

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200780004960.3

[43] 公开日 2009年3月11日

[11] 公开号 CN 101384903A

[22] 申请日 2007.2.9

[21] 申请号 200780004960.3

[30] 优先权

[32] 2006.2.9 [33] US [31] 60/771,677

[86] 国际申请 PCT/US2007/003608 2007.2.9

[87] 国际公布 WO2007/092627 英 2007.8.16

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.7

[71] 申请人 南佛罗里达大学

地址 美国佛罗里达州

[72] 发明人 P·A·克鲁克

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所
代理人 黄革生 凌立

权利要求书4页 说明书47页 序列表15页
附图14页

[54] 发明名称

利用 BCL-2 水平的增高检测癌肿

[57] 摘要

本发明涉及通过检测受试者生物样本中的 Bcl-2 对受试者癌肿如早期或晚期卵巢癌进行诊断、预后和监测的方法，所述样本优选为尿液或血液样本。可以利用能检测或结合 Bcl-2 蛋白，或能检测或结合其编码核酸的物质测量 Bcl-2，所述物质如与 Bcl-2 蛋白或其部分特异性反应的抗体。本发明还涉及用于实施本发明方法的试剂盒。本发明还涉及快速检测体液中 Bcl-2 的装置，以及快速测量体液中 Bcl-2 的方法。

1. 检测受试者癌肿的方法，其包括检测受试者生物样本中是否存在 Bcl-2，其中 Bcl-2 水平高于预设阈值提示受试者患有癌肿。
2. 权利要求 1 的方法，其中所述检测包括检测生物样本中的 Bcl-2 蛋白。
3. 权利要求 1 的方法，其中所述检测包括检测生物样本中编码 Bcl-2 蛋白的核酸序列。
4. 权利要求 1 的方法，其中所述检测包括：
 - (a) 使生物样本与结合 Bcl-2 蛋白的结合剂接触以形成复合物；
 - (b) 检测该复合物；并将检测的复合物对应于样本中 Bcl-2 蛋白的量，其中 Bcl-2 蛋白增高提示癌肿。
5. 权利要求 1 的方法，其中生物样本为选自尿液、全血、血清、血浆、腹水及腹膜液的生物液体。
6. 权利要求 1 的方法，其中生物样本为尿液。
7. 权利要求 1 的方法，其中癌肿选自卵巢癌、原发性腹膜癌及子宫内膜癌。
8. 权利要求 1 的方法，其中癌肿为卵巢癌。
9. 权利要求 8 的方法，其中生物样本为尿液或血液，而癌肿为卵巢癌。
10. 权利要求 1 的方法，其中癌肿选自乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤、肉瘤、膀胱癌及头颈癌。
11. 权利要求 1 的方法，其中生物样本为尿液或血液，而癌肿为前列腺癌。
12. 权利要求 4 的方法，其中结合剂固化于支持物上。
13. 权利要求 4 的方法，其中结合剂为单克隆或多克隆抗体。

14. 权利要求 4 的方法，其中所述 (b) 中的检测还包括将标记与结合剂连接或掺入结合剂中。

15. 权利要求 13 的方法，其中所述 (b) 中的检测使用基于 ELISA 的免疫酶联检测。

16. 权利要求 1 的方法，其还包括在所述 Bcl-2 检测前、检测中及检测后，检测受试者同一生物样品或不同生物样品中的癌肿生物标志物。

17. 权利要求 16 的方法，其中癌肿生物标志物为妇科癌肿的生物标志物。

18. 权利要求 16 的方法，其中生物标志物为 CA125、LPA 或 OVXI。

19. 权利要求 1 的方法，其中所述受试者患有癌肿，且其中作为癌肿治疗前、治疗中或治疗后监测受试者的一部分，在若干时间点定期进行所述检测。

20. 权利要求 1 的方法，其还包括将生物样本中 Bcl-2 的水平与正常对照样本中 Bcl-2 的水平进行比较，其中生物样本中 Bcl-2 水平高于正常对照样本中的水平提示存在癌肿。

21. 权利要求 1 的方法，其中受试者在实施所述检测时并无任何癌肿症状。

22. 权利要求 1 的方法，其中受试者在实施所述检测时具有一种或多种癌肿症状。

23. 权利要求 1 的方法，其中受试者具有选自以下的一种或多种症状：盆腔痛、异常阴道出血、腹胀、持续背痛、持续胃部不适、排便或排尿习惯改变、性交疼痛、非计划的体重减轻 10 磅或以上、外阴或阴道异常、乳房改变，以及疲乏。

24. 权利要求 1 的方法，其中受试者在所述检测时血 CA125 水平增高。

25. 权利要求 1 的方法，其中受试者在所述检测时血 CA125 水平不增高。

26. 预后评估患有或疑似患有癌肿的受试者的方法，其包括 a) 确定受试者生物样本中的 Bcl-2 水平； b) 将步骤(a)中确定的水平与未患癌肿的正

常受试者生物样本中已知的 Bcl-2 范围进行比较；且 c)根据步骤(b)的比较确定受试者预后，其中步骤(a)中 Bcl-2 水平高提示进展型癌肿，因而预后较差。

27. 快速检测体液样本中 Bcl-2 的装置，其包括接受体液样本的加样区；含有与样本中 Bcl-2 结合的结合剂的标记区；以及结合 Bcl-2 的结合剂滞留并发出信号的检测区，其中 Bcl-2 水平低于阈值浓度的受试者样本发出的信号与 Bcl-2 水平高于阈值浓度的受试者样本发出的信号不同。

28. 权利要求 27 的装置，其中体液为尿液且所述阈值浓度为 0ng/ml 至 2.0ng/ml。

29. 权利要求 27 的装置，其中体液为尿液且所述阈值浓度为 1.8ng/ml。

30. 权利要求 27 的装置，其中所述装置含有参照区，所述参照区发出的信号强度与 Bcl-2 水平等于阈值浓度的受试者样本在检测区发出的信号强度相同。

31. 权利要求 27 的装置，其中结合剂为标志的抗体。

32. 权利要求 31 的装置，其中抗体为胶体金标志。

33. 权利要求 27 的装置，其中检测区包括固化的抗 Bcl-2 抗体。

34. 权利要求 27 的装置，其中装置在检测区下游含有控制区，所述控制区滞留通过检测区的结合剂。

35. 权利要求 27 的装置，其中控制区与参照区为相同区域。

36. 权利要求 27 的装置，其中结合剂为标志的单克隆抗体。

37. 测量体液中 Bcl-2 的方法，其包括：(a)获取受试者的体液样本；(b)将样本与结合样本中任意 Bcl-2 的结合剂接触；(c)分离结合了 Bcl-2 的结合剂；(d)检测(c)中分离的结合剂携带的信号；以及(e)将步骤(d)检测的信号与参照信号进行比较，所述参照信号为 Bcl-2 水平等于阈值浓度的受试者样本所发出的信号。

38. 权利要求 37 的方法，其中体液为尿液且所述阈值浓度为 0ng/ml 至 2.0ng/ml。

39. 权利要求 37 的方法，其中体液为尿液且所述阈值浓度为 1.8ng/ml。

40. 检测生物样本中癌肿的试剂盒，其包括 Bcl-2 特异性结合剂，以及利用结合剂检测生物液体中癌肿的印刷说明书。

41. 权利要求 40 的试剂盒，其还包括一种或多种用于生物样本的蛋白酶抑制剂。

利用 BCL-2 水平的增高检测癌肿

相关申请的交互引用

本申请要求 2006 年 2 月 9 日提交的美国临时申请系列号 60/771,677 的优先权,所述申请的全文均在本文引用作为参考,包括其中任意图、表、核酸序列、氨基酸序列以及附图。

技术背景

癌肿标志物是癌肿(cancer)出现时可在体内发现的物质(通常为血液或尿液中)。它们可能是癌肿细胞自身的产物,也可能是机体对癌肿或其他病症的应答产物。由于若干原因,通常癌肿标志物本身不足以诊断(或除外)某一特定类型的癌肿。大部分癌肿标志物既可由正常细胞产生,也可由癌肿细胞产生,即便前者产量较小。有时非癌性疾病也会导致某些癌肿标志物水平高于正常。因此,仅有一小部分癌肿标志物为大多数医生所常用。当医生确实关注某一癌肿标志物水平时,他或她通常会同时考虑患者的病史和体格检查,及其他实验室测试或影像学测试的结果。

筛查是指在没有相应疾病症状的个体中检查癌肿,而早期诊断是指在疾病的早期阶段发现癌肿,此时癌肿已发生扩散的可能性较小(或能有效治疗的可能性更大)。虽然起初研究和发展癌肿标记物时为了在无症状人群中发现癌肿,但很少有癌肿标记物能真正有助于这一需求。

卵巢癌是病死率最高的妇科癌肿。缺乏早期症状和检测卵巢癌的可靠筛查测试,使得 70%以上诊断为该病的女性都发生了卵巢外转移,从而导致预后较差,每年约有 12,000 人死于卵巢癌(5 年生存率仅为 37%)。目前,由医师进行的物理盆腔检查、超声波或测量血 CA125 水平,是仅有的检测卵巢癌的标准方法。然而,这些方法都不能提供可靠一致及准确的卵巢癌检测方法。例如,虽然 80%以上的卵巢癌女性血 CA125 水平都会增

高，血 CA125 水平用于检测早期疾病的准确性仅为约 50%。迫切需求发展另一种能够可靠准确检测所有卵巢癌的新测试方法。因此，需要技术来克服目前可靠、准确、安全且成本有效的卵巢癌检测方法的缺乏。此外，需要能够准确检测所有卵巢癌（其中很多目前未被检测），并在卵巢癌病程中监测疾病负担的技术。

用于诊断卵巢癌的准确、安全、简便且可靠的测试，将惠及美国及世界范围内的所有女性，包括医疗服务不足的地区，特别是卵巢癌发生风险高的女性人群。考虑到美国每年约有 25,000 女性被诊断为卵巢癌，在疾病早期和晚期均可检测的卵巢癌生物标志物不仅能证实卵巢癌的诊断，而且也可能检测出数以千计的以往未被诊断的卵巢癌。在疾病尚局限于卵巢时早期检测卵巢癌尤其重要，而目前卵巢癌诊断中早期检测还不到 10%。在这些情况下，手术切除患侧卵巢可提高患者存活率至 90% 以上，且预计可降低医疗花费。在每一患者病程中对其卵巢癌进行准确检测和监测的能力，不仅有助于初始卵巢癌诊断，也能预测疗效和/或疾病复发。例如，发展市售的、FDA 批准的基于 ELISA 的测试，可以成为卵巢癌临床诊断的金标准。

凋亡是正常发展和维护组织稳态的关键生物过程，但它也参与很多病理过程包括组织损伤、退行性疾病、免疫疾病和癌肿（Lowe, S. W. 和 Lin, A. W. *Carcinogenesis*, 2000, 21:485-495）。不论是由结合膜的死亡受体活化（Ashkenazi, A. 等人 *J. Clin. Invest.*, 1999, 104:155-162; Walczak, H. Krammer, P.H. *Exp. Cell Res*, 2000, 256:58-66），还是由应激诱导的线粒体破坏(mitochondrial perturbation)及随后的细胞色素 c 释放（Loeffler, M. 和 Kroemer, G. *Exp. Cell Res.*, 2000, 256:19-26; Wernig, F. 和 Xu, Q. *Prog. Biophys. Mol. Biol.*, 2002, 78:105-137; Takano, T. 等人. *Antiox. Redox. Signal*, 2002, 4:533-541），下游级联反应的活化通过破坏细胞骨架、关闭 DNA 复制和修复、降解染色体 DNA 并最终将细胞分解为凋亡小体，导致细胞损伤逐步发生（Nagata, S. *Exp. Cell Res.*, 2000, 256:12-18）。凋亡的核心调节物包括 bcl-2 蛋白家族的成员（Farrow, S.N. 和 Brown, R. *Curr. Opin.*

Gen. Dev., 1996, 6:45-49)。

bcl-2 蛋白家族包括作用于凋亡级联反应不同水平以对凋亡加以调节的促-和抗-凋亡蛋白家族成员。bcl-2 家族成员含有至少一个 Bcl-2-同源(BH)结构域 (Farrow, S.N.和 Brown, R. Curr. Opin. Gen. Dev., 1996, 6:45-49)。虽然所有 bcl-2 家族成员都具有膜通道形成活性, Bcl-2 (原始 bcl-2 家族成员)通道为阳离子 (Ca^{++}) 选择性, 且由于其专有的 ER 和线粒体膜位置 (Thomenius, M.J.和 Distelhorst, CW.J. Cell Sci., 2003, 116:4493-4499), Bcl-2 的抗凋亡功能至少部分是由其阻断钙离子从 ER 释放的能力所介导, 进而防止了线粒体膜的破坏和细胞色素 c 的释放。由于 Bcl-2 在包括卵巢癌在内的多种类型肿瘤中均过量表达 (Sharma, H.等人. Head Neck, 2004, 26:733-740; Hanaoka, T.等人. Intl. J. Clin. Oncol, 2002, 7:152-158; Trisciuoglio, D.等人. J. Cell Physiol, 2005, 205:414-421; Khalifeh, I.等人. Int. J. Gynecol. Pathol, 2004, 23:162-169; O'Neill, CJ 等人 Am. J. Surg. Pathol, 2005, 29:1034-1041), 它稳定了凋亡攻击中的线粒体膜, 从而有助于化学抗性的产生。目前, 临床前研究集中研发抑制 Bcl-2 的物质, 包括反义寡核苷酸如 G3、139 (Ackermann, EJ.等人 J. Biol. Chem., 1999, 274:11245-11252), 以及 Bcl-2 的小分子抑制物 (Lickliter, J.D.等人 Leukemia, 2003, 17:2074-2080)。尽管此类研究将 Bcl-2 作为治疗干预的靶位, 文献中尚无有关尿 Bcl-2 定量的报道。

拥有能对癌肿如卵巢癌提供安全、灵敏、特异及经济的检测方法的可用检测非常有利, 将惠及整个社会。

发明概述

本发明涉及癌肿筛查。Bcl-2 是癌肿如生殖系统癌肿预后、诊断和监测用生物标志物。例如, Bcl-2 可用于诊断和监测早期及晚期卵巢癌。Bcl-2 可用作手术前及复发后癌肿的生物标志物。Bcl-2 以及与 Bcl-2 多核苷酸或多肽结合的物质, 可用于检测和监测卵巢癌, 及其他生殖系统或非生殖系统癌肿。

因此,更具体而言,本发明涉及通过筛查生物样本中 Bcl-2 水平的增高来检测癌肿,所述生物样本如尿液、血液(例如全血、血清或血浆)和腹水。在一个实施方案中,癌肿为卵巢癌。在另一实施方案中,癌肿为选自乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤、肉瘤、膀胱癌及头颈癌的类型。任选本方法还包括确认受试者确实患有所检测癌肿(例如评估存在的一种或多种癌肿症状、检测其他癌肿标志物、通过影像学设备如 X 光、CT、核成像(PET 和 SPECT)、超声波、MRI 等检测癌肿存在),和/或治疗受试者中所检测到的癌肿(例如通过手术、化疗,和/或放射疗法)。

本发明也涉及实施本发明方法的试剂盒。

本发明的另一方面涉及在体液如血液或尿液中快速检测 Bcl-2 的装置。优选该装置为侧流装置。在某一实施方案中,该装置包括接受体液如血液或尿液样本的加样区;含有与样本中 Bcl-2 结合的结合剂的标记区;以及结合 Bcl-2 的结合剂滞留并发出信号的检测区,其中 Bcl-2 水平低于阈值浓度的受试者样本发出的信号,与 Bcl-2 水平等于或高于阈值浓度的受试者样本发出的信号不同。

本发明的另一方面涉及简便、迅速、可靠、准确且成本有效的检测体液(如血液或尿液)中 Bcl-2 的测试,类似于现有的家用受孕测试,可在家中、医生办公室或患者床旁使用。

在某一实施方案中,该测试为测量体液 Bcl-2 的方法,其包括:(a)获取受试者体液样本,如血液或尿液;(b)将样本与能结合样本中任意 Bcl-2 的结合剂接触;(c)分离结合 Bcl-2 的结合剂;(d)检测从(c)中分离的结合剂中携带的信号;以及(e)将步骤(d)检测的信号与参照信号进行比较,所述参照信号为 Bcl-2 水平等于阈值浓度的受试者样本所发出的信号。在某一实施方案中,体液为尿液,而阈值浓度介于 0ng/ml 和 2.0ng/ml 间。在另一实施方案中,体液为尿液,而阈值浓度为 1.8ng/ml。

为评估尿 Bcl-2 水平能否用于检测卵巢癌,收集正常健康志愿者及卵巢癌患者的尿液,并用 ELISA 测量其 Bcl-2。癌肿患者尿中 Bcl-2 的平均

含量通常至少为健康对照者的 10 倍。此外，采自 35 名患有良性妇科疾病（包括畸胎瘤、卵巢囊肿、平滑肌瘤、多囊卵巢疾病、腺纤维瘤或囊腺瘤）女性的尿样中无一 Bcl-2 水平高于正常健康志愿者。外科切除术后卵巢癌患者尿 Bcl-2 水平下降多达 100%。尿 Bcl-2 升高与卵巢癌相关的敏感性和特异性几乎均为 100%，而血 CA125 水平 >35U/ml 仅能鉴别出 68% 的卵巢癌患者。对临床参数的比较提示，尿 Bcl-2 水平与肿瘤的分期和分级间相关性良好。然而，尿 Bcl-2 水平与患者年龄或肿瘤大小并不相关。因此，通过基于 ELISA 的检测定量尿 Bcl-2，提供了一种安全、灵敏、特异且经济的用于检测卵巢癌、全病程监测卵巢癌，并预测治疗和预后结局的方法。

附图简述

图 1 为描述尿 Bcl-2 水平的柱状图。卵巢癌患者尿 Bcl-2 水平高于正常健康志愿者。收集正常健康志愿者、卵巢癌（包括浆液性癌和粘液性癌组织学亚型）患者以及腹膜癌患者的尿样。进一步将浆液性卵巢癌再分为 1 期（浆液癌分组左侧的前三个柱形）、2 期（浆液癌分组中其后八个柱形（即浆液癌组中左起 4-11 柱形）以及 3 期（浆液癌分组右侧部分的十一个柱形（即浆液癌组中左起 12-22 柱形）。利用 ELISA 检测尿 Bcl-2 三次（ELISA 试剂盒，获自 Bender MedSystems，目录号 BMS244/3），其结果以均值 ng/ml Bcl-2 \pm S.E 表示。数据提示，癌肿患者尿 Bcl-2 水平持续升高。Student t 检验分析显示，正常样本和癌肿样本中存在统计学差异， $p < 0.00001$ 。

图 2 为描述正常人和癌肿患者尿 Bcl-2 水平的柱形图。再次收集正常健康志愿者、卵巢癌（包括子宫内膜样癌、浆液性癌和粘液性癌组织学亚型）患者以及腹膜癌患者的尿样。进一步将浆液性卵巢癌再分为 1 期（浆液癌组中最左侧 7 个柱形）、2 期（浆液癌组中左起 8-17 柱形）以及 3 期（浆液癌组中最右侧 12 个柱形）。利用 ELISA 检测尿 Bcl-2 三次（ELISA 试剂盒，获自 Bender Med Systems），结果以均值 ng/ml Bcl-2 表示，并代表了目前为止测试的所有正常及手术前癌肿样本。与图 1 一致，数据提示癌肿患者尿 Bcl-2 水平持续升高。Student t 检验分析显示正常样本和癌肿

样本中存在统计学差异, $p < 0.00001$ 。

图 3A 和 3B 为柱状图, 显示尿 Bcl-2 与肿瘤分期和分级分别相关。绘制所有可得的卵巢癌亚型(浆液性、子宫内膜样、粘液性)中尿 Bcl-2 水平对肿瘤分期的分布图。I、II、III 及 V 期以罗马数字表示, 分组情况示于其下。图 3A 说明疾病分别局限于卵巢和腹膜腔的 I 和 II 期癌肿患者尿 Bcl-2 水平最低(均值 ng/ml Bcl-2=2.2), 尽管其仍显著高于正常对照。疾病扩散至卵巢外的 III 期和疾病复发的 V 期中尿 Bcl-2 水平最高(均值 ng/ml Bcl-2=4.22)。

图 4A 和 4B 为一组柱状图, 显示尿 Bcl-2 (图 4A) 与检测血浆 CA125 水平(图 4B)相比检测卵巢癌的能力。将前图 1-3 所示的尿 Bcl-2 水平尽可能与来自同一正常健康志愿者和癌肿患者的血浆 CA125 水平进行比较。其中癌肿患者包括患粘液性卵巢癌(Muc)、原发腹膜癌(PP)以及浆液性卵巢癌(Serous)的患者。ELISA 检测 CA125 水平三次(试剂盒来自 Bio-Quant, San Diego, CA, 目录号 BQ 1013T)。数据表示为均值 ng/ml Bcl-2(A)和均值 U/ml CA125 (图 4B)。提高的尿 Bcl-2 水平检测卵巢癌的敏感性和特异性几乎均为 100%。与之相对, 目前用于卵巢癌检测标准的血 CA125 水平 $> 35 \text{U/ml}$, 仅能正确鉴别出 68% 的卵巢癌患者。

图 5 为柱状图, 显示尿 Bcl-2 水平与患者年龄无关。为检查癌肿患者尿中 Bcl-2 水平增高是否与患者年龄相关, 比较尿 Bcl-2 水平(如前表 1-3 和 4A-4B 所确定)与患者年龄。尽管本研究中正常健康志愿者的平均年龄(54.8 岁)略低于癌肿患者(66.2 岁), 由于年龄跨度较大(见图 5 插页), 两组年龄间并不存在统计学差异。此外, 癌肿患者的平均年龄与文献和临床数据一致, 提示卵巢癌通常多发于围绝经期和绝经后女性。然而, 在尿 Bcl-2 水平和患者年龄间似乎并不存在相关性。

图 6 为柱状图, 显示尿 Bcl-2 与卵巢肿瘤大小不相关。为检查癌肿患者尿 Bcl-2 水平增高是否与肿瘤大小相关, 比较尿 Bcl-2 水平(如前表 1-3 和 4A-4B 所确定)与肿瘤大小。肿瘤分为: I=微型肿瘤; 3=小于 3cm 的肿瘤; 6=介于 3 和 6cm 间的肿瘤; 10=大于 6cm 上至 10cm 的肿瘤; II=大于

10cm 的肿瘤。数据提示尿 Bcl-2 水平和肿瘤大小间似乎并不存在相关性。

图 7A 和 7B 为一组柱状图，显示卵巢癌外科切除术后尿 Bcl-2 下降。为进一步测试尿 Bcl-2 检测卵巢癌的准确性，比较可获得的卵巢癌患者在初次切除手术前（黑色柱）和首次切除术（去除所有可见肿瘤）后 2 周内（灰色柱）尿 Bcl-2 水平（图 7A）。对于收集术前术后尿样的 7 名患者而言，初次手术切除肿瘤后 Bcl-2 水平的下降多达 100%。因而，这些数据提示，肿瘤是卵巢癌患者尿中 Bcl-2 增高的来源，而尿 Bcl-2 水平与卵巢癌平行存在。此外，收集了图 7A 中 7 名患者中 5 人的后续临床随访尿样并测量其中的 Bcl-2（蓝色柱），随访时间为初次手术后 7 至 11 个月不等（图 7B）。在 3 名随访患者中尿 Bcl-2 仍保持较低水平（#41、43、54），而 2 名患者出现升高（#5、27）。初步的病历回顾（chart review）提示#41、43、54 患者在随访当时正在接受化疗，其卵巢癌疾病得到控制。与之相反，病历回顾提示#5、27 患者疾病出现复发（5B、27B），而患者#27b 接受了二次肿瘤切除术。与临床信息一致，接受化疗且无明显或很少残留疾病的患者中尿 Bcl-2 水平持续较低（#41、43、54）。与之相似，尿 Bcl-2 水平的增高与疾病的复发（#5b、27B）相关，且随再次切除术而降低（#27c）。

