



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111007255 A

(43)申请公布日 2020.04.14

(21)申请号 201911255012.8

(22)申请日 2019.12.10

(71)申请人 江苏三联生物工程有限公司

地址 214000 江苏省无锡市菱湖大道97号
兴业楼A座三楼

(72)发明人 尤梦竹 泮锋纲 丁俊杰 施启尧

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/535(2006.01)

权利要求书1页 说明书11页 附图1页

(54)发明名称

一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片及其制备方法

(57)摘要

本发明公开了一种用于检测肾损伤标志物的蛋白芯片,所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤:(1)黑玻片预处理;(2)抗体溶液点样;(3)封闭工艺;制得所述蛋白芯片。本发明蛋白芯片用于检测肾损伤标志物,该技术实现联合检测可以有效地提高检测效率,降低检测成本;本发明人开发了同时包含有丛生蛋白、胱抑素C、肾损伤分子-1、人纤溶酶原激活物抑制因子1、尿免疫球蛋白、热休克蛋白72、 β -连环蛋白、 β 2-微球蛋白、尿转铁蛋白、尿 α 1-微球蛋白、三叶因子3、尿海藻糖酶、人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白和尿微量白蛋白14个指标的蛋白芯片诊断试剂盒,具有快速,高效,低成本等优点。

1. 一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片,其特征在于所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤:

- (1) 黑玻片预处理;
- (2) 抗体溶液点样;
- (3) 封闭工艺,制得所述蛋白芯片。

2. 根据权利要求1所述的蛋白芯片,其特征在于步骤(1)中所述黑玻片预处理的方法为:

- ①将黑玻片置于含有NaOH的玻片预处理液中浸泡16~24h,之后采用纯化水清洗2~8次;
- ②将黑玻片置于质量浓度为0.05~1%的硅烷溶液中浸泡20~60min;
- ③将浸泡好的黑玻片氮气吹扫后放入烘箱中,于100~180℃条件下烘烤0.2~0.6h。

3. 根据权利要求1所述的蛋白芯片,其特征在于步骤(2)中所述抗体溶液包括抗丛生蛋白抗体、抗胱抑素C抗体、抗肾损伤分子-1抗体、抗人纤溶酶原激活物抑制因子1抗体、抗尿免疫球蛋白抗体、抗热休克蛋白72抗体、抗 β -连环蛋白抗体、抗 β 2-微球蛋白抗体、抗尿转铁蛋白抗体、抗尿 α 1-微球蛋白抗体、抗三叶因子3抗体、抗尿海藻糖酶抗体、抗人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体和抗尿微量白蛋白抗体溶液。

4. 根据权利要求1所述的蛋白芯片,其特征在于步骤(2)中所述点样的方法为机器自动化点样。

5. 根据权利要求1所述的蛋白芯片,其特征在于步骤(3)中所述封闭过程为:将点样好的黑玻片没入封闭液中1~24h,之后取出黑玻片,并离心去除残余封闭液,制得所述蛋白芯片。

6. 根据权利要求5所述的蛋白芯片,其特征在于所述封闭液为含有封闭蛋白的缓冲溶液;所述封闭蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;所述缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、HEPS缓冲液、MOPS缓冲液中的一种或多种。

7. 一种权利要求1~6任一项所述蛋白芯片的应用,其特征在于将所述蛋白芯片制成试剂盒。

8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于所述试剂盒还包括标记有HRP酶或碱磷酶的第二抗体溶液、对标记物敏感的化学发光底物。

一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术领域,尤其是涉及一种用于检测肾损伤标志物的蛋白芯片及其制备方法。

背景技术

[0002] 急性肾损伤(acute kidney injury, AKI)指由多种病因引起的肾功能快速下降而出现的临床综合症,根据2012年KDIGO指南的定义,AKI即血清肌酐浓度在7天内较基础值上升超过50%,或48小时内血清肌酐浓度升高 0.3mg/dL 。AKI是一个比较宽泛的临床病理生理状态,涉及多种不同的病因,包括某些特殊的肾疾病(如急性间质性肾炎、急性肾小球肾炎、急性肾血管病变)以及其他一些非特异性的病因(如肾前性的氮质血症、急性肾后梗阻性肾病)。AKI的病因涉及很多暴露高危因素和相关的风险因素。暴露高危因素包括脓毒症、重症系统疾病、心源性休克、烧伤、创伤、心血管手术、肾毒性药物等。可能诱发AKI发生的风险因素包括脱水、高龄、女性、黑人、慢性肾脏病、慢性的心肺肝疾病、糖尿病、肿瘤及贫血等^[1]。据统计,住院患者AKI发病率达1%~7%,死亡率高达60.3%。此外,AKI也是导致慢性肾脏病(chronic kidney disease, CKD)和慢性肾衰竭的重要原因,20%~50%的AKI幸存患者可发展为CKD,同时,CKD也是诱发AKI发生的主要危险因素之一,发生AKI的患者约30%存在CKD病史^[2,3]。

[0003] 近年来探索和发现的肾损伤相关生物标志物有30多种,主要包括:①反映肾小球功能受损的标志物,如胱抑素C、尿免疫球蛋白、尿转铁蛋白、尿微量白蛋白等;②反映肾小管受损的标志物,如中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白、肾损伤分子-1、 β_2 -微球蛋白、 α_1 -微球蛋白等。不同生物标志物各具优缺点,单一生物标志物检测常缺乏足够的诊断敏感性和特异性,临床应用价值受限。联合运用多个生物标志物更符合临床需求。

[0004] (1) 丛生蛋白(clusterin)

[0005] 丛生蛋白是一种分子量为80kDa的异二聚体糖蛋白,正常人肾脏仅有微量表达,主要分布在肾脏内动脉的内膜及肾小管,肾小球无表达。生理状态下不能从肾小球滤过,而各种肾损伤状态下,包括尿路梗阻、局部缺血/再灌注损伤、肾毒性损伤等,其在血液和尿液中的表达量增加^[4],被美国FDA批准为预测药物性肾损害的生物标志物^[5]。

