



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108362884 A

(43)申请公布日 2018.08.03

(21)申请号 201710206641.6

(22)申请日 2017.03.31

(71)申请人 谢君

地址 200082 上海市杨浦区邯郸路220号

申请人 朱乃硕 朱嗣博

(72)发明人 谢君 朱乃硕 朱嗣博

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

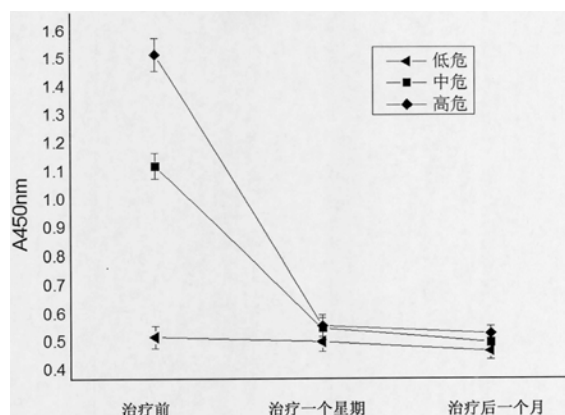
权利要求书1页 说明书3页
序列表1页 附图2页

(54)发明名称

一种肿瘤危险度和治疗效果评估的血清及组织分子指标

(57)摘要

本发明属于肿瘤诊断和治疗疗效及复发判断的分子指标技术领域,具体为应用血清中与肿瘤密切相关的ApoA1蛋白的表位肽及其制作特异抗体来特异检测肿瘤危险程度和治疗疗效的诊断试剂。本发明首先用iTRAQ大量检测肿瘤如前列腺癌治疗前后的血清蛋白的含量变化,发现ApoA1蛋白与肿瘤的危险分级和治疗疗效密切相关。然后筛选和人工合成APOA1中的功能表位肽,并以这些肽作为抗原免疫动物制作相应抗体,得到的抗体可以较灵敏地检测低危,中危和高危的肿瘤病人,并对肿瘤如前列腺癌的疗效有较好地评估作用;该分子标志物可用来作为检测标准对照和制备抗体用于生产相应肿瘤诊断和研究试剂盒。



1. 一种用于诊断肿瘤危险度和治疗疗效的分子指标,其特征在于具有SeqNo.1所示的核苷酸序列和SeqNo.2的蛋白序列。

2. 一种基于ApoA1蛋白的表位肽,其序列特征为SeqNo.3、SeqNo.4、SeqNo5、SeqNo6。

3. 一种基于SeqNo.3、SeqNo.4、SeqNo5、SeqNo6等表位肽制作的特异抗体,该抗体能较好地监测血清和组织中ApoA1蛋白的含量,从而达到检测肿瘤危险度和治疗效果的目的。

4. 一种由权利要求书1.和2.所描述的序列制作的蛋白或肽作为标准蛋白分子对照,以权利要求书3所描述的抗体分子作为探针等核心成分组成的肿瘤标志分子免疫检测试剂盒,可用于血清和组织中APOA1蛋白含量测定,以对相应肿瘤的危险度和治疗效果及复发情况进行分析诊断医用。

一种肿瘤危险度和治疗效果评估的血清及组织分子指标

技术领域

[0001] 本发明属于肿瘤诊断和治疗效果评估的技术领域,具体涉及用一种血清和组织中的分子指标ApoA1蛋白中的表位肽及其制作的特异抗体,然后利用这种抗体检测血清中ApoA1 的含量,从而评估肿瘤危险分级和治疗效果。

