



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02826502.5

[45] 授权公告日 2009年1月14日

[11] 授权公告号 CN 100451655C

[22] 申请日 2002.12.28 [21] 申请号 02826502.5
 [30] 优先权
 [32] 2001.12.29 [33] KR [31] 10-2001-0088090
 [86] 国际申请 PCT/KR2002/002469 2002.12.28
 [87] 国际公布 WO2003/060522 英 2003.7.24
 [85] 进入国家阶段日期 2004.6.29
 [73] 专利权人 韩国生命工学研究院
 地址 韩国大田广域市
 [72] 发明人 高正宪 黄寿英 孙昊成 吴世正
 李贞娥 李尚澈 刘钟信 李大实
 [56] 参考文献
 US5605807A 1997.2.25
 CN1021217A 1988.10.5
 US5427914A 1995.6.27
 审查员 汤丽妮

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公司
 代理人 程金山

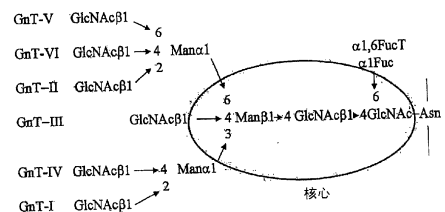
权利要求书 2 页 说明书 16 页 附图 7 页

[54] 发明名称

通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白的糖基化变化诊断癌症的方法及使用其诊断癌症的试剂盒

[57] 摘要

本发明涉及通过检测肿瘤发生和转移相关的蛋白质来诊断癌症的方法，及其应用此法的诊断试剂盒，尤其是涉及通过检测蛋白质的糖基化变化来诊断癌症的方法及使用该方法诊断癌症的试剂盒。本发明的方法和试剂盒可有效地应用于包括结肠癌、胃癌、肺癌和肝癌在内的癌症的灵敏诊断。



1. 针对来自样品的蛋白质的抗体在制备用于诊断癌症的诊断剂中的应用，所述蛋白质与肿瘤发生和转移相关，并且选自由 PDF，肽基脯氨酸顺反异构酶，半乳凝素结合蛋白，L3 抗原，Mac-2-结合蛋白，血清蛋白 90K，肿瘤相关抗原 90K，TIMP-1 和含 SEQ. ID.Nos 6-11 所表示的肽序列的蛋白质组成的组，其中所述诊断剂用于通过检测所述蛋白质的表达和 N-联糖链变化来诊断癌症。
2. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述样品取自血或尿。
3. 如权利要求 1 所述的应用，其中所述癌症选自由结肠癌，胃癌，肺癌，肝癌，子宫癌，乳腺癌和胰腺癌组成的组。
4. 如权利要求 1 所述的应用，其中的糖链变化是 N-联 β 1, 6 N-乙酰葡萄糖胺的糖链分支的变化。
5. 如权利要求 1 所述的应用，其中的检测方法是 ELISA 或包括免疫印迹的利用抗原-抗体结合应答的方法。
6. 一种通过检测一种或多种蛋白质的糖链改变及其表达来诊断结肠癌的试剂盒，所述蛋白质选自由前列腺衍生的因子，肽基脯氨酸顺反异构酶，半乳凝素结合蛋白，L3 抗原，Mac-2-结合蛋白，血清蛋白 90K，肿瘤相关抗原 90K，基质金属蛋白酶-1 的组织抑制物和含 SEQ. ID.Nos 6-11 所表示的肽序列的蛋白质组成的组，所述试剂盒由一种或多种抗上述与肿瘤发生和转移相关的蛋白的抗体，基质，缓冲液，化合物标记的抗体，所述抗体针对上述蛋白质，显色酶或荧光物质缀合的二级抗体，显色底物，显色底物溶液，植物凝集素-L4 或化合物标记的植物凝集素-L4，和显色底物或荧光物质缀合的所述化合物受体。
7. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其中的糖链变化是 N-联 β 1, 6 N-乙酰葡萄糖胺的糖链分支的变化。
8. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其中的基质选自由硝酸纤维素膜，用聚乙烯树脂合成的 96 孔板，用聚苯乙烯树脂合成的 96 孔板和

载玻片组成的组。

9. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其中所述显色酶选自由过氧化物酶和碱性磷酸酶组成的组，所述显色底物溶液选自由 2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)，邻-苯二胺和 N-四甲联苯胺组成的组。
10. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其中所述化合物是生物素，所述受体是抗生物素蛋白。
11. 如权利要求 6 所述的试剂盒，其中所述荧光物质选自由异硫氰酸荧光素和罗丹明-B-异硫氰酸组成的组。

通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白的糖基化变化诊断癌症的方法及 使用其诊断癌症的试剂盒

发明领域

本发明涉及通过检测与肿瘤发生和转移相关的蛋白质来诊断癌症的方法，及使用其的诊断试剂盒，更具体地，涉及通过检测与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的糖基化变化，尤其是蛋白质的 N 联糖链的变化，来诊断癌症的方法及使用其的诊断试剂盒。

发明背景

为了分析蛋白质的功能，长期以来一直使用双向电泳。但最近，由于质谱仪象 MALDI-TOF 的发展以及 N-末端氨基酸序列测定的简便方法的建立，蛋白质组学——一种后基因组功能分析方法取代了双向电泳的位置。可是，蛋白质组学限于应用在由高度复杂的信号转导所造成的癌症的研究中，因为尽管人体处于动态过程，蛋白质组学却可选择性的用于某一时间点的功能分析中。为了检测癌症，监测信号转导所造成的表达增加或翻译后修饰比观察染色后新斑点的出现更重要。双向电泳可探测到的蛋白质量太小了，不足以通过单一染色进行分析。观察蛋白质的糖基化有助于克服上述问题和纠正由于翻译后修饰所造成的分析误差。当将癌症病人组与对照组相比较时，通过普通的电泳难以发现两组之间的斑点差异，而在此同时，通过分析凝集素的糖基化变化却可能描绘出两组之间的清晰曲线图。这种方法现在被称之为糖组学 (glycomics)，它是一种改良的分析方法，克服了蛋白质组学分析中的困难，其特征在于追踪进行翻译后的修饰时蛋白质的糖基化变化。

通过观察肿瘤发生和转移过程中细胞的生物学变化，可以得到这样的结论：细胞膜表面的各种糖蛋白或糖脂被来自原癌基因的特异信号所诱导而经历“异常的糖基化”，导致糖链改变，连续引起细胞间粘附和识别的