[0006] (2) 肾损伤分子-1(KIM-1)

[0007] 肾损伤分子-1一种由肾脏近端小管上皮分泌的I型跨膜糖蛋白,分子量104kD,含有一个14kD的膜结合区和90kD的可溶部分。根据其胞内C末端结构不同可分为KIM-1a和KIM-1b,前者胞内部分缺乏酪氨酸激酶磷酸化区,主要表达于肝脏,后者的胞内部分富含酪氨酸激酶磷酸化区,主要表达于肾脏。KIM-1还可在活化的Th1和Th2细胞表达,因此又将其称为T细胞免疫球蛋白和粘蛋白-1(TIM-1)。KIM-1具有高度的组织特异性,其于受损后再生的近端小管上皮细胞内表达水平明显上调,而不表达于正常的肾组织内。在金属基质蛋白酶的介导下,KIM-1细胞外结构域可发生裂解,形成的可溶性分子脱落入肾小管管腔内,可实现对尿KIM-1的定量检测^[6]。有研究表明,在糖尿病早期肾损伤中,Kim-1敏感度最强

(77.2%),热休克蛋白72特异性最强(90.0%),KIM-1+人纤溶酶原激活物抑制因子1+热休克蛋白72联检的敏感度和特异度分别为91.1%、97.0%^[7]。因其在识别肾组织损伤方面具有良好的特异性和敏感性,尿KIM-1在2014年被FDA批准用于临床进行辅助诊断AKI^[6]。

[0008] (3) 人纤溶酶原激活物抑制因子1 (PAI-1)

[0009] 纤溶酶原激活物抑制因子1是一类分子量为50kD的糖蛋白,属于丝氨酸蛋白酶抑制剂家族,是体内最主要的尿激酶型纤溶酶原激活剂(uPA)和组织型纤溶酶原激活剂(tPA)的抑制剂。tPA和uPA可降解纤维蛋白和细胞外基质,因此PAI-1可影响血栓形成和纤维化过程。PAI-1在肾病的发生发展过程中起了重要的作用,在正常生理状态下,肾脏表达极少量的PAI-1,但是在急性或慢性的病理状态下,PAI-1的表达明显升高,随着损伤的减轻,PAI-1水平降低。在肾病中PAI-1的研究主要集中在动脉粥样硬化和硬化肾小球中,如肾动脉硬化、糖尿病肾病和慢性移植肾肾病^[8]。

[0010] (4) 热休克蛋白72 (HSP72)

[0011] 热休克蛋白根据分子量不同可被分为HSP100、HSP90、HSP70、HSP60及HSP40。HSP70家族主要包括HSP72和HSP73,是整个热休克蛋白家族中进化最保守、最重要的成员,是细胞应激反应最有效的缓冲系统。这两种蛋白的氨基酸序列90%都相同,HSP73属于结构型热休克蛋白,表达基本固定不变,HSP72属于诱导型热休克蛋白,在正常细胞中只有少量表达,在各种因素刺激下可大量表达。HSP72可以参与体内新合成蛋白质的折叠,降解或修复损伤蛋白质,抑制炎症因子的合成和分泌,减少应激损伤导致的细胞坏死或凋亡^[9]。HSP72在肾小管上皮细胞、间质平滑肌细胞、血管周神经细胞均可表达,其对肾脏的保护作用已在肾缺血再灌注损伤、肾毒性损伤、阻塞性肾损伤等模型中得到证实^[10]。

[0012] (5) α 1-微球蛋白 (α 1-MG)

[0013] α 1-微球蛋白主要由肝脏细胞和淋巴组织合成,分子量26kDa,可经肾小球自由过滤,在近端肾小管几乎全部被重吸收,正常情况下尿中含量极微,若含量升高提示肾小管重吸收功能受损,见于多种肾小管病变早期,目前多用于预测和观察早期肾损伤和糖尿病肾病并发症。与 β 2-MG相比, α 1-MG不受恶性肿瘤及尿液酸碱度影响,对于肾小管早期损伤是非常敏感的指标^[11,12]。有研究表明尿液中 α 1-MG和胱抑素C联合检测糖尿病肾病的阳性率为79.8%^[13],急性肾小管坏死病例中尿 α 1-MG的检测灵敏度为88%,特异度81%^[4]。

[0014] (6) β 2-微球蛋白 (β 2-MG)

[0015] β 2-微球蛋白由人体几乎所有有核细胞产生,分子量11.8kDa,主要由肾小球滤过,且仅由肾脏排泄,体内产生速率恒定,不受年龄、性别、肌肉的影响,尿中 β 2-MG升高,则提示肾小管损害或滤过功能下降,常见于急慢性肾炎、肾功能衰竭等。 β 2-MG在肾脏疾病方面的应用主要包括诊断早期肾损伤、鉴别肾小球或肾小管性炎症、预报肾移植排斥反应、鉴别上下尿路感染、监测某些药物的肾毒性等。测定血、尿 β 2-MG可作为诊断早期糖尿病肾病和高血压。肾损害的一项敏感指标。用尿液中A1b/ β 2-MG比值可用来鉴别肾小球或肾小管性的肾脏损害,若尿中A1b/ β 2-MG>1000,高度提示原发性肾小球性疾病,尿中A1b/ β 2-MG<40,提示肾小管性疾病^[4]。

[0016] (7) β -连环蛋白 (β -catenin)

[0017] β -连环蛋白的功能主要为介导细胞间黏附和参与基因的表达,广泛分布于内皮细胞、成纤维细胞等,参与其增殖、分化、凋亡。Wnt/ β -catenin信号通路是一种进化保守、高度

