(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2016 年 9 月 29 日 (29.09.2016)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2016/149972 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 33/68 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2015/076924

(22) 国际申请日: 2015 年 4 月 18 日 (18.04.2015)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201510130214.5 2015 年 3 月 24 日 (24.03.2015) CN

(71) 申请人: **深圳市贝沃德克生物技术研究院有限公司 (BIO-TECH ACADEMY(CHINA) CO.,LTD.)** [CN/CN]; 中国广东省深圳南山科技园南区高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518063 (CN)。 **深圳市易特科信息技术有限公司 (E-TECHNO INFORMATION TECHNOLOGIES CO.,LTD.)** [CN/CN]; 中国广东省深圳南山科技园南区高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518048 (CN)。 **深圳市前海安测信息技术有限公司 (ANYCHECK INFORMATION TECHNOLOGIES CO.LTD.)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区科技园南区高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518063 (CN)。

(72) 发明人: **张贯京 (ZHANG, Guanjing)**; 中国广东省深圳南山科技园南区高新南七道数字技术园 B1 栋 3 层 3B, Guangdong 518057 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

(54) **Title**: DIABETIC NEPHROPATHY EARLY SCREENING REAGENT KIT, BIOMARKER TESTING METHOD AND APPLICATIONS

(54) **发明名称** : 糖尿病肾病早期筛查试剂盒、生物标志物检测方法及应用

(57) **Abstract**: A diabetic nephropathy early screening reagent kit comprising testing reagents. The testing reagents comprise a first testing reagent, a second testing reagent, a third testing reagent, and a fourth testing reagent. A solute for the first testing reagent is a first podocalyxin antibody. A solute for the second testing reagent is a first collagen IV antibody. A solute for the third testing reagent is a first liver fatty acid binding protein antibody. A solute for the fourth testing reagent is a first neutrophil gelatinase-associated lipocalin antibody. By having podocalyxin, collagen IV, liver fatty acid binding protein, and neutrophil gelatinase-associated lipocalin serving as biomarkers, the diabetic nephropathy early screening reagent kit is capable of providing assistance in determining kidney damages on the basis of an actual testing result, thus providing assistance in distinguishing early-stage diabetic nephropathy.

(57) **摘要**: 一种糖尿病肾病早期筛查试剂盒，包括检测试剂；所述检测试剂包括第一检测试剂、第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂；所述第一检测试剂的溶质为第一足糖萼蛋白抗体，所述第二检测试剂的溶质为第一 IV 型胶原蛋白抗体，所述第三检测试剂的溶质为第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体，所述第四检测试剂的溶质为第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。这种糖尿病肾病早期筛查试剂盒通过足糖萼蛋白、IV 型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物，可以根据实际检测结果，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

WO 2016/149972 A1

发明名称：糖尿病肾病早期筛查试剂盒、生物标志物检测方法及应用

[1] 技术领域

[2] 本发明涉及生物检测领域，尤其是涉及一种糖尿病肾病早期筛查试剂盒、生物标志物检测方法及应用。

[3] 背景技术

[4] 糖尿病肾病是糖尿病最严重的慢性微血管并发症之一，并最终引起终末肾衰竭，是糖尿病患者死亡的主要原因。据世界卫生组织2013年统计，全世界约有3.47亿人患有糖尿病，其中超过80%的糖尿病死亡病例发生在发展中国家。同时，世界卫生组织预测到2030年，全球因糖尿病死亡的人数将翻一番，其中30%~40%的2型糖尿病人将发展为糖尿病肾病，20%~40%的1型糖尿病患者在15~30年后也将发展为糖尿病肾病，造成了巨大且沉重的社会经济负担。

[5] 然而，糖尿病肾病早期很难发现，且临床糖尿病肾病诊断黄金标准肌酐和蛋白尿也只能间接反映肾脏实质性病变（肾小球系膜细胞扩增、基底膜加厚、足细胞损伤、肾小管上皮细胞及间质细胞损伤等），无法诊断早期糖尿病肾病。

[6] 肾穿刺活检技术虽可以辅助临床糖尿病肾病早期诊断，但该技术的创伤性较大，术后会引起并发症，且技术难度较高，不能作为糖尿病肾病患者检查的常规项目。通常当临床确诊时，糖尿病肾病患者错过了最佳的治疗时机，致使疾病急剧恶化，不可逆转。因此，积极寻找糖尿病肾病早期诊断标志物及其检测试剂盒，并进行早期干预具有重要的现实意义。

[7] 蛋白生物标志物(biomarker)是反映疾病存在和状态的一种可测量的指示物。在疾病、应激和康复的过程中，任何的生理变化最终都能在蛋白水平上得到体现，是疾病研究最直观的手段。当前蛋白分子标志物的检测已成为临床疾病早期诊断、疾病分型、药物靶标筛选及药物研发等最有效的方法。尿液是血液在经过肾小球过滤，肾小管及集合管重吸收、排泄及分泌而产生的代谢终产物，尿液中的蛋白种类及含量的高低直接反映了泌尿系统，尤其是肾脏的健康状态，

可以用于预测糖尿病肾病发生、发展及预后的情况。同时，大量的研究发现，多个蛋白生物标志物组群与慢性病患者的临床及预后密切相关，表明同步联合测定多个蛋白因子有助于更全面的了解疾病进程。

[8] 发明内容

[9] 基于此，有必要提供一种可以用于区分早期糖尿病肾病的糖尿病肾病早期筛查试剂盒、生物标志物检测方法及应用。

[10] 一种糖尿病肾病早期筛查试剂盒，包括检测试剂和捕获试剂；

[11] 所述检测试剂包括第一检测试剂、第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂，所述第一检测试剂的溶质为第一足糖萼蛋白抗体，所述第二检测试剂的溶质为第一IV型胶原蛋白抗体，所述第三检测试剂的溶质为第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体，所述第四检测试剂的溶质为第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体；

[12] 所述捕获试剂的溶质包括结合了第一可检测标记成分的第二足糖萼蛋白抗体、结合了第二可检测标记成分的第二IV型胶原蛋白抗体、结合了第三可检测标记成分的第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体和结合了第四可检测标记成分的第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[13] 足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物在制备肾损伤诊断试剂或肾损伤诊断装置中的应用。

[14] 这种糖尿病肾病早期筛查试剂盒通过足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物，可以根据实际检测结果，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

[15] 附图说明

[16] 图1为一实施方式的生物标志物检测方法的流程图；

[17] 图2a为足糖萼蛋白在糖尿病肾病早期尿液中的验证图，*表示$P<0.05$；

[18] 图2b为IV型胶原蛋白在糖尿病肾病早期尿液中的验证图，*表示$P<0.05$；

[19] 图2c为肝型脂肪酸结合蛋白在糖尿病肾病早期尿液中的验证图，*表示$P<0.05$；

[20] 图2d为中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白在糖尿病肾病早期尿液中的验证图，*表示P<0.05；

