

(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
2012 年 11 月 1 日 (01.11.2012)



(10) 国际公布号
WO 2012/145925 A1

(51) 国际专利分类号:

G01N 33/53 (2006.01) G01N 33/536 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01) G01N 33/577 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01) A61K 39/35 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2011/073545

(22) 国际申请日: 2011 年 4 月 29 日 (29.04.2011)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): **深圳大学 (SHENZHEN UNIVERSITY)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(72) 发明人: 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): **刘志刚 (LIU, Zhigang)** [CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

(74) 代理人: **深圳市科吉华烽知识产权事务所 (SHENZHEN KINDWOLF INTELLECTUAL PROPERTY FIRM)**; 中国广东省深圳市南山区深南西路深南花园裙楼 A 区四层 402 室, 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, 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, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, 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, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, 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: USES OF FOOD ALLERGENS AND ANTIBODIES THEREOF IN IGA NEPHROPATHY

(54) 发明名称: 食物过敏原和食物过敏原抗体在 IgA 肾病方面的应用

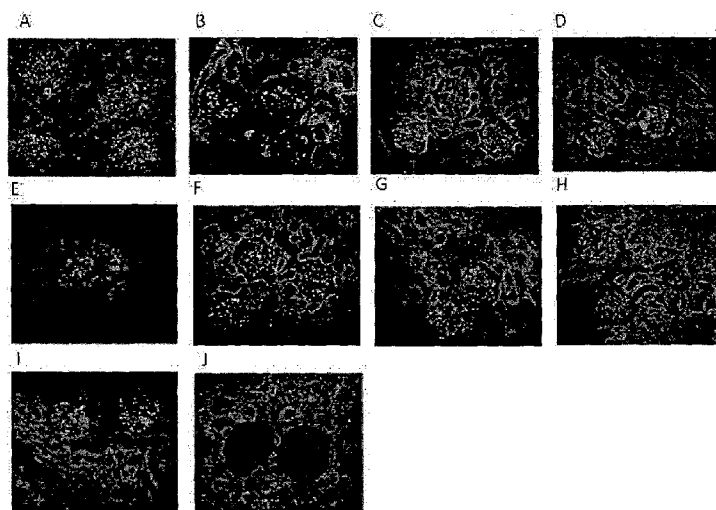


图 4A / Fig. 4A

(57) Abstract: The present invention provides uses of food allergens and antibodies thereof for manufacturing the reagents for the detection of IgA nephropathy, and also provides methods for detecting the causes of IgA nephropathy by using food allergens and antibodies thereof.

[见续页]

WO 2012/145925 A1



(57) 摘要:

本发明提供了食物过敏原及其抗体在制备 IgA 肾病检测试剂中的应用，还提供了利用食物过敏原及其抗体检测 IgA 肾病病因的方法。

食物过敏原和食物过敏原抗体在 IgA 肾病方面的应用

技术领域

本发明涉及食物过敏原和食物过敏原抗体在 IgA 肾病方面的应用，即食物过敏原和食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，以及检测 IgA 肾病病因的方法。

背景技术

IgA 肾病(IgA nephropathy, IgAN)是一组以 IgA 或 IgA 为主的免疫复合物在肾小球系膜区沉积为主要特征，病因不明的免疫复合物肾小球肾炎，是世界范围内最常见的肾小球疾病，占肾小球疾病的 30%~40%，即使在 IgA 肾病发病率较低的美国，20 岁~39 岁的成人中，IgA 肾病仍占肾小球病的首位。IgA 肾病也是我国慢性肾脏病的主要类型，约占我国肾小球疾病的 40%左右。现已明确 IgA 肾病是进展性疾病，发病后每 10 年约有 20%的患者进展到慢性肾功能衰竭，目前认为本病约 40%的病人最终进展为终末期肾衰(ESRD)。故 IgA 肾病严重危害患者的健康和生活质量，同时，也给患者、家庭和社会造成巨大的经济负担。目前，IgA 肾病确切的病因和发病机制尚未明了，亦无统一、有效的治疗方法。

发明内容

本发明基于一个新的研究发现，本发明的发明人通过实验研究发现：IgA 肾病的发生与食物过敏原有直接关系，食物过敏原可能介导了 IgA 肾病的发生。因此，通过检测样本中食物过敏原或食物过敏原抗体的存在情况，能够准确判断 IgA 肾病的病因，为后续的治疗提供思路。本发明还提供了食物过敏原和食物过敏原抗体的新用途，即在制备 IgA 肾病检测试剂中的应用；此外，本发明还提供了检测 IgA 肾病病因的方法。

食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。

优选的，所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原（如虾、蟹等）、乳类过敏原、榛子过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。上述八种食物过敏原为最常见的 8 类食物过敏原。

优选的，所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白单克隆抗体、鸡蛋卵粘蛋白 OVM 单克隆抗体、鱼小清蛋白单克隆抗体、虾肌球蛋白单克隆抗体、花生 Arah1 蛋白单克隆抗体、榛子 Corh1 蛋白单克隆抗体、大豆 Gly mBd 单克隆抗体和蟹原肌球蛋白单克隆抗体中的至少一种。牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白 OVM、鱼小清蛋白、虾肌球蛋白、花生 Arah1 蛋白、榛子 Corh1 蛋白、大豆 Gly mBd、蟹原肌球蛋白分别为各自类别食物过敏原中引起过敏反应的主要蛋白。

优选的，所述食物过敏原抗体为多克隆抗体、单克隆抗体中的至少一种。

更优选的，所述食物过敏原抗体为单克隆抗体，以降低检测试剂在实际检测过程中的假阳性率。

优选的，所述食物过敏原抗体为荧光标记抗体、酶标抗体或生物素标记抗体。使得检测试剂在实际检测过程中更为灵敏，检测的实验结果易于观察，且准确性高。

优选的，所述食物过敏原抗体为异硫氰酸荧光素（FITC）标记抗体、四甲基异氰酸罗达明（TRITC）标记抗体、罗丹明红（RRX）标记抗体、德克萨斯红（TR）标记抗体、青类染料（Cy2, Cy3, Cy5）标记抗体、藻红蛋白或藻胆色素蛋白（PE）标记抗体或醋酸（AMCA）标记抗体。

FITC 在冷暗干燥处可保存多年，是目前应用最广泛的荧光素。FITC 荧光二抗主要优点是人眼对黄绿色较为敏感，通常切片标本中的绿色荧光少于红色。

TRITC 为罗丹明的衍生物，呈紫红色粉末，较稳定。最大吸收光波长为 550nm，最大发射光波长为 620nm，呈现橙红色荧光，与 FITC 的绿色荧光对比鲜明，可配合用于双重标记或对比染色。因其荧光淬灭慢，也可用于单独标记染色。

RRX 和 TR 是罗丹明的衍生物耦联基团具有不同的吸收波长（570, 596nm）和最大发射波长（590, 620nm）。使用 RRX 和 TR 可以得到更好的颜色区分。

Cy2 比 FITC 在光下更稳定，Cy3 和 Cy5 比其他的荧光团探针要更亮，更稳定，背景更弱。

藻红蛋白 PE 的吸收波长范围较广，最大的吸收波长为 566nm，最大的发射波长为 574nm。藻红蛋白作为荧光标记物具有以下优点：首先具有强的长波长激发和发射荧光，可避免来自其他生物材料荧光的干扰；并且具有极高的发射量子产率；另外 PE 具有非常高的水溶性而且与许多生物学或合成材料的多位点稳定交联。

AMCA 的信号相对较弱，单标实验中不推荐使用 AMCA。AMCA 和荧光素的荧光波长只有很小的重叠范围，而和发出长波长荧光的荧光基团没有或者只有极少的重叠，因此它最常用于多标记实验中，比如免疫荧光显微镜和流式细胞仪。

本发明还提供了食物过敏原的新用途，即在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。

优选的，所述食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、榛子过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原为牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白 OVM、鱼小清

蛋白、虾肌球蛋白、花生 Arah1 蛋白、榛子 Corh1 蛋白、大豆 Gly mBd、蟹原肌球蛋白中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原带有标记分子。使得利用上述的检测试剂进行检测的检测结果更易于观察，且准确性高。

优选的，所述标记分子为酶标记分子。

本发明还提供了一种检测 IgA 肾病病因的方法，利用食物过敏原抗体，采用免疫组化法检测样本中的食物过敏原，若检测出某种或多种食物过敏原，则说明该种食物过敏原或该多种食物过敏原为该 IgA 肾病患者患者的病因。

优选的，所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、榛子过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白单克隆抗体、鸡蛋卵粘蛋白 OVM 单克隆抗体、鱼小清蛋白单克隆抗体、虾肌球蛋白单克隆抗体、花生 Arah1 蛋白单克隆抗体、榛子 Corh1 蛋白单克隆抗体、大豆 Gly mBd 单克隆抗体、蟹原肌球蛋白单克隆抗体中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原抗体为多克隆抗体、单克隆抗体中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原抗体为荧光标记抗体、酶标抗体或生物素标记抗体。

更优选的，所述食物过敏原抗体为异硫氰酸荧光素（FITC）标记抗体、四甲基异氰酸罗达明（TRITC）标记抗体、罗丹明红（RRX）标记抗体、德克萨斯红（TR）标记抗体、青类染料（Cy2, Cy3, Cy5）标记抗体、藻红蛋白或藻胆色素蛋白（PE）标记抗体或醋酸（AMCA）标记抗体。

上述任一方案中更优选的，所述样本为组织石蜡切片、组织冰冻切片中的至少一种。

更优选的，所述样本为肾组织石蜡切片，包括以下步骤：

- A. 肾组织石蜡切片脱蜡至水；
- B. 去除肾组织石蜡切片样本的内源性过氧化物酶；
- C. 抗原修复，然后封闭非特异性位点；
- D. 加入荧光标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察结果；或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育，洗涤，然后加入信号分子标记的 IgA 二抗，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察检测结果；或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育，洗涤，然后加入信号分子标记的 IgA 二抗，孵育、洗涤，加入信号分子标记的 IgG 二抗，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察结果。

育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察检测结果。

组织石蜡切片对抗原的定位效果较好，且利于长期保存，因此，选用肾石蜡切片，使得实验结果对于食物过敏原的定位更为准确，对需保存时间较长的样本来说，选用上述方法，检测结果更为准确。