复杂的关键发育途径,在正常成人肾中,Wnt/ β -catenin信号通路相对沉默,但在多种动物模型和人类肾疾病中,Wnt/ β -catenin信号在肾损伤后被激活,参与了肾脏的损伤和修复^[14]。有研究显示,Wnt/ β -catenin信号通路在糖尿病肾病的发展中起重要作用,可加重胰岛素抵抗,还可促进动脉粥样硬化的发生和发展,是影响肾脏功能的独立危险因素^[15]。尿 β -catenin在诊断 ANCA相关性小血管炎肾损害的敏感度和特异度分别为96.6%和90%^[16]。

[0018] (8) 尿微量白蛋白(尿mALB)

[0019] 微量白蛋白尿是指尿中白蛋白量30~300mg/24h或定时收集尿标本测定(20~200 μ g/min) 或随机尿样本中白蛋白浓度为20~200mg/L,即超出正常参考值上限(30mg/24h或20 μ g/min 或20mg/L)而又未检出临床蛋白尿的中间阶段。尿微量白蛋白(microalbumin, MA) 分子量为69kDa,带负电荷,是肾功能障碍的早期诊断指标,其特异性和敏感性均比尿总蛋白高^[17]。正常情况下,绝大部分不能通过肾小球滤过膜,而各种原因导致肾小球滤过膜屏障通透性增加或损坏时,尿中MA的漏出量即增加。KDIGO已将MA纳入CKD分期,推荐尿MA/尿肌酐>30mg/g用于诊断微量蛋白尿^[12]。美国糖尿病协会推荐所有病程 $\geq$ 5年的I型糖尿病和所有新诊断的II型糖尿病患者每年检测尿白蛋白的排泄情况^[18]。

[0020] (9) 尿转铁蛋白(TRF)

[0021] 尿转铁蛋白是一种单链糖蛋白,分子量76.5kDa,主要由肝脏合成,一般情况下不能自由通过肾小球滤过膜屏障,但由于其所带负电荷较白蛋白少,肾小球滤过膜上电荷屏障发生轻微损伤即可导致TRF漏出,在肾损伤早期尿白蛋白水平正常时,70%的患者TRF水平显著增高,提示TRF可作为早期糖尿病肾病的重要诊断指标^[19]。有研究指出尿TRF在糖尿病肾病早期诊断中的灵敏度为50.0%,特异度为97.8%^[20]。

[0022] (10) 尿免疫球蛋白(IgG)

[0023] 尿免疫球蛋白G是一种分子量150kDa的阴离子血浆蛋白,生理状态下不能通过肾小球滤过屏障,因此其在尿液中的出现即预示着肾小球滤过屏障的破坏,是肾小球损伤的标志物^[21]。IgG可能出现在微量白蛋白尿之前以及发生的阶段,并伴有尿TRF、尿血浆铜蓝蛋白等的升高^[18]。有研究表明原发性肾病综合征患者中IgG阳性率高达73.63%^[22]。

[0024] (11) 人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)

[0025] NGAL是由近端肾小管具有活性的嗜中性粒细胞合成,以共价键与中性粒细胞明胶酶相连,分子量25kDa。正常情况下在人体组织中低表达,但当发生肾毒性或缺血性损伤时,NGAL 明显上调,高表达于受损肾小管。NGAL可以抵抗蛋白水解酶的作用,便于在尿液中检测,是一种肾毒性或缺血性急性肾损伤的早期敏感且特异的生物学标志物^[12]。尿NGAL诊断ANCA相关性小血管炎肾损害的敏感度和特异度分别为82.8%和40%^[16]。

[0026] (12) 半胱氨酸蛋白酶抑制剂C(CysC)

[0027] 半胱氨酸蛋白酶抑制剂C是一种非糖基化的碱性蛋白质,分子量13359,由所有有核细胞产生,生成速度很稳定,不受炎症影响,可自由通过肾小球滤膜,在近端小管被重吸收并代谢,不从肾小管分泌,其分子量大于肌酐,又带正电荷因此更易反应肾小球滤过率的早期变化,而且CysC从尿中的排出量不受年龄、性别、肌肉量、饮食、运动、感染等因素影响,肾小管功能一旦发生紊乱,尿液CysC含量能上升200倍^[13],故被认为是比血肌酐更好的反应早期肾小球滤过率变化的新型生物标志物。有研究报导急性肾小管坏死病例中尿CysC的

检测灵敏度为92%，特异度83%^[4]。

[0028] (13) 三叶因子3 (TFF3)

[0029] 三叶因子3由59个氨基酸组成，分子量约为6.7kDa，主要以二聚体形式产生生物效应，TFF3具有一定组织细胞特异性，主要存在于小肠、结肠杯状细胞、甲状腺、子宫内膜、肾小管上皮细胞等。动物实验表明，与当前临床常用生物标志物血肌酐、尿素氮相比，尿TFF3能更早地诊断肾小管损伤，且灵敏度和特异性均较高，有望成为慢性肾病及肾小球肾炎的新型标志物^[23,24]。

[0030] (14) 尿海藻糖酶

[0031] 尿海藻糖酶(urinary trehalase)是一种胞外糖蛋白酶，分子量75kD，在人体内仅产生于近端肾小管和小肠粘膜上皮组织，在分布上具有高度特异性。海藻糖酶在血中浓度很低，由于分子量较大且等电点低，一般不能从肾小球中滤过，在尿中如检出海藻糖酶活性增高，则提示近端肾小管功能受损。海藻糖酶的生物活性极为稳定，不易被降解，在4℃放置一周，其活性无明显变化。因此海藻糖酶可以作为一种理想的反映肾小管损伤的指标^[25]。研究指出尿海藻糖酶诊断ANCA相关性小血管炎肾损害的敏感度和特异度分别为93.1%和80%^[16]。

