



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102844661 B

(45) 授权公告日 2014.06.25

(21) 申请号 201180018413.7

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2011.02.11

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/303,361 2010.02.11 US

(56) 对比文件

CN 1867679 A, 2006.11.22, 全文.

WO 2007100183 A1, 2007.09.07, 权利要求 1-13.

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012.10.10

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2011/000217 2011.02.11

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2011/097960 EN 2011.08.18

(73) 专利权人 香港理工大学

地址 中国香港九龙红磡

审查员 吴立

(72) 发明人 卢俊立 林颖淇

(74) 专利代理机构 北京金思港知识产权代理有

限公司 11349

代理人 邵毓琴

(51) Int. Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

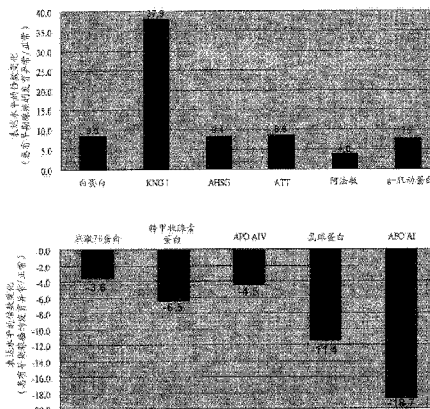
权利要求书1页 说明书13页 附图17页

(54) 发明名称

胃癌的生物标志物及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一组指示早期胃癌的生物标志物和通过检测这些生物标志物在血液样品中的水平而在早期诊断胃癌的方法。检测到由白蛋白、T-激肽原 I、α-2-HS 糖蛋白、α-1-抗胰蛋白酶、阿法敏和 γ-肌动蛋白组成的组中的一种或更多种蛋白生物标志物的过表达和 / 或检测到由应激 70 蛋白、载脂蛋白 A-I、载脂蛋白 A-IV、转甲状腺素蛋白和鼠球蛋白组成的组中的一种或更多种蛋白生物标志物的低表达是胃癌存在的指示。



1. 蛋白生物标志物在制备用于估测受试对象患有胃癌的可能性的药物中的应用,其中,所述蛋白生物标志物选自由第一蛋白生物标志物和第二蛋白生物标志物组成的组,所述第一蛋白生物标志物为选自由白蛋白、T- 激肽原 I、 $\alpha$ -2-HS 糖蛋白、阿法敏和  $\gamma$ - 肌动蛋白组成的组中的至少一种,所述第二蛋白生物标志物为选自由应激 70 蛋白和鼠球蛋白组成的组中的至少一种,所述估测包括如下步骤:

(a) 检测所述第一蛋白生物标志物在来自所述受试对象的检测样品中的过表达,和  
(b) 检测所述第二蛋白生物标志物在所述检测样品中的低表达。

2. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,步骤 (a) 包括检测至少两种所述第一蛋白生物标志物的过表达,并且步骤 (b) 包括检测至少两种所述第二蛋白生物标志物的低表达。

3. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,步骤 (a) 包括检测至少三种所述第一蛋白生物标志物的过表达,并且步骤 (b) 包括检测至少两种所述第二蛋白生物标志物和至少一种选自由载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AIV 和转甲状腺素蛋白组成的组中的蛋白生物标志物的低表达。

4. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,步骤 (a) 包括检测至少四种所述第一蛋白生物标志物的过表达,并且步骤 (b) 包括检测至少两种所述第二蛋白生物标志物和至少两种选自由载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AIV 和转甲状腺素蛋白组成的组中的蛋白生物标志物的低表达。

5. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,步骤 (a) 包括检测至少五种所述第一蛋白生物标志物的过表达,并且步骤 (b) 包括检测至少两种所述第二蛋白生物标志物和至少三种选自由载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AIV 和转甲状腺素蛋白组成的组中的蛋白生物标志物的低表达。

6. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,步骤 (a) 包括检测至少五种所述第一蛋白生物标志物和  $\alpha$ -1- 抗胰蛋白酶的过表达。

7. 根据权利要求 1 所述的应用,其中,所述检测样品为血液样品。

## 胃癌的生物标志物及其应用

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求在 2010 年 2 月 11 日提交的美国临时申请 No. 61/303, 361 的权益。

### 技术领域

[0003] 本发明涉及生物技术领域。更具体地说,本发明涉及生物标志物在胃癌的诊断和治疗中的应用。

### 背景技术

[0004] 胃癌是世界范围内造成癌症相关死亡的第二大最常见因素,五年存活率低于 15%。死亡率高是由于诊断受到耽搁,因为胃癌(例如发育异常和早期腺癌)在早期通常是没有症状的。胃癌的早期诊断和手术介入对于更好的预后是关键,这将五年存活率提高到 50%。目前,消化道内窥镜检查法(strointestinal endoscopy)是诊断的金标准。然而,这是一个不舒服的程序,本身存在风险,并且操作不适合于大规模筛查。然而,目前没有用于胃癌诊断的具有灵敏性和特异性的非侵入性检测。确实需要鉴定出用于诊断目的指示早期胃癌的存在的可靠的血清蛋白生物标志物(biomarker)。

[0005] 在后基因组时代,认识到蛋白是身体的役马(work horse)。不同代谢途径都是通过蛋白来表现。因此,可以使用在胃癌早期表达的独特且特异的蛋白作为生物标志物。从病理学上来看,癌症的进展主要表现为癌组织中的失控生长、心血管的构建和对临近组织的浸入。这些变化将带来蛋白表达的伴随性变化,包括它们的形成、集中和与其它分子的相互作用。通过利用血液和淋巴灌注到组织和器官,来自癌组织的蛋白和片段浸入循环。身体对癌症的防御性反应还生成另外一组蛋白。因此,来自病人的血清/血浆样品将为胃癌发生的筛查提供理想的样品。

### 发明内容

[0006] 为了满足上述需求,本发明鉴定出一组指示早期胃癌的蛋白生物标志物。所述蛋白生物标志物通过使用比较基因组学技术进行鉴定。该过程总结如下。

[0007] 通过实验方法诱导大鼠胃癌。采取一系列的血清样品,并通过高分辨率乳房 X 线照相术检测胃损伤。目的是将所见到的可能胃损伤与血浆样品中发现的差异化表达的蛋白关联。还使用定制的免疫亲和柱进行高丰度蛋白的移除。使用比较蛋白组学分析来寻找患有发育异常和早期腺癌的大鼠的血清中的特征性变化(characteristic alternation)。利用组织学检查确认胃部癌发生的不同时期。最后,通过 Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization Time Of Flight Mass Spectrometry(MALDI-TOF MS)来鉴定出一组血清候选生物标志物。这些生物标志物的一些还未见报道与胃癌相关。

[0008] 查出到表达差异化超过 3 倍的蛋白,并且通过胶内胰蛋白酶消化和随后的 MALDI-TOF MS 成功鉴定到 11 种蛋白(见图 1)。本发明人发现的六种上调蛋白是白蛋白、T- 激肽原 I(KNGI)、 $\alpha$ -2-HS 糖蛋白(AHSG)、 $\alpha$ -1- 抗胰蛋白酶(ATT)、阿法敏(Afamin)和

$\gamma$ -肌动蛋白。另外五种下调蛋白是应激 70 蛋白、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AIV、转甲状腺素蛋白和鼠球蛋白。它们的主要功能总结在图 2 中。

[0009] 作为本发明的一个目的,提供了使用所鉴定到的一组蛋白生物标志物来对早期胃癌进行大规模筛查的方法。

[0010] 作为本发明的另一个目的,可以使用所鉴定到的一些蛋白生物标志物作为抗癌药物的靶用于治疗目的。由于这一组生物标志物的表达水平上升指示胃癌的存在,因此它们可能是癌组织的必需组分。这些蛋白的破坏可能导致癌的破坏。另一方面,显示下调的癌症生物标志物的增强可以增强可能在癌症状态已经受到影响的正常途径。

[0011] 在本公开内容所附的并且构成本公开内容的一部分的权利要求书中具体指出了表征本发明的各种新颖性特征。为了更好地理解本发明、本发明的操作优点和利用本发明所达到的特定目的,可以参考附图和以下说明,其中例示并描述了本发明的优选的实施方式。

### 附图说明

[0012] 图 1 示出了根据本发明的在早期指示胃癌的上调生物标志物和下调变化。

[0013] 图 2 总结了本发明的生物标志物的主要功能。

[0014] 图 3 是示出典型 2D-DIGE 实验的工作流程的图。

[0015] 图 4 示出了显示大鼠 H&E 系的胃部的显微照片 (250 倍)。

[0016] 图 5 是显示 Ig  $\gamma$  ( $MW \sim 180kDa$ ) 的纯度的非还原性 SDS-PAGE。

[0017] 图 6 是使用大鼠血清作为样品的 10%SDS-PAGE 和 Western 印迹。

[0018] 图 7 显示 40mg 粗制大鼠血清 (左) 和双耗竭大鼠血清 (流通物) (右) 的代表性 10%2-DE 凝胶 (银染)。

[0019] 图 8 是在 18cm IPG 胶条 (strip) 中解析的 40  $\mu$  g 大鼠血清样品的蛋白组的代表性 2-DE,其中采用 pH 3-10,10% 的 SDS-PAGE。

[0020] 图 9 是在 18cm IPG 胶条 (strip) 中解析的 40  $\mu$  g 大鼠血清样品的蛋白组的代表性 2-DE,其中采用 pH 4-7,10% 的 SDS-PAGE 作为第二维度。

[0021] 图 10 是去除 HAP 后大鼠血清模式的代表性 2-DE,其中采用印染可视化。正常 (上图) 和患有腺癌的发育异常 (下图) 血清样品 (40  $\mu$  g)。

[0022] 图 11 是图 10 示出的显示一致地差异化表达超过 3 倍的 15 种蛋白的 2-DE 凝胶的放大区域。

[0023] 图 12 显示在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的差异化蛋白的鉴定。(\* 第一个数指示通过 MS 分析的值,后一个数代表 MS/MS 分析) (向上箭头指示在癌症中被上调,而向下箭头指示在癌症中被下调) (NA:没有获得数据)。

[0024] 图 13 提供免疫耗竭后标记的总共为 150  $\mu$  g 血清样品的代表性 2D-DIGE 凝胶 (pH 4-7)。(A) Cy 3 (D&A 血清样品) 和 Cy 5 (对照血清) 的重叠图。(B) 分开的 CyDye 图: Cy 2 (内部标准物)、Cy 3 和 Cy 5。

[0025] 图 14 是通过 DeCyder 分析一致地表达差异化超过 3 倍的 11 个斑点 (spot) 的 3D 图像。

[0026] 图 15 显示在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的差异化蛋白的鉴定,其中在免疫耗

竭后进行样品归一化。

[0027] 图 16 显示在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的差异化蛋白的鉴定,其中在免疫耗竭前进行样品归一化。

[0028] 图 17 是显示使用 3 种不同样品制备方法鉴定到的差异化蛋白的数量 (A) 以及它们的身份 (B) 的文氏图。

[0029] 图 18 显示在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的差异化蛋白的身份。

## 具体实施方式

### [0030] 材料

[0031] 除非另有说明,否则所有使用的化学品均来自 Sigma(USA),并且至少是分析级 (AR)。另外,包括乙腈、甲醇和三氟乙酸在内的有机溶剂至少是 HPLC 级。塑料器具具有高质量,以避免聚合物渗漏。Eppendorf 管是最高分析级,来自 Eppendorf (USA)。

### [0032] 动物模型

[0033] 24 只 6 周龄雄性维斯塔大鼠 (Wistar rat) 从中国香港大学实验动物中心 (Laboratory Animal Services Centre, LASEC) 购买。将动物于标准实验室条件下圈养在聚碳酸酯笼中,室温为  $23 \pm 2^\circ \text{C}$ ,相对湿度为  $60 \pm 5\%$ ,12 小时光 / 暗循环。让动物自由采食和进水。所有程序都是按照香港理工大学的动物受试对象道德委员会批准 (Animal Subjects Ethics Subcommittee) 的协议进行。

[0034] 通过 N-甲基-N'-硝基-N-硝基胍 (N-methyl-N'-nitro-N-nitroso guandine, MNNG) 进行的胃癌诱导

[0035] 在 2 周的实验室条件适应之后,当大鼠达到 8 周龄时利用 MNNG 进行胃癌诱导。让实验组中的 19 只大鼠每天饮用新鲜配制的含有 0.01%MNNG 的水。在最初的 6 周每周通过口服强饲法饲喂 1mL 10% 的 NaCl 以引发由 MNNG(Chen 等,2004) 诱导的胃部癌发生。溶液保存在遮光瓶中以避免 MNNG 受光降解。5 只对照大鼠饲喂普通自来水。每 2 周记录每只大鼠的体重。