优选的，所述样本为肾组织冰冻切片，包括以下步骤：

- A. 去除肾组织冰冻切片样本的内源性过氧化物酶；
- B. 抗原修复，然后封闭非特异性位点；
- C. 加入荧光标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察结果；或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育，洗涤，然后加入信号分子标记的 IgA 二抗，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察检测结果；或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体，孵育，洗涤，然后加入信号分子标记的 IgA 二抗，孵育、洗涤，加入信号分子标记的 IgG 二抗，孵育、洗涤、封片，然后通过荧光显微镜观察检测结果。

冰冻切片对食物过敏原的保真效果更好，而石蜡切片在组织固定，脱水、透明、浸蜡、包埋、脱蜡等过程中可能会对抗原的性质造成影响。此外，使用冰冻切片使得上述方法更为简单，而石蜡切片要求脱蜡入水、抗原修复等过程，比较繁琐，同时冰冻切片还可以避免石蜡自发荧光的干扰；但是冰冻切片在制备好后只能保存较短的时间，不利于大量样本的同时检测。因此，使用肾组织石蜡切片和肾组织冰冻切片各有优缺点。

本发明还提供了另外一种检测 IgA 肾病病因的方法，利用食物过敏原，通过 ELISA 技术检测样本中的食物过敏原抗体，若检测出某种或多种食物过敏原抗体，则说明该种食物过敏原或该多种食物过敏原为该 IgA 肾病患者患者的病因。

优选的，所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、榛子过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白 OVM、鱼小清蛋白、虾肌球蛋白、花生 Ara h1 蛋白、榛子 Cor h1 蛋白、大豆 Gly m Bd、蟹原肌球蛋白中的至少一种。

优选的，所述食物过敏原带有标记分子。

更优选的，所述标记分子为酶标记分子。

优选的，所述样本为血清、血浆、全血和组织液中的至少一种。

优选的，所述样本为血清样本，包括以下步骤：

- A. 在预包被有食物过敏原的 96 孔板中加入封闭液, 封闭非特异性位点, 孵育;
- B. 洗涤, 然后加入待检测的血清样本, 孵育;
- C. 洗涤, 加入酶标记 IgA 二抗, 孵育;
- D. 洗涤后加入显色液, 在避光条件下显色, 然后加入终止液, 利用酶标仪读取 96 孔板中各孔的吸光值。

优选的, 所述酶标记 IgA 二抗的酶标记分子可选用辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶 (AKP) 或葡萄糖氧化酶 (GOD)。

当酶标记 IgA 二抗为羊抗鼠 HRP-IgA 二抗时, 显色液为 TMB 显色液, 酶标仪读取的吸光值为 96 孔板中各孔在 450nm 处的吸光值。

利用上述方法进行检测对仪器的要求较低, 在基层医疗机构和普通实验室中也能进行, 使得对普通人群进行 IgA 肾病筛查成为可能, 也有利于 IgA 肾病的早期预警, 具有良好的临床应用前景。

上述利用食物过敏原进行 IgA 肾病病因检测的方法可以和利用食物过敏原抗体进行肾病病因检测的方法联合使用, 使得 IgA 肾病病因检测结果更为准确。

与现有技术相比, 本发明提出了食物过敏原和食物过敏原抗体的新用途, 即在制备 IgA 肾病检测试剂中的应用, 使得方便、快捷、准确的确定 IgA 肾病病因成为现实, 从而为 IgA 肾病的治疗提供新思路。另外, 本方面提供的检测 IgA 肾病病因的方法简单、高效, 检测结果准确。

附图说明

图 1 为 8 类食物过敏原基因片段 PCR 扩增 DNA 电泳图;

图 2 为 8 类食物过敏原的表达蛋白的 SDS-PAGE 电泳图;

图 3 为 8 类食物过敏原的单克隆抗体鉴定 western-blot 图;

图 4A 和图 4B 为部分 IgA 肾病患者肾组织切片 8 类食物过敏原免疫荧光图;

图 5 为 ELISA 检测已确诊 IgA 肾病患者血清中总抗体 (总 IgA 和总 IgG) 及食物过敏原特异性抗体柱形图;

图 6 为 ELISA 检测已确诊 IgA 肾病患者血清中常见食物抗原特异性抗体柱形图。

具体实施方式

一、食物过敏原与 IgA 肾病直接相关证明实验。

1. 八种食物过敏原的基因的克隆和表达。

参照 NCBI 序列: 牛奶主要过敏原 BLG 基因 (GeneBank ID EU883598) (表达牛奶 β -乳球蛋白), 鸡蛋卵粘蛋白 OVM (GeneBank ID FJ227543)、鱼小清蛋

白 (GeneBank ID EF591789)、虾肌球蛋白 (GeneBank ID EF584510)、花生 Ara h1 蛋白 (GeneBank ID AF432231)、榛子 Corh1 蛋白 (GeneBank ID EU195058)、大豆 Gly mBd (GeneBank EU883600) 和蟹原肌球蛋白 Tropomyosin (GeneBank ID EF143836), 分别设计了 8 对引物, 见表 1。

基因名称	类型	序列 (5' ---->3')	序列编号
牛奶 BLG	F	GAACATATGAAGTGCCTCCTGCT	SEQ ID NO:1
	R	GAACTCGAGCTAGATGTGGCACTGCTC	SEQ ID NO:2
鸡蛋卵粘蛋白 OVM	F	ATGGCCATGGCAGGCGTC	SEQ ID NO:3
	R	TCAGCATTTTCCAAAATGGCTTA	SEQ ID NO:4
鱼小清蛋白	F	ATGGCGTTCGCCGGCCTTCT	SEQ ID NO:5
	R	AAGTTCTGCAGGAACAGTTT	SEQ ID NO:6
虾肌球蛋白	F	ATGGAGGCCATCAAGAAGAAGATGC	SEQ ID NO:7
	R	TTAGTAGCCAGACAGTTCGC	SEQ ID NO:8
花生 Ara h1 蛋白	F	AGACTGGAGACAACCAAGAGAAG	SEQ ID NO:9
	R	TTTCTTCCCTCACATGGCTACC	SEQ ID NO:10
榛子 Corh1 蛋白	F	ATGGGTGTTTTCTGCTACGAGGA	SEQ ID NO:11
	R	CTAACAGTAGGCATCAGGGTGTG	SEQ ID NO:12
大豆 GlymBd	F	AGGTGTAGATCTGGCGGCGGTGTCATCACCCAAGTA	SEQ ID NO:13
	R	TCACACAAGCTTAGCCTGCGGATCCGCCGCCGCTTAAGAACGCTTGCTC	SEQ ID NO:14
蟹原肌球蛋白	F	ATGGAGGCCATCAAGAAGAAGATGC	SEQ ID NO:15
	R	TTAATAGCCAGTCAGTTCGC	SEQ ID NO:16

表 1

1.1 RT-PCR。

分别取 100mg 上述 8 类食物过敏原的组织, 用 RNasy mini kit (购自于 Qiagen 公司) 产品说明的操作规程提取总 RNA, 并对 RNA 进行定量和质量鉴定。

逆转录反应是使用 BBI 公司的 AMV 逆转录酶体系, 将 1 μ g 的总 RNA 与 0.5 μ g 的 Oligo dT 混合, 70 $^{\circ}$ C 加热 5 分钟, 迅速冷却至 0 $^{\circ}$ C。按产品说明加入缓冲液, 42 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时。分别取逆转录反应后的 cDNA 4 μ L, 分别作为 PCR 反应的模板扩增上述 8 种食物过敏原的基因。

PCR 反应体系为, 95 $^{\circ}$ C 3min 然后用 Touchdown 方式进行扩增, 第一个循环为 94 $^{\circ}$ C 45S, 65 $^{\circ}$ C 45S, 72 $^{\circ}$ C 2min, 此后每个循环的退火温度下降 1 $^{\circ}$ C, 当退火温度下降到 57 $^{\circ}$ C 时, 则以 94 $^{\circ}$ C 45s, 57 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min 运行 35 个循环, 再于 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min 后结束反应。将 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳。

结果如图 1 所示, 8 类食物过敏原基因扩增片段在预测位置有明亮的条带, 说明 RT-PCR 扩增成功。图中 A-H 分别表示: A: 牛奶 β -乳球蛋白 530bp; B: 鸡蛋卵粘蛋白 627bp; C: 鱼小清蛋白 230bp; D: 虾肌球蛋白 850bp; E: 花生

Arah1 130bp, F: 榛子 Corh1 432bp; G: 大豆 Gly mBd 450bp; H: 蟹原肌球蛋白 855bp。

1.2 重组质粒的构建。

使用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收 PCR 产物，按照产品说明操作规程进行回收。将 1.1 回收的 PCR 产物分别使用 TaKaRa pMD18-T 载体试剂盒进行连接。连接产物转化感受态细胞大肠杆菌，涂板 37℃ 过夜培养，分别采用 PCR 扩增和双酶切鉴定的方式筛选阳性克隆质粒。操作方法参照第三版《分子克隆》第一章 96-99 页。将鉴定的阳性菌落由上海生工生物工程有限公司进行序列分析。将测序正确的质粒与原核表达载体 pET-28a 分别进行双酶切。使用 T4 DNA 连接酶，将酶切所获基因片段与原核表达载体 pET-28a（购自 Qiagen 公司）的酶切产物相互连接。再将连接产物转化至感受态大肠杆菌，菌落 PCR 及质粒双酶切鉴定准确无误后转化高效表达菌大肠杆菌 BL21 (DE3) 和 E. coli Rosetta (DE3)，得表达菌，用于诱导表达。

1.3 重组食物过敏原蛋白的诱导表达。

将 1.2 转化后的表达菌挑取单菌落至 20mL LB(含卡那霉素 40 μg/mL) 试管中，37℃，200 rpm 摇床过夜。按 1:50 接种量，将 20mL 培养物接种到 1L LB 培养基(含卡那霉素 40 μg/mL) 中。37℃，200 rpm 摇床培养，待细菌生长处于对数生长期 ($A_{600nm}=0.6-0.8$) 时，加入终浓度为 1mmol/L 的 IPTG，诱导蛋白表达。4h 后取 1mL 菌液，制备样品进行 SDS-PAGE 凝胶电泳来检测表达情况。在上述表达产物中，重悬于 20mM Tris-HCl(pH7.5)。三次冻融后超声波(300W, 20min, 冰浴) 破菌。4℃，15000rpm 离心 15min，分别取上清与沉淀进行 15% SDS-PAGE 电泳分析。

