

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200510029161.4

[51] Int. Cl.

G01N 33/574 (2006.01)

G01N 33/532 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

[43] 公开日 2007年2月28日

[11] 公开号 CN 1920568A

[22] 申请日 2005.8.26

[21] 申请号 200510029161.4

[71] 申请人 中国科学院上海生命科学研究院

地址 200031 上海市徐汇区岳阳路320号

[72] 发明人 曾嵘 李辰 周晓 袁新雨

[74] 专利代理机构 上海智信专利代理有限公司

代理人 缪利明

权利要求书1页 说明书9页 附图1页

[54] 发明名称

核纤层蛋白 A/C 的应用

[57] 摘要

本发明通过筛选在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白，找到了一种在肝细胞癌的癌组织中高表达的蛋白，免疫印迹实验进一步证实了核纤层蛋白 A/C 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达，同时双向凝胶电泳的免疫印迹进一步证实核纤层蛋白 A/C 的不同的翻译后修饰形式在癌组织中也有上调表达。鉴于核纤层蛋白 A/C 与肝细胞癌的这种相关性，该蛋白可以用作检测肝癌的蛋白质分子标记。

- 1、一种核纤层蛋白 A/C 的应用，其特征在于，用作检测肝癌的蛋白质分子标记。
- 2、如权利要求 1 所述的应用，其特征在于，所述用作检测肝癌的蛋白质分子标记是检测该蛋白在肝细胞组织中的表达量。
- 3、如权利要求 2 所述的应用，其特征在于，所述检测该蛋白在肝细胞组织中的表达量是检测该蛋白在肝细胞组织中是否存在上调表达。
- 4、一种抗核纤层蛋白 A/C 的抗体的应用，其特征在于，用于制备检测肝癌的制剂。
- 5、如权利要求 4 所述的应用，其特征在于，所述抗核纤层蛋白 A/C 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。
- 6、一种抗核纤层蛋白 A/C 的抗体的应用，其特征在于，用于制备检测肝癌的试剂盒。
- 7、如权利要求 6 所述的应用，其特征在于，所述抗核纤层蛋白 A/C 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。
- 8、一种体外检测肝细胞组织中核纤层蛋白 A/C 的表达是否异常的方法，其特征在于包括以下步骤：
 - A、用特异性抗核纤层蛋白 A/C 的抗体检测待测肝细胞中核纤层蛋白 A/C 的数量；
 - B、将步骤 A 测得的核纤层蛋白 A/C 的数量与正常肝组织中的核纤层蛋白 A/C 的数量进行比较，如测得的蛋白数量高于正常值，则表示被检测肝组织中核纤层蛋白 A/C 的表达异常。
- 9、如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述所述抗核纤层蛋白 A/C 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

核纤层蛋白 A/C 的应用

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体地说，本发明涉及一种核纤层蛋白 A/C 用作检测肝癌的蛋白质分子标记的应用。

背景技术

肝癌是一种严重危害人类的疾病。西方发达国家肝癌的发病率较低，国际上对肝癌的基础研究仍较为薄弱，而我国是肝癌高发国家，发病率和死亡率呈现上升趋势，且发病年龄构成年轻化，每年用于肝癌治疗的医疗支出大为增加，肝癌成了严重危害我国人民生命财产安全的头号敌人，并且是影响社会经济发展的一个重要因素，加大力度进行我国肝癌的基础研究具有战略意义，而分离和鉴定新的肝癌相关基因是目前肝癌基础研究中的前沿课题。

到目前为止，已有不下 20 种的基因异常表达被确定与肝癌的发生发展有关，但已确定的肝癌相关基因在肝癌中的异常表达率并不高，肝癌的发病机制至今仍未阐明，肝癌的早期诊断率仍有待提高。此外，传统的肝癌手术加化疗以及近年来配合使用的多种基因治疗方法仍没有明显提高肝癌患者的生存率，因而寻找新的肝癌相关基因尤其是肝癌高表达基因对于探讨肝癌的发病机制具有重要意义。

