



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 103837679 B

(45) 授权公告日 2016.06.08

(21) 申请号 201410057837.X

(22) 申请日 2014.02.20

(73) 专利权人 浙江大学

地址 310027 浙江省杭州市西湖区浙大路
38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 杭州求是专利事务有限公
司 33200

代理人 杜军

(51) Int. Cl.

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

(56) 对比文件

US 2009/0036375 A1, 2009.02.05,

US 2012/0070843 A1, 2012.03.22,

CN 101257897 A, 2008.09.03,

CN 102307997 A, 2012.01.04,

Yan Li et al..Resveratrol inhibits
proliferation and promotes apoptosis of
osteosarcoma cells.《European Journal of

Pharmacology》.2009, 第609卷第13-18页.

Yan Li et al..Resveratrol inhibits
proliferation and promotes apoptosis of
osteosarcoma cells.《European Journal of
Pharmacology》.2009, 第609卷第13-18页.

Yedong Cheng et al..SIRT1 inhibition
by melatonin exerts antitumor activity in
human osteosarcoma cells.《European Journal
of Pharmacology》.2013, 第715卷第219-229
页.

Strausberg, R..
AAH12499.1.《GenBank》.2003, 第1-2页.

审查员 周露露

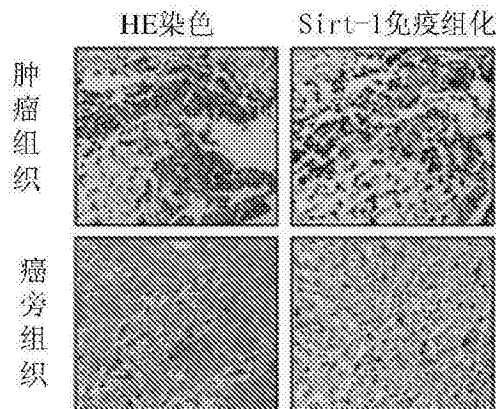
权利要求书1页 说明书3页
序列表6页 附图2页

(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.检测Sirt-1蛋白的试剂在制备诊断骨肉瘤产品或制备预测骨肉瘤转移产品中的应用。

2.如权利要求1所述的检测Sirt-1蛋白的试剂在制备诊断骨肉瘤产品或制备预测骨肉瘤转移产品中的应用,其特征在于Sirt-1蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

3.如权利要求1所述的检测Sirt-1蛋白的试剂在制备诊断骨肉瘤产品或制备预测骨肉瘤转移产品中的应用,其特征在于诊断骨肉瘤或预测骨肉瘤转移的产品用于免疫检测,并包括:与Sirt-1蛋白特异性结合的抗体。

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修饰水平的增加。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:

[0007] 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。

[0008] 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。

[0009] 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';

[0010] 反向引物:5'-CCCAAATCCAGCTCCTCCAG-3'。

[0011] 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'。

[0012] 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'。

[0013] 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'。

[0014] 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。

[0015] 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。

[0016] 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

[0017] 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；

[0018] 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；

[0019] 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

[0020] 下面结合附图和实施例对本发明作进一步详细的说明。

[0021] 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。

[0022] 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。

[0023] 实施例1：

[0024] 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)。

[0025] 实施例2:

[0026] 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)。

[0027] 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

[0028]	Sirt-1表 达	转移数/总数 (n)	转移率 (%)
	-	0/0	/
	+/-	0/2	0%
	+	2/10	20%
	++	4/10	40%

[0029] 实施例3:

[0030] 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
 465 470 475 480

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

Val Thr Asp Met Asn Tyr Pro Ser Asn Lys Ser

545	550	555	
<210> 2			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工合成			
<400> 2			
agctgatgaa ccgcttgcta			20
<210> 3			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工合成			
<400> 3			
cccaaattcca gctcctccag			20
<210> 4			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工合成			
<400> 4			
aacaggttgc gggaatccaa			20
<210> 5			
<211> 20			
<212> DNA			
<213> 人工合成			
<400> 5			
gttcatcagc tgggcaccta			20