结果如图 2 所示重组 8 类食物过敏原蛋白在理论分子量处有外源蛋白条带出现，重组蛋白可在大肠杆菌表达系统大量表达。图中 A-H 分别表示 8 种重组食物过敏原的表达情况，A: 牛奶 β-乳球蛋白 26kD; B: 鸡蛋卵粘蛋白 21kD; C: 鱼小清蛋白 42kD; D: 虾肌球蛋白 36kD; E: 花生 Arah1 38kD, F: 榛子 Corh1 15.8kD; G: 大豆 Gly mBd 16.5kD; H: 蟹原肌球蛋白 38kD。

1.4 重组蛋白的分离纯化。

装好 Ni-NTA 柱（购自 Pharmacia Biotech 公司），检测密封性。清洗，具体清洗过程程序按 Ni-NTA（说明书操作进行。用 Ni-NTA 装柱，1.6×20cm，柱体积为 10mL，用缓冲液 1 平衡 2-5 个柱床体积，流速为 2mL/min；将 20mL 细胞破碎液（50mM PBS, pH7.4, 0.5mM NaCl）0.45μM 滤膜过滤，上样，流速为 1mL/min；用缓冲液 1 再洗 2-5 个柱床体积，流速为 2mL/min；再用分别含 20mM、50mM、

100mM、200mM、300mM、400mM 的咪唑洗脱，流速为 2mL/min，收集洗脱峰尖和峰液，进行 SDS-PAGE 电泳，并对含目标蛋白的洗脱组分分别进行透析并冻干保存，得重组蛋白：牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白、鱼小清蛋白、虾肌球蛋白、花生 Arah1、榛子 Corh1 15、大豆 Gly mBd、蟹原肌球蛋白。

1.5 免疫学特性鉴定。

将 1.4 纯化的重组蛋白进行 15%SDS-PAGE 电泳分离，电压 80 至 100V，时间 90 至 120min，然后进行免疫印迹，操作步骤见《分子克隆》，将 SDS-PAGE 胶上蛋白电转到硝酸纤维素膜上，电转条件为：300mA/板；350mA/2 板，60min。取下膜，TBA 洗膜，5min $\times$ 3。将膜置于封闭液中缓慢摇动 30min。4℃封闭过夜。将 NC 膜裁剪成小片条并放入血清池孵育槽，分别与已稀释的 25 例含有相应特异性 IgE 的过敏患者血清（一抗）37℃孵育 2h。回收血清。TBST 洗膜，5min $\times$ 3。加入用二抗 buffer 稀释（1:3000）的生物素标记的羊抗人 IgE 抗体（二抗），37℃孵育 2h。TBST 洗膜，5min $\times$ 3。加入经 HRP 标记链霉亲和素 buffer 稀释（1:1000）的辣根过氧化物酶（HRP）标记的链霉亲和素。37℃孵育 1.5h。TBST 洗膜，5min 3 次。TBS 洗膜，5min 3 次。在膜表面滴加 DAB 显色液，双蒸水洗涤终止显色反应。

2. 八种食物过敏原的单克隆抗体的制备。

2.1 杂交瘤细胞的制备。

将 1.4 制备所得的鸡蛋卵粘蛋白溶解，取 1mL 0.25g/L 与等体积的弗氏完全佐剂（购于 Sigma 公司）充分乳化后皮下注射于 5 只 Balb/c 小鼠（购自于广东省医学实验动物中心）。每间隔 3 周加强免疫 1 次，加强免疫时改用弗氏不完全佐剂，抗原量及注射途径不变。第 2 次加强免疫后 7d 取尾血测效价。融合前 3d，经尾静脉注射同等剂量的抗原 PBS 溶液再加强免疫 1 次。分别收集免疫小鼠脾细胞和 NS-1 细胞以约 1:5 的比例在 50%PEG 作用下按常规方法融合。融合后的细胞沉淀用 2.5mL 完全培养液轻悬加入 22.5mL 半固体培养基 Medium D 混匀后倒入直径 3.5cm 的平皿中，每个平皿约 2mL，37℃，5%CO₂ 培养。一周后肉眼可见平皿的培养基表面有白色斑点，显微镜下即为细胞克隆团。无菌条件下将平皿中分散的、单个的细胞团吸起放入 96 孔板培养液中，继续培养。96 孔板中细胞长满后间接 ELISA 法进行检测，阳性孔用有限稀释法进行亚克隆。

另外七类食物过敏原的杂交瘤细胞的制备可参照上述方法进行。

2.2 单克隆抗体生产和效价测定。

对已经建株的杂交瘤细胞扩大培养同时在 BALB/c 小鼠体内诱生小鼠腹水生产单克隆抗体。取 8 周龄的 BALB/c 小鼠，腹腔注射液体石蜡 0.5mL/只，7 天后

腹腔注射杂交瘤细胞 5×10^5 – 5×10^6 /只, 7–10 天后抽取小鼠腹水, 1200r/min 离心 10min 取上清, 用间接 ELISA 测定效价。将腹水按 1: 100、1: 200、1: 400、1: 800、等倍比稀释后, 将重组蛋白包被, 测定其 A450nm 值, 用免疫前小鼠血清做平行阴性对照试验, 以与重组蛋白靶抗原发生反应的单克隆抗体的最大稀释度即为其效价, $P/N \geq 2.1$ 为阳性。8 类食物过敏原的单克隆抗体效价结果如表 2 所示, 8 株抗体效价在 1.3×10^{-4} 至 10^{-8} 以上。抗体纯化参照 HiTrap protein A 亲和层析说明书进行抗体纯化, HiTrap protein A 购自 Amersham 公司。

类别	牛奶 BLG	鸡蛋卵粘蛋白 OVM	鱼小清蛋白	虾肌球蛋白
单克隆抗体效价	10^{-6}	10^{-8}	4×10^{-5}	1.3×10^{-4}
类别	花生 Ara h1 蛋白	榛子 Corh1 蛋白	大豆 Gly Bd	蟹原肌球蛋白
单克隆抗体效价	2.048×10^{-5}	10^{-7}	5×10^{-5}	5×10^{-6}

表 2

2.3 单克隆抗体的鉴定。

先将 1.4 制备得到的重组蛋白进行 12% SDS-PAGE 电泳, 以蛋白质电泳转移仪将凝胶上的蛋白质转至固定好的硝酸纤维素膜上 (300mA, 50min), 用丽春红染液对膜进行染色后剪膜, 再用超纯水、TBST (10mmol/L Tris, 150mmol/L NaCl, 0.2% Tween-20, pH8.0) 洗去丽春红。加用 TBST 配制的 2% BSA 4℃ 封闭过夜, TBST 摇洗后, 分别加入此单克隆抗体室温孵育 1h, 以免疫前鼠血清作为阴性对照; 用 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 的抗体为二抗, 室温孵育 1h, TBST 洗膜后, 用 DAB 试剂显色。

Western blotting 分析表明, 多株单抗均能特异性与 8 类食物过敏原蛋白结合结果如图 3 所示。从而鉴定出此 8 株单抗具有抗 8 类食物过敏原蛋白的活性。图中 A–H 分别表明纯化后的 8 类食物过敏原蛋白均能与鼠抗食物过敏原蛋白单克隆抗体 IgG 相互作用, 均具有良好的免疫原性。A: 牛奶 β -乳球蛋白 26kD; B: 鸡蛋卵粘蛋白 21kD; C: 鱼小清蛋白 42kD; D: 虾肌球蛋白 36kD; E: 花生 Ara h1 38kD, F: 榛子 Corh1 15.8kD; G: 大豆 Gly mBd 16.5kD; H: 蟹原肌球蛋白 38kD。

2.4 单克隆抗体的标记。

单克隆抗体标记生物素可参照 Sulfo-NHS-Biotin 试剂盒 (购自于 Thermo 公司) 说明书进行操作。如: 将 Sulfo-NHS-Biotin 放置室温平衡 10min。抗体浓度调整至 3mg/ μ L, 置于 30KD 超滤离心柱内, 10000 转/min, 离心 5min, 将 Buffer 置换为 PBS 缓冲液。将 10mM Sulfo-NHS-Biotin 溶解于 500 μ L 超纯水中。加入预先计算好的体积量的 Sulfo-NHS-Biotin 溶液到抗体溶液中。室温避光孵育

30min。将反应物至于超滤离心柱中，1000g 离心 2min，去下清，将滤膜放回离心管。加入 100μL PBS 于滤膜上，1000g 离心 2min，弃下清，重复 3 次。将滤膜倒置于新离心管中，1000g 离心 2min，收集滤液，滤液为纯化的抗体溶液。
-20℃保存抗体。

3.1 总蛋白抗原的制备

用液氮研磨花生生成粉末，按1:15的比例用丙酮浸泡去脂48h，放在4℃冰箱，每12h换液1次，搅拌2次。去丙酮，干燥后称重，每5g样品加30mL提取液（8mmol/L Tris-HCl, 25mmol/L Tricine, pH8.6）4℃过夜，11000转/min，离心30min，收集上清。取上清进行不连续SDS - PAGE分析粗提液中蛋白质组分并测定分子量。

3.2 多克隆抗体的制备。

体重3kg的雄性新西兰兔1只，免疫前1d耳缘静脉取血，4℃静置1h后分离血清作为阴性对照。初次免疫时，每只新西兰兔背部皮下多点注射2mL弗氏佐剂乳化的花生总蛋白抗原（蛋白浓度为0.5mg/mL）。2周后以不完全弗氏佐剂乳化的融合蛋白纯品进行第二次免疫，方法同前。隔2周后重复免疫1次，剂量、方法均与第二次免疫相同。免疫3次后，耳缘静脉采血作多克隆抗体ELISA法效价分析。效价符合要求（ELISA法效价>1：1280000）后，加强免疫1次。加强免疫后3d，颈总动脉插管法放血，离心收集血清，放入-80℃保存备用。

