

[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 200510029158.2

[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 1920566A

[22] 申请日 2005.8.26

[21] 申请号 200510029158.2

[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

FK506 结合蛋白4 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FK506结合蛋白4的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。鉴于FK506结合蛋白4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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

6、一种抗 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的抗体检测待测肝细胞中 FK506 结合蛋白 4 的数量；

B、将步骤 A 测得的 FK506 结合蛋白 4 的数量与正常肝组织中的 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的抗体包括单克隆抗体和多克隆抗体。

## FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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。

FK506 结合蛋白 4(FK506-binding protein 4; Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase; PPIase; Rotamase; p59 protein; HSP binding immunophilin; HBI; FKBP52 protein; 52 kDa FK506 binding protein; FKBP59; FKBP4) 的 Genebank 登录号为 gi|4503729, NCBI 的登录号为 NP\_002005。它是一种免疫抑制剂 (FK506 或 rapamycin) 结合蛋白，在体外具有肽基脯氨酰异构酶 (peptidyl prolyl isomerase) 和似分子伴侣活性 (chaperone-like activity)，体内的 FK506 结合蛋白 4 则属于类固醇激素受体复合物 (steroid hormone receptor complexes)，它在免疫调控、蛋白折叠与运输等基础细胞学过程中发挥重要功能。

FK506 和 rapamycin 是结构相关的高效的免疫抑制剂，它们阻断不同的胞内信号传导途径并受结合它们的亲免疫蛋白家族 (immunophilin protein family) 成员调控。人类的亲

免疫蛋白家族成员包括 FKBP12 (FKBP1)、FKBP13 (FKBP2)、FKBP25 (FKBP3) 和 FK506 结合蛋白 4 (FKBP4) (Peattie, D. A. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 89: 10974-10978, 1992)。

FK506 结合蛋白 4 是一个“巨大的”亲免疫素，它的 N 端结构域与 FKBP12 在结构和功能上高度保守。和 FKBP12 不同的是，它与 FK506 结合形成的复合物没有免疫抑制剂活性。酵母双杂交实验显示：一种过氧化物酶 phytanoyl-CoA alpha-hydroxylase (PHYH) 特异性结合 FK506 结合蛋白 4 的 N 端结构域 (Chambraud, B. et al. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 96: 2104-2109, 1999)。

FK506 结合蛋白 4 还同两种热休克蛋白 hsp90 和 hsp70 相互作用，它们都是类固醇激素受体复合物成员 (Sanchez ER, Faber LE, Henzel WJ, Pratt WB. *Biochemistry.* 1990 May 29; 29(21): 5145-52)。FK506 结合蛋白 4 包含一个酪蛋白激酶 II (casein kinase II, CK2) 的保守磷酸化作用位点 Thr143 (Miyata Y. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997 Dec 23; 94(26): 14500-5)，这一修饰调节 FK506 结合蛋白 4 与热休克蛋白 90 (heat shock protein 90, HSP90) 的结合与否，CK2 磷酸化的 FK506 结合蛋白 4 不再具有 HSP90 结合活性，这是一种改变复合物组成 (如类固醇受体和蛋白激酶) 的调控方式。

另外，FK506 结合蛋白 4 还与二型腺相关病毒载体 (adeno-associated virus type 2 vectors, AAV) 有强烈相互作用，在人细胞系中表现为能显著刺激 AAV 相关的基因表达，从而体现了 FK506 结合蛋白 4 在人类基因治疗领域中良好的应用前景 (Qing K. et al. *J. Virol.* 2001 Oct; 75(19): 8968-76)。

最近的一篇文献表明，人结肠癌细胞系 DLD-1 中，FK506 结合蛋白 4 与 HSP90、P53 等相互作用并使得肿瘤抑制蛋白 P53 从细胞核移位至细胞质是 P53 蛋白丧失肿瘤抑制功能的可能机制 (Galigniana MD., et al. *J. Biol Chem.* 2004 May 21; 279(21): 22483-9. Epub 2004 Mar 5)。另外，乳腺癌细胞系 MCF-7 中也报道过 FK506 结合蛋白 4 在 mRNA 水平的高表达情况 (Kumar P., et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001 Jun 1; 284(1): 219-25)。但截止目前，还没有 FK506 结合蛋白 4 与肝细胞癌的相关报道。