变化, 从而造成个体的肿瘤发生和转移 (Hakomori 和 Kannagi, 1983, *J. Natl. Cancer Inst.*, 71: 231—251; Feizi, 1985, *Nature*, 314: 53—571)。当外部刺激物进入时, 信号通过原癌基因 ras、转录因子 ets-1 转送从而刺激 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 V (GnT-V) 的表达。GnT-V 是催化 N-乙酰葡萄糖胺附着于糖蛋白碱性糖链的 β 1, 6 位点上反应的酶, 已知此酶与癌症入侵和转移直接相关 (Dennis 等, 1987, *Science*, 236: 582—5853)。至于糖蛋白, 碱性糖链是在蛋白质合成后形成于内质网 (RE) 中的, 随后转移到高尔基体中。然后, 在那由细胞的多种重要活动所产生的各种糖转移酶 (glycotransferase) 将糖加到蛋白上。通过 6 种 N-乙酰葡萄糖胺转移酶 (I-VI) 的催化作用形成初级糖链, 尤其是形成 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺糖链的 GnT-V 被认为与肿瘤发生和转移有密切的关系。GnT-V 位于高尔基体。此酶通过引起糖链的改变使靶蛋白进入或从细胞表面分泌出来。与此同时, 糖蛋白识别靶细胞的表面蛋白质并随后粘附其上, 引起癌症。

1987 年, Dennis 等人的报告首次注意到了 GnT-V, 他们发现 β 1, 6 支链显著表现为癌症组织正在生长或处于转移期间 (Dennis 等, 1987, *Science*, 236: 582—5853)。细胞表面蛋白质 gp130 是 GnT-V 的主要靶蛋白之一并且在添加 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺时显示出高度的转移活性。GnT-V 基因敲除小鼠已被建立, 在其胚胎干细胞 (ES) 中 GnT-V 缺失, 且多瘤病毒中部 T 抗原 (下文表示为 “PyMT”) 病毒原癌基因被引入其中以诱发癌症。因此, 与其它只有 PyMT 被过表达的正常小鼠组相比, PyMT 诱发的癌症生长和转移在 GnT-V 基因敲除小鼠中被显著抑制 (Granovsky 等, 2000, *Nature Med.*, 6: 306—312), 且 β 1, 6 支链的生长引起高度的转移, 尤其是在患乳腺癌的小鼠中。最近的研究支持, GnT-V 对 33 种肝细胞癌 (HCC) 组织的活性是对正常组织活性的 50 倍, 是对癌症周围组织的 4 倍 (Yao 等, 1998, *J Cancer Res. Clin. Oncol.*, 124: 27—307)。在将 GnT-V 过表达的大肠癌细胞系 WiDr 引入免疫缺陷小鼠以引发大肠癌时, 或在利用受精卵通过 CAM 分析研究血管发生时, GnT-V 的高转移活性都再次得到了证实 (Miyoshi 等, 2001, 未发表的结果)。因此, GnT-V 被认为与转移相关并对任何组织类型都具有高转移活性。GnT-V 酶纯化自人肺癌

细胞和小鼠肾细胞，而此酶的 cDNA 克隆及基因组结构和启动子的分析都已完成 (Gu 等, 1993, *J Biochem*, 113: 614-619; Soreibah 等, 1993, *J Biol. Chem.*, 268: 15381-15385; Kang 等, 1996, *J Biol. Chem.*, 271: 26706-26712)。本发明人还在最近的研究中还报告了转录因子 ets-1 与 GnT-V 的表达有密切的关系 (Ko 等, 1999, *J Biol. Chem.*, 274 (33): 22941-22948)。由于饮食生活方式的趋于西化和癌症发展的持续增长，对于大肠癌，目前在男人和女人最高发病率中排名第四。不过，迄今为止，除了内窥镜检测法之外还无准确诊断结肠癌的方法。

因而，本发明人在癌症诱发细胞中检测到了通过 GnT-V 而被附加了糖的 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺，并发现了通过用质谱仪分析氨基酸序列显示其中有糖链改变的新糖蛋白。本发明人开发了由检测待测样品中上述蛋白质的糖链改变来诊断癌症的方法及使用其的癌症诊断试剂盒，从而完成了本发明。

发明详述

本发明的一个目的是提供了通过检测肿瘤发生和转移相关的蛋白质的糖链改变来诊断癌症的方法及使用其的诊断试剂盒。

为了完成上述目的，本发明提供了通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白质的糖链改变来诊断癌症的方法。

本发明还提供了利用上述方法的诊断试剂盒。

本发明的进一步特征将在下文详述。

为了实现上述目的，本发明提供了通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白质的糖链改变来诊断癌症的方法。

上述癌症可选自由结肠癌、胃癌、肺癌、肝癌、子宫癌、乳腺癌和胰腺癌组成的组，但并不局限于此。

本发明提供了检测癌症细胞和转移细胞中蛋白质糖链支链改变的方法，表现为与正常细胞相比， β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺的变化，即 N-联 (N-linked) 糖链的变化。形成 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺糖链的 GnT-V 与所有组织的肿瘤发生和转移都有关联，而 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺糖链可用凝集素植物凝集素-L4 (下文表示为“L4-PHA”) 进行检测。

转移是由细胞间的识别和粘附引起的。与细胞间识别和粘附有关的糖蛋白位于细胞表面或分泌自细胞表面。因此，可通过检测来自血或尿之类的体液的初步标志来诊断癌症。在本发明的优选实施方案中，为了确定大肠癌的特异标记，使用了 GnT-V 表达相当低的结肠癌细胞系 WiDr，并利用了一种过表达 GnT-V 的细胞系 GnT-V/WiDr 作为结肠癌的模式系统进行糖组学的研究。在本发明中，用双向电泳分析了转移的癌症细胞的培养液。结果得到了两板胶。一板胶用考马斯亮兰染色，另一板胶用凝集素印迹处理。最终，癌症细胞和转移细胞而不是正常细胞中的糖链被改变了的蛋白质被分离开（见图 5 和图 6）。用识别 β 1,6-N-乙酰葡萄糖胺分支的凝集素印迹在癌症细胞中探测到了具有强的暗斑点的某些区域。相应于这些斑点的蛋白质被证实与肿瘤发生和转移有关并显示出了糖链的变化。

本发明人切下这些斑点，然后再次切割这些蛋白质。用电喷射离子化（ESI）/四倍飞行时间（Q-TOF）质谱仪确定这些肽的氨基酸序列，从而证实了 SEQ. ID. Nos 1-15 所代表的肽序列。通过将它们与已建立的蛋白质数据库进行比较来鉴别这些具有准确名称的肽序列并进一步分析各序列、分子量和等电点（见表 1）。

基于 N-联糖链位于序列 Asn-Xaa-Thr/Ser 中的 Asn 上的事实证实了上述蛋白质（Varki 等，1999, *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor Laboratory, 纽约，美国，85-100 页）。

由 SEQ. ID. No 1 和 2 所代表的上述被分析的肽序列是 PDF（来源于前列腺的因子）的一部分。同时，已知 PDF 是 BMPs（骨形成蛋白）的一种，BMPs 是 TGF- β （转化生长因子 β ）家族的一员，并通过诱发软骨形成而与骨的发育和再生相关（Paralkar, V. M. 等，1998, *J Biol. Chem*, 273: 13760-13767）。且此肽具有两个保留完好的 N-联糖链位点。上述蛋白质已以 PDF、MIC-1（巨噬细胞抑制细胞因子-1）、PLAB（胎盘骨成形蛋白）、GDF-15（生长/分化因子 15）等名称被许多研究小组所发现。

