有较好特异性。

对 UCHL1 鼠单抗进行 SDS-PAGE 凝胶电泳分析，发现该抗体无法与 UCHL1 蛋白特异性结合，因此后续实验仅使用 UCHL1 兔多抗进行。

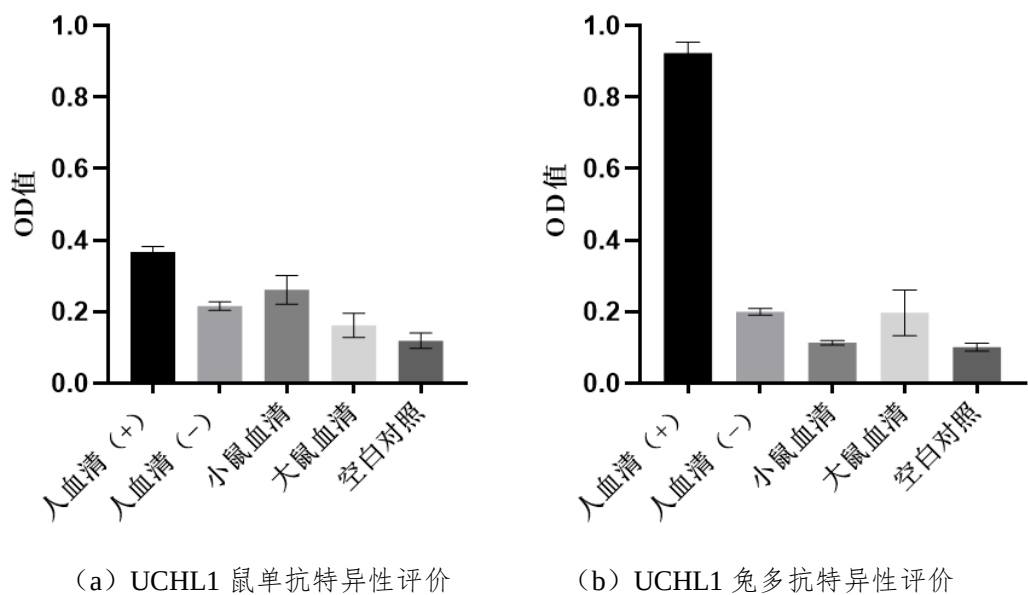


图 32 UCHL1 抗体特异性评价

2.3.3.2 抗体效价检测

采用 ELISA 法对 UCHL1 兔多抗进行效价检测并于商品化抗体对比。结果（表 27）显示，制备 UCHL1 兔多抗与商品化 UCHL1 兔多抗效价均在 1×10^5 ，二者效价相当。

表 27 UCHL1 兔多抗效价检测

	空白	1×10^3	1×10^4	1×10^5
制备 UCHL1 兔多抗	0.0897	3.1770	0.9585	0.2369
商品化 UCHL1 兔多抗	0.0826	3.9994	1.2997	0.2624

2.3.4 UCHL1 匹配抗体对确定

将量子点微球与抗体相偶联，在试纸条上进行检测。比较相同条件下偶联不同抗体后 C 线荧光强度，结果（图 33）显示，MyBioSource 牌子的抗体偶联效果最佳；比较阳性样本与阴性样本 T/C 的值及其比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ ，结果（图 34）显示，MyBioSource 牌子兔单抗与制备的兔多抗匹配效果最佳，后续实验选择该匹配抗体对进行。

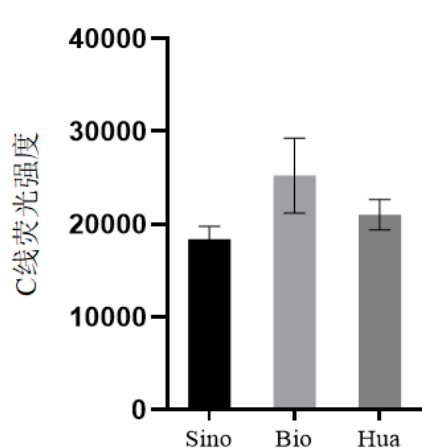


图 33 不同抗体 C 线荧光强度

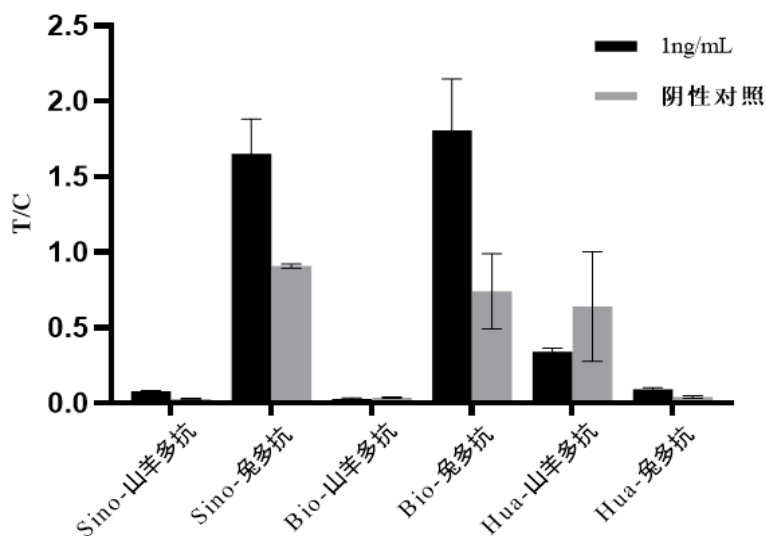


图 34 不同抗体对检测结果

注：Sino 为义翘神州品牌抗体；Bio 为 MyBioSource 品牌抗体；Hua 为华安生物品牌抗体

2.3.5 荧光探针制备方案确定

2.3.5.1 偶联缓冲液 pH 确定

比较不同偶联 pH 条件下 C 线荧光强度，发现当 pH 值为 8.0 时 C 线荧光强度最大（图 35），此时量子点微球偶联抗体效果最佳。

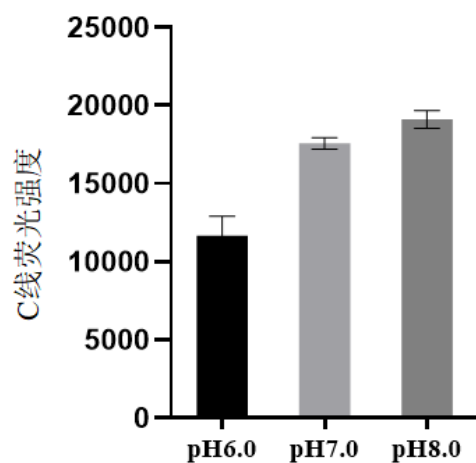


图 35 不同 pH 下 C 线荧光强度

2.3.5.2 抗体偶联比例确定

比较偶联不同质量抗体时的 C 线荧光强度，结果（图 36）显示，当偶联抗体质量为 10 μ g 时 C 线读数最大，为最佳抗体偶联比例。

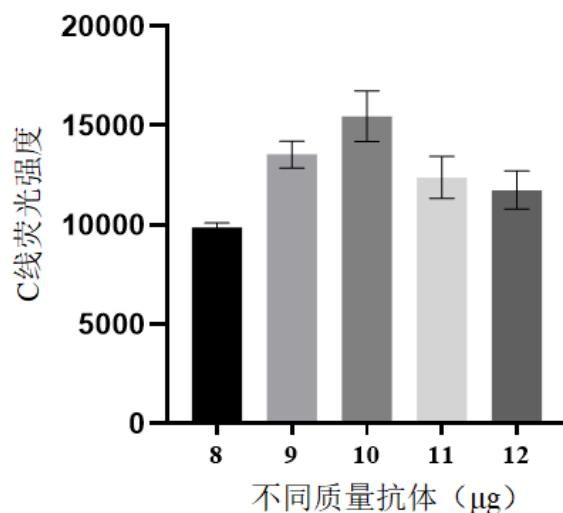


图 36 偶联不同质量抗体 C 线荧光强度

2.3.5.3 荧光探针制备方案

综合上述优化条件，最终得到 UCHL1 荧光探针制备方案如下：

取 10μL 量子点微球，加入 40μL MES (0.1M, pH6.0) 溶液中混匀，随后加入 1.2mg EDC 和 0.4mg NHS 在 37℃水浴条件下孵育 30min 进行量子点微球的激活。以 12000rpm 转速离心 10min 弃去上清液，加入 80μL PBS 缓冲液 (0.01M, pH8.0) 在 25W 条件下超声 1min (超声 5s, 间歇 5s) 洗涤，重复洗涤 2 次。

取 10μg UCHL1 兔单抗加入 60μL PBS 缓冲液中混匀后加入清洗完成的量子点中，37℃水浴孵育 2.5h。用 PBS 缓冲液配置 3%BSA 封闭液，取 35μL 加入孵育完成后的偶联溶液中 (封闭液终浓度为 1%)，37℃水浴条件下继续孵育 30min。以 12000rpm 转速离心 10min，获得量子点微球偶联抗体，于 200μL PBS 溶液中重悬 (0.01M, pH7.4, 含 1%BSA)，储存于 4℃备用。

2.3.6 免疫层析试纸条制备方案确定

2.3.6.1 探针用量及划膜浓度确定

根据兔抗浓度、二抗浓度及荧光探针用量，设计三因素三水平的正交实验表 (表 28)，检测阳性样本与阴性样本 T/C 的比值 $[(T/C)/(T_0/C_0)]$ (表 29)，每组实验平行重复三次取平均值作为实验结果，在 SPSSAU 上进行正交实验极差分析，分析结果 (表 30) 显示，当兔抗浓度选择水平 2，二抗浓度选择水平 1，探针用量选择水平 2 时检测效果最佳，即兔抗浓度为 0.96mg/mL，二抗浓度为 0.5mg/mL，探针用量为 3μL 时为试纸条最佳划膜浓度和探针用量。

表 28 $L_9(3^3)$ 正交实验因素水平表

因素	兔抗浓度 (mg/mL)	二抗浓度 (mg/mL)	探针用量 (μ L)
水平 1	0.64	0.5	2.5
水平 2	0.96	0.75	3
水平 3	1.28	1	3.5

表 29 $L_9(3^3)$ 正交实验结果表

实验编号	兔抗浓度 (mg/mL)	二抗浓度 (mg/mL)	探针用量 (μ L)	(T/C)/(T ₀ /C ₀)
1	1	1	1	1.1669
2	1	2	3	1.1815
3	1	3	2	1.8257
4	2	1	3	1.8671
5	2	2	2	1.2040
6	2	3	1	1.4465
7	3	1	2	1.6626
8	3	2	1	1.2771
9	3	3	3	1.1778

表 30 $L_9(3^3)$ 正交实验极差分析表

项	水平	兔抗浓度(mg/mL)	二抗浓度(mg/mL)	探针用量 (μ L)
K 值	1	4.17	4.7	3.89
	2	4.52	3.66	4.69
	3	4.12	4.45	4.23
K avg 值	1	1.39	1.57	1.3
	2	1.51	1.22	1.56
	3	1.37	1.48	1.41
最佳水平		2	1	2
R		0.13	0.34	0.27
水平数量		3	3	3
每水平重复数 r		3	3	3

注：表格中 K 值为某因素某水平时试验数据求和，K avg 值为对应的平均值；最佳水平指某因子时最佳 K avg 值对应的水平编号；R 指因素的极差值，该值等于某因素时，K avg 最大值 减去 K avg 最小值，可结合因素极差值对比各因素的优劣；水平数量指某因素的水平数，每水平重复数 r 指水平的平均试验重复次数。

2.3.6.2 试纸条检测时间确定

结果显示，在阳性样本中加入荧光探针孵育，6min 后 T/C 比值达到稳定（图 37）；在阴性样本中加入荧光探针进行检测，9min 后 T/C 比值基本保持不变（图 38）。选择该孵育时间与检测时间作为样本检测条件，检测总耗时为 15min。

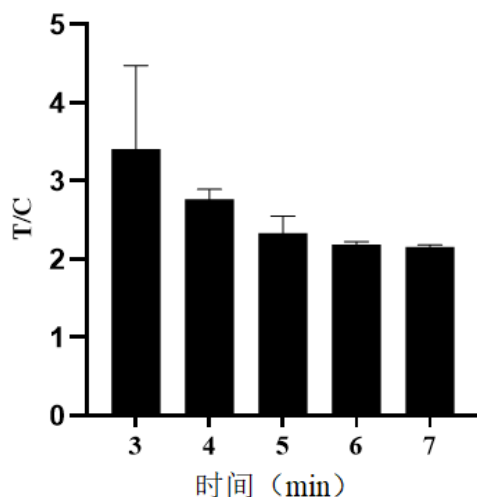


图 37 T/C 稳定孵育时间

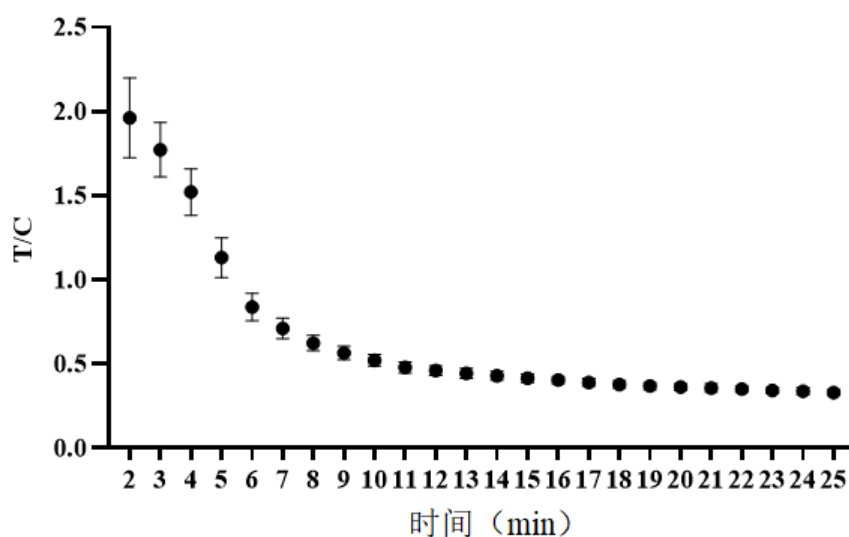


图 38 T/C 稳定检测时间

2.3.6.3 UCHL1 检测试纸条制备方案

综合上述优化条件，最终得到试纸条制备及检测方案如下：

将 NC 膜贴于背板，将 0.64mg/mL UCHL1 兔多抗以 1.5 μ L/cm 的速度在 NC 膜上划膜作为检测线（T 线），将山羊抗兔二抗稀释至 0.5mg/mL 以 1 μ L/cm 的速度在 NC 膜上划膜作为质控线（C 线），两线间隔 6mm，于烘箱中 37 $^{\circ}$ C 烘干。将样品垫

