



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102408478 A

(43) 申请公布日 2012.04.11

(21) 申请号 201010290758.5

(22) 申请日 2010.09.21

(71) 申请人 复旦大学

地址 200433 上海市邯郸路 220 号

(72) 发明人 施前 杨柳松 徐晓恩

(74) 专利代理机构 上海元一成知识产权代理事

务所(普通合伙) 31268

代理人 吴桂琴

(51) Int. Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 27/62 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 13 页

(54) 发明名称

一种人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白及其用途

(57) 摘要

本发明属生物技术和医学领域。涉及人少突神经胶质瘤标志物,具体涉及一种能区分临床上具有化疗敏感的、1P 等位基因杂合性缺失的人少突神经胶质瘤的蛋白标志物 MAP2 蛋白及其用途。本发明通过 iTRAQ-LC-MS/MS 技术,确定了能区分临床上具有化疗敏感的、1P 缺失的,少突神经胶质瘤的蛋白标志物 MAP2 蛋白。该 MAP2 蛋白具有 90% 的 1P 缺失预测准确度。该标志物不仅仅可以解释 1p 等位基因缺失的少突神经胶质瘤样品的化疗敏感的机制,也可以通过决策树模型预测 1p 等位基因缺失的少突神经胶质瘤病人的化疗敏感性。该 MAP2 蛋白可进一步制备临床试剂盒,为少突神经胶质瘤的诊断,预后,和治疗提供帮助。

1. 一种人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白,其特征在于,所述的 MAP2 蛋白其分子量为 199526Da。

2. 一种检测人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白的方法,其特征在于,在完整离体的肿瘤组织中筛选差异蛋白,然后用抗体进行免疫印迹和免疫组化后续验证,获得差异蛋白 MAP2 蛋白。

3. 按权利要求 2 所述的方法,其特征在于,其包括步骤:

1) 制备少突神经胶质瘤冰冻标本和石蜡包埋标本,

分别将离体的肿瘤标本速冻并于 -80°C 保存,制备少突神经胶质瘤冰冻标本,组织学评估所述肿瘤组织中肿瘤细胞的含量超过 80%;福尔马林固定和石蜡包埋制得少突神经胶质瘤石蜡包埋标本;

2) 三色 FISH 技术分析检测染色体臂 1p 上等位基因的缺失

用 1p36 微缺失综合症的特异性三色荧光标记探针,检测染色体臂 1p 上等位基因的缺失;

3) 基于 iTRAQ-LC-MS/MS 技术的蛋白质组分析蛋白质谱,寻找差异蛋白

直接采用离体的肿瘤组织获得高丰度的蛋白后,顺序进行蛋白纯化、消化裂解后,再用 iTRAQ 试剂进行差异标记及样品混合,离心干燥,色析分离,再经四级杆飞行时间串联质谱进行蛋白质组数据分析,确定 1p 缺失和非缺失的少突神经胶质瘤间的差异蛋白;

4) 免疫印迹和免疫组化检测

用 Western blot 对挑选出的差异蛋白进行验证。

4. MAP2 蛋白在制备检测 1P 等位基因杂合性缺失存在与否的生物标志物中的用途。

5. MAP2 蛋白在制备 1P 等位基因杂合性缺失存在状态的决策树分析模型中的用途。

6. 一种检测试剂盒,其特征在于,其含有权利要求 1 所述的人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白。

7. 一种诊断 1p 等位基因缺失的少突神经胶质瘤化疗敏感性的试剂盒,其特征在于,其含有权利要求 1 所述的 MAP2 蛋白。

一种人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白及其用途

技术领域

[0001] 本发明属生物技术和医学领域。涉及人少突神经胶质瘤标志物,具体涉及一种能区分临床上具有化疗敏感的、1P 等位基因杂合性缺失 (1p Loss of heterozygosity, 1p LOH) 的人少突神经胶质瘤 (Oligodendroglioma, OG) 的蛋白标志物 MAP2 蛋白 (microtubule-associated protein 2, MAP2) 及其用途。

背景技术

[0002] 生物标志物 (biomarker) 是指能被客观测量的,指示正常生理或病理过程,或是机体对于药物反应的物理、化学、生物指标。现代肿瘤研究的最关键的问题之一,就是寻找早期检测,诊断分型,治疗监测和预后,以及作为药物靶标的标志物。研究揭示了细胞从正常状态转变为肿瘤的过程中,细胞内蛋白表达谱会发生一系列变化。肿瘤标志物就是在肿瘤发生和发展过程中,由肿瘤细胞合成释放或宿主对肿瘤反应性释放的一类物质。它们具有一定的特异性与灵敏度,可以用作诊断与治疗中的监测指标。

[0003] 少突神经胶质瘤属神经胶质瘤,占原发性脑肿瘤的 2-5%,占脑胶质瘤的 4-15%。据研究报道,肿瘤组织中 1p (或 1p 和 19q) 等位基因缺失的病人,对化疗反应敏感,并有良好的预后,而不含 1p 等位基因缺失的病人对化疗反应不敏感,相对预后较差。自 1998 年始,有研究针对少突神经胶质瘤患者的有关 1p 等位基因缺失的分子机制,利用候选基因、基因组和蛋白质组的各种方法进行了若干尝试分析,但仍未揭示出 1p 等位基因缺失患者的化疗敏感性机制,也未能利用生物标志物来作为预测 1p 等位基因缺失的状态和化疗敏感性。目前常用的 1p 等位缺失的检测方法有:FISH (荧光原位杂交) 和微卫星 DNA 法,所述方法需要特殊的设备和技术,而且往往过程繁琐,费用昂贵,其中,微卫星 DNA 法更是需要除患者肿瘤组织样品以外的病人基因组 DNA (病人血中获得),引入了更多的收集,处理等繁琐步骤。

[0004] 综上所述,很有必要寻找一种易于临床检测,可进一步用于预测 1p 等位基因缺失,或化疗敏感性的标志物,其将具有重大的临床意义,并可据此研究少突神经胶质瘤 1p 等位基因缺失样品化疗敏感的机制。

发明内容

[0005] 本发明的目的是为克服现有技术的缺陷,提供一种人少突神经胶质瘤标志物 MAP2 蛋白及其用途。

[0006] 该 MAP2 蛋白可用作人少突神经胶质瘤的蛋白标志物,尤其能用作区分临床上具有化疗敏感的,1P 等位基因杂合性缺失的人少突神经胶质瘤的蛋白标志物。

[0007] 该 MAP2 蛋白可用于准确预测具有 90% 的 1P 等位基因杂合性缺失,可用于少突神经胶质瘤 1p 缺失样品化疗敏感的机制研究,以及通过决策树模型等方式预测 1p 等位基因杂合性缺失的病人的化疗敏感性,为诊断和预后以及治疗提供靶点。

[0008] 本发明的另一个目的是提供一种基于 iTRAQ-LC-MS/MS 技术的蛋白质组分析蛋白

质谱,检测 MAP2 蛋白的方法。

[0009] 本发明运用 8 标的 iTRAQ 结合 LC-MS/MS 技术分析离体的少突神经胶质瘤样品,获得差异表达的蛋白。本发明的一个实施例中,为能获得高丰度的蛋白,直接采用离体的肿瘤组织为 iTRAQ 实验的样本,所获得的差异表达的蛋白直接代表肿瘤本身和与化疗肿瘤生物学相关的肿瘤微环境。

[0010] 本发明所述的具有差异表达的蛋白,包括如表 1 所示的一组 13 种蛋白质,其中优选 MAP2 蛋白,该 MAP2 蛋白其分子量为 199526Da。

[0011] 表 1 是 13 个候选差异表达的蛋白。

[0012]

No.	Protein Description	Gene Symbol	Chromosome	Accession ^a	Mass (Da) ^b	Coverage(%) ^c	Fold Change ^d	P value ^e
1	High mobility group protein B1	HMGB1	13q12.3	IPI00419258.4	24894	14.8	0.366176207	0.00232
2	Isoform 3 of Microtubule-associated protein 2	MAP2	2q34	IPI00472094.1	199526	9.4	0.279983755	0.00391
3	TMSB4X protein (Fragment)	TMSB4X	Xp22.2	IPI00815829.1	7769	29	0.210333577	0.01303
4	Alpha-2-macroglobulin receptor-associated protein precursor	LRPAP1	4p16.3	IPI00026848.3	41466	3.1	0.618525894	0.01581
5	MARCKS-related protein	MARCKSL1	1p35.1	IPI00641181.5	19529	15.9	0.325424219	0.02237
6	60S acidic ribosomal protein P2	RPLP2	11p15.5	IPI00008529.1	11665	48.7	0.444364411	0.02349
7	CDGSH iron sulfur domain-containing protein 1	CISD1	10q21.1	IPI00020510.1	12199	12	0.700766438	0.02546
8	Vacuolar proton pump subunit E 1	ATP6V1E1	22q11.21	IPI00003856.1	26145	29.6	0.365996188	0.03053
9	Isoform Sap-mu-6 of Proactivator polypeptide precursor	PSAP	10q22.1	IPI00873201.1	58113	1.5	0.327713489	0.04429
10	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial precursor	PPIF	10q22.3	IPI00026519.1	22040	12.1	0.502731818	0.04749
11	Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARPC5L	1q25.3	IPI00414554.5	16941	7.8	0.625835499	0.04988
12 ^f	Ubiquitin-like modifier-activating enzyme 1	UBA1	Xp11.23	IPI00645078.1	117849	1	1.532018411	0.03138
13 ^f	cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit	PRKARIA	17q24.2	IPI00021831.1	42982	3.2	1.415476643	0.04669