[0032] 肾损伤相关指标检测多采用免疫学方法，目前市场最常见的检测方法有免疫印迹法(斑点免疫、条带免疫)、免疫比浊、酶联免疫、化学发光法等。免疫印迹法适合于初筛检验，方法简单，灵敏度和特异性较差，一般仅能实现定性检测。酶联免疫(ELISA)、单指标化学发光法为免疫诊断最常用的方法，灵敏度和特异性都比较高，结果可靠性比免疫印迹法高，但对于组合项目需对每个项目进行单独的检测，检测效率较低，成本高昂。而且需对十几个指标进行独立的定标质控，操作繁琐，不利于快速给出检测结果。

[0033] 蛋白芯片技术实现联合检测可以一次性测定多个指标，有效地提高检测效率，实现定量检测、降低检测成本，且该方法具有灵敏度高、特异性好、全自动化程度高、应用范围广等优点。

发明内容

[0034] 针对现有技术存在的上述问题，本发明申请人提供了一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片及其制备方法。本发明蛋白芯片用于检测肾损伤标志物，应用本公司独创的蛋白芯片技术实现联合检测可以有效地提高检测效率，降低检测成本；本发明人开发了同时包含有丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶14个指标的蛋白芯片诊断试剂盒，具有快速、高效、低成本等优点。

[0035] 本发明的技术方案如下：

[0036] 一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片，所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤：

[0037] (1) 黑玻片预处理；

[0038] (2) 抗体溶液点样；

[0039] (3) 封闭工艺，制得所述蛋白芯片。

[0040] 步骤(1)中所述黑玻片预处理的方法为：

[0041] ①将黑玻片置于含有NaOH的玻片预处理液中浸泡16~24h,之后采用纯化水清洗2~8次;

[0042] ②将黑玻片置于质量浓度为0.05~1%的硅烷溶液(介质为25%乙醇)中浸泡20~60min;

[0043] ③将浸泡好的黑玻片氮气吹扫放入烘箱中,于100~180℃条件下烘烤0.2~0.6h。

[0044] 步骤(2)中所述抗体溶液包括丛生蛋白抗体、KIM-1抗体、PAI-1抗体、HSP72抗体、 α 1-MG 抗体、 β 2-MG抗体、 β -连环蛋白抗体、尿mALB抗体、尿TRF抗体、尿IgG抗体、NGAL 抗体、CysC抗体、TFF3抗体和尿海藻糖酶抗体溶液。

[0045] 步骤(2)中所述点样的方法为机器自动化点样。

[0046] 步骤(3)中所述封闭过程为:将点样好的黑玻片没入封闭液中1~24h,之后取出黑玻片,并离心去除残余封闭液,制得所述蛋白芯片。

[0047] 所述封闭液为含有封闭蛋白的缓冲溶液;所述封闭蛋白为牛血清白蛋白或卵清蛋白;所述缓冲液为PBS缓冲液、Tris缓冲液、HEPS缓冲液、MOPS缓冲液中的一种或多种。

[0048] 一种所述蛋白芯片的应用,将所述蛋白芯片制成试剂盒。

[0049] 所述试剂盒还包括标记有HRP酶或碱性磷酸酶的第二抗体溶液、对标记物敏感的化学发光底物。

[0050] 所述标记有HRP酶的第二抗体溶液浓度分别为:丛生蛋白第二抗体0.5 μ g/mL、KIM-1第二抗体0.5 μ g/mL、PAI-1第二抗体0.1 μ g/mL、HSP72第二抗体0.1 μ g/mL、 α 1-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β 2-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β -连环蛋白0.5 μ g/mL、尿mALB第二抗体0.5 μ g/mL、尿TRF第二抗体0.5 μ g/mL、尿IgG第二抗体0.5 μ g/mL、NGAL第二抗体0.5 μ g/mL、CysC第二抗体0.5 μ g/mL、TFF3第二抗体0.1 μ g/mL和尿海藻糖酶第二抗体0.1 μ g/mL;所述化学发光底物为分别含有鲁米诺、过氧化氢的检测液A和检测液B。

[0051] 本发明有益的技术效果在于:

[0052] 本发明蛋白芯片用于检测14个重要的肾损伤标志物,应用蛋白芯片技术实现联合检测可以有效地提高检测效率,降低检测成本;同时包含有丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶14个指标的蛋白芯片诊断试剂盒,具有快速、高效、低成本等优点。配合本公司的自动化蛋白芯片阅读仪,可以实现自动化检测。由于有效地将14个指标集成在一张芯片中进行检测,只需要一份病人尿样就可以实现14个指标的同时快速检测。本产品和技术作为一种新颖的检测方法,目前世界上还没有同类产品面市。

[0053] 本发明采用经典的免疫学夹心法。在玻璃为载体的芯片基质上固定捕获抗体,这些抗体可以捕获被测样本中特异性的抗原,被捕获的抗原与标记有HRP酶或碱磷酶的第二抗体相结合,形成复合物。加入对标记物敏感的化学发光底物进行化学发光,其光信号通过CCD摄像头采集,通过光信号的强弱可以判断被测样本中特定标志物抗原的浓度。

[0054] 本试剂盒使用了肾损伤芯片技术平台,而国内其他厂家的单项检测方法使用的是普通化学发光手段。与之相比,本产品的优势在于:①由于抗原与本产品抗体结合的特异性高、亲和力强,并且受到其他杂质影响较低,因此,对生物样品的要求非常低,可简化样品的前处理过程;②能够快速高通量、平行化定量分析大量样品;③操作简单,结果正确率高;④病人只需采一份尿样,且迅速可以给出监测结果。⑤所需试剂和样品少,价格低廉。

附图说明

[0055] 图1为本发明抗体点样示意图；

[0056] 图中，列1：阳性质控列；列2：空白；列3至列16分别为：丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3 和尿海藻糖酶抗体。