与吸水垫按照 2mm 的重叠与 NC 膜组装，裁剪成 4mm 宽度的试纸条，放入铝箔袋中于 4℃密封干燥储存。

取待测样品 70μL 加入 3μL 量子点微球偶联抗体，孵育 5min 后滴入试纸条中进行荧光检测，9min 后在免疫荧光分析仪中进行读数，观察 T 线与 C 线的读数比值 (T/C)。检测时以 C 线出现读数为检测有效，若 C 线无读数则该检测无效。

2.3.7 试纸条评价结果

2.3.7.1 特异性评价

分别用试纸条对 IL-6、IL-8、GFAP 和 MBP 四种蛋白因子样本进行检测，结果 (图 39) 显示，除 UCHL1 外其余蛋白检测结果与阴性对照结果接近，UCHL1 蛋白检测结果则明显高于对照结果，说明本试纸条针对 UCHL1 蛋白拥有较好的检测特异性。

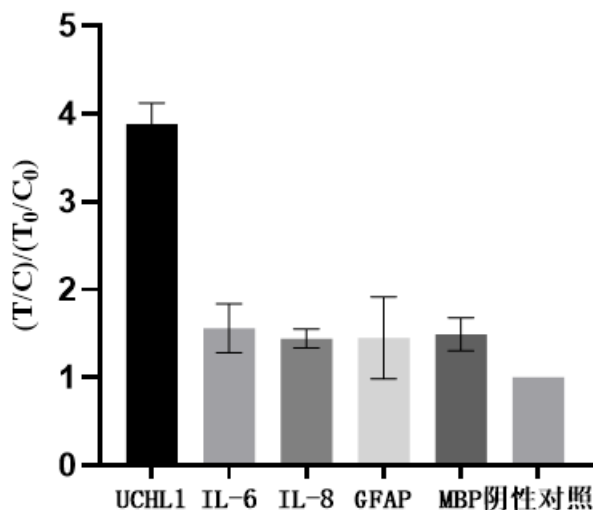


图 39 试纸条特异性评价

2.3.7.2 重复性评价

对 0.1~1ng/mL 不同浓度的 UCHL1 样本进行 5 次重复检测，可达到 0.2ng/mL 的检出下限。*t* 检验证明：UCHL1 浓度为 0.2ng/mL 时 5 次 T/C 比值与阴性对照之间 *P* 值小于 0.05，有统计学差异 (*P*=0.0488)；而 UCHL1 浓度为 0.1ng/mL 时 5 次 T/C 比值与阴性对照的 *P* 值大于 0.05，无统计学差异 (*P*=0.3502)。将阳性样本 T/C 比值与阴性对照相比后计算[(T/C)/(T₀/C₀)]，得到关于蛋白浓度的线性回归方程： $y=3.361x+0.4926$ ($R^2=0.9743$) (图 40)。随机抽取取三批次共 12 张试纸条对 1ng/mL UCHL1 血清样本进行重复检测，CV 值为 9.58%，表明本试纸条具有较好重复性 (图 41)。

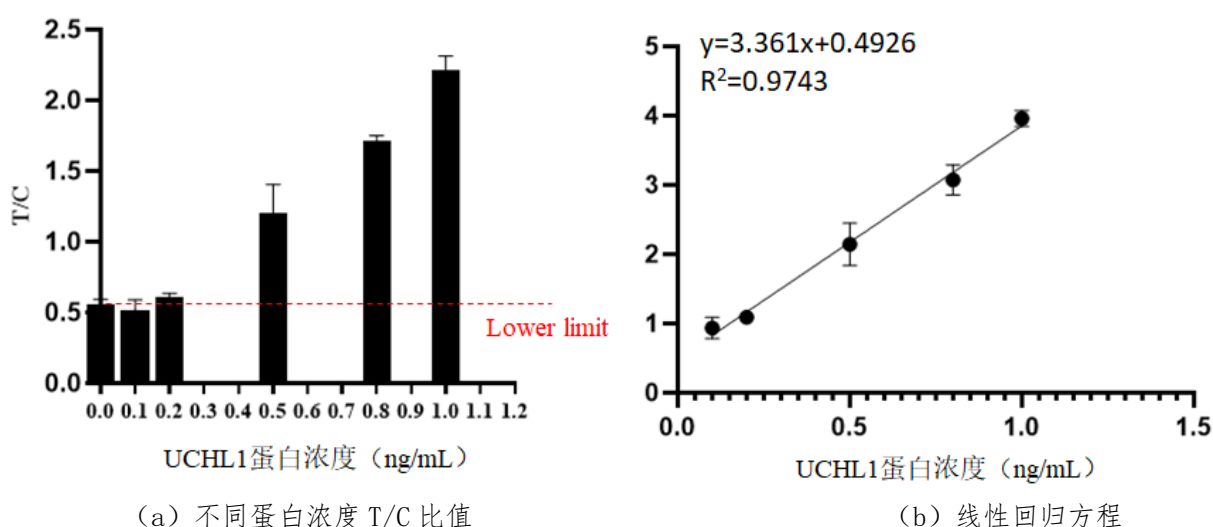


图 40 标准曲线建立

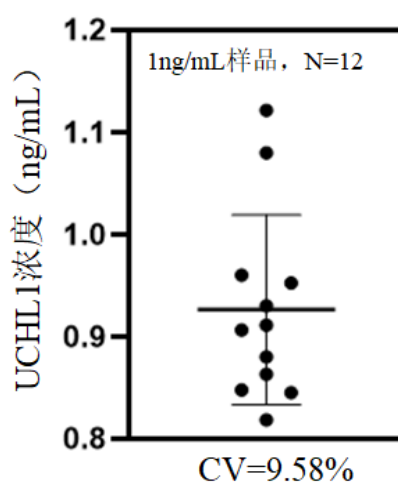


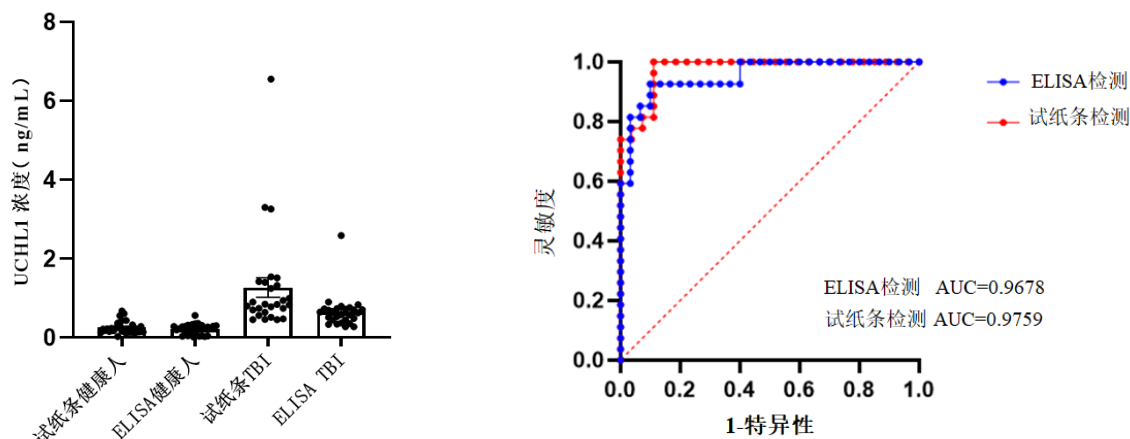
图 41 不同试纸条重复性验证

2.3.7.3 临床样本评价

分别采用试纸条和 ELISA 检测试剂盒对收集到的 30 例健康人血清样本和 29 例 mmTBI 患者血清样本进行检测并建立 ROC 曲线 (图 42), 根据约登指数分析得出当 UCHL1 浓度阈值为 0.446ng/mL 时, 试纸条检测约登指数最大为 0.9; 当 UCHL1 浓度阈值为 0.337ng/mL 时, ELISA 检测约登指数最大为 0.8259。

以该浓度阈值分别得到两种检测方法的临床样本诊断结果 (表 31), 其中试纸条检测特异性为 90% (27/30), 灵敏度为 100% (29/29); ELISA 检测特异性为 90% (27/30), 灵敏度为 96.55% (28/29), 二者 ROC 曲线下面积分别为 0.9759 和 0.9678。采用 MedCalc 软件对二者的 AUC 面积进行假设检验比较 (DeLong test), 得到

$P=0.7658>0.05$ ，因此认为试纸条检测效果与商品化 ELISA 试剂盒相当，但其检测时间仅为 15min，显著优于商品化 ELISA 试剂盒检测所需时间。



(a) 试纸条与 ELISA 法 UCHL1 浓度检测结果

(b) 试纸条与 ELISA 法 ROC 曲线

图 42 试纸条与 ELISA 法临床样本检测

表 31 试纸条与 ELISA 方法临床样本诊断

	试纸条		ELISA	
	健康人	mmTBI 患者	健康人	mmTBI 患者
阳性	3	29	3	28
阴性	27	0	27	1
合计	30	29	30	29

根据受伤至采血时间对 mTBI 患者与健康人血清 UCHL1 浓度进行对比作图，结果（图 43）表明，UCHL1 血清浓度在 TBI 后 4~8h 会有一个显著提升，该时间段可作为 UCHL1 用于评估 TBI 的最佳检测窗口。

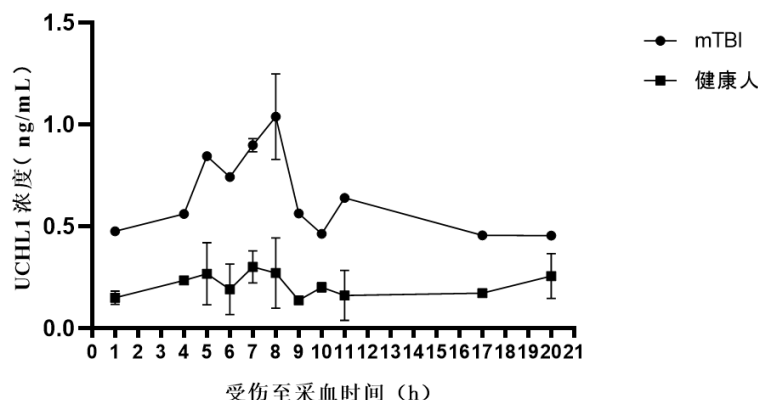


图 43 mTBI 患者 UCHL1 浓度随时间变化

2.4 讨论

据报道, UCHL1 属于 TBI 急性期标志物, 其在患者遭受 TBI 后迅速上升, 8 h 后达到峰值, 并在 48 h 内迅速下降, 这一特点使 UCHL1 具有了 TBI 早期预测价值^[53]。从我们的实验结果来看, UCHL1 在 TBI 后 4~8h 显著提升, 可以成为最佳检测窗口期, 与 UCHL1 的血清浓度变化特点相符合。

除了对 TBI 的分级诊断外, UCHL1 还可预测 TBI 后 6 个月内的不良反应 (AUC=0.74), 是检测结构性脑损伤的重要独立因素^[69], 但其预测效果在 GCS 评分 3-12 分的患者中效果优于 GCS 评分大于 12 分的患者, 这提示临床使用 UCHL1 判断 mTBI 患者仍需结合头颅 CT 等其他指标才能准确判断。另外, UCHL1 血清浓度还可以从非颅内来源增加, 如骨科疾病等^[70], 血清 UCHL1 水平无法对 CT 阴性的 mTBI 患者和骨科创伤人员进行区分。因此在以 UCHL1 进行检测判断时, 还需结合患者的临床病史排除干扰。

与 ELISA 检测试剂盒相比, 我们研制的试纸条操作便捷、结果可靠, 仅需 70 μ L 血清样本即可在 15min 完成检测, 大幅提高检测效率, 不受仪器与场地的限制。本试纸条所建立的基于量子点标记的免疫层析技术可以广泛适用于对各类血清分子标志物的检测, 其用途也随着分子标志物的改变而不断拓展。此外, 基于量子点独特的光学性质, 以该技术制备的试纸条还可用于多指标联合检测, 为 mmTBI 的精准诊断提供新的方法学依据。