图 8A 和 8B 显示了良性妇科疾病患者中 Bcl-2 测试的结果。利用 ELISA 法检查良性妇科疾病患者尿样中的 Bcl-2。样本检查重复三次，数据以均值 $\text{ng/ml Bcl-2} \pm \text{S.E}$ 表示（图 8A）。根据类型（良性囊性畸胎瘤、单纯囊肿、平滑肌瘤、多囊卵巢、腺纤维瘤、粘液性和浆液性囊腺瘤）划分良性妇科疾病样本，以卵巢癌患者样本#41（白色柱）作为内部正对照。良性疾病的平均尿 $\text{Bcl-2 ng/ml} \pm \text{S.E}$ 显示于其相应标题下。重新绘制图 2 和图 3A 中样品，以显示该研究组（ $n=92$ ）中 Bcl-2 的表达，如图 8B 所示。良性疾病患者、癌肿患者及正常人的 Bcl-2 水平分别为 0.115-1.016ng/ml、1.12-9.8ng/ml 及 0-1.26 ng/ml，其均值分别为 0.614ng/ml、3.4ng/ml 及 0.21ng/ml。

图 9 为柱状图，显示 Bcl-2 可被分泌至细胞培养条件培养基内。收集建立的卵巢癌（OV2008、SKOV3、PA1）、宫颈癌（Hela）、前列腺癌（LNCap、

DU145、PC-3)、头颈癌(HN5a)及淋巴瘤(Raji)癌肿细胞系的条件培养基(CM),并用ELISA检查其中的Bcl-2。数据以三份样本的均值表示。在卵巢癌、宫颈癌及前列腺癌细胞培养CM中存在Bcl-2,提示这些癌肿细胞产生并分泌Bcl-2。

图10显示在某些癌肿细胞内Bcl-2过量表达。对建立的卵巢癌(SW626、C13)、头颈癌(HN5a)、宫颈癌(Hela)及前列腺癌(DU145)的癌肿细胞系细胞的细胞溶胞产物进行Bcl-2的western免疫印迹。以肌动蛋白作为加样对照,以FHIOSEI18细胞(SV-40大T抗原转染人卵巢表面上皮细胞)作为正常非恶性卵巢表面上皮对照细胞。根据密度分析,将Bcl-2水平对肌动蛋白归一化,标注在图像下面。正常细胞几乎不含bcl-2,而卵巢癌和宫颈癌细胞Bcl-2的含量最高。

图11显示保存后Bcl-2蛋白浓度。作为该研究的一部分,起初测试正常健康个体(#506、508)和卵巢癌患者(#77、97)尿样中的Bcl-2(对照),并在室温(25℃)、冰箱(4℃)、-20℃冰箱(-20℃)或-80℃冰箱(-80℃)中保存4天后再次测试。使用ELISA试剂盒(BenderMed Systems)测试所有样本尿Bcl-2水平两次。

图12显示了溶血磷脂酸(LPA)治疗后,癌肿细胞系的条件培养基(CM)中Bcl-2蛋白的浓度,包括前列腺癌细胞系DU145。数据表明,LPA治疗通常以自分泌循环的形式反馈至癌肿细胞,刺激某些类型的癌肿细胞向CM中分泌Bcl-2。由于这些癌肿细胞系与卵巢癌细胞系一样向其CM中分泌Bcl-2,体内这些细胞系的癌肿对应物会向生物液体中分泌Bcl-2,如尿液和/或血液,从而可能被本发明所检测。

序列简述

SEQ ID NO:1 为人 Bcl-2 DNA (GenBank 登录号 M14745); 编码区 (CDS): 第 32-751 位碱基。

SEQ ID NO:2 为人 Bcl-2 蛋白 (GenBank 登录号 AAA35591)。

SEQ ID NO:3 为人 Bcl-2 DNA, 转录变体 α (GenBank 登录号

NM_000633); CDS: 第 494-1213 位碱基。

SEQ ID NO:4 为人 Bcl-2 蛋白, 转录变体 α (GenBank 登录号 NP_000624)。

SEQ ID NO:5 为人 Bcl-2 DNA, 转录变体 β (GenBank 登录号 NM_000657); CDS: 第 494-1111 位碱基。

SEQ ID NO:6 为人 Bcl-2 蛋白, 转录变体 β (GenBank 登录号 NP_000648)。

发明详述

Bcl-2 是癌肿如卵巢癌的有效分子标志物。癌肿标志物(也称为肿瘤标志物)为体内出现的与癌肿相关的分子, 如激素、酶及免疫球蛋白, 对其测量或鉴定有助于患者的诊断或临床管理。它们可能为癌肿细胞自身产物, 或者为机体应答癌肿或其他病症的产物。大部分癌肿标志物为蛋白质。某些癌肿标志物仅见于一种类型的癌肿, 而另一些则可见于数种类型的癌肿。如同其他癌肿标志物一样, Bcl-2 可有多种用途, 如: 筛查健康人群或高风险人群中癌肿的发生; 诊断癌肿或某一特定类型的癌肿如卵巢癌; 确定受试者的预后; 并监测受试者消退期或接受手术、放疗、化疗或其他癌肿治疗时的病程进展。

为评估尿 Bcl-2 水平是否可用于检测卵巢癌, 收集正常健康志愿者 (N=21) 和卵巢癌患者 (N=34) 和原发性腹膜癌患者 (N=2) 的尿液, 并根据生产商说明、利用市售 ELISA 试剂盒 (BenderMedSystems, 目录号 BMS244/3) 重复三次检测其 Bcl-2。结果以均值 ng/ml Bcl-2 \pm S.E. 表示。健康志愿者尿中 Bcl-2 的平均量为 0.204ng/ml, 而术前癌肿患者尿中平均量为 3.12 ng/ml, 通常为正常对照者的至少 10 倍。Student t 检验分析显示, 正常和癌症样本之间存在统计学差异, $p < 0.00001$ 。对临床参数的比较提示, 尿 Bcl-2 水平与肿瘤分期和分级的相关性良好 (图 3A 和 3B)。

根据生产商说明、利用市售 ELISA 试剂盒 (Bio-Quant, 目录号 BQ1013T) 重复三次检测某些上述相同受试者的血浆样本中 CA125 水平。

尿 Bcl-2 升高检测卵巢癌的敏感性和特异性几乎均为 100%，而目前用于卵巢癌检测标准的血 CA125 水平 >35U/ml，仅能正确鉴别出 68% 的卵巢癌患者。

为进一步测试尿 Bcl-2 水平检测卵巢癌的准确性，比较可获得的卵巢癌患者在初次切除手术前和首次切除术（去除所有可见肿瘤）后 2 周内尿 Bcl-2 水平。对于收集术前术后尿样的 7 名患者而言，初次手术切除肿瘤后 Bcl-2 水平的下降多达 100%。因而，这些数据提示，癌肿是卵巢癌患者尿中 Bcl-2 增高的来源。此外，收集了 7 名患者中 5 人的后续临床随访尿样并测量其中的 Bcl-2，随访时间为初次手术后 7 至 11 个月不等。在 3 名随访患者中尿 Bcl-2 仍保持较低水平（#41、43、54），而 2 名患者出现升高（#5、27）。初步的病历回顾提示#41、43 及 54 患者在随访当时正在接受化疗，其卵巢癌疾病得到控制。与之相反，病历回顾提示#5、27 患者疾病出现复发，而#27 患者接受了二次肿瘤切除术。与临床信息一致，接受化疗且无明显或很少残留疾病的患者中尿 Bcl-2 水平持续较低（#41、43、54）。与之相似，尿 Bcl-2 水平的增高与疾病的复发（#5、27）相关，且随再次切除术而降低（#27c）。

总之，这些数据说明利用基于 ELISA 的测定对尿 Bcl-2 进行定量，提供了检测卵巢癌的安全、灵敏、特异且经济的新方法。此外，尿 Bcl-2 水平可用于监测整个病程中卵巢癌的存在，可用于预测治疗和预后结局。

本发明的一个方面包括检测受试者癌肿的方法，其包括检测受试者生物样本中的 Bcl-2 的存在，所述生物样本例如尿液、血液、腹膜液或腹水，其中 Bcl-2 水平高于预设阈值提示受试者患有癌肿。优选该检测并非通过狭线印迹测定实施（如可自 BioRad 购买）。

使用本发明的方法、装置及试剂盒进行检测和/或监测的癌肿，包括但不限于乳腺癌（例如浸润性（浸润性）、浸润前、炎性、Paget's 病、转移或复发）；胃肠道/消化系统癌肿（例如阑尾、胆管、结肠、食道、胆囊、胃、小肠、肝、胰腺、直肠和胃）；生殖泌尿系统癌肿（例如肾上腺、膀胱、肾、阴茎、前列腺、睾丸和泌尿道）；妇科癌肿（例如宫颈、子宫内膜、输

卵管、卵巢、子宫、阴道及外阴); 头颈癌(例如眼、头颈、下颌、喉、鼻腔、口腔癌、咽、唾液腺、鼻窦、喉咙、甲状腺、舌及扁桃体); 造血/血癌(例如 Hodgkin's 病、白血病(急性淋巴细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性髓系白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓系白血病)、多发性骨髓瘤、淋巴瘤及淋巴结); 骨骼肌肉/软组织癌肿(例如骨、骨肉瘤、黑素瘤、皮肤(基底细胞、鳞状细胞)、肉瘤(Ewing's 肉瘤、Kaposi 肉瘤)); 神经系统癌肿(例如脑(星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、胶质细胞瘤)、垂体、脊髓); 以及呼吸系统/肺部癌肿(例如肺(腺癌、燕麦细胞、非小细胞、小细胞、鳞状细胞)以及间皮瘤)。在某一实施方案中, 癌肿为卵巢癌。在另一实施方案中, 癌肿为选自乳腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌、肺癌、结肠癌、前列腺癌、黑素瘤、胶质母细胞瘤、肉瘤、膀胱癌及头颈癌的类型。

在本发明方法的某一实施方案中, 检测包括: (a) 使生物样本与结合 Bcl-2 蛋白的结合剂接触以形成复合物; 以及 (b) 检测复合物; 并将检测复合物对应于样本中 Bcl-2 蛋白的量, 其中 Bcl-2 蛋白增高提示癌肿。在特定实施方案中, (b) 的检测还包括向试剂中连接或掺入标记, 或使用基于 ELISA 的酶联免疫检测。

任选本发明的方法还包括在所述 Bcl-2 检测前、检测中及检测后, 检测受试者同一生物样品或不同生物样品中的癌肿生物标志物。在某一实施方案中, 癌肿生物标志物为生殖系统癌肿的生物标志物, 例如妇科癌肿。在另一实施方案中, 生物标志物为 CA125 或 OVXI。在实施 Bcl-2 检测的同时, 受试者血中 CA125 水平可能增高, 也可能并不增高。

在某些实施方案中, 受试者患有癌肿如卵巢癌, 且为癌肿治疗前、治疗中或治疗后监测受试者的一部分, 在若干时间点定期进行检测。

任选本发明的方法还包括将生物样本中 Bcl-2 的水平与正常对照样本中 Bcl-2 水平进行比较, 其中生物样本中 Bcl-2 水平高于正常对照样本水平提示存在癌肿如卵巢癌。

在某些实施方案中, 受试者在实施 Bcl-2 检测时并无任何癌肿症状。在另一些实施方案中, 受试者在实施 Bcl-2 检测时具有一种或多种癌肿表

现。例如，就妇科癌肿而言（例如卵巢癌），妇科癌肿的一种或多种症状包括盆腔痛、异常阴道出血、腹胀（abdominal swelling or bloating）、持续背痛、持续胃部不适、排便或排尿习惯改变（如便秘、腹泻、血便、排气、稀便、尿频或尿急、便秘）、性交疼痛、非计划的体重减轻 10 磅或以上、外阴或阴道异常（例如水疱、肤色改变或出现分泌物）、乳房改变（如肿块、疼痛、乳头分泌物、下陷、红或肿），以及疲乏。

在另一实施方案中，本发明包括评估患有或疑似患有癌肿的受试者预后的方法，其包括：a)确定受试者生物样本如尿液、血液或腹水内的 Bcl-2 水平；b)将步骤(a)中确定的水平与未患癌肿的正常受试者生物样本中已知的 Bcl-2 范围进行比较；且 c)根据步骤(b)的比较确定受试者预后，其中步骤(a)中 Bcl-2 水平高提示进展型癌肿（aggressive form of cancer），因而预后较差。

术语“检测”包括测定或确定是否存在目标 Bcl-2（Bcl-2 编码核酸序列或 Bcl-2 基因产物（多肽））、其亚基或试剂结合目标组合物等，或测定、查问、确认、建立或确定妇科癌肿、转移、分期或其他类似病症的一个或几个事实特征。该术语包括 Bcl-2 及其他癌肿标志物在诊断、预后及监测中的应用。该术语包括定量、半定量及定性检测方法。在涉及 Bcl-2 蛋白（相对于编码 Bcl-2 蛋白的核酸分子而言）检测的本发明实施方案中，检测方法优选为基于 ELISA 的方法。优选在本发明的多种实施方案中，该检测方法提供了有关受试者样本中 Bcl-2 存在与否及其量的信息输出（即读数或信号）。例如，该输出可为定性（例如“阳性”或“阴性”），或定量的（例如用每毫升纳克表示的浓度）。

在某一实施方案中，本发明涉及通过定量受试者生物样本如尿中 Bcl-2 蛋白或其编码核酸（DNA 或 RNA），从而检测受试者癌肿的方法，其包括，(a)使该生物样本与直接或间接标记有可检测物质的 Bcl-2 特异性抗体接触（反应）；以及(b)检测该可检测物质。

在某一实施方案中，本发明涉及通过定量受试者生物样本如尿液或血液中 Bcl-2，从而诊断和/或监测受试者癌肿的方法，其包括(a)使该生物样

本与直接或间接标记有可检测物质的 Bcl-2 特异性抗体反应；以及(b)检测该可检测物质。

本发明方法的实施方案包括(a)使受试者生物样本与直接或间接酶标记的 Bcl-2 特异性抗体接触；(b)加入该酶的底物，其中所选择的底物能使底物或酶和底物的反应产物形成荧光复合物；(c)通过测量荧光复合物的荧光，定量样本中的 Bcl-2；以及(d)将该定量水平与标准进行比较。

优选的本发明实施方案包括以下步骤：

(a) 将生物样本与直接或间接标记有可检测物质的 Bcl-2 特异性第一抗体，以及 Bcl-2 特异的固化第二抗体孵育；

(b) 将第一抗体与第二抗体分开，提供第一抗体相和第二抗体相；

(c) 检测第一或第二抗体相中可检测的物质，从而定量该生物样本中的 Bcl-2；并

(d) 将定量的 Bcl-2 与标准进行比较。

本发明方法中所用的标准是指，健康对照受试者、良性疾病患者（例如良性妇科疾病）、早期妇科癌肿患者样本或受试者的其他样本的 Bcl-2 水平。Bcl-2 水平相对于标准增高可能提示癌肿，如早期或晚期卵巢癌。

本发明也涉及将本文所述的方法、装置及试剂盒与一种或多种其他癌肿标志物（生物标志物）联合使用。因此，本发明涉及分析生物样本中是否存在 Bcl-2、并分析同一样本或同一受试者另一生物样本中其他特异性提示癌肿的标志物的方法。可于实施 Bcl-2 检测前、检测中和/或检测后检测该一种或多种其他标志物。标志物的实例包括 CA125、LPA 及 OVX1。在优选实施方案中，标志物为 Bcl-2 和 CA125。可包括物质以改进本文所述的方法、装置和试剂盒，所述物质用于检测其他标志物或标志物编码核酸。

可与本发明联用的癌肿标志物包括但不限于： α 甲胎蛋白(AFP)，如用于胰腺、肾、卵巢、宫颈及睾丸癌；癌胚抗原(CEA)，如用于肺、胰腺、肾、乳腺、子宫、肝、胃及结直肠癌；糖抗原 15-3 (CA15-3)，如用于肺、胰腺、乳腺、卵巢及肝癌；糖抗原 19-9(CA19-9)，如用于肺、卵巢、子宫、肝、胃、结直肠及胆管癌；癌抗原 125(CA125)，如用于肺、胰腺、

乳腺、卵巢、宫颈、子宫、肝、胃及结直肠癌；游离前列腺特异抗原和前列腺特异抗原- $\alpha 1$ (PSA)，用于前列腺癌；游离前列腺特异抗原(PSAF)，用于前列腺和结直肠癌；前列腺特异抗原- $\alpha 1$ 抗胰凝乳蛋白酶复合物(PSAC)，用于前列腺癌；前列腺酸性磷酸酶(PAP)，用于前列腺癌；人甲状腺球蛋白(hTG)，用于甲状腺癌或 Wilm's 瘤；人绒毛膜促性腺激素 β (hCG β)，如用于肺、胰腺、肾、卵巢、子宫、睾丸、肝、结直肠、膀胱及脑癌肿；铁蛋白(Ferr)，如用于肺癌、睾丸癌、喉癌、Burkitt's 淋巴瘤、神经母细胞瘤及白血病；神经元特异性烯醇化酶(NSE)，用于肺癌、甲状腺癌、Wilm's 瘤及神经母细胞瘤；白介素 2 (IL-2)，用于肾癌及多发性骨髓瘤；白介素 6(IL-6)，用于肾癌、乳腺癌、卵巢癌及多发性骨髓瘤； $\beta 2$ 微球蛋白 (B2M)，用于肾癌、卵巢癌、前列腺癌、白血病、多发性骨髓瘤及淋巴瘤；以及 $\alpha 2$ 微球蛋白(A2M)，用于前列腺癌。上述癌肿标志物具有诊断和/预后意义的生物样本（如血液或尿液）的选择可由本领域技术人员容易地确定。

如上所述，本发明提供了通过检测受试者生物样本中 Bcl-2，对受试者癌肿如卵巢癌进行监测、诊断或预后的方法。在某一实施方案中，本发明包括使该样本与直接或间接标记有可检测物质的 Bcl-2 特异性抗体接触，并检测该可检测物质。

本发明的方法可用于检测相对于非疾病状态 Bcl-2 过多或过少，或用于检测是否存在经修饰的 Bcl-2（例如小于全长），后者与疾病状态（如卵巢癌）或向疾病状态的进展相关。本文所述的方法可用于评估存在恶性或恶性前细胞的概率。此类方法可用于检测癌肿、定量其生长，并协助对妇科癌肿进行诊断和预后。这些方法可用于检测癌肿转移，并证实手术、癌肿化疗和/或放疗后是否除去了所有的肿瘤组织。它们还可用于监测癌肿化疗及癌肿复发。

本发明方法尤其适用于诊断早期卵巢癌（例如当受试者无症状时），以及预后卵巢癌疾病的进展和死亡率。正如本文所述，样本（例如尿液、血清、血浆、全血、腹水）中检测的 Bcl-2 水平相对于标准水平（例如正常

人或良性疾病的水平)的增高,提示疾病进展状态、浆液型组织学类型、次佳切除、大的残存肿瘤,和/或疾病进展及致死的风险增加。

术语“样本”、“生物样本”等是指已知或可能表达或含有 Bcl-2 的材料类型,例如尿液。测试样本可自来源获取后直接使用,或经过预处理以修饰所取样本的特性。样本可来自任何生物来源,例如组织或提取物,包括细胞(如肿瘤细胞)及生理性液体,例如全血、血浆、血清、腹膜液、腹水等。样本可获自动物,优选哺乳动物,最优选人类。可使用任意方法对样本进行预处理,和/或利用任意方便而不干扰测定的培养基配制样本。可在使用前处理样本,例如从血液中制备血浆、稀释粘液、向样本如尿液中添加一种或多种蛋白酶抑制剂(例如 4-(2 氨基乙基)-苯磺酰氟、EDTA、抑酶醛肽,和/或胃蛋白酶抑制剂)等。样本处理包括过滤、蒸馏、提取、浓缩、灭活干扰成分、添加试剂等。

可在多种生物样本(包括组织或其提取物)中检测是否存在 bcl-2。优选在人尿液中检测 Bcl-2。

在本发明实施方案中,本文所述的方法通过定量受试者生物样本中的 Bcl-2,用于诊断和监测妇科癌肿。优选将待测受试者样本中定量 Bcl-2 的量,与该受试者的另一样本或其早期样本的定量水平,或对照样本的定量水平进行比较。可以通过前瞻性和/或回顾性统计学研究,确定来自健康受试者的对照样本水平。选择无临床显性疾病或异常的健康受试者进行统计学研究。根据 Bcl-2 水平相对于对照样本或相同受试者以前定量水平的统计学差异,可以做出诊断。

术语“Bcl-2”是指人 B 细胞淋巴瘤蛋白 2(也称为 B 细胞 CLL/淋巴瘤 2),系一种能阻断某些细胞如淋巴细胞凋亡的线粒体外整合蛋白(integral outer mitochondrial protein, Cleary MX.等人, Cell, 1986, 47(1): 19-28; Tsujimoto Y.和 Croce CM., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1986, 83:5214-5218,均在本文全部引用作为参考)。术语“Bcl-2”包括编码 Bcl-2 基因产物(多肽)的核酸序列(如 GenBank 登录号 M14745; SEQ ID NO:1),以及 Bcl-2 多肽(如 GenBank 登录号 AAA35591; SEQ ID NO:2)。该术

语包括 GenBank 登录号 M14745 和 AAA35591 的人 Bcl-2 所有同源物、天然存在的等位基因变体、同种型及前体。一般而言，天然存在的人 Bcl-2 等位基因变体与 GenBank 登录号 M14745 和 AAA35591 所示的序列具有显著的序列同源性 (70-90%)。等位基因变体可能含有 Bcl-2 序列的保守性氨基酸取代，或含有某一 Bcl-2 同源物中相应位点的氨基酸取代。由于不同剪切产生的 α 和 β 两种转录子变体在其 C 末端有所不同。 α 变体 (GenBank 登录号 NP_000624 (SEQ ID NO:4) 以及 GenBank 登录号 NM_000633 (SEQ ID NO:3)) 是较长的转录子，编码较长的同种型 (α)，而 β 变体较短 (GenBank 登录号 NM_000648 (SEQ ID NO:6); GenBank 登录号 NP_000657 (SEQ ID NO:5))。与 α 变体相比， β 变体的 3' UTR 和编码区，以及 C 末端不同。在某一特定实施方案中，本发明的方法、装置和试剂盒具有 Bcl-2 (例如 SEQ ID NO: 1、2、3、4、5 和/或 6) 特异性，但在本领域已知的“Bcl-2 样”分子的核酸分子或多肽 (如使用 Bcl-2 特异性 (如免疫反应性) 结合剂，但对 Bcl-2 样分子并不反应) 并无特异性，例如 Ruben 等人, 2002 年 8 月 8 日公开的美国专利申请公开 2002/0106731 A1 中所述的，该申请于本文全部引用作为参考。

术语“受试者”和“患者”本文可互换使用，指可罹患癌肿的温血动物如哺乳动物。对于某些癌肿而言，受试者为女性或雌性非人哺乳动物。对于另一些癌肿而言，受试者为男性或雄性非人哺乳动物。

能够在受试者生物样本中检测 Bcl-2 的物质，能够与 Bcl-2 多肽或编码 Bcl-2 的核酸分子发生反应或结合。此类物质的实例 (本文也称为结合剂) 包括但不限于，结合 Bcl-2 的 Bcl-2 抗体或其片段、Bcl-2 结合配偶体，以及可与 Bcl-2 多肽编码核酸分子杂交的核酸分子。优选该结合剂标记有可检测物质 (如可检测部分)。结合剂本身也可作用如标记。