已知由 SEQ. ID. No 3 和 4 所代表的上述被分析的肽序列是 T 细胞亲环蛋白，也称为肽基脯氨酸顺反异构酶。所保留的 N-联糖链可发现于众所周知作为抗氧化剂系统要素的序列的 3 个位点上。

通过与已建立的完整数据库相比较，证实了由 SEQ. ID. Nos 6-11 所代

表的上述被分析的肽序列是一种新的蛋白质。该蛋白质在其第四个肽段上具有 Asn-Xaa-Ser 序列，提示了它可能包含 N-联糖链。

已知由 SEQ. ID. No 12 和 13 所代表的上述被分析的肽序列具有许多名称，galectin 结合蛋白、L3 抗原、Mac-2-结合蛋白、血清蛋白 90K、肿瘤相关蛋白 90K 等，并且从癌症或艾滋病病人的血液中探测到。RNA 印迹的结果显示该蛋白质多表达于初级癌症组织及肿瘤相关细胞系中，尽管表达随疾病类型的不同而变化。该蛋白质被证实具有 7 个保留的 N-联糖链位点 (Ullich, A. 等, 1994, *J Biol. Chem.*, 269: 18401-18407)。

已知由 SEQ. ID. No 14 和 15 所代表的上述被分析的肽序列是 TIMP-1 (基质金属蛋白酶-1 的组织抑制物)，而迄今为止已发现 4 种 TIMPs (1-4)。作为一种小分子蛋白质，这些蛋白质的分子量为 22K-30K，且蛋白质具有 40-50% 的同源性。TIMP-1 采取了糖基化的形式，因为其分子量似乎是高的 (见图 7)。且 N-末端被附着于 MMPs 上，导致了对基质金属蛋白酶活性的抑制。此蛋白质在两个位点具有 N-联糖链 (Gomls-Reuth, F. 等, 1997, *Nature*, 389: 77-81)。

即使已经已知上述五种蛋白质中的两种 - galectin 结合蛋白 (肿瘤相关抗原 90K) 和 TIMP-1 与肿瘤发生和转移直接相关，但目前仍未出现关于癌症和上述两种细胞诱发 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺的糖链分支变化的明确报道。

上文所探测出的反映了其糖链变化与肿瘤发生和转移有关的蛋白质是糖蛋白，它们位于细胞表面或分泌自细胞表面，因此可通过检测血或尿之类体液中这些蛋白质的表达和 N-联糖链的变化来诊断癌症。

用肿瘤发生和转移相关蛋白来诊断癌症的方法包括以下两步：从病人身上取样 (步骤 1)；然后检测上述样品中与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的 N-联糖链的变化及其表达 (步骤 2)。

上述步骤 1 中的样品可取自血或尿，优选用常规的血清分离方法制备。

至于上述步骤 2 中的检测方法，每一种基于抗原-抗体反应原理的分析方法都可使用。尤其优选使用 ELISA (酶联免疫吸附试验) 和免疫印迹这类用于分析抗原-抗体反应的最普通的方法。

为了诊断癌症, 本发明人提供了在相应蛋白质抗体产生后检测与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的 N-联糖链变化及其表达的方法。

用 ELISA 检测这些蛋白质的 N-联糖链变化及其表达的方法包括以下步骤:

- 1) 将抗肿瘤发生和转移相关蛋白质的抗体粘附在基质上;
- 2) 在上述基质上加入样品血清引起反应, 然后对其进行洗涤;
- 3) 加入标记的同种抗体或标记的 L4-PHA 以进行进一步的反应;
- 4) 洗涤上述基质后, 在上面加入结合了显色酶或荧光物质的二抗以进行进一步反应; 并
- 5) 在用显色底物溶液将其显色后, 用 ELISA 读数器检测其光密度。

步骤 1 中的基质可选自由硝酸纤维素膜、用聚乙烯树脂合成的 96 孔板、用聚苯乙烯合成的 96 孔板和载玻片组成的组, 本发明所选用的是 96 孔板。

生物素之类的化学化合物(或其衍生物)可用作上述步骤 3 的标记物。用生物素标记的相同抗体可分析与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的表达, 并可用生物素标记的 L4-PHA 检测 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺的糖链分支的变化, 即 N-联糖链的变化。

过氧化物酶或碱性磷酸酶可用作与步骤 4 的抗体结合的显色酶, 而 FITC 或 RITC 可用作荧光物质。特别是, 与抗体结合的过氧化物酶可用于本发明中。

ABTS[2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)]、OPD(邻-苯二胺)和 TMB(N-四甲联苯胺)可用作步骤 5 的显色底物溶液, 特别地, 用过氧化物酶显色的 OPD 被用于本发明中。

本发明诊断癌症的方法可用于利用生物微型芯片和自动微阵列系统进行的样品质量分析中。

本发明还提供了通过检测与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的糖链变化及其表达来诊断癌症的试剂盒。

上文所提及的癌症包括大肠癌、胃癌、肺癌、肝癌、子宫癌、乳腺癌和胰腺癌, 但并不局限于此, 即, 任何类型的癌症都可作为本发明的靶目标。

与肿瘤发生和转移相关的蛋白质可选自由 PDF、肽基脯氨酸顺反异构酶、galectin 结合蛋白、L3 抗原、Mac-2-结合蛋白、血清蛋白 90K、肿瘤相关抗原 90K、TIMP-1 以及包含 SEQ. ID. Nos 6-11 所代表的肽序列的蛋白质。

本发明的诊断试剂盒可用于上述蛋白质表达的定性分析或定量分析，并可用于检测 N-联糖链的变化，准确的说是 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺糖链分支的变化，ELISA 可用于此检测中。例如，所用的诊断试剂盒可供 ELISA，此 ELISA 所用的 96 孔微量滴定板已包被了抗上述蛋白质的抗体。

本发明的诊断试剂盒可包括抗上述蛋白质的抗体、基质、缓冲溶液、显色酶或荧光物质所标记的二抗、显色底物，及尤其是 L4-PHA 以检测 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺糖链分支的变化。

至于基质，可使用硝酸纤维素膜、用聚乙烯树脂合成的 96 孔板、用聚苯乙烯树脂合成的 96 孔板和载玻片。至于显色酶，可用过氧化物酶和碱性磷酸酶。至于荧光物质，可用 FITC 和 RITC，而至于显色底物溶液，可用 ABTS [2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯噻唑啉-6-磺酸)]、OPD (邻-苯二胺) 和 TMB (N-四甲联苯胺)。

为了用本发明的诊断试剂盒诊断癌症，可采取利用了生物微型芯片的自动分析方法。例如，制备蛋白质芯片和同时检测蛋白质的那些糖链的变化来构成诊断试剂盒，所述蛋白质芯片通过将其中由于与肿瘤发生和转移相关而改变糖链的蛋白质固定到载玻片的表面而获得。此诊断试剂盒还包括蛋白质、缓冲溶液和 L4-PHA 等。