第三章 基于代谢组学的轻度颅脑损伤潜在标志物筛选

引 言

轻中度颅脑损伤（mild to moderate traumatic brain injury, mmTBI）发生率的居高不下一直是一个全球性的公共卫生难点。尽管 mmTBI 日益受到公众关注，临床上依然缺乏对于 mmTBI，尤其是轻度 TBI（mild TBI, mTBI）的标准化定义和精准分级指标^[59]，以影像学检查作为 mTBI 的诊断依据时也有约 29%患者出现 CT 诊断结果假阴性^[71]。相比之下，生物标志物作为一类可被客观测量与评价的指标，它的出现或浓度改变能够真实反映患者的病生理状态，有效判断疾病的发生、发展和预后，可以弥补传统诊断方式的不足。因此，开发一套能够反映 mTBI 潜在病生理特点的生物标志物将极大有助于 mTBI 的临床诊断和预后评估，并且对 mTBI 靶向药物研究和疾病管理也具有重大意义。

近年来，用于辅助诊断及评估 TBI 严重程度的血清标志物成为研究热点，如星形胶质细胞中的 S100 钙结合蛋白 B(S100B)和神经胶质纤维酸性蛋白(GFAP)；神经元中的神经元特异性烯醇化酶（NSE）和泛素羧基末端水解酶（UCHL1）；轴突损伤相关的 Tau 蛋白、神经丝轻链蛋白（NFL）和髓鞘碱性蛋白（MBP）等，关于他们的优缺点^[15, 19, 72-77]见表 32。大量研究表明这些血清标志物可以对 TBI 进行辅助诊断和预后评估，但作为独立检测因子尚且存在不足，并未能实际应用于临床^[78]。因此如何筛选更好的检测标志物并联合现有诊断决策提高对于 mTBI 的精准诊断仍然存在挑战。

表 32 TBI 血清标志物优缺点

蛋白标志物	颅脑中表达部位	优点	缺点
S100B	星形胶质细胞	急性 TBI 时显著升高，与格拉斯哥预后评分显著负相关	易受患者年龄影响，特异性较低
GFAP	星形胶质细胞	可区分轻度 TBI 中 CT 检查异常患者	特异性差，其他脑部疾病也可导致升高
NSE	神经元	与 TBI 严重程度显著相关，与格拉斯哥昏迷评分负相关	对轻度 TBI 不敏感

续表 32 TBI 血清标志物优缺点

蛋白标志物	颅脑中表达部位	优点	缺点
UCHL1	神经元	特异性较高, 与 TBI 严重程度正相关	半衰期短, 受采样时间影响
Tau	神经元细胞核	P-Tau/T-Tau 比值与 CT 表现显著相关	仅可预测重度 TBI, 与轻度 TBI 无显著相关性
NFL	神经元轴突	对轻度 TBI 轴突损伤敏感	需脑脊液采集, 特异性较差
MBP	神经元轴突	可预测儿童 TBI 的预后	非中枢神经特有蛋白, 特异性差

注: S100B: S100 钙结合蛋白 B; GFAP: 神经胶质纤维酸性蛋白; NSE: 神经元特异性烯醇化酶; UCHL1: 泛素 C 末端水解酶; P-Tau: 磷酸化 Tau 蛋白; T-Tau: 总 Tau 蛋白; NFL: 神经丝轻链蛋白; MBP: 髓鞘碱性蛋白。

代谢组学是 20 世纪 90 年代末期发展起来的一门新兴学科, 是研究关于生命体被扰动后 (如外界刺激、病理生理变化、基因突变等) 引起的代谢产物 (内源性代谢物) 种类、数量及其变化规律的科学。通过代谢组学技术分析实验组与对照组的代谢水平差异, 找出差异代谢物, 有助于生物标志物的筛选, 可以揭示其参与的生命活动机制, 完成调控通路等方面的研究。

从检测方式上, 代谢组学可以分为非靶向分析和靶向分析两类。非靶向分析模式通常建立在高分辨质谱仪上, 依赖其强大的高分辨率质量分析仪器, 能够对样本中的各类代谢物进行无偏向、大规模、系统性的检测, 最大程度反映生物体内的代谢水平扰动情况, 适合项目前期的基础研究; 靶向分析模式通常建立在单位质量分辨率高的质谱仪上, 依赖于串联质谱的高选择能力及高灵敏度, 使用针对性开发的样品制备及色谱分离方法, 有目的地对代谢物进行特异性检测, 适用于特定关注的代谢物检测分析及对非靶代谢组筛选到的差异代谢物进行验证。

基于以上调研, 结合我课题组前期实验结果, 我们认为可以通过构建轻度弥漫性闭合型颅脑损伤模型小鼠^[79]作为实验组, 与对照组小鼠共同进行脑组织与血清样本的采集, 利用非靶向代谢组学技术对比实验组与对照组小鼠代谢水平的差异, 找出差异代谢物并利用 ELISA 技术对差异代谢物进行初步验证, 寻找潜在的 mTBI 分子标志物。

3.1 实验材料

3.1.1 实验动物

35 只 SPF 级健康 ICR 雄性小鼠，7 周龄，体重 32~34g，购自北京华阜康生物科技有限公司【SCXK（京）2019-0008】，饲养于军事医学研究院实验动物中心【SYXK（军）2017-0023】。饲养环境：昼夜各半循环照明，湿度恒定在 40%~60%，温度控制在 22~24℃，自由饮食水和饲料。本动物实验已获得军事医学研究院实验动物福利伦理委员会批准【IACUC-DWZX-2022-584】。

3.1.2 主要试剂

表 33 主要试剂

试剂	公司
乙腈	Thermo
乙酸铵	Sigma
甲醇	Thermo
氨水	Thermo
苯乙胺 ELISA 检测试剂盒	江苏酶免实业有限公司
黄嘌呤 ELISA 检测试剂盒	江苏酶免实业有限公司
霉酚酸酯 ELISA 检测试剂盒	江苏酶免实业有限公司

3.1.3 实验仪器

表 34 实验仪器

仪器	型号/货号
脑立体定位打击装置	深圳华阳 SR200D
质谱仪	AB Triple TOF 6600 质谱仪(AB SCIEX)
LC 超高压液相色谱仪	Agilent 1290 Infinity LC 超高压液相色谱仪
低温高速离心机	Eppendorf 5430R
色谱柱	Waters, ACQUITY UPLC BEH Amide 1.7 μ m, 2.1 mm $\times$ 100 mm column

3.2 实验方法

3.2.1 轻度弥漫性闭合型颅脑损伤小鼠造模

关于 TBI 实验动物模型目前已有较多研究，包括流体冲击模型（Fluid percussion injury models, FPI）、可控皮质撞击模型（Controlled cortical impact injury

model, CCI)、重物撞击模型 (Weight drop TBI models)、爆炸冲击模型 (Models of blast TBI) 等, 但对于轻中度弥漫性闭合型脑损伤模型研究较少, 无明确的相关参数和评价指标。基于我课题组前期实验结果, 我们认为以轻度弥漫性闭合型脑损伤模型^[79]对小鼠进行造模, 可以更好模拟实际场景当中 mTBI 的发生。

3.2.1.1 动物分组

将小鼠随机分为假手术组 (Sham 组, n=9) 和实验组 (mTBI 组, n=9), 实验组采用圆柱形砣码进行打击, 其中砣码质量为 80g, 直径为 13mm, 致伤高度为 20cm (表 35)。

表 35 实验分组

组别	数量 (只)	打击重量 (g)	致伤高度 (cm)
Sham 组	9	0	0
mTBI 组	9	80	20

3.2.1.2 造模方法

小鼠在造模前 12h 禁食禁水。用生理盐水配置 1%戊巴比妥钠作为麻醉剂, 将小鼠称重, 按照 6 μ L/g 对小鼠以腹腔注射的方式进行麻醉。待小鼠充分麻醉后 (角膜反射消失、痛觉反射消失、呼吸频率降低、肌张力减小), 将小鼠颅顶毛发剃除, 以俯卧位固定于操作台上的海绵垫, 海绵垫弹性系数为 K=2.95 N/cm。

使用脑立体定位打击装置固定小鼠位置。使小鼠前牙咬住仪器前侧横杆, 固定住小鼠前后方位, 保证小鼠脑部水平; 将仪器左右两侧的耳杆横向推入小鼠左右两侧耳道下方 (下颌骨凹陷处), 托住头颅, 调整位置使耳杆与打击管道在同一水平线上, 固定小鼠左右方位; 将打击管道对准小鼠右外侧脑, 砣码前缘与小鼠眼尾相切, 砣码切线与小鼠冠状轴相切; 向下调整打击管道位置, 使接触面与颅顶平面保持平齐。调整期间确保小鼠呼吸状态正常 (图 44)。

为避免打击管道中砣码反弹对小鼠造成二次损伤, 在砣码与小鼠颅脑撞击后立即拉住砣码牵引绳。打击后, 立即将小鼠脱离装置放置于 37°C 恒温垫上, 30min 后放回笼子内等待复苏。Sham 组除不施加打击外, 其余操作同组。

致伤后处理: 致伤后密切观察小鼠生命体征情况变化。若有小鼠死亡, 记录只数并补充相应数量小鼠重复实验。

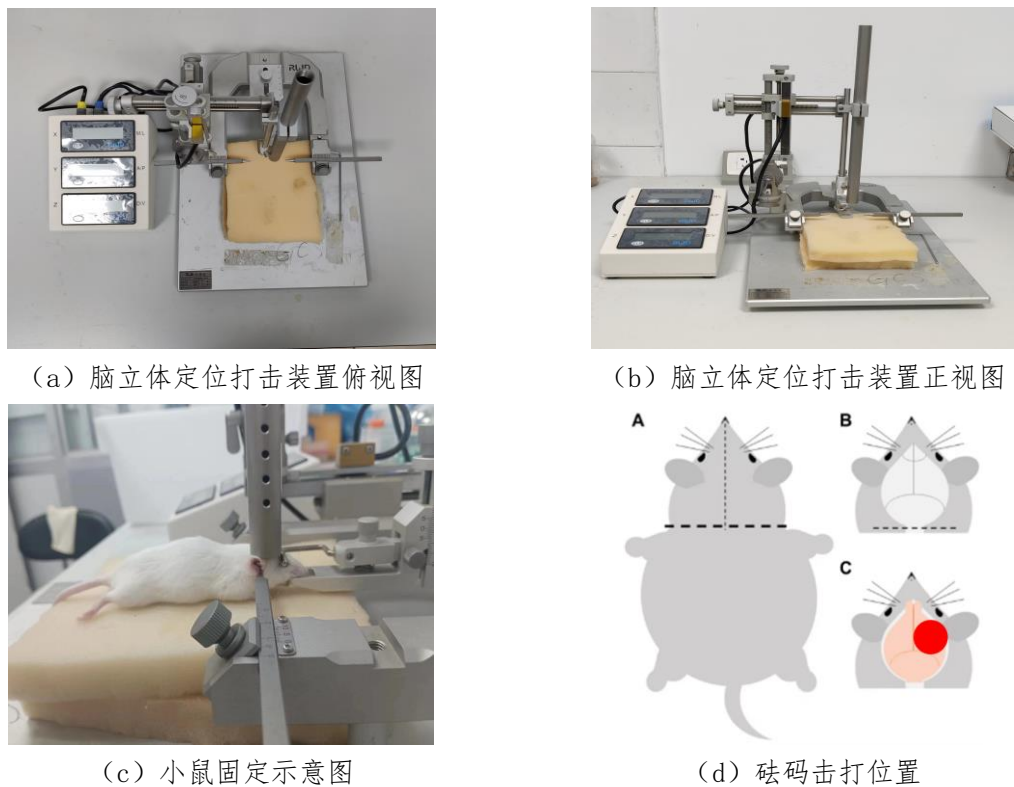


图 44 小鼠造模示意图

3.2.2 代谢组学分析

3.2.2.1 样本采集

分别采集 Sham 组小鼠和实验组小鼠进行造模后 3h 和 6h 的脑组织样本与血清样本（表 36），进行代谢组学分析。

表 36 采样分组

分组名称	样本来源	组别	数量（只）
B1	脑组织	Sham 组	3
B2	脑组织	mTBI 3h 组	3
B3	脑组织	mTBI 6h 组	3
S1	血清	Sham 组	3
S2	血清	mTBI 3h 组	3
S3	血清	mTBI 6h 组	3

脑组织采集步骤：

（1）麻醉。用生理盐水配置 1%戊巴比妥钠作为麻醉剂，将小鼠称重，按照 6 μ L/g 对小鼠以腹腔注射的方式进行麻醉。

(2) 灌流。将麻醉后的小鼠仰卧位固定,用手术剪开胸,于小鼠心脏右心耳剪开一小漏口,经左心室灌注生理盐水约 60mL,直至观察到右心耳流出清凉液体。

(3) 冷冻。灌流后迅速将小鼠开颅,取出脑组织于液氮中冻存。

血清采集步骤:

(1) 采血。采用摘除眼球方式采集小鼠全身血液,血液采集完成后将小鼠脱颈处死。

(2) 分离血清。将装有采集血液的离心管于室温静置 2h,随后在 4℃条件下 3000rpm 离心 10min,上层淡黄色清液即为小鼠血清。

(3) 冷冻。将小鼠血清于-80℃冷冻储存。

3.2.2.2 色谱-质谱分析

将采集样本在 4℃缓慢解冻后加入预冷的甲醇/乙腈/水混合溶液(体积比 2:2:1),涡旋混合,低温超声 30min,于-20℃静置 10min,在 4℃条件下 14000g 离心 20min,取上清真空干燥。质谱分析时加入 100μL 乙腈水溶液(体积比 1:1)复溶,涡旋混合,在 4℃条件下 14000g 离心 15min,取上清液进样分析。

色谱条件:

柱温 25℃,流速 0.5mL/min,进样量 2μL;

流动相 A: 水+25mM 乙酸铵+25mM 氨水,流动相 B: 乙腈;

梯度洗脱程序: 0-0.5min, 95%流动相 B 洗脱; 0.5-7min, 流动相 B 从 95%线性变化至 65%; 7-8min, 流动相 B 从 65%线性变化至 40%; 8-9min, 流动相 B 维持 40%; 9-9.1min, 流动相 B 从 40%线性变化至 95%; 9.1-12min, 流动相 B 维持 95%。全过程样品置于 4℃中自动进样。

质谱条件:

分别采用电喷雾电离(ESI)正离子和负离子模式检测,ESI 源及质谱设置参数如下:

雾化气辅助加热气 1(Gas1): 60, 辅助加热气 2(Gas2): 60, 气帘气(CUR): 30psi, 离子源温度: 600℃, 喷雾电压(ISVF) ± 500 V(正负两种模式);

一级质荷比检测范围: 80-1200 Da, 分辨率: 60000, 扫描累积时间: 100ms, 二级采用分段式采集方法, 扫描范围是 70-1200 Da, 二级分辨率: 30000, 扫描累积时间: 50ms, 动态排除时间: 4 s。

得到数据后对数据质量进行评价,尽可能减少由实验、仪器造成的数据误差;随后对代谢组学数据进行相应统计学分析,筛选出具有显著差异性的代谢产物。

3.2.3 代谢组学结果验证

筛选出显著性差异代谢产物，购买相关代谢产物的商品化 ELISA 检测试剂盒。重复小鼠造模，按照说明书使用商品化 ELISA 检测试剂盒对实验组小鼠与对照组小鼠血清中的代谢差异物进行重复验证，完成 mTBI 潜在分子标志物的初步筛选。

重复验证实验中造模条件与 3.2.1 中一致，实验分组如下：

表 37 重复验证实验分组

样本来源	组别	数量（只）
血清	Sham 组	3
血清	mTBI 1h 组	3
血清	mTBI 3h 组	3
血清	mTBI 6h 组	3
血清	mTBI 8h 组	3

3.3 实验结果

3.3.1 代谢组学数据质量评价

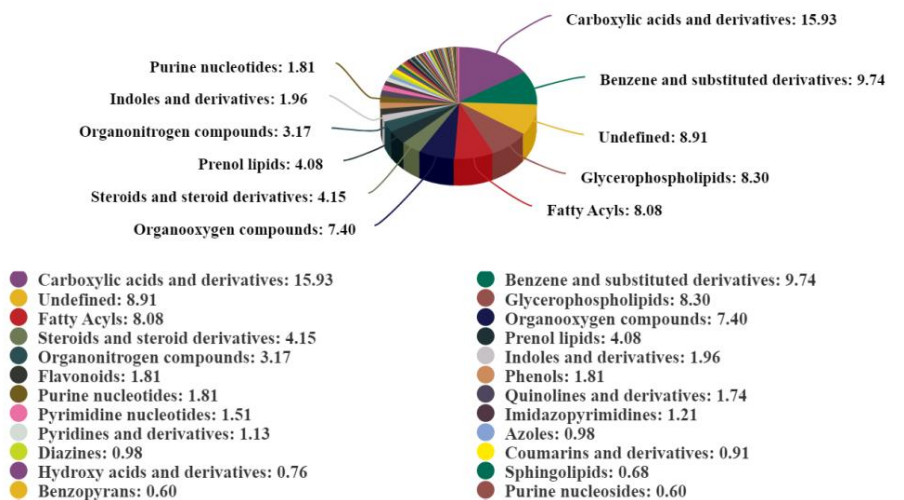
在进行样本检测的同时制备 QC 样本。QC 样本由各待测样本等量混合制成，在待测样本进行色谱-质谱分析的进样前、中和后期分别上机检测，用于评价实验过程中产生的仪器误差。通过对 QC 样本进行样本总离子流图分析、总体样本主成分分析、QC 样本相关性分析、QC 样本相对标准偏差分析等数据评价，说明本次实验数据由实验仪器引起的系统误差较小，重复性好，数据波动在正常范围内，可用于后续数据分析。

3.3.2 代谢组学结果分析

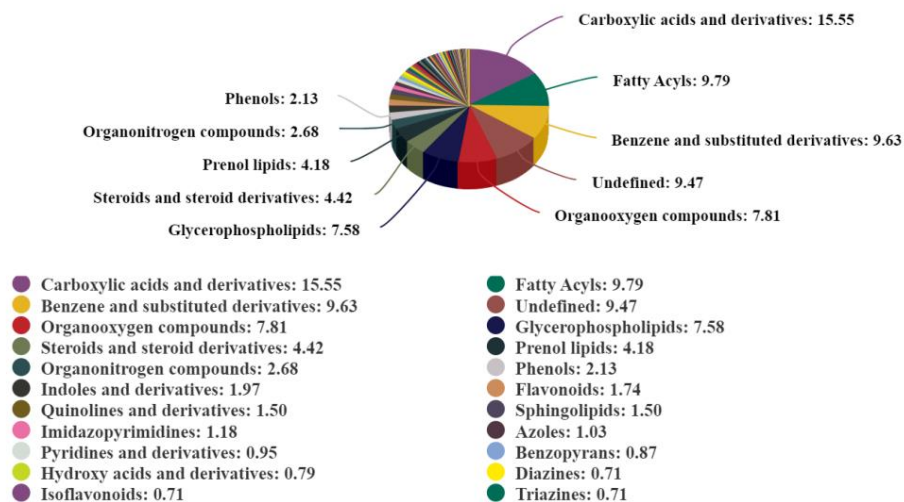
3.3.2.1 代谢物鉴定数量

对脑组织样本，在正负离子模式合并后共鉴定出代谢物 1325 种；对血清样本，在正负离子模式合并后共鉴定出代谢物 1267 种。

根据化学分类进行归属统计，得到各类代谢物数量占比如图 45 所示。



(a) 脑组织中鉴定代谢物占比

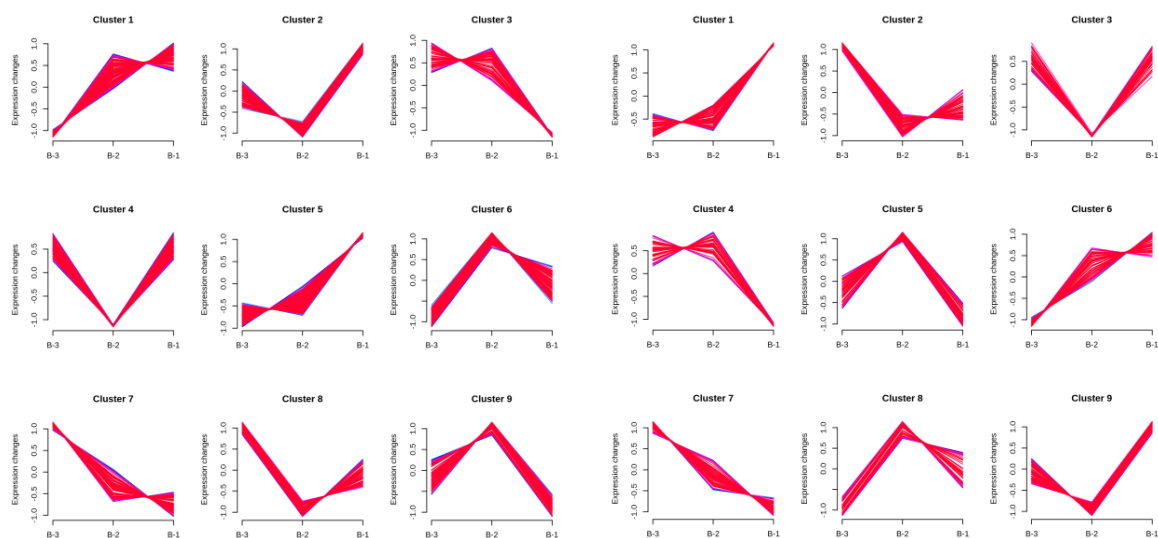


(b) 血清中鉴定代谢物占比

图 45 代谢物鉴定数量及占比

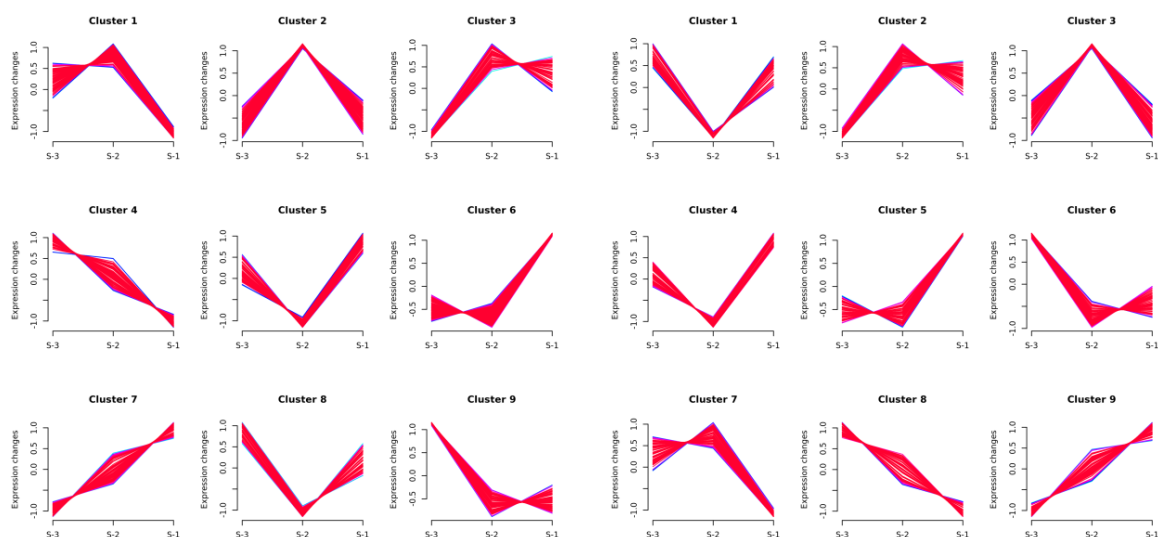
3.3.2.2 代谢物表达量变化趋势

采用 Mfuzz 包的 fuzz c-means (FCM) 算法对代谢物在各组分当中的表达模式和变化量趋势进行分析, 根据所有代谢物的表达趋势分为不同模块, 结果如图 46 所示, 说明不同时间点代谢产物有明显浓度差异。



(a) 脑组织正离子模式代谢物变化趋势

(b) 脑组织负离子模式代谢物变化趋势



(c) 血清正离子模式代谢物变化趋势

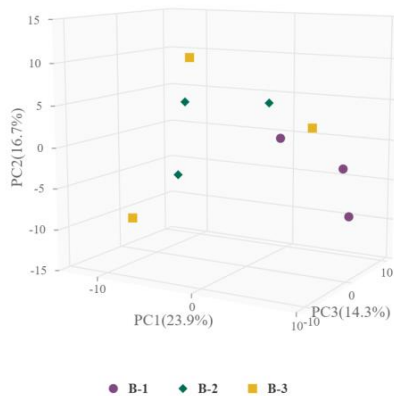
(d) 血清负离子模式代谢物变化趋势

注：横坐标代表不同组别，纵坐标表示均一化后表达量的变化。每一个 Cluster 线条为一类代谢物的表达趋势。

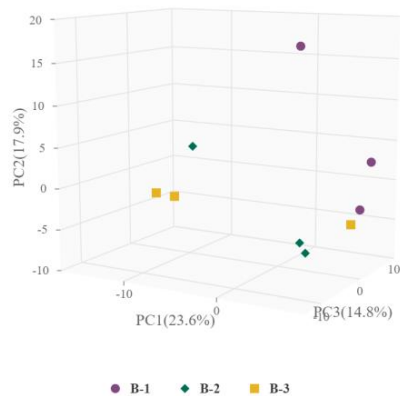
图 46 代谢物表达量变化趋势

3.3.2.3 组间差异分析

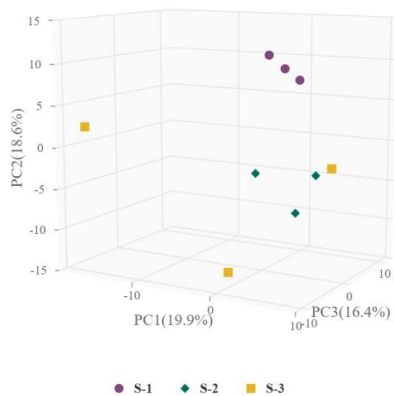
主成分分析 (Principal Component Analysis, PCA) 可以将原本鉴定到的所有代谢物重新线性组合，形成一组新的综合变量达到降维目的，同时还能从总体上反映样本组间和组内的变异度。因此采用 PCA 观察组间样本的总体分布趋势和组间样本差异度。分别将三个组两两比较做 PCA 分析，得分结果如图 47 所示。