具体实施方式

[0057] 下面结合附图和实施例，对本发明进行具体描述。

[0058] 实施例1

[0059] 一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片，所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤：

[0060] (1) 黑玻片预处理；

[0061] ①将黑玻片置于含有2%NaOH的玻片预处理液中浸泡16h，之后采用纯化水清洗2~8次；

[0062] ②将黑玻片置于质量浓度为0.05%的硅烷溶液(25%乙醇)中浸泡60min；

[0063] ③将浸泡好的黑玻片氮气吹扫后放入烘箱中，于180℃条件下烘烤0.2h。

[0064] (2) 抗体溶液点样；

[0065] 参考图1，采用机器自动化点样丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶抗体溶液，浓度为0.1mg/mL，每点点样20nL，各抗体点样分布如图1所示。

[0066] (3) 封闭工艺；

[0067] 将点样好的黑玻片没入封闭液(内含1%牛血清白蛋白的PBS缓冲液)中10h，之后取出黑玻片，并离心去除残余封闭液，制得所述蛋白芯片。

[0068] (4) 试剂盒

[0069] 将所述蛋白芯片与标记有HRP酶的第二抗体溶液(浓度分别为丛生蛋白第二抗体0.5 μ g/mL、KIM-1第二抗体0.5 μ g/mL、PAI-1第二抗体0.1 μ g/mL、HSP72第二抗体0.1 μ g/mL、 α 1-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β 2-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β -连环蛋白0.5 μ g/mL、尿mALB第二抗体0.5 μ g/mL、尿TRF第二抗体0.5 μ g/mL、尿IgG第二抗体0.5 μ g/mL、NGAL第二抗体0.5 μ g/mL、CysC第二抗体0.5 μ g/mL、TFF3第二抗体0.1 μ g/mL和尿海藻糖酶第二抗体0.1 μ g/mL)、检测液A(含1%鲁米诺和2%Tris)和检测液B(1%过氧化氢)共同包装成试剂盒。

[0070] 实施例2

[0071] 一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片，所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤：

[0072] (1) 黑玻片预处理；

[0073] ①将黑玻片置于含有2%NaOH的玻片预处理液中浸泡24h，之后采用纯化水清洗2~8次；

[0074] ②将黑玻片置于质量浓度为0.5%的硅烷溶液(介质为25%乙醇)中浸泡30min；

[0075] ③将浸泡好的黑玻片氮气吹扫后放入烘箱中，于140℃条件下烘烤0.5h。

[0076] (2) 抗体溶液点样；

[0077] 参考图1,采用机器自动化点样丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶抗体溶液,浓度为0.1mg/mL,每点点样20nL,各抗体点样分布如图1所示。

[0078] (3) 封闭工艺;

[0079] 将点样好的黑玻片没入封闭液(内含2%卵清蛋白的PBS缓冲液)中24h,之后取出黑玻片,并离心去除残余封闭液,制得所述蛋白芯片。

[0080] (4) 试剂盒

[0081] 将所述蛋白芯片与标记有HRP酶的第二抗体溶液(浓度分别为丛生蛋白第二抗体0.5 μ g/mL、KIM-1第二抗体0.5 μ g/mL、PAI-1第二抗体0.1 μ g/mL、HSP72第二抗体0.1 μ g/mL、 α 1-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β 2-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β -连环蛋白0.5 μ g/mL、尿mALB第二抗体0.5 μ g/mL、尿TRF第二抗体0.5 μ g/mL、尿IgG第二抗体0.5 μ g/mL、NGAL第二抗体0.5 μ g/mL、CysC第二抗体0.5 μ g/mL、TFF3第二抗体0.1 μ g/mL和尿海藻糖酶第二抗体0.1 μ g/mL)、检测液A(含1%鲁米诺和2%Tris)和检测液B(含1%过氧化氢)共同包装成试剂盒。

[0082] 实施例3

[0083] 一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片,所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤:

[0084] (1) 黑玻片预处理;

[0085] ①将黑玻片置于含有2%NaOH的玻片预处理液中浸泡20h,之后采用纯化水清洗2~8次;

[0086] ②将黑玻片置于质量浓度为1%的硅烷溶液(介质为25%乙醇)中浸泡20min;

[0087] ③将浸泡好的黑玻片氮气吹扫后放入烘箱中,于100℃条件下烘烤0.6h。

[0088] (2) 抗体溶液点样;

[0089] 参考图1,采用机器自动化点样丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶抗体溶液,浓度为0.1mg/mL,每点点样20nL,各抗体点样分布如图1所示。

[0090] (3) 封闭工艺;

[0091] 将点样好的黑玻片没入封闭液(内含3%牛血清白蛋白的Tris缓冲液)中8h,之后取出黑玻片,并离心去除残余封闭液,制得所述蛋白芯片。

[0092] (4) 试剂盒

[0093] 将所述蛋白芯片与标记有HRP酶的第二抗体溶液(浓度分别为丛生蛋白第二抗体0.5 μ g/mL、KIM-1第二抗体0.5 μ g/mL、PAI-1第二抗体0.1 μ g/mL、HSP72第二抗体0.1 μ g/mL、 α 1-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β 2-MG第二抗体0.1 μ g/mL、 β -连环蛋白0.5 μ g/mL、尿mALB第二抗体0.5 μ g/mL、尿TRF第二抗体0.5 μ g/mL、尿IgG第二抗体0.5 μ g/mL、NGAL第二抗体0.5 μ g/mL、CysC第二抗体0.5 μ g/mL、TFF3第二抗体0.1 μ g/mL和尿海藻糖酶第二抗体0.1 μ g/mL)、检测液A(含1%鲁米诺和2%Tris)和检测液B(1%过氧化氢)共同包装成试剂盒。

[0094] 测试例:

[0095] 使用本公司生产的SLXP-001型生物芯片阅读仪对临床尿样进行检测,检测结果与各参比试剂盒(以国产主流厂家的单指标试剂盒为参比)进行对比。

[0096] SLXP-001型生物芯片阅读仪的工作过程如下:

[0097] 仪器自动吸取200 μ L的稀释后的待测样本(尿液稀释100倍)至反应杯中,仪器将本发明实施例制得的蛋白芯片自动地放入待测样本中,37 $^{\circ}$ C孵育40分钟,随后仪器夹爪将芯片取出,经仪器自动冲洗后投入到标记有HRP酶的第二抗体溶液(200 μ L,仪器自动提前吸好),再次孵育40分钟后,仪器夹爪将芯片再次取出,经仪器自动冲洗后投入到发光底物溶液中(由 100 μ L的检测液A和100 μ L的检测液B混合而成,由仪器自动吸取和混合),最后对蛋白芯片进行拍照成像,软件自动分析图片,给出分析结果。检测结果如表1~表5所示。

[0098] 表1

样本号	丛生蛋白实测值 ng/mL	丛生蛋白参比值 (参比试剂) ng/mL	KIM-1 实测值 ng/mL	KIM-1 参比值 (参比试剂) ng/mL	PAI-1 实测值 ng/mL	PAI-1 参比值 (参比试剂) ng/mL
1	364.17	375.09	1.46	1.50	0.88	0.90
2	185.05	170.24	0.90	0.83	2.23	2.05
3	246.47	236.61	0.75	0.72	1.19	1.14
4	135.85	142.64	1.88	1.98	1.45	1.52
5	313.96	304.54	1.75	1.69	0.66	0.64
6	161.22	166.06	0.45	0.46	1.23	1.27
7	527.52	506.42	1.18	1.14	1.77	1.69
8	368.03	356.99	0.37	0.36	0.45	0.44
9	153.93	161.63	0.32	0.34	0.85	0.89
10	98.32	101.27	0.61	0.62	2.57	2.65
11	242.26	232.57	1.42	1.36	1.22	1.17
12	288.75	297.42	1.83	1.88	3.40	3.50
13	511.93	537.53	0.54	0.57	0.60	0.63
14	188.90	183.24	0.22	0.21	0.47	0.46
15	151.01	158.56	1.10	1.16	1.30	1.37
16	295.78	283.95	0.67	0.64	4.10	3.94
17	113.80	119.49	1.24	1.31	0.80	0.84
18	430.78	452.32	0.44	0.46	3.19	3.35
19	122.55	117.65	0.82	0.79	1.93	1.85
20	94.71	97.55	1.55	1.59	3.07	3.16

[0100] 表2

样本号	HSP72 实测值 ng/mL	HSP72 参比值 (参比试剂) ng/mL	α 1-MG 实测值 ng/mL	α 1-MG 参比值 (参比试剂) ng/mL	β 2-MG 实测值 μ g/mL	β 2-MG 参比值 (参比试剂) μ g/mL
1	21.04	21.67	13.39	13.80	182.88	188.37
2	24.06	22.13	83.27	76.61	124.39	114.44
3	29.11	27.95	157.28	150.99	63.38	60.85
4	35.43	37.20	164.89	173.13	101.41	106.48
5	36.77	35.67	88.48	85.82	142.43	138.16
6	28.24	29.09	113.62	117.03	119.77	123.36
7	36.92	35.44	12.96	12.44	212.41	203.92
8	26.77	25.97	98.58	95.62	120.88	117.25
9	20.55	21.57	103.32	108.49	86.47	90.79
10	29.22	30.09	123.44	127.14	191.43	197.18
11	27.11	26.03	21.79	20.92	85.64	82.22
12	37.81	38.94	149.32	153.80	168.17	173.21
13	25.62	26.90	96.73	101.57	208.38	218.80
14	27.37	26.55	14.26	13.83	171.83	166.68
15	35.98	37.78	136.81	143.65	207.75	218.14
16	24.11	23.15	66.94	64.26	87.41	83.91
17	26.36	27.67	18.94	19.88	90.78	95.32
18	34.86	36.61	41.26	43.32	92.50	97.12
19	21.45	20.59	95.65	91.83	50.47	48.45
20	18.53	19.09	69.12	71.19	103.72	106.83

[0102] 表3

样本号	β -连环蛋白实测值 ng/mL	β -连环蛋白参比值 (参比试剂) ng/mL	尿 mALB 实测值 μ g/mL	尿 mALB 参比值 (参比试剂) μ g/mL	尿 TRF 实测值 ng/mL	尿 TRF 参比值 (参比试剂) ng/mL
1	19.42	20.01	10.11	11.12	159.09	163.86
2	26.91	24.76	28.42	27.00	12.12	11.15
3	11.95	11.47	32.43	34.05	93.27	89.54
4	25.04	26.30	36.90	40.59	36.54	38.37
5	76.58	74.28	20.19	21.20	23.34	22.64
6	24.85	25.60	23.87	22.68	118.95	122.52
7	10.66	10.23	13.62	12.94	58.12	55.79
8	14.91	14.46	21.48	22.55	160.19	155.38
9	8.98	9.43	40.46	44.51	10.85	11.39
10	10.94	11.27	17.55	16.15	40.87	42.09
11	26.01	24.97	23.65	22.47	29.01	27.85
12	156.25	160.93	18.44	16.96	46.22	47.61
13	20.84	21.88	7.14	6.64	151.86	159.45
14	9.19	8.91	30.54	33.59	60.38	58.57
15	109.76	115.25	12.35	11.73	114.32	120.03
16	9.19	8.82	1.63	1.50	75.32	72.31
17	19.74	20.73	14.16	15.58	57.75	60.64
18	13.84	14.53	13.89	12.78	169.16	177.61
19	8.02	7.70	5.47	5.09	105.77	101.54
20	20.95	21.58	20.65	19.62	42.38	43.65

