



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110658335 A

(43)申请公布日 2020.01.07

(21)申请号 201910858916.3

(22)申请日 2019.09.11

(71)申请人 蚌埠医学院

地址 233003 安徽省蚌埠市东海大道2600号

(72)发明人 马佳 夏俊 王志伟 张语捷

(74)专利代理机构 北京高沃律师事务所 11569

代理人 马云华

(51)Int.Cl.

G01N 33/535(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

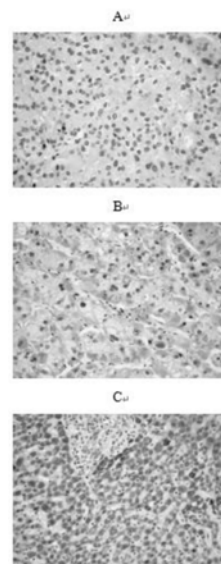
权利要求书1页 说明书5页 附图1页

### (54)发明名称

一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法

### (57)摘要

本发明提供了一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法,涉及生物医学技术领域,所述检测方法,包括:采用免疫组化方法对正常组织和待测样本组织分别进行染色,分别检测染色浓度和染色范围;根据所述的染色浓度和染色范围分别得到染色浓度分数和染色范围分数;分别计算所述染色浓度分数和染色范围分数的乘积,分别记作染色指数SI;根据所述的染色指数SI,获得NOSIP蛋白表达量。本发明提供的检测方法能够科学的检测NOSIP蛋白表达量,发现NOSIP蛋白在LIHC中高表达,NOSIP是LIHC远处转移的重要标志物。



1. 一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法,其特征在于,包括:采用免疫组化方法对正常组织和待测样本组织分别进行染色,分别检测染色浓度和染色范围;根据所述的染色浓度和染色范围分别得到染色浓度分数和染色范围分数;分别计算所述染色浓度分数和染色范围分数的乘积,分别记作染色指数SI;根据所述的染色指数SI,获得NOSIP蛋白表达量;

所述染色浓度分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色浓度分数为0分时,染色浓度显示为阴性;当所述染色浓度分数为1分时,染色浓度显示为弱;当所述染色浓度分数为2分时,染色浓度显示为中等;当所述染色浓度分数为3分时,染色浓度显示为强;

所述染色范围分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色范围分数为0分时,染色范围为0%;当所述染色范围分数为1分时,染色范围为1%~10%;当所述染色范围分数为2分时,染色范围为11%~50%;当所述染色范围分数为3分时,染色范围为51%~100%;

当所述染色指数SI>1时,NOSIP蛋白高表达;当所述染色指数SI≤1时,NOSIP蛋白低表达。

2. 根据权利要求1所述的检测方法,其特征在于,所述染色的方法包括:取正常组织或待测样本组织,与NOSIP抗体进行第一孵育后,再与生物素标记的第二抗体进行第二孵育后,再与链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶进行第三孵育后,以DAB为显色剂进行显色,再用苏木精复染。

3. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述第一孵育的温度为3℃~5℃;所述第一孵育的时间为8h~12h。

4. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述第二孵育的温度为35℃~38℃;所述第二孵育的时间为8min~12min。

5. 根据权利要求2所述的检测方法,其特征在于,所述第三孵育的温度为35℃~38℃;所述第三孵育的时间为8min~12min。

6. 根据权利要求1~5任意一项所述的检测方法,其特征在于,所述正常组织为癌旁肝组织和正常肝组织。

7. 根据权利要求1~5任意一项所述的检测方法,其特征在于,所述待测样本组织为肝癌组织。

## 一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及生物医学技术领域,具体涉及一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法。

### 背景技术

[0002] 肝癌即肝脏恶性肿瘤,可分为原发性和继发性两大类。原发性肝脏恶性肿瘤起源于肝脏的上皮或间叶组织,前者称为原发性肝癌,是我国高发的,危害极大的恶性肿瘤;后者称为肉瘤,与原发性肝癌相比,较为少见。继发性或称转移性肝癌系指全身多个器官起源的恶性肿瘤侵犯至肝脏。一般多见于胃、胆道、胰腺、结直肠、卵巢、子宫、肺、乳腺等器官恶性肿瘤的肝转移。

[0003] 现有技术中已有对肝癌的分类和分期的报道,但现有技术中并未发现有关对肝癌组织中NOSIP蛋白表达的报道。

### 发明内容

[0004] 有鉴于此,本发明的目的在于提供一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法。

[0005] 为了实现上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0006] 本发明提供了一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法,包括:采用免疫组化方法对正常组织和待测样本组织分别进行染色,分别检测染色浓度和染色范围;根据所述的染色浓度和染色范围分别得到染色浓度分数和染色范围分数;分别计算所述染色浓度分数和染色范围分数的乘积,分别记作染色指数SI;根据所述的染色指数SI,获得NOSIP蛋白表达量;

