

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 200410047032.3

[51] Int. Cl.

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 33/535 (2006.01)

A61B 10/00 (2006.01)

G01N 1/28 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 4 月 30 日

[11] 授权公告号 CN 100385238C

[22] 申请日 2004.12.10

[21] 申请号 200410047032.3

[73] 专利权人 中南大学肿瘤研究所

地址 410078 湖南省长沙市湘雅路 88 号

[72] 发明人 李桂源 周后德 周 鸣 李小玲

沈守荣 赵 谨 熊 炜

[56] 参考文献

CN1482244A 2004.3.17

CN1403820A 2003.3.19

CN1482243A 2004.3.17

CN1464069A 2003.12.31

人鼻咽组织特异性表达基因 NASG 编码产物在细胞中的融合表达. 张必成等. 生命科学
研究, 第 7 卷第 1 期. 2003

审查员 唐 莉

[74] 专利代理机构 湖南兆弘专利事务所

代理人 张美娟 谢新元

权利要求书 1 页 说明书 8 页 附图 2 页

[54] 发明名称

鼻咽组织特异性基因编码蛋白的检测试剂盒、制备及其应用

[57] 摘要

本发明涉及一种分泌性蛋白的免疫检测。首先根据鼻咽组织特异性基因 NASG 的氨基酸序列, 设计一段多肽制备兔抗人多肽抗体, 同时用 NASG 的融合蛋白制备兔抗人的融合蛋白抗体, 以纯化的 NASG 重组蛋白作标准品, 经双抗体夹心法制备 NASG 蛋白的 ELISA 检测试剂盒, 从鼻咽部取病人分泌物进行 ELISA 检测, 定量检测各人群鼻咽分泌物中 NASG 的蛋白表达量, 对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。研究表明, 该试剂盒对初诊病人的诊断准确率与病理结果一致, 该检测快速、无创, 不仅可用于鼻咽癌的诊断, 而且适用于鼻咽癌的早期大规模人群筛查与患病风险预测, 为鼻咽癌的早期诊断与防治提供了强有力的技术支

1、一种鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG 的检测试剂盒，包括包被有抗体的酶标板、酶标二抗、通用试剂 Tween-20 和显色底物四甲基联苯胺 TMB，其特征在于该试剂盒的酶标板孔内为经包被液处理和阻滞液处理的 NASG 全长融合蛋白抗体，另配备有辣根过氧化物酶 HRP 标记的兔抗人 NASG 21 肽抗体，21 肽氨基酸序列为：Cys, Lys, Val, The, Asp, Pro, Gln, Leu, Leu, Glu, Leu, Gly, Leu, Val, Gln, Se, Pro, Asp, Gly, His, Arg。

2、按权利要求 1 所述的一种鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG 的检测试剂盒，其特征在于试剂盒酶标板孔内的 NASG 全长融合蛋白抗体的浓度为 $1\mu\text{g/ml}$ 。

3、一种如权利要求 1 所述的鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG 的检测试剂盒的制备方法，包括兔抗人 NASG 21 肽抗体的制备，兔抗人 NASG 全长融合蛋白抗体的制备，其特征在于：

(1)、制备兔抗人 NASG 21 肽抗体时，根据 NASG 的氨基酸序列，设计并合成的 21 个氨基酸多肽经免疫家兔制备抗体；

(2)、将兔抗人 NASG 全长融合蛋白抗体，用包被缓冲液稀释至 $1\mu\text{g/ml}$ 加入到酶标板孔内， 4°C 包被过夜；

(3)、倒去未包被的液体，用含 0.1%Tween-20 的磷酸盐缓冲液—PBST 冲洗后加入含 0.5%牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液， 37°C 孵育 1 小时，PBST 洗脱，放 4°C 保存备用。

鼻咽组织特异性基因编码蛋白的检测试剂盒、制备及其应用

技术领域:

本发明涉及生物物质的免疫学检测,具体涉及一种分泌性蛋白的检测。

背景技术:

鼻咽癌(NPC)是我国南方常见的恶性肿瘤,广东为高发区。鼻咽癌是指鼻咽粘膜上皮发生的癌肿,大多为低分化鳞癌,其恶性度高,发病部位隐蔽,特别是在咽隐窝和鼻咽顶部者,早期症状不明显,因而难以早期发现,误诊误治率较高,可达12.2%,因而在确诊的鼻咽癌中,其5年生存率长期徘徊在50%~60%左右。对鼻咽癌进行早期诊断以便早期治疗,提高患者的生存率一直是NPC临床研究的重要课题之一。目前对鼻咽癌早期的检测方法有多种,包括有:EB病毒血清学标记物如病毒壳抗原-免疫球蛋白A(EBVCA 2IgA)、EB病毒潜伏膜蛋白、EB病毒早期复合抗原(EBV 2-EA) IgG 的抗体检测,鼻咽癌相关肿瘤标记物如白细胞介素、肿瘤坏死因子、细胞间黏附分子、CYFRA 2121 以及端粒酶等的检测。虽然这些指标的单独或联合应用为鼻咽癌的诊断提供了有用的信息,然而它们均缺乏足够的灵敏度与特异性。我们知道,EB病毒不但与鼻咽癌的发生有关,而且与Burkitt淋巴瘤、上呼吸道的感染等密切相关,近来也有报道在各种T 细胞淋巴瘤中检测到EB病毒 DNA,因而鼻咽癌患者EB病毒抗体与病理确诊相比阳性符合率仅为72.6%~77.3%。而且并非所有鼻咽癌的发生均与EB病毒相关,90%以上人群在成年前都感染过EBV,在NPC患者血清中检测到EBV 也并不能证明EBV 直接与NPC有关。因此,虽然EB病毒相关抗体滴度与鼻咽癌的发生、发展有很高的相关性,其检测方法也有优越性,但仍然只能作为一种相关指标而起提示作用,不能用来作为鼻咽癌的确诊指标。如果缺少病理诊断,即使EB 病毒相关抗体滴度再高,也难以作为实施放疗和化疗的依据。除了对晚期鼻咽癌的病理学诊断外,目前尚没有其他的早期、无创性检查方法;即使是病理学诊断,也难以一次性取到病变组织,无法避免对微小病灶的多次有创性取样。鼻咽癌非典型病灶型或粘膜下型的病例虽经多次活检,常因无病理切片阳性结果而延误治疗;对于放疗后的病例,当其鼻咽组织表现不典型时,在判断其病变是复发还是放疗反应上,也左右为难,尤其是某些放疗后出现颅脑症状的患者,各项检查(包括病理检查)都很难准确判断到底是放射性脑病还是癌灶向颅内发展,极大地影响治疗决策。综上所述,建立一种能对鼻咽癌患者进行筛查、诊断的无创性检测方法,对鼻咽癌的早期筛查、诊断、预防及治疗等具有重要意义。

通过抑制性消减杂交联合cDNA 微阵列技术,我们克隆了上呼吸道特异性表达的鼻咽

癌易感基因候选者——NASG, (专利申请号: 02139605.1, 基因序列登录号: AF439448)。我们通过对新克隆的NASG基因(又称SPLUNC基因)的结构与功能进行分析, 发现NASG蛋白是一种分泌性蛋白, 在正常人及鼻咽部慢性炎症患者的鼻咽组织中表达丰富, 而在鼻咽癌患者的鼻咽组织中表达显著下调。因而如何通过检测NASG蛋白的含量以及如何无创伤地获取NASG蛋白则是建立早期、无创伤检测需要解决的问题。

发明内容:

本发明旨在通过制备一种NASG蛋白检测试剂盒, 从鼻咽部取得分泌物检测NASG蛋白的含量从而实现对早期鼻咽癌患者的无创伤快速诊断。

实现上述发明目的的技术方案为:

一种鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG 的检测试剂盒, 包括包被好的酶标板、HRP 标记二抗, 通用试剂 Tween-20 和显色底物四甲基联苯胺 TMB, 该试剂盒的酶标板孔内为经包被液处理和阻滞液处理的 NASG 融合蛋白抗体, 另配备有辣根过氧化物酶 HRP 标记的兔抗 NASG 多肽抗体; 试剂盒酶标板孔内的 NASG 融合蛋白抗体的浓度以 1mg/ml 为佳。鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG 的检测试剂盒的制备方法, 包括兔抗人多肽抗体的制备, 兔抗人 NASG 融合蛋白抗体的制备, (1)、制备兔抗人多肽抗体时, 根据 NASG 的氨基酸序列, 设计并合成 21 个氨基酸的多肽序列为: Cys, Lys, Val, The, Asp, Pro, Gln, Leu, Leu, Glu, Leu, Gly, Leu, Val, Gln, Ser, Pro, Asp, Gly, His, Arg; (2)、将兔抗人 NASG 融合蛋白抗体, 用包被缓冲液稀释至 1 μ g/ml 加入到酶标板孔内, 4℃包被过夜; (3)、倒去未包被的液体, 用含 0.1%Tween-20 磷酸盐缓冲液 PBST 冲洗后加入含 0.5% 牛血清蛋白的磷酸盐缓冲液 PBST, 37℃孵育 1 小时, PBST 洗脱, 放 4℃保存备用。

鼻咽组织特异性基因编码蛋白测验试剂盒应用于作为鼻咽癌早期诊断指标的人体鼻咽分泌物中 NASG 蛋白含量的检测方法为:

(1)、鼻咽分泌物的获取: 生理盐水冲洗鼻腔, 用细棉签在鼻视镜下插到鼻咽部, 放置 5~8 分钟, 取出棉签, 将棉球放入底部空心、外套有离心收集管的小离心管中, 在 4℃下 7500xg 离心获取鼻咽分泌物;

(2)、将获取的抗原-鼻咽分泌物按 1: 10 用生理盐水稀释后, 加入到若干个试剂盒的酶标板孔中, 同时在若干个未加待测抗原的酶标板孔内加入纯化的 NASG 基因重组蛋白做标准样; 37℃条件下, 在 100 转/分钟的摇床中孵育 3 小时, 用 PBST 洗去未结合的鼻咽分泌物, 吸干残余液体;

(3) 将HRP标记的兔抗人NASG多肽抗体加入到已加抗原的酶标板中, 孵育后洗去未

结合抗体,加入显色底物TMB,室温放置20分钟,加入到2M的硫酸终止反应,在酶标仪420nm的波长读数、计量;

(4) 将测得的浓度与正常人群鼻咽分泌物中 NASG 浓度对比,判断患者鼻咽分泌物中蛋白含量的高低。

附图说明

下面结合附图进一步详述本发明:

图1为从大肠杆菌中诱导的NASG-GST融合蛋白;

图2为抗体包被到酶标板后制备的ELISA检测试剂盒;

图3为 Western blot 检测 NASG 在正常鼻咽分泌物和鼻咽癌分泌物中的表达;

1, 3, 4: 鼻咽癌患者鼻咽分泌物; 2, 5-8: 正常人及慢性炎症病人鼻咽分泌物

图4为 NASG 在正常鼻咽组织和鼻咽癌活检标本中的表达

A: Northern blot, I 鼻咽癌组织, II 正常组织,

B: RT-PCR; .1, 2. 正常成人鼻咽 3. 人胚鼻咽

4. HNE1 5~8. NPC 活检标本

一、NASG (SPLUNC) 的ELISA试剂盒的制备:

1、NASG (SPLUNC) 抗体的制备:

1)、制备兔抗人的多肽抗体:

①、根据 NASG 的氨基酸序列,设计并化学合成 21 个氨基酸的 NASG 多肽,该多肽的序列为: Cys, Lys, Val, The, Asp, Pro, Gln, Leu, Leu, Glu, Leu, Gly, Leu, Val, Gln, Ser, Pro, Asp, Gly, His, Arg, 将多肽与钥孔戚血蓝素 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 交联以增加免疫原性。

②、将多肽溶于磷酸盐 (PBS) 缓冲液,注射至新西兰家兔,首次剂量为 $300 \mu\text{g/kg}$,加强免疫的剂量约为首次剂量的 $1/4$ 左右。每 2~3 周加强免疫一次,共免疫 4 次,获得的抗血清用 Pierce 公司的亲和层析纯化试剂盒(具体步骤严格按 Pierce 公司的说明书进行)纯化出抗 NASG (PLUNC) 的 IgG (NASG 抗体 1);

