

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/564

G01N 33/543



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02822274.1

[43] 公开日 2005年2月23日

[11] 公开号 CN 1585900A

[22] 申请日 2002.11.26 [21] 申请号 02822274.1

[30] 优先权

[32] 2001.11.28 [33] GB [31] 0128583.2

[86] 国际申请 PCT/GB2002/005285 2002.11.26

[87] 国际公布 WO2003/048772 英 2003.6.12

[85] 进入国家阶段日期 2004.5.9

[71] 申请人 RSR 有限公司

地址 英国加的夫

[72] 发明人 伯纳德·里斯·史密斯

雅德维加·富尔马尼亚克

迈克尔·鲍威尔

[74] 专利代理机构 隆天国际知识产权代理有限公司

代理人 高龙鑫 王颖

权利要求书 19 页 说明书 47 页 附图 2 页

[54] 发明名称 检测与胰腺胰岛细胞抗原分子和/或胰岛素反应的自身抗体

[57] 摘要

一种筛选动物受试体体液样本中的分析物自身抗体的方法，该自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变体、类似物、衍生物或片段，以及所述方法中使用的试剂盒。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种筛选动物受试体体液样本中能与一种或多种抗原分子发生反应的分析物自身抗体的方法，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体体液样本；

(b) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素，以及它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段；

(d) 将步骤 (b) 和 (c) 提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本相接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子]，其中存在于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子、或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与分析物自身抗体结合的区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得；

(e) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供固定方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第一抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上；

(f) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供直接或间接的可检测标记物，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第二抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之

后被这种直接或间接的可检测标记物所标记；

(g) 检测是否存在步骤(e)中所固定的、在步骤(d)中形成的复合物，以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

2. 根据权利要求1的方法，其中能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的的第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素，和 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

3. 根据权利要求2的方法，其中能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的的第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

4. 根据权利要求3的方法，其包括提供能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应的、且主要由 GAD 组成的第一抗原分子，所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，根据步骤(e)被固定在固体支持物上；还提供与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应的、主要由 GAD 组成的第二抗原分子，所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，它们被步骤(f)提供的标记物所标记。

5. 根据权利要求3的方法，其包括提供能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 IA-2 组成的第一抗原分子，所述 IA-2 抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，根据步骤(e)被固

定在固体支持物上；还提供能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 IA-2 组成的第二抗原分子，所述 IA-2 抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，它们被步骤（f）提供的标记物所标记。

6. 根据权利要求 3 的方法，其包括提供（i）与体液样本中的分析物自身抗体反应的 GAD 第一和第二抗原分子，所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 GAD 第一抗原分子按照步骤（e）被固定到固体支持物上，且所述 GAD 第二抗原分子被步骤（f）提供的标记物所标记；以及（ii）与体液样本中的分析物自身抗体反应的 IA-2 第一和第二抗原分子，所述 IA-2 抗原分子选自 IA-2、其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 IA-2 第一抗原分子按照步骤（e）被固定到固体支持物上，且所述 IA-2 第二抗原分子被步骤（f）提供的标记物所标记。

7. 一种筛选动物受试体体液样本中能与一种或多种抗原分子反应的分析物自身抗体的方法，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

（a）提供所述的受试体体液样本；

（b）提供能与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c)提供能与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子,所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子,其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段;

(d)将步骤(b)和(c)提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本相接触,由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物,该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子],其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子、或由该共同抗原分子衍生而得,或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体的结合区域位于一种共同的抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得;

(e)在步骤(d)之前或之中或之后给予固定方法,由此步骤(d)形成的复合物中的第一抗原分子在步骤(d)之前或之中或之后被固定到固体支持物上;

(f)在步骤(d)之前或之中或之后,给予直接或间接的可检测标记物,由此步骤(d)形成的复合物中的第二抗原分子在步骤(d)之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记;

(g)检测是否存在步骤(e)中所固定的、在步骤(d)中形成的复合物,以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

8.一种筛选动物受试体体液样本中能与 GAD 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的方法,所述方法包括:

(a)提供所述受试体的所述体液样本;

(b)提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的、且主要由 GAD 抗原分子组成的第一和第二抗原分子,所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子,其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中所述 GAD 第一抗原分子根据步骤(d)被固定在固体支持物上,所述 GAD 第二抗原分子被步骤(e)提供的标记物所标记;

(c) 将步骤 (b) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触, 由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物, 该复合物包括[所述 GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述 GAD 第二抗原分子];

5 (d) 在步骤 (c) 之前或之中或之后给予固定方法, 由此步骤 (c) 形成的复合物中的 GAD 第一抗原分子在步骤 (c) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上;

(e) 在步骤 (c) 之前或之中或之后, 提供直接或间接的可检测标记物, 由此步骤 (c) 形成的复合物中的 GAD 第二抗原分子在步骤 (c) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记;

(f) 检测是否存在步骤 (d) 中所固定的、在步骤 (c) 中形成的复合物, 以得到所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

9. 一种筛选动物受试体体液样本中与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的方法, 所述方法包括:

15 (a) 提供所述受试体的所述体液样本;

(b) 提供能与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的、且主要由 IA-2 抗原分子组成的第一和第二抗原分子, 所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 其中, 抗原分子选自 IA-2 和它的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中所述 IA-2 第一抗原分子根据步骤 (d) 被固定到固体支持物上, 所述 IA-2 第二抗原分子根据步骤 (e) 的标记方法被标记;

(c) 将步骤 (b) 提供的 IA-2 抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触, 由此体液样本中的分析物自身抗体与所述 IA-2 抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物, 该复合物包括[IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[IA-2 第二抗原分子];

(d) 在步骤 (c) 之前或之中或之后给予固定方法, 由此步骤 (c) 形成的复合物中的 IA-2 第一抗原分子在步骤 (c) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上;

30 (e) 在步骤 (c) 之前或之中或之后, 提供直接或间接的可检测标记物,

由此步骤(c)形成的复合物中的IA-2第二抗原分子在步骤(c)之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记;

(f)检测是否存在步骤(d)所固定的、步骤(c)所形成的复合物,以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

5 10. 一种筛选动物受试体体液样本中能分别与GAD和IA-2,或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的第一和第二分析物自身抗体的方法,所述方法包括:

(a)提供所述的受试体体液样本;

(b)提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的GAD第一和第二
10 抗原分子,GAD抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子,其中抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中,所述融合分子中至少一种
15 抗原分子包括GAD₆₅、GAD₆₇或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中所述GAD第一抗原分子根据步骤(e)被固定在固体支持物上,所述GAD第二抗原分子被步骤(f)的标记物所标记;

(c)提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的IA-2第一和第二
抗原分子,所述抗原分子选自IA-2或其一种或多种变异体、类似物、衍生物
或片段,以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原
20 分子,其中抗原分子选自IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中,所述融合分子中至少一种抗原分子包括IA-2或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中所述IA-2第一抗原分子根据步骤(e)被固定在固体支持物上,所述IA-2第二抗原分子被步骤(f)提供的标记物所标记;

(d)将步骤(b)和(c)提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触,由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物,该复合物包括[GAD第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[GAD第二抗原分子]或[IA-2第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[IA-2第二
25 抗原分子];

(e)在步骤(d)之前或之中或之后提供固定方法,由此步骤(d)形成

的复合物中的 GAD 或 IA-2 第一抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上;

(f) 在步骤 (d) 之前或之中或之后, 提供直接或间接的可检测标记物, 由此步骤 (d) 形成的复合物中的 GAD 或 IA-2 第二抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记;

(g) 检测是否存在步骤 (e) 中固定的、步骤 (d) 中形成的复合物, 以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

11. 根据权利要求 1 至 10 任意一项的方法, 其中, 所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种或多种共同的抗原分子。

12. 根据权利要求 11, 即从属于权利要求 1 至 4、6 至 8 或 10 中任意一项的方法, 其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇。

13. 根据权利要求 11, 即从属于权利要求 1 至 3、5 至 7、9 或 10 中任意一项的方法, 其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括 IA-2。

14. 根据权利要求 1 至 10 任意一项的方法, 其中, 一种或多种复合物中的第一或第二抗原分子之一选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素, 而另一存在于一种或多种复合物中的抗原分子包含上述抗原分子的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段, 它们能与所述体液样本中的自身抗体发生反应。

15. 根据权利要求 14, 即从属于权利要求 1 至 4、6 至 8 或 10 中任意一项的方法, 其中, 与所述体液样本中自身抗体反应的一种或多种复合物中的第一或第二抗原中的一种包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇, 而另一种存在于一种或多种复合物中的抗原分子包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段。

16. 根据权利要求 14, 即从属于权利要求 1 至 3、5 至 7、9 或 10 中任意一项的方法, 其中, 一种或多种复合物中的第一或第二抗原分子中的一种包括 IA-2, 而另一存在于一种或多种复合物中的抗原分子包含 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 它们能与所述体液样本中的自身抗体发生反应。

17.根据权利要求 1 至 11 任意一项的方法，其中，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子都包括同一抗原分子的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段，它们能与所述体液样本中自身抗体反应。

18.根据权利要求 17，即从属于权利要求 1 至 4、6 至 8 或 10 中任意一项的方法，其中，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子都包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段，它们能与所述体液样本中的自身抗体反应。

19.根据权利要求 17，即从属于权利要求 1 至 3、5 至 7、9 或 10 中任意一项的方法，其中，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子都包括 IA-2 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段，它们能与所述体液样本中的自身抗体反应。

20.根据权利要求 1 至 19 任意一项的方法，其中，所述一种或多种第一抗原在与待检体液样本接触之前被固定在固体支持物上。

21.根据权利要求 20 的方法，其中，在体液样本与一种或多种第二抗原分子接触的同时或者随后，所述被固定的一种或多种第一抗原分子与筛选的体液样本接触。

22.根据权利要求 21 的方法，其中，所述被固定的一种或多种第一抗原分子随后与待检体液样本相接触，从而形成中间复合物，其包括[抗原分子]-[分析物自身抗体]，其中抗原分子被固定到固体支持物上，然后将固定的中间复合物与液相中的一种或多种第二抗原分子接触，从而形成复合物，其包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，该复合物是通过第一抗原分子被固定到固体支持物上。

23.一种筛选动物受试体体液样本中分析物自身抗体的方法，该抗体与一种或多种抗原分子反应，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素、或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体体液样本；

(b) 提供一种或多种与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分

子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段；

(c)提供与体液样本中分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，该第二抗原分子存在于液相中；

(d)将步骤(b)和(c)提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种被固定的复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或是从该共同抗原分子衍生而得，或者其中与分析物自身抗体结合的所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子的结合区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体的结合区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得；

(e)在步骤(d)之前或之中或之后提供直接或间接检测的标记物，由此，步骤(d)形成的复合物中的第二抗原分子在步骤(d)之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记；和

(f)检测是否存在步骤(d)形成的复合物，以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

24.根据权利要求23的方法，其中所述第一和第二抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素，和GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

25.根据权利要求24的方法，其中所述的能与体液样本中分析物自身抗体反应的第一和第二抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、

和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

26.一种用于筛选动物受试体体液样本中与一种或多种抗原分子发生反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素、或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒
5 包括：

(a)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、和所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原
10 分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(b)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合
15 分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c)将(a)和(b)提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应
20 而形成一种或多种复合物，该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子]，其中位于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包含一种共同的抗原分子、或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体结合的区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得；

(d)所述(c)定义的复合物中的第一抗原分子在第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(e)在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述(c)定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

(f)检测是否存在(d)中所固定的(c)中所定义的复合物的方法，以
30 提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

27.根据权利要求 26 的试剂盒，其中所述第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素，和 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

28.根据权利要求 27 的试剂盒，其中所述与体液样本中分析物自身抗体反应的第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

29.根据权利要求 28 的试剂盒，其包括提供能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 GAD 组成的第一抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇，它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，如 (d) 中所定义被固定在固体支持物上，和与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 GAD 组成的第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，如 (e) 中所定义被标记物所标记。

30. 根据权利要求 28 的试剂盒，其包括提供能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 IA-2 组成的第一抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，如 (d) 所定义被固定到固体支持物上；以及与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应、主要由 IA-2 组成的第二抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似

物、衍生物或片段，如(e)所定义被标记物所标记。

31.根据权利要求28的试剂盒，其包括提供(i)与体液样本中的分析物自身抗体反应的GAD第一和第二抗原分子，所述GAD抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，
5 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中融合分子中的至少一种抗原分子包括GAD₆₅、GAD₆₇，或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述GAD第一抗原分子如(d)所定义被固定到固体支持物上，且所述GAD第二抗原分子如(e)中所定义
10 被标记物所标记；以及(ii)与体液样本中的分析物自身抗体反应的IA-2第一和第二抗原分子，所述IA-2抗原分子选自IA-2、其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中融合分子中的至少一种抗原分
15 子包括IA-2或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述IA-2第一抗原分子如(d)所定义被固定到固体支持物上，且所述IA-2第二抗原分子如(e)中所定义被标记物所标记。

32.一种筛选动物受试体体液样本中与一种或多种抗原分子反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子或其一种或
20 多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒包括：

(a)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2和所述物
25 质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(b)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2和所述物
30 质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c) 将 (a) 和 (b) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，其中存在于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或是由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体相结合的区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得；

