



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106589128 B

(45)授权公告日 2020.03.03

(21)申请号 201510682917.9

G01N 33/574(2006.01)

(22)申请日 2015.10.20

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

CN 101124240 A,2008.02.13,

申请公布号 CN 106589128 A

CN 101124240 A,2008.02.13,

(43)申请公布日 2017.04.26

CN 101633693 A,2010.01.27,

(73)专利权人 天津医科大学

CN 102445539 A,2012.05.09,

地址 300070 天津市和平区气象台路22号

宁珠 等.血清AFP、CEA、AFU、GGT-II联合检测诊断原发性肝癌的临床价值.《中国医药导报》.2013,第10卷(第2期),第73-75页.

(72)发明人 张宁 罗艺

审查员 任长辉

(74)专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
11021

代理人 吴小明

(51)Int.Cl.

C07K 16/40(2006.01)

C07K 16/18(2006.01)

G01N 33/577(2006.01)

权利要求书3页 说明书21页

序列表16页 附图23页

(54)发明名称

肝癌标志物单克隆抗体的制备及其应用

(57)摘要

本发明涉及针对人肝癌标志物的抗体或其片段(特别是单链抗体),用于制备它们的方法,包含它们的检测试剂和试剂盒,及其应用。

1. 测定或诊断用试剂盒或试剂,其特征在于包含针对HGF的抗体或其片段和分别针对选自AFP、GGT II、AFU和GPC3的标志物的抗体或其片段中的一种或多种,

所述抗体为单克隆抗体,其特征在于包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中

a) 对于针对AFP的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:21所示的CDR1区,如SEQ ID NO:22所示的CDR2区和如SEQ ID NO:23所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:24所示的CDR1区,如SEQ ID NO:25所示的CDR2区和如SEQ ID NO:26所示的CDR3区;

b) 对于针对AFU的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:27所示的CDR1区,如SEQ ID NO:28所示的CDR2区和如SEQ ID NO:29所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:30所示的CDR1区,如SEQ ID NO:31所示的CDR2区和如SEQ ID NO:32所示的CDR3区;

c) 对于针对GGT II的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:33所示的CDR1区,如SEQ ID NO:34所示的CDR2区和如SEQ ID NO:35所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:36所示的CDR1区,如SEQ ID NO:37所示的CDR2区和如SEQ ID NO:38所示的CDR3区;

d) 对于针对HGF的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:39所示的CDR1区,如SEQ ID NO:40所示的CDR2区和如SEQ ID NO:41所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:42所示的CDR1区,如SEQ ID NO:43所示的CDR2区和如SEQ ID NO:44所示的CDR3区;和

e) 对于针对GPC3的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:45所示的CDR1区,如SEQ ID NO:46所示的CDR2区和如SEQ ID NO:47所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:48所示的CDR1区,如SEQ ID NO:49所示的CDR2区和如SEQ ID NO:50所示的CDR3区,

所述片段为Fv, Fab, Fab', Fab'-SH或F(ab')₂。

2. 根据权利要求1所述的试剂盒或试剂,其包含针对HGF的抗体或其片段和分别针对选自AFP、GGT II、AFU和GPC3的标志物的抗体或其片段中的2、3或4种。

3. 根据权利要求1所述的试剂盒或试剂,其用于ELISA测定、Western Blotting测定、免疫组织化学测定或免疫荧光测定。

4. 根据权利要求3所述的试剂盒或试剂,其用于诊断肝癌。

5. 根据权利要求1所述的试剂盒或试剂,其特征在於:

a) 针对AFP的抗体包含如SEQ ID NO:1所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:2所示的重链可变结构域;

b) 针对AFU的抗体包含如SEQ ID NO:3所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:4所示的重链可变结构域;

c) 针对GGT II的抗体包含如SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:6所示的重链可变结构域;

d) 针对HGF的抗体包含如SEQ ID NO:7所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:8所示的重链可变结构域;或

e) 针对GPC3的抗体包含如SEQ ID NO:9所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:10所示

的重链可变结构域。

6. 根据权利要求1所述的试剂盒或试剂,其特征在于所述抗体是人IgG2亚类、人IgG1亚类或人IgM亚类单克隆抗体。

7. 针对HGF的抗体或其片段和分别针对选自AFP、GGT II、AFU和GPC3的标志物的抗体或其片段中的一种或多种的组合在制备测定或诊断用试剂盒或试剂中的应用,所述抗体为单克隆抗体,其特征在于包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中

a) 对于针对AFP的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:21所示的CDR1区,如SEQ ID NO:22所示的CDR2区和如SEQ ID NO:23所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:24所示的CDR1区,如SEQ ID NO:25所示的CDR2区和如SEQ ID NO:26所示的CDR3区;

b) 对于针对AFU的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:27所示的CDR1区,如SEQ ID NO:28所示的CDR2区和如SEQ ID NO:29所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:30所示的CDR1区,如SEQ ID NO:31所示的CDR2区和如SEQ ID NO:32所示的CDR3区;

c) 对于针对GGT II的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:33所示的CDR1区,如SEQ ID NO:34所示的CDR2区和如SEQ ID NO:35所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:36所示的CDR1区,如SEQ ID NO:37所示的CDR2区和如SEQ ID NO:38所示的CDR3区;

d) 对于针对HGF的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:39所示的CDR1区,如SEQ ID NO:40所示的CDR2区和如SEQ ID NO:41所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:42所示的CDR1区,如SEQ ID NO:43所示的CDR2区和如SEQ ID NO:44所示的CDR3区;和

e) 对于针对GPC3的抗体,所述轻链可变结构域包含如SEQ ID NO:45所示的CDR1区,如SEQ ID NO:46所示的CDR2区和如SEQ ID NO:47所示的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含如SEQ ID NO:48所示的CDR1区,如SEQ ID NO:49所示的CDR2区和如SEQ ID NO:50所示的CDR3区,

所述片段为Fv, Fab, Fab', Fab'-SH或F(ab')₂。

8. 根据权利要求7所述的应用,其中所述试剂盒或试剂包含针对HGF的抗体或其片段和分别针对选自AFP、GGT II、AFU和GPC3的标志物的抗体或其片段中的2、3或4种。

9. 根据权利要求7所述的应用,其中所述试剂盒或试剂用于ELISA测定、Western Blotting测定、免疫组织化学测定或免疫荧光测定。

10. 根据权利要求9所述的应用,其中所述试剂盒或试剂用于诊断肝癌。

11. 根据权利要求7所述的应用,其中:

a) 针对AFP的抗体包含如SEQ ID NO:1所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:2所示的重链可变结构域;

b) 针对AFU的抗体包含如SEQ ID NO:3所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:4所示的重链可变结构域;

c) 针对GGT II的抗体包含如SEQ ID NO:5所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:6所示的重链可变结构域;

d) 针对HGF的抗体包含如SEQ ID NO:7所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:8所示的重链可变结构域;或

e) 针对GPC3的抗体包含如SEQ ID NO:9所示的轻链可变结构域和如SEQ ID NO:10所示的重链可变结构域。

12. 根据权利要求7所述的应用,其特征在於所述抗体是人IgG2亚类、人IgG1亚类或人IgM亚类单克隆抗体。

肝癌标志物单克隆抗体的制备及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及针对人肝癌标志物的抗体或其片段(特别是单链抗体),用于制备它们的方法,包含它们的检测试剂和试剂盒,及其应用。

背景技术

[0002] 原发性肝癌(PLC,简称肝癌)是临床上最常见的恶性肿瘤之一,起病隐匿,侵袭生长迅速,治疗后易复发,预后极差,被称为“癌中之王”。全世界半数左右的肝癌患者集中在中国,每年我国约有11万人死于肝癌,居恶性肿瘤死亡率的第二位。目前,手术切除及肝移植是肝癌最有效的治疗方法,但绝大多数肝癌患者就诊时已到中晚期,无法手术,手术切除率仅为10-30%。对于不能手术的病例,传统的放、化疗效果不佳,患者生存期一般不超过半年。由此可见肝癌早期诊断至关重要,是临床诊疗和预后的关键。

[0003] 早期肝癌检出率低的现状反映出目前肝癌的诊断方法还有很大局限性。当前肝癌的诊断主要依靠血清学检查和影像学诊断。血清学检查主要检测血清中的肿瘤标志物,目前主要是依靠AFP的检测,但AFP在小肝癌中的敏感度仅为40%左右。由此可见,单独使用一种肿瘤标志物无法准确诊断肿瘤的发生和发展,联合检测多种肿瘤标志物才能提高检出的准确率,避免或减少漏诊和假阳性。应用新的检测技术、选择更有诊断价值的标志物组合,提高现有肿瘤标志物检测的灵敏度和特异性对肝癌早期诊断极为重要。目前,常用的肝癌标志物主要包括:甲胎蛋白(AFP)、谷氨酰转移酶同工酶II(GGT II)、 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)、肝细胞生长因子(HGF)、硫酸肝素蛋白多糖3(GPC3)、癌胚抗原(CEA)等。

[0004] 单克隆抗体能识别各种生物活性物质如蛋白、多糖、脂蛋白、神经肽、核酸等的单一抗原决定簇并与其特异性结合,又由于单克隆抗体的均质性极易大量生产,使得单克隆抗体在生命科学研究领域中得到极为广泛的应用。单链抗体(scFv)是抗体分子中保留抗原结合部分的最小功能片段,分子量约为完整抗体的1/6,是用基因工程方法将抗体重链和轻链可变区通过一段连接肽连接而成的重组蛋白。单链抗体优越性在于可通过包含体大量表达,尤其易于构建抗体融合蛋白,具有分子小、免疫原性低、无Fc端、不易与具有Fc受体的靶细胞结合、对肿瘤组织的穿透力强等特点。利用单克隆抗体和单链抗体,用于早期肝癌的检测,具有无可比拟的优势。

发明内容

[0005] 本发明包括特异性结合于人肝癌标志物的抗体或其片段,所述人肝癌标志物选自以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、谷氨酰转移酶同工酶II(GGT II)、 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)、肝细胞生长因子(HGF)和硫酸肝素蛋白多糖3(GPC3)。

[0006] 优选所述抗体为单克隆抗体,其特征在于包含轻链可变结构域和重链可变结构域,其中

[0007] a) 对于针对AFP的抗体,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:21的CDR1区,SEQ ID NO:22的CDR2区和SEQ ID NO:23的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:24的

CDR1区,SEQ ID NO:25的CDR2区和SEQ ID NO:26的CDR3区;

[0008] b) 对于针对AFU的抗体,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:27的CDR1区,SEQ ID NO:28的CDR2区和SEQ ID NO:29的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:30的CDR1区,SEQ ID NO:31的CDR2区和SEQ ID NO:32的CDR3区;

[0009] c) 对于针对GGT II的抗体,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:33的CDR1区,SEQ ID NO:34的CDR2区和SEQ ID NO:35的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:36的CDR1区,SEQ ID NO:37的CDR2区和SEQ ID NO:38的CDR3区;

[0010] d) 对于针对HGF的抗体,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:39的CDR1区,SEQ ID NO:40的CDR2区和SEQ ID NO:41的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:42的CDR1区,SEQ ID NO:43的CDR2区和SEQ ID NO:44的CDR3区;和

[0011] e) 对于针对GPC3的抗体,所述轻链可变结构域包含SEQ ID NO:45的CDR1区,SEQ ID NO:46的CDR2区和SEQ ID NO:47的CDR3区,并且所述重链可变结构域包含SEQ ID NO:48的CDR1区,SEQ ID NO:49的CDR2区和SEQ ID NO:50的CDR3区。

[0012] 优选地,所述抗体或其片段其特征在于包含:

[0013] a) SEQ ID NO:1的轻链可变结构域和SEQ ID NO:2的重链可变结构域;

[0014] b) SEQ ID NO:3的轻链可变结构域和SEQ ID NO:4的重链可变结构域;

[0015] c) SEQ ID NO:5的轻链可变结构域和SEQ ID NO:6的重链可变结构域;

[0016] d) SEQ ID NO:7的轻链可变结构域和SEQ ID NO:8的重链可变结构域;或

[0017] e) SEQ ID NO:9的轻链可变结构域和SEQ ID NO:10的重链可变结构域。

[0018] 优选地,所述抗体或其片段其特征在于所述抗体是人IgG2亚类、人IgG1亚类或人IgM亚类的。

[0019] 优选地,所述片段是单链抗体(scFv)。

[0020] 本发明的另一个实施方案是包含本发明所述的抗体或其片段的测定或诊断用试剂盒或试剂。

[0021] 优选地,所述试剂盒或试剂用于ELISA测定、Western Blotting测定、免疫组织化学测定或免疫荧光测定,特别是用于诊断肝癌。

[0022] 本发明的另一个实施方案是本发明所述的抗体或其片段在制备测定或诊断用试剂盒或试剂中的应用,优选所述试剂盒或试剂用于ELISA测定、Western Blotting测定、免疫组织化学测定或免疫荧光测定,特别是用于诊断肝癌。

[0023] 本发明的另一个实施方案是编码本发明所述的抗体或其片段的核酸。

[0024] 本发明的另一个实施方案是包含本发明所述的核酸的表达载体,优选所述载体用于在原核宿主细胞或真核宿主细胞中表达特异性结合于人肝癌标志物的抗体或其片段,所述人肝癌标志物选自由以下组成的组:甲胎蛋白(AFP)、谷氨酰转移酶同工酶II(GGT II)、 α -L-岩藻糖苷酶(AFU)、肝细胞生长因子(HGF)和硫酸肝素蛋白多糖3(GPC3)。

[0025] 本发明的另一个实施方案是包含本发明所述的载体的原核宿主细胞或真核宿主细胞。

[0026] 本发明还包括用于产生根据本发明所述的重组人或人源化的抗体的方法,其特征在于在原核或真核宿主细胞中表达根据本发明所述的核酸,并且从所述细胞或细胞培养上清液中回收所述抗体。本发明还包括可通过所述重组方法获得的抗体。

[0027] 根据本发明所述的抗体或其片段特别用于ELISA测定、Western Blotting测定、免疫组织化学测定或免疫荧光测定,特别是用于诊断肝癌。

[0028] 发明详述

[0029] 本发明公开了针对五种肝癌标志物的单克隆抗体和单链抗体,及其制备方法和科研医疗用途,属于细胞工程技术领域。它们以市售AFP和本实验室制备的HGF、AFU、GGT II、GPC3融合蛋白为抗原,免疫Balb/c小鼠得到分泌抗体的B细胞,与骨髓瘤细胞融合后筛选具有分泌单克隆抗体的融合细胞;所制备单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting、免疫组织化学、免疫荧光等对相应抗原的检测;此外,本发明还利用基因工程方法分别制备了只含有每种抗体重链可变区和轻链可变区的单链抗体(ScFv),所构建的单链抗体具有分子小、免疫原性低、无Fc端、对肿瘤组织的穿透力强等特点。将这些抗体联用,有望开发出应用于肝癌患者早期血清学诊断的有效试剂盒。

[0030] 具体地,本发明提供以下各项:

[0031] 1、五种单克隆抗体,HGF、AFP、AFU、GGT II、GPC3单克隆抗体,其特征在于它们是以市售AFP和自行制备的HGF、AFU、GGT II、GPC3融合蛋白为抗原,免疫Balb/c小鼠得到分泌抗体的B细胞,与骨髓瘤细胞融合后筛选具有分泌单克隆抗体的融合细胞,注射到小鼠腹腔得到含有抗体的腹水,纯化后即得到单克隆抗体,HGF抗体为IgG2b和IgG2a,AFP抗体为IgG2a,AFU抗体为IgM,GPC3抗体为IgG2b,GGT II抗体为IgG2b和IgG1。

[0032] 2、根据以上1所述的单克隆抗体,其特征在于其制备方法包括的步骤:

[0033] 1)用HGF、AFP、AFU、GGT II、GPC3抗原蛋白分别免疫Balb/c小鼠,ELISA法测效价后,取小鼠脾脏从而得到能分泌相应抗体的B细胞;

[0034] 2)用细胞融合技术将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞系SP2/0融合,利用无限稀释法、有限稀释法结合ELISA法筛选得到具有分泌单克隆抗体功能的杂交瘤细胞;

[0035] 3)将杂交瘤细胞注射入提前注射过pristine的Balb/c小鼠腹腔内,得到小鼠腹水,经盐析法和透析袋透析后,应用HiTrap Protein G HP柱纯化单克隆抗体;

[0036] 4)利用AKTA蛋白分离纯化仪洗脱结合好的纯化柱,得到单克隆抗体。

[0037] 3、根据以上1所述的单克隆抗体,其特征在于所制备的HGF单克隆抗体能很好应用于酶联免疫吸附法(ELISA)和Western Blotting对HGF的检测;所制备的AFP单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting和免疫组织化学(IHC)对AFP的检测;所制备的AFU单克隆抗体能够很好地应用于Western Blotting对AFU的检测;所制备的GGT II单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting和免疫荧光(IF)对GGT II的检测;所制备的GPC3单克隆抗体能很好地应用于ELISA、Western Blotting和IF对GPC3的检测。

[0038] 4、根据以上3所述的单克隆抗体应用,其特征在于其包括的步骤:

[0039] 1)ELISA法:在酶标板上包被所制备的单克隆抗体,检测HCC患者血清和正常人血清,孵育羊抗鼠二抗后OPD显色,检测吸光度;

[0040] 2)Western Blotting法:将不同肝癌细胞蛋白(HepG2、Hep3b、7721、7702等)上样电泳转膜后,孵育所制备的单克隆抗体作为一抗,孵育二抗后ECL显色,暗室曝光;

[0041] 3)免疫组织化学法(IHC):使用肝癌组织石蜡切片,经脱蜡、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶后,孵育所制备的单克隆抗体作为一抗,孵育二抗后DAB显色,经复染、脱水步骤后封片拍照;

[0042] 4) 免疫荧光法 (IF): 将肝癌细胞HepG2铺种于放有盖玻片的十二孔板, 经固定及打孔后, 孵育所制备的单克隆抗体作为一抗, 孵育二抗及DAPI染核后封片拍照。

[0043] 5、五种单链抗体, 其特征在于它们分别根据已制备的HGF、AFP、AFU、GGT II 和GPC3单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区序列, 经过Overlap PCR、质粒构建及蛋白表达纯化等步骤制备而成的, 具有分子小、免疫原性低、无Fc端、对肿瘤组织的穿透力强等特点。

[0044] 6、根据以上5所述的单链抗体, 其特征在于各自的碱基序列, 详见专利说明书。

[0045] 7、根据以上5所述的单链抗体, 其特征在于其制备方法所包括的步骤:

[0046] 1) 提取杂交瘤细胞的RNA, 经逆转录后PCR扩增重链可变区V_H、轻链可变区V_L片段, 与载体连接后转化入感受态DH5 α , 挑选V_H和V_L阳性克隆。

[0047] 2) 用PCR法分别扩增出相应单克隆抗体的V_H和V_L, 之后用Overlap PCR法连接V_H、V_L片段。

[0048] 3) 用重组技术构建Payz-HGF (AFP、AFU、GGT II、GPC3) ScFv质粒, 在大肠杆菌16C9中大量表达, 应用Hi trapFF亲和层析柱纯化单链抗体。

[0049] 根据具体地, 本发明提供了针对不同肝癌标志物抗原的五类抗体, 分别为AFP单克隆抗体及单链抗体, AFU单克隆抗体及单链抗体, GGT II 单克隆抗体及单链抗体, HGF单克隆抗体及单链抗体, GPC3单克隆抗体及单链抗体。

[0050] 本发明所述的五种单克隆抗体的抗原AFP为市售, 纯度大于95%以上, HGF、AFU、GGT II 和GPC3抗原为本实验室制备, 在大肠杆菌中表达, 为原核表达的融合蛋白。

[0051] 本发明所述的五种单克隆抗体的制备所包括的步骤为:

[0052] 1) 用HGF、AFP、AFU、GGT II、GPC3抗原蛋白分别免疫Balb/c小鼠, ELISA法测效价后, 取小鼠脾脏从而得到能分泌相应抗体的B细胞;

[0053] 2) 用细胞融合技术将小鼠脾细胞与骨髓瘤细胞系SP2/0融合, 利用无限稀释法、有限稀释法结合ELISA法筛选得到具有分泌单克隆抗体功能的杂交瘤细胞;

[0054] 3) 将杂交瘤细胞注射入提前注射过pristine的Balb/c小鼠腹腔内, 得到小鼠腹水, 经盐析法和透析袋透析后, 应用HiTrap Protein G HP柱纯化单克隆抗体;

[0055] 4) 利用AKTA蛋白分离纯化仪洗脱结合好的纯化柱, 得到单克隆抗体。

[0056] 本发明所制备的单克隆抗体应用的步骤为:

[0057] 1) ELISA法: 在酶标板上包被所制备的单克隆抗体, 检测HCC患者血清和正常人血清, 孵育生物素标记单克隆抗体和HRP标记亲和素后OPD显色, 检测吸光度;

[0058] 2) Western Blotting法: 将不同肝癌细胞蛋白 (HepG2、Hep3b、7721、7702等) 上样电泳转膜后, 孵育所制备的单克隆抗体作为一抗, 孵育二抗后ECL显色, 暗室曝光;

[0059] 3) 免疫组织化学法 (IHC): 使用肝癌组织石蜡切片, 经脱蜡、抗原修复、灭活内源性过氧化物酶后, 孵育所制备的单克隆抗体作为一抗, 孵育二抗后DAB显色, 经复染、脱水步骤后封片拍照;

[0060] 4) 免疫荧光法 (IF): 将肝癌细胞HepG2铺种于放有盖玻片的十二孔板, 经固定及打孔后, 孵育所制备的单克隆抗体作为一抗, 孵育二抗及DAPI染核后封片拍照;