[0013] 本发明中,在完整离体的肿瘤组织中筛选生物标志物,然后用抗体进行后续验证(免疫印迹和免疫组化),所获得的差异蛋白 MAP2 蛋白可以作为区分少突神经胶质瘤病人中 1P 等位基因杂合性缺失存在与否的候选生物标志物;本发明经网络分析表明肌动蛋白骨架信号途径参与少突神经胶质瘤病人中 1P 等位基因杂合性缺失的状态选择。

[0014] 本发明通过决策树分析模型显示 MAP2 蛋白是 1P 等位基因杂合性缺失存在状态的有力预测物。

[0015] 本发明的目的通过下述技术方案施现:

[0016] 1) 组织和标本的准备,

[0017] 通过 FISH 检测 55 个离体的少突神经胶质瘤样品(包括 16 个冰冻组织和 39 个石蜡包埋组织)中染色体 1p 的缺失情况,检测结果显示,染色体 1p 等位基因杂合缺失率在 WHOII 级的少突神经胶质瘤样品中为 20/33(61%),WHOIII 级的少突神经胶质瘤样品中为 11/22(50%)(如图 1 所示);

[0018] 2) 用三色 FISH 技术检测组织标本中染色体 1p 的等位基因的缺失情况,

[0019] 检测分析少突神经胶质瘤中含 1p 等位基因杂合缺失和不含 1p 等位基因杂合缺失之间的差异蛋白表达情况,根据 1p 等位基因杂合缺失的存在情况将冰冻肿瘤标本分成两组,每组取 4 个样本,结果显示,组间无论 1p 等位基因杂合缺失存在与否,各个样品在组织学水平上无明显差别;

[0020] 3) 基于 iTRAQ-LC-MS/MS 技术的蛋白质组分析蛋白质谱,寻找差异蛋白,

[0021] 在上述两组 8 个样品中共鉴定到 449 个非冗余蛋白(置信区间设置为 95%),将这些蛋白根据分子量和等电点进行分布分析(如图 2 所示),利用 DAVID 进行 GO 分析蛋白参与的生物学程序(biological process, BP),细胞学成分(cellular component, CC)和分子功能(molecular function, MF)(如图 2 所示),在鉴定的 449 个蛋白中,确定有显著性差异($p < 0.05$)的 13 个蛋白(如表 1 所示),其中差异蛋白代表 MAP2(含 1p 等位基因杂合缺失样品中高表达)的串联质谱图如图 3 所示;

[0022] 网络分析差异表达蛋白显示肌动蛋白网络对于区别 OG 中是否含 1p 等位基因杂合缺失具有突出的重要的意义(如图 4 所示);

[0023] 4) 为了验证 iTRAQ-LC/MS/MS 实验的定量结果,采用检测蛋白质水平的方法,抽提组织中的蛋白质,用特异抗体对 MAP2 蛋白进行免疫印迹验证,或对石蜡包埋的组织,用特异抗体进行免疫组化试验,Western Blot 结果显示,在 1p 等位基因杂合缺失样品中 MAP2 蛋白水平表达高(如图 5 所示, β -actin 做为内参蛋白);

[0024] 将 MAP2 蛋白用来做免疫组化分析,经过 1p 等位基因杂合缺失 FISH 验证过的 39 个新样品做为分析对象,同样地,不含 1p 等位基因杂合缺失的样品中 MAP2 低得分低表达(Mann-Whitney-Wilcoxon's U-tests < 0.05),并且事先如期一样,MAP2 在细胞膜和胞浆中表达(如图 6 所示);

[0025] 为了进一步验证免疫组化数据是否可以区分 1p 等位基因杂合缺失的状态,本发明进行了无监督聚类分析,39 个新样品被分成两大组,多数不含 1p 等位基因杂合缺失的样品归类到第一组,多数含 1p 等位基因杂合缺失的样品归类到第二组(如图 7 所示),该结果促使进一步来检测是否可以用一个决策树(decision tree)区分是否含 1p 等位基因杂合缺失的少突胶质瘤,本发明的一个实施例中采用一个五单位决策树(包括 4 个标志物和 19 个节点)用于检测区分上述两组,其精确度为 84.6%(数据未显示),而且大多数区分力度来源于 MAP2 蛋白;本发明的一个实施例中更加精确的模型,使用 MAP2 数据产生一单位决策树,共 3 个节点,该决策树其预测含 1p 等位基因杂合缺失的准确度达 90.5%,不含 1p 等位基因杂合缺失的准确度为 61.1%(如图 7 所示)。

[0026] 本发明中,MAP2 表达是最重要的节点,是最重要的区分能力,可以由单个 MAP2 节点构建决策树(如图 7 所示),所述的 MAP2 表达可以作为 1p 等位基因杂合缺失的标志物,也可以认为 1p 等位基因杂合缺失的存在状况与 MAP2 的表达差异有关。

[0027] 虽然根据 MAP2 作为一个微管结合蛋白特性以及临床研究结果,仍然不能排除 MAP2 在烷化剂化疗药物中有化疗敏感性,在含 1p 等位基因杂合缺失的少突胶质瘤病人中的化疗敏感性可能在一定程度上与 MAP2 的高表达有关。

[0028] 本发明通过 iTRAQ-LC-MS/MS 技术,确定了能区分临床上具有化疗敏感的,1P 缺失的,少突神经胶质瘤的蛋白标志物 MAP2 蛋白。该 MAP2 蛋白具有 90%的 1P 缺失预测准确度。该标志物不仅仅可以解释 1p 等位基因缺失的少突神经胶质瘤样品的化疗敏感的机制,也可以通过决策树模型预测 1p 等位基因缺失的少突神经胶质瘤病人的化疗敏感性。

[0029] 该 MAP2 蛋白可进一步制备临床试剂盒,为少突神经胶质瘤的诊断,预后,和治疗提供帮助。

附图说明

[0030] 图 1. 不同遗传模式 1p LOH 的 2 个例子 (含组织切片形态图和 FISH 图),

[0031] 其中, A 为 WHO II 级的形态图, B 为相对应的 FISH 图片 (一个黄色信号代表 1p36, 一个绿色信号代表 1pTEL, 二个浅蓝绿信号作为内参代表 1q25 如图箭头所示); C 为 WHO III 的形态图, D 为 C 相对应的 FISH 图片 (二个黄色信号代表 1p36, 二个绿色信号代表 1pTEL, 二个浅蓝绿信号作为内参代表 1q25 如图箭头所示)。

[0032] 图 2. 在两组 8 个样品中鉴定到 449 个非冗余蛋白 (置信区间设置为 95%), 将这些蛋白根据分子量和等电点进行分布分析, 利用 DAVID 进行 GO 分析蛋白参与的生物学程序 (biological process, BP), 细胞学成分 (cellular component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF);

[0033] 其中, A 为 449 个蛋白中 MW 和 pI 的分布, B、C 和 D 分别是 449 个蛋白中 BP、CC 和 MF 的分布。

[0034] 图 3. 差异蛋白代表 MAP2 (含 1p LOH 样品中高表达) 的串联质谱图,

[0035] 其中, A 为 MAP2 蛋白肽段 IGSTDNIK 的 MS/MS 谱图 (来源含 1p LOH 中 MAP2 上调的样品), B 为 iTRAQ 八标中此肽段的强度差异。

[0036] 图 4. KEGG 数据库网络分析,

[0037] 其中, 24 个差异蛋白 ($p < 0.1$) 在网络分析中, 其中 4 个用来做后续研究的蛋白用灰色框标注。

[0038] 图 5. 差异蛋白的 Western Blot 验证,

[0039] 其中, 用 β -actin 作为内参蛋白。

[0040] 图 6. 免疫组化验证福尔马林固定石蜡包埋样品中 (不含 1p LOH 和含 1p LOH) 差异表达蛋白 UBA1 (A), ATP6V1E1 (B), MAP2 (C), HGMB1 (D) 情况, 进行免疫组化的样品为 39 个新样品, 包括 18 个不含 1p LOH 和 21 个含 1p LOH 样品。

