



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103969234 B

(45)授权公告日 2017.02.15

(21)申请号 201410154456.3

(22)申请日 2014.04.17

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103969234 A

(43)申请公布日 2014.08.06

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

(72)发明人 唐东起 李世武 吴琦 苏红霞

(74)专利代理机构 济南信达专利事务所有限公司 37100

代理人 罗文墨

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

(56)对比文件

CN 101608222 A,2009.12.23,

CN 1423131 A,2003.06.11,

CN 202502099 U,2012.10.24,

CN 103116030 A,2013.05.22,

CN 101563597 A,2009.10.21,

US 2008300170 A1,2008.12.04,

刘松梅等.糖尿病线粒体DNA常见易感基因位点检测芯片的研制.《中华检验医学杂志》.2006,第29卷(第12期),

审查员 彭倩筠

权利要求书2页 说明书5页
序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种荧光素酶-多抗原融合蛋白以及蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物

(57)摘要

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

序号	GAD-65 抗原	IA-2a 抗原	IA-2b 抗原	ICA	检测结果
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	+	+	+
12	+	+	+	+	+
13	+	+	+	+	+
14	+	+	+	+	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	+	+	+	+	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	96%	100%	83%	80%	100%

1. 荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于:该荧光素酶-多抗原融合蛋白通过以下步骤获得:

A、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

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

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

B、质粒转化

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

C、融合蛋白的获取

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

D、重组融合蛋白的纯化

把步骤C所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08 mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;即得荧光素酶-多抗原融合蛋白。

2. 根据权利要求1所述的荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于所述:

GAD65抗原基因序列是:SEQ ID NO.1 ;

IA-2a抗原基因序列是:SEQ ID NO.2 ;

IA-2b抗原基因序列是:SEQ ID NO.3 ;

insulin抗原基因序列是:SEQ ID NO.4 。

3. 根据权利要求1所述的荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于:PCR扩增的反应条件程序:90℃~95℃变性5~10分钟;然后93℃~98℃变性45~60秒,45℃~50℃退火30~45秒,65℃~70℃延伸50~60秒,进行25~30个循环;最后70℃~75℃延伸10~15分钟,0~4℃保温。

4. 根据权利要求1所述的荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于:所述荧光素酶基因为RanIIIa荧光素酶基因。

5. 根据权利要求1所述的荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于:哺乳细胞系统为293改良细胞。

6. 根据权利要求1所述的荧光素酶-多抗原融合蛋白,其特征在于:E、将步骤D所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L,pH7.0~8.0 PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每微升中有 10^7 ~ 10^8 个荧光单位。

7. 蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物,其特征在于:该蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物通过以下步骤获得:

A、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

a、选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列:GAD65抗原基因序列、IA-2a抗原基因

序列、IA-2b抗原基因序列和insulin抗原基因序列,进行PCR扩增,在kpnI位点GGTACC引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

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

B、质粒转化

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

C、融合蛋白的获取

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

D、重组融合蛋白的纯化

把步骤C所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08 mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;即得荧光素酶-多抗原融合蛋白;

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

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

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

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

8. 根据权利要求7所述的蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物,其特征在于所述:

GAD65抗原基因序列是:SEQ ID NO.1 ;

IA-2a抗原基因序列是:SEQ ID NO.2 ;

IA-2b抗原基因序列是:SEQ ID NO.3 ;

insulin抗原基因序列是:SEQ ID NO.4 ;

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

所述荧光素酶基因为RanIIa荧光素酶基因;

哺乳细胞系统为293改良细胞。

一种荧光素酶-多抗原融合蛋白以及蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物

技术领域

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

背景技术

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

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

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

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

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

发明内容

[0007] 本发明的技术任务是解决现有技术的不足,提供一种快速简便、准确率高的,并可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法。

[0008] 本发明的技术方案是按以下方式实现的,该可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法,其特征在于:将荧光素酶基因与多抗原基因融合成融合载体,所述多抗原采用能够免疫应答产生I型糖尿病的病人血清中自身免疫性抗体的抗原,

