



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107478842 A

(43)申请公布日 2017.12.15

(21)申请号 201710545890.8

G01N 33/533(2006.01)

(22)申请日 2015.07.01

(30)优先权数据

14/321,867 2014.07.02 US

14/321,870 2014.07.02 US

(62)分案原申请数据

201510379493.9 2015.07.01

(71)申请人 龙胜发展有限公司

地址 中国香港上环

(72)发明人 文咏贤 卫凤文 黄炳镠 卫智贤

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有

限公司 11270

代理人 景鹏 姚开丽

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书10页

序列表11页 附图12页

(54)发明名称

用于肝癌的无创诊断的特异性生物标志物组

(57)摘要

与毗邻肝肿瘤的正常肝组织上皮细胞相比肝肿瘤块内的细胞包含独特的一组蛋白/肿瘤抗原。肿瘤抗原的存在与针对这些肿瘤抗原的自身抗体的产生有关。本发明涉及一组蛋白的鉴定和说明,该组蛋白可以充当用于肝癌诊断和预后的一组新的标志物。具体地,其涉及能够对肝癌患者的血清中的自身抗体进行诊断性和预后性测量的试剂盒。本发明提供了一种无创的、特异性的、灵敏的和有成本效益的检测和定量方法,从而对常规诊断方法形成补充,该方法通过评价一组经验证的肝癌蛋白/肿瘤抗原实现,该组肝癌蛋白/肿瘤抗原包括Bmi-1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A或IL26。

点	蛋白	MW (kD)
1	Bmi1	37
2	VCC1	13.6
3	SUMO-4	11
4	RhoA	22
5	TXN	12
6	ET-1	24
7	UBE2C	20
8	HDGF2	74
9	FGF21	20
10	LECT2	16
11	SOD1	16
12	STMN4	22
13	中期因子	19
14	IL-17A	17.5
15	IL-26	20

1. 一种用于检测和定量针对多种肿瘤生物标志物的自身抗体以用于对肝癌进行诊断和分期的方法,所述方法包括:

将肿瘤细胞与正常细胞进行比较以评价作为所述癌症的多个特异性生物标志物的一组蛋白,该组蛋白在肿瘤细胞中是独特的,但在正常细胞中不是独特的;

通过使用基于二维的技术或基于质谱的技术从患者的配对活检样品中鉴定该组蛋白;验证用于诊断肝癌的该组蛋白,

其中该组蛋白从cDNA克隆表达、被纯化并偶联至具有不同发射波长的荧光微球珠以形成蛋白-珠缀合物,以及

其中存在于患者血清中的针对该组蛋白的自身抗体与所述蛋白-珠缀合物免疫结合。

2. 权利要求1所述的方法,其中所述自身抗体随后与PE-缀合的二抗相互反应,并且对所述微球珠特异的荧光信号充当所述蛋白-珠缀合物的标识物。

3. 权利要求2所述的方法,其中测量复合物处由所述PE-缀合的二抗赋予的荧光强度以允许检测和定量所述自身抗体。

4. 权利要求1所述的方法,进一步包括比较患者和健康受试者之间的血清以确定针对一种或多种对应生物标志物的自身抗体的水平。

5. 权利要求1所述的方法,进一步包括比较获自处于不同时期的不同患者的不同血清以生成用于分期的特征谱。

6. 权利要求1所述的方法,其中该组蛋白包括SEQ ID NO.1-15的氨基酸序列中的至少一个。

7. 权利要求1所述的方法,其中所述多种肿瘤生物标志物包括Bmi-1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A和IL26中的至少一种。

8. 权利要求1所述的方法,其中所述肿瘤细胞包含来自肝细胞癌(HCC)肿瘤的细胞。

9. 权利要求1所述的方法,其中每个所述荧光微球珠具有对每种与特异性肿瘤生物标志物的存在对应的蛋白特异的独特的荧光发射波长,其中由与每种所述特异性肿瘤生物标志物的蛋白的蛋白-珠缀合物结合的PE-缀合的二抗所生成的PE信号是在患者血清中如此产生的自身抗体的存在的指示物,并且所述PE信号的荧光强度与所述特异性肿瘤生物标志物的丰度成比例。

10. 权利要求1所述的方法,其中存在于所述自身抗体中的每种所述肿瘤生物标志物低至约0.15ng/mL。

11. 一种通过检测和定量来自患者的针对多种肿瘤生物标志物的自身抗体来对肝癌进行诊断和分期的试剂盒,所述试剂盒包括一组蛋白,该组蛋白表达自cDNA克隆、并被纯化和偶联至具有不同发射波长的荧光微球珠,以形成蛋白-珠缀合物用于免疫结合自身抗体并随后被PE-缀合的二抗靶向,使得能够测量荧光信号和强度以确定与正常受试者相比所述患者中的自身抗体的水平。

12. 权利要求11所述的试剂盒,其中该组蛋白包括SEQ ID NO.1-15的氨基酸序列中的至少一个。

13. 权利要求11所述的试剂盒,其中所述肿瘤生物标志物包括Bmi-1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A和IL26中的至

少一种。

14. 权利要求11所述的试剂盒,其中每个所述cDNA克隆包含带His标签的质粒,所述带His标签的质粒包含要在感受态细胞中表达的蛋白的对应cDNA插入物,所述蛋白用于与具有不同发射波长的荧光微球珠偶联,以形成用于免疫结合自身抗体并随后被PE-缀合的二抗靶向的蛋白-珠缀合物。

15. 权利要求11所述的试剂盒,其中多个各自产生独特荧光的的不同荧光微球珠与如此表达和纯化的该组蛋白缀合以形成蛋白-珠缀合物,并且将所述蛋白-珠缀合物预装入容器的孔中,并且向每个孔中装入包含自身抗体的患者血清并允许其与所述蛋白-珠缀合物相互作用,接着加入所述PE-缀合的二抗以结合所述自身抗体,然后洗掉任何过量的二抗并各自地测量包含所述蛋白-珠缀合物和级联的抗体的复合物,其中所述蛋白-珠缀合物的独特荧光信号标识特异性肿瘤生物标志物的存在,而来自所述复合物的二抗的PE信号指示患者血清中自身抗体的存在和所述肿瘤生物标志物的相对浓度。

16. 权利要求11所述的试剂盒,其中存在于所述自身抗体中的每种所述肿瘤生物标志物低至约0.15ng/mL。

用于肝癌的无创诊断的特异性生物标志物组

[0001] 本申请是申请日为2015年7月1日、申请人为龙胜发展有限公司、发明名称为“用于肝癌的无创诊断的特异性生物标志物组”的中国专利申请201510379493.9的分案申请。

[0002] 版权声明/许可

[0003] 本专利文件的公开内容的一部分含有接受版权保护的内容。版权拥有者不反对任何人影印复制专利文件或者专利公开,因为它出现在专利和商标局专利文档或记录中,但在其它方面保留所有版权。下面的声明适用于如下所述的和在本文附带的附图中的过程、实验和数据:版权©2014,Vision Global Holdings Limited,保留所有权利。

技术领域

[0004] 本发明描述了一种用于检测和定量一组特异性的和新的肝细胞癌(HCC)肿瘤生物标志物的方法,所述方法通过测量肝癌患者血清中的对应自身抗体来完成。该组生物标志物包括Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A和IL26。更具体地,本发明进一步描述了一种容易获得的高通量和灵敏的测试试剂盒的设计,以采取患者的外周血清样品来在早期以无创的方式检测肝癌,所述检测通过测量针对选自所述生物标志物组的至少一种生物标志物的自身抗体进行。本发明进一步允许鉴定用于分期的特征生物标志物谱,以及检测化疗治疗后的监测期期间的复发。本发明将支持自动数据分析。

背景技术

[0005] 肝细胞癌(HCC)是中国第二普遍的癌症,占总人口的5.7%[1]。大多数HCC患者发生快速的肿瘤进展,导致高死亡率。为了提高总生存率,对该疾病的早期诊断变得至关重要。目前,检测HCC的最普遍方式是血液检查,血液检查测量HCC肿瘤标志物诸如甲胎蛋白(AFP)的水平。AFP是在胎儿的发育过程中由卵黄囊和肝产生的血浆蛋白,作为血清白蛋白的一种形式。在正常条件下,AFP水平在出生后逐渐下降并且在成年人中保持低水平。肿瘤标志物的水平增加指示可能有肝癌。然而,AFP检查的主要问题是过多的假阳性。这是因为HCC不是导致AFP水平升高的唯一原因,酒精性肝炎、慢性肝炎或肝硬化也与AFP的升高相关。

[0006] 尽管AFP检查普遍被推荐用于肝癌的诊断,但其结果并不是结论性的。疑似患者将需要经历超声成像、CT扫描或对比MRI扫描以进一步确认。取肝活检以区分肿瘤是良性还是恶性的。然而,对HCC的常规检测具有一些限制性:(a)约20%的肝癌不产生升高水平的常用HCC肿瘤标志物[2]。(b)病毒性肝硬化会对血液检查产生假阳性结果[3]。(c)超声不能检测到小的肿瘤[4]。(d)CT扫描需要高的辐射剂量并且对小于1cm的肿瘤不灵敏[5]。(e)MRI扫描很昂贵,并且操作很耗时。由于这些限制,需要开发新的具有较高灵敏度和特异性的生物标志物筛选,目的是早期诊断HCC和/或确定HCC的预后,从而对常规方法进行补充。

[0007] 与紧靠肿瘤的正常肝上皮细胞相比,HCC肿瘤细胞往往会产生独特的一组蛋白。评价经验证的HCC肿瘤生物标志物具有有利于HCC诊断的巨大潜力。然而,不是所有生物标志

物本身可以在血清或尿中找到以进行方便的诊断。可选地,特异性针对生物标志物的自身抗体提供了评价生物标志物的表达的机会。在许多癌症中已经证明肿瘤生物标志物的存在与针对这些肿瘤抗原的自身抗体的产生有关[6-8]。检测患者血清中的自身抗体将允许我们更有效地检查生物标志物的存在。理想地,从外周血中检查自身抗体将是在早期以无创的方式检测肝癌的证据。妨碍生物标志物的临床应用的一个常见障碍是它们在被发现后并未被验证。但一旦经过验证,这些检查将具有成本效益并且是准确的。原型的设计也支持高通量筛选。这可以减少常规肝癌诊断所需的成本。

[0008] 下面列举的参考文献偶尔在说明书中引用。这些参考文献的每一篇公开内容都全部地通过引用合并于本文中。

[0009] [1]Chen JG,Zhang SW.Liver cancer epidemic in China:past,present and future(中国的肝癌流行病学:过去、现在和未来).Semin Cancer Biol.2011;21(1):59-69

[0010] [2]Okuda K,Peters RL.Human alpha-1fetoprotein(人 α -1胎蛋白).Hepatocellular Carcinoma.1976:353-67

[0011] [3]Lok AS,Lai CL.Alpha-fetoprotein monitoring in Chinese patients with chronic hepatitis E virus infection:role in the early detection of hepatocellular carcinoma(在患有慢性戊型肝炎病毒感染的中国患者中的甲胎蛋白监测:在肝细胞癌早期检测中的作用).Hepatolog.y 1989;9:110-115

[0012] [4]Colombo M,de Franchis R,Del Ninno E,Sangiovanni A,De Fazio C, Tommasini M,Donato MF,Piva A,Di Carlo V,Dioguardi N.Hepatocellular carcinoma in Italian patients with cirrhosis(患有肝硬化的意大利患者中的肝细胞癌).N Engl J Med.1991;325:675-80

[0013] [5]Sahani DV,Kalva SP.Imaging the Liver(对肝脏成像).The Oncologist.2004;9(4):385-397

[0014] [6]Masutomi K,Kaneko S,Yasukawa M,Arai K,Murakami S,Kobayashi K.Identification of serum anti-human telomerase reverse transcriptase(hTERT) auto-antibodies during progression to hepatocellular carcinoma(对进展至肝细胞癌期间血清抗人端粒酶反转录酶(hTERT)自身抗体的鉴定).Oncogene.2002Aug29;21(38):5946-50.

[0015] [7]Karanikas V,Khalil S,Kerenidi T,Gourgoulialis KI,Germenis AE.Anti-survivin antibody responses in lung cancer(肺癌中的抗存活素反应).Cancer Lett.2009Sep 18;282(2):159-66.

[0016] [8]Wang YQ,Zhang HH,Liu CL,Xia Q,Wu H,Yu XH,Kong W.Correlation between auto-antibodies to survivin and MUC1variable number tandem repeats in colorectal cancer(在结直肠癌中针对存活素的自身抗体和MUC1可变数目串联重复序列之间的相关性).Asian Pac J Cancer Prev.2012;13(11):5557-62.

