

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610057515.0

[51] Int. Cl.

C12N 15/09 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/574 (2006.01)

[43] 公开日 2007 年 9 月 19 日

[11] 公开号 CN 101037684A

[22] 申请日 2006.3.13

[21] 申请号 200610057515.0

[71] 申请人 北京市肿瘤防治研究所

地址 100036 北京市海淀区阜成路 52 号

[72] 发明人 吕有勇 张庆英 李文梅 赵 敏
刘斯奇

[74] 专利代理机构 北京天昊联合知识产权代理有限公司

代理人 罗会英 刘榜美

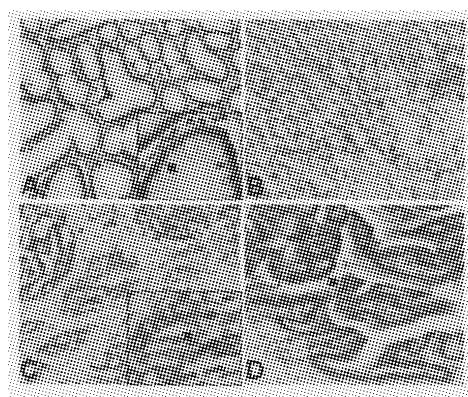
权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 5 页

[54] 发明名称

钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及其用途

[57] 摘要

一种钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及其用途的发明是通过构建原核表达载体 pET - 28/S100A14 并获得高效表达的 S100A14 - his 融合蛋白，经免疫动物得到 S100A14 抗血清，通过免疫亲和层析纯化获得了具有高度特异性抗体，可用于石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析。通过鉴定 S100A14 在胃癌组织中的差异表达，确定 S100A14 在高分化癌组织中表达明显高于低分化癌组织 ($\chi^2 = 20.51$, $P < 0.001$)。进一步结果表明，S100A14 高表达组的病例 5 年生存率高于低表达组 (Log - rank test, $\chi^2 = 5.24$, $P = 0.02$)。由此表明，我们首次获得的抗 S100A14 抗体可用于鉴别胃癌组织的分化程度和判断临床预后。



1、一种钙结合蛋白 S100A14 抗体制备方法，其特征在于：通过构建了原核表达载体并获得可溶性的 S100A14 融合蛋白，经免疫动物得到高滴度的抗 S100A14 抗体，经过纯化获得了具有高度特异性抗体。

2、一种钙结合蛋白 S100A14 抗体的用途，其特征在于：S100A14 抗体可用于石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析，S100A14 抗体在石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析中均表现出高度特异性，并能验证 S100A14 在胃癌细胞系和组织中的差异表达。

3、根据权利要求 2 所述的钙结合蛋白 S100A14 抗体的用途，其特征在于：S100A14 抗体可用于鉴别胃癌组织的分化程度，通过大样本胃癌组织的免疫组化和 Western blot 分析，确定 S100A14 在高分化癌组织中表达明显高于低分化癌组织。

4、根据权利要求 2 所述的钙结合蛋白 S100A14 抗体的用途，其特征在于：S100A14 抗体可用于判断胃癌临床预后，S100A14 高表达组病例 5 年生存率明显高于低表达组。

钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及其用途

技术领域

一种钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及其用途的发明，涉及基因克隆、蛋白表达、抗体制备、纯化，免疫细胞和组织化学染色多项技术。特别涉及钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及鉴别胃癌分化程度和临床预后的用途。通过制备高度特异性的抗体，采用石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析，鉴定 S100A14 在胃癌细胞和组织中的差异表达，利用 S100A14 抗体鉴别胃癌组织的分化程度和判断临床预后。

