



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102713624 A

(43) 申请公布日 2012. 10. 03

(21) 申请号 201180007011. 7

G01N 33/533 (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 01. 18

G01N 33/534 (2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/535 (2006. 01)

2010-012976 2010. 01. 25 JP

G01N 33/574 (2006. 01)

(85) PCT申请进入国家阶段日

2012. 07. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2011/050720 2011. 01. 18

(87) PCT申请的公布数据

W02011/090017 JA 2011. 07. 28

(71) 申请人 日东纺绩株式会社

地址 日本福島县

(72) 发明人 小島良 野田健太 清宮正徳

曾川一幸 野村文夫

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 罗菊华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

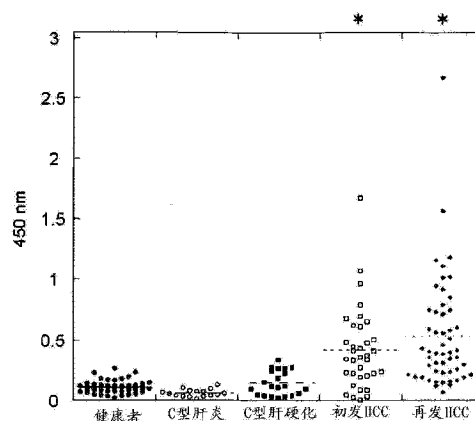
权利要求书 1 页 说明书 5 页 附图 2 页

(54) 发明名称

抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法、其中使用的试剂盒、及使用其的原发性肝细胞癌的判断方法

(57) 摘要

通过使待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原反应,并用标记抗人免疫球蛋白抗体测定生成的自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物,可测定其自身抗体,由此可判断原发性肝细胞癌。



1. 抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法,其特征在于,通过使待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原反应,并测定生成的抗 Ku86 自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物来测定其自身抗体。
2. 权利要求 1 所述的免疫测定方法,其中所述待测样品是血液来源待测样品。
3. 权利要求 1 或 2 所述的免疫测定方法,其中所述免疫测定方法是酶联免疫测定方法、荧光免疫测定方法、化学发光免疫测定方法、或者放射免疫测定方法。
4. 权利要求 1 ~ 3 之任一项所述的免疫测定方法,其用于癌判断。
5. 权利要求 4 所述的免疫测定方法,其中所述癌是原发性肝细胞癌。
6. 抗 Ku86 自身抗体免疫测定用试剂盒,其特征在于,作为试剂成分含至少 Ku86 抗原。
7. 权利要求 6 所述的试剂盒,其中所述 Ku86 抗原结合于水不溶性载体。
8. 权利要求 7 所述的试剂盒,其还含抗人免疫球蛋白抗体。
9. 权利要求 8 所述的试剂盒,其中所述抗人免疫球蛋白抗体经标记物标记。
10. 原发性肝细胞癌判断方法,其通过测定抗 Ku86 自身抗体,判断是原发性肝细胞癌。
11. 权利要求 10 所述的原发性肝细胞癌判断方法,其测定血液来源待测样品中的自身抗体。
12. 原发性肝细胞癌判断用标记物,其含抗 Ku86 自身抗体。
13. 权利要求 12 所述的原发性肝细胞癌判断用标记物,其用于使用血液来源待测样品来判断。

抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法、其中使用的试剂盒、及使用其的原发性肝细胞癌的判断方法

【技术领域】

[0001] 本发明涉及用于测定抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法及免疫测定用试剂盒。抗 Ku86 自身抗体特别是在原发性肝细胞癌患者的血中特异性地出现,从而,本发明不单单仅是提供测定自身抗体的方法,也可在原发性肝细胞癌的判断中利用。

【背景技术】

[0002] Ku86 是与双链 DNA 切断相关的蛋白质,与 Ku70 一起,形成被称为 Ku 的异源二聚体,该 Ku 异源二聚体与 DNA 依赖性蛋白激酶等共同可修复双链 DNA 切断(非专利文献 1)。

[0003] 另一方面,由向琼脂糖 2 维电泳适用 2D-DIGE 法(二维荧光示差凝胶电泳, two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis)的改良琼脂糖 2 维电泳法(非专利文献 2),通过蛋白质组解析进行原发性肝细胞癌的癌部及周边的非癌部组织的表达蛋白的量的比较,得知被称为 Ku86 的蛋白质在癌部多表达(非专利文献 3)。