因此，为治疗和诊断目的研究和开发在肝癌中高表达的基因和/或蛋白具有重要意义。本领域迫切需要新的在肝癌中高表达的基因和/或蛋白。

核纤层蛋白 A/C (lamin A/C)，Genebank 的登录号为 gi|27436946|，NCBI 的登录号为 NP_733821，Swissprot 登录号为 P02545，IPI 号为：IPI00021405.1，IPI00216952.1，IPI00216953.1。核纤层蛋白 A/C 是组成核纤层的结构成分之一，是核纤层蛋白 A 和核纤层蛋白 C 的总称，他们是同一基因的不同加工产物，因而相对于 B 型核纤层蛋白而言，他们一起被归入 A 型核纤层蛋白。他们组成核纤层，并与中间纤维，核骨架相连接，形成贯穿于细胞核和细胞质的骨架结构体系，为细胞内蛋白锚定，染色体锚定提供支持。

研究表明核纤层在细胞分裂期的结构重组主要是由于核纤层蛋白 A/C 被磷酸化修饰造成的。细胞分裂期中，核纤层蛋白包括核纤层蛋白 A/C 的磷酸化水平发生显著变化，分裂前期高度磷酸化，而末期则发生去磷酸化，最新研究表明核纤层蛋白 A/C 是促分裂因子

(MPF) 的 p34cdc2 亚基的直接作用底物。p34cdc2 亚基可以使核纤层蛋白 A/C 分子杆状区两端的 Ser22 和 Ser392 磷酸化, 直接导致核纤层解聚 (《细胞生物学》, 翟中和等, 高等教育出版社 (2000 年 8 月第 1 版), p350-355)。

另有研究证明核纤层蛋白 A/C 与中间纤维有许多共同点, 说明核纤层蛋白 A/C 属于中间纤维蛋白家族成员, 被确定为第 V 型中间纤维蛋白 (《细胞生物学》, 翟中和等, 高等教育出版社 (2000 年 8 月第 1 版), p350-355)。

但是到目前为止, 现有技术中未见有关于核纤层蛋白 A/C 与肝细胞癌的相关性的报道。

发明内容

通过筛选在肝细胞癌组织以及肝细胞癌旁组织中差异表达的蛋白质, 本申请的发明人找到了一种在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白质 (在癌组织中上调表达), 经质谱鉴定为核纤层蛋白 A/C。进一步的免疫印迹实验证实, 核纤层蛋白 A/C 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达 (在癌组织中上调表达)。

基于核纤层蛋白 A/C 与肝细胞癌的这种相关性, 以该蛋白作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝癌。

因此, 本发明的首要目的即在于提供一种核纤层蛋白 A/C 用作检测肝癌的蛋白质分子标记的应用。

本发明的另一个目的在于提供一种抗核纤层蛋白 A/C 的抗体, 包括单克隆抗体和多克隆抗体, 用于制备检测肝癌的制剂的应用。

本发明的再一个目的还在于提供一种抗核纤层蛋白 A/C 的抗体, 包括单克隆抗体和多克隆抗体, 用于制备检测肝癌的试剂盒的应用。

本发明的又一个目的在于提供一种体外检测肝细胞组织中核纤层蛋白 A/C 的表达是否异常的方法, 该方法包括以下步骤:

- A、用特异性抗核纤层蛋白 A/C 的抗体检测待测肝细胞中核纤层蛋白 A/C 的数量;
- B、将步骤 A 测得的核纤层蛋白 A/C 的数量与正常肝组织中的核纤层蛋白 A/C 的数量进行比较, 如测得的蛋白数量高于正常值, 则表示被检测肝组织中核纤层蛋白 A/C 的表达异常。

鉴于到目前为止, 现有技术中未见有关于核纤层蛋白 A/C 与肝细胞癌的相关性的报道, 因此, 本发明的这一发现将为肝细胞癌的诊断和/或治疗提供一条全新的途径。

附图说明

图 1 为核纤层蛋白 A/C 在癌组织和癌旁组织的 2D-DIGE 图谱中的量变示意图，显示了蛋白质点 628, 618, 1923（经质谱鉴定的核纤层蛋白 A/C）在肝细胞癌患者的癌组织中的表达相比在癌旁组织中的表达明显上调。