附图简述

图 1 显示了通过 6 种与 N-联糖链有关的糖基转移酶的作用而获得的糖链，

图 2 是一套图表，显示了用糖基转移酶 GnT-V 将 β 1, 6-N-乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc β 1) 加到糖链上的过程，

图 3 是一套照片，显示了三个细胞系 (Mock/WiDr、ets-1/WiDr、GnT-V/WiDr) 的双向电泳获得的胶用考马斯亮兰染色后的结果，

图 4 是一套照片，显示了凝集素与三种细胞系双向电泳获得的胶进行

印迹杂交的结果，

图 5 是一套照片，显示了来自三种细胞系的无血清介质在双向电泳后用考马斯亮兰染色的结果，

图 6 是一套照片，显示了来自三种细胞系的无血清介质在双向电泳后与 L4-PHA 凝集素进行印迹杂交的结果，

图 7 显示了用 ESI/Q-TOF 对 timp-1 氨基酸序列进行分析的结果。

实施例

如以下实施例所示，本发明实践上的及目前优选的实施方案是例证性的。

不过，在考虑到此公布内容的基础上，本领域的技术人员可以在本发明的精神和范围内进行修饰和改善。

实施例 1：细胞系的双向电泳和凝集素印迹杂交

本发明人用 GnT-V/WiDr 细胞系进行蛋白质组学的研究，考虑将此细胞系作为大肠癌的模式系统。具体地，就是首先培养细胞，然后在细胞内和细胞外分泌蛋白质中找出由于与所述酶相联系而引起癌症恶化的特异蛋白质组。在补充了 10% FCS 的 RPMI 培养基 (Gibco BRL) 中培养 Mock/WiDr, 对照组细胞系, ets-1/WiDr, 过表达 ets-1 的细胞系, 和 GnT-V/WiDr, 过表达 GnT-V 的细胞系。为了制备过表达的细胞系, 将真核过表达质粒 (Ko 等, 1999, *J. Biol. Chem.*, 274 (33): 22941-22948)、转录因子 ets-1 和糖基转移酶 GnT-V 引入大肠癌细胞系 WiDr (由美国典型培养物保藏中心提供; ATCC, 美国)。用 G418 (350 μg/ml) 处理细胞以相应于新霉素抗性基因。菌落形成时, 利用抗体进行蛋白质印迹杂交探测 ets-1, 并利用 cDNA 进行 RNA 印迹杂交探测 GnT-V。2-3 天后, 当在二氧化碳培养箱中细胞铺满培养板底部 90% 的面积 (汇合) 时, 用 PBS (磷酸盐缓冲的盐水) 洗细胞两次以上以去除残留的血清。用刮刀收集细胞并用 PBS 洗涤。将细胞悬浮于 1ml PBS 中, 然后用超声发生器将其进行超声 (三次, 每次 1 分钟)。在上述破碎细胞中加入含 TCA (三氯乙酸) 的丙酮 (终浓度 10%) 以仅沉淀蛋白质。用丙酮将其洗涤三次以上以去除残留的 TCA,

然后干燥。加入胶上样缓冲溶液（8M 尿素、2%Triton X-100、20mM 二硫苏糖醇、0.5%载体两性电解质、溴酚蓝染料）将其新溶解并用 Multiphor-II（Pharmarcia 公司）进行单向电泳（18 厘米干条，pH3-10）。

在用含 SDS 和 2-巯基乙醇的平衡缓冲溶液平衡所获得的单向电泳胶后，用 Protean II（Bio-Rad 公司）在 12% 聚丙烯酰胺凝胶上进行双向电泳。得到两块胶：一板用生物安全染色溶液（Bio-Rad 公司）进行考马斯亮蓝染色，另一板则用半干燥转移仪（Bio-Rad 公司）转移到 PVDF（聚偏二氟乙烯）膜上。使识别 β 1,6-N-乙酰葡萄糖胺支链的生物素标记的 L-PHA 与具有该支链的糖蛋白粘附在一起，然后将 HRP-标记的链霉抗生物素蛋白附着其上。通过 ECL 荧光反应将其暴露于胶片上。

为了与对照组（Mock/WiDr）进行比较，在相同条件下进行这些实验，即，首先进行单向电泳（等电点分离），然后用考马斯亮蓝染色（图 3），将胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上，随后用 GnT-V 特异的 L4-PHA 进行凝集素印迹杂交（图 4）。进行 3 次以上的双向电泳并用计算机软件（PDQUEST，Bio-Rad 公司）分析细胞内蛋白质表达的变化。结果，在蛋白质表达图谱上未发现差异显示 4 倍以上的蛋白质，在凝集素印迹杂交中也未发现显著的改变（图 4）。

实施例 2：无血清培养基的双向电泳和凝集素印迹杂交

本发明人将细胞系培养于无血清培养基中，从中研究糖链的变化。具体地，就是将 Mock/WiDr 细胞系、ets-1/WiDr 细胞系和 GnT-V/WiDr 细胞系培养于含 10%FCS 的 RPMI 培养基（Gibco BRL）中。2-3 天后，当在二氧化碳培养箱中细胞铺满培养板底部约 80% 的面积时，用 PBS 洗两次以上以去除残留的血清。然后加入无血清的 RPMI 进一步培养 48 小时，收获培养液。浓缩培养液后，加入含 TCA（三氯乙酸）的丙酮（终浓度 10%）使蛋白质沉淀。用丙酮将其洗涤三次以上以去除残留的 TCA，然后干燥。加入凝胶上样缓冲溶液（8M 尿素、2%Triton X-100、20mM 二硫苏糖醇、0.5%载体两性电解质、溴酚蓝染料）将其溶解。用与上述实施例 1 相同的方法进行单向电泳和双向电泳。

完成双向电泳后，探测到少量的 FCS，而预期 PIM（翻译后修饰）会

有广泛的变化，因此几乎不能将表达与有限的软件进行比较。与此同时，L-PHA 凝集素印迹杂交的结果证实了与对照组相比，ets-1 过表达细胞系中检测到了较暗的斑点，而在 GnT-V 过表达细胞系中则观察到最暗的斑点（图 5 和图 6）。切下所有上述斑点中的 12 个并对其中的 5 个进行鉴别。

实施例 3：用 ESI/Q-TOF 质谱仪进行蛋白质序列分析

为了鉴别位于上述 5 个斑点处的蛋白质，本发明人用考马斯亮蓝将已暴露于 X-射线胶片 PVDF 膜（凝集素印迹杂交）进行染色，然后再次将其附着于已感光的胶片上，从而确定斑点的准确位置，随后切下与考马斯亮蓝染色的胶的那些相对应的斑点。用 30% 甲醇和 100% 乙腈对其脱色后，加入 10 个单位的胰蛋白酶（Promega 公司）然后在 37°C 切割肽过夜。用乙腈提取肽，用离心冷冻干燥器将其冷冻干燥，然后用 ESI/Q-TOF（电喷射离子化/四倍飞行时间）质谱仪测定氨基酸序列。ESI 可分离各种肽，而从串联质谱（tandom mass）就可能进行序列分析。

