



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102175879 A

(43) 申请公布日 2011.09.07

(21) 申请号 201110021447.3

(22) 申请日 2011.01.19

(71) 申请人 西北大学

地址 710069 陕西省西安市太白北路 229 号
西北大学

(72) 发明人 李铮 于汉杰 朱珉之 秦棣楠
简强 张华

(74) 专利代理机构 西安智邦专利商标代理有限公司 61211

代理人 徐平

(51) Int. Cl.

G01N 33/96 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/533 (2006.01)

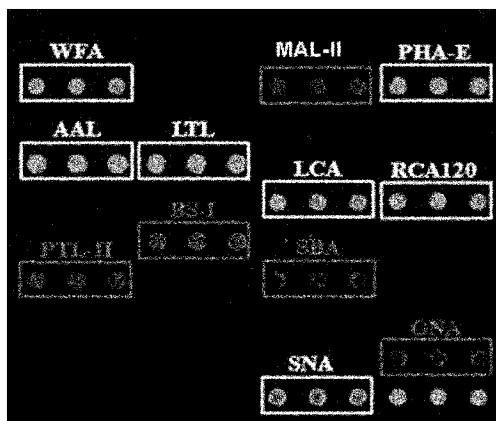
权利要求书 2 页 说明书 7 页 附图 1 页

(54) 发明名称

一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法

(57) 摘要

本发明提供一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法,以快速、简便、准确检测肝肿瘤的替代生物标志物的表达信息。该方法主要步骤有:1) 制备分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片;2) 分别对唾液、血清和尿液样本原液进行预处理,去除杂质,纯化蛋白,用荧光试剂进行标记,并用 G-25 柱去除多余荧光,得到相应的待检测样本;3) 将三种待检测样本分别加载到对应的凝集素芯片上以获得各待检测样本中糖蛋白糖链谱,根据其中任一待检测样本的反应结果即得出所述替代生物标志物的信息。本发明检测过程灵敏度高、检测结论准确,具有安全、无损伤、标本收集简便、容易保存等优点。



1. 一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法,包括以下步骤:
 - 1) 制备分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片
 - 1.1) 取环氧化片基备用;
 - 1.2) 对应于唾液样本,选取以下 12 种凝集素 WFA、AAL、RCA120、PHA-E、LTL、LCA、SNA、MAL-II、BS-I、PTL-II、SBA 和 GNA 中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液;
对应于血清样本,选取以下 9 种凝集素 HHL、AAL、GSL-I、PSA、SJA、PTL-II、ECA、PWM 和 GNA 中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液;
对应于尿液样本,选取以下 7 种凝集素 HHL、AAL、GSL-I、PSA、RCA120、DSA 和 WGA 中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液;
 - 1.3) 将配制得到的点样液加到 384 孔板内;再用点样仪器在环氧化片基上点样得到芯片;
 - 1.4) 将点制好的芯片在湿度为 55% -65% 的环境中孵育 2.5-3.5 小时;
 - 1.5) 对孵育好的芯片在 37℃ 的环境中抽真空使芯片干燥,并使凝集素固定于芯片上;
 - 1.6) 将固定好的凝集素芯片放置于干燥器中以备用,作为分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片;
 - 2) 分别对唾液、血清和尿液样本原液进行预处理,去除杂质,纯化蛋白,用荧光试剂进行标记,并用 G-25 柱去除多余荧光,得到相应的待检测样本;
 - 3) 将三种待检测样本分别加载到对应的凝集素芯片上以获得各待检测样本中糖蛋白糖链谱,根据其中任一待检测样本的反应结果即得出所述替代生物标志物的信息;对于任一待检测样本,具体操作步骤如下
 - 3.1) 将 1-2% 牛血清白蛋白溶解于磷酸盐缓冲液-吐温 20 中配制成封闭液,将制备好的凝集素芯片置于封闭液中;
 - 3.2) 将封闭后的凝集素芯片依次用磷酸盐缓冲液-吐温 20 和磷酸盐缓冲液清洗,以去除步骤 3.1) 中未完全固定于芯片上的凝集素,再经甩干后备用;
 - 3.3) 对经步骤 3.2) 甩干后的凝集素芯片加入 3-5 μ g 待检测样本和 500-800 μ L 的孵育缓冲液,室温孵育;
 - 3.4) 将孵育后的凝集素芯片依次用磷酸盐缓冲液-吐温 20 和磷酸盐缓冲液清洗,以去除步骤 3.3) 中未完全结合于凝集素芯片上的待检测样本的蛋白,再经甩干后备用;
 - 3.5) 对经步骤 3.4) 甩干后的凝集素芯片用 GenePix4000B 芯片扫描仪扫描,得到凝集素与标记后糖蛋白糖链结合的荧光图像;
 - 3.6) 通过 GenePix3.0 软件对荧光图像进行中值分析,对图像中的凝集素所对应的糖链结构反复核对后得出所述替代生物标志物的表达信息。
2. 根据权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 3.1)、3.2) 和 3.4) 中的磷酸盐缓冲液 pH7.4,含有 NaCl 8.0g/L, KCl 0.2g/L, KH_2PO_4 0.2g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g/L;磷酸盐缓冲液-吐温 20 :10mmol/L 磷酸盐缓冲液中含质量分数 0.05-0.5% 吐温 20。
3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于,步骤 3.3) 中的孵育缓冲液:磷酸盐缓冲液-吐温 20 中含质量分数 1% 牛血清白蛋白和质量分数 10-20% 羟胺。
4. 根据权利要求 3 所述的方法,其特征在于:所述荧光试剂采用 Cy3 或 Cy5。
5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于:步骤 1.3) 所述点样仪器采用晶芯 48 点

