

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200510073352.0

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)

[43] 公开日 2006年12月6日

[11] 公开号 CN 1873417A

[22] 申请日 2005.6.2

[21] 申请号 200510073352.0

[71] 申请人 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

地址 100021 北京市朝阳区潘家园南里17号

[72] 发明人 杨治华 冉宇靓 李国惠 李江伟

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程伟

权利要求书1页 说明书20页

[54] 发明名称

一种用于诊断肺癌的蛋白质芯片

[57] 摘要

本发明涉及一种新的诊断人肺癌的蛋白质芯片，以及由此蛋白质芯片衍生的诊断试剂盒。该蛋白质芯片包含了12种特定人蛋白质的蛋白斑点，使用该蛋白质芯片可以检测被检人血液样品中这12种蛋白质各自相应抗体的含量，联合分析这12个蛋白质的相应抗体的检测结果，可以判断被检人是否为肺癌患者。本发明进一步提供了该蛋白质芯片在健康人群或高危人群中筛查肺癌的应用。

1、一种诊断人肺癌的蛋白质芯片，其特征在于由以下氨基酸序列组成：

- (1) 具有序列号 1 所示氨基酸序列的 MAGEA1 抗原片段；
- (2) 具有序列号 2 所示氨基酸序列的 MATK 抗原片段；
- (3) 具有序列号 3 所示氨基酸序列的 MAGEA3 抗原片段；
- (4) 具有序列号 4 所示氨基酸序列的 CCT8 抗原片段；
- (5) 具有序列号 5 所示氨基酸序列的 TP53 抗原片段；
- (6) 具有序列号 6 所示氨基酸序列的 ZNF258 抗原片段；
- (7) 具有序列号 7 所示氨基酸序列的 PRC1 抗原片段；
- (8) 具有序列号 8 所示氨基酸序列的 C14orf104 抗原片段；
- (9) 具有序列号 9 所示氨基酸序列的 EEF1A1 抗原片段；
- (10) 具有序列号 10 所示氨基酸序列的 ZIC2 抗原片段；
- (11) 具有序列号 11 所示氨基酸序列的 SOX2 抗原片段；和
- (12) 具有序列号 12 所示氨基酸序列的 S100A10 抗原片段。

2、如权利要求 1 所述的蛋白质芯片，其中所述的蛋白质为重组表达的蛋白质。

3、一种蛋白质芯片诊断试剂盒，其包括如权利要求 1 或 2 所述的蛋白质芯片。

一种用于诊断肺癌的蛋白质芯片

技术领域

本发明涉及一种用于诊断肺癌的蛋白质芯片，以及由此蛋白质芯片衍生的诊断试剂盒。本发明进一步提供了蛋白质芯片以及由此蛋白质芯片衍生的诊断试剂盒在肺癌诊断、健康人群或高危人群肺癌筛查中的应用。确切地说是本发明涉及一种可用于血清学检测诊断人肺癌的蛋白质芯片，该方法通过检测 12 种抗原在被检人血液样品中的各自的相应抗体的含量，并联合分析这 12 种抗原相应抗体检测的结果，来判定被检人是否患有肺癌。本发明还涉及由此蛋白质芯片衍生的诊断试剂盒，这些诊断试剂盒均采用或包含了此蛋白质芯片。另外，本发明提供了此蛋白质芯片及衍生的诊断试剂盒在肺癌诊断、健康人群或高危人群肺癌筛查中的应用。

背景技术

人肺癌是人类常见肿瘤之一，发病率高、死亡率高，目前肺癌的死亡率仍然在 85%以上，严重威胁着人类的生命健康。肺癌死亡率高的最重要的原因是肺癌的诊断率低，早期肺癌病人无体征，因而到医院就诊的病人绝大多数是中晚期病人。提高早期肺癌、肺癌的诊断率，将亚临床肺癌或隐匿性肺癌从人群中筛查出来，对于提高肺癌的治愈率及降低死亡率具有重大的意义。

目前肺癌的诊断主要分为 2 类：侵入性诊断和非侵入性诊断。侵入性诊断包括穿刺活检、手术探查等创伤性手段；非侵入性诊断包括各种影像学诊断手段（如 X 光胸片、CT、核磁共振、PET 等）、细胞学检查，以及各种体液中某些肺癌或肿瘤标志物的检测。肺癌的侵入性诊断痛苦大，病人不愿意接受，一般只用于临床的鉴别诊断和确诊。肺癌最常用的诊断手段还是非侵入性诊断，在目前尤其是指影像学诊断和细胞学诊断。

40 年前胸部 X 光片就已作为早期肺癌的诊断和筛查手段之一，尽管这种技术费时，费用也高于细胞学检查，但确实能发现一些痰检阴性的早期肺癌。我国云锡肺癌高发现场 1992-1997 年 6 年对 10481 高危人群普查 6 年的结果表明，普查痰检阳性率为 31.74%，X 光胸片的阳性检出率为 63.64%，优于痰细胞学，但其阳性预测值(33.05%)却低于痰细胞学的阳性预测值(62.01%)。此外 X 光片通常只能检出大于 1.5cm 病灶的肺癌，而对更早期的肺癌、隐匿性、可疑肺癌及癌前病变均不能检出。自 70 年代英国科学家 Housfield 发明 CT 用于肺癌的诊断以来，相继又发展了多种先进的影像设备和技术，如螺旋 CT、高分辨 CT、肺血管和支气管动脉 DSA 造影，以及近几年发展起来的 PET。这些先进的影像设备和技术都有各自的优势和不足，以及不同的用途。对早期肺癌的检出率也有所提高。近年来美国、

日本一些发达国家将螺旋 CT 技术用于人群早期肺癌的筛查。1993 年美国的早期肺癌普查方案对 1000 例自愿者高危人群采用低剂量螺旋 CT 筛查,发现 233 例有 1-6 个非钙化结节,其中 27 例确诊肺癌,早期肺癌 23 例 (85%),而同期 X 光片漏诊率为 83%。日本 1998 年报道了采用螺旋 CT 普查人群早期肺癌,并与传统的痰细胞学和 X 光片技术进行了比较。结果在螺旋 CT 筛查的 9452 人中,肺癌的检出率为 0.37%,而在 26338 人痰检和 X 光片检测中,肺癌的检出率仅为 0.16%,前者是后者的 2.3 倍。同时发现低剂量螺旋 CT 对周围型早期肺癌的检出明显好于中央型。近几年发展起来的另一种新技术 PET 对肺癌诊断的敏感性和准确性又有进一步的提高。美国、日本、德国、加拿大等各国报道的结果显示, PET 在分辨恶性与良性非钙化结节的敏感性、特异性均高于螺旋 CT,可达 85%和 90%。但是, PET 不能检出小于 1.5cm 的肺癌病灶,在早期肺癌的诊断上无显著优势,且设备价格更昂贵。螺旋 CT 在我国大中城市的医院均有,但其检测费昂贵(800-1000 元/人份),在现阶段我国的国情下不可能作为筛查人群的技术。综上所述,除 X 光胸片以外的所有影像学设备和技术,在我国目前的国情下均不可能用于人群早期肺癌的筛查和诊断,但在确诊早期肺癌中有一定的意义。本研究将利用低剂量螺旋 CT 技术对高危人群筛查出来的阳性病例的边缘型早期肺癌确诊。支气管纤维镜检在肺癌诊断中的应用,主要是用于痰检和 X 光胸片发现异常或 CT 发现非钙化结节的病例,通过支纤镜检确定病变,并取活检组织或洗液,再进一步进行病理或细胞学确诊。通常对于有经验的大夫,支纤镜检可发现约 30-40%的早期癌,难以检出癌前病变和原位癌。近年来 Xillix 公司研制了荧光支气管镜,利用自发荧光技术,在 442nm 兰色氩镉激光照射下正常组织发出绿色自身荧光,癌变组织和不典型增生则发出棕色或棕红色光,有助于确定活检部位,发现早期肺癌,并有助于判断手术范围,同时还能检出癌前病变。美国、加拿大报道的结果显示,其原位癌和癌前病变检出率是普通白光支纤镜的几倍。但这一设备价格昂贵,对操作人员专业水平要求很高,检测费也贵,是痛苦有创性检测技术,对中心型早期肺癌和癌前病变,检出率较高,对周围型肺癌检出率低。因此这一技术和设备也不可能作为筛查人群的技术方法。

