



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103969234 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201410154456. 3

(22) 申请日 2014. 04. 17

(71) 申请人 山东东兴汇智生物科技有限公司
地址 261061 山东省潍坊市高新区健康东街
以南高新二路以东

(72) 发明人 唐东起 李世武 吴琦 苏红霞

(74) 专利代理机构 济南信达专利事务所有限公
司 37100

代理人 罗文墨

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

G01N 33/533 (2006. 01)

权利要求书2页 说明书5页
序列表3页 附图1页

(54) 发明名称

可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的
方法

(57) 摘要

本发明提供一种可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,属于医学检测技术领域,将荧光素酶基因与多抗原基因融合成融合载体,然后利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶-多抗原融合蛋白的表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶-多抗原融合蛋白;然后利用免疫沉淀反应,将荧光素酶-多抗原融合蛋白稀释液与病人血清混合进行特异性结合,获得融合蛋白-抗体复合物,再加入蛋白 A 琼脂糖捕捉融合蛋白-抗体复合物;加入荧光素酶底物,检测荧光强度。该方法快速简便、准确率高,克服现有技术使用放射性标记物所引起的放射线辐射和污染等问题,高灵敏度、高信噪比,测量值稳定可靠。

实施例结果					
序号	GAD-65 抗体	IA-2a 抗体	IA-2b 抗体	IAA	结果判定
1	+	+	+	—	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	—	—	+
4	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
6	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	—	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	—	+	+
12	+	+	+	—	+
13	+	+	+	—	+
14	+	+	+	—	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	—	+	—	—	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	90%	100%	85%	60%	100%

1. 可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在于:将荧光素酶基因与多抗原基因融合成融合载体,所述多抗原采用能够免疫应答产生 I 型糖尿病的病人血清中自身免疫性抗体的抗原,然后利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶—多抗原融合蛋白的表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶—多抗原融合蛋白;然后利用免疫沉淀反应,将荧光素酶—多抗原融合蛋白稀释液与病人血清混合进行特异性结合,获得融合蛋白—抗体复合物,再加入蛋白 A 琼脂糖捕捉融合蛋白—抗体复合物;加入荧光素酶底物,检测荧光强度。

2. 根据权利要求 1 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在于包括以下步骤:

A、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

a、选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列:GAD65 抗原基因序列、IA-2a 抗原基因序列、IA-2b 抗原基因序列和 insulin 抗原基因序列,进行 PCR 扩增,在 kpn1 位点 GGTACC 引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

b、将获得的目的片段与 PA0815 载体质粒分别进行 kpn1 和 xba1 双酶切,并使用 T4 连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

B、质粒转化

将重组质粒转入制备好的感受态哺乳细胞系统中,在氨苄耐药基因平皿中筛选阳性克隆,从转化细胞内提取质粒 DNA,然后质粒 DNA 进行 PCR 鉴定及 kpn1 和 xba1 双酶切鉴定;

C、融合蛋白的获取

挑取单菌落至含有 8%~15% I 型糖尿病的病人血清的 DMEM 培养液中 27℃~31℃下培养 50~60h,于 0~4℃,6000~8000rpm 离心 15~20min;将得到的细胞沉淀用磷酸盐缓冲液洗涤并离心 2~3 次,最后将收获的细胞在冰浴中超声处理 15~30 min,然后将细胞裂解液于 0~4℃,最大转速离心 15~45 min 后取上清液;

D、重组融合蛋白的纯化

把步骤 C 所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经 0.05~0.08 mol/L Tris-Hcl 缓冲液冲洗 2~3 次,后冻干备用;

E、将步骤 D 所得融合蛋白用 0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0 PBS 磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每微升中有 $10^7 \sim 10^8$ 个荧光单位;

F、向离心管中加入 50 μ L~80 μ L 的融合蛋白稀释液,然后加入 80~140 μ L 预处理好的实验组的病人血清,在室温下,让 I 型糖尿病自身抗体与抗原特异性结合 3~5h;

G、再加入 2~8 μ L 蛋白 A 琼脂糖,来捕捉融合蛋白—抗体复合物,0℃~4℃缓慢摇动融合蛋白—抗体复合物过夜或室温缓慢摇动 1~2h,使抗体与蛋白 A 琼脂糖偶连得到蛋白 A 琼脂糖—融合蛋白—抗体复合物;

