(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104049070 B
(45)授权公告日 2016.03.09

(21)申请号 201410299703.9

(22)申请日 2014.06.27

(73)专利权人 樊均明
地址 610000 四川省成都市武侯区放生池41号1栋1单元26号

(72)发明人 樊均明 王丽 文集 李雪英

(74)专利代理机构 成都高远知识产权代理事务所(普通合伙) 51222
代理人 李高峡

(51)Int.Cl.
G01N 33/15(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)

(56)对比文件

王乾了等.动物模型与IgA肾病的发病机制研究.《中华肾病研究电子杂志》.2014,第3卷(第2期),

王乾了等.动物模型与IgA肾病的发病机制研究.《中华肾病研究电子杂志》.2014,第3卷(第2期),

周金金等.IgA肾病动物模型研究的新进展.《中国中西医结合肾病杂志》.2011,第12卷(第10期),

樊均明等.IgA肾病免疫发病机制及免疫抑制治疗.《西部医学》.2013,第25卷(第2期),

李雪英.IgA肾病自身免疫发病机制研究进展.《中国中西医结合肾病杂志》.2013,第14卷(第12期),

审查员 高自强

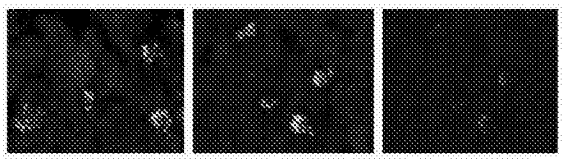
权利要求书1页 说明书8页 附图6页

(54)发明名称

一种IgAN动物模型的构建方法及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种IgAN动物模型的构建方法。具体步骤为:(a)体外制备IgA免疫复合物;(b)将制备得到的IgA免疫复合物注射到小鼠体内。本发明的建模方法操作简单易行、成功率高、重复性好、机体损害小,并且能够用于探究早期IgAN患者体内IgA免疫复合物的清除机制,筛选能够清除系膜区IgA免疫复合物沉积的药物、以及评价使用生物学方法清除异常沉积的IgA来治疗IgAN的效果。



CN 104049070 B

1. 一种 IgAN 动物模型的构建方法，包括以下步骤：

(a) 体外制备 IgA 免疫复合物；

(b) 将步骤 (a) 制备得到的 IgA 免疫复合物注射到小鼠体内，注射量为 750μl/ 次，注射一次；

步骤 (a) IgA 免疫复合物中，IgA1 是异常糖基化的 IgA1；

步骤 (b) 所述的小鼠为 Babl/c 小鼠。

2. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (a) 所述 IgA 免疫复合物为 IgA1-IgG 免疫复合物。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的方法，其特征在于：制备 IgA 免疫复合物的抗原：抗体的比例为 (1:1)-(2:1)。

4. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：制备 IgA 免疫复合物的抗原：抗体的比例为 1:1。

5. 根据权利要求 3 所述的方法，其特征在于：制备 IgA 免疫复合物的抗原：抗体的比例为 2:1。

6. 根据权利要求 1 所述的方法，其特征在于：步骤 (b) 所述的注射为尾静脉注射。

7. 一种权利要求 1 ～ 6 所述的方法制备的动物模型。

8. 权利要求 7 所述的动物模型在筛选 IgA1 酶类药物中的用途，包含以下步骤：

(1) 将 IgA1 酶类药物注射到动物模型体内；

(2) 免疫荧光判断动物模型体内 IgA 免疫复合物的分解程度；

(3) 根据分解程度对 IgA1 酶类药物的效果进行评价。

9. 根据权利要求 8 所述的用途，其特征在于：步骤 (1) 所述的 IgA1 酶类药物是商品化的 IgA1 酶，或细菌中提取的 IgA1 酶。

一种 IgAN 动物模型的构建方法及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一种动物模型的构建方法及其应用，具体为一种 IgAN 动物模型的构建方法及其应用。

背景技术

[0002] IgA 肾病 (IgAN) 是全球范围内最为常见的原发性肾小球疾病，大约 25％～ 50％的患者在疾病诊断后 25 年内发展到终末期肾衰竭 (ESRD) ；患者即使接受肾移植，仍有超过 50％的患者在肾移植术后两年内 IgAN 复发。因此，对 IgAN 的发病机制及其防治研究具有重要的临床价值和社会意义。

[0003] 现有研究表明，IgAN作为一种自身免疫性疾病，是以 IgA 或以 IgA 为主的免疫球蛋白在肾小球系膜区及毛细血管袢呈弥漫颗粒状或团块状沉积所引起一系列临床及病理改变。半乳糖缺失的 IgA 暴露其铰链区抗原决定簇，使得针对异常 IgA 的自身 IgG 和 IgA 抗体产生，形成的免疫复合物沉积于系膜区，激活系膜细胞及补体系统导致肾脏损伤。

[0004] 目前，在原治疗基础上从自身免疫发病机制角度出发，探索新的 IgAN 治疗思路成为了研究热点。但是，各种新的治疗方法和药物能否有效减少或者去除肾小球的 IgA 免疫复合物沉积，都需要先通过动物实验来进行验证。为了解决上述问题，本发明提供了一种构建 IgA 免疫复合物沉积动物模型的方法，构建得到的动物模型能够成功模拟临床患者体内 IgA 免疫复合物在肾小球系膜区沉积的现象，进而为研究 IgAN 发病机制和药物对免疫复合物的降解作用提供研究基础。

[0005] 已经报道的可以用于构建 IgAN 动物模型的方法包括 ：尾静脉注射葡聚糖 G200 的方法，口服或静脉注射葡萄球菌、大肠杆菌、副流感嗜血杆菌、仙台病毒等病原微生物成分或免疫复合物的方法，用穿通支原体 (Mpe) 经尿道上行感染小鼠的方法，以及口服牛血清白蛋白 (BSA) 加尾静脉注射葡萄球菌肠毒素 (SEB) 复合法等。但是上述方法在操作上繁琐复杂，造模时间长，而且在造模过程中还存在着对其他器官造成严重损伤引起动物死亡，免疫复合物沉积不明显，重复性不好等问题。因此，寻找一种操作简单易行、成功率高、重复性好、机体损害小的 IgAN 动物模型构建方法，并把构建得到的模型用于 IgAN 的病理和药理研究，能够为 IgAN 患者的临床治疗提供参考。

发明内容

[0006] 为了克服现有技术的缺陷，本发明提供了一种 IgAN 动物模型的构建方法，模拟临床 IgAN 患者体内 IgA 免疫复合物在肾小球系膜区沉积的现象，仅使用简单的步骤就能够构建出可以用于研究 IgA 发病机制和药物对免疫复合物的降解作用的 IgAN 动物模型。