结果，用 ESI/Q-TOF 测定了 SEQ. ID. Nos1-15 所代表的肽序列，并在与蛋白质数据库进行对比后对它们进行了鉴别。每个序列、分子量（MW）和等电点（pI）如下表（表 1）所示。

<表 1>

编号	序列	名称	功能	分子量	等电点	N-联糖基化
a	SEQ. ID. No 1 SEQ. ID. No 2	GDF-15	PLAB/TFG- β 家族	34168.6	9.79	是
b	SEQ. ID. No 3 SEQ. ID. No 4 SEQ. ID. No 5	亲环蛋白	肽基脯氨 酸顺反异 构酶 A	18012.7	7.86	是
c	SEQ. ID. No 6 SEQ. ID. No 7 SEQ. ID. No 8	未鉴别	未鉴别	约 20K	约 5.5	是

	SEQ. ID. No 9 SEQ. ID. No 10 SEQ. ID. No 11					
d	SEQ. ID. No 12 SEQ. ID. No 13	Galectin 3 结合蛋白	Galectin 结合血清蛋白	65331.6	5.13	是
e	SEQ. ID. No 14 SEQ. ID. No 15	TIMP-1	基质金属蛋白酶的 组织抑制物	23171.1	8.46	是

它们的特征解释如下。基于 N-联糖链位于序列 Asn-Xaa-Thr/Ser 中的 Asn 上的事实证实了上述蛋白质 (Varki 等, 1999, *Essentials of glycobiology*, Cold Spring Harbor, 纽约, 美国, 85-100 页)。

上表 1 中的 a 包含 SEQ. ID. No 1 和 2 所代表肽序列, 它是 PDF (来源于前列腺的因子), 是 TGF- β (转化生长因子 β) 家族的 BMPs 蛋白质 (骨形成蛋白) 中的一种, 具有两个保守的 N-联糖链位点。该蛋白质除 PDF 外, 还以 MIC-1 (巨噬细胞抑制细胞因子-1)、PLAB (胎盘骨成形蛋白)、GDF-15、PTGFP 等许多名称被多个研究小组所发现。

已知 b 是含 SEQ. ID. No 3、4 和 5 所代表的肽序列的 T 细胞亲环蛋白, 也称为肽基脯氨酸顺反异构酶。它有三个保守的 N-联糖链位点。

通过与已建立的数据库相比较, 证实了包含由 SEQ. ID. Nos 6-11 所代表的肽序列的 c 是一种新的蛋白质。因为该蛋白质在其第四个肽段上具有 Asn-Xaa-Ser 序列, 它也被认为具有 N-联糖链。

已知包含 SEQ. ID. No 12 和 13 所代表的肽序列的 d 具有许多名称, 如 galectin 结合蛋白、L3 抗原、Mac-2-结合蛋白、血清蛋白 90K、肿瘤相关蛋白 90K 等, 并且具有 7 个保守的 N-联糖链位点。

已知包含 SEQ. ID. No 14 和 15 所代表的肽序列的 e 是 TIMP-1 (基质金属蛋白酶-1 的组织抑制物), 且是用 ESI/Q-TOF 所鉴别的上述 timp-1 的一个实施例 (图 7)。如图 7 所示, TIMP-1 形状为由糖基化形成的长队, 因此其分子量看上去较大。TIMP-1 也具有两个 N-联糖链位点。

实施例 4: 蛋白质糖链分支的变化或其表达的检测

为了通过检测上文所鉴别的蛋白质的糖链变化及其表达来诊断癌症, 本发明人用 ELISA 来检测所述蛋白质的糖链变化及其表达。

首先, 获得靶蛋白的 cDNA, 然后将其克隆到真核基因表达载体中。将其克隆到 WiDr 细胞系中。纯化来自上述培养溶液的蛋白质 (各 1mg)。将它们与佐剂混合, 皮下注射入兔子体内, 进行多克隆抗体的制备。按要求分别将需要量的抗体粘附于两个 96 孔板上。准确的说, 就是在含 100 μ l 的 0.1M 碳酸钠 (pH9.6) 条件下用来源于细菌的蛋白 A 包被 96 孔板 (Maxisorb Nunc), 1 μ g/孔。用 TBS-T (Tris-缓冲的盐水-吐温、0.2M Tris-Cl、0.4M NaCl、0.05%吐温-20) 洗涤 96 孔板, 然后将上文所制备的抗体粘附其上。用 TBS-T 再次洗涤, 然后封闭未粘附抗体的部分, 制备稳定的抗体系统。为了保证重复性和统计处理, 在向培养板中加入血液或其它待测样品后进行连续稀释, 然后用 TBS-T 将其洗涤 3 次。此时, 靶蛋白将被粘附于其特异抗体上。用标记了生物素的相同抗体证实该蛋白质的表达, 用凝集素证实 β 1, 6N-乙酰葡萄糖胺的糖链变化, 其中利用了生物素标记 L-PHA。为了制备生物素标记的抗体, 在 23 $^{\circ}$ C 下、250ml SBRB (琥珀酰亚胺生物素反应缓冲液) 中将抗体 (5-10mg/ml) 透析 6 小时。在 DMSO (二甲亚砜) 中将 NHS-生物素 (N-羟基琥珀酰亚胺生物素) 或 NHS-LC-生物素 (长链磺基琥珀酰亚胺 6- (生物素酰胺) 己酸酯衍生物生物素) 的浓度调节至 2-4mg/ml, 将抗体和生物素溶液以 1:30 (抗体:生物素) 的比率混合, 然后在 37 $^{\circ}$ C 进行搅拌。放置 1 小时使生物素和抗体结合。在 BBS (硼酸盐缓冲的盐水) 中进行透析后制备生物素标记的抗体。至于凝集素, 则使用了购买的生物素标记的 L-PHA。用购买的抗生物素蛋白-过氧化物酶试剂盒检测生物素标记的抗体和凝集素。确切的说, 加入 H₂O₂ 和邻-苯胺, 过氧化物酶的一种底物, 然后测定 490nm 处的光密度。测定

癌症病人血液样品中蛋白质的表达及 β 1, 6N-乙酰葡萄糖胺的糖基化改变, 然后与正常对照组的数据进行比较。

结果, 癌症病人血液中的 β 1, 6N-乙酰葡萄糖胺糖基化程度比正常血液中的提高了10—20倍。

工业适用性

如下文所述, 本发明的通过检测与肿瘤发生和转移相关的蛋白质的糖链改变来诊断癌症的方法以及使用其的诊断试剂盒可有效地用于诊断包括大肠癌在内的癌症。

序列表

<110> 韩国生命工学研究院

<120> 通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白的糖基化变化诊断癌症的方法及使用其诊断癌症的试剂盒

