



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105699653 A

(43) 申请公布日 2016.06.22

(21) 申请号 201410689935.5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014.11.25

G01N 33/68(2006.01)

(83) 生物保藏信息

G01N 33/531(2006.01)

CGMCC No. 9806 2014.10.16

G01N 33/543(2006.01)

(71) 申请人 北京市肝病研究所

地址 100069 北京市丰台区右安门外西头条  
8号

申请人 首都医科大学附属北京佑安医院

(72) 发明人 石英 陈德喜 李宁 谢立 刘凯  
黄雁翔 刘芳

(74) 专利代理机构 北京德和衡律师事务所  
11405

代理人 陈浩

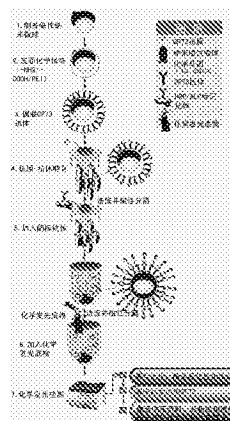
权利要求书2页 说明书14页  
序列表4页 附图5页

(54) 发明名称

一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测  
GP73 抗原的方法

(57) 摘要

本发明涉及诊断试剂技术领域,特别涉及一种磁性免疫体外诊断试剂。为了解决传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,本发明提供一种 GP73 单克隆抗体及一种表面偶联有 GP73 单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中 GP73 抗原的方法。用于产生所述 GP73 单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:AAAERGAVELKK。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。



1. 一种用于检测 GP73 抗原的单克隆抗体,其特征在于,用于产生所述单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:

AAAERGAVELKK。

2. 根据权利要求 1 所述的单克隆抗体,其特征在于,所述单克隆抗体是 CGMCC 保藏编号 9806 的 GP73 单克隆抗体杂交瘤细胞产生的抗体。

3. 一种超顺磁纳米免疫微球,其特征在于,所述纳米免疫微球包括纳米微球,所述纳米微球上偶联有权利要求 1 或 2 所述的 GP73 单克隆抗体。

4. 根据权利要求 3 所述的超顺磁纳米免疫微球,其特征在于,所述纳米微球包括微球核心和无机小分子,所述无机小分子覆盖在微球核心的表面形成无机小分子层,所述纳米微球通过无机小分子偶联所述抗体。

5. 根据权利要求 4 所述的超顺磁纳米免疫微球,其特征在于,所述无机小分子是二氧化硅 (SiO<sub>2</sub>)。

6. 一种用于检测 GP73 的多克隆抗体,其特征在于,用于产生所述多克隆抗体的抗原选自下述氨基酸序列的片段:

QMKEVKEQCEERIEEVTKKGNEAVASRDLSNNDQRQQLQALSEPQPRLQAAGLPHTTEVPQGKGNVLGNSK  
SQTAPASSEVVLDSKRQVEKEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGGRRGFGGAGELGQTPQVQAALSV  
SQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRNQKLRGEDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKR  
DTINLLDQREKRNHTL。

7. 根据权利要求 6 所述的多克隆抗体,其特征在于,产生所述多克隆抗体的抗原为下述氨基酸序列中至少两种氨基酸序列的组合:

MKEVKEQCE;

EAVASRDLS;

PERDQLVIP。

8. 一种杂交瘤细胞株,其是 CGMCC 保藏编号 9806 的 GP73 单克隆抗体杂交瘤细胞。

9. 一种制备权利要求 3 所述的纳米免疫微球的方法,其特征在于,所述方法包括下述步骤:

(1) 取 50-200  $\mu$  I 超顺磁性纳米微球;

(2) 对微球表面进行化学修饰;

(3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

(4) 用洗涤液进行洗涤;

a. 将超顺磁性纳米微球加入 400-800  $\mu$  I 洗涤液,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

(5) 加入浓度为 0.5 ~ 3mg/ml 的 GP73 单克隆抗体溶液,恒温振荡反应;

(6) 磁性分离,弃上清液;

(7) 用相同洗涤液进行洗涤;

a. 每次加入洗涤液 400-800  $\mu$  I,并使之分散;

b. 磁性分离,弃上清液;

c. 重复以上洗涤步骤 2-3 次;

d. 加入 0.5 ~ 2ml 贮存液,4 $^{\circ}$ C 保存备用。

10. 一种用于检测 GP73 抗原的试剂盒, 其特征在于, 所述试剂盒包括权利要求 3 所述的超顺磁纳米免疫微球, 和权利要求 6 所述 GP73 多克隆抗体。

## 一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测 GP73 抗原的方法

### 技术领域

[0001] 本发明属于诊断试剂技术领域,涉及磁性免疫体外诊断试剂,特别涉及一种表面偶联有 GP73 单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中 GP73 抗原的方法。

### 背景技术

[0002] 肝癌是常见的恶性肿瘤之一,“早诊、早治”是防治肝癌的关键。目前临床上对肝癌的诊断方法主要是影像学和血清标志物甲胎蛋白(AFP)的检测,早期肝癌直径小,影像学几乎检测不到,AFP 诊断敏感性较低(25%),会漏检一部分早期肝癌患者。

[0003] 高尔基体蛋白 73(GP73)被认为是目前最好的肝癌早期诊断血清学标志物之一,其检测敏感性和特异性均高于 AFP。国内外已有的 GP73 试剂均为传统的酶联免疫方法,该方法的不足之处在于检测灵敏度较低,反应时间较长。

[0004] 磁性纳米微球具有超顺磁性,具有巨大的比表面积和可以偶联多种生物分子的特点。在无外加磁场时磁性纳米微球均匀分散在溶液中,使抗原-抗体快速、高效反应,在外加磁场的作用下,超顺磁性纳米微球可快速移动,通过吸附、洗涤、解吸附等操作步骤从复杂的生物化学混合物体系中分离得到目标分子;传统的酶联免疫方法是通过物理吸附将生物分子固定在酶标板表面,因而限制了该方法的敏感性和稳定性。磁性纳米微球有巨大的比表面积,可偶联更大量的生物分子,并且通过双功能化学试剂将生物分子共价偶联在其表面,因而大大提高反应速度、检测灵敏度和稳定性。

### 发明内容

[0005] 为了解决现有技术中肝癌诊断试剂检测用时长、抗体固定容量小、灵敏度较低和稳定性较差的技术问题,为了解决传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,本发明提供一种 GP73 单克隆抗体及一种表面偶联有 GP73 单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球采用双抗体夹心酶免法或化学发光法检测人血清或血浆中 GP73 抗原的方法。用于产生所述 GP73 单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:AAAERGAVELKK。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球,及利用该微球检测 GP73 抗原的方法,能够用于肝癌早期诊断。

[0006] 为达到上述目的,本发明的技术解决方案是:

[0007] 本发明提供一种用于检测 GP73 抗原的单克隆抗体,用于产生所述单克隆抗体的抗原具有下述氨基酸序列:

[0008] AAAERGAVELKK(参见序列 1)。

[0009] 进一步的,所述单克隆抗体是 CGMCC 保藏编号 9806 的 GP73 单克隆抗体杂交瘤细

胞产生的抗体。

[0010] 用于检测 GP73 抗原的抗体称为 GP73 抗体。所述 GP73 单克隆抗体具有高免疫活性。

[0011] GP73 抗体针对 GP73 抗原的超保守部位 (PC Site), 因此具有高度敏感性和特异性。

[0012] 本发明还提供一种超顺磁纳米免疫微球, 所述纳米免疫微球包括纳米微球, 所述纳米微球上偶联有所述 GP73 单克隆抗体。

[0013] 所述超顺磁纳米免疫微球可简称为磁性免疫微球。

[0014] 所述 GP73 单克隆抗体通过双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面。所述双功能化学试剂是戊二醛, 或, EDC(1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 碳二亚胺。

