



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110221052 A

(43)申请公布日 2019.09.10

(21)申请号 201910521939.5

G01N 33/576(2006.01)

(22)申请日 2019.06.17

G01N 33/68(2006.01)

(71)申请人 昆山德诺瑞尔生物科技有限公司
地址 215316 江苏省苏州市昆山市玉山镇
元丰路168号生物楼205室

(72)发明人 张鑫 李国平

(74)专利代理机构 南京纵横知识产权代理有限公司 32224

代理人 董建林

(51) Int. Cl.

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/532(2006.01)

G01N 33/558(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

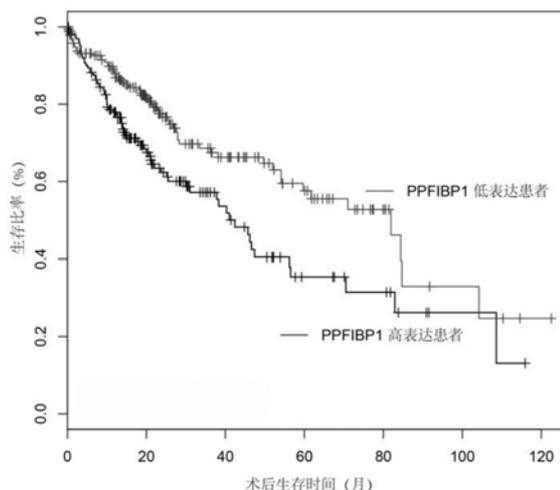
权利要求书1页 说明书4页
序列表4页 附图2页

(54)发明名称

PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用

(57)摘要

本发明提供了PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用。本发明采用免疫组化方法检测PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量,以此判断肝癌患者术后生存期的长短。本发明的有益效果主要体现在:本发明提供了PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用,提示该蛋白能用于制备判断肝癌患者预后的蛋白质分子标记,对于肝癌病人术后监控具有重要的指导意义。



1. PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用。
2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述PPFIBP1蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。
3. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述肝癌术后预后评估试剂盒包括:人源PPFIBP1多克隆抗体和免疫组化实验试剂。
4. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述人源PPFIBP1多克隆抗体由序列为SEQ ID NO.1所示的PPFIBP1蛋白免疫兔子获得。
5. 根据权利要求3所述的应用,其特征在于,所述免疫组化实验试剂包括:二甲苯、无水乙醇、H2O2去离子水溶液、封闭用正常山羊血清工作液、辣根过氧化物酶化二抗工作液、浓缩型DAB显色试剂、苏木素液、水溶性封片剂、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液抗原修复液以及PV9000聚合物增强剂。
6. 根据权利要求1-5任一项所述的应用,其特征在于,所述应用是指以PPFIBP1蛋白作为分子标记,利用人源PPFIBP1多克隆抗体,结合免疫组化实验试剂,检测PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量,并根据PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量进行肝癌术后预后评估。
7. 根据权利要求6所述的应用,其特征在于,检测相对表达量并根据相对表达量进行肝癌术后预后评估的具体方法为:
 - 利用人源PPFIBP1多克隆抗体,结合免疫组化实验试剂,对肝癌组织切片进行免疫组化染色;
 - 获取免疫组化染色后的肝癌组织切片的免疫组化图片;
 - 利用生物图像处理软件分析所述免疫组化图片获得目标区域内平均光密度值,将平均光密度值换算为可用于评判所述肝癌组织切片中PPFIBP1蛋白相对表达量的染色评分;
 - 根据所述染色评分评估肝癌患者术后的预后情况。
8. 根据权利要求7所述的应用,其特征在于,评分时扣除组织间隙,准确选择肝癌细胞为目标区域。

PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,涉及一种PPFIBP1蛋白的应用,具体涉及一种PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用。

