



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1957256 B

(45) 授权公告日 2013.01.02

(21) 申请号 200580016317.3

(22) 申请日 2005.03.23

(30) 优先权数据

60/556,495 2004.03.24 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2006.11.21

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2005/009740 2005.03.23

(87) PCT申请的公布数据

W02005/095964 EN 2005.10.13

(73) 专利权人 三路影像公司

地址 美国北卡罗来纳

(72) 发明人 T·J·费希尔 D·P·马利诺夫斯基

A·J·泰勒 M·R·帕克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51) Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2004013632 A, 2004.02.12, 全文.

CN 1360059 A, 2002.07.24, 全文, 尤其是说明书第 7-8 页.

BALDWIN P. ET AL.. TRANSLATIONAL APPROACHES TO IMPROVING CERVICAL SCREENING. 《NATURE REVIEWS. CANCER》. 2003, 第 3 卷第 217-226 页.

审查员 牛培利

权利要求书 2 页 说明书 65 页

序列表 38 页 附图 9 页

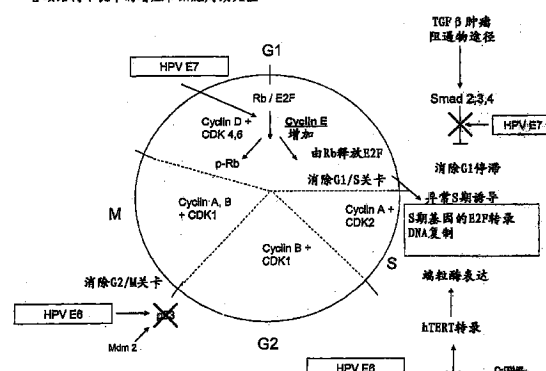
(54) 发明名称

用于子宫颈疾病检测的方法和组合物

(57) 摘要

提供了用于在患者样品中鉴定高度子宫颈疾病的方法和组合物。本发明的方法包括在机体样品中检测至少一种生物标志物的过表达, 其中所述生物标志物选择性地高度子宫颈疾病中过表达。在特定的权利要求中, 所述机体样品是 Pap 抹片或单层宫颈细胞。本发明的生物标志物包括参与细胞周期调控、信号转导和 DNA 复制及转录的基因和蛋白。在特定的权利要求中, 所述生物标志物是 S 期基因。在本发明的一些方面, 使用生物标志物的特异性抗体在蛋白水平上或使用核酸杂交技术在核酸水平上检测目的生物标志物的过表达。还提供了实施本发明方法的试剂盒。

宫颈结构不良中的增殖和细胞周期失控



1. 至少三种抗体在制备用于在患者中诊断高度子宫颈疾病的试剂中的用途,其中第一种和第二种抗体特异性结合于生物标志物蛋白 MCM2,且第三种抗体特异性结合于生物标志物蛋白 Topo2A,其中所述三种抗体特异性地检测来自患者的机体样品中的所述生物标志物蛋白的过表达,其中所述生物标志物蛋白的过表达的检出特异性地鉴定指示高度子宫颈疾病的样品。

2. 权利要求 1 的用途,其中所述生物标志物蛋白的过表达将指示高度子宫颈疾病的样品和指示良性增殖、早期 HPV 感染或轻度发育异常的样品区分开。

3. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病不依赖于形态学分析或不依赖于 HPV 感染状况的确定。

4. 权利要求 1 的用途,其中通过进行免疫细胞化学法检测所述生物标志物蛋白的表达。

5. 权利要求 4 的用途,其中人工地进行所述免疫细胞化学法。

6. 权利要求 4 的用途,其中以自动化的方式进行所述免疫细胞化学法。

7. 权利要求 1 的用途,其中所述样品包含子宫颈细胞。

8. 权利要求 1 的用途,其中所述样品包含单层子宫颈细胞。

9. 权利要求 1 的用途,其中所述样品包括基于液体的制备物中处于悬浮状态的子宫颈细胞。

10. 权利要求 1 的用途,其中所述样品包括子宫颈组织样品。

11. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病的灵敏度至少为 90%。

12. 权利要求 11 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病的阳性预测值至少为 40%。

13. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病的特异性至少为 85%。

14. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病针对具有异常帕帕尼克拉乌 Pap 抹片检查结果的患者进行。

15. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病作为一般患者群体中高度子宫颈疾病的初步筛查进行。

16. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断高度子宫颈疾病与形态学分析结合进行。

17. 权利要求 1 的用途,其中所述诊断还包括样品的帕帕尼古拉乌 (Pap) 染色。

18. 权利要求 1 的用途,其中将所述抗体作为单独的抗体试剂按顺序和所述样品接触。

19. 权利要求 1 的用途,其中将所述抗体作为抗体混和物同时和所述样品接触。

20. 权利要求 1 的用途,其中将所述抗体中的各抗体和分开的包含部分样品的显微镜载片接触。

21. 包含至少三种抗体的试剂盒,其中第一种和第二种抗体特异性结合于生物标记蛋白 MCM2,且第三种抗体特异性结合于生物标记蛋白 Topo2A。

22. 权利要求 21 的试剂盒,其中所述试剂盒还包含过氧化物酶封闭剂、蛋白封闭剂、用于检测抗体与所述生物标志物蛋白的结合的化学试剂、复染剂、着色剂和使用说明书。

23. 权利要求 22 的试剂盒,其中所述用于检测抗体结合的化学试剂包括色原和缀合至被标记的聚合物上的二抗,其中所述色原包含 3', 3' - 二氨基联苯胺,其中所述被标记的聚合物包含缀合至葡聚糖聚合物的辣根过氧化物酶。

24. 权利要求 22 的试剂盒,其中所述复染剂包含苏木精。

25. 权利要求 22 的试剂盒,其中所述着色剂包含含有 pH 7.4 的 Tris 缓冲盐水、Tween-20 和叠氮化钠的溶液。
26. 权利要求 22 的试剂盒,还包含阳性对照样品。
27. 权利要求 26 的试剂盒,其中所述阳性对照样品包含 SiHa 细胞。
28. 权利要求 21 的试剂盒,还包含用于 Pap 染色的试剂。
29. 权利要求 28 的试剂盒,其中用于 Pap 染色的试剂包含 EA50 和 Orange G。
30. 权利要求 21 的试剂盒,其中将所述至少三种抗体作为分开的试剂提供。
31. 权利要求 21 的试剂盒,其中将所述至少三种抗体作为混合物来提供。
32. 权利要求 21 的试剂盒在制备用于诊断高度子宫颈疾病的试剂中的用途。

用于子宫颈疾病检测的方法和组合物

发明领域

[0001] 本发明涉及用于检测高度子宫颈疾病的方法和组合物。

[0002] 发明背景

[0003] 宫颈癌是妇女中的第二大常见肿瘤,大约占有女性癌症的 12%,每年导致大约 250,000 人死亡。Baldwin 等人 (2003) *Nature Reviews Cancer* 3:1-10。在许多不能进行大规模筛查程序的发展中国家,临床问题更加严重。在这些国家,宫颈癌是妇女中癌症死亡的头号病因。

[0004] 大部分宫颈癌的病例表现为鳞状细胞癌,尽管也观察到腺癌。可通过人群筛查来预防宫颈癌,因为其通过已完全明确的非浸润上皮内阶段演化而来,所述阶段可通过形态学方法进行辨别。Williams 等人 (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:14932-14937。尽管不知道正常细胞是如何开始转化的,但从正常的复层上皮通过子宫颈上皮内赘瘤 (cervical intraepithelial neoplasia, CIN) 至浸润性癌的组织病理学变化的连续谱的概念多年来已被广泛接受。宫颈癌的前身是发育异常,在本领域也称为 CIN 或鳞状上皮内病变 (squamous intraepithelial lesions, SIL)。可使用三级 (three-tiered) (CIN) 或二级 (two-tiered) (Bethesda) 系统将鳞状上皮内异常分类。在 Bethesda 系统下,低度鳞状上皮内病变 (LSIL),对应于 CIN I 和 HPV 感染,通常代表了有效果的 HPV 感染,其发展成浸润性疾病的风险相对较低。尽管 LSIL 和 HSIL 都被视为恶性肿瘤的潜在前身,但在三级系统中对应于 CIN II 和 CIN III 的高度鳞状上皮内病变 (HSIL),和 LSIL 相比显示更高的发展成宫颈癌的风险。在该系统下,也可将患者的样品分类为 ASCUS (意义不明的非典型性鳞状细胞, atypical squamous cells of unknown significance) 或 AGUS (意义不明的非典型性腺细胞, atypical glandular cells of unknown significance)。

[0005] 已证实宫颈癌和通过高危型的人乳头瘤病毒 (HPV) 例如 16、18 和 31 型的感染之间的强关联性。事实上,大量流行病学和分子生物学证据已将 HPV 感染确定为宫颈癌的病因因素。此外,在 85% 或更多的高度子宫颈疾病的病例中发现了 HPV。然而,HPV 感染非常普遍,可能在 5-15% 超过 30 岁的妇女中发生,但很少有 HPV 阳性的妇女会发展成高度子宫颈疾病或癌症。单独的 HPV 存在只是感染的指标,而不是高度子宫颈疾病的指标,因此,只对 HPV 感染进行检测导致许多假阳性。参见,例如, Wright 等人 (2004) *Obstet. Gynecol.* 103:304-309。

[0006] 目前的文献表明 HPV 感染宫颈的深部组织内的基底干细胞。干细胞向成熟角质形成细胞的分化 (结果导致所述细胞迁移至复层子宫颈上皮) 和 HPV 病毒复制以及细胞的再传染有关联。在该病毒复制过程中,发生许多细胞变化,包括细胞周期失控 (de-regulation)、活跃的增殖、DNA 复制、转录激活和基因组的不稳定性 (Crum (2000) *Molecular Pathology* 13:243-251; Middleton 等人 (2003) *J. Virol.* 77:10186-10201; Pett 等人 (2004) *Cancer Res.* 64:1359-1368)。

[0007] 大多数 HPV 感染实际上是短暂的,因为病毒感染会在 12 个月内将其自身消解。对于那些因为一种或多种 HPV 的致癌亚型而发生持久性感染的个体,和无 HPV 感染的患者相

比,存在发展瘤形成的风险。已知 HPV 在子宫颈癌形成 (cervical neoplasia) 的发展上的重要性,在鉴定可能发生子宫颈癌形成的患者上,HPV 的临床检测已逐渐成为重要的诊断工具。基于 HPV 的子宫颈疾病的筛查的临床功效在于其阴性预测价值。HPV 阴性结果和正常的 Pap 抹片检查史一起是无疾病状况和在以后的 1-3 年期间较少可能发生子宫颈癌形成的优良指标。然而,阳性 HPV 结果不是子宫颈疾病的诊断,而只是感染的指征。尽管大多数 HPV 感染是短暂的并且会在 12 个月的时期内自发清除,但具有高危 HPV 病毒亚型的持续性感染预示着发生子宫颈癌形成的更大可能性。为补充 HPV 检测,预期和子宫颈癌形成关联的分子标志物的鉴定可提高针对子宫颈疾病诊断的临床特异性。

[0008] 对经帕帕尼古拉乌染色的子宫颈抹片 (Pap 抹片) 进行细胞学检查目前是检测子宫颈癌所选用的方法。Pap 抹片检查是种主观的方法,60 多年来其基本上保持未变。然而,关于其性能存在几个顾虑。报道的单一 Pap 检查的灵敏度 (检查呈阳性的疾病阳性的比例) 较低,并且显示较宽的变化范围 (30-87%)。对于潜在的高度疾病的确定,单一 Pap 抹片检查的特异性 (经检验呈阴性的疾病阴性的比例) 在筛查人群中低达 86%,在 ASCUS PLUS 人群中更要低得多。参见, Baldwin 等人,同上。相当比例的鉴定为 LSIL 或 CIN I 的 Pap 抹片检查实际上是高度病变阳性。此外,高达 10% 的 Pap 抹片检查被分类为 ASCUS (意义不明的非典型性鳞状细胞),即不太可能明确归类为正常、中度或严重病变、或肿瘤。然而,经验显示高达 10% 的该 ASCUS 群体具有高度病变,所述病变因此而被忽略掉。参见,例如, Manos 等人 (1999) JAMA 281:1605-1610。

[0009] 因此,需要这样的用于诊断高度子宫颈疾病的方法,该方法不依赖于常规的 Pap 抹片检查和针对高危 HPV 感染的分子检测或者与其一起使用。该方法应当能够特异性地鉴定存在于所有患者群体中的高度子宫颈疾病,包括通过 Pap 染色被分类为 LSIL 或 CIN I、而实际上是高度病变阳性 (即,“假阴性”) 的病例。因此,本领域需要这样的特异的、可靠的诊断方法,该方法能够检测高度子宫颈疾病以及能够区别高度疾病和不被当作临床疾病的病症例如早期 HPV 感染和轻度发育异常。

[0010] 发明概述

[0011] 提供了用于诊断高度子宫颈疾病的组合物和方法。本发明的方法包括检测至少一种生物标志物、特别是核生物标记物在机体样品中的过表达,其中所述生物标志物的过表达的检测特异性地鉴定显示高度子宫颈疾病的样品。本方法可将显示高度子宫颈疾病的样品和显示良性增殖、早期 HPV 感染或轻度发育异常的样品区分开。因此,该方法依赖于这样的生物标志物的检测,该生物标志物选择性地高度子宫颈疾病状态中过表达,而不在正常细胞或不指示临床疾病的细胞中过表达。

[0012] 本发明的生物标志物是选择性地高度子宫颈疾病中过表达的蛋白和 / 或基因,包括由于 HPV 诱导的细胞周期功能失调和负责 S 期诱导的某些基因的激活造成的蛋白和 / 或基因的过表达。特别吸引人的生物标志物包括 S 期基因,其过表达是由于 HPV 诱导的细胞周期功能失调和随后的转录因子 SP-1 和 E2F 的激活造成的。本发明的生物标志物基因或蛋白的过表达的检测可区分显示高度疾病的样品 (例如中度至严重的发育异常和宫颈癌) 和正常细胞或不指示临床疾病 (例如,无发育异常的早期 HPV 感染和轻度发育异常) 的细胞。

[0013] 可在蛋白或核酸水平上估计生物标志物的过表达。在一些实施方案中,提供了利

用抗体在子宫颈细胞学样品中检测生物标志物的过表达的免疫细胞化学技术。在本发明的该方面,使用至少一种针对感兴趣的特定生物标志物的抗体。也可通过基于核酸的技术(包括,例如,杂交和 RT-PCR)检测过表达。此外还提供了包含用于实施本发明方法的试剂的试剂盒。

[0014] 也可将本发明的方法和用于分析形态学特征或 HPV 感染状况的常规妇科诊断技术结合使用。因此,例如,此处提供的免疫细胞化学方法可和 Pap 抹片检查一起使用,这样就保存了来自常规方法的所有形态学信息。通过这种方式,对在高度子宫颈疾病中选择性地过表达的生物标记物的检测可减少 Pap 抹片检查的高假阳性率,从而有助于大规模自动化筛查。

[0015] 附图概述

[0016] 图 1 提供了子宫颈结构异常中的增殖和细胞周期失控的图解概述。子宫颈癌形成中的细胞周期变化和增殖控制缺陷。HPV 感染和 E6 与 E7 癌蛋白 (oncoproteins) 的过表达引起了细胞周期和增殖控制中的一系列变化。HPV E6 癌蛋白消除了 G1/S 和 G2/M 界线上的细胞周期关卡,结果 DNA 进行复制,产生体细胞突变。E7 促进了加速进入 S 期,结果 DNA 复制所需的 S 期基因长时间表达(异常的 S 期诱导)。同样,E6 提高了端粒酶的表达,在增殖和细胞永生期间确保了连续的染色体端粒完整性。最后,E7 消除了 TGF- β 信号转导途径,从而消除了 G1 期阻滞的该控制机制和增殖的控制。

[0017] 图 2 提供了子宫颈癌形成中的异常 S 期诱导的示意性图解说明。HPV 蛋白对细胞周期控制和增殖的作用包括 p53 和 Rb 肿瘤抑制途径的失活、E2F-1 转录的激活、S 期基因 MCM-2、MCM-6、MCM-7、TOP2A 和细胞周期蛋白 E1 等的诱导。此外,E2 和 Sp-1 转录因子相互作用,从而激活 p21-waf-1 的基因表达。

[0018] 图 3 提供了细胞周期的异常 S 期中关于细胞增殖的反馈回路的示意图。S 期中细胞周期蛋白 E 和 CDK2 的过表达导致允许诱导 S 期基因的独立机制。

[0019] 图 4 提供了 c-myc 在异常 S 期诱导中的作用的示意图。C-myc 是细胞增殖中重要的转录激活物。编码 c-myc 的基因位于染色体上。该位置与已证实了 HPV18 的整合以及该基因区域的相应扩增属同一位置。c-myc 基因的扩增将导致被编码的蛋白的过表达,c-myc 的增加的水平将独立地促进 S 期基因转录,从而进一步加速细胞增殖。

[0020] 图 5 提供了针对 MCM7 转录体变体的 TaqMan [®] 引物的示意图。

[0021] 图 6 举例说明了具有轻度发育异常的患者和患有鳞状细胞癌的患者在 IHC 测定法中针对 Claudin1 的抗体的差异染色模式。

[0022] 图 7 举例说明 IHC 和 ICC 形式中针对 Claudin1 的抗体的差异染色模式。显示了正常细胞和指示 CINIII 和 HSIL 的细胞。

[0023] 图 8 举例说明了用核生物标志物(即,MCM2)获得的细胞核染色模式和用细胞质生物标志物(p16)获得的细胞质染色模式。结果来自高度子宫颈疾病患者样品的免疫细胞化学(ICC)测定。

[0024] 图 9 举例说明在使用两种不同的针对 MCM6 的抗体对来自患有高度子宫颈疾病的患者的宫颈组织进行的免疫组织化学(IHC)测定中期望的和期望的抗体染色。

[0025] 发明详述

[0026] 本发明提供了用于鉴定或诊断高度子宫颈疾病的组合物和方法。该方法包括检测

选择性地在高度子宫颈疾病（例如中度至严重的发育异常和宫颈癌）中过表达的特定生物标志物的过表达。即，本发明的生物标志物能够区别 HPV 感染的细胞和癌变前、恶性的、或显露癌性的 HPV 感染的细胞。用于诊断高度子宫颈疾病的方法包括来自患者的组织或体液样品中检测至少一种指示高度子宫颈疾病的生物标志物的过表达。在特定的实施方案中，使用抗体和免疫细胞化学技术检测目的生物标志物的表达。此外还提供了用于实施本发明的方法的试剂盒。

[0027] “诊断高度子宫颈疾病”包括，例如，诊断或检测子宫颈疾病的存在、监控疾病的进程，和鉴定或检测指示高度子宫颈疾病的细胞或样品。术语诊断、检测和鉴定高度子宫颈疾病在此处可交换使用。“高度子宫颈疾病”是指通过阴道镜被分类为癌前病理、恶性病理、中度至严重发育异常，和宫颈癌的病症。潜在的高度子宫颈疾病包括 CINII、CINIII、HSIL、原位癌、腺癌，和癌（FIGOI-IV 期）的组织学鉴定。

[0028] 如上所述，相当比例的表现 Pap 抹片检查分类为正常、CINI 或 ASCUS 的患者实际上具有高度子宫颈疾病特征性的病变。因此，本发明的方法允许在所有患者（包括这些“假阴性”患者）群体中鉴定高度子宫颈疾病，并且便于检查患者样品中的稀有异常细胞。尽管本发明的方法也可和常规诊断技术例如 Pap 抹片检查、针对高危型 HPV 的分子检测等一起使用，但其可不依赖于细胞形态学和 HPV 感染状态进行诊断。

[0029] 基于 HPV 型和宫颈癌以及癌前病变的相关性已将其分为高危型和低危型类别。低危 HPV 型包括 6、11、42、43、44 型，并且和增加的宫颈癌风险无关。相反地，高危 HPV 型，包括 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 型，和宫颈癌以及鳞状上皮内病变强烈相关。参见，例如，Wright 等人 (2004) *Obstet. Gynecol.* 103 :304-309。事实上，超过 99% 的宫颈癌和高危 HPV 感染相关。持久的高危 HPV 感染通过 HPV 基因 E2、E6 和 E7 的作用导致子宫颈细胞中细胞周期和有丝分裂关卡的破坏。具体地说，HPV E7 导致细胞周期蛋白 E 的增加和随后转录因子 E2f 从视网膜母细胞瘤 (Rb) 蛋白 (Rb) 的释放。然后释放的 E2f 转录因子触发各种 S 期基因的转录，导致细胞周期控制的丧失，所述 S 期基因包括拓扑异构酶 II α (Topo2A)、MCM 蛋白、细胞周期蛋白 E1 和 E2 以及 p14 α 。HPV E2 通过激活 Sp-1 转录因子进一步刺激 S 期基因例如 p21^{Waf-1} 的过表达。由持久 HPV 感染引起的细胞周期的破坏可导致轻度宫颈结构异常，然后该疾病可发展为中度或严重发育异常，最终在一些情况下导致宫颈癌。“宫颈癌”指和宫颈组织或子宫颈细胞相关的任何癌症或癌症病变。

[0030] 宫颈角质形成细胞内的 HPV 感染导致破坏细胞周期内的活动的多种变化。高危 HPV 亚型的 E6 和 E7 癌蛋白参与许多这样的细胞过程，所述细胞过程和被感染的角质形成细胞的增加的增殖和致癌性转化相关。E6 蛋白参与两个至关重要的过程。第一个过程是通过在蛋白介导的蛋白水解进行的 P53 肿瘤抑制蛋白的降解。功能性 p53 的除去消除了在进入 DNA 修复和有丝分裂前负责 DNA 修复的主要细胞周期关卡 (Duensing 和 Munger (2003) *Prog CellCycle Res.* 5 :383-391)。此外，已显示 E6 和 c-myc 蛋白相互作用，负责 hTERT 基因的直接转录激活，随后表达端粒酶 (McMurray 和 McCance (2003) *J Virol.* 77 :9852-9861; Veldman 等人 (2003) *Proc Natl Acad SciU. S. A.* 100 :8211-8216)。端粒酶的活化是癌症生物学中负责在复制染色体时保持端粒长度的关键步骤，该酶在细胞永生期间可确保功能完整的染色体。

[0031] 已知 HPV 癌蛋白 E7 通过两个独立的机制促进细胞增殖。第一机制是通过 E7 和

Smad 蛋白 (Smad2、3 和 4) 的直接相互作用,从而抑制其结合 DNA 的能力 (Lee 等人 (2002) J Biol Chem. 277 :38557-38564),由此使负责将细胞周期阻滞在 G1 期的 TGF- β 肿瘤抑制途径失活。同样,已知 E7 特异性地和 Rb 肿瘤抑制蛋白相互作用。在细胞周期的 G1 期内, Rb 和 E2F 转录因子复合,从而防止 E2F 激活基因转录。在 G1/S 边界上, Rb 蛋白被磷酸化, 释放出 E2F 转录因子,从而启动 E2F 基因转录和进入细胞周期的 S 期。HPV E7 癌蛋白通过直接结合 Rb 并从复合物中置换出 E2F 来消除该控制机制。这导致受 E2F 基因驱动基因转录不依赖于正常的细胞周期控制 (Duensing 和 Munger (2003) Prog Cell Cycle Res. 5 : 383-391 ;Duensing 和 Munger (2004) Int J Cancer 109 :157-162 ;Clarke 和 Chetty (2001) Gynecol Oncol. 82 :238-246)。该 E2F 的释放使基因转录和细胞周期控制解偶联,从而导致负责 DNA 合成和细胞增殖的 S 期基因的长时间和异常转录。此外,已显示 E6 和 E7 两者的组合作用导致子宫颈癌形成中的中心体异常和后来的基因组不稳定性 (Duensing 和 Munger (2004) Int J Cancer 109 :157-162)。

[0032] 尽管不想限制于特定的机制,但在一些实施方案中,作为 HPV 的致癌株系感染的结果,可将高度子宫颈疾病的分子行为表征为通常只在细胞周期的 S 期期间表达的离散基因的过表达。随后不受控制的基因转录的激活和异常的 S 期诱导通过 E2F-1 转录因子途径来介导。该行为似乎标示了高度子宫颈疾病并提供了致癌 HPV 感染和子宫颈癌形成的分子行为之间的联系。在分子诊断测定形式中使用这些子宫颈癌形成的分子标志物可改进子宫颈疾病的检测,使之具有比现有方法更高的灵敏度和特异性。一般参见图 1-4 和 Malinowski (2005) BioTechniques 38 :1-8 (即将出版),在此以其全文引用作为参考。因此,在特定的实施方案中,用于诊断高度子宫颈疾病的方法包括检测生物标志物的过表达,其中如此处描述的,该生物标志物的过表达标示了异常的 S 期诱导。在其他实施方案中,所述方法包括检测生物标志物的过表达,其中该生物标志物的过表达标示了 HPV E6 和 HPV E7 基因的活跃转录或过表达。

[0033] 以形态学术语常规地定义发育异常,表现在上皮细胞的正常定位的丧失、伴随细胞和细胞核大小、形状和染色特征上的改变。如通过癌前发育异常病症例如 CIN 的鉴定所显示的,根据细胞异常的程度对发育异常分级 (即,轻度、中度、严重),发育异常被广泛视作从正常组织到子宫颈癌形成的进程中的中间阶段。基于对于高度子宫颈疾病特异的生物标志物的过表达,本发明的方法允许鉴定高度子宫颈疾病,包括中度至严重发育异常以及宫颈癌 (即, CINII 病症和以上病症)。

[0034] 和 Pap 抹片检查和 / 或 HPV 感染检测法相比,此处公开的方法提供了更优越的高度子宫颈疾病检测法。在本发明的特定方面,本方法的灵敏度和特异性等于或高于常规的 Pap 抹片检查法。如此处所用的“特异性”是指本发明的方法可准确鉴定已通过阴道镜被确定为 NIL (即真阴性) 的样品的水平。即,特异性是试验呈阴性的疾病阴性的比例。在临床研究中,通过将真阴性的数目除以真阴性和假阳性之和来计算特异性。“灵敏度”是指本发明的方法可精确地鉴定已通过阴道镜确定为高度子宫颈疾病阳性 (即真阳性) 的样品的水平。因此,灵敏度是试验呈阳性的疾病阳性的比例。在临床研究中,通过将真实阳性的数目除以真阳性和假阴性之和来计算灵敏度。参见下面的实施例 1-3。在一些实施方案中,用于高度子宫颈疾病检测的所公开方法的灵敏度优选地是至少大约 70%,更优选地至少大约 80%,最优选地至少大约 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99% 或更多。此外,本方法的特异

性优选地为至少大约 70%，更优选地至少大约 80%、最优选地至少大约 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99%或更多。

[0035] 术语“阳性预测值”或“PPV”是指当患者限定于通过使用本发明方法分类为阳性的患者时，该患者患有高度子宫颈疾病的概率。在临床研究中，通过将真阳性的数目除以真阳性和假阳性之和来计算 PPV。在一些实施方案中，用于诊断高度子宫颈疾病的本发明方法的 PPV 至少为约 40%，同时保持至少大约 90%，更优选地至少大约 95%的灵敏度。试验的“阴性预测值”或“NPV”是当患者限定于所有试验呈阴性的患者时，该患者不患有该疾病的概率。在临床研究中通过将真阴性的数目除以真阴性和假阴性之和来计算 NPV。

[0036] 本发明的生物标志物包括基因和蛋白，以及其变体和片段。这些生物标志物包括这样的 DNA，该 DNA 包含编码该生物标志物的核酸序列的完整或部分序列、或该序列的互补序列。生物标志物核酸也包括这样的 RNA，该 RNA 包含任何目的核酸序列的完整或部分序列。生物标志物蛋白是由本发明 DNA 标志物编码的蛋白或对应于本发明 DNA 标志物的蛋白。生物标志物蛋白包含任何生物标记蛋白或多肽的完整的或部分氨基酸序列。

[0037] “生物标志物”是任何这样的基因或蛋白，所述基因或蛋白在组织或细胞中的表达水平与正常的或健康的细胞或组织中的表达水平相比发生了改变。本发明的生物标志物是针对潜在的高度子宫颈疾病而言具有选择性的。“在高度子宫颈疾病中选择性过表达”是指目的生物标记物在高度子宫颈疾病中过表达，但不在被分类为 LSIL、CINI 的病症、无任何发育异常存在的 HPV- 感染样品、不成熟的完全发育细胞和不被当作临床疾病的其他病症中过表达。因此，本发明的生物标志物的检测能够区别指示潜在的高度子宫颈疾病的样品和指示良性增殖、早期 HPV 感染或轻度发育异常的样品。“早期 HPV 感染”是指未发展成宫颈结构异常的 HPV 感染。如此处所用的，“轻度发育异常”是指其中无高度病变存在的 LSIL 和 CINI。本发明的方法也可将指示高度疾病的细胞与正常细胞、不成熟的完全发育细胞和不指示临床疾病的其他细胞区分开。这样，本发明的方法允许准确地鉴定高度子宫颈疾病，即使在被常规的 Pap 抹片检查错误地分类为正常、CINI、LSIL 或 ASCUS 情况（即，“假阴性”）下亦如此。在一些实施方案中，作为对异常的或非典型的 Pap 抹片检查的反映，进行诊断高度子宫颈疾病的方法。即，可进行本发明的方法以响应具有异常或非典型性 Pap 抹片检查结果的患者。在本发明的其他方面，将所述方法作为在一般的妇女人群中进行的高度子宫颈疾病的初步筛查来进行，就如同目前进行常规的 Pap 抹片检查一样。

[0038] 本发明的生物标志物包括选择性在上面定义的高度子宫颈疾病中过表达的任何基因或蛋白。这些生物标记物能够在细胞学细胞悬浮物中鉴定癌前、恶性或显现癌性的细胞。本发明的生物标志物检测 CINII 病症和以上病症中的细胞，但不检测 CINI 和其中不存在潜在的高度疾病的 HPV 感染细胞。特别感兴趣的生物标志物包括参与细胞周期调控、细胞周期的 HPV 干扰、DNA 复制和转录以及信号转导的基因和蛋白。在一些实施方案中，生物标志物是 S 期基因，包括其表达受 E2f 转录因子或 Sp-1 转录因子刺激的基因。细胞核生物标志物可用于实施本发明的某些方面。“细胞核生物标志物”是指主要在细胞的细胞核中表达的生物标志物。细胞核生物标志物可在细胞的其他部分以较低的程度表达。尽管标示高度子宫颈疾病的任何生物标志物可用于本发明，但在某些实施方案中，生物标志物，特别是细胞核生物标志物，选自 MCM2、MCM6、MCM7、p21^{Waf1}、拓扑异构酶 II α (Topo2A)、p14^{arf} 和细胞周期蛋白 E。更具体地，生物标志物可以包含 MCM 蛋白。

[0039] 微小染色体维持 (MCM) 蛋白在真核细胞 DNA 复制中起着非常重要的作用。微小染色体维持 (MCM) 蛋白通过在双 DNA 链的从头合成期间将复制前复合物 (prereplication complex) 加载至 DNA 上和充当解旋酶以帮助双链 DNA 解链而在 DNA 复制的早期阶段发挥作用。MCM 蛋白中的每一个蛋白在其高度保守的中心结构域具有 DNA 依赖性 ATP 酶基元。当正常细胞从细胞周期的 G₀ 期进行至 G₁/S 期时, MCM 蛋白的水平通常以可变的方式增加。在 G₀ 期, MCM2 和 MCM5 蛋白远不如 MCM7 和 MCM3 蛋白丰富。MCM6 和 MCM2、MCM4 以及 MCM7 形成结合组蛋白 H3 的复合物。此外, MCM4、MCM6 和 MCM7 的亚复合物具有解旋酶活性, 该活性是通过 MCM6 的 ATP 结合活性和 MCM4 的 DNA 结合活性介导的。参见, 例如, Freeman 等人 (1999) Clin. Cancer Res. 5 :2121-2132 ;Lei 等人 (2001) JCellSci. 114 :1447-1454 ;Ishimi 等人 (2003) Eur. J. Biochem. 270 :1089-1101, 所有文献在此以其全文引用作为参考。

[0040] 早期的出版物已显示 MCM 蛋白, 特别是 MCM-5, 可用于检测子宫颈疾病 (Williams 等人 (1998) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 95 :14932-14937) 以及其他癌症 (Freeman 等人 (1999) Clin Cancer Res. 5 :2121-2132)。已出版的文献表明针对 MCM-5 的抗体能够检测子宫颈癌形成细胞。MCM-5 用于检测高度子宫颈疾病的特异性未得到证实 (Williams 等人 (1998) Proc Natl Acad Sci U. S. A. 95 :14932-14937)。MCM-5 表达的检测不限于高度子宫颈疾病, 其还在经鉴定的低度发育异常和在用高危 HPV 感染后已进入细胞周期的细胞中被检测到。使用针对 MCM-5 的抗体对子宫颈癌形成的检测显示于图 4。除了 MCM-5 外, 已显示来自 MCM 家族的其他成员, 包括 MCM-2 和 MCM-7, 是用于在组织样品中检测子宫颈癌形成的可能有用的生物标志物 (Freeman 等人 (1999) Clin Cancer Res. 5 :2121-2132 ;Brake 等人 (2003) Cancer Res. 63 :8173-8180)。近年来的结果已显示 MCM-7 似乎是用于使用免疫化学形式检测高度子宫颈疾病的特异性标志物 (Brake 等人 (2003) Cancer Res. 63 :8173-8180 ;Malinowski 等人 (2004) ActaCytol. 43 :696)。

[0041] 拓扑异构酶 II α (Topo2a) 是参与 DNA 复制的基本的细胞核酶, 其是许多用于癌症治疗的抗癌药物的靶。Topo2a 的减少的表达是对几种化疗剂的耐受性的最主要机制。在许多不同的肿瘤中已注意到该蛋白的表达范围的重大变化。Topo2a 主要存在于正在增殖的细胞中, 其在 M 期在特定的位点被磷酸化修饰, 这对有丝分裂染色体凝集和分离至关重要。

[0042] p21 是由染色体 6p 上的 WAF1/Cip1 编码的蛋白。经显示该基因抑制几种细胞周期蛋白 / 细胞周期蛋白依赖性激酶复合物的活性, 从而阻止细胞周期的进程。p21^{Waf1} 的表达介导 p53 的细胞周期阻滞功能。因为 p21 似乎介导 p53 的几种生长调节功能, 其表达可能比 p53 的积累更准确地反映 p53 的功能状态。此外, p21^{Waf1} 可通过阻断增殖细胞中的细胞核抗原 (PCNA) 的作用来抑制 DNA 复制。

[0043] 细胞周期蛋白 E 是 cdk-2 的调控亚基, 其在哺乳动物细胞周期中控制 G₁/S 的转变。细胞周期蛋白 E 的多种同种型只在肿瘤中表达而不在正常的组织中表达, 这暗示着细胞周期蛋白 E 的转录后调控。体外分析表明, 细胞周期蛋白 E 的这些截短的变体同种型能够磷酸化组蛋白 H1。细胞周期蛋白 E 上的变化已被认为是各种癌症中预后差的指标。

[0044] 尽管已详细地讨论了上述生物标志物, 但可将在高度子宫颈疾病状态 (例如, CINII、CINIII 和宫颈癌) 中过表达的任何生物标志物用于实施本发明。其它感兴趣的生物标志物包括对于 G₁/S 期边界点或 S 期特异的受细胞周期调控的基因。这些基因包括但不限于解旋酶 (DDX11)、尿嘧啶 DNA 乙二醇酯酶 (uracil DNA glycolase, UNG)、E2F5、细胞

周期蛋白 E1 (CCNE1)、细胞周期蛋白 E2 (CCNE2)、CDC25A、CDC45L、CDC6、p21WAF-1 (CDKN1A)、CDKN3、E2F1、MCM2、MCM6、NPAT、PCNA、茎环 BP (SLBP)、BRCA1、BRCA2、CCNG2、CDKN2C、二氢叶酸还原酶 (DHFR)、组蛋白 H1、组蛋白 H2A、组蛋白 H2B、组蛋白 H3、组蛋白 H4、MSH2、NASP、核糖核苷酸还原酶 M1 (RRM1)、核糖核苷酸还原酶 M2 (RRM2)、胸苷合成酶 (TYMS)、复制因子 C4 (RFC4)、RAD51、染色质因子 1A (CHAF1A)、染色质因子 1B (CHAF1B)、拓扑异构酶 III (TOP3A)、ORC1、引发酶 2A (PRIM2A)、CDC27、引发酶 1 (PRIM1)、瓣结构内切核酸酶 (flap structure endonuclease, FEN1)、fanconi anemia comp. grp A (FNACA)、PKMYT1 和复制蛋白 A2 (RPA2)。参见,例如,Whitfield 等人 (2002) Mol. Biol. Cell 13:1977-2000,以其全文在此引用作为参考。其他感兴趣的 S 期基因包括细胞周期蛋白依赖性激酶 2 (CDK2)、MCM3、MCM4、MCM5、DNA 聚合酶 I α (DNA POL1)、DNA 连接酶 1、B-Myb、DNA 甲基转移酶 (DNA MET)、中心粒周围蛋白 (pericentrin, PER)、KIF4、DP-1、ID-3、RAN 结合蛋白 (RANBP1)、间隙连接 $\alpha 6$ (GJA6)、氨基乙酰丙酸脱水酶 (amino levulinatodehydratase, ALDH)、组蛋白 2A Z (H2A. Z)、精胺合酶 (SpmS)、增殖蛋白 2、T 淋巴细胞激活蛋白、磷脂酶 A2 (PLA2) 和 L6 抗原 (L6)。参见,例如,Nevins 等人 (2001) Mol. Cell. Biol. 21:4689-4699,此处引用作为参考。

[0045] 在本发明的一些方面,生物标志物包含由 E2f 转录因子诱导的基因。这些基因包括但不限于胸苷酸合酶 (thymidylate synthase)、胸苷激酶 1、核糖核苷酸还原酶 M1、核糖核苷酸还原酶 M2、CDK2、细胞周期蛋白 E、MCM3、MCM7、PCNA、DNA 引发酶小亚基、拓扑异构酶 IIA (Topo2A)、DNA 连接酶 1、flap endonuclease1、RAD51、CDC2、细胞周期蛋白 A2、细胞周期蛋白 B1、细胞周期蛋白 B2、KI-67、KIFC1、FIN16、BUB1、输入蛋白 α -2、HMG2、zeste 增强子、STK-1、组蛋白茎环 BP、Rb、P18-INK4C、膜联蛋白 VII、c-Myb、CDC25A、细胞周期蛋白 D3、细胞周期蛋白 E1、脱氧胞嘧啶激酶、DP-1、内皮素转化酶 (endothelin converting enzyme)、烯醇化酶 2、P18I NK4C、核糖核苷酸还原酶和尿嘧啶 DAN 乙二醇酯酶 2。参见,例如 Nevins 等人,同上;Muller 等人 (2000) Genes and Dev. 15:267-285。在特定的实施方案中,感兴趣的生物标志物是由参与细胞周期调控和 DNA 复制的 E2f 转录因子诱导的基因,例如,细胞周期蛋白 E2、Ki-67、p57KIP2、RANBPM 和复制蛋白 A1。一些 E2f 诱导的感兴趣基因参与凋亡,其包括 APAF1、Bcl-2、caspase3、MAP3 激酶 5 和 TNF 受体相关因子。其他 E2f 诱导的基因参与转录的调控,其包括例如 ash2 样、polyhomeotic2、embryonic ectoderm protein、Zeste 基因增强子、hairy/enhancer of split、同源异形盒 A10、同源异形盒 A7、同源异形盒 A9、同源结构域 TF1、早期前 B 细胞白血病 FT3、YY1TF、POU 结构域 TF、TAFII130、TBP 因子 172、碱性 TF3、溴区结构 (bromodomain)/ 锌指、SWI/SNF、ID4、TEA-4、NFATC1、NFATC3、BT、CNC-1、MAF、MAFF、MAFG、核心结合蛋白、E74 样因子 4、c-FOS、JUNB、锌指 DNA BP 和 Cbp/p300 转录激活物。参与信号转导的 E2f 诱导的基因也是潜在的目的生物标志物,其包括 TGF β 、卵泡抑素 (follistatin)、骨形态发生蛋白 2 (bonemorphogenetic protein2)、BMP 受体类型 1A、曲蛋白同源物 1 (frizzled homolog1)、WNT10B、鞘氨醇激酶 1、双特异性磷酸酶 7、双特异性 (Y) 磷酸酶、FGF 受体 3、蛋白酪氨酸磷酸酶、双特异性 (Y) 磷酸酶 D6655、胰岛素受体、成熟 T 细胞增殖蛋白 1、FGF 受体 2、TGF α 、CDC42 效应蛋白 3、Met、CD58、CD83、TACC1 和 TEAD4。

[0046] 尽管本发明的方法要求在患者样品中检测至少一个生物标志物以检测高度子宫颈疾病,但可使用 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个生物标志物来实施本发明。已认识到对机体样品中的超过一个生物标志物的检测可用于鉴定高度子宫颈疾病的事件。因此,在一

些实施方案中,使用两种或更多种生物标志物,更优选地,使用两种或更多种互补生物标志物。“互补”是指机体样品中生物标志物的组合的检测导致比只使用其中一个生物标志物时以更大比例成功鉴定高度子宫颈疾病。因此,在一些情况下,可通过使用至少两种生物标志物进行高度子宫颈疾病的更准确的确定。因此,当使用至少两种生物标志物时,使用至少两种针对不同生物标志物蛋白的抗体来实施此处公开的免疫细胞化学方法。可同时或共同地将抗体和机体样品接触。在本发明的某些方面,使用 3 种抗体检测 MCM2 和 Topo2A 的过表达,其中抗体中的两种抗体对于 MCM2 是特异性的,第三种抗体对于 Topo2A 是特异性的。

[0047] 在特定的实施方案中,本发明的诊断方法包括从患者收集子宫颈样品,将样品和至少一种对于目的生物标志物特异的抗体接触,检测抗体结合。表现本发明生物标志物的过表达的样品,如通过抗体结合的检测所确定的,被认为是高度子宫颈疾病阳性的。在特定的实施方案中,机体样品是单层子宫颈细胞。在本发明的一些方面,在玻璃载片上提供单层子宫颈细胞。

[0048] “机体样品”是指可检测到生物标志物表达的细胞、组织或体液的任何取样。这些机体样品的示例包括但不限于血液、淋巴、尿、妇科流体 (gynecological fluids)、活组织检查和涂片。可通过各种技术,包括例如,通过刮取或擦拭表面或通过使用针头抽取体液来从患者获得机体样品。用于收集各种机体样品的方法在本领域是众所周知的。在特定的实施方案中,机体样品包括子宫颈细胞,作为宫颈组织样品或如悬浮物中的子宫颈细胞,特别是基于液体的制备物。在一个实施方案中,按照基于液体的细胞学样品制备指南,例如 SurePath[®] (TriPath Imaging, Inc.) 或 ThinPrep[®] preparation (CYTYC, Inc.) 所述收集宫颈样品。可将机体样品转移至玻璃载片上以进行放大观察。可对载片上的细胞使用固定液和染色液以保存样品和帮助检查。在一个实施方案中,收集宫颈样品,对其进行处理以提供单层样品,如美国专利号 5,346,831 (此处引用作为参考) 中所示。