[0015] 进一步的, 所述超顺磁纳米免疫微球中, 所述纳米微球包括微球核心和无机小分子, 所述无机小分子覆盖在微球核心的表面形成无机小分子层, 所述纳米微球通过无机小分子偶联所述抗体。

[0016] 所述微球核心表面覆盖薄层无机小分子, 可减少非特异性吸附。所述微球表面利用  $-NH_2$ ,  $-COOH$ , 或 PEI (聚醚酰亚胺) 进行表面化学修饰。

[0017] 所述微球核心的材质是四氧化三铁, 所述微球核心的直径尺寸为 6-12nm; 所述微球的直径为 10 ~ 30nm。进一步的, 所述微球核心的直径尺寸为 8nm。

[0018] 所述的超顺磁纳米免疫微球中, 所述无机小分子是二氧化硅 ( $SiO_2$ )。

[0019] 本发明还提供一种用于检测 GP73 的多克隆抗体, 用于产生所述多克隆抗体的抗原选自下述氨基酸序列的片段:

[0020] QMKEVKEQCEERIEEVTKKGNEAVASRDLSSENNDQRQQLQALSEP

[0021] QPRLQAAGLPHTEVPQGKGNVLGNSKSTPAPSSEVVLDISKRQVE

[0022] KEETNEIQVVNEEPQRDRLPQEPGREQVVEDRPVGGRGFGGAGEL

[0023] GQTPQVQAALSVSQENPEMEGPERDQLVIPDGQEEEQEAAGEGRN

[0024] QQKLRGEDDYNMDENEAESETDKQAALAGNDRNIDVFNVEDQKRD

[0025] TINLLDQREKRNHTL (参见序列 5)。

[0026] 用于检测 GP73 抗原的多克隆抗体称为 GP73 多克隆抗体。所述 GP73 多克隆抗体上偶联酶标记物。

[0027] 进一步的, 用于产生所述多克隆抗体的抗原为下述氨基酸序列中至少两种氨基酸序列的组合:

[0028] MKEVKEQCE (参见序列 2);

[0029] EAVASRDLS (参见序列 3);

[0030] PERDQLVIP (参见序列 4)。

[0031] 本发明还提供一种制备上述纳米免疫微球的方法, 所述方法包括下述步骤:

[0032] (1) 取 50-200  $\mu$  I 超顺磁性纳米微球;

[0033] (2) 对微球表面进行化学修饰;

[0034] (3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

[0035] (4) 用洗涤液进行洗涤;

- [0036] a. 将超顺磁性纳米微球加入 400-800  $\mu$  I 洗涤液,并使之分散;
- [0037] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0038] (5) 加入浓度为 0.5 ~ 3mg/ml 的 GP73 单克隆抗体溶液,恒温振荡反应;
- [0039] (6) 磁性分离,弃上清液;
- [0040] (7) 用相同洗涤液进行洗涤;
- [0041] a. 每次加入洗涤液 400-800  $\mu$  I,并使之分散;
- [0042] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0043] c. 重复以上洗涤步骤 2-3 次;
- [0044] d. 加入 0.5 ~ 2ml 贮存液,4 $^{\circ}$ C 保存备用。
- [0045] 所述洗涤液为 0.01 ~ 0.2M 的碳酸盐缓冲液,PH = 8.0 ~ 9.5 ;或 0.01 ~ 0.2M 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸盐缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6。
- [0046] 所述 GP73 单克隆抗体的溶液采用碳酸盐缓冲液,PH = 8.0 ~ 9.5 ;或 0.01 ~ 0.2M 的三羟甲基氨基甲烷 - 盐酸盐缓冲液,PH = 7.0 ~ 7.6。
- [0047] 所述贮存液为 0.01 ~ 0.2M 的 PB,PH = 7.0 ~ 8.0 ;或 0.01 ~ 0.2M 的 Tris-HCl,PH = 7.0 ~ 8.0 ;所述贮存液中均加入防腐剂,所述防腐剂为 0.01 ~ 0.2% 的  $\text{NaN}_3$  或者 0.01 ~ 0.2% 的硫柳汞。
- [0048] 所述防腐剂的浓度单位为重量(克)体积比(毫升)。
- [0049] 所述第(5)步中恒温振荡反应的温度为 4 ~ 40 $^{\circ}$ C,反应时间为 10 ~ 60 分钟,振动速度为 180 ~ 200rpm。
- [0050] 本发明还提供一种杂交瘤细胞株,其是 CGMCC 保藏编号 9806 的 GP73 单克隆抗体杂交瘤细胞株。
- [0051] 本发明还提供一种利用所述的超顺磁性纳米免疫微球检测 GP73 抗原的方法(简称显色检测法),所述方法包括下述步骤:
- [0052] (1) 将试管置于试管架上,设阳性对照试管孔 2 孔,阴性对照试管孔 3 孔,空白对照孔 1 孔;
- [0053] (2) 在待检样品试管中加入 10 ~ 50  $\mu$  I 样品稀释液和 5 ~ 100  $\mu$  I 的待检样品,阳性对照管和阴性对照管中分别加入阳性对照样品和阴性对照样品 50 ~ 100  $\mu$  I;
- [0054] (3) 充分混匀已加贮存液的含有 GP73 单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球溶液后,用加样器向各反应试管中加入 5 ~ 50  $\mu$  I 该微球溶液,混匀,4 ~ 40 $^{\circ}$ C 反应 0.5 ~ 2 小时;
- [0055] (4) 各试管加入 5 ~ 50  $\mu$  I 已偶联 GP73 多克隆抗体的酶标记物,混匀,4 ~ 40 $^{\circ}$ C 反应 0.5 ~ 2 小时;
- [0056] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次:
- [0057] a. 每次加入洗涤液 400-800  $\mu$  I,并使之分散,
- [0058] b. 磁性分离,弃上清液;
- [0059] (6) 各管加入 50 ~ 200  $\mu$  I 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)显色液,混匀,4 ~ 40 $^{\circ}$ C 反应 10 ~ 30 分钟;
- [0060] (7) 各管加入 50 ~ 200  $\mu$  I 终止液,混匀,磁性分离,将上清液移至专用于酶标仪上进行吸光度值(OD)测量的酶标板孔中,在酶标仪上用 450nm 和 630nm 进行双波长测定各孔

OD 值。

[0061] 本发明还提供另一种利用上述的超顺磁性纳米免疫微球检测 GP73 抗原的方法（简称化学发光检测法），所述方法包括下述步骤：

[0062] (1) 将试管置于试管架上，设阳性对照试管孔 2 孔，阴性对照试管孔 3 孔，空白对照孔 1 孔；

[0063] (2) 在待检样品试管中加入 10 ~ 50  $\mu$  I 样品稀释液和 5 ~ 100  $\mu$  I 的待检样品，阳性对照管和阴性对照管中各加入阳性对照样品和阴性对照样品 50 ~ 100  $\mu$  I；

[0064] (3) 充分混匀已加贮存液的上述的含有 GP73 单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球溶液后，各管加入 5 ~ 50  $\mu$  I 该微球溶液，混匀，4 ~ 40 $^{\circ}$ C 反应 0.5 ~ 2 小时；

[0065] (4) 各管加入 5 ~ 50  $\mu$  I 已偶联上述的 GP73 多克隆抗体的酶标记物，混匀，4 ~ 40 $^{\circ}$ C 反应 0.5 ~ 2 小时；

[0066] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少 2 次：

[0067] a. 每次加入洗涤液 400-800  $\mu$  I，并使之分散；

[0068] b. 磁性分离，弃上清液；

[0069] (6) 各管加入 50 ~ 200  $\mu$  I 化学发光物质溶液，该化学发光物质是：3-(2-螺旋金刚烷)-4-甲氧基-4-(3-磷氧酰)-苯基-1,2-二氧环乙烷二钠盐 (AMPPD)；