<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 atcttgctg	20

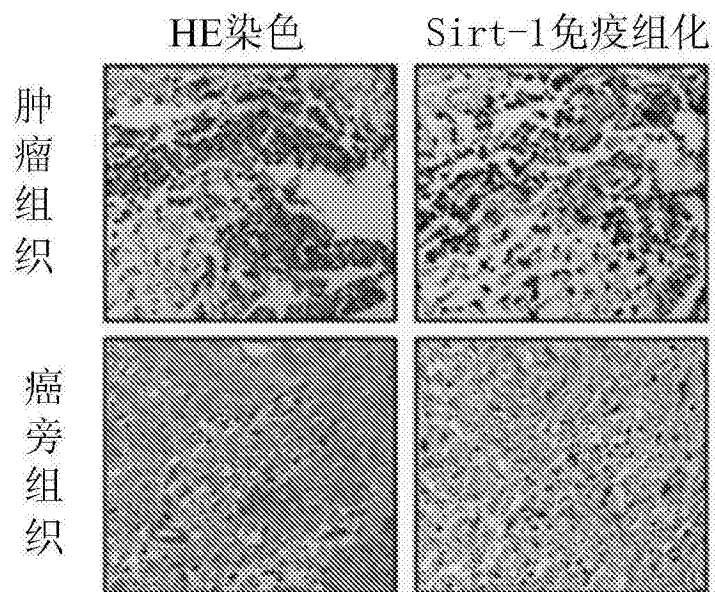


图1

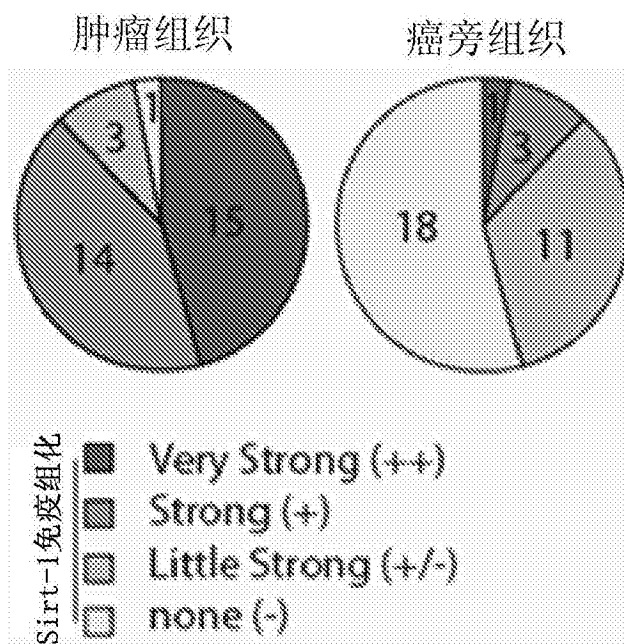


图2

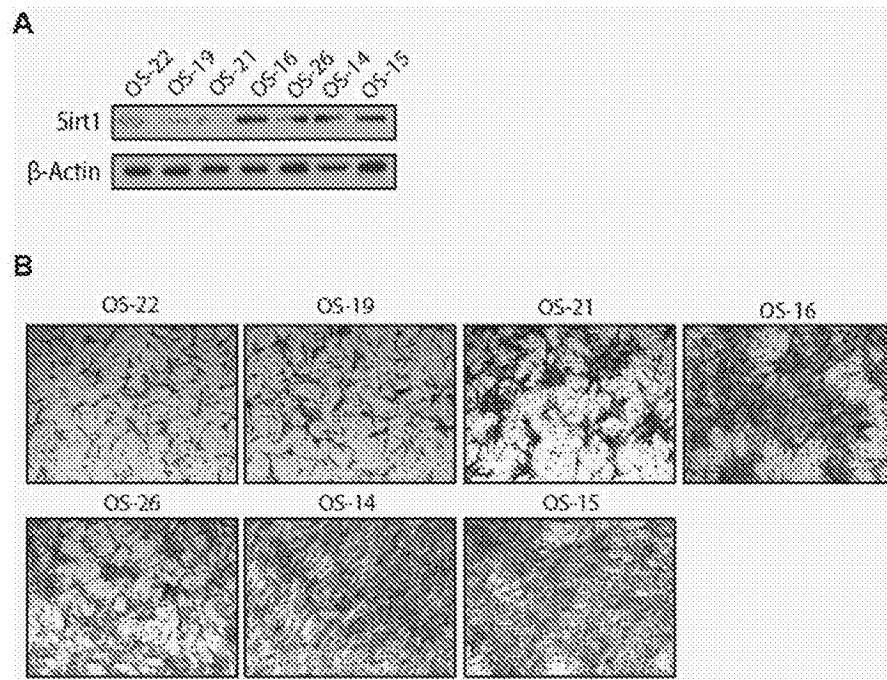


图3

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	CN103837679B	公开(公告)日	2016-06-08
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		
[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		
审查员(译)	周露露		
其他公开文献	CN103837679A		
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