## 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 FK506 结合蛋白 4。进一步的免疫印迹实验证实，FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的抗体检测待测肝细胞中 FK506 结合蛋白 4 的数量；

B、将步骤 A 测得的 FK506 结合蛋白 4 的数量与正常肝组织中的 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的表达异常。

虽然在现有技术中有关于 FK506 结合蛋白 4 在人结肠癌细胞系以及乳腺癌中高表达的报道，但是到目前为止，还没有 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 在癌组织和癌旁组织的 2-DE 图谱中的量变示意图，显示了蛋白质点 SSP 2614（经质谱鉴定的 FK506 结合蛋白 4）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 FK506 结合蛋白 4 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) 制备了肝细胞癌的癌组织与癌旁组织的蛋白质样品, 以双向凝胶电泳 (2-DE) 技术筛选在癌组织与癌旁组织中差异表达的蛋白质点并质谱鉴定, 结果发现 FK506 结合蛋白 4 在肝细胞癌癌组织中上调表达。免疫印迹实验进一步证实 FK506 结合蛋白 4 的确在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。

因此, 以 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 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  $\mu$ 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）、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）、Tri-n-butylphosphat（TBP）、PDQuest 软件等为 Bio-Rad 产品。

LCQ<sup>TM</sup> Deca XP system 和 ProteomeX<sup>TM</sup> Workstation 购自 Thermo Finnigan 公司。

非线性固相 pH 梯度预制胶条 (IPG 干胶条, pH3-10NL, 130×3×0.5 mm)、IPG 缓冲液、IPGphor 等电聚焦系统 (Amersham Pharmacia Biotech)、Amersham Pharmacia ETTAN Dalt II systems 等为 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), 采用双向凝胶电泳法对其中的差异表达蛋白进行筛选, 双向凝胶电泳主要按 Sanchez 等人的改进方法 (Sanchez, J. C. et al. *Electrophoresis* 1997, 18, 324-327) 进行, 具体如下:

首先采用分析型双向凝胶电泳, 将 60 $\mu$ g 蛋白质样品与重泡涨液 (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 $\mu$ l, 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, 采用银染使胶条生成图像, 并以 GS-710 图像扫描仪 (Bio-Rad) 透射模式扫描胶图像, 分辨率为 84.7  $\mu$ m/pixel。点的检测和匹配用 PDQuest 软件分析。蛋白质点的等电点 pI 和分子量  $M_r$  以 2-DE 标准蛋白质 (Bio-Rad) 的作为 Marker, 输入软件用于分析其它蛋白的 pI 和  $M_r$ 。

本实施例以非酶解样品制备法共制备 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, 共得到 2-DE 图谱 40 余幅, 其中 5 对样品重复 3 次 PDQuest 软件进行了癌组织与癌旁组织的蛋白质差别表达谱分析, 分析结果见以下表 2。

表 2、PDQuest 软件分析结果 (部分)

样品名称	匹配点	统计分析 (t 测试, p<0.05)	定量分析		定性分析		相关系数	
			在 T 中 更多	在 N 中 更多	仅在 T 中	仅在 N 中	T-T 或 N-N	T-N
3 27	1283	230	35	54	16	22	r[0.82718-0.86666]	r[0.69826-0.76055]
3 28	1316	97	24	9	9	6	r[0.75556-0.84765]	r[0.63577-0.73870]
4 15	1121	393	51	56	48	75	r[0.82165-0.85401]	r[0.66092-0.72361]
4 18	1125	362	41	74	46	57	r[0.827149-0.863555]	r[0.673221-0.729310]
4 29	1213	264	67	46	44	95	r[0.79004-0.86468]	r[0.60064-0.68952]

