

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/536

G01N 33/543 G01N 33/569

C07K 14/05



[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 00109576.5

[45] 授权公告日 2004 年 5 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1151376C

[22] 申请日 2000.7.5 [21] 申请号 00109576.5

[71] 专利权人 勤立生物科技股份有限公司

地址 中国台湾

[72] 发明人 周宽基

审查员 高桂莲

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

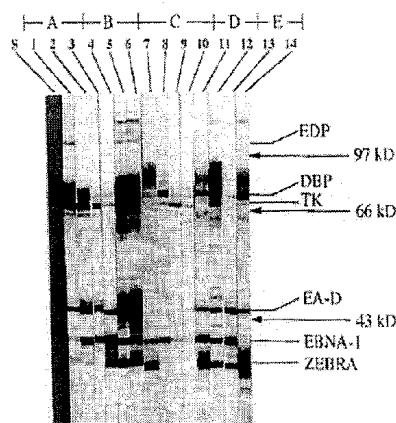
代理人 朱黎光 汤保平

权利要求书 3 页 说明书 10 页 附图 1 页

[54] 发明名称 应用非洲淋巴细胞瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人治疗前后的血清反应

[57] 摘要

本发明是属于使用方法的范畴，有关应用非洲淋巴细胞瘤病毒，Epstein - Barr(简称 EB)病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后的血清反应，特别是利用 EB 病毒所表现的特异蛋白，如 DNA 结合蛋白(DBP)、早期扩散性抗原(EA - D)、EB 病毒一号核抗原(EBNA - 1)、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶(EDP)、胸腺嘧啶激活酶(TK)及 EB 病毒 BZLF - 1 复制激活质(ZEBRA)等，本发明使用 EB 病毒在不同感染时期所表现的特异抗原，包括潜伏感染期以及病毒复制期的六种不同抗原，以免疫分析法来检测并评估鼻咽癌病人在治疗前后，血清中对这六种不同抗原同时存在的 IgA 效价情况，从而提供了一种更好的检测方法，以评估鼻咽癌病人的治疗疗效。



1、一种检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，是使用非洲淋巴瘤病毒的综合抗原作为反应因子，其中非洲淋巴瘤病毒综合抗原是可刺激鼻咽癌病人血清中产生 IgA 者，是 EB 病毒所表现的特异蛋白，其可选自下列群组：DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质。

2、如权利要求 1 所述的使用非洲淋巴瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中非洲淋巴瘤病毒综合原至少包含潜伏感染期及病毒复制期在内的三种特异蛋白，它是为 EB 病毒一号核抗原、早期扩散性抗原、DNA 结合蛋白、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质五种抗原或 EB 病毒一号核抗原、早期扩散性抗原、DNA 结合蛋白、胸腺嘧啶激活酶、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质六种抗原的组合。

3、如权利要求 1 所述的使用非洲淋巴瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中鼻咽癌病人在治疗前后的血清反应，是 EB 病毒抗原可引发鼻咽癌病人血清中产生 IgA 去辨认，包括 DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质。

4、如权利要求 2 所述的使用非洲淋巴瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中非洲淋巴瘤病毒综合抗原是由基因工程细菌所产生的接合产物。

5、一种以免疫印迹法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，是包括：

将病人血清与包含有非洲淋巴瘤病毒综合抗原的硝酸纤维膜反应；

前述反应是与病人血清中抗非洲淋巴瘤病毒综合抗原的 IgA 抗体反应；

前述 IgA 抗体再与信号产生物连结的抗人类 IgA 抗体反应；及侦测前述信号产生物的浓度以进行检测；其中非洲淋巴细胞瘤病毒综合抗原是可刺激鼻咽癌病人血清产生 IgA 者，是 EB 病毒所表现的特异蛋白，可
5 选自下列群组：DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质及其混合物。

6、如权利要求 5 所述的以免疫印迹法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中信号产生物可选自下列群组：酵素、过氧化酶、碱性磷酸酶、荧光物、有色聚合物与电学活性物。

10 7、一种以固态载体分析法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，包括：

将病人血清与一固定有非洲淋巴细胞瘤病毒综合抗原的固态载体反应；

15 前述反应是与病人血清中抗非洲淋巴细胞瘤病毒综合抗原的 IgA 抗体反应；

前述 IgA 抗体再与信号产生物连结的抗人类免疫球蛋白或特异性结合蛋白抗体反应；及侦测前述信号产生物的浓度以进行检测；其中非洲淋巴细胞瘤病毒综合抗原是可刺激鼻咽癌病人血清产生 IgA 者，是 EB 病毒所表现的特异蛋白，可选自下列群组：DNA 结合蛋白、早期扩散性抗
20 原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质及其混合物。