[0049] 单层方法涉及在带阳离子电荷的基底上制备单层细胞学材料的方法。该方法包括这样的步骤,即在密度梯度上通过离心分离细胞学材料,产生该细胞学材料的紧密聚集的沉淀,混合该细胞学材料的沉淀,从混合的沉淀中取出预先确定体积的等分,将该等分和预先确定体积的水沉积在沉降容器中,该容器可移动地装在带阳离子电荷的基底上,从而可使细胞学材料在重力作用下沉淀在该基底上,在细胞学材料沉淀后,从沉降容器中除去水分。为了进行自动化分析,可将沉淀容器和基底分开。可通过本领域已知的任何方法,例如吹吸法 (syringing)、胰蛋白酶法 (trypsinizing)、超声处理、震荡、涡旋或通过使用美国专利 5,316,814 (其内容在此引用作为参考) 中描述的装置进行分离。在一些实施方案中,使用 PrepStain[™] 载片处理器 (TriPath Imaging, Inc.) 从 SurePath[™] (TriPath Imaging, Inc.) 制备包含单层子宫颈细胞的载片。

[0050] 此处包括本领域可获得的用于鉴定或检测生物标志物的任何方法。可在核酸水平或蛋白水平上检测本发明的生物标志物的过表达。为了确定过表达,可将要检查的机体样品和来源于健康人的对应的机体样品进行比较。即,表达的“正常”水平是未遭受高度子宫颈疾病的人受试者或患者的子宫颈细胞中该生物标志物的表达水平。在一些实施方案中,特别是当机体样品包含单层子宫颈细胞时,生物标志物过表达的确定不需要机体样品和来源于健康人的对应机体样品之间的比较。在该情况下,来自单一患者的单层子宫颈细胞可以每 50,000 个正常细胞包含少至 1-2 个异常细胞。这些异常细胞 (通过本发明标志物的

过表达鉴定的)的检测,排除了和来源于健康人的对应机体样品相比较的需要。

[0051] 用于检测本发明标志物的方法包括在核酸或蛋白水平上确定生物标志物的量或存在的任何方法。这些方法在本领域是熟知,包括但不限于 western 印迹法、Northern 印迹法、southern 印迹法、ELISA、免疫沉淀法、免疫荧光法、流式细胞术、免疫细胞化学法、核酸杂交技术、核酸逆转录法以及核酸扩增法。在特定的实施方案中,使用例如针对特定生物标志物蛋白的抗体在蛋白水平上检测生物标志物的过表达。这些抗体可用于各种方法,例如 western 印迹法、ELISA、免疫沉淀法或免疫细胞化学技术。同样,可将 Pap 抹片检查的免疫染色和常规 Pap 染色结合,这样可获得形态学信息和免疫细胞化学信息。这样,生物标志物的检测可减少 Pap 抹片检查的高假阴性率,从而可促进大规模自动化筛查。

[0052] 在一个实施方案中,使用对于生物标志物蛋白特异的抗体检测机体样品中生物标志物蛋白的过表达。该方法包括从患者获得机体样品,将该机体样品和至少一种针对于选择性地高度子宫颈疾病中过表达的生物标志物的抗体相接触,和检测抗体结合以确定该生物标志物在患者样品中是否过表达。本发明的优选的方面提供了用于诊断高度子宫颈疾病的免疫细胞化学技术。具体地,该方法包括患者样品中的生物标志物的抗体染色,该生物标志物对于高度子宫颈疾病是特异性的。本领域技术人员认识到,可人工地或以自动化的方式(使用例如 Autostainer Universal Staining System(Dako) 或 Biocare Nemesis Autostainer(Biocare))进行本文下面描述的免疫细胞化学法。实施例 1 中提供了一个用于宫颈样品的抗体染色(即免疫细胞化学)的方案。

[0053] 在优选的免疫细胞化学法中,将患者的宫颈样品收集入液体培养基中,例如,在 SurePath™ 收集小瓶(TriPath Imaging, Inc.)中。使用自动化处理器,例如 .PrepStain™ 系统(TriPath Imaging, Inc.),从液体培养基中收集细胞和将其沉淀在载玻片上的薄层内以待进一步分析。可固定或不固定载片样品,并可在制备后立即对其进行分析或可将其保存以待以后分析。在一些实施方案中,将制备的玻片贮存在 95% 的乙醇中最少 24 小时。可选择地,在其他实施方案中,如下所述将载片贮存在预处理缓冲液中。

[0054] 为制备易于抗体结合的生物标志物抗原,可能需要对样品进行修饰。在免疫细胞化学法的特定方面,将载片转移至预处理缓冲液例如 SureSlide® 制备缓冲液(TriPath Imaging, Inc.)和任选地将其加热以增加抗原的易接近性。样品在预处理缓冲液中的加热快速地破坏了细胞的脂双层,使得抗原(即,生物标志物蛋白)更容易进行抗体结合。预处理缓冲液可包含聚合物、去垢剂、或者非离子或阴离子表面活性剂例如乙氧基化的阴离子或非离子表面活性剂、链烷酸酯或烷氧基化物或甚至这些表面活性剂的混合物,或甚至使用胆盐。在特定的实施方案中,预处理缓冲液包含非离子或阴离子去垢剂,例如和具有大约 370kD 分子量的烷氧基化物混合的具有大约 183kD 分子量的链烷酸钠(在下文中称作 RAM)。在特定的实施方案中,预处理缓冲液包含 1% RAM。在一些实施方案中,预处理缓冲液也可用作上面指出的载片贮存缓冲液。在另一个实施方案中,将 0.1% 至 1% 的脱氧胆酸、钠盐、一水合物的溶液用作贮存缓冲液和预处理缓冲液。在本发明的另一个实施方案中,可将月桂基(聚氧乙烯)醚-13-羧酸钠(例如, Sandopan LS)或/和乙氧基化的阴离子复合物或甚至烷基芳基乙氧化羧酸的溶液用于贮存和预处理缓冲液。在本发明的特定方面,载片预处理缓冲液包含 0.05% 至 5% 月桂基(聚氧乙烯)醚-13-羧酸钠,优选地 0.1% 至 1% 月桂基(聚氧乙烯)醚-13-羧酸钠、更优选地 0.5% 月桂基(聚氧乙烯)醚-13-羧酸

钠。在一个实施方案中,载玻片可在预处理和染色处理前在缓冲液中贮存长达 72 小时。可将本发明的预处理缓冲液用于制备在免疫测定法(例如,免疫细胞化学法和免疫组织化学法)中更容易进行抗体结合的抗原的方法。参见实施例 14。术语“预处理缓冲液”和“制备缓冲液”在此处可交换使用,其是指这样的缓冲液,该缓冲液用于制备,特别是通过增加抗原的对抗体结合的易接近性来制备用于免疫染色的细胞学或组织学样品。

[0055] 可将制备更容易进行抗体结合的抗原的任何方法用于本发明的实施,所述方法包括本领域已知的抗原修复法(antigen retrieval methods)。参见,例如,Bibbo 等人(2002)Acta. Cytol. 46:25-29;Saqi 等人(2003)Diagn. Cytopathol. 27:365-370;Bibbo 等人(2003)Anal. Quant. Cytol. Histol. 25:8-11,此处以其全文引用作为参考。在一些实施方案中,抗原修复包括将载片贮在 95%的乙醇中至少 24 小时,将载玻片浸没在预热至 95°C 的 1X Target Retrieval Solution pH6.0(DAKOS1699)/dH₂O 浴中,将载玻片置于蒸器中 25 分钟。参见下面的实施例 2。

[0056] 在进行增加抗原的易接近性的预处理或抗原修复后,使用合适的封闭试剂(例如,过氧化物酶封闭试剂例如过氧化氢)封闭样品。在一些实施方案中,使用蛋白封闭剂封闭样品以防止抗体的非特异性结合。所述蛋白封闭剂可包含,例如,纯化的酪蛋白。然后将针对目的生物标志物的抗体,特别是单克隆抗体,和样品一起温育。如上面所指出的,本领域技术人员认识到,在一些情况下,通过在患者样品中检测超过一种生物标志物可获得高度子宫颈疾病的更准确的诊断。因此,在特定的实施方案中,使用至少两种针对两种不同生物标志物的抗体检测高度子宫颈疾病。当使用超过一种抗体时,可将这些抗体作为单个抗体试剂顺次加入至单一样品中或作为抗体混合物同时加入。参见下面实施例 3。可选择地,可将各单一抗体加入至来自相同患者的分开的样品,再将所得的数据合并。在特定的实施方案中,抗体混合物包含至少 3 种抗体,其中两种抗体特异性地结合 MCM2,第三种抗体特异性地结合 Topo2A。

[0057] 检测抗体结合的技术在本领域是熟知的。可使用产生对应于抗体结合水平、因此对应于生物标志物蛋白表达水平的可检测信号的化学试剂来检测针对目的生物标志物的抗体结合。在本发明的其中一个免疫细胞化学法中,通过使用缀合了被标记的聚合物的第二抗体来检测抗体结合。经标记的聚合物的示例包括但不限于聚合物-酶缀合物。一般将这些复合物中的酶用于催化色原在抗原-抗体结合位点的沉积,从而引起对应于目的生物标志物的表达水平的细胞染色。特别有吸引力的酶包括辣根过氧化物酶(HRP)和碱性磷酸酶(AP)。可使用商购获得的抗体检测系统,例如,Dako Envision+ 系统和 Biocare Medical's Mach3 系统实施本发明。

[0058] 在本发明的一个具体的免疫细胞化学法中,通过使用 HRP 标记的缀合了二抗的聚合物来检测针对生物标志物的抗体结合。也可使用结合小鼠单克隆抗体的小鼠探针试剂和结合小鼠探针试剂的缀合 HRP 的聚合物来检测抗体结合。使用色原 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)就抗体结合对载玻片进行染色,然后用苏木精和任选地着色剂例如氢氧化铵或 TBS/Tween-20 进行复染。在本发明的一些方面,由细胞检验技术员和/或病理学家在显微镜下检查载片以评估细胞染色(即,生物标志物的过表达)和确定是否存在高度子宫颈疾病。可选择地,可通过自动化的显微镜方法或通过人工借助有助于鉴定阳性染色细胞的计算机软件检查样品。

[0059] 术语“抗体”广义上包括天然发生的抗体形式和重组抗体例如单链抗体、嵌合抗体和人源化抗体和多特异性抗体以及所有前述抗体的片段和衍生物,所述片段和衍生物至少具有抗原结合位点。抗体衍生物可包含缀合至所述抗体的蛋白或化学部分。

[0060] “抗体”和“免疫球蛋白”(Igs)是具有相同结构特征的糖蛋白。尽管抗体表现对抗原的结合特异性,但免疫球蛋白包括抗体和缺乏抗原特异性的其他抗体样分子。后一种的多肽通过例如淋巴系统以较低的水平产生,在骨髓瘤中以增加的水平产生。

[0061] 术语“抗体”以最广的意义使用,其包括完全地组装的抗体、可结合抗原的抗体片段(例如, Fab'、F' (ab)₂、Fv、单链抗体、二价抗体(diabodies))和包含前述抗体的重组肽。

[0062] 此处使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均一的抗体的群体中获得的抗体,即,构成该群体的各抗体是完全相同的,除了可能天然发生的可以少量存在的突变。“抗体片段”包含完整抗体的部分,优选地完整抗体的抗原结合或可变区部分。抗体片段的示例包括 Fab、Fab'、F(ab')₂ 和 Fv 片段;二价抗体;线性抗体(Zapata 等人(1995)Protein Eng8(10):1057-1062);单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体的木瓜蛋白酶降解产生两个完全相同的抗原结合片段,称为“Fab”片段,各片段具有单个抗原结合位点,剩余的“Fc”片段,其名称反应其容易地结晶 35 的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并能够交联抗原的 F(ab')₂ 片段。

[0063] “Fv”是包含完整的抗原识别和结合位点的最小抗体片段。在双链 Fv 种类中,该区域由一条重链可变结构域和一条轻链可变结构域通过紧密的、非共价缔合形成的二聚体构成。在单链 Fv 种类中,可通过柔性肽连接体将一条重链可变结构域和一条轻链可变结构域共价连接,从而可使轻链和重链以类似于双链 Fv 种类中的形式以“二聚”结构结合。正是处于该构型,各可变区的 3 个 CDRs 相互作用,从而在 V_H-V_L 二聚体的表面上确定了抗原结合位点。总之,6 个 CDRs 为抗体提供了抗原结合特异性。然而,即使是单个可变区(或只包含 3 个特异于抗原的 CDRs 的 Fv 一半)也具有识别和结合抗原的能力,但以比完整结合位点更低的亲和力结合。

[0064] Fab 片段也包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(C_H1)。Fab 片段和 Fab' 片段的相同之处在于在重链 C_H1 结构域的羧基端加入了少数残基,包括一个或多个来源于抗体铰链区的半胱氨酸。Fab' -SH 在此处是 Fab' 的名称,在所述 Fab' 中,恒定区的半胱氨酸残基具有游离巯基。F(ab')₂ 抗体片段最初作为成对的 Fab' 片段(在其之间具有铰链半胱氨酸)产生。

[0065] 可通过用生物标志物蛋白免疫原免疫合适的受试者(例如,兔子、山羊、小鼠或其他哺乳动物)来制备多克隆抗体。可通过标准技术,例如采用使用固定的生物标志物蛋白的酶联免疫吸附测定法(ELISA)在一段时间内监控被免疫的受试者中的抗体滴度。在免疫后的合适时间点,例如当抗体滴度最高时,可从受试者获得抗体生产细胞,并通过标准技术将其用于制备单克隆抗体,所述标准技术是例如最先由 Kohler 和 Milstein(1975)Nature256:495-497 描述的杂交瘤技术、人 B 细胞杂交瘤技术(Kozbor 等人(1983)Immunol. Today4:72)、EBV 杂交瘤技术(Cole 等人(1985)in Monoclonal Antibodies and CancerTherapy, ed. Reisfeld 和 Sell(Alan R. Liss, Inc., New York, NY), pp. 77-96)或 trioma 技术。用于生产杂交瘤的技术是熟知的(一般参见 Coligan 等人,编著(1994)

Current Protocols in Immunology(JohnWiley&Sons, Inc., New York, NY) ;Galfre 等人 (1977)Nature266 :550-52 ;Kenneth(1980)in Monoclonal Antibodies :A New Dimension In Biological Analyses(Plenum Publishing Corp., NY) ;和 Lerner(1981)YaleJ. Biol. Med. ,54 :387-402)。

[0066] 作为制备单克隆抗体分泌性杂交瘤的另一选择,可通过用生物标志物蛋白筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体展示文库)从而分离结合该生物标志物蛋白的免疫球蛋白文库成员来鉴定和分离单克隆抗体。可商购(例如, the Pharmacia Recombinant PhageAntibody System, Catalog No.27-9400-01; 和 the StratageneSurfZAP9Phage Display Kit, Catalog No.240612)获得产生和筛选噬菌体展示文库的试剂盒。此外,特别适合用于产生和筛选抗体展示文库的方法和试剂的示例可见于例如美国专利号 5,223,409 ;PCT 公开号 W092/18619 ;W091/17271 ;W092/20791 ;W092/15679 ;93/01288 ;W092/01047 ;92/09690 ;90/02809 ;Fuchs 等人 (1991)Bio/Technology9 :1370-1372 ;Hay 等人 (1992)Hum. Antibod. Hybridomas3 :81-85 ;Huse 等人 (1989)Science246 :1275-1281 ;Griffiths 等人 (1993)EMBOJ12 :725-734 中。

[0067] 可通过将抗体偶联可检测物质来帮助抗体结合的检测。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质和放射性物质。合适的酶的示例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β 半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基的示例包括链霉亲和素 / 生物素和亲和素 / 生物素;合适的荧光物质的示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白 (phycoerythrin) ;发光物质的示例包括鲁米诺 (lumino) ;生物发光物质的示例包括萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;合适的放射性物质的示例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0068] 关于本发明免疫细胞化学法中的抗体染色的检测,本领域内也存在用于在生物样品中定量确定多分子种类(例如生物标志物蛋白)的量的视频显微术 (video-microscopy) 和软件方法,其中通过具有特定颜色的代表性染料标志物来指示存在的各分子种类。这些方法作为比色分析法在本领域也是已知的。在这些方法中,在将生物样品染色以可视地显现特定目的生物标志物的存在后,使用视频显微术提供所述生物样品的图象。这些方法中的一些方法,例如在属于 Marcelpoil 等人的美国专利申请 .09/957,446 和属于 Marcelpoil 等人的美国专利申请 10/057,729(此处引用作为参考)中公开的方法,公开了成象系统和相关软件基于代表性颜色染料标志物的存在确定存在的各分子种类的相对量的用途,所述分子种类的相对量分别由成象系统和相关软件确定的所述颜色染料标志物的光密度或透射值 (transmittance value) 表示。通过使用被“解构”成其组分颜色部分的单一视频图象,这些技术可定量确定各分子种类在经染色的生物样品中的相对量。

[0069] 选择用于实施本发明的抗体,使其对目的生物标志物蛋白具有高特异性。制备抗体和选择合适抗体的方法在本领域是已知的。参见,例如, Celis, 编著 (即将出版) Cell Biology&Laboratory Handbook, 第 3 版 (Academic Press, New York), 在此以其全文引用作为参考。在一些实施方案中,可使用商购获得的针对特定生物标志物蛋白的抗体来实施本发明。也可基于想要的细胞学而不是组织学样品的染色来选择本发明的抗体。即,在特定的实施方案中,根据最终的样品形式(即,细胞学制备物)和就结合特异性来选择抗体。

[0070] 在本发明的一些方面,通过多步筛选法选择和纯化针对特定目的生物标志物的抗体。在特定的实施方案中,筛选多元瘤 (polydomas) 以鉴定具有想要的特异性和灵敏度性状的生物标志物的特异性抗体。如此处所用的,“多元瘤”是指多个杂交瘤。一般地在多孔组织培养板上提供本发明的多元瘤。在最初的抗体筛选步骤中,产生包含多个正常 (即,无 CIN)、CINI、鳞状细胞癌和腺癌样品的肿瘤组织微阵列。用于在单张载片上产生多个组织的阵列的方法和设备,例如 **Chemicon®** Advanced Tissue Arrayer 在本领域是已知的。参见,例如,美国专利号 4,820,504。使用标准的免疫组织化学技术就阳性染色对来自各孔的包含多元瘤的未稀释上清液进行分析。在该起始筛选步骤中,基本上忽略背景,即非特异性结合。选择产生阳性结果的多元瘤并将其用于抗体筛选的第二阶段。

[0071] 在第二筛选步骤中,将阳性多元瘤接受有限稀释法。使用标准的免疫组织化学技术就 CINI 或宫颈癌样品的阳性染色对所得的未经筛选的抗体进行分析。在该阶段,背景染色是相关的,只选择只对异常细胞 (即, CINI 和癌细胞) 阳性染色的候选多元瘤作进一步分析。

[0072] 为鉴定可将正常样品和 CINI 样品与来自标示高度子宫颈疾病 (即, CINI 和其以上病症) 的样品区分开的抗体,产生疾病组组织微阵列。该组织微阵列一般包含多个无 CIN 的样品、CINI 样品、CINI 样品、CINI 样品、鳞状细胞癌样品和腺癌样品。使用标准的免疫组织化学技术就只对标示高度子宫颈疾病的样品 (即, CINI 样品和其以上病症的样品) 特异性阳性染色来对候选多元瘤进行测定。选择产生阳性结果和最小背景染色的多元瘤以进行进一步分析。

[0073] 为了选择单个候选单克隆抗体,将阳性染色的培养物制备为单一克隆。用于分离单个克隆的方法在本领域是熟知的。使用上述的肿瘤和疾病组组织微阵列,就 CINI、CINI、鳞状细胞癌和腺癌样品的特异性染色来测定来自各克隆的包含未纯化抗体的上清液。选择显示高度子宫颈疾病样品 (即, CINI 和其以上病症) 的阳性染色、其他细胞类型 (即, 正常样品和 CINI 样品) 的最小染色以及极少背景的候选抗体以进行纯化和进一步分析。通过亲和吸附层析纯化抗体的方法在本领域是熟知的。

[0074] 为了鉴定高度子宫颈疾病样品中展示最大特异性染色而在子宫颈细胞学样品中展示最小背景 (非特异性染色) 的抗体,使用本发明的免疫细胞化学技术测定在上述基于免疫组织化学的筛选方法中分离和纯化的候选抗体。在实施例 1 和 2 中提供了进行免疫细胞化学法的示例性方案。

[0075] 具体地,使用纯化的目的抗体测定统计学上显著数目的 NIL (即,非浸润性病变)、ASCUS、LSIL、HSIL 或癌性子宫颈细胞学患者样品。通过此处描述的免疫细胞化学法分析所述样品,并基于对特定生物标志物的阳性抗体染色将其分类为高度子宫颈疾病阳性、阴性或不确定的类型。计算各抗体的灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。为本发明选择在子宫颈细胞学样品中展现最大的高度子宫颈疾病特异性染色和最低背景 (即,最大信噪比) 的抗体。

[0076] 合适的抗体的鉴定导致测定的信噪比增加和临床功效上的增加。使用的测定形式和样品类型在合适的抗体的选择中是至关重要的因素。许多针对生物标志物的抗体在使用细胞学制备物的免疫细胞化学形式中或在使用福尔马林固定的石蜡包埋样品的免疫组织化学形式中不产生理想的信噪比。此外,在免疫组织化学形式中产生最大信噪比的生物标

志物抗体可能在免疫细胞化学测定法中表现不好。例如,在免疫细胞化学形式中产生理想的染色水平的抗体可能在免疫组织化学测定中不产生合适的染色水平(数据未显示)。同样,当用于免疫组织化学测定时产生可接受的信噪比的抗体可能导致免疫细胞化学样品的过度染色(数据未显示)。因此,抗体的选择需要及早考虑所用的测定形式和最终样品类型。

[0077] 在不能获得支持免疫细胞化学形式中的染色解释的组织结构的情况下,基于细胞学的测定法(即,免疫细胞化学法)和基于组织的测定法(即,免疫组织化学法)不同。例如,在用针对 Claudin1 的抗体对来自患有轻度发育异常或鳞状细胞癌的患者样品进行免疫组织化学测定时,结果显示 Claudin1 在轻度发育异常样品的病灶中表达(即,淡棕色染色),但在癌症病灶(图 12)中明显地过表达(即,暗棕色染色)。在免疫细胞化学测定法中用相同的 Claudin1 抗体获得的结果是不确定的(图 13)。尽管在免疫组织化学测定法中使用 Claudin1 抗体可容易地检测异常细胞,但在本发明的免疫细胞化学测定法中通过 Claudin1 染色获得的结果更难以解释。因此,适合于免疫组织化学形式的生物标志物可能不适合于免疫细胞化学测定法,从而不包含在本发明的优选实施方案中。

[0078] 此外,生物标志物在细胞内的定位也是免疫细胞化学测定法中要考虑的重要问题。展示细胞核、细胞质或膜染色模式的生物标志物可通过形态学的方法进行确定并且适合用于免疫组织化学法。然而,细胞质和膜染色使得在免疫组织化学测定法中鉴定子宫颈疾病的至关重要的形态学特征(例如,核质比)非常困难。参见图 15。相反地,在细胞核中表达和显示细胞核染色模式的生物标志物有助于抗体染色的检查,也允许形态学分析。参见图 15。因此,在一些优选的实施方案中,只有选择性地细胞核中表达的生物标志物用于本发明的免疫细胞化学测定法。

[0079] 本领域技术人员认识到,需要对抗体滴度和检测化学条件进行优化,以使特定抗体的信噪比达到最大。要确定使抗体和本发明的生物标志物的特异性结合最大化并使非特异性结合(或“背景”)最小化的抗体浓度。在特定的实施方案中,通过开始时在福尔马林固定、石蜡包埋的正常组织样品和高度子宫颈疾病组织样品上检测各种抗体稀释度来确定用于子宫颈细胞学制备物的合适的抗体滴度。最先确定针对福尔马林固定、石蜡包埋的宫颈组织样品的最适宜抗体浓度和检测化学条件。优化抗体滴度和检测条件的设计是常规的,并且在本领域技术员的常规能力范围之内。在确定了针对固定的组织样品的最优条件之后,在相同的条件下将各抗体用于子宫颈细胞学制备物。一些抗体需要额外的最优化以减少背景染色和/或增加细胞学样品中的染色的特异性和灵敏度。

[0080] 此外,本领域技术人员认识到用于实施本发明方法的特定抗体的浓度视如下因素(如结合时间、抗体对生物标志物蛋白的特异性水平和机体样品制备的方法)的变化而变化。此外,当使用多个抗体时,所需的浓度可能受到向样品中加入所述抗体的顺序(即,作为混合物同时加入或作为单种抗体试剂顺次加入)影响。此外,也必须优化用于显示针对目的生物标志物的抗体结合的检测化学条件,以产生想要的信噪比。

[0081] 在另一个实施方案中,在核酸水平上检测目的生物标志物的表达。用于评估表达的基于核酸的技术在本领域是熟知的,其包括,例如,确定机体样品中生物标志物 mRNA 的水平。许多表达检测方法使用分离的 RNA。可使用不对 mRNA 的分离进行选择的任何 RNA 分离技术来从子宫颈细胞纯化 RNA(参见,例如, Ausubel 等人,编著, (1987-1999) Current

Protocols in Molecular Biology (John Wiley & Sons, New York)。此外,可使用本领域技术人员熟知的技术,例如 Chomczynski 的单步 RNA 分离法 (1989, 美国专利号 4, 843, 155), 容易地处理大量组织样品。

[0082] 术语“探针”是指可选择性地结合明确想要的靶生物分子 (例如, 核苷酸转录物或由生物标志物编码的蛋白或对应于生物标志物的蛋白) 的任何分子。探针可由本领域技术人员合成, 或其可来源于合适的生物学制剂。可特别地设计探针以使其被标记。可用作探针的分子的示例包括但不限于 RNA、DNA、蛋白、抗体和有机分子。

[0083] 分离的 mRNA 可用于杂交或扩增测定法, 其包括, 但不限于, Southern 或 Northern 分析、聚合酶链式反应分析和探针阵列。用于 mRNA 水平检测的一个方法包括将分离的 mRNA 和能够与由被检测的基因编码的 mRNA 杂交的核酸分子 (探针) 接触。核酸探针可以是, 例如, 全长 cDNA 或其部分, 例如长度至少为 7、15、30、50、100、250 或 500 个核苷酸并且足以在严格条件下特异性地和编码本发明生物标志物的 mRNA 或基因组 DNA 杂交的寡核苷酸。mRNA 和探针的杂交表明所述生物标志物正在表达。

[0084] 在一个实施方案中, 将 mRNA 固定在固体表面上并使其和探针接触, 例如通过使分离的 mRNA 在琼脂糖凝胶上跑胶和将所述 mRNA 从凝胶转移至膜例如硝酸纤维素上来进行。在可选择的实施方案中, 将探针固定在固体表面并将 mRNA 和探针例如 Affymetrix 基因芯片阵列中的探针接触。本领域技术人员可容易地改造已知的 mRNA 检测方法, 使之适合用于检测由本发明的生物标志物编码的 mRNA 的水平。

[0085] 用于确定样品中生物标志物 mRNA 的水平的可选择方法包括核酸扩增的方法, 例如, 通过 RT-PCR (Mullis, 1987, 美国专利号 4, 683, 202 中所示的实验实施方案)、连接酶链式反应 (Barany (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88 : 189-193)、自主序列复制 (Guatelli 等人 (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87 : 1874-1878)、转录扩增系统 (Kwoh 等人 (1989) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 : 1173-1177)、Q- β 复制酶 (Lizardi 等人 (1988) Bio/Technology 6 : 1197)、滚环复制 (Lizardi 等人, 美国专利号 5, 854, 033) 或任何其他核酸扩增方法, 然后使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。如果分子以极低的数量存在, 则这些检测方案特别适合用于检测这样的核酸分子。在本发明的特定方面, 通过荧光定量 RT-PCR (即, TaqMan  System) 评估生物标志物的表达。这些方法一般使用成对的特异的生物标志物的寡核苷酸引物。用于设计特异的已知序列的寡核苷酸引物的方法在本领域是熟知的。

[0086] 使用膜印迹 (例如用于杂交分析的印迹例如 Northern、Southern、斑点印迹等)、或微孔、样品管、凝胶、小珠或纤维 (或任何包含结合的核酸的固体支持物) 监控 RNA 的生物标志物表达水平。参见美国专利号 5, 770, 722、5, 874, 219、5, 744, 305、5, 677, 195 和 5, 445, 934, 其在此引用作为参考。生物标志物表达的检测也可包括使用溶液中的核酸探针。

[0087] 在本发明的一个实施方案中, 使用微阵列检测生物标志物的表达。因为不同实验之间的重复性的原因, 微阵列特别适合用于该目的。DNA 微阵列提供了用于同时测量大量基因的表达水平的一个方法。各阵列由附着至固体支持物上的捕获探针的可重复模式构成。将标记的 RNA 或 DNA 和阵列上的互补探针杂交, 然后通过激光扫描进行检测。确定阵列上各探针的杂交强度, 将其转化为表示相对基因表达水平的数量值。参见, 美国专利号 6, 040, 138、5, 800, 992 和 6, 020, 135、6, 033, 860 和 6, 344, 316, 其在此引用作为参考。高密

度的寡核苷酸阵列特别适合用于确定样品中大量 RNA 的基因表达谱。

[0088] 使用机械合成法合成这些阵列的技术描述于例如美国专利 5,384,261 中,在所有情况下以其全文在此引用作为参考。尽管平面阵列表面是优选的,但可将阵列制作在实际上是任何形状的表面或甚至多层表面上。阵列可以是小珠、凝胶、聚合物表面、纤维例如光纤、玻璃或任何其他合适的基底上的肽或核酸,参见美国专利号 5,770,358、5,789,162、5,708,153、6,040,193 和 5,800,992,在所有情况下,各以其全文在此引用作为参考。可以这样的方式包装阵列以使其能够用于诊断学或内含设备的其他操作。参见,例如,美国专利号 5,856,174 和 5,922,591,此处引用作为参考。

[0089] 在一个方法中,把从样品中分离的总 mRNA 转变成标记的 cRNA,然后将其和寡核苷酸阵列杂交。将各样品和分开的阵列杂交。可通过参考存在于阵列上和样品中的合适对照来计算相对转录水平。

[0090] 此外还提供了实施本发明方法的试剂盒。“试剂盒”是指包含至少一种用于特异性地检测本发明生物标志物表达的试剂,例如抗体、核酸探针等的任何产品(例如,包装盒或容器)。试剂盒可以作为进行本发明方法的单位形式推销、分发或销售。此外,试剂盒可包含描述试剂盒和其使用方法的说明书。

[0091] 在特定的实施方案中,提供了用于实施本发明的免疫细胞化学方法的试剂盒。该试剂盒可与下面实施例 1 中描述的人工和自动化免疫细胞化学技术(例如,细胞染色)相容。这些试剂盒包含至少一种针对目的生物标志物的抗体、用于检测针对生物标志物的抗体结合的化学物质、复染剂和可选地帮助鉴定阳性染色细胞的着色剂。可使用检测抗原-抗体结合的任何化学物质实施本发明。在一些实施方案中,检测化学物质包含缀合至第二抗体的经标记的聚合物。例如,可提供这样的第二抗体,该第二抗体缀合了催化色原在抗原-抗体结合位置沉积的酶。这些酶和使用其检测抗体结合的技术在本领域是熟知的。在一个实施方案中,试剂盒包含缀合至经 HRP 标记的聚合物的第二抗体。此外还可提供可和缀合的酶相容的色原(例如,在经 HRP 标记的第二抗体的情况下是 DAB)和溶液,例如用于阻止非特异性染色的过氧化氢。在其他实施方案中,通过使用结合小鼠单克隆抗体的小鼠探针试剂,然后加入用结合小鼠探针试剂的 HRP 缀合的葡聚糖聚合物来检测针对生物标志物蛋白的抗体结合。这些检测试剂可从例如 BiocareMedical 商购获得。

[0092] 本发明的试剂盒可进一步包含过氧化物酶封闭试剂(例如,过氧化氢)、蛋白封闭试剂(例如,纯化的酪蛋白)以及复染剂(例如,苏木精)。在试剂盒中还可提供着色剂(bluing agent)(例如,含有 Tween-20 和叠氮化钠的氢氧化铵或 TBS、pH7.4)以帮助检测阳性染色的细胞。

[0093] 在另一个实施方案中,本发明的免疫细胞化学试剂盒额外地包含至少两种用于特异性地检测至少两种不同生物标志物表达的试剂,例如,抗体。在试剂盒中可以单一试剂或可选择地以包含针对不同目的生物标志物的所有抗体的抗体混合物形式提供各抗体。此外,可在这样的容器(例如密封的容器)中提供任何或所有试剂盒试剂,该容器保护它们免受外部环境的影响。在下面的实施例 8 中描述了用于实施本发明方法的示例性试剂盒。

[0094] 可在试剂盒中包含阳性和/或阴性对照以证明根据本发明使用的试剂的活性和正确用法。对照可包含已知对于目的生物标志物的存在是阳性的或阴性的样品,例如组织切片、固定在载片上的细胞等。在特定的实施方案中,阳性对照包含 SiHa 细胞。该细胞是

超三倍体 (hypertriploid) 并且 HPV-16 感染阳性的人宫颈鳞状癌细胞系, 因此其可用作高度子宫颈疾病状态中的生物标志物过表达的正对照。可在本发明的试剂盒中以制备的载片或与载片制备物相容的细胞悬浮物的形式提供 SiHa 对照细胞。对照的设计和使用是标准的并且在本领域技术人员的常规能力范围之内。

[0095] 在其他实施方案中, 还提供了用于鉴定 (包括在核酸水平上检测生物标志物过表达) 高度宫颈的试剂盒。这些试剂盒包含, 例如, 至少一种特异性地结合生物标志物核酸或其片段的核酸探针。在特定的实施方案中, 试剂盒包含至少两种与不同的生物标志物核酸杂交的核酸探针。

[0096] 在一些实施方案中, 本发明的方法可和分析形态学特征的常规细胞学技术一起使用。例如, 本发明的免疫细胞化学技术可和常规的 Pap 染色一起使用, 这样保存了来自常规方法的所有形态学信息。这样, 生物标志物的检测可减少 Pap 抹片检查的高假阴性率, 并且可有助于大规模的自动化筛查。在特定的实施方案中, 如下面实施例 6-7 中所描述的, 在单一方法中将上面公开的免疫细胞化学法和常规的 Pap 染色组合使用。组合的免疫细胞化学法和 Pap 染色法允许显现选择性地在高度子宫颈疾病中过表达的生物标志物和单一样品 (例如, 包含单层子宫颈细胞的显微镜载片) 中的细胞形态学。组合的免疫细胞化学和 Pap 染色法可允许更准确的鉴定和诊断高度子宫颈疾病, 特别是在被常规的 Pap 抹片检查检测错误地分类为正常的、LSIL 或 ASCUS 的情况下。在单一方法中对生物标志物的过表达和细胞形态学进行分析可取代 Pap 抹片检查作为宫颈癌的主要筛选方法。

[0097] 本领域技术人员认识到需要对该组合方法学的染色参数 (例如, 温育时间、洗涤时间、色原 / 染色浓度等) 进行优化, 以使能够获得免疫细胞化学结果 (例如, 色原染色) 和 Pap 染色之间的足够反差。使染色参数最优化的测定法的设计是标准的, 并且在本领域技术人员的常规能力之内。本发明也包含用于进行组合的免疫细胞化学和 Pap 染色的方法的试剂盒。如上所述, 这些试剂盒包含进行免疫细胞化学法所需的试剂和进行常规的 Pap 染色所需的试剂, 特别是 EA50 和 OrangeG。

[0098] 本领域技术人员还认识到本发明的方法中的任一步骤或所有步骤可由人执行, 或可选择地以自动化的方式进行。因此, 可将机体样品制备、样品染色和生物标志物表达的检测的步骤自动化。

[0099] 通过举例说明的方式但不以限定的方式提供下列实施例:

[0100] 实施例

[0101] 实施例 1: 使用免疫细胞化学法进行的生物标志物过表达的检测

[0102] 载片的制备和预处理

[0103] 收集患者宫颈样品并将其放入 SurePath™ 收集瓶 (TriPathImaging, Inc.)。使用 PrepStain™ 载片处理系统 (TriPathImaging, Inc.) 从液体培养基中收集子宫颈细胞并将其沉积在载玻片上的薄层中。将制备的载片立即转移至预处理缓冲液 (1% RAM) 中并在 95°C 下加热 45 分钟。将载片冷却至室温, 在 TBS (tris 缓冲盐溶液) 中漂洗 3 次 (每次漂洗 2 分钟)。

[0104] 人工免疫细胞化学法

[0105] 为防止非特异性背景染色, 不允许在染色过程中使载片变干。此外, 为了阻止非特异性染色, 对载片施加过氧化氢 5 分钟, 然后用 TBS 漂洗。在室温下给载片施用将针对 MCM6

的抗体,进行 1 小时。在用 MCM6 抗体温育后,用 TBS 洗涤载片 3 次,每次洗涤 2 分钟。在室温下给载片施用 Dako Envision+HRP 标记的聚合物第二抗体,进行 30 分钟,然后用 TBS 漂洗。施加 HRP 底物色原 DAB10 分钟,然后用水漂洗载片 5 分钟。用苏木精复染各载片,然后用水漂洗直至干净。复染后,将载片浸入氢氧化铵 10 秒,然后用水漂洗 1 分钟。

[0106] 通过将载片浸入 95%乙醇 1 分钟,然后浸入无水乙醇再进行 1 分钟来对样品进行脱水。通过在二甲苯中漂洗 3 次,每次漂洗 1 分钟,来透化载片。然后用永久性封片剂封片,在 35℃下烘干。使用明视野显微镜显现阳性染色细胞。

[0107] 自动化的免疫细胞化学法

[0108] 按照厂商说明书为 Dako Autostainer Universal Staining 系统编程,将上述人工免疫细胞化学法中所必需的染色和复染试剂装载入机器。将制备的和预处理的载片装入自动染色仪中,运行程序。在运行结束时,取出载片并在水中漂洗 5 分钟。如上所述将载片脱水、透化、封片和分析。

[0109] 实施例 2 :临床样品中生物标志物的检测

[0110] 收集大约 180 个代表各种诊断的宫颈细胞学患者样品。之前通过阴道镜确定了这些患者中存在或不存在指示高度疾病的癌细胞或者病变。下表显示在该研究中分析的各诊断组内的样品数目和阴道镜判定的描述 (例如,高度病变的存在或不存在)。

[0111] 表 1 :被分析的样品

[0112]

诊断	计数	描述
NIL	72	HPV 阴性
ASC-US	26	26 个无病变 0 个具有病变或高危 HPV
LSIL	48	42 个高度病变阴性 6 个高度病变阳性
HSIL	25	
癌症	10	鳞状细胞癌和腺癌

[0113] 通过免疫细胞化学法分析样品以鉴定高度宫颈疾病。使用抗体检测 6 个目的生物标志物的过表达 :MCM2、MCM6、MCM7、p21^{Waf1}、细胞周期蛋白 E 和 Topo2A。测定对照包括在 SiHa 细胞系上进行的 MCM2、MCM6、MCM7、p21^{Waf1}、细胞周期蛋白 E、Topo2A 和小鼠 IgG 阴性。也通过常规的 Pap 染色技术分析样品。

[0114] 载片的制备

[0115] 从贮存室中取出各样品并让其恢复至室温。向各瓶中加入 6mlTriPath CytoRich[®]防腐剂并振荡混匀。在 TriPathPrepMate[®]自动处理器上处理样品,将小瓶中所有剩余的液体转移至离心管中。在 200xg 下离心样品 2 分钟,吸取上清液。然后在 800xg 下离心样品 10 分钟,轻轻倒出上清液。将样品管装载至 TriPath PrepStain[®]系统上,运行系统软件 (版本 1.1 ;Transfer Only)。每个患者样品制备 8 张载片,在使用 Pap 染色和免疫细胞化学法之前将其贮存在 95%乙醇中至少 24 小时,但不要超过 2 周。

[0116] Pap 染色法

[0117] 将制备的载片在 95%乙醇中温育 30 秒,然后用水再漂洗 30 秒。对载片使用苏木精 6 分钟。在水中漂洗载片 1 分钟,在酸性水中漂洗 2 秒和在水中漂洗 30 秒。使用着

色剂（氢氧化铵）30 秒，首先在水中漂洗、然后在 95%乙醇中漂洗各 30 秒。使用 EA50 和 OrangeG(Autocyte®) 6分钟。在 95%乙醇中漂洗载片 2 分钟，在 100%乙醇中漂洗 3 次，在二甲苯中漂洗 3 次，每次漂洗 30 秒。

[0118] 然后使用 Acrytol 封片剂封片并在 35℃下烘干。由病理学家使用明视野显微镜检查样品。

[0119] 免疫细胞化学法

[0120] 从 95%的乙醇中取出制备的载片，用去离子水漂洗大约 1 分钟。将载片置于 1X 靶修复溶液 (Target Retrieval Solution)pH6.0 (DAKO S1699) / 预热至 95℃的 dH₂O 水浴中并置于蒸器中进行 25 分钟。让样品在室温下冷却 20 分钟，在去离子水中充分漂洗，将其置于 TBS 中。基本上按照上述实施例 1 中，“自动化的免疫细胞化学法”部分所述，就生物标志物表达对预处理的载片染色。按照说明稀释商购获得的针对 MCM2 (1:200)、MCM7 (1:25)、p21waf1 (1:100) 和细胞周期蛋白 E (1:100) 的抗体，使用其检测生物标志物的表达。以 1:6000 的稀释度使用通过实施例 4 中描述的多元瘤筛选法鉴定的纯化 MCM6 抗体。

[0121] 载片的解释

[0122] 由细胞检验技术员和病理学家筛选和检查各载片。按照下列参数将样品分类为高度子宫颈疾病阳性、阴性或不确定性：

[0123] ●排除非细胞人工假象和染成棕色 (DAB) 的炎性细胞。

[0124] ●当用 DAB 染色时，成熟的、正常表现的鳞状细胞和正常表现的腺细胞不计为阳性。

[0125] ●鳞状完全发育细胞和不正常细胞一起被认为是阳性的。

[0126] ●低于 1.5 的染色强度被认为是阴性的。

[0127] ●通过结合载片的检查解决不一致的结果。

[0128] 将免疫细胞化学法的结果和前面通过阴道镜获得的结果进行比较。然后给予每张载片最终的结果：真阳性 (TP)、真阴性 (TN)、假阳性 (FP)、假阴性 (FN) 或不确定性。计算各生物标志物的灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。

[0129] 结果

[0130] 下面概述了各生物标志物的结果。

[0131] 表 2 :MCM2

[0132]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	71	1	72
ASC-US(无损伤)	0	0	0	25	1	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	7	0	31	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	7	0	1	0	2	10
	34	7	5	127	8	181

[0133] 灵敏度 0.8718

[0134] 特异性 0.9478

[0135] PPV 0.8293

[0136] NPV 0.9621

[0137] 表 3:MCM6

[0138]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	22	1	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	24	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	22	0	0	0	3	25
癌	10	0	0	0	0	10
	35	17	2	114	13	181

[0139] 灵敏度 0.9459

[0140] 特异性 0.8702

[0141] PPV 0.6731

[0142] NPV 0.9828

[0143] 表 4:MCM7

[0144]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	21	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	28	2	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	14	3	116	11	181

[0145] 灵敏度 0.9250

[0146] 特异性 0.8923

[0147] PPV 0.7255

[0148] NPV 0.9748

[0149] 表 5:细胞周期蛋白 E

[0150]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	72	0	72
ASC-US(无损伤)	0	0	0	26	0	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	3	0	35	4	42
LSIL (HSIL)	2	0	4	0	0	6
HSIL	15	0	4	0	6	25
癌	7	0	2	0	1	10
	24	3	10	133	11	181

