



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101290318 B

(45) 授权公告日 2012.08.08

(21) 申请号 200710039562.7

(22) 申请日 2007.04.17

(73) 专利权人 上海市肿瘤研究所

地址 200032 上海市斜土路 2200 弄 25 号

(72) 发明人 屠红 周伟 赵新泰

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 徐迅

Marker for Hepatocellular Carcinoma.《Cancer Research》.2005,第65卷(第1期),第372-373页.

Wang XY, et al.Glypican-3 expression in hepatocellular tumors:diagnostic value for preneoplastic lesions and hepatocellular carcinomas.《Human Pathology》.2006,第37卷第1435-1441页.

审查员 李子东

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/53(2006.01)

(56) 对比文件

Capurro M, et al.Glypican-3: a novel serum and histochemical marker for hepatocellular carcinoma.《Gastroenterology》.2003,第125卷(第1期),第92页 Sandwich ELISA 部分.

Capurro M, et al.Glypican-3 as a Serum

权利要求书 1 页 说明书 20 页 附图 2 页

(54) 发明名称

一种用于诊断肝癌的 ELISA 试剂盒

(57) 摘要

本发明公开了一种肝癌的检测试剂盒,所述检测试剂盒中含有结合硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的抗原表位的多克隆抗体,以及结合硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位以外抗原表位的单克隆抗体或多克隆抗体。本发明的试剂盒检测灵敏度高,检测耗时短,有助于尽早地诊断肝癌患者,及时治疗,提高生存率。并且,与仅检测 AFP 标志物相比,在检测 AFP 标志物的同时采用本发明的试剂盒检测 GPC3 标记物可显著提高肝癌的诊断敏感性。

1. 一种用于检测硫酸肝素蛋白多糖 3 的测试片,其特征在于,所述的测试片包括:  
固相载体;和  
包被于所述固相载体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位,并且所述多克隆抗体通过将硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位蛋白片段免疫动物而获得。
2. 如权利要求 1 所述的测试片,其特征在于,所述固相载体是酶标反应板。
3. 一种检测试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒含有权利要求 1 所述的测试片,或者所述的试剂盒含有:  
(a) 固相载体;  
(b) 容器 a 以及位于所述容器 a 中的作为第一抗体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位,并且所述多克隆抗体通过将硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位蛋白片段免疫动物而获得;和  
(c) 用于将所述的第一抗体包被于所述固相载体的试剂。
4. 如权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中还装载有:  
容器 b,所述的容器 b 中装有第二抗体,所述第二抗体是多克隆抗体,所述多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位。
5. 如权利要求 3 所述的试剂盒,其特征在于,所述的试剂盒中还装载有:  
容器 b',所述的容器 b' 中装有第二抗体,所述第二抗体是单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位。
6. 如权利要求 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述单克隆抗体结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的以下表位:  
硫酸肝素蛋白多糖 3 第 25-358 位中的表位;  
硫酸肝素蛋白多糖 3 第 350-364 位中的表位;或  
硫酸肝素蛋白多糖 3 第 444-516 位中的表位。
7. 如权利要求 4 或 5 所述的试剂盒,其特征在于,所述的第二抗体带有可检测的标记物。
8. 如权利要求 7 所述的试剂盒,其特征在于,所述的可检测的标记物选自:辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶。
9. 一种多克隆抗体,其特征在于,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位,并且所述多克隆抗体通过将硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位蛋白片段免疫动物而获得。

## 一种用于诊断肝癌的 ELISA 试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术和免疫学领域,具体涉及检测肝癌标记物硫酸肝素蛋白多糖 3(GPC3) 的抗体、试剂盒以及它们的用途。

### 背景技术

[0002] 原发性肝癌是全球第 6 位、中国第 3 位最常见的癌症。据国际癌症研究中心 (IARC) 估计,2000 年全球肝癌发病数为 56.4 万人,其中约 55% 发生在中国,即中国肝癌发病 30.6 万人,肝癌死亡 30.0 万,占我国居民肿瘤死亡的第二位。肝癌出现症状时多属中晚期,切除后复发、转移率高。因此,肝癌的早期诊断对延长患者的生存时间和降低肝癌死亡率具有重要意义。

[0003] 目前,影像学诊断、细胞与组织学诊断及化学诊断是肿瘤诊断的三大主要方法。影像学诊断在肝癌诊断中起重要的作用,但是在诊断小肝癌及区分良恶性结节中均具有一定的局限。超声检查或 CT 阳性结果,结合血清甲胎蛋白 ( $\alpha$ -fetoprotein, AFP) 水平高于 400ng/ml 的检测结果,可对肝癌做出确诊。但是,通常当这些条件都符合时,已经错过了治疗的最佳时机。无论是超声波检查、CT 扫描还是核磁共振,对小病灶的鉴定都有一定的局限性,尤其是肝硬化结节在影象学上与小肝癌结节有许多的相似之处。因此,虽然影像学技术在近年来取得了巨大的进步,但临床上仍需结合肝癌的分子标志物,在较为复杂的病例中将良恶性肝病进行区分。此外,肿瘤的临床分期及肿瘤大小是肝癌治疗效果的决定因素,因此,肿瘤标志物还可用于肝癌危险人群(如 HBV 慢性携带者和肝硬化患者)的普查。

[0004] 目前肝癌诊断最常用的标志物是甲胎蛋白 (AFP),在症状和影像学改变发生前数月即可出现异常。正常人血清中 AFP 含量一般小于 10ng/ml。当 AFP 的诊断值定为 20ng/ml 时,其敏感性为 50 ~ 60%,但在肿瘤较小的病例中,敏感性显著降低,有报道仅为 40%。单独使用 AFP 作为肝癌诊断标志物的另一个问题是缺乏特异性,在相当多的慢性肝炎患者尤其是肝硬化患者中,AFP 含量也达 20-200ng/ml。目前认为可与 AFP 互补诊断的标志物有 AFP 异质体、 $\gamma$ -谷氨酰转移酶同工酶 II 和异常凝血酶原等,但由于它们在敏感性和特异性上的不足,以及检测方法的繁琐复杂,使其始终停留在实验室研究水平,未能转化成临床常规检查项目。因此,探索新的肿瘤分子标志物,以及建立相应的易于推广的检测方法,仍是当今肝癌研究领域的重要课题之一。

[0005] 硫酸肝素蛋白多糖 3(Glypican-3, GPC3) 是近年来发现的一种与肝癌相关的分子。应用差异显示技术, Hsu 等首次发现了 cDNA100% 同源于 GPC3 的 MXR7 基因在肝癌组织中有异常表达。在 191 例肝细胞癌 (HCC) 组织中,143 例 (74.8%) 能检测到了 MXR7 的 mRNA,而在 156 例癌旁“非瘤”肝组织中仅有 5 例 (3.2%) 为阳性,该 5 例均为有门脉或远处转移的病例。随后,多家实验室相继证实了这一结果。在 HCC 组织中, GPC3mRNA 和蛋白阳性检出率均在 73% 以上, mRNA 平均水平可较正常肝组织中高出 21.7 倍,而在正常肝脏、肝脏良性肿瘤、慢性肝炎和肝硬化等中则均呈阴性,表明该蛋白表达具有较高的肿瘤细胞特异性,是一种新型的肝癌标志物。

[0006] 然而,由于正常人外周血中 GPC3 含量微弱,肿瘤患者血清中 GPC3 含量尽管明显增加但仍然处于较低水平,建立灵敏度高的检测系统非常不易,导致这样肿瘤标志物迄今未能进入临床使用。

[0007] 因此,本领域迫切需要开发可灵敏检测 GPC3 水平的检测系统以及检测方法,为临床肿瘤的诊断提供良好的途径。

## 发明内容

[0008] 本发明的目的在于提供可灵敏、准确地检测样品中硫酸肝素蛋白多糖 3 含量的检测试剂。

[0009] 本发明的目的还在于提供检测样品中硫酸肝素蛋白多糖 3 含量的检测试剂盒。

[0010] 在本发明的第一方面,提供一种用于检测硫酸肝素蛋白多糖 3 的测试片,所述的测试片包括:

[0011] 固相载体;和

[0012] 包被于所述固相载体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位。

[0013] 在另一优选例中,所述固相载体是酶标反应板。

[0014] 在本发明的第二方面,提供一种检测试剂盒,所述的试剂盒含有所述的测试片,或者

[0015] 所述的试剂盒含有:(a) 固相载体;

[0016] (b) 容器 a 以及位于所述容器 a 中的作为第一抗体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位;和

[0017] (c) 用于将所述的第一抗体包被于所述固相载体的试剂。

[0018] 在另一优选例中,所述的试剂盒中还装载有:

[0019] 容器 b,所述的容器 b 中装有第二抗体,所述第二抗体是多克隆抗体,所述多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位。

[0020] 在另一优选例中,所述的试剂盒中还装载有:

[0021] 容器 b',所述的容器 b' 中装有第二抗体,所述第二抗体是单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位。

[0022] 在另一优选例中,所述单克隆抗体结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的以下表位:

[0023] 硫酸肝素蛋白多糖 3 第 25-358 位中的表位;

[0024] 硫酸肝素蛋白多糖 3 第 350-364 位中的表位;或

[0025] 硫酸肝素蛋白多糖 3 第 444-516 位中的表位。

[0026] 更优选的,所述单克隆抗体结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 25-358 位中的表位。