早在 30 年代,痰细胞学检测技术在国内外已用于肺癌的诊断,由于检测方法的简便、经济,后来也作为人群筛查早期肺癌的技术方法,但其阳性检出率低。中晚期病人的检出率为 60-80%,而早期肺癌的检出率仅有 10-20%。美国 NCI 的肺癌早期发现实验中,不足 10%的肺癌是由细胞学单独发现。云锡肺癌高发现场不断改进痰检方法,其在 1992-1997 年 6 年间普查中,痰检阳性率平均为 31.74%,可见漏诊率仍很高。其原因(1)该技术对痰中能排出癌细胞的中心型肺癌检出率较高,而对周围型肺癌诊断用处不大。在云锡普查中,339 例痰检阳性的病例中,216 例为中心型(占 63%)。原因(2)普通痰细胞涂片质量差,镜检难度大。原因(3)操作者判断的误差大,其次痰样本获取的质量差异大。近年来国外发展一种新的痰细

胞学检测技术(ThinPrep 即液基超薄细胞电脑扫描技术),目前已发展出第三代自动化设备 AutocytePrep and AutoPap 系统,该技术的优点是能将粘稠的痰处理稀化,能制备出质量很高的超薄细胞片,从而提高痰检的检出率,同时能自动收集痰中几乎所有的脱落细胞进行镜检或各种分子标志物的自动检测,数据分析处理,对早期肺癌诊断的敏感性可提高到 40-60%。另一个重要的优点是能提高癌前病变的检出率,但该技术需价格昂贵的进口设备,每份标本处理的试剂费为 100 元人民币,操作人员需较高的专业水平。国外主要在大医院里应用,用于人群早期肺癌筛查的报道甚少。国内目前仅有几个大城市的极少医院有此设备,开展了这项技术。因此,在我国现有国情下不可能用于大人群筛检。此外该技术对于周围型和边缘型早期肺癌检出率较低。

随着分子生物学的迅速发展,在研究肺癌病因的同时,也在分子水平上对肺癌发生发展有了更多的了解。已有的研究表明在肺癌发生发展的多阶段过程中,细胞形态的恶性生物学改变伴随着其分子水平的多种基因参与和改变,它们包括癌基因的扩增、过度表达、突变和抑癌基因的缺失、突变、易位、重排等等多种基因的改变。到目前为止,已报道的与肺癌发生相关的基因异常改变约有十余种。最常见的癌基因改变有 ras 家族、myc 家族、HER2、Bcl-2 的过度表达等等。同时发现 P53、Rb、CDKN2、DuTT1、FHIT、BAP-1 等抑癌基因的突变、缺失、转导、易位及甲基化等改变。细胞遗传学和分子生物学技术的分析,还发现多个染色体上某些基因的改变与肺癌的发生发展密切相关。近年来还发现端粒酶, hnRNPA2/B1 有较高的癌变预测意义。为检测这些基因的改变,相继建立和发展起来多种分子生物学检测技术,如各种 PCR 技术(RT-PCR、PCR-SSCP、PCR-RFLPs),各种核酸杂交技术(Southern、Northern、比较基因组杂交技术等),以及近年来发展起来的荧光原位杂交技术(FISH)和微卫星多态性分析技术等。但这些技术对肺癌的诊断均需依赖于病灶组织或病变细胞的获得,阳性样本的获取均有较大的难度,而且难于在肺癌的早期阶段采集到所需的标本,使这些技术在肺癌的早期诊断中难以发挥相应的作用。加之这些技术需要特殊试剂和仪器、操作复杂、价格昂贵、其敏感性、特异性和准确性尚难以定论,目前国内外均未将这些技术作为人群普查筛检早期肺癌的手段和方法。

目前大约已经发现了 60 余种肺癌生物标志物,它们或与人肺癌直接相关,或与不同种类的肺癌相关,或与肺癌预后相关,或与肺癌转移相关,或与肺癌临床分期相关,或与肺癌耐药相关等等。这些抗原包括: ACE、ADH、AFP、AgNORs、ANP、AHH、blood group antigens、BN/GRP、CA125、CA19-9、CA242、CA50、Cadherins、Clcitonin、Cathepsin B、CC10、CEA、Cholecystokinin-B/gastrin receptor、CK-BB、c-N-L-myc、Cyclin D1、CYFRA 21-1、CYFRA21.1、CYP1A1/GSTM1、EGFR、Epithelial glycoprotein 1、Epithelial glycoprotein 2、Ferritin、Ganglioside fucosyl-GM1 (FucGM1)、Glutathione-S-transferase、HER2、Heterogeneous nuclear

ribonucleoprotein A2/B1、H-K-N-ras、IGF-I、IL-2R、Integrins、Ki-67、Lewis antigens、Le-y、MMP-9、MUC 1、NCAM、NeuAc、NSE、P53、PCNA、Peptid hormones ACTH、Phosphopyruvate Hydratase、pro GRP、p21、SCC 抗体、sialyl SSEA-1、SLX、TA-4、Telomerase、TGF-a、胸苷激酶、TPA、铁传递蛋白、uPA 等等。Kulpa, J., Wojcik, E., Radkowski, A., Kolodziejcki, L., and Stasik, Z. CYFRA 21-1, TPA-M, TPS, SCC-Ag 和 CEA 在鳞状细胞肺癌病人和化工产业工人对照人群中的情况. 抗癌研究 2000,20(6D):5035-5040. Nguyen, V. N., Mirejovsky, T., Melinova, L., and Mandys, V. CD44 和它的 v6 剪接变体在肺癌中: 与 NCAM, CEA, EMA 和 UP1 以及预后因子相关. 赘生物, 2000,47(6):400-408. Alatas, F., Alatas, O., Metintas, M., Colak, O., Harmanci, E., and Demir, S. CEA, CA 15-3, CA 19-9, CYFRA 21-1, NSE 和 TSA 试验在胸水中的诊断价值. 肺癌, 2001,31(1):9-16. Foa, P., Fornier, M., Miceli, R., Seregni, E., Santambrogio, L., Nosotti, M., Massaron, S., Cataldo, I., Oldani, S., Iurlo, A., Caldiera, S., and Bombardieri, E. 在可切除性非小细胞肺癌中术前 CEA, NSE, SCC, TPA 和 CYFRA 21.1 血清水平可作为预后指标. 生物标志物国际期刊, 1999,14(2):92-98. Graziano, S. L., Kern, J. A., Herndon, J. E., Tatum, A., Brisson, M. L., Memoli, V., Sugarbaker, D., Skarin, A. T., Kreisman, H., and Green, M. R. IIIA 期非小细胞肺癌化疗前后神经内分泌标志, HER2 和 CEA 的分析: 癌症和淋巴瘤组 B 研究. 肺癌, 1998,21(3):203-211. Abe, S. 肺癌的分子生物学预后指标. 日本 Geka Gakkai 杂志, 1997,98(1):2-7. Fukuda, M. and Oka, M. [血清肿瘤标志物在肺癌诊断中的作用和不足]. 日本 Rinsho, 1996,54(6):1610-1615. Moro, D., Villemain, D., Vuillez, J. P., Delord, C. A., and Brambilla, C. CEA, CYFRA21-1 和 SCC 在非小细胞肺癌中. 肺癌, 1995,13(2):169-176. Giovanella, L., Ceriani, L., Bandera, M., Beghe, B., and Roncari, G. 血清标志物 CEA, NSE, TPS 和 CYFRA 21.1 在肺癌中应用的评估. 生物标志物国际期刊, 1995,10(3):156-160. Niklinski, J. and Furman, M. 肺癌的临床肿瘤标志物. 欧洲癌症期刊 Prev., 1995,4(2):129-138. 这些肺癌相关生物标志物中, 多数属于位于胞浆的类型, 另外的 AFP、CA125、CA19-9、CA242、CA50、Cadherins、Cholecystokinin-B/gastrin receptor、Epithelial glycoprotein 1、Epithelial glycoprotein 2、HER2、CEA、Integrins、Lewis antigens、MUC 1、NCAM 等标志物位于肺癌细胞表面, 大致分为三大类, 受体类、细胞表面粘附分子和细胞表面糖蛋白类。总的来说, 这些标志物单独诊断肺癌的意义不是太高, 但联合检测仍具有一定的诊断、判断预后的意义。例如, NSE 在小细胞肺癌中的阳性率为 60-85%, CEA 达 50-60%, 而 HER2 仅达 30-50%。

