



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110412295 A

(43)申请公布日 2019.11.05

(21)申请号 201910733073.4

(22)申请日 2019.08.09

(71)申请人 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院

地址 100850 北京市海淀区太平路27号院

申请人 首都医科大学

(72)发明人 张令强 谢萍 彭志强 陈玉娇
杜梦鸽

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张立娜

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/574(2006.01)

G01N 33/531(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图2页

(54)发明名称

PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物及其特异性抗体的发明与应用

(57)摘要

本发明公开了PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物以及其特异性抗体的发明与应用。本发明提供了PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于评判乳腺癌分级分期的产品中的应用,以及在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。本发明还制备了PTEN Nedd8修饰抗体,其可以特异性识别PTEN K402位点的Nedd8修饰,PTEN Nedd8修饰随乳腺癌患者肿瘤恶性程度TNM分期和病理学分级的增加而增强,PTEN Nedd8修饰程度越高,患者预后越差。本发明对乳腺癌预测预后情况及为个体患者提供辅助治疗方案具有重要的临床意义。

1. PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于评判乳腺癌分级分期的产品中的应用。

2. PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。

3. 用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质在制备用于评判乳腺癌分级分期的产品中的应用。

4. 用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。

5. 根据权利要求3或4所述的应用,其特征在于:所述用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质为能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质;

进一步地,所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质为抗SEQ ID No.2所示肽段的抗体;

更进一步地,所述抗体为以SEQ ID No.2所示肽段作为免疫原免疫动物所得的多克隆抗体或抗血清。

6. SEQ ID No.2所示肽段。

7. 能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质;

进一步地,所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质为抗SEQ ID No.2所示肽段的抗体;

更进一步地,所述抗体为以SEQ ID No.2所示肽段作为免疫原免疫动物所得的多克隆抗体或抗血清。

8. 如下任一中的应用:

(A1) SEQ ID No.2所示肽段在制备权利要求7所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质中的应用;

(A2) 权利要求7所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质在制备用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的产品中的应用。

9. PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为靶点在筛选或制备乳腺癌靶向药物中的应用。

10. 根据权利要求1-9中任一所述的应用或产品,其特征在于:所述PTEN蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物及其特异性抗体的发明与应用

技术领域

[0001] 本发明涉及肿瘤分子生物学领域,具体涉及PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物以及其特异性抗体的发明与应用。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤是危害我国人民健康和生命的重要疾病之一,近20年来,我国癌症发病率呈逐年上升趋势。其中肺癌的发病率仍然高居榜首,其次为胃癌、结直肠癌、肝癌和食管癌,前十位的恶性肿瘤占了全部的76.39%,其中女性乳腺癌发病最多,并呈年轻化趋势,乳腺癌已严重威胁到我国妇女的身体健康。PTEN是继p53后另一个较为广泛地与肿瘤发生关系密切的抑癌基因,纯合缺失PTEN基因的小鼠胚胎致死,杂合缺失PTEN基因的小鼠则自发形成多种类型的肿瘤,PTEN在多种肿瘤中的突变或者缺失与肿瘤发生高度相关。然而在乳腺癌患者体内PTEN突变率极低,但仅仅20-30%的PTEN蛋白水平降低即可以促进乳腺癌的发生发展,其中机制不明。

[0003] 目前全球乳腺癌新发病例数140万左右,我们国家大概是十万分之三十左右。但是最近十年来我国乳腺癌的发病率在上升,每年新增4%左右,目前我国新发生的乳腺癌患者有20万左右,约占到全球总病例数的15%。值得关注的是,乳腺癌患者日趋年轻化,而且年轻乳腺癌患者预后比年纪大的要差。这一部分病人应该是单位、家庭、社会的中坚力量,所以要早期发现、早期治疗,才能够取得更好的效果。虽然乳腺癌早期治愈率都在95%以上,但在我国预防及医疗条件较差的地区,钼靶X线筛查和B超检查没有很好的普及,另外,有一些具有高危因素、有家族史或某些基因突变的妇女,患者就诊时多已经发现乳腺癌晚期,难以实现保乳治疗,手术切除治疗常常由于肿瘤的转移而不能彻底切除肿瘤组织,使得临床治疗比较困难,术后也常常复发,放射治疗又因肿瘤转移而必须扩大照射范围,相应地增加了对正常机体的损伤,影响预后。所以,早期诊断对乳腺癌患者尤为重要,能够在发病早期有效地预测乳腺癌的发病阶段和预后,并寻找新型肿瘤分子靶向药物将是乳腺癌最主要的治疗手段。

