

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200480025775.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 9 月 9 日

[11] 授权公告号 CN 100538360C

[22] 申请日 2004.7.7

[21] 申请号 200480025775.9

[30] 优先权

[32] 2003.7.8 [33] US [31] 60/485,653

[86] 国际申请 PCT/CN2004/000767 2004.7.7

[87] 国际公布 WO2005/003768 英 2005.1.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.3.8

[73] 专利权人 香港大学

地址 中国香港薄扶林道

[72] 发明人 王云川 许克新 王向红

[56] 参考文献

US6482599B1 2001.11.19

US5858685 1999.1.12

WO01/71360A2 2001.9.27

CN1367385A 2002.9.4

审查员 边 昕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 郭文洁 王景朝

权利要求书 2 页 说明书 13 页 附图 15 页

[54] 发明名称

良性前列腺增生(BPH)的人蛋白标记

[57] 摘要

本发明提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生(BPH)的方法,该方法包括从受试者获取前列腺液样品、以及分析该前列腺液样品以检测BPH蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有BPH。本发明进一步提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生(BPH)的方法,该方法包括从受试者获取血清样品、以及分析该血清样品以检测BPH蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有BPH。最后,本发明提供一种含有BPH蛋白标记与使用说明书的用于检测良性前列腺增生(BPH)标记的诊断试剂盒。

1. 良性前列腺增生蛋白标记在制备确定受试者是否患有良性前列腺增生的试剂中的用途，其中良性前列腺增生蛋白标记为 α s1-酪蛋白。

2. 针对良性前列腺增生蛋白标记的抗体在制备确定受试者是否患有良性前列腺增生的试剂中的用途，其中良性前列腺增生蛋白标记为 α s1-酪蛋白。

3. 根据权利要求2中的用途，其中，所述的抗体是单克隆抗体。

4. 根据权利要求2中的用途，其中，所述的抗体吸附在基质上。

5. 一种用于检测良性前列腺增生的诊断试剂盒，其包含良性前列腺增生蛋白标记与使用说明书，其中所述的良性前列腺增生标记为 α s1-酪蛋白。

6. 如权利要求5所述的试剂盒，其中，所述的使用说明书中给出了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生的方法，该方法包括：
(a) 从受试者获取前列腺液样品，以及 (b) 分析该样品以检测良性前列腺增生蛋白标记存在与否，从而确定受试者是否患有良性前列腺增生。

7. 如权利要求5所述的试剂盒，其中，所述的使用说明书中给出了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生的方法，该方法包括：
(a) 从受试者获取血清样品，以及 (b) 分析该血清样品以检测良性前列腺增生蛋白标记存在与否，从而确定受试者是否患有良性前列腺增生。

8. 根据权利要求5-7中任一项的诊断试剂盒，其中受试者为人类男性，所述样品通过挤压其前列腺获得。

9. 根据权利要求5-7中任一项所述的试剂盒，其中所述的前列腺液样品通过2-D凝胶电泳和质谱分析。

10. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法，其中良性前列腺增生蛋白标记使用针对良性前列腺增生蛋白标记的抗体进行检测。

11. 根据权利要求5-7中任一项所述的方法，其中良性前列腺增生蛋白标记使用免疫放射分析进行检测。

12. 一种用于检测良性前列腺增生标记的诊断试剂盒，其含有针

对 α 1-酪蛋白的抗体及使用说明书。

13. 根据权利要求 12 的诊断试剂盒，其中抗体是单克隆抗体。

14. 根据权利要求 12 的诊断试剂盒，其中抗体吸附在基质上。

良性前列腺增生 (BPH) 的人蛋白标记

本申请要求于 2003 年 7 月 8 日提交的美国临时申请 No.60/485,653 以及于 2003 年 8 月 27 日提交的美国临时申请 No. 60/498,623 的优先权, 它们的内容并入本申请作为参照。

在本申请中, 通过在括号中标注作者及日期的方式引用了多个出版物。所述出版物的完整引述列于说明书的最后、权利要求之前。这些出版物的完整内容并入本申请作为参照, 以期更完整地公开在此所描述和请求保护的申请的申请日前本领域的现有技术。

技术领域

本发明涉及用于检测良性前列腺增生 (BPH) 的新的蛋白标记以及检测 BPH 的方法。

发明背景

良性前列腺增生 (BPH) 是一种常见的、与日益增长的年龄相关的前列腺紊乱。很高比例的年龄超过 50 岁的男性 (68%) 具有良性前列腺增生的组织学证据, 截至 70 岁, 百分之四十三 (43%) 的男性具有临床上明显的前列腺增大。该疾病的特征是前列腺的尿道周围与过渡区域处的腺体及肌纤维组织逐渐增大, 从而导致膀胱出口梗阻的症状。仅仅在美国, 每年为 BPH 要进行 350, 000 至 400, 000 例手术, 这使得它成为美国最常见的治疗, 总花费达 45 亿美元。BPH 的发病率远高于前列腺癌, 但对其病因几乎没有什么了解。不过, 普遍认为高龄男性中睾酮与雌激素之间平衡的细微变化可能会引发前列腺的生长, 从而导致 BPH。良性 (或恶性) 疾病引起的前列腺肿大一般导致前列腺部尿道顺应性降低并增加膀胱出口梗阻。结果经常在膀胱中发生次级变化。这些变化包括膀胱壁肥大以及小梁与憩室的形成。逼肌的次级变化主要是与前列腺梗阻、遗尿、尿频尿急相关的最为棘手的症状相关。根本的机制仍然具有争论, 但可能同梗阻膀胱中逼肌发育不稳定有部分关联。

导致膀胱出口梗阻的 BPH 传统上通过经尿道前列腺切除术

(TURP)来治疗。尽管 TURP 被认为是 BPH 外科处理中的黄金标准,但存在高频率的并发症。例如,70%的切除案例受到不同程度的逆行性射精的困扰,1-2%导致尿失禁。作为选择,BPH 可以通过施用诸如 α -受体阻滞剂这类药物或者通过使用非那雄胺(Proscar)阻滞睾酮对前列腺的活性来进行治疗。后一种药物是通过抑制 5- α 还原酶的活性阻止睾酮转变为前列腺中的活性形式 DHT 来发挥作用的。利用这种手段,可以阻止前列腺受到男性激素的刺激,防止其进一步生长,这样来预防临床 BPH 的发展。然而,在长至可检测的大小或者发展至需要进行外科手术的症状之前,尚无可靠的标记来检测 BPH。而到了可检测的时候,在绝大多数情况下,膀胱逼肌已经被损害,其中相当数量即便在 TURP 后也无法获得改善。现有的那些众所周知的标记——前列腺酸性磷酸酶(PAP)及前列腺特异抗原(PSA),尽管可用于检测前列腺癌,但在 BPH 早期检测方面并不是非常有用。PSA 是当前最好的最有用处的用于检测前列腺癌的标记。不过,由于 BPH 与前列腺癌在 PSA 水平上有很大重叠,在那些两可病例中尤为如此(PSA 水平范围为 4-10 ng/ml),因此无法精确区分 BPH 与前列腺癌。已经尝试通过测量游离 PSA(PSA 没有与蛋白酶抑制剂结合)与总 PSA(游离 PSA 加上与 α -1-抗糜蛋白酶[ACT]结合的 PSA)的比例,或者联合 PSA 与 hK2,来改善两可区域诊断的精确度。不过,相当数量的受试者仍然被错误分类。

近来全世界几个实验室进行了一些尝试,其焦点是用于 BPH 的特异性标记。Mikolajczyk 与其同事已报道来自 BPH 病人前列腺组织过渡区域的一种游离 PSA 修饰形式有所升高,他们称之为 BPSA(BPH 相关 PSA)。

他们进一步报道了在精浆中存在 BPSA。BPSA 用作 BPH 标记的潜力正在积极探索中。目前对前列腺癌发生的研究证实通过皮下注射睾酮(T)及苯甲雌二醇(E2)可轻易诱发前列腺癌。这与分泌蛋白谱的并发变化、许多多肽生长因子的改变表达、间质平滑肌紊乱以及包括在动物模型的前列腺癌及人前列腺癌的发育及发展过程中 Id-1 基因过量表达在内的差异基因表达相关联。通过将 Id-1 基因转染已知的人前列腺癌细胞系 LNCaP 中对该基因的功能进行了广泛研究,发现它通过灭活 p16^{INK4a}/RB 可在无血清培养基中刺激癌细胞增殖,其中包括激

活 MAPK 及 NF-KB 途径.通过使用激素诱发的前列腺癌 Noble 大鼠模型,发现施用激素胶囊后 2-3 个月在前列腺中首先检测到发育异常.发育异常/癌的发展与一种新的分泌蛋白,与人激肽释放酶 2 (hK2) 同源并且是前列腺特异抗原 (PSA) 基因家族成员的一种的激肽释放酶样蛋白的出现同时发生.尽管 PSA (hK3) 在前列腺癌诊断方面有用,但它并不是肿瘤特异性的.为了找到更好且更特异的用于前列腺癌的肿瘤标记进行了全球范围的广泛检索,其中 hK2 是候选之一,因为它的水平与前列腺癌更直接线性相关,表现出了更多的肿瘤特异性.目前的研究表明在人 BPH 中,分泌蛋白谱有相类似的改变,其中可能会分泌能够在前列腺分泌物和/或血清中可检测的特异蛋白.

发明概述

本发明提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生 (BPH) 的方法,该方法包括从受试者获取前列腺液样品、以及分析该前列腺液样品以检测 BPH 蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有 BPH.

本发明进一步提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生 (BPH) 的方法,该方法包括从受试者获取血清样品、以及分析该血清样品以检测 BPH 蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有 BPH.

最后,本发明提供一种含有 BPH 蛋白标记与使用说明书的用于检测良性前列腺增生 (BPH) 标记的诊断试剂盒,以及含有针对 PSP61、IwPSA 及 α 1-酪蛋白的抗体与使用说明书的用于检测良性前列腺增生 (BPH) 标记的诊断试剂盒.

附图的简要描述

图 1 是 BPH 及非 BPH 对照的人前列腺液 (EPS) 中分泌蛋白的双向电泳分析.根据等电点 (pI, pH 3-10) 及分子量分离 200 μ g 蛋白,凝胶用银染来处理.所示的是来自年轻组 (A)、同龄对照组 (B) 及 BPH 患者 (C) 的具有代表性的凝胶.箭头指示仅在 BPH 样品中存在的 (斑点 1-3)、在 BPH 中高表达的 (斑点 4) 以及在 BPH 及正常对照中均表达的 (斑点或者斑痕 5-8) 蛋白斑.

