

小鼠 *17 β -hsd10* 的克隆、表达及双抗夹心 ELISA 方法的建立

刘传志, 牛莹莹, 陈元安, 武成, 于源华

长春理工大学 生命科学技术学院, 吉林 长春 130022

刘传志, 牛莹莹, 陈元安, 等. 小鼠 *17 β -hsd10* 的克隆、表达及双抗夹心 ELISA 方法的建立. 生物工程学报, 2014, 30(11): 1775-1781.

Liu CZ, Niu YY, Chen YA, et al. Molecular cloning, prokaryotic expression and double-antibody sandwich ELISA development of *17 β -hsd10* in mouse. Chin J Biotech, 2014, 30(11): 1775-1781.

摘要: 原核表达小鼠 *17 β -羟基类固醇脱氢酶* (*17 β -hsd10*), 制备抗 *17 β -hsd10* 多克隆抗体, 建立 *17 β -hsd10* 双抗夹心酶联免疫检测方法 (Enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)。采用 RT-PCR 技术克隆得到小鼠肝脏 *17 β -hsd10* 基因, 构建原核表达体系 pET15b-*17 β -hsd10*/*Escherichia coli* BL21(DE3), IPTG 诱导重组蛋白表达, 并优化表达条件; 目的蛋白用 His 融合蛋白纯化柱 (His-Binding-resin) 纯化并免疫 BALB/c 小鼠和新西兰大耳白兔, 免疫血清总 IgG 采用硫酸铵沉淀法纯化, 用获得的高效价鼠源和兔源两种多克隆抗体, 建立 *17 β -hsd10* 双抗夹心酶联免疫检测方法。表达蛋白约为 29.5 kDa, 纯化后浓度为 1.5 mg/mL, 鼠源和兔源多克隆抗体效价分别为 1.25×10^4 和 2.5×10^4 , 建立的检测方法对于多种羟基类固醇脱氢酶无交叉反应, 特异性良好, 可检出含量约为 0.05 - 0.1 $\mu\text{g/mL}$ 的阳性血清。建立的 *17 β -hsd10* 双抗夹心 ELISA 方法, 简便、快速、敏感, 适合实验室研究科研广泛应用。并可能为检测阿尔茨海默病提供新思路和方法。

关键词: *17 β -羟基类固醇脱氢酶 10*, 双抗夹心酶联免疫方法, 多克隆抗体

Received: January 26, 2014; **Accepted:** July 25, 2014

Supported by: Key Project in the Science and Technology Development Program of Jilin (No. 20120963).

Corresponding author: Yuanhua Yu. Tel/Fax: +86-431-85583099; E-mail: yuyuanhua8888@126.com

吉林省科技发展计划重点项目 (No. 20120963) 资助。

Molecular cloning, prokaryotic expression and double-antibody sandwich ELISA development of *17 β -hsd10* in mouse

Chuanzhi Liu, Yingying Niu, Yuan'an Chen, Cheng Wu, and Yuanhua Yu

School of Life Science and Technology, Changchun University of Science & Technology, Changchun 130022, Jilin, China

Abstract: We expressed 17β -hydroxysteroid dehydrogenase10(*17 β -hsd10*) recombinant protein, prepared anti-*17 β -hsd10* polyclonal antibodies and established sandwich enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) test for detection of *17 β -hsd10*. RT-PCR was used to get the gene of *17 β -hsd10* of mouse liver, and a prokaryotic protein expression system pET15b-*17 β -hsd10*/*Escherichia coli* BL21 (DE3) which induced with isopropyl-1-thio- β -galactopyranoside (IPTG) for recombinant protein expression was constructed subsequently. The target protein purified using His-Binding-resin column was used to immunize BALB/c mice and rabbits, serum total IgGs from immunized animals were purified by ammonium sulfate precipitation method. We established a Double-antibody Sandwich enzyme linked immunosorbent assay about *17 β -hsd10* using the two antibodies we prepared. We got the concentration of 1.5 mg/mL of *17 β -hsd10* protein with molecular weight of 29.5 kDa, and polyclonal antibodies from mouse and rabbit with the tite 1.25×10^4 and 2.5×10^4 respectively. The concentration of 0.1 μ g/mL of *17 β -hsd10* can be detected by the Double-antibody Sandwich ELISA we established, and the assay was sensitive and specific. It can be widely used in clinical and experimental study.