H、免疫沉淀反应后,在 0℃~4℃以 3000 rpm 速度离心 3~5 min,将蛋白 A 琼脂糖—融合蛋白—抗体复合物离心至管底;将上清小心吸去,沉淀用磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖—抗体复合物悬起离心洗涤 2~5 次;

I、用 10~40 μ L 磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖—融合蛋白—抗体复合物悬起后,加入 20~100 μ L 荧光素酶底物,立即用荧光检测仪检测荧光强度,判断血清样品中是否含

有 I 型糖尿病自身抗体。

3. 根据权利要求 1 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在
于所述多抗原基因采用能够表达对应:

能够免疫应答 I 型糖尿病的谷氨酸脱羧酶 GAD65 抗体、酪氨酸磷酸酶 IA-2a 抗体、酪氨
酸磷酸酶 IA-2b 抗体和胰岛素自身 IAA 抗体的四种抗体的 GAD65 抗原、IA-2a 抗原、IA-2b
抗原和 insulin 抗原的四种抗原基因。

4. 根据权利要求 3 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在
于所述:

GAD65 抗原基因序列是:SEQ ID NO. 1 ;

IA-2a 抗原基因序列是:SEQ ID NO. 2 ;

IA-2b 抗原基因序列是:SEQ ID NO. 3 ;

insulin 抗原基因序列是:SEQ ID NO. 4 。

5. 根据权利要求 2 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在
于以磷酸盐缓冲液和健康人的血清为空白对照,以排除非特异性结合的干扰,与空白对照
相比,实验组比空白组荧光明显强,即为 I 型糖尿病自身抗体检测阳性,即可确定实验组的
病人血清含有 I 型糖尿病自身免疫性抗体。

6. 根据权利要求 2 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在
于:PCR 扩增的反应条件程序:90℃~95℃变性 5~10 分钟;然后 93℃~98℃变性 45~
60 秒,45℃~50℃退火 30~45 秒,65℃~70℃延伸 50~60 秒,进行 25~30 个循环;最
后 70℃~75℃延伸 10~15 分钟,0~4℃保温。

7. 根据权利要求 1 或 2 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特
征在于:所述荧光素酶基因为 Ranilla 荧光素酶基因。

8. 根据权利要求 1 或 2 所述的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特
征在于:哺乳细胞系统为 293 改良细胞。

可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,具体地说是一种可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法。

背景技术

[0002] 一般的, I 型糖尿病是一种自体免疫疾病,机体受到感染(尤其是病毒感染)、毒物等因素诱发而产生异常自身体液和细胞免疫应答,导致胰岛 β 细胞损伤,胰岛素分泌减少,一旦发病需要依赖外源性胰岛素补充以维持生命,所以 I 型糖尿病又称胰岛素依赖性糖尿病。

[0003] 此类糖尿病常见于儿童和青年患者,但是它可以在任何年龄段的人群中发生,并且此类糖尿病的患病率约占总糖尿病病例的 10%。可见及早地对 I 型糖尿病进行诊断以及高危人群中进行预报具有重要的意义。

[0004] 对糖尿病的诊断主要通过检测其自身免疫性抗体,抗体主要包括以下几种:谷氨酸脱羧酶抗体(GADA)、胰岛细胞抗体(ICA)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2a、IA-2b)及胰岛素自身免疫性抗体(IAA)。目前测定 GADA、IA-2A、IAA 常用的方法有放射免疫法、酶联免疫法;用于 ICA 测定的主要用间接免疫荧光法,另外也有用酶联免疫法及免疫组化法。

[0005] ELISA 技术(enzyme-linked immuno sorbent assay 酶联免疫吸附测定)对于酶的活性和灵敏度要求很高,其特异性取决于抗原制备的优劣;且其结合物制备尚未标准化,这使得实验结果的可重复性不高,需要进行多次检测。另外,若抗原及酶结合物浓度低,最后吸光度值太小,易出现假阴性。多数国家的临床检测已放弃 ELISA 法,使用放射免疫法(RIA 法)。

