疾病监测
DISEASE SURVEILANCE

蛋白质体外扩增技术在神经退行性疾病诊断中的应用

陈冬冬 石琦 董小平

Application of protein amplification in vitro in the diagnosis of neurodegenerative diseases

Chen Dongdong Shi Qi Dong Xiaoping

在线阅读 View online: https://doi.org/10.3784/jbjc.202105280304

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

基于蛋白质组学技术的新型冠状病毒感染诊断研究进展

Progress in research in diagnosis of SARS-CoV-2 infection based on proteomics technique

疾病监测. 2021, 36(1): 23 https://doi.org/10.3784/jbjc.202012040406

鼻疽诺卡菌菌体蛋白的免疫蛋白质组学研究

Immunoproteomics research of cellular protein of *Nocardia farcinica*

疾病监测. 2018, 33(4): 294 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2018.04.009

羊瘙痒因子139A感染引起小鼠脑组织中的1-ACT表达增加

Remarkable up-regulation of 1-antichymotrypsin in brains of scrapie agent 139A infected mice

疾病监测. 2017, 32(4): 282 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2017.04.007

荧光偏振检测法在布鲁氏菌病诊断中的应用

Application of fluorescence polarization assay in diagnosis of brucellosis

疾病监测. 2021, 36(12): 1248 https://doi.org/10.3784/jbjc.202103220144

浅析标准编码系统在中国疾病预防控制信息系统的应用

Application of standard coding system in China's disease prevention and control information system

疾病监测. 2017, 32(7): 615 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2017.07.020

我国散发型克-雅病失能等级及权重初步评定

Assessment of disability level and weight of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease cases in China

疾病监测. 2019, 34(2): 122 https://doi.org/10.3784/j.issn.1003-9961.2019.02.008

关注微信公众号，获得更多资讯信息

朊病毒病监测专题

蛋白质体外扩增技术在神经退行性疾病诊断中的应用

开放科学（OSID）

陈冬冬，石琦，董小平

摘要： 神经退行性疾病患者被诊断时通常已经处于疾病晚期，该类疾病的诊断主要取决于临床症状的鉴别，给诊断造成一定的困难。目前已经逐渐开始尝试对神经退行性疾病进行早期诊断。蛋白质体外扩增技术包括蛋白质错误折叠循环扩增（Protein Misfolding Cyclic Amplification, PMCA）和实时震动诱导转化（Real-time Quaking-induced Conversion, RT-QuIC），是用于检测错误折叠的蛋白质聚集体的超灵敏蛋白质扩增法。随着该类技术不断地改进，目前已逐渐应用于朊病毒病、突触核蛋白病、阿尔茨海默病和皮克氏病等疾病中错误折叠蛋白的检测。PMCA 和 RT-QuIC 技术在临床症状出现前的早期阶段也显示出很高的检测灵敏度和特异性，并且可以进行鉴别诊断，这两种检测手段作为实验室辅助诊断方法，具有巨大的应用前景。

关键词： 朊病毒病；突触核蛋白病；阿尔茨海默病；蛋白质错误折叠循环扩增；实时震动诱导转化

中图分类号： R211; R511　　**文献标志码：** A　　**文章编号：** 1003−9961（2022）02−0180−05

Application of protein amplification in vitro in the diagnosis of neurodegenerative diseases

Chen Dongdong, Shi Qi, Dong Xiaoping. Institute for Viral Disease Prevention and Control, State Key Laboratory for Communicable Disease Prevention and Control, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

***Corresponding authors**: Shi Qi,* Email: shiqi76@126.com; *Dong Xiaoping,* Email: dongxp238@sina.com

Abstract: Patients with neurodegenerative diseases are usually in the end stage when they are diagnosed. The diagnosis of these diseases mainly depends on the differentiation of clinical symptoms, which causes certain difficulties in diagnosis. In the past few years, some new diagnostic approaches have been developed for the early diagnosis of neurodegenerative diseases. Protein misfolding cyclic amplification (PMCA) and real-time quaking-induced conversion (RT-QuIC) are ultra-sensitive protein amplification assays for the detection of misfolded protein aggregates. With the improvement of these technologies, it has been gradually applied to detect the misfolded proteins in prion disease, synuclein disease, Alzheimer's disease and Pick's disease. PMCA and RT-QuIC have also shown high sensitivity and specificity in the pre-clinical stages, and can be used for differential diagnosis. As laboratory auxiliary diagnostic methods, PMCA and RT-QuIC have great application prospects.