[0027] 在另一优选例中,所述的第二抗体带有可检测的标记物。

[0028] 在另一优选例中,所述的可检测的标记物选自:辣根过氧化物酶 (HRP)、碱性磷酸酶。

[0029] 更优选的,所述的标记物是辣根过氧化物酶。

- [0030] 在另一优选例中,所述的试剂盒中还装载有:
- [0031] 容器 c,所述的容器 c 中装有与标记物相对应的底物;
- [0032] 容器 d,所述的容器 d 中装有显色剂;
- [0033] 容器 e,所述的容器 e 中装有洗涤液;和/或
- [0034] 容器 f,所述的容器 f 中装有终止液。
- [0035] 在本发明的第三方面,提供一种体外检测硫酸肝素蛋白多糖 3 的方法,包括以下步骤:
- [0036] (a) 将待测样品加样于包被有第一抗体的固相载体,从而使待测样品中的硫酸肝素蛋白多糖 3 与固相载体上的第一抗体结合,形成带有“硫酸肝素蛋白多糖 3-第一抗体”二元复合物的固相载体;所述的第一抗体是特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位的多克隆抗体;
- [0037] (b) 将第二抗体加样于(a)获得的固相载体,从而形成带有“第二抗体-硫酸肝素蛋白多糖 3-第一抗体”三元复合物的固相载体;所述的第二抗体是特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位以外的表位的单克隆抗体或多克隆抗体,且所述的第二抗体携带一可检测标记物;和
- [0038] (c) 检测三元复合物中的可检测标记物,从而确定待检测样品中硫酸肝素蛋白多糖 3 的存在与否以及存在的量。
- [0039] 在本发明的第四方面,提供一种多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位,并且所述多克隆抗体通过将硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位蛋白片段免疫动物而获得。
- [0040] 在另一优选例中,所述的动物是:兔。
- [0041] 在另一方面,本发明还提供了上述的多克隆抗体的用途,它被用于制备检测硫酸肝素蛋白多糖 3 的试剂盒。
- [0042] 本发明的其它方面由于本文的公开内容,对本领域的技术人员而言是显而易见的。

#### 附图说明

- [0043] 图 1 显示了 GPC3 蛋白 25-358aa 氨基酸片段的编码基因。
- [0044] 图 2 显示了 GPC3 蛋白 25-358 氨基酸序列。
- [0045] 图 3 显示了 pProEX Hta-GPC3(73-1074) 质粒的小规模表达鉴定。
- [0046] 图 4 显示了 Ni 柱纯化后的 GPC3(25-358aa) 蛋白的 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定。
- [0047] 图 5 显示了 Western Blot 检测纯化后的 GPC3(25-358aa) 蛋白。其中, M 表示分子量 marker; W-18 表示采用多抗 W-18(针对蛋白 N 端蛋白表位)检测的结果; anti-His 表示采用 anti-His 抗体检测的结果。
- [0048] 图 6 显示了采用鼠抗 GPC3(25-358aa) 单抗 gp2# 检测胎盘及肿瘤细胞的细胞裂解液的 Western Blot 结果。其中, 1. 胎盘组织, 2. L02 细胞, 3. MCF-7 细胞, 4. HeLa 细胞。
- [0049] 图 7 显示了采用兔抗 GPC3-Ag3 多抗检测肿瘤细胞的细胞裂解液的 Western Blot

结果。其中,1. Huh-7 细胞 ;2. HepG2 细胞 ;3. MCF-7 细胞 ;4. HeLa 细胞。

[0050] 图 8 显示了 GPC3 定量标准曲线。

[0051] 图 9 显示了正常人、肝炎肝硬化及肝癌患者血清 GPC3 含量。

[0052] 图 10 显示了 GPC3 受试者工作特征曲线 (ROC 曲线)。

### 具体实施方式

[0053] 本发明人经过广泛的研究和试验,意外地发现,对应于硫酸肝素蛋白多糖 3(GPC3) 氨基酸序列第 379-393 位抗原表位的多克隆抗体可极好地识别 GPC3 抗原;当采用该多克隆抗体作为第一抗体捕获 GPC3 后,再用对应于 GPC3 氨基酸第 379-393 位以外其他区段的表位的第二抗体(包括单克隆抗体或多克隆抗体),可以极其有效地结合于 GPC3,从而通过双抗夹心法高灵敏地检测 GPC3 抗原。与之相反,当使用结合于 GPC3 其他区段(如第 444-516 位)的多克隆抗体作为第一抗体时,则检测灵敏度较低。

[0054] 此外,本发明人还意外地发现,当使用特异性结合 GPC3 第 379-393 位抗原表位的多克隆抗体作为第一抗体时,GPC3 肝癌标志物与 AFP 肝癌标志物的结合检测具有更高的互补性诊断价值。与单单检测 AFP 标志物相比,在检测 AFP 标志物的同时采用本发明的试剂盒检测 GPC3 标记物可显著提高肝癌的诊断敏感性。此基础上完成了本发明。

[0055] 本领域技术人员均了解,一种抗原可能含有多个抗原表位(抗原决定簇),因此,针对同一个抗原可以获得不止一个抗体(包括单克隆抗体或多克隆抗体),这些抗体对抗原的结合特性(如特异性等)均可能是不同的。因此,针对同一个抗原,本领域人员需要进行反复比较、筛选和鉴定,才能找到适合于特异性和敏感性结合的抗体。由于 GPC3 蛋白是一条较长的多肽,其大部分抗原决定簇被包含在空间结构的内部,因此找到适合于与之结合的抗体难度较高。

[0056] 针对上述技术难题,本发明人制备了多种对应于 GPC3 的单克隆抗体和多克隆抗体,通过大量的试验,检测不同种单克隆抗体或多克隆抗体对于 GPC3 的结合特异性以及敏感性。结果发现,对应于 GPC3 氨基酸序列第 379-393 位抗原表位的多克隆抗体可特别良好地识别 GPC3 抗原。

[0057] 并且,本发明人将不同种单克隆抗体和/或不同种多克隆抗体进行两两配伍(基于双抗夹心法原理)来检测这些单克隆抗体和多克隆抗体的组合对于 GPC3 的结合特异性以及敏感性。最终发现:采用结合于 GPC3 氨基酸序列第 379-393 位中抗原表位的多克隆抗体(作为第一抗体),以及结合于 GPC3 氨基酸第 379-393 位以外抗原表位的单克隆抗体或多克隆抗体(作为第二抗体)作为基于双抗夹心法的检测试剂,可特别灵敏地检测 GPC3 抗原。而当采用结合于第 379-393 位以外的抗原表位的多克隆克隆抗体与其它单克隆抗体或多克隆抗体配伍时,敏感性和特异性均不高;当采用单克隆抗体与单克隆抗体配伍时,敏感性高,但是特异性很差。

[0058] 如本文所用,所述的“样品”是指分离自人体的物质,包括但不限于:血清、血浆、尿液、或其它组织提取液。优选的,所述的样品是血清或血浆。

[0059] 如本文所用,所述的“捕获抗体”、“包被抗体”、“第一抗体”与“一抗”可互换使用,都是指所述的结合于 GPC3 氨基酸序列第 379-393 位中的抗原表位的多克隆抗体。

[0060] 所述的第一抗体可被包被在固相载体上。本发明对所采用的固相载体没有特别的

限制,只要其能够与第一单克隆抗体相偶联(连接)即可。例如,所述的固相载体为酶标反应板。

[0061] 如本文所用,所述的“检测抗体”、“第二抗体”与“二抗”可互换使用,都是指特异性结合于 GPC3 第 379-393 位以外的抗原表位的抗体,其可以是单克隆抗体或者是多克隆抗体。

[0062] 硫酸肝素蛋白多糖 3

[0063] 硫酸肝素蛋白多糖 3(Glypican-3, GPC3) 位于细胞膜表面,由核心蛋白和糖胺聚糖(肝素及硫酸乙酰肝素)侧链构成,是细胞表面多功能的共同受体,通过与细胞外基质、生长因子和蛋白酶等的相互作用传递信号,在细胞的生长、发育、分化和迁移等中有重要功能。GPC3 在体内的存在有明显的组织特异性和时相特异性:在人胚胎期,胃肠道和中胚层来源的组织中有大量 GPC3 表达;但在成人,除胎盘组织外,仅肺、肾、心和卵巢等少数组织中有 GPC3 的低度表达,肝脏中为阴性。本发明人在研究中发现,肝细胞癌(HCC)患者血清中,GPC3 平均浓度显著高于正常对照和肝硬化患者。在分化较好的 HCC 病例中,GPC3 较 AFP 检测更为敏感,两者联合检测可大大提高肝癌的诊断阳性率。

[0064] GPC3 蛋白的氨基酸序列和核苷酸序列是本领域已知的,其氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示,其核苷酸序列如 SEQ ID NO:6 所示。或者,本领域人员也可参见 GenBank 登录号 NP\_004475 和 NM\_004484.2 所提供氨基酸序列和核苷酸序列。

[0065] 抗体

[0066] 本发明人提供了一种可极好地识别 GPC3 抗原的多克隆抗体,所述抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的抗原表位。

[0067] 所述多克隆抗体通过采用 GPC3 第 379-393 位蛋白片段免疫动物而获得。多克隆抗体的制备是本领域技术人员所熟知的。佐剂可用于增强免疫反应,如弗氏佐剂。例如,所述多克隆抗体的制备方法如下:将 GPC3 第 379-393 位蛋白片段与弗氏佐剂按照适当比例(如 1:1)混合,充分乳化后免疫动物。免疫方法可使用皮下注射。动物免疫 1-4 个月后,可从动物静脉血中收获抗血清并纯化,获得抗 GPC3 第 379-393 位蛋白片段的多克隆抗体。

[0068] 作为本发明的优选方式,所述的动物是:兔。

[0069] 在本发明的实施例中,本发明人制备了多种多克隆抗体(包括兔抗人 GPC3-Ag3 多克隆抗体(结合于 GPC3 第 379-393 位中的抗原表位)、兔抗人 GPC3-Ag1(结合于 GPC3 第 73-86 位中的抗原表位)、兔抗人 GPC3-Ag4 多克隆抗体(结合于 GPC3 第 444-516 位中的抗原表位)),在后续的 ELISA 检测中发现,兔抗人 GPC3-Ag3 多克隆抗体与其它各种非结合于 GPC3 第 379-393 位中的表位的单克隆抗体或多克隆抗体配伍,可特别灵敏地检测 GPC3 抗原含量。