图 2 为核纤层蛋白 A/C 的免疫印迹分析结果示意图。

图 3 为核纤层蛋白 A/C 的双向凝胶电泳后的免疫印迹分析结果示意图。

具体实施方式

下面结合具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。

下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件如 Sambrook 等人，分子克隆：实验室手册（New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989）中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件。

本申请的发明人用非酶解样品制备法（nonenzymatic sample preparation, NESP）制备的肝细胞癌的癌组织与癌旁组织蛋白质样品，以双向荧光差异凝胶电泳技术（two-dimensional fluorescence difference gel electrophoresis, 2D-DIGE）筛选在癌组织及癌旁组织中差异表达的蛋白质点并质谱鉴定，结果发现 3 个平行的蛋白质点（提示潜在的蛋白翻译后修饰的存在）都是核纤层蛋白 A/C，且均在在肝细胞癌癌组织中上调表达。免疫印迹实验进一步证实核纤层蛋白 A/C 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。而且，双向凝胶电泳后的免疫印迹实验也进一步证实核纤层蛋白 A/C 的不同翻译后修饰形式的存在与癌组织中的上调表达，提示核纤层蛋白 A/C 不同的翻译后修饰形式也是重要的变化指标。

因此，以核纤层蛋白 A/C 作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝癌，也即核纤层蛋白 A/C 可以用作检测肝癌的蛋白质分子标记。

实施例 1、肝细胞癌癌组织及癌旁组织蛋白质样品的制备

本实施例中所使用的尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-1-丙磺酸（CHAPS）、苯甲基磺酰氟（PMSF）、二硫苏糖醇（DTT）均购自 Sigma 公司。

本实施例以非酶解样品制备法（nonenzymatic sample preparation, NESP）制备肝细胞癌的癌组织及癌旁组织蛋白质样品，具体如下：

手术切除的新鲜组织块迅速置于冰上，快速切成几个肉眼可见、无坏死区域的小块。用预冷的不含谷氨酰胺的 RPMI1640 培养基（5%胎牛血清，0.2mM PMSF，1mM EDTA，苯甲异噁唑青霉素 25mg/mL，庆大霉素 50mg/mL，青霉素 100 U/mL，链霉素 100 mg/mL，两性霉素 B 0.25 mg/mL，制霉菌素 50 U/mL）洗涤组织小块数次后，在液氮中快速研磨成细胞沉淀，细胞沉淀分别溶于适量裂解液（8mol/L 尿素、4% CHAPS、40mmol/L Tris 和 65mmol/L DTT）中，超声细胞破碎仪（Soniprep 150，英国，MSE）冰浴间歇超声 2min，15000 r/min、4℃离心 1h。取上清，以改良的 Bradford 法（见 Bio-Rad 公司产品说明书）进行总蛋白质定量，制备好的肝细胞癌组织及相应癌旁组织的蛋白质样品分装，-80℃保存备用。

以上述方法制备 16 对肝细胞癌组织及癌旁组织蛋白质样品。16 例肝细胞癌标本均来自东方肝胆外科医院，由 2 个病理科医生明确为肝细胞癌。均为男性，平均年龄 49.4 岁（31~65 岁），血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性，16 例（100%）属临床分级（TNM 分级）III 级。其中，甲胎蛋白（AFP）高于 25 $\mu\text{g/L}$ 的 15 例（93.75%）；14 例肿瘤大于 5cm。16 例肝细胞癌标本的病理资料详见以下表 1。

表 1、16 例肝细胞癌标本的病理资料

No.	性别	年龄	HBV	HCV	等级	AFP	尺寸
f31	男性	56	+	-	III	>1000	7×6
f32	男性	51	+		III	>1000	14×12×12
f33	男性	50	+	-	III	>1000	5×6
f39	男性	55	+	-	III	>1000	5×5.5
3 27	男性	44	+	-	III	>1000	8×8×7
3 28	男性	45	+	-	III	>1000	7.5×6
4 15	男性	40	+	-	III	>1000	10×8×6
4 18	男性	31	+	-	III	3.7	8×5×8
4 22	男性	57	+	-	III	>1000	3.5×4
4 29	男性	44	+	-	III	>1000	7.2×6
3 17	男性	58	+	-	III	>1000	5.2×6.4
4 2	男性	45	+	-	III	>1000	7.7×5.4
4 5	男性	51	+	-	III	>1000	5.5×4.0
4 8	男性	55	+	-	III	>1000	4×3
4 9	男性	43	+	-	III	>1000	12×12
4 24	男性	65	+	-	III	>1000	11.5×6.5