[0009] 然后利用细胞转化技术,将融合载体导入哺乳细胞系统中,进行荧光素酶-多抗原融合蛋白的表达;裂解基因重组细胞,获得荧光素酶-多抗原融合蛋白;然后利用免疫沉淀反应,将荧光素酶-多抗原融合蛋白稀释液与病人血清混合进行特异性结合,获得融合蛋

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

[0010] 可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法,包括以下步骤:

[0011] A、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

[0012] a、选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列(GAD65抗原基因序列、IA-2a抗原基因序列、IA-2b抗原基因序列和insulin抗原基因序列),进行PCR扩增,在kpnI位点(GGTACC)引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

[0013] b、将获得的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpnI和xbaI双酶切,并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒;

[0014] B、质粒转化

[0015] 将重组质粒转入制备好的感受态哺乳细胞系统中,在氨苄耐药基因平皿中筛选阳性克隆,从转化细胞内提取质粒DNA,然后质粒DNA进行PCR鉴定及kpnI和xbaI双酶切鉴定;

[0016] C、融合蛋白的获取

[0017] 挑取单菌落至含有8%~15% I型糖尿病的病人血清的DMEM培养液中27℃~31℃下培养50~60h,于0~4℃,6000~8000rpm离心15~20min;将得到的细胞沉淀用磷酸盐缓冲液洗涤并离心2~3次,最后将收获的细胞在冰浴中超声处理15~30 min,然后将细胞裂解液于0~4℃,最大转速离心15~45 min后取上清液;

[0018] D、重组融合蛋白的纯化

[0019] 把步骤C所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.05~0.08 mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗2~3次,后冻干备用;

[0020] E、将步骤D所得融合蛋白用0.01~0.02mol/L, pH7.0~8.0 PBS磷酸盐缓冲液进行一定倍数的梯度稀释得融合蛋白稀释液,要求融合蛋白稀释液每微升中有 10^7 ~ 10^8 个荧光单位;

[0021] F、向离心管中加入50μL~80μL的融合蛋白稀释液,然后加入80~140 μL 预处理好的实验组的病人血清,在室温下,让I型糖尿病自身抗体与抗原特异性结合3~5h;

[0022] G、再加入2~8 μL蛋白A琼脂糖,来捕捉融合蛋白-抗体复合物,0℃~4℃缓慢摇动融合蛋白-抗体复合物过夜或室温缓慢摇动1~2h,使抗体与蛋白A琼脂糖偶连得到蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物;

[0023] H、免疫沉淀反应后,在0℃~4℃以3000 rpm 速度离心3~5 min,将蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物离心至管底;将上清小心吸去,沉淀用磷酸盐缓冲液将蛋白A琼脂糖-抗体复合物悬起离心洗涤2~5次;

[0024] I、用10~40 μL 磷酸盐缓冲液将蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物悬起后,加入20~100 μL 荧光素酶底物,立即用荧光检测仪检测荧光强度,判断血清样品中是否含有I型糖尿病自身抗体。

[0025] 多抗原是能免疫应答产生I型糖尿病的病人血清中抗体的抗原。

[0026] 抗体是采用患有I型糖尿病的病人血清中的抗体。抗体是指谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65抗体)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2a抗体和IA-2b抗体)和胰岛素自身抗体(IAA)四种抗体。

[0027] 所述多抗原基因采用能够表达对应:能够免疫应答I型糖尿病的谷氨酸脱羧酶

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

[0028] GAD65抗原基因序列是:SEQ ID NO.1 ;

[0029] IA-2a抗原基因序列是:SEQ ID NO.2 ;

[0030] IA-2b抗原基因序列是:SEQ ID NO.3 ;

[0031] insulin抗原基因序列是:SEQ ID NO.4 。

[0032] 以磷酸盐缓冲液和健康人的血清为空白对照,以排除非特异性结合的干扰,与空白对照相比,实验组比空白组荧光明显强,即为I型糖尿病自身抗体检测阳性,即可确定实验组的病人血清含有I型糖尿病自身免疫性抗体。

[0033] PCR扩增的反应条件程序:90℃~95℃变性5~10分钟;然后93℃~98℃变性45~60秒,45℃~50℃退火30~45秒,65℃~70℃延伸50~60秒,进行25~30个循环;最后70℃~75℃延伸10~15分钟,0~4℃保温。

