

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580031278.4

[51] Int. Cl.

C12Q 1/68 (2006.01)

C12Q 1/00 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/96 (2006.01)

[43] 公开日 2008年2月13日

[11] 公开号 CN 101124336A

[22] 申请日 2005.7.25

[21] 申请号 200580031278.4

[30] 优先权

[32] 2004.7.23 [33] US [31] 60/590,631

[86] 国际申请 PCT/US2005/026218 2005.7.25

[87] 国际公布 WO2006/012588 英 2006.2.2

[85] 进入国家阶段日期 2007.3.16

[71] 申请人 阿斯彭生物制药有限公司

地址 美国科罗拉多州

[72] 发明人 M·A·科金 J·F·比尔勒

R·唐纳利 D·纽曼

[74] 专利代理机构 北京北翔知识产权代理有限公司

代理人 张广育 姜建成

权利要求书 3 页 说明书 33 页 附图 9 页

[54] 发明名称

用于诊断阑尾炎的方法和设备

[57] 摘要

提供了一种诊断患者体内的阑尾炎的方法，所述方法包括鉴定所述患者的至少一种阑尾炎的症状，以及鉴定所述患者的体液或组织样本中是否存在至少一种与阑尾炎差异相关的分子。MRP-8/14和触珠蛋白是与阑尾炎差异相关的分子的实例。还提供了用于进行本发明的阑尾炎分析的设备 and 试剂盒。在一个实施方案中，所述设备为用于检测血液样本的流过式免疫分析形式。此外，还提供了筛选与阑尾炎差异相关的分子的方法，所述方法包括使用取自因怀疑患阑尾炎而进行手术的患者样本。

1. 一种诊断患者体内的阑尾炎的方法，所述方法包括：
 鉴定所述患者的至少一种阑尾炎的症状；以及
 鉴定所述患者的体液或组织样本中是否存在至少一种与阑尾炎差异相关的分子；
 由此诊断所述患者体内的阑尾炎。
2. 根据权利要求1的方法，其中不知道所述患者患有与所述分子是否存在于样本中相关的干扰性疾病，所述样本的类型为鉴定所述分子时所用的样本类型。
3. 根据权利要求1的方法，其中所述干扰性疾病选自：新近同种异体移植；败血症；脑膜炎；肺炎；结核病；类风湿性关节炎；胃肠道癌症；炎性肠病；皮肤癌；牙周炎；先兆子痫和艾滋病。
4. 根据权利要求1的方法，其中所述体液为血液。
5. 根据权利要求1的方法，其中所述体液为血清。
6. 根据权利要求1的方法，其中所述分子在所述患者的组织中被鉴定。
7. 根据权利要求1的方法，其中两种或两种以上的与阑尾炎差异相关的分子被鉴定。
8. 根据权利要求1的方法，其中 MRP-8/14 是否存在被鉴定。
9. 根据权利要求1的方法，其中 MRP-8/14 和触珠蛋白是否存在被鉴定。
10. 根据权利要求1的方法，其中所述阑尾炎的症状选自：腹部疼痛；疼痛由肚脐附近开始，然后转移至腹部的右下象限；食欲缺乏（食欲减退）；进食困难并伴随嗜睡；在疼痛出现后开始恶心；在疼痛出现后开始呕吐；呕吐伴随疲劳；便秘；少量粘液性粪便；腹泻；不能放屁；低烧；腹胀；腹部疼痛加剧；里急后重（感到需要移动肠胃）；高烧、白细胞增多和血浆粘度增加。
11. 根据权利要求1的方法，其中在所述患者中鉴定了至少两种阑尾炎的症状。
12. 根据权利要求1的方法，其中 MRP8-/14 或触珠蛋白是否存在被鉴定，并且还有至少另外一种分子被鉴定，所述另外一种分子选自：胃肠道的独特性结构蛋白、应激相关炎性介质、免疫因子、肠道菌群指示物、纤溶酶原激活因子抑制物-1、脂肪酸结合蛋白、核因子 κ B (NF

- κ B)、特异性阑尾抗原 (HLA-DR)、炎性相关抗原、以及编码上述任一种蛋白的核酸。
13. 根据权利要求 1 的方法, 还包括通过一种方法鉴定至少一种所述分子, 所述方法包括:
- 从第二名患者获得第二份体液或组织样本, 其中所述第二名患者患有阑尾炎;
- 从第三名患者获得第三份体液或组织样本, 其中所述第三名患者患有特征在于具有至少一种阑尾炎症状的非阑尾炎疾病;
- 分析第二份和第三份样本, 以在第二名患者体内检测与阑尾炎差异相关的分子, 藉此所述分子与阑尾炎差异相关; 并
- 鉴定该分子是否存在, 或鉴定该分子的存在量是否比第一份样本中的存在量高, 由此诊断所述患者体内的阑尾炎。
14. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述样本为体液样本, 并且在免疫分析设备上进行所述分子的所述鉴定。
15. 根据权利要求 14 的方法, 其中所述样本为血液。
16. 根据权利要求 1 的方法, 其中对所述分子的所述鉴定是通过在所述样本中检测编码所述分子的核酸序列来进行的。
17. 一种鉴定与阑尾炎差异相关的分子的方法, 所述方法包括:
- 从因被怀疑患有阑尾炎而进行外科手术的一组患者中的每一名患者获取样本;
- 在手术过程中确定所述的每一名患者是否患阑尾炎; 并
- 分析所述样本中与阑尾炎差异相关的分子是否存在。
18. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述样本为血液样本。
19. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述样本为阑尾组织样本。
20. 根据权利要求 19 的方法, 其中在组织中鉴定所述分子之后还要在血浆中鉴定。
21. 根据权利要求 20 的方法, 其中血液样本也取自所述患者, 测定所述患有阑尾炎的患者血浆中的所述分子的量并与未患有阑尾炎的患者血浆中的所述分子的量进行比较。
22. 根据权利要求 17 的方法, 其中所述与阑尾炎差异相关的分子选自: 胃肠道的独特性结构蛋白、应激相关炎性介质、免疫因子、肠道菌群指示物、纤溶酶原激活因子抑制物-1、脂肪酸结合蛋白、核因子

- κ B (NF κ B)、特异性阑尾抗原 (HLA-DR)、炎性相关抗原、以及编码上述任一种蛋白的核酸。
23. 一种用于在取自怀疑患有阑尾炎的患者样本中检测与阑尾炎差异相关分子是否存在的免疫分析测试设备, 所述设备包括:
- 针对所述分子的第一抗体;
 - 所述第一抗体的支持物;
 - 将所述第一抗体与所述样本相接触的工具; 以及
 - 检测所述第一抗体与所述分子的结合的工具。
24. 根据权利要求 23 的设备, 其中所述第一抗体为针对 MRP-8/14 的抗体。
25. 根据权利要求 23 的设备, 其中所述第一抗体为针对触珠蛋白的抗体。
26. 根据权利要求 23 的免疫分析检测设备, 还包括用于裂解所述样本中的细胞的工具。
27. 根据权利要求 23 的免疫分析检测设备, 它为一种侧流设备, 包括使液体样本流入以便与所述第一抗体相接触的引入装置。
28. 根据权利要求 27 的免疫分析检测设备, 还包括一个用于从血液样本中过滤血清或血浆的滤器。
29. 根据权利要求 23 的设备, 还包括一个外罩。
30. 根据权利要求 23 的设备, 所述设备为量杆或盒的形式。
31. 一种试剂盒, 包括权利要求 23 的设备和使用所述设备的说明书。
32. 一种检测与阑尾炎差异相关分子是否存在的方法, 所述方法包括:
- a) 将权利要求 23 的免疫分析检测设备与所述样本相接触; 以及
 - b) 读出用于检测结合的所述工具的结果。

用于诊断阑尾炎的方法和设备

相关申请的交互引用

本申请要求以 2004 年 7 月 23 日提交的系列号为 No. 60/590,631 的美国临时申请作为优先权基础。

背景技术

阑尾炎是一种常见的急性外科疾病，各年龄段的人都可能发病。每年在美国大约有 70 万例发病病例。大部分病例出现在 10 岁至 30 岁的群体中。尽早作出准确的诊断是获得良好治疗效果的重要因素。

许多就医的患者具有的症状似乎是患有阑尾炎，但实际上这些症状是由例如病毒感染的其他疾病导致的。如何将阑尾炎患者与患其他疾病的患者区别开是医生们每天都会遇到的一个棘手的临床问题。虽然医学科技已经对阑尾炎及其治疗方法有了很深入的了解，但是准确识别或诊断该疾病的能力还是十分有限。

真正的阑尾炎与其他临床疾病在临床表现上有很多相似之处，这对准确并尽早地确诊造成了很大困难。似乎没有哪种单独的体征、症状、检测或方法能够提供阑尾炎的可靠标志。成像技术也难以鉴定和表征阑尾，尤其是在治疗可能最有效的疾病早期。成像技术的不利还在于其花费昂贵，并有赖于进行该研究的受过严格训练且经验丰富的人的可得性。这些局限性使得每年有数千人受到疾病误诊或诊断延误的危害。对于阑尾炎而言，诊断延误是导致疾病恶化并引起与该疾病相关的并发症的最重要的原因。阑尾炎的误诊不仅会导致不必要的手术，还会延误对已存在的疾病的正确治疗。

对于疑似阑尾炎的患者，如何将负面的阑尾切除术率降至最低而又不增加穿孔发生率是外科医生们的一个难题。更有效地治疗这种极为常见的疾病所亟需的是一种能够在该疾病进程的最早期识别该疾病的简单可靠的诊断性检测。

尽管阑尾这一器官的最初发炎可能先于阑尾腔阻塞出现，甚至可能

加重该阻塞，但是阑尾炎的典型发病机制却始于该阑尾腔阻塞。阑尾分泌的粘液填满了该封闭腔，使腔内压力增加并导致膨胀。增加的腔内压可能超过毛细血管灌注压的水平，从而导致正常的淋巴引流和循环引流受到干扰。最后造成阑尾缺血。由于阑尾粘液缺乏免疫力，所以会造成腔内的细菌侵入。晚期的病例还可能发生阑尾穿孔并使脓液漏至腹腔。

目前阑尾炎的诊断还很困难，并且该困难在疾病发展的各个阶段一直存在。下文对该疾病的各个阶段及其相关临床表现作一些假设性的描述。本领域普通技术人员将会发现，在某一给定患者群中疾病的表现会有程度相当大的差异。

在炎症的最早期，患者可表现出各种非特异性的体征和症状。当出现阻塞时，上述表现可包括脐周疼痛、轻微的绞痛和食欲减弱。当疾病进程使腔内压力和膨胀程度增加时，会引起包括下列的表现：疼痛定位于腹部的右下象限、恶心、呕吐、腹泻和低烧。如果出现了穿孔，患者可表现剧痛和高烧。在这个疾病的相当晚期，会有出现可能致命性的败血症的高风险。

目前，医师们使用一些手段来辅助阑尾炎的诊断。这些手段包括内科检查、实验室检测和其他方法。常规的实验室检测包括分类的或不分类的全血细胞计数（CBC）和尿液分析（UA）。其他检测包括腹部的计算机断层摄影（CT）扫描和腹部超声检查法。方法可包括例如腹腔镜检查和探查术。

Flum 等人试图确定阑尾切除术前的误诊率是否随某些技术的可得性的提高而有所减少（Flum DR et al., 2001）。这些技术包括计算机断层摄影术（CT）、超声检查法和腹腔镜检查，这些检查技术均被建议用于表现出疑似阑尾炎体征的患者。Flum 等人得出如下结论：“与人们期望的相反，在使用计算机断层摄影术、超声检查法和腹腔镜检查之后，导致不必要的阑尾切除术的误诊率并没有变化，而且穿孔的发生率也没有减少。这些数据表明，在整体水平上，阑尾炎的诊断水平并没有随着诊断技术的提高而得以改善。”阑尾炎的误诊率在男性中约为 9%，在女性中约为 23.2%（Neary, W., 2001）。

骨髓相关蛋白复合物 8/14（MRP-8/14）是一种与急性炎症性疾病相

关的异二聚体复合物(参见 Striz and Trebichavsky, 2004)。该复合物属于 S100 蛋白超家族, 也被称为 S100A8/9、L1、巨噬细胞抑制因子相关蛋白和钙防卫蛋白。该异二聚体由一个 8 千道尔顿的亚基(MRP-8)和一个 14 千道尔顿的亚基(MRP-14)组成。或者, MRP-8 和 MRP-14 分别被称为 S100A8/钙粒蛋白和 S100A9/钙粒蛋白 b。MRP-8/14 是一种最先在巨噬细胞中发现的钙结合蛋白。表达高浓度 MRP-8/14 的嗜中性粒细胞可见于各种炎症, 所述炎症包括类风湿性关节炎、炎性肠病和同种异体移植物排斥(Frosch et al., 2000; Limburg et al., 2000; Burkhardt et al., 2001)。

MRP-8/14 并不总是炎症的诊断特征。例如它并不能可信地表明炎性憩室炎的存在(Gasché, C. 2005)。淋巴细胞通常不含有 MRP-8/14 (Hycult Biotechnology 公司, 针对人 S100A8/A9 的单克隆抗体), 因此 MRP-8/14 并不是以存在淋巴细胞而不存在非嗜中性粒细胞为特征的炎症的诊断特征。而且, 这种蛋白与机会性感染也不总是相关(Froland, M. F., et al., 1994)。

触珠蛋白是一种在溶血后结合游离血红蛋白的急性期蛋白质。触珠蛋白-血红蛋白复合物由肝脏清除。触珠蛋白是一种由两个 α 亚基和两个 β 亚基组成的异四聚体。 α 亚基和 β 亚基来源于一条单链多肽前体, 该单链多肽前体被酶切割而产生这些亚基。 α 亚基和 β 亚基的分子量分别为约 9kd-18kd 和 38kd。