本实施例所用癌组织及癌旁组织样品均为取自同一肝细胞癌患者的成对样品，所有16例肝细胞癌病例有极相似的病例诊断指标：均为男性，平均年龄49.4岁（31~65岁），血清检测 hepatitis B 病毒感染阳性，16例（100%）属 TNM 分级 III 级。其中，AFP 高于 25 $\mu\text{g/L}$ 的 15 例（93.75%）；14 例肿瘤大于 5cm。这种取样方法有利于降低个体间差别对实验分析工作的影响。

实施例 2、差异表达蛋白的筛选

本实施例中使用的尿素、3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-1-丙磺酸（CHAPS）、十二烷基磺酸钠（SDS）、二硫苏糖醇（DTT）购自 Sigma 公司；碘乙酰胺（IAA）、丙烯酰胺、N,N-甲叉双丙烯酰胺等购自 Fluka 公司。

过硫酸胺（AP）、TEMED、Tri-n-butylphosphat（TBP）、Sypro Ruby 荧光染料等为 Bio-Rad 产品。

LCQTM Deca XP system 和 ProteomeXTM Workstation 购自 Thermo Finnigan 公司。

Cy2、Cy3、Cy5 荧光染料，非线性固相 pH 梯度预制胶条（IPG 干胶条，pH3-10 NL，130×3×0.5 mm）、IPG 缓冲液、IPGphor 等电聚焦系统、Amersham Pharmacia Ettan Dalt II 系统，Typhoon 扫描仪，自动切胶仪，DeCyderTM 分析软件等均为 Amersham Bioscience 公司产品。

取实施例 1 得到的 16 对肝细胞癌的癌组织及癌旁组织蛋白质样品中的 10 对（表 1 中 f31、f32、f33、f39、3 27、3 28、4 15、4 18、4 22 和 3 17），采用双向荧光差异凝胶电泳法对其中的差异表达蛋白进行筛选，双向荧光差异凝胶电泳主要按 Tonge R. 等人的改进方法（Tonge R et al. *Proteomics* 2001, 1, 377-3396）进行，具体如下：

首先采用分析型双向荧光差异凝胶电泳：参照产品说明书，将 50 μg 蛋白质样品先分别用 400 pmol 的 Cy2 或 Cy3 或 Cy5 荧光染料进行蛋白质标记反应，其中 Cy2 标记内标样品（癌组织和癌旁组织等量混合样品），癌组织各一半分别用 Cy3、Cy5 标记，癌旁组织也各一半分别用 Cy3、Cy5 标记，而后 Cy2 标记的内标样品与 Cy3 或 Cy5 标记的癌组织或癌旁组织样品混合后，再与重泡涨液（8mol/L 尿素、2%CHAPS、0.5% IPG 缓冲液、18mmol/L DTT 和痕量溴酚蓝）混合，总体积 250 μl ，使用 130×3×0.5 mm pH3-10 NL 胶条，在 IPGphor 等电聚焦系统上进行一向分离，总电压小时约为 80000Vhrs。等电聚焦后胶条依次在平衡液 I（6M 尿素、30%甘油、2%SDS、1% DTT）和平衡液 II（平衡液 I 中 DTT 以 2.5% IAA 代替）中平衡，每次 15min。胶条转移至十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶（SDS-PAGE，胶浓度 12%）上缘，电泳条件为 15mA/胶 30min，然后 30mA/胶保持至溴酚蓝离胶下缘 0.5 cm。

然后, 采用 Typhoon 扫描仪扫描生成图像, 分辨率为 100 $\mu\text{m}/\text{pixel}$ 。点的检测和匹配用 DeCyder™ 分析软件 (Amersham Pharmacia Biotech) 分析。

