



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109387627 B

(45) 授权公告日 2021.09.24

(21) 申请号 201811203459.6

CN 105753991 A, 2016.07.13

(22) 申请日 2018.10.16

EP 2945648 A1, 2015.11.25

EP 1212423 A2, 2002.06.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109387627 A

Genbank.Accession NO:ACT97132,
VAR2CSA, partial [Plasmodium falciparum].
《Genebank》.2016,

(43) 申请公布日 2019.02.26

Thomas M. Clausen et al..Structural
and Functional Insight into How the
Plasmodium falciparum VAR2CSA Protein
Mediates Binding to Chondroitin Sulfate A
in Placental Malaria.《THE JOURNAL OF
BIOLOGICAL CHEMISTRY》.2012,第287卷(第28
期),

(73) 专利权人 中国科学院深圳先进技术研究院
地址 518055 广东省深圳市南山区西丽大
学城学苑大道1068号

Anand Srivastava et al..Var2CSA
Minimal CSA Binding Region Is Located
within the N-Terminal Region.《PLoS ONE》
.2011,第6卷(第5期),

(72) 发明人 范秀军 张居作 张键 代小勇
张保珍 汪宝蓓 陈指龙

Ali Salanti et al..Targeting Human
Cancer by a Glycosaminoglycan Binding
Malaria Protein.《Cancer Cell》.2015,

(74) 专利代理机构 北京市诚辉律师事务所
11430

康巍等.恶性疟原虫海南株var2csa基因DBL
区蛋白的原核表达及功能分析.《中国寄生虫学
与寄生虫病杂志》.2011,第29卷(第1期),

代理人 范盈

审查员 赵佩

(51) Int.Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表4页 附图2页

(56) 对比文件

CN 104136041 A, 2014.11.05

CN 108570118 A, 2018.09.25

CN 106459224 A, 2017.02.22

CN 106512022 A, 2017.03.22

CN 106459224 A, 2017.02.22

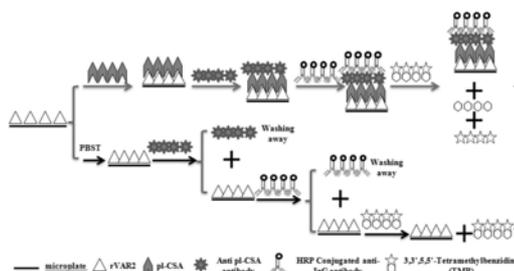
(54) 发明名称

一种基于胎盘样硫酸软骨素A的癌症筛查和
早期诊断的试剂方法

(57) 摘要

本发明涉及一种基于胎盘样硫酸软骨素A的
癌症筛查和早期诊断的试剂和方法,具体公开了
一种用于检测肿瘤的ELISA试剂盒,其包括用于
与胎盘样硫酸软骨素A (p1-CSA) 结合的捕获蛋
白,优选地,所述的捕获蛋白选自疟原虫感染红
细胞表面抗原 (VAR2CSA, rVAR2) 的最小结合肽
段,更优选地,所述最小结合肽段序列如SEQ ID
No.1所示。本发明首次发现了p1-CSA能够在多种

体液中检测到,这为定性或定量在体外生物学检
测p1-CSA提供了依据,本发明的方法检测限低、
重复性好、特异性高。



CN 109387627 B

1. 一种用于检测肿瘤的ELISA试剂盒,其包括用于与胎盘样硫酸软骨素A(p1-CSA)结合的捕获蛋白,所述的捕获蛋白选自疟原虫感染红细胞表面抗原的最小结合肽段,所述最小结合肽段序列如SEQ ID No.1所示,SEQ ID No.1序列为EDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKC。

2. 根据权利要求1所述的ELISA试剂盒,其特征在于,试剂盒中还包括检测抗体;所述的检测抗体为胎盘样硫酸软骨素A的抗体。

3. 根据权利要求2所述的ELISA试剂盒,其特征在于,检测抗体为胎盘样硫酸软骨素A的单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体和抗体片段。

4. 根据权利要求1-3任一项所述的ELISA试剂盒,其特征在于,试剂盒中还包括酶标抗体,所述酶标抗体为抗检测抗体酶标的抗体。

5. 根据权利要求4所述的ELISA试剂盒,其特征在于,所述的酶标抗体中的酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖酶、金胶体。

6. 根据权利要求5所述的ELISA试剂盒,其特征在于,在使用辣根过氧化物酶的情况下,作为显色底物选自3,3',5,5'-四甲基联苯胺、邻苯二胺;在使用ALP的情况下,作为显色底物选自对硝基苯磷酸酯;在使用 β -半乳糖酶时,作为显色底物,选自邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷。

7. 根据权利要求1-3任一项所述的ELISA试剂盒,其特征在于,试剂盒中还包括洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液、标准对照蛋白。

8. 根据权利要求1-3任一项所述的ELISA试剂盒,其特征在于,最低检测限为310 ng/mL以上。

9. 权利要求1-8任一项所述的ELISA试剂盒在制备肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复的检测试剂的用途。

10. 一种检测胎盘样硫酸软骨素A的ELISA方法,其特征在于,其中以疟原虫感染红细胞表面抗原的最小结合肽段作为捕获蛋白,疟原虫感染红细胞表面抗原的最小结合肽段序列如SEQ ID No.1所示,SEQ ID No.1序列为EDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKC。

11. 根据权利要求10所述的检测胎盘样硫酸软骨素A的ELISA方法,其特征在于,所述ELISA方法为直接法ELISA、间接法ELISA或夹心法ELISA。

12. 根据权利要求10所述的检测胎盘样硫酸软骨素A的ELISA方法,其特征在于,当为夹心法ELISA时以胎盘样硫酸软骨素A抗体为检测抗体。

13. 疟原虫感染红细胞表面抗原的最小结合肽段在制备检测受试者罹患肿瘤情况的试剂中的用途,所述的疟原虫感染红细胞表面抗原的最小结合肽段的序列如SEQ ID No.1所示。

14. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,受检测的样品为生物体液。

15. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,受检测的样品为细胞裂解液、细胞培养液、血液、血清、血浆;

所述罹患肿瘤情况包括肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复。

16. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为酶免疫分析用试剂。

17. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为化学发光酶免疫测定法用试剂、荧光酶免疫测定法用试剂、放射免疫测定法用试剂。

18. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为化学发光免疫测定法

用试剂、荧光抗体法用试剂。

19. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为电化学发光免疫测定法用试剂。

20. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为免疫层析法用试剂。

21. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为凝集法用试剂、竞争法用试剂。

22. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为胶体金试纸条。

23. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为纳米检测试剂胶体试剂。

24. 根据权利要求13所述的用途,其特征在于,其中所述的试剂为ELISA试剂。

25. 根据权利要求16所述的用途,其特征在于,所述酶免疫分析选自ELISA直接法、ELISA间接法,ELISA夹心法。

26. 根据权利要求25所述的用途,其特征在于,所述酶免疫分析选自ELISA夹心法。

一种基于胎盘样硫酸软骨素A的癌症筛查和早期诊断的试剂方法

技术领域

[0001] 本发明涉及生物技术检测领域,具体涉及一种基于胎盘样硫酸软骨素A的癌症筛查和早期诊断ELISA方法及其试剂盒。

背景技术

[0002] 癌症是一种全球范围内严重的公共健康问题,源于癌细胞不可控的异常生长和转移。根据国际癌症组织的2012年的统计,每年大约有1410万的新增癌症病例,造成大约有820万病人死亡,且因生活方式的改变呈现逐年增加的趋势,如饮食失衡、缺乏锻炼以及高龄生育等^[1-3]。遗憾的是,目前癌症的筛查、和早期诊断是尚未克服的科学难题,癌症病例被发现时通常已经进入中晚期,此时癌细胞已广泛转移或者疯狂生长,普通的药物很难抑制癌细胞生长,化疗成为了主要的方式,多数的化疗药物在消灭或抑制癌细胞的同时抑制了正常细胞的生长和更新,使得癌症成为了不治之症。癌症的早期可能是治疗的窗口期,因此迫切需要探索一种更有效的癌症筛查和早期诊断的方法。