[0004] 【现有技术文献】

[0005] 【非专利文献】

[0006] 非专利文献 1:Li et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 9, No. 2, 832-837, 2002

[0007] 非专利文献 2:Takeshi Tomonaga et al., Clin. Cancer Res. 2004 ;10:2007-2014

[0008] 非专利文献 3:Masanori Seimiya et al., Hepatology 2008 ;48:519-30

【发明内容】

[0009] 【发明要解决的技术课题】

[0010] 本发明人发现,通过测定在疑似患癌的患者或癌患者来源的组织待测样品中存在的 Ku86 的表达水平,可进行它们的组织的癌部与非癌部的判别。本发明人再对血液待测样品中的 Ku86 的存在进行持续研究时,令人惊讶地发现,有在血液待测样品中存在抗 Ku86 自身抗体的情况,在原发性肝细胞癌患者的情况中,其自身抗体的量特异性地多。从而,本发明的目的是提供,可应用于原发性肝细胞癌判断的,抗 Ku86 自身抗体的测定方法。

[0011] 【解决课题的技术方案】

[0012] 本发明人发现,通过使待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原反应,并用标记抗人免疫球蛋白抗体测定生成的自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物,可测定其自身抗体,由此可使癌判断成为可能,从而完成本发明。

[0013] 从而,本发明涉及抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法,其特征在于,通过使待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原反应,并测定生成的抗 Ku86 自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物来测定其自身抗体。

[0014] 再者,本发明涉及抗 Ku86 自身抗体免疫测定用试剂盒,其特征在于,作为试剂成分含至少 Ku86 抗原。

[0015] 再者,本发明涉及原发性肝细胞癌判断方法,其通过测定抗 Ku86 自身抗体,判断

是原发性肝细胞癌。

[0016] 再者,本发明涉及原发性肝细胞癌判断用标记物,其含抗 Ku86 自身抗体。

[0017] 【发明效果】

[0018] 在本发明中,可简单地测定待测样品中,特别是,血液来源待测样品中存在的抗 Ku86 自身抗体,对于原发性肝细胞癌患者的判断有效。

【附图说明】

[0019] 【图 1】是使用致敏 Ku86 抗原的 ELISA 板而测定健康人待测样品、C 型肝炎患者血清待测样品、C 型肝硬变患者血清待测样品、初发原发性肝细胞癌(以下,也称之为初发 HCC)患者血清待测样品及再发原发性肝细胞癌(以下,也称之为再发 HCC)患者血清待测样品中抗 Ku86 自身抗体的结果。再有,图中,横轴示疾病名,纵轴示对波长 450nm 光的吸光度。另外,星号示在进行与健康人血清待测样品组、C 型肝炎患者待测样品组或 C 型肝硬变患者血清待测样品组的比较的全部的情况中,存在通过 Wilcoxon 的 2 标本检验的显著差异($p < 0.0001$)的血清待测样品组。

[0020] 【图 2】是使用致敏 Ku86 抗原的 ELISA 板而测定健康人血清待测样品、初发 HCC 患者血清待测样品、大肠癌患者血清待测样品、胃癌患者血清待测样品、胰腺癌患者血清待测样品、乳腺癌患者血清待测样品、肺癌患者血清待测样品及食道癌患者血清待测样品中 Ku86 和其自身抗体的复合物的结果。再有,图中,横轴示疾病名,纵轴示对波长 450nm 光的吸光度。另外,星号示在进行与健康人血清待测样品组、大肠癌患者血清待测样品组、胃癌患者血清待测样品组、胰腺癌患者血清待测样品组、乳腺癌患者血清待测样品组、肺癌患者血清待测样品组或食道癌患者血清待测样品组的比较的全部的情况中,存在通过 Wilcoxon 的 2 标本检验的显著差异($p < 0.0001$)的血清待测样品组。

[0021] 【实施方式】

[0022] 本发明的抗 Ku86 自身抗体的免疫测定方法的特征在于,通过使待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原反应,并测定生成的抗 Ku86 自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物来测定抗 Ku86 自身抗体。

[0023] 在本发明中,作为待测样品,以活体来源的样品为适宜,特别是,以血液来源待测样品为适宜,作为血液来源待测样品,可例示全血、血浆、血清。

[0024] 本发明的免疫测定方法的测定对象是抗 Ku86 自身抗体。如上所述, Ku86 是与双链 DNA 切断相关的蛋白质,其正式名是 ATP- 依赖性 DNA 解链酶 2 亚基 2 (ATP-dependent DNA helicase 2 subunit 2),作为别名也称之为 XRCC5。另外, Ku86 是在美国的国立生物工程学信息中心(NCBI)的登录号(accession No)是 gi-10863945 的,由 732 个的氨基酸构成的 82kDa 的蛋白质。

