



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107966565 A

(43)申请公布日 2018.04.27

(21)申请号 201711127322.2

G01N 33/543(2006.01)

(22)申请日 2017.11.15

(83)生物保藏信息

CGMCC No.14724 2017.09.28

(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 陈德喜 时红波 刘芳 时红林 谢立 殷继明 魏飞力

(74)专利代理机构 北京华科联合专利事务所 (普通合伙) 11130

代理人 王为 孟旭

(51)Int.Cl.

G01N 33/574(2006.01)

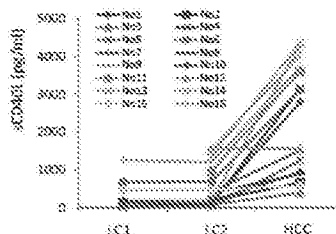
权利要求书1页 说明书9页 序列表2页 附图2页

(54)发明名称

一种肝癌早期筛查和早期诊断标志物 sCD40L

(57)摘要

本发明涉及一种肝癌早期筛查和早期诊断标志物sCD40L以及含有该标志物的疾病诊断试剂,特别涉及一种肝癌早期筛查和早期诊断标志物sCD40L试剂,单克隆抗体及其试剂盒。本发明的试剂盒可用于肝癌早期筛查,肝癌复发早期诊断和肝癌常规诊断,本发明进一步提供检测sCD40L的方法,所述方法包括双抗体夹心酶免法和化学发光法。



1. sCD40L作为标记物在制备肝癌筛查和早期诊断的诊断试剂中的应用。
2. 一种试剂盒,其中包括sCD40L单克隆抗体。
3. 一种sCD40L单克隆抗体。
4. 一种用于制备sCD40L单克隆抗体的细胞株,保藏编号为:CGMCC14724。
5. 根据权利要求2所述的试剂盒,还包括用sCD40L单克隆抗体制备的免疫微球。
6. 根据权利要求2所述的试剂盒,还包括已偶联sCD40L单克隆抗体的酶标记物。
7. 根据权利要求2所述的试剂盒,还包括任选的选自以下组分之一组分:显色液;洗涤液;样品稀释液;阳性对照样品和阴性对照样品;终止液。
8. 用sCD40L单克隆抗体制备的免疫微球在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sCD40L抗原中的应用。
9. 一种检测试剂盒,包括;
 - (1) 含有sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球
 - (2) 已偶联sCD40L多克隆抗体的酶标记物。
10. 根据权利要求9所述的试剂盒,其组成如下;
 - (1) 含有sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球
 - (2) 已偶联sCD40L多克隆抗体的酶标记物
 - (3) 显色液
 - (4) 洗涤液
 - (5) 样品稀释液
 - (6) 阳性对照样品和阴性对照样品
 - (7) 终止液。

一种肝癌早期筛查和早期诊断标志物sCD40L

技术领域

[0001] 本发明涉及一种疾病诊断试剂,特别涉及一种肝癌早期筛查和早期诊断标志物sCD40L试剂,单克隆抗体及其试剂盒。

背景技术

[0002] 肝细胞癌(hepatocellular carcinoma,HCC)是我国发病率以及死亡率最高的恶性肿瘤之一。资料显示,HCC在恶性肿瘤死亡中居第三位。我国每年新增HCC病人13.5万人,死亡约11万人,占全世界HCC死亡人数的45%。大多数的HCC在诊断时已是中晚期,此时癌细胞转移快,手术后复发率高,对常用的化学治疗药如5-Fu和阿霉素等敏感性差,目前尚难取得令人满意的治疗效果,患者预后较差。多数患者 HCC的发生经历了从慢性肝炎到肝硬化,最终发展为肝癌的病理演变历程。因此利用肝癌早期诊断标志物筛查早期发现肝癌,尤其在高危人群中发现早期肝癌,对于挽救患者生命,降低家庭和社会医疗成本均具有重要的价值。

[0003] 近年来肝癌诊断的血清标志物已有许多,其中最受关注的是美国NCI 的EDRN小组正推进三期临床实验的5个血清学标志物。他们是 AFP/AFP-L3,DCP,GP73,HGF和骨桥蛋白。其中AFP-L3,DCP, GP73,HGF主要分析他们的肝癌特异性岩藻糖化蛋白的水平。他们的前期研究显示在肝癌早期诊断中具有一定的价值。然而这些蛋白都是经过肿瘤细胞分泌或漏出,而且这些蛋白与肝细胞增殖关系密切,因此往往在肝硬化和肝癌横向队列比较时差异显著,但当针对危险人群动态跟踪筛查时,往往出现肝癌增高的患者在肝硬化阶段因为肝再生结节的存在就已经增高,因此至今不能确定用其作为肝癌预警指标。