[0004] 发展新型乳腺癌标志物作为预后指标与新型治疗靶点一直是乳腺癌研究的热点。乳腺癌的手术切除治疗常常由于肿瘤的转移而不能彻底切除肿瘤组织,使得临床治疗比较困难,术后也常常复发,且中晚期难以实现保乳手术,术后严重影响患者身心和生活质量。因此,早期诊断乳腺癌和预测乳腺癌预后是乳腺癌研究急需解决的临床实际问题。肿瘤标志物的发现和合理应用是肿瘤预测预后和辅助治疗的前提。因此对于找出更好的乳腺癌诊断和预测预后分子标志物,将为乳腺癌的分子靶向治疗提供了重要的理论依据。

发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物以及其特异性抗体的发明与应用。

[0006] 第一方面,本发明要求保护PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于评判乳腺癌分级分期(特别是早期分级分期)的产品中的应用。

[0007] 第二方面,本发明要求保护PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。

[0008] 第三方面,本发明要求保护用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质在制备用于评判乳腺癌分级分期(特别是早期分级分期)的产品中的应用。

[0009] 第四方面,本发明要求保护用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。

[0010] 进一步地,所述用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的物质可为能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质。

[0011] 更进一步地,所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质可为抗SEQ ID No.2所示肽段的抗体。

[0012] 更加具体地,所述抗体可为以SEQ ID No.2所示肽段作为免疫原免疫动物所得的多克隆抗体或抗血清。

[0013] 第五方面,本发明要求保护SEQ ID No.2所示肽段。

[0014] 第六方面,本发明要求保护能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质。

[0015] 进一步地,所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质可为抗SEQ ID No.2所示肽段的抗体;

[0016] 更进一步地,所述抗体具体可为以SEQ ID No.2所示肽段作为免疫原免疫动物所得的多克隆抗体或抗血清。

[0017] 第七方面,本发明要求保护如下任一中的应用:

[0018] (A1) SEQ ID No.2所示肽段在制备前文第六方面中所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质中的应用;

[0019] (A2) 前文第六方面中所述能够与SEQ ID No.2所示肽段特异性结合的物质在制备用于检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰的产品中的应用。

[0020] 在上述各方面中,所述分级为病理学分级;所述分期为TNM分期。

[0021] 在上述各方面中,PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰水平随乳腺癌患者肿瘤病理学分级和TNM分期的增加而升高;PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度越高,患者预后越差。

[0022] 第八方面,本发明要求保护PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为靶点在筛选或制备乳腺癌靶向药物中的应用。

[0023] 其中,所述乳腺癌靶向药物如乳腺癌分子靶向药物。

[0024] 在上述各方面中,所述PTEN蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0025] 在上述各方面中,所述PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰是指所述PTEN蛋白的第402位赖氨酸上共价结合Nedd8蛋白后的一种翻译后修饰。

[0026] 本发明至少包括以下有益效果:本发明以PTEN Nedd8共价修饰作为标志物用于乳腺癌早期分级分期诊断的靶标,PTEN Nedd8修饰抗体可以特异性识别PTEN K402位点的Nedd8修饰,PTEN Nedd8修饰随乳腺癌患者肿瘤恶性程度TNM分期(stage)和病理学分级(grade)的增加而增强,PTEN Nedd8修饰程度越高,患者预后越差,这将为深入研究和大规模验证PTEN Nedd8修饰与乳腺癌的相关性,对乳腺癌预测预后情况及为个体患者提供辅助

治疗方案具有重要的临床意义。

附图说明

[0027] 图1为本发明其中一个实施例中制备靶向PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰抗体的部分结果示意图。其中,A为ELISA评估抗体效价表;B为western blot检测Nedd8修饰激活酶抑制剂MLN4924阻断MCF-7细胞中PTEN K402位点Nedd8修饰的抗体特异性评价结果。