样系统。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:步骤 3.3) 是对甩干后的凝集素芯片加入 $4\mu\text{g}$ 待检测样本和 $780\mu\text{L}$ 的孵育缓冲液,并在室温孵育 2 小时。

一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测肿瘤的替代生物标志物的方法,具体涉及在唾液、血清和/或尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法。

背景技术

[0002] 目前,在临床上缺乏灵敏、特异的早期肝癌诊断标志物,能检测出的早期肝癌病例大约占有肝癌病例的 25%。尽管已经发现了很多可以作为肝癌诊断标志物的生物大分子,但是这些标志物检测的结果仍旧停留在对晚期肝癌的诊断。甲胎蛋白 (AFP) 是目前肝癌诊断的特异性指标,但 AFP 测定存在假阳性和假阴性的问题。约 20% 的晚期肝癌病人,直至病故前,AFP 测定仍为阴性。而在肝癌治疗方面也未找到特异、有效的分子靶点。因此,寻找和发现新的肝癌标志物和治疗靶点用于肝癌早期诊断和治疗显得尤为重要。

[0003] 目前对于原发性肝癌经过抽血化验,有 4 项指标可提供有价值的诊断。血清学检测结合影像学检查使肝癌在亚临床期(还没有出现症状)即可做出诊断,从而明显提高了肝癌的远期疗效。目前医院常用诊断肝癌血清指标有以下几种:甲胎蛋白 (AFP)、异常凝血酶原 (AP)、 γ -谷氨酰转移酶同工酶 II (GGT2) 及血清岩藻糖苷酶 (AFU)。

[0004] 甲胎蛋白 (AFP) 甲胎蛋白是 1956 年在胎儿血清中发现的一种胚胎专一性甲种球蛋白,1964 年有人在肝癌患者血清中测得它。参考值: $< 20 \mu\text{g/L}$ 。临床意义:正常情况下,这种存在于胚胎早期血清中的甲胎蛋白在出生后即迅速消失,如重现于成人血清中,则提示有肝癌的可能。另外,在生殖腺胚胎瘤和少数转移性肿瘤如胃癌,以及在孕妇、肝炎、肝硬化患者血清中甲胎蛋白可呈假阳性,但升高不如肝癌明显。甲胎蛋白现已广泛用于肝细胞癌的普查、诊断、判断治疗效果、预测复发。普查中阳性可早于症状出现 8~11 个月。甲胎蛋白对肝细胞癌的临床价值可以归纳为:①是一种仅次于病理检查的诊断方法;②为目前最好的早期诊断方法之一,可在临床症状出现前 8~11 个月做出诊断;③为反映病情变化和疗效的敏感指标;④有助于检出亚临床期、复发性与转移性肝癌。