除了作为血红蛋白清除剂之外, 触珠蛋白还具有广泛的生物学功能(Dobryszczycka, 1997)。已发现触珠蛋白在某些感染和炎性疾病中得以上调, 并且该蛋白调节免疫反应, 这可能是通过调节单核细胞的功能来实现(Arredouani et al., 2005)。已表明该 α 亚基可能作为卵巢癌的血清标志物(Ye et al., 2003)。

通过鉴定与阑尾炎差异相关的分子将大大提高准确诊断阑尾炎的能力。

发明内容

本发明提供一种诊断患者体内的阑尾炎的方法, 所述方法包括鉴定所述患者的至少一种阑尾炎的典型症状, 以及鉴定所述患者的体液或组

织样本中是否存在至少一种与阑尾炎差异相关的分子。本领域众所周知阑尾炎的诊断十分困难,并且经常出现误诊。因此本文中使用的术语“诊断阑尾炎”并不必然表示对阑尾炎的诊断正确率比通常更高。然而,事实上,本发明的方法显示出在正确诊断方面提供了改进,几乎没有假阳性结果,假阴性结果也很少。

在“与阑尾炎差异相关”的分子中术语“差异相关”指的是:(1)存在于阑尾炎患者体内而不存在于未患阑尾炎患者体内的分子;(2)在阑尾炎患者体内和未患阑尾炎患者体内之间其相对水平(量)有差异的分子;(3)一种分子,它的存在或存在水平与阑尾炎其他症状的存在相结合,一起作为阑尾炎的诊断特征;和/或(4)一种分子,它的存在或存在水平与存在该分子的、不是阑尾炎的疾病的症状的缺少相结合,一起作为阑尾炎的诊断特征。

这类分子的诊断水平在本文中也称为“阈值”或“阈水平”。与阑尾炎差异相关的分子优选地为蛋白抗原。

阑尾炎的典型症状包括:腹部疼痛;疼痛由肚脐附近开始,然后转移至腹部的右下象限;食欲缺乏(食欲减退);进食困难并伴随嗜睡;在疼痛出现后开始恶心;在疼痛出现后开始呕吐;呕吐伴随疲劳;便秘;少量粘液性粪便;腹泻;不能放屁;低烧;腹胀;腹部疼痛加剧;里急后重(感到需要移动肠胃);高烧和白细胞增多。阑尾炎还会引起血浆粘度增加。在本发明的一个实施方案中,鉴定了至少两种或两种以上的阑尾炎症状。

在本发明的一个实施方案中,筛选患者以测定他们是否患有“干扰性疾病”,即其中所述分子存在于此类被测试样本中的另一种疾病。如果患者未患有这样一种干扰性疾病,则检测该患者体内是否存在该分子,或者,如果患者确实患有这样一种干扰性疾病,则检测患者体内是否存在阑尾炎诊断水平的该分子。当患者患有干扰性疾病时,其阑尾炎诊断水平为高于患干扰性疾病但未患阑尾炎的患者体内的水平的水平。干扰性疾病包括:新近同种异体移植;败血症;脑膜炎;肺炎;结核病;类风湿性关节炎;胃肠道癌症;炎性肠病;皮肤癌;牙周炎;先兆子痫和艾滋病。

样本可为体液或组织,还可包括全血、血浆、血清、乳汁、尿液、唾液和/或细胞。也可以使用粪便样品。优选地,组织和粪便样品在检

测前进行液化。

在本发明的一个实施方案中，检测了两种或两种以上与阑尾炎差异相关的分子。对其他分子的鉴定使本方法的准确率更高。

一种与阑尾炎差异相关的分子为 MRP-8/14。另一种为触珠蛋白。这两种分子都可用于诊断阑尾炎。

未患阑尾炎的患者体内存在的 MRP-8/14 水平在约 1 至约 11 $\mu\text{g/ml}$ 的范围内。高于该值的水平为诊断阑尾炎提供了更高的准确率。高于约 10、11、13、15 或 20 $\mu\text{g/ml}$ MRP-8/14 的水平可用于诊断阑尾炎。未患阑尾炎的患者体内存在的触珠蛋白水平在约 27 - 139mg/dL 的范围内。高于该值如高于 125、130、135、139 和 150 的水平为诊断阑尾炎提供了更高的准确率。

可用本发明方法检测的其他分子，或除上述分子外还可被检测的其他分子包括：胃肠道的独特性结构蛋白、应激相关炎性介质（stress-related inflammatory mediator）、免疫因子、肠道菌群指示物、纤溶酶原激活因子抑制物-1、脂肪酸结合蛋白、核因子 κB (NF κB)、特异性阑尾抗原 (HLA-DR)、炎性相关抗原、以及编码上述任一种蛋白的核酸，包括编码 MRP-8/14 和触珠蛋白的核酸。用于检测核酸是否存在的方法为本领域已知。

本发明的方法包括从疑似阑尾炎患者获得第一份样本，还包括通过一种方法鉴定至少一种与阑尾炎差异相关的分子，所述方法包括从患有阑尾炎的第二个患者获得第二份组织或体液样本；从第三名患者获得第三份体液或组织样本，其中所述第三名患者患有特征在于具有至少一种阑尾炎症状的非阑尾炎疾病；以及分析第二份和第三份样本，以在第二名患者体内检测与阑尾炎差异相关的分子，然后鉴定第一份样本中是否存在该分子或该分子的水平是否升高，由此诊断阑尾炎。鉴定与阑尾炎差异相关分子的方法的候选分子包括：胃肠道的独特性结构蛋白、应激相关炎性介质、免疫因子、肠道菌群指示物、纤溶酶原激活因子抑制物-1、脂肪酸结合蛋白、核因子 κB (NF κB)、特异性阑尾抗原 (HLA-DR)、炎性相关抗原、以及编码上述任一种蛋白的核酸。

本发明还提供一种鉴定与阑尾炎差异相关的分子的方法，所述方法包括从因被怀疑患有阑尾炎而进行外科手术的一组患者中的每一名患者获取样本；在手术过程中确定所述每一名患者是否患阑尾炎；以及分

析所述样本中与阑尾炎差异相关的分子是否存在。样本可为血液样本或阑尾组织样本。这种方法还可包括测定样本中已发现与阑尾炎差异相关的分子的含量。在本发明的一个实施方案中，在鉴定了组织中的分子之后还鉴定血浆中的分子。这需要取自疑似患阑尾炎的患者血液样本。还测定与未患阑尾炎的患者相比，患有阑尾炎的患者体内的与阑尾炎差异相关的分子的量。

本发明的诊断阑尾炎的方法可以包括使用检测设备例如盒式（cartridge）检测设备和量杆（dipstick）检测设备，和/或其他测定与阑尾炎差异相关的分子是否存在的方法，例如进行蛋白质印迹、RNA印迹、ELISA测试、蛋白质功能测试、PCR和其他本领域已知的分析。在对于一些存在于未患阑尾炎的患者体内、但在阑尾炎患者体内上调的与阑尾炎差异相关分子的检测中，不仅需要检测该分子是否存在，还需要检测该分子在患者体液或组织中存在的相对量。可设计盒式免疫分析以提供本文所述分子的相对量的信息。可以使用包括ELISA在内的本领域已知的其他分析方法和例如Beckman Coulter公司的Synchron LX系统等的医院分析设备来测定患者体内这类分子的存在量，然后将其与未患阑尾炎的患者体内的存在量进行比较，以确定所述患者是否患有阑尾炎。

用于诊断阑尾炎的方法可包括使用针对与阑尾炎差异相关分子的单克隆或多克隆抗体而进行的免疫学分析。这种抗体为本领域已知或可用本领域已知的方法产生而无需进行过多的试验。

本发明还提供一种用于在样本中检测与阑尾炎差异相关分子是否存在的免疫分析测试设备。所述设备包括特异性针对该分子的单克隆或多克隆第一抗体、该单克隆或多克隆第一抗体的支持物、使该单克隆或多克隆第一抗体与样本接触的工具、以及可检测该单克隆或多克隆第一抗体与该分子的结合的指示器。

抗体与分子的结合的检测可包括将抗体/分子复合物与可结合复合物中的分子或抗体的被标记的第二抗体相结合。

检测设备的形式可为盒式、量杆或本领域已知的其他构造。检测设备还可为试剂盒的一部分，该试剂盒中可包括使用说明书、将检测结果与对未患阑尾炎的患者所作的相同检测的结果相比较的说明书、例如得自未患阑尾炎患者的细胞或体液等的其他反应试剂、以及本领域已知

的其他试剂。这类分析设备为本领域已知，并描述于例如美国专利公开文本 No.2003/0224452 中。

用于诊断阑尾炎的方法可包括将样本中所述分子的水平与在未患阑尾炎的人中同样分子的背景水平相比较。这种比较可用任何本领域已知的方法进行。它可包括将样本结果与得自己知未患阑尾炎的人的第二份样本所得的结果相比较，或将样本结果与得自己知未患阑尾炎的人的第二份样本所得的照片或其他图表结果相比较。也可以使用具有掩盖非阑尾炎水平的工具的检测设备，例如具有与指示非阑尾炎水平的指示器相同颜色或色调的支持物，或具有与非阑尾炎水平相同颜色或色调的滤器，这样只有较高的、阑尾炎指示水平的该分子被例如目测检出。本发明方法可包括使用具有背景水平的非阑尾炎样本所特有的分子的对照体液，以及上述的有色支持物和/或滤光器。

当样本为血液时，本方法还包括通过本领域已知的方法例如过滤或离心对血液进行处理，以分离用于测试的血浆或血清。

抗体支持物为本领域已知。在本发明的一个实施方案中，抗体支持物为吸收垫，抗体可清除地或固定地附着于垫上。在本发明的设备中，可使用本领域已知的检测与所述分子结合的抗体的任何指示工具。指示工具可包括被标记的单克隆或多克隆第二抗体，它可结合选定的蛋白质，它优选地结合选定蛋白质上的与单克隆或多克隆第一抗体结合表位基本上不同的表位，这样单克隆或多克隆第一抗体的结合不会阻碍第二抗体的结合，反之亦然。指示工具还可包括检测窗，可通过该视窗观察被标记的抗体。本领域已知的任何标记都可用于标记该第二抗体。在本发明的一个实施方案中，该标记为胶体金。第二抗体可为单克隆或多克隆抗体。在本发明的一个实施方案中，第一抗体是用与阑尾炎差异相关分子的特定多肽序列制备的多克隆或单克隆抗体，第二抗体是结合该分子的不同位点或结合第一抗体的不同单克隆或多克隆抗体。MRP-8 和 MRP-14 的抗体由 Cell Sciences, Canton, MA 公司市售。可用于本发明方法的针对触珠蛋白的单克隆抗体也是本领域已知的，例如描述于美国专利 No.5,552,295。

在本发明的一个实施方案中，待分析的样本为液体，免疫分析检测设备为一种侧流设备，它包括使液体样本流入以便与抗体接触的引入装置。检测设备还可包括保证检测正确进行的流量控制工具。这类流量控

制工具可包括结合至支持物上的控制抗原，所述控制抗原可捕获检测抗体，作为保证合适量的样本液流过检测设备的工具。或者，流量控制工具可包括在控制区域内的可捕获检测抗体的捕获抗体，该捕获抗体也指示合适流量流过本设备中。

还提供了使用上述设备来检测与阑尾炎差异相关分子是否存在的方法，所述方法包括：提供本发明的免疫分析检测设备；使第一抗体与样本接触；以及读出能够检测第一抗体的结合的指示器。优选地，该结合表示被测患者患有阑尾炎。可在医生的诊室、急救室或手术室来实行应用这些设备的方法，而不需要将患者或样本送至隔离的实验室中。

本发明的设备可用于检测上述的样本。当检测细胞时，例如当怀疑与阑尾炎差异相关的分子存在于血细胞或组织细胞中而不是存在于血清中的时候，该方法和/或设备可包括使用洗涤剂、穿刺或本领域已知的其他物理或化学方法的细胞裂解步骤或工具。

附图说明

图 1: 来自正常阑尾组织 (A) 和患病阑尾组织 (B) 的蛋白质的二维电泳照片。蛋白质在 X 轴通过等电聚焦分离，在 Y 轴通过分子量分离。分子量为千道尔顿，示于图左侧。箭头指示的是上调的蛋白 AP-93。

图 2: 正常组织 (N) 和患病组织 (A) 的 MRP-14 的蛋白质印迹分析。图中数字为样本编号。分子量以千道尔顿表示。

图 3: 正常组织 (N) 和患病组织 (A) 的 MRP-8 的蛋白质印迹分析。图中数字为样本编号。分子量以千道尔顿表示。

图 4: 用 ELISA 测定的正常血清和阑尾炎血清中的 MRP-8/14 的相对水平。以相对于未患阑尾炎患者的平均值的倍数方式示出该水平，所述倍数在本文中也可以被称作“成倍增加值”。黑色柱代表取自患有阑尾炎的患者样本。白色柱代表取自未患阑尾炎的患者样本。

图 5: 来自正常人 (A) 和阑尾炎患者 (B) 的不完全血清 (depleted serum) 样本中的蛋白质二维电泳照片。蛋白质在 X 轴通过等电聚焦分离，在 Y 轴通过分子量分离。分子量为千道尔顿，示于图左侧。带尾的箭头指示的是上调的蛋白 AP-77 (触珠蛋白的 α 亚基)。无尾的箭头

指示的是在患者和正常人体内含量相同的对照蛋白。

图 6: 来自正常人 (A) 和患病 (穿孔) 患者 (B) 的阑尾组织的蛋白质二维电泳照片。蛋白质在 X 轴通过等电聚焦分离, 在 Y 轴通过分子量分离。分子量为千道尔顿, 示于图左侧。箭头指示的是上调的蛋白 AP-91 (触珠蛋白的 α 亚基)。

图 7: 触珠蛋白的分布。正常组织 (N) 和患病组织 (A) 的触珠蛋白的蛋白质印迹分析。图中数字为样本编号。分子量以千道尔顿表示。 α 亚基和 β 亚基分别 $>20\text{kd}$ 和 38kd 。