[0041] 图 7. IHC 样品归类分析,

[0042] 其中, A 为等级归类, 框成两组, 星号标记的样品考虑可能是错误归类, 第一组的错误归类率是 6/24 (25%), 第二组的错误归类率 3/15 (20%); B 为决策树分析, 只有一个母节点, MAP2 为此树所需; C 为将 B 的决策树进行归类总结。

具体实施方式

[0043] 实施例 1: 组织和标本 (少突神经胶质瘤冰冻标本和石蜡包埋标本) 的准备

[0044] 将手术取得的离体的新鲜的肿瘤标本速冻并于 -80°C 保存 (所有的少突神经胶质瘤的标本和病人的临床资料均依照机构审查委员会批准协议, 取得病人的知情同意后从复旦大学附属华山医院获得)。组织学评估确保取得的肿瘤组织肿瘤细胞的含量超过 80% 以便于蛋白质组研究。另外 39 份经福尔马林固定和石蜡包埋的肿瘤标本用于候选蛋白的鉴定。由两名神经病理专科医生按照《WHO 组织学分类 (2000)》进行肿瘤分级。

[0045] 实施例 2: 三色 FISH 技术分析检测染色体臂 1p 上等位基因的缺失

[0046] 切 $5\mu\text{m}$ 厚的冰冻切片, 100% 酒精固定, 4°C 用 0.2% 多聚甲醛 / PBS 固定 10 分钟。用商业化的 1p36 微缺失综合症的特异性三色荧光标记探针即橙色, 绿色和浅蓝绿色三色荧光同位素分别标记的 LSI 1p36, TelVysion 1p 和 LSI 1q25 探针, 按操作手册进行荧光

原位杂交,检测染色体臂 1p 上等位基因的缺失;其包括简要步骤:将切片 73°C 变性 5 分钟,加 10 μ l 探针混合物,盖玻片覆盖,37°C 孵育过夜,45°C 洗涤,转移到 2 \times SSC/0.1% NP-40 液(室温)。再由 DAPI-11 染色。经石蜡包埋的切片进行三色 FISH 分析时,使用前需经柠檬酸钠缓冲液煮沸 20 分钟,再用胃蛋白酶(4mg/ml)37°C 消化 10-15 分钟。

[0047] 尼康荧光显微镜(Eclipse 80i)观察,90%以上细胞核表达 FISH 信号的标本认定有效,统计 100 个不相重叠的细胞核作为荧光信号的数目,5 例正常脑组织标本(通过脑外伤减压手术获得)作为每对探针的对照。> 32%的肿瘤细胞核包含 1 个代表 1p36 的黄色信号和代表 1p tel 的绿色信号被定义为 1p 的缺失。浅蓝绿色的 1q25 作为 1p 缺失的内参。用高分辨率的相机拍照。

[0048] FISH 检测 55 个少突神经胶质瘤样品(包括 16 个冰冻组织和 39 个石蜡包埋组织)中染色体 1p 的缺失情况。检测结果显示,染色体 1p 上杂合子缺失率在 WHO II 级 OG 中为 20/33(61%),WHO III 级 OG 中为 11/22(50%)。

[0049] 实施例 3:基于 iTRAQ-LC-MS/MS 技术的蛋白质组分析蛋白质谱,寻找差异蛋白

[0050] 本发明的 iTRAQ 实验中,直接采用离体的肿瘤组织获得高丰度的蛋白,所获得的差异表达的蛋白直接代表肿瘤本身和与化疗肿瘤生物学相关的肿瘤微环境。

[0051] iTRAQ 样品准备:挑选 8 份少突神经胶质瘤(其中 4 个是 1p 杂合缺失,4 个没有 1p 杂合缺失)的冷冻标本做蛋白质组序列分析,取 50mg 的固体肿瘤组织,与裂解液(Tris-HCl 50mM, thiourea 2.5M, urea8M, CHAPS 4%, DTT 65mM)混匀,提取总蛋白。超声破碎,6 \times 10s 脉冲,冰上操作。20000g 离心 45min,去除细胞碎片。本实验的整个操作过程都在冰上进行。用 Ready Prep 2-D Cleanup Kit(Bio-Rad Laboratories, Inc. USA)按操作说明纯化蛋白,测定每个样本的总蛋白浓度;每个样品取 50 μ g,加入 0.2ml 浓度为 50 μ g/ml 的胰酶溶液(Promega)于 37°C 过夜消化裂解,再用 iTRAQ 试剂进行差异标记;4 个没有 1p 杂合缺失的肿瘤样本分别用 iTRAQ 113, 114, 115 和 116 标记,另外 4 个是 1p 杂合缺失的肿瘤样本分别用 iTRAQ117, 118, 119 和 121 标记;再将标记的样品混合,离心干燥(Christ Alpha 1-2and Christ RVC 2-25, Christ, Germany);

[0052] LC/MS/MS:混合好的样品经 ACQUITY Ultra Performance LC system(Waters, USA)进行色析分离,再经四级杆飞行时间串联质谱 Qstar XL MS/MS system(Applied Biosystems, USA)进行分析;

[0053] 蛋白质组数据分析:所有的 LC/MS/MS 数据通过 Analyst QS 1.1(Applied Biosystems, USA)获得,MS/MS 数据用 Protein Pilot v3.0(Applied Biosystems)软件分析,对肽段进行鉴定,用双尾学生 t 检验(SPSS 13.0 软件)分析 iTRAQ 蛋白质组结果,确定 1p 缺失和非缺失的少突神经胶质瘤间的差异蛋白,当 $p < 0.05$ 时,确认结果有显著性差异;

[0054] 生物信息学分析:用生物信息学分析软件 DAVID 数据库对少突胶质瘤鉴定出的差异蛋白进行功能验证,用 KEGG 数据库做进一步的路径分析,使用 SPSS16 软件对免疫组化的结果进行无监督聚类 and 决策树分析。

[0055] 实施例 4:免疫印迹和免疫组化检测

[0056] 用 Western blot 对挑选出的蛋白进行验证:

[0057] 挑选用于之前的蛋白质组分析的同样的 8 个少突胶质瘤标本,用 T-PER 组织蛋白

提取试剂 (Pierce, Rockford, IL, USA) 和蛋白酶抑制剂 (Roche Molecular Biochemicals, Indianapolis, IN, USA) 提取蛋白, 15000rpm 4℃ 离心, 收集上清。用 12% SDS-PAGE 胶 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 电泳, 每个标本的上样量 40 μg。将胶上的蛋白电转到 PVDF 膜上 (GE Healthcare, USA), 用含 6% 脱脂奶粉的 TBS-T 缓冲液封闭。将膜与抗人的单克隆抗体 MAP2 (1 : 1000, 长岛生物, 上海, 中国) 孵育, 洗膜后再将膜与对应的二抗孵育。加超敏发光液 (Pierce, Pockford) 显色后用 LAS-3000 化学发光成像系统检测 (Fujifilm, Japan)。

[0058] 免疫组化检测: 用之前经 1p LOH FISH 验证过的 39 份经福尔马林固定和石蜡包埋的 肿瘤组织标本做分析对象。将切片贴附于多聚赖氨酸包被的玻片上, 37℃ 度干燥过夜。切片经脱蜡, 水合和内源性过氧化物酶的失活。用 pH 6, 浓度为 10mmol/L 的柠檬酸钠缓冲液煮沸 15-20 分钟进行抗原修复。抗人的单克隆抗体 MAP2 (1 : 200, 长岛生物, 上海, 中国)。用 DAKO EnVision 二步法检测系统检测, 用苏木精复染, 每次染色均设阳性和阴性对照。对免疫组织化学染色法进行评估。

[0059] Western Blot 结果显示, 在 1p 等位基因杂合缺失样品中 MAP2 蛋白水平表达高 (如图 5 所示, β-actin 做为内参蛋白); 将 MAP2 蛋白用来做免疫组化分析, 经过 1p 等位基因杂合缺失 FISH 验证过的 39 个新样品做为分析对象, 同样地, 不含 1p 等位基因杂合缺失的样品中 MAP2 低得分低表达 (Mann-Whitney-Wilcoxon's U-tests < 0.05), 并且事先如期一样, MAP2 在细胞膜和胞浆中表达 (如图 6 所示)。

