



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102346184 A

(43) 申请公布日 2012. 02. 08

(21) 申请号 201010244440. 3

(22) 申请日 2010. 08. 03

(71) 申请人 中国人民解放军军事医学科学院生
物工程研究所

地址 100850 北京市海淀区太平路 27 号军
事医学科学院生物工程研究所

(72) 发明人 周建光 钱晓龙

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限
公司 11245

代理人 关畅 任凤华

(51) Int. Cl.

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/577(2006. 01)

权利要求书 2 页 说明书 13 页
序列表 3 页 附图 4 页

(54) 发明名称

SPON2 的新用途

(57) 摘要

本发明公开了 SPON2 的新用途。该新用途是抗脊椎蛋白 2 的抗体在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。实验证明,用检测 SPON2 的酶联免疫试剂盒或用检测 SPON2 的免疫组化试剂盒对前列腺癌进行诊断,诊断结果更精确和准确,优于现有的 PSA 诊断方法。

1. 抗脊椎蛋白 2 的抗体在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其特征在于:所述抗脊椎蛋白 2 的抗体为抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体和 / 或抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体;

所述抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体为鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体;所述抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体为羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体。

3. 检测脊椎蛋白 2 的试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用;
或脊椎蛋白 2 在设计和 / 或制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。

4. 根据权利要求 1-3 中任一所述的应用,其特征在于:所述检测脊椎蛋白 2 的试剂盒为检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒或检测脊椎蛋白 2 的免疫组化试剂盒。

5. 根据权利要求 1-4 中任一所述的应用,其特征在于:所述检测脊椎蛋白 2 的试剂盒为检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒,所述前列腺癌为如下 1) 或 2) 所示:

1) Gleason 评分为 4 ~ 6 分的前列腺癌、Gleason 评分为 7 分的前列腺癌、Gleason 评分为 8 分的前列腺癌或 Gleason 评分为 9 ~ 10 分的前列腺癌;

2) 前列腺特异性抗原阴性的前列腺癌;

所述检测脊椎蛋白 2 的试剂盒为检测脊椎蛋白 2 的免疫组化试剂盒,所述前列腺癌为如下 I 或 II 或 III 所示:

I、Gleason 评分为 7 ~ 8 分的前列腺癌或 Gleason 评分 ≤ 6 分的前列腺癌;

II、WHO 评分为 2 级的前列腺癌;

III、有转移灶的前列腺癌。

6. 根据权利要求 1-5 中任一所述的应用,其特征在于:

所述检测脊椎蛋白 2 的试剂盒为检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒,所述前列腺特异性抗原阴性为血清中前列腺特异性抗原浓度小于等于 10ng/ml;

所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒由鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体、羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体、标准品溶液、包被缓冲液、封闭液、洗涤缓冲液、终止液、底物溶液和酶标抗体组成;

所述包被缓冲液由碳酸钠、碳酸氢钠和水组成;所述碳酸钠在所述包被缓冲液中的浓度为 1.59g/L,所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的浓度为 2.93g/L;

所述洗涤缓冲液由氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、Tween 20 和水组成;氯化钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 8g/L,氯化钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.2g/L,磷酸氢二钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 1.44g/L,磷酸二氢钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.24g/L, Tween 20 在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.1% (体积百分比);

所述封闭液由所述洗涤缓冲液和牛血清白蛋白组成,牛血清白蛋白在所述封闭液中的浓度为 10g/L;

所述终止液为 2M 的硫酸水溶液;

所述酶标抗体为 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体;

所述标准品溶液为所述封闭液与所述脊椎蛋白 2 组成脊椎蛋白 2 浓度不同的如下溶液:100,50,25,12.5,6.3,3.1 和 1.6ng/ml。

7. 根据权利要求 1-6 中任一所述的应用,其特征在于:

所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒中,所述包被缓冲液与所述羊来源的抗脊椎蛋

白 2 的多克隆抗体组成抗体浓度为 630ng/ml 的溶液 ;所述封闭液与鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体组成抗体浓度为 5ug/ml 的溶液 ;所述封闭液与酶标抗体组成酶标抗体浓度为 80ng/ml 的溶液 ;

所述脊椎蛋白 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示 ;所述前列腺特异性抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

8. 一种用于辅助诊断前列腺癌的酶联免疫试剂盒,由以下物质组成 :抗脊椎蛋白 2 的抗体、标准品溶液、包被缓冲液、封闭液、洗涤缓冲液、终止液和酶标抗体。

9. 根据权利要求 8 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于 :所述抗体为鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体和羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体 ;

所述包被缓冲液由碳酸钠、碳酸氢钠和水组成 ;所述碳酸钠在所述包被缓冲液中的浓度为 1.59g/L,所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的浓度为 2.93g/L ;

所述洗涤缓冲液由氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、Tween 20 和水组成 ;氯化钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 8g/L,氯化钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.2g/L,磷酸氢二钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 1.44g/L,磷酸二氢钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.24g/L, Tween 20 在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.1% (体积百分比) ;

所述封闭液由所述洗涤缓冲液和牛血清白蛋白组成,牛血清白蛋白在所述封闭液中的浓度为 10g/L ;

所述终止液为 2M 的硫酸水溶液 ;所述酶标抗体为 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体 ;

所述标准品溶液为所述封闭液与所述脊椎蛋白 2 组成脊椎蛋白 2 浓度不同的如下溶液 :100,50,25,12.5,6.3,3.1 和 1.6ng/ml。

10. 根据权利要求 8 或 9 所述的酶联免疫试剂盒,其特征在于 :所述包被缓冲液与所述羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体组成抗体浓度为 630ng/ml 的溶液 ;所述封闭液与鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体组成抗体浓度为 5ug/ml 的溶液 ;所述封闭液与酶标抗体组成酶标抗体浓度为 80ng/ml 的溶液。

SPON2 的新用途

技术领域

[0001] 本发明涉及 SPON2 的新用途。

背景技术

[0002] 前列腺癌是北美国家男性中最常见的恶性肿瘤之一,2008 年美国新确诊为前列腺癌的患者占该年新确诊为恶性肿瘤患者的 25%。在我国,随着人口结构逐步老龄化,前列腺癌的发病率也在逐年增高。

[0003] 肿瘤血清标志物的是目前研究的热点。理想的肿瘤血清标志物应该有如下的特点:能够区分高危与健康人群,能够用于肿瘤的诊断,方法简单、成本低廉,能够用于肿瘤的临床分期评估,能够用于肿瘤的治疗效果评估,能够用于预测肿瘤的转移与复发。

[0004] PSA 是目前应用最为广泛的前列腺癌血清标志物。尽管 PSA 筛查带来了诸多好处,但近年来也饱受争议和质疑。近些年来,发现 PSA 检测的对前列腺癌的特异性较差,良性前列腺增生和前列腺炎患者的血清 PSA 也会有所升高。除此之外,血清 PSA 水平在 4~10ng/ml 之间属于灰区,难以区分前列腺的良性病变与恶性病变。还有一些标志物,或者临床应用较为局限,或者效果不是很理想。寻找能够替代 PSA 或弥补 PSA 缺陷的血清诊断标志物是十分必要的。

[0005] 脊椎蛋白 2 (SPON2, Spondin-2, Mindin, DIL-1) 属细胞外基质蛋白质类,因在癌变与非癌变的肺泡细胞中差异表达而得名。脊椎蛋白 2 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:1。

[0006] 前列腺特异性抗原 (PSA) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO:2 所示。

发明内容

[0007] 本发明的一个目的是提供一种抗脊椎蛋白 2 的抗体、检测脊椎蛋白 2 的试剂盒的新用途。

[0008] 抗脊椎蛋白 2 的抗体的新用途为抗脊椎蛋白 2 的抗体在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。

[0009] 所述抗脊椎蛋白 2 的抗体为抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体和 / 或抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体;

[0010] 所述抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体为鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体;所述抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体为羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体。

[0011] 上述抗体均是从商业途径得到的抗体,或经过细胞体外培养得到的抗体;羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体具体可购自 R&D 公司,产品目录号为 AF-2609;鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体具体可购自 Abnova 公司,产品目录号为 H00010417-M01J。

