

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



# [12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200710107507.7

G01N 1/34 (2006.01)  
G01N 33/53 (2006.01)  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 21/76 (2006.01)

[43] 公开日 2007年10月10日

[11] 公开号 CN 101051010A

[22] 申请日 2007.5.17

[21] 申请号 200710107507.7

[71] 申请人 北京热景生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区科学城航丰路8  
号中关村丰台园生命科学孵化中心405  
室

[72] 发明人 林长青

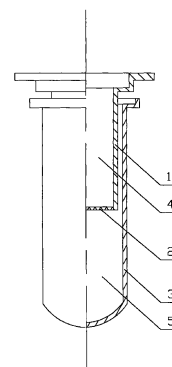
权利要求书 3 页 说明书 19 页 附图 1 页

## [54] 发明名称

一种检测糖链异常 IgA 肾病的装置及应用此装置的试剂盒

## [57] 摘要

本发明涉及了一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱。该离心柱由上部分离管和下部收集管组成。上部分离管装有偶联蜗牛凝集素(HAA)的亲合介质,上部分离管底部是一个滤布,下部收集管中装有缓冲溶液。蜗牛凝集素(HAA)能与糖链异常 IgA 相结合。经过离心洗脱,获得与蜗牛凝集素 HAA 相结合的糖链异常 IgA。本发明还涉及了一种含有该预装离心柱的化学发光检测试剂盒和一种含有该预装离心柱的酶联免疫定量检测试剂盒及其制备、使用方法。应用该试剂盒可快速、简便的测定糖链异常 IgA 的含量,准确的对 IgA 肾病进行早期诊断,为 IgA 肾病的预防、诊断、治疗提供支持。



1. 上部离心管
2. 过滤膜
3. 下部收集管
4. 填充介质
5. 保护凝集素活性的保护液

1、一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于其由上部分离管和下部收集管组成，所述上部离管装有偶联凝集素的亲合介质，上部的分离管底部有一滤布，所述下部收集管中装有缓冲溶液。为纯化亲和吸附的蛋白，并配套清洗液和洗脱液。

2、如权利要求 1 所述的分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于所述凝集素为欧洲花园蜗牛凝集素 HAA、蜗牛凝集素 HPA、或野生长绒毛豌豆凝集素 VVA、花生凝集素 PNA 。

3、如权利要求 1 所述的分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于所述亲合介质是采用琼脂糖基础介质包括琼脂糖凝胶 sepharose 4B、琼脂糖凝胶 sepharose 6B、或琼脂糖凝胶 sepharose FF，琼脂糖凝胶 sepharose CL-4B、琼脂糖凝胶 sepharose CL-6B 所述缓冲溶液为凝集素的活性保护液。

4、如权利要求 1 所述的分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于所述滤布是能阻挡偶联有凝集素的亲合介质穿过而不阻挡液体和蛋白质穿过的滤布。

5、如权利要求 3 所述的分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于所述装有偶联凝集素 HAA 的琼脂糖凝胶通过以下步骤获得：

(1)将溴化氢活化 Sepharose 4B 用 1 mmol/L HCl 浸泡、洗涤；

(2)称取 HAA，溶于偶联缓冲液中，与经洗涤的 Sepharose4B 合并混匀；

(3)用偶联缓冲液洗去未偶联的 HAA，测定洗涤液中的 HAA 含量，计得偶联率为 98%；

(4)用甘氨酸封闭剩余活化基因，洗涤，4 °C 暂存备用。

6、如权利要求 1 所述的分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，其特征在于所述检测的标本是血清和尿液，血清指去除血液中细胞成分，离心后的上清液体。

7、一种检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的定量检测试剂盒，其特征为试剂盒所含的标本处理系统如权利要求 1 所述，经过权利要求 1 所述的装置进行纯化获得糖链异常 IgA 后，进行检测获得其含量。该种定量检测方法包括放射免疫测定法、荧光免疫测定法（时间分辨荧光技术）、酶免疫测定法、免疫胶体金标记技术、化学发光免疫测定法、电化学发光免疫测定法。

8、一种如权利要求 7 所述的检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的定量检测试剂盒，其特征为标本处理系统如权利要求 1 所述，检测糖链异常 IgA 和糖链异常 IgA 含量采用化学发光方法，检测试剂盒包括下列组件：

(1) 分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱；

(2) 包被了羊抗人 IgA 多抗的化学发光酶标板；

(3) 阳性对照物、阴性对照物；

(4) 酶标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体；

(5) 化学发光底物溶液 A、化学发光底物显色液 B、糖链异常 IgA 清洗缓冲液、糖链异常 IgA 洗脱液、IgA 标准品，

所述分离糖链异常 IgA 的预装离心柱由上部分离管和下部收集管组成，所述上部分离管装有偶联凝集素的亲合介质，所述下部收集管中装有缓冲溶液。

9、一种如权利要求 7 所述的检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的定量检测试剂盒，其特征为标本处理系统如权利要求 1 所述，检测糖链异常 IgA 采用酶联免疫定量分析方法，检测试剂盒包括下列组件：

(1) 分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱；

(2) 包被了羊抗人 IgA 多抗的酶标板；

(3) 阳性对照物、阴性对照物；

(4) 酶标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体；

(5) 底物溶液 A、显色液 B、糖链异常 IgA 清洗缓冲液、糖链异常 IgA 洗脱液、反应终止液、IgA 标准品、浓缩洗涤液，

所述分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱由上部分离管和下部收集管组成，所述上部分离管装有偶联凝集素的亲合介质，所述下部收集管中装有缓冲溶液。