具体实施方式

阑尾被识别为一个与大肠和小肠分离的器官。它以一个手指形口袋的形式从还被称为盲肠的升结肠的基部伸出。阑尾同大肠一样为中空结构并由与大肠相同的三层组织层组成。这三层为粘膜层、肌肉层和浆膜层。阑尾腔和盲肠腔通过一个圆形开口 (孔) 相连接, 阑尾通过该孔将其分泌物加至粪便流中。这些分泌物是阑尾的粘膜产生的过剩的粘液。除了含有粘液之外, 阑尾还含有右结肠中常见的多种细菌。阑尾腔的阻塞是造成急性阑尾炎的主要因素。虽然粪石是阑尾阻塞的通常原因, 但是肥大的淋巴组织、在 X 射线检查之前的浓缩钡、蔬菜和水果的种子、以及例如蛔虫的肠道寄生虫也会阻塞阑尾腔。

在阑尾腔阻塞后就会跟着发生一系列放大事件。阑尾的近端阻塞会产生阻碍阑尾粘液正常流入盲肠的闭环阻塞。阑尾粘液的持续正常分泌会很快填满阑尾的腔内空间 (大约 0.1cc)。当阑尾的腔内空间被填满时, 由被阻塞的阑尾产生的其它粘液会迅速增加器官内的腔内压。该增加的腔内压会对阑尾壁施加向外的作用力并使得阑尾膨胀。膨胀会刺激内脏传入痛觉纤维的神经末梢, 在中腹或下腹产生模糊的弥散性的钝痛。该相当突然的膨胀还会刺激蠕动, 致使在阑尾炎早期除了出现内脏疼痛之外还会绞痛。

不仅是持续的粘液分泌, 阑尾中内生细菌的快速繁殖也会使阑尾继续膨胀。随着器官内压力增加, 会超过阑尾壁中的静脉压。这增加的腔内压随之会阻塞毛细血管和微静脉, 但是由于动脉的流入还在持续, 就会导致充血和血管淤血。这种程度的膨胀通常会导致反射性恶心和呕

吐，并且弥散性内脏疼痛会变得更为严重。炎性过程很快会波及阑尾的浆膜层，结果还会波及该区域的壁腹膜，从而产生疼痛特征性转移至右下象限（RLQ）。当疼痛定位于RLQ时，疾病的发展已经相当严重了。

包括阑尾在内的胃肠道的粘膜很容易受到血液供应受损的影响。因此，在病程的早期，由于胃肠道整体缺乏抵抗力而使得细菌可侵入更深层的组织。这种细菌侵入导致阑尾被毁坏并导致各种细菌毒素在全身释放。这种死亡组织产物和细菌毒素的全身性释放的结果是出现发烧、心动过速和白细胞增多。随着进行性阑尾膨胀增加，在阑尾浆膜层的肠系膜对缘上会出现对动脉压力的侵占、椭圆形梗塞形成。随着膨胀、细菌侵入、血管供应的抵抗力缺乏和梗塞的发展，会在肠系膜对缘上通过其中一个梗塞区域发生穿孔。这种穿孔会使细菌及其毒素释放至腹腔。

由于阑尾炎的症状经常与其他疾病的症状相混淆，因此阑尾炎也被称为“伟大的模仿者（great imitator）”。这种混淆产生于该疾病早期的疼痛的非特异性和阑尾炎发展过程的可变性。在右下象限的腹部的疼痛是阑尾炎的标志，但这通常不是患者最先感觉到的疼痛。当阑尾腔开始阻塞时，患者可能没有什么症状，因为此时阑尾腔还没有机会被粘液填充。将阑尾腔填满所需的时间与阻塞点之后的腔内可用体积成正比。由于该体积取决于个体的阑尾大小和整个阑尾长度中粪石或其他阻塞物所在的确切位置，因此上述时间可能变化很大并难以预计。如果粪石或其他阻塞物接近阑尾的顶端，则该可用体积就相对很小，出现症状或穿孔的时间就很短。反之亦然，如果粪石或其他阻塞物接近阑尾的底部，就能提供尽可能大的阑尾体积。

当阑尾开始膨胀时，阑尾炎患者通常会感到在腹部中段开始有些非特异性的不适。这种不适很容易与一些常见疾病相混淆，例如消化不良、便秘或病毒性疾病。阑尾的继续膨胀会伴随一定程度的恶心和频繁的呕吐。呕吐症状极少很严重或持续，这又加重了阑尾炎与常见疾病的混淆。

阑尾炎病程后期，炎症将发展到阑尾的最外层。该最外层被称为浆膜层，它与被称做腹膜的腹腔内层相接触。这种接触使炎症波及腹膜而产生腹膜炎，腹膜炎是以局部疼痛方式被患者感知，此时阑尾与腹膜相接触。这种症状在不同的个体中也会有差异。阑尾最通常是位于右下象限的腹部，在被称为麦克伯尼点的区域下方。麦克伯尼点是位于腹部上、从髂骨前上端至肚脐的连线的三分之二处的一个部位。然而阑尾也可能

位于其他位置,这种情况下由阑尾炎产生的腹膜炎就会发生在非通常的部位。这也是在阑尾炎病理中造成误诊和延误手术治疗的一个常见因素。

不管阑尾炎发生在什么位置,如果任凭阑尾炎发展的话,该器官最终都会造成穿孔。这会使穿孔的阑尾周围的腹腔被细菌污染而产生严重的感染。这种感染通常会导致腹内局部的脓肿或蜂窝组织炎,会产生全身性的败血症。

使用了蛋白质组学方法来鉴定与阑尾炎差异相关的分子。鉴定了存在于急性阑尾炎患者的阑尾组织中的蛋白质复合物 MRP-8/14。这种复合物与阑尾炎高度相关的性质促使我们检测了疑似阑尾炎患者的血清中的 MRP-8/14 水平。与疑似患有阑尾炎但实际上阑尾还未发炎的患者相比,阑尾炎患者体内的 MRP-8/14 的水平显著升高 ($p < 0.02$)。血清中的 MRP-8/14 的来源是发炎的阑尾组织。这一发现与 MRP-8/14 的已知功能相一致。

MRP-8/14 在炎症中的作用还不完全清楚,但是它似乎在将白细胞保留在微毛细血管中起关键的作用。细胞外的 MRP-8/14 通过结合硫酸肝素和特别羧化的聚糖而与内皮细胞相互作用 (Robinson et al., 2002)。由 MRP-8/14 与内皮细胞的结合而诱导的胞内信号途径和效应物机理还不完全确定。然而,MRP-8/14 与巨噬细胞的相互作用增加了整联蛋白受体 CD11b-CD18 的结合活性。这是白细胞粘连到血管内皮的主要途径之一 (Ryckman et al., 2003)。相信 MRP-8/14 利用了晚期糖化终末产物的受体 (RAGE)。MRP-8/14 的同家族蛋白 S100A12 是一种由内皮细胞表达的 RAGE 的特定配体,它们的相互作用激活了在这些细胞中结合的 NF- κ B (Hsieh et al., 2004)。NF κ B 的结合随后诱导了多种促炎性分子例如各种细胞因子或粘合分子的表达。因此,S100 蛋白的释放和细胞外功能代表了一种正反馈机制,巨噬细胞通过这种机制促进了白细胞向炎症位置的募集。综上所述,这些蛋白似乎在某些炎性疾病的基本炎性反应中起作用,是阑尾组织炎症的极好的标记。

嗜中性粒细胞是最先从血液循环中迁移到炎症位置的白细胞。嗜中性粒细胞中,组成大约 40% 的胞质总蛋白的是 MRP-8/14 复合物。这种蛋白仅在巨噬细胞系的细胞中特异性表达,使血液中的单核细胞和被急性激活的巨噬细胞成为这些蛋白的其他潜在血细胞来源。MRP-8/14 通

常不在淋巴细胞、定居巨噬细胞或参与到慢性炎症的巨噬细胞中表达。还已知在急性炎症的特定时期，这两种蛋白由粘膜上皮独立地表达。

在阑尾炎的病程中，阑尾腔阻塞及其导致的阑尾壁的膨胀引起了炎症反应。随后循环中的嗜中性粒细胞和激活的巨噬细胞被募集至这一区域。虽然这种蛋白复合物的表达与炎症中的巨噬细胞活性有关，但是 MRP-8/14 和细胞活性的确切关系并不十分清楚。已知的是 MRP-8/14 的胞内分布会随着巨噬细胞的激活状态而变化。正常的巨噬细胞在胞质中含有该复合物，在当巨噬细胞被激活时 MRP-8/14 从胞质移位至细胞膜（特异性地与细胞骨架的蛋白结合）。这暗示着 MRP-8/14 可能与细胞运动、吞噬作用或炎性信号转导有关。细胞运动和信号转导中的作用还可解释为什么 MRP-8/14 由例如阑尾中形成血管的血管内皮直接产生。

不论 MRP-8/14 在某些炎性疾病中起什么样的作用，它在急性炎性细胞中的丰富含量使它成为急性阑尾炎的极好的检测物和监测物。炎症过程的第一步是嗜中性粒细胞和巨噬细胞向特定位置的募集。在我们的研究中，该特定位置是阑尾，那些含有 MRP-8/14 的细胞将在这里与攻击性刺激物战斗。这种战斗通常导致 MRP-8/14 细胞的死亡和并 MRP-8/14 从胞质或细胞膜释放至患者的循环系统中。同时，阑尾的粘液层也会开始产生和释放 MRP-8/14 以促进巨噬细胞迁移或炎症的扩大。然后这一过程将会随着被阑尾炎募集的 MRP-8/14 细胞的数量增加而被不断放大，最后向循环系统中释放更多的 MRP-8/14。引起胞内 MRP-8/14 的增加并且该 MRP-8/14 增加的趋势与炎症的程度相关的炎症状态的其他实例也是已知的。特别地，慢性支气管炎、囊性纤维化病和类风湿性关节炎都会引起血清中 MRP-8/14 水平的升高，并且这些疾病的严重程度通常与检出的血清中的 MRP-8/14 水平成正比。

MRP-8/14 的生理学作用使其成为急性阑尾炎的理想临床标记。由于阑尾炎患者通常比较年轻并且健康状况良好，因此他们通常产生较强的炎症反应。这种较强的炎症反应据信会在疾病的极早期释放 MRP-8/14，并且随着阑尾炎的发展增强释放。此外，已知会引起 MRP-8/14 水平升高的疾病在这一低龄群体中并不常见，并且通常不会产生与阑尾炎相似的症状。最后，由于 MRP-8/14 不定位于淋巴细胞，也不会由淋巴细胞的增殖引起，所以相信这一标记在病毒感染时不会升

高。这是阑尾炎诊断的非常有利的一点，因为病毒感染是最容易与阑尾炎相混淆的疾病之一。

触珠蛋白在本发明中也被鉴定为有用的阑尾炎标记。对不完全血清的差异蛋白质组学筛选确定触珠蛋白为阑尾炎的标记。对阑尾组织的再一次差异筛选证实触珠蛋白在阑尾炎患者的阑尾组织中上调。这一发现通过对组织蛋白质的蛋白质印迹分析证实。具体而言， α 亚基同种型仅存在于患病组织中。由于触珠蛋白是一种血浆蛋白，因此它作为阑尾炎的生物标记很有价值。

实施例

实施例 1. MRP-8/14。

本研究的目的是鉴定一种可对早期急性阑尾炎诊断的决策基础做出贡献的组织特异性标记。使用蛋白质组学筛选以鉴定在阑尾中的在急性阑尾炎中特异性上调的蛋白质。MRP-8/14 因其在患病阑尾组织和急性阑尾炎患者的血清中均有存在而被鉴定。

材料和方法

标本和血清采集。参加本研究的所有患者都根据其主治医生确定的可接受护理标准得以治疗。在实行本研究包括的方法之前，所有患者都由医生进行过检查并被诊断患有阑尾炎。主治医生们对这些阑尾炎患者的治疗计划包括立即进行阑尾切除术。由各自的医生决定治疗的具体手段，例如使用抗体、手术技术（开腹手术或腹腔镜手术）。

排除标准：现已患有慢性炎症的任何患者均被排除，所述慢性炎症例如哮喘、类风湿性关节炎、炎性肠病、银屑病或嗜中性粒细胞减少。孕妇也被排除在外。

研究者向所有患者解释了本研究，并得到了他们的同意。在得到受试者的同意后，分配给受试者一个编号，并获得了非个人的统计学和临床学信息（年龄、性别、种族、症状持续时间、血细胞计数（WBC）、成像研究结果等等）。在进行手术时，在常规的麻醉后通过外周静脉穿刺采得全血样本（体积为 5-10cc）。然后将该血液标本置于冰上。尽快

从病理标本上采集一小块发炎阑尾的样本（大约 1 克）并置于冰上。然后将预冷的血样以 3000rpm 离心 20 分钟分离出分离的血清。然后将该分离的血清和阑尾组织片分别置于-80℃冻存。

阑尾组织的处理。从进行阑尾切除术的患者获取阑尾组织并置于-80℃储存直至处理之前。使用无菌的研钵和杵将个体的组织样本在液氮中研磨为粉末。将组织粉末置于 37℃的提取缓冲液（0.025M Tris 碱、200mM 氯化钠、5mM EDTA、0.1%叠氮化钠、pH 7.5）中孵育以提取蛋白。将样本以 14000rpm 离心 10 分钟。将上清液储存于-80℃直至分析。

提取的组织样本的 2D 凝胶分析。对不完全血清样本和提取的组织样本进行 2D 凝胶分析。按照 2D 凝胶分析的 Zoom 实验手册(Invitrogen)进行等电聚焦 (IEF) 和 SDS-PAGE。每块凝胶上分析等量的蛋白质。

在阴性血清的凝胶和阳性血清的凝胶之间进行了比较，以确定哪种蛋白在阳性样本中存在而在阴性样本中不存在。鉴定了候选的凝胶点并进行了 MALDI-TOF 蛋白质鉴定分析 (Linden Biosciences)。