[0012] 检测脊椎蛋白 2 的试剂盒的新用途是检测脊椎蛋白 2 的试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。

[0013] 检测脊椎蛋白 2 的试剂盒为检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒或检测脊椎蛋白 2 的免疫组化试剂盒。

[0014] 脊椎蛋白 2 在设计和 / 或制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用也属于本发明的保护范围。

[0015] 上述任一所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用中,所述前列腺癌为如下 1) 或 2) 所示:

[0016] 1) Gleason 评分为 4 ~ 6 分的前列腺癌、Gleason 评分为 7 分的前列腺癌、Gleason 评分为 8 分的前列腺癌或 Gleason 评分为 9 ~ 10 分的前列腺癌;

[0017] 2) 前列腺特异性抗原阴性的前列腺癌;

[0018] 检测脊椎蛋白 2 的试剂盒检测脊椎蛋白 2 的免疫组化试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用中,所述前列腺癌为如下 I 或 II 或 III 所示:

[0019] I、Gleason 评分为 7 ~ 8 分的前列腺癌或 Gleason 评分 $\leq$ 6 分的前列腺癌;

[0020] II、WHO 评分为 2 级的前列腺癌;

[0021] III、有转移灶的前列腺癌。

[0022] 上述任一所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用中,所述前列腺特异性抗原阴性为血清中前列腺特异性抗原浓度小于等于 10ng/ml。

[0023] 上述任一所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用中,所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒由鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体、羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体、标准品溶液、包被缓冲液、封闭液、洗涤缓冲液、终止液、底物溶液和酶标抗体组成;

[0024] 所述包被缓冲液由碳酸钠、碳酸氢钠和水组成;所述碳酸钠在所述包被缓冲液中的浓度为 1.59g/L,所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的浓度为 2.93g/L;

[0025] 所述洗涤缓冲液由氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、Tween 20 和水组成;氯化钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 8g/L,氯化钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.2g/L,磷酸氢二钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 1.44g/L,磷酸二氢钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.24g/L, Tween 20 在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.1% (体积百分比);

[0026] 所述封闭液由所述洗涤缓冲液和牛血清白蛋白组成,牛血清白蛋白在所述封闭液中的浓度为 10g/L;

[0027] 所述终止液为 2M 的硫酸水溶液;

[0028] 所述酶标抗体为 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体;

[0029] 所述标准品溶液为所述封闭液与所述脊椎蛋白 2 组成脊椎蛋白 2 浓度不同的如下溶液:100,50,25,12.5,6.3,3.1 和 1.6ng/ml。

[0030] 上述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒和免疫组化试剂盒还可从商业途径得到;上述检测脊椎蛋白 2 的免疫组化试剂盒具体可为山羊二步法免疫组化试剂盒,具体可以购自中杉金桥生物公司,产品目录号为 PV-9003。

[0031] 上述任一所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用中,所述检测脊椎蛋白 2 的酶联免疫试剂盒中,所述包被缓冲液与所述羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体组成抗体浓度为 630ng/ml 的溶液;所述封闭液与鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体组成抗体浓度为 5ug/ml 的溶液;所述封闭液与酶标抗体组成酶标抗体浓度为 80ng/ml 的溶液;

[0032] 所述脊椎蛋白 2 的氨基酸序列如 SEQ ID NO :1 所示 ;所述前列腺特异性抗原的氨基酸序列如 SEQ ID NO :2 所示。

[0033] 本发明的另一个目的是提供一种用于辅助诊断前列腺癌的酶联免疫试剂盒。

[0034] 本发明所提供的用于辅助诊断前列腺癌的酶联免疫试剂盒由以下物质组成 :上述任一所述抗脊椎蛋白 2 的抗体、标准品溶液、包被缓冲液、封闭液、洗涤缓冲液、终止液和酶标抗体。

[0035] 上述酶联免疫试剂盒中,所述抗体为鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体和羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体 ;

[0036] 所述包被缓冲液由碳酸钠、碳酸氢钠和水组成 ;所述碳酸钠在所述包被缓冲液中的浓度为 1.59g/L,所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的浓度为 2.93g/L ;

[0037] 所述洗涤缓冲液由氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、Tween 20 和水组成 ;氯化钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 8g/L,氯化钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.2g/L,磷酸氢二钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 1.44g/L,磷酸二氢钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.24g/L,Tween 20 在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.1% (体积百分比) ;

[0038] 所述封闭液由所述洗涤缓冲液和牛血清白蛋白组成,牛血清白蛋白在所述封闭液中的浓度为 10g/L ;

[0039] 所述终止液为 2M 的硫酸水溶液 ;

[0040] 所述酶标抗体为 HRP 标记的山羊抗小鼠抗体 ;

[0041] 所述标准品溶液为所述封闭液与所述脊椎蛋白 2 组成脊椎蛋白 2 浓度不同的如下溶液 :100,50,25,12.5,6.3,3.1 和 1.6ng/ml。

[0042] 上述任一所述酶联免疫试剂盒中,所述包被缓冲液与所述羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体组成抗体浓度为 630ng/ml 的溶液 ;所述封闭液与鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体组成抗体浓度为 5ug/ml 的溶液 ;所述封闭液与酶标抗体组成酶标抗体浓度为 80ng/ml 的溶液。

[0043] 实验证明,用检测 SPON2 的酶联免疫试剂盒对 13 例正常人,4 例良性前列腺增生,72 例前列腺癌患者血清中的 SPON2 进行检测,结果前列腺癌患者中 SPON2 的含量显著高于正常人或良性前列腺增生者,表明通过检测血清中 SPON2 的含量可以诊断前列腺癌 ;尤其突出的是,SPON2 在 Gleason 评分 4 ~ 6 分的前列腺癌患者血清中的含量与正常人差异极显著,SPON2 在 PSA 水平小于 10ng/ml 前列腺癌患者血清中的含量与正常人差异极显著,证明用 SPON2 诊断前列腺癌精确度更高更准确。

[0044] 实验还证明,用检测 SPON2 的免疫组化试剂盒对 10 例正常和前列腺癌旁组织、19 例良性前列腺增生和 44 例前列腺癌组织检测。结果 SPON2 在前列腺癌组织中明显比正常组织和良性前列腺增生组织中阳性率升高,表达增强 ;更突出的是,SPON2 在诊断 Gleason 评分 (7 ~ 8)、WHO 分级 2 级的前列腺癌、发生转移的前列腺癌组织中染色增强更为显著,前列腺癌中 SPON2 的染色强度与 PSA 呈正相关,但其表达与良性病变差异明显,远远优于 PSA。证明用 SPON2 诊断前列腺癌精确度更高更准确。

附图说明

[0045] 图 1 为双夹心 ELISA 法检测 SPON2 浓度的标准曲线。

[0046] 图 2 为 SPON2 在前列腺癌患者血清中较正常人和良性前列腺增生患者明显上调。横线代表中位数值,差异用 Willcoxon Two-Sample Test 进行统计分析。

[0047] 图 3 为 SPON2 有助于血清 PSA 水平小于 10ng/ml 前列腺癌患者的诊断。

[0048] 图 4 为半定量 RT-PCR 证实 SPON2 仅在 AR 阳性的前列腺癌细胞系中表达。

[0049] 图 5 为胞外蛋白 Western Blot 证实 SPON2 仅在 AR 阳性的前列腺癌细胞系中表达。

[0050] 图 6 为前列腺癌患者的组织标本中 PSA 的染色强度和 SPON2 的染色强度呈正相关。P 值用 Spearman 相关进行计算。(r = Spearman 相关系数)。

[0051] 图 7 为 SPON2 和 PSA 在正常前列腺组织,良性前列腺增生组织和不同 Gleason 评分、不同 WHO 分级和 TNM 分期的前列腺癌组织中的表达。用 HE 染色作为参照,照片所示为连续切片的组织芯片上同一个组织点的同一位置。

具体实施方式

[0052] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0053] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0054] 下述实施例中使用的培养基、抗体、化学试剂如下:

[0055]	名称	产地	货号
[0056]	氯化钠	国产分析纯	
[0057]	氯化钾	国产分析纯	
[0058]	磷酸氢二钠	国产分析纯	
[0059]	磷酸二氢钾	国产分析纯	
[0060]	Tween 20	国产分析纯	
[0061]	HRP 标记山羊抗小鼠中杉金桥		ZB-2305
[0062]	IgG (H+L)		
[0063]	SPON2 羊多克隆抗体	R&D 公司	AF-2609
[0064]	(Anti-human Mindin		
[0065]	Antibody)		
[0066]	山羊二步法免疫组化试剂盒	中杉金桥生物	PV-9003
[0067]	免疫组化专用磷酸盐缓冲液	中杉金桥生物	ZLI-9061
[0068]	(0.01M PH = 7.2 ~ 7.4)		
[0069]	柠檬酸盐抗原修复液 (0.01	中杉金桥生物	ZLI9064
[0070]	M PH = 6.0)		
[0071]	DAB 显色试剂盒	中杉金桥生物	ZLI-9031
[0072]	前列腺癌组织芯片	陕西超英生物科技	(编号 PR807)
[0073]	二甲苯	国产分析纯	
[0074]	中性树胶	国产分析纯	
[0075]	苏木素	中杉金桥生物	ZLI-9610
[0076]	氨水	国产分析纯	
[0077]	碳酸氢钠	国产分析纯	
[0078]	牛血清清蛋白 (BSA)	美国 Proliant 公司	RF101

- [0079] 可溶性单组分 TMB 底物溶 天根科技 PA107-01
- [0080] 液
- [0081] 浓硫酸 国产分析纯
- [0082] SPON2 鼠单克隆抗体 Abnova H00010417-M01J
- [0083] (SPON2 monoclonal
- [0084] antibody (M01J), clone 3C6)
- [0085] SPON2 标准品 (SPON2 Abnova H00010417-P01
- [0086] Recombinant Protein (P01))
- [0087] PSA 羊多克隆抗体 R&D 公司 AF1344
- [0088] (Anti-human Kallikrein
- [0089] 3/PSA Antibody)
- [0090] 下述实施例中使用的主要仪器设备如下：
- [0091] 免疫组化笔 中杉金桥生物 ZLI-9305
- [0092] 96 孔酶标板 Corning Costar 9018
- [0093] IX70 荧光倒置显微镜 Olympus
- [0094] 酶联检测仪 Bio-Rad
- [0095] 实施例 1、用于诊断前列腺癌的试剂盒
- [0096] 本实施例中，检测样本中 SPON2 或 PSA 的含量值均用 $M(Q_R)$ 表示，M 表示样本中 SPON2 含量的中位数； Q_R 表示样本中 SPON2 含量的四分位数间距，即 $Q_R =$ 上四分位数值与下四分位数值之差的绝对值。
- [0097] 一、试剂盒组成
- [0098] 1、包被抗体：羊来源的抗脊椎蛋白 2 的多克隆抗体 (SPON2 羊多克隆抗体)。
- [0099] 2、结合抗体：鼠来源的抗脊椎蛋白 2 的单克隆抗体 (SPON2 鼠单克隆抗体)。
- [0100] 3、标准品：脊椎蛋白 2。封闭液与脊椎蛋白 2 组成脊椎蛋白 2 浓度不同的如下溶液：100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 和 1.6ng/ml。
- [0101] 4、包被缓冲液：由碳酸钠、碳酸氢钠和水组成；所述碳酸钠在所述包被缓冲液中的浓度为 1.59g/L，所述碳酸氢钠在所述包被缓冲液中的浓度为 2.93g/L；
- [0102] 5、洗涤缓冲液：由氯化钠、氯化钾、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、Tween 20 和水组成；氯化钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 8g/L，氯化钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.2g/L，磷酸氢二钠在所述洗涤缓冲液中的浓度是 1.44g/L，磷酸二氢钾在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.24g/L，Tween 20 在所述洗涤缓冲液中的浓度是 0.1%（体积百分比）；
- [0103] 6、封闭液：由所述洗涤缓冲液和牛血清白蛋白组成，牛血清白蛋白在所述封闭液中的浓度为 10g/L。
- [0104] 7、终止液：2M 的硫酸水溶液；
- [0105] 8、底物溶液的组成：四甲基联苯胺 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine, TMB) 的水溶液。
- [0106] 9、酶标抗体：HRP 标记的山羊抗小鼠抗体。
- [0107] 10、如下溶液：
- [0108] 1) 包被抗体的溶液：由包被缓冲液与包被抗体组成，包被抗体在溶液中的浓度为

630ng/ml ;

[0109] 2) 结合抗体的溶液 : 由封闭液与结合抗体组成, 结合抗体在溶液中的浓度为 5ug/ml ;

[0110] 3) 酶标抗体的溶液 : 由封闭液与酶标抗体组成, 酶标抗体在溶液中的浓度为 80ng/ml。

[0111] 二、试剂盒制备

[0112] 碳酸盐包被缓冲液按照如下方法配制 : 向 900ml 去离子水中加入 1.59g 碳酸钠和 2.93g 碳酸氢钠, 去离子水定容至 1L。

[0113] ELISA 洗涤缓冲液 (PBST) 按照如下方法配制 : 向 900ml 蒸馏水中加入 8g 氯化钠, 0.2g 氯化钾, 1.44g 磷酸氢二钠, 0.24g 磷酸二氢钾, 调 PH 值至 7.4, 用蒸馏水定容至 1L, 高压灭菌后冷却至室温, 加入 0.1% (体积百分比) Tween 20 试剂混匀后使用。

[0114] ELISA 封闭液 : 向上述 ELISA 洗涤缓冲液加入 10g 牛血清白蛋白 (BSA), 用 ELISA 洗涤缓冲液定容至 1L。

[0115] ELISA 反应终止液 : 2M 硫酸水溶液。

[0116] 三、试剂盒的应用

[0117] (一) SPON2 双夹心 ELISA 标准曲线的建立

[0118] 1、用碳酸盐包被缓冲液稀释 SPON2 羊多克隆抗体 (Anti-human Mindin Antibody) 630ng/ml, 置于酶联板中每孔 100 μ l 4℃包被过夜 ;

[0119] 2、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次 ;

[0120] 3、加入 ELISA 封闭液 100 μ l 每孔, 37℃ 2h ;

[0121] 4、用 ELISA 封闭液梯度稀释 SPON2 标准品 (SPON2 Recombinant Protein(P01)) 浓度分别为 100, 50, 25, 12.5, 6.3, 3.1 和 1.6ng/ml, 取未加标准品的 ELISA 封闭液作为空白对照, 每个浓度做两个重复。每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37℃ 2h ;

[0122] 5、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次 ;

[0123] 6、用 ELISA 封闭液稀释 SPON2 鼠单克隆抗体 (SPON2monoclonal antibody (M01J), clone 3C6) 至 5 μ g/ml, 每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37℃ 2h ;

[0124] 7、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次 ;

[0125] 8、用 ELISA 封闭液稀释 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 至 80ng/ml, 每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37℃ 2h ;

[0126] 9、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次 ;

[0127] 10、每孔加入 100 μ l 可溶性 TMB 单组分底物溶液, 避光 15-20min ;

[0128] 11、加入 ELISA 中止液每孔 100 μ l 中止反应 ;

[0129] 12、读取每孔 450nm 光吸收读数, 减去 570nm 光吸收读数, 即为该孔读数, 取两个孔的平均值作为该浓度的读数 ;

[0130] 13、每个浓度的读数减去空白对照读数后, 取对数, 与标准品浓度的对数拟合线性关系。

[0131] 获得的标准曲线如图 1 所示。 $Y = 1.5763x + 2.5237, R^2 = 0.9768$ 。

[0132] (二) 用建立的双夹心 ELISA 法检测患者血清

[0133] 检测 89 份人血清标本, 包括 : 13 例正常老年人 (Normal), 4 例良性前列腺增生患

者 (BPH), 72 例前列腺癌患者的血清 (PCa)。血清标本的采取均经过患者和正常老年人的同意。

[0134] 检测方法如下:

[0135] 1、用碳酸盐包被缓冲液稀释 SPON2 羊多克隆抗体 (Anti-human Mindin Antibody) 630ng/ml, 置于酶联板中每孔 100 μ l 4 $^{\circ}$ C 包被过夜;