[0003] 近期的分子标志物研究为癌症发生机制提供了一种新的视角,如糖胺聚糖^[4],血管生成素^[5]等。但基于这些生物标志物还缺乏可靠的筛查和诊断方法。酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immuno-sorbent assay,ELISA)起始于1975年,当时用于检测旋毛虫抗体,用以诊断旋毛虫病^[6]。由于ELISA方法的敏感性高、特异性好、操作简单、高通量等特点^[7,8],先已经被广泛用于细菌^[9]、病毒^[7]和寄生虫^[10]等相关疾病的筛查、诊断和免疫学监测。然而这样一种方法却很少在癌症的筛查和早期诊断中得到应用和推广,最主要的原因是缺乏一种癌症细胞特异性表达,且在多种癌症组织中广泛存在的生物学标志物。

[0004] 在已经发现癌症标志物中,胎盘样硫酸软骨素A(placental like chondroitin sulfate A,p1-CSA)是一种特征性的糖胺聚糖,具有特征性的二糖单元^[11],在癌症组织中特异性表达,有趣的是其在多种癌症组织中广泛表达,可能在癌症发展进程中发挥关键作用,与肿瘤的恶性程度呈正相关性^[12]。但p1-CSA最初作为疟原虫感染红细胞在胎盘绒毛间隙聚集的一种受体被发现,能够与疟原虫感染红细胞表面抗原VAR2CSA特异性结合。VAR2CSA与p1-CSA的结合具有高度的亲和性、特异性,最小结合单位的亲和力KD约为15Nm^[13],使得VAR2CSA能成为p1-CSA的一种特异性的捕获蛋白,用以纯化p1-CSA,或者在其他方面得以应用,但缺乏这方面试剂和方法的开发和应用。以纯化的p1-CSA进行免疫,制备抗体,从进一步建立免疫学监测方法,用于癌症的筛查和早期诊断将具有广泛和非常有前景的应用价值。

[0005] ELISA方法具有高度敏感性、高度特异性、操作简单、高通量性等特点^[7,8],已经被广泛用于细菌^[9]、病毒^[7]和寄生虫^[10]等相关疾病的筛查、诊断和免疫学监测。然而这样一种方法缺很少在癌症的筛查和早期诊断中得到应用,最主要的原因是缺乏一种癌症细胞特异性表达,且在多种癌症组织中广泛存在的生物学标志物。

[0006] 本发明针对这一科学难题,选择在癌症组织特异性表达,且在多种癌症组织中广

泛性表达的标志物p1-CSA,但其是否能释放进入生物液体,如培养上清或者血清,现有技术中并未报道,不清楚是否可以开发ELISA检测方法,检测癌症细胞本身、以及生物液体中释放的p1-CSA含量,从而确定癌细胞的存在,达到癌症筛查和早期诊断的目的。

[0007] 参考文献

[0008] 1.Torre LA,Bray F,Siegel RL,Ferlay J,Lortet-Tieulent J,Jemal A:Global cancer statistics,2012.CA:a cancer journal for clinicians 2015,65(2):87-108.

[0009] 2.Siegel R,Ma J,Zou Z,Jemal A:Cancer statistics,2014.CA:a cancer journal for clinicians 2014,64(1):9-29.

[0010] 3.Siegel RL,Miller KD,Jemal A:Cancer statistics,2016.CA:a cancer journal for clinicians 2016,66(1):7-30.

[0011] 4.Gama CI,Tully SE,Sotogaku N,Clark PM,Rawat M,Vaidehi N,Goddard WA,3rd,Nishi A,Hsieh-Wilson LC:Sulfation patterns of glycosaminoglycans encode molecular recognition and activity.Nature chemical biology 2006,2(9):467-473.

[0012] 5.Keskin D,Kim J,Cooke VG,Wu CC,Sugimoto H,Gu C,De Palma M,Kalluri R,LeBleu VS:Targeting vascular pericytes in hypoxic tumors increases lung metastasis via angiopoietin-2.Cell reports 2015,10(7):1066-1081.

[0013] 6.Ruitenberg EJ,Ljungstrom I,Steerenberg PA,Buys J:Application of immunofluorescence and immunoenzyme methods in the serodiagnosis of Trichinella spiralis infection.Annals of the New York Academy of Sciences 1975,254:296-303.

[0014] 7.Qiu X,Wong G,Audet J,Bello A,Fernando L,Alimonti JB,Fausther-Bovendo H,Wei H,Aviles J,Hiatt E et al:Reversion of advanced Ebola virus disease in nonhuman primates with ZMapp.Nature 2014,514(7520):47-53.

[0015] 8.Dwyer DS,Bradley RJ,Urquhart CK,Kearney JF:Naturally occurring anti-idiotypic antibodies in myasthenia gravis patients.Nature 1983,301(5901):611-614.

[0016] 9.Wadhwa A,Johanson RE,Eda K,Waters WR,Palmer MV,Bannantine JP,Eda S:Evaluation of ethanol vortex ELISA for detection of bovine tuberculosis in cattle and deer.BMC veterinary research 2014,10:147.

[0017] 10.Hosseinejad M:Evaluation of an indirect ELISA using a tachyzoite surface antigen SAG1for diagnosis of Toxoplasma gondii infection in cats.Experimental parasitology 2012,132(4):556-560.

[0018] 11.Mikami T,Kitagawa H:Biosynthesis and function of chondroitin sulfate.Biochimica et biophysica acta 2013,1830(10):4719-4733.

[0019] 12.Salanti A,Clausen TM,Agerbaek MO,Al Nakouzi N,Dahlback M,Oo HZ,Lee S,Gustavsson T,Rich JR,Hedberg BJ et al:Targeting Human Cancer by a Glycosaminoglycan Binding Malaria Protein.Cancer cell 2015,28(4):500-514.

[0020] 13.Clausen TM,Christoffersen S,Dahlback M,Langkilde AE,Jensen KE,Resende M,Agerbaek MO,Andersen D,Berisha B,Ditlev SB et al:Structural and

functional insight into how the Plasmodium falciparum VAR2CSA protein mediates binding to chondroitin sulfate A in placental malaria. The Journal of biological chemistry 2012, 287 (28) :23332-23345.

发明内容

[0021] 为了解决早期诊断癌症较难,验证方法少等难题,本发明首次证实了在血液等生物液体中能检测到p1-CSA,并且验证了通过分析p1-CSA的水平确证受试者患肿瘤的发生、发展或康复情况。本发明采用捕获p1-CSA的疟原虫感染红细胞表面抗原结合肽段及p1-CSA抗体作为检测试剂对受试者进行检测。证实了p1-CSA及其抗体能够通过体液的体外检测,进行早期的肿瘤诊断和肿瘤发展监控。

[0022] 具体地,本发明第一个方面提供了提供一种用于检测肿瘤的ELISA试剂盒,其包括用于检测胎盘样硫酸软骨素A (p1-CSA)的捕获蛋白。

[0023] 本发明中的技术方案中,所述ELISA试剂盒包含固定相载体,所述固定相载体优选为96孔微量板、微量杯、纳米棒、纳米粒等生物相容性材料,只要其能够将捕获蛋白固定于固定相表面而不破坏生物活性。

[0024] 在本发明的技术方案中,所述的捕获蛋白选自疟原虫感染红细胞表面抗原 (VAR2CSA, rVAR2) 的最小结合肽段,其序列如SEQ ID No.1所示,