发明内容

[0017] 在本发明中,提供了一种测量针对一组特异性肿瘤生物标志物的自身抗体以对癌症进行诊断和分期的检测和定量方法。与正常肝上皮细胞比较,HCC肿瘤细胞往往产生一组

独特的蛋白。对该组独特的蛋白(生物标志物)的评价将对常规诊断方法进行补充并有利于癌症的早期诊断。

[0018] 通过使用基于二维/质谱法的方法,在本发明中从患者的配对活检(肿瘤活检相对于毗邻的正常组织)中鉴定了一组肝癌生物标志物,包括Bmi1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A和IL26。

[0019] 然后验证了此组肝癌生物标志物的特异性和准确性,并一起用于诊断肝癌。在本发明中,列举的生物标志物的蛋白表达自cDNA克隆,其被纯化并偶联至具有不同发射波长的荧光微球珠。存在于患者血清中的针对所述蛋白的自身抗体免疫结合于蛋白-珠缀合物。自身抗体随后与藻红蛋白(PE)-缀合的二抗相互作用。微球珠的特异性荧光信号充当缀合的生物标志物的标识物。通过测量在复合物处由PE-缀合的二抗产生的荧光强度,能够检测和定量自身抗体。由于自身抗体是在患者血清中产生的,与HCC肿瘤细胞处的生物标志物的丰度成正比,因此由较高浓度的自身抗体所产生的较高荧光强度指示对应生物标志物的较高表达。针对总血清自身抗体的每种生物标志物的最低检测限为约0.15ng/mL。

[0020] 与来自健康受试者的血清相比,针对目标生物标志物的自身抗体的水平在癌症患者中处于较高的浓度。而且,比较来自处于不同时期的肝癌患者的不同血清,可以生成用于分期的特征谱。因此,本发明允许无创地评价被靶向的肝癌生物标志物。这使得能够检测处于早期阶段的HCC以及鉴定用于分期的特征生物标志物谱,以及检测化疗治疗后的监测期间的复发。

附图说明

[0021] 下文参照附图更详细地描述本发明的实施方案,在附图中:

[0022] 图1示出通过二维质谱法发现的肿瘤活检和毗邻的正常组织之间蛋白表达谱的差异,该法鉴别出在肝癌中上调的15种特异性生物标志物;箭头指示在质谱分析仪的2-D凝胶上鉴定出的点的位置。

[0023] 图2显示了在本发明中靶向和测量的一组15种经验证的肝癌生物标志物以及它们的对应分子量。

[0024] 图3显示了从cDNA克隆表达生物标志物的工作流程。

[0025] 图4显示了纯化表达自大肠杆菌的生物标志物的工作流程。

[0026] 图5显示了通过BioPlex系统测量自身抗体的工作流程。

[0027] 图6显示了生物标志物蛋白与BioPlex珠的缀合。

[0028] 图7显示了生物标志物-BioPlex珠缀合物与一抗和PE-缀合的二抗免疫反应的复合物的图示。

[0029] 图8显示了从被限制性内切酶HindIII和BamHI切割的质粒释放的DNA插入物的凝胶电泳。

[0030] 图9显示了考马斯蓝染色的SDS-PAGE,证明了异丙基- β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)对(a) Bmi1、(b) SOD1、(c) IL-17A、(d) TXN和(e) 中期因子生物标志物的诱导。

[0031] 图10显示了(a) Bmi1、(b) SOD-1和(e) IL-17A在AKTA中的洗脱图。

[0032] 图11显示了考马斯蓝染色的SDS-PAGE,证明了对带His-标签的(a) Bmi1、(b) SOD-1和(d) IL-17A生物标志物的纯化;级分A是未经IPTG诱导的细菌;级分B是利用IPTG诱导的细

菌;级分C是细菌溶解产物。

[0033] 图12显示了示出荧光强度相对于抗-Bmi1抗体的浓度的标准曲线。

[0034] 图13是显示了试验设计的示意图:将含有自身抗体的患者血清混合至含对应于生物标志物组的15种生物标志物的15种类型的珠子的孔中,然后添加PE-缀合的二抗。

具体实施方式

[0035] 定义

[0036] 术语“生物标志物”是指与正常上皮细胞相比在肿瘤中独特地表达或上调的蛋白。

[0037] 术语“生物标志物组”是指从患者的配对活检(肿瘤活检相对于毗邻的正常组织)中鉴定的生物标志物的特定组合,且其是本发明中测量的靶标。

[0038] 术语“自身抗体”是指由患者身体产生的抗体,其与肿瘤生物标志物的表达有关,并且其存在于循环中并且可以在外周血清中收集。

[0039] Bmi1(多梳环指)是多梳组(PcG)复合蛋白PRC1-样复合体的蛋白组分。其负责维持许多基因(包括Hox基因)在整个发育过程中的转录抑制状态。其调控经由组蛋白H2A' Lys-119'的单泛素化,单泛素化修饰组蛋白并重构染色质,导致表达。

[0040] VCC1或CXCL17(趋化因子(C-X-C基序)配体17)在血管生成并可能在肿瘤的发生中具有重要作用。也认为其是一种管家趋化因子,调控未活化的血液单核细胞和不成熟的树突状细胞至组织中的募集。其在针对感染的先天防御中也可能具有一定作用。VCC1的功能障碍与十二指肠炎和霍乱相关。

[0041] SUMO-4(小泛素样修饰物4)属于小的泛素相关修饰物家族且定位在细胞质中。其共价附着于靶蛋白IKBA以控制其亚细胞定位、稳定性或活性。这最终导致对IL12B基因的NF- κ -B-依赖性转录的负调控。

[0042] RhoA(Ras同源物家族成员A)调控联系质膜受体与粘着斑和肌动蛋白应力纤维的组装体的信号传导通路。其还参与细胞周期胞质分裂期间至关重要的微管依赖性信号传导,以及参与微管的稳定以及细胞迁移和粘附的其他信号传导通路。

[0043] TXN(硫氧还蛋白)形成同型二聚体,并且通过其活性中心二巯基化物可逆地氧化为二硫化物而参与到氧化还原反应中,并且催化二巯基化物-二硫化物交换反应。已报道其与乳腺粘液癌相关。

[0044] ET-1(内皮缩血管肽1)是由血管内皮细胞产生的强力血管收缩剂。其与在所有组织中广泛表达的内皮缩血管肽受体结合,所述组织包括非血管结构样上皮细胞、神经胶质和神经元。除了在维持血管张力中的主要作用以外,其还被认为具有共同促有丝分裂活性(co-mitogenic activity)并且增强其他生长因子的效应。

[0045] UBE2C(泛素缀合酶E2C)属于E2泛素缀合酶家族。这是参与泛素化的三种酶之一,泛素化是用于靶向异常蛋白以进行降解的重要细胞机制。更具体地,UBE2C是有丝分裂细胞周期蛋白的靶向降解和细胞周期进程所需要的。因此,据信此蛋白也可能参与癌症进展。

[0046] HDGF2称为肝癌衍生生长因子2。此蛋白在许多肿瘤中高度表达,据报道其在数种肿瘤的发生和进展中具有关键的作用。尽管机制尚未阐明,但认为HDGF2具有促有丝分裂、血管生成、神经营养和抗凋亡活性。

[0047] FGF21(成纤维细胞生长因子21)是FGF家族的家族成员,其参与多样的生物学过

程,包括胚胎发育、细胞生长、形态发生、组织修复、肿瘤生长和侵袭。更具体地,FGF21通过诱导葡萄糖转运蛋白SLC2A1/GLUT1表达来刺激分化的脂肪细胞中的葡萄糖更新。已经发现FGF21与脂肪肝病相关。

[0048] LECT2(白细胞衍生趋化因子1)是一种分泌蛋白,其充当中性粒细胞的趋化因子并且刺激软骨细胞和成骨细胞的生长。该蛋白与急性肝衰竭相关。

[0049] SOD1(超氧化物歧化酶1)是含Cu/Zn的抗氧化酶,其负责将胞液、细胞核和线粒体的膜间隙中的超氧自由基破坏成分子氧和过氧化氢。维持胞液中低水平的超氧化物是重要的,由此保护细胞免于发生氧化应激和随后的细胞死亡。

[0050] STMN4(Stathmin样蛋白4)是一种小的调控蛋白,据信该蛋白在传递整合多种多样的细胞内信号传导途径方面具有一定作用,该信号传导途径进而控制细胞增殖、分化和功能。还表明此蛋白通过抑制微管的聚合和/或有利于它们的解聚而促成对微管动力学的控制。

[0051] 中期因子或NEGF2(神经轴突生长促进因子2)是一种分泌性生长因子,其结合肝素并对维甲酸有反应。中期因子促进细胞生长、迁移和血管生成,特别是在肿瘤发生期间。已经证明其与乳腺癌和软组织肉瘤相关。

[0052] IL-17A(白细胞介素17A)是一种由活化的T细胞产生的促炎细胞因子。其调控NF- κ B和有丝分裂原激活的蛋白激酶的活性,刺激IL6和环氧合酶-2的表达,并且增加氧化氮的产生。几种慢性炎症和硬化症通常与IL-17A升高相关。

[0053] IL-26(白细胞介素26)属于IL-10细胞因子家族,并且由活化的T细胞产生,其靶向上皮细胞进行信号转导。其与细胞表面上的诸如肝素、硫酸肝素和硫酸皮肤素的糖胺聚糖强烈结合,糖胺聚糖以类似方式作用于复合受体以将IL-26富集在生产细胞和靶细胞的表面上。

[0054] 在下面的描述中,一种或多种生物标志物、检测/验证/鉴定/定量方法的相应实施方案作为优选实例给出。对于本领域技术人员来说显而易见的是,在不背离本发明的范围和精神的前提下,可以做出多种修改,包括添加和/或替换。可以省略具体细节以不使本发明难以理解;然而,撰写本公开内容的目的是使得本领域技术人员能够在不进行过多实验的情况下实施本文中的教导。

[0055] 在本发明中,用于检测和定量肝癌的肝肿瘤生物标志物组首先通过二维/质谱法鉴定,二维/质谱法解析患者的配对活检(肿瘤活检相对于毗邻的正常组织)之间蛋白表达谱的差异(图1)。生物标志物通过在石蜡切片的HCC块上进行免疫组织化学染色以及HCC患者血清中的Western印迹来验证。这样得到了要在本发明中进行评价以用于肝癌诊断目的的一组最终的15种生物标志物(图2)。

[0056] 基于被靶向的生物标志物的氨基酸序列,采用商业合成的cDNA克隆表达生物标志物组(图3)。然后使从cDNA克隆表达的蛋白接受一系列步骤的纯化(图4)。经纯化的生物标志物随后经稳定的酰胺键与BioPlex珠缀合(图5、6),BioPlex珠是一种荧光微球珠,可成组存在,其各自产生独特荧光信号用于在多路装置中标识。珠上的生物标志物被特异性一抗识别,该特异性一抗随后被与PE缀合的抗人二抗结合(图7)。因此BioPlex机器从复合物同时测量到两个信号。BioPlex珠发出的荧光充当标识物,同时来自PE的信号指示生物标志物存在于复合物中。这也有助于将通过抗体级联反应结合的生物标志物-珠缀合物和与抗体

没有免疫反应性的那些生物标志物-珠缀合物区分开。

[0057] 为了证明所述生物标志物在本发明中的重要性,通过限制性内切酶切割确认cDNA克隆(图8)。转化的细菌通过IPTG诱导以表达生物标志物蛋白。通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色验证的蛋白表达显露了蛋白条带(图9a-e)。带His-标签的Bmi1、SOD1和IL-17A蛋白通过AKTA纯化(图10a-c),然后通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色验证(图11a-c)。

[0058] 试验的灵敏度通过在系列稀释度的抗体中加入标准品(spiking)进行测量。添加的抗体可以得到信号的最低浓度提示该特定生物标志物的灵敏度。同时,构建显示PE的荧光强度相对于系列稀释度的抗体的标准曲线(图12)。所述标准曲线可以用于通过比较PE强度来评估患者血清中生物标志物特异性自身抗体的浓度。

[0059] 在本发明中,各自产生独特荧光的多个15种不同的Bioplex珠与生物标志物组缀合并预装在平板的孔中(图13)。向孔中装入含有自身抗体的患者血清并使其与生物标志物缀合物相互作用。然后加入PE-缀合的二抗并使其与自身抗体结合。在机器中,洗掉过量的二抗,各自地测量包含生物标志物-珠缀合物以及级联的抗体复合物。Bioplex珠的独特荧光信号标识生物标志物,而来自相同复合物的PE信号指示自身抗体作为一抗存在(图7)。总起来说,测量值将提示自身抗体的存在以及患者血清中的相对浓度。

[0060] 在标准化随机化试验设计中,比较健康组和诊断患有肝癌的患者之间自身抗体的相对水平的均值。使用T检验来分析变异显著性。显著性差异指示所述生物标志物对于肝癌是特异性的。在验证试验后,将获得肝癌阳性和阴性患者的生物标志物特异性自身抗体的浓度范围并将其用作未来诊断的参考点。同时,还在不同时期的肝癌患者之间比较自身抗体的表达谱。生物标志物表达的特征谱将指示HCC分期。

[0061] 总起来说,对相对自身抗体水平和生物标志物的表达谱的测量,本发明代表了补充常规肝癌诊断的不同方法。本发明进一步能够无创地检测针对患者血清中的本发明的经验证的靶标的自身抗体,鉴别疾病的程度和特征。除了早期检测I期肝癌以外,本发明还能够生成用于分期的特征谱,并检测乳房切除术后或化疗治疗后的监测期期间的复发。

