



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108414741 A

(43)申请公布日 2018.08.17

(21)申请号 201810055622.2

(22)申请日 2018.01.19

(71)申请人 苏庆宁

地址 518055 广东省深圳市南山西丽镇南
国丽城3栋G1505

申请人 祝胜郎

(72)发明人 不公告发明人

(74)专利代理机构 北京博华智恒知识产权代理
事务所(普通合伙) 11431

代理人 樊卫民 谭彦闻

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

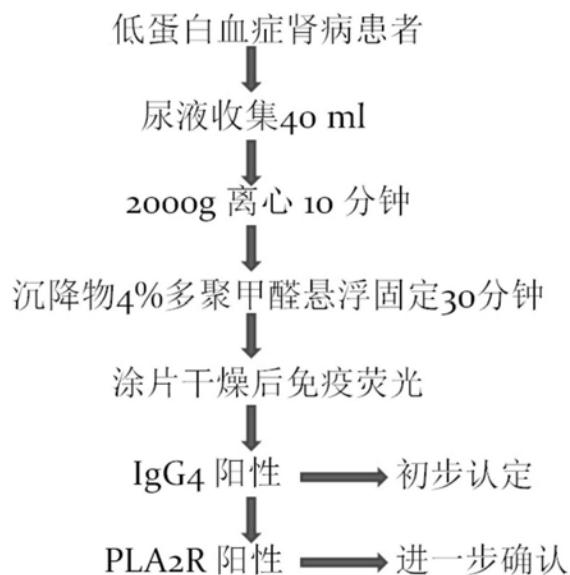
权利要求书1页 说明书8页 附图10页

(54)发明名称

一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测
用试剂中的用途

(57)摘要

本发明提供了一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途，所述免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种，所述膜性肾病无创检测包括在采集自受试者的生物样品中检测IgG4、PLA2R、Nephrin和NPHS2中的一种或多种。本发明提供的免疫组合物用于制备膜性肾病无创检测用试剂，该无创检测方法可以得到与肾脏活检高度一致的检测结果，对膜性肾病具有较高的检测准确性；而且该检测方法是非侵入性的，为膜性肾病的鉴别诊断提供了一种快速而无创的检测方法。



1. 一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途，所述免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种，所述膜性肾病无创检测包括在采集自受试者的生物样品中检测IgG4、PLA2R、Nephrin和NPHS2中的一种或多种。

2. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述生物样品是经过离心处理的尿液沉淀物，所述尿液沉淀物包含以下中的一种或多种：细胞、细胞碎片、以及附着在细胞或细胞碎片上的免疫复合物。

3. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述膜性肾病无创检测为免疫荧光检测。

4. 根据权利要求3所述的用途，其特征在于，所述免疫荧光检测按照以下步骤进行：

(1) 将所述免疫组合物作为一抗与所述采集自受试者的生物样品接触，形成抗体-抗原复合物，洗涤除去未结合的一抗；

(2) 加入荧光标记的二抗进行染色，洗涤除去未结合的二抗；

(3) 制片，使用荧光显微镜观察荧光标记信号的位置及分布。

5. 根据权利要求4所述的用途，其特征在于，所述染色为单独染色、双重染色、三重染色或其任意组合。

6. 根据权利要求5所述的用途，其特征在于，所述单独染色包括对IgG4或PLA2R单独进行免疫荧光染色。

7. 根据权利要求5所述的用途，其特征在于，所述双重染色包括对以下任一组合中的两种物质均进行免疫荧光染色：

组合(1) IgG4和PLA2R；

组合(2) IgG4和Nephrin；或

组合(3) IgG4和NPHS2。

8. 根据权利要求5所述的用途，其特征在于，所述三重染色包括对以下任一组合中的三种物质均进行免疫荧光染色：

组合(4) IgG4、PLA2R和Nephrin；或

组合(5) IgG4、PLA2R和NPHS2中。

9. 根据权利要求1所述的用途，其特征在于，所述膜性肾病无创检测为免疫印记检测。

10. 根据权利要求9所述的用途，其特征在于，所述免疫印迹检测包括在所述采集自受试者的生物样品中检测PLA2R的存在及其分子量。

一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途

技术领域

[0001] 本发明涉及膜性肾病的检测，具体涉及一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途。

背景技术

[0002] 我国慢性肾脏病(CKD)患病率为10.8%，膜性肾病(MN)是以肾小球基底膜上皮细胞下免疫复合物沉积伴基底膜增厚为特征的一组疾病，是成人肾病综合征的常见原因。膜性肾病在原发性肾小球疾病中约占6.0%-28.8%，成为继IgA肾病之后原发性肾小球疾病的第二病因，同时也是导致终末期肾脏疾病(ESRD)的重要病因。2016年南方医院侯凡凡院士团队的一项大规模研究显示，膜性肾病比例达23.4%，仅次于IgA肾病(28.1%)。

[0003] 根据发病原因是否明确，膜性肾病分为自发性膜性肾病(IMN)和继发性膜性肾病(SMN)。IMN是排除系统性红斑狼疮、感染、肿瘤和药物中毒等原因的原发性膜性肾病，占75% -80%。自发性膜性肾病(IMN)与继发性膜性肾病(SMN)在病因、治疗和预后等方面均有很大不同，因此对IMN和SMN的早诊断和鉴别诊断尤为重要。

[0004] 目前临床常用的肾脏疾病检测方法是肾脏活检，即肾穿刺检查，膜性肾病的检测和诊断也依赖于这种检查。然而，肾穿刺检查是一项较为复杂的、技术含量较高的检查方法，一般需要在三级以上医院及其相关检测机构配合进行，普及性较差。另外，肾穿刺是一种侵入性检测手段，受试者需要住院过夜以完成检查，因而难以成为慢性疾病治疗过程中明确疗效和预后所需的多次重复性检查手段。而且，肾穿刺还有引发内出血的风险。

[0005] 已有研究发现，自发性膜性肾病(IMN)的根本病因是针对M型磷脂酶A2受体(PLA2R)的自身抗体的存在，该M型磷脂酶A2受体在肾脏肾小球中表达。患有IMN的个体的血清中含有可检测量的这种自身抗体。根据这种自身抗体与IMN的相关性，可以利用PLA2R抗体的血清学检测作为自发性膜性肾病诊断和预后的指标。但是，临床实践表明，自发性膜性肾病患者血清PLA2R抗体阳性率仅为68.5%，仍有31.5%的特发性膜性肾病患者血清PLA2R抗体为阴性而难以有效检出。

[0006] 基于现有技术的上述缺陷，亟需开发出一种针对膜性肾病的高效、简单、非侵入的检测和诊断方法以及用于该方法的试剂。

发明内容

[0007] 本发明人经研究发现，膜性肾病患者体内的抗-PLA2R的自身抗体为免疫球蛋白家族(IgG)。本发明人还发现，在IMN患者的血液检测中，IMN患者的血清IgG水平与健康人相比明显下降，约65.75% IMN患者发生低IgG血症。而低IgG血症并非IMN的专一性指标，临幊上约56.47%的低IgG血症患者被确诊为IMN，约45.53%的低IgG血症患者被确诊为微小病变(MCD)。因此，当前的膜性肾病的血液检测具有局限性。

[0008] 本发明人还发现，膜性肾病患者尿液离心沉渣分离的肾足细胞和细胞碎片中PLA2R及其抗体检测呈阳性，并且其中抗体IgG的存在及其含量与膜性肾病相关。本发明人

据此发明出一种膜性肾病的无创检测方法以及以及用于该无创检测方法的试剂,以克服现有检测方法的不足和局限性。

[0009] 根据本发明,提供一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途,所述免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种,所述膜性肾病无创检测包括在采集自受试者的生物样品中检测 IgG4、PLA2R、Nephrin和NPHS2中的一种或多种。