Key words: Prion disease; Synuclein disease; Alzheimer's disease; Protein Misfolding Cyclic Amplification; Real-time Quaking-induced Conversion

This study was supported by National Key Research and Development Program of China (No. 2020YFE0205700) **and Grant from the State Key Laboratory for Infectious Disease Prevention and Control** (No .2019SKLID501)

蛋白质折叠是多肽链获得功能性空间结构过程，而如果发生错误折叠则无法发挥正常功能[1]。蛋白质错误折叠和包涵体形成与神经退行性疾病密切相关，包括阿尔茨海默病（Alzheimer's disease, AD）、帕金森病（Parkinson's disease, PD）、多系统萎缩（multiple system atrophy, MSA）、亨廷顿病（Huntington's disease, HD）以及相关的多聚谷氨酰胺（polyQ）扩张性疾病、路易体痴呆（dementia with Lewy bodies，DLB）、散发性和家族性肌萎缩侧索硬化症（amyotrophic lateral sclerosis, ALS）以及朊病毒病（ Prion diseases，PrDs ）等。这些神经退行性疾病症状上都以认知障碍为主要表征，典型症状不明显，导致疾病难以鉴别诊断。通常诊断时已经处于疾病晚期，因此，针对疾病早期建立有效的检测方法对于此类疾病的诊断尤为重要[2]。

PMCA（蛋白质错误折叠循环扩增）和 RT-QuIC（实时震动诱导转化）是两种检测病理蛋白质聚集的超灵敏蛋白质体外扩增技术。这两种技术基于存在于生物体液或组织样品中的错误折叠蛋白质。在适宜的温度下，将样品在含有底物的缓冲溶液中孵育。形成的聚集体（种子）作为模板，使单体转换为聚集体。

基金项目：国家重点研发计划（No. 2020YFE0205700）；传染病预防控制国家重点实验室课题（No. 2019SKLID501）

作者单位：中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所，传染病预防控制国家重点实验室，北京 102206

作者简介：陈冬冬，河南省南阳市人，博士生，主要从事朊病毒病致病机制研究，帕金森病蛋白质体外扩增技术研究，Email：kristen1107@163.com

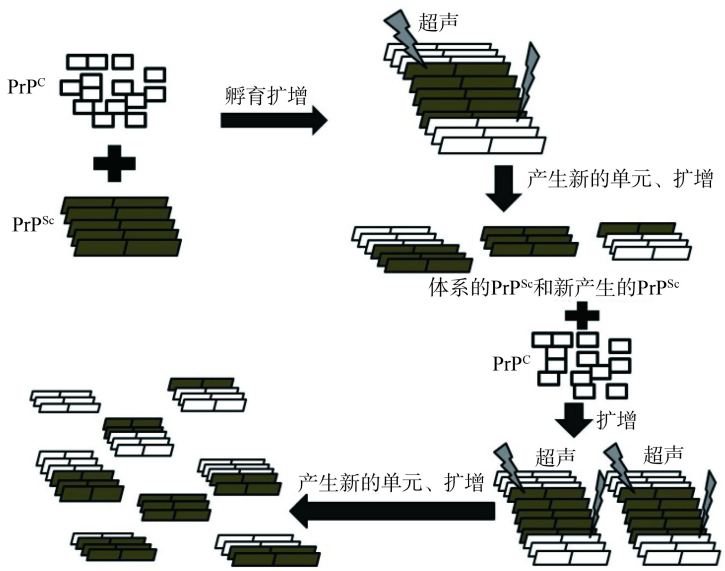
通信作者：石琦，Tel：010−58900818，Email：shiqi76@126.com；董小平，Tel：010−58900815，Email：dongxp238@sina.com