[0062] 实施例

[0063] 通过描述本发明的具体实施方案提供下面的实施例,而不意在以任何方式限制本发明的范围。

[0064] 实施例1a

[0065] 从患者的活检中提取蛋白

[0066] 收集500mg患者的配对活检(肿瘤活检相对于毗邻的正常组织)并用PBS洗涤。通过浸没在液氮中冷冻组织,并立即用研杵和研钵将组织匀浆。向匀浆的样品中,加入裂解溶液(8M尿素,4%CHAPS,2%IPG缓冲液,0.2mg/ml PMSF),然后涡旋至少5min直至组织完全分散。然后通过4°C在14,000rpm离心10分钟将裂解产物澄清。通过2D Clean Up kit(清洗试剂盒)(Amersham)进一步清洗上清液以去除盐和杂质。用最小体积的再水化溶液(不添加DTT&IPG缓冲液)将片状沉淀物重悬。然后通过Bio-Rad蛋白测定法测量蛋白浓度,并将200g/管的等分试样在-70°C保存。

[0067] 实施例1b

[0068] 通过二维电泳解析蛋白

[0069] 向1ml再水化贮备溶液加入2.8mg DTT、5μl pharmalyte或IPG缓冲液和2μl溴酚

蓝。将50-100 μ g蛋白样品加入至含有250 μ l再水化溶液的13cm Immobiline DryStrip (IPG条)。在去除保护盖后,将IPG条定位在条架中,凝胶侧向下,并且用Cover Fluid覆盖以防止电泳期间脱水。然后将条放置在Ettan IPGphor (Amersham) 上进行等电点聚焦(第一维电泳)。

[0070] 在第一维电泳后,用平衡溶液(6M尿素2%SDS、50mM Tris HCl pH 6.8、30%甘油、0.002%溴酚蓝、每10ml缓冲液100mg DTT和每10ml缓冲液250mg IAA)将IPG条平衡,然后用1x SDS电泳缓冲液洗涤4-5次。将IPG条放置在第二维凝胶的顶部上面并且用密封溶液(在1x SDS电泳缓冲液中的0.5%低熔点琼脂糖、0.002%溴酚蓝)覆盖。然后进行第二维电泳:先30mA进行15min,接着以60mA进行3-4h。

[0071] 在完成第二维电泳后,从盒上取出凝胶,将其固定并用硝酸银染色。鉴定出代表15种上调的蛋白的15个点(图1)。为了鉴定蛋白(图2),将银染色的凝胶切片脱色并用胰蛋白酶消化以从凝胶中释放蛋白用于MALDI-TOF分析。

[0072] 实施例2a (SEQ ID NO.1)

[0073] Bmi1的氨基酸序列

[0074] MHRTRIKITELNPHLMCVLCGGYFIDATTIECLHSFCKTCIVRYLETSKYCPCIDVQVHKTRPLLNI
RSDKTLQDIVYKLVPLGFKNEMKRRRDFYAAHPSADAANGSNEDRGEVADEKRIITDDEIISLSIEFFDQNRDRK
VNKDKEKSKEEVNDKRYLRCPAAMTMHLRKFRLSKMDIPNTFQIDVMYEEEPKDYTYLMDIAYIYTWRNGPLPL
KYRVRPTCKRMKISHQRDGLTNAGELES DSGSDKANSPAGGIPSTSSCLPSPSTPVQSPHPQFPHISSTMNGTSNSP
SGNHQSSFANRPRKSSVNGSSATSSG

[0075] 实施例2b (SEQ ID NO.2)

[0076] VCC1的氨基酸序列

[0077] MKVLISSLLLLLPLMLMSMVSSSLNPGVARGHRDRGQASRRWLQEGGQECECKDWFLRAPRRKFMTVSG
LPKKQCPCDHFKGNVKKTRHQRHHRKPNKHSRACQQLKQCQLRSFALPL

[0078] 实施例2c (SEQ ID NO.3)

[0079] SUMO-4的氨基酸序列

[0080] MANEKPTTEVKTENNNHINLKVAGQDGSVVQFKIKRQTPLSKLMKAYCEPRGLSVKQIRFRFGGQPISG
TDKPAQLEMEDEDTIDVFQQPTGGVY

[0081] 实施例2d (SEQ ID NO.4)

[0082] RhoA的氨基酸序列

[0083] MAAIRKKLVIVGDGACGKTCLLIVFSKDQFPEVYVPTVFENYVADIEVDGKQVELALWDTAGQEDYDRL
RPLSYPD TDVILMCF SIDSPDSLENIPEKWTPEVKHFPCNPVPIILVGNKKDLRND EHTRRELAKMKQEPVKPEEGRD
MANRIGAFGYMECSAKTKDGVREVFEMATRAALQARRGKKKSGCLVL

[0084] 实施例2e (SEQ ID NO.5)

[0085] TXN的氨基酸序列

[0086] MVKQIESKTAFQEALDAAGDKLVVDFSATWCGPCKMIKPFHSLSEKYSNVIFLEVDVDDCQDVASEC
EVKCMPTFQFFKKGQKVGFEFSGANKEKLEATINELV

[0087] 实施例2f (SEQ ID NO.6)

[0088] ET-1的氨基酸序列

[0089] MDYLLMIFSLLFVACQGAPETA VLGAELSAVGENGGEKPTSPPPWRLRRSKRCS CSSLMDKECVYFCHL

DIIWVNTPEHVVPYGLGSPRSKRALENLLPTKATDRENRCQCASQKDKKCWNFCQAGKELRAEDIMEKDWNNHKKGK
DCSKLGKKCIYQQQLVRGRKIRRSSEEHLRQTRSETMRNSVKSSFHDPKLGKNSRERYVTHNRAHW

[0090] 实施例2g (SEQ ID NO.7)

[0091] UBE2C的氨基酸序列

[0092] MASQNRDPAATSVAAARKGAEPSSGAARGPVGKRLQQELMTLMMSGDKGISAFPESDNLFKWVGTIHGA
AGTVYEDLRYKLSLEFPSPGYPNAPTVMKFLTPCYHPNVDTQGNICLDILKEKWSALYDVRTILLSIQSLLGEPNIDS
PLNTHAAELWKNPTAFKKYLQETYSKQVTSQEP

[0093] 实施例2h (SEQ ID NO.8)

[0094] HDGF2的氨基酸序列

[0095] MARPRPREYKAGDLVFAKMKGYPHWPARIDELPEGAVKPPANKYPIFFFGTHETAFLGPKDLFPYKEYK
DKFGKSNKRKGFNEGLWEIENNPVGFYQAIQQQSSSETEGEGGNTADASSEEGDRVEEDGKGRKNEKAGSKR
KKSYSKSSKQSRKSPGDEDDKCKEENKSSSEGGDAGNDRNTTSDLQKTSEGT

[0096] 实施例2i (SEQ ID NO.9)

[0097] FGF21的氨基酸序列

[0098] MDSDETFEHSGLWVSVLAGLLLACQAHPIPDSSPLLQFQQVVRQRYLYTDDAQQTEAHLEIREDGTV
GGAADQSPESLLQLKALKPGVIQILGVKTSRFLCQRPDQALYGLHFDPEACSFRELLEDGYNVYQSEAHGLPLHL
PGNKSPHRDPAPRGPAPRFLPLPLPALPEPPGILAPQPPDVGSSDPLSMVGPSQGRSPSYAS

[0099] 实施例2j (SEQ ID NO.10)

[0100] LECT2的氨基酸序列

[0101] MFSTKALLLAGLISTALAGPWANICAGKSSNEIRTCDRHGCGQYSAQRSQRPHQGVLDVLCAGSTVYAP
FTGMIVGQEKPYQNKNAINNGVIRISGRGFCVKMFYIKPIKYKGPICKGKGLTLLPLQKVYPGIQSHVHIENCSSD
PTAYL

[0102] 实施例2k (SEQ ID NO.11)

[0103] SOD1的氨基酸序列

[0104]

MATKAVCVLKGDPVQGIINFEQKESNGPVKVGSIKGLTEGLHGFHVHEFGDNTAGCTSAGPHFNPLSRKHGGPKD
EERHVGD LGNVTADKGVADVSIEDVISLSGDHCIIIGRTL VVHEKADDLGKGGNEESTKTGNAGSRLACGVIGIAQ

实施例2l (SEQ ID NO.12)

[0105] STMN4的氨基酸序列

[0106] MTLAAYKEKMKELPLVSLFCSCFLADPLNKSSYKYEADTVDLNWCVISDMEVIELNKCTSGQSFEVILK
PPSFDGVPEFNASLPRRRDPSLEEIQKKLEAAEERRKYQEAELLKHLAEKREHEREVIQKAIENNNFIKMAKEKLA
QKMESNKENREAHLAAMLERLQEKDKHAEVVRKNKELKEEASR

[0107] 实施例2m (SEQ ID NO.13)

[0108] 中期因子 (midkine) 的氨基酸序列

[0109] MQHRGFLLLTLALLALTSVAKKKDKVKKGGPGSECAEWAWGPCTPSSKDCGVGFREGTCGAQTQRIR
CRVPCNWKKEFGADCKYKFENWGACDGGTGTKVRQGTLLKARYNAQCQETIRVTKPCTPKTKAKAKKGGKGD

[0110] 实施例2n (SEQ ID NO.14)

[0111] IL-17A的氨基酸序列

[0112] MTPGKTSLVSLLLLLSLEAIVKAGITIPRNP GCPNSEDKNFPRTVMVNLNIHNRNTNTNPKRSSDYNR

STSPWNLHRNEDPERYPVSIWEAKCRHLGCINADGNVDYHMNSVPIQQEILVLRREPPHPCNSFRLEKILVSVGCTC
VTPIVHHVA

[0113] 实施例2o (SEQ ID NO.15)

[0114] IL-26的氨基酸序列

[0115] MLVNFILRCGLLLVTLSLAIAKHKQSSFTKSCYPRGTLQAVDALYIKAAWLKATIPEDRIKNIRLLKK
KTKKQFMKNCQFQEQLLSFFMEDVFGQLQLQGCKKIRFVEDFHSLRQKLSHCISCASSAREMKSITRMKRIFYRIGN
KGIYKAISELDILLSWIKKLESSQ

[0116] 实施例3a

[0117] 生物标志物组的表达

[0118] 将含有编码生物标志物组的cDNA插入物的带His标签的质粒转化至DH5感受态细胞中(301,图3)。挑出单个集落并使其在细菌培养物中生长(302)。扩充质粒的数目,并通过miniprep从细菌中提取质粒。将质粒进一步转化至BL21DE3或BL21DE3pLysS感受态细胞中。选择转化的细菌并使其在2X 100ml LB培养基中生长。当细菌培养物达到0.06的光密度时,向100ml细菌培养物加入200 μ M IPTG(303)。使用不含IPTG的另外100ml细菌培养物作为阴性对照。将细菌培养物在30 $^{\circ}$ C摇动孵育。在孵育后3h以及在孵育过夜后的第二天早晨保留500 μ l细菌培养物并在-20 $^{\circ}$ C贮存。

[0119] 将进行IPTG诱导以及未进行IPTG诱导的细菌培养物在500ml离心瓶中混合在一起。通过在4 $^{\circ}$ C以9000rpm离心20min收集细菌细胞(304)。保留500 μ l上清液作为另一阴性对照,并弃去剩余的上清液。对在不同的点收集的细菌培养物和阴性对照进行SDS-PAGE电泳以解析蛋白(305)。然后将凝胶用考马斯蓝染色过夜。在将凝胶脱色后,可以通过检查尺寸和与阴性对照比较来确认蛋白诱导。

[0120] 实施例3b

[0121] 对生物标志物组的蛋白纯化

[0122] 将细菌细胞片状沉淀物通过在室温下涡旋重悬在10ml增溶缓冲液中。将重悬的细胞保持在处于冰上的50ml离心管中,通过以70%的振幅进行10轮超声完全裂解细胞,每轮为超声30秒、间隔30秒(401,图4)。裂解的细胞在4 $^{\circ}$ C以10,000rpm离心1h(402)。将上清液转移至透析管中并浸没在4 $^{\circ}$ C的1L未过滤的起始缓冲液4-6h并持续搅拌(403)。用另一份1L起始缓冲液继续透析过夜。上清液进一步用0.22 μ m滤片和注射器过滤。向装配有装填了0.1M硫酸镍的HiTrap螯合柱的AKTA机器(404)中加载经过滤的样品(405)。在AKTA机器上设定程序,自动地将洗脱液以多个级分收集(406)。从不同级分纯化的蛋白通过SDS-PAGE分析检查(407)。

[0123] 实施例4a

[0124] 蛋白与Bio-Plex珠的偶联

[0125] 根据生产厂商的指导手册将纯化的生物标志物组的蛋白与Bio-Plex珠(Bio-Rad)偶联(501)。简言之,将未偶联的珠子涡旋30s,然后超声作用15s。通过以最大速度将100 μ l珠子离心4min将1,250,000个珠子收集在反应管中。在用100 μ l珠子洗涤缓冲液通过离心洗涤后,将珠子重悬在80 μ l珠子活化缓冲液中。向珠子添加10 μ l 50mg/ml新鲜制备的N-羟基磺酸琥珀酰亚胺(S-NHS)和10 μ l 50mg/ml新鲜制备的1-乙基-3-(3-二甲氨基丙基)碳化二亚胺(EDC),接着在室温下在暗处孵育20min(图6)。然后用150 μ l PBS洗涤珠子两次。

[0126] 向洗涤过的珠子添加10 μ g蛋白,并用PBS将总体积加满至500 μ l,并使其在暗处摇动孵育2h。在以最大速度离心4min后去除上清液。向珠子添加250 μ l封闭缓冲液并在暗处震荡30min,接着以最大速度离心4min,并移除上清液。将珠子简单洗涤,然后将其重悬在储存缓冲液中在4 $^{\circ}$ C储存。利用血细胞计数器计数珠子的数目。