[0070] 制备特异性抗 GPC3 蛋白的单克隆抗体的技术是本领域中众所周知的。这里,“特异性”是指抗体能结合于 GPC3 蛋白或其片段;更特别地,指那些能与 GPC3 蛋白或其片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。

[0071] 所述的单克隆抗体是特异性结合于 GPC3 第 379-393 位以外的抗原表位的抗体。应理解,当用于作为第二抗体与所述的结合于 GPC3 第 379-393 位中的抗原表位的多克隆抗体(作为第一抗体)联合用于检测 GPC3 抗原时(基于双抗夹心法原理),所述的单克隆抗体可以是多种多样的,只要其能够特异性结合于 GPC3 第 379-393 位以外的抗原表位。

[0072] 优选的,所述的 GPC3 第 379-393 位以外的抗原表位选自:

[0073] GPC3 第 25-358 位对应的抗原表位;

[0074] GPC3 第 350-364 位对应的抗原表位;或

[0075] GPC3 第 444-516 位对应的抗原表位。

[0076] 本发明的单克隆抗体可以利用杂交瘤技术来制备。利用杂交瘤技术制备单克隆抗体是本领域技术人员所熟知的,例如可参见 Kohler 等人, Nature 256:495, 1975; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:511, 1976; Kohler 等人, Eur. J. Immunol. 6:292, 1976; Hammerling 等人, In Monoclonal Antibodies and T Cell Hybridomas, Elsevier, N. Y., 1981 中所描述的。

[0077] 在得知了所述单克隆抗体所对应的 GPC3 抗原的表位位置,本领域人员可方便地通过已知的方法获得所述的单克隆抗体。例如,当需要制备抗 GPC3 第 25-358 位对应的抗原表位的单克隆抗体时,采用 GPC3 第 25-358 位蛋白片段免疫小鼠,制备杂交瘤,从而获得所需的抗体。

[0078] 检测试剂盒

[0079] 本发明人根据双抗夹心法的原理,制备了一种可用于检测样品中 GPC3 蛋白水平的试剂盒。双抗夹心法常规的做法是将一抗固定于载体,然后一抗与抗原反应,洗涤后再与二抗反应(所述的二抗携带可检测标记物,或可与携带可检测标记物的物质结合),最后进行化学发光或酶联显色反应检测信号。双抗夹心法特别适用于具有两个或两个以上表位的抗原的检测。

[0080] 本发明人发现,采用结合于 GPC3 第 379-393 位中的抗原表位的多克隆抗体与特异性地结合于 GPC3 第 379-393 位以外的抗原表位的抗体来将目标抗原 GPC3 吸附及定位,其定位和放大效果特别好,从而具有很高的特异性和精密度。并且,相对于单抗体的竞争法来说,双抗体夹心法的测定效果更为优良,因而测定时只需很少的样品量。所以采用双抗体夹心法无论在灵敏度、精确度、准确度、特异性及稳定性上更具有优势。

[0081] 本发明的检测试剂盒含有测试片,所述的测试片包括:固相载体;和包被于所述固相载体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位。

[0082] 或者,本发明的检测试剂盒含有 (a) 固相载体;(b) 容器 a 以及位于所述容器 a 中的作为第一抗体的抗硫酸肝素蛋白多糖 3 的多克隆抗体,所述的多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位;和 (c) 用于将所述的第一抗体包被于所述固相载体的试剂。

[0083] 作为本发明的优选方式,所述的试剂盒中还装载有:

[0084] 容器 b,所述的容器 b 中装有第二抗体,所述第二抗体是多克隆抗体,所述多克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位;或者,

[0085] 容器 b',所述的容器 b' 中装有第二抗体,所述第二抗体是单克隆抗体,所述单克隆抗体特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 中除第 379-393 位以外的表位。

[0086] 作为本发明的优选方式,所述的第二抗体带有可检测的标记物。

[0087] 如本文所用,所述的“可检测的标记物”是指用于确定待检测样品中 GPC3 的存在

与否以及存在的量的标志物。在确定了本发明的试剂盒所采用的包被抗体和 / 或检测抗体后,可以采用本领域常规用于与检测抗体结合来进行检测的各种标记物。本发明对所采用的标记物没有特别的限制,只要是能够与所述的检测抗体结合,且在适当处理后能够准确地指示待检测样品中 GPC3 蛋白的存在与否以及存在量的标记物均是可用的。所述的标记物可直接被设置于第二抗体上;或者,所述的标记物也可被设置于特异性抗第二抗体的抗抗体上,本领域人员可根据所采用的抗体的种类和特性,选择适宜的标记物。例如,所述的标记物可以选自:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酯酶(AP)、葡萄糖氧化酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、脲酶、过氧化氢酶、或葡萄糖淀粉酶。

[0088] 当采用如上所示的一些酶标记物时,还需要采用一些与相应的酶结合的底物,从而可通过显色等方式来报导标记物的存在情况或者存在量。如本文所用,所述的“与标记物相对应的底物”是指可被标记物所催化显色,用于显示第二抗体与 GPC3 发生结合的识别信号。所述的底物例如:用于辣根过氧化物酶的邻苯二胺(OPD)、四甲基联苯胺(TMB)、ABTS;用于碱性磷酸酯酶的对硝基苯磷酸酯(p-nitrophenyl phosphate, p-NPP);等等。本领域人员可根据所采用的标记物的种类和特性,选择适宜的底物。

[0089] 作为本发明的优选方式,所述的第二抗体与标记物直接相连接。更优选的,所述的标记物是 HRP。与以生物素标记检测抗体、反应后再与链亲和素-HRP 反应相比较,直接在检测抗体上标记 HRP、反应结束后直接加底物显色更为简单便捷。

[0090] 为了获得定量结果,还可以在检测过程中设置含已知浓度的多个 GPC3 蛋白的标准品。对于标准品的设置方法可采用常规的方法。

[0091] 为了消除假阳性和假阴性,也可在检测过程中设置质控(对照)。

[0092] 此外,为了使本发明的试剂盒在检测时更方便,所述的试剂盒中优选的还包含其它一些辅助试剂,所述的辅助试剂是 ELISA 试剂盒中常规使用的一些试剂,这些试剂的特性以及它们的配制方法均是本领域技术人员所熟知的。所述的试剂例如(但不限于):显色剂、洗涤液、终止液、增敏液、稀释液。

[0093] 此外,在所述试剂盒中还可包含使用说明书,用于说明其中装载的试剂的使用方法。

[0094] 本发明的试剂盒可应用于:

[0095] (A) 作为独立的检测系统,进行肝癌的诊断;

[0096] (B) 与影像学检查和 / 或 AFP 标志物检测等结合,进行肝癌的诊断;

[0097] (C) 进行 AFP 增高肝病的良恶性鉴别诊断;

[0098] (D) 进行治疗前 GPC3 阳性肝癌的预后监测;

[0099] (E) 进行肝癌高危人群的筛查;和 / 或

[0100] (F) 进行肝癌相关的基础研究。

[0101] 检测方法

[0102] 本发明提供了一种利用本发明的试剂盒体外检测 GPC3 蛋白的方法,包括以下步骤:

[0103] (a) 将待测样品加样于包被有第一抗体的固相载体,从而使待测样品中的硫酸肝素蛋白多糖 3 与固相载体上的第一抗体结合,形成带有“硫酸肝素蛋白多糖 3- 第一抗体”二元复合物的固相载体;所述的第一抗体是特异性结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位中的表位,而不结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位的多克隆抗体;

[0104] (b) 将第二抗体加样于 (a) 获得的固相载体,从而形成带有“第二抗体-硫酸肝素

蛋白多糖 3- 第一抗体”三元复合物的固相载体 ;所述的第二抗体是结合于硫酸肝素蛋白多糖 3 第 379-393 位以外的抗原表位的单克隆抗体或多克隆抗体,且所述的第二抗体携带一可检测标记物 ;和

[0105] (c) 检测三元复合物中的可检测标记物,从而确定待检测样品中硫酸肝素蛋白多糖 3 的存在与否以及存在的量。

[0106] 作为本发明的一种优选方式,定量检测 GPC3 蛋白的方法具体如下 :

[0107] (i) 抗原抗体反应 :将本发明的第一抗体包被在多孔板上,之后在多孔板的微孔内分别加入不同浓度的标准品、质控品 ( 可选 ),或待测血清样品 ;

[0108] (ii) 酶联反应 :将第二抗体 ( 其上设置有标记物 ) 溶液加入各孔,振荡、孵育 ;洗涤 ;

[0109] (iii) 显色反应 :每孔加入对应于标记物的底物、显色剂,孵育,每孔加入反应终止液,结束反应 ;

[0110] (iv) 酶标仪测定 OD 值 ;

[0111] (v) 结果计算 :

[0112] A) 制作标准曲线 :以 GPC3 蛋白标准品浓度为横坐标,标准品测定 OD 值为纵坐标,作出标准曲线 ;

[0113] B) 评判质控品浓度 ( 可选 ):根据质控品的 OD 值,从标准曲线上读出相应的浓度值 ;质控品测定浓度值处于给定范围时,该次测定有效 ;

[0114] C) 计算待测血清样品浓度 :当标准曲线和质控品均被判定有效时,根据待测样本的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的 GPC3 蛋白浓度。

[0115] 由于本发明的检测试剂或试剂盒敏感性高,大大缩短了样品孵育时间 ( 约  $2 \pm 0.5$  小时 ),因此利用所述试剂盒只需很短的时间即可获得 GPC3 的定量数据,该时间一般在 2-4 小时。而采用常规的试剂或试剂盒检测时,样品通常需要孵育过夜以增加敏感性。