10, 一种如权利要求 7 所述的检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的定量检测试剂盒，其判定方法为计算糖链异常 IgA 占总 IgA 的比值、计算糖链异常 IgA 的含量。

## 一种检测糖链异常 IgA 肾病的装置及应用此装置的试剂盒

### 技术领域

本发明涉及了一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱及应用此装置的试剂盒，属于生物技术领域，用于对 IgA 肾病发生进行诊断。

### 背景技术

IgA 肾病 (IgAN) 是一组多病因引起的具有相同免疫病理学特征的慢性肾小球疾病。临床上约 40% - 45% 的患者表现为肉眼或显微镜下血尿，35% - 40% 的患者表现为显微镜下血尿伴蛋白尿，其余表现为肾病综合征和肾功能衰竭。IgA 肾病是世界范围内一种常见的肾小球疾病，它的流行在不同洲、不同国家或在一个国家不同地区的差异很大，如亚洲的日本、新加坡，IgA 肾病的发病率占原发性肾小球疾病的 50%，而美国西部的印第安人低发区只占 2%。一般而言，白人、黄种人明显高于黑人的发病率。我国 IgA 肾病的发病率占原发性肾小球疾病的 26% ~ 34%。男女之比大约是 2:1。以血尿为主的 IgA 肾病目前尚无特效的治疗。

目前诊断依据：1. 肉眼血尿或显微镜下血尿或无症状性蛋白尿（尤其男性青年）；2. 血尿为肾小球性（畸形红细胞为主），蛋白尿为高、中分子或混合性蛋白尿，血清 IgA 可能升高；3. 肾活检免疫病理检查肾小球系膜区可见到颗粒状 IgA 为主的免疫荧光；4. 除外链球菌感染后急性肾小球肾炎、非 IgA 系膜增生性肾炎、薄基底膜肾病、狼疮性肾炎、紫癜性肾炎、肝硬化及酒精性肝病的肾损害等。本病诊断依靠肾活检标本的免疫病理学检查，临床缺乏简便的免疫学检测方法。

IgA分 IgA1 和 IgA2 两个亚型。正常人血清中 IgA1 约占 80%~90%。IgA1 与 IgA2 亚型的重要区别之一就是 IgA1 分子的绞链上有 O-连接寡糖链,其结构式为: Ser (Thr)-GalNAc-Gal-NA, 而 IgA2 及其它免疫球蛋白则无此糖链结构。因此通常所说的糖链异常 IgA 既指糖链异常 IgA1。

蛋白质糖基化的方式有两种: N-连接方式和 O-连接方式。N-连接糖基与肽链上的天冬酰胺残基相连,其糖基链较长且结构复杂; O-连接糖基与肽链上的丝氨酸或苏氨酸残基相连,其糖基链较短且结构简单。大多数的血清糖蛋白仅含有 N-连接糖基而无 O-连接糖基,膜上的糖蛋白的糖基则多为 O-连接糖基。

所有的免疫球蛋白均为糖蛋白,其中 IgA 糖基化程度很高,分子中含有 8% 的糖,而且它为少见的几种既含 N-连接糖基又含 O-连接糖基的血清蛋白之一,其分子每侧重链中含有 2 个或多于 2 个的 N-连接糖基和 3-5 个 O-连接糖基。目前已知的含有 O-连接糖基的血清蛋白有: IgD、C1 抑制物、纤溶酶原、白介素-2、白介素-6、载脂蛋白 CIII、载脂蛋白 E 和促红细胞生成素,但这些糖蛋白在血清中的含量远小于 IgA1。

IgA1 分子 O-连接糖基最基本的结构是 N-乙酰乳糖胺 (GalNAc) 以 O-连接方式与肽骨架上的丝氨酸或苏氨酸残基相连。在此基础上 N-乙酰半乳糖胺可通过  $\beta$  1、3 半乳糖基转移酶在其末端连上半乳糖基。

目前研究表明, IgA 肾病与 IgA 糖链上半乳糖状态相关。IgA 肾病其典型的病理改变为肾小球基底膜上 IgA1 单体及聚合 IgA1 复合物的大量沉积。研究发现该沉淀实际上是包含 IgA1 的免疫复合物,而导致此免疫复合物的产生原因是 IgA1 由于异常糖链变化即半乳糖缺失而产生自身抗原性。

IgA1 的寡糖链半乳糖基缺失,导致其末端糖基 N-乙酰乳糖胺 GalNAc 处于暴露状态。病人 IgA1 较正常 IgA1 与凝集素 HAA (*Helix aspersa* agglutin), 结合率明显增加。

IgA1 半乳糖基化缺失的致病原因与肝细胞对其代谢性清除减少有关。肝细胞膜上含有非唾液酸糖蛋白受体,该受体通过 IgA1 寡糖链上的半乳糖 Gal 与 IgA1 特异识别,而去半乳糖型 IgA1 失去与此受体结合能力,因此,导致循环中去半乳糖基 IgA1 含量增加,并沉积到基底膜上。此外,去半乳糖基 IgA1 还易与 IgG 形成较大复合物,也阻碍了肝细胞对其摄取和处理的效能。IgA1 寡糖链的末端半乳糖是由  $\beta$  1, 3-半乳糖苷转移酶 ( $\beta$  1, 3-GTase) 催化的, IgAN 病人也伴有此酶的活性降低。用去半乳糖处理后的绞链区 IgA1 与 T 细胞、B 细胞和单核细胞共培养,以观察受体细胞对其重新半乳糖基化的转化能力实验表明;病人与正常人 T 细胞和单核细胞的转化率无差别,而 B 细胞转化率在病人则明显降低,提示 B 细胞中  $\beta$  1, 3-Gtase 酶量及活性的变化。