提取的阑尾组织样本的蛋白质印迹分析。用样本 (10 μg) 进行了标准的 Laemmli SDS-PAGE, 并将其转到用于蛋白质印迹分析的硝酸纤维素膜上, 所述蛋白质印迹分析使用采用化学荧光监测的标准技术。使用 Magic Mark Western Standard (Invitrogen) 以确定分子量。将 MRP-8 (钙粒蛋白 A C-19, Santa Cruz, SC-8112) 在 0.5x Uniblock (AspenBio, Inc) 中以 1:100 稀释用作一抗。二抗是亲和纯化的过氧化物酶偶联的抗山羊 IgG (H+L) (Vector, PI-9500)。将 MR-14 (钙粒蛋白 B C-19, Santa Cruz, SC-8114) 在 0.5x Uniblock 中以 1:100 稀释用作一抗。二抗是亲和纯化的过氧化物酶偶联的抗山羊 IgG (H+L) (Vector, PI-9500), 在 Uniblock 中 1:2000 稀释。

血清中 MRP-8/14 测定。使用市售的 ELISA (Buhlmann S100-Cellion S100 A8/A9) 按照厂商的实验手册通过 ELISA 测定了血清中的 MRP-8/14 水平。

结果

存在于取自阑尾炎患者的阑尾组织中的蛋白的鉴定。对不完全血清样本进行了差异蛋白质组学分析, 目的是找出急性阑尾炎患者体内增加

的蛋白质。该分析包括将取自正常患者的样本和取自阑尾穿孔的患者的样本进行比较。在即将进行手术之前取血样。本研究中的正常患者是因表现出腹痛、经过手术并发现其阑尾正常的患者。在手术过程中采集正常和患病的阑尾组织。

蛋白质组学方法使用二维电泳比较一组4个正常样本和一组4个阑尾炎样本。图1显示所分析的蛋白质的2D分布图。进行了凝胶之间的比较，二者之间最明显的差异为图1B中显示的AP-93。根据图1中的凝胶结果，AP-93的分子量约为14千道尔顿。将相应的凝胶切片用MALDI-TOF分析并得出了阳性的鉴定结果。该鉴定结果基于两种胰蛋白酶的肽的光谱：NIETIINTFHQYSVK[SEQ ID NO:1]和LGHPDTLNQGEFKELVR[SEQ ID NO:2]。这两种肽对应下述的MRP-14的氨基酸序列（GenBank编号P06702）中的带有下列划线的残基：

MTCKMSQLERNIETIINTFHQYSVKLGHPDTLNQGEFKELVR
KDLQNFLKKNKNEKVIEHIMEDLDTNADKQLSFEEFIMLMARL
TWASHEKMHEGDEGPGHHHKPGLGEGTP [SEQ ID NO:3]。

分子量的相匹配也肯定了AP-93是MRP-14的MALDI-TOF鉴定结果。基于上述数据，MRP-14蛋白在患病样本组中的含量大大高于其在正常样本组中的含量。

MRP-14和MRP-8在患病阑尾组织中的存在。为证实MRP-14在患病组织中的存在，将抗MRP-14抗体用于对取自个体的正常和患病阑尾的组织提取物进行了蛋白质印迹分析。图2显示了来自9个正常样本和11个阑尾炎样本的蛋白质印迹结果。在每个阑尾炎样本中都存在14千道尔顿的条带。在正常样本中没有可检出的信号。这一数据肯定了蛋白质组学筛选数据，显示该蛋白是阑尾组织患病的标记。

由于已知MRP-8以二聚体形式与MRP-14共存，还对组织标本就是否存在MRP-8进行了检测。图3显示使用抗MRP-8抗体对正常的和患病的组织样本进行蛋白质印迹分析的数据。不出所料，在所有的患病阑尾样本中都存在MRP-8，并且在正常阑尾组织中都检测不到。上述蛋白质印迹的数据显示MRP-8和MRP-14蛋白在阑尾炎组织中的含量比正常阑尾组织中的含量要高得多。

急性阑尾炎患者血清中MRP-8/14水平的升高。阑尾炎与阑尾组织

中 MRP-8/14 的存在之间的高度相关性促使我们检测这些患者和随后加入本研究的其他患者的血清中 MRP-8/14 的水平。在手术前采集血清，储存起来并在得知疾病状态后进行分析。使用特异性针对该复合物的夹心 ELISA 测量了 MRP-8/14 水平。

表 1 列出了使用由 Hycult(Netherlands)公司生产、由 Cell Sciences, Canton, MA 公司市售的 ELISA 测定的 39 名患者的血清中的 MRP-8/14 水平。该量以相对于研究中未患阑尾炎患者的平均水平的倍数方式示出该水平。注意到所有阑尾炎患者显示出 MRP-8/14 较正常水平成倍增加。根据 ELISA 产品所附的说明书进行实验。由于样本被重新编号，因此样本编号与图 2 和图 3 中没有对应关系。

表 1

样本号	临床诊断	病理学	分级	正常值的倍数
1	晚期阑尾炎	轻急性阑尾炎	2	2.80428
2	阑尾正常	正常	1	0.960805
3	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	5.554904
4	阑尾穿孔	阑尾穿孔、坏死	4	6.53913
5	早期阑尾炎	轻急性阑尾炎	2	4.562059
6	早期阑尾炎	轻急性阑尾炎	1	2.881124
7	严重穿孔	阑尾穿孔、坏死	4	7.906886
8	阑尾正常	轻急性阑尾炎	2	3.971489
9	早期阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	3.83328
10	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	3.566665
11	阑尾炎	轻急性阑尾炎	2	3.205335
12	阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	5.51224
13	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	2.92671
14	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎、坏死	4	3.866306
15	穿孔	透壁性阑尾炎	3	4.54657
16	晚期阑尾炎	阑尾穿孔	4	7.01877
17	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	4.25998
18	阑尾炎	透壁性阑尾炎	3	6.90312
19	阑尾正常	正常	1	0.838679
20	阑尾正常	正常	1	0.590095
21	早期阑尾炎	阑尾炎、阑尾周围有改变	3	1.682291
22	阑尾正常	正常	1	1.128849

23	晚期阑尾炎	透壁性阑尾炎	4	2.338583
24	阑尾正常	正常	1	2.478035
25	阑尾发热			2.807046
26	穿孔	穿孔	4	4.954136
27	正常	正常	1	0.918438
28	发热	发热	2	4.387589
29	早期	透壁性阑尾炎	3	4.015013
30	发热	透壁性阑尾炎	3	2.460902
31	正常	正常	1	0.594943
32	发热	透壁性阑尾炎	3	4.211086
33	穿孔	透壁性阑尾炎	4	3.835219
34	正常	正常	1	1.968859
35	穿孔	透壁性阑尾炎	4	4.126198
36	晚期	透壁性阑尾炎	3	2.423726
37	阑尾发热	透壁性阑尾炎	3	4.178647
38	早期	透壁性阑尾炎	3	9.584398
39	正常	透壁性阑尾炎	2	2.835339

我们鉴定了存在于阑尾炎患者的阑尾和血清中的蛋白质复合物。根据蛋白质印迹分析数据,阑尾组织中 MRP-8/14 的存在与疾病高度相关。而且 MRP-8/14 在血清中的水平还可以预测阑尾炎。我们假设这种增加是由于这些蛋白从阑尾的嗜中性粒细胞渗透到全身的产量增加,以及可能是由于阑尾自身的粘膜产生这些蛋白的产量增加。这项研究表明 MRP8/14 是急性阑尾炎的有用的临床标记。在我们发现 MRP-8/14 是与阑尾炎差异相关的分子之后,我们的工作又被 Power, C. et al., 2004 和 2005 的发现所证实,他们报道在急性阑尾炎患者的粪便中也检出了这种分子。

实施例 2. 触珠蛋白。

使用对血清和阑尾组织的蛋白质组学筛选,我们测定出触珠蛋白在急性阑尾炎患者体内上调。触珠蛋白的 α 亚基是筛选该疾病的特别有用的标记。

材料和方法

标本和血清采集、阑尾组织处理、对所提取组织样本的 2D 凝胶分析和对所提取组织样本的蛋白质印迹分析均同实施例 1，除了在蛋白质印迹中是将亲和纯化的抗人触珠蛋白 (Rockland, 600-401-272) 在 0.5x Uniblock 中以 1:5000 稀释用作一抗；二抗是亲和纯化的过氧化物酶偶联的抗兔 IgG (H+L) (vector, pi-1000)，在 Uniblock 中 1:5000 稀释。

结果

存在于取自阑尾炎患者的阑尾组织中的蛋白的鉴定。对不完全血清样本进行了差异蛋白质组学分析，目的是找出急性阑尾炎患者体内增加的蛋白质。该分析包括将取自正常患者的样本和取自阑尾穿孔的患者的样本进行比较。在即将进行手术之前取血样。本研究中的正常患者是因表现出腹痛、经过手术并发现其阑尾正常的患者。在手术过程中采集正常和患病的阑尾组织。

蛋白组学方法使用二维电泳比较一组 4 个正常样本和一组 4 个阑尾炎样本。图 5 显示对缺乏 IgG 和清蛋白的血清中分析的蛋白质的 2D 分布图。进行了凝胶之间的比较，二者之间最明显的差异为图 5B 中显示的 AP-77。将凝胶点中的蛋白 AP-77 用胰蛋白酶消化，并用 MALDI-TOF 进行了分析。所得到的两种肽具有下述序列：TEGDGVYTLNNEKQWINK [SEQ ID NO:4] 和 AVGDKLPECEADDGCPKPPEIAHGYVEHSVR [SEQ ID NO:5]。将该序列与触珠蛋白的 α 亚基进行了比对。触珠蛋白前体的序列 (GenBank 编号 NP005134) 如下所示，下划线的部分是胰蛋白酶的片段。

```
MSALGAVIALLLWGQLFAVDSGNDVTDIADDGCPKPPEIAHGYVEHSVR
YQCKNYYKLRTEGDGVYTLNDKKQWINKAVGDKLPECEADDGCPKPPEIAHGYVE
HSVRYQCKNYYKLRTEGDGVYTLNNEKQWINKAVGDKLPECEAVCGKPKNPANPV
QRILGGHLDAGSFPWQAKMVSHHNLTTGATLINEQWLLTTAKNLFLNHSENATAK
DIAPTLTLYVGKKQLVEIEKVWLHPNYSQVDIGLIKQKQVSVNERVMPICLPSKDYA
EVGRVGYVSGWGRNANFKFTDHLKYVMLPVADQDQCIRHYEGSTVPEKKTSPKSPV
GVQPILNEHTFCAGMSKYQEDTCYGDAGSAFAVHDLEEDTWYATGILSFDKSCAV
AEYGVYVKVTSIQDWVQKTIAEN [SEQ ID NO:6].
```

图 6 显示了患病的和正常的阑尾组织蛋白质的二维电泳分布比较。

用 MALDI-TOF 分析了两个点：AP-91 和 AP-93，测定为阳性结果。测得 AP-91 蛋白与触珠蛋白 α 亚基 AP-77 蛋白相同。

患病阑尾组织中触珠蛋白的增加。为证实触珠蛋白在患病组织中的存在，使用抗触珠蛋白抗体对取自个体的正常和患病阑尾的组织提取物进行了蛋白质印迹分析。图 7 显示了来自 6 个正常样本和 6 个阑尾炎样本的蛋白质印迹数据。几乎每个样本中都含有一定水平的 38kd 的 β 亚基，但是似乎在阑尾炎的样本中该水平有所提高。在每个阑尾炎样本中都存在一条 >20 千道尔顿的条带，而在所有正常组织样本中均不存在。这一数据肯定了蛋白质组学筛选的结果，显示该蛋白是阑尾组织患病的标记。 α 亚基的特异性比 β 亚基的更高。

实施例 3. 使用体液样本鉴定分子的方法。

在本实施例的变化方案中，体液样本可包括全血、血清或血浆。所述样本为取自即将进行阑尾切除术的病人的全血。将标本置于冰上并转移至实验室。然后将血液通过 3000rpm 离心 15 分钟进行处理。然后通过将血浆倒入另一容器中得以分离。

在进行阑尾切除手术时，可将患者归类为患有阑尾炎的 (AP) 和未患阑尾炎的 (NAP)。这种分类是基于本领域已知的临床评估、病理学或这两者。就阑尾炎而言，其临床病症还可分为穿孔的或未穿孔的。

将取自 AP 患者的样本任选地混合然后分成等份。任选地，对混合的等份进行处理以除去例如抗体和血清清蛋白的选定组分。类似地，将取自 NAP 的样本也任选地混合然后分成等份，并任选地进行处理以除去相同的选定组分。优选地，AP 样本和 NAP 样本按相似方式进行处理。

然后，将每一个混合的等份 AP 和 NAP 样本都进行本领域已知的二维凝胶电泳分析。将每种样本类型的结果在蛋白是否存在及其相对表达水平方面进行比较。优选地，检测与来源于 AP 样本的蛋白相对应的信号，所述蛋白或不存在于 NAP 样本中，或以相对较低的水平在 NAP 样本中表达。对这类 AP 蛋白质进行进一步表征。

进一步表征包括部分氨基酸测序、质谱和其他本领域已知的分析技术。对应部分氨基酸序列的基因的全长克隆可被分离并以重组蛋白形式表达。该重组蛋白可用作检测抗原。或者，部分或完整的重组蛋白可用

于诱导或以其它方式产生特异性的多克隆或单克隆抗体试剂。将抗体试剂用于检测患者体内的抗原以辅助阑尾炎的诊断。抗原性分子的组合也可以用于阑尾炎的诊断。

实施例 4. 使用组织样本鉴定分子的方法

从阑尾炎患者 (AP) 和未患阑尾炎患者 (NAP) 身上采集组织样本。优选地, 该组织为阑尾。将 AP 或 NAP 组织样本分别任选地混合得到 AP 组织组或 NAP 组织组。AP 和 NAP 组织样本各自用作分离总 RNA 和/或 mRNA 的来源。在分离后将 AP-RNA 和 NAP-RNA 分别保存并用于 cDNA 的制备。