[0005] 异常凝血酶原 (AP) 异常凝血酶原也称 γ -羧基凝血酶原。参考值: < 250 微克/升。临床意义:肝癌患者血清异常凝血酶原阳性率为 69.4%。多数资料表明,异常凝血酶原对原发性肝癌有较高的特异性,而良性肝病、转移性肝癌仅少数呈阳性,因此对亚临床肝癌有早期诊断价值。

[0006] γ -谷氨酰转移酶同工酶 II (GGT2) γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 对原发性和转移性肝癌诊断的阳性率可达 90%,特异性达 97.1%,非癌性肝病和肝外疾病患者的阳性率小于 5%。 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 与甲胎蛋白浓度无关,在甲胎蛋白低浓度和假阴性肝癌患者中, γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 的阳性率也较高。

[0007] 血清岩藻糖苷酶 (AFU) 参考值:3.5~10.3 单位/升 (U/L)。国内报道,血清岩藻糖苷酶诊断原发性肝癌的阳性率为 70%~80%,该指标阳性与甲胎蛋白浓度及肿瘤大小无关。血清岩藻糖苷酶对甲胎蛋白阴性肝癌和小肝癌患者的阳性率分别为 76.1%和 70.8%。

对转移性肝癌和肝良性肿瘤均为阴性,但肝硬化、慢性肝炎患者出现假阳性率较高。

[0008] 甲胎蛋白、 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II、异常凝血酶原对肝癌有肯定的诊断价值,在普查中也有早期诊断意义。 γ -谷氨酰转肽酶同工酶 II 和异常凝血酶原若与甲胎蛋白联合检测,则可大大提高诊断准确率。血清岩藻糖苷酶对肝癌有一定的诊断价值,但特异性不高,若与甲胎蛋白联合检测,可用做甲胎蛋白阴性肝癌患者的辅助诊断。

[0009] 目前发现人的唾液中有 1166 种蛋白质。其中大部分蛋白质能同时在血浆和泪液中找到。从这些蛋白质中可以找到与心血管疾病、癌症、肾脏病等疾病相关的生物标志物,从而为今后的临床诊断提供一种非侵袭性新方式。如在不久前发表于《蛋白组学研究杂志》[J Proteome Res 2009,8(1):239] 的一项研究证实,唾液蛋白质与 2 型糖尿病相关。通过对 2 型糖尿病患者和对照者的唾液蛋白组学分析,发现了唾液中 487 种与 2 型糖尿病有关的蛋白。其中 33% 的蛋白以前从未被报告出现在人类唾液中。在这些蛋白中,有 65 种蛋白的水平在患者和对照者唾液中能相差 2 倍之多。进一步分析显示,一些蛋白水平在 2 型糖尿病患者的唾液中显著升高,在糖尿病前期患者中也有相应升高趋势,因此,可能作为未来无创诊断 2 型糖尿病和发现糖尿病前期患者的生物标志物。

[0010] 科学家们通过一项动物研究,试图挖掘唾液中蛋白随肿瘤改变的机制。在癌症模型小鼠中肿瘤与唾液中蛋白水平改变相关,推测肿瘤和内分泌器官一样,可以分泌激素、淋巴因子和细胞因子,通过血液运输到远端器官,对其产生影响。一旦这些因子到达唾液腺,则唾液中的基因转录谱会发生改变,导致某些蛋白的丰度或种类改变。这些丰度或种类改变的蛋白将可能成为唾液中检测肿瘤的替代生物标志物。研究者在黑色素瘤和非小细胞肺癌的模型小鼠以及对照小鼠中比较了唾液中转录因子水平的差异。结果发现,肿瘤小鼠与正常小鼠相比,其唾液中转录组学改变显著。进一步分析显示,转录组学某些改变在肿瘤组织、血液、唾液腺和唾液中均存在。