以上方法均是直接检测样品中发生改变的抗原、蛋白或基因。与以上检测方法明显不同, 近年来发现肿瘤病人血液中含有针对肿瘤抗原或自身抗原的抗体, 某些抗原的相应抗体在正常人和肿瘤病人中的分布呈现一定的特异性, 可能具有一定的诊断价值。但目前发现的这些种类的抗原在肿瘤病人当中阳性率低, 单独

应用或少数几种联合应用时诊断的灵敏度和准确度都不够，不能作为一种新的诊断方法。目前根据研究该类抗原的权威组织统计（<http://www2.licr.org/CancerImmunomeDB/SerexSearchDB.php>），在小细胞肺癌中，这类抗原已发现5个，分别是：DRCTNNB1A、ID4、SOX1、SOX2、ZIC2；而在非小细胞肺癌当中，尚未直接分离到这种抗原。在其他肿瘤中，也发现了可以与肺癌交叉反应的这类抗原，如NY-ESO-1、CEA等，但肺癌阳性率低，不具有单独的诊断肺癌的意义。

综上所述，上述众多的肺癌诊断技术中，目前国外常用的肺癌筛检诊断技术为痰细胞学检查、X光片和螺旋CT等技术，其检出率仍不高，国内常用的仍然是检出率较低的痰细胞学和X光片技术。因此，研究开发易于在人群筛查中广泛推广应用的简便、快速、高效、经济、无创无痛的早期肺癌筛查早诊技术是国内外攻克肺癌早诊“关口”的难点和重点。从血液中检测各种分子标志物的技术方法，具有简便、经济、快速、无创无痛易于接受的特点，优于上面所述的各种技术，但是目前尚缺乏敏感性和特异性均较高的检查指标。肺癌涉及的多种基因及分子的改变均难以在血清中检出。但目前尚未见到任何关于采用多种蛋白质抗原检测血清中相应抗体的含量，并以此判断被检人是否患有肺癌的报道。目前也尚未见到多蛋白样品的蛋白质芯片用于检测人血清中相应抗体含量的报道。

发明内容

因此，为了克服现有技术的不足，本发明的第一个目的在于提供一种新的可用于诊断人肺癌的蛋白质芯片，该蛋白质芯片包含但不是仅仅包含序列号1—12特定的蛋白质抗原，通过该蛋白质芯片可以检测被检人血液（血清、血浆或全血成分）中这些特定的抗原的相应抗体的含量，联合分析这种抗原相应抗体检测的结果，可以用来判定被检人是否患有肺癌。

本发明的第二个目的在于提供一类由上述蛋白质芯片衍生制成的诊断肺癌的试剂盒。

本发明的第三个目的在于所述的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒在肺癌诊断、健康人群或高危人群肺癌筛查中的应用。

根据本发明的第一个方面，本发明提供了一种新的可用于诊断人肺癌的蛋白质芯片，所述蛋白质芯片的特征在于：

1) 包含，但不仅仅包含，以下序列号抗原的蛋白质斑点：(1) 序列号1所示氨基酸序列的MAGEA1抗原片段；(2) 序列号2所示氨基酸序列的MATK抗原片段；(3) 序列号3所示氨基酸序列的MAGEA3抗原片段；(4) 序列号4所示氨基酸序列的CCT8抗原片段；(5) 序列号5所示氨基酸序列的TP53抗原片段；(6) 序列号6所示氨基酸序列的ZNF258抗原片段；(7) 序列号7所示氨基酸序列的PRC1抗原片段；(8) 序列号8所示氨基酸序列的C14orf104抗原片段；(9) 序列号9所示氨基酸序列的EEF1A1抗原片段；(10) 序列号10所示氨基酸序列的ZIC2

抗原片段；(11) 序列号 11 所示氨基酸序列的 SOX2 抗原片段；以及 (12) 序列号 1 所示氨基酸序列的 S100A10 抗原片段。

通过检测人的血液样品来检测样品中所述的序列号 1—12 蛋白质的相应抗体的含量，以通过联合分析各蛋白质相应抗体的检测结果可以判断被检人是否为肺癌。

在本发明中，所述的抗原是指包含上述氨基酸残基序列的任何多肽、蛋白质或融合蛋白质。因为本发明是采用这些蛋白质抗原检测可以与之结合的抗体，因此在技术上是显而易见的，只要采用包含上述氨基酸残基序列的任何多肽、蛋白质或融合蛋白质，均可以具有几乎相同的免疫学特性，从而也可以用于检测可以与这些蛋白质抗原结合的抗体。

本发明上述的序列号 1 至序列号 12 所述的 12 种抗原是经采用混合人肺癌原发病灶组织（包括 1 例肺腺癌、1 例肺鳞癌、1 例小细胞肺癌）建立表达 cDNA 文库，并通过 20 例自体 and 异体肺癌病人血清进行免疫印迹筛选、削减抑制杂交筛选、去 Ig 背景筛选后获得的在肺癌病人血清中存在相应抗体的抗原，在筛选完 2×10^6 pfu 的库之后，共获得了 50 个可与肺癌病人血清反应的蛋白质抗原克隆。

将上述抗原的基因克隆入带有正确读码框的原核表达载体（例如 pET30-b (+)），通过 IPTG 诱导表达，提取包涵体并初步纯化，获得了该肺癌抗原的重组蛋白。采用上述重组蛋白，以适量浓度点于免疫印迹膜上，采用肺癌和正常人血清各 20 例，并采用酶联免疫印迹法检测，挑选正常人的阳性率与肺癌病人的阳性率有较大差异的克隆。按此方法获得了 16 个与正常人血清反应的阳性率与肺癌病人有较大差异的抗原克隆。

将前述获得的抗原的重组蛋白采用生物芯片点样机点样于醛基化的玻璃基片上，每点的浓度约 1-2mg/ml，点样量约 4-10nl。采用免疫荧光的方法检测被检血清中针对这些抗原的人抗体。共采用上述方法检测了 400 例肺癌病人血清和 400 例正常人血清，结果显示，其中 12 种抗原在肺癌病人血清和正常人血清中的相应抗体存在较大的差异，联合分析诊断肺癌的灵敏度可达 88.0%，而准确度也可达 83.9%。这 12 种抗原分别是：(1) MAGEA1 抗原片段，(2) MATK 抗原片段，(3) MAGEA3 抗原片段，(4) CCT8 抗原片段，(5) TP53 抗原片段，(6) ZNF258 抗原片段，(7) PRC1 抗原片段，(8) C14orf104 抗原片段，(9) EEF1A1 抗原片段，(10) ZIC2 抗原片段，(11) SOX2 抗原片段，(12) S100A10 抗原片段。以上结果说明采用含上述 12 种蛋白质抗原的蛋白质芯片检测上述 12 种抗原血液中相应抗体的含量，并且进行联合分析，判断被检人是否患有肺癌对于肺癌诊断具有较高的灵敏度和特异度，具有非常重要的应用价值。进一步，采用这种蛋白质芯片对 400 例肺部良性病变的病人的血清进行了检测，结果该蛋白质芯片对区分肺部良性病变具有较好的特异性，仅仅有 20% 的假阳性率，鉴别诊断的效果良好。