本实施例对以非酶解样品制备法制备的 10 对肝细胞癌患者的癌组织与相应癌旁组织的蛋白质样品进行了分析, 共得到 2D-DIGE 图谱 30 幅, DeCyder™ 分析软件进行了癌组织与癌旁组织的蛋白质差别表达谱分析, 在 pH3-10 非线性胶条上, 荧光染色条件下两类组织样品均显示约 1300 个点, 经过 DeCyder™ 软件的成对 t-test (paired t-test) 和方差 (one-way ANOVA) 的严谨统计分析, 以 $p < 0.05$, 1.5 倍变化作为筛选标准, 共筛选到 249 个有统计学意义的肝细胞癌组织与癌旁组织的表达差异点。

图谱分析之后, 本实施例又采用制备型双向荧光差异凝胶电泳, 上样量为 0.5mg, 总 Vhrs 约为 90000, 采用可与质谱兼容的 Sypro Ruby 荧光染料 (Bio-Rad 公司) 染色, Typhoon 扫描仪检测, 其它与分析型双向荧光差异凝胶电泳方法相同。

接下来的胶内酶解与质谱鉴定过程如下: 蛋白质点由质谱兼容的 Sypro Ruby 荧光染料染色的制备型电泳凝胶上用自动切胶仪 (Amersham Pharmacia Biotech 公司) 切取, 在 100mM NH_4HCO_3 、30%乙腈中脱色, 真空冷冻干燥, 5 μl 50mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.3, 蛋白质: 胰蛋白酶 = 1: 5, w/w) 中 4 $^\circ\text{C}$ 放置 2 hr, 加入 20 μl 50mmol/L NH_4HCO_3 (pH 8.3), 37 $^\circ\text{C}$ 酶解过夜。抽提蛋白 (60% 乙腈、0.1% 三氟乙酸), 真空冷冻干燥。LCQ™ Deca XP 系统 (Thermo Finnigan 公司) 鉴定酶解好的样品, Bioworks 软件 (Thermo finnigan 公司) 进行数据库搜索。

应用双向荧光差异凝胶电泳技术、胶内酶解技术、质谱技术, 本实施例共鉴别出了 75 个差别点, 对应 69 种差别表达的蛋白质。

在差异表达谱中, 点 618, 1923, 628 (图 1) 在癌组织中表达明显上调, 经切点、胶内酶解, 点 618, 1923, 628 用 1D-LC-MS/MS 质谱 (液相串联质谱) 鉴定和数据库搜索分别得 11, 8, 10 个非重复肽段 (分别共鉴定到 13, 10, 18 个肽段) 与核纤层蛋白 A/C 相符并满足打分条件 (ΔCn 值 ≥ 0.1 , 并且 X corr 值: 若为 1 个电荷 ≥ 1.9 , 若为 2 个电荷 ≥ 2.2 , 若为 3 个电荷 ≥ 3.75), 氨基酸覆盖率分别为 19.00%, 13.84%, 16.43%。具体结果详见以下表 2:

表 2、点 618, 1923, 628 的质谱鉴定结果

编号	肽段序列	质量数(MH+)	电荷数	X Corr 值	Delta Cn 值
618	K. AAYEAE LGDAR. K	1166.22	2	3.1017	0.3826
	K. EAALSTAL SEK. R	1120.24	2	2.6732	0.457
	K. LEAALGEAK. K	902.028	2	2.7782	0.2828
	R. IDSLSAQLSQLQK. Q	1431.62	2	2.8396	0.2966
	R. ITESEEVVSR. E	1149.23	2	3.0689	0.5131
	R. LADALQELR. A	1029.17	2	3.6656	0.34
	R. LADALQELR. A	1029.17	2	3.1608	0.2326
	R. QNGDDPLLTYR. F	1292.38	2	2.8252	0.4659
	R. SGAQASSTPLSPTR. I	1360.46	2	3.9652	0.517
	R. SGAQASSTPLSPTR. I	1360.46	2	3.4329	0.5586
	R. SLETENAGLR. L	1090.17	2	2.6847	0.2581
	R. VAVEEVDEEGK. F	1204.27	2	3.0745	0.4853
	K. EDLQELNDR. L	1132.16	2	2.6718	0.2263
1923	K. AAYEAE LGDAR. K	1166.22	2	3.3497	0.2527
	K. AAYEAE LGDAR. K	1166.22	2	3.3496	0.4115
	K. LEAALGEAK. K	902.028	2	2.5523	0.3018
	R. IDSLSAQLSQLQK. Q	1431.62	2	3.5532	0.434
	R. ITESEEVVSR. E	1149.23	2	3.0113	0.4256
	R. ITESEEVVSR. E	1149.23	2	2.2532	0.373
	R. LADALQELR. A	1029.17	2	3.2368	0.2407
	R. SGAQASSTPLSPTR. I	1360.46	2	3.8146	0.5562
	R. SLETENAGLR. L	1090.17	2	2.9157	0.28
	R. TLEGELHDLR. G	1183.3	2	2.6339	0.335
628	K. AAYEAE LGDAR. K	1166.22	2	3.3461	0.3472
	K. AAYEAE LGDAR. K	1166.22	2	2.7917	0.3644
	K. DLEALLNSK. E	1003.13	2	2.7569	0.3468
	K. DLEALLNSK. E	1003.13	2	2.745	0.3343
	K. EDLQELNDR. L	1132.16	2	2.4463	0.259
	K. LEAALGEAK. K	902.028	2	2.8924	0.3383
	K. LEAALGEAK. K	902.028	2	2.9348	0.381
	K. LLEGEER. L	975.036	2	2.7905	0.156
	R. ITESEEVVSR. E	1149.23	2	2.9001	0.4797
	R. ITESEEVVSR. E	1149.23	2	3.0074	0.4436
	R. QNGDDPLLTYR. F	1292.38	2	2.2833	0.4375
	R. QNGDDPLLTYR. F	1292.38	2	2.6146	0.4227
	R. SGAQASSTPLSPTR. I	1360.46	2	3.4928	0.4338
	R. SGAQASSTPLSPTR. I	1360.46	2	3.3177	0.4031
	R. SLETENAGLR. L	1090.17	2	2.6913	0.2064
	R. SLETENAGLR. L	1090.17	2	2.3681	0.2008
	R. VAVEEVDEEGK. F	1204.27	2	3.1046	0.4968
R. VAVEEVDEEGK. F	1204.27	2	3.3067	0.539	

并且,根据 DeCyder™ 软件对已有 2D-DIGE 图谱的分析,发现点 618, 1923, 628 的高表达符合严格的统计学分析(表 3):

表 3、点 618, 1923, 628 在癌组织中的上调在 10 例病例中的统计分析情况

编号	成对 T-test 比值	平均比值(癌/癌旁)	方差值 (one-way ANOVA)
618	0.000391	1.5574	0.000391
628	0.01358	1.6101	0.01358
1923	0.003848	1.5085	0.003848

因而,2D-DIGE 图谱分析显示:618, 1923 及 628 三个差异点在癌组织中的上调表达在不同肝细胞癌患者的癌组织与癌旁组织的 2D-DIGE 图谱中得到良好的重复,具有显著的统计学意义。

实施例 3、核纤层蛋白 A/C 差异表达的免疫印迹验证

为确认核纤层蛋白 A/C 的差异表达,取 10 位肝细胞癌患者的癌组织及相应癌旁组织蛋白质样品(表 1 中 3 17, 3 27, 4 2, 4 5, 4 8, 4 9, 4 15, 4 18, 4 22 和 4 24),用购买的抗核纤层蛋白 A/C 抗体进行免疫印迹分析,具体过程简述如下:

每个样品取 20 μ g 蛋白质样品用 12% SDS-PAGE 分离,转移至 PVDF 膜(购自 Amersham Biosciences 公司)上,一抗使用鼠抗人核纤层蛋白 A/C 单克隆抗体(购自 Santa Cruz 公司,1:100),4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,用 TBST(每升含 Tris 2.42 g,氯化钠 8 g, Tween 20 ml,用 HCl 调节 pH 到 7.6)洗涤三次,每次 5 分钟,二抗为抗鼠抗体(购自 Santa Cruz 公司,1:10000),室温孵育 1 小时,再用 TBST 洗涤三次,每次 10 分钟,最后用 ECL plus 试剂(Amersham Biosciences 公司)反应 5 分钟后,以 X-光片曝光检测,检测结果如图 2 所示。