[0010] 其中,所述生物样品是经过离心处理的尿液沉淀物,所述尿液沉淀物包含以下中的一种或多种:细胞、细胞碎片、以及附着在细胞或细胞碎片上的免疫复合物。

[0011] 其中,所述膜性肾病无创检测为免疫荧光检测。

[0012] 所述免疫荧光检测按照以下步骤进行:

[0013] (1) 将所述免疫组合物作为一抗与所述采集自受试者的生物样品接触,形成抗体-抗原复合物,洗涤除去未结合的一抗;

[0014] (2) 加入荧光标记的二抗进行染色,洗涤除去未结合的二抗;

[0015] (3) 制片,使用荧光显微镜观察荧光标记信号的位置及分布。

[0016] 上述步骤(2)中的所述染色为单独染色、双重染色、三重染色或其任意组合。

[0017] 其中,所述单独染色包括对IgG4或PLA2R单独进行免疫荧光染色。

[0018] 其中,所述双重染色包括对以下任一组合中的两种物质均进行免疫荧光染色:

[0019] 组合(1) IgG4和PLA2R;

[0020] 组合(2) IgG4和Nephrin;或

[0021] 组合(3) IgG4和NPHS2。

[0022] 其中,所述三重染色包括对以下任一组合中的三种物质均进行免疫荧光染色:

[0023] 组合(4) IgG4、PLA2R和Nephrin;或

[0024] 组合(5) IgG4、PLA2R和NPHS2中。

[0025] 所述膜性肾病无创检测还可以为免疫印迹检测。

[0026] 所述免疫印迹检测包括在所述采集自受试者的生物样品中检测PLA2R的存在及其分子量。

[0027] 本发明提供的免疫组合物用于制备膜性肾病的无创检测用试剂,其具有如下有益效果:

[0028] (1) 该无创检测方法可以得到与肾脏活检高度一致的检测结果,对膜性肾病具有较高的检测准确性;

[0029] (2) 该无创检测方法是非侵入性的,避免对受试者造成不必要的损伤,并且取样简便、检测快速简单;

[0030] (3) 本发明为膜性肾病的鉴别诊断提供了一种快速而无创的检测方法,为肾活检之外又一检测与诊断方式,并为慢性肾病长期治疗所需的疗效观察提供随时可检测的手段;

[0031] (4) 本发明提供的无创检测方法可以作为一种对特发性膜性肾病进行无创性检查的常规项目,为部分拒绝接受肾穿刺活检或有肾穿刺禁忌症的病人提供另外一种选择,或者作为判断是否需要肾穿刺活检之前的初步检测,也为无条件开展肾穿刺活检的医疗单位能够对特发性膜性肾病患者进行及时诊断和治疗提供新的方法。

附图说明

- [0032] 图1示出根据本发明一种实施方式的待测样品的分离方法流程图。
- [0033] 图2示出根据本发明一种实施方式的待测样品分离及检测方法流程图。
- [0034] 图3示出根据本发明一种实施方式的膜性肾病患者的免疫荧光测试结果,其示出了IgG4与NPHS2的免疫荧光信号。
- [0035] 图4示出根据本发明一种实施方式的膜性肾病患者的免疫荧光测试结果,其示出了PLA2R与Nephrin的免疫荧光信号。
- [0036] 图5示出正常健康受试者的IgG4免疫荧光检测图像。
- [0037] 图6-7示出膜性肾病患者的IgG4免疫荧光检测图像,其中,图6示出完整细胞上的IgG4信号,图7示出细胞碎片上的IgG4信号。
- [0038] 图8示出局灶节段肾小球硬化(FSGS)患者的IgG4免疫荧光检测图像。
- [0039] 图9示出糖尿病肾病(DN)患者的IgG4免疫荧光检测图像。
- [0040] 图10示出微小病变肾病(MCD)患者的IgG4免疫荧光检测图像。
- [0041] 图11示出IgA肾病患者的IgG4免疫荧光检测图像。
- [0042] 图12示出膜性肾病患者尿液中IgG4和PLA2R双重染色的免疫荧光检测图像。
- [0043] 图13示出膜性肾病患者尿液中IgG4和肾足细胞标记物 NPHS2双重染色的免疫荧光检测图像。
- [0044] 图14示出膜性肾病患者尿液中PLA2R和肾足细胞标记物 Nephrin双重染色的免疫荧光检测图像。
- [0045] 图15示出膜性肾病患者、正常受试者和其他肾病患者尿液的Western Blot检测结果。

具体实施方式

- [0046] 下面通过附图和具体实施方式对本发明进一步详细说明。通过这些说明,本发明的特点和优点将变得更为清楚明确。
- [0047] 本发明上下文所使用的术语“阳性”是指具有可检出的检测信号。
- [0048] 本发明上下文所使用的“在一种实施方式中”和“在另一种实施方式中”可以指代相同的实施方式,也可以指代不同的实施方式。
- [0049] 本发明提供一种针对受试者尿液细胞及细胞碎片中膜性肾病生物标志物的检测方法以及用于该检测方法的试剂,其检测结果类似于肾脏活检的检查结果。本发明为膜性肾病的鉴别诊断和愈后检验提供了一种快速而无创的检测方法,成为肾脏活检之外的又一检测与诊断方式,并为慢性肾病长期治疗所需的疗效观察提供随时可检测的手段。
- [0050] 根据本发明,提供一种免疫组合物,该免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种。
- [0051] 根据本发明,所述免疫组合物可以与IgG4、PLA2R、肾足细胞标志物Nephrin和肾足细胞标志物NPHS2中的一种或多种特异性结合,生成免疫复合物,从而进一步通过免疫荧光检测或免疫印迹检测来检测IgG4、PLA2R、肾足细胞标志物Nephrin 和肾足细胞标志物NPHS2中的一种或多种的存在和分布。

[0052] 在一种实施方式中,所述免疫组合物作为免疫荧光检测中的一抗。

[0053] 根据本发明,还提供一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途,所述免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种,所述膜性肾病无创检测包括在采集自受试者的生物样品中检测 IgG4、PLA2R、Nephrin和NPHS2中的一种或多种。

[0054] 在根据本发明的一种实施方式中,所述膜性肾病无创检测为免疫荧光检测。

[0055] 所述免疫荧光检测按照以下步骤进行:

[0056] (1) 将所述免疫组合物作为一抗与所述采集自受试者的生物样品接触,形成抗体-抗原复合物,洗涤除去未结合的一抗;

[0057] (2) 加入荧光标记的二抗进行染色,洗涤除去未结合的二抗;

[0058] (3) 制片,使用荧光显微镜观察荧光标记信号的位置及分布。

[0059] 在一种实施方式中,上述步骤(2)中的所述染色为单独染色、双重染色、三重染色或其任意组合。

[0060] 其中,所述单独染色包括对IgG4或PLA2R单独进行免疫荧光染色。

[0061] 其中,所述双重染色包括对以下任一组合中的两种物质均进行免疫荧光染色:

[0062] 组合(1) IgG4和PLA2R;

[0063] 组合(2) IgG4和Nephrin;或

[0064] 组合(3) IgG4和NPHS2。

[0065] 其中,所述三重染色包括对以下任一组合中的三种物质均进行免疫荧光染色:

[0066] 组合(4) IgG4、PLA2R和Nephrin;或

[0067] 组合(5) IgG4、PLA2R和NPHS2中。

[0068] 在根据本发明的另一种实施方式中,所述膜性肾病无创检测还可以为免疫印记检测。所述免疫印迹检测包括在所述采集自受试者的生物样品中检测PLA2R的存在及其分子量。

