



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103837679 A

(43) 申请公布日 2014.06.04

(21) 申请号 201410057837.X

(22) 申请日 2014.02.20

(71) 申请人 浙江大学医学院附属第二医院
地址 310009 浙江省杭州市上城区解放路
88号

(72) 发明人 张宁 叶招明 应美丹 曹戟
王强 刘兵

(74) 专利代理机构 杭州求是专利事务所有限公
司 33200

代理人 杜军

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

权利要求书1页 说明书3页

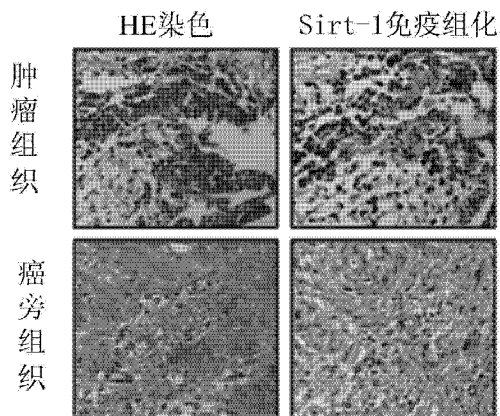
序列表6页 附图2页

(54) 发明名称

Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用

(57) 摘要

本发明公开 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用。该 Sirt-1 蛋白可作为骨肉瘤诊断的标记分子,提高骨肉瘤诊断和预测骨肉瘤转移的准确性。用免疫检测诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:与 Sirt-1 蛋白特异性结合的抗体。诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品。Sirt-1 蛋白可作为诊断和预测转移的特异性标志蛋白,使骨肉瘤诊断更加准确、快速。



1. Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於 Sirt-1 蛋白作为标记分子。

2. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於 Sirt-1 蛋白的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示。

3. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品。

4. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於用免疫检测诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:与 Sirt-1 蛋白特异性结合的抗体。

5. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於用 RT-PCR 诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品至少包括一对特异性扩增 Sirt-1 基因的引物:正向引物:5 '-AGCTGATGAACCGCTTGCTA-3 ',如 SEQ ID NO. 2 所示;反向引物:5 '-CCCAAATCCAGCTCCTCCAG-3 ',如 SEQ ID NO. 3 所示。

6. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於用实时定量 PCR 诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品至少包括一对特异性扩增 Sirt-1 基因的引物:正向引物:5 '-AACAGGTTGCGGAATCCAA-3 ',如 SEQ ID NO. 4 所示;反向引物:5 '-GTTTCATCAGCTGGGCACCTA-3 ',如 SEQ ID NO. 5 所示。

7. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於用原位杂交诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:与 Sirt-1 基因的核酸序列杂交的探针:5 '-CATTTTCCATGGCGCTGAGG-3 ',如 SEQ ID NO. 6 所示。

8. 如权利要求 1 所述的 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用,其特征在於用基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:与 Sirt-1 基因的核酸序列杂交的探针:5 '-TTGCAACAGCATCTTGCCTG-3 ',如 SEQ ID NO. 7 所示。

Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及一个蛋白的应用,尤其涉及 Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用。

背景技术

[0002] 骨肉瘤是最常见的恶性成骨性肿瘤之一,流行病学研究发现该病好发于 15-25 岁的青少年,且男性发病率高于女性。骨肉瘤好发部位是长管状骨的干骺端,该肿瘤恶性程度高,预后极差,单纯截肢后患者的 5 年生存率低于 20%,此外该肿瘤的另一个显著特点是肺部转移早,在临床做出骨肉瘤诊断时,其中大部分已经发生肺的微小转移。因此,有效诊断骨肉瘤,特别是研发预测骨肉瘤转移的技术是目前骨肿瘤研究中的重点和难点。

[0003] 目前,越来越多的研究表明 Sirt1 与肿瘤的发生发展密切相关。在很多肿瘤中,Sirt1 的表达水平会明显增高,且 Sirt1 常集中于一些异常沉默的抑癌基因(这些基因的 DNA 被过度甲基化)的启动子上。文献报道在乳腺癌和结肠癌中,对 Sirt1 的抑制增加了内源性启动子中 H4-K16 和 H3-K7 的乙酰化作用,可以满足基因重复表达的条件。Sirt1 通过对组蛋白的 H1-K26 的脱乙酰化作用和促进 H3K9me2 的丢失来调节异染色质的构成。Sirt1 与 SUV39H1 直接结合并脱去其乙酰基,促进 SUV39H1 的活性进而引起 H3K9me3 修饰水平的提高。此外,Sirt1 也可以将很多非组蛋白去乙酰化,比如可以对 p53 进行去乙酰化,负向调节 p53 的功能;Sirt1 还可以对 DNA 修复蛋白 Ku70、FOXO 家族蛋白、NF- κ B 等进行调控。尽管 Sirt1 的生物学功能已被逐步探明,但目前尚无文献报道 Sirt1 与骨肉瘤的相关性研究,更未见 Sirt1 表达与骨肉瘤转移的相关研究。