[0007] 本发明构建 IgAN 动物模型的方法包括以下步骤 ：

[0008] (a) 体外制备 IgA 免疫复合物 ；

[0009] (b) 将步骤 (a) 制备得到的 IgA 免疫复合物注射到小鼠体内，注射量为 750μl/次，注射一次。

[0010] 所述“免疫复合物”是指抗原和抗体特异性结合形成的复合物。

[0011] 其中，步骤 (a) 中 IgA 免疫复合物为 IgA1-IgG 免疫复合物。用于制备步骤 (a) 中 IgA 免疫复合物的 IgA1 可以是正常糖基化的 IgA1，或异常糖基化的 IgA1。

[0012] 其中，步骤 (a) 中制备 IgA 免疫复合物的抗原 :抗体的比例为 (1:1)-(2:1)。优选地，使用商品化 IgA1 制备 IgA 免疫复合物时，抗原 :抗体的比例为 1:1 ；使用 IgAN 患者血清来源的 IgA1 制备 IgA 免疫复合物时，抗原 :抗体的比例为 2:1。

[0013] 所述商品化 IgA1 是指 Human IgA1protein，产品编号 ab91020，abcom 公司，或 Human IgA1protein，产品编号 30C-CP7034，fitzgerald 公司，或 Human IgA1，Myelom，产品编号 400109，Merck Chemicals 公司。

[0014] 其中，步骤 (b) 所述的注射可选择肌肉注射，尾静脉注射，但优选为尾静脉注射 ；所述的小鼠优选为 Babl/c 小鼠。

[0015] 判断所构建动物模型体内的 IgA 免疫复合物沉积程度的方法为 :分别在 1h、4h、8h、16h、24h 时间点处死小鼠，取肾组织做冰冻切片，免疫荧光检测 IgA 免疫复合物沉积情况。

[0016] 本发明还提供利用本发明方法制备的动物模型在筛选 IgA1 酶类药物中的用途，包含以下步骤 :

[0017] (1) 将 IgA1 酶类药物注射到动物模型体内 ；

[0018] (2) 免疫荧光判断动物模型体内 IgA 免疫复合物的分解程度 ；

[0019] (3) 根据分解程度对 IgA1 酶类药物的效果进行评价。

[0020] 其中，步骤 (1) 所述的 IgA1 酶类药物是商品化的 IgA1 酶，或细菌中提取的 IgA1 酶。

[0021] 在一个具体的实施例中，采用商品化的人多发性骨髓瘤血浆 IgA1 或者 IgAN 患者血清中提取的低糖基化 IgA1 作为抗原，采用商品化的 IgG 作为抗体在体外形成免疫复合物。

[0022] 在一个具体的实施例中，采用商品化的 IgA1 酶和从流感嗜血杆菌 ATCC49247 中提取的 IgA1 酶注射到动物模型中，评价不同的 IgA1 酶对体内 IgA1 的消化能力。

[0023] 已有研究提示，即使行肾移植治疗，约 50％的病人术后 3-5 年 IgAN 将再次复发，其原因仍是 IgA 免疫复合物沉积于移植肾。说明清除异常沉积的 IgA 免疫复合物是治疗的根本。现有的制作 IgAN 动物模型的方法存在繁琐复杂的问题，本发明方法从模拟 IgAN 的发病机制出发，将体外形成的 IgA 免疫复合物直接注射到小鼠体内，通过免疫荧光观察 IgA 及其 IgA 免疫复合物在肾小球系膜区的沉积现象，为筛选能够分解系膜区免疫复合物沉积的药物、探究早期 IgA 清除机制，以及采用生物学方法清除异常沉积的 IgA 从而达到治疗 IgA 肾病的研究提供一种简单易行的动物模型。

[0024] 显然，根据本发明的上述内容，按照本领域的普通技术知识和惯用手段，在不脱离本发明上述基本技术思想前提下，还可以做出其它多种形式的修改、替换或变更。

[0025] 以下通过实施例形式的具体实施方式，对本发明的上述内容再作进一步的详细说明。但不应将此理解为本发明上述主题的范围仅限于以下的实例。凡基于本发明上述内容所实现的技术均属于本发明的范围。

附图说明

[0026] 图 1 IgA 患者血清中 Jacalin 结合蛋白的 SDS-PAGE 电泳：

[0027] 1. IgA1 标准品；2. 稀释血清；3. 50％饱和 $(NH4)_2SO_4$ 沉淀；4. Jacalin 穿透液；5. PBS 流出液；6. 蜜二糖洗脱液 1；7. 蜜二糖洗脱液 2；8. 蜜二糖洗脱液 3；9. 蜜二糖洗脱浓缩液

[0028] 图 2 Western blot 鉴定提取的 IgA1 蛋白：

[0029] 1. IgA 患者血清；2. 过 Jacalin 纯化柱穿透液；3. PBS 流出液；4. 过 Jacalin 柱蜜二糖洗脱液；5. PBS 流出液；6-9. 过 Sephadex G-200 分子筛层析流出液

[0030] 图 3 Jacalin 结合蛋白过 Sephadex G-200 分子筛层析：

[0031] 第 1 峰为 pIgA，第 2 峰为 mIgA，第 3 峰为非 IgA 峰

[0032] 图 4 IgA1 蛋白过 Sephadex G-200 分子筛层析：

[0033] 第 1 峰为 pIgA1，第 2 峰为 mIgA1

[0034] 图 5-1 商品化的 IgA1 形成的免疫复合物 1 的免疫荧光观察图 (4h)

[0035] 图 5-2 IgAN 患者血清中提取的低糖基化 IgA1 形成的免疫复合物 2 的免疫荧光观察图 (4h)

[0036] 图 5-3 阴性对照组的免疫荧光观察图

[0037] 图 5-4 同源对照组的免疫荧光观察图

[0038] 图 5-5 免疫复合物沉积 8h 的免疫荧光观察图

[0039] 图 5-6 免疫复合物沉积 24h 的免疫荧光观察图

[0040] 图 5-7 免疫复合物沉积 1 周后重复注射 1 次的免疫荧光观察图

[0041] 图 6-1 低糖基化 IgA1 形成的免疫复合物与 NaCl（对照）作用后的免疫荧光观察图

[0042] 图 6-2 低糖基化 IgA1 形成的免疫复合物与提取自流感嗜血杆菌 ATCC49247 的 IgA1 酶作用后的免疫荧光观察图

[0043] 图 6-3 低糖基化 IgA1 形成的免疫复合物与商品化的 IgA1 酶作用后的免疫荧光观察图

[0044] 图 6-4 商品化 IgA1 形成的免疫复合物与 NaCl（对照）作用后的免疫荧光观察图

[0045] 图 6-5 商品化 IgA1 形成的免疫复合物与提取自流感嗜血杆菌 ATCC49247 的 IgA1 酶作用后的免疫荧光观察图

[0046] 图 6-6 商品化 IgA1 形成的免疫复合物与商品化的 IgA1 酶作用后的免疫荧光观察图

[0047] 图 5-1 至图 6-6 中，a 为荧光抗体 2：检测 IgA1 的 Fc 段；b 为荧光抗体 1：检测 IgA1 的 F(ab) 段；c 为荧光抗体 3：检测羊抗人抗体的 F(ab) 段，即免疫复合物中的 IgA1 的 Fab 段。