用本领域已知的技术建立消减文库。任选地, 扩增 cDNA 文库。建立 cDNA 文库是为了除去不需要的组分, 例如含量很高的种类和在患病组织和在正常组织中都表达的种类。上述技术的实例包括 Bonaldo et al. (1996) 和 Deichmann M et al. (2001) 中所述的技术。

在建立了消减文库之后, 对在疾病条件下有差异表达的序列所对应的选定克隆进行分析、分离和测序。使用分子生物学技术, 选出了用于重组表达部分或完整的蛋白的候选克隆。然后将这类蛋白用作检测用的抗原。或者, 部分或完整的重组蛋白可用于诱导或以其它方式产生特异性的多克隆或单克隆抗体试剂。将抗体试剂用于检测患者体内的抗原以辅助阑尾炎的诊断。可以预料抗原性分子的组合也可以用于阑尾炎的诊断。

实施例 5. 通过评估血样粘度进行阑尾炎诊断的方法。

从被怀疑患有阑尾炎并即将进行阑尾切除术的患者身上采集全血。将标本置于冰上并转移至临床实验室。然后将血液通过 3000rpm 离心 15 分钟, 然后通过将该样本倾倒入另一容器中从该样本中分离血浆。

在倾倒过程中对样本进行粘度分析。粘度增加表明可能患有阑尾炎。大约 80% 的阑尾炎患者的样本表现出粘度增加, 而只有 0% 至小于 5% 的未患阑尾炎的患者表现出粘度增加。注意到粘度增加的程度与阑尾炎的严重程度相关。

粘度测量可评视觉的观察进行, 也可用本领域已知的技术实行。例

如可使用 Coulter Harkness 毛细管粘度计 (Harkness J., 1963) 或其他技术 (Haidekker MA, et al., 2002)。

血浆粘度的增加这一指标可与其他诊断技术结合使用, 例如与以下的一种或多种技术结合使用: 生理检测、分类或不分类的全血计数 (CBC)、尿液分析 (UA)、计算机体层摄影术 (CT)、腹部超声波检查和腹腔镜检查。

本申请中所有的参考文献例如出版物、专利和专利文献的全部内容都以援引的方式纳入本文, 就如同这其中的每一篇参考文献被单独引入一样, 所援引的这些文献的范围以它们不和本申请公开的内容相冲突为准。

本文中所使用的术语“包括”、“含有”、“包含”或“含有”应被解释为意在特地指出所提到的特征、整数、步骤或所指的组分的存在, 而不是要将一个或多个其他特征、整数、步骤、组分或其群体的存在或将其作为补充排除在外。

本发明参照各种具体而优选的实施方案和技术进行了描述。然而, 应当理解在本发明精神和范围的情况下可进行多种变化和改变。对本领域技术人员显而易见的是, 根据本发明公开的内容, 不需进行过多的实验, 就可将其他本文没有具体描述的组合物、方法、设备、设备元件、材料、过程、技术和实施方案及其各自的变化方案用于实施本发明。本发明旨在包括本领域已知的所有功能性等价物。当公开一个范围时, 旨在包括该范围中的子范围和单个数值。本发明并不限于所公开的实施方案、附图和说明书中示例性描述的内容中所包括的范围, 上述内容是以举例的方式而不是以限制的方式给出。

参考文献

Aadland E, Fagerhol MK. Faecal calprotectin: a marker of inflammation throughout the intestinal tract. *Europ J Gastroenterol Hepatol* 2002; 14:1

Ahlquist DA, Gilbert JA. Stool markers for colorectal screening: future considerations. *Dig Dis* 1996; 14(3):132-44.

Alic M. Is fecal calprotectin the next standard in inflammatory bowel disease activity tests?. [Letter] *American Journal of Gastroenterology* 1999; 94(11):3370-1.

Arnott IDR, Watts D, Ghosh S. Review article: is clinical remission the optimum therapeutic goal in the treatment of Crohn's disease? *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:857.

Arredouani MS, Kasran A, Vanoirbeek JA, Berger FG, Baumann H, Ceuppens JL. 2005. Haptoglobin dampens endotoxin-induced inflammatory effects both in vitro and in vivo. *Immunology*. 114(2):263-71.

Berger D, Bolke E, Seidelmann M, Beger HG. Time-scale of interleukin-6, myeloid related proteins (MRP), C reactive protein (CRP), and endotoxin plasma levels during the postoperative acute phase reaction. *Shock* 1997; 7(6):422-6.

Berntzen HB, Endresen GK, Fagerhol MK, Spiechowicz J, Mowinckel P. Calprotectin (the L1 protein) during surgery in patients with rheumatoid arthritis. *Scand J Clin Lab Invest* 1991; 51(7):643-50.

Berntzen HB, Fagerhol MK, Ostensen M, Mowinckel P, Hoyeraal HM. The L1 protein as a new indicator of inflammatory activity in patients with juvenile rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1991; 18(1):133-8.

Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. A longitudinal study of the leukocyte protein L1 as an indicator of disease activity in patients with rheumatoid arthritis. *J Rheumatol* 1989; 16(11):1416-20.

Berntzen HB, Munthe E, Fagerhol MK. The major leukocyte protein L1 as an indicator of inflammatory joint disease. *Scand J Rheumatol* 1988; Supp 76:251-6.

Berntzen HB, Olmez U, Fagerhol MK, Munthe E. The leukocyte protein L1 in plasma and synovial fluid from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *Scand J Rheumatol* 1991; 20(2):74-82.

Berstad A, Arslan G, Folvik G. Relationship between intestinal permeability and calprotectin in gut lavage fluid. *Scand J Gastroenterol* 2000; 35(1):64-9.

Bjarnason I, Sherwood R. Fecal calprotectin: a significant step in the noninvasive assessment of intestinal inflammation. *J Pediatr Gastroent Nutr* 2001; 33:11.

Bjerke K, Halstensen TS, Jahnsen F, Pulford K, Brandtzaeg P. Distribution of macrophages and granulocytes expressing L1 protein (calprotectin) in human Peyer's patches compared with normal ileal lamina propria and mesenteric lymph nodes. *Gut* 1993; 34(10):1357-63.

Bogumil T, Rieckmann P, Kubuschok B, Felgenhauer K, Bruck W. Serum levels of macrophage-derived protein MRP-8/14 are elevated in active multiple sclerosis. *Neuroscience Letters* 1998; 247(2-3):195-7

Bonaldo MF et al., 1996. Normalization and subtraction: Two approaches to facilitate Gene discovery. *Genome Res.* 6:791-806.

Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. I. Comparison with other leukocyte markers by paired immunofluorescence and immunoenzyme staining. *Am J Clin Pathol* 1987; 87(6):681-99.

Brandtzaeg P, Dale I, Fagerhol MK. Distribution of a formalin-resistant myelomonocytic antigen (L1) in human tissues. II. Normal and aberrant occurrence in various epithelia. *Am J Clin Pathol* 1987; 87(6):700-7.

Brandtzaeg P, Dale I, Gabrielsen TO. The leukocyte protein L1 (calprotectin): usefulness as an immunohistochemical marker antigen and putative biological function. *Histopathol* 1992; 21(2):191-6.

Brun JG, Cuida M, Jacobsen H, Kloster R, Johannesen AC, Hoyeraal HM, Jonsson R. Sjögren's syndrome in inflammatory rheumatic diseases: analysis of the leukocyte protein calprotectin in plasma and saliva. *Scand J Rheumatol* 1994; 23(3):114-8.

Brun JG, Haga HJ, Boe E, Kallay I, Lekven C, Berntzen HB, Fagerhol MK. Calprotectin in patients with rheumatoid arthritis: relation to clinical and laboratory variables of disease activity. *J Rheumatol* 1992; 19(6):859-62.

Brydon WG, Campbell SS, Anderson NA, Wilson RG, Ghosh S. Faecal calprotectin levels and colorectal neoplasia. *Gut* 2001; 48(4):579-80.

Bunn SK, Bisset WM, Main MJ, Golden BE. Fecal calprotectin as a measure of disease activity in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 32(2):171-7

Bunn SK, Bisset WM, Main MJC, Gray ES, Olson S, Golden BE. Fecal calprotectin: Validation as a noninvasive measure of bowel inflammation in childhood inflammatory bowel disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2001; 33:11.

Burkhardt K, Radespiel-Troger M, Rupprecht HD, Goppelt-Struebe M, Riess R, Renders L, Hauser IA, and U Kunzendorf 2001. An increase in myeloid-related protein serum levels precedes acute renal allograft rejection. *J Am Soc Nephrol* 12:1947-57.

Clark BR, Kelly SE, Fleming S. Calgranulin expression and association with the keratinocyte cytoskeleton. *J Pathol* 1990; 160(1):25-30

Dale I, Brandtzaeg P, Fagerhol MK, Scott H. Distribution of a new myelomonocytic antigen (L1) in human peripheral blood leukocytes. Immunofluorescence and immunoperoxidase staining features in comparison with lysozyme and lactoferrin. *Am J Clin Pathol* 1985; 84(1):24-34.

Dale I, Brandtzaeg P. Expression of the epithelial L1 antigen as an immunohistochemical marker of squamous cell carcinoma of the lung. *Histopathol* 1989; 14(5):493-502.

Dale I. Plasma levels of the calcium-binding L1 leukocyte protein: standardization of blood collection and evaluation of reference intervals in healthy controls. *Scand J Clin Lab Invest* 1990; 50(8) :837-41.

Deichmann, M., Polychronidis, M., Wacker, J., Thome, M. & Naher, H., 2001. The protein phosphatase 2A subunit Bg gene is identified to be differentially expressed in malignant melanomas by subtractive suppression hybridization. *Melanoma Research* 2001(11):1-9.

Dobryszczyka W. 1997. Biological functions of haptoglobin--new pieces to an old puzzle. *Eur J Clin Chem Clin Biochem* 35(9):647-54.

Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. Keratinocyte expression of calprotectin in oral inflammatory mucosal diseases. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(7):303-7.

Eversole LR, Miyasaki KT, Christensen RE. The distribution of the antimicrobial protein, calprotectin, in normal oral keratinocytes. *Arch Oral Biol* 1992; 37(11):963-8.

Fagerhol MK, Andersson KB, Naess-Andresen CF, Brandtzaeg P, Dale I. Calprotectin (The L1 Leukocyte Protein) In: VL Smith & JR Dedman (Eds): *Stimulus Response Coupling. The Role of Intracellular Calcium-Binding Proteins*, CRC Press, Boca Raton, Fla., USA, 1990, pp. 187-210.

Fagerhol MK. Calprotectin, a faecal marker of organic gastrointestinal abnormality. *Lancet* 2000; 356(9244):1783-4.

Flum DR et al., 2001. Has misdiagnosis of appendicitis decreased over time? A population-based analysis. *JAMA* 286 (14):1748-1753.

Fosse E, Moen O, Johnson E, Semb G, Brockmeier V, Mollnes TE, Fagerhol MK, Venge P. Reduced complement and granulocyte activation with heparin-coated cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery* 1994; 58(2):472-7.

Frosch M, Strey A, Vogl T, Wulffraat NM, Kuis W, Sunderkotter C, Harms E, Sorg C, and J Roth 2000. Myeloid-related proteins 8 and 14 are specifically secreted during interaction of phagocytes and activated endothelium and are useful markers for monitoring disease activity in pauciarticular-onset juvenile rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum* 43:628-37.

Gabrielsen TO, Brandtzaeg P, Hoel PS, Dale I. Epithelial distribution of a myelomonocytic antigen L1 in relation to cutaneous malignancies and melanocytic naevi. *Br J Dermatol* 1988; 118(1):59-67.

Gabrielsen TO, Dale I, Brandtzaeg P, Hoel PS, Fagerhol MK, Larsen TE, Thune PO. Epidermal and dermal distribution of a myelomonocytic antigen (L1) shared by epithelial cells in various inflammatory skin diseases. *J Am Acad Dermatol* 1986; 15(2 Pt 1):173-9.

Garred P, Fosse E, Fagerhol MK, Videm V, Mollnes TE. Calprotectin and complement activation during major operations with or without cardiopulmonary bypass. *Annals of Thoracic Surgery* 1993; 55(3):694-9.

Gasché, C., 2005. Laboratory Tests—What Do They Tell Us?, Falk Symposium Abstract, June 17-18, 2005, Munich, Germany.

Gaya DR, Mackenzie JF. Faecal calprotectin: a bright future for assessing disease activity in Crohn's disease. *Q J Med* 2002; 95:557 (editorial).

Gilbert JA, Ahlquist DA, Mahoney DW, Zinsmeister AR, Rubin J, Ellefson RD. Fecal marker variability in colorectal cancer: calprotectin versus hemoglobin. *Scand J Gastroenterol* 1996; 31(10):1001-5.

Golden BE, Clohessy PA, Russell G, Fagerhol MK. Calprotectin as a marker of inflammation in cystic fibrosis. *Archives of Disease in Childhood* 1996; 74(2):136-9.

Haga HJ, Brun JG, Berntzen HB, Cervera R, Khamashta M, Hughes GR. Calprotectin in patients with systemic lupus erythematosus: relation to clinical and laboratory parameters of disease activity. *Lupus* 1993; 2(1):47-50.

Haidekker MA, et al., 2002. A novel approach to blood plasma viscosity measurement using fluorescent molecular rotors. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282:H1609-H1614.

Hammer HB, Kvien TK, Glennas A, Melby K. A longitudinal study of calprotectin as an inflammatory marker in patients with reactive arthritis. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13(1):59-64.

Hanai H, Takeuchi K, Iida T, Arai H, Kanaoka K, Iwasaki T, Nakamura A, Hosoda Y, Shirai N, Hirasawa K, Takahira K, Kataoka H, Sano M, Osawa M, Sugimoto S. Clinical significance of faecal calprotectin levels in patients with ulcerative colitis. *Nippon Shokakibyo Gakkai Zasshi* 2003; 100:21.

