

[19]中华人民共和国国家知识产权局

[51]Int. Cl⁷

G01N 33/53

[12] 发明专利申请公开说明书

G01N 33/533 G01N 33/561

G01N 33/68

[21] 申请号 00119375.9

[43]公开日 2000年12月27日

[11]公开号 CN 1278065A

[22]申请日 2000.7.13 [21]申请号 00119375.9

[71]申请人 厦门大学

地址 361005 福建省厦门市思明南路 422 号

[72]发明人 廖绵初 干佰仙

[74]专利代理机构 厦门大学专利事务所

代理人 马应森 陈永秀

权利要求书 1 页 说明书 4 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法

[57]摘要

涉及一种医学检测法。检测甲胎蛋白异质体的方法是将醋酸纤维素膜条带两端浸泡于缓冲液中,后吸干,取待检血清与植物凝絮素预先混合,再将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端,另一端加标记抗甲胎蛋白抗体,通电电泳,后观察结果。因血清与植物凝絮素预先混合,即让甲胎蛋白异质体与植物凝絮素预先结合,再用电泳分离此结合物,故检测快速,不需制备传统的琼脂糖,有利于标准化和工业化生产,不存在放射性污染,节省设备,降低成本。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

知识产权出版社出版

权 利 要 求 书

1. 一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于
 - 1) 将醋酸纤维素膜条带的两端浸泡于巴比妥缓冲液中，取出后吸干；
 - 2) 取待检血清 1~20 μ L 与 1~5mg/mL 的植物凝聚素 1~10 μ L 预先混合，在室温下放置待用；
 - 3) 将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端，在另一端滴加标记抗甲胎蛋白抗体，再吹干；
 - 4) 将加好待测样品的醋酸纤维素膜放在电泳槽上，并通电电泳；
 - 5) 电泳后取下醋酸纤维素膜，用生理盐水浸泡洗涤，吸干后观察结果：若为甲胎蛋白异质体阳性的肝癌血清，则有 2 条带；而其他甲胎蛋白阳性的肝病病人血清，则仅有 1 条带；甲胎蛋白阴性的病人不出现条带。
2. 如权利要求 1 所述的一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于所说的待检血清为 3 μ L 与 2mg/mL 的植物凝聚素 1 μ L 预先混合。
3. 如权利要求 1 所述的一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于所说的植物凝聚素为伴刀豆凝聚素，小豌豆凝聚素或小扁豆凝聚素。
4. 如权利要求 1 所述的一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于所说的抗甲胎蛋白抗体用酶联免疫标记物，如辣根过氧化物酶，碱性磷酸酶，酸性磷酸酶，葡萄糖氧化酶，D-半乳糖苷酶或生物素标记，电泳后用各自的酶底物显色。
5. 如权利要求 1 所述的一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于所说的抗甲胎蛋白抗体用荧光素标记物，电泳后醋酸纤维素膜用紫外灯观察。
6. 如权利要求 3 所述的一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法，其特征在于所说的植物凝聚素用伴刀豆凝聚素 ConA。

说明书

一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法

本发明涉及一种医学检测方法。

甲胎蛋白 (AFP) 检测是用于肝癌早期诊断的首要方法, 甲胎蛋白异质体的检测是目前用于区分肝癌和非癌所产生的甲胎蛋白的唯一方法。在第四届全国肝癌学术交流会上, 已作为原发性肝癌的诊断标准, 推荐给医师使用。崔贞福等 (中华医学检验杂志, 1986, 9 (3): 154—155) 介绍了亲和交叉免疫电泳自显影法检测甲胎蛋白糖链异质体。关赛芳等 (肿瘤, 1990, 10 (1): 38—39) 介绍了 Western 免疫酶标印迹法鉴别异源性 AFP 分子变异体。韩玲, 等 (上海免疫学杂志, 1993, 13 (4): 227—228) 介绍了人甲胎蛋白异质体直接固相时间分辨荧光免疫测定。目前使用的检测方法, 主要存在的问题是:

1) 检测花费时间多, 需要 3 天才能出结果。

2) 需要使用放射性同位素, 因此无论在试剂制备 (125-碘标记抗甲胎蛋白抗体), 还是在医院使用, 都存在同位素污染的问题。

3) 在制备含凝聚素的琼脂糖胶时, 质量不容易控制; 因为凝聚素是一种植物蛋白, 对热敏感, 而琼脂糖胶在 50℃ 以下, 就会凝固。因此, 制备时要在不低于 56℃ 时加入凝聚素, 质量不容易控制。此外, 受不同批号的凝聚素、琼脂糖和聚合度的影响, 使检验结果不稳定。