[0151] 灵敏度 0.7059

[0152] 特异性 0.9779

[0153] PPV 0.8889

[0154] NPV 0.9301

[0155] 表 6 :p21^{waf1}

[0156]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	22	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
癌	7	0	2	0	1	10
	31	15	6	106	23	181

[0157] 灵敏度 0.8378

[0158] 特异性 0.8760

[0159] PPV 0.6739

[0160] NPV 0.9464

[0161] 表 7 :TOP02A

[0162]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	24	1	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	4	0	27	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	21	0	1	0	3	25
癌	9	0	0	0	-1	10
	33	5	4	119	20	181

[0163] 灵敏度 0.8919

[0164] 特异性 0.9597

[0165] PPV 0.8684

[0166] NPV 0.9675

[0167] 使用本发明的免疫细胞化学法就高度宫颈疾病的存在分析大约 180 个病例。在该数目中, MCM 生物标志物产生在 4% 至 7% 范围内变化的不确定性比率。此外, MCM 显示 95% 的特异性和 87% 的灵敏度。MCM6 和 MCM7 生物标志物分别产生 95% 和 93% 的相当的灵敏度结果。这两个生物标志物的特异性在 87% 至 89% 之间。

[0168] 细胞周期蛋白 E 产生 98% 的最高特异性值。尽管不确定性率为 6%, 但灵敏度只有 71%。P21^{waf1} 的不确定性率是所有受测试标志物中最高的, 为 13%。P21^{waf1} 产生 84% 的灵敏度和 88% 的特异性。对于生物标志物 Topo2A, 观察到 96% 的特异性。Topo2A 的不确定性率为 11%, 具有 89% 的灵敏度。

[0169] 实施例 3 :使用抗体混合物进行的临床样品中生物标志物的检测

[0170] 通过免疫细胞化学法分析大约 180 个通过阴道镜确定的子宫颈细胞学样品以鉴

定高度子宫颈疾病。就多个目的生物标志物的表达分析各样品。具体地,就其检测高度子宫颈疾病的能力对针对 MCM2、MCM6、MCM7、p21waf1、细胞周期蛋白 E 和 Topo2A 的抗体的各种组合进行分析。使用免疫细胞化学法和实施例 2 中所述的载片解释指南就多个目的生物标志物的表达对这些样品进行评估。

[0171] 将免疫细胞化学结果和前面通过阴道镜获得的结果进行比较。然后给各载片以真阳性 (TP)、真阴性 (TN)、假阳性 (FP)、假阴性 (FN) 或不确定性的最终结果。计算各生物标志物的灵敏度、特异性、阳性预测值和阴性预测值。

[0172] 结果

[0173] 下面概述各生物标志物的结果。

[0174] 表 8 :MCM2 和 MCM7

[0175]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	20	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	25	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

[0176] 灵敏度 0.9268

[0177] 特异性 0.8810

[0178] PPV 0.7170

[0179] NPV 0.9737

[0180] 表 9 :MCM6 和 MCM7

[0181]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	21	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	16	0	23	3	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

[0182] 灵敏度 0.9500

[0183] 特异性 0.8516

[0184] PPV 0.6667

[0185] NPV 0.9820

[0186] 表 10 :MCM7 和 TOP02A

[0187]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	21	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	29	1	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	20	0	2	0	3	25
癌	8	0	0	0	2	10
	32	14	4	114	17	181

[0188] 灵敏度 0.8889

[0189] 特异性 0.8906

[0190] PPV 0.6957

[0191] NPV 0.9661

[0192] 表 11 :MCM7 和细胞周期因子 E

[0193]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	21	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	28	2	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	14	3	116	10	181

[0194] 灵敏度 0.9268

[0195] 特异性 0.8923

[0196] PPV 0.7308

[0197] NPV 0.9748

[0198] 表 12 :MCM7 和 p21waf1

[0199]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	20	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	21	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	19	3	98	24	181

[0200] 灵敏度 0.9250

[0201] 特异性 0.8376

[0202] PPV 0.6607

[0203] NPV 0.9703

[0204] 表 13 :MCM2 和 MCM6

[0205]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	21	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	17	0	21	4	42
LSIL (HSIL)	3	0	2	0	1	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	37	20	2	109	13	181

[0206] 灵敏度 0.9487

[0207] 特异性 0.8450

[0208] PPV 0.6491

[0209] NPV 0.9820

[0210] 表 14 :MCM2 和 TOP0IIA

[0211]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	23	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	8	4	18	12	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	9	7	108	20	181

[0212] 灵敏度 0.8409

[0213] 特异性 0.9231

[0214] PPV 0.8043

[0215] NPV 0.9391

[0216] 表 15 :MCM2 和细胞周期蛋白 E

[0217]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	71	1	72
ASC-US(无损伤)	0	0	0	25	1	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	9	0	27	6	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	8	0	2	0	0	10
	35	9	6	123	8	181

[0218] 灵敏度 0.8537

[0219] 特异性 0.9318

[0220] PPV 0.7955

[0221] NPV 0.9535

[0222] 表 16 :MCM2 和 p21waf1

[0223]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	21	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

[0224] 灵敏度 0.8780

[0225] 特异性 0.8644

[0226] PPV 0.6923

[0227] NPV 0.9533

[0228] 表 17 :TOP02A 和细胞周期蛋白 E

[0229]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	68	4	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	24	1	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	5	0	27	10	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	2	25
癌	9	0	0	0	1	10
	34	6	4	119	18	181

[0230] 灵敏度 0.8947

[0231] 特异性 0.9520

[0232] PPV 0.8500

[0233] NPV 0.9675

[0234] 表 18 :TOP02A 和 D21waf1

[0235]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	58	12	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	21	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	19	10	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	98	25	181

[0236] 灵敏度 0.9268

[0237] 特异性 0.8522

[0238] PPV 0.6909

[0239] NPV 0.9703

[0240] 表 19 :p21waf1 和周期蛋白 E

[0241]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	61	9	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	22	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	22	0	1	0	—2	25
癌	8	0	1	0	1	10
	33	15	5	106	22	181

[0242] 灵敏度 0.8684

[0243] 特异性 0.8760

[0244] PPV 0.6875

[0245] NPV 0.9550

[0246] 表 20 :MCM2、MCM6 和 MCM7

[0247]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	20	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	17	0	21	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	20	2	105	16	181

[0248] 灵敏度 0.9500

[0249] 特异性 0.8400

[0250] PPV 0.6552

[0251] NPV 0.9813

[0252] 表 21 :MCM2、MCM7 和 TOP02A

[0253]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	20	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

[0254] 灵敏度 0.9512

[0255] 特异性 0.8739

[0256] PPV 0.7222

[0257] NPV 0.9811

[0258] 表 22 :MCM6、MCM7 和 TOP02A

[0259]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	21	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	16	0	20	6	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	104	17	181

[0260] 灵敏度 0.9512

[0261] 特异性 0.8455

[0262] PPV 0.6724

[0263] NPV 0.9811

[0264] 表 23 :MCM6、MCM7 和细胞周期蛋白 E

[0265]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	65	7	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	21	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	16	0	23	3	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	0	0	1	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	2	109	13	181

[0266] 灵敏度 0.9500

[0267] 特异性 0.8516

[0268] PPV 0.6667

[0269] NPV 0.9820

[0270] 表 24 :MCM2、MCM7 和细胞周期蛋白 E

[0271]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	66	6	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	20	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	25	4	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	15	3	111	14	181

[0272] 灵敏度 0.9268

[0273] 特异性 0.8810

[0274] PPV 0.7170

[0275] NPV 0.9737

[0276] 表 25 :MCM2、MCM7 和 p21waf1

[0277]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	18	5	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	20	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

[0278] 灵敏度 0.9268

[0279] 特异性 0.8319

[0280] PPV 0.6667

[0281] NPV 0.9691

[0282] 表 26 :MCM2、TOP2A 和细胞周期蛋白 E

[0283]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	67	5	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	23	2	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	9	0	22	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	9	0	0	0	1	10
	37	10	3	112	19	181

[0284]

灵敏度	0.9250
特异性	0.9180
PPV	0.7872
NPV	0.9739

[0285] 表 27 :MCM2、细胞周期蛋白 E 和 p21waf1

[0286]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	60	10	72
ASC-US(无损伤)	0	1	0	21	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	9	0	1	0	0	10
	36	16	5	102	22	181

[0287]

灵敏度	0.8780
特异性	0.8644
PPV	0.6923
NPV	0.9533

[0288] 表 28 :MCM2、TOP0IIA 和 p21waf1

[0289]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	20	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	18	11	42
LSIL (HSIL)	3	0	3	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	17	3	95	28	181

[0290]

灵敏度	0.9268
特异性	0.8482
PPV	0.6909
NPV	0.9694

[0291] 表 29 :MCM7、TOP02A 和细胞周期蛋白 E

[0292]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	64	8	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	21	3	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	12	0	23	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	14	2	108	18	181

[0293] 灵敏度 0.9512

[0294] 特异性 0.8852

[0295] PPV 0.7358

[0296] NPV 0.9818

[0297] 表 30 :MCM7、p21waf1 和细胞周期蛋白 E

[0298]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	57	13	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	19	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	21	7	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	97	24	181

[0299] 灵敏度 0.9268

[0300] 特异性 0.8362

[0301] PPV 0.6667

[0302] NPV 0.9700

[0303] 表 31 :MCM7、p21waf1 和 TOP02A

[0304]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	54	16	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	19	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	18	10	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	—0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	91	30	181

[0305] 灵敏度 0.9512

[0306] 特异性 0.8273

[0307] PPV 0.6724

[0308] NPV 0.9785

[0309] 表 32 :MCM2、MCM7、细胞周期蛋白 E 和 p21waf1

[0310]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	56	14	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	18	5	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	20	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	24	0	1	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	38	19	3	94	27	181

[0311] 灵敏度 0.9268

[0312] 特异性 0.8319

[0313] PPV 0.6667

[0314] NPV 0.9691

[0315] 表 33 :MCM2、MCM7、细胞周期蛋白 E 和 TOP0IIA

[0316]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	0	0	63	9	72
ASC-US(无损伤)	0	2	0	20	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	13	0	21	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	15	2	104	21	181

[0317] 灵敏度 0.9512

[0318] 特异性 0.8739

[0319] PPV 0.7222

[0320] NPV 0.9811

[0321] 表 34 :MCM2、MCM7、细胞周期蛋白 E、p21waf1 和 TOP02A

[0322]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	53	17	72
ASC-US(无损伤)	0	3	0	18	5	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	14	0	18	10	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	19	2	89	32	181

[0323] 灵敏度 0.9512

[0324] 特异性 0.8241

[0325] PPV 0.6724

[0326] NPV 0.9780

[0327] 表 35 :MCM2、MCM6、MCM7、TOP02A、细胞周期蛋白 E 和 p21waf1

[0328]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计
NIL	0	2	0	52	18	72
ASC-US(无损伤)	0	4	0	18	4	26
ASC-US(损伤)	0	0	0	0	0	0
LSIL (无 HSIL)	0	18	0	16	8	42
LSIL (HSIL)	4	0	2	0	0	6
HSIL	25	0	0	0	0	25
癌	10	0	0	0	0	10
	39	24	2	86	30	181

[0329] 灵敏度 0.9512

[0330] 特异性 0.7818

[0331] PPV 0.6190

[0332] NPV 0.9773

[0333] 汇集上述关于 28 个抗体混合物的数据。使用包含针对 2、3、4、5 或甚至所有 6 个目的生物标志物的抗体的混合物对生物标志物的表达进行分析。28 个抗体混合物中的 21 个显示大于 92% 的灵敏度。28 个混合物的 4 个产生高于 90% 的特异性,最低值为 78%。MCM2、TOP2A 和细胞周期蛋白 E 的组合获得最高值。该混合物产生 93% 的灵敏度和 92% 的特异性。可以看出至少 3 个生物标志物的组合应当产生大于 90% 的灵敏度。要认识到,对测定法的调整可进一步增加该测定法的灵敏度和特异性。

[0334] 实施例 4:使用抗体混合物对生物标志物表达的检测

[0335] 使用各种针对细胞周期蛋白 E、MCM2、MCM6、MCM7、p21waf1 和 TOP2a 的抗体的组合制备抗体混合物。各混合物的组成列于下表。

[0336] 表 36:抗体混合物的组合

[0337]

混合物编号	生物标志物
混合物 1	Cyclin E, MCM2, MCM7
混合物 2	Cyclin E, MCM6, MCM7
混合物 3	Cyclin E, MCM7, p21waf1
混合物 4	Cyclin E, MCM7, TOP2a
混合物 5	MCM2, MCM7, p21waf1
混合物 6	MCM6, MCM7, p21waf1
混合物 7	MCM7, p21waf1, TOP2a
混合物 8	MCM2, MCM7, TOP2a
混合物 9	MCM6, MCM7, TOP2a
混合物 10	MCM2, MCM6, MCM7
混合物 11	Cyclin E, MCM2, MCM6, MCM7, p21waf1, TOP2a
混合物 12	Cyclin E, MCM2, MCM7, p21waf1
混合物 13	MCM2 和 MCM7
混合物 14	MCM7 和 p21waf1
混合物 15	MCM7 和 CyclinE
混合物 16	MCM2 和 p21waf1
混合物 17	Cyclin E 和 p21waf1
混合物 18	MCM2 和 CyclinE
混合物 19	MCM7 和 TOP2a
混合物 20	MCM2 和 TOP2a
混合物 21	CyclinE 和 TOP2a
混合物 22	p21waf1 和 TOP2a

[0338] 通过合并 HSIL 事例 (HSIL 库) 和 NIL 事例 (NIL 库) 来制备两组子宫颈细胞学样品。然后在 HSIL 库和 NIL 库上检验各抗体混合物。也将生物标志物抗体单个地作为对照进行检验。如实施例 2 中所述,进行载片制备和自动化的免疫细胞化学法。

[0339] 由细胞检验技术员和病理学家筛查和检查载片。在筛选过程中记录的标示高度子宫颈疾病的细胞的特异性染色、腺细胞的染色、细菌交叉反应性和细胞染色的位置都是可变的。

[0340] 当和使用单一生物标志物的检测获得的结果相比时,使用生物标志物抗体混合物的免疫细胞化学法的结果显示在 HSIL 库中标示高度子宫颈疾病的细胞的染色增加。此外,当混合物中抗体的数目从 2 增加至 3、4 或 6 时背景没有明显的增加。另外,当在 NIL 库上

进行检验时,各种抗体的混合物没有显示背景染色上的增加。

[0341] 实施例 5:使用免疫细胞化学法对宫颈样品中生物标志物的过表达进行检测

[0342] 载片制备和预处理

[0343] 如上面实施例 1 中所述收集患者宫颈样品。通过**AutoPrep®** System 使用“prep only”模式制备包含单层子宫颈细胞的载片。立即将制备的载片置于**1X SureSlide®** 预处理缓冲液(去离子水中的 0.5%月桂基(聚氧乙烯)醚-13-羧酸钠(Sandopan LS))中进行最少 1 小时、最多 72 小时。将预处理的载片放入 95℃下的蒸器中进行 45 分钟而无需预热。从蒸器中取出载片,让其在室温下冷却 20 分钟,然后在去离子水中充分漂洗。在 TBST(TBS/Tween-20)中漂洗载片 2 次,每次漂洗 2 分钟。轻拍载片以除去多余的缓冲液并将其放入湿盒。如下所述,将载片接受人工或自动化的免疫细胞化学法。

[0344] 人工免疫细胞化学法

[0345] 给各载片施用 200 μ l 过氧化物酶封闭剂(0.03%过氧化氢)以覆盖细胞沉积区域,进行 5 分钟的时间。然后用 TBST 漂洗载片 3 次,每次漂洗 2 分钟。除去过量的缓冲液,然后将载片放入湿盒。给各载片施用 200 μ l 蛋白封闭剂(纯化的酪蛋白和表面活性剂)并将其温育 5 分钟。在除去过量蛋白封闭剂后,将载片放入湿盒中。

[0346] 给各载片施用 200 μ l 包含 2 种针对 MCM2 的小鼠抗人抗体(0.39mg/ml 的克隆 27C5.6, 1:800 的稀释度;0.918mg/ml 的克隆 26H6.19, 1:10,000 的稀释度)的第一单克隆抗体混合物和特异于 Topo2A(100 μ g/ml 的克隆 SWT3D1, 1:10,000 稀释度)的第三种鼠抗人抗体,以完全覆盖细胞沉积区域。将载片温育 30 分钟,然后用 TBST 漂洗 3 次,每次漂洗 2 分钟。除去多余的缓冲液,再将载片放回湿盒中。如上施用 200 μ l 结合小鼠单克隆抗体的探针试剂,进行 20 分钟。用 TBST 漂洗载片 3 次,每次漂洗 2 分钟。除去多余的缓冲液,再将载片放入湿盒。

[0347] 如上施用 200 μ l 这样的结合小鼠探针试剂的聚合物试剂进行 20 分钟,该聚合物试剂包含缀合有 HRP 和第二山羊抗小鼠抗体的葡聚糖聚合物,然后用 TBST 漂洗载片 3 次,每次漂洗 2 分钟。在除去多余的缓冲液后,将载片放回湿盒。如上施用 200 μ l DAB 底物色原溶液,进行 5 分钟。用去离子水漂洗载片 5 分钟,然后用 TBST 漂洗 2 分钟,其间更换一次缓冲液。如前所述,除去多余的缓冲液,将载片放入湿盒。加入 200 μ l 苏木精,进行 1 分钟,然后用去离子水漂洗 3 次,每次漂洗 2 分钟。除去多余的去离子水,将载片放入湿盒。给各载片施用 200 μ l 着色剂(即,含有 tween-20 和叠氮化钠的 TBS, pH7.4),进行 1 分钟。然后在 TBST 中漂洗(其间更换一次 TBST)载片和在去离子水中漂洗(其间更换一次水)载片,各进行 2 分钟。然后如实施例 1 和 2 中所述对载片进行脱水、透化、封片和分析。

[0348] 自动化的免疫细胞化学法

[0349] 按照厂商说明书为自动化染色仪编程,包括下列顺序步骤:

[0350] a. 2 次缓冲液漂洗(TBST)

[0351] b. 5 分钟过氧化物酶封闭

[0352] c. 2 次缓冲液漂洗(TBST)

[0353] d. 5 分钟蛋白封闭,吹风(blow)

[0354] e. 30 分钟一抗混合物温育

[0355] f. 3 次缓冲液漂洗(TBST)

[0356] g. 20 分钟小鼠探针试剂温育

[0357] h. 3 次缓冲液漂洗 (TBST)

[0358] i. 20 分钟聚合物 -HRP 温育

[0359] j. 3 次缓冲液漂洗 (TBST)

[0360] k. 5 分钟 DAB (加 1 滴色原至 1ml 缓冲液中)

[0361] l. 3 次水漂洗

[0362] m. 2 次缓冲液漂洗 (TBST)

[0363] n. 1 分钟 Mayer' s 苏木精染色

[0364] o. 3 次水漂洗

[0365] p. 1 分钟着色剂

[0366] q. 1 次缓冲液漂洗 (TBST)

[0367] r. 1 次水漂洗

[0368] 将必需的染色剂和复染试剂装入机器。将制备的和经预处理的载片加载到自动化染色仪上,运行上述程序。在运行结束时,取出载片用自来水短暂漂洗。如实施例 1 和 2 中所述对载片进行脱水、透化、封片和分析。

[0369] 结果

[0370] 表 37 :NIL 事件 (n = 45)

[0371]

Pap 结果		
NIL	其它	不确定
44	1 (ASC-US)	0

[0372]

ICC 结果		
阳性	阴性	不确定
0	44	1

[0373] 表 38 :HSIL 事件 (n = 45)

[0374]

Pap 结果		
HSIL	其它	不确定
45	0	0

[0375]

ICC 结果		
阳性	阴性	不确定
45	0	0

[0376] 在 45 个测试的 NIL 事件中,经 Pap 染色的载片的检查显示一个 ASC-US 事件。NIL 样品的免疫细胞化学 (ICC) 结果呈阴性,一个事件被认为不满足评估的要求。对于 HSIL 事

件,基于经 Pap 染色的载片的检查,45 个事件中的每一个都被确定为高度子宫颈疾病。此外,在 ICC 测定中 45 个 HSIL 事件中的每一个也呈阳性。阴性对照,即施用于 SiHa 细胞系对照的通用小鼠 IgG 对照,在 ICC 测定中产生阴性结果。阳性对照,即用于 SiHa 细胞系对照的一抗混合物在 ICC 测定中产生阳性结果。

[0377] 实施例 6 :组合的免疫细胞化学和 Pap 染色法

[0378] 如上面实施例子 1 中所述收集患者子宫颈样品。如实施例 5 中所述制备和预处理包含单层子宫颈细胞的载片。将经预处理的各载片接受自动化的免疫细胞化学和 Pap 染色法,从而允许在单张载片上显现生物标志物的过表达和细胞形态学。

[0379] 自动化免疫细胞化学法

[0380] 如上面实施例 5 中所述在各载片上进行自动化免疫细胞化学法。在染色程序结束时,从自动化染色仪中取出载片,用自来水漂洗 3-5 分钟。然后如下所述,按照常规 Pap 染色法对各载片进行染色。

[0381] Pap 染色法

[0382] 在进行自动化免疫细胞化学法之后,进一步用 Pap 染色法对各载片进行染色。首先在 95%乙醇中漂洗载片 30 秒。给一半载片施用 EA50 和 Orange G3 分钟,给剩下的载片施用 EA50 和 Orange G6 分钟。然后在 95%乙醇中漂洗所有载片 2 次,在 100%乙醇中漂洗 3 次,在二甲苯中漂洗 3 次,每次漂洗 30 秒。然后如上面实施例 1 和 2 中所述用永久性封片剂对载片进行封片并对其进行分析。

[0383] 结果

[0384] 在 Pap 染色法中,使 5 个 NIL 和 5 个 HSIL 事件的组各自接受 3 分钟或 6 分钟的使用 EA50 和 Orange G 的染色。结果显示 3 分钟和 6 分钟染色方案之间的差异很小。接受 3 分钟 Pap 染色的载片表现稍微较弱的染色。此外,用 Pap 复染容易地观察 ICC 阳性染色的 HSIL 细胞。

[0385] 实施例 7 :组合的免疫细胞化学和 Pap 染色法 (Pap 染色的最优化)

[0386] 为使免疫细胞化学法的色原 (即, DAB) 染色和 Pap 染色的水平之间的反差最大,修改实施例 6 中概述的组合免疫细胞化学和 Pap 染色法以优化 Pap 染色参数。

[0387] 如上面实施例 6 中所述制备、预处理载片,并使其接受自动免疫细胞化学法。然后基本上按照实施例 6 中所描述的,并作下述改动,用常规 Pap 染色对载片进行染色。使用 Harris 制剂和 Myers 制剂检测苏木精。施用 EA/Orange G3 分钟或 6 分钟。此外,在加入 EA/OrangeG 后更换 95%的乙醇 3 次。

[0388] 基于免疫细胞化学染色将载片确定为阳性、阴性或不确定性。此外,从形态学上对载片进行评估以便与即将进行的 Pap 诊断进行比较。

[0389] 结果

[0390] 表 39 :组合免疫细胞化学和 PaD 染色法的结果

[0391]

进行的 Pap 诊断	ICC 结果	备注
NIL N = 7	阴性	所有事件被确定为 NIL
LSIL N = 6	阴性	6 个 LSIL 中的 5 个在载片上没有 LSIL 细胞。这些事件是 NIL 或 ASC-US。

HSIL N = 6	阳性	所有事件被确定为 HSIL
癌症 n = 4	阳性	所有事件是鳞状细胞癌

[0392] 组合的 ICC 和 Pap 染色法允许进行形态学分析和生物标志物过表达的估量。需要其他的实验来进一步最优化所述方法。

[0393] 实施例 8 :用于检测子宫颈样品中生物标志物过表达的免疫细胞化学法试剂盒

[0394] I. 方法的原理

[0395] 免疫细胞技术检测试剂盒包含完成常规制备的单层宫颈样品的三步骤免疫细胞化学染色法所需要的试剂。在用单克隆抗体混合物温育后,该试剂盒使用基于葡聚糖技术的立即可使用的显色剂。该试剂由第二山羊抗小鼠抗体分子和连接至葡聚糖聚合物主链的辣根过氧化物酶分子组成。随后加入的色原的酶促转化导致在抗原位置上形成可见的反应产物。然后用苏木精复染样品,使用着色剂,对载片进行封片。使用光学显微镜解释结果。当目的细胞被染成棕色时,获得指示宫颈高度疾病的阳性结果。

[0396] 可使用自动成象设备建立潜在阳性细胞的图库。然后检查图库以确定阳性结果或阴性结果。

[0397] 所述免疫细胞化学检测试剂盒可用于人工和自动染色。

[0398] II. 提供的试剂

[0399] 免疫细胞化学检测试剂盒包含下列材料,其足以满足 75 个单层制备物,每个制备物使用 200 μ l 立即可使用的小鼠单克隆抗体混合物:

[0400] 表 40 :免疫细胞化学法试剂盒组分

[0401]

瓶号	量	描述
1a	1x15mL	过氧化物酶 - 封闭剂 :缓冲的过氧化氢和稳定剂和合适的组分
1b	1x15mL	蛋白封闭剂 :纯化的酪蛋白和含有防腐剂与表面活性剂的经修饰 PBS 中的蛋白的合适组合
2	1x15mL	小鼠抗人抗体的混合物 :在含有 Tween20、pH7.4 的 TRIS 缓冲溶液中提供的立即可使用的单克隆抗体混合物。包含 0.39mg/mL MCM2mAb 克隆 27C5.6(1:800 的稀释度)、0.918mg/mL MCM2mAb 克隆 26H6.19(1:10000 的稀释度)、稳定蛋白和抗微生物剂
3a	1x15mL	小鼠探针试剂 :结合小鼠单克隆抗体
3b	1x15mL	聚合物试剂 :缀合有结合小鼠探针试剂的辣根过氧化物酶的聚合物
4a	1x18mL	DAB 底物缓冲液 :用于制备 DAB 色原的底物缓冲液
4b	1x1mL	DAB 色原 :3,3'-二氨基联苯胺色原溶液
5	1x18mL	苏木精复染液 :水性的 Mayers 苏木精
6	1x18mL	着色剂 :含有 Tween20 和 0.09% NaN ₃ 的 Tris 缓冲盐溶液, pH7.4

[0402] 下列材料和试剂是进行免疫细胞化学法所需但试剂盒中未提供的:

[0403] ● 吸收剂 Wipes

[0404] ● SiHa 细胞系 (TriPath Imaging, Inc.)

- [0405] ●去离子或蒸馏水
- [0406] ●乙醇 (95%和 100%)
- [0407] ●玻璃盖片
- [0408] ●Gloves
- [0409] ●湿盒
- [0410] ●光学显微镜 (10x、20x、40x 物镜)
- [0411] ●封片剂
- [0412] ●移液器和移液器吸头 (能够递送 20 μ l、200 μ l 和 1000 μ l 体积)
- [0413] ●SureSlide 制备缓冲液 (TriPath Imaging, Inc.)- 预处理缓冲液 (去离子水中的 0.5%月桂基 (聚氧乙烯) 醚-13- 羧酸钠 (SandopanLS))
- [0414] ●染色缸或水浴
- [0415] ●定时器 (能够 1-60 分钟的时间间隔)
- [0416] ●Tris 缓冲盐溶液 (TBS)
- [0417] ●Tween20
- [0418] ●通用小鼠 IgG 阴性对照
- [0419] ●涡旋器
- [0420] ●二甲苯或二甲苯替代物
- [0421] ●蒸器 (Steamer)/ 水浴锅
- [0422] III. 使用说明书
- [0423] 样品制备
- [0424] 进行下列制备宫颈样品的步骤:
- [0425] ●参考用于从残留样品制备载片的 SurePath PrepStainSystem™ 的操作员手册。
- [0426] ●向 SurePath™ 瓶 (大约 2mL) 中的残留样品加 8mLSurePath™ 防腐液。使用标准技术在 PrepMate™ 上和使用 GYN 版本 1.1, Slide Preparation 在 PrepStain™ 上处理经稀释的样品。
- [0427] ●在免疫染色之前, 将制备的载片立即放入预处理缓冲液中最短 1 小时, 最长 72 小时。
- [0428] ●为了获得最优化的试剂盒性能, 必须使用抗原表位修复法。该方法包括在室温下将制备的载片浸于预处理缓冲液中最短 1 小时, 然后在预处理缓冲液中加热载片至 95℃。将载片在 95℃下保持 15 分钟, 让其在室温下冷却 20 分钟。推荐使用经校准的水浴锅或能够保持所需温度的蔬菜蒸器 (vegetable steamer)。位于更高海拔的实验室应当确定保持所需温度的最好方法。在抗原表位修复和冷却后立即开始染色过程。偏离所述方法可影响结果。
- [0429] 试剂制备
- [0430] 在染色前制备下列试剂:
- [0431] 含有 0.05% Tween20 的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST)
- [0432] ●按照厂商说明书制备 TBS。
- [0433] ●以 0.05%的终浓度加入 Tween20。
- [0434] ●如果在一周内使用, 在室温下贮存。

- [0435] ●未使用的溶液可在 2-8℃下贮存 3 个月。
- [0436] ●溶液是清亮和无色的。如果出现混浊弃去稀释的溶液。
- [0437] 底物色原溶液 (DAB) (足够 5 张载片的体积)
- [0438] ●将 1mL DAB 缓冲的底物移入试管。
- [0439] ●加入一滴 (20-30 μ L) DAB+ 色原。充分混合并用移液器加至载片上。
- [0440] ●每天重新配制底物 - 色原溶液。
- [0441] ●溶液中产生的任何沉淀不影响染色质量。
- [0442] IV. 染色方案 (在室温下进行, 20-25℃)
- [0443] 进行下列步骤以便对子宫颈细胞学样品进行免疫染色 :
- [0444] 染色方法注意事项 :
- [0445] ●用户应当在使用前仔细阅读这些说明书并且熟悉所有成分。
- [0446] ●在免疫染色前将所有试剂平衡至室温 (20-25℃)。在室温下进行所有温育。
- [0447] ●在染色过程中不要让载片变干。变干的细胞制品可表现增加的非特异性染色。
- 将盖片暴露于通风处 (drafts)。应当将载片置于温盒中以进行长时间温育。
- [0448] 抗原表位修复
- [0449] ●将制备的载片置于预处理缓冲液, 最短 1 小时至最长 72 小时。
- [0450] ●在 95℃下温育 15 分钟。
- [0451] ●将整个科普林缸和载片从水浴锅或蒸器中取出, 让载片在缓冲液中冷却 20 分钟。
- [0452] ●用双蒸水漂洗载片并转移至 TBST 水浴中。
- [0453] 过氧化物酶封闭
- [0454] ●使多余的缓冲液流出。
- [0455] ●将载片放入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布)。
- [0456] ●施加 200 μ L 过氧化物酶封闭剂覆盖细胞沉积区域。
- [0457] ●温育 5 分钟 ($\pm$ 1 分钟)。
- [0458] ●在 TBST 中漂洗, 更换 3 次, 每次 2 分钟。
- [0459] 蛋白封闭
- [0460] ●使多余的缓冲液流出。
- [0461] ●将载片放入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布)。
- [0462] ●使用 200 μ L 蛋白封闭剂完全覆盖细胞沉积区域。
- [0463] ●温育 5 分钟 ($\pm$ 1 分钟)。
- [0464] ●不漂洗载片。
- [0465] 一抗混合物
- [0466] ●使多余的蛋白封闭液流出。
- [0467] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布)。
- [0468] ●使用 200 μ L 一抗混合物 (以完全覆盖细胞沉积区域)。
- [0469] ●在室温下温育 30 分钟。
- [0470] ●使用洗瓶 (不要将液流直接对着细胞沉积区域) 用 TBST 单个地漂洗每张载片。
- 将载片装入载片架中。

- [0471] ●在 TBST 中漂洗载片, 更换 3 次, 每次 2 分钟。
- [0472] 检测化学法
- [0473] ●使多余的缓冲液流出。
- [0474] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布) 。
- [0475] ●使用 200 μ L 小鼠探针以完全覆盖细胞沉积区域。
- [0476] ●温育 20 分钟 ($\pm$ 1 分钟) 。
- [0477] ●在 TBST 中漂洗载片, 更换 3 次, 每次 2 分钟。
- [0478] ●使多余的缓冲液流出。
- [0479] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布) 。
- [0480] ●使用 200 μ L 聚合物以完全覆盖细胞沉积区域。
- [0481] ●温育 20 分钟 ($\pm$ 1 分钟) 。
- [0482] ●在 TBST 中漂洗载片, 更换 3 次, 每次 2 分钟。
- [0483] ●流出多余的缓冲液。
- [0484] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布) 。
- [0485] ●使用 200 μ L DAB 工作溶液以完全覆盖细胞沉积区域。
- [0486] ●温育 5 分钟 ($\pm$ 1 分钟) 。
- [0487] ●在 diH₂O 中漂洗载片 5 分钟。
- [0488] 复染
- [0489] ●在 TBST 中漂洗载片, 更换 1 次, 进行 2 分钟。
- [0490] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布) 。
- [0491] ●使用 200 μ L 苏木精以完全覆盖细胞沉积区域。
- [0492] ●温育 1 分钟 ($\pm$ 10 秒) 。
- [0493] ●在流动的 H₂O 中漂洗载片 3 分钟。
- [0494] ●将载片装入制备的湿盒 (装填有用水湿润的纸巾或纱布) 。
- [0495] ●使用 200 μ L 着色剂使载片着色, 进行 1 分钟 ($\pm$ 10 秒) 。
- [0496] ●重复流水漂洗 1 分钟。
- [0497] 封片
- [0498] ●将载片浸入 95% 乙醇中, 1 分钟或 25 次浸入。
- [0499] ●将载片浸入无水乙醇, 更换 4 次, 每次 1 分钟或 25 次浸入。
- [0500] ●用二甲苯透化, 更换 3 次, 每次 1 分钟或 25 次浸入。
- [0501] ●使用玻璃盖玻片用非水性、永久性封片剂遮盖载片。
- [0502] V. 质量控制
- [0503] 当使用本实施例中描述的免疫细胞化学法试剂盒时考虑下列质量控制问题 :
- [0504] 结果的可变性通常来源于样品操作中的差异和检测方法中的变化。参考免疫细胞化学法的 NCCLS 质量保证的提议的质量控制指南以获得额外的信息。
- [0505] 可从 TriPath Imaging, Inc. 商购获得对照细胞系。各瓶装有被作为临床样品以相似的方式进行处理的宫颈癌细胞系。在各染色方法中应当染两张载片。对照载片细胞系的评估显示染色进行的有效性。
- [0506] VI. 染色的解释

[0507] 对照载片：

[0508] 首先检查用免疫细胞化学检测试剂盒染色的对照载片以确定所有试剂功能正常。细胞的细胞核中棕色 (3,3' - 二氨基联苯胺四盐酸, DAB) 反应产物的存在表示阳性反应性。

[0509] 患者的样品：

[0510] 由细胞检验技术员或病理学家使用光学显微镜进行载片评估。人工地检查细胞或通过电子技术将其贮存在来源于光学显微镜的图象库中。

[0511] 收集大约 1610 个代表各种诊断的宫颈样品。下表显示在各诊断组 (通过常规 Pap 染色法或活组织检查确定的) 中使用免疫细胞化学试剂盒分析的样品的数目。

[0512] 表 41 :各诊断组 (PaD 染色) 中的患者样品

[0513]

细胞学 结果	数目	%
NIL	671	41.7%
LSIL	395	24.53%
ASCUS	349	21.68%
HSIL	150	9.32%
ASCH	38	2.36%
AGUS	6	0.37%
SCC	1	0.06%
总计	1610	

[0514] 表 42 :各诊断组 (活组织检查) 内的患者样品

[0515]

活组织 检查结果	数目	%
NIL	968	60.20%
CIN1	369	22.95%
CIN2	140	8.71%
CIN3	131	8.15%
遗失	2	
总计	1610	

[0516] 载片打分指导

[0517] 进行下列步骤以给通过本实施例中描述的免疫细胞化学法分析的所有载片打分：

[0518] 步骤 1 :其是恰当的样品吗？

[0519] The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology (第 2 版) 指出,“恰当的基于液体的制品应当具有至少 5000 个良好显现的 / 良好保存的鳞状细胞的估量最低值。”当评估所有载片时使用这些相同的标准。然而,正如常规的 Pap 制备一样,按照定义,具有表现阳性分子反应的异常细胞的任何样品是符合评估要求的。如果对该步骤的回答是“是”,那么细胞检验技术员进行下一步骤;如果回答是“否”,那么该结果不符合评估要求。

[0520] 步骤 2 :在上皮细胞中存在中度至强烈的棕色细胞核染色吗？

[0521] 用于本实施例的免疫细胞化学法试剂盒(例如,SureDetectDetection Chemistry 试剂盒)的检测化学药品将和 $\geq$ CIN2 相关的发育异常细胞核染上棕色色源 DAB。对该步骤回答“是”,就容易显现的棕色染色对样品进行分析。如果只看到微弱的棕色或呈现“红色”的棕色,那么不足以确保其是阳性。如果没有看到棕色的细胞核染色,则认为其是阴性检测结果。如果具有足够的棕色染色,分析进入下一步骤。

[0522] 步骤 3:这是具有棕色细胞核染色的鳞状细胞(或腺)细胞吗?该细胞 $\geq$ ASC(AGC) 吗?