[0116] 本发明的主要优点在于 :

[0117] (1) 首次发现采用对应于 GPC3 氨基酸序列第 379-393 位抗原表位的多克隆抗体可良好地识别 GPC3 抗原,将其与对应于 GPC3 氨基酸第 379-393 位以外抗原表位的抗体联合应用作为基于双抗夹心法的检测试剂,可特别灵敏地检测 GPC3 抗原。

[0118] (2) 提供了一种使用方便且灵敏度高的肝癌检测试剂盒,在样品中 GPC3 含量较低 (1ng 水平) 时即可灵敏地检测,并且完成检测所需的时间很短 ( 约 2-4 小时 )。所述试剂盒有助于尽早地诊断肝癌患者,及时治疗,提高生存率,具有积极的社会效益。在肝癌疗效随访、亚临床转移复发监控以及预后判断等方面也有广泛的应用价值。

[0119] (3) 本发明人还发现, GPC3 肝癌标志物与 AFP 肝癌标志物的结合检测具有互补性诊断价值。GPC3 与 AFP 联合应用,不仅可提高肝癌早期诊断的阳性率,而且可对临床上为数众多的 AFP 低度或中度增高患者的良恶性病变进行鉴别诊断。与单单检测 AFP 标志物相比,在检测 AFP 标志物的同时采用本发明的试剂盒检测 GPC3 标记物可显著提高肝癌的诊断敏感性。

[0120] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。应理解,这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件如 Sambrook 等人,分子克隆 :实验室指南 (New York :Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) 中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和

份数按重量计算。

[0121] 除非另行定义,文中所使用的所有专业与科学用语与本领域熟练人员所熟悉的意义相同。此外,任何与所记载内容相似或均等的方法及材料皆可应用于本发明中。文中所述的较佳实施方法与材料仅作示范之用。

[0122] 实施例 1. 多肽抗原 GPC3(25-358)、GPC3(444-516) 的原核制备

[0123] 采用如下方法制备具有 GPC3 全长氨基酸序列第 25-358 位序列的多肽抗原 GPC3(25-358) :

[0124] (1) 人胎盘总 RNA 的提取

[0125] 取人胎盘组织约 1g, 至 1.5ml 的离心管中, 加 1ml TRAZOL 试剂, 用玻璃匀浆器打碎组织, 抽取 RNA。

[0126] (2) 反转录

[0127] 取 5  $\mu$ g 总 RNA, 用 ThermoScript RT-PCR System(GIBCO BRL 公司) 试剂盒, 参照反转录试剂盒说明以 oligo(dT) 20 为引物, AMV 反转录酶反转录合成 cDNA。

[0128] (3) 表达载体的构建

[0129] 设计如下引物:

[0130] GPC3-73(SEQ ID NO :3) :

[0131] 5' cgcgaaattcCAGCCCCCGCCGCCGCCGCC3' 和

[0132] GPC3-1074(SEQ ID NO :4) :

[0133] 5' gcgctcgagTTATCTATATTGGCGTTGTTGAGAATGGGCACATAAC3'

[0134] 以新合成的人胎盘 cDNA 为模板, 以前述设计的引物为引物, 对 GPC-3 蛋白 N 端编码序列(去除 24aa 信号肽部分)nt. 73-1074 进行扩增。扩增体系为 10  $\mu$ L; 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 再延伸 10min。PCR 产物用 10g/L 的琼脂糖凝胶电泳进行鉴定, 并用 PCR 片段回收试剂盒回收 PCR 产物。

[0135] PCR 产物以 EcoRI 和 Xho I 位点克隆至 pProEX Hta 载体(购自美国 Invitrogen 公司), 获得表达 GPC-3 蛋白 25-358aa 的质粒 pProEX Hta-GPC3(73-1074), 测序鉴定基因序列中无影响氨基酸改变的点突变(图 1, SEQ ID NO :1), 推导的氨基酸序列见图 2(SEQ ID NO :2)。

[0136] (4) pProEX Hta-GPC3(73-1074) 的表达与纯化

[0137] 将重组质粒 pProEX Hta-GPC3(73-1074) 转化感受态大肠杆菌菌株 BL21-codonplus(DE3)-RP(购自 Stratagene), 涂氨苄青霉素抗性琼脂平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置生长过夜, 在含氨苄青霉素琼脂平板上用牙签挑取 3 个克隆于 3ml 含氨苄的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 摇床过夜。过夜培养的菌按 1:100 比例转接种至 3ml 含氨苄的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C 振荡培养 3h, 至对数中期 ( $A_{550} = 0.5$ )。加入异丙基硫代- $\beta$ -d-半乳糖苷(IPTG) 至终浓度为 1mmol/L, 继续振荡培养 3h, 诱导 GPC3 蛋白表达。取各个诱导菌及未诱导的对照菌, 量为相当于  $A_{550} = 1$  时 100  $\mu$ l 菌液, 沉淀后悬于 10  $\mu$ l 1 $\times$ SDS 上样缓冲液, 沸水浴中煮 5min。-20 $^{\circ}$ C 保存或立即用于 SDS-PAGE 凝胶电泳。SDS-PAGE 电泳鉴定蛋白的表达。结果诱导菌在 40KD 处有特异性蛋白表达条带(GPC3), 见图 3。

[0138] 按照小样诱导条件, 诱导 200ml pProEXHta-GPC3(73-1074)-codonplus 表达蛋白, 并用 Ni 柱纯化, 然后进行 SDS-PAGE 凝胶电泳鉴定。结果发现, 40KD 左右蛋白主带占总蛋白

90%以上,见图 4。

[0139] pProEXHta-GPC3(73-1074) 表达蛋白定位于包涵体中,按不可溶蛋白的纯化步骤纯化:

[0140] (a) 层析柱用 10 倍 TNA 体积的 GuNTA-0Buffer(20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 0.5mol/L NaCl,8mol/L Urea) 洗。

[0141] 将样品加到 TNA 层析柱中,流速控制在 15ml/h 左右,收集穿透部分,用于 SDS-PAGE 分析蛋白质的结合情况。

[0142] 层析用 5 倍 TNA 体积的 GuNTA-0Buffer 洗,流速控制在 30ml/h 左右。

[0143] (b) 分别用 5 倍 TNA 体积的 GuTNA-209(20mmol/L Tris-HCl pH7.9,0.5mol/L NaCl,8mol/L Urea,20mmol/L), GuTNA-40(20mmol/L Tris-HCl pH7.9,0.5mol/L NaCl,8mol/L Urea,40mmol/L Imidazole),GuTNA-60(20mmol/LTris-HCl pH7.9,0.5mol/L NaCl,8mol/L Urea,60mmol/L Imidazole), GuTNA-100(20mmol/L Tris-HCl pH7.9,0.5mol/L NaCl,8mol/L Urea,100mmol/L Imidazole), GuTNA-500(20mmol/L Tris-HCl pH7.9, 0.5mol/LNaCl,8mol/L Urea,500mmol/LImidazole) 洗脱,流速控制在 15ml/h,收集洗脱液,每管收集一个 TNA 体积。

[0144] 以 anti-His 抗体以及 Santa Cruz 公司抗 -GPC3 多抗 W-18(针对蛋白 N 端蛋白表位) 对纯化产物进行常规的 Western Blot 检测,结果证实表达产物为 GPC3 蛋白,见图 5。

[0145] 采用与前述制备多肽抗原 GPC3(25-358) 相似的原核表达方法,本发明人还制备了选自 GPC3 全长氨基酸序列的第 444-516 位的多肽抗原 GPC3(444-516),命名为 GPC3-Ag4。

[0146] 实施例 2

[0147] 多肽抗原 GPC3(379-393)、GPC3(73-86)、GPC3(350-364) 的合成及偶联

[0148] 利用软件 DNASTar 对全长 GPC3 蛋白抗原性进行分析,主要根据蛋白的抗原性、可及性两个参数选择位于 GPC3 全长氨基酸序列的第 379-393 位的多肽抗原 GPC3(379-393) 位氨基酸 ETLSSRRRELIQKLIK(SEQ ID NO:5),命名为 GPC3-Ag3。该多肽采用人工合成方法制备,GPC3-Ag3 合成后采用戊二醛法与 KLH(钥孔血蓝蛋白) 进行偶联,得到 GPC3-Ag3-KLH。

[0149] 此外,本发明人还合成了选自 GPC3 全长氨基酸序列的第 73-86 位的多肽抗原 GPC3(73-86),命名为 GPC3-Ag1;选自 GPC3 全长氨基酸序列的第 350-364 位的多肽抗原 GPC3(350-364),命名为 GPC3-Ag2。并且,将 GPC3(73-86) 与 KLH 相偶联,得到 GPC3-Ag1-KLH。

[0150] 实施例 3 多克隆抗体的制备

[0151] a. 兔抗人 GPC3-Ag3 多克隆抗体的制备

[0152] 抗原:GPC3-Ag3-KLH。

[0153] 动物:新西兰大白兔,一只雄性,一只雌性,4-6 周,2.5-3.0kg,均购自中国科学院上海实验动物中心。

[0154] (1) 取一只雄性和雌性健康新西兰大白兔同时免疫。免疫前经兔耳缘静脉取血 1-2ml,分离血清,分装,-80℃ 保存待用。初次免疫时,每只兔注射 1mg 抗原。将弗氏完全佐剂与 1ml 抗原(1mg) 等体积混合,充分乳化后经背部皮内组织进行多点注射。