Keywords: 17β -hydroxysteroid dehydrogenase10, double-antibody Sandwich ELISA, polyclonal antibodies

17β -羟基类固醇脱氢酶 (*17 β -hsd10*) 属于短链脱氢酶超家族 (SDR)^[1-3], 由 *17 β -hsd10* 基因编码, 参与脂肪酸 β 氧化, 糖皮质激素和孕酮分解代谢及胆汁酸同分异构化作用^[4-5]。最初, *17 β -hsd10* 被认为是 3-羟氨基辅酶 A 脱氢酶-II(SHAD, HADH2) 或内质网 $A\beta$ 相关蛋白 (ERAB)^[6-8], 现已证实, 人类的 *17 β -hsd10* 与 β -淀粉样蛋白 (Amyloid- β , $A\beta$ 蛋白) 具有中等亲和性^[5], 它通过一个氨基末端紧密的靶作用信号定位于线粒体^[9-10]。从人类 *17 β -hsd10* 同 $A\beta$ 蛋白结合的结构测定推断出 $A\beta$ 蛋白的结合是特异的^[11]。He 等研究发现, 在阿尔茨海默病 (AD) 转基因小鼠的突触海马体中存在 *17 β -hsd10* 的富集现象^[12]。Yang 等的研究也证实, *17 β -hsd10* 参与大脑认知活动, 在阿尔茨海默病患者和 AD

小鼠模型的脑中检测到 *17 β -hsd10* 的大量表达^[13]。这些研究均揭示出 *17 β -hsd10* 与阿尔茨海默病的相关性。

阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease, AD) 即所谓的老年痴呆症, 是一种致死性神经退行性疾病, 据中国阿尔茨海默病协会 2011 年公布的调查结果显示, 全球有约 3 650 万人患有痴呆症, 平均生存期只有 5.9 年, 是威胁老人健康的“四大杀手”之一。有研究认为, 开始出现明显症状之前的几年甚至是几十年, 阿尔茨海默病便已发病^[14-17]。但是, 目前为止, 在患上 AD 的最早期 (也就是出现明显症状之前), 还没有一种有效的方法能够将其发现。

目前, 诊断 AD 的最佳生物标志物包括核磁共振成像 (MRI)、正电子发射断层扫描 (PET)

和脑脊液蛋白检测^[18-19]。但是, 这些诊断方法要么价格昂贵, 要么会对患者带来极大的痛苦, 一种更加快速、简便的 AD 诊断方法仍然是该领域研究人员不断追求的目标。

本文从小鼠肝脏中克隆得到 *17β-hsd10* 基因, 原核表达小鼠 *17β-hsd10*, 制备抗 *17β-hsd10* 多克隆抗体, 建立 *17β-hsd10* 双抗夹心酶联免疫检测方法 (ELISA)^[20-21]。可检出含量约为 0.1–0.05 μg/mL 的阳性血清, 有望成为 AD 的快速诊断新方法。

1 材料与方 法

1.1 主要材料

IPTG (Merck 公司), 弗氏完全和不完全佐剂、咪唑等 (Sigma 公司), His-Binding-resin 纯化柱 (上海悦克生物技术有限公司), BALB/c 小鼠、新西兰白兔由吉林大学动物室提供, 96 孔酶标板 (Costar), HRP 标记的羊抗兔抗体购自北京中杉金桥生物技术有限公司, DN M-9602 酶标分析仪购自北京普朗有限公司。3α-*hsd*、11β-*hsd*、17β-*hsd4*、6 的标准品购置于 Sigma 公司, 组氨酸标签蛋白蛋氨酸-γ 裂解酶 (MGL)、pET-15b 质粒及 *E. coli* BL21(DE3) 为本实验室保存。

