

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610026841.5

[51] Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/18 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G12N 15/12 (2006.01)

G12N 15/63 (2006.01)

[43] 公开日 2007年11月28日

[11] 公开号 CN 101077886A

[22] 申请日 2006.5.25

[21] 申请号 200610026841.5

[71] 申请人 上海普洛康裕药物研究院有限公司

地址 201314 上海市南汇区圆中路 1399 号

共同申请人 张 辉 罗宏伟

[72] 发明人 张 辉 罗宏伟

[74] 专利代理机构 上海三和万国知识产权代理事务所

代理人 章鸣玉

权利要求书 1 页 说明书 16 页 附图 2 页

[54] 发明名称

重组蛋白 AMACR 及其在制备前列腺癌诊断标记物上的应用

[57] 摘要

本发明提供 AMACR 的基因序列及其获得方法、可在宿主细胞表达的重组质粒 pRSET - B - AM-ACR 及其获得方法、在宿主细胞中表达的重组蛋白 AMACR 及其制备方法。本发明还提供以重组蛋白 AMACR 与佐剂的混合物为抗原免疫动物的过程，以及免疫所得抗体及其制备方法。本发明还提供重组蛋白 AMACR 在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。

1. 重组蛋白 AMACR, 其特征在于包含序列表中 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列。
2. 重组蛋白 AMACR 的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:
  - 1) 提取雄性激素依赖型人细胞株 LNCaP 中所含总 RNA, 以其作为模板进行 RT-PCR 扩增, 获得序列表中 SEQ ID NO.2 所示的 AMACR 全基因序列;
  - 2) 构建增幅用重组质粒 pDrive-AMACR;
  - 3) 构建表达用重组质粒 pRSET-B-AMACR;
  - 4) 转化重组质粒 pRSET-B-AMACR 至宿主细胞中, 并在宿主细胞中表达, 获得重组蛋白 AMACR。
3. 如权利要求 2 所述的制备方法, 其中还包括纯化步骤。
4. 如权利要求 3 所述的制备方法, 其中所述的纯化步骤采用 Ni-NTA 树脂。
5. 抗 AMACR 抗体, 其特征在于以重组蛋白 AMACR 为抗原, 经免疫动物后所得的抗体。
6. 抗 AMACR 抗体的制备方法, 其特征在于包括以下步骤:
  - 1) 以重组蛋白 AMACR 为抗原, 多次免疫动物;
  - 2) 采集免疫后全血, 分离得血清, 获得抗 AMACR 抗体。
7. 如权利要求 6 所述的制备方法, 其中所述抗原还包括免疫佐剂。
8. 如权利要求 6 所述的制备方法, 其中还包括采用 rProtein A Sepharose Fast Flow 树脂进行纯化的步骤。
9. 权利要求 1 所述重组蛋白 AMACR 在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。
10. 前列腺癌的体外检测方法, 其特征在于包括以下步骤:
  - 1) 前列腺样品的固定、包埋及切片;
  - 2) 脱蜡和水化;
  - 3) 用抗 AMACR 抗体进行免疫组织化学染色;
  - 4) 脱水、透明、封片及镜检。

## 重组蛋白 AMACR 及其在制备前列腺癌诊断标记物上的应用

### 技术领域

本发明涉及医药生物研究领域，具体涉及分子和细胞生物学研究领域、免疫学研究领域以及疾病的诊断研究领域，更具体地涉及体外重组蛋白 AMACR 及其制备、抗 AMACR 抗体及其制备以及重组蛋白 AMACR 在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。

### 背景技术

前列腺癌是男性生殖系常见的恶性肿瘤。前列腺癌的发病率在国内外有很大差别：欧美各国发病率极高，在老龄男性中仅次于肺癌(Reiter Robert E, (2002). *Campbell's Urology*, Walsh PC, ed. Elsevier, pp. 3003-30024.); 东方发病率比较低，但是近几年我国前列腺癌的发病率有上升的趋势。据估计，男性在青壮年时期，约有 35%-40% 患有不同程度的前列腺炎。前列腺疾病容易诱发前列腺癌。

通常诊断前列腺癌是采用筛选(screening)方法，包括血清前列腺特异性抗原测试法(*serum prostate specific antigen testing*, PSA)和直肠指检(*digital rectal examination*, DRE)。目前这两种方法的组合是用于诊断早期前列腺癌的最佳方法。作为诊断标志物，全血清 PSA 浓度高于 10ng/ml 时疑似为前列腺癌；PSA 浓度低于 10ng/ml 时，则较难判断(Stamey et al., (2002). *J. Urol.* 167, 103-111.)。各项研究显示 PSA 筛选能够诊断 70%-80% 的前列腺癌，其中包括 40% 的无感觉肿瘤(Schroder, (2003), *Urol. Clin. North Am.* 30, 239-51, viii.)。从中看出尽管 PSA/DRE 组合和前列腺活检使前列腺癌的诊断正确率达到 80%，然而仍会遗漏大量肿瘤，尤其是无感觉肿瘤。

其次，应用 PSA 筛选来诊断前列腺癌尚存在以下几方面的不足。当全血清 PSA 在 4ng/ml-10ng/ml (正常为 0-2.5ng/ml) 范围时：1. 在此范围内的男性需要做前列腺活检(Catalona et al., (1994b), *J. Urol.* 151, 1283 -1290.)，然而在这种情况下最终被诊断为癌症的患者仅占 22%-27% (Catalona et al., (1993), *JAMA* 270, 948-954.; Djavan et al., (2000), *J. Urol.* 163, 1144-1148.)，原因可能是与前列腺癌无关的 PSA 的增高或者活检取样存在问题；2. 活检诊断的假阴性比率达到 25%(Cookson, (2000), *Mol.*