注：在 T 中更多 = 在肝癌组织中表达上调的蛋白质点；  
在 N 中更多 = 在肝癌组织中表达下调的蛋白质点；  
仅在 T 中 = 仅在肝癌组织中检测到的蛋白质点；  
仅在 N 中 = 仅在非肝癌组织中检测到的蛋白质点；  
T-T = 肿瘤之间的相关系数；  
N-N = 成对的非肿瘤之间相关系数；  
T-N = 肿瘤组织和成对的非肿瘤组织之间的相关系数。

在 pH3-10 胶条上，银染条件下两类组织样品均显示约 1200 个银染点。癌组织间银染点匹配率为 0.75~0.86，癌组织与癌旁组织间银染点匹配率为 0.60~0.76，一定程度上说明两类组织样品取样方法的科学性。

图谱分析之后，本实施例又采用制备型双向凝胶电泳，上样量为 1.5mg，总 Vhrs 约为 90000，采用可与质谱兼容的考马斯亮蓝法检测，其它与分析型双向凝胶电泳方法相同。

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考马斯亮蓝染色的制备型电泳凝胶上手工切取，在 100mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ 、30%乙腈中脱色，真空冷冻干燥，5  $\mu\text{l}$  50mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (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  $\mu\text{l}$  50mmol/L  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  (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<sup>TM</sup> Deca XP 系统鉴定酶解好的样品，Bioworks 软件 (Thermo finnigan 公司) 进行数据库搜索。

应用双向凝胶电泳技术、胶内酶解技术、质谱技术，本实施例鉴别出了 116 个差别点，对应 102 种差别表达的蛋白质。其中，肝细胞癌组织中高表达或仅在其中表达的为 61 个差别点，对应 54 种蛋白质；肝细胞癌旁组织中高表达或仅在其中表达的为 55 个差别点，对应 48 种蛋白质。

在差异表达谱中，点 SSP 2614 (图 1) 在癌组织中表达明显上调，经切点、胶内酶解，点 SSP 2614 用 1D-LC-MS/MS 质谱鉴定和数据库搜索得 15 个非重复肽段 (共鉴定到 29 个肽段) 与 FK506 结合蛋白 4 相符并满足打分条件 ( $\Delta \text{Cn}$  值  $\geq 0.1$ ，并且 X corr 值：若为 1 个电荷  $\geq 1.9$ ，若为 2 个电荷  $\geq 2.2$ ，若为 3 个电荷  $\geq 3.75$ )，氨基酸覆盖率为 40.96%，具体结果详见以下表 3：

表 3、点 SSP2614 的质谱鉴定结果

肽段序列	质量数(MH+)	电荷数	X Corr 值	Delta Cn 值
K. AEASSGDHPTDTEMKEEQK. S	2091.16	3	3.8407	0.4336
K. AEASSGDHPTDTEMKEEQK. S	2091.16	3	3.8392	0.2821
K. ALELDSNNEK. G	1133.19	2	2.9637	0.255
K. ALELDSNNEK. G	1133.19	2	3.0623	0.1945
K. ATESGAQSAPLPMEGVDISPK. Q	2086.31	2	4.3708	0.4317
K. AWDIAIATMK. V	1120.35	2	2.6935	0.428
K. AWDIAIATMK. V	1120.35	2	2.7976	0.3989
K. FSFDLKGGEVIK. A	1340.55	2	3.1865	0.4557
K. LQAFSAAIESCNK. A	1439.59	2	3.8466	0.4881
K. LQAFSAAIESCNK. A	1439.59	2	4.2572	0.5335
K. LQAFSAAIESCNK. A	1439.59	2	4.0599	0.553
K. LYANMFER. L	1044.21	2	2.4764	0.3592
K. LYANMFER. L	1044.21	2	2.4287	0.1813
K. SNTAGSQSQVETEA. -	1409.4	2	3.9979	0.4761
K. TQLAVCQQR. I	1104.24	2	3.0109	0.4217
K. TQLAVCQQR. I	1104.24	2	3.0067	0.4106
K. TQLAVCQQR. I	1104.24	2	2.9653	0.4514
K. VLQLYPNNK. A	1089.27	2	2.5529	0.2537
K. VLQLYPNNK. A	1089.27	2	2.9799	0.263
K. VLQLYPNNK. A	1089.27	2	2.7007	0.1457
K. YKQALLQYK. K	1155.37	2	2.6239	0.245
K. YKQALLQYK. K	1155.37	2	3.1507	0.3611
R. EGTGTEMPMIGDR. V	1394.56	2	2.4124	0.3688
R. FEIGEGENLDLPYGLER. A	1952.11	2	4.5489	0.618
R. FEIGEGENLDLPYGLER. A	1952.11	2	4.2994	0.5597
R. FEIGEGENLDLPYGLER. A	1952.11	2	4.1121	0.5963
R. GTVYFKEGK. Y	1029.17	2	2.2764	0.3408
R. RGEAHLAVNDFELAR. A	1698.86	3	4.1094	0.4317
R. RGEAHLAVNDFELAR. A	1698.86	3	3.835	0.3324