3.3 多克隆抗体测定。

包被花生总蛋白，蛋白至终浓度为25 μg/mL，每孔100 μL常规包被96 孔板（留1 个孔作空白对照），37℃孵育2 h，洗板机洗板3 次，每次3min，PBST-5% BSA每孔加100 μL，37℃封闭2h。重复洗板后以PBS稀释多克隆抗体（1：5000、1：20000、1：80000、1：320000、1：1280000），37℃孵育2h，同时选择1个复孔作为阴性对照。每个浓度选择3个复孔做对比，洗板3次，每孔加入100 μL 1：5000 TBST-5% BSA稀释的HRP标记羊抗兔IgG，37℃孵育40min。同样方法洗板3次后加底物TMB 50 μL显色5 min，1mol/L H₂SO₄终止液终止反应，酶标仪490 nm单波长紫外光检测。花生多克隆抗体效价测定的ELISA法分析免疫后第1次与第2次抗体效价3次测量均值与免疫前3次测量均值比较，结果均大于2.1倍，证明花生多克隆抗体效价>1：128 000。血清-20℃保存。

3.4多克隆抗体的纯化

将制备的多抗的抗血清用结合缓冲液（1mol/L Tris/HCl、pH9.0、20mmol/L Na₃PO₄）稀释后，经0.45 μm的滤膜过滤，加样到HiTrap™ ProteinG HP的纯化柱上（购自Amersham公司），按说明书进行抗体纯化。用洗脱缓冲液（100mmol/L

甘氨酸-HCl, pH2.7) 洗脱后, 收集洗脱峰。Western blotting 鉴定抗花生多克隆抗体。

4. 标记食物过敏原多克隆抗体。

多克隆抗体的标记可参考 2.4 单克隆抗体标记。

5. 肾组织荧光免疫组化检测。

1) 已确诊的 IgA 肾病患者的肾组织石蜡切片 167 例常规脱蜡至水;

2) 滴加 3% H_2O_2 孵育 20min, 去除内源性过氧化物酶, pH 7.4 0.01mol/LPBS 漂洗 3 次。滴加 0.25%胰酶 (购于加拿大 invitrogen 公司) 于石蜡切片上, 置于湿盒中, 37℃ 孵育 15 分钟进行抗原修复。PBST 浸洗 3 次, 5 分钟/次。滴加 5%BSA (购于武汉博士德生物公司) 于石蜡切片上, 至于湿盒中, 37℃ 孵育 1 小时。甩掉石蜡切片上的封闭液, 将 2.2 制备所得的 8 种不同的食物过敏原的小鼠单克隆抗体按照所测得的效价 (见表 2) 分别稀释成不同的工作液, 分别滴加到石蜡切片上, 每张切片约 50 μ l, 以全部覆盖组织为准。置于湿盒中, 4℃ 过夜。PBST 浸洗 3 次, 5 分钟/次。在避光情况下吸干组织周围液体, 滴加羊抗人 IgA-TRITC 二抗 (1:3000, 购于美国 SouthernBiotech 公司), 每块组织块约 50 μ l, 37℃, 45 分钟。PBST 浸洗 3 次, 5 分钟/次。吸干组织周围液体, 滴加兔抗小鼠 IgG-FITC 二抗 (1:1000, 购于美国 SouthernBiotech 公司), 每块组织块约 50 μ l, 37℃, 45 分钟。PBST 洗 5 次, 5 分钟/次。擦干组织周围液体, 甘油封片, 荧光显微镜下观察结果, 并对观察到的实验结果进行统计分析, 结果见表 3、图 4A 和图 4B。

各组检测的抗原类型	牛奶 BLG	鸡蛋卵粘蛋白 OVM	鱼小清蛋白	虾肌球蛋白	花生 Ara h1 蛋白
阳性	9	8	4	14	8
阴性	6	3	7	4	9
总和	15	11	11	18	17
阳性率 (%)	60	72.2	36.4	72.2	47
各组检测的抗原类型	榛子 Corh1 蛋白	大豆 Gly Bd	蟹原肌球蛋白	混合	总计
阳性	13	6	16	27	105
阴性	8	10	8	7	62
总和	21	16	24	34	167
阳性率 (%)	61.9	37.5	66.7	80	62.8

表 3. 确诊 IgA 肾病患者肾组织切片食物抗原检测统计表。

表 3 所述混合,是指将上述 8 类食物过敏原的单克隆抗体混合起来,制备成 8 类食物抗原的混合抗体。图 4A 和图 4B 所示 A-H 分别表示用 2.2 制备所得的 8 类不同的食物过敏原的小鼠单克隆抗体进行的检测组: A: 牛奶 BLG 单克隆抗体; B: 鸡蛋卵粘蛋白 OVM 单克隆抗体; C: 鱼小清蛋白单克隆抗体; D: 虾肌球蛋白单克隆抗体; E: 花生 Ara h1 蛋白单克隆抗体; F: 榛子 Corh1 蛋白单克隆抗体; G: 大豆 Gly Bd 单克隆抗体; H: 蟹原肌球蛋白单克隆抗体; I: 混合组(包括上述 8 类单克隆抗体的); J: 空白对照。

图 4A 和 4B 中可观察到, IgA 肾病患者肾组织切片检测结果呈阳性, 且食物过敏原主要分布于肾小球和肾小管内皮细胞, 而正常人对照组则呈阴性。被检测的所有 IgA 肾病患者肾组织切片中, 食物过敏原的免疫荧光总阳性率为 62.8%。其中, IgA 肾病患者的肾组织切片的鸡蛋、牛奶、小麦、甲壳类(虾、蟹)食物过敏原的免疫荧光定位阳性率超过 50%; 而 IgA 肾病患者的肾组织切片的大豆、花生、鱼食物过敏原的免疫荧光定位阳性率较低(小于 50%)。上述食物过敏原检测阳性的 IgA 肾病患者在禁食相对应的阳性过敏原食物后, 病情明显好转, 说明该阳性的食物过敏原在肾小球或肾小管的沉积是 IgA 肾病的病因。

6. ELISA 检测 IgA 肾病人血清中食物过敏原抗体

在近一个月内收集 150 例临床确诊 IgA 肾病患者血清, 采用 ELISA 对患者血清中 8 类食物过敏原的特异性抗体进行检测。将一定量的 1.4 制备的 8 种重组食物过敏原分别稀释到 pH9.6 的包被液中, 至终浓度为 $10\mu\text{g/mL}$, 加入到 96 孔板中, $100\mu\text{L/孔}$, 4°C 过夜。用 PBST 洗液(含 0.5%吐温 20)洗板 5 次, 加入封闭液, $100\mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 2h。再用 PBST 洗液洗板 5 次, 用含有 1%小牛血清的 PBST 按 1: 3000 病人血清, 然后加入到分别已包被的 96 孔酶标检测板孔中, $100\mu\text{L/孔}$, 37°C 孵育 2h。PBST 洗液洗板 5 次, 每孔加入 $100\mu\text{L}$ 已稀释的羊抗鼠 HRP-IgA(1: 4000), 37°C 孵育 2h。PBST 洗板 5 次, 加入 $50\mu\text{L}$ 显色液 A 和 $50\mu\text{L}$ 显色液 B, 37°C 避光条件下显色 15min, 加 $50\mu\text{L}$ 2M H_2SO_4 终止反应, 读取吸光值 (A_{450} 值)。

结果见图 5 和图 6。如图 5 所示: IgA 肾病患者血清里总 IgA (tIgA) 较自身血清总 IgG (tIgG) 和正常人血清对照组 tIgA 均显著增高; 患者血清中总 tIgG 较正常人血清中 tIgG 均明显降低; IgA 肾病患者血清里常见的八类混合食物特异性 IgA (sIgA) 显著升高; IgA 肾病患者血清中 sIgA 较患者自身 sIgG 有显著性差异 ($P<0.01$), IgA 肾病患者血清中 sIgA 较正常人血清对照组中 sIgA 有显著性差异 ($P<0.01$)。如图 6 所示 (1: 牛奶 β -乳球蛋白; 2: 鸡蛋卵粘蛋白; 3: 鱼小清蛋白; 4: 虾肌球蛋白; 5: 花生 Ara h1 蛋白; 6: 榛子 Corh1 蛋白; 7:

大豆 Gly mBd 蛋白; 8: 蟹原肌球蛋白; 9: 空白对照), IgA 肾病患者血清中, 常见食物过敏原 sIgA 均显著性升高, 而常见食物抗原 sIgG 差异不明显 (除了虾过敏原 sIgG); 其中, 鸡蛋、牛奶、小麦、甲壳类 (虾、蟹) 的 sIgA 相对较高, 与食物特异性过敏原荧光定位检测结果一致。

上述食物过敏原抗体检测阳性的 IgA 肾病患者在禁食相对应的阳性过敏原食物后, 病情明显好转, 说明该阳性的食物过敏原是 IgA 肾病的病因。

综上, 食物过敏原和食物过敏原抗体与 IgA 肾病的发生密切相关, 食物过敏原是部分 IgA 肾病的病因, 因此, 可以通过检测样本 (如肾组织石蜡切片、肾组织冰冻切片、血清、全血、血浆和/或组织液等) 中食物过敏原或食物过敏原抗体的情况来确定 IgA 肾病的病因。

二、利用食物过敏原或食物过敏原抗体进行 IgA 肾病病因检测。

1. 样本为 IgA 肾病患者的肾组织石蜡切片。

- A. 肾组织石蜡切片脱蜡至水;
- B. 去除肾组织石蜡切片样本的内源性过氧化物酶;
- C. 抗原修复, 然后封闭非特异性位点;
- D. 加入荧光标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤, 加入信号分子标记的 IgG 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果。

优选的, 具体步骤如下;

- A. 肾组织石蜡切片脱蜡至水;
- B. 去除肾组织石蜡切片样本的内源性过氧化物酶: 滴加 3% 双氧水 (甲醇配置) 于切片上, 置于湿盒中, 室温孵育 20 分钟;
- C. 抗原修复, 然后封闭非特异性位点: 滴加 0.25% 胰酶 (购于加拿大 invitrogen 公司) 于切片上, 置于湿盒中, 37℃ 孵育 15 分钟; 滴加 5% BSA (购于武汉博士德生物公司) 于切片上, 至于湿盒中, 37℃ 孵育 1 小时;
- D1. 加一抗: 将切片上的封闭液倒去, 勿洗; 将 2.2 制备的八种不同的小鼠食物过敏原单抗, 分别滴加到切片中的组织上, 每张切片约 50 μ L, 以全部覆盖组织为准; 至于湿盒中, 4℃ 过夜;
- D2. 加二抗: (以下流程均需避光) 吸干组织周围液体, 滴加羊抗人 IgA-TRITC 二抗 (购于美国 SouthernBiotech 公司), 每张切片约 50 μ L, 37℃ 孵育, 45 分

钟;