[0155] (2) 以后每隔 2 周加强免疫一次,总共两次,抗原量不变,改用弗氏不完全佐剂,注

射方法不变。第二次加强后第 7 天,用 ELISA 方法测定兔血清中抗体的效价。血清效价达到要求后,乙醚麻醉兔,进行颈动脉插管,取尽新西兰大白兔血液,室温放置 30min,再置于 4℃ 冰箱过夜,吸取析出的兔血清,余血于 4℃,4000rpm 离心 10min,吸取上层血清,即得到兔抗人 GPC3-Ag3 多克隆抗体。

[0156] GPC3-Ag3-KLH 免疫 5 周后的兔血清效价见表 1。

[0157] 表 1

[0158]

血清稀释度	1:1000	1:3000	1:6000
免疫兔 O. D.	0.989	0.751	0.546
正常兔 O. D.	0.112	—	—
PBS O. D.	0.078	—	—

[0159] 以纯化后的兔血清对细胞裂解液进行 Western Blot 检测。结果发现,采用肝癌细胞 Huh-7(ATCC) 及 HepG2(ATCC) 的细胞裂解液作为抗原,以所述兔血清为抗体,在分子量 60KD(全长 GPC3) 处有特异性条带;而以 MCF-7(人乳腺癌细胞,ATCC) 及 HeLa(人宫颈癌细胞,ATCC) 的裂解液作为抗原,以所述兔血清为抗体,结果为阴性,见图 7。可见所述的兔抗人 GPC3-Ag3 多克隆抗体具有较高的特异性。并且,进一步的试验还显示,所述的多克隆抗体不结合于位于 GPC3 的 1-378 位或 394-580 位中的表位。

[0160] b. 兔抗人 GPC3-Ag1、兔抗人 GPC3-Ag4 多克隆抗体的制备

[0161] 采用的抗原为 GPC3-Ag1-KLH 以及 GPC3-Ag4,采用的动物同前述 a。

[0162] 根据前述 a 同样的方法,制备获得兔抗人 GPC3-Ag1 多克隆抗体、兔抗人 GPC3-Ag4 多克隆抗体。GPC3-Ag1-KLH 免疫 7 周后的兔血清效价见表 2;GPC3-Ag4 免疫 5 周后的兔血清效价见表 3。

[0163] 表 2

[0164]

血清稀释度	1:1000	1:3000	1:6000
免疫兔 O. D.	1.13	0.74	0.612
正常兔 O. D.	0.103	—	—
PBS O. D.	0.099	—	—

[0165] 表 3

[0166]

血清稀释度	1: 1000	1: 3000	1: 6000
免疫兔 O. D.	2.036	1.563	0.981
正常兔 O. D.	0.125		
PBS O. D.	0.098		

[0167] 实施例 4 抗 GPC3 单克隆抗体的制备及纯化

[0168] a. 鼠抗 GPC3 (25-358) 单克隆抗体的制备及纯化

[0169] 取 6-8 周龄 BALB/c 小鼠, 初次免疫用纯化的 GPC3 (25-358) 蛋白与等体积的福氏完全佐剂混合后, 于背部及腹股沟多点皮下免疫, 以后每隔 2 周免疫一次, 用同剂量的抗原与福氏不完全佐剂混匀后于背部多点皮下免疫。第 3 次免疫 7 天后, 鼠尾静脉采血, 用间接 ELISA 法测定特异性抗体的产生。融合前 3 天, 再用同样剂量的不加佐剂的抗原腹腔加强免疫 1 次。

[0170] 加强免疫三天后, 断颈处死小鼠, 在无菌条件下取出脾脏, 用注射器注入约 0.2-0.5ml 无血清培养液使其胀大, 再用弯曲的注射针头多点刺破脾膜, 用挤压的方法使淋巴细胞从中逸出, 制备免疫脾细胞悬液后计数, 用不完全培养液洗涤 2 次。取对数生长的骨髓瘤细胞 SP2/0, 1000rpm/min 离心 5min, 弃上清, 用不完全培养液混悬细胞后计数, 取所需的细胞数, 用不完全培养液洗涤 2 次。将骨髓瘤细胞与脾细胞按 1:10 的比例混合在一起, 在 50ml 塑料离心管内用不完全培养液洗 1 次, 1200rpm/min 离心 8min。弃上清, 用滴管吸净残留液体, 以免影响 PEG 的浓度。轻轻弹击离心管底, 使细胞沉淀略加松动。在室温下融合: ① 30s 内加入预热的 1ml 45% PEG1000 含 5% DMSO, 边加边搅拌; ② 作用 90s; ③ 加预热的不完全培养液, 终止 PEG 作用, 每隔 2min 分别加入 1ml, 2ml, 3ml, 4ml, 5ml 和 10ml。离心, 800rpm/min, 6min。弃上清, 先用 6ml 左右 20% 小牛血清 RPMI1640 轻轻混悬, 不能用力吹打, 以免使融合在一起的细胞散开。根据所用 96 孔培养板的数量, 补加完全培养液, 10ml 一块 96 孔板。将融合后细胞悬液加入含有饲养细胞的 96 孔板, 100  $\mu$ l/孔, 37 $^{\circ}$ C、5% CO<sub>2</sub> 温箱培养。一般一块 96 孔板含有  $1 \times 10^7$  脾细胞。在融合 24h 后加 HAT 选择培养液。HAT 选择培养液维持培养两周后, 改用 HT 培养液, 再维持培养两周, 改用一般培养液。当杂交瘤细胞布满孔底 1/10 面积时, 即可开始检测特异性抗体。用包被液将通过基因工程获得的 GPC3 蛋白稀释为 5  $\mu$ g/ml, 以每孔 100  $\mu$ l 包被酶标板, 置于 4 $^{\circ}$ C 过夜后弃上清, 用洗涤液将包被好的酶标板洗涤 3 次, 每次 5min, 然后每孔加入 200  $\mu$ l 封闭液 (3% BSA PBST), 37 $^{\circ}$ C 放置 2h, 倾去封闭液, 同上洗涤, 每孔加入 100  $\mu$ l 培液上清, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1.5h, 弃上清, 同上洗涤后每孔加入 1:1000 稀释的羊抗鼠 IgG-HRP100  $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h, 将孔内上清弃去, 同上洗涤, 每孔加入 100  $\mu$ l 的显色液 (OPD-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), 室温避光显色 10-20min 后, 每孔加入 50  $\mu$ l 的终止液终止反应, 酶标仪读出 A<sub>490nm</sub> 值。阳性克隆按有限稀释法进行克隆化, 经三次克隆化后筛选出所需要的杂交瘤细胞系。结果获得 11 株阳性克隆, 分别命名为 gp1#-gp11#。

[0171] 腹腔注射液体石蜡于 F<sub>1</sub> 代小鼠, 2 周后腹腔注射  $1 \times 10^5$  个杂交瘤细胞, 接种细胞 7-10 天后产生腹水, 密切观察动物的健康状况与腹水征象, 待腹水尽可能多, 而小鼠濒于死亡之前, 处死小鼠, 用滴管将腹水吸入试管中。

[0172] 取腹水或免疫后兔血清与等体积的 PBS (0.01mol/L, pH7.4, 含 0.15mol/L 的 NaCl) 稀释后, 再加与上面等体积的饱和硫酸铵 (90g 硫酸铵加到 100ml 蒸馏水中, 80 $^{\circ}$ C 溶解, 趁热过滤, 降至室温后即有结晶析出, 用硫酸调至 pH7.0), 置 4 $^{\circ}$ C, 4h, 然后 10000rpm/min 离心 15min, 弃上清, 沉淀用 1-5ml PBS 溶解, 移入透析袋, 在 PBS (0.01mol/L, pH7.4, 含 0.15mol/L 的 NaCl) 中 4 $^{\circ}$ C 透析过夜, 将透析袋中的蛋白液移入 Protein A Sepharose CL-4B 柱循环数次, 用 Tris-HCl (0.05mol/L, pH8.0, 含 0.15mol/L 的 NaCl) 清洗已经上样的 Protein A 柱, 至在紫外光谱仪记录纸上显示没有蛋白再洗脱下来, 然后用解离液 (0.01mol/L, 甘氨酸

酸-HCl, pH3.0, 含 0.15mol/L 的 NaCl) 洗脱抗体, 洗脱液立即用 1mol/L Tris-HCl (pH8.0) 调 pH 至 7.2, 在 PBS(0.01mol/L, pH7.4, 含 0.15mol/L 的 NaCl) 中 4°C 透析过夜后进行蛋白定量和特异性验证, 获得纯化的抗 GPC3(25-358) 单克隆抗体。所获得的单克隆抗体效价及分型见表 4。

[0173] 表 4

[0174]

Gp	1#	2#	3#	4#	5#	6#	7#	8#	9#	10#	11#
培液效价	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000	1:64000
抗体亚型	IgG1	IgG1 $\kappa$	IgG2a	IgG2a	IgG2a	IgG1	IgG1	IgG2a	IgG2a	IgG2b	IgG1

[0175] 选择 gp2# 单克隆抗体用于后续试验, 腹水纯化后的其能识别富含 GPC3 的胎盘裂解物中 40KD 左右的可溶性 GPC3, 但在 L02( 胚肝细胞, ATCC)、MCF-7( 人乳腺癌细胞, ATCC) 及 HeLa( 人宫颈癌细胞, ATCC) 中未见该条带( 图 6), 可见该抗体特异性强。

[0176] b. 鼠抗 GPC3(350-364)、GPC3(444-516) 单克隆抗体的制备

[0177] 以多肽抗原 GPC3(350-364) 为抗原, 采用与前述 a 相同的方法, 制备获得 10 株杂交瘤细胞株, 分别命名为 2G7, 3D4, 3F5, 3G1, 3G6, 4B9, 5H10, 6H10, 7C8 和 9D9。这些杂交瘤制备的单克隆抗体阳性腹水 1:10000 稀释后直接 ELISA 结果见表 5。

[0178] 表 5

[0179]