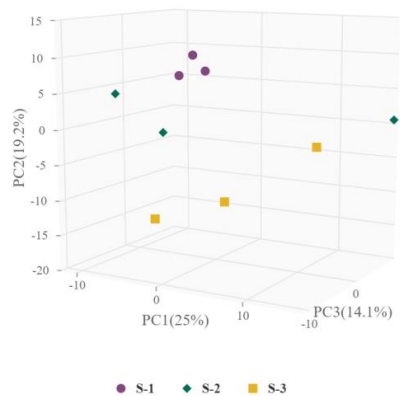
(a) 脑组织样本正离子模式 PCA 得分图



(b) 脑组织样本负离子模式 PCA 得分图



(c) 血清样本正离子模式 PCA 得分图



(d) 血清样本负离子模式 PCA 得分图

注：同一颜色点表示组内重复，点的分布状态反映出组间、组内差异度。

图 47 主成分分析图

经过 7 次循环交互验证，得到 PCA 模型参数如表 38、表 39 所示。

表 38 脑组织 PCA 模型参数

离子模式	样品组分	A	R ² X (cum)
正离子	B1、B2、B3	3	0.549
负离子	B1、B2、B3	3	0.563

表 39 血清 PCA 模型参数

离子模式	样品组分	A	R ² X (cum)
正离子	S1、S2、S3	3	0.549
负离子	S1、S2、S3	3	0.583

注：表中 A 表示主成分数，R²X(cum)表示模型解释率，一般 R²X(cum)>0.4 为好，说明模型可靠。

结果表明，待测组分组内聚集度高，组间分离明显，说明模型可靠，组间有明显差异。

3.3.2.4 差异代谢物筛选

OPLS-DA 模型得到的变量权重值（Variable Importance for the Projection, VIP）能够用于衡量各代谢物表达模式对各组样本分类判别的影响强度和解释能力，挖掘出具有生物学意义的差异代谢分子。通常以 $VIP > 1$ 的代谢物被认为在模型解释中具有显著贡献。

本实验严格以 OPLS-DA $VIP > 1$ 和 $P \text{ value} < 0.05$ 为显著性差异代谢物筛选标准，筛选结果如下（具体筛选产物见附录 A）：

表 40 脑组织中筛选结果

筛选模式	比较组	显著性差异物数量
正离子模式	B2 VS B1	25
	B3 VS B1	41
	B3 VS B2	24
负离子模式	B2 VS B1	35
	B3 VS B1	23
	B3 VS B2	14

注：B1 为脑组织样本 Sham 组，B2 为脑组织样本 mTBI 3h 组，B3 为脑组织样本 mTBI 6h 组。

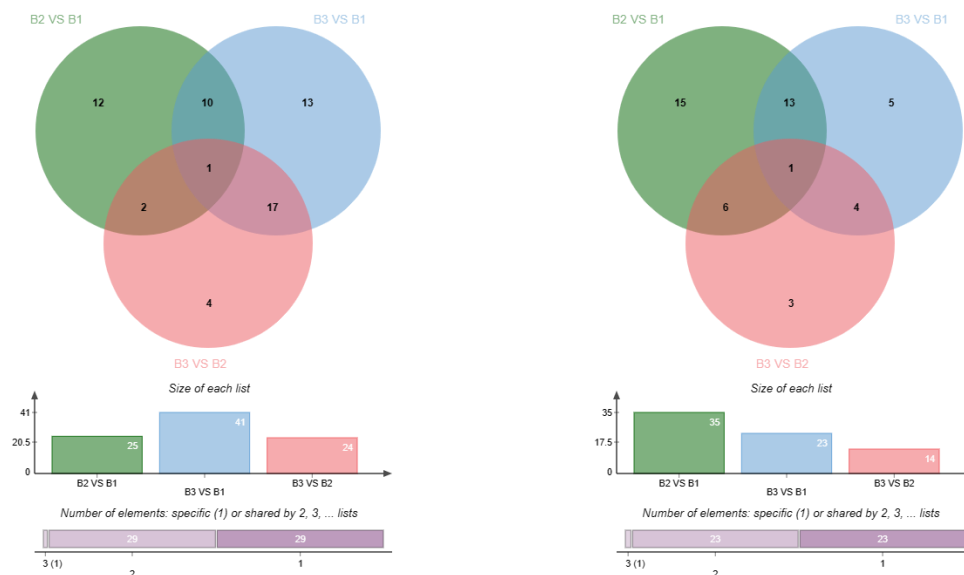
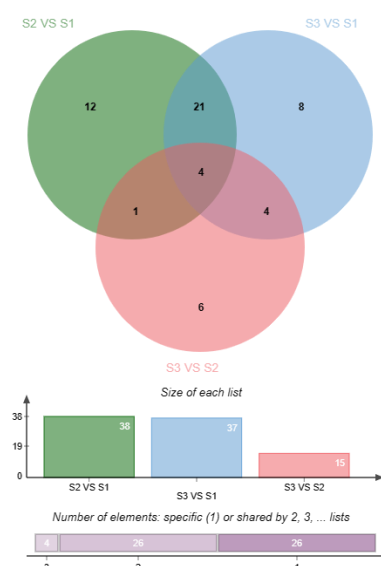


图 48 脑组织样本差异代谢物筛选结果 Venn 图

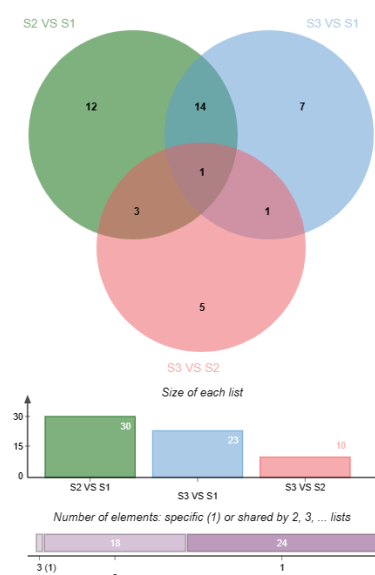
表 41 血清中筛选结果

筛选模式	比较组	显著性差异物数量
正离子模式	S2 VS S1	38
	S3 VS S1	37
	S3 VS S2	15
负离子模式	S2 VS S1	30
	S3 VS S1	23
	S3 VS S2	10

注：S1 为血清样本 Sham 组，S2 为血清样本 mTBI 3h 组，S3 为血清样本 mTBI 6h 组。



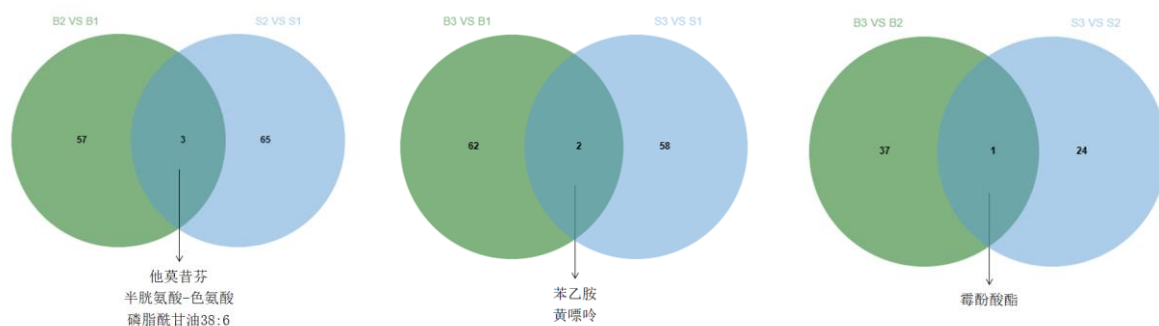
(a) 正离子模式下筛选结果 Venn 图



(b) 负离子模式下筛选结果 Venn 图

图 49 血清样本差异代谢物筛选结果 Venn 图

综合正负离子模式下筛选出的代谢产物，分别将脑组织样本中 mTBI 3h 组和 Sham 组之间的差异代谢物与血清中 mTBI 3h 组和 Sham 组之间的差异代谢物进行交集对比（图 50a），得到 3 种差异代谢物：他莫昔芬、半胱氨酸-色氨酸、磷脂酰甘油 38:6；将脑组织样本中 mTBI 6h 组和 Sham 组之间的差异代谢物与血清中 mTBI 6h 组和 Sham 组之间的差异代谢物进行交集对比（图 50b），得到 2 种代谢物：黄嘌呤和苯乙胺；将脑组织样本中 mTBI 6h 组和 mTBI 3h 组之间的差异代谢物与血清中 mTBI 6h 组和 mTBI 3h 组之间的差异代谢物进行交集对比（图 50c），得到 1 种差异代谢物：霉酚酸酯。



(a) 脑组织与血清中 mTBI 3h 组与对照组代谢差异物交集 (b) 脑组织与血清中 mTBI 6h 组与对照组代谢差异物交集 (c) 脑组织与血清中 mTBI 6h 组与 mTBI 3h 组代谢差异物交集

图 50 脑组织与血清不同比较组代谢差异物交集

其中第一组差异代谢物他莫昔芬、半胱氨酸-色氨酸和磷脂酰甘油 38:6 仅在 mTBI 3h 与对照组中存在。第二组差异代谢物中，苯乙胺除在 mTBI 6h 与对照组中存在外，同时存在于血清样本 mTBI 3h 与对照组的差异代谢物；黄嘌呤同时存在于脑组织样本 mTBI 3h 与对照组的差异代谢物。第三组差异代谢物中，霉酚酸酯除在 mTBI 6h 与 mTBI 3h 组中存在外，同时存在于脑组织样本 mTBI 6h 与对照组、血清样本 mTBI 3h 与对照组的差异代谢物。

综合以上条件，黄嘌呤、苯乙胺和霉酚酸酯可能提示 mTBI 的发生或成为 mTBI 的潜在相关分子。进一步的，对该三种分子在 mTBI 后的趋势变化进行重复性验证。

3.3.3 代谢差异物重复验证

按照弥漫性闭合型轻度颅脑损伤模型对小鼠重复造模，分别于 mTBI 后 1h、3h、6h 和 8h 采集小鼠血清，按照购买的黄嘌呤、苯乙胺和霉酚酸酯 ELISA 检测试剂盒说明书对小鼠血清进行检测。每组血清样本设置 3 组复孔。

重复验证结果表明，黄嘌呤血清水平在 mTBI 后开始上升，mTBI 后 3h 达到峰值，随后缓慢下降，至 mTBI 后 8h 下降至与对照组相似水平（图 51）。其在 3h 与 6h 水平均高于对照组，与筛选交集组相符。

苯乙胺血清水平在 mTBI 后 1h 迅速上升达到峰值，随后开始下降，至 mTBI 后 3h 下降至与对照组相似水平，并维持稳定（图 52）。其在血清中的变化水平与筛选交集不相符，可能是实验样本数量过少导致的误差，还需进一步验证。

霉酚酸酯血清水平在 mTBI 后 1h 迅速上升并达到峰值，随后缓慢下降，至 mTBI 后 8h 仍高于对照组水平（图 53）。其在 3h 与 6h 水平均高于对照组，且 6h 水平较 3h 有所下降存在差异，与筛选交集相符。

TBI 潜在分子标志物需要满足血清水平浓度随时间变化具有较好稳定性。黄嘌呤与霉酚酸酯在 TBI 后 8h 内均能维持正常以上水平，可作为 mTBI 提示分子进一步进行研究验证。受实验样本数量限制，该结论还需后续实验及更大样本验证。

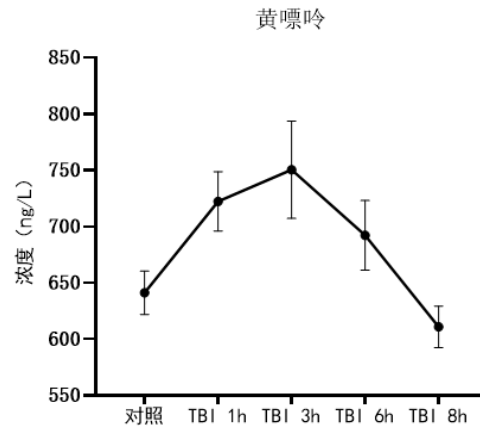


图 51 黄嘌呤重复验证结果

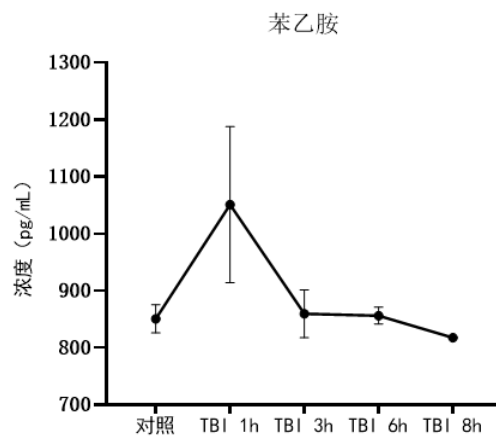


图 52 苯乙胺重复验证结果

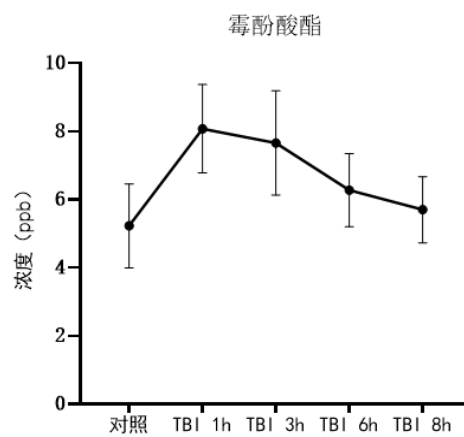


图 53 霉酚酸酯重复验证结果

3.4 讨论

通过对 mTBI 小鼠血清和对照组小鼠血清的代谢组学分析，初步筛选出黄嘌呤、苯乙胺和霉酚酸酯三种潜在 mTBI 相关分子。

黄嘌呤是由黄嘌呤氧化酶（Xanthine oxidase, XOD）从次黄嘌呤中分离而来，与氧化应激代谢通路相关，而这正是诱发 TBI 后继发性脑损伤并导致脑缺血和脑水肿的重要因素之一。有研究表明，对大鼠进行 TBI 造模后，发现其 XOD 活性增高^[81]，与实验筛选结果相符。