[0070] (7) 用化学发光仪器检测各孔的信号值。

[0071] 上述检测 GP73 抗原的方法中，所述样品稀释液为 0.01 ~ 0.2M 的 PBST, PH = 5.0 ~ 8.0；或 0.01 ~ 0.2M 的 Tris-HCl, PH = 4.0 ~ 7.8；或 0.001 ~ 10M 的 CBS, PH = 9.0 ~ 11.0；或 0.001 ~ 10M 的醋酸盐缓冲液, PH = 3.0 ~ 7.0；或 0.001 ~ 10M 的柠檬酸缓冲液, PH = 3.0 ~ 8.0。

[0072] 所述洗涤液为 0.01 ~ 0.2M 的 PBST, PH = 7.0 ~ 8.0；或 0.01 ~ 0.2M 的 Tris-HCl, PH = 7.0 ~ 7.6。

[0073] 所述终止液为 0.01 ~ 4M 的 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>，或 0.01 ~ 4M 的 HCl，或 0.01 ~ 4M 的柠檬酸。

[0074] 上述检测 GP73 抗原的方法中，所述超顺磁性纳米免疫微球上偶联的 GP73 单克隆抗体与酶标记物上偶联的 GP73 多克隆抗体识别不同的 GP73 抗原表位。

[0075] 上述检测 GP73 抗原的方法中，酶标记物偶联的 GP73 多克隆抗体与 GP73 抗原可溶性切割片段特异性结合。

[0076] 因此，本发明提供的 GP73 多克隆抗体针对血浆中游离的 GP73 具有高度特异性和敏感性。

[0077] 本发明提供的 GP73 多克隆抗体是利用酶标记的多克隆抗体，能够多方位地与 GP73 抗原的不同表位相结合，因此提高检测的灵敏度。

[0078] 本发明还提供一种用于检测 GP73 抗原的试剂盒，所述试剂盒包括上述的超顺磁性纳米免疫微球，和上述的 GP73 多克隆抗体。

[0079] 上述试剂盒利用纯化的大肠杆菌表达的 GP73 全长融合蛋白作为标准品，系列稀释后定量检测血浆中 GP73。

[0080] 本发明提供的超顺磁纳米微球上偶联的 GP73 单克隆抗体针对 GP73 超保守部位 (PC Site) 下游，例如下游的 12 个氨基酸，该表位在不同种属生物进化过程中仍然保守，而且在 GP73 被裂解后，作为细胞外部分可在血浆中检测到。因此，针对该部位的单克隆抗体

具有最佳的敏感性,大大提高了人群自然变异 GP73 的检出率。

[0081] 酶标记物上偶联的 GP73 多克隆抗体,针对胞浆内游离 GP73 酸性区末端的序列。因此,对血浆中游离的 GP73 具有高度特异性和敏感性;利用多克隆抗体针对多个表位,使酶标信号获得扩大,提高了检测的灵敏度。

[0082] 本发明以超顺磁性纳米微球作为反应和分离的固相载体,合成表面偶联 GP73 单克隆抗体的超顺磁性免疫微球,该微球与被检人血清或血浆中 GP73 抗原特异性结合,形成抗原-抗体复合物,再和标记物标记的 GP73 多克隆抗体特异性抗体结合,应用相应的检测系统,定性或定量检测人血清或血浆中 GP73 特异性抗原。

[0083] 本发明所获得的细胞株能够特异性的分泌针对 GP73 抗原的单克隆抗体,所产生的抗体具有较好的灵敏度和较高的特异性。

[0084] 本发明提供的 GP73 单克隆抗体,具有较好的灵敏度和较高的特异性。

[0085] 与现有技术相比,本发明将磁性纳米微球与效价高、特异性强的 GP73 单克隆抗体结合,解决了传统酶联免疫方法中固定的抗体容量较小、反应时间较长、灵敏度相对较低和固定的抗体稳定性较低的技术问题,具有偶联更多抗体、免疫反应速度较快、特异性高、重复性好、成本低、实验条件要求简单等特点。

[0086] 具体的,本发明具有下述优点:

[0087] 1、检测速度快,约 1 小时左右,特异性高,稳定性和重复性好。

[0088] 2、采用超顺磁性纳米微球作为反应和分离载体,明显提高了检测的灵敏度和稳定性,可检测的最低抗原浓度为 100pg/ml,灵敏度达 90.5%,特异性 84%,AUROC :0.909。4℃ 储存,稳定性好。

[0089] 检测过程中:(1) 在无外加磁场时,磁性纳米微球均匀分散在溶液中,使抗原和抗体的反应类似于均相反应,加速了抗原-抗体复合物的形成;(2) 在外加磁场的作用下,超顺磁性纳米微球可快速移动,通过吸附、洗涤、解吸附等操作步骤从复杂的生物化学混合物体系中分离得到目标分子;(3) 磁性纳米微球有巨大的比表面积,可偶联更大量的生物分子,检测灵敏度高,范围宽,对于高浓度的标本无需稀释可直接定量测定,避免了稀释误差和基质效应;(4) GP73 单克隆抗体通过双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面,偶联条件温和,最大限度保持了 GP73 单克隆抗体的免疫活性,大大提高了检测敏感性和方便性,易于实现大规模制备 GP73 单克隆抗体的磁性纳米免疫微球并应用于检测人血清或血浆中的 GP73 抗原。

[0090] 3、本发明采用针对 GP73 保守部位的单克隆抗体偶联磁性纳米微球,可明显提高检测的特异性和敏感性;采用针对 GP73 可溶性片段的多克隆抗体偶联酶作为检测抗体,可大大提高血浆中 GP73 的检出率,并充分扩大检测信号,使 GP73 的检测有很好的特异性和敏感性。

## 附图说明

[0091] 图 1 是 GP73 的超保守部位结构示意图;

[0092] 图 2 是 GP73 胞外区结构示意图;

[0093] 图 3 是利用本发明提供的免疫微球及 GP73 多克隆抗体检测样品中的 GP73 抗原的 ROC 曲线图;

[0094] 图 4 是制备超顺磁纳米免疫微球及利用该免疫微球及 GP73 多克隆抗体检测样品中的 GP73 抗原的方法的流程示意图。

[0095] 图 5 是本发明提供的超顺磁性纳米免疫微球的稳定性检测结果示意图；

[0096] 图 6 是 GP73 单克隆抗体腹水肝癌细胞染色免疫荧光图。

### 具体实施方式

[0097] 为了更易理解本发明提供的技术方案，下文将本发明的较佳的实施例，并配合图式做详细说明如下：

[0098] 如图 1 所示，GP73 超保守部位 (PC Site) 下游 12 个氨基酸 :EGRVRRAAAERG, 该表位在不同种属生物进化过程中仍然保守。

[0099] 人 :LQTRIMELEGRVRRAAAERG ( 参见序列 6)

[0100] 黑猩猩 :LQTRIMELEGRVRRAAAERG ( 参见序列 7)

[0101] 小家鼠 :LQTRIVELEGRVRRAAAERG ( 参见序列 8)

[0102] 褐家鼠 :LQTRIVELEGRVRRAAAERG ( 参见序列 9)

[0103] 原鸡 :LQSRIMELEGKVRRAAAAERG ( 参见序列 10)。

[0104] 酶标记物上偶联的 GP73 多克隆抗体，针对胞浆内游离 GP73 酸性区末端的序列，GP73 酸性区如图 2 所示。

[0105] 评价 GP73 是否可以作为 HCC 的早期诊断指标，试验用的 HCC 标本应为初诊病例标本，未经任何干预治疗。目前试验中的大多数 HCC 标本均进行过干预治疗，所以本申请选取所有标本中诊断为 HCC 而未有干预治疗记录的病例标本共 150 例绘制 ROC 曲线。如图 3 所示，利用本发明提供的磁性免疫微球、及 GP73 多克隆抗体检测 GP73 抗原的方法具有较高的准确率。