收稿日期：2021−05−28　　网络出版日期：2021−12−02

通过引入震动/超声处理步骤，将聚集体破碎以产生更多的聚合点，通过重复多次的孵育和破碎循环，以实现聚集体的指数扩增，将微量种子显著扩增至常规免疫学方法可检测水平[3]。

PMCA 方法可以应用于检测感染组织和生物体液中微量的朊病毒，目前无法用蛋白免疫印迹（western blot, WB）检测到的微量朊病毒可以通过 PMCA 技术检测，并且可以确定异常朊蛋白（scrapie amyloid-forming isoform of the prion protein, PrP^{Sc}）可接种实验动物，用于感染力分析[4]。PMCA 是在体外将待检组织匀浆或生物体液与过量的底物蛋白（一般为同种属正常动物脑匀浆）孵育，以聚集体为模板，诱导底物蛋白形成不溶性聚集物。聚集物经超声作用后可产生多个小片段结构单位，这些小单位可作为新模板参与后续反应，最终经过多次循环后，在体系内形成大量的聚集物，见图 1。反应结束，取适量反应液用蛋白酶 K（protease, PK）消化后采用 WB 检测朊病毒，用以分析待检组织匀浆或生物体液中是否存在朊病毒。

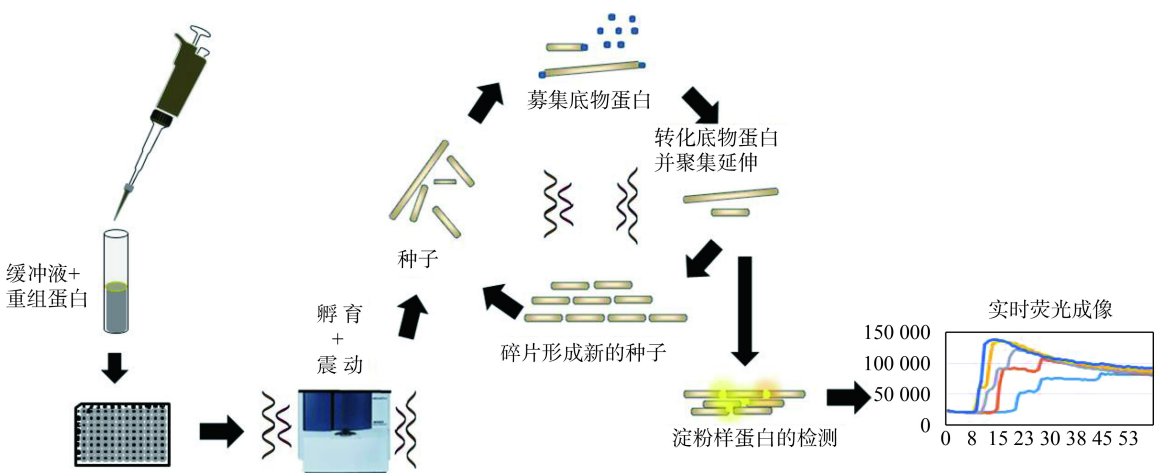
RT-QuIC 方法在 PMCA 方法的基础上进行了改进，底物由脑匀浆替换为重组朊蛋白，并用剧烈的间歇震动代替超声处理，使单体底物聚集。通过在聚集过程中结合淀粉样蛋白敏感的硫磺素-T 染料发出的荧光进行实时检测，见图 2。RT-QuIC 原理与 PMCA 相似，区别在于 PMCA 基于超声波，采用正常脑组织匀浆作为底物来源，而 RT-QuIC 基于种子