[0523] 使用 The Bethesda System for Reporting Cervical Cytology(第2版) (“TBS”) 中概述的相同形态学标准,确定含有棕色细胞核的鳞状细胞是否 $\geq$ ASC(非典型性鳞状细胞)。这包括 ASC-US、ASC-H、LSIL、HSIL 和癌细胞。如果细胞在外表上是腺细胞,那么使用确定细胞是否 $\geq$ AGC(非典型性腺细胞)的 TBS 标准。其包括子宫颈内 AGC、子宫内膜 AGC、AIS 和腺癌。如果细胞被认为 $\geq$ ASC(或 $\geq$ AGC),那么这将导致阳性结果。如果所述细胞和 NILM(上皮内病变或恶性肿瘤呈阴性)一致,那么这应该是阴性检测结果。

[0524] VII. 结果

[0525] 最初通过常规 Pap 染色法分类为 NIL 的 27 个事件在免疫细胞化学检测中被染成阳性。根据通过行业认证的病理学家(aboardcertified pathologist)的检查,在这 27 个事件中,7 件被分类为 HSIL,10 件为 ASC-H,3 件为 ASC-US,3 件为不确定事件。7 个 HSIL 事件被认为是高度子宫颈疾病。在免疫细胞化学测定中通过阳性免疫染色鉴定了这 27 个事件,从而显示此处公开的用于鉴定通过 Pap 染色被错误分类为 NIL 的患者的方法的价值。

[0526] 没有获得所有 NIL 样品的活组织检查结果。基于和“黄金标准”活组织检查结果的比较计算本实施例中描述的免疫细胞化学法的灵敏度和阳性预测值(PPV)的估计值。单一的活组织检查作为黄金标准具有局限性。通过对患者的系列监控或使用积极手术终点例如电圈切除术(loop electrosurgical excision procedure)或锥形活组织检查将提高 ICC 测定法的 PPV。已知单一的活组织检查具有至少 31% 的疾病的假阴性结果。参见 Elit 等人(2004) J. LowerGenitalTractDisease8(3):181-187。

[0527] 表 43:基于活组织检查结果的 I CC 检测法的估量的灵敏度和阳性预测值

[0528]

	ASC-H	ASCUS	LSIL	HSIL	>ASCUS
灵敏度	76.5% (52.7%, 90.4%)*	92.6% (76.6%, 97.9%)	97.7% (92.1%, 99.4%)	98.5% (94.6%, 99.6%)	96.2% (93.1%, 97.9%)
PPV	59.1% (38.7%, 76.7%)	26.0% (18.3%, 35.6%)	31.0% (25.9%, 36.7%)	90.1% (84.1%, 94.0%)	46.9% (42.8%, 51.2%)

[0529] *(95%的置信区间)

[0530] 也将免疫细胞化学法的灵敏度和 PPV 与用常规 Pap 染色获得的灵敏度和 PPV 进行比较。使用 Pap 染色的两个临床终点（即，≥ LSIL 和 ≥ HSIL）。同样，所有计算的标准是活组织检查的结果。

[0531] 表 44 :Pap 检测法和免疫细胞化学法的比较

[0532]

	>LSIL(采用 Pap 检验法)	>HSIL(采用 Pap 检验法	>ASCUS(采用 ICC)
灵敏度	76.5% (52.7%,90.4%)*	92.6% (76.6%,97.9%)	97.7% (92.1%,99.4%)
PPV	59.1% (38.7%,76.7%)	26.0% (18.3%,35.6%)	31.0% (25.9%,36.7%)

[0533] *(95%的置信区间)

[0534] 表 42 中提供的结果表明免疫细胞化学法检测出更多的高度子宫颈疾病样品,同时保持高 PPV。

[0535] 在使用免疫细胞化学试剂盒的本研究中有 14 个假阴性。对该 14 个患者样品中的 13 个进行 HPV 检测。没有获得其中一个假阴性患者的多余样品。

[0536] 使用NucleoSpin®Tissue DNA 试剂盒 (BD Clontech, Cat#635967) 从宫颈细胞学样品分离基因组 DNA。为了进行质量控制,进行 β 珠蛋白(一种管家基因)的 PCR 分析。

[0537] 如本领域中所述通过常规的 L1PCR 用 MY09/11 引物组和通过嵌套式 PCR 用 MY09/11 和 GP5+/6+ 引物组进行 HPV L1 基因的扩增以提高检测灵敏度。进一步对 L1 扩增子进行 DNA 测序以鉴定存在的 HPV 的类型。

[0538] 从 13 个临床细胞学样品中的 10 个样品中分离出质量好的基因组 DNA。如通过 β 珠蛋白 PCR 分析所显示的,3 个样品具有质量差的基因组 DNA。在 13 个样品中的 10 个样品中,使用常规的 L1PCR(用 MY09/11 引物)和嵌套式 L1PCR(用 MY09/11 和 GP5+/6+ 引物)不能检测到 HPV DNA 或 HPV DNA 经检测呈阴性。该数据表明,假定 HPV 对于高度子宫颈疾病呈阳性(>92%的灵敏度),那么对于大部分假阴性样品发生了取样错误。

[0539] 实施例 8 :MCM6 抗体的抗择

[0540] 多元瘤筛选

[0541] 筛选多孔组织培养板中提供的多元瘤以鉴定具有想要的灵敏度和特异性性质的 MCM6 生物标志物特异性抗体。产生在单张载片上包含多个正常(即无 CIN)、CINI、鳞状细胞癌和腺癌样品的组织微阵列。就组织微阵列的阳性染色对来自各孔的包含多元瘤的未稀释上清液进行分析。在该阶段基本上忽略背景,即非特异性结合。35 个受试多元瘤中的 11 个产生阳性染色结果,选择其以作进一步分析。

[0542] 为了确定选择的多元瘤的特异性,将用所述多元瘤上清液获得的染色模式和用商购获得的 MCM6 抗体 (BD Transduction Laboratories) 的染色模式进行比较。用所述多元瘤上清液获得的染色模式似乎比用商购获得的 MCM6 抗体(图 17)观察到的染色模式更具特异性。

[0543] 然后将 11 个选择的多元瘤接受有限稀释法。就包含多个正常(即,无 CIN)、CINI、鳞状细胞癌和腺癌样品的组织微阵列的阳性染色对 30 个由选择的多元瘤的上清液产生的有限稀释度进行测定。基于异常和癌性宫颈组织样品的阳性染色选择两个作为最好的上清液的有限稀释度克隆 9D4.3 和 9D4.4。然后就其和 NIL、LSIL、HSIL 组织的反应性检测这些克隆的不同稀释度并合并基于液体的细胞学样品。1:100 稀释度的克隆 9D4.3 产生最大的信噪比,选择其以作进一步的表征。

[0544] MCM6, 克隆 9D4.3 的表征

[0545] 为了进一步表征克隆 9D4.3, 就 40 个基于液体的细胞学样品的阳性染色对该克隆进行测定, 所述细胞学样品选自下列诊断类别: NIL(7)、LSIL(10)、HSIL(18) 和宫颈癌 (5)。使用 PrepStain™ 载片处理器 (TriPath Imaging, Inc.) 制备 40 个样品中每一个样品的载片。每个样品的两张载片各用 MCM2 抗体 (Dako) 和克隆 9D4.3 进行染色。剩下的载片用于 PAP 染色或作为阴性对照。

[0546] 为制备载片, 将各样品在 200xg 下离心 2 分钟以形成沉淀, 轻轻倒出上清液。向各样品中加入 2mL 去离子水, 涡旋样品, 然后在 600xg 下离心 5 分钟。在轻轻倒出上清液后, 加入另外的 700 μ L tris 缓冲的水。最后将样品装在 PrepStain™ 载片处理器 (Tripath Imaging, Inc.), 版本 1.1 上, 运行 Transfer Only 程序。

[0547] 制备后, 将所有载片保持在 95% 的 ETOH 中至少 24 小时并且不超过 3 天。通过将载片置于 1x 靶修复溶液 (Target Retrieval Solution) pH6.0 (DAKO S1699)/dH₂O 浴 (预热至 95°C) 中, 在蒸器中进行 25 分钟来实现 MCM2 的抗原修复。对于 MCM6, 通过将载片放入 1x Tris pH9.5 缓冲液 (Biocare)/dH₂O 水浴 (预热至 95°C) 中, 在蒸器中进行 25 分钟来实现抗原的可接近性。在蒸后, 让所有载片在室温下冷却 20 分钟。

[0548] 通过使用实施例 1 (“自动化免疫组织化学法”) 中所述的 DAKO 通用自动化染色仪的免疫组织化学法, 来对载片进行染色。由经验丰富的细胞检验技术员就通过形态学确定的诊断分类来对载片进行筛选和评估。就标志物染色强度 (0-3)、阳性染色细胞的百分比和标志物染色的定位 (细胞核、细胞质、膜或其组合) 来评估样品。细胞染色强度按 0-3 评分。对细胞评分 ≥ 1.5 的进行计数。当表现成熟正常的鳞状细胞和表现正常的腺细胞染色呈棕色时, 不将其当作阳性计数。然而, 将鳞状成熟细胞和异常细胞作为阳性计数。然后将免疫细胞化学载片命名为 TN (真阴性)、FN (假阴性)、TP (真阳性) 或 FP (假阳性)。

[0549] 表 45: 克隆 9D4.3 (MCM6)

[0550]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计		
NIL	0	0	0	1	0	1	灵敏度	0.9655
LSIL	0	1	0	9	0	10	特异性	0.9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0.9655
癌	5	0	0	0	0	5	NPP	0.9091
	28	1	1	10	0	40		

[0551] 表 46: MCM

[0552]

	TP	FP	FN	TN	不确定	总计		
NIL	0	0	0	1	0	1	灵敏度	0.9310
LSIL	0	1	0	9	0	10	特异性	0.9091
HSIL	23	0	1	0	0	24	PPP	0.9643
癌	4	0	1	0	0	5	NPP	0.8333
	27	1	2	10	0	40		

[0553] 使用的计算

[0554] 灵敏度 = $TP / (TP + FN)$

[0555] 特异性 = $TN / (FP + TN)$

[0556] 阳性预测指数 (Positive Predictive Power, PPP) = TP/(TP+FP)

[0557] 阴性预测指数 (Negative Predictive Power, NPP) = TN/(FN+TN)

[0558] 将克隆 9D4.3 的灵敏度和特异性与用商购获得的 MCM2 抗体获得的相当。一个 NIL 事件对于两个抗体都呈阴性。在使用克隆 9D4.3 和商购获得的 MCM2 抗体的情况下, 10 个 LSIL 事件中的 9 个为阴性。在使用 9D4.3 和商购获得的 MCM2 抗体的情况下, 24 个 HSIL 事件中的 23 个为阳性。对于宫颈癌样品, 在使用克隆 9D4.3 的情况下, 所有 5 个样品都为阳性, 在使用 MCM2 抗体的情况下, 5 个样品中的 4 个为阳性。

[0559] MM6、克隆 9D4.3 的纯化

[0560] 由于其灵敏度、特异性和显示细胞核染色模式的原因, 纯化克隆 9D4.3 以作进一步分析。按照标准方法, 使用 StreamlinerProteinA (Amersham Biosciences) 亲和吸附层析获得纯化的抗体。然后在 1:500 和 1:6000 之间的各种稀释度下就对 HSIL 的基于液体的子宫颈细胞学集库 (pool) 的反应性对所得的抗体溶液进行检测。在达到 1:6000 的滴度时, 信号仍然明显。

[0561] 实施例 10: 临床组织样品中生物标志物的实时 PCR 检测

[0562] 使用 ABI Prism7700 序列检测系统 (Applied Biosystems) 进行 **TaqMan[®]** 实时 PCR。在本研究中, 在 Primer Express[™] 程序, 版本 1.5 (Applied Biosystems) 的帮助下, 设计用于靶宫颈生物标志物 (即, MCM7、p21^{waf}、p14^{ARF}/p16、细胞周期蛋白 E1 和细胞周期蛋白 E2) 的特异性扩增的引物和探针。下面显示了引物和探针的序列信息:

[0563] MCM7:

[0564] 引物名称:MCM7_T1T3-F

[0565] 序列:CTCTGAGCCCGCCAAGC (SEQ ID NO:25)

[0566] 引物名称:MCM7_T1T3-R

[0567] 序列:TGTAAGAACTTCTTAACCTTTTCCTTCTCTA (SEQ IDNO:26)

[0568] 探针名称:MCM7_T1T3- 探针

[0569] 序列:CCCTCGGCAGCGATGGCACT (SEQ ID NO:27)

[0570] 引物名称:MCM7_T2T4-F

[0571] 序列:GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (SEQ ID NO:28)

[0572] 引物名称:MCM7_T2T4-R

[0573] 序列:CCCGCTCCCGCCAT (SEQ ID NO:29)

[0574] 探针名称:MCM7_T2T4- 探针

[0575] 序列:CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (SEQ IDNO:30)

[0576] 引物名称:MCM7_T2-F

[0577] 序列:GTCCGAAGCCCCCAGAA (SEQ ID NO:31)

[0578] 引物名称:MCM7_T2-R

[0579] 序列:CCCGACAGAGACCACTCACA (SEQ ID NO:32)

[0580] 探针名称:MCM7_T2- 探针

[0581] 序列:CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (SEQ ID NO:33)

[0582] 引物名称:MCM7_T3T4-F

[0583] 序列:CGCTACGCGAAGCTCTTTG (SEQ ID NO:34)

- [0584] 引物名称 :MCM7_T3T4-R
[0585] 序列 :CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (SEQ ID NO :35)
[0586] 探针名称 :MCM7_T3T4- 探针
[0587] 序列 :TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (SEQ ID NO :36)
[0588]

p21^{wal}:

- [0589] 引物名称 :p21T1T2-F
[0590] 序列 :CAAACGCCGGCTGATCTT (SEQ ID NO :37)
[0591] 引物名称 :p21T1T2-R
[0592] 序列 :CCAGGACTGCAGGCTTCCT (SEQ ID NO :38)
[0593] 探针名称 :p21T1T2- 探针
[0594] 序列 :CAAGAGGAAGCCCTAATCCGCCCA (SEQ ID NO :39)
[0595] 引物名称 :p21T2-F
[0596] 序列 :GAGCGGCGGCAGACAA (SEQ ID NO :40)
[0597] 引物名称 :p21T2-R
[0598] 序列 :CCGCGAACACGCATCCT (SEQ ID NO :41)
[0599] 探针名称 :p21T2- 探针
[0600] 序列 :CCCAGAGCCGAGCCAAGCGTG (SEQ ID NO :42)
[0601] 引物名称 :p21T3-F
[0602] 序列 :TGGAGACTCTCAGGGTCGAAA (SEQ ID NO :43)
[0603] 引物名称 :p21T3-R
[0604] 序列 :TCCAGTCTGGCCAACAGAGTT (SEQ ID NO :44)
[0605] 探针名称 :p21T3- 探针
[0606] 序列 :CGGCGGCAGACCAGCATGAC (SEQ ID NO :45)
[0607]

p14^{ARF}/p16:

- [0608] 引物名称 :p16T4-F
[0609] 序列 :GCC CTC GTG CTG ATG CTA CT (SEQ ID NO :46)
[0610] 引物名称 :p16T4-R
[0611] 序列 :TCA TCA TGA CCT GGT CTT CTA GGA (SEQ ID NO :47)
[0612] 探针名称 :p16T4- 探针
[0613] 序列 :AGC GTC TAG GGC AGC AGC CGC (SEQ ID NO :48)
[0614] 引物名称 :p16T1-F
[0615] 序列 :TGCCCAACGCACCGA (SEQ ID NO :49)
[0616] 引物名称 :p16T1-R
[0617] 序列 :GGGCGCTGCCCATCA (SEQ ID NO :50)
[0618] 探针名称 :p16T1- 探针
[0619] 序列 :TCGGAGGCCGATCCAGGTCATG (SEQ ID NO :51)

- [0620] 引物名称 :p16T2-F
[0621] 序列 :AAGCTTCCTTTCCGTCATGC (SEQ ID NO :52)
[0622] 引物名称 :p16T2-R
[0623] 序列 :CATGACCTGCCAGAGAGAACAG (SEQ ID NO :53)
[0624] 探针名称 :p16T2- 探针
[0625] 序列 :CCCCACCTGGCTCTGACCA (SEQ ID NO :54)
[0626] 引物名称 :p16T3-F
[0627] 序列 :GGAAACCAAGGAAGAGGAATGAG (SEQ ID NO :55)
[0628] 引物名称 :p16T3-R
[0629] 序列 :TGTTCCCCCTTCAGATCTTCT (SEQ ID NO :56)
[0630] 探针名称 :p16T3- 探针
[0631] 序列 :ACGCGCGTACAGATCTCTCGAATGCT (SEQ ID NO :57)
[0632] 引物名称 :p16 通用 -F
[0633] 序列 :CACGCCCTAAGCGCACAT (SEQ ID NO :58)
[0634] 引物名称 :p16 通用 -R
[0635] 序列 :CCTAGTTCACAAAATGCTTGTTCATG (SEQ ID NO :59)
[0636] 探针名称 :p16 通用 - 探针
[0637] 序列 :TTTCTTGCGAGCCTCGCAGCCTC (SEQ ID NO :60)
[0638] 细胞周期蛋白 E1 :
[0639] 引物名称 :CCNE1T1T2-F
[0640] 序列 :AAAGAAGATGATGACCGGGTTTAC (SEQ ID NO :61)
[0641] 引物名称 :CCNE1T1T2-R
[0642] 序列 :GAGCCTCTGGATGGTGCAA (SEQ ID NO :62)
[0643] 探针名称 :CCNE1T1T2-P
[0644] 序列 :CAAACTCAACGTGCAAGCCTCGGA (SEQ ID NO :63)
[0645] 引物名称 :CCNE1T1-F
[0646] 序列 :TCCGCCGCGGACAA (SEQ ID NO :64)
[0647] 引物名称 :CCNE1T1-R
[0648] 序列 :CATGGTGTCCCGCTCCTT (SEQ ID NO :65)
[0649] 探针名称 :CCNE1T1- 探针
[0650] 序列 :ACCCTGGCCTCAGGCCGAG (SEQ ID NO :66)
[0651] 细胞周期蛋白 E2 :
[0652] 引物名称 :CCNE2T1T2-F
[0653] 序列 :GGAATTGTTGGCCACCTGTATT (SEQ ID NO :67)
[0654] 引物名称 :CCNE2T1T2-R
[0655] 序列 :CTGGAGAAATCACTTGTTCCTATTTCT (SEQ ID NO :68)
[0656] TaqMan 探针名称 :CCNE2T1T2-P
[0657] 序列 :CAGTCCTTGCATTATCATTGAAACACCTCACA (SEQ ID NO :69)
[0658] 引物名称 :CCNE2T1T3-F

- [0659] 序列 :TCAACTCATTGGAATTACCTCATTATTC (SEQ ID NO :70)
- [0660] 引物名称 :CCNE2T1T3-R
- [0661] 序列 :ACCATCAGTGACGTAAGCAAACCTC (SEQ ID NO :71)
- [0662] TaqMan 探针名称 :CCNE2T1T3-P
- [0663] 序列 :CCAAACTTGAGGAAATCTATGCTCCTAACTCCA (SEQ ID NO :72)
- [0664] 引物名称 :CCNE2T2-F
- [0665] 序列 :TTTTGAAGTTCTGCATTCTGACTTG (SEQ ID NO :73)
- [0666] 引物名称 :CCNE2T2-R
- [0667] 序列 :ACCATCAGTGACGTAAGCAAGATAA (SEQ ID NO :74)
- [0668] TaqMan 探针名称 :CCNE2T2-P
- [0669] 序列 :AACCACAGATGAGGTCCATACTTCTAGACTGGCT (SEQ ID NO :75)

[0670] 在 5' 碱基上用荧光染料 FAM(6-羧基荧光素) 标记探针,并在 3' 碱基上用淬灭染料 TAMRA(6-羧基四甲基罗丹明) 标记探针。扩增子的大小大约为 100bp。使用 18S 核糖体 RNA 作为内源对照。用荧光染料 VIC™ 标记 18SrRNA 探针。从 Applied Biosystems 购买已配好的 18S rRNA 引物 / 探针混合物。通过使用 High-Capacity cDNA Archive 试剂盒 (Applied Biosystems) 用随机六碱基聚合物将从正常 (N) 或癌 (T) 宫颈组织中提取的 5 μg 总 RNA 定量地转化成单链 cDNA 形式。

[0671] 制备下列反应试剂:

[0672] 20X 引物 / 探针的主混合物 (MasterMix) (200 μl 中)

- | | | |
|--------|------------------|--------|
| [0673] | 180 μM 正向引物 | 20 μl |
| [0674] | 180 μM 反向引物 | 20 μl |
| [0675] | 100 μM TaqMan 探针 | 10 μl |
| [0676] | H ₂ O | 150 μl |

[0677] 最终的反应混合物 (25 μl / 小孔)

- | | | |
|--------|-------------------------------------|---------|
| [0678] | 20X 引物 / 探针的主混合物 | 1.25 μl |
| [0679] | 2X TaqMan 通用 PCR 主混合物 (P/N:4304437) | 12.5 μl |
| [0680] | cDNA 模板 | 5.0 μl |
| [0681] | H ₂ O | 6.25 |

[0682] 从 Applied Biosystems 购买 20X TaqMan 通用 PCR 主混合物。在 25 μl 总体积中,最终的引物和探针浓度分别为 0.9 μM 和 0.25 μM。每个小孔使用 10ng 总 RNA。扩增条件是:50℃下进行 2 分钟,95℃下进行 10 分钟,和 2 步骤循环:95℃下进行 15 秒和 60℃下进行 60 秒,总共 40 个循环。各轮中包含至少 3 个无模板对照反应混和物。所有实验一式三份进行。

[0683] 在各反应结束时,将记录的荧光强度用于下面的计算: R_n^+ 是包含所有组分的反应的 R_n 值。 R_n^- 是未反应样品的 R_n 值(基线值或在 NTC 中检测到的值)。 ΔR_n 是 R_n^+ 和 R_n^- 之间的差,其是通过 PCR 产生的信号大小的指标。在本研究中使用比较 C_T 法,该方法不使用已知量的标准,但将靶序列的相对量和选择的任何参照值(例如 18S rRNA)进行比较。使用 **TaqMan**® Human Endogenous Control Plate 方案转换原始数据以进行实时 PCR 数据分析。

[0684] 结果

[0685] 以列表的形式在下面列出用各生物标志物和用特异性引物获得的结果。用正常宫颈组织样品（即，NIL）获得的结果称为 N；用宫颈癌组织获得的结果标记为 T。

[0686] 表 47 :MCM7 的结果

[0687]

样品	T2	T5	T1T3	T2T4	T3T4
CV01-T	4	0.04	29.9	4.5	1.4
CV03-T	5.7	0.02	36.8	6.1	2.6
CV05-T	4.13	0.08	17.3	1.35	3.68
CV07-T	2.6	0.06	18.77	0.88	3.27
CV09-T	4.96	0.08	15.01	3.69	3.22
CV11-T	5.9	0.01	7.37	3.08	1.75
CV13-T	6.74	0.04	19.74	4.55	4.11
CV15-T	3.04	0.05	3.65	3.43	1.25
CV17-T	5.21	0.02	20.07	2.74	1.56
CV19-T	3.34	0.09	21.17	2.88	6
CV21-T	6.7	0.08	10.64	4.75	4.59
CV23-T	7.08	0.33	32.17	5.6	4.25
CV25-T	4.87	0.03	18.11	4.58	4.51
CV27-T	4.24	0.03	36.25	4.6	2.82
平均值	4.89	0.07	20.50	3.77	3.22
中值	4.89	0.05	19.74	3.77	3.22
STD	1.32	0.07	9.46	1.39	1.32
CV02-N	2.5	0.02	10.6	2.6	1.1
CV04-N	4.6	0.02	7.1	4.8	2.4
CV06-N	1.75	0.01	2.14	1.36	2.63
CV08-N	1.35	0.01	4.8	1.71	1.54
CV10-N	5.6	0.03	5.07	5.12	1.85
CV12-N	5.68	0.02	7.34	3.19	2.29
CV16-N	4.35	0.08	3.72	2.75	1.78
CV18-N	3.98	0.01	4.74	3.63	1.7
CV20-N	2.03	0.03	5.42	1.4	2.78
CV22-N	2.66	0.02	4.33	2.26	2.42
CV24-N	4.88	0.09	9.03	1.53	2.77
CV28-N	2.71	0.01	10.38	1.36	1.7
平均值	3.51	0.03	6.22	2.64	2.08
中值	3.51	0.02	5.42	2.60	2.08
STD	1.40	0.03	2.48	1.21	0.50

[0688] 表 48 :p21^{ras} 的结果

[0689]

患者	T1T2	T2	T3
Pt01-T	23.33	0.06	0.00
Pt02-T	14.66	0.01	0.00
pt03-T	11.86	0.00	0.00
Pt04-T	27.04	0.01	0.00
Pt05-T	14.72	0.00	0.00
Pt06-T	22.84	0.01	0.00
Pt07-T	14.04	0.00	0.00

Pt08-T	31.93	0.01	0.01
Pt09-T	35.02	0.00	0.00
Pt10-T	13.2	0.00	0.00
Pt11-T	24.87	0.01	0.00
Pt12-T	10.85	0.00	0.00
Pt13-T	36.51	0.02	0.01
Pt14-T	12.72	0.00	0.00
Pt15-T	10.64	0.00	0.00
Pt16-T	22.58	0.04	0.00
Pt17-T	39.64	0.14	0.04
Pt01-N	4.57	0.03	0.00
Pt02-N	5.57	0.00	0.00
Pt03-N	3.54	0.00	0.00
Pt04-N	8.18	0.00	0.00
Pt05-N	5.4	0.10	0.00
Pt06-N	11.01	0.00	0.00
Pt08-N	10.39	0.00	0.00
Pt09-N	9.11	0.00	0.00
Pt10-N	4.41	0.00	0.00
Pt11-N	8.64	0.00	0.00
Pt12-N	3.03	0.00	0.00
Pt14-N	3.55	0.00	0.00
Pt15-N	2.42	0.01	0.00
Pt17-N	11.46	0.05	0.01
T- 平均值	21.5559		
N- 平均值	6.52		
St. T- 检验=	7.3E-06		

[0690] 表 49 :p14 **p14^{ARF/p16}** 的结果

[0691]

患者	T1	T2	T3	T4	通用
Pt01-T	0.2	0.1	0.2	0.2	0.2
Pt02-T	16.3	11.2	5.1	21.7	36.5
Pt03-T	16.5	6.2	3.1	15.1	29.6
Pt04-T	10.1	2.8	2.6	13.2	27.7
Pt05-T	12.7	3.6	2.1	11.3	23.1
Pt01-N	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
Pt02-N	2.5	2.6	1.6	2.7	6.8
Pt04-N	2.6	0.6	0.8	2.4	5.8
Pt05-N	2.1	0.8	0.7	4.1	4.6
T- 平均值	11.2	4.8	2.6	12.3	23.4
N- 平均值	1.8	1.0	0.8	2.3	4.3

[0692] 表 50 :细胞周期蛋白 E1 的结果

[0693]

患者	T1T2 癌 M.	癌 SD	T1T2 正常 M.	正常 SD	T1 癌 M.	癌 SD	T1 正常 M.	正常 SD
----	-----------------	---------	------------------	----------	---------------	---------	----------------	----------

Pt01	12.19	0.12	4.11	0.13	1.34	0.04	0.5	0.03
Pt02	16.72	0.21	4.44	0.34	1.35	0.02	0.47	0.05
Pt03	11.45	0.41	2.81	0.13	1.17	0.01	0.06	0.02
Pt04	21.33	0.45	5.33	0.09	0.76	0.1	0.23	0.01
Pt05	11.17	0.25	3.68	0.15	0.95	0.05	0.15	0.03
Pt06	21.65	0.24	3.11	0.22	0.89	0.03	0.13	0.02
Pt07	23.26	0.54	0	0	0.75	0.06	0	0.01
Pt08	8.37	0.24	3.1	0.01	0.12	0.01	0.13	0.02
Pt09	17.74	0.43	2.17	0.08	0.73	0.02	0.09	0.01
Pt10	18.51	0.29	4.56	0.17	1.37	0.03	0.41	0.04
Pt11	10.58	0.52	3.92	0.12	0.57	0.01	0.23	0.03
Pt12	33.67	0.58	7.87	0.1	0.78	0.01	0.28	0.05
Pt13	36.9	0.41	0	0	1.05	0.04	0	0
Pt14	31.01	0.29	6.01	0.26	1.68	0.05	0.24	0.03
Pt15	7.35	0.23	1.24	0.09	0.34	0.08	0.08	0.02
Pt16	12.71	0.61	3.72	0	1.1	0.06	0.07	0.01
Pt17	12.13	0.21	11.46	0.15	0.34	0.07	0.05	0.01
Pt18	14.22	0.14	5.94	0.06	0.73	0.08	0.26	0.04
Pt19	12.69	0.81	3.52	0.02	0.41	0.04	0.24	0.02
Pt20	16.56	0.16	6.1	0.12	0.17	0.02	0.06	0
Pt21	11.63	0.23	3.01	0.06	0.54	0.04	0.23	0.01
Pt22	17.39	0.34	2.36	0.02	0.47	0.02	0.24	0.05
Pt23	16.56	0.16	2.1	0.02	0.18	0.03	0.09	0.01
Pt24	22.23	0.33	4.06	0.28	1.9	0.17	0.52	0.01
Pt25	13.98	0.48	3.72	0.05	0.54	0.04	0.23	0.01
Pt26	22.71	0.76	4.48	0.07	0.47	0.02	0.24	0.05
Pt27	16.17	0.4	5.64	0.3	0.18	0	0.12	0.01
Pt28	12.6	0.56	3.8	0.06	0.29	0.03	0.05	0
Pt29	13.69	0.34	3.1	0.18	0.29	0.03	0.11	0
Pt30	17.69	0.61	4.3	0.11	0.36	0.01	0.03	0
Pt31	20.46	0.3	3.91	0.21	0.47	0.03	0.08	0
Pt32	18.38	0.18	3.16	0.06	0.42	0.02	0.17	0.01
Pt33	21.1	0.62	4.52	0.33	1.07	0.05	0.24	0.01
Pt34	21.5	1.37	4.56	0.13	0.24	0.01	0.11	0.01
平均	17.54		4.26		0.68		0.20	
T/N	4.1							
t- 检验								
P =	7.80E-14							

[0694] 表 51 :细胞周期蛋白 E2 的结果

[0695]

患者	T1T2	T1T2Std. Dev.	T1T3	T1T3Std. Dev.	T2	T2Std. Dev.
Pt01-T	13.17	1.02	16.11	0.39	0.01	0.00
Pt02-T	13.42	0.3	18.12	2.21	0.15	0.02
Pt03-T	13.64	0.50	17.40	2.16	0.05	0.01
Pt04-T	19.37	1.41	24.26	1.01	0.01	0.00
Pt05-T	10.59	1.1	14.71	1.58	0.17	0.02
Pt06-T	7.96	0.91	9.32	0.51	0.06	0.01
Pt07-T	14.1	1.73	16.92	0.84	0.54	0.06
Pt08-T	8.11	0.67	9.50	0.66	0.34	0.07
Pt09-T	13.04	0.72	18.27	0.99	0.02	0.00
Pt10-T	19.56	2.29	23.42	0.00	0.02	0.01

Pt11-T	16.8	1.57	18.71	2.15	0.08	0.01
Pt12-T	16.05	0.85	18.81	0.74	0.91	0.01
Pt13-T	14.91	0.87	18.51	1.59	0.61	0.16
Pt14-T	14.89	0.32	20.49	0.86	0.42	0.03
Pt15-T	12.44	0.47	15.26	1.00	0.68	0.18
Pt16-T	11.54	1.58	13.13	0.75	1.02	0.14
Pt17-T	6.78	0.47	7.91	0.45	0.85	0.10
Pt01-N	4.89	0.21	5.94	0.53	0.00	0.00
Pt02-N	6.32	0.47	8.91	0.61	0.13	0.00
Pt03-N	4.8	0.31	5.89	0.30	0.04	0.00
Pt04-N	13.28	0.74	15.28	1.37	0.01	0.00
Pt05-N	6.51	1.2	9.04	0.82	0.16	0.02
Pt06-N	4.96	0.83	6.41	0.84	0.05	0.01
Pt08-N	6.48	0.73	6.82	0.60	0.07	0.02
Pt09-N	3.74	0.48	4.63	0.66	0.03	0.01
Pt10-N	10.32	0.93	11.31	0.89	0.02	0.00
Pt11-N	10.34	0.26	13.90	0.53	0.04	0.04
Pt12-N	13.81	1.69	16.60	1.45	0.24	0.07
Pt14-N	6.92	0.63	9.07	0.95	0.14	0.03
Pt15-N	4.8	0.73	8.55	1.40	0.10	0.03
Pt17-N	5.33	0.2	5.78	0.27	0.23	0.07
T- 平均值	13.32		16.52		0.35	
N- 平均值	7.32		9.15		0.09	
St. T- 检验	4.16E-05		3.31742E-05		0.008813	

[0696] 实施例 11 :临床组织样品中生物标志物的实时 PCR 检测

[0697] 如实施例 9 中所述,使用宫颈癌组织样品(例如,腺癌、鳞状细胞癌)和正常宫颈组织样品进行**TaqMan®**实时 PCR。在本研究中,在 Primer Express™ 程序,版本 1.5(Applied Biosystems)的帮助下,设计用于靶宫颈生物标志物(即,MCM2、MCM6、MCM7 和 Topo2A)的特异性扩增的引物和探针。下面显示引物和探针的序列信息:

[0698] TaqMan 引物

[0699] MCM2:

[0700] 引物名称:MCM2-F

[0701] 序列:5'-GGAGGTGGTACTGGCCATGTA-3'(SEQ ID NO:80)

[0702] 引物名称:MCM2-R

[0703] 序列:5'-GGGAGATGCGGACATGGAT-3'(SEQ ID NO:81)

[0704] TaqMan' 探针名称:MCM2-P

[0705] 序列:5'-CCAAGTACGACCGCATCACCAACCA-3'(SEQ ID NO:82)

[0706] MCM6:

[0707] 引物名称:MCM6-F

[0708] 序列:5'-CATTCCAAGACCTGCCTACCA-3'(SEQ ID NO:83)

[0709] 引物名称:MCM6-R

[0710] 序列:5'-ATGCGAGTGAGCAAACCAATT-3'(SEQ ID NO:84)

[0711] TaqMan 探针名称:MCM6-P

[0712] 序列:5'-ACACAAGATTCGAGAGCTCACCTCATCCA-3'(SEQ ID NO:85)

[0713] MCM7:

- [0714] 引物名称:MCM7_T1T3-F
- [0715] 序列:CTCTGAGCCCCGCAAGC (SEQ ID NO :25)
- [0716] 引物名称:MCM7_T1T3-R
- [0717] 序列:TGTAAGAACTTCTTAACCTTTTCCTTCTCTA (SEQ IDNO :26)
- [0718] 探针名称:MCM7_T1T3- 探针
- [0719] 序列:CCCTCGGCAGCGATGGCACT (SEQ ID NO :27)
- [0720] 引物名称:MCM7_T2T4-F
- [0721] 序列:GAGGAATCCCGAGCTGTGAA (SEQ ID NO :28)
- [0722] 引物名称:MCM7_T2T4-R
- [0723] 序列:CCCGCTCCCGCCAT (SEQ ID NO :29)
- [0724] 探针名称:MCM7_T2T4- 探针
- [0725] 序列:CCCATGTGCTTCTTTGTTTACTAAGAGCGGAA (SEQ IDNO :30)
- [0726] 引物名称:MCM7_T2-F
- [0727] 序列:GTCCGAAGCCCCCAGAA (SEQ ID NO :31)
- [0728] 引物名称:MCM7_T2-R
- [0729] 序列:CCCGACAGAGACCACTCACA (SEQ ID NO :32)
- [0730] 探针名称:MCM7_T2- 探针
- [0731] 序列:CAGTACCCTGCTGAACTCATGCGCA (SEQ ID NO :33)
- [0732] 引物名称:MCM7_T3T4-F
- [0733] 序列:CGCTACGCGAAGCTCTTTG (SEQ ID NO :34)
- [0734] 引物名称:MCM7_T3T4-R
- [0735] 序列:CCTTTGTTTGCCATTGTTCTCTAA (SEQ ID NO :35)
- [0736] 探针名称:MCM7_T3T4- 探针
- [0737] 序列:TGCCGTACAAGAGCTGCTGCCTCA (SEQ ID NO :36)
- [0738] TOP2A :
- [0739] 引物名称:TOP2A_F
- [0740] 序列:5' -GGCTACATGGTGGCAAGGA-3' (SEQ ID NO :86)
- [0741] 引物名称:TOP2A_R
- [0742] 序列:5' -TGGAATAACAATCGAGCCAAAG-3' (SEQ ID NO :87)
- [0743] TaqMan 探针名称:TOP2A_P
- [0744] 序列:5' -TGCTAGTCCACGATACATCTTTACAATGCTCAGC-3' (SEQ ID NO :88)
- [0745] 结果
- [0746] 以列表的形式在下面列出获得的各标志物的结果。也在下面对数据进行概述。
- [0747] 表 52 :速冻的宫颈癌组织样品
- [0748]

患者	TPO ID	诊断的病程	HPV 类型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt01	CV- 001	鳞状 细胞癌	HPV16	8. 93	11. 31	29. 9	23. 76

Pt02	CV-003	腺癌	HPV18	10.94	14.29	36.8	25.28
Pt03	CV-005	腺癌	HPV18	17.67	13.84	17.3	23.18
Pt04	CV-007	鳞状 细胞癌	HPV16	23.61	13.3	18.77	23.26
Pt05	CV-009	鳞状 细胞癌	HPV16	9.3	11.26	15.01	20.33
Pt06	CV-011	鳞状 细胞癌	HPV16	13.86	11.58	7.37	8.37
Pt07	CV-013	腺癌	HPV18	27.03	16.32	19.74	34.29
Pt08	CV-015	鳞状 细胞癌	HPV16, HPV18, +	8.28	8.16	3.65	8.57
Pt09	CV-017	鳞状 细胞癌	HPV18	12.61	13.56	20.07	11.31
Pt10	CV-019	鳞状 细胞癌	HPV18	31.88	23.38	21.17	27.48
Pt11	CV-021	鳞状 细胞癌	HPV16	11.27	14.76	10.64	12.73
Pt12	CV-023	鳞状 细胞癌	HPV16	11.39	11.29	32.17	21.11
Pt13	CV-025	鳞状 细胞癌	HPV16	23.88	18.98	18.11	27.96
Pt14	CV-027	鳞状 细胞癌	HPV18, HPV16, +	12.26	15.53	36.25	26.63
Pt15	CV-029	鳞状 细胞癌	HPV16	6.56	7.92	9.64	7.81
Pt16	CV-031	鳞状 细胞癌	HPV73	28.12	12.21	27.3	21.4
Pt17	CV-033	鳞状 细胞癌	HPV16	8.76	7.59	14.37	12.42
Pt18	CV-035	鳞状 细胞癌	HPV16	21.4	12.65	23.63	27.57
Pt19	CV-037	鳞状 细胞癌	HPV18	12.59	13.06	14.37	9.24

[0749]

患者	TP0 ID	诊断的病程	HPV 类型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt20	CV-039	腺、鳞 细胞癌	HPV16, HPV18, +	7.24	8.17	16.97	15.13
Pt21	CV-041	鳞状 细胞癌	HPV16	9.61	11.84	13.88	11.92

Pt22	CV-043	鳞状 细胞癌	HPV16	21.57	13.21	18.31	24.19
Pt23	CV-045	鳞状 细胞癌	HPV16	21.19	13.18	18.76	19.97
Pt24	CV-047	鳞状 细胞癌	HPV18	24.61	19.09	20.19	28.14
Pt25	CV-049	鳞状 细胞癌	HPV18	11.43	10.2	13.70	10.55
Pt26	CV-051	鳞状 细胞癌	HPV16	24.25	20.54	23.26	33.26
Pt27	CV-053	鳞状 细胞癌	HPV45	26.74	21.34	20.96	20.34
Pt28	CV-055	鳞状 细胞癌	HPV16, HPV18, +	12.65	12	14.42	12.17
Pt29	CV-057	鳞状 细胞癌	HPV16	16	14.72	25.46	22.16
Pt30	CV-059	鳞状 细胞癌	HPV16, HPV18, +	22.55	17.87	15.30	25.54
Pt31	CV-061	鳞状 细胞癌	HPV16	24.08	21.88	23.11	25.28
Pt32	CV-063	鳞状 细胞癌	HPV18, HPV16, +	24.16	12.55	21.63	22.39
Pt33	CV-065	鳞状 细胞癌	HPV16	26.63	16.05	27.56	28.84
Pt34	CV-067	鳞状 细胞癌	HPV16	19.61	23.28	19.03	25.57

[0750] 表 53 :相邻的正常组织样品

[0751]

患者	TPO ID	HPV 类型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt01	CV-002	阴性	3.04	4.4	10.6	10.52
Pt02	CV-004	阴性	6.26	6.28	7.1	9.06
Pt03	CV-006	HPV18	2.06	2.53	2.14	3.86
Pt04	CV-008	阴性	3.14	4.15	4.8	8.03
Pt05	CV-010	阴性	2.2	3.45	5.07	6.91
Pt06	CV-012	阴性	2.06	2.29	7.34	6.82
Pt07	CV-014	阴性	N/A	N/A	N/A	N/A

Pt08	CV-016	阴性	2.55	3.13	3.72	2.02
Pt09	CV-018	阴性	2.09	3.09	4.74	1.24
Pt10	CV-020	阴性	8.15	6.76	5.42	10.41
Pt11	CV-022	阴性	4.53	5.34	4.33	6.64
Pt12	CV-024	阴性	1.94	2.45	9.03	6.13
Pt13	CV-026	阴性	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt14	CV-028	阴性	2.62	2.95	10.38	5.3
Pt15	CV-030	阴性	1.14	1.28	2.06	1.54
Pt16	CV-032	阴性	N/A	N/A	N/A	N/A
Pt17	CV-034	阴性	1.24	1.91	1.32	0.42
Pt18	CV-036	阴性	3.4	1.89	4.01	4.32
Pt19	CV-038	阴性	3.48	4.98	5.60	7.92
Pt20	CV-040	阴性	1.84	3.28	3.73	1.38

[0752]

患者	TPO ID	HPV 类型	MCM2 TaqM	MCM6 TaqMan	MCM7 TaqM	TOP2A TaqM
Pt21	CV-042	阴性	1.53	3.3	4.77	1.01
Pt22	CV-044	阴性	2.65	4.03	2.74	2.59
Pt23	CV-046	阴性	3.09	3.53	5.90	3.42
Pt24	CV-048	HPV18	2.57	5.19	3.82	5.32
Pt25	CV-050	阴性	5.84	4.64	7.78	9.14
Pt26	CV-052	阴性	5.11	5.22	5.37	5.13
Pt27	CV-054	阴性	2.91	3.29	5.10	0.76
Pt28	CV-056	阴性	4.14	3.74	5.54	4.15
Pt29	CV-058	HPV16	2.83	4.98	10.13	7.57

Pt30	CV-060	阴性	6.41	5	5.39	10.05
Pt31	CV-062	阴性	5.72	4.93	9.29	9.95
Pt32	CV-064	阴性	8.06	5.41	7.64	9
Pt33	CV-066	阴性	9.93	7.94	10.78	9.95
Pt34	CV-068	阴性	2.36	6.39	5.73	1.81

[0753] 结果概述

[0754] 表 54 :肿瘤对相邻正常组织

[0755]

标志物	肿瘤 (M ± SD)	正常 (M ± SD)	R	P
MCM2	17.43 ± 7.34	3.71 ± 2.21	4.70	<0.0001
MCM6	14.32 ± 4.32	4.12 ± 1.56	3.48	<0.0001
MCM7	19.38 ± 6.94	5.85 ± 2.59	3.31	<0.0001
TOP2A	20.53 ± 7.54	5.56 ± 3.33	3.69	<0.0001

[0756] M :平均值 ;SD :标准误 ;R :肿瘤平均值对正常平均值的比例 ;P :t-test 的 P 值。

[0757] 表 55 :HPV-16 对 HPV-18

[0758]

标志物	肿瘤 HPV 类型	病例	肿瘤 (M ± SD)	正常 (M ± SD)
MCM2	16	18	16.77 ± 6.78	3.29 ± 2.13
	18	8	17.23 ± 8.16	3.99 ± 2.40
	16+18	6	14.52 ± 7.18	4.27 ± 2.47
MCM6	16	18	14.19 ± 4.44	3.97 ± 1.75
	18	8	14.24 ± 4.10	4.35 ± 1.54
	16+18	6	12.38 ± 3.89	3.92 ± 1.04
MCM7	16	18	19.39 ± 6.94	6.07 ± 2.98
	18	8	17.23 ± 4.16	5.07 ± 1.91
	16+18	6	18.04 ± 7.71	6.07 ± 2.56
TOP2A	16	18	20.92 ± 7.38	5.46 ± 3.26
	18	8	19.78 ± 9.52	6.19 ± 3.33
	16+18	6	18.41 ± 7.49	5.32 ± 3.57

[0759] 表 56 :鳞状细胞癌与腺癌

[0760]

标志物	组织病理学	病例	肿瘤 (M ± SD)	正常 (M ± SD)
MCM2	SCC	30	17.66 ± 7.28	3.74 ± 2.23
	AC	4	15.72 ± 8.69	3.39 ± 2.49
MCM6	SCC	30	14.48 ± 4.44	4.13 ± 1.55
	AC	4	13.16 ± 3.49	4.03 ± 1.98
MCM7	SCC	30	19.27 ± 7.25	6.01 ± 2.58
	AC	4	20.20 ± 4.57	4.32 ± 2.53
TOP2A	SCC	30	20.01 ± 7.47	5.65 ± 3.34
	AC	4	21.47 ± 7.87	4.77 ± 3.92

[0761] SCC :鳞状细胞癌 ;AC :腺癌

[0762] 实施例 12 :宫颈癌和乳腺癌细胞系中生物标志物的实时 PCR 检测

[0763] 进行TaqMan[®]实时 PCR 以检测 MCM2、MCM6 和 MCM7 在宫颈癌细胞系和乳腺癌细胞系中的表达水平。

[0764] 实验设计和方案

[0765] 从 ATCC 购买三种人宫颈癌细胞系 SiHa、Caski 和 HeLa 以及三种人乳腺癌细胞系 MCF-7、SK-BR3 和 CAMA,并将其用于本实验。通过RNeasy[®]Protect Mini 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从新培养的细胞提取总细胞 RNA,并使用 High-Capacity cDNA Archive 试剂盒 (Applied Biosystems, P/N:4322171) 用随机六聚物将其转变成单链 cDNA 形式。在 ABI Prism[®] 7700Sequence Detection System 上使用TaqMan[®]通用 PCR 主混合物 (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 进行实时 PCR。

[0766] 用 ABI Primer Express[™] 程序 (版本 1.5) 设计用于 MCM2、MCM6 和 MCM7 的特异性扩增的引物和探针。MCM7 包含 4 种转录变体 :在 NCBIEntrez 核苷酸数据库中鉴定了转录变体 1 (T1,refseqNM_005916) 和转录变体 2 (T2,refseq NM_182776)。如通过由 NCBI 的 Model Maker 汇集的 EST 所分析的,变体 T3 和 T4 在 5' 末端附近具有可变的外显子。特别地设计了引物和探针 T1T3、T2T4、T2 和 T3T4 用于检测变体 T1 和 T3、T2 和 T4、T2,以及 T3 和 T4。引物和探针的序列显示于上面的实施例 10 和 11 中。

[0767] 用荧光染料 FAM (6- 羧基荧光素) 在 5' 碱基上和用淬灭染色 TAMRA (6- 羧基四甲基罗丹明) 在 3' 碱基上标记探针。使用 18S 核糖体 RNA 作为内源对照。用荧光染料 VIC 标记 18SrRNA 探针。从 AppliedBiosystems 购买已配好的 18S rRNA 引物 / 探针混和物。在总体积为 25 μ l、分别包含 0.9 μ M 和 0.25 μ M 的引物和探针的反应混合物中使用 10ng cDNA,扩增条件是 :50℃ 下进行 2 分钟,95℃ 下进行 10 分钟,和 2 步骤循环 :95℃ 下进行 15 秒和 60℃ 下进行 60 秒,总共 40 个循环。各轮反应中包含至少 3 个无模板对照反应混和物。所有实验一式两次进行。按照 ABI 的用户指南 (P/N4303859) 使用相对定量方法,基于其 CT

值计算靶基因相对于 18S 内源对照的表达水平。

[0768] 结果

[0769] 以列表的形式在下面列出获得的各生物标志物的结果。

[0770] 表 57 : 宫颈癌细胞系和乳腺癌细胞系的生物标志物的表达

[0771]

	SiHa	Caski	HeLa	MCF7	SK-BR3	CAMA
MCM2	21.4	5.01	8.79	18.84	7.65	17.32
MCM6	12.34	5.77	6.46	12.6	5.44	13.14
MCM7	20.53	17.27	8.31	26.91	30.38	25.36

[0772] 结论

[0773] 结果显示宫颈 HeLa 细胞具有低表达水平的 MCM2、MCM6 和 MCM7 生物标志物。宫颈 SiHa、乳腺 MCM7 和 CAMA 细胞系都显示 MCM2、MCM6 和 MCM7 生物标志物的过表达。宫颈 Caski 和乳腺 SK-BR3 细胞系显示 MCM7 的过表达,但显示 MCM2 和 MCM6 的低表达。