图 2 所示的是经 ESI-MS/MS 后斑点 1 (PSP94 的同种异型, [iPSP94], 即 PSP61) 的谱图。图表顶部所示的是 MS/MS 离子, 图表底部包含 MasEnt43 谱图。

图 3 是经 ESI-MS/MS 后斑点 1 (iPSP94, [即 PSP61]) 的片段序列, 通过数据库检索后确认为 PSP94, 但其仅有 61 氨基酸, 因此为 PSP61。

图 4 所示的是经 ESI-MS/MS 后斑点 2 (血清白蛋白) 的谱图。图表顶部所示的是 MS/MS 离子, 图表底部包含 MasEnt43 谱图。

图 5 是经 ESI-MS/MS 后斑点 2 (血清白蛋白) 的片段序列, 图表顶部所示的是 MS/MS 离子, 图表底部包含 MasEnt43 谱图。

图 6 是斑点 3 的片段序列, 经 ESI-MS/MS 后低分子量 PSA (lwPSA)。

图 7 是斑点 3 中 α 1-酪蛋白的谱图。图表顶部所示的是 MS/MS 离子, 图表底部包含 MasEnt43 谱图。

图 8 为斑点 3 中 α 1-酪蛋白的片段序列。

图 9 是经 MALDI-MS 后斑点 5 中多肽的谱图。谱图是在反射模式、质量范围为 600-3400 Da 的条件下获得的。所提取多肽的谱图经数据库检索后鉴定为锌- α -2-糖蛋白。

图 10 是经 MALDI-MS 后斑点 6 中多肽的谱图。谱图是在反射模式、质量范围为 600-3400 Da 的条件下获得的。所提取多肽的谱图经数据库检索后鉴定为微精浆蛋白 (microseminoprotein) (PSP94)。

图 11 是经 MALDI-MS 后斑点 8 中多肽的谱图。谱图是在反射模式、质量范围为 600-3400 Da 的条件下获得的。所提取多肽的谱图经数据库检索后鉴定为前列腺酸性磷酸酶 (PAP)。

图 12 是经 MALDI-MS 后斑点 4 (乳铁传递蛋白) 的谱图。图表顶部所示的是 MS/MS 离子, 图表底部包含 MasEnt43 谱图。

图 13 经 ESI-MS/MS 后斑点 4 (乳铁传递蛋白) 的片段序列, 通过数据库检索后确认为乳铁传递蛋白。

图 14 所示的是在人正常前列腺、BPH 及前列腺癌样品中 α 1-酪蛋白的免疫染色 (A $\times$ 100; B $\times$ 200; C、D、E、F, $\times$ 400)。

(A) 在正常前列腺中没有观察到 α 1-酪蛋白染色。

(B) 在 BPH 样品中没有观察到 β -酪蛋白染色。

(C),(D) 这两张显微照片表明 BPH 中 α s1-酪蛋白染色, +++(C 和 D)表示强度。可观察到上皮细胞细胞质和前列腺分泌物中均观察到 α s1-酪蛋白。

(E) 这张显微照片表明充分分化的前列腺癌 (Gleason grade 2-3) 的典型免疫活性, 强度为 +。

(F) 欠分化的前列腺癌 (Gleason grade 4-5) 表现出 α s1-酪蛋白染色阴性。

图 15 是在人正常前列腺、BPH 及前列腺癌中 α s1-酪蛋白的免疫反应性。所有正常前列腺与 70% 的前列腺癌样品的 α s1-酪蛋白反应为阴性。仅 30% 的前列腺癌样品分别表现出轻度至中等的 α s1-酪蛋白免疫反应性。相反, 91% 的 BPH 样品表现出中等至强烈的 α s1-酪蛋白免疫反应性, 其中 36% 为 ++ 并且 55% 为 +++ 水平。

发明的详细描述

定义

在本申请的用法中, 其中如果没有另外特别说明, 下述每个术语均为下文所阐述的意思。

在本文用法中, “受试者”可以是诸如灵长类、小鼠、大鼠、豚鼠或者兔子等任何动物。在优选实施例中, 受试者是人。

在本文用法中, “蛋白标记”指所发现的蛋白其水平与模式癌症相关。“BPH 蛋白标记”是其水平与 BPH 诊断相关的蛋白。

发明的实施例

本发明提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生 (BPH) 的方法, 该方法包括从受试者获取前列腺液样品、以及分析该前列腺液样品以检测 BPH 蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有 BPH。在优选实施例中, 受试者为人类男性。通过直肠途径手指挤压病人的前列腺可获得分泌的前列腺液样品。在一个实施例中, 使用双向电泳法与质谱分析来检测标记蛋白。针对这些标记蛋白的特异的抗血清增加了。可以使用针对蛋白标记的抗体来检测蛋白标记。在优选实施例中, 蛋白标记包括 PSP61、lwPSA 或者 α s1-酪蛋白。

本发明进一步提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生

(BPH)的方法,该方法包括从受试者获取血清样品、以及分析该血清样品以检测 BPH 蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有 BPH。在优选实施例中,受试者为人类男性,蛋白标记包括 PSP61、IwPSA 或者 α 1-酪蛋白。在另一个实施例中,可以应用使用抗体的免疫放射分析来检测蛋白标记。这些抗体可以是针对 PSP61、IwPSA 或者 α 1-酪蛋白的单克隆抗体。

本发明进一步提供一种用于检测良性前列腺增生(BPH)标记的诊断试剂盒。在一个实施例中,该诊断试剂盒含有 BPH 蛋白标记与使用说明书。在另一个实施例中,用于检测良性前列腺增生(BPH)的诊断试剂盒包括针对 PSP61、IwPSA 或者 α 1-酪蛋白的抗体以及使用说明书。在一个实施例中,抗体是单克隆抗体。在另一个实施例中,抗体吸附在某种基质上。

下述的实验细节用以说明如何实施本发明,其不应被视为以任何形式限制了本发明。

实验细节

已经进行了广泛研究用以分析通过直肠指检(DRE)直接挤压前列腺所获得的前列腺分泌物。已知通过以上过程收集的分泌物为前列腺液(EPSs)。正常人前列腺(年轻组及同龄对照组)与 BPH 的 EPS 样品分别与蛋白酶抑制剂混合,冷冻条件下储存备用。通过双向电泳对正常前列腺及 BPH 的 EPS 进行的比较分析表明,在 BPH 分泌物中有多种蛋白被差异表达。特别地,仅仅在 BPH 样品中发现了称为斑点 1、2 和 3 的三个主要斑点,而在正常/同龄样品中则完全缺失或者以极低以至无法检测的水平表达(图 1)。尽管还有其它的差异表达的斑点(即,斑点 4 等),但目前关注的焦点仍然是这三个主要斑点(斑点 1-3)。利用质谱检测以及 mass sequencing(在悉尼 Macquarie 大学澳大利亚蛋白质组分析研究组[APAF]的协助下)对这些差异表达的斑点进行分析,表明斑点 1 为 PSP94 的“同种异型物”(iPSP94; MW 14kDa, pI 4.5)或者是 β -微精浆蛋白——即已知的类抑制素多肽(3-抑制素)。我们进一步鉴定了该蛋白,发现该蛋白实际上含有 61 个氨基酸(而非 PSP94 的 94 个氨基酸)(参见图 2 和 3),因此应该更确切的称之为 PSP61。斑点 2 (MW 为 9kDa, pI 5-5.5)被证实为血清白蛋白(图 4、

5), 而斑点 3 (MW 10kDa, pI 8.5-9.3) 含有两种蛋白: 一种是低分子量的 PSA (lwPSA) (图 6), 另一种为 α 1-酪蛋白 (图 7、8)。

为了检验实验的有效性和可靠性, 对在正常、同龄对照及 BPH 样品中均存在的几个主要蛋白斑点进行了分析。例如, 斑点 5 为锌- α -2-糖蛋白 (图 9), 斑点 6 至 8 分别为 PSP94 (图 10)、PSA[数据未列出, 由 Western blotting 证实]及前列腺酸性磷酸酶[PAP] (图 11)。进一步注明斑点 4 实际上是乳铁传递蛋白 (图 12、13)。已经证实这些蛋白可以同特异的抗血清作用, 而且它们曾被报道为前列腺的分泌成分。

在本研究中, 使用了年轻成年男性 (40 岁以下) 的 EPS 样品与同龄未患有 BPH 的 EPS。来自已确认患有前列腺癌的病人的 EPSs 没有包括在内, 原因是因为绝大多数患有前列腺癌的病人其 BPH 程度总是变化的。因此, 如果包括来自前列腺癌病人的 EPSs 只会多余地在初期搞乱 BPH 信号。三个前列腺癌细胞系, LNCaP (PSA+)、PC3 (PSA-) 及 DU145 (PSA-) 的上清, 经双向电泳分析后发现, LNCaP (连同其它两个细胞系) 对于 lwPSA 是阴性的, 在所有三个细胞系中没有或者仅仅是痕量 PSP94 被检出。在人体中, 已报道 PSP94 在前列腺癌中被下调。这有助于支持我们的假设——lwPSA 与 PSP94 及 PSP61 在前列腺癌细胞中不在任何重要途径中表达。

I BPH 分泌物中特异性标记蛋白的鉴定及特征

A. 收集前列腺分泌物

从 10 名年龄为 40 岁或以下 (正常) 的男性、50 岁同龄对照及 50 名年龄在 60-70 岁之间并确诊患有 BPH 的男性中收集前列腺液 (EPSs)。在着手进行任何治疗方案之前, 从正常组、同龄对照组 (未患有 BPH) 与 BPH 病人 (已确诊) 中获得 EPS 样品 (每份约 1ml), 分别与蛋白酶抑制剂混合, 冷冻条件下 (-80℃) 储存备用。它们分别称作非 BPH (正常的与同龄对照) 及 BPH-EPS (BPH)。

B. 双向凝胶电泳

采用根据 Wilkins 等编辑的书所述的方案 (31) 总结在下面几个段落中, 使用 IPGphor Isoelectric Focusing System 与垂直 SDS-PAGE, 对来自正常组、同龄对照组及 BPH 病人的 EPS 进行双向凝胶电泳。

1. 第一向——等电聚焦 (IEF)