[0061] 本发明筛选出的5种抗体稳定性非常好, 杂交瘤细胞株经过多次鉴定都保持了强分泌抗体的特性。抗体制备过程中采用镜下直接吸取细胞株的方法, 大大提高了得到单克隆株的概率, 有效缩短了分选的时间。本发明所采用的抗原纯度高, 免疫原性强, 从源头上

保证了所制备抗体的质量。

[0062] 本发明所制备的HGF单克隆抗体能很好应用于ELISA和Western Blotting对HGF的检测;所制备的AFP单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting和IHC对AFP的检测;所制备的AFU单克隆抗体能够很好地应用于ELISA和Western Blotting对AFU的检测;所制备的GGT II单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting和IF对GGT II的检测;所制备的GPC3单克隆抗体能很好地应用于ELISA、Western Blotting和IF对GPC3的检测。

[0063] 单链抗体(scFv)是抗体分子中保留抗原结合部分的最小功能片段,分子量约为完整抗体的1/6,是用基因工程方法将抗体重链和轻链可变区通过一段连接肽连接而成的重组蛋白,具有分子小、免疫原性低、无Fc端、对肿瘤组织的穿透力强等特点。为了更好地将肝癌标志物抗体应用于肝癌检测,本发明分别根据已制备的HGF、AFP、AFU、GGT II和GPC3单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区序列,制备了相应的单链抗体。

[0064] 本发明所述的五种单链抗体的制备所包括的步骤为:

[0065] 1) 提取杂交瘤细胞的RNA,经逆转录后PCR扩增重链可变区 V_H 、轻链可变区 V_L 片段,与载体连接后转化入DH5 α ,挑选 V_H 和 V_L 阳性克隆。

[0066] 2) 用PCR法分别扩增出相应单抗的 V_H 和 V_L ,之后用Overlap PCR法连接 V_H 、 V_L 片段。

[0067] 2) 用重组技术构建Payz-HGF (AFP、AFU、GGT II、GPC3) ScFv质粒,在大肠杆菌16C9中大量表达,应用HitrapFF亲和层析柱纯化单链抗体。

[0068] 定义

[0069] 术语“抗体”涵盖抗体结构的多种形式,包括但不限于完整的抗体和抗体片段。根据本发明所述的抗体优选地是人源化的抗体、嵌合抗体或其它遗传改造的抗体,只要根据本发明的特征性质仍旧保留。

[0070] 抗体的“类别”是指其重链具有的恒定结构域或恒定区的类型。有五个主要类别的抗体:IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,并且这些中的一些可以进一步被划分为亚类(同种型),例如,IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁和IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为 α , δ , ϵ , γ 和 μ 。

[0071] “抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的部分,所述部分结合完整抗体结合的抗原。抗体片段的实例包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0072] 术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”用于本文中时,指单一氨基酸组成的抗体分子制剂。

[0073] “可变结构域”(轻链(V_L)的可变结构域,重链(V_H)的可变结构域)用于本文中时,表示直接参与抗体与抗原结合的每对轻链和重链结构域。可变轻链和重链的结构域具有相同的一般结构且每个结构域包括4个构架(FR)区,所述构架区的序列普遍保守,其通过3个“高变区”(或互补决定区,CDRs)相连接。构架区采用 β -折叠构象且CDR可以形成连接 β -折叠结构的环。每条链中的CDR通过构架区以其三维结构保持并与来自另一条链的CDR一起形成抗原结合位点。抗体重链和轻链CDR3区在按照本发明的抗体的结合特异性/亲和力方面发挥特别重要的作用并因此提供本发明的另一个目的。

[0074] 用于本文时,术语“抗体的抗原结合部分”指负责抗原结合的抗体的氨基酸残基。抗体的抗原结合部分包括来自“互补决定区”或“CDRs”的氨基酸残基。“构架”或“FR”区是除

本文中定义的高变区残基之外的那些可变结构域区域。因此,抗体的轻链和重链可变结构域从N端到C端包括结构域FR1,CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。特别地,重链的CDR3是最有助于抗原结合的区域并且限定抗体的性质。按照Kabat,E.A.,等,免疫目的的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,公众健康服务,国家健康研究所(Public Health Service,National Institutes of Health),Bethesda,MD.(1991))的标准定义确定CDR和FR区域,和/或来自“高变环”的那些残基。

[0075] 术语“核酸”或“核酸分子”,用于本文时,意欲包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链的,但是优选是双链DNA。

[0076] 术语“氨基酸”在本申请中使用指天然存在的羧基 α 氨基酸的组,其包括丙氨酸(三字母编码:ala,一字母编码:A),精氨酸(arg,R),天冬酰胺(asn,N),天冬氨酸(asp,D),半胱氨酸(cys,C),谷氨酰胺(gln,Q),谷氨酸(glu,E),甘氨酸(gly,G),组氨酸(his,H),异亮氨酸(ile,I),亮氨酸(leu,L),赖氨酸(lys,K),甲硫氨酸(met,M),苯丙氨酸(phe,F),脯氨酸(pro,P),丝氨酸(ser,S),苏氨酸(thr,T),色氨酸(trp,W),酪氨酸(try,Y),和缬氨酸(val,V)。

[0077] 用于本文中时,表述“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可交替使用,且全部这些名称都包括子代。因此,词语“转化体”和“转化的细胞”包括原代受试细胞和由其来源的培养物,而不考虑转移的次数。还理解所有的子代的DNA含量可能不精确一致,这归因于有意或无意的突变。包括在最初转化的细胞中筛选的具有相同功能或生物学活性的变异子代。

[0078] 根据本发明所述的抗体可以由重组方式产生。因此,本发明的一个方面是编码根据本发明所述的抗体的核酸,并且另一个方面是包含编码根据本发明抗体的所述核酸的细胞。用于重组生产的方法是现有技术中广泛已知的并且包含在原核细胞和真核细胞中的蛋白表达,以及随后的抗体分离和通常纯化为药用纯度。对于将前述抗体在宿主细胞中的表达,将编码各个修饰的轻链和重链的核酸通过标准方法插入表达载体中。在适合的原核或真核宿主细胞如CHO细胞,NS0细胞,SP2/0细胞,HEK293细胞,COS细胞,PER.C6细胞,酵母,或大肠杆菌细胞中进行表达,并且将所述抗体从细胞(上清液或裂解后的细胞)中回收。用于重组生产抗体的一般方法是现有技术中公知的,并且例如在Makrides,S.C.,Protein Expr.Purif.17(1999)183-202;Geisse,S.,等,Protein Expr.Purif.8(1996)271-282;Kaufman,R.J.,分子生物技术(Mol.Biotechnol.)16(2000)151-161;Werner,R.G.,J Drug Res(药物研究杂志).48(1998)870-880的综述文章中描述。

[0079] 根据本发明所述的抗体适当地从培养基中通过常规免疫球蛋白纯化方法分离,所述纯化方法如,例如蛋白A-琼脂糖,羟基磷灰石层析法,凝胶电泳,透析或亲和层析法。编码所述单克隆抗体的DNA和RNA容易地使用常规方法进行分离和测序。杂交瘤细胞可以充当所述DNA和RNA的来源。一旦被分离,可以将DNA插入表达载体中,所述表达载体接着被转染到不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞如HEK 293细胞,CHO细胞,或骨髓瘤细胞中,从而在宿主细胞中获得重组单克隆抗体的合成。

[0080] 提供下列实施例,序列列表和附图来辅助理解本发明,其真实范围在后附的权利要求中提出。需要理解可以在不背离本发明实质的情况下对本发明进行改动。

[0081] 氨基酸和核苷酸序列描述

[0082] SEQ ID NO:1抗AFP单克隆抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列

- [0083] SEQ ID NO:2抗AFP单克隆抗体的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0084] SEQ ID NO:3抗AFU单克隆抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列
- [0085] SEQ ID NO:4抗AFU单克隆抗体的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0086] SEQ ID NO:5抗GGT II单克隆抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列
- [0087] SEQ ID NO:6抗GGT II单克隆抗体的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0088] SEQ ID NO:7抗HGF单克隆抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列
- [0089] SEQ ID NO:8抗HGF单克隆抗体的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0090] SEQ ID NO:9抗GPC3单克隆抗体的轻链可变结构域的氨基酸序列
- [0091] SEQ ID NO:10抗GPC3单克隆抗体的重链可变结构域的氨基酸序列
- [0092] SEQ ID NO:11编码抗AFP单克隆抗体的轻链可变结构域的核苷酸序列
- [0093] SEQ ID NO:12编码抗AFP单克隆抗体的重链可变结构域的核苷酸序列
- [0094] SEQ ID NO:13编码抗AFU单克隆抗体的轻链可变结构域的核苷酸序列
- [0095] SEQ ID NO:14编码抗AFU单克隆抗体的重链可变结构域的核苷酸序列
- [0096] SEQ ID NO:15编码抗GGT II单克隆抗体的轻链可变结构域的核苷酸序列
- [0097] SEQ ID NO:16编码抗GGT II单克隆抗体的重链可变结构域的核苷酸序列
- [0098] SEQ ID NO:17编码抗HGF单克隆抗体的轻链可变结构域的核苷酸序列
- [0099] SEQ ID NO:18编码抗HGF单克隆抗体的重链可变结构域的核苷酸序列
- [0100] SEQ ID NO:19编码抗GPC3单克隆抗体的轻链可变结构域的核苷酸序列
- [0101] SEQ ID NO:20编码抗GPC3单克隆抗体的重链可变结构域的核苷酸序列
- [0102] SEQ ID NO:21抗AFP单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1序列
- [0103] SEQ ID NO:22抗AFP单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR2序列
- [0104] SEQ ID NO:23抗AFP单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR3序列
- [0105] SEQ ID NO:24抗AFP单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1序列
- [0106] SEQ ID NO:25抗AFP单克隆抗体的重链可变结构域的CDR2序列
- [0107] SEQ ID NO:26抗AFP单克隆抗体的重链可变结构域的CDR3序列
- [0108] SEQ ID NO:27抗AFU单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1序列
- [0109] SEQ ID NO:28抗AFU单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR2序列
- [0110] SEQ ID NO:29抗AFU单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR3序列
- [0111] SEQ ID NO:30抗AFU单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1序列
- [0112] SEQ ID NO:31抗AFU单克隆抗体的重链可变结构域的CDR2序列
- [0113] SEQ ID NO:32抗AFU单克隆抗体的重链可变结构域的CDR3序列
- [0114] SEQ ID NO:33抗GGT II单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1序列
- [0115] SEQ ID NO:34抗GGT II单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR2序列
- [0116] SEQ ID NO:35抗GGT II单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR3序列
- [0117] SEQ ID NO:36抗GGT II单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1序列
- [0118] SEQ ID NO:37抗GGT II单克隆抗体的重链可变结构域的CDR2序列
- [0119] SEQ ID NO:38抗GGT II单克隆抗体的重链可变结构域的CDR3序列
- [0120] SEQ ID NO:39抗HGF单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1序列
- [0121] SEQ ID NO:40抗HGF单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR2序列

- [0122] SEQ ID NO:41抗HGF单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR3序列
- [0123] SEQ ID NO:42抗HGF单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1序列
- [0124] SEQ ID NO:43抗HGF单克隆抗体的重链可变结构域的CDR2序列
- [0125] SEQ ID NO:44抗HGF单克隆抗体的重链可变结构域的CDR3序列
- [0126] SEQ ID NO:45抗GPC3单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR1序列
- [0127] SEQ ID NO:46抗GPC3单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR2序列
- [0128] SEQ ID NO:47抗GPC3单克隆抗体的轻链可变结构域的CDR3序列
- [0129] SEQ ID NO:48抗GPC3单克隆抗体的重链可变结构域的CDR1序列
- [0130] SEQ ID NO:49抗GPC3单克隆抗体的重链可变结构域的CDR2序列
- [0131] SEQ ID NO:50抗GPC3单克隆抗体的重链可变结构域的CDR3序列

附图说明

- [0132] 图1. 实施例3中HGF单克隆抗体纯化图谱;
- [0133] 图2. 实施例3中AFP单克隆抗体纯化图谱;
- [0134] 图3. 实施例3中GGT II单克隆抗体纯化图谱;
- [0135] 图4. 实施例7中HGF H1及H2单克隆抗体 (H1为IgG2a类型, H2为IgG2b类型, 对第一种进行了测序) 对不同细胞系中HGF表达的检测;
- [0136] 图5. 实施例7中AFP单克隆抗体对不同细胞系中AFP表达的检测;
- [0137] 图6. 实施例7中GGT II单克隆抗体对不同细胞系中GGT II表达的检测;
- [0138] 图7. 实施例7中GPC3单克隆抗体对不同细胞系中GPC3表达的检测;
- [0139] 图8. 实施例6中ELISA法对人血清HGF含量的检测;
- [0140] 图9. 实施例8中AFP单克隆抗体免疫组织化学法检测肝癌组织AFP的表达;
- [0141] 图10. 实施例9中GGT II单克隆抗体免疫荧光法检测肝癌细胞GGT II的表达;
- [0142] 图11. 实施例9中GPC3单克隆抗体免疫荧光法检测肝癌细胞GPC3的表达;
- [0143] 图12. 实施例5中HGF单链抗体SDS-PAGE图;
- [0144] 图13. 实施例4中overlap PCR连接AFP VH和AFP VL片段电泳图;
- [0145] 图14. 实施例8中HGF单克隆抗体免疫组织化学法检测肝癌组织AFP的表达 (结论: 抗体可以应用于人肝细胞肝癌免疫组化);
- [0146] 图15. 实施例8中AFU单克隆抗体免疫组织化学法检测肝癌组织AFP的表达 (结论: 抗体可以应用于人肝细胞肝癌免疫组化);
- [0147] 图16. 实施例1中各免疫原蛋白的氨基酸序列 (注: 所用AFP抗原为市售蛋白);
- [0148] 图17. 实施例10AFP、AFU、HGF、GPC3和GGT2在四组受试者血清中含量统计图;
- [0149] 图18. 实施例10在全人群筛查肝癌时AFP、AFU、HGF、GPC3和GGT2单独检测全期肝癌患者血清的ROC曲线图;
- [0150] 图19. 实施例10在全人群筛查肝癌时HGF单指标纳入受试者年龄和性别检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图;
- [0151] 图20. 实施例10在全人群筛查肝癌时, 双指标纳入受试者性别检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图;
- [0152] 图21. 实施例10在全人群筛查肝癌时, 双指标纳入受试者年龄检测全期肝癌和早

期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0153] 图22. 实施例10在全人群筛查肝癌时, 三指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0154] 图23. 实施例10在全人群筛查肝癌时, 四指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0155] 图24. 实施例10在全人群筛查肝癌时, 五指标联合检测全期及早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0156] 图25. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, HGF单指标及HGF纳入受试者年龄性别检测全期肝癌和早期肝癌的ROC曲线图；

[0157] 图26. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, 双指标纳入受试者性别检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0158] 图27. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, 双指标纳入受试者年龄检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0159] 图28. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, 三指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0160] 图29. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, 四指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0161] 图30. 实施例10在肝炎患者中筛查肝癌时, 五指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0162] 图31. 实施例10在肝硬化患者中筛查肝癌时, HGF单指标及HGF纳入受试者年龄性别检测全期肝癌和早期肝癌的ROC曲线图；

[0163] 图32. 实施例10在肝硬化患者中筛查肝癌时, 双指标纳入受试者性别或年龄检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0164] 图33. 实施例10在肝硬化患者中筛查肝癌时, 三指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0165] 图34. 实施例10在肝硬化患者中筛查肝癌时, 四指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；

[0166] 图35. 实施例10在肝硬化患者中筛查肝癌时, 五指标检测全期肝癌和早期肝癌患者血清的ROC曲线图；和

[0167] 图36. 实施例10中AFP、AFU、HGF、GPC3和GGT2在肝癌病人血清, 乙肝病人血清, 肝硬化病人血清及正常人血清中检测值模型验证。

具体实施方式

[0168] 下面通过实施例对本发明进行具体描述, 它们只用于对本发明进行进一步的说明, 不能理解为对本发明保护范围的限制, 本领域的技术人员根据上述本发明的内容做出一些非本质的改进和调整, 均属本发明保护范围。

[0169] 实施例1: 制备HGF抗体动物免疫及免疫效价测定 (以HGF为例, 其余抗体步骤相同或类似)

[0170] 1) 7周大小雌性Balb/c小鼠3只, 首次免疫采用100 μ g HGF融合蛋白 (任选地例如带

有标签蛋白如His的HGF蛋白)/每只鼠,加等体积福氏完全佐剂,通过三通来乳化混匀形成油包水的乳糜状,皮下多点注射。

[0171] 2) 间隔三周后抗原剂量减半,加福氏不完全佐剂及生理盐水混匀,腹腔注射。同法免疫四次后采取静脉血测效价。

[0172] 3) 包被HGF蛋白,4ng/ml。4℃过夜;

[0173] 4) PBS清洗一遍后,0.2%BSA室温封闭1h;

[0174] 5) 血清分别稀释成1:200、1:400、1:800、1:2000、1:4000、1:8000、1:20000。PBS为空白对照,未免疫过的小鼠血清作为阴性对照。37℃孵育2h;

[0175] 6) PBS清洗三遍后,羊抗鼠二抗1:5000,37℃孵育1h;

[0176] 7) PBS清洗五遍后,OPD显色5-10min;

[0177] 8) 终止液终止,492nm波长下检测吸光度。

[0178] 实施例2:细胞融合及融合细胞的筛选

[0179] 1) 处死7周大小Balb/c小鼠2只,取巨噬细胞作为饲养细胞铺在6块96孔板内;

[0180] 2) 取静脉冲击三天后的小鼠处死后取脾脏,与骨髓瘤细胞SP2/0融合后无限稀释法铺成6个96孔板。培养条件为含20%FBS的1×HAT的DMEM/F12培养液;

[0181] 3) 10天后观察克隆生长,期间补充两次含血清的1×HAT的DMEM/F12培养液;

[0182] 4) 显微镜下观察杂交瘤细胞,又圆又亮葡萄串生长的即可以开始检测特异性。用ELISA法筛选出能与抗原特异性结合的阳性孔进行亚克隆化;

[0183] 5) 有限稀释法亚克隆:取巨噬细胞作为饲养细胞铺在6块96孔板内。调整阳性孔细胞数为 1×10^3 /ml左右,加入含血清的1×HT的RPMI1640培养液使每孔细胞分别为2个/孔,1个/孔,0.5个/孔;

[0184] 6) 4-5天后观察,用ELISA法对上清进行抗体检测,再得到阳性孔扩大培养再进行克隆化,直到得到单克隆抗体细胞;

[0185] 7) 筛选出的阳性单克隆株扩大化培养,冻存至液氮罐,定期复苏检查细胞活性和分泌抗体的稳定性。本发明筛选出的5种抗体稳定性非常好,杂交瘤细胞株经过多次鉴定都保持了强分泌抗体的特性。

[0186] 实施例3:腹水的制备与纯化

[0187] 1) 准备10周大左右的雌性Balb/c小鼠5只,腹腔注射500μl pristine/只,待7-21天后每只鼠腹腔注射 2×10^6 个处于对数生长期的杂交瘤细胞,10天后密切观察小鼠,待腹水尽可能多时处死小鼠取出腹水。3000rpm,15min离心去杂质,去油脂。

[0188] 2) 盐析法沉淀免疫球蛋白:用PBS将腹水稀释一倍,加入饱和硫酸铵使终浓度为33%。边滴加边摇晃。4℃放置4小时以上。12000rpm,离心15min后弃去上清。沉淀用适量PBS溶解,放入透析袋,4℃透析过夜。

[0189] 3) 取出透析液,使用泳动泵将液体上柱,免疫球蛋白会特异性与Protein G结合,将留下的液体再上柱一遍使结合更加完全,用PB buffer不断过柱,将杂蛋白洗脱下来;

[0190] 4) 将结合好的柱子装在AKTA蛋白分离纯化仪上,PB buffer平衡后,将流动相换成0.1M甘氨酸洗脱液,观察UV吸收峰。洗脱液管保存冰上,以免蛋白降解;

[0191] 5) 将洗脱液转移到50ml浓缩管(100KD),2000rpm,4℃离心4小时。不断加入PB buffer置换,直到剩下1ml左右蛋白溶液,吸出至EP管,检测OD值,测定浓度;