[0774] 实施例 . 13 : 通过瞬时 HPV16E6/E7 基因转染进行的 293 细胞中宫颈生物标志物表达的诱导

[0775] 使用 **TaqMan**[®] 实时 PCR 测定法研究 HEK293 细胞系系统中宫颈生物标志物的表达和高危 HPV 癌基因转录之间的关系。

[0776] 实验设计和方案

[0777] 在本实验中采用受四环素调控的表达系统 (T-Rex 系统, Invitrogen, Inc)。构建表达 HPV16E2、E6 或 E7 蛋白的 T-Rex 载体。将包含突变体 E2、E6 或 E7 基因的载体用作负对照。然后用 HPV 质粒转染 T-Rex293 细胞,用四环素激活 HPV 基因的表达,进行 4 小时、24 小时和 72 小时。通过 **RNeasy**[®] Protect Mini 试剂盒 (Qiagen, Valencia, CA) 从经转染的细胞提取总细胞 RNA,并使用 High-Capacity cDNA Archive 试剂盒 (Applied Biosystems, P/N : 4322171) 用随机六核苷酸聚体将其转变为单链 cDNA 形式。在 ABI **Prism**[®] 7700 Sequence Detection System 上使用 **TaqMan**[®] Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems, Inc., Foster City, CA) 进行实时 PCR。

[0778] 用 ABI Primer Express[™] 程序 (版本 1.5) 设计用于 MCM2、MCM6、MCM7、TOP2A、细胞周期蛋白 E1、p21、p14、HPV16E2、E6 和 E7 的特异性扩增的引物和探针。MCM7 包含 4 种转录变体 : 在 NCBI Entrez 核苷酸数据库中鉴定了转录变体 1 (T1, refseqNM_005916) 和转录变体 2 (T2, refseq NM_182776)。如通过由 NCBI 的 Model Maker 汇集的 EST 装配所分析的,变体 T3 和 T4 在 5' 末端附近具有可变的外显子。用于特异性地检测变体 T1 和 T3、T2 和 T4、T2 以及 T3 和 T4 的引物和探针分别称为 T1T3、T2T4、T2 和 T3T4。引物和探针的序列和上面实施例 10 和 11 中显示的一样。

[0779] 用荧光染料 FAM (6- 羧基荧光素) 在 5' 碱基上和用淬灭染色 TAMRA (6- 羧基四甲基罗丹明) 在 3' 碱基上标记探针。使用 18S 核糖体 RNA 作为内源对照。用荧光染料 VIC 标记 18SrRNA 探针。从 Applied Biosystems 购买已配好的 18SrRNA 引物 / 探针混和物。在总体积为 25 μ l、包含浓度分别为 0.9 μ M 和 0.25 μ M 的引物和探针的反应混合物中使用 10ng cDNA。扩增条件是 : 50 $^{\circ}$ C 下进行 2 分钟, 95 $^{\circ}$ C 下进行 10 分钟, 和 2 步骤循环 : 95 $^{\circ}$ C 下进行 15 秒和 60 $^{\circ}$ C 下进行 60 秒, 总共 40 个循环。每轮包括至少 3 个无模板对照反应混和物。所有

实验一式两份进行。按照 ABI 的用户指南 (P/N4303859) 使用相对定量方法, 基于其 CT 值计算靶基因相对于 18S 内源对照的表达水平。

[0780] 结果

[0781] 通过转染的时间进程曲线观察到 T-Rex293 细胞中 HPV16E2、E6 和 E7 基因的表达增加。转染后从 4 小时直到 72 小时, T-Rex293 细胞中 Topo2A、MCM2、MCM6、MCM7 和细胞周期蛋白 E 的 mRNA 表达显著地由 HPV16E6 或 E7 基因诱导。然而, 在 HPV 基因感染后对 p21 和 p14 并未检测到表达水平升高。E6 或 E7 的表达似乎不被 E2 基因的共转染抑制。这是因为 E6 或 E7 的表达完全由外源 CMV 启动子驱动而不是由天然的 HPV 启动子驱动。后者在本模型系统中不存在。

[0782] 表 58 :Topo2A

[0783]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	6.91	0.07	5.22	0.13	5.68	0.14	6.61	0.36
293-H16E6	6.91	0.07	11.31	0.22	18.13	0.89	17.39	0.85
293-H16E7	6.91	0.07	20.33	0.9	28.94	0.71	35.02	1.03
293-H16dE7	6.91	0.07	6.43	0.35	8.18	0.64	7.39	0.18
293-LacZ	6.91	0.07	7.4	0.07	7.36	0.22	7.25	0.67

[0784] 表 59 :MCM2

[0785]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	4.79	0.23	5.25	0.36	5.24	0.31	4.44	0.3
293-H16E6	4.79	0.23	6.04	0.21	9.38	0.37	12.08	0.18
293-H16E7	4.79	0.23	10.81	0.16	12.29	0.36	16.34	0.8
293-H16dE7	4.79	0.23	5.72	0.36	4.98	0.27	5.03	0.39
293-LacZ	4.79	0.23	5.67	0.61	5.68	0.47	5.98	0.79

[0786] 表 60 :MCM6

[0787]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	3.62	0.2	3.5	0.22	4.72	0	4.44	0.26
293-H16E6	3.62	0.2	4.74	0.07	9.03	0.04	9.68	0.43
293-H16E7	3.62	0.2	7.7	0.04	13.5	0.33	14.03	0.41
293-H16dE7	3.62	0.2	5.23	0.28	4.6	0.32	4.73	0.37
293-LacZ	3.62	0.2	4.77	0.12	4.66	0.14	5.34	0.39

[0788] 表 61 :MCM7

[0789]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	4.2	0.04	6.3	0.28	5.3	0.18	5.8	0.31
293-H16E6	4.2	0.04	4.99	0.05	9.55	0.23	15.24	0.3
293-H16E7	4.2	0.04	10.11	0.84	14.23	0.84	21.18	0.31
293-H16dE7	4.2	0.04	3.65	0.3	6.06	0.3	4.64	0.07
293-LacZ	4.2	0.04	5.74	0.45	5.31	0.55	5.66	0.17

[0790] 表 62 :Cyclin E1

[0791]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	6.02	0.00	5.06	0.10	5.03	0.35	5.72	0.31
293-H16E6	6.02	0.00	9.19	0.18	8.95	0.79	9.38	0.18
293-H16E7	6.02	0.00	12.91	0.38	17.63	0.17	17.32	0.25
293-H16dE7	6.02	0.00	5.45	0.24	6.87	0.20	5.11	0.08
293-LacZ	6.02	0.00	5.72	0.31	6.28	0.37	5.65	0.64

[0792] 表 63 :p21

[0793]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	4.76	0.19	4.05	0.30	5.19	0.61	4.92	0.60
293-H16E6	4.76	0.19	5.56	0.19	5.60	0.08	7.21	0.07
293-H16E7	4.76	0.19	7.52	0.29	5.22	0.13	6.45	0.13
293-H16dE7	4.76	0.19	4.38	0.26	5.60	0.66	5.10	0.05
293-LacZ	4.76	0.19	3.86	0.00	4.53	0.27	5.37	0.29

[0794] 表 64 :p14

[0795]

转染	0h	0h SD	4h	4h SD	24h	24h SD	72h	72h SD
293-H16E2	4.78	0.30	4.44	0.09	5.04	0.44	5.04	0.07
293-H16E6	4.78	0.30	4.77	0.12	5.48	0.13	4.52	0.11
293-H16E7	4.78	0.30	6.38	0.62	5.60	0.25	6.43	0.35
293-H16dE7	4.78	0.30	5.08	0.12	5.53	0.35	5.10	0.15
293-LacZ	4.78	0.30	4.54	0.40	4.68	0.16	5.76	0.25

[0796] 表 65 :HPV16 E2

[0797]

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Mock
4h	130.22	0	0	110.7	0	0	95.34	36.6	3.94	12.86	0	0
24h	162.12	0	0	111.41	0	0	118.17	90.19	19.77	7.7	0	0
72h	251.55	0	0	141.57	0	0	162.54	128.41	32.94	9.89	0	0

[0798] 表 66 :HPV16 E6

[0799]

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Mock
4h	0	205	0	0	219.87	0	128.41	0	199.65	0	0	0
24h	0	329.67	0	0	225.96	0	158.31	0	188.03	0	0	0
72h	0	757.26	0	0	315.22	0	392	0	271.55	0	0	0

[0800] 表 67 :HPV16 E7

[0801]

	E2	E6	E7	dE2	dE6	dE7	E2+E6	E2+E7	dE2+E6	dE2+E7	LacZ	Mock
4h	0	0	330.76	0	0	165.48	0	120.65	0	201.19	0	0
24h	0	0	1514.6	0	0	239.63	0	857.89	0	600.57	0	0
72h	0	0	2806.8	0	0	355.9	0	1444.25	0	809.11	0	0

[0802] 实施例 14 :使用载片预处理缓冲液增加免疫细胞化学和免疫组织化学法中的抗原可接近性

[0803] 样品选择和试剂描述

[0804] 将成对的来自相同患者的细胞学和组织学样品接受免疫测定以检测生物标志物的过表达。分析来自分类为 ASCUS (3)、LSIL (6) 和 HSIL (5) 的患者的石蜡块组织样品和 **SurePath®** 细胞学样品。所用的试剂是抗体混合物 (用于细胞学)、经修饰的抗体混合物 (用于组织学)、检测试剂、复染剂和 **SureSlide®** 制备缓冲液 10X (预处理溶液)。

[0805] 细胞学载片制备和自动免疫细胞化学法

[0806] 为了进行免疫细胞化学法,如实施例 5 中所示进行载片制备和预处理。然后如实施例 5 中所述的一样 (除了一点不同外) 对各细胞学样品进行自动化免疫细胞化学法。对于本实验,将一抗混合物 (MCM2 克隆 26H6.19 1:10,000、MCM2 克隆 27C5.6 1:800、TOP0IIA 克隆 SWT3D1 1:1000) 的温育减少至 30 分钟。

[0807] 组织学载片制备和自动化免疫细胞化学法

[0808] 对于各事件,切取 4 微米的切片并将其干燥过夜或在 70℃ 的鼓风干燥箱中干燥 20 分钟。将切片在二甲苯中脱蜡,更换 3 次二甲苯,每次 5 分钟。然后在无水乙醇中清洗载片,每次 5 分钟。将载片放入水下并充分漂洗。将载片转移至 1X**SureSlide** 制备缓冲液的预热溶液并置于蒸器中温育 25 分钟。从蒸器中聚出载片并让其在室温下冷却 20 分钟。慢慢地在水中漂洗载片直至缓冲液被完全替换掉。进行 TBST 漂洗,更换 2 次缓冲液,每次 2 分钟。

[0809] 如实施例 5 中针对免疫细胞化学法的描述一样 (除了两点不同外) 进行自动化免疫组织化学法。在本实验中,一抗混合物的温育减少至 30 分钟。此外,用下列稀释度 (MCM2 克隆 26H6.19 1:4,000、MCM2 克隆 27C5.6 1:200、TOP0IIA 克隆 SWT3D1 1:400) 修饰一抗混合物。

[0810] 结果

[0811] 使用 RUO 试剂在组织学和细胞学样品上观察到预期的染色模式。具体地说,成功地证实了用 **SureSlide®** 制备缓冲液、检测试剂和复染剂对组织学和细胞学样品进行免疫染色的能力。

[0812] 表 68 :生物标志物核苷酸和氨基酸序列的信息

[0813]

生物标志物名称	核苷酸序列		氨基酸序列	
	录入号	序列编号	录入号	序列编号
Cyclin E1(同工型 1)	NM_001238	SEQ ID NO:1	NP_001229	SEQ ID NO:2
Cyclin E1(同工型 2)	NM_057182	SEQ ID NO:3	NP_476530	SEQ ID NO:4
Cyclin E2(同工型 1)	NM_057749	SEQ ID NO:5	NP_477097	SEQ ID NO:6
Cyclin E2(同工型 2)	NM_057735	SEQ ID NO:7	NP_477083	SEQ ID NO:8
Cyclin E2(同工型 3)	NM_004702	SEQ ID NO:9	NP_004693	SEQ ID NO:10
MCM2	NM_004526	SEQ ID NO:11	NP_0045417	SEQ ID NO:12
MCM6	NM_005915	SEQ ID NO:89	NP_005906	SEQ ID NO:90
MCM7(同工型 1)	NM_005916	SEQ ID NO:13	NP_005907	SEQ ID NO:14
MCM7(同工型 2)	NM_182776	SEQ ID NO:15	NP_877577	SEQ ID NO:16
p21/waf1(变体 1)	NM_000389	SEQ ID NO:17	NP_000380	SEQ ID NO:18
p21/waf1(变体 2)	NM_078467	SEQ ID NO:19	NP_510867	SEQ ID NO:20
p14ARF	NM_058195	SEQ ID NO:21	NP_478102	SEQ ID NO:22
Topo2a	NM_001067	SEQ ID NO:23	NP_0010568	SEQ ID NO:24

[0814] 根据上面的描述和实施例,本领域技术人员认识到,和常规方法相比,本发明的方法允许对高度子宫颈疾病进行更优越的不依赖于年龄的检测。本发明的方法可特别地适合下面所述的用途:

[0815] ●用于年龄超过 30 岁的妇女,所述检测可以是 HPV 阳性结果的反映或作为 ASCUS+ 细胞学结果的反映。

[0816] ●用于年龄小于 30 岁的妇女,所述检测可和用于检测高度子宫颈疾病的细胞学检测法一起使用。

[0817] ●用于年龄超过 30 岁的妇女,所述检测可和用于检测高度子宫颈疾病的细胞学检测法一起使用。

[0818] ●用于年龄小于 30 岁的妇女,将所述检测作为检测高度子宫颈疾病的初步筛查来进行使用。

[0819] ●用于年龄超过 30 岁的妇女,将所述检测作为检测高度子宫颈疾病的初步筛查来进行使用。

[0820] ●在年龄小于 30 岁的妇女中,所述检测可替代 Pap 抹片检查。

[0821] ●最后,不依赖于年龄,所述检测可替代 Pap 抹片检查。

[0822] 来源于本发明的实践的其他潜在有利方面包括:

[0823] ●30 岁和 30 岁以上具有 NIL/HPV 阳性结果的妇女中的组织学高度异常性的检测。

[0824] ●年龄超过 30 岁、对 DNA+Pap 抹片检查呈阳性的妇女中高度子宫颈疾病的检测有更好的特异性。

[0825] ●对 ASC-US、ASC-H 和 LSIL 分类范围内的妇女中高度子宫颈疾病可更好的检测,不依赖于年龄。

[0826] ●对 HSIL 分类范围内的高度子宫颈疾病的检测有更好的特异性。

[0827] ●和基于细胞学的诊断结合在年龄小于 30 岁的妇女中用于检测高度子宫颈疾病。

[0828] ●和基于细胞学的诊断结合用于高度子宫颈疾病的检测,不依赖于年龄。

[0829] ●作为年龄小于 30 岁的妇女中的初步筛查用于高度子宫颈疾病的检测有提高的特异性。

[0830] ●作为初步筛选用于高度子宫颈疾病的检测有提高的特异性,不依赖于年龄。

[0831] ●鉴定子宫颈疾病和区别 HPV 感染与高度子宫颈疾病。

[0832] ●可使用人工解释或通过自动化显微镜技术辅助解释建立可接受的测定表现。

[0833] 本说明书中提到的所有出版物和专利申请代表了和本发明所属技术领域内的技术人员的水平。所有出版物和专利申请都在此处引用作为参考,就如同每一篇出版物或专利申请被明确和单独地指示被引用作为参考一样。

[0834] 尽管已通过图表和示例对前述发明作了较为详细的描述以便理解清楚,但很显然,可进行某些改变和修饰而不背离所附实施方案的范围。

[0001]

序列表

<110> Fischer, Timothy J.
Malinowski, Douglas P.
Taylor, Adriann J.
Parker, Margaret R.

<120> 用于检测宫颈疾病的方法和组合物

<130> 46143/290269

<150> 60/556,495

<151> 2004-03-24

<160> 90

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 1958

<212> DNA

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

agcagccggc gcggccgcca gcgcggtgta gggggcaggc gcggatcccg ccaccgccc 60
gcgctcggcc cgcgcactcc cggcgccgcc gccgccactg ccgtcgccgc cgcgcgctgc 120
ggggactgga gcgcgcgctc cgcgcgggac aagaccctgg cctcaggccg gaggagccc 180
atcatgccga gggagcgagc ggagcgggat gcgaaggagc gggacacccat gaaggaggac 240
ggcggcgcgagg agttctcggc tcgctccagg aagagggaagg caaacgtgac cgtttttttg 300
caggatccag atgaagaaat ggccaaaatc gacaggacgg cgagggacca gtgtgggagc 360
cagccttggg acaataatgc agtctgtgca gacccctgct ccctgatccc cacacctgac 420
aaagaagatg atgaccgggt ttacccaaac tcaacgtgca agcctcggat tattgcacca 480
tccagaggct ccccgctgcc tgtactgagc tgggcaaata gagagggaag ctggaaaatc 540
atgttaaaaca aggaaaagac atacttaagg gatcagcact ttcttgagca acaccctctt 600
ctgcagccaa aaatgcgagc aattcttctg gatttggttaa tggagggtgtg tgaagtctat 660
aaacttcaca gggagacctt ttacttggca caagatttct ttgaccggtat tatggcgaca 720
caagaaaatg ttgtaaaaac tcttttacag cttattggga ttcatcttt atttattgca 780
gccaaacttg aggaaatcta tctccaaag ttgcaccagt ttgcgtatgt gacagatgga 840
gcttggtcag gagatgaaat tctcaccatg gaattaatga ttatgaaggc ccttaagtgg 900
cgtttaagtc ccttgactat tgtgtcctgg ctgaatgtat acatgcagg tgcataatcta 960
aatgacttac atgaagtgtc actgcgcgag tatccccagc aaatctttat acagattgca 1020
gagctgttgg atctctgtgt cctggatgtt gactgccttg aatttcctta tgggtatactt 1080
gctgcttcgg ccttgatatca tttctcgtca tctgaattga tgcaaaagg ttcagggtat 1140
cagtgggtgc acatagagaa ctgtgtcaag tggatggttc catttgccat ggttataagg 1200
gagacgggga gctcaaaact gaagcacttc aggggcgtcg ctgatgaaga tgcacacaac 1260
atacagaccc acagagacag cttggatttg ctggacaâag cccgagcaaa gaaagccatg 1320
ttgtctgaac aaaatagggc ttctcctctc cccagtgggc tctcaccct gccacagagc 1380
ggtaagaagc agagcagcgg gcgggaaatg gcgtgaccac cccatccttc tccaccaaag 1440
acagttagcg gcctgctcca cgttctcttc tgtctgttgc agcggaggcg tgcgtttgct 1500
tttacagata tctgaatgga agagtgtttc ttccacaaca gaagtatttc tgtggatggc 1560
atcaaacagg gcaaagtgtt ttttattgaa tgcttatagg ttttttttaa ataagtgggt 1620
caagtacacc agccacctcc agacaccagt gcgtgctccc gatgctgcta tggaggtgc 1680
tacttgacct aagggaactc cacaacaaca aaagcttgaa gctgtggagg gccacggtgg 1740
cgtggctctc ctgcaggtg ttctgggctc cgttgtacca agtggagcag gtggttgagg 1800
gcaagcgttg tgcagagccc atagccagct gggcaggggg ctgccctctc cacattatca 1860
gttgacagtg tacaatgect ttgatgaact gttttgtaag tgetgctata tctatccatt 1920
ttttaataaaa gataatactg tttttgagac aaaaaaaa 1958

```

<210> 2

<211> 410

<212> PRT

<213> 人

[0002]

<400> 2

```

Met Pro Arg Glu Arg Arg Glu Arg Asp Ala Lys Glu Arg Asp Thr Met
 1          5          10          15
Lys Glu Asp Gly Gly Ala Glu Phe Ser Ala Arg Ser Arg Lys Arg Lys
 20          25          30
Ala Asn Val Thr Val Phe Leu Gln Asp Pro Asp Glu Glu Met Ala Lys
 35          40          45
Ile Asp Arg Thr Ala Arg Asp Gln Cys Gly Ser Gln Pro Trp Asp Asn
 50          55          60
Asn Ala Val Cys Ala Asp Pro Cys Ser Leu Ile Pro Thr Pro Asp Lys
 65          70          75          80
Glu Asp Asp Asp Arg Val Tyr Pro Asn Ser Thr Cys Lys Pro Arg Ile
 85          90          95
Ile Ala Pro Ser Arg Gly Ser Pro Leu Pro Val Leu Ser Trp Ala Asn
 100         105         110
Arg Glu Glu Val Trp Lys Ile Met Leu Asn Lys Glu Lys Thr Tyr Leu
 115         120         125
Arg Asp Gln His Phe Leu Glu Gln His Pro Leu Leu Gln Pro Lys Met
 130         135         140
Arg Ala Ile Leu Leu Asp Trp Leu Met Glu Val Cys Glu Val Tyr Lys
 145         150         155         160
Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg Tyr
 165         170         175
Met Ala Thr Gln Glu Asn Val Val Lys Thr Leu Leu Gln Leu Ile Gly
 180         185         190
Ile Ser Ser Leu Phe Ile Ala Ala Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Pro Pro
 195         200         205
Lys Leu His Gln Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Gly Asp
 210         215         220
Glu Ile Leu Thr Met Glu Leu Met Ile Met Lys Ala Leu Lys Trp Arg
 225         230         235         240
Leu Ser Pro Leu Thr Ile Val Ser Trp Leu Asn Val Tyr Met Gln Val
 245         250         255
Ala Tyr Leu Asn Asp Leu His Glu Val Leu Leu Pro Gln Tyr Pro Gln
 260         265         270
Gln Ile Phe Ile Gln Ile Ala Glu Leu Leu Asp Leu Cys Val Leu Asp
 275         280         285
Val Asp Cys Leu Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Ser Ala Leu
 290         295         300
Tyr His Phe Ser Ser Ser Glu Leu Met Gln Lys Val Ser Gly Tyr Gln
 305         310         315         320
Trp Cys Asp Ile Glu Asn Cys Val Lys Trp Met Val Pro Phe Ala Met
 325         330         335
Val Ile Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Leu Lys His Phe Arg Gly Val
 340         345         350
Ala Asp Glu Asp Ala His Asn Ile Gln Thr His Arg Asp Ser Leu Asp
 355         360         365
Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ala Lys Lys Ala Met Leu Ser Glu Gln Asn
 370         375         380
Arg Ala Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Pro Gln Ser Gly
 385         390         395         400
Lys Lys Gln Ser Ser Gly Pro Glu Met Ala
 405         410

```

<210> 3

<211> 1787

<212> DNA

<213> 人

<400> 3

```

gtgctcaccg ggcgcggtgc caccggtgc cacagggatg cgaaggagcg ggacaccatg 60
aaggaggacg gcggcgcgga gttctcggtc cgctccagga agaggaaggc aaacgtgacc 120
gtttttttgc aggatccaga tgaagaaatg gccaaaatcg acaggacggc gagggaccag 180
tgtgggagcc agccttgga caataatgca gtctgtgcag acccctgtct cctgatecccc 240
acacctgaca aagaagatga tgaccgggtt tacccaaact caacgtgcaa gcctcggatt 300

```

[0003]

```

attgcaccat ccagaggetc cccgctgcct gtactgagct gggcaaatag agaggaagtc 360
tggaaaatca tgttaaaciaa ggaaaagaca tacttaaggg atcagcactt tcttgagcaa 420
caccctcttc tgcagccaaa aatgcgagca attcttctgg attggttaat ggaggtgtgt 480
gaagtctata aacttcacag ggagaccttt tacttggcac aagatttctt tgaccgggat 540
atggcgacac aagaaaatgt tgtaaaaact cttttacagc ttattgggat ttcattctta 600
tttattgcag ccaaacttga ggaaatctat cctccaaagt tgcaccagtt tgcgtatgtg 660
acagatggag cttgttcagg agatgaaatt ctcaccatgg aattaatgat tatgaagcc 720
cttaagtggc gtttaagtcc cctgactatt gtgtcctggc tgaatgtata catgcaggtt 780
gcatatctaa atgacttaca tgaagtgtca ctgccgcagt atccccagca aatctttata 840
cagattgcag agctgttgga tctctgtgtc ctggatgttg actgccttga atttccttat 900
ggatatactt ctgcttcggc cttgtatcat ttctcgtcat ctgaattgat gcaaaaggtt 960
tcagggtatc agtggtgcga catagagaac tgtgtcaagt ggatggttcc atttgccatg 1020
gttataaggg agacggggag ctcaaaactg aagcacttca ggggcgtcgc tgatgaagat 1080
gcacacaaca tacagaccca cagagacagc ttggatttgc tggacaaagc ccgagcaaag 1140
aaagccatgt tgtctgaaca aaatagggct tctcctctcc ccagtgggct cctcaccctc 1200
ccacagagcg gtaagaagca gagcagcggg ccggaaatgg cgtgaccacc ccatecttct 1260
ccaccaaaga cagttgcgcg cctgctccac gttctcttct gtctgttgca gccggagcgt 1320
gcggttgcct ttacagatat ctgaatggaa gagtgttct tccacaacag aagtatttct 1380
gtggatggca tcaaacaggg caaagtgttt ttattgaat gottataggt tttttttaa 1440
taagtgggtc aagtacacca gccacctcca gaccacgtg cgtgctccc atgctgctat 1500
ggaaggtgct acttgacctt agggactccc acaacaacaa aagcttgaag ctgtggagg 1560
ccacggtggc gtggctctcc tcgcaggtgt tctgggctcc gttgtacca gtggagcagg 1620
tggttgcggg caagcgttgt gcagagcca tagccagctg ggcagggggc tgcctctctc 1680
acattatcag ttgacagtgt acaatgcctt tgatgaactg ttttgtaagt gctgctatat 1740
ctatccattt ttttaataaag ataatactgt ttttgagaca aaaaaaa 1787

```

<210> 4

<211> 395

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

```

Met Lys Glu Asp Gly Gly Ala Glu Phe Ser Ala Arg Ser Arg Lys Arg
1          5          10          15
Lys Ala Asn Val Thr Val Phe Leu Gln Asp Pro Asp Glu Glu Met Ala
20        25        30
Lys Ile Asp Arg Thr Ala Arg Asp Gln Cys Gly Ser Gln Pro Trp Asp
35        40        45
Asn Asn Ala Val Cys Ala Asp Pro Cys Ser Leu Ile Pro Thr Pro Asp
50        55        60
Lys Glu Asp Asp Asp Arg Val Tyr Pro Asn Ser Thr Cys Lys Pro Arg
65        70        75        80
Ile Ile Ala Pro Ser Arg Gly Ser Pro Leu Pro Val Leu Ser Trp Ala
85        90        95
Asn Arg Glu Glu Val Trp Lys Ile Met Leu Asn Lys Glu Lys Thr Tyr
100       105       110
Leu Arg Asp Gln His Phe Leu Glu Gln His Pro Leu Leu Gln Pro Lys
115       120       125
Met Arg Ala Ile Leu Leu Asp Trp Leu Met Glu Val Cys Glu Val Tyr
130       135       140
Lys Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg
145       150       155       160
Tyr Met Ala Thr Gln Glu Asn Val Val Lys Thr Leu Leu Gln Leu Ile
165       170       175
Gly Ile Ser Ser Leu Phe Ile Ala Ala Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Pro
180       185       190
Pro Lys Leu His Gln Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Gly
195       200       205
Asp Glu Ile Leu Thr Met Glu Leu Met Ile Met Lys Ala Leu Lys Trp
210       215       220
Arg Leu Ser Pro Leu Thr Ile Val Ser Trp Leu Asn Val Tyr Met Gln
225       230       235       240
Val Ala Tyr Leu Asn Asp Leu His Glu Val Leu Leu Pro Gln Tyr Pro
245       250       255
Gln Gln Ile Phe Ile Gln Ile Ala Glu Leu Leu Asp Leu Cys Val Leu
260       265       270

```

[0004]

```

Asp Val Asp Cys Leu Glu Phe Pro Tyr Gly Ile Leu Ala Ala Ser Ala
    275                280                285
Leu Tyr His Phe Ser Ser Ser Glu Leu Met Gln Lys Val Ser Gly Tyr
    290                295                300
Gln Trp Cys Asp Ile Glu Asn Cys Val Lys Trp Met Val Pro Phe Ala
    305                310                315                320
Met Val Ile Arg Glu Thr Gly Ser Ser Lys Leu Lys His Phe Arg Gly
    325                330                335
Val Ala Asp Glu Asp Ala His Asn Ile Gln Thr His Arg Asp Ser Leu
    340                345                350
Asp Leu Leu Asp Lys Ala Arg Ala Lys Lys Ala Met Leu Ser Glu Gln
    355                360                365
Asn Arg Ala Ser Pro Leu Pro Ser Gly Leu Leu Thr Pro Pro Gln Ser
    370                375                380
Gly Lys Lys Gln Ser Ser Gly Pro Glu Met Ala
    385                390                395

```

<210> 5

<211> 2748

<212> DNA

<213> 人

<400> 5

```

agcgggtgcg gggcggggacc ggcccgggcct atatattggg ttggcgccgg cgccagctga 60
gccgagcggg agctgggtctg gcgaggtttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
aagtagccgt ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacggaat cccccaaga 180
agcccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccag gatgtcaaaa aaagaagaga 240
ggagggtcacc aagaaacatc agtatgaaat taggaattgt tggccacctg tattatctgg 300
ggggatcagt ccttgcatca tcattgaaac acctcacaaa gaaataggaa caagtgattt 360
ctccagattt acaaattaca gatttaaaaa tctttttatt aatccttcac ctttgctga 420
tttaagctgg ggatgttcaa aagaagtctg gctaaacatg ttaaaaaagg agagcagata 480
tgttcatgac aaacattttg aagttctgca ttctgacttg gaaccacaga tgagggtccat 540
acttctagac tggcttttag aggtatgtga agtatacaca ctccataggg aaacatttta 600
tcttgacaaa gacttttttg atagatttat gttgacacaa aaggatataa ataaaaatat 660
gcttcaactc attggaatta cctcattatt cattgcttcc aaacttgagg aaatctatgc 720
tcctaaactc caagagtttg cttacgtcac tgatgggtgct tgcagtgaag aggatatctt 780
aaggatggaa ctcattatat taaaggcttt aaaatgggaa ctttgctcctg taacaatcat 840
ctcctggcta aatctctttc tccaagttga tgctcttaaa gatgctccta aagttcttct 900
acctcagtat tctcaggaaa cattcattca aatagctcag cttttagatc tgtgtattct 960
agccattgat tcattagagt tccagtacag aatactgact gctgctgcct tgtgccattt 1020
tacctccatt gaagtgggta agaaagcctc aggtttggag tgggacagta ttccagaatg 1080
tgtagattgg atggtacctt ttgtcaatgt agtaaaaagt actagtccag tgaagctgaa 1140
gacttttaag aagattccta tggagacag acataatatc cagacacata caaactattt 1200
ggctatgctg gaggaagtaa attacataaa caccttcaga aaagggggac agttgtcacc 1260
agtgctgcaat ggaggcatta tgacaccacc gaagagcact gaaaaaccac caggaaaaca 1320
ctaaagaaga taactaagca aacaagttgg aattcaccaa gattgggtag aactgggtatc 1380
actgaactac taaagtttta cagaaagtag tgctgtgatt gattgcccta gccaatcac 1440
aagttacact gccattctga ttttaaaact tacaattggc actaaagaat acatttaatt 1500
atttcctatg ttagctgtta aagaaacage aggacttggt taaaaagatg tcttcattcc 1560
caaggttact ggatagaagc caaccacagt ctataccata gcaatgtttt tcctttaatc 1620
cagtgttact gtgtttatct tgataaacta ggaattttgt cactggagtt ttggactgga 1680
taagtgtctac cttaaagggg atactaagtg atacagtact ttgaatctag ttgttagatt 1740
ctcaaaattc ctacactctt gactagtga atttggttct tgaaaattaa atttaaaact 1800
gtttacaaag gtttagtttt gtaataaggt gactaattta tctatagctg ctatagcaag 1860
ctattataaa acttgaattt ctacaaatgg tgaattttta tgttttttaa actagtttat 1920
ttgccttgcc ataacacatt ttttaactaa taaggcttag atgaacatgg tgttcaacct 1980
gtgctctaaa cagtgggagt accaaagaaa ttataaacia gataaatgct gtggctcctt 2040
cctaactggg gctttcttga catgtagggt gcttggtaat aacctttttg tatatcacia 2100
tttgggtgaa aaacttaagt accctttcaa actatttata tgaggaagtc actttactac 2160
tctaagatat cctaaggaa tttttttttt taatttagtg tgactaaggc tttatttatg 2220
tttgtgaaac tgttaagggt ctttctaaat tctccatttg tgagataagg acagtgtcaa 2280
agtgataaag cttaacactt gacctaaact tctattttct taaggaagaa gattattaaa 2340
tatatactga tctctagaaa tctatttatt aaaaaagac atgaaaactt gctgtacata 2400
ggctagctat ttctaaatat tttaaattag cttttctaaa aaaaaaatcc agcctcataa 2460
agtagattag aaaactagat tgctagttaa ttttgttatc agatatgtga atctcttctc 2520

```

[0005]

```

cctttgaaga aactatacat ttattgttac ggtatgaagt cttctgtata gtttggtttt 2580
aaactaatat ttgtttcagt attttgtctg aaaagaaaac accactaatt gtgtacatat 2640
gtattatata aacttaacct ttttaactctg tttattttta gccattggt taaaaataaa 2700
aagttaaaaa aatttaactg cttaaaagta aaaaaaaaaa aaaaaaaa 2748

```

<210> 6
 <211> 404
 <212> PRT
 <213> 人

```

<400> 6
Met Ser Arg Arg Ser Ser Arg Leu Gln Ala Lys Gln Gln Pro Gln Pro
1      5      10      15
Ser Gln Thr Glu Ser Pro Gln Glu Ala Gln Ile Ile Gln Ala Lys Lys
20     25     30
Arg Lys Thr Thr Gln Asp Val Lys Lys Arg Arg Glu Glu Val Thr Lys
35     40     45
Lys His Gln Tyr Glu Ile Arg Asn Cys Trp Pro Pro Val Leu Ser Gly
50     55     60
Gly Ile Ser Pro Cys Ile Ile Glu Thr Pro His Lys Glu Ile Gly
65     70     75     80
Thr Ser Asp Phe Ser Arg Phe Thr Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Leu Phe
85     90     95
Ile Asn Pro Ser Pro Leu Pro Asp Leu Ser Trp Gly Cys Ser Lys Glu
100    105    110
Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr Val His Asp Lys
115    120    125
His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln Met Arg Ser Ile
130    135    140
Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr Thr Leu His Arg
145    150    155    160
Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg Phe Met Leu Thr
165    170    175
Gln Lys Asp Ile Asn Lys Asn Met Leu Gln Leu Ile Gly Ile Thr Ser
180    185    190
Leu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Glu Ile Tyr Ala Pro Lys Leu Gln
195    200    205
Glu Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu Glu Asp Ile Leu
210    215    220
Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp Glu Leu Cys Pro
225    230    235    240
Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln Val Asp Ala Leu
245    250    255
Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser Gln Glu Thr Phe
260    265    270
Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu Ala Ile Asp Ser
275    280    285
Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala Leu Cys His Phe
290    295    300
Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu Glu Trp Asp Ser
305    310    315    320
Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val Asn Val Val Lys
325    330    335
Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys Ile Pro Met Glu
340    345    350
Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu Ala Met Leu Glu
355    360    365
Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly Gln Leu Ser Pro
370    375    380
Val Cys Asn Gly Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser Thr Glu Lys Pro
385    390    395    400
Pro Gly Lys His

```

<210> 7

[0006]

<211> 2613

<212> DNA

<213> 人

<400> 7

```

agcgggtgcg gggcgggacc ggccccggcct atatattggg ttggcgccgg cgccagctga 60
gccgagcggg agctgggtctg gcgagggttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
aagtagccgt ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacggaat ccccccaaga 180
agcccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccag gatgtcaaaa aaagaagaga 240
ggaggtcacc aagaaacatc agtatgaaat taggaattgt tggccacctg tattatctgg 300
ggggatcagt ccttgcattha tcattgaaac acctcacaaa gaaataggaa caagtgattt 360
ctccagattt acaaattaca gatttaaaaa tctttttatt aatccttcac ctttgcttga 420
tttaagctgg ggatgttcaa aagaagtctg gctaacaatg ttaaaaaagg agagcagata 480
tgttcctgac aaacattttg aagttctgca ttctgacttg gaaccacaga tgagggtccat 540
acttctagac tggcttttag aggtatgtga agtatacaca cttcataggg aaacatttta 600
tcttgcttac gtcactgatg gtgcttgcat tgaaggagg atcttaagga tggaaactcat 660
tatattaaag gctttaaaat gggaaacttg tccgtgaaca atcatctcct ggctaaatct 720
ctttctccaa gttgatgctc ttaaagatgc tcttaaagtt cttctacctc agtattctca 780
ggaaacattc attcaaatag ctcagctttt agatctgtgt attctagcca ttgattccat 840
agagttccag tacagaatac tgactgctgc tgccttgctc cattttacct ccattgaagt 900
ggttaagaaa gcctcaggtt tggagtggga cagtatttca gaatgtgtag attggatggg 960
accttttctc aatgtagtaa aaagtactag tccagtgaag ctgaagactt ttaagaagat 1020
tccataggaa gacagacata atatccagac acatacaaac tatttggcta tgctggagga 1080
agtaaattac ataaacacct tcagaaaagg gggacagttg tcaccagtggt gcaatggagg 1140
cattatgaca ccaccgaaga gcactgaaaa accaccagga aaacactaaa gaagataact 1200
aagcaaacaa gttggaattc accaagattg ggtagaactg gtatcactga actactaaag 1260
ttttacagaa agtagtgctg tgattgattg ccctagecaa ttcacaagtt acactgccat 1320
tctgatttta aaacttacaa ttggcactaa agaatacatt taattatttc ctatgttagc 1380
tgttaaagaa acagcaggac ttgtttacaa agatgtcttc attcccaagg ttactggata 1440
gaagccaacc acagtcctata ccatagcaat gtttttccct taatccagtg ttactgtgtt 1500
tatcttgata aactaggaat ttgtcactg agtttttgga ctggataagt gctaccttaa 1560
agggatatac aagtgatata gtactttgaa tctagttgtt agattctcaa aattcctaca 1620
ctcttgacta gtgcaatttg gttcttgaaa attaaattta aacttgttta caaaggttta 1680
gttttgtaat aaggtgacta atttatctat agctgctata gcaagctatt ataaaacttg 1740
aatttctaca aatggtgaaa tttaatgttt tttaaactag tttatttgcc ttgccataac 1800
acatttttta actaataagg cttagatgaa catggtgttc aacctgtgct ctaaacagtg 1860
ggagtaccaa agaaattata aacaagataa atgctgtggc tcttccctaa ctggggcttt 1920
cttgacatgt aggttgcttg gtaataacct ttttgatat cacaatttgg gtgaaaaact 1980
taagtacctt ttcaaactat ttatagagg aagtcacttt actactctaa gatatcccta 2040
aggaattttt ttttttaatt tagtgtgact aaggctttat ttatgtttgt gaaactgtta 2100
aggtcctttc taaattcttc cattgtgaga taaggacagt gtcaaagtga taaagcttaa 2160
cacttgacct aaacttctat tttcttaagg aagaagagta ttaaatatat actgactcct 2220
agaaatctat ttattaaaaa aagacatgaa aacttgctgt acataggcta gctatttcta 2280
aatattttta attagctttt ctaaaaaaa aatccagcct cataaagtag attagaaaac 2340
tagattgcta gtttattttg ttatcagata tgtgaatctc ttctcccttt gaagaaacta 2400
tacatttatt gttacgggat gaagtcttct gtatagtttg tttttaaact aatatttgtt 2460
tcagtatttt gtctgaaaag aaaacaccac taattgtgta catatgtatt atataaactt 2520
aaccttttaa tactgtttat ttttagccca ttgtttaaaa aataaaagtt aaaaaaattt 2580
aactgcttaa aagtaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 2613

```

<210> 8

<211> 359

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

```

Met Ser Arg Arg Ser Ser Arg Leu Gln Ala Lys Gln Gln Pro Gln Pro
1      5      10      15
Ser Gln Thr Glu Ser Pro Gln Glu Ala Gln Ile Ile Gln Ala Lys Lys
20      25      30
Arg Lys Thr Thr Gln Asp Val Lys Lys Arg Arg Glu Glu Val Thr Lys
35      40      45
Lys His Gln Tyr Glu Ile Arg Asn Cys Trp Pro Pro Val Leu Ser Gly
50      55      60
Gly Ile Ser Pro Cys Ile Ile Glu Thr Pro His Lys Glu Ile Gly
65      70      75      80

```

[0007]

Thr Ser Asp Phe Ser Arg Phe Thr Asn Tyr Arg Phe Lys Asn Leu Phe
 85 90 95
 Ile Asn Pro Ser Pro Leu Pro Asp Leu Ser Trp Gly Cys Ser Lys Glu
 100 105 110
 Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr Val His Asp Lys
 115 120 125
 His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln Met Arg Ser Ile
 130 135 140
 Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr Thr Leu His Arg
 145 150 155 160
 Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu Glu
 165 170 175
 Asp Ile Leu Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp Glu
 180 185 190
 Leu Cys Pro Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln Val
 195 200 205
 Asp Ala Leu Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser Gln
 210 215 220
 Glu Thr Phe Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu Ala
 225 230 235 240
 Ile Asp Ser Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala Leu
 245 250 255
 Cys His Phe Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu Glu
 260 265 270
 Trp Asp Ser Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val Asn
 275 280 285
 Val Val Lys Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys Ile
 290 295 300
 Pro Met Glu Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu Ala
 305 310 315 320
 Met Leu Glu Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly Gln
 325 330 335
 Leu Ser Pro Val Cys Asn Gly Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser Thr
 340 345 350
 Glu Lys Pro Pro Gly Lys His
 355

<210> 9

<211> 2536

<212> DNA

<213> 人

<400> 9

agcgggtgcg gggcgggacc ggcccggcct atatatattggg ttggcgccgg cgccagctga 60
 gccgagcggg agctggtctg gcgaggtttt atacacctga aagaagagaa tgtcaagacg 120
 aagtagccgt ttacaagcta agcagcagcc ccagcccagc cagacggaat ccccccaaga 180
 agcccagata atccaggcca agaagaggaa aactaccag gatgtcaaaa gaagtctggc 240
 taaacatggt aaaaaaggag agcagatatg ttcatgacaa acattttgaa gttctgcatt 300
 ctgacttgga accacagatg aggtccatac ttctagactg gcttttagag gtatgtgaag 360
 tatacacact tcatagggaa acattttatc ttgcacaaga cttttttgat agatttatgt 420
 tgacacaaaa ggatataaat aaaaatatgc ttcaactcat tggaattacc tcattattca 480
 ttgcttccaa acttgaggaa atctatgctc ctaaactcca agagtttgct tacgtcactg 540
 atggtgcttg cagtgaagag gatattctaa ggatggaact cattatatta aaggctttaa 600
 aatgggaact ttgtcctgta acaatcatct cctggctaaa tctctttctc caagttgatg 660
 ctcttaaaga tgctcctaaa gttcttctac ctacgtattc tcaggaaaca ttcattcaaa 720

 tagctcagct tttagatctg tgtattctag ccattgatcc attagagttc cagtacagaa 780
 tactgactgc tgctgccttg tgccatttta cctccattga agtggttaag aaagcctcag 840
 gtttggagtg ggacagtatt tcagaatgtg tagattggat ggtacctttt gtcaatgtag 900
 taaaaagtac tagtccagtg aagctgaaga cttttaagaa gattcctatg gaagacagac 960
 ataatatcca gacacataca aactatttgg ctatgctgga ggaagtaaat tacataaaca 1020
 ccttcagaaa agggggacag ttgtcaccag tgtgcaatgg aggcattatg acaccaccga 1080
 agagcactga aaaaccacca ggaaacact aaagaagata actaagcaaa caagttggaa 1140
 ttcaccaaga ttgggtagaa ctggtatcac tgaactacta aagttttaca gaaagtagtg 1200
 ctgtgattga ttgccctagc caattcacia gttacactgc cattctgatt ttaaaactta 1260

[0008]