[0007] 所述染色浓度分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色浓度分数为0分时,染色浓度显示为阴性;当所述染色浓度分数为1分时,染色浓度显示为弱;当所述染色浓度分数为2分时,染色浓度显示为中等;当所述染色浓度分数为3分时,染色浓度显示为强;

[0008] 所述染色范围分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色范围分数为0分时,染色范围为0%;当所述染色范围分数为1分时,染色范围为1%~10%;当所述染色范围分数为2分时,染色范围为11%~50%;当所述染色范围分数为3分时,染色范围为51%~100%;

[0009] 当所述染色指数 $SI > 1$ 时,NOSIP蛋白高表达;当所述染色指数 $SI \leq 1$ 时,NOSIP蛋白低表达。

[0010] 优选地,所述染色的方法包括:取正常组织或待测样本组织,与NOSIP抗体进行第一孵育后,再与生物素标记的第二抗体进行第二孵育后,再与链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶进行第三孵育后,以DAB为显色剂进行显色,再用苏木精复染。

[0011] 优选地,所述第一孵育的温度为 $3^{\circ}\text{C} \sim 5^{\circ}\text{C}$ ;所述第一孵育的时间为 $8\text{h} \sim 12\text{h}$ 。

[0012] 优选地,所述第二孵育的温度为 $35^{\circ}\text{C} \sim 38^{\circ}\text{C}$ ;所述第二孵育的时间为 $8\text{min} \sim 12\text{min}$ 。

[0013] 优选地,所述第三孵育的温度为 $35^{\circ}\text{C}\sim 38^{\circ}\text{C}$ ;所述第三孵育的时间为 $8\text{min}\sim 12\text{min}$ 。

[0014] 优选地,所述正常组织为癌旁肝组织和正常肝组织。

[0015] 优选地,所述待测样本组织为肝癌组织。

[0016] 本发明提供了一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法。本发明提供的检测方法能够科学的检测NOSIP蛋白表达量,发现NOSIP蛋白在LIHC中高表达,NOSIP是LIHC远处转移的重要标志物。

## 附图说明

[0017] 图1为肝组织中NOSIP免疫组化染色结果;其中,A示NOSIP在肝细胞中染色为阴性,B示NOSIP在肝癌细胞膜、细胞浆中中等表达,C示NOSIP在肝癌细胞浆中强表达。

## 具体实施方式

[0018] 本发明提供了一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法,包括:采用免疫组化方法对正常组织和待测样本组织分别进行染色,分别检测染色浓度和染色范围;根据所述的染色浓度和染色范围分别得到染色浓度分数和染色范围分数;分别计算所述染色浓度分数和染色范围分数的乘积,分别记作染色指数SI;根据所述的染色指数SI,获得NOSIP蛋白表达量;

[0019] 所述染色浓度分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色浓度分数为0分时,染色浓度显示为阴性;当所述染色浓度分数为1分时,染色浓度显示为弱;当所述染色浓度分数为2分时,染色浓度显示为中等;当所述染色浓度分数为3分时,染色浓度显示为强;

[0020] 所述染色范围分数分为0分、1分、2分和3分;当所述染色范围分数为0分时,染色范围为0%;当所述染色范围分数为1分时,染色范围为 $1\%\sim 10\%$ ;当所述染色范围分数为2分时,染色范围为 $11\%\sim 50\%$ ;当所述染色范围分数为3分时,染色范围为 $51\%\sim 100\%$ ;

[0021] 当所述染色指数 $SI>1$ 时,NOSIP蛋白高表达;当所述染色指数 $SI\leq 1$ 时,NOSIP蛋白低表达。

[0022] 在本发明中,根据染色浓度得到染色浓度分数时,染色为棕色时,染色浓度为强;染色为深黄色时,染色浓度为中等;染色为浅黄色时,染色浓度为弱。

[0023] 在本发明中,所述NOSIP蛋白的表达量与肿瘤远处转移、病理类型和年龄显著相关。

[0024] 在本发明中,所述NOSIP蛋白的表达量用于肿瘤分级和肿瘤分期。

[0025] 在本发明中,所述染色的方法优选包括:取正常组织或待测样本组织,与NOSIP抗体进行第一孵育后,再与生物素标记的第二抗体进行第二孵育后,再与链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶进行第三孵育后,以DAB为显色剂进行显色,再用苏木精复染。

