

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.  
G01N 33/577 (2006.01)  
G01N 33/531 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510108154.3

[43] 公开日 2006年5月17日

[11] 公开号 CN 1773286A

[22] 申请日 2005.10.9

[21] 申请号 200510108154.3

[71] 申请人 北京微龙阵列生物技术有限公司

地址 100070 北京市丰台区科学城航丰路8  
号中关村丰台园生命科学孵化中心512  
室

[72] 发明人 林长青

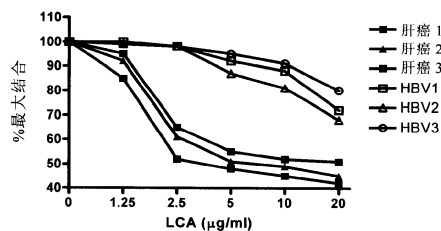
权利要求书1页 说明书14页 附图1页

## [54] 发明名称

凝集素竞争法肝癌甲胎蛋白异质体 AFP-L3  
定量检测试剂盒

## [57] 摘要

本发明提供了一种单克隆抗体，它是通过使用具有与 AFP 异质体糖链结合扁豆凝集素位点相竞争的单抗，筛选杂交瘤克隆而获得的。本发明还提供了含有该单克隆抗体的试剂盒、其制备方法及其应用。该试剂盒可作为肝癌早期诊断的指标，判断肝癌的发生，为肝癌的预防、诊断、治疗提供直接的支持。



1. 甲胎蛋白异质体 AFP-L3 酶联免疫定量测定试剂盒, 其特征在于, 它含有结合位点在甲胎异质体的糖链附近的单克隆抗体, 当与该糖链特异结合的凝集素结合上去之后, 会形成位阻, 特异性地影响该单克隆抗体的结合。

2. 甲胎蛋白异质体 AFP-L3 酶联免疫定量测定试剂盒, 其特征在于, 它含有通过下述方法制备出的单克隆抗体: 采用肝癌病人腹水中提取的甲胎蛋白进行包被后, 加入凝集素和对照缓冲液, 再加入要筛选的单克隆株, 最后采用标记 HRP 的抗鼠 IgG 进行反应, 然后显色, 筛选的标准是: 在加入凝集素结合后, 对比对照缓冲液该孔显色 OD 值显著下降 (OD 值变化  $\geq 50\%$ ) 的抗血清; 筛选该杂交瘤克隆, 注射小鼠腹腔, 收集腹水, 纯化单克隆抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的试剂盒, 它还含有甲胎异质体阳性、阴性对照、甲胎蛋白标准品、酶标板、凝集素溶液、对照缓冲液、辣根过氧化物酶标记 AFP-L3 单克隆抗体、辅助试剂, 其特征在于, 所述的单克隆抗体是标记在辣根过氧化物酶上。

4. 制作权利要求 3 所述的试剂盒的方法, 包括甲胎异质体阳性、阴性对照的制备, 甲胎蛋白标准品、酶标板、凝集素溶液、对照缓冲液、辣根过氧化物酶标记 AFP-L3 单克隆抗体、辅助试剂的配制。

5. 定量检测甲胎蛋白异质体的方法, 其中包括使权利要求 1-3 中的任一项所述的试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

6. 检测早期原发性肝癌的方法, 其中包括使权利要求 1-3 中的任一项所述的试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

## 凝集素竞争法肝癌甲胎蛋白异质体 AFP-L3 定量检测试剂盒

### 技术领域

5 本发明属于生物技术领域，更具体地说，本发明提供了一种结合位点在甲胎蛋白异质体糖链附近，该位点能被扁豆凝集素竞争结合掩蔽掉的甲胎蛋白单抗，并提供了采用该单克隆抗体研制出的用于检测甲胎蛋白异质 AFP-L3 含量的试剂盒、其制备方法及其应用。利用该试剂盒可以快速、准确地对肝癌的发生情况进行早期诊断。

10

### 背景技术

在世界范围内，肝细胞癌是第四种最常见的癌症，第三种最常见的癌症相关死亡原因。危险因素包括由乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒导致的慢性肝炎和肝硬化。要得到有效治疗，筛查和普查的临床效率依赖于早期诊断。