[0028] 图2为本发明其中一个实施例中Nedd8-PTEN K402抗体检测PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为乳腺癌患者诊断和预后的新型标志物的部分结果示意图。其中,A为免疫组化检测乳腺癌患者癌和癌旁组织中PTEN K402位点Nedd8修饰水平的结果;B为乳腺癌患者癌和癌旁组织中PTEN K402位点Nedd8修饰程度的着色统计图;C为乳腺癌患者癌旁组织、TNM分期1、2、3期癌组织中PTEN K402位点Nedd8修饰程度的着色统计图;D为乳腺癌患者癌旁组织、TNM分期1、2、3期癌组织中PTEN K402位点Nedd8修饰的免疫组化图;E为乳腺癌患者癌旁组织、病理学分级1、2、3级癌组织中PTEN K402位点Nedd8修饰的免疫组化图;F为乳腺癌患者癌旁组织、病理学分级1、2、3级癌组织中PTEN K402位点Nedd8修饰程度的着色统计图;G为PTEN K402位点Nedd8修饰程度和乳腺癌患者预后的K-M曲线分析图。

具体实施方式

[0029] 应当理解,本文所使用的诸如“具有”、“包含”以及“包括”术语并不配出一个或多个其它元件或其组合的存在或添加。

[0030] 本发明研究发现乳腺癌组织样本中PTEN蛋白的K402位点存在Nedd8修饰。其中,PTEN蛋白的氨基酸序列如SEQ ID No.1所示。

[0031] 本发明使用PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰抗体,分析比较乳腺癌组织样本与正常对照样本中PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度。

[0032] 本发明的部分实验结果首先特异性靶向PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰抗原决定簇设计肽段,合成后免疫兔子4次(分别在第1天,第21天,第28天和第35天),取血4次(第45天取30ml,第50天、第65天和第70天取20ml)进行血清筛选检测(ELISA/Dot blot),采血进行抗血清纯化,western blot鉴定。

[0033] 本发明使用PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰抗体在含有126例乳腺癌患者癌组织和87例癌旁组织标本切片的肿瘤芯片上进行免疫组化,肿瘤芯片购买自上海芯超生物,分析PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度在乳腺癌患者癌组织和癌旁组织中的表达情况,分析PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度与乳腺癌患者肿瘤分级分期的相关性,提示PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度可以作为乳腺癌早期诊断和分级分期的标志物。

[0034] K-M生存曲线分析结果显示:PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度高的患者预后差,提示PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰可以作为新的乳腺癌预后分子标志物。

[0035] 为使本领域技术人员更好地理解本发明的技术方案,现提供下述具体的实施例进行说明:

[0036] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明,均为常规方法。

[0037] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0038] 实施例1、设计和制备靶向PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰抗体

[0039] 一、材料和方法

[0040] 1、材料

[0041] 生理盐水, 弗氏完全佐剂, 弗氏不完全佐剂, 健康的6周大小的新西兰大白兔两只(约2Kg), 蛋白多肽,

[0042] 2、方法

[0043] (1) 根据Nedd8共价结合PTEN蛋白K402位点设计肽段进行合成, 肽段序列为CEDQHTQIT-(LALRGG)K-V (SEQ ID No.2, 括号内肽段序列为第10位赖氨酸上的修饰基团序列), 此肽段靶向PTEN蛋白K402位点共价结合Nedd8的序列。此肽段作为制备抗体的免疫原, 检测抗体效价的抗原。

[0044] (2) 挑选健康的6周大小的新西兰大白兔两只, 使其适应新的生活环境, 稳定几天再进行首次取血作为阴性对照;

[0045] (3) 用生理盐水稀释免疫原, 然后与相应的佐剂进行1:1体积混合, 抗原和佐剂完全混合形成稳定的乳剂, 将该乳剂在兔子双肩周围的皮肤下进行皮下注射和后大腿进行肌肉注射。每个区域大约用1/4的免疫原。初次免疫400 μ g抗原比较适合, 使用弗氏完全佐剂, 后续免疫加强为每次100 μ g, 使用弗氏不完全佐剂。

[0046] (4) 取血: 家兔仰卧于兔架上固定头部, 用纱布固定四肢, 头部略放低以暴露颈部。剃毛并消毒皮肤; 沿颈部中线用手术刀切开皮肤约10cm, 分离皮下结缔组织, 直至暴露出气管两侧的胸锁乳突肌; 用直头止血钳分离胸锁乳突肌与气管间的颈三角区疏松组织, 暴露出颈总动脉后用弯头眼科镊使之游离, 剥离神经和结缔组织; 于动脉下套入两根黑丝线, 分别置于远心及近心端。结扎远心端的丝线。近心端的动脉用血管夹夹住; 用小拇指垫在血管下, 用尖头眼科手术剪在两根丝线间的动脉壁上剪一小口, 插入塑料放血管。再将近心端的丝线结扎固定于放血管上, 以防放血管滑脱; 松开止血钳, 使血液流入容器中。一般一只家兔可放血100-120ml。