发明内容

[0004] 本发明针对现有技术的不足,提供 Sirt-1 蛋白的一种新应用,该 Sirt-1 蛋白可作为骨肉瘤诊断的标记分子,提高骨肉瘤诊断和预测骨肉瘤转移的准确性。

[0005] 所述的 Sirt-1 蛋白的氨基酸序列,如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明通过如下技术方案实现:

所述诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:用 RT-PCR、实时定量 PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品。

[0007] 在本发明中,所述用免疫检测诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括:与 Sirt-1 蛋白特异性结合的抗体。

[0008] 所述用 RT-PCR 诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品至少包括一对特异性扩增 Sirt-1 基因的引物:正向引物:5'-AGCTGATGAACCGCTTGCTA-3';

反向引物:5'-CCCAAATCCAGCTCCTCCAG-3'。

[0009] 所述用实时定量 PCR 诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品至少包括一对特异性扩增 Sirt-1 基因的引物:正向引物:5'-AACAGGTTGCGGAATCCAA-3';反向引物:5'-GTTTCATCAGCTGGGCACCTA-3'。

[0010] 所述用原位杂交诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括：与 Sirt-1 基因的核酸序列杂交的探针：5'-CATTTTCCATGGCGCTGAGG-3'。

[0011] 所述用基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括：与 Sirt-1 基因的核酸序列杂交的探针：5'-TTGCAACAGCATCTTGCCTG-3'。

[0012] 在本发明中，可以使用一系列本领域已知的方法来制备针对 Sirt-1 蛋白特异的抗体。例如，将纯化的人 Sirt-1 蛋白或它的抗原片段注射入动物体内以产生多克隆抗体。同样，表达人 Sirt-1 蛋白或它的抗原片段的细胞也可以用来对动物致免疫而产生抗体。根据本发明制备的抗体也可以是单克隆抗体，这些单克隆抗体可用杂交瘤技术制备。本发明的抗体包括可以阻抑 Sirt-1 功能的抗体，也可以是不影响人 Sirt-1 蛋白功能的抗体。每一类抗体都可以通过对人 Sirt-1 蛋白的片断或功能域致免疫而产生，而人 Sirt-1 蛋白产物及其片段可以用重组方法产生或用多肽合成仪进行合成。与非修饰形式的 Sirt-1 蛋白结合的抗体，可以利用在原核细胞例如 E. coli 中产生的基因产物来免疫动物而得到。与翻译后修饰形式如糖基化或磷酸化 Sirt-1 蛋白或多肽结合的抗体，可以利用在真核细胞如酵母或昆虫细胞中产生的基因产物来免疫动物而得到。

[0013] 在本发明中，所述探针可以是 DNA、RNA、DNA-RNA 嵌合体、PNA 或其他衍生物。所述探针的长度没有限制，只要能够完成特异性杂交、与目的核苷酸序列特异性结合，任何长度都可以。所述探针的长度可以短至 25、20、15 或 10 个碱基长度。同样，所述探针的长度可长至 60、80、100、150、300 个碱基对或更长，甚至整个基因。由于不同的探针长度对杂交效率、信号特异性有不同的影响，所述探针的长度通常至少是 14 个碱基对，最长一般不超过 30 个碱基对，与目的核苷酸序列互补的长度以 15-25 个碱基对最佳。所述探针自身互补序列最好少于 4 个碱基对，以免影响杂交效率。

[0014] 本发明实验证明 Sirt-1 蛋白在骨肉瘤组织中的表达明显高于癌旁组织，且与骨肉瘤肺转移密切相关；而在原代骨肉瘤细胞中 Sirt-1 蛋白与其侵袭运动能力呈正相关。因此，Sirt-1 蛋白可作为诊断和预测转移的特异性标志蛋白，使骨肉瘤诊断更加准确、快速。

附图说明

[0015] 图 1 为本发明通过免疫组化法验证 Sirt-1 在人骨肉瘤组织和癌旁组织中的表达图；

图 2 为本发明通过免疫组化法检测骨肉瘤中 Sirt-1 蛋白水平；

图 3 为表达不同程度 Sirt-1 蛋白的原代骨肉瘤细胞在体外的侵袭运动能力。

具体实施方式

[0016] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0017] 以下实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，或按照制造厂商所建议的条件。