并且, 根据 PDQuest 软件对已有 2-DE 图谱的分析, 通过比较点 SSP 2614 在不同肝细胞癌患者的癌组织与癌旁组织的 2-DE 图谱中的表达情况, 发现 SSP 2614 以下 5 例不同病例中的都是在癌组织中高表达 (表 4):

表 4、点 SSP2614 在癌组织中的上调表达在 5 例不同病例中的重复情况

SSP No.	病例 4 29 (癌/癌旁)	病例 3 27	病例 3 28	病例 4 15	病例 4 18	平均比例(癌/癌旁) $\pm$ STDEV
SSP 2614	3.1	2.7	3.1	3	2.9	3 $\pm$ 0.167

因而，2-DE 图谱分析显示：点 SSP2614 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 2-DE 图谱中得到良好的重复（50%）。

### 实施例 3、FK506 结合蛋白 4 差异表达的免疫印迹验证

为确认 FK506 结合蛋白 4 在双向凝胶电泳中的差异表达，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 FK506 结合蛋白 4 抗体进行免疫印迹分析，具体过程简述如下：

每个样品取 20  $\mu\text{g}$  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 FK506 结合蛋白 4 单抗（购自 Stressgen Biotechnologies 公司，1:1000），室温孵育 2 小时，用 TBST（每升含 Tris 2.42 g, 氯化钠 8 g, Tween 20 1ml, 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）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无一例外的呈现这样的现象：癌组织中 FK506 结合蛋白 4 的杂交条带的浓度都明显高于相应的癌旁组织；可见 FK506 结合蛋白 4 在肝细胞癌的癌组织中存在高表达，该结果与双向凝胶电泳结果一致。

综上所述，FK506 结合蛋白 4 在肝细胞癌的癌组织及癌旁组织中存在明显的差异表达，显然与肝细胞癌的发生发展有着密切的相关性，因此，以 FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 的抗体，包括各种抗 FK506 结合蛋白 4 的单克隆抗体和多克隆抗体，由于其能够用于检测 FK506 结合蛋白 4 的表达量，因而可以用于检测肝癌，或者用于制备检测肝癌的制剂或试剂盒等，这对于本领域的技术人员来说是显而易见的。

虽然有关 FK506 结合蛋白 4 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的标记物却是肯定的。FK506 结合蛋白 4 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 FK506 结合蛋白 4 可能作为肝癌的预后分子标记和临床治疗的靶分子。

