

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410074306.8

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/531 (2006.01)

G01N 23/04 (2006.01)

[43] 公开日 2006 年 3 月 15 日

[11] 公开号 CN 1746676A

[22] 申请日 2004.9.8

[21] 申请号 200410074306.8

[71] 申请人 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

地址 100021 北京市左安门外潘家园

[72] 发明人 赵晓航 倪晓光 赵平

[74] 专利代理机构 北京北新智诚知识产权代理有限公司

代理人 刁玉生

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 2 页

[54] 发明名称

一种胰腺癌血清标志分子的检测方法

[57] 摘要

本发明涉及一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，通过定量免疫印记法检测人血清/血浆中凝溶胶蛋白浓度，根据所述凝溶胶蛋白含量降低的水平无创性地辅助早期发现胰腺癌。人血浆凝溶胶蛋白标准品，按照一定浓度梯度稀释后与待测血清样本总蛋白共同经 SDS - PAGE 分离，将分离的蛋白从凝胶上转移至 PVDF 膜上。含有样本的 PVDF 膜与抗人凝溶胶蛋白抗体做免疫印迹反应，印迹信号经化学发光、放大后使 X 光片曝光。印迹结果扫描后在图像分析软件辅助下，绘制凝溶胶蛋白标准品含量与印迹强度关系的标准曲线，并在标准曲线的线性范围内计算出同一凝胶上待测血清样品的凝溶胶蛋白含量。该方法简便、快捷，易于被患者接受，对辅助胰腺癌诊断有较高的敏感性和特异性。

1、一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，其特征在于：通过定量免疫印记法检测人血清/血浆中凝溶胶蛋白浓度，根据所述凝溶胶蛋白含量降低的水平无创性地辅助早期发现胰腺癌。

2、根据权利要求1所述的胰腺癌血清标志分子的检测方法，其特征在于：

A、采集病人手术前的血清，使用1×磷酸盐缓冲液稀释50倍后制成待测血清样品；

B、将已知浓度的人血浆凝溶胶蛋白标准品，按照一定浓度梯度与所述待测血清样品共同经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，其中，每块含有所述待测血清样品的胶上至少含有4个泳道连续浓度的所述人血浆凝溶胶蛋白标准品；

C、通过电转移将经过分离的蛋白质从所述的胶上转移至聚偏氟乙烯膜上，该膜经脱脂牛奶封闭后，用抗人凝溶胶蛋白抗体进行免疫印迹反应，反应信号经化学发光、放大，并在暗室内对X光片曝光，形成凝溶胶蛋白印迹结果X光片；

D、使用扫描仪对凝溶胶蛋白印迹结果X光片扫描，用图像分析软件根据已知凝溶胶蛋白标准品含量信号强度绘制标准曲线，并在标准曲线的线性范围内计算出同一块胶上所述待测血清样品中未知的凝溶胶蛋白含量。

一种胰腺癌血清标志分子的检测方法

技术领域

本发明涉及一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，该方法通过定量检测存在于血清/血浆中凝溶胶蛋白（gelsolin）含量，无创性地辅助胰腺癌的早期发现。

背景技术

胰腺癌是一种凶险的消化系统恶性肿瘤，发病隐匿，预后差。近 10 年来其发病率和死亡率呈上升的趋势，根据中国疾病监测指示系统的报告，1991 年至 2000 年我国胰腺癌的死亡率由 2.18/10 万上升到 3.26/10 万，胰腺癌是我国因癌症死亡的第 5-7 位常见恶性肿瘤。在美国，2003 年新增胰腺癌病人 30,700 人，因胰腺癌死亡 30,000 人，位居恶性肿瘤死亡的第四位。胰腺癌早期一般没有症状。当肿瘤向周围脏器浸润，出现腹胀、背痛甚至黄疸等症状时，大部分病人已经出现局部血管、脏器或淋巴结的侵犯或转移，丧失了根治切除的机会，而化疗、放疗对胰腺癌的控制也不能很有效地延长生命。目前，胰腺癌总的 5 年存活率仅为 3-5%，确诊后的中位生存时间<6 个月。然而对于局限在胰腺内的、无淋巴结转移的小胰腺癌（直径<3cm）实行根治性切除后，5 年存活率可达 40%，中位生存时间延长至 32 个月。因此能否实现对胰腺癌的早期诊断是胰腺癌防治中的关键所在。