(d) 所述 (c) 定义的复合物中的第一抗原分子在第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(e) 在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述 (c) 定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

(f) 检测是否存在 (d) 中所固定的、(c) 中所定义的复合物的方法，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

33. 一种筛选动物受试体体液样本中与 GAD 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的基本由 GAD 抗原分子组成的第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 GAD 第一抗原分子如 (c) 中所定义的被固定在固体支持物上，所述 GAD 第二抗原分子如 (d) 中所定义被标记物所标记；

(b) 将 (a) 中抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[所述 GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述 GAD 第二抗原分子]；

(c) 所述 (b) 定义的复合物中的 GAD 第一抗原分子在 GAD 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(d) 在 GAD 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为 (b) 定义的复合物中的 GAD 第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方

法；

(e) 检测是否存在 (c) 中所固定的、(b) 中所定义的复合物的方法，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

34. 一种筛选动物受试体体液样本中与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的、主要由 IA-2 抗原分子组成的第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2、其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 IA-2 第一抗原分子如 (c) 中所定义的被固定在固体支持物上，所述 IA-2 第二抗原分子如 (d) 中所定义被标记物所标记；

(b) 将步骤 (a) 的 IA-2 抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子 IA-2 发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[所述 IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述 IA-2 第二抗原分子]；

(c) 所述 (b) 定义的复合物中的 IA-2 第一抗原分子在 IA-2 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(d) 在 IA-2 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为 (b) 定义的复合物中的 IA-2 第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

(e) 检测是否存在 (c) 中所固定的、(b) 中所定义的复合物的方法，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

35. 一种筛选动物受试体体液样本中分别与 GAD 和 IA-2，或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的第一和第二分析物自身抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 GAD 第一和第二抗原分子，GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或

多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中，所述融合分子中至少一种抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇ 或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 GAD 第一抗原分子如 (d) 中所定义的被固定在固体支持物上，所述 GAD 第二抗原分子如 (e) 中所定义的被标记物所标记；

5 (b) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 IA-2 第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中，抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇，其中，所述融合分子中至少一种抗原分子包括 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中
10 所述 IA-2 第一抗原分子如 (d) 中所定义的被固定在固体支持物上，所述 IA-2 第二抗原分子如 (e) 中所定义的被标记物所标记；

(c) 将 (a) 和 (b) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[GAD 第二抗原分子]或[IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[IA-2 第二
15 抗原分子]；

(d) 所述 (c) 定义的复合物中的 GAD 或 IA-2 第一抗原分子在 GAD 或 IA-2 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

20 (e) 在 GAD 或 IA-2 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述 (c) 定义的复合物中的 GAD 或 IA-2 第二抗原分子提供直接或间接的可检测的标记方法；

(f) 检测是否存在 (d) 中所固定的、(c) 中所定义的复合物的方法，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

25 36.根据权利要求 26 至 35 中任意一项的试剂盒，其中第一和第二抗原分子包括一种或多种共同的抗原分子。

37.根据权利要求 36，即从属于权利要求 26 至 29、31 至 33 或 35 中任意一项的试剂盒，其中所述第一和第二抗原分子包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇。

30 38.根据权利要求 36，即从属于权利要求 26 至 28、30 至 32、34 或 35 中任意一项的试剂盒，其中所述第一和第二抗原分子包括 IA-2。

39.根据权利要求 26 至 35 任意一项的试剂盒，其中，一种或多种复合物中的第一或第二抗原分子的一种选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，而另一种包括第一或第二抗原分子的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段，它们能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应。

5 40.根据权利要求 39，即从属于权利要求 26 至 29、31 至 33 或 35 中任意一项的试剂盒，其中，第一或第二抗原中的一种包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇，而另一种抗原分子包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段，它们能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应。

10 41.根据权利要求 39，即从属于权利要求 26 至 28、30 至 32、34 或 35 中任意一项的试剂盒，其中，第一或第二抗原分子中的一种包括 IA-2，而另一种抗原分子包括 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，它们能与所述体液样本中的分析物自身抗体发生反应。

15 42.根据权利要求 26 至 36 任意一项的试剂盒，其中，第一和第二抗原分子都包括能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的同一抗原分子的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段。

43.根据权利要求 42，即从属于权利要求 26 至 29、31 至 33 或 35 中任意一项的试剂盒，其中，第一和第二抗原分子都包括能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段

20 44.根据权利要求 42，即从属于权利要求 26 至 28、30 至 32、34 或 35 中任意一项的试剂盒，其中，第一和第二抗原分子都包括能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的 IA-2 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段。

25 45.根据权利要求 26 至 44 任意一项的试剂盒，其包括将所述一种或多种第一抗原在与待检体液样本接触之前被固定到固体支持物上的固定方法。

46.根据权利要求 45 的试剂盒，其包括在一种或多种第二抗原分子与体液样本接触的同时或者随后，将所述被固定的一种或多种第一抗原分子与体液样本接触的方法。

30 47.根据权利要求 46 的试剂盒，其中，接触方法包括被固定的一种或多种第一抗原分子与待检体液样本相接触，从而形成中间复合物，其包括[抗原

分子]-[分析物自身抗体]，其中抗原分子被固定到固体支持物上，然后将该中间复合物与液相中的一种或多种第二抗原分子接触，从而形成复合物，其包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，该复合物通过第一抗原分子被固定到固体支持物上。

5 48.一种筛选动物受试体体液样本中分析物自身抗体的试剂盒，该抗体与一种或多种抗原分子反应，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒包括：

(a)一种或多种与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和所述一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，其中，所述第一抗原分子被固定在固体支持物上；

(b)与体液样本中分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，该第二抗原分子存在于液相中，并如(d)中所定义被标记物所标记；

(c)(a)和(b)所提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种被固定的复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子、或是从该共同抗原分子衍生而得，或者其中与分析物自身抗体结合的所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子的结合区域位于一种共同抗原分子中、或由该共同抗原分子衍生而得，该被固定的复合物是通过复合物中的第一抗原分子被固定在固体支持物上的；

(d)在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述(c)定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测的标记方法；

(e) 检测是否存在(c)中所定义的复合物的方法, 以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

49. 根据权利要求 48 的试剂盒, 其中所述第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素, 或 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

50. 根据权利要求 49 的试剂盒, 其中所述与体液样本中分析物自身抗体反应的第一和第二抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

51. 根据权利要求 1 至 25 中任意一项的方法, 或 26 至 50 中任意一项的试剂盒, 其中, 所述体液样本来自动物受试体, 该动物疑似患有、容易患有或已经患有的一种或多种以下疾病, 1 型糖尿病和/或僵人综合征、2 型糖尿病、一种或多种自身免疫性甲状腺疾病、乳糜泄、一种或多种结缔组织疾病、肾上腺自身免疫性疾病、或两种或多种不同自身免疫性疾病并存。

52. 一种在动物受试体中诊断患有的一种或多种与自身抗体有关的疾病的方法, 或诊断该疾病初始发生的方法, 所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应, 该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素, 该方法包括利用权利要求 1 至 25 中任意一项的方法、或权利要求 26 至 50 中任意一项的试剂盒, 检测与一种或多种抗原分子反应的自身抗体, 所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素, 检测出的自身抗体能够作为患有所述一种或多种疾病或疾病初始发生的诊断指示。

53. 一种延迟或预防动物受试体中与所述自身抗体有关的疾病或疾病发生的方法, 或治疗患有这种疾病的动物患者的方法, 所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应, 该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素, 该方法包括利用权利要求 1 至 25 中任意一项的方法、或权利要求 26 至 50 任意一项的试剂盒, 先检测所述受试体体液样本中能与上述抗原分子反应的自身抗体, 作为患有疾病或疾病初始发生的指示, 因此得以诊断受试体是否患有所

述疾病或疾病的初始发生，并给予受试体至少一种治疗有效量的治疗剂，该治疗剂的作用是延迟疾病的发生、排除、预防和/或治疗这种疾病。

54.根据权利要求 52 或 53 的方法，其中一种或多种疾病选自 1 型糖尿病和/或僵人综合征、2 型糖尿病、一种或多种自身免疫性甲状腺疾病、乳糜泄、
5 一种或多种结缔组织疾病、肾上腺自身免疫性疾病、或两种或多种不同自身免疫性疾病并存。

55.根据权利要求 26 至 50 的任意一项试剂盒，其与治疗有效量的至少一种治疗剂组合，该治疗剂能有效治疗与自身抗体相关的一种或多种疾病，所述的自身抗体能与一种或多种选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素的抗原分
10 子发生反应。

检测与胰腺胰岛细胞抗原分子和/或胰岛素反应的自身抗体

5 技术领域

本发明涉及检测与胰腺胰岛细胞抗原分子和/或胰岛素反应的自身抗体的方法和试剂盒,例如用来检测表征胰岛素依赖性糖尿病(IDDM, 1型糖尿病)开始出现或疾病存在的自身抗体的方法和试剂盒。

10 背景技术

1型糖尿病是流行的自身免疫性疾病中的一种,在欧洲和北美,有超过2百万的患者(M A Atkinson, G S Eisenbarth. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet, 2001 358: 221-229)。而且,1型糖尿病的发病率在全球范围内每年以2.5%的速率增长,预测2010年后发病率将比1998年高出40%(M A Atkinson, G S Eisenbarth. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet, 2001 358 : 221-229)。

胰腺 β 细胞抗原的自身抗体是1型糖尿病的易识别血清标记物,其包括:在免疫荧光测试(ICA)中与胰岛细胞反应的自身抗体,谷氨酸脱羧酶(GAD, 尤其是其65kDa异构体GAD₆₅)的自身抗体,蛋白酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(指IA-2或ICA512)自身抗体和胰岛素的自身抗体。GAD₆₅自身抗体和IA-2自身抗体是ICA反应性成分(M A Atkinson, G S Eisenbarth Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet, 2001 358: 221-229)。至少在约90%的1型糖尿病患者血清诊断中存在GAD₆₅, IA-2和胰岛素这三种类型的自身抗体中的一种(M A Atkinson, G S Eisenbarth. Type 1 diabetes: new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet, 2001 358 : 221-229)。上述自身抗体作为胰腺 β 细胞自身免疫的血清标记物的检测也可以被用于监测糖尿病预防试验的患者(M A Atkinson, G S Eisenbarth. Type 1 diabetes : Desc/Clms Page number 2 new perspectives on disease pathogenesis and treatment. The Lancet, 2001 358 : 221- 229)。

目前, GAD₆₅ 自身抗体是利用 ³⁵S, ³H 或 ¹²⁵I 标记的 GAD65 放射活化, 通过免疫沉淀测试法(IPA)进行检测。用 ³⁵S 或 ³H 标记的 GAD₆₅ 已在体外转录/翻译体系中制备出(C E Grubin, T Daniels, B Toivola, M Landdin-Olsson, W A Hagopian, L Li, A E Karlsen, E Boel, B Michelsen, A Lernmark. A novel radioligand binding assay to determine diagnostic accuracy of isoform-specific glutamic acid decarboxylase antibodies in childhood IDDM. *Diabetologia*, 1994 37: 344-350; J S Petersen, K R Hejnaes, A Moody, A E Karlsen, M O Marshall, M Hoier-Madsen, E Boel, B K Michelsen, T Dyrberg. Detection of GAD65 antibodies in diabetes and other autoimmune diseases using a simple radioligand assay. *Diabetes*, 1994 43: 459-467; and A Falorni, E Ortqvist, B Persson, A Lernmark. Radioimmunoassays for glutamic acid decarboxylase (GAD65) and GAD65 autoantibodies using ³⁵S or ³H recombinant human ligands. *Journal of Immunological Methods*, 1995 186 : 88-89)。天然的 GAD₆₅, 例如从脑组织中分离的鼠或猪 GAD₆₅(M J Rowley, I R Mackay, Q-Y Chen, W J Knowles, P Z Zimmet. Antibodies to glutamic acid decarboxylase discriminate major types of diabetes mellitus. *Diabetes*, 1992 41: 548: 551; and M Ohta, H Obayashi, K Takahashi, Y Kitagawa, K Nakano, S Matsuo, M Ohishi, N Itoh, K Hayashi, K Ohta. A simple solid-phase radioimmunoassay for glutamic acid decarboxylase (GAD) antibodies in patients with diabetes mellitus. *J Clin Biochem Nutr*, 1996 20: 139-148)或重组人 GAD₆₅, 例如在昆虫细胞、酵母菌或哺乳细胞中表达的重组人 GAD₆₅ (F Luhder, K-P Woltanski, L Mauch, H Haubruck, K-D Kohnert, I Rjasanowski, D Michaelis, M Ziegler. Detection of autoantibodies to the 65-kDa isoform of glutamate decarboxylase by radioimmunoassay. *European Journal of Endocrinology*, 1994 130: 575-80; M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Rees Smith, J Furmaniak. *Clinica Chimica Acta*, 1996 256: 175-188; and T Matsuba, M Yano, No Abiru, H Takino, S Akazawa, S Nagataki, K Yasukawa. Expression of recombinant human glutamic acid decarboxylase (GAD) in myeloma cells and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for autoantibodies to GAD. *J Biochem*, 1997 121: 20-24)已经用 ¹²⁵I 标记并用于 IPAs 中。GAD₆₅ 和 IA-2 的