### [0036] 血液样品收集

[0037] 在利用 MNNG 进行的胃癌诱导后第 8 周开始,每两周从每只大鼠收集血液样品。在轻度醚麻醉下利用锐利的玻璃毛细管从眼部下方的静脉采取约 1.5mL 血液。将血液在室温静置 1 小时使其凝结。然后在 2,000g 在  $4^\circ \text{C}$  离心 20 分钟。将所得血清等分成小份并在  $-80^\circ \text{C}$  保存待用。没有样品保存超过 12 个月。

### [0038] 胃部的高分辨 X 线分析

[0039] 从第 19 周开始,每月通过高分辨 X 线检查实验大鼠。乳房 X 线照相机 MAMMOMAT 3000(Siemens, 德国) 由香港理工大学的射线照相室 (Radiographic Clinic) 提供。在用氯胺酮 (90mg/kg) 和子拉辛 (zylaxine, 10mg/kg) 进行麻醉的情况下,口服强饲 1mL 10% 的泛影葡胺 (gastrografin) 以包埋胃壁。然后,口服施用约 50mL 空气使胃部膨胀以便更好地观察。让大鼠取卧姿位置进行 X 线照射 (图 2.3)。X 线条件设定为:电压在 23kV 至 35kV 的范围内,毫安秒在 2mA 至 5mA 之间。

### [0040] 胃部组织的组织学检查

[0041] 在需要胃部组织的情况下,从动物上取下胃部,然后将它们于 10% 缓冲福尔马林

中固定以使组织稳定从而防止腐烂。每个胃部切成 4 条,包括胃部近端 1 条,胃部主体 2 条和胃部远端 1 条(如图 2.4 所示)。在 53.7° C 将它们放在福尔马林中浸没 6 小时。然后将样品浸没在乙醇浓度逐渐升高的多个浴室中以使组织脱水,然后进行二甲苯浴(一种清洁剂),最后放到热熔融石蜡中。然后将样品包埋在模具中使其冷却硬化。使用显微切片机将组织切成 4 μm。将切片放在载玻片上用苏木精和曙红染色。苏木精将细胞核染成蓝色,而曙红将细胞质染成粉红色。在光学显微镜下分析样本。检查发育异常和 / 或腺癌的发生,然后由 Pak-kwan Hui(广华医院病理科(Pathology Department of The Kwong Wah Hospital)主任(顾问级病理学家))确认。

#### [0042] 在母鸡中的抗体生成和来自蛋黄的 Ig Y 的纯化

[0043] 抗体生成:将经用 PBS(0.5ml 终体积)稀释的来自正常维斯塔大鼠的 200 μg 大鼠血清与弗氏完全佐剂(在初始注射中)或弗氏不完全佐剂(在随后的加强中)中按 1:1(v/v, 体积比)混合(Ruan 等, 2005)。以 3 周的间隔将 1 mL 的抗原乳液注射到母鸡的胸肌中, 注射 4 次, 以及按 6 周的间隔进行最后的两次注射。每天收集鸡蛋、标记并保存在 4° C。

[0044] Ig Y 纯化:为了获得最大量的鸡蛋 Ig Y(抗目标抗原),进行了 3 种不同的 Ig Y 纯化方法。

[0045] EGGstract 试剂盒:根据制造商的说明书进行 EGGstract Ig Y 纯化(Promega, USA)。简而言之,获取每个鸡蛋的蛋黄并称重,然后在室温下向其中缓慢加入 3 倍体积的溶液 A。将混合物混合 5 分钟。此后让蛋黄的液体部分析出,然后将蛋黄混合物于 10000g 在 4° C 离心 15 分钟。加入 1/3 体积的溶液 B,然后缓慢搅拌 5 分钟。再于 10000g 在 4° C 将上清液再离心 15 分钟。然后,在 1/3 体积的溶液 B 中将沉淀重新悬浮,缓慢搅拌 5 分钟,在与上述相同的条件下进行最后一轮的离心。最后,将沉淀在初始蛋黄体积的 PBS 中重新悬浮。

[0046] 硫酸铵沉淀:用水以 1:2 的体积比稀释蛋黄,然后在 -20° C 冷冻过夜。然后将混合物解冻并在 10000g 在 4° C 离心 10 分钟。向上清液中添加硫酸铵至终浓度为 50%(w/v, 重量 / 体积)。在 4° C 将溶液混合 1 小时,然后在 5000g 离心 20 分钟。离心之后,将沉淀于 0.01M Tris-HCl 中重新悬浮至上清液一半的体积。然后,通过添加硫酸铵至 33% 的终浓度来使样品沉淀。再在 4° C 再次搅拌溶液 1 小时,然后在 5000g 离心 20 分钟。最后,在离心之后,将沉淀重新悬浮在 PBS 中(Ruan 等, 2005)。

[0047] 硫酸钠沉淀:用水以 1:9 的稀释比稀释蛋黄,然后在 4° C 温育 6 小时。然后,将混合物在 10000g 在 4° C 离心 25 分钟。然后,收集上清液并通过添加硫酸钠(19%, 重量 / 体积)进行沉淀。在室温将上清液搅拌 2 小时,在 10000g 在 4° C 进行另一轮 25 分钟的离心之后,收集沉淀并溶解在 PBS 中(Akita 和 Nakai, 1993)。

[0048] 亲和柱:根据制造商的说明书制备溴化氰活化琼脂糖。简而言之,洗涤 CNBr 活化琼脂糖并以若干个等分试样在 1mM 冷 HCl 中溶胀 30 分钟。然后,用 5-10 柱体积的蒸馏水洗涤 CNBr 活化琼脂糖,再用偶联缓冲液洗涤。然后通过烧结玻璃过滤器对悬浮液进行快速过滤。然后立即将偶联缓冲液中的 Ig Y 转移至树脂。将 Ig Y 与凝胶混合并在 4° C 温育过夜。再通过烧结玻璃过滤器将悬浮液过滤。使用偶联缓冲液从琼脂糖上洗掉未反应的配体。然后,添加封闭剂以在 4° C 将未反应的位点封闭 16 小时。最后,先使用偶联缓冲液充分洗涤凝胶,再用乙酸盐缓冲液反复洗涤 5 次。然后留取 Ig Y 亲和凝胶待用。

[0049] 血清样品中高丰度蛋白 (HAP) 的耗竭 (depletion)

[0050] 首先用至少 10 倍柱体积的平衡缓冲液 (10mM Tris, pH 7.4) 平衡 IgY 亲和柱 (10mL, 在 4.91cm 2x 5cm 柱中)。将血清样品装载到柱子上部。通常收集 4mL 的组分。将“流通”组分收集作为“HAP 耗竭”血清。利用洗脱缓冲液 (0.1M 甘氨酸, pH 2.5) 进行酸性洗脱。立即用中和缓冲液 (1M Tris, pH 8) 中和从柱子上洗脱的蛋白。最后, 用 20mM pH 7.4 的 Tris 缓冲液充分洗涤以柱子 pH 得到恢复。然后使用 AmiconUltra 20 (Millipore, USA) 或 Amicon Ultra 4 (Millipore, USA) (截流值为 10kDa) 浓缩所收集的“流通 / 结合”样品。

[0051] 蛋白浓度测定

[0052] 按照制造商的说明书通过布拉德福德分析法 (Bradford assay, Bio-Rad, USA) 测定蛋白浓度。在 595nm 处读取样品吸光值。根据由从 0 到 10mg/mL 的一系列浓度的牛血清白蛋白 (BSA) 生成的标准曲线确定每个样品的蛋白浓度。

[0053] 一维凝胶电泳 (1-DE)

[0054] 通过与等体积的还原性样品缓冲液 (0.5M Tris-HCl pH 6.8, 0.025% SDS (w/v), 0.25% 甘油 (v/v), 痕量的 0.1% 溴酚蓝和 0.125%  $\beta$ -巯基乙醇 (v/v)) 或非还原样品缓冲液 (与还原样品缓冲液相似, 不同的是没有添加  $\beta$ -巯基乙醇) 混合而制得蛋白样品, 然后在 95°C 加热 15 分钟。使用带有 5% 积层凝胶的 10% 丙烯酰胺平板凝胶解析样品混合物。通电, 恒定电压为 100V。进行电泳直至染料前沿到达分离凝胶的底部。

[0055] 二维凝胶电泳 (2-DE)

[0056] 第一维等电聚焦 (IEF): 在 20°C, 在 IEF 再水化盒中, 对具有线性 pH 3 至 10 或 4 至 7 的经固定的 pH 梯度 (IPG) 胶条 (18cm, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) 进行被动再水化 12 小时, 蛋白在含有 7M 脲、2M 硫脲、4%(w/v (重量 / 体积)) CHAPS、10%(w/v) 异丙醇、5%(v/v) 丙三醇、64mM DTT 和 1%(v/v (体积 / 体积)) IPG 缓冲液的改性缓冲液中。然后将胶条转移到 IEF 聚焦盘中, 凝胶面向电极。IPG 胶条使用矿物油覆盖 IPG 胶条以避免脱水。使用 PROTEAN IEF CELL (Bio-Rad, USA) 在 20°C 进行 IEF。所施加的电压如下: 500V × 1 小时, 1000V × 1 小时, 4000V × 2 小时, 8000V × 4 小时, 在 8000V 80kVh 和最后的步骤且保持在 50V。总共有约 100kV 施加于胶条。

[0057] IPG 胶条的平衡: 在 IEF 之后, 将胶条浸没在含有 1%(w/v) DTT 的平衡缓冲液 (50mM Tris-HCl pH 8.8, 6M 脲, 39%(v/v) 丙三醇, 2%(w/v) SDS 和 0.006%(w/v) 溴酚蓝) 在连续振荡的同时进行 15 分钟的还原。随后, 将胶条放入到另一份含有 25%(w/v) 碘乙酰胺的平衡液中在连续振荡的同时进行 15 分钟的烷基化。

[0058] 第二维 -SDS-PAGE: 使用蒸馏水漂洗经过平衡的胶条, 然后将其放到 10% 丙烯酰胺平板凝胶的顶部。在所述胶条的顶部加上 0.5% 琼脂糖溶液以与所述凝胶相连接地密封所述胶条。在前 15 分钟以 15mA / 凝胶进行电泳, 然后增加到 35mA / 凝胶, 直到染料前沿到达分离凝胶的底部。

[0059] 银染: 在电泳之后, 采用质谱相容性银染程序对凝胶进行染色。简而言之, 在含有 40%(v/v) 乙醇和 10%(v/v) 乙酸的固定液中将凝胶固定 1 小时。然后, 在 30%(v/v) 乙醇, 0.2%(w/v) 硫代硫酸钠中将凝胶敏化 30 分钟。使用蒸馏水将凝胶洗涤 3 次, 每次 5 分钟。然后, 使用 0.25%(w/v) 硝酸银洗涤凝胶 20 分钟。然后再用蒸馏水洗涤凝胶 2 次, 每次洗涤 1 分钟。最后, 通过将凝胶于含有 2.5%(w/v) 碳酸钠的 0.04%(v/v) 甲醛中振荡而对凝胶进

行显影。当蛋白斑点达到所需的暗度水平时,通过加入 1.5%(w/v)EDTA 终止显影步骤。

[0060] 图像分析:通过常规扫描仪(Plustek, USA)扫描经染色的凝胶。然后通过 2-DE 凝胶分析软件 Melanie version 4.0(Gene-bio, Sweden)分析图像。

[0061] 二维差异凝胶电泳(Two dimensional Difference Gel Electrophoresis, 2D-DIGE)

[0062] 该方法在 IEF 之前使用花青染料(cyanine, Cy)标记蛋白并且在每个样品使用不同的荧光标记的情况下可以在同一 2-D 凝胶上在两个样品(对照样品和疾病样品)之间进行量化比较。这减少了斑点图案变化性和在实验使用的凝胶的数量,使得斑点配对(spot match)明显简单而准确。最低限度的标记确保每个蛋白分子只有一个赖氨酸并且提取物中不超过 3% 蛋白分子受到标记。花青染料(CyDye)的单个正电荷代替了存在于赖氨酸中的单个正电荷,从而使蛋白的等电点没有变化,但是使尺寸增加约 500Da。

[0063] 针对 Cy2 标记样品对来自两个样品(Cy3 和 Cy5)的单个蛋白数据进行归一化(即 Cy5: Cy2 和 Cy3: Cy2)。然后使用统计分析对来自所有凝胶的对照样品和疾病样品之间的这些对数丰度比进行比较。图 3 示出了典型的 2D-DIGE 试验的工作流程。