Urol. 4, 93-97.), 原因可能是取样时检体方向的随机性, 因而有四分之三的处于这一浓度范围内的男性并不受益于这个过程(阴性并不排除癌症的存在)而且还会经历焦虑、不适、流血和感染这些副作用(Aus et al., (1996), Br. J. Urol. 77, 851-855.; Rietbergen et al., (1997), Urology 49, 875-880.); 3.通常第一次活检显示为阴性的男性会被建议重复一次, 但在复查过程中能检测出癌的比率仅为 10%(Djavan et al., (2003), Urol. Clin. North Am. 30, 253-62, viii.)。当 PSA 浓度在 2.5ng/ml- 4ng/ml 范围时: 有 15%- 40%的癌症被遗漏(Catalona et al., (1997), JAMA 277, 1452-1455.; Schroder et al., (2000), J. Urol. 163, 806-812.)。当 PSA 浓度在 2.5-3ng/ml 范围时: 在此范围内的男性也被鼓励做活检(Catalona et al., (1994a), J. Urol. 152, 2037-2042.; Schroder et al., (2000), J. Urol. 163, 806-812.; Babaian et al., (2000), Urology 56, 1000-1006.)。在上述这三个 PSA 浓度范围内, 良性前列腺肿大的情况更为普遍, 而且已发现 PSA 诊断在检测早期器官癌症上有很大的局限性(Canto et al., (2003), Urol. Clin. North Am. 30, 263-277.)。

另外, 在过去 50 年里经男性尸体解剖发现 40%的病例是死于前列腺癌(Stoller ML, Current Medical Diagnosis & Treatment 2002, M.S.P.M. Tierney LM, ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, pp. 985-990.), 研究显示 30%的 50 岁以上男性以及 60%-70%的 80 岁以上男性是逐步在前列腺体中产生小肿瘤(Stoller ML, Current Medical Diagnosis & Treatment 2002, M.S.P.M.Tierney LM, ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, pp. 985-990.)。据估计在这些患者中间, 只有 16%的病人是通过 screening 方法诊断出前列腺癌, 并经放射线治疗而获益(McGregor et al., (1998), CMAJ. 159, 1368 -1372.)。

因此, 非常需要发展一种更为敏感和特异的方法来检测前列腺癌。

前列腺癌诊断的一个革命性方法是直观地估计肿瘤的存在和程度。理想的造影技术是能对患者伤害最小而且能够高精确度和特异性地检测出肿瘤的大小和位置。然而目前各种造影技术均无法达到这样的效果, 包括 TRUS、CT、核磁共振、MRS 和放射线标记 ProstaScint 抗体成像技术(Moul et al., (2001), Urol. Clin. North Am. 28, 459-472.; Purohit et al., (2003), Urol. Clin. North Am. 30, 279-293.)。上述文献显示大量中间阶段的前列腺癌病人, 即使是用各种综合的临床方法仍无法显示足够精确的肿瘤阶段和时期。因而需要一个新的方法来提高诊断的精确度和治疗的效果。

此时, 肿瘤标志物的应用便应运而生了。肿瘤标志物是肿瘤细胞本身存在或分

泌的特异性物质,对肿瘤的早期诊断、观察评价治疗的效果及判断愈后有极大的意义。一种合适的、用于前列腺癌的肿瘤标志物应该是一种基因产物——能够大量且持久地在前列腺癌以及大部分癌细胞中表达。AMACR 就是符合这些条件的一个分子(Xu et al., (2000), *Cancer Res.* 60, 1677-1682.)。

AMACR,  $\alpha$ -甲酰基-辅酶 A 消旋酶 ( $\alpha$ -methylacyl-CoA racemase, 即 P504S), 是一个在前列腺癌中持久且大量表达的蛋白质(Jiang et al., (2001), *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 1397-1404.; Luo et al., (2002), *Cancer Res.* 62, 2220-2226.; Rubin et al., (2002), *JAMA* 287, 1662-1670.)。AMACR 是在支链脂肪酸以及它们的衍生物的 $\beta$ -氧化过程中起基本作用的一种酶(Swinnen et al., (2002), *Int. J. Cancer* 98, 19-22.), 它能催化几种(2R)-甲基-支链脂酰辅酶 A 酯与(S)脂异构体之间的转化(Schmitz et al., (1994), *Eur. J. Biochem.* 222, 313-323.; Wanders et al., (2001), *Biochem. Soc. Trans.* 29, 250-267.)。

P504S/AMACR 在前列腺癌的 mRNA 和蛋白质水平上均有大量表达(Xu et al., (2000), *Cancer Res.* 60, 1677-1682.), 其大量表达存在于癌的各个阶段和时期(Luo et al., (2002), *Cancer Res.* 62, 2220-2226.; Rubin et al., (2002), *JAMA* 287, 1662-1670.); 同时研究表明,在 95%甚至于 100%的前列腺癌病例中,大部分腺体的 AMACR 经免疫染色后结果均呈阳性;而只有 3%-12%的正常前列腺上皮细胞染色为微弱阳性(Jiang et al., 2001; Luo et al., 2002; Rubin et al., 2002); PIN (前列腺内上皮肿瘤,一种前列腺癌的前体缺乏症)染色为阳性结果也很普遍(Beach et al., (2002), *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* 29, 933-938.; Luo et al., (2002), *Cancer Res.* 62, 2220-2226.; Rubin et al., (2002), *JAMA* 287, 1662-1670.), 因此用 AMACR 来鉴定以及对初级前列腺肿瘤的定位有着无可比拟的优势(Yang et al., 2003)。同时,这种方法还能应用于穿刺活检中以辅助确定穿刺的方向、能估计肿瘤的程度以及帮助搜索癌的系统转移(Jiang et al., (2002), *Am. J. Surg. Pathol.* 26, 1169-1174.; Magi-Galluzzi et al., (2003), *Am. J. Surg. Pathol.* 27, 1128-1133.)。可见 AMACR 在临床上是一个应用意义极大的分子。