背景技术

S100家族是一个有21个成员的钙离子结合蛋白超家族，具有EF手形结构，被认为是一种钙传感器蛋白，转导钙依赖性的细胞调节信号。S100蛋白本身不具备内源性的蛋白酶活性，与钙结合之后，蛋白的构象发生改变，暴露出疏水区，然后与不同的靶蛋白分子结合，传递钙信号、调节细胞内钙离子的浓度。通过钙离子信号转导，在细胞内，主要是调节蛋白质磷酸化、细胞骨架装配、基因转录及酶的活性。在细胞外，具有趋化活性，神经营养活性，与糖基化受体RAGE结合分泌至细胞外。因此，在肌肉收缩、基因表达、激素分泌、细胞增殖、分化等方面发挥重要的生物学作用。进一步研究发现S100家族成员在多种人类肿瘤（如乳腺癌、黑色素细胞瘤、结直肠癌、胃癌）中表达异常，并参与肿瘤细胞的增殖、分化、浸润和转移的调控。

胃癌是我国最常见的消化道肿瘤之一，大多数就诊患者为中晚期，现有的治疗方法难以获得满意的疗效。为了克服目前临幊上对肿瘤的盲目治疗或不当治疗，建立和发展肿瘤个体化诊治的新方法是改善和提高肿瘤诊治水平的关键问题。建立胃癌的分子分型将对肿瘤的生物学行为及预后判断具有重要的意义。虽然有关肿瘤增殖、凋亡的标志基因已有大量的报道，但标志实体瘤细胞分化的基因及调控机理的报道仍然较少。

我们通过胃癌基因差异表达谱的建立和标志基因的鉴定，发现 S100 钙结合蛋白家族在胃癌组织中的表达有明显的变化，其中，S100A14 在胃癌组织中的表达有明显的差异，表现为 43.2% (16/37) 的癌低表达，37.8% (14/37) 的癌高表达，进一步的实验分析了 S100A14 在胃癌组织中 mRNA 的差异表达变化，发现 S100A14 在高分化癌组织的表达水平明显高于低分化癌组织 ($P=0.019$)，据此，明确了 S100A14 在不同分化程度的胃癌组织中有明显的差异表达，其表达水平与分化程度相关（表 1）。在此基础上，通过基因克隆，构建原核表达载体，经诱导获得高效表达 S100A14 融合蛋白并免疫动物得到 S100A14 多克隆抗体。采用免疫亲和层析纯化获得了具有高度特异性抗体可用于石蜡切片免疫组化和 Western blot。

通过大样本的免疫组化分析，确定 S100A14 可用于鉴别胃癌的分化程度。进一步对临床资料分析结果表明，S100A14 差异表达与临床预后有关，S100A14 高表达组病例 5 年生存率明显高于低表达组 ($P=0.02$)。这一结果表明，S100A14 可用于鉴别胃癌的分化程度和判断临床预后。

发明内容

本发明的目的在于：确定 S100A14 在胃癌细胞系及组织中有明显的差异表达，其中，S100A14 的表达水平与高分化程度相关。提出钙结合蛋白 S100A14 抗体制备及其鉴别胃癌分化程度和临床预后的用途。

本发明是通过构建了原核表达载体并获得可溶性的 S100A14 融合蛋白，经免疫动物得到高滴度的抗 S100A14 抗体，经过纯化获得了具有高度特异性抗体。

进一步，S100A14 抗体可用于石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析，S100A14 抗体在石蜡切片免疫组化和 Western blot 分析中均表现出高度特异性，并能验证 S100A14 在胃癌细胞系和组织中的差异表达。免疫组化显示 S100A14 蛋白在上皮细胞膜呈强阳性染色，在正常胃粘膜阳性染色为 48/67 (71.6%)，在胃癌中阳性染色为 60/125(48.0%)。Western blot 结果显示，S100A14 蛋白仅在细胞系 AGS，PAMC82 和 N87 中表达。

进一步，S100A14 抗体可用于鉴别胃癌组织的分化程度。通过大样本胃癌组织的免疫组化和 Western blot 分析，确定 S100A14 在高分化癌组织中表达明显高于