[0104] 表4

样本号	尿 IgG 实测值 μ g/mL	尿 IgG 参比值 (参比试剂) μ g/mL	NGAL 实测值 ng/mL	NGAL 参比值 (参比试剂) ng/mL	尿 CysC 实测值 ng/mL	尿 CysC 参比值 (参比试剂) ng/mL
1	2.48	2.56	17.27	17.79	81.59	84.04
2	0.82	0.75	26.58	24.46	61.10	56.21
3	1.68	1.61	12.81	12.29	119.34	114.57
4	3.23	3.39	17.87	18.77	133.61	140.29
5	3.71	3.60	33.22	32.22	72.37	70.20
6	4.02	4.14	23.02	23.71	158.63	163.39
7	1.52	1.46	16.50	15.84	65.94	63.30
8	3.72	3.61	23.65	22.94	32.66	31.68
9	4.45	4.67	6.67	7.01	113.63	119.31
10	3.33	3.43	32.20	33.17	211.26	217.60
11	3.42	3.28	13.99	13.43	61.75	59.28
12	1.98	2.04	5.11	5.26	125.42	129.18
13	3.62	3.80	>72	>72	24.88	26.13
14	1.92	1.86	49.84	48.34	158.54	153.78
15	3.78	3.97	27.74	29.13	153.50	161.17
16	2.26	2.17	46.90	45.02	38.39	36.85
17	1.03	1.08	30.97	32.52	86.53	90.86
18	2.83	2.98	13.21	13.88	43.16	45.32
19	1.40	1.35	24.18	23.21	97.79	93.88
20	3.00	3.09	10.30	10.61	128.65	132.50

[0106] 表5

样本号	TFF3 实测值 ng/mL	TFF3 参比值 (参比试剂) ng/mL	尿海藻糖酶实测值 ng/mL	尿海藻糖酶参比值 (参比试剂) ng/mL
1	119.38	122.96	0.81	0.83
2	152.39	140.20	1.38	1.27
3	62.61	60.10	1.68	1.62
4	279.10	293.06	0.98	1.03
5	166.91	161.90	2.02	1.96
6	483.04	497.53	2.08	2.15
7	104.79	100.60	2.61	2.51
8	141.86	137.61	1.00	0.97
9	75.37	79.13	1.33	1.40
10	207.00	213.21	0.87	0.89
11	420.30	403.49	2.78	2.67
12	118.20	121.75	1.70	1.75
13	226.09	237.40	2.11	2.22
14	62.11	60.25	1.86	1.80
15	89.23	93.70	1.09	1.15
16	232.85	223.54	2.10	2.01
17	129.65	136.13	2.70	2.83
18	94.06	98.77	2.64	2.77
19	86.19	82.74	1.61	1.54
20	197.56	203.49	1.77	1.83

[0107]

[0108] 由上表可见,本发明所提供的试剂盒,同时检测丛生蛋白、KIM-1、PAI-1、HSP72、 α 1-MG、 β 2-MG、 β -连环蛋白、尿mALB、尿TRF、尿IgG、NGAL、CysC、TFF3和尿海藻糖酶14个指标,可以获得与单指标试剂盒相似的结果(相对误差多数在10%以内),在灵敏度,线性范围等方面也没有显著差异。本试剂盒可以有效地替代单指标试剂盒进行多种肾损伤指标的测定。使用本试剂盒可以实现高效率,简操作,低成本,用时短等多个优点,非常有助于及时,准确地发现肾损伤和监控肾损伤的发展程度。

[0109] 参考文献

[0110] [1] 闫文娟,张炯.急性肾损伤的研究进展[J].临床与病理杂志,2019,39(7):1571-1575.

[0111] [2] 陈沐林,杨陈,韩焕钦,等.急性肾损伤生物标志物的研究现状及新进展[J].医学综述,2019,25(9):1761-1765.

[0112] [3] 马锡慧.流式微球技术检测肾损伤标志物方法学建立及初步临床应用[D].北京:中国人民解放军军事医学科学院,2016.

[0113] [4] 赵晋.基于新型生物标志物评价中药对肾功能的影响[D].广州:广州中医药大学,2015.

[0114] [5] Petra V, Sofie S, Erio BT, et al. Tissue Kim-1 and urinary clusterin as early indicators of cisplatin-induced acute kidney injury in rats[J]. Toxicologic Pathology, 2012, 40(7):1049-1062.

[0115] [6] 张译丹.肾损伤分子-1在原发性膜性肾病中的表达及其意义[D].济南:山东大学,2018.

[0116] [7] 林永梅,陈映,陈姮熹,等.Kim-1、PAI-1及Hsp72联合检测对糖尿病早期肾损害的诊断价值[J].西南国防医药,2017,27(3):247-250.