15

AFP-L3 是唯一的由得病患者肝脏中癌细胞生成的蛋白。在加拿大和美国的一项多中心、前瞻性、双盲、长期临床试验中，对该检测方法进行了研究。结果显示 AFP-L3%升高(15%以上)的患者，在接下来的 21 个月中，发生肝细胞癌的危险增加 7 倍之多。根据已有的肝细胞癌肿瘤学实践指南，这些患者肝细胞癌发生率极端增高。

20

甲胎蛋白(alpha2fetoprotein, AFP)是一种糖蛋白，在哺乳动物胚胎期由肝脏实质细胞和卵黄囊细胞合成，来源于内胚层的胃肠道粘膜细胞也可少量合成。正常情况下，AFP 主要存在于胎儿循环中，随着胎儿发育成熟，AFP 合成逐渐减少。出生时脐血中 AFP 浓度可达 10~100mg/L，出生后一年降至正常成人水平。如果新生儿 AFP 明显升高提示新生儿肝炎、先天性胆道闭锁或有能分泌 AFP 的胚胎性恶性肿瘤。

25

早在 1970 年，就有学者发现肝细胞癌患者血清 AFP 淀粉凝胶

电泳时常出现不同的迁移率，而新生儿、胎儿的 AFP 电泳迁移率相同。当时认为系 AFP 所含的唾液酸含量不同所致，并提出 AFP 异质体(AFP Variants)的概念。随后的研究表明,AFP 的糖链结构存在不同程度的变异，而所谓的异质性主要是因为 AFP 所含碳水化合物不同所致。AFP 异质体形成的确切机制还不十分清楚，其过程可能是这样的:增生的肝细胞及肝癌细胞于 G1 期和 S 期合成 AFP，并将其分布于核周、内质网腔及高尔基分泌小囊中，位于粗面内质网及高尔基体中的 AFP 在糖基化转移酶参与下受到不同的糖基化修饰后分泌到循环中。由于糖基化的不同，导致了 AFP 异质性的差异。另一可能的原因是糖基化转移酶异常造成糖基化后 AFP 构象的改变。AFP 的糖链结构能与多种凝集素相作用，与不同凝集素结合的 AFP 分子结构蛋白部分基本相同,但糖链部分有所差异。不同的糖链决定其与凝集素的亲和力。根据亲和性的不同，可将 AFP 异质体分为不同类型，如扁豆凝集素(LCA)亲和型、豌豆凝集素不亲和型，刀豆凝集素(Con2A)亲和型和 Con2A 不亲和型。另有一种分类方法是将电泳获得的区带从阳极开始以 1、2、3 编号，结合凝集素进行命名。如使用 LCA 则命名为 AFP-L1、AFP-L2、AFP-L3;使用 Con2A 则命名为 AFP2C1、AFP2C2、AFP2C3。

AFP 异质体许多糖链的结构尚未完全明了。与 LCA 相结合的基础是 AFP 糖链岩藻糖基化(LCA 与岩藻糖有较强的亲和力)，由于胚胎期 AFP 几乎无岩藻糖成分，因而可以认为这种分子糖链的异常是糖基化异常的反映。AFP-L3 与 LCA 的结合位点是门冬酰胺连接的岩藻糖化的 N2 乙酰葡萄糖胺。

## 25 AFP 异质体检测的临床意义

1)胚胎异常发育及胎儿先天性疾患 正常妊娠期母体血清中 AFP 与胚胎中 AFP 处于平衡状态，一旦胎儿畸形或胎盘屏障发生异常，可导致胎儿血清渗入羊水中或羊水渗入母体血清，造成母体羊水或

血清 AFP 急剧升高。但仅仅测定 AFP 总量有一定的局限性。实验表明:妊娠早期羊水中的 AFP12%~53%来自卵黄囊(Con2A 非结合型),而胎儿血清中的 AFP 主要来自胚肝(Con2A 结合型)。观察两者的比值,若 Con2A 非结合型/Con2A 结合型比值下降则反映胎儿血清中的 AFP 漏入羊水,胎儿有先天异常的可能,如神经管缺损、无脑儿或脊柱裂等。儿童肝母细胞瘤、胆道闭锁、性腺肿瘤、恶性畸胎瘤等可有 AFP 和/或 AFP 异质体的阳性。