重组融合蛋白也已经用于 IPAs 中来检测组合的自身抗体(A Zavialov, M Ankelo, AWesterlund-Karlsson, M Knip, J Illonen, A Hinkkanen. Novel fusion proteins in the analysis of diabetes associated autoantibodies to GAD65 and IA-2. Journal of Immunological Methods, 2000 246: 91-96; and M Rickert, J Seissler, 5 W Dangel, H Lorenz, W Richter. Fusion proteins for combined analysis of autoantibodies to the 65-kDaisoform of glutamic acid decarboxylase and islet antigen-2 in insulin dependent diabetes mellitus. Clinical Chemistry,2001 47 (5): 926-934)。

目前可获得的基于 ^{35}S -GAD₆₅ 的 IPAs 在技术上要求高, 难于标准化, 价格昂贵且不适合用于试剂盒中。基于人重组 ^{125}I -GAD₆₅ 与基于 ^{35}S -GAD₆₅ 的测试具有相同的灵敏性和特异性, 但前者具有产率高、技术简单、成本低的优点, 且易于制成试剂盒。然而, 基于从鼠或猪的脑组织中分离的 ^{125}I -GAD₆₅, 由于受到 GAD₆₇ 异构体的污染而使其检测特异性较低。

GAD₆₅ 自身抗体也可用不同类型的 ELISAs 检测(A M Gronowski, E C C Wong, T RWilhite, D L Martin, C H Smith, C A Parvin, M Landt. Detection of glutamic acid decarboxylase autoantibodies with the varelisa ELISA. Clinical Chemistry, 1995 41 (10):1532-1534 ; and H D Mehta, B S Vold, S Minkin, E Fullman. DELISA: sensitive nonisotopic assay for GAD65 autoantibodies, a key risk-assessment marker for insulin-dependent diabetes mellitus. Clinical 20 Chemistry, 1996 42 (2): 263-269)。

然而, 目前通过 ELISA 检测 GAD₆₅ 自身抗体的试验比上述 IPAs 的灵敏性和特异性差, 且研究的成熟程度也不如 IPAs (R S Schmidli, P G Colman, E Bonifacio, Participating Laboratories. Disease sensitivity and specificity of 52 assays for glutamic acid decarboxylase antibodies. The second 25 internationalGADAAb workshop. Diabetes, 1995 44: 636-640)。

本发明解决了上面提及的用于筛选表征 1 型糖尿病发病或疾病存在的自身抗体相关的方法和试剂盒的问题, 并可以普遍用于与胰腺胰岛细胞抗原分子和/或胰岛素反应的自身抗体的测定中。本发明的方法和试剂盒尤其具有与上述现有技术相比得到改善的特异性和灵敏性。

30 本发明提供一种筛选动物受试体体液样本中与一种或多种抗原分子发生

反应的分析物自身抗体的方法，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体的体液样本；

5 (b) 提供与体液样本中的分析物自身抗体能发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

10 (c) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段；

(d) 将步骤 (b) 和 (c) 提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子]，其中存在于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括
20 一种共同的抗原分子或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体的结合区域存在于一种共同抗原分子中或由该共同抗原分子衍生而得；

(e) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供固定方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第一抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被固定到固体支持
25 物上；

(f) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供直接或间接的可检测的标记方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第二抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记方法所标记；

(g) 检测是否存在步骤 (e) 中所固定的、在步骤 (d) 中形成的复合物
30 物，以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的筛选分析物自身抗体的方法的优点尤其在于提供了高特异性和高灵敏性的自身抗体检测。

本发明所需的与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子、或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段或其融合分子可以选自任何胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的融合分子，尤其适于选自谷氨酸脱羧酶(GAD，尤其是其谷氨酸脱羧酶 65KDa 和 67KDa 异构体，GAD₆₅ 和 GAD₆₇)、蛋白质酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(IA-2)和胰岛素，或它们的一种或多种变异体（诸如，IA-2 β)、类似物、衍生物或片段，或包含两种或多种上述分子的融合分子，存在于体液样本中的分析物自身抗体能与这些分子反应。在本发明特别优选的实施例中，采用了一种或多种上述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素，尤其是上述胰腺胰岛细胞抗原分子，优选一种或多种 GAD₆₅，GAD₆₇ 或 IA-2。可选择的方案是，优选采用一种或多种上述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，尤其是一种或多种上述胰腺胰岛细胞抗原分子的变异体、类似物、衍生物或片段，优选一种或多种 GAD₆₅，GAD₆₇ 或 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。本发明另一个可选择的优选实施例中，优选采用一种或多种包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子的融合分子，所述抗原分子选自上述胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

因此，可以理解本发明所述术语 GAD 包括所有 GAD 异构体，尤其包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇。在一些实施例中优选使用 GAD₆₅，而在另外一些实施例中优选使用 GAD₆₇。也可以理解，本发明包括其公开范围内的包含有 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 或其一种或多种片段（如其结合区域）的融合分子。例如，本发明范围内的融合分子包括 GAD₆₅ 与 GAD₆₇ 直接或间接融合，或 GAD₆₅ 的一个或多个结合区域与 GAD₆₇ 的一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子。并且，还可以理解本发明范围内的融合分子可以包括 IA-2，或其一个或多个结合区域与 IA-2 β 或 IA-2 β 的一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子。本发明还包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇、或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段与 IA-2 或 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段

直接或间接融合的融合分子。

本发明所需的与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子、或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段尤其适于选自谷氨酸脱羧酶(GAD, 尤其是 GAD₆₅ 或 GAD₆₇)、蛋白酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(IA-2)、或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 这些分子能与存在于分析物液体样本中的自身抗体发生反应。

在本发明的一个优选方案中, 上述筛选方法适用于检测下述物质的分析物自身抗体: GAD 和/或 IA-2, 一种或多种包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的抗原分子, 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 和/或 IA-2, 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段的抗原分子, 通过这些抗原分子与体液样本中的分析物自身抗体发生反应而得到检测。当本发明采用融合抗原分子时, 适宜的融合分子可以包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段直接或间接融合的融合分子; 适宜的融合分子也可以包括 GAD₆₅ 与 GAD₆₇ 直接或间接融合的融合分子、或 GAD₆₅ 的一个或多个结合区域与 GAD₆₇ 的一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子; 适宜的融合分子还包括 IA-2 或其一个或多个结合区域与 IA-2 β 或其一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子。

本发明优选的方法包括提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子, 其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素, 它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 该第一抗原分子按照本发明方法中的步骤(e)被固定到固体支持物上, 然后提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子, 其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素, 它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其根据步骤(f)提供的标记方法被标记。

本发明更优选的方法包括提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的一

种或多种第一抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种
变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多
种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它
们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段（例如，与所述体液样本中
5 的分析物自身抗体反应的融合分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇、或它们的一种或多
种变异体、类似物、衍生物或片段与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、
衍生物或片段直接或间接融合的融合分子），该第一抗原分子按照本发明方法
中的步骤（e）被固定到固体支持物上，提供与体液样本中的分析物自身抗体
反应的一种或多种第二抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一
10 种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两
种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2
和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段（例如与所述体液样本
中的分析物自身抗体反应的融合分子，其包括 GAD₆₅、GAD₆₇、或它们的一
种或多种变异体、类似物、衍生物或片段与 IA-2 或其一种或多种变异体、类
15 似物、衍生物或片段直接或间接融合的融合分子），其被步骤（f）提供的标
记物所标记。本发明的优选方法包括检测 GAD 的自身抗体方法，该方法包
括提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的主要是由 GAD 抗原分子组成
的第一抗原分子，其中 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或
多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种
20 或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇ 和它
们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段（例如与所述体液样本中的分
析物自身抗体反应的融合分子包括：GAD₆₅ 与 GAD₆₇ 直接或间接融合，或
GAD₆₅ 的一个或多个结合区域与 GAD₆₇ 的一个或多个结合区域直接或间接融
合的融合分子），该第一抗原分子按照本发明方法中的步骤（e）被固定到固
25 体支持物上，提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的主要由 GAD 组成
的抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇ 或它们的一种或多种变异体、类似物、
衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合
的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、
类似物、衍生物或片段（例如与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的融
30 合分子包括：GAD₆₅ 与 GAD₆₇ 直接或间接融合，或 GAD₆₅ 的一个或多个结合

区域与 GAD₆₇ 的一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子), 其被步骤 (f) 提供的标记方法所标记。本发明的优选方法还有检测 IA-2 自身抗体的方法, 该方法包括提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的主要由 IA-2 抗原分子组成的第一抗原分子, 该抗原分子选自 IA-2、或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段 (例如与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的融合分子, 包括 IA-2 或其一个或多个结合区域与 IA-2 β 或其一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子), 该第一抗原分子按照本发明方法中的步骤 (e) 被固定到固体支持物上, 以及提供与体液样本中的分析物自身抗体反应的基本由 IA-2 抗原分子组成的第二抗原分子, 该抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段 (例如与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的融合分子, 包括 IA-2 或其一个或多个结合区域与 IA-2 β 或其一个或多个结合区域直接或间接融合的融合分子), 其被步骤 (f) 提供的标记方法标记。本发明的方法还可以是用于检测 GAD 和 IA-2 二者的自身抗体的方法, 该方法包括提供 (i) 与体液样本中的分析物自身抗体反应的 GAD 第一和第二抗原分子, 所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇, 所述 GAD 第一抗原分子按照本发明方法中的步骤 (e) 被固定到固体支持物上, 且所述 GAD 第二抗原分子被步骤 (f) 提供的标记方法所标记; 以及 (ii) 与体液样本中的分析物自身抗体反应的 IA-2 第一和第二抗原分子, 所述 IA-2 抗原分子选自 IA-2、它的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 该抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中所述

IA-2 第一抗原分子按照本发明方法中的步骤 (e) 被固定到固体支持物上，且所述 IA-2 第二抗原分子被步骤 (f) 提供的标记方法所标记。

因此，本发明的一个优选实施例包括一种筛选动物受试体体液样本中能与一种或多种抗原分子反应的分析物自身抗体的方法，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体的所述体液样本；

(b) 提供与存在于体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c) 提供与存在于体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(d) 将步骤 (b) 和 (c) 提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子]，其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体的结合区域存在于一种共同的抗原分子或由该共同抗原分子衍生而得；

(e) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供固定方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第一抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上；

(f) 在步骤 (d) 之前或之中或之后，给予直接或间接的可检测标记方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的第二抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记方法所标记；

(g) 检测是否存在步骤(e)中所固定的、在步骤(d)中形成的复合物，以得到所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括筛选动物受试体体液样本中只与 GAD 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的方法，

5 所述方法包括：

(a) 提供所述受试体的所述体液样本；

(b) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的主要由 GAD 抗原分子组成的第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子
10 包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 GAD 第一抗原分子根据步骤(d)被固定在固体支持物上，所述 GAD 第二抗原分子被步骤(e)提供的标记方法所标记；

(c) 将步骤(b)提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本接触，
15 由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[GAD 第二抗原分子]；

(d) 在步骤(c)之前或之中或之后进行固定，由此步骤(c)形成的复合物中的 GAD 第一抗原分子在步骤(c)之前或之中或之后被固定到固体支持物上；
20

(e) 在步骤(c)之前或之中或之后，提供直接或间接的可检测标记方法，由此步骤(c)形成的复合物中的 GAD 第二抗原分子在步骤(c)之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记方法所标记；

(f) 检测是否存在步骤(d)中所固定的、在步骤(c)中形成的复合物，
25 以得到所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括筛选动物受试体体液样本中与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的方法，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体的所述体液样本；

30 (b) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的主要由 IA-2 抗原

分子组成的第一和第二抗原分子,所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子,其中,抗原分子选自 IA-2 和所述一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中所述 IA-2 第一抗原分子根据步骤 (d) 被
5 固定在固体支持物上,所述 IA-2 第二抗原分子根据步骤 (e) 的标记方法被标记;

(c) 将步骤 (b) 提供的 IA-2 抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触,由此体液样本中的分析物自身抗体与所述 IA-2 抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物,该复合物包括[IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗
10 体]-[IA-2 第二抗原分子];

(d) 在步骤 (c) 之前或之中或之后进行固定,由此步骤 (c) 形成的复合物中的 IA-2 第一抗原分子在步骤 (c) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上;

(e) 在步骤 (c) 之前或之中或之后,提供直接或间接的可检测标记方
15 法,由此步骤 (c) 形成的复合物中的 IA-2 第二抗原分子在步骤 (c) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记方法所标记;

(f) 检测是否存在步骤 (d) 所固定的、步骤 (c) 所形成的复合物,以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括筛选动物受试体体液样本中分别与 GAD 和
20 IA-2 反应、或与它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的第一和第二分析物自身抗体的方法,所述方法包括:

(a) 提供所述受试体的所述体液样本;

(b) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 GAD 第一和第二
25 抗原分子,GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,以及融合分子,该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子,其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中,所述融合分子中至少一种
30 抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇ 或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,其中所述 GAD 第一抗原分子根据步骤 (e) 被固定在固体支持物上,所述 GAD 第二抗原分子被步骤 (f) 的标记方法所标记;

(c) 提供与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 IA-2 第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中，所述融合分子中至少一种抗原分子包括 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 IA-2 第一抗原分子根据步骤 (e) 被固定在固体支持物上，所述 IA-2 第二抗原分子被步骤 (f) 提供的标记物方法标记；