因此,制备 AMACR 抗体并将其应用于病理组织切片染色,会大大提高诊断前列腺癌的准确度。美国已有这方面的报道及应用,报道显示免疫动物所用的抗原是合成多肽。可是,由于多肽分子量小,属于半抗原,自身不能诱导抗体产生,必须通过物理吸附或化学合成法与载体结合后才能刺激机体产生抗体。合成免疫原性

高的多肽抗原操作繁琐。

考虑到制备抗原的简易性以及获得更高效价的抗体，本发明者使用体外重组蛋白质作为抗原。本发明者应用分子克隆技术从人体前列腺癌细胞中克隆得到 AMACR 编码全基因，并在大肠杆菌中大量表达重组质粒 pRSET-B-AMACR，获得重组蛋白 AMACR。将所得重组蛋白作为抗原免疫家兔，制备得到抗 AMACR 抗体。将所得抗 AMACR 抗体应用于体外检测前列腺癌，从而完成了本发明。

因此，本发明的第一个目的是提供重组蛋白 AMACR。

本发明的第二个目的是提供重组蛋白 AMACR 的制备方法。

本发明的第三个目的是提供抗 AMACR 抗体。

本发明的第四个目的是提供抗 AMACR 抗体的制备方法。

本发明的第五个目的是提供重组蛋白 AMACR 在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。

本发明的第六个目的是提供前列腺癌的体外检测方法。

## 发明概述

本发明第一方面提供的重组蛋白 AMACR 的氨基酸序列包含序列表中 SEQ ID NO.1 所示氨基酸序列。

本发明第二方面提供的重组蛋白 AMACR 的制备方法包括以下步骤：

- 1) 提取雄性激素依赖型人癌细胞株 LNCaP 中所含总 RNA，以其作为模板进行 RT-PCR 扩增，获得序列表中 SEQ ID NO.2 所示的 AMACR 编码全基因序列；
- 2) 构建增幅用重组质粒 pDrive-AMACR；
- 3) 构建表达用重组质粒 pRSET-B-AMACR；
- 4) 转化重组质粒 pRSET-B-AMACR 至宿主细胞中，并在宿主细胞中表达，得到表达产物重组蛋白 AMACR；
- 5) Ni-NTA 树脂纯化表达产物重组蛋白 AMACR。

本发明第三方面提供的抗 AMACR 抗体是以重组蛋白 AMACR 为抗原，经免疫动物后所得的抗体。

本发明第四方面提供的抗 AMACR 抗体的制备方法包括以下步骤：

- 1) 以重组蛋白 AMACR 为抗原，多次免疫动物；

- 2) 采集免疫后全血，分离得血清。获得抗 AMACR 抗体。
- 3) 重组蛋白 A 琼脂糖凝胶快速分离树脂 (rProtein A Sepharose Fast Flow) 纯化所得抗体。

本发明的第五方面提供重组蛋白 AMACR 在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。

本发明的第六方面提供的前列腺癌体外检测的方法包括以下步骤：

- 1) 前列腺样品的固定、包埋及切片；
- 2) 脱蜡和水化；
- 3) 用抗 AMACR 抗体进行免疫组织化学染色；
- 4) 脱水、透明、封片及镜检。

## 发明详述

本发明者首先对 AMACR 基因进行扩增，所得扩增产物与质粒载体 pDrive 构建成增幅用重组质粒 pDrive-AMACR，转化、抽提质粒后，进行 DNA 测序鉴定；之后将质粒 pDrive-AMACR 与质粒载体 pRSET-B 通过酶切、回收及连接构建成在原核生物中表达的重组质粒 pRSET-B-AMACR，转化、抽提质粒，DNA 测序鉴定后将所得质粒转化于宿主细胞中大量表达，所得重组蛋白用 Ni-NTA 亲和层析树脂纯化；将纯化所得蛋白作为抗原，多次免疫家兔后，收集家兔血清，所得血清经纯化后得到抗 AMACR 抗体；将所得抗体应用于免疫组织化学染色。

### 1. AMACR 基因的克隆

从雄性激素依赖型人癌细胞株 LNCaP 中抽提出总 RNA。以序列表中 SEQ ID NO. 3 所示的 DNA 序列为 5'端引物、SEQ ID NO. 4 所示的 DNA 序列为 3'端引物，经 RT-PCR 技术扩增得编码 AMACR 的全基因序列。

将所得 AMACR 基因 PCR 片段与质粒载体 pDrive 酶切连接，构建成增幅用重组质粒 pDrive-AMACR。将此重组质粒转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中，培养后涂布于含有氨苄青霉素 (Amp) 的 LB 平板上。挑取单克隆进行培养，抽提菌体中所含质粒，进行 DNA 测序鉴定。

### 2. 构建可在宿主细胞中表达的重组质粒 pRSET-B-AMACR

挑选上述经 DNA 测序鉴定正确的质粒与表达载体 pRSET-B 酶切连接，构建成表达重组质粒 pRSET-B-AMACR。将此重组质粒转化入大肠杆菌 BL21 (DE3) pLys

S感受态细胞中,培养后涂布于含有 Amp 和氯霉素的 LB 平板上,只有带有 pRSET-B-AMACR 的克隆才能在此平板中生长。挑取单克隆进行培养,抽提菌体中所含质粒,进行 DNA 测序鉴定,确认在克隆过程中 AMACR 基因没有发生变异及蛋白读取框正确。

### 3. 重组质粒 pRSET-B-AMACR 在大肠杆菌中的表达与重组蛋白的制备

挑选上述经 DNA 测序鉴定正确的质粒,于含有 Amp 和氯霉素的 LB 培养液中培养过夜,隔天转种至新鲜的上述培养液中培养菌液至对数生长期,加入诱导剂继续培养,最后收集菌体沉淀。用变性剂溶解所得菌体沉淀,离心后保留上清液。由于重组质粒含有 6×His,因此选用 Ni-NTA 亲和层析树脂纯化所得上清液。SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)鉴定诱导表达及纯化结果。