背景技术

[0002] 我国每年新发生肿瘤病人有400多万,仅前列腺癌全球每年发生就高达110万例,在中国,前列腺癌是排名第二的男性恶性肿瘤,而且在过去的二十多年,致死率增加了10倍。对肿瘤的高灵敏和诊断、危险分级以便采取相应的治疗措施,并对肿瘤的治疗效果进行有效的评估,需要对肿瘤特异的高度灵敏的特殊病理分子标志物的发现和应用,这是目前急需解决的问题。但目前能用于肿瘤诊断和治疗评估的病理分子标志物非常有限,以前列腺癌为例,其危险分级是根据患者血清PSA、Gleason评分和临床分期将前列腺癌分为低、中、高危三类,这种分级方法涉及三种指标,其中的Gleason评分和临床分期指标是根据肿瘤的形状和边界等多种形态来诊断,较难把握。更重要的目前许多肿瘤(如前列腺癌)还没有关于治疗效果评估的统一指标,对精准治疗的实施非常不利。

发明内容

[0003] 本发明目的是提供一个血清分子指标可以方便且精确地诊断肿瘤的危险程度并可以用来评估对肿瘤的治疗效果。

[0004] 技术方案:

[0005] (1) 本研究首先通过iTRAQ检测肿瘤不同危险分期和治疗不同阶段的血清蛋白组表达变化,发现ApoA1,在不同危险分期的前列腺癌中表达有重要差异($p < 0.001$),而且在手术、化疗、放疗如重离子治疗的不同阶段,肿瘤症状好转(基于肿瘤体积大小和病理指标)的过程中,该分子指标的含量具有明显的不同($p < 0.001$) (表1和图1)。

[0006] (2) 通过差异蛋白富集分析发现该分子通过血小板脱粒影响重离子治疗的效果(图 2)。

[0007] (3) 通过生物信息学和结构生物学的方法及B细胞表位分析方法,获得四种肽表位序列,通过混合酸酐法人工合成所需的肽,免疫动物产生抗APO1蛋白表位的高亲和性抗体。根据该抗体制作的诊断试剂,可以诊断肿瘤如前列腺癌的危险程度和治疗疗效(图3)。

[0008] 表1. APOA1在不同分级肿瘤(前列腺癌)中的表达谱

[0009]

	低危			中危			高危		
	治疗前	治疗中	治疗后	治疗前	治疗中	治疗后	治疗前	治疗中	治疗后
APOA1-1	0.786	0.954	1.170	4.850	1.102	1.118	5.989	1.188	1.213
APOA1-2	1.141	1.181	1.469	5.063	0.902	1.034	7.134	1.185	1.315
APOA1-3	1.010	1.049	1.291	4.705	0.960	1.141	6.402	1.020	1.165
APOA1-4	1.037	0.927	1.173	4.257	0.849	1.020	6.110	0.937	1.081

[0010] 本发明提供的血清分子指标ApoA1基因序列和氨基酸序列分别为SeqNo.1和SeqNo.2。

[0011] 本发明提供的抗原表位肽是SeqNo.3、SeqNo.4、SeqNo5、SeqNo6(序列附件),发现这四种肽能引起强烈免疫反应,产生特异性抗体,可用于检测APOA1的含量和存在。

[0012] 本发明提供的是基于这四种表位肽序列及其所制备的特异性抗体,首次用于诊断肿瘤危险程度和治疗疗效的检测试剂盒,该试剂盒能分辨低危,中危和高危肿瘤病人,并验证了肿瘤如前列腺癌病人($P<0.05$)的诊断以及治疗效果(治疗前和治疗好转的具有明显的差异, $P<0.05$)的检测评估。