注：PMCA. 蛋白质错误折叠循环扩增； PrP^{Sc}. 异常朊蛋白； PrP^{C}. 正常的细胞型朊蛋白

图 1　PMCA 过程的示意图

Figure 1　Diagrammatic representation of PMCA procedure



注：RT-QuIC. 实时震动诱导转化

图 2　RT-QuIC 过程的示意图

Figure 2　Diagrammatic representation of RT-QuIC procedure

诱导的重组底物蛋白错误折叠和聚集，可实时通过酶标仪在荧光板读出信号，观察扩增进度[3]。RT-QuIC 方法具有耗时少的优点，同时兼具直观自动化的优点。记录的荧光值与样品中原纤维聚集体的质量成正比，其趋势可提供有关单体聚集动力学的信息。RT-QuIC 的局限性是对富含 β 折叠基序的原纤维聚集体敏感，不识别原纤维的蛋白组份[5]。PMCA 和 RT-QuIC 的都是高度灵敏和高特异性的检测方法，目前，已有对朊蛋白、Aβ 肽、Tau 蛋白和 α-突触核蛋白进行 PMCA 和 RT-QuIC 扩增的报道[4,6-9]。

1　朊病毒与朊病毒病

朊病毒（Prion），是一种不含核酸但具有感染性的蛋白质，能够侵袭人类和多种动物的神经系统并引发宿主发生神经退行性疾病。PrDs 的特征在于神经变性和致死性。在哺乳动物中，朊病毒致病的关键是通过将正常的细胞型朊蛋白（Prion celluar protein，PrP^{c}）转化为致病型 PrP^{Sc}。该病潜伏期长，致死率 100%；目前，尚无有效的治疗方法，只能通过尸检或脑组织活检检出朊病毒才能确诊。临床表现为进行性痴呆，没有疾病特性典型症状，从出现症状到疾病末期进展很快，一般小于 2 年。通过一些临床检查指标的明显异常，如核磁共振成像（nuclear magnetic resonance imaging，NMRI）、脑电图（electroencephalogram，EEG）和脑脊液（cerebro-spinal fluid，CSF）生物标志物，如 CSF 14-3-3 等可以辅助诊断[10]。但是，这些检查和检测不是 PrDs 特异性，因此，缺乏诊断准确性且没有足够的灵敏度[11]。

为解决 PrDs 早期诊断困难的问题，2001 年建立朊病毒的 PMCA 检测方法。该方法灵敏度高，可以检测到常规方法无法检测到的朊病毒[4]。待检样品可以是脑匀浆、尿液、血液、脑脊液（CSF）和唾液等。Atarashi 等[12]改进 PMCA 方法，使用重组蛋白底物替代脑匀浆作为底物，称为 rPrP-PMCA 方法，该方法可以大大缩短检测时间。

为避免 PMCA 和 rPrP-PMCA 方法中由于声波破碎处理而产生相关问题，开发了朊病毒 RT-QuIC 检测方法。该方法比 PMCA 和 rPrP-PMCA 方法速度更快，且比 PMCA 操作更便捷[13]。但 PMCA 方法可获具有感染性的 PrP^{Sc}，扩增产物颅内接种仓鼠会引发 PrDs，而 RT-QuIC 获得的是富含交叉 β 折叠基序的原纤维聚集体，因此不具感染性[14]。

目前，通过技术改进其他易获生物样本，如脑脊液、血液、血浆、血清、尿液、唾液以及外周组织中获得的活检组织（如嗅黏膜、胃肠道和皮肤）也都具有潜力作为 RT-QuIC 待检样品来源[15-23]。应用 RT-QuIC 方法在检测朊病毒病脑脊液样品中朊病毒的敏感性为 96%，特异性为 100%[24]；检测散发型 CJD 嗅觉黏膜样本中朊病毒的敏感度为 97%，特异性为 100%[23]；皮肤样品中朊病毒的敏感性为 89%，特异性为 100%[22]。其他生物样本的敏感性和特异性相对较低，方法的技术参数正在改进中。

2　α 突触核蛋白与突触核蛋白病

突触核蛋白病包括 PD、DLB 和 MSA，病因均涉及 α 突触核蛋白（α-synuclein，α-syn）的聚集，α-syn 主要存在于中枢神经系统，分布在突触前神经末端[25]。PD 是常见的神经退行性疾病，主要症状表现为运动迟缓、齿轮样强直、静止型震颤、拖行步态和平衡障碍等[26]。有研究表明，PD 的临床诊断正确率为 75%，而早期诊断准确率仅为 53%[27]。疾病早期诊断后治疗，可以明显改善患者的预后[28]。PD 的确诊诊断依赖于尸检，众多学者致力于改进 PD 的诊断方法，尤其是提高对突触核蛋白病的特异性和敏感性的早期诊断。由于 α-syn 聚集是临床症状出现之前的早期现象，因此 α-syn 的检测可以帮助早期诊断。目前，已经广泛研究了 α-syn 作为突触核蛋白病的生物标志物的诊断价值[7,29]。