### 4. 重组蛋白 AMACR 接种家兔诱导免疫反应及所得抗体的纯化

以所得重组蛋白为抗原,对家兔进行颈部皮下多点注射免疫,整个免疫过程分四次进行。第一次将抗原与完全福氏佐剂混和后注射,第二、三、四次将抗原与不完全福氏佐剂混和后注射,每次免疫注射间隔时间为 28-30 天。待第一次免疫后 100 天采集家兔全血,分离血清获得抗体。用 rProtein A Sepharose Fast Flow 纯化所得抗体,透析纯化产物。

### 5. 抗 AMACR 抗体应用于免疫组织化学染色及标记物的检测

待测前列腺样品经福尔马林固定、包埋、切片、脱蜡水化及微波炉抗原修复后进行免疫组织化学染色,再经脱水、透明及封片后进行镜检。上述免疫组织化学染色步骤均为常规方法。

本发明有如下优点:

本发明者选用 Invitrogen 的 pRSET A, B, C Kit 构建重组蛋白。这是一个专门用于在大肠杆菌中高水平表达重组蛋白质的工具包。其中 pRSET 是从 pUC-衍生出的专门用于在大肠杆菌中高水平表达和纯化重组蛋白质的载体。

本发明者在构建重组质粒 pRSET-B-AMACR 时,将(小)牛小肠碱性磷酸(酯)酶(calf intestinal alkaline phosphatase, CIAP)作用于双酶切后的 pRSET-B 质粒。其中,CIAP 破坏开环后碱基末端的磷酸基,阻止载体的自我环化,大大提高了连接的效率。

本发明者将重组蛋白与佐剂混合后进行免疫。这种组合方式使抗原充分发挥其免疫原性,从而所得抗体具特异性高,亲和力大的特点。

本发明者通过标记物检测, 所得结果显示通过染色能很好的区分正常的前列腺切片和癌症患者的前列腺切片, 并且其染色有效率达到 90%以上, 也就是说在免疫组化染色过程中, 每 100 例正常的前列腺切片的假阳性率低于 10%。因此病理医生能利用被染色的患者组织切片来辅助进行前列腺癌的诊断。

#### 附图说明

图 1 是 AMACR 全基因序列的扩增结果。

图 2 是重组蛋白 AMACR 的诱导结果。

图 3 是重组蛋白 AMACR 的纯化结果。

图 4 是前列腺样品的镜检结果。

#### 具体实施方案

下面用实施例对本发明作进一步阐述, 但这些实施例绝非对本发明有任何限制。本领域技术人员在本说明书的启示下对本发明实施中所作的任何变动都将落在权利要求书的范围内。

#### 实施例 1 AMACR 基因的克隆

##### 1). 材料:

细胞株: LNCaP 是一种雄性激素依赖型人细胞株, 是为数不多的几个前列腺癌研究的常用癌细胞株的一种。

培养液: DMEM 是 GIBCO 的产品, 利用前需要添加 10%的 FBS。

##### 2). 步骤:

a. 抽提总 RNA: 用 Rneasy Micro Kit (Qiagen 公司) 从 LNCaP 细胞中提取总 RNA。

b. RT-PCR 扩增 AMACR 基因:

用 One Step RT-PCR Kit (Qiagen 公司) 对步骤 a 所得 RNA 进行 AMACR 基因的扩增。

引物的设计: Primer A: 5'GAGCTCGGCA CTGCAGGGCA TCTCG

Primer B: 5'GGTACCAAAT TCACTTGAGC CGTGGGCC

引物 Primer A (序列表中 SEQ ID NO. 3 所示) 为增幅 AMACR 基因的 5'端引物, 其中引入了 *Sac I* 酶切位点 GAGCTC;

引物 Primer B (序列表中 SEQ ID NO. 4 所示) 为增幅 AMACR 基因的 3' 端引物, 其中引入 *Kpn I* 酶切位点 GGTACC。

反应体系 (总体积 50 $\mu$ l):

成分	反应体积( $\mu$ l)	最终浓度
无 RNA 酶的水		
5 $\times$ Qiagen One Step RT-PCR 缓冲液	10	1 $\times$
dNTP 混合物	2	每种成分 400 $\mu$ M
Primer A		0.6 $\mu$ M
Primer B		0.6 $\mu$ M
Qiagen One Step RT-PCR 酶混和物	2	
RNA 酶抑制剂	1	
模板 RNA		1pg-2 $\mu$ g/反应

反应条件:

反应步骤	温度( $^{\circ}$ C)	时间(min)
逆转录反应	50	30
PCR 激活反应	95	15
变性反应	94	0.5
退火反应	60	0.5
伸长反应	72	1
最终伸长反应	72	10

其中变性、退火和伸长反应为 35 个循环。

AMACR 基因序列的扩增结果见图 1。其中, 泳道 1 为 PCR 参照分子量; 泳道 2 为 AMACR 基因的 PCR 扩增条带。结果显示, 泳道 2 所示条带大小约为 1149bp, 与预计结果相符。

## 实施例 2 AMACR 基因 PCR 产物的测序验证

### 1) pDrive-AMACR 增幅质粒的构建:

用 PCR Cloning Kit (Qiagen 公司) 将实施例 1 所得 AMACR 基因与 pDrive 载体进行连接。

连接体系 (总体积 10 $\mu$ l):

成份	反应液体积( $\mu$ l)
pDrive 克隆载体(50ng/ml)	1
AMACR 基因的 PCR 产物	2
水	2
2 $\times$ Ligation Master 混合物	5

反应条件: 将上述连接体系于 16 $^{\circ}$ C 中反应 30min。

### 2) 重组质粒 pDrive-AMACR 转化入大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 中进行筛选:

缓慢解冻 PCR Cloning Kit 中所提供的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞后,加入 1 $\mu$ l 步骤 1)所得连接液。冰浴 30 分钟; 42 $^{\circ}$ C 热休克 40 秒; 冰浴 2 分钟之后, 加入 LB 培养基, 于 37 $^{\circ}$ C 孵化 1 小时, 随后涂布于含有 100 $\mu$ g/ml 的 Amp 的 LB 平板上, 培养皿倒置于 37 $^{\circ}$ C 中培养 12 小时以上, 直到长出明显的菌落为止。