寻找胰腺癌特异的生物标志分子一直是胰腺癌研究的重要内容。Rosty 等使用表面增强激光解吸离子化质谱技术从胰液中发现了称为肝癌—小肠—胰腺/胰腺炎相关蛋白 I。在胰腺癌患者的胰液中该蛋白含量明显升高，其辅助胰腺癌诊断的敏感性和特异性分别为 75%和 87%。由于采集人体胰液具有一定的危险性，该方法不适合用于常规临床检查。目前用于胰腺癌辅助诊断的血清肿瘤标志物有 10 余种，其中最常用的 CA19-9，诊断胰腺癌的敏感性和特异性约为 70%和 60%。但是，由于 CA19-9 是 Lewis 血型抗原标志，在人群中约有 5%-10% Lewis 血型抗原阴性者不分泌 CA19-9，因此 CA19-9 辅助诊断胰腺癌的应用具有局限性。寻找特异性和敏感性高的血清/血浆肿瘤相关标志物分子，对胰腺癌早诊、早治很有必要。

发明内容

本发明的目的在于提供一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，该方法可以

测定人血清中凝溶胶蛋白含量，血清凝溶胶蛋白含量明显降低可以作为一个血清学标志分子，无创性地辅助胰腺癌诊断，早期发现胰腺癌。

本发明的目的是采用以下技术方案实现的：一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，通过定量免疫印记法检测人血清/血浆中凝溶胶蛋白浓度，根据所述凝溶胶蛋白含量降低的水平无创性地辅助早期发现胰腺癌，其具体步骤是：

A、采集病人手术前的血清，使用1×磷酸盐缓冲液稀释50倍后制成待测血清样品；

B、将已知浓度的人血浆凝溶胶蛋白标准品，按照一定浓度梯度与所述待测血清样品共同经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，其中，每块含有所述待测血清样品的胶上至少含有4个泳道连续浓度的所述人血浆凝溶胶蛋白标准品；

C、通过电转移将经过分离的蛋白质从所述的胶上转移至聚偏氟乙烯膜上，该膜经脱脂牛奶封闭后，用抗人凝溶胶蛋白抗体进行免疫印迹反应，反应信号经化学发光、放大，并在暗室内对X光片曝光，形成凝溶胶蛋白印迹结果X光片；

D、使用扫描仪对凝溶胶蛋白印迹结果X光片扫描，用图像分析软件根据已知凝溶胶蛋白标准品含量信号强度绘制标准曲线，并在标准曲线的线性范围内计算出同一块胶上所述待测血清样品中未知的凝溶胶蛋白含量。

本发明的有益效果是通过建立检测病人血清中凝溶胶蛋白（gelsolin）含量的定量免疫印迹方法，准确测定血清凝溶胶蛋白含量。该方法简便、快捷、患者易于接受，对辅助胰腺癌诊断有较高的敏感性和特异性，也为胰腺癌高危人群筛查提供了一种新的、无创性的检查方式。

附图说明

下面结合附图和实施例对本发明做进一步说明。

图1 血清凝溶胶蛋白含量的计算方法

图2 血清凝溶胶蛋白平均含量的计算

图3 血清凝溶胶蛋白标准曲线的绘制

具体实施方式

一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，通过定量免疫印记法检测人血清/血浆中凝溶胶蛋白（gelsolin）浓度，根据所述凝溶胶蛋白含量降低的水平无创性地辅助早期发现胰腺癌，其具体步骤是：

A、采集病人血清：用不含任何抗凝剂的真空采血管（Greiner-Bio One, Frickenhausen, Germany）采集病人清晨空腹血液样本4毫升，在4℃下经3000