具体实施方式

[0048] 用于形成免疫复合物的抗原：

[0049] 抗原 1：购买商品化的人多发性骨髓瘤血浆 IgA1，Myeloma(Fitzgrald 公司)

[0050] 抗原 2：从 IgAN 患者血清中提取的低糖基化 IgA1

[0051] 用于形成免疫复合物的抗体：

[0052] 抗体 1：AffiniPure F(ab')2Fragment Goat Anti-Human IgG,F(ab')2Fragment Specific(Jackson 公司)，为特异抗 IgA1 的 IgG

[0053] 抗体 2：ChromPure Goat IgG.F(ab')2Fragment(Jackson 公司)，为非特异抗 IgA1 的普通的 IgG

[0054] 荧光抗体：

[0055] 荧光抗体 1：检测 IgA1 的 F(ab) 段

[0056] (FITC)-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Human IgG,F(ab')2Fragment Specific(Jackson 公司)

[0057] 荧光抗体 2：检测 IgA1 的 Fc 段

[0058] Mouse monoclonal B35064B4Anti-Human IgA1Fc(FITC)ab99793(abcam 公司)

[0059] 荧光抗体 3：检测羊抗人抗体的 F(ab) 段

[0060] Rhodamine(TRITC)-conjugated AffiniPure Rabbit Anti-Goat IgG,F(ab')2Fragment Specific(Jackson 公司)

[0061] 8-10W 的 Babl/c 雌性小鼠购自成都达硕生物科技有限公司

[0062] 实施例 1 本发明 IgA 免疫复合物的制备

[0063] 将抗原 1(商品化的 IgA1) 与抗体 1 按照 1:1 浓度比例形成免疫复合物 1：

[0064] 将商品化 IgA1 稀释至 1mg/ml 与 1mg/ml Goat anti-human F(ab)2 抗体，即抗体 1 混合，室温放置 5min 后，取 5μl 滴在洁净载玻片上，显微镜下观察可见有明显复合物形成，将形成的复合物置 4℃保存备用。

[0065] 实施例 2 本发明 IgA 免疫复合物的制备

[0066] 1、从 IgAN 患者血清中提取低糖基化 IgA1

[0067] 将 IgAN 患者血清样品通过硫酸铵沉淀、阴离子交换进行初步分离纯化后，利用凝集素 Jacalin 对 IgA1 的糖链末端特异结合的特性，通过 Jacalin 亲和层析柱制备 IgA1 亚型纯品，利用葡聚糖凝胶 Sephadex G-200 可分离 5-600KD 分子量范围内的蛋白质原理，将 IgA1 通过 Sephadex G-200 分子筛层析柱进一步分离获得不同形式的 IgA1，混合不同形式的 IgA1 即可得到总 IgA1。

[0068] 1.1 硫酸铵沉淀

[0069] 步骤：取血清 5.0ml 于小试管中，边搅拌混匀边缓慢滴加饱和硫酸铵 5.0ml，防止形成团块降低沉淀物的特异性，混匀后室温静置 30min 或置 4℃冰箱过夜，高速低温离心 10000rpm，10 分钟，将上清液(含白蛋白)弃去，取沉淀物(含球蛋白)溶于 0.02mol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 中，重复洗涤一次，加入 2ml0.02mol/L Tris 缓冲液 (pH8.0) 溶解，此液即为粗提的 γ 一球蛋白溶液，将溶解的粗提液转移到 10KD 的透析卡中，置于盛适量 Tris 缓冲液的大烧杯中，4℃搅拌情况下透析过夜，用纳氏试剂检测水中的 NH4+，直到阴性为止。

[0070] 1.2DEAE52- 纤维素离子交换层析

[0071] 材料：样品(经 pH8.0，0.02mol/LTris 缓冲液透析过的 IgAN 患者血清)，DEAE－纤维素(阴离子交换剂)，2.5×25cm 层析柱及不同离子强度的 Tris 洗脱剂。

[0072] 步骤：用 0.02M Tris 缓冲液 (pH8.0) 平衡柱子，将透析袋内的蛋白质溶液用 0.22μm 的过滤器过滤后缓慢加入层析柱上，开下端出口，使样品进入柱床，吸附的蛋白质，

用连续增加 NaCl 的浓度来洗脱，用线性梯度缓冲液 (20-200mmol/L NaCl) 洗脱，流速 1ml/min，分部收集洗脱液 1.5ml/ 管。

[0073] 1.3Jacalin 亲和层析

[0074] 试剂

[0075] (1)0.1M，PH7.4 磷酸盐缓冲盐液 (Phosphate Buffered Saline，PBS)(2)0.1M 蜜二糖 /PBS Elution Buffer

[0076] (3)0.02％ NaN3

[0077] 实验步骤：

[0078] (1) 用 5 倍柱体积的 PBS 液平衡层析柱；

[0079] (2) 将样品手动加入 Immobilized Jacalin 亲和层析柱，4℃孵育 30min；

[0080] (3) 用 10 倍柱体积的 PBS 洗柱 (或直至洗脱液在 280nm 的光吸收度低于 0.01)，血清中的 IgA1 将吸附于层析柱上，不与柱子结合的蛋白质随缓冲液流出柱外，弃去洗脱液；

[0081] (4) 用 5 倍柱体积的 0.1M 蜜二糖 /0.1M PBS(PH7.4)0.5ml/min 洗脱层析柱至紫外分光光度仪 280nm 波长下光吸收度低于 0.01，吸附于柱上的血清 IgA1 将随溶液流出，2ml/管子收集洗脱液；

[0082] (5) 再用 10 倍柱体积 PBS 平衡层析柱，柱子保存于含 0.02％ NaN3 的超纯水中：

[0083] (6) 将洗脱液转移入分子限量 10KD 的透析袋中，结扎，用相对分子质量为 20000 的聚乙二醇 (PEG)4℃浓缩。

[0084] 1.4Superdex200 凝胶柱层析

[0085] 试剂

[0086] 0.05M PB/0.15M NaCl 缓冲液 (PH7.2)

[0087] 实验步骤：

[0088] (1) 将浓缩洗脱液上样于 Sephacryl S200 分子筛层析柱；

[0089] (2) 用 3 倍柱体积的 0.05M PB/0.15M NaCl 缓冲液 (PH7.2)0.5ml/min 洗柱，每种 IgA1 中含有不同分子量成分将按照分子量由大到小的顺序随缓冲液流出柱外，共有 3 个洗脱峰，分别为多聚 IgA1(polymeric IgA1，pIgA1)、单体 IgA1(monomeric IgA1，mIgA1) 和其他非 IgA1 蛋白；