```

caattggcac taaagaatcac atttaatttat ttcctatggt agctgttaaa gaaacagcag 1320
gacttggttta caaagatgtc ttcattccca aggttactgg atagaagcca accacagtct 1380
ataccatagc aatgtttttc ctttaatcca gtgttactgt gtttatcttg ataaactagg 1440
aattttgtca ctggagtttt ggactggata agtgcctacc taaaggggat actaagtgat 1500
acagtaacttt gaatctagtt gtttagattct caaaattcct acactcttga ctagtgcagt 1560
ttggttcttg aaaattaaat tttaacttgt ttacaaaggt ttagttttgt aataaggtga 1620
ctaattttatc tatagctgct atagcaagct attataaaac ttgaatttct acaaatgggtg 1680
aaatttaattg ttttttaaac tagtttattt gccttgccat aacacatttt ttaactaata 1740
aggcttagat gaacatgggtg ttcaacctgt gctctaaaca gtgggagtag caaagaaatt 1800
ataaacaaga taaatgctgt ggctccttcc taactggggc tttcttgaca tgtaggttgc 1860
ttggtaataa cctttttgta tatcacaatt tgggtgaaaa acttaagtac cctttcaaac 1920
tatttatatg aggaagtcac tttaactctc taagatatcc ctaaggaatt ttttttttta 1980
atattagtgtg actaaggctt tatttatggt tgtgaaactg ttaaggctct ttctaaattc 2040
ctccattgtg agataaggac agtgtcaaag tgataagct taacacttga cctaaacttc 2100
tattttctta aggaagaaga gtattaaata tatactgact cctagaaatc tatttattaa 2160
aaaaagacat gaaaacttgc tgtacatagg ctactatatt ctaaatatatt taaattagct 2220
tttctaaaaa aaaaatccag cctcataaag tagattagaa aactagattg ctagtattat 2280
ttgttatcag atatgtgaat ctcttctccc ttgaagaaa ctatacattt attgttacgg 2340
tatgaagtct tctgtatagt ttgtttttta actaatattt gtttcagtat ttgtctgaa 2400
aagaaaacac cactaattgt gtacatatgt attatataaa cttaaccttt taatactggt 2460
tatttttagc ccattgttta aaaaataaaa gttaaaaaaa tttaactgct taaaagtaaa 2520
aaaaaaaaa aaaaaa 2536

```

<210> 10

<211> 296

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

```

Met Ser Lys Glu Val Trp Leu Asn Met Leu Lys Lys Glu Ser Arg Tyr
1 5 10 15
Val His Asp Lys His Phe Glu Val Leu His Ser Asp Leu Glu Pro Gln
20 25 30
Met Arg Ser Ile Leu Leu Asp Trp Leu Leu Glu Val Cys Glu Val Tyr
35 40 45
Thr Leu His Arg Glu Thr Phe Tyr Leu Ala Gln Asp Phe Phe Asp Arg
50 55 60
Phe Met Leu Thr Gln Lys Asp Ile Asn Lys Asn Met Leu Gln Leu Ile
65 70 75 80
Gly Ile Thr Ser Leu Phe Ile Ala Ser Lys Leu Glu Glu Ile Tyr Ala
85 90 95
Pro Lys Leu Gln Glu Phe Ala Tyr Val Thr Asp Gly Ala Cys Ser Glu
100 105 110
Glu Asp Ile Leu Arg Met Glu Leu Ile Ile Leu Lys Ala Leu Lys Trp
115 120 125
Glu Leu Cys Pro Val Thr Ile Ile Ser Trp Leu Asn Leu Phe Leu Gln
130 135 140
Val Asp Ala Leu Lys Asp Ala Pro Lys Val Leu Leu Pro Gln Tyr Ser
145 150 155 160
Gln Glu Thr Phe Ile Gln Ile Ala Gln Leu Leu Asp Leu Cys Ile Leu
165 170 175
Ala Ile Asp Ser Leu Glu Phe Gln Tyr Arg Ile Leu Thr Ala Ala Ala
180 185 190
Leu Cys His Phe Thr Ser Ile Glu Val Val Lys Lys Ala Ser Gly Leu
195 200 205
Glu Trp Asp Ser Ile Ser Glu Cys Val Asp Trp Met Val Pro Phe Val
210 215 220
Asn Val Val Lys Ser Thr Ser Pro Val Lys Leu Lys Thr Phe Lys Lys
225 230 235 240
Ile Pro Met Glu Asp Arg His Asn Ile Gln Thr His Thr Asn Tyr Leu
245 250 255
Ala Met Leu Glu Glu Val Asn Tyr Ile Asn Thr Phe Arg Lys Gly Gly
260 265 270
Gln Leu Ser Pro Val Cys Asn Gly Ile Met Thr Pro Pro Lys Ser
275 280 285
Thr Glu Lys Pro Pro Gly Lys His

```

[0009]

290

295

<210> 11
 <211> 3453
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 11

```

acttttccgcg cgaaacctgg ttgttgctgt agtggcggag aggatcgtgg tactgctatg 60
gcggaatcat cggaatcett caccatggca tccagcccg ccagcgtcg gcgaggcaat 120
gacctcttca cctccagccc tggccgaagc tcccgcgta ctgatgccct caccctccagc 180
cctggccgtg accttccacc atttgaggat gaytccgagg ggctcctagg cacagagggg 240
ccccctggagg aagaagagga tggagaggag ctcatgtgg atggcatgga aagggactac 300
cgcgccatcc cagagctgga cgcctatgag gccgaggac tggctctgga tgatgaggac 360
gtagaggagc tgacggccag tcagaggag gcagcagagc gggccatgcg gcagcgtgac 420
cgggaggctg gccggggcct gggccgcag cgcgtgggc tctgtatga cagcgatgag 480
gaggacgagg agcgcctgc ccgcaagcgc gccaggtgg agcgggccac ggaggacggc 540
gaggaggacg aggagatgat cgagagcadc gagaacctgg aggatctcaa aggccactct 600
gtgcgcgagt gggtagcat gggggcccc cggctggaga tccaccaccg cttcaagaac 660
ttcctgcgca ctacgctcga cagccacggc cacaacgtct tcaaggagcg catcagcgac 720
atgtgcaaa agaacctga gagcctgggt gtgaactatg aggacttggc agccaggag 780
cactgctgg cctacttcc gctgaggca ccggcggagc tgctgcagat ctttgatgag 840
gctgccctgg aggtggtact ggccatgtac ccaagtcag accgcacac caaccacatc 900
catgtccgca tctccacct gcctctgggt gaggagctgc gctcgtgag gcagctgcat 960
ctgaaccagc tgatccgcac cagtggggtg gtgaccagct gcactggcgt cctgccccag 1020
ctcagcatgg tcaagtacaa ctgcaacaag tgcaatttcg tctgggtcc tttctgccag 1080
tcccagaacc aggaggtgaa accaggctcc tgtcctgagt gccagtggc cgggcccttt 1140
gaggtcaaca tggaggagac catctatcag aactaccagc gtatccgaat ccaggagagt 1200
ccaggcaaa tgggcgctgg ccggctgccc cgtcccaagg acgccattct cctcgcat 1260
ctgggtggaca gctgcaagcc aggagacgag atagagctga ctggcatcta tcacaacaac 1320
tatgatggct cctcaacac tgccaatggc ttcctgtct ttgccactgt catectagcc 1380
aaccacgtgg ccaagaagga caacaagggt gctgtagggg aactgaccga tgaagatgtg 1440
aagatgatca ctagcctct caagatcag cagatcggag agaagatctt tgccagcat 1500
gctccttcca tctatggtca tgaagacac aagagaggcc tggctctggc cctgttcgga 1560
ggggagccca aaaacccagg tggcaagcac aaggtacgtg gtgatatcaa cgtgctcttg 1620
tgccgagacc ctggcacagc gaagtccgag tttctcaagt atattgagaa agtgtccagc 1680
cgagccatct tcaccactgg ccaggggcg tccgctgtgg gcctcacgyc gtatgtccag 1740
cggcaccctg tcagcaggga gtggacctt gaggtgggg ccctggttct ggctgaccga 1800
ggagtgtgtc tcattgatga atttgacaag atgaatgacc aggacagaac cagcatccat 1860
gaggccatgg agcaacagag catctccatc tcgaaggctg gcacgtcac ctccctgcag 1920
gctcgtgca cggteattgc tgcgccaac cccataggag ggcgtacga cccctcgtg 1980
actttctctg agaacgtgga cctcacagag cccatcatct cactgttga catcctgtgt 2040
gtgggtgagg acaccgtgga ccagtcacg gacgagatgc tggcccgctt cgtgggtggc 2100
agccacgtca gacaccacc cagcaacaag gaggaggagg ggctggccaa tggcagcgt 2160
gctgagcccc ccattgccc cagctatggc tgggagcccc tgcccaggga ggctcgaag 2220
aagtacatca tctacgccc gtagagggtc caccggaagc tcaaccagat ggaccaggac 2280
aagggtggca agatgtacag tgacctgagg aaagaatcta tggcgacagg cagcatcccc 2340
attacggtgc ggcacatcga gtccatgatc cgcattggcg aggccacgc gcgcacccat 2400
ctgcgggact atgtgatcga agacgacgtc aacatggcca tccgctgat gctggagagc 2460
ttcatagaca cacagaagtt cagcgtcatg cgcagcatgc gcaagacttt tgcccgtac 2520
ctttcattcc ggctgacaa caatgagctg ttgctctca tactgaagca gttagtggca 2580
gagcagggtg catatcagcg caaccgcttt ggggccagc aggacactat tgaggtccct 2640
gagaaggact tggtagataa ggctcgtcag atcaacatcc acaacctctc tgcattttat 2700
gacagtgagc tcttcaggat gaacaagtcc agccacgacc tgaaaaggaa aatgatcctg 2760
cagcagttct gaggccctat gccatccata aggtatcctt gggattctgg tttgggtgg 2820
tcagtgcctt cgtgtcttta tggacacaaa accagagcac ttgatgaact cggggtacta 2880
gggtcagggc ttatagcagg atgtctggct gcacctggca tgactgtttg tttctccaa 2940
cctgctttgt gcttctcacc tttgggtgg atgecttgc agtgtgtctt acttgggtgc 3000
tgaacatctt gccacctcc agtgctttgt ctccactcag taccttggat cagagctgct 3060
gagttcagga tgcctgcgtg tggtttaggt gttagccttc ttacatggat gtcaggagag 3120
ctgetgccct cttggcgtga gttgcgtatt caggtgctt ttgctgctt tggccagaga 3180
gctgagttgaa gatgtttgta atcgttttca gtctcctgca ggtttctgtg cccctgtggt 3240
ggaaggggc acgacagtc cagcgacgc tctgggctc ctagtcgca ggggtgggag 3300
gtgagtcagc cggattatcc actgccaca gttatcagct gccattgtct cctgtctgtt 3360
tccccactct cttatttgtg cattcgggtt ggtttctgta gttttaattt ttaataaagt 3420

```

[0010]

tgaataaaat ataaaaaaaa aaaaaaaaaa aaa 3453

<210> 12
 <211> 904
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12
 Met Ala Glu Ser Ser Glu Ser Phe Thr Met Ala Ser Ser Pro Ala Gln
 1 5 10 15
 Arg Arg Arg Gly Asn Asp Pro Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Ser Ser
 20 25 30
 Arg Arg Thr Asp Ala Leu Thr Ser Ser Pro Gly Arg Asp Leu Pro Pro
 35 40 45
 Phe Glu Asp Glu Ser Glu Gly Leu Leu Gly Thr Glu Gly Pro Leu Glu
 50 55 60
 Glu Glu Glu Asp Gly Glu Glu Leu Ile Gly Asp Gly Met Glu Arg Asp
 65 70 75 80
 Tyr Arg Ala Ile Pro Glu Leu Asp Ala Tyr Glu Ala Glu Gly Leu Ala
 85 90 95
 Leu Asp Asp Glu Asp Val Glu Glu Leu Thr Ala Ser Gln Arg Glu Ala
 100 105 110
 Ala Glu Arg Ala Met Arg Gln Arg Asp Arg Glu Ala Gly Arg Gly Leu
 115 120 125
 Gly Arg Met Arg Arg Gly Leu Leu Tyr Asp Ser Asp Glu Glu Asp Glu
 130 135 140
 Glu Arg Pro Ala Arg Lys Arg Arg Gln Val Glu Arg Ala Thr Glu Asp
 145 150 155 160
 Gly Glu Glu Asp Glu Glu Met Ile Glu Ser Ile Glu Asn Leu Glu Asp
 165 170 175
 Leu Lys Gly His Ser Val Arg Glu Trp Val Ser Met Ala Gly Pro Arg
 180 185 190
 Leu Glu Ile His His Arg Phe Lys Asn Phe Leu Arg Thr His Val Asp
 195 200 205
 Ser His Gly His Asn Val Phe Lys Glu Arg Ile Ser Asp Met Cys Lys
 210 215 220
 Glu Asn Arg Glu Ser Leu Val Val Asn Tyr Glu Asp Leu Ala Ala Arg
 225 230 235 240
 Glu His Val Leu Ala Tyr Phe Leu Pro Glu Ala Pro Ala Glu Leu Leu
 245 250 255
 Gln Ile Phe Asp Glu Ala Ala Leu Glu Val Val Leu Ala Met Tyr Pro
 260 265 270
 Lys Tyr Asp Arg Ile Thr Asn His Ile His Val Arg Ile Ser His Leu
 275 280 285
 Pro Leu Val Glu Glu Leu Arg Ser Leu Arg Gln Leu His Leu Asn Gln
 290 295 300
 Leu Ile Arg Thr Ser Gly Val Val Thr Ser Cys Thr Gly Val Leu Pro
 305 310 315 320
 Gln Leu Ser Met Val Lys Tyr Asn Cys Asn Lys Cys Asn Phe Val Leu
 325 330 335
 Gly Pro Phe Cys Glu Ser Gln Asn Gln Glu Val Lys Pro Gly Ser Cys
 340 345 350
 Pro Glu Cys Gln Ser Ala Gly Pro Phe Glu Val Asn Met Glu Glu Thr
 355 360 365
 Ile Tyr Gln Asn Tyr Gln Arg Ile Arg Ile Gln Glu Ser Pro Gly Lys
 370 375 380
 Val Ala Ala Gly Arg Leu Pro Arg Ser Lys Asp Ala Ile Leu Leu Ala
 385 390 395 400

Asp Leu Val Asp Ser Cys Lys Pro Gly Asp Glu Ile Glu Leu Thr Gly
 405 410 415
 Ile Tyr His Asn Asn Tyr Asp Gly Ser Leu Asn Thr Ala Asn Gly Phe
 420 425 430
 Pro Val Phe Ala Thr Val Ile Leu Ala Asn His Val Ala Lys Lys Asp
 435 440 445
 Asn Lys Val Ala Val Gly Glu Leu Thr Asp Glu Asp Val Lys Met Ile

[0011]

450	455	460
Thr Ser Leu Ser Lys Asp Gln Gln Ile Gly Glu Lys Ile Phe Ala Ser		
465	470	475
Ile Ala Pro Ser Ile Tyr Gly His Glu Asp Ile Lys Arg Gly Leu Ala		480
	485	490
Leu Ala Leu Phe Gly Gly Glu Pro Lys Asn Pro Gly Gly Lys His Lys		495
	500	505
Val Arg Gly Asp Ile Asn Val Leu Leu Cys Gly Asp Pro Gly Thr Ala		510
	515	520
Lys Ser Gln Phe Leu Lys Tyr Ile Glu Lys Val Ser Ser Arg Ala Ile		525
	530	535
Phe Thr Thr Gly Gln Gly Ala Ser Ala Val Gly Leu Thr Ala Tyr Val		540
545	550	555
Gln Arg His Pro Val Ser Arg Glu Trp Thr Leu Glu Ala Gly Ala Leu		560
	565	570
Val Leu Ala Asp Arg Gly Val Cys Leu Ile Asp Glu Phe Asp Lys Met		575
	580	585
Asn Asp Gln Asp Arg Thr Ser Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln Ser		590
	595	600
Ile Ser Ile Ser Lys Ala Gly Ile Val Thr Ser Leu Gln Ala Arg Cys		605
	610	615
Thr Val Ile Ala Ala Ala Asn Pro Ile Gly Gly Arg Tyr Asp Pro Ser		620
625	630	635
Leu Thr Phe Ser Glu Asn Val Asp Leu Thr Glu Pro Ile Ile Ser Arg		640
	645	650
Phe Asp Ile Leu Cys Val Val Arg Asp Thr Val Asp Pro Val Gln Asp		655
	660	665
Glu Met Leu Ala Arg Phe Val Val Gly Ser His Val Arg His His Pro		670
	675	680
Ser Asn Lys Glu Glu Glu Gly Leu Ala Asn Gly Ser Ala Ala Glu Pro		685
	690	695
Ala Met Pro Asn Thr Tyr Gly Val Glu Pro Leu Pro Gln Glu Val Leu		700
705	710	715
Lys Lys Tyr Ile Ile Tyr Ala Lys Glu Arg Val His Pro Lys Leu Asn		720
	725	730
Gln Met Asp Gln Asp Lys Val Ala Lys Met Tyr Ser Asp Leu Arg Lys		735
	740	745
Glu Ser Met Ala Thr Gly Ser Ile Pro Ile Thr Val Arg His Ile Glu		750
	755	760
Ser Met Ile Arg Met Ala Glu Ala His Ala Arg Ile His Leu Arg Asp		765
	770	775
Tyr Val Ile Glu Asp Asp Val Asn Met Ala Ile Arg Val Met Leu Glu		780
785	790	795
Ser Phe Ile Asp Thr Gln Lys Phe Ser Val Met Arg Ser Met Arg Lys		800
	805	810
Thr Phe Ala Arg Tyr Leu Ser Phe Arg Arg Asp Asn Asn Glu Leu Leu		815
	820	825
Leu Phe Ile Leu Lys Gln Leu Val Ala Glu Gln Val Thr Tyr Gln Arg		830
	835	840
Asn Arg Phe Gly Ala Gln Gln Asp Thr Ile Glu Val Pro Glu Lys Asp		845
	850	855
Leu Val Asp Lys Ala Arg Gln Ile Asn Ile His Asn Leu Ser Ala Phe		860
865	870	875
Tyr Asp Ser Glu Leu Phe Arg Met Asn Lys Phe Ser His Asp Leu Lys		880
	885	890
Arg Lys Met Ile Leu Gln Gln Phe		895
	900	

<210> 13
 <211> 2821
 <212> DNA
 <213> 人

 <400> 13

```

cgccccctcc cagcccccaag ggtctaggat acagtctttg tagatgagcg ggtccccctt 60
ggaggacaga atgaagaatt gggaaatcat ggccgttctg gagagtagac aagaagacgg 120
cgaaagtccg gcctgccccg cectgcggcc ccggaacaaa agaacgcgtg tgcgctggcc 180
ctttaagagc gattctcttc cgcccgccgc agctcggacc gcgggaaacc cggcgccctg 240
actaccocgc ccggagatcc ccttccgacg ccgcacccgc ctcccgccta ctcatcttag 300
gcccgcacgg tgattggctt gcggctagcg ggaggtgaag aaggccgcct tgtccgattg 360
gcccgcacgc agtggcgccg gtcacgtggg gggcgacgtt tcgcgccaat ttcggttggc 420
cgcccgacgt ccacccgcgc gagattctca gcttcccag gagcaagacc tctgagccc 480
ccaagcgccg ccgcacggcc ctgggcagcg atggcactga aggactacgc gctagagaag 540
gaaaaggtta agaagttctt acaagagttc taccaggatg atgaactcgg gaagaagcag 600
ttcaagtatg ggaaccagtt ggttcggctg gctcatcggg aacagggtgg tctgtatgtg 660
gacctggacg acgtagccga ggatgacccc gagtgggtgg actcaatttg tgagaatgcc 720
aggcgctacg cgaagctctt tgctgatgcc gtacaagagc tgctgcctca gtacaaggag 780
agggaaagtg taaataaaga tgtcctggac gtttacattg agcatcggct aatgatggag 840
cagcggagtc gggaccctgg gatggtccga agccccaga accagtaccc tgctgaactc 900
atgcgcagat ttgagctgta ttttcaaggc cctagcagca acaagcctcg tgtgatccgg 960
gaagtgcggg ctgactctgt ggggaagllg gtaactgtgc gtggaatcgt cactcgtgtc 1020
tctgaagtca aacccaagat ggtggtggcc acttacactt gtgaccagtg tggggcagag 1080
acctaccagc cgatccagtc tcccactttc atgcctctga tcatgtgccc aagccaggag 1140
tgccaaacca accgctcagg agggcggtcg tatctgcaga cacggggctc cagattcatc 1200
aaattccagg agatgaagat gcaagaacat agtgatcagg tgccctgtgg aaatatccct 1260
cgtagtatca cgggtgctgt agaaggagag aacacaagga ttgccagcc tggagaccac 1320
gtcagcgta caggtatttt cttgccaatc ctgcgcactg gggtccgaca ggtggtacag 1380
ggtttactct cagaaacctc cctggaagcc catcggattg tgaagatgaa caagagttag 1440
gatgatgagt ctggggctgg agagctcacc agggaggagc tgaggcaaat tgcagaggag 1500
gatttctacg aaaagctggc agcttcaatc gccccagaaa tatacgggca tgaagatgtg 1560
aagaaggcac tgctgctcct gctagtcggg ggtgtggacc agtctcctcg aggcataaaa 1620
atccggggca acatcaacat ctgtctgatg ggggatcctg gtgtggccaa gtctcagctc 1680
ctgtcataca ttgatcgact ggcgcctcgc agccagtaca caacaggccg gggtcctc 1740
ggagtggggc ttacggcagc tgtgctgaga gactccgtga gtggagaact gaccttagag 1800
ggtggggccc tgggtgctggc tgaccagggt gtgtgctgca ttgatgagtt cgacaagatg 1860
gctgagggcg accgcacagc catccacgag gtcatggagc agcagaccat ctccattgcc 1920
aaggccggca ttctaccac actcaatgcc cgctgctcca tctggtgccc cgccaacct 1980
gcctacgggc gctacaacct tcgcgcagc ctggagcaga acatacagct acctgctgca 2040
ctgctctccc ggtttgacct cctctggctg attcaggacc ggcccgaccy agacaatgac 2100
ctacggttgg ccagcacat cacctatgtg caccagcaca gccgcagccc cccctcccag 2160
tttgaacctc tggacatgaa gctcatgagg cgttacatag ccatgtgccc cgagaagcag 2220
cccatgggtc cagagtctct ggctgactac atcacagcga catacgtgga gatgaggcga 2280
gaggtttggg ctagtaagga tgccacctat acttctgccc ggacctgct ggctatcctg 2340
cgcttctcca ctgctctggc acgtctgaga atggtggatg tgggtggagaa agaagatgtg 2400
aatgaagcca tcaggcta at ggagatgtca aaggactctc ttctaggaga caaggggcag 2460
acagctagga ctacagacc agcagatgtg atatttgcca ccgtccgtga actggtctca 2520
gggggcccga gtgtccggtt ctctgaggca gacgagcgt gtgtatctcg tggcttcaca 2580
cccgcccagt tccaggcgcc tctggatgaa tatgaggagc tcaatgtctg gcaggtcaat 2640
gcttcccga caccgatcac ttttgtctga ttccagcctg cttgcaacct tggggtcctc 2700
ttgttccctg ctggcctgcc ccttgggaag gggcagtgat gcctttgagg ggaaggagga 2760
gcccctcttt ctcccatgct gcacttactc cttttgctaa taaaagtgtt ttagattgt 2820
c

```

<210> 14

<211> 719

<212> PRT

<213> 人

<400> 14

```

Met Ala Leu Lys Asp Tyr Ala Leu Glu Lys Glu Lys Val Lys Lys Phe
1          5          10          15
Leu Gln Glu Phe Tyr Gln Asp Asp Glu Leu Gly Lys Lys Gln Phe Lys
20          25          30
Tyr Gly Asn Gln Leu Val Arg Leu Ala His Arg Glu Gln Val Ala Leu
35          40          45
Tyr Val Asp Leu Asp Asp Val Ala Glu Asp Asp Pro Glu Leu Val Asp
50          55          60
Ser Ile Cys Glu Asn Ala Arg Arg Tyr Ala Lys Leu Phe Ala Asp Ala
65          70          75          80
Val Gln Glu Leu Leu Pro Gln Tyr Lys Glu Arg Glu Val Val Asn Lys

```

[0013]

85							90							95		
Asp	Val	Leu	Asp	Val	Tyr	Ile	Glu	His	Arg	Leu	Met	Met	Glu	Gln	Arg	
			100					105					110			
Ser	Arg	Asp	Pro	Gly	Met	Val	Arg	Ser	Pro	Gln	Asn	Gln	Tyr	Pro	Ala	
			115					120					125			
Glu	Leu	Met	Arg	Arg	Phe	Glu	Leu	Tyr	Phe	Gln	Gly	Pro	Ser	Ser	Asn	
			130					135				140				
Lys	Pro	Arg	Val	Ile	Arg	Glu	Val	Arg	Ala	Asp	Ser	Val	Gly	Lys	Leu	
145						150				155					160	
Val	Thr	Val	Arg	Gly	Ile	Val	Thr	Arg	Val	Ser	Glu	Val	Lys	Pro	Lys	
				165					170					175		
Met	Val	Val	Ala	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asp	Gln	Cys	Gly	Ala	Glu	Thr	Tyr	
			180					185					190			
Gln	Pro	Ile	Gln	Ser	Pro	Thr	Phe	Met	Pro	Leu	Ile	Met	Cys	Pro	Ser	
			195					200				205				
Gln	Glu	Cys	Gln	Thr	Asn	Arg	Ser	Gly	Gly	Arg	Leu	Tyr	Leu	Gln	Thr	
			210				215					220				
Arg	Gly	Ser	Arg	Phe	Ile	Lys	Phe	Gln	Glu	Met	Lys	Met	Gln	Glu	His	
225						230				235					240	
Ser	Asp	Gln	Val	Pro	Val	Gly	Asn	Ile	Pro	Arg	Ser	Ile	Thr	Val	Leu	
				245					250					255		
Val	Glu	Gly	Glu	Asn	Thr	Arg	Ile	Ala	Gln	Pro	Gly	Asp	His	Val	Ser	
			260					265					270			
Val	Thr	Gly	Ile	Phe	Leu	Pro	Ile	Leu	Arg	Thr	Gly	Phe	Arg	Gln	Val	
			275					280					285			
Val	Gln	Gly	Leu	Leu	Ser	Glu	Thr	Tyr	Leu	Glu	Ala	His	Arg	Ile	Val	
			290				295					300				
Lys	Met	Asn	Lys	Ser	Glu	Asp	Asp	Glu	Ser	Gly	Ala	Gly	Glu	Leu	Thr	
305					310					315					320	
Arg	Glu	Glu	Leu	Arg	Gln	Ile	Ala	Glu	Glu	Asp	Phe	Tyr	Glu	Lys	Leu	
				325					330					335		
Ala	Ala	Ser	Ile	Ala	Pro	Glu	Ile	Tyr	Gly	His	Glu	Asp	Val	Lys	Lys	
			340					345					350			
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Val	Gly	Gly	Val	Asp	Gln	Ser	Pro	Arg	Gly		
			355					360				365				
Met	Lys	Ile	Arg	Gly	Asn	Ile	Asn	Ile	Cys	Leu	Met	Gly	Asp	Pro	Gly	
			370				375					380				
Val	Ala	Lys	Ser	Gln	Leu	Leu	Ser	Tyr	Ile	Asp	Arg	Leu	Ala	Pro	Arg	
385					390					395					400	
Ser	Gln	Tyr	Thr	Thr	Gly	Arg	Gly	Ser	Ser	Gly	Val	Gly	Leu	Thr	Ala	
				405					410					415		
Ala	Val	Leu	Arg	Asp	Ser	Val	Ser	Gly	Glu	Leu	Thr	Leu	Glu	Gly	Gly	
			420					425					430			
Ala	Leu	Val	Leu	Ala	Asp	Gln	Gly	Val	Cys	Cys	Ile	Asp	Glu	Phe	Asp	
			435				440					445				
Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Asp	Arg	Thr	Ala	Ile	His	Glu	Val	Met	Glu	Gln	
			450				455					460				
Gln	Thr	Ile	Ser	Ile	Ala	Lys	Ala	Gly	Ile	Leu	Thr	Thr	Leu	Asn	Ala	
465					470					475					480	
Arg	Cys	Ser	Ile	Leu	Ala	Ala	Ala	Asn	Pro	Ala	Tyr	Gly	Arg	Tyr	Asn	
				485					490					495		
Pro	Arg	Arg	Ser	Leu	Glu	Gln	Asn	Ile	Gln	Leu	Pro	Ala	Ala	Leu	Leu	
			500					505					510			
Ser	Arg	Phe	Asp	Leu	Leu	Trp	Leu	Ile	Gln	Asp	Arg	Pro	Asp	Arg	Asp	
			515				520					525				
Asn	Asp	Leu	Arg	Leu	Ala	Gln	His	Ile	Thr	Tyr	Val	His	Gln	His	Ser	
			530				535					540				
Arg	Gln	Pro	Pro	Ser	Gln	Phe	Glu	Pro	Leu	Asp	Met	Lys	Leu	Met	Arg	
545					550					555					560	
Arg	Tyr	Ile	Ala	Met	Cys	Arg	Glu	Lys	Gln	Pro	Met	Val	Pro	Glu	Ser	
				565					570					575		
Leu	Ala	Asp	Tyr	Ile	Thr	Ala	Ala	Tyr	Val	Glu	Met	Arg	Arg	Glu	Ala	
			580					585					590			
Trp	Ala	Ser	Lys	Asp	Ala	Thr	Tyr	Thr	Ser	Ala	Arg	Thr	Leu	Leu	Ala	
			595					600				605				
Ile	Leu	Arg	Leu	Ser	Thr	Ala	Leu	Ala	Arg	Leu	Arg	Met	Val	Asp	Val	

[0014]

610	Val Glu Lys Glu Asp	615	Val Asn Glu Ala Ile Arg	620	Leu Met Glu Met Ser
625	Lys Asp Ser Leu Leu	630	Gly Asp Lys Gly Gln Thr	635	Ala Arg Thr Gln Arg
	645		650		655
Pro Ala Asp	Val Ile Phe Ala Thr	Val Arg Glu	Leu Val Ser Gly Gly		
	660		665		670
Arg Ser Val Arg Phe Ser Glu	Ala Glu Gln Arg	Cys Val Ser Arg Gly			
	675		680		685
Phe Thr Pro Ala Gln Phe Gln Ala Ala Leu Asp	Glu Tyr Glu Glu Leu				
	690		695		700
Asn Val Trp Gln Val Asn Ala Ser Arg Thr Arg	Ile Thr Phe Val				
705		710		715	

<210> 15
 <211> 2900
 <212> DNA
 <213> 人

<400> 15

```

agtgtcgtgt aaacagtgtc ctccgcgcgc gcggccgcgc agagagctgc ggcccggggg 60
ggcgtgcctg ggatccggag ctccgcctcg gcccgggaaa ggcggcagtg ggctgggata 120
gcgggtgtctc tgggtgtgat ggccaatggc tggactggct ccgcgccctg gcggaggaat 180
cccgagctgt gaagcggctg gaatccgggc ccatgtgctt ctttgtttac taagagcgga 240
agcgtatggcg ggagcggggg tgggtgcgcg tggcggggtg cgggtggcga ggtcccggtg 300
aaatcagggg ctaaggggac ccaaagaagg cgggggatca taggggtgga aagaaagctg 360
agaacctga gaccggagtg tgaggggcca acggggaagg gcgctagaat tttaaactaa 420
agtagggacc ggaattcccc tggggagatg ttggatggcc ctgtgcactg ccacgggctc 480
tttattcttc gctgggttaga aacagacttg tgaaaaagag ttatgccac tttggggaga 540
cttcgaaaag gttaagaagt tcttacaaga gttctaccag gatgatgaac tcgggaagaa 600
gcagttcaag tatgggaacc agttgggtcg gctggctcat cgggaacagg tggctctgta 660
tgtggacctg gacgacgtag ccgaggatga ccccgagttg gtggactcaa tttgtgagaa 720
tgccagcgcg tacgcgaagc tctttgctga tgccgtacaa gagctgctgc ctacgtacaa 780
ggagagggaa gtggtaataa aagatgtcct ggacgtttac attgagcacc ggctaataat 840
ggagcagcgg agtcgggacc ctgggatggg ccgaagcccc cagaaccagt acctgctga 900
actcatgcgc agattgttag tggctctctg cgggaaagat gtagggattg gttctccagg 960
atctgttttg tgactgtttt ctccccttag tgactgtat tttcaaggcc ctagcagcaa 1020
caagcctcgt gtgatccggg aagtgcgggc tgactctgtg gggaagtgg taactgtgcg 1080
tggaatcgte actcgtgtct ctgaagtcaa acccaagatg gtgggtggca cttacacttg 1140
tgaccagtgt ggggcagaga cctaccagcc gatccagtct cccactttca tgccctctgat 1200
catgtgcccc agccaggagt gccaaaccaa ccgctcagga gggcggtgt atctgcagac 1260
acggggctcc agattcatca aattccagga gatgaagat caagaacata gtgatcagg 1320
gcctgtggga aataaccctc gtagtatcac ggtgctggta gaaggagaga acacaaggat 1380
tgccagcct ggagaccacg tcagcgtcac tggtattttc ttgccaatcc tgcgcactgg 1440
gttccgacag gtggtacagg gtttactctc agaaacctac ctggaagccc atcggattgt 1500
gaagatgaac aagagttagg atgatgagtc tgggctgga gagctacca gggaggagct 1560
gaggcaaat gcagaggagg atttctacga aaagctggca gcttcaatcg ccccgaaaat 1620
atacgggcat gaagatgtga agaaggcact gctgctcctg ctagtccggg gtgtggacca 1680
gtctcctcga ggcataaaaa tccggggcaa catcaacatc tgtctgatgg gggatcctgg 1740
tgtggccaag tctcagctcc tgcatacat tgatcgactg gcgcctcgca gccagtacac 1800
aacaggccgg ggtcctcctag gagtggggct tacggcagct gtgctgagag actccgtgag 1860
tggaactg accttagagg gtggggccct ggtgctggct gaccagggtg tgtgctgcat 1920
tgatgagttc gacaagatgg ctgaggccga ccgcacagcc atccacgagg tcatggagca 1980
gcagaccatc tccattgcca aggcgggcat tctcaccaca ctcaatgccc gctgctccat 2040
cctggctgcc gccaacctg cctacgggcg ctacaacct ctctggctga ttcaggaccg 2100
catcacgcta cctgctgcac tgctctcccg gtttgacctc ctctggctga ttcaggaccg 2160
gcccagccga gacaatgacc tacggttggc ccagcacatc acctatgtgc accagcacag 2220
ccggcagccc cctccagct ttgaacctct ggacatgaag ctcatgaggc gttacatagc 2280
catgtgccgc gagaagcagc ccatggtgcc agagtctctg gctgactaca tcacagcagc 2340
atactggag atgaggcgag aggcctgggc tagtaaggat gccacctata cttctgcccg 2400
gacctgctg gctatcctgc gcctttccac tgctctggca cgtctgagaa tgggtgatgt 2460
ggtggagaaa gaagatgtga atgaagccat caggctaata gagatgtcaa aggactctct 2520
tctaggagac aaggggcaga cagctaggac tcagagacca gcagatgtga tatttgcac 2580
cgtccgtgaa ctgggtctcag ggggccgaag tgtccggctc tctgaggcag agcagcgtg 2640
tgtatctcgt ggcttcacac ccgcccagtt ccaggcggct ctggatgaat atgaggagct 2700

```

[0015]

```

caatgtctgg caggteaatg cttcccggaac acggatcaact tttgtctgat tccagcctgc 2760
ttgcaaccct ggggtcctct tgttcctgc tggcctgccc cttgggaagg ggcagtgatg 2820
cctttgaggg gaaggaggag cccctcttcc tcccatgctg cacttactcc ttttgctaat 2880
aaaagtgttt gtagattgtc 2900

```

<210> 16
 <211> 543
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 16

```

Met Val Val Ala Thr Tyr Thr Cys Asp Gln Cys Gly Ala Glu Thr Tyr
 1          5          10          15
Gln Pro Ile Gln Ser Pro Thr Phe Met Pro Leu Ile Met Cys Pro Ser
 20          25          30
Gln Glu Cys Gln Thr Asn Arg Ser Gly Gly Arg Leu Tyr Leu Gln Thr
 35          40          45
Arg Gly Ser Arg Phe Ile Lys Phe Gln Glu Met Lys Met Gln Glu His
 50          55          60
Ser Asp Gln Val Pro Val Gly Asn Ile Pro Arg Ser Ile Thr Val Leu
 65          70          75          80
Val Glu Gly Glu Asn Thr Arg Ile Ala Gln Pro Gly Asp His Val Ser
 85          90          95
Val Thr Gly Ile Phe Leu Pro Ile Leu Arg Thr Gly Phe Arg Gln Val
100          105          110
Val Gln Gly Leu Leu Ser Glu Thr Tyr Leu Glu Ala His Arg Ile Val
115          120          125
Lys Met Asn Lys Ser Glu Asp Glu Ser Gly Ala Gly Glu Leu Thr
130          135          140
Arg Glu Glu Leu Arg Gln Ile Ala Glu Glu Asp Phe Tyr Glu Lys Leu
145          150          155          160
Ala Ala Ser Ile Ala Pro Glu Ile Tyr Gly His Glu Asp Val Lys Lys
165          170          175
Ala Leu Leu Leu Leu Leu Val Gly Gly Val Asp Gln Ser Pro Arg Gly
180          185          190
Met Lys Ile Arg Gly Asn Ile Asn Ile Cys Leu Met Gly Asp Pro Gly
195          200          205
Val Ala Lys Ser Gln Leu Leu Ser Tyr Ile Asp Arg Leu Ala Pro Arg
210          215          220
Ser Gln Tyr Thr Thr Gly Arg Gly Ser Ser Gly Val Gly Leu Thr Ala
225          230          235          240

Ala Val Leu Arg Asp Ser Val Ser Gly Glu Leu Thr Leu Glu Gly Gly
245          250          255
Ala Leu Val Leu Ala Asp Gln Gly Val Cys Cys Ile Asp Glu Phe Asp
260          265          270
Lys Met Ala Glu Ala Asp Arg Thr Ala Ile His Glu Val Met Glu Gln
275          280          285
Gln Thr Ile Ser Ile Ala Lys Ala Gly Ile Leu Thr Thr Leu Asn Ala
290          295          300
Arg Cys Ser Ile Leu Ala Ala Asn Pro Ala Tyr Gly Arg Tyr Asn
305          310          315          320
Pro Arg Arg Ser Leu Glu Gln Asn Ile Gln Leu Pro Ala Ala Leu Leu
325          330          335
Ser Arg Phe Asp Leu Leu Trp Leu Ile Gln Asp Arg Pro Asp Arg Asp
340          345          350
Asn Asp Leu Arg Leu Ala Gln His Ile Thr Tyr Val His Gln His Ser
355          360          365
Arg Gln Pro Pro Ser Gln Phe Glu Pro Leu Asp Met Lys Leu Met Arg
370          375          380
Arg Tyr Ile Ala Met Cys Arg Glu Lys Gln Pro Met Val Pro Glu Ser
385          390          395          400
Leu Ala Asp Tyr Ile Thr Ala Ala Tyr Val Glu Met Arg Arg Glu Ala
405          410          415
Trp Ala Ser Lys Asp Ala Thr Tyr Thr Ser Ala Arg Thr Leu Leu Ala
420          425          430

```

[0016]

```

Ile Leu Arg Leu Ser Thr Ala Leu Ala Arg Leu Arg Met Val Asp Val
    435                440                445
Val Glu Lys Glu Asp Val Asn Glu Ala Ile Arg Leu Met Glu Met Ser
    450                455                460
Lys Asp Ser Leu Leu Gly Asp Lys Gly Gln Thr Ala Arg Thr Gln Arg
    465                470                475                480
Pro Ala Asp Val Ile Phe Ala Thr Val Arg Glu Leu Val Ser Gly Gly
    485                490                495
Arg Ser Val Arg Phe Ser Glu Ala Glu Gln Arg Cys Val Ser Arg Gly
    500                505                510
Phe Thr Pro Ala Gln Phe Gln Ala Ala Leu Asp Glu Tyr Glu Glu Leu
    515                520                525
Asn Val Trp Gln Val Asn Ala Ser Arg Thr Arg Ile Thr Phe Val
    530                535                540

```

<210> 17
 <211> 2140
 <212> DNA
 <213> 人

```

<400> 17
agctgagggtg tgagcagctg ccgaagtcag ttcccttgtyg agccggagct gggcgccggat 60
tcgccgaggc accgaggcac tcagaggagg cgccatgtca gaaccggctg gggatgtccg 120
tcagaaccca tgcggcagca aggcctgccg ccgcctcttc ggcacagtgg acagcgagca 180
gctgagccgc gactgtgatg cgctaatggc gggtgcac caggaggccc gtgagcgatg 240
gaacttcgac ttgttcacag agacaccact ggagggtgac ttgcctggg agcgtgtgcg 300
gggccttggc ctgcccgaagc tctaccttcc cagggggccc cggcgaggcc gggatgagtt 360
gggaggaggc aggcggcctg gcacctcacc tgctctgctg caggggacag cagagggaaga 420
ccatgtggac ctgtcactgt cttgtaccct tgtgcctcgc tcaggggagc aggtgaagg 480
gtccccaggc ggacctggag actctcaggc tcgaaaacgg cggcagacca gcatgacaga 540
tttctaccac tccaaacgcc ggctgatctt ctccaaggag aagccctaat ccgccacag 600
gaagcctgca gtcttgaag cgcgaggggc tcaaaggccc gctctacatc ttctgcctta 660
gtctcagttt gtgtgtctta attattattt gtgttttaat ttaaacacct cctcatgtac 720
atacctggc cgccccctgc cccccagcct ctggcattag aattatttaa acaaaaaacta 780
ggcggttgaa tgagagggtc ctaagagtgc tgggcatttt tattttatga aatactattt 840
aaagcctcct catcccggtg tctccttttc ctctctcccg gaggttgggt gggcgcgctt 900
catgccagct acttctcct cccacttgt cgcgtgggtg gtacctctg gagggtgtg 960
gtccttccc atcgctgtca caggcgggta tgaaattcac cccctttcct ggacactcag 1020
acctgaattc tttttcattt gagaagtaaa cagatggcac ttggaagggg cctcaccgag 1080
tggggggcac atcaaaaact ttggagtccc ctacacctct ctaaggttgg gcagggtgac 1140
cctgaagtga gcacagccta ggcctgagct ggggacctgg taccctcctg gctcttgata 1200
ccccctctg tcttgtgaag gcagggggaa ggtgggttac tggagcagac caccgcct 1260
gcccctcatg cccctctgac ctgcactggg gagccgctct cagtgttgag ccttttccct 1320
ctttggctcc cctgtacctt ttgaggagcc ccagcttacc ctctctctcc agctgggctc 1380
tgcaattccc ctctgtgct gtccctcccc ctgtcttttc ccttcagtac cctctcatgc 1440
tccaggtggc tctgagggtc ctgtcccacc cccaccccca gctcaatgga ctggaagggg 1500
aagggaacaca caagaagaag ggcacctag ttctacctca ggcagctcaa gcagcgaccg 1560
ccccctctc tagctgtggg ggtgagggtc ccatgtggtg gcacaggccc ccttgagtgg 1620
ggttatctct gtgttagggg tatatgatgg gggagtagat ctttctagga gggagacact 1680
ggcccccaa atcgccagc gaccttctc atccaccca tccctcccca gttcattgca 1740
ctttgattag cagcgaaca aggagtcaga cattttaaga tgggtggcagt agaggctatg 1800
gacagggcat gccacgtggg ctcatatggg gctgggagta gttgtcttc ctggcactaa 1860
cgttgagccc ctggaggcac tgaagtgtt agtgtacttg gagtattggg gtctgacccc 1920
aaacaccttc cagctcctgt aacatactgg cctggactgt tttctctcgg ctccccatgt 1980
gtcctgggtc ccgtttctcc acctagactg taaacctctc gagggcaggg accacacct 2040
gtactgttct gtgtctttca cagctctccc cacaatgctg aatatacagc aggtgctcaa 2100
taaatgattc ttagtgaact taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2140

```

<210> 18
 <211> 164
 <212> PRT
 <213> 人