背景技术

[0002] 肝细胞肝癌是最常见的肝脏原发恶性肿瘤,在世界范围内每年新增病例50~10万,列恶性肿瘤发病率第五、死亡率第三。目前已经明确的肝癌致病因素包括嗜肝病毒感染、黄曲霉素、酒精、烟草、遗传代谢性肝病等。依附于不同人群暴露特点的差异,肝癌在各地的发病率也不尽相同。大多数高发地区(如亚、非两洲)病例主要源自乙型肝炎病毒和丙型肝炎病毒感染,在地理和人种上的分布与嗜肝病毒的流行病学特点相吻合。由于乙型肝炎的肆虐,全球肝癌病例有80%出现在亚洲,我国更是占据了其中大部分,每年新发病例超过35万,同期死亡病例达32万,高居男性癌症总体死亡率第2位、女性第3位,造成了极为沉重的疾病负担和经济压力。

[0003] 随着诊断及治疗手段的进步,近二十年来疗效已经有了一定的提高,但肝癌的转移复发仍是影响长期疗效的重要阻碍。因此深入研究肝癌转移复发机制、探索有效预测肿瘤复发的分子标志物和积极的抗复发治疗措施是当前肝癌诊治中的重点和难点。

[0004] 本发明首次将PPFIBP1引入了肝癌研究领域,发现PPFIBP1在肝癌中高表达,且其表达水平与肝癌临床病理特征及预后密切相关,提示PPFIBP1是一个新的肝癌预后标志物和术后预警蛋白。

发明内容

[0005] 本发明的目的之一在于提供PPFIBP1蛋白的新应用,特别是PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用。

[0006] 本发明经过广泛而深入的研究,首次发现,采用免疫组化方法检测PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的表达量,能够判断肝癌患者出现肝癌复发转移的风险。基于PPFIBP1蛋白表达量与肝癌复发转移的相关性,以PPFIBP1蛋白作为预后标志物对其表达量进行检测可以用于指导肝癌的预后判断。

[0007] 因此,本发明提供了PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用,该应用是以PPFIBP1蛋白作为分子标记,利用PPFIBP1抗体,结合免疫组化实验试剂,检测PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量,并根据PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量进行肝癌术后预后评估。

[0008] 所述PPFIBP1蛋白氨基酸序列如SEQ ID NO.1所示。

[0009] 本发明还提供了所述应用中用于肝癌术后预后评估的试剂盒,该试剂盒包括:人源PPFIBP1多克隆抗体、免疫组化实验试剂。所述免疫组化实验试剂为本领域免疫组化实验中的常用试剂。

[0010] 进一步,所述人源PPFIBP1多克隆抗体由序列为SEQ ID NO.1所示的PPFIBP1蛋白

免疫兔子获得,可自行制备,也可采用市购商品。

[0011] 进一步,所述免疫组化实验试剂包括:二甲苯、无水乙醇、H2O2去离子水溶液、封闭用正常山羊血清工作液、辣根过氧化物酶化二抗工作液、浓缩型DAB显色试剂、苏木素液、水溶性封片剂、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液抗原修复液以及PV9000聚合物增强剂。

[0012] 利用本发明所述试剂盒进行肝癌术后预后评估的方法如下:

利用人源PPFIBP1多克隆抗体,结合免疫组化实验试剂,对肝癌组织切片进行免疫组化染色;

获取免疫组化染色后的肝癌组织切片的免疫组化图片;

利用生物图像处理软件分析所述免疫组化图片获得目标区域内平均光密度值,将平均光密度值换算为可用于评判所述肝癌组织切片中PPFIBP1蛋白相对表达量的染色评分;

根据所述染色评分评估肝癌患者术后的预后情况。

[0013] 进一步,评分时扣除组织间隙,准确选择肝癌细胞为目标区域。

[0014] 本发明具有以下有益效果:

本发明显示出PPFIBP1蛋白与肝癌的预后具有显著的相关性,因此以PPFIBP1蛋白作为预后标志物对其表达量进行检测可以用于指导肝癌的预后判断,为预测肝癌的复发转移及术后的生存率提供了一条全新途径,对肝癌患者的预后判断具有重要作用。

附图说明

[0015] 图1为PPFIBP1蛋白在肝癌患者癌旁组织中弱表达;