- [0192] 6) 将单克隆抗体稀释到1mg/ml,加入甘油,分装,-20℃保存。
- [0193] 实施例4:HGF单链抗体载体的构建(以HGF为例,其余抗体步骤相同或类似)
- [0194] 1) 选取处于对数生长期,能持续分泌单克隆抗体的杂交瘤细胞 2×10^7 个,使用TRIZOL裂解液提取RNA。
- [0195] 2) 将RNA用DEPC水稀释到300ng/ μ l,使用逆转录试剂盒进行RNA逆转录,得到的cDNA用于进行PCR扩增。
- [0196] 3) PCR扩增HGF V_H 、HGF V_L 片段:以逆转录合成的HGF cDNA为模板,分别以P1,P2和P3,P4为引物扩增重轻链可变区片段,反应体系为50 μ l。
- [0197] 扩增重链轻链可变区的简并性引物:
- [0198] P1:重链上游5' -SAGGTGMAGCTKCASSARTCWGG
- [0199] P2:重链下游5' -TGGGGSTGTGTTTTGGCTGMRGAGACRGTA
- [0200] P3: κ 上游5' -GACATTGTKMTSACMCAGYMKYCM
- [0201] P4: κ 下游5' -GGATACAGTTGGTGCAGCATCATCAGCCCGTTT
- [0202] 4) 反应产物经1.2%琼脂糖凝胶电泳分离,采用切胶回收试剂盒纯化回收。
- [0203] 5) 将切胶回收的HGF V_H DNA、HGF V_L DNA分别与pMD 19T Vector连接,连接产物分别转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,使用蓝白筛选挑选阳性克隆,测序正确后提取质粒。
- [0204] 6) 以测序阳性的克隆为模板,PCR法分别扩增HGF V_H 和HGF V_L ,通过overlap PCR将HGF V_H 和HGF V_L 通过GlyGlyGlyGlySer (G4S) 基因片段连接。
- [0205] 7) 利用限制性内切酶Mlu I, Sph I酶切HGF V_H - V_L 基因片段,与用同样酶切的Payz Vector进行连接。连接产物转化16C9感受态细菌,通过菌落PCR挑选阳性克隆,测序正确后用于融合蛋白的表达。
- [0206] 本发明获得的单克隆抗体的轻链和重链可变结构域的氨基酸序列及其编码核苷酸序列如以下和序列表中所示。
- [0207] 本发明所述的五个单链抗体的碱基序列为:
- [0208] 1) HGF SCFV (IgG2b)
- [0209] GAGCTCGATATTCAGATGATACAGTCTCCATCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCAACCATC
AAGTGCCAGGCCAGTGAGGATATTAGTAGTAATTTAGCCTGGTGTGTCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCCAAGCTCCT
GATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATACTC
TCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTTACTACTGTGCAGGCGTTATAGTCGTGGTAGTGATACT
TTTGCTTTTCGGCGTGGGGACCAAGCTGGAAAATAAAAGGTGGTTTCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGAAGCTGATGGA
ATCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCTGGGGCTTCAGTGACGCTGCCTGCAAGGCTTCGGGCTACACATTTACTGACT
ATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGATTGGAGCTATTGATCCTGAAACTGGTGGT
ACTGCCTACAGTCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCTTCCAGCACAGCCTACATGGAGCT
CCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTACGCTAAGGATTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGG
TCACTGTCTCTGCAGAGAGTCAGTCCTTCCAAAATGTCACTAGTGGAGGTGGAGGTAAGGAGGTGGAGGTGGCCAG
GCCGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTCCGGACTACGCTTCTTAG
- [0210] 2) AFP SCFV (IgG2a)
- [0211] GCGC ACGCGT ACGCTGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAG
TGAAGTTGCTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTACCAACTACTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACA

AGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTAATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCC
 ACACTGACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCATAACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT
 ATTACTGTACAAGATGGAGGGCAACTCGGACTATAGGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTC
 TGCAGCCAAAACGACAGCCCCAGGTGGAGGCGGATCAGACATTGTGCTCACCCAGTCGCCCCCTCCCTATCT
 GTATCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTGAATTAACATGGTATCAGC
 AGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGTTGCAAGAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCAAGGTTGAG
 TGGCAGTGGATCAGGCACACAATATCCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAATTTATTACTGT
 CAACATTTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGGGCTGATGCTGCACCAA
 CTGTATCCGGTGGAGGCGGATCACATCACCATCACCATCATTGAGCATGCGCGC

[0212] 3) AFU SCFV (IgM)

[0213] GAGCTCGATATTAAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATT
 AATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAATAAAGCTTCT
 TATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATCCATCAAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTC
 TCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTTGAATGTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCGTACACGTTT
 GGAGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGGTGGTTCCTCTAGATCTCCCTCGAGGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGGGC
 TGAGCTGGTGGAGCCTGGAGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGGTCTGGCTACACGCTCACTGATTATGCTATGC
 ACTGGGTGAGGCAGAGTCTGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACATACTATGGTGATGCTAACTAC
 AACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAGACCCTCCAGCACAGCCTATATGGAACCTGCCAGACT
 GACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGATGGTTACGACGTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTC
 AAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGAGTCAGTCCCTCCCAAATGTCAGTGGAGGTGGAGGTAAGGAGGT
 GGAGGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATAACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTA
 G

[0214] 4) GGT II SCFV (IgG2b)

[0215] GAGCTCGACATTTTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCTGTGAGtCTTGGAGATCAAGCCTCCAT
 CTCTTGACAGATCTAATCGGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCC
 AGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAAGTGGCAGTGGATCA
 GGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACA
 TGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAAGGTGGTTCCTCTAGATCTCCCTCGAGGTGCAGC
 TGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGGAGCCTGGAGTCTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGGTCTGGCTACACGTTT
 ACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAGGCAGAGTCCCTGCAAAGAGTCTAGAGTGGATTGGAGTTATTAGTACATACTA
 TGGTGATGCTAACTACAACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACAGATCCTCCAGCACAGCCTATA
 TGGAACCTGCCAGACTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGATGGTTACGACGTTCTATGCT
 ATGGACTACTGGGGTCAAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGCCCCATCTGTCACTAGTGGAGG
 TGGAGGTAAGGAGGTGGAGGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATAACCCGTACGACGTTT
 CGGACTACGCTTCTTAG

[0216] 5) GPC3 SCFV (IgG2b)

[0217] GAGCTCGACATTTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGCTCCTGGGGAAACAGCCACCCTC
 TCCTGCTGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCAGGCTCCT
 CATCTACGGTGCATTCACCAGGGCCGCTGGTGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGCTCTGGGACACTCTTCACTC

TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAATTTATTATTGTCAGCAGTTTAATAACTGGCCTCGGACGTTC
 GGCCGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAAGGTGGTTCCCTCTAGATCTTCCCTCGAGGTGCAGCTGAAGGAGTCGGGACC
 TGGCCTGGTGAAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGCACTGTCAGTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGGCT
 GGAAGTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTGGATGGGCTACATAAGCTACAGTGGTGGCACTAGCTAC
 AACCCATCTCTCAAAAGTCGAATCTCTATCACTCGAGACACATCCAAGAACCAGTTCTTCCCTGCAGTTGAATTCTGT
 GACTACTGAGGACACAGCCACATATTTCTGTGCAAGAGATCCTGGGGAATATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTC
 AAGGAACCTCAGTACCGTCTCCCAGCCAAAACGACACCCCATCTGTCAGTGGAGGTGGAGGTAAAGGAGGT
 GGAGGTGGCCAGGCCGGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATACCCGTACGACGTTCCGGACTACGCTTCTTA
 G

[0218] AFP的重链、轻链可变区氨基酸序列及其编码核苷酸序列,其中加粗、加下划线部分为CDR区序列:轻链:

[0219] GGATACAGTTGGTGCAGCATCAGCCGTTTGATTTCAGCTTGGTGCCTCCACCGAACGTCCACGGAGT
 ACCCCAAAAATGTTGACAGTAATAAATTCAAAAATCTCAGACTGCAGGCTGTTGATCTTGAGGGAATATTGTGTGC
 CTGATCCACTGCCACTGAACCTTGATGGCACACCATCTGCTAAGTTTCTTGCAACATAGACCAGGAGCTGAGGAGAT
 TTTCCCTGTTTCTGCTGATAACCATGTTAATTCAGTAAATATTCTCACTGCTCGACATGTGATGGTGCAGTTTC
 TCCCACAGATACAGATAGGGAGGCGGGCGACTGGGTGAGCACAATGTC

[0220] 氨基酸序列:

[0221] DIVLTQSPASLSVSVGETVITCRASENIYSELTWYQQKQKSPQLLVYVARNLADGVPSRFSGSGSGT
 QYSLKINSLQSEDFGIYYCQHFWGTPWTFGGGKLEIKRADAAPTVS

[0222] 重链:

[0223] GAGGTGCAGCTGCAGCAGTCAGGGGCTGAACTGGTGAAGCCTGGGGCTCAGTGAAGTTGTCCTGCAAG
 GCTTCTGGCTACACCTTCACCAACTACTATATGTACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGG
 AGAGATTAATCCTAGCAATGGTGATACTAACTTCAATGAGAAGTTCAAGAGCAAGGCCACACTGACTGTAGACAAAT
 CCTCCAGCACAGCATAACATGCAACTCAGCAGCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTACAAGATGGAGG
 GCAACTCGGACTATAGGGTTTGTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGCCAAAACGACAGCCCC
 A

[0224] 氨基酸序列:

[0225] EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYYMYWVKRPGQGLEWIGEINPSNGDTNFNEKFKSKAT
 LTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRWRARTIGFAYWGQGLVTVSAAKTTAP

[0226] AFU的重链、轻链可变区氨基酸序列及其编码核苷酸序列:

[0227] 轻链

[0228] GAGCTCGATATTAAGATAACCCAGTCTCCATCTTATCTTGCTGCATCTCCTGGAGAAACCATTACTATT
 AATTGCAGGGCAAGTAAGAGCATTAGCAAATATTTAGCCTGGTATCAAGAGAAACCTGGGAAAATAAAGCTTCT
 TATCTACTCTGGATCCACTTTGCAATCTGGAATCCATCAAGTTTCAAGTGGCAGTGGATCTGGTACAGATTTCACTC
 TCACCATCAGTAGCCTGGAGCCTGAAGATTTGCAATGTATTACTGTCAACAGCATAATGAATACCCGTACACGTTCC
 GGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0229] 氨基酸序列:

[0230] ELDIKITQSPSYLAASPGETITINCRASKSISKYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFSGSGS
 GTDFTLTISSLEPEDFAMYYCQHNEYPTTFGGGKLELK

[0231] 重链

[0232] CTCGAGGTGAAGCTTGAGGAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGTCTCAGTGAAGATTCCTGC
AAGGGTTCTGGCTACACGCTCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAGGCAGAGTCCTGCAAAGAGTCTAGAGTGGAT
TGGAGTTATTAGTACATACTATGGTGATGCTAACTACAACCAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACA
GACCCTCCAGCACAGCCTATATGGAAC TTGCCAGACTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGAT
GGTTACGACGTCTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGAGAGTCAGTCCTT
CCCAAATGTCACTAGTGGAGGTGGAGGTAAAGGAGGTGGAGGT

[0233] 氨基酸序列:

[0234] LEVKLEESGAELVRPGVSVKISCKGSGYTLTDYAMHWVRQSPAKSLEWIGVISTYYGDANYNQKFKGKA
TMTVDRPSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARDGYDVFYAMDYWGQTSVTVSSSESQSPFNVTSGGGGKGGGG

[0235] GGT2的重链、轻链可变区氨基酸序列及其编码核苷酸序列:

[0236] 轻链

[0237] GAGCTCGACATTTTGATGACTCAGACTCCACTCTCCCTGTCTGTCTCAGtCTTGAGATCAAGCCTCCAT
CTCTTGACAGATCTAATCGGAGCCTTGACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCC
AGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGATCA
GGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACA
TGTTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA

[0238] 氨基酸序列:

[0239] ELDILMTQTPLSLSVSLGDQASISCRSNRSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEADLGVYFCSQSTHVPYTFGGGKLELK

[0240] 重链

[0241] CTCGAGGTGCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGAGTCTCAGTGAAGATTCCTGC
AAGGGTTCTGGCTACACGTTCACTGATTATGCTATGCACTGGGTGAGGCAGAGTCCTGCAAAGAGTCTAGAGTGGAT
TGGAGTTATTAGTACATACTATGGTGATGCTAACTACAACCAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACAATGACTGTTGACA
GATCCTCCAGCACAGCCTATATGGAAC TTGCCAGACTGACATCTGAGGATTCTGCCATCTATTACTGTGCAAGAGAT
GGTTACGACGTCTTCTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGCCAAAACAACAGC
CCCATCTGTCACTAGTGGAGGTGGAGGTAAAGGAGGTGGAGGT

[0242] 氨基酸序列:

[0243] LEVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFDYAMHWVRQSPAKSLEWIGVISTYYGDANYNQKFKGKA
TMTVDRSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARDGYDVFYAMDYWGQTSVTVSSAKTTAPSVTSGGGGKGGGG

[0244] HGF的重链、轻链可变区氨基酸序列及其编码核苷酸序列:

[0245] 轻链

[0246] GAGCTCGATATTCAGATGATACAGTCTCCATCCTCCGTGGAGGCAGCTGTGGGAGGCACAGTCACCATC
AAGTGCCAGGCCAGTGAGGATATTAGTAGTAATTTAGCCTGGTGTGTCAGCAGAAACCAGGACAGCCTCCCAAGCTCCT
GATCTATGGTGCATCCACTCTGGCATCTGGGGTCCCATCGCGTTCAAAGGCAGTGGATCTGGGACACAGTATACTC
TCACCATCAGCGACGTGCAGTGTGACGATGCTGCCACTACTACTGTGCAGGCGTTATAGTCGTGGTAGTGATACT
TTTGCTTTCGGCGTGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA

[0247] 氨基酸序列:

[0248] ELDIQMIQSPSSVEAAVGGTVTIKQASEDISSNLAWCQQKPGQPPKLLIYGASTLASGVPSRFKSGS

GTQYTLTISDVQCDDAATYYCAGGYSRGSDFAFGVGKLEIK

[0249] 重链

[0250] CTCGAGGTGAAGCTGATGGAATCTGGGGCTGAGCTGGTGAGGCCTGGGGCTTCAGTGACGCTGTCCTGC
AAGGCTTCGGGCTACACATTTACTGACTATGAAATGCACTGGGTGAAGCAGACACCTGTGCATGGCCTGGAATGGAT
TGGAGCTATTGATCCTGAAACTGGTGGTACTGCCTACAGTCAGAAGTTC AAGGGCAAGGCCACACTGACTGCAGACA
AATCTTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCCGAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTACGCTAAGG
ATTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCAGAGAGTCAGTCCTTCCCAAATGTCACTAGTGGAGG
TGGAGGTAAAGGAGGTGGAGGT

[0251] 氨基酸序列:

[0252] LEVKLMESGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGAI DPETGGTAYSQKFKGKA
TLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTLR IAYWQGTLVTVSAESQSFPNVTSGGGGKGGG

[0253] GPC3的重链、轻链可变区氨基酸序列及其编码核苷酸序列:

[0254] 轻链

[0255] GAGCTCGACATTGTGTTGACACAGTCTCCAGCCACCCTGTCTGTGTCTCTGGGGAAACAGCCACCCTC
TCCTGCTGGGCCAGTCAGAGTATTGGCACCTACTTAGCCTGGTACCAACAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCT
CATCTACGGTGCATTACCAGGGCCGCTGGTGTCCAGACAGGTTCACTGGCAGTGGCTCTGGGACACTCTTCACTC
TCACCATCAGCAGCCTGCAGTCTGAAGATTTTGAATTTATTATTGTCAGCAGTTTAATAACTGGCCTCGGACGTTCC
GGCCGGGGGACCAAGCTGGAAATCAAA

[0256] 氨基酸序列:

[0257] ELDIVLTQSPATLSVSPGETATLSCWASQSIGTYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAFTRAAGVPDRFTGSGS
GTLFTLTISLQSEDFAIYYCQQFNWPRTFGRGKLEIK

[0258] 重链

[0259] CTCGAGGTGCAGCTGAAGGAGTCGGGACCTGGCCTGGTGAACCTTCTCAGTCTCTGTCCCTCACCTGC
ACTGTCACTGGCTACTCAATCACCAGTGATTATGGCTGGAACCTGGATCCGGCAGTTTCCAGGAAACAACTGGAGTG
GATGGGCTACATAAGCTACAGTGGTGGCACTAGCTACAACCCATCTCTCAAAGTGAATCTCTATCACTCGAGACA
CATCCAAGAACCAGTTCTTCTGCAGTTGAATTCTGTGACTACTGAGGACACAGCCACATATTTCTGTGCAAGAGAT
CCTGGGGAATATTACTATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCCCAGCCAAAACGACACC
CCCATCTGTCACTAGTGGAGGTGGAGGTAAAGGAGGTGGAGGT

[0260] 氨基酸序列:

[0261] LEVQLKESGPGLVKPSQSLTCTVTGYSITSDYGWNWIRQFPGNKLEWMGYISYSGGTSYNPSLKSRI
SITRDTSKNQFFLQLNSVTTEDTATYFCARDPGEYYYAMDYWGQTSVTVSPAKTTPPSVTSGGGGKGGGG

[0262] 实施例5:单链抗体的表达与纯化(以HGF为例,其余抗体步骤相同)

[0263] 1) 将重组的融合蛋白表达载体Payz-HGF V_H-V_L转化大肠杆菌16C9,将测序正确的
单菌落接种于15ml含氨苄青霉素100μg/ml的2×YT培养基中,在恒温摇瓶箱中37℃,
200rpm,震荡培养过夜。将培养好的小量菌液移入1000ml含氨苄青霉素100μg/ml的2×YT培
养基中扩大培养,在4℃,8000rpm,离心10min,,收集菌体。

[0264] 2) 将收集到的菌体在室温与-20℃间反复冻融几次,增加细菌壁的通透性,便于裂
解;按照培养基:裂解液体积比为40:1的比例,向化冻后的菌体内加入50ml细菌周质腔裂解
液,轻轻震荡混匀后,置于4℃轻摇1h;4℃,12000rpm离心10min,取上清;

[0265] 3) 将含有目的蛋白的上清液放入预先处理过(经EDTA和碳酸氢钠混合煮沸5min取出,EDTA再煮沸5min)的透析袋内,用1×PBS透析24h,前4h内每2h换一次透析液,后20h内逐渐延长更换透析液间隔直至过夜;

[0266] 4) 透析过的周质腔蛋白液经0.22μm的滤膜过滤后,Hi trapFF亲和层析柱纯化。洗脱并浓缩蛋白后分装后保存于-20℃,即为HGF单链抗体。

[0267] 5) SDS-PAGE凝胶电泳检测纯化后的单链抗体。

[0268] 实施例6:ELISA法验证所制备的单克隆抗体(以HGF为例,其余抗体步骤相同)

[0269] 1) 酶标板包被HGF单克隆抗体,4℃过夜;

[0270] 2) PBS清洗一遍后,0.2%BSA室温封闭1h;

[0271] 3) 将30例HCC患者血清和30例正常人血清分别1:2稀释后加入酶标板微孔中,PBS为空白对,37℃孵育2h;

[0272] 4) 加入生物素标记的HGF抗体1:500稀释,37℃孵育1h;

[0273] 4) PBS清洗三遍后,加入亲和素-辣根过氧化物酶(Advin-HRP),37℃孵育1h;

[0274] 5) PBS清洗五遍后,OPD显色5-10min;

[0275] 6) 终止液终止,492nm波长下检测吸光度。

[0276] 实施例7:Western Blotting法验证所制备的单克隆抗体

[0277] 1) 将培养好的肝癌细胞HepG2(ATCC HB-8065)、Hep3b(ATCC HB-8064)、SMMC-7721(可商购自上海复祥生物科技有限公司)、HL-7702(可商购自通派(上海)生物科技有限公司)等使用SDS裂解液提取蛋白,使用BCA法测定蛋白浓度后上样或-80℃保存。

[0278] 2) 配置10%的SDS-PAGE分离胶和5%的浓缩胶。

[0279] 3) 取30-50μg蛋白上样,上样前在蛋白中加入5×loading buffer,95℃变性5min;选择合适分子量的蛋白marker作为标尺。

[0280] 4) 电泳:开始时恒压60V,待条带进入分离胶后,将电压调至120V,电泳至溴酚蓝跑到胶的底部即可停止,进行考马斯亮蓝染色或者转膜。

[0281] 5) 考马斯亮蓝染色:用至少5倍体积的考马斯亮蓝染色液浸泡凝胶,在摇床上孵育3-4h,吸走染色液后用脱色液脱至目的条带清晰,将凝胶扫描。

[0282] 6) 如不染色则进行转膜。转膜夹中放置海绵、滤纸、PVDF膜和胶(正极方向先是一层海绵垫一再放三层滤纸—将PVDF膜放在滤纸上一胶—三层滤纸—海绵垫—负极),装到转膜仪中,250mA恒流,根据目的蛋白分子量大小转膜1-3h。

[0283] 7) 转膜结束后,将PVDF膜用TBST清洗一遍,用5%脱脂奶粉或BSA室温孵育1h封闭抗原。

[0284] 8) 加入一抗:用脱脂奶粉将抗体稀释到合适的浓度,his-tag(1:1000),单克隆培养上清液或腹水(1:1000-1:5000)加在膜上,4℃孵育过夜,TBST清洗三次,每次10min。

[0285] 9) 室温孵育二抗1h,二抗用1%脱脂奶粉或者1%的BSA稀释到合适浓度(1:5000-1:10000),TBST清洗三次,每次10min。

[0286] 10) 化学发光法(ECL)显色,暗室曝光。

[0287] 实施例8:免疫组织化学法验证所制备的单克隆抗体

[0288] 1) 肝癌组织石蜡切片脱蜡:干烤65℃过夜——二甲苯I 20min——二甲苯II 20min——无水乙醇I 5~10min——无水乙醇II 5~10min——95%乙醇2min——85%乙

醇2min——75%乙醇2min——60%乙醇2min——蒸馏水清洗。

[0289] 2) 抗原热修复:切片中加入400ml PBS+8ml抗原修复液,使用高压锅140℃,维持2min,室温自然冷却。

[0290] 3) 灭活内源性过氧化物酶:片子甩、擦干,3% H_2O_2 常温避光作用10min(在湿盘中操作,每张片子50~60 μ l的液量)。

[0291] 4) 孵育一抗(单克隆抗体):PBS清洗3次 \times 2min;用3%BSA将单克隆抗体稀释至适合浓度(1:500~1:2000)加到切片上,一抗室温半小时孵育后,4℃过夜。

[0292] 5) 孵育二抗:从4℃拿出的切片首先在室温孵育半小时,PBS清洗3次 \times 2min;用3%BSA将二抗稀释至适合浓度(1:500)加到切片上,37℃孵育箱30~40min。