[0025] 若实施本发明的免疫测定方法,则使用作为试剂的 Ku86 抗原。作为作为试剂的 Ku86 抗原,只要是可与抗 Ku86 自身抗体发生抗原抗体反应的抗原,则不特别限定,可例示 Ku86 全长蛋白质、作为 Ku86 全长蛋白质的变体的,有可和与该蛋白质同样的抗 Ku86 自身抗体发生抗原抗体反应的功能,并且与该氨基酸序列有 90% 以上的相同性的蛋白质或有在 Ku86 全长蛋白质的氨基酸序列中缺失、取代或附加 1 个至数个氨基酸残基的氨基酸序列的蛋白质的变体、作为 Ku86 的片段肽的可与 Ku86 的自身抗体发生抗原抗体反应的肽。Ku86

全长蛋白质可从 Abnova 公司得到,但由于全氨基酸序列是如上所述已知,Ku86 全长蛋白质或其变体也可根据基因重组技术合成。在本发明中,在使用 Ku86 的片段肽之时,可将 Ku86 全长蛋白质通过酶分解等切成各种的肽片段而制成,使用市售的自动肽合成装置也可容易地制成。另外,也可将目标的 Ku86 的片段肽通过基因重组技术制成。

[0026] 在本发明中,可使如此得到的 Ku86 全长蛋白质的变体或片段肽与抗 Ku86 自身抗体进行反应而选择发生抗原抗体反应的当作作为试剂的 Ku86 抗原而使用。在本发明中,除了上述的各肽片段的全体之外,也可使用其一部分,也可使用它们的混合物,这些也包括在作为试剂的 Ku86 抗原中。

[0027] 在本发明中,免疫测定抗 Ku86 自身抗体时,例如,将作为试剂的 Ku86 抗原固相化到微板或其他载体,向得到的水不溶化载体适用预计含有该自身抗体的待测样品而使与作为试剂的 Ku86 抗原进行抗原抗体反应而结合,接下来,适用用酶等标记的抗人免疫球蛋白抗体而反应结合到该自身抗体。

[0028] 水不溶化载体的制备可使用将蛋白质结合到固相面的已知的方法容易地进行。例如,作为固相化载体,通常用到:珠、微板、管等。作为向这些固相面结合作为试剂的 Ku86 抗原的方法,可适宜利用物理吸附、化学结合等已知的固定化技术。

[0029] 使如此固相化的 Ku86 抗原和含有该自身抗体的待测样品接触,则仅抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原特异性地结合。从而,当加标记的抗人免疫球蛋白抗体时,由于抗人免疫球蛋白抗体与抗 Ku86 自身抗体结合,所以可利用此标记进行测定。

[0030] 作为标记,可适宜使用酶、放射性同位素、FITC、若丹明、亮氨酸之类的荧光物质、化学发光物质等常用的标记。使用这些各种标记,可由酶联免疫测定方法、放射免疫测定方法、荧光免疫测定方法、化学发光免疫测定方法等的方法,测定抗 Ku86 自身抗体。

[0031] 作为酶联免疫测定方法中使用的标记酶,可适宜使用辣根过氧化物酶、牛小肠碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶等的酶联免疫分析法(EIA)中常用的酶,可适宜使用适合于这些的酶的在 EIA 中常用的发色底物。作为发色底物,例如在 HRP 的情况下,使用 3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMBZ)、TMBZ·HCl、TMBZ·PS、ABTS、o-苯二胺、p-羟苯基醋酸等,在碱性磷酸酶的情况下,使用 p-硝基苯基磷酸酯、4-甲基伞形花酰磷酸酯等,在 β -半乳糖苷酶的情况下,使用 o-硝基苯基- β -D-吡喃半乳糖、4-甲基伞形花酰 β -D-吡喃半乳糖等。

[0032] 在放射免疫测定方法、荧光免疫测定方法、化学发光免疫测定方法等中,也可采用通常使用的公知的标记。

[0033] 在本发明的免疫测定方法中,除了上述的方法之外,通过蛋白印迹法、免疫组织染色法、乳胶免疫比浊法及免疫沉降法等免疫测定法、液相层析法,也可测定抗 Ku86 自身抗体。