Harkness J., 1963. A new method for the measurement of plasma viscosity. *Lancet* 2:280 –281.

Hetland G, Berntzen HB, Fagerhol MK. Levels of calprotectin (leukocyte L1 protein) during apheresis. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52(6):479-82.

Homann C, Garred P, Graudal N, Hasselqvist P, Christiansen M, Fagerhol MK, Thomsen AC. Plasma calprotectin: a new prognostic marker of survival in alcohol-induced cirrhosis. *Hepatology* 1995; 21(4):979-85.

Hsieh HL, Schafer BW, Weigle B, and CW Heizmann 2004 S100 protein translocation in response to extracellular S100 is mediated by receptor for advanced glycation endproducts in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 316:949-59.

Hycult Biotechnology b.v., ELISA Test Kit for Human Calprotectin information sheet, Catalog No. HK325.

Hycult Biotechnology b.v., Monoclonal Antibody to Human S100A8/A9 (MRP-8/MRP-14), calprotectin Clone 27E10 information sheet, Catalog No. HM2156.

Ikemoto, M., et al. 2003. New ELISA System for Myeloid-related Protein Complex (MRP8/14) and its Clinical Significance as a Sensitive Marker for

Inflammatory Responses Associated with Transplant Rejection, *Clin. Chem.* 49:594-600.

Johne B, Fagerhol MK, Lyberg T, Prydz H, Brandtzaeg P, Naess-Andresen CF, Dale I. Functional and clinical aspects of the myelomonocyte protein calprotectin. *Molecular Pathology* 1997; 50(3):113-23.

Johne B, Kronborg O, Ton HI, Kristinsson J, Fuglerud P. A new fecal calprotectin test for colorectal neoplasia. Clinical results and comparison with previous method. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(3):291-6.

Katnik et al, 1989. Monoclonal Antibodies Against Human Haptoglobin. *Hybridoma* 8 : (5):551-560.

Kelly SE, Hunter JA, Jones DB, Clark BR, Fleming S. Morphological evidence for calcium-dependent association of calgranulin with the epidermal cytoskeleton in inflammatory dermatoses. *Br J Dermatol* 1991; 124(5):403-9.

Kelly SE, Jones DB, Fleming S. Calgranulin expression in inflammatory dermatoses. *J Pathol* 1989; 159(1):17-21.

Kerkhoff C, Klempt M, Sorg C. Novel insights into structure and function of MRP8 (S100A8) and MRP14 (S100A9). *Biochimica et Biophysica Acta* 1998; 1448(2):200-11.

Kjeldsen-Kragh J, Mellbye OJ, Haugen M, Mollnes TE, Hammer HB, Sioud M, Forre O. Changes in laboratory variables in rheumatoid arthritis patients during a trial of fasting and one-year vegetarian diet. *Scand J Rheumatol* 1995; 24(2):85-93.

Koike T, Kondo K, Makita T, Kajiyama K, Yoshida T, Morikawa M. Intracellular localization of migration inhibitory factor-related protein (MRP) and detection of cell surface MRP binding sites on human leukemia cell lines. *J Biochem* 1998; 123(6):1079-87.

Kristinsson J, Armbruster CH, Ugstad M, Kriwanek S, Nygaard K, Ton H, Fuglerud P. Fecal excretion of calprotectin in colorectal cancer; relationship to tumor characteristics. *Scand J Gastroenterol* 2001; 36(2):202-7.

Kristinsson J, Roseth A, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H, Borner OP, Raknerud N, Nygaard K. Fecal calprotectin concentration in patients with colorectal carcinoma. *Diseases of the Colon & Rectum* 1998; 41(3):316-21.

Kronborg O, Ugstad M, Fuglerud P, Johne B, Hardcastle J, Scholefield JH, Vellacott K, Moshakis V, Reynolds JR. Faecal calprotectin levels in a high risk population for colorectal neoplasia. *Gut* 2000; 46(6):795-800.

Kumar, R.K., et al. 2001. Dimeric S100A8 in human neutrophils is diminished after phagocytosis, *J. Leukoc. Biol.* 70(1):59-64.

Limburg PJ, Ahlquist DA, Sandborn WJ, Mahoney DW, Devens ME, Harrington JJ and AR Zinsmeister 2000. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *Am J Gastroenterol*, 10:2831-7.

Limburg PJ. Ahlquist DA. Sandborn WJ. Mahoney DW. Devens ME. Harrington JJ. Zinsmeister AR. Fecal calprotectin levels predict colorectal inflammation among patients with chronic diarrhea referred for colonoscopy. *American Journal of Gastroenterology* 2000; 95(10):2831-7.

Longbottom D, Sallenave JM, van Heyningen V. Subunit structure of calgranulins A and B obtained from sputum, plasma, granulocytes and cultured epithelial cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1992; 1120(2):215-22.

Lugering N, Stoll R, Schmid KW, Kucharzik T, Stein H, Burmeister G, Sorg C, Domschke W. The myeloic related protein MRP8/14 (27E10 antigen)-usefulness as a potential marker for disease activity in ulcerative colitis and putative biological function. *Europ J Clin Invest* 1995; 25(9):659-64.

Meling TR. Aabakken L. Roseth A. Osnes M. Faecal calprotectin shedding after short-term treatment with non-steroidal anti-inflammatory drugs. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1996; 31(4):339-44.

Moen O, Fosse E, Braten J, Andersson C, Fagerhol MK, Venge P, Hogasen K, Mollnes TE. Roller and centrifugal pumps compared in vitro with regard to haemolysis, granulocyte and complement activation. *Perfusion* 1994; 9(2):109-17.

Muller F, Froland SS, Aukrust P, Fagerhol MK. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events. *J Acq Immune Defic Syndr* 1994; 7(9):931-9.

Muller, F., et al. 1994. Elevated serum calprotectin levels in HIV-infected patients: the calprotectin response during ZDV treatment is associated with clinical events, *J. Acqui. Immune Defic. Syndr.* 7(9):931-939.

Neary, Walter, 2001. Press Release from University of Washington, Misdiagnosis of appendicitis continues despite new tools.

Olafsdottir E, Aksnes L, Fluge G, Berstad A. Faecal calprotectin in infants with infantile colic, healthy infants, children with inflammatory bowel disease, children with recurrent abdominal pain and healthy children. *Acta Paediatr* 2002; 91:45.

Pekna M, Borowiec J, Fagerhol MK, Venge P, Thelin S. Biocompatibility of heparin-coated circuits used in cardiopulmonary bypass. *Scand J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 28(1):5-11.

Power, C. et al, 2005. Raised faecal calprotectin levels in patients presenting with right iliac fossa pain warrant mandatory laparoscopy: a non-invasive predictor of acute appendicitis, *Thieme connect, Endoscopy* 37:DOI:10.1055/2-2005-868524.

Power, C., et al. 2004, Irish Society of Gastroenterology Winter Meeting Program Oral Presentation Raised Faecal Calprotectin Levels in Patients Presenting with Right Iliac Fossa Pain Warrant Mandatory Laparoscopy: A Non-invasive Predictor of Acute Appendicitis.

Robinson MJ, Tessier P, Poulsom R, and N. Hogg 2002 The S100 family heterodimer, MRP-8/14, binds with high affinity to heparin and heparan sulfate glycosaminoglycans on endothelial cells. *J Biol Chem.* 277:3658-65.

Roseth AG, Aadland E, Grzyb K. Normalization of faecal calprotectin: a predictor of mucosal healing in patients with inflammatory bowel disease. *Scand J Gastroenterol.* 2004 Oct;39(10):1017-20.

Roseth AG, Fagerhol MK, Aadland E, Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scand J Gastroenterol* 1992; 27(9):793-8.

Roseth AG, Kristinsson J, Fagerhol MK, Schjonsby H, Aadland E, Nygaard K, Roald B. Faecal calprotectin: a novel test for the diagnosis of colorectal cancer? *Scand J Gastroenterol* 1993; 28(12):1073-6.

Roseth AG. Aadland E. Jahnsen J. Raknerud N. Assessment of disease activity in ulcerative colitis by faecal calprotectin, a novel granulocyte marker protein. *Digestion* 1997; 58(2):176-80.

Roseth AG. Fagerhol MK. Aadland E. Schjonsby H. Assessment of the neutrophil dominating protein calprotectin in feces. A methodologic study. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1992; 27(9):793-8.

Roseth AG. Schmidt PN. Fagerhol MK. Correlation between faecal excretion of indium-111-labelled granulocytes and calprotectin, a granulocyte marker protein, in patients with inflammatory bowel disease. *Scandinavian Journal of Gastroenterology* 1999; 34(1):50-4.

Ryckman C, Vandal K, Rouleau P, Talbot M, and PA Tessier 2003 Proinflammatory activities of S100: proteins S100A8, S100A9, and S100A8/A9 induce neutrophil chemotaxis and adhesion. *J Immunol.* 170:3233-42.

Saintigny G, Schmidt R, Shroot B, Juhlin L, Reichert U, Michel S. Differential expression of calgranulin A and B in various epithelial cell lines and reconstructed epidermis. *J Invest Dermatol* 1992; 99(5):639-44.

Sander J, Fagerhol MK, Bakken JS, Dale I. Plasma levels of the leucocyte L1 protein in febrile conditions: relation to aetiology, number of leucocytes in blood, blood sedimentation reaction and C-reactive protein. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44(4):357-62.

Semb AG, Gabrielsen TO, Halstensen TS, Fagerhol MK, Brandtzaeg P, Vaage J. Cardiac surgery and distribution of the leukocyte L1 protein-calprotectin. *Europ J Cardio-Thoracic Surgery* 1991; 5(7):363-7.

Shanahan F. Inflammatory bowel disease: immunodiagnostics, immunotherapeutics, and ecotherapeutics. *Gastroenterol* 2001; 120:622.

Stockley RA, Dale I, Hill SL, Fagerhol MK. Relationship of neutrophil cytoplasmic protein (L1) to acute and chronic lung disease. *Scand J Clin Lab Invest* 1984; 44(7):629-34.

Striz, I. and I. Trebichavsky 2004. Calprotectin – a Pleiotropic Molecule in Acute and Chronic Inflammation. *Physiol Res.* 53:245-253.

Thomas P. Rihani H. Roseth A. Sigthorsson G. Price A. Nicholls RJ. Bjarnason I. Assessment of ileal pouch inflammation by single-stool calprotectin assay. *Diseases of the Colon & Rectum* 2000; 43(2):214-20.

Tibble J, Sigthorsson G, Foster R, Fagerhol MK, Bjarnason I. Faecal calprotectin and faecal occult blood tests in the diagnosis of colorectal carcinoma and adenoma. *Gut* 2001; 49:402.

Tibble J. Teahon K. Thjodleifsson B. Roseth A. Sigthorsson G. Bridger S. Foster R. Sherwood R. Fagerhol M. Bjarnason I. A simple method for assessing intestinal inflammation in Crohn's disease. *Gut* 2000; 47(4):506-13.

Tibble JA, Bjarnason I. Department of Medicine, Guy's, King's, St Thomas's Medical School, Bessemer Road, London SE5 9PJ, UK. Non-invasive investigation of inflammatory bowel disease.

Tibble JA, Bjarnason I. Department of Medicine, Guy's, King's, St. Thomas's Medical School, London, UK. Fecal calprotectin as an index of intestinal inflammation.

Tibble JA, Bjarnason I. Markers of intestinal inflammation and predictors of clinical relapse in patients with quiescent IBD. *Medscape Gastroenterol* 2001; 3 (2).

Tibble JA, Sigthorsson G, Bridger S, Fagerhol MK, Bjarnason I. Surrogate markers of intestinal inflammation are predictive of relapse in patients with inflammatory bowel disease. [Journal Article] *Gastroenterology* 2000; 119(1):15-22.

Tibble JA, Sigthorsson G, Foster R, Scott D, Fagerhol MK, Roseth A, Bjarnason I. High prevalence of NSAID enteropathy as shown by a simple faecal test. *Gut* 1999; 45(3):362-6.

Ton H, Brandsnes. Dale S, Holtlund J, Skuibina E, Schjonsby H, Johne B. Improved assay for fecal calprotectin. *Clinica Chimica Acta* 2000; 292(1-2):41-54.

Tungekar MF, Heryet A, Gatter KC. The L1 antigen and squamous metaplasia in the bladder. *Histopathol* 1991; 19(3):245-50.

U.S. Patent No. 5,350,687, Odink, et al., September 27, 1994, Antibodies which bind to novel lymphokine related peptides.

U.S. Patent No. 5,455,160, Fagerhol, et al., Diagnostic test and kit for disease disorders in the digestive system.

U.S. Patent No. 5,552,295, Stanker, et al., September 3, 1996, Monoclonal antibodies to bovine haptoglobin and methods for detecting serum haptoglobin levels.

U.S. Patent No. 6,451,550, Eckersall, September 17, 2002, Haptoglobin assay.

U.S. Patent Publication No. 20030224452, Colgin, et al., Pregnancy Detection.

Wilkinson MM, Busuttill A, Hayward C, Brock DJ, Dorin JR, Van Heyningen V. Expression pattern of two related cystic fibrosis-associated calcium-binding proteins in normal and abnormal tissues. *J Cell Science* 1988; 91 (Pt 2):221-30.

Ye B, Cramer DW, Skates SJ, Gygi SP, Pratomo V, Fu L, Horick NK, Licklider LJ, Schorge JO, Berkowitz RS, Mok SC. 2003 Haptoglobin-alpha subunit as potential serum biomarker in ovarian cancer: identification and characterization using proteomic profiling and mass spectrometry. *Clin Cancer Res* 9(8):2904-11.

Yerly S, Bouvier M, Rougemont A, Srivastava I, Perrin LH. 1990. Development of a haptoglobin ELISA. Its use as an indicator for malaria. *Acta Trop.* 1990 47(4):237-44.