2)、制备兔抗人的 NASG 融合蛋白抗体

①、PCR 扩增 NASG 的全长,将其克隆至带 GST 靶标志的原核表达载体 PGEX,转化大肠杆菌 JM109,于 30°C 下用异丙基- β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导 NASG 蛋白的表达,用发玛西亚公司的 GST 蛋白纯化试剂盒纯化出 NASG-GST 融合蛋白(图 1)(具体操作严格按照公司的说明书进行)。

②、用该融合蛋白免疫新西兰白兔,制备兔抗人的抗体 (NASG 抗体 2) 并用亲和层

析纯化（方法同前述多肽抗体）。

3)、多肽融合蛋白抗体的效价与特异性检测

①、将合成的多肽用包被缓冲液（称取 8.4 克碳酸氢钠，3.56 克碳酸钠溶于 1 升去离子水中，调 PH 值至 9.50）溶解为 10 μ g/ml，按 100 μ l/孔加到 96 孔酶标板，4℃过夜。

②、取出酶标板，倒掉包被缓冲液，含 0.1%Tween-20 的 PBS（PBST）冲洗 3 遍，加入 200 μ l 阻滞液（含 1%牛血清白蛋白的 PBST）阻止非特异性结合位点，37℃孵育 1 小时，PBST 洗脱 2 次。

③、按 1: 500; 1: 1000; 1: 2000; 1: 5000; 1: 10000; 1: 100000; 1: 1000000 共 7 个稀释度（稀释液：在一升去离子水中溶解 80 克氯化钠，11.6 克磷酸氢二钠，2 克磷酸二氢钾，2 克氯化钾，调 PH 值至 7.2）加入前面两种 NASG 抗血清。37℃孵育 1 小时，PBST 洗 3 次。

④、加入辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗，37℃孵育 45 分钟，PBST 洗 5 次。

⑤、混合 6ml 四甲基联苯胺(TMB)试剂 A 与 6ml TMB 试剂 B, 100 μ l/孔加入到 96 孔板，室温孵育 15 分钟，可见抗体检测阳性的孔呈蓝色，我们制备抗体的效价可达到 1: 1000000。

⑥、取鼻咽分泌物及鼻咽癌细胞株裂解液(50mM Tris, 150mM NaCl, 1mM 乙二胺四乙酸二钠, 1% Triton X-100, PH:8.0)，进行 SDS-PAGE 电泳，转移至硝酸纤维素膜，按常规程序进行 Western blot 分析，ECL 发光，放射自显影，常规洗片。可见鼻咽分泌物及鼻咽癌细胞株裂解液中仅有一条目的条带，说明我们所制作的抗体具有高度的特异性。

2、NASG 的 ELISA 检测试剂盒的制备

1)、包被抗体和酶标抗体工作浓度的选择

按照 Pierce 公司的 BCA 蛋白浓度测定试剂盒说明书操作，测定抗体及抗原的浓度。然后采用标准的棋盘测定方法，用包被缓冲液（配方同前）将 NASG 融合蛋白抗体（抗体 2）稀释至浓度为 10、1、0.1 μ g/ml，分别在 ELISA 板上包被，每一浓度包括三个纵行，4℃过夜，PBST 洗涤 3 次。在其中一个横行的各包被孔中加入强阳性抗原液（10 μ g/ml 的 NASG-GST 融合蛋白），另一横行中加入弱阳性抗原液（0.001 μ g/ml 的 NASG-GST 融合蛋白），第三行加入阴性对照。37℃保温 2 小时，PBST 洗涤 4 次。加入 HRP 标记的 NASG 多肽抗体（酶标抗体 1），37℃保温 1 小时，PBST 洗涤 3 次。加入 TMB 底物，室温放置 15 分钟，加入终止液（2M H_2SO_4 ），酶标仪上读数，从而选择包被抗体的浓度为 1 μ g/ml。