D3. 加另一二抗: 吸干组织周围液体, 滴加兔抗小鼠 IgG-FITC 二抗 (购于美国 SouthernBiotech 公司), 每张切片约 50 μ L, 37°C 孵育, 45 分钟;

D4. 擦干组织周围液体, 甘油封片, 指甲油封边; 然后在荧光显微镜下观察结果。

2. 样本为 IgA 肾病患者的肾组织冰冻切片。

A. 去除肾组织冰冻切片样本的内源性过氧化物酶;

B. 抗原修复, 然后封闭非特异性位点;

C. 加入荧光标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤, 加入信号分子标记的 IgG 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果。

优选的, 具体步骤如下;

A. 去除肾组织冰冻切片样本的内源性过氧化物酶: 冰冻切片制备好后, 室温放置 30 分钟; 然后在 4°C 丙酮溶液中固定 10 分钟; 然后用 PBS 溶液洗涤 3 次; 然后再用过氧化氢孵育 5-10 分钟, 消除内源性过氧化物酶的活性;

B. 抗原修复, 然后封闭非特异性位点: 滴加 0.25% 胰酶 (购于加拿大 invitrogen 公司) 于切片上, 置于湿盒中, 37°C 孵育 15 分钟; 滴加 5% BSA (购于武汉博士德生物公司) 于切片上, 至于湿盒中, 37°C 孵育 1 小时;

C1. 加一抗: 将切片上的封闭液倒去, 勿洗; 将 2.2 制备的八种不同的小鼠食物过敏原单抗, 分别滴加到切片中的组织上, 每张切片约 50 μ L, 以全部覆盖组织为准; 至于湿盒中, 4°C 过夜;

C2. 加二抗: (以下流程均需避光) 吸干组织周围液体, 滴加羊抗人 IgA-TRITC 二抗 (购于美国 SouthernBiotech 公司), 每张切片约 50 μ L, 37°C 孵育, 45 分钟;

C3. 加另一二抗: 吸干组织周围液体, 滴加兔抗小鼠 IgG-FITC 二抗 (购于美国 SouthernBiotech 公司), 每张切片约 50 μ L, 37°C 孵育, 45 分钟;

C4. 擦干组织周围液体, 甘油封片, 指甲油封边; 然后在荧光显微镜下观察结果。

3. 样本为血清。

A. 在预包被有食物过敏原的 96 孔板中加入封闭液, 孵育;

B. 洗涤, 然后加入待检测的血清样本, 孵育;

C. 洗涤，加入酶标记 IgA 二抗，孵育；

D. 洗涤后加入显色液，在避光条件下显色，然后加入终止液，利用酶标仪读取 96 孔板中各孔的吸光值。

优选的，所述酶标记 IgA 二抗的酶标记分子可选用辣根过氧化物酶（HRP）、碱性磷酸酶（AKP）或葡萄糖氧化酶（GOD）。

当酶标记 IgA 二抗为羊抗鼠 HRP-IgA 二抗时，显色液为 TMB 显色液，酶标仪读取的吸光值为 96 孔板中各孔在 450nm 处的吸光值。

具体步骤如下：

A. 食物过敏原的预包被：将一定量的 1.4 制备的 8 种重组食物过敏原分别稀释到 pH9.6 的包被液中，至终浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ ，加入到 96 孔板中， $100 \mu\text{L/孔}$ ， 4°C 过夜；

B. 用 PBST 洗液（含 0.5%吐温 20）洗板 5 次，加入封闭液， $100 \mu\text{L/孔}$ ， 37°C 孵育 2h；

C. 再用 PBST 洗液洗板 5 次，用含有 1%小牛血清的 PBST 按 1：3000 病人血清，然后加入到分别已包被的 96 孔酶标检测板孔中， $100 \mu\text{L/孔}$ ， 37°C 孵育 2h；

D. PBST 洗液洗板 5 次，每孔加入 $100 \mu\text{L}$ 已稀释的羊抗鼠 HRP-IgA（1：4000）， 37°C 孵育 2h；

E. PBST 洗板 5 次，加入 $50 \mu\text{L}$ 显色液 A 和 $50 \mu\text{L}$ 显色液 B（此处的显色液 A、B 分别是什么？请确认）， 37°C 避光条件下显色 15min，加 $50 \mu\text{L}$ $2\text{M H}_2\text{SO}_4$ ，终止反应，读取吸光值（A450 值）。

以上内容是结合具体的优选实施方式对本发明所作的进一步详细说明，不能认定本发明的具体实施只局限于这些说明。对于本发明所属技术领域的普通技术人员来说，在不脱离本发明构思的前提下，还可以做出若干简单推演或替换，都应当视为属于本发明的保护范围。

权利要求书

1. 食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。
2. 如权利要求 1 所述的食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、小麦过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。
3. 如权利要求 2 所述的食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白单克隆抗体、鸡蛋卵粘蛋白 OVM 单克隆抗体、鱼小清蛋白单克隆抗体、虾肌球蛋白单克隆抗体、花生 Arah1 蛋白单克隆抗体、榛子 Corh1 蛋白单克隆抗体、大豆 Gly mBd 单克隆抗体和蟹原肌球蛋白单克隆抗体中的至少一种。
4. 如权利要求 1 或 2 或 3 所述的食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原抗体为多克隆抗体、单克隆抗体中的至少一种。
5. 如权利要求 4 所述的食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原抗体为荧光标记抗体、酶标抗体或生物素标记抗体。
6. 如权利要求 5 所述的食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原抗体为异硫氰酸荧光素标记抗体、四甲基异氰酸罗达明标记抗体、罗丹明红标记抗体、德克萨斯红标记抗体、青类染料标记抗体、藻红蛋白标记抗体、藻胆色素蛋白标记抗体或醋酸标记抗体。
7. 食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。
8. 如权利要求 7 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、小麦过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。
9. 如权利要求 8 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原为牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白 OVM、鱼小清蛋白、虾肌球蛋白、花生 Arah1 蛋白、榛子 Corh1 蛋白、大豆 Gly mBd 和蟹原肌球蛋白中的至少一种。
10. 如权利要求 7 或 8 或 9 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原带有标记分子。
11. 如权利要求 10 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述标记分子为酶标记分子。

12. 一种检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 利用食物过敏原抗体, 采用免疫组化法检测 IgA 肾病患者样本中的食物过敏原, 若检测出某种或多种食物过敏原, 则说明该种食物过敏原或该多种食物过敏原为该 IgA 肾病患者患者的病因。

13. 如权利要求 12 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、榛子过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。

14. 如权利要求 13 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白单克隆抗体、鸡蛋卵粘蛋白 OVM 单克隆抗体、鱼小清蛋白单克隆抗体、虾肌球蛋白单克隆抗体、花生 Arahl 蛋白单克隆抗体、榛子 Corhl 蛋白单克隆抗体、大豆 Gly mBd 单克隆抗体和蟹原肌球蛋白单克隆抗体中的至少一种。

15. 如权利要求 12 或 13 或 14 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述食物过敏原抗体为多克隆抗体、单克隆抗体中的至少一种。

16. 如权利要求 15 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述食物过敏原抗体为荧光标记抗体、酶标抗体或生物素标记抗体。

17. 如权利要求 16 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述食物过敏原抗体为异硫氰酸荧光素标记抗体、四甲基异氰酸罗达明标记抗体、罗丹明红标记抗体、德克萨斯红标记抗体、青类染料标记抗体、藻红蛋白标记抗体、藻胆色素蛋白标记抗体或醋酸标记抗体。

18. 如权利要求 12 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述样本为组织石蜡切片、冰冻切片中的至少一种。

19. 如权利要求 18 所述的检测 IgA 肾病病因的方法, 其特征在于: 所述样本为肾组织石蜡切片, 包括以下步骤:

- A. 肾组织石蜡切片脱蜡至水;
- B. 去除肾组织石蜡切片样本的内源性过氧化物酶;
- C. 抗原修复, 然后封闭非特异性位点;
- D. 加入荧光标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果; 或者加入无标记的食物过敏原单克隆抗体, 孵育, 洗涤, 然后加入信号分子标记的 IgA 二抗, 孵育、洗涤, 加入信号分子标记的 IgG 二抗, 孵育、洗涤、封片, 然后通过荧光显微镜观察检测结果。

20. 一种检测 IgA 肾病病因的方法，其特征在于：利用食物过敏原，通过 ELISA 技术检测样本中的食物过敏原抗体，若检测出某种或多种食物过敏原抗体，则说明该种食物过敏原或该多种食物过敏原为该 IgA 肾病患者患者的病因。

21. 如权利要求 20 所述的检测 IgA 肾病病因的方法，其特征在于：所述的食物过敏原为花生过敏原、坚果类过敏原、鱼类过敏原、甲壳类过敏原、乳类过敏原、小麦过敏原、大豆过敏原和蛋类过敏原中的至少一种。

22. 如权利要求 21 所述的检测 IgA 肾病病因的方法，其特征在于：所述食物过敏原抗体为牛奶 β -乳球蛋白、鸡蛋卵粘蛋白 OVM、鱼小清蛋白、虾肌球蛋白、花生 Arah1 蛋白、榛子 Corh1 蛋白、大豆 Gly mBd 和蟹原肌球蛋白中的至少一种。

23. 如权利要求 20 或 21 或 22 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述食物过敏原带有标记分子。

24. 如权利要求 23 所述的食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用，其特征在于：所述标记分子为酶标记分子。

25. 如权利要求 20 所述的检测 IgA 肾病病因的方法，其特征在于：所述样本为血清、血浆、全血和组织液中的至少一种。

26. 如权利要求 25 所述的检测 IgA 肾病病因的方法，其特征在于：所述样本为血清样本，包括以下步骤：

- A. 在预包被有食物过敏原的 96 孔板中加入封闭液，孵育；
- B. 洗涤，然后加入待检测的血清样本，孵育；
- C. 洗涤，加入酶标记 IgA 二抗，孵育；
- D. 洗涤后加入显色液，在避光条件下显色，然后加入终止液，利用酶标仪读取 96 孔板中各孔的吸光值。