[0136] 2、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次;

[0137] 3、加入 ELISA 封闭液 100 μ l 每孔, 37 $^{\circ}$ C 2h;

[0138] 4、按待测血清:ELISA 封闭液 = 1 : 2 稀释待测血清, 取未加标准品的 ELISA 封闭液作为空白对照。每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37 $^{\circ}$ C 2h;

[0139] 5、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次;

[0140] 6、用 ELISA 封闭液稀释 SPON2 鼠单克隆抗体 (SPON2 monoclonal antibody (M01J), clone 3C6) 至 5 μ g/ml, 每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37 $^{\circ}$ C 2h;

[0141] 7、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次;

[0142] 8、用 ELISA 封闭液稀释 HRP 标记山羊抗小鼠 IgG (H+L) 至 80ng/ml, 每孔 100 μ l 置于酶联板中, 37 $^{\circ}$ C 2h;

[0143] 9、用 ELISA 洗涤缓冲液洗酶联板 3 次;

[0144] 10、每孔加入 100 μ l 可溶性 TMB 单组分底物溶液, 避光 15-20min;

[0145] 11、加入 ELISA 中止液每孔 100 μ l 中止反应;

[0146] 12、读取每孔 450nm 光吸收读数, 减去 570nm 光吸收读数, 即为该孔读数;

[0147] 13、每个孔的读数减去空白对照读数后, 取对数, 代入标准曲线, 取 3×10^{-1} (代入曲线所得值) 即为血清 SPON2 浓度。

[0148] 用 Willcoxon Two-Sample Test 统计分析正常群体中 SPON2 的含量与前列腺癌患者群体中 SPON2 的含量差异是否显著。

[0149] 结果如表 1 和图 2 所示。结果: 前列腺癌患者血清中 SPON2 含量较正常人或所有的良性病变者有明显的上调 (***, P 小于 0.001)。应用 Willcoxon Two-Sample Test 确认其差异具有统计学意义。表明, 可以用该试剂盒诊断前列腺癌。

[0150] 表 1. 应用双夹心 ELISA 检测 SPON2 在正常人、良性增生者和前列腺癌患者血清中的差异表达 (单位 ng/ml)

		Case Number	M(Q _R)
[0151]	Benign	17	0.55(7.15)
	Normal	13	0.45(5.19)
	Malignant PCa	72	20.19(23.86)***

[0152] (三) 比较正常人血清中的 SPON2 浓度与不同 Gleason 评分前列腺癌患者的血清 SPON2 浓度

[0153] Gleason 评分 70 例前列腺癌患者, 分成表 2 中所述等级。用 SNK 法 (q 检验) 统计分析正常群体中 SPON2 的含量与不同 Gleason 评分的前列腺癌患者群体中 SPON2 的含量差

异是否显著。

[0154] 将正常人血清中的 SPON2 浓度与不同 Gleason 评分前列腺癌患者的血清 SPON2 浓度做了比较。结果如表 2:SNK 法(q 检验)表明各个 Gleason 评分(4~6 分,7 分,8 分,9~10 分)的前列腺癌血清 SPON2 表达明显高于正常人(*),并具有统计学意义;而 Gleason 评分为 4~6 分的前列腺癌患者(#)血清 SPON2 表达高于其他 Gleason 评分组(7 分,8 分,9~10 分)并具有统计学意义。

[0155] 表 2、应用双夹心 ELISA 检测 SPON2 在正常人和不同 Gleason 评分的前列腺癌患者血清中的差异表达(单位 ng/ml)

[0156]

	Case Number	M(Q _R)
Normal	13	0.45(5.19)
Gleason Score 4 ~ 6	12	25.75(53.31)*#
Gleason Score 7	30	18.70(34.78)*
Gleason Score 8	13	20.00(23.14)*
Gleason Score 9 ~ 10	15	23.11(13.33)*

[0157] (四) 正常人血清中的 SPON2 浓度与血清 PSA $\leq 10\text{ng/ml}$ 前列腺癌患者的血清 SPON2 浓度比较

[0158] 血清中前列腺特异性抗原 PSA 浓度的检测方法:应用电化学发光法,使用 RocheElecsys 2010 全自动电化学发光免疫分析仪及其配套的 PSA 试剂(由与仪器配套生产的德国罗氏诊断有限公司提供),均在效期内使用。标准曲线的制备和血清检测严格按照操作流程进行。

[0159] 将正常人血清中的 SPON2 浓度与血清 PSA $\leq 10\text{ng/ml}$ 前列腺癌患者的血清 SPON2 浓度做了比较,同时对他们的血清 PSA 浓度也做了比较。结果:PSA $\leq 10\text{ng/ml}$ (*)的前列腺癌患者和 PSA $> 10\text{ng/ml}$ (*)的前列腺癌患者血清中 SPON2 水平均明显高于正常老年人。应用 Willcoxon Two-Sample Test 确定其具有统计学意义(p 分别等于 0.0013 和 0.0001)。而在 PSA $\leq 10\text{ng/ml}$ 的患者中,PSA 水平与正常老年人并无明显差异(p = 0.2852)。说明:SPON2 有助于对血清 PSA 水平小于 10ng/ml 的前列腺患者的诊断,而这些前列腺癌患者的血清 PSA 水平与正常人并无明显差异(图 3 和表 3)。

[0160]

表 3. 应用双夹心 ELISA 检测 SPON2 在正常人、PSA $\leq$ 10 ng/ml 的前列腺癌患者和 PSA $>$ 10 ng/ml 的前列腺癌患者血清中的差异表达 (单位 ng/ml)

		Case Number	SPON2 M(Q _R)	PSA M(Q _R)
Normal		13	0.45(5.19)	0.40(2.30)
PCa	PSA $\leq$ 10 ng/ml	9	16.01(15.06)*	3.94(5.16)
	PSA $>$ 10 ng/ml	61	21.53(27.24)*	88.50(274.78)

[0161] 实施例 2、SPON2 在细胞中的表达

[0162] 半定量 RT-PCR 检测 SPON2 在各种前列腺癌细胞系中的表达情况。胞外蛋白 Western Blot 检测 SPON2 在各种前列腺癌细胞系中的表达情况。

[0163] BPH 是良性前列腺增生模型。LNCaP 和 C4-2 细胞是国际上承认的前列腺癌研究细胞模型。PC3 是前列腺癌骨转移的细胞模型,雄激素受体阴性;C4-2B 是由 LNCaP 演变而来,为骨转移的细胞系,同样也具有雄激素非依赖的性质,AR 阳性;DU145 是前列腺癌脑转移的细胞系,雄激素受体阴性。

[0164] 结果如图 4 和图 5 所示。结果表明,SPON2 具有前列腺癌细胞系特异性,仅在 AR 阳性的前列腺癌细胞系中表达。

[0165] 实施例 3、免疫组化法诊断前列腺癌

[0166] 一、SPON2 在前列腺组织中的免疫组织化学染色分析 (组织芯片) 方法如下:

[0167] 1、烤片,然后脱蜡至水;二甲苯 I 20min,二甲苯 II 20min,100%乙醇 5min,100%乙醇 5min,95%乙醇 5min,90%乙醇 5min,85%乙醇 5min,75%乙醇 5min,去离子水 5min;

[0168] 2、用柠檬酸盐修复液进行抗原修复;

[0169] 柠檬酸盐修复液储存液:

[0170] A. 0.1M 枸橼酸溶液:称取 21.01g 枸橼酸 ($C_6H_8O_7 \cdot H_2O$) 溶于 1000ml 蒸馏水中。

[0171] B. 0.1M 枸橼酸钠溶液:称取 29.41g 枸橼酸钠 ($C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$) 溶于 1000ml 蒸馏水中。

[0172] 柠檬酸盐修复液工作液:取 9mlA 液和 41ml B 液加入 450ml 蒸馏水中,溶液 pH 值应为 6.0)。

[0173] 3、组化笔圈定反应区域后,滴加双氧水常温反应 10min;

[0174] 4、PBS 洗液 (氯化钠 (NaCl)8g,氯化钾 (KCl)0.2g,12 水合磷酸氢二钠 ($Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$) 3.58g,磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.24g,去离子水定容至 1L,加入 1ml Tween20 混匀即可) 在组化盒里洗 3 次,每次 5min;