Bcl-2 抗体

可从科研或商业途径得到用于本发明方法的 Bcl-2 特异性抗体。或者，也可使用分离的天然 Bcl-2 或重组 Bcl-2 制备抗体、单克隆或多克隆抗体以

及免疫活性片段(例如 Fab 或(Fab)₂ 片段)、抗体重链、抗体轻链、人源化抗体、遗传工程生产的单链 Fv 分子(Ladne 等人., 美国专利号 4,946,778), 或嵌合抗体如含有鼠抗体结合特异性但其他部分来源于人的抗体。可使用本领域技术人员已知的方法制备抗体, 包括单克隆和多克隆抗体、片段及嵌合体。优选如用于本发明方法的抗体与 Bcl-2 结合的 Ka 大于或等于 10⁷M, 则该抗体具有 Bcl-2 反应性。在本发明的夹心免疫测定中, 使用小鼠多克隆抗体及兔多克隆抗体。

为生产单克隆抗体, 用 Bcl-2 蛋白或多肽接种宿主哺乳动物然后进行加强。在末次加强数天后收集接种哺乳动物的脾脏。根据 Kohler 和 Milstein (Nature, 1975,256:495-497) 所述的一般方法, 将脾脏的细胞悬浮液与肿瘤细胞进行融合。肽片段应当含有足够的氨基酸残基以用于定义待测 Bcl-2 分子的表位。

若该片段太短而不具有免疫原性, 可将其缀合于载体分子。某些合适的载体分子包括钥孔血蓝蛋白和牛血清白蛋白。可通过本领域已知的方法实施缀合。此类方法之一是将片段的半胱氨酸残基与载体分子中的半胱氨酸残基结合。可用本领域已知的方法合成该肽片段。Stuart 和 Young 在 “Solid Phase Peptide Synthesis” 第二版, Pierce Chemical Company (1984) 中描述了一些合适的方法。

可通过技术人员已知的多种方法完成抗体或片段的纯化, 包括硫酸铵或硫酸钠沉淀法后对生理盐水进行透析、离子交换色谱法、亲和或免疫亲和色谱法, 以及凝胶过滤、区带电泳等 (Goding in, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 第二版, 104-126 页, Orlando, Fla., Academic Press)。优选使用纯化抗体或纯化的含有至少一部分 Bcl-2 结合区域的抗体片段, 包括如 Fv、F(ab')₂、Fab' 片段(Harlow 和 Lane, 1988, Antibody Cold Spring Harbor), 来检测妇科癌肿患者或具有患病风险者体液中的 Bcl-2, 优选于卵巢癌患者尿液或血液中检测。

为用于检测和/或监测癌肿, 可将纯化抗体直接或通过连接物共价连于可用作报告基团的化合物上, 以便检测 Bcl-2 的存在。多种不同类型物质

可用作报告基团，包括但不限于酶、染料、放射活性金属及非金属同位素、产荧光化合物(fluorogenic compound)、荧光化合物等。用于检测、监测的本发明抗体（或其片段）的抗体缀合物的制备方法描述于美国专利号 4,671,958、4,741,900 和 4,867,973。

本发明的一方面中，可于已知的 Bcl-2 基因序列及其编码的氨基酸序列中鉴定优选的结合表位，并将其用于产生具有高度结合亲和力的 Bcl-2 抗体。同时，对 Bcl-2 上结合表位的鉴定可用于设计和构建优选抗体。例如，可重组表达编码优选 Bcl-2 表位的 DNA，并用于选择与该表位选择性结合的抗体。然后于足以使抗体与 Bcl-2 上特异性结合表位发生特异性结合的条件中，将所选抗体暴露于样本，随后检测形成的复合物的量。文献中已有对特异性抗体方法的成熟理解和描述。有关其制备更详细的描述可见于如 *Practical Immunology*, Butt, W. R. 编著, Marcel Dekker, New York, 1984 中所述。

本发明也涉及 Bcl-2 抗体的检测。Bcl-2 是妇科癌肿特异性标志物。因此，对受试者生物液体中 Bcl-2 抗体的检测有助于诊断妇科癌肿。

蛋白质结合测定

与 Bcl-2 特异性反应的抗体或衍生物，如酶缀合物或标记衍生物，可用于检测多种生物样本中的 Bcl-2，例如可将其用于任意已知的基于蛋白质中抗原决定簇和抗体结合反应的免疫测定。此类测定的实例为放射性免疫测定、酶免疫测定（例如 ELISA）、免疫荧光法、免疫沉淀法、乳胶凝集法、血凝法及组织化学测试。

可将 Bcl-2 特异性抗体标记可检测物质，并基于该可检测物质的存在生物样本中进行定位。可检测物质的实例包括但不限于，以下放射性同位素（如 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{35}S 、 ^{125}I 、 ^{131}I ）、荧光标记（如 FITC、罗丹明、镧系荧光物）、发光标记如鲁米诺、酶标记（如辣根过氧化物酶、 β 半乳糖苷酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、乙酰胆碱酯酶）、生物素化基团（可被标记的亲合素检测，例如可通过光学或量热法检测的含有荧光标记或酶活性的链酶亲合素）、可由第二报告子识别的预定多肽表位（如亮氨酸拉链序列、第

二抗体的结合位点、金属结合位点、表位标志)。也可使用间接方法,其中初级抗原抗体反应因第二抗体的引入而被放大,所述第二抗体对 Bcl-2 反应性抗体具有特异性。例如,若 Bcl-2 特异性抗体为兔 IgG 抗体,则第二抗体可为标记有本文所述可检测物质的羊抗兔 γ 球蛋白。

本领域普通技术人员可熟练完成上述缀合或标记抗体的方法。(见如 Imman, *Methods In Enzymology*, 34 卷, *Affinity Techniques, Enzyme Purification: B 部分*, Jakoby 和 Wichek 编著, Academic Press, New York, 30 页, 1974; 以及 Wilchek 和 Bayer, "The Avidin-Biotin Complex in Bioanalytical Applications", *Anal. Biochem.* 171:1-32, 1988, 其中有关用酶或配体结合部分缀合或标记抗体的方法)。

时间分辨荧光测定法可用于检测信号。如 Christopoulos T.K. 和 Diamandis E.P., *Anal. Chem.*, 1992:64:342-346 所述的方法可用于常规时间分辨测定法。

因此,本发明实施方案提供了一种方法,其中用酶标记 Bcl-2 抗体,选择该酶的底物使该底物,或酶和底物的反应产物可与镧系金属形成荧光复合物。加入镧系金属,并通过测量荧光复合物的荧光强度定量样本中的 Bcl-2。可直接或间接用酶标记 Bcl-2 特异性抗体。基于该酶底物,或酶与底物的反应产物与镧系金属如铈及铽复合的能力,对酶加以选择。合适的酶实例包括碱性磷酸酶和 β 半乳糖苷酶。优选该酶为碱性磷酸酶。也可间接用酶标记 Bcl-2 抗体。例如,可将抗体缀合于配体结合对的一个配偶体,而将酶偶联于该配体结合对的另一配偶体。代表性实例包括亲和素-生物素,以及核黄素-核黄素结合蛋白。优选该抗体为生物素化,而酶偶联于链酶亲和素。

在本方法的某一实施方案中,添加酶的底物,从而检测结合于样本中 Bcl-2 的抗体。选择底物使当存在镧系金属时(如铈、铽、钆及镨,优选铈及铽),底物,或酶和底物的反应产物与镧系金属形成荧光复合物。可提供此类荧光复合物的酶及酶的底物实例描述于 Diamandis 的美国专利号 5,3112,922。例如,当抗体直接或间接标记碱性磷酸酶时,该方法使用的底

物可为 4-甲基伞形酮磷酸酯(4-methylumbeliferyl phosphate)或 5-氟水杨酸磷酸酯(5-fluoropsalicyl phosphate)。通常使用时间分辨荧光仪如 CyberFluor 615 Immoanalyzer (Nordion International, Kanata Ontario), 测量复合物的荧光强度。

可将样本、Bcl-2 特异性抗体或 Bcl-2 固化于载体上。合适载体的实例为琼脂糖、纤维素、葡聚糖、葡聚糖凝胶, 琼脂糖、脂质体、羧甲基纤维素聚苯乙烯、滤纸、离子交换树脂、塑料薄膜、塑料管、玻璃珠、聚氧甲基乙烯醚-马来酸共聚物、氨基酸共聚物、乙烯-马来酸共聚物、尼龙、丝等。载体形状可如管、测试平板、孔、珠、盘、球等。可通过已知的化学或物理方法如溴化氰偶联, 将金属与合适的不可溶性载体反应来制备固定的抗体。

本发明的某一实施方案, 提供了通过免疫测定测量 Bcl-2 来确定适当样本如尿液中 Bcl-2 的模式。对于技术人员显而易见的是, 多种免疫测定方法可用于测量 Bcl-2。一般而言, Bcl-2 免疫测定方法可为竞争性或非竞争性方法。竞争性方法一般使用 Bcl-2 的固化或固定抗体(抗 Bcl-2)及 Bcl-2 的标记形式。样本 Bcl-2 及标记 Bcl-2 竞争结合抗 Bcl-2。将产生的与抗 Bcl-2 结合的标记 Bcl-2 (结合级分)与未结合的 Bcl-2 (非结合级分)分离后, 测量结合或非结合级分的标记量, 并以任意常规方法将其与生物样本中 Bcl-2 的量相关, 例如与标准曲线对比。

优选使用非竞争性方法确定 Bcl-2, 其中最常用的方法为夹心法。在该测定中, 使用了两种抗 Bcl-2 抗体。抗 Bcl-2 抗体之一为直接或间接标记的(也称为检测抗体), 另一则为固化或固定的(也称为捕获抗体)。可将捕获及检测抗体同时或顺序接触生物样本。将捕获抗体与样本孵育, 并在其后的预定时间添加检测抗体(有时称为“前向”方法), 可完成顺序方法; 或者可先将检测抗体与样本孵育然后加入捕获抗体(有时称为“反向”方法), 来完成顺序方法。经过必要的孵育后, 将捕获抗体从液态测试混合物中分离以完成测定, 并测量至少一部分分离的捕获抗体相或剩余液态测试混合物中的标记。一般而言, 在捕获抗体相进行测量, 因为其中含有捕获

抗体及检测抗体结合（夹心）的 Bcl-2。

在通常的 Bcl-2 双位点免疫测定中，捕获及检测抗体之一或两者均为多克隆抗体。检测抗体所用的标记可选自本领域已知的任意常规标记。如同蛋白质检测测定的其他实施方案一样，该标记可为如酶或化学发光部分，或放射活性同位素、荧光素；可检测配体（例如可通过标记的配体结合配偶体进行二次结合检测）等。优选抗体标记有可通过添加底物而检测的酶，其中选择底物使酶与底物的反应产物形成荧光复合物。选择捕获抗体，从而使其提供与剩余测试混合物分离的模式。因此，可向测定中引入已固化或非可溶形式的捕获抗体，或者捕获抗体也可为固定形式，该形式可在向测定中引入捕获抗体后即刻完成固化。固化的捕获抗体中可含有与固相共价或非共价相连的抗体，所述固相如磁性颗粒、乳胶颗粒、微滴定多孔平板、珠、槽或其他反应容器。固定捕获抗体的实例为经配体部分（如半抗原、生物素等）化学修饰的抗体，所述抗体在接触配体固化形式的结合配偶体（如抗体、亲和素等）后即被固定。在某一实施方案中，可使用一系列结合于固相的捕获抗体的特异性抗体来固定捕获抗体。

本发明中具体的夹心免疫测定法使用两种与 Bcl-2 反应的抗体，酶标记的对 Bcl-2 反应性抗体具有特异性的第二抗体，以及产荧光的酶底物。在某一实施方案中，酶为碱性磷酸酶（ALP），而底物为 5-氟水杨酸磷酸酯。ALP 裂解出产荧光底物 5-氟水杨酸磷酸酯的磷酸基团，产生 5-氟水杨酸（FSA）。5-氟水杨酸随后可形成 FSA-Tb(3+)-EDTA 形式的强荧光三元复合物，后者可通过时间分辨模式测量 Tb³⁺ 荧光而进行定量。一般使用本文所述的时间分辨荧光仪测量荧光强度。

上述免疫测定方法和形式仅为举例而并不具有限制性，因为一般而言，认为任意免疫测定方法或形式均可用于本发明。

本发明的检测方法、装置及试剂盒可使用纳米线传感技术（Zhen 等人，*Nature Biotechnology*, 2005, 23(10):1294-1301; Lieber 等人，*Anal. Chem.*, 2006, 78(13):4260-4269，均在本文引用作为参考），或微梁谐振技术（Lee 等人，*Biosens. Bioelectron.*, 2005, 20(10):2157-2162; Wee 等人，*Biosens.*

Bioelectron., 2005, 20(10): 1932-1938; Campbell 和 Mutharasan, Biosens. Bioelectron., 2005, 21(3):462-473; Campbell 和 Mutharasan, Biosens. Bioelectron., 2005, 21(4):597-607; Hwang 等人, Lab Chip, 2004, 4(6):547-552; Mukhopadhyay 等人, Nano. Lett, 2005, 5(12):2835-2388, 均在本文引用作为参考)检测样本中的 Bcl-2。此外, Huang 等人描述了在市售表面等离子体共振生物传感器中进行前列腺特异性抗原免疫测定 (Biosens. Bioelectron., 2005, 21(3):483-490, 本文引用作为参考), 可修改其用于检测 Bcl-2。高灵敏度小型免疫测定也可用于 Bcl-2 检测 (Cesaro-Tadic 等人, Lab Chip, 2004, 4(6):563-569; Zimmerman 等人, Biomed. Microdevices, 2005, 7(2): 99-110, 本文均引用作为参考)。

核酸

核酸包括与 Bcl-2 编码核酸杂交的天然核酸、寡核苷酸、反义寡核苷酸以及合成寡核苷酸, 均可用作试剂来检测妇科癌肿患者或具有妇科癌肿患病风险者生物样本中的 Bcl-2, 优选对卵巢癌患者或具有卵巢癌患病风险者的尿液进行检测。本发明涉及使用对应于 Bcl-2 编码序列的核酸序列及其互补序列, 以及与 Bcl-2 转录物编码序列较上游或较下游的序列 (例如 5' 及 3' 非翻译区中含有的序列或延伸至其中的序列) 互补的序列, 作为检测妇科癌肿患者或具有妇科癌肿患病风险者生物样本中的 Bcl-2 表达的试剂, 优选对卵巢癌患者或具有卵巢癌患病风险者的尿液进行检测。

优选用于检测生物样本中 Bcl-2 的寡核苷酸为与编码 Bcl-2 的 cDNA 序列至少部分互补的寡核苷酸。这些互补序列为本领域已知的“反义”序列。这些寡核苷酸可为寡核糖核苷酸或寡脱氧核糖核苷酸。此外, 寡核苷酸可为由具有生物意义的核苷酸形成的寡聚物, 即 A (腺嘌呤)、dA (脱氧腺嘌呤)、G (鸟嘌呤)、dG (脱氧鸟嘌呤)、C (胞嘧啶)、dC (脱氧胞嘧啶)、T (胸腺嘧啶) 以及 U (尿嘧啶), 或经修饰的寡核苷酸类型, 例如用甲基或硫原子取代核苷酸间的磷酸二酯键内的磷酸氧原子。此外, 这些核苷酸本身和/或核糖部分可经过修饰。

可利用本领域任意熟知的化学寡核苷酸合成方法,化学合成寡核苷酸。例如,可使用任意市售自动核酸合成仪制备寡核苷酸。或者通过标准重组 DNA 技术如诱导非编码链的转录,产生寡核苷酸。可将编码 Bcl-2 的 DNA 序列插入重组 DNA 系统,例如以反向插入合适的启动子下游,从而使非编码链进行转录。

虽然可以使用任意长度的寡核苷酸杂交 Bcl-2 编码核酸,优选通常为 8-100 个核苷酸的寡核苷酸。最优选用于尿样中 Bcl-2 检测的寡核苷酸,为 15-50 个核苷酸长的寡核苷酸。

然后通过标准技术分离并纯化用于杂交 Bcl-2 核酸分子的寡核苷酸(化学合成或是通过重组 DNA 技术得到),并优选通过标准标记方法进行标记(如用 ^{35}S 或 ^{32}P)。

本发明也涉及寡核苷酸对用于聚合酶链式反应 (PCR),以检测生物样本中 Bcl-2 的表达。寡核苷酸对包括正向 Bcl-2 引物和反向 Bcl-2 引物。

可通过核酸杂交方法确定患者样本中的 Bcl-2,例如但并不仅限于 Northern 印迹分析、点印迹、Southern 印迹分析、原位荧光杂交 (FISH) 和 PCR。色谱法(优选 HPLC)及其他已知的测定也可用于确定样本中 Bcl-2 的信使 RNA 水平。

Bcl-2 编码核酸分子可见于 Bcl 阳性癌肿细胞的生物体液中,所述 Bcl 阳性癌肿细胞系脱落或释放至所检测液体中所致。

本发明的某一方面涉及核酸作为检测患者生物样本 Bcl-2 的试剂的用途,其中所述核酸经过标记。核酸试剂可标记放射活性标记、荧光标记、酶、化学发光标志、比色标志,或其他上述讨论的或本领域已知的标记或标志。

本发明的另一方面涉及使用 Northern 印迹分析检测体液样本中是否存在 Bcl-2 mRNA。该分析的第一步涉及通过凝胶电泳分离出含有 Bcl-2 核酸的样本。然后将分散的核酸转移至硝化纤维素滤膜(filter)或其他滤膜上。然后将标记寡核苷酸于适当杂交条件下暴露于滤膜,所述杂交条件如 42°C 下 50% 甲醛、 $5\times$ SSPE、 $2\times$ Denhardt's 溶液、0.1% SDS,如

Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Maniatis 等人(1982, CSH Laboratory)中所述。其他本领域已知的有用方法包括溶液杂交、点及狭线 RNA 杂交以及基于探针的微阵列。利用本领域已知的标准方法测量杂交片段的放射活性，定量患者生物液体中含有的 Bcl-2 核酸的量。

点印迹涉及将含有目标核酸的样本加样至膜上。可于加样至膜上前或后变性核酸。将膜与标记探针一同孵育。点印迹方法为技术人员所熟知，且更详细描述于美国专利号 4,582,789 及 4,617,261 中，其公开在本文引用作为参考。

聚合酶链式反应 (PCR) 是扩增核酸样本中含有的一条或多条特定核酸序列的方法，该法使用聚合反应所需的引物及试剂，并检测扩增序列。一种引物的延伸产物若与另一杂交，即成为产生所需特定核酸序列的模板，反之亦然，重复该过程足够多次以产生所需量的序列。技术人员检测所需序列是否存在 (美国专利号 4,683,195) 通常使用聚合酶链式反应。

技术人员常规实施用于检测所需序列的 PCR 特定实例是反转录 PCR (RT-PCR; Saiki 等人, Science, 1985, 230:1350; Scharf 等人, Science, 1986, 233:1076)。RT-PCR 涉及从生物液体中分离总 RNA、在识别所需核酸序列的引物存在时变性 RNA、使用该引物通过反转录产生 RNA 的 cDNA 拷贝、使用特定引物通过 PCR 扩增 cDNA，并通过电泳法或技术人员已知的其他方法检测扩增的 cDNA。

在优选实施方案中，在妇科癌肿患者或具有妇科癌肿患病风险者的生物液体 (优选卵巢癌患者或具有卵巢癌患病风险者的尿液) 中检测 Bcl-2 核酸的方法，包括 Northern 印迹分析、点印迹、Southern 印迹分析、FISH 和 PCR。

装置

可在固相支持物上实施本发明方法。所用的固相支持物可为测定生物样本中分析物常规使用者，通常由纤维素、多糖如葡聚糖凝胶等材料构建而成，可能部分具有外罩以保护和/或处理固相支持物。根据所需用途，固

相支持物可为刚性、半刚性、柔韧性、弹性（具有形状记忆）等。可在体内或体外（离体）检测样本中的 Bcl-2。根据本发明某一实施方案，当需要不将样本移出体外而确定样品中 Bcl-2 的量时（即体内），支持物应当对受试者无害，且为任意便于插入机体合适部分的形式。例如，支持物可为由聚四氟乙烯、聚苯乙烯或其他刚性无害塑料材料合成的探针，其大小和形状均适于引入体内。本领域技术人员能够选择合适的情性支持物及其所需用途的大小。

本发明测定（方法）中的接触步骤包括将生物样本与固相支持物进行接触、结合或混合，所述固相支持物如反应器、微反应器、试管、微管、孔、多孔平板或其他固相支持物。在本发明实施方案中，与生物样本（如尿液）接触的固相固载具有针对待测液体基质侧流的吸收垫或膜，例如可获自 Millipore Corp. (Bedford, MA)，包括但不限于 Hi-Flow Plus™ 膜及膜卡，以及 SureWick™ 垫材料。

可构建任何适于所需用途形式的实施本发明方法的诊断装置。因此，在某一实施方案中，可构建本发明装置为一次性或重复使用性测试条或棒，以接触 Bcl-2 水平待测的生物样本如尿液或血液。在另一实施方案中，可使用本领域公认的微米尺度制造技术构建装置，从而生产出能够移植或注射入解剖位点（如腹腔）的针样实物，以实现诊断性应用。在其他实施方案中，可构建用于重复实验室应用的延长探针形式的装置。

在优选实施方案中，本发明装置包括固相支持物（例如条或试纸棒），其表面作用如侧流基质以限制生物样本如尿液、全血、血清、血浆、腹膜液或腹水的流经途径。

用于检测多种目标分析物的免疫色谱测定（也称为侧向流动试纸条或简易试纸条测试）已问世多时，也可用于检测 Bcl-2。侧向流动测试的益处包括其形式用户友好、结果迅速、在较大范围的气候条件下具有长期稳定性，以及相对较低的生产成本。这些特征使得侧向流动测试成为包括家庭测试、快速医护点测试以及多种分析物的现场测试等在内的应用的理想之选。该测试的原理非常直观。其关键之处在于，可以定性测试能与可视的

可检测固相支持物（例如染色微球）结合的任意配体，甚至在许多情况下可以进行半定量测量。例如，Fernandez-Sanchez 等人(J. Immuno. Methods, 2005, 307(1-2):1-12, 本文引用作为参考)描述了某种用于检测血清中游离和总前列腺特异抗原的一步侧向流动免疫试纸条，可改造其用于检测生物样本如血液或尿液中的 Bcl-2。

目前市场上更为常见的某些免疫色谱测定为妊娠（例如非处方(OTC)测试试剂盒）、链球菌咽炎及衣原体测试。近来使用免疫色谱测定法研发出许多针对已有抗原的新测试。例如，自 1917 年就已知社区获得性肺炎的最常见病原，但直至最近才研发出简便的测定，而这一测定即是使用该简便测试试纸条方法完成的（Murdoch, D.R.等人.J Clin Microbiol, 2001, 39:3495-3498）。使用类似测定可以迅速在混合血液中检测人免疫缺陷病毒（HIV）（Soroka, S.D.等人. J Clin Virol, 2003, 27:90-96）。已有一种硝化纤维素膜卡用于通过检测碳纳米粒子的移动和结合来诊断血吸虫病（van Dam, GJ.等人. J Clin Microbiol, 2004, 42:5458-5461）。

免疫色谱测定常用的两种方法为非竞争性（或直接）及竞争性（或竞争性抑制）反应方法(TechNote #303, Rev. #001, 1999, Bangs Laboratories, Inc., Fishers, IN)。通常使用直接（双抗体夹心法）方法测试具有多重抗原位点的较大分析物，例如促黄体激素（LH）、人绒毛膜促性腺激素（hCG）以及 HIV。此处，所需的样本分析物不过量，因此一部分微球不会在捕获线捕获，而将继续向二线固化抗体（控制区）前进。该控制线使用对微球上缀合抗体特异的物种特异性抗免疫球蛋白抗体。游离抗原若存在，则通过向加样垫上加样（尿液、血清等）引入装置内。随后游离抗原结合于抗体-微球复合物。将样本抗原表位 1 特异性抗体 1 与染色微球偶联，并于装置内干燥。加样时，微球-抗体复合物再水化并由液体携带至捕获区及控制线。将样本抗原中另一抗原位点（表位 2）特异性抗体 2 干燥置于捕获线处的膜上。将可与抗体 1 反应的物种特异性抗免疫球蛋白抗体（抗体 3），干燥置于控制线处的膜上。当样本中存在抗原时（即阳性测试），该抗原可通过其两个抗原位点同时与抗体 1（缀合于微球）和抗体 2（干燥置于捕获

