

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510075367.0

G01N 30/88 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/561 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月6日

[11] 公开号 CN 1873410A

[22] 申请日 2005.6.16

[21] 申请号 200510075367.0

[71] 申请人 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
地址 100021 北京市朝阳区潘家园17号

[72] 发明人 赵晓航 何洪智 吴旻

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司
代理人 刁玉生

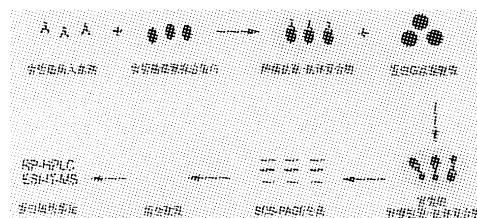
权利要求书1页 说明书5页 附图2页

[54] 发明名称

一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法

[57] 摘要

本发明涉及一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，以血清为分子探针，免疫沉淀肿瘤细胞中潜在的肿瘤抗原，富集的肿瘤抗原-抗体复合物经 SDS-PAGE 电泳分离、考马斯亮蓝染色、特异蛋白条带的酶解消化，肽段抽提，反相高效液相色谱 (RP-HPLC) 分离和电喷雾离子化偶联在线离子阱质谱 (ESI-IT-MS) 鉴定等综合技术路线，筛选食管癌血清标志蛋白。筛选到的 Ku70 蛋白经免疫印迹实验证实为新的食管癌候选标志物，Ku70 蛋白表达明显增高与早期食管癌癌变相关。



1、一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，其特征在于：

A、采集食管癌病人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得肿瘤血清；

B、采集健康人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得对照血清；

C、提取体外培养的细胞株总蛋白；

D、用所述病人的肿瘤血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白中的肿瘤自身抗原，分离得到肿瘤抗原-抗体复合物；同时，用所述的对照血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白，得到非特异的免疫复合物；

E、用 SDS-PAGE 电泳，按分子量大小分离所述的肿瘤抗原-抗体复合物，获得泳道 1 蛋白；

同时，用 SDS-PAGE 电泳，按照分子量大小分离所述的非特异免疫复合物，获得泳道 2 蛋白；

F、对比所述的泳道 1 蛋白和泳道 2 蛋白，切下肿瘤特异表达的蛋白条带，对该蛋白条带进行胶内胰蛋白酶酶解消化、肽段抽提、混合肽段液相色谱分离和电喷雾离子化偶联在线离子阱质谱蛋白属性鉴定，得到特异的肿瘤相关标志物。

2、根据权利要求 1 所述的在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，其特征在于：经蛋白免疫印迹证实 Ku70 蛋白为食管癌特异的肿瘤相关标志物，该 Ku70 蛋白在食管癌组织中明显高表达，并与食管癌癌变相关。

一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法

技术领域

本发明涉及一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法。该方法使用食管癌病人血清作为抗体，钩取肿瘤抗原，然后富集肿瘤抗原-抗体复合物，富集的肿瘤抗原-抗体复合物经 SDS-PAGE 电泳分离后进行质谱鉴定，获得肿瘤标志物。

背景技术

食管癌是我国常见恶性肿瘤之一，目前尚缺乏有效的早期诊断方法。在肿瘤发生发展过程中由于基因组不稳定性会引起许多蛋白质表达和降解失常，这些异常改变的蛋白质或小分子肽能被机体免疫系统识别为“非己”物质（自身抗原）而诱导机体产生抗肿瘤自身抗原的体液免疫反应，在血清中出现自身抗体。肿瘤自身抗原和自身抗体是一类可以专一地相互识别、结合的，具有肿瘤特征的重要“标志分子”。理论上，肿瘤自身抗原诱导产生的肿瘤自身抗体及部分释放到血液中的自身抗原有可能作为一种血清标志，如果检测方法足够敏感（包括蛋白质分离效果和鉴定的灵敏度），可以反映个体患肿瘤的风险。

自 90 年代以来，人们先后建立了细胞毒性淋巴细胞（cyto-toxic lymphocyte, CTL）识别法、重组 cDNA 表达文库的血清学分析法（serological analysis of recombinant cDNA expression libraries, SEREX）等肿瘤抗原鉴定办法。但由于 CTL 法要求先在体外建立自体的 CTL 克隆和肿瘤细胞株，这不仅增加了实验的难度，也使得此法目前仅限于分析黑色素瘤、肾细胞癌、头颈癌等少数易于体外建株的肿瘤类型。由于 SEREX 需要建立表达文库，其分析也具有建库肿瘤个体基因组遗传物质的局限性。另外，SEREX 技术不能产生针对蛋白质异构体或蛋白质不同翻译后修饰形式的抗体。