挑选 5 个菌落, 于 5ml 含有 Amp 的 LB 液体培养基中培养过夜, 用 QIAprep Spin Miniprep kit (Qiagen 公司) 抽提菌体中所含重组质粒。DNA 测序鉴定所得质粒的 DNA 序列。

测序鉴定结果显示, 与预计结果一致, 含有完整的未变异的 AMACR 基因。

### 实施例 3 在原核生物中表达的重组质粒 pRSET-B-AMACR 的构建

#### 1) 材料:

试剂盒: pRSET A, B, C Kit (Invitrogen 公司), 这是一个专门在大肠菌中高水平表达重组蛋白质的工具包。

表达载体: pRSET, 这是一个从 pUC-衍生出来的专门用于大肠杆菌中高水平表达和纯化重组蛋白质的载体。

#### 2) 步骤 (具体步骤见操作手册):

- a. 酶切: 用 *Sac I* 和 *Kpn I* 酶于 37 $^{\circ}$ C 中分别消化 pDrive-AMACR 和 pRSET-B, 反应 2 小时以上, 直到被完全切断为止。
- b. AMACR 基因的回收纯化: 用 MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen 公司) 抽提双酶切后所得的目标片段。
- c. pRSET-B 载体的回收纯化: 双酶切后的 pRSET-B 质粒经纯化去除这两种酶的活性后, 加入 CIAP 并于 37 $^{\circ}$ C 中反应 1 小时, 破坏开环后碱基末端的磷酸基, 阻止载体的自我环化, 再纯化, 去除 CIAP 酶活性。
- d. 连接:

反应体系 (总体积 20 $\mu$ l):

成份	反应体积( $\mu$ l)
<i>Sac I-Kpn I</i> 双酶切后的 pRSET-B	3
<i>Sac I-Kpn I</i> 双酶切后的 AMACR	5
水	8
10 $\times$ 连接缓冲液	2
连接酶	2

反应条件: 将上述连接体系于 16 $^{\circ}$ C 中反应 30min。

#### 实施例 4 pRSET-B-AMACR 表达载体的鉴定

根据实施例 2 中步骤 2)的方法, 将实施例 3 所得连接产物转化入大肠杆菌 BL21(DE3)pLys S 菌株中, 并且抽提菌体所含的重组表达质粒。用 DNA 测序方法来鉴定所得质粒。

测序鉴定结果显示, 与预计结果一致, 并未发生变异, 且蛋白读取框正确。

#### 实施例 5 AMACR 重组表达质粒在大肠杆菌中的诱导表达

由于只有带有 pRSET-B-AMACR 的克隆才能在含有 Amp 和氯霉素的培养基中存活, 因此可挑取平皿上的单菌落, 于 3ml 含有 50 $\mu$ g/ml Amp 和 35 $\mu$ g/ml 氯霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 震荡培养过夜。随后转种至 25ml 的培养基(不含抗菌素)中, 使所得菌液的 OD<sub>600</sub> 约为 0.1。继续培养至 OD<sub>600</sub> = 0.4 时, 取出 1ml 菌液作为对照, 其余菌液加入终浓度为 1mM 的异丙基 $\beta$ -D-硫代半乳糖苷(isopropyl  $\beta$ -D thiogalactoside, IPTG)诱导 T7 RNA 聚合酶(T7 RNA polymerase)的表达。对照菌液和诱导菌液继续培养, 培养温度为 25 $^{\circ}$ C, 诱导时间为 20 小时, 使所得菌液的 OD<sub>600</sub> 为 1。收集菌体。

重组蛋白 AMACR 的诱导电泳图谱见图 2。其中, 泳道 1 为未诱导表达的重组质粒 pRSET-B-AMACR; 泳道 2 为标准分子量蛋白; 泳道 3 及泳道 4 均为诱导表达的重组质粒 pRSET-B-AMACR。结果显示, 在分子量为 46KDa 处, 诱导后的菌体较诱导前的菌体呈现出明显表达条带, 此处即为重组蛋白 AMACR, 分子量大小与理论值相符。

#### 实施例 5 AMACR 重组蛋白的纯化

- 1) 使用试剂: 纯化试剂盒为 The QIAexpressionist Kit (Qiagen 公司)。包含缓冲液 A-E、2 $\times$ SDS-PAGE 样品缓冲液、Ni-NTA 树脂以及空层析柱。
- 2) 步骤:
  - a. 破碎: 将实施例 4 所得菌体沉淀按照每克湿菌体加入 5ml 缓冲液的比例加入一定量的缓冲液 B, 充分混匀后于 12,000rpm 离心 20 分钟, 收集上清液。
  - b. 纯化: 取 5 倍柱体积的缓冲液 B 平衡树脂。取 4ml 步骤 a 所得上清液与 1ml 50% 的 Ni-NTA 树脂结合, 室温轻柔混合 15 分钟以上。收集流穿液。用 5ml 的缓冲液 C 洗涤两次, 直至 OD<sub>280</sub> 低于 0.01。用 0.5ml 的缓冲液 D 洗脱 4 次后, 再用 0.5ml

的缓冲液 E 洗脱 4 次。收集所有洗脱液。

**c. SDS-PAGE 鉴定表达与纯化:**

预制胶——Bis-Tris-HCl (pH 6.4) 聚丙烯酰胺凝胶制备 (Invitrogen 公司提供)。电泳条件: 200V。染色: 考马斯亮蓝 (Coomassie Brilliant Blue) R-250 染色。