[0004] CD40 (Bp50) 是与T细胞和B细胞功能有关的一种表面抗原,分子量为 45-50KD,基因定位于20q12-20q13.2,编码长277个氨基酸的跨膜蛋白,其胞外段、跨膜段和胞内段分别有193、22和62个氨基酸。CD40分子胞外段包含4个富含半胱氨酸的重复肽段,构成与其配体结合的区域。CD40分子的天然配体CD40L (CD154) 是属于肿瘤坏死因子超家族的II型跨膜糖蛋白,主要表达于活化的CD4+T细胞、CD8+T 细胞、B细胞、血小板和肥大细胞、DC、内皮细胞等。与其受体CD40 的组成性表达不同,CD40L的表达是瞬时的,并且受到精确调节。CD40和CD40L广泛的细胞表达谱提示二者的相互作用具有重要的生物学功能。CD40-CD40L在胸腺依赖的体液免疫应答(初次应答和再次应答)和记忆B细胞成熟过程中发挥重要作用。初始T细胞活化需要双信号刺激:通过T细胞抗原受体(T cell receptor,TCR)传递的抗原特异性信号(第一信号)和共刺激分子(如CD80/CD86,两者与T细胞表面的CD28作用)提供的第二信号。第一信号诱导T细胞表达CD40 L,这一作用使抗原提呈细胞上调表达表面共刺激分子(如 CD80/CD86),从而又能反过来扩大T细胞的活化效应。

[0005] 多数肝癌的发生与肝脏的长期慢性病理过程密不可分,往往经历从慢性肝炎肝硬化再到肝癌的病理过程,因此寻找新的肝癌(HCC)早期诊断、复发早期诊断和肝癌危险人群(肝硬化患者)肝癌早期筛查的检测标志物具有重要意义。本发明人发现,sCD40L可以用于肝癌筛查和早期诊断的标志物,为此进行了深入的研究。本发明人发现 sCD40L作为肝癌预

警标志物至少有两大大优势。第一,它是由血小板释放到血浆中的,而肝硬化和正常人群相比,血小板水平因脾功能亢进而显著下降,因此sCD40L的背景水平在肝硬化患者中较正常人群显著降低(图1),因此在由肝硬化到肝癌发生时会有更高的敏感性。第二,肝癌时,sCD40L从血小板释放是一个酶促反应过程,存在持续的级联放大作用,因此和AFP、GP73等这些肝癌分泌型血浆分子标志物相比,敏感性和特异性大大的增强,使肝硬化危险人群的肝癌有效筛查真的成为可能。为此,本发明人在研究结果的基础上设计了有关的诊断试剂及其检测试剂盒,具体地说本发明人发现的新型 sCD40L肝癌早期筛查和早期诊断标志物及其产品(基于辣根酶或碱性磷酸酶的化学发光检测体系和基于液相抗体分选磁珠的检测体系构成的两类检测技术体系)。本发明利用比现有血清和血浆肝癌分子诊断标志物具有更高敏感性的标志物sCD40L。它的临床应用将极大地改变肝癌诊断严重滞后的局面,具有重要的临床应用价值。

发明内容

[0006] 本发明目的在于我们发现了一种可用于肝癌早期筛查,肝癌复发早期诊断和肝癌常规诊断的一种血浆分子标志物,本发明还包括利用该标志物(sCD40L)进行(1)肝癌高危人群的临床和科研动态筛查;(2)肝癌患者临床诊断;(3)肝癌患者肝移植、肝癌微创治疗和肝癌切除术后的复发早期诊断。我们同时利用该标志物开发基于sCD40L的磁珠化学发光法和基于液相抗体分选磁珠的检测体系构成的两类诊断试剂盒用于上述诊断。

[0007] 基于以上目的,本发明提供一种可用于肝癌早期筛查,肝癌复发早期诊断和肝癌常规诊断的一种血浆分子标志物,所述标志物,命名为 sCD40L,其氨基酸一级结构见序列3。

[0008] 在获得本发明所述标志物及其应用之后,本发明进一步提供检测 sCD40L的方法,所述方法包括双抗体夹心酶免法和化学发光法。

[0009] 为使本发明检测sCD40L的方法适合工业化,本发明进一步提供检测 sCD40L的试剂盒,所述试剂盒中,含有用于检测sCD40L的试剂,包括但不限于双抗体夹心酶免法和化学发光法所用的试剂,特别包括 sCD40L单克隆抗体,或者包括使用sCD40L单克隆抗体制备的免疫微球。