蛋白组学技术的快速发展使分离和鉴定血清/血浆微量肿瘤相关蛋白成为可能。一种结合传统十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-poly acrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）蛋白分离方法和纳升级毛细管反相高效液相色谱（reverse phase high-performance liquid chromatograph, RP-HPLC）与电喷雾离子化偶联在线离子阱串联质谱（electrospray ionization coupled on-line an ion trap mass spectrometry, ESI-IT-MS）技术，通过直接分析蛋白质酶解后产生的肽谱而鉴定蛋白质。该

技术具有较高的蛋白分离和鉴定能力，可以分辨出那些用传统二维电泳（2-dimensional electrophoresis, 2-DE）不容易分辨的蛋白。

发明内容

本发明的目的是提出一种在病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，该方法使用病人血清作为抗体，钩取肿瘤细胞和组织中的肿瘤抗原，然后得到并富集肿瘤抗原-抗体复合物，富集的肿瘤抗原-抗体复合物经 SDS-PAGE 电泳分离后进行质谱鉴定，获得肿瘤标志物。该肿瘤标志物可用于辅助食管癌的早诊。

本发明的目的是这样实现的：一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，其特征在于：

A、采集食管癌病人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得肿瘤血清；

B、采集健康人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得对照血清；

C、提取体外培养的细胞株总蛋白；

D、用所述病人的肿瘤血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白中的肿瘤自身抗原，分离得到肿瘤抗原-抗体复合物；同时，用所述的对照血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白，得到非特异的免疫复合物；

E、用 SDS-PAGE 电泳，按分子量大小分离所述的肿瘤抗原-抗体复合物，获得泳道 1 蛋白；

同时，用 SDS-PAGE 电泳，按照分子量大小分离所述的非特异免疫复合物，获得泳道 2 蛋白；

F、对比所述的泳道 1 蛋白和泳道 2 蛋白，切下肿瘤特异表达的蛋白条带，对该蛋白条带进行胶内胰蛋白酶酶解消化、肽段抽提、混合肽段液相色谱分离和电喷雾离子化偶联在线离子阱质谱蛋白属性鉴定，得到特异的肿瘤相关标志物。

附图说明

以下结合附图及实施例对本发明作进一步说明。

图 1 是本发明的检测技术流程图

图 2 是本发明的 SDS-PAGE 电泳分离图

图 3 是本发明的免疫印迹分析肿瘤标志物 Ku70 在组织中的表达图

具体实施方式

实施例一：

参见图 1 和图 2，在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，其步骤如下：

A、采集食管癌病人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得肿瘤血清；

B、采集健康人外周血样本，在离体后 2—3 小时内于 4℃ 温度下离心并分离上层血清，获得对照血清；

C、提取体外培养的细胞株总蛋白；本实施例的具体做法是：体外培养的食管癌细胞株 EC-0156，弃去培养皿中的培养液，经预冷的 1×磷酸盐缓冲液 (PBS)，pH 7.4 (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄) 洗涤 3 次，加入适量蛋白裂解液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 1mM AEBSF, 20μg/ml Approtinin, 20μg/ml Leupeptin)，置于冰上 20 min，刮下细胞并收集至离心管中，超声破碎处理后，于 4℃ 温度下以每分钟 1200 转 (rotation per minute, rpm) 的转速离心 30 min，收集上清液为细胞株总蛋白；

D、用所述病人的肿瘤血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白中的肿瘤自身抗原，分离得到肿瘤抗原-抗体复合物；同时，用所述的对照血清免疫沉淀所述细胞株总蛋白，得到非特异的免疫复合物；

在本实施例中具体做法是：分别用 300μg 细胞株总蛋白，加入 30μl 肿瘤血清 (肿瘤免疫沉淀) 或等量健康人血清 (对照免疫沉淀) 于 4℃ 温度下旋转孵育过夜。加入 40μl 蛋白 G 琼脂糖珠 (1:1 体积比的蛋白 G 琼脂糖珠与缓冲液的混悬物)，于 4℃ 温度下继续旋转孵育 3h，经转速为 500 rpm 于 4℃ 温度下离心 5min，弃去上清，保留与免疫复合物结合的蛋白 G 琼脂糖珠。分别用 0.5ml 细胞裂解液洗免疫复合物-蛋白 G 琼脂糖珠，于 4℃ 温度下低速离心 (300-400 rpm) 5 分钟，重复 3 次；