8、一种固态相免疫层析法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，包括：

25 将非洲淋巴细胞瘤病毒抗原或抗人类 IgA 抗体或结合蛋白固定于固态载体的一端；

将信号产生物结合的对抗人类 IgA 抗体或结合蛋白或信号产生物结合的非非洲淋巴细胞瘤病毒抗原于前述固态载体的另一端；

将病人血清置入前述固态载体；

30 由病人血清湿润的同时，由毛细现象将信号产生物及分析物携带至前述非洲淋巴细胞瘤病毒抗原或抗人类 IgA 抗体或结合蛋白固著处反应；

及侦测前述信号产生物体的浓度以进行检测；其中非洲淋巴瘤病毒综合抗原是可刺激鼻咽癌病人血清产生 IgA 者，是 EB 病毒所表现的特异蛋白，可选自下列群组：DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质及其混合物。

- 5 9、如权利要求 7 或 8 所述的以固态载体分析法或固态相免疫层析法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中固态载体包括表面修饰或未修饰的聚苯乙烯、玻璃纤维、纤维素、尼龙、交联糊精、各式层析纸、金属、硝基纤维素、磁珠。
- 10 10、如权利要求 7 或 8 所述的以固态载体分析法或固态相免疫层析法以检测鼻咽癌病人在治疗前后血清反应的方法，其特征在于，其中信号产生物可选自下列群组：酵素、过氧化酶、碱性磷酸酶、荧光物、有色聚合物与电化学活性物。

应用非洲淋巴细胞瘤病毒的综合抗原以检测
鼻咽癌病人治疗前后的血清反应

5

技术领域

本发明是属于使用方法的范畴，有关应用非洲淋巴细胞瘤病毒(Epstein-Barr 简称 EB)病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后的血清反应。

10

背景技术

在东南亚，鼻咽癌是一种很常见的肿瘤，高发区包括中国南部[Zeng, Int J Cancer 36:545, 1985]、香港[Ho, Br J Cancer 37:356, 1978]、台湾[Lynn, J Laryngol Otol 99:567, 1985]、新加坡[Zhu, Int J Cancer 37:689, 1986]，以及马来西亚[Mathew, Cancer Immunol Immunother 38:68, 1994]，即一些较多华人或是华裔的地区。年龄调整后的年发生率约每年每十万人人口三人至六十人左右[Muir, IARC Sci Publ 5:840, 1987]。遗传倾向、饮食习惯、环境因素和病毒感染都与鼻咽癌的高发率有关[Ho, Br J Cancer 37:356, 1978; Chan, Int J Cancer 32:171, 1983; Zeng, Int J Cancer 36:545, 1985; Mathew, Cancer Immunol Immunother 38:68, 1994; Zheng, Acta Oncol 33:867, 1994]。在这些因素当中，非洲淋巴细胞瘤病毒， Epstein-Barr 病毒(EB 病毒)，感染被认为是与疾病的发展最有关。在鼻咽癌细胞中，不仅常能检测到 EB 病毒的基因产物[Desgranges, Int J Cancer 29:87, 1982; Wu, Am J Pathol 138:1461, 1991; Feinmesser, N Engl J Med 326:17, 1992, Yeung, Int J Cancer 53:746, 1993]，鼻咽癌患者血清中对 EB 病毒抗原的 IgA 和 IgB 也都较常人高出许多[Henle, J Natl Cancer Inst 51:361, 1973; Ho, Br J Cancer 37:356, 1978; Cheng, Proc Natl Acad Sci USA 77:6162, 1980]。

因此，EB 病毒的血清研究、病毒研究、病理研究、免疫研究及分子生物学研究，也最常被用来评估鼻咽癌疾病治疗前后的状况[Henle, J Natl

Cancer Inst51:301, 1973; Cheng, Proc Natl Acad Sci USA77:6162, 1980)。虽然某些研究结果显示 EB 病毒的血清抗体效价与病人治疗预后有关，但是，不同研究结果所产生的结论并不一致[Henle, J Natl Cancer Inst 51:361, 1973; Cheng, Proc Natl Acad Sci USA77:6162, 1980]。不同研究结论的产生，可能是不同的研究单位所采用的特殊阳病毒抗原，仅具有有限的适用范围所致；或者是因为在癌细胞中的 EB 病毒并不只是潜伏性感染而已[Fahraeus, Int J Cancer 42:329, 1998; Chow, Therapeut Radiol Oncol 2:243,1995]。最近，本实验室采用综合 EB 病毒于潜伏性感染以及急性感染期所表现的抗原，例如，EBNA-1 和 EA-D，以检测新鼻咽癌患者，其检测敏感性竟可达到 98.1%的检测率[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers&Prev 6:363, 1997]。但上述两项抗原的结合以检测病人的血清并不能表现病人治疗的效果或病情的发展。