[0010] 本发明进一步提供一种磁性免疫体外诊断试剂。所述诊断试剂含有一种表面偶联有sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,本发明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sCD40L抗原。本发明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。

[0011] 本发明的检测试剂盒,其包括的组份有含有sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球,已偶联sCD40L单克隆抗体的酶标记物

[0012] 以及任选的选自以下组分之一的组分:

[0013] 显色液;洗涤液;样品稀释液;阳性对照样品和阴性对照样品;终止液。

[0014] 优选的,本发明的检测试剂盒组成如下:

[0015] (1) 含有sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球

[0016] (2) 已偶联sCD40L多克隆抗体的酶标记物

[0017] (3) 显色液

[0018] (4) 洗涤液

[0019] (5) 样品稀释液

[0020] (6) 阳性对照样品和阴性对照样品

[0021] (7) 终止液

[0022] 作为序列表中序列3的sCD40L抗原,属于本发明人首次发现的肿瘤标志物,其作为一种蛋白分子,可以采用合成或基因重组等方法制备,为得到该肿瘤标志物,本发明设计了以下制备方法:

[0023] 以人的PBMC为模板,提取RNA,反转录为CDNA,设计引物,引物序列为上游引物:5'-3' atgcaaaaaggtgatcagaatcct,见序列表中序列1,下游引物:5'-3' gagtttgagtaagccaaaggac,见序列表中序列2。

[0024] 进行PCR扩增,扩增的PCR产物经纯化后,DNA连接酶的作用下进行连接,连接产物转化入感受态菌,挑选阳性克隆,提取质粒,双酶切鉴定后测序。将测序正确的克隆抽提质粒,并转入菌株,诱导表达,电泳监测目的蛋白的表达;表达的目的蛋白经纯化后,得到具有免疫原性的目的蛋白sCD40L。

[0025] 为了获得抗sCD40L抗原的单克隆抗体,本发明建立了以下方法

[0026] 1. 动物免疫

[0027] 初次免疫抗原1~50 μ g加福氏完全佐剂皮下多点注射(一般0.8~1ml,0.2ml/点)。3周后,第二次免疫剂量同上,加福氏不完全佐剂皮下注射。3周后,第三次免疫剂量同上,不加佐剂,腹腔内注射,5~7天后采血测其效价)。2~3周,加强免疫,剂量50~500 μ g为宜,腹腔内注射。3天后,取脾融合。

[0028] 2. 细胞融合

[0029] (1) 制备饲养细胞层:一般选用小鼠腹腔巨噬细胞。

[0030] 与免疫小鼠相同品系的小鼠,常用BALB/C小鼠,6~10周,拉颈处死,浸泡在75%酒精内,3~5min。用无菌剪刀剪开皮肤,暴露腹膜。用无菌注射器注入5~6ml预冷的培养液(严禁刺破肠管)。反复冲洗,吸出冲洗液,冲洗液放入10ml离心管,1200rpm/分离5~6min。用20%小牛血清(NCS)或胎牛血清(FCS)的培养液混悬,调整细胞数至 1×10^5 /ml,加入96孔板,100 μ l/孔,放入37 $^{\circ}$ C CO₂ 孵箱培养。

[0031] (2) 制备免疫脾细胞

[0032] 最后一次加强免疫3天后小鼠拉颈处死,无菌取脾脏,培养液洗一次,脾脏研碎,过不锈钢筛网,离心,细胞用培养液洗2次,计数取 10^8 脾淋巴细胞悬液备用。

[0033] (3) 制备骨髓瘤细胞

[0034] 取对数生长骨髓瘤细胞离心,用无血清培养液洗2次,计数,取得 1×10^7 细胞备用。

[0035] (4) 融合

[0036] ①将骨髓瘤细胞与脾细胞按1:5的比例混合在一起,在50ml离心管中用无血清不完全培养液洗1次,离心,1200rpm,8min;弃上清,用吸管吸净残留液体,以免影响聚乙二醇(PEG)浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略松动。

[0037] ②90s内加入37 $^{\circ}$ C预温的1ml 45%PEG(分子量1500)溶液,边加边轻微摇动。37 $^{\circ}$ C水浴作用90s。