E、用 SDS-PAGE 电泳 (也可称为聚丙烯酰胺凝胶电泳)，按分子量大小分离所述的肿瘤抗原-抗体复合物，凝胶经考马斯亮蓝染色后获得泳道 1 蛋白；

同时，用 SDS-PAGE 电泳，按照分子量大小分离所述的非特异免疫复合物 (对照免疫沉淀复合物)，凝胶经考马斯亮蓝染色后获得泳道 2 蛋白。

在本实施例中具体做法是：在肿瘤自身抗原抗体复合物-蛋白 G 琼脂糖珠中加入 30μl 蛋白上样缓冲液 (0.125M Tris-HCl pH 6.8, 4% SDS, 20% glycerol, 0.004% bromphenol blue, 10% β-巯基乙醇)，混匀后 100℃ 加热 5min。12,000rpm 转速离心 5min，收集上清 (包含肿瘤抗原-抗体复合物中的所有蛋白质)，弃

去沉淀（蛋白 G 琼脂糖珠），上清中的蛋白质用 10% SDS-PAGE 电泳分离，凝胶经考马斯亮蓝染色后获得泳道 1 蛋白；同样，在对照非特异免疫复合物-蛋白 G 琼脂糖珠中加入 30 μ l 蛋白上样缓冲液（同前），混匀后 100 $^{\circ}$ C 加热 5min。12,000 rpm 离心 5min，收集上清（包含非特异免疫复合物中的所有蛋白质），弃去沉淀（蛋白 G 琼脂糖珠），上清中的蛋白质用 10% SDS-PAGE 电泳分离，凝胶经考马斯亮蓝染色后获得泳道 2 蛋白。

F、对比所述的泳道 1 蛋白和泳道 2 蛋白，分别切下肿瘤特异表达的蛋白条带（仅在泳道 1 中出现的差异表达蛋白），比如分子量为 45 和 70 千道尔顿 kilo-dalton, kDa) 的蛋白条带。该蛋白条带首先在胶内经胰蛋白酶酶解成特定肽段并抽提浓缩，即在酶解产物中加入 50 μ l 含有 50%乙腈 (acetonitrile) 和 50%的 25mM 碳酸氢铵 (NH_4HCO_3) 溶液，静置 15min 后，以 4000 rpm，离心 1 分钟，弃去上清，得到浓缩的混合肽段。混合肽段采用反相高效液相色谱 (reverse phase high-performance liquid chromatograph, RP-HPLC) 分离，并用电喷雾离子化偶联在线离子阱串联质谱仪 (electrospray ionization coupled on-line an ion trap mass spectrometry, ESI-IT-MS。商品名: LCQ Deca XP plus, 美国 ThermoFinnigan 公司产品) 进行蛋白质属性的鉴定，得到特异的肿瘤相关标志物。

在通常状况下血清中的自身抗体滴度很低，很难用蛋白质组学方法鉴定。为鉴定潜在的肿瘤相关标志物，结合体液免疫反应与蛋白质组技术，以血清为分子探针，免疫沉淀肿瘤组织或细胞株中潜在的肿瘤抗原，富集的肿瘤抗原-抗体复合物经 SDS-PAGE 电泳分离、考马斯亮蓝染色、特异蛋白条带的酶解消化，肽段抽提，混合肽段液相色谱分离 (RP-HPLC) 和电喷雾离子化偶联在线离子阱 (ESI-IT-MS) 质谱鉴定等综合技术路线，筛选血清标志蛋白。使用本发明的方法从病人血清标本中检测肿瘤相关标志物，达到区分食管癌与非肿瘤健康人、食管良性病变和其它消化道肿瘤，以及早期发现食管癌的目的。

在本发明的实施例中，使用上述检测肿瘤相关标志物的方法分离鉴定了多种相关标志蛋白，其中之一 Ku70 蛋白进一步用蛋白免疫印迹 (Western blot) 方法验证，证明 Ku70 蛋白在食管癌组织中表达明显高于正常食管上皮，是候选的肿瘤标志蛋白。其蛋白免疫印迹验证方法步骤如下：