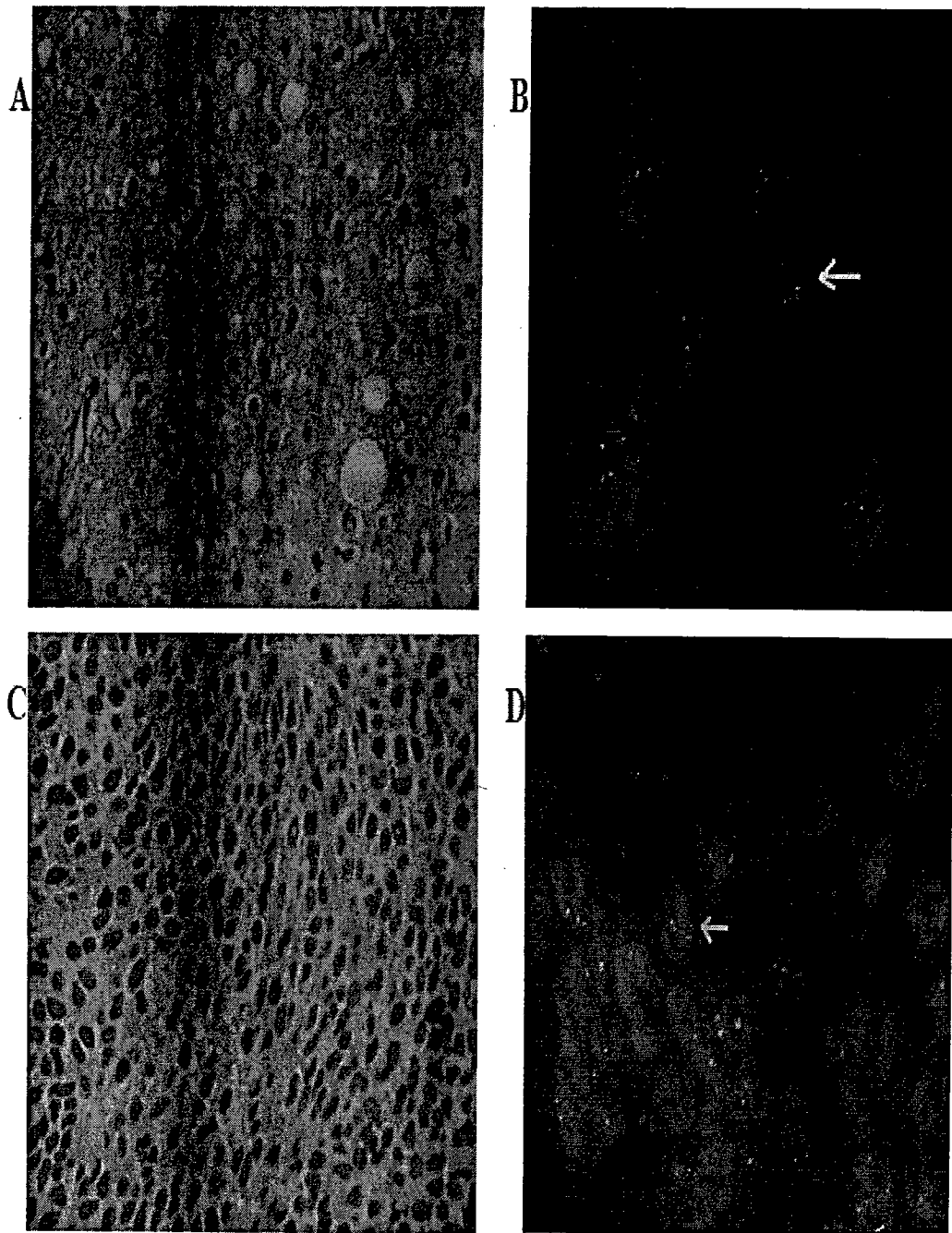


图 1

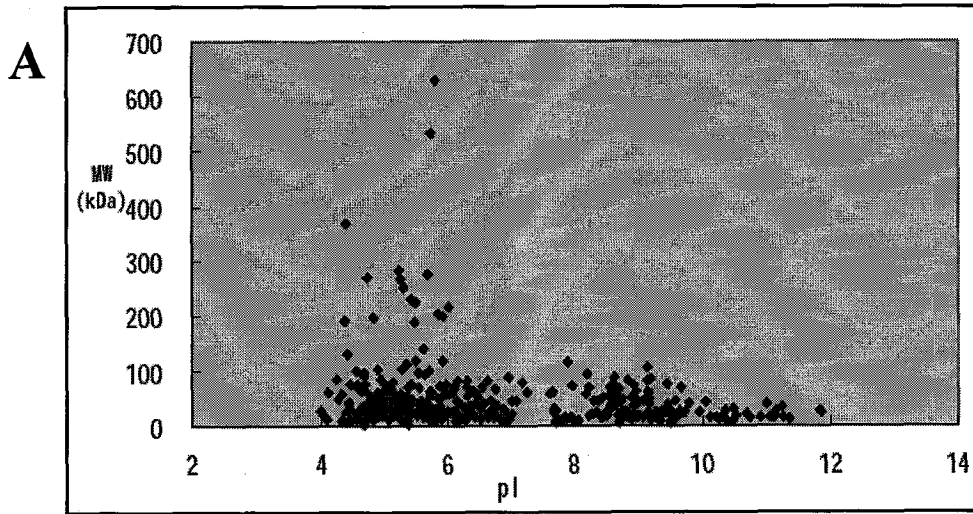


图 2A