图2为PPFIBP1蛋白在肝癌组织中高表达;

图3为肝癌组织中PPFIBP1低表达患者与高表达患者生存曲线。

具体实施方式

[0016] 下面结合具体实施例对本发明作进一步描述。以下实施例仅用于更加清楚地说明本发明的技术方案,而不能以此来限制本发明的保护范围。

[0017] 下面对本发明实施例的PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用以及利用所述试剂盒进行肝癌术后预后评估进行具体说明。

[0018] 其中,所述试剂盒包括:人源PPFIBP1多克隆抗体、免疫组化实验试剂。所述免疫组化实验试剂为本领域免疫组化实验中的常用试剂。

[0019] 所述人源PPFIBP1多克隆抗体由序列为SEQ ID NO.1所示的PPFIBP1蛋白免疫兔子获得,可自行制备,也可采用市购商品。

[0020] 所述免疫组化实验试剂包括:二甲苯、无水乙醇、3% H2O2去离子水溶液,封闭用正常山羊血清工作液、辣根过氧化物酶化二抗工作液、浓缩型DAB显色试剂、苏木素液、水溶性封片剂、磷酸盐缓冲液、柠檬酸盐缓冲液抗原修复液、PV9000聚合物增强剂。

[0021] 其中,水溶性封片剂采用中性树胶封片剂。

[0022] 利用上述试剂盒进行肝癌术后预后评估的具体步骤如下:

1、试剂配制

(1) 磷酸盐缓冲液:NaCl 80克,Na₂HPO₄·12H₂O 28.8克,KCl 2克,KH₂PO₄ 2.0 克,双蒸水充分溶解,pH调至7.4,定容至1000毫升,120℃高压蒸汽灭菌20分钟,4℃保存。

[0023] (2) 柠檬酸盐缓冲液抗原修复液:柠檬酸三钠3 克,柠檬酸0.4 克,双蒸水充分溶解,定容至1000毫升,pH为6.0,4℃保存。

[0024] 2、染色

1) 烘片:制备肝癌组织石蜡切片,将石蜡切片置于65℃烤箱中2h。

[0025] 2) 脱蜡:将烘热的切片趁热从65℃烤箱中拿出迅速放入二甲苯溶液中充分脱蜡,顺序为二甲苯I10分钟,二甲苯II10分钟,100%乙醇5分钟,95%乙醇5分钟,85%乙醇5分钟,75%乙醇5分钟,双蒸水5分钟,注意整个脱蜡过程中液体要完全没过组织。

[0026] 3) 将切片取出,置于免疫组化湿盒上,磷酸盐缓冲液冲洗3遍,每遍5分钟。

[0027] 4) 抗原修复:取适量双蒸水于高压锅内,提前5分钟预热。取适量的柠檬酸盐缓冲液抗原修复液(pH=6.0)于抗原修复盒中,将切片插入切片架,务必使修复液完全浸没组织,高温高压修复5分钟。修复完毕后将修复盒取出置于常温30分钟以上,待修复液冷却到室温以后,将切片取出置于湿盒上,磷酸盐缓冲液冲洗3遍,每遍5分钟。

[0028] 5) 3%的过氧化氢(试剂1)灭活内源性过氧化物酶:将切片上多余的磷酸盐缓冲液擦干,滴加过氧化氢完全覆盖组织,室温孵育10分钟。孵育完毕后,磷酸盐缓冲液冲洗3遍,每遍5分钟。

[0029] 6) 血清封闭:将切片上多余的液体擦干,每张切片滴加约50μL封闭用正常山羊血清工作液,确保液体完全覆盖组织,室温孵育20分钟。孵育完毕后,不用磷酸盐缓冲液冲洗,轻甩切片甩去液体。

[0030] 7) 一抗孵育:按照抗体说明书推荐浓度和预实验结果用磷酸盐缓冲液稀释人源PPFIBP1多克隆抗体原液,混匀后得到一抗稀释液,每张切片滴加50μL一抗稀释液,确保抗体完全覆盖组织且湿盒内有适量液体以保证不会干片。4℃孵育过夜。