[21] 图3a为足糖萼蛋白的ROC曲线图；

[22] 图3b为IV型胶原蛋白的ROC曲线图；

[23] 图3c为肝型脂肪酸结合蛋白的ROC曲线图；

[24] 图3d为中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的ROC曲线图。

[25] 具体实施方式

[26] 下面主要结合附图及具体实施例对糖尿病肾病早期筛查试剂盒、生物标志物检测方法及应用作进一步详细的说明。

[27] 足糖萼蛋白（podocalyxin）是O连接的跨膜糖蛋白，位于肾脏足细胞足突顶膜区，是肾小球基底膜电荷屏障的主要成分，保证肾小球滤过膜电荷屏障的完整性，在肾脏滤过功能中发挥着重要作用。 IV型胶原蛋白（Collagen IV）是肾小球基底膜及系膜基质的重要组称成分，在肾小球基底膜滤过完整性中发挥着重要作用。糖尿病人高血糖刺激产生IVcollagen，若增加的IVcollagen沉积到糖尿病人肾脏肾小球系膜基质上，会产生弥散性肾小球硬化症；若沉积到肾小球基底膜或肾小管上，会导致系膜扩增、肾小球间质化和肾小管损伤。 肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)在肾近端小管细胞内表达，参与肾小管间质细胞能量产生及代谢过程。在糖尿病肾病并发过程中，尿液中L-FABP表达水平与尿白蛋白浓度成正相关，预示着尿液中L-FABP是肾小管间质细胞损伤的生物标志物。 中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)是一种铁离子结合蛋白，在肾小管内皮细胞中表达，参与多种生物学功能，如细胞凋亡、天然免疫、肾脏生长发育等。在糖尿病肾病早期，NGAL在尿液中出现高表达，且NGAL表达量的增加与肾小管近端小管的损伤呈正比，预示着尿液中NGAL是肾小管间质细胞损伤的生物标志物。 因此，足糖萼蛋白（podocalyxin）和IV型胶原蛋白（Collagen IV）可以作为肾小球损伤的生物标志物，肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)可以作为肾小管损伤的生物标志物。

[28] 本申请中选择上述4种生物标志物用于糖尿病肾病早期诊断，检测这4种生物标志物，根据这4种生物标志物的含量，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期

糖尿病肾病提供辅助。

[29] 一实施方式的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，包括基板、检测试剂和捕获试剂。检测试剂包括第一检测试剂、第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂。

[30] 第一检测试剂的溶质为第一足糖蓼蛋白抗体，第二检测试剂的溶质为第一IV型胶原蛋白抗体，第三检测试剂的溶质为第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体，第四检测试剂的溶质为第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[31] 捕获试剂的溶质包括结合了第一可检测标记成分的第二足糖蓼蛋白抗体、结合了第二可检测标记成分的第二IV型胶原蛋白抗体、结合了第三可检测标记成分的第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体和结合了第四可检测标记成分的第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[32] 优选的，检测试剂包括第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂，捕获试剂的溶质包括结合了第二可检测标记成分的第二IV型胶原蛋白抗体、结合了第三可检测标记成分的第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体和结合了第四可检测标记成分的第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[33] 基板上设有检测位点，基板可以为硝酸纤维素膜、尼龙膜或玻璃基片。本实施方式中，基板选择硝酸纤维素膜。基板可以省略，在上述糖尿病肾病早期筛查试剂盒使用时，搭配其他公司售卖的基板即可。

[34] 本实施方式中，检测位点包括第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点，第一检测位点对应第一检测试剂，第二检测位点对应第二检测试剂，第三检测位点对应第三检测试剂，第四检测位点对应第四检测试剂。

[35] 本实施方式中，第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点均为4个，通过重复试验避免误差。

[36] 这种糖尿病肾病早期筛查试剂盒可以根据实际检测结果，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

[37] 糖尿病肾病早期筛查试剂盒还包括足糖蓼蛋白标准品、IV型胶原蛋白标准品、肝型脂肪酸结合蛋白标准品和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品，这四种标准品均购自北京傲锐东源生物科技有限公司。对应的，基板上还需要设有第一阳性对照位点、第二阳性对照位点、第三阳性对照位点和第四阳性对照

位点，足糖萼蛋白标准品对应第一阳性对照位点，IV型胶原蛋白标准品对应第二阳性对照位点，肝型脂肪酸结合蛋白标准品对应第三阳性对照位点，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品对应第四阳性对照位点。

[38] 第一可检测标记成分可以为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质。第二可检测标记成分可以为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质。第三可检测标记成分可以为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质。第四可检测标记成分可以为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质。

[39] 本实施方式中，第一可检测标记成分、第二可检测标记成分、第三可检测标记成分和第四可检测标记成分均为辣根过氧化物酶（HRP）。

[40] 本实施方式中，糖尿病肾病早期筛查试剂盒还包括检测液。检测液的溶质为TMB（3,3',5,5'-四甲基联苯胺）。

[41] 本实施方式中，第一足糖萼蛋白抗体（购自Sigma公司，货号：AMAB90667）为单克隆抗体，第二足糖萼蛋白抗体（购自Sigma公司，货号：SAB2500809）为多克隆抗体。

[42] 本实施方式中，第一IV型胶原蛋白抗体（购自Sigma公司，货号：C1926）为单克隆抗体，第二IV型胶原蛋白抗体(购自Abcam公司，货号：ab6586)为多克隆抗体。

[43] 本实施方式中，第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体（购自Sigma公司，货号：WH0002167M1）为单克隆抗体，第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体(Abcam公司，货号：ab101837)为多克隆抗体。

[44] 本实施方式中，第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体（购自Abcam公司，货号：ab23477）为单克隆抗体，第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体（Abcam公司，货号：ab166677）为多克隆抗体。

[45] 这种糖尿病肾病早期筛查试剂盒通过足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物，可以根据实际检测结果，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

[46] 如图1所示的一实施方式的生物标志物检测方法，采用上述的糖尿病肾病早期

筛查试剂盒，包括如下步骤：

[47] S10、提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净。

[48] 检测试剂包括第一检测试剂、第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂。

[49] 第一检测试剂的溶质为第一足糖萼蛋白抗体，第二检测试剂的溶质为第一IV型胶原蛋白抗体，第三检测试剂的溶质为第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体，第四检测试剂的溶质为第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[50] 捕获试剂的溶质包括结合了第一可检测标记成分的第二足糖萼蛋白抗体、结合了第二可检测标记成分的第二IV型胶原蛋白抗体、结合了第三可检测标记成分的第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体和结合了第四可检测标记成分的第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[51] 本实施方式中，检测位点包括第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点，第一检测位点对应第一检测试剂，第二检测位点对应第二检测试剂，第三检测位点对应第三检测试剂，第四检测位点对应第四检测试剂。