低分化癌组织，确定S100A14在高分化癌组织表达高，在低分化癌组织中表达低(77.5%,31/40 vs 34.1%, 29/85, $P< 0.001$)。组织Western blot结果显示S100A14在高分化癌中的表达水平明显高于低分化癌。

进一步，S100A14 抗体可用于判断胃癌临床预后。S100A14 高表达组病例中位生存时间 32 个月(95%CI, 11.95~52.05)，低表达 13 个月(95%CI, 10.66~15.34)，S100A14 高表达组病例 5 年生存率明显高于低表达组。S100A14 高表达组的病例 5 年生存率高于低表达组(log rank test, $\chi^2=5.24$, $P=0.02$)。

这一发现表明，S100A14 可作为鉴别胃癌组织的分化程度和判断临床预后的分子标志。其重要意义在于：我们首次获得的抗 S100A14 抗体可用于鉴别胃癌组织的分化程度和判断临床预后。

附图说明

图 1A-B 是 重组蛋白 S100A14/His 的诱导表达和纯化。A1：诱导前的菌体蛋白； A2：加 IPTG 诱导 4hr 后的菌体蛋白； A3：诱导后的菌体超声破碎后的沉淀； A4：诱导后菌体超声破碎后的上清。B 纯化的重组蛋白 S100A14/His 为 15.4kDa， B1：纯化后的重组蛋白 S100A14；

图 2 是 Western blot 检测 S100A14 在胃癌细胞系及胃癌组织中的表达。**a.** 内对照 actin；**b.** 未纯化抗体检测结果：12KDa 带为 S100A14, 15KDa 带为非特异带；**c.** 纯化后抗体检测结果，仅出现 12KDa 特异性条带，S100A14 在细胞系中出现明显差异表达，仅在细胞系 AGS, PAMC82 及 N87 中表达，而且以 N87 的表达水平最高；

图 3 是 Western blot 对 S100A14 抗体的验证 A: 2 μ g S100A14/His 蛋白出现抗体杂交信号； B: 2 μ g N2 蛋白未出现杂交信号； C: 4 μ g S100A14/His 蛋白出现抗体结合信号； D: 2 μ g CKB 蛋白未见杂交信号；

图 4 是 S100A14 在胃癌及其配对正常组织中的差异表达。高分化癌 Case12 和 15 癌中的表达水平明显高于低分化癌 Case1 和 3；

图5是 IHC检测S100A14蛋白在胃癌中表达 A 正常胃粘膜组织中S100A14呈强阳性染色, B 低分化胃癌中S100A14呈阴性染色 C 中分化胃癌中S100A14呈弱阳性染色, D 高分化胃癌中S100A14呈强阳性染色。箭头所指为膜阳性着色, 放大倍数:200×. 右下角 400× ;

图6 是 S100A14 高表达与低表达两组病例生存率比较(Kalpan-Meier 生存曲线)。S100A14 高表达组病例中位生存时间为 32 个月 (95%CI, 11.95~52.05), 低表达组为 13 个月 (95%CI, 10.66~15.34), 高表达组生存率高于低表达组(log rank test, $\chi^2=5.24, p=0.02$)。

具体实施方式

下面结合附图和具体的实施例来详细说明本发明。

一、实验材料

1、胃癌细胞系: BGC823、MGC803、SGC7901、PAMC82、MKN45、AGS、N87 培养于含 5% FBS (Hyclone 公司) 的 DMEM (Gibco 公司) 培养液, 常规置 37°C、5% CO₂ 条件下培养, 取生长状态良好的细胞用于实验。

2、胃癌组织标本: 标本来源于北京大学临床肿瘤学院组织标本库。手术切除的新鲜癌组织与癌旁正常组织在停止血供 30 分钟内放入液氮。标本均经病理证实, 并有患者知情同意。

3、组织阵列: 由本室自己制备。组织阵列包括含 125 例胃癌组织标本 (高分化 40 例, 低分化 85 例), 67 例配对的正常组织标本, 每个标本含 2 个重复点阵, 具备相应的临床病理资料。其中 79 例具备随访资料。