[0064] 样品标记

[0065] 根据生产厂家说明书进行荧光标记。简而言之,将 CyDye 于高梯度 N, N-二甲基甲酰胺(DMF)中重构成浓度为 1mM 的储备液。据认为,该储备液在 -20°C 保存数月是稳定的。在本发明的情况中,该储备液在两个月内使用。2D-DIGE 原理图示在以上的图 2.6 中。简而言之,使用 DMF 将 CyDye 储备液稀释至 400pmol/μl 的终浓度,然后立即进行标记。必须将蛋白样品的 pH 的调节至 8.5 并且浓度为 5 μg/μl 至 10 μg/μl。使用 3 种 Cy 染料(Cy2、Cy3 和 Cy5)之一来标记蛋白样品。使用 Cy2 标记样品作为 DeCyder 分析凝胶上的内部标准物。将样品进行涡旋振荡然后在黑暗中在冰上温育 30 分钟。然后,将 10mM 赖氨酸添加到样品中以终止标记反应。然后混合样品并在黑暗中在冰上再温育 10 分钟。将经过标记的样品直接进行 2-DE 或在 -80°C 保存备用。

[0066] 当进行 2-DE 时,汇集被不同 CyDye 标记的样品然后被动再水化为带有改进的再水化缓冲液的胶条。采用与上述的常规 2-DE 相同的程序进行 2D-DIGE。不同的是使用专门的低荧光 Pyrex 玻璃板来使在扫描过程中的背景荧光最小化并且使信噪比最大化。其他设备设置与常规 2-DE 的相同。另外,一旦用 CyDye 标记样品后,随后的步骤必须在黑暗中进行,因为要防止 CyDye 见光以使光漂白最小化。

[0067] 蛋白检测和图像分析

[0068] 在进行二维凝胶电泳后,在凝胶仍然在低荧光玻璃盒中的时候对其进行扫描。使用双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)清洁玻璃板的外部并用 Kimwipe 使之干燥,然后将凝胶盒定位在 Typhoon 9400 可变模式成像仪(Typhoon 9400 Variable Mode Imager, GE Healthcare, USA)中。Cy2 图像以 488 μm 的激发波长和 520 μm 带通(BP)40 发射滤光器进行扫描。Cy3 图像以 532 μm 的激发波长和 580 μm BP 40 发射滤光器进行扫描。Cy5 图像以 633 μm 激光器的激发波长和 670 μm BP 30 发射滤光器进行扫描。通过调节功率并使分辨率为 1000 μm(像素尺寸)来扫描凝胶,以充分利用饱和前的图像动态范围(image dynamic range)。随后,将凝胶图像转换成 16 比特 TIF 文件,然后转移至 ImageQuant V5.0(GE Healthcare, USA)进行凝胶对齐并切割。然后,使用 DeCyder 软件 V6.0(GE Healthcare, USA)进行斑点检测,利用该软



件确定斑点检测和排阻的光学设定。在绝大多数的情况下,将斑点检测的估计数量设定为 2500 个斑点。一般情况下,更高的值常常导致包括非蛋白来源的斑点。在 DeCyder 差异胶内分析 (DeCyder Differential In-gel Analysis, DIA) 模块中进行蛋白表达的统计和量化。只有归一化后体积变化超过 3 倍的那些蛋白斑点才被认为是差异化表达。

#### [0069] MALDI-TOF MS

[0070] 胶内消化:胶内蛋白胰蛋白酶消化根据来自制造商 Bruker Daltonick(德国)的手册“用于质谱的蛋白质程序 (Proteomic protocol for mass spectrometry)”进行。简而言之,切下经银染的凝胶上感兴趣的蛋白斑点并通过使用纯净水 (milli-Q 水) 洗涤 20 分钟进行脱色。此后,在脱色液 (30mM 铁氰化钾和 64mM 硫代硫酸钠) 中温育 15 分钟,然后使用 25mM 碳酸氢铵反复洗涤直到胶块变成无色。然后添加乙腈以使胶块脱水。当胶块收缩时除去剩余的乙腈。随后,将胶块在真空下干燥。干燥后,将胶块在 56°C 在还原性溶液 (含有 10mM 的二硫苏糖醇的 25mM 碳酸氢铵) 中温育 45 分钟。此后,在室温黑暗中使用烷基化溶液 (含有 55mM 碘乙酰胺的 25mM 碳酸氢铵) 将感兴趣的胶块温育 30 分钟。另外,使用含有 50mM 碳酸氢铵的 50%(v/v, 体积比) 的乙腈将胶块洗涤 15 分钟,并添加 100% 乙腈以使它们再次收缩。将在 25mM 碳酸氢铵中新鲜制备的 3  $\mu$ l 的 10  $\mu$ g/ml 胰蛋白酶 (Promega) 添加至胶块并将胶块-溶液混合物在 56°C 温育 90 分钟。洗脱胶塞 (gel plug) 中的胰蛋白酶片段,将 50%(v/v) 乙腈和 1%(v/v) 三氟乙酸添加至胶塞。利用超声波促进肽片段扩散到溶液中。

#### [0071] 肽质量指纹 (Peptide mass fingerprint, PMF) 分析

[0072] 使用配备有反射器的 Bruker Autoflex III MALDI-TOF-TOF 质谱仪 (Bruker Daltonic, 德国) 分析待鉴定的蛋白的 PMF 指纹。在 MALDI-TOF MS 反射器模式中,由脉冲 UV (紫外光) 激光束产生的离子被加速至 23.5kV 的动能。在 MALDI-TOF-TOF MS 模式中,前体离子被加速至 8kV 并在时间-离子门 (time-ion-gate) 中进行选择。片段在 LIFT 室中被进一步加速了 19kV 并在离子反射器通过后分析它们的质量。根据来自 Bruker Daltonics(德国)的称为“AnchorChipTMTechology Revision 2.0”的手册制备基质和肽样品。简而言之,将 1  $\mu$ l 基质溶液-在乙腈中饱和的氰基-4-羟基肉桂酸:0.1%TFA(1:1) 点 (spot) 在锚芯片靶板上。待基质小滴在空气中干燥后,施加相同体积的样品溶液,并让其再次变干。使用 1  $\mu$ l 的 1%TFA 将样品斑点洗涤 30 秒。使用压缩空气轻缓地吹掉小滴。使用 1  $\mu$ l 的乙醇:丙酮:0.1%TFA(6:3:1) 使所得的扩散后的样品斑点重结晶。最后,将靶板放到 Autoflex III 机中进行 PMF 分析。使用带有外部校正标准物的质量校正试剂盒 (Mass Calibration Kit) (Bruker Daltonics, 德国) 校正光谱。

#### [0073] 数据检索

[0074] 将所生成的 PMF 光谱提交至内部 NCBI 数据库 (in-house NCBI database), 然后使用 Mascot 搜索引擎针对啮齿目分类进行检索。通常将检索条件设定如下:固定脲甲基修饰 (fixed carbamidomethyl modification)、可变氧化修饰 (variable oxidation modification)、单错切限 (one mis-cleavage limitation) 和 200ppm 的分子量公差。

#### [0075] Western 印迹

[0076] 在 SDS-PAGE 分离之后,在 4°C 以 100V 将经解析的蛋白样品向 0.45  $\mu$ m 硝化纤维素 (NC) 膜 (Amersham Biosciences, US) 上转移 1 小时。随后,使用 5%(w/v, 重量体积比)

在 Tris 缓冲盐水 (TBS) 缓冲液中的脱脂奶粉在 4℃ 将经印迹的膜封闭过夜。然后使用 20mM Tris-Tween 缓冲盐水 (TBST) 以 5 分钟循环将膜洗涤 30 分钟以除去任何过量的 BSA。将在 TBS 缓冲液中的抗大鼠全血清 Ig $\gamma$  (1:10000) 加到膜上并在室温温育 1 小时。然后使用 20mM TBST 以 5 分钟循环将膜洗涤 30 分钟。此后, 使用在 TBS 缓冲液中的辣根过氧化物酶 (HRG) 偶联的兔抗 Ig $\gamma$  重链和轻链抗体的 1:10000 稀释液对膜进行探查。将膜-缓冲液装置 (setup) 在室温温育 1 小时。再使用 20mM TBST 以 5 分钟循环将膜洗涤 30 分钟。最后, 使用 SuperSignal 化学发光底物检测试剂盒 (SuperSignal chemiluminescent substrate detection kit (Pierce, USA)) 使印迹显影。

#### [0077] 维斯塔大鼠中胃癌模型的建立

[0078] 人类中的胃癌一般是在后期得到诊断, 并且在这种情况下, 难以在早期收集血清样品。另外, 如在前文部分所详细说明了, 为生物标记物探索而收集的人类组织 / 体液样品中存在大量的变数。这些变数非常难以控制和 / 或优化。而且, 基因组研究的结果只是告诉具有致癌基因的那些人发展癌症的机会, 但是没有指示发生的时间。来自良性肿瘤和恶性肿瘤的基因表达中的很多变化是因为后翻译修饰的缘故, 这无法通过 DNA 或 RNA 分析来检测。因此, 使用大鼠模型进行的蛋白质组研究提供了有前景的替代方案。已经证明, 通过施用 MNNG 在维斯塔大鼠中诱导的胃癌是人类差异化型胃癌的一种良好模型。这是因为大鼠胃癌具有与人类癌症非常相似的组织学特征。另外, 在使用各种肿瘤促进剂和预防剂进行处理时, 具有 MNNG 诱导癌症的大鼠显示出与人类癌症非常类似的反应 (Manikandan 等, 2008)。根据寡聚核苷酸微阵列分析, 在大鼠胃癌中, 参与胃部的差异化表型的基因下调而参与胞外基质重塑和免疫反应的那些基因上调。这些表达型式类似于人类胃癌的表达型式 (Abe 等, 2003)。因此, 使用 MNNG 中毒维斯塔大鼠来建立胃癌模型以探索血清中的有关生物标记物。所有有关的程序已经在上文中说明。

#### [0079] 体重的变化

[0080] 每 2 周记录实验大鼠和对照的体重并且所有体重都显示体重的净增加。然而, 在检测到发育异常之前, 在实验组大鼠中观察到体重的明显损失。这种体重增加模式与以前的研究是吻合的 (Nagai 等, 1984; Schwab 等, 1997)。

#### [0081] 组织学研究

[0082] 还利用胃部的组织切片在微观上研究发育异常的存在。发育异常的主要的组织学和细胞学特征包括细胞异型性 (核多形性、着色过度、核分层、核质比增加、胞质嗜碱性增加以及核极性损失); 差异化异常 (在化生性肠上皮细胞中的杯状细胞和潘氏细胞数目缺少 / 减少和胃上皮细胞的分泌产物的消失 / 减少) 和解体的黏膜结构系统 (隐窝结构不规则、背靠背腺体形成 (back-to-back gland formation), 隐窝的出芽和分支以及管腔内和表面乳头状生长)。

[0083] 从大鼠获得胃部之后, 根据上文所述对它们进行处理。在固定和各种染色程序之后, 进行组织学研究并且确定癌发生的时期。

[0084] 现在参考图 4。胃部 A 显示正常的组织。对于胃部 B, 腺体差异化失去。小窝腺体显示增加的核尺寸、泡状核和增加的有丝分裂像。出现发育异常。在胃部 C 中出现严重的发育异常, 早期的腺癌显示浸润固有层和肌层的发育异常腺体。在胃部 D 中, 存在由与充分差异化的腺癌保持一致的严重发育异常的粘蛋白分泌腺体组成的肿瘤块。

[0085] 根据胃部癌症的一般分类(日本胃癌(Japanese Gastric Cancer),1998),可以将实验组大鼠的健康状态分成四期。第一期是大鼠保持正常。在第二期,发育异常,小窝腺体具有增加的核尺寸、泡状核、增加的有丝分裂速度,并且失去腺体差异化。在第三期,除了出现严重的发育异常之外,早期腺癌还显示出浸润到固有层和肌层的发育异常腺体。在第四期,存在肿瘤块。该肿瘤块由与充分差异化的腺癌保持一致的严重发育异常的粘蛋白分泌腺体组成。

[0086] 从大鼠中获得的组织学结果还发现,发育异常和腺癌主要出现在胃部的胃窦(antrum)/幽门,并且有时也发生在胃部的主体。在人类中,发育异常经常见于胃窦/幽门,并且在一定水平上也见于胃底。但是在大鼠中,发育异常限于胃窦/幽门,在胃底中没有见到(Matsukura 等,1978)。

#### [0087] 利用 MNNG 诱导胃癌后大鼠的健康状态

[0088] 将实验组的两只大鼠从研究中排除,因为它们在胃癌诱导后很快就死于麻醉并发症。在整个实验中,在对照大鼠中都没有观察到发育异常和腺癌。对于实验组,在饮用水中喂饲 0.01%MNNG 之后,19 只维斯塔大鼠的健康状态根据它们切下的胃部的组织学的结果被分为 4 种状态:7 只大鼠保持正常;8 只大鼠具有发育异常;3 只大鼠具有发育异常+早期腺癌;1 只大鼠具有腺癌。