苯乙胺（Phenylethylamine, PEA），又名 β -苯乙胺，是一种生物碱与单胺类神经递质，与去甲肾上腺素类似。据报道，在对大鼠进行模拟 TBI 后，大鼠额叶皮层去甲肾上腺素转运体表达数量增加，TBI 后 4 周显著增加，提示去甲肾上腺素转运体可能具有作为 TBI 治疗靶点的价值^[82]；另外有研究表明，去甲肾上腺素给药能够减少 TBI 后的继发性损伤^[83]，因此苯乙胺的存在可能成为 mTBI 的潜在相关分子。

霉酚酸酯（Mycophenolate mofetil, MMF）是霉酚酸（mycophenolic acid, MPA）的酯类衍生物，具有独特的免疫抑制作用和较高的生物安全性，已作为商品化药物用于治疗红斑狼疮等风湿免疫性疾病。MMF 在体内能够迅速水解为活性代谢产物 MPA，MPA 通过抑制嘌呤核苷酸从头合成途径的关键限速酶使鸟嘌呤核苷酸的合成减少，因而能选择性抑制 T、B 淋巴细胞的增殖和功能。目前暂无 MMF 与 TBI 相关的研究报道，但从 TBI 的原发性损伤与继发性损伤机理来看，MMF 可能与星形胶质细胞的激活以及后续代谢途径相关，并提示了 mTBI 的潜在药物治疗相关靶点，可能与霉酚酸酯的新药物用途相关。

mTBI 潜在相关分子的初步筛选为 mTBI 新标志物的筛选奠定了一定基础，但由于本实验仅在动物层面进行实验，实验样本数量较少，实验重复验证仅对小鼠血清进行了 ELISA 检测，还未进行深入靶向筛选及临床水平的样本验证，因此对于该三种分子的作用机制及在 mTBI 诊断中的灵敏度与特异性有待于进一步的探索研究与验证

第四章 结论与展望

4.1 结论

4.1.1 基于 GFAP 和 UCHL1 的 mmTBI 快速检测试纸条的研制及应用

本研究分别制备了以 GFAP 和 UCHL1 为检测分子用于 mmTBI 快速诊断的免疫层析试纸条。在以 GFAP 为检测分子时,通过对 GFAP 各亚型保守片段的筛选,制备了 GFAP 小鼠单克隆抗体,在最大程度上实现了对不同年龄段人群血清中 GFAP 的检测。该模式下试纸条最佳制备工艺为:量子点微球偶联抗体比例为 10:1 (100 μ g 量子点微球: 10 μ g GFAP 鼠单抗),偶联 pH6.0,GFAP 兔多抗与山羊抗鼠二抗划膜浓度为 1mg/mL。在该试纸条检测中,仅需 70 μ L 血清样本即可在 13min 内实现对 mmTBI 患者与非 TBI 患者的区分,检测灵敏度达到 95.24%,特异性达到 90%,检测效果与商品化 ELISA 试剂盒相当,检测时间与检测便捷性显著优于 ELISA 检测试剂盒。对 GFAP 快速检测试纸条进行了定量学方法的建立,在以人血清为基质的样本中,GFAP 的标准曲线为 $y=2.814\lg x+3.499$,检测下限为 0.15ng/mL,线性回归系数 $R^2=0.978$,批间差异在 10.7%,具有良好的可重复性,不与非 GFAP 外的蛋白因子反应,具有良好的特异性。确定了 GFAP 最佳检测窗口在 TBI 后 6~10h,为 TBI 的准确评估提供辅助参考依据。

在以 UCHL1 为检测分子时,通过制备 UCHL1 蛋白作为免疫原制备了 UCHL1 兔多抗,以量子点微球偶联兔单抗作为荧光探针实现对血清中 UCHL1 的检测。该模式下试纸条最佳工艺为:量子点微球偶联抗体比例为 10:1 (100 μ g 量子点微球: 10 μ g UCHL1 兔单抗),偶联 pH8.0,UCHL1 兔多抗划膜浓度为 0.96mg/mL,山羊抗兔二抗划膜浓度为 0.5mg/mL。在该试纸条检测中,仅需 70 μ L 血清样本即可在 15min 内实现对 mmTBI 患者与非 TBI 患者的区分,检测灵敏度达到 100%,特异性达到 90%,检测效果与商品化 ELISA 试剂盒相当,检测时间与检测便捷性显著优于 ELISA 检测试剂盒。对 UCHL1 快速检测试纸条进行了定量学方法的建立,在以人血清为基质的样本中,UCHL1 的标准曲线为 $y=3.361x+0.4926$,检测下限为 0.2ng/mL,线性回归系数 $R^2=0.9743$,批间差异在 9.58%,具有良好的可重复性,不与非 UCHL1 外的蛋白因子反应,具有良好的特异性。确定了 UCHL1 最佳检测窗口在 TBI 后 4~8h,为 TBI 的准确评估提供辅助参考依据。

4.1.2 mTBI 潜在相关分子的初步筛选

通过建立轻度弥漫性闭合型颅脑损伤小鼠模型,对 mTBI 小鼠的脑组织及血清

样本在 mTBI 后 3h 和 6h 取样，与对照组小鼠一并进行代谢组学分析，最终筛选出 mTBI 相关潜在分子黄嘌呤、苯乙胺和霉酚酸酯。通过重复造模实验对这 3 种潜在相关分子进行验证，结合文献查阅，初步判断了这 3 种分子与 mTBI 的相关性，尤其是霉酚酸酯，为 mTBI 的药物治疗提供新的潜在靶点。

4.2 展望

4.2.1 基于 GFAP 和 UCHL1 联合检测的 mmTBI 诊断试纸条的研制

GFAP 与 UCHL1 快速检测试纸条的成功研制证明了基于量子点标记免疫层析技术的方法建立及该方法体系的可拓展性。基于量子点独特的光学性质，该方法体系同样适用于多分子联合检测的试纸条研制。有研究发现，将 GFAP 与 UCHL1 联合使用可以对脑部弥漫性损伤和局灶性损伤有更好的评估价值^[84]，在某些时间点上对 TBI 的诊断效果优于单独标志物的使用^[85]。从检测时间窗口上来讲，多标志物的联合检测可以在一定程度上拓宽检测所需时间窗，使检测试纸条应用范围更广，如将 GFAP 与 UCHL1 联合使用，则最佳检测时间窗口可以延长至 TBI 后 4h~10h，尽管存在浓度峰值的错峰匹配，但更适合于实际应用场景。

随着对 mmTBI 标志物的不断探索发展，多指标联合检测分析将为 TBI 的诊断、发展及预后提供更精准的判断，与影像学、量表评价等结合共同形成完善的评估体系，为 TBI 的临床诊疗提供有力支持。

4.2.2 mTBI 潜在相关分子的靶向性筛选及验证

通过对 mTBI 小鼠的非靶向代谢组学分析，筛选出了 mTBI 潜在相关分子及分子所属类别与相关代谢通路。由于样本进行代谢组学分析时样本数量较少，因此仅作为 mTBI 潜在相关分子的初步筛选。进一步的，可以以筛选出的分子类别和相关代谢通路进行代谢组学的靶向性分析，聚焦 mTBI 潜在相关分子的重复性验证，为 mTBI 提供全新角度的分子标志物、代谢通路与药物作用靶点。

另一方面，一个可靠的生物标志物需要拥有易于获得、重复性好、可定量检测、兼顾特异性与灵敏度等特点，从代谢组学分析得到的潜在相关分子还需转化为可应用于临床的生物诊断标志物。随着 mTBI 研究的不断深入和新技术新学科的交叉融合，必将建立起更精准、更灵敏、更可靠的 mTBI 诊断方法，推动快速诊断技术的进一步发展。

参考文献

- [1] Galgano M, Toshkezi G, Qiu X, et al. Traumatic Brain Injury: Current Treatment Strategies and Future Endeavors[J]. Cell Transplant. 2017, 26(7): 1118-1130.
- [2] Maas A, Menon D K, Adelson P D, et al. Traumatic brain injury: integrated approaches to improve prevention, clinical care, and research[J]. Lancet Neurol. 2017, 16(12): 987-1048.
- [3] Maas A, Menon D K, Manley G T, et al. Traumatic brain injury: progress and challenges in prevention, clinical care, and research[J]. Lancet Neurol. 2022, 21(11): 1004-1060.
- [4] Feigin V L, Nichols E, Alam T, et al. Global, regional, and national burden of neurological disorders, 1990–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016[J]. The Lancet Neurology. 2019, 18(5): 459-480.
- [5] Jiang J Y, Gao G Y, Feng J F, et al. Traumatic brain injury in China[J]. Lancet Neurol. 2019, 18(3): 286-295.
- [6] Wojcik B E, Stein C R, Bagg K, et al. Traumatic brain injury hospitalizations of U.S. army soldiers deployed to Afghanistan and Iraq[J]. Am J Prev Med. 2010, 38(1 Suppl): S108-S116.
- [7] Zhang J K, Botterbush K S, Bagdady K, et al. Blast-Related Traumatic Brain Injuries Secondary to Thermobaric Explosives: Implications for the War in Ukraine[J]. World Neurosurg. 2022, 167: 176-183.
- [8] Sgro M, Ellens S, Kodila Z N, et al. Repetitive mild traumatic brain injury alters central and peripheral clock gene expression in the adolescent rat[J]. Neurobiology of Sleep and Circadian Rhythms. 2023, 14: 100090.
- [9] Group T M O C. VA/DoD Clinical Practice Guideline for Management of Concussion/Mild Traumatic Brain Injury[J]. J Rehabil Res Dev. 2009, 46(6): CP1-CP68.
- [10] Weissman S H, Busch K G, Schouten R. The evolution of terrorism from 1914 to 2014[J]. Behav Sci Law. 2014, 32(3): 259-262.
- [11] Mosti C B, Klingaman E A, Brownlow J A, et al. Insomnia prevalence among U.S. Army soldiers with history of TBI[J]. Rehabil Psychol. 2019, 64(4): 475-481.
- [12] Byers A L, Li Y, Barnes D E, et al. TBI and risk of death in military veterans over 14 years: Injury severity, timing, and cause of death[J]. J Psychiatr Res. 2022, 156: 200-205.

- [13] Gardner R C, Barnes D E, Li Y, et al. Medical and Psychiatric Risk Factors for Dementia in Veterans with and without Traumatic Brain Injury (TBI): A Nationwide Cohort Study[J]. *J Prev Alzheimers Dis*. 2023, 10(2): 244-250.
- [14] Zhou Y, Greenwald B D. Update on Insomnia after Mild Traumatic Brain Injury[J]. *Brain Sci*. 2018, 8(12): 223.
- [15] Mcinnes K, Friesen C L, Mackenzie D E, et al. Mild Traumatic Brain Injury (mTBI) and chronic cognitive impairment: A scoping review[J]. *PLoS One*. 2017, 12(4): e0174847.
- [16] Silverberg N D, Iverson G L, Arciniegas D B, et al. Expert Panel Survey to Update the American Congress of Rehabilitation Medicine Definition of Mild Traumatic Brain Injury[J]. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation*. 2021, 102(1): 76-86.
- [17] Blennow K, Brody D L, Kochanek P M, et al. Traumatic brain injuries[J]. *Nat Rev Dis Primers*. 2016, 2: 16084.
- [18] Huie J R, Mondello S, Lindsell C J, et al. Biomarkers for Traumatic Brain Injury: Data Standards and Statistical Considerations[J]. *J Neurotrauma*. 2021, 38(18): 2514-2529.
- [19] Wang K K, Yang Z, Zhu T, et al. An update on diagnostic and prognostic biomarkers for traumatic brain injury[J]. *Expert Rev Mol Diagn*. 2018, 18(2): 165-180.
- [20] Shir D, Graff-Radford J, Hofrenning E I, et al. Association of plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) with neuroimaging of Alzheimer's disease and vascular pathology[J]. *Alzheimers Dement (Amst)*. 2022, 14(1): e12291.
- [21] Mayo S, Benito-Leon J, Pena-Bautista C, et al. Recent Evidence in Epigenomics and Proteomics Biomarkers for Early and Minimally Invasive Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases[J]. *Curr Neuropharmacol*. 2021, 19(8):1273-1303.
- [22] Hier D B, Obafemi-Ajayi T, Thimman M S, et al. Blood biomarkers for mild traumatic brain injury: a selective review of unresolved issues[J]. *BiomarkRes*. 2021, 9(1): 70.
- [23] Mi Z, Graham S H. Role of UCHL1 in the pathogenesis of neurodegenerative diseases and brain injury[J]. *Ageing Res Rev*. 2023, 86: 101856.
- [24] Supraja P, Tripathy S, Krishna V S, et al. Label-free, ultrasensitive and rapid detection of FDA-approved TBI specific UCHL1 biomarker in plasma using MWCNT-PPY nanocomposite as bio-electrical transducer: A step closer to point-of-care diagnosis of TBI[J]. *Biosens Bioelectron*. 2022, 216: 114631.
- [25] Shahjouei S, Sadeghi-Naini M, Yang Z, et al. The diagnostic values of UCH-L1 in traumatic brain injury: A meta-analysis[J]. *Brain Inj*. 2018, 32(1): 1-17.
- [26] Wang C, Xiao R, Wang S, et al. Magnetic quantum dot based lateral flow assay biosensor for multiplex and sensitive detection of protein toxins in food

samples[J]. *Biosens Bioelectron.* 2019, 146: 111754.