线处的膜上)结合。不论是否存在抗原,抗体1包被的微球均在控制线处与抗体3结合。若样本中不含有抗原(阴性测试),则微球不受阻碍通过捕获线,但会被控制线滞留。

通常使用竞争性反应方法测试携有单个抗原决定簇、无法同时结合两种抗体的小分子。如同双抗体夹心测定一样,游离抗原如存在,可通过向样本垫上加样引入装置内。样本中含有的游离抗原与抗体-微球复合物结合。抗体1对样本抗原具有特异性,并与染色微球偶联。将抗原载体分子(一般为BSA)缀合物干燥置于捕获线处的膜上。抗体2(Ab2)则被干燥置于控制线处膜上,其是能够捕获试剂颗粒并确认测试完成的物种特异性抗免疫球蛋白。若样本中含有抗原(阳性测试),微球上的抗体(Ab1)已经被样本内抗原饱和,因此捕获线处结合的抗原缀合物不会与之结合。任何未被抗原载体分子捕获的微球均可被控制线处的Ab2捕获。若样本中不含有抗原(阴性测试),抗体包被的干燥微球能够被控制线处结合的抗原缀合物所捕获。

通常,用于在这些装置中固定抗体的膜是由原生疏水材料制成,如硝化纤维素。用于固相支持的微球以及缀合抗体均为疏水,且其与膜间的反应使其能有效干燥于膜上。

可将样本和/或Bcl-2特异性结合剂列阵于固相支持物上,也可使用多种支持物进行多重检测或分析。“列阵”是指将某一文库(例如靶定同一目标分子或不同目标分子的一系列不同样本或一系列装置)或其他集合中的成员进行组织或排列,以使其成为合乎逻辑或有形的阵列。因此,“阵列”是指如生物样本的合乎逻辑或有形的排列。有形阵列可为任意“空间格式”或“物理划分格式”,其中相应文库成员的物理形式以有序的方式排列,以供进行组合筛选。例如,可将个体样本或样本文库的集群成员在如多孔平板上排为一系列编号的排和列。与之相似,可将结合剂铺板或置于微滴定板(或盘)上,如96孔、384孔或1536孔板。任选将Bcl-2特异性结合剂固化于固相支持物上。

Bcl-2和癌肿生物标志物的检测,以及其他需在样本上实施的测定,均

可与其他目标分子的检测同时或序贯进行，也可以自动化、高通量形式进行。

可将 Bcl-2 特异性结合剂沉积于结合区，但仍保持“游离”（非固化）；在捕获区则固化于固相支持物。Bcl-2 特异性结合剂可通过如支持物的非特异性吸附或与支持物共价成键而得以固化。将结合剂固定于支持物上的技术为本领域公知，且描述于如美国专利号 4,399,217、4,381,291、4,357,311、4,343,312 及 4,260,678 中，均在本文引用作为参考。此类技术可用于固定本发明的结合剂。当固相支持物为聚四氟乙烯时，使用钠和铵胺化支持物并通过碳二亚胺反应将抗体共价连接于活化的支持物，可以活化支持物而将激素抗体偶联于支持物（yon Klitzing, Schultek, Strasburger, Fricke 和 Wood, “Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine 1982”, International Atomic Energy Agency, Vienna (1982), 57-62 页）。

本发明的诊断装置利用侧流试纸条（LFS）技术，后者已应用于多种其他快速试纸条测定系统，如基于人绒毛膜促性腺激素（hCG）抗体的非处方早孕试纸条。与许多其他诊断装置一样，本装置使用结合剂以结合目标分子（Bcl-2）。该装置具有接收生物样本如血液或尿液的加样区、含有结合样本中 Bcl-2 标记的标记区，以及滞留 Bcl-2 标记的检测区。

滞留于检测区的结合剂发出信号，该信号随着生物样本中 Bcl-2 水平是低于、等于还是高于给定阈值浓度而有所不同。例如，在使用尿 Bcl-2 检测卵巢癌时，阈值浓度为 0ng/ml 至 2.0ng/ml。在另一实施方案中，使用尿 Bcl-2 检测卵巢癌的阈值浓度为 1.8ng/ml。受试者样本中 Bcl-2 水平等于或高于给定参照 Bcl-2 浓度，可称为“阈值水平”、“阈值量”或“阈值样本”。装置中的加样区适于接收待测定的生物样本。通常加样区由吸收性材料如印迹纸制成。标记区含有可与样本中任意 Bcl-2 结合的结合剂。在某一实施方案中，结合剂为抗体（例如单克隆抗体、多克隆抗体、抗体片段）。为便于检测，结合剂优选连接能发出肉眼可见信号的标记，例如标志有荧光标记或彩色标记如缀合胶体金，其视觉效果为粉色。

检测区滞留已结合结合剂的 Bcl-2。这通常是由固化结合剂如固化抗体

实现的。若标记区和检测区的结合剂均为抗体，它们通常识别目标分子（Bcl-2 蛋白）上的不同表位。从而可形成含有抗体-Bcl-2-抗体的“夹心”。

检测区位于加样区的下游，而标记区通常位于二者之间。因此样本会由加样区迁移至标记区，此处任意样本与标记结合。Bcl-2-结合剂复合物以及过量的结合剂则继续向检测区迁移。当 Bcl-2-结合剂复合物遇到捕获试剂时，复合物被滞留而样本及过量的结合剂仍继续迁移。随着样本中 Bcl-2 水平的增高，滞留于检测区的结合剂（Bcl-2-结合剂复合物的形式）的量也成比例增加。

在优选实施方案中，本发明的装置能够根据阈值浓度区别样本。这一点可通过多种方法实现。

某一类装置中含有包括固定强度的信号的参照区，滞留于检测区的结合剂的量可与之进行比较——若检测区信号等于参照区信号，该样本即为阈值样本；若检测区信号强度低于参照区，则该样本所含 Bcl-2 少于阈值样本；若检测区的信号强度高于参照区，则该样本中所含 Bcl-2 多于阈值样本。

可容易制备并校准合适的参照区。在该类装置中，一般结合剂对于样本中的 Bcl-2 而言为过量，而参照区可处于检测区上游，或优选下游。参照区信号与检测区信号为同一类型的信号，即它们通常均为肉眼可见，例如使用相同的标志。优选的该型装置参照区包括胶体金标志的固化蛋白（例如胎牛血清白蛋白）。

在本发明的另一种装置中，参照区位于检测区下游，且包括能捕获结合剂的试剂（例如固化的抗结合剂抗体）。流经该装置的结合剂并不过量，设置其浓度使得其中 50% 被含阈值浓度的 Bcl-2 的样本所结合。因此，阈值样本中 50% 结合剂将滞留于检测区，而 50% 留在参照区。若样本中 Bcl-2 的水平高于阈值样本，则到达参照区的结合剂将不足 50%，而检测区发出的信号强于参照区；相反，若样本中 Bcl-2 的水平低于阈值样本，留在检测区的结合剂将不足 50%，而参照区发出的信号强于检测区。

在本发明的另一类似运作的装置中，参照区处于检测区下游，其中含

有有限量可捕获结合剂的试剂(例如固化的抗结合剂抗体)。该试剂的水平使得在阈值样本中,其滞留标记的量与检测区可结合的标记量相同,而过多的标记将继续迁移至参照区以外。

因此,在这三种装置中,利用检测区和参照区间的对比以将样本与阈值浓度进行比较。优选可肉眼确定检测:参照结合比例。优选检测区和参照区定位邻近,以有助于视觉比较两区域的信号强度。

第四类装置中不需要参照区,但构建检测区使之主要产生开/关应答,例如阈值浓度以下无信号,而阈值或阈值以上发出信号。

第五类装置中也不需要参照区,但使用对应于阈值浓度的外部参照。可采用多种形式,例如可比较检测区信号的印制卡片,或将检测区测量绝对值(如比色信号)与机器中储存的参照值进行比较的机器读数仪。

在本发明的某些实施方案中,该装置包括位于检测区下游的控制区。控制区一般用于捕获流经检测和/或参照区的过量结合剂(例如使用固化抗结合剂抗体)。若结合剂滞留于控制区内,则证实发生了结合剂的固化和通过装置的迁移。该功能也可由参照区完成。

在优选实施方案中,优选将检测区、参照区和控制区成型在硝化纤维素支持物上。

通常由检测区下游的棉芯协助毛细运动,帮助从加样区到检测区的迁移。该棉芯通常由吸收性材料制成如印迹或色谱纸。

可简单便宜地生产本发明装置,简便形式为试纸棒。此外,其使用也很方便,如家庭使用。因此,本发明提供了可在家庭使用的筛查癌肿如卵巢癌的装置。

诊断或监测妇科癌肿的试剂盒

本发明的一方面包括含有诊断或监测癌肿必需元件的试剂盒。优选该试剂盒包括用于收集患者生物液体的容器,以及用于检测液体中是否含有Bcl-2或其编码核酸的试剂。可将该试剂盒的成分包装于水性基质中或以冻干形式包装。

本发明的方法可利用诊断试剂盒实施，以定性或定量检测样本如血液或尿液中的 Bcl-2。例如，该试剂盒中可含有 Bcl-2 特异性结合剂（例如抗体）、针对标记有酶的抗体的抗体；以及酶的底物。该试剂盒也可含有固相支持物如微滴定多孔平板、标准品、测定稀释液、洗涤缓冲物、自粘平板盖和/或利用该试剂盒实施本发明方法的说明书。在某一实施方案中，该试剂盒包括用于待测定生物样本（如血液或尿液）的一种或多种蛋白酶抑制剂（例如蛋白酶抑制剂组合）。

可以制备诊断或监测妇科癌肿的试剂盒，其包括一种或多种可检测 Bcl-2 蛋白的试剂，例如但并不仅限于 Bcl-2 抗体、其片段或 Bcl-2 结合对象。可将这些试剂与用于收集患者生物液体的容器包装在一起。若该试剂盒中所用的抗体或结合对象为带有标记（例如放射活性金属铁或基团）的缀合物形式，则提供的此类缀合物成分可以为完全缀合的形式、中间体形式或分离的部分以供试剂盒使用者自行缀合。

也可制备含有一种或多种检测 Bcl-2 核酸的试剂的试剂盒，所述 Bcl-2 核酸例如但并不仅限于全长 Bcl-2 核酸、Bcl-2 寡核苷酸以及 Bcl-2 引物对。可将这些试剂与用于收集患者生物液体的容器包装在一起。核酸可为标记形式或待标记形式。

试剂盒的其他成分包括但不限于，收集生物样本的用具、标记检测试剂（结合试剂）的用具、用于在生物样本中固化 Bcl-2 蛋白或 Bcl-2 核酸的成员、将生物样本加样至膜上的用具、使试剂结合至受试者生物样本中 Bcl-2 的用具、第二抗体、将总 RNA 从受试者生物液体中分离的用具、实施凝胶电泳的用具、从分离的总 RNA 中产生 cDNA 的用具、实施杂交测定的用具，以及进行 PCR 的用具等。

本文所用的术语“ELISA”包括酶联免疫吸附测定，即使用结合于固相的抗体或抗原以及酶-抗原或酶-抗体缀合物以检测并定量样本中抗原（如 Bcl-2）或抗体量的方法。有关 ELISA 技术的描述见于 D.P. Sites 等人 *Basic and Clinical Immunology* 第 22 章，第 4 版（1982，Lange Medical Publications of Los Altos, Calif 出版），以及美国专利号 3,654,090、

3,850,752, 和 4,016,043, 其公开均在本文引用作为参考。ELISA 测定可以用于定量样本中抗原、蛋白质或其他目标分子的量。具体而言, 可以通过在固相支持物(例如聚氯乙烯)上附着目标抗原或蛋白质的特异性抗体来实施 ELISA。可加入细胞提取物或其他目标样本如尿液以形成抗体-抗原复合物, 而多余的未结合的样本则被洗掉。加入对抗原上另一不同位点特异的酶联抗体。洗涤支持物以除去未结合的酶联第二抗体。酶联抗体包括但不限于碱性磷酸酶。第二抗体上的酶能将所加的无色底物转化为有色产物, 或能将无荧光底物转化为荧光产物。可于单个容器中实施此处提供的基于 ELISA 的测定方法, 或在一系列容器中进行, 也可改装为自动程序。

在这些示例性的实施方案中, 抗体可标记 FRET 染料对、生物发光共振能量转移 (BRET) 蛋白、荧光染料-淬灭染料组合、 β -半乳糖苷互补测定蛋白质片段。例如, 抗体可参与 FRET、BRET、荧光淬灭或 β -半乳糖苷互补, 以产生荧光、比色或增强的化学发光 (ECL) 信号。

这些方法通常用于抗原特异性抗体应答的检测中, 在基本免疫学教科书中详细描述, 如 *Immunology* (Ivan Roitt, Jonathan Brostoff 和 David Male, London: Mosby, c1998. 第 5 版), 以及 *Immunobiology: Immune System in Health and Disease*/Charles A. Janeway 和 Paul Travers. Oxford: Blackwell Sci. 出版 1994), 其内容均在本文引用作为参考。

定义

本文所用的术语“癌肿”和“癌性的”, 是指或描述通常以细胞生长失调为特征的哺乳动物生理情况, 即增殖紊乱。此类增殖紊乱的实例包括癌肿如癌症、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤及白血病, 以及其他本文公开的癌肿。此类癌肿的更具体实例包括乳腺癌、前列腺癌、结肠癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、消化道癌肿、胰腺癌、宫颈癌、卵巢癌、腹膜癌、肝癌(如肝细胞癌)、膀胱癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌及甲状腺癌。

癌肿的其他非限制性实例为基底细胞癌、胆道癌、骨癌、脑及 CNS

癌肿、绒毛膜癌、结缔组织癌、食管癌、眼癌、头颈癌、胃癌、上皮内肿瘤、喉癌、淋巴瘤包括 Hodgkin's 及非 Hodgkin's 淋巴瘤、黑素瘤、骨髓瘤、神经母细胞瘤、口腔癌（例如唇、舌、嘴和咽）、胰腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤；直肠癌、呼吸系统癌肿、肉瘤、皮肤癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、泌尿系统癌肿，以及其他癌及肉瘤。癌肿类型的实例列于表 1。

表 1. 癌肿类型实例

- | | |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 急性淋巴细胞白血病，成人 急性淋巴细胞白血病，儿童 急性髓系白血病，成人 急性髓系白血病，儿童 肾上腺皮质癌 肾上腺皮质癌，儿童 AIDS 相关癌肿 AIDS 相关淋巴瘤 肛门癌 星形细胞瘤，儿童小脑 星形细胞瘤，儿童大脑 <input type="checkbox"/> 基底细胞癌 胆管癌，肝外 膀胱癌 膀胱癌，儿童 骨癌 骨肉瘤/恶性纤维性 组织细胞瘤 脑干胶质瘤，儿童 脑肿瘤，成人 脑肿瘤，脑干胶质瘤，儿童 脑肿瘤，小脑 星形细胞瘤，儿童 脑肿瘤，大脑 星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童 脑肿瘤，室管膜瘤，儿童 脑肿瘤，髓母细胞瘤，儿童 | <ul style="list-style-type: none"> <input type="checkbox"/> 毛细胞白血病 头颈癌肿 肝细胞（肝）癌，成人（原发） 肝细胞（肝）癌，儿童（原发） Hodgkin's 淋巴瘤，成人 Hodgkin's 淋巴瘤，儿童 妊娠期 Hodgkin's 淋巴瘤 下咽癌 下丘脑及视通路胶质瘤，儿童 <input type="checkbox"/> 眶内黑素瘤 胰岛细胞癌（胰腺内分泌部分） <input type="checkbox"/> Kaposi's 肉瘤 肾（肾细胞）癌 肾癌，儿童 <input type="checkbox"/> 喉癌 喉癌，儿童 白血病，急性淋巴细胞，成人 白血病，急性淋巴细胞，儿童 白血病，急性髓系，成人 白血病，急性髓系，儿童 白血病，慢性淋巴细胞 白血病，慢性髓系 白血病，毛细胞 唇及口腔癌肿 肝癌，成人（原发） 肝癌，儿童（原发） 肺癌，非小细胞 |
|--|--|

- 脑肿瘤，幕上
原始神经外胚层肿瘤，儿童
脑肿瘤，视通路及下丘脑胶质瘤，儿童
脑肿瘤，儿童
- 乳腺癌
乳腺癌，儿童
乳腺癌，男性
支气管腺癌/类癌，儿童
Burkitt's 淋巴瘤
- 类癌肿瘤，儿童
类癌肿瘤，胃肠道
原发不明癌症
中枢神经系统淋巴瘤，原发
小脑星形细胞瘤，儿童
大脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童
宫颈癌
儿童癌肿
慢性淋巴细胞白血病
慢性髓系白血病
慢性骨髓增生性疾病
结肠癌
结直肠癌，儿童
皮肤 T 细胞淋巴瘤，见蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征
- 子宫内膜癌
室管膜瘤，儿童
食管癌
食管癌，儿童
Ewing's 家族肿瘤
颅外生殖细胞肿瘤，儿童
性腺外生殖细胞肿瘤
肝外胆管癌
眼癌，眶内黑素瘤
- 肺癌，小细胞
淋巴瘤，AIDS 相关性
淋巴瘤，Burkitt's
- 淋巴瘤，皮肤 T 细胞，见蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征
淋巴瘤，Hodgkin's，成人
淋巴瘤，Hodgkin's，儿童
淋巴瘤，妊娠期 Hodgkin's
淋巴瘤，非 Hodgkin's，成人
淋巴瘤，非 Hodgkin's，儿童
淋巴瘤，妊娠期非 Hodgkin's
淋巴瘤，原发中枢神经系统
- 瓦尔斯特伦巨球蛋白血症，骨恶性组织细胞瘤/骨肉瘤
髓母细胞瘤，儿童
黑素瘤
- 黑素瘤，眶内（眼）
Merkel 细胞癌
间皮瘤，成人恶性
间皮瘤，儿童
原发不明的转移颈部鳞状细胞癌
多发内分泌腺瘤综合征，儿童
多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤
蕈样肉芽肿
- 骨髓增生异常综合征
骨髓增生异常/骨髓增殖性疾病
髓系白血病，慢性
髓系白血病，成人急性
髓系白血病，儿童急性
骨髓瘤，多发
骨髓增殖性疾病，慢性
- 鼻腔及副鼻窦癌肿
鼻咽癌

- 眼癌, 视网膜母细胞瘤
- 胆囊癌
- 胃癌
- 胃癌, 儿童
- 胃肠道类癌
- 生殖细胞肿瘤, 颅外, 儿童
- 生殖细胞肿瘤, 性腺外
- 生殖细胞肿瘤, 卵巢
- 妊娠滋养细胞肿瘤
- 胶质瘤, 成人
- 胶质瘤, 儿童脑干
- 胶质瘤, 儿童大脑
- 星形细胞瘤
- 胶质瘤, 儿童视通路及下丘脑
- 皮肤癌肿 (黑素瘤)
- 皮肤癌, Merker 细胞
- 小细胞肺癌
- 小肠癌
- 软组织肉瘤, 成人
- 软组织肉瘤, 儿童
- 鳞状细胞癌, 见皮肤癌肿 (非黑素瘤)
- 原发不明的颈部鳞状细胞癌, 转移
- 胃癌
- 胃癌, 儿童
- 幕上原始神经外胚层肿瘤, 儿童
- T 细胞淋巴瘤, 皮肤, 见蕈样肉芽肿和 Sézary 综合征
- 睾丸癌
- 胸腺瘤, 儿童
- 胸腺瘤及胸腺癌
- 甲状腺癌
- 甲状腺癌, 儿童
- 肾盂及输尿管移行细胞癌
- 鼻咽癌, 儿童
- 神经母细胞瘤
- 非 Hodgkin's 淋巴瘤, 成人
- 非 Hodgkin's 淋巴瘤, 儿童
- 妊娠期非 Hodgkin's 淋巴瘤
- 非小细胞肺癌
- 口癌肿, 儿童
- 口腔癌肿, 唇及口咽癌肿
- 骨肉瘤/骨恶性纤维组织细胞瘤
- 卵巢癌, 儿童
- 卵巢上皮细胞癌
- 卵巢生殖细胞肿瘤
- 卵巢低恶性度肿瘤
- 胰腺癌
- 胰腺癌, 儿童
- 胰腺癌, 胰岛细胞
- 副鼻窦及鼻腔癌肿
- 甲状旁腺癌
- 阴茎癌
- 嗜铬细胞瘤
- 成松果体细胞瘤及幕上原始神经外胚层肿瘤, 儿童
- 垂体瘤
- 浆细胞瘤/多发骨髓瘤
- 胸膜肺母细胞瘤
- 妊娠及乳腺癌
- 妊娠及 Hodgkin's 淋巴瘤
- 妊娠及非 Hodgkin's 淋巴瘤
- 原发中枢神经系统淋巴瘤
- 前列腺癌
- 直肠癌
- 肾细胞 (肾) 癌
- 肾细胞 (肾) 癌, 儿童

- | | |
|--|---|
| <ul style="list-style-type: none"> 滋养细胞肿瘤，妊娠 □ 原发不明，癌，成人 原发不明，癌肿，儿童 儿童少见癌肿 输尿管及肾盂，移行细胞癌 尿道癌 子宫癌肿，子宫内膜 子宫肉瘤 □ 阴道癌肿 视通路及下丘脑胶质瘤，儿童 外阴癌肿 □ 瓦尔斯特伦巨球蛋白血症 Wilms'肿瘤 | <ul style="list-style-type: none"> 肾盂及输尿管，移行细胞癌 视网膜母细胞瘤 横纹肌肉瘤，儿童 □ 涎腺癌 涎腺癌，儿童 肉瘤，Ewing's 家族肿瘤 肉瘤，Kaposi's 肉瘤，软组织，成人 肉瘤，软组织，儿童 肉瘤，子宫 Sézary 综合征 皮肤癌肿（非黑素瘤） 皮肤癌，儿童 |
|--|---|

本文所用的术语“肿瘤”是指恶性或良性所有肿瘤性细胞的生长和增殖，以及所有癌前及癌性细胞和组织。例如，一类特殊癌肿的特征在于实体肿块肿瘤。该实体肿瘤肿块若存在，可能为原发肿瘤肿块。原发肿瘤肿块是指由组织正常细胞转化而来的癌肿细胞在组织中的生长。大多数情况下，可以通过视诊或触诊方法发现囊肿的存在而鉴定原发肿瘤肿块，或通过组织形状、组织或重量的不规整鉴定之。然而，某些原发肿瘤无法触及，仅能通过医学影像技术如 X 光（例如乳腺成像）、超声、CT 和 MRI，或细针抽吸进行检测。后面这些技术的应用更常见于早期检测。对组织中癌肿细胞的分子和表型分析通常可以证实该癌肿是否源于该组织，或该病损是由另一位置转移而来。

“样本”（生物样本）可为来自人或非人受试者的任意生理状态（如固体、液体、半固体、蒸气）、任意复杂性的任意目标物质组合。样本可为理应可能含有 Bcl-2 的任意组合物，所述组合物可通过本发明的方法、装置及试剂盒分析。优选样本为液体（生物液体）。样本包括人或动物样本。可将样本置于试管、培养器、多孔平板或任意其他容器或支持底物中。例如，样本可为细胞培养物、人或动物组织。细胞组织的液体匀浆为可能含有本发明可检测的 Bcl-2 的生物液体。