[0090] (3) 收集峰 1 和峰 2 洗脱液，PEG20000 浓缩后，重复上样，再次洗脱，此次有 2 个洗脱峰，收集各峰洗脱液，混合后得到纯品 IgA1，PEG20000 浓缩后保存于 EP 管中，BCA 法测蛋白浓度。

[0091] (4) 胶体的再生与保存：用 0.5mol/L NaCl 溶液浸泡胶体 30min，倾去 NaCl 溶液，蒸馏永冲洗数次，再用缓冲液充分平衡即可。

[0092] 1.5western blot 法验证提取的 IgA1

[0093] SDS-PAGE 电泳后，转膜，5％脱脂牛奶封闭 1h，加入 TBST 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgA1 抗体 (a 链，SouthernBiotech 公司)，37℃杂交袋中孵育 2h，TBST 洗 3 次，进行化学发光反应。

[0094] 纯化提取结果：分离纯化血清 IgA 的 SDS-PAGE 电泳结果如图 1 所示。Western Blot 法鉴定提取的血清 IgA1 如图 2 所示。Jacalin 结合蛋白过 Sephadex G-200 分子筛层析分离结果如图 3 所示。不同形式 IgA1 过 Sephadex G-200 分子筛层析分离结果如图 4 所

示。

[0095] 2、制备免疫复合物

[0096] 将抗原 2(按照上述方法从患者血清提取的低糖基化 IgA1)与抗体 1 按照 2:1 的浓度比例体外形成免疫复合物 2：

[0097] 将制备的 IgA1 稀释至 2mg/ml 与 1mg/ml Goat anti-human F(ab)2 抗体，即抗体 1 混合，室温放置 5min 后，取 5μl 滴在洁净载玻片上，显微镜下观察可见有明显复合物形成，将形成的复合物置 4℃保存备用。

[0098] 实施例 3 本发明动物模型的制备

[0099] 将实施例 1 和实施例 2 得到的免疫复合物尾静脉注射到小鼠体内，构建类似于 IgAN 患者的免疫复合物沉积的动物模型。

[0100] 3.1 实验分组：

[0101] 随机选取 8-10W 的 Babl/c 雌性小鼠 30 只，进行分组，每组 5 只。

[0102] 3.2 尾静脉注射：

[0103] 实验组 1 注射 750μl 的免疫复合物 1(商品化 IgA1+抗体 1)；实验组 2 注射 750μl 的免疫复合物 2(血清提取的低糖基化 IgA1+抗体 1)；阴性对照组分别为注射商品化 IgA1 或血清提取的低糖基化 IgA1+NaCl；同源对照组分别为注射商品化 IgA1 或血清提取的低糖基化 IgA1 与抗体 2 形成的免疫复合物 3；

[0104] 3.3 检测免疫荧光，判断免疫复合物的沉积程度

[0105] (1) 分别在 1h、4h、8h、16h、24h，颈处死小鼠，取小鼠肾组织，做冰冻切片；

[0106] (2) 免疫荧光检测各时间点肾脏 IgA1 及含 IgA1 的免疫复合物沉积情况。通过荧光抗体 1 和荧光抗体 2 来检测 IgA1 沉积情况，另用荧光抗体 3 来检测免疫复合物中抗体的沉积情况。

[0107] (3) 动物实验荧光染色方法

[0108] 1) 取各组织切片，每只小鼠选取 3 个标本，双蒸水脱胶后用圈存笔圈存组织，冷丙酮 4℃固定 5 - 10min，PBST 洗 5min×3 次。

[0109] 2) 封闭：各标本加入即用型兔血清 30 - 40μl，37 度温箱湿盒内孵育 1h，PBST 洗 5min×3 次。

[0110] 3) 避光下，将按 1:50 稀释的兔抗人 IgG - Fab 和兔抗羊 IgG - Fab30μl 共同加入一标本上，1:50 稀释的鼠抗人 IgA - Fc30μl 加入另一标本，第三个标本则加入 PBS 做阴性对照，37℃温箱湿盒内孵育 45min，PBST 洗 5min×7 次。

[0111] 4) 各标本上加入 1:5000 稀释的 DAPI30 - 40μl，室温湿盒内孵育 3min，PBST 洗 3min。

[0112] 5) 封片：各标本上加入 15μl 抗荧光淬灭剂，倾斜盖上盖玻片，正置荧光显微镜下观察。

[0113] 实验结果：在荧光显微镜下，与阴性对照组(如图 5-3)和同源对照组(如图 5-4)相比，无论是免疫复合物 1(如图 5-1)还是免疫复合物 2(如图 5-2)均能明显观察到免疫复合物在肾小球系膜区的沉积现象。在注入小鼠体内 1h 到 8h 内，荧光强度无明显差别，16h 时荧光强度有逐渐增强趋势，24h 时的荧光强度明显强于 8h，差异有统计学意义($P < 0.05$)(如图 5-5 和 5-6 所示)。

[0114] （表 1 为 4h 时的荧光面积和强度）

[0115] 表 1 免疫荧光分析结果($\bar{x}\pm s$)

[0116]

抗原类型	荧光抗体类型	指标	模型组	对照组	P 值
低糖基化 IgA1	鼠抗人 Fc	荧光面积	18570±1299	1310±110	P<0.01
		荧光强度	0.323±0.239	0.009±0.001	P<0.01
	兔抗人 Fab	荧光面积	38100±1683	923±132	P<0.01
		荧光强度	0.4530±0.096	0.012±0.001	P<0.01
	兔抗羊 Fab	荧光面积	36870±1447	1129±176	P<0.01
		荧光强度	0.416±0.023	0.010±0.001	P<0.01
商品化 IgA1	鼠抗人 Fc	荧光面积	14570±1321	1137±129	P<0.01
		荧光强度	0.315±0.034	0.015±0.009	P<0.01
	兔抗人 Fab	荧光面积	28531±1369	1320±133	P<0.01
		荧光强度	0.525±0.009	0.023±0.004	P<0.01
	兔抗羊 Fab	荧光面积	28225±1350	1288±120	P<0.01
		荧光强度	0.274±0.015	0.022±0.012	P<0.01

[0117] 为了验证本发明动物模型的稳定性，注入免疫复合物 1 周后再以相同的剂量重复注射 1 次，24h 后处死的小鼠其肾小球系膜区沉积的免疫复合物与仅注射 1 次的小鼠相比，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)（图 5-7）。表明第一次注射入的免疫复合物能较稳定地存在于小鼠肾组织系膜区，而不会被小鼠自身免疫系统消化排除。