[0106] 如图 4 所示，本发明提供的制备超顺磁纳米免疫微球及利用该微球及 GP73 多克隆抗体检测 GP73 抗原的方法包括下述步骤：

[0107] 1、制备磁性纳米微球，

[0108] 2、利用  $-NH_2$ 、 $-COOH$  或 PEI 进行表面化学修饰，

[0109] 3、偶联 GP73 单克隆抗体，

[0110] 4、抗原 - 抗体孵育，

[0111] 5、加入酶标多克隆抗体，洗涤并磁性分离，

[0112] 6、加入化学发光底物，

[0113] 7、化学发光检测。

[0114] 已偶联 GP73 单克隆抗体的纳米磁珠、裂解液和 HRP 稀释液于  $4^{\circ}C$ 、室温 ( $20^{\circ}C \sim 25^{\circ}C$ ) 放置 6 天、8 天和 10 天后，测定阳性对照、HCAg-NS3 阳性标本和正常人标本各 1 例。其 OD 值无显著性变化，如图 5 所示。说明本发明提供的超顺磁纳米免疫微球，及 GP73 多克隆抗体稳定性较好。

[0115] 本发明的原理：

[0116] 1、通过双功能化学试剂 ( 戊二醛，或 EDC (1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐) 碳二亚胺) 将 GP73 单克隆抗体共价偶联在磁性纳米微球表面，制备磁性免疫微球 (MIB)。

[0117] 2、待检样品与磁性免疫微球在 37℃ 反应,若待检样品中含有 GP73,则其将与 MIB 表面的 GP73 单抗进行特异性免疫反应,被捕获在 MIB 表面。

[0118] 3、加入酶标记的 GP73 多抗,该 GP73 多抗将与被捕获在 MIB 表面的 GP73 进行特异性免疫反应,形成抗体-抗原-抗体三明治夹心复合物,通过洗涤除去游离的未参与反应的抗原、抗体等其他杂质。

[0119] 4、加入显色液 A、B 或化学发光底物,在三明治夹心复合物中的酶的催化作用下,产生的有色产物在波长 450nm 处有最高吸收峰,可用酶标仪进行测量或用化学发光检测仪检测产生的光学信号。测量值与被检 GP73 的浓度成正相关。

[0120] 实施例 1:

[0121] 1、制备 GP73 单抗。

[0122] (1)、合成多肽 AAAERGAVELKK(序列 1),偶联 BSA(牛血清白蛋白)。

[0123] (2)、动物免疫:将步骤(1)得到的合成多肽(GP73 抗原)与完全福氏佐剂等量混合制成乳化剂,共免疫 BaIb/c 小鼠 5 只。第 1 次免疫 100 μg/只,4 周后用不完全福氏佐剂第 2 次免疫,50 μg/只。第 2 次免疫 2 周后(共 6 周)取尾静脉血测定效价,5 只小鼠抗体效价均达到 1:32000。第 2 次免疫 4 周后(共 8 周)用不完全福氏佐剂第 3 次免疫,剂量、途径与第 2 次相同。第 3 次免疫 2 周后(共 10 周)尾静脉取血再次测定效价,5 只小鼠的 GP73 抗体效价分别为 1:64000、1:64000、1:128000、1:64000、1:128000,取 3 号和 5 号小鼠做融合。

[0124] (3)、GP73 单抗阳性细胞株筛选

[0125] 用免疫过的 BaIb/c 小鼠制备脾细胞悬液后,吸取脾细胞和骨髓瘤细胞悬液按 5:1 体积比混合,置于离心管内充分混匀,离心使沉淀细胞松散均匀成糊状。

[0126] 取 50% 的聚乙二醇 1.0ml 加入混合细胞中促进融合。加入 45ml HAT 培养液制成细胞悬液,并加入已铺成饲养细胞层的 96 孔板中,每孔 0.1ml,置 37℃ 5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。分别于第 3、6 天后换液 HAT 1 次,10 天时取上清液,用 ELISA 法测 GP73 抗体效价,进行初筛,阳性孔准备进行亚克隆。杂交瘤细胞的克隆化采用有限稀释法。用滴管反复吹打 24 孔板细胞,使细胞充分混匀,进行细胞计数,将混匀细胞液进行系列稀释至 10 个细胞/ml,将稀释好的细胞悬液每孔 0.1ml 接种于已铺有饲养细胞层的 96 孔板中,显微镜下观察细胞克隆生长情况。反复克隆多次,确定阳性单克隆细胞株后扩大培养。

[0127] (4)、腹水制备:接种杂交瘤细胞前 10 天 BaIb/c 小鼠腹腔注射 0.5ml 石蜡油,每只小鼠腹腔注射 0.5ml 杂交瘤细胞。2 周内小鼠腹部明显膨大,处死后吸出腹水,离心后低温保存上清。

[0128] 应用 B 淋巴细胞杂交瘤技术融合细胞,共用 11 块 96 孔板,融合率 100%,阳性率 20%。初筛阳性孔进行 2-4 次克隆,阳性率达 100%。共获得 11 株能稳定分泌 GP73 McAb 的杂交瘤细胞株,分别命名,如表 1 第一列所示。经扩大培养后,分别制备腹水。培养上清液和腹水中 GP73 抗体的效价见表 1。

[0129] 表 1 1 株 GP73 McAb 效价测定

[0130]

McAbs	细胞培养上清抗体效价	腹水抗体效价

GED467	1 : 2000	1 : 128000
GDD285	1 : 2000	1 : 32000
GCC52315	1 : 2000	1 : 2048000
GEG696	1 : 8000	1 : 128000
GEC3531	1 : 8000	1 : 128000
GCF1011	1 : 4000	1 : 512000
GEG5997	1 : 4000	1 : 512000
GAD3474	1 : 2000	1 : 2048000
GDA124	1 : 4000	1 : 8192000
GFF116	1 : 8000	1 : 8192000
GBG9601	1 : 4000	1 : 512000

[0131]

[0132] 产生本发明 GP73 单抗的是小鼠杂交瘤细胞株 GDA124。

[0133] 上述杂交瘤细胞株 GDA124 提交保藏，

[0134] 保藏单位是：中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心 (CGMCC)。

[0135] 提交保藏的目的是：用于专利程序的生物材料保存。

[0136] 提交保藏日期是：2014 年 10 月 16 日。

[0137] 保藏编号是：9806。

[0138] (5)、采用纯化 GP73 表达抗原和其他蛋白（人血清白蛋白 HAS、BSA、GST、大肠杆菌 BL-21 菌体、HCV 和 HDV 重组蛋白）分别包被酶标板，检测 GP73 单抗对不同蛋白的反应性。抗体特异性检测：无菌爬片置于 6 孔板的孔中，向孔中接种 HepG2 细胞（HepG2 属于肝癌细胞，天然状态下即有较为丰富的 GP73 蛋白表达），以普通骨髓瘤细胞接种的小鼠产生的腹水作为阴性对照，其结果见表 2。细胞融合率达 70% 后用免疫荧光检测 GP73 表达水平。DAPI 细胞核染色（参见图 6）。

[0139] 表 2 11 株杂交瘤细胞接种小鼠产生的腹水的特异性检测 (OD 值)

[0140]

McAbs	包被蛋白						
	GP73	HAS	BSA	GST	大肠杆	HCV 重	HDV

[0141]