4、原核表达质粒: pET-28a 由中科院基因研究所, 北京华大蛋白质研究中心惠赠。

5、菌株: 宿主菌株DH5α为Invitrogen公司产品, 表达菌株BL-21 (DE3) 由北京华大蛋白质研究中心惠赠。

6、免疫动物: 新西兰白兔由北京大学第一医院实验动物中心提供。

7、蛋白纯化及抗体纯化胶: Ni^{2+} -NTA agarose 蛋白纯化胶, 购自 Qigen 公司, CNBR sepharose 抗体纯化胶, 购自 Pharmacia 公司。

二、实验步骤

1、原核表达载体 pET/S100A14 的构建

实验以已构建好的含 S100A14 CDS 基因片断的 pGEM®-T Easy 重组质粒为模板 (经测序三次以上序列正确), 通过设计引物在基因的两端引入了 BamH ∇ (5' 端)和 Hind \odot (3' 端) 酶切位点, PCR 扩增 S100A14 基因全长 CDS 的片断并定向克隆至 pET-28a 原核表达载体, 阳性重组质粒采用 BamHI 和 HindIII 双酶切及测序验证。

2、重组蛋白 S100A14/His 的诱导表达和纯化:

将测序鉴定无误后的 pET/S100A14 重组质粒转入表达菌株 BL-21 (DE3), 经 IPTG 诱导产生 S100A14-His 融合蛋白, S100A14 CDS 全长编码 104AA, 分子量为 11.662kDa, 约等于 12 kDa, S100A14-His 融合蛋白分子量约为 15.4kDa。经 SDS-PAGE 验证该蛋白表达存在于上清中, 为可溶性蛋白(图 1A)。通过对融合蛋白的纯化, 得到高纯度的 S100A14/His 融合蛋白(图 1B)。采用 Bradford 法测定蛋白浓度后, -20°C 保存。

3、免疫动物抗血清的制备、鉴定及纯化

选取健康成年新西兰大白兔 2 只 (体重在 2~2.5kg), 将含 200 μg 融合蛋白和等体积的完全佛氏佐剂充分乳化后背部脊柱两侧皮下多点注射, 经初次免疫和 4 次加强免疫后, 当血清效价达到 10^{-5} 时, 收集抗血清, -70°C 分装冻存。

采用 Western blot 检测胃癌细胞系中 S100A14 的表达, 在分子量 12kDa 大小相符的位置出现清晰的条带, 说明抗血清中含有抗 S100A14 抗体。但同时出现明显的 15kDa 非特异性条带(图 2b), 石蜡组织切片的免疫组化出现非特异性染色。抗体经过 CNBR sepharose 免疫亲和层析纯化, 用于 Western blot 鉴定胃癌细胞系中 S100A14 的表达出现单一一条带 (图 2c), 进一步采用重组蛋白 S100A14/His (15.4kDa)、N2/His (26kDa) 和 CKB/His(48kDa)对其进行鉴定, 只有 2 μg 和 4 μg 重组蛋白 S100A14/His 泳道出现与抗体的结合信号(图 3)。石蜡

切片免疫组化结果染色特异性强, 提示抗体制备获得具有高度特异性的 S100A14 抗体。

4、S100A14 在胃癌细胞系和组织蛋白表达水平的鉴定

纯化的 S100A14 抗体用于 IHC 及 Western blot 检测胃癌细胞及组织中 S100A14 蛋白的差异表达, 获得了高度特异性的结果。IHC 显示 S100A14 蛋白在上皮细胞膜呈强阳性染色, 在正常胃粘膜阳性染色为 48/67 (71.6%), 在胃癌中阳性染色为 60/125 (48.0%)。Western blot 结果显示, S100A14 蛋白仅在细胞系 AGS, PAMC82 和 N87 中表达(图 2c)。