[0034] 本发明的免疫测定方法作为试剂成分含至少 Ku86 抗原,可由抗 Ku86 自身抗体免疫测定用试剂盒实施。Ku86 抗原,可例如,以结合于微板等的水不溶性载体的形态作为试剂盒的试剂成分。作为试剂盒的其他试剂成分,可举出抗人免疫球蛋白抗体,此抗人免疫球蛋白抗体,根据采用的酶联免疫测定方法、放射免疫测定方法、荧光免疫测定方法、化学发光免疫测定方法等的测定方法,使用经酶、放射性同位元素、荧光物质、化学发光物质等的标记物标记的。作为其他试剂成分,也可适宜加表面活性剂、缓冲剂。

[0035] 在本发明中,通过测定抗 Ku86 自身抗体,可进行原发性肝细胞癌的判断。通过本发明的测定方法测定抗 Ku86 自身抗体对于患者的癌疾病的判别有效。本发明的测定方法的利用对于例如,健康人,和初发原发性肝细胞癌患者或再发原发性肝细胞癌患者的判别有效。另外,通过利用本发明的测定方法,使大肠癌患者、胃癌患者、胰腺癌患者、乳腺癌患者、肺癌患者或食道癌患者等的癌患者,和初发原发性肝细胞癌患者或再发原发性肝细胞癌患者的判别成可能。再者,通过利用本发明的测定方法,使 C 型肝炎患者或 C 型肝硬变等的肝脏疾病患者,和初发原发性肝细胞癌患者或再发原发性肝细胞癌患者等的原发性肝细胞癌患者的判别成可能。

[0036] 从以上的说明可知,抗 Ku86 自身抗体是成为原发性肝细胞癌判断用标记物的物质,可作为原发性肝细胞癌的判断用标记物使用。另外,抗 Ku86 自身抗体可作为使用全血、血浆、血清等的血液来源待测样品判断原发性肝细胞癌的标记物而适宜。

【实施例】

[0037] 以下,通过实施例再详细地说明本发明,本发明不受这些实施例的任何限制。

[0038] 【实施例 1 :抗 Ku86 自身抗体的测定】

[0039] 对从健康人、C 型肝炎患者、C 型肝硬变患者、初发原发性肝细胞癌患者、再发原发性肝细胞癌患者、大肠癌患者、胃癌患者、胰腺癌患者、乳腺癌患者、肺癌患者及食道癌患者采集的血清待测样品,用接下来具体说明的酶联免疫测定法(ELISA 法)测定抗 Ku86 自身抗体。

[0040] 【1. 方法】

[0041] (1) Ku86 的 ELISA 板的制成

[0042] 作为水不溶性载体使用 ELISA 板(Nunc 公司制,Maxisorp),向其作为 Ku86 将 XRCC5 全长体(重组体蛋白质 GST 标签附带 :Abnova 公司制 $5 \mu\text{g/mL}$, $100 \mu\text{L/孔}$)于 4°C 静置 1 晚而致敏,其后,用含 0.05% 吐温 20 的 PBS ($200 \mu\text{L/孔}$)进行 3 次清洗。接下来,用含 1.5%BSA、10% 蔗糖的 PBS ($200 \mu\text{L/孔}$)包被 1 晚而制成 Ku86 的 ELISA 板。

[0043] (2) 抗 Ku86 自身抗体的测定

[0044] 将各样品血清用 PBS 稀释 100 倍,将其加到各 $100 \mu\text{L/孔}$ Ku86 的 ELISA 板,于 37°C 静置 1 小时,其后,将该板用含 0.05% 吐温 20 的 PBS ($200 \mu\text{L/孔}$)清洗 3 次。向该板也加各 $100 \mu\text{L/孔}$ HRP 标记免疫球蛋白(将 HRP 标记的抗 - 人 IgG (Zymed 公司制)用含 0.05% 吐温 20 的 PBS 稀释 4000 倍的),于 37°C 静置 30 分钟。接下来,将该板用含 0.05% 吐温 20 的 PBS ($200 \mu\text{L/孔}$)清洗 3 次之后,加各 $100 \mu\text{L/孔}$ TMBZ,于室温静置 10 分钟之后,作为反应停止剂加 $100 \mu\text{L/孔}$ 的 1N 硫酸。吸光度是使用酶标仪(BioRad 公司制),在波长 450nm 处进行测定。