	抗原				菌 BL-21 菌体	组蛋白	重组蛋 白
GED467	1.307	0.072	0.07	0.114	0.16	0.109	0.095
GDD285	0.899	0.077	0.095	0.129	0.109	0.217	0.42
GCC52315	0.986	0.106	0.22	0.063	0.13	0.12	0.16
GEG696	1.256	0.071	0.248	0.114	0.123	0.111	0.063
GEC3531	1.385	0.085	0.109	0.079	0.079	0.066	0.081
GCF1011	1.088	0.081	0.058	0.058	0.062	0.135	0.048
GEG5997	1.065	0.131	0.076	0.129	0.081	0.132	0.109
GAD3474	0.836	0.093	0.091	0.088	0.117	0.118	0.093
GDA124	1.386	0.056	0.13	0.221	0.101	0.097	0.079
GFF116	1.588	0.079	0.098	0.097	0.085	0.105	0.137
GBG9601	1.465	0.077	0.098	0.139	0.123	0.098	0.067
阴性对照 腹水	0.213	0.145	0.075	0.064	0.053	0.085	0.102

[0142] 2、制备纳米微球。

[0143] 称取 0.30g  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  和 0.85g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 溶解于 10mL 二次蒸馏水中配制混合溶液, 取 250mL 置于三口瓶内, 置于 65℃ 的恒温水浴锅中, 强烈的磁力搅拌下, 滴加浓 NaOH 溶液至 pH = 7, 此时有棕色颗粒生成。再滴加稀 NaOH 溶液至 pH = 8, 继续搅拌, 加入无水乙醇, 静置 10min 后, 将温度升高进行熟化, 调节酸度。搅拌的同时加入表面活性剂十二烷基苯磺酸钠, 整个反应过程在氮气保护下进行。30min 后, 用强磁铁来沉降, 分离上层清液, 用蒸馏水和无水乙醇反复洗涤沉淀物, 直至洗水的 pH 为 7 左右, 将沉淀物置于真空干燥箱中, 在 75℃ 下干燥 5h, 得磁性纳米  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉体。

[0144] 所得  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  粉体是微球核心, 所述微球核心的直径尺寸为 6-12nm;  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  微球核心外表面包覆二氧化硅, 所得微球的直径为 10 ~ 30nm。

[0145] 3、制备纳米免疫微球:

[0146] (1) 取超顺磁性纳米微球;

[0147] (2) 对微球表面进行化学修饰;

[0148] (3) 将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

[0149] (4) 取 100  $\mu\text{l}$  步骤 (3) 所得磁性纳米微球于 2mL 离心管中, 磁性分离, 弃上清液,

[0150] (5) 每次用洗涤液 (0.02M Tris-HCl, 含 0.02% 吐温 20, PH = 7.4) 300  $\mu\text{l}$  洗涤, 至少洗 2 次后, 磁性分离, 弃上清液,

[0151] (6) 加入 200  $\mu$  I 浓度为 1mg/ml 的 GP73 单抗,混匀,室温振荡反应 20 ~ 30 分钟,振荡速度为 180rpm。

[0152] (7) 磁性分离,弃上清液,用上述洗涤液洗 3 次,加入 0.5 ~ 2ml 贮存液 (0.2M PBS, 含 10% BSA, 0.2% 硫柳汞, PH = 7.4), 得到免疫微球。

[0153] 所得到的免疫微球置 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

[0154] 上述方法中偶联效率参见表 3, 表 3 显示了 GP73 单抗溶液在偶联磁性纳米微球前后在波长 280nm 处吸光度值的变化。

[0155] 表 3 磁性纳米微球与 GP73 单抗的偶联

[0156]

GP73 单抗溶液吸光度值 (280nm)		偶联效率 (%)
偶联前	偶联后	
0.346	0.075	78.3

[0157] 表 3 中 :1. 偶联前 GP73 单抗溶液用 0.1M PBS (PH = 7.4) 稀释 5 倍后测得 280nm 处吸光度值为 0.346。

[0158] 2. 偶联后上清液用 0.1M PBS (PH = 7.4) 稀释 5 倍后测得 280nm 处吸光度值为 0.075。

[0159] 3. **偶联效率** =  $\frac{OD_{\text{偶联前}} - OD_{\text{偶联后上清}}}{OD_{\text{偶联前}}} \times 100\%$

[0160] 表 3 数据显示本发明中制备的磁性纳米微球对 GP73 单抗有较高的偶联效率。

[0161] 实施例 2

[0162] 利用实施例 1 提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测 GP73 抗原的方法检测 402 例健康献血者样品中的 GP73 抗原。

[0163] 血清或血浆中 GP73 的检测 :

[0164] (1) 各试管中分别加入 50  $\mu$  I 样品稀释液 (0.02M PBS, 含 0.1% Tween 20, PH = 7.4),

[0165] (2) 再加入 50  $\mu$  I 待检样品,

[0166] (3) 阳性对照孔中加入 50  $\mu$  I 基因工程 GP73 溶液 (缓冲液为 0.1M PBS),

[0167] (4) 阴性对照孔中加入 50  $\mu$  I 正常人血清,

[0168] (5) 空白孔中不加样品稀释液。

[0169] (6) 将试管或孔中的不同物质混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟后取出,

[0170] (7) 各试管分别加入 50  $\mu$  I 磁性免疫微球溶液 (空白孔不加), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟后取出,

[0171] (8) 各试管分别加入 50  $\mu$  I 酶标 GP73 多抗 (空白孔不加), 混匀, 37 $^{\circ}$ C 反应 15 分钟,

[0172] (9) 磁性分离, 弃上清液, 每管加入 400  $\mu$  I 洗涤液 (0.02M Tris-HCl, 含 0.02% Tween 20, PH = 7.4), 如此洗 3 次。

[0173] (10) 每试管中分别加入 50  $\mu$  I 显色液 A 和 50  $\mu$  I 显色液 B, 混匀后置 37°C 避光反应 5 分钟,

[0174] (11) 每试管中均加入 100  $\mu$  I 2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 进行终止反应,

[0175] (12) 磁性分离 2 分钟, 取各试管上清液 100  $\mu$  I 移至酶标板孔中,

[0176] (13) 用酶标仪在波长 450nm 处测量各孔的吸光度 (OD) 值 (参考波长为 630nm)。

[0177] 综合对 402 例健康献血者样品检测的原始数据 (OD 值) 结果进行分析, 依据《医学科研中的统计方法》(第二版马斌荣主编科学出版社), 402 例体检标本的平均值  $X = 0.080$ , 标准差  $SD = 0.0173$ , 正常值范围 =  $X \pm 1.96SD$ ,  $Cutoff = 0.114$ , 得出结论: 本研究中以标本的  $OD > 0.114$  判为 GP73 阳性。

[0178] 实施例 3

[0179] 利用实施例 1 提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测 GP73 抗原的方法检测 153 例肝癌患者样品中的 GP73 抗原。

[0180] 1、具体检测方法同实施例 2

[0181] 2、对 153 例肝癌病例血清标本的检测结果的原始数据 (OD 值) 进行分析, 所得结论如表 4 所示。

[0182] 表 4 153 例肝癌病例血清标本的检测结果统计表

[0183]

检测结果统计表项目	统计值
GP73阳性率 (%)	62.1 (95/153)
已查AFP	138
AFP阳性率 (%)	43.5 (60/138)
GP73阳性率 (%)	63.0 (87/138)
GP73和AFP均为阳性	52
GP73和AFP均为阴性	43
78例AFP阴性中GP73的阳性率 (%)	44.9 (35/78)
51例GP73阴性中AFP的阳性率 (%)	15.7 (8/51)
20例肝切除病例	
GP73阳性率 (%)	35.0 (7/20)
AFP阳性率 (%)	20.0 (4/20)
GP73和AFP均为阳性	4
GP73和AFP均为阴性	13
15例AFP阴性中GP73阳性	3
12例GP73阴性中AFP阳性	0
2例肝移植	
GP73阳性	0
AFP阳性	1
未手术过1例, GP73、AFP均为阳性	