4) 检验结果是通过放射自显影来获得, 需要胶片冲洗设备。曝光不足或显影不良都会影响结果。

5) 由于琼脂糖胶的保存问题难以解决, 故试剂标准化问题难以解决, 无法进行工业化生产。

本发明的目的在于提供一种不存在放射性污染、不需要专门设备、有利于标准化、便于医院检验结果质量控制、检测快速的用于检测甲胎蛋白异质体的方法。

用于检测甲胎蛋白异质体的方法是:

1) 将醋酸纤维素膜条带的两端浸泡于巴比妥缓冲液中, 取出后吸干。

2) 取待检血清 1~20 μ L 与 1~5mg/mL 的植物凝聚素 1~10 μ L 预先混合, 在室温下放置待用。

3) 将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端, 在其另一端滴加标记抗甲胎蛋白抗体, 再

吹干。

4) 将加好待测样品的醋酸纤维素膜放在电泳槽上，加入电泳缓冲液，并通电电泳。

5) 电泳后取下醋酸纤维素膜，用生理盐水浸泡洗涤，洗去未结合的物质，吸干后观察结果：若为甲胎蛋白异质体阳性的肝癌血清，则有 2 条带，而其他甲胎蛋白阳性的肝病病人血清，则仅有 1 条带；不产生甲胎蛋白的肝病病人，则不出现条带。

在已有技术中，是将凝聚素加入到琼脂糖胶中，使其在电泳过程中完成甲胎蛋白异质体与植物凝聚素的结合，从而达到区分的目的。而本发明的技术关键是血清与植物凝聚素预先混合，让甲胎蛋白异质体与植物凝聚素预先结合，再用电泳分离此结合物。因此本发明从根本上克服我们在背景技术部分所指出的困难，其主要优点是：

1) 可以快速检测，一小时可获得结果。

2) 若使用了荧光素标记物，不存在放射性污染，同时也就不需要放射自显影，节省了胶片和冲洗设备，医院减少了设备投资，可通过紫外灯（如验钞仪）直接观察，降低了检验费用。

3) 由于通过免疫电泳方法浓缩荧光素标记物，不需要专门设备（用荧光显微镜或荧光分光光度计检测荧光），使基层医院都可以使用，有利于肝癌的早期检测和早期诊断。

4) 通过检测试剂标准化生产，有利于对各医院的检验结果的比较，使医院检验结果质量控制得以实现。

5) 节省植物凝聚素，因为植物凝聚素是价格昂贵的制品，每克高达 1800 元，因此可降低试剂成本。

6) 由于采用预先混合凝聚素的方法，就没有必要用琼脂糖胶分离甲胎蛋白异质体，可以用醋酸纤维素膜代替琼脂糖，从而降低成本。

7) 不需要制备琼脂糖，解决了试剂的保存问题（以往都是临时制备），因此有利于甲胎蛋白异质体检测方法标准化，可以进行大规模的工业化生产。

实施例 1：为了进行甲胎蛋白异质体的快速检测，需先准备有关试剂和材料：1) 巴比妥缓冲液，PH 8.6，用于电泳，巴比妥钠 10.3g，0.25N HCl 38.2mL，NaN₃ 0.1g，加无离子水至 1000mL；2) 醋酸纤维素膜；3) 标记抗甲胎蛋白抗体；4) 植物凝聚素；5) 电泳仪和平板电泳槽。以下给出具体方法：

1) 将 8cm×10cm 醋酸纤维素膜用铅笔划成 1cm 宽的条带，并在两端各 1cm 处划线，浸入巴比妥缓冲液中浸泡后取出，用滤纸吸干。

2) 取待检血清 3 μ L, 与 2mg/mL 的伴刀豆凝聚素 ConA 1 μ L 混合, 室温下放置待用。

3) 将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端, 在另一端滴加荧光素标记抗甲胎蛋白抗体 5 μ L, 用电吹风吹干。

4) 将加好待测样品的醋酸纤维素膜放到电泳槽上, 其中血清端为阴极, 荧光素标记抗甲胎蛋白抗体端为阳极, 用滤纸作电极桥, 按 15~20V/cm 调整电压, 通电电泳 25~30min。