[0018] 下面实施例所用的 Sirt-1 蛋白的氨基酸序列，如 SEQ ID NO. 1 所示。

[0019] 实施例 1：

选取骨肉瘤临床样本以及癌旁组织 33 对，用 10% 甲醛溶液固定 7 天，随后制备石蜡包埋的组织块。将样本制备厚度为 8 微米的石蜡切片，并采用免疫组化法检测 Sirt-1 蛋白的

表达情况,在正置显微镜下观察 Sirt-1 蛋白的表达情况。如图 1 所示,癌组织中 Sirt-1 蛋白的表达显著高于癌旁组织。对这 33 对骨肉瘤临床样本以及癌旁组织中 Sirt-1 蛋白的表达情况进行统计,发现癌组织中强阳性为 15 例,阳性为 14 例,弱阳性为 3 例,阴性为 1 例;而在癌旁组织中强阳性为 1 例,阳性为 3 例,弱阳性为 11 例,阴性为 18 例(图 2)。

[0020] 实施例 2:

对前述实施例 1 中的 33 例骨肉瘤进行 3 年回顾性调研,其中有 22 例有详细的随访记录,故在这 22 例样本中分析 Sirt-1 蛋白表达与骨肉瘤病人预后之间的关系。结果发现,Sirt-1 表达越强,骨肉瘤病人的转移率越高(表 1)。

[0021] 表 1 骨肉瘤中 Sirt-1 蛋白水平与肺转移及 3 年生存率的相关性

Sirt-1 表达	转移数/总数 (n)	转移率 (%)
-	0/0	/
+/-	0/2	0%
+	2/10	20%
++	4/10	40%

实施例 3:

选取体外培养的 7 株原代骨肉瘤细胞,采用免疫印迹法检测 Sirt-1 蛋白的表达,以 Actin 作为内参,如图 3A 所示,不同的原代骨肉瘤细胞内 Sirt-1 蛋白表达水平存在差异。随后采用 Transwell 法检测原代骨肉瘤细胞的侵袭迁移能力。如图 3B 所示,一般来说,原代骨肉瘤细胞中 Sirt-1 蛋白的高表达与其体外侵袭运动能力呈正相关。图 3A 中颜色越深说明, Sirt-1 在该细胞表达越强,同时图 3B 颜色越深说明侵袭能力越强,图 3A 与图 3B 结果正相关。

SEQUENCE LISTING

<110> 浙江大学医学院附属第二医院

<120> Sirt-1 蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用

<130> 1

<160> 7

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 555

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met Ile Gly Thr Asp Pro Arg Thr Ile Leu Lys Asp Leu Leu Pro Glu
1 5 10 15