[0038] ③加37 $^{\circ}$ C预温的不完全培养液以终止PEG作用,每隔2min分别加入1ml、2ml、3ml、

4ml、5ml和6ml。

[0039] ④离心,800rpm,6min。

[0040] ⑤弃上清,用含20%小牛血清HAT选择培养液重悬。

[0041] ⑥将上述细胞,加到已有饲养细胞层的96孔板内,每孔加 100 μ l。一般一个免疫脾脏可接种4块96孔板。

[0042] ⑦将培养板置37 $^{\circ}$ C、5%CO₂培养箱中培养。

[0043] 3. 选择杂交瘤细胞及抗体检测 (ELISA)

[0044] 0.25 μ g sCD40L抗原包被(包被液:0.05mol/L碳酸氢钠缓冲液,pH9.6)在微孔板上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用2%牛血清白蛋白和0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液封闭微孔板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗板后,200 μ l 样本(细胞培养上清或者腹水)加入微孔板中,37 $^{\circ}$ C孵育2小时;100 μ l羊抗鼠IgG过氧化物酶结合物(1:50 000稀释)加入微孔板中,7 $^{\circ}$ C孵育2小时;最后加入100 μ l底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺),室温孵育10-15分钟,2mol/L硫酸终止反应。应用酶标仪(Bio-Rad, Hercules, California, USA)读取光密度值判定结果。

[0045] 经过筛选,筛选出稳定分泌抗体的阳性杂交瘤细胞株(该细胞株已经保藏在中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心,编号为 CGMCC No.14724,保藏日期2017年9月28日,分类命名:sCD40L 单克隆抗体细胞株,保藏地址北京市朝阳区北辰西路1号院3号)。

[0046] 4. 杂交瘤克隆化(有限稀释法克隆)

[0047] (1)克隆前1天制备饲养细胞层(同细胞融合)。

[0048] (2)将要克隆的杂交瘤细胞从培养孔内轻轻吹干,计数。

[0049] (3)调整细胞为3~10个细胞/ml。

[0050] (4)取头天准备的饲养细胞层的细胞培养板,每孔加入稀释细胞100 μ l。孵育于37 $^{\circ}$ C、5%CO₂孵箱中。

[0051] (5)在第7天换液,以后每2~3天换液1次。

[0052] (6)8~9天可见细胞克隆形成,及时检测抗体活性。

[0053] (7)将阳性孔的细胞移至24孔板中扩大培养。

[0054] (8)每个克隆应尽快冻存。

[0055] 5. 腹水制备及单克隆抗体的鉴定

[0056] 单克隆细胞体外常规培养,收集 1×10^6 细胞注射到BALB/c小鼠腹腔中,诱导腹水,单克隆抗体的鉴定方法同ELISA。

[0057] 本发明进一步包括sCD40L单克隆抗体的超顺磁性纳米免疫微球的制备:

[0058] (1)取50-200 μ l超顺磁性纳米微球;

[0059] (2)对微球表面进行化学修饰;

[0060] (3)将双功能化学试剂共价偶联在磁性纳米微球表面;

[0061] (4)用洗涤液进行洗涤;

[0062] a.将超顺磁性纳米微球加入400-800 μ l洗涤液,并使之分散;

[0063] b.磁性分离,弃上清液;

[0064] (5)加入浓度为0.5~3mg/ml的sCD40L单克隆抗体溶液,恒温振荡反应;

[0065] (6)磁性分离,弃上清液;

[0066] (7) 用相同洗涤液进行洗涤；

[0067] a. 每次加入洗涤液400-800 μ l, 并使之分散；

[0068] b. 磁性分离, 弃上清液；

[0069] c. 重复以上洗涤步骤2-3次；

[0070] d. 加入0.5~2ml贮存液, 4 $^{\circ}$ C保存备用。

[0071] 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。所述的sCD40L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。

[0072] 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NaN₃或者0.01~0.2%的硫柳汞。所述防腐剂的浓度单位为重量(克)体积比(毫升)。

[0073] 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

[0074] sCD40L单克隆抗体的酶标记物的制备:

[0075] a) 以NaIO₄-乙二醇法进行HRP的氧化, 达到终浓度10mg/ml;

[0076] 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NaBH₄溶液终止反应, 再对PBS透析过夜。

[0077] c) 用饱和硫酸铵沉淀, 获得纯化的HRP酶标抗sCD40L多克隆抗体。

[0078] 本发明的发明思路基于下述二方面的考虑。第一, HCC目前在我国已占癌症死亡的第二位, 80%来自于肝硬化的患者, 因此是一个有着特殊危险人群的癌症, 发现特异的肝癌血清或血浆分子标志物用于该特殊人群的肝癌早起筛查一直是全世界相关医务工作者最关注的技术; 第二, 然而至今为止仍没有发现一个有效的可用于肝癌早起筛查的分子标志物, 美国国家肿瘤研究院正集中对5个在肝癌早期诊断具有潜在价值的血浆分子标志物进行三期临床实验;