如前所述，虽然鼻咽癌曾被认为与阳病毒的潜伏性感染有关，但是从鼻咽癌患者的血清研究所得的结果，大多数的病人具有持续性对 EB 病毒的高效价 IgA，显示问题可能不是一般所想像的简单[Uenle, J Natl Cancer Inst51:361, 1973; HO, Br J Cancer 37:356, 1978; Zeng, Int J Cancer36:545, 1985]。对 EB 病毒的某特定抗原的高效价 IgA，显示宿主的免疫系统是在某特定的表皮性位置上，受到此特定抗原持续性的刺激所致[Stolzenberg, Int J Cancer 66:337, 1996; Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers &Prev 6:363, 1997)。还有，对 EB 病毒早期和晚期基因产物以及病毒囊包蛋白抗原(VCA)的高效价抗体，更显示病人的免疫系统可能最近才与这些抗原，甚至是与成熟的病毒颗粒相遇过(Chow, Therapeut Radiol Oncol 2:243, 1995; Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6:363, 1997]。

但是，电子显微镜的彻底研究，并无法在鼻咽癌的癌细胞中找到 EB 病毒病毒颗粒的存在情况[Gazzolo, J Natl Cancer Inst 48:73, 1972]。有趣的是，若是这些鼻咽癌的癌细胞曾在裸鼠中培养过，其所产生的恶性表皮细胞却可释放出 EB 病毒颗粒来感染狨猴的淋巴细胞[Trumper, Int J Cancer 20:655, 1997; Crawford, Int J Cancer 24:294, 1979]。其实，新鲜培养的鼻咽癌癌细胞受到溴化去氧尿苷酸[Tromper, Int J Cancer17: 578, 1976]或是耐柏酯[Tomei, Nature 329:73, 1987]的刺激后，细胞亦

可释放出 EB 病毒的病毒颗粒。在受丁酸钠处理过的淋巴瘤细胞，同样的现象，即 EB 病毒颗粒的释放也曾被观察到[Cheng, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6162, 1980]。这些数据显示，鼻咽癌病人的病理微环境，可调控鼻咽癌癌细胞内 EB 病毒的基因表现，而此种 EB 病毒的基因表现，则在鼻咽癌病人的 IgA 表现上反映出来。这种数据亦显示鼻咽癌病人对 EB 病毒不寻常的免疫反应，可能也是因为针对 EB 病毒不寻常的基因表现，或是 ED 病毒感染再活化的结果[Stolzenberg, Int J Cancer 66:337, 1996]，或是这两种情形的混合[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6:363, 1997]。所以，使用病毒某感染时期的某单一抗原来研究疾病，以及预测疾病治疗的效果，应该会有其先天的限制。

根据这种观念，本实验室曾使用 EB 病毒在不同感染时期所表现的特异抗原，包括潜伏感染期以及病毒复制期[Martel-Renoir, J Gen Virol 76: 1401, 1995]的六种不同抗原，来检测鼻咽癌病人血清中对这六种不同抗原同时存在的 IgA 效价情况。本实验室的研究成果，完全与已有的观察结果吻合，显示 EB 病毒感染在鼻咽癌癌细胞内，并不仅是潜伏性感染而已[Henle, J Natl Cancer Inst 51:361, 1973; Cheng, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6162, 1980; De-Vathaire, Int J Cancer 42: 176, 1988]。虽然不同病人之间对不同抗原蛋白的免疫敏感性与免疫特异性都有不同的表现，但这不但表示不同抗原蛋白的免疫抗原性不同，更表示这些不同的抗原蛋白，在病人体内的表现时段长短，以及抗原蛋白表现量的多寡，呈现于病人生病期间的免疫系统的反应度而已。因此，侦测到血清中的 IgA 对 EB 病毒在不同期间所表现的基因产物，更反映出在每一个不同的病人体内其对 EB 病毒感染情况的免疫作用。虽然其他的说法也有其可能性，但是，这种结果与 EBNA-1 是维持表体 EB 病毒所需的事实是一致的[Fåthraeus, Int J Cancer 42: 329, 1988; Liebowitz, 1993]，即 EB 病毒可能受到病人体内一种尚未明白的病理机制所活化[Martel-Renoir, J Gen Virol 76: 1401, 1995; Stolzenberg, Int J Cancer 66: 337, 1996; Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1997]。