[0184]

43例其它治疗（介入、射频、消融、化疗等）	
GP73阳性率（%）	53.5（23/43）
AFP阳性率（%）	34.9（15/43）
GP73和AFP均为阳性	13
GP73和AFP均为阴性	18
28例AFP阴性中GP73阳性率（%）	35.7（10/28）
20例GP73阴性中AFP阳性率（%）	10.0（2/20）
2例死亡	
GP73阳性	2
AFP阳性	2

[0185] 上面表 4 的结果表明,利用本发明提供的 GP73 抗体及其检测方法与 AFP 方法相比,本发明提供的方法对肝癌患者的检出率更高,具有更好的灵敏度。

[0186] 实施例 4

[0187] 利用实施例 1 提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球及本发明所述检测 GP73 抗原的方法检测 528 例肝硬化患者样品中的 GP73 抗原。

[0188] 1、血清或血浆中 GP73 检测方法见实施例。

[0189] 2、对 528 例肝硬化患者检测结果的原始数据（OD 值）进行分析,分析结果如表 5 所示

[0190] 表 5 528 例肝硬化病例血清标本检测结果分析统计表

[0191]

检测结果统计表项目	统计值
GP73 阳性率（%）	67.8(358/528)
已查 AFP	198
AFP 阳性率（%）	28.3(56/198)
GP73 阳性率（%）	61.6(122/198)
GP73 和 AFP 均为阳性	45
GP73 和 AFP 均为阴性	65
142 例 AFP 阴性中 GP73 的阳性率（%）	54.2(77/142)
76 例 GP73 阴性中 AFP 的阳性率（%）	14.5(11/76)
48 例后诊断为 HCC 的病例中已查 AFP	45
AFP 阳性率（%）	44.4(20/45)
GP73 阳性率（%）	68.9(31/45)

GP73 和 AFP 均为阳性	14
GP73 和 AFP 均为阴性	8
25 例 AFP 阴性中 GP73 的阳性率 (%)	68.0(17/25)
14 例 GP73 阴性中 AFP 的阳性率 (%)	42.9(6/14)

[0192] 总结：在已查病历的 51 例中，48 例后期诊断为 HCC，GP73 阳性率 70.6(36/51) 明显高于 AFP 阳性率 43.5% (20/46)，表明 GP73 是较 AFP 好的 HCC 预测指标。

[0193] 实施例 2,3,4 中所用的酶标 GP73 多抗用辣根过氧化物酶 (HRP) 标记 GP73 多克隆抗体制备而得。GP73 多克隆抗体通过常规免疫方法采用 GP73 抗原免疫新西兰大白兔而获得。

[0194] 具体采用下述方法制备 GP73 多抗：

[0195] (1) 分别制备具有下述氨基酸序列的多肽：

[0196] MKEVKEQCE( 参见序列 2)；

[0197] EAVASRDLS( 参见序列 3)；

[0198] PERDQLVIP( 参见序列 4)。

[0199] (2) 将步骤 (1) 中制备的三种多肽以 1:1:1 的质量比混合，用该混合物免疫新西兰大白兔。免疫动物为体重 3kg 的新西兰成年雌性白兔 2 只。免疫 3 次后静脉采血并分离血清，采用间接 ELISA 法测定效价，结果显示血清效价达 1:200000 以上。处死动物，收集血清。将两只兔子的血清混合后，纯化血清，获得上述 GP73 多抗。

[0200] 采用下述方法制备上述酶标 GP73 多克隆抗体：

[0201] a) 以  $\text{NaIO}_4$ - 乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml；

[0202] b) 在碱性碳酸盐缓冲液 (0.05M, Ph9.5 的碳酸盐缓冲液) 中透析 5 小时，实现 HRP 对多克隆抗体的标记，反应结束后用  $\text{NaBH}_4$  溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜。

[0203] c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化的 HRP 酶标抗 GP73 多克隆抗体。

[0204] 实施例 2,3,4 中作为阳性对照使用的基因工程 GP73 抗原为现有市场上可得到的商品。

[0205] 实施例 2,3,4 中所用纳米免疫微球可检测的最低抗原浓度为 100pg/ml (参见表 6)。

[0206] 表 6 实施例 2 中所用纳米免疫微球可检测的 GP73 抗原浓度范围

[0207]

GP73 抗原 (pg/ml)	OD 值
阴性	0.045
50	0.097
100	0.146

200	0.575
500	0.711

[0208] 注：以 GST 蛋白作为阴性抗原对照，按照健康对照样本中获得的 cutoff 值，大于 0.114 认为是阳性结果。

[0209] 由表 6 的结果可以得出，本发明提供的纳米免疫微球可检测 GP73 抗原的最低抗原浓度为 100pg/mL，灵敏度较高。

[0210] 参见表 7，表 7 显示了本发明提供的检测 GP73 的方法的特异性和灵敏度。

[0211] 表 7 本发明提供的超敏感超顺磁性纳米免疫微球检测 GP73 的特异性和灵敏度

[0212]

灵敏度 (%)	特异性 (%)	Cutoff	AUROC
90.5	84.0	0.114	0.909

[0213] 注：表 7 中的 Cutoff 值是 0.114，是根据实施例 2 中的 402 例体检者标本的检测结果计算出来的。

[0214] 以上所述，仅为本发明的较佳实施例而已，并非用于限定本发明的保护范围。凡是根据本发明内容所做的均等变化与修饰，均涵盖在本发明的专利范围内。

[0001]

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; 北京市肝病研究所

&lt;120&gt; 一种超敏感超顺磁性纳米免疫微球及其检测GP73抗原的方法

&lt;130&gt; 140702

&lt;160&gt; 10

&lt;170&gt; PatentIn version 3.3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 12

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 1

Ala Ala Ala Glu Arg Gly Ala Val Glu Leu Lys Lys  
 1 5 10

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 2

Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu  
 1 5

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 3

Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser  
 1 5

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;400&gt; 4

Pro Glu Arg Asp Gln Leu Val Ile Pro  
 1 5

[0002]

<210> 5  
 <211> 240  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
  
 <400> 5  
  
 Gln Met Lys Glu Val Lys Glu Gln Cys Glu Glu Arg Ile Glu Glu Val  
 1 5 10 15  
  
 Thr Lys Lys Gly Asn Glu Ala Val Ala Ser Arg Asp Leu Ser Glu Asn  
 20 25 30  
  
 Asn Asp Gln Arg Gln Gln Leu Gln Ala Leu Ser Glu Pro Gln Pro Arg  
 35 40 45  
  
 Leu Gln Ala Ala Gly Leu Pro His Thr Glu Val Pro Gln Gly Lys Gly  
 50 55 60  
  
 Asn Val Leu Gly Asn Ser Lys Ser Gln Thr Pro Ala Pro Ser Ser Glu  
 65 70 75 80  
  
 Val Val Leu Asp Ser Lys Arg Gln Val Glu Lys Glu Glu Thr Asn Glu  
 85 90 95  
  
 Ile Gln Val Val Asn Glu Glu Pro Gln Arg Asp Arg Leu Pro Gln Glu  
 100 105 110  
  
 Pro Gly Arg Glu Gln Val Val Glu Asp Arg Pro Val Gly Gly Arg Gly  
 115 120 125  
  
 Phe Gly Gly Ala Gly Glu Leu Gly Gln Thr Pro Gln Val Gln Ala Ala  
 130 135 140  
  
 Leu Ser Val Ser Gln Glu Asn Pro Glu Met Glu Gly Pro Glu Arg Asp  
 145 150 155 160  
  