[0011] 目前,相关的替代生物标志物的检测仍处于试验研究,检测灵敏度、结论准确性不高,检测方法需要高度专业、复杂的检测操作才能够实现;因此,亟需一种能够快速、简便、准确检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法。

发明内容

[0012] 本发明提供一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法,以快速、简便、准确检测肝肿瘤的替代生物标志物的表达信息。

[0013] 本发明的技术方案如下:

[0014] 一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法,包括以下步骤:

[0015] 1) 制备分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片

[0016] 1.1) 取环氧化片基备用;

[0017] 1.2) 对应于唾液样本,选取以下 12 种凝集素 WFA、AAL、RCA120、PHA-E、LTL、LCA、SNA、MAL-II、BS-I、PTL-II、SBA 和 GNA 中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液;

[0018] 对应于血清样本,选取以下 9 种凝集素 HHL、AAL、GSL-I、PSA、SJA、PTL-II、ECA、PWM 和 GNA 中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液;

[0019] 对应于尿液样本,选取以下 7 种凝集素 HHL、AAL、GSL-I、PSA、RCA120、DSA 和 WGA

中的至少四种配制成浓度为 0.1-10mg/ml 的点样液；

[0020] 1.3) 将配制得到的点样液加到 384 孔板内；再用点样仪器在环氧化片基上点样得到芯片；

[0021] 1.4) 将点制好的芯片在湿度为 55% -65% 的环境中孵育 2.5-3.5 小时；

[0022] 1.5) 对孵育好的芯片在 37℃ 的环境中抽真空使芯片干燥，并使凝集素固定于芯片上；

[0023] 1.6) 将固定好的凝集素芯片放置于干燥器中以备用，作为分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片；

[0024] 2) 分别对唾液、血清和尿液样本原液进行预处理，去除杂质，纯化蛋白，用荧光试剂进行标记，并用 G-25 柱去除多余荧光，得到相应的待检测样本；

[0025] 3) 将三种待检测样本分别加载到对应的凝集素芯片上以获得各待检测样本中糖蛋白糖链谱，根据其中任一待检测样本的反应结果即得出所述替代生物标志物的信息；对于任一待检测样本，具体操作步骤如下

[0026] 3.1) 将 1-2% 牛血清白蛋白溶解于磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 中配制成封闭液，将制备好的凝集素芯片置于封闭液中；

[0027] 3.2) 将封闭后的凝集素芯片依次用磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 和磷酸盐缓冲液清洗，以去除步骤 3.1) 中未完全固定于芯片上的凝集素，再经甩干后备用；

[0028] 3.3) 对经步骤 3.2) 甩干后的凝集素芯片加入 3-5 μ g 待检测样本和 500-800 μ L 的孵育缓冲液，室温孵育；

[0029] 3.4) 将孵育后的凝集素芯片依次用磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 和磷酸盐缓冲液清洗，以去除步骤 3.3) 中未完全结合于凝集素芯片上的待检测样本的蛋白，再经甩干后备用；

[0030] 3.5) 对经步骤 3.4) 甩干后的凝集素芯片用 GenePix4000B 芯片扫描仪扫描，得到凝集素与标记后糖蛋白糖链结合的荧光图像；

[0031] 3.6) 通过 GenePix3.0 软件对荧光图像进行中值分析，对图像中的凝集素所对应的糖链结构反复核对后得出所述替代生物标志物的表达信息。

[0032] 上述步骤 3.1)、3.2) 和 3.4) 中的磷酸盐缓冲液 pH7.4，含有 NaCl 8.0g/L，KCl 0.2g/L， KH_2PO_4 0.2g/L， $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g/L；磷酸盐缓冲液 - 吐温 20：10mmol/L 磷酸盐缓冲液中含质量分数 0.05-0.5% 吐温 20。

[0033] 上述步骤 3.3) 中的孵育缓冲液：磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 中含质量分数 1% 牛血清白蛋白和质量分数 10-20% 羟胺。