5、S100A14 抗体用于鉴别胃癌的分化程度

进一步对 S100A14 在胃癌细胞系和胃癌组织中的蛋白表达水平进行了分析, 发现 S100A14 在细胞系 N87 中的表达水平明显高于其它细胞系, 该细胞系为高分化来源 (图 2c)。组织 Western blot 结果也显示 S100A14 在高分化癌中的表达水平明显高于低分化癌(图 4)。

分析组织微阵列的 IHC 的结果表明, S100A14 蛋白在 77.5% (31/40) 高分化癌组织中和 34.1% (29/85) 的低分化癌组织中表达阳性, 即在高分化癌组织中的表达明显高于低分化组织 ($\chi^2=20.51$, $P<0.001$)。根据着色的强度及面积, 将 S100A14 蛋白表达分为阴性 (-), 阳性 (+), 中等强度阳性 (++) 和强阳性 (+++) 表达, 经过统计, 发现高低分化癌中 S100A14 的表达水平在强度上有差别 (表 2, 图 5), 中等强度阳性与强度阳性表达在高分化癌中明显高于低分化癌 ($\chi^2=28.09$, $p<0.001$), 其中, 中等强度阳性和强阳性表达在高分化癌组织中的阳性率分别为低分化癌组织中的 3.3 和 6.9 倍。

6、S100A14 抗体用于判断胃癌临床预后

在确定 S100A14 表达与分化程度相关的基础上, 根据 S100A14 蛋白水平的表达情况将病例分为高表达组和低表达组, 利用 Kaplan-Meier 法生存曲线和 Log-rank 检验, 分析了 S100A14 表达变化与胃癌病例生存时间的关系。结果表明, S100A14 表达不同的两组病例生存率有差别, S100A14 高表达组的病例 5 年生存率高于低表达组 (Log-rank test, $\chi^2=5.24$, $P=0.02$) (图 6)。但同样对 S100A6

蛋白表达的生存曲线分析后发现，S100A6 高表达和低表达的两组生存率没有差别（Log-rank test, $\chi^2=0.29, P=0.58$ ）。

表1 S100A14 mRNA 在胃癌及配对正常组织中的差异表达的定量PCR结果比较

病理特征	总例数	上调例数	上调例数/总例数(%)	p
高分化	11	7	63.6	0.019
低分化	20	5	25.0	

表2 S100A14 蛋白在胃癌及配对正常组织中表达的IHC结果比较

病理特征	阳性例数/总例数(%)	阳性染色 (%)			p 值
		+	++	+++	
正常	48 /67 (71.6)	23.8	26.8	21.0	0.002
胃癌	60/125 (48.0)	24.0	10.4	13.6	
高分化	31/40 (77.5)	25.0	20.0	32.5	0.001
低分化	29/85 (34.1)	23.5	6.0	4.7	