2) 鉴别肝癌与良性肝病 原发性肝癌患者 AFP 常升高,但许多良性肝脏疾病也可有 AFP 升高,单凭 AFP 结果有时很难区分良、恶性病变。此时 AFP 异质体检测就具有良好的临床意义,尤其对于 AFP 在 30~400ng/ml 之间者具有较好的价值。Yozhiaki 对 361 例肝硬化进行了前瞻性研究,在 53 例 AFP 在 30ug/L 以上的患者中,2 年以后 21 例发展为肝癌,确诊肝癌时 39%的患者 AFP 在 400ug/L 以下。对比研究开始时肝细胞肝癌(HCC)组与非 HCC 组 AFP 测定值,未发现差异有显著性,研究发现病变时 AFP 异质体的类型有所不同,对 HCC 诊断 LCA 阳性率 87.12%假阳性率 21.5%,ConA 阳性率 89.17%假阳性率 17.15%。目前的研究结果把 AFP-L3 含量大于 15%作为肝癌的阳性指标。

3) 肝癌术后的监测 肝癌切除术后,血清 AFP 含量随之下降,其下降速度取决于体内残留 AFP 量及半衰期,一般 2 月内转阴,转阴时 AFP 异质体随之消失。如果 AFP 明显下降但不转阴,异质体变化不明显,则提示手术不彻底,可能还存在边缘残留、血管癌栓、卫星结节或转移等。如果异质体下降至 25%以下,AFP 和异质体浓度相对恒定,则可能是患者有肝炎或肝硬化所致。

AFP-L3 含量的判断:目前的研究表明 AFP-L3 的含量大于 15% 可以作为原发性肝癌阳性的指标。

但是长期以来,国内只有少数临床实验室能够测定 AFP 异质体,只有少数城市能满足临床测定 AFP 异质体的要求。迄今为止的异质

体测定方法（目前主要方法为电泳分离亲和吸附法），对于技术的要求较高、操作繁琐、试剂昂贵。

### 发明内容

5 本发明提供了诊断试剂盒及其制备方法，通过该试剂盒可以准确地诊断出早期原发性肝癌。由于筛选出了结合位点位于 AFP-L3 糖链附近、且该位点很容易被凝集素所结合掉的单抗，采用凝集素液相竞争方法，能真实地反应出血清中甲胎蛋白异质体的含量水平，显示出极高的灵敏度，方法快速简便。

10 一方面，本发明提供了一种单克隆抗体，该单抗结合位点在甲胎蛋白异质体的糖链附近，当与该糖链特异结合的凝集素结合上去之后，形成位阻，特异的影响该单抗的结合。因此通过对比加入凝集素进行封闭竞争前后的变化，就可以计算出该血清中甲胎蛋白所含异质体的含量。所述的单克隆抗体是由下述方法筛选制备出的：采用肝癌病人腹水中提取的甲胎蛋白进行包被后，加入凝集素和对照缓冲液，再加入要筛选的单克隆株，最后采用标记 HRP 的抗鼠 IgG 进行反应，然后显色，筛选的标准是：在加入凝集素结合后，对比对照缓冲液该孔显色 OD 值显著下降（OD 值变化  $\geq 50\%$ ）的克隆株。筛选该杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。

15 另一方面，本发明还提供了上述的单克隆抗体在制备用于检测甲胎蛋白异质体含量的试剂盒中的应用。

25 上述的本发明的试剂盒还可以含有甲胎蛋白标准品、凝集素溶液、空白对照液、酶标板、辣根过氧化物酶（HRP）标记的 AFP-L3 单克隆抗体、辅助试剂，其中，所述的单克隆抗体是标记于 HRP 上的。

另一方面，本发明还提供了上述试剂盒的制作方法，其包括阳性对照、阴性对照的制备、单克隆抗体包被板的制作、酶标单抗体的制备、以及辅助试剂的配制。

本发明试剂盒中的阳性、阴性对照是从人血清中制备的。一种制备步骤包括：收集肝癌病人腹水和健康正常人血清，过滤除菌、分装，即获得阳性、阴性对照。

本发明试剂盒中的单克隆抗体包被板是用普通高滴度的甲胎蛋白单克隆抗体（这种抗体可以商品化获得）包被酶标板而制作的。酶标板可选用国产板或进口板；规格可以是 96 孔平板或 12×8、12×4 可拆条板。