[0127] 实施例4b

[0128] 对蛋白-珠子偶联的验证

[0129] 向HTS 96孔板加入50 μ l缀合的Bio-Plex珠(100珠/ μ l)以与一抗反应,然后与二抗反应(502)。制备市售的针对生物标志物组的一抗的系列稀释液:8,000、4,000、1,000、250、62.5、15.625、3.906、0.977、0.244和0.061ng/ml。将50 μ l每种稀释液加入至每孔中。通过在孔中不包括一抗、以及一抗和二抗两者制备两个阴性对照。然后用箔封闭板,并将其保持在振荡器上以350rpm持续30min,并避光。

[0130] 孵育后,用150 μ l PBS洗涤珠子3次。将50 μ l PE-缀合的二抗(8,000ng/ml)添加至每孔中,除了阴性对照以外。再次密封板,将板在暗处摇动孵育30min。然后通过PBS洗掉过量的抗体。用校正试剂盒和验证试剂盒校正Bio-Plex机器。在将HTS板加载至机器上后,测量来自Bio-Plex珠和二抗上缀合的PE两者的信号(503)(示意图显示在图7中)。通过Logistic-5PL生成校正曲线。

[0131] 实施例4c:

[0132] 通过BioPlex系统收集血清样品并测量自身抗体

[0133] 通过在37 $^{\circ}$ C静置1h使全血样品凝固。在以1000g室温离心10min后在上清液收集包含自身抗体的血清。当需要时用PBS稀释血清样品。向预先装载了缀合有生物标志物组的Bioplex珠的HTS板加载血清样品、摇动孵育30min(图13)。类似于实施例4b中所述的步骤,向PBS洗过的珠子加入50 μ l PE-缀合的二抗(8000ng/ml),接着震荡另外30min。在三轮洗涤后,将板加载至Bio-Plex机器并测量荧光信号(504)。然后可以从标准曲线计算自身抗体的浓度。

[0134] 为了说明和描述的目的,前面已经提供了对本发明的描述。其不意在是穷尽的或限制本发明于所公开的准确形式。许多改型和变化形式对于本领域中熟练的从业人员来说是显而易见的。

[0135] 选择并描述多个实施方案以最好地解释本发明的原理及其实际应用,由此使得本领域其他技术人员能够理解本发明的多种实施方案并利用适合于所考虑的特定用途的各种改型。意在由下面的权利要求及其等效形式限定本发明的范围。

[0136] 工业实用性

[0137] 本申请要求保护的方法和包含15种经鉴定的生物标志物的试剂盒可以不仅用来鉴定和定量患者血清中自身抗体的存在以对肝癌进行检测和/或分期,而且也可用于靶向这些标志物的药物开发以用于专门地治疗肝癌。

序列表

<110> 龙胜发展有限公司

<120> 用于肝癌的无创诊断的特异性生物标志物组

<130> P7783PC00

<150> US 14/321,867

<151> 2014-07-02

<150> US 14/321,870

<151> 2014-07-02

<160> 15

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 326

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 1

```

Met His Arg Thr Thr Arg Ile Lys Ile Thr Glu Leu Asn Pro His Leu
1           5           10           15
Met Cys Val Leu Cys Gly Gly Tyr Phe Ile Asp Ala Thr Thr Ile Ile
           20           25           30
Glu Cys Leu His Ser Phe Cys Lys Thr Cys Ile Val Arg Tyr Leu Glu
           35           40           45
Thr Ser Lys Tyr Cys Pro Ile Cys Asp Val Gln Val His Lys Thr Arg
           50           55           60
Pro Leu Leu Asn Ile Arg Ser Asp Lys Thr Leu Gln Asp Ile Val Tyr
65           70           75           80
Lys Leu Val Pro Gly Leu Phe Lys Asn Glu Met Lys Arg Arg Arg Asp
           85           90           95
Phe Tyr Ala Ala His Pro Ser Ala Asp Ala Ala Asn Gly Ser Asn Glu
           100          105          110
Asp Arg Gly Glu Val Ala Asp Glu Asp Lys Arg Ile Ile Thr Asp Asp
           115          120          125
Glu Ile Ile Ser Leu Ser Ile Glu Phe Phe Asp Gln Asn Arg Leu Asp
           130          135          140
Arg Lys Val Asn Lys Asp Lys Glu Lys Ser Lys Glu Glu Val Asn Asp
145          150          155          160
Lys Arg Tyr Leu Arg Cys Pro Ala Ala Met Thr Val Met His Leu Arg
           165          170          175
Lys Phe Leu Arg Ser Lys Met Asp Ile Pro Asn Thr Phe Gln Ile Asp

```


115

<210> 3

<211> 95

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 3

Met Ala Asn Glu Lys Pro Thr Glu Glu Val Lys Thr Glu Asn Asn Asn
 1 5 10 15
 His Ile Asn Leu Lys Val Ala Gly Gln Asp Gly Ser Val Val Gln Phe
 20 25 30
 Lys Ile Lys Arg Gln Thr Pro Leu Ser Lys Leu Met Lys Ala Tyr Cys
 35 40 45
 Glu Pro Arg Gly Leu Ser Val Lys Gln Ile Arg Phe Arg Phe Gly Gly
 50 55 60
 Gln Pro Ile Ser Gly Thr Asp Lys Pro Ala Gln Leu Glu Met Glu Asp
 65 70 75 80
 Glu Asp Thr Ile Asp Val Phe Gln Gln Pro Thr Gly Gly Val Tyr
 85 90 95

<210> 4

<211> 193

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 4

Met Ala Ala Ile Arg Lys Lys Leu Val Ile Val Gly Asp Gly Ala Cys
 1 5 10 15
 Gly Lys Thr Cys Leu Leu Ile Val Phe Ser Lys Asp Gln Phe Pro Glu
 20 25 30
 Val Tyr Val Pro Thr Val Phe Glu Asn Tyr Val Ala Asp Ile Glu Val
 35 40 45
 Asp Gly Lys Gln Val Glu Leu Ala Leu Trp Asp Thr Ala Gly Gln Glu
 50 55 60
 Asp Tyr Asp Arg Leu Arg Pro Leu Ser Tyr Pro Asp Thr Asp Val Ile
 65 70 75 80
 Leu Met Cys Phe Ser Ile Asp Ser Pro Asp Ser Leu Glu Asn Ile Pro
 85 90 95
 Glu Lys Trp Thr Pro Glu Val Lys His Phe Cys Pro Asn Val Pro Ile
 100 105 110
 Ile Leu Val Gly Asn Lys Lys Asp Leu Arg Asn Asp Glu His Thr Arg
 115 120 125

Arg Glu Leu Ala Lys Met Lys Gln Glu Pro Val Lys Pro Glu Glu Gly
 130 135 140
 Arg Asp Met Ala Asn Arg Ile Gly Ala Phe Gly Tyr Met Glu Cys Ser
 145 150 155 160
 Ala Lys Thr Lys Asp Gly Val Arg Glu Val Phe Glu Met Ala Thr Arg
 165 170 175
 Ala Ala Leu Gln Ala Arg Arg Gly Lys Lys Lys Ser Gly Cys Leu Val
 180 185 190

Leu

<210> 5

<211> 105

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 5

Met Val Lys Gln Ile Glu Ser Lys Thr Ala Phe Gln Glu Ala Leu Asp
 1 5 10 15
 Ala Ala Gly Asp Lys Leu Val Val Val Asp Phe Ser Ala Thr Trp Cys
 20 25 30
 Gly Pro Cys Lys Met Ile Lys Pro Phe Phe His Ser Leu Ser Glu Lys
 35 40 45
 Tyr Ser Asn Val Ile Phe Leu Glu Val Asp Val Asp Asp Cys Gln Asp
 50 55 60
 Val Ala Ser Glu Cys Glu Val Lys Cys Met Pro Thr Phe Gln Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Lys Gly Gln Lys Val Gly Glu Phe Ser Gly Ala Asn Lys Glu Lys
 85 90 95
 Leu Glu Ala Thr Ile Asn Glu Leu Val
 100 105

<210> 6

<211> 212

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 6

Met Asp Tyr Leu Leu Met Ile Phe Ser Leu Leu Phe Val Ala Cys Gln
 1 5 10 15
 Gly Ala Pro Glu Thr Ala Val Leu Gly Ala Glu Leu Ser Ala Val Gly
 20 25 30
 Glu Asn Gly Gly Glu Lys Pro Thr Pro Ser Pro Pro Trp Arg Leu Arg
 35 40 45

Arg Ser Lys Arg Cys Ser Cys Ser Ser Leu Met Asp Lys Glu Cys Val
 50 55 60
 Tyr Phe Cys His Leu Asp Ile Ile Trp Val Asn Thr Pro Glu His Val
 65 70 75 80
 Val Pro Tyr Gly Leu Gly Ser Pro Arg Ser Lys Arg Ala Leu Glu Asn
 85 90 95
 Leu Leu Pro Thr Lys Ala Thr Asp Arg Glu Asn Arg Cys Gln Cys Ala
 100 105 110
 Ser Gln Lys Asp Lys Lys Cys Trp Asn Phe Cys Gln Ala Gly Lys Glu
 115 120 125
 Leu Arg Ala Glu Asp Ile Met Glu Lys Asp Trp Asn Asn His Lys Lys
 130 135 140
 Gly Lys Asp Cys Ser Lys Leu Gly Lys Lys Cys Ile Tyr Gln Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Arg Gly Arg Lys Ile Arg Arg Ser Ser Glu Glu His Leu Arg Gln
 165 170 175
 Thr Arg Ser Glu Thr Met Arg Asn Ser Val Lys Ser Ser Phe His Asp
 180 185 190
 Pro Lys Leu Lys Gly Asn Pro Ser Arg Glu Arg Tyr Val Thr His Asn
 195 200 205
 Arg Ala His Trp
 210
 <210> 7
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 7
 Met Ala Ser Gln Asn Arg Asp Pro Ala Ala Thr Ser Val Ala Ala Ala
 1 5 10 15
 Arg Lys Gly Ala Glu Pro Ser Gly Gly Ala Ala Arg Gly Pro Val Gly
 20 25 30
 Lys Arg Leu Gln Gln Glu Leu Met Thr Leu Met Met Ser Gly Asp Lys
 35 40 45
 Gly Ile Ser Ala Phe Pro Glu Ser Asp Asn Leu Phe Lys Trp Val Gly
 50 55 60
 Thr Ile His Gly Ala Ala Gly Thr Val Tyr Glu Asp Leu Arg Tyr Lys
 65 70 75 80
 Leu Ser Leu Glu Phe Pro Ser Gly Tyr Pro Tyr Asn Ala Pro Thr Val
 85 90 95

Lys Phe Leu Thr Pro Cys Tyr His Pro Asn Val Asp Thr Gln Gly Asn
 100 105 110
 Ile Cys Leu Asp Ile Leu Lys Glu Lys Trp Ser Ala Leu Tyr Asp Val
 115 120 125
 Arg Thr Ile Leu Leu Ser Ile Gln Ser Leu Leu Gly Glu Pro Asn Ile
 130 135 140
 Asp Ser Pro Leu Asn Thr His Ala Ala Glu Leu Trp Lys Asn Pro Thr
 145 150 155 160
 Ala Phe Lys Lys Tyr Leu Gln Glu Thr Tyr Ser Lys Gln Val Thr Ser
 165 170 175
 Gln Glu Pro
 <210> 8
 <211> 203
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 8
 Met Ala Arg Pro Arg Pro Arg Glu Tyr Lys Ala Gly Asp Leu Val Phe
 1 5 10 15
 Ala Lys Met Lys Gly Tyr Pro His Trp Pro Ala Arg Ile Asp Glu Leu
 20 25 30
 Pro Glu Gly Ala Val Lys Pro Pro Ala Asn Lys Tyr Pro Ile Phe Phe
 35 40 45
 Phe Gly Thr His Glu Thr Ala Phe Leu Gly Pro Lys Asp Leu Phe Pro
 50 55 60
 Tyr Lys Glu Tyr Lys Asp Lys Phe Gly Lys Ser Asn Lys Arg Lys Gly
 65 70 75 80
 Phe Asn Glu Gly Leu Trp Glu Ile Glu Asn Asn Pro Gly Val Lys Phe
 85 90 95
 Thr Gly Tyr Gln Ala Ile Gln Gln Gln Ser Ser Ser Glu Thr Glu Gly
 100 105 110
 Glu Gly Gly Asn Thr Ala Asp Ala Ser Ser Glu Glu Glu Gly Asp Arg
 115 120 125
 Val Glu Glu Asp Gly Lys Gly Lys Arg Lys Asn Glu Lys Ala Gly Ser
 130 135 140
 Lys Arg Lys Lys Ser Tyr Thr Ser Lys Lys Ser Ser Lys Gln Ser Arg
 145 150 155 160
 Lys Ser Pro Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asp Cys Lys Glu Glu Glu Asn
 165 170 175
 Lys Ser Ser Ser Glu Gly Gly Asp Ala Gly Asn Asp Thr Arg Asn Thr