 Gln Leu Val Ile Pro Asp Gly Gln Glu Glu Glu Gln Glu Ala Ala Gly  
 165 170 175  
  
 Glu Gly Arg Asn Gln Gln Lys Leu Arg Gly Glu Asp Asp Tyr Asn Met  
 180 185 190  
  
 Asp Glu Asn Glu Ala Glu Ser Glu Thr Asp Lys Gln Ala Ala Leu Ala

[0003]

195	200	205
Gly Asn Asp Arg Asn Ile Asp Val Phe Asn Val Glu Asp Gln Lys Arg 210 215 220		
Asp Thr Ile Asn Leu Leu Asp Gln Arg Glu Lys Arg Asn His Thr Leu 225 230 235 240		
<210> 6		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 6		
Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala 1 5 10 15		
Ala Glu Arg Gly 20		
<210> 7		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 黑猩猩		
<400> 7		
Leu Gln Thr Arg Ile Met Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala 1 5 10 15		
Ala Glu Arg Gly 20		
<210> 8		
<211> 20		
<212> PRT		
<213> 小家鼠		
<400> 8		
Leu Gln Thr Arg Ile Val Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala 1 5 10 15		
Ala Glu Arg Gly 20		

[0004]

<210> 9  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 褐家鼠

<400> 9

Leu Gln Thr Arg Ile Val Glu Leu Glu Gly Arg Val Arg Arg Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Glu Arg Gly  
20