2G7	3D4	3F5	3G1	3G6	4B9	5H10	6H10	7C8	9D9
1.459	2.456	1.824	2.142	2.56	1.500	1.124	1.443	2.39	1.112

[0180] 以多肽抗原 GPC3(444-516) 为抗原, 采用与前述 a 相同的方法, 制备获得 7 株杂交瘤细胞株, 分别命名为 1C6, 1F4, 2D2, 2F2, 2G9, 3C6 和 4F3。这些杂交瘤制备的单克隆抗体阳性腹水 1:10000 稀释后直接 ELISA 结果见表 6。

[0181] 表 6

[0182]

腹水	1C6	1F4	2D2	2F2	2G9	3C6	4F3	PBS
A490n	0.491	1.211	0.888	1.249	0.633	1.099	0.588	0.103
m								

[0183] 实施例 5 抗体的辣根过氧化物酶 (HRP) 标记

[0184] 称取 HRP0.6mg 溶于 120  $\mu$  l 水中; 加入 NaIO<sub>4</sub>(12.8mg/ml) 120  $\mu$  l, 4°C 30min; 加入乙二醇 (9  $\mu$  l in 1ml) 120  $\mu$  l 室温 30min; 1mg/ml 的抗体 240  $\mu$  l 混匀后装入透析袋对碳酸盐缓冲液 (0.05M pH9.6) 缓慢搅拌透析过夜, 使之结合; 第二天加 NaBH<sub>4</sub>(5mg/ml) 24  $\mu$  l, 4°C 2h; 装透析袋, 4°C 对 0.05M/L PBS (pH7.2) 透析过夜 4°C 离心, 取上清检测效价。

[0185] 实施例 6 ELISA 检测

[0186] 1. 以 GPC3-Ag3 多克隆抗体为第一抗体, 以 HRP 标记的鼠抗 GPC3 单克隆抗体 (gp2#) 为第二抗体的 ELISA

[0187] 将纯化的兔抗 GPC3 多抗 GPC3-Ag3 多克隆抗体用包被缓冲液 ((0.01mol/L 磷酸盐缓冲液 pH7.6)) 稀释至 5  $\mu$  g/ml, 包被酶标反应板, 每孔 100  $\mu$  l, 4°C 孵育过夜后洗涤 1 次 (洗涤缓冲液 PBST: 100ml PBS (pH7.2) 中加入 0.05ml Tween-20); 加入 200  $\mu$  l 封闭液 (封闭

液:100mIPBST 中加入 3g 的 BSA) 封闭酶标反应板,37℃ 孵育 2h 后洗涤 1 次;加入待测样本,每孔 100 μ l (血清:PBS = 1:3) (0.02mol/L PBS 缓冲液 pH7.2),22℃ 孵育 2h 后洗涤 5 次;加入 1:150 稀释的辣根过氧化物酶标记的鼠抗 GPC3 单克隆抗体 (gp2#-HRP),每孔 100 μ l,22℃ 孵育 30min,后洗涤 6 次;加入底物液每孔 100 μ l (A 液、B 液各 50 μ l) (A 液:0.2mol/L (19.2g) 柠檬酸 24.3ml;0.2mol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25.7ml;H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>0.1%;加 ddH<sub>2</sub>O 至 1200ml;B 液:TMB3.9g;柠檬酸 10.52g;EDTA1.86g;甘油 300ml;加热溶解后加蒸馏水至 10000ml)。37℃ 避光显色 15min,每孔加入终止液终止反应,用 Bio-Tek 公司的酶标仪 ELX800 酶标仪读取各孔 OD 值 (波长 450nm)。

[0188] 结果,以上述鼠抗 GPC3 单克隆抗体 (gp2#) 及 GPC3-Ag3 多克隆抗体建立夹心 ELISA 法,对稀释于 25% 正常人血清中的 GPC3 重组蛋白进行检测,结果最低检测浓度为 2ng/ml,在 5ng-125ng 的范围内 GPC3 含量和 O. D. 度数呈良好的线性关系,见图 8。

[0189] 进一步地,本发明人利用上述 ELISA 方法,对 106 例正常人、96 份肝炎肝硬化及 364 例肝癌病人的血清进行了 GPC3 检测,结果正常人平均值为 6.04±9.21ng/ml,肝炎肝硬化为 11.7±12.23ng/ml。肝癌患者血清 GPC3 浓度呈偏态分布,平均均值为 87.22ng/ml,其中有大于 2000ng/ml 的有 3 人,最高者为 5432ng/ml。正常人、肝炎肝硬化于肝癌间 GPC3 差异具有极显著性 (P<0.000),正常人和肝炎肝硬化之间的差异无显著性 (图 9)。

[0190] 根据对肝癌和肝炎肝硬化两组病人所作的受试者工作曲线 (图 10),当阳性值取 36.8ng/ml 时,诊断的敏感性和特异性分别为 32% 和 2%;当阳性值取 27.1ng/ml 时,诊断的敏感性和特异性分别为 45.1% 和 8.4% (表 7)。

[0191] 表 7

[0192]

GPC3 值 (ng/ml)	敏感性	1- 特异性
1.5	0.864	0.663
5.2	0.814	0.589
10.3	0.716	0.463
15.5	0.655	0.379
20.3	0.572	0.295
25	0.473	0.137
26.5	0.458	0.116
27.1	0.451	0.084
30.3	0.398	0.063
33.3	0.371	0.042
36.8	0.322	0.021
37.8	0.318	0.011
40.8	0.295	0.011
45.1	0.25	0.011
48.6	0.216	0.011
50.1	0.212	0
104.1	0.114	0

[0193] 2. 单抗与单抗,单抗与多抗,多抗与多抗之间配伍试验

[0194] 本发明人利用前述制备的各种单克隆抗体和多克隆抗体,建立了以不同单抗或多抗作为第一抗体或第二抗体进行配伍的夹心 ELISA 检测方法,用于检测抗原 GPC3。采用的 ELISA 检测步骤与 1 所述方法类似。

[0195] 结果发现,用于建立夹心 ELISA 方法时,各种配伍间的检测敏感性相差很远。当以

兔抗人 GPC3-Ag3 多抗以外的其它两种多抗分别作为第一抗体和第二抗体配伍时,敏感性和特异性均差。如以兔抗人 GPC3-Ag4 包板,以抗人 GPC3-Ag1 检测,浓度为 100ng/ml 的标本 OD450 读数为 0.234,而阴性标本 OD450 读数也有 0.204,达不到诊断试剂盒的要求。

[0196] 当单抗与单抗(如 1F4+gp2#)配伍时,敏感性高,最低检测浓度达 0.5ng/ml。但是,特异性很差,正常人血清易出现假阳性结果,假阳性率甚至高达 18%。

[0197] 当单抗与多抗配伍时,以兔抗人 GPC3-Ag3 多抗(第一抗体)+鼠抗 GPC3 单克隆抗体(gp2#)(第二抗体)配伍检测结果准确,采用多抗兔抗人 GPC3-Ag3 多抗(第一抗体)+3C6 单抗(第二抗体)检测同一样本时的 OD 读数与前组接近。当采用多抗兔抗人 GPC3-Ag4(第一抗体)+单抗 7C8(第二抗体)检测时,检测同一样本时 OD 读数较兔抗人 GPC3-Ag3 多抗和鼠抗 GPC3 单克隆抗体(gp2#)配伍低 10~15%,准确性差。而采用多抗兔抗人 GPC3-Ag1 与多种前述制备的单抗或多抗检测时,准确性更差。

[0198] 实施例 7GPC3 与 AFP 的互补性诊断

[0199] 采用本发明人获得的最佳配伍兔抗人 GPC3-Ag3 多抗和鼠抗 GPC3 单克隆抗体(gp2#),建立 ELISA 双夹心试剂盒;并且采用检测 AFP 指标的 AFP 检测放免试剂盒试剂盒(购自上海生物制品所),对 151 份病理诊断明确的肝细胞肝癌同时进行了 AFP 与 GPC3 的检测。

[0200] 结果,当 AFP 和 GPC3 的阳性判定值分别定为 20ng/ml 和 30ng/ml 时,前者阳性诊断率为 49%(74/151),后者为 40%(61/151)(表 8)。具有意义的是,在 77 例 AFP 阴性的肝癌中,有 34(44%)例 GPC3 为阳性,表明 GPC3 是一和 AFP 互补的肝癌标志物。联合 AFP 和 GPC3 的检测,可将前者的诊断敏感性由 49%提高至 72%。

[0201] 表 8

[0202]

	AFP+	AFP-	合计
GPC3+	27	34	61
GPC3-	47	43	90
合计	74	77	151

[0203] 在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考,就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解,在阅读了本发明的上述讲授内容之后,本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改,这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

[0204] 序列表

[0205] <110>上海市肿瘤研究所

[0206] <120>一种用于诊断肝癌的 ELISA 试剂盒

[0207] <130>072225

[0208] <160>5

[0209] <170>PatentIn version3.3

[0210] <210>1

[0211] <211>1002

[0212] <212>DNA

[0213] <213> 智人 (Homo Sapiens)