如前所述，以 EBNA-1 互补与 EB 病毒溶解周期有关的抗原，可以提供比单一抗原更好的鼻咽癌侦测法，不但其侦测率可以提高，而且能提

早侦测到鼻咽癌。因此，此包括潜伏感染期以及病毒复制期所表现的整系列基因产物，作成的免疫检验试片，当然可以提供一较精确的方法以预估病人的治疗效果，并能提早侦测到鼻咽癌的复发；此外，本实验室的实验数据不仅与其他实验室所得的实验结果非常一致[Henle, J Natl Cancer Inst 51: 361, 1973; HO, Br J Cancer 37: 356, 1978; Cheng, Proc Natl Acad Sci USA 77: 6162, 1990]，而且显示出癌细胞和病理微环境的相互作用，亦可影响 EB 病毒在癌细胞内的基因表现。

发明内容

因此，本发明的目的是提供一种应用非洲淋巴细胞瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人治疗前后的血清反应的方法，进而可以提供一种更好的检测方法，以评估鼻咽癌病人的治疗疗效。

本发明中，使用 EB 病毒在不同感染时期所表现的特异抗原，包括潜伏感染期以及病毒复制期的六种不同抗原，以免疫分析法来检测并评估鼻咽癌病人在治疗前后，血清中对这六种不同抗原同时存在的 IgA 效价情况。本发明也证实了这种方法的有效性，即本发明可以提供一种更好的检测方法，以评估鼻咽癌病人的治疗疗效。

附图说明

图 1 是一个代表所有以免疫印迹法检测分析鼻咽癌病人在治疗前后血清中 IgA 浓度变化的反应图，每一条硝酸纤维膜上皆含有六种 EB 病毒的特异抗原，其个别含量如右所列：EDP, 0.25 μ g; DBP, 0.25 μ g; TK, 0.25 μ g; EA-D, 0.25 μ g; EBNA-1, 0.1 μ g; 及 ZEBRA, 0.25 μ g。每一种 EB 病毒特异蛋白的相关位置(标示于右边)显示于 S 道，此 S 道上的 EB 病毒特异蛋白是以 0.25% Coomassie blue 染色的。箭头：蛋白质分子重量标准的位置。每一条个别道的相关以酵素联结免疫吸附法所测读的 A450 吸收光谱值；第一道，0.598；第二道 1.196；第三道，1.010(A 例)；第四道，1.120；第五道，1.318；第六道，1.570(B 例)；第七道，0.632；第八道，0.650；第九道，0.408；第十道，0.217(C 例)；第十一道，1.212；第十二道，0.935(D 例)；第十三道，1.196；和第十四道，0.461(E 例)。

具体实施方式

本发明是属于使用方法的范畴，有关应用 EB 病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后的血清反应，特别是利用 EB 病毒所表现的特异蛋白，如 DNA 结合蛋白(DBP)、早期扩散性抗原(EA-D)、EB 病毒一号核抗原(EBNA-1)、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶(EDP)、胸腺嘧啶激活酶(TK)及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质(ZEBRA)等。例如使用硫酸化十二脂酸钠-聚丙烯酰胺胶电泳法与免疫印迹法所得的硝酸纤维膜来检测时，每一片硝酸纤维膜细条，都包括此六种 EB 病毒的 5 特异抗原；有关基因工程所产生的细菌，即利用基因工程大肠杆菌所携带的杂种载体以及杂种载体上所携带的基因，和其所制备的 DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶及 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质。使用时，每个细条单独与病人的血清反应，其反应则以信号产生物标记的抗人类 IgA 抗体来辨识。例如以碱性磷酸酶标记的羊对人的 IgA 抗体及硝化四佐琳蓝和磷酸-五-溴化-四-氯化-三-吡啶 10 辨识(Sigma, St.Louis, MO)每个硝酸纤维膜细条上的阳性反应是在特定位置上所显现的蓝紫色条纹。而本发明所谓的信号产生物则不限定为酵素。另固态载体检测法包括酵素联结免疫吸附法(ELISA)，其检测原理在于将上述 EB 病毒的综合抗原固定于固态载体表面；固态载体可能为聚苯乙烯(Polystyrene)、硝酸纤维膜及其他能以化学键结或物理吸附蛋白质的 20 材质。这些固定化的抗原与病人血清反应，当病人血清中具有对抗 EB 病毒抗原抗体存在而其存在抗体的种类与浓度则有 关于病人当时的诊疗及病情发展的状况。病人血清中的人类抗 EB 病毒抗原抗体与相对应的抗原结合反应形成免疫络合物(Complex)。将固态载体表面未参与反应的血清洗净后，在与信号产生物连结的抗人类 IgA 抗体来反应。信号产生物的种类依探测方法的不同而有差别。信号产生物可以是酵素，酵素与其相对的显色剂产生颜色而得以判读；信号产生物亦可以是荧光物、有色聚 25 合物、电化学生物活性物等物质。本发明亦可以单步骤或多步骤免疫层析法来实施。根据台湾第 N1 55849 号专利固态相验证法中阐述免疫层析法，EB 病毒抗原固著于长条固态载体的一端；而信号产生物结合的对抗人类 30