[0089] 从摄入 MNNG 后第 17 周开始,19 只大鼠中的 12 只大鼠(63%)经组织学确认在胃部中具有发展的发育异常,其中,它们中的 3 只大鼠还发展到早期腺癌时期,并且 1 只大鼠具有带有肿瘤的腺癌;同时 6 只其他大鼠保持正常。当与文章所述的情况相比,本发明的结果与利用 MNNG 诱导维斯塔大鼠胃癌的发病率(55%-73%)(Bralow 等,1973;Martin 等,1974)和诱导癌症所需的时间相似。一些不同可能是由于使用高度近交系大鼠的缘故(Kobori 等,1976)。

[0090] 由于本发明人的设计的目的是发现早期胃癌的候选生物标记物,因此来自 D&A 组的血清样品被用于后一部分的研究。

[0091] 从结果可以看出,伴有或者不伴有腺癌的胃部发育异常得以在 12 只大鼠中成功建立。然后可以使用来自这些大鼠的血清样品进行蛋白质组学研究,以发现候选生物标记物。

#### [0092] 从血清样品中的高丰度蛋白(HAP)的去除

[0093] 血清中存在大量的蛋白使得其成为用于揭示疾病生物标记物的理想材料。但是,这也是一种巨大的分析挑战,因为血清蛋白质组含有大量的浓度动态范围广的蛋白。由于大多数先进的分析技术受到样品量的限制,一些丰度非常低的蛋白的存在使得难以检测到低丰度蛋白。因此,在生物标记物探索中除去高丰度蛋白(HAP)是必要的。

[0094] 在若干种常用技术中,使用抗体来除去白蛋白、免疫球蛋白和其他高丰度蛋白似乎是最有效果并且最具有特异性的方法。但是,由于常用哺乳动物(例如大鼠、兔和狗)来产生抗体,大量交叉反应引起干扰的发生。幸运的是,目前可以使用由鸟类多克隆 IgY 抗体组成的市售免疫耗竭柱。鸟类多克隆抗体迅速地受到欢迎是因为所生成的抗体数量比哺乳动物的高很多倍。这是因为抗体生成动物中的免疫反应往往随着与用作抗原来源的动物的系统差异的增加而增加。另外,小鸡抗体与相应的兔抗体相比识别哺乳动物蛋白上的更多表位(Schade 等,1996)。这使得在小鸡中生成抗高度保守的哺乳动物蛋白的抗体比在其

他动物中更加成功 (Tini 等, 2002)。另外, 在卵黄中获得高的且持续时间长的 IgY 滴度所需的抗原数量比较而言要比在兔子中所需的数量低得多 (Song 等, 1985; Hatta 等, 1993)。除了在鸟类血清中所见到的之外, 鸟类抗体在蛋黄中的丰度高。因此, 通过收集鸟蛋可以容易地收集鸟类抗体 (Fischer 等, 1996)。如此可以使得不用对宿主进行抽血。使用完全弗氏佐剂对小鸡进行免疫是完全可以接受的并且不引起局部炎性反应 (Ruan 等, 2005)。IgY 生成和纯化简单而有效。有各种方法和技术可以用来满足不同的要求和需要, 例如纯度、收率、活性和时间节省。而且, 卵黄抗体在冷、热以及酸条件下是长期稳定的 (Camenisch 等, 1999)。

#### [0095] IgY 生成

[0096] 在 100 多年以前, Klemperer 就证明了抗体物质可以从经免疫的母鸡转移至其鸡蛋中 (Klemperer, 1893)。鸡蛋蛋黄在多克隆抗体生成中的应用得到充分的认识并且卵黄中的 IgY 浓度高于母鸡血清中的浓度 (Rose 等, 1974; Larsson 等, 1993; Woolley 和 Landon, 1995)。

[0097] 在 5 只经免疫的母鸡中, 在使用免疫原 (大鼠血清) 进行第一次免疫后在第 10 周左右有两只母鸡没有下蛋。因此, 这些母鸡没有在实验中使用。其他 3 只母鸡保留 39 周并且收集到总共 308 个免疫鸡蛋。

#### [0098] IgY 纯化

[0099] 有若干种用于 IgY 纯化的常用程序。为了选出最适合用于纯化 IgY 的方法, 将 3 个蛋黄混合, 分成 3 个相同的组, 并且使用三种最常用的方法进行纯化。对三种方法的评价如下: 直接硫酸铵沉淀、直接硫酸钠沉淀和可市售获得的称为 EGGstract 试剂盒的方法。在进行所推荐的程序之后, 使用非还原性 SDS-PAGE 来评价这三种不同方法的效率。使用非还原性凝胶是因为 IgY 纯化的主要污染物约为 70kDa 和 30kDa, 这与 IgY 的重链和轻链 (分别为 67kDa 和 23kDa) 非常接近。通过银染使受解析的蛋白可视化。

[0100] 如图 5 所示, 在泳道 2 中的蛋白是污染少得多的蛋白, 特别是在 30-50kDa 范围内。使用抗 IgY 抗体证实约 180kDa 的蛋白条带是 IgY。因此, 使用 EGGstract 试剂盒的纯化效率似乎比其他两种方法优越得多。

#### [0101] 所收集的 IgY 的特异性

[0102] 利用针对大鼠血清的 Western 印迹来研究使用大鼠血清 (作为抗原) 注射产生的 IgY。为了比较, 也探查了来自未进行抗原注射的母鸡的用作对照的正常 IgY。

[0103] 参考图 6, 该图显示使用大鼠血清作为样品的 10%SDS-PAGE 和 Western 印迹。泳道 1 是分子量标记物。泳道 2 是使用考马斯亮蓝染色的 5  $\mu$ g 的大鼠血清。泳道 3 是使用收集于对照鸡蛋的 IgY 进行探查的相应 Western 印迹。泳道 4 是使用经免疫的母鸡中产生的 IgY 进行探查的相应 Western 印迹, 并且稀释比为 1 : 10000。

[0104] 从 Western 印迹 (图 6) 可以看出, 泳道 3 (使用对照 IgY 进行探查) 没有条带, 而泳道 4 (使用从经免疫的鸡蛋分离得到的 IgY 进行探查) 具有很多指示为阳性的条带。这些结果表明在经免疫的母鸡中产生的 IgY 对大鼠血清具有特异性。另外, 在使用考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 中见到的一些丰富的蛋白也以高丰度存在于 Western 印迹中。这些结果说明通过 IgY 检测到的蛋白是在正常大鼠血清中的高丰度蛋白。

#### [0105] 柱子的耗竭效率

[0106] 将该免疫耗竭柱设计为除去血清中的大多数高丰度蛋白。可以通过耗竭步骤后留下的蛋白总量来容易地评价该柱子的耗竭效率。使粗制血清过柱一次（单耗竭）或两次（双耗竭，让来自第一轮的流通物再过柱一次）。测量单耗竭和双耗竭后的蛋白总量。

[0107] 结果显示，柱子在双耗竭后的耗竭效率高达（初始蛋白浓度的）99%，但是对于单耗竭而言，耗竭效率为约 90%。在所有的高丰度蛋白中，白蛋白是最为丰富的。因此，还研究了白蛋白的除去以提供对 HAP 除去步骤的评估。

#### [0108] 免疫耗竭之前和之后大鼠血清的蛋白质组图

[0109] 根据上述利用以 18cm, pH 4-7 胶条进行的被动再水化的程序进行免疫耗竭之前和之后的大鼠血清蛋白质组的比较。

[0110] 如图 7 所示，双耗竭之前和之后血清样品的蛋白质组有很大的不同，说明已经除去了在 2DE 凝胶中遮掩低丰度蛋白的大多数高丰度蛋白。在粗制大鼠血清和双耗竭大鼠血清的凝胶中分别检测到约 700 个斑点和 1000 个斑点。这使得在比较基因组学研究过程中“容易”检测到低丰度候选癌症生物标记物蛋白。

#### [0111] 生物标记物候选物的鉴定

[0112] 除了使用以不同类型的染料（包括银和荧光染料）2D-DE 的检测限和动态范围问题的挑战之外，在生物标记物探索步骤中，耗竭步骤后样品的归一化一直有争论。通常，研究人员在样品被耗竭后一直要标记蛋白。然而，存在与相同和 / 或不同样品的不同耗竭循环之间的变化有关的问题。因此，对由银染和 Cydye 荧光标签可视化并在耗竭之前和之后进行样品归因化的 2-DE 色谱图进行比较。结果在下文提供。还将对在“最佳”样品准备步骤中的代表胃部发育异常的可能的生物标记物候选物的差异化表达蛋白进行鉴定。结果也将在下文提供。

[0113] 2-DE 凝胶的优化：为了进行比较蛋白组学，需要对血清蛋白组中的蛋白进行充分的解析。在最初的实验中，首先在 pH 3-10 的 8cm IPG 胶条中解析血清蛋白组中的蛋白（如图 8 所示）。发现大多数蛋白集中在酸性区域。因此，使用 pH 4-7 的 8cm IPG 胶条再次进行 2-DE。结果如图 9 所示。凝胶上的蛋白显示已经被充分解析并得到适当聚焦。因此，18cm 且 pH 4-7 的 IPG 胶条适用于随后的所有实验。

[0114] 采用银染的 2-DE：在 2-DE 中常用检测限为 1-10ng 左右的银染可视化方法。在本设计中，在第一维度，对血清样品进行双耗竭并将 40mg 蛋白在线性 pH 4-7 IPG 胶条（18cm）上进行解析，然后以 10%SDS-PAGE 作为第二维度。使用银染方法，通过 Melanie 软件检测到约 100 个斑点。

[0115] 在对正常对照和患有腺癌的发育异常（D&A）的血清蛋白组所进行的比较中，所有实验按 6 次重复进行。银染后，标注通过 Melanie 软件检测到的差异化表达（具有超过 3 倍差异）的蛋白斑点并计数。发现总共有 15 个斑点的表达差异化至少 3 倍。参考图 12，在所述 15 个斑点中，11 个斑点得到顺利鉴定，并且它们属于 6 种蛋白物种。4 种蛋白的身份还未知道。记录蛋白斑点的数目并显示在图 10 中。在图 11 中显示的是 2-DE 的放大区，其中显示 15 种一致地差异化表达超过 3 倍的蛋白。

[0116] 2D-DIGE：银染的一种主要不利之处是差异化表达水平的定量分析的不准确性，这是由于其线性动态范围窄的缘故。在 2001 年发现了为动态检测范围提供新东西（breath）的荧光染料并且上市销售。使用荧光染料的最常用的方法是 DIGE 标记（Tonge 等，2001）。

而且,利用 DIGE 的样品标记的优点,可以在标记之前和之后对通过柱耗竭产生的差异化蛋白进行比较。另外,进行正反标记实验以解释通过 CyDye 进行的任何偏好蛋白标记,从而进一步验证 DIGE 技术对样品的应用

[0117] 免疫耗竭后的样品归一化 (DIGE 标记):在免疫耗竭之后,使用 Cy3 标记 50mg 的 D&A 样品,使用 Cy5 标记 50mg 的正常样品,并使用 Cy2 标记正常样品和 D&A 样品的等量蛋白混合物作为内部对照。结果,每块凝胶由两个实验样品 + 它们作为内部标准物的混合物组成。在常规 2-DE 程序之后,使用相互排阻激发和发射波长单独对 Cy2、Cy3 和 Cy5 通道进行成像。使用 DeCyder 软件的差异化胶内分析 (DIA) 模块分析图像,可以针对集中的内部标准物计算每种蛋白斑点的表达比。

[0118] 图 13 是免疫耗竭后标记的总共 150  $\mu$ g 血清样品的代表性 2D-DIGE 凝胶 (pH 4-7)。(A) Cy 3 (D&A 的血清样品) 和 Cy 5 (对照血清) 的重叠图像。(B) 分开的 CyDye 图像: Cy 2 (内部标准物)、Cy 3 和 Cy5。对于为比较而在 DIGE 标记之前分别耗竭的正常和 D&A,由软件检测到 1597 个斑点。发现有 35 个斑点有至少 3 倍的差异化表达,其中,23 个斑点是上调的,而 12 个斑点是下调的。成功得到鉴定的 11 种蛋白的由 DeCyder 软件分析的强度以 3D 图像显示在图 14 中。图 15 显示了在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的差异化蛋白的身份。

[0119] 免疫耗竭前的样品归因化 (DIGE 标记):为了使通过“差异相同”的免疫耗竭柱的任何样品组的偏差机会最小化,在装载柱子之前进行样品的 DIGE 标记。这使得可以让正常和 D&A 样品以相同的初始量装载并通过免疫耗竭柱一起除去,使用 Cy3 和 Cy5 标记每个样品中的 1mg 蛋白,使用 Cy2 标记正常和 D&A 的混合物。将总共 3mg 蛋白装载到柱子中并一起进行免疫耗竭。在利用预先制作的 Ig  $\gamma$  亲和柱对样品进行免疫耗竭之后,通过 DeCyder 分析凝胶。结果显示有 60 个斑点差异化表达 (至少 3 倍),其中 40 个斑点上调,20 个斑点是下调。成功鉴定的 11 种蛋白通过 DeCyder 软件分析的强度以 3D 图像显示。图 16 显示了在胃癌的大鼠 D&A 血清样品中发现的相应差异化蛋白的身份。