(d) 将步骤 (b) 和 (c) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[GAD 第二抗原分子]或[IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[IA-2 第二抗原分子]；

(e) 在步骤 (d) 之前或之中或之后提供固定方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的 GAD 或 IA-2 第一抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被固定到固体支持物上；

(f) 在步骤 (d) 之前或之中或之后，提供直接或间接的可检测标记方法，由此步骤 (d) 形成的复合物中的 GAD 或 IA-2 第二抗原分子在步骤 (d) 之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记方法所标记；

(g) 检测是否存在步骤 (e) 中固定的、步骤 (d) 中形成的复合物，以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明方法可以优选为上述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子都包括一种或多种共同的抗原分子。例如，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子可以包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇；或者可以包括 IA-2。

与上述体液样本中自身抗体反应的、存在于一种或多种复合物中的第一或第二抗原分子包括选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素的抗原分子，而存在于一种或多种复合物中的其它抗原分子，包括上述抗原分子的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段。例如，与上述体液样本中自身抗体反应的一种或多种复合物中的第一或第二抗原包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇，而存在于一种或多种复合物中的其它抗原分子包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的一种或多种变异

体、类似物、衍生物、或片段。再例如，与所述体液样本中自身抗体反应的一种或多种复合物中的第一或第二抗原分子包括 IA-2，而存在于一种或多种复合物中的另一种抗原分子，包括 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

- 5 本发明的再一实施例是，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子均包括能与所述体液样本中自身抗体反应的同一抗原分子的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段。例如，一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子均包括与所述体液样本中自身抗体反应的 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段。再例如，一种或多种复合物中的第一
- 10 和第二抗原分子均包括与所述体液样本中自身抗体反应的 IA-2 的相同或不同的变异体、类似物、衍生物或片段。从上述可以理解，复合物中的两种抗原分子包括衍生于同一抗原分子的变异体、类似物、衍生物或片段，这些变异体、类似物、衍生物或片段可以相同或不同（例如变异体 1 和变异体 2，其中，变异体 1 和 2 可以分别代表 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的不同变异体，或片段 1
- 15 和片段 2，其中，片段 1 和 2 可以分别代表 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的不同片段，诸如，完全不同或部分重叠的 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的表位）。

在本发明所述采用融合分子的情况下，可以理解该融合分子包括独特的抗原分子（例如 GAD₆₅ 和 IA-2），但本发明所形成的复合物中的融合分子，其分别由第一和第二抗原提供的与分析物自身抗体相结合的区域存在于一种

20 同一抗原分子中，或由该同一抗原分子衍生而得。利用一种或多种融合分子所形成的复合物的实例包括 (i) [GAD-IA-2_{固定}]-[分析物自身抗体]-[GAD-IA-2_{标记}]，其中自身抗体包括 GAD 自身抗体，该自身抗体与[GAD-IA-2_{固定}]和 [GAD-IA-2_{标记}]中的 GAD 的结合区域发生反应，或复合物的自身抗体包括 IA-2 自身抗体，该自身抗体与[GAD-IA-2_{固定}]和[GAD-IA-2_{标记}]中的 IA-2 的结

25 合区域发生反应，或(ii)[GAD-（片段）_{固定}]-[分析物自身抗体]-[GAD-IA-2_{标记}]，其中，GAD 分析物自身抗体与[GAD-（片段）_{固定}]和[GAD-IA-2_{标记}]中的 GAD 的结合区域发生反应，或 (iii) [IA-2（片段）_{固定}]-[分析物自身抗体]-[GAD-IA-2_{标记}]，其中，IA-2 分析物自身抗体与[IA-2（片段）_{固定}]和[GAD-IA-2_{标记}]中的 IA-2 结合区域发生反应，其中 GAD 可以为 GAD₆₅ 或 GAD₆₇。

- 30 适宜的可检测标记物选自酶标记物、同位素标记物、化学发光标记物、

5 荧光标记物、颜料及类似物，典型的标记物选自碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、生物素或类似物，尤其包括生物素。这些可检测标记物（当与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段或其一种或多种融合分子相结合）与一种或多种被标记的底物（诸如抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素结合物，例如抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶结合物或类似结合物）发生反应，由此得到的结合物可以通过测试光密度或类似方法而得到检测。

10 可检测标记物可以直接与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子结合。可检测标记物也可以间接与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子结合，尤其是可检测标记物与一种或多种抗体或其它结合试剂相结合，所述抗体或试剂能够与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子相结合。

15 本发明的筛选自身抗体的方法尤其包括通过本领域熟知的非竞争性夹心测试法，直接监测本发明所提供的（i）待检受试体体液样本中的自身抗体与（ii）上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子的反应。

20 根据本发明一个优选实施例，上述一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子被固定在固体支持物上，上述一种或多种第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子与可检测标记物结合，其中优选的第二抗原分子存在于液相中，这是熟知的 ELISA 技术的惯例做法。

25 本发明的一种优选方法是将与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子，在与待检体液样本接触之前，固定到固体支持物上。与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的该固定的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或它们的一种或多种融合分子，在与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种

30

第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子与体液样本接触的同时或者随后，与体液样本接触。尤其优选被固定的能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段、或所述物质的一种或多种融合分子与待检体液样本接触以形成中间复合物，其包括[抗原分子]-[分析物自身抗体]，其中抗原分子被固定到固体支持物上，然后将形成的中间复合物与液相中的、并能与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段、或它们的一种或多种融合分子接触，从而形成复合物，其包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，该复合物是通过第一抗原分子被固定到固体支持物上。

因此，本发明提供了一种筛选动物受试体体液样本中分析物自身抗体的方法，该抗体与一种或多种抗原分子反应，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述方法包括：

(a) 提供所述受试体体液样本；

(b) 提供一种或多种与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段；

(c) 提供与体液样本中分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，该第二抗原分子存在于液相中；

(d) 将步骤(b)和(c)提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种被固定的复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗

体]-[所述第二抗原分子],其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或是从该共同抗原分子衍生而得,或者其中与分析物自身抗体结合的所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子的结合区域存在于一种共同抗原分子中或由该共同抗原分子衍生而得;

5 (e) 在步骤(d)之前或之中或之后提供直接或间接检测的标记物,由此,步骤(d)形成的复合物中的第二抗原分子在步骤(d)之前或之中或之后被这种直接或间接的可检测标记物所标记;

(f) 检测是否存在步骤(d)形成的复合物,以获得所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

10 本发明所需的能与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,或这些物质的融合分子可以选自任何胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,或这些物质的融合分子,尤其适于选自谷氨酸脱羧酶(GAD,尤其是其 65KDa 和 67KDa 异构体 GAD₆₅ 和 GAD₆₇)、蛋白酪氨酸磷酸酶样胰岛
15 细胞抗原(IA-2)和胰岛素,或它们的一种或多种变异体(诸如, IA-2 β)、类似物、衍生物或片段,或包含两种或多种上述物质的融合分子。本发明尤其所需的与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,适于选自谷氨酸脱羧酶(GAD,尤其是 GAD₆₅ 和 GAD₆₇)、蛋白酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(IA-2)、或所述物质的一种或多
20 种变异体、类似物、衍生物或片段。

本发明还包括其它接触技术,例如在上述接触步骤之前并不预先固定一种或多种第一抗原分子或其变异体、类似物、衍生物、或片段,或这些物质的一种或多种融合分子,而是先将固体支持物与用来结合一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段、或一种或多种这些
25 物质的融合分子的结合剂相接触,然后将一种或多种上述第一和第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段,或一种或多种这些物质的融合分子以及待检体液样本与处理后的固体支持物接触。

关于本发明所采用的固体支持物和条件,它与已知免疫测试技术中所惯用的固体支持物和使用条件并没有根本的区别。本发明所采用的固体支持物
30 包括已知 ELISA 技术中常用的 ELISA 板,或其它适宜支持物,诸如管、颗

粒、磁珠、硝酸纤维或类似物。

本发明还提供了一种用于筛选动物受试体体液样本中与一种或多种抗原分子发生反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒包括：

(a)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(b)与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(c)将(a)和(b)提供的抗原分子同时或相继与所述用于筛选的体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[第二抗原分子]，其中存在于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体的结合区域存在于一种共同的抗原分子中或由该共同的抗原分子衍生而得；

(d)所述(c)定义的复合物中的第一抗原分子在第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(e)在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述(c)定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

(f)检测是否存在(d)中所固定的、(c)中所形成的复合物，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明用于筛选分析物自身抗体的试剂盒的优点尤其在于，它能够高特异性和高灵敏性地检测这种自身抗体。

5 本发明所需的与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，或这些物质的融合分子可以选自任何胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素、和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的融合分子，尤其适于从谷氨酸脱羧酶(GAD, 尤其是其 65KDa 和 67KDa 的谷氨酸脱羧酶异构体 GAD₆₅ 和 GAD₆₇)、蛋白质酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(IA-2)和胰岛素，或它们的一种或多种变异体（诸如，IA-2 β ）、类似物、衍生物或片段，或包含两种或多种上述物质的融合分子。
10 尤其是，本发明所需的能与分析物自身抗体反应的一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，适于选自谷氨酸脱羧酶(GAD, 尤其是其 65KDa 和 67KDa 异构体 GAD₆₅ 和 GAD₆₇)、蛋白质酪氨酸磷酸酶样胰岛细胞抗原(IA-2)和胰岛素，或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

15 在本发明的一个优选方案中，上述筛选试剂盒是用于检测分析物自身抗体的，该抗体是下述抗原的抗体：GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 和/或 IA-2、或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段的抗原分子，和/或 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段的抗原分子。对于本发明使用融合分子的试剂盒情况下，合适的融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，如前述方法部分的大量描述。
20

本发明优选的试剂盒包括与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素，这些物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，所述融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，该第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，以及与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、
30 胰岛素，它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，

所述融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其如 (e) 中所定义被标记物所标记。

本发明更优选的试剂盒包括与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、上述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，所述融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，该第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，以及与体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2，上述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，所述融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其如 (e) 中所定义被标记物所标记。本发明的优选试剂盒还包括与体液样本中的分析物自身抗体反应的主要是由 GAD 抗原分子组成的第一抗原分子，其中 GAD 选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，该第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，以及与体液样本中的分析物自身抗体反应的主要由 GAD 组成的第二抗原分子，其选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其如 (e) 中所定义被标记物所标记。本发明的优选试剂盒还包括与体液样本中的分析物自身抗体反应的基本由 IA-2 抗原分子组成的第一抗原分子，该抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，该第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，以及与体液样本中的分析物自身抗体反应的基本由 IA-2 抗原分子组成的第二抗原分子，该抗原分子选自

IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其如 (e) 中所定义被标记物所标记。本发明的另一种试剂盒包括 (i) 与体液样本中的分析物自身抗体反应的 GAD 第一和第二抗原分子，所述 GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇ 或所述物质的一种多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 GAD 第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，且所述 GAD 第二抗原分子如 (e) 中所定义被标记物标记；以及 (ii) 与体液样本中的分析物自身抗体反应的 IA-2 第一和第二抗原分子，所述 IA-2 抗原分子选自 IA-2、其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，该抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中至少一种融合分子中的抗原分子包括 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述 IA-2 第一抗原分子如 (d) 中所定义被固定到固体支持物上，且所述 IA-2 第二抗原分子如 (e) 中所定义被标记物所标记。

因此，本发明的一个优选实施例包括一种筛选动物受试体体液样本中能与一种或多种抗原分子反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒包括：

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第一抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

(b) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2、所述物质的一种或多种变异

体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段；

5 (c) 将 (a) 和 (b) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，其中存在于所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或是由该共同抗原分子衍生而得，或者其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子与所述分析物自身抗体相结合的区域存在于一种共同抗原分子中或由该共同抗原分子衍生而得；

10 (d) 所述 (c) 定义的复合物中的第一抗原分子在第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法；

(e) 在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述 (c) 定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

15 (f) 检测是否存在 (d) 中所固定的 (c) 中所定义的复合物，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括筛选动物受试体体液样本中与 GAD 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的试剂盒，所述试剂盒包括：

20 (a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的基本由 GAD 抗原分子组成的第一和第二抗原分子，所述抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、所述物质的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，其中所述

25 GAD 第一抗原分子如 (c) 中所定义的被固定在固体支持物上，所述 GAD 第二抗原分子如 (d) 中所定义被标记物所标记；

(b) 将 (a) 中抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物，该复合物包括[所述 GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述

30 GAD 第二抗原分子]；

(c) 所述 (b) 定义的复合物中的 GAD 第一抗原分子在 GAD 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法;

(d) 在 GAD 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后, 为 (b) 所定义的复合物中的 GAD 第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法;

(e) 检测是否存在 (c) 中所固定的 (b) 中所定义的复合物, 以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括筛选动物受试体体液样本中与 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应的分析物自身抗体的试剂盒, 所述试剂盒包括:

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的主要由 IA-2 抗原分子组成的第一和第二抗原分子, 所述抗原分子选自 IA-2、其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 其中抗原分子选自 IA-2 和其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中所述 IA-2 第一抗原分子如 (c) 中所定义的被固定在固体支持物上, 所述 IA-2 第二抗原分子如 (d) 中所定义被标记物所标记;