[0293] 6) DAB显色。

[0294] 7) 复染:①苏木素3~5min,自来水冲洗;②盐酸酒精约30秒,自来水冲洗,紫—深红—浅红(观察颜色);③0.5%氨水1~2min,自来水冲洗。镜下观察细胞染色,染色深则分化时间(盐酸酒精)稍长些即可;染色浅则再置于苏木素中染色即可。

[0295] 8) 脱水:70%乙醇3min——85%乙醇3min——95%乙醇3min——无水乙醇I 5~10min——无水乙醇II 5~10min——二甲苯I 1小时——二甲苯II 1小时(时间不定)。

[0296] 9) 用中性树脂封片,保存,照相。

[0297] 实施例9:免疫荧光法验证所制备的单克隆抗体

[0298] 1) 实验前一天将含 $2-3 \times 10^4$ 细胞(HepG2)的单细胞悬液铺种在放有盖玻片的十二孔盘中一个孔中(要保证有单个细胞)。每个条件做两个附孔,待细胞贴壁12~24h后,用于实验分析。

[0299] 2) 用PBS洗涤细胞3次,1ml/孔4%的PFA于室温固定10min。吸出PFA,用PBS洗3次,加入1ml的50mM氯化铵于室温孵育10min,吸取氯化铵,PBS洗3次。

[0300] 3) 加入1ml的0.2%Triton X-100,10min;吸出Triton,PBS洗3次;

[0301] 4) 加入1ml 3%的BSA封闭,室温1h,可在摇床上晃动;吸出BSA,用PBS洗10min。

[0302] 5) 加一抗(单克隆抗体),稀释比例为1:200-1:500,将抗体(双染各加20 μ l,单染加40 μ l)到保鲜膜或封口膜上,将盖玻片从十二孔盘中取出,吸干多余的水分,有细胞的一面接触抗体,室温>1h或4℃过夜。

[0303] 6) 将玻片重新放回到十二孔盘中,有细胞的一面朝上,用PBS洗3次,10min/次;加二抗,稀释比例一般为1:400,避光室温反应1h。

[0304] 7) 将玻片重新放回到十二孔盘中,有细胞的一面朝上,PBS洗3次,10min/次。加DAPI染细胞核,一般稀释比例为1:1000,每个盖玻片20 μ l,避光于室温反应10min。

[0305] 8) 将玻片重新放回到十二孔盘中,有细胞的一面朝上,PBS洗2次,10min/次。把封片剂(mowoil)滴在载玻片上,每片15 μ l,将有细胞的面朝下,勿有气泡。等封片剂干后室温约30min后放在4℃,避光保存。

[0306] 9) 荧光显微镜下观察染色结果。

[0307] 如从附图中可以看出,本发明所制备的HGF单克隆抗体能很好应用于ELISA和Western Blotting对HGF的检测;所制备的AFP单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting和IHC对AFP的检测;所制备的AFU单克隆抗体能够很好地应用于ELISA和Western Blotting对AFU的检测;所制备的GGT II单克隆抗体能很好应用于ELISA、Western Blotting

和IF对GGT II的检测;所制备的GPC3单克隆抗体能很好地应用于ELISA、Western Blotting和IF对GPC3的检测。

[0308] 实施例10.本发明抗体或其组合诊断肝癌的应用

[0309] 在天津医科大学肿瘤医院,分别收集肝癌患者、乙肝患者及正常者外周血各60-300例。在实验中收集了肝癌患者血清288例,乙肝患者血清87例,肝硬化患者80例,正常者血清241例。

[0310] 外周血收集1小时内,3000g离心5-10分钟,取血清移入新的离心管,-80℃冰箱保存。

[0311] 通过使用上述实施例中制备的单克隆抗体或单链抗体,通过ELISA检测待测血清中AFP、AFU、GPC3、GGT2和HGF的浓度。

[0312] 1) 诊断试验评价指标及选择

[0313] 采用灵敏度(真阳性率,Sensitivity)、特异度(真阴性率,Specificity)、阳性预测值(PPV)、阴性预测值(NPV)评价待测指标的诊断效果:

[0314] 灵敏度 = $TP / (TP + FN) \times 100\%$

[0315] 特异度 = $TN / (TN + FP) \times 100\%$

[0316] 阳性预测值 = $TP / (TP + FP) \times 100\%$

[0317] 阴性预测值 = $TN / (TN + FN) \times 100\%$

[0318] 正确指数(Youden index) = (灵敏度+特异度)-100%

[0319] 其中,TN(true negative) = 真阴性;FP(false positive) = 假阳性;TP(true positive) = 真阳性;FN(false negative) = 假阴性。

[0320] 选用受试者工作曲线(receiver operating characteristic curve,ROC)对所有可能的切点作计算显示灵敏度和特异度之间相互关系。通过改变切点,获得多对真阳性率(即灵敏度)与假阳性率(1-特异度)值,以假阳性率为横坐标,以灵敏度为纵坐标,绘制ROC曲线,从而动态、客观地反映诊断系统的效能。ROC曲线下面积(AUC)表示诊断系统中阳性和阴性诊断结果分布的重叠程度,反映诊断系统区分阳性和阴性诊断结果的能力大小,也就是诊断试验的价值大小。通过找到ROC曲线上正确指数最大点确定诊断指标临界值,并通过Bootstrap方法随机抽样1000次,确定临界值95%可信区间。

[0321] 2) 统计模型的构建

[0322] 通过logistic回归模型实现单指标、多指标联合诊断试验HCC,并分别应用于健康正常人、HBV感染者、肝硬化患者,在三组和病人群中进行ROC分析。根据疾病状态建立logistic回归模型,通过形成的预测概率或联合预测因子为分析指标,并结合非参数模型和双正态模型建立ROC曲线。

[0323] Logistic回归模型:

$$[0324] \quad g(u) = \ln\left(\frac{p}{1-p}\right) = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n = \beta Y_i;$$

$$[0325] \quad \text{且有 } p = \frac{e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n)}}{1 + e^{(\beta_0 + \beta_1 x_1 + \dots + \beta_n x_n)}}$$

[0326] 常数项 β_0 表示暴露剂量为0时个体发病(HCC)与不发病(HBV感染者、肝硬化患者、健康人,或三者之和)概率之比的自然对数。回归系数 $\beta_0, \beta_1, \dots, \beta_n$ 表示自变量 x_i 改变一个单

位时 $\ln\left(\frac{p}{1-p}\right)$ 的改变量。对于研究变量(5个蛋白)在某个连续的截断点 P_k 有: $BY \geq g(P_k)$, $Y_{ik} = 1$; $BY < g(P_k)$, $Y_{ik} = 0$ 。而同于多指标结合的诊断试验,其图形为一个平面从而获得灵敏度和特异度构建ROC曲线。

[0327] 分析和统计结果参见附图。

[0328] 结果和讨论:

[0329] 早期肝癌检出率低的现状反映出目前肝癌的诊断方法还有很大局限性。当前肝癌的诊断主要依靠血清学检查和影像学诊断。血清学检查主要检测血清中的肿瘤标志物,目前主要是依靠AFP的检测,但AFP在小肝癌中的敏感度仅为40%左右。

[0330] 利用本发明制备的特异性结合于人肝癌标志物的抗体或其单链抗体片段,在AFP、AFU、HGF、GPC3和GGT2五个标志物中,进行HGF单指标检测,以及HGF联合其它标志物进行双指标、三指标、四指标及五指标检测时,能够与乙肝患者、肝硬化患者和健康者区别开来而检测肝癌。

[0331] 在全部人群(肝癌、乙肝、肝硬化和正常人)中筛查肝癌,在乙肝患者中筛查肝癌,以及在肝硬化患者中筛查肝癌时,HGF单指标检测全期肝癌和早期肝癌均有很高的敏感度和特异性。通过利用本发明制备的特异性结合于HGF的抗体或其片段,利用所述的肝癌血清学检测方法,使用HGF单指标在全部人群(肝癌、乙肝、肝硬化和正常人)中筛查肝癌,其检测全期肝癌的敏感度为90.3%,特异性为90.5%,在巴塞罗那分期的早期(A期)肝癌患者中,检测的敏感度为90.2%,特异性为84.1%,纳入受试者的年龄和性别后,HGF在全期肝癌中的敏感度为91.3%,特异性为90.9%,在早期肝癌中的敏感度为86.3%,特异性为90.5%;在乙肝患者中筛查肝癌,HGF单指标检测全期肝癌的敏感度为94.4%,特异性为91.8%,检测早期肝癌的敏感度为90.2%,特异性为91.9%,纳入受试者年龄性别后,检测全期肝癌的敏感度为90.8%,特异性为95.2%,检测早期肝癌的敏感度为92.2%,特异性为90.2%;在肝硬化患者中筛查肝癌,HGF单指标检测全期肝癌和早期肝癌的敏感度和特异性均可达72%和73%以上,显著优于临床常用的AFP,说明单独检测血清中HGF的含量,必要时并综合受试者年龄和性别可以满足临床肝癌诊断的需要。

[0332] 检测两个指标在全部人群筛查肝癌,在乙肝患者中筛查肝癌,以及在肝硬化患者中筛查肝癌时,HGF与AFP、AFU、GPC3、GGT2四个标志物之一分别联用,检测全期肝癌和早期肝癌均可达到很高的敏感度和特异性,对于原发性肝癌患者的诊断具有显著意义,特别是HGF与AFP的联合为肝癌患者血清学诊断及早期诊断的最佳组合。

[0333] 特别地,检测两个指标在全部人群筛查肝癌时,只纳入受试者性别进行统计后,HGF与AFP联用检测全期肝癌的敏感度为90.8%,特异性为93.1%,HGF与AFU联用检测全期肝癌的敏感度为87.2%,特异性为94.6%,HGF与GPC3联用检测全期肝癌的敏感度为91.8%,特异性为90.6%,HGF与GGT2联用检测全期肝癌的敏感度为89.3%,特异性为93.1%;只纳入受试者年龄后,HGF与AFP联用检测全期肝癌的敏感度为92.3%,特异性为90.9%,HGF与AFU联用检测全期肝癌的敏感度为90.8%,特异性为91.6%,HGF与GPC3联用检测全期肝癌的敏感度为90.3%,特异性为90.9%,HGF与GGT2联用检测全期肝癌的敏感度为89.3%,特异性为92.3%。在检测早期肝癌时,将HGF与AFP,HGF与AFU,HGF与GPC3,HGF与GGT2分别联用,纳入年龄或性别之一后,均可达到86%以上的敏感度和和84%以上的特异

性。

[0334] 而在乙肝患者中筛查肝癌时,只纳入受试者性别进行统计后,HGF与AFP联用检测全期肝癌敏感度为92.9%,特异性为95.2%,HGF与AFU联用检测全期肝癌敏感度为93.4%,特异性为93.5%,HGF与GPC3联用检测全期肝癌敏感度为93.4%,特异性为93.5%,HGF与GGT2联用检测全期肝癌敏感度为92.3%,特异性为93.5%。;只纳入受试者年龄进行统计后,HGF与AFP联用检测全期肝癌敏感度为92.3%,特异性为93.5%,HGF与AFU联用检测全期肝癌敏感度为93.9%,特异性为93.4%,HGF与GPC3联用检测全期肝癌敏感度为93.9%,特异性为93.4%,HGF与GGT2联用检测全期肝癌敏感度为93.4%,特异性为95.1%。在检测早期肝癌时,将HGF与AFP,HGF与AFU,HGF与GPC3,HGF与GGT2分别联用,纳入年龄或性别之一后,均可达到86.3%以上的敏感度和和83.9%以上的特异性。在肝硬化患者中筛查肝癌时,纳入年龄或性别之一后,HGF与其他四个标志物分别联用,检测全期肝癌和早期肝癌均可达到较高的敏感度和特异性。说明HGF与其他四个指标单独联合检测,并综合受试者年龄或性别后,对于原发性肝癌患者的诊断具有显著意义,特别是HGF与AFP的联合为肝癌患者血清学诊断及早期诊断的最佳组合。

[0335] 检测三个指标在全部人群中筛查肝癌,检测全期肝癌时,HGF+AFP+AFU联用,HGF+AFP+GPC3联用,HGF+AFP+GGT2联用,HGF+AFU+GPC3联用时,均可达到91.8%以上的敏感度和90.2%以上的特异性,检测早期肝癌时,HGF+AFP+AFU联用,HGF+AFP+GPC3联用,以及HGF+AFP+GGT2联用时,均可达86.3%以上的敏感度和85.5%以上的特异性,在乙肝患者中筛查肝癌时,HGF+AFP+AFU,HGF+AFP+GPC3,HGF+AFP+GGT2,HGF+AFU+GPC3以及HGF+GPC3+GGT2联合应用,检测全期肝癌的敏感度均可达92.3%以上,特异性可达93.5%以上,检测早期肝癌也有较好效果,特别是HGF+AFP+AFU的组合,敏感度达90.2%,特异性达98.4%;在肝硬化患者中筛查肝癌时,HGF与另两种标志物联用,也可达到较满意的效果,说明HGF与另外两种标志物联合检测,可以满足临床肝癌血清学诊断及早期诊断的需求。

[0336] 检测四个指标筛查肝癌时,敏感度和特异性均有提高,在全部人群中筛查肝癌时,HGF、AFP、GPC3和GGT2的组合检测全期肝癌的敏感度为91.3%,特异性为92.0%,检测早期肝癌的敏感度为86.3%,特异性为90.5%,在乙患者中筛查肝癌时,HGF、AFP、AFU和GGT2的组合检测全期肝癌的敏感度为91.8%,特异性为98.4%,检测早期肝癌的敏感度为92.2%,特异性为98.4%,在肝硬化患者中筛查肝癌时,HGF与另外三种指标联用时,均可达到较高的敏感度和特异性。

[0337] 五种标志物联合应用,敏感度和特异性进一步提高,在全人群中筛查肝癌时,其检测全期肝癌的敏感度可达91.2%,特异性可达93%,检测早期肝癌的敏感度为84.3%,特异性可达87.2%,在乙肝患者中筛查肝癌时,检测全期肝癌的敏感度为91.8%,特异性为98.4%,检测早期肝癌的敏感度为92.2%,特异性为98.4%,在肝硬化患者中筛查肝癌时,检测全期肝癌的敏感度为91.3%,特异性为76.2%,检测早期肝癌的敏感度为92.2%,特异性为66.7%。显著优于目前临床肝癌检测的金标准AFP。

[0338] 为了验证检测结果的准确性,本发明将五种标志物在肝癌病人血清,正常人血清和乙肝病人血清中的检测值建立了模型,将全部研究对象的危险系数(RS)从小到大排列,分割为高危组($RS \geq 0.5$)和低危组($RS < 0.5$),大部分肝癌患者被正确分到高危组,散点图趋势明显,说明模型结果符合事实情况。该模型可以用于分析AFP、AFU、HGF、GPC3、GGT2五种标

志物检测值与肝癌的相关性。

[0339] 本发明通过大量样本验证和统计学分析,通过利用本发明制备的单克隆抗体或其单链抗体片段,证明HGF可以作为肝癌标志物单独用于肝癌的筛查和早期诊断,其检测灵敏度和特异性均大幅优于临床的金标准AFP,HGF与其它一个或多个指标的联合使用,可作为HGF检测的补充,进一步提高肝癌血清学诊断的灵敏度和特异性。

[0340] 虽然为了清楚的理解,已经借助于附图和实施例在一些细节上描述了上述发明,但是说明书和实施例不应当被视为限制本发明的范围。本文中引用的所有专利和科学文献的公开内容通过引用完整地清楚并入。

序列表

<110> 天津医科大学

<120> 肝癌标志物单克隆抗体的制备及其应用

<130> IB157949

<160> 50

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 116

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 1

[0001]

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Glu
20 25 30

Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro Gln Leu Leu Val
35 40 45

Tyr Val Ala Arg Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Ile Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
100 105 110

Pro Thr Val Ser
115

<210> 2

<211> 126

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 2

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr
20 25 30

Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe
50 55 60

Lys Ser Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Trp Arg Ala Thr Arg Thr Ile Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr Ala Pro
115 120 125

<210> 3

[0002]

<211> 109

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 3

Glu Leu Asp Ile Lys Ile Thr Gln Ser Pro Ser Tyr Leu Ala Ala Ser
1 5 10 15

Pro Gly Glu Thr Ile Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Lys Ser Ile Ser
20 25 30

Lys Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Glu Lys Pro Gly Lys Thr Asn Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Thr Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65 70 75 80

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Met Tyr Tyr Cys Gln Gln His Asn Glu Tyr
85 90 95

Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 4

<211> 140

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 4

Leu Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Asp
20 25 30

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Asn Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Arg Pro Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

[0003]

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Val Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn
115 120 125

Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

<210> 5

<211> 114

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 5

Glu Leu Asp Ile Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser
1 5 10 15

Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Arg Ser Leu Val
20 25 30

His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
65 70 75 80

Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser
85 90 95

Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
100 105 110

Leu Lys

<210> 6

<211> 140

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 6

Leu Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
1 5 10 15

Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
20 25 30

[0004]

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ser Pro Ala Lys Ser Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Asn Tyr Asn Gln Lys
50 55 60

Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Arg Ser Ser Ser Thr Ala
65 70 75 80

Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Val Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser
115 120 125

Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
130 135 140

<210> 7

<211> 112

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 7

Glu Leu Asp Ile Gln Met Ile Gln Ser Pro Ser Ser Val Glu Ala Ala
 1 5 10 15
 Val Gly Gly Thr Val Thr Ile Lys Cys Gln Ala Ser Glu Asp Ile Ser
 20 25 30
 Ser Asn Leu Ala Trp Cys Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 50 55 60
 Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val
 65 70 75 80
 Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gly Gly Tyr Ser Arg
 85 90 95
 Gly Ser Asp Thr Phe Ala Phe Gly Val Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 8
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 [0005]
 <400> 8
 Leu Glu Val Lys Leu Met Glu Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly
 1 5 10 15
 Ala Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp
 20 25 30
 Tyr Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp
 35 40 45
 Ile Gly Ala Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Ser Gln Lys
 50 55 60
 Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala
 65 70 75 80
 Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr
 85 90 95
 Cys Thr Leu Arg Ile Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 Ser Ala Glu Ser Gln Ser Phe Pro Asn Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly
 115 120 125
 Lys Gly Gly Gly Gly
 130

<210> 9
 <211> 109
 <212> PRT
 <213> 小鼠

 <400> 9
 Glu Leu Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser
 1 5 10 15
 Pro Gly Glu Thr Ala Thr Leu Ser Cys Trp Ala Ser Gln Ser Ile Gly
 20 25 30
 Thr Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu
 35 40 45
 Leu Ile Tyr Gly Ala Phe Thr Arg Ala Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60
 Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 65 70 75 80
 Gln Ser Glu Asp Phe Ala Ile Tyr Tyr Cys Gln Gln Phe Asn Asn Trp
 85 90 95
 [0006] Pro Arg Thr Phe Gly Arg Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105

<210> 10
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> 小鼠

 <400> 10
 Leu Glu Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
 1 5 10 15
 Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Ser
 20 25 30
 Asp Tyr Gly Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys Leu Glu
 35 40 45
 Trp Met Gly Tyr Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Pro Ser
 50 55 60
 Leu Lys Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe
 65 70 75 80
 Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
 85 90 95

Cys Ala Arg Asp Pro Gly Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Pro Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser
 115 120 125
 Val Thr Ser Gly Gly Gly Gly Lys Gly Gly Gly Gly
 130 135 140

<210> 11
 <211> 348
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 11
 ggatacagtt ggtgcagcat cagcccgttt gatttcagc ttggtgcctc caccgaacgt 60
 ccacggagta ccccaaaaat gttgacagta ataaattcca aaatcttcag actgcaggt 120
 gttgatcttg agggaatatt gtgtgcctga tccactgcca ctgaaccttg atggcacacc 180
 atctgctaag tttcttgcaa catagaccag gagctgagga gattttccct gtttctgctg 240
 ataccatgtt aattcactgt aaatattctc acttgctega catgtgatgg tgacagtctc 300
 tcccacagat acagataggg aggcgggcga ctgggtgagc acaatgtc 348

[0007]

<210> 12
 <211> 378
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 12
 gaggtgcagc tgcagcagtc aggggctgaa ctgggaagc ctggggcttc agtgaagttg 60
 tcttgcgaag cttctggcta caccttcacc aactactata tgtactgggt gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag attaactcta gcaatggtga tactaacttc 180
 aatgagaagt tcaagagcaa ggccacactg actgtagaca aatcctccag cacagcatac 240
 atgcaactca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtac aagatggagg 300
 gcaactcgga ctatagggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 360
 gccaaaacga cagcccca 378