[0069] 在根据本发明的一种实施方式中,所述膜性肾病的无创检测方法包括以下步骤:

[0070] (1) 对采集自受试者的生物样品进行分离,得到待测样品;和

[0071] (2) 在所述待测样品中检测抗-PLA2R的一种或多种自身抗体。

[0072] 待测样品的分离

[0073] 本发明所述采集自受试者的生物样品优选为尿液,可以通过本领域已知的任何方式进行采集。

[0074] 本发明所述受试者是哺乳动物。在一种实施方式中,所述受试者是人类。在另一种实施方式中,所述受试者是肾病患者。在另一种实施方式中,所述受试者是表现为低蛋白血症的肾病患者。在另一种实施方式中,所述受试者是疑似患有膜性肾病的人类受试者。

[0075] 本发明提供一种对尿液中细胞及细胞碎片进行分离的方法。该方法通过离心收集尿液中的细胞及细胞碎片,从而成功地将细胞或细胞碎片表面的附着性免疫复合物与一般溶解性蛋白分子进行分离,为后续的检测步骤提供技术支持。

[0076] 该方法能够排除免疫复合物检测中存在的干扰性问题。该方法将待测样品进行有效浓缩,在去除可溶性干扰物的同时,还大大提高了检测的灵敏度,使原来难以检出的低含量成分能够轻易地检测出来。

[0077] 在根据本发明的一种实施方式中，尿液样品经离心沉降得到的沉降物进行盖玻片或载玻片涂片，或者经固定后再进行涂片，从而用于检测，所述检测包括但不限于免疫荧光检测、免疫化学检测、生化检测中的一种或多种。在一种实施方式中，所述尿液样品为10-40ml。在一种实施方式中，所述尿液样品经过1000-4000转/分钟离心，优选离心5-20分钟，更优选离心10分钟。

[0078] 在一种实施方式中，离心沉降可以用多次甩片的方式替代。

[0079] 在一种实施方式中，所述沉降物经过进一步离心洗涤以去除尿液中的可溶性蛋白，再将洗涤后的沉降物重悬溶解以便用于检测。

[0080] 在一种实施方式中，所述沉降物经过悬浮固定，优选用多聚甲醛进行悬浮固定。在一种实施方式中，采用0.5ml的4%多聚甲醛悬浮固定30分钟。

[0081] 在一种实施方式中，将经过上述处理后的待测样品滴于盖玻片或载玻片上，或者用甩片机将待测样品甩在盖玻片上并干燥。

[0082] 所述待测样品包含以下中的一种或多种：细胞、细胞碎片、以及附着在细胞或细胞碎片上的免疫复合物。

[0083] 待测样品的检测

[0084] 在根据本发明的一种实施方式中，在所述待测样品中检测抗-PLA2R的一种或多种自身抗体。所述抗-PLA2R的一种或多种自身抗体是免疫球蛋白家族中的一种或多种。在一种实施方式中，所述免疫球蛋白是IgG4。

[0085] 在根据本发明的一种实施方式中，所述检测方法还包括在所述待测样品中检测PLA2R受体。

[0086] 在根据本发明的一种实施方式中，所述检测方法还包括在所述待测样品中检测IgG4-PLA2R免疫复合物。

[0087] 在根据本发明的一种实施方式中，所述检测方法还包括在所述待测样品中检测一种或多种肾足细胞标志物。在一种实施方式中，所述一种或多种肾足细胞标志物是Nephrin、NPHS2 或二者的组合。在一种实施方式中，所述肾足细胞中Nephrin 和NPHS2中的至少一者在检测中呈阳性。

[0088] 在根据本发明的一种实施方式中，以下两种或两种以上物质的共同存在指示所述受试者患有膜性肾病：PLA2R受体、抗-PLA2R的一种或多种自身抗体、PLA2R受体-抗体免疫复合物、一种或多种肾足细胞标志物。

[0089] 在一种实施方式中，所述PLA2R受体的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。在一种实施方式中，所述与IgG4共定位的PLA2R受体的存在指示所述受试者患有膜性肾病。

[0090] 在一种实施方式中，所述抗-PLA2R的一种或多种自身抗体的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。在一种实施方式中，IgG4的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。

[0091] 在一种实施方式中，所述IgG4-PLA2R免疫复合物的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。

[0092] 在一种实施方式中，所述一种或多种肾足细胞标志物的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。在一种实施方式中，所述与IgG4共定位的一种或多种肾足细胞标志物的存在指示所述受试者患有膜性肾病。在一种实施方式中，肾足细胞中 Nephrin和NPHS2中至少一者的存在单独指示所述受试者患有膜性肾病。在一种实施方式中，肾足细胞中Nephrin和

NPHS2 中至少一者的存在与PLA2R受体、IgG4抗体、IgG4-PLA2R免疫复合物中至少一者的存在共同指示所述受试者患有膜性肾病。

[0093] 在一种实施方式中,对所述待测样品进行免疫荧光检测、免疫化学检测、生化检测中的一种或多种。

[0094] 所述免疫荧光检测通过对以下物质中的一种或多种进行免疫荧光染色,从而检测这些物质的存在和分布,所述物质为 PLA2R受体、抗-PLA2R的一种或多种自身抗体、PLA2R受体- 抗体免疫复合物、一种或多种肾足细胞标志物。

[0095] 所述染色为单独染色、双重染色、三重染色或其任意组合。组合包括但不限于以下方式:

[0096] 组合1:

[0097] 单独染色:IgG4或PLA2R

[0098] 双重染色:IgG4和NPHS2 (或Nephrin)

[0099] 组合2:

[0100] 双重染色:IgG4和PLA2R

[0101] 双重染色:IgG4和NPHS2 (或Nephrin)

[0102] 组合3:

[0103] 三重染色:IgG4、PLA2R和NPHS2 (或Nephrin)

[0104] 在一种实施方式中,在所述待测样品的免疫荧光检测中, PLA2R受体、IgG4抗体、IgG4-PLA2R免疫复合物中的至少一者与肾足细胞标志物的共定位指示所述受试者患有膜性肾病。

[0105] 在一种实施方式中,在所述待测样品的免疫荧光检测中, PLA2R受体、IgG4抗体、IgG4-PLA2R免疫复合物中的至少一者的阳性信号减弱或转阴指示膜性肾病患者疾病有所好转或完全痊愈。

[0106] 在一种实施方式中,所述无创检测方法可以与血液检测联合应用,用于弥补膜性肾病血液检测的不足。在另一种实施方式中,所述无创检测方法也可以独立地用于膜性肾病的诊断和愈后检验。另一种实施方式中,所述无创检测方法还可以用作判断是否需要进行肾穿刺活检的初步检测。

[0107] 实施例

[0108] 实施例1分离

[0109] 如图1所示,对采集自受试者的尿液样品进行分离,具体如下:

[0110] 采集受试者的40ml新鲜尿液样品,经1000-4000转/分钟离心10分钟,收集沉降物(含有细胞及细胞碎片)。将沉淀物用 PBS重悬,再次经1000-4000转/分钟离心10分钟,洗去残留的可溶性蛋白,收集沉降物。沉降物用PBS重悬并分装成三份待测样品I、II、III。

[0111] 其中,待测样品I用0.5ml的4%多聚甲醛悬浮固定30分钟,用于免疫组化、免疫荧光。电镜等观察性检测。待测样品II中加入凝胶电泳缓冲液,用于免疫印迹检测(Western Blot)。待测样品III中加入蛋白酶抑制剂,置于-80℃保存,用于蛋白组学芯片等检测。

[0112] 实施例2免疫荧光检测

[0113] 如图2所示,对待测样品进行免疫荧光检测,具体如下:

[0114] 利用抗人IgG4抗体、抗人PLA2R抗体、抗人NPHS2抗体和抗人IgA抗体作为一抗,抗

体血清来源为小鼠、兔或羊,单抗或多抗;

[0115] 利用FITC、Cy3和Cy5等荧光标记的驴抗鼠、驴抗兔或驴抗羊抗体为二抗;

[0116] 检测方式为单染(一种一抗)、双染(两种一抗)或三染(三种一抗);

[0117] 免疫荧光一抗抗体用含1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(PBS)稀释100-200倍,孵育抗体前先用含0.2%Triton和1%BSA的PBS(PBST)孵育15-30分钟,一抗孵育过夜或2-3小时;

[0118] 免疫荧光二抗抗体也用含1%牛血清白蛋白(BSA)的磷酸缓冲液(PBS)稀释100-200倍,孵育时间1-2小时;

[0119] 一抗和二抗孵育后均用PBS洗3次,每次10分钟;

[0120] 二抗孵育完并用PBS洗后,用水洗一次然后用DAPI染5分钟,水洗3次后封片;

[0121] 一抗可采用直接偶联有荧光素或酶的相应抗体进行直接免疫荧光检测。

[0122] 检测图像如图3和4所示,膜性肾病患者的IgG4阳性信号多呈颗粒状或小团块状的碎片,这些碎片在显微镜明场(DIC)图像中与细胞和其他细胞碎片相比略显扁平和不清。

[0123] 实施例3不同肾病患者及正常受试者的尿液IgG4免疫荧光检测

[0124] 按照本发明上文所述的无创检测方法,对采集自正常的健康受试者、膜性肾病患者、局灶节段肾小球硬化(FSGS)患者、糖尿病肾病(DN)患者、微小病变肾病(MCD)患者、IgA肾病患者的尿液分别进行IgG4免疫荧光检测,检测图像见图5-11。

[0125] 图5为正常健康受试者的免疫荧光检测图像,如图所示,正常人尿液沉降物IgG4信号为阴性。

[0126] 图6-7为膜性肾病患者的免疫荧光检测图像,图6为完整细胞上的IgG4信号,图7为细胞碎片上的IgG4信号。如图所示,IgG4阳性信号多为细胞碎片,少部分在完整细胞上。

[0127] 图8为局灶节段肾小球硬化(FSGS)患者的免疫荧光检测图像,如图所示,IgG4信号为阴性。

[0128] 图9为糖尿病肾病(DN)患者的免疫荧光检测图像,如图所示,IgG4信号为阴性。

[0129] 图10为微小病变肾病(MCD)患者的免疫荧光检测图像,如图所示,IgG4信号为阴性。

[0130] 图11为IgA肾病患者的免疫荧光检测图像,如图所示,少数IgA肾病患者具有微弱的IgG4信号。

[0131] 实施例4膜性肾病患者的尿液双重染色免疫荧光检测

[0132] 按照本发明上文所述的无创检测方法,对采集自膜性肾病患者的尿液进行双重染色免疫荧光检测,检测图像见图12-14。

[0133] 图12为尿液中IgG4和PLA2R双重染色的免疫荧光检测图像,如图所示,膜性肾病患者尿液中IgG4与PLA2R分布一致。

[0134] 图13为尿液中IgG4和肾足细胞标记物NPHS2双重染色的免疫荧光检测图像,如图所示,IgG4和NPHS2共定位。

[0135] 图14为尿液中PLA2R和肾足细胞标记物Nephrin双重染色的免疫荧光检测图像,如图所示,PLA2R与Nephrin共定位。

[0136] 膜性肾病尿沉降物中完整肾足细胞数量不多,IgG4与肾足细胞标记物(NPHS2)重合,但这部分沉降物仅占IgG4阳性信号的很少部分;

[0137] 膜性肾病PLA2R阳性信号与IgG4信号特征相同,其他肾病偶见PLA2R阳性信号,但这些信号经常较弱且IgG4为阴性或不与IgG4共定位。

[0138] 实施例5免疫印迹检测

[0139] 对采集自膜性肾病患者(3例)、正常受试者(1例)和其他肾病患者(3例)的尿液进行Western Blot检测,结果见图15。

[0140] 如图15所示,三例膜性肾病患者尿液样品在免疫荧光检测和Western blot检测中PLA2R信号均为阳性,但3号患者的肾穿刺免疫荧光中PLA2R信号为阴性,这表明膜性肾病的肾穿刺检测具有不足。Western Blot结果表明3号患者尿液中PLA2R的分子量明显不同于1号和2号患者,这可能是PLA2R基因表达产物的差异、基因变异或蛋白降解所造成,这也是不同来源的PLA2R抗体(抗原表位不同)得出不同结果的原因。

[0141] 上述说明示出并描述了本发明的一种实例,但如前所述,应当理解本发明并非局限于本文所披露的形式,不应看作是对其他实施例的排除,而可用于各种其他组合、修改和环境,并能够在本文所述发明构想范围内,通过上述教导或相关领域的技术或知识进行改动。而本领域人员所进行的改动和变化不脱离本发明的精神和范围,则都应在本发明所附加权利要求的保护范围内。

[0142] 以上结合优选实施方式和范例性实例对本发明进行了详细说明。不过需要声明的是,这些具体实施方式仅是对本发明的阐述性解释,并不对本发明的保护范围构成任何限制。在不超出本发明精神和保护范围的情况下,可以对本发明技术内容及其实施方式进行各种改进、等价替换或修饰,这些均落入本发明的保护范围内。本发明的保护范围以所附权利要求为准。