[0120] 下表显示在两种 2D-DIGE 方法中的不同程序的比较:

	使用银染可视化的 2-DE	免疫耗竭后的样品归一化 (DIGE 标记)	免疫耗竭前的样品归一化 (DIGE 标记)
[0121] 斑点总数	1002	1597	1632
上调斑点总数	9	23	40
下调斑点总数	6	12	20

[0122] 免疫耗竭前的 DIGE 标记获得了数量较多的差异化表达蛋白。比较通过三种不同样品制备方法发现差异化表达的蛋白列表是值得的。一些蛋白显示出在三种方法中的所有方法 / 一些方法共同被检测到,而其他蛋白只有采用最灵敏的方法才会被检测到。为了比较通过这三种方法发现的差异化表达蛋白的一致性,建构文氏图并显示在图 17 中。应当留意的是,只有身份已知的差异化蛋白才被用来建构这种文氏图。

[0123] 通过这三种不同方法鉴定了总共 12 种差异化表达的蛋白。其中在通过利用银染

进行的 2-DE 所检测到的 6 种蛋白中,其中 5 种蛋白也见于其他两种 2-DE 方法;并且免疫耗竭方法之前和之后进行样品归因化的两种 2D-DIGE 都鉴定到 6 种另外的蛋白。2D-DIGE 方法可以检测到更多的差异化蛋白,这是不奇怪的,因为这种方法与采用银染的 2-DE 相比具有更高的灵敏度和更广的动态范围。然而,由 DIGE 查到的一些蛋白斑点不能通过 MALDI-TOF-TOF MS 鉴定到,这是因为可用于 MALDI-TOF-TOF MS 鉴定的蛋白数量不足的缘故。通过 DeCyder 检测到的蛋白在银染后在凝胶上没有观察到,使得鉴定对于采用标准蛋白组设置的大多数实验室是不实用的。

[0124] 通过 MALDI-TOF-TOF MS 进行的差异化表达蛋白的鉴定:对来自以上三组实验的所有差异化表达蛋白(至少 3 倍)都进行了 MALDI-TOF-TOF MS 分析。所鉴定的蛋白总结在图 18 中。

[0125] 通过建立大鼠胃癌模型,本发明为本发明人提供了非常有用的研究模型和用于鉴定胃癌生物标记物的方法及其早期诊断和治疗的方法,其中一个大优点的是其使用了更加方便并且介入更少的系列血样样品。评价受试对象具有胃癌的可能性的方法包括如下步骤:(a) 从个体抽取血液样品;(b) 检测选自由白蛋白、T- 激肽原 I、 $\alpha$ -2-HS 糖蛋白、 $\alpha$ -1- 抗胰蛋白酶、阿法敏和  $\gamma$ - 肌动蛋白组成的组中的一种或更多种蛋白生物标志物在来自所述受试对象的检测样品中的任意过表达,和 (c) 检测选自由应激 70 蛋白、载脂蛋白 AI、载脂蛋白 AIV、转甲状腺素蛋白和鼠球蛋白组成的组中的一种或更多种生物标志物在所述检测样品中的任意低表达。该步骤使用已知的不是本发明部分的常规方法进行。

[0126] 尽管在应用于本发明的优选实施方式时已经说明并指出本发明的新的基本特征,但是应当理解的是,本领域的技术人员在未偏离本发明的实质的情况下可以对所述实施方式的形式和细节进行各种省略、替代和改变。本发明不限于上述实施方式,这些实施方式仅作为例子提供,它们可以在所附专利权利要求所限定的保护范围内以各种方式进行改变。

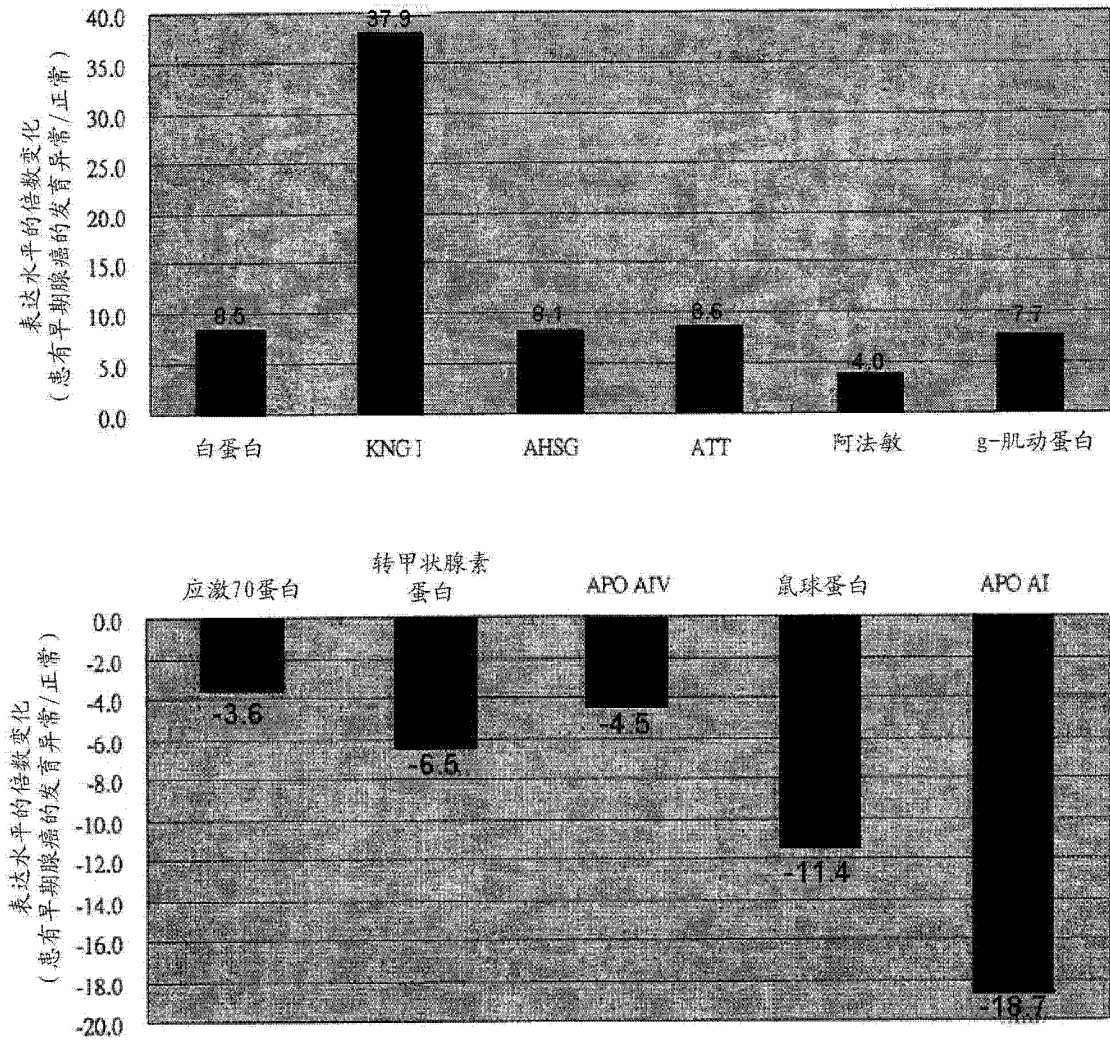


图 1

蛋白身份	功能	表达
白蛋白	急性期反应, 转运	↑
T-激肽原 I	急性期反应	↑
α-2-HS 糖蛋白	急性期反应	↑
α-1-抗胰蛋白酶	急性期反应	↑
阿法敏	转运	↑
γ-肌动蛋白	细胞运动性	↑
应激 70 蛋白	蛋白折叠	↓
载脂蛋白 A-I	转运	↓
载脂蛋白 A-IV	转运	↓
转甲状腺素蛋白	转运	↓
鼠球蛋白	急性期反应	↓