<210> 13
 <211> 327
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 13
 gagctcgata ttaagataac ccagctctcca tcttatcttg ctgcatctcc tggagaaacc 60
 attactatta attgcagggc aagtaagagc attagcaaat atttagcctg gtatcaagag 120

	aaacctggga aaactaataa gcttcttata tactctggat ccactttgca atctggaatt	180
	ccatcaaggt tcagtggcag tggatctggt acagattca ctctaccat cagtagcctg	240
	gagcctgaag attttgcaat gtattactgt caacagcata atgaataccc gtacacgttc	300
	ggagggggga ccaagctgga gctgaaa	327
	<210> 14	
	<211> 420	
	<212> DNA	
	<213> 小鼠	
	<400> 14	
	ctcgaggtga agcttgagga gtctggggct gagctgggta ggccctggagt ctcagtgaag	60
	atttctgca agggttctgg ctacacgtc actgattatg ctatgactg ggtgaggcag	120
	agtctgcaa agagtctaga gtggattgga gttattagta catactatgg tgatgctaac	180
	tacaaccaga agttcaaggg caaggccaca atgactgtg acagaccctc cagcacagcc	240
	tatatggaac ttgccagact gacatctgag gattctgcca tctattactg tgcaagagat	300
	ggttaagac tcttctatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc	360
	tcagagagtc agtccttccc aatgtcact agtggaggtg gaggtaaagg aggtggaggt	420
	<210> 15	
[0008]	<211> 342	
	<212> DNA	
	<213> 小鼠	
	<400> 15	
	gagctcgaca ttttgatgac tcagactcca ctctccctgt ctgtcagtct tggagatcaa	60
	gcctccatct cttgcagatc taatcggagc cttgtacaca gtaatggaaa cacctattta	120
	cattggtacc tgcagaagcc aggccagtct ccaaagctcc tgatctacaa agtttccaac	180
	cgatcttctg gggctccaga caggttcagt ggcagtggat caggacaga tttcacactc	240
	aagatcagca gactggagcc tgaggatctg ggagtttatt tctgctctca aagtacacat	300
	gttccgtaca cgttcggagg ggggaccaag ctggagctga aa	342
	<210> 16	
	<211> 420	
	<212> DNA	
	<213> 小鼠	
	<400> 16	
	ctcgaggtgc agctcagca gtctggggct gagctgggta ggccctggagt ctcagtgaag	60
	atttctgca agggttctgg ctacacgttc actgattatg ctatgactg ggtgaggcag	120
	agtctgcaa agagtctaga gtggattgga gttattagta catactatgg tgatgctaac	180

tacaaccaga agttcaaggg caagccaca atgactgttg acagatcctc cagcacagcc	240
tatatggaac ttgccagact gacatctgag gattctgcca tctattactg tgcaagagat	300
ggttacgacg tcttctatgc tatggactac tggggcaag gaacctcagt caccgctcc	360
tcagccaaaa caacageccc atctgtcact agtggagggt gaggtaaagg aggtggaggt	420
<210> 17	
<211> 336	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 17	
gagctcgata ttcagatgat acagctccca tctctcgtgg aggcagctgt gggaggcaca	60
gtcacatca agtgccaggc cagtgaggat attagtagta atttagcctg gtgcagcag	120
aaaccaggac agcctcccaa getcctgate tatggtgcat ccaactctggt atctggggtc	180
ccatcgcggt tcaaaggcag tggatctggg acacagtata ctctaccat cagcgacgtg	240
cagtgtgacg atgtgccac ttactactgt gcaggcggtt atagtcgtgg tagtgatact	300
ttgctttcg gcgtggggac caagctgga ataaaa	336
<210> 18	
<211> 399	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 18	
ctcgaggatga agctgatgga atctggggct gagctggtga ggcctggggc ttcagtgaag	60
ctgtcctgca aggcttcggg ctacacattt actgactatg aatgcactg ggtgaagcag	120
acacctgtgc atggcctgga atggattgga gctattgac ctgaaactgg tggactgccc	180
tacagtcaga agttcaaggg caagccaca ctgactgcag acaaatctc cagcacagcc	240
tacatggagc tccgcagcct gacatctgag gactctgccg tctattactg tacgtaagg	300
attgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctg cagagagtca gtccttccca	360
aatgtcacta gtggagggtg aggtaaagga ggtggaggt	399
<210> 19	
<211> 327	
<212> DNA	
<213> 小鼠	
<400> 19	
gagctcgaca ttgtgtgac acagctccca gcaccctgt ctgtgtctcc tgggaaaca	60
gccaccctct cctgtcgggc cagtcagagt attggcacc acttagcctg gtaccaacag	120
aaacctggcc aggetcccag getcctcacc tacggtgcat tcaccagggc cgctgggtgc	180

[0009]

ccagacaggt tcaactggcag tggctctggg acactcttca ctctcaccat cagcagcctg 240
 cagictgaag attttgcaat ttattattgt cagcagttta ataactggcc tggcagcttc 300
 ggccggggga ccaagctgga aatcaaa 327

<210> 20
 <211> 420
 <212> DNA
 <213> 小鼠

<400> 20
 ctcgaggtgc agctgaagga gtcgggacct ggcttggta aaccttctca gtctctgtcc 60
 ctcacctgca ctgtcactgg ctactcaatc accagtgatt atggctggaa ctggatccgg 120
 cagtttcag gaaacaaact ggagtggatg ggctacataa gctacagtgg tggcactage 180
 tacaacctat ctctcaaaag tgaatctct atcactcgag acacatcaa gaaccagttc 240
 ttctctcagt tgaattctgt gactactgag gacacagcca catattctg tgcaagagat 300
 cctggggaat attactatgc tatggactac tgggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
 ccagccaaaa cgacaccccc atctgtcact agtggaggtg gaggtaaagg aggtggaggt 420

<210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 小鼠

[0010]

<400> 21
 Glu Asn Ile Tyr Ser Glu
 1 5

<210> 22
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 22
 Val Ala Arg
 1

<210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小鼠

<400> 23

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 24

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 24

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Tyr
1 5

<210> 25

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 25

Ile Asn Pro Ser Asn Gly Asp Thr
1 5

[0011]

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 26

Thr Arg Trp Arg Ala Thr Arg Thr Ile Gly Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 27

Lys Ser Ile Ser Lys
1 5

<210> 28

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 28

Ser Gly Ser
1

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 29

Gln Gln His Asn Glu Tyr Pro Tyr Thr
1 5

<210> 30

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

[0012]

<400> 30

Gly Tyr Thr Leu Thr Asp Tyr Ala
1 5

<210> 31

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 31

Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala
1 5

<210> 32

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 32

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Val Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 33

<211> 11

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 33

Arg Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 34

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 34

Lys Val Ser
1

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

[0013]

<400> 35

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 36

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 36

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala
1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 37

Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala
1 5

<210> 38

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 38

Ala Arg Asp Gly Tyr Asp Val Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 39

Glu Asp Ile Ser Ser Asn
1 5

<210> 40

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 40

Gly Ala Ser
1

<210> 41

<211> 12

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 41

Ala Gly Gly Tyr Ser Arg Gly Ser Asp Thr Phe Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

[0014]

<400> 42

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Glu
1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 43

Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr
1 5

<210> 44

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 44

Thr Leu Arg Ile Ala Tyr
1 5

[0015]

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 45

Gln Ser Ile Gly Thr Tyr
1 5

<210> 46

<211> 3

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 46

Gly Ala Phe
1

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 47

Gln Gln Phe Asn Asn Trp Pro Arg Thr
1 5

<210> 48

<211> 9

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 48

Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Asp Tyr Gly
1 5

[0016]

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 49

Ile Ser Tyr Ser Gly Gly Thr
1 5

<210> 50

<211> 13

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 50

Ala Arg Asp Pro Gly Glu Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

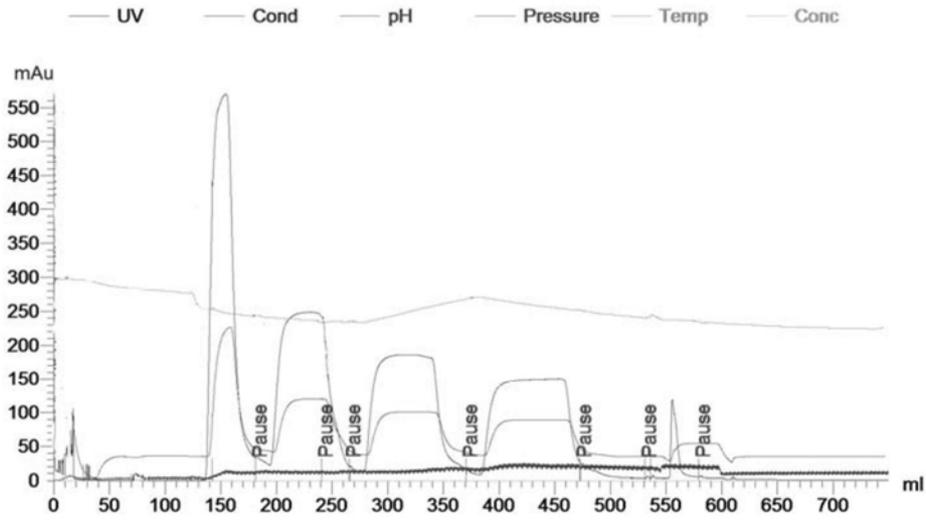


图1

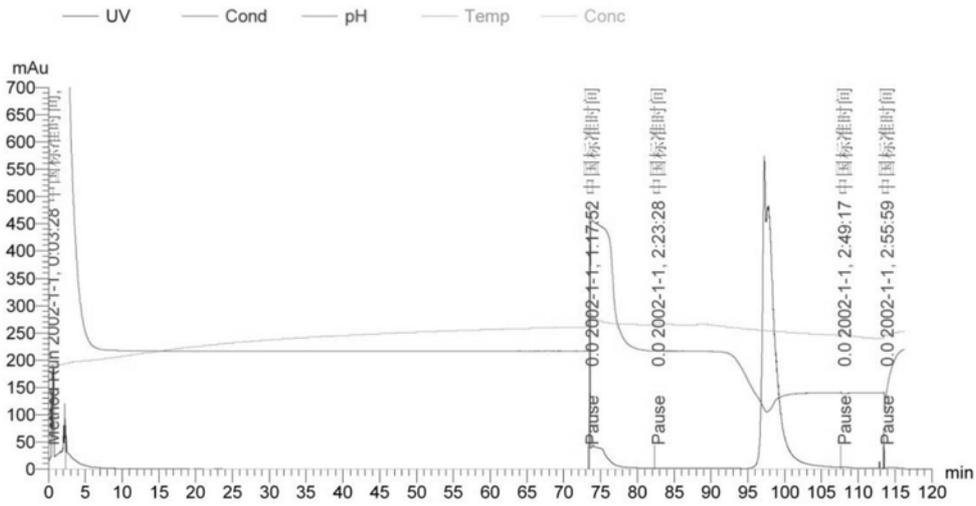


图2

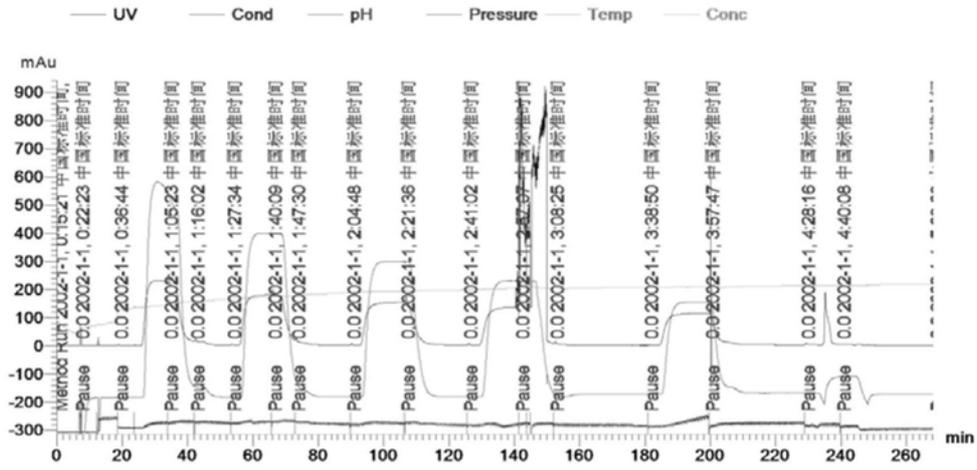


图3

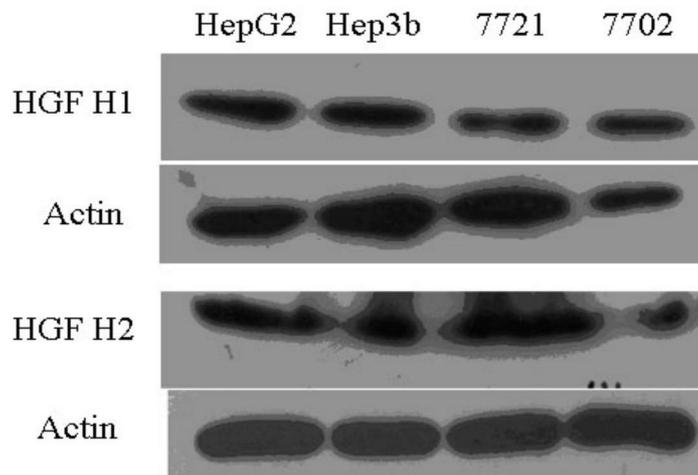


图4

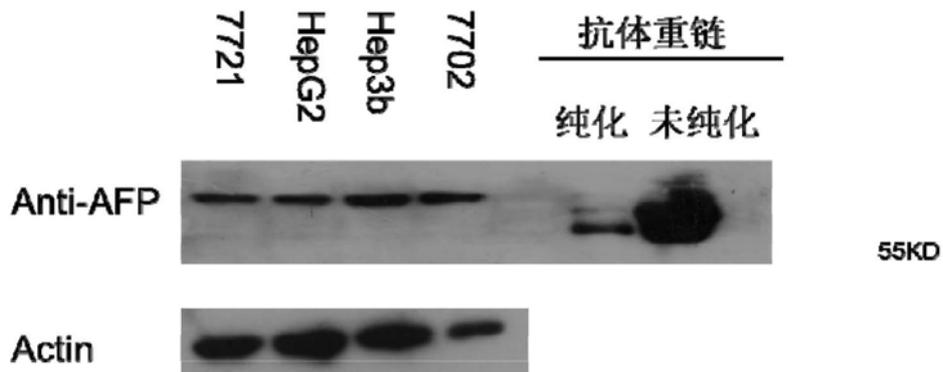


图5

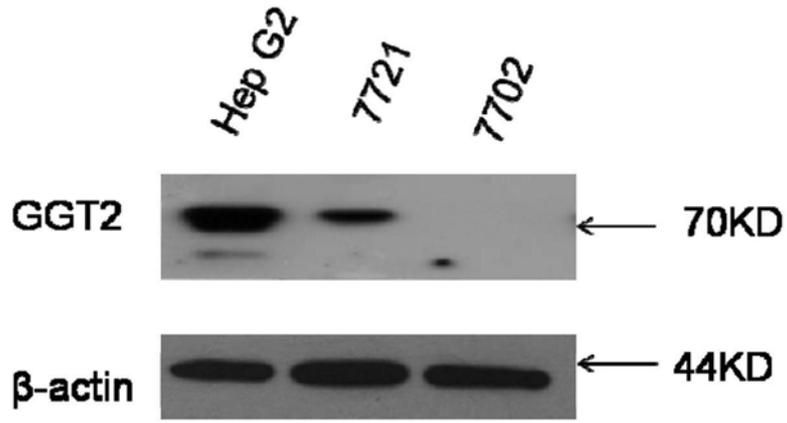


图6

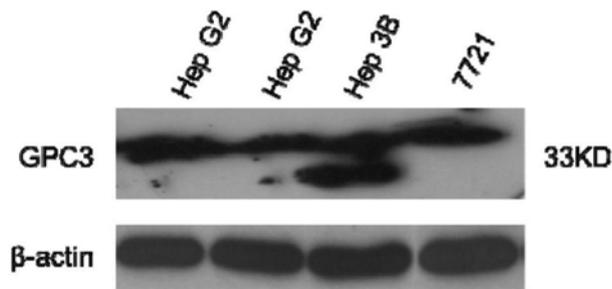


图7

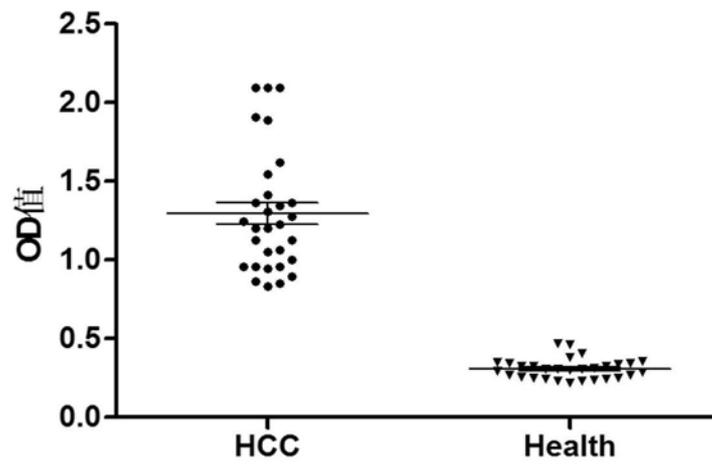


图8

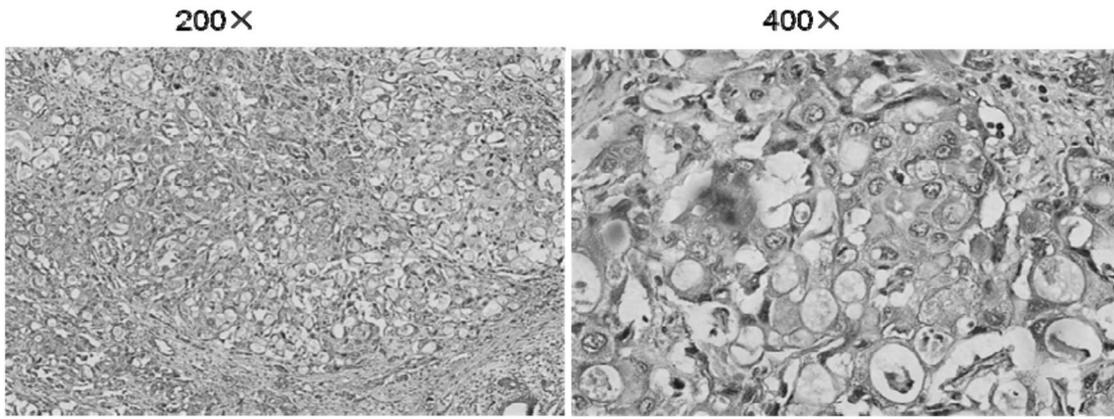


图9



图10

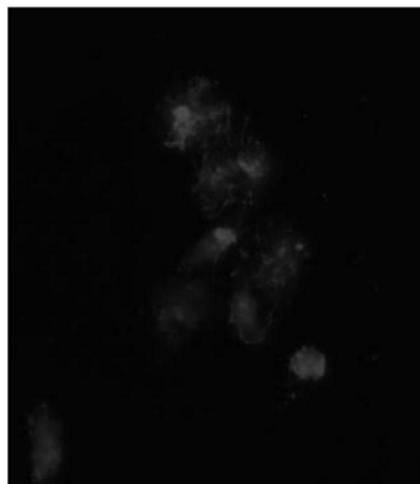


图11

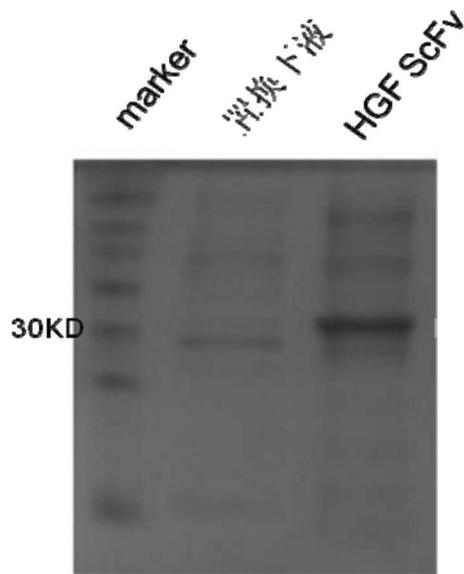


图12

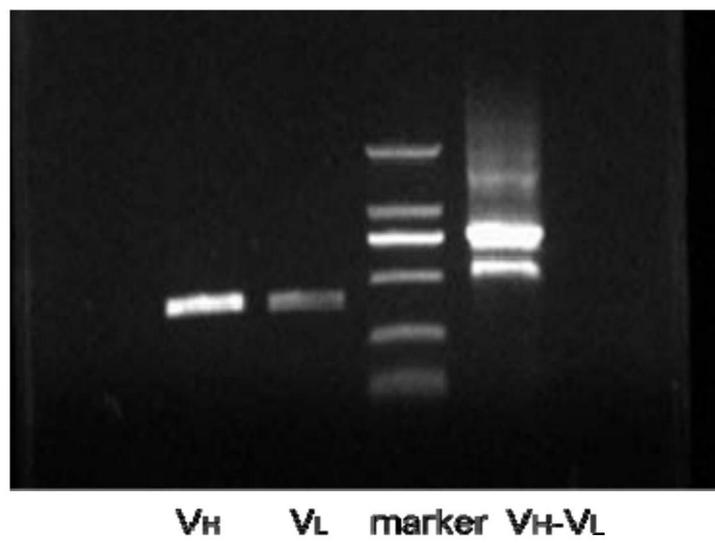
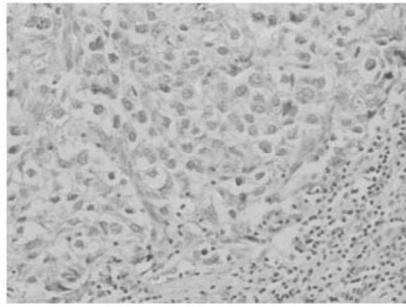
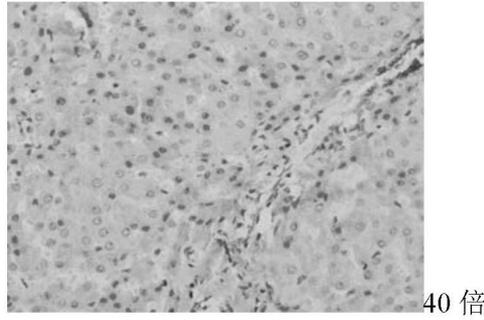