图 2 的免疫印迹结果显示,10 对癌组织与癌旁组织中全部呈现这样的现象:癌组织中核纤层蛋白 A/C 的杂交条带的浓度都明显高于相应的癌旁组织;可见核纤层蛋白 A/C 在肝细胞癌的癌组织中存在高表达,该结果与双向荧光差异凝胶电泳结果一致。

其中,病例 4 2 癌组织及相应癌旁组织样品进行了双向凝胶电泳的免疫印迹分析,发现核纤层蛋白 A/C 的不同的翻译后修饰形式在癌组织中也有上调表达(图 3),其中就有在 2D-DIGE 中发现的三种翻译后修饰的形式,进一步提示核纤层蛋白 A/C 不同的翻译后修饰形式也是重要的变化指标。

综上所述,核纤层蛋白 A/C 在肝细胞癌的癌组织及癌旁组织中存在差异表达,显然与肝细胞癌的发生发展有着密切的相关性,因此,以核纤层蛋白 A/C 作为一个蛋白质分子标记对其表达量进行检测可以用于检测肝细胞癌。相应的,特异性抗核纤层蛋白 A/C 的抗体,包括各种抗核纤层蛋白 A/C 的单克隆抗体和多克隆抗体,由于其能够用于检测核纤层蛋白 A/C 的表达量,因而可以用于检测肝癌,或者用于制备检测肝癌易感性的制剂或试剂盒等,这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

虽然有关核纤层蛋白 A/C 动态的生物学功能及肿瘤相关机制还有待进一步研究,但是将其作为检测肝癌或肝癌易感性的标记物却是肯定的。核纤层蛋白 A/C 可作为肝细胞癌的潜在标志,而其在胞内的生物学功能提示核纤层蛋白 A/C 可能作为肝癌的预后分子标记和临床治疗的靶分子。

专利名称(译)	核纤层蛋白A/C的应用		
公开(公告)号	CN1920568A	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510029161.4	申请日	2005-08-26
[标]申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
当前申请(专利权)人(译)	中国科学院上海生命科学研究院		
[标]发明人	曾嵘 李辰 周晓 袁新雨		
发明人	曾嵘 李辰 周晓 袁新雨		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/532 G01N33/68		
代理人(译)	缪利明		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明通过筛选在肝细胞癌的癌组织和癌旁组织中存在差异表达的蛋白，找到了一种在肝细胞癌的癌组织中高表达的蛋白，免疫印迹实验进一步证实了核纤层蛋白A/C的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达，同时双向凝胶电泳的免疫印迹进一步证实核纤层蛋白A/C的不同的翻译后修饰形式在癌组织中也有上调表达。鉴于核纤层蛋白A/C与肝细胞癌的这种相关性，该蛋白可以用作检测肝癌的蛋白质分子标记。

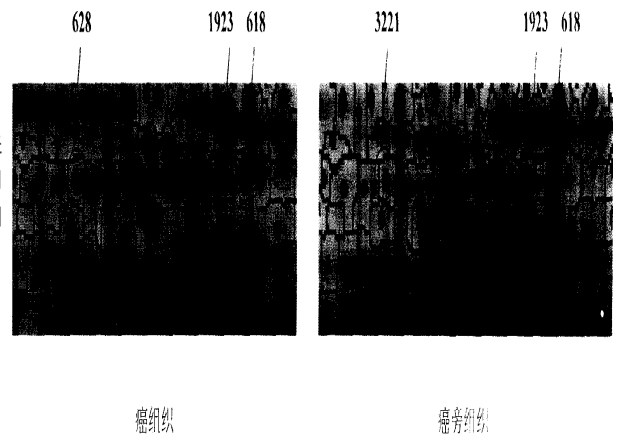


图1