[0079] 为了达成本发明上述目的, 我们对该标志物与现在全世界公认的临床用于肝癌血清学诊断的标志物AFP进行了对比, AFP的检测利用临床通用的罗氏AFP酶联化学发光检测法: (1) 利用横断面标本验证发现sCD40L是一个完全优于AFP的临床肝癌检测标志物。虽然至今为止, 已有AFP/AFP-L3, DCP, GP73, HGF和骨桥蛋白等标志物被用于肝癌的诊断, 但临床上普遍用的还是AFP, 但它的阳性率不足60%, 且往往只有中晚期才敏感, 因此发现新的标志物应非常重要。我们针对我们发现的sCD40L标志物在正常人群, 慢性肝炎, 肝硬化和肝癌四类横断面人群(各50例)进行了分析。结果见图(1A), 不仅HCC与正常人群, 慢性肝炎, 肝硬化之间有显著差异(P<0.01), 而且肝硬化患者的水平较正常人群显著降低(P<0.05)。而该人群的AFP水平虽然在少数HCC晚期(20%)显著增高, 但多数处于低水平, 因离散度大而没有显著差异(图1B)。以AFP为横坐标的ROC曲线结果显示(95%) (图1C)。

[0080] 利用肝癌患者肝移植、肝癌微创治疗和肝癌切除术前后及复发标本验证发现sCD40L是一个完全优于AFP的临床肝癌复发早期诊断的检测标志物。首先我们在10例肝癌射频微创治疗复发的患者中进行了早期复发诊断分析, 结果显示, 10例HCC患者有8例sCD40L在微创治疗前血浆中的含量处于高水平(图2A的第一点), 微创治疗后的第3天到第

7天就降到最低水平(图2A的第三和第四点)。非常有趣的是在第二次复发的早期(直径<3CM) sCD40L又迅速增高(图2A的第五点)。微创治疗后sCD40L的水平又迅速下降(图2A的第六和第七点)。而AFP在上述10例患者中只有4例的AFP在微创治疗前血浆中的含量处于高水平,也存在微创治疗后的下降,但在sCD40L增高的HCC 复发时间点都不能检测到AFP水平的增高(图2A),提示AFP在肝癌复发诊断的敏感性远低于sCD40L. 然后我们利用50例肝癌肝移植的患者的移植前后血浆sCD40L水平分析显示sCD40L水平在移植后5 到7天的血浆中的水平显著降低(图2B)。这进一步说明血浆sCD40L 与肝癌的存在密切相关,可用于肝癌肝移植、肝癌切除术后及肝癌微创治疗后肝癌复发或转移复发的早期诊断。

[0081] 利用肝硬化人群的动态筛查验证发现sCD40L是一个至今为止最有希望用于针对肝癌危险人群的临床肝癌早期筛查诊断的检测标志物。多数患者HCC的发生经历了从慢性肝炎到肝硬化,最终发展为肝癌的病理演变历程。因此利用肝癌早期诊断标志物筛查早期发现肝癌,尤其在高危人群中发现早期肝癌,对于挽救患者生命,降低家庭和社会医疗成本均具有重要的价值。我们针对135例肝硬化动态筛查队列的检测显示,对于同一个患者,sCD40L的水平在连续6个月以上间隔的两个时间点的检测结果显示一致性达到95%,(图3A),而11例在这一队列中发现的早期肝癌,肝癌确诊点的血浆sCD40L较上一个监测点高2到5倍(图3B),而这11例由肝硬化到肝癌的AFP动态检测结果显示,AFP在肝癌确诊点的血浆水平和上一个监测点之间没有显著差异。提示sCD40L可用于肝硬化到肝癌患者的早期预警筛查而 AFP却不能。

[0082] 本发明的有益效果:

[0083] 本发明发现了一个可以用于肝癌早期筛查、肝癌复发早期诊断和肝癌诊断的血浆分子标志物(sCD40L)。肝癌在中国占肿瘤死亡率的第二位,高死亡率的重要原因是无法早期诊断,因此sCD40L早期诊断对于挽救肝癌患者的生命非常重要。从绩效上考虑,挽救一个患者的生命价值超百万元,因此该发明具有极大的社会价值。