样本的“复杂性”是指样本中存在的不同分子种类的相对数目。

本文所用的术语“体液”是指从人或动物受试者中得到的组合物。体液包括但不限于尿液、全血、血浆、血清、泪液、精液、涎液、痰、呼出气体、鼻腔分泌物、咽渗出物、支气管肺泡洗出液、气管吸出物、小肠液、淋巴液、脑脊液、羊膜液、腺体液、粪便、汗液、粘液、阴道或尿道分泌物、脑脊液，以及经皮漏出液。体液也包括前述所有含有匀浆固体材料（如粪便、组织及活检样本）的溶液或混合物中试验分离的级分。

本文所用的术语“离体”，是指受试者体外的环境。因此，采集自受试者的体液样本为本发明涉及体液的离体样本。本发明的方法及装置的留置实施方案于体内获取样本。

本文所用的术语“缀合物”是指包括两个或多个分子彼此相连而形成单结构的化合物，任选其间通过连接基团连接。该连接可为分子间的直接连接（如化学键）或通过使用连接基团的连接。

本文所用的术语“支持物”、“底物”及“表面”是指由多孔或非多孔的不溶于水的材料形成的固相，该固相可具有多种形状如条、棒、颗粒、珠或多孔平板中任意一种。在某些实施方案中，支持物具有固定组织的支持物基质，该基质优选作用如组织基质，例如微滴定盘。固相支持物材料包括但不限于，纤维素、多糖如葡聚糖凝胶、玻璃、聚丙烯酰吗啉、硅胶、可控孔度玻璃（CPG）、聚苯乙烯、聚苯乙烯/乳胶、聚乙烯如超高分子量聚乙烯（UPE）、聚酰胺、聚偏 1,1-二氟乙烯（PVDF）、聚四氟乙烯（PTFE；TEFLON）、羧基改性的特氟隆、尼龙、硝化纤维素以及金属和合金如金、铂和钯。根据具体用途不同，固相支持物可为生物性、非生物性、有机、无机或这些的任意组合，存在如颗粒、绳束、沉淀物、凝胶、片、垫、卡、条、棒、试纸条、管道、球、容器、毛细管、垫、切片、薄膜、平板、滑动片等。优选该固相支持物为平面形状，以有助于接触生物样本如尿液、全血、血浆、血清、腹膜液或腹水。其他合适的固相支持物材料对于本领域技术人员而言显而易见。固相支持物为具有或不具内衬（例如聚苯乙烯或聚酯卡内衬）的膜，如可购自 Millipore Corp. (Bedford, MA) 者，例如 Hi-Flow™ Plus 膜卡。固相支持物表面可含有反应性基团，如羧

基、氨基、羟基、巯基等以连接核酸、蛋白质等。虽然并非全部，有时固相支持物表面的组成材料与支持物相同。因此，该表面可由多种材料中的任意种组成，如聚合物、塑料、树脂、多糖、硅胶或基于硅胶的材料、碳、金属、无机玻璃、膜或任意上述支持物材料（例如作为一层包被）。

本文所用的术语“标记”和“标志”是指可发出可检测信号的物质，包括但不限于酶如碱性磷酸酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶及辣根过氧化物酶、核酶、复制酶如 QB 复制酶的底物、启动子、染料、荧光剂（如荧光素、异硫氰酸盐、罗丹明化合物、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二醛及荧光胺）、化学发光剂如异鲁米诺、增敏剂、辅酶、酶底物、放射标记、颗粒如乳胶或碳颗粒、脂质体、细胞等，可进一步用染料、催化剂或其他可检测基团对其进行标记。

本文所用的术语“受体”及“受体蛋白”是指与其他分子如 Bcl-2 特异性结合的生物活性蛋白性分子。

本文所用的术语“配体”是指含有能与特定受体蛋白特异性相互作用而结合的结构部分的分子。

本文所用的术语“抗体”是指免疫球蛋白分子以及免疫球蛋白分子的免疫活性部分（片段），即含有抗体结合位点或抗原互补位的分子。该术语包括单克隆抗体及多克隆抗体。

本文所用的术语“单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”是指抗体分子中仅含有一种能与特定抗原发生免疫反应的抗体结合位点。因此，单克隆抗体组合物对发生免疫反应的任意抗原一般都表现为单一结合亲和力。单克隆抗体组合物一般由单细胞克隆产生的抗体组成，所述单细胞克隆称为杂交瘤，仅分泌（产生）一类抗体分子。杂交瘤细胞是由抗体产生细胞和骨髓瘤细胞或其他自持细胞系融合而成。此类抗体由 Kohler 和 Milstein, *Nature*, 1975, 256:495-497 首次描述，其公开在本文引用作为参考。示例性的杂交瘤技术描述于 Niman 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1983, 80:4949-4953 中。产生单克隆抗体、杂交瘤细胞或杂交瘤细胞培养物的其他方法也为公知。见如 *Antibodies: A Laboratory Manual*, Harlow 等人,

Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 或从所有免疫性组分中分离单克隆抗体的方法描述如 Sasatry 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1989, 86:5728-5732; 及 Huse 等人, Science, 1981, 246:1275-1281。本文引用的文献在此引用作为参考。

本文所用的“半透膜”是指液体不通透而气体可通过其转移的生物相容性材料。此类气体包括但不限于氧气、水蒸气及二氧化碳。半透膜是可用于形成封闭限流腔室的至少一部分的材料实例。半透膜能够将微生物污染排除在外(例如孔特征性小至足以阻止可污染分析物(如细胞)的微生物通过)。某一特定方面而言,半透膜的光学穿透性和清晰程度足以允许观察分析物如细胞的颜色、生长、大小、形态、成像及其他本领域已知的目的。

本文所用的术语“结合”是指任何永久性或暂时性的物理连接或紧密关联。例如,结合可为氢键、疏水作用、范德瓦尔斯力、共价键或离子键作用的结果。

本文所用的术语“颗粒”包括任何构型的不可溶材料,所述构型包括但不限于球形、线状、刷状及不规则形状。颗粒可为多孔的,内部含有规则或随机通道。颗粒可为磁性颗粒。颗粒的实例包括但不限于硅胶、纤维素、琼脂糖珠、聚苯乙烯(固体、多孔、衍生)珠、可控孔度玻璃、凝胶珠、磁珠、溶胶、生物细胞、亚细胞颗粒、微生物(原生动植物、细菌、酵母、病毒及其他感染病原)、微团、脂质体、环糊精及其他不可溶材料。

“编码序列”或“编码区域”为转录为 mRNA 和/或翻译为多肽的多核苷酸序列。例如,编码序列可编码目标多肽。编码序列的边界由 5'端的翻译起始密码子和 3'端的翻译终止密码子所确定。编码序列包括但不限于 mRNA、cDNA 及重组多核苷酸序列。

本文所用的术语“多肽”是指包括两个或多个氨基酸之中任意数目的任意聚合物,本文与术语“蛋白质”、“基因产物”及“肽”可互换使用。

本文所用的术语“核苷”是指含有嘌呤或嘧啶碱基,并与核糖或脱氧核糖共价连接的分子。核苷酸的实例包括腺嘌呤核苷、鸟嘌呤核苷、胞嘧

啶核苷、尿嘧啶核苷及胸腺嘧啶核苷。

本文所用的术语“核苷酸”是指含有一个或多个磷酸基团以酯键连于糖部分的核苷。核苷酸实例包括单磷酸核苷、双磷酸核苷以及三磷酸核苷。

本文术语“多核苷酸”、“核酸分子”以及“核苷酸分子”可互换使用，是指由5'和3'碳原子之间形成磷酸二酯键连接而成的核苷酸聚合物。例如，多核苷酸可编码多肽如 Bcl-2 多肽（不论是否表达），也可为短干扰 RNA（siRNA）、反义核酸（反义寡核苷酸）、适体、核酶（催化性 RNA）或三链寡核苷酸（即抗基因）。

本文所用的术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”一般是指核糖核苷酸聚合物。术语“DNA”或“DNA 分子”或“脱氧核糖核酸分子”一般是指脱氧核糖核苷酸聚合物。可以天然合成 DNA 和 RNA 分子（例如分别通过 DNA 复制或 DNA 转录）。RNA 分子可经转录后修饰。也可化学合成 DNA 和 RNA 分子。DNA 和 RNA 分子可为单链（即分别为 ssRNA 和 ssDNA）或多链（例如双链，即分别为 dsRNA 和 dsDNA）。然而，基于本发明的性质，术语“RNA”或“RNA 分子”或“核糖核酸分子”也可指基本（即大于 80% 或优选大于 90%）由核糖核苷酸组成的聚合物，但任选含有至少一个非核糖核苷酸分子，例如至少一个脱氧核糖核苷酸和/或至少一个核苷酸类似物。

本文所用的术语“核苷酸类似物”或“核酸类似物”在此处也指经改变的核苷酸/核酸，或经修饰的核苷酸/核酸，是指非标准核苷酸，包括非天然存在的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸。优选核苷酸类似物可在任意位点进行修饰，只要其改变核苷酸的某些化学性质但仍保留该核苷酸类似物行使其预期功能的能力。例如，锁定核酸（LNA）为一类核苷酸类似物，具有对互补 DNA 和 RNA 的极高度亲和力和出众的特异性。LNA 寡核苷酸已被用作体外及体内的反义分子（Jepsen J.S. 等人，*Oligonucleotides*, 2004, 14(2):130-146）。

本文所用的术语“RNA 类似物”是指与未改变或未修饰的相应 RNA 相比，具有至少一处改变或修饰的核苷酸的多核苷酸（如化学合成的多核

苷酸),但仍保留了与未改变或未修饰的相应 RNA 相同或相似的性质或功能。如上所述,寡核苷酸可被连接相连,所述连接使 RNA 类似物相对于磷酸二酯键连接的 RNA 分子水解率下降。RNA 类似物的实例包括糖-和/或主干修饰的核糖核苷酸和/或脱氧核糖核苷酸。此类改变或修饰还可包括添加非核苷酸材料,例如向 RNA 末端或内部(在 RNA 的一个或多个核苷酸上)添加。

术语“包括”、“由组成”以及“主要由组成”根据其标准含义定义。这些术语在本申请中可以相互替换,以共享每一术语所含的特定含义。

术语“分离的”或“生物纯净”是指材料基本不含有天然状态材料中通常伴随的成分。

除非另行说明,本说明书中使用的单数形式“一个”和“某个”包括复数含义。因此,例如提及“某一抗体”包括超过一个此类抗体。提及“某一分子”包括超过一个此类分子,诸如此类。

除非另有说明,本发明的实施使用本领域技术内分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、电生理学以及药理学的常规技术。此类技术详细描述于文献中(见如 Sambrook, Fritsch & Maniatis, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第二版(1989); *DNA Cloning*, 第 I 及 II 卷 (D. N. Glover 编著, 1985); Perbal, B., *A Practical Guide to Molecular Cloning* (1984); 系列 *Methods In Enzymology* (S. Colowick 和 N. Kaplan 编著, Academic Press, Inc.); *Transcription and Translation* (Hames 等人编著, 1984); *Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells* (J. H. Miller 等人编著, (1987) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.); Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (第 2 版, Springer-Verlag); 以及 *PCR: A Practical Approach* (McPherson 等人编著 (1991) IRL Press)), 其中每一部均全部在本文引用作为参考。

以下为说明实施本发明的材料、方法及步骤的实例。这些实例为说明性,并无限制性。

材料和方法

患者队列. 根据以前的制度审批, 收集正常健康对照志愿者 (N=21)、患有良性妇科疾病女性 (N=35) 以及 H. Lee Moffitt 癌症中心的卵巢癌患者 (N=34) 的尿液及血液样本。除了 8 份样本外其余均在首次手术切除前收集, 而后 8 份样本在研究募集时已出现疾病复发。若可能则鉴定福尔马林蜡块, 并回顾切片以根据 FIGO 评分确认其组织学诊断。同时也回顾这些女性的医疗记录, 并提取可得的相关患者年龄、肿瘤类型、分期、分级、大小及手术治疗的摘要。

样本制备. 在患者知情同意前提下, 收集患者的尿样和血浆, 匿名并编码以保护患者身份, 从 H. Lee Moffitt 癌症中心取出以进行此项研究。所用的样本均保存于冰内。用标准蛋白酶抑制剂组合 (80 µg/ml 4-(2 氨基乙基)-苯磺酰氟、200µg/ml EDTA、0.2 µg/ml 抑酶醛肽、0.2 µg/ml 胃蛋白酶抑制剂, Sigma Scientific, St. Louis, MI) 处理尿样, 并于 3000 × g 下离心。然后将尿上清液和血浆样本等分并贮存于 -20℃。

酶联免疫吸附测定. 为测量患者尿中 Bcl-2 水平, 根据生产商的说明, 使用定量夹心酶联免疫吸附测定 (ELISA; R&D Systems, Minneapolis, MN) 测定样本。为测量受试者的血浆 CA125 水平, 根据生产商说明用 ELISA (Bio-Quant, San Diego, CA) 测定样本。使用 Dynex MRX 平板读数器 (Dynex Technologies, Chantilly, VA) 于 450nm 处检测酶反应, Bcl-2 的结果以三次重复样本的吸收均值±S.E 表示, 而 CA125 结果表示为两次重复样本的均值。

统计分析. Bcl-2 ELISA 的样本重复检测三次, 采用 Kruskal-Wallis 测试进行其数据的正态分布性。然后用 Mann-Whitney U 检验分析数据以确定正常对照样本、良性疾病患者样本以及卵巢癌患者样本间的统计学显著性。与之相似, 利用 SAS 系统进行的判别分析被用于确定每组成员的正确性 (正常 vs. 良性 vs. 癌肿)。

实施例 1 - 卵巢癌患者尿 Bcl-2 水平增高

收集 90 人的尿液及血液，其中样本收集自正常对照 (N=21)、患有良性疾病女性 (N=35) 及患有卵巢癌女性 (N=34)。后一组由诊断为子宫内膜样癌 (N=1)、粘液性 (N=7) 及浆液性卵巢癌 (N=24) 以及常与卵巢癌相关的原发腹膜癌 (N=2) 的女性组成。样本收集自良性妇科疾病女性，所述女性包括良性囊性畸胎瘤 (N=2)、单纯囊肿 (N=10)、平滑肌瘤 (N=8)、多囊卵巢疾病 (N=1)、卵巢腺纤维瘤 (N=4)、粘液性囊腺瘤 (N=2) 以及浆液性囊腺瘤 (N=8) 女性。虽然这一队列仅为一个小型预试验，它在组织性、分级及分期分布上具有典型临床实践的代表性。

为确定尿 Bcl-2 水平是否适合作为新的卵巢癌分子标志物，通过 ELISA 分析筛查正常对照、良性妇科疾病女性及卵巢癌患者的尿样 (图 1)。正常对照样本中尿 Bcl-2 量通常很低 (均值 0.21ng/ml)。与之相对，卵巢癌及原发腹膜癌中尿 Bcl-2 通常大于正常对照样本 10 倍以上 (3.4ng/ml) (图 1A)。正常尿液中 Bcl-2 含量均小于 1.8ng/ml，而仅有 2 份癌症样本的 Bcl-2 低于 1.8ng/ml (1.12ng/ml 和 1.78 ng/ml)。由于浆液性癌是卵巢上皮细胞癌的主要类型，对浆液性腺癌患者而言，根据疾病分级 (图 1A) 和分期 (图 1B) 检查其尿 Bcl-2 水平。尽管随着肿瘤分级和分期增高 Bcl-2 水平有增高的趋势，肿瘤分级和分期间 Bcl-2 水平的差异并无统计学显著性。与之类似，测量了尿液收集时的血清肌酐，提示尿 Bcl-2 水平与肾功能不全并无相关性 (数据未显示)。特别是一名患者 (#77) 尿 Bcl-2 水平出现了极显著增高 (>9ng/ml)，而并无其他显著临床症状。

表 2 总结了图 1 和图 2 所示尿样平均 Bcl-2 水平的结果。括号内的数字表示每一组中的样本数目。此外，将这些数据进行分组，以显示正常个体及卵巢癌组织学亚型、肿瘤分级和肿瘤分期间的平均 Bcl-2 水平 (ng/ml)。数据显示健康志愿者尿中 Bcl-2 的平均水平为 0.204ng/ml，所有癌症患者的尿 Bcl-2 水平一般为其 10 倍 (3.12 ng/ml)。此外，在浆液性卵巢癌 (最常见的卵巢癌类型) 中，尿 Bcl-2 水平似乎与肿瘤分期显著相关，而与肿瘤分级中度相关。

表 2.正常及卵巢癌患者的尿 Bcl-2 水平

样本		Bcl-2 (ng/ml)
正常 (21)		0.204
子宫内膜样 (1)		3.168
粘液性 (4)		2.35
腹膜性 (2)		1.78
浆液性 (29)	1 级 (7)	2.76
	2 级 (10)	3.98
	3 级 (12)	3.94
	1 期 (3)	1.92
	2 期 (4)	3.23
	3 期 (14)	4.07
	5 期 (8)	4.04

实施例 2 - 良性妇科疾病患者的尿 Bcl-2 并未增高

ELISA 测量 35 名良性妇科疾病患病女性尿 Bcl-2 (在患者治疗前收集尿液), 提示 Bcl-2 水平均值为 0.02ng/ml, 样本中无一 Bcl-2>1.8ng/ml, 如图 8A 所示。这些良性疾病包括良性畸胎瘤、单纯囊肿、平滑肌瘤、多囊卵巢、纤维瘤及腺瘤。这些检测值与正常对照类似, 但显著低于卵巢癌样本, 提示增高的尿 Bcl-2 水平 (大于 1.8ng/ml) 与卵巢癌相关。

Kruskal-Wallis 检验用于测试数据的正态分布性。由于“正常”组不符合正态分布 (可能是由于样本数过小), 以 Mann-Whitney U 检验分析组间差异。结果提示正常和良性组间无显著差异 ($p<0.5$), 但正常和癌症或良性和癌症组间 $p<0.001$ 。图 8B 是对该研究组尿 Bcl-2 水平的总结。与之类似, 使用 SAS 系统进行的判别分析显示, 正常/良性或癌症组中成员正确性的概率大于 90%。

实施例 3 - 尿 Bcl-2 与患者年龄或肿瘤大小无关

对临床参数的比较提示尿 Bcl-2 水平与患者年龄无关（见图 5）。虽然正常对照（29-81 岁，均值 $48.5 \pm S.D. 12.7$ 岁）以及良性妇科疾病患者女性（28-84 岁，均值 $55.9 \pm S.D. 13.9$ 岁）的年龄范围及平均年龄略低于卵巢癌患者（26-92 岁，均值 $62.2 \pm S.D. 13.8$ 岁），本研究中该差异并无统计学显著性。与之类似，尿 Bcl-2 水平与切除手术时测量的肿瘤大小并不相关（图 6），肿瘤大小从微型至 $>10\text{cm}$ ，这可能反映了个体间的生物变异或肿瘤组成的变异。

实施例 4 - 尿 Bcl-2 检测卵巢癌比血 CA125 更准确

为证实尿 Bcl-2 增高是否是比癌抗原 125 (CA125) 更好的卵巢癌诊断指标，比较 12 名正常对照以及 23 名卵巢癌患者中的尿 Bcl-2 与 CA125 水平（图 4A 和 4B）。在检查的患者中尿 Bcl-2 增高与卵巢癌检测的相关性几乎为 100%。尿 Bcl-2 水平增高 ($>1.8\text{ng/ml}$) 鉴定了 17/17 浆液性腺癌患者、4/4 粘液性腺癌患者，以及 1/2 原发腹膜癌患者为卵巢癌阳性（图 4A）。正常对照中无一尿 Bcl-2 水平 $>1.8\text{ng/ml}$ ，从而正确被归为癌症阴性。与之相对，现行的卵巢癌检测标准血 CA125 水平 $>35\text{U/ml}$ 鉴定了 13/17 或 76% 浆液性腺癌患者（图 4B）。与之类似，CA125 分析鉴定了 3/4 或 75% 粘液性卵巢癌患者（尽管这些患者的 CA125 水平为 41-43 U/ml），以及 1/2 或 50% 原发性腹膜癌患者为癌症阳性。CA125 水平增高也错误地将 2/12 或 16% 健康个体鉴定为癌症阳性，这提示尿 Bcl-2 增高用于检测卵巢癌似乎比 CA125 更准确。

实施例 5 - 手术切除后尿 Bcl-2 下降

为进一步测试高水平尿 Bcl-2 检测卵巢癌的准确性，比较 7 名卵巢癌患者初次手术切除除去所有可见肿瘤前（图 7A 和 7B，黑色柱）以及手术后 2 周内（白色柱）尿 Bcl-2 的水平。对于这些收集初次术前及术后尿液的患者而言，手术移除肿瘤后 Bcl-2 水平下降多达 100%，表明卵巢癌患者中肿瘤的存在与尿 Bcl-2 增高相关性良好。

目前，临床前研究集中关注研发 Bcl-2 抑制物，包括反义寡核苷酸及小分子 Bcl-2 抑制物。虽然此类研究以 Bcl-2 为治疗性干预的靶位，目前的数据提示利用基于 ELISA 的测定对尿 Bcl-2 进行定量提供了用于检测卵巢癌的安全、灵敏、特异且经济的新方法，将惠及美国及世界范围内的所有女性包括医疗服务不足的地区，特别是卵巢癌发生风险高的女性人群。此外，考虑到每年美国约有 25,000 女性被诊断为卵巢癌，在疾病早期和晚期利用尿 Bcl-2 检测卵巢癌不但可以证实卵巢癌的诊断，也有可能检测出数以千计的以往未被诊断的卵巢癌。这对于早期检测卵巢癌尤其重要，在诊断的卵巢癌中早期卵巢癌不超过 10%，但手术切除患侧卵巢可使患者存活率提高至 90% 以上，并可预见减少终生医疗费用。最后，除了发挥新的诊断功能以外，尿 Bcl-2 水平可用于监测病程中卵巢癌的存在与否，从而可能影响治疗和预后结局。显而易见，需要更大样本人群的研究以证实尿 Bcl-2 水平是否能作为卵巢癌生物标志物，并研究卵巢癌中尿 Bcl-2 增高的分子机制。然而，由于并无报道使用尿液检测或 Bcl-2 作为卵巢癌的生物标志物，该试点研究表明，利用 ELISA 测量尿 Bcl-2，提供了检测所有卵巢癌肿的新的简便方法，并可能降低该导致每年数千女性死亡的隐匿疾病的致死率。

实施例 6 - Bcl-2 测试的尿保存条件

检查尿 Bcl-2 的保存稳定性的研究表明，若制备样本时添加了蛋白酶抑制剂组合，则这些尿液可于 -20℃ 保存 1 年以上而不致丧失其中 Bcl-2 的可检测性（见图 11 中“对照”及“-20℃”）。这有益于那些需要重复测试以前样本及现有样本的个体。或者，也可将这些样本保存在 4℃ 最多 4 天，而不会对尿 Bcl-2 的检测产生不良影响。这些结果很重要，因为它们提示，只要向尿样中添加蛋白酶抑制剂并保持尿样冷冻，将患者尿液运送（从可能较远的地区）到实验室进行 Bcl-2 检测可能需要的时间就不会对尿 Bcl-2 检测的结果造成不良影响。然而，室温保存 4 天的样本中 Bcl-2 测量值降低，而 -80℃ 保存的尿样中无法检测到 Bcl-2；因此，应当禁止将用于 Bcl-2