[0031] 8) 复温:将湿盒从4℃取出,置于37℃恒温箱中复温45分钟。45分钟后将湿盒取出,磷酸盐缓冲液冲洗切片3遍,每遍5分钟。

[0032] 9) 孵育PV9000聚合物增强剂:将切片上多余的液体擦干,每张切片滴加约50μL PV9000聚合物增强剂,确保液体完全覆盖组织,37℃恒温箱孵育30分钟。30分钟后将湿盒取出,磷酸盐缓冲液冲洗切片3遍,每遍5分钟。

[0033] 10) 孵育二抗:将切片上多余的液体擦掉,每张切片滴加约50μL辣根过氧化物酶化二抗工作液,完全覆盖组织,置于37℃恒温箱中孵育30分钟。30分钟后取出湿盒,磷酸盐缓冲液冲洗切片3遍,每遍5分钟。

[0034] 11) 二氨基联苯胺(Diaminobenzidine, DAB)显色:按照每张切片50μL的量以底物稀释液:浓缩型DAB显色试剂=1: 20的比例配置DAB显色液,整个过程避光,在棕色EP(eppendorf)管中配置,现用现配。滴加显色液后于显微镜下观察并开始计时,注意完全覆盖组织不要干片,显色至理想效果后放入自来水中终止显色,整个显色过程不超过10分钟。

[0035] 12) 苏木素染色:将切片重新插到切片架上,整架切片放入苏木素染液中染色2分钟,2分钟后将整架切片取出,自来水冲洗去除多余的苏木素染液。整架切片放入盐酸酒精中分化3秒,自来水冲洗干净,放入氨水中反蓝,自来水中冲洗干净。显微镜下观察显色效果,可重复上述步骤直至显色满意。

[0036] 13) 脱水、透明、封片:将整架切片从自来水中取出,依次放入75%乙醇2分钟,85%乙醇2分钟,95%乙醇2分钟,100%乙醇2分钟,二甲苯I3分钟,二甲苯II3分钟,取出置于通风

橱中晾干,取适量中性树胶封片。

[0037] 3、染色评分

利用ImagePro Plus 6.0软件进行。该软件能够用于免疫组化图片的定量分析,通过测算光密度值反映目的蛋白表达量。其定量关联呈对数关系,符合朗伯比尔定律。评分时扣除纤维组织及肝窦等组织间隙,准确选择肝癌细胞为目标区域,通过灰度图片转换后测量其累计光密度及面积,计算目标区域内平均光密度值,取其对数值作为单张图片染色评分。每处组织最终染色评分为5张免疫组化图片的均值。生存及复发曲线利用Kaplan Meier法绘制,Log-rank检验用于层间及组间比较。

[0038] 其中,免疫组化图片采用数码相机和成像装置对免疫组化染色后的肝癌组织切片进行拍摄获得。

[0039] 实施例1

在本实施例中,收集363例接受肝癌根治术病人的肿瘤样本,利用上述免疫组织化学方法进行检测。本发明在363例肝癌病人的肿瘤组织中检测结果如图1-3所示,其中:图1示出了PPFIBP1在癌旁组织中弱表达;图2示出了PPFIBP1在肝癌组织中高表达(图2);图3示出了肝癌组织中PPFIBP1低表达患者与高表达患者生存曲线,通过Kaplan Meier生存曲线分析可知,PPFIBP1高表达的患者平均生存期显著低于PPFIBP1低表达的患者。