免疫球蛋白抗体或结合蛋白则于固态载体的另一端，由人体血清的湿润同时由毛细现象将信号产生物及分析物携带至 EB 病毒抗原固著处而与之结合，检测信号产生物的浓度而达到所欲检测的目的。

5 本发明以下列实施例作进一步的说明，但这些实施例所述内容并非用以界定本发明的范围，任何熟习本项技术的人士所知的修饰和改变均仍涵盖于本发明的技术方案范围内。

实施例 1：病人的选择与追踪。

10 从 1980 年 6 月至 1992 年 7 月，总共有 314 位新诊断的鼻咽癌病人参与本研究。所有的病人都是病理确定的病人，而且至少有一次的追踪治疗或是死亡的登记；所有的病人都追踪到 1997 年 6 月为止。临床期别是根据 UICC 系统分期。从 103 位具有相当的年龄与性别分布的健康人所收集的血清列为对照组。从 122 位对 Cytomegalovirus 或是对 herpes Simplex virus-1 具有高效价 IgG 者的血清则用来测试交叉反应(Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1997)。本研究计划曾经过
15 本院医药道德委员会首肯通过，而且都得到每一位病人的同意、签名后执行。

初诊断时，就开始收集每一位病人的血清及周边血球细胞；之后，第一年每三个月复诊时，各抽一次；第二年之后，则每六个月复诊时，再各抽一次。治疗方法主要是在鼻咽腔部位施于放射线 70 至 74Gy(2Gy/
20 次，5 次/周)。如果肿瘤已侵犯到病人的头颈部淋巴结，则于头颈部淋巴结部位施予放射线 65 至 74Gy；在原发部位复发者，则施予外围性放射治疗(external Beam Irradiation)；如果肿瘤已侵犯到病人的远端器官者，则施予包含 cisplatin 与 5-fluorouracil 的化学治疗[Chi, J Clin Oncol 13: 2620, 1995)。治疗后，所有病人都按照常规复诊、追踪。酵素联结免疫
25 吸附法、免疫印迹法、原位杂交法(ISH)及聚合酶链反应(PCR)等方法的使用皆采用单盲的研究步骤[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1977]。原发部位复发者的诊察是以鼻镜检查、鼻咽腔部位采用活检使用原位杂交法检测 EB 病毒基因 EBER 在癌细胞中的表达。如果怀疑肿瘤已侵犯到病人的远端器官，如肝、肺，则采用超声波扫描及 X
30 光片等方法确诊。如果怀疑肿瘤已侵犯到病人的骨髓，则活检使用原位

杂交法检测 EB 病毒基因 EBER 在癌细胞中的表达[Chao, Cancer 78: 24, 1996]。鼻咽癌病人治疗前的临床症状、特征等列于表一。

表一、鼻咽癌病人治疗前的临床症状

	肿瘤大小	淋巴转移情况	肿瘤期别 ^a
5	T1 11.1%(35) ^b	NO 26.8%(84)	I 7.3%(23)
	T2 26.8%(84)	N1 8.0%(25)	II 12.7%(40)
	T3 23.2%(73)	N2 24.8%(78)	III 20.1%(63)
	T4 38.8%(122)	N3 40.4%(127)	IV 58.9%(188)

10 ^a侵犯淋巴者 73.2%(230) ^b括弧内的数目代表病人的数目。
 侵犯肝脏或肺脏者 1.6%(5) 全部受分析的病人数目是 314。
 侵犯头部神经者 3.8%(12)
 侵犯骨骼者 17.8%(56)