<210> 10  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 原鸡

<400> 10

Leu Gln Ser Arg Ile Met Glu Leu Glu Gly Lys Val Arg Arg Ala Ala  
1 5 10 15

Ala Glu Arg Gly  
20

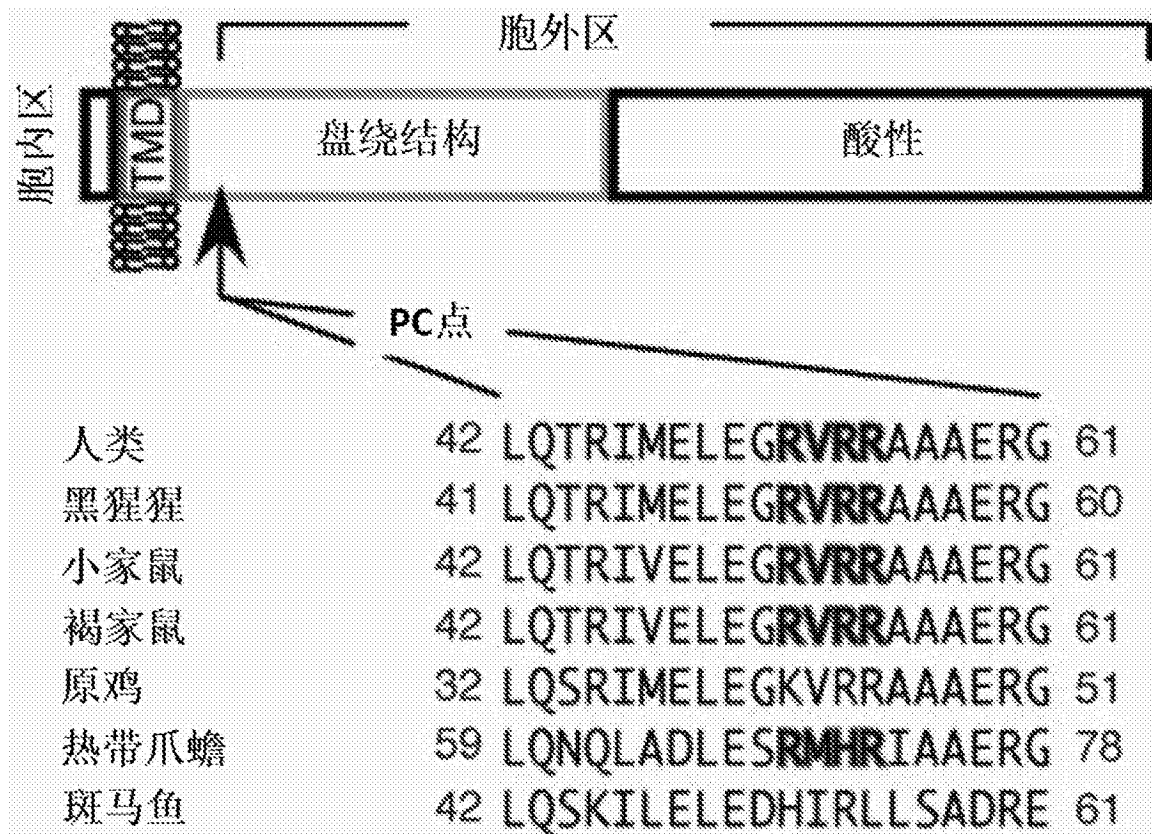


图 1



图 2

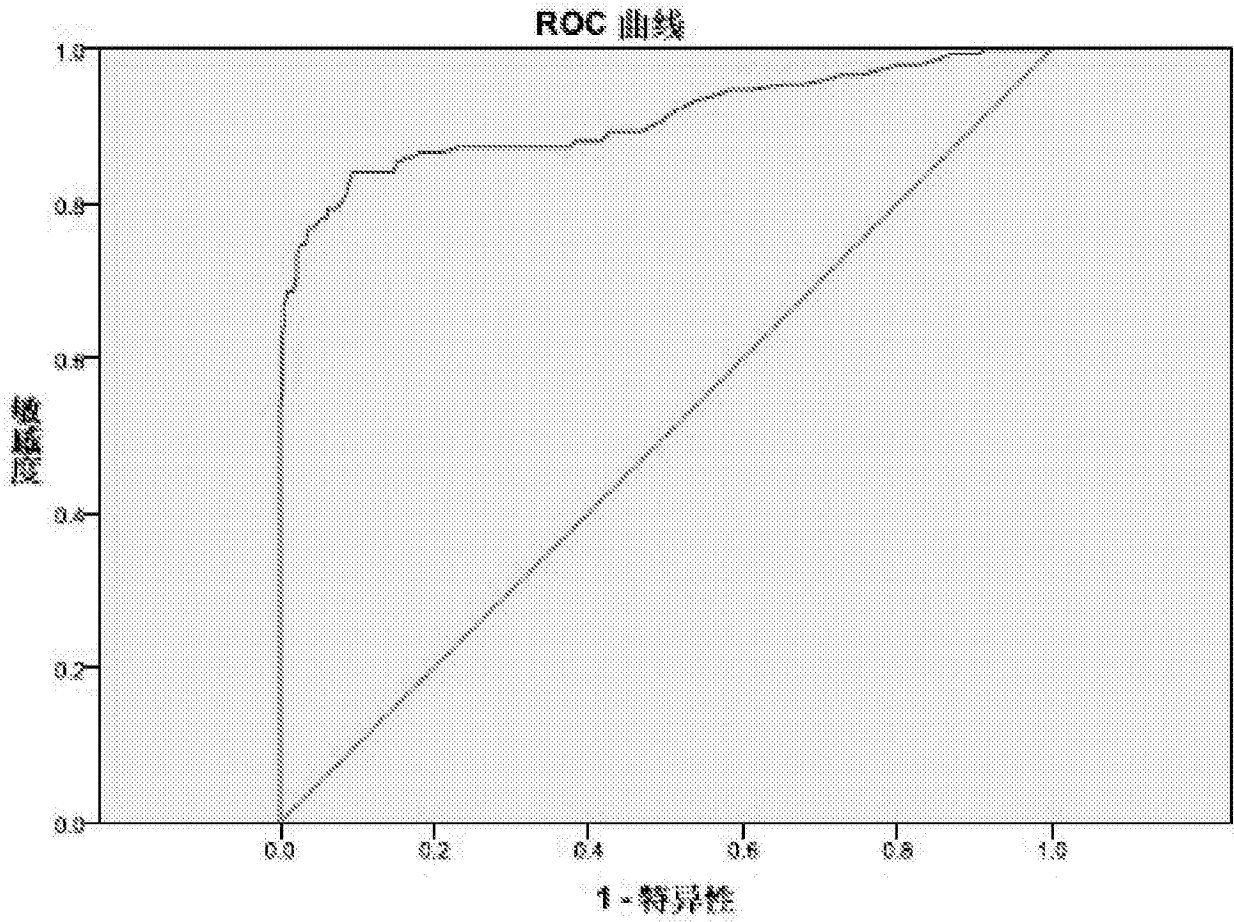


图 3

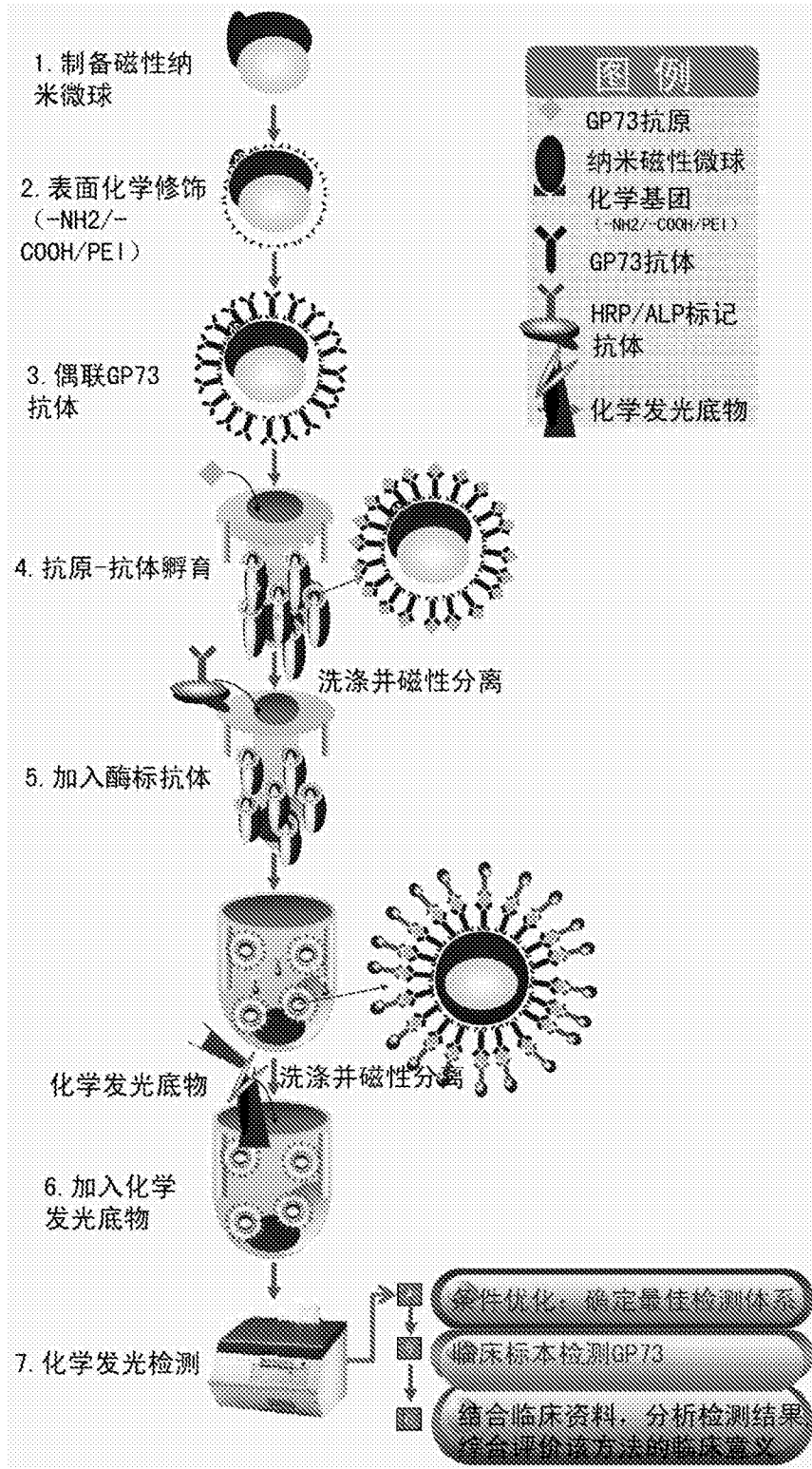


图 4

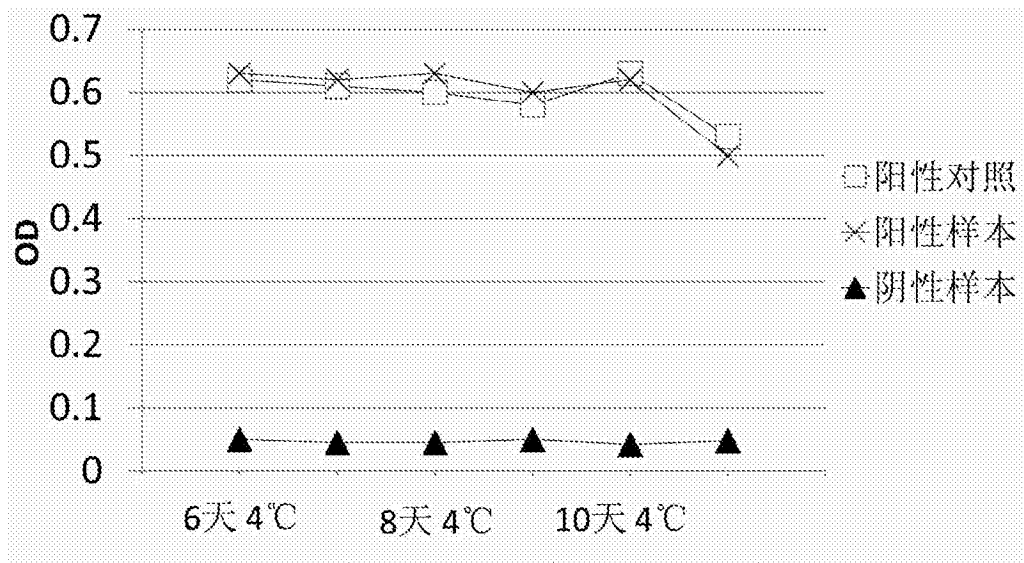


图 5

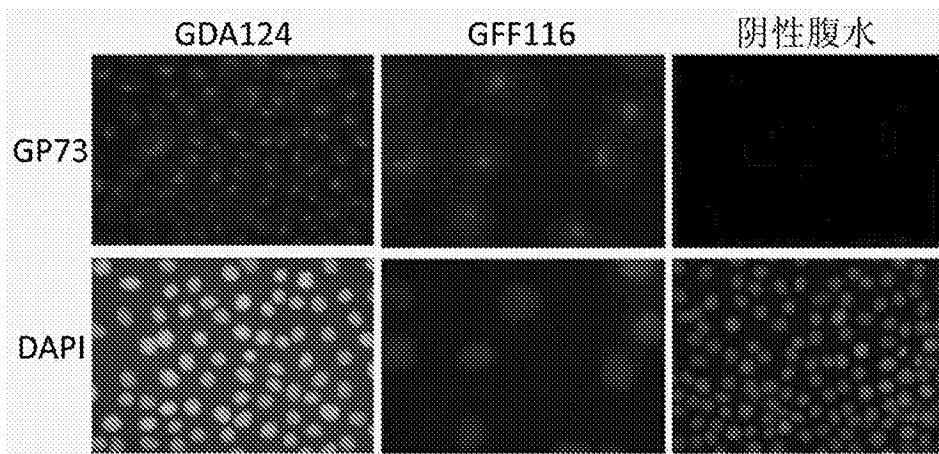


图 6