使用固定 pH 梯度 (IPG) 胶条 (Amersham Pharmacia Biotech) 进行等电聚焦。将 5 μ l EPS 溶解或稀释在 250 μ l 再水化液 (8M 尿素, 2% CHAPS, 0.5% IPG 缓冲液) 中, 含有样品的水化液加入到 IPG 胶条中, 使其再水化 14h。EPS 样品在从 100V (2h)、500V (1h) 1000V (1h) 至 8000V (4h) 逐渐增高的电压下进行电泳。在第一向 IEF 中, 蛋白根据其 pH 值进行分离。

2. 第二向——SDS-PAGE

在平衡缓冲液 (50mM Tris-Cl, 6M 尿素, 30% 甘油, 2% SDS, DTT 10mg/ml 或者碘乙酰胺 25mg/ml, 以及示踪染料) 中平衡 IPG 胶条 30 分钟。随后, 将 IPG 胶条置于垂直 SDS-PAGE 体系 (Hoefer SE 600) 中, 根据分子量通过电泳来分离蛋白。所获得的凝胶利用银染试剂盒 (Amersham) 进行银染。在 ImageMaster 2D Elite 凝胶分析软件 (Amersham) 的协助下对来自年轻组和同龄对照组及 BPH 组的 EPS 的双向凝胶进行比较, 以显示差异表达蛋白概况。

C. 质谱分析

Young CYF, Seay T, Higen K, Charlesworth MC, Roche PC, Klee GG, Tindall D, Prostate [Suppl] 7: 17-24 (1996) 中所述的实验步骤如下。

1. 衬质辅助激光解吸电离质谱 (MALDI-MS) 方法

为了进行质谱分析, 电泳图可用银或考马斯亮蓝来染色。确定双向凝胶上差异表达的蛋白斑点, 切下用于质谱分析。在质谱分析中, 我们请求澳大利亚蛋白质组分析研究组 (APAF) 给予协助。使用的是 MALDI-MS 方法。所分离的蛋白斑点首先于 37°C 进行胶内胰蛋白酶酶切。所获得的多肽使用 10% 乙腈、1% TFA 溶液从胶中提取, 用 ZipTip 进行纯化。多肽从基质上洗脱, 置于 MALDI 靶上并风干。然后使用一台 Micromass ToF Spec 2E 飞行时间质谱学进行 MALDI-MS。使用氮激光器 (337 nm) 照射样品, 通过反射模式在 600-3400 Da 的质量范围获得谱图。利用近点校正, 可以给出典型的 ~100 ppm 或者更低的质量精度。然后可获得来自样品多肽的单一同位素峰列表 (图 10-12)。用 Peptident 对 SWISS-PROT 和 TREMBL 中智人 (Homo sapiens) 的肽质指纹图谱进行检索。这可以基于肽指纹给出最相似的候选蛋白。

2. 电喷雾离子化质谱/Mass Sequencing (ESI-MS/MS)

差异表达的蛋白斑点的性质进一步通过 ESI-MS/MS 来确认。经 16h 胰蛋白酶消化后, 所获得的多肽使用 ZipTip 纯化以浓缩并除去盐分。利用配备纳米喷雾源 (nanospray source) 的 Micromass Q-TOF MS 通过 ESI-TOF MS/MS 分析样品, 使用硼硅酸毛细管手动获得数据。获取 m/z 范围超过 400-1800 的数据, 以选取用于 MS/MS 分析的多肽。选定多肽后, 将机器调节到质谱/Mass Sequence 模式, 在多种碰撞能量设置下收集 m/z 范围 50-2000 的数据。生成多肽片段及片段离子 (Y 系列离子用于所关注多肽的测序) 的谱图。通过这些收集的数据, 可以确定所关注多肽的氨基酸序列。基于所选取多肽的氨基酸序列数据, 可以确定最可能的蛋白。

II 特异标记蛋白的细胞来源

通过双向电泳和质谱对这些差异表达蛋白的性质进行了鉴定, 使用免疫组织化学和原位杂交方法对三个特异蛋白的细胞来源进行检测, 并评估这些蛋白标记在 BPH 中的特异性。

A. 抗血清的生成

为了确定这些蛋白的细胞来源, 生成了针对这些蛋白的抗血清。为了实现这个步骤, 采用了 Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA 的服务, 在基于标记蛋白通过大量测序所确定的已知氨基酸序列的基础上生成特异性针对这些蛋白的抗体。

B. 免疫组织化学 (IHC)

抗血清的特异性首先针对相应差异表达的蛋白斑点进行确认。然后将这些抗血清用于正常人前列腺、同龄对照组、BPH 组及前列腺癌样品的 IHC。结果表明 BPH 的前列腺上皮细胞对这些标记蛋白表现出阳性反应, 而基质组织则是阴性的 (图 14、15)。这表明特异性的标记蛋白是由 BPH 上皮细胞分泌的。

III. 蛋白标记的检测

最后阶段就是检测 PSP61、IwPSA 及 α s1-酪蛋白是否存在于 BPH 病人的血清中, 以开发出一种通过检测血清中是否存在这些蛋白来诊断 BPH 的方法, 并特别在临界情形下评估新发现的标记与 PSA 水平的

相关性。

A. 简介

由于血检是最便利的临床检测方法之一，因此本计划的最后一步就是检测这三个蛋白能否在 BPH 病人的血液中检出，以及它们是否是 BPH 病人所特有的。同时也将检验 PSA 水平，并研究 PSA 水平与这三个蛋白水平之间的关联。我们预测结果对 PSA 与 PSP94 将会是阳性的，因为已知它们是存在于血清中。预计这些分子的变体（即 PSP61、lwPSA 及 α 1-酪蛋白）也将会进入血液，因此能够在血清中检出。一旦获得确认，这将被证明在临床症状尚未出现前的早期 BPH 诊断中是非常有用的。然后可以考虑生产检验试剂盒。

B. 收集用于化验的血液

从新近被诊断患有 BPH 的 100 个病人中按标准方式收集静脉血（20 ml）。为了进行比较，还收集了 20 个正常男子（年龄 40 岁以下）与 50 个同龄对照的血液。此外，为了进行比较，从 50 个 PSA 水平范围在 4-10 nm/ml 的病人中收集血液样品。样品在室温下放置 1 小时，然后在 3500 rpm 离心 10 分钟，使血清与其它血液组分分离。之后将样品保存在 20℃ 备用。

C. 确定 PSP61、lwPSA 及 α 1-酪蛋白血清浓度

通过免疫反射分析（Tandem-R PSA, Hybritech, Inc.）或者 Labrie 等描述的方法（34）对样品进行分析，用于不含 PSA 的常规血清及总 PSA 的检验。对这些方法通过使用所生成的特异的单克隆抗体（即 lwPSA、PSP61 及 α 1-酪蛋白）来代替原始抗体进行了调整，用来检验血清 lwPSA、PSP61 及 α 1-酪蛋白。所获得的数据同常规 PSA 或 PSP94 的数据进行比较。一旦确立了检验方法，便可进行大规模的血清检查以确定这些蛋白作为 BPH 标记的特异性。

D. 特异性 BPH 标记的水平与特别涉及 PSA 水平临界高度（即，4-10 ng/ml）的血清 PSA 水平的关系

评估所有确诊为 BPH 的病人（100）的 PSA 水平，并比较这些 PSA 水平与本研究确定的 BPH 标记。对 PSA 水平为临界高度的病人体内的 BPH 特异标记，也通过确定其特异 BPH 标记（即 PSP61、lwPSA 及 α 1-酪蛋白）的血清水平来进行了评估。通过比较 BPH 病人中 PSA 水平与特异 BPH 标记以及血清 PSA 为临界高度的患者中的这些标记，

可以确定后者是否患有前列腺癌。PSA（临界高度）与特异标记同时升高的病人可能仅患有 BPH。在另一方面，特异 BPH 标记降低或者为无法检测水平的病人更可能患有前列腺癌。

下列参考文献在本说明书中引用。这些参考文献的全部内容作为背景和现有技术引入本发明。

参考文献:

1. Berry SJ, Coffey DS, Walsh PC, Ewing LL, J. Urol. 132:474-479 (1984).
2. Carter HB and Coffey DS, The Prostate 16:39-48 (1990).
3. McNeal JE, Invest. Urol. 15:340-345 (1978).
4. McNeal, JE, "The prostate gland: Morphology and pathobiology," Monogr. in Urol. vol 4, No 1 (1983).
5. Djavan B, Nadersbacher S, Klingler HC, Ghawidel K, et al., Tech. Urol. 5:12-20 (1999).
6. Holtgrewe HL., "Transurethral prostatectomy," Urol. Clin. North Am. 22:357-368 (1995).
7. Arai Y, Aoki Y, Okubo K, Maeda H, Terada N, et al., J. Urol. 164:1206-11 (2000).
8. Dixon CM and Lepor H, Benign Prostatic Hyperplasia. Z. Petrovich and L. Baert (eds.). Springer-Verlag, 193-204 (1993).
9. Gromley GJ, Stoner E, Bruskewitz RC et al., N. Eng. J. Med. 327:1185-1191 (1992).
10. Vermeulen A, Giagulli VA, Scheppe P, Buntinx A, Stoner E, The Prostate 14:45-53 (1989).
11. Geller J, J. Clin. Endocr. Met. 71:1552-1555 (1990).

12. Kirby R and Christmas T, Benign Prostatic Hyperplasia, Gower Med. Publ. (1993).
13. Dupont A, Cusan L, Gomez JL, Thibeault MM, Tremblay M, Labrie F., J. Urol., 146:1064-7 (1991).
14. Partin AW, Oesterling JE, J. Urol. 152:1358-1368 (1994).
15. Lee CS, Oesterling JE (1995). Sem. Surg. Oncol., 11:23-35.
16. Barichello M, Gion M, Bonazza A, et al., Eur. Urol., 27:295-300 (1995).
17. Mikolajczyk SD, Millar LS, Wang TJ, Rittenhouse HG, Wolfert RL, Marks LS, Song WT, Wheeler TM and Slawin KM, Urol., 55:41-45 (2000).
18. Wang TJ, Slawin KM, Rittenhouse HG, Millar LS and Mikolajczyk SD, Eur. J. Biochem., 267:4040-4045 (2000).
19. Mikolajczyk SD, Millar LS, Marker KM, Wang TJ, Rittenhouse HG, Marks LS, Slawin KM, Prostate, 45:271-276 (2000).
20. Wang YZ and Wong YC, "Sex Hormone-Induced Prostatic Carcinogenesis In The Noble Rat: The Role Of Insulin-Like Growth Factor-1 (IGF-1) and Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) in the Development Of Prostate Cancer," Prostate, 35:165-177 (1998).
21. Xie W, Wong YC, Tsao SW and Wong NS, "Expression Of A Kallikrein-Like Protein In Prostatic Intraepithelial Neoplasia In Ventral Prostate Of The Noble Rat," Prostate, 42:8-17 (2000).
22. Wong YC, Wang YZ and Tam NNC, "The Prostate Gland And Prostate Carcinogenesis," Italian J. Anat. Embryol., 103 (Suppl.1) n. 4:237-252 (1998).
23. Tam NNC, Chung SSM, Lee DTW and Wong, YC, "Aberrant Expression Of Hepatocyte Growth Factor And Its Receptor, c-Met, During Sex Hormone-Induced Prostatic Carcinogenesis In The Noble Rat," Carcinogenesis, 21:2183-2191 (2000).
24. Wong YC, Xie W and Tsao SW, "Structural Changes And Alteration In Expression Of TGF- β 1 And Its Receptors In Prostatic Intraepithelial Neoplasm (PIN) In The Ventral Prostate Of Noble Rats," Prostate, 45:289-298 (2000).
25. Wong YC, Tam NNC, "Dedifferentiation Of Stromal Smooth Muscle As A Factor In Prostate Carcinogenesis," Differentiation, 70:633-45 (2002).