A、参见图 3，提取组织总蛋白。具体做法是取新鲜手术切除的食管癌及其远端正常食管上皮组织各 0.2g，于液氮中砸碎并研磨成粉末状。将粉末转移到离心管中，加入蛋白裂解液 (50mM Tris-HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1% Triton

X-100, 0.1% SDS, 1mM AEBSF, 20 μ g/ml Approtinin, 20 μ g/ml Leupeptin), 置于冰上 20 min, 经超声处理后于 4 $^{\circ}$ C 温度下以 12000 rpm 转速离心 30 min, 收集上清液为食管癌和正常食管上皮组织总蛋白。

B、来自不同个体的食管癌 (C1、C2、C3) 和正常食管上皮 (N1、N2、N3) 组织总蛋白样品各 10 μ g, 用 10% 的 SDS-PAGE 电泳按分子量大小分离。电泳后, 在电转仪中将蛋白从 SDS-PAGE 电泳胶上转移至 PVDF (polyvinylidene difluoride) 膜上。PVDF 膜用含 10% 脱脂奶粉的 PBS (137mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, pH 7.4) 在室温封闭 3 小时, 弃去封闭液, 用 5ml PBS 洗 1 次。用 1:1000 稀释的抗 Ku70 单克隆抗体室温下孵育 3 小时后, 含有蛋白质的 PVDF 膜用 TTBS 缓冲液 (20mM Tris-HCl, pH7.5, 50-100mM NaCl, 0.1% Tween-20) 洗 6 次, 每次 5min。加入辣根过氧化物酶标记的二抗孵育 1.5 小时, 用 TTBS 缓冲液洗 6 次, 每次 5min。最后用 PBS 洗 1 次, 5min。将 ECL 化学发光试剂盒中的 A 液和 B 液等量混合, 均匀地加到膜上, 杂交信号在暗室中对 X 光片 (Kodak X-Omat K Film) 曝光, X 光片经显影、定影后, 记录胶片上杂交信号结果。同时, 以细胞中恒定存在的微管蛋白 (α -tubulin, 分子量约为 54 kDa) 杂交结果作为蛋白上样量的内对照。Ku 70 蛋白 (分子量约为 70 kDa) 在食管癌组织中 (C1、C2、C3) 的表达明显高于正常食管上皮 (N1、N2、N3)。