```

<400> 18
Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys

```

[0017]

1	5	10	15
Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg			
20	25	30	
Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg			
35	40	45	
Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala			
50	55	60	
Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr			
65	70	75	80
Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg Arg Pro Gly			
85	90	95	
Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp			
100	105	110	
Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu			
115	120	125	
Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln			
130	135	140	
Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser			
145	150	155	160
Lys Arg Lys Pro			

<210> 19

<211> 2281

<212> DNA

<213> 人

<400> 19

```

agctgaggtg tgagcagctg ccgaagtcag ttccttgtgg agccggagct gggcgcggtat 60
tcgccgaggg accgaggcac tcagaggagg tgagagagcg gcggcagaca acagggggacc 120
ccgggcccggg gggccagagc cgagccaagc gtgcccgcgt gtgtccctgc gtgtcccgca 180
ggatgctgtg tcgcggtgtg gtgctgcgtt cacagggtgt tctgcggcag gcgccatgtc 240
agaaccggct ggggatgtcc gtcagaaccc atcgggcage aaggcctgcc gccgcctctt 300
cggcccagtg gacagcgagc agctgagccg cgaactgtat gcgctaattg cgggctgcat 360
ccaggaggcc cgtgagcgat ggaacttcga cttgtcacc gagacaccac tggagggtga 420
cttcgcctgg gagegtgtgc ggggccttgg cctgcccagg ctctaccttc ccacggggcc 480
ccggcgaggc cgggatgagt tgggaggagg caggcgccct ggcacctcac ctgtctgtct 540
gcaggggaca gcagaggaag accatgtgga cctgtcactg tcttgtacct ttgtgcctcg 600
ctcaggggag caggctgaag ggtccccagg tggacctgga gactctcagg gtgcgaaaac 660
goggcagacc agcatgacag atttctacca ctccaaacgc cggctgatct tctccaagag 720
gaagccctaa tccgcccaca ggaagcctgc agtccctgga gcgcgagggc ctcaaaggcc 780
cgctctacat cttctgcctt agtctcagtt tgtgtgtctt aattattatt tgtgttttaa 840
tttaaacacc tctcatgta cataccctgg ccgcccctcg cccccagcc tctggcatta 900
gaattattta aacaaaaact aggcggttga atgagagggt cctaagagtg ctgggcattt 960
ttattttatg aaatactatt taaagcctcc tcatcccgtg ttctcctttt cctctctccc 1020
ggaggttggg tgggcccgtc tcatgccagc tacttctccc tcccacttg tccgtgggt 1080
ggtacctctt ggagggtgt ggtccttccc catcgtgtgc acaggcggtt atgaaattca 1140
ccccctttcc tggacactca gacctgaatt ctttttcatt tgagaagtaa acagatggca 1200
ctttgaaggg gctcaccoga gtgggggcat catcaaaaac tttggagtcc cctcacctcc 1260
tctaagggtg ggcagggtga cctgaagtg agcacagcct agggctgagc tggggacctg 1320
gtacctctct ggctcttgat acccccctct gtcttgtgaa ggcaggggga aggtggggtc 1380
ctggagcaga ccaccccgc tgccctcatg gccctctga cctgcactgg ggagcccgtc 1440
tcagtgttga gctttttccc tctttggctc cctgtacct tttgaggagc ccagctacc 1500
cttcttctcc agctgggtct tgcaattccc ctctgtgtct gtccctcccc cttgtccttt 1560
cccttcagta cctctcagc tccaggtggt tctgaggtgc ctgtcccacc cccaccccca 1620
gctcaatgga ctggaagggg aaggacaca caagaagaag ggcacctag ttctacctca 1680
ggcagctcaa gcagcgaccg cccctcctc tagctgtggg ggtgagggtc ccagtgtgtg 1740
gcacaggccc ccttgagtgg ggttatctct gtgttagggg tatatgatgg gggagtagat 1800
ctttctagga gggagacact ggcctcctca atcgtccagc gacctctctc atccacccca 1860
tccctcccca gttcattgca ctttgattag cagcggaaca aggagtca caatttaaga 1920
tggtagcagt agaggctatg gacagggcat gccacgtggg ctcatatggg gctgggagta 1980
gttgtctttc ctggcactaa cgttgagccc ctggaggcac tgaagtgtt agtgbacttg 2040
gagtattggg gtctgacccc aaacacctc cagctcctgt aacatactgg cctggactgt 2100
ttctctctcg cttcccctgt gtctgtgttc ccgtttctcc acctagactg taaacctctc 2160
gagggcaggg accacacct gtactgttct gtgtctttca cagctcctcc cacaatgtgt 2220

```

[0018]

aatatacagc aggtgctcaa taaatgattc ttagtgactt taaaaaaaaa aaaaaaaaaa 2280
a 2281

<210> 20
<211> 164
<212> PRT
<213> 人

<400> 20
Met Ser Glu Pro Ala Gly Asp Val Arg Gln Asn Pro Cys Gly Ser Lys
1 5 10 15
Ala Cys Arg Arg Leu Phe Gly Pro Val Asp Ser Glu Gln Leu Ser Arg
20 25 30
Asp Cys Asp Ala Leu Met Ala Gly Cys Ile Gln Glu Ala Arg Glu Arg
35 40 45
Trp Asn Phe Asp Phe Val Thr Glu Thr Pro Leu Glu Gly Asp Phe Ala
50 55 60
Trp Glu Arg Val Arg Gly Leu Gly Leu Pro Lys Leu Tyr Leu Pro Thr
65 70 75 80
Gly Pro Arg Arg Gly Arg Asp Glu Leu Gly Gly Gly Arg Arg Pro Gly
85 90 95
Thr Ser Pro Ala Leu Leu Gln Gly Thr Ala Glu Glu Asp His Val Asp
100 105 110
Leu Ser Leu Ser Cys Thr Leu Val Pro Arg Ser Gly Glu Gln Ala Glu
115 120 125
Gly Ser Pro Gly Gly Pro Gly Asp Ser Gln Gly Arg Lys Arg Arg Gln
130 135 140
Thr Ser Met Thr Asp Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser
145 150 155 160
Lys Arg Lys Pro

<210> 21
<211> 1275
<212> DNA
<213> 人

<400> 21
cctccctacg ggccgctccg gcagcccttc ccgcgtgcgc agggctcaga gccgttccga 60
gatcttgagg gtccgggttg gagtgggggt ggggtggggg tgggggtgaa ggtggggggc 120
ggcgcgctc aggaaggcg ggtgcgcgcc tgcggggcgg agatgggcag gggcggtgc 180
gtgggtccca gtctgcagtt aagggggcag gagtggcgct gctcacctct ggtgccaaag 240
ggcgcgcgag cggctgccga gctcgccctt ggaggcggcg agaaccatgg ggcaggttc 300
ttggtgaccc tccgattcgg gcgcgcgtgc ggcccgccgc gactgagggt ttctgtggtt 360
cacatccgcg ggctcacggg ggagtgggca gcgccagggg cgcgccgcgc tgtggccctc 420
gtgctgatgc tactgaggag ccagcgtcta ggccagcagc cgttccttag aagaccagg 480
catgatgatg ggccgcgcc gagtggcgga gctgctgctg ctccacggcg cggagcccaa 540
ctgcgcgcgac ccgcgcactc tcacccgacc cgtgcacgac gctgcccggg agggcttcct 600
ggacacgctg gtggtgctgc accggggcgg ggccgggctg gactgcgcg atgcctgggg 660
ccgtctgccc gtggacctgg ctgaggagct gggccatcgc gatgtcgac ggtacctgcg 720
cgcggtcgcg gggggcacca gaggcagtaa ccatgccgcg atagatgccg cggaggtcc 780
ctcagacatc cccgattgaa agaaccagag aggtctgtag aaacctcggg aaacttagat 840
catcagtcac cgaaggctct acagggccac aactgcccc gccacaacc acccgcttt 900
cgtagttttc atttagaaaa tagagctttt aaaaatgtcc tgccttttaa cgtagatata 960
tgccctcccc cactaccgta aatgtccatt tatatcattt tttatatatt cttataaaaa 1020
tgtaaaaaag aaaaacaccg cttctgcctt ttcactgtgt tggagttttc tggagtgage 1080
actcacgccc taagcgcaca ttcattgtgg catttcttgc gagcctcgca gcctccggaa 1140
gctgtcgact tcatgacaag cattttgtga actaggggag ctcagggggg ttactggctt 1200
ctcttgagtc acactgctag caaatggcag aaccaaagct caaataaaaa taaaataatt 1260
ttcattcatt cactc 1275

<210> 22
<211> 173
<212> PRT
<213> 人

[0019]

<400> 22

```

Met Gly Arg Gly Arg Cys Val Gly Pro Ser Leu Gln Leu Arg Gly Gln
 1           5           10           15
Glu Trp Arg Cys Ser Pro Leu Val Pro Lys Gly Gly Ala Ala Ala Ala
      20           25           30
Glu Leu Gly Pro Gly Gly Gly Glu Asn Met Val Arg Arg Phe Leu Val
 35           40           45
Thr Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly Pro Pro Arg Val Arg Val Phe
 50           55           60
Val Val His Ile Pro Arg Leu Thr Gly Glu Trp Ala Ala Pro Gly Ala
 65           70           75           80
Pro Ala Ala Val Ala Leu Val Leu Met Leu Leu Arg Ser Gln Arg Leu
      85           90           95
Gly Gln Gln Pro Leu Pro Arg Arg Pro Gly His Asp Asp Gly Gln Arg
 100           105           110
Pro Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Pro Arg Arg Gly Ala Gln Leu Arg
 115           120           125
Arg Pro Arg His Ser His Pro Thr Arg Ala Arg Arg Cys Pro Gly Gly
 130           135           140
Leu Pro Gly His Ala Gly Gly Ala Ala Pro Gly Arg Gly Ala Ala Gly
 145           150           155           160
Arg Ala Arg Cys Leu Gly Pro Ser Ala Arg Gly Pro Gly
      165           170

```

<210> 23

<211> 5698

<212> DNA

<213> 人

<400> 23

```

agggttcaagt ggagctctcc taaccgacgc gcgtctgtgg agaagcggct tggctcggggg 60
tggtctcgtg gggctcctgcc tgttttagtcg ctttcagggt tcttgagccc cttcacgacc 120
gtcaccatgg aagtgtcacc attgcagcct gtaaatgaaa atatgcaagt caacaaaata 180
aagaaaaatg aagatgctaa gaaaagactg tctgttgaaa gaatctatca aaagaaaaca 240
caattggaac atattttgct ccgcccagac acctacattg gttctgtgga attagtgcac 300
cagcaaatgt gggtttacga tgaagatgtt ggcattaact atagggaagt cacttttgtt 360
cctggtttgt acaaaatctt tgatgagatt ctagttaatg ctgcggacaa caaacaaagg 420
gacccaaaaa tgtcttgtat tagagtcaca attgatccgg aaaacaattt aattagtata 480
tggaataatg gaaaaggat tctgtttgtt gaacacaaag ttgaaaagat gtatgtccca 540
gctctcatat ttggacagct cctaacttct agtaactatg atgatgatga aaagaaagt 600
acaggtggtc gaaatggcta tggagccaaa ttgtgtaaca tattcagta caaatttact 660
gtggaaacag ccagtagaga atacaagaaa atgttcaaac agacatggat ggataatatg 720
ggaagagctg gtgagatgga actcaagccc ttcaatggag aagattatac atgtatcacc 780
tttcagcctg atttgtctaa gtttaaaatg caaagcctgg acaaagatat tgttgacta 840
atggtcagaa gagcatatga tattgctgga tccaccaaaag atgtcaaagt ctttcttaat 900
ggaaataaac tggcagtaaa aggatctcgt agttatgtgg acatgtattt gaaggacaag 960
ttggatgaaa ctggttaact cttgaaagta atacatgaac aagtaaacca caggtgggaa 1020
gtgtgtttaa ctatgagtga aaaaggcttt cagcaaatta gctttgtcaa cagcattgct 1080
acatccaagg gtggcagaca tgttgattat gtagctgatc agattgtgac taaacttgtt 1140
gatgttgtga agaagaagaa caagggtggt gttgcagtaa aagcacatca ggtgaaaaat 1200
cacatgtgga tttttgtaaa tgccttaatt gaaaacccaa cctttgactc tcagacaaaa 1260
gaaaacatga ctttacaacc caagagcttt ggaatcaacat gccatttgag tgaaaaaatt 1320
atcaaagctg ccattggctg tggatttgta gaaagcatac taaactgggt gaagtttaag 1380
gcccaagtcc agttaaacaa gaagtgttca gctgtaaaac ataatagaat caaggaatt 1440
cccaaactcg atgatgccaa tgatgcaggg ggccgaaact ccactgagtg tacgcttatc 1500
ctgactgagg gagattcagc caaaactttg gctgtttcag gccttggtgt ggttgggaga 1560
gacaaatatg ggttttccc tcttagagga aaaatactca atgttcgaga agcttctcat 1620
aagcagatca tggaaaatgc tgagattaac aatatcatca agattgtggg tcttcagta 1680
aagaaaaact atgaagatga agattcattg aagacgcttc gttatgggaa gataatgatt 1740
atgacagatc aggaccaaga tggttcccac atcaaaggct tgcgtattaa ttttatccat 1800
cacaactggc cctctcttct gcgacatcgt tttctggagg aatttatcac tcccattgta 1860
aaggatatcta aaaacaagca agaaatggca ttttacagcc ttctgaatt tgaagagtgg 1920
aagagtctta ctccaatca taaaaaatgg aaagtcaaat attacaaagg tttgggcacc 1980
agcacatcaa aggaagctaa agaatacttt gcagatatga aaagacatcg tatccagttc 2040

```

[0020]

```

aaatattctg gteectgaaga tgatgetget atcagcctgg ccttttagcaa aaaacagata 2100
gatgatcgaa aggaatggtt aactaatttc atggaggata gaagacaacg aaagttactt 2160
gggcttcctg aggattactt gtatggacaa actaccacat atctgacata taatgacttc 2220
atcaacaagg aacttatctt gttctcaaat tctgataacg agagatctat cccttctatg 2280
gtggatggtt tgaaccagg tcagagaaag gttttgttta ctgcttcaa acggaatgac 2340
aagcgagaag taaaggttgc ccaattagct ggatcagtggt ctgaaatgtc tcttatcat 2400
catggtgaga tgtcactaat gatgaccatt atcaatttgg ctgagaattt tgtgggtagc 2460
aataatctaa acctcttgcg gccattgggt cagtttggtg ccaggctaca tgggtggcaag 2520
gattctgcta gtccacgata catctttaca atgctcagct ctttggctcg attgttattt 2580
ccaccaaaaag atgatcacac gttgaagttt ttatatgatg acaaccagcg tgttgagcct 2640
gaatggtaca ttctatttat tcccatgggt ctgataaaat gtgctgaagg aatcggtact 2700
gggtggtctt gcaaaatccc caactttgat gtgcgtgaaa ttgtaaataa catcaggcgt 2760
ttgatggatg gagaagaacc tttgccaatg tctccaagtt acaagaactt caagggtact 2820
attgaagaac tggctccaaa tcaatatgtg attagtgggt aagtagctat tcttaattct 2880
acaaccattg aaatctcaga gcttcccgct agaacatgga ccagacata caaagaacaa 2940
gttctagaac ccatgttgaa tggcaccgag aagacacctc ctctcataac agactatag 3000
gaataccata cagataccac tgtgaaattt gttgtgaaga tgactgaaga aaaactggca 3060
gaggcagaga gagtggact acacaaagtc tcaaaactcc aaactagtct cacatgcaac 3120
tctatgggtc tttttgacca cgtaggtgtt ttaaagaaat atgacacggt gttggatatt 3180
ctaagagact tttttgaact cagacttaaa tattatggat taagaaaaga atggctccta 3240
ggaatgcttg gtgctgaatc tgctaaactg aataatcagg ctgcgtttat cttagagaaa 3300
atagatggca aaataatcat tgaaaataag cctaagaaag aattaattaa agttctgatt 3360
cagaggggat atgattcgga tcctgtgaag gctgggaaag aagcccagca aaaggttcca 3420
gatgaagaag aaaatgaaga gagtgaacac gaaaaggaaa ctgaaaagag tgactcgtta 3480
acagattctg gaccaacctt caactatctt cttgatatgc ccctttggtt ttaaccaag 3540
gaaaagaaag atgaactctg caggctaaga aatgaaaaag aacaagagct ggacacatta 3600
aaaagaaaga gtccatcaga tttgtggaaa gaagacttgg ctacatttat tgaagaattg 3660
gaggctgttg aagccaagga aaaacaagat gaacaagtcg gacttctctg gaaagggggg 3720
aaggccaagg ggaaaaaac acaaatggct gaagttttgc cttctccgct tggtaaaaga 3780
gtcattccac gaataaccat agaaatgaaa gcagaggcag aaaagaaaaa taaaagaaa 3840
attaagaatg aaaatactga aggaagccct caagaagatg gtgtggaact agaaggcta 3900
aaacaaagat tagaaaagaa acagaaaaga gaaccaggta caaagacaaa gaaacaaact 3960
acattggcat ttaagccaat caaaaaagga aagaagagaa atccctggtc tgattcagaa 4020
tcagatagga gcagtgacga aagtaatttt gatgtccctc cagagaaaac agagccacgg 4080
agagcagcaa caaaaacaaa attcacaatg gatttggatt cagatgaaga tttctcagat 4140
tttgatgaaa aaactgatga tgaagatttt gtcccatcag atgctagtcc acctagacc 4200
aaaacttccc caaaacttag taacaaagaa ctgaaaccac agaaaagtg agaaaagtg 4260
cttgaagctg atgatgttaa gggcagtgta ccactgtctt caagccctcc tgctacacat 4320
ttccagatg aaactgaaat tacaacccta gttcctaata agaattgtac agtgaagaa 4380
acagcagcaa aaagtcagtc ttccacctcc actaccggtg ccaaaaaaag ggctgcccc 4440
aaaggaacta aaagggatcc agctttgaat tctggtgtct ctcaaaagcc tgatcctgcc 4500
aaaaccaaga atgcgcgcaa aaggaagcca tccacttctg atgattctga ctctaatttt 4560
gagaaaaatg tttcgaaagc agtcacaagc aagaaatcca agggggagag tgatgacttc 4620
catatggact ttgactcagc tgtggctcct cgggcaaaat ctgtacgggc aaagaaacct 4680
ataaagtacc tgggaagagtc agatgaagat gatctgtttt aaaatgtgag gcgattattt 4740
taagtaatta tcttaccag ccgaagactg gttttaaagt tacctgaagc tcttaacttc 4800
ctccctctg aatttagttt ggggaaggtg tttttagtag aagacatcaa agtgaagtaa 4860
agcccaagt tcttttagct ttttataata ctgtctaat agtgaccatc tcatgggcat 4920
tgttttcttc tctgctttgt ctgtgttttg agtctgcttt cttttgtctt taaaacctga 4980
tttttaagtt cttctgaact gtagaaatag ctatctgac acttcagcgt aaagcaggt 5040
gtttattaac catccactaa gctaaaacta gagcagtttg atttaaaagt gtcactcttc 5100
ctccttttct actttcagta gatatgagat agagcataat tatctgtttt atcttagttt 5160
tatacataat ttaccatcag atagaacttt atggttctag tacagatact ctactacact 5220
cagcctctta tgtccaagt tttcttttaa gcaatgagaa attgctcatg ttctcatct 5280
tctcaaatca tcagaggcca aagaaaaaca gcttggctgt gtctataact tgacacagtc 5340
aatagaatga agaaaattag agtagttatg tgattatttc agctcttgac ctgtcccttc 5400
tggctgcctc tgagtctgaa tctcccaaag agagaaacca atttctaaga ggactggatt 5460
gcagaagact cggggacaac atttgatcca agatcttaaa tgttatattg ataaccatgc 5520
tcagcaatga gctattagat tcattttggg aaatctccat aatttcaatt tgtaaacttt 5580
gttaagacct gctacattg ttatatgtgt gtgacttgag taatgttatc aacgtttttg 5640
taaataattt ctatgttttt ctattagcta aattccaaca attttgtact ttaataaa 5698

```

<210> 24

<211> 1531

[0021]

<212> PRT

<213> 人

<400> 24

```

Met Glu Val Ser Pro Leu Gln Pro Val Asn Glu Asn Met Gln Val Asn
 1          5          10          15
Lys Ile Lys Lys Asn Glu Asp Ala Lys Lys Arg Leu Ser Val Glu Arg
      20          25          30
Ile Tyr Gln Lys Lys Thr Gln Leu Glu His Ile Leu Leu Arg Pro Asp
      35          40          45
Thr Tyr Ile Gly Ser Val Glu Leu Val Thr Gln Gln Met Trp Val Tyr
      50          55          60
Asp Glu Asp Val Gly Ile Asn Tyr Arg Glu Val Thr Phe Val Pro Gly
      65          70          75          80
Leu Tyr Lys Ile Phe Asp Glu Ile Leu Val Asn Ala Ala Asp Asn Lys
      85          90          95
Gln Arg Asp Pro Lys Met Ser Cys Ile Arg Val Thr Ile Asp Pro Glu
      100         105         110
Asn Asn Leu Ile Ser Ile Trp Asn Asn Gly Lys Gly Ile Pro Val Val
      115         120         125
Glu His Lys Val Glu Lys Met Tyr Val Pro Ala Leu Ile Phe Gly Gln
      130         135         140
Leu Leu Thr Ser Ser Asn Tyr Asp Asp Asp Glu Lys Lys Val Thr Gly
      145         150         155         160
Gly Arg Asn Gly Tyr Gly Ala Lys Leu Cys Asn Ile Phe Ser Thr Lys
      165         170         175
Phe Thr Val Glu Thr Ala Ser Arg Glu Tyr Lys Lys Met Phe Lys Gln
      180         185         190
Thr Trp Met Asp Asn Met Gly Arg Ala Gly Glu Met Glu Leu Lys Pro
      195         200         205
Phe Asn Gly Glu Asp Tyr Thr Cys Ile Thr Phe Gln Pro Asp Leu Ser
      210         215         220
Lys Phe Lys Met Gln Ser Leu Asp Lys Asp Ile Val Ala Leu Met Val
      225         230         235         240
Arg Arg Ala Tyr Asp Ile Ala Gly Ser Thr Lys Asp Val Lys Val Phe
      245         250         255
Leu Asn Gly Asn Lys Leu Pro Val Lys Gly Phe Arg Ser Tyr Val Asp
      260         265         270
Met Tyr Leu Lys Asp Lys Leu Asp Glu Thr Gly Asn Ser Leu Lys Val
      275         280         285
Ile His Glu Gln Val Asn His Arg Trp Glu Val Cys Leu Thr Met Ser
      290         295         300
Glu Lys Gly Phe Gln Gln Ile Ser Phe Val Asn Ser Ile Ala Thr Ser
      305         310         315         320
Lys Gly Gly Arg His Val Asp Tyr Val Ala Asp Gln Ile Val Thr Lys
      325         330         335
Leu Val Asp Val Val Lys Lys Lys Asn Lys Gly Gly Val Ala Val Lys
      340         345         350
Ala His Gln Val Lys Asn His Met Trp Ile Phe Val Asn Ala Leu Ile
      355         360         365
Glu Asn Pro Thr Phe Asp Ser Gln Thr Lys Glu Asn Met Thr Leu Gln
      370         375         380
Pro Lys Ser Phe Gly Ser Thr Cys Gln Leu Ser Glu Lys Phe Ile Lys
      385         390         395         400
Ala Ala Ile Gly Cys Gly Ile Val Glu Ser Ile Leu Asn Trp Val Lys
      405         410         415
Phe Lys Ala Gln Val Gln Leu Asn Lys Lys Cys Ser Ala Val Lys His
      420         425         430
Asn Arg Ile Lys Gly Ile Pro Lys Leu Asp Asp Ala Asn Asp Ala Gly
      435         440         445
Gly Arg Asn Ser Thr Glu Cys Thr Leu Ile Leu Thr Glu Gly Asp Ser
      450         455         460
Ala Lys Thr Leu Ala Val Ser Gly Leu Gly Val Val Gly Arg Asp Lys
      465         470         475         480
Tyr Gly Val Phe Pro Leu Arg Gly Lys Ile Leu Asn Val Arg Glu Ala
      485         490         495

```

[0022]

Ser	His	Lys	Gln	Ile	Met	Glu	Asn	Ala	Glu	Ile	Asn	Asn	Ile	Ile	Lys	500	505	510
Ile	Val	Gly	Leu	Gln	Tyr	Lys	Lys	Asn	Tyr	Glu	Asp	Glu	Asp	Ser	Leu	515	520	525
Lys	Thr	Leu	Arg	Tyr	Gly	Lys	Ile	Met	Ile	Met	Thr	Asp	Gln	Asp	Gln	530	535	540
Asp	Gly	Ser	His	Ile	Lys	Gly	Leu	Leu	Ile	Asn	Phe	Ile	His	His	Asn	545	550	555
Trp	Pro	Ser	Leu	Leu	Arg	His	Arg	Phe	Leu	Glu	Glu	Phe	Ile	Thr	Pro	565	570	575
Ile	Val	Lys	Val	Ser	Lys	Asn	Lys	Gln	Glu	Met	Ala	Phe	Tyr	Ser	Leu	580	585	590
Pro	Glu	Phe	Glu	Glu	Trp	Lys	Ser	Ser	Thr	Pro	Asn	His	Lys	Lys	Trp	595	600	605
Lys	Val	Lys	Tyr	Tyr	Lys	Gly	Leu	Gly	Thr	Ser	Thr	Ser	Lys	Glu	Ala	610	615	620
Lys	Glu	Tyr	Phe	Ala	Asp	Met	Lys	Arg	His	Arg	Ile	Gln	Phe	Lys	Tyr	625	630	635
Ser	Gly	Pro	Glu	Asp	Asp	Ala	Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Phe	Ser	Lys	Lys	645	650	655
Gln	Ile	Asp	Asp	Arg	Lys	Glu	Trp	Leu	Thr	Asn	Phe	Met	Glu	Asp	Arg	660	665	670
Arg	Gln	Arg	Lys	Leu	Leu	Gly	Leu	Pro	Glu	Asp	Tyr	Leu	Tyr	Gly	Gln	675	680	685
Thr	Thr	Thr	Tyr	Leu	Thr	Tyr	Asn	Asp	Phe	Ile	Asn	Lys	Glu	Leu	Ile	690	695	700
Leu	Phe	Ser	Asn	Ser	Asp	Asn	Glu	Arg	Ser	Ile	Pro	Ser	Met	Val	Asp	705	710	715
Gly	Leu	Lys	Pro	Gly	Gln	Arg	Lys	Val	Leu	Phe	Thr	Cys	Phe	Lys	Arg	725	730	735
Asn	Asp	Lys	Arg	Glu	Val	Lys	Val	Ala	Gln	Leu	Ala	Gly	Ser	Val	Ala	740	745	750
Glu	Met	Ser	Ser	Tyr	His	His	Gly	Glu	Met	Ser	Leu	Met	Met	Thr	Ile	755	760	765
Ile	Asn	Leu	Ala	Gln	Asn	Phe	Val	Gly	Ser	Asn	Asn	Leu	Asn	Leu	Leu	770	775	780
Gln	Pro	Ile	Gly	Gln	Phe	Gly	Thr	Arg	Leu	His	Gly	Gly	Lys	Asp	Ser	785	790	795
Ala	Ser	Pro	Arg	Tyr	Ile	Phe	Thr	Met	Leu	Ser	Ser	Leu	Ala	Arg	Leu	805	810	815
Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Asp	Asp	His	Thr	Leu	Lys	Phe	Leu	Tyr	Asp	Asp	820	825	830
Asn	Gln	Arg	Val	Glu	Pro	Glu	Trp	Tyr	Ile	Pro	Ile	Ile	Pro	Met	Val	835	840	845
Leu	Ile	Asn	Gly	Ala	Glu	Gly	Ile	Gly	Thr	Gly	Trp	Ser	Cys	Lys	Ile	850	855	860
Pro	Asn	Phe	Asp	Val	Arg	Glu	Ile	Val	Asn	Asn	Ile	Arg	Arg	Leu	Met	865	870	875
Asp	Gly	Glu	Glu	Pro	Leu	Pro	Met	Leu	Pro	Ser	Tyr	Lys	Asn	Phe	Lys	885	890	895
Gly	Thr	Ile	Glu	Glu	Leu	Ala	Pro	Asn	Gln	Tyr	Val	Ile	Ser	Gly	Glu	900	905	910
Val	Ala	Ile	Leu	Asn	Ser	Thr	Thr	Ile	Glu	Ile	Ser	Glu	Leu	Pro	Val	915	920	925
Arg	Thr	Trp	Thr	Gln	Thr	Tyr	Lys	Glu	Gln	Val	Leu	Glu	Pro	Met	Leu	930	935	940
Asn	Gly	Thr	Glu	Lys	Thr	Pro	Pro	Leu	Ile	Thr	Asp	Tyr	Arg	Glu	Tyr	945	950	955
His	Thr	Asp	Thr	Thr	Val	Lys	Phe	Val	Val	Lys	Met	Thr	Glu	Glu	Lys	965	970	975
Leu	Ala	Glu	Ala	Glu	Arg	Val	Gly	Leu	His	Lys	Val	Phe	Lys	Leu	Gln	980	985	990
Thr	Ser	Leu	Thr	Cys	Asn	Ser	Met	Val	Leu	Phe	Asp	His	Val	Gly	Cys	995	1000	1005
Leu	Lys	Lys	Tyr	Asp	Thr	Val	Leu	Asp	Ile	Leu	Arg	Asp	Phe	Phe	Glu	1010	1015	1020

[0023]

```

Leu Arg Leu Lys Tyr Tyr Gly Leu Arg Lys Glu Trp Leu Leu Gly Met
1025                1030                1035                1040
Leu Gly Ala Glu Ser Ala Lys Leu Asn Asn Gln Ala Arg Phe Ile Leu
                1045                1050                1055
Glu Lys Ile Asp Gly Lys Ile Ile Ile Glu Asn Lys Pro Lys Lys Glu
                1060                1065                1070
Leu Ile Lys Val Leu Ile Gln Arg Gly Tyr Asp Ser Asp Pro Val Lys
                1075                1080                1085
Ala Trp Lys Glu Ala Gln Gln Lys Val Pro Asp Glu Glu Glu Asn Glu
                1090                1095                1100
Glu Ser Asp Asn Glu Lys Glu Thr Glu Lys Ser Asp Ser Val Thr Asp
1105                1110                1115                1120
Ser Gly Pro Thr Phe Asn Tyr Leu Leu Asp Met Pro Leu Trp Tyr Leu
                1125                1130                1135
Thr Lys Glu Lys Lys Asp Glu Leu Cys Arg Leu Arg Asn Glu Lys Glu
                1140                1145                1150
Gln Glu Leu Asp Thr Leu Lys Arg Lys Ser Pro Ser Asp Leu Trp Lys
                1155                1160                1165
Glu Asp Leu Ala Thr Phe Ile Glu Glu Leu Glu Ala Val Glu Ala Lys
                1170                1175                1180
Glu Lys Gln Asp Glu Gln Val Gly Leu Pro Gly Lys Gly Gly Lys Ala
1185                1190                1195                1200
Lys Gly Lys Lys Thr Gln Met Ala Glu Val Leu Pro Ser Pro Arg Gly
                1205                1210                1215
Gln Arg Val Ile Pro Arg Ile Thr Ile Glu Met Lys Ala Glu Ala Glu
                1220                1225                1230
Lys Lys Asn Lys Lys Lys Ile Lys Asn Glu Asn Thr Glu Gly Ser Pro
                1235                1240                1245
Gln Glu Asp Gly Val Glu Leu Glu Gly Leu Lys Gln Arg Leu Glu Lys
                1250                1255                1260
Lys Gln Lys Arg Glu Pro Gly Thr Lys Thr Lys Lys Gln Thr Thr Leu
1265                1270                1275                1280
Ala Phe Lys Pro Ile Lys Lys Gly Lys Lys Arg Asn Pro Trp Ser Asp
                1285                1290                1295
Ser Glu Ser Asp Arg Ser Ser Asp Glu Ser Asn Phe Asp Val Pro Pro
                1300                1305                1310
Arg Glu Thr Glu Pro Arg Arg Ala Ala Thr Lys Thr Lys Phe Thr Met
                1315                1320                1325
Asp Leu Asp Ser Asp Glu Asp Phe Ser Asp Phe Asp Glu Lys Thr Asp
                1330                1335                1340
Asp Glu Asp Phe Val Pro Ser Asp Ala Ser Pro Pro Lys Thr Lys Thr
1345                1350                1355                1360
Ser Pro Lys Leu Ser Asn Lys Glu Leu Lys Pro Gln Lys Ser Val Val
                1365                1370                1375
Ser Asp Leu Glu Ala Asp Asp Val Lys Gly Ser Val Pro Leu Ser Ser
                1380                1385                1390
Ser Pro Pro Ala Thr His Phe Pro Asp Glu Thr Glu Ile Thr Asn Pro
                1395                1400                1405
Val Pro Lys Lys Asn Val Thr Val Lys Lys Thr Ala Ala Lys Ser Gln
                1410                1415                1420
Ser Ser Thr Ser Thr Thr Gly Ala Lys Lys Arg Ala Ala Pro Lys Gly
1425                1430                1435                1440
Thr Lys Arg Asp Pro Ala Leu Asn Ser Gly Val Ser Gln Lys Pro Asp
                1445                1450                1455
Pro Ala Lys Thr Lys Asn Arg Arg Lys Arg Lys Pro Ser Thr Ser Asp
                1460                1465                1470
Asp Ser Asp Ser Asn Phe Glu Lys Ile Val Ser Lys Ala Val Thr Ser
                1475                1480                1485
Lys Lys Ser Lys Gly Glu Ser Asp Asp Phe His Met Asp Phe Asp Ser
                1490                1495                1500
Ala Val Ala Pro Arg Ala Lys Ser Val Arg Ala Lys Lys Pro Ile Lys
1505                1510                1515                1520
Tyr Leu Glu Glu Ser Asp Glu Asp Asp Leu Phe
                1525                1530

```

[0024]

<210> 25	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 25	
ctctgagccc gccaaagc	17
<210> 26	
<211> 31	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 26	
tgtaagaact tcttaacett ttccttctct a	31
<210> 27	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 27	
ccctcggcag cgatggcact	20
<210> 28	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 28	
gaggaatccc gagctgtgaa	20
<210> 29	
<211> 14	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 29	
cccgcctccc ccat	14
<210> 30	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 30	
cccatgtgct tctttgttta ctaagagcgg aa	32

[0025]

<210> 31	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 31	
gtccgaagcc cccagaa	17
<210> 32	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 32	
cccgcagag accactcaca	20
<210> 33	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 33	
cagtaccctg ctgaactcat gcgca	25
<210> 34	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 34	
cgctacgcga agctctttg	19
<210> 35	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 35	
cctttgtttg ccattgttct ctaa	24
<210> 36	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 36	
tgccgtacaa gagctgctgc ctca	24

[0026]

<210> 37	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 37	
caaacgcgg ctgatctt	18
<210> 38	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 38	
ccaggactgc aggttcct	19
<210> 39	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 39	
caagaggaag ccctaaccg ccca	24
<210> 40	
<211> 16	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 40	
gagcggcggc agacaa	16
<210> 41	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 41	
ccgcgaacac gcacct	17
<210> 42	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 42	
cccagagccg agccaagcgt g	21

[0027]

<210> 43	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 43	
tgagactct cagggtcgaa a	21
<210> 44	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 44	
tccagtctgg ccaacagagt t	21
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 45	
cggcggcaga ccagcatgac	20
<210> 46	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 46	
gcctcgtgc tgatgctact	20
<210> 47	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 47	
tcatcatgac ctggtcttct agga	24
<210> 48	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 48	
agcgtctagg gcagcagccg c	21

[0028]

<210> 49
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 49
 tgcccaacgc accga 15

<210> 50
 <211> 15
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 50
 gggcgctgcc catca 15

<210> 51
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 51
 tcggaggccg atccaggtca tg 22

<210> 52
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 52
 aagcttcctt tccgtcatgc 20

<210> 53
 <211> 22
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 53
 catgacctgc cagagagaac ag 22

<210> 54
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 54
 cccccaccct ggcctctgacc a 21

[0029]

<210> 55	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 55	
ggaaaccaag gaagaggaat gag	23
<210> 56	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 56	
tggtcccccc ttcagatctt ct	22
<210> 57	
<211> 26	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 57	
acgcgcgtac agatctctcg aatgct	26
<210> 58	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 58	
cacgccctaa gcgcacat	18
<210> 59	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 59	
cctagttcac aaaatgcttg tcatg	25
<210> 60	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 60	
tttcttgcca gcctcgcagc etc	23

[0030]

<210> 61
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 61
 aaagaagatg atgaccgggt ttac

24

<210> 62
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 62
 gagcctctgg atggtgcaa

19

<210> 63
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 63
 caaactcaac gtgcaagcct cgga

24

<210> 64
 <211> 14
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 64
 tccgccgcgg acaa

14

<210> 65
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 65
 catggtgtcc cgctcctt

18

<210> 66
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 66
 accctggcct caggccggag

20

[0031]

<210> 67	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 67	
ggaattgttg gccacctgta tt	22
<210> 68	
<211> 27	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 68	
ctggagaaat cacttggtcc tatttct	27
<210> 69	
<211> 32	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 69	
cagtccttgc attatcattg aaacacctca ca	32
<210> 70	
<211> 28	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 70	
tcaactcatt ggaattacct cattatcc	28
<210> 71	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 71	
accatcagtg acgtaagcaa actc	24
<210> 72	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 引物	
<400> 72	
ccaaacttga ggaaatctat gctcctaaac tcca	34

[0032]

<210> 73
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 73
 ttttgaagtt ctgcattctg acttg

25

<210> 74
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 74
 accatcagtg acgtaagcaa gataa

25

<210> 75
 <211> 34
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物

<400> 75
 aaccacagat gaggtccata cttctagact ggct

34

<210> 76
 <211> 156
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1) ... (156)
 <223> p16/p14ARF 同工型 I 的部分氨基酸序列

<400> 76
 Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
 1 5 10 15
 Ala Thr Ala Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
 35 40 45
 Ile Gln Val Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu
 50 55 60
 Leu His Gly Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg
 65 70 75 80
 Pro Val His Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val
 85 90 95
 Leu His Arg Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg
 100 105 110
 Leu Pro Val Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg
 115 120 125
 Tyr Leu Arg Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg
 130 135 140
 Ile Asp Ala Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
 145 150 155

[0033]

<210> 77
 <211> 105
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(105)
 <223> p16/p14ARF 同工型 2 的部分氨基酸序列

<400> 77
 Met Met Met Gly Ser Ala Arg Val Ala Glu Leu Leu Leu Leu His Gly
 1 5 10 15
 Ala Glu Pro Asn Cys Ala Asp Pro Ala Thr Leu Thr Arg Pro Val His
 20 25 30
 Asp Ala Ala Arg Glu Gly Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg
 35 40 45
 Ala Gly Ala Arg Leu Asp Val Arg Asp Ala Trp Gly Arg Leu Pro Val
 50 55 60
 Asp Leu Ala Glu Glu Leu Gly His Arg Asp Val Ala Arg Tyr Leu Arg
 65 70 75 80
 Ala Ala Ala Gly Gly Thr Arg Gly Ser Asn His Ala Arg Ile Asp Ala
 85 90 95
 Ala Glu Gly Pro Ser Asp Ile Pro Asp
 100 105

<210> 78
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 人

<220>
 <221> VARIANT
 <222> (1)...(116)
 <223> p16/p14ARF 同工型 3 的部分氨基酸序列

<400> 78
 Met Glu Pro Ala Ala Gly Ser Ser Met Glu Pro Ser Ala Asp Trp Leu
 1 5 10 15
 Ala Thr Ala Ala Arg Gly Arg Val Glu Glu Val Arg Ala Leu Leu
 20 25 30
 Glu Ala Gly Ala Leu Pro Asn Ala Pro Asn Ser Tyr Gly Arg Arg Pro
 35 40 45
 Ile Gln Val Gly Arg Arg Ser Ala Ala Gly Ala Gly Asp Gly Gly Arg
 50 55 60
 Leu Trp Arg Thr Lys Phe Ala Gly Glu Leu Glu Ser Gly Ser Ala Ser
 65 70 75 80
 Ile Leu Arg Lys Lys Gly Arg Leu Pro Gly Glu Phe Ser Glu Gly Val
 85 90 95
 Cys Asn His Arg Pro Pro Pro Gly Asp Ala Leu Gly Ala Trp Glu Thr
 100 105 110
 Lys Glu Glu Glu
 115

<210> 79
 <211> 173
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 79

[0034]