[0026] 本发明对所述正常组织、待测样本组织、NOSIP抗体、生物素标记的第二抗体、链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶、DAB显色剂和苏木精的来源没有特殊限定,采用常规市售产品即可。

[0027] 在本发明中,所述第一孵育的温度优选为 $3^{\circ}\text{C}\sim 5^{\circ}\text{C}$ ,更优选为 $4^{\circ}\text{C}$ ;所述第一孵育的时间优选为 $8\text{h}\sim 12\text{h}$ ,更优选为 $10\text{h}$ 。

[0028] 在本发明中,所述第二孵育的温度优选为35℃~38℃,更优选为37℃;所述第二孵育的时间优选为8min~12min,更优选为10min。

[0029] 在本发明中,所述第三孵育的温度优选为35℃~38℃,更优选为37℃;所述第三孵育的时间优选为8min~12min,更优选为10min。

[0030] 在本发明中,所述正常组织优选为癌旁肝组织和正常肝组织;所述待测样本组织优选为肝癌组织。

[0031] 下面将结合本发明中的实施例,对本发明中的技术方案进行清楚、完整地描述。显然,所描述的实施例仅仅是本发明一部分实施例,而不是全部的实施例。基于本发明中的实施例,本领域普通技术人员在没有做出创造性劳动前提下所获得的所有其他实施例,都属于本发明保护的范围。

[0032] 实施例1

[0033] 一、材料和方法

[0034] 1、病人和组织样本

[0035] 为了做免疫组化检测,从西安艾丽娜生物科技公司购买组织芯片LV1221,为临床IV期为主型肝原发癌及转移癌组织组合微阵列,包含癌旁组织5例,肝原发癌71例和肝转移癌22例;以及组织芯片LVN241,包含24例正常肝组织。

[0036] 临床样本的信息详见表1。病人包括60名男性和33名女性,年龄在27岁到76岁之间,平均年龄为54.8岁。本发明的组织病理学分级和临床分期是根据世界卫生组织(WHO)和第六版的pTNM国际抗癌联盟(UICC,2002)的标准来定义的。由两位高级病理学家对所有肿瘤的组织学类型和分级重新进行了评估。

[0037] 2、免疫组化

[0038] 福尔马林固定的石蜡包埋的组织芯片(5μm)60℃烤片30min,常规脱蜡后复水,以Tris-EDTA(PH8.0)微波修复抗原,冷却至室温,三羟甲基氨基甲烷(Tris)盐缓冲液,PBS洗5分钟×3次;用3%H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-甲醇封闭内源性过氧化物酶,室温10分钟,PBS洗5分钟×3次;滴加正常非免疫动物血清,室温10分钟。除去血清,滴加一抗NOSIP(1:25),4℃过夜;用0.1%Tween-20PBS洗5分钟×3次;滴加生物素标记的羊抗鼠/兔IgG,37℃孵育10分钟;用0.1%Tween-20 PBS洗5分钟×3次;滴加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶,37℃孵育10分钟;DAB显色5分钟,蒸馏水洗终止显色;苏木素复染、水洗、分化后充分水洗返蓝;常规脱水透明,中性树胶封片。用正常血清孵育的样本作为阴性对照。

[0039] 3、免疫染色评估

[0040] 由两位病理学家对临床指标未知的每张切片的5个区域进行独立的评估和确认。如果二人意见不一致,他们将使用双透镜对标本重新进行评估,直到最后双方无异议。染色浓度被分别被评为0分(阴性)、1分(弱)、2分(中等)、和3分(强)。染色范围分别被评为0分(0%)、1分(1-10%)、2分(11-50%)和3分(51-100%)。染色指数(Staining index,SI)=染色浓度分数×染色范围分数。根据上述评估方法,通过确定正常膀胱上皮和恶性病灶的SI来评估NOSIP的表达,得到其SI分别为0、1、2、3、4、6和9分。为了统计评估,当肿瘤的最终SI>1分时,本发明认为NOSIP高表达。

[0041] 4、统计学分析

[0042] 用x<sup>2</sup>检验评估NOSIP蛋白在肿瘤组织和对照组织中的表达和NOSIP蛋白表达与临

床病理参数之间相的关系的显著性。用SPSS 11.0软件进行统计分析。 $P < 0.05$ , 认为有显著差异。

## [0043] 二、结果

### [0044] 1、NOSIP蛋白在LIHC病人中高表达

[0045] 为了分析NOSIP在肝癌和正常肝组织间的表达差异, 本发明用免疫组化方法检测了93例肝癌患者的石蜡切片和24例正常肝组织、5例癌旁肝组织的石蜡切片。癌旁和正常肝组织多为阴性表达或弱阳性表达(图1A)。29%肝癌组织中NOSIP有高表达( $p < 0.05$ )。值得注意的是, NOSIP染色主要集中在肝癌细胞的细胞膜和细胞质内(图1B-1C)。