[52] S10具体为：将第一检测试剂滴加在第一检测位点，将第二检测试剂滴加在第二检测位点，将第三检测试剂滴加在第三检测位点，将第四检测试剂滴加在第四检测位点，充分反应后分别将第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点洗涤干净。

[53] 洗涤的操作可以采用传统PBS稀释液，具体可以为0.01mol/L PBS（pH=7.4）+0.05%吐温-20。

[54] S20、将洗涤干净后的检测位点封闭，封闭完成后将检测位点洗涤干净。

[55] S20具体为：分别将洗涤干净后的第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点封闭，封闭完成后分别将第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点洗涤干净。

[56] 封闭液可以将脱脂奶粉或牛血清白蛋白溶于PBS（pH=7.4，0.01mol/L）得到。

[57] S30、将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净。

[58] S30具体为：将待检测样本分别滴加在封闭完成并洗涤干净的第一检测位点、

第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点上，充分反应后分别将第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点洗涤干净。

[59] 本实施方式中，待检测样本选择尿液样本。

[60] 一般来说，尿液样本在进行检测前，需要进行稀释，稀释倍数可以为100倍。

[61] S40、将捕获试剂滴加在检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净。

[62] S40具体为：将捕获试剂分别滴加在第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点上，充分反应后分别将第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点洗涤干净。

[63] S50、检测位点是否含有第一可检测标记成分、第二可检测标记成分、第三可检测标记成分和第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到待检测样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[64] S50具体为：分别检测第一检测位点、第二检测位点、第三检测位点和第四检测位点上是否含有第一可检测标记成分、第二可检测标记成分、第三可检测标记成分和第四可检测标记成分，并且根据检测结果确定待检测样本中是否含有足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白。

[65] 这种肾损伤检测方法可以为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

[66] 具体的，可以先设置截断值，接着可以将得到的待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量与截断值进行对比。

[67] （1）当待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量均在截断值以上时判定为阳性，此外则判定为阴性。这种判定方法适用于对初步筛查结果的进一步确认。

[68] （2）当待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量至少有一个在截断值以上时判定为阳性，此外则判定为阴性。这种判定方法适用于大人群样本的初步筛查。

[69] 上述二种判定方法各有优点，可以单独使用，也可以结合使用。

[70] 在一个优选的实施例中，用血肌酐（creatinine，Cr）校正后，Podocalyxin的浓度截断值为67.15ng/g Cr，Collagen IV的浓度截断值为2.945μg/g Cr，L-FABP的浓度截断值为4.75μg/g Cr，NGAL的浓度截断值为56.8μg/g Cr。

[71] 这种生物标志物检测方法还可以用于评估肾损伤治疗方法的有效性，具体为：待检测样本包括治疗前样本和治疗后样本；将得到的治疗前样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量与治疗后样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量进行对比，根据比对结果评估治疗方法的有效性。

[72] 上述治疗方法的有效性的具体评估过程为：如果治疗后样本中的生物标志物的浓度与治疗前样本相比发现下降或者维持不变，则表明治疗有效；如果发现升高，且具有统计学显著意义，则表明无效。

[73] 这种采用上述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒的生物标志物检测方法，通过足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物，可以根据实际检测结果，为肾损伤提供辅助判断，从而为区分早期糖尿病肾病提供辅助。

[74] 本申请发明人结合文献报道及研究试验，发现足糖萼蛋白（podocalyxin）、IV型胶原蛋白（Collagen IV）、肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)与糖尿病肾病早期疾病的发生发展密切相关，同时利用蛋白芯片检测发现，在糖尿病肾病患者尿液中这4种标志物的含量显著高于正常对照（$p<0.05$），且随着疾病的发展而增加。

[75] 同时检测这4种生物标志物，利用其联合变化对糖尿病肾病进行预测，可灵敏、特异的筛查早期糖尿病肾病，拥有较为广阔的市场应用前景。

[76] 同时检测这4种生物标志物具有以下优点：1）从肾脏结构功能角度看，糖尿病肾病早期损伤可能发生于肾小球，亦可能发生于肾小管，本试剂盒选用的四种生物标志物既包含肾小球损伤特异生物标志物（足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白），又包含肾小管损伤特异标志物（肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相

关脂质运载蛋白），因此利用这4种生物标志物组合同时检测，有助于避免漏诊，实现糖尿病肾损伤早发现、早诊断；2）从糖尿病肾病分子通路上看，糖尿病肾病损伤机制涉及到多个分子通路，如肾脏纤维化（IV型胶原蛋白）、炎症反应（中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白）、氧化应激（肝型脂肪酸结合蛋白）等，从多个分子通路预测疾病，有助于糖尿病早发现；因此，同时检测足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白这4种生物标志物，并且通过选择合理的判定方法，大大提高了肾功能损伤检测的灵敏度和特异度。

[77] 此外，足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白还可以作为生物标志物在制备肾损伤诊断试剂或肾损伤诊断装置中得到应用。

[78] 以下为具体实施例，实施例中出现的各种仪器和试剂如果没有特别说明，均采用本领域常规仪器或试剂。

[79] 下面结合具体实施例对本申请的4种生物标志物的筛选、分析和应用做进一步的详细说明。

[80] 实施例1：糖尿病肾病早期诊断生物标志物的筛选及验证

[81] 一、实验方法

[82] 1、病理筛选

[83] 选取已知身体状况的受试者共205例，其中健康对照50例，2型糖尿病患者155例（其中所有患者患糖尿病年限均大于2年）；并按照蛋白尿情况对155例糖尿病患者进行划分，其中正常蛋白尿患者61例，微量蛋白尿患者52例，大量蛋白尿患者42例。MDRD GRF公式估算肾小球滤过率（eGFR）。

[84] 注：本研究已被伦理审核机构批准，所有受试者均签署知情同意书。

[85] 2、尿标本的收集和处理

[86] 用无菌容器收集受试者清晨第一次排出的尿液样本（30mL），4℃ 8000g离心30min，取上清，储存于-80℃用于蛋白组学实验。所有尿液标本均在未使用任何药物治疗前收集。在进行蛋白组学实验时，将同一分期来自不同患者的尿液样本混合，用于蛋白组学研究。