<130> 2fpo-12-01

<150> KR2001-88090

<151> 2001-12-29

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Gly Val Ser Ser Leu Gln Thr Tyr Asp Asp Leu Leu Ala Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 人

<400> 2

Glu Asp Leu Gly Trp Ala Asp Trp Val Leu Ser Pro Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 3

Val Ser Phe Glu Leu Phe Ala Asp Lys
1 5

<210> 4

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 4

Phe Glu Asp Glu Asn Phe Ile Leu Lys
1 5

<210> 5

<211> 19

<212> PRT

<213> 人

<400> 5

Asn Val Asn Pro Thr Val Phe Phe Asp Leu Ala Val Asp Gly Glu Pro
1 5 10 15

Leu Gly Arg

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人

<400> 6

Phe Thr Gly Gly His Glu Val Lys
1 5

<210> 7
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 7
 Gly Leu Gly Ala Ser Asp Ser Thr Leu Thr Tyr Arg
 1 5 10

<210> 8
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 8
 Asp Asn Asn Leu Gly Gln Ala Phe Gln Phe Glu Asp Arg
 1 5 10

<210> 9
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 9
 Glu Phe Gly Leu Gly Ala Thr Ser Asp Ser Tyr
 1 5 10

<210> 10
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 10
 Val Gly Asp Asn Xaa Leu Gly Ala Asn Ser
 1 5 10

<210> 11
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 11
 Ser Gly Ala Tyr Thr Tyr
 1 5

<210> 12
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 12
 Gln Thr Pro Gln His Pro Ser Phe Leu Phe Gln Asp Lys
 1 5 10

<210> 13
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 13
 Tyr Tyr Pro Tyr Gln Ser Phe Gln Thr Pro Gln His Pro Ser Phe Leu
 1 5 10 15

Phe Gln Asp Lys
 20

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 14
Ser Glu Glu Phe Leu Leu Ala Gly Lys
1 5

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 15
Gln Ala Leu Gly Asp Ala
1 5
1

4

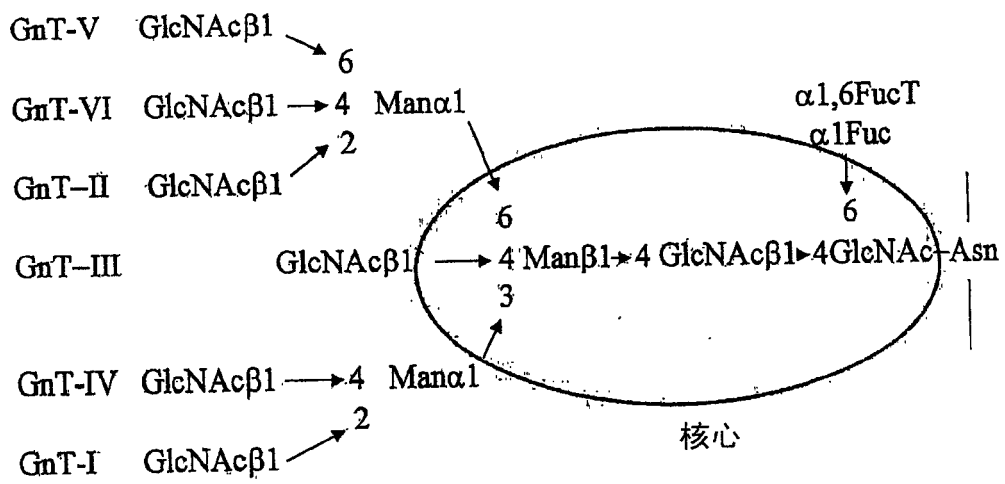


图 1

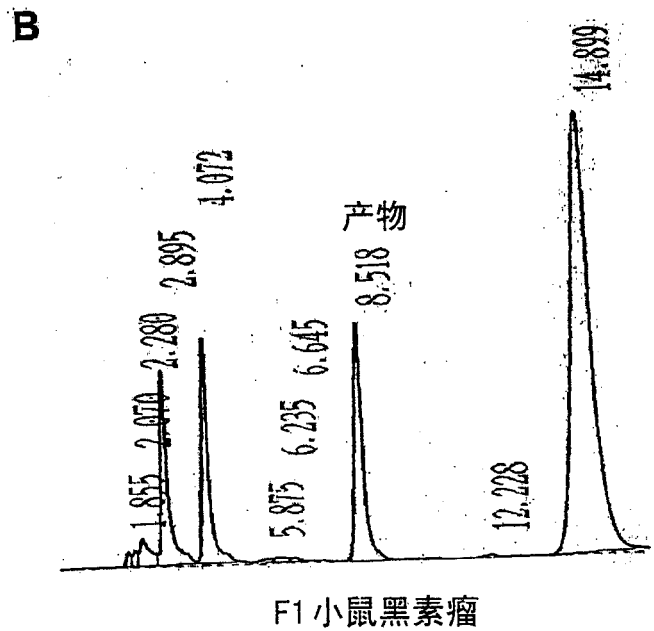
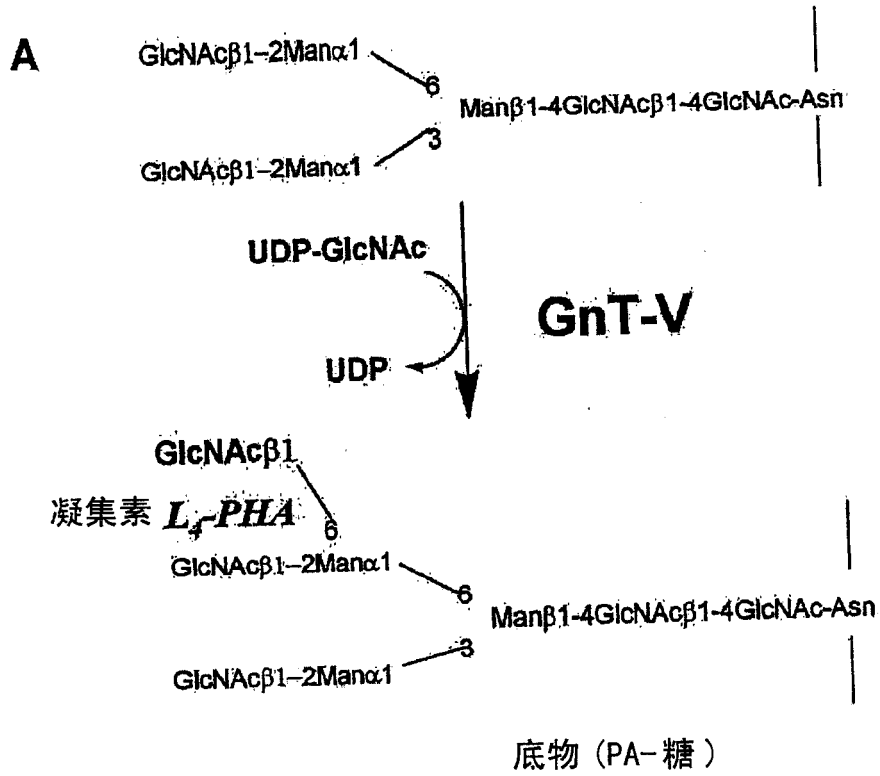