[0175] 5、用中杉金桥抗体稀释液稀释 R&D 公司 SPON2 羊多克隆抗体 (Anti-human Mindin Antibody) 至工作浓度 4 μ g/ml;

[0176] 中杉金桥抗体稀释液:用 TBS (Tris 缓冲液 (TBS) (25mol/L Tris 缓冲液),去离子水 800ml,氯化钠 8g,Tris 碱 3g,Kcl 0.2g 用 Hcl 调 PH 至 7.4,加水定容至 1L,高压灭菌,室温保存) 或 PBS 将正常动物的非免疫血清配成浓度为 5-10% (即 1:10-20 倍稀释) 的工作液即得到抗体稀释液。一般血清种属的选择为二抗来源的动物的血清。

[0177] 6、一抗 (即 R&D 公司 SPON2 羊多克隆抗体工作液) 滴制至标本中心 (30-50 μ l),

湿盒摇匀摇床低速 5min 后,4℃过夜;

[0178] 7、PBS 洗液在组化盒里洗 3 次,每次 5min;

[0179] 8、滴加山羊二步法试剂盒中试剂 1(聚合辅助剂)一滴,用枪头拨匀,摇床 5min,37℃ 20min;

[0180] 9、PBS 洗液在组化盒里洗 3 次,每次 5min;

[0181] 10、加试剂 2(辣根酶标记的抗山羊 IgG 多聚体)一滴,用枪头拨匀,摇床 5min,37℃ 20min;

[0182] 11、PBS 洗液在组化盒里洗 3 次,每次 5min;

[0183] 12、按说明书要求进行 DAB 显色;DAB 显色液配制方法:先以少量 TBS 溶解 50mg 3,3'-二氨基联苯胺四盐酸盐(DAB),然后用 TBS 补足 100ml,充分混匀,使 DAB 的终浓度为 0.05%,过滤后显色前加入 30% H₂O₂ 35 μL,过滤掉沉淀物即可。

[0184] 13、转入苏木素盒子中,染色 1-2min;

[0185] 14、用自来水洗去苏木素浮色,约 2-3 次,去离子水中泡 5min;

[0186] 15、分化液中(70%乙醇水溶液 985mL 中加入 15 毫升 1mmol/L 盐酸水溶液)浸泡 10 秒,降低本底;

[0187] 16、碱性溶液中增强苏木素染色强度;加入免疫组化核染色增强液(返蓝)(70%乙醇水溶液与氨水以 100 毫升:0.5 毫升体积比的混合液)5min,去离子水冲洗 3 次;

[0188] 17、封片脱水:75%乙醇 5min,85%乙醇 5min,90%乙醇 5min,95%乙醇 5min,100%乙醇 5min,二甲苯 II 20min,二甲苯 I 20min;

[0189] 18、标本中心用 1 毫升枪头滴 2 滴中性树脂,盖好盖玻片,注意不要产生气泡;

[0190] 19、风干 2 个小时以上,镜下观察。

[0191] PSA 检测:方法与上述一致,不同的是一抗为 R&D 公司 PSA 羊多克隆抗体,用中杉金桥抗体稀释液稀释至工作浓度 5ug/ml。

[0192] 二、检测材料和结果统计分析

[0193] 1、SPON2 的组织芯片分析

[0194] 陕西超英生物科技有限公司提供的前列腺组织芯片 PR807 中,含有正常前列腺组织 3 例,前列腺癌旁组织 7 例,良性前列腺增生(BPH)标本 20 例,前列腺癌(PCa)标本 50 例。其中 6 例前列腺癌标本中发生脱片或未见到前列腺癌组织,1 例良性前列腺增生标本出现脱片。本实验对两张连续切片的芯片分别用 SPON2 和 PSA 抗体进行了免疫组织化学染色,公司提供的一张完全相同组织芯片的 HE 染色作为对照。

[0195] (1) 首先在低倍镜下对各个组织点 SPON2 是否染色进行了判定,将其分为阴性(-)、弱阳性(±)和阳性(+),其统计结果如表 4,统计结果采用 Fisher 精确检验法(Fisher's Exact Test)进行分析,发现在前列腺癌患者中 SPON2 的阳性率明显高于正常人和良性前列腺癌增生患者。

[0196]

表 4.:前列腺标本中 SPON2 表达的组织芯片分析(阳性率)						
Staining with SPON2 Antibody	Tissues		WHO Grade		Metastasis	
	正常&癌 旁或增生	PCa	≤ 2	> 2	No	Yes
-&±	17(58.6%)	13(29.5%)	4(22.2%)	7(36.8%)	8(29.6%)	4(25.0%)
+	12(41.4%)	31(70.5%)	14(77.8%)	12(63.2%)	19(70.4%)	12(75.0%)
P	0.017		0.476		1.000	

[0197]

[0198] (2) 在 $40\times$ 物镜下,对芯片上每个样品随机选取 5 个点,白平衡后进行拍照。运用 Image-Pro Plus 6.0 软件计算选取 5 个点的积分光密度 (Integral optical density, IOD) 之和,取平均值作为每个样品的 IOD SUM。运用 SAS 6.12 软件对正常组织 (包括癌旁组织),良性前列腺增生组织,和前列腺癌组织的 IOD SUM 进行分析 (表 5),染色强度用中位数 (四分位数间距) 即 $M(Q_R)$ 表示, $P(\text{Chi Square}) < 0.05$ 时代表各个组之间的差异有显著性。结果在前列腺癌组织标本中 SPON2 染色较正常组织和前列腺增生组织均有明显增强,而 PSA 的表达差异没有显著性。表明该免疫组化检测可以用来诊断前列腺癌。

[0199]

表 5. 前列腺标本中 PSA 和 SPON2 表达的组织芯片分析 (积分光密度之和 IOD SUM)			
Staining with SPON2 Antibody	Case Number	SPON2 $M(Q_R)$	PSA $M(Q_R)$
正常&癌旁	10	14442(13143)	83524(44509)
增生	19	9753(16097)	89009(42693)
PCa	44	27293(42318)*	90279(52385)
P(Chi Square)	-	0.0044	0.8630

[0200] *:SNK 法 (q 检验) 表明前列腺癌中 SPON2 染色明显强于正常和良性增生前列腺组织,并具有统计学意义。

[0201] (3) 运用 SAS 6.12 软件对正常组织 (包括癌旁组织),良性前列腺增生组织,和不同 WHO 分级 (WHO Grade) 的前列腺癌组织的 IOD SUM 进行分析 (表 6),染色强度用 $M(Q_R)$ 表示, $P(\text{Chi Square}) < 0.05$ 时代表各个组之间的差异有显著性。结果,SPON2 在 WHO 分级为 2 级的组织中染色增强最为明显,而 PSA 在各组间的表达差异没有显著性。

[0202]

[0203]

表 6. 前列腺标本中 PSA 和 SPON2 表达的组织芯片分析 (积分光密度之和 IOD SUM, 根据前列腺癌 WHO 分级分类)

Staining with SPON2 Antibody	Case Number	SPON2 M(Q _R)	PSA M(Q _R)
Normal	10	14442(13143)	83524(44509)
BPH	19	9753(16097)	89009(42693)
PCa(WHO Grade<2)	5	27187(34535)	75730(25578)
PCa (WHO Grade=2)	13	52544(49740)*	97077(30483)
PCa (WHO Grade>2)	26	20003(32443)	84587(64459)
P(Chi Square)	-	0.0098	0.9237

[0204] *:SNK 法 (q 检验) 表明 WHO 分级为 2 级的前列腺癌中 SPON2 染色明显强于正常和良性增生前列腺组织, 并具有统计学意义。

[0205] (4) 运用 SAS 6.12 软件对正常组织 (包括癌旁组织), 良性前列腺增生组织, 和不同 Gleason 评分 (Gleason Score) 的前列腺癌组织的 IOD SUM 运用 SAS 软件进行分析 (表 7), 染色强度用 M(Q_R) 表示, P(Chi Square) < 0.05 时代表各个组之间的差异有显著性。结果, SPON2 在 Gleason 评分为 7~8 分的组织中染色增强最为明显, 而 PSA 在各组间的表达差异没有显著性。