[0214] <400>1

[0215]

```

cagccccgc cgccgccgc ggacgccacc tgcaccaag tccgctcctt cttccagaga    60
ctgcagcccg gactcaagtg ggtgccagaa actcccgtgc caggatcaga ttgcaagta    120
tgtctcccta agggcccaac atgctgtctc agaaagatgg aagaaaaata ccaactaaca    180
gctcgattga acatggaaca gctgcttcag tetgcaagta tggagctcaa gttcttaatt    240
attcagaatg ctgcggtttt ccaagaggcc ttgaaattg ttgttcgcca tgccaagaac    300
tacaccaatg ccatgttcaa gaacaactac ccaagcctga ctccacaagc ttttgagttt    360
gtgggtgaat ttttcacaga tgtgtctctc tacatcttgg gttctgacat caatgtagat    420
gacatggctc atgaattggt tgacagcctg ttccagtc tctataccca gctaatgaac    480
ccaggcctgc ctgattcagc ctgggacatc aatgagtgcc tccgaggagc aagacgtgac    540
ctgaaagtat ttgggaattt cccaagctt attatgacce aggtttccaa gtcactgcaa    600
gtcactagga tcttcttca ggctctgaat ctgggaattg aagtgatcaa cacaactgat    660
cacctgaagt tcagtaagga ctgtggccga atgctacca gaatgtggta ctgctcttac    720
tgccagggac tgatgatggt taaacctgt ggcggttact gcaatgtggt catgcaaggc    780
tgtatggcag gtgtggtgga gattgacaag tactggagag aatacattct gtcccttga    840
gaacttgta atggcatgta cagaatctat gacatggaga acgtactgct tggctctttt    900
tcaacaatcc atgattctat ccagtatgtc cagaagaatg caggaaagct gaccaccact    960
attggcaagt tatgtgccca tttcaacaa cgccaatata ga                          1002

```

[0216] <210>2

[0217] <211>334

[0218] <212>PRT

[0219] <213> 智人 (Homo Sapiens)

[0220] <400>2

[0221]

```

Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser
1           5           10           15
Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro
                20                25                30
Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys
                35                40                45
Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn

```

[0222]



- [0234] <212>DNA
- [0235] <213> 人工序列
- [0236] <220>
- [0237] <221>misc\_feature
- [0238] <223> 引物
- [0239] <400>4
- [0240]
- gcgctcgagt tatctatatt ggcgttggtg agaatgggca cataac 46
- [0241] <210>5
- [0242] <211>15
- [0243] <212>PRT
- [0244] <213> 人工序列
- [0245] <220>
- [0246] <221>MISC\_FEATURE
- [0247] <223>GPC3 蛋白第 379-393 位氨基酸序列
- [0248] <400>5
- [0249]
- Glu Thr Leu Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys  
1 5 10 15
- [0250] <210>6
- [0251] <211>1743
- [0252] <212>DNA
- [0253] <213> 智人 (Homo Sapiens)
- [0254] <400>6
- [0255]
- atggccggga ccgtgcgcac cgcgtgcttg gtggtggcga tgctgctcag cttggacttc 60  
ccgggacagg cgcagccccc gccgcccgcg ccggacgcca cctgtcacca agtccgctcc 120  
ttcttccaga gactgcagcc cggactcaag tgggtgccag aaactcccgt gccaggatca 180  
gatttgcaag tatgtctccc taagggccca acatgctgct caagaaagat ggaagaaaaa 240  
taccaactaa cagctcgatt gaacatgaa cagctgcttc agtctgcaag tatggagctc 300  
aagticttaa ttattcagaa tgetgcggtt ttccaagagg cctttgaaat tgttgctcgc 360  
catgccaaga actacaccaa tgccatgttc aagaacaact acccaagcct gactccacaa 420  
gcttttgagt ttgtgggtga attttcaca gatgtgtctc tctacatctt gggttctgac 480  
atcaatgtag atgacatggt caatgaattg ttgacagcc tgtttccagt catctatacc 540  
cagctaataa acccaggcct gcctgattca gccttggaca tcaatgagtg cctccgagga 600  
gcaagacgtg acctgaaagt atttgggaat tccccaaagc ttattatgac ccaggtttcc 660  
aagtcactgc aagtcactag gatcttcctt caggctctga atcttggaaat tgaagtgate 720  
aacacaactg atcacctgaa gttcagtaag gactgtggcc gaatgctcac cagaatgtgg 780  
tactgctctt actgccaggg actgatgatg gttaaaccct gtggcggta ctgcaatgtg 840  
gtcatgcaag gctgtatggc aggtgtggtg gagattgaca agtactggag agaatacatt 900
- [0256]

```

ctgtcccttg aagaacttgt gaatggcatg tacagaatct atgacatgga gaacgtactg 960
cttggctctt tttcaacaat ccatgattct atccagtatg tccagaagaa tgcaggaaag 1020
ctgaccacca ctattggcaa gttatgtgcc cattctcaac aacgccaata tagatctgct 1080
tattatctctg aagatctctt tattgacaag aaagtattaa aagttgctca ttagaacaat 1140
gaagaaacct tatccagccg aagaaggaa ctaattcaga agttgaagtc tttcatcagc 1200
ttctatagtg ctttgcctgg ctacatctgc agccatagcc ctgtggcgga aaacgacacc 1260
ctttgctgga atggacaaga actcgtggag agatacagcc aaaaggcagc aaggaatgga 1320
atgaaaaacc agttcaatct ccatgagctg aaaatgaagg gccctgagcc agtggtcagt 1380
caaattattg acaaactgaa gcacattaac cagctcctga gaacatgct tatgcccaaa 1440
ggtagagttc tggataaaaa cctggatgag gaagggtttg aaagtggaga ctgcggtgat 1500
gatgaagatg agtgcattgg agggctctgt gatggaatga taaaagtgaa gaatcagctc 1560
cgcttctctg cagaactggc ctatgatctg gatgtggatg atgcgcctgg aaacagtcag 1620
caggcaactc cgaaggacaa cgagataagc accttcaca acctcgggaa cgttcattcc 1680
ccgctgaagc ttctcaccag catggccatc tcgggtgtgt gcttcttctt cctggtcac 1740
tga 1743

```

- [0257] <210>7  
[0258] <211>580  
[0259] <212>PRT  
[0260] <213> 智人 (Homo Sapiens)  
[0261] <400>7  
[0262]

```

Met Ala Gly Thr Val Arg Thr Ala Cys Leu Val Val Ala Met Leu Leu
1          5          10          15
Ser Leu Asp Phe Pro Gly Gln Ala Gln Pro Pro Pro Pro Pro Pro Asp
          20          25          30
Ala Thr Cys His Gln Val Arg Ser Phe Phe Gln Arg Leu Gln Pro Gly
          35          40          45
Leu Lys Trp Val Pro Glu Thr Pro Val Pro Gly Ser Asp Leu Gln Val
          50          55          60
Cys Leu Pro Lys Gly Pro Thr Cys Cys Ser Arg Lys Met Glu Glu Lys
65          70          75          80
Tyr Gln Leu Thr Ala Arg Leu Asn Met Glu Gln Leu Leu Gln Ser Ala
          85          90          95
Ser Met Glu Leu Lys Phe Leu Ile Ile Gln Asn Ala Ala Val Phe Gln
          100          105          110
Glu Ala Phe Glu Ile Val Val Arg His Ala Lys Asn Tyr Thr Asn Ala
          115          120          125
Met Phe Lys Asn Asn Tyr Pro Ser Leu Thr Pro Gln Ala Phe Glu Phe
          130          135          140
Val Gly Glu Phe Phe Thr Asp Val Ser Leu Tyr Ile Leu Gly Ser Asp
145          150          155          160
Ile Asn Val Asp Asp Met Val Asn Glu Leu Phe Asp Ser Leu Phe Pro
          165          170          175
Val Ile Tyr Thr Gln Leu Met Asn Pro Gly Leu Pro Asp Ser Ala Leu
          180          185          190
Asp Ile Asn Glu Cys Leu Arg Gly Ala Arg Arg Asp Leu Lys Val Phe
          195          200          205
Gly Asn Phe Pro Lys Leu Ile Met Thr Gln Val Ser Lys Ser Leu Gln

```

[0263]

210	215	220
Val Thr Arg Ile Phe Leu Gln Ala Leu Asn Leu Gly Ile Glu Val Ile		
225	230	235
Asn Thr Thr Asp His Leu Lys Phe Ser Lys Asp Cys Gly Arg Met Leu		
	245	250
Thr Arg Met Trp Tyr Cys Ser Tyr Cys Gln Gly Leu Met Met Val Lys		
	260	265
Pro Cys Gly Gly Tyr Cys Asn Val Met Gln Gly Cys Met Ala Gly		270
	275	280
Val Val Glu Ile Asp Lys Tyr Trp Arg Glu Tyr Ile Leu Ser Leu Glu		285
	290	295
Glu Leu Val Asn Gly Met Tyr Arg Ile Tyr Asp Met Glu Asn Val Leu		300
	305	310
Leu Gly Leu Phe Ser Thr Ile His Asp Ser Ile Gln Tyr Val Gln Lys		315
	325	330
Asn Ala Gly Lys Leu Thr Thr Thr Ile Gly Lys Leu Cys Ala His Ser		335
	340	345
Gln Gln Arg Gln Tyr Arg Ser Ala Tyr Tyr Pro Glu Asp Leu Phe Ile		350
	355	360
Asp Lys Lys Val Leu Lys Val Ala His Val Glu His Glu Glu Thr Leu		365
	370	375
Ser Ser Arg Arg Arg Glu Leu Ile Gln Lys Leu Lys Ser Phe Ile Ser		380
	385	390
Phe Tyr Ser Ala Leu Pro Gly Tyr Ile Cys Ser His Ser Pro Val Ala		395
	405	410
Glu Asn Asp Thr Leu Cys Trp Asn Gly Gln Glu Leu Val Glu Arg Tyr		415
	420	425
Ser Gln Lys Ala Ala Arg Asn Gly Met Lys Asn Gln Phe Asn Leu His		430
	435	440
Glu Leu Lys Met Lys Gly Pro Glu Pro Val Val Ser Gln Ile Ile Asp		445
	450	455
Lys Leu Lys His Ile Asn Gln Leu Leu Arg Thr Met Ser Met Pro Lys		460
	465	470
Gly Arg Val Leu Asp Lys Asn Leu Asp Glu Glu Gly Phe Glu Ser Gly		475
	485	490
Asp Cys Gly Asp Asp Glu Asp Glu Cys Ile Gly Gly Ser Gly Asp Gly		495
	500	505
Met Ile Lys Val Lys Asn Gln Leu Arg Phe Leu Ala Glu Leu Ala Tyr		510
	515	520
Asp Leu Asp Val Asp Asp Ala Pro Gly Asn Ser Gln Gln Ala Thr Pro		525
	530	535
Lys Asp Asn Glu Ile Ser Thr Phe His Asn Leu Gly Asn Val His Ser		540
	545	550
Pro Leu Lys Leu Leu Thr Ser Met Ala Ile Ser Val Val Cys Phe Phe		555
	565	570
Phe Leu Val His		575
	580	