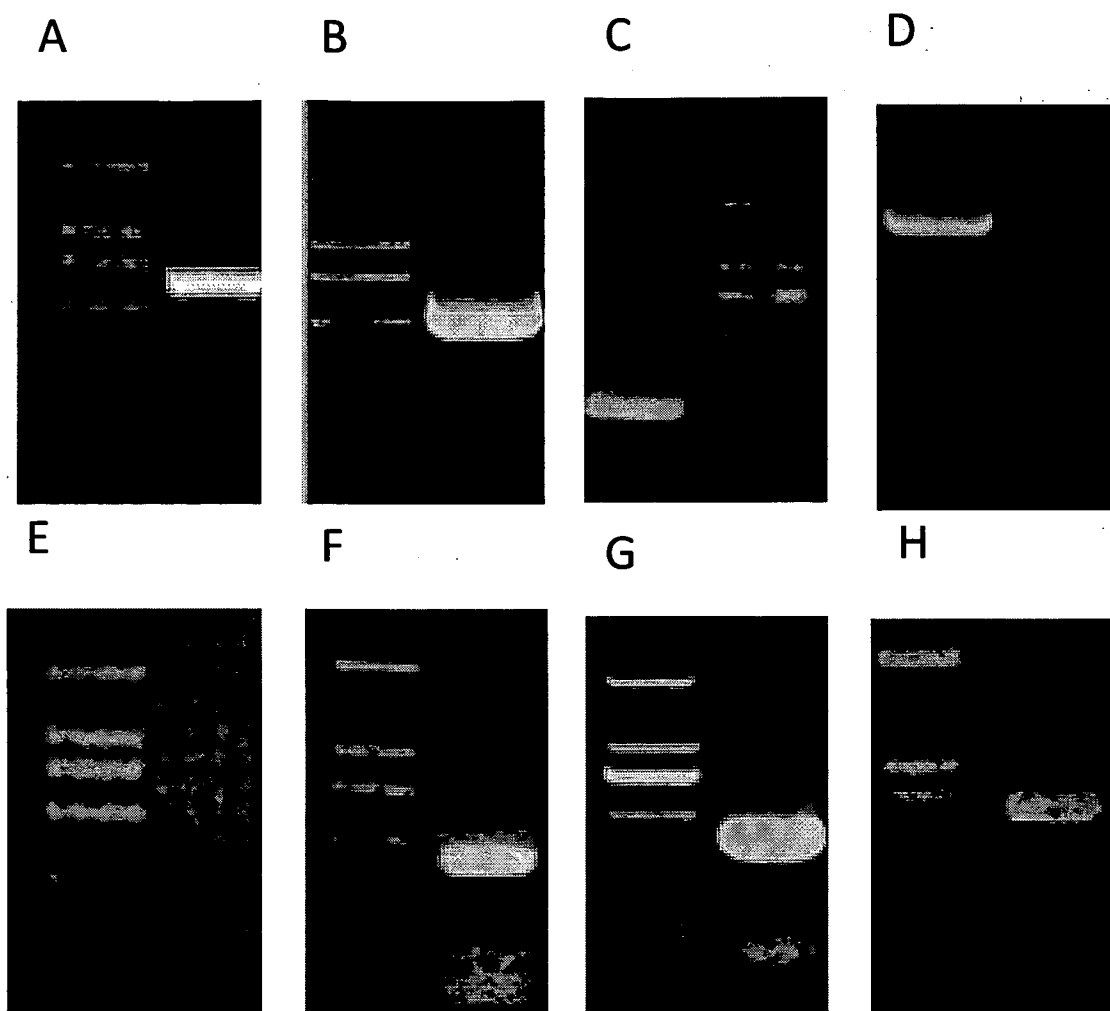
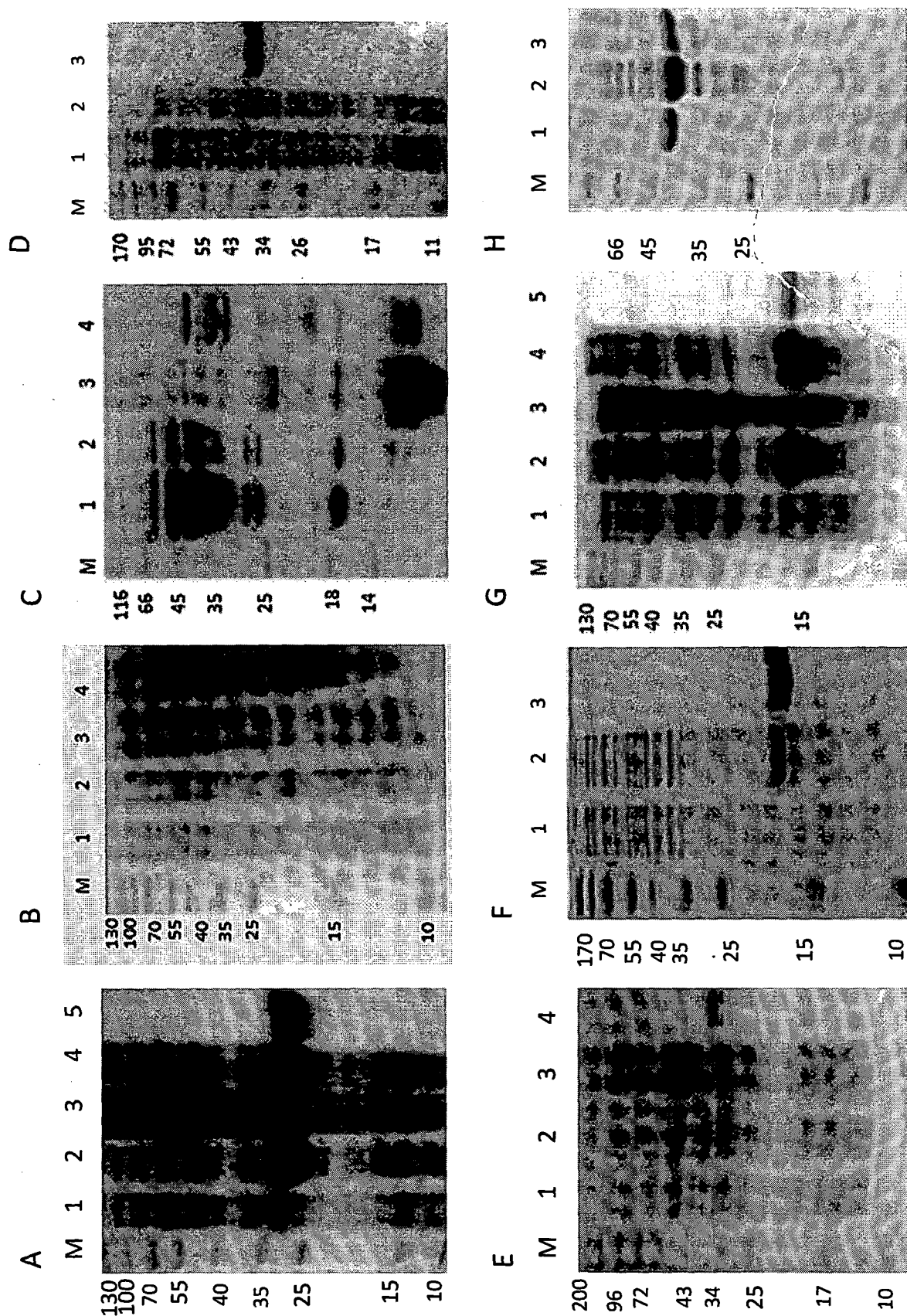