转/分,离心15分钟,于冰上分离血清。血清分装于多个0.5毫升的离心管中,于干冰上速冻后立即转-80℃冰箱保存。使用时从冰箱中取出,在冰上自然融化后,用1×磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline,简称PBS)稀释50倍后制成待测血清样品;

B、用1×PBS稀释人血浆凝溶胶蛋白标准品至5微克/毫升,制成已知浓度的人血浆凝溶胶蛋白标准品;

将已知浓度的人血浆凝溶胶蛋白标准品和待测血清样品共同经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis,简称SDS-PAGE)分离:蛋白标准品和待测血清样品在2×SDS凝胶加样缓冲液中,经100℃加热10分钟处理后,加入SDS-PAGE加样孔。每块胶上含有由4种连续递增浓度的标准凝溶胶蛋白泳道(即每泳道上样量分别为1微克/毫升;2微克/毫升;3微克/毫升;3.5微克/毫升)和数个1:50稀释的待测病人血清样品(每泳道上样5微升)。凝胶置于垂直蛋白质电泳仪(mini-protein III, Bio-Rad Laboratories)上,在100-120伏恒压条件下使标准品和待测样品的蛋白质在同一块胶上和完全相同的实验条件下分离;

C、电泳后将已分离的蛋白从凝胶上通过电转膜仪(mini-transblot cell, Bio-Rad Laboratories)在4℃、110伏恒压条件下转移至聚偏氟乙烯膜(polyvinylidene difluoride,简称PVDF膜),转膜1小时;

含有样品的PVDF膜经1×PBS稀释的10%脱脂牛奶(安怡长青高钙脱脂奶粉)于4℃封闭3小时。用抗人凝溶胶蛋白抗体在膜上进行免疫印迹反应:加入1:1000稀释的小鼠抗人凝溶胶蛋白单克隆抗体(BD Biosciences Pharmingen)室温孵育2-3小时;洗膜液洗膜,5分钟/次,共洗3次;加入1:3000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG(Santa Cruz Biotechnology)室温孵育1小时;洗膜液洗膜,5分钟/次,共洗5次;加入化学发光试剂ECL(Santa Cruz Biotechnology)放大凝溶胶蛋白印迹信号,在暗室内对X光片(Kodak X-Omat V Film)曝光(每张膜至少选3种不同曝光时间,曝光3次以上),经显影、定影后形成凝溶胶蛋白印迹结果X光片,见图1中的A部。图中显示出梯度稀释的凝溶胶蛋白标准品(一块胶上至少有连续4个不同浓度)与待测血清样品在同一胶上使蛋白质分离,并用凝溶胶蛋白抗体做特异性免疫印迹分析。结果显示,血清中凝溶胶蛋白分子量为93kDa, N113、N115和N116为正常血清样品;P16、P57和P118为胰腺癌血清样品。用人血清中相对恒定表达的转铁蛋白(transferrin, 分子量为80kDa)含量作为血清样本上样量的内对照。

D、用扫描仪(N-TEK NuScan 900)扫描凝溶胶蛋白印迹结果X光片,用图像分析软件Quantity One 4.4.1(Bio-Rad Laboratories)根据已知凝溶胶蛋白标准品含量信号强度绘制标准曲线。只有当已知含量的标准品与其对应的蛋白印迹强度呈线性分布时($r>0.94$),方可绘制二者之间线性关系的标准曲线反之,如果 $r\leq 0.94$,表示标准曲线不可信。进一步在标准曲线的线性范围内,定量分析同一胶上待测血清的蛋白印迹强度,换算出凝溶胶蛋白含量。

参见图2所示,为了减小由于曝光时间不同对蛋白量与印迹强度间线性关系影响的实验误差,分别计算三次不同曝光时间下凝溶胶蛋白含量,并取平均值作为待测样本中凝溶胶蛋白的最终含量。