[0025] EDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKC SEQ ID No.1。

[0026] 在上述方法中,所述方法为非诊断和治疗用途。

[0027] 在本发明的技术方案中,试剂盒中还包括检测抗体;所述的检测抗体为胎盘样硫酸软骨素A的抗体,优选地为胎盘样硫酸软骨素A的单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如,双特异性抗体)和抗体片段,只要其能够显示所需的抗原结合活性。

[0028] 所述的胎盘样硫酸软骨素A通过以下方法获得:市售获得,化学合成方法,化学分离纯化方法,例如CN201710966913.2中的方法制得。

[0029] 所述检测抗体通过以胎盘样硫酸软骨素A对生物体进行免疫后获得抗体、通过杂交瘤方法获得抗体或通过基因工程方法获得抗体。

[0030] 在本发明的技术方案中,试剂盒中还包括酶标抗体,所述酶标抗体为抗检测抗体酶标的抗体。

[0031] 在本发明的技术方案中,所述的酶标抗体中的酶选自辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶(ALP)、 β -半乳糖酶等酶、金胶体等,但并不限于上述标记物。

[0032] 在本发明的技术方案中,在使用辣根过氧化物酶的情况下,作为显色底物选自3,3',5,5'-四甲基联苯胺、邻苯二胺等。在使用ALP的情况下,作为显色底物选自对硝基苯磷酸酯等。在使用 β -半乳糖酶时,作为显色底物,选自邻硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖苷等。

[0033] 在本发明的技术方案中,试剂盒中还包括洗涤液、样品稀释液、显色液、终止液、标准对照蛋白。

[0034] 在本发明的技术方案中,p1-CSA的检测限为310ng/ml以上,优选为1 μ g/ml以上。

[0035] 在本发明的技术方案中,受检测的样品为细胞裂解液、细胞培养液、血液、血清、血浆。

[0036] 在本发明的技术方案中,所述肿瘤包括卵巢癌、脂肪肉瘤、肺癌、肝癌、乳腺癌、骨

髓癌、睾丸间质瘤、前列腺癌、胰腺癌、宫颈癌、结肠癌。

[0037] 本发明另一个方面提供了感染红细胞表面抗原的最小结合肽段和/或p1-CSA的抗体在制备检测肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复的试剂中的用途,所述的感染红细胞表面抗原的最小结合肽段的序列如SEQ ID No.1所示。

[0038] 本发明中所述的试剂为酶免疫分析(ELISA)用试剂、化学发光酶免疫测定法(CLEIA)用试剂、化学发光免疫测定法(CLIA)用试剂、荧光抗体法(FAT)用试剂、荧光酶免疫测定法(FEIA)用试剂、电化学发光免疫测定法(ECLIA)用试剂、放射免疫测定法(RIA)用试剂、免疫层析法用试剂、凝集法用试剂、竞争法用试剂、胶体金试纸条、纳米检测试剂胶体试剂、ELISA试剂等,但是,并不限于这些方法。在上述技术方案中,所述酶免疫分析选自ELISA直接法、ELISA间接法,ELISA夹心法,优选为ELISA夹心法。

[0039] 本发明中所述的试剂用于受试者血液或体液的检测。

[0040] 在本发明的技术方案中,所述的p1-CSA为胎盘样硫酸软骨素A。

[0041] 本发明另一个方面提供了前述用于检测肿瘤的ELISA试剂盒作为肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复的检测试剂或工具的用途。

[0042] 本发明另一个方面提供了一种ELISA检测胎盘样硫酸软骨素A的方法,其中以疟原虫感染红细胞表面抗原(VAR2CSA,rVAR2)的最小结合肽段作为捕获蛋白,疟原虫感染红细胞表面抗原(VAR2CSA,rVAR2)的最小结合肽段序列如SEQ ID No.1所示,

[0043] EDVKDINFDTKEKFLAGCLIVSFHEGKC SEQ ID No.1。

[0044] 在上述方法中,所述方法为非诊断和治疗用途。

[0045] 在上述方法中,所述ELISA为直接法ELISA、间接法ELISA或夹心法ELISA。

[0046] 本发明再一个方面提供了一种基于胎盘样硫酸软骨素A的肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复的检测方法,所述方法为以感染红细胞表面抗原的最小结合肽段的序列作为检测试剂,体外检测受试者体内p1-CSA的方法,所述以感染红细胞表面抗原的序列如SEQ ID No.1所示。

[0047] 上述方法中,所述的体外检测为以酶免疫分析(ELISA)法、化学发光酶免疫测定法(CLEIA)、化学发光免疫测定法(CLIA)、荧光抗体法(FAT)、荧光酶免疫测定法(FEIA)、电化学发光免疫测定法(ECLIA)、放射免疫测定法(RIA)、免疫层析法、凝集法、竞争法、胶体金试纸条、纳米检测试剂胶体方法进行检测,但是,并不限于这些方法。在上述技术方案中,所述酶免疫分析选自ELISA直接法、ELISA间接法,ELISA夹心法,优选为ELISA夹心法。

[0048] 上述方法中,体外检测的样品为受试者的细胞裂解液、细胞培养液、血液、血清、血浆。

[0049] 优选地,采用前述ELISA试剂盒进行检测。

[0050] 在本发明中,所述检测抗体为与待检测物的抗体或抗体片段。

[0051] 在本发明中,所述酶标抗体为带有标记的检测抗体的二抗。

[0052] 在本发明的技术方案中,所述的肿瘤筛查、肿瘤早期诊断、肿瘤进展或肿瘤康复的检测方法或者试剂,是指待测样品中检测到胎盘样硫酸软骨素A则待测样品受试者罹患肿瘤。

[0053] 有益效果

[0054] 1) 本发明首次发现了p1-CSA能够在多种体液中检测到,这为定性或定量在体外生

物学检测p1-CSA提供了依据。

[0055] 2) 本发明验证了通过体外检测p1-CSA能够判断受试者患肿瘤情况,为早期肿瘤诊断提供了新的方法。

[0056] 3) 本发明的方法简单,同时检测限低、重复性好、特异性高。

附图说明

[0057] 图1为本发明的技术原理图。

[0058] 图2为灵敏性和重复性检测结果。其中A为灵敏性实验结果,B为重复性实验结果。

[0059] 图3为应用本发明方法检测肿瘤细胞表达p1-CSA的水平。

[0060] 图4为模型鼠和临床病例样本验证检测结果。其中A为模型鼠实验结果,B为临床病例实验结果。

具体实施方式

[0061] 实施例1.ELISA捕获蛋白的准备

[0062] 化学合成VAR2CSA的最小结合肽段EDVKDINFDTKKFLAGCLIVSFHEGKC,命名为p1-CSA-BP作为ELISA方法的捕获蛋白。

[0063] 实施例2.纯化的p1-CSA准备

[0064] p1-CSA可以通过市售或化学方法制备,本发明采用本实验室在先专利方法制备p1-CAS。制备方法参见申请号:2017110966913.2中的制备。具体如下,

[0065] 以亲和层析的方法对胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物进行层析纯化,其中亲和层析柱材为重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白与亲和层析基质的偶联物,所述层析纯化的方法为将胎盘样硫酸软骨素A或其衍生物粗品上样于亲和层析柱上,并以洗涤液进行洗涤至没有杂质流出,再以洗脱液进行洗脱并收集胎盘样硫酸软骨素A纯品或其衍生物纯品。所述重组疟原虫感染红细胞表面抗原蛋白的序列如SEQ ID No.2所示。