15 男性病人的平均年龄是 51.6±12.9 岁(n=251)，而女性病人的平均年龄是 43.2±13.1 岁(n=63)。除了 73 位患者在放射治疗之后仍有残余病灶之外，其他 241 位病人都达完全缓解。两年的局部复发率大约是 20.3%。放射治疗之后，五年的存活率则与疾病的期别与被侵犯的淋巴结数目成反比(期别 I, 100%; 期别 II, 71.2%; 期别 III, 42.0%; 期别 IV, 29.5% 及 NO, 68%; N1, 50.7%; N2, 43.8%; 和 N3, 31.2%)。

20 实施例 2: 质体的制备与 EB 病毒特异抗原的纯化质体的制备与 EB 病毒特异抗原的纯化是按照以前的说明方法施行[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1997)。简言之，个别的 EB 病毒基因是使用一对特异的引物由 cDNA(从 P3HR1 细胞)或是由 EB 病毒的基因库(从 B95-8 细胞)以聚合酶链反应的方法复制出来的[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1997]。然后将复制出来的 DNA 片段接到表
 25 达载体 pET3C(Novagen, Madison, WI)或是 pET3CP 内。重组的蛋白质则以分子量的方法、部分氨基酸序列分析法或是酵素活性法确认。重组的 EB 病毒抗原是由细菌溶解液逐步的使用离子交换(ion exchange)、凝胶过滤(Sel filtration)与凝胶电泳(gel electrophoresis)方法纯化出来的。

实施例 3: 酵素联结免疫吸附法

纯化的 EB 病毒抗原则用来敏感化酵素联结免疫吸附法所使用塑胶盘。病人血清以 1:200 稀释于血清缓冲液中[5%奶粉、20%E.coli 溶解液、0.1%Tween(吐温)20、150mM NaCl 及 50mM Tris(pH7.5)]。然后, 将塑胶盘置于 37°C 反应 60 分钟; 以蒸馏水十次洗净稀释血清后, 则以联结过氧化酶的羊抗人 IgA 的抗体(1:12000 稀释)于 37°C 反应 30 分钟。阳性反应的辨识以 3,3',5,5'-四甲基苯显色十五分钟后, 在光谱仪判读分析 A450nm 的吸收值。

每一个样品都作三次重复。当六种在不同感染时期所表现的 EB 病毒的特异抗原皆用来评估鼻咽癌病人的血清 IgA 浓度时, 不同时期所代表的抗原相对的免疫反应, 可由病人血清中相对应不同的 IgA 浓度来显示。比较仅以 EBNA-1 及 EA-D 两抗原的 IgA 浓度更具临床意义。其中的差异将于以下实施例中说明。

实施例 4: 免疫印迹分析

以免疫印迹分析病人血清的方法, 以前曾描述过[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev 6: 363, 1997]。简言之, 将六种纯化的重组蛋白质, DNA 结合蛋白、早期扩散性抗原、EB 病毒一号核抗原、EB 病毒特异性 DNA 聚合酶、胸腺嘧啶激活酶和 EB 病毒 BZLF-1 复制激活质混合置入单槽 SDS-PAGE 中, 以电泳的方式分开, 然后将蛋白质电转至硝酸纤维膜上, 含有此六种纯化重组蛋白质的硝酸纤维膜则切成细条。每一个硝酸纤维膜细条则用来检测一位病人的血清。阳性反应是以碱性磷酸酶连结的羊对人 IgA 的抗体与硝化四佐琳蓝和磷酸-五-溴化-四-氯化-三-吡啶辨识。阳性反应的每一个细条都仔细登记, 列表, 然后与以酵素联结免疫吸附法所得的数据相比较。治疗后, 有八位本来血清呈阴性反应的病人, 仍属阴性反应; 其他在诊断时诊断时呈阳性反应的病人, 则继续以含 EBNA-1 和 EA-D 的酵素联结免疫吸附法追踪病情, 其结果列于表二。

在 306 位血清呈阳性反应的病人当中, 有 169 位(55.2%)的 ISA 浓度仍停留在定切值之上[Chow, Cancer Epidemiol Biomarkers & Prev6: 363, 1997]; 100 位病人的 IgA 浓度则逐渐降低; 但是有 37 位病人的 IgA 浓度

却异常升高。大多数 IgA 浓度异常升高的病人，在短期内都会有疾病提前复发、提前远端转移或是提前死亡的现象。但是 IgA 的浓度变异，并不是在每一个病人身上都会造成相同的结果。有五位病人，虽然其 IgA 浓度逐渐降低，却在第一年去逝；因为怀疑这种结果与检测人类免疫缺陷病毒