图 1



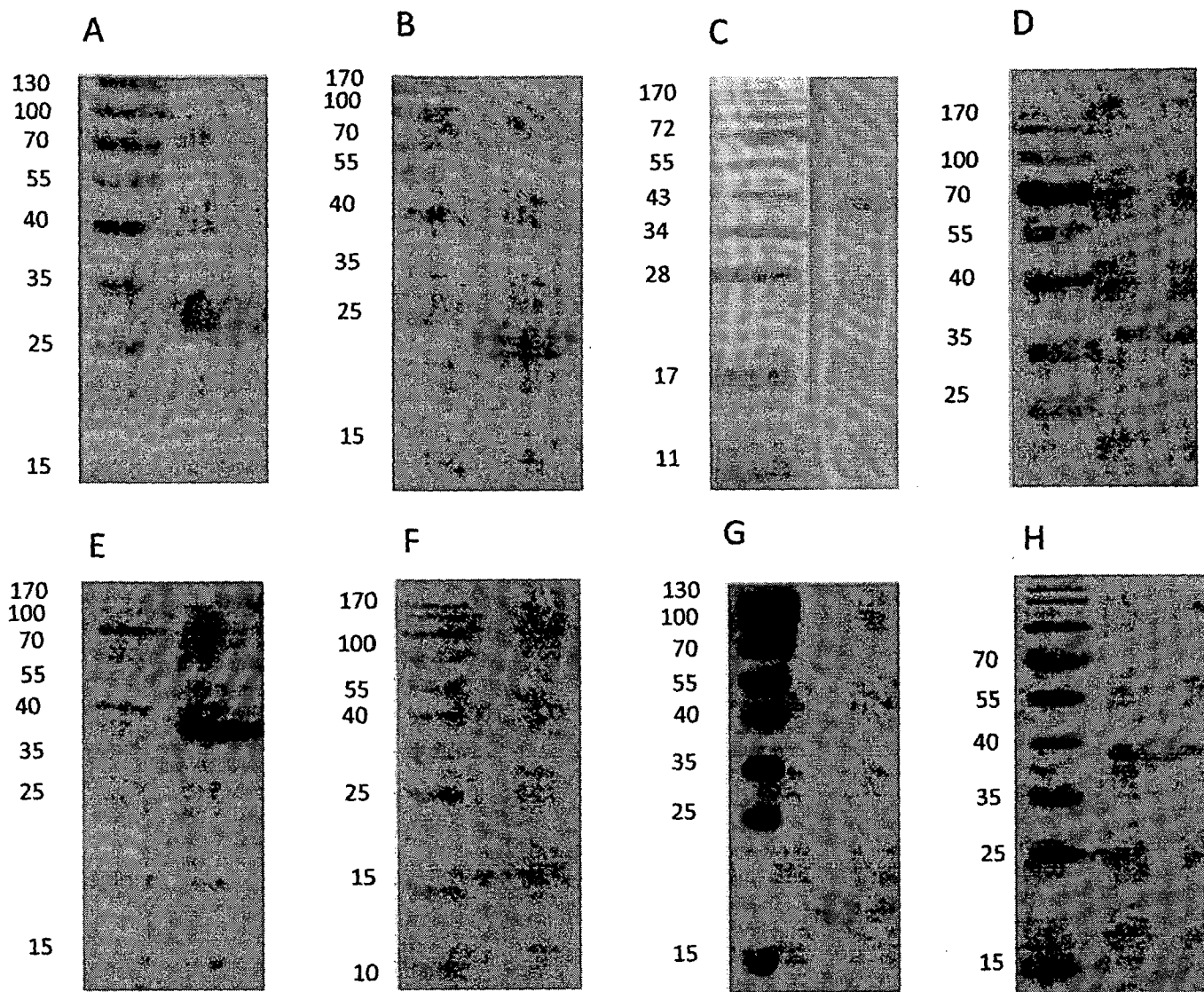


图 3

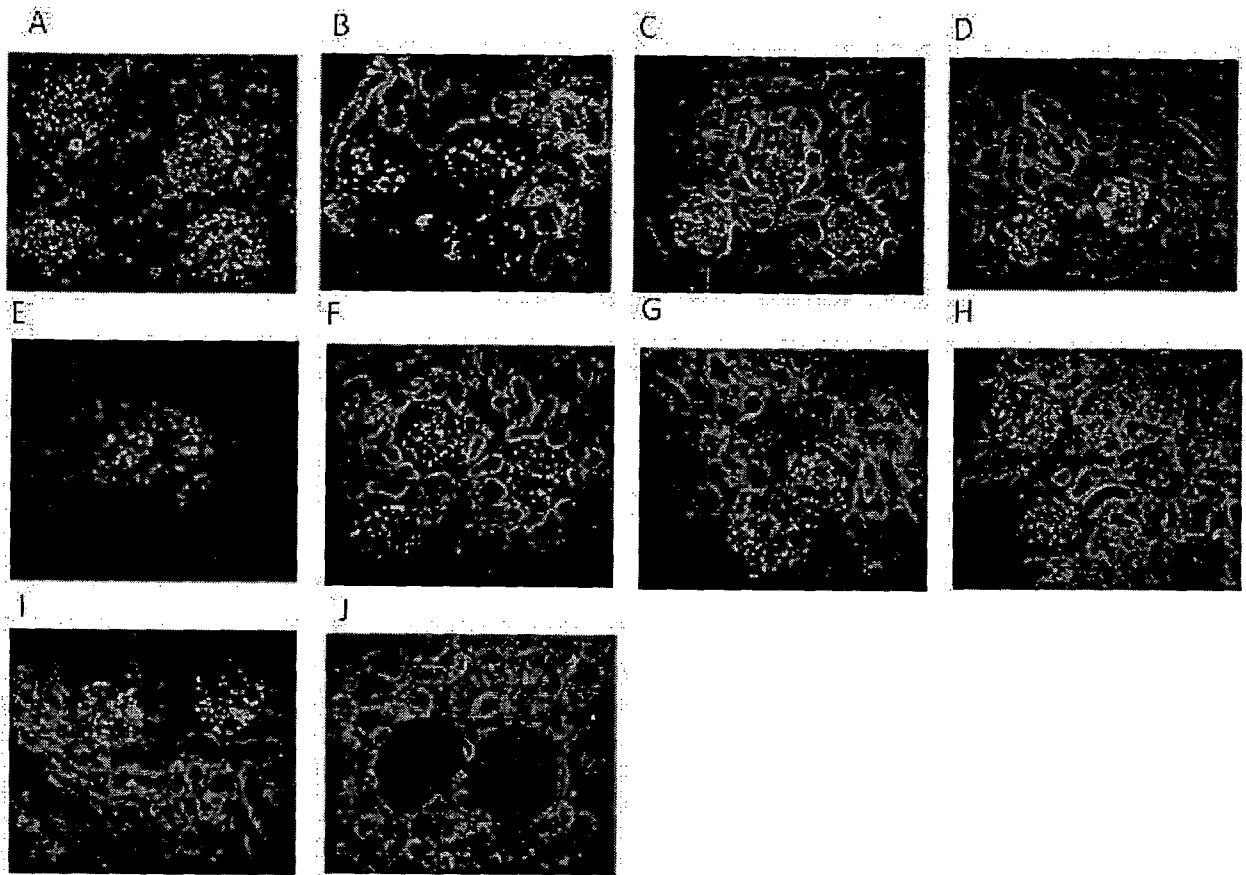


图 4A

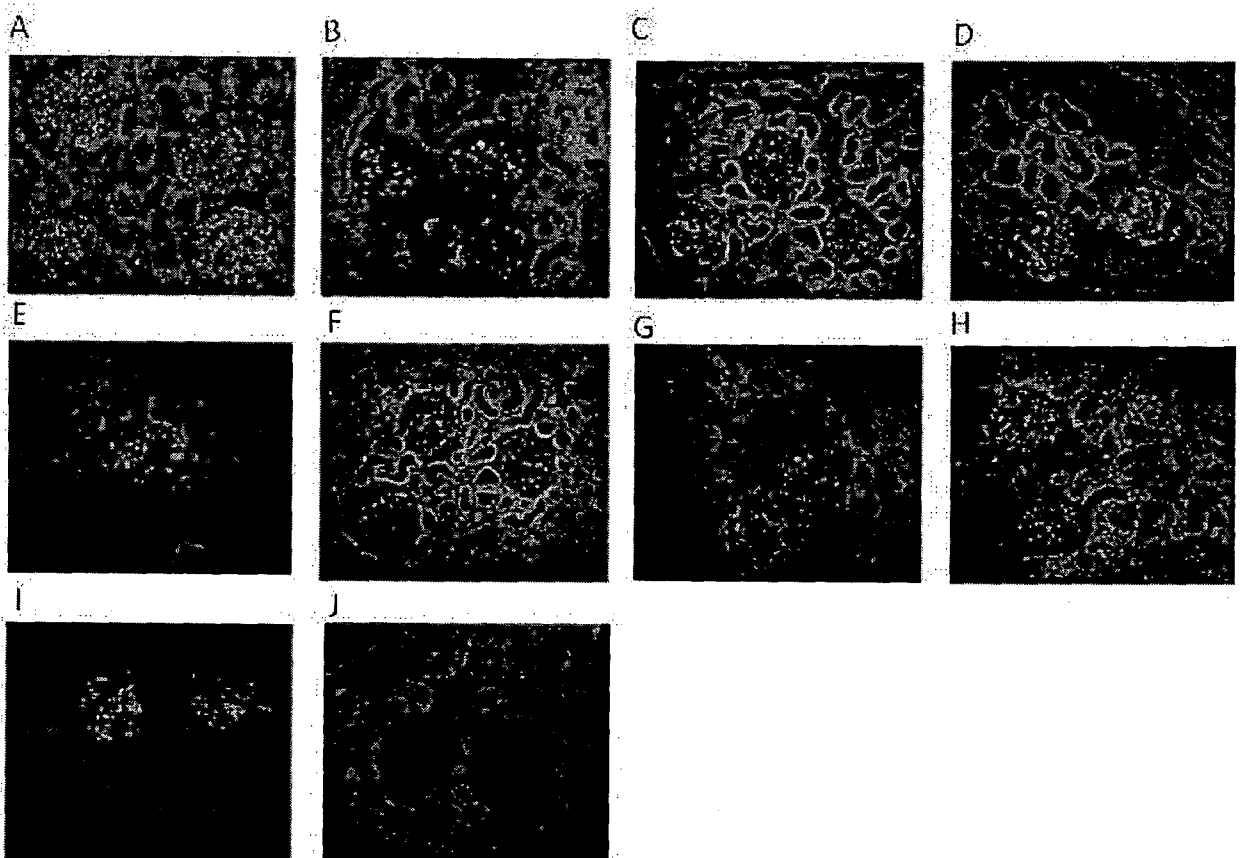
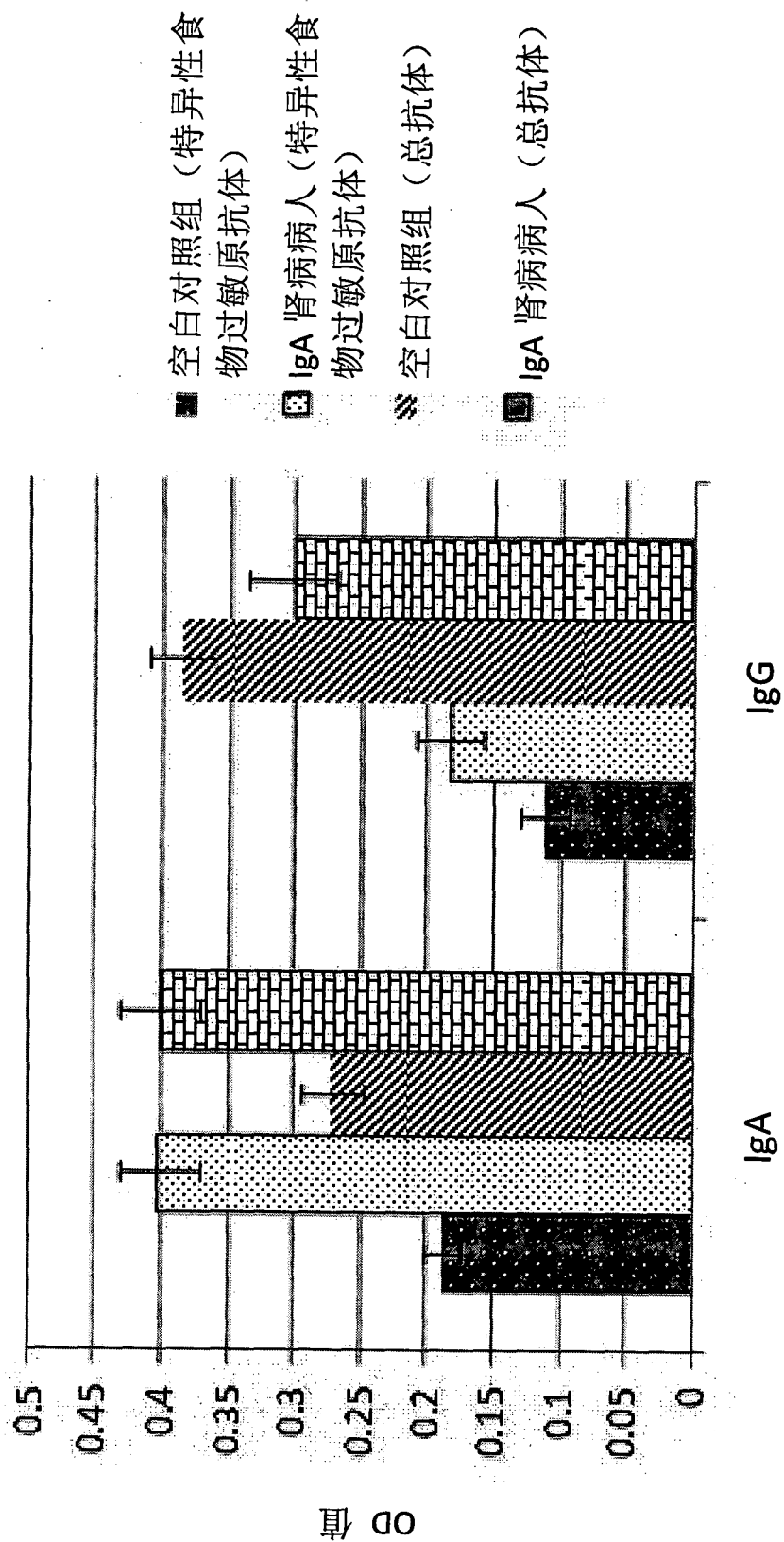
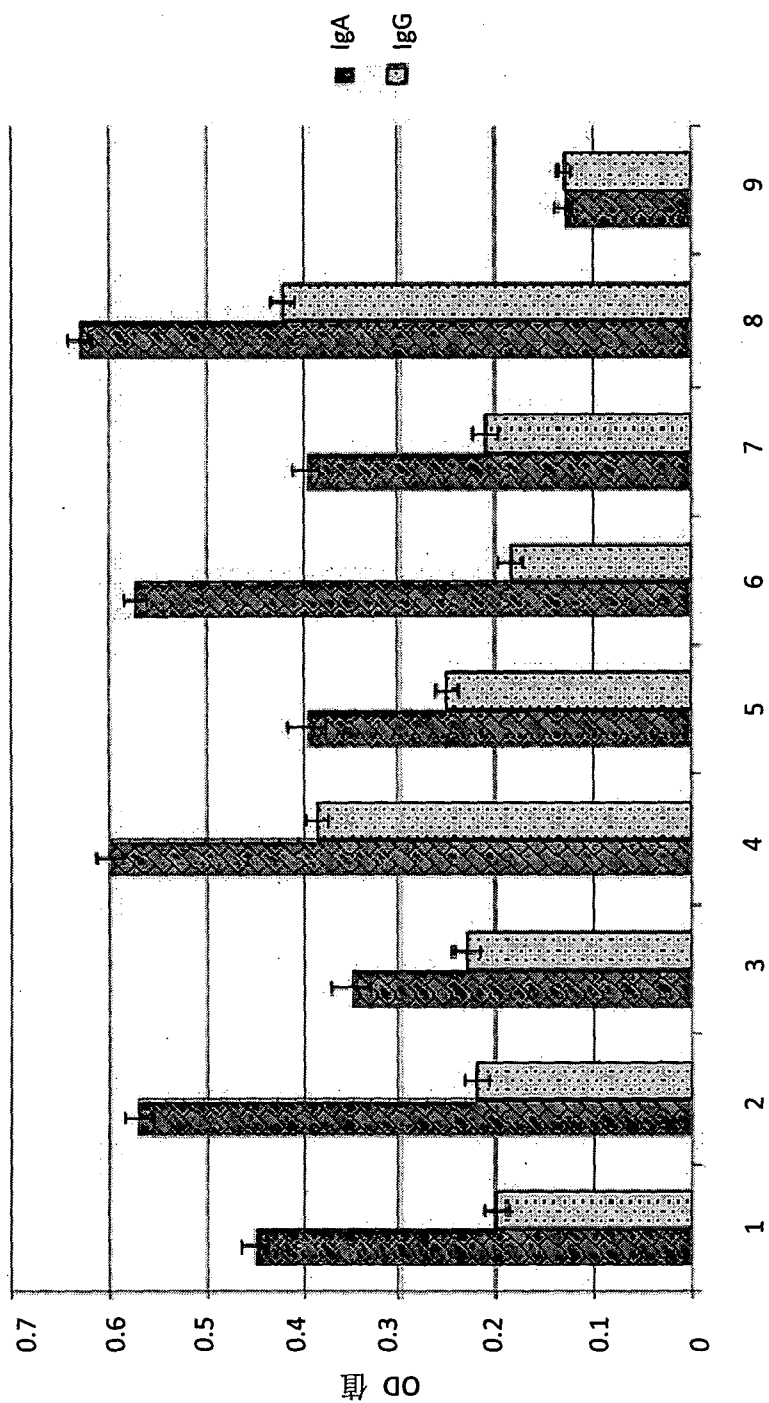