[0034] 上述荧光试剂采用 Cy3 或 Cy5。

[0035] 上述点样仪器采用晶芯 48 点样系统为佳。

[0036] 上述步骤 3.3) 的较佳取值是对甩干后的凝集素芯片加入 4 μ g 待检测样本和 780 μ L 的孵育缓冲液，并在室温孵育 2 小时。

[0037] 本发明具有以下优点：唾液、血清、尿液分析检查有非侵袭性、简单、快速等优点，而且具有安全、无损伤、标本收集简便、容易保存等优点，检测过程灵敏度高、检测结论准确。

附图说明

[0038] 图 1 为本发明实施例中唾液样本检测结果。

具体实施方式

[0039] 凝集素是一类具有糖链专一性、可促使细胞凝集的蛋白质,它具有与糖链专一性、非共价、可逆结合的能力。凝集素芯片是将各种不同来源的凝集素固定于醛基化、环氧化或经其它方式修饰后的玻璃片基上,再与标记后的糖蛋白、菌体、细胞等待检测样品反应,经后续处理后,以检测待检测样品的糖链结构。凝集素芯片能简便、快速、高通量的检测分析蛋白质的糖基化修饰,在短时间内给出待检测样品的糖结构指纹图谱。

[0040] 本发明通过下面的大量实验研究发现:

[0041] (1) 应用 CCl_4 成功诱导小鼠肝纤维化模型研究发现:凝集素 MAL-II, LTL, SBA, PSA 和 WGA 识别的唾液酸 (sialic acid) α -2,3 连接,岩藻糖 (Fucose) α -1,3 乙酰葡萄糖胺 (GlcNAc), Fucose α -1,6GlcNAc, 多价唾液酸 (multivalent Sia) 和唾液酸化的路易斯寡糖-抗原 (sialyl-Lewis^x antigen) 糖链结构高表达,而 STL 识别的 GlcNAc 末端糖链结构则低表达。

[0042] (2) 通过转化生长因子- β (TGF- β) 诱导的发生纤维化肝星状细胞系 LX-2 的研究发现:凝集素 LTL, AAL 识别的 α -1,3/1,4 岩藻糖分支结构,凝集素 DBA, PNA, VVA, MPL 识别的 Tn/T 抗原, SNA 识别的唾液酸 α -2,6 结构, PHA-E 识别的平分型 N 乙酰葡萄糖胺和双天线 N- 连糖链结构, SJA, BPL, GSL-I 识别的末端 N 乙酰半乳糖胺及 α 半乳糖结构在纤维化的肝星状细胞系 LX-2 中高表达;而 MAL-II 识别的唾液酸 α -2,3 结构, PSA 识别的 α -1,6 核心岩藻糖结构, HHL, GNA, NPA 识别的 Non-substituted α 1-6Man 结构, PWM, WGA 识别的聚 LacNAc 和 (GlcNAc)_n 结构在纤维化肝星状细胞系 LX-2 中低表达。

[0043] (3) 通过对肝癌细胞系 (SMMC-7721 和 Hep G2) 与正常肝细胞系 (QZG) 的对比研究发现:肝癌细胞中凝集素 MAL-II, PNA, AAL, LTL, LEL, STL 识别的 Sia α -2,3 连接, Tn 抗原, 岩藻糖, Fucose α -1,3 连接, 聚 N- 乙酰乳糖胺 (poly-LacNAc) 和 (GlcNAc)_n 糖链结构高表达,而 PTL-I, RCA120, GSL-I, UEA-I 识别的 α - 乙酰半乳糖胺 (GalNAc) c 和 α - 半乳糖 (Galactose), Gal β -1,4Glc (NAc), α -1,2 岩藻糖分支糖链结构低表达。

[0044] (4) 通过对 60 份肝癌病人血清和 60 份健康人血清的比较研究发现:凝集素 HHL, AAL, GSL-I 和 PSA 识别的甘露糖 (mannose) α -1,3(-6) 连接, 岩藻糖, 末端乙酰半乳糖胺 (GalNAc) 和 Tn 抗原糖链结构在肝癌病人血清中高表达,而 SJA, PTL-II 识别 α GalNAc 和 α Galactose 以及半乳糖苷 (galactosides) β 型的糖链结构低表达。