2)、试剂盒的批量制备

①、将兔抗人的 NASG 融合蛋白抗体用包被缓冲液稀释至 1 μ g/ml，将其加入到 96 孔

酶标板, 4℃包被过夜。

②、倒去未包被的液体, 含 0.1%Tween-20 的 PBS (PBST) 冲洗 3 遍, 加入 200ul 阻滞液阻止非特异性结合位点, 37℃孵育 1 小时, PBST 洗脱 2 次。放 4℃批量保存备用 (图 2)。

③、试剂盒的其它试剂如 HRP 标记的兔抗 NASG 抗体按用量分装, 通用试剂如 Tween-20, TMB 从 Pierce 公司购置并分装。

3)、灵敏性、特异性、稳定性的检测

①、将 NASG 蛋白用 PBS 稀释成 200ug/ml, 100ug/ml, 50ug/ml, 25ug/ml, 10ug/ml, 2ug/ml, 0.5ug/ml, 0.05ug/ml, 0.01ug/ml, 0ug/ml, 每孔 100ul 加入到上述包被好的酶标板中, 37℃孵育 2 小时。含 0.1%Tween-20 的 PBS (PBST) 冲洗 3 遍。

②、按 1: 1000 将 HRP-NASG 抗体稀释, 每孔加入 100ul, 37℃孵育 1 小时, PBST 洗 4 遍。

③、加入 100ul TMB 底物室温放置 15 分钟, 加入 2M 的硫酸, 420nm 波长的酶标仪下读数。

④、检测最低的 NASG 抗原的量, 我们的结果显示, 该试剂能检测出 0.01ug/ml NASG 蛋白的浓度, 说明我们的试剂盒具有较高的灵敏度。

二、NASG (SPLUNC) 的 ELISA 试剂盒的检测步骤:

1、鼻咽分泌物的取材方法: 用生理盐水冲洗鼻腔后, 将一根细棉签在鼻视镜下插到鼻咽部 (肿瘤表面), 放置 5-8 分钟后, 快速取出棉签, 将棉球放入底部空心的小离心管, 离心管外再套上离心收集管, 在 4℃下 7500×g 离心 1 分钟, 就可获得鼻咽分泌物。该方法为无创性取材, 能普遍被人接受。

2、纯化的 NASG 基因重组蛋白作为标准品, 将抗原 (鼻咽分泌物) 按 1: 10 稀释后, 加入到前面已包被好的酶标板中, 37℃摇床以 100 转/分钟的速度孵育 3 小时, 用洗板液洗去未结合的抗原。

3、PBST 洗板 3-4 次, 吸干残余液体, 加入 HRP 标记的兔抗人的 NASG 多肽抗体孵育, 洗去未结合的抗体, 加入显色底物 TMB, 室温放置 20 分钟, 可见各孔显示不同深度的蓝色 (附图 2), 加入 2M 的硫酸终止反应, 酶标仪在 420nm 波长读数, 计算样本中 NASG 蛋白的含量。可得到在正常人群的鼻咽分泌物中 NASG 蛋白的浓度为 30-80ug/ml, 而鼻咽癌患者鼻咽分泌物中 NASG 蛋白的浓度为小于 5ug/ml。

4、通过该方法我们检测了 80 例鼻咽癌患者鼻咽分泌物中的 NASG 蛋白的含量, 仅两例放疗后的鼻咽癌患者鼻咽分泌物中 NASG 蛋白含量大于 5ug/ml, 因而诊断鼻咽癌的准确率达到 90%以上, 利用鼻咽分泌物中的 NASG 蛋白含量来对鼻咽癌作出早期、快速的无创

性诊断,具有良好的特异性。

5、取同一正常人及鼻咽癌患者的鼻咽分泌物,利用本方法进行 ELISA 测定,每天测定一次,共重复 10 次,按公式变异系数(CV)= $S/X \times 100\%$ (S 为标准差, X 为平均值)计算批间及批内变异系数,可得批内与批间变异系数分别为 4.63%和 4.98%。说明该检测方法稳定性好。