重组蛋白 AMACR 的纯化结果见图 3。其中, 泳道 1 为标准分子量蛋白; 泳道 2 为纯化蛋白 (浓度为 1×); 泳道 3 为纯化蛋白 (浓度为 1/2×); 泳道 4 为纯化蛋白 (浓度为 1/4×); 泳道 5 为纯化蛋白 (浓度为 1/8×)。结果显示, 经洗脱得到的纯化蛋白, 其分子量约为 46KDa, 与理论值相符。经 DC Protein Assay Kit (BioRad 公司) 测定, 所得纯化蛋白 (浓度为 1×) 的浓度为 300μg/ml。

**实施例 6 AMACR 重组蛋白接种家兔诱导免疫反应**

1) 家兔数量: 两只。

2) 抗原注射量: 每只家兔需要 50—200μg 实施例 5 所得抗原。

3) 免疫步骤:

**a. 第一次免疫:**

免疫原: 根据 2) 所示抗原注射量, 取等倍体积的完全福氏佐剂 (Sigma 公司) 与之混合, 于 6000 转/分搅拌机上搅拌 5 分钟, 使两者充分混匀, 待注射家兔;

免疫注射方式: 家兔颈部皮下多点注射;

**b. 第二次免疫:**

免疫时间: 第一次免疫之后的 28-30 天后;

免疫原: 根据 2) 所示抗原注射量, 取等倍体积的不完全福氏佐剂 (Sigma 公司) 与之混合, 于 6000 转/分搅拌机上搅拌 5 分钟, 待两者充分混匀, 待注射家兔;

免疫注射方式: 家兔颈部皮下多点注射;

**c. 第三次免疫:**

免疫时间: 第一次免疫之后的 58-60 天后;

免疫原: 同步骤 b. 所示免疫原;

免疫注射方式: 同步骤 b. 所示方式;

**d. 第四次免疫:**

免疫时间：第一次免疫之后的 88-90 天后；

免疫原：同步骤 b.所示免疫原；

免疫注射方式：同步骤 b.所示方式；

e. 采家兔血获得抗体：

采血时间：第一次免疫之后的第 100 天；

抗体的获得：离心所得家兔全血，收集血清，所得抗体待纯化。

### 实施例 7 AMACR 重组蛋白免疫家兔后所得抗体的纯化

1) 试剂和材料：

a. rProtein A Sepharose Fast Flow (Amersham Biosciences #17-1279-01)；

b. 0.1M Tris-HCl, pH 8.0；

c. 0.05M 甘氨酸-盐酸, pH 2.8；

d. 1M Tris-HCl, pH 8.0

2) 纯化步骤：

a. 树脂平衡：用 10 倍柱体积的 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液平衡树脂；

b. 上样：根据实施例 6 所得血清量，加入等倍体积的 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液，混匀后上样；

c. 洗涤：用 0.1M Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液洗涤，至流穿液的  $OD_{280} < 0.05$ ；

d. 洗脱：用 0.05M 甘氨酸-盐酸 (pH 2.8) 缓冲液分管洗脱，收集洗脱液；

e. 透析：将步骤 d.所得洗脱液按 1:10 的比例加至含有 1M Tris-HCl (pH 8.0) 缓冲液的试管内，测定  $OD_{280}$ ；合并  $OD_{280} > 0.1$  的洗脱所得液，随后于 1×PBS 中透析过夜。

通过测定透析所得抗体  $OD_{280}$ ，换算得到抗体的浓度，即抗体浓度 (mg/ml) =  $OD_{280} \times 0.8$ 。结果显示，抗体  $OD_{280} = 1$ ，则抗体浓度 (mg/ml) = 0.8 mg/ml

### 实施例 7 免疫组织化学染色

1) 前列腺样品的固定：通常利用福尔马林来固定样品。

2) 切片：通常制作 6 $\mu$ m 厚的切片。

3) 染色：

a. 脱蜡和水化：脱蜡前，将组织切片在 60℃ 恒温箱中烘烤 30~60 分钟；组织切片

- 置于二甲苯中浸泡 5 分钟，更换二甲苯后再浸泡 5 分钟；无水乙醇中浸泡 3 分钟，更换无水乙醇再浸泡 3 分钟；95%乙醇中浸泡 3 分钟；80%乙醇中浸泡 3 分钟；70%乙醇中浸泡 3 分钟；纯水中浸泡 3 分钟；PBS 缓冲液中浸泡 3 分钟；3% $H_2O_2$ （80%甲醇）滴加在组织样品上，室温静置 10 分钟，以消除内源性过氧化物酶的活性；PBS 洗涤 2 次各 5 分钟。
- b. 微波炉抗原修复：将步骤 a 所得组织切片放入 0.01M 枸橼酸钠缓冲液（pH6.0），于微波炉中加热至沸腾，保持沸腾 5~6 分钟；在缓冲液中冷却 30 分钟；PBS 洗涤 2 次各 5 分钟。
- c. 免疫组织化学染色：在步骤 b 所得组织切片中滴加正常山羊血清封闭液（不可有气泡），室温反应 45 分钟；滴加 I 抗，（即抗 AMACR 抗体，1:100 稀释）50 $\mu$ l，4 $^{\circ}$ C 反应过夜；用 PBS 缓冲液洗涤 2 次各 10 分钟；滴加 II 抗（山羊抗家兔，1:200 稀释）40~50 $\mu$ l，室温静置 1 小时；PBS 缓冲液洗涤 2 次各 10 分钟；DAB 显色 5~10 分钟，在显微镜下掌握染色程度；自来水冲洗 10 分钟；苏木精复染 2 分钟后，放在 PBS 缓冲液中直到变蓝，随后用自来水冲洗。
- d. 脱水、透明、封片、镜检：将步骤 c 所得组织切片依次于 70%乙醇中浸泡 3 分钟；80%乙醇中浸泡 3 分钟；95%乙醇中浸泡 3 分钟；无水乙醇中浸泡 3 分钟，更换无水乙醇再浸泡 3 分钟；置于二甲苯中浸泡 5 分钟，更换二甲苯后再浸泡 5 分钟；最后封片。