	180		185		190
Thr Ser Asp	Leu Gln Lys	Thr Ser Glu Gly Thr			
	195		200		
<210> 9					
<211> 209					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					
<400> 9					
Met Asp Ser Asp Glu Thr Gly Phe Glu His Ser Gly Leu Trp Val Ser					
1	5		10		15
Val Leu Ala Gly Leu Leu Leu Gly Ala Cys Gln Ala His Pro Ile Pro					
	20		25		30
Asp Ser Ser Pro Leu Leu Gln Phe Gly Gly Gln Val Arg Gln Arg Tyr					
	35		40		45
Leu Tyr Thr Asp Asp Ala Gln Gln Thr Glu Ala His Leu Glu Ile Arg					
	50		55		60
Glu Asp Gly Thr Val Gly Gly Ala Ala Asp Gln Ser Pro Glu Ser Leu					
65	70		75		80
Leu Gln Leu Lys Ala Leu Lys Pro Gly Val Ile Gln Ile Leu Gly Val					
	85		90		95
Lys Thr Ser Arg Phe Leu Cys Gln Arg Pro Asp Gly Ala Leu Tyr Gly					
	100		105		110
Ser Leu His Phe Asp Pro Glu Ala Cys Ser Phe Arg Glu Leu Leu Leu					
	115		120		125
Glu Asp Gly Tyr Asn Val Tyr Gln Ser Glu Ala His Gly Leu Pro Leu					
	130		135		140
His Leu Pro Gly Asn Lys Ser Pro His Arg Asp Pro Ala Pro Arg Gly					
145	150		155		160
Pro Ala Arg Phe Leu Pro Leu Pro Gly Leu Pro Pro Ala Leu Pro Glu					
	165		170		175
Pro Pro Gly Ile Leu Ala Pro Gln Pro Pro Asp Val Gly Ser Ser Asp					
	180		185		190
Pro Leu Ser Met Val Gly Pro Ser Gln Gly Arg Ser Pro Ser Tyr Ala					
	195		200		205
Ser					
<210> 10					
<211> 151					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					

<400> 10

Met Phe Ser Thr Lys Ala Leu Leu Leu Ala Gly Leu Ile Ser Thr Ala
 1 5 10 15
 Leu Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ile Cys Ala Gly Lys Ser Ser Asn Glu
 20 25 30
 Ile Arg Thr Cys Asp Arg His Gly Cys Gly Gln Tyr Ser Ala Gln Arg
 35 40 45
 Ser Gln Arg Pro His Gln Gly Val Asp Val Leu Cys Ser Ala Gly Ser
 50 55 60
 Thr Val Tyr Ala Pro Phe Thr Gly Met Ile Val Gly Gln Glu Lys Pro
 65 70 75 80
 Tyr Gln Asn Lys Asn Ala Ile Asn Asn Gly Val Arg Ile Ser Gly Arg
 85 90 95
 Gly Phe Cys Val Lys Met Phe Tyr Ile Lys Pro Ile Lys Tyr Lys Gly
 100 105 110
 Pro Ile Lys Lys Gly Glu Lys Leu Gly Thr Leu Leu Pro Leu Gln Lys
 115 120 125
 Val Tyr Pro Gly Ile Gln Ser His Val His Ile Glu Asn Cys Asp Ser
 130 135 140
 Ser Asp Pro Thr Ala Tyr Leu
 145 150

<210> 11

<211> 153

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 11

Met Ala Thr Lys Ala Val Cys Val Leu Lys Gly Asp Gly Pro Val Gln
 1 5 10 15
 Gly Ile Ile Asn Phe Glu Gln Lys Glu Ser Asn Gly Pro Val Lys Val
 20 25 30
 Trp Gly Ser Ile Lys Gly Leu Thr Glu Gly Leu His Gly Phe His Val
 35 40 45
 His Glu Phe Gly Asp Asn Thr Ala Gly Cys Thr Ser Ala Gly Pro His
 50 55 60
 Phe Asn Pro Leu Ser Arg Lys His Gly Gly Pro Lys Asp Glu Glu Arg
 65 70 75 80
 His Val Gly Asp Leu Gly Asn Val Thr Ala Asp Lys Asp Gly Val Ala
 85 90 95
 Asp Val Ser Ile Glu Asp Val Ile Ser Leu Ser Gly Asp His Cys Ile

	100		105		110
Ile Gly Arg Thr Leu Val Val His Glu Lys Ala Asp Asp Leu Gly Lys					
	115		120		125
Gly Gly Asn Glu Glu Ser Thr Lys Thr Gly Asn Ala Gly Ser Arg Leu					
	130		135		140
Ala Cys Gly Val Ile Gly Ile Ala Gln					
145			150		
<210> 12					
<211> 189					
<212> PRT					
<213> 人(Homo sapiens)					
<400> 12					
Met Thr Leu Ala Ala Tyr Lys Glu Lys Met Lys Glu Leu Pro Leu Val					
1	5		10		15
Ser Leu Phe Cys Ser Cys Phe Leu Ala Asp Pro Leu Asn Lys Ser Ser					
	20		25		30
Tyr Lys Tyr Glu Ala Asp Thr Val Asp Leu Asn Trp Cys Val Ile Ser					
	35		40		45
Asp Met Glu Val Ile Glu Leu Asn Lys Cys Thr Ser Gly Gln Ser Phe					
	50		55		60
Glu Val Ile Leu Lys Pro Pro Ser Phe Asp Gly Val Pro Glu Phe Asn					
65	70		75		80
Ala Ser Leu Pro Arg Arg Arg Asp Pro Ser Leu Glu Glu Ile Gln Lys					
	85		90		95
Lys Leu Glu Ala Ala Glu Glu Arg Arg Lys Tyr Gln Glu Ala Glu Leu					
	100		105		110
Leu Lys His Leu Ala Glu Lys Arg Glu His Glu Arg Glu Val Ile Gln					
	115		120		125
Lys Ala Ile Glu Glu Asn Asn Asn Phe Ile Lys Met Ala Lys Glu Lys					
	130		135		140
Leu Ala Gln Lys Met Glu Ser Asn Lys Glu Asn Arg Glu Ala His Leu					
145	150		155		160
Ala Ala Met Leu Glu Arg Leu Gln Glu Lys Asp Lys His Ala Glu Glu					
	165		170		175
Val Arg Lys Asn Lys Glu Leu Lys Glu Glu Ala Ser Arg					
	180		185		
<210> 13					
<211> 143					
<212> PRT					

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 13

```

Met Gln His Arg Gly Phe Leu Leu Leu Thr Leu Leu Ala Leu Leu Ala
1           5           10           15
Leu Thr Ser Ala Val Ala Lys Lys Lys Asp Lys Val Lys Lys Gly Gly
           20           25           30
Pro Gly Ser Glu Cys Ala Glu Trp Ala Trp Gly Pro Cys Thr Pro Ser
           35           40           45
Ser Lys Asp Cys Gly Val Gly Phe Arg Glu Gly Thr Cys Gly Ala Gln
           50           55           60
Thr Gln Arg Ile Arg Cys Arg Val Pro Cys Asn Trp Lys Lys Glu Phe
65           70           75           80
Gly Ala Asp Cys Lys Tyr Lys Phe Glu Asn Trp Gly Ala Cys Asp Gly
           85           90           95
Gly Thr Gly Thr Lys Val Arg Gln Gly Thr Leu Lys Lys Ala Arg Tyr
           100          105          110
Asn Ala Gln Cys Gln Glu Thr Ile Arg Val Thr Lys Pro Cys Thr Pro
           115          120          125
Lys Thr Lys Ala Lys Ala Lys Ala Lys Lys Gly Lys Gly Lys Asp
           130          135          140

```

<210> 14

<211> 155

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 14

```

Met Thr Pro Gly Lys Thr Ser Leu Val Ser Leu Leu Leu Leu Leu Ser
1           5           10           15
Leu Glu Ala Ile Val Lys Ala Gly Ile Thr Ile Pro Arg Asn Pro Gly
           20           25           30
Cys Pro Asn Ser Glu Asp Lys Asn Phe Pro Arg Thr Val Met Val Asn
           35           40           45
Leu Asn Ile His Asn Arg Asn Thr Asn Thr Asn Pro Lys Arg Ser Ser
           50           55           60
Asp Tyr Tyr Asn Arg Ser Thr Ser Pro Trp Asn Leu His Arg Asn Glu
65           70           75           80
Asp Pro Glu Arg Tyr Pro Ser Val Ile Trp Glu Ala Lys Cys Arg His
           85           90           95
Leu Gly Cys Ile Asn Ala Asp Gly Asn Val Asp Tyr His Met Asn Ser
           100          105          110

```

Val Pro Ile Gln Gln Glu Ile Leu Val Leu Arg Arg Glu Pro Pro His
 115 120 125
 Cys Pro Asn Ser Phe Arg Leu Glu Lys Ile Leu Val Ser Val Gly Cys
 130 135 140
 Thr Cys Val Thr Pro Ile Val His His Val Ala
 145 150 155
 <210> 15
 <211> 171
 <212> PRT
 <213> 人(Homo sapiens)
 <400> 15
 Met Leu Val Asn Phe Ile Leu Arg Cys Gly Leu Leu Leu Val Thr Leu
 1 5 10 15
 Ser Leu Ala Ile Ala Lys His Lys Gln Ser Ser Phe Thr Lys Ser Cys
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Gly Thr Leu Ser Gln Ala Val Asp Ala Leu Tyr Ile Lys
 35 40 45
 Ala Ala Trp Leu Lys Ala Thr Ile Pro Glu Asp Arg Ile Lys Asn Ile
 50 55 60
 Arg Leu Leu Lys Lys Lys Thr Lys Lys Gln Phe Met Lys Asn Cys Gln
 65 70 75 80
 Phe Gln Glu Gln Leu Leu Ser Phe Phe Met Glu Asp Val Phe Gly Gln
 85 90 95
 Leu Gln Leu Gln Gly Cys Lys Lys Ile Arg Phe Val Glu Asp Phe His
 100 105 110
 Ser Leu Arg Gln Lys Leu Ser His Cys Ile Ser Cys Ala Ser Ser Ala
 115 120 125
 Arg Glu Met Lys Ser Ile Thr Arg Met Lys Arg Ile Phe Tyr Arg Ile
 130 135 140
 Gly Asn Lys Gly Ile Tyr Lys Ala Ile Ser Glu Leu Asp Ile Leu Leu
 145 150 155 160
 Ser Trp Ile Lys Lys Leu Leu Glu Ser Ser Gln
 165 170

正常样品



肿瘤样品



图1

点	蛋白	MW (kD)
1	Bmi1	37
2	VCC1	13.6
3	SUMO-4	11
4	RhoA	22
5	TXN	12
6	ET-1	24
7	UBE2C	20
8	HDGF2	74
9	FGF21	20
10	LECT2	16
11	SOD1	16
12	STMN4	22
13	中期因子	19
14	IL-17A	17.5
15	IL-26	20