我们经过多年的研究,不但克隆了鼻咽组织特异性表达的鼻咽癌抑瘤基因,而且证明了其作为一种分泌性蛋白,能在鼻咽分泌物中检测出。因此,我们制备了抗 NASG(SPLUN1)的抗体,进一步经双抗体夹心法制备 NASG 蛋白的 ELISA 检测试剂盒,从鼻咽部取分泌物进行 ELISA 检测,定量检测各人群鼻咽分泌物中 NASG 蛋白表达量,从而预测鼻咽癌的患病风险,筛查易感者,并对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。初步研究结果表明,该试剂盒对门诊初诊病人的诊断准确率与病理结果一致(图 3),该检测快速、对患者不造损伤,病人及正常人均可接受;同时我们发现鼻咽癌患者正常侧鼻咽部分泌物中的 NASG 蛋白表达也发生下调,结合我们对 NASG 基因的生物信息学分析,说明 NASG 表达下调为鼻咽癌发生的早期事件(图 4),因而该项研究不但可用于鼻咽癌的早期诊断,而且适用于鼻咽癌的早期大规模人群筛查与患病风险预测,为鼻咽癌的早期诊断与防治提供了强有力的技术支持。一方面,我们可以对鼻咽分泌物中 NASG 蛋白表达下调的人群进行早期的预防,从而降低发病率;另一方面,由于鼻咽癌的死亡原因大部分因肿瘤的晚期转移引起,利用该检测方法,我们可以在早期诊断鼻咽癌,做到早期诊断、早期治疗,从而降低病死率,提高患者的生活质量。因而,本研究具有极大的经济与社会价值,值得广泛的推广应用。

具体实施方法:

1、某一患者鼻咽部用生理盐水冲洗,按前述方法取患者右侧鼻咽分泌物 20ul,同时对患者行病理活检。将取得的鼻咽分泌物用 PBS 稀释成 200ul,开始利用本试剂盒对分泌物中的 NASG 蛋白进行定量检测;

2、冰箱取出已经包被好的酶标板,室温下放置 20 分钟,同时将标准品按如下浓度稀释:25ug/ml, 12.5ug/ml, 6.25ug/ml, 3.12ug/ml, 1.56ug/ml, 0.78ug/ml, 0.39ug/ml, 0ug/ml(空白对照),将稀释液各取 100ul 按下表中的顺序(下表中的 96 格即为酶标板中 96 孔)加入到酶标板;

3、取自正常人的鼻咽分泌物 10 倍稀释液(已定量,含 NASG 蛋白 6ug/ml)取 100ul 加入酶标板(标准孔),再加入病人的待测样本,各种样本均加双孔;

4、37℃摇床以 100 转/分钟的速度孵育 3 小时后,用洗板液洗去未结合的抗原,吸

干残余液体;

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	25	25	标准	标准								
B	12.5	12.5	病人	病人								
C	6.25	6.25										
D	3.12	3.12										
E	1.56	1.56										
F	0.78	0.78										
G	0.39	0.39										
H	0	0										

5、1: 1000 将 HRP-NASG 抗体稀释, 每孔加入 100ul, 37℃ 孵育 1 小时, PBST 洗 4 遍;

6、加入 100ul TMB 底物室温放置 15 分钟, 加入 2M 硫酸 (终止液), 420nm 波长的酶标仪下读数;

7、根据测得的 NASG 蛋白浓度乘稀释倍数, 得出该病人鼻咽分泌物中的 NASG 蛋白含量为 4.27ug/ml。表明该患者患有鼻咽癌, 两天后, 病理结果显示该患者为鼻咽低分化鳞癌。