一种单克隆抗体包被酶标板的制作步骤如下：

包被：将上述单克隆抗体用 0.05M 碳酸缓冲液稀释后加入酶标板各孔，每孔 100 $\mu$ l，吸附过夜，用吐温磷酸盐缓冲液洗板，再用含牛血清白蛋白的吐温磷酸盐缓冲液封闭过夜，甩干后晾干，即获得单克隆抗体包被酶标板。

酶标记单抗：本发明试剂盒中的酶标单克隆抗体是用辣根过氧化物酶（HRP）标记 AFP-L3 单克隆抗体而制备的。一种酶标单克隆抗体的制备步骤如下：

- a) 以 NaIO<sub>4</sub>-乙二醇法进行 HRP 的氧化，达到终浓度 10mg/ml。
- b) 单克隆抗体和 HRP 在碱性碳酸盐缓冲液中透析 6 小时，实现 HRP 对单克隆抗体的标记，反应结束后用 NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应，再对 PBS 透析过夜。
- c) 用饱和硫酸铵沉淀，获得纯化的 HRP 酶标抗 AFP-L3 单克隆抗体。

本发明试剂盒中的辅助试剂包括凝集素溶液、对照缓冲液、酶联反应底物溶液、显色液、反应终止液和清洗缓冲液，一种配制辅助试剂的方法如下：

a) 凝集素溶液：20mmol/LPBS 配制的扁豆凝集素溶液，浓度为 5 $\mu$ g/ml,对照缓冲液为 20mmol/L PBS.

b) 底物溶液 A: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (pH5.0) 配制的 3%过氧化氢溶液；

c) 显色液 B: 四甲基联苯胺(TMB)甲醇溶液, 浓度为 0.1mg/ml;

d) 反应终止液: 2mol/L 硫酸;

e) 清洗缓冲液 (20 倍浓缩液, 20 $\times$ ): PBS (pH7.4) 配制的 0.05%吐温 20 溶液。

5 另一方面, 本发明还提供了检测甲胎异质体的含量的方法, 其中包括使上述试剂盒与血清或血浆样品相接触的步骤。

更具体地, 本发明的检测方法包括下述步骤:

a) 抗原-抗体反应: 在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别双孔加入 50 $\mu$ l 阳性、阴性对照血清, 或待测血清样品, 使用记号笔  
10 标记成 1、2 系列。37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。洗板操作 4 次。

b) 1 系列加样孔中加入含有凝集素的溶液, 2 系列加样孔中加入不含有凝集素的对照溶液。37 $^{\circ}$ C 水浴保温 30 分钟。取出板, 甩掉孔中液体。

c) 将 HRP-单克隆抗体溶液加入各孔, 每孔 100 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴  
15 保温 30 分钟。重复洗板操作 4 次。

d) 显色反应: 每孔依次加入底物溶液 A, 显色液 B 各 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50 $\mu$ l 反应终止液结束反应。

e) 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 值并记录。

20 f) 制作标准曲线: 以标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 OD 值为纵坐标, 作出标准曲线; 计算标准曲线回归系数  $R^2$ , 当  $R^2 > 0.95$  时本次测定有效;

g) 计算待测血清样品浓度: 根据待测样品的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的 AFP 和 AFP-L3 浓度。

25 阳性质控血清: (孔 2-孔 1)  $\div$  孔 2  $\geq 15\%$  时, 本次测定有效。

阴性对照血清: (孔 2-孔 1)  $\div$  孔 2  $\geq 15\%$  时, 本次测定有效。

待检测血清: (孔 2-孔 1)  $\div$  孔 2  $\geq 15\%$  时, 说明其中甲胎蛋白异质体含量较高, 为肝癌阳性。

本发明提供了一种甲胎蛋白异质体定量酶联免疫测定试剂盒，它含有甲胎蛋白标准品、酶标板、辣根过氧化物酶标记单克隆抗体、辅助试剂，其特征在于，所述的单克隆抗体是能结合于甲胎蛋白异质体糖链附近，使用凝集素液相竞争、筛选杂交瘤克隆而获得的，