因此 IgA 肾病中 IgA1 糖链异常变化后会影响到其与相应受体或其它蛋白的相互作用,从而更易于与系膜基质成份结合和形成免疫复合物,沉积于肾小球,这是导致 IgA 肾病的分子机理。

因此,检测血清中糖链异常 IgA1 是早期诊断 IgA 肾病的关键。

目前 国内外尚缺乏对灵敏、特异诊断的实验室检查方法,金标准只能依靠肾活检穿刺术取肾组织,通过免疫荧光等病理分析来确诊。由于肾活检是一种创伤性手术,有一定的危险性,可引起血尿等并发症,同时手术费用昂贵,所以常不被病人所接受。

临床需要一种能够快速高效检测糖链异常 IgA 的试剂盒,但是一直没有进展。造成此困难的原因是正常 IgA 与糖链异常 IgA1 的差异只存在于糖链,既其只有质的细微改变而无明显量的变化,以往手段无法进行二者的有效区分。

凝集素是一类广泛存在于自然界的一大类非免疫来源的蛋白质或糖蛋白，它能与糖专一性地、非共价地可逆结合，并且有凝集血细胞的作用，故称为凝集素。

Sumner和Howell于1936年首先从刀豆(jackbean, *Canavalia ensiformis*)种子纯化了伴刀豆凝集素-ConA。ConA能凝集溶液中的糖元和淀粉，ConA的血凝作用可被蔗糖抑制，因而推测ConA的血凝作用是与细胞表面糖作用的结果。

目前已有近千种植物被测得具有凝集素活性。植物中，不只种子中存在凝集素，根、茎、叶、皮、果实汁中也发现有凝集素。除植物外，其它生物，如各种真菌、某些病毒、无脊椎动物、脊椎动物及至人体的各种组织和器官中都存在凝集素。

凝集素可与糖专一性地结合。目前按结合糖的类型，凝集素可分为六类：D-甘露糖或D-葡萄糖； N-乙酰氨基葡萄糖； N-乙酰氨基半乳糖； D-半乳糖； L-岩藻糖； 唾液酸。凝集素HAA(*Helix aspersa agglutin*)来源于欧洲花园蜗牛，能特异与缺失半乳糖的GalNAc结合，类似的凝集素还有目前蜗牛凝集素HPA (*Helix pomatia agglutin*)，野生长绒毛豌豆凝集素VVA (*Vicia villosa agglutin*)，花生凝集素PNA (*Peanut agglutinin*)。

## 发明内容

为了克服现有技术的不足，本发明提供一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱及含有该预装柱的诊断试剂盒。通过该试剂盒可以真实地检测出血清或尿液中糖链异常 IgA 的含量水平，准确地诊断出 IgA 肾病，具有极高的灵敏度，方法快速简便。

一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA 的预装离心柱，该预装离心柱由上部分离

管和下部收集管组成，所述上部分离心管装有偶联凝集素的亲合介质，所述下部收集管中装有缓冲溶液，所述分离管底部有一滤布，使得琼脂糖颗粒无法穿过的滤布。该装置通过离心收集纯化的组分。

所述凝集素包括欧洲花园蜗牛凝集素 HAA(Helix aspersa agglutin)、蜗牛凝集素 HPA( Helix pomatia agglutin ),野生长绒毛豌豆凝集素 VV( Vicia villosa ),花生凝集素 PNA ( Peanut agglutinin )。

所述亲合介质是采用琼脂糖凝胶为基础载体的介质包括琼脂糖 sepharose 4B、琼脂糖凝胶 sepharose 6B 或琼脂糖凝胶 sepharose FF, 琼脂糖凝胶 sepharose CL-4B、琼脂糖凝胶 sepharose CL-6B。

所述缓冲溶液为凝集素的活性保护液。

所述琼脂糖凝胶为 sepharose 4B, 缓冲液为凝集素的活性保护液, 含 1mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、1 mmol/L 的  $\text{MnCl}_2$  和 50 mmol/L 的 Tris-HCL, PH 7.5。

所述滤布是能阻挡偶联有凝集素的亲合介质穿过而不阻挡液体和蛋白质穿过的滤布。

所述检测的标本是血清和尿液, 血清指去除血液中细胞成分, 离心后的上清液体。

所述装有偶联凝集素的琼脂糖凝胶由以下步骤得到的:

采用 Pharmacia 公司经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 偶联凝集素 HAA ( 采购自 Sigma 公司 ) 。

(1)将 1.5 g Sepharose 4B 浸泡于 1 mmol/L HCl 至膨胀, 移入砂蕊漏斗, 以 300 mL 1 mmol/L HCl 洗涤约 30 min;

(2)称取 2 mgHAA, 溶于 7.5 mL 偶联缓冲液 ( 0.1 mmol/L  $\text{NaHCO}_3$ , 0.5 mol/L NaCl, pH 8.3 ), 与经洗涤的 Sepharose 4B 合并, 以带塞的 10 mL 试管上下颠倒混匀 ( 室温, 2 h );

(3)以 10 mL 偶联缓冲液洗去未偶联的 HAA,测定洗涤液中的 HAA 含量,计得偶联率为 98%;

(4)用 0.2 mol/L 甘氨酸封闭剩余活化基因;

(5)依次用 10 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4, 含 0.5 mol/L NaCl) 和 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 8, 含 0.5 mol/L NaCl) 洗涤 3 次,再以含 0.1% BSA、1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.1 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 的 PBS (PBS-BSA) 洗涤 1 次,4 °C 暂存备用。

本发明提供了与微量离心柱配套使用,用于洗脱结合到 HAA-Sepharose 上面的糖链异常 IgA1 的洗脱液,其制作方法和组成如下:

20mmTris-Hcl,NaCl 150mm,ph7.4 缓冲液,其中含有 500mm α-甲基-D-甘露糖苷,为保证长时间保存而不长菌,加入防腐剂 Proclin 300 至 0.1%.