[0034] 所述荧光素酶基因为RanIIa荧光素酶基因。

[0035] 哺乳细胞系统为293改良细胞。

[0036] 本发明与现有技术相比所产生的有益效果是:

[0037] 可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法是在放射免疫技术的基础上,使用荧光素融合蛋白作为标记物,研发出的基因重组荧光素酶—多抗原融合蛋白抗体检测技术。

[0038] 可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法快速简便、准确率高,克服现有技术使用放射性标记物所引起的放射线辐射和污染等问题,使用微量荧光检测仪检测,与传统的HPLC相比,操作简单,直接接受标准0.2mL离心管进行隔离测定,无需开盖堵截污染途径,保证实验结果可靠和操作人员安全。另外采用不小于25uL样品量进行测定,达到微量省试剂的要求。并且高灵敏度、高信噪比,测量值稳定可靠。

[0039] 该可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法中蛋白A琼脂糖的使用能够特异性地结合免疫球蛋白的FC片段,所以能和抗原-抗体结合,减少非特异性结合的吸附。

[0040] 荧光素酶基因选用RanIIa荧光素酶基因。所采用的荧光酶底物,是一种RanIIa荧光底物,在荧光酶的作用下可产生荧光,荧光信号强度与荧光素酶浓度成正比。

[0041] 该可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法使用微量荧光检测仪检测,与传统的HPLC相比,操作简单,直接接受标准0.2mL离心管进行隔离测定,无需开盖堵截污染途径,保证实验结果可靠和操作人员安全。

[0042] 该可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法采用不小于25uL样品量进行测定,达到微量省试剂的要求。

[0043] 该可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法的实验组血清中只要含有四种抗体中的一种,即只要有一种抗体检测为阳性,即可确定样品含有糖尿病自身抗体,高灵敏度、高信噪比,测量值稳定可靠。

附图说明

[0044] 附图1是本发明的实施例测定结果示意图。

具体实施方式

[0045] 下面对本发明的可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法作以下详细说明。

[0046] 实施例：

[0047] 本发明的可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法包括以下步骤：

[0048] 1、荧光素酶基因与多抗原基因的融合载体的构建

[0049] (1)选取荧光素酶基因和多抗原基因的目的序列(GAD65抗原基因序列、IA-2a抗原基因序列、IA-2b抗原基因序列和insulin抗原基因序列),进行PCR扩增,PCR扩增的反应条件程序:90℃~95℃变性5~10分钟;然后93℃~98℃变性45~60秒,45℃~50℃退火30~45秒,65℃~70℃延伸50~60秒,进行25~30个循环;最后70℃~75℃延伸10~15分钟,0~4℃保温。

[0050] 在kpnI位点(GGTACC)引入限制性内切酶,获得目的片段,做凝胶电泳进行鉴定;

[0051] 多抗原是能免疫应答产生I型糖尿病的病人血清中抗体的抗原。

[0052] 抗体是采用患有I型糖尿病的病人血清中的抗体。抗体是指谷氨酸脱羧酶抗体(GAD65抗体)、酪氨酸磷酸酶抗体(IA-2a抗体和IA-2b抗体)和胰岛素自身抗体(IAA)四种抗体。

[0053] 所述多抗原基因采用能够表达对应:能够免疫应答I型糖尿病的谷氨酸脱羧酶GAD65抗体、酪氨酸磷酸酶IA-2a抗体、酪氨酸磷酸酶IA-2b抗体和胰岛素自身IAA抗体的四种抗体的GAD65抗原、IA-2a抗原、IA-2b抗原和insulin抗原的四种抗原基因。

[0054] GAD65抗原基因序列是:SEQ ID NO.1 ;

[0055] IA-2a抗原基因序列是:SEQ ID NO.2 ;

[0056] IA-2b抗原基因序列是:SEQ ID NO.3 ;