- [0117] [8]钟建泳.PAI-1通过与玻连蛋白结合减少心脏纤维化和肾脏尿蛋白的机制研究[D].上海:复旦大学,2012.
- [0118] [9]石丽.急性低氧环境下热休克蛋白72在大鼠肾脏中的表达及意义[D].西宁:青海大学,2014.
- [0119] [10]晏春根,朱冬芳,王锋.热休克蛋白72和Toll样受体4在肝肾综合征大鼠肾组织中的表达及作用研究[J].中国危重病急救医学,2007,19(12):731-734.
- [0120] [11]李明远.重症监护病房患者急性肾损伤的流行病学研究[D].苏州:苏州大学,2013.
- [0121] [12]金艳.尿微量白蛋白在危重症患者早期肾损伤中的临床价值初探[D].北京:北京中医药大学,2014.
- [0122] [13]朱槿宏,王有奎,吕海宏,等.尿胱抑素C和 α -1微球蛋白在糖尿病肾病中的诊断研究[J].中国卫生检验杂志,2016,26(12):1729-1733.
- [0123] [14]杨迷玲,徐宪伟,张果,等. β -catenin在慢性移植肾肾损伤中的作用[J].临床与病理杂志,2019,39(2):268-274.
- [0124] [15]罗立,冯锦红,孔刘莎,等. β -catenin和cadherin蛋白联合血尿酸检测对DN预后的评估[J].临床输血与检验,2019,21(2):180-183.
- [0125] [16]彭卫华,陈凌舟,许敏敏,等.ANCA相关性小血管炎肾损害患者尿液肾损伤生物标志物的检测及意义[J].中国中西医结合肾病杂志,2017,18(10):860-865.
- [0126] [17]李霞.正常高值血压与尿微量白蛋白关系的探讨[D].太原:山西医科大学,2009.
- [0127] [18]郑茂.住院2型糖尿病患者尿蛋白排泄的调查研究[D].合肥:安徽医科大学,2018.
- [0128] [19]林创辉.尿转铁蛋白测定在糖尿病肾病早期诊断中的临床意义[J].糖尿病新世界,2015,(4):125-126.
- [0129] [20]王婧.糖尿病肾病血清胱抑素C、尿转铁蛋白与肾小球滤过率的相关性研究[D].石家庄:河北医科大学,2013.
- [0130] [21]薛昊.尿蛋白标志物在糖尿病肾病诊断、进展及预后评价中的价值研究[D].上海:中国人民解放军海军军医大学,2018.
- [0131] [22]张霞.原发性肾病综合征补体、免疫球蛋白与临床病理分析[D].延安:延安大学,2014.
- [0132] [23]ASTOR B C.KOTTGEN A.HWANG S J.et al.Trefoil factor 3 predicts incident chronic kidney disease:a case-control study nested within the Atherosclerosis Risk in Communities(ARIC) study[J].Am J Nephrol,2011,34(4):291-297.
- [0133] [24]DU T Y.LUO H M.QIN H C.et al.Circulating serum trefoil factor 3 (TFF3) is dramatically increased in chronic kidney disease[J].PLoS One.2014,8(11):e80271.
- [0134] [25]张普山.尿海藻糖酶对近端肾小管损伤的临床意义[D].长沙:中南大学,2004.

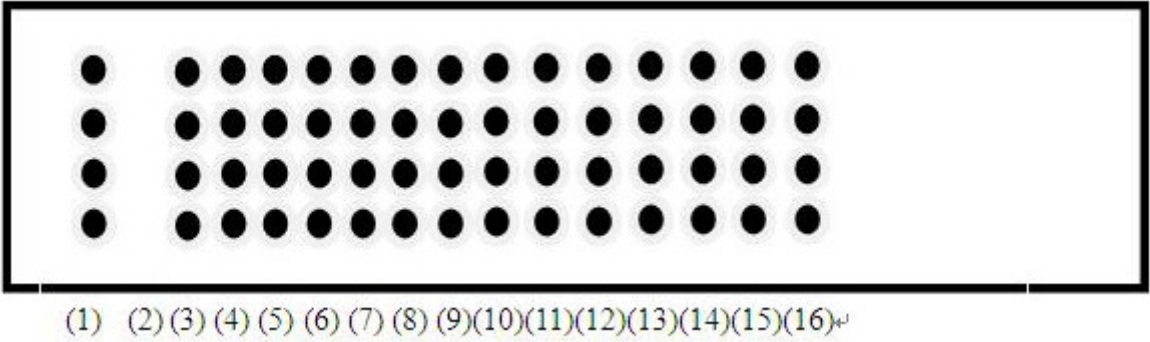
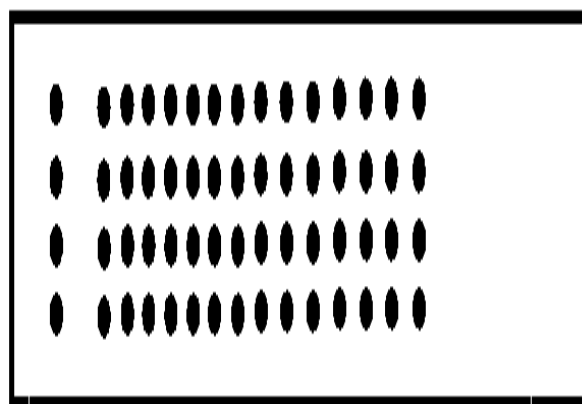


图1

专利名称(译)	一种用于肾损伤标志物检测的蛋白芯片及其制备方法		
公开(公告)号	CN111007255A	公开(公告)日	2020-04-14
申请号	CN201911255012.8	申请日	2019-12-10
[标]申请(专利权)人(译)	江苏三联生物工程有限公司		
申请(专利权)人(译)	江苏三联生物工程有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	江苏三联生物工程有限公司		
[标]发明人	泮锋纲 丁俊杰 施启尧		
发明人	尤梦竹 泮锋纲 丁俊杰 施启尧		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/535		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/535 G01N33/68 G01N2800/34		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于检测肾损伤标志物的蛋白芯片，所述蛋白芯片的制备方法包括如下步骤：（1）黑玻片预处理；（2）抗体溶液点样；（3）封闭工艺；制得所述蛋白芯片。本发明蛋白芯片用于检测肾损伤标志物，该技术实现联合检测可以有效地提高检测效率，降低检测成本；本发明人开发了同时包含有丛生蛋白、胱抑素C、肾损伤分子-1、人纤溶酶原激活物抑制因子1、尿免疫球蛋白、热休克蛋白72、β-连环蛋白、β2-微球蛋白、尿转铁蛋白、尿α1-微球蛋白、三叶因子3、尿海藻糖酶、人中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白和尿微量白蛋白14个指标的蛋白芯片诊断试剂盒，具有快速，高效，低成本等优点。



(1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16)