[0045] 再有,待测样品使用健康人 48 例、C 型肝炎患者 16 例、C 型肝硬变患者 21 例、初发原发性肝细胞癌患者待测样品 35 症例、再发原发性肝细胞癌患者 52 例、大肠癌患者待测样品 16 例、胃癌患者 16 例、胰腺癌患者 16 例、乳腺癌患者 20 例、肺癌患者 10 例、食道癌患者 18 例。

[0046] 【2. 结果】

[0047] 将使用 Ku86 的 ELISA 板测定抗 Ku86 自身抗体的结果示于图 1。显著差异检验使

用 KaleidaGraph4.0, 用 Wilcoxon 的 2 标本检验进行统计处理。

[0048] 如图 1 所示, 与健康人组、C 型肝炎组及 C 型肝硬变组比较, 初发原发性肝细胞癌患者待测样品组及再发原发性肝细胞癌患者待测样品组的抗 Ku86 自身抗体量确认明显的显著差异。从而示, 血中的抗 Ku86 自身抗体的免疫测定在肝脏疾病之中, 对于原发性肝细胞癌的判别有效。

[0049] 如图 2 所示, 与健康人组或各种的癌患者待测样品组、即, 大肠癌患者待测样品组、胃癌患者待测样品组、胰腺癌患者待测样品组、乳腺癌患者待测样品组、肺癌患者待测样品组及食道癌患者待测样品组比较, 原发性肝细胞癌患者待测样品组的抗 Ku86 自身抗体量确认显著差异。从而示, 血中的抗 Ku86 自身抗体的免疫测定对于健康人和原发性肝细胞癌患者的判别有效。再者示, 血中的抗 Ku86 自身抗体的免疫测定对于大肠癌患者、胃癌患者、胰腺癌患者、乳腺癌患者、肺癌患者或食道癌患者等的癌患者和原发性肝细胞癌患者的判别也有效。

[0050] 【工业实用性】

[0051] 如以上详细地说明, 通过使血液来源待测样品等的待测样品中的抗 Ku86 自身抗体与作为试剂的 Ku86 抗原进行反应, 并测定生成的自身抗体和 Ku86 抗原的免疫复合物, 可测定其自身抗体, 由此, 可判断原发性肝细胞癌。