PMCA 方法可检测突触核蛋白病患者 CSF 中少量的 α-syn 聚集体[7]。对 CSF 样本检测的总体敏感性为 88.5% 和特异性为 96.9%。研究发现，PMCA 方法可有效扩增出 PD 小鼠模型脑匀浆的 α-syn，扩增产物接种 PD 模型幼鼠后加速其神经症状发作[30]。通过脑脊液 α-syn 的 PMCA 方法可有效鉴别帕金森病和多系统萎缩，PD 和 MSA 最大荧光值和聚集动力学不同，MSA 患者的样本比 PD 患者的样本聚集更快，但达到的最大荧光值更低，采用生物化学、生物物理和生物学方法对 α-syn PMCA 产物进行分析，发现脑脊液中 α-syn 聚集物特征可方便地区分帕金森病和多系统萎缩，总灵敏度为 95.4%。

RT-QuIC 方法同样具备扩增错误折叠 α-syn 能力，灵敏度达 94%，特异性达 100%，表明 RT-QuIC 可用作突触核蛋白病诊断工具[31]。α-syn RT-QuIC 可应用于 PD、DLB 和 MSA 患者的脑脊液样本，采用不同的反应体系，但对 MSA 的敏感性低至 35.2%，推测是由于 MSA 和 PD 之间 α-Syn 聚集物的显著结构差异所致。通过可溶或不可溶的 α-syn 原纤维聚集体的检测可鉴别 PD 和 DLB，对接种 DLB、PD 和对照组织的 RT-QuIC 产物中行抗 PK 酶检测，DLB 组产物抗 PK 的 α-syn 的分子质量在 10～18 kDa 之间，而 PD 和对照组的 RT-QuIC 产物对 PK 完全敏感[32]。通过使用突变型 α-syn 底物和优化的反应条件，

可以在 1～2 d 内完成 CSF 标本 α-syn 的 RT-QuIC 检测。

到目前为止，α-syn 的 PMCA 和 RT-QuIC 检测方法主要用于脑脊液样品，也有用于皮肤、嗅黏膜和结肠样本的报道，但在灵敏度和特异性上有待进一步优化[33-35]。此外，标准化操作程序、减少测定的持续时间、提高其灵敏度和重复性、保证均匀的滞后时间、最大的荧光强度是 α-syn 的 PMCA 和 RT-QuIC 方法成为诊断突触核蛋白病的有效工具的前提。

3 Aβ 肽、Tau 蛋白与阿尔茨海默病

AD 患者大脑中存在两种主要的病理性包涵体，一种是细胞外淀粉样蛋白-β（amyloid-β, Aβ）沉积，以脑淀粉样斑块形式存在，另一种是细胞内 tau 蛋白聚集物，以神经纤维缠结形式存在[36]。由于 Tau 蛋白 mRNA 剪辑方式不同，正常人可表达6 种异构体，其中，包含 3 个或 4 个微管结合重复序列（3R 或 4R Tau）[37]。多种神经退行性疾病存在特征性的 Tau 蛋白聚集，不同的疾病涉及不同异构体的 Tau 蛋白聚集，如 3R（例如 Pick 病），4R（例如进行性上的核性麻痹）或 3R 和 4R Tau 蛋白的共同聚集（例如 AD 和慢性创伤性脑病）。

通过 PMCA 检测脑脊液中的 Aβ 蛋白，辅助其他诊断，能够将 AD 患者与多种其他神经退行性疾病或非退行性神经疾病的患者区分开，检测总敏感性为 90%，特异性为 92%[8]。使用来自 AD、皮质基底变性和进行性核上性麻痹患者大脑的人源性 tau 株作为种子，进行 PMCA 扩增获得的致病性 tau 蛋白可保留特定疾病的生物活性特征[38]。