检测的尿样保存于室温或-80℃。

本文提及或引用的所有专利、专利申请、临时申请及出版物（见上或见下）在此处均全部引用作为参考，包括其中所有的图和表格，只要它们与本说明中的明确教导无矛盾之处。

应当理解本文所述的实施例和实施方案均仅用于说明，本领域技术人员可根据其提出多种修饰或改变建议，其也包括在本申请的精神和范围内。

- <110> 南佛罗里达大学
- <120> 利用 BCL-2 水平的增高检测癌肿
- <130> USF-254XC1
- <150> 60/771, 677
- <151> 2006-02-09
- <160> 6
- <170> PatentIn 版本 3.3
- <210> 1
- <211> 6030
- <212> DNA
- <213> 人 (Homo sapiens)
- <300>
- <301> Cleary, M. L., Smith, S. D. 和 Sklar, J.
- <302> Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation
- <303> Cell
- <304> 47
- <305> 1
- <306> 19-28
- <307> 1986
- <400> 1
- gttggccccc gttacttttc ctctgggaaa tatggcgcac gctgggagaa cagggtacga 60
- taaccggggag atagtgatga agtacatcca ttataagctg tcgcagaggg gctacgagtg 120
- ggatgcggga gatgtgggcg ccgcgcccc gggggccgcc cccgcgccg gcattttctc 180
- ctcgcagccc gggcacacgc ccatacagc cgcatcccg gaccggctc ccaggacctc 240
- gccgctgcag accccggctg cccccggcgc cgccgcgggg cctgcgctca gcccggtgcc 300
- accigtggtc cacctgacct tccgccagc cggcgacgac ttctccgcc gctaccgccg 360
- cgacttcgcc gagatgtcca ggcagctgca cctgacgcc tteaccgcgc ggggacgctt 420
- tgccacggtg gtggaggagc tcttcagga cggggtgaac tgggggagga ttgtggcctt 480
- cittgagttc ggtggggctca tgtgtgtgga gagcgtcaac cgggagatgt cggccctggt 540

ggacaacatc gccctgtgga tgactgagta cctgaaccgg cacctgcaca cctggatcca 600
ggataacgga ggctgggatg cctttgtgga actgtacggc cccagcatgc ggccctctgtt 660
lgatttctcc tggctgtctc tgaagactct gctcagtttg gccctgggtg gagcttgcac 720
caccctgggt gcctatctgg gccacaagtg aagtcaacat gcctgcccc aacaaatag 780
caaaagggtc actaaagcag tagaaataat atgcattgtc agtgatgttc catgaaacaa 840
agctgcagge tgtttaagaa aaaataacac acatataaac atcacacaca cagacagaca 900
cacacacaca caacaattaa cagtcttcag gcaaaacgtc gaatcagcta tttactgcca 960
aagggaaata tcatttattt tttacattat taagaaaaaa agatttattt atttaagaca 1020
gicccatcaa aactcctgtc ttggaaatc cgaccactaa ttgccaagca ccgcttcgtg 1080
lggctccacc tggatgttct gtgcctgtaa acatagattc gctttccatg ttgttgccg 1140
galcaccatc tgaagagcag acggatggaa aaaggacctg atcattgggg aagctggctt 1200
ictggctgct ggaggctggg gagaagggtg tcattcactt gcatttcttt gccctggggg 1260
ctlgatatt aacagaggga gggttctgt ggggggaagt ccatgcctcc ctggcctgaa 1320
gaagagatic tttgcatatg actcacatga tgcatacctg gtgggaggaa aagagtggg 1380
aacctcagat ggacctagta cccactgaga tttccacgcc gaaggacagc gatgggaaaa 1440
algcccttaa atcataggaa agtatttttt taagctacca attgtgccga gaaaagcatt 1500
tlagcaattt atacaatate atccagtacc ttaagccctg attgtgtata ttcatatatt 1560
tlggatacgc acccccac tccaataact ggctctgtct gagtaagaaa cagaatctc 1620
tggaaactiga ggaagtgaac atttcggtga ctccgcac aggaaggcta gagttacca 1680
gagcaicagg ccgccacaag tgctgcttt taggagaccg aagtccgcag aacctgctg 1740
lgtcccagct tggaggcctg gtccctggaac tgagccgggg ccctcactgg cctcctccag 1800
ggatgatcaa cagggcagtg tggctctcca atgtctggaa gctgatggag ctcaaatc 1860
cacigtcaag aaagagcagt agaggggtgt ggctgggcct gtcaccctgg ggccctccag 1920
gtaggccctt tttcacgtgg agcatgggag ccacgacct tcttaagaca tgtatactg 1980

tagaggggaag gaacagaggc cctgggccct tcctatcaga aggacatggt gaaggctggg	2040
aacgtgagga gaggcaatgg ccacggccca ttttggctgt agcacatggc acgttggctg	2100
tglggccitg gcccacctgt gagtttaaag caaggcttta aatgactttg gagagggtca	2160
caaatcctaa aagaagcatt gaagtgaggt gtcattgatt aattgacccc tgtctatgga	2220
atlacatgta aaacattatc ttgtcactgt agtttggttt tatttgaaaa cctgacaaaa	2280
aaaaagtcc aggtgtgaa tatgggggtt atctgtacat cctggggcat taaaaaaaa	2340
atcaatggtg gggaactata aagaagtaac aaaagaagtg acatcttcag caaataaact	2400
aggaaatfff tttttcttc agtttagaat cagccttgaa acattgatgg aataactctg	2460
iggcattatt gcattatata ccatttatct gtattaactt tggaatgtac tctgttcaat	2520
glliaatgct gtggttgata tttcgaaagc tgctttaaa aaatacatgc atctcagcgt	2580
ttttttgttt ttaattgtat ttagttatgg cctatacact atttggagc aaaggtgatc	2640
gttttctgtt tgagatffff atctcttgat tcttcaaaag cattctgaga aggtgagata	2700
agccctgagt ctgagctacc taagaaaaac ctggatgtca ctggccactg aggagctttg	2760
tlcaacca gtcattgtca tttccacgtc aacagaattg tttattgtga cagttatata	2820
tglgtccct ttgaccttgt ttcttgaagg tttcctcgtc cctgggcaat tccgattta	2880
atlcattgta ttcaggatta catgcatggt tggttaaacc catgagattc attcagttaa	2940
aaatccagat ggcaaatgac cagcagattc aaatctatgg tggtttgacc tttagagagt	3000
tgcittacgt ggccgtttc aacacagacc caccagagc cctcctgccc tccttccgcg	3060
ggggctttct catggctgtc cttcagggtc ttctgaaat gcagtgggtc ttacgtcca	3120
ccaagaaagc aggaaacctg tggatgaag ccagacctc ccggcgggcc tcagggaaca	3180
gaatgatcag acctttgaat gattctaatt ttttaagcaa atattatfff atgaaaggtt	3240
facatigtca aagtgatgaa tatggaatat ccaatcctgt gctgctatcc tgccaaaatc	3300
atllaatgg agtcagtttg cagtatgctc cacgtggtaa gatcctcca gctgctttag	3360
aagtaacaat gaagaacgtg gacgctttta atataagcc tgttttct tctgttgtg	3420
ttcaaacggg attcacagag tatttgaaaa atgtatatat attaagaggt cacgggggct	3480

aallgctggc tggctgcctt ttgctgtggg gttttgttac ctggttttaa taacagtaaa 3540
tglgcccagc ctcttggccc cagaactgta cagtattgtg gctgcaactg ctctaagagt 3600
agttgatggt gcattttcct tattgttaaa aacatgtag aagcaatgaa tgtatataaa 3660
agcctcaact agtcattttt ttctcctctt ctttttttctc attatatcta attattttgc 3720
agttgggcaa cagagaacca tccctatttt gtattgaaga gggattcaca tctgcatcct 3780
aactgctctt tatgaatgaa aaaacagtcc tctgtatgta ctctcttta cactggccag 3840
ggtcagagtt aaatagagta tatgcacttt ccaaattggg gacaagggtc ctaaaaaaag 3900
ccccaaaagg agaagaacat ctgagaacct cctcggcctt cccagtcctt cgctgcacaa 3960
atactccgca agagaggcca gaatgacagc tgacagggtc tatggccatc gggctcgtctc 4020
cgaagatttg gcaggggcag aaaactctgg caggcttaag atttgggaata aagtcacaga 4080
alcaaggaag cacctcaatt tagttcaaac aagacgcaa cattctctcc acagctcact 4140
tacctctctg tgttcagatg tggccttcca tttatatgtg atctttgttt tattagtaaa 4200
tgcattatcat ctaaagaigt agctctggcc cagtgggaaa aattaggaag tgattataaa 4260
tcgagaggag ttataataat caagattaaa tgtaataat cagggcaatc ccaacacatg 4320
tctagctttc acctccagga tctattgagt gaacagaatt gcaaatagtc tctatttgta 4380
allgaactta tcctaaaaca aatagttttat aatgtgaac ttaaactcta attaattcca 4440
actglacttt taaggcagtg gctgttttta gactttctta tcacttatag ttagtaatgt 4500
acacctactc taccagagaa aaacaggaaa ggctcgaaat acaagccatt ctaaggaaat 4560
tagggagtca gttgaaatc tattctgac tttattctgtg gtgtcttttg cagcccagac 4620
aaaigtggtt acacactttt taagaaatac aattctacat tgtcaagctt atgaaggttc 4680
caalcagatc tttattgtta ttcaatttgg atctttcagg gatttttttt ttaaattatt 4740
algggacaaa ggacatttgt tggaggggtg ggagggagga acaattttta aatataaaac 4800
allcccaagt ttggatcagg gagtgggaag ttttcagaat aaccagaact aagggtatga 4860
aggacctgta ttggggtcga tgtgatgcct ctgcgaagaa ccttgtgtga caaatgagaa 4920

acattttgaa gtttgtggta cgaccttag attccagaga catcagcatg gctcaaagtg 4980
 cagciccgtt tggcagtgca atggtataaa tttcaagctg gatatgtcta atgggtattt 5040
 aaacaataaa tgtgcagttt taactaacag gatatttaat gacaaccttc tggttggtag 5100
 ggacatctgt ttctaaatgt ttattatgta caatacagaa aaaaatttta taaaattaag 5160
 caatgtgaaa ctgaattgga gagtgataat acaagtcctt tagtcttacc cagtgaatca 5220
 ttctgttcca tgtctttgga caacctgac cttggacaat catgaaatat gcactcact 5280
 ggatgcaaag aaaatcagat ggagcatgaa tggactgta ccggttcac tggactgccc 5340
 cagaaaaata acttcaagca aacatcctat caacaacaag gttgttctgc ataccaagct 5400
 gagcacagaa gatgggaaca ctggtggagg atggaaaggc tcgctcaatc aagaaaattc 5460
 tgagactatt aataaataag actgtagtgt agatactgag taaatccatg cacctaaacc 5520
 ttttggaaaa tctgccgtgg gccctccaga tagctcattt cattaagttt ttcctccaa 5580
 ggtagaalti gcaagagtga cagtggattg catttctttt ggggaagctt tcttttggtg 5640
 gtttlttlla ttataccttc ttaagtttcc aaccaaggtt tgcttttggt ttgagttact 5700
 ggggttattt ttgttttaaa taaaaataag tgtacaataa gtgtttttgt attgaaagct 5760
 tttgttatca agattttcat acttttacct tccatggctc tttttaagat tgatactttt 5820
 aagaggtggc tgatattctg caacactgta cacataaaaa atacggtaag gatactttac 5880
 atggttaagg taaagtaagt ctccagttgg ccaccattag ctataatggc actttgtttg 5940
 tgttgttggg aaaagtcaca ttgccattaa actttccttg tctgtctagt taatattgtg 6000
 aagaaaaata aagtacagtg tgagatactg 6030

<210> 2
 <211> 239
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 2

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
 1 5 10 15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
 20 25 30

- <303> Surgery
 <304> 140
 <305> 6
 <306> 899-905
 <307> 2006
- <300>
 <301> Haydee Cottliar, A. S., Noriega, M. F., Narbaitz, M., Rodriguez, A. Slavutsky, I. R.
 <302> Association between telomere length and BCL2 gene rearrangements in low- and high-grade non-Hodgkin lymphomas
 <303> Cancer Genet. Cytogenet.
 <304> 171
 <305> 1
 <306> 1-8
 <307> 2006
- <300>
 <301> Maluf, F. C., Cordon-Cardo, C., Verbel, D. A., Satagopan, J. M., Boyle, M. G., Herr, H. Bajorin, D. F.
 <302> Assessing interactions between mdm-2, p53, and bcl-2 as prognostic variables in muscle-invasive bladder cancer treated with neo-adjuvant chemotherapy followed by locoregional surgical
 <303> Ann. Oncol.
 <304> 17
 <305> 11
 <306> 1677-1686
 <307> 2006
- <300>
 <301> Porebska, I., Wyrodek, E., Kosacka, M., Adamiak, J., Jankowska, R. Harlozinska-Szmyrka, A.
 <302> Apoptotic markers p53, Bcl-2 and Bax in primary lung cancer
 <303> In Vivo
 <304> 20
 <305> 5
 <306> 599-604
 <307> 2006
- <400> 3
 ttctgtgaa gcagaagtct gggaatcgat ctggaatcc tctaatttt tactccctct 60
 ccccgcgact cctgattcat tgggaagttt caaatcagct ataactggag agtgctgaag 120
 attgatggga tcgttgccctt atgcatttgt tttggtitta caaaaaggaa acttgacaga 180
 ggatcatgct gtacttaaaa aatacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata 240
 ctactaata ataacgtgcc tcatgaaata aagatccgaa aggaattgga ataaaaattt 300

cctgcatctc atgccaaggg ggaacacca gaatcaagtg ttccgctga ttgaagacac 360
ccccctgtcc aagaatgcaa agcacatcca ataaaatagc tggattataa ctctctttct 420
ttctctgggg gccgtggggt gggagctggg gcgagagggt ccgttgccc ccgttgcttt 480
tcctctggga aggatgggc acgctgggag aacagggtac gataaccggg agatagtgat 540
gaagtacatc cattataage tgtcgcagag gggctacgag tgggatgagg gagatgtggg 600
cgccgcgccc ccgggggccc ccccccacc gggcatcttc tcctcccagc ccgggcacac 660
gccccatcca gccgcatccc gggaccgggt cggcaggacc tcgccgtgc agaccccggc 720
tgccccggc gccgccggg ggctgcgct cagcccgggt ccacctgtgg tccacctgac 780
ccctccgag gccggcgag acttctccc cgcctaccgc cgcgacttc ccgagatgtc 840
cagccagctg cacctgacgc ccttcaccgc gcggggacgc tttgccacgg tggaggagga 900
gtctctcagg gacggggtga actgggggag gattgtggcc ttctttgagt tcggagggg 960
catgtgtgtg gagagcgtca accgggagat gtcgccctg gtggacaaca tcgccctgtg 1020
galgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc caggataac gaggtggga 1080
tgcccttggt gaactgtacg gccccagcat gcggcctctg tttgatttct cctggctgtc 1140
ictgaagact ctgctcagtt tggcctgggt gggagcttgc atcaccctgg gtgcctatct 1200
ggccacaag tgaagtcaac atgcctgcc caaacaata tgcaaaagg tcaactaaagc 1260
agtagaaata atatgcattg tcagtgatgt accatgaaac aaagctgcag gctgtttaag 1320
aaaaaataac acacatataa acatcacaca cacagacaga cacacacaca cacaacaatt 1380
aacagtcttc aggcaaacg tcgaatcagc tatttactgc caaaggaaa tatcatttat 1440
tltttacatt altaagaaaa aaagatttat ttatttaaga cagtcccatc aaaactcctg 1500
lctllggaaa tccgaccact aattgccaag caccgcttcg tgtggctcca cctggatggt 1560
ctglgcctgt aaacatagat tcgctttcca tgttgttggc cggatcacca tctgaagagc 1620
agacggatgg aaaaaggacc tgatcattgg ggaagctggc tttctggctg ctggaggctg 1680
gggagaaggt gttcattcac ttgcatttct ttgcctggg ggctgtgata ttaacagagg 1740

gagggttccct	gtggggggaa	gtccatgcct	ccttggcctg	aagaagagac	tctttgcata	1800
tgactcacat	gatgcatacc	tggtgggagg	aaaagagttg	ggaacttcag	atggacctag	1860
taccactga	gatttccacg	ccgaaggaca	gcgatgggaa	aaatgccctt	aaatcatagg	1920
aaagtatttt	tttaagctac	caattgtgcc	gagaaaagca	tttagcaat	ttatacaata	1980
tcattccagta	ccttaagccc	tgatttgta	tattcatata	ttttggatac	gcacccccca	2040
actcccaata	ctggctctgt	ctgagtaaga	aacagaatcc	tctggaactt	gaggaagtga	2100
acatttcggt	gacttccgca	tcaggaaggc	tagagtacc	cagagcatca	ggccgccaca	2160
agtgccctgct	tttaggagac	cgaagtccgc	agaacctgcc	tgtgtccag	cttgagggcc	2220
tggtcctgga	actgagccgg	ggcctcact	ggcctcctcc	agggatgatc	aacagggcag	2280
tgtggtctcc	gaatgtctgg	aagctgatgg	agctcagaat	tccactgtca	agaaagagca	2340
glagaggggt	gtggctgggc	ctgtcacct	ggggcctcc	aggtaggccc	gttttcacgt	2400
ggagcatggg	agccacgacc	cttcttaaga	catgtatcac	tgtagagga	aggaacagag	2460
gccctgggcc	cttcctatca	gaaggacatg	gtgaaggctg	ggaacgtgag	gagaggcaat	2520
ggccacggcc	cattttgget	gtagcacatg	gcacgttggc	tgtgtggcct	tggcccacct	2580
gtgagtttaa	agcaaggctt	taaatgactt	tggagagggt	cacaaatcct	aaaagaagca	2640
ttgaagtgag	gtgtcatgga	ttaattgacc	cctgtctatg	gaattacatg	taaaacatta	2700
ctttgtcact	gtagtttgg	tttatttgaa	aacctgacaa	aaaaaaagt	ccaggtgtgg	2760
aatatggggg	ttatctgtac	atcctggggc	attaaaaaaa	aatcaatgg	tggggaacta	2820
taaagaagta	acaaaagaag	tgacatcttc	agcaataaaa	ctaggaaatt	ttttttctt	2880
ccagtttaga	atcagccttg	aacattgat	ggaataactc	tgtggcatta	ttgcattata	2940
taccatttat	ctgtattaac	tttggaatgt	actctgttca	atgtttaatg	ctgtggttga	3000
tatttcgaaa	gctgctttaa	aaaaatacat	gcacttcagc	gttttttgt	ttttaattgt	3060
atllagttat	ggcctataca	ctatttgtga	gcaaagggtga	tcgttttctg	tttgagattt	3120
ttatctcttg	attcttcaaa	agcattctga	gaaggtgaga	taagccctga	gtctcagcta	3180
cclaagaaaa	acctggatgt	cactggccac	tgaggagctt	tgtttcaacc	aagtcatgtg	3240

calttccacg tcaacagaat tgtttattgt gacagttata tctgttgccc ctttgacct	3300
gtttcttgaa ggtttctcgc tccctgggca attccgcatt taattcatgg tattcaggat	3360
tacatgcatg ttgggttaaa cccatgagat tcattcagtt aaaaatccag atggcaaatg	3420
accagcagat tcaaatctat ggtggtttga cctttagaga gttgctttac gtggcctggt	3480
tcaacacaga cccaccaga gccctcctgc ectccttccg cgggggcttt ctcatggctg	3540
tccttcaggg tcttctgaa atgcagtggg gcttacgctc caccaagaaa gcaggaaacc	3600
tgiggatga agccagacct ccccgccggg cctcaggaa cagaatgac agaccttga	3660
atgattctaa tttttaagca aatattatt ttatgaaagg ttacattgt caaagtgatg	3720
aatatggaat atccaatcct gtgctgctat cctgccaaa tcattttaat ggagtcagtt	3780
tgcagtatgc tccacgtggg aagatcctcc aagctgcttt agaagtaaca atgaagaacg	3840
lggacgtttt taatataaag cctgttttgt cttttgttgt tgttcaaacg ggattcacag	3900
aglatttgaa aaatgtatat atattaagag gtcacggggg ctaattgctg gctggctgcc	3960
tttgccttg gggttttgtt acctggtttt aataacagta aatgtgcca gcctcttggc	4020
cccagaactg tacagtattg tggctgcact tgctctaaga gtagttgatg ttgcattttc	4080
ctatttgta aaaacatggt agaagcaatg aatgtatata aaagcctcaa ctagtcat	4140
tttctcctc ttctttttt tcattatata taattatttt gcagttgggc aacagagaac	4200
catccctatt ttgtattgaa gagggattca catctgcatc ttaactgctc tttatgaatg	4260
aaaaaacagt cctctgtatg tactcctctt tacactggcc agggtcagag ttaaatagag	4320
talatgcact ttccaaattg gggacaaggg ctctaaaaaa agccccaaaa ggagaagaac	4380
aictgagaac ctctcggcc ctcccagtcc ctgctgcac aaatactccg caagagaggc	4440
cagaatgaca gctgacaggg tctatggcca tgggtcgtc tccgaagatt tggcaggggc	4500
agaaaactct ggcaggctta agatttgaa taaagtcaca gaattaagga agcacctcaa	4560
ttlacttcaa acaagacgcc aacattctct ccacagctca ctacctctc tgtgttcaga	4620
tgiggccttc catttatatg tgatcttctt tttattagta aatgcttatc atctaaagat	4680

gtagctctgg cccagtggga aaaattagga agtgattata aatcgagagg agttataata 4740
 atcaagatta aatgtaaata atcagggcaa tcccaacaca tgtctagctt tcacctccag 4800
 galctattga gtgaacagaa ttgcaaatag tctctatttg taattgaact taccctaaaa 4860
 caaatagttt ataaatgtga acttaaactc taattaattc caactgtact ttaaggcag 4920
 tggctgtttt tagactttct taccacttat agttagtaat gtacacctac tctatcagag 4980
 aaaaacagga aaggctcgaa atacaagcca ttctaaggaa attagggagt cagttgaaat 5040
 tctattctga tcttattctg tgggtgtctt tgcagcccag acaaatgtgg ttacacactt 5100
 ttaagaaat acaattctac attgtcaagc ttatgaaggc tccaatcaga tctttattgt 5160
 tattcaattt ggatctttca gggatTTTT ttttaaatTA ttatgggaca aaggacattt 5220
 gttggagggg tgggagggag gaagaatttt taaatgtaa acattccca gtttggatca 5280
 gggagttgga agttttcaga ataaccagaa ctaagggtat gaaggacctg tattggggtc 5340
 gatgtgatgc ctctgcgaag aaccttgtgt gacaaatgag aaacattttg aagtttgtgg 5400
 tacgaccttt agattccaga gacatcagca tggctcaaag tgcagctccg tttggcagtg 5460
 caatggata aatttcaagc tggatatgtc taatgggtat taaacaata aatgtgcagt 5520
 tliaactaac aggatattta atgacaacct tctggttggg agggacatct gtttctaaat 5580
 gtttattatg tacaatacag aaaaaattt tataaaatta agcaatgtga aactgaattg 5640
 gagagtgata atacaagtec tttagtctta cccagtgaat cattctgttc catgtctttg 5700
 gacaacctg accttggaca atcatgaaat atgcatctca ctggatgcaa agaaaatcag 5760
 atggagcatg aatggtactg taccggttca tctggactgc cccagaaaaa taacttcaag 5820
 caaacatcct atcaacaaca aggttgttct gcataccaag ctgagcacag aagatgggaa 5880
 cacgggtgga ggatggaaag gctcgtcaa tcaagaaaat tctgagacta ttaataaata 5940
 agactgtagt gtagatactg agtaaatcca tgcacctaaa ccttttggaa aatctgccgt 6000
 gggccctcca gatagctcat ttcattaagt tttccctcc aaggtagaat ttgcaagagt 6060
 gacagtggat tgcatttctt ttggggaagc tttcttttgg tggttttggt tattatacct 6120
 tctlaagttt tcaaccaagg ttgcttttg ttttgagtta ctggggttat ttttgtttta 6180

aataaaaata agtgtaaat aagtgtttt gtattgaaag ctttgttat caagattttc 6240
atacttttac cttccatggc tctttttaag attgatactt ttaagagtg gctgatattc 6300
tgcaacactg tacacataaa aaatacggta aggatacttt acatggtaa ggtaaagtaa 6360
giciccagtt ggccaccatt agctataatg gcactttggt tgtgttgttg gaaaaagtca 6420
cattgccatt aaactttcct tgtctgtcta gttaatattg tgaagaaaaa taaagtacag 6480
tgtgagatac tg 6492