[0040] 因此,PPFIBP1蛋白表达量与肝癌复发转移具有相关性,以PPFIBP1蛋白作为预后标志物对其表达量进行检测可以用于指导肝癌的预后判断。

[0041] 以上已以较佳实施例公布了本发明,然其并非用以限制本发明,凡采取等同替换或等效变换的方案所获得的技术方案,均落在本发明的保护范围内。

序列表

<110> 昆山德诺瑞尔生物科技有限公司

<120> PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用

<160> 1

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 1011

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<400> 1

```

Met Met Ser Asp Ala Ser Asp Met Leu Ala Ala Ala Leu Glu Gln Met
1           5           10           15
Asp Gly Ile Ile Ala Gly Ser Lys Ala Leu Glu Tyr Ser Asn Gly Ile
           20           25           30
Phe Asp Cys Gln Ser Pro Thr Ser Pro Phe Met Gly Ser Leu Arg Ala
           35           40           45
Leu His Leu Val Glu Asp Leu Arg Gly Leu Leu Glu Met Met Glu Thr
           50           55           60
Asp Glu Lys Glu Gly Leu Arg Cys Gln Ile Pro Asp Ser Thr Ala Glu
65           70           75           80
Thr Leu Val Glu Trp Leu Gln Ser Gln Met Thr Asn Gly His Leu Pro
           85           90           95
Gly Asn Gly Asp Val Tyr Gln Glu Arg Leu Ala Arg Leu Glu Asn Asp
           100          105          110
Lys Glu Ser Leu Val Leu Gln Val Ser Val Leu Thr Asp Gln Val Glu
           115          120          125
Ala Gln Gly Glu Lys Ile Arg Asp Leu Glu Phe Cys Leu Glu Glu His
           130          135          140
Arg Glu Lys Val Asn Ala Thr Glu Glu Met Leu Gln Gln Glu Leu Leu
145          150          155          160
Ser Arg Thr Ser Leu Glu Thr Gln Lys Leu Asp Leu Met Ala Glu Ile
           165          170          175
Ser Asn Leu Lys Leu Lys Leu Thr Ala Val Glu Lys Asp Arg Leu Asp
           180          185          190
Tyr Glu Asp Lys Phe Arg Asp Thr Glu Gly Leu Ile Gln Glu Ile Asn
           195          200          205
Asp Leu Arg Leu Lys Val Ser Glu Met Asp Ser Glu Arg Leu Gln Tyr
210          215          220

```

Glu Lys Lys Leu Lys Ser Thr Lys Ser Leu Met Ala Lys Leu Ser Ser
 225 230 235 240
 Met Lys Ile Lys Val Gly Gln Met Gln Tyr Glu Lys Gln Arg Met Glu
 245 250 255
 Gln Lys Trp Glu Ser Leu Lys Asp Glu Leu Ala Ser Leu Lys Glu Gln
 260 265 270
 Leu Glu Glu Lys Glu Ser Glu Val Lys Arg Leu Gln Glu Lys Leu Val
 275 280 285
 Cys Lys Met Lys Gly Glu Gly Val Glu Ile Val Asp Arg Asp Ile Glu
 290 295 300
 Val Gln Lys Met Lys Lys Ala Val Glu Ser Leu Met Ala Ala Asn Glu
 305 310 315 320
 Glu Lys Asp Arg Lys Ile Glu Asp Leu Arg Gln Cys Leu Asn Arg Tyr
 325 330 335
 Lys Lys Met Gln Asp Thr Val Val Leu Ala Gln Gly Lys Asp Gly Glu
 340 345 350
 Tyr Glu Glu Leu Leu Asn Ser Ser Ser Ile Ser Ser Leu Leu Asp Ala
 355 360 365
 Gln Gly Phe Ser Asp Leu Glu Lys Ser Pro Ser Pro Thr Pro Val Met
 370 375 380
 Gly Ser Pro Ser Cys Asp Pro Phe Asn Thr Ser Val Pro Glu Glu Phe
 385 390 395 400
 His Thr Thr Ile Leu Gln Val Ser Ile Pro Ser Leu Leu Pro Ala Thr
 405 410 415
 Val Ser Met Glu Thr Ser Glu Lys Ser Lys Leu Thr Pro Lys Pro Glu
 420 425 430
 Thr Ser Phe Glu Glu Asn Asp Gly Asn Ile Ile Leu Gly Ala Thr Val
 435 440 445
 Asp Thr Gln Leu Cys Asp Lys Leu Leu Thr Ser Ser Leu Gln Lys Ser
 450 455 460
 Ser Ser Leu Gly Asn Leu Lys Lys Glu Thr Ser Asp Gly Glu Lys Glu
 465 470 475 480
 Thr Ile Gln Lys Thr Ser Glu Asp Arg Ala Pro Ala Glu Ser Arg Pro
 485 490 495
 Phe Gly Thr Leu Pro Pro Arg Pro Pro Gly Gln Asp Thr Ser Met Asp
 500 505 510
 Asp Asn Pro Phe Gly Thr Arg Lys Val Arg Ser Ser Phe Gly Arg Gly
 515 520 525
 Phe Phe Lys Ile Lys Ser Asn Lys Arg Thr Ala Ser Ala Pro Asn Leu