研究发现，检测 3R Tau 的 RT-QuIC 方法，可以灵敏的针对 Pick 病进行诊断[39]。在此基础上，开发了三种 RT-QuIC 方法敏感地检测 Pick 病、AD 和慢性外伤性脑病，并且可以将 Pick 病与 AD 和慢性创伤性脑病区分开[40-41]。但对于 AD 的 PMCA 和 RT-QuIC 技术研究较少。

4 展望

PMCA 和 RT-QuIC 检测方法在神经退行性疾病实验室诊断中获得了极大关注。尽管仍有一定局限性，但已成为这些疾病早期诊断和治疗的潜力工具。未来进一步改进 PMCA 和 RT-QuIC 方法敏感性、准确性以及可重复性将有助于更好的辅助临床诊断。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参 考 文 献

[1] Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases[J]. *Nat Rev Neurosci*, 2003, 4(1): 49–60. DOI: 10.1038/nrn1007.

[2] Erkkinen MG, Kim MO, Geschwind MD. Clinical neurology and epidemiology of the major neurodegenerative diseases[J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2018, 10(4): a033118. DOI: 10.1101/cshperspect.a033118.

[3] Green AJE, Zanusso G. Prion protein amplification techniques[J]. *Handb Clin Neurol*, 2018, 153: 357 –370. DOI: 10.1016/b978-0-444-63945-5.00019-2.

[4] Saborio GP, Permanne B, Soto C. Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding[J]. *Nature*, 2001, 411(6839): 810 –813. DOI: 10.1038/35081095.

[5] Biancalana M, Koide S. Molecular mechanism of Thioflavin-T binding to amyloid fibrils[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1804(7): 1405–1412. DOI: 10.1016/j.bbapap.2010.04.001.

[6] Saijo E, Groveman BR, Kraus A, et al. Ultrasensitive RT-QuIC seed amplification assays for disease-associated tau, α-synuclein, and prion aggregates[M]//Gomes CM. Protein Misfolding Diseases: Methods and Protocols. New York: *Humana Press*, 2019: 19–37. DOI: 10.1007/978-1-4939-8820-4_2.

[7] Shahnawaz M, Tokuda T, Waragai M, et al. Development of a biochemical diagnosis of parkinson disease by detection of α-synuclein misfolded aggregates in cerebrospinal fluid[J]. *JAMA Neurol*, 2017, 74(2): 163 –172. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.4547.

[8] Salvadores N, Shahnawaz M, Scarpini E, et al. Detection of misfolded Aβ oligomers for sensitive biochemical diagnosis of Alzheimer's disease[J]. *Cell Rep*, 2014, 7(1): 261–268. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.02.031.

[9] Moda F. Protein misfolding cyclic amplification of infectious prions[J]. *Prog Mol Biol Transl Sci*, 2017, 150: 361–374. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2017.06.016.

[10] Chohan G, Pennington C, Mackenzie JM, et al. The role of cerebrospinal fluid 14-3-3 and other proteins in the diagnosis of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease in the UK: a 10-year review[J]. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 2010, 81(11): 1243–1248. DOI: 10.1136/jnnp.2009.197962.

[11] Collins SJ, Sanchez-Juan P, Masters CL, et al. Determinants of diagnostic investigation sensitivities across the clinical spectrum of sporadic Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *Brain*, 2006, 129(9): 2278–2287. DOI: 10.1093/brain/awl159.

[12] Atarashi R, Moore RA, Sim VL, et al. Ultrasensitive detection of scrapie prion protein using seeded conversion of recombinant prion protein[J]. *Nat Methods*, 2007, 4(8): 645 –650. DOI: 10.1038/nmeth1066.

[13] Atarashi R, Wilham JM, Christensen L, et al. Simplified ultrasensitive prion detection by recombinant PrP conversion with shaking[J]. *Nat Methods*, 2008, 5(3): 211 –212. DOI: 10.1038/nmeth0308-211.

[14] Castilla J, Saá P, Hetz C, et al. In vitro generation of infectious scrapie prions[J]. *Cell*, 2005, 121(2): 195–206. DOI: 10.1016/j.cell.2005.02.011.