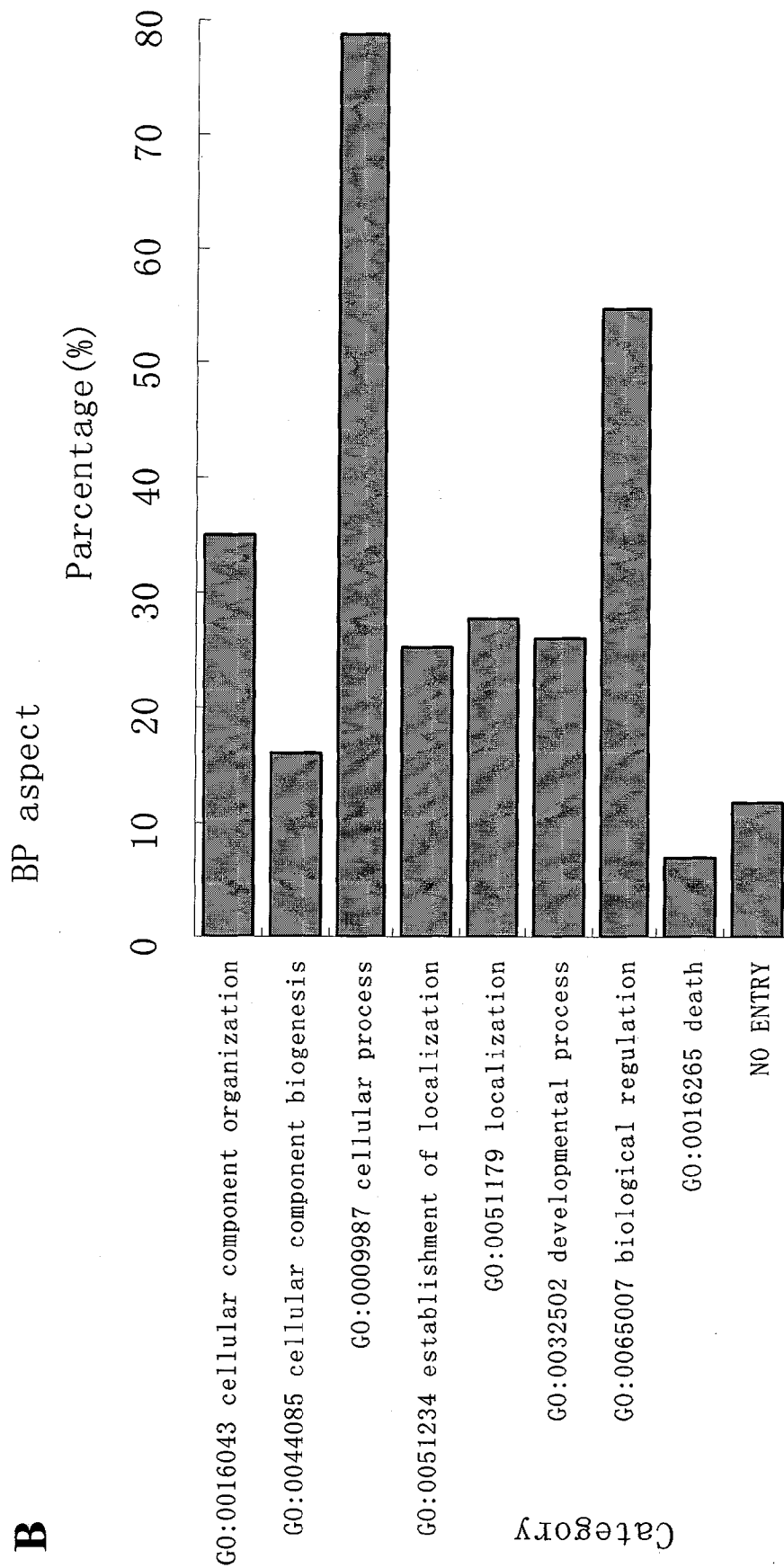


图 2B

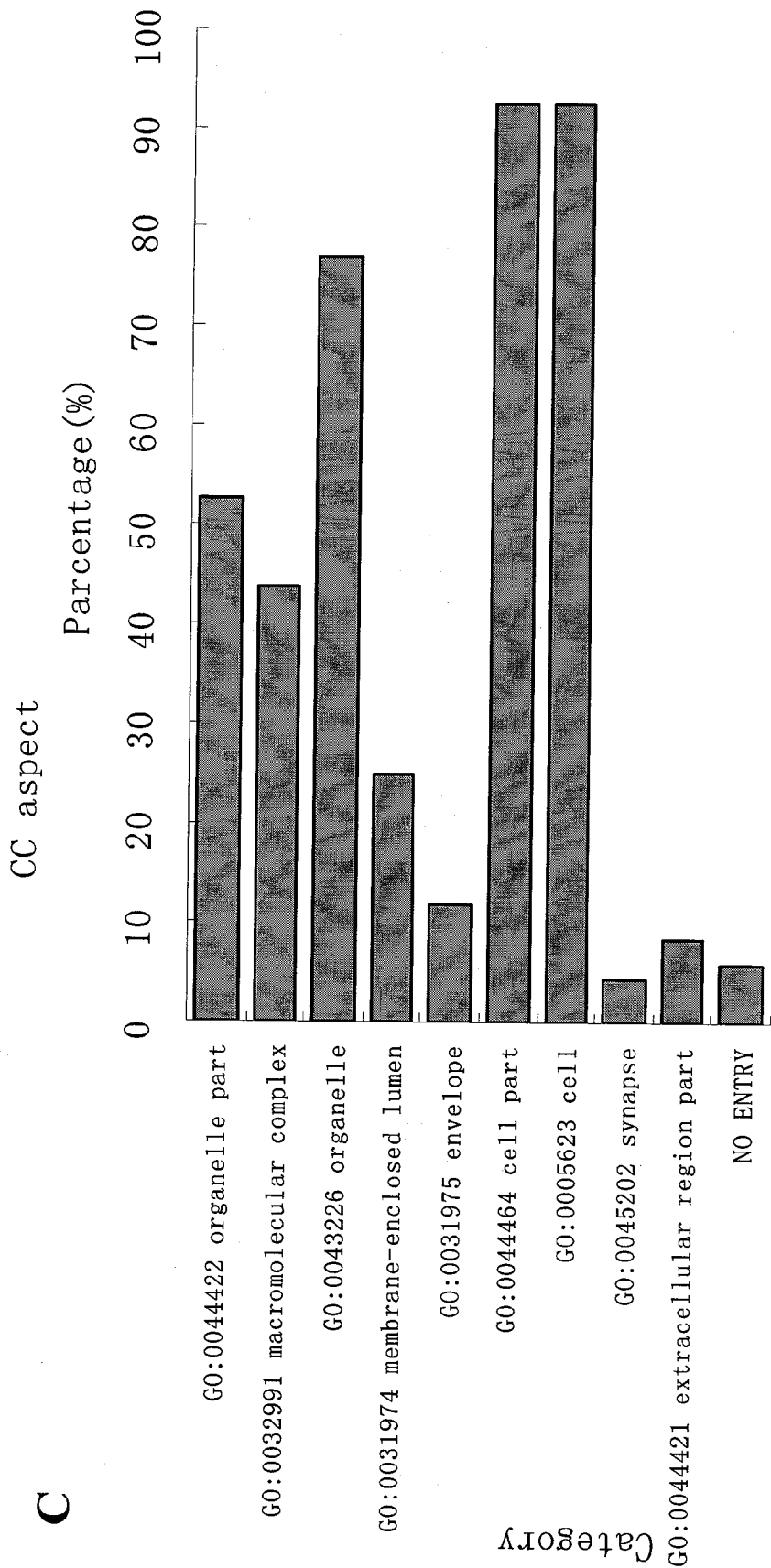
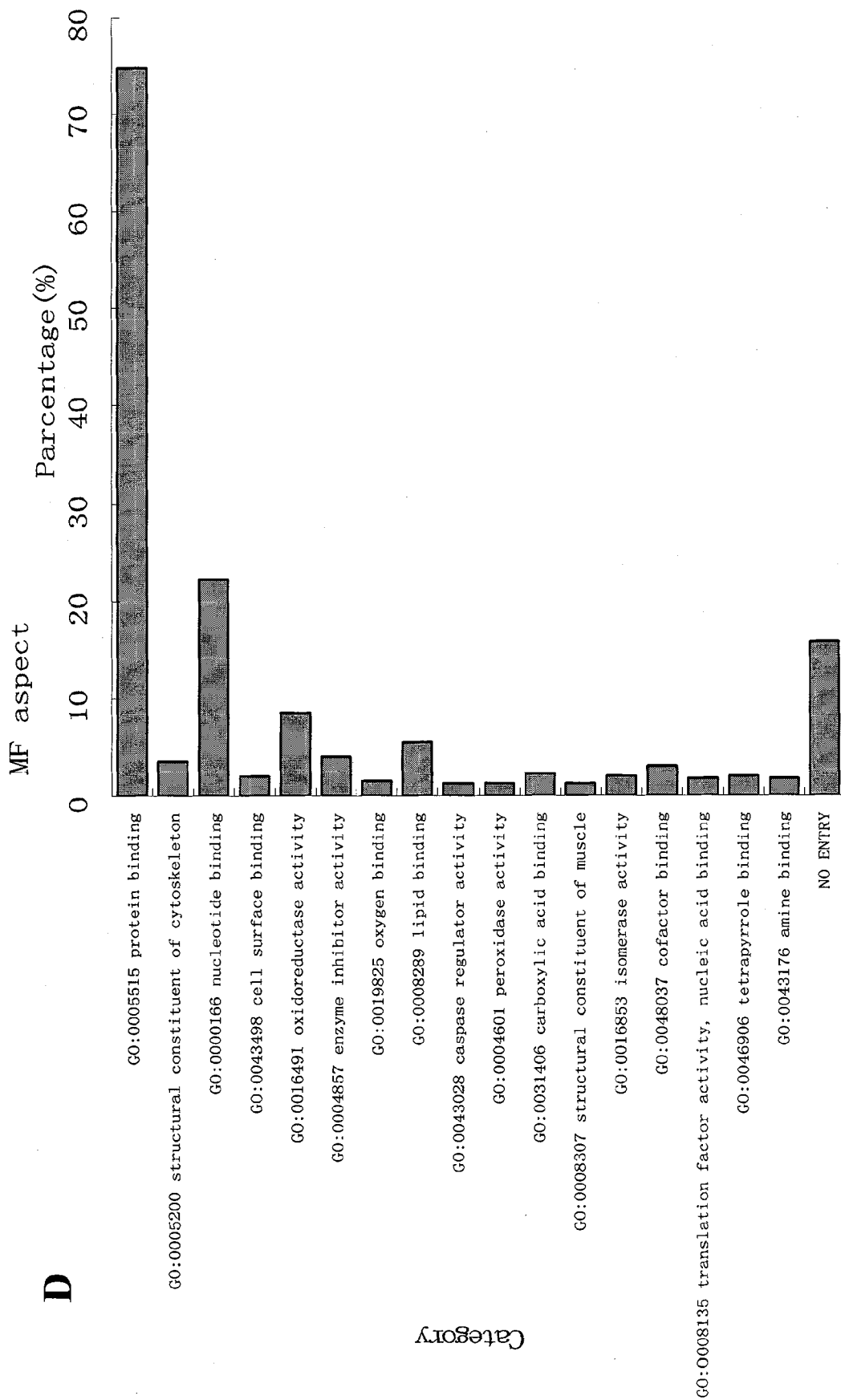