洗脱步骤:在洗脱时,将上述溶液加入其中,在温箱中温育 30 分钟,达到洗脱的目的。

本发明提供了一种采用该预装离心柱进行纯化糖链异常 IgA 步骤及其相关试剂组成。

该组合包括预装微量离心柱(内装已经偶联了欧洲花园蜗牛凝集素 HAA 的琼脂糖和其保护液),清洗液(20mmTris-Hcl,PH7.4 缓冲液,0.1% Proclin 300),洗脱液(20mmTris-Hcl,NaCl 150mm,ph7.4 缓冲液,其中含有 500mm α-甲基-D-甘露糖苷,0.1%,Proclin 300)。

1. 将待检测血清或尿液完全离心,血清要求无溶血;取出预装微量离心柱,弃去下层收集管中液体。

2. 样本稀释:吸取 250ul 血清或尿液于试管中,并加入 350ul 清洗液稀释、摇匀。

3. 加样: 吸出 450ul 稀释后标本加入上部分离心管中。37℃温箱静置, 此操作请不要盖离心管盖子, 样本稀释液将在 15 分钟内流入下层收集管中; 试管中剩余 150ul 稀释标本 (样本①) 准备对照检测用。

4. 将收集管内液体弃去;

5. 往上部离心管中加入清洗液 600ul, 等待清洗液全部流入下层收集管中 (约 3 分钟), 盖上离心管盖, 2000 转 (或 3000 转) 室温下离心 2 分钟;

6. 弃去下层收集管中液体;

7. 往上部离心管中加入清洗液 600ul, 等待清洗液全部流入下层收集管中 (约 3 分钟), 盖上离心管盖, 2000 转 (或 3000 转) 室温下离心 2 分钟;

8. 弃去下层收集管中液体;

9. 加入洗脱液 450ul, 等洗脱液体数滴出现在下层收集管时, 盖上离心管盖, 放置 37℃恒温箱中, 温育 30 分钟;

10. 取出离心管, 2000 (或 3000 转) 转室温下离心 2 分钟;

11. 收集流入下层收集管中的液体 (样本②) 备检测。

本发明提供了一种含有上述预装离心柱的化学发光试剂盒及其制备方法。

该化学发光试剂盒包括了分离 IgA 肾病糖链异常 IgA1 的预装离心柱; 包被了羊抗人 IgA 的化学发光酶标板; 阳性对照物、阴性对照物; 酶标记的抗 IgA1 单克隆抗体; 底物溶液 A、显色液 B、糖链异常 IgA1 清洗缓冲液、糖链异常 IgA1 洗脱液、IgA 标准品。

本试剂盒的制作方法如下:

(1)包被: 将普通高滴度的羊抗人 IgA 多抗(来源于 Sigma 公司)用 0.05M 柠檬酸缓冲液稀释后加入酶标板各孔, 每孔 100 $\mu$ l, 吸附过夜, 用吐温磷酸盐缓冲液洗板, 再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干,

即获得单克隆抗体包被酶标板。化学发光酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是96孔平板或12×8、12×4可拆条板；

(2) 阳性、阴性对照物：

阳性对照物：收集IgA肾病病人血清，过滤除菌、分装；

阴性对照物：收集正常人血清，过滤除菌、分装；

(3) 酶标记单抗：购买自Sigma公司的HRP-鼠抗人IgA1。

(4) 辅助试剂的配制方法如下：

a) 底物溶液A：通过市售获得

b) 显色液B：通过市售

c) 糖链异常IgA1清洗缓冲液 20mmTris-HCl, PH7.4,含0.1%Proclin 300防腐劑

d) 糖链异常IgA1洗脱液 20mmTris-HCl, PH7.4,150mmNaCl,500mmol/L α-甲基-D-甘露糖苷, 含0.1%Proclin 300防腐劑

d)浓缩洗涤液(20倍浓缩液, 20×)：PBS (pH7.4)配制的0.05%吐温20溶液；

(5) 将预装离心柱、包被了羊抗人IgA多抗的化学发光酶标板、阳性对照物、阴性对照物、酶标记的鼠抗人IgA1单克隆抗体、底物溶液A、显色液B、糖链异常IgA1清洗缓冲液、糖链异常IgA1洗脱液、IgA标准品共同包装，得到试剂盒。

本发明还提供了一种含有上述预装离心柱的酶联免疫定量检测试剂盒及其制作。

该试剂盒包括了分离IgA肾病糖链异常IgA1的预装离心柱；包被了羊抗人IgA多抗的酶标板；阳性对照物、阴性对照物；酶标记的鼠抗人IgA1单克隆抗体；底物溶液A、显色液B、反应终止液、糖链异常IgA1清洗缓冲液、糖链异常IgA1洗脱液、IgA标准品、浓缩洗涤液。

本试剂盒的制作方法如下:

(1)包被:将普通高滴度的羊抗人 IgA 多抗(来源于 Sigma 公司)用 0.05M 碳酸缓冲液稀释后加入酶标板各孔,每孔 100 $\mu$ l,吸附过夜,用吐温磷酸盐缓冲液洗板,再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜,甩干后晾干,即获得单克隆抗体包被酶标板。酶标板是聚苯乙烯酶标板,可选用国产板或进口板;规格可以是 96 孔平板或 12 $\times$ 8、12 $\times$ 4 可拆条板;

(2)阳性、阴性对照物:

阳性对照物:收集 IgA 肾病病人血清,过滤除菌、分装;

阴性对照物:收集正常人血清,过滤除菌、分装;

(3)酶标记单抗:标记 HRP 的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体来源于 Sigma 公司。

(4)辅助试剂的配制方法如下:

a)底物溶液 A:磷酸-柠檬酸缓冲液(pH5.0)配制的 3%过氧化氢溶液;

b)显色液 B:四甲基联苯胺(TMB)甲醇溶液,浓度为 0.1mg/ml;

c)糖链异常 IgA1 清洗缓冲液 20mmTris-Hcl, PH7.4,含 0.1%Proclin 300 防腐剂

d)糖链异常 IgA1 洗脱液 20mmTris-Hcl, PH7.4,150mmNaCl,500mmol/L  $\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷,含 0.1%Proclin 300 防腐剂

e)浓缩洗涤液(20 倍浓缩液, 20 $\times$ ): PBS (pH7.4)配制的 0.05%吐温 20 溶液;

f)反应终止液: 2mol/L 硫酸;

(5)将预装离心柱、包被了羊抗人 IgA 多抗的酶标板、阳性对照物、阴性对照物、酶标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体、底物溶液 A、显色液 B、糖链异常 IgA1 清洗缓冲液、糖链异常 IgA1 洗脱液、反应终止液、IgA 标准品共同包装,得到试剂盒。

本发明克服了以往 IgA 肾病无特异检测方法的缺点，避免肾活检给病人带来的痛苦，操作者只需要离心和温育等简单操作，在 2 小时内就可以完成检测，直接定量计算出血样或尿液标本中所含的糖链异常 IgA1 的含量，方法简便，检测快捷，结果准确，为 IgA 肾病的预防、诊断、治疗提供了支持。

## 附图说明

附图为本发明预装离心柱的剖面结构示意图。

## 具体实施方式

下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是，本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的具体改进都属于本发明要求保护的范畴。

参见附图，本发明提供一种分离 IgA 肾病糖链异常 IgA1 的预装离心柱，由位于上部的分离管 1 和位于下部的收集管 3 组成，通常可以采用将分离管插接到收集管上的方式实现两者的连接，所述上部分离管装有偶联凝集素的亲合介质 4（为图面清晰起见，图中标注的是用于装亲合介质的管内空间，没有绘出介质实物），所述下部收集管中装有缓冲溶液（为图面清晰起见，图中标注的是用于装缓冲溶液的管内空间，没有绘出溶液实物），所述分离管底部主要是一滤布，该滤布采用能阻挡偶联有凝集素的亲合介质穿过而不阻挡液体和蛋白质穿过的滤布，以便在离心分离时，分离出来的液体和蛋白质能够透过该滤布进入下面的收集管。可以使用现有的这种滤布，并通过在分离管底部设置一个夹持塑料垫圈，将滤布固定住。

实施例 1: 检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的酶联免疫定量检测试剂盒的制作:

该试剂盒（96 人份）组成包括:

IgA 肾病糖链异常 IgA 亲和吸附离心管 96 份

IgA 肾病阴性、阳性对照物各 1 瓶;

羊抗人 IgA 多抗包被板 (96 孔) 1 块;

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

IgA 标准品 1 瓶;

底物溶液 A、显色液 B 各 1 瓶, 5ml/瓶;

反应终止液 1 瓶, 5ml/瓶;

糖链异常 IgA 清洗缓冲液 25ml/瓶

糖链异常 IgA 洗脱液 15ml/瓶

浓缩洗涤液 (20 倍浓缩液, 20×) 20ml/瓶

具体操作如下:

1. 制备 IgA 肾病-阴性、阳性对照物:

1) 收集血清或尿液: 从医院或血站获得健康正常人血清, 于-20℃保存备用; 当试剂盒用于检测尿液时, 对照阳性采用 IgA 肾病阳性病人尿液。

2) 分装:

阳性对照物: 在无菌条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中, 每管 0.5ml。贮存于 4℃;

阴性对照物: 正常人血清, 经检定为 IgA 肾病阴性。取多份以上血清合并成批, 经 60℃ 1 小时处理后, 过滤除菌。在无菌的条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中, 每管 0.5ml。贮存于 4℃。

2. 制作羊抗人 IgA 多抗包被板:

a) 包被:

酶标板采用进口或国产的 12×8 可拆条板。将羊抗人 IgA 多抗用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释为 20μg/ml 后加入酶标板各孔, 每孔 100μl, 吸附过夜, 用清水缓冲液洗板, 再用该封闭液 2%BSA 封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得羊抗人 IgA 多抗包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭;

b)辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体可以市售(Sigma 公司)获得:

4)分装:用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3)获得的酶标鼠抗人 IgA1 单克隆抗体至合适的工作浓度,按 6ml/瓶分装,贮存于 4℃。

4. 辅助试剂的配制:

1)底物溶液 A: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (PH5.0) 配制的 3% 过氧化氢溶液,按 5ml/瓶分装;

2)显色液 B: TMB(0.1mg/ml) 甲醇溶液,按 5ml/瓶分装;

3)反应终止液: 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>,按 3ml/瓶分装;

4)糖链异常 IgA 清洗缓冲液 20mmTris-Hcl, PH7.4,含 0.1%Proclin 300 防腐剂

5)糖链异常 IgA 洗脱液 20mmTris-Hcl, PH7.4,150mmNaCl,500mmol/L α - 甲基-D-甘露糖苷,含 0.1%Proclin 300 防腐剂

6)浓缩洗涤液 (20 倍浓缩液, 20×): PBS (pH7.4) 配制的 0.05%吐温 20 溶液;