[87] 3. iTRAQ定量蛋白组学技术

[88] 利用ProteoMinerTM蛋白富集试剂盒（Bio-Rad, 货号: 163-3006）去除高丰度蛋白，冷丙酮/三氯乙酸法提取尿液总蛋白，Bradford法测定蛋白浓度。按照iTRAQ标记试剂盒（Applied Biosystem Inc. 货号: MS10016）操作步骤处理、标记不同组尿蛋白样本。操作步骤简述如下：取各组尿蛋白样本各100μg，每管分别加入预冷的丙酮（丙酮：样本体积比=6：1），-20℃沉淀1小时，12000rpm超速离心15min后将沉淀重悬于20μL溶解缓冲液中。还原、封闭尿蛋白中的半胱氨酸，胰酶消化，然后利用iTRAQ标记试剂114、115、116、117分别标记正常蛋白尿患者、微量蛋白尿患者、大量蛋白尿患者和正常对照的尿蛋白。等量混合标记后的尿蛋白肽，依次利用强离子交换层析、反向层析进行分离，质谱技术进行分析（SCX-RPLC-MS/MS），Mascot软件鉴定尿液中的蛋白，寻找疾病组和对照以及疾病组之间差异表达蛋白。

[89] 4、ELISA法验证差异表达蛋白

[90] 利用ELISA技术确认寻找到的差异蛋白（足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白）在正常对照和各疾病组尿液中的表达量，旨在验证质谱技术结果的准确性及这些差异蛋白作为糖尿病肾病早期生物标志物（Biomarker）的准确性。具体地说，利用稀释缓冲液将尿液1：100稀释，然后利用针对不同蛋白生物标志物的ELISA板测量不同疾病组尿液中生物标志物的含量，每个样本重复测量三次。

[91] 5、统计分析

[92] 数据用SPSS 14.0软件（Statistical Product and Service Solutions，“统计产品与服务解决方案”软件）处理，以平均值±标准差表示。用方差分析(Analysis of Variance，ANOVA)进行正态分布数据的组间比较；用受试者工作特性曲线（ROC）分析各种生物标志物预测的准确性、特异性及灵敏性。$P<0.05$表示具有显著统计学差异。

[93] 6、4种生物标志物综合检测早期糖尿病肾病

[94] 糖尿病肾病是一种复杂并发症，在糖尿病肾病初期可能会导致肾小管损伤，或者导致肾小球损伤。本申请中的4种生物标志物，其中足糖萼蛋白和IV型胶原蛋

白主要反映肾小球损伤；肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白主要反映肾小管损伤。为准确的诊断早期糖尿病肾病，本实验组合使用二种或二种以上生物标志物，采用（1）和（2）的判定方法进行综合判定。

[95] （1）组合中所含的所有生物标志物均为阳性（截断值以上）时判定为阳性，除此以外判定为阴性。这种判定方法适用于对初步筛查结果的进一步确认。

[96] （2）组合中所含的生物标志物有一个为阳性（截断值以上）时即判断为阳性，除此以外判断为阴性。这种判定方法适用于大人群样本的初步筛查。

[97] 本研究发现，生物标志物组合的种类和数量的差异，会导致疾病诊断灵敏度和特异度不同。因此可以选择最佳的生物标志物组合来诊断早期糖尿病肾病。

[98] 二、结果

[99] 1、受试者基本信息如下表2所示。

[100] 表2：质谱实验受试者身体状况及生化指标

[Table 1]

	健康对照(n=50)	正常蛋白尿患者(n=61)	微量蛋白尿患者(n=52)	大量蛋白尿患者(n=42)	P 值
性别（男/女）	30/20	27/34	23/29	22/20	ND
年龄	58±10.2	63±12	62±6.9	60±14	ND
患病时间	-	4.5±3.6	7.5±6.2	10±7.7	0.012
血糖	4.3±2.12	9.41±3.21	8.81±2.56	7.87±2.84	<0.001
HbA_{1C} (%)	4.2±0.44	7.6±1.6	7.2±1.4	7.4±2.5	<0.001
收缩压（mmHg）	118±12	128±10	125±15	131±22	0.017
舒张压（mmHg）	72±10	76±8	80±12	81±9	0.101
Serum Cr (mg/dL)	0.9±0.3	0.9±0.4	1.1±0.9	2.1±1.8*	<0.001
MDRD_eGFR	86±9.5	84.2±22.3	76±25.8*#	45.9±21.6*#§	<0.001
UACR (mg/g)	7.2 ±2.1	13.1±7.5*	93.1 ±22.5*#	650.3±125*#§	<0.001

[101] 注：ND: No Difference; *p<0.001 vs. 健康对照；#p<0.001 vs 正常蛋白尿患者；§p<0.001 vs 微量蛋白尿患者，HbA1C为糖化血红蛋白，Serum Cr指血肌酐; UACR指尿白蛋白与肌酐比值。

[102] 2、尿液蛋白组学结果描述

[103] 前期筛选阶段，蛋白组学实验2次重复分别鉴定到465和478个蛋白，在二次实验中共同鉴定到322个蛋白。在二次实验中114/117（正常蛋白尿组/正常对照）、115/117(微量蛋白尿组/正常对照)及116/117（大量蛋白尿组/正常对照）iTRAQ

比值均显示出差异表达的蛋白共62个（ratio<0.667或ratio>1.5）。因本发明旨在寻找糖尿病肾病早期（正常蛋白尿期或I和II期）生物标志物，对发生差异表达的62个蛋白进行进一步分析，结果发现有15个蛋白在糖尿病肾病组的不同分期发生差异表达（ratio<0.667或ratio>1.5）。

[104] 通过文献报道和生物信息学分析（Gene Ontology和KEGG Pathway分析）对15个鉴定到的差异表达蛋白进行进一步分析，发现足糖萼蛋白（podocalyxin）、IV型胶原蛋白（Collagen IV）、肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白(NGAL)在糖尿病引起的肾病并发症病发过程中发挥着非常重要的作用。

[105] 3、ELISA法验证差异表达蛋白

[106] 利用ELISA法验证尿液蛋白组学实验筛选出的差异表达蛋白：足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白，得到下表3。

[107] 表3：ELISA验证4种糖尿病肾病早期标志物

[Table 2]