```

Met Gly Arg Gly Arg Cys Val Gly Pro Ser Leu Gln Leu Arg Gly Gln
 1          5          10          15
Glu Trp Arg Cys Ser Pro Leu Val Pro Lys Gly Gly Ala Ala Ala Ala
      20          25          30
Glu Leu Gly Pro Gly Gly Gly Glu Asn Met Val Arg Arg Phe Leu Val
      35          40          45
Thr Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly Pro Pro Arg Val Arg Val Phe
      50          55          60
Val Val His Ile Pro Arg Leu Thr Gly Glu Trp Ala Ala Pro Gly Ala
      65          70          75          80
Pro Ala Ala Val Ala Leu Val Leu Met Leu Leu Arg Ser Gln Arg Leu
      85          90          95
Gly Gln Gln Pro Leu Pro Arg Arg Pro Gly His Asp Asp Gly Gln Arg
      100          105          110
Pro Ser Gly Gly Ala Ala Ala Ala Pro Arg Arg Gly Ala Gln Leu Arg
      115          120          125
Arg Pro Arg His Ser His Pro Thr Arg Ala Arg Arg Cys Pro Gly Gly
      130          135          140
Leu Pro Gly His Ala Gly Gly Ala Ala Pro Gly Arg Gly Ala Ala Gly
      145          150          155          160
Arg Ala Arg Cys Leu Gly Pro Ser Ala Arg Gly Pro Gly
      165          170

```

<210> 80
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 80
 ggaggtggta ctggccatgt a

21

<210> 81
 <211> 19
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 81
 gggagatgcg gacatggat

19

<210> 82
 <211> 25
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 82
 ccaagtacga ccgcatcacc aacca

25

<210> 83
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> PCR 引物

<400> 83

[0035]

cattccaaga cctgectacc a	21
<210> 84	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 84	
atgcgagtga gcaaaccaat t	21
<210> 85	
<211> 29	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 85	
acacaagatt cgagagctca cctcatcca	29
<210> 86	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 86	
ggctacatgg tggcaagga	19
<210> 87	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 87	
tggaaataac aatcgagcca aag	23
<210> 88	
<211> 34	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> PCR 引物	
<400> 88	
tgctagtcca cgatacatct ttacaatgct cagc	34
<210> 89	
<211> 3769	
<212> DNA	
<213> 人	
<400> 89	
aaagctgcag cgtctggaaa aaagcgactt gtggcggtcg agcgtggcgc aggcgaatcc 60	
tcggcactaa gcaaatatgg acctcgcggc ggcagcggag ccgggcgcgc gcagccagca 120	
cctggaggtc cgcgacgagg tggccgagaa gtgccagaaa ctgttcctgg acttcttggga 180	

[0036]

```

ggagttttcag agcagcagatg gagaaatttaa ataacttgcaa ttagcagaggg aactgatttcg 240
tcctgagagaga aacacatttg ttgtgagttt tgtggacctg gaacaattta accagcaact 300
ttccaccacc attcaagagg agttctatag agtttaccct tacctgtgtc gggccttgaa 360
aacattcgtc aaagaccgta aagagatccc tcttgccaag gatttttatg ttgcattcca 420
agacctgcct accagacaca agattcgaga gctcacctca tccagaattg gtttgctcac 480
tcgcacagat gggcaggttg tgccgactca cccagttcac ccagagcttg tgagcggaac 540
ttttctgtgc ttggactgtc agacagtgat cagggatgta gaacagcagt tcaaatacac 600
acagccaaac atctgccgaa atccagtttg tgccaacagg aggagattct tactggatac 660
aaataaatca agatttggtg attttcaaaa ggttcgtatt caagagaccc aagctgagct 720
tcctcgaggg agtatcccc gcagtttaga agtaatttta agggctgaag ctgtggaatc 780
agctcaagct ggtgacaagt gtgactttac agggacactg attgttgtgc ctgacgtctc 840
caagcttagc acaccaggag cacgtgcaga aactaattcc cgtgtcagtg gtgttgatgg 900
atatgagaca gaaggcattc gaggactccg ggccttggtt gttagggacc tttcttatag 960
gctggtcttt cttgectgct gtgttgccgc aaccaacca aggtttgggg ggaagagct 1020
cagagatgag gaacagacag ctgagagcat taagaacca atgactgtga aagaatggga 1080
gaaagtgttt gagatgagtc aagataaaaa tctataccac aatctttgta ccagcctgtt 1140
ccctactata catggcaatg atgaagtaaa acgggtgtgc ctgctgatgc tctttggtgg 1200
cgttccaaag acaacaggag aagggaacct tcttcgaggg gacataaatg tttgcattgt 1260
tggtagacca agtacagcta agagccaatt tctcaagcac gtggaggagt tcagccccag 1320
agctgtctac accagtggtg aagcgtccag tgctgctggc ttaacagcag ctgttgtgag 1380
agatgaagaa tctcatgagt ttgtcattga ggctggagct ttgatgttgg ctgataatgg 1440
tgtgtgttgt attgatgaat ttgataagat ggacgtgcgg gatcaagttg ctatctcatga 1500
agctatggaa cagcagacca tatccatcac taaagcagga gtgaaggcta ctctgaacgc 1560
ccgtagcgtc attttggcag cagcaaaccc aatcagtgga cactatgaca galcaaaatc 1620
attgaaacag aatataaatt tgtcagctcc catcatgtcc cgattcgatc tcttctttat 1680
ccttggtgat gaatgtaatg aggttacaga ttatgccatt gccaggcgca tagtagattt 1740
gcattcaaga attgaggaa caaltgatcg tgtctattcc ctcgatgata tcagaagata 1800
tcttctcttt gcaagacagt ttaaacccaa gatttccaaa gagtccaggg acttcattgt 1860
ggagcaatat aaacatctcc gccagagaga tggttctgga gtgaccaagt ctctcatggag 1920
gattacagtg cgacagcttg agagcatgat tctgtctctc gaagctatgg ctggatgca 1980
ctgctgtgat gaggtccaac ctaaacatgt gaaggaaagt ttccggttac tgaataaatc 2040
aatcatccgt gtggaaacac ctgatgtcaa tctagatcaa gaggaagaga tccagatgga 2100
ggtagatgag ggtgctggtg gcatcaatgg tcatgctgac agccctgctc ctgtgaacgg 2160

```

```

gatcaatggc tacaatgaag acataaatca agagtctgct cccaaagcct ccttaaggct 2220
gggcttctct gagtactgcc gaatctctaa ccttattgtg cttcacctca gaaagggtgga 2280
agaagaagag gacgagtcag cattaaagag gagegagctt gttaactggg actlgaagga 2340
aatcgaatca gagatagact ctgaagaaga acttataaat aaaaaaagaa tcatagagaa 2400
agttattcat cgactcacac actatgatca tgttctaatt gagctcacc aggettgatt 2460
gaaaggctcc acagaggaa gtgagagcta tgaagaagat cctacttgg tagttaaccc 2520
taactacttg ctogaagatt gagatagtga aagtaactga ccagagctga ggaactgtgg 2580
cacagcacct cgtggectgg agcctggetg gagctctgct agggacagaa gtgtttctgg 2640
aagtgtatgct tccaggattt gttttcagaa acaagaattg agttgatgg cctatgtgtc 2700
acattcatca caggtttcat accaacacag gcttcagcac ttcctttggt gtgtttcctg 2760
tcccagtgaa gttggaacca aataatgtgt agtctctata accaatacct ttgttttcat 2820
gtgtaagaaa aggeccatta cttttaaggt atgtgctgtc ctattgagca aataactttt 2880
tttcaattgc cagctactgc ttttattcat caaaataaaa taacttggtc tgaagttgtc 2940
tattggattt ctttctactg taccctgatt attacttcca tctacttctg aatgtgagac 3000
tttccctttt tgcttaacct ggagtgaaga ggtagaactg tggattatg gatgaggttt 3060
ctatgagaag gagtcattag agaactcata tgaagctag aggccttaga gatgactttc 3120
caagggttaat tccagttggt tttttttttt tttaagttta taaaagttta ttatactttt 3180
ttaaatttac tcttttagta tttattttac ttctgtgtcc taagggtaat ttctcaggat 3240
tgttttcaaa ttgctttttt aggggaaata ggtcatttgc tatattacaa gcaatcccc 3300
aattttatgg tcttccagga aaagtatta ccgtttatga tactaacagt tctgagact 3360
tagctatgat cagtatgttc atgaggtgga gcagttcctg tgttgcagct ttaacaaca 3420
gatggcattc attaaatcac aaagtatgtt aaaggtcaca aaagcaaat aactgtctga 3480
ggctaaggcc cacgtgggac agtctaatac ccagagtag tcaacttgcc ttgatgtctg 3540
agctttccag tgcaatgtga atttgagcag ccagaaatct attagtagaa agcaagacag 3600
attaatatag gttaaaacaa tgatttaaat atgtttctcc caataattat ctcttccct 3660
ggaatcaact tgtatgaac cttgtcaaaa tgtactccac aagtatgtac aattaagtat 3720
tttaaaaata aatggcaaac attaaaaaca aaaaaaaaa aaaaaaaaa 3769

```

<210> 90
<211> 821
<212> PRT
<213> 人

[0037]

```

<400> 90
Met Asp Leu Ala Ala Ala Glu Pro Gly Ala Gly Ser Gln His Leu
1      5      10      15
Glu Val Arg Asp Glu Val Ala Glu Lys Cys Gln Lys Leu Phe Leu Asp
20     25     30
Phe Leu Glu Glu Phe Gln Ser Ser Asp Gly Glu Ile Lys Tyr Leu Gln
35     40     45
Leu Ala Glu Glu Leu Ile Arg Pro Glu Arg Asn Thr Leu Val Val Ser
50     55     60
Phe Val Asp Leu Glu Gln Phe Asn Gln Gln Leu Ser Thr Thr Ile Gln
65     70     75     80
Glu Glu Phe Tyr Arg Val Tyr Pro Tyr Leu Cys Arg Ala Leu Lys Thr
85     90     95
Phe Val Lys Asp Arg Lys Glu Ile Pro Leu Ala Lys Asp Phe Tyr Val
100    105    110
Ala Phe Gln Asp Leu Pro Thr Arg His Lys Ile Arg Glu Leu Thr Ser
115    120    125
Ser Arg Ile Gly Leu Leu Thr Arg Ile Ser Gly Gln Val Val Arg Thr
130    135    140
His Pro Val His Pro Glu Leu Val Ser Gly Thr Phe Leu Cys Leu Asp
145    150    155    160
Cys Gln Thr Val Ile Arg Asp Val Glu Gln Gln Phe Lys Tyr Thr Gln
165    170    175
Pro Asn Ile Cys Arg Asn Pro Val Cys Ala Asn Arg Arg Arg Phe Leu
180    185    190
Leu Asp Thr Asn Lys Ser Arg Phe Val Asp Phe Gln Lys Val Arg Ile
195    200    205
Gln Glu Thr Gln Ala Glu Leu Pro Arg Gly Ser Ile Pro Arg Ser Leu
210    215    220
Glu Val Ile Leu Arg Ala Glu Ala Val Glu Ser Ala Gln Ala Gly Asp
225    230    235    240
Lys Cys Asp Phe Thr Gly Thr Leu Ile Val Val Pro Asp Val Ser Lys
245    250    255
Leu Ser Thr Pro Gly Ala Arg Ala Glu Thr Asn Ser Arg Val Ser Gly
260    265    270
Val Asp Gly Tyr Glu Thr Glu Gly Ile Arg Gly Leu Arg Ala Leu Gly
275    280    285
Val Arg Asp Leu Ser Tyr Arg Leu Val Phe Leu Ala Cys Cys Val Ala
290    295    300
Pro Thr Asn Pro Arg Phe Gly Gly Lys Glu Leu Arg Asp Glu Glu Gln
305    310    315    320
Thr Ala Glu Ser Ile Lys Asn Gln Met Thr Val Lys Glu Trp Glu Lys
325    330    335
Val Phe Glu Met Ser Gln Asp Lys Asn Leu Tyr His Asn Leu Cys Thr
340    345    350
Ser Leu Phe Pro Thr Ile His Gly Asn Asp Glu Val Lys Arg Gly Val
355    360    365
Leu Leu Met Leu Phe Gly Gly Val Pro Lys Thr Thr Gly Glu Gly Thr
370    375    380
Ser Leu Arg Gly Asp Ile Asn Val Cys Ile Val Gly Asp Pro Ser Thr
385    390    395    400
Ala Lys Ser Gln Phe Leu Lys His Val Glu Glu Phe Ser Pro Arg Ala
405    410    415
Val Tyr Thr Ser Gly Lys Ala Ser Ser Ala Ala Gly Leu Thr Ala Ala
420    425    430
Val Val Arg Asp Glu Glu Ser His Glu Phe Val Ile Glu Ala Gly Ala
435    440    445
Leu Met Leu Ala Asp Asn Gly Val Cys Cys Ile Asp Glu Phe Asp Lys
450    455    460
Met Asp Val Arg Asp Gln Val Ala Ile His Glu Ala Met Glu Gln Gln
465    470    475    480
Thr Ile Ser Ile Thr Lys Ala Gly Val Lys Ala Thr Leu Asn Ala Arg
485    490    495
Thr Ser Ile Leu Ala Ala Ala Asn Pro Ile Ser Gly His Tyr Asp Arg
500    505    510

```

[0038]

Ser	Lys	Ser	Leu	Lys	Gln	Asn	Ile	Asn	Leu	Ser	Ala	Pro	Ile	Met	Ser
	515						520					525			
Arg	Phe	Asp	Leu	Phe	Phe	Ile	Leu	Val	Asp	Glu	Cys	Asn	Glu	Val	Thr
	530					535					540				
Asp	Tyr	Ala	Ile	Ala	Arg	Arg	Ile	Val	Asp	Leu	His	Ser	Arg	Ile	Glu
	545				550					555					560
Glu	Ser	Ile	Asp	Arg	Val	Tyr	Ser	Leu	Asp	Asp	Ile	Arg	Arg	Tyr	Leu
				565					570						575
Leu	Phe	Ala	Arg	Gln	Phe	Lys	Pro	Lys	Ile	Ser	Lys	Glu	Ser	Glu	Asp
			580					585					590		
Phe	Ile	Val	Glu	Gln	Tyr	Lys	His	Leu	Arg	Gln	Arg	Asp	Gly	Ser	Gly
	595					600						605			
Val	Thr	Lys	Ser	Ser	Trp	Arg	Ile	Thr	Val	Arg	Gln	Leu	Glu	Ser	Met
	610					615						620			
Ile	Arg	Leu	Ser	Glu	Ala	Met	Ala	Arg	Met	His	Cys	Cys	Asp	Glu	Val
	625				630					635					640
Gln	Pro	Lys	His	Val	Lys	Glu	Ala	Phe	Arg	Leu	Leu	Asn	Lys	Ser	Ile
				645					650						655
Ile	Arg	Val	Glu	Thr	Pro	Asp	Val	Asn	Leu	Asp	Gln	Glu	Glu	Glu	Ile
			660					665						670	
Gln	Met	Glu	Val	Asp	Glu	Gly	Ala	Gly	Gly	Ile	Asn	Gly	His	Ala	Asp
	675					680						685			
Ser	Pro	Ala	Pro	Val	Asn	Gly	Ile	Asn	Gly	Tyr	Asn	Glu	Asp	Ile	Asn
	690				695						700				
Gln	Glu	Ser	Ala	Pro	Lys	Ala	Ser	Leu	Arg	Leu	Gly	Phe	Ser	Glu	Tyr
	705				710					715					720
Cys	Arg	Ile	Ser	Asn	Leu	Ile	Val	Leu	His	Leu	Arg	Lys	Val	Glu	Glu
				725					730						735
Glu	Glu	Asp	Glu	Ser	Ala	Leu	Lys	Arg	Ser	Glu	Leu	Val	Asn	Trp	Tyr
			740					745					750		
Leu	Lys	Glu	Ile	Glu	Ser	Glu	Ile	Asp	Ser	Glu	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn
	755					760							765		
Lys	Lys	Arg	Ile	Ile	Glu	Lys	Val	Ile	His	Arg	Leu	Thr	His	Tyr	Asp
	770					775						780			
His	Val	Leu	Ile	Glu	Leu	Thr	Gln	Ala	Gly	Leu	Lys	Gly	Ser	Thr	Glu
	785				790					795					800
Gly	Ser	Glu	Ser	Tyr	Glu	Glu	Asp	Pro	Tyr	Leu	Val	Val	Asn	Pro	Asn
			805						810					815	
Tyr	Leu	Leu	Glu	Asp											
			820												

图1: 宫颈结构不良中的增殖和细胞周期失控

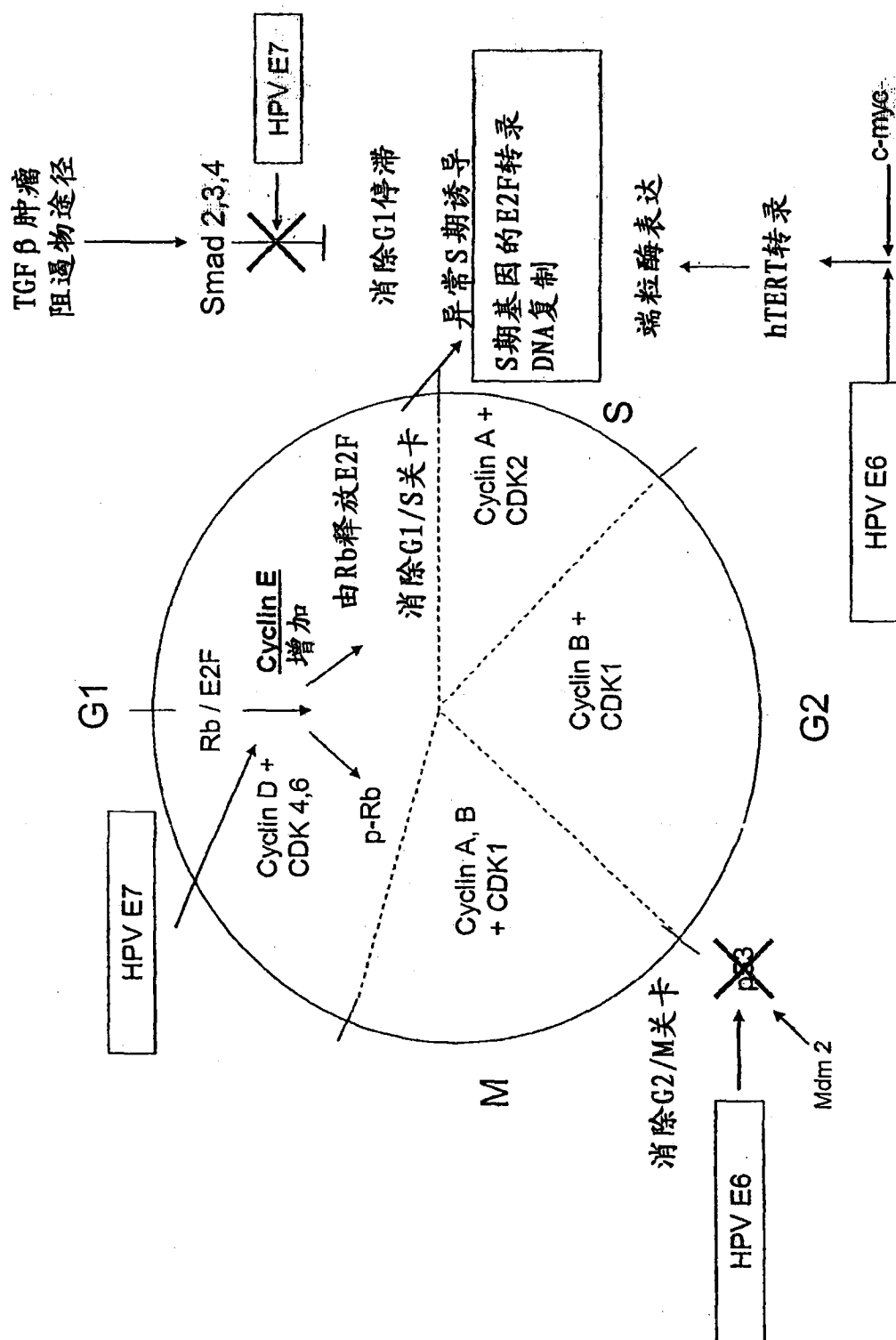


图2: 宫颈癌形成中的异常S期诱导

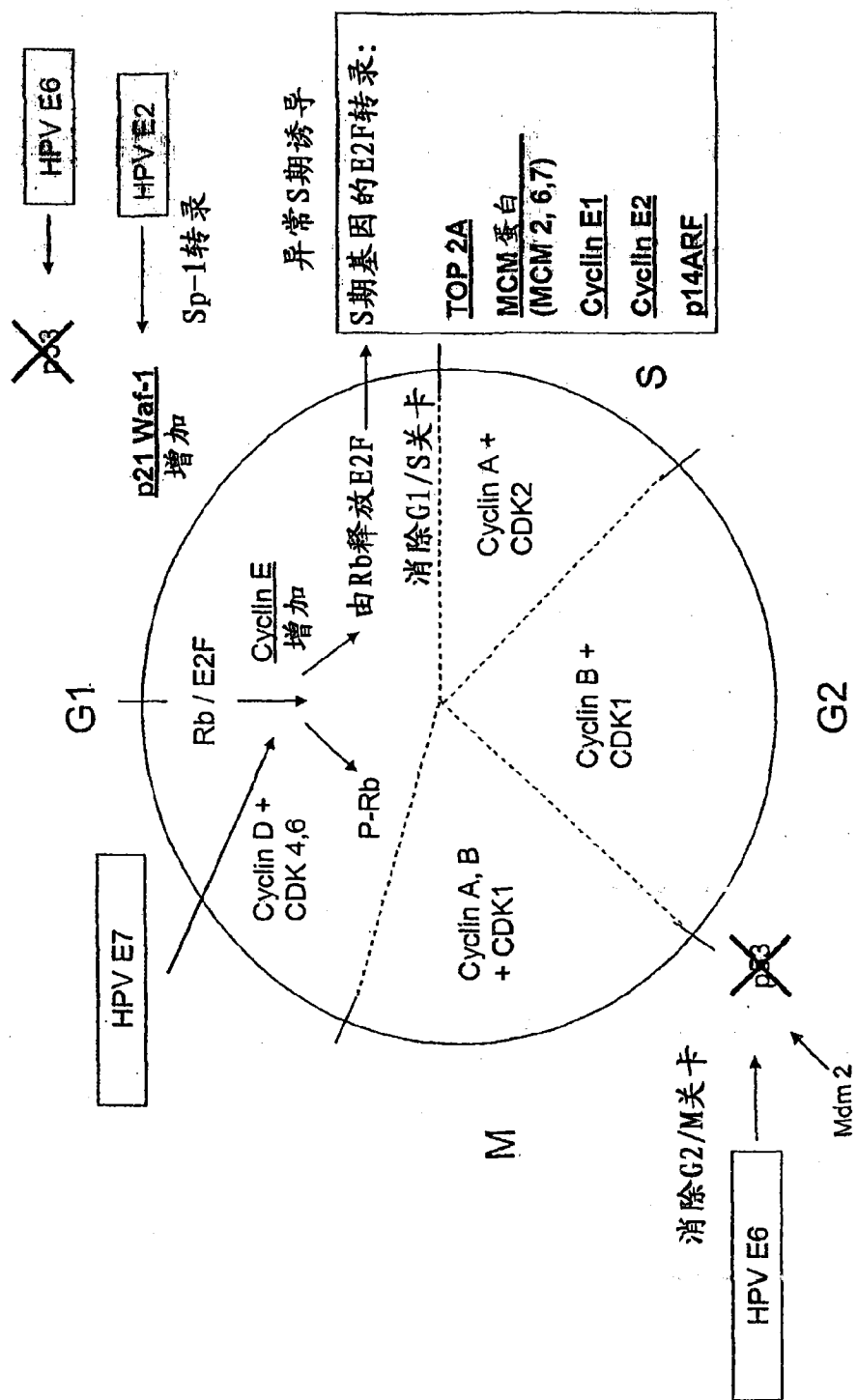


图3: 宫颈癌形成中的异常S期诱导

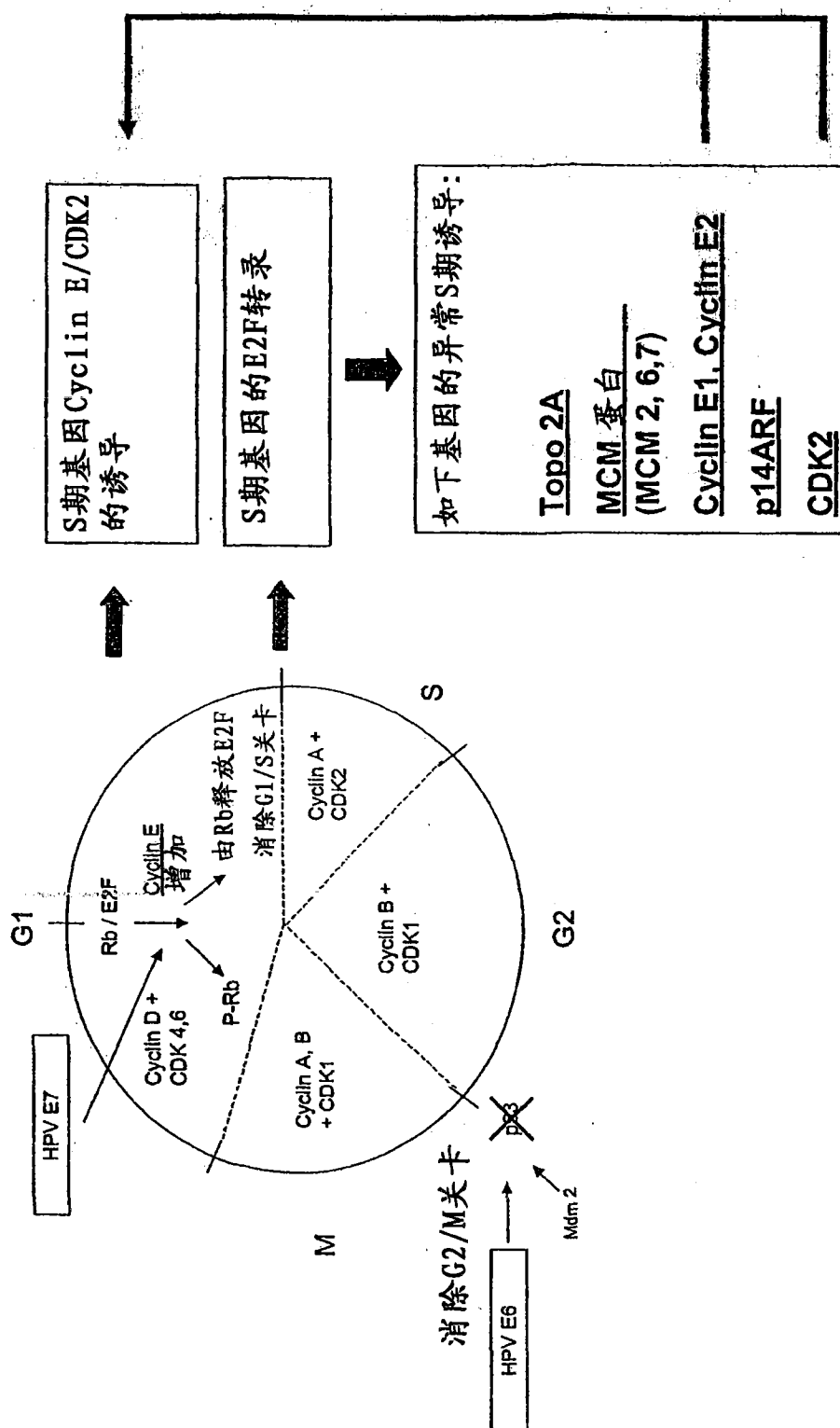


图4: 宫颈癌形成中的异常S期诱导

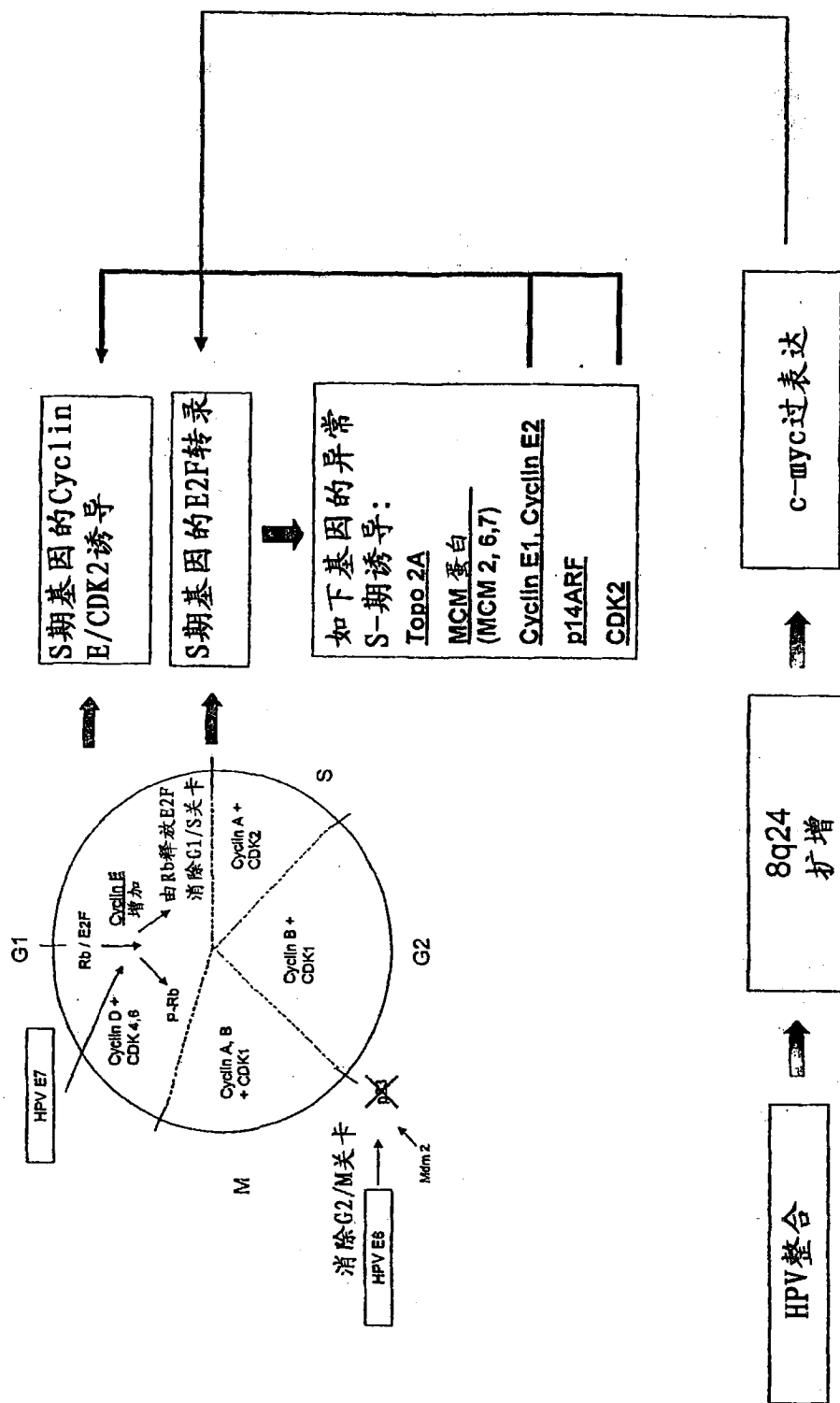


图5: MCM7转录变体: TaqMan引物

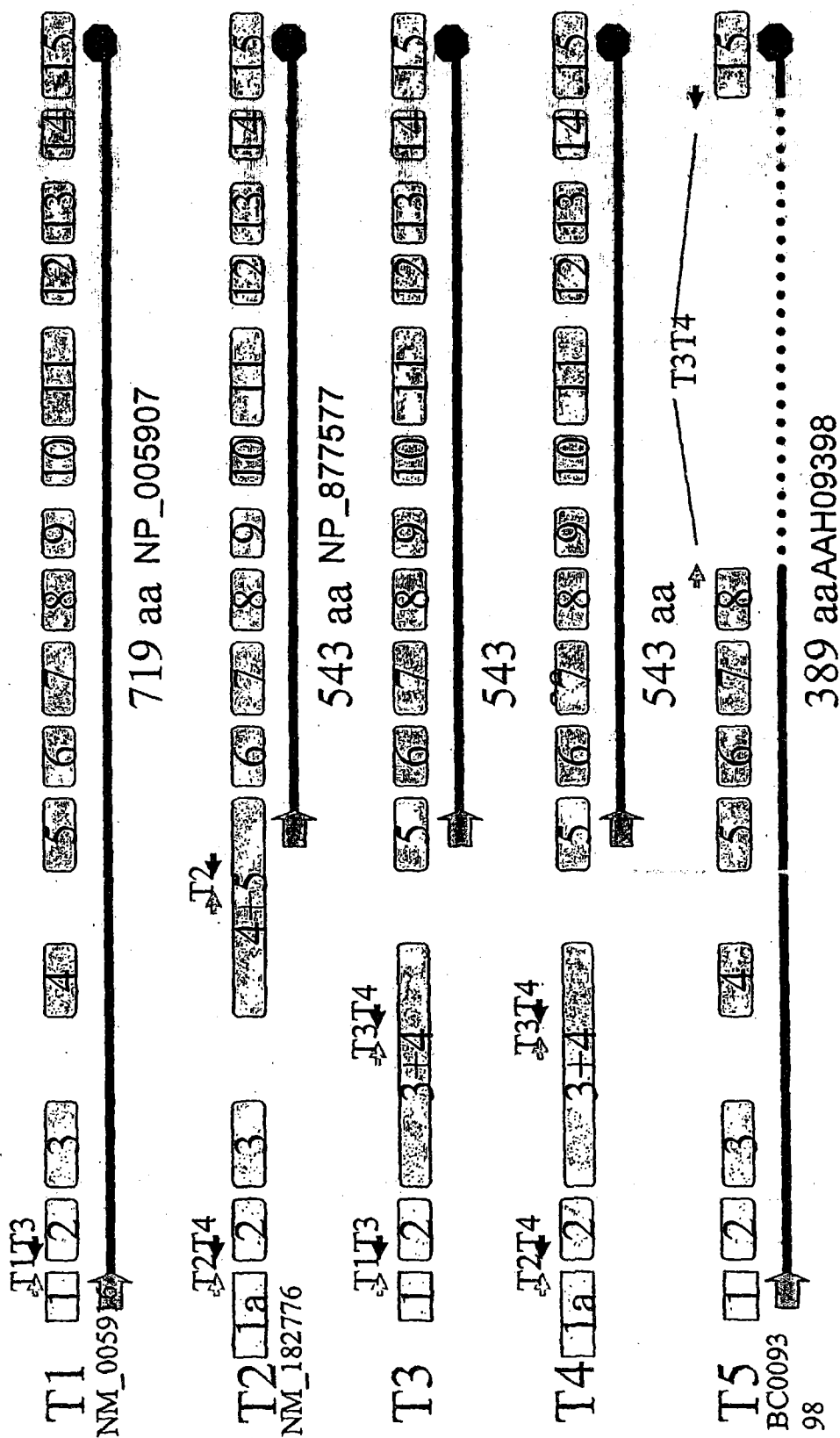


图6: 宫颈组织样品中的Claudin I表达 (IHC)



轻度结构异常



鳞状细胞癌

图7: 组织 (IHC) 和细胞学 (ICC) 样品中的Claudin I表达

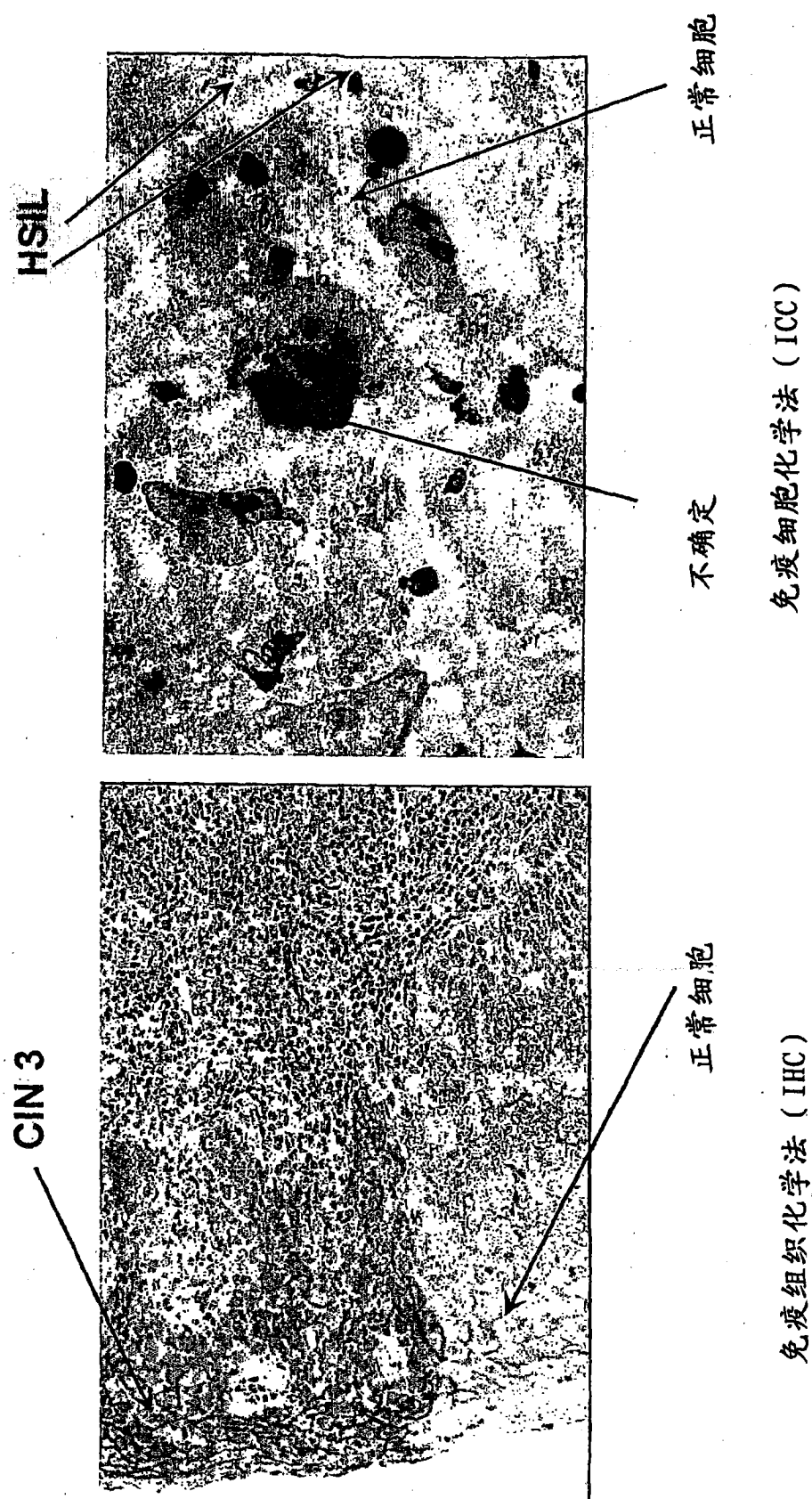


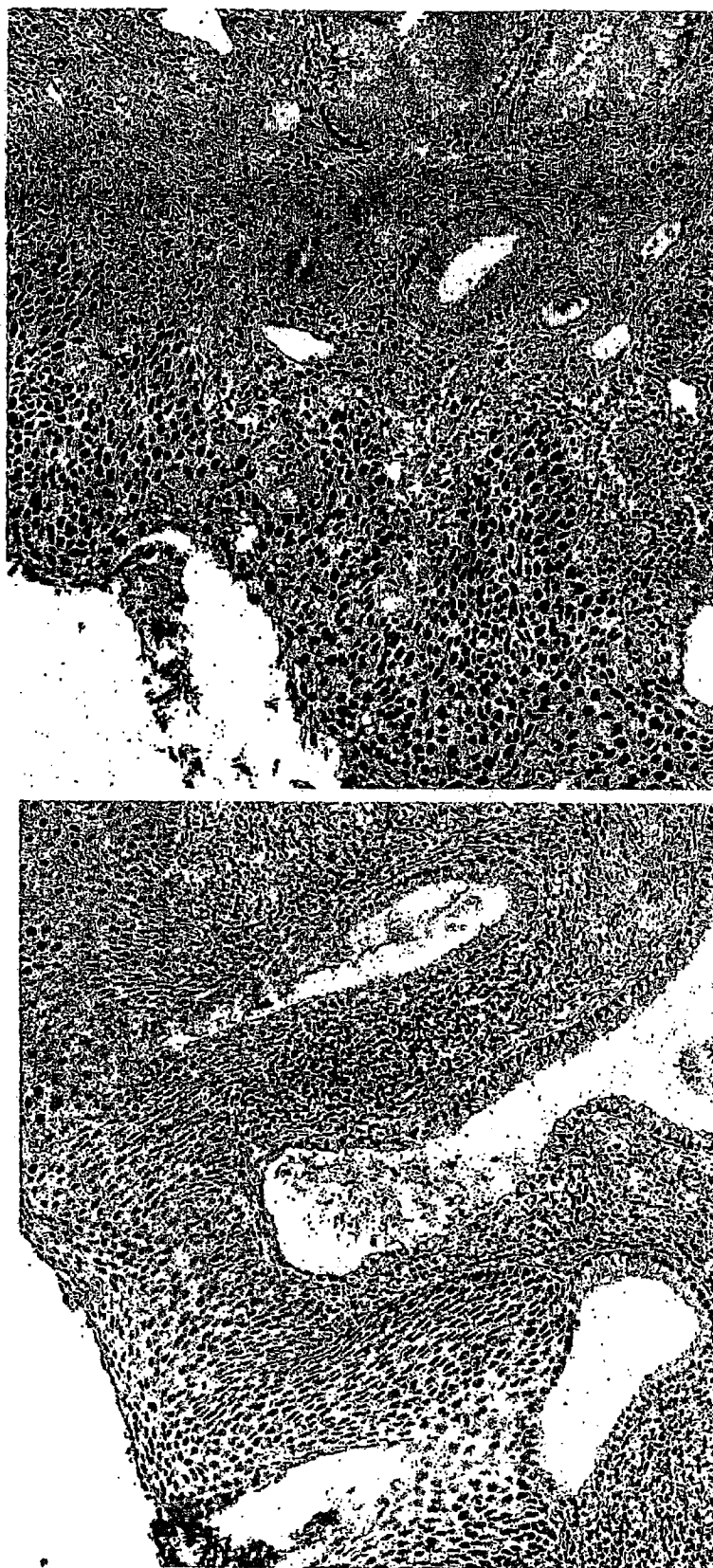
图8: 高度宫颈疾病样品的ICC检验



MCM2 (细胞核标志物)

P16 (细胞质标志物)

图9: 使用不同MCM6抗体对宫颈组织样品的差异染色模式 (IHC)



最佳Mab染色
内部制备的抗体

次佳Mab染色
来自转导实验室的抗体

专利名称(译)	用于子宫颈疾病检测的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1957256B	公开(公告)日	2013-01-02
申请号	CN200580016317.3	申请日	2005-03-23
[标]发明人	TJ费希尔 DP马利诺夫斯基 AJ泰勒 MR帕克		
发明人	T·J·费希尔 D·P·马利诺夫斯基 A·J·泰勒 M·R·帕克		
IPC分类号	G01N33/574 C07K16/18 C12Q1/68 G01N33/53 C07K16/30 C12P19/34 C12Q1/70 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/57411 C07K16/3069 C12Q1/6886 C12Q2600/112 C12Q2600/158 G01N33/6875 G01N2333/025		
代理人(译)	刘晓东		
审查员(译)	牛培利		
优先权	60/556495 2004-03-24 US		
其他公开文献	CN1957256A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

提供了用于在患者样品中鉴定高度子宫颈疾病的方法和组合物。本发明的方法包括在机体样品中检测至少一种生物标志物的过表达，其中所述生物标志物选择性地高度子宫颈疾病中过表达。在特定的权利要求中，所述机体样品是Pap抹片或单层宫颈细胞。本发明的生物标志物包括参与细胞周期调控、信号转导和DNA复制及转录的基因和蛋白。在特定的权利要求中，所述生物标志物是S期基因。在本发明的一些方面，使用生物标志物的特异性抗体在蛋白水平上或使用核酸杂交技术在核酸水平上检测目的生物标志物的过表达。还提供了实施本发明方法的试剂盒。

宫颈结构不良中的增殖和细胞周期失控