实施例 2: 检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的化学发光检测试剂盒的制作

该试剂盒 (96 人份) 组成包括:

IgA 肾病糖链异常 IgA 亲和吸附离心管 96 份

IgA 肾病阴性、阳性对照各 1 瓶;

羊抗人 IgA 多抗包被板 (96 孔) 1 块;

辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体 1 瓶, 6ml/瓶;

IgA 标准品 1 瓶

底物溶液 A、显色液 B 各 1 瓶, 5ml/瓶;

糖链异常 IgA 清洗缓冲液 25ml/瓶

糖链异常 IgA 洗脱液 15ml/瓶

浓缩洗涤液（20倍浓缩液，20×） 20ml/瓶

具体操作如下：

1. 制备 IgA 肾病-阴性、阳性对照物：

1) 收集血清或尿液：从医院或血站获得健康正常人血清，于-20℃保存备用；当试剂盒用于检测尿液时，对照阳性采用 IgA 肾病阳性病人尿液。

2) 分装：

阳性对照物：在无菌条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中，每管 0.5ml。贮存于 4℃；

阴性对照物：正常人血清，经检定为 IgA 肾病阴性。取多份以上血清合并成批，经 60℃ 1 小时处理后，过滤除菌。在无菌的条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中，每管 0.5ml。贮存于 4℃。

2. 制作羊抗人 IgA 多抗包被板：

a) 包被：

化学发光酶标板采用进口或国产的 12×8 可拆条板。将步骤 1) 羊抗人 IgA 多抗用 0.05mol/L 柠檬酸缓冲液稀释为 20μg/ml 后加入酶标板各孔，每孔 100μl，吸附过夜，用清洗缓冲液洗板，再用该封闭液缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得单克隆抗体包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭；

b) 辣根过氧化物酶(HRP)标记的鼠抗人 IgA1 单克隆抗体通过市售(Sigma 公司)获得：

4) 分装：用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的酶标鼠抗人 IgA1 单克隆抗体至合适的工作浓度，按 6ml/瓶分装，贮存于 4℃。

4. 辅助试剂的配制：

1) 底物溶液 A: 1.0ml EDTA ( $1.0 \times 10^{-2}$  M)、1.0ml H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $7.5 \times 10^{-3}$  M)、0.4ml HCl ( $1.0 \times 10^{-2}$  M) 和 0.2ml Tween20 (1%)

2) 显色液 B: luminol  $5.0 \times 10^{-4}$  Mol/L;

3) 糖链异常 IgA 清洗缓冲液 20mmTris-Hcl, PH7.4,含 0.1%Proclin 300 防腐剂

4) 糖链异常 IgA 洗脱液 20mmTris-Hcl, PH7.4,150mmNaCl,500mmol/L  $\alpha$ -甲基-D-甘露糖苷, 含 0.1%Proclin 300 防腐剂

5)浓缩洗涤液 (20 倍浓缩液, 20 $\times$ ): PBS (pH7.4) 配制的 0.05%吐温 20 溶液;

### 实施例 3: 预装离心柱的制备和使用

1、预装离心柱由离心柱和填充介质组成, 离心柱由上部的离心管和下部的收集管组成, 二者套在一起, 组成离心柱, 辅助试剂包括糖链异常 IgA 清洗液和糖链异常 IgA 洗脱液。

2、离心柱填充材料的制备: 采用 Pharmacia 公司经 CNBr 活化的 Sepharose 4B 和 Sigma 公司的 HAA, 按以下步骤偶联:

(1)将 1.5 g Sepharose 4B 浸泡于 1 mmol/L HCl 至膨胀, 移入砂蕊漏斗, 以 300 mL 1 mmol/L HCl 洗涤约 30 min;

(2)称取 50 mg HAA, 溶于 7.5 mL 偶联缓冲液 (0.1 mmol/L NaHCO<sub>3</sub>, pH 8.3, 0.5 mol/L NaCl), 与经洗涤的 Sepharose 4B 合并, 以带塞的 10 mL 试管上下颠倒混匀 (室温,2 h);

(3)以 10 mL 偶联缓冲液洗去未偶联的 HAA。经测定洗涤液中的 HAA 含量, 计得偶联率为 98%;

(4)用 0.2 mol/L 甘氨酸封闭剩余活化基因;

(5)依次用 10 mL 0.1 mol/L 醋酸缓冲液 (pH 4, 含 0.5 mol/L NaCl) 和 0.1 mol/L Tris 缓冲液 (pH 8, 含 0.5 mol/L NaCl) 洗涤 3 次, 再以含 0.1% BSA, 1 mmol/L CaCl<sub>2</sub> 和 0.1 mmol/L MnCl<sub>2</sub> 的 PBS (PBS-BSA) 洗涤 1 次, 4 °C 暂存备用。

3、在上部分离心管中，加入一层滤布，并加一个塑料垫圈固定，该滤布的孔径小于琼脂糖，因此琼脂糖不能经过，但是蛋白质量和液体可以流过。取300ul 已经偶联的凝集素的 sepharose 4B 加入离心柱上部的离心管中。

4、加入 1ml-2ml 凝集素保存缓冲液，缓冲液充满存在介质的部位，并大部分存在于下面的收集管中，本发明预装离心柱下部收集管中的缓冲液含 1mmol/L 的  $\text{CaCl}_2$ 、1 mmol/L  $\text{MnCl}_2$  和 50 mmol/L Tris-HCL，PH 7.5