5 且标记在所述的酶标板上。所述的单克隆抗体是由下述方法制备出的：采用肝癌病人腹水中提取的甲胎蛋白进行包被后，加入凝集素和对照缓冲液，再加入要筛选的单克隆株，最后采用标记 HRP 的抗鼠 IgG 进行反应，然后显色，筛选的标准是：在加入凝集素结合后，对比对照缓冲液该孔显色 OD 值显著下降（OD 值变化  $\geq 50\%$ ）的抗

10 血清。筛选该杂交瘤克隆，注射小鼠腹腔，收集腹水，纯化单克隆抗体。

另一方面，本发明还提供了上述试剂盒的制作方法，其包括单克隆抗体包被板的制作、酶标单克隆抗体的制备、以及辅助试剂的配制。

15 本发明试剂盒中的甲胎蛋白标准品是商品化购买得到。

与已有的甲胎蛋白异质体亲和吸附法检测中的应用试剂相比较，本发明试剂盒具有以下优点：

本发明试剂盒以获得的针对甲胎蛋白异质体糖链蛋白附近位点、而且这个位点会由于凝集素的结合而被位阻掩蔽的单克隆抗体作为

20 AFP-L3 检测的手段，并应用酶免定量方法克服了以往检测方法操作步骤烦琐、耗时长、需要配套设备多的缺点。

试剂盒配套用的标准品，能够直接定量计算出血样标本中所含的甲胎蛋白和甲胎蛋白异质体的含量，方法应用简便。

25

## 附图说明

图 1 显示了用本发明的 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒对乙肝慢性大三阳肝炎标本和原发性肝癌标本中 AFP-L3 不同含量进行检测的结果。

## 具体实施方式

下面用实施例进一步说明本发明。应该理解的是，本发明的实施例是用于说明本发明而不是对本发明的限制。根据本发明的实质对本发明进行的简单改进都属于本发明要求保护的范围。

### **实施例 1: AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒的制作**

一种 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒（96 人份），其组成包括：

- 15 AFP-L3 阴性、阳性对照各 1 瓶；
- AFP 单克隆抗体包被板（96 孔）1 块；
- 辣根过氧化物酶（HRP）标记的 AFP-L3 单克隆抗体 1 瓶，6ml/瓶；
- 扁豆凝集素（LCA）溶液 1 瓶
- 20 空白缓冲液 1 瓶
- AFP 标准品 1 瓶
- 底物溶液 A、显色液 B 各 1 瓶，各 5ml/瓶；
- 反应终止液 1 瓶，5ml/瓶；
- 清洗缓冲液（20X 浓缩）1 瓶，30ml/瓶。

25 具体操作如下：

#### 1. 制备 AFP-阴性、阳性对照：

1) 收集血清：从医院或血站获得健康正常人血清、肝癌病人腹水，于-70℃保存备用；

## 2) 分装:

AFP-L3 阳性对照物: 肝癌阳性病人腹水, 在无菌条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中, 每管 0.5ml。贮存于 4℃。

阴性对照血清: 正常人血清, 经检定 AFP 阴性。取多份以上血清合并成批, 经 60℃ 1 小时处理后, 过滤除菌在无菌的条件下分装入 1.5ml eppendorf 管中, 每管 0.5ml。贮存于 4℃。

## 2. 制作 AFP 单克隆抗体包被板:

### a) 包被:

酶标板采用进口或国产生产的 12×8 可拆条板。将步骤 1) 所获单克隆抗体用 0.05mol/L 碳酸盐缓冲液稀释为 20μg/ml 后加入酶标板各孔, 每孔 100μl, 吸附过夜, 用清洗缓冲液洗板, 再用该封闭液缓冲液封闭过夜, 甩干后晾干, 即获得单克隆抗体包被酶标板。按 96 孔/块用铝箔袋包装、真空封闭。

b) 制备辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的抗 AFP-L3 单克隆抗体免疫和细胞融合: 从肝癌病人腹水中提取的免疫原(甲胎蛋白)与弗氏完全佐剂混合, 得到油状乳液。将该乳液以 0.2 毫升的剂量皮下施给 BALB/C 小鼠(CLEA Japan 的产品, 6 周龄雄性)的背部位点。第一次免疫 7 天或 14 天后增强免疫, 然后在细胞融合前 3 天, 腹膜内施用 0.2 毫升上述免疫原。最后一次增强 3 天后, 从各小鼠上切下脾脏细胞, 与骨髓瘤细胞(SP2/0-Ag14 株, RikenGeneBank)以 10: 1 混合, 用 50% 聚乙二醇 4000 融合。在 HAT 培养基(Gibco 的产品)上选择性培养杂交瘤。