图13

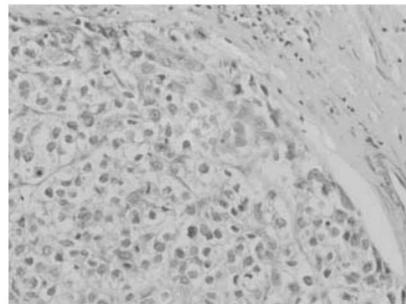


抗体在人肝细胞肝癌（HCC）组织中的表达

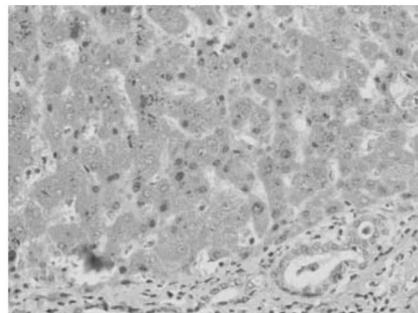


抗体在癌旁中的表达

图14



在人肝细胞肝癌（HCC）组织中的表达



在人肝癌组织中的表达

图15

AFU

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MRAPGMRSRP AGPALLLLLL FLGAAESVRR AQPPRRYTPD
70 80 90 100 110 120
 WPSLDSRPLP AWFDEAKFGV FIHWGVFSVP AWGSEWFWWH WQGEGRPQYQ RFMRDNYPPG
130 140 150 160 170 180
 FSYADFGPQF TARFFHPEEW ADLQAAGAK YVVLTTKHHE GFTNWPSVPS WNWNSKDVGP
190 200 210 220 230 240
 HRDLVGELGT ALRKRNIIRYG LYHSLLEWFH PLYLLDKKNG FKTQHFVSAK TMPELYDLVN
250 260 270 280 290 300
 SYKPDLIWSD GEWPCPTYW NSTNFLSWLY NDSPVKDEVV VNDRWGQNCN CHHGGYYNCE
310 320 330 340 350 360
 DKFKPQSLPD HKWEMCTSID KFSWGYRRDM ALSDVTEESE IISELVQTVS LGGNYLLNIG
370 380 390 400 410 420
 PTKDGLIVPI FQERLLAVGK WLSINGEAIY ASKPWRVQWE KNTTSVWYTS KGSAYVAIFL
430 440 450 460 470 480
 HWPENGLVNL ESPITTSTTK ITMLGIQGD LKWSTDPDKGL FISLPQLPPS AVPAEFAWTI

KLTGVK

GGT2

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRGSEFMKKK LVVLGLLAVV LVLVIVGLCL
70 80 90 100 110 120
 WLPSASKEPD NHVYTRAAVA ADAKQCSKIG RDALRDGGSA VDAAIAALLC VGLMNAHSMG
130 140 150 160 170 180
 IGGGLFLTIY NSTTRKAEVI NAREVAPRLA FATMFNSSEQ SQKGGLSVAV PGEIRGYELA

190 200 210 220 230 240
 HQRHGRLPWA RLFQPSIQLA RQGFPVKGKL AAALENKRTV IEQQPVLCEV FCRDRKVLRE

250 260 270 280 290 300
 GERLTLPQLA DTYETLAI EG AQAFYNGSLT AQIVKDIQAA GGIVTAEDLN NYRAELIEHP

310 320 330 340 350 360
 LNISLGDVVL YMP SAPLSGP VLALILNILK GYNFSRESVE SPEQKGLTYH RIVEAFRFAY

370 380 390 400 410 420
 AKRLLGDPK FVDVTEVVRN MTSEFFAAQL RAQISDDTTH PISYYKPEFY TPDDGGTAHL

430 440 450 460 470 480
 SVVAEDGSAV SATSTINLYF GSKVRSPVSG ILFNNEMDDF SSPSITNEFG VPPSPANFIQ

490 500 510 520 530 540
 PGKQPLSSMC PTIMVGQDQG VRMVVGAAGG TQITTATALA IIYNLWFGYD VKRAVEEPRL

550 560 570 580 590 600
 HNQLLPNVT VERNIDQAVT AALETRHHHT QIASTFIAVV QAIVRTAGGW AAASDRKGG

610 620
 EPAGYKLA AA LEHHHHHDP AA

GPC3

ATCHQVRSFFQRLQPGLKWPETVPVPGSDLQVCLPKGPTCCSRKMEEKYQLTARLNMEQLLQSA
 SMELKFLIIQNAAVFQEAFEIVVRHAKNYTNAMFKNNYPSLTPQAFEFVGEFFTDVSLYILGSDIN
 VDDMVNELFDSLFPVIYTQLMNPGLPDSALDINECLRGARRDLKVFGNFPKLIMTQVSKSLQVTR
 IFLQALNLGIEVINTTDHLKFSKDCGRMLTRMWYCSYCQGLMMVKPCGGYCNVVMQGC MAGV
 VEIDKYWREYILSLEELVNGMYRIYDMENVLLGLFSTIHDSIQYVQKNAGKLT TTETEKKIWHFK
 YPIFFLCIGLDLQIGKLCAHSQQRQYRF