[0047] (5) 血清的分离: 如果用三角瓶或平皿盛血, 将器皿倾斜放置于37 $^{\circ}$ C烘箱2小时, 转移到4 $^{\circ}$ C沉淀过夜, 第二天早上用吸管吸取血清, 在血清中加入NaN₃至终浓度1g/ml, 分装后-20 $^{\circ}$ C保存。

[0048] (6) ELISA测定效价

[0049] ①包被抗原: 先配制0.05MNa₂CO₃-NaHCO₃缓冲液 (pH9.6), 然后用新鲜配制0.05MNa₂CO₃-NaHCO₃缓冲液稀释抗原 (SEQ ID No.2所示肽段) 为1:100倍浓度溶液, 取出96孔酶标板, 用移液枪将稀释好的抗原加到2 \times 10孔中, 每孔100 μ l, 标记未加抗原包被的孔, 置于4 $^{\circ}$ C过夜。

[0050] ②洗涤: 从4 $^{\circ}$ C里取出已包被的酶标板, 甩干包被液, 每孔中加入100 μ l含0.05% Tween-20的PBS洗涤在3-5次, 每次3-5min, 最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

[0051] ③封闭: 用移液枪向每孔中加入100 μ l含5%正常牛血清的PBS-T (0.05% Tween-20-PBS), 置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中温育1h, 封闭非特异性结合位点。

[0052] 洗涤: 取出已封闭的酶标板, 甩干封闭液, 每孔中加入100 μ l含0.05% Tween-20的PBS洗涤在3-5次, 每次3-5min, 最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

[0053] ④加样: 将在事先准备好的兔抗血清用PBS-T从1:1K (1000) 进行3倍梯度稀释到1:19683K, 然后在加过包被液包被过的两排孔的第1对孔中加入免疫前兔血清为阴性对照, 余

下的孔分别按兔抗血清浓度梯度依次加入样品,每孔100 μ l,置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中温育1小时。

[0054] ⑤洗涤:取出加过样的酶标板,甩干样品血清,每孔中加入100 μ l含0.05% Tween-20的PBS洗涤在3-5次,每次3-5min,最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

[0055] ⑥加酶标二抗:用PBS-T稀释辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体至1:10000倍,每孔加入100 μ l,置于37 $^{\circ}$ C恒温培养箱中温育1小时。

[0056] ⑦洗涤:取出加过酶标二抗的酶标板,甩干里面的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔抗体,在每孔中加入100 μ l含0.05% Tween-20的PBS洗涤在3-5次,每次3-5min,最后一次洗涤后在吸水纸上拍干。

[0057] ⑧加底物显色液:配制含0.03% H₂O₂的溶于磷酸-柠檬酸缓冲液(7ml 0.1M Na₂HPO₄和3ml 0.1M柠檬酸混合)的0.4mg/ml OPD显色液,每孔加入新鲜配制的OPD显色液100 μ l,室温静置于阴暗处20-40min。

[0058] ⑨加终止液:待显色均匀(溶液变淡黄色)后,每孔加入50 μ l 12% H₂SO₄终止反应。

[0059] ⑩酶标仪读数:将加了终止液的酶标板放入酶标仪中,将波长调至490nm读取数据。

[0060] (7) 制备亲和柱进行抗体的亲和纯化

[0061] ①准备protein A亲和柱:通常选取5mL或10mL protein A填料,将等体积的填料和PBS缓冲溶液混合、搅拌,抽气去除填料中的气泡。

[0062] 将protein A填料缓慢加入玻璃柱中,灌制层析柱。此过程中要避免柱干。灌注完毕后用10倍体积预冷的PBS缓冲溶液平衡柱子。

[0063] ②Protein A亲和层析:

[0064] 将血清用过滤器进行过滤后,上样到平衡好的protein A层析柱上,为检测抗血清与填料的结合效率,需保留上样流出液。

[0065] 用PBS缓冲溶液清洗柱子,再用150mM甘氨酸缓冲液进行洗脱。收集洗脱液,并加入中和缓冲溶液调制pH为7。

[0066] ③富集目的抗体:将protein A纯化后得到的粗纯IgG上样到平衡好的抗原多肽亲和层析柱上,专一性的富集目的抗体。

[0067] ④去除非特异性抗体:将上一步得到的目的抗体上样到平衡好的阴性多肽亲和层析柱上,直接收集流出液,从而去除非特异性的抗体成分。

[0068] ⑤在得到洗脱的抗体后,经蔗糖或聚乙二醇浓缩后于PBS中透析除盐,使用紫外可见分光光度计在波长280nm处测定抗体OD值,所得OD值除以1.35即为所测抗体的浓度,加入等体积甘油置于-20 $^{\circ}$ C可长期保存。

[0069] (8) western blot鉴定抗体效果和特异性

[0070] 二、结果

[0071] 抗体效价是指抗体在保持其最佳特异性染色,并且具备最小背景染色条件下的最高稀释倍数。ELISA检测抗体效价(450nm波长条件下检测吸光度;0.D.450nm>1.0),用SEQ ID No.2所示肽段免疫兔子制备得到的抗体效价高于1:162,000(图1中A),说明该抗体特异性较好亲和力较高。接下来验证该抗体能否识别人源细胞内源PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰,为了判断所检测到的western blot条带是否为修饰带,我们使用不同浓度Nedd8修饰激

活酶抑制剂MLN4924处理人乳腺癌细胞系MCF-7细胞12个小时,收取蛋白进行western blot检测。倘若该修饰带能够被MLN4924去除,则证明该抗体可特异性识别PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰,结果如图1中B所示,使用制备的PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体可以在人乳腺癌细胞系MCF-7细胞中检测到内源PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰,且能被MLN4924抑制,其中Cullin1蛋白为该实验的阳性对照,GAPDH蛋白作为内参。

[0072] 实施例2、分析乳腺癌组织和癌旁组织中PTEN K402位点Nedd8修饰程度的变化

[0073] 一、材料和方法

[0074] 1、材料

[0075] 人乳腺癌肿瘤芯片(货号:HBreD139Su01和HBre-Duc090Sur-01,上海芯超生物公司,含病人分级分期以及预后等临床相关信息),实施例1中制备的PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体。

[0076] 2、方法

[0077] (1)切片放入:60℃烘箱烤20min,使蜡融化;

[0078] (2)脱蜡至水:二甲苯1→二甲苯2→无水乙醇1→无水乙醇2→95%乙醇→90%乙醇→80%乙醇→70乙醇→水,各5min;

[0079] (3)PBS洗5min;

[0080] (4)微波修复抗原:预先将购买的商品化柠檬酸钠修复液(碧云天,P0081)微波加热至沸腾,将切片浸入柠檬酸钠修复液,微波中火修复15min修复结束后将烧杯放置等待冷却至室温后才可将切片取出。(也可放置在4℃冷却至室温);

[0081] (5)PBS洗5min,3次;

[0082] (6)过氧化氢封闭:取30%过氧化氢溶液用PBS稀释至浓度为3%过氧化氢溶液,避光封闭20min;

[0083] (7)PBS洗5min,3次;

[0084] (8)封闭:用滤纸擦拭玻片正面无组织的部分,甩去组织上多余水分,用免疫组化笔在组织外围画圈,迅速滴加10%BSA-PBS,放入湿盒中,37℃封闭30min;

[0085] (9)一抗:用5%BSA-PBS按1:150稀释实施例1中制备的PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体,封闭结束后取出玻片,甩去组织上的封闭液,迅速滴加稀释好的抗体,放入湿盒中,4℃过夜;

[0086] (10)PBS洗5min,5次;

[0087] (11)二抗:用5%BSA-PBS稀释兔二抗,通常稀释比例为1:200,甩去组织上水分后迅速滴加稀释好的二抗,室温2h或37℃45min;

[0088] (12)PBS洗5min,5次;

[0089] (13)DAB显色:A液1滴B液1ml配制DAB显色液,甩去组织上水分,迅速滴加DAB显色液,通常显色3-5min显色时镜下观察,待着色后浸入纯水中终止显色;

[0090] (14)纯水洗25min;