[0066] SEQ ID No.2

[0067] LENYIKGDPYFAEYATKLSFILNPSDANNPSGETANHNDEACNCNESGISSVQQAQTSGPSSNKTCITH
SSIKTNKKKECKDVKLGVRENDKDLKICVIEDTSLSGVDNCCCQDLLGILQENCSDNKRGSNSDSCDNKNQDECQK
KLEKVFASLTNGYKCDKCKSGTSRSKWKIWKSSGNEEGLQEEYANTIGLPPRTQSLYLGNLPKLENCEDVKDIN
FDTKEKFLAGCLIVSFHEGKNLKKRYPQNKNSGNKENLCKALEYSFADYGDLIKGTSIWDNEYTKDLELNLQNNFGK
LFGKYIKKNNTAEQDTSYSSLDLRESWWNTNKYIWTAMKHGAEMNITTCNADGSVTGSGSSCDDIPTIDLIPQYL
RFLQEWVENFCEQRQAKVKDVIITNCKSCKESGNKCKTECKTKCKDECEKYKFFIEACGTAGGGIGTAGSPWSKRWDQ
IYKRYSKHIEDAKRNRKAGTKNCGTSSTTNAASTDENKCVQSDIDSFFKHLIDIGLTPSSYLSNVLDDNICGADK
APWTTYTTTTTEKCNKERDKSKSQSSDTLVVVNVPSPLGNTPYRYKYACQCKIPTNEETCDDRKEYMNQWSCGSAR
TMKRGYKNDNYELCKYNGVDVKPTTVRSNSSKLDGNDVTFNLFQWKEIQYQIEQYMTNANISCIDEKEVLDSVS
DEGTPKVRGGYEDGRNNNTDQGTNCKEKCKCYKLWIEKINDQWKGQKDNYNKRFSKQIYDANKGSQNKVVVLSNFL
FFSCWEEYIQKYFNGDWSKIKNIGSDTFEFLIKKCGNNSAHGEEIFNEKLKNAEKKCKENESTDTNINKSETSCDLN
ATNYIRGCQSKTYDGKIFPGKGGEKQWICKDTIIHGDTNGACIPPRQTQNLVCGELWDKSYGGRSNIKNDTKELLKEK

[0068] 实施例3.p1-CSA抗体的准备

[0069] 1) Balb/c小鼠免疫

[0070] 50 μ g免疫原p1-CSA溶于200 μ L PBS溶液,与等体积的完全弗氏佐剂混合,微量抗原乳化装置充分乳化1小时。然后颈背部多点注射六周龄雌性Balb/c小鼠。初次免疫采用弗氏完全佐剂,并重复一次,加强免疫为弗氏不完全佐剂,免疫间隔期为2周,融合前三天腹腔注射100 μ g p1-CSA免疫原溶于200 μ L PBS溶液,不加佐剂。第三次免疫后的7天到10天小鼠尾部采血,每只小鼠约15 μ L,进行效价检测。

[0071] 2) 效价测定

[0072] 效价测定采用间接非竞争ELISA法。将1 μ g/ml p1-CSA溶于包被缓冲液中,加入酶标板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗板三次后,每孔200 μ L 2%BSA封闭液,37 $^{\circ}$ C反应1小时。PBST洗板三次,每孔加入100 μ L抗体血清稀释溶液。37 $^{\circ}$ C反应1小时后,PBST洗板三次,每孔加入100 μ L羊抗鼠酶标二抗,37 $^{\circ}$ C反应1小时。PBST洗板六次,加入底物显色液反应15分钟。加入50 μ L 2M硫酸终止反应。在450nm下测定吸收值。

[0073] 3) 细胞融合

[0074] 采集免疫鼠血液,4 $^{\circ}$ C 1200rpm离心30分钟,收集血清,此血清既为p1-CSA多克隆抗体。

[0075] 在无菌状态下,取出抗体血清高效价Balb/c小鼠的脾脏,放入盛有RPMI-1640培养液的匀浆器,将脾脏轻轻研磨,吸出细胞悬液,离心去杂,RPMI-1640培养液洗涤两次。取对数生长的骨髓瘤细胞SP2/0,1200rpm离心5分钟,弃上清,用RPMI-1640培养液混悬细胞后计数,取所需的细胞数。将SP2/0骨髓瘤细胞与脾细胞按1:10比例混合在一起,在50ml离心管内用RPMI-1640培养液洗1次,1200rpm,离心8分钟,弃上清,吸净残留液体,以免影响PEG浓度。轻轻弹击离心管底,使细胞沉淀略加松动。在37 $^{\circ}$ C下,30秒内加入预热的1m L 50%PEG,边加边搅拌。90秒后,缓慢加入预热RPMI-1640培养液终止PEG作用。1200rpm,离心5分钟,弃上清,加入10m L RPMI-1640培养液重悬细胞,与90m L半固体HAT培养液充分混合。采用20m L注射器吸取半固体培养基,转移至6孔细胞培养板,每孔1.5m L,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂培养箱培养14天。

[0076] 4) 杂交瘤细胞的筛选

[0077] 14天后,培养板中长出肉眼可见的白点,每个白点及为一株杂交瘤细胞株。将每个白点及时转移至96孔细胞培养板。倒置显微镜下观察,当细胞即将充满视野时,测定细胞上清。首先采用间接非竞争ELISA法,见2.2.3.2。每孔加100 μ L细胞上清测定。将阳性孔取出,再做间接竞争ELISA法。将1 μ g/m L p1-CSA溶于包被缓冲液中,加入酶标板中,100 μ L/孔,4 $^{\circ}$ C过夜。PBST洗板三次后,每孔200 μ L 1.5%OVA封闭液,37 $^{\circ}$ C反应1小时。PBST洗板三次,每孔加入50 μ L细胞上清和50 μ L PL-CSA标准液。37 $^{\circ}$ C反应1小时后,PBST洗板三次,每孔加入100 μ L羊抗鼠酶标二抗,37 $^{\circ}$ C反应1小时。PBST洗板六次,加入底物显色液反应15分钟。加入50 μ L 2M硫酸终止反应。在450nm下测定吸收值,将对p1-CSA有抑制的细胞株筛选出来。

[0078] 5) 单克隆抗体的制备

[0079] 采用小鼠腹水制备单克隆抗体。不完全弗氏佐剂腹腔注射小鼠,0.4m L/只,3天后每只小鼠腹腔注射杂交瘤细胞,7~12天后,当小鼠腹部膨胀明显时抽取腹水。3000rpm/min离心10分钟,弃去上部脂肪,收集中间澄清腹水,-20 $^{\circ}$ C冻存备用。

[0080] 6) 单克隆抗体的纯化及鉴定

[0081] 单克隆抗体的纯化采用饱和硫酸铵法和Protein A法纯化。

[0082] 步骤如下:饱和硫酸铵法:取10m L处理好的小鼠腹水移入烧杯中,在磁力搅拌下,缓慢滴加饱和硫酸铵溶液5.0m L;继续搅拌30min后;10000r/min离心15min;弃去上清液,沉淀物用1/3饱和度硫酸铵溶液重悬,搅拌作用30min后,10000r/min,离心15min;弃去上清液,沉淀物溶于1.5m L纯水中,装入透析袋,透析24h,去除盐离子,每6h换水。透析好后,真空冷冻干燥,-20℃保存备用。

[0083] Protein A法:将5m L小鼠腹水用PBS溶液稀释到50m L,0.45μm滤膜过滤后上Protein A柱。流速为1m L/min;用PBS溶液再洗20m L,流速为1m L/min;用pH4.0柠檬酸缓冲液洗脱,流速为1m L/min,收集洗脱峰,用纯水流洗20m L,再用0.3%Na₃NPBS冲洗5m L并保存,流速为2m L/min,柱子置于4℃中保存。洗脱液装入透析袋,透析24h,去除盐离子,每6h换水。透析好后,真空冷冻干燥,-20℃保存备用。

[0084] 单克隆抗体的纯度采用SDS-PAGE凝胶电泳法测定。步骤为:将10%分离胶注入玻璃夹层中,上部用纯水密封,待分离胶聚合后,倒去纯水,注入5%浓缩胶,插入点样梳。将单克隆抗体加入等体积2×SDS-PAGE样品处理液至终浓度为5μg/m L,100℃水浴5min,冷却后备用。加样10μL后,起始电压80V,然后用120V电压进行分离,待溴苯酚蓝指示剂到达底部边缘时即停止电泳。然后剥胶染色,0.5h后用脱色液过夜脱色,凝胶成像仪拍照。