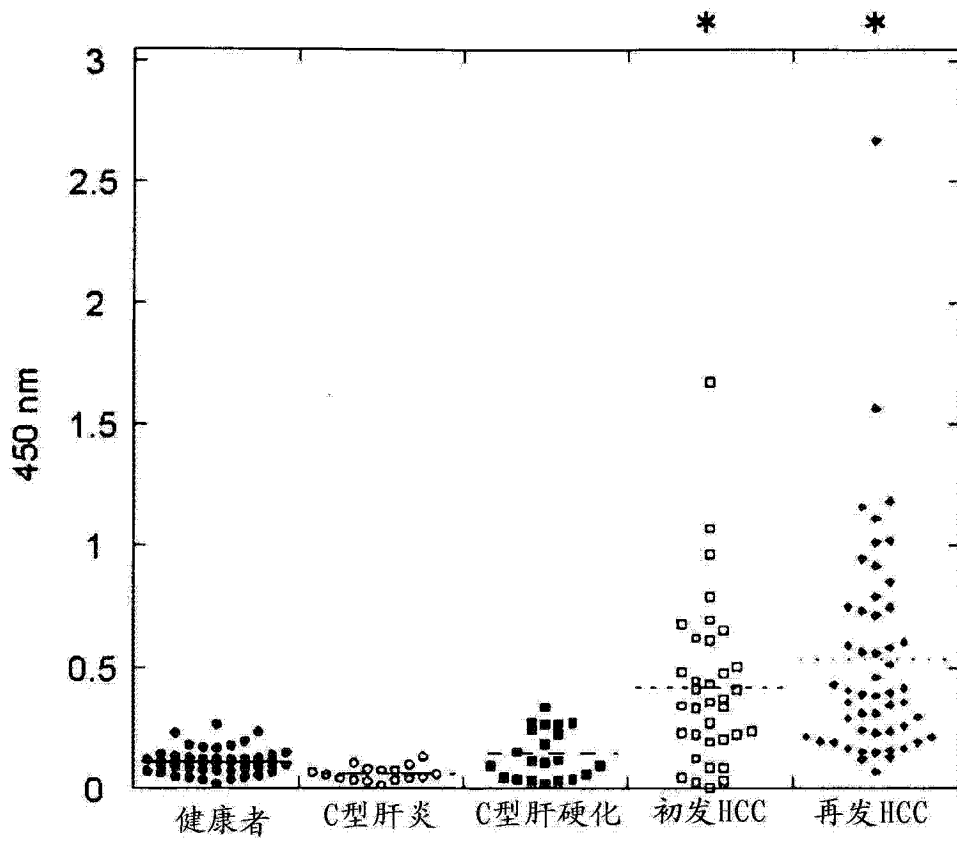


图 1

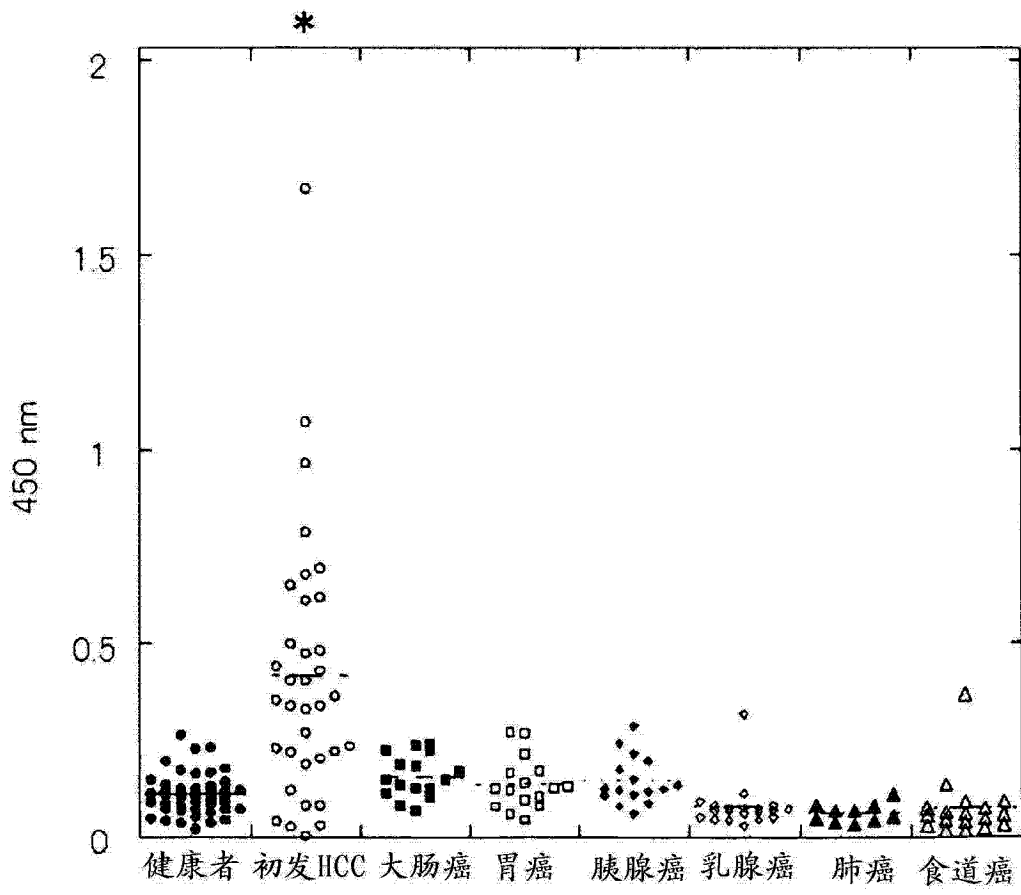


图 2

专利名称(译)	抗Ku86自身抗体的免疫测定方法、其中使用的试剂盒、及使用其的原发性肝细胞癌的判断方法		
公开(公告)号	CN102713624A	公开(公告)日	2012-10-03
申请号	CN201180007011.7	申请日	2011-01-18
[标]申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
当前申请(专利权)人(译)	日东纺绩株式会社		
[标]发明人	小岛良 野田健太 清宫正德 曾川一幸 野村文夫		
发明人	小岛良 野田健太 清宫正德 曾川一幸 野村文夫		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/57438 G01N2333/90 G01N33/6854 G01N33/57484 G01N2333/47		
优先权	2010012976 2010-01-25 JP		
其他公开文献	CN102713624B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

通过使待测样品中的抗Ku86自身抗体与作为试剂的Ku86抗原反应，并用标记抗人免疫球蛋白抗体测定生成的自身抗体和Ku86抗原的免疫复合物，可测定其自身抗体，由此可判断原发性肝细胞癌。