<210> 1

<211> 256

<212>PRT

<213>鼻咽组织特异性基因编码蛋白 NASG

<220>

<400> 1

```

Met Phe Gln The Gly Gly Leu Ile Val Phe Tyr Gly Leu Leu Ala Gln
1          5          10          15
The Met Ala Gln Phe Gly Gly Leu Pro Val Pro Leu Asp Gln The Leu
20          25          30
Pro Leu Asn Val Asn Pro Ala Leu Pro Leu Ser Pro The Gly Leu Ala
35          40          45
Gly Ser Leu The Asn Ala Leu Ser Asn Gly Leu Leu Ser Gly Gly Leu
50          55          60
Leu Gly Ile Leu Glu Asn Leu Pro Leu Leu Asp Ile Leu Lys Pro Gly
65          70          75          80
Gly Gly The Ser Gly Gly Leu Leu Gly Gly Leu Leu Gly Lys Val The
85          90          95
Ser Val Ile Pro Gly Leu Asn Asn Ile Ile Asp Ile Lys Val The Asn
100         105         110
Pro Gln Leu Leu Glu Leu Gly Leu Val Gln Ser Pro Asp Gly His Arg
115         120         125
Leu Tyr Val The Ile Pro Leu Gly Ile Lys Leu Gln Val Asn The Pro
130         135         140
Leu Val Gly Ala Ser Leu Leu Arg Leu Ala Val Lys Leu Asp Ile The
145         150         155         160
Ala Glu Ile Leu Ala Val Arg Asp Lys Gln Glu Arg Ile His Leu Val
165         170         175
Leu Gly Asp Cys The His Ser Pro Gly Ser Leu Gln Ile Ser Leu Leu
180         185         190
Asp Gly Leu Gly Pro Leu Pro Ile Gln Gly Leu Leu Asp Ser Leu The
195         200         205
Gly Ile Leu Asn Lys Val Leu Pro Val Leu Val Gln Gly Asn Val Cys
210         215         220
Pro Leu Val Asn Glu Val Leu Arg Gly Leu Asp Ile The Leu Val His
225         230         235         240
Asp Ile Val Asn Met Leu Ile His Gly Leu Gln Phe Val Ile Lys Val
245         250         255