参见图1中的B部,图中显示根据凝溶胶蛋白标准品的蛋白含量及其对应印迹信号强度,用Quantity One 4.4.1软件绘制的标准曲线,并根据待测血清样本凝溶胶蛋白免疫印迹信号强度,在标准曲线的线性范围内计算出待测血清样本中凝溶胶蛋白含量。横坐标为蛋白印迹强度(像素/平方毫米),纵坐标为蛋白浓度(微克/毫升)。Std1-Std4为凝溶胶蛋白标准品,N113、N115和N116为正常血清样本;P16、P57和P118为胰腺癌血清样品。

图2显示血清中凝溶胶蛋白平均含量的计算方法。图中的A部、B部、C部、D部、E部和F部代表六次实验结果。由于曝光时间的不同对蛋白含量与蛋白印迹强度之间的线性关系有一定的影响,为了减小实验误差,每次实验取三种不同曝光时间对X光片曝光(曝光时间1、2、3),分别计算三次不同曝光时间的血清样本凝溶胶蛋白的平均含量,作为待测样品中凝溶胶蛋白最终含量。

结果判定:待测血清样品中凝溶胶蛋白的含量降低,低于191.15mg/L时,提示该患者可能患有胰腺癌,需高度注意。

在本实施例中,需要提供一个已知浓度的人血浆凝溶胶蛋白作为标准品的数据,该数据产生如下:

将已知浓度(1毫克/毫升)的人血浆凝溶胶蛋白标准品(购自Cytoskeleton公司,美国Denver,CO)用1×PBS稀释至5微克/毫升,并呈梯度递增加样,使每泳道标准品上样量分别为1微克/毫升、1.5微克/毫升、2微克/毫升、2.5微克/毫升、3微克/毫升和3.5微克/毫升。在每一批实验中至少含有4个连续浓度的标准品点,绘制标准曲线。

人血浆凝溶胶蛋白标准品和数个1:50稀释的待测血清(每泳道上样5微升)样本在2×SDS凝胶加样缓冲液中经100℃加热10分钟后,SDS-PAGE凝胶置于垂直蛋白质电泳仪(mini-protein III, Bio-Rad Laboratories)上,在100-120

伏恒压条件下使标准品和待测样本的蛋白质在同一块胶上和完全相同的实验条件下按分子量大小分离；

通过电转膜仪 (mini-transblot cell, Bio-Rad Laboratories) 在4℃、110伏恒压条件下，将电泳后的蛋白从凝胶上转移至PVDF膜（转膜1小时）。含有样本的PVDF膜经1×PBS稀释的10%脱脂牛奶（安怡长青高钙脱脂奶粉）于4℃封闭3小时。加入1:1000稀释的小鼠抗人凝溶胶蛋白单克隆抗体 (BD Biosciences Pharmingen) 室温孵育2-3小时；洗膜液洗膜，5分钟/次，共洗3次；加入1:3000稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗小鼠IgG (Santa Cruz Biotechnology) 室温孵育1小时；洗膜液洗膜，5分钟/次，共洗5次；加入化学发光试剂ECL (Santa Cruz Biotechnology) 放大凝溶胶蛋白印迹信号，在暗室内对X光片 (Kodak X-Omat K Film) 曝光（每张膜至少选3种不同曝光时间，曝光3次以上），经显影、定影后形成凝溶胶蛋白印迹结果X光片，参见图3中的A部。

凝溶胶蛋白印迹结果经扫描仪 (N-TEK NuScan 900) 扫描，使用图像分析软件 Quantity One 4.4.1 (Bio-Rad Laboratories) 根据已知凝溶胶蛋白标准品含量和对应的印迹信号强度绘制标准曲线。只有当已知含量的标准品与其对应的蛋白印迹强度呈线性分布时 ($r > 0.94$)，方可绘制二者之间线性关系的标准曲线。