Thr Ile Pro Pro Pro Glu Leu Asp Asp Met Thr Leu Trp Gln Ile Val
 20 25 30

Ile Asn Ile Leu Ser Glu Pro Pro Lys Arg Lys Lys Arg Lys Asp Ile
 35 40 45

Asn Thr Ile Glu Asp Ala Val Lys Leu Leu Gln Glu Cys Lys Lys Ile
 50 55 60

Ile Val Leu Thr Gly Ala Gly Val Ser Val Ser Cys Gly Ile Pro Asp
65 70 75 80

Phe Arg Ser Arg Asp Gly Ile Tyr Ala Arg Leu Ala Val Asp Phe Pro
85 90 95

Asp Leu Pro Asp Pro Gln Ala Met Phe Asp Ile Glu Tyr Phe Arg Lys
100 105 110

Asp Pro Arg Pro Phe Phe Lys Phe Ala Lys Glu Ile Tyr Pro Gly Gln
115 120 125

Phe Gln Pro Ser Leu Cys His Lys Phe Ile Ala Leu Ser Asp Lys Glu
130 135 140

Gly Lys Leu Leu Arg Asn Tyr Thr Gln Asn Ile Asp Thr Leu Glu Gln
145 150 155 160

Val Ala Gly Ile Gln Arg Ile Ile Gln Cys His Gly Ser Phe Ala Thr
165 170 175

Ala Ser Cys Leu Ile Cys Lys Tyr Lys Val Asp Cys Glu Ala Val Arg
180 185 190

Gly Ala Leu Phe Ser Gln Val Val Pro Arg Cys Pro Arg Cys Pro Ala
195 200 205

Asp Glu Pro Leu Ala Ile Met Lys Pro Glu Ile Val Phe Phe Gly Glu
210 215 220

Asn Leu Pro Glu Gln Phe His Arg Ala Met Lys Tyr Asp Lys Asp Glu
225 230 235 240

Val Asp Leu Leu Ile Val Ile Gly Ser Ser Leu Lys Val Arg Pro Val
 245 250 255

Ala Leu Ile Pro Ser Ser Ile Pro His Glu Val Pro Gln Ile Leu Ile
 260 265 270

Asn Arg Glu Pro Leu Pro His Leu His Phe Asp Val Glu Leu Leu Gly
 275 280 285

Asp Cys Asp Val Ile Ile Asn Glu Leu Cys His Arg Leu Gly Gly Glu
 290 295 300

Tyr Ala Lys Leu Cys Cys Asn Pro Val Lys Leu Ser Glu Ile Thr Glu
 305 310 315 320

Lys Pro Pro Arg Thr Gln Lys Glu Leu Ala Tyr Leu Ser Glu Leu Pro
 325 330 335

Pro Thr Pro Leu His Val Ser Glu Asp Ser Ser Ser Pro Glu Arg Thr
 340 345 350

Ser Pro Pro Asp Ser Ser Val Ile Val Thr Leu Leu Asp Gln Ala Ala
 355 360 365

Lys Ser Asn Asp Asp Leu Asp Val Ser Glu Ser Lys Gly Cys Met Glu
 370 375 380

Glu Lys Pro Gln Glu Val Gln Thr Ser Arg Asn Val Glu Ser Ile Ala

385	390	395	400
Glu Gln Met Glu Asn Pro Asp Leu Lys Asn Val Gly Ser Ser Thr Gly	405	410	415
Glu Lys Asn Glu Arg Thr Ser Val Ala Gly Thr Val Arg Lys Cys Trp	420	425	430
Pro Asn Arg Val Ala Lys Glu Gln Ile Ser Arg Arg Leu Asp Gly Asn	435	440	445
Gln Tyr Leu Phe Leu Pro Pro Asn Arg Tyr Ile Phe His Gly Ala Glu	450	455	460
Val Tyr Ser Asp Ser Glu Asp Asp Val Leu Ser Ser Ser Ser Cys Gly	465	470	475
Ser Asn Ser Asp Ser Gly Thr Cys Gln Ser Pro Ser Leu Glu Glu Pro	485	490	495
Met Glu Asp Glu Ser Glu Ile Glu Glu Phe Tyr Asn Gly Leu Glu Asp	500	505	510
Glu Pro Asp Val Pro Glu Arg Ala Gly Gly Ala Gly Phe Gly Thr Asp	515	520	525
Gly Asp Asp Gln Glu Ala Ile Asn Glu Ala Ile Ser Val Lys Gln Glu	530	535	540

<210>	6	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	6	
	cattttccat ggcgctgagg	20
<210>	7	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工合成	
<400>	7	
	ttgcaacagc atcttgacctg	20