[27] Wang Q, Li S, Zhang Y, et al. A highly sensitive photothermal immunochromatographic sensor for detection of aflatoxin B(1) based on nanoparticles[J]. *Food Chem.* 2023, 401: 134065.

[28] Kong Y, Wang H, Wu S, et al. A quantum dot fluorescent microsphere based immunochromatographic strip for detection of brucellosis[J]. *BMC Vet Res.* 2021, 17(1): 48.

[29] Nguyen A, Dao T D, Trinh T, et al. Sensitive detection of influenza avirus based on a CdSe/CdS/ZnS quantum dot-linked rapid fluorescent immunochromatographic test[J]. *Biosens Bioelectron.* 2020, 155: 112090.

[30] Ma Y, Xu G, Wei F, et al. Carbon dots based immunosorbent assay for the determination of GFAP in human serum[J]. *Nanotechnology.* 2018, 29(14):145501.

[31] Le T, Zhang Z, Wu J, et al. A fluorescent immunochromatographic strip test using a quantum dot-antibody probe for rapid and quantitative detection of 1-aminohydantoin in edible animal tissues[J]. *Anal Bioanal Chem.* 2018, 410(2):565-572.

[32] Brus L E. Electron-electron and electron-hole interactions in small semiconductor crystallites: The size dependence of the lowest excited electronic state[J]. *The Journal of Chemical Physics.* 1984, 80(9): 4403-4409.

[33] Dahan M, Laurence T, Pinaud F, et al. Time-gated biological imaging by use of colloidal quantum dots[J]. *Opt Lett.* 2001, 26(11): 825-827.

[34] Alivisatos A P, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes[J]. *Annu Rev Biomed Eng.* 2005, 7: 55-76.

[35] Chang Y P, Pinaud F, Antelman J, et al. Tracking bio-molecules in live cells using quantum dots[J]. *J Biophotonics.* 2008, 1(4): 287-298.

[36] Taranova N A, Berlina A N, Zherdev A V, et al. 'Traffic light' immunochromatographic test based on multicolor quantum dots for the simultaneous detection of several antibiotics in milk[J]. *Biosens Bioelectron.* 2015, 63: 255-261.

[37] Kwon H, Lee J, Song R, et al. In vitro and in vivo imaging of prostate cancer angiogenesis using anti-vascular endothelial growth factor receptor 2 antibody-conjugated quantum dot[J]. *Korean J Radiol.* 2013, 14(1): 30-37.

[38] Esteve-Turrillas F A, Abad-Fuentes A. Applications of quantum dots as probes in immunosensing of small-sized analytes[J]. *Biosens Bioelectron.* 2013, 41: 12-29.

[39] Huang X, Weng J, Sang F, et al. Characterization of quantum dot bioconjugates by capillary electrophoresis with laser-induced fluorescent

detection[J]. JChromatogr A. 2006, 1113(1-2): 251-254.

[40] Sukhanova A, Even-Desrumeaux K, Kisserli A, et al. Oriented conjugates of conjugates of single-domain antibodies and quantum dots: toward a new generation of of ultrasmall diagnostic nanoprobes[J]. Nanomedicine. 2012, 8(4): 516-525.

[41] Gao X, Yang L, Petros J A, et al. In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots[J]. Curr Opin Biotechnol. 2005, 16(1): 63-72.

[42] Ren M, Xu H, Huang X, et al. Immunochromatographic assay for ultrasensitive detection of aflatoxin B(1) in maize by highly luminescent quantum dotbeads[J]. ACS Appl Mater Interfaces. 2014, 6(16): 14215-14222.

[43] Zhou C, Mao M, Yuan H, et al. Fluorescent QDs-polystyrene composite nanospheres for highly efficient and rapid protein antigen detection[J]. Journal of Nanoparticle Research. 2013, 15(9): 1901.

[44] Guo L, Shao Y, Duan H, et al. Magnetic Quantum Dot Nanobead-Based Fluorescent Immunochromatographic Assay for the Highly Sensitive Detection of Aflatoxin B(1) in Dark Soy Sauce[J]. Anal Chem. 2019, 91(7): 4727-4734.

[45] Bai Z, Wei H, Yang X, et al. Rapid Enrichment and Ultrasensitive Detection of Influenza A Virus in Human Specimen using Magnetic Quantum Dot Nanobeads Based Test Strips[J]. Sens Actuators B Chem. 2020, 325: 128780.

[46] Middeldorp J, Hol E M. GFAP in health and disease[J]. Prog Neurobiol. 2011, 93(3): 421-443.

[47] Brenner M. Role of GFAP in CNS injuries[J]. Neurosci Lett. 2014, 565: 7-13.

[48] Shir D, Graff-Radford J, Hofrenning E I, et al. Association of plasma glial fibrillary acidic protein (GFAP) with neuroimaging of Alzheimer's disease and vascular pathology[J]. Alzheimers Dement (Amst). 2022, 14(1): e12291.

[49] Twait E L, Gerritsen L, Moonen J, et al. Plasma Markers of Alzheimer's Disease Pathology, Neuronal Injury, and Astrocytic Activation and MRI Loadof Vascular Pathology and Neurodegeneration: The SMART-MR Study[J]. J Am Heart Assoc. 2024, 13(4): e032134.

[50] Mayo S, Benito-Leon J, Pena-Bautista C, et al. Recent Evidence in Epigenomics and Proteomics Biomarkers for Early and Minimally Invasive Diagnosis of Alzheimer's and Parkinson's Diseases[J]. Curr Neuropharmacol. 2021, 19(8): 1273-1303.

[51] Yang Z, Arja R D, Zhu T, et al. Characterization of Calpain and Caspase-6-Generated Glial Fibrillary Acidic Protein Breakdown Products Following Traumatic Brain Injury and Astroglial Cell Injury[J]. Int J Mol Sci. 2022, 23(16).

[52] Okonkwo D O, Puffer R C, Puccio A M, et al. Point-of-Care Platform Blood Biomarker Testing of Glial Fibrillary Acidic Protein versus S100 Calcium-Binding Protein B for Prediction of Traumatic Brain Injuries: A Transforming Research and

Clinical Knowledge in Traumatic Brain Injury Study[J]. *J Neurotrauma*. 2020, 37(23): 2460-2467.

[53] Papa L, Brophy G M, Welch R D, et al. Time Course and Diagnostic Accuracy of Glial and Neuronal Blood Biomarkers GFAP and UCH-L1 in a Large Cohort of Trauma Patients With and Without Mild Traumatic Brain Injury[J]. *JAMA Neurology*. 2016, 73(5): 551.

[54] Metting Z, Wilczak N, Rodiger L A, et al. GFAP and S100B in the acute phase of mild traumatic brain injury[J]. *Neurology*. 2012, 78(18): 1428-1433.

[55] Amoo M, Henry J, O Halloran P J, et al. S100B, GFAP, UCH-L1 and NSE as predictors of abnormalities on CT imaging following mild traumatic brain injury: a systematic review and meta-analysis of diagnostic test accuracy[J]. *Neurosurgical Review*. 2022, 45(2): 1171-1193.

[56] Duan H, Chen X, Xu W, et al. Quantum-dot submicrobead-based immunochromatographic assay for quantitative and sensitive detection of zearalenone[J]. *Talanta*. 2015, 132: 126-131.

[57] Liu J, Wang B, Huang H, et al. Quantitative ciprofloxacin on-site rapid detections using quantum dot microsphere based immunochromatographic test strips[J]. *Food Chem*. 2021, 335: 127596.

[58] Feigin V L, Theadom A, Barker-Collo S, et al. Incidence of traumatic brain injury in New Zealand: a population-based study[J]. *Lancet Neurol*. 2013, 12(1): 53-64.

[59] Sussman E S, Pendharkar A V, Ho A L, et al. Mild traumatic brain injury and concussion: terminology and classification[J]. *Handb Clin Neurol*. 2018, 158: 21-24.

[60] Nielsen A L, Holm I E, Johansen M, et al. A new splice variant of glial fibrillary acidic protein, GFAP epsilon, interacts with the presenilin proteins[J]. *J Biol Chem*. 2002, 277(33): 29983-29991.

[61] Blechingberg J, Holm I E, Nielsen K B, et al. Identification and characterization of GFAPkappa, a novel glial fibrillary acidic protein isoform[J]. *Glia*. 2007, 55(5): 497-507.

[62] Zetterberg H, Blennow K. Fluid biomarkers for mild traumatic brain injury and related conditions[J]. *Nat Rev Neurol*. 2016, 12(10): 563-574.

[63] Graham S H, Liu H. Life and death in the trash heap: The ubiquitin proteasome pathway and UCHL1 in brain aging, neurodegenerative disease and cerebral Ischemia[J]. *Ageing Res Rev*. 2017, 34: 30-38.

[64] Ciechanover A, Kwon Y T. Degradation of misfolded proteins in neurodegenerative diseases: therapeutic targets and strategies[J]. *Exp Mol Med*. 2015, 47(3): e147.

[65] Mondello S, Linnet A, Buki A, et al. Clinical utility of serum levels of ubiquitin C-terminal hydrolase as a biomarker for severe traumatic brain injury[J]. *Neurosurgery*. 2012, 70(3): 666-675.

[66] Papa L, Robertson C S, Wang K K, et al. Biomarkers improve clinical outcome predictors of mortality following non-penetrating severe traumatic brain injury[J]. *Neurocrit Care*. 2015, 22(1): 52-64.

[67] Kevin K. Wang A J C M C, J. Adrian Tyndall B Z Y A M, Frederick K. Korley F D O G A, et al. Diagnostic performance of point-of-care ubiquitin carboxy-terminal Hydrolase-L1 assay in distinguishing imaging abnormalities in traumatic brain injury: A TRACK-TBI cohort study[J]. *Advances in Biomarker Sciences and Technology*. 2023(5): 38-49.

[68] Day I N, Thompson R J. UCHL1 (PGP 9.5): neuronal biomarker and ubiquitin system protein[J]. *Prog Neurobiol*. 2010, 90(3): 327-362.

[69] Korley F K, Jain S, Sun X, et al. Prognostic value of day-of-injury plasma GFAP and UCH-L1 concentrations for predicting functional recovery after traumatic brain injury in patients from the US TRACK-TBI cohort: an observational cohort study[J]. *Lancet Neurol*. 2022, 21(9): 803-813.

[70] Posti J P, Hossain I, Takala R S, et al. Glial Fibrillary Acidic Protein and Ubiquitin C-Terminal Hydrolase-L1 Are Not Specific Biomarkers for Mild CT-Negative Traumatic Brain Injury[J]. *J Neurotrauma*. 2016, 34(7): 1427-1438.

[71] Yue J K, Upadhyayula P S, Avalos L N, et al. The Role of Blood Biomarkers for Magnetic Resonance Imaging Diagnosis of Traumatic Brain Injury[J]. *Medicina (Kaunas)*. 2020, 56(2): 87.

[72] Czeiter E, Amrein K, Gravesteijn B Y, et al. Blood biomarkers on admission in acute traumatic brain injury: Relations to severity, CT findings and care path in the CENTER-TBI study[J]. *EBioMedicine*. 2020, 56: 102785.

[73] Harrington M G. Searching for a traumatic brain injury biomarker to aid clinical decision making in the emergency department[J]. *EBioMedicine*. 2020, 56: 102798.

[74] Mehta T, Fayyaz M, Giler G E, et al. Current Trends in Biomarkers for Traumatic Brain Injury[J]. *Open Access J Neurol Neurosurg*. 2020, 12(4): 86-94.

[75] Mcdonald S J, Shultz S R, Agoston D V. The Known Unknowns: An Overview of the State of Blood-Based Protein Biomarkers of Mild Traumatic Brain Injury[J]. *J Neurotrauma*. 2021, 38(19): 2652-2666.

[76] Manivannan S, Makwana M, Ahmed A I, et al. Profiling biomarkers of traumatic axonal injury: From mouse to man[J]. *Clin Neurol Neurosurg*. 2018, 171: 6-20.

[77] Agoston D V, Shutes-David A, Peskind E R. Biofluid biomarkers of traumatic

brain injury[J]. *Brain Inj.* 2017, 31(9): 1195-1203.

[78] Scheers I, Palermo J J, Freedman S, et al. Recommendations for and Management of Autoimmune Pancreatitis in Childhood: Consensus FromINSPPIRE[J]. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2018, 67(2): 232-236.