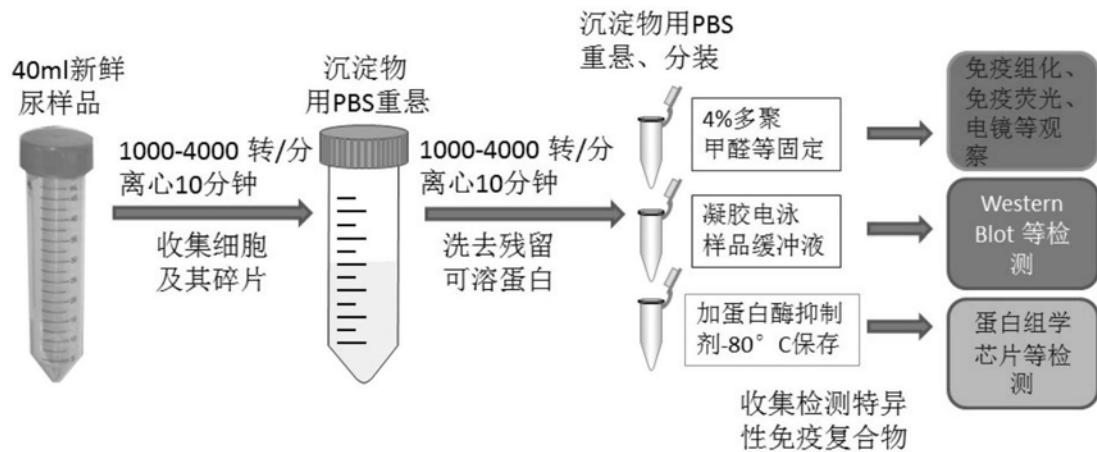


图1

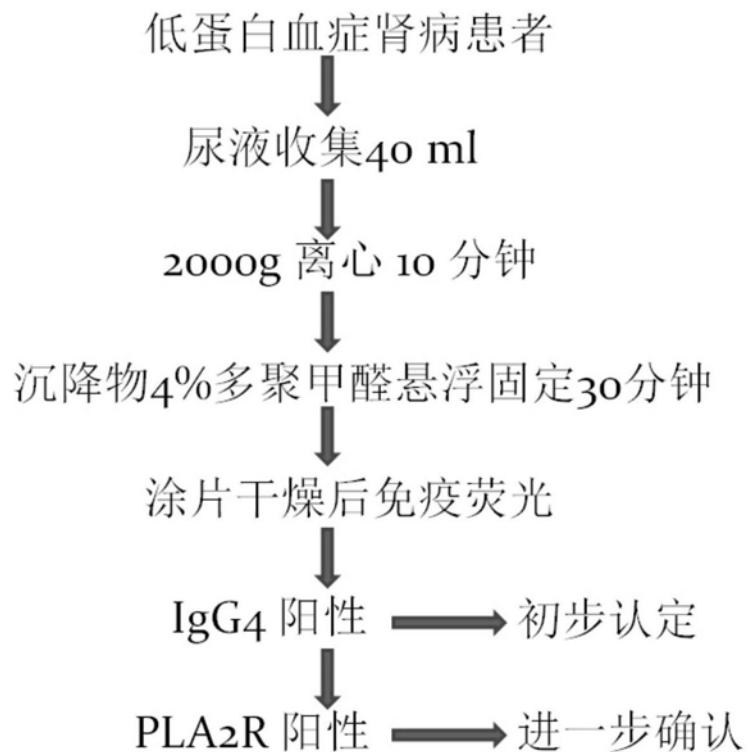


图2

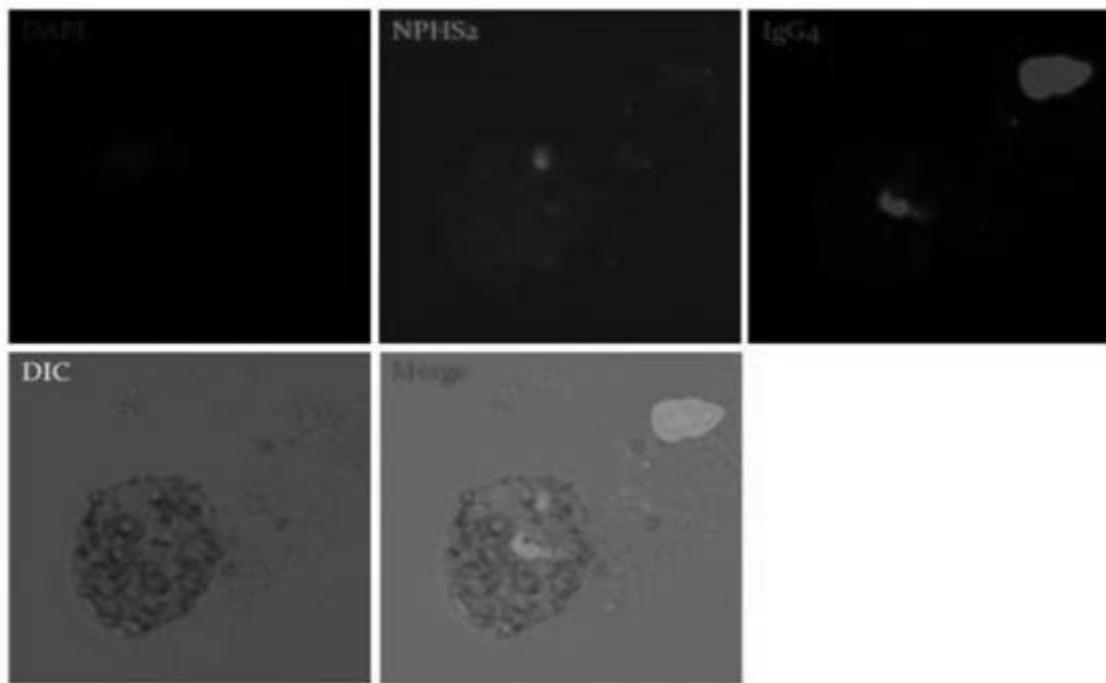


图3

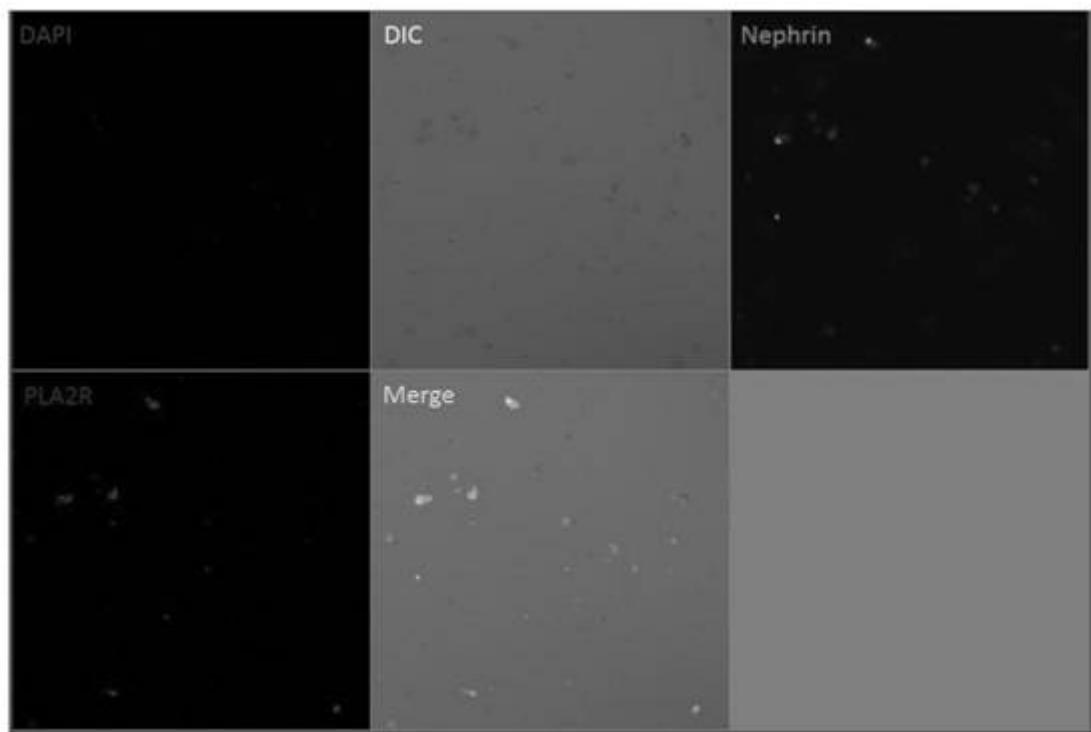


图4

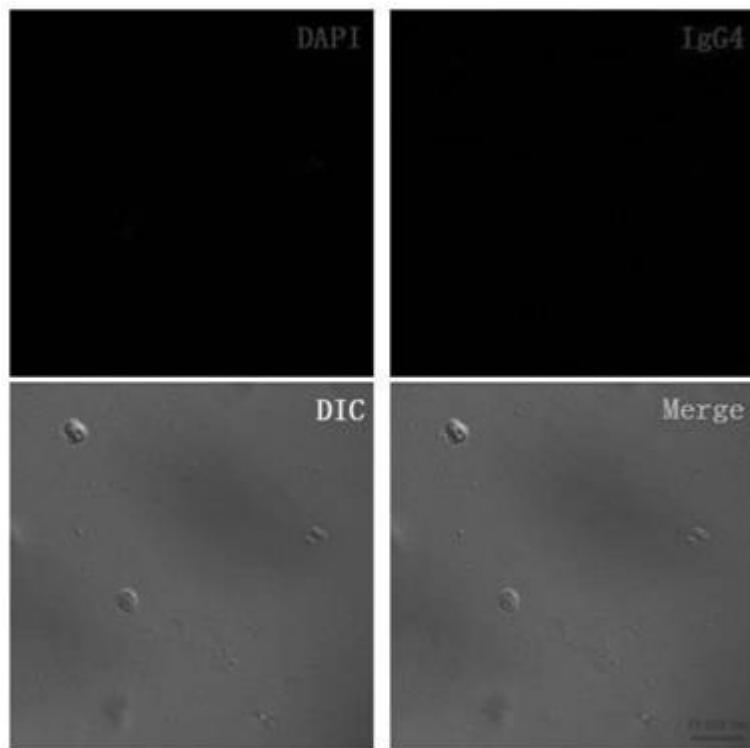


图5

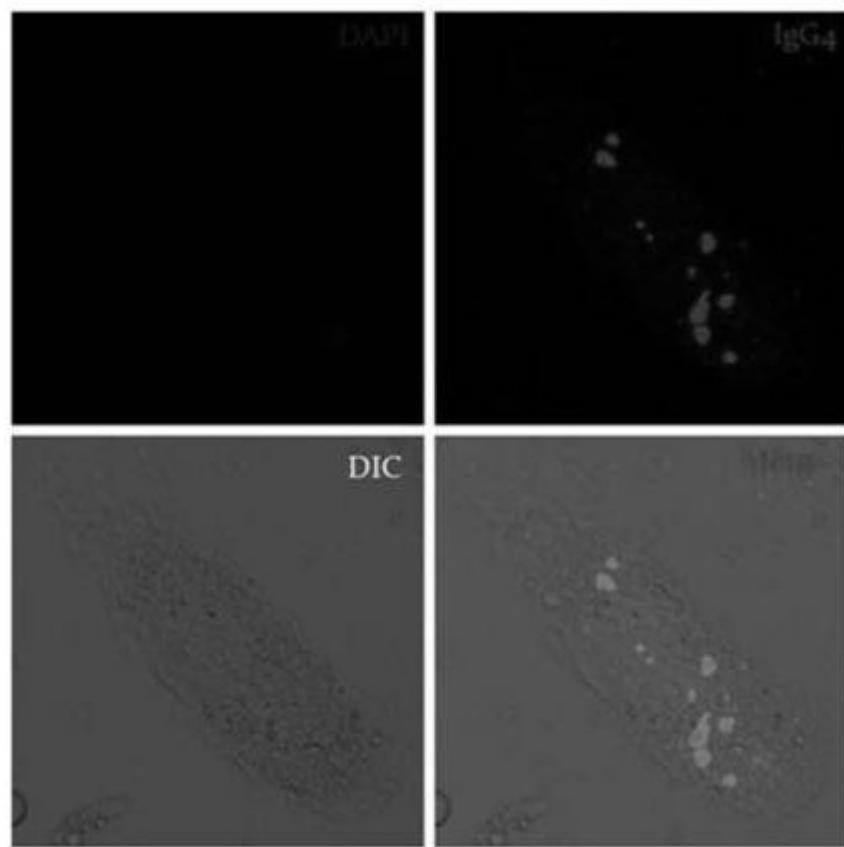


图6

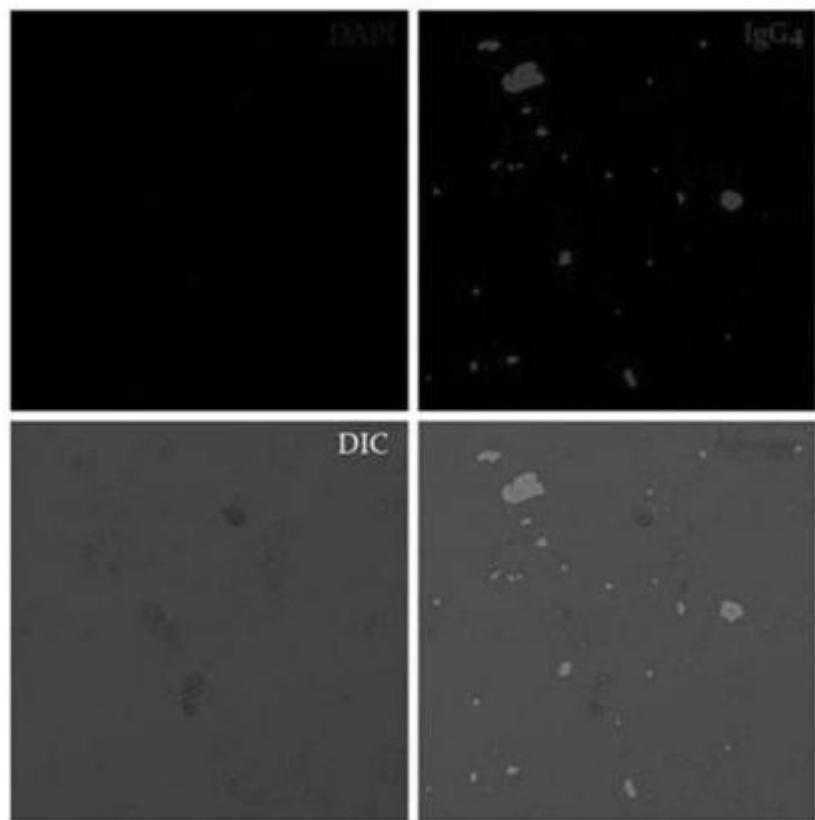


图7