<210> 4
<211> 239
<212> PRT
<213> 人

<400> 4

Met	Ala	His	Ala	Gly	Arg	Thr	Gly	Tyr	Asp	Asn	Arg	Glu	Ile	Val	Met
i				5					10					15	
Lys	Tyr	Ile	His	Tyr	Lys	Leu	Ser	Gln	Arg	Gly	Tyr	Glu	Trp	Asp	Ala
			20					25					30		
Gly	Asp	Val	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Pro	Ala	Pro	Gly	Ile
		35					40					45			
Phe	Ser	Ser	Gln	Pro	Gly	His	Thr	Pro	His	Pro	Ala	Ala	Ser	Arg	Asp
	50					55					60				
Pro	Val	Ala	Arg	Thr	Ser	Pro	Leu	Gln	Thr	Pro	Ala	Ala	Pro	Gly	Ala
65					70				75					80	
Ala	Ala	Gly	Pro	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Pro	Pro	Val	Val	His	Leu	Thr
				85					90					95	
Leu	Arg	Gln	Ala	Gly	Asp	Asp	Phe	Ser	Arg	Arg	Tyr	Arg	Arg	Asp	Phe
		100						105						110	
Ala	Glu	Met	Ser	Ser	Gln	Leu	His	Leu	Thr	Pro	Phe	Thr	Ala	Arg	Gly
		115					120					125			
Arg	Phe	Ala	Thr	Val	Val	Glu	Glu	Leu	Phe	Arg	Asp	Gly	Val	Asn	Trp
	130					135					140				
Gly	Arg	Ile	Val	Ala	Phe	Phe	Glu	Phe	Gly	Gly	Val	Met	Cys	Val	Glu
145				150						155					160

Ser Val Asn Arg Glu Met Ser Pro Leu Val Asp Asn Ile Ala Leu Trp
 165 170 175

Met Thr Glu Tyr Leu Asn Arg His Leu His Thr Trp Ile Gln Asp Asn
 180 185 190

Gly Gly Trp Asp Ala Phe Val Glu Leu Tyr Gly Pro Ser Met Arg Pro
 195 200 205

Leu Phe Asp Phe Ser Trp Leu Ser Leu Lys Thr Leu Leu Ser Leu Ala
 210 215 220

Leu Val Gly Ala Cys Ile Thr Leu Gly Ala Tyr Leu Gly His Lys
 225 230 235

<210> 5

<211> 1207

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

tttctgtgaa gcagaagtct gggaatcgat ctggaaatcc tcctaatttt tactccctct 60
 ccccgcgact cctgattcat tgggaagttt caaatcagct ataactggag agtgctgaag 120
 attgatggga tegtgcctt atgcatttgt tttggtttta caaaaaggaa acttgacaga 180
 ggatcatgct gtacttaaaa aatacaacat cacagaggaa gtagactgat attaacaata 240
 cttactaata ataacgtgcc tcatgaaata aagatccgaa aggaattgga ataaaaattt 300
 cctgcatctc atccaaggg ggaacacca gaatcaagtg ttccgctga ttgaagacac 360
 cccctcgccc aagaatgcaa agcacatcca ataaaatagc tggattataa ctctcttct 420
 ttctctgggg gccgtgggt gggagctggg gcgagaggtg ccgttggccc ccgttgcttt 480
 tcctctggga aggatggcgc acgctgggag aacagggtac gataaccggg agatagtgat 540
 gaagtacatc cattataagc tgtcgcagag gggtacgag tgggatgcgg gagatgtggg 600
 cgcccgcccc ccgggggccc cccccacc gggcatcttc tcctcccage ccgggcacac 660
 gccccatcca gccgcatccc gggaccgggt cgccaggacc tcgccgtgc agacccccgc 720
 tgccccggc gccgcgagg ggccctgcgt cagccccgtg ccacctgtgg tccacctgac 780
 cctccgccag gccggcgacg acttctcccg ccgctaccgc cgcgacttcg ccgagatgtc 840

cagccagctg cacctgacgc ccttcaccgc gcggggacgc ttgccacgg tggaggagga 900
gctcttcagg gacgggggtga actgggggag gattgtggcc ttctttgagt tcggtggggt 960
catgtgtgtg gagagcgtca accgggagat gtcgccctg gtggacaaca tcgccctgtg 1020
gatgactgag tacctgaacc ggcacctgca cacctggatc caggataacg gaggctgggt 1080
aggtgcactt ggtgatgiga gtctgggctg aggccacagg tccgagatgc gggggttgga 1140
gigcgggtgg gctcctgggg caatgggagg ctgtggagcc ggcgaaataa aatcagagtt 1200
gttgcta 1207

<210> 6
<211> 205
<212> PRT
<213> 人

<400> 6

Met Ala His Ala Gly Arg Thr Gly Tyr Asp Asn Arg Glu Ile Val Met
1 5 10 15

Lys Tyr Ile His Tyr Lys Leu Ser Gln Arg Gly Tyr Glu Trp Asp Ala
20 25 30

Gly Asp Val Gly Ala Ala Pro Pro Gly Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ile
35 40 45

Phe Ser Ser Gln Pro Gly His Thr Pro His Pro Ala Ala Ser Arg Asp
50 55 60

Pro Val Ala Arg Thr Ser Pro Leu Gln Thr Pro Ala Ala Pro Gly Ala
65 70 75 80

Ala Ala Gly Pro Ala Leu Ser Pro Val Pro Pro Val Val His Leu Thr
85 90 95

Leu Arg Gln Ala Gly Asp Asp Phe Ser Arg Arg Tyr Arg Arg Asp Phe
100 105 110

Ala Glu Met Ser Ser Gln Leu His Leu Thr Pro Phe Thr Ala Arg Gly
115 120 125

Arg Phe Ala Thr Val Val Glu Glu Leu Phe Arg Asp Gly Val Asn Trp
130 135 140

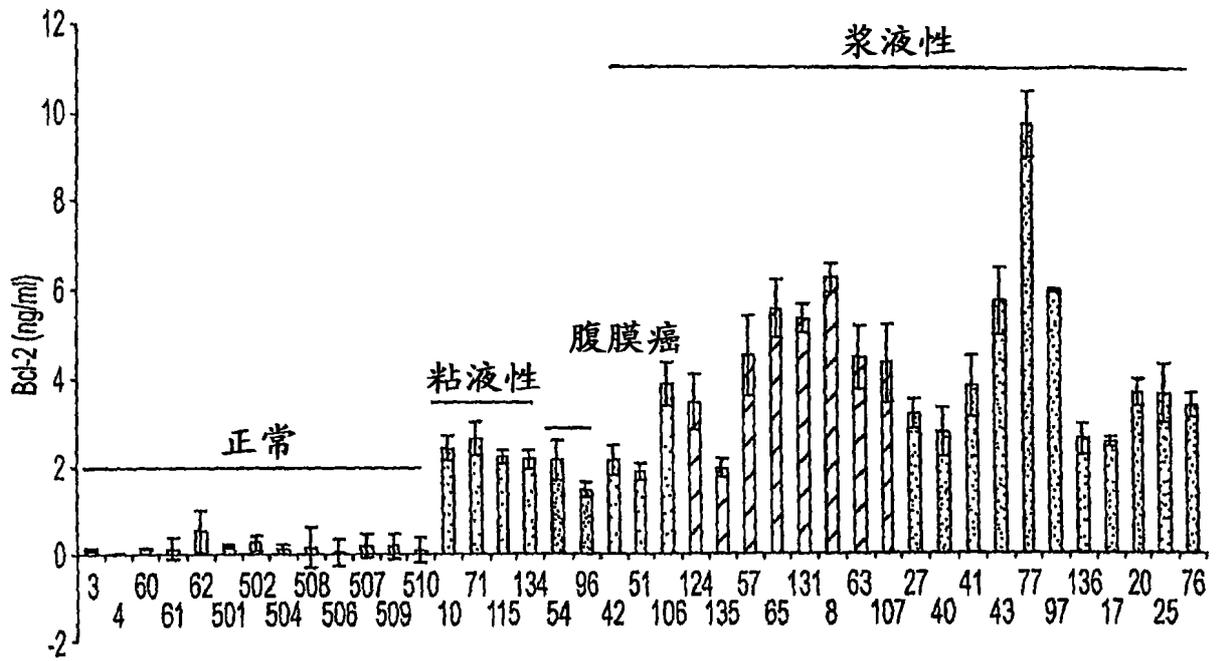


图 1

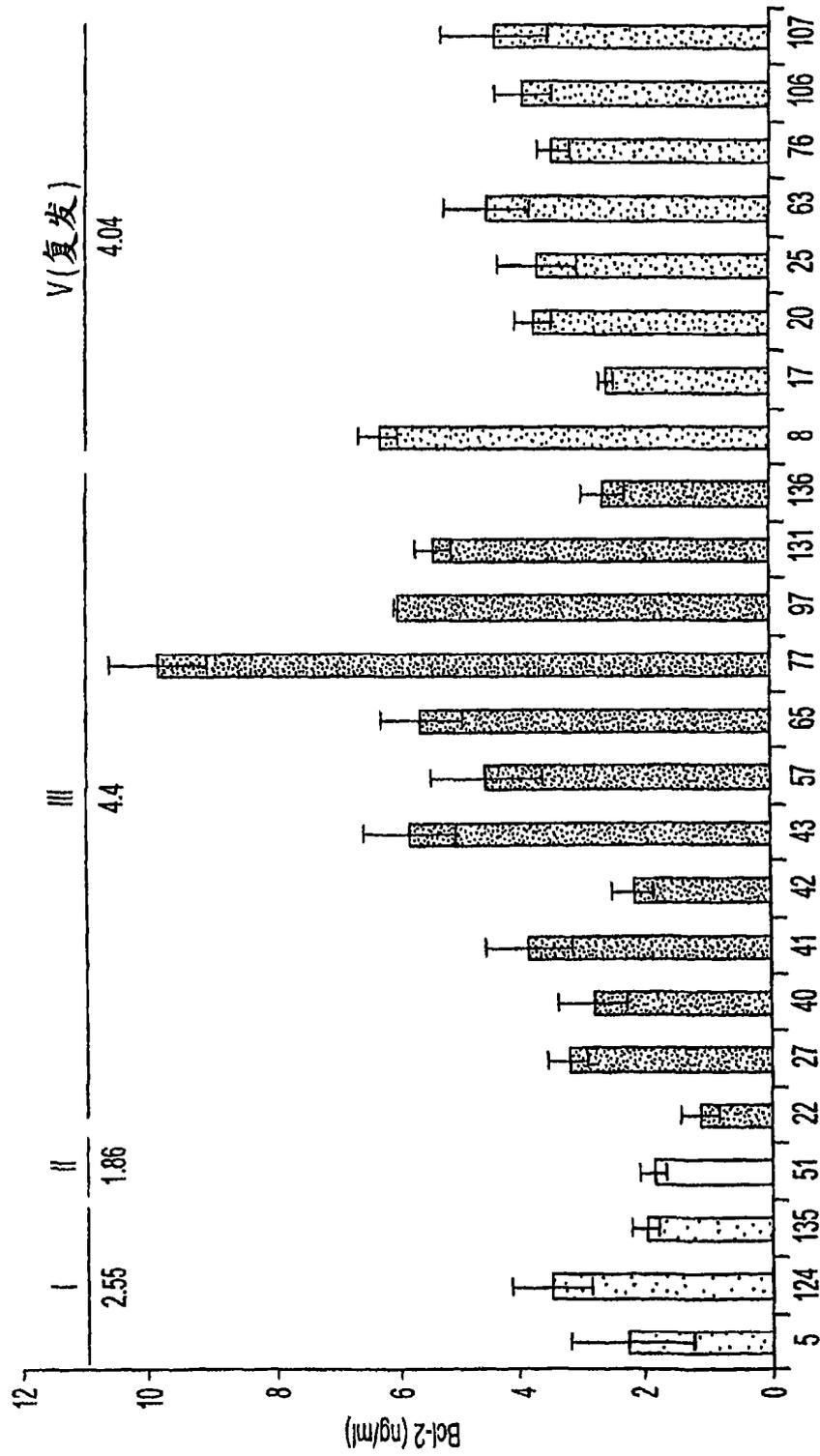
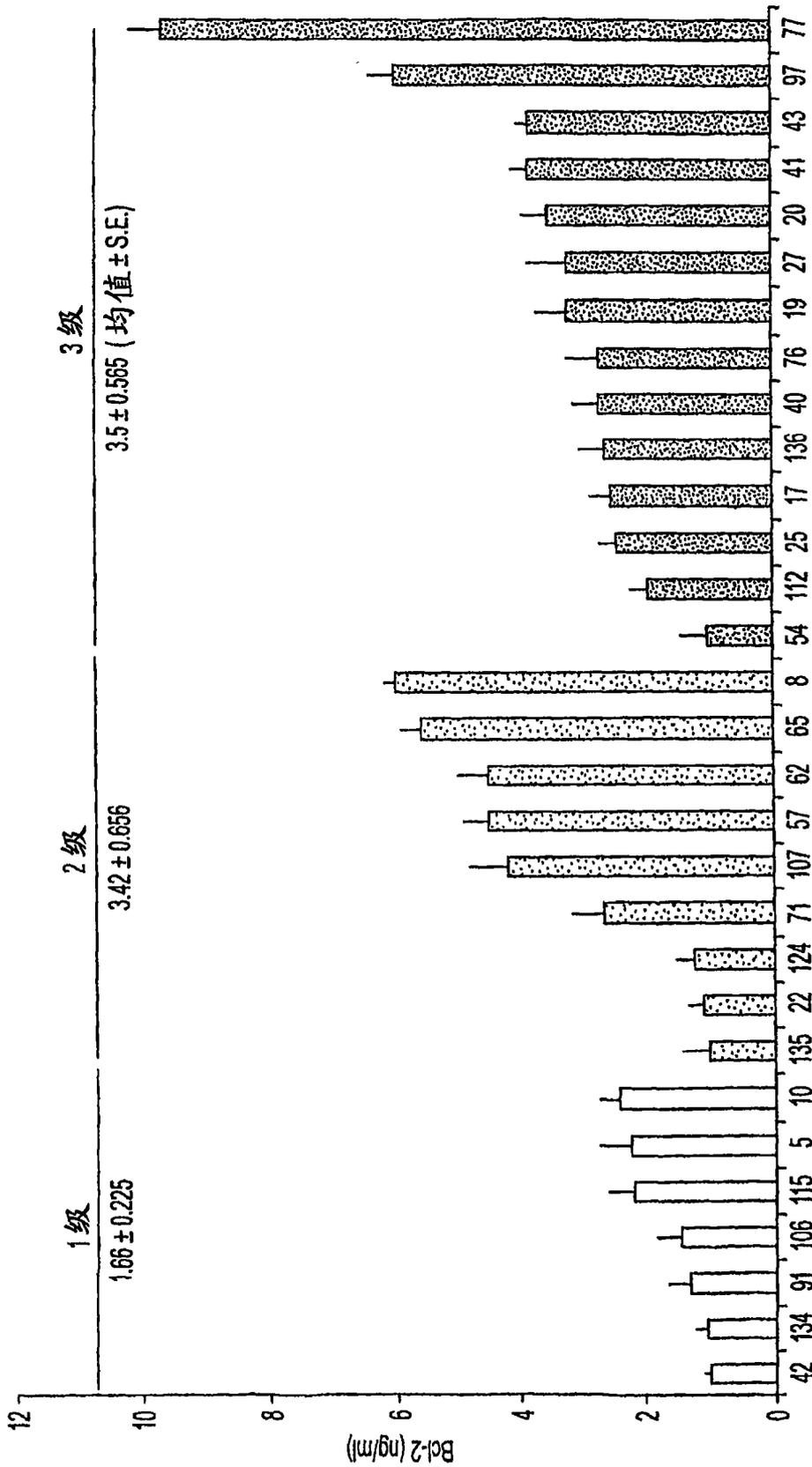


图 3A



患者样品

图 3 B

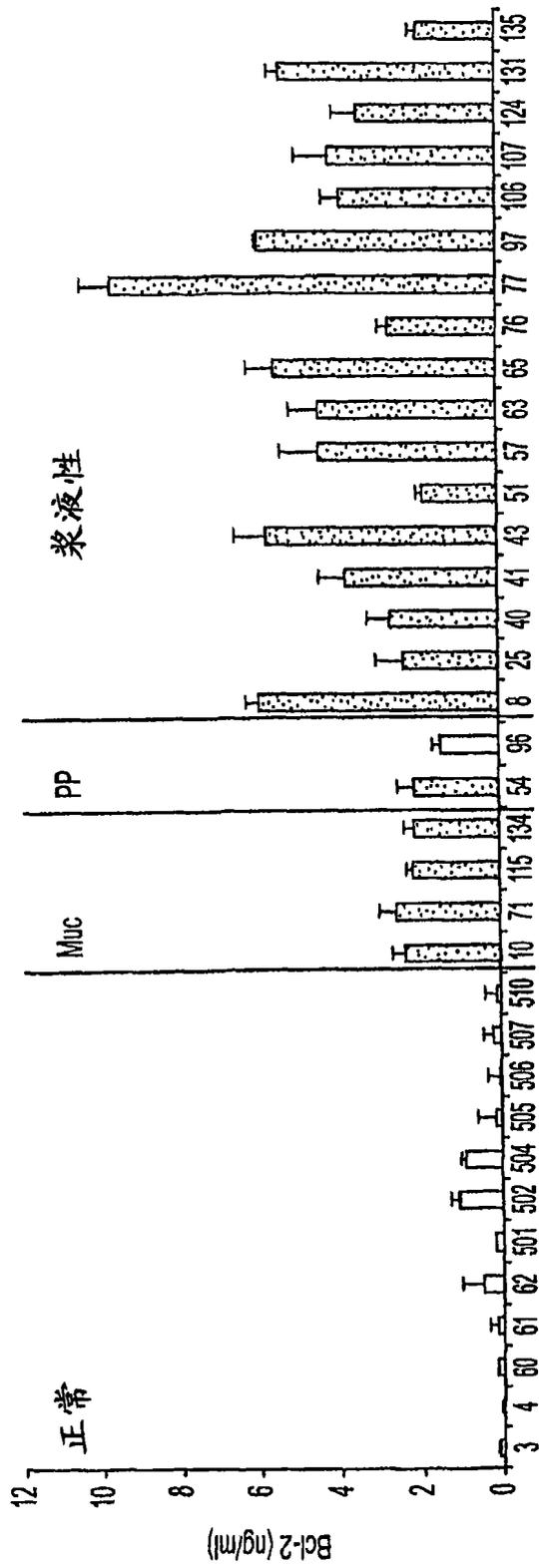
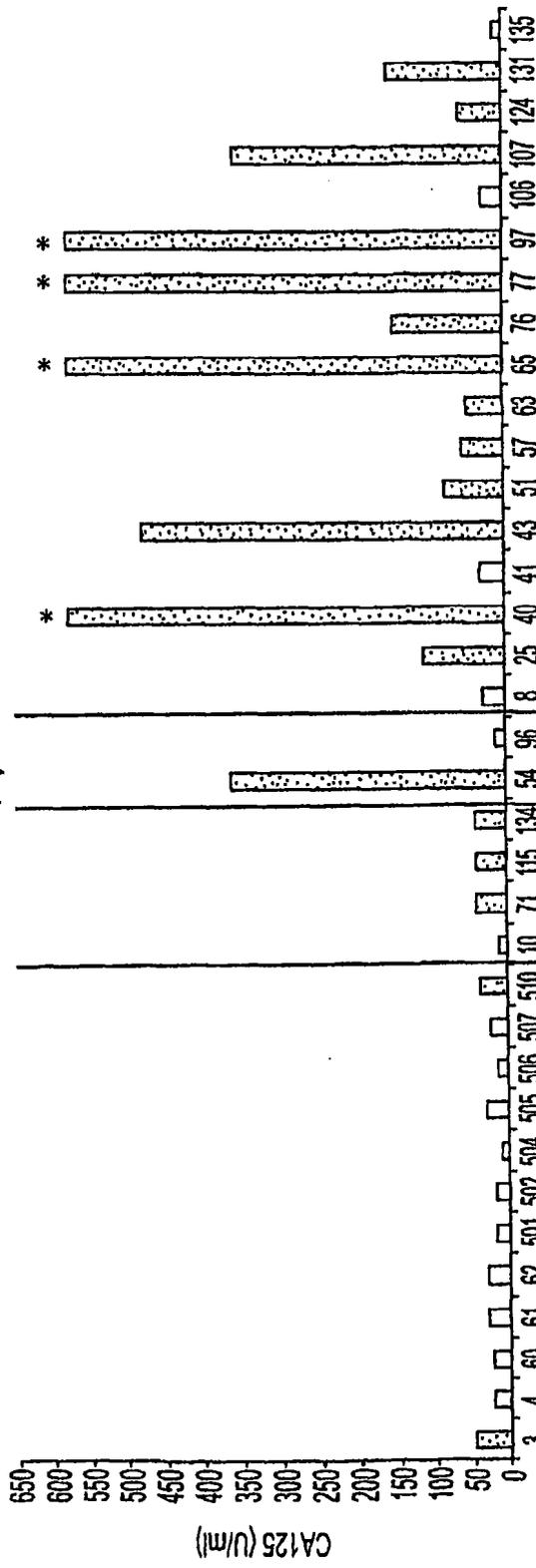