5) 电泳结束后, 关闭电源, 取下醋酸纤维素膜, 用生理盐水浸泡洗涤, 洗去未结合的物质, 取出后用滤纸吸干, 置于紫外灯下观察。

6) 结果: 甲胎蛋白异质体阳性的肝癌血清有二条带, 而其它甲胎蛋白阳性的肝病病人血清, 仅有一条带; 甲胎蛋白阴性的病人不出现条带。

实施例 2: 将 8cm \times 12cm 醋酸纤维素膜用铅笔划成 1.2cm 宽的条带, 并在两端各 1.2cm 处划线, 浸入巴比妥缓冲液中浸泡后取出, 用滤纸吸干。取待检血清 15~20 μ L, 与 4~5mg/mL 的植物凝聚素 ConA 8~10 μ L 混合, 室温下放置待用, 将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端, 在另一端滴加常和的酶联免疫标记物如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶 1~5 μ L, 用电吹风吹干。将加好待测样品的醋酸纤维素膜放到电泳槽上, 按 10~15V/cm 调整电压, 通电电泳 45~60min。电泳结束后, 取下醋酸纤维素膜, 用生理盐水浸泡洗涤, 取出后吸干再观察。可通过酶底物系统显色。

实施例 3: 将长为 8cm 的醋酸纤维素膜处理后浸入巴比妥缓冲液中, 取待检血清 1~2 μ L, 与 3~4mg/mL 的小豌豆凝聚素 2~4 μ L 混合, 室温下放置待用。将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端, 在另一端滴加常用的酶联免疫标记物如酸性磷酸酶, 葡萄糖氧化酶, D-半乳糖苷酶或生物素等标记抗甲胎蛋白抗体 1~5 μ L, 用电吹风吹干, 也可以用小滤纸条滴加血清或抗体后放到上面。将加好待测样品的醋酸纤维素膜放到电泳槽上, 按 2~5V/cm 调整电压, 通电电泳 20~25min, 电泳后的做法与实施例 2 相同。

实施例 4: 将 10cm \times 14cm 醋酸纤维素膜划成 1cm 宽的条带, 并在两端划线, 浸入巴比妥缓冲液中浸泡后取出吸干。取待检血清 5~10 μ L, 与 2~3mg/mL 的小扁豆凝聚素 5~7 μ L 混合, 室温下放置待用, 将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端, 在另一端滴加荧光素标记抗甲胎蛋白抗体 1~5 μ L, 吹干, 也可用小滤纸条滴加血清或抗体后放到上面。将加好待测样品的醋酸纤维素膜放到电泳槽上, 按 6~10V/cm 调整电压, 通电电泳 35~40min, 电泳结束后取下醋酸纤维素膜, 用生理盐水浸泡洗涤, 取出后吸干置于紫外灯下观察, 即可得出结果, 不需进行底物显色。

用荧光素标记的抗甲胎蛋白抗体是用荧光素取代¹²⁵—碘标记的抗甲胎蛋白抗体,常用荧光素如异硫氰酸荧光素 (FITC)、二氯三嗪基氨基荧光素 (DTAF)、四乙基罗丹明 (RB 200)、四甲基异硫氰酸罗丹明 (TMRITC) 等。制备荧光素标记的甲胎蛋白抗体的方法以荧光素 FITC 为例说明如下: 取 30mL 的抗甲胎蛋白抗体溶液, 配制 3mg (相当于甲胎蛋白抗体蛋白量为 1/100) 的 FITC, 将 FITC 缓慢滴加入抗体溶液中, 注意测定溶液的 PH 保持在 9.0~9.5。荧光素加毕, 将反应物移入冰箱搅拌。将标记溶液装入透析袋中, 在流水中透析, 再移入 1000~2000mL 的 0.01 mol/L PH 7.2 磷酸缓冲液 (PBS) 中, 在冰箱中继续透析。用葡聚糖凝胶 (Sephadex) G-25 (或 G-50) 柱 (1.2×30cm), 在 0.01 mol/L PH 7.2 磷酸缓冲液 (PBS) 平衡后, 加入透析液, 用相同的 PBS 溶液洗脱, 收集第一着色峰, 即为所需的产物。

专利名称(译)	一种用于检测甲胎蛋白异质体的方法		
公开(公告)号	CN1278065A	公开(公告)日	2000-12-27
申请号	CN00119375.9	申请日	2000-07-13
[标]申请(专利权)人(译)	厦门大学		
申请(专利权)人(译)	厦门大学		
当前申请(专利权)人(译)	厦门大学		
[标]发明人	廖绵初 干侣仙		
发明人	廖绵初 干侣仙		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/561 G01N33/68		
代理人(译)	陈永秀		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

涉及一种医学检测法。检测甲胎蛋白异质体的方法是将醋酸纤维素膜条带两端浸泡于缓冲液中,后吸干,取待检血清与植物凝聚素预先混合,再将混合血清滴加到醋酸纤维素膜的一端,另一端加标记抗甲胎蛋白抗体,通电电泳,后观察结果。因血清与植物凝聚素预先混合,即让甲胎蛋白异质体与植物凝聚素预先结合,再用电泳分离此结合物,故检测快速,不需制备传统的琼脂糖,有利于标准化和工业化生产,不存在放射性污染,节省设备,降低成本。