[0057] insulin抗原基因序列是:SEQ ID NO.4 。

[0058] (2)将获得的的目的片段与PA0815载体质粒分别进行kpnI和xbaI双酶切,并使用T4连接酶将目的基因与载体基因连接得到重组质粒。

[0059] 2、质粒转化

[0060] 将重组质粒转入制备好的感受态哺乳细胞系统中,在氨苄耐药基因平皿中筛选阳性克隆,从阳性克隆细胞内提取质粒DNA,然后质粒DNA进行PCR鉴定及kpnI和xbaI双酶切鉴定。

[0061] 3、融合蛋白的获取

[0062] 挑取单菌落至含有10% 血清的DMEM培养液中29℃下培养54h(中间过程进行逐步扩大培养),于4℃,8000rpm离心15min;将得到的细胞沉淀用磷酸盐缓冲液洗涤并离心3次,最后将收获的细胞在冰浴中超声处理30 min,然后将细胞裂解液于4℃,最大转速离心30 min后取上清液。

[0063] 4、重组融合蛋白的纯化

[0064] 把所得上清液,用硫酸铵沉淀法进行分级沉淀,沉淀物经0.06 mol/L Tris-HCl缓冲液冲洗3次,后冻干备用。

[0065] 5、将冻干备用的融合蛋白用0.01mol/L,pH7.4 PBS缓冲液进行一定倍数的梯度稀

释,确保每微升中有 10^7 个荧光单位。

[0066] 6、向离心管中加入75 μ L的融合蛋白稀释液,然后加入100 μ L 预处理好的实验组的血清,在室温下,让糖尿病自身抗体与抗原特异性结合3~5h。

[0067] 7、为了保证检测的准确性,试验时分别以磷酸盐缓冲液和健康人的血清为空白对照,以排除某些非特异性结合的干扰。

[0068] 8、再加入5 μ L蛋白A琼脂糖,来捕捉抗原-抗体复合物,4 $^{\circ}$ C缓慢摇动抗原-抗体复合物过夜或室温缓慢摇动2h,使抗体与蛋白A琼脂糖偶连得到蛋白A琼脂糖-抗原-抗体复合物。

[0069] 9、免疫沉淀反应后,在0 $^{\circ}$ C以3000 rpm 速度离心5 min,将蛋白A琼脂糖-抗原-抗体复合物离心至管底;将上清小心吸去,沉淀用磷酸盐缓冲液将蛋白A琼脂糖-抗原-抗体复合物悬起离心洗涤3次。

[0070] 10、用30 μ L 磷酸盐缓冲液将蛋白A琼脂糖-抗原-抗体复合物悬起后,加入80 μ L 荧光素酶底物,立即用荧光检测仪检测荧光强度,判断血清样品中是否含有糖尿病自身抗体。

[0071] 11、与空白对照相比,实验组比空白组荧光明显强,即为糖尿病自身抗体检测阳性,四种抗体只要有一种检测为阳性,即可确定样品含有糖尿病自身抗体,样品来源人体患有I型糖尿病。

[0072] 利用上述方法对50例健康血清进行检测,有49份阴性,一份假阳性,故特异性为 $49/(49+1)*100=98\%$,对20例I型糖尿病患者进行检测,全部为阳性,故敏感性为100%。测定结果如附图1。