[0045] (5) 通过对 2 对肝癌病人肝癌组织样本和癌旁正常组织的比较研究发现:凝集素 PHA-E+L, PHA-E 识别的平分型 N- 乙酰葡萄糖胺, 分支 N- 糖链结构, MAL-I, MAL-II 识别的唾液酸 α -2,3 结构, GNA, NPA 识别的是 Non-substituted α 1-6Man 结构, SBA, VVA, DBA, Jacalin 识别的 T/Tn 抗原, AAL, LTL 识别的岩藻糖 α -1,3/1,4 连接, SNA 识别的唾液酸 α -2,6 结构, LCA, PSA 识别的 α -1,6 核心岩藻糖结构在肝癌组织中高表达;而 WFA 识别的末端 N 乙酰半乳糖胺, DSA, STL, EEL 识别的 Poly-LacNAc, 分支 LacNAc 和 (GlcNAc)_n 结构在肝癌组织中低表达。

[0046] (6) 通过对 2 对肝癌病人唾液和同龄同性别健康人唾液的研究发现:凝集素 WFA, AAL, RCA120, PHA-E, LTL, LCA, SNA 识别的末端 GalNAc, 岩藻糖, Gal β -1,4Glc (NAc), 平分型

乙酰葡萄糖胺 (bisecting GlcNAc) 和双天线型 N-糖链 (biantennary N-glycans), 岩藻糖 α -1,3, 核心岩藻糖 α -1,6 和 Sia α -2,6 糖链结构在肝癌病人唾液中高表达, 而 MAL-II, BS-I, PTL-II, SBA, GNA 识别的 Sia α -2,3 连接, α -GalNAc 和 α -Gal, Man α -1,3 连接的糖链结构低表达。

[0047] (7) 通过对 11 份肝癌病人尿液和 33 份健康人尿液的研究发现:通过对 11 份肝癌病人尿液和 33 份健康人尿液的研究发现:凝集素 HHL, AAL, GSL-I 和 PSA 识别的 Man α -1,3(-6) 连接, 岩藻糖, α -GalNAc 和 α -Gal, Tn 抗原以及 Fucose α -1,6GlcNAc 糖链结构在肝癌病人尿液中高表达, 而 RCA120, DSA 和 WGA 识别的 Gal β -1,4Glc(NAc), β -1,4GlcNAc 和乙酰乳糖胺 (LacNAc) 以及多价唾液酸 (multivalent Sia) 糖链结构低表达。

[0048] 以唾液样本为例, 本发明具体检测步骤如下:

[0049] 1) 制备凝集素芯片

[0050] 1.1) 取环氧化片基备用;

[0051] 1.2) 将 12 种凝集素 (WFA, AAL, RCA120, PHA-E, LTL, LCA, SNA, MAL-II, BS-I, PTL-II, SBA 和 GNA) 配制成浓度为 1mg/ml 的点样液;

[0052] 1.3) 将配制的点样液加到 384 孔板内;再用晶芯 48 点样系统在环氧化片基上点样;

[0053] 1.4) 将点制好的芯片在湿度为 60% 的环境中孵育 3 小时;

[0054] 1.5) 对孵育好的芯片在 37°C 的环境中抽真空 3 小时, 使芯片干燥, 并使凝集素固定于芯片上;

[0055] 1.6) 将固定好的凝集素芯片放置在 4°C 干燥器中以备用。

[0056] 2) 唾液样本原液的采集和处理;于收集前 2h 禁饮食。0.9% 生理盐水漱口, 静坐低头, 舌尖顶住上颚, 用无菌离心管收集自然分泌全唾液。每份唾液样本采集 1ml。运输时密封离心管口, 0°C 冰袋冷藏, 时间不超过 30min。于 4°C 10000g 低温离心 1h, 取上清。用 0.45 μ m 的滤膜进行过滤, 加入蛋白酶抑制剂。BCA 法或 Bradford 法进行蛋白定量。分装后保存于 -80°C 冰箱中;