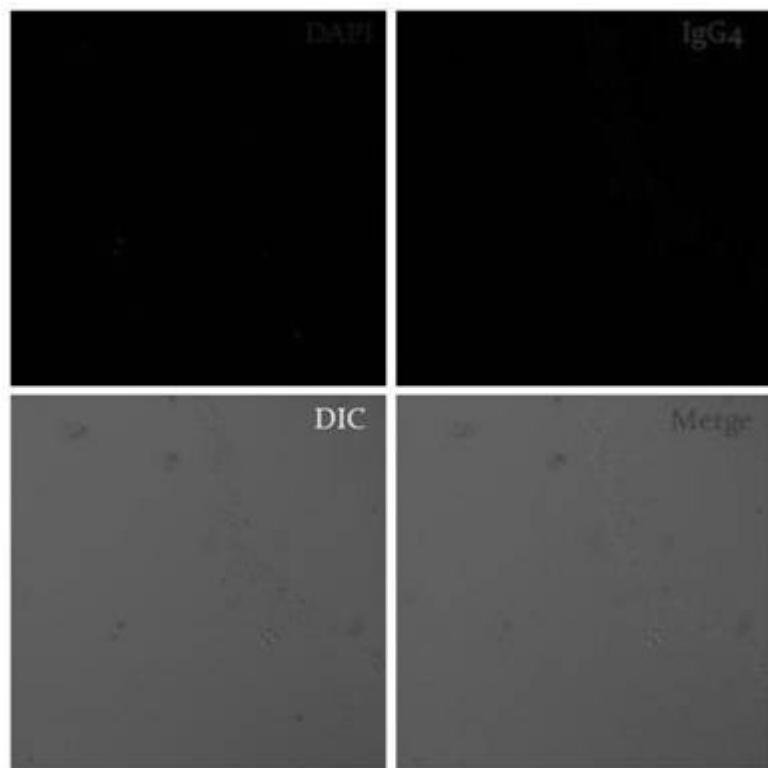


图8

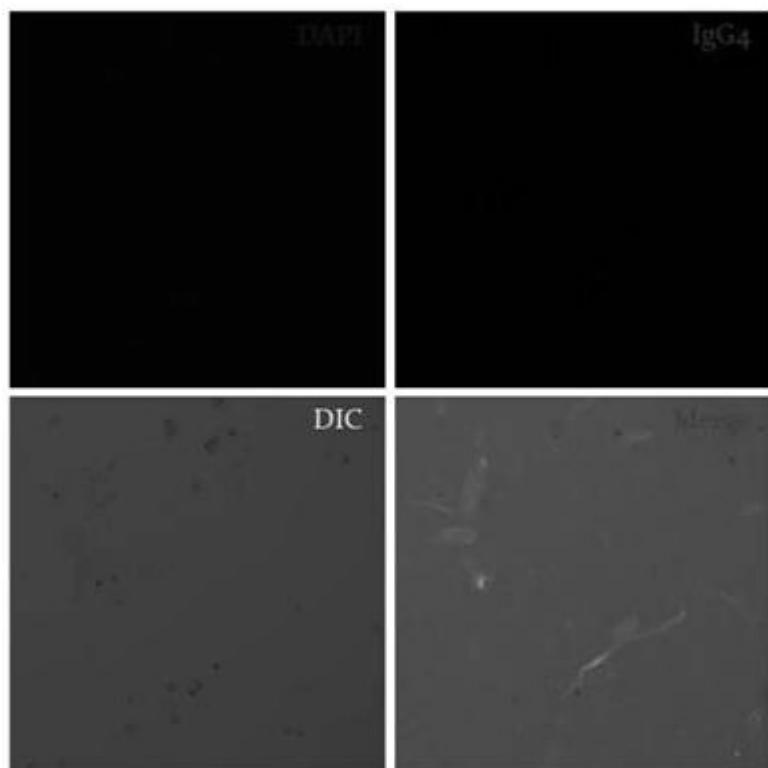


图9

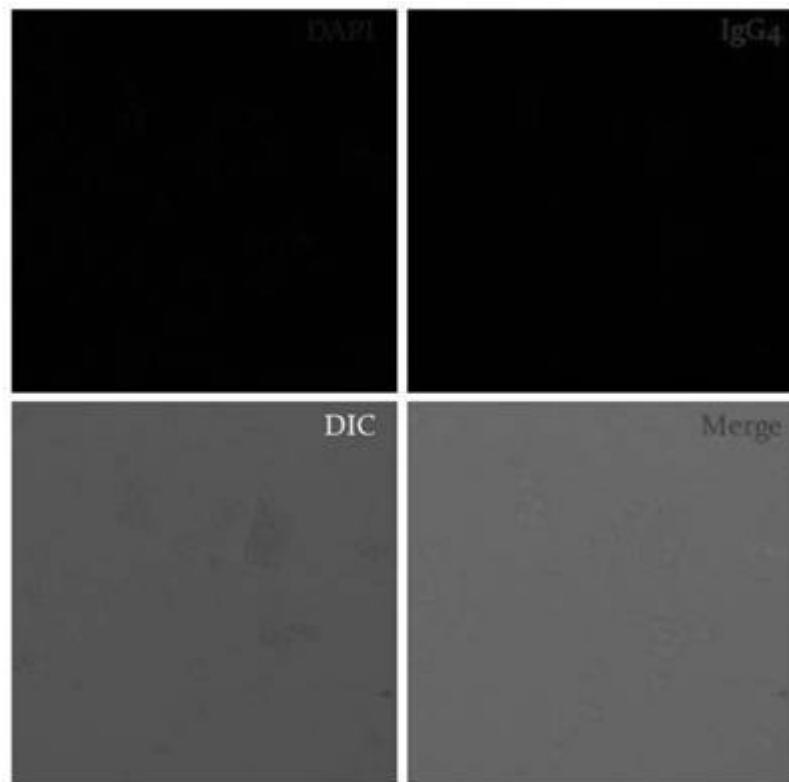


图10

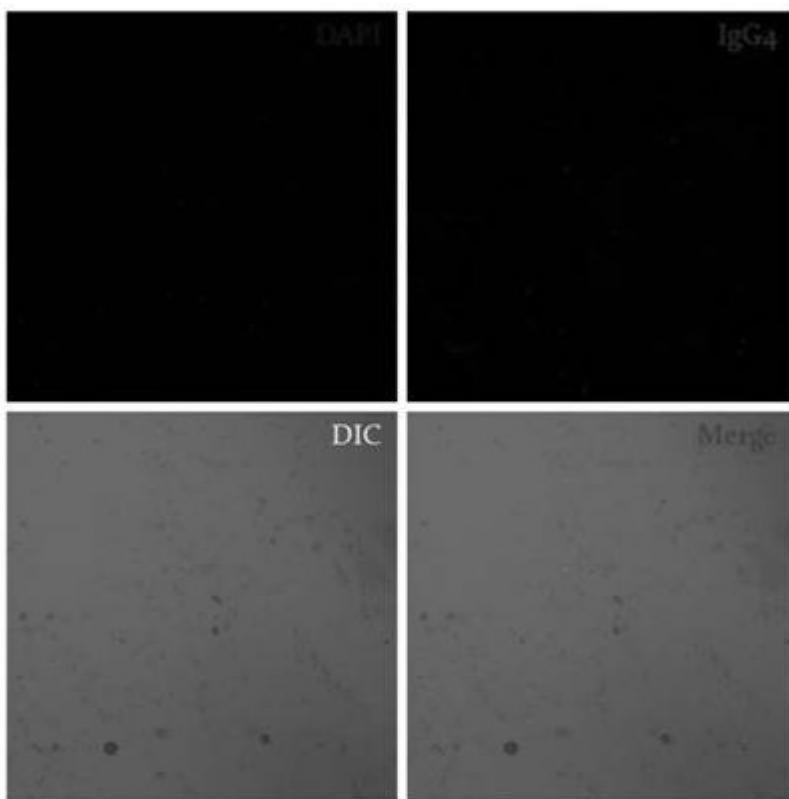


图11

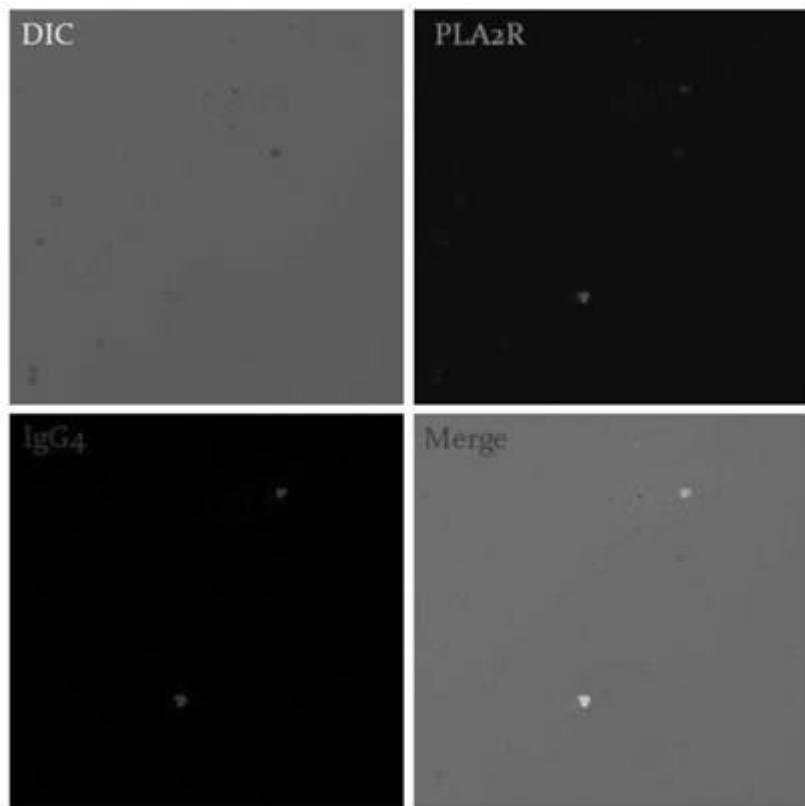


图12

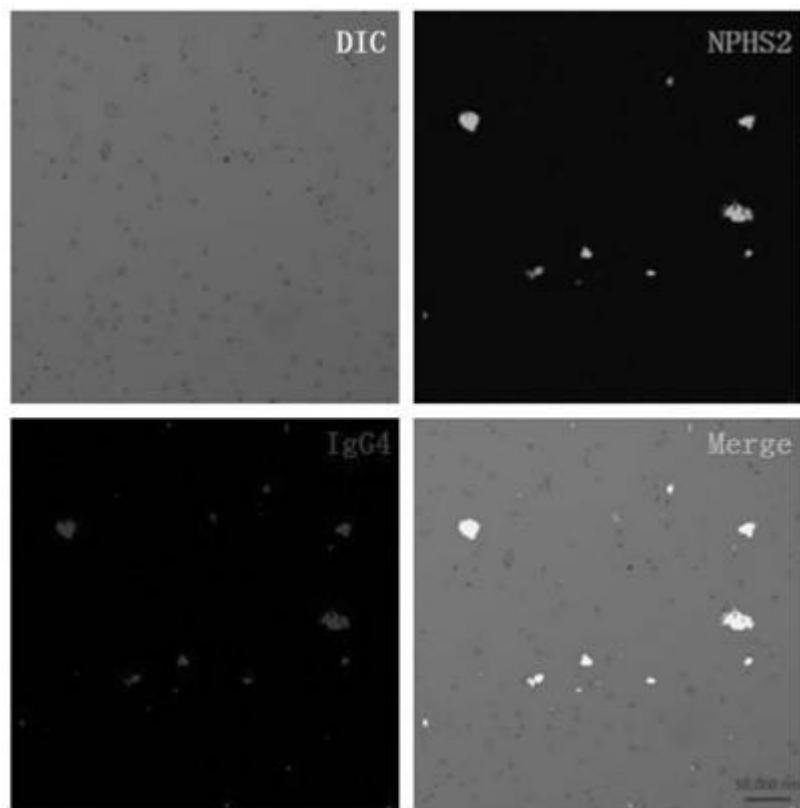


图13

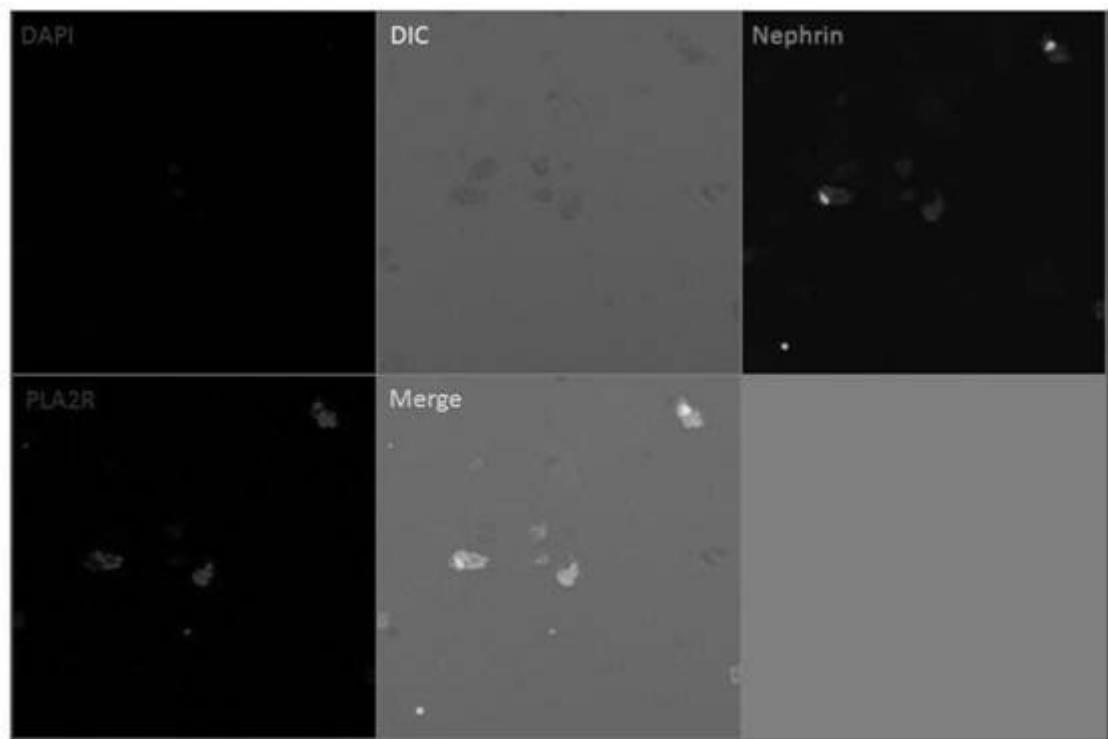


图14