[15] Orrú CD, Bongianni M, Tonoli G, et al. A test for Creutzfeldt-Jakob disease using nasal brushings[J]. *N Engl J Med*, 2014, 371(6): 519–529. DOI: 10.1056/NEJMoa1315200.

[16] Haley NJ, Carver S, Hoon-Hanks LL, et al. Detection of chronic wasting disease in the lymph nodes of free-ranging cervids by real-time quaking-induced conversion[J]. *J Clin Microbiol*, 2014, 52(9): 3237–3243. DOI: 10.1128/jcm.01258-14.

[17] Orrú CD, Wilham JM, Raymond LD, et al. Prion disease blood test using immunoprecipitation and improved quaking-induced conversion[J]. *mBio*, 2011, 2: e00078 –11. DOI: 10.1128/mBio.00078-11.

[18] Steinacker P, Blennow K, Halbgebauer S, et al. Neurofilaments in blood and CSF for diagnosis and prediction of onset in Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 38737. DOI: 10.1038/srep38737.

[19] Bongianni M, Orrù C, Groveman BR, et al. Diagnosis of human prion disease using real-time quaking-induced conversion testing of olfactory mucosa and cerebrospinal fluid samples[J]. *JAMA Neurol*, 2017, 74(2): 155 –162. DOI: 10.1001/jamaneurol.2016.4614.
[20] John TR, Schätzl HM, Gilch S. Early detection of chronic wasting disease prions in urine of pre-symptomatic deer by real-time quaking-induced conversion assay[J]. *Prion*, 2013, 7(3): 253–258. DOI: 10.4161/pri.24430.
[21] Henderson DM, Manca M, Haley NJ, et al. Rapid antemortem detection of CWD prions in deer saliva[J]. *PLoS One*, 2013, 8(9): e74377. DOI: 10.1371/journal.pone.0074377.
[22] Mammana A, Baiardi S, Rossi M, et al. Detection of prions in skin punch biopsies of Creutzfeldt-Jakob disease patients[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2020, 7(4): 559–564. DOI: 10.1002/acn3.51000.
[23] Haley NJ, Siepker C, Hoon-Hanks LL, et al. Seeded amplification of chronic wasting disease prions in nasal brushings and recto-anal mucosa-associated lymphoid tissues from elk by real-time quaking-induced conversion[J]. *J Clin Microbiol*, 2016, 54(4): 1117–1126. DOI: 10.1128/jcm.02700-15.
[24] Zanusso G, Monaco S, Pocchiari M, et al. Advanced tests for early and accurate diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease[J]. *Nat Rev Neurol*, 2016, 12(6): 325–333. DOI: 10.1038/nrneurol.2016.65.
[25] Bridi JC, Hirth F. Mechanisms of α-synuclein induced synaptopathy in parkinson's disease[J]. *Front Neurosci*, 2018, 12: 80. DOI: 10.3389/fnins.2018.00080.
[26] Hayes MT. Parkinson's disease and parkinsonism[J]. *Am J Med*, 2019, 132(7): 802–807. DOI: 10.1016/j.amjmed.2019.03.001.
[27] Adler CH, Beach TG, Hentz JG, et al. Low clinical diagnostic accuracy of early vs advanced Parkinson disease: clinicopathologic study[J]. *Neurology*, 2014, 83(5): 406 –412. DOI: 10.1212/wnl.0000000000000641.
[28] Pagan FL. Improving outcomes through early diagnosis of Parkinson's disease[J]. *Am J Manag Care*, 2012, 18(7 Suppl): S176-S182.
[29] Groveman BR, Orrù CD, Hughson AG, et al. Correction to: Rapid and ultra-sensitive quantitation of disease-associated α-synuclein seeds in brain and cerebrospinal fluid by αSyn RT-QuIC[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 180. DOI: 10.1186/s40478-020-01052-y.