[0006] 放射免疫分析具有许多其它分析方法无可比拟的优点。它既具有免疫反应的高特异性,又具有放射性测量的高灵敏度,并且样品用量少,常可测至皮摩尔量。但本方法有时会出现交叉反应、假阳性反应、组织样品处理不够迅速,不能灭活降解酶和盐,有时会影响结果等。

[0007]

发明内容

[0008] 本发明的技术任务是解决现有技术的不足,提供一种快速简便、准确率高的,并可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法。

[0009] 本发明的技术方案是按以下方式实现的,该可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在于:将荧光素酶基因与多抗原基因融合成融合载体,所述多抗原采用能够免疫应答产生 I 型糖尿病的病人血清中自身免疫性抗体的抗原,

然后利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶—多抗原融合蛋白的表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶—多抗原融合蛋白;然后利用免疫沉淀反应,将荧光素酶—多抗原融合蛋白稀释液与病人血清混合进行特异性结合,获得融合蛋

白-抗原-抗体复合物,再加入蛋白 A 琼脂糖捕捉融合蛋白-抗原-抗体复合物;加入荧光素酶底物,检测荧光强度。

[0010] 可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法,包括以下步骤:

A、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

a、选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列(GAD65 抗原基因序列、IA-2a 抗原基因序列、IA-2b 抗原基因序列和 insulin 抗原基因序列),进行 PCR 扩增,在 kpn1 位点(GGTACC)引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

b、将获得的目的片段与 PA0815 载体质粒分别进行 kpn1 和 xba1 双酶切,并使用 T4 连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

B、质粒转化

将重组质粒转入制备好的感受态哺乳细胞系统中,在氨苄耐药基因平皿中筛选阳性克隆,从转化细胞内提取质粒 DNA,然后质粒 DNA 进行 PCR 鉴定及 kpn1 和 xba1 双酶切鉴定;

C、融合蛋白的获取

挑取单菌落至含有 8%~15% I 型糖尿病的病人血清的 DMEM 培养液中 27℃~31℃下培养 50~60h,于 0~4℃,6000~8000rpm 离心 15~20min;将得到的细胞沉淀用磷酸盐缓冲液洗涤并离心 2~3 次,最后将收获的细胞在冰浴中超声处理 15~30 min,然后将细胞裂解液于 0~4℃,最大转速离心 15~45 min 后取上清液;

D、重组融合蛋白的纯化

把步骤 C 所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经 0.05~0.08 mol/L Tris-Hcl 缓冲液冲洗 2~3 次,后冻干备用;

E、将步骤 D 所得融合蛋白用 0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0 PBS 磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每微升中有 $10^7 \sim 10^8$ 个荧光单位;

F、向离心管中加入 50 μ L~80 μ L 的融合蛋白稀释液,然后加入 80~140 μ L 预处理好的实验组的病人血清,在室温下,让 I 型糖尿病自身抗体与抗原特异性结合 3~5h;

G、再加入 2~8 μ L 蛋白 A 琼脂糖,来捕捉融合蛋白-抗体复合物,0℃~4℃缓慢摇动融合蛋白-抗体复合物过夜或室温缓慢摇动 1~2h,使抗体与蛋白 A 琼脂糖偶连得到蛋白 A 琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物;

H、免疫沉淀反应后,在 0℃~4℃以 3000 rpm 速度离心 3~5 min,将蛋白 A 琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物离心至管底;将上清小心吸去,沉淀用磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖-抗体复合物悬起离心洗涤 2~5 次;

I、用 10~40 μ L 磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物悬起后,加入 20~100 μ L 荧光素酶底物,立即用荧光检测仪检测荧光强度,判断血清样品中是否含有 I 型糖尿病自身抗体。

[0011] 多抗原是能免疫应答产生 I 型糖尿病的病人血清中抗体的抗原。

[0012] 抗体是采用患有 I 型糖尿病的病人血清中的抗体。抗体是指谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65 抗体)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2a 抗体和 IA-2b 抗体)和胰岛素自身抗体(IAA)四种抗体。

[0013] 所述多抗原基因采用能够表达对应:能够免疫应答 I 型糖尿病的谷氨酸脱羧酶

GAD65 抗体、酪氨酸磷酸酶 IA-2a 抗体、酪氨酸磷酸酶 IA-2b 抗体和胰岛素自身 IAA 抗体的四种抗体的 GAD65 抗原、IA-2a 抗原、IA-2b 抗原和 insulin 抗原的四种抗原基因。