杂交瘤选择: 在融合后第 12 天, 用 ELISA 法测定各培养上清液中的抗体活性。先在 ELISA 板的每孔固定有 10 微克/毫升的 AFP 抗原, 在各孔中先加入 100ug/ml 扁豆凝集素 (PBS 配制), 并安排同样数量的对照孔中加入缓冲液 PBS, 反应在 37℃ 进行 30 分钟后, 取出板甩掉其中液体, 各取 200 微升的融合细胞的培养上清液加到 96 孔 ELISA 板 Coaster 的产品)的孔中, 每次取的培养上清液都加在

对照孔中一份 100ul。反应在 37℃ 进行 1 小时，然后用含 0.05% Tween 20 的 PBS(洗液)洗涤，加入 200 微升过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG (Cappel 产品，1: 20, 000)。反应在 37℃ 进行 1 小时后，用上述洗液洗涤板。然后在各孔中加入 200 微升底物溶液(0.1M 联苯二胺和 0.012 % 过氧化氢水溶液)，使反应在室温下进行 15 分钟。然后，在各孔中加入 50 微升 3.5mol 硫酸终止酶反应，测量 492 纳米的吸光度，选择能与加入凝集素后反应显著下降的抗体 (OD 值变化大于 50%)。用限制稀释法对各克隆进行两次克隆。克隆后的杂交瘤移植到 BALB/C 小鼠中，结果发现 2 个杂交瘤克隆产生各种可作为腹水回收的单克隆抗体。

#### 单克隆抗体的标记

- 1) 酶的氧化 (全过程避光)
  - a) 称取 HRP 5mg，加 ddH<sub>2</sub>O 250μl 溶解。
  - b) 称取 NaIO<sub>4</sub> 5mg，加 ddH<sub>2</sub>O 250μl 溶解，配制成 20mg/mL 的浓度。
  - c) 往 HRP 溶液中逐滴加入 NaIO<sub>4</sub> 溶液，边加边搅拌。
  - d) 将混合好的溶液置于 4℃，静置 30 分钟。
  - e) 取 5ml 乙二醇溶于 25μl ddH<sub>2</sub>O 中，逐滴加入上述混合溶液中，边加边搅拌。
  - f) 室温静置 30 分钟。
  - g) 酶氧化过程完成，HRP 终浓度为 10mg/ml。
- 2) 单克隆抗体的准备及标记 (避光)
  - a) 调整抗体浓度到 5mg/ml 左右(蛋白浓度过低则用 PEG20000 浓缩)，用 pH9.5 左右的 50mmol/L CB(1mol/L NaHCO<sub>3</sub> 与 1mol/L Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 按 10:1 的比例混合，使用前以蒸馏水稀释 20 倍)透析去甘油或杂质 (如 Tris)，4℃ 下透析过夜，其中换液 3 次。
  - b) 将单克隆抗体与 HRP 按 1: 4 混合，于 50mmol/L pH9.5 CB 中透析 6 小时以上，头两个小时换液一次。

c) 用新鲜配置的 1mg NaBH<sub>4</sub> 溶液终止反应。摇匀, 4℃ 静置 2 小时, 每半小时摇一次, NaBH<sub>4</sub> 溶液加入的量要合适。

d) 用 pH7.2 的 10 mM PBS(预配置 0.01mol/L 的 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 和 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 储备液, 根据需要的 pH 值混匀二者成 PBS 缓冲液)透析过夜。换液一次即可。