	健康对照 (n=55)	正常蛋白尿患者 (n=40)	微量蛋白尿患者 (n=53)	大量蛋白尿患者 (n=35)	P 值
性别（男 / 女）	35/20	18/22	29/24	17/18	ND
年龄	58±11	60±12	62±5	63±11	ND
HbA_{1C} (%)	4.1±0.6	7.3±1.1	7.5±1.2	7.0±2.2	<0.001
MDRD_eGFR	86±9	82.2±20.3	72±25.8★#	42±22.5*#§	0.021
UACR (mg/g)	6.1 ±2.5	23.1±7.2*	212.1 ±25.5*#	850.3±125*#§	<0.001
Podocalyxin (μg/g creatinine)	34.3±10.8	100±32.8*	129.4±52.2*	251.7±103.5*#§	<0.001
Collagen IV (μg/g creatinine)	1.63±0.8	2.23±1.22★	6.18±2.75*#	15.4±6.2*#§	<0.001
L-FABP (μg/g creatinine)	1.6±0.9	4.8±2.3*	8.6±3.5*#	64±24.8*#§	<0.001
NGAL (ng/mL)	6.6±2.1	55.6±22.1*	105.8±30.5*#	258.6±85.9*#§	<0.001

[108] 注：ND: No Difference; *p<0.001 vs. 健康对照；★p<0.05 vs 健康对照；#p<0.001 vs 正常蛋白尿患者；§p<0.001 vs 微量蛋白尿。

[109] 由表3和图2a~图2d可以看出，糖尿病组尿液中足糖萼蛋白（podocalyxin）、IV型胶原蛋白（Collagen IV）、肝型脂肪酸结合蛋白(L-FABP)和中性粒细胞明胶

酶相关脂质运载蛋白(NGAL)的表达量显著高于健康对照，且随着患者病情的严重（蛋白尿增加）而增加。

[110] 对肾小球滤过率、蛋白尿与4种蛋白标志物的相关性分析，得到下表4。

[111] 表4：肾小球滤过率、蛋白尿与4种蛋白标志物的相关性分析

[Table 3]

	肾小球滤过率（eGFR）	尿白蛋白肌酐比率（UACR）
Podocalyxin	R=-0.984*	R= 0.958*
Collagen	R= -0.996#	R= 0.963*
L-FABP	R= -0.989*	R= 0.998#
NGAL	R= -0.984*	R= 0.976*

[112] 由表4可以看出，上述4种蛋白的表达量和尿蛋白呈显著正相关，与eGFR呈显著负相关。 利用受试者工作特性曲线（ROC）分析糖尿病肾病患者和健康对照尿液中的四种生物标志物，得到图3a~图3d。 由图3a~图3d可以得到下表5。

[113] 表5：四种生物标志物ROC曲线分析

[Table 4]

测试结果变量	曲线下面积	渐近显著性水平	渐近 95% 置信区间 下限	渐近 95% 置信区间 上限
Collagen	0.858	0.005	0.777	0.938
NGAL	0.901	0.001	0.825	0.976
LFABP	0.907	0.003	0.837	0.976
PDOX	0.892	0.003	0.816	0.968

[114] 由表5可以看出，podocalyxin、Collagen

IV、L-FABP和NGAL曲线下面积（AUC）分别为0.892（p<0.01）、0.858（p<0.01）、0.907（p<0.01）和0.901（p<0.01）。敏感性和特异性分析显示，当选取最高“youden”指数时，尿液中四种生物标志物的灵敏度、特异度和浓度截断值分

别为：podocalyxin（灵敏度89.8%；特异度为76.2%；浓度截断值为67.15ng/g creatinine）、Collagen IV（灵敏度71.2%；特异度为90.5%；浓度截断值为2.945 μg/g creatinine）、L-FABP（灵敏度79.6%；特异度为95.2%；浓度截断值为4.75 μg/g creatinine）和NGAL（灵敏度84.7%；特异度为85.8%；浓度截断值为49.85ng/mL）。

[115] 以上结果表明这4种蛋白分子可能参与了糖尿病肾病病发过程，为可信的早期糖尿病肾病生物标志物。

[116] 4、糖尿病肾病早期诊断方法

[117] 在进行糖尿病诊断时，可通过健康对照的测定结果及四种蛋白分子浓度截断值来确定这4种蛋白标志物相对含量参考正常范围，结合四种生物标志物测量结果，若其中任何一种蛋白浓度超出正常范围则可初步诊断为早期糖尿病肾病；同时结合GFR、蛋白尿等指标对早期糖尿病肾病进行综合评估。

[118] 5．多种生物标志物组合进行糖尿病肾病早期诊断

[119] 将尿中四种生物标志物进行组合来诊断早期糖尿病肾病的灵敏度和特异度。其中将NGAL测量值用Cr校正，通过ROC曲线分析其截断值。尿中NGAL浓度截断值为56.8μg/g Cr；尿中L-FABP浓度截断值为4.75 μg/g Cr；尿中Collagen IV浓度截断值为2.945 μg/g Cr；尿中podocalyxin浓度截断值为67.15ng/g Cr。

[120] 对各种组合进行统计处理，比较不同组合的灵敏度和特异度，得到下表6。其中，在符号“∩”表示的组合中，该组合所含的所有生物标志物均为阳性（截断值以上）时即判断为阳性，计算灵敏度和特异度。在符号“∪”表示的组合中，该组合所含的生物标志物有一个为阳性（截断值以上）时即判断为阳性，计算灵敏度和特异度。

[121] 表6：用于诊断早期糖尿病肾病蛋白生物标志物组合灵敏度和特异性

[Table 5]

组合	灵敏度	特异度
IV Collagen ∪ NGAL	0.933	0.665
IV Collagen ∩ NGAL	0.55	0.942
IV Collagen ∪ Podocalyxin	0.92	0.594
IV Collagen ∩ Podocalyxin	0.547	0.983
NGAL ∪ Podocalyxin	0.968	0.615
NGAL ∩ Podocalyxin	0.527	0.941
L-FABP ∪ Podocalyxin	0.923	0.505
L-FABP ∩ Podocalyxin	0.541	0.969
IV Collagen ∪ NGAL∪ L-FABP ∪Podocalyxin	0.989	0.475
IV Collagen ∩ NGAL∩ L-FABP ∩Podocalyxin	0.536	0.983

[122] 由表6可以看出，根据组合生物标志物种类和数量的变化，灵敏度和特异度也会发生变化。这表示根据实验目的选择生物标志物的组合，能高效、特异的用于疾病诊断。

[123] 灵敏度高的组合（IV Collagen ∪ NGAL；IV Collagen ∪ Podocalyxin；NGAL ∪ Podocalyxin； L-FABP ∪ Podocalyxin；IV Collagen ∪ NGAL∪ L-FABP ∪Podocalyxin）适合于初次筛查；相反，特异度高的组合（IV Collagen ∩ NGAL；IV Collagen ∩ Podocalyxin；NGAL ∩ Podocalyxin；L-FABP ∩ Podocalyxin；IV Collagen ∩ NGAL∩ L-FABP ∩Podocalyxin）适合二次检查或三次检查等需要进行可靠性更高的判断检查。例如，若在初次筛查时出现阳性，此时通过特异度较高的组合方法对初次检查结果进行二次判定，最终给出有效且可靠的早期糖尿病肾病诊断结果。 由表6可以看出，“IV Collagen、NGAL、L-FABP和Podocalyxin”这个组合，可以通过选择合适的判定