图 2C



D

图 2D

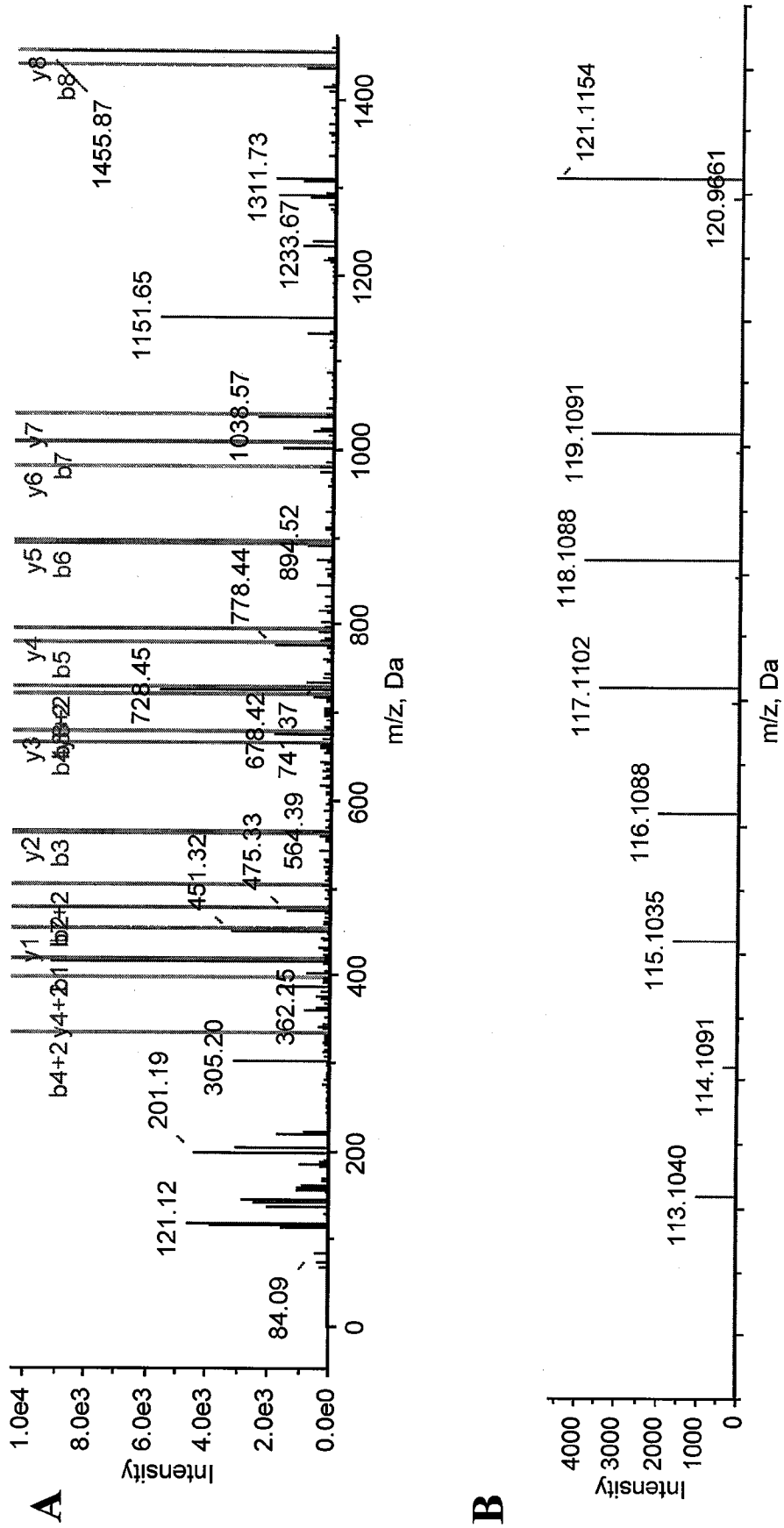


图 3

1p LOH 1p Intact

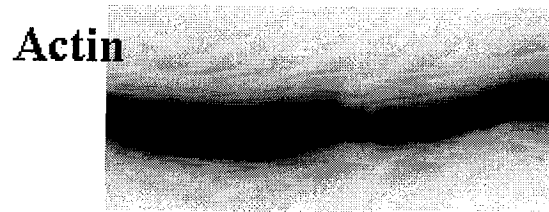
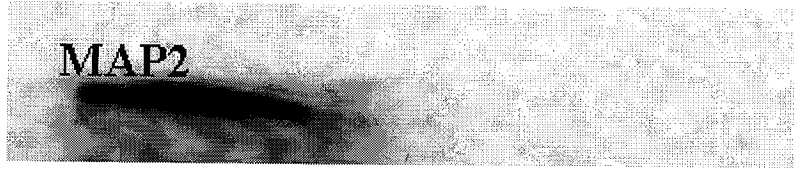