1.2 方 法

1.2.1 引物设计

根据 GenBank 上已登记的小鼠 *17β-hsd10* 基因序列以及表达载体的多克隆位点设计特异性引物, 分别引入 *Nde* I 和 *Bam*H I 酶切位点 (斜体带下划线)。引物序列如表 1, 引物合成由上海生工生物工程有限公司完成。

1.2.2 *17β-hsd10* 基因的克隆及表达

采用天根动物组织 RNA 提取试剂盒提取小

表 1 小鼠 *17β-hsd10* 基因引物序列

Table 1 Primer sequence of *17β-hsd10* gene in mouse

Primer name	Primer sequence (5'-3')
Forward	<i>ACATATGATGGCTGCGGCAGTTTCG</i>
Reverse	<i>GAGGGATCCCTTAAGGCTGCATTTCG</i>

Forward *CATATGA* is *Nde* I site, reverse *GGATCC* is *Bam*H I site.

鼠肝脏总 RNA, 随后采用 RT-PCR 试剂盒合成小鼠 *17β-hsd10* 基因 cDNA 第一链, 以此为模板进行 PCR 扩增, 反应条件: 94 °C, 5 min (94 °C, 2 min; 54 °C, 30 s, 72 °C, 1 min) 循环 30 次; 72 °C, 5 min。1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定正确后回收, 与 pUCm-T 连接后 (pUCm-T-M10) 测序。

将 pUCm-T-M10 与 pET-15b 分别用 *Nde* I 和 *Bam*H I 双酶切并回收, 产物于 22 °C 连接过夜后转化 *E. coli* BL21 (DE3), 少量提取质粒进行双酶切和 PCR 鉴定, 阳性质粒命名为 pET-5b-M10, 由上海生工测序。获得重组工程菌株在 37 °C, 培养液 pH 值为 8.0, 诱导剂 IPTG 的浓度为 0.5 mmol/L 的条件下, 振荡培养 48 h, 12% SDS-PAGE 鉴定, 亲和层析 (Ni) 柱纯化 *17β-hsd10* 蛋白。

1.2.3 抗 *17β-hsd10* 多克隆抗体的制备及纯化

用纯化后的 *17β-hsd10* 蛋白分 3 次免疫新西兰大耳白兔和 BALB/c 小鼠, 每次间隔 2 周, 第二、三次免疫 1 周后取血清, 免疫程序如表 2。

用 ELISA 法测定效价, 以免疫前的血清作为阴性对照, 阳性判定标准: P/N > 2.1 记为阳性, 抗体效价: 阳性孔最大稀释倍数记为抗体效价。抗血清在 13 000 r/min, 离心 5 min, 收集上清。等体积生理盐水混匀滴加硫酸铵 (体积分数 50%), 用浓氨水调至 pH 值 8.0, 充分沉淀抗体。室温平衡后, 离心, 弃上清。重复此沉淀步骤

表 2 *17β-hsd10* 多克隆抗体免疫程序Table 2 Immune Procedures of anti-*17β-hsd10* polyclonal antibody

	Rabbit	BALB/c mouse
The first immunization	600 μg / rabbit, emulsified in complete Freund's adjuvant, injected hypodermically	200 μg /mus, emulsified in complete Freund's adjuvant injected intraperitoneally
The second immunization	600 μg / rabbit, emulsified in incomplete Freund's adjuvant injected intraperitoneally	200 μg /mus, emulsified in incomplete Freund's adjuvant injected intraperitoneally
The third immunization	As above	As above