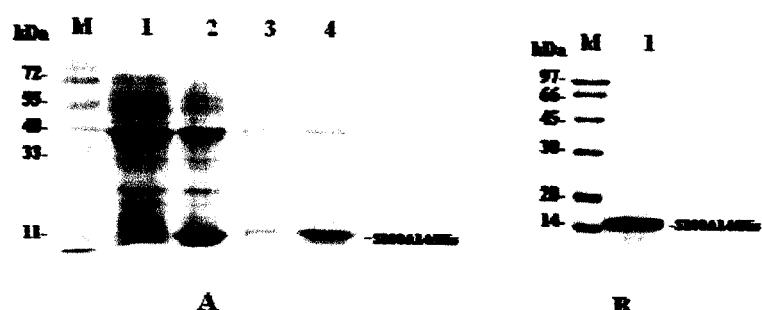


图 1

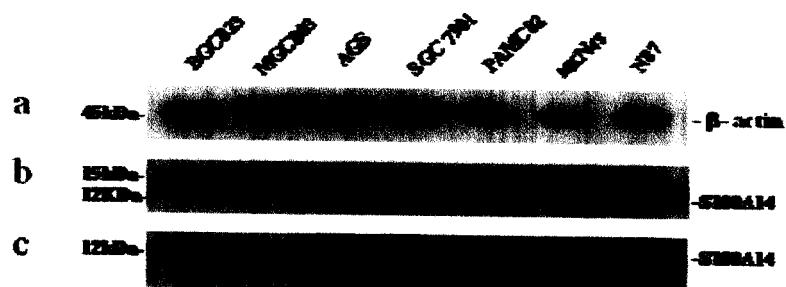


图 2

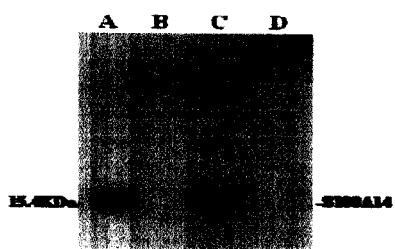


图 3

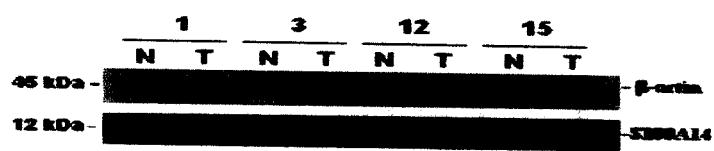


图 4

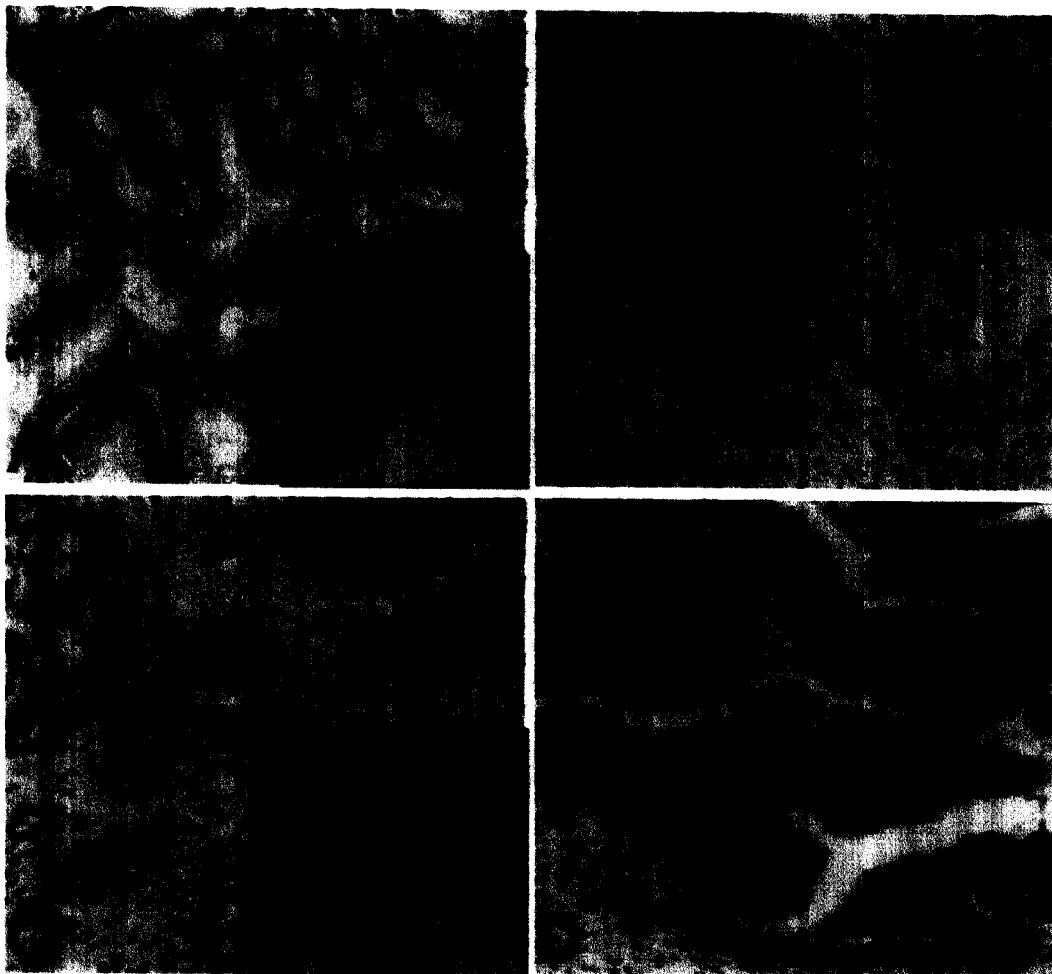


图 5

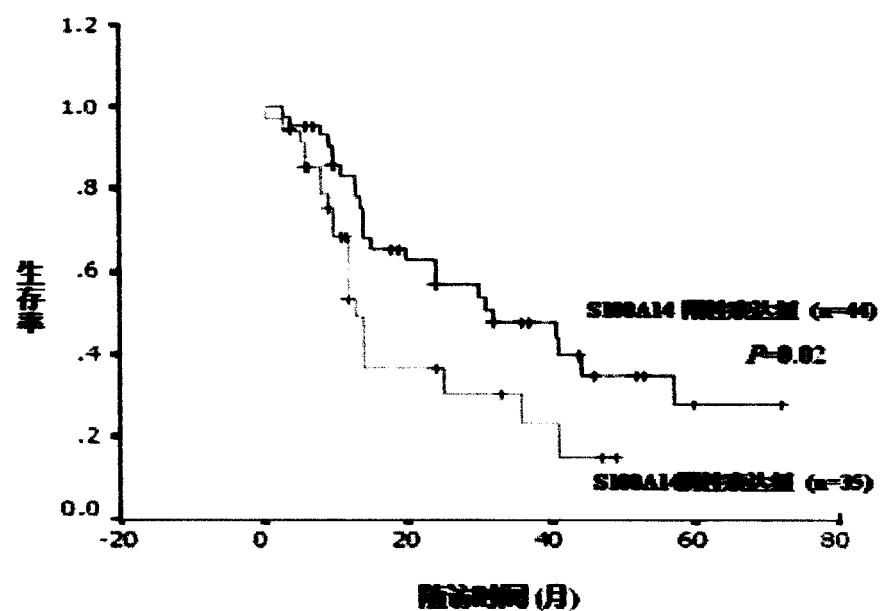


图 6

专利名称(译)	钙结合蛋白S100A14抗体制备及其用途		
公开(公告)号	CN101037684A	公开(公告)日	2007-09-19
申请号	CN200610057515.0	申请日	2006-03-13
[标]申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
当前申请(专利权)人(译)	北京市肿瘤防治研究所		
[标]发明人	吕有勇 张庆英 李文梅 赵敏 刘斯奇		
发明人	吕有勇 张庆英 李文梅 赵敏 刘斯奇		
IPC分类号	C12N15/09 C12N15/62 C07K16/18 G01N33/53 G01N33/574		
代理人(译)	罗会英		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种钙结合蛋白S100A14抗体制备及其用途的发明是通过构建原核表达载体pET - 28/S100A14并获得高效表达的S100A14 - his融合蛋白，经免疫动物得到S100A14抗血清，通过免疫亲和层析纯化获得了具有高度特异性抗体，可用于石蜡切片免疫组化和Western blot分析。通过鉴定S100A14在胃癌组织中的差异表达，确定S100A14在高分化癌组织中表达明显高于低分化癌组织($\chi^2 = 20.51$, $P < 0.001$)。进一步结果表明，S100A14高表达组的病例5年生存率高于低表达组(Log - rank test , $\chi^2 = 5.24$, $P = 0.02$)。由此表明，我们首次获得的抗S100A14抗体可用于鉴别胃癌组织的分化程度和判断临床预后。