附图说明

[0013] 图1是不同危险分级的肿瘤(前列腺癌)病例在重离子治疗前中后APOA1不同片断的表达(iTRAQ测量)情况图。

[0014] 图2是ApoA1通过血小板脱粒从分泌颗粒中排到细胞外的示意图。

[0015] 图3是通过四种表位肽制作的多克隆抗体监测重离子治疗前列腺癌疗效的线图。

具体实施方式

[0016] 1.对外周血进行取样。抽血后2小时内马上进行处理。

[0017] 2.室温血液自然凝固10-20分钟后,离心20分钟左右(2000-3000转/分)取上清液

[0018] 3.按1:1-1:500在150 μ l小试管中梯度稀释待测。

[0019] 4.在96或48孔板上分别设空白孔(空白对照孔不加样品及酶标试剂,其余各步操作相同)、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50 μ l,待测样品孔中测样品50 μ l。加样将样品加于酶标板孔底部,尽量不触及孔壁,轻轻晃动混匀;标准孔为分别加入一定浓度的各目标靶蛋白和表位肽(序列为SEQ ID No.2、No.3、No.4、No5、No6);

[0020] 5.温育,配液,洗涤和加酶:用封板膜封板后置37 $^{\circ}$ C温育30分钟;将30倍(48T的20倍)浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用;小心揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,静置30秒后弃去,如此重复5次,拍干;每孔加入酶标试剂50 μ l,空白孔除外;

[0021] 6.显色和终止:每孔先加入显色剂A50 μ l,再加入显色剂B50 μ l,轻轻震荡混匀,37 $^{\circ}$ C避光显色10分钟;终止:每孔加终止液50 μ l,终止反应(此时蓝色立转黄色);

[0022] 7.以空白空调零,450nm波长依序测量各孔的吸光度(OD值)。测定应在加终止液后15分钟以内进行。以标准物的浓度为横坐标,OD值为纵坐标,在坐标纸上绘出标准曲线,根据样品的OD值由标准曲线查出相应的浓度;再乘以稀释倍数;或用标准物的浓度与OD值计

算出标准曲线的直线回归方程式,将样品的OD值代入方程式,计算出样品浓度,再乘以稀释倍数,即为样品的实际浓度。

[0023] 8.以前列腺癌为例就诊断指标的参数:以正常为对照,如果样本浓度为正常的1.2-2 倍,为低危病人;2-3倍,为中危病人;3倍以上即为高危病人。治疗效果评估:中危和高危病人,如果治疗后,样本浓度回归2倍以下,即为治疗好转。如回归正常水平,即基本恢复。

[0001]

序列表

SEQ ID No.1 基因核苷酸 ,

CACAATGGACAATGGCAACTGCCACACACTCCCATGGAGGGGAAGGGGATGAGTGCAGGGAACCCCGAC
CCCACCCGGGAGACCTGCAAGCCTGCAGACACTCCCCTCCCGCCCCACTGAACCCTTGACCCCTGCCCT
GCAGCCCCCGCAGCTTGCTGTTTTGCCCACTCTATTTGCCCAGCCCCAGGGACAGAGCTGATCCTTGAAC
CTTAAGTTCCACATTGCCAGGACCAGTGAGCAGCAACAGGGCCGGGGCTGGGCTTATCAGCCTCCCAGCC
CAGACCCTGGCTGCAGACATAAATAGGCCCTGCAAGAGCTGGCTGCTTAGAGACTGCGAGAAGGAGGTCC
CCCACGGCCCTTCAGGATGAAAGCTGCGGTGCTGACCTTGCCCGTGCTCTTCTGACGGGGAGCCAGGCT
CGGCATTTCTGGCAGCAAGATGAACCCCCCAGAGCCCCCTGGGATCGAGTGAAGGACCTGGCCACTGTGT
ACGTGGATGTGCTCAAAGACAGCGGCAGAGACTATGTGTCCCAGTTTGAAGGCTCCGCCTTGGGAAAACA
GCTAAACCTAAAGCTCCTTGACAACTGGGACAGCGTGACCTCCACCTTCAGCAAGCTGCGCGAACAGCTC
GGCCCTGTGACCCAGGAGTTCTGGGATAACCTGGAAGGAGACAGAGGGCCTGAGGCAGGAGATGAGCA
AGGATCTGGAGGAGGTGAAGGCCAAGGTGCAGCCCTACCTGGACGACTTCCAGAAGAAGTGGCAGGAGGA
GATGGAGCTCTACCGCCAGAAGGTGGAGCCGCTGCGCGCAGAGCTCCAAGAGGGCGCGCGCCAGAAGCTG
CACGAGCTGCAAGAGAAGCTGAGCCCACTGGGCGAGGAGATGCGCGACCGCGCGCGCGCCATGTGGACG
CGCTGCGCACGCATCTGGCCCCCTACAGCGACGAGCTGCGCCAGCGCTTGGCCGCGCGCCTTGAGGCTCT
CAAGGAGAACGGCGGCGCCAGACTGGCCGAGTACCACGCCAAGGCCACCGAGCATCTGAGCACGCTCAGC
GAGAAGGCCAAGCCCGCGCTCGAGGACCTCCGCCAAGGCCGTGCTGCCCGTGCTGGAGAGCTTCAAGGTCA
GCTTCTGAGCGCTCTCGAGGAGTACACTAAGAAGCTCAACACCCAGTGAGGCGCCCGCGCGCCCCC
TTCCCGGTGCTCAGAATAAACGTTTCCAAAGTGGGAAAAAAAAAAAAA