2-3 次。最后一次离心后所得沉淀物即为粗提 IgG 抗体。将此沉淀物溶于 4-5 mL 生理盐水中，装入透析袋 4 °C 透析过夜。于 -20 °C 保存。

1.2.4 双抗夹心 ELISA 方法的建立

以 pH9.6 的碳酸盐缓冲液稀释鼠源抗 *17β-hsd10* 多抗，包被酶标板，100 μL/孔，4 °C 过夜；用洗涤液（含 0.05% Tween 20，pH 7.0 的 PBS 溶液，PBST）洗涤 3 次；每孔加入 100 μL 封闭液（含 10 mg/mL BSA），37 °C 封闭 1 h，洗板 3 次；加入待检样品，100 μL/孔，37 °C 孵育 1 h，洗板 3 次；加入兔源抗 *17β-hsd10* 多抗，100 μL/孔，37 °C 孵育 1 h，洗板 3 次；加入酶标羊抗兔 IgG，50 μL/孔，37 °C 孵育 1 h，洗板 3 次；加底物溶液（四甲基联苯胺，TMB），50 μL/孔，室温显色 15 min；最后加 2 mol/L 硫酸终止反应，100 μL/孔，测定 OD_{450} ，计算 S/N 值， $S/N = \text{样品 } OD_{450} / \text{阴性样品 } OD_{450}$ 。

1.2.5 特异性实验

用建立的 ELISA 方法检测含有 *3α-hsd*、*11β-hsd*、*17β-hsd4*、7 的标准品，并用实验室表达的 His-标签蛋白蛋氨酸-γ 裂解酶（MGL）做标签鉴定。同时设阳性、阴性和空白对照，进行交叉反应实验，以评价该方法的特异性。

1.2.6 敏感性实验

将已确定浓度的 *17β-hsd10* 梯度稀释（1 :

800、1 : 1 600、1 : 3 200、1 : 6 400、1 : 12 800、1 : 25 600、1 : 51 200、1 : 102 400、1 : 204 800）后，取 100 μL 进行 ELISA 检测，确定所建立方法的最低检出浓度。

2 结果

2.1 *17β-hsd10* 基因的克隆

应用设计的引物及 RT-PCR 技术扩增了小鼠 *17β-hsd10* 的全长 cDNA，构建重组质粒 pUCm-T-M10，经 *Nde* I 和 *Bam* H I 双酶切，获得 789 bp 的条带，如图 1，测序证实为目的基因。

2.2 *17β-hsd10* 表达质粒的构建

构建的重组质粒双酶切及 PCR 鉴定结果分别如图 2 所示，质粒构建成功，对重组质粒 pET-15b-M10 进行 PCR 鉴定得到 1 条带证实，大小正确。

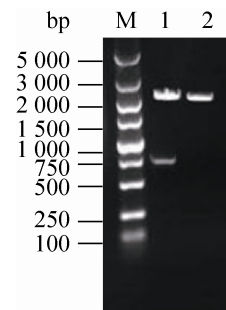


图 1 重组质粒 pUCm-T-M10 双酶切鉴定电泳图谱
Fig. 1 Electrophoretogram is double enzyme digestion of pUCm-T-M10. 1: samples; 2: pUCm-T; M: DL5 000 DNA marker.

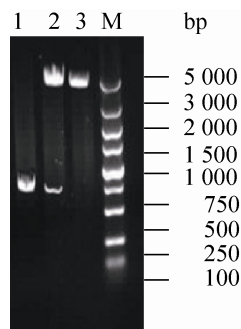


图2 重组质粒 pET-15b-M10 双酶切鉴定及 PCR 鉴定电泳图谱电泳图谱

Fig. 2 Electrophoretogram is double enzyme digestion and PCR of pET-15b-M10. 1: PCR of pET-15b-M10; 2: sample; 3: pET-15b; M: DL5 000 DNA marker.