方法，获得最高的灵敏度和特异度。

[124] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式，其描述较为具体和详细，但并不能因此而理解为对本发明专利范围的限制。应当指出的是，对于本领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干变形和改进，这些都属于本发明的保护范围。因此，本发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。

权利要求书

[权利要求 1] 一种糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，包括检测试剂和捕获试剂；

所述检测试剂包括第一检测试剂、第二检测试剂、第三检测试剂和第四检测试剂，所述第一检测试剂的溶质为第一足糖萼蛋白抗体，所述第二检测试剂的溶质为第一IV型胶原蛋白抗体，所述第三检测试剂的溶质为第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体，所述第四检测试剂的溶质为第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体；

所述捕获试剂的溶质包括结合了第一可检测标记成分的第二足糖萼蛋白抗体、结合了第二可检测标记成分的第二IV型胶原蛋白抗体、结合了第三可检测标记成分的第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体和结合了第四可检测标记成分的第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体。

[权利要求 2] 如权利要求1所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，所述糖尿病肾病早期筛查试剂盒还包括足糖萼蛋白标准品、IV型胶原蛋白标准品、肝型脂肪酸结合蛋白标准品和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白标准品。

[权利要求 3] 如权利要求1所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，所述第一足糖萼蛋白抗体为单克隆抗体，所述第二足糖萼蛋白抗体为多单克隆抗体； 所述第一IV型胶原蛋白抗体为单克隆抗体，所述第二IV型胶原蛋白抗体为多克隆抗体； 所述第一肝型脂肪酸结合蛋白抗体为单克隆抗体，所述第二肝型脂肪酸结合蛋白抗体为多克隆抗体； 所述第一中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体为单克隆抗体，所述第二中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白抗体为多克隆抗体。

[权利要求 4] 如权利要求1所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，所述第一可检测标记成分为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质； 所述第二可检测标记成分为酶、辅基

、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质；所述第三可检测标记成分为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质；所述第四可检测标记成分为酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质或放射活性物质。

[权利要求 5] 一种生物标志物检测方法，采用如权利要求1所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，包括如下步骤：

提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；将洗涤干净后的所述检测位点封闭，封闭完成后将所述检测位点洗涤干净；将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；将捕获试剂滴加在所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；以及 检测所述检测位点是否含有所述第一可检测标记成分、所述第二可检测标记成分、所述第三可检测标记成分和所述第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到所述待检测样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[权利要求 6] 一种生物标志物检测方法，采用如权利要求2所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，包括如下步骤：

提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；将洗涤干净后的所述检测位点封闭，封闭完成后将所述检测位点洗涤干净；将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；将捕获试剂滴加在所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；以及 检测所述检测位点是否含有所述第一可检测标记成分、所述第二可检测标记成分、所述第三可检测标记成分和所述第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到所述待检测样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[权利要求 7] 一种生物标志物检测方法，采用如权利要求3所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，包括如下步骤：

提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净； 将洗涤干净后的所述检测位点封闭，封闭完成后将所述检测位点洗涤干净； 将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净； 将捕获试剂滴加在所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；以及 检测所述检测位点是否含有所述第一可检测标记成分、所述第二可检测标记成分、所述第三可检测标记成分和所述第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到所述待检测样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[权利要求 8] 一种生物标志物检测方法，采用如权利要求4所述的糖尿病肾病早期筛查试剂盒，其特征在于，包括如下步骤：

提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净； 将洗涤干净后的所述检测位点封闭，封闭完成后将所述检测位点洗涤干净； 将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净； 将捕获试剂滴加在所述检测位点上，充分反应后将所述检测位点洗涤干净；以及 检测所述检测位点是否含有所述第一可检测标记成分、所述第二可检测标记成分、所述第三可检测标记成分和所述第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到所述待检测样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量。

[权利要求 9] 如权利要求5所述的生物标志物检测方法，其特征在于，还包括如下步骤：将得到的所述待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量与截断值进行对比，当所述待检测样本中的足糖萼蛋白、

IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量均在截断值以上时判定为阳性，此外则判定为阴性。

[权利要求 10] 如权利要求5所述的生物标志物检测方法，其特征在于，还包括如下步骤：将得到的所述待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量与截断值进行对比，当所述待检测样本中的足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量至少有一个在截断值以上时判定为阳性，此外则判定为阴性。

[权利要求 11] 如权利要求5所述的生物标志物检测方法，其特征在于，所述待检测样本包括治疗前样本和治疗后样本；

将得到的治疗前样本中足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量与治疗后样本中的足糖萼蛋白抗体、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量进行对比，根据比对结果评估治疗方法的有效性。

[权利要求 12] 如权利要求5所述的生物标志物检测方法，其特征在于，所述待检测样本为尿液样本。

[权利要求 13] 足糖萼蛋白、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白作为生物标志物在制备肾损伤诊断试剂或肾损伤诊断装置中的应用。

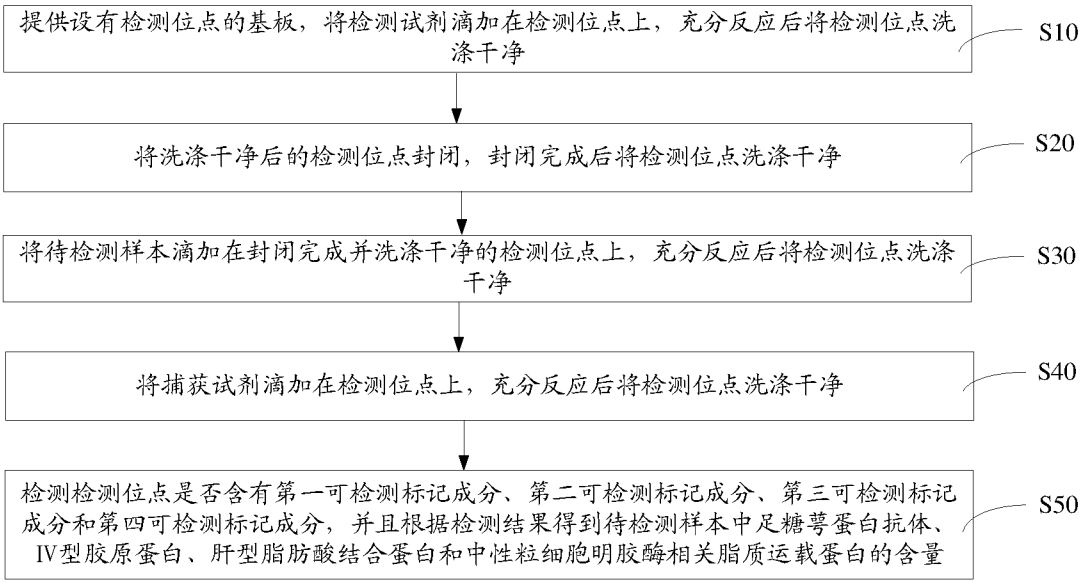
提供设有检测位点的基板，将检测试剂滴加在检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净
S10
将洗涤干净后的检测位点封闭，封闭完成后将检测位点洗涤干净
S20
将待检测样本滴加在封闭完成并洗涤干净的检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净
S30
将捕获试剂滴加在检测位点上，充分反应后将检测位点洗涤干净
S40
检测检测位点是否含有第一可检测标记成分、第二可检测标记成分、第三可检测标记成分和第四可检测标记成分，并且根据检测结果得到待检测样本中足糖萼蛋白抗体、IV型胶原蛋白、肝型脂肪酸结合蛋白和中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白的含量
S50