26. Ouyang XS, Wang XH, Lee DTW, Tsao SW and Wong YC, "Up-regulation of TRMP-2, MMP-7 and Id-1 During Sex Hormone-Induced Prostate Carcinogenesis In The Noble Rat," Carcinogenesis, 22:965-973 (2001).
27. Ouyang,XS, Wang XH, Lee TW, Tsao SW and Wong YC, "Overexpression of Id-1 in Prostate Cancer," J. Urology, 167: 2598-2602 (2002).
28. Ouyang XS, Wang XH, Ling MT, Wong HL, Tsao SW, and Wong YC, "Id-1 Stimulates Serum Independent Prostate Cancer Cell Proliferation Through Inactivation of p16^{INK4a}/pRB Pathway," Carcinogenesis, 23:721-725 (2002).
29. Ling MT, Wang XH, Ouyang XS, Lee TKW, Fan TY, Xu KX, Tsao SW and Wong YC, "Activation of MAPK Signaling Pathway Is Essential for Id-1 Induced Serum Independent Prostate Cancer Cell Growth," Oncogene, 21:8498-8505 (2002).
30. Ling MT, Wang XH, Ouyang XS, Xu KX, Tsao SW and Wong YC, "Id-1 Expression Promotes Cell Survival Through Activation of NF- κ B Signaling Pathway In Prostate Cancer Cells," Oncogene (In Press) (2003).
31. Young CYF, Seay T, Higen K, Charlesworth MC, Roche PC, Klee GG, Tindall D, Prostate [Suppl] 7:17-24 (1996).
32. KX Xu, X Wang, MT Ling, DTW. Lee, TY Fan, F L Chan, J JW Xuan, SW Tsao, YC Wong, "Identification of a Specifically Expressed Modified Form Of Novel PSP-94 Protein in the Secretion of Benign Prostatic Hyperplasia," Electrophoresis, 24:1311-1316 (2003).
33. Chan PSF, Chan LW, Xuan JW, Chin JL, Choi HL and Chan FL, Prostate, 41:99-109 (1999).
34. Wilkins MR, Williams KL, Appel RD and Hochstrasser DF (eds.) Proteome Research: New Frontiers in Functional Genomics. Principles and Practice, Springer (1997).
35. Labrie F, Dupont A, Suburu R, Cusan L, Tremblay M, Gomez JL and Emond J., J. Urol., 147:846-852 (1992).