[0084] 我们针对该发现,开发了基于sCD40L新型肝癌筛查和早起诊断检测试剂盒,具体地说该专利对sCD40L在肝癌的诊断应用上进行保护,同时,我们开发出基于辣根酶或碱性磷酸酶的化学发光检测体系和基于液相抗体分选磁珠的检测体系构成的两类检测技术体系用于肝癌诊断和早期筛查。

[0085] 本发明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sCD40L单克隆抗体及一种表面偶联有sCD40L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sCD40L抗原的方法。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。

附图说明

[0086] 图1:sCD40L在肝癌中的水平显著高于正常对照、慢性肝炎和肝硬化组。(A)液相芯片发检测的血浆sCD40L结果;(B)酶联免疫化学发光法检测的血浆sCD40L结果;(C)酶联免疫化学发光法检测的血浆AFP结果;(D)肝硬化对原发性肝癌的ROC曲线结果显示95%CI 的特异性达0.831,敏感性达0.897(cutoff值为18.313ng/ml)

[0087] 图2:肝癌患者肝癌微创治疗前后及复发动态sCD40L检测结果。(A) 与肝癌发生相关的10例标本动态sCD40L结果;(B) 3例与肝癌发生非相关动态sCD40L结果;(C) 2例血浆sCD40L相差10倍的动态结果一致性比较。

[0088] 图3:sCD40L和AFP在15例从肝硬化到肝癌中的同一患者动态结果比较分析,(A) sCD40L在15例从肝硬化到肝癌中的同一患者动态结果;(B) AFP在15例从肝硬化到肝癌中的同一患者动态结果

具体实施方式

[0089] 以下通过实施例进一步说明本发明。

[0090] 实施例1

[0091] 两个单克隆抗体配对检测实施例。

[0092] 双抗体夹心法检测抗原,如果采用的两个抗体均为单克隆抗体,要求配对的两个单克隆抗体针对抗原的不同表位,并且这两个抗原表位之间的距离越远越好,以免形成竞争性抑制。

[0093] 绘制抗原饱和曲线

[0094] 0.25 μ g sCD40L抗原包被(包被液:0.05mol/L碳酸氢钠缓冲液, pH9.6)在微孔板上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用2%牛血清白蛋白和0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液封闭微孔板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗板后,将单克隆抗体进行系列稀释,滴度从1:10到1:107,加入微孔板中,37 $^{\circ}$ C孵育2小时;100 μ l羊抗鼠IgG过氧化物酶结合物(1:50 000稀释)加入微孔板中,7 $^{\circ}$ C孵育2小时;最后加入100 μ l底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺),室温孵育10-15分钟,2mol/L硫酸终止反应。应用酶标仪(Bio-Rad,Hercules,California,USA)读取光密度值判定结果。绘制不同单克隆抗体的抗原饱和曲线,当增加单克隆抗体滴度,光密度值不再明显增加时,提示包被的抗原已经达到饱和。

[0095] ELISA叠加实验

[0096] 0.25 μ g sCD40L抗原包被(包被液:0.05mol/L碳酸氢钠缓冲液, pH9.6)在微孔板上,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;用2%牛血清白蛋白和0.05% Tween20的磷酸盐缓冲液封闭微孔板,4 $^{\circ}$ C孵育过夜;洗板后,将随机配对的两个单克隆抗体等量同时加入微孔板中,每个单克隆抗体加入100 μ l,稀释滴度为抗原饱和时单克隆抗体的滴度,37 $^{\circ}$ C孵育2小时;100 μ l羊抗鼠IgG过氧化物酶结合物(1:50 000稀释)加入微孔板中,7 $^{\circ}$ C孵育2小时;最后加入100 μ l底物(3,3',5,5'-四甲基联苯胺),室温孵育10-15分钟,2mol/L硫酸终止反应。应用酶标仪(Bio-Rad,Hercules,California,USA)读取光密度值判定结果。按如下公式计算叠加指数(A.I.):

$$[0097] \quad A.I. = \left\{ \frac{2 A_{1+2}}{A_1 + A_2} - 1 \right\} \times 100\%$$

[0098] A₁,A₂和A₁₊₂分别是1号单克隆抗体、2号单克隆抗体、1号和2号单克隆抗体混合得到的光密度值。理论上讲,如果1号和2号单克隆抗体结合到同一抗原表位,那么A₁₊₂等于A₁和A₂的平均值,叠加指数(A.I.)将是0;如果1号和2号单克隆抗体结合到不同的抗原表