综上所述，本发明提供了一种新的可用于诊断人肺癌的蛋白质芯片，该蛋白质

芯片可用于联合检测分析被检人血液中 12 种特定抗原相应抗体的含量，从而判断被检人是否为肺癌患者。该蛋白质芯片采用被检人的血液样品为检测样品，可采用各种适宜的方法分别检测 12 种特定抗原的相应特异性抗体在样品中的相对含量，每种抗原相应抗体的相对含量都有一个相应的阈值，被检血样高于（或低于）此值的被判断为阳性，联合分析这 12 种抗原相应抗体阳性的总数，当被检人的 12 种抗原阳性总数的值大于一个相应的阈值时，该被检人被判为阳性，即被诊断为肺癌患者。该蛋白质芯片经在 400 人的肺癌患者和 400 人的正常人中验证，其灵敏度为 88.0%，准确度为 83.9%。该蛋白质芯片的创新之处在于：1) 检测的指标是 12 种抗原的相应抗体在被检人血清中的含量，即被检人在体内自发产生的针对这 12 种抗原的自身抗体的水平，而不是这 12 种抗原本身在被检人体内的表达水平。相对直接检测抗原本身来说，抗原的相应抗体在肺癌发生的早期就可以产生，此时抗原也许尚不能在血液中被检出，因而比直接检测抗原来说可诊断的肺癌可能更小；抗原的相应抗体更容易进入血液循环而被检测到，同时人体可以对微量抗原产生相当多的相应抗体，具有一定的放大作用；另外，人体对这 12 种抗原产生相应抗体的情况也在一定程度反映了人体抗肺癌免疫反应的状态，在一定程度上加强了检测结果反映被检人是否患有肺癌的准确性。2) 结果判定是在联合分析 12 种抗原相应抗体检测结果的基础上做出的，具有更好的灵敏度和准确度。现行的肺癌诊断技术方法目前均采用单一指标，所以诊断的灵敏度和准确度往往达不到很高。本发明所采用的 12 种抗原单独检测肺癌的灵敏度和准确度都不是很高，但联合分析之后该方法诊断肺癌的灵敏度和准确度都大大提高，达到了一个临床可接受的水平。多标志物联合分析的观点与现在公认的肺癌发生是一个多基因、多过程参与的观点是相一致。3) 该蛋白质芯片所采用的 12 种抗原中有 7 种(MATK 抗原片段、CCT8 抗原片段、ZNF258 抗原片段、PRC1 抗原片段、C14orf104 抗原片段、EEF1A1 抗原片段、S100A10 抗原片段) 目前尚未见到肺癌病人体内存在相应抗体的报道，也尚未见到其用于诊断、检测肺癌的报道。

根据本发明的第二个方面，提供一类由上述蛋白质芯片衍生的诊断肺癌的试剂盒，这类诊断肺癌的试剂盒可用于非侵入性地诊断人肺癌。这类诊断试剂盒采用了但不是仅仅采用本发明提供的新的蛋白质芯片，实际上，这些试剂盒可以在本领域共知的范围内，加上其它一些对照以便进行结果的标准判断，或是在本发明提供的蛋白质芯片所包含的 12 种蛋白质抗原的基础上，再增加其它的检测指标来联合判断。另外，由本发明提供的肺癌诊断方法衍生的试剂盒也可以采用本领域共知的范围内的多种技术手段来检测各抗原相应抗体的含量，实现本发明的目的，例如免疫荧光、免疫印迹、放射免疫、酶联免疫吸附等，检测抗原相应抗体的手段的不同并不会影响对该被检人是否为肺癌患者的判断。

根据本发明提供的新的诊断人肺癌的蛋白质芯片，很容易获得由该蛋白质芯片衍生的各种诊断试剂盒。本发明提供的可用于肺癌诊断的蛋白质芯片的核心关

键在于该芯片上所包含的 12 种蛋白质抗原的种类（蛋白质具体的氨基酸序列），从而可以通过该蛋白质芯片检测这 12 种特定抗原相应抗体在被检人血液中的含量，从本技术领域的普通专业知识很容易推出，采用何种技术手段检测抗原相应抗体的含量，以及采用何种抗原的存在形式（天然抗原、重组蛋白抗原、合成多肽）来检测均不会影响该方法对被检人是否患有肺癌的判断；并且，在任何肺癌诊断试剂盒中只要包含了检测本发明所述方法的 12 个抗原的相应抗体的检测指标，该试剂盒检测肺癌的灵敏度和特异度就应该至少达到本发明涉及的方法的灵敏度和准确度，额外地增加其它肺癌相关的检测指标一般均能在本发明涉及的方法的基础上进一步提高诊断灵敏度和准确度。下面举一些简单的制备本发明涉及的肺癌诊断方法衍生的试剂盒的例子，可以通过以下方法获得衍生试剂盒，但不只限于下列方法。在大肠杆菌中表达包含有本发明所述的 12 种抗原特征氨基酸序列的重组蛋白或重组融合蛋白，纯化分离这些目标蛋白，使其纯度达到 80%以上，在各抗原以及人 IgG、人 IgM（以上两种为对照，以便进行横向参比）中加入适量的生物素化的 BSA，以适宜的浓度点样于经醛基化处理的玻璃基片上，抗原将共价交联于基片之上，采用牛血清封闭剩余的交联位点，干燥后低温干燥保存，这就是试剂盒中的检测玻片；将人 IgG 及人 IgM 抗体标准品进行倍比稀释，选择适宜的浓度梯度点样于经醛基化处理的玻璃片基上，抗体标准品将共价交联于基片之上，采用牛血清封闭剩余的交联位点，干燥后低温干燥保存，这就是试剂盒中的检测校正玻片；将含 10%牛血清的 PBS（0.01mol/Lm, pH7.4）无菌过滤装瓶，这就是样品稀释液；将含 0.02% Tween20 的 PBS（0.01mol/Lm, pH7.4）无菌过滤装瓶，这就是洗涤液；将含有适宜稀释度的链霉亲和素-Cy5 荧光标记二抗、链霉亲和素-Cy3 荧光标记二抗、羊抗人 IgG-Cy5 荧光标记二抗及羊抗人 IgM-Cy3 荧光标记二抗装瓶，这就是荧光二抗。以上五种成分即可组装成一种由本发明所述方法衍生的肺癌诊断试剂盒，应用时，在检测玻片的点样区加入荧光标记的链霉亲和素 37℃下保湿孵育 1 小时，采用洗涤液洗涤 3 次。将被检人血清取 2 μ l，以样品稀释液稀释至 20 μ l，取 10 μ l 加在检测玻片上覆盖点样区，37℃下保湿孵育 1 小时；而取 10 μ l 的稀释液加在检测校正玻片上覆盖点样区。采用洗涤液洗涤 3 次，加入与链霉亲和素标记荧光不同的抗人 IgG 或人 IgM 荧光二抗（例如，链霉亲和素为 Cy-3 标记，则加入羊抗人 IgG-Cy5 荧光标记二抗），37℃下保湿孵育 1 小时，采用洗涤液洗涤 5 次，干燥后在激光共聚焦芯片读片机上读取各点样点荧光的颜色和强度。各抗原点样点的荧光强度代表了相应抗体的相对含量，生物素化的 BSA 与链霉亲和素反应的荧光强度可作为抗原抗体反应的内参照，人 IgG、IgM 的荧光强度可作为各被检人横向参比的对照，而由不同稀释度的人 IgG 或 IgM 抗体标准品的荧光强度绘制的标准曲线可作为抗体含量的量化标准和批间反应的对照。按预先确定好的各抗原的阈值分析各抗原荧光强度的数据，可判断被检人该抗原相应抗体是否为阳性，累加 12 种抗原的阳性数，再根据预先确定的阳性数阈值即可判

断该被检人是否为肺癌患者。在上述衍生试剂盒的基础上，可再增加检测指标，例如，将癌胚抗原（CEA）额外作为1种抗原也点于玻片上，就可以衍生出另外一种试剂盒，并可能增加该试剂盒诊断肺癌的灵敏度和准确度。

根据本发明的第三方面，本发明还提供了所述的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒在肺癌诊断、健康人群或高危人群肺癌筛查中的应用。

针对临床上被怀疑为肺癌的被检者，可抽取其血液样品，采用本发明所涉及的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒，检测被检人血液中所说的12种抗原相应抗体的含量，进而判断被检者是否为肺癌患者。由于检测方法或试剂盒的各种对照的差异，判断被检者是否为肺癌的标准并不是唯一的，一旦被检者被采用本发明判断涉及的诊断方法或由该方法衍生的试剂盒判断为患有肺癌，则应高度怀疑被检者为实际肺癌患者，并采用各种检测手段进行各种临床确诊，如临床不能发现病灶，则应密切随访监测被检者肺癌发生发展的情况。