图2

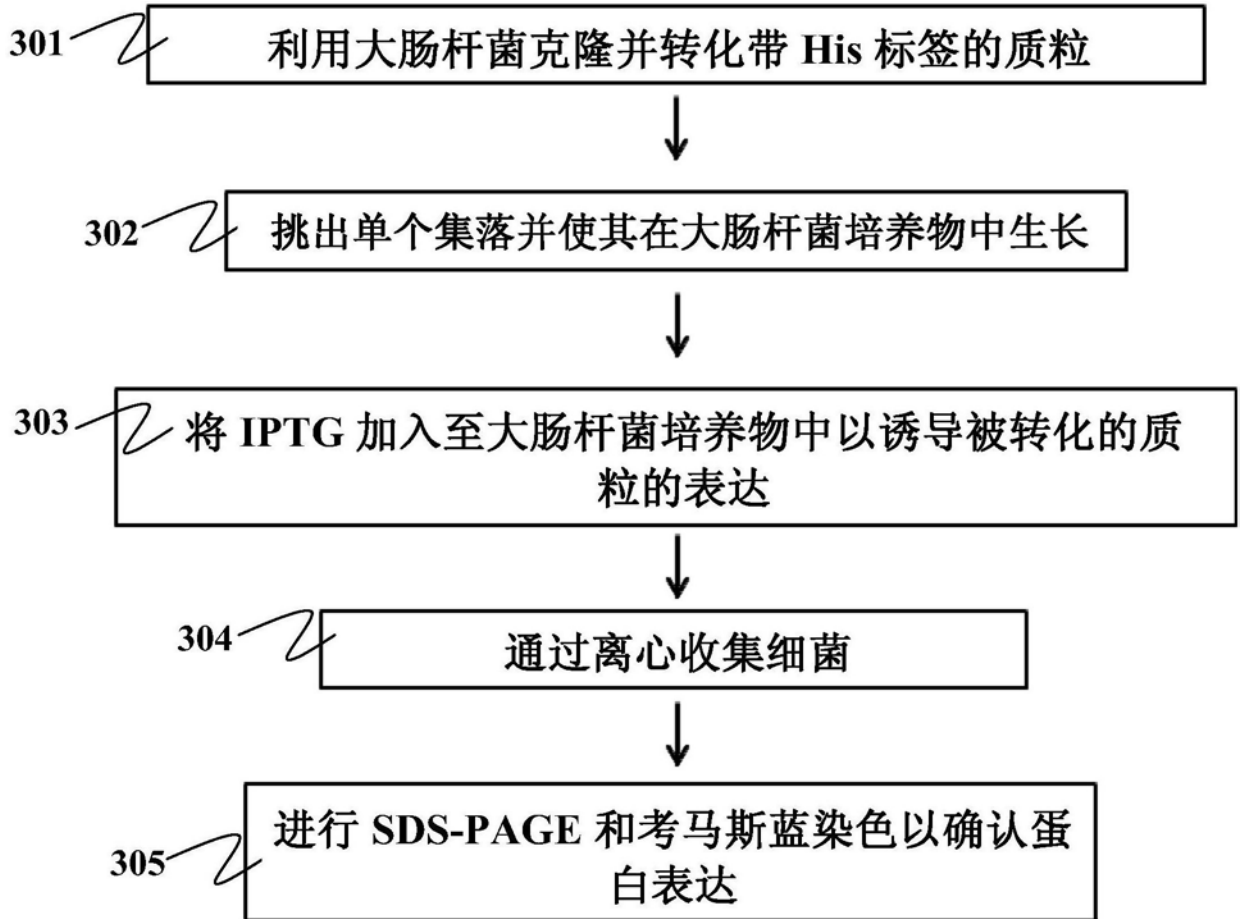


图3

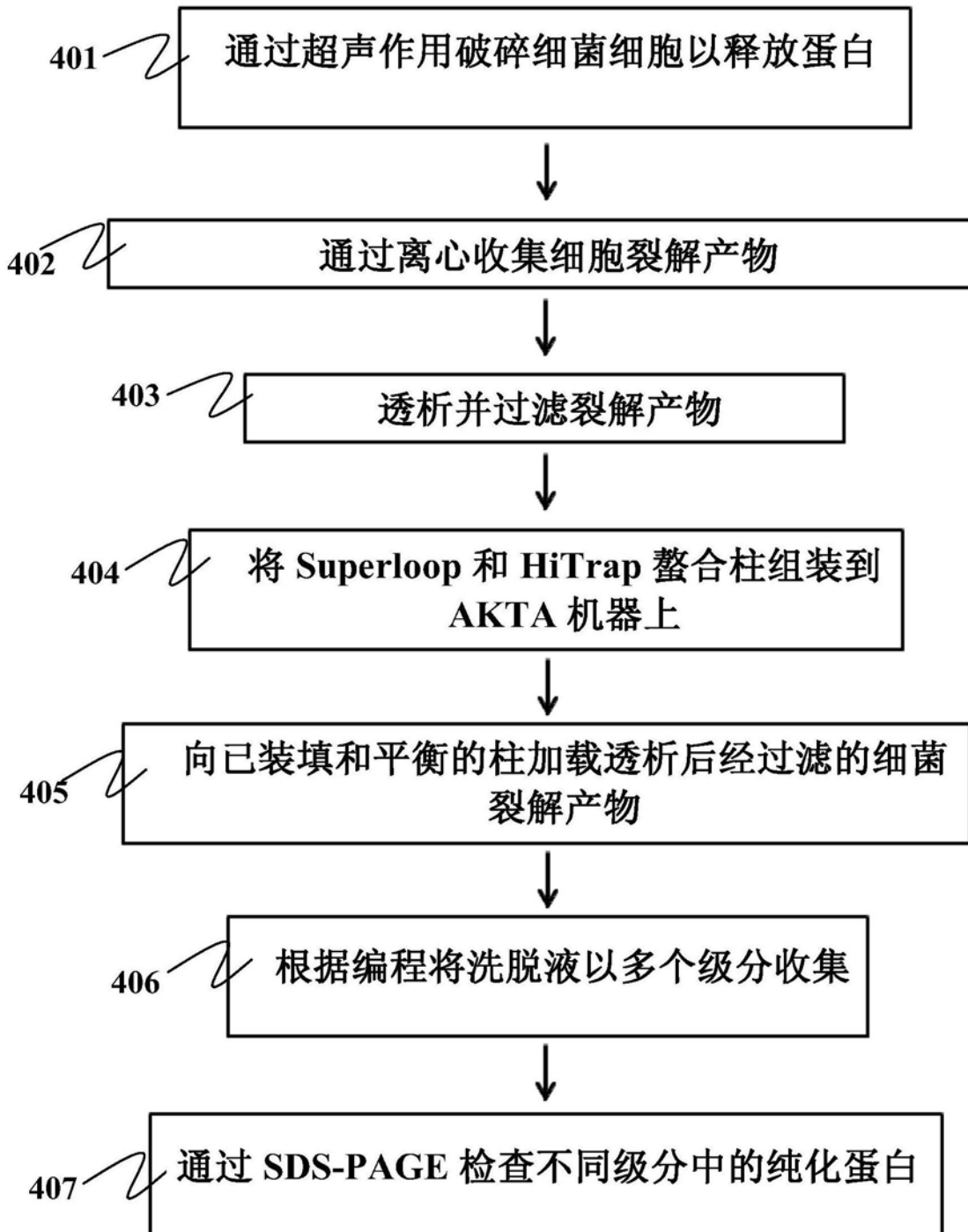


图4

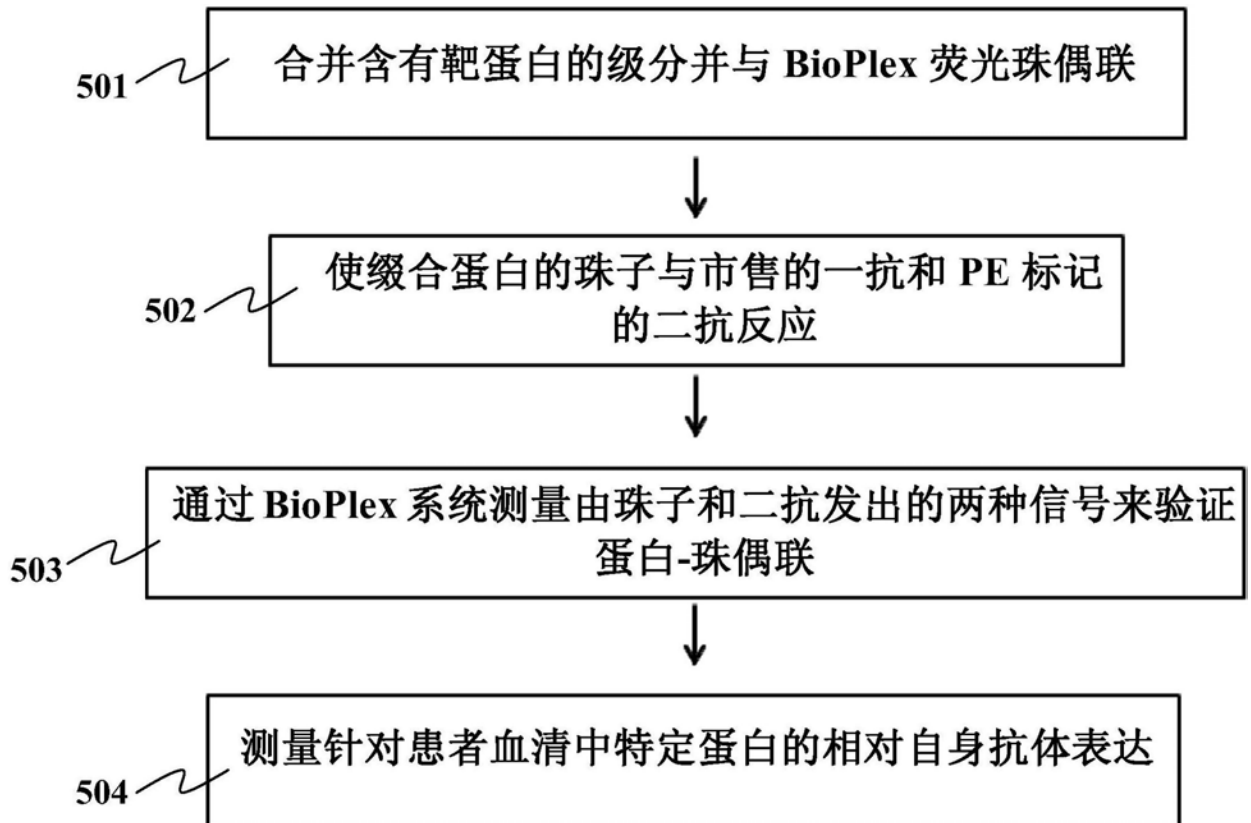


图5

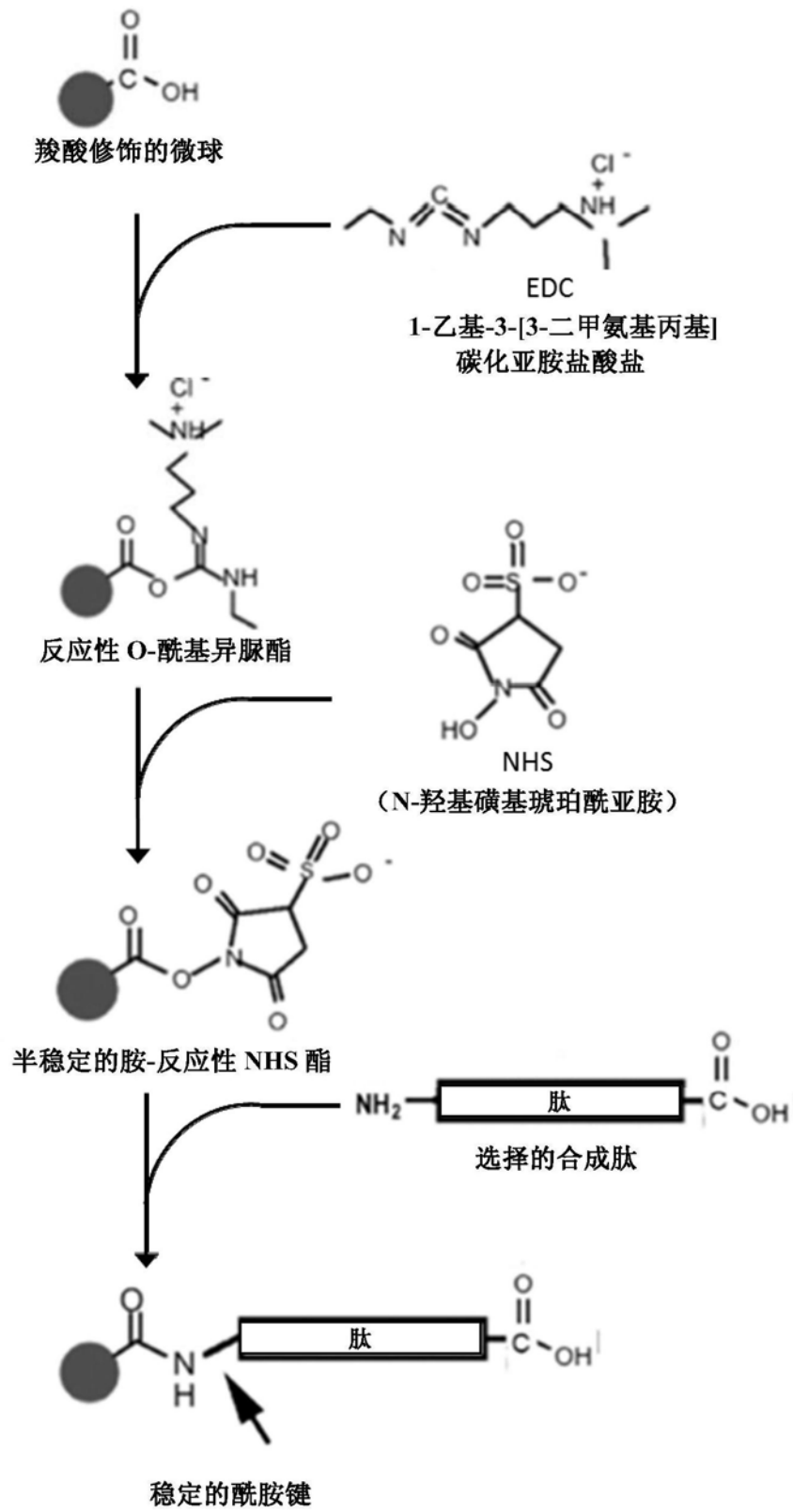


图6

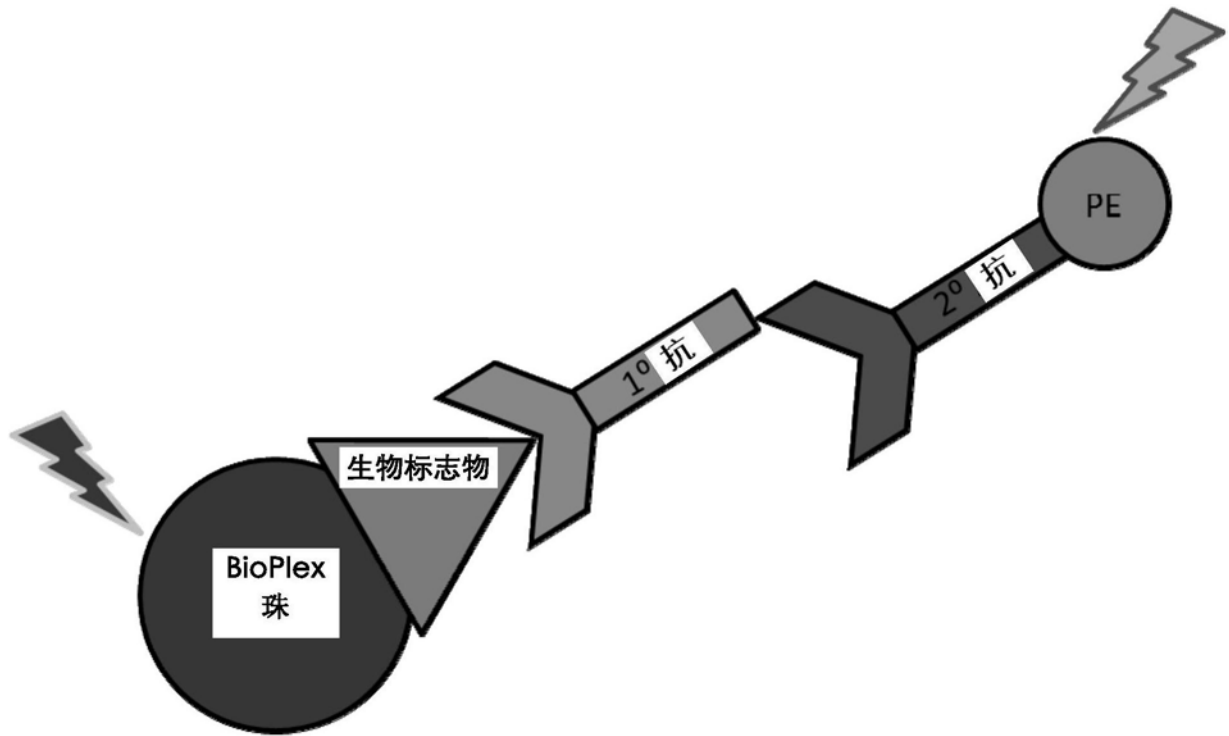


图7