[0091] (15)染核:甩去组织上多余水分,滴加苏木素染色液染色3-5min,分色液分色2s至粉红色随后浸入纯水中,镜下观察染色效果。自来水洗15min或使用返蓝液使核颜色返蓝;

[0092] (16)封片:纯水→70乙醇→80%乙醇→90%乙醇→95%乙醇→无水乙醇→无水乙

醇→二甲苯→二甲苯各5min,取出玻片,用滤纸擦拭多余液体,在玻片组织一端滴加封片用树脂,取载玻片轻轻盖上组织,组织上不要有气泡。

[0093] 二、结果

[0094] 染色扫描后使用Image Pro Plus软件分析PTEN K402位点Nedd8修饰抗体染色的IOD(积累光密度)水平,然后进行数据整理和统计分析,分析结果显示,与癌旁组织相比,PTEN K402位点的Nedd8修饰程度在乳腺癌患者组织中显著升高(图2中A和B)。

[0095] 实施例3、分析乳腺癌组织不同TNM分期中PTEN K402位点Nedd8修饰程度的变化

[0096] 一、材料和方法

[0097] 1、材料

[0098] 人乳腺癌肿瘤芯片(货号:HBre-Duc170Sur-01和HBre-Duc090Sur-01,上海芯超生物公司,含病人分级分期以及预后等临床相关信息),实施例1中制备的PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体。

[0099] 2、方法

[0100] 免疫组化,方法同实施例2。

[0101] 二、结果

[0102] Image Pro Plus软件统计PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体染色的IOD(积累光密度)水平,分析结果发现PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度与TNM分期和病理学分级呈现正相关,分期、分级越高,PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰程度越高(图2中C、D、F、F)。

[0103] 实施例4、K-M曲线分析PTEN K402位点Nedd8修饰对乳腺癌患者预后的影响

[0104] 一、材料和方法

[0105] 1、材料

[0106] 人乳腺癌肿瘤芯片(货号:HBre-Duc170Sur-01和HBre-Duc090Sur-01,上海芯超生物公司,含病人分级分期以及预后等临床相关信息),实施例1中制备的PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰抗体。

[0107] 2、方法

[0108] 免疫组化,方法同实施例2。

[0109] 二、结果

[0110] 使用GraphPad Prism 5软件,Kaplan-Meier检验分析PTEN蛋白K402位点Nedd8的修饰水平与乳腺癌患者积累生存率的相关性。分析结果发现,PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰程度高的患者积累生存率低,反之则高(图2中G),表明PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰程度确实可以作为乳腺癌的预后分子标志物。

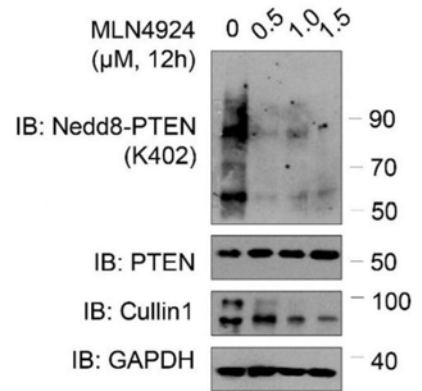
[0111] 本发明采用分子生物学实验的方法分析发现PTEN蛋白K402位点发生Nedd8修饰,制备特异性靶向该修饰位点的抗体,免疫组化实验发现在乳腺癌患者体内PTEN蛋白K402位点呈现高Nedd8修饰,且PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰与TNM乳腺癌患者分级分期正相关;预后分析表明PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰程度越高,患者预后越差。明确PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰可作为一种新型特异的乳腺癌标志物,本发明所制备的用于检测PTEN蛋白K402位点Nedd8修饰的抗体可应用于临床乳腺癌预后以及分子靶向诊断,这将为乳腺癌发病机制的研究和预测乳腺癌病人诊治的分级分期及预后提供新的靶点。

[0112] 尽管本发明的实施方案已公开如上,但其并不仅仅限于说明书和实施方式中所列运用,它完全可以被适用于各种适合本发明的领域,对于熟悉本领域的人员而言,可容易地实现另外的修改,因此在不背离权利要求及等同范围所限定的一般概念下,本发明并不限于特定的细节和这里示出与描述的实施方案。