图 2

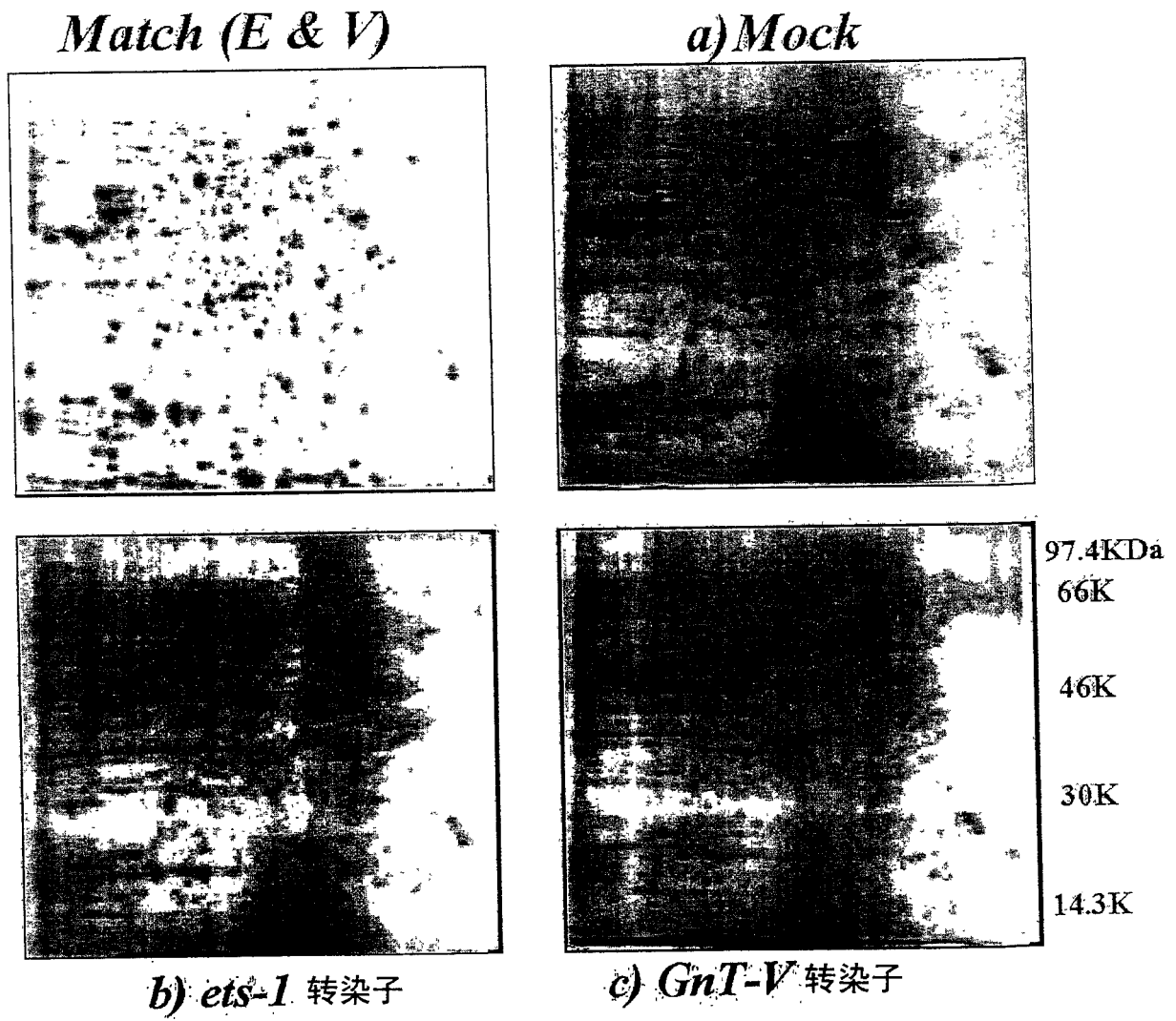


图 3

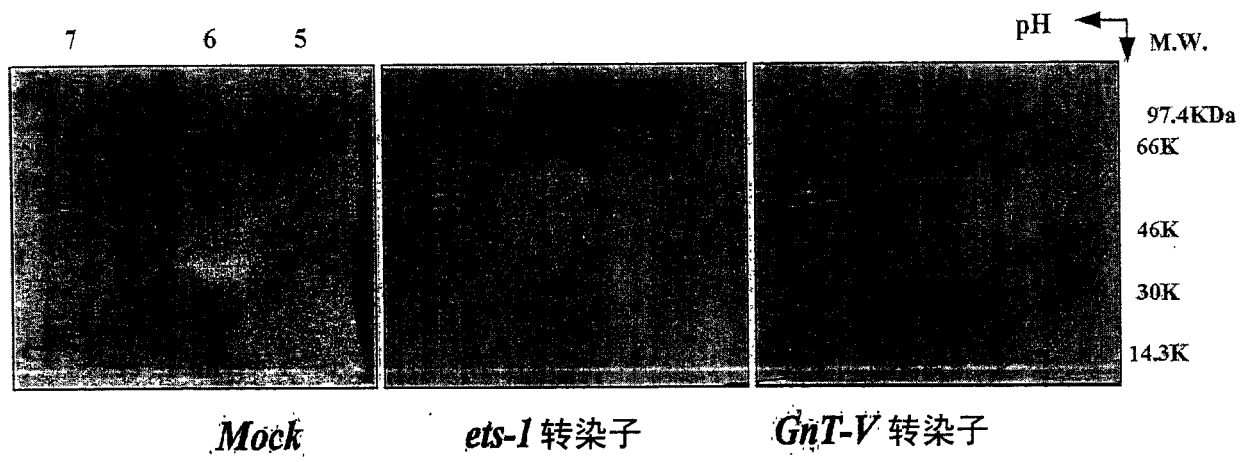


图 4

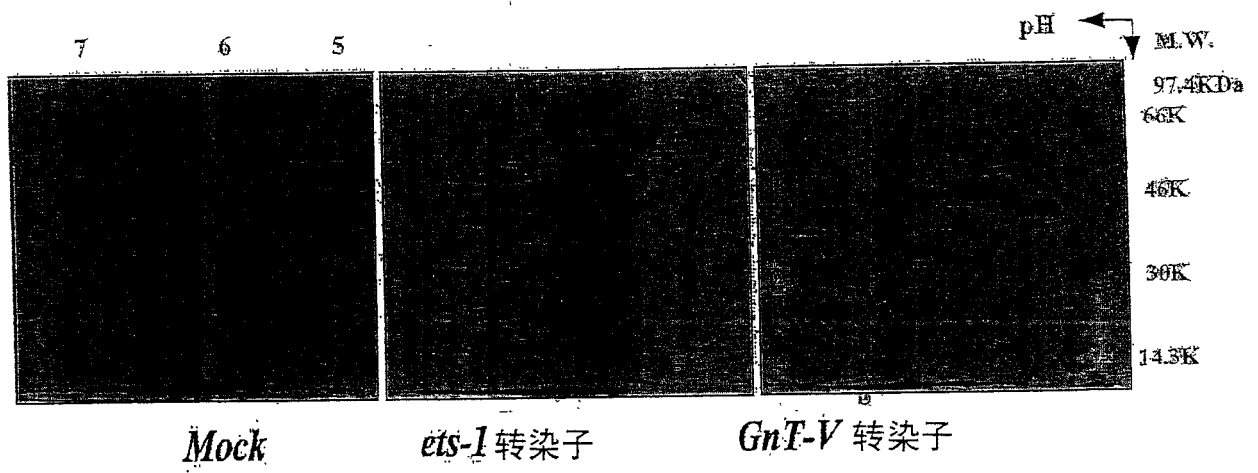


图 5

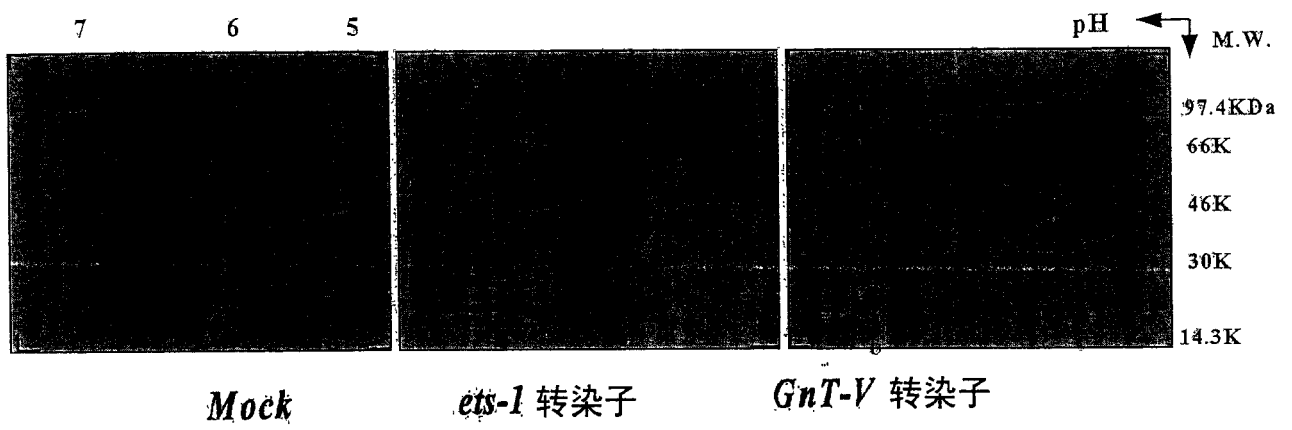


图 6

斑点“e”的MS/MS图谱 SEEFLIAGK (M+H=993.5)

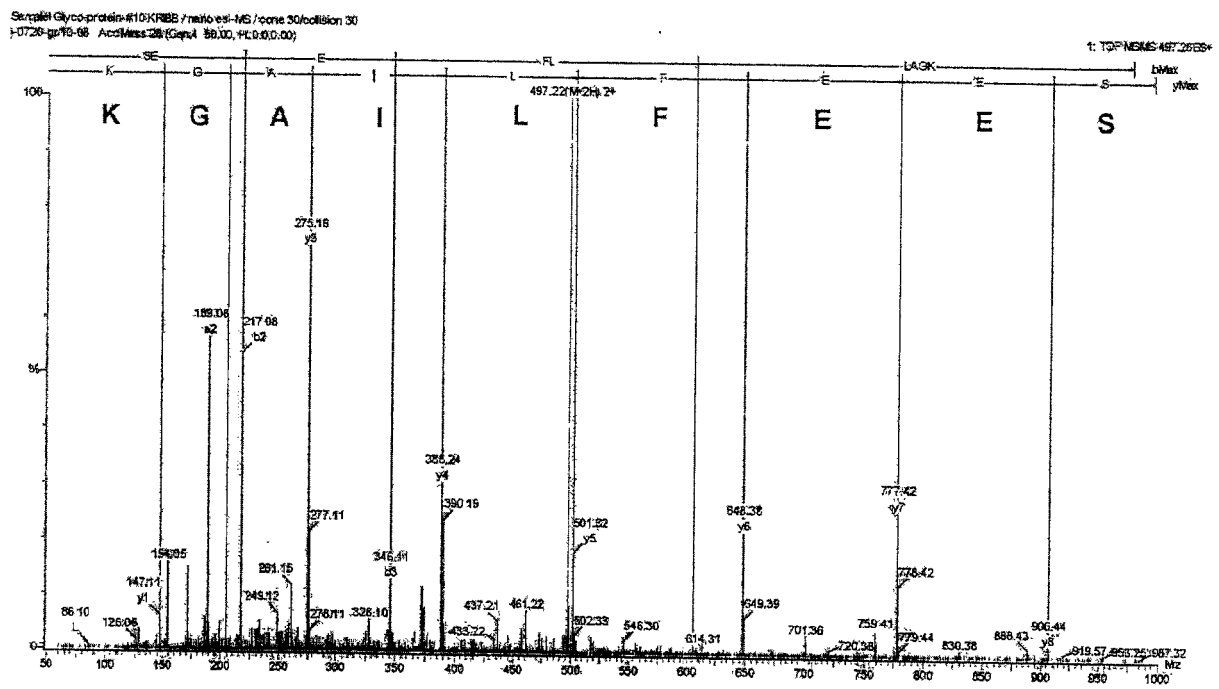


图 7

专利名称(译)	通过检测肿瘤发生和转移相关蛋白的糖基化变化诊断癌症的方法及使用其诊断癌症的试剂盒		
公开(公告)号	CN100451655C	公开(公告)日	2009-01-14
申请号	CN02826502.5	申请日	2002-12-28
[标]申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	韩国生命工学研究院		
[标]发明人	高正宪 黄寿英 孙昊成 吴世正 李贞妮 李尚澈 刘钟信 李大实		
发明人	高正宪 黄寿英 孙昊成 吴世正 李贞妮 李尚澈 刘钟信 李大实		
IPC分类号	G01N33/574 C07K7/06 C07K7/08 G01N21/78 G01N33/53 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/57469		
代理人(译)	程金山		
优先权	1020010088090 2001-12-29 KR		
其他公开文献	CN1610831A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及通过检测肿瘤发生和转移相关的蛋白质来诊断癌症的方法，及其应用此法的诊断试剂盒，尤其是涉及通过检测蛋白质的糖基化变化来诊断癌症的方法及使用该方法诊断癌症的试剂盒。本发明的方法和试剂盒可有效地应用于包括结肠癌、胃癌、肺癌和肝癌在内的癌症的灵敏诊断。