对于普通的健康人群或医学上定义的肺癌高危人群，则可以采用本发明所涉及的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒对他们进行普查筛检，抽取被检人群的血液样本，按上述方法判定其是否患有肺癌，一旦被检者被采用本发明判断涉及的诊断方法或由该方法衍生的试剂盒判断为患有肺癌，则应采用各种检测手段进行各种临床确诊，如临床不能发现病灶，则应密切随访监测被检者肺癌发生发展的情况。

总的来说，利用本发明提供的新的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒，则可以非常方便、快捷、无创、高效地诊断或普查筛检肺癌疑似患者或肺癌高危人群，以及参加检测的正常健康人群。

下面将结合多种实施例来说明如何实施本发明所述的新的诊断人肺癌的蛋白质芯片，如何由该蛋白质芯片衍生出相应的试剂盒，以及如何用上述新的诊断人肺癌的蛋白质芯片及其衍生的诊断试剂盒诊断、普查、筛检肺癌疑似患者、肺癌高危人群以及健康人群。

具体实施方式

以下将参照实施例详细描述本发明，其中：

实施例1 制备新的诊断人肺癌的蛋白质芯片并检测被检血清样本

本发明涉及的新的诊断人肺癌的蛋白质芯片可以通过多种具体的技术实施，下面就进行较详细的描述：

将本方法涉及的12种抗原吸附或共价交联于适宜的固相支持物上。这12种抗原可以是提纯的天然蛋白，或是重组表达的蛋白，或是重组表达的含有各抗原特征氨基酸序列的重组融合蛋白，或是直接合成的各抗原特征氨基酸序列的多肽。所指的固相支持物可以是玻片、免疫印迹膜、免疫吸附所用的各种微孔板等。可

以采用静电作用的方式将抗原直接吸附于固相支持物上，也可以采用共价交联的方式交联于固相支持物上。具体举例为，取适量生物素化的 BSA 加入到这 12 种纯化后的抗原重组蛋白中，然后加入终浓度为 0.05% 的 Tween-20，充分混匀后以 1mg/ml—2mg/ml 的浓度点样于醛基化的玻璃基片表面，此时这 12 种抗原被以共价交联的方式交联于玻片表面，即已经制备成功可用于诊断人肺癌的蛋白质芯片。然后再采用牛血清封闭玻片表面的其它未交联的反应位点。

封闭后首先将 Cy3 或者 Cy5 标记的链霉亲和素与吸附或共价交联这 12 种抗原的固相支持物表面混合孵育。经通常免疫学技术采用的各种洗涤剂洗涤后，加入被检血样品与固相支持物表面混合孵育，使得被检血样品中的这 12 种抗原的相应抗体与固相支持物表面的抗原结合，从而间接地吸附于固相支持物表面。再经通常免疫学技术采用的各种洗涤剂洗去非特异吸附的杂蛋白，在固相支持物表面留下相应的人抗体和荧光标记的链霉亲和素。具体举例，将 1:80 稀释的 Cy5 标记的链霉亲和素或者 1:800 稀释的 Cy3 标记的链霉亲和素与已封闭的玻片 37 度保湿孵育 1 小时后，采用 0.01mol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗玻片 3 次。然后将 1:10 稀释的被检血清与上述已封闭后的玻片室温保湿孵育 1 小时，弃被检血清，采用 0.01mol/L 的 pH7.4 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗玻片 3 次。

可以采用多种常用免疫学方法探测上述存留于固相支持物表面的相应人抗体，例如免疫荧光法、免疫酶法、化学发光法、放射免疫法、酶联免疫吸附法、免疫印迹法等。具体举例，可采用免疫荧光法。在与 Cy3-链霉亲和素反应后的玻片内加入羊抗人 IgG-Cy5 二抗，而在与 Cy5-链霉亲和素反应后的玻片内加入羊抗人 IgM-Cy3 二抗，保湿孵育 1 小时。弃荧光二抗液，采用 0.01mol/L 的 pH7.4 的 PBS 冲洗玻片 3 次，去离子水冲洗玻片 1 次。空气干燥，于激光共聚焦芯片扫描仪下读取 635nm 和 530nm 的各点荧光强度和面积。其中 635nm 下该点的总荧光量（或平均荧光强度）代表被检血清中该点抗原相应的 IgG 抗体的相对含量，530nm 下该点的总荧光量（或平均荧光强度）代表被检血清中该点抗原相应的 IgM 抗体的相对含量。然后进行数据的处理：首先，将检测所得抗原点的荧光强度与点内生物素及链霉亲和素反应的荧光强度相除。其次，如果检测的抗体类型为 IgG，在此步骤将经过第一步处理后的数据与经同样处理的 IgG 标准品的数值相除；如果检测的抗体类型为 IgM，在此步骤将经过第一步处理后的数据与经同样处理的孔内 IgM 标准品的数值相除。第三，将 IgG 或者 IgM 标准片的数据同样按照以上两个步骤进行处理。然后根据 IgG 或者 IgM 抗体的稀释度，绘制标准曲线。通过不同批次标准曲线的不同，对不同批次的实验数据进行校正。然后将第二步的数据代入标准曲线的公式计算抗原在血清中的相应抗体含量。参照设立的对照并与相应的判断标准进行比较，可以判断该被检人的该抗原的相应抗体是否为阳性。

确定单个抗原是否为阳性后，联合分析 12 个抗原的结果，计算总的抗原阳性

的个数，再与相应的判断标准进行比较，凡大于规定标准值者即可判断为肺癌患者。

实施例 2 序列号 1—12 相应抗原的制备

编码本发明所述的 (1) MAGEA1 抗原片段, (2) MATK 抗原片段, (3) MAGEA3 抗原片段, (4) CCT8 抗原片段, (5) TP53 抗原片段, (6) ZNF258 抗原片段, (7) PRC1 抗原片段, (8) C14orf104 抗原片段, (9) EEF1A1 抗原片段, (10) ZIC2 抗原片段, (11) SOX2 抗原片段, (12) S100A10 抗原片段, CCT8 抗原片段、EEF1A1 抗原片段、S100A10 抗原片段、MATK 抗原片段、ZNF258 抗原片段、SOX2 抗原片段、MAGEA3 抗原片段、TP53 抗原片段的 DNA 片段已预先采用 EcoR I 和 Xho I 酶克隆在 pBluescript SK(+/-)原核克隆载体中。EcoR I 和 Xho I 双酶切重组表达载体 pET30-b(+), 回收约 5.4kb 的双酶切片段备用。EcoR I 和 Xho I 双酶切含各抗原片段基因的 pBluescript SK(+/-)载体, 回收各抗原相应的双酶切片段, 分别克隆入回收的 pET30-b(+)表达载体中。再分别采用 EcoR I 和 Xho I 双酶切筛选重组克隆。采用碱裂解法大量提取质粒, 以 0.1 μ g 的 DNA 转化 BL21 大肠杆菌。挑取转化克隆, 在 LB 培养基中培养至 OD600 约 0.6, 加入终浓度为 2mM 的 IPTG 诱导表达, 4 小时以后离心收获菌体。超声波震荡破碎菌体, 离心收集沉淀, 沉淀为含有目的抗原蛋白的包涵体。8M 尿素溶解沉淀, 4 度放置 12 小时以上, 离心去除不溶物, 与 Ni 亲和层析柱混合结合 1 小时。结合后装柱, 采用 pH6.5 的 8M 尿素洗涤层析柱 20 倍柱体积, 然后采用 pH5.9 的 8M 尿素洗脱层析柱 10 倍柱体积, 分部收集, 最后采用 pH4.5 的 8M 尿素洗脱层析柱 10 倍柱体积, 分部收集。洗脱各组分分别上样进行 SDS-PAGE 分析, 选择目的蛋白所在的组分进行复性。将目的蛋白所在的组分合并后调整蛋白浓度至 0.25mg/ml, 对含 2M 尿素的缓冲液透析, 4 度透析 12 小时, 再对含 0.2M 尿素的缓冲液透析, 4 度透析 12 小时, 再对含 0.02M 尿素的缓冲液透析, 4 度透析 12 小时, 再对不含尿素的缓冲液透析, 4 度透析 12 小时。采用 PEG20000 吸水浓缩的方法浓缩各抗原至最终浓度为 1mg/ml—2mg/ml。离心去沉淀, Lowry 法测定蛋白含量, 获得各抗原的重组蛋白。