图 2



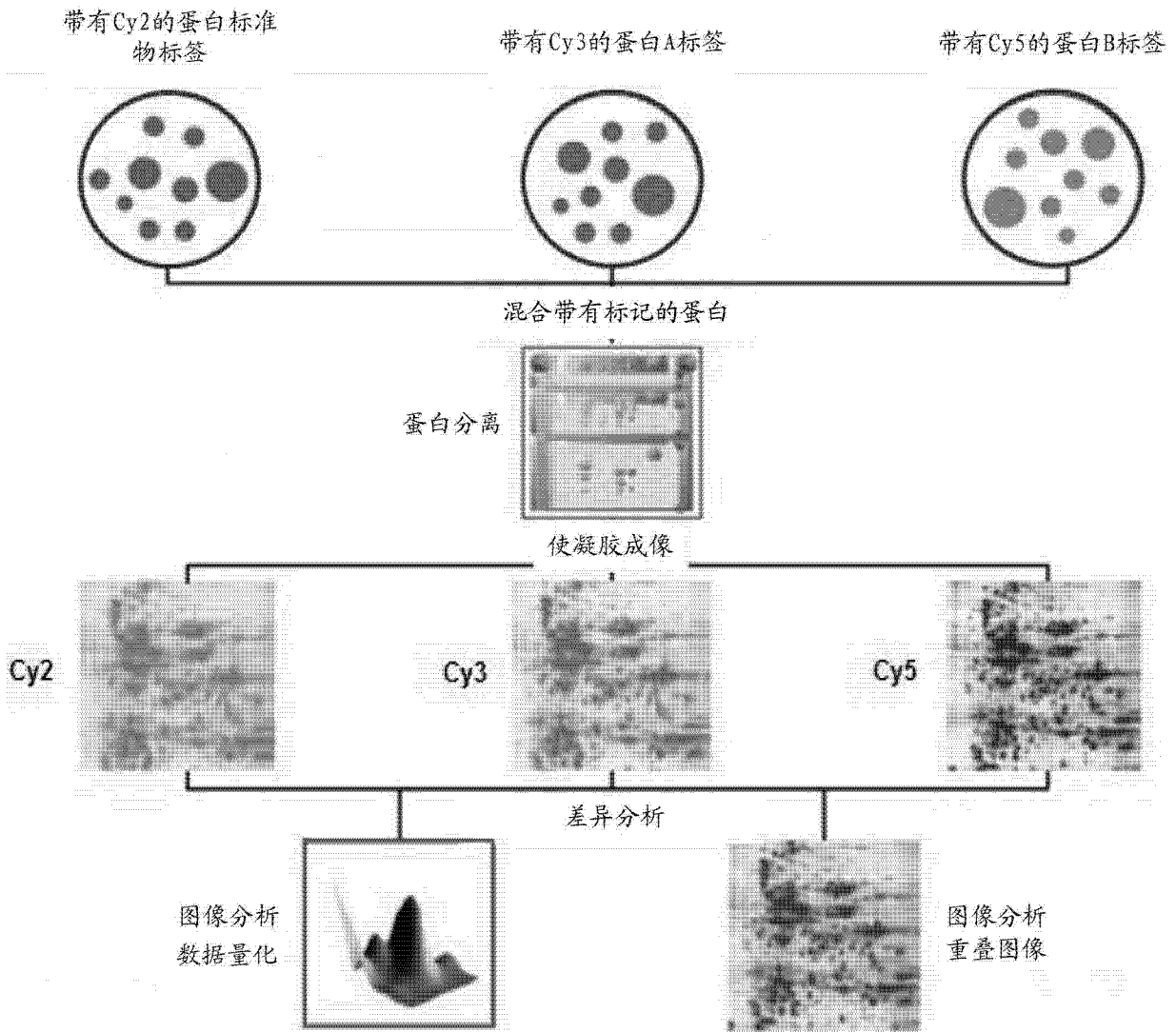


图 3

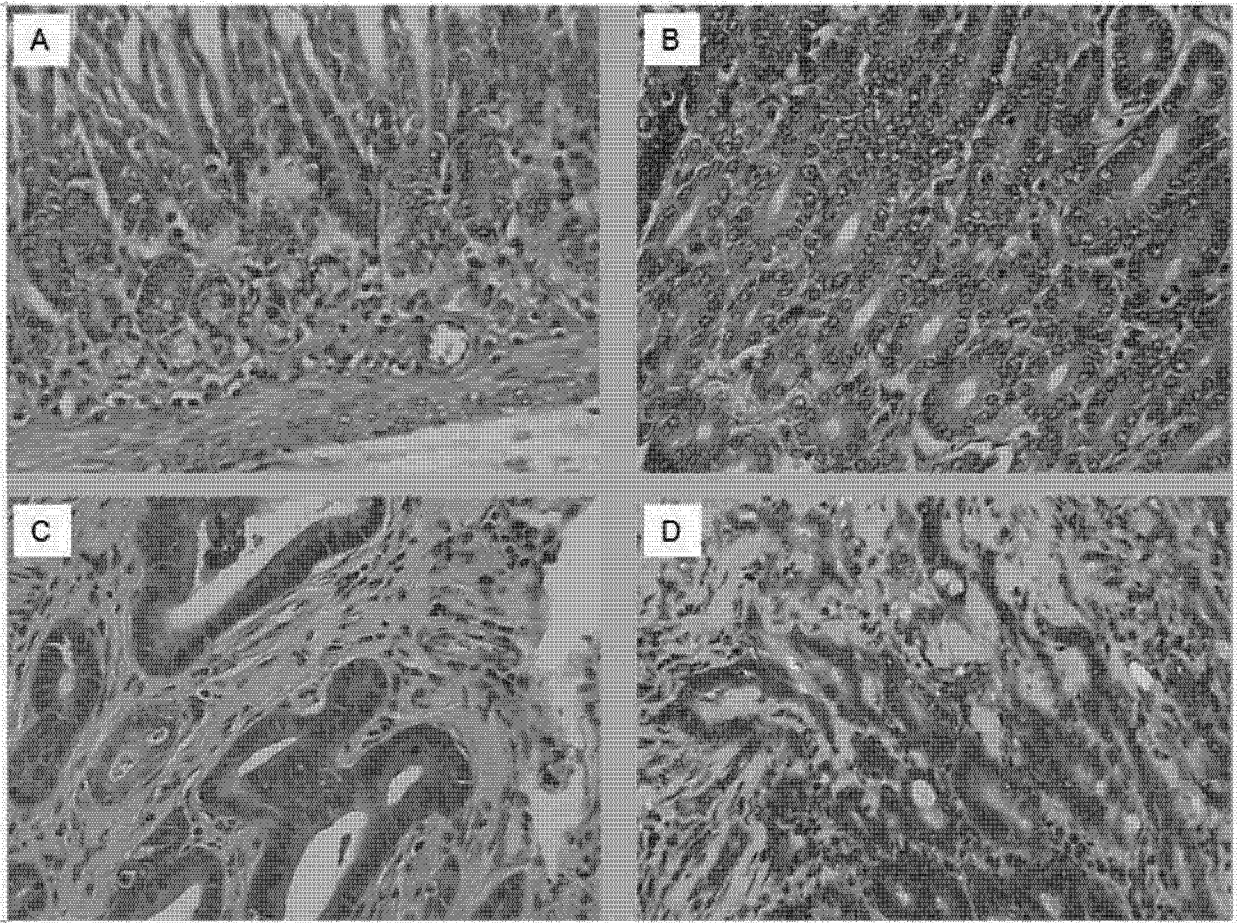


图 4

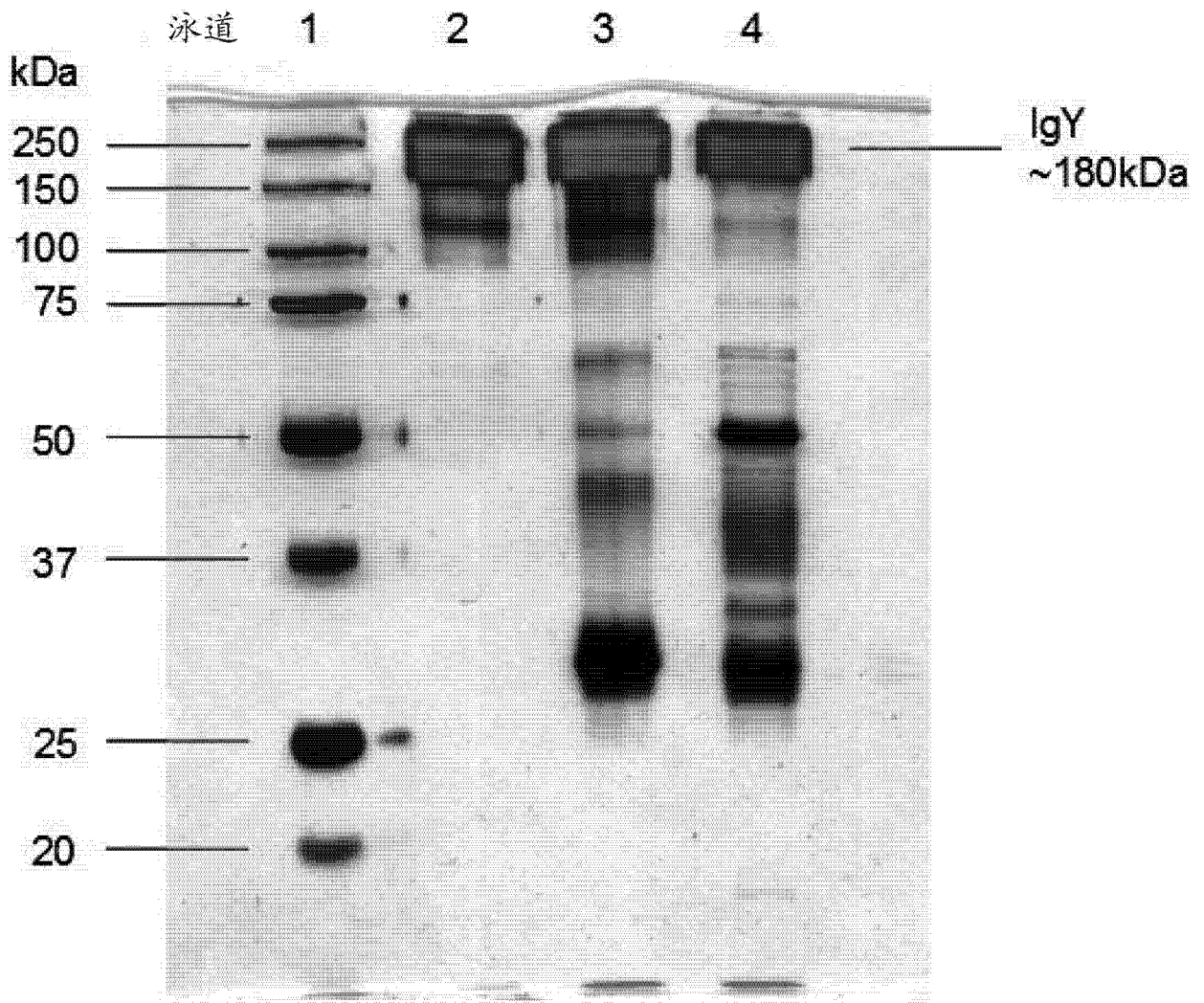


图 5

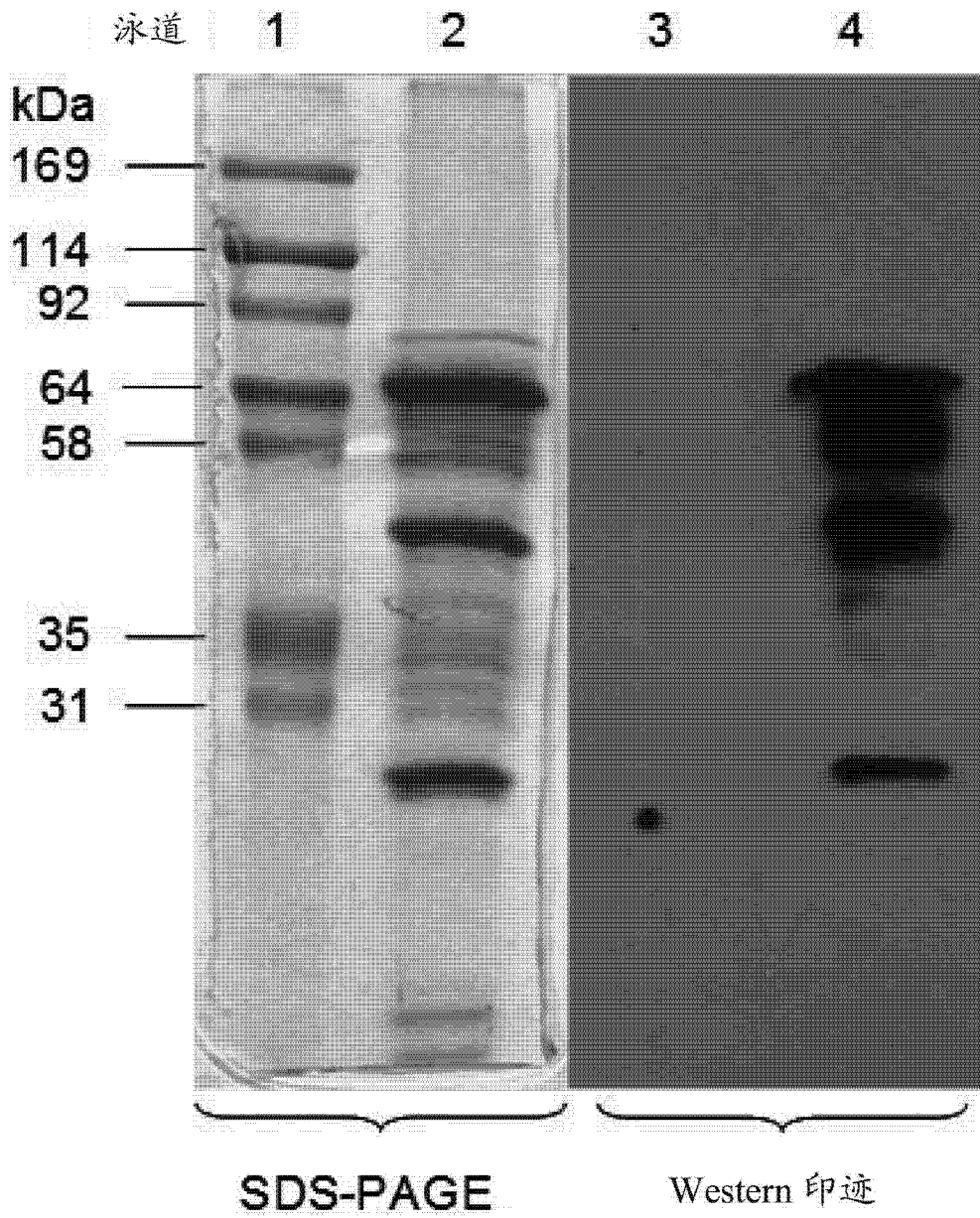


图 6

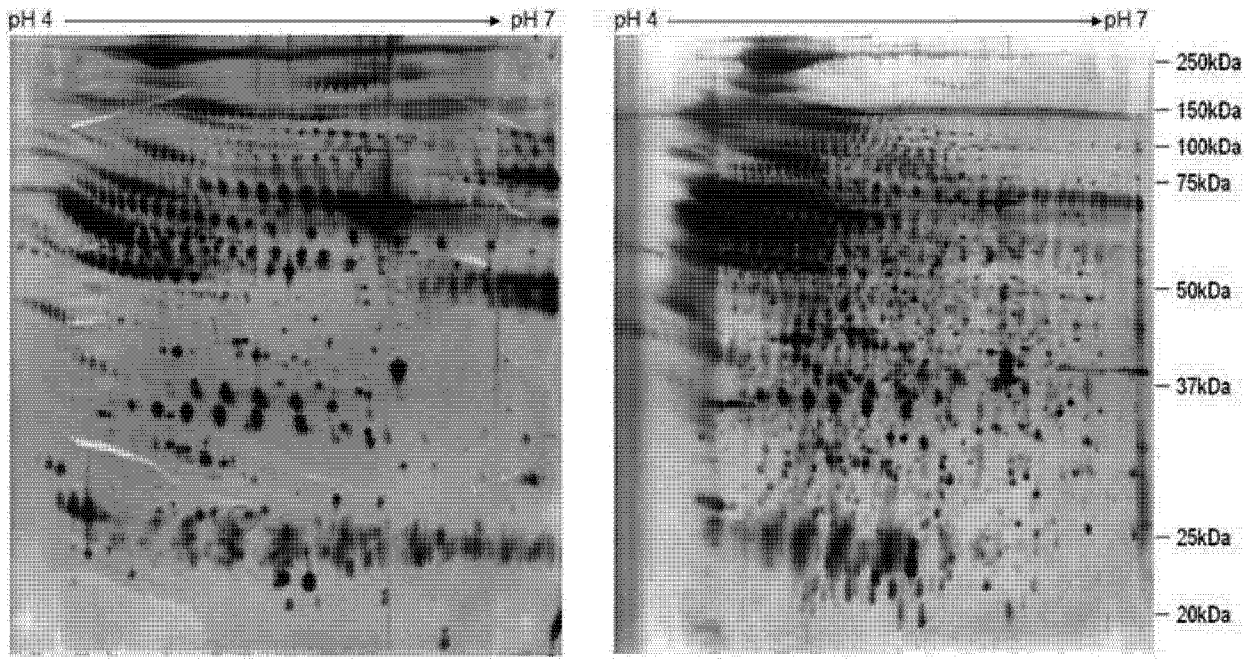


图 7

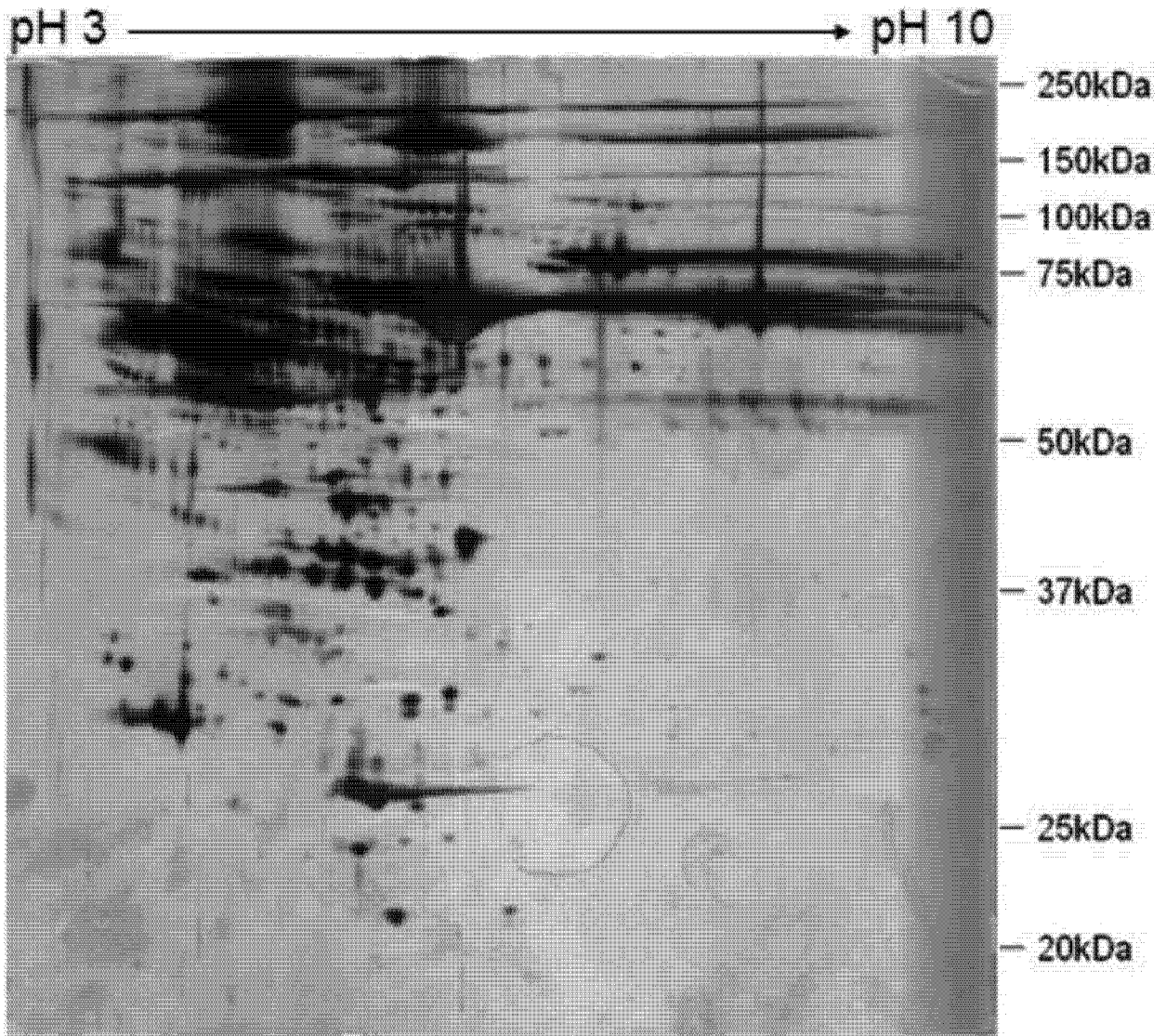


图 8



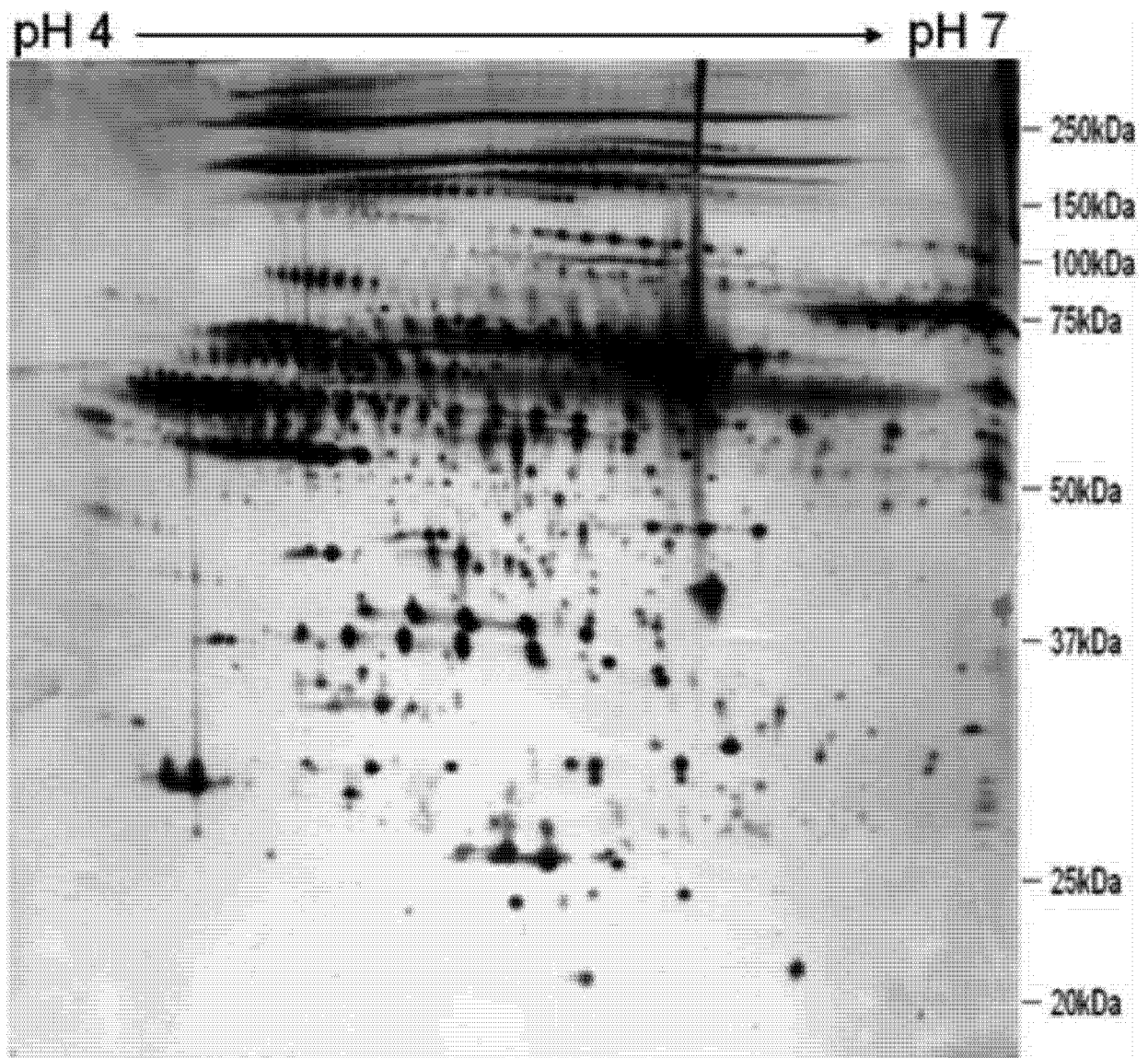


图 9

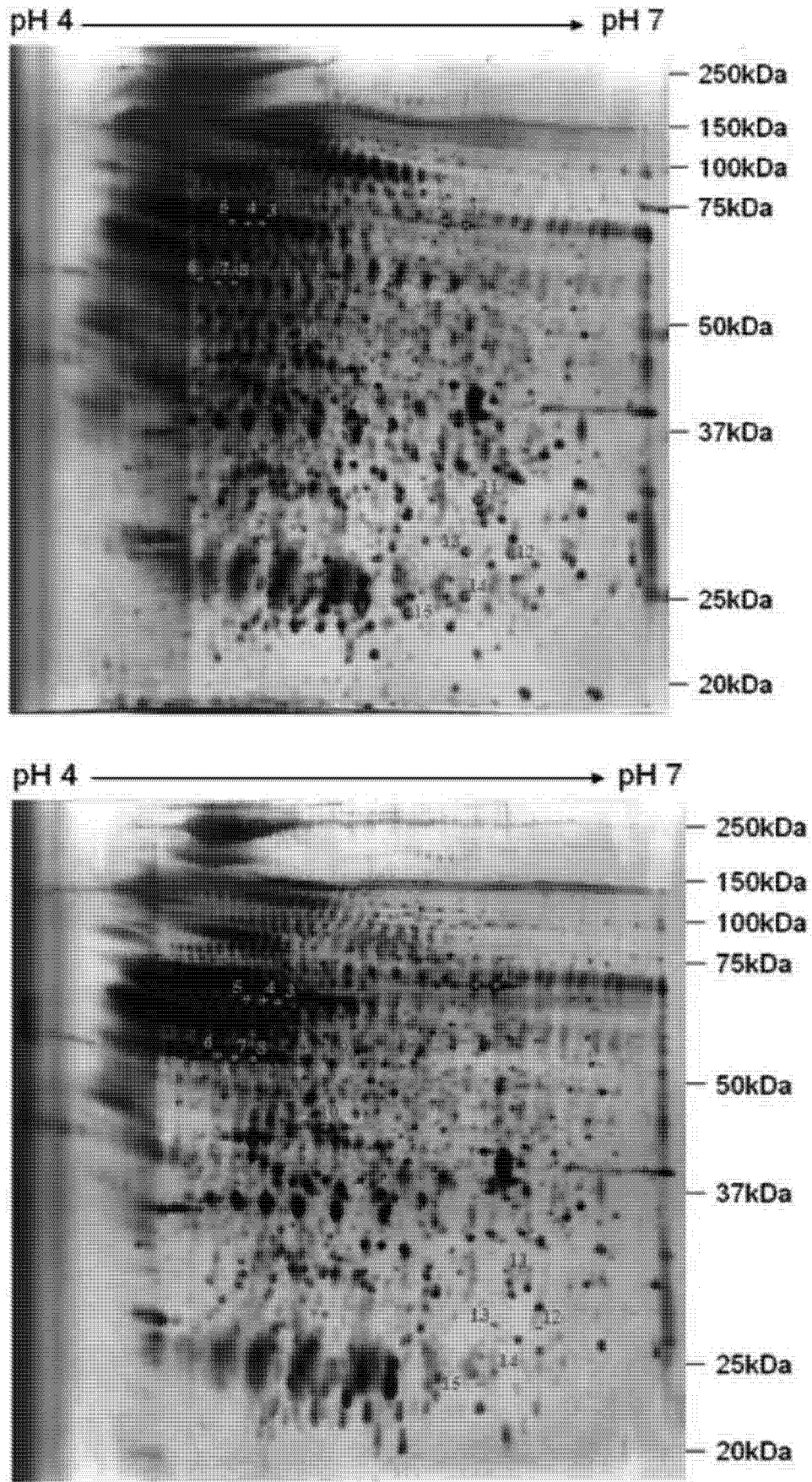


图 10



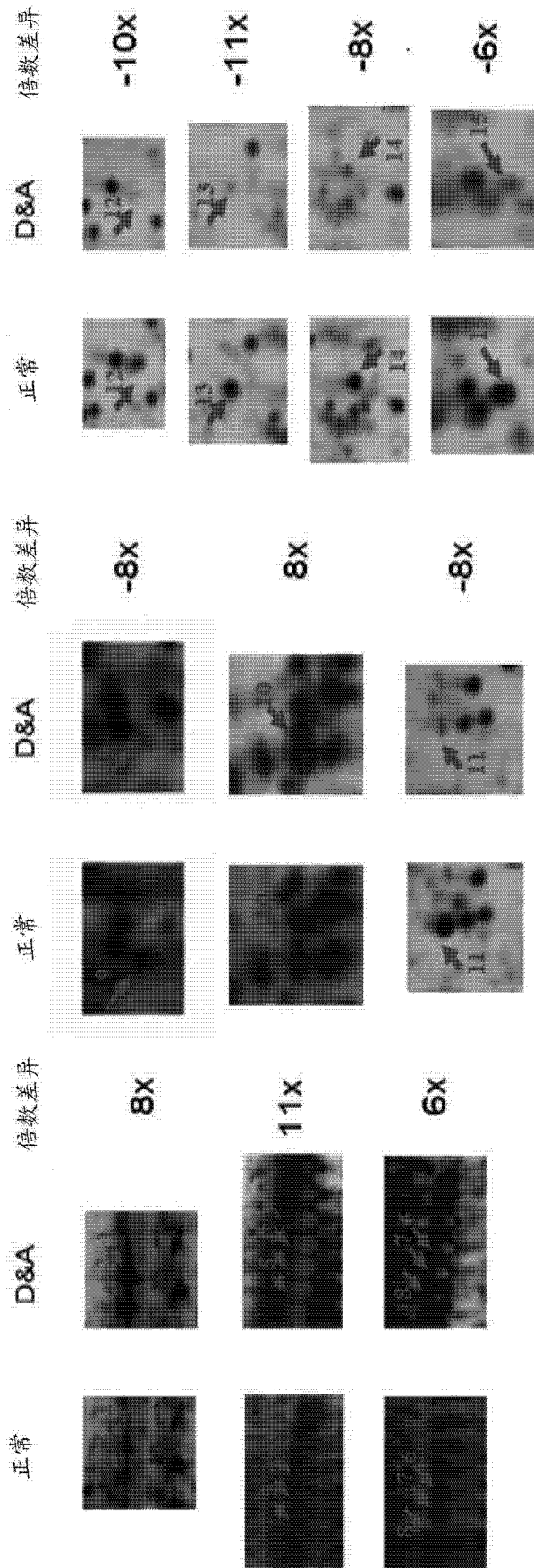


图 11

斑点编号	蛋白身份	登录号	Mr (kDa)/pI	Mascot分数*	序列覆盖率(%)*	表达
1,2	白蛋白	gi 19705431	70.67/6.09	326/94	49/2	↑
3,4,5	T-激肽原1	gi 60392582	48.828/6.08	93/94	19/3	↑
6,7,8	$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶	gi 203063	45.978/5.7	98/62	24/2	↑
9	应激70蛋白	gi 62664205	73.984/5.87	61/NA	13/NA	↓
10	$\gamma$ -肌动蛋白	gi 109507063	42.109/5.31	143/107	42/4	↑