2.3 *17β-hsd10* 的表达及纯化

重组工程菌株采用 IPTG 诱导,使其表达 *17β-hsd10* 蛋白,对诱导表达过程中的主要影响因素进行优化分析,纯化产物 SDS-PAGE 鉴定如图 3,在约 29.5 kDa 处有一条明显表达带,与预期蛋白分子量相符。

2.4 双抗夹心 ELISA 方法的建立

本研究最终获得的兔源和鼠源抗 *17β-hsd10* 多克隆抗体效价分别为 1.25×10^4 和 2.5×10^4 。其中鼠源多克隆抗体的最佳包被浓度为 $2.5 \mu\text{g/mL}$,兔源多克隆抗体的最佳工作浓度为 $1.0 \mu\text{g/mL}$,酶标抗体的稀释倍数为 1:5 000。方阵试验数据为对应反应条件下的 S/N 值(表 3)。

表 3 鼠源抗 *17β-hsd10* 多抗及兔源抗 *17β-hsd10* 多抗的最佳工作浓度确定

Table 3 Determination of the optimal concentration of coating antibody and rabbit-anti-*17β-hsd10*-IgG

Concentration of rabbit-anti- <i>17β-hsd10</i> -IgG/($\mu\text{g/mL}$)	Concentration of mouse-anti- <i>17β-hsd10</i> -IgG/($\mu\text{g/mL}$)				
	1.0	1.25	2.5	5.0	10
0.5	3.44±0.30	3.50±0.10	3.64±0.30	3.63±0.20	3.54±0.20
1.0	3.54±0.30	3.40±0.40	3.79±0.30	3.66±0.30	3.50±0.30
2.5	3.47±0.10	3.52±0.30	3.63±0.40	3.54±0.20	3.64±0.30
5.0	3.43±0.40	3.49±0.20	3.64±0.20	3.59±0.40	3.58±0.20
10.0	3.29±0.20	3.44±0.40	3.54±0.40	3.49±0.20	3.41±0.30

Carry 3 groups, two parallel samples of each group; the above data are average for each group the SD 0.20–0.50, SV 5.82%–8.38%.

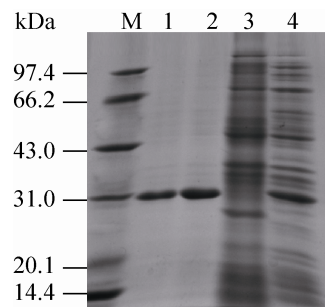


图3 *17β-hsd10* 蛋白诱导表达及纯化 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of recombinant *17β-hsd10* protein expression and purified protein. M: marker; 1, 2: *17β-hsd10*; 3: *E. coli* BL21 (pET-15b); 4: *E. coli* BL21 (pET-15b-M10).

2.5 特异性实验

用本研究建立的方法对 *3α-hsd*、*11β-hsd*、*17β-hsd4*、7 的标准品进行检测,蛋氨酸- γ 裂解酶 (MGL) M10(+) 为含有 *17β-hsd10* 和 M10(-) 为不含有 *17β-hsd10*。结果显示除重组蛋白显示阳性外,其他受试蛋白并未测出阳性,说明本方法的特异性较好(表 4)。

2.6 敏感性实验

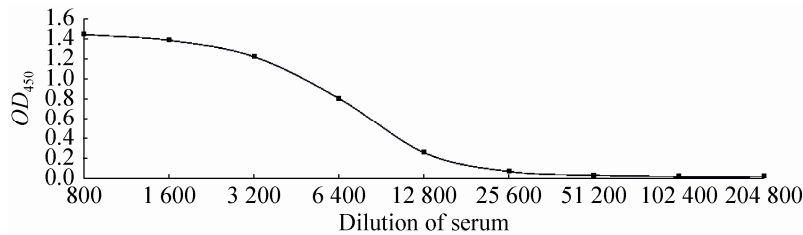
检测 *17β-hsd10* (M10+) 阳性血清, OD_{450} 值随着稀释倍数的增加而减小(图 4),当血清 12 800 倍稀释时,检测结果为阳性,当血清 25 600 倍稀释时,检测结果为阴性,即所能检测的最小范围在 $0.1\text{--}0.05 \mu\text{g/mL}$,所建立的方法具有较好的敏感性。