图 5

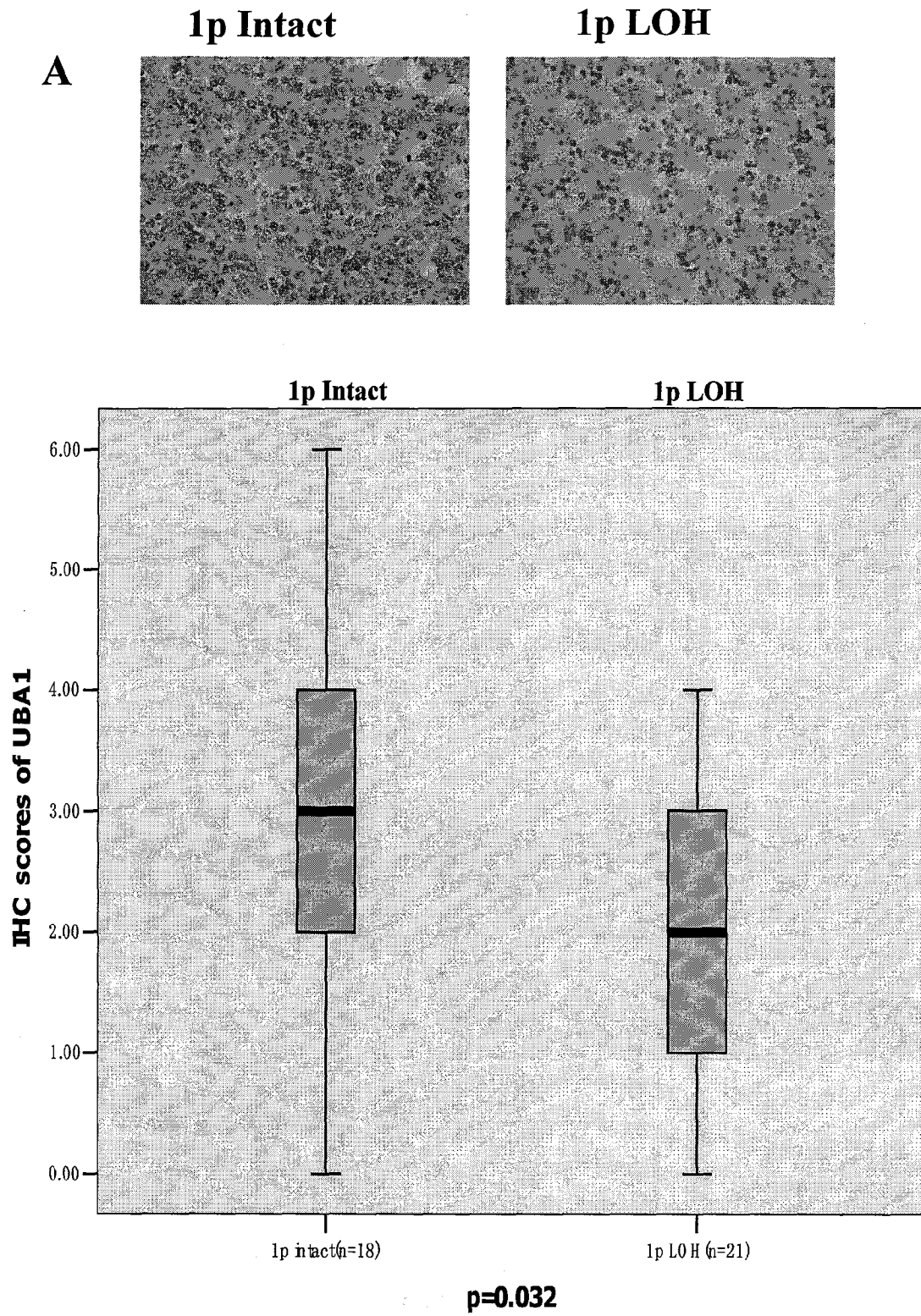


图 6A

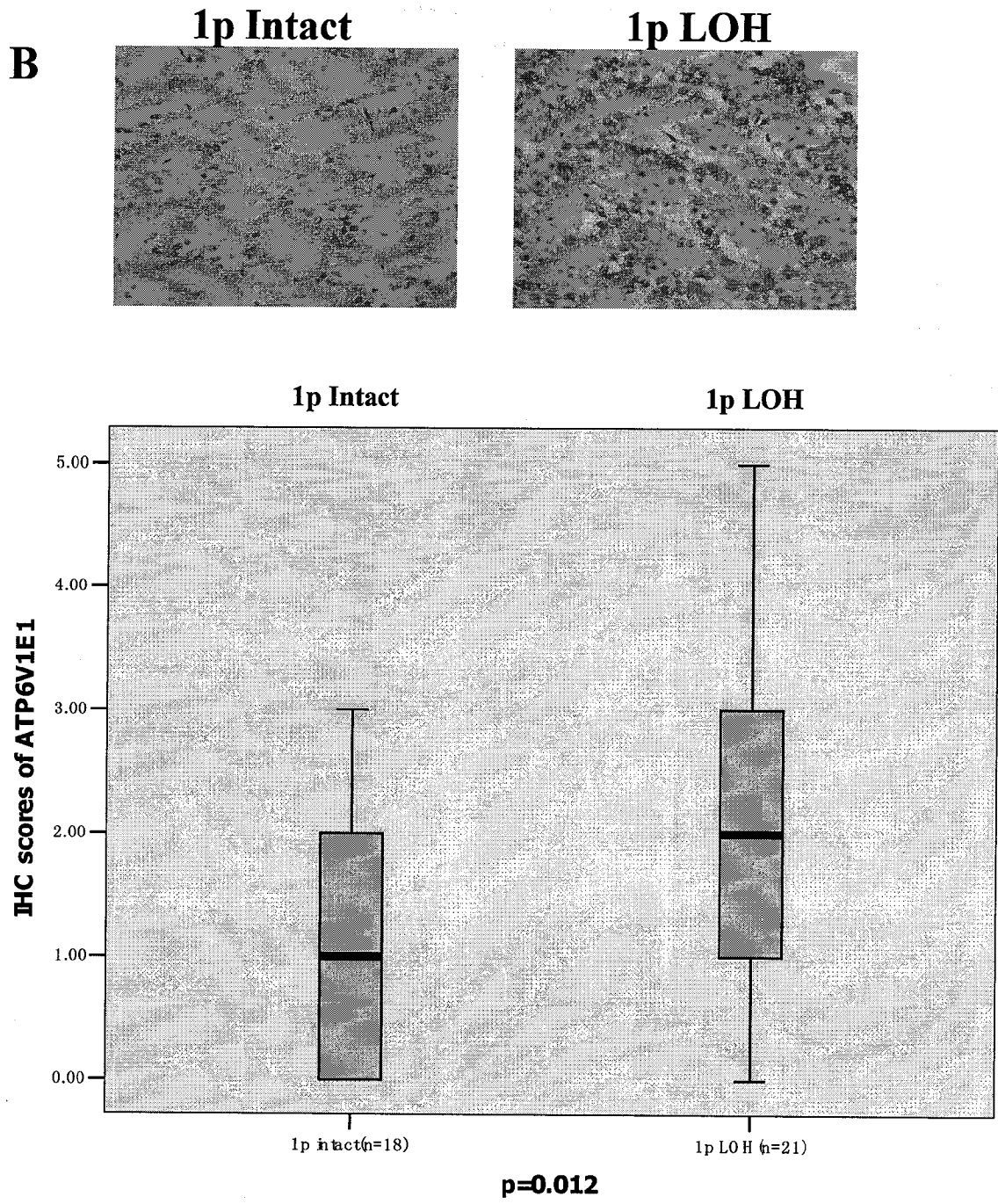
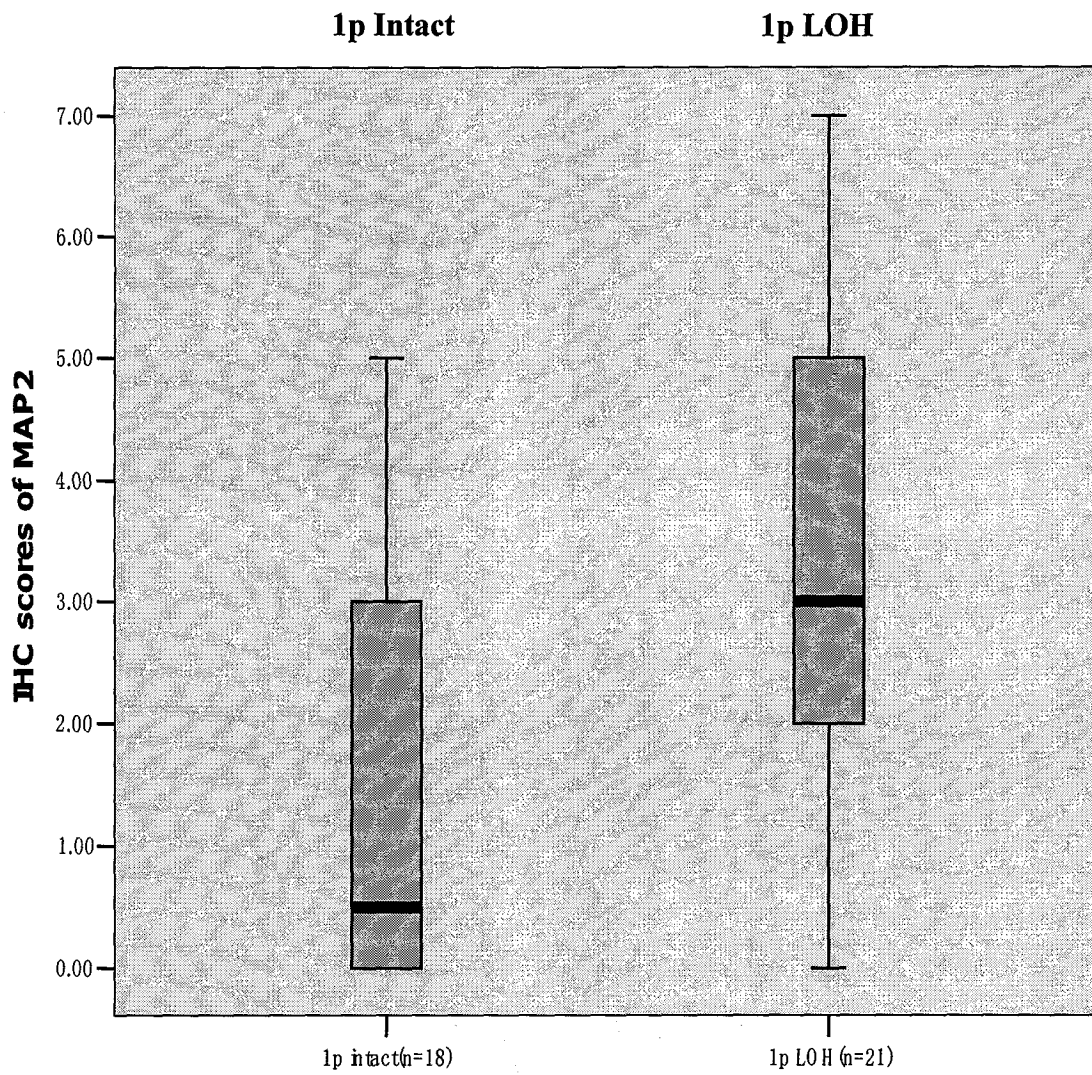
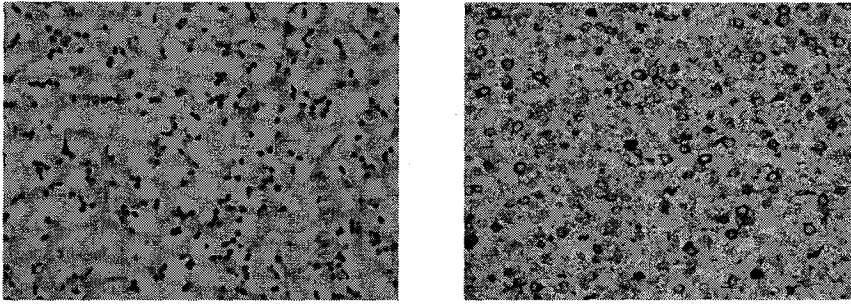