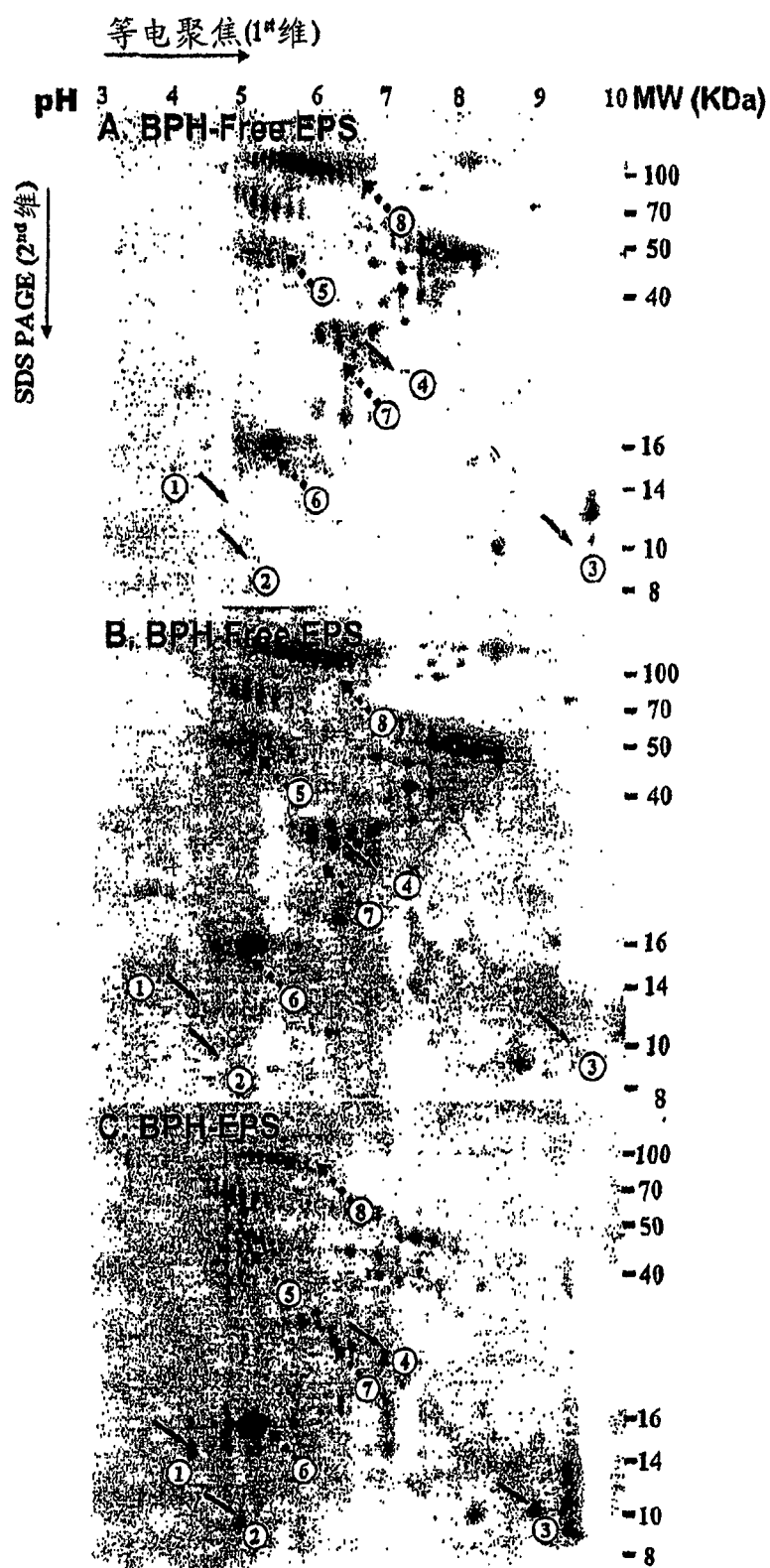


图 1

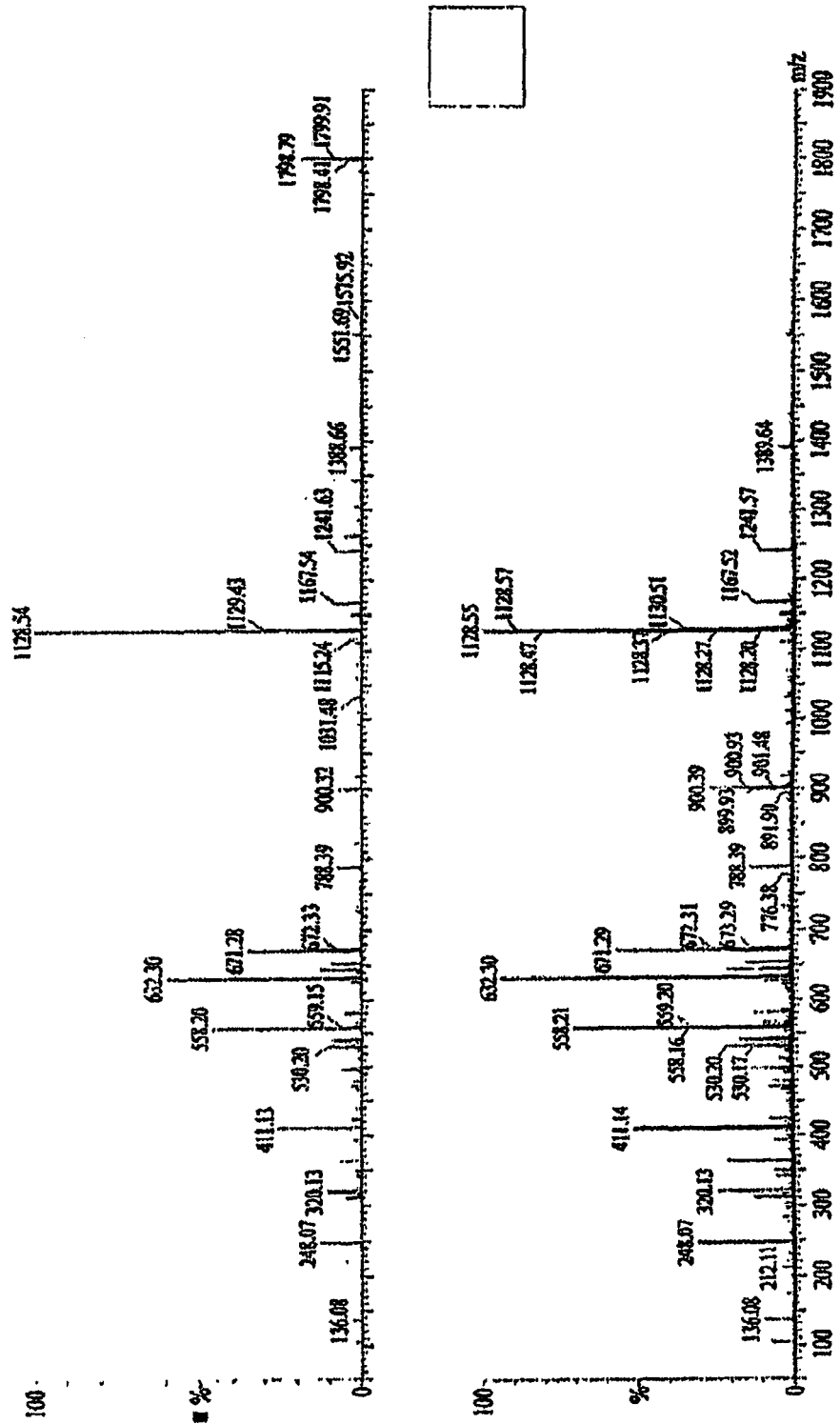


图 2

a	220.11	381.17	530.24	613.33	740.33	854.42	983.47	1043.49	1139.55	1236.61	1353.63	1440.66	1556.69	1596.74	1752.84	1880.89
	0.04	-0.06	0.04	0.04	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
b	240.11	411.17	550.24	671.32	768.37	881.42	1011.45	1068.40	1167.55	1254.60	1371.62	1436.65	1573.68	1624.73	1780.83	1908.88
	0.03	0.03	0.02	0.04	-0.02	---	---	0.04	0.02	---	---	---	---	-0.09	---	---
247.10	Try	Phe	Leu	Pro	Ileu	Gln	Gly	Val	Pro	Gly	Asp	Ser	Thr	Asp	Arg	---
y	1926.89	1679.80	1516.73	1369.66	1256.58	1159.53	1045.48	936.44	859.42	760.35	643.30	606.28	481.25	404.22	393.17	167.07
z	---	0.00	-0.05	-0.04	-0.04	-0.02	-0.07	-0.04	-0.01	-0.04	-0.05	-0.53	-0.04	-0.02	-0.04	-0.04
---	1589.86	1662.77	1459.70	1352.65	1239.55	1142.50	1028.45	899.41	842.35	743.82	646.27	589.25	474.22	387.19	286.14	130.04
---	---	---	---	---	-0.04	-0.09	---	---	---	-0.03	---	-0.06	-0.05	-0.08	0.01	---