[0014] GAD65 抗原基因序列是 :SEQ ID NO. 1 ;

IA-2a 抗原基因序列是 :SEQ ID NO. 2 ;

IA-2b 抗原基因序列是 :SEQ ID NO. 3 ;

insulin 抗原基因序列是 :SEQ ID NO. 4 。

[0015] 以磷酸盐缓冲液和健康人的血清为空白对照,以排除非特异性结合的干扰,与空白对照相比,实验组比空白组荧光明显强,即为 I 型糖尿病自身抗体检测阳性,即可确定实验组的病人血清含有 I 型糖尿病自身免疫性抗体。

[0016] PCR 扩增的反应条件程序 :90℃~95℃变性 5~10 分钟 ;然后 93℃~98℃变性 45~60 秒,45℃~50℃退火 30~45 秒,65℃~70℃延伸 50~60 秒,进行 25~30 个循环 ;最后 70℃~75℃延伸 10~15 分钟,0~4℃保温。

[0017] 所述荧光素酶基因为 Ranilla 荧光素酶基因。

[0018] 哺乳细胞系统为 293 改良细胞。

[0019] 本发明与现有技术相比所产生的有益效果是 :

可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法是在放射免疫技术的基础上,使用荧光素融合蛋白作为标记物,研发出的基因重组荧光素酶—多抗原融合蛋白抗体检测技术。

[0020] 可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法快速简便、准确率高,克服现有技术使用放射性标记物所引起的放射线辐射和污染等问题,使用微量荧光检测仪检测,与传统的 HPLC 相比,操作简单,直接接受标准 0.2mL 离心管进行隔离测定,无需开盖堵截污染途径,保证实验结果可靠和操作人员安全。另外采用不小于 25uL 样品量进行测定,达到微量省试剂的要求。并且高灵敏度、高信噪比,测量值稳定可靠。

[0021] 该可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法中蛋白 A 琼脂糖的使用能够特异性地结合免疫球蛋白的 FC 片段,所以能和抗原—抗体结合,减少非特异性结合的吸附。

[0022] 荧光素酶基因选用 Ranilla 荧光素酶基因。所采用的荧光酶底物,是一种 Ranilla 荧光底物,在荧光酶的作用下可产生荧光,荧光信号强度与荧光素酶浓度成正比。

[0023] 该可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法使用微量荧光检测仪检测,与传统的 HPLC 相比,操作简单,直接接受标准 0.2mL 离心管进行隔离测定,无需开盖堵截污染途径,保证实验结果可靠和操作人员安全。

[0024] 该可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法采用不小于 25 μ L 样品量进行测定,达到微量省试剂的要求。

[0025] 该可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法的实验组血清中只要含有四种抗体中的一种,即只要有一种抗体检测为阳性,即可确定样品含有糖尿病自身抗体,高灵敏度、高信噪比,测量值稳定可靠。

[0026]

附图说明

[0027] 附图 1 是本发明的实施例测定结果示意图。

[0028]

具体实施方式

[0029] 下面对本发明的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法作以下详细说明。

[0030] 实施例：

本发明的可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法包括以下步骤：

1、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

(1) 选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列(GAD65 抗原基因序列、IA-2a 抗原基因序列、IA-2b 抗原基因序列和 insulin 抗原基因序列),进行 PCR 扩增,PCR 扩增的反应条件程序:90℃~95℃变性 5~10 分钟;然后 93℃~98℃变性 45~60 秒,45℃~50℃退火 30~45 秒,65℃~70℃延伸 50~60 秒,进行 25~30 个循环;最后 70℃~75℃延伸 10~15 分钟,0~4℃保温。

[0031] 在 kpn1 位点(GGTACC)引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;多抗原是能免疫应答产生 I 型糖尿病的病人血清中抗体的抗原。

[0032] 抗体是采用患有 I 型糖尿病的病人血清中的抗体。抗体是指谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65 抗体)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2a 抗体和 IA-2b 抗体)和胰岛素自身抗体(IAA)四种抗体。