SEQ ID No.2 蛋白氨基酸

MKAAVLTLAVLFLTGSQARHFWQQDEPPQSPWDRVKDLATVYVDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKQLNLKL
LDNWDSTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQKKWQEEMELYR
QKVEPLRAELQEGARQKLHELQEKLSPLGEEMRDRARAHVDALRTHLAPYSDELRLQRLAARLEALKENGG
ARLAHEYHAKATEHLSTLSEKAKPALEDLRQGILLPVLESFKVSFLSALEEYTKKLNTQ

SeqNo. 3 表位肽序列: DSVTSTFSKLREQLGPVTQEFWDNLEKETEGLRQEMSeqNo.4 表位肽序列: VDVLKDSGRDYVSQFEGSALGKSeqNo.5 表位肽序列: EHLSTLSEKAKPALEDLRQGILLPVLESFKSeqNo.6 表位肽序列: DNLEKETEGLRQEMSKDLEEVKAKVQPYLDDFQK

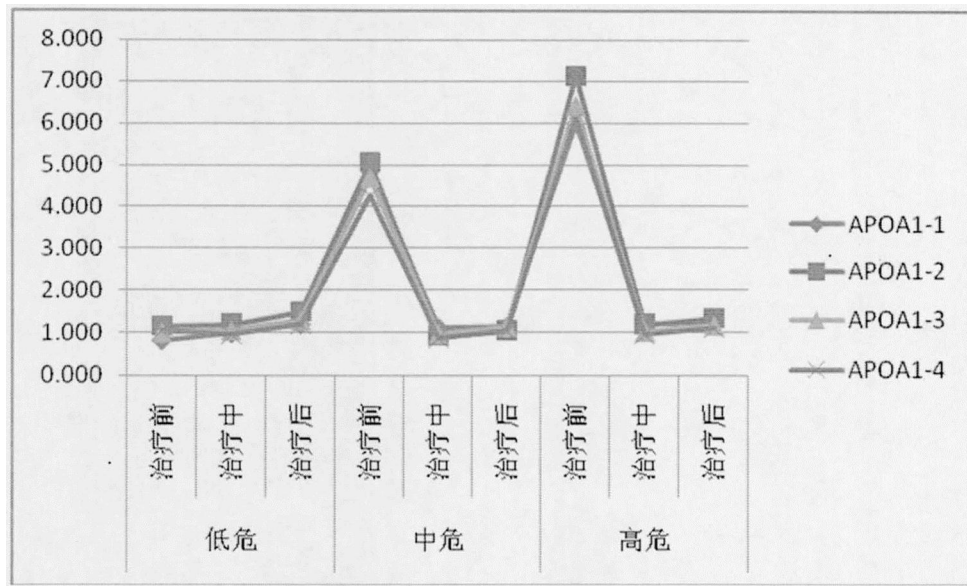


图1

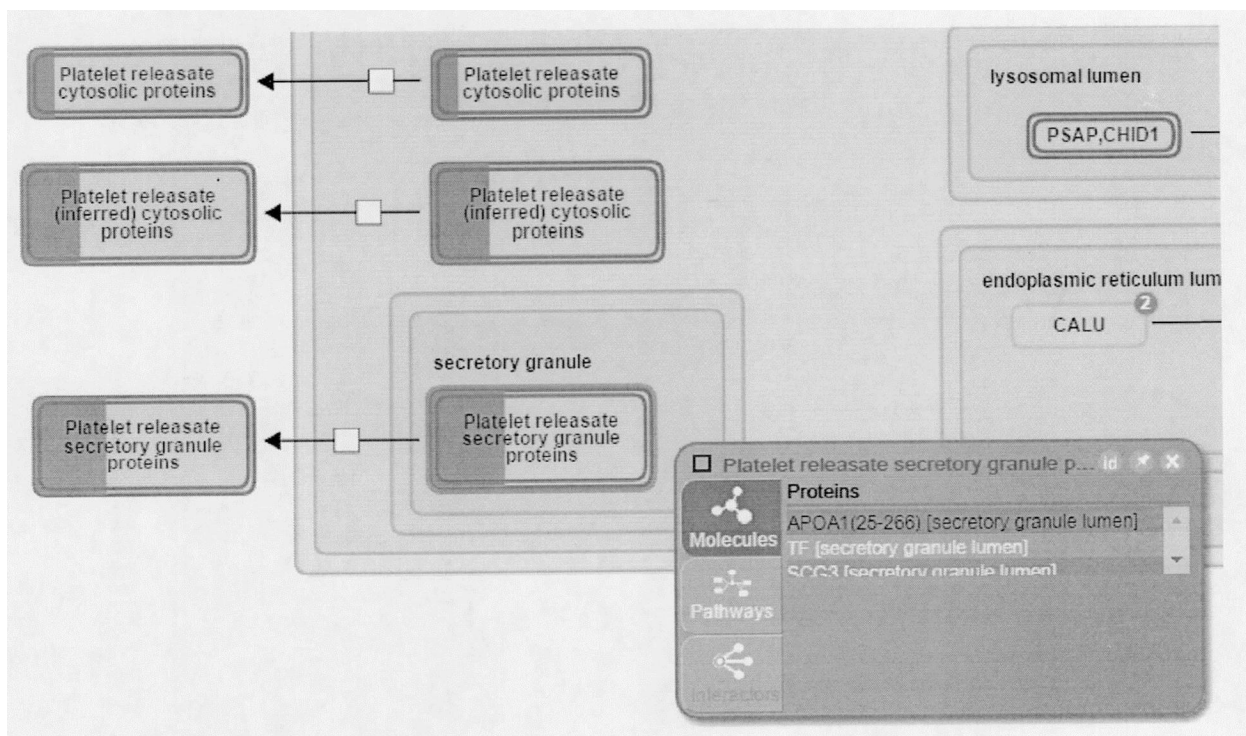


图2

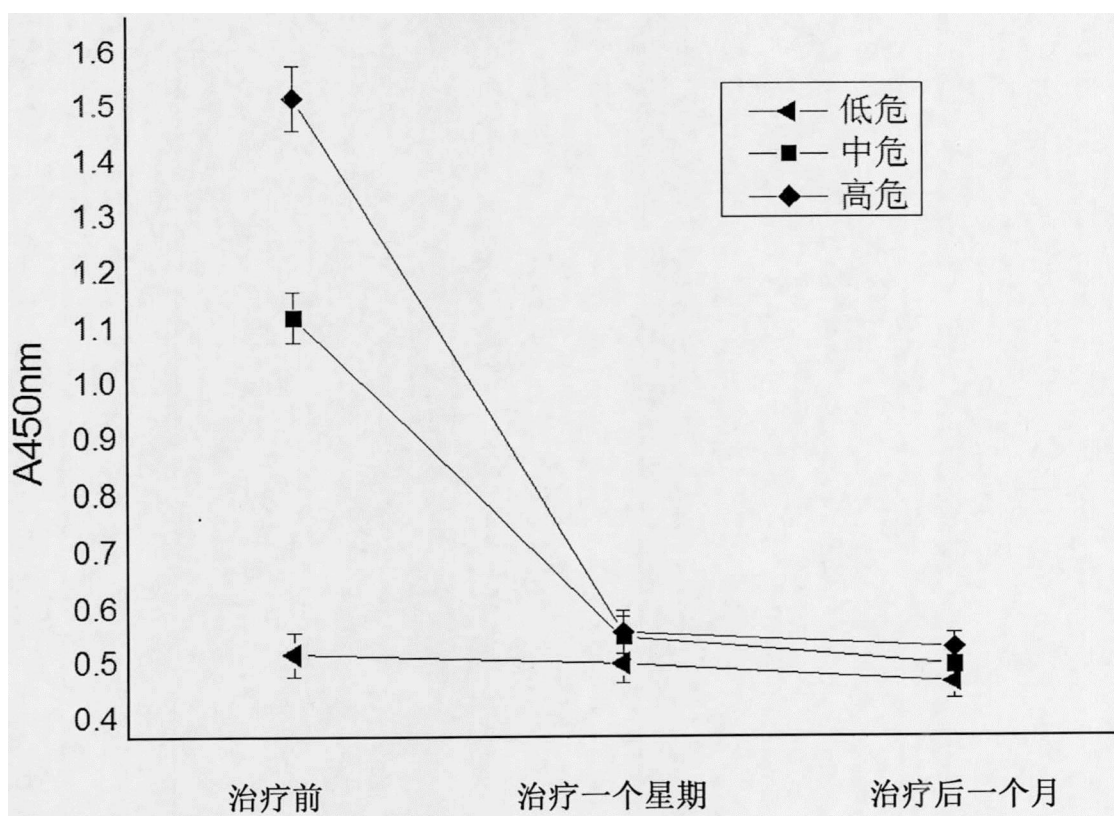


图3

专利名称(译)	一种肿瘤危险度和治疗效果评估的血清及组织分子指标		
公开(公告)号	CN108362884A	公开(公告)日	2018-08-03
申请号	CN201710206641.6	申请日	2017-03-31
[标]申请(专利权)人(译)	谢君 朱乃硕 朱嗣博		
申请(专利权)人(译)	谢君 朱乃硕 朱嗣博		
当前申请(专利权)人(译)	谢君 朱乃硕 朱嗣博		
[标]发明人	谢君 朱乃硕 朱嗣博		
发明人	谢君 朱乃硕 朱嗣博		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/68 G01N2800/52 G01N2800/56		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属于肿瘤诊断和治疗疗效及复发判断的分子指标技术领域，具体为应用血清中与肿瘤密切相关的ApoA1蛋白的表位肽及其制作特异抗体来特异检测肿瘤危险程度和治疗疗效的诊断试剂。本发明首先用iTRAQ大量检测肿瘤如前列腺癌治疗前后的血清蛋白的含量变化，发现ApoA1蛋白与肿瘤的危险分级和治疗疗效密切相关。然后筛选和人工合成APOA1中的功能表位肽，并以这些肽作为抗原免疫动物制作相应抗体，得到的抗体可以较灵敏地检测低危，中危和高危的肿瘤病人，并对肿瘤如前列腺癌的疗效有较好地评估作用；该分子标志物可用来作为检测标准对照和制备抗体用于生产相应肿瘤诊断和研究试剂盒。