HGF

10 20 30 40 50 60
 MGSSHHHHHH SSGLVPRGSH MASMTGGQQM GRQRKRRNTI HEFKKSAKTT LIKIDPALKI

70 80 90 100 110 120
 KTKKVNTADQ CANRCTRNGK LPFTCKAFVF DKARKQCLWF PFNSMSSGVK KEFGHEFDLY

130 140 150 160 170 180
 ENKDYIRNCI IGKGRSYKGT VSITKSGIKC QPWSSMIPHE HSFLPSSYRG KDLQENYCRN

190 200 210 220 230 240
 PRGEEGGPWC FTSNPEVRYE VCDIPQCSEV ECMTCSNGESY RGLMDHTESG KICQRWDHQT

250 260 270 280 290 300
 PHRHKFLPER YPDKGFDDNY CRNPDGQPRP WCYTLDPHTR WEYCAIKTCA DNTMNDTDVP

310 320 330 340 350 360
 LETTECIQQG GEGYRGTVNT IWNGIPCQRW DSQYPHEHDM TPENFKCKDL RENYCRNPDG

370 380 390 400 410 420
 SESPWCFTTD PNIRVGYSQ IPNCDSHGG DCYRGNGKNY MGNLSQTRSG LTCSMWDKNM

430 440 450 460 470 480
 EDLHRHIFWE PDASKLNENY CRNPDDAHG PWCYTGNPLI PWDYCPISRC EGDTPPTIVN

490 500 510 520 530 540
 LDHPVISCAL TKQLRVVNGI PTRTNIGWMV SLRYRNKHIC GGSLIKESWV LTARQCFPSR

550 560 570 580 590 600
 DLKDYEAWLG IHDVHGRGDE KCKQVLNVSQ LVYGPEGSDL VLMKLARPAV LDDFVSTIDL

610 620 630 640 650 660
 PNYGCTIPEK TSCSVYGGWGY TGLINYDGLL RVAHLYIMGN EKCSQHHRGK VTLNESEICA

670 680 690 700 710 720