<110> 中国人民解放军军事科学院军事医学研究院;首都医科大学
 <120> PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物及其特异性抗体的发明与应用
 <130> GNCLN191676
 <160> 2
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 403
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1
 Met Thr Ala Ile Ile Lys Glu Ile Val Ser Arg Asn Lys Arg Arg Tyr
 1 5 10 15
 Gln Glu Asp Gly Phe Asp Leu Asp Leu Thr Tyr Ile Tyr Pro Asn Ile
 20 25 30
 Ile Ala Met Gly Phe Pro Ala Glu Arg Leu Glu Gly Val Tyr Arg Asn
 35 40 45
 Asn Ile Asp Asp Val Val Arg Phe Leu Asp Ser Lys His Lys Asn His
 50 55 60
 Tyr Lys Ile Tyr Asn Leu Cys Ala Glu Arg His Tyr Asp Thr Ala Lys
 65 70 75 80
 Phe Asn Cys Arg Val Ala Gln Tyr Pro Phe Glu Asp His Asn Pro Pro
 85 90 95
 Gln Leu Glu Leu Ile Lys Pro Phe Cys Glu Asp Leu Asp Gln Trp Leu
 100 105 110
 Ser Glu Asp Asp Asn His Val Ala Ala Ile His Cys Lys Ala Gly Lys
 115 120 125
 Gly Arg Thr Gly Val Met Ile Cys Ala Tyr Leu Leu His Arg Gly Lys
 130 135 140
 Phe Leu Lys Ala Gln Glu Ala Leu Asp Phe Tyr Gly Glu Val Arg Thr
 145 150 155 160
 Arg Asp Lys Lys Gly Val Thr Ile Pro Ser Gln Arg Arg Tyr Val Tyr
 165 170 175
 Tyr Tyr Ser Tyr Leu Leu Lys Asn His Leu Asp Tyr Arg Pro Val Ala
 180 185 190
 Leu Leu Phe His Lys Met Met Phe Glu Thr Ile Pro Met Phe Ser Gly
 195 200 205
 Gly Thr Cys Asn Pro Gln Phe Val Val Cys Gln Leu Lys Val Lys Ile
 210 215 220

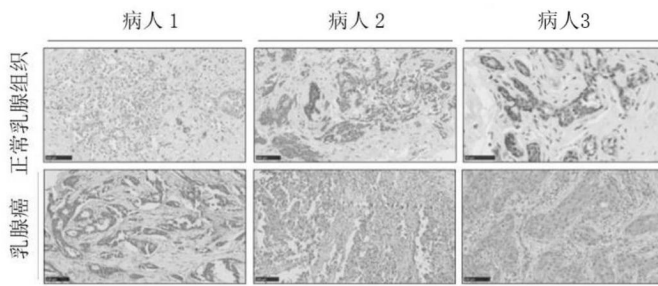
稀释倍数	抗体包被	PTEN K402位点被Nedd8 共价修饰的肽段
	OD450	
	1: 18K	3.059
	1: 54K	2.338
	1: 162K	1.497
	1: 486K	0.654
	1: 1458K	0.337
	1: 4374K	0.102