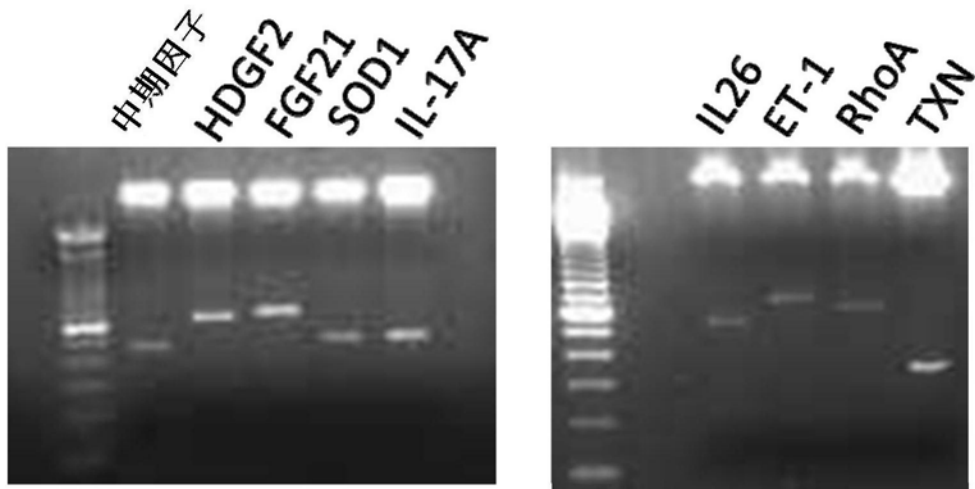


图8

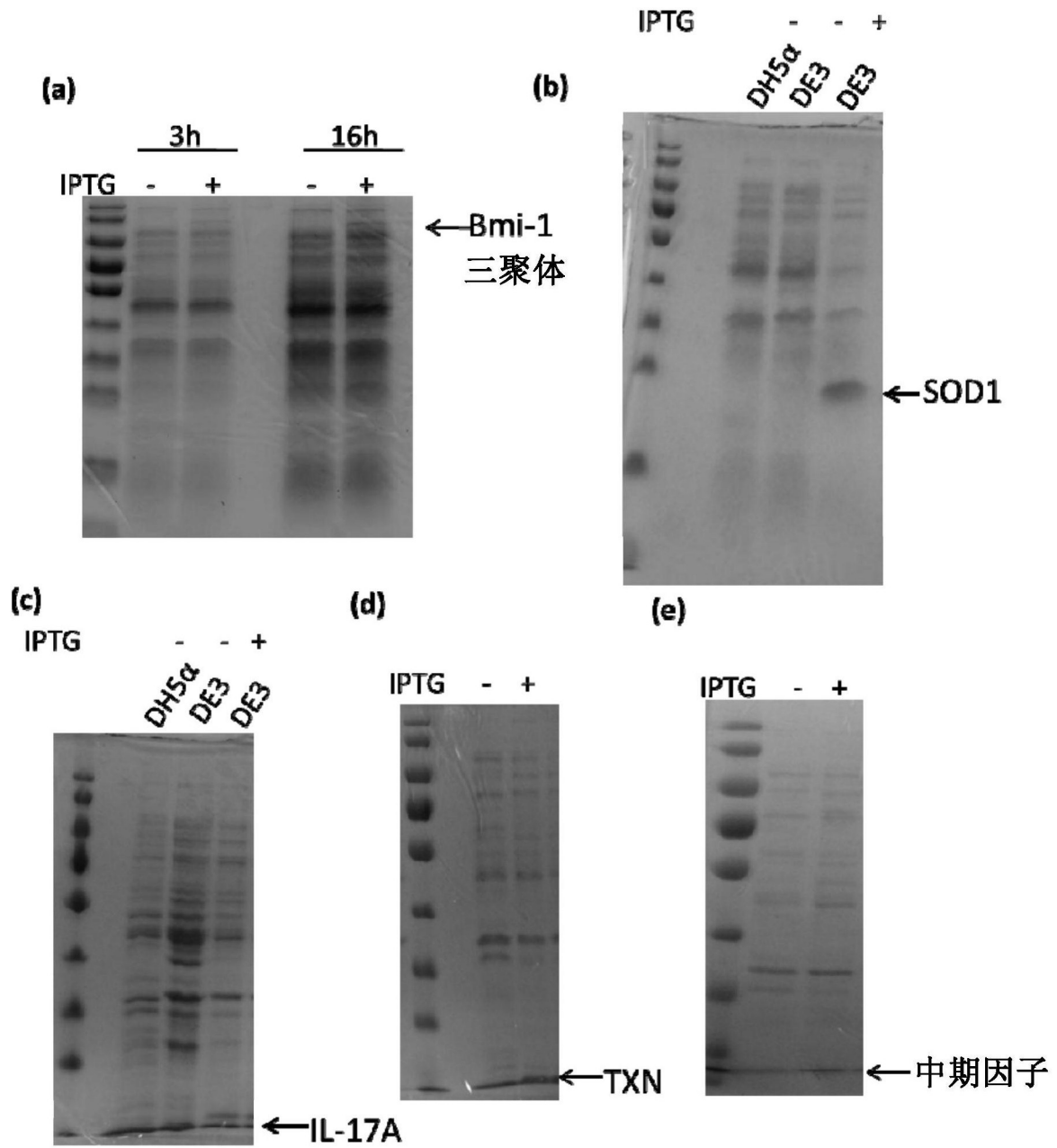


图9

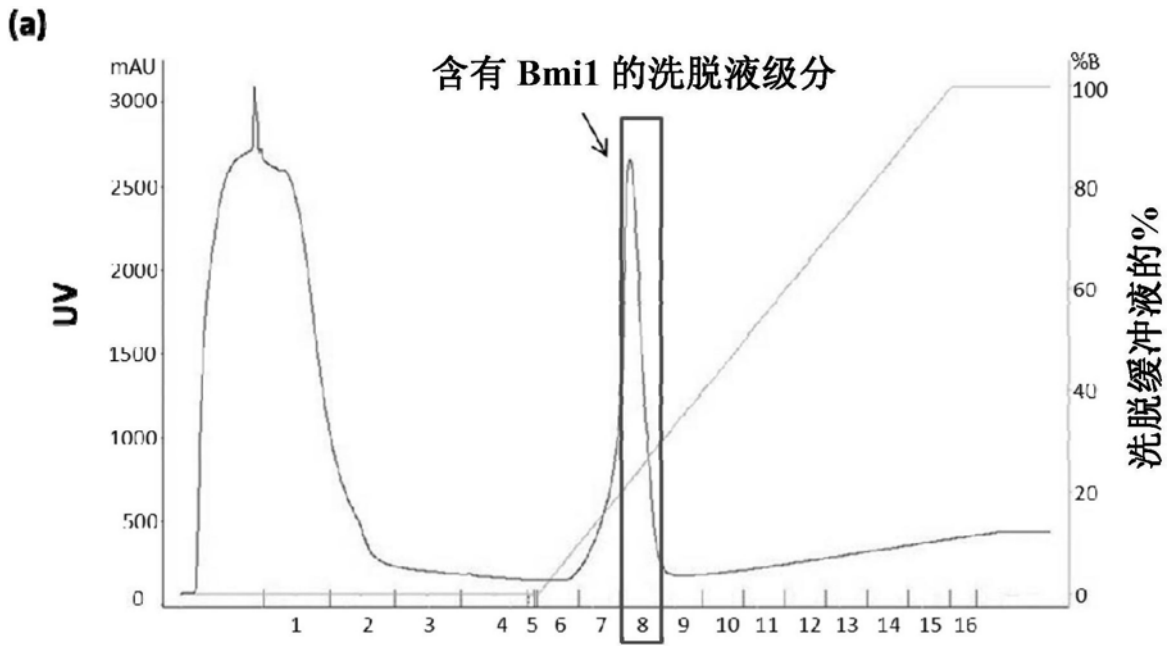


图10

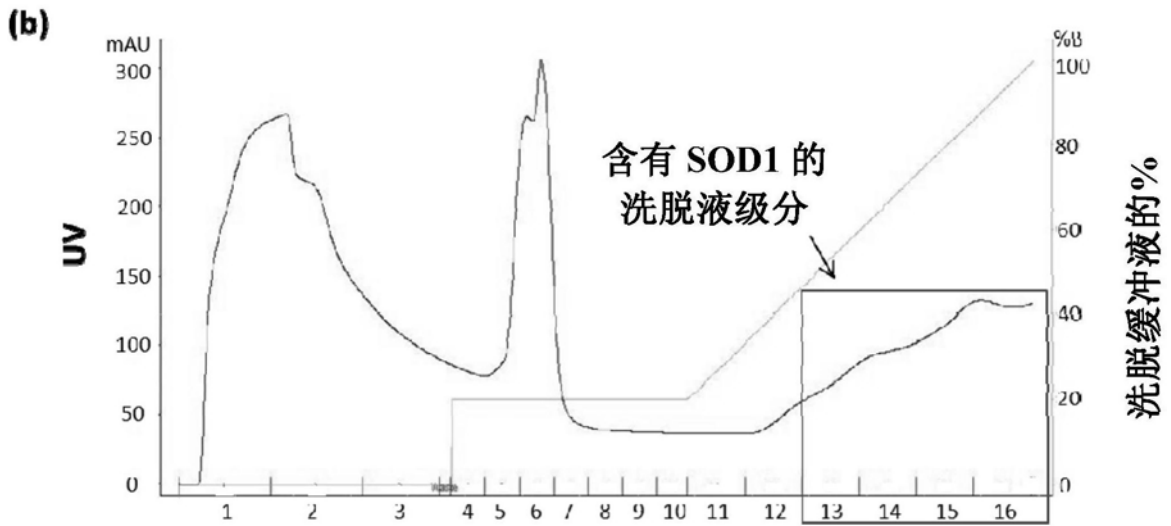


图10(续)

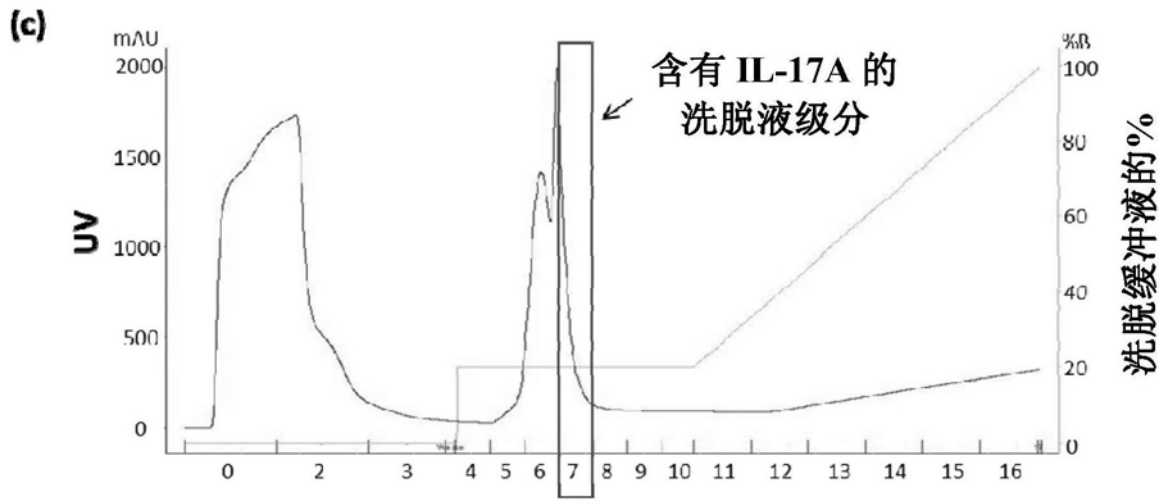


图10(续)