实施例 3:

诊断肺癌的蛋白质芯片的衍生试剂盒的制备 (蛋白芯片诊断试剂盒)

(一) 试剂盒的组成

1. 预点抗原的蛋白芯片。
2. IgG/IgM 抗体标准片。
3. 样品稀释液。
4. 洗涤液浓缩液。

5. 荧光标记抗人抗体二抗的浓缩液。
6. 荧光标记链霉亲和素的浓缩液。
7. 试剂盒说明书。

(二) 试剂盒各组成成份的制备

1. 预点抗原的蛋白芯片的制备：购买商品化的 BSA 包被并经醛基化处理后的载体玻片，例如美国 CEL Associates 公司的 CSS-100 型玻片。采用实施例 2 制备的 12 种抗原的纯化重组蛋白，以及人 IgG (0.2mg/ml)、人 IgM (0.2mg/ml) 标准品作为样品，加入适量的生物素化的 BSA 和 tween-20，采用生物芯片点样机将上述 14 种样品点于载体玻片上形成微阵列，每玻片点 10 个平行的微阵列，每个微阵列之间采用贴上适宜大小的塑料膜分割开来，每个样品每点点样约 4nl、2 个平行点。点样结束后保湿放置 4 小时促进样品交联于玻片之上，然后在玻片表面加上一层含 20%胎牛血清的 PBS，室温保湿放置 1 小时后 4℃放置过夜，以充分封闭玻片上的非特异蛋白交联或结合位点。弃去液体，空气干燥，将玻片放置于铝箔塑料袋中充氮干燥密封，置于 4℃下保存。以上过程制备成功预点抗原的蛋白芯片。
2. IgG/IgM 抗体标准片的制备：采用 0.01mol/L 的 pH7.4 的 PBS 对 IgG 和 IgM 抗体的标准品进行稀释，分别配制 6 个稀释度的抗体溶液，包括 0 ug/ml、10 ug/ml、20 ug/ml、40 ug/ml、80 ug/ml 和 160 ug/ml。在每份抗体样品中加入适量的生物素化的 BSA，然后加入终浓度为 0.05%的 Tween-20，充分混匀。采用生物芯片点样机将上述抗体标准品样品点于载体玻片上形成微阵列，每玻片点 10 个平行的微阵列，每个微阵列之间采用贴上适宜大小的塑料膜分割开来，每个样品每点点样约 4nl、2 个平行点。点样结束后保湿放置 4 小时促进样品交联于玻片之上，然后在玻片表面加上一层含 20%胎牛血清的 PBS，室温保湿放置 1 小时后 4℃放置过夜，以充分封闭玻片上的非特异蛋白交联或结合位点。弃去液体，空气干燥，将玻片放置于铝箔塑料袋中充氮干燥密封，置于 4℃下保存。以上过程制备成功预点抗体标准品的蛋白芯片。
3. 样品稀释液：配制含 10%胎牛血清的 PBS (0.01mol/L, pH7.4)，加入终浓度为 0.02%的 Tween 20，无菌过滤分装，每瓶 2ml。
4. 洗涤液浓缩液：配制 10 倍浓缩的 PBS (0.01mol/L, pH7.4)，无菌过滤分装，每瓶 20ml，使用前采用去离子水稀释至 200ml。
5. 荧光标记抗人抗体二抗的浓缩液：使用市售的抗人 IgG-Cy5 荧光标记二抗和抗人 IgM-Cy3 荧光标记二抗在分别滴定适宜的稀释度后，

分装于棕色小瓶。

6. 荧光标记链霉亲和素的浓缩液：使用市售的链霉亲和素-Cy5 荧光标记二抗和链霉亲和素-Cy3 荧光标记二抗在分别滴定适宜的稀释度后，分装于棕色小瓶。
7. 试剂盒说明书：说明书应包含以下内容，试剂盒的组成、存放条件、使用操作步骤、结果分析判断方法、注意事项等。

（三）试剂盒的操作方法与结果判断

操作方法：

1. 将密封的预点芯片从 4℃ 下取出，室温预温 15 分钟以上。
2. 将 180ml 去离子水加入 20ml 洗涤液浓缩液，配制好洗涤液。
3. 打开预点抗原和抗体标准品芯片密封袋，取出芯片平放。采用样品稀释液按标签上标定的稀释度稀释荧光标记链霉亲和素的浓缩液，将稀释好的工作液各取 20 μ l，加入各个微阵列样品池，均匀覆盖样品池的所有表面，但不要溢出样品池。
4. 37℃ 下保湿孵育 1 小时。
5. 快速甩去芯片上的液体，以 20ml 以上的洗涤液均匀流过玻片表面洗涤玻片，共洗涤玻片 3 次。
6. 采用样品稀释液按照预定的比例稀释血清样品，推荐采用 1:10 稀释。
7. 将稀释好的样品各取 20 μ l，加入预点抗原芯片的微阵列样品池，均匀覆盖样品池的所有表面，但不要溢出样品池。在预点抗体标准品的芯片微阵列样品池内加入稀释液。
8. 37℃ 下保湿孵育 1 小时。
9. 快速甩去芯片上的液体，以 20ml 以上的洗涤液均匀流过玻片表面洗涤玻片，共洗涤玻片 3 次。
10. 采用样品稀释液按标签上标定的稀释度稀释荧光二抗工作液，将稀释好的荧光二抗工作液各取 20 μ l，加入各个微阵列样品池，均匀覆盖样品池的所有表面，但不要溢出样品池。
11. 37℃ 下保湿孵育 1 小时。
12. 快速甩去芯片上的液体，以 20ml 以上的洗涤液均匀流过玻片表面洗涤玻片，共洗涤玻片 3 次。
13. 以 20ml 以上的去离子水均匀流过玻片表面洗涤玻片，共洗涤玻片 1 次。
14. 空气干燥，于适宜的仪器上读取各点在 635nm、530nm 的荧光强度。

结果判断：

1. 对于单个微阵列的单个点样点来说，按以下方法判断其是否阳性：分别计算该点的 635nm 荧光强度与该点的 532nm 荧光强度的比值和人 IgG 点 635nm 荧光强度与该点的 532nm 荧光强度的比值，取二者的比值，然后根据人 IgG 标准品预点片的抗体标准曲线的公式计算该抗原相应的抗体含量。采用该数值与预定的标准比，判断该点抗原 IgG 抗体是否阳性，阳性则计数为 1，阴性计数为 0；分别计算该点的 532nm 荧光强度与该点的 635nm 荧光强度的比值和人 IgM 点 532nm 荧光强度与该点的 635nm 荧光强度的比值，取二者的比值，然后根据人 IgM 标准品预点片的抗体标准曲线的公式计算该抗原相应的抗体含量。采用该数值与预定的标准比，判断该点抗原 IgM 抗体是否阳性，阳性则计数为 1，阴性计数为 0。
2. 对于某个微阵列对应的被检人来说，其阳性抗原数按以下方法计算：按 1.所述方法判断单点阳性数后，阵列中 12 种抗原单点阳性数的总和即为被检人的阳性抗原数。
3. 将被检人阳性抗原数与预定标准对比，当被检人阳性抗原数大于或等于预定标准值时，即被判断为肺癌阳性。

实施例 4:

采用新的诊断肺癌的蛋白质芯片及衍生试剂盒诊断、普查、筛检肺癌疑似患者、肺癌高危人群以及健康人群

采用实施例 3 所述的试剂盒（采用蛋白芯片加免疫荧光法）检测肺癌疑似患者 800 例（400 例肺癌加 400 例肺部良性病变）、肺癌高危人群 3200 例、健康人群（普通社区人群）2000 例。采用实施例 4 所述的肺癌诊断标准进行结果判断。

结果被检的 800 例肺癌疑似患者中被判为肺癌的 448 例，其中 368 例被临床确诊为肺癌，80 例被临床确诊为肺部良性病变；被该方法判断为非肺癌的 352 例，其中 32 例被临床确诊为肺癌，320 例被临床确诊为肺部良性病变。说明该方法不仅可以诊断肺癌，而且对于肺部良性病变具有较高的鉴别诊断率。