[0033] 所述多抗原基因采用能够表达对应:能够免疫应答 I 型糖尿病的谷氨酸脱羧酶 GAD65 抗体、酪氨酸磷酸酶 IA-2a 抗体、酪氨酸磷酸酶 IA-2b 抗体和胰岛素自身 IAA 抗体的四种抗体的 GAD65 抗原、IA-2a 抗原、IA-2b 抗原和 insulin 抗原的四种抗原基因。

[0034] GAD65 抗原基因序列是:SEQ ID NO.1;

IA-2a 抗原基因序列是:SEQ ID NO.2;

IA-2b 抗原基因序列是:SEQ ID NO.3;

insulin 抗原基因序列是:SEQ ID NO.4。

[0035] (2) 将获得的目的片段与 PA0815 载体质粒分别进行 kpn1 和 xba1 双酶切,并使用 T4 连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒。

2、质粒转化

将重组质粒转入制备好的感受态哺乳细胞系统中,在氨苄耐药基因平皿中筛选阳性克隆,从阳性克隆细胞内提取质粒 DNA,然后质粒 DNA 进行 PCR 鉴定及 kpn1 和 xba1 双酶切鉴定。

3、融合蛋白的获取

挑取单菌落至含有 10% 血清的 DMEM 培养液中 29℃下培养 54h (中间过程进行逐步扩大培养),于 4℃,8000rpm 离心 15min;将得到的细胞沉淀用磷酸盐缓冲液洗涤并离心 3 次,最后将收获的细胞在冰浴中超声处理 30 min,然后将细胞裂解液于 4℃,最大转速离心 30 min 后取上清液。

4、重组融合蛋白的纯化

把所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经 0.06 mol/L Tris-Hcl 缓冲液冲洗 3 次,后冻干备用。

[0039] 5、将冻干备用的融合蛋白用 0.01mol/L, pH7.4 PBS 缓冲液进行一定倍数的梯度稀

释,确保每微升中有 10^7 个荧光单位。

[0040] 6、向离心管中加入 $75\ \mu\text{L}$ 的融合蛋白稀释液,然后加入 $100\ \mu\text{L}$ 预处理好的实验组的血清,在室温下,让糖尿病自身抗体与抗原特异性结合 $3\sim 5\text{h}$ 。

[0041] 7、为了保证检测的准确性,试验时分别以磷酸盐缓冲液和健康人的血清为空白对照,以排除某些非特异性结合的干扰。

[0042] 8、再加入 $5\ \mu\text{L}$ 蛋白 A 琼脂糖,来捕捉抗原-抗体复合物, 4°C 缓慢摇动抗原-抗体复合物过夜或室温缓慢摇动 2h ,使抗体与蛋白 A 琼脂糖偶连得到蛋白 A 琼脂糖-抗原-抗体复合物。

[0043] 9、免疫沉淀反应后,在 0°C 以 $3000\ \text{rpm}$ 速度离心 $5\ \text{min}$,将蛋白 A 琼脂糖-抗原-抗体复合物离心至管底;将上清小心吸去,沉淀用磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖-抗原-抗体复合物悬起离心洗涤 3 次。

[0044] 10、用 $30\ \mu\text{L}$ 磷酸盐缓冲液将蛋白 A 琼脂糖-抗原-抗体复合物悬起后,加入 $80\ \mu\text{L}$ 荧光素酶底物,立即用荧光检测仪检测荧光强度,判断血清样品中是否含有糖尿病自身抗体。

[0045] 11、与空白对照相比,实验组比空白组荧光明显强,即为糖尿病自身抗体检测阳性,四种抗体只要有一种检测为阳性,即可确定样品含有糖尿病自身抗体,样品来源人体患有 I 型糖尿病。

[0046] 利用上述方法对 50 例健康血清进行检测,有 49 份阴性,一份假阳性,故特异性为 $49/(49+1)*100=98\%$,对 20 例 I 型糖尿病患者进行检测,全部为阳性,故敏感性为 100% 。测定结果如附图 1。