[0206]

表 7. 前列腺标本中 PSA 和 SPON2 表达的组织芯片分析 (积分光密度之和 IOD SUM, 根据前列腺癌 Gleason 评分分类)

Staining with SPON2 Antibody	Case Number	SPON2 M(Q _R)	PSA M(Q _R)
Normal	10	14442(13143)	83524(44509)
BPH	19	9753(16097)	89009(42693)
PCa(Gleason Score ≤6)	16	27293(48462) [#]	84686(64020)
PCa(Gleason Score 7~8)	14	38186(44453)* [#]	99232 (63566)
PCa(Gleason Score 9~10)	14	23071(30368)	84278 (65793)
P(Chi Square)	-	0.0059	0.7392

[0207] *:SNK 法 (q 检验) 表明 Gleason 评分为 7~8 分的前列腺癌中 SPON2 染色明显强于正常前列腺组织, 并具有统计学意义。

[0208] #:SNK 法 (q 检验) 表明所有 Gleason 评分 ≤6 分和 7~8 分的前列腺癌中 SPON2 染色均明显强于良性增生前列腺组织, 并具有统计学意义。

[0209] (5) 运用 SAS 6.12 软件对正常组织 (包括癌旁组织), 良性前列腺增生组织, 和有

转移灶和无转移灶的前列腺癌组织的 IOD SUM 运用 SAS 软件进行分析 (表 8), 染色强度用 $M(Q_R)$ 表示, $P(\text{Chi Square}) < 0.05$ 时代表各个组之间的差异有显著性。结果, SPON2 在有转移灶的前列腺癌组织中染色增强更为明显, 而 PSA 在各组间的表达差异没有显著性。

[0210]

表 8. 前列腺标本中 PSA 和 SPON2 表达的组织芯片分析 (积分光密度之和 IOD SUM, 根据前列腺癌有无转移灶分类)

Staining with SPON2 Antibody	Case Number	SPON2 $M(Q_R)$	PSA $M(Q_R)$
Normal	10	14442(13143)*	83524(44509)
BPH	19	9753(16097)	89009(42693)
PCa(无转移灶)	27	27187(41979)	88979(48485)
PCa(有转移灶)	16	33295(49743) *	87436(67536)
P(Chi Square)	-	0.0072	0.9544

[0211] * :SNK 法 (q 检验) 表明有转移的前列腺癌中 SPON2 染色明显强于良性增生前列腺组织, 并具有统计学意义。

[0212] (6) 对 44 例前列腺癌组织中每个样品对应的 PSA 和 SPON2 的 IOD SUM 进行分析, 结果二者的表达呈正相关 (图 6)。

[0213] (7) 选取了正常组织, 良性前列腺增生组织及不同 WHO 分级, 不同 Gleason 评分, 有无转移的前列腺癌组织有代表性的共 6 例, PSA 染色、SPON2 染色和 HE 染色在连续切片中相同位置的 $40\times$ 物镜下的对照图。结果如图 7。

[0001]

序列表

<110>中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所

<120>SPON2 的新用途

<160>2

<210> 1

<211> 331

<212> PRT

<213> 1

<400> 1

Met Glu Asn Pro Ser Pro Ala Ala Ala Leu Gly Lys Ala Leu Cys Ala
1 5 10 15
Leu Leu Leu Ala Thr Leu Gly Ala Ala Gly Gln Pro Leu Gly Gly Glu
20 25 30
Ser Ile Cys Ser Ala Arg Ala Pro Ala Lys Tyr Ser Ile Thr Phe Thr
35 40 45
Gly Lys Trp Ser Gln Thr Ala Phe Pro Lys Gln Tyr Pro Leu Phe Arg
50 55 60
Pro Pro Ala Gln Trp Ser Ser Leu Leu Gly Ala Ala His Ser Ser Asp
65 70 75 80
Tyr Ser Met Trp Arg Lys Asn Gln Tyr Val Ser Asn Gly Leu Arg Asp
85 90 95
Phe Ala Glu Arg Gly Glu Ala Trp Ala Leu Met Lys Glu Ile Glu Ala
100 105 110
Ala Gly Glu Ala Leu Gln Ser Val His Ala Val Phe Ser Ala Pro Ala
115 120 125
Val Pro Ser Gly Thr Gly Gln Thr Ser Ala Glu Leu Glu Val Gln Arg
130 135 140

[0002]

Arg His Ser Leu Val Ser Phe Val Val Arg Ile Val Pro Ser Pro Asp			
145	150	155	160
Trp Phe Val Gly Val Asp Ser Leu Asp Leu Cys Asp Gly Asp Arg Trp			
	165	170	175
Arg Glu Gln Ala Ala Leu Asp Leu Tyr Pro Tyr Asp Ala Gly Thr Asp			
	180	185	190
Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Pro Asn Phe Ala Thr Ile Pro Gln Asp			
	195	200	205
Thr Val Thr Glu Ile Thr Ser Ser Ser Pro Ser His Pro Ala Asn Ser			
	210	215	220
Phe Tyr Tyr Pro Arg Leu Lys Ala Leu Pro Pro Ile Ala Arg Val Thr			
225	230	235	240
Leu Val Arg Leu Arg Gln Ser Pro Arg Ala Phe Ile Pro Pro Ala Pro			
	245	250	255
Val Leu Pro Ser Arg Asp Asn Glu Ile Val Asp Ser Ala Ser Val Pro			
	260	265	270
Glu Thr Pro Leu Asp Cys Glu Val Ser Leu Trp Ser Ser Trp Gly Leu			
	275	280	285
Cys Gly Gly His Cys Gly Arg Leu Gly Thr Lys Ser Arg Thr Arg Tyr			
	290	295	300
Val Arg Val Gln Pro Ala Asn Asn Gly Ser Pro Cys Pro Glu Leu Glu			
305	310	315	320
Glu Glu Ala Glu Cys Val Pro Asp Asn Cys Val			
	325	330	

<210>2

<211>227

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

[0003]

<223>

<400>2

```

Met Trp Val Pro Val Val Phe Leu Thr Leu Ser Val Thr Trp Ile Gly
1           5           10           15
Ala Ala Pro Leu Ile Leu Ser Arg Ile Val Gly Gly Trp Glu Cys Glu
          20           25           30
Lys His Ser Gln Pro Trp Gln Val Leu Val Ala Ser Arg Gly Arg Ala
          35           40           45
Val Cys Gly Gly Val Leu Val His Pro Gln Trp Val Leu Thr Ala Ala
          50           55           60
His Cys Ile Arg Asn Lys Ser Val Ile Leu Leu Gly Arg His Ser Leu
65           70           75           80
Phe His Pro Glu Asp Thr Gly Gln Val Phe Gln Val Ser His Ser Phe
          85           90           95
Pro His Pro Leu Tyr Asp Met Ser Leu Leu Lys Asn Arg Phe Leu Arg
          100          105          110
Pro Gly Asp Asp Ser Ser His Asp Leu Met Leu Leu Arg Leu Ser Glu
          115          120          125
Pro Ala Glu Leu Thr Asp Ala Val Lys Val Met Asp Leu Pro Thr Gln
          130          135          140
Glu Pro Ala Leu Gly Thr Thr Cys Tyr Ala Ser Gly Trp Gly Ser Ile
145          150          155          160
Glu Pro Glu Glu Phe Leu Thr Pro Lys Lys Leu Gln Cys Val Asp Leu
          165          170          175
His Val Ile Ser Asn Asp Val Cys Ala Gln Val His Pro Gln Lys Val
          180          185          190
Thr Lys Phe Met Leu Cys Ala Gly Arg Trp Thr Gly Gly Lys Ser Thr
          195          200          205
Cys Ser Val Ser His Pro Tyr Ser Gln Asp Leu Glu Gly Lys Gly Glu
          210          215          220
Trp Gly Pro
225