位,那么A1+2等于A1和A2的和,叠加指数(A.I.)将是 100%。

[0099] 实施例2

[0100] 1、灵敏度特异性验证方法及结果。(见图1)

[0101] (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,5空白对照孔1孔;

[0102] (2) 在待检样品试管中加入10~50 μ l样品稀释液和5~100 μ l 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 μ l;

[0103] (3) 充分混匀已加贮存液的含有sCD40L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 μ l该微球溶液,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0104] (4) 各试管加入5~50 μ l已偶联sCD40L单克隆抗体的酶标记物,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0105] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少2次:每次加入洗涤液400~800 μ l,并使之分散,磁性分离,弃上清液;

[0106] (6) 各管加入50~200 μ l 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;

[0107] (7) 各管加入50~200 μ l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。

[0108] 实施例3

[0109] 化学发光检测法,

[0110] 所述方法包括下述步骤:

[0111] (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;

[0112] (2) 在待检样品试管中加入10~50 μ l样品稀释液和5~100 μ l 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 μ l;

[0113] (3) 充分混匀已加贮存液的上述的含有sCD40L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 μ l该微球溶液,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0114] (4) 各管加入5~50 μ l已偶联上述的sCD40L单克隆抗体的酶标记物,混匀,4~40 $^{\circ}$ C反应0.5~2小时;

[0115] (5) 用相同洗涤液洗涤各管至少2次:每次加入洗涤液400~800 μ l,并使之分散;磁性分离,弃上清液;

[0116] (6) 各管加入50~200 μ l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);

[0117] (7) 用化学发光仪器检测各孔的信号值。

[0118] 上述检测sCD40L抗原的方法中,所述样品稀释液为0.01~0.2M的PBST,10PH=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。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。所述终止液为0.01~4M的H₂SO₄,或0.01~4M的HCl,或0.01~4M的柠檬酸。

[0119] 上述检测sCD40L抗原的方法中,所述超顺磁性纳米免疫微球上偶联的sCD40L单克隆抗体与酶标记物上偶联的sCD40L单克隆抗体识别不同的sCD40L抗原表位。

110	115	120
Pro Gly Ala Ser Val Phe Val Asn Val Thr Asp Pro Ser Gln Val		
125	130	135
Ser His Gly Thr Gly Phe Thr Ser Phe Gly Leu Leu Lys Leu		
140	145	149