[79] 卜苑静, 付文亮, 邢微微, 等. 轻中度闭合型创伤性脑损伤小鼠模型建立及评价[J]. *中国实验动物学报.* 2023, 31(9): 1140-1147.

[80] Xiong Y, Mahmood A, Chopp M. Animal models of traumatic brain injury[J]. *Nat Rev Neurosci.* 2013, 14(2): 128-142.

[81] Solaroglu I, Okutan O, Kaptanoglu E, et al. Increased xanthine oxidase activity after traumatic brain injury in rats[J]. *J Clin Neurosci.* 2005, 12(3): 273-275.

[82] Chen X, Wagner A K, Li Y, et al. Poster 14: Regional Changes in Norepinephrine Transporter Expression After Experimental TBI.[J]. *Archives of Physical Medicine and Rehabilitation.* 2005, 86(9): e9.

[83] Lloyd-Donald P, Spencer W, Cheng J, et al. In adult patients with severe traumatic brain injury, does the use of norepinephrine for augmenting cerebral perfusion pressure improve neurological outcome? A systematic review[J]. *Injury.* 2020, 51(10): 2129-2134.

[84] Diaz-Arrastia R, Wang K K, Papa L, et al. Acute biomarkers of traumatic brain injury: relationship between plasma levels of ubiquitin C-terminal hydrolase-L1 and glial fibrillary acidic protein[J]. *J Neurotrauma.* 2014, 31(1): 19-25.

[85] Mondello S, Jeromin A, Buki A, et al. Glial neuronal ratio: a novel index for differentiating injury type in patients with severe traumatic brain injury[J]. *J Neurotrauma.* 2012, 29(6): 1096-1104.

附录 A 代谢组学显著性差异物筛选结果

1 脑组织样本中正离子模式下显著性差异代谢物

1.1 mTBI 3h 组与 Sham 组筛选结果

Uridine 5'-diphosphate
Natamycin
Monoelaidin
Liriodenine
3-[(2s,3r,4s,5s,6r)-4,5-dihydroxy-6-(hydroxymethyl)-3-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihydroxy-6-(hydroxymethyl)oxan-2-yl]oxyoxan-2-yl]oxy-2-(3,4-dihydroxyphenyl)-5-hydroxy-7-methoxyc
hromen-4-one
Midazolam
Chloroquine
Forskolin
3-methoxytyramine
Tributylphosphine oxide
7-methyladenine
Oleoyl-l-carnitine
Gamma-l-glutamyl-l-glutamic acid
Tamoxifen
Apafant
Caylin-1
Lnt
4-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)furo(3,2-g)chromen-7-one
Indole-3-acetamide
Aristolochic acid ii
Bradykinin
Boscalid
Harmalol
Diclosulam
Demetons

1.2 mTBI 6h 组与 Sham 组筛选结果

Uridine 5'-diphosphate
3-pyridinecarboxaldehyde
Natamycin
Arenobufagin
Cys-Met-Arg

1-pyrrolidineheptanoic acid, 2-(3-hydroxyoctyl)-5-oxo
Propanoic acid, 2-[[1-[3-[4-([1,1'-biphenyl]-4-ylcarbonyl)-2-propylphenoxy]
2-amino-1-phenylbutane
Zoledronic acid
Parthenolide
Benzo(b)fluoranthene
Midazolam
Mycophenolate mofetil
Forskolin
N,n'-diphenyl-p-phenylenediamine
Fenfluramine
3-methoxytyramine
1-hexadecyl-2-(9z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
7-methyladenine
Oleoyle-L-carnitine
2-[2-[19-acetamido-6-(3,4-dicarboxybutanoyloxy)-16,18-dihydroxy-5,9-dimethylicosan-7-yl]oxy-2-oxoethyl]butanedioic acid
4-androsten-11 β -ol-3,17-dione
Vinyl carbamate
Osthole
Prothioconazole
L-valinamide,n-(4-methoxy-1,4-dioxobutyl)-l-alanyl-l-alanyl-l-prolyl-n-(4-methyl-2-oxo-2h-1-benzopyran-7-yl)
Lnt
4-(2,3-dihydroxy-3-methylbutoxy)furo(3,2-g)chromen-7-one
Thr-Pro-Arg
19-hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione
Bradykinin
Pro-Trp
Boscalid
Hydroquinone
Arachidonoyl ethanolamide
Formothion
Dodecanoic acid, 12-[[[(cyclohexylamino)carbonyl]amino]
Trachelanthine
Fenpropidin
Glu-Pro-Arg
 γ -linolenic acid

1.3 mTBI 6h 组与 TBI 3h 组筛选结果

3-pyridinecarboxaldehyde

Arenobufagin
Cys-Met-Arg
Monoelaidin
1-pyrrolidineheptanoic acid, 2-(3-hydroxyoctyl)-5-oxo-
Propanoic acid, 2-[[1-[3-[4-([1,1'-biphenyl]-4-ylcarbonyl)-2-propylphenoxy]
propyl]-1,2,3,4-tetrahydro-5-quinolinyloxy]-2-methyl
2-amino-1-phenylbutane
Zoledronic acid
Liriodenine
Parthenolide
Benzo(b)fluoranthene
Mycophenolate mofetil
N,n'-diphenyl-p-phenylenediamine
Fenfluramine
1-hexadecyl-2-(9z-octadecenoyl)-sn-glycero-3-phosphocholine
4-androsten-11.beta.-ol-3,17-dione
Vinyl carbamate
L-valinamide,n-(4-methoxy-1,4-dioxobutyl)-l-alanyl-l-alanyl-l-prolyl-n-(4-methyl-2-oxo-2
h-1-benzopyran-7-yl)
Thr-Pro-Arg
Leukotriene d4 methyl ester
Apicidin
D-myo-inositol-1,5-diphosphate
2,3-dinor-8-isoprostaglandin-f2.alpha.

2 脑组织样本中负离子模式下显著性差异代谢物

2.1 mTBI 3h 组与 Sham 组筛选结果

Gallic acid
Xanthine
Hydroxyphenyllactic acid
11beta-hydroxyprogesterone
Thymol-beta-d-glucoside
Garcinol
Ostruthin
Hydroquinidine
Glyceric acid
17,20-dimethylprostaglandin f1.alpha.
Gdp-l-fucose
O-phosphoethanolamine
Sarcosine

Gly-His-Lys

Pg 42:9

Udp-xylose

Quercetin

2-phosphonobutyric acid

L-Valine

L-gulono-1,4-lactone

Succinic semialdehyde

Cytidine

(-)-secoisolariciresinol

2,4-dichlorophenol

N-methyl-L-alanine

2-(2,6-dihydroxy-4-methoxycarbonylbenzoyl)-3-hydroxybenzoic acid

Mandipropamid

Pg 38:6

Trp-Cys

Uridine 5'-diphosphoglucuronic acid (UDP-D-glucuronate)

N-acetylneuraminate

D-Sorbitol

L-threonate

Taurine

Cholic acid

2.2 mTBI 6h 组与 Sham 组筛选结果

Gallic acid

Xanthine

Hydroxyphenyllactic acid

11beta-hydroxyprogesterone

Thymol-beta-D-glucoside

Ostruthin

Hydroquinidine

Glyceric acid

Gdp-L-fucose

Cys-Gln

Sarcosine

Gly-His-Lys

Udp-xylose

2,6'-dimethoxy-2'-hydroxychalcone

Digalacturonic acid

Gatifloxacin

L-gulono-1,4-lactone

Buprenorphine glucuronide
D-ribulose 5-phosphate
(2-aminoethoxy)[2-[docosa-4.7.10.13.16.19-hexaenoyloxy]-3-[octadeca-1.9-dien-1-yloxy]
propoxy]phosphinic acid
N-methyl-L-alanine
Thymidine
Erucic acid

2.3 mTBI 6h 组与 TBI 3h 组筛选结果:

Garcinol
17,20-dimethylprostaglandin f1.alpha.
Cys-Gln
Pg 42:9
Quercetin
2-phosphonobutyric acid
Gatifloxacin
Buprenorphine glucuronide
2-(2,6-dihydroxy-4-methoxycarbonylbenzoyl)-3-hydroxybenzoic acid
Thymidine
N-fructosyl pyroglutamate
N-acetyl-p-fluoro-dl-phenylalanine
Guanidinoethyl sulfonate

3 血清样本中正离子模式下显著性差异代谢物

3.1 mTBI 3h 组与 Sham 组筛选结果

Adenosine 5'-monophosphate
Oleic acid methyl ester
Isopropalin
1-methylhistidine
Metamitron
Guanosine diphosphate
4,6-diamino-5-formamidopyrimidine
Creatinine
Arg-Ala-Lys
N-(4-fluorobenzoyl)-5-amino-1h-indole
5-aminolevulinic acid
2-amino-1-phenylbutane
Methyl,6-diacetyloxy-10-hydroxy-2,4b,7,7,10a,12a-hexamethyl-12-methylidene-1,4,8-trio
xo-4a,5,6,6a,9,10,10b,11-octahydronaphtho[1,2-h]isochromene-2-carboxylate
L-theanine

D,l-n,n-didesmethyl-o-desmethylvenlafaxine

Lappaconitine

L-arginine, methyl ester

Trioxsalen

15-deoxy-goyazensolide

Dl-homocysteine

Flunixin

Phosphocreatine

N-.alpha.-acetyl-l-ornithine

Deoxycytidine

Carbazole

Oxamyl

Trimethylamine n-oxide

Tamoxifen

Parthenolide

Zanamivir

2'-deoxycytidine

Penbutolol

Vernolate

Methaqualone

1-Palmitoyllysophosphatidylcholine

3.2 mTBI 6h 组与 Sham 组筛选结果

Adenosine 5'-monophosphate

Oleic acid methyl ester

Isopropalin

1-methylhistidine

Metamitron

4,6-diamino-5-formamidopyrimidine

Creatinine

N-stearoylsphinganine

Hexaethylene glycol

Asn-Arg-Lys

Arg-Ala-Lys

Perseitol

N-(4-fluorobenzoyl)-5-amino-1h-indole

5-aminolevulinic acid

2-amino-1-phenylbutane

Methyl,6-diacetyloxy-10-hydroxy-2,4b,7,7,10a,12a-hexamethyl-12-methylidene-1,4,8-trioxo-4a,5,6,6a,9,10,10b,11-octahydronaphtho[1,2-h]isochromene-2-carboxylate

L-theanine

D,l-n,n-didesmethyl-o-desmethylvenlafaxine
Lappaconitine
L-arginine, methyl ester
Trioxsalen
15-deoxy-goyazensolide
Myristamine oxide
Amprenavir
DL-homocysteine
Flunixin
Phosphocreatine
6-hydroxymelatonin
Thioperamide
Triethylene glycol monobutyl ether
Deoxycytidine
Guanine
Gardenin b
Propylenethiourea

3.3 mTBI 6h 组与 TBI 3h 组筛选结果

1-methylhistidine
Guanosine diphosphate
N-stearoylsphinganine
Hexaethylene glycol
Asn-Arg-Lys
Myristamine oxide
Gossypol
1-behenoyl-2-hydroxy-sn-glycero-3-phosphocholine
2,4,6-tri-tert-butylaniline
Histidine

4 血清样本中负离子模式下显著性差异代谢物

4.1 mTBI 3h 组与 Sham 组筛选结果

Adenosine 5'-phosphosulfate
Inosine
Desferrioxamine d2
Trans-ferulic acid
3-deoxy-d-glycero-d-galacto-2-nonulosonic acid
Hippuric acid
Mycophenolate mofetil
Propanoic acid,

2-[[4-[2-[[[(cyclohexylamino)carbonyl](4-cyclohexylbutyl)amino]ethyl]phenyl]thio]-2-methyl
Phenylalanine
Homovanillic acid sulfate
Quillaic acid
3-ketofusidic acid
Etidronic acid
4-vinylphenol
2-amino-4,6-dihydroxypyrimidine
4-hydroxy-4'-chlorobiphenyl
Carnitine
Gln-Gly-Gln
Indolelactic acid
4-hydroxyisoleucine
Trp-Cys
Pe 35:2
Ethyl syringate
Fipronil sulfone
Pg 38:6
Isopentenyl pyrophosphate
Theobromine
Ponceau 6
Fludioxonil
L-arabinose

4.2 mTBI 6h 组与 Sham 组筛选结果

Adenosine 5'-phosphosulfate
Inosine
Desferrioxamine d2
Trans-ferulic acid
3-deoxy-d-glycero-d-galacto-2-nonulosonic acid
Hippuric acid
3-hydroxymyristic acid
Propanoic acid,
2-[[4-[2-[[[(cyclohexylamino)carbonyl](4-cyclohexylbutyl)amino]ethyl]phenyl]thio]-2-methyl
Homovanillic acid sulfate
Quillaic acid
3-ketofusidic acid
Etidronic acid
4-vinylphenol
Asp-Trp
4-hydroxy-4'-chlorobiphenyl

Gln-Gly-Gln

3,4-dihydroxy-5-[(2s,3r,4s,5s,6r)-3,4,5-trihydroxy-6-[[4-(2-hydroxypropan-2-yl)cyclohexane-1-carbonyl]oxymethyl]oxan-2-yl]oxybenzoic acid

2-bromophenanthridin-6-ol

Sm d42:2

Pe 35:2

Formylanthranilic acid

Lanosterol

Xanthine