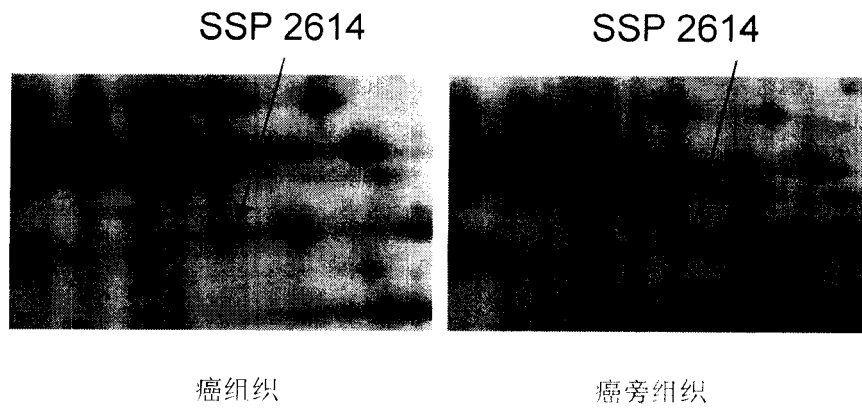


图 1

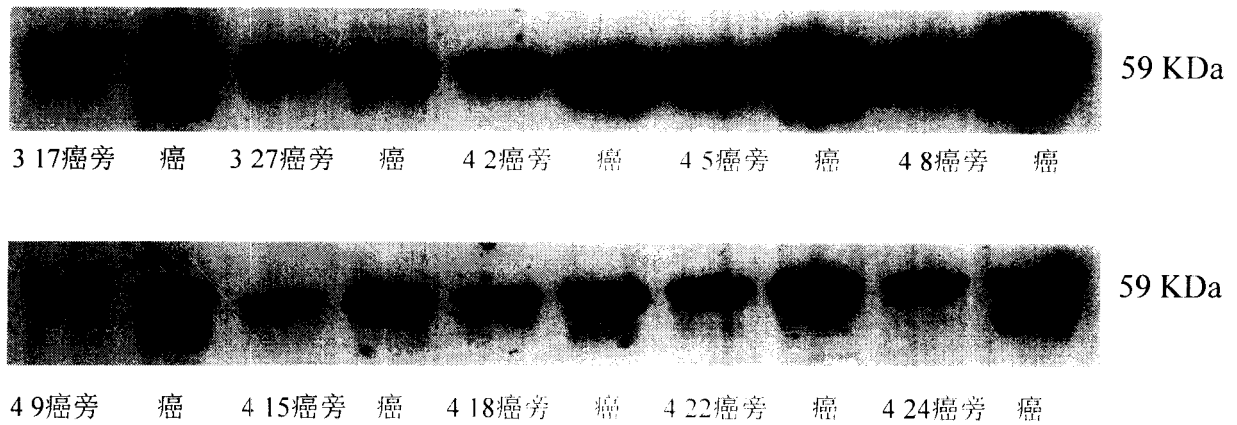


图 2

专利名称(译)	FK506结合蛋白4的应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN1920566A</a>	公开(公告)日	2007-02-28
申请号	CN200510029158.2	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		
其他公开文献	CN1920566B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

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FK506结合蛋白4的在肝细胞癌的癌组织与癌旁组织中存在差异表达。鉴于FK506结合蛋白4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。

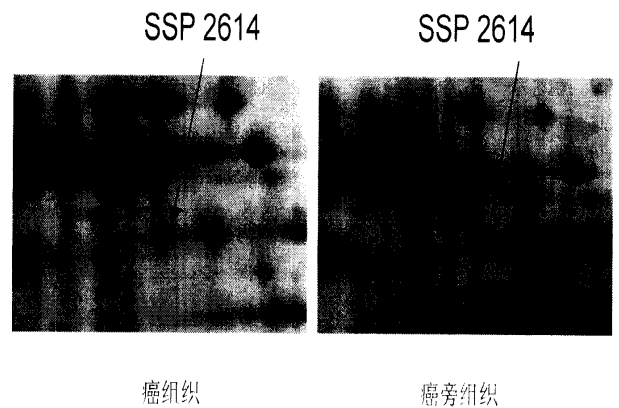


图1