5 感染时的假阴性率类似，本实验室开始使用含有六种纯化的重组抗原的免疫印迹法分析并追踪病人的血清与病情。本实验特别注重 32 位 IgA 浓度具异常变化的病人，他们在第一年的存活率，我们也特别追踪十位 IgA 浓度有显著升高，其存活却超过五年。

表二、鼻咽癌病人治疗前后三个月，血清中对 EBNA-1 和 EA-D IgA 浓度变化的情况以及 ISA 浓度变化与病人存活时间长短的关系。

存活时间	治疗后血清中对 EBNA-1 和 EA-D 的 IgA 浓度		
	降低	不变	升高
≤一年(n=30)	16.7%(5) [°]	50.0%(15)	33.3%(10)
一年至五年(n=103)	31.1%(32)	52.4%(54)	16.5%(17)
15 >五年(n=173)	36.4%(63)	57.8%(100)	5.8%(10)

[°]括弧内的数目代表病人的数目，存活时间显示于左栏。全部受分析的病人数目是 306。 $\chi^2=21.39$, $P<0.005$ 。

其中以五个病人为代表的例子显示于图 1。因此，图 1 是一个代表所有以免疫印迹法检测分析鼻咽癌病人在治疗前后血清中 IgA 浓度变化的反应图；每一条硝酸纤维膜上皆含有六种 EB 病毒的特异抗原，其个别含量如右所列：EDP, 0.25 μ g; DBP, 0.25 μ g; TK, 0.25 μ g; EA-D, 0.25 μ g; EBNA-1, 0.1 μ g; 及 ZEBRA, 0.25 μ g。第一道至第三道的血清(A 例)是由一位以酵素联结免疫吸附法检测时，IgA 浓度逐渐升高的病人；

25 当我们比较血清 ISA 浓度与免疫印迹分析的数据时，虽然 EBNA-1/IgA 有升高的趋势，从第一道至第三道的特异蛋白量看，大致上，IgA 对 EB 病毒其他特异抗原的浓度是呈降低的倾向，而降低的特异抗原主要是和 EB 病毒复制有关的蛋白质，例如 EDP, DBP, TK 和 ZEBRA 等。在 B 例上看时，则以酵素联结免疫吸附法检测或足以免疫印迹法分析数据时，

30 其结果都有升高的趋势(免疫印迹法结果，第四道至第六道)。有趣的是升

高的 IgA 浓度也是和 EB 病毒复制有关的蛋白质，例如 EDP，DBP，TK 和 EA-D 等(请比较第四道和第五道及第六道的结果)。在 EB 病毒特异抗原之间的其他斑纹可能是重组的 EB 病毒抗原纯化时所残余的细菌蛋白质，但为病人的 IgA 所辨认出来。

5 以含 EBNA-1 和 EA-D 的酵素联结免疫吸附法检测血清时，IgA 浓度不变，但是以免疫印迹法分析时却有降低的倾向者，则以 C 例为代表(图 1，第七至第十道)；此例，不但在第七至第十道中侦测不到 EA-D/IgA，对于其他和 EB 病毒复制有关的蛋白质，如 DBP，TK 和 ZEBRA 等，其 IgA 浓度也逐渐减低。D 例则代表 IgA 浓度不论是以酵素联结免疫吸附法
10 检测或是以免疫印迹法检测时，其结果皆居高不下的病人(图 1，第十五与第十二道)。E 例则代表以酵素联结免疫吸附法检测时，IgA 浓度下降；但是以免疫印迹法检测时，IgA 对和 EB 病毒复制有关的蛋白质，如 DBP 和 ZEBRA，却有升高的趋势(图 1，第十三与第十四道)；值得注意的是，在本例中以免疫印迹法检测时，检测不到第十四道的 EBNA-1。以上的结果
15 显示，使用免疫印迹法检测病人血清时，不但能分析病人血清对个别 EB 病毒抗原的免疫反应度，也能同时观察到 IgA 浓度的变化。当比较使用免疫印迹法检测病人血清所得的结果与病人的病情时，IgA 浓度居高不下的病人或是 IgA 浓度突常升高者，尤其是对和 EB 病毒复制有关的蛋白质，如 DBP，EA-D，EDP，TK 和 ZEBRA 等，有升高趋势的病人，其预后
20 较差，通常在短期内会有疾病复发或是远端转移的现象发生。