Sequence Listing

<110> 山东东兴汇智生物科技有限公司

<120> 可同时检测四种 I 型糖尿病自身免疫抗体的方法

<160> 4

<170> PatentIn Version 3.3

<210> 1

<211> 382

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221>

<222>

<223> GAD65 抗原基因

<400> 1

catctccggg ctctggcttt tggtecttcg ggtcggaaaa tggctccggg gattccgaca	60
atcccggcac agcgcgagcc tggtgccaag tggctcagaa gttcacgggc ggcatcggaa	120
acaaactgtg cgccctgctc tacggagacg ccgagaagcc ggcggagagc ggcgggagcc	180
aacccccgcg ggtegcgcgc cggaaggccg cctgcgcctg cgaccagaag ccctgcagct	240
gtcccaaagc ggatgtcaac tacgggtttc tccatgcaac agacctgctg ccggcgtgtg	300
atggagaaag gcccactttg gcgtttctgc aagatgttat gaacatttta cttcagtatg	360
tggtgaaaag tttegataga tc	382

<210> 2

<211> 741

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221>

<222>

<223> IA-2a 抗原基因

<400> 2

agttcacaca gcagcacccc ctctggtgcg aggagccagc acagtctaac atggatatct	60
ccactgggca catgattctg gcatatatgg aagatcatct gaagaataaa gaccgcttgc	120
ttaaagagtg ggaggtctctg tgctcctacc aggcagaacc cagcaccatc tcagcagctc	180
agagtgaag taacatcaag aagaaccgct gctcggatgc cgtgccctat gaccattcca	240
gagtgaagct gaaagctgag attaacccat ccaggacaga ttacatcaat gccagcacca	300
ttattgagca tgacccccgg atgccagcgt atatcgccac ccaaggaccc ctctcacaca	360
ccatctctga tttctggcag atggtttggg aaagcgggtg tacagtcata gtgatgatga	420
cagctctggt tgaggatgga gaaaagcagt gtgatcgcta ctggcccgat gaaggctctt	480
ctctatacca catctacgag gtgaacctgg tgtctgagca tatctggtgt aatgacttcc	540
tggttcgtag tttctacctg aagaatgtcc aaaccagga aactcgcacc ctgactcagt	600
tccacttctt aagctggcct gcacaaggaa taccacttc cacacgccct ctgctggact	660
ttcgcaggaa agtcaacaag tgctaccgtg gacgctcctg ccccatcatt gtgcactgca	720
gtgatggtac aggcaggact g	741

<210> 3

<211> 194

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221>

<222>

<223> IA-2b 抗原基因

<400> 3

gcacctgac tcggttccac ttcctaagct ggcccagacag ggaatcccca cttccacacg	60
ccctctgctg gactttcgca gggaagtcaa caagtgtctac cgtggacgct cctgccccat	120
catttgtcac tgcagtgatg gtacaggccg gactggaaca tatatcctga ttgacatggt	180
cctgaaccgc ccta	194