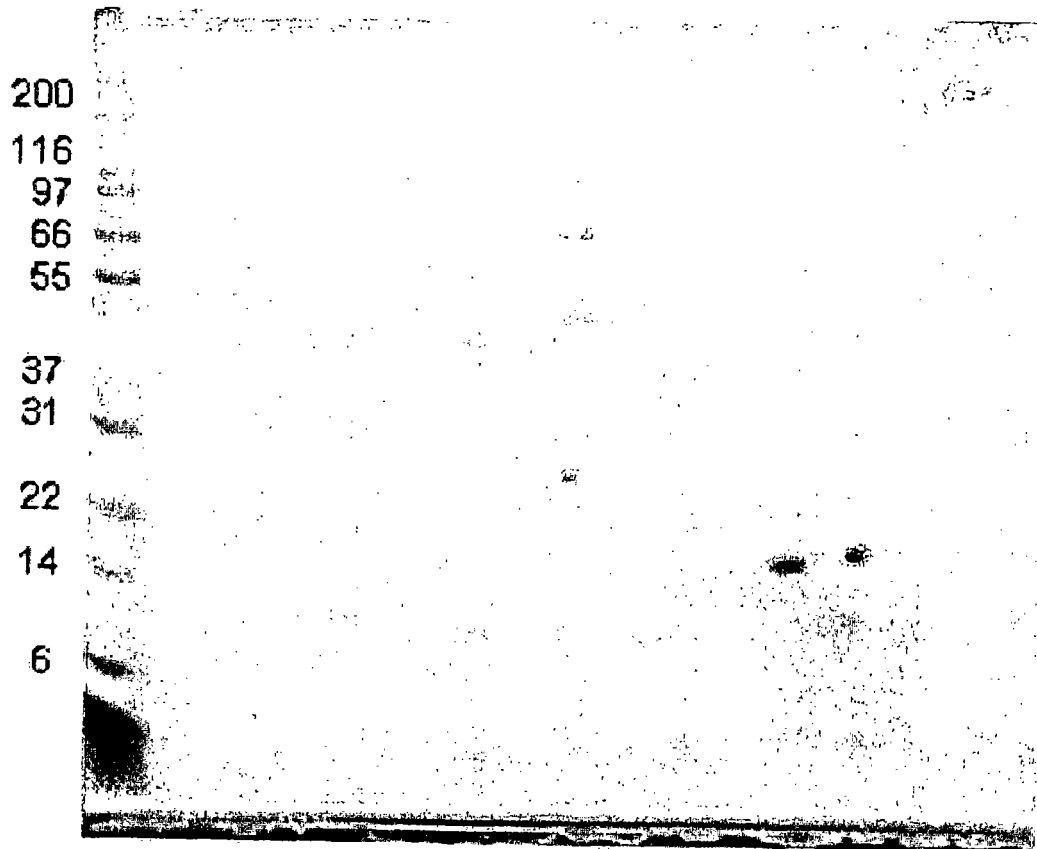


图 1A

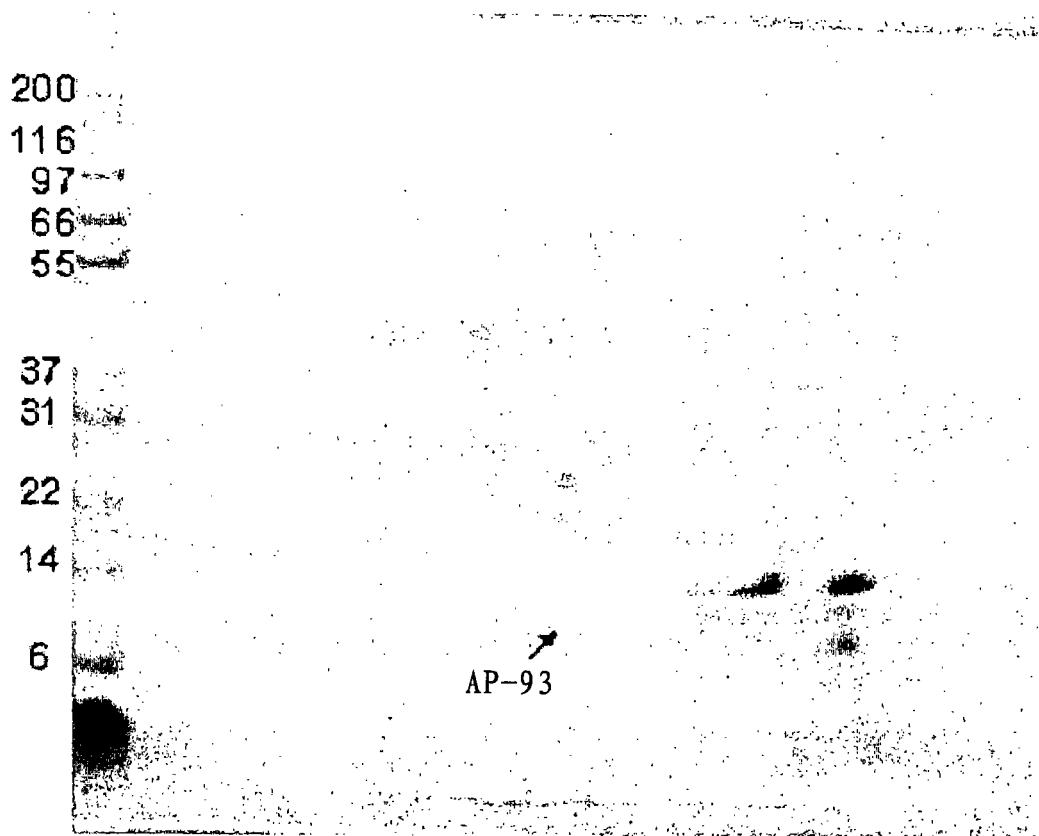


图 1B

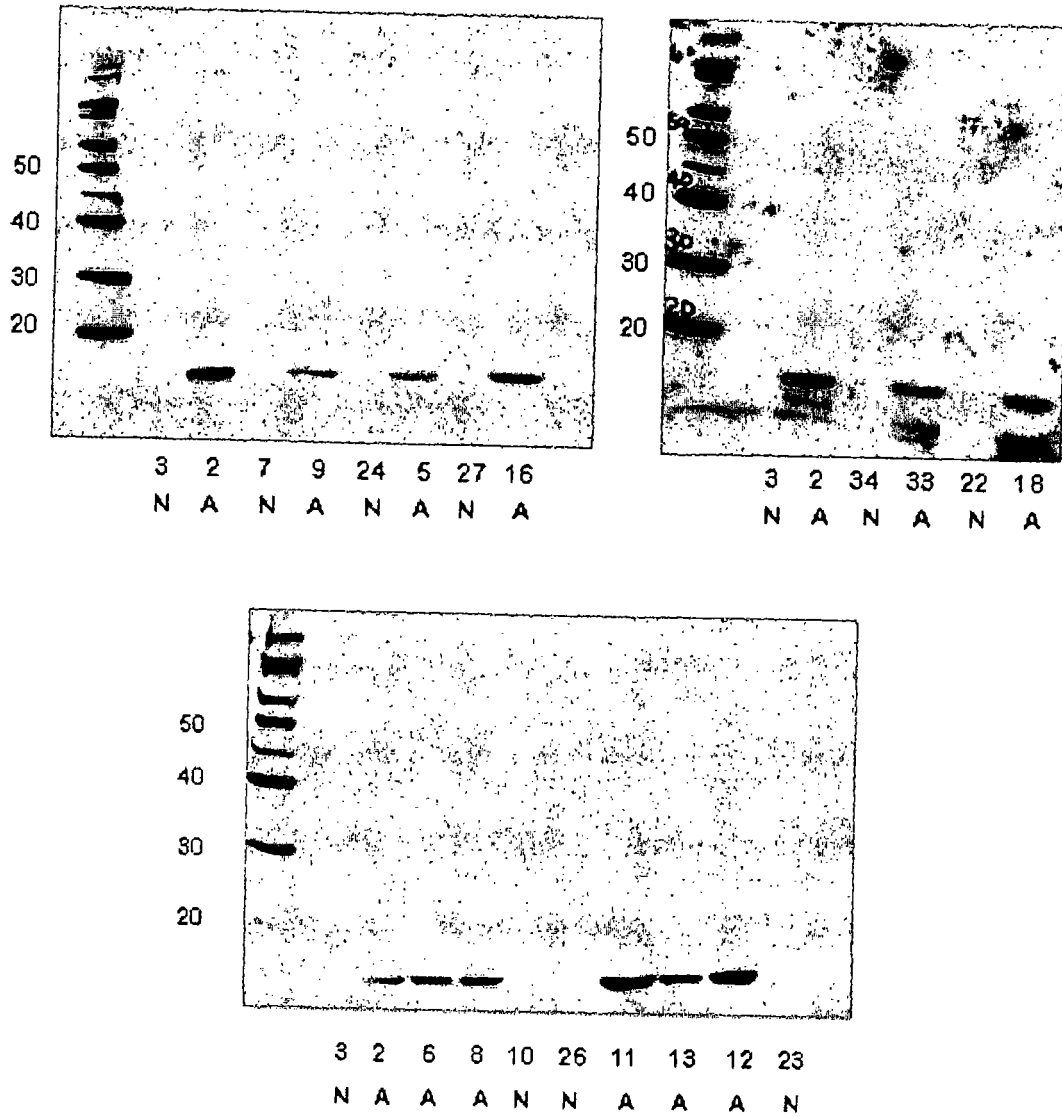


图 2

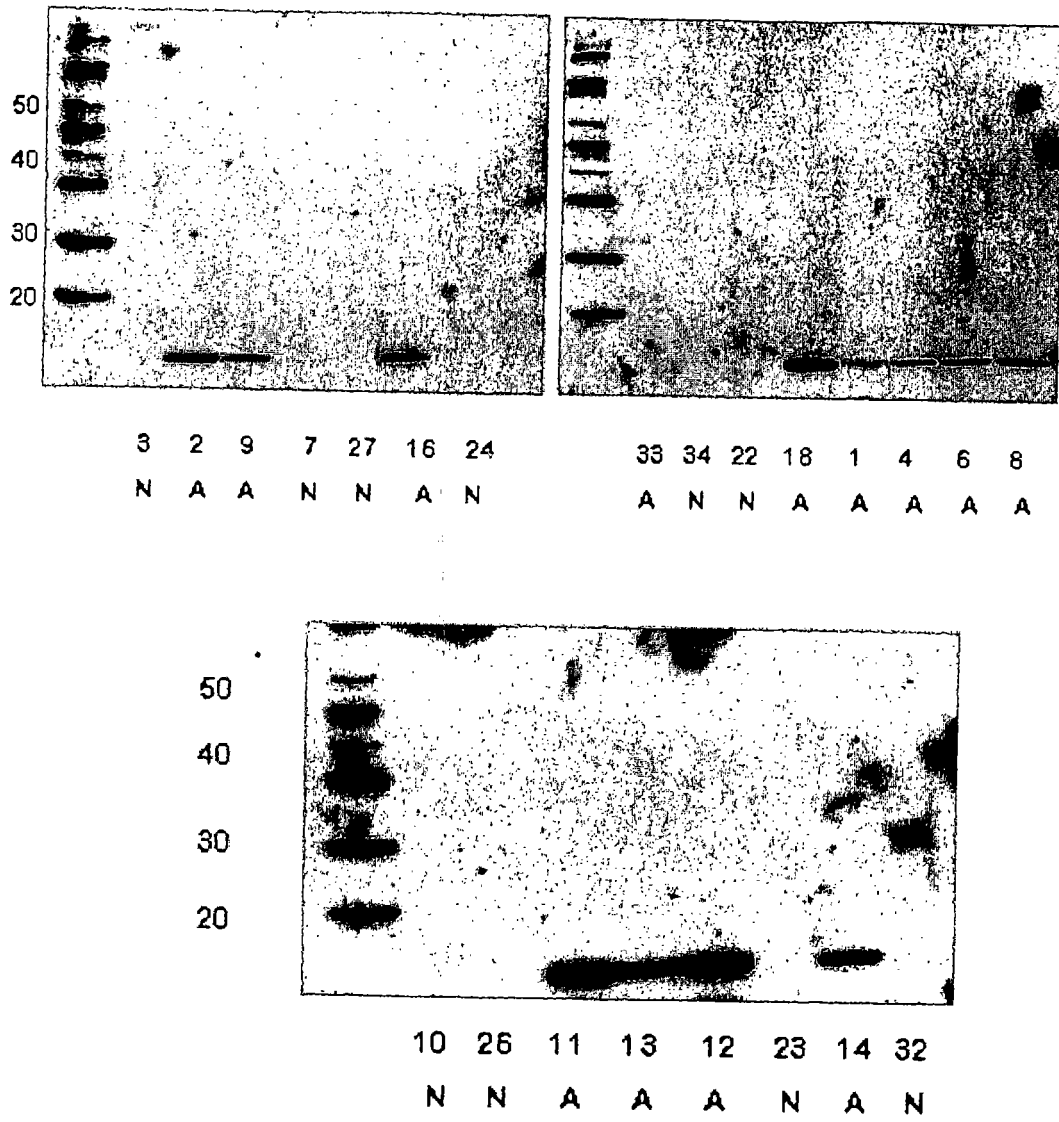


图 3

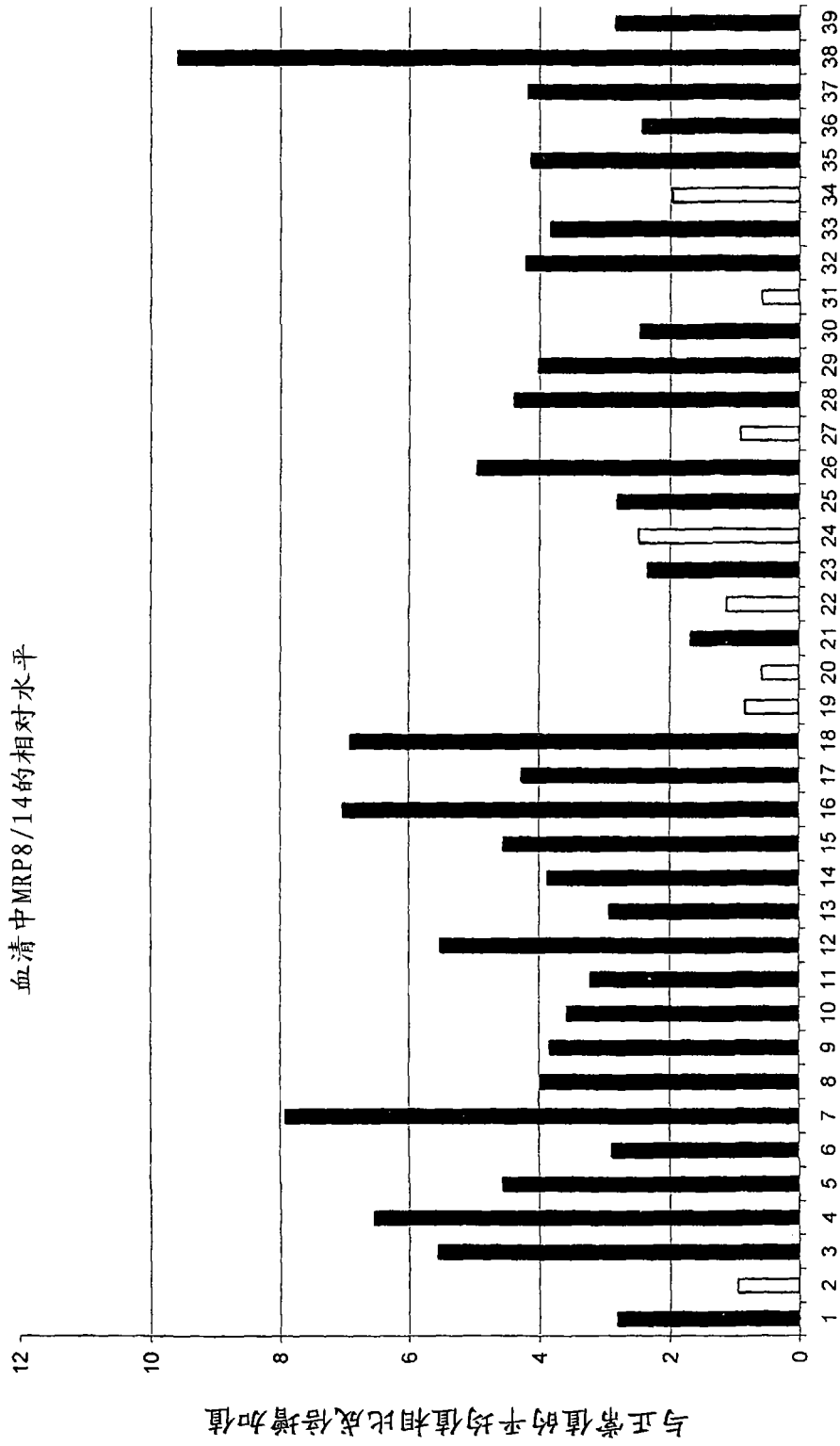


图 4

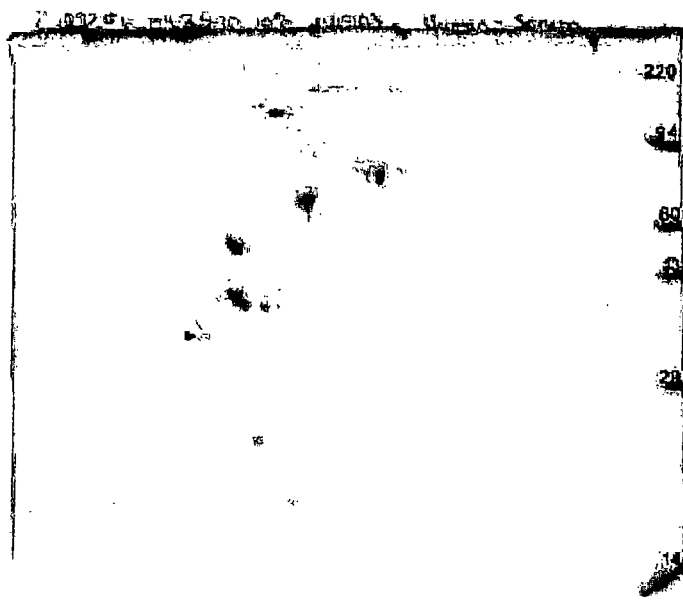


图 5A

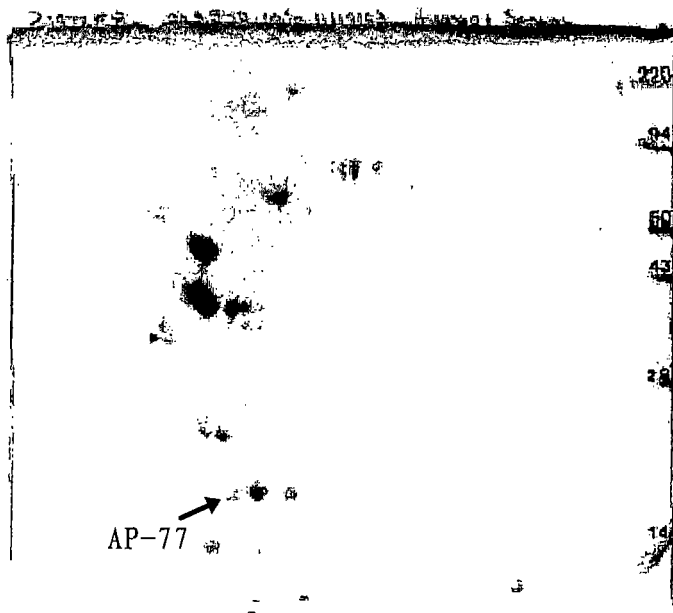


图 5B

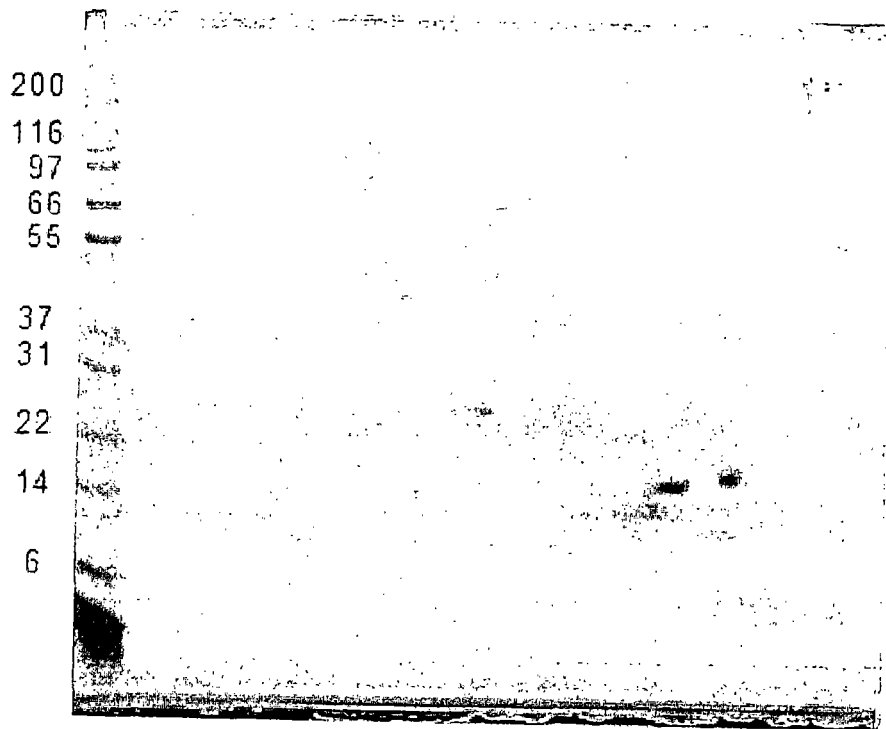


图 6A

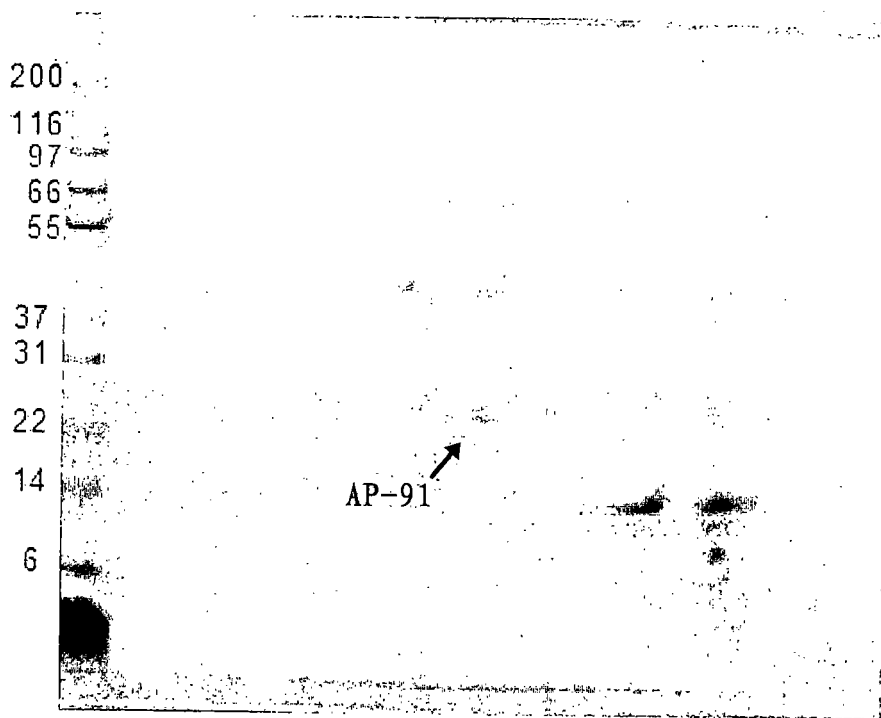


图 6B

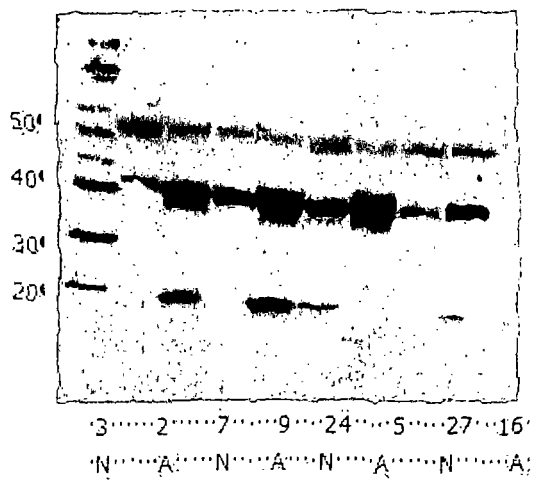


图 7A

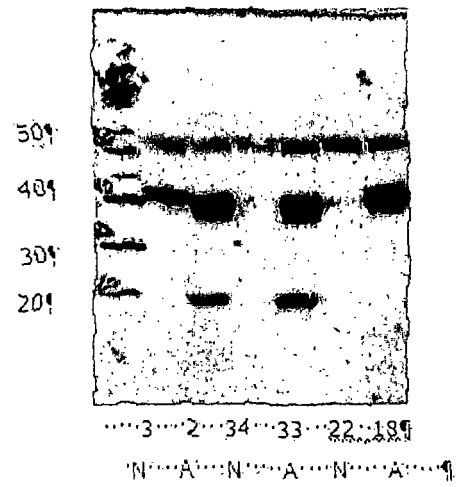


图 7B

专利名称(译)	用于诊断阑尾炎的方法和设备		
公开(公告)号	CN101124336A	公开(公告)日	2008-02-13
申请号	CN200580031278.4	申请日	2005-07-25
[标]申请(专利权)人(译)	阿斯彭生物制药有限公司		