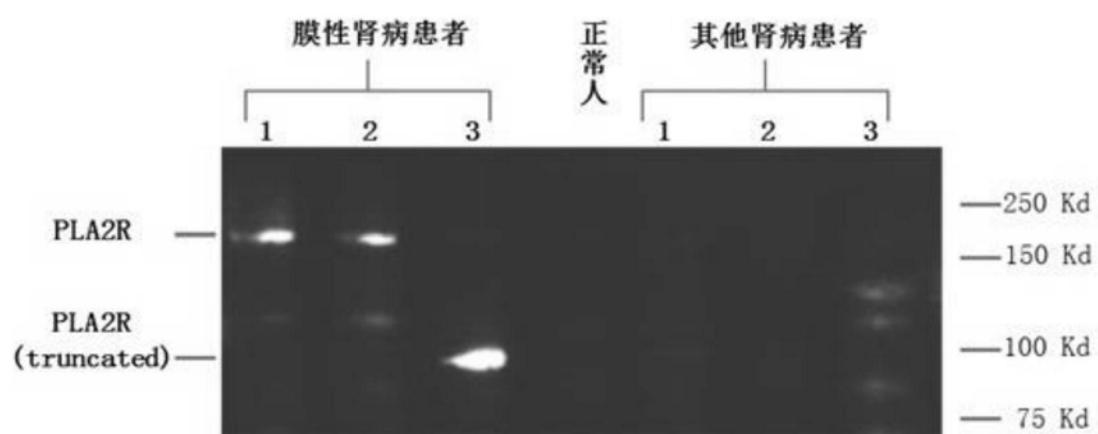


图15

专利名称(译)	一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途		
公开(公告)号	CN108414741A	公开(公告)日	2018-08-17
申请号	CN201810055622.2	申请日	2018-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	苏庆宁		
申请(专利权)人(译)	苏庆宁		
当前申请(专利权)人(译)	苏庆宁		
[标]发明人	不公告发明人		
发明人	不公告发明人		
IPC分类号	G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533		
其他公开文献	CN108414741B		
外部链接	Espacenet	Sipo	

摘要(译)

本发明提供了一种免疫组合物在制备膜性肾病无创检测用试剂中的用途，所述免疫组合物包括抗-IgG4抗体、抗-PLA2R抗体、抗-Nephrin抗体和抗-NPHS2抗体中的一种或多种，所述膜性肾病无创检测包括在采集自受试者的生物样品中检测IgG4、PLA2R、Nephrin和NPHS2中的一种或多种。本发明提供的免疫组合物用于制备膜性肾病无创检测用试剂，该无创检测方法可以得到与肾脏活检高度一致的检测结果，对膜性肾病具有较高的检测准确性；而且该检测方法是非侵入性的，为膜性肾病的鉴别诊断提供了一种快速而无创的检测方法。