(b) 将步骤 (a) 的 IA-2 抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法, 由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子 IA-2 发生反应而形成一种或多种复合物, 该复合物包括[所述 IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述 IA-2 第二抗原分子];

(c) 所述 (b) 定义的复合物中的 IA-2 第一抗原分子在 IA-2 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后被固定到固体支持物上的方法;

(d) 在 IA-2 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后, 为 (b) 定义的复合物中的 IA-2 第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法;

(e) 检测是否存在 (c) 中所固定的 (b) 中所定义的复合物, 以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

本发明的优选实施例还包括用于筛选动物受试体体液样本中第一和第二分析物自身抗体的试剂盒, 该抗体能分别与 GAD 和 IA-2, 或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段反应, 所述试剂盒包括:

(a) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 GAD 第一和第二抗原分子, GAD 抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 其中抗原分子选自 GAD₆₅、GAD₆₇、IA-2 和它们的一种或多
5 种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中, 所述融合分子中至少一种抗原分子包括 GAD₆₅、GAD₆₇ 或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中所述 GAD 第一抗原分子如 (d) 中所定义的被固定在固体支持物上, 所述 GAD 第二抗原分子如 (e) 中所定义的被标记物所标记;

(b) 与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的 IA-2 第一和第二抗原
10 分子, 所述抗原分子选自 IA-2 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段以及融合分子, 该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子, 其中, 抗原分子选自 IA-2、GAD₆₅、GAD₆₇ 和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中, 所述融合分子中至少一种抗原分子包括 IA-2
15 或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段, 其中所述 IA-2 第一抗原分子如 (d) 中所定义的被固定在固体支持物上, 所述 IA-2 第二抗原分子如 (f) 中所定义的被标记物所标记;

(c) 将 (a) 和 (b) 提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触, 由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子发生反应而形成一种或多种复合物, 该复合物包括[GAD 第一抗原分子]-[分析物自身抗
20 体]-[GAD 第二抗原分子]或[IA-2 第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[IA-2 第二抗原分子];

(d) 所述 (c) 定义的复合物中的 GAD 或 IA-2 第一抗原分子在 GAD 或 IA-2 第一抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后, 被固定到固体支持物上的方法;

(e) 在 GAD 或 IA-2 第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后, 为所述 (c) 定义的复合物中的 GAD 或 IA-2 第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法;

(f) 检测是否存在 (d) 中所固定的 (c) 中所定义的复合物的方法, 以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

30 本发明的试剂盒可以优选为第一和第二抗原分子包括一种或多种共同的

抗原分子。例如，第一和第二抗原分子可以包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇；或者都包括 IA-2。

也可以优选，与所述体液样本中自身抗体反应的第一或第二抗原分子中的一种包括选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素的抗原分子，而另一种抗原分子则包括上述第一或第二抗原分子的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段。例如，与所述体液样本中自身抗体反应的第一或第二抗原分子中的一种包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇，而另一种抗原分子则包括 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的一种或多种变异体、类似物、衍生物、或片段。再例如，与所述体液样本中自身抗体反应的第一或第二抗原分子中的一种包括 IA-2，而另一种抗原分子包括 IA-2 的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段。

本发明的再一实施例是第一和第二抗原分子都包括与所述体液样本中自身抗体反应的同一抗原分子的可相同也可不同的变异体、类似物、衍生物或片段。例如，第一和第二抗原分子都包括与所述体液样本中自身抗体反应的 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的可相同也可不同的变异体、类似物、衍生物或片段。再例如，第一和第二抗原分子都包括与所述体液样本中自身抗体反应的 IA-2 的可相同也可不同的变异体、类似物、衍生物或片段。可以理解为，第一和第二抗原分子包括衍生于同一抗原分子的变异体、类似物、衍生物或片段，这些变异体、类似物、衍生物或片段可以相同或不同（例如，第一抗原分子的变异体 1 和第二抗原分子的变异体 2，其中，变异体 1 和 2 可以分别代表 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的不同变异体，或第一抗原分子的片段 1 和第二抗原分子的片段 2，其中，片段 1 和 2 可以分别代表 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的不同片段，诸如，完全不同或部分重叠的 GAD₆₅ 或 GAD₆₇ 的表位）。

适宜的可检测标记物选自酶标记物、同位素标记物、化学发光标记物、荧光标记物、颜料及类似物，典型的标记物选自碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶、生物素或类似物，尤其包括生物素。这些可检测标记物（当与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子相结合）与一种或多种其标记的底物（诸如抗生物素蛋白或抗生物素蛋白链菌素结合物，例如抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶结合物或类似结合物）发生反应，由此得到的结合物可以通过测试光密度或类似方法而得到检测。

可检测标记物可以直接与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子结合。可检测标记物也可以间接与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子结合，尤其是可检测标记物与一种或多种抗体或其它结合试剂相结合，所述抗体或试剂能够与上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子相结合。

本发明筛选自身抗体的试剂盒进一步包括直接监测本发明所提供的 (i) 待检受试体体液样本中的自身抗体与 (ii) 上述一种或多种抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子相互反应的方法，尤其是利用本领域熟知的非竞争性夹心测试法。

根据本发明一个优选实施例，上述一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子被固定在固体支持物上，上述一种或多种第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子与可检测标记物结合，其中优选的第二抗原分子存在于液相中，这是熟知的 ELISA 技术的常规做法。

本发明的一种优选试剂盒包括与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子，在与待检体液样本接触之前，被固定到固体支持物上的方法。本发明适宜的试剂盒包括与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的被固定的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子，在与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子与体液样本接触的同时或者随后，与体液样本接触的方法。尤其优选的接触方法是被固定的与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或这些物质的一种或多种融合分子在与待检体液样本接触而形成了中间复合物，其包括[抗原分子]-[分析物自身抗体]，其中抗原分子被固定到固体支持物上，且该被固定的中间复

合物随后与液相中的与所述体液样本中的分析物自身抗体反应的一种或多种第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或所述物质的一种或多种融合分子接触，从而形成复合物，其包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，该复合物通过第一抗原分子被固
5 定到固体支持物上。

因此，本发明提供了一种筛选动物受试体体液样本中分析物自身抗体的试剂盒，该抗体与一种或多种抗原分子反应，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，所述试剂盒包括：

10 (a) 一种或多种与体液样本中的分析物自身抗体发生反应的第一抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和所述一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，其中，所述第
15 一抗原分子被固定在固体支持物上；

(b) 与体液样本中分析物自身抗体发生反应的一种或多种第二抗原分子，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素、所述胰腺胰岛细胞抗原分子或胰岛素的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及融合分子，该融合分子包括两种或多种直接或间接融合的抗原分子，其中抗原分
20 子选自胰腺胰岛细胞抗原分子、胰岛素和它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或其片段，该第二抗原分子存在于液相中，并如(d)中所定义被标记物所标记；

(c) (a) 和 (b) 所提供的抗原分子同时或相继与所述待检体液样本相接触的方法，由此体液样本中的分析物自身抗体与所述抗原分子反应而形成
25 一种或多种被固定的复合物，该复合物包括[所述第一抗原分子]-[分析物自身抗体]-[所述第二抗原分子]，其中所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子包括一种共同的抗原分子或是从该共同抗原分子衍生而得，或者其中与分析物自身抗体结合的所述一种或多种复合物中的第一和第二抗原分子的结合区域存在于一种共同抗原分子中或由该共同抗原分子衍生而得，该被固定
30 的复合物是通过复合物中的第一抗原分子被固定在固体支撑上的；

(d) 在第二抗原与待检体液样本接触之前或之中或之后，为所述 (c) 定义的复合物中的第二抗原分子提供直接或间接的可检测标记物的方法；

(f) 检测是否存在 (c) 中所定义的复合物，以提供所述样本中是否存在分析物自身抗体的指示。

5 本发明的试剂盒中的其它接触方法还可以是，例如在上述接触步骤之前并不先提供固定一种或多种第一抗原分子或其变异体、类似物、衍生物、或片段，或这些物质的一种或多种融合分子的方法，而是先提供固体支持物与用于结合一种或多种第一抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或一种或多种这些物质的融合分子的结合剂相接触的方法，对于这种
10 试剂盒，其还包括随后将处理后的固体支持物与所述一种或多种第一和第二抗原分子或其一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，或一种或多种这些物质的融合分子以及待检体液样本接触的方法。

 关于本发明的试剂盒采用的固体支持物和条件，与已知免疫测试技术中所惯用的固体支持物和条件并没有根本的区别。本发明所采用的固体支持物
15 包括已知 ELISA 技术中常用的 ELISA 板，或其它适宜支持物，诸如管、颗粒、磁珠、硝酸纤维或类似物。

 本发明所提供的与选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素的一种或多种抗原分子发生反应的分析物自身抗体的检测方法，或利用本发明的试剂盒，可以用来诊断与该分析物自身抗体有关的一些疾病。尤其是，本发明能够用来
20 筛选动物受试体的体液样本，所述动物疑似患有或已经患有下述疾病：1 型糖尿病和/或僵人综合征、2 型糖尿病、一种或多种自身免疫性甲状腺疾病、乳糜泄、一种或多种结缔组织疾病、肾上腺自身免疫性疾病、或两种或多种不同自身免疫性疾病并存，本发明进一步提供了诊断动物受试体中上述任一疾病的方法。

25 从上述内容可以获知本发明提供了用于检测动物受试体的体液样本中的分析物自身抗体的测试方法和检测用试剂盒，该自身抗体与一种或多种抗原分子发生反应，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，并能够提供患有上述疾病或该疾病征兆的指示。通过检测体液样本中的这种自身抗体（或至少样本中该自身抗体的水平）而得到受试体很有可能患有所述疾病
30 的指示，从而使这些疾病或其初始征兆能够得到诊断。

本发明进一步提供一种诊断动物受试体（尤其是人类）中与所述自身抗体有关的疾病或该疾病初始征兆的方法，所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，该方法包括检测与一种或多种抗原分子反应的自身抗体，所述抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，并能够提供上述受试体体液样本中具有所述疾病或疾病初始征兆的指示，据此，检测出的自身抗体能够提供是否患有所述疾病或该疾病初始征兆的指示。

本发明还进一步提供了一种延迟或预防动物受试体（尤其是人类）中与所述自身抗体有关的疾病或该疾病初始征兆的方法，或治疗或治愈患有这种疾病的动物（尤其是人类）患者的方法，所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，该方法包括先检测所述受试体体液样本中的所述自身抗体，并给予所述疾病或疾病初始征兆的指示，因此得以诊断受试体是否患有所述疾病或具有该疾病的初始征兆，并给予至少受试体一种治疗有效量的治疗剂，该治疗剂的作用是延迟疾病初始征兆的出现、排除、预防和/或治疗这些疾病。

本发明进一步提供了一种评定延迟或预防动物受试体（尤其是人类）中与所述自身抗体有关的疾病出现的有效性的方法，所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，或评定治疗或治愈动物受试体（尤其是人类）中与所述自身抗体有关的疾病的有效性的方法，所述自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素，该方法包括至少给予受试体一种治疗有效量的治疗剂，该治疗剂的作用是延迟疾病出现、排除、预防和/或治疗这种疾病，并检测受试体体液样本中的所述自身抗体，并给予患有疾病或疾病出现的指示，因此提供了治疗、延迟或预防这种疾病出现的有效性的指示。

本发明进一步提供了一种如上所述的试剂盒以及至少一种治疗有效量的治疗剂，该治疗剂的作用是治疗与一种或多种抗原分子反应的自身抗体有关的疾病，所述抗原选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素。

本发明中用于筛选的体液样本一般地包括血样或其它液体血组成，如血清样或血浆样，而样本也可以是其它的生物液体，诸如唾液或尿液或被溶解的组织提取液。

本发明所使用的术语“抗原”或“抗原分子”表示与本发明所述抗体发生反应的化合物，且该抗原能够与抗体结合而形成特定的抗体-抗原复合物。抗原或抗原分子可以是天然的或合成的，其修饰物优选为不损害它与特异性抗体相结合的性质。

5 如上所述，本发明还使用了抗原分子的“变异体”、“类似物”、“衍生物”和“片段”，术语“变异体”、“类似物”、“衍生物”和“片段”表示主要保留了天然抗原分子相同生物功能或活性，尤其是其与特异性抗体结合性质的多肽。本发明所述变异体、类似物、衍生物和片段以及片段的变异体、类似物、衍生物具有一个一级结构的氨基酸，其中天然抗原分子中的几个（如 5 至 10、1
10 至 5 或 1 至 3）氨基酸残基被取代、删除或添加或以这些方式的任意组合而进行修饰。尤其优选的是沉默取代、添加和删除，这样的修饰不改变或者不显著改变天然抗原分子的生物活性或功能。保守型取代是下面大篇幅所述的优选取代方式。

更具体而言，本发明适宜的抗原分子的变异体、类似物或衍生物可以是
15 其中一个或多个氨基酸残基被保守的或非保守的氨基酸残基（优选保守的氨基酸残基）所取代的抗原分子，或其中一个或多个氨基酸残基包括取代基或类似物的抗原分子。

最典型的变异体、类似物或衍生物是通过保守性氨基酸取代而与参照物（如本发明所述的天然抗原分子）不同的分子。这种取代是用具有类似性质的
20 的其它氨基酸取代多肽中的特定氨基酸。典型的保守型取代是脂肪氨基酸 A、V、L 和 I、羟基残基 S 和 T、酸性残基 D 和 E、氨基残基 N 和 Q、碱性残基 K 和 R、芳香残基 F 和 Y 之间的相互替代。