图 6B

C

1p Intact

1p LOH



p=0.002

图 6C

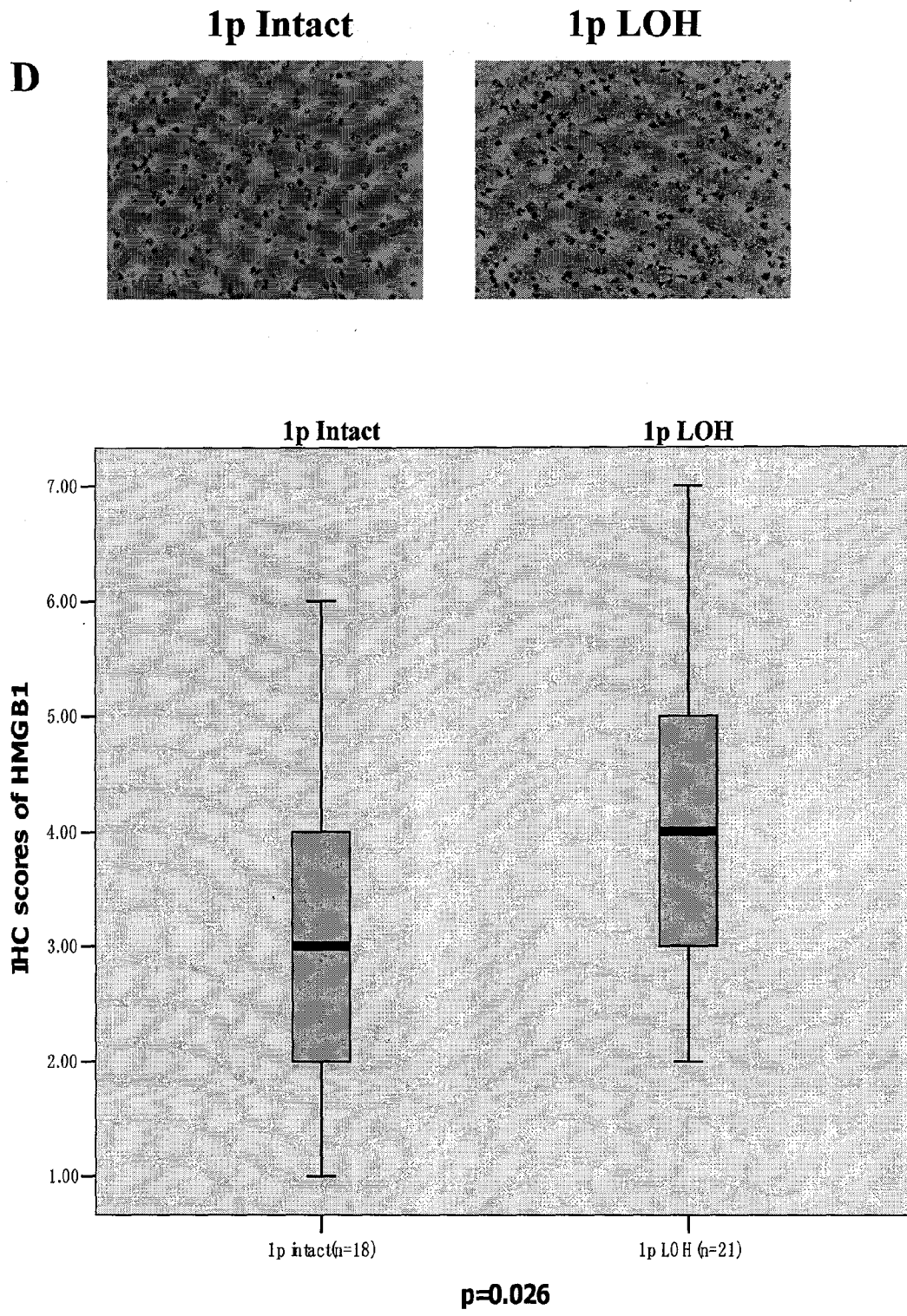


图 6D

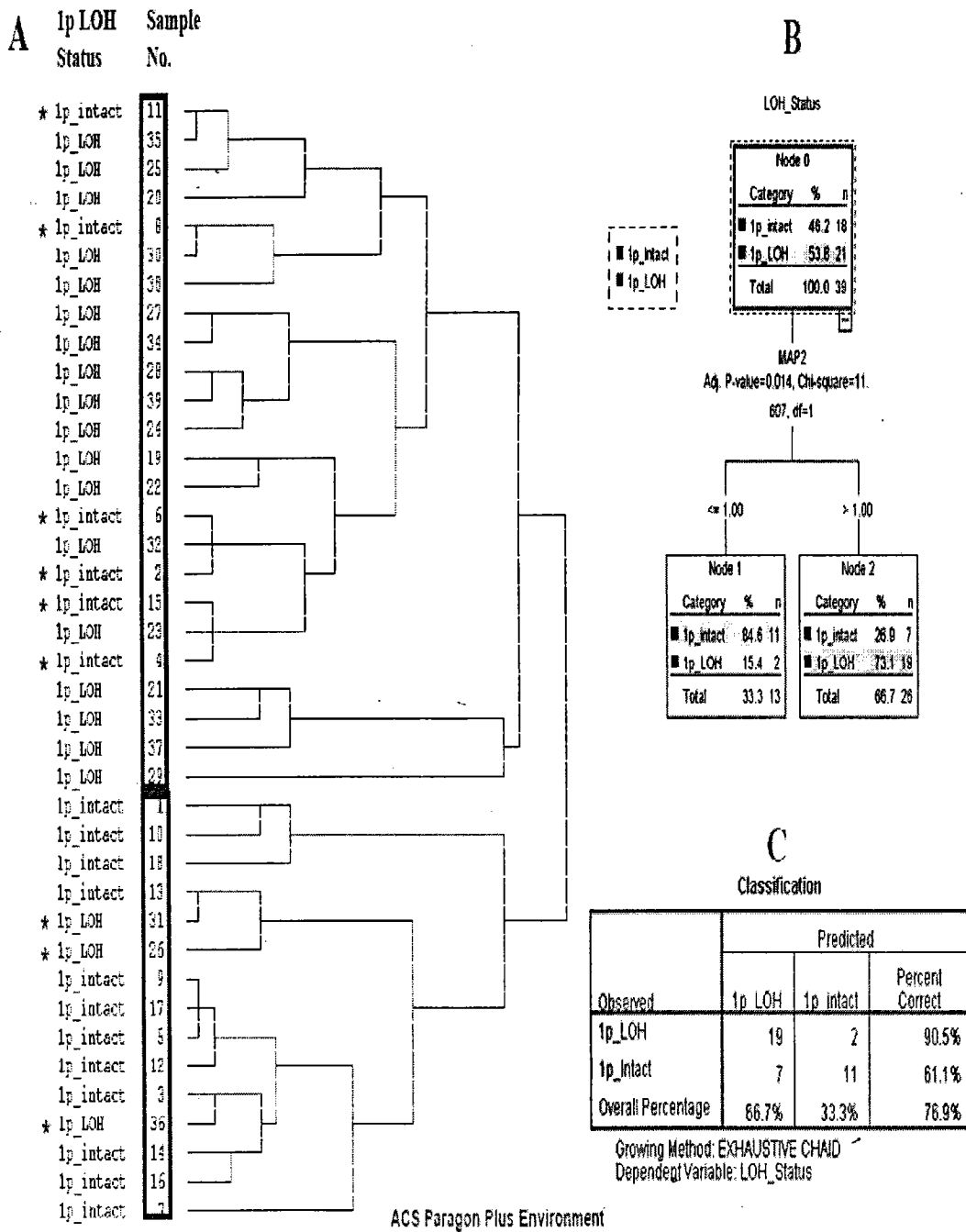


图 7

专利名称(译)	一种人少突神经胶质瘤标志物MAP2蛋白及其用途		
公开(公告)号	CN102408478A	公开(公告)日	2012-04-11
申请号	CN201010290758.5	申请日	2010-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	复旦大学		
申请(专利权)人(译)	复旦大学		
当前申请(专利权)人(译)	复旦大学		
[标]发明人	施前 杨柳松 徐晓恩		
发明人	施前 杨柳松 徐晓恩		
IPC分类号	C07K14/47 G01N33/53 G01N27/62 G01N21/64		
代理人(译)	吴桂琴		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明属生物技术和医学领域。涉及人少突神经胶质瘤标志物，具体涉及一种能区分临床上具有化疗敏感的、1P等位基因杂合性缺失的人少突神经胶质瘤的蛋白标志物MAP2蛋白及其用途。本发明通过iTRAQ-LC-MS/MS技术，确定了能区分临床上具有化疗敏感的，1P缺失的，少突神经胶质瘤的蛋白标志物MAP2蛋白。该MAP2蛋白具有90%的1P缺失预测准确度。该标志物不仅仅可以解释1p等位基因缺失的少突神经胶质瘤样品的化疗敏感的机制，也可以通过决策树模型预测1p等位基因缺失的少突神经胶质瘤病人的化疗敏感性。该MAP2蛋白可进一步制备临床试剂盒，为少突神经胶质瘤的诊断，预后，和治疗提供帮助。