11	间- $\alpha$ -抑制剂H4重链	gi 9506819	103.885/6.08	61/NA	5/NA	↓
12	未知	NA	NA	NA	NA	↓
13	未知	NA	NA	NA	NA	↓
14	未知	NA	NA	NA	NA	↓
15	未知	NA	NA	NA	NA	↓

图 12

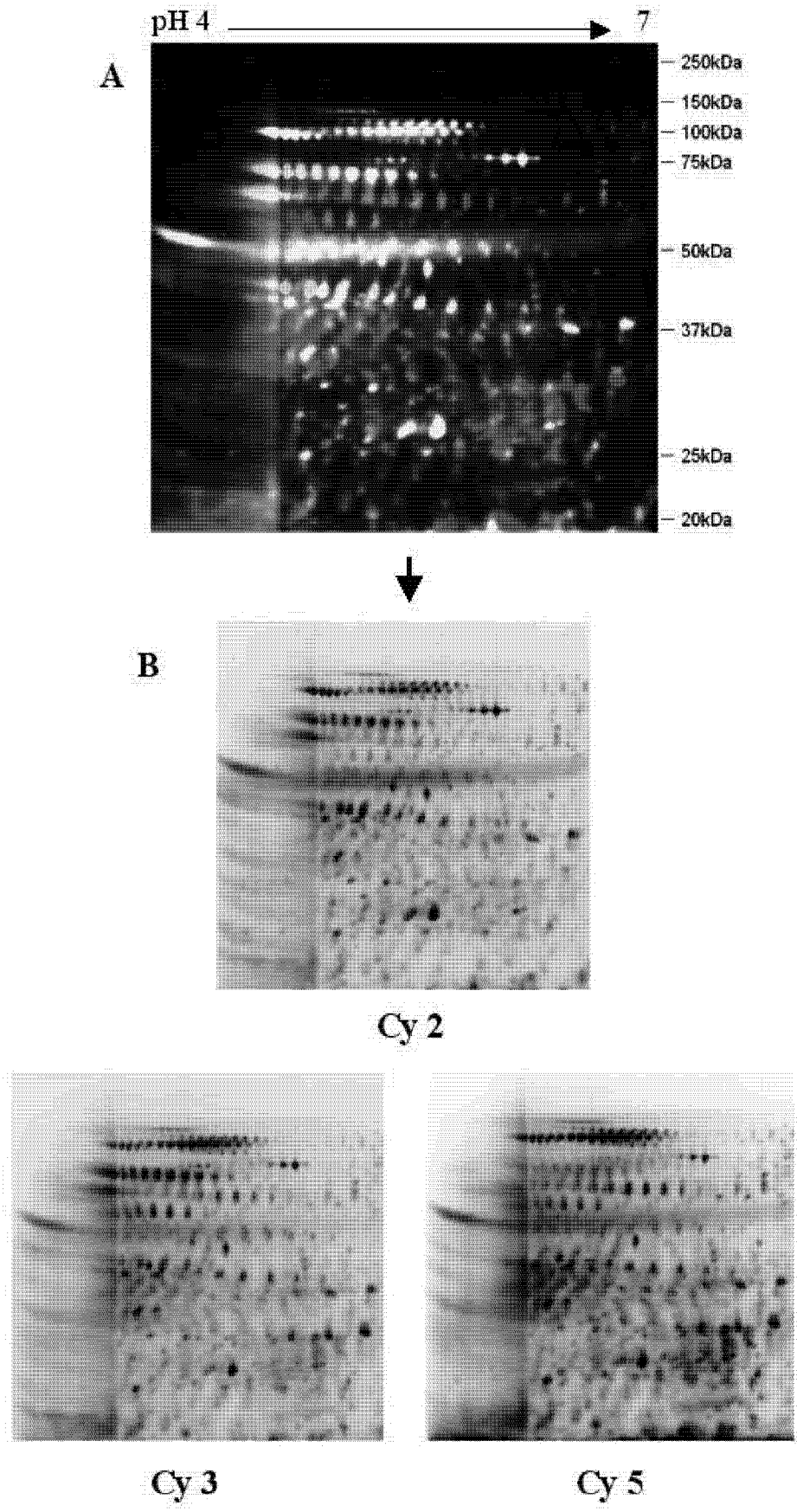
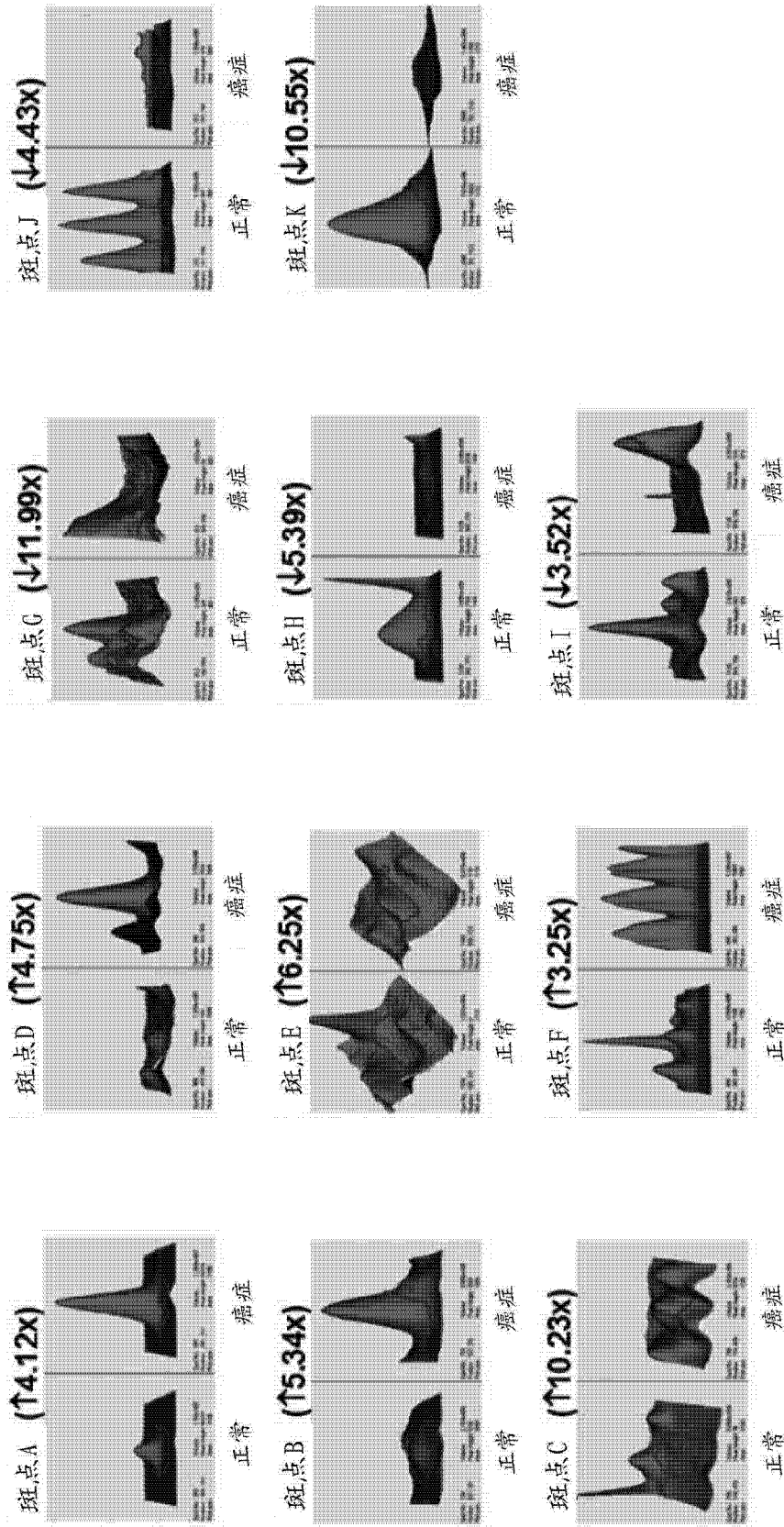


图 13



\*倍数差异显示在括号中。↑：上调，↓：下调

图 14

斑点编号	蛋白身份	登录号	Mr (kDa)/pI	Mascot分数*	序列覆盖率(%)*	表达
A	白蛋白	gi 19705431	70.67/6.09	326/94	49/2	↑
B	T-激肽原I	gi 60392582	48.828/6.08	93/94	19/3	↑
C	$\alpha$ -2-HS糖蛋白	gi 231468	38.757/6.05	73/NA	26/NA	↑
D	$\alpha$ -1-抗胰蛋白酶	gi 203063	45.978/5.7	98/62	24/2	↑
E	$\gamma$ -肌动蛋白	gi 109507063	42.109/5.31	143/107	42/4	↑
F	阿法敏	gi 27229290	71.172/5.87	213/144	30/2	↑
G	应激70蛋白	gi 62664205	73.984/5.87	61/NA	13/NA	↓
H	转甲状腺素蛋白	gi 3212532	13.122/6.04	92/37	73/19	↓
I	载脂蛋白A-IV	gi 114008	44.429/5.12	71/62	24/3	↓