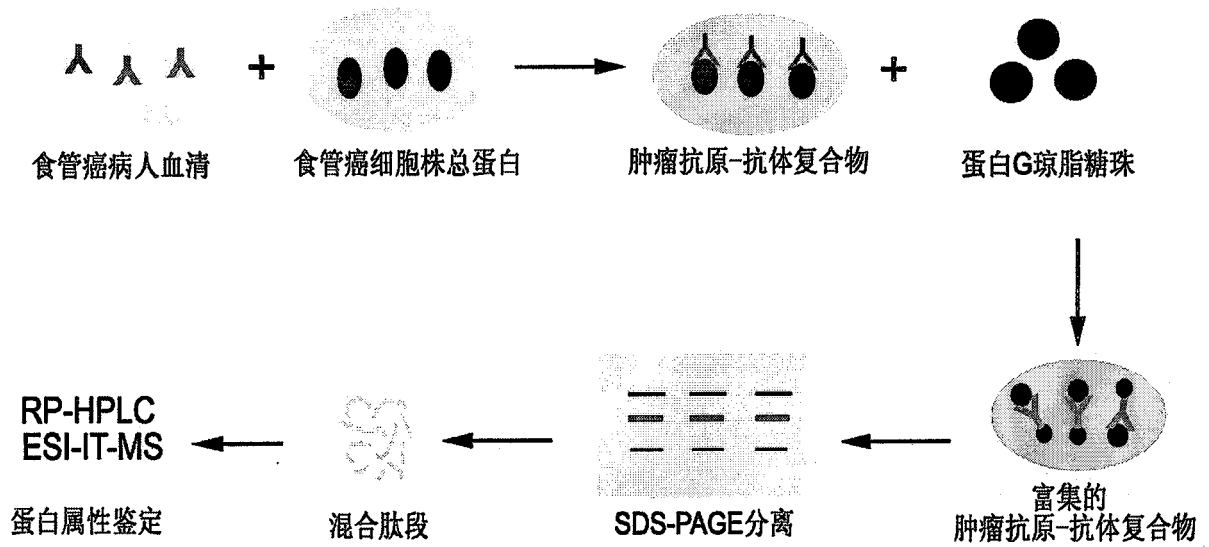


图 1

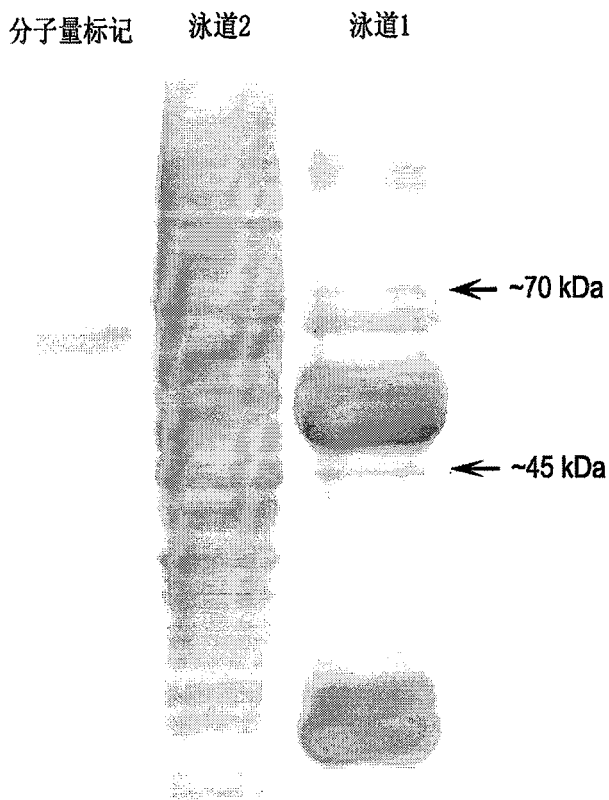


图 2

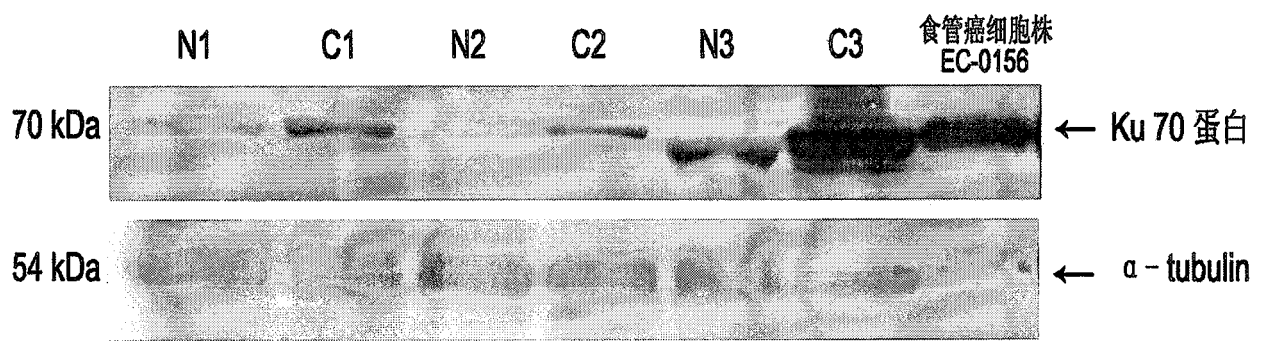


图 3

专利名称(译)	一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法		
公开(公告)号	CN1873410A	公开(公告)日	2006-12-06
申请号	CN200510075367.0	申请日	2005-06-16
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
[标]发明人	赵晓航 何洪智 吴旻		
发明人	赵晓航 何洪智 吴旻		
IPC分类号	G01N30/88 G01N33/574 G01N33/561 G01N33/531		
其他公开文献	CN1873410B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种在食管癌病人血清中检测肿瘤相关标志物的方法，以血清为分子探针，免疫沉淀肿瘤细胞中潜在的肿瘤抗原，富集的肿瘤抗原-抗体复合物经SDS-PAGE电泳分离、考马斯亮蓝染色、特异蛋白条带的酶解消化，肽段抽提，反相高效液相色谱(RP-HPLC)分离和电喷雾离子化偶联在线离子阱质谱(ESI-IT-MS)鉴定等综合技术路线，筛选食管癌血清标志蛋白。筛选到的Ku70蛋白经免疫印迹实验证实为新的食管癌候选标志物，Ku70蛋白表达明显增高与早期食管癌癌变相关。