[0057] 然后用荧光试剂 Cy3 对一份处理好的唾液样本进行标记, 用 G-25 柱去除多余荧光;分装冻存于 -20°C 以下的环境中。

[0058] 3) 将标记样本加载到凝集素芯片上以获得样本中糖蛋白糖链谱

[0059] 3.1) 将 2% 牛血清白蛋白溶解到磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 中配制成封闭液, 将制备好的凝集素芯片置于封闭液 1 小时;

[0060] 3.2) 将封闭后的凝集素芯片用磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 和磷酸盐缓冲液分别清洗各 2 次, 每次 3 分钟, 再经甩干后备用;

[0061] 3.3) 对甩干后的凝集素芯片加入 4 μ g 标记好的样本和 780 μ L 的孵育缓冲液, 并在室温孵育 3 小时;

[0062] 3.4) 将孵育后的凝集素芯片用磷酸盐缓冲液 - 吐温 20 和磷酸盐缓冲液分别清洗各 2 次, 每次 3 分钟, 再甩干;

[0063] 3.5) 对甩干后的凝集素芯片用 GenePix4000B 芯片扫描仪扫描, 得到凝集素与标记后糖蛋白结合的荧光图像;参见图 1。

[0064] 3.6) 通过 GenePix3.0 软件对荧光图像进行中值分析, 对图像中 4 种以上的凝集素

所对应的糖链结构反复核对后得出受检者肝肿瘤的替代生物标志物的表达信息。唾液样本中糖链结构分析结果如下表一所示,通过这些糖链分析显示此受检者肝肿瘤呈阳性。

[0065] 表一

[0066]

凝集素	特异识别的糖链结构	表达信息
WFA	Terminal GalNAc	++
AAL	Fucose	+++
RCA120	Gal β -1,4Glc(NAc)	+++
PHA-E	Bisecting GlcNAc and biantennary N-glycans	+
LTL	Fucose α -1,3GlcNAc	+++
LCA	Fucose α -1,6GlcNAc	+
SNA	Sia α -2,6Gal	+
MAL-II	α -2,3Sia	--
BS-I	α -Gal and α -GalNAc	--
PTL-II	β -galactosides	--
SBA	Terminal GalNAc (especially GalNAc α -1-3Gal)	--
GNA	Terminal α -1,3mannose	--

[0067]

[0068] + :糖链结构在样本中高表达 ; - :糖链结构在样本中低表达。

[0069] 对于血清样本的检测,其步骤与前述唾液样本检测步骤相同,其中血清样本原液的采集处理具体是 :抽取一定量的血液,室温或 4℃ 静置半小时,3000rpm 离心 5 分钟,分离血清。血清分离后分装,于 -80℃ 保存。血清使用前 12000g,4℃ 离心 15min,吸取中间层用于实验。

[0070] 表二给出了血清样本中糖蛋白糖链谱。根据下表中凝集素对应的糖链谱结果可以判断出此受检者肝肿瘤呈阳性。

[0071] 表二

[0072]

凝集素	特异识别的糖链结构	表达信息
HHL	non-substituted α -1,6Man	++

AAL	Fucose	+++
GSL-I	α GalNAc, GalNAc α -Ser/Thr (Tn) and α Gal	+++
PSA	Fucose α -1,6GlcNAc	+
SJA	terminal in GalNAc and Gal	--
PTL-II	β -Gal	---
ECA	Gal β -1,4Glc (NAc)	--
PWM	poly-LacNAc and (GlcNAc) _n	--
GNA	terminal α -1,3mannose	-

[0073]

[0074] + :糖链结构在样本中高表达 ; - :糖链结构在样本中低表达。

[0075] 对于尿液样本的检测,其步骤与前述唾液样本检测步骤相同,其中尿液样本原液的采集处理具体是:收集晨尿 50mL(最好中间段),快速存放于 4℃冰箱。4℃,14000g 离心 60min 除去杂质,收集上清。先后用滤纸(抽滤)和 0.2 μ m 滤膜各过滤一次,进一步去除杂质。用分子筛(3KD 截流柱)去除色素、小分子等物质,溶液由黄色变为澄清或微黄。用丙酮沉淀方法浓缩,-20℃保存。