图3中的A部显示凝溶胶蛋白标准品呈梯度递增加样后的免疫印迹结果。每泳道标准品上样量分别为1微克/毫升、1.5微克/毫升、2微克/毫升、2.5微克/毫升、3微克/毫升和3.5微克/毫升等；图3中的B部显示使用Quantity One 4.4.1软件绘制凝溶胶蛋白标准品的蛋白浓度与其对应的蛋白印迹强度之间的标准曲线 ($r = 0.996$)。横坐标为蛋白印迹强度，即每平方毫米面积中的平均像素数 (pixel/mm²)，纵坐标为蛋白浓度，即每毫升体积含蛋白质的微克数 (μg/ml)。

本实施例中所用液体配方如下：

- 1、1×PBS (pH7.4)：137mM NaCl, 2.68mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 1.76mM KH₂PO₄。
- 2、2×SDS 凝胶加样缓冲液：100mM Tris-HCl, pH6.8, 200mM DTT, 4% SDS, 0.2% 溴酚蓝, 20%甘油。
- 3、Tris-甘氨酸电泳缓冲液：25 mM Tris, 250mM 甘氨酸, pH8.3, 0.1% SDS。
- 4、转膜液：25mM Tris, 192mM 甘氨酸, 20% 甲醇, pH8.3。
- 5、洗膜液：20mM Tris-HCl, pH7.5, 200mM NaCl, 0.1% Tween-20。

本发明建立检测病人血清中新的胰腺癌血清学标志分子——凝溶胶蛋白含量的定量免疫印迹方法，准确测定血清凝溶胶蛋白含量对早期发现胰腺癌具有

重要意义。通过定量免疫印迹方法检测了血浆型凝溶胶蛋白 (gelsolin) 在 65 例胰腺导管腺癌、34 例消化系统其它恶性肿瘤 (包括食管癌 6 例、胃癌 6 例、结直肠癌 5 例、十二直肠癌 5 例、胆囊癌 4 例、胆管癌 3 例和胰岛细胞瘤 5 例)、11 例胰腺良性疾病 (慢性胰腺炎 5 例、假性囊肿 3 例和良性腺瘤 3 例) 和 54 例正常人血清中的表达水平。胰腺癌病人血清中凝溶胶蛋白的平均含量为 $155.24 \pm 44.29 \text{ mg/L}$ ，显著低于正常人血清凝溶胶蛋白平均含量 $224.44 \pm 42.92 \text{ mg/L}$ ；消化系统其它恶性肿瘤病人平均血清凝溶胶蛋白含量为 $212.10 \pm 60.35 \text{ mg/L}$ ；胰腺良性疾病病人血清凝溶胶蛋白含量为 $203.74 \pm 26.70 \text{ mg/L}$ ($P < 0.001$)。而且，血清凝溶胶蛋白含量不受血清中其它成分，如白蛋白、胆红素等的影响，比较稳定。受试者工作特征 (receiver operating characteristic, ROC) 曲线显示，以血清凝溶胶蛋白浓度 $\leq 191.15 \text{ mg/L}$ 为标准，用血清凝溶胶蛋白含量检测胰腺癌的敏感性为 78.5%，特异性为 72.7%，可以作为胰腺癌的一个血清学辅助诊断标志分子。