更具体而言，本发明所用术语“片段”表示氨基酸序列与天然氨基酸中的部分而不是全部氨基酸相同的多肽，其变异体或衍生物和该片段可以是“独
25 立”的，即不是部分存在或被融合至其它氨基酸或多肽中，或可以存在于更大的多肽中，由其自身构成一部分或一区域。本发明优选的片段可以是一个或多个所述抗原分子的表位，且该表位片段可以“独立”形式使用或存在于更大多肽如骨架多肽中，其中这些片段自身构成一部分或一区域。与使用全长抗原相比，这些表位片段以分离或独立形式使用更能增强稳定性和/或提高特异
30 性。

本发明将通过下述实施例进一步给予举例说明，但并不意于限制本发明的保护范围。

实施例

5 GAD 包被的 ELISA 板的制备

由 SDS-PAGE 测定的纯度>95%的人重组 GAD₆₅(M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Rees Smith, J Furmaniak. Clinica Chimica Acta, 1996 256: 175-188)在包被缓冲液中被稀释至 150 μ g/L, 该缓冲液包括 1.59g/L Na₂CO₃、2.94g/L NaHCO₃、0.1g/L NaN₃、0.01g/L 酚红和 5mg/L BSA (pH 9.2), 将 150 μ L 的稀释溶液加入 96 孔 ELISA 板(商品名为 Nunc F8 MaxiSorp)中。然后在 4 $^{\circ}$ C 下, 包被该板过夜, 吸出孔中物质, 用高盐缓冲液(HSB)清洗三次, 该缓冲液包括 10g/L BSA, 1g/L NaN₃, 11.69g/L NaCl, 18.17g/L Tris, 和 10mL/L 聚氧乙烯山梨糖醇酐单月桂酸酯(商品名为 Tween 20 (pH 8.3))。将后包被缓冲液加入到孔中 (每孔 250 μ L), 15 该缓冲液包括 3g/L BSA、9g/L NaCl、20g/L 蔗糖和 0.2g/L NaN₃, 室温下培养 30 分钟。然后吸出后包被缓冲液, 真空干燥, 4 $^{\circ}$ C 下, 在用硅胶的密封袋中储存备用。

用生物素标记 GAD₆₅

20 PBS(1.15g/L Na₂HPO₄, 0.2g/L KH₂PO₄, 0.2g/L KCl, 8g/L NaCl) 中的人重组 GAD₆₅ 与商用生物素化试剂(sulfo-NHS-LC-LC-生物素, 商品名为 EZ-Link, Perbio Science 制造)反应, 摩尔比为 1 份的 GAD₆₅ 比 24 份的生物化试剂, 室温下反应 30 分钟。4 $^{\circ}$ C 下对 PBS 透析使反应停止, 在-70 $^{\circ}$ C 下, 将得到的物质分为小等份进行储藏。

25 将利用上述技术获得的生物素标记 GAD₆₅(GAD₆₅-Bi)在 20g/L BSA 中被稀释至 3mg/L, 通过 0.22 μ m 过滤器过滤, 以每小瓶 1mL 等分, 冷冻干燥, 然后在-20 $^{\circ}$ C 下储藏。使用时, 每小瓶加入 7.5mL 的 HSB, 使 GAD₆₅-Bi 的浓度为 400 μ g/L。

30 制备 GAD₆₅ 自身抗体测试的校准品

将 GAD₆₅ 的三种人单克隆抗体的 IgG 制备液(M J Powell, N Hayakawa, M Masuda, J Sanders, M Evans, LDKE Premawardhana, J Furmaniak, B Rees Smith. Isolation and characterization of three human monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase(GAD65) from a patient without clinical diabetes. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2001 17 (S1) :021) 在 HSB 中稀释, 使 450nm 时的光密度为 4.0 至 0.1。这些单克隆抗体是已知的 1 型糖尿病患者血清中 GAD₆₅ 的代表性自身抗体(M J Powell, N Hayakawa, M Masuda, J Sanders, M Evans, LDKE Premawardhana, JFurmaniak, B Rees Smith. Isolation and characterization of three human monoclonal antibodies to glutamic acid decarboxylase(GAD65) from a patient without clinical diabetes. Diabetes/Metabolism Research and Reviews, 2001 17(S 1) : 021)。

GAD₆₅ 自身抗体检测

根据上述技术制备的包被有 GAD₆₅ 的板置于室温中, 将 25 μ L 待测供体的未稀释血清样本或校准品加到板上的孔中, 一式两份, 在室温下培养 1 个小时并以 200rpm 进行振荡。然后吸出样品, 用缓冲液(8.7g/L NaCl, 2.4g/L Tris, 0.5mL/L Tween 20, pH 7.6)清洗孔三次, 随后加入 100 μ L 的 GAD65-Bi, 该 GAD65-Bi 根据上述方法在 HSB(400 μ g/L) 中稀释制得, 将板在室温下培养 1 个小时, 同时 200rpm 振荡。吸出孔中的培养物, 用缓冲液(8.7g/L NaCl, 2.4g/L Tris, 0.5mL/L Tween20, pH 7.6)清洗孔三次。然后, 加入 100 μ L 稀释浓度为 1 μ g/mL 的抗生物素蛋白链菌素辣根过氧化物酶结合物, 在室温下培养 20 分钟, 200rpm 振荡。吸出培养物后, 用缓冲液(8.7g/L NaCl, 2.4g/L Tris, 0.5mL/L Tween20, pH 7.6)清洗孔三次, 用水洗一次。然后加入 100 μ L 四甲基联苯胺 (TMB), 在暗处培养 20 分钟, 随后加入 50 μ L 的 0.5mol/L H₂SO₄。然后在 ELISA 板读数器中测定 450nm 时孔的吸收度或者在样本 450nm 的 OD > 4.0 时, 测量 405nm 时的吸收度。

将上述步骤应用到 IA-2 自身抗体以及 GAD₆₅ 与 IA-2 自身抗体的联合检测中 (尤其是涉及制备生物素标记的 IA-2, IA-2-Bi)。用于绘制校准曲线的 IA-2 自身抗体的参照制备液是由多克隆 IA-2 自身抗体制备得到。

结果

450nm 时 GAD₆₅ 的 OD 值校准曲线如图 1a 所示。该曲线的测定对象包括 7 个任意分配的 GAD₆₅ 自身抗体校准品, ELISA 单位从 0 ELISA 单位/mL 至 512 ELISA 单位/mL。对于校准品 0, 1.0, 2.0, 8.0, 32, 128 和 512, 450nm 时的 OD 值分别为 0.033, 0.168, 0.310, 1.020, 3.187, > 4.0 和 > 4.0。图 1b 显示了校准品 1.0, 2.0, 8.0, 32, 128 和 512, 405nm 时的 OD 值分别为 0.008, 0.048, 0.090, 0.290, 0.929, 1.385 和 1.620。随后, 450nm 时的 OD 值 > 4.0 的样本可以在如图 1b 所示的 OD_{405nm} 的校准曲线内测量。对于 n=25 的健康献血者血清而言, 450nm 时的平均±SD 吸收度为 0.04±0.015。

本发明的 GAD₆₅ 自身抗体的结果如表 1 和 2 所示。表 1 列出了 n=18 的 1 型糖尿病患者和 n=14 的甲状腺机能亢进患者(Graves' disease)血清中的 GAD₆₅ 自身抗体结果。当采用 ELISA 技术, 所有 18 例糖尿病患者血清的 GAD₆₅ 自身抗体检测都为阳性(水平 > 1.0 ELISA 单位/mL), 然而采用放射免疫测试法(RIA)时, 只有 13 名患者为阳性。RIA 检测中显阴性的 5 例样本在 ELISA 检测中显示了低水平的 GAD₆₅ 自身抗体, 其 450nm 时的 OD 值在 0.117 至 0.980 之间(1.3 至 10.7 ELISA 单位/mL)。RIA 检测中的低水平样本(1.0 至 7.5 RIA 单位/mL), ELISA 检测时 450nm 的 OD 值在 0.290 和 1.060 之间(12.0 至 105.8 ELISA 单位/mL)。RIA 检测的较高水平的 GAD₆₅ 自身抗体(26.8 至 118.8 RIA 单位/mL), 利用 ELISA 技术检测的 450nm 时的 OD 值都非常高, > 4.0 (> 128 ELISA 单位/mL), 因此, 样本中的 GAD₆₅ 自身抗体水平和校准曲线的关系在测量 405nm 的吸收度后再计算。在进行 ELISA 测试之前, 将待测血清与未标记的 GAD₆₅(最终浓度为 0.0005 至 0.01ug/mL)进行预培养会导致 450nm 时的 OD 值产生剂量依赖性的降低。这些实验确证了本发明的 ELISA 技术检测中 GAD₆₅ 自身抗体的特异性。

对于 n=14 的甲状腺机能亢进患者, 所有样本的 450nm 时的 OD 值都低于 0.05 (<1 ELISA 单位/mL, 采用本发明的 ELISA 技术检测); 用 RIA 检测 GAD₆₅ 自身抗体时, 所有样本都显阴性(<1 RIA 单位/mL)。

ELISA 和 RIA 检测 GAD₆₅ 自身抗体的最低检测限值如表 2 所示。RIA 检测时, 胰岛细胞自身抗体的 WHO 参照制备液[NIBSC 97/550] 的稀释度为 250 至 31.25 WHO 单位/mL, 可检测到 GAD₆₅ 水平。而利用本发明的 ELISA

技术时,可检测到 GAD₆₅ 自身抗体的 WHO 标准稀释浓度为 250 至 3.91 WHO 单位/mL。血清样本 Z (来自具高水平 GAD₆₅ 自身抗体的患者) 的稀释特征的实施例如表 2 所示。RIA 可检测到 GAD₆₅ 自身抗体的样本 Z 的稀释度范围为 1/8 至 1/8192。ELISA 技术检测到 GAD₆₅ 自身抗体的样本 Z 的稀释度范围
5 为 1/8 至 1/32768。通过对 WHO 标准品和患者血清的终点稀释度分析,显示采用 ELISA 技术可检测到自身抗体的稀释度高于 RIA 检测的 4 至 8 倍。

采用 ELISA 技术检测的 IA-2 自身抗体的结果实例如表 3 所示。450nm 时 IA-2 自身抗体 OD 校准值(0, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0, 16, 32, 64, 128 ELISA 单位/mL)为 0.054 至 >4.0, OD_{405nm} 值为 0.008 至 1.874。在 RIA 测试中, IA-2
10 自身抗体水平为 2.0 至 38.9 RIA 单位/mL 的 n=10 的 1 型糖尿病患者的血清在 ELISA 测试中都显阳性。这些样本 450nm 的 OD 值在 0.209 至 >4.0 (2.6 至 > 32 ELISA 单位/mL) 之间。在 250 WHO 单位/mL 和 125 WHO 单位/mL 的 IA-2 自身抗体 RIA 中, 可检测到 WHO 标准品, 而利用 ELISA 技术可检测到该 WHO 标准品的进一步稀释液(62.5 WHO 单位/mL 和 31.25 WHO 单位
15 /mL)中的抗体。n=10 的健康献血者血清 (RIA 检测 IA-2 自身抗体时, 都显阴性) 450nm 的 OD 值为 0.030 和 0.071 (< 1 ELISA 单位/mL)之间。

表 4 和 5 显示了联合检测 GAD₆₅ 自身抗体和 IA-2 自身抗体的结果。表 4 显示了利用 ELISA 技术联合检测 GAD₆₅ 自身抗体和 IA-2 自身抗体的结果, 检测中采用了 IA-2-Bi 或 GAD₆₅-Bi 或 IA-2-Bi+GAD₆₅-Bi。在 IA-2 自身抗体
20 校准品中, 使用 GAD₆₅-Bi 时, ELISA 检测中没有任何吸收信号, 而当使用 IA-2-Bi 或 IA-2-Bi+GAD₆₅-Bi 时, 观察到 450nm 的 OD 值的剂量依赖性增加。单独的 IA-2-Bi 与 IA-2-Bi+GAD₆₅-Bi 的 450nm OD 值基本相同。在检测中使用 IA-2-Bi 时, GAD₆₅ 自身抗体校准品中没有检测到任何吸收信号, 而使用 GAD₆₅-Bi 和 IA-2-Bi+GAD₆₅-Bi 时, 观察到 450nm 的 OD 值剂量依赖性反应。
25 比较单独的 GAD₆₅-Bi 与 IA-2-Bi+GAD₆₅-Bi+GAD₆₅-Bi 450nm 时的 OD 值。检测血清样本 Z 的不同稀释浓度中的两种抗体, 显示了与单独检测 IA-2 自身抗体或 GAD₆₅ 自身抗体的结果相吻合。来自健康献血者血清或健康献血者血清池的血清的 450nmOD 值非常低, 为从 0.006 至 0.046, 与使用的生物素标记抗原种类无关。该实验显示了联合检测 IA-2 自身抗体和 GAD₆₅ 自身抗体
30 时, 结果是确定的, 说明测试样本中存在两种自身抗体。