#### 实施例 8 标记物的检测

根据正常组织不被染色、癌组织被染成棕色的显色反应，结合实施例 7 所得结果，即可确定待测前列腺样品是否癌变。

前列腺样品镜检结果见图 5。其中，A 为细胞角蛋白；B 为癌细胞；C 为癌细胞（High Grade）；D 为正常细胞；E 为正常细胞。根据结果显示，未着色细胞为正常细胞，深色为癌细胞。

## SEQUENCE LISTING

<110> 上海普洛康裕药物研究院有限公司  
 张, 辉  
 罗, 宏伟

<120> 重组蛋白AMACR及其在制备前列腺癌诊断标记物上的应用

<130> CN051013

<160> 4

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1  
 <211> 382  
 <212> PRT  
 <213> 人工合成

<400> 1

Met Ala Leu Gln Gly Ile Ser Val Met Glu Leu Ser Gly Leu Ala Pro  
 1 5 10 15

Gly Pro Phe Cys Ala Met Val Leu Ala Asp Phe Gly Ala Arg Val Val  
 20 25 30

Arg Val Asp Arg Pro Gly Ser Arg Tyr Asp Val Ser Arg Leu Gly Arg  
 35 40 45

Gly Lys Arg Ser Leu Val Leu Asp Leu Lys Gln Pro Arg Gly Ala Ala  
 50 55 60

Val Leu Arg Arg Leu Cys Lys Arg Ser Asp Val Leu Leu Glu Pro Phe  
 65 70 75 80

Arg Arg Gly Val Met Glu Lys Leu Gln Leu Gly Pro Glu Ile Leu Gln  
 85 90 95

Arg Glu Asn Pro Arg Leu Ile Tyr Ala Arg Leu Ser Gly Phe Gly Gln  
 100 105 110

Ser Gly Ser Phe Cys Arg Leu Ala Gly His Asp Ile Asn Tyr Leu Ala  
 115 120 125

Leu Ser Gly Val Leu Ser Lys Ile Gly Arg Ser Gly Glu Asn Pro Tyr  
 130 135 140

Ala Pro Leu Asn Leu Leu Ala Asp Phe Ala Gly Gly Gly Leu Met Cys  
 145 150 155 160

Ala Leu Gly Ile Ile Met Ala Leu Phe Asp Arg Thr Arg Thr Asp Lys  
 165 170 175

Gly Gln Val Ile Asp Ala Asn Met Val Glu Gly Thr Ala Tyr Leu Ser  
 180 185 190

Ser Phe Leu Trp Lys Thr Gln Lys Ser Ser Leu Trp Glu Ala Pro Arg  
 195 200 205

Gly Gln Asn Met Leu Asp Gly Gly Ala Pro Phe Tyr Thr Thr Tyr Arg  
 210 215 220

Thr Ala Asp Gly Glu Phe Met Ala Val Gly Ala Ile Glu Pro Gln Phe  
225 230 235 240

Tyr Glu Leu Leu Ile Lys Gly Leu Gly Leu Lys Ser Asp Glu Leu Pro  
245 250 255

Asn Gln Met Ser Met Asp Asp Trp Pro Glu Met Lys Lys Lys Phe Ala  
260 265 270

Asp Val Phe Ala Lys Lys Thr Lys Ala Glu Trp Cys Gln Ile Phe Asp  
275 280 285

Gly Thr Asp Ala Cys Val Thr Pro Val Leu Thr Phe Glu Glu Val Val  
290 295 300

His His Asp His Asn Lys Glu Arg Gly Ser Phe Ile Thr Ser Glu Glu  
305 310 315 320

Gln Asp Val Ser Pro Arg Pro Ala Pro Leu Leu Leu Asn Thr Pro Ala  
325 330 335

Ile Pro Ser Phe Lys Arg Asp Pro Phe Ile Gly Glu His Thr Glu Glu  
340 345 350

Ile Leu Glu Glu Phe Gly Phe Ser Arg Glu Glu Ile Cys Gln Leu Asn  
355 360 365

Ser Asp Lys Ile Ile Glu Ser Asn Lys Val Lys Ala Ser Leu  
370 375 380

<210> 2  
<211> 1149  
<212> DNA  
<213> 人工合成

<400> 2  
atggcactgc agggcatctc ggtcatggag ctgtccggcc tggccccggg cccgttctgt 60  
gctatggtcc tggctgactt cggggcgcgt gtggtacgcg tggaccggcc cggtccccgc 120  
tacgacgtga gccgcttggg ccggggcaag cgctcgttag tgctggacct gaagcagccg 180  
cggggagccg ccgtgctgcg gcgctctgtc aagcggtcgg atgtgctgct ggagcccttc 240  
cgcccggtg tcatggagaa actccagctg ggcccagaga ttctgcagcg ggaaaatcca 300  
aggcttattt atgccaggct gagtggattt ggccagtcag gaagcttctg cgggttagct 360  
ggccacgata tcaactattt ggctttgtca ggtgttctct caaaaattgg cagaagtgg 420  
gagaatccgt atgccccgct gaatctcctg gctgactttg ctggtggtgg ccttatgtgt 480  
gcactgggca ttataatggc tctttttgac cgcacacgca ctgacaaggg tcaggtcatt 540  
gatgcaaata tggtggaagg aacagcatat ttaagttctt ttctgtggaa aactcagaaa 600  
tcgagtctgt gggaagcacc tcgaggacag aacatgttgg atggtggagc acctttctat 660  
acgacttaca ggacagcaga tggggaattc atggctgttg gagcaataga accccagttc 720  
tacgagctgc tgatcaaagg acttggacta aagtctgatg aacttcccaa tcagatgagc 780  
atggatgatt ggccagaaat gaagaagaag tttgcagatg tatttgcaaa gaagacgaag 840