[0118] 结果说明，本发明方法用正常糖基化的 IgA1 或低糖基化的 IgA1 均能成功构建出类似于 IgAN 患者体内免疫复合物沉积的动物模型。

[0119] 实验例本发明动物模型用于评价 IgA1 酶的体内作用

[0120] 实验材料：

[0121] 流感嗜血杆菌 ATCC49247 购自上海川翔生物科技有限公司；

[0122] 商品用 IgA1 酶 (IgA Protease(Igase Pro-Pro-Y-Pro)，商品号：EP0205，MObitec 公司）

[0123] 1、细菌 IgA1 酶的制备

[0124] 取出甘油保存的流感嗜血杆菌 ATCC49247 菌种管，室温下解冻，然后接种于哥伦比亚巧克力琼脂平板上，37℃孵箱培养 18 - 24h；取菌苔进行革兰染色检查，如为无污染的纯培养物，则挑取平板中数个单菌落，接种于 3ml 加入含有 Hemin（终浓度为 10μg/ml）和 β -NAD（终浓度为 10μg/ml）的心脑浸液液体培养基中，置 37℃全温震荡培养箱 200r/min 培养 18h，镜检无污染后用比浊管调整菌液的浊度，使光吸收值 A600 为 1.0；取 2ml 菌悬液接种于 200ml 的心脑浸液液体培养基中，37℃全温震荡培养箱 200r/min 培养 15 - 24h。将培养一定时间的细菌悬液在冷冻离心机上以 3000r/min 的转速离心 10min，收集上清备用。

[0125] (2) 硫酸铵盐析

[0126] 取细菌培养上清液 100ml，在 4℃搅拌条件下缓慢加入饱和硫酸铵 $(NH_4)_2SO_4$ 至终

浓度为 50%，注意搅拌过程中不要搅出气泡，之后静置 2h 于 4℃ 6000r/min 离心 15min，收集沉淀，用少量 Tris - HCl 缓冲液 (0.05mol/L，pH8.2) 溶解，即获得 IgA 蛋白酶粗制品。

[0127] (3)IgA 蛋白酶粗制品的透析与浓缩

[0128] 将 IgA 蛋白酶粗制品加入 10KD 的透析卡中，在 Tris - HCl 缓冲液 (0.05mol/L，pH8.2) 中 4℃透析 24h，其间更换透析液 1 -2 次并搅动，将透析后的样品于 4℃ 8000g 离心 20min，弃去沉淀，收集上清转移入预冷的 Amicon - Ultra - 15 超滤管中 (50KD)，5000g 离心 15min，收集浓缩液，BCA 法测蛋白浓度，- 20℃冻存。

[0129] 2、动物模型准备：按照实施例 3 的方法构建实验组 1、阴性对照组、同源对照组、实验组 2、阴性对照组、同源对照组的小鼠各 4 只。

[0130] 3、IgA1 酶对物模型肾组织中 IgA1 的体内降解作用

[0131] (1) 给上述的动物模型 (4h) 通过尾静脉注入商品化的 IgA1 蛋白酶和步骤 1 制备的来自细菌的 IgA1 蛋白酶，作用 2h 后，处死小鼠，取肾组织制作冰冻切片。

[0132] (2) 免疫荧光观察沉积于小鼠肾脏的 IgA1 及含 IgA1 的免疫复合物的降解情况。

[0133] 实验结果：加酶组免疫复合物 (如图 6-2、6-3 和图 6-5、6-6) 荧光强度明显弱于复合物加 NaCl 对照组 (如图 6-1 和图 6-4)，商品化 IgA1 酶对沉积于肾脏的 IgA1 及含 IgA1 免疫复合物的分解作用 (如图 6-3 和 6-6) 明显弱于流感嗜血杆菌 ATCC49247 分泌的 IgA1 酶作用 (如图 6-2 和 6-5)。由此可知，通过尾静脉注入 IgA1 蛋白酶能够消化沉积于小鼠肾脏的正常糖基化的或低糖基化的 IgA1 及其免疫复合物。因此，本发明方法构建的动物模型可以用于检测或评价 IgA1 酶的体内作用，从而用于这类药物的筛选。

[0134] 综上所述，本发明提供了一种 IgAN 动物模型的构建方法，模拟临床 IgAN 患者体内 IgA 免疫复合物在肾小球系膜区沉积的现象，仅使用简单的步骤就能够构建出一种用于评价 IgA1 酶在体内对免疫复合物的分解作用的 IgAN 动物模型，为 IgAN 的临床治疗和药物筛选提供重要参考。