cagccccgccgcccgcgcccgcgacgccacctgtcaccaagtccgctccttctccagagactgcagcccggactc  
aagtgggtgccagaaactcccgtgccaggatcagattgcaagtatgtctccctaagggcccaacatgctgtcaag  
aaagatggaagaaaaataccaactaacagctcgattgaacatggaacagctgcttcagtctgcaagtatggagctca  
agttcttaattattcagaatgctgcggtttccaagaggcctttgaaattgtgttcgccatgccaagaactacaccaatg  
ccatgttcaagaacaactaccaagcctgactccacaagctttgagttgtgggtgaattttcacagatgtgtctctct  
acatcttgggttctgacatcaatgtagatgacatggtaaatgaattgttgacagcctgtttccagtcatacccagc  
taatgaaccaggcctgctgattcagccttgacatcaatgagtgccctccgaggagcaagacgtgacctgaaagt  
atttgggaattccccaagcttattatgaccaggtttccaagtcactgcaagtcactaggatcttccctcaggctctgaa  
tcttgaattgaagtgatcaacacaactgatcacctgaagtcagtaaggactgtggccgaatgctcaccagaatgtg  
gtactgtcttactgccagggactgatgatggttaaaccctgtggcgggtactgcaatgtggatgcaaggctgtatg  
gcaggtgtggaggagattgacaagtactggagagaatacattctgtccctgaagaactgtgaatggcatgtacaga  
atctatgacatggagaacgtactgcttggctcttttcaacaatccatgattctatccagtatgtccagaagaatgcagg  
aaagctgaccaccactattggcaagtatgtgccattctcaacaacgccaatataga

图 1

QPPPPPDATCHQVRSFFQRLQPGLKWVPETVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKME  
EKYQLTARLNMEQLLQSASMELKFLIIQNAAVFQEA FEIVVRHAKNYTNAMFK  
NNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYLGS DINVDDMVNELFDSLFPVIYTQLMNP  
LPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIMTQVSKSLQVTRIFLQALNLGIEVIN  
TTDHLKFSKDCGRMILTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGC MAGVV  
EIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLT  
TTIGKLC AHSQQRQYR

图 2

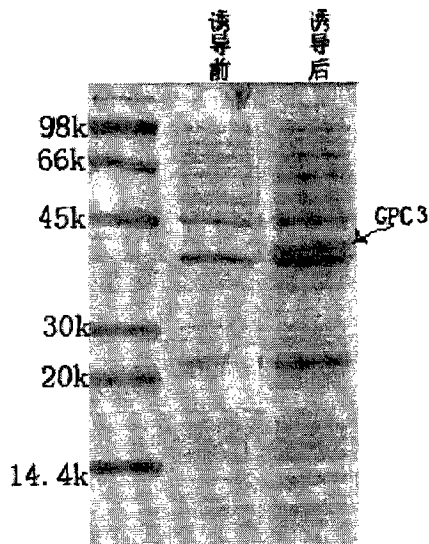


图 3

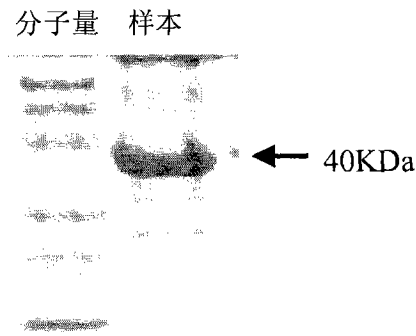


图 4

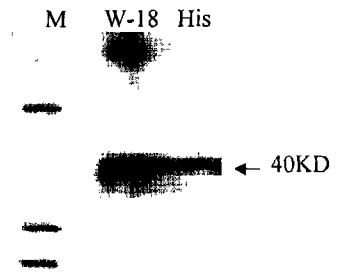


图 5

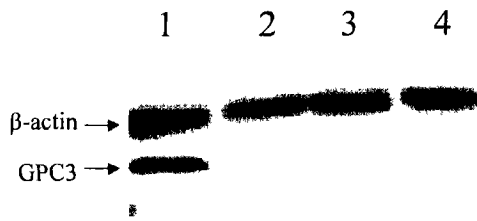


图 6

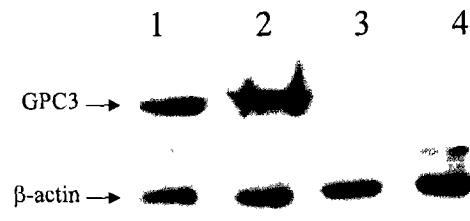


图 7

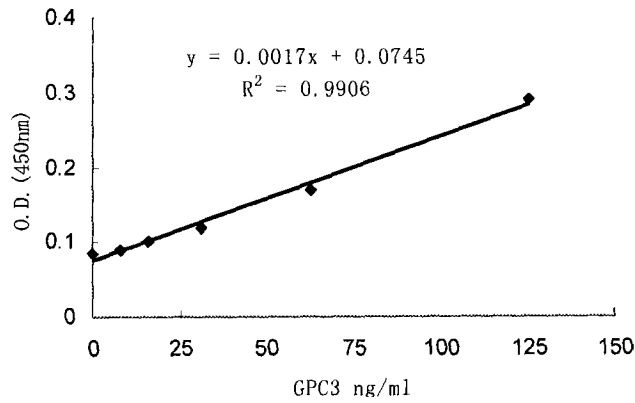


图 8

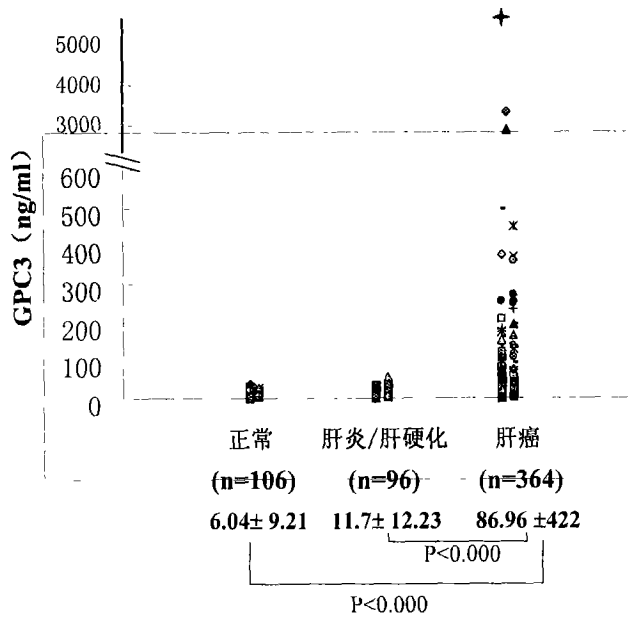


图 9

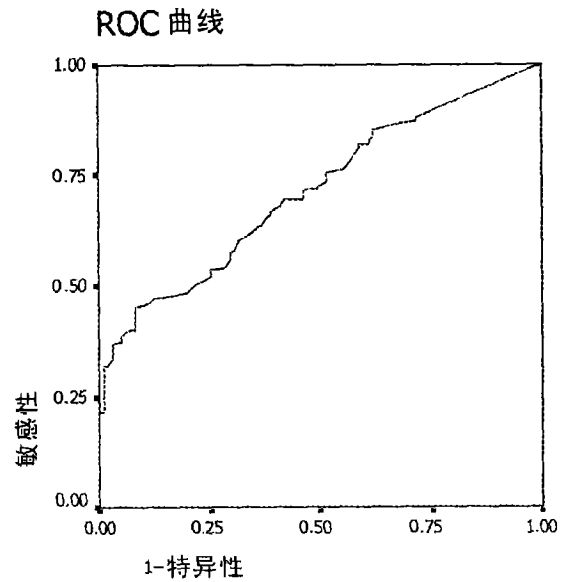


图 10

专利名称(译)	一种用于诊断肝癌的ELISA试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN101290318B</a>	公开(公告)日	2012-08-08
申请号	CN200710039562.7	申请日	2007-04-17
[标]申请(专利权)人(译)	上海市肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	上海市肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	上海市肿瘤研究所		
[标]发明人	屠红 周伟 赵新泰		
发明人	屠红 周伟 赵新泰		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/543 G01N33/53		
代理人(译)	徐迅		
审查员(译)	李子东		
其他公开文献	CN101290318A		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种肝癌的检测试剂盒，所述检测试剂盒中含有结合硫酸肝素蛋白多糖3第379-393位中的抗原表位的多克隆抗体，以及结合硫酸肝素蛋白多糖3第379-393位以外抗原表位的单克隆抗体或多克隆抗体。本发明的试剂盒检测灵敏度高，检测耗时短，有助于尽早地诊断肝癌患者，及时治疗，提高生存率。并且，与仅检测AFP标志物相比，在检测AFP标志物的同时采用本发明的试剂盒检测GPC3标记物可显著提高肝癌的诊断敏感性。

血清稀释度	1:1000	1:3000	1:6000
免疫兔 O.D.	0.989	0.751	0.546
正常兔 O.D.	0.112	—	—
PBS O.D.	0.078	—	—