 GAEKIGSGPC EGDYGGPLVC EQHKMRMVLG VIVPGRGCAI PNRPGIFVRV AYYAKWIHKI

730 740 750
 ILTYKVPQSD PNSSSVDKLA AALEHHHHHH DPAA

图16

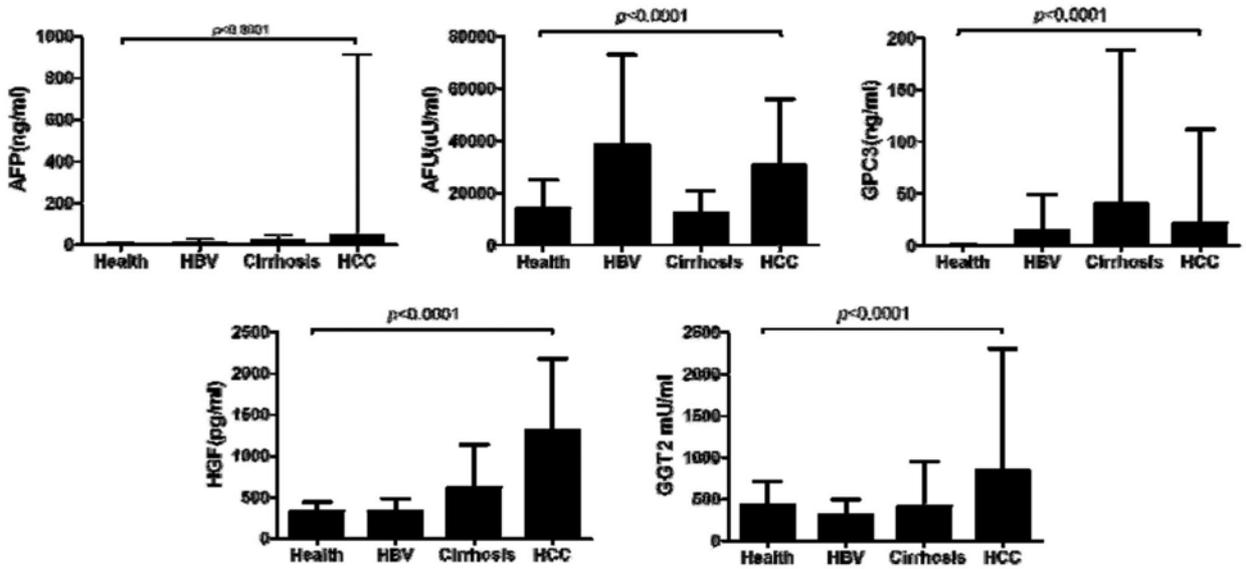


图17

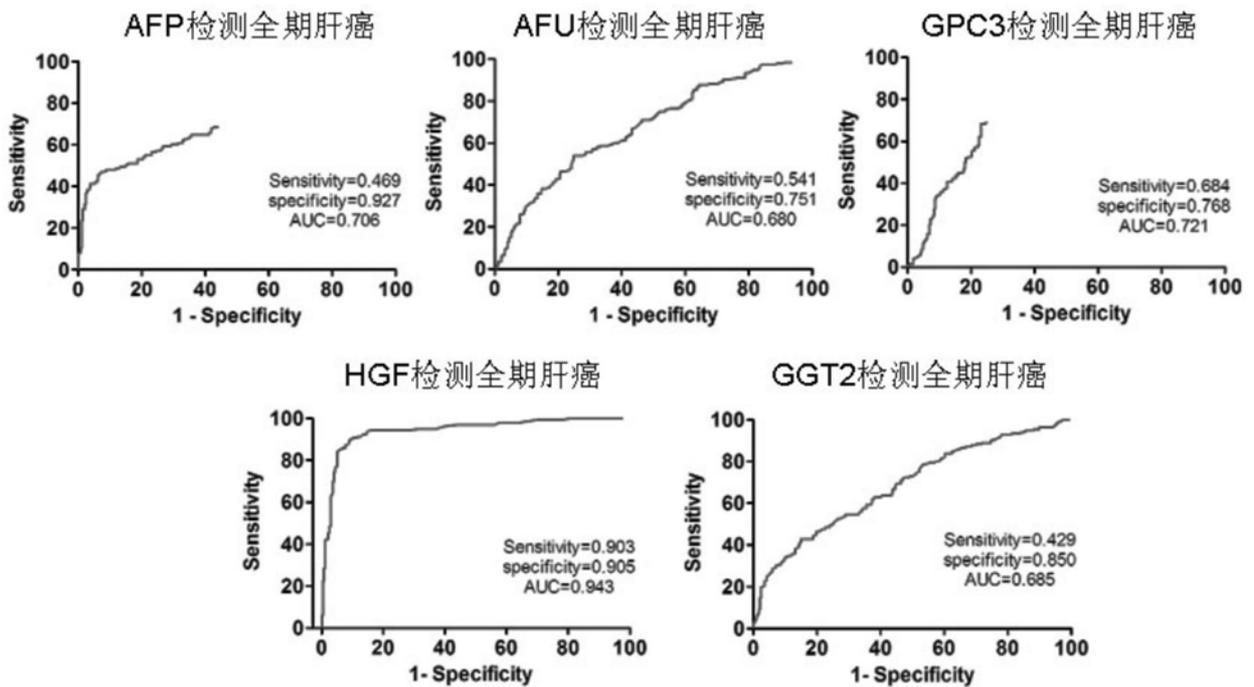


图18

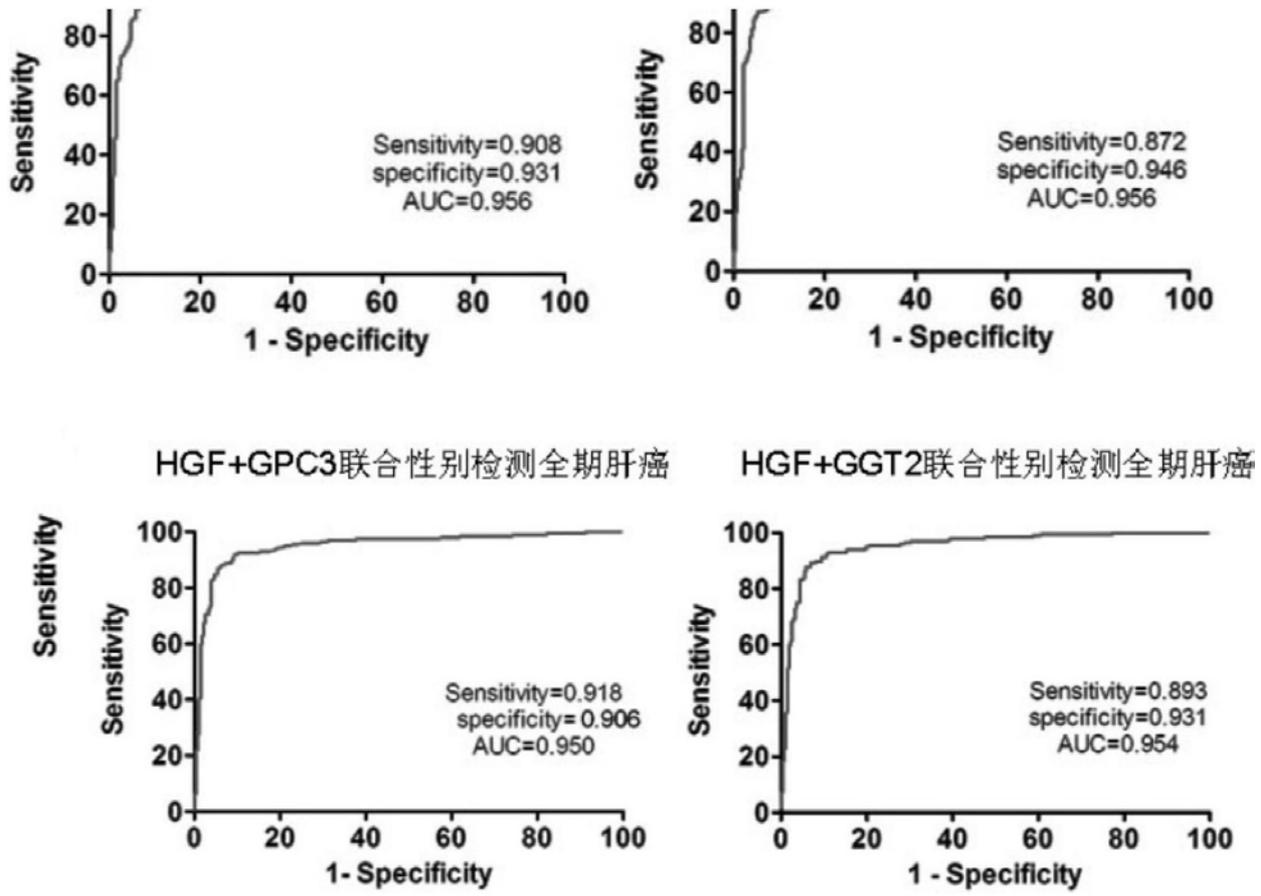


图19

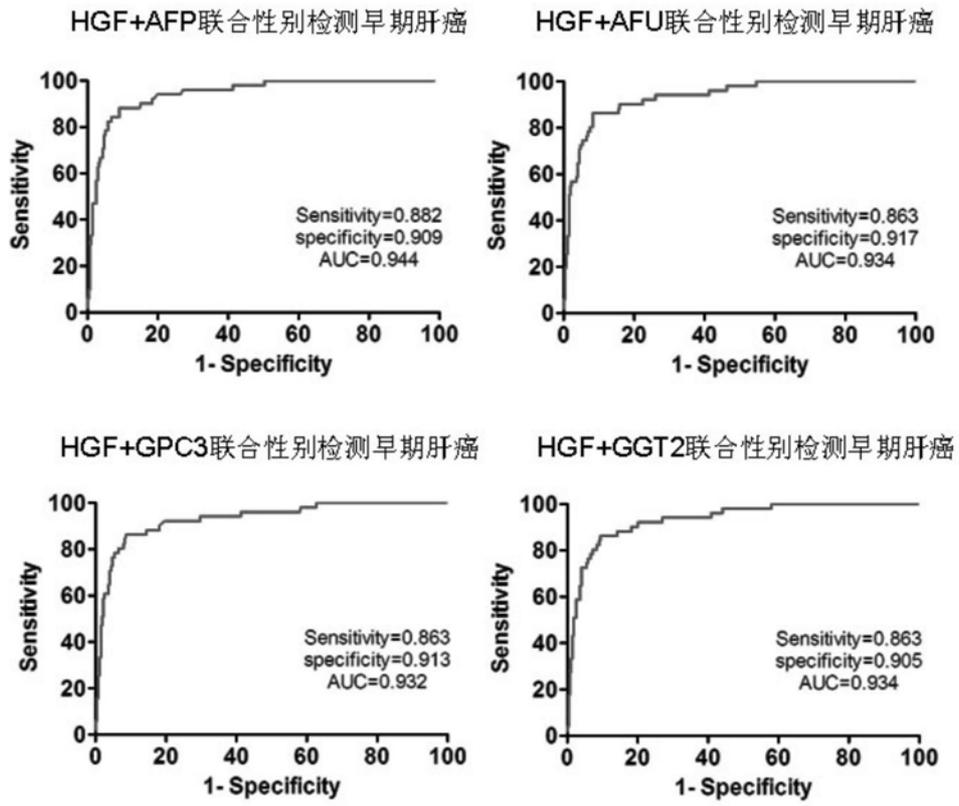


图20

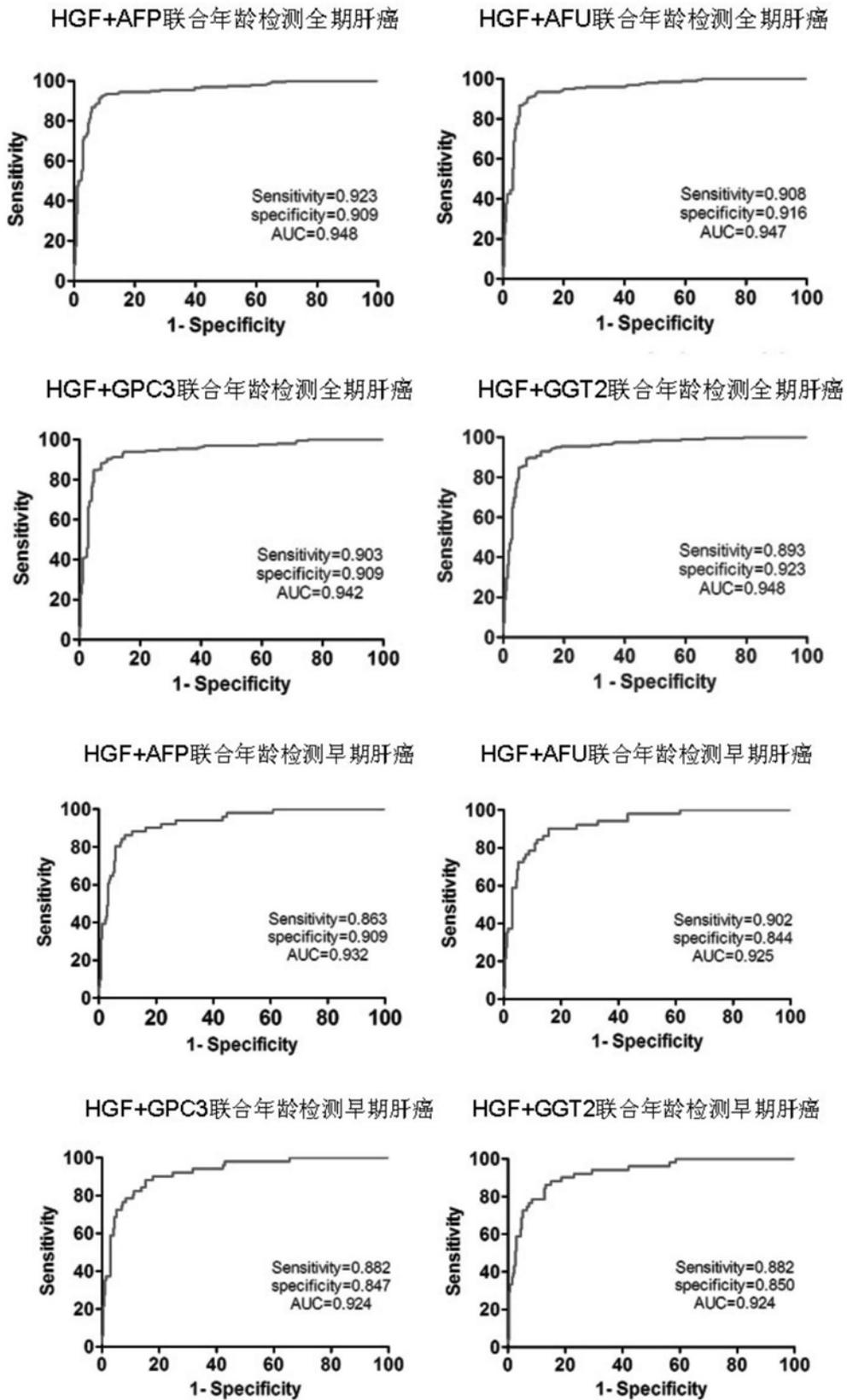


图21

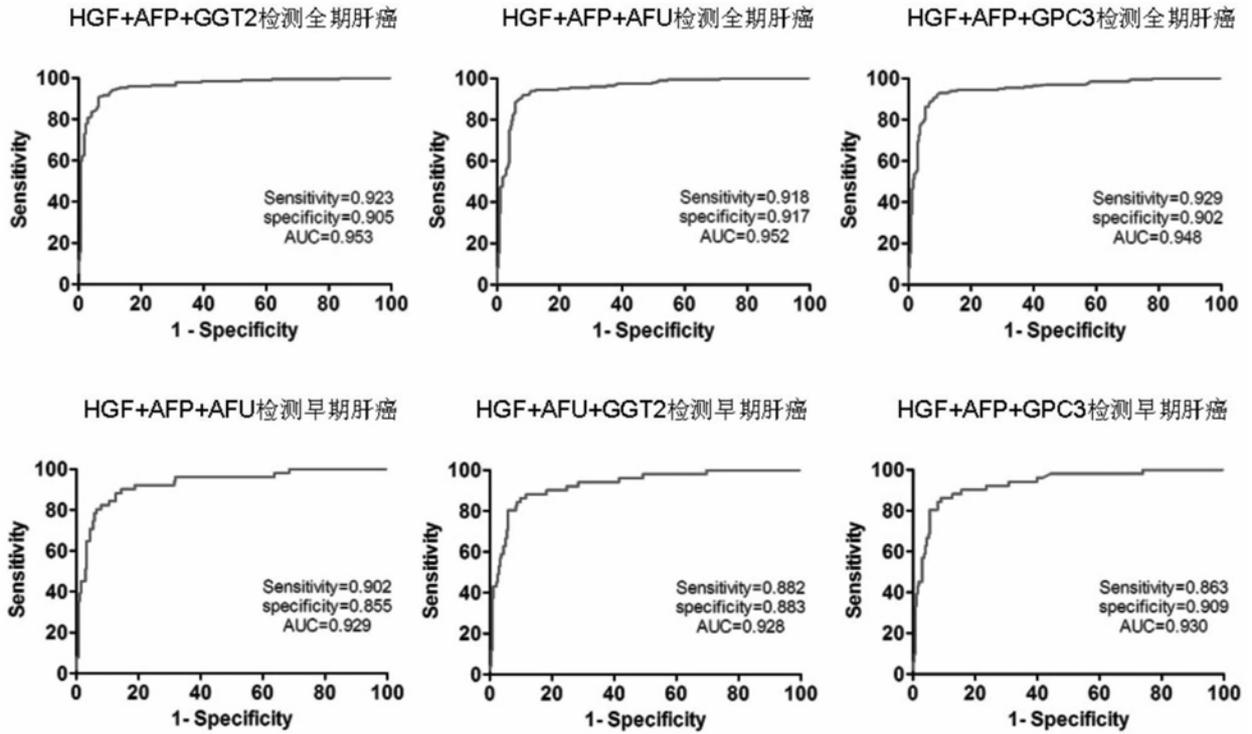


图22

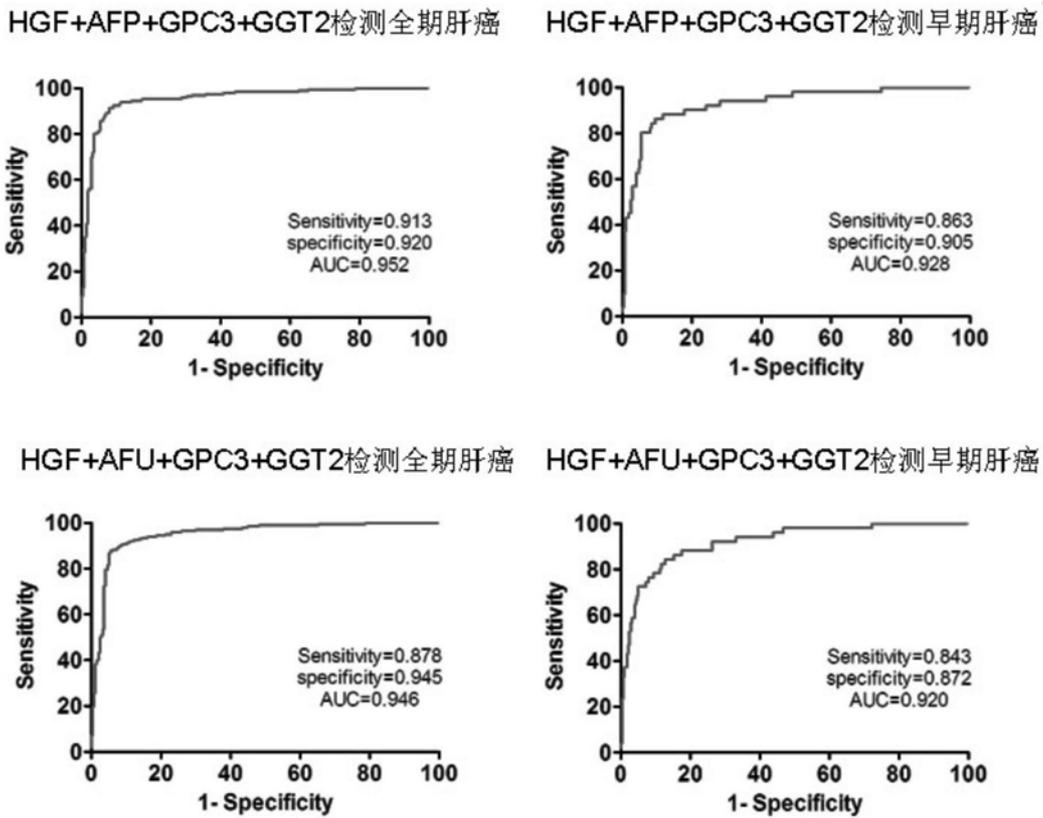


图23

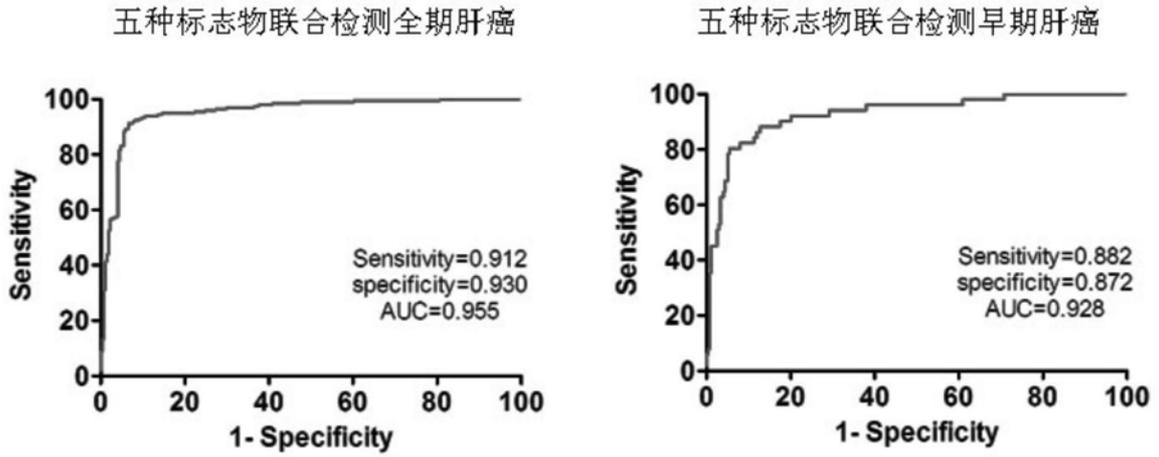


图24

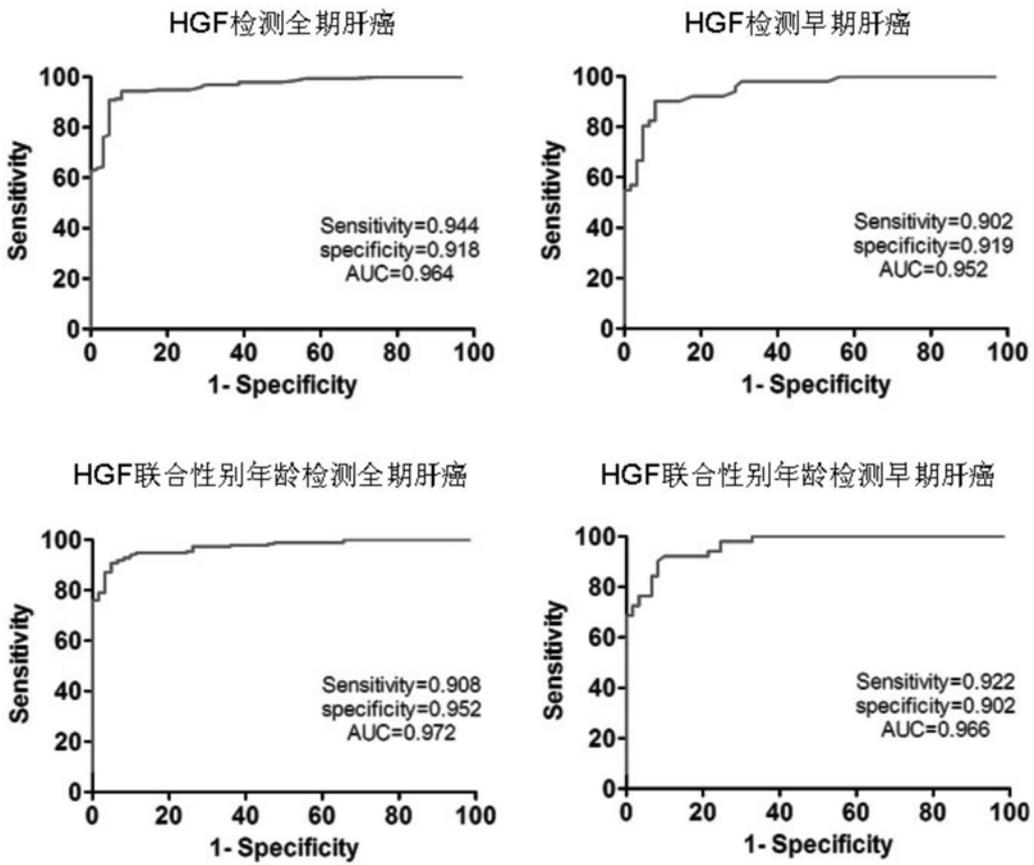


图25

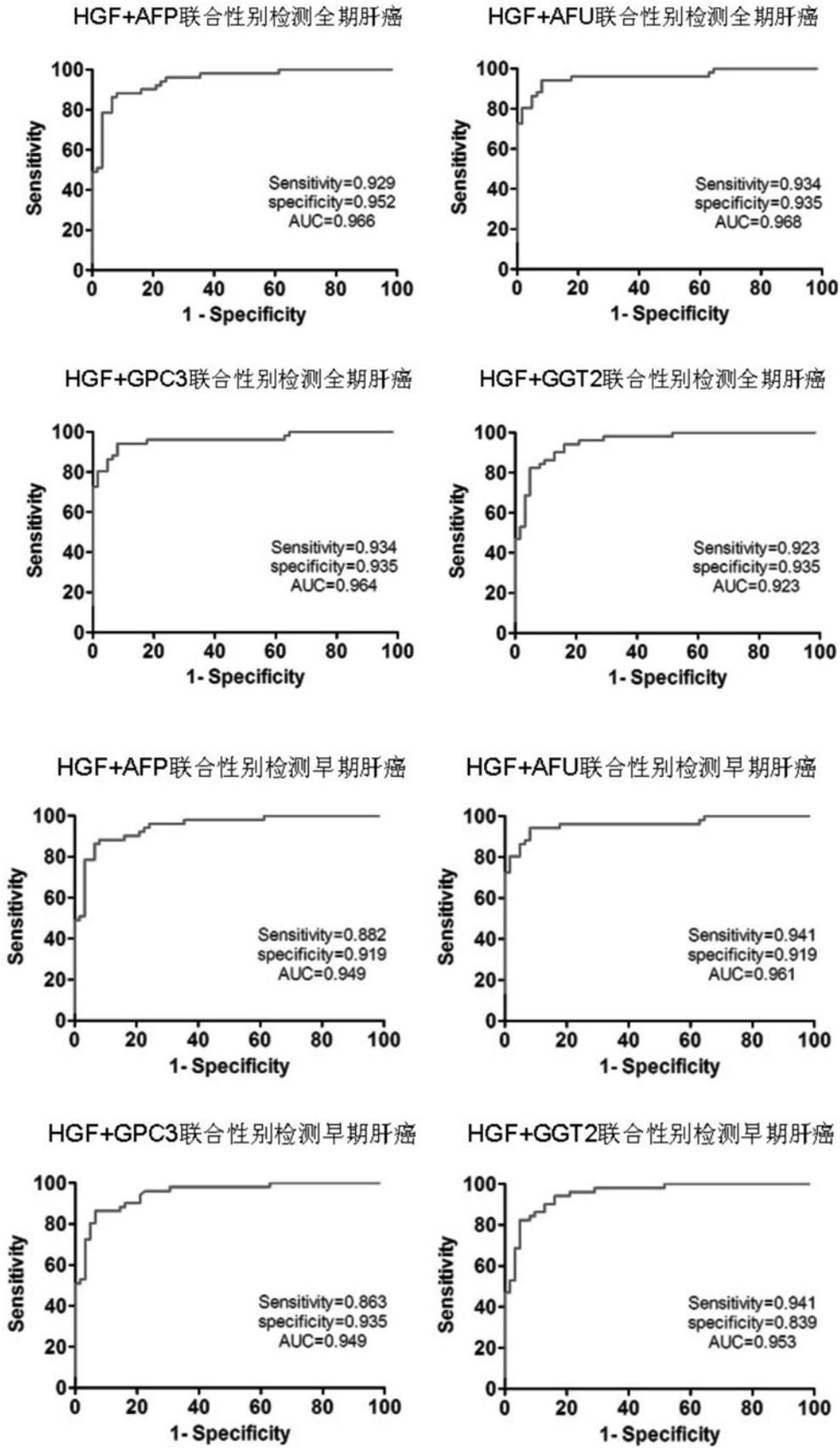


图26

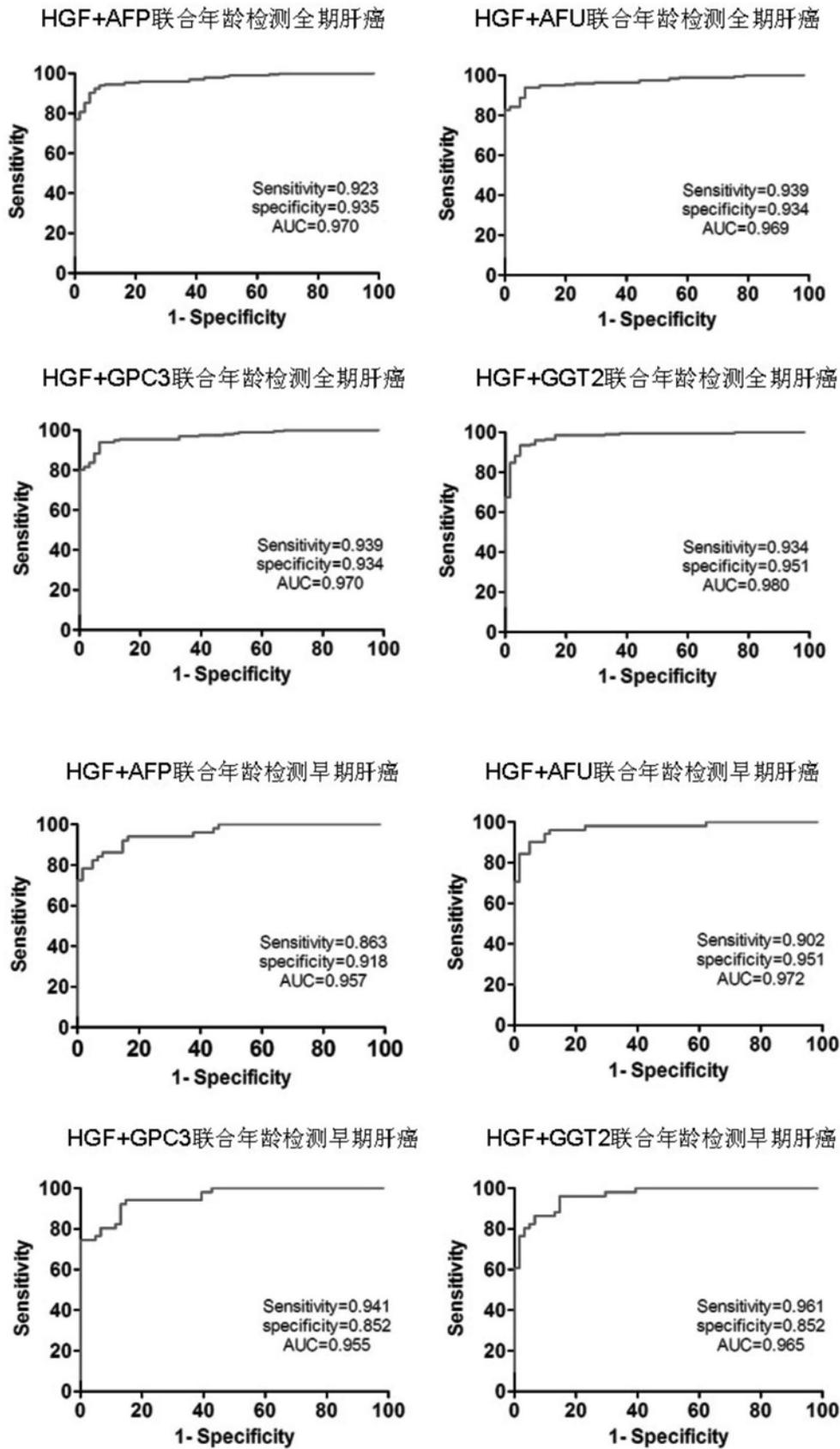


图27

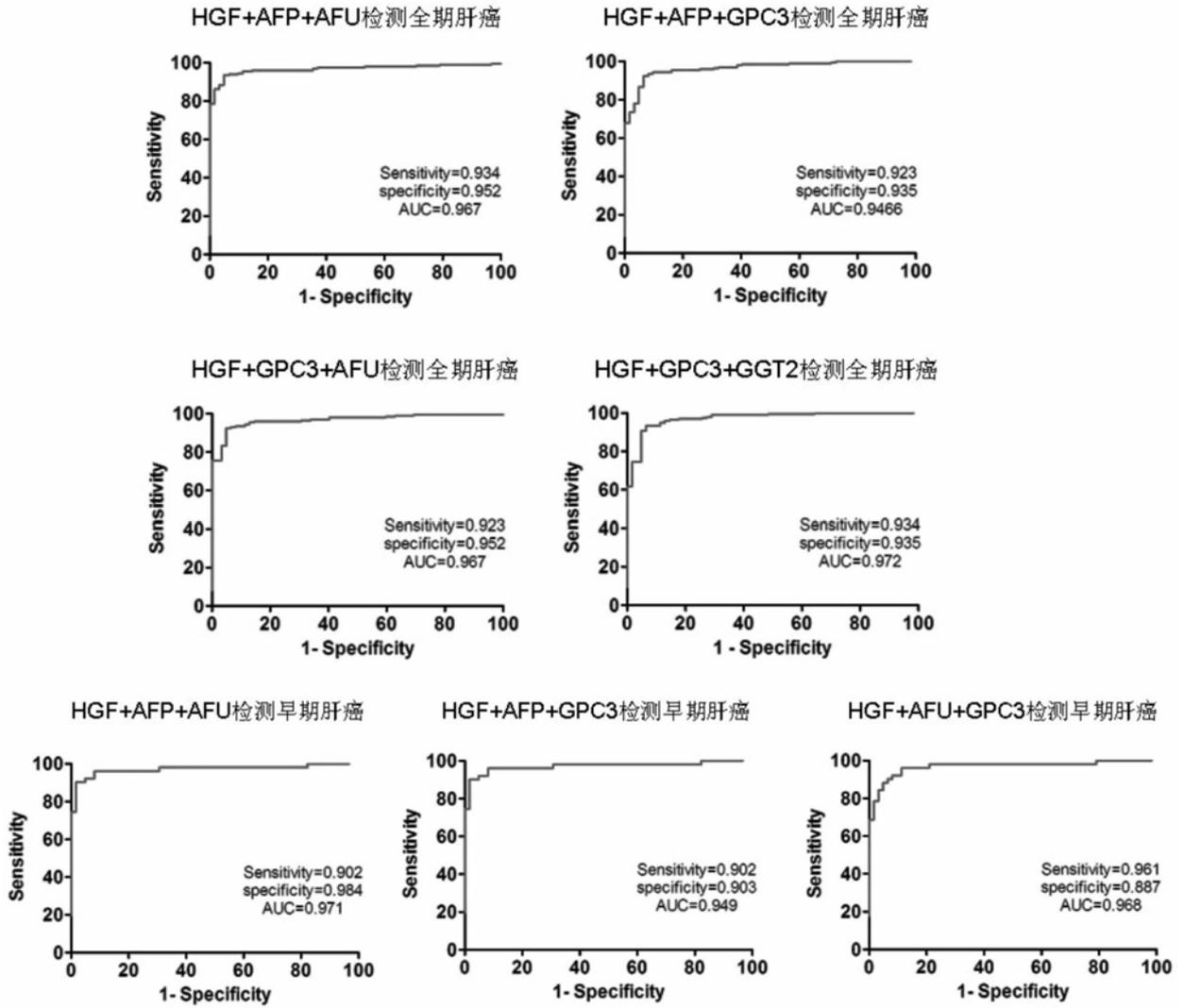


图28

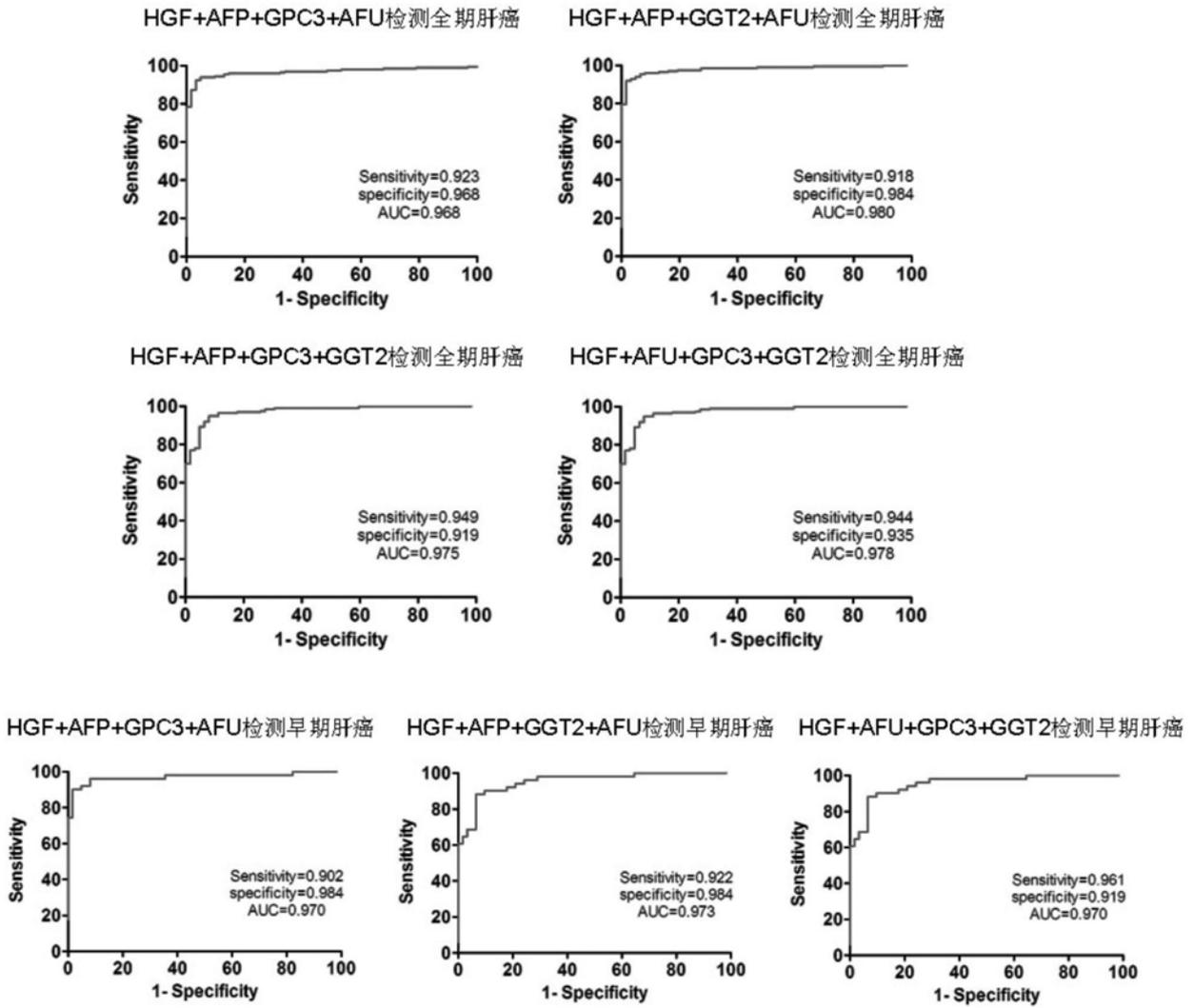


图29

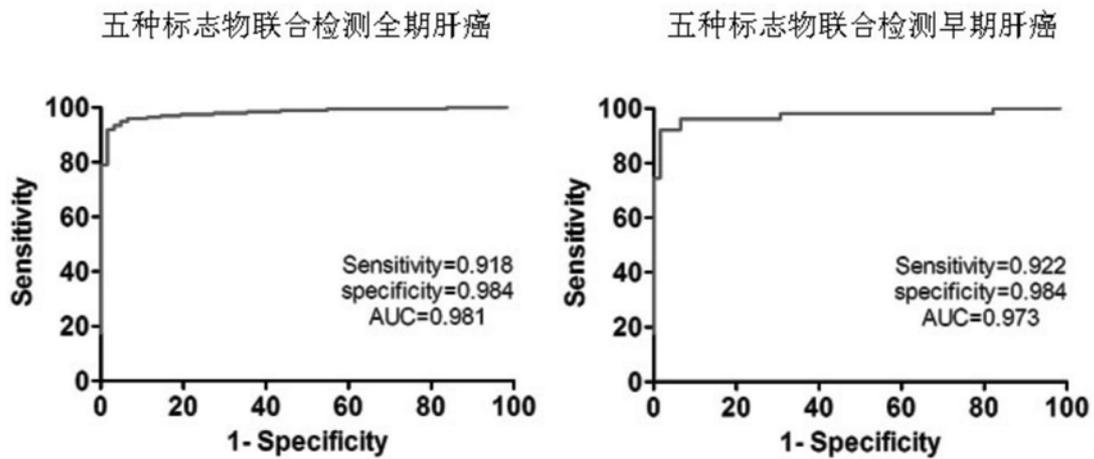


图30

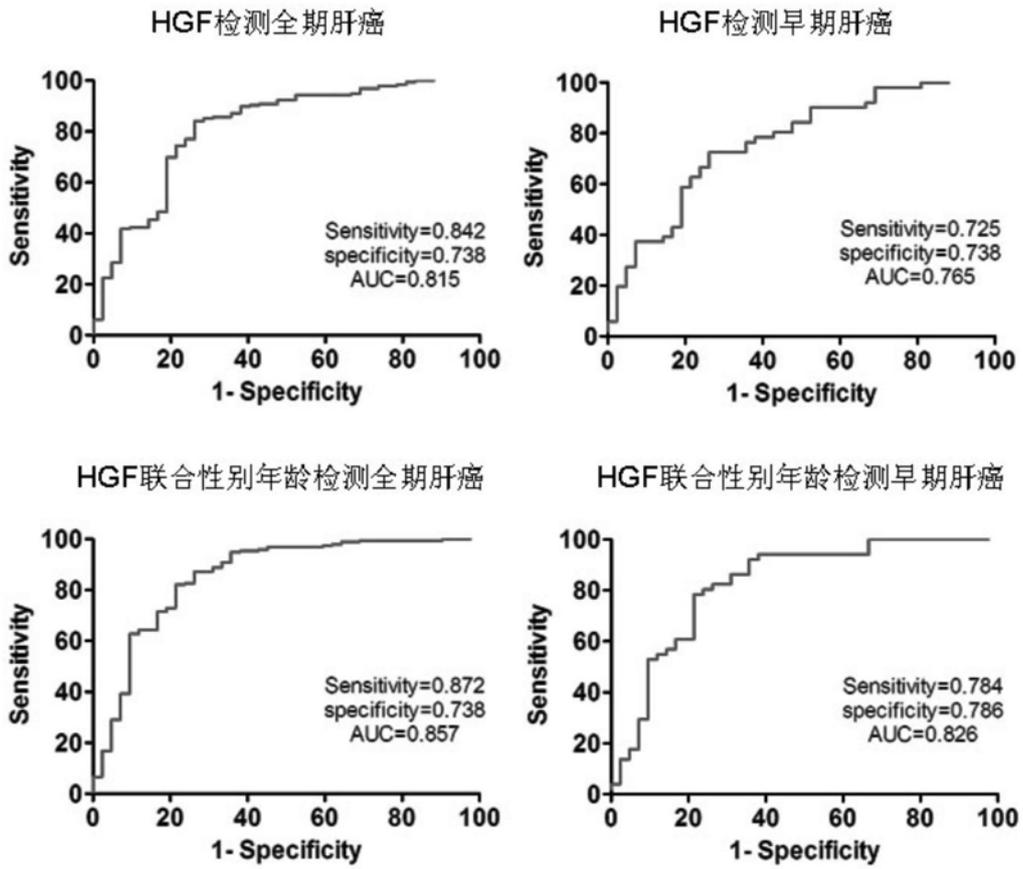


图31

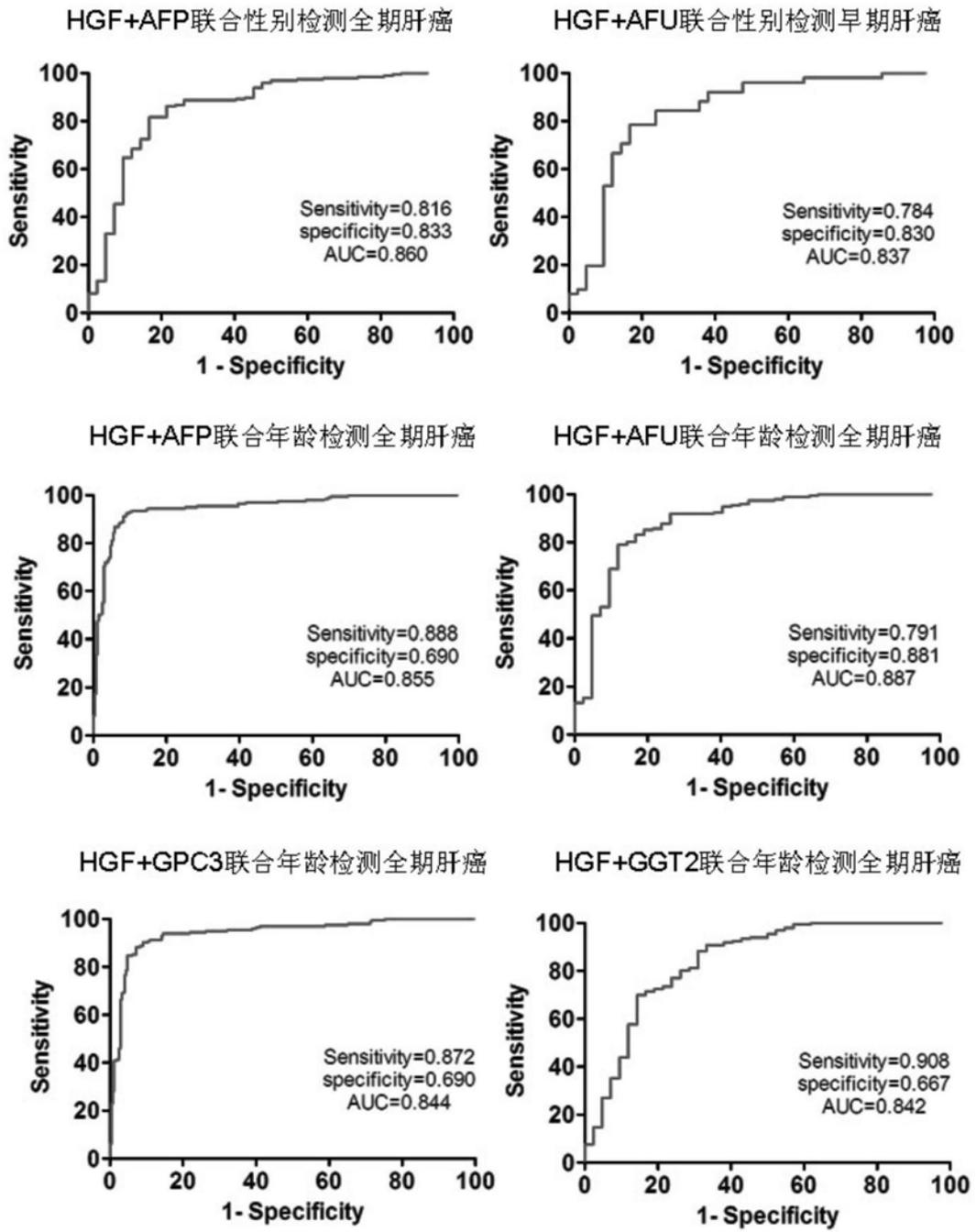


图32

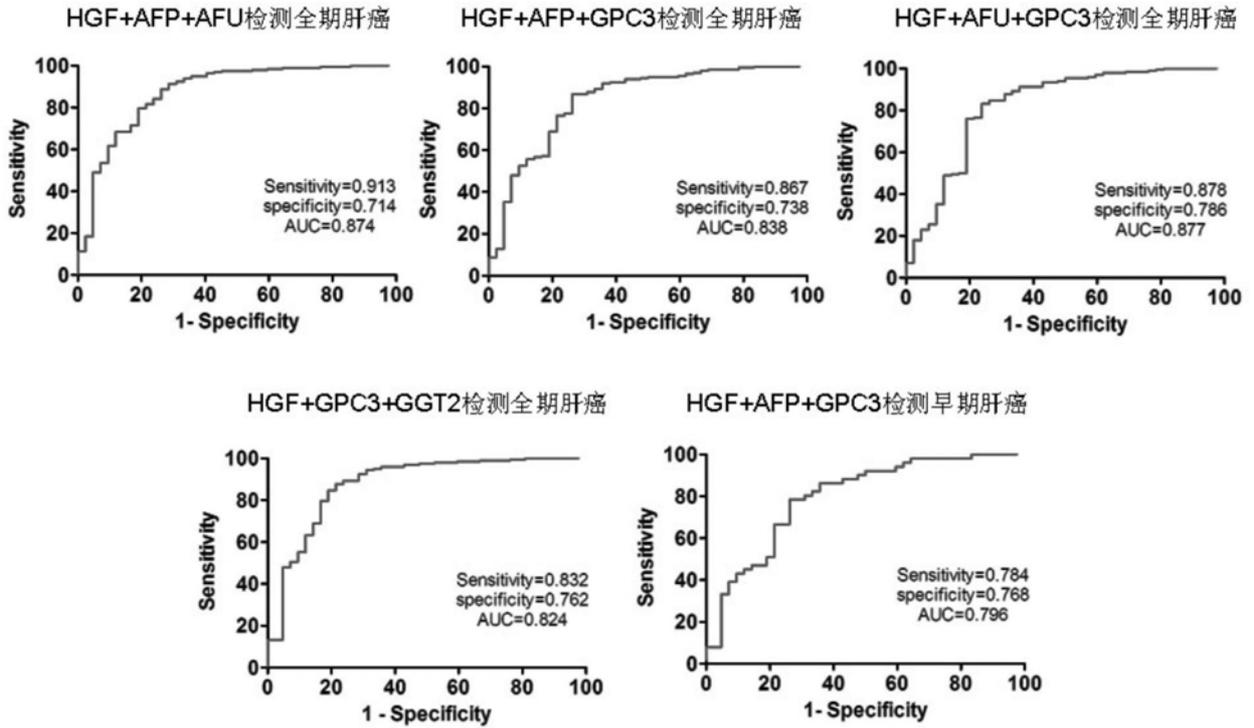


图33

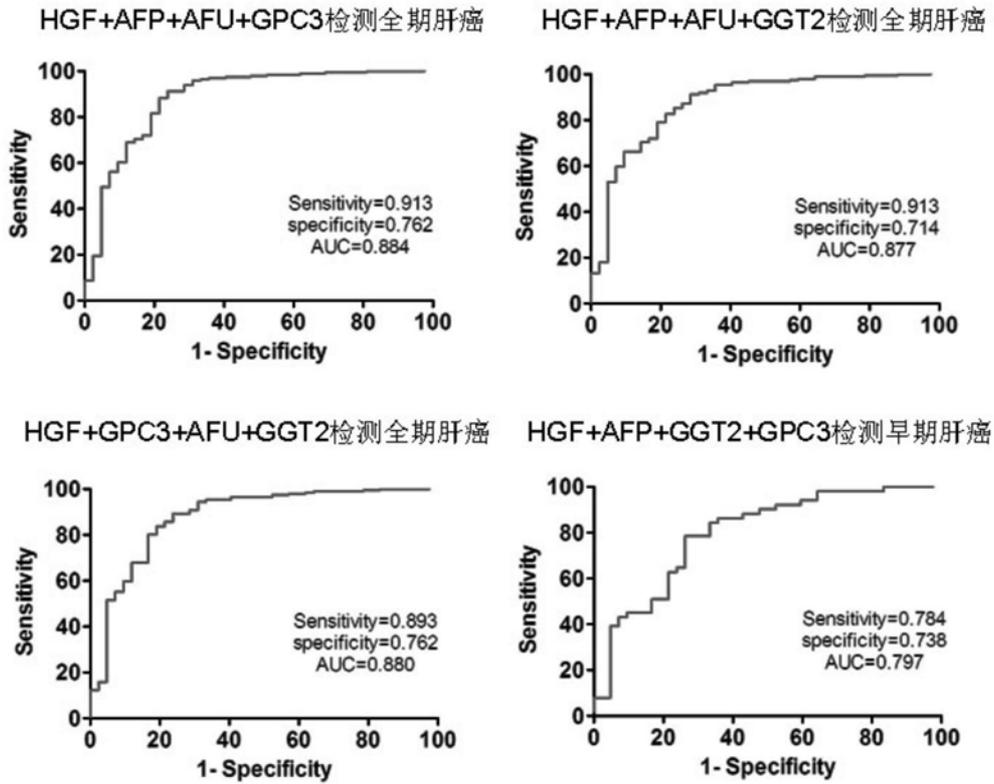


图34

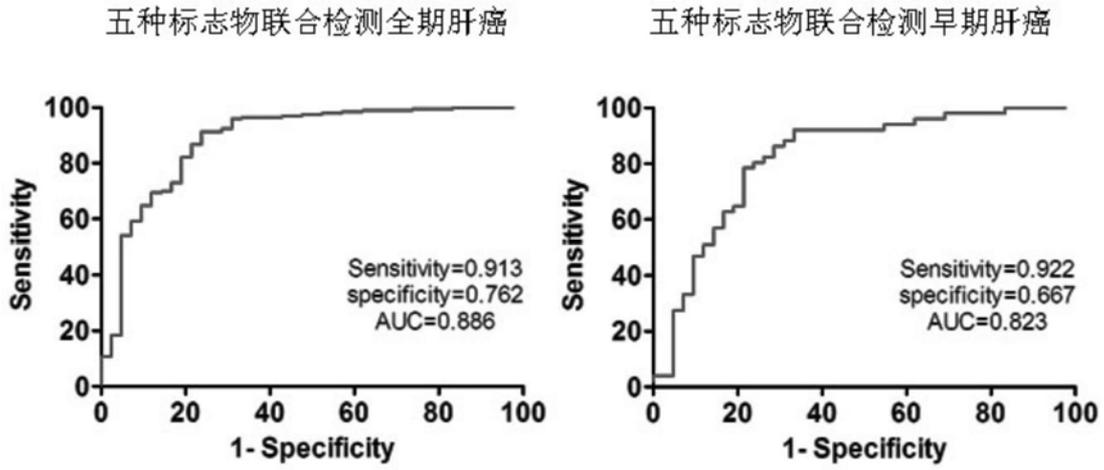


图35

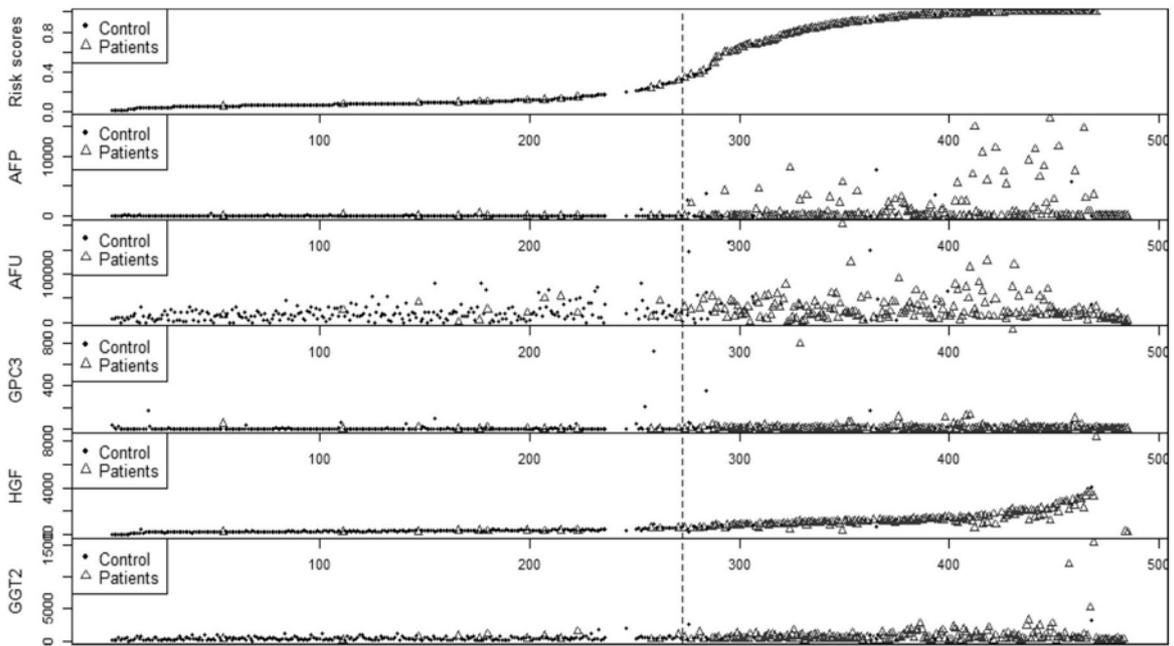


图36