<210> 4

<211> 1770

<212> DNA

<213> 未知

<220>

<221>

<222>

<223> insulin 抗原基因

<400> 4

atgtgggtcc	tgatgagctg	gctggccttc	gcggcagggc	tggtagccgg	aacacagtgt	60
ccagatgggc	agttctgccc	tgttgccctgc	tgccttgacc	agggaggagc	caactacagc	120
tgctgtaacc	ctcttctgga	cacatggcct	agaataacga	gccatcatct	agatggctcc	180
tgccagaccc	atggccactg	tectgtctggc	tattcttgtc	ttctcactgt	gtctgggact	240
tccagctgct	gcccgttctc	taagggtgtg	tcttgtgggtg	atggctacca	ctgctgcccc	300
cagggcttcc	actgtagtgc	agatgggaaa	tcctgcttcc	agatgtcaga	taacccttg	360
ggtgctgtcc	agtgtcctgg	gagccagttt	gaatgtcctg	actctgccac	ctgctgcatt	420
atggttgatg	gttcgtgggg	atgttgctcc	atgccccagg	cctcttgctg	tgaagacaga	480
gtgcattgct	gtcccatgg	ggcctcctgt	gacctgggtc	acacacgatg	cgtttcaccc	540
acgggcaccc	acaccctact	aaagaagttc	cctgcacaaa	agaccaacag	ggcagtgtct	600
ttgccttttt	ctgtcgtgtg	ccctgatgct	aagaccagct	gtcccgatga	ttctacctgc	660
tgtgagctac	ccactgggaa	gtatggctgc	tgtccaatgc	ccaatgccat	ctgctgttcc	720
gaccacctgc	actgctgccc	ccaggacact	gtatgtgacc	tgatccagag	taagtgccta	780
tccaagaact	acaccacgga	tctcctgacc	aagctgcctg	gatacccagct	gaaggagggtg	840
aagtgcgaca	tggaggtgag	ctgccctgaa	ggatatacct	gctgccgcct	caacactggg	900
gcctggggct	gctgtccatt	tgccaaggcc	gtgtgtttgtg	aggatcacat	tcattgctgc	960
ccggcaggggt	ttcagtgtca	cacagagaaa	ggaacctgcg	aaatgggtat	cctccaagta	1020
ccctggatga	agaaggtcat	agccccctc	cgcctgccag	accacagat	cttgaagagt	1080
gatacacctt	gtgatgactt	cactaggtgt	cctacaaaca	atacctgctg	caaactcaat	1140
tctggggact	ggggctgctg	tccatccca	gaggctgtct	gctgctcaga	caaccagcat	1200
tgctgccctc	agggccttcac	atgtctggct	caggggtact	gtcagaaggg	agacacaatg	1260
gtggctggcc	tggagaagat	acctgcccgc	cagacaaccc	cgctccaaat	tggagatatac	1320
ggttgtgacc	agcataccag	ctgcccagta	gggcaaacct	gctgcccgaag	cctcaaggga	1380
agttgggcct	gctgccagct	gccccatgct	gtgtgctgtg	aggaccggca	gcaactgttgc	1440
ccggccgggt	acacctgcaa	tgtgaaggcg	aggacctgtg	agaaggatgt	cgattttatc	1500
cagcctcccg	tgctcctgac	cctcgccct	aaggttggga	atgtggagtgt	tggagaagggt	1560
catttctgcc	atgataacca	gacctgttgt	aaagacagtgt	caggagtctg	ggcctgctgt	1620
ccctacctaa	agggtgtctg	ctgtagagat	ggacgtcact	gttgccccgg	tggttccac	1680
tgttcagcca	ggggaaccaa	gtgtttgcga	aagaagattc	ctcgtggga	catgtttttg	1740
agggatccgg	tccaagacc	gctactgtaa				1770

实施例结果					
序号	GAD-65 抗体	IA-2a 抗体	IA-2b 抗体	IAA	结果判定
1	+	+	+	—	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	—	—	+
4	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
6	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	—	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	—	+	+
12	+	+	+	—	+
13	+	+	+	—	+
14	+	+	+	—	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	—	+	—	—	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	90%	100%	35%	60%	100%

图 1

专利名称(译)	可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法		
公开(公告)号	CN103969234A	公开(公告)日	2014-08-06
申请号	CN201410154456.3	申请日	2014-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
[标]发明人	唐东起 李世武 吴琦 苏红霞		
发明人	唐东起 李世武 吴琦 苏红霞		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
其他公开文献	CN103969234B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法，属于医学检测技术领域，将荧光素酶基因与多抗原基因融合成融合载体，然后利用细胞转化技术，将融合载体导入哺乳细胞系统中，进行荧光素酶—多抗原融合蛋白的表达；裂解基因重组细胞，获得荧光素酶-多抗原融合蛋白；然后利用免疫沉淀反应，将荧光素酶-多抗原融合蛋白稀释液与病人血清混合进行特异性结合，获得融合蛋白-抗体复合物，再加入蛋白A琼脂糖捕捉融合蛋白-抗体复合物；加入荧光素酶底物，检测荧光强度。该方法快速简便、准确率高，克服现有技术使用放射性标记物所引起的放射线辐射和污染等问题，高灵敏度、高信噪比，测量值稳定可靠。

实施例结果					
序号	GAD-65 抗体	IA-2a 抗体	IA-2b 抗体	IAA	结果判定
1	+	+	+	—	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	—	—	+
4	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
6	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	—	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	—	+	+
12	+	+	+	—	+
13	+	+	+	—	+
14	+	+	+	—	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	—	+	—	—	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	90%	100%	85%	60%	100%