图 4B





INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073545

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See extra sheet

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)

IPC: G01N, A61K

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)

CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, NCBI, ISI web of Knowledge, EMBASE:
immunoglobulin, IgA, IgAN, nephropathy, nephritis, glomerular disease, allergy, allergen, antibody, food**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	ZHAO, Xiangling et al, Clinical significance of detecting food-specific IgG antibody in diagnosis and treatment of IgA Nephropathy, Chin J Postgrad Med, 5 March 2009, Vol.32, No.7, pages 61-62	12-19
A	SUN, Gaihe, Clinical application of food intolerance specific IgG antibody detection in serum, Lab Med Clin, July 2007, Vol.4, No.7, pages 591-592	12-19

☐ 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
20 Jan. 2012 (20.01.2012)Date of mailing of the international search report
09 Feb. 2012 (09.02.2012)Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LUO, Deming

Telephone No. (86-10)62411016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073545

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

- 1、 claims: 1-6
Relate to the uses of antibodies against food allergens in manufacturing the reagents for detecting the cause of IgA Nephropathy.
 - 2、 claims: 7-11
Relate to the uses of food allergens in manufacturing the reagents for detecting the cause of IgA Nephropathy.
 - 3、 claims: 12-19
Relate to the methods of detecting the cause of IgA Nephropathy using antibodies against food allergens.
 - 4、 claims: 20-26
Relate to the methods of detecting the cause of IgA Nephropathy using food allergens.
D1 discloses that IgA Nephropathy is associated with food allergens and the cause of IgA Nephropathy can be diagnosed by detecting food allergens or the antibodies thereof (ZHAO,Xiangling et al, Clinical significance of detecting food-specific IgG antibody in diagnosis and treatment of IgA Nephropathy, Chin J Postgrad Med, March 5th 2009, Vol.32, No.7, pages 61-62). So there is no technical correlation between the said four groups which don't involve any same or corresponding special technical feature. Thereby, the requirement of unity of invention referred to in Rule 13.1 shall not be fulfilled.
1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
 2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fee.
 3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
 4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Claim 12-19, according to the opinion statement in response to PCT/ISA/206 on 12.12.2011.

- Remark on protest**
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2011/073545

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 33/53 (2006.01)i

G01N 33/531 (2006.01)i

G01N 33/533 (2006.01)i

G01N 33/535 (2006.01)i

G01N 33/536 (2006.01)i

G01N 33/577 (2006.01)i

A61K 39/35 (2006.01)i

A61K 39/395 (2006.01)i

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2011/073545

A. 主题的分类

见附加页

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)

IPC: G01N, A61K

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))

CNABS, DWPI, SIPOABS, VEN, CNTXT, EPTXT, USTXT, WOTXT, JPTXT, CNKI, NCBI, ISI web of Knowledge, EMBASE: 免疫球蛋白, 肾病, 肾小球疾病, 过敏, 过敏原, 变应原, 抗体, 食物, immunoglobulin, IgA, IgAN, nephropathy, nephritis, glomerular disease, allergy, allergen, antibody, food

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
X	赵向玲等, 食物特异性 IgG 抗体检测在 IgA 肾病诊治中的临床意义, 中国医师进修杂志, 5.3 月 2009, 第 32 卷第 7 期, 第 61-62 页	12-19
A	孙改河, 食物不耐受血清特异性 IgG 抗体检测在临床中的应用, 检验医学与临床, 31.7 月 2007, 第 4 卷第 7 期, 第 591-592 页	12-19

☐ 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

20.1 月 2012 (20.01.2012)

国际检索报告邮寄日期

09.2 月 2012 (09.02.2012)

ISA/CN 的名称和邮寄地址:

中华人民共和国国家知识产权局

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

罗德明

电话号码: (86-10) **62411016**

第II 栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第 1 页第 2 项)

根据条约第 17 条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☐ 权利要求：
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，
具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III 栏 缺乏发明单一性的意见(续第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明，即：

- 1、权利要求 1-6，涉及食物过敏原抗体在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。
- 2、权利要求 7-11，涉及食物过敏原在制备 IgA 肾病病因检测试剂中的应用。
- 3、权利要求 12-19，涉及利用食物过敏原抗体检测 IgA 肾病病因的方法。
- 4、权利要求 20-26，涉及利用食物过敏原检测 IgA 肾病病因的方法。

对比文件 1（赵向玲等，食物特异性 IgG 抗体检测在 IgA 肾病诊治中的临床意义，中国医师进修杂志，2009 年 3 月 5 日，32(7):61-62）公开了 IgA 肾病与食物过敏原相关，可以通过检测食物过敏原或食物过敏原抗体来诊断 IgA 肾病病因。因此，上述四组权利要求之间不存在技术关联，不含有任何相同或相应的特定技术特征，不满足 PCT 细则 13.1 所述的发明单一性的要求。

1. ☐ 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费，本国际检索报告涉及全部可作检索的权利要求。
2. ☐ 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索，本单位未通知缴纳任何附加费。
3. ☐ 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费，本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。
具体地说，是权利要求：
4. ☒ 申请人未按时缴纳被要求缴纳的附加检索费。因此，本国际检索报告仅涉及权利要求书中首先提及的发明；包含该发明的权利要求是：
权利要求 12-19，按照申请人 2011 年 12 月 12 日对 PCT/ISA/206 表的意见陈述中所选择的发明。

关于异议的说明：☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，适用时，缴纳了异议费。
☐ 申请人缴纳了附加检索费，同时提交了异议书，但未在通知书规定的时间期限内缴纳异议费。
☐ 缴纳附加检索费时未提交异议书。

主题的分类

G01N 33/53 (2006.01)i

G01N 33/531 (2006.01)i

G01N 33/533 (2006.01)i

G01N 33/535 (2006.01)i

G01N 33/536 (2006.01)i

G01N 33/577 (2006.01)i

A61K 39/35 (2006.01)i

A61K 39/395 (2006.01)i