```

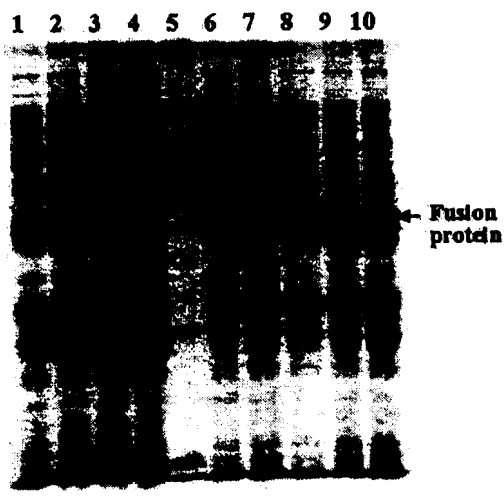


图 1

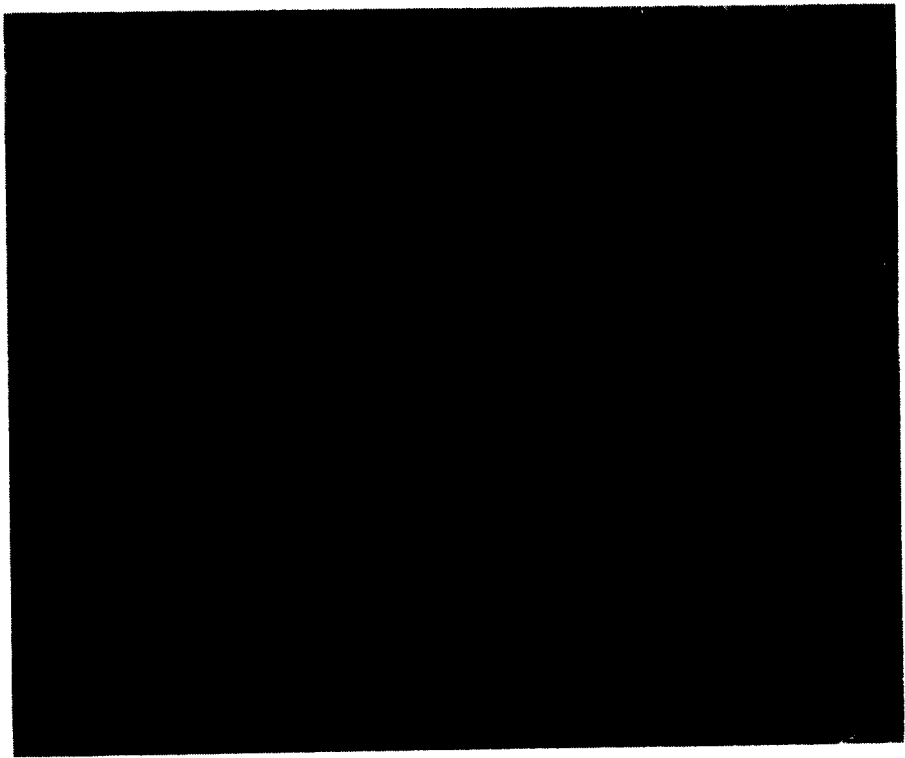


图 2

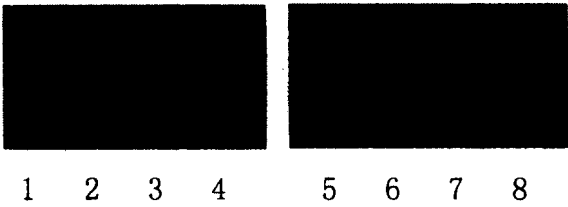


图 3

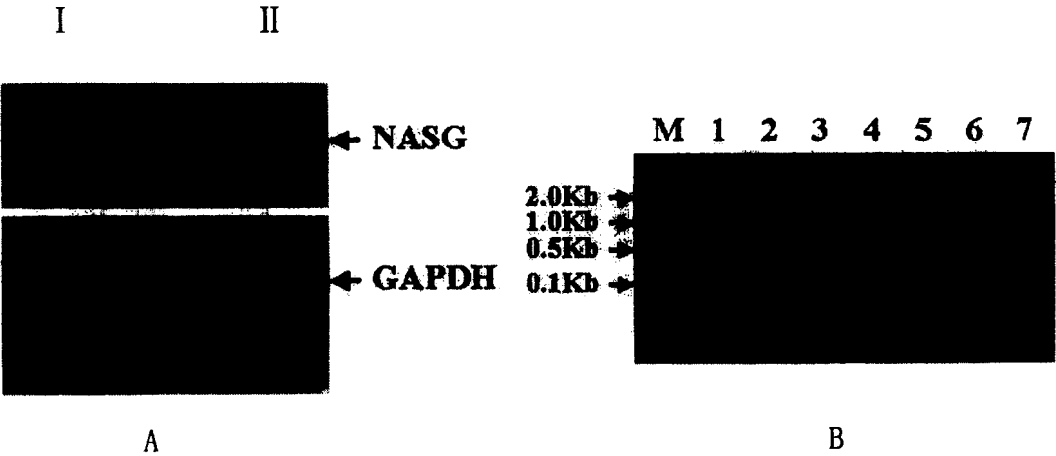


图 4

专利名称(译)	鼻咽组织特异性基因编码蛋白的检测试剂盒、制备及其应用		
公开(公告)号	CN100385238C	公开(公告)日	2008-04-30
申请号	CN200410047032.3	申请日	2004-12-10
[标]发明人	李桂源 周后德 周鸣 李小玲 沈守荣 赵谨 熊炜		
发明人	李桂源 周后德 周鸣 李小玲 沈守荣 赵谨 熊炜		
IPC分类号	G01N33/543 G01N33/535 A61B10/00 G01N1/28		
代理人(译)	张美娟 谢新元		
审查员(译)	唐莉		
其他公开文献	CN1624478A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种分泌性蛋白的免疫检测。首先根据鼻咽组织特异性基因NASG的氨基酸序列,设计一段多肽制备兔抗人多肽抗体,同时用NASG的融合蛋白制备兔抗人的融合蛋白抗体,以纯化的NASG重组蛋白作标准品,经双抗体夹心法制备NASG蛋白的ELISA检测试剂盒,从鼻咽部取病人分泌物进行ELISA检测,定量检测各人群鼻咽分泌物中NASG的蛋白表达量,对鼻咽癌患者做出早期、快速的无创性诊断。研究结果表明,该试剂盒对初诊病人的诊断准确率与病理结果一致,该检测快速、无创,不仅可用于鼻咽癌的诊断,而且适用于鼻咽癌的早期大规模人群筛查与患病风险预测,为鼻咽癌的早期诊断与防治提供了强有力的技术支持。