```

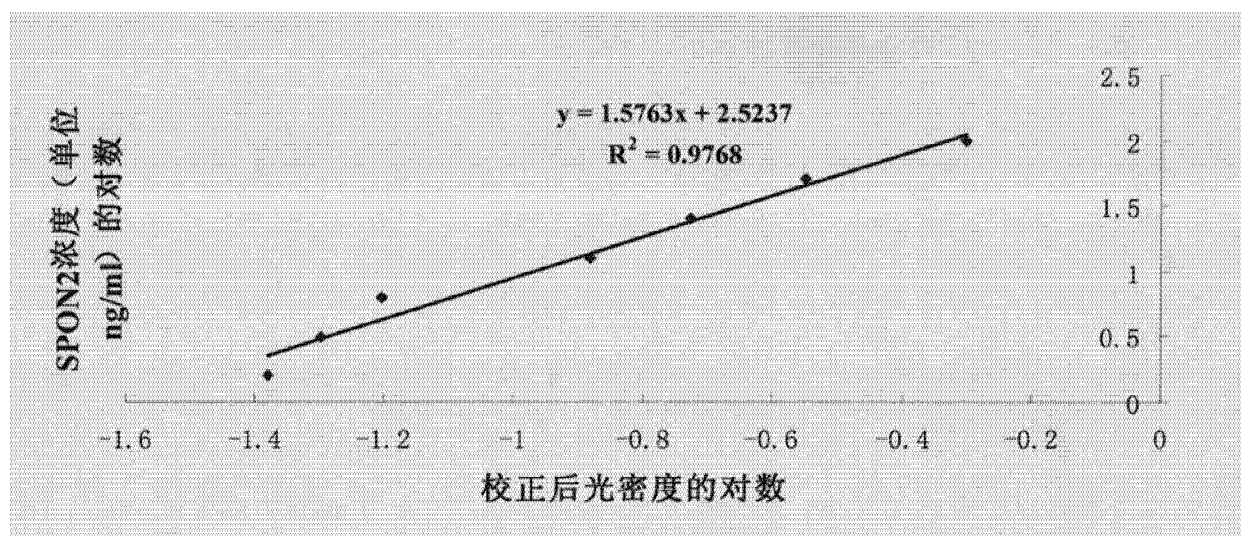


图 1

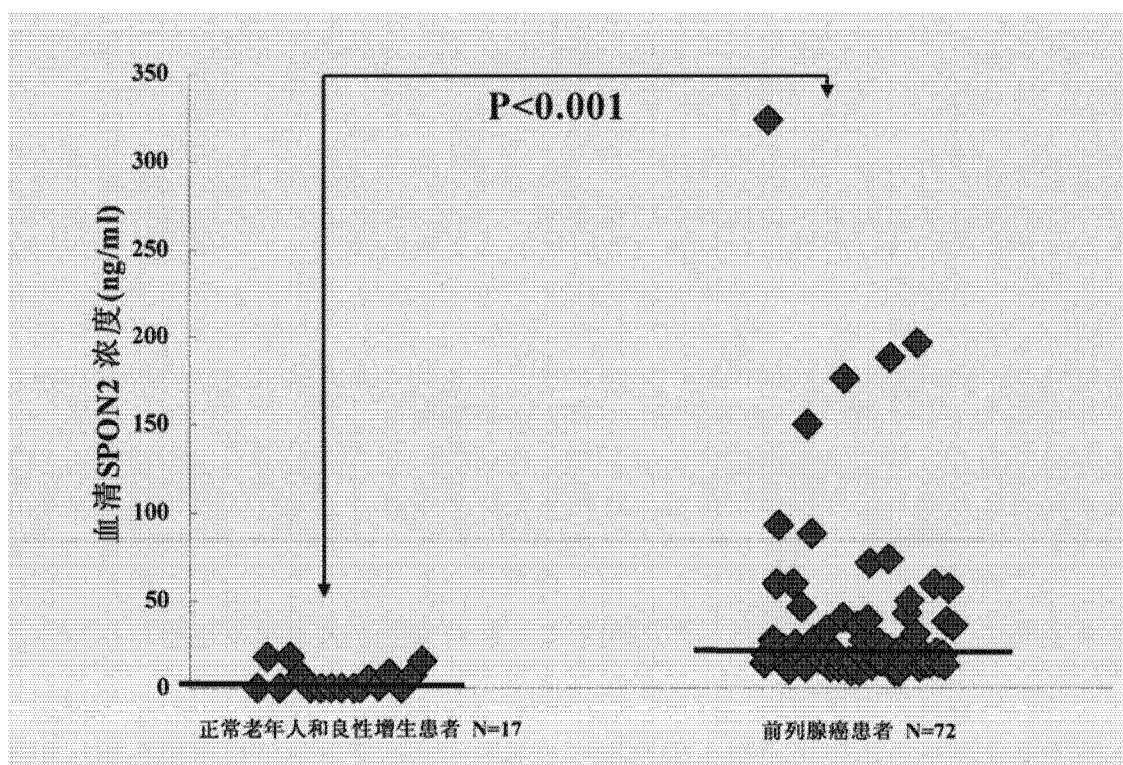


图 2

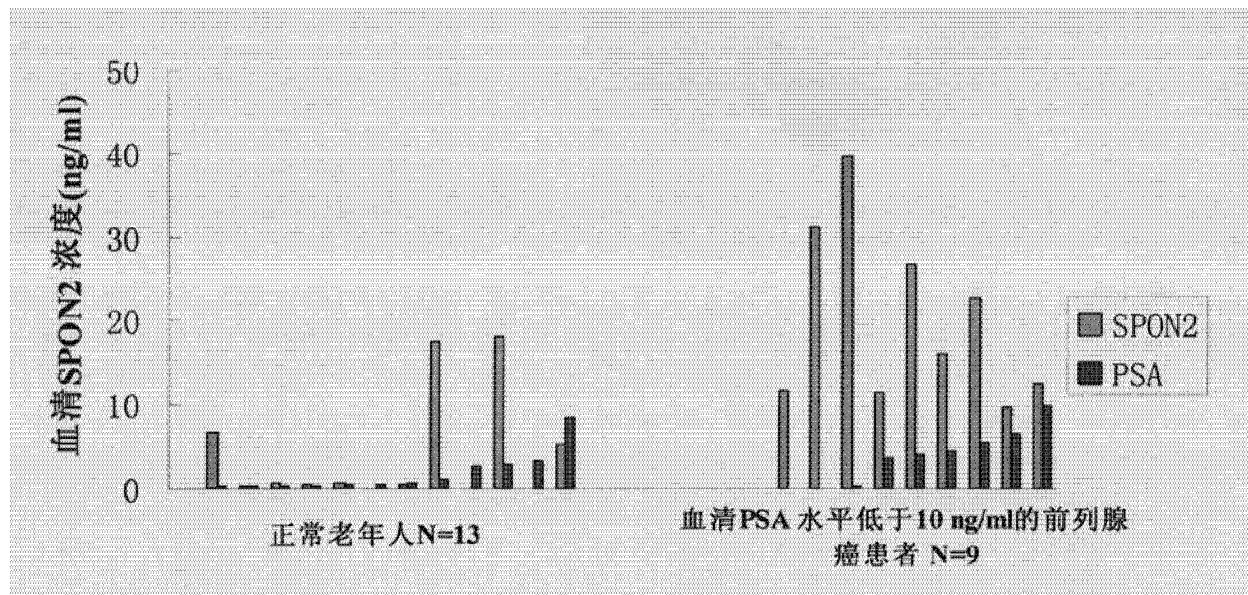


图 3

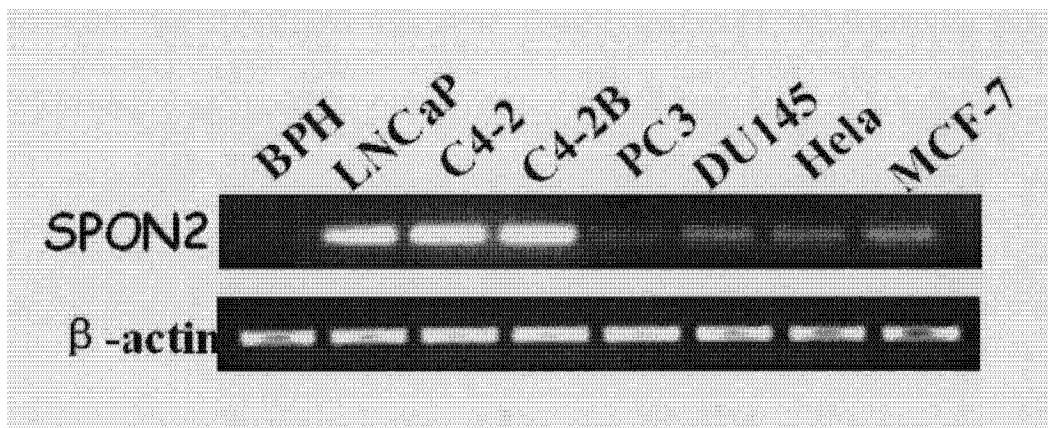


图 4

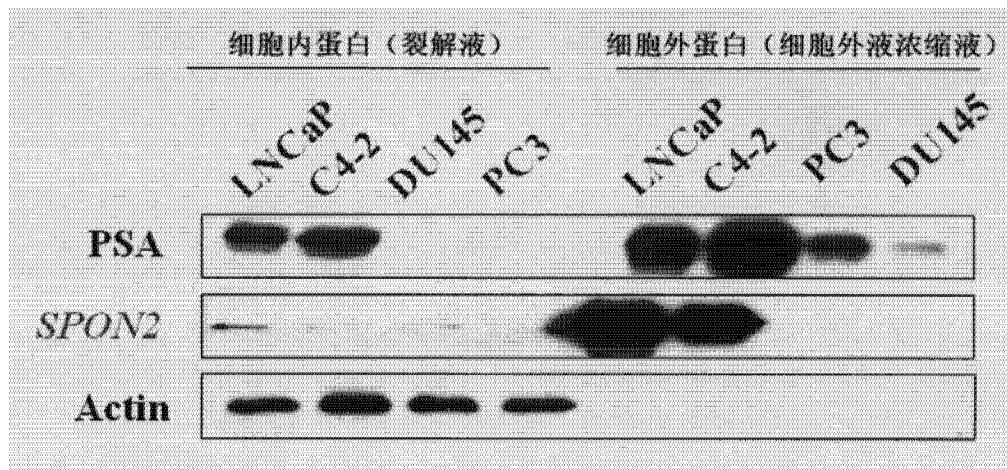


图 5

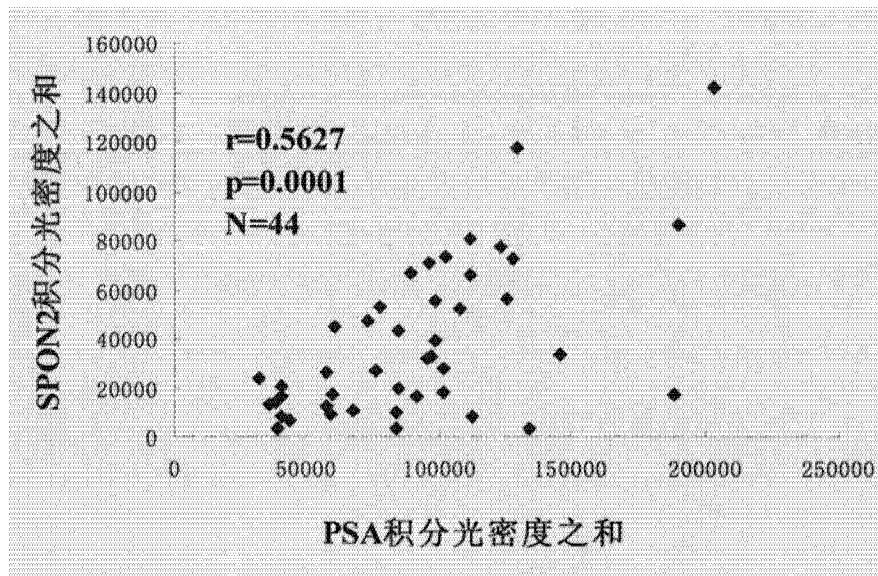


图 6

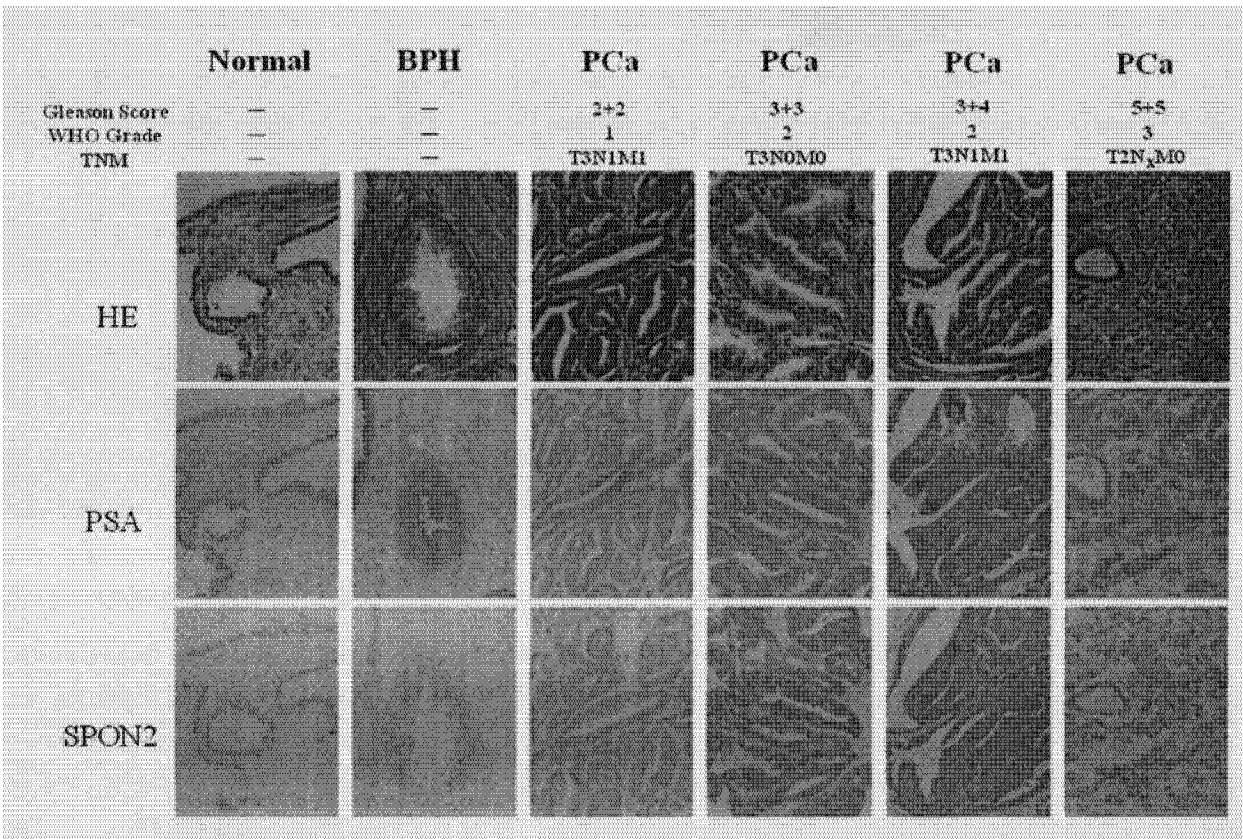


图 7

专利名称(译)	SPON2的新用途		
公开(公告)号	CN102346184A	公开(公告)日	2012-02-08
申请号	CN201010244440.3	申请日	2010-08-03
[标]申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国人民解放军军事医学科学院生物工程研究所		
[标]发明人	周建光 钱晓龙		
发明人	周建光 钱晓龙		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/577		
代理人(译)	关畅		
其他公开文献	CN102346184B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了SPON2的新用途。该新用途是抗脊椎蛋白2的抗体在制备用于辅助诊断前列腺癌的试剂盒中的应用。实验证明，用检测SPON2的酶联免疫试剂盒或用检测SPON2的免疫组化试剂盒对前列腺癌进行诊断，诊断结果更精确和准确，优于现有的PSA诊断方法。

		Case Number	M(Q _R)
Benign		17	0.55(7.15)
	Normal	13	0.45(5.19)
Malignant	PCa	72	20.19(23.86)***