[30] Nicot S, Verchère J, Bélondrade M, et al. Seeded propagation of α-synuclein aggregation in mouse brain using protein misfolding cyclic amplification[J]. *FASEB J*, 2019, 33(11): 12073 –12086. DOI: 10.1096/fj.201900354R.
[31] Manne S, Kondru N, Hepker M, et al. Ultrasensitive detection of aggregated α-synuclein in glial cells, human cerebrospinal fluid, and brain tissue using the RT-QuIC assay: new high-throughput neuroimmune biomarker assay for parkinsonian disorders[J]. *J Neuroimmune Pharmacol*, 2019, 14(3): 423 –435. DOI: 10.1007/s11481-019-09835-4.
[32] Candelise N, Schmitz M, Llorens F, et al. Seeding variability of different alpha synuclein strains in synucleinopathies[J]. *Ann Neurol*, 2019, 85(5): 691–703. DOI: 10.1002/ana.25446.
[33] Bargar C, Wang W, Gunzler SA, et al. Streamlined alpha-synuclein RT-QuIC assay for various biospecimens in Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2021, 9(1): 62. DOI: 10.1186/s40478-021-01175-w.
[34] De Luca CMG, Elia AE, Portaleone SM, et al. Efficient RT-QuIC seeding activity for α-synuclein in olfactory mucosa samples of patients with Parkinson's disease and multiple system atrophy[J]. *Transl Neurodegener*, 2019, 8: 24. DOI: 10.1186/s40035-019-0164-x.
[35] Wang ZR, Becker K, Donadio V, et al. Skin α-synuclein aggregation seeding activity as a novel biomarker for parkinson disease[J]. *JAMA Neurol*, 2020, 78(1): 30 –40. DOI: 10.1001/jamaneurol.2020.3311.
[36] Jack CR Jr, Bennett DA, Blennow K, et al. NIA-AA research framework: toward a biological definition of alzheimer's disease[J]. *Alzheimers Dement*, 2018, 14(4): 535–562. DOI: 10.1016/j.jalz.2018.02.018.
[37] Iqbal K, del C. Alonso A, Chen S, et al. Tau pathology in Alzheimer disease and other tauopathies[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2005, 1739(2/3): 198 –210. DOI: 10.1016/j.bbadis.2004.09.008.
[38] Xu H, O'Reilly M, Gibbons GS, et al. In vitro amplification of pathogenic tau conserves disease-specific bioactive characteristics[J]. *Acta Neuropathol*, 2021, 141(2): 193 –215. DOI: 10.1007/s00401-020-02253-4.
[39] Saijo E, Ghetti B, Zanusso G, et al. Ultrasensitive and selective detection of 3-repeat tau seeding activity in Pick disease brain and cerebrospinal fluid[J]. *Acta Neuropathol*, 2017, 133(5): 751–765. DOI: 10.1007/s00401-017-1692-z.
[40] Kraus A, Saijo E, Metrick II MA, et al. Seeding selectivity and ultrasensitive detection of tau aggregate conformers of Alzheimer disease[J]. *Acta Neuropathol*, 2019, 137(4): 585 –598. DOI: 10.1007/s00401-018-1947-3.
[41] Metrick II MA, Ferreira NDC, Saijo E, et al. A single ultrasensitive assay for detection and discrimination of tau aggregates of Alzheimer and Pick diseases[J]. *Acta Neuropathol Commun*, 2020, 8(1): 22. DOI: 10.1186/s40478-020-0887-z.

陈冬冬

ORCID: 0000-0002-1846-8459

作者贡献：

陈冬冬：文献收集整理，文章撰写

董小平、石琦：文章设计、修改

本文创新点和学术评论句见开放科学（OSID）平台，欢迎扫描开放科学（OSID）二维码，与作者开展交流互动

引用本文：陈冬冬，石琦，董小平. 蛋白质体外扩增技术在神经退行性疾病诊断中的应用[J]. 疾病监测，2022，37(2)：180－184. DOI: 10.3784/jbjc.202105280304

Chen DD, Shi Q, Dong XP. Application of protein amplification in vitro in the diagnosis of neurodegenerative diseases[J]. *Dis Surveill*, 2022, 37(2): 180－184. DOI: 10.3784/jbjc.202105280304

（本文编辑：杨小平）