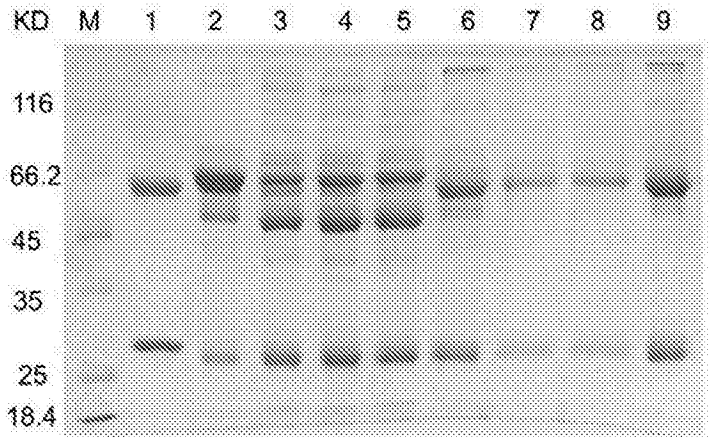

KD
M
1
2
3
4
5
6
7
8
9
116
66.2
45
35
25
18.4

图 1

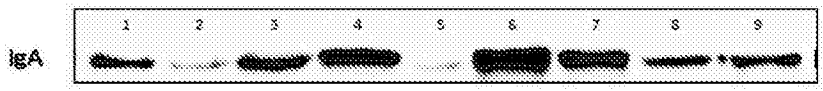

IgA
1
2
3
4
5
6
7
8
9

图 2

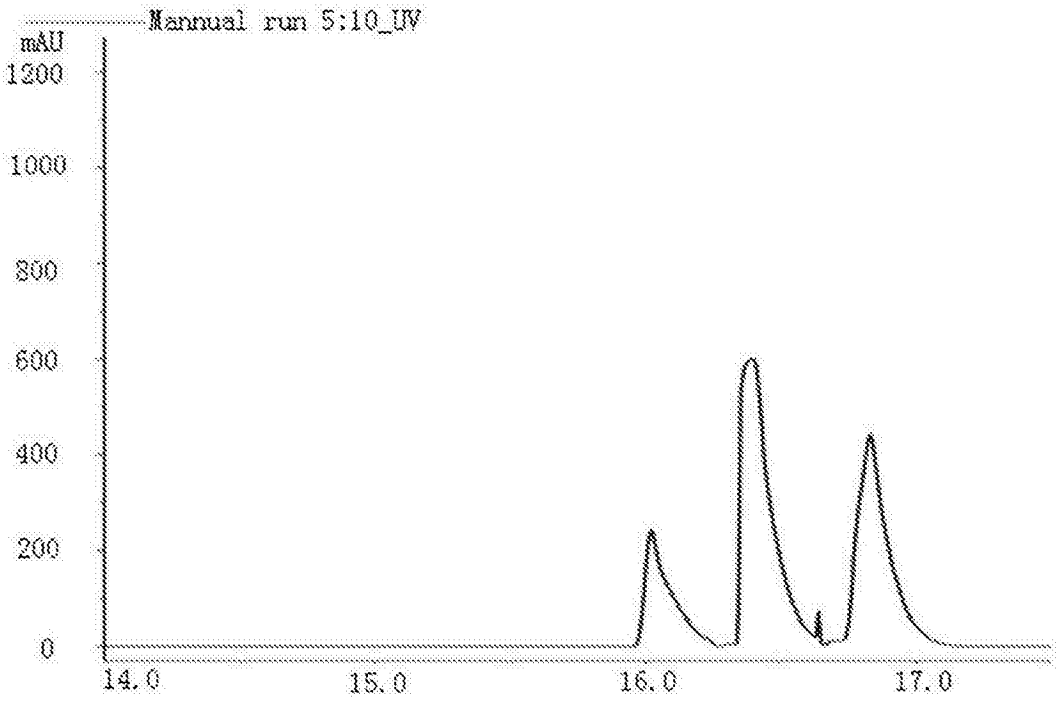

Mannual run 5:10_UV
mAU
1200
1000
800
600
400
200
0
14.0
15.0
16.0
17.0

图 3

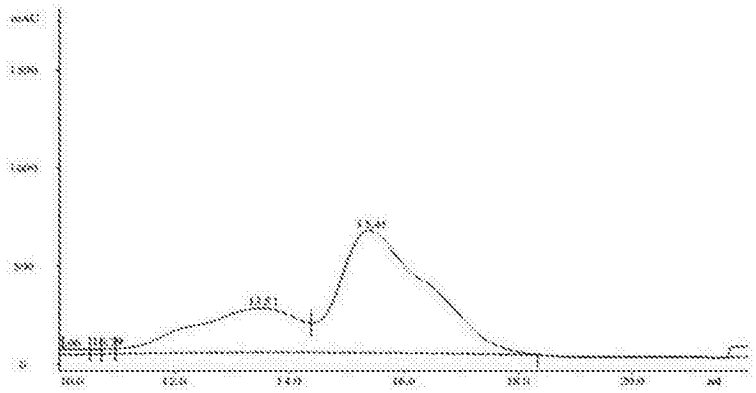
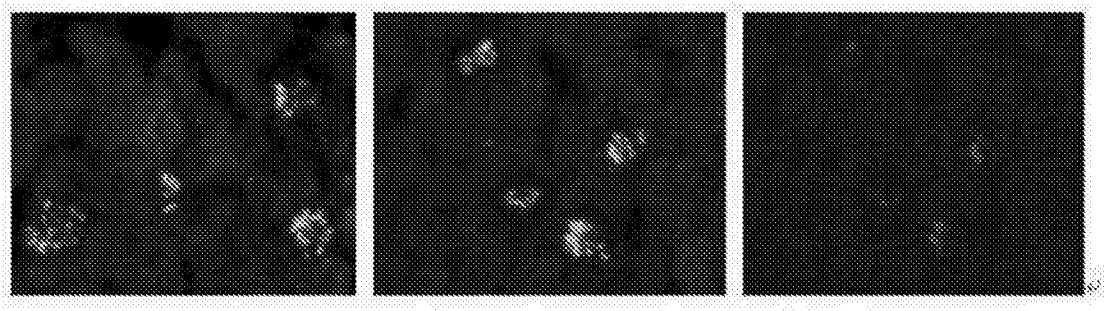
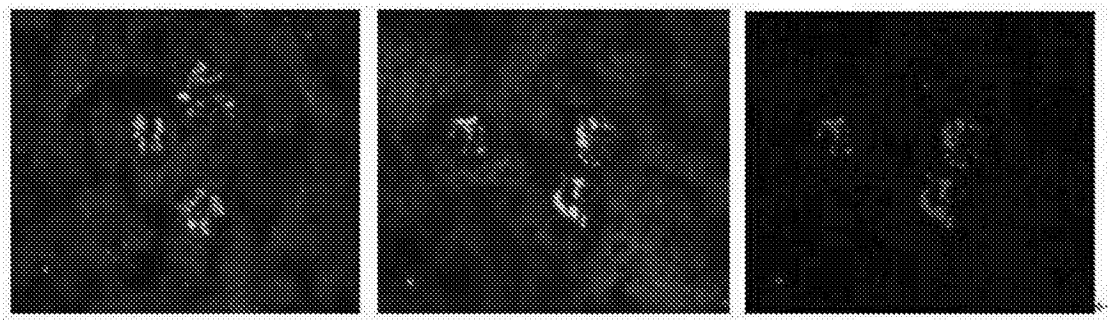