A

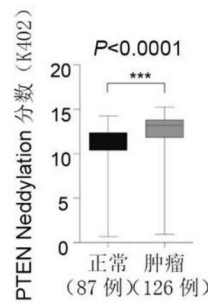


B

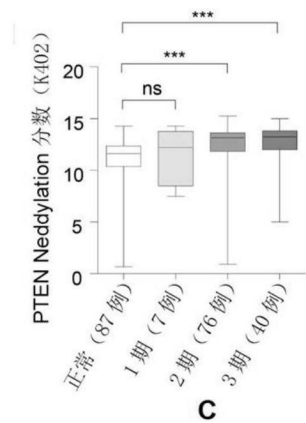
图1



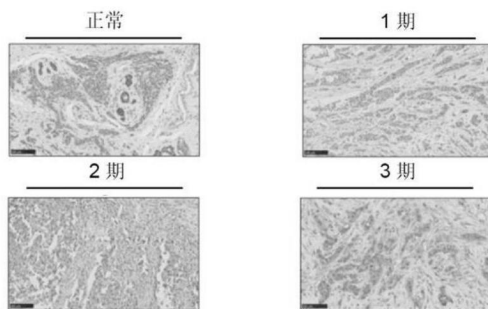
A



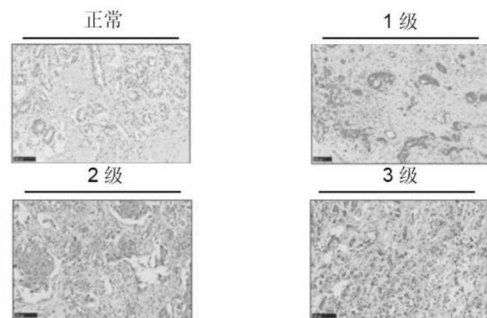
B



C



D



E

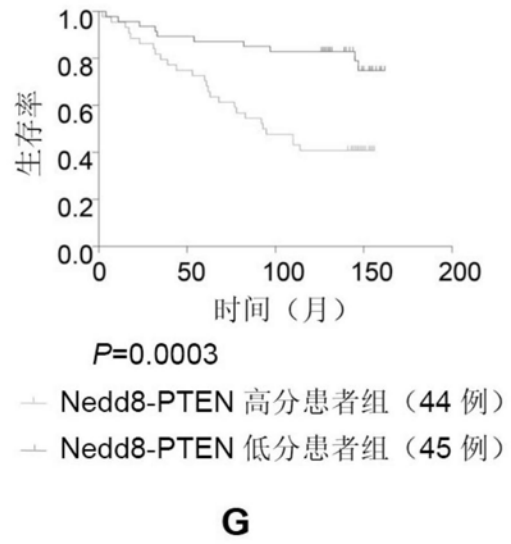
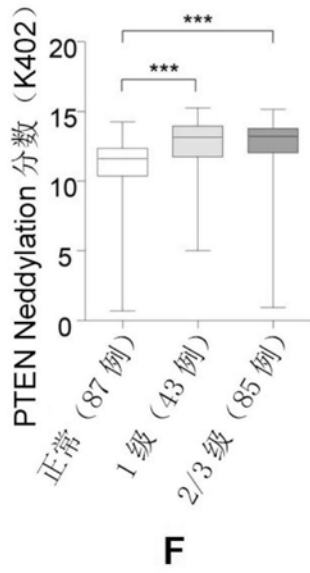
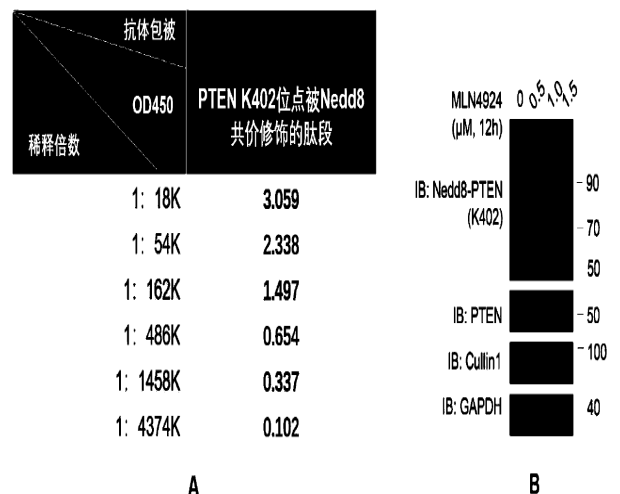


图2

专利名称(译)	PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物及其特异性抗体的发明与应用		
公开(公告)号	CN110412295A	公开(公告)日	2019-11-05
申请号	CN201910733073.4	申请日	2019-08-09
[标]申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
当前申请(专利权)人(译)	首都医科大学		
[标]发明人	张令强 谢萍 彭志强 陈玉娇 杜梦鸽		
发明人	张令强 谢萍 彭志强 陈玉娇 杜梦鸽		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/574 G01N33/531		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/57415 G01N33/57484 G01N33/6854 G01N33/6893		
代理人(译)	张立娜		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了PTEN Nedd8修饰作为乳腺癌新型标志物以及其特异性抗体的发明与应用。本发明提供了PTEN蛋白K402位点的Nedd8修饰作为标志物在制备用于评判乳腺癌分级分期的产品中的应用，以及在制备用于预测乳腺癌预后的产品中的应用。本发明还制备了PTEN Nedd8修饰抗体，其可以特异性识别PTEN K402位点的Nedd8修饰，PTEN Nedd8修饰随乳腺癌患者肿瘤恶性程度TNM分期和病理学分级的增加而增强，PTEN Nedd8修饰程度越高，患者预后越差。本发明对乳腺癌预测预后情况及为个体患者提供辅助治疗方案具有重要的临床意义。



A

B