相类似于免疫印迹法但分别将前述的抗原以吸附或键结于固态载体上并依相同程序来检测病人血清，不但可免除电泳分离的步骤同时得到的相同结果。

25 本发明所公开的方法可应用于鼻咽癌患者治疗前后或病情发展状况的检验分析以提供医师诊断用药的参考。以往文献并无相类似的阐述，具有新颖性；本发明能够分析患者治疗状况及病情发展，比较目前所有鼻咽癌相关检验试剂及方法却无此功能，具有进步性；本发明所揭示的方法可实际应用于，临床检验，具有产业应用性。

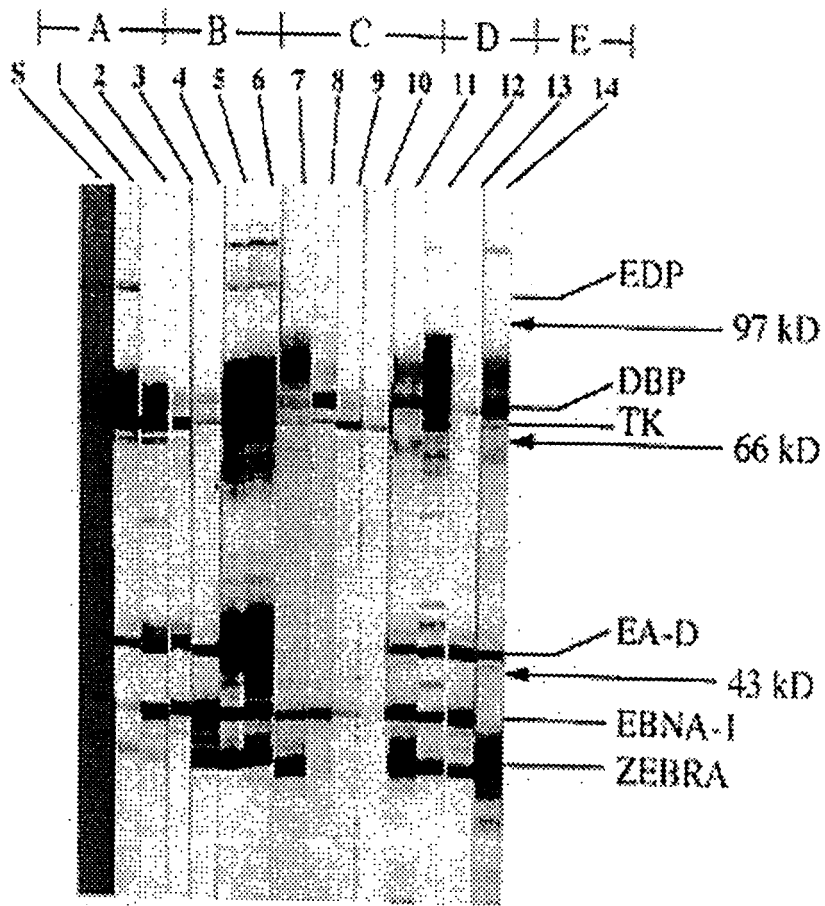


图 1

专利名称(译)	应用非洲淋巴细胞瘤病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人治疗前后的血清反应		
公开(公告)号	CN1151376C	公开(公告)日	2004-05-26
申请号	CN00109576.5	申请日	2000-07-05
[标]申请(专利权)人(译)	勤立生物科技股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	勤立生物科技股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	勤立生物科技股份有限公司		
[标]发明人	周宽基		
发明人	周宽基		
IPC分类号	C07K14/05 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/543 G01N33/561 G01N33/569		
代理人(译)	朱黎光		
其他公开文献	CN1331415A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明是属于使用方法的范畴，有关应用非洲淋巴细胞瘤病毒，Epstein-Barr(简称EB)病毒的综合抗原以检测鼻咽癌病人在治疗前后的血清反应，特别是利用EB病毒所表现的特异蛋白，如DNA结合蛋白(DBP)、早期扩散性抗原(EA-D)、EB病毒一号核抗原(EBNA-1)、EB病毒特异性DNA聚合酶(EDP)、胸腺嘧啶激活酶(TK)及EB病毒BZLF-1复制激活质(ZEBRA)等，本发明使用EB病毒在不同感染时期所表现的特异抗原，包括潜伏感染期以及病毒复制期的六种不同抗原，以免疫分析法来检测并评估鼻咽癌病人在治疗前后，血清中对这六种不同抗原同时存在的IgA效价情况，从而提供了一种更好的检测方法，以评估鼻咽癌病人的治疗疗效。