图 1

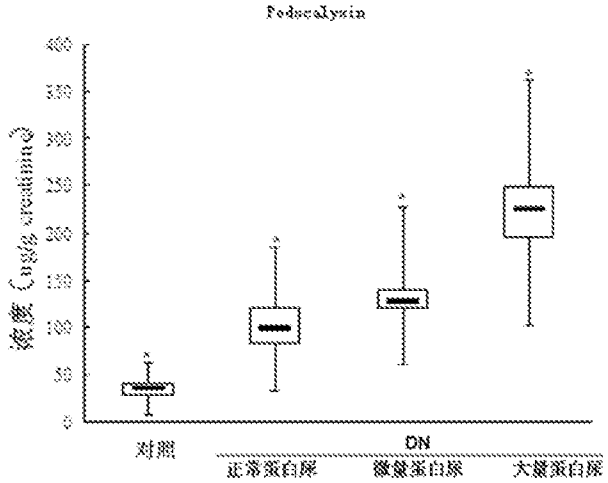
Podocalyxin
浓度 (ug/g creatinine)
对照
DN
正常蛋白尿
微量蛋白尿
大量蛋白尿

图 2a

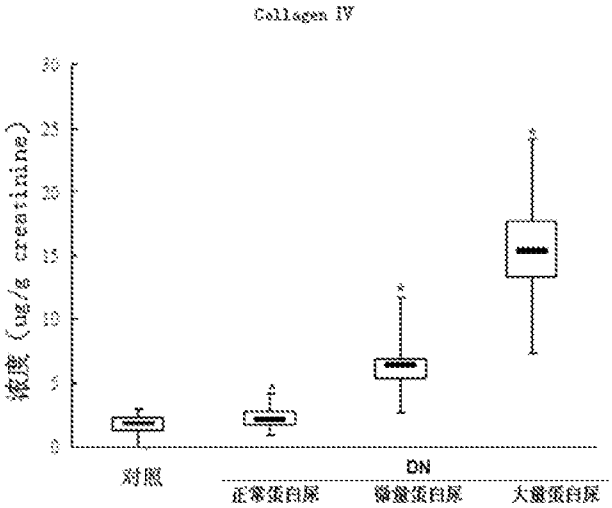
Collagen IV
浓度 (ug/g creatinine)
对照
DN
正常蛋白尿
微量蛋白尿
大量蛋白尿

图 2b

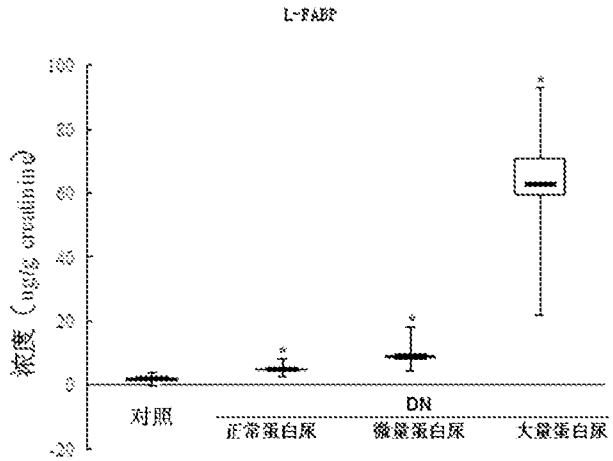
L-FABP
浓度（ug/g creatinine）
对照
DN
正常蛋白尿
微量蛋白尿
大量蛋白尿