表 4 交叉反应实验

Table 4 The ELISA specific test

Sample	<i>3α-hsd</i>	<i>11β-hsd</i>	<i>17β-hsd4</i>	<i>17β-hsd7</i>	MGL	M10(+)	M10(-)
<i>OD</i> ₄₅₀	0.10±0.05	0.20±0.03	0.11±0.03	0.12±0.04	0.04±0.02	1.10±0.07	0.12±0.04

Carry 3 groups, two parallel samples of each group the above data are average for each group the SD 0.01–0.007, SV 5.32%–9.27%.



Sample	M10(-)	1:800	1:1 600	1:3 200	1:6 400	1:12 800	1:25 600	1:51 200	1:102 400	1:204 800
<i>OD</i> ₄₅₀	0.08	1.44± 0.62	1.38± 0.57	1.24± 0.44	0.82± 0.42	0.28± 0.07	0.12± 0.02	0.04± 0.01	0.001	0.001
P/N	----	18.00	17.25	15.50	10.25	3.50	1.50	0.50	0.012 5	0.012 5

图 4 ELISA 检测 M10 阳性血清的最大稀释倍数和 P/N 值

Fig. 4 The dilution ratio of the positive serum sample by ELISA. Carry 3 groups, two parallel samples of each group, the above *OD*₄₅₀ data are average for each group.

3 讨论

本文克隆了与 AD 相关的 *17 β -hsd10* 的基因, 与已登记的小鼠 *17 β -hsd10* 比对, 未发现碱基突变; 经 BLAST 比对发现, 与人类的 *17 β -hsd10* 的基因同源性为 99%。SDS-PAGE 凝胶电泳结果显示, *17 β -hsd10* 在 *E. coli* 中获得了高纯度表达。采用该纯化蛋白作为抗原免疫动物, 获得了高效价多克隆抗体, *3 α -hsd*、*11 β -hsd*、*17 β -hsd* 等其他类型的羟基类固醇脱氢酶呈阴性反应, 说明该方法对于 *17 β -hsd10* 具有良好的特异性; 同时, 实验结果显示, 当血清中存在 0.05 μ g/mL 以上的 *17 β -hsd10* 时, 该方法仍然可以准确检出, 说明本文建立的方法具有高度的敏感性。本文建立的 *17 β -hsd10* 双抗夹心 ELISA 方法, 通过进一步地改进提高与验证, 为研制检测阿尔茨海默病新方法奠定了基础。

REFERENCES

- [1] Lukacik P, Keller B, Bunkoczi G, et al. Structural and biochemical characterization of human orphan DHRS10 reveals a novel cytosolic enzyme with steroid dehydrogenase activity. *Biochem J*, 2007, 402(3): 419–427.
- [2] Mindnich R, Möller G, Adamski J, et al. The role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol*, 2004, 218(1/2): 17–20.
- [3] Marchais-Oberwinkler S, Henn C, Möller G, et al. 17 β -Hydroxysteroid dehydrogenases (*17 β -hsds*) as therapeutic targets: protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2011, 125(1/2): 66–82.
- [4] Hansic C, Jahner D, Spiess AN, et al. The gene for the Alzheimer-associated beta-amyloid-binding protein (ERAB) is differentially expressed in the testicular Leydig cells of the azoospermic w/w(v) mouse. *Eur J Biochem*, 1998, 258: 53–60.
- [5] He XY, Schulz H, Yu YS, et al. A human brain