[0085] 7) 单克隆抗体的特异性测定

[0086] 将p1-CSA与其结构类似物CSB,CSC作为竞争抑制原。先将竞争原进行梯度稀释,各取50μL与等量抗体混合,加入已经包被并封闭好的ELISA板中,37℃温育1h,其余步骤同间接非竞争ELISA法。以各竞争抑制原浓度为横坐标,以抑制率(各浓度标准竞争抑制原孔OD值与不加竞争抑制原孔OD值的百分比)为纵坐标绘制标准曲线。以各曲线抑制率为50%时对应的竞争抑制原的浓度计为IC₅₀。以p1-CSA的IC₅₀值和其他结构类似物的IC₅₀值比较的百分数来衡量两者的交叉反应率。

[0087] 实施例4.p1-CSA抗体的最佳稀释倍数

[0088] 不同批次抗体稀释倍数存在差异,需要每批次检测。此部分选择多克隆抗体和单克隆抗体都可行,优选单克隆抗体。

[0089] P1-CSA抗体稀释倍数的测定采用矩阵法,既96孔微量板包被p1-CSA-BP,浓度为大于5μg/ml,优选浓度20μg/ml,稀释于50mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,每孔200μl,4℃孵育过夜,PBST洗板三次。2%的BAS 37℃封闭2小时。一系列浓度梯度的p1-CSA,包括3.91μg/ml,7.81μg/ml,15.63μg/ml,31.25μg/m,62.50μg/m,125.00μg/ml,250.00μg/ml, and 500.00μg/ml,每个浓度12个复孔,37℃孵育2小时,PBST洗板3次,每次5分钟。p1-CSA抗体,包括1:100,1:1 000,1:10 000,1:100 000,每个浓度3个复孔,37℃孵育2小时,设非免疫鼠血清为阴性对照,同上PBST洗板3次。37℃反应1小时后,PBST洗板三次,每孔加入100μL羊抗鼠酶标二抗(1:10 000),37℃反应1小时。PBST洗板六次,加入TMB底物显色液反应15分钟。加入50μL 2M硫酸终止反应。在450nm下测定吸收值。

[0090] 实验抗体的P/N值应高于国家标准(国家标准为≥2.1),而本次检测最佳稀释倍数为1:1000。

[0091] 表1.本批次抗体的最佳稀释倍数检测。

稀释比例	血清	pI-CSA ($\mu\text{g/ml}$)							
		3.90 6	7.813	15.62 5	31.25 0	62.50 0	125.000	250.000	500.00 0
[0092]	1:100 阳性血清	0.65 9	1.018	1.254	1.491	1.850	2.067	2.554	2.573
	阴性血清	0.25 8	0.273	0.278	0.272	0.292	0.282	0.307	0.303
	阳性/阴性 P/N	2.55 8	3.726	4.512	5.488	6.334	7.344	8.326	8.485
[0093]	1:1000 阳性血清	0.24 7	0.442	0.717	1.064	1.495	1.835	2.084	2.497
	阴性血清	0.08 6	0.088	0.089	0.099	0.101	0.099	0.101	0.095
	阳性/阴性 P/N	2.87 3	5.025	8.107	10.75 1	14.87 6	18.534	20.735	26.419
[0093]	1:10000 阳性血清	0.22 1	0.229	0.399	0.552	0.775	0.954	1.082	1.266
	阴性血清	0.09 5	0.092	0.096	0.109	0.110	0.109	0.110	0.103
	阳性/阴性 P/N	2.33 1	2.495	4.156	5.086	7.020	8.781	9.801	12.267
[0093]	1:100000 阳性血清	0.20 6	0.225	0.299	0.414	0.581	0.715	0.812	0.950
	阴性血清	0.09 1	0.095	0.092	0.104	0.106	0.104	0.106	0.099
	阳性/阴性 P/N	2.27 4	2.373	3.260	3.968	5.473	6.851	7.641	9.591

[0094] 实施例5.ELISA灵敏性验证

[0095] 优选浓度的pI-CSA-BP (20 $\mu\text{g/ml}$) 稀释于50mM pH 9.6的碳酸盐缓冲液中,每孔200 μl 包被96孔微量板,4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜,PBST洗板三次。2%的BAS 37 $^{\circ}\text{C}$ 封闭2小时。一系列浓度梯度的pI-CSA,包括0.31,0.61 $\mu\text{g/ml}$,1.22 $\mu\text{g/ml}$,2.44 $\mu\text{g/ml}$,4.88 $\mu\text{g/ml}$,9.77 $\mu\text{g/ml}$,19.53 $\mu\text{g/ml}$,39.06 $\mu\text{g/ml}$,78.13 $\mu\text{g/ml}$,156.25 $\mu\text{g/ml}$,312.50 $\mu\text{g/ml}$,625.00 $\mu\text{g/ml}$,1250.00 $\mu\text{g/ml}$,2500.00 $\mu\text{g/ml}$,和5000.00 $\mu\text{g/ml}$,每个浓度3个复孔,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时,PBST洗板3次,每次5分钟。pI-CSA抗体最优稀释1:1000,设非免疫鼠血清为阴性对照,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育2小时,同上PBST洗板3次。37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时后,PBST洗板三次,每孔加入100 μL 羊抗鼠酶标二抗(1:1000),37 $^{\circ}\text{C}$ 反应1小时。PBST洗板六次,加入TMB底物显色液反应15分钟。加入50 μL 2M硫酸终止反应。在450nm下测定吸收值。实验结果参见图2A。

[0096] 本发明ELISA检测方法的灵敏性为310ng/ml,最适检测范围在3.91 $\mu\text{g/ml}$ 至500.00 $\mu\text{g/ml}$ 。

[0097] 实施例6.ELISA重复性验证

[0098] 如前述实施例5中的实验步骤,选用p1-CSA浓度为3.91 $\mu\text{g}/\text{ml}$,7.81 $\mu\text{g}/\text{ml}$,15.63 $\mu\text{g}/\text{ml}$,31.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$,62.50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,125.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,250.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,500.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,为标准系列浓度进行重复性验证。实验结果参见图2B。

[0099] 最适检测范围在1.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 至500.00 $\mu\text{g}/\text{ml}$,在此范围内具有较好的重复性。

[0100] 实施例7.ELISA特异性验证

[0101] 根据上述实验中的步骤,检测CSB(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和CSC(500 $\mu\text{g}/\text{ml}$),实验可靠值采用 $P/N \geq 2.1$ 。利用p1-CSA的同类物CSB和CSC,二者的OD450nm类似于阴性血清检测值, P/N 约等于1,且对p1-CSA的特异性结合不具备有实质性的拮抗作用。实验结果证实本发明的方法特异性好。

[0102] 实施例8针对细胞裂解物和上清液的检测

[0103] 选择了15种细胞,包括10种癌细胞和4种正常的细胞,DMEM/DF12培养基补充10%的FBS,37 $^{\circ}\text{C}$ 5%的CO₂培养箱,待细胞生长至80-90%的融合率,用PBS洗2次,更换新鲜无血清培养基,继续培养24h,收集培养上清;1000rpm离心10min,收集上清用于检测;培养细胞用PBS洗2次,0.25%的无EDTA胰酶消化分离细胞,收集细胞悬液,1000rpm离心5min收集细胞,细胞重悬于PBS中,冰浴条件50%的功率超声波20sec(超声5sec、停5sec),1000rpm离心5min,收集上清即为细胞裂解液,用于检测。应用此ELISA方法进行检测,检测方法同ELISA重复性检测。通过研究能够准确检测癌症细胞表达的p1-CSA,从而区分正常细胞和癌症细胞。具体信息参见表1。结果参见图3。实验结果证实癌细胞的培养上清、裂解液中均可以检测到p1-CSA,而正常细胞检测不到。以此证明可以用过ELISA的方法鉴别正常细胞和癌细胞,从而实现利用生物液体或者肿瘤组织细胞进行筛查和早期诊断、以及治疗效果评价。