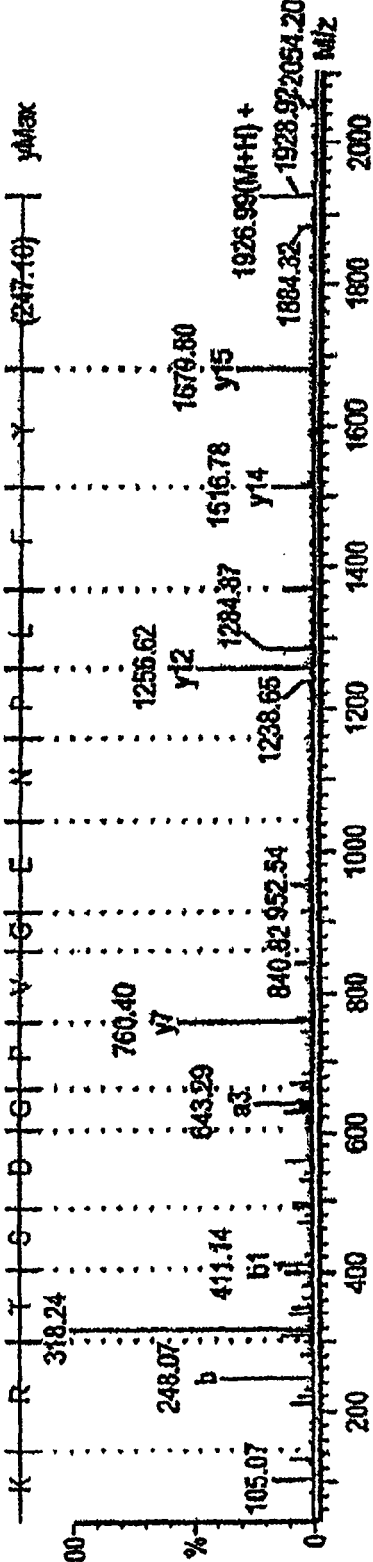


图 3

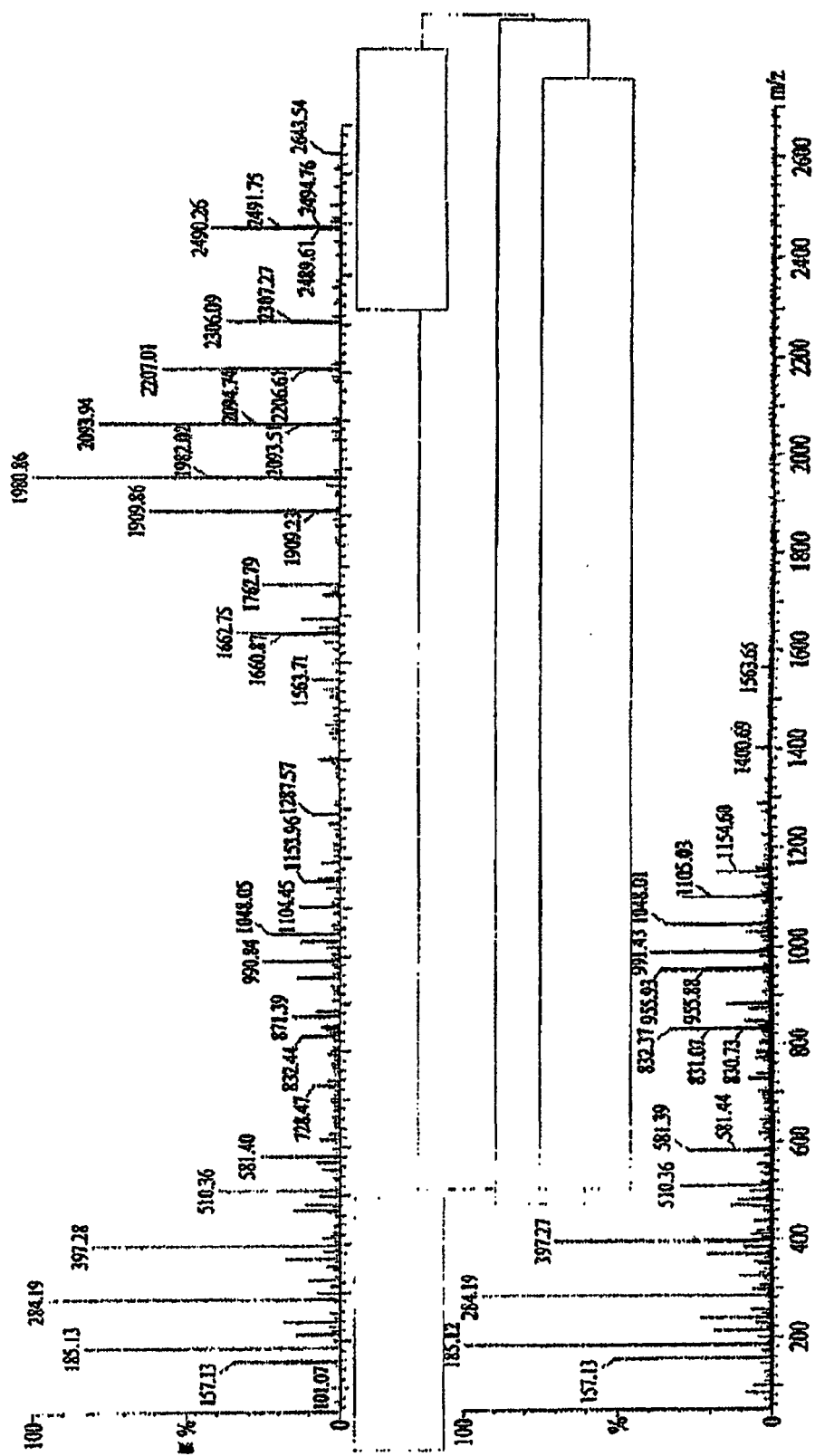


图 4

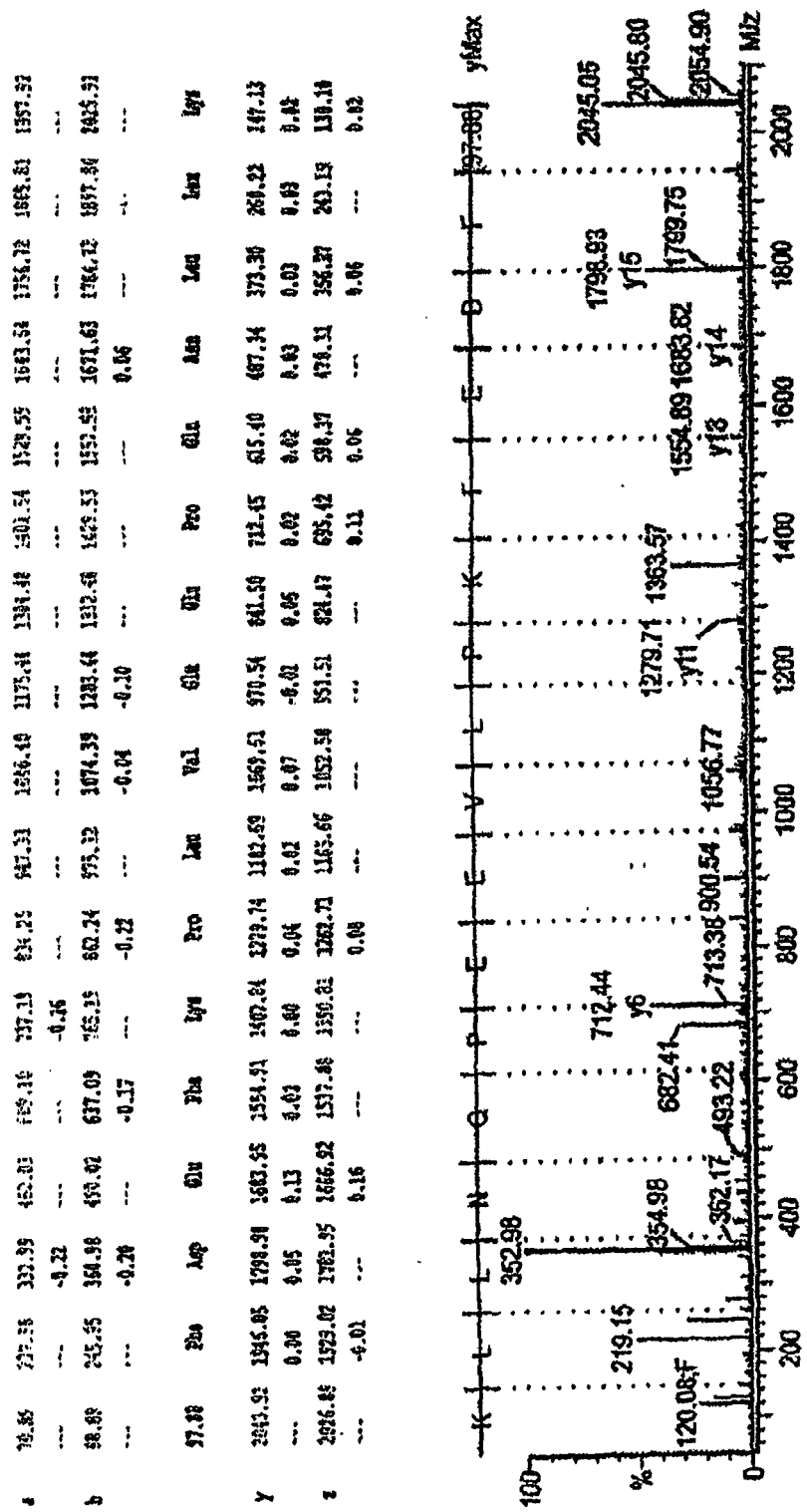


图 5

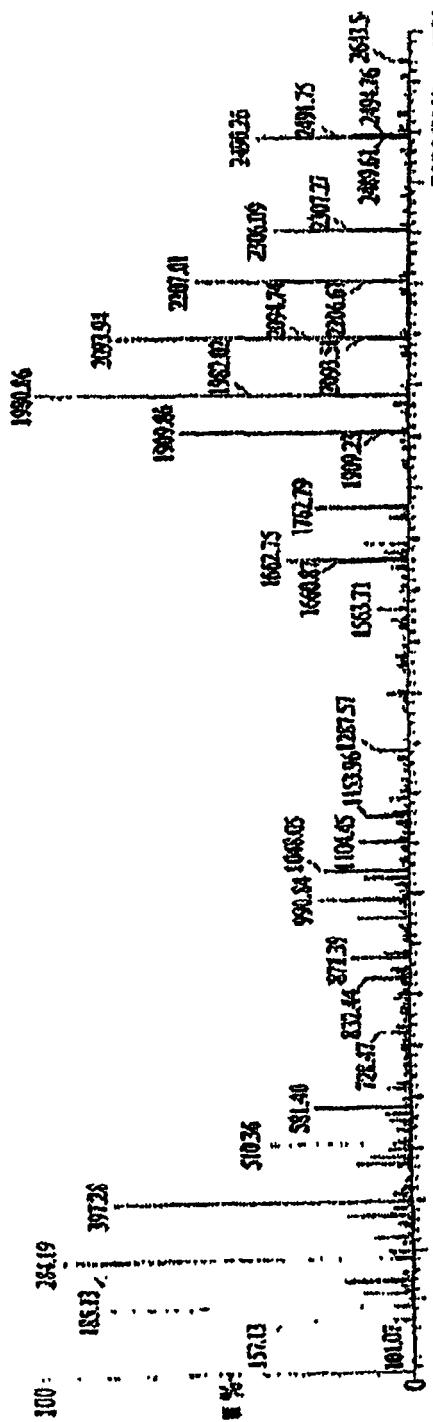


图 6 斑点3的片段序列,ESI-MS/MS后的分子量PSA (1wPSA)