[0076] 表三给出了尿液样本中糖蛋白糖链谱。根据下表中凝集素对应的糖链谱结果可以判断出此受检者肝肿瘤呈阳性。

[0077] 表三

[0078]

凝集素	特异识别的糖链结构	表达信息
HHL	Non-substituted α -1,6Man	++
AAL	Fucose	+++
GSL-I	α GalNAc, GalNAc α -Ser/Thr (Tn) and α Gal	+++
PSA	Fucose α -1,6GlcNAc	+
RCA120	Gal β -1,4Glc (NAc)	--
DSA	β 1-4GlcNAc and LacNAc	--
WGA	multivalent Sia	-

[0079] + :糖链结构在样本中高表达 ; - :糖链结构在样本中低表达。

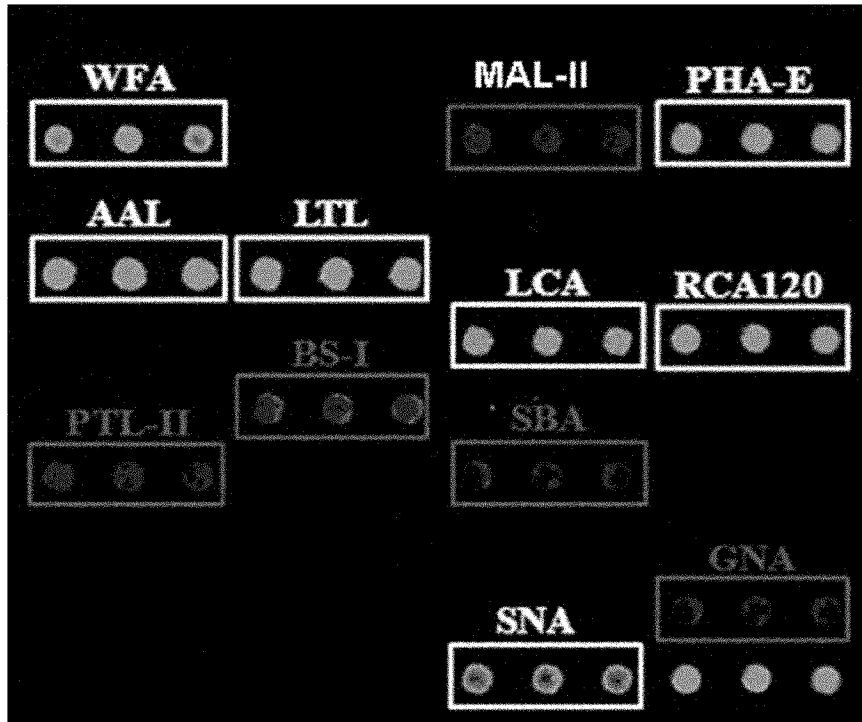


图 1

专利名称(译)	一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法		
公开(公告)号	CN102175879A	公开(公告)日	2011-09-07
申请号	CN201110021447.3	申请日	2011-01-19
申请(专利权)人(译)	西北大学		
当前申请(专利权)人(译)	西北大学		
[标]发明人	李铮 于汉杰 朱珉之 秦松楠 简强 张华		
发明人	李铮 于汉杰 朱珉之 秦松楠 简强 张华		
IPC分类号	G01N33/96 G01N33/68 G01N33/533		
代理人(译)	徐平		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种在唾液、血清和尿液中检测肝肿瘤的替代生物标志物的方法，以快速、简便、准确检测肝肿瘤的替代生物标志物的表达信息。该方法主要步骤有：1)制备分别对应于唾液、血清和尿液样本检测的凝集素芯片；2)分别对唾液、血清和尿液样本原液进行预处理，去除杂质，纯化蛋白，用荧光试剂进行标记，并用G-25柱去除多余荧光，得到相应的待检测样本；3)将三种待检测样本分别加载到对应的凝集素芯片上以获得各待检测样本中糖蛋白糖链谱，根据其中任一待检测样本的反应结果即得出所述替代生物标志物的信息。本发明检测过程灵敏度高、检测结论准确，具有安全、无损伤、标本收集简便、容易保存等优点。