[0104] 表1.所选用的细胞

编号.	细胞系	类别	来源	分组	样品
1	HTR8	滋养层细胞	人	阳性对照	每个细胞系
2	A2780	卵巢癌细胞	人	癌细胞	中两个细胞
3	SKOV3	卵巢癌细胞	人		裂解物样品,
4	SW872	脂肪肉瘤细胞	人		两个上清液
5	A549	肺癌细胞	人		样品

[0105]

	6	Hep-G2	肝癌细胞	人	
	7	MCF7	乳腺癌细胞	人	
	8	Sp2/0	骨髓瘤细胞	鼠	
	9	MLTC-1	睾丸间质瘤细胞	鼠	
	10	RM-1	前列腺癌细胞	鼠	
[0106]	11	α TC1-9	胰腺癌细胞	鼠	
	12	COV434	卵巢颗粒肿瘤细胞	人	
	13	LO2	肝细胞	人	阴性对照
	14	3T3-L1	胚胎成纤维细胞	鼠	
	15	RAW 264.7	巨噬细胞;	鼠	

[0107] 实施例9针对动物模型样品的检测

[0108] 选择2种癌症模型鼠血清,即卵巢癌(10例)和绒癌(10例),绒癌细胞JEG3和卵巢癌细胞SKOV3在DMEM/DF12培养基中(补充10%的FBS),37℃5%的CO₂培养箱,待细胞生长至80-90%的融合率,0.25%的无EDTA胰酶消化分离细胞,收集细胞悬液,1000rpm离心5min收集细胞,细胞重悬于PBS中。 10^6 个细胞小鼠尾静脉全身植瘤或者皮下植瘤,每周测定皮下肿瘤组织大小;利用Fluc基因、腹腔注射荧光素、通过小动物成像监测体内肿瘤细胞的生长,肿瘤生长26天后,麻醉眼球采血,处死小鼠。血液1000rpm离心20min,收集上清既为血清,用于检测。通过ELISA方法进行本发明的应用验证,实验方案同重复性验证,实验结果参见图4A,该实验结果说明本发明的方法能准确的检测到癌症模型鼠血清中存在游离的p1-CSA,从而实现区别癌症模型鼠和正常健康鼠血清。

[0109] 实施例10针对患者样品的检测

[0110] 本发明选择2种临床癌症病例,既宫颈癌(7例)和卵巢癌(7例),肿瘤血液样本来自深圳市南山医院和北京大学深圳医院,通过了伦理审查和病人的知情同意,血液样本4℃运回实验室,1000rpm离心20min,收集上清既为血清,用于检测。通过ELISA方法进行检测,完成临床样本应用验证,实验结果参见图4B结果能准确检测出癌症病例血清中的p1-CSA,从而区别癌症病人和健康人群血清。

[0001] SEQUENCE LISTING
 [0002] <110> 中国科学院深圳先进技术研究院
 [0003] <120> 一种基于胎盘样硫酸软骨素A的癌症筛查和早期诊断的试剂方法
 [0004] <130> CP11801303C
 [0005] <160> 2
 [0006] <170> PatentIn version 3.3
 [0007] <210> 1
 [0008] <211> 28
 [0009] <212> PRT
 [0010] <213> 人工序列
 [0011] <400> 1
 [0012] Glu Asp Val Lys Asp Ile Asn Phe Asp Thr Lys Glu Lys Phe Leu Ala
 [0013] 1 5 10 15
 [0014] Gly Cys Leu Ile Val Ser Phe His Glu Gly Lys Cys
 [0015] 20 25
 [0016] <210> 2
 [0017] <211> 916
 [0018] <212> PRT
 [0019] <213> 人工序列
 [0020] <400> 2
 [0021] Leu Glu Asn Tyr Ile Lys Gly Asp Pro Tyr Phe Ala Glu Tyr Ala Thr
 [0022] 1 5 10 15
 [0023] Lys Leu Ser Phe Ile Leu Asn Pro Ser Asp Ala Asn Asn Pro Ser Gly
 [0024] 20 25 30
 [0025] Glu Thr Ala Asn His Asn Asp Glu Ala Cys Asn Cys Asn Glu Ser Gly
 [0026] 35 40 45
 [0027] Ile Ser Ser Val Gly Gln Ala Gln Thr Ser Gly Pro Ser Ser Asn Lys
 [0028] 50 55 60
 [0029] Thr Cys Ile Thr His Ser Ser Ile Lys Thr Asn Lys Lys Lys Glu Cys
 [0030] 65 70 75 80
 [0031] Lys Asp Val Lys Leu Gly Val Arg Glu Asn Asp Lys Asp Leu Lys Ile
 [0032] 85 90 95
 [0033] Cys Val Ile Glu Asp Thr Ser Leu Ser Gly Val Asp Asn Cys Cys Cys
 [0034] 100 105 110
 [0035] Gln Asp Leu Leu Gly Ile Leu Gln Glu Asn Cys Ser Asp Asn Lys Arg
 [0036] 115 120 125
 [0037] Gly Ser Ser Ser Asn Asp Ser Cys Asp Asn Lys Asn Gln Asp Glu Cys
 [0038] 130 135 140

[0039]	Gln Lys Lys Leu Glu Lys Val Phe Ala Ser Leu Thr Asn Gly Tyr Lys
[0040]	145 150 155 160
[0041]	Cys Asp Lys Cys Lys Ser Gly Thr Ser Arg Ser Lys Lys Lys Trp Ile
[0042]	165 170 175
[0043]	Trp Lys Lys Ser Ser Gly Asn Glu Glu Gly Leu Gln Glu Glu Tyr Ala
[0044]	180 185 190
[0045]	Asn Thr Ile Gly Leu Pro Pro Arg Thr Gln Ser Leu Tyr Leu Gly Asn
[0046]	195 200 205
[0047]	Leu Pro Lys Leu Glu Asn Val Cys Glu Asp Val Lys Asp Ile Asn Phe
[0048]	210 215 220
[0049]	Asp Thr Lys Glu Lys Phe Leu Ala Gly Cys Leu Ile Val Ser Phe His
[0050]	225 230 235 240
[0051]	Glu Gly Lys Asn Leu Lys Lys Arg Tyr Pro Gln Asn Lys Asn Ser Gly
[0052]	245 250 255
[0053]	Asn Lys Glu Asn Leu Cys Lys Ala Leu Glu Tyr Ser Phe Ala Asp Tyr
[0054]	260 265 270
[0055]	Gly Asp Leu Ile Lys Gly Thr Ser Ile Trp Asp Asn Glu Tyr Thr Lys
[0056]	275 280 285
[0057]	Asp Leu Glu Leu Asn Leu Gln Asn Asn Phe Gly Lys Leu Phe Gly Lys
[0058]	290 295 300
[0059]	Tyr Ile Lys Lys Asn Asn Thr Ala Glu Gln Asp Thr Ser Tyr Ser Ser
[0060]	305 310 315 320
[0061]	Leu Asp Glu Leu Arg Glu Ser Trp Trp Asn Thr Asn Lys Lys Tyr Ile
[0062]	325 330 335
[0063]	Trp Thr Ala Met Lys His Gly Ala Glu Met Asn Ile Thr Thr Cys Asn
[0064]	340 345 350
[0065]	Ala Asp Gly Ser Val Thr Gly Ser Gly Ser Ser Cys Asp Asp Ile Pro
[0066]	355 360 365
[0067]	Thr Ile Asp Leu Ile Pro Gln Tyr Leu Arg Phe Leu Gln Glu Trp Val
[0068]	370 375 380
[0069]	Glu Asn Phe Cys Glu Gln Arg Gln Ala Lys Val Lys Asp Val Ile Thr
[0070]	385 390 395 400
[0071]	Asn Cys Lys Ser Cys Lys Glu Ser Gly Asn Lys Cys Lys Thr Glu Cys
[0072]	405 410 415
[0073]	Lys Thr Lys Cys Lys Asp Glu Cys Glu Lys Tyr Lys Lys Phe Ile Glu
[0074]	420 425 430
[0075]	Ala Cys Gly Thr Ala Gly Gly Gly Ile Gly Thr Ala Gly Ser Pro Trp
[0076]	435 440 445
[0077]	Ser Lys Arg Trp Asp Gln Ile Tyr Lys Arg Tyr Ser Lys His Ile Glu