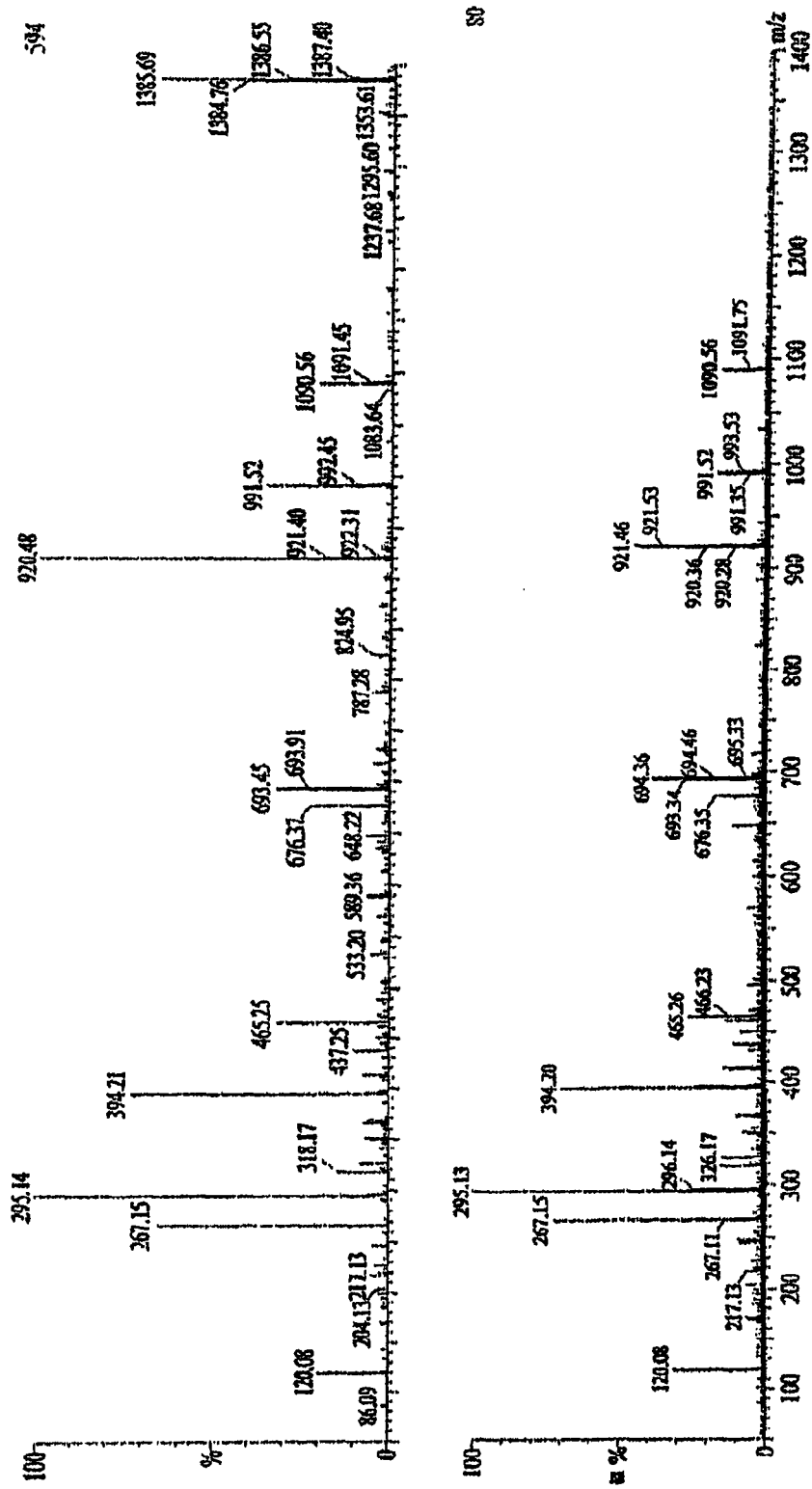


图 7

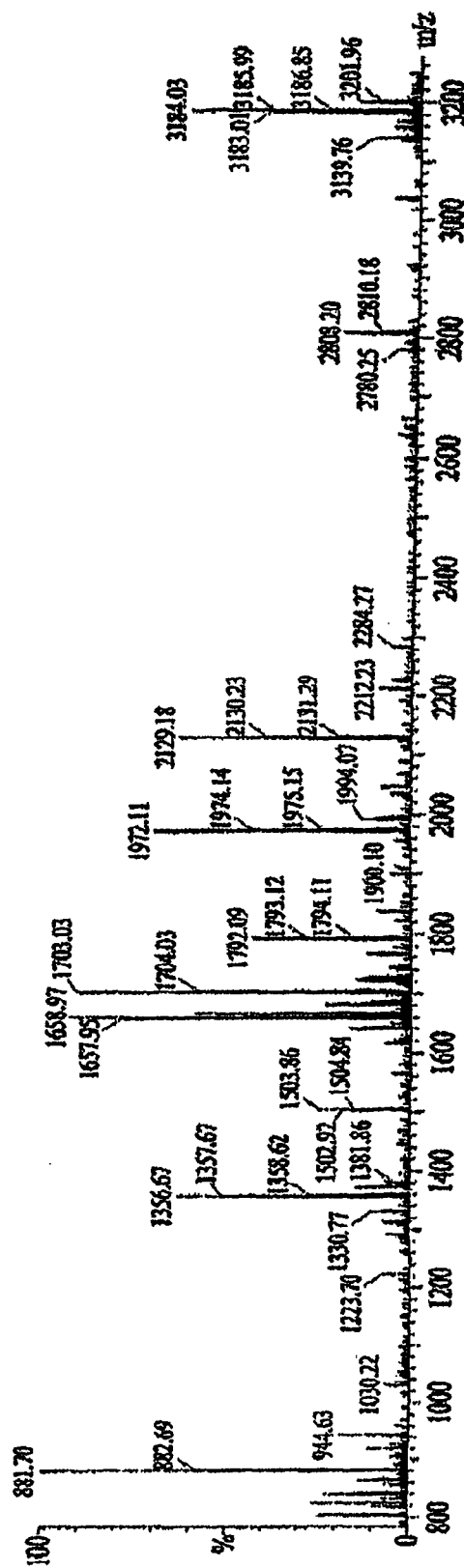


图 9

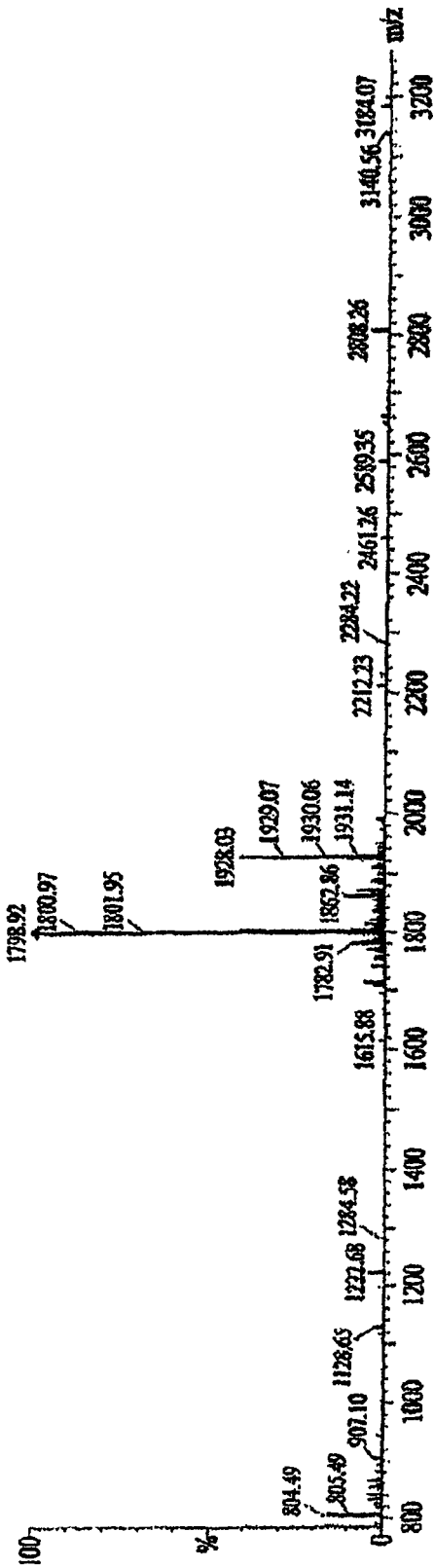


图 10

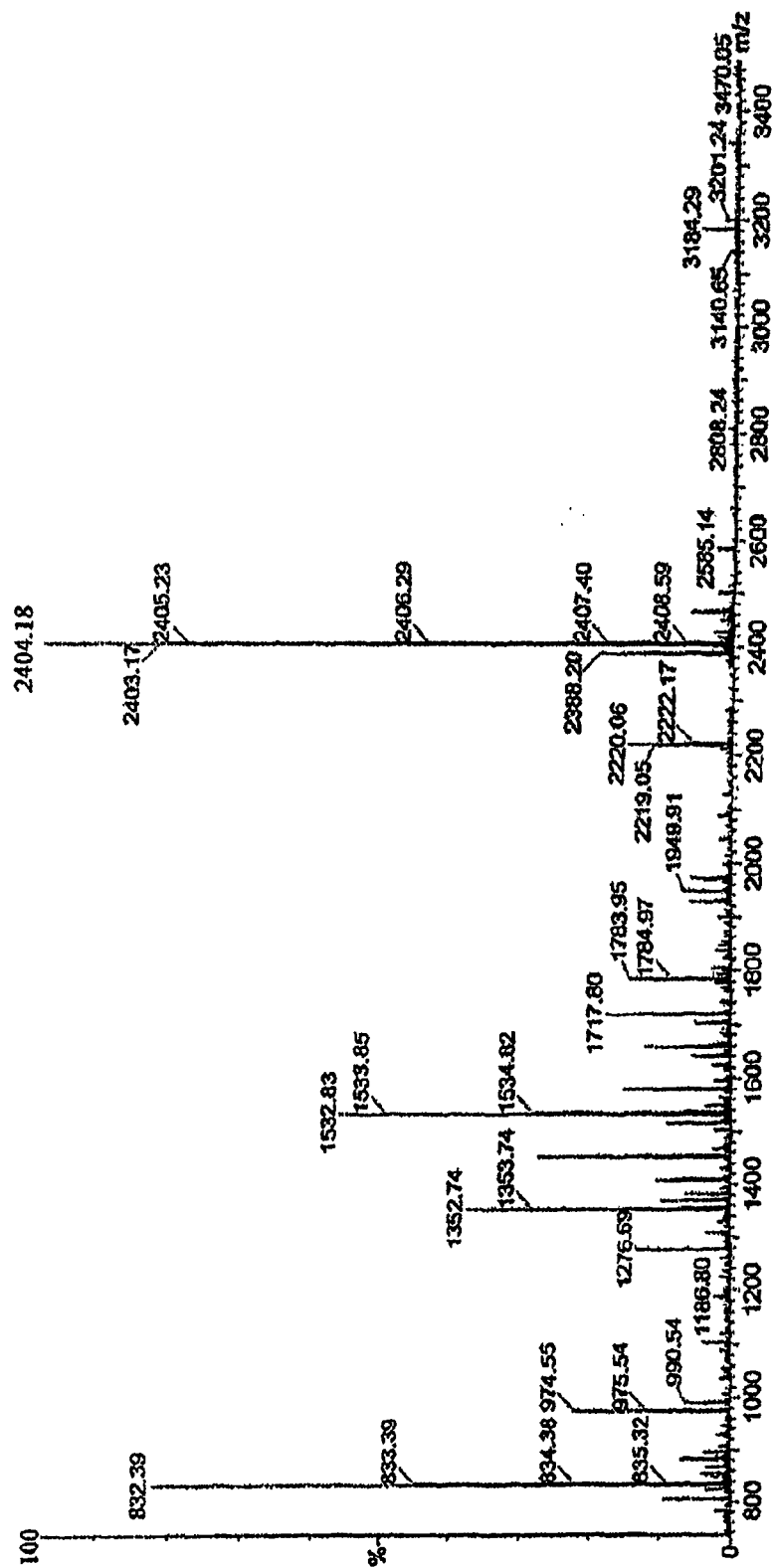


图 11

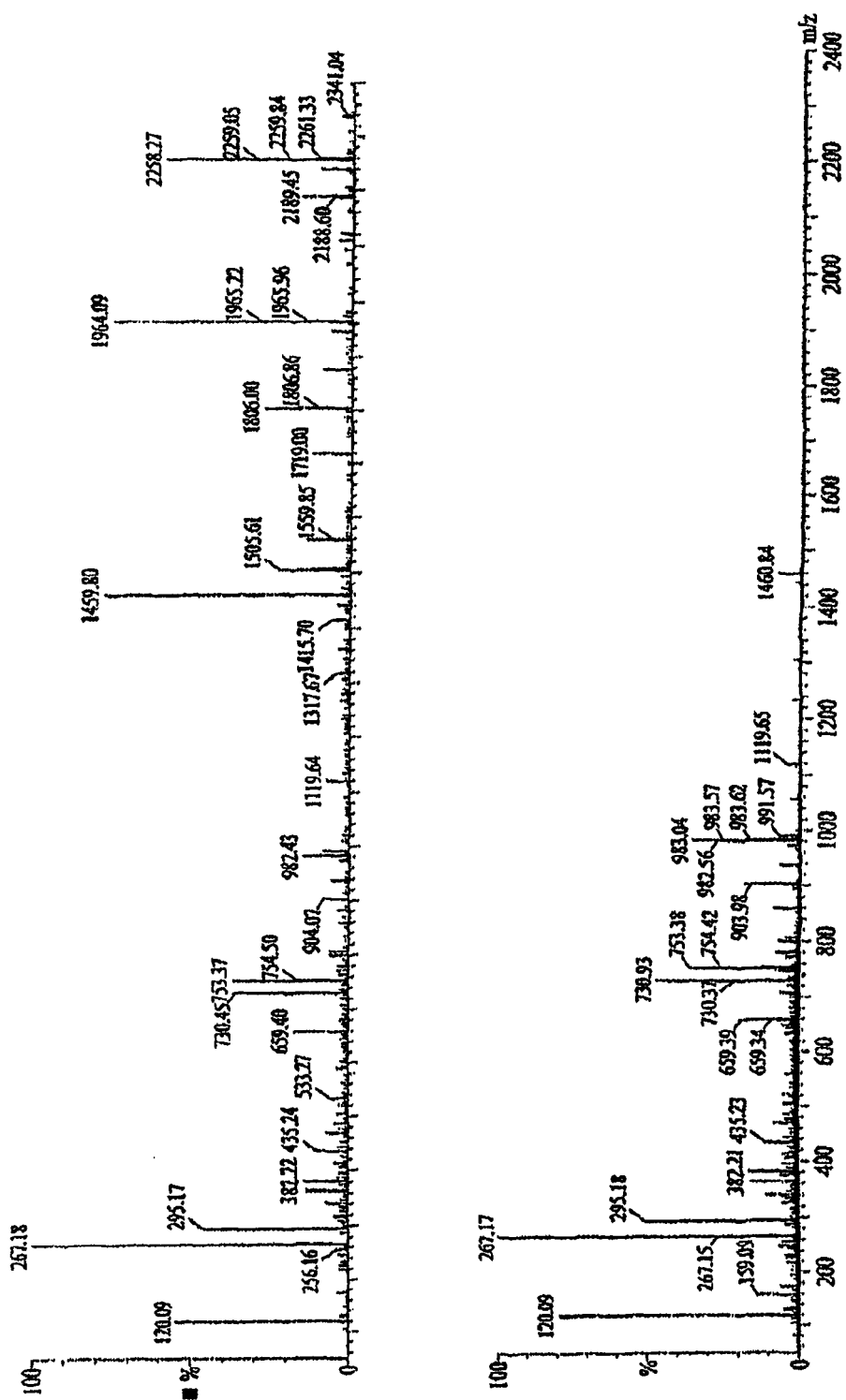


图 12

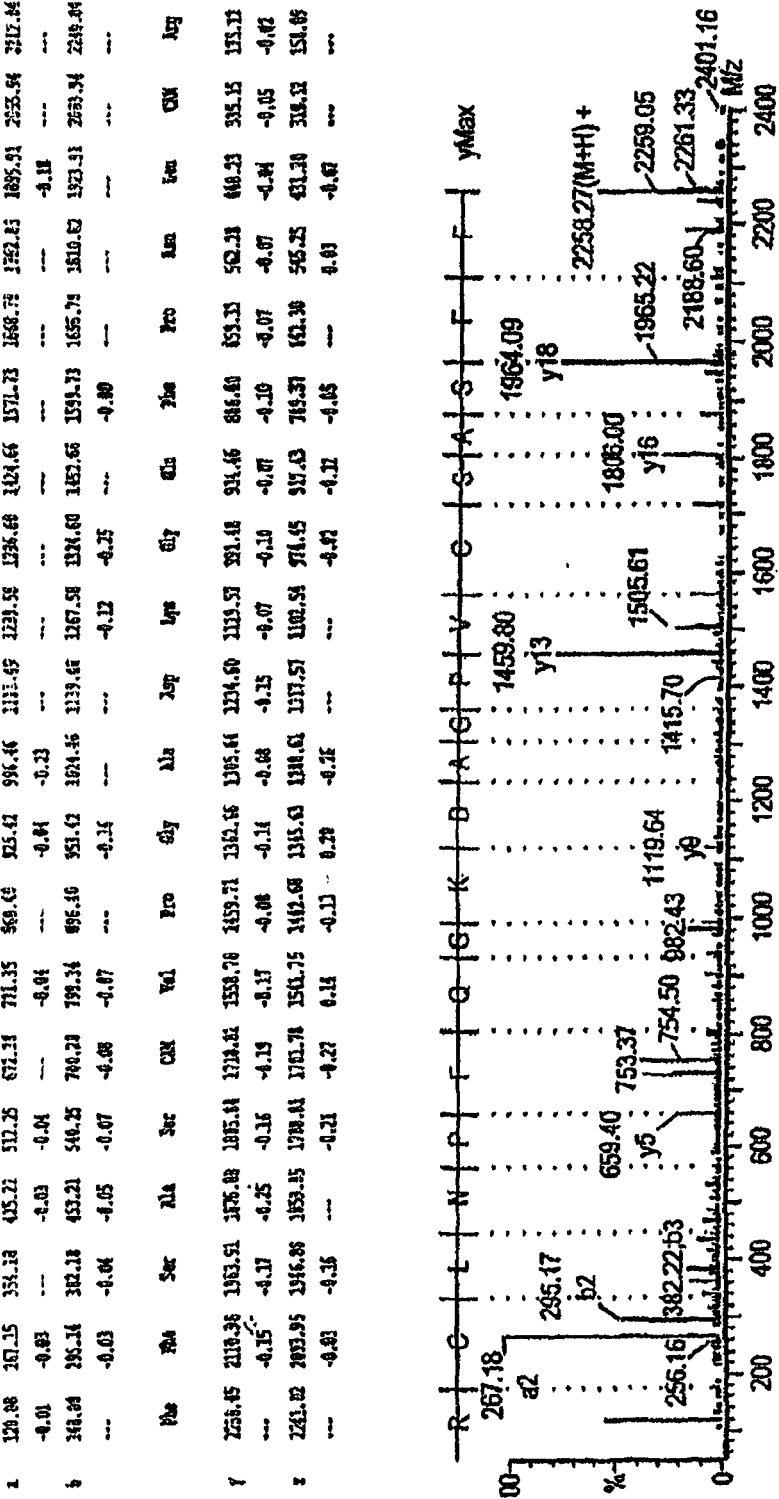


图 13

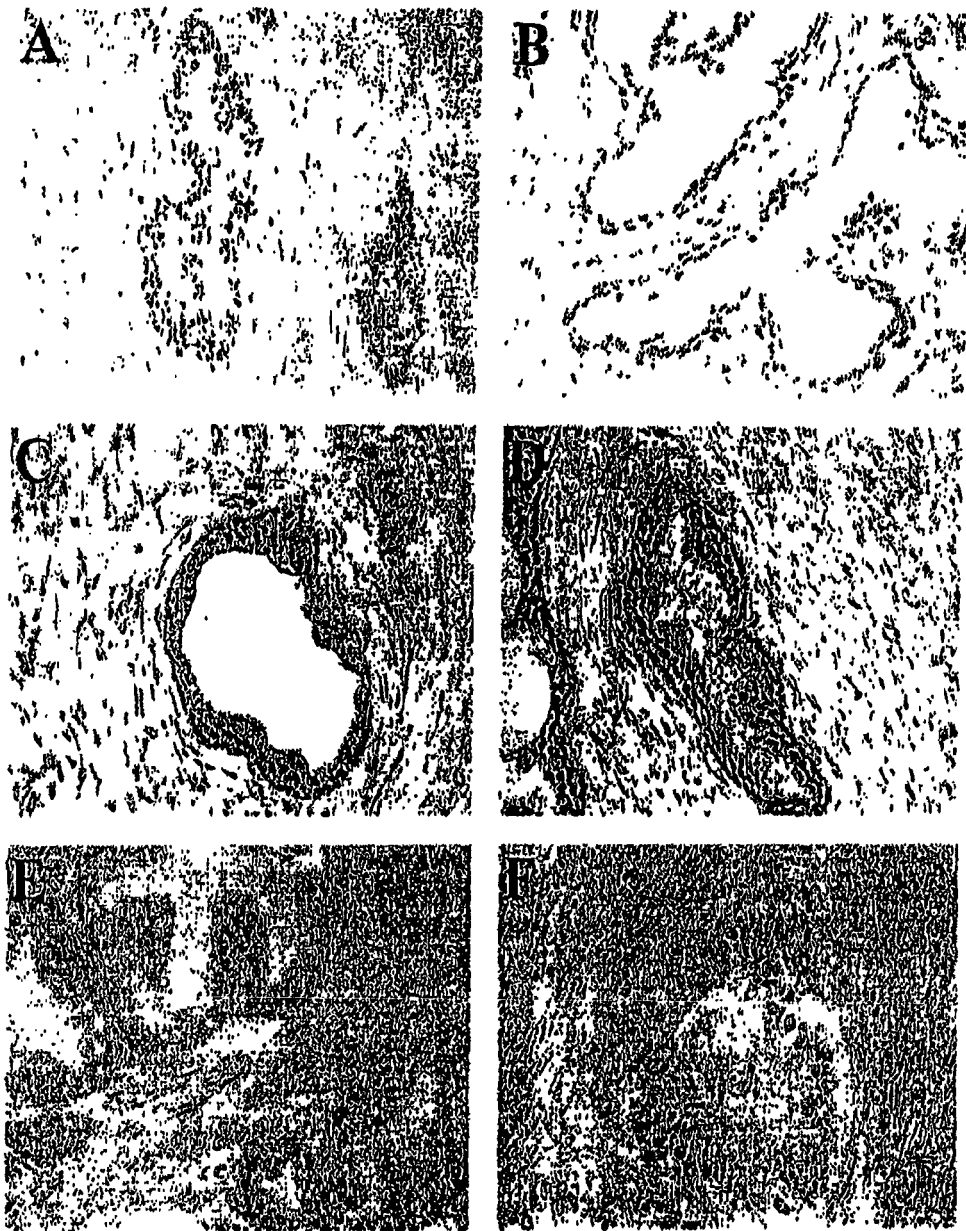


图14人正常前列腺、BPH及前列腺癌样品中 α s 1-酪蛋白的免疫染色(A $\times 100$; B $\times 200$; C, D, E, F $\times 400$).

(A). 在正常前列腺中未观察到 α s 1-酪蛋白染色

(B). 在BPH样品中未观察到 β -酪蛋白染色

(C), (D) 这两张显微照片表明BPH中的 α s 1-酪蛋白免疫染色+++ (C和D) 代表强度, 可观察到在上皮细胞细胞质和前列腺分泌物中均观察到 α s 1-酪蛋白

(E) 这张显微照片表明充分分化的前列腺癌

(Gleason grade 2-3) 的典型免疫活性, 强度为+.

(F) 缺乏分化的前列腺癌(Gleason grade 4-5)表现出 α s 1-酪蛋白免疫染色阴性

图 14

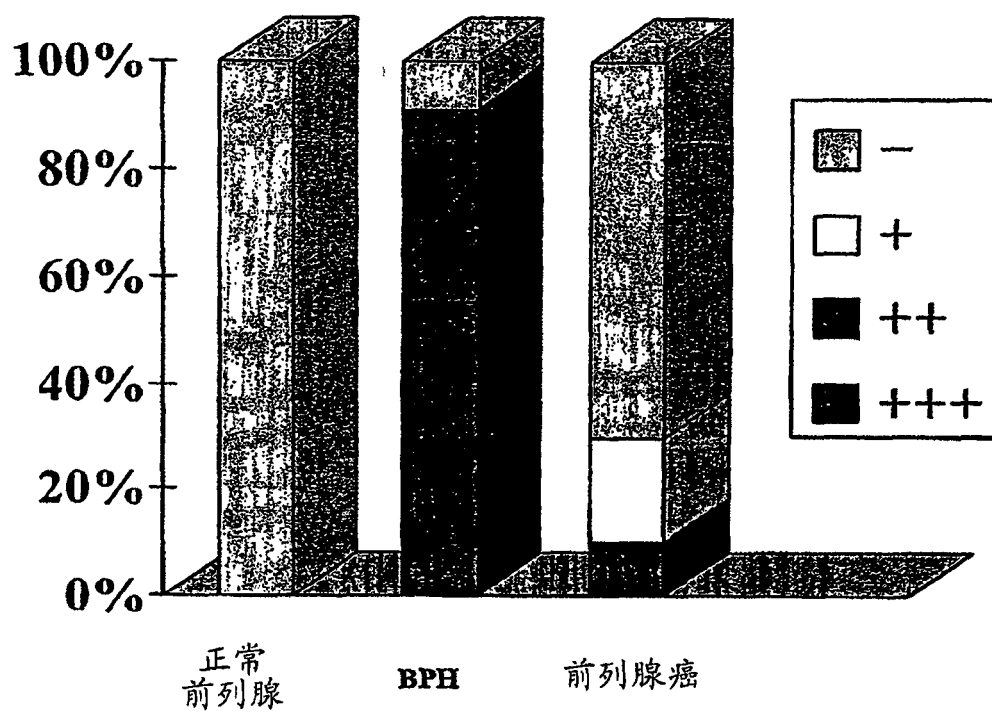


图 15

专利名称(译)	良性前列腺增生(BPH)的人蛋白标记		
公开(公告)号	CN100538360C	公开(公告)日	2009-09-09
申请号	CN200480025775.9	申请日	2004-07-07
[标]申请(专利权)人(译)	香港大学		
申请(专利权)人(译)	香港大学		
当前申请(专利权)人(译)	香港大学		
[标]发明人	王云川 许克新 王向红		
发明人	王云川 许克新 王向红		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577 G01N33/68 G01N33/567 G01N33/574		
CPC分类号	G01N2800/342 G01N33/57434 G01N33/6893		
代理人(译)	郭文洁 王景朝		
优先权	60/485653 2003-07-08 US		
其他公开文献	CN1849511A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生(BPH)的方法,该方法包括从受试者获取前列腺液样品、以及分析该前列腺液样品以检测BPH蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有BPH。本发明进一步提供了一种诊断受试者是否患有良性前列腺增生(BPH)的方法,该方法包括从受试者获取血清样品、以及分析该血清样品以检测BPH蛋白标记存在与否从而确定受试者是否患有BPH。最后,本发明提供一种含有BPH蛋白标记与使用说明书的用于检测良性前列腺增生(BPH)标记的诊断试剂盒。