[0001]	Sequence Listing	
[0002]	<110>山东东兴汇智生物科技有限公司	
[0003]	<120>可同时检测四种I型糖尿病自身免疫抗体的方法	
[0004]	<160> 4	
[0005]	<170> PatentIn Version 3.3	
[0006]	<210> 1	
[0007]	<211> 382	
[0008]	<212> DNA	
[0009]	<213> 未知	
[0010]	<220>	
[0011]	<221>	
[0012]	<222>	
[0013]	<223> GAD65抗原基因	
[0014]	<400> 1	
[0015]	catctccggg ctctggcttt tggtecttcg ggtcggaaaa tggctccggg gattccgaca	60
[0016]	atcccggcac agcgcgagcc tgggtccaag tggctcagaa gttcacgggc ggcatcggaa	120
[0017]	acaaactgtg cgcctgctc tacggagacg ccgagaagcc ggcggagagc ggcgggagcc	180
[0018]	aacccccgcg ggtcgccgcc cggaaggccg cctgcgcctg cgaccagaag ccctgcagct	240
[0019]	gtcccaaagc ggatgtcaac tacgggtttc tccatgcaac agacctgctg ccggcggtgtg	300
[0020]	atggagaaag gcccactttg gcgtttctgc aagatgttat gaacatttta cttagtatg	360
[0021]	tggtgaaaag tttegataga tc	382
[0022]	<210> 2	
[0023]	<211> 741	
[0024]	<212> DNA	
[0025]	<213> 未知	
[0026]	<220>	
[0027]	<221>	
[0028]	<222>	
[0029]	<223> IA-2a抗原基因	
[0030]	<400> 2	
[0031]	agttcacaca gcagcaccce ctctggtgcg aggagccagc acagtetaac atggatatct	60
[0032]	ccaactgggca catgattctg gcataatgg aagatcatct gaagaataaa gaccgcttgc	120
[0033]	ttaaagagtg ggaggctctg tgctctacc aggcagaacc cagcaccatc tcagcagctc	180
[0034]	agagtgaag taacatcaag aagaaccgct gctcgatgc cgtgcctat gaccattcca	240
[0035]	gagtgaagct gaaagctgag attaaccat ccaggacaga ttacatcaat gccagcaca	300
[0036]	ttattgagca tgacccccgg atgccagcgt atatcgccac ccaaggacce ctctcacaca	360
[0037]	ccatctctga tttctggcag atggtttggg aaagcgggtg tacagtcata gtgatgatga	420
[0038]	cagctctggt tgaggatgga gaaaagcagt gtgatcgcta ctggccccgat gaagctctt	480

[0039]	ctctatacca catctacgag gtgaacctgg tgtctgagca tatctggtgt aatgacttcc	540
[0040]	tggttcgtag tttctacctg aagaatgtcc aaaccaggga aactcgcacc ctgactcagt	600
[0041]	tccacttct aagetggcct gcacaaggaa taccacttc cacacgcct ctgctggact	660
[0042]	ttcgaggaa agtcaacaag tgctaccgtg gacgctcctg cccatcatt gtgactgca	720
[0043]	gtgatggtac aggcaggact g	741
[0044]	<210> 3	
[0045]	<211> 194	
[0046]	<212> DNA	
[0047]	<213> 未知	
[0048]	<220>	
[0049]	<221>	
[0050]	<222>	
[0051]	<223> IA-2b抗原基因	
[0052]	<400> 3	
[0053]	gcacctgac teggttccac ttctaaget ggeccgacag ggaateccca ctccacacg	60
[0054]	ccctctgtg gactttcgca gggaagtcaa caagtgtac cgtggacgct cctgccccat	120
[0055]	cattgtgac tgcagtgatg gtacaggccg gactggaaca tatatcctga ttgacatggt	180
[0056]	cctgaaccgc ccta	194
[0057]	<210> 4	
[0058]	<211> 1770	
[0059]	<212> DNA	
[0060]	<213> 未知	
[0061]	<220>	
[0062]	<221>	
[0063]	<222>	
[0064]	<223> insuLin抗原基因	
[0065]	<400> 4	
[0066]	atgtgggtcc tgatgagctg gctggccttc gcggcagggc tggtagccgg aacacagtgt	60
[0067]	ccagatgggc agttctgccc tgttgectgc tgccttgacc agggaggagc caactacagc	120
[0068]	tgtgtaacc ctcttctgga cacatggcct agaataacga gccatcatct agatggctcc	180
[0069]	tgccagacc atggccactg tctgctggtc tattcttgtc ttctcactgt gtctgggact	240
[0070]	tccagctgct gcccgttctc taagggtgtg tcttgtggtg atggctacca ctgctgcccc	300
[0071]	cagggettcc actgtagtgc agatgggaaa tctgcttcc agatgtcaga taacccttg	360
[0072]	ggtgctgtcc agtgtctgg gagccagttt gaatgtctg actctgccac ctgctgcatt	420
[0073]	atggttgatg gttcgtgggg atggtgtccc atgccccagg cctcttgctg tgaagacaga	480
[0074]	gtgcattgct gtccccatgg ggcctctgt gacctggtc acacacgatg cgtttcacc	540
[0075]	acgggcacc acaccctact aaagaagttc cctgcacaaa agaccaacag ggcagtgtct	600
[0076]	ttgcctttt ctgtcgtgtg cctgatgct aagaccagt gtcccgatga ttctacctgc	660
[0077]	tgtgagctac cactgggaa gtatggtgctg tgtccaatgc ccaatgcat ctgctgttcc	720