- L-3-hydroxyacyl-coenzyme a dehydrogenase is identical to an amyloid β -peptide-binding protein involved in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*, 1998, 273(17): 41–46.
- [6] Shafqat N, Marschall HU, Filling C, et al. Expanded substrate screenings of human and *Drosophila* type 10 17β -hydroxysteroid dehydrogenases (*hsds*) reveal multiple specificities in bile acid and steroid hormone metabolism: characterization of multifunctional $3\alpha/7\alpha/7\beta/17\beta/20\beta/21$ -H. *Biochem J*, 2003, 376(Pt 1): 49–60.
- [7] Liao YC, Lee WJ, Hwang JP, et al. ABCA7 gene and the risk of Alzheimer's disease in Han Chinese in Taiwan. *Neurobiol Aging*, 2014, 10(1) 1547–1558.
- [8] Rosenthal SL, Kamboh MI, et al. Late-onset Alzheimer's disease genes and the potentially implicated pathways. *Curr Genet Med Rep*. 2014, 3(2):85–101.
- [9] He XY, Merz G, Yang YZ, et al. Characterization and localization of human type10 17β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Eur J Biochem*, 2001, 268(18): 4899–4907.
- [10] Yan SD, Fu J, Soto C, et al. An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature*, 1997, 389(6652): 689–695.
- [11] Hort J, O'Brien JT, Gainotti G, et al. EFNS guidelines for the diagnosis and management of Alzheimer's disease. *Eur J Neurol*, 2010, 17(10): 1236–1248.
- [12] He XY, Wen GY, Merz G, et al. Abundant type 10 17β -hydroxysteroid dehydrogenase in the hippocampus of mouse Alzheimer's disease model. *Brain Res Mol Brain Res*, 2002, 99(1): 46–53.
- [13] Yang SY, He XY, Miller D, et al. Hydroxysteroid (17β) dehydrogenase X in human health and disease. *Mol Cell Endocrinol*, 2011, 343(1/2): 1–6.
- [14] Wu F, Cai ZY, Yan Y, et al. Advances in the pathogenesis of Alzheimer's disease metabolize sugars derived. *Chongqing Medical*, 2008, 37(17): 1999–2000 (in Chinese).
- 吴芳, 蔡志友, 晏勇, 等. 阿尔茨海默病糖代谢源性发病机制研究进展. *重庆医学*, 2008, 37(17): 1999–2000.
- [15] Niu FN, Sun ZZ, Xu Y, et al. Advances in molecular targets marked the early diagnosis of Alzheimer's disease. *J Inter Neurol Neurosurg*, 2009, 1: 86–90 (in Chinese).
- 牛丰南, 孙宗正, 徐运, 等. 阿尔茨海默病早期诊断的分子靶标研究进展. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2009, 1: 86–90.
- [16] Kong YY, Guan YH, Wu P, et al. Novel PET molecular probes for early diagnosis of Alzheimer's disease. *Inter J Radiation Med Nuclear Medicine*, 2012, 36(5): 17–24 (in Chinese).
- 孔艳艳, 管一晖, 吴平, 等. PET 分子探针在阿尔茨海默病早期诊断中的研究进展. *国际放射医学核医学杂志*, 2012, 36(5): 17–24.
- [17] Rusinek H, Santi, Frid D, et al. Regional brain atrophy rate predicts future cognitive decline:6-year longitudinal MR imaging study of normal aging. *Radiology*, 2003, 229(3): 691–696.
- [18] Dimou E, Booij J, Rodrigues M, et al. Amyloid PET and MRI in Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Curr Alzheimer Res*, 2009, 6(3): 312–319.
- [19] Valotassiou V, Archimandritis S, Sifakis N, et al. Alzheimer's disease: spect and pet tracers for beta-amyloid imaging. *Curr Alzheimer Res*, 2010, 7(6): 477–486.
- [20] Clark CM, Schneider JA, Bedell BJ, et al. Use of florbetapir-PET for imaging beta-amyloid pathology. *JAMA*, 2011, 305(3): 275–283.
- [21] Wong DF, Rosenberg PB, Zhou Y. *In vivo* imaging of amyloid deposition in Alzheimer Disease using the radioligand $18F$ -AV-45 (flobetapir [corrected] F 18). *J Nucl Med*, 2010, 51(6): 913–920.

(本文责编 陈宏宇)