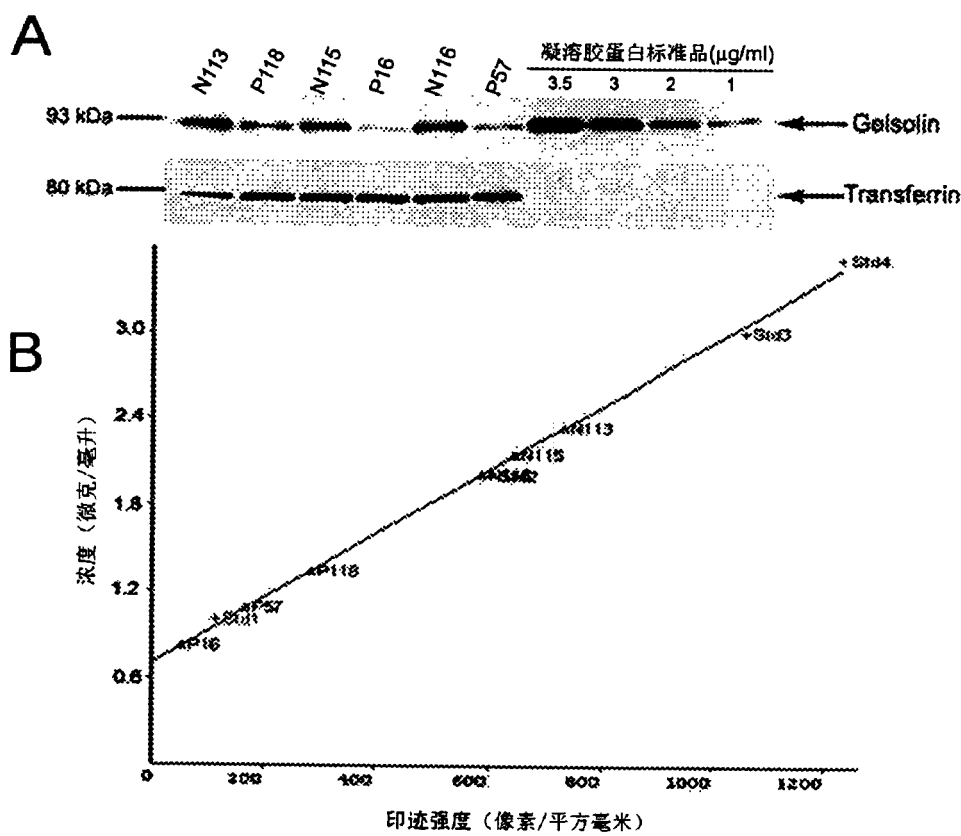


图 1

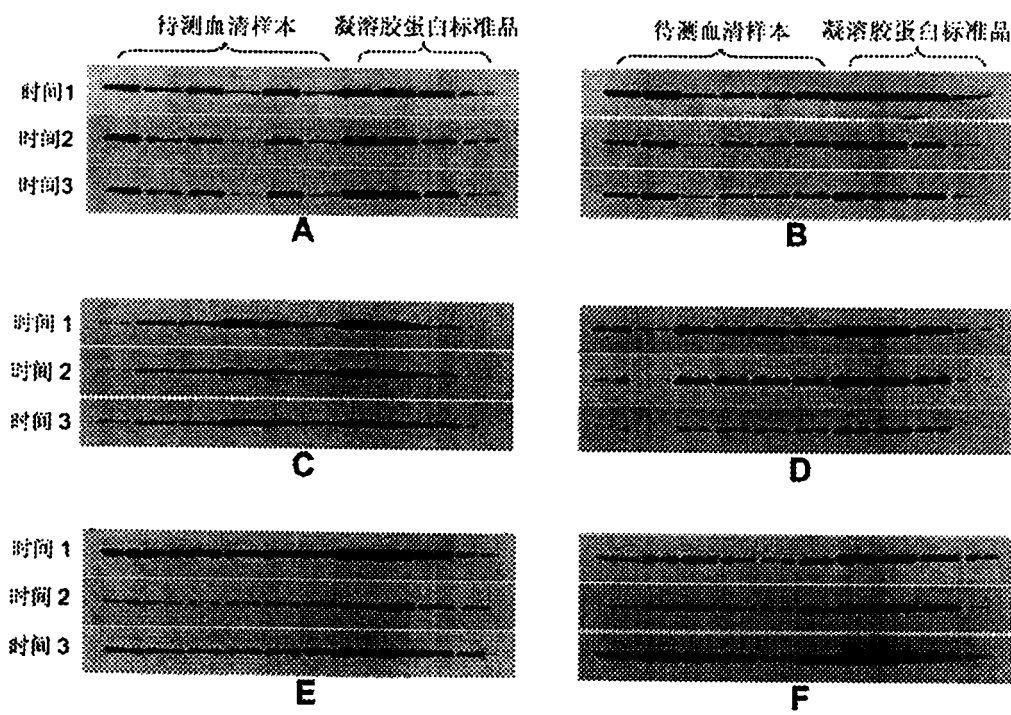


图 2

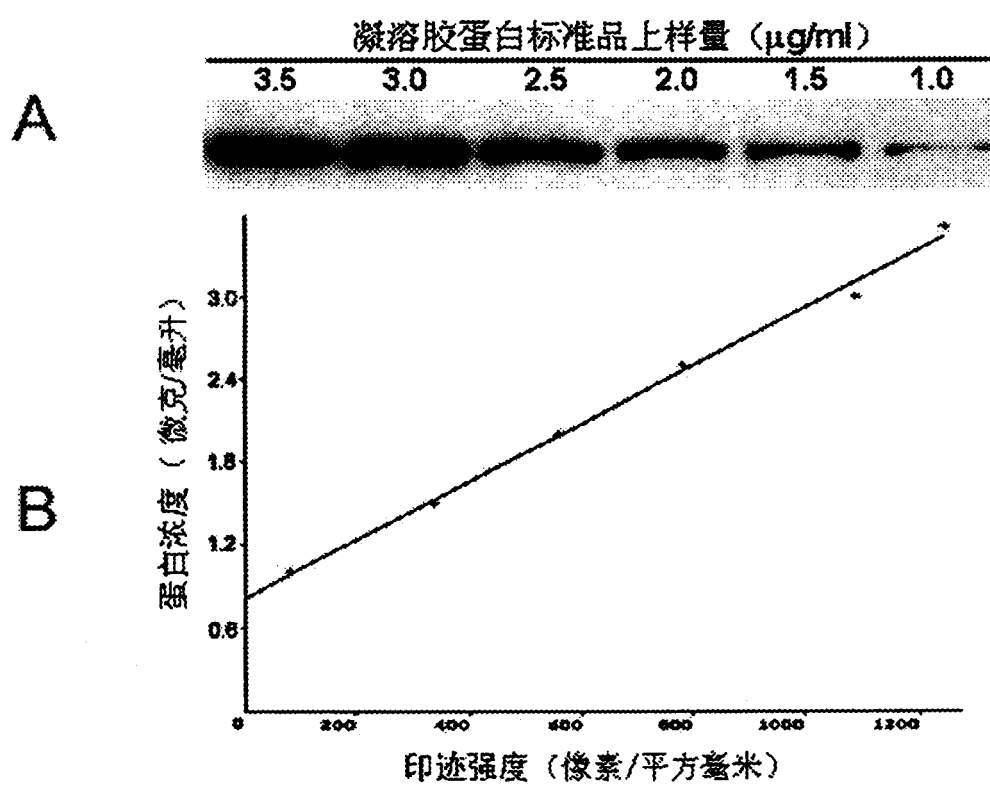


图 3

专利名称(译)	一种胰腺癌血清标志分子的检测方法		
公开(公告)号	CN1746676A	公开(公告)日	2006-03-15
申请号	CN200410074306.8	申请日	2004-09-08
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
[标]发明人	赵晓航 倪晓光 赵平		
发明人	赵晓航 倪晓光 赵平		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531 G01N23/04		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种胰腺癌血清标志分子的检测方法，通过定量免疫印记法检测人血清/血浆中凝溶胶蛋白浓度，根据所述凝溶胶蛋白含量降低的水平无创性地辅助早期发现胰腺癌。人血浆凝溶胶蛋白标准品，按照一定浓度梯度稀释后与待测血清样本总蛋白共同经SDS - PAGE分离，将分离的蛋白从凝胶上转移至PVDF膜上。含有样本的PVDF膜与抗人凝溶胶蛋白抗体做免疫印迹反应，印迹信号经化学发光、放大后使X光片曝光。印迹结果扫描后在图像分析软件辅助下，绘制凝溶胶蛋白标准品含量与印迹强度关系的标准曲线，并在标准曲线的线性范围内计算出同一凝胶上待测血清样品的凝溶胶蛋白含量。该方法简便、快捷，易于被患者接受，对辅助胰腺癌诊断有较高的敏感性和特异性。