[0078]	gaccacctgc actgctgccc ccaggacact gtatgtgacc tgatccagag taagtgccta	780
[0079]	tccaagaact acaccacgga tctcctgacc aagctgcctg gatacccagt gaaggaggtg	840
[0080]	aagtgcgaca tggaggtgag ctgccctgaa ggatatacct gctgccgect caaactggg	900
[0081]	gcctggggct gctgtccatt tgccaaggcc gtgtgtttgt aggatcacat tcattgctgc	960
[0082]	ccggcagggt ttcagtgtca cacagagaaa ggaacctgcg aaatgggtat cctccaagta	1020
[0083]	ccctggatga agaaggtcat agccccctc cgctgccag acccacagat cttgaagagt	1080
[0084]	gatacacctt gtgatgactt cactaggtgt cctacaaaca atacctgctg caaactcaat	1140
[0085]	tctggggact ggggctgctg tcccatcca gaggtgtct gctgctcaga caaccagcat	1200
[0086]	tgctgccctc agggttcac atgtctggct caggggtact gtcagaaggg agacacaatg	1260
[0087]	gtggctggcc tggagaagat acctgcccgc cagacaacce cgctccaaat tggagatatac	1320
[0088]	ggttgtgacc agcataccag ctgccagta gggcaaacct gctgccaag cctcaaggga	1380
[0089]	agttgggect gctgccagct gccccatgct gtgtgctgtg aggaccggca gcactgttgc	1440
[0090]	ccggccgggt acacctgcaa tgtgaaggcg aggacctgtg agaaggatgt cgattttatc	1500
[0091]	cagctcccg tctcctgac cctcgccct aaggttggga atgtggagtg tggagaaggg	1560
[0092]	catttctgcc atgataacca gacctgttgt aaagacagtg caggagtctg ggctgctgt	1620
[0093]	ccctacctaa aggtgtctg ctgtagagat ggacgtcact gttgccccgg tggttccac	1680
[0094]	tgttcagcca ggggaaccaa gtgtttgcga aagaagattc ctcgctggga catgtttttg	1740
[0095]	agggatccgg tccaagacc gctactgtaa	1770

实施例结果					
序号	GAD-65 抗体	IA-2a 抗体	IA-2b 抗体	IAA	结果判定
1	+	+	+	—	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	—	—	+
4	+	+	+	+	+
5	—	+	+	+	+
6	+	+	+	—	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	—	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	—	+	+
12	+	+	+	—	+
13	+	+	+	—	+
14	+	+	+	—	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	—	+	—	—	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	95%	100%	85%	60%	100%

图1

专利名称(译)	一种荧光素酶-多抗原融合蛋白以及蛋白A琼脂糖-融合蛋白-抗体复合物		
公开(公告)号	CN103969234B	公开(公告)日	2017-02-15
申请号	CN201410154456.3	申请日	2014-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	山东东兴汇智生物科技有限公司		
[标]发明人	唐东起 李世武 吴琦 苏红霞		
发明人	唐东起 李世武 吴琦 苏红霞		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/533		
其他公开文献	CN103969234A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

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

序号	GAD65 阳性	IA-2a 阳性	IA-2b 阳性	IA-9 阳性	结果判定
1	+	+	+	++	+
2	+	+	+	+	+
3	+	+	++	++	+
4	+	+	+	+	+
5	++	+	+	+	+
6	+	+	+	++	+
7	+	+	+	+	+
8	+	+	+	++	+
9	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
11	+	+	++	+	+
12	+	+	+	++	+
13	+	+	+	++	+
14	+	+	+	++	+
15	+	+	+	+	+
16	+	+	+	+	+
17	++	+	++	++	+
18	+	+	+	+	+
19	+	+	+	+	+
20	+	+	+	+	+
阳性率	90%	100%	85%	80%	100%