Met Ala Gln Leu Leu Asn Ile Pro Pro Asn Lys Thr Leu Leu Arg Arg
 850 855 860
 His Leu Ala Thr His Phe Asn Leu Leu Ile Gly Ala Glu Ala Gln His
 865 870 875 880
 Gln Lys Arg Asp Ala Met Glu Leu Pro Asp Tyr Val Leu Leu Thr Ala
 885 890 895
 Thr Ala Lys Val Lys Pro Lys Lys Leu Ala Phe Ser Asn Phe Gly Asn
 900 905 910
 Leu Arg Lys Lys Lys Gln Glu Asp Gly Glu Glu Tyr Val Cys Pro Met
 915 920 925
 Glu Leu Gly Gln Ala Ser Gly Ser Ala Ser Lys Lys Gly Phe Lys Pro
 930 935 940
 Gly Leu Asp Met Arg Leu Tyr Glu Glu Asp Asp Leu Asp Arg Leu Glu
 945 950 955 960
 Gln Met Glu Asp Ser Glu Gly Thr Val Arg Gln Ile Gly Ala Phe Ser
 965 970 975
 Glu Gly Ile Asn Asn Leu Thr His Met Leu Lys Glu Asp Asp Met Phe
 980 985 990
 Lys Asp Phe Ala Ala Arg Ser Pro Ser Ala Ser Ile Thr Asp Glu Asp
 995 1000 1005
 Ser Asn Val
 1010