[0078]	450	455	460
[0079]	Asp Ala Lys Arg Asn Arg Lys Ala Gly Thr Lys Asn Cys Gly Thr Ser		
[0080]	465	470	475
[0081]	Ser Thr Thr Asn Ala Ala Ala Ser Thr Asp Glu Asn Lys Cys Val Gln		
[0082]		485	490
[0083]	Ser Asp Ile Asp Ser Phe Phe Lys His Leu Ile Asp Ile Gly Leu Thr		
[0084]		500	505
[0085]	Thr Pro Ser Ser Tyr Leu Ser Asn Val Leu Asp Asp Asn Ile Cys Gly		
[0086]		515	520
[0087]	Ala Asp Lys Ala Pro Trp Thr Thr Tyr Thr Thr Tyr Thr Thr Thr Glu		
[0088]		530	535
[0089]	Lys Cys Asn Lys Glu Arg Asp Lys Ser Lys Ser Gln Ser Ser Asp Thr		
[0090]		545	550
[0091]	Leu Val Val Val Asn Val Pro Ser Pro Leu Gly Asn Thr Pro Tyr Arg		
[0092]		565	570
[0093]	Tyr Lys Tyr Ala Cys Gln Cys Lys Ile Pro Thr Asn Glu Glu Thr Cys		
[0094]		580	585
[0095]	Asp Asp Arg Lys Glu Tyr Met Asn Gln Trp Ser Cys Gly Ser Ala Arg		
[0096]		595	600
[0097]	Thr Met Lys Arg Gly Tyr Lys Asn Asp Asn Tyr Glu Leu Cys Lys Tyr		
[0098]		610	615
[0099]	Asn Gly Val Asp Val Lys Pro Thr Thr Val Arg Ser Asn Ser Ser Lys		
[0100]		625	630
[0101]	Leu Asp Gly Asn Asp Val Thr Phe Phe Asn Leu Phe Glu Gln Trp Asn		
[0102]		645	650
[0103]	Lys Glu Ile Gln Tyr Gln Ile Glu Gln Tyr Met Thr Asn Ala Asn Ile		
[0104]		660	665
[0105]	Ser Cys Ile Asp Glu Lys Glu Val Leu Asp Ser Val Ser Asp Glu Gly		
[0106]		675	680
[0107]	Thr Pro Lys Val Arg Gly Gly Tyr Glu Asp Gly Arg Asn Asn Asn Thr		
[0108]		690	695
[0109]	Asp Gln Gly Thr Asn Cys Lys Glu Lys Cys Lys Cys Tyr Lys Leu Trp		
[0110]		705	710
[0111]	Ile Glu Lys Ile Asn Asp Gln Trp Gly Lys Gln Lys Asp Asn Tyr Asn		
[0112]		725	730
[0113]	Lys Phe Arg Ser Lys Gln Ile Tyr Asp Ala Asn Lys Gly Ser Gln Asn		
[0114]		740	745
[0115]	Lys Lys Val Val Ser Leu Ser Asn Phe Leu Phe Phe Ser Cys Trp Glu		
[0116]		755	760

[0117]	Glu Tyr Ile Gln Lys Tyr Phe Asn Gly Asp Trp Ser Lys Ile Lys Asn
[0118]	770 775 780
[0119]	Ile Gly Ser Asp Thr Phe Glu Phe Leu Ile Lys Lys Cys Gly Asn Asn
[0120]	785 790 795 800
[0121]	Ser Ala His Gly Glu Glu Ile Phe Asn Glu Lys Leu Lys Asn Ala Glu
[0122]	805 810 815
[0123]	Lys Lys Cys Lys Glu Asn Glu Ser Thr Asp Thr Asn Ile Asn Lys Ser
[0124]	820 825 830
[0125]	Glu Thr Ser Cys Asp Leu Asn Ala Thr Asn Tyr Ile Arg Gly Cys Gln
[0126]	835 840 845
[0127]	Ser Lys Thr Tyr Asp Gly Lys Ile Phe Pro Gly Lys Gly Gly Glu Lys
[0128]	850 855 860
[0129]	Gln Trp Ile Cys Lys Asp Thr Ile Ile His Gly Asp Thr Asn Gly Ala
[0130]	865 870 875 880
[0131]	Cys Ile Pro Pro Arg Thr Gln Asn Leu Cys Val Gly Glu Leu Trp Asp
[0132]	885 890 895
[0133]	Lys Ser Tyr Gly Gly Arg Ser Asn Ile Lys Asn Asp Thr Lys Glu Leu
[0134]	900 905 910
[0135]	Leu Lys Glu Lys
[0136]	915