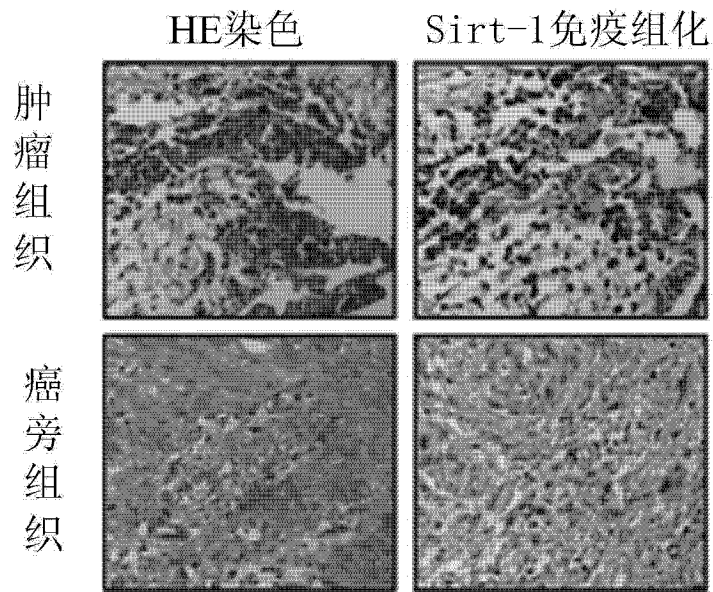


图 1

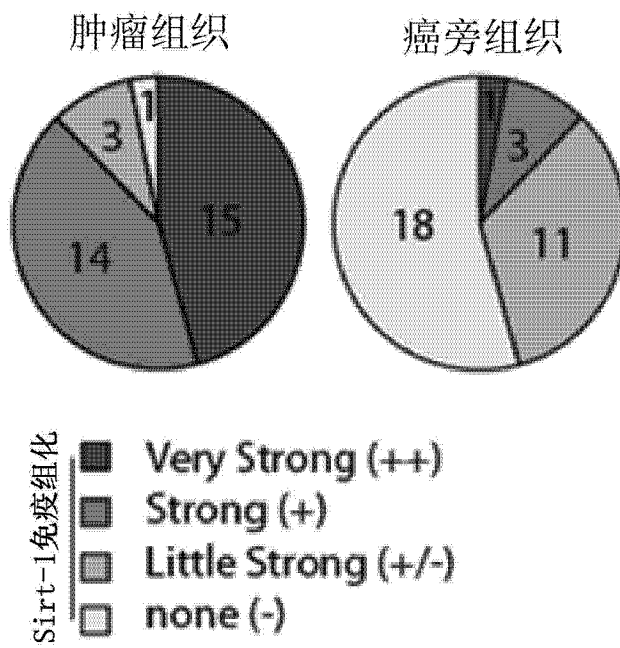


图 2

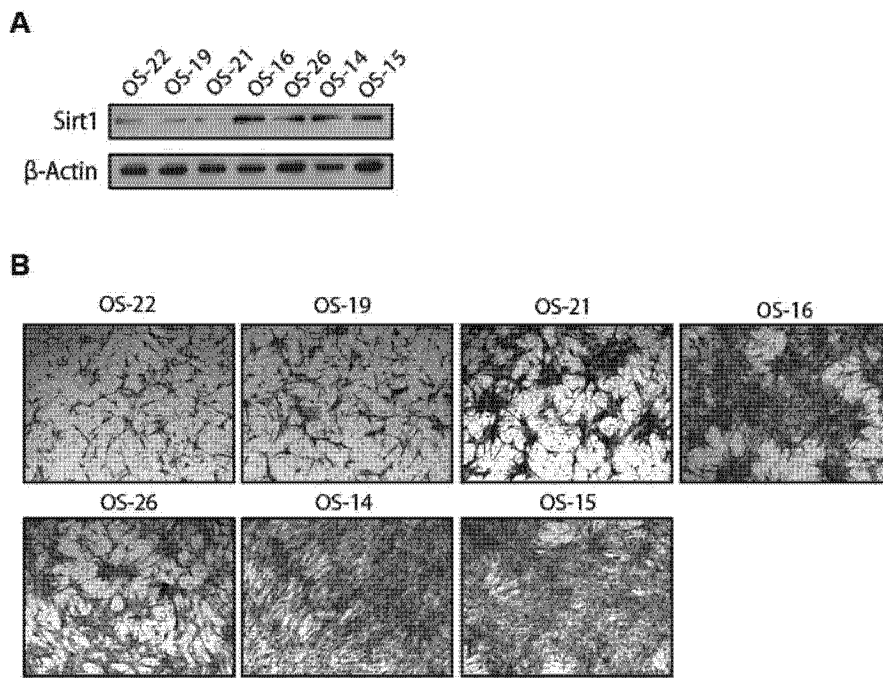


图 3

专利名称(译)	Sirt-1蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用		
公开(公告)号	CN103837679A	公开(公告)日	2014-06-04
申请号	CN201410057837.X	申请日	2014-02-20
[标]申请(专利权)人(译)	浙江大学医学院附属第二医院		
申请(专利权)人(译)	浙江大学医学院附属第二医院		
当前申请(专利权)人(译)	浙江大学医学院附属第二医院		
[标]发明人	张宁 叶招明 应美丹 曹戟 王强 刘兵		
发明人	张宁 叶招明 应美丹 曹戟 王强 刘兵		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532		
CPC分类号	G01N33/57484 G01N33/6893 G01N2800/50		
代理人(译)	杜军		
其他公开文献	CN103837679B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开Sirt-1蛋白在诊断、预测骨肉瘤转移产品的应用。该Sirt-1蛋白可作为骨肉瘤诊断的标记分子，提高骨肉瘤诊断和预测骨肉瘤转移的准确性。用免疫检测诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括：与Sirt-1蛋白特异性结合的抗体。诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品包括：用RT-PCR、实时定量PCR、免疫检测、原位杂交或基因芯片诊断骨肉瘤和预测骨肉瘤转移的产品。Sirt-1蛋白可作为诊断和预测转移的特异性标志蛋白，使骨肉瘤诊断更加准确、快速。

肿瘤组织

癌旁组织

HE染色

Sirt-1免疫组化