表 5 显示了联合检测 IA-2 自身抗体和 GAD₆₅ 自身抗体的更为详细的结果。测定了 1 型糖尿病患者的血清。利用 RIA 测定了这些血清的 IA-2 自身抗体和 GAD₆₅ 自身抗体;血清 1-3 中 IA-2 自身抗体和 GAD₆₅ 自身抗体的检测都为阳性,血清 4-6 中 GAD₆₅ 自身抗体检测为阴性,而 IA-2 自身抗体为阳性,血清 7-9 中 GAD₆₅ 自身抗体检测为阳性, IA-2 自身抗体为阴性,血清 10-12 中 IA-2 自身抗体和 GAD₆₅ 自身抗体的检测都为阴性。如表 5 所示,在联合检测中,血清样本中检测到一种或另一种或两种自身抗体。RIA 检测的血清 6 中的 IA-2 自身抗体处于边界水平(0.9 RIA 单位/mL),联合 ELISA 技术检测中的吸收信号明显为阳性。

表 6、7 和 8 分别显示 ELISA 检测不同患者亚组中 GAD₆₅ 自身抗体、IA-2 自身抗体以及 GAD₆₅ 和 IA-2 自身抗体混合结果的其它实例。

结论

上述结果显示了本发明的非放射技术可以用来检测待测样本中的 GAD₆₅ 自身抗体。非放射技术也可以用来分别或同时地检测 IA-2 自身抗体,其测试结果确定,且与已建立的放射参照方法结果吻合(M Powell, L Prentice, T Asawa, R Kato, J Sawicka, H Tanaka, V Petersen, A Munkley, S Morgan, B Rees Smith, JFurmaniak. Clinica Chimica Acta, 1996 256: 175-188 ; and M Masuda, M Powell, S Chen, C Beer, P Fichna, B Rees Smith, JFurmaniak. Autoantibodies toIA-2 in insulin-dependent diabetes mellitus. Measurements with a new immunoprecipitation assay. Clinica Chimica Acta, 2000 291: 53-66)。而且,利用本发明的非放射技术检测 GAD₆₅ 自身抗体和 IA-2 自身抗体的灵敏度至少与 RIA 检测相同(表 1,2 和 3)。

本发明技术提供了非放射测试法来检测 GAD₆₅ 自身抗体或 IA-2 自身抗体,该方法灵敏度高,可方便地用于诊断和筛选中。本发明对于 GAD₆₅ 自身抗体和 IA-2 自身抗体的联合检测法在多人群筛选中尤其有利。

表 1

本发明 ELISA 检测患者血清中的 GAD₆₅ 自身抗体和放射免疫检测法 (RIA) 基于 ¹²⁵I-标记的 GAD₆₅ 检测 GAD₆₅ 自身抗体

样本	ELISA ELISA 单位/ml	OD450nm	OD450nm	RIA RIA 单位/ml
1 型 DM 血清样本				
1	10.7	0.980	0.254	<1.0
2	8.1	0.660	0.158	<1.0
3	2.1	0.183	0.024	<1.0
4	1.3	0.117	0.001	<1.0
5	4.4	0.432	0.091	<1.0
6	>128	>4.0	2.100	74.3
7	>128	>4.0	2.283	118.8
8	>128	>4.0	2.155	83.2
9	>128	>4.0	2.230	87.4
10	>128	>4.0	2.023	83.0
11	>128	>4.0	1.774	41.9
12	>128	>4.0	1.554	26.8
13	105.8	3.596	1.060	7.5
14	21.9	1.830	0.485	3.6
15	20.2	1.735	0.466	3.1
16	12.0	1.116	0.290	1.5
17	43.4	2.615	0.732	4.7
18	20.8	1.771	0.473	2.2
甲状腺机能亢进患者血清样本				
1	<1.0	0.015		<1.0

2	<1.0	0.019		<1.0
3	<1.0	0.049		<1.0
4	<1.0	0.048		<1.0
5	<1.0	0.008		<1.0
6	<1.0	0.031		<1.0
7	<1.0	0.036		<1.0
8	<1.0	0.033		<1.0
9	<1.0	0.029		<1.0
10	<1.0	0.037		<1.0
11	<1.0	0.036		<1.0
12	<1.0	0.042		<1.0
13	<1.0	0.041		<1.0
14	<1.0	0.047		<1.0

注：高于 1 RIA 单位/mL 的 GAD Ab 水平为 RIA 测试阳性。1 型 DM=1 型糖尿病。

表 2

ELISA 和 RIA 测试 GAD₆₅ Ab 的灵敏度比较

样本	ELISA ELISA 单位/ml	OD405nm	OD405nm	RIA RIA 单位/ml
WHO 标准 品 (97/550)				
250	>128	>4.0	1.234	6.4
125	45.5	2.670	0.742	3.6
62.5	17.4	1.557	0.422	2.5
31.25	10.0	0.894	0.225	1.1
15.63	4.4	0.431	0.095	<1.0
7.81	2.2	0.202	0.023	<1.0
3.91	1.2	0.100	0.00	<1.0
1.95	<1.0	0.058	0.00	<1.0
0.98	<1.0	0.031	0.00	<1.0
样本 Z				
1/8	>128	>4.0	2.048	91
1/32	>128	>4.0	1.868	76
1/128	>128	>4.0	1.769	38
1/512	>128	>4.0	1.591	13
1/1024	90	3.714	1.120	5.6
1/2048	29.4	2.542		3.1
1/4096	12.0	1.375		1.4
1/8192	6.9	0.784		1.0
1/16384	2.8	0.385		<1.0
1/32768	1.6	0.210		<1.0
1/65536	<1.0	0.132		<1.0
1/131072	<1.0	0.092		<1.0
1/262144	<1.0	0.055		<1.0

注: 高于 1 RIA 单位/mL 的 GAD Ab 水平为 RIA 测试阳性。*WHO 单位/mL。

表 3

用 ELISA 和基于 ^{125}I -标记的 IA-2/ICA512 的 RIA 方法检测 IA-2/ICA512 自身抗体

样本	ELISA ELISA 单位/ml	OD405nm	OD405nm	RIA RIA 单位/ml
IA-2Ab 校准品				
	0	0.054	0.008	
	1	0.114	0.021	
	2	0.183	0.040	
	4	0.313	0.073	
	8	0.614	0.166	
	16	1.219	0.340	
	32	2.506	0.719	
	64	>4	1.371	
	128	>4	1.874	
1 型 DM 血清样本				
1	>32	>4	1.420	14.8
2	>32	>4	1.594	38.9
3	11.2	0.859	0.228	2.8
4	>32	>4	2.096	22.7
5	>32	>4	2.348	33.9
6	6.5	0.516	0.140	6.3
7	>32	>4	2.354	15.8
8	4.1	0.265	0.067	2.9
9	2.6	0.209	0.055	2.3
10	8.4	0.664	0.179	2.0
WHO 标准品				
(97/550)*				

250	18.8	1.503		2.0
125	9.2	0.721		1.2
62.5	4.0	0.337		<1.0
31.25	2.0	0.191		<1.0
15.63	<1.0	0.116		<1.0
7.81	<1.0	0.093		<1.0
健康献血者血液				
1	<1.0	0.030		<1.0
2	<1.0	0.036		<1.0
3	<1.0	0.043		<1.0
4	<1.0	0.045		<1.0
5	<1.0	0.070		<1.0
6	<1.0	0.045		<1.0
7	<1.0	0.063		<1.0
8	<1.0	0.037		<1.0
9	<1.0	0.071		<1.0
10	<1.0	0.069		<1.0

注：高于1 RIA 单位/mL 的 IA-2/ICA512 Ab 水平为 RIA 测试阳性。1 型 DM=1 型糖尿病。*WHO 单位/mL。

表 4

ELISA 检测 GAD₆₅Ab 和 IA-2/ICA512Ab 混合物

样本 ELISA 单位/mL	IA-2-Bi OD450nm	GAD ₆₅ -Bi OD450nm	GAD ₆₅ -Bi+ IA-2-Bi OD450nm
IA-2 Ab 校准品			
8	1.314	0.022	1.252
16	2.730	0.033	2.574
32	3.888	0.031	3.824
GAD ₆₅ Ab 校准品			
4	0.053	0.460	0.458
16	0.045	1.518	1.400
32	0.043	2.033	2.160
血清样本 Z			
稀释 1/2	3.069	>4	>4
1/4	2.328	>4	>4
1/8	0.905	>4	>4
1/16	0.401	3.936	3.875
1/32	0.197	3.379	3.626
1/64	0.143	2.209	2.512
1/128	0.069	1.718	1.571
健康献血者血清	0.019	0.006	0.023
健康献血者血清池	0.022	0.015	0.046

表 5

ELISA 检测 GAD₆₅Ab 和 IA-2/ICA512 Ab 混合物

样本 ELISA 单位/mL	OD450nm	OD450nm	GAD ₆₅ Ab RIA RIA 单位/mL	IA-2/ICA512 Ab RIA RIA 单位/mL
GAD ₆₅ Ab 校准 品				
0	0.080	0.028		
2	0.231	0.070		
8	0.737	0.219		
16	1.476	0.436		
32	2.117	0.613		
64	2.648	0.755		
128	3.607	1.083		
IA-2 Ab 校准品				
0	0.065	0.025		
2	0.205	0.054		
4	0.308	0.081		
8	0.552	0.154		
16	1.116	0.327		
32	2.031	0.590		
64	3.596	1.079		
128	>4	1.777		
1 型 DM 血清样 本				
1	>4	1.646	10.8	14.8
2	>4	1.964	50.2	39.0
3	1.640	0.481	3.1	2.8
4	>4	1.927	阴性	22.7
5	>4	2.428	阴性	39.9

6	0.298	0.100	阴性	0.9
7	3.594	1.063	26.8	阴性
8	>4	2.092	253.0	阴性
9	1.874	0.554	2.2	阴性
10	0.068	0.040	阴性	阴性
11	0.074	0.029	阴性	阴性
12	0.066	0.021	阴性	阴性
健康献血者血清池	0.073	0.020	阴性	阴性

注: 高于 1 RIA 单位/mL 的 GAD₆₅ Ab 水平为 RIA 测试阳性。高于 1 RIA 单位/mL 的 IA-2/ICA512 Ab 水平为 RIA 测试阳性。1 型 DM=1 型糖尿病。

表 6

ELISA 或放射免疫测试法(RIA)根据 ^{125}I -标记的 GAD_{65} 检测不同患者组的 GAD_{65}Ab

	ELISA 显阳性数 (%) (5 单位/mL 或更高=阳性)	RIA 显阳性数 (%) (25 单位/mL 或更高=阳性)
健康献血者血液 n=300	2/300 (0.7%) ¹	3/300 (1%) ²
1 型 DM n=39	39/39 (100%) ³	32/39 (82%) ⁴
2 型 DM n=62	1/62 (1.6%) ⁵	0/62 (0%)
甲状腺机能亢进 n=88	2/88 (2.3%) ⁶	3/88 (3.4%) ⁷
桥本甲状腺炎 n=11	1/11 (9%) ⁸	0/11
类风湿关节炎 n=10	0/10	0/10
系统性红斑狼疮 n=10	1/10 (10%) ⁹	1/10 (10%) ⁹

5 ¹ ELISA 检测 GAD_{65}Ab 显阳性的样品, 数值为 11 单位/mL 和 >500 单位/mL (所有单位/mL 都是 WHO 97/550)。吸收实验表明存在特异性 GAD_{65}Ab 。用 RIA 分别检测相同样本, 显示阴性以及 2500 单位/mL。

² RIA 检测 GAD_{65}Ab 显阳性的样本, 数值为 33、100、2500 单位/mL。用 ELISA 分别检测相同样本, 显示阴性、阴性以及 >500 单位/mL。

10 ³ 数值范围: 5.2 至 >500 单位/mL。

⁴ 数值范围: 阴性至 3800 单位/mL。

⁵ ELISA 检测 GAD_{65}Ab 显阳性的样品, 数值为 40 单位/mL。用 RIA 检测相同样本, 显阴性。

⁶ ELISA 检测 GAD₆₅Ab 显阳性的样品，数值为 306 和 500 单位/mL。用 RIA 分别检测相同样本，数值为 354 和 1700 单位/mL。

⁷ RIA 检测 GAD₆₅Ab 显阳性的样品，数值为 78、354 和 1700 单位/mL。用 ELISA 分别检测相同样本，分别为阴性、306 和 500 单位/mL。

5 ⁸ ELISA 检测 GAD₆₅Ab 显阳性的样品数值为 24 单位/mL。用 RIA 检测该样本显阴性。

⁹ ELISA 和 RIA 检测 GAD₆₅Ab 显阳性的相同样品，数值分别为 15 单位/mL 和 30 单位/mL。

表 7

ELISA 或基于 ^{125}I -标记 IA-2 的放射免疫测试法 (RIA) 测定不同患者组的 IA-2 Ab

	ELISA 显阳性数 (%) (30 单位/mL 或更高=阳性)	RIA 显阳性数 (%) (125 单位/mL 或更高=阳性)
健康献血者血液 n=210	2/210 (1%) ¹	2/210 (1%) ²
1 型 DM n=30	12/30 (40%) ³	12/30 (40%) ⁴
2 型 DM n=62	1/62 (1.6%) ⁵	0/62
甲状腺机能亢进 n=102	0/102	0/102
类风湿关节炎 n=10	0/10	0/10
系统性红斑狼疮 n=10	1/10	1/10