申请(专利权)人(译)	阿斯彭生物制药有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	阿斯彭生物制药有限公司		
[标]发明人	MA科金 JF比尔勒 R唐纳利 D纽曼		
发明人	M·A·科金 J·F·比尔勒 R·唐纳利 D·纽曼		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/00 G01N33/53 G01N33/96		
CPC分类号	C12Q1/6883 G01N2800/06 G01N33/6893 G01N33/6872 C12Q2600/158 Y10S435/81		
代理人(译)	姜建成		
优先权	60/590631 2004-07-23 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了一种诊断患者体内的阑尾炎的方法，所述方法包括鉴定所述患者的至少一种阑尾炎的症状，以及鉴定所述患者的体液或组织样本中是否存在至少一种与阑尾炎差异相关的分子。MRP - 8/14和触珠蛋白是与阑尾炎差异相关的分子的实例。还提供了用于进行本发明的阑尾炎分析的设备 and 试剂盒。在一个实施方案中，所述设备为用于检测血液样本的流式免疫分析形式。此外，还提供了筛选与阑尾炎差异相关的分子的方法，所述方法包括使用取自因怀疑患阑尾炎而进行手术的患者样本。

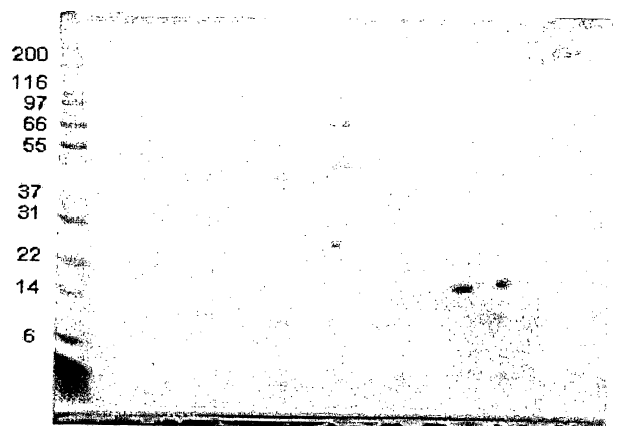


图 1A