被检测的肺癌高危人群 3200 例中 304 例被判断为肺癌，采用目前常规的筛检肺癌的手段——X 光胸片及痰细胞学检测已经诊断这 304 例被检人中 42 例属于肺癌，而 X 光胸片及痰细胞学筛检在这 3200 例中总共检测出 51 例肺癌，目前这 51 例肺癌正在进行临床确诊。这说明该方法可以以较高的灵敏度将肺癌患者从被检人群中筛检出来，从而可以用于初步筛检肺癌高危人群，在将这些高度疑似肺癌的人群进行临床确诊和随访。

被检测的健康人群（普通社区人群）2000 例中 156 例被判断为肺癌，其中临床确诊 1 例肺癌，而同时进行的体检也仅发现此 1 例肺癌。说明采用该方法可以将肺癌患者从健康人群中筛检出来。

序列表

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
<213> 人工序列
<211>序列的长度: 309 个 aa/309 个氨基酸残基
<400>氨基酸

<210> 序列号 1
gene: "MAGEA1"
GENE ID: AY148486
product="MAGE-1 protein"
protein_id="AAN62752.1"

MSLEQRSLHCKPEEALAEQQAALGLVCVQAAAASSSSPLVLGTLEEVPTAGSTDPQSPQGASAFPTTINF
TRQRQPSEGSSSREEEGPSTSCILESIFRAVITKKVADLVGFLLKLRAREPVTKAEMLESVIKNYKHCF
PEIFGKASESLQLVFGIDVKEADPTGHSYVLVTCGLSYDGLLDGNQIMPKTGFLIIVLVMIAMEGGHAP
EEEIWEELSVMEVYDGREHSAYGEPKLLTQDLVQEKYLEYRQVPDSDPARYEFLWGPRALAETSY
VKVLEYVIKVSARVRFFPSLREAALREEEEGV

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
<213> 人工序列
<211>序列的长度: 507 个 aa/507 个氨基酸残基
<400>氨基酸

<210>序列号 2:
gene="MATK"
GENE ID:NM_139355
product="megakaryocyte-associated tyrosine kinase isoform a"
protein_id="NP_647612.1"

MAGRGLSVSWRAFHGCDSEELPRVSPRFLRAWHPPVVSARMPTRRWAPGTQCITKCEHTRPKPGELAFR
KGDVVTILEACENKSWYRVKHTSGQEGLLAAGALREREALSADPKLSLMPWFHGKISGQEAQQQLQPPE
DGLFLVRESARHPGDYVLCVSFGRDVIHYRVLHRDGHILTIDEAVFFCNLMDMVEHYSKDKGAICTKLVRP
KRKHGTKSAEEELARAGWLLNLQHLTLGAQIGEGEFGAVLQGEYLGQKVAVKNIKCDVTAQAFLDETAVM
TKMQHENLVRLGLVILHQGLYIVMEHVSKGNLVNFLRTRGRALVNTAQLLQFSLHVAEGMEYLESKLVH
RDLAARNILVSEDLVAKVSDFLAKAERKGLDSSRLPVKWTAPEALKHGKFTSKSDVWSFGVLLWEVFSY
GRAPYPKMSLKEVSEAVEKGYRMEPPEGCPGVHVLMSSCWEAEPARRPPFRKLAEKLARELRSAGAPAS
VSGQDADGSTSPRSQEP

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
<213> 人工序列
<211>序列的长度: 314 个 aa/314 个氨基酸残基
<400>氨基酸

<210>序列号 3:

gene="MAGEA3"

GENE ID: AY148486

product="melanoma antigen family A, 3"

protein_id="NP_005353.1"

MPLEQRSQHCKPEEGLEARGEALGLVGAQAPATEEQEAASSSSTLVEVTLGEVPAESPDPQPQSPQGASS
LPTTMNYPLWSQSYEDSSNQEEEGPSTFPDLESEFQAALS SRKVAELVHFLLLKYRAREPVTKAEMLGSVV
GNWQYFFPVIFSKASSSLQLVFGIELMEVDPIGHLYIFATCLGLSYDGLLDGNQIMPKAGLLIIVLAIIA
REGDCAPEEKIWEELSVLEVFEGREDSILGDPKLLTQHFVQENYLEYRQVPGSDPACYEFLWGPR
ALVETSYVVKVLHMMVKISGGPHISYPPLHEWVLRGEE

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

<213> 人工序列

<211>序列的长度: 497 个 aa/497 个氨基酸残基

<400>氨基酸

<210>序列号 4:

gene="CCT8"

GENE ID: BC012584

product="CCT8 protein"

protein_id="AAH12584.1"

MNKMVINHLEKLFVTNDAATILRELEVQHPPAAKMIVMASHMQEQEVGDGTNFVLVFAGALLELAEELLRI
GLSVSEVIEGYEIA CRKAHEILPNLVCCSAKNLRDIDEVSSLLRTS IM SKQY GNEVFLAKLIAQACVSIF
PDSGHFNVDNIRVCKILGSGISSSSVLHGMVFKKETEGDVT SVKDAKIAVYSCPFDMITETKGTVL IKT
AEELMNFSKGEENLMDAQVKAIADTGANVVVTGGKVADMALHYANKYNIMLVRLNSKWDLRRLCKT
VGATALPRLTPPVLEEMGHCD SVYLSEVGD TQVVVFKHEKEDGAISTIVLRGSTDNLMD DIERAVDDGVN
TFKVLTRDKRLVPGGGATEIELAKQITSYGETCPGLEQYAIKKFAEAFEAI PRALAENSGVKANEVISKL
YAVHQEGNKNVGLDIEAEVPAVKDMLEAGILD TYLGKYWA IKLATNAAVTVLRVDQI IMAKPAGGPKPPS
GKKDWDDDDQND

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所

<213> 人工序列

<211>序列的长度: 393 个 aa/393 个氨基酸残基

<400>氨基酸

<210>序列号 5:

gene="TP53"

GENE ID: NM_000546

product="tumor protein p53"

protein_id="NP_000537.2"

MEEPQSDPSVEPPLSQETFSDLWKLLPENNVLSPLPSQAMDDLMLSPDDIEQWFTEDPGPDEAPRMPEAA
 PRVAPAPAAPTPAAPAPAPAPSWPLSSSVPSQKTYQGSYGFRLGFLHSGTAKSVTCTYSPALNKMFCQLAKT
 CPVQLWVDSTPPPGRVVRAMAIYKQSQHMTEVVRRCPHHERCSDSDGLAPPQHLIRVEGNLVEYLDDRN
 TFRHSVVVPYEPPEVGSDDCTTIHYNMCMSSCMGMNRRPILTIITLEDSSGNLLGRNSFEVRVCA
 CPGRRRTEENLRKKGEPHHELPPGSTKRALPNNTSSSPQPKKKPLDGEYFTLQIRGRERFEMFRELNE
 ALELKDAQAGKEPGGSRAHSSHLKSKKGQSTSRHKKLMFKTEGPDS

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：723 个 aa/723 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 6:
 gene="ZNF258"
 GENE ID: NM_007167
 product="zinc finger protein 258"
 protein_id="NP_009098.1"

MKEPLDGECGKAVVPQQEELDKIKEEPDNAQEYGCVQQPKTQESKLIKGGVSSVNERPIAQQLNPGFQLS
 FASSGPSVLLPSVPAVAIKVFCSGCKKMLYKGGTAYHKTGSTQLFCSTRCITRHSSPAQLPPPKKTCTN
 CSKDILNPKDVIITRFENSYPKDFCSQSCLSSYELKKKPVVTIYTKSISTKCSMCQKNADTRFEVKYQN
 VVHGLCSDACFSKFHSTNNLTMCCENCSSYCYSSSGPCQSQKVFSSSTVTAYQNSAQIPPYALG
 KSLRPSAEMIETTNDSGKTELFCSINCLSAIRVKTVTSSGVQVSCHSCKTSAIPQYHLAMSNGTIYSFCS
 SSCVVAFAQNVFSKPKGTNSSAVPLSQGQVVVSPSSRSASVIGGGNTSAVSPSSIRGSAAASLQPLGEQS
 QQVALTHTVVKLKQCQHCNHLFATKPELLFYKGMFLFCGKNCSEYKKNKVVAMCDYCKLQKIIKETVR
 FSGVDKPFCEVCKFLSARDFGERWGNYSYCSYCSQTSPNLVENRLEGKLEEFCCEDCMSKFTVLFYQM
 AKCDGCKRQGLSESIKWRGNIKHFCNLFVLEFCHQQIMNDCLPQNKVNISKAKTAVTELPSARTDTP
 VITVMSLAKIPATLSTGNTNSVLKGAVTKEAAKIIQDESTQEDAMKFPSSQSSQPSRLLKNKGISCKPV
 TQTKATSCKPHTQHKECQTECPVRAVC