本预装离心柱的使用方法如下：

1. 将待检测血清或尿液完全离心，血清无溶血；取出预装微量离心柱，弃去下层收集管中液体。
2. 样本稀释：吸取 250ul 样本于试管中，并加入 350ul 清洗液稀释、摇匀。
3. 加样：吸出 450ul 稀释后标本加入上部分离心管中。37℃温箱静置，此操作请不要盖离心管盖子，样本稀释液将在 15 分钟内流入下层收集管中；
4. 将收集管内液体弃去；
5. 往上部离心管中加入清洗液 600ul，等待清洗液全部流入下层收集管中（约 3 分钟），盖上离心管盖，2000 转（或 3000 转）室温下离心 2 分钟；
6. 弃去下层收集管中液体；
7. 往上部离心管中加入清洗液 600ul，等待清洗液全部流入下层收集管中（约 3 分钟），盖上离心管盖，2000 转（或 3000 转）室温下离心 2 分钟；
8. 弃去下层收集管中液体；
9. 加入洗脱液 450ul，等洗脱液体数滴出现在下层收集管时，盖上离心管盖，放置 37℃恒温箱中，温育 30 分钟；
10. 取出离心管，2000（或 3000 转）转室温下离心 2 分钟；
11. 收集流入下层收集管中的液体（样本②）备检测。

本发明的试剂盒的质量检测方法是：

1) 蛋白载量: 偶联 HAA 的含量通过计算偶联前蛋白含量减去未偶联蛋白获得含量。要求不低于 7mg/ml, 在 7-10mg/ml 可以取得较好的结果。

2) 准确性: 5 份正常阴性质控血清 (包括特异性对照血清) 参考品、5 份正常尿液参考品的检测结果, 无假阳性出现。3 份 IgA 肾病患者血清和 2 份 IgA 肾病患者尿液标本检测结果无假阴性出现。

3) 精密度: 随机抽取 20 盒不同批次试剂盒, 用同一份阳性质控血清按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果, 求出均值、SD 和变异系数 CV。精密度试验结果显示批间 CV 小于 10%。

3) 检测灵敏度: 根据 IgA 标准品稀释测定结果, 本试剂盒的检测灵敏度为 10ng/ml。

实施例 4: 用本发明提供的检测 IgA 肾病糖链异常 IgA 的化学发光检测试剂盒进行糖链异常 IgA 含量检测的方法和步骤是:

#### 一、试剂盒组成

- 1, 羊抗人 IgA 多抗包被板
- 2, 鼠抗人 IgA1 单抗酶标记物
- 3, 化学发光底物 A 和 B
- 4, 浓缩洗涤液
- 5, 预装 HAA-Sepharose 4B 亲和吸附离心管
- 6, 糖链异常 IgA 清洗液
- 7, 糖链异常 IgA 洗脱液
- 8, IgA 定量标准品
- 9, 说明书
- 10, 盖板膜

#### 二、标本处理和糖链异常 IgA 纯化

1. 取出预装微量离心柱，弃去下层收集管中液体。将待检测血清或尿液完全离心，血清要求无溶血；
2. 样本稀释：吸取 250ul 血清或尿液于试管中，并加入 350ul 清洗液稀释、摇匀。
3. 加样：吸出 450ul 稀释后标本加入上部分离心管中。37℃温箱静置，此操作请不要盖离心管盖子，样本稀释液将在 15 分钟内流入下层收集管中；试管中剩余 150ul 稀释血清（样本①）准备对照检测用。
4. 将收集管内液体弃去；
5. 往上部离心管中加入清洗液 600ul，等待清洗液全部流入下层收集管中（约 3 分钟），盖上离心管盖，2000 转（或 3000 转）室温下离心 2 分钟；
6. 弃去下层收集管中液体；
7. 往上部离心管中加入清洗液 600ul，等待清洗液全部流入下层收集管中（约 3 分钟），盖上离心管盖，2000 转（或 3000 转）室温下离心 2 分钟；
8. 弃去下层收集管中液体；
9. 加入洗脱液 450ul，等洗脱液体数滴出现在下层收集管时，盖上离心管盖，放置 37℃恒温箱中，温育 30 分钟；
10. 取出离心管，2000（或 3000 转）转室温下离心 2 分钟；
11. 收集流入下层收集管中的液体（样本②）备检测。

### 三、定量检测糖链异常 IgA

1. 设计好包被板的位置及数量，未用的包被板密闭，放入到 2-8℃冰箱中。
2. 加入待检查糖链异常 IgA 的标本到相应的包被板微孔中。
3. 37℃温育 30 分钟。
4. 洗涤 5 次，扣干包被板上残留的液体。
5. 依次向各孔中加入 100 μl 的酶结合物。

6. 37℃温育 30 分钟
7. 洗涤 5 次，扣干包被板上残留的液体
8. 向每孔加入 50 μl 底物液，请预先将 A、B 液等体积混合；或向每孔中先加 25 μl 底物 A 再加 25 μl 底物 B，轻轻拍匀 5 秒钟。
9. 在加入底物后 10 分钟内采用化学发光仪进行检测。

#### 四、结果判定

制作标准曲线：以标准品浓度为横坐标，标准品测定的 RLU 值为纵坐标，作出标准曲线；计算标准曲线回归系数  $R^2$ ，当  $R^2 > 0.95$  时本次测定有效；

将检测所得的读值按该试剂标准品曲线计算糖链异常 IgA 含量，

比值判定：糖链异常 IgA  $\geq 10\text{ng/mL}$  为 IgA 肾病或患 IgA 肾病高危者

糖链异常 IgA1%判定：（IgA1 样本 2 含量 ÷ IgA1 样本 1 含量）\*100%

糖链异常 IgA1%  $\geq 10\%$  为 IgA 肾病阳性

糖链异常 IgA1%  $< 10\%$  为 IgA 肾病阴性

实施例 5：采用本发明提供的试剂盒对 IgA 肾病病人阳性样品的检测结果：

为判断本发明酶联免疫试剂盒与临床 IgA 肾病检测结果的符合率，取本发明的试剂盒进行了对比检测实验。采用北京大学附属第一医院提供的 20 份已知 IgA 肾病标本和来自河北血液中心的 20 份正常献血员血清进行对比检测。