¹ ELISA 检测 IA-2 显阳性的样品, 数值为 44 单位/mL 和 179 单位/mL (所有单位/mL 都是 WHO 97/550)。吸收实验表明样本中存在特异性 IA-2 Ab。用 RIA 检测相同样本, 显阴性。

² RIA 检测 IA-2 Ab 显阳性的样本, 数值为 150 和 288 单位/mL。ELISA 检测相同样本, 显阴性。

³ 数值范围: 132 至 >4000 单位/mL。

⁴ 数值范围: 178 至 4508 单位/mL。

⁵ IA-2 Ab 显阳性的样品为 101 单位/mL。用 RIA 检测相同样本, 显阴性。

表 8

不同患者组中的 GAD₆₅ Ab ELISA、IA-2 Ab ELISA 和 GAD₆₅ Ab + IA-2 Ab ELISA 的检测结果

	显阳性数 (%)		
	GAD ₆₅ Ab ELISA	IA-2 Ab ELISA	GAD ₆₅ Ab + IA-2 Ab ELISA
1 型 DM n=35	28/35 ¹ (80%)	14/35 ² (40%)	33/35 ³ (94.3%)
2 型 DM n=44	1/44 ⁴ (2.3%)	1/44 ⁵ (2.3%)	2/44 ⁶ (4.5%)
健康献血者血液 n=73	2/73 ⁷ (2.7%)	0/73 (0%)	2/73 ⁸ (2.7%)
甲状腺机能亢进 n=20	0/20 (0%)	0/20 (0%)	0/20 (0%)
类风湿关节炎 n=10	0/10 (0%)	0/10 (0%)	0/10 (0%)
系统性红斑狼疮 n=10	1/10 ⁹ (10%)	0/10 (0%)	1/10 ¹⁰ (10%)

5 ¹ ELISA 检测 GAD₆₅Ab 显阳性的样品,数值范围为 7.3 至>500 单位/mL (单位/mL 为 WHO 97/550)。

² ELISA 检测 IA-2 显阳性的样品,数值范围为 34 至 3613 单位/mL 和 179 单位/mL (单位/mL 为 WHO 97/550)。

³ 所有组合的 ELISA 检测结果按照如下计算表示:

10

样本的 OD450nm 值

健康献血者血清池的 OD450nm 值

;

数值为 2.0 或更高为阳性

18 例血清对于 GAD₆₅Ab 的检测为阳性,对于 IA-2 Ab 的检测为阴性;

15

所有 18 例血清在 ELISA 联合检测中为阳性。

4 例血清对于 GAD₆₅Ab 的检测为阳性，对于 IA-2 Ab 的检测为阴性；所有 4 例血清在 ELISA 联合检测中为阳性。

10 例血清对于 GAD₆₅Ab 和 IA-2 Ab 的检测都为阳性；所有 10 例血清在 ELISA 联合检测中为阳性。

5 1 例血清对于 GAD₆₅Ab 和 IA-2 Ab 的检测都为阴性，但在 ELISA 联合检测中为阳性。

2 例血清在所有 3 种检测中都显阴性。

4 在一个阳性样本中，GAD₆₅Ab 的检测水平为 10 单位/mL，而对于 IA-2 Ab 的检测显阴性。

5 在一个阳性样本中，对于 GAD₆₅Ab 的检测显阴性，而 IA-2 Ab 的检测水平为 76 单位/mL。

6 阳性样本与 4 和 5 中的样本相同（给定值分别为 7.8 和 4.8）。

15 ELISA 检测不同患者组中 GAD₆₅ Ab、IA-2 Ab 和 GAD₆₅ Ab +IA-2 Ab 的结果。

7 在两个阳性样本中，GAD₆₅Ab 水平为 9 和 >500 单位/mL，而对于 IA-2 Ab 的检测显阴性。

8 阳性样本与 7 中的样本相同。这些样本的给定值分别为 3.6 和 55.0。

9 GAD₆₅Ab 水平为 15 单位/mL，而 IA-2 Ab 的检测显阴性。

20 10 阳性样本与 9 中的样本相同。给定值为 6.0。

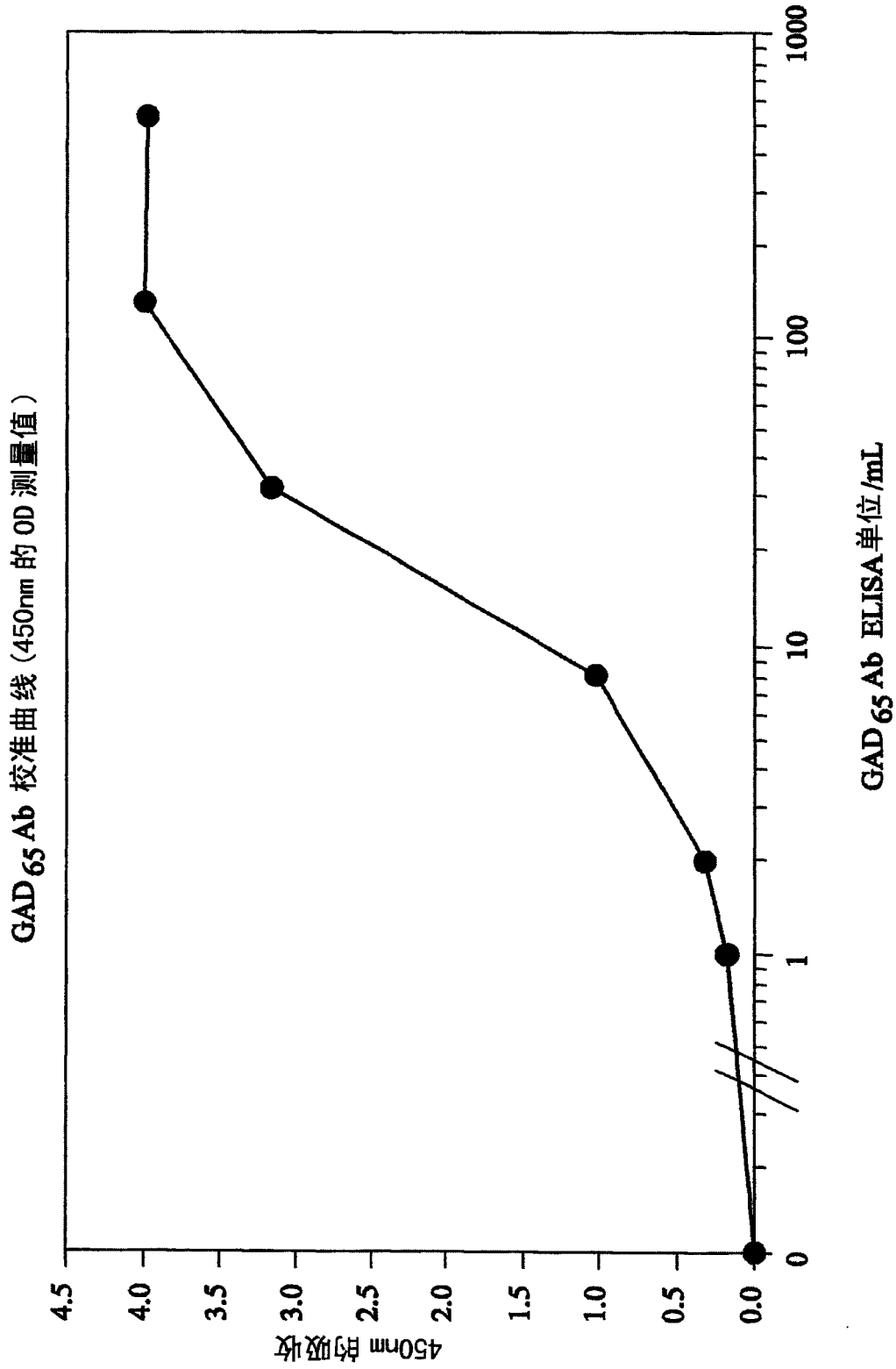


图 1a

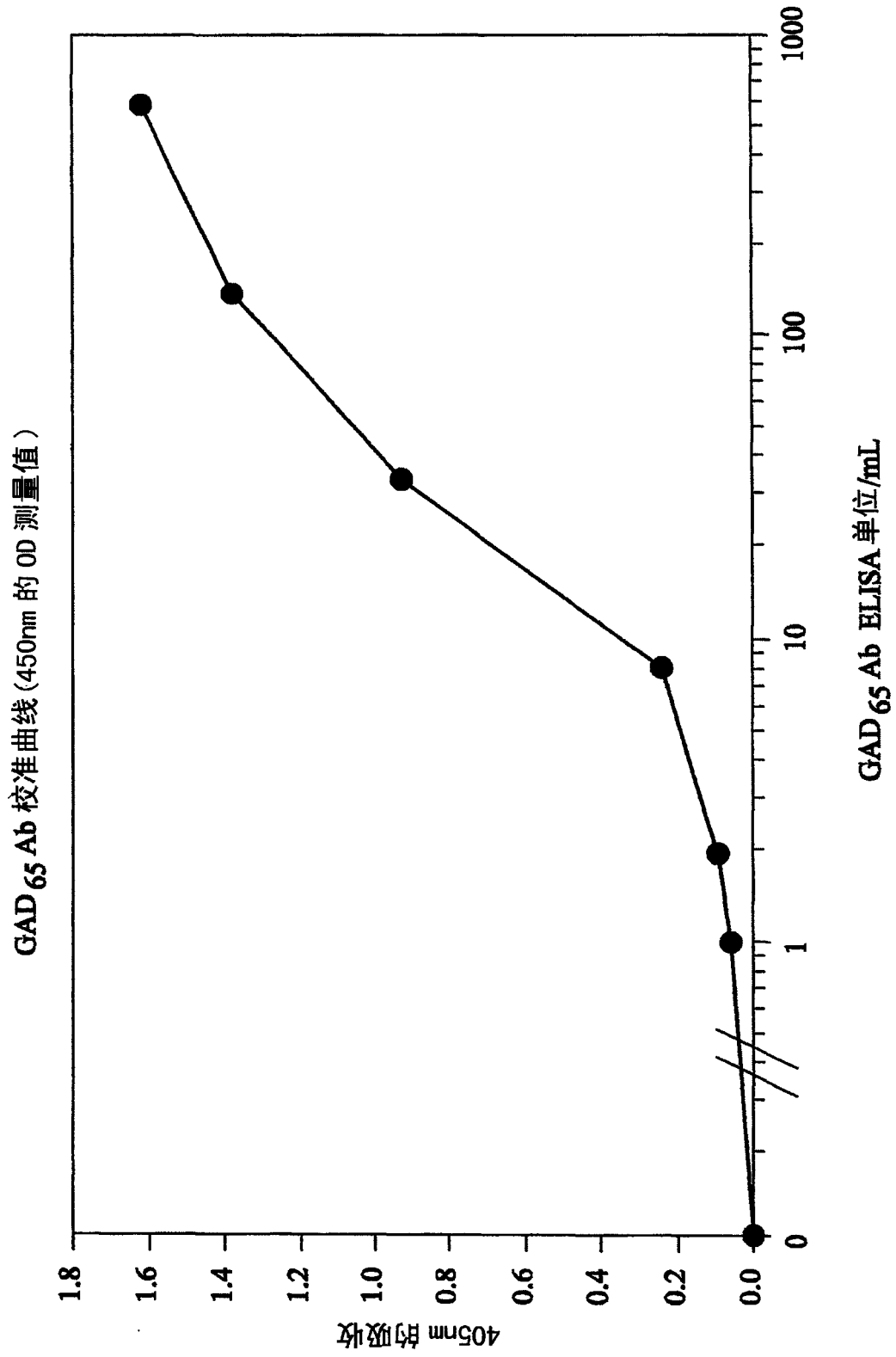


图 1b

专利名称(译)	检测与胰腺胰岛细胞抗原分子和/或胰岛素反应的自身抗体		
公开(公告)号	CN1585900A	公开(公告)日	2005-02-23
申请号	CN02822274.1	申请日	2002-11-26
[标]申请(专利权)人(译)	R S R有限公司		
申请(专利权)人(译)	RSR有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	RSR有限公司		
[标]发明人	伯纳德里斯史密斯 雅德维加富尔马尼亚克 迈克尔鲍威尔		
发明人	伯纳德·里斯·史密斯 雅德维加·富尔马尼亚克 迈克尔·鲍威尔		
IPC分类号	A61K45/00 A61P3/10 A61P5/14 A61P5/38 A61P37/02 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/564 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/54306 C12Y301/01048 C12Y301/03048 C12Y401/01015 G01N33/538 G01N33/543 G01N33/573 G01N2333/916 G01N2333/988 G01N2496/00 G01N2800/042		
代理人(译)	王颖		
优先权	2001028583 2001-11-28 GB		
其他公开文献	CN100439920C		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种筛选动物受试体体液样本中的分析物自身抗体的方法，该自身抗体与一种或多种抗原分子反应，该抗原分子选自胰腺胰岛细胞抗原分子和胰岛素或它们的一种或多种变异体、类似物、衍生物或片段，以及所述方法中使用的试剂盒。