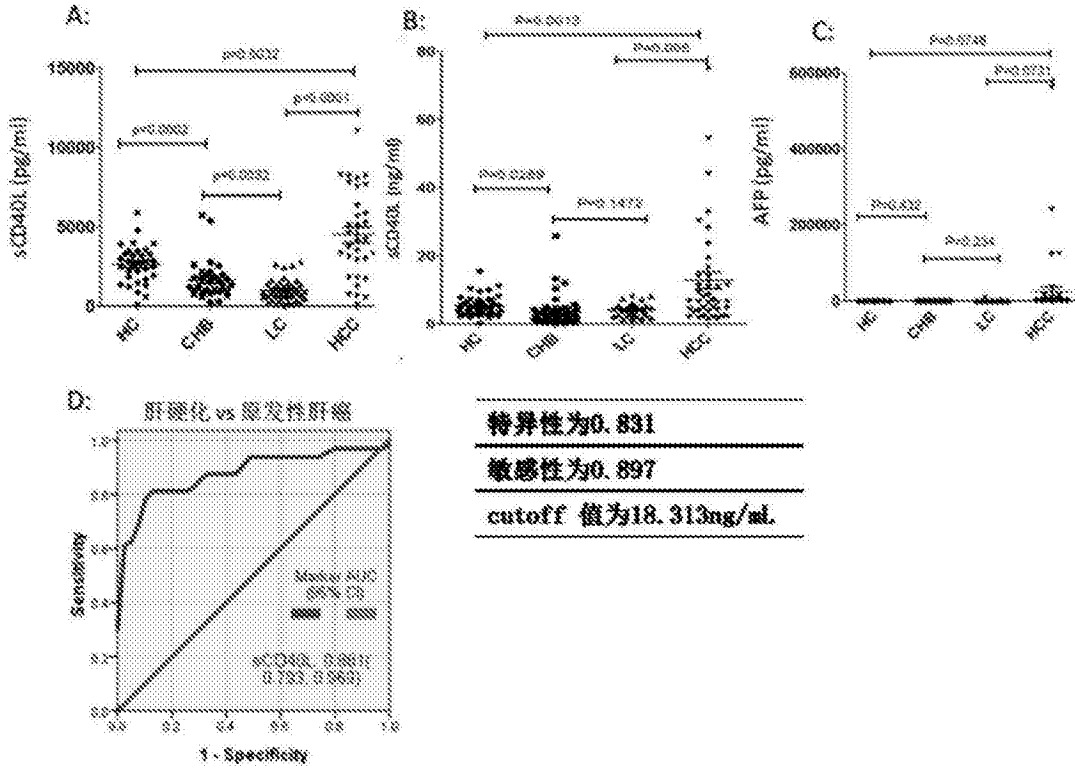


图1

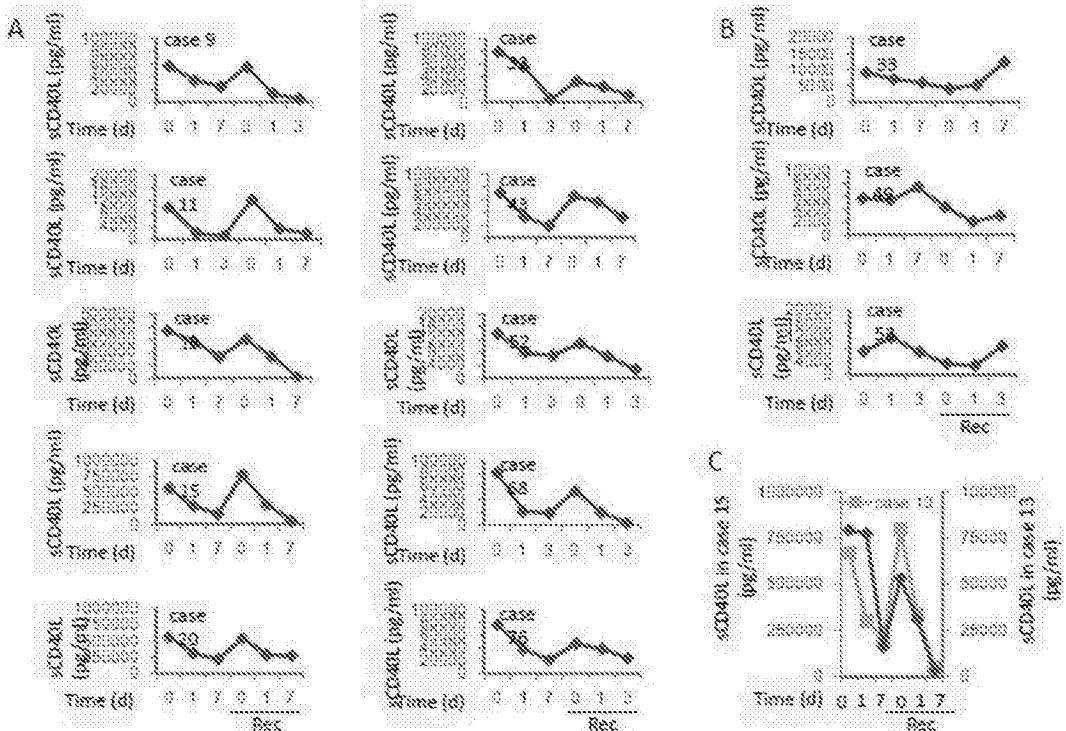


图2

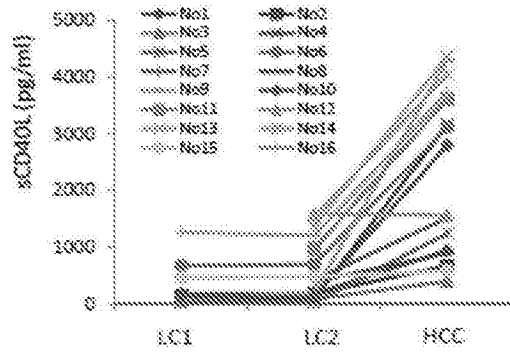


图3A

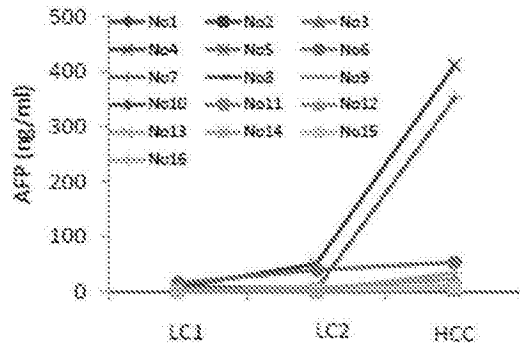


图3B