图 4



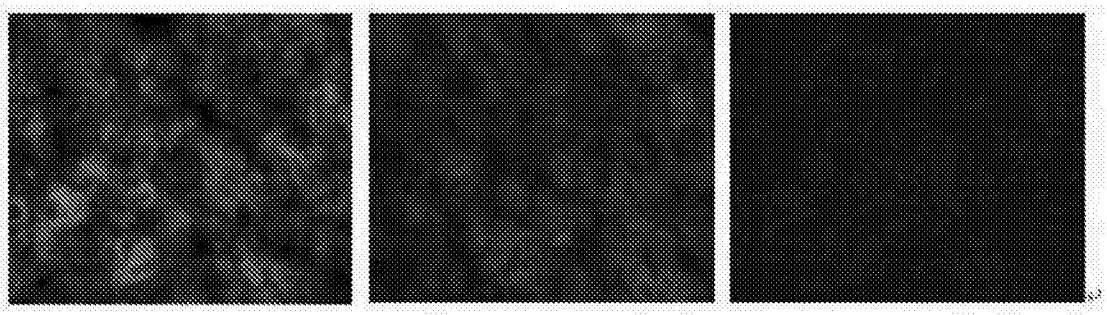
5-1 a 5-1 b 5-1 c

图 5-1



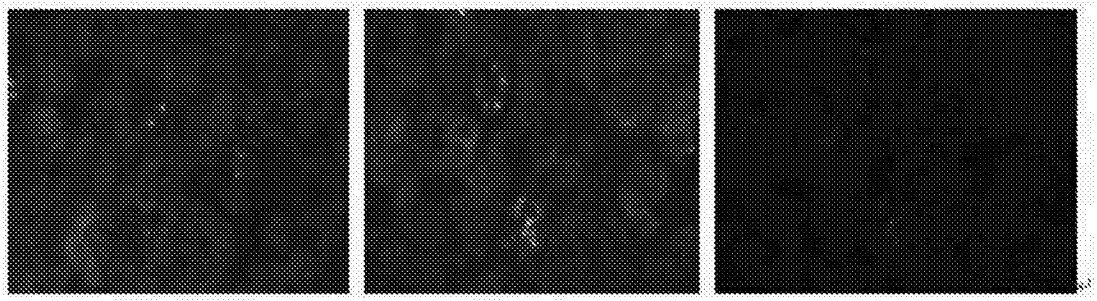
5-2 a 5-2 b 5-2 c

图 5-2



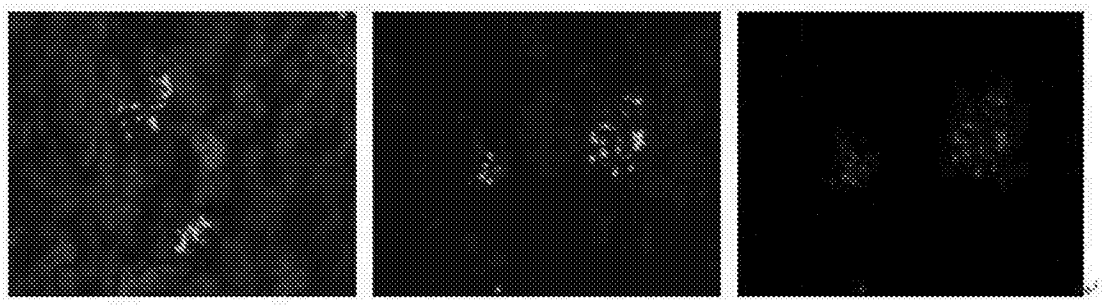
5-3 a 5-3 b 5-3 c

图 5-3



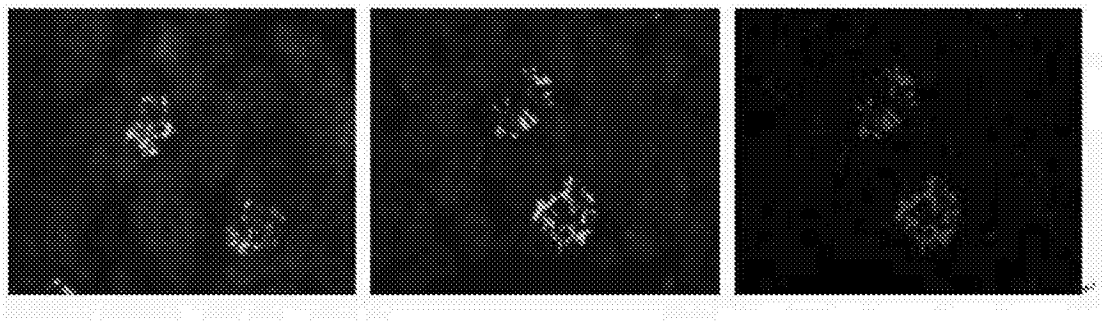
5-4 a 5-4 b 5-4 c

图 5-4



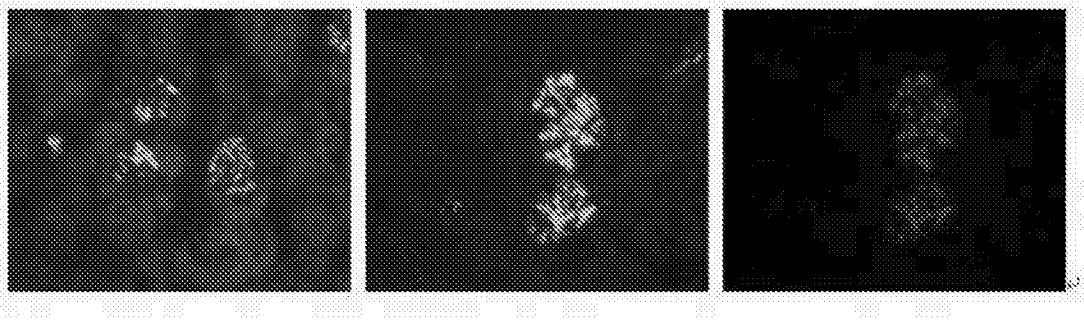
5-5 a 5-5 b 5-5 c

图 5-5



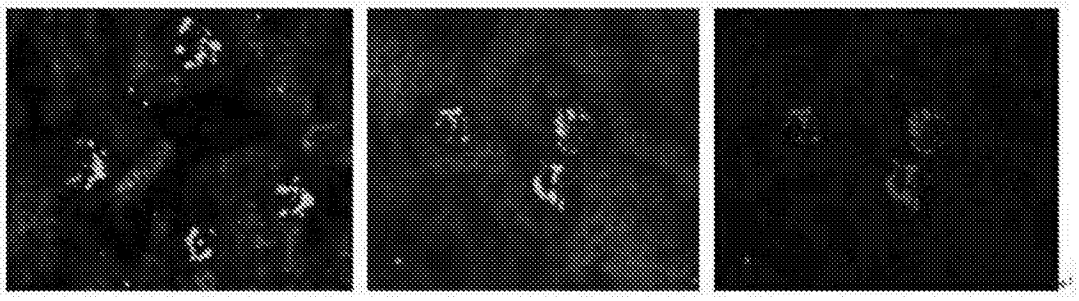
5-6 a 5-6 b 5-6 c

图 5-6



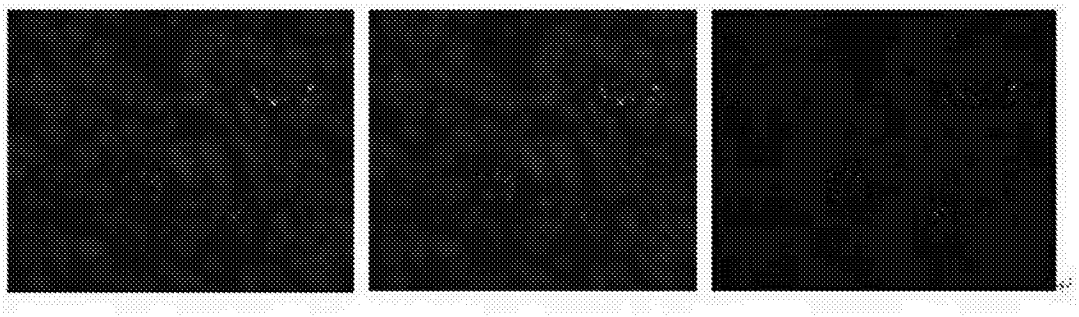
5-7 a 5-7 b 5-7 c

图 5-7



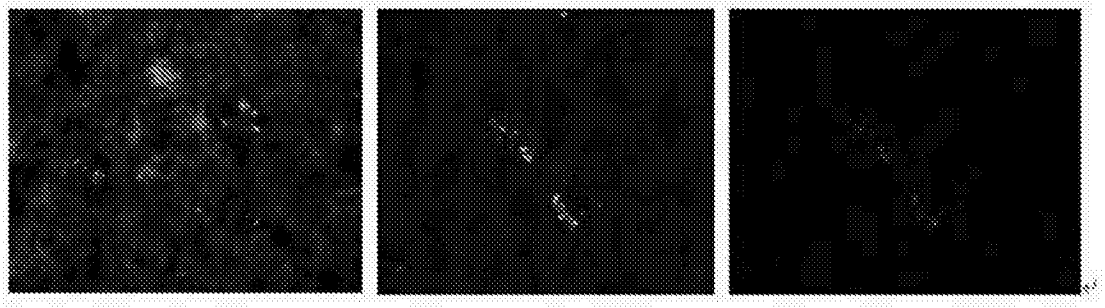
6-1 a 6-1 b 6-1 c

图 6-1



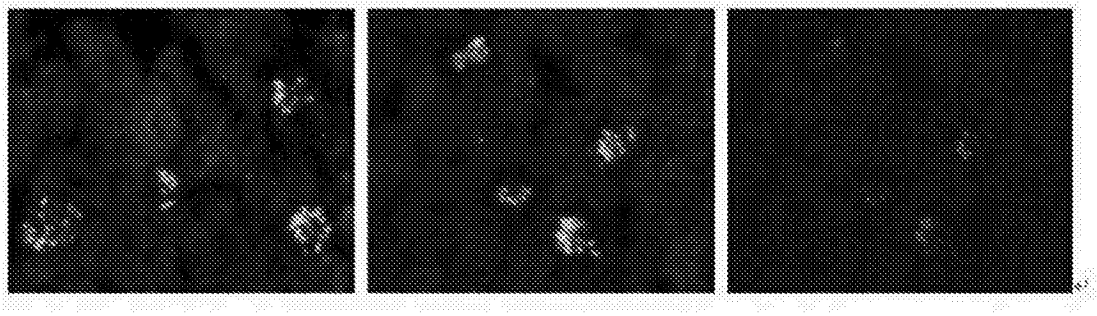
6-2 a 6-2b 6-2 c

图 6-2



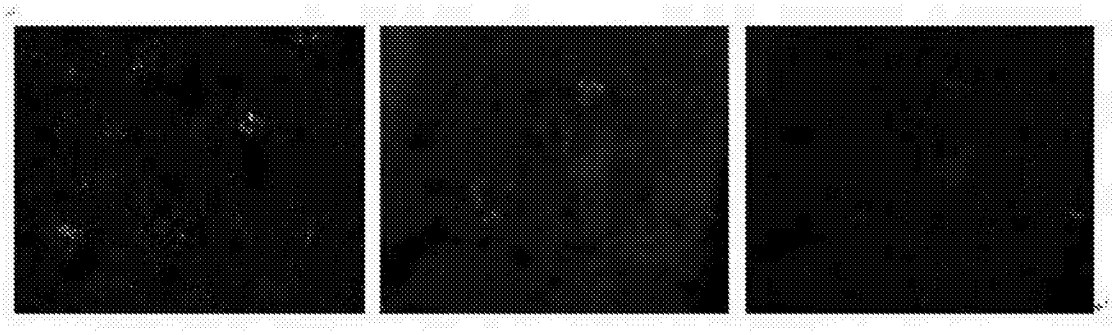