### [0046] 2、NOSIP蛋白表达和临床病理特征的相关性

#### [0047] 表1 LIHC病人NOSIP表达和临床病理特征之间的相关性

[0048]

分组	总数	NOSIP 表达		P 值
		低表达(n)	高表达(n)	
<b>性别</b>				0.841
男	60	43	17	
女	33	23	10	
<b>年龄</b>				0.024
<55 岁	32	18	14	
≥55 岁	61	48	13	
<b>远处转移</b>				0.000
转移	21	6	15	
无转移	72	60	12	
<b>病理分型</b>				0.000
肝细胞肝癌	36	18	18	
肝胆管细胞癌	50	49	8	
混合性肝细胞肝癌	3	3	0	
<b>肿瘤分级</b>				0.218
I	11	9	2	
II	34	26	8	
III	21	20	1	
<b>肿瘤分期</b>				1.000
I, II	3	3	0	
III, IV	69	58	11	
<b>淋巴结转移</b>				0.585
阳性	66	55	11	
阴性	7	7	0	

[0049] 由表1可知,NOSIP蛋白高表达与肿瘤远处转移( $p<0.001$ )、肿瘤组织分型( $p<0.001$ )、和年龄( $p=0.024$ )显著相关。50%的肝细胞肝癌中NOSIP高表达,16%%的肝胆管细胞癌中NOSIP高表达。然而,NOSIP的蛋白表达与其他临床病理特征如性别、肿瘤分期、分级、淋巴结转移等并不相关。

[0050] 以上所述仅是本发明的优选实施方式,应当指出,对于本技术领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明原理的前提下,还可以做出若干改进和润饰,这些改进和润饰也应视为本发明的保护范围。

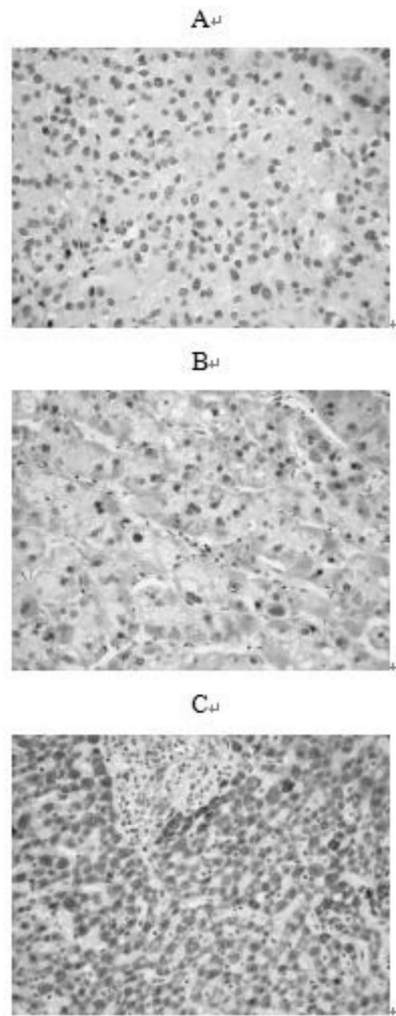


图1



专利名称(译)	一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN110658335A</a>	公开(公告)日	2020-01-07
申请号	CN201910858916.3	申请日	2019-09-11
[标]申请(专利权)人(译)	蚌埠医学院		
申请(专利权)人(译)	蚌埠医学院		
当前申请(专利权)人(译)	蚌埠医学院		
[标]发明人	马佳 夏俊 王志伟		
发明人	马佳 夏俊 王志伟 张语捷		
IPC分类号	G01N33/535 G01N33/574		
CPC分类号	G01N33/535 G01N33/57438 G01N33/57496		
代理人(译)	马云华		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明提供了一种非诊断目的的NOSIP蛋白表达量的检测方法，涉及生物医学技术领域，所述检测方法，包括：采用免疫组化方法对正常组织和待测样本组织分别进行染色，分别检测染色浓度和染色范围；根据所述的染色浓度和染色范围分别得到染色浓度分数和染色范围分数；分别计算所述染色浓度分数和染色范围分数的乘积，分别记作染色指数SI；根据所述的染色指数SI，获得NOSIP蛋白表达量。本发明提供的检测方法能够科学的检测NOSIP蛋白表达量，发现NOSIP蛋白在LIHC中高表达，NOSIP是LIHC远处转移的重要标志物。