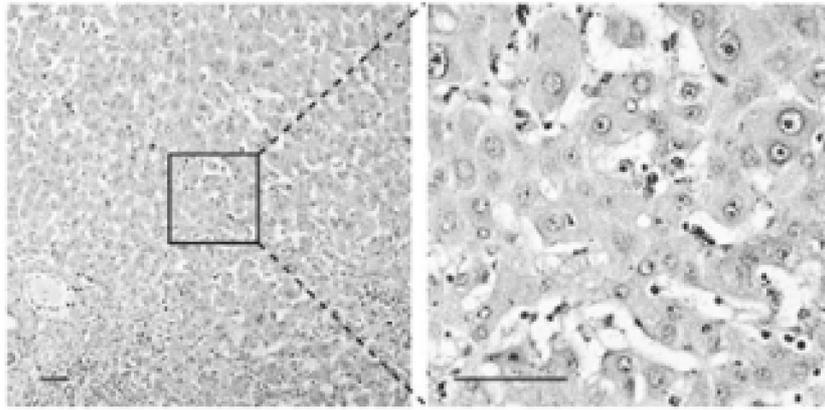


图1

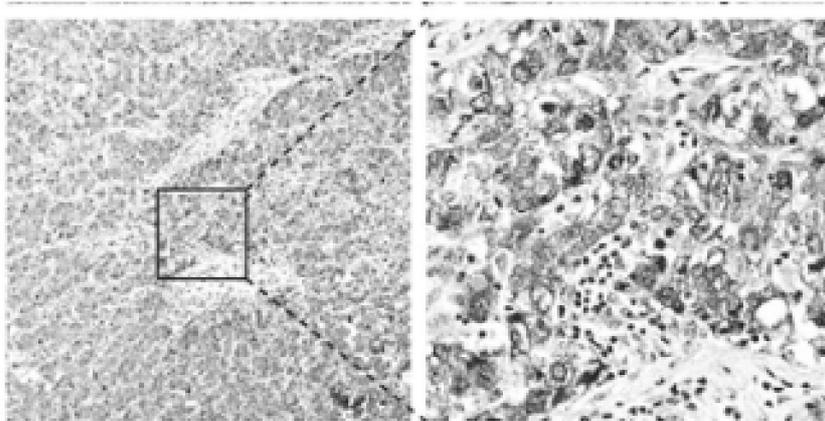


图2

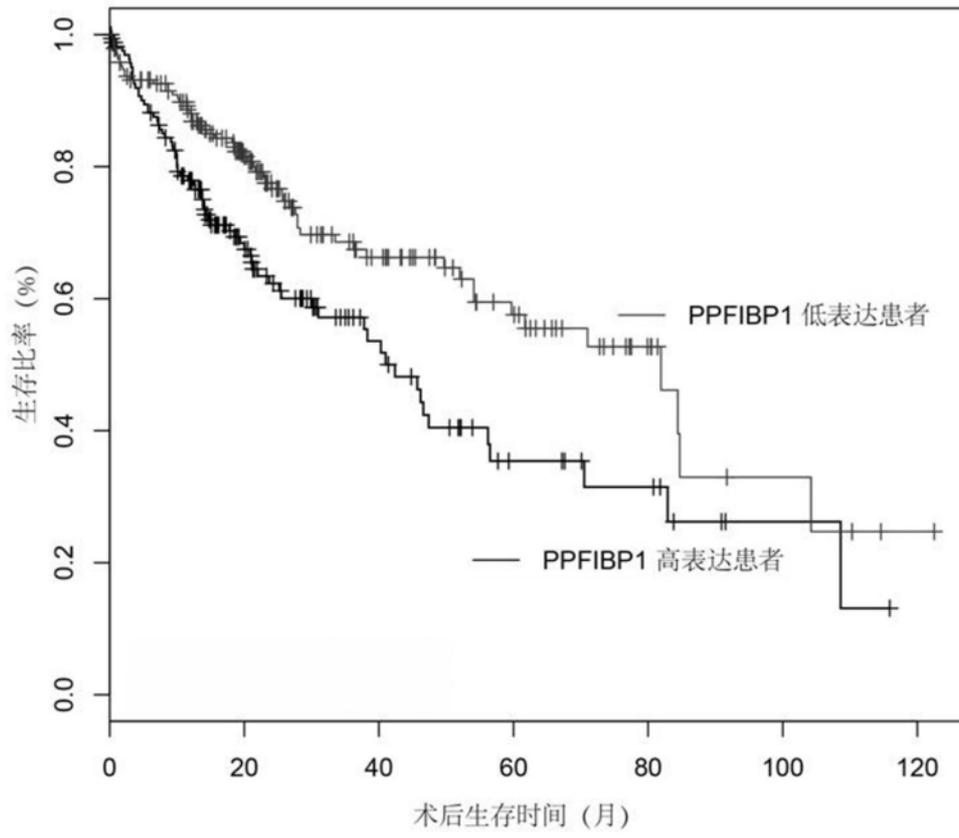


图3

专利名称(译)	PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用		
公开(公告)号	CN110221052A	公开(公告)日	2019-09-10
申请号	CN201910521939.5	申请日	2019-06-17
[标]发明人	张鑫 李国平		
发明人	张鑫 李国平		
IPC分类号	G01N33/50 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/574 G01N33/576 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/5067 G01N33/531 G01N33/532 G01N33/558 G01N33/57438 G01N33/5761 G01N33/68		
代理人(译)	董建林		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用。本发明采用免疫组化方法检测PPFIBP1蛋白在肝癌组织中的相对表达量，以此判断肝癌患者术后生存期的长短。本发明的有益效果主要体现在：本发明提供了PPFIBP1蛋白在制备肝癌术后预后评估试剂盒中的应用，提示该蛋白能用于制备判断肝癌患者预后的蛋白质分子标记，对于肝癌病人术后监控具有重要的指导意义。