6-3 a 6-3 b 6-3c

图 6-3



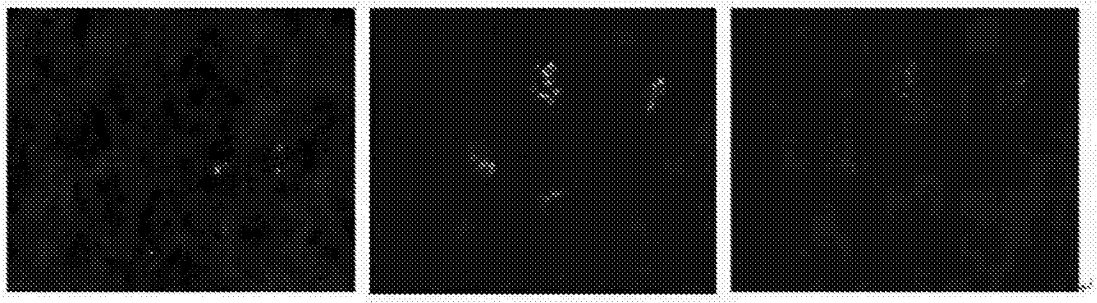
6-4 a 6-4 b 6-4 c

图 6-4



6-5 a 6-5 b 6-5 c

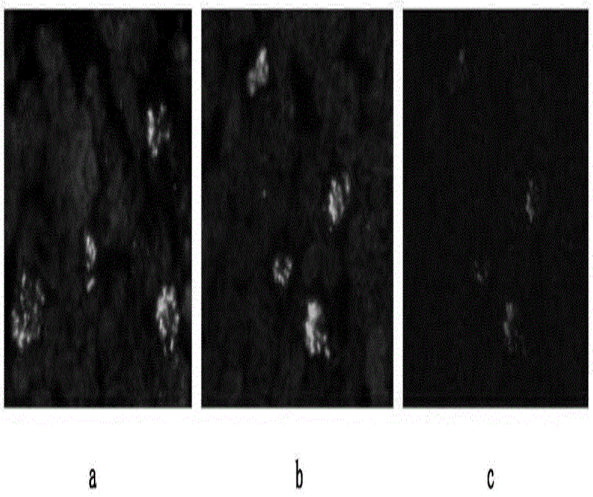
图 6-5



6-6 a 6-6 b 6-6 c

图 6-6

专利名称(译)	一种IgAN动物模型的构建方法及其应用		
公开(公告)号	CN104049070B	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201410299703.9	申请日	2014-06-27
[标]发明人	樊均明 王丽 文集 李雪英		
发明人	樊均明 王丽 文集 李雪英		
IPC分类号	G01N33/15 G01N33/53		
审查员(译)	高自强		
其他公开文献	CN104049070A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种IgAN动物模型的构建方法。具体步骤为：(a)体外制备IgA免疫复合物；(b)将制备得到的IgA免疫复合物注射到小鼠体内。本发明的建模方法操作简单易行、成功率高、重复性好、机体损害小，并且能够用于探究早期IgAN患者体内IgA免疫复合物的清除机制，筛选能够清除系膜区IgA免疫复合物沉积的药物、以及评价使用生物学方法清除异常沉积的IgA来治疗IgAN的效果。