3) 纯化 HRP 酶标抗 AFP-L3 单克隆抗体

a) 完成标记的单克隆抗体溶液中逐滴加入饱和硫酸铵溶液, 边加入边搅拌, 直至饱和硫酸铵浓度降低至 1/3。

b) 4℃ 静置 1 小时。

10 c) 8000rpm 离心 10 分钟, 将上清移至新管中, 沉淀用等体积 PBS 重新悬浮。

d) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 40%, 分别收集上清和沉淀。

15 e) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 50%, 分别收集上清和沉淀。

f) 重复以上操作, 将饱和硫酸铵浓度提高到 60%, 分别收集上清和沉淀。

g) 收集分离的各个组分, SDS-PAGE 鉴定纯度。

h) 提纯的 HRP-单克隆抗体对 PBS 透析过夜。

20 i) 超滤管离心浓缩纯化的 HRP-多克隆抗体, 获得克分子比接近 1:8 的酶标抗单克隆抗体。

4) 组装: 用含 10%胎牛血清的缓冲液稀释由步骤 3) 获得的酶标抗 AFP-L3 单克隆抗体至合适的工作浓度, 按 6ml/瓶分装, 贮存于 4℃。

25 4. 配制底物溶液 A: 磷酸-柠檬酸缓冲液 (PH5.0) 配制的 3% 过氧化氢溶液, 按 5ml/瓶分装。

5. 配制显色液 B: TMB(0.1mg/ml) 甲醇溶液, 按 5ml/瓶分装。

6. 配制反应终止液: 2mol/L H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 按 3ml/瓶分装。

7. 配制清洗缓冲液（20倍浓缩液）：PBS(pH7.4)配制的1%吐温20溶液，按15ml/瓶分装。

### 应用本发明技术制备 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒的质量检测

5        1) 准确性：10份正常阴性质控血清（包括特异性对照血清）参考品的检测结果，无假阳性出现。5份肝癌AFP阳性质控血清的参考品检测结果无假阴性出现。

      2) 精密度：随机抽取20盒不同批次试剂盒，用同一份肝癌阳性质控血清按说明书操作步骤进行重复测定。计算每次测定结果，  
10  求出均值、SD和变异系数CV。精密度试验结果显示批间CV小于10%。

      3) 检测灵敏度：根据AFP标准品稀释测定结果，本试剂盒的检测灵敏度为20ng/ml。

      4) 特异性：取四份待测样品混合后分为四份混合血清标本，每  
15  份1ml。分别加入50ng剂量的组织型纤溶酶原激活剂（tPA）、血纤维蛋白溶酶（Plasmin）、或纤粘连蛋白（FN）后制成干扰试验血清标本#1、#2、#3，未加任何干扰物的#4混合血清标本作为基础样品。按说明书操作步骤进行测定并计算结果。然后按干扰试验计算公式计算干扰率。标本#1、#2、#3的干扰误差均小于1.5%。

20

### **实施例2：AFP-L3定量酶联免疫检测试剂盒的使用**

1. 清洗缓冲液配制：将试剂盒提供的浓缩清洗缓冲液加蒸馏水20倍稀释。

2. 抗原-抗体反应：在试剂盒提供的抗体包被板的微孔中分别  
25  双孔加入50μl阳性或阴性质控血清，或待测血清样品，37℃水浴保温30分钟，洗板5次，加入凝集素溶液和对照液在每个双孔中，37℃水浴保温30分钟，甩去液体，将HRP-单克隆抗体溶液加入各孔，每孔50ul，37℃水浴保温30分钟。重复洗板操作5次，每次3分钟。

3. 显色反应: 每孔依次加入底物溶液 A、TMB 显色液 B 各 50 $\mu$ l, 37 $^{\circ}$ C 水浴保温 10 分钟, 每孔再加入 50ul 反应终止液结束反应。

4. 比色: 以空白对照孔的吸光值调零, 用酶标仪在 450nm 测定 OD 平均值; 记录各孔吸光值; 计算双孔阳性、阴性质控血清 OD 值的平均值。

#### 5. 结果判断

1) 制作标准曲线: 以标准品浓度为横坐标, 标准品测定的 OD 值为纵坐标, 作出标准曲线; 计算标准曲线回归系数  $R^2$ , 当  $R^2 > 0.95$  时本次测定有效;