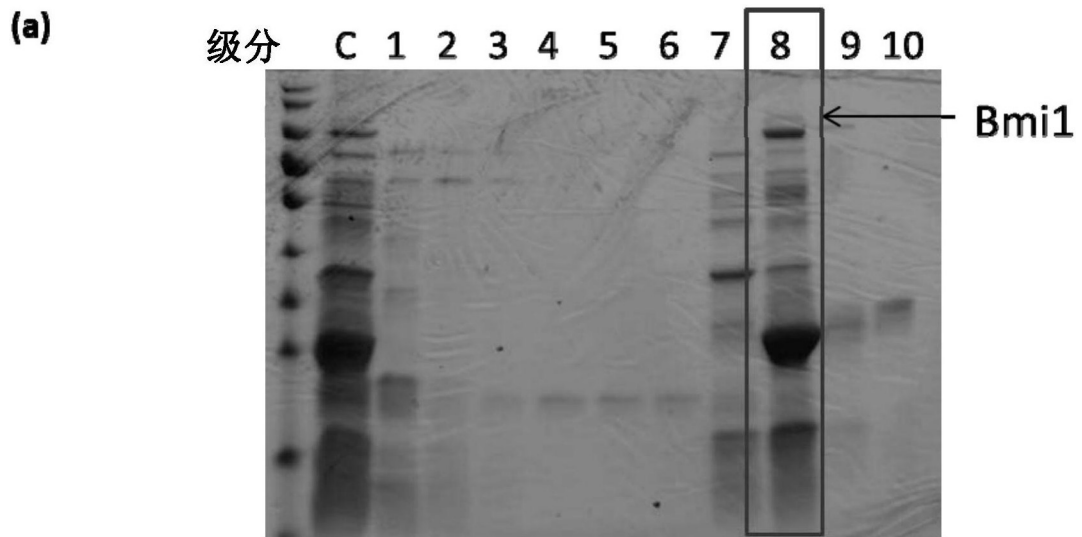


图11

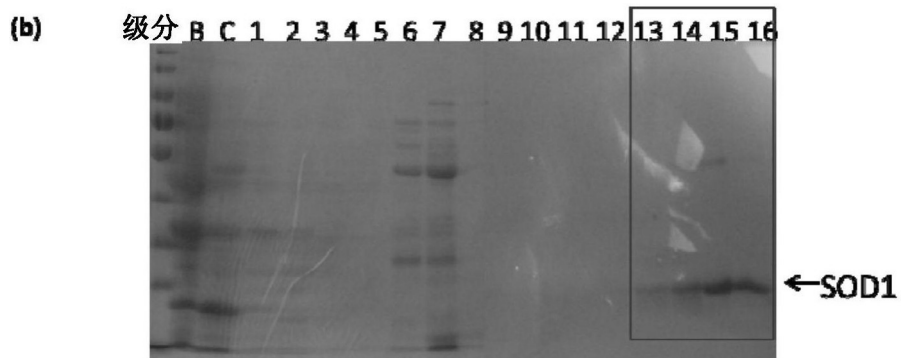


图11(续)

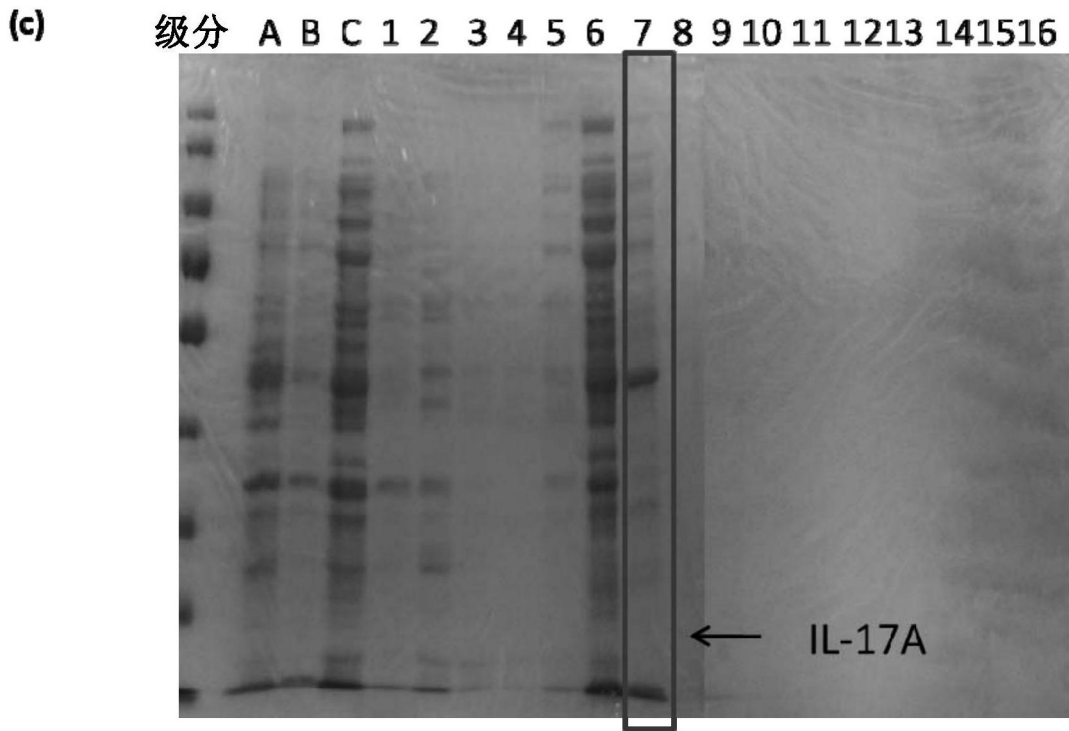


图11(续)

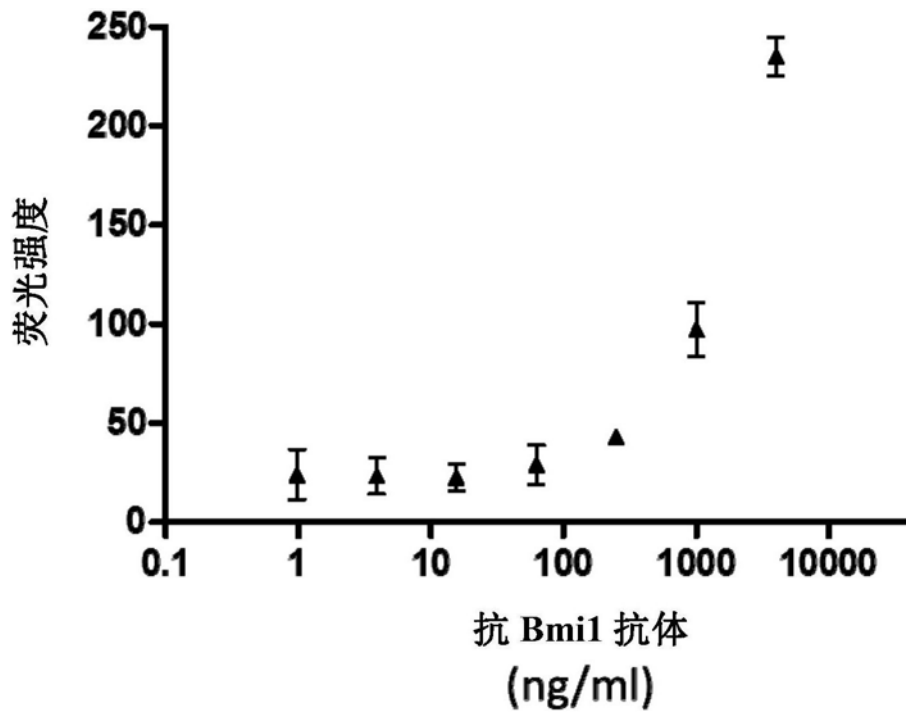


图12

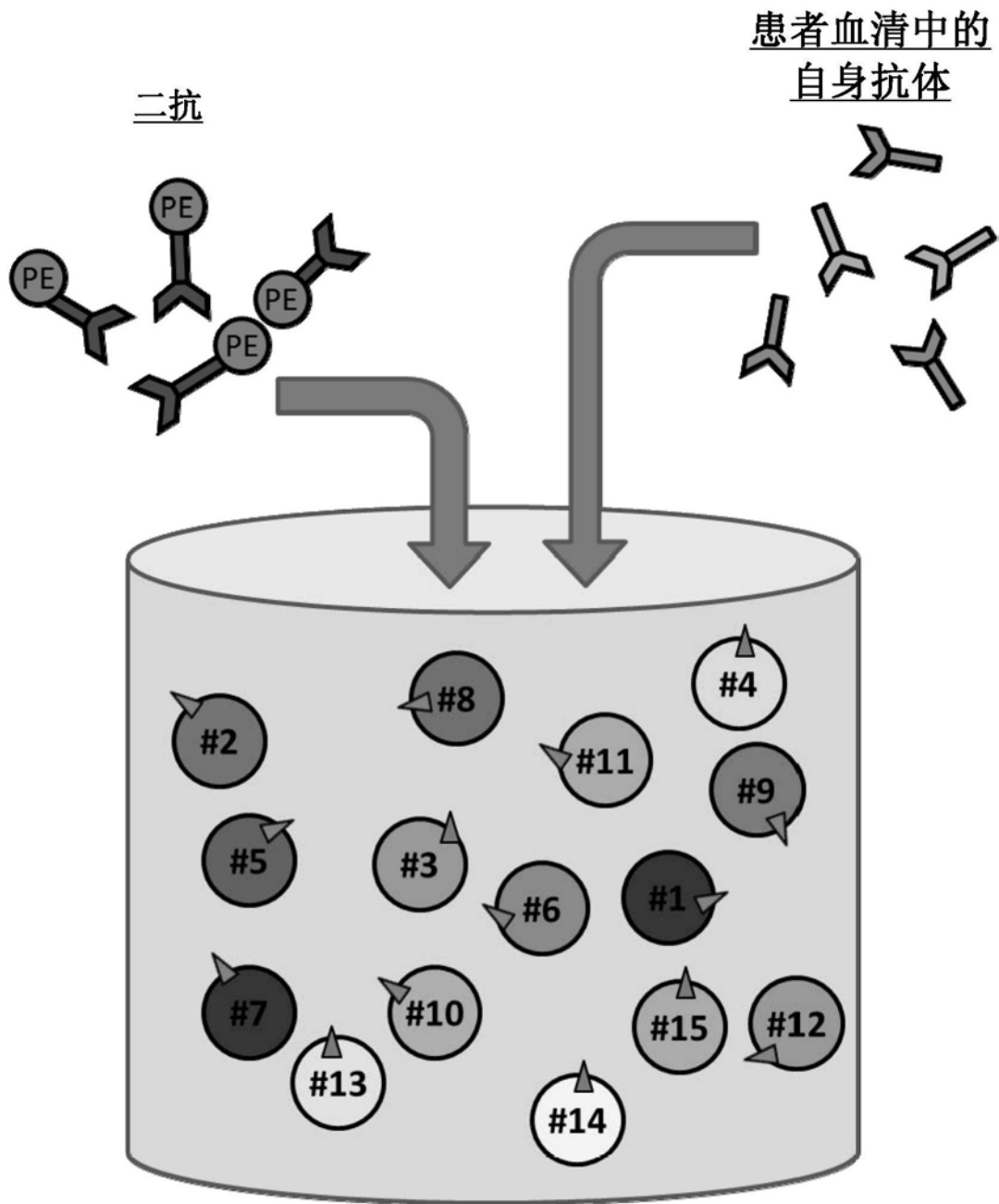


图13

专利名称(译)	用于肝癌的无创诊断的特异性生物标志物组		
公开(公告)号	CN107478842A	公开(公告)日	2017-12-15
申请号	CN2017110545890.8	申请日	2015-07-01
申请(专利权)人(译)	龙胜发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	龙胜发展有限公司		
[标]发明人	文咏贤 卫凤文 黄炳镠 卫智贤		
发明人	文咏贤 卫凤文 黄炳镠 卫智贤		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/533 G01N33/57438 G01N33/57488 G01N33/582 G01N33/6803 G01N33/6863 G01N33/6869 A61P35/00 G01N33/564 G01N2800/56 G01N2800/60 G01N33/57484		
代理人(译)	景鹏		
优先权	14/321867 2014-07-02 US 14/321870 2014-07-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)			
与毗邻肝肿瘤的正常肝组织上皮细胞相比肝肿瘤块内的细胞包含独特的一组蛋白/肿瘤抗原。肿瘤抗原的存在与针对这些肿瘤抗原的自身抗体的产生有关。本发明涉及一组蛋白的鉴定和说明，该组蛋白可以充当用于肝癌诊断和预后的一组新的标志物。具体地，其涉及能够对肝癌患者的血清中的自身抗体进行诊断性和预后性测量的试剂盒。本发明提供了一种无创的、特异性的、灵敏的和有成本效益的检测和定量方法，从而对常规诊断方法形成补充，该方法通过评价一组经验证的肝癌蛋白/肿瘤抗原实现，该组肝癌蛋白/肿瘤抗原包括Bmi-1、VCC1、SUMO-4、RhoA、TXN、ET-1、UBE2C、HDGF2、FGF21、LECT2、SOD1、STMN4、中期因子、IL-17A或IL26。	1	Bmi1	37
	2	VCC1	13.6
	3	SUMO-4	11
	4	RhoA	22
	5	TXN	12
	6	ET-1	24
	7	UBE2C	20
	8	HDGF2	74
	9	FGF21	20
	10	LECT2	16
	11	SOD1	16
	12	STMN4	22
	13	中期因子	19
	14	IL-17A	17.5
	15	IL-26	20