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：620 个 aa/620 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 7:
 gene="PRC1"
 GENE ID: NM_003981
 product="protein regulator of cytokinesis 1 isoform 1"
 protein_id="NP_003972.1"

MRRSEVLAEEISIVCLQKALNHLREIWELIGIPEDQRLQRTEVVKKHIKELLDMMIAEEESLKERLIKSIS
 VCQKELNTLCSELHVEPFQEEGETTILQLEKDLRTQVELMRKQKKERKQELKLLQEQQELCEILCMPHY

DIDSASVPSLEELNQFRQHVTTLRETKASRREEFVSIKRQIILCMEELDHTPDTSFERDVVCEDEDAFCL
 SLENIATLQKLLRQLEMQKSQNEAVCEGLRTQIRELWDRLQIPEEEREAVATIMSGSKAKVRKALQ
 LEVDRLEELKMQNMKKVIEAIRVELVQYWDQCFYSQEQRQAFAPFCAEDYTESLLQLHDAEIVRLKNYYE
 VHKELFEGVQKWEETWRLFLEFERKASDPNRFNTRGGNLLKEEKQRAKLQKMLPKLEEELKARIELWEQE
 HSKAFMVNGQKFMHEYVAEQWEMHRLEKERAKQERQLKNKKQTETEMLYGSAPRTPSKRRGLAPNTPGKAR
 KLNTTMSNATANSSIRPIFGGTVYHSPVSRLLPPSGSKPVAASTCSGKKTPTGRHGANKENLELNGSIL
 SGGYPGSAPLQRNFSINSVASTYSEFAKDPSSLSDSSTVGLQRELSKASKSDATSGILNSTNIQS

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：328 个 aa/328 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 8:
 gene="C14orf104"
 GENE ID: NM_018139
 product="hypothetical protein LOC55172"
 protein_id="NP_060609.1"

MGGPGTKSGEPLCPPLLCNQDKETLTLIIQVPRIQPQSLQGDNLPLWYKLRFSAQDLVYSFFLQFAPENK
 LSTTEPVISISSNNAVIELAKSPESHGHWREWYYGVNNDLEERLFFVNEENVNEFLEEVLSSPFKQMSL
 TPPLIEVLQVTDNKIQINAKLQECNSDQLQKGEERVNEESHLEKEYIEHCNTPPTDSDSSIAVKALQI
 DSFGLVTCFQQESLDVSMILGKSQQPESKMQSEFIKEKSATCSNEEKDNLNESVITEEKETDGDH
 LSSLLNKTTHVHNIPGFDSIKETNMQDGSVQVIKDHVTNCAFSFQNSLLYDL

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：462 个 aa/462 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 9:
 gene="EEF1A1"
 GENE ID: NM_001402
 product="eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1"
 protein_id="NP_001393.1"

MGKEKTHINIVVIGHVDSGKSTTTGHLIYKCGGIDKRTIEKFEKEAAEMGKGSFKYAWVLDKLAERERG
 ITIDISLWKFETSKYYVTIIDAPGHRDFIKNMITGTSQADCAVLIVAAGVGEFEAGISKNGQTRHALLA
 YTLGVKQLIVGVNKMDSTPEPPYSQKRYEEIVKEVSTYIKKIGYNPDTVAFVPISGWNGDNMLEPSANMPW
 FKGWKVTRKDGNASGTTLEALDCILPPTRPTDKPLRLPLQDVYKIGGIGTVPVGRVETGVLPKGMVVTF
 APVNVTTTEVKSVMHHEALSEALPGDNVGFVNKNSVKDVRRGVAGDSKNDPPMEAGFTAQVIILNHP
 GQISAGYAPVLDCHTAHIACKFAELKEKIDRRSGKLEDPKFLKSGDAIIVDMVPGKPMCVESFSDYPP
 LGRFAVRDMRQTVAVGVIAVDKKAAGAGKVTKSAQAQKAK

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：532 个 aa/532 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 10:
 gene="ZIC2"
 GENE ID: NM_007129
 product="zinc finger protein of the cerebellum 2"
 protein_id="NP_009060.2"

```
MLLDAGPQFPAIGVGSFARHHHSAAAAAAAAAEMQDRELSLAAAQNGFVDSAAAHMGAFLNPGAHEL
PGQSSAFTSQPGAYPGSAAAAAAAAALGPHAAHVGSYSGPPFNSTRDFLFRSRGFSDSAPGGGQHGLFG
PGAGGLHHAHSDAQGHLLFPGLPEQHGHGPHGSQNVLNGQMLGLPGEVFGGRSEQYRQVASPRTPYSAQ
HNQYGPMMNMGMNMAAAAHHHHHHHHPGAFFRYMRQQCIKQELICKWIDPEQLSNPKKSCNKT
FSTMHELVTHSVVEHVGPEQSNHVCFWEECPREGKPFKAKYKLVNHIRVHTGKPFPCFPFGCGKVFAR
SENLKIHKRHTGKPFQCFEGCDRRFANSSDRKKHMHVHTSDKPYLCKMCDKSYTHPSSLRKHMKVHE
SSPQGSSESPAASSGYESSTPPGLVSPSAEPQSSSNLSPAAAAAAAAAAAAAAAAAVSAVHRGGGSGGGAG
GGSGGGSGGGGGGAGGGGGSSGGSGGTAGGHSGLSSNFNEWYV
```

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：317 个 aa/317 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 11:
 gene="SOX2"
 GENE ID: NM_003106
 product="sex-determining region Y-box 2"
 protein_id="NP_003097.1"

```
MYNMMETELKPPGPQQTSGGGGNSTAAAAGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRGQRRKMAQENPKMHNSE
ISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKEHPDYKYRPRRKTTLMKKDKYTLPGLLAPGGNSMA
SGVGVGAGLGAGVNQRMSYAHMNGWSNGSYSMMQDQLGYPQHPLNAHGAAQMPMHRDVSALQYNSM
TSSQTYMNGSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGSVVKSEASSPVPVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISM
YLPGAEVPEPAAPSRLHMSQHYQSGPVPGTAINGTLPLSHM
```

<110> 中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所
 <213> 人工序列
 <211>序列的长度：97 个 aa/97 个氨基酸残基
 <400>氨基酸

<210>序列号 12:

gene="S100A10"
GENE ID : NM_002966
product="S100 calcium-binding protein A10"
protein_id="NP_002957.1"

MPSQMEHAMETMMFTFHKFAGDKGYLTKEDLRVLEKEFPGFLENQKDPLAVDKIMKDLQCRDGKVGFG
SFFSLIAGLTIACNDYFVVHMKQKGKK

专利名称(译)	一种用于诊断肺癌的蛋白质芯片		
公开(公告)号	CN1873417A	公开(公告)日	2006-12-06
申请号	CN200510073352.0	申请日	2005-06-02
[标]申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
当前申请(专利权)人(译)	中国医学科学院肿瘤医院肿瘤研究所		
[标]发明人	杨治华 冉宇靓 李国惠 李江伟		
发明人	杨治华 冉宇靓 李国惠 李江伟		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/531		
代理人(译)	程伟		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种新的诊断人肺癌的蛋白质芯片，以及由此蛋白质芯片衍生的诊断试剂盒。该蛋白质芯片包含了12种特定人蛋白质的蛋白斑点，使用该蛋白质芯片可以检测被检人血液样品中这12种蛋白质各自相应抗体的含量，联合分析这12个蛋白质的相应抗体的检测结果，可以判断被检人是否为肺癌患者。本发明进一步提供了该蛋白质芯片在健康人群或高危人群中筛查肺癌的应用。