10 2) 计算待测血清样品浓度: 根据待测样品的 OD 值从标准曲线计算出待测血清样品的 AFP 和 AFP-L3 浓度。

阳性质控血清:  $(\text{孔}2 - \text{孔}1) \div \text{孔}2 \geq 15\%$  时, 本次测定有效。

15 阴性对照血清:  $(\text{孔}2 - \text{孔}1) \div \text{孔}2 \geq 15\%$  时, 本次测定有效。

待检测血清:  $(\text{孔}2 - \text{孔}1) \div \text{孔}2 \geq 15\%$  时, 说明其中甲胎蛋白异质体含量较高。

### 20 实施例 3: 本发明 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒对肝癌病人阳性样品的检测

为判断本发明 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒与临床肝癌检测结果的符合率, 取本发明进行检测。地坛医院临床研究数据: 100 份已知原发性肝癌阳性标本, 50 份体检健康血清, 100 份肝硬化血清, 分别用 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒进行检测, 结果见表 1。

25

表 1.在不同标本中检出率比较

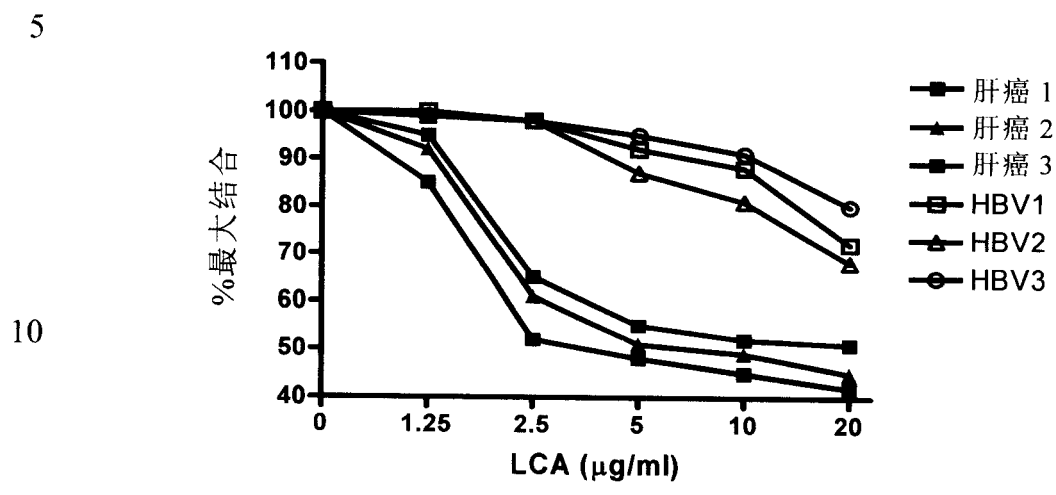
血清来源	例数	阳性数 (阳性比例)	
		AFP 阳性 (大于 20ng)	AFP-L3 含量 (≥ 15%)
100 份原发性肝癌阳性标本	100	91%	82 %
50 份健康人	50	0	0
100 份肝硬化	100	82%	95%

本实验结果表明, 本发明对于原发性肝癌的符合率高达 82%, 在肝硬化中的特异性高达 95%。

5

#### 实施例 4: 本发明 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂盒对乙肝慢性大三阳肝炎标本和原发性肝癌标本的检测

10 两类标本进行 AFP-L3 定量检测, 原发性肝癌 3 份, 大三阳慢性肝炎 3 份, 检测结果如图 1 所示。图 1 结果显示, 本发明 AFP-L3 酶联免疫定量检测试剂当使用凝集素竞争含量为 5ug/ml 时, 可以清楚分辨出大三阳慢性肝炎和原发性肝癌之间 AFP-L3 含量的不同。



15

图 1

专利名称(译)	凝集素竞争法肝癌甲胎蛋白异质体AFP - L3定量检测试剂盒		
公开(公告)号	<a href="#">CN1773286A</a>	公开(公告)日	2006-05-17
申请号	CN200510108154.3	申请日	2005-10-09
[标]发明人	林长青		
发明人	林长青		
IPC分类号	G01N33/577 G01N33/531		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供了一种单克隆抗体，它是通过使用具有与AFP异质体糖链结合扁豆凝集素位点相竞争的单抗，筛选杂交瘤克隆而获得的。本发明还提供了含有该单克隆抗体的试剂盒、其制备方法及其应用。该试剂盒可作为肝癌早期诊断的指标，判断肝癌的发生，为肝癌的预防、诊断、治疗提供直接的支持。