表 1. 在不同标本中检出率比较

血清来源	例数	阳性数（阳性比例）	
		肾活检	本方法
20 份原发性肝癌阳性标本	20	100%	100 %
20 份健康人	20	0	0

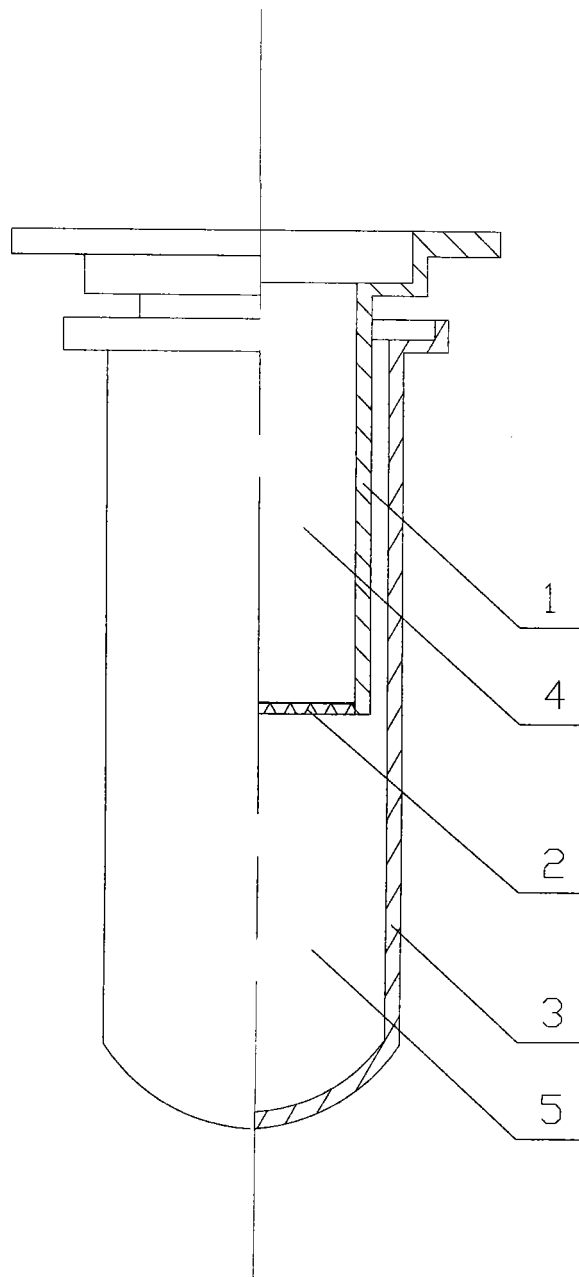
实施例 5: 采用本发明提供的试剂盒对 IgA 肾病病人血清样品和尿液样品检测的对比结果:

为判断本发明对两种样本检测的差异, 取本发明的化学发光试剂盒对来自美国阿拉巴马州伯明翰大学医学系提供的 10 份已知 IgA 肾病血清和尿液标本进行对比检测。

表 2. 在不同标本中检出率比较

样本来源 (均为确诊病人)	例数	本方法检测阳性率
		(糖链异常 IgA% $\geq$ 10 为阳性)
血清样本	10 份	100%
尿液样本	10 份	90%

结果表明两种体液检测无明显差异。

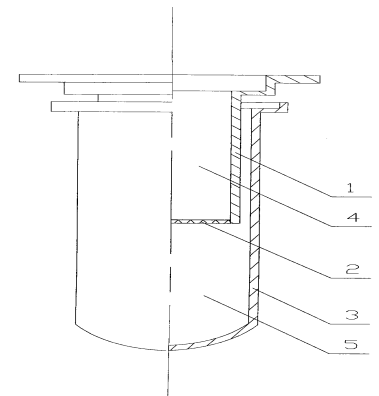


- 1, 上部离心管
- 2, 过滤膜
- 3, 下部收集管
- 4, 填充介质
- 5, 保护凝集素活性的保护液

专利名称(译)	一种检测糖链异常IgA肾病的装置及应用此装置的试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101051010A</a>	公开(公告)日	2007-10-10
申请号	CN200710107507.7	申请日	2007-05-17
[标]申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	北京热景生物技术有限公司		
[标]发明人	林长青		
发明人	林长青		
IPC分类号	G01N1/34 G01N33/53 G01N33/577 G01N21/76		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及了一种分离IgA肾病糖链异常IgA的预装离心柱。该离心柱由上部分离管和下部收集管组成。上部分离管装有偶联蜗牛凝集素(HAA)的亲合介质，上部分离管底部是一个滤布，下部收集管中装有缓冲溶液。蜗牛凝集素(HAA)能与糖链异常IgA相结合。经过离心洗脱，获得与蜗牛凝集素HAA相结合的糖链异常IgA。本发明还涉及了一种含有该预装离心柱的化学发光检测试剂盒和一种含有该预装离心柱的酶联免疫定量检测试剂盒及其制备、使用方法。应用该试剂盒可快速、简便的测定糖链异常IgA的含量，准确的对IgA肾病进行早期诊断，为IgA肾病的预防、诊断、治疗提供支持。



1. 上部离心管
2. 过滤膜
3. 下部收集管
4. 填充介质
5. 保护凝集素活性的保护液