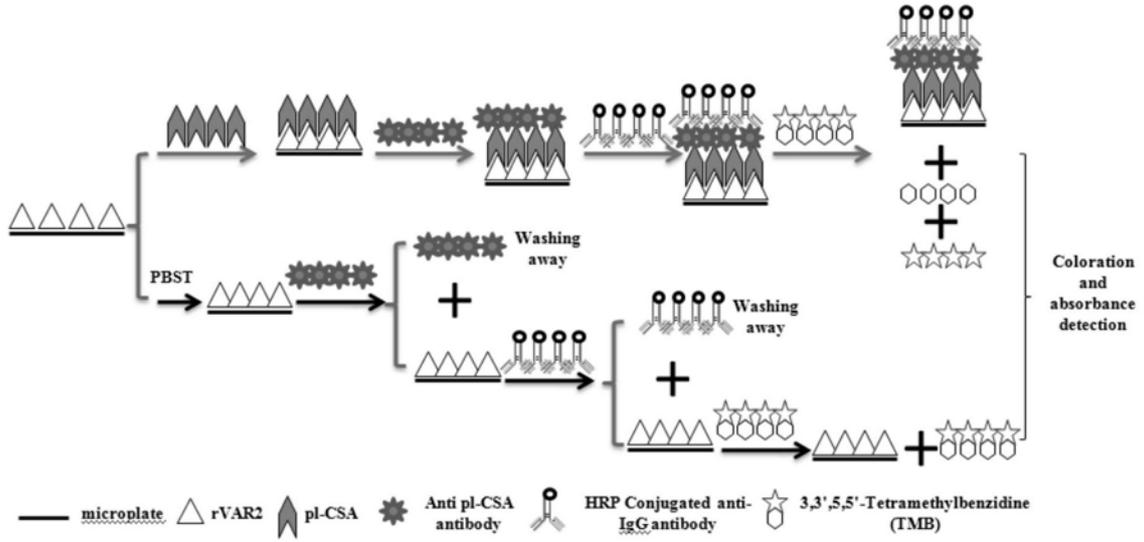


图1

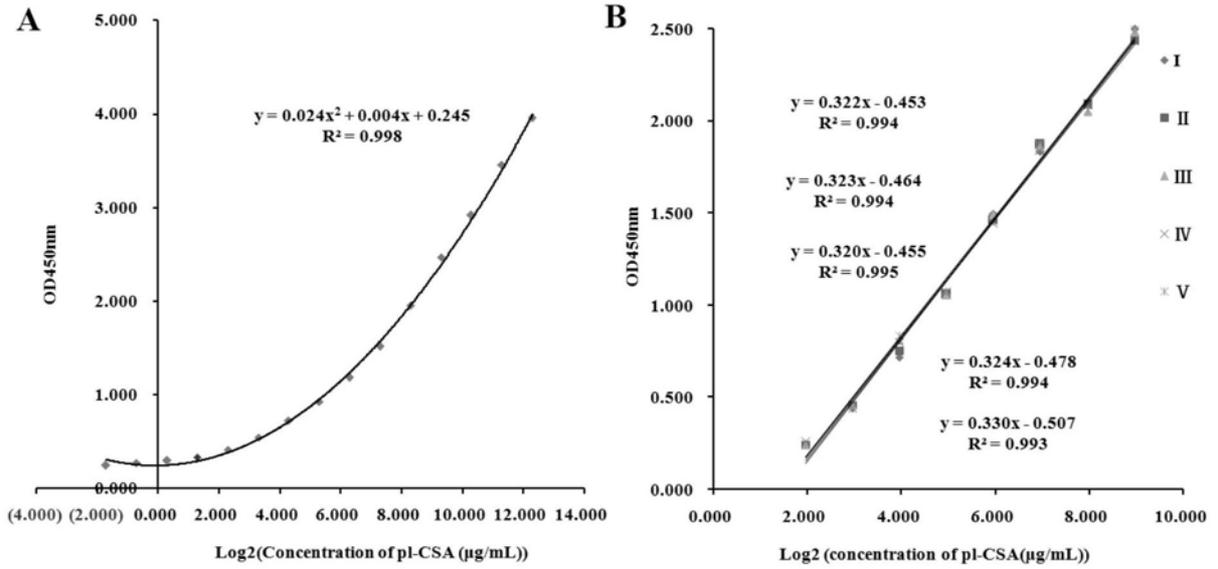


图2

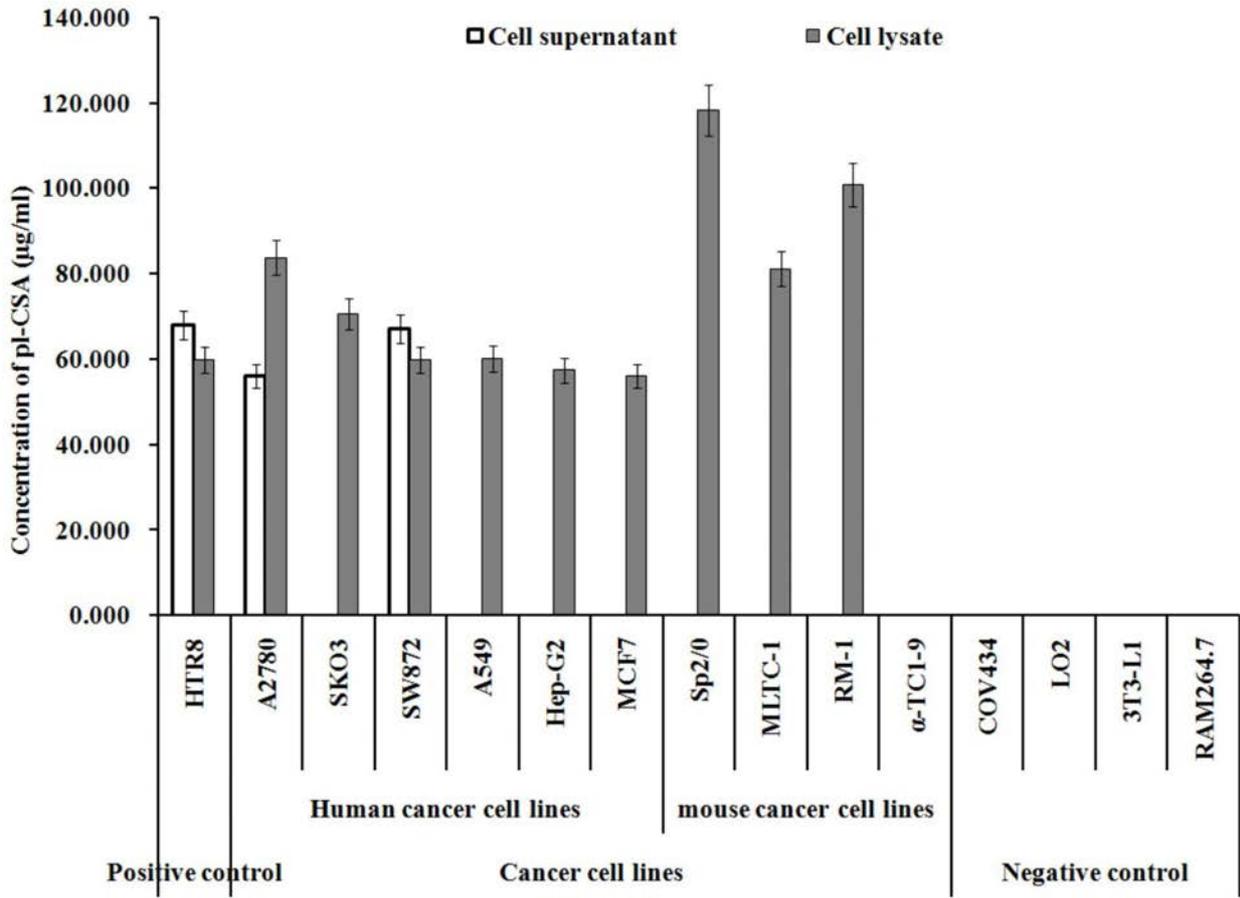


图3

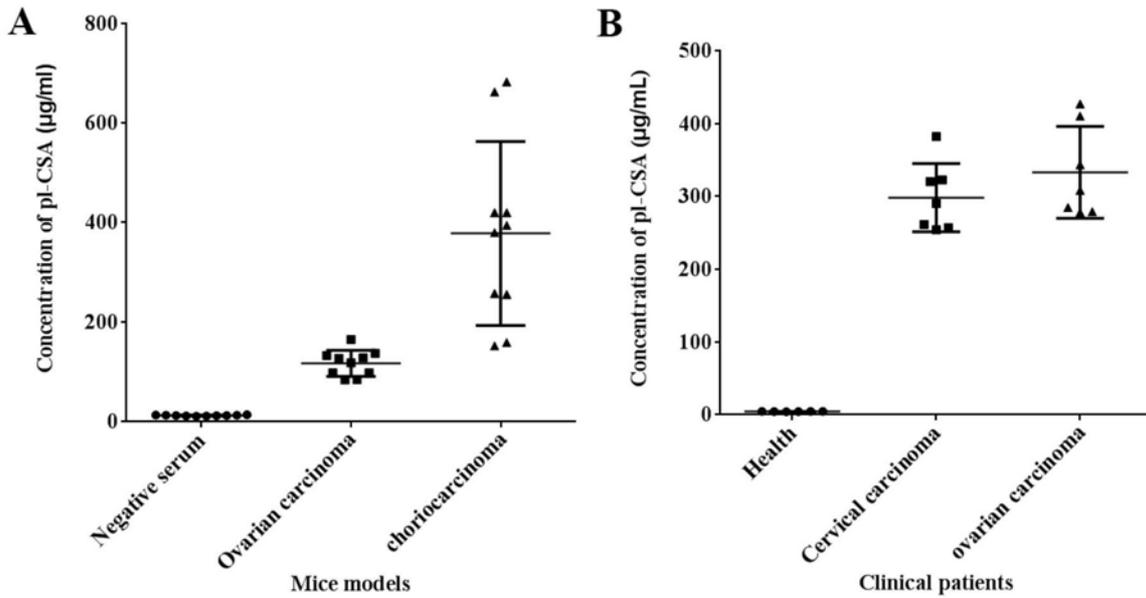


图4