图 2c

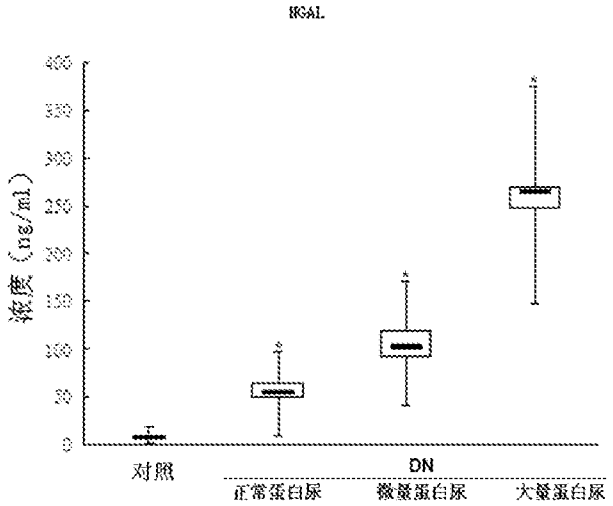
NGAL
浓度（ng/ml）
对照
DN
正常蛋白尿
微量蛋白尿
大量蛋白尿

图 2d

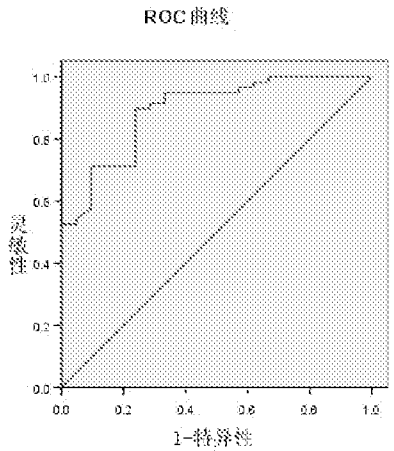
ROC曲线
1-特异性

图 3a

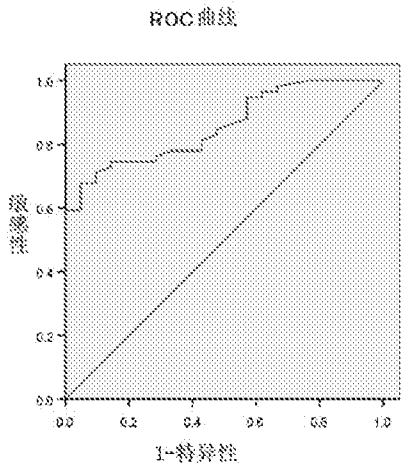

图 3b

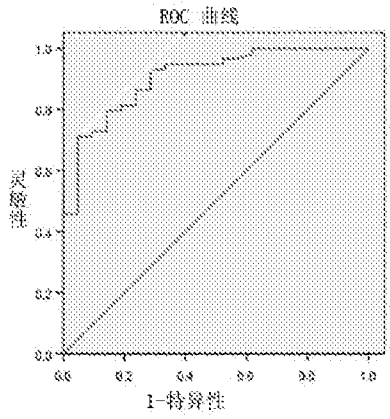

图 3c

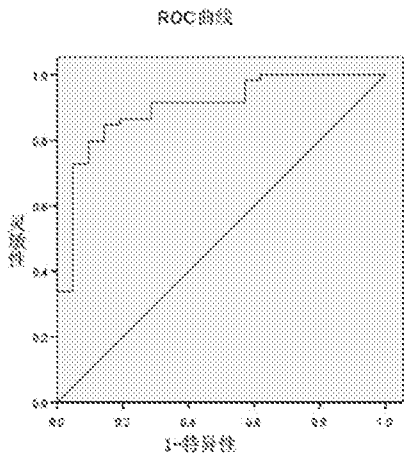

图 3d

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/076924

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/68 (2006.01) i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNPAT; WPI; EPODOC; CNKI; GOOGLE: podocalyxin, podocyte marker protein, liver fatty acid binding protein, neutrophil gelatinase-associated lipocalin, screen, diagnose, podpcalyxin, PCX, collagen, LFABP, NGAL, biomarker, diabetic nephropathy, DN

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
E	CN 104764886 A (SHENZHEN BEIWODEKE BIOTECHNOLOGY RESEARCH INSTITUTE CO., LTD. et al.), 08 July 2015(08.07.2015), claims 1-10, and embodiment 1	1-13
E	CN 204479593 U (SHENZHEN E-TECHCO SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD. et al.), 15 July 2015(15.07.2015), claims 1-9, and embodiment 1	1-13
E	CN 204479594 U (SHENZHEN E-TECHCO SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD. et al.), 15 July 2015(15.07.2015), claims 1-10, and embodiment 1	1-13
Y	QIAN, Xiaoling et al., "The Significance of Detection of Urinary Podocalyxin, Nephrin and Monocyte Chemoattractant Protein-1 for Diabetic Nephropa-Thy in Newly Diagnosed T2DM Patients", JOURNAL OF CHINESE PHYSICIAN, volume 16, number 2, 28 February 2014 (28.02.2014), 196-199	1-13
Y	MEHTA, S. et al. "Urinary Biomarkers of Diabetic Nephropathy", CURRENT BIOMARKER FINDINGS, volume 3, number /, 22 November 2013 (22.11.2013), 67-78	1-13

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
08 October 2015 (08.10.2015)	**24 November 2015 (24.11.2015)**
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer **WANG, Hui** Telephone No.: (86-10) **62413721**

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/076924

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010143423 A1 (NIIGATA UNIVERSITY et al.), 16 December 2010 (16.12.2010), abstract, and embodiments 1 and 2	1-13
Y	WO 2013183596 A1 (NAGOYA UNIVERSITY), 12 December 2013 (12.12.2013), abstract, and description, paragraph [0063]	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2015/076924

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 104764886 A	08 July 2015	None	
CN 204479593 U	15 July 2015	None	
CN 204479594 U	15 July 2015	None	
WO 2010143423 A1	16 December 2010	EP 2442106 B1	19 August 2015
		JP 5759372 B2	05 August 2015
		EP 2442106 A4	20 February 2013
		US 2012164667 A1	28 June 2012
		EP 2442106 A1	18 April 2012
WO 2013183596 A1	12 December 2013	None	

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/076924

A. 主题的分类

G01N 33/68(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNPAT;WPI;EPODOC;CNKI;GOOGLE:足糖萼蛋白，足盂蛋白，足细胞标志蛋白，胶原蛋白，肝型脂肪酸结合蛋白，中性粒细胞明胶酶相关脂质运载蛋白，糖尿病肾病，筛选，诊断，生物标志物，podpcalyxin，PCX,collagen，L-FABP，NGAL，biomarker，diabetic nephropathy，DN

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
E	CN 104764886 A (深圳市贝沃德克生物技术研究院有限公司 等) 2015年 7月 8日 (2015-07-08) 权利要求1-10，实施例1	1-13
E	CN 204479593 U (深圳市易特科信息技术有限公司 等) 2015年 7月 15日 (2015-07-15) 权利要求1-9，实施例1	1-13
E	CN 204479594 U (深圳市易特科信息技术有限公司 等) 2015年 7月 15日 (2015-07-15) 权利要求1-10，实施例1	1-13
Y	钱晓玲 等. "2型糖尿病患者尿PCX、Nephrin及MCP-1水平在诊断早期肾病中的作用" 中国医师杂志, 第16卷，第2期，2014年 2月 28日 (2014-02-28)， 196-199	1-13
Y	MEHTA, S.et al. "Urinary biomarkers of diabetic nephropathy" Current Biomarker Findings, 第3卷，第/期，2013年 11月 22日 (2013-11-22)， 67-78	1-13

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

"A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

"E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

"L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

"O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

"P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

"T" 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

"X" 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

"Y" 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

"&" 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2015年 10月 8日	2015年 11月 24日

ISA/CN的名称和邮寄地址	受权官员
中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 中国	王慧
传真号 (86-10)62019451	电话号码 (86-10)62413721

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2015/076924

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
Y	WO 2010143423 A1 (国立法人新潟大学 等) 2010年 12月 16日 (2010-12-16) 摘要，实施例1，2	1-13
Y	WO 2013183596 A1 (国立大学法人名古屋大学) 2013年 12月 12日 (2013-12-12) 摘要，说明书第【0063】段	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2015/076924

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	104764886	A	2015年 7月 8日	无			
CN	204479593	U	2015年 7月 15日	无			
CN	204479594	U	2015年 7月 15日	无			
WO	2010143423	A1	2010年 12月 16日	EP	2442106	B1	2015年 8月 19日
				JP	5759372	B2	2015年 8月 5日
				EP	2442106	A4	2013年 2月 20日
				US	2012164667	A1	2012年 6月 28日
				EP	2442106	A1	2012年 4月 18日
WO	2013183596	A1	2013年 12月 12日	无			