图 4 A



患者样品

图 4 B

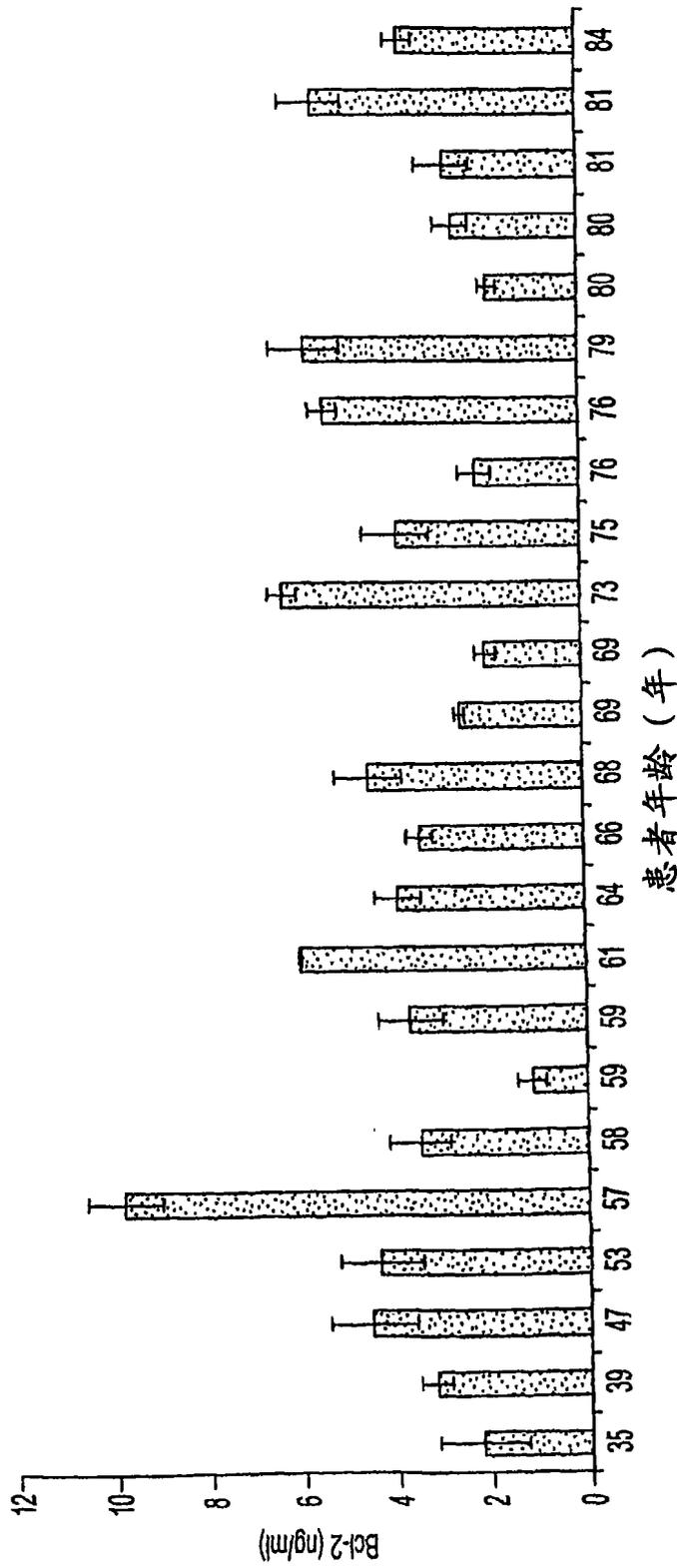


图 5

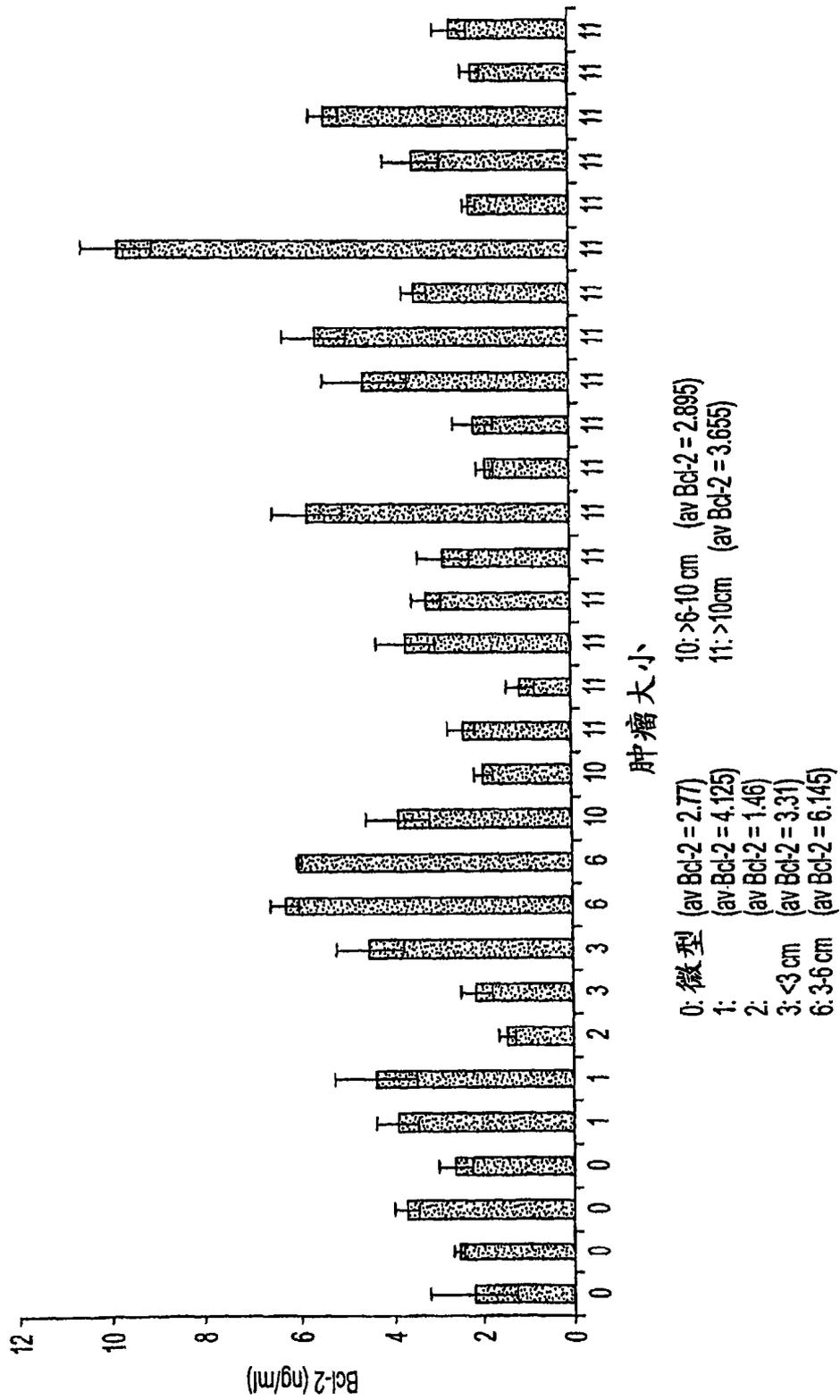


图 6

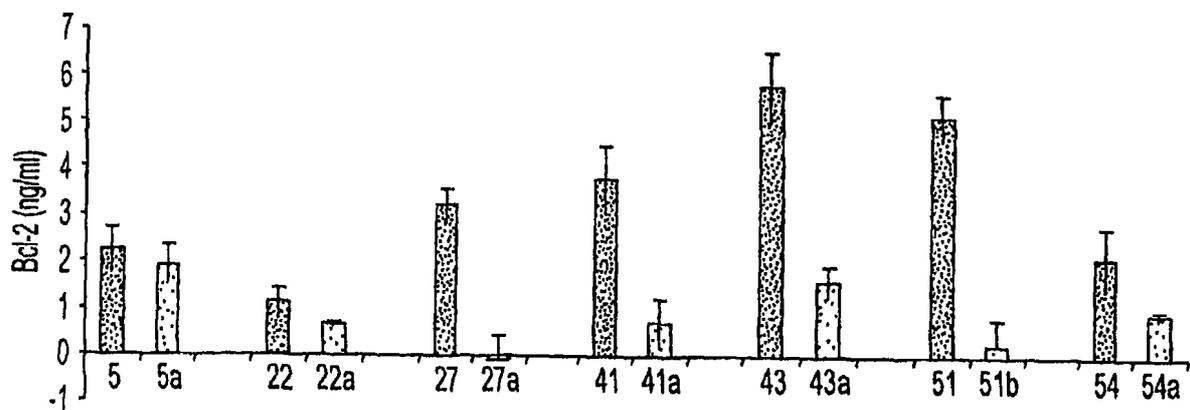


图 7 A

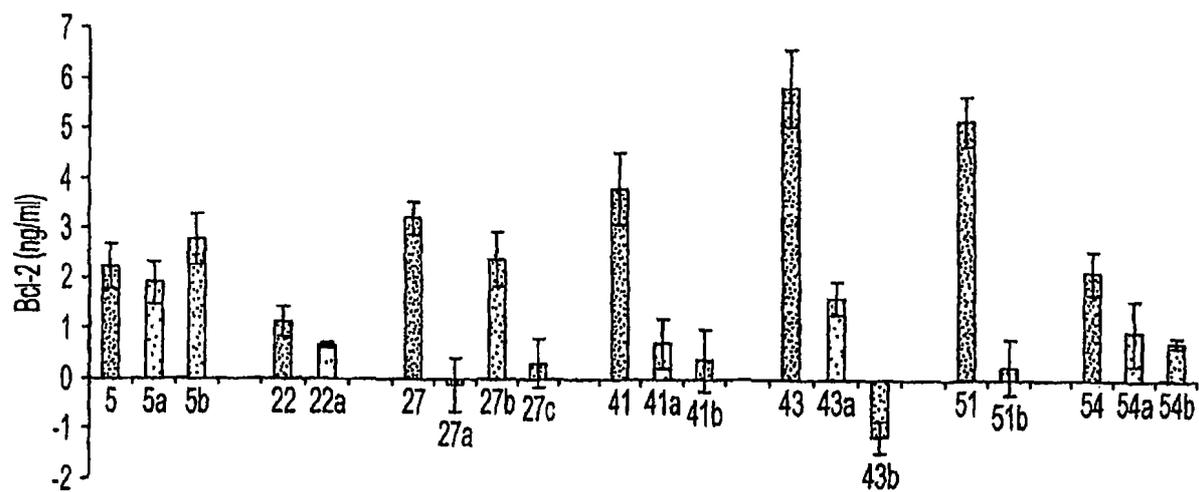


图 7 B

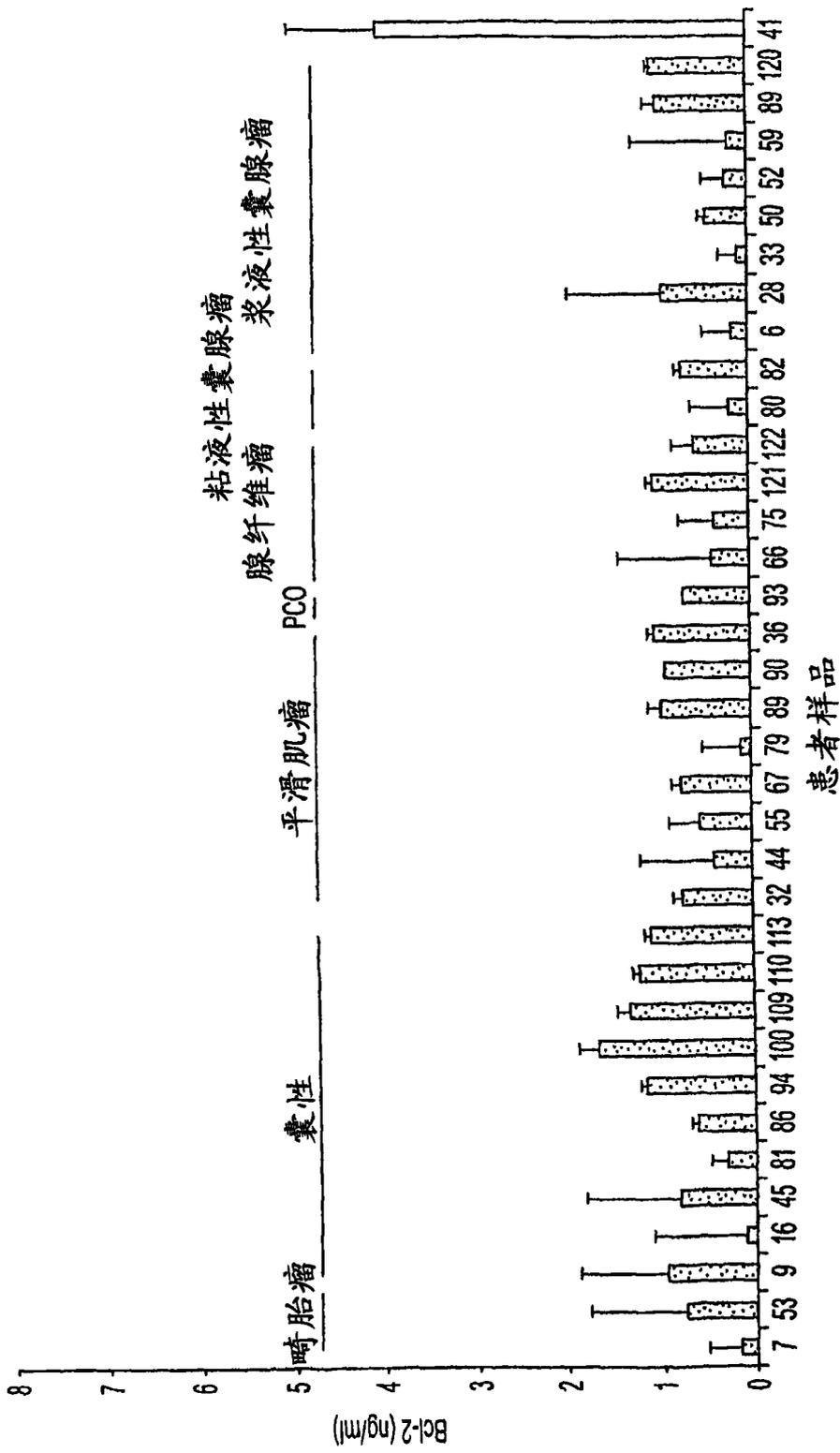


图 8 A

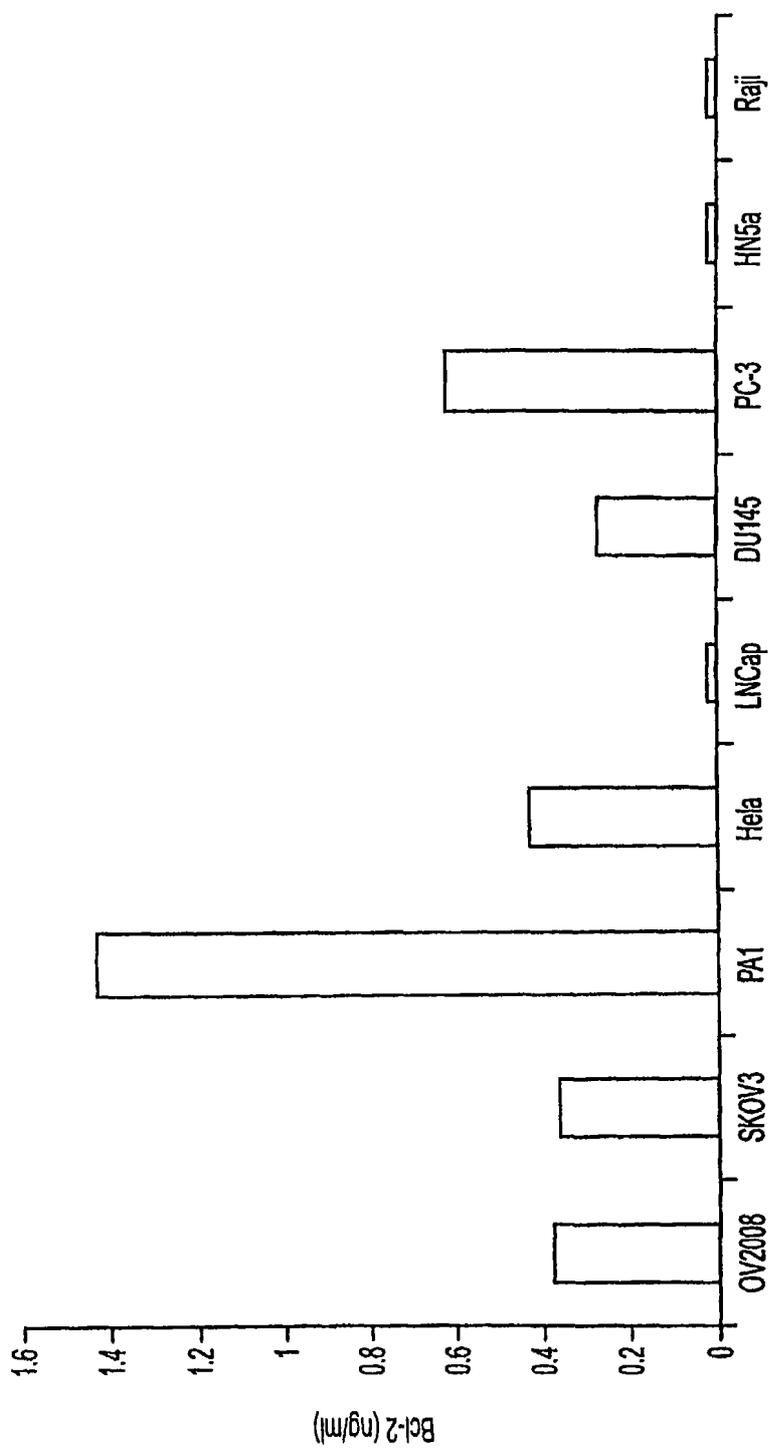


图 9

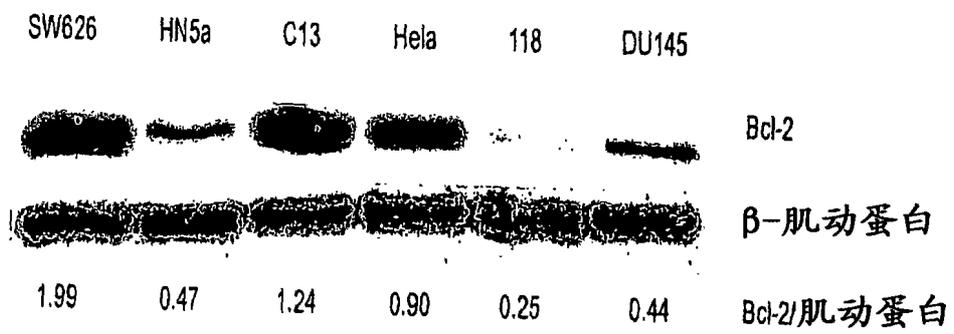


图 10

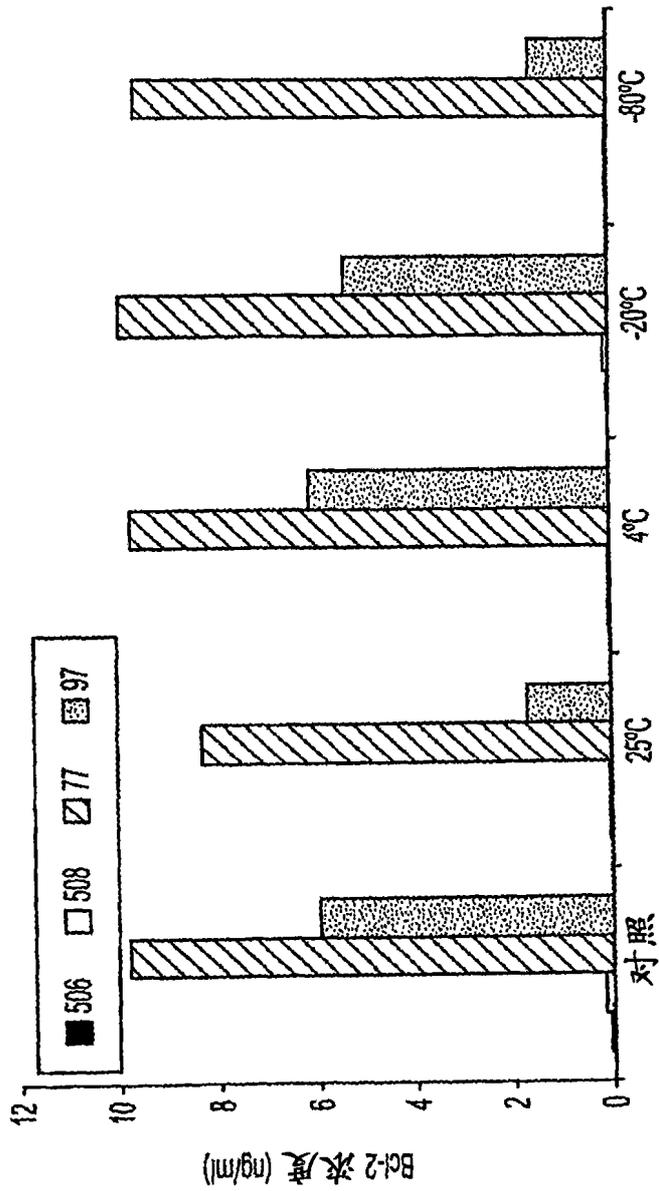


图 11

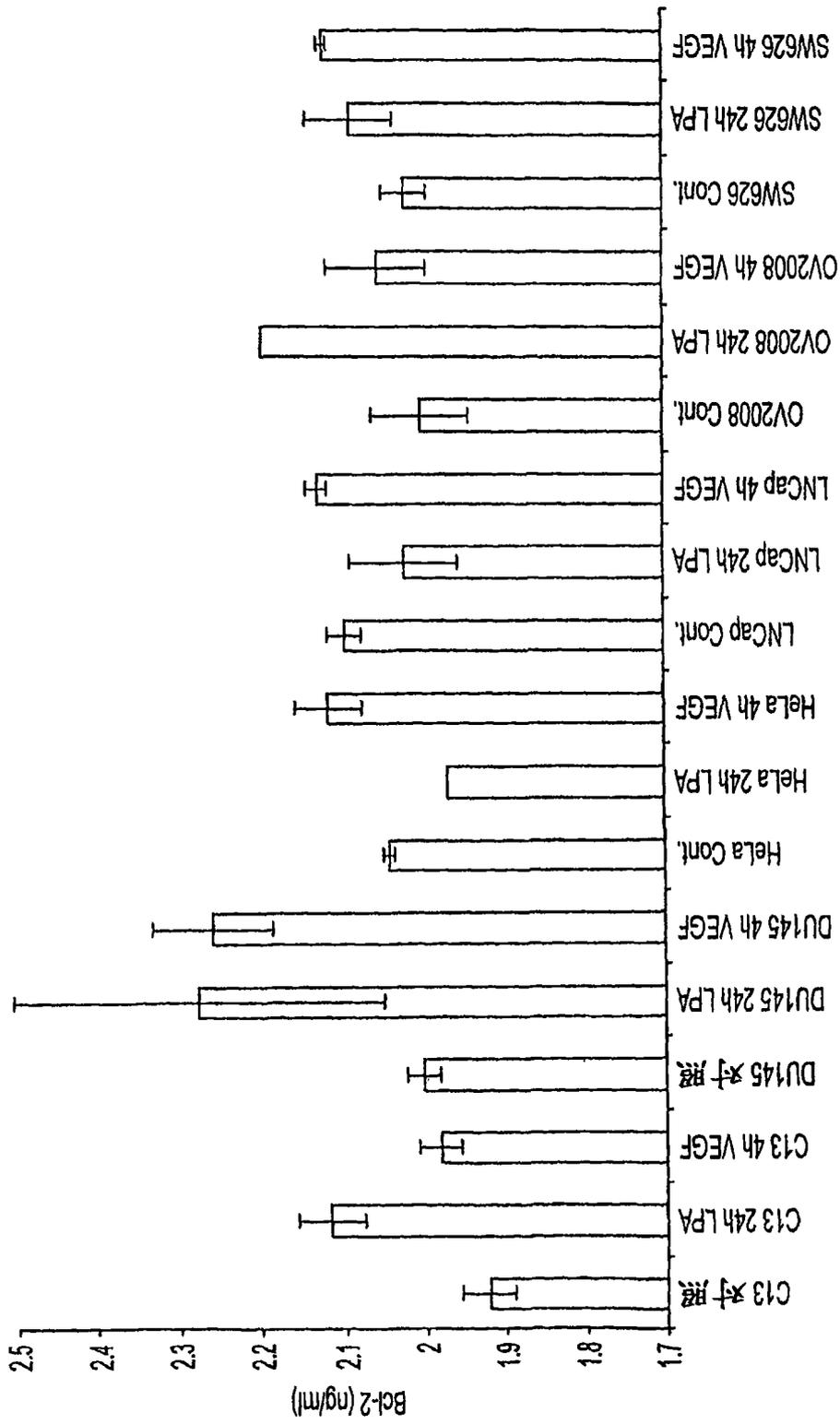


图 12

专利名称(译)	利用BCL - 2水平的增高检测癌肿		
公开(公告)号	CN101384903A	公开(公告)日	2009-03-11
申请号	CN200780004960.3	申请日	2007-02-09
[标]申请(专利权)人(译)	南佛罗里达大学		
申请(专利权)人(译)	南佛罗里达大学		
当前申请(专利权)人(译)	南佛罗里达大学		
[标]发明人	PA克鲁克		
发明人	P·A·克鲁克		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	C12Q2600/112 C12Q1/6883 G01N33/57449 G01N33/57484 C12Q2600/158 G01N2333/47 Y10T436 /143333		
代理人(译)	凌立		
优先权	60/771677 2006-02-09 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及通过检测受试者生物样本中的Bcl - 2对受试者癌肿如早期或晚期卵巢癌进行诊断、预后和监测的方法，所述样本优选为尿液或血液样本。可以利用能检测或结合Bcl - 2蛋白，或能检测或结合其编码核酸的物质测量Bcl - 2，所述物质如与Bcl - 2蛋白或其部分特异性反应的抗体。本发明还涉及用于实施本发明方法的试剂盒。本发明还涉及快速检测液体中Bcl - 2的装置，以及快速测量液体中Bcl - 2的方法。