---

```

gcagagtggg gtcaaatctt tgacggcaca gatgcctgtg tgactccggt tctgactttt 900
gaggagggtt ttcacatga tcacaacaag gaacggggct cgtttatcac cagtgaggag 960
caggacgtga gccccgccc tgcacctctg ctgttaaaca ccccagccat cccttctttc 1020
aaaagggatc ctttcatagg agaacacact gaggagatac ttgaagaatt tggattcagc 1080
cgcgaagaga tttgtcagct taactcagat aaaatcattg aaagtaataa ggtaaaagct 1140
agtctctaa 1149

```

```

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工合成

```

```

<400> 3
gagctcggca ctgcaggga tctcg 25

```

```

<210> 4
<211> 28
<212> DNA
<213> 人工合成

```

```

<400> 4
ggtaccaaattcacttgagc cgtgggcc 28

```

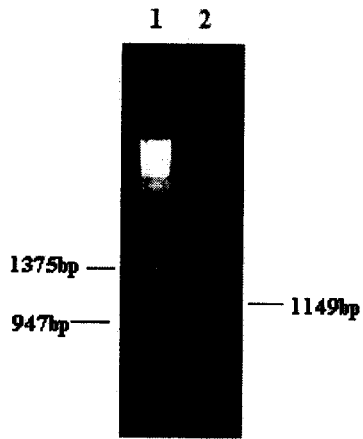


图 1



图 2

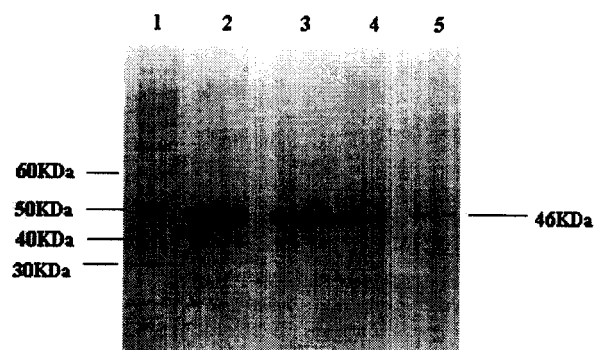


图 3

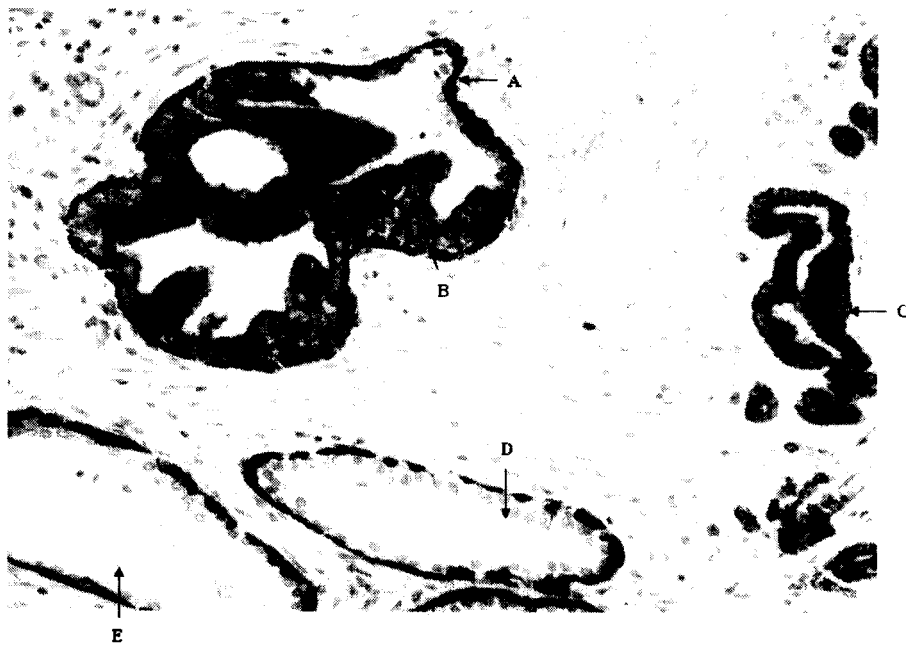


图 4

专利名称(译)	重组蛋白AMACR及其在制备前列腺癌诊断标记物上的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN101077886A</a>	公开(公告)日	2007-11-28
申请号	CN200610026841.5	申请日	2006-05-25
[标]申请(专利权)人(译)	上海普洛康裕药物研究院有限公司 张辉 罗宏伟		
申请(专利权)人(译)	上海普洛康裕药物研究院有限公司 张辉 罗宏伟		
当前申请(专利权)人(译)	上海普洛康裕药物研究院有限公司 张辉 罗宏伟		
[标]发明人	张辉 罗宏伟		
发明人	张辉 罗宏伟		
IPC分类号	C07K14/47 C07K16/18 G01N33/53 C12N15/12 C12N15/63		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明提供AMACR的基因序列及其获得方法、可在宿主细胞表达的重组质粒pRSET - B - AMACR及其获得方法、在宿主细胞中表达的重组蛋白AMACR及其制备方法。本发明还提供以重组蛋白AMACR与佐剂的混合物为抗原免疫动物的过程，以及免疫所得抗体及其制备方法。本发明还提供重组蛋白AMACR在制备前列腺癌诊断标记物上的应用。

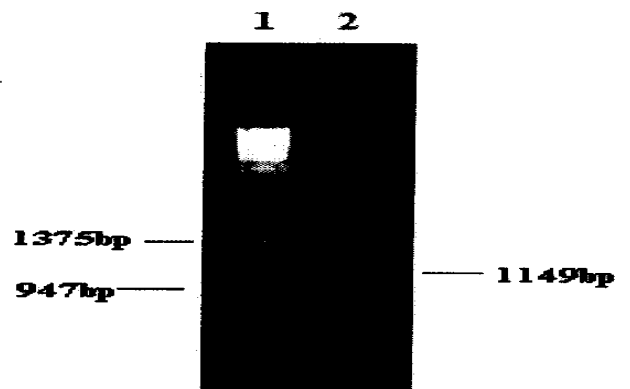


图 1