J	鼠球蛋白	gi 12831225	166.590/5.68	96/NA	9/NA	↓
K	载脂蛋白A-I	gi 6978515	30.100/5.52	185/123	50/5	↓

\*第一个数表示通过MS分析的值, 后一个数代表MS/MS分析。↑: 在癌症中上调, ↓: 在癌症中下调, NA: 没有获得数据

图 15

斑点编号	蛋白身份	登录号	M <sub>r</sub> (kDa)/pI	Mascot分数*	序列覆盖率(%)*	表达
a	白蛋白	gi 19705431	70.67/6.09	326/94	49/2	↑
b	T-凝肽原I	gi 60392582	48.828/6.08	93/94	19/3	↑
c	α-2-HS糖蛋白	gi 231468	38.757/6.05	73/NA	26/NA	↑
d	α-1-抗胰蛋白酶	gi 203063	45.978/5.7	98/62	24/2	↑
e	γ-肌动蛋白	gi 109507063	42.109/5.31	143/107	42/4	↑
f	阿法敏	gi 27229290	71.172/5.87	213/144	30/2	↑
g	应激70蛋白	gi 62664205	73.984/5.87	61/NA	13/NA	↓
h	转甲状腺素蛋白	gi 3212532	13.122/6.04	92/37	73/19	↓
i	载脂蛋白A-IV	gi 114008	44.429/5.12	71/62	24/3	↓
j	鼠球蛋白	gi 12831225	166.590/5.68	96/NA	9/NA	↓
k	载脂蛋白A-I	gi 6978515	30.100/5.52	185/123	50/5	↓

\*第一个数表示通过MS分析的值，后一个数代表MS/MS分析。↑：在癌症中上调。↓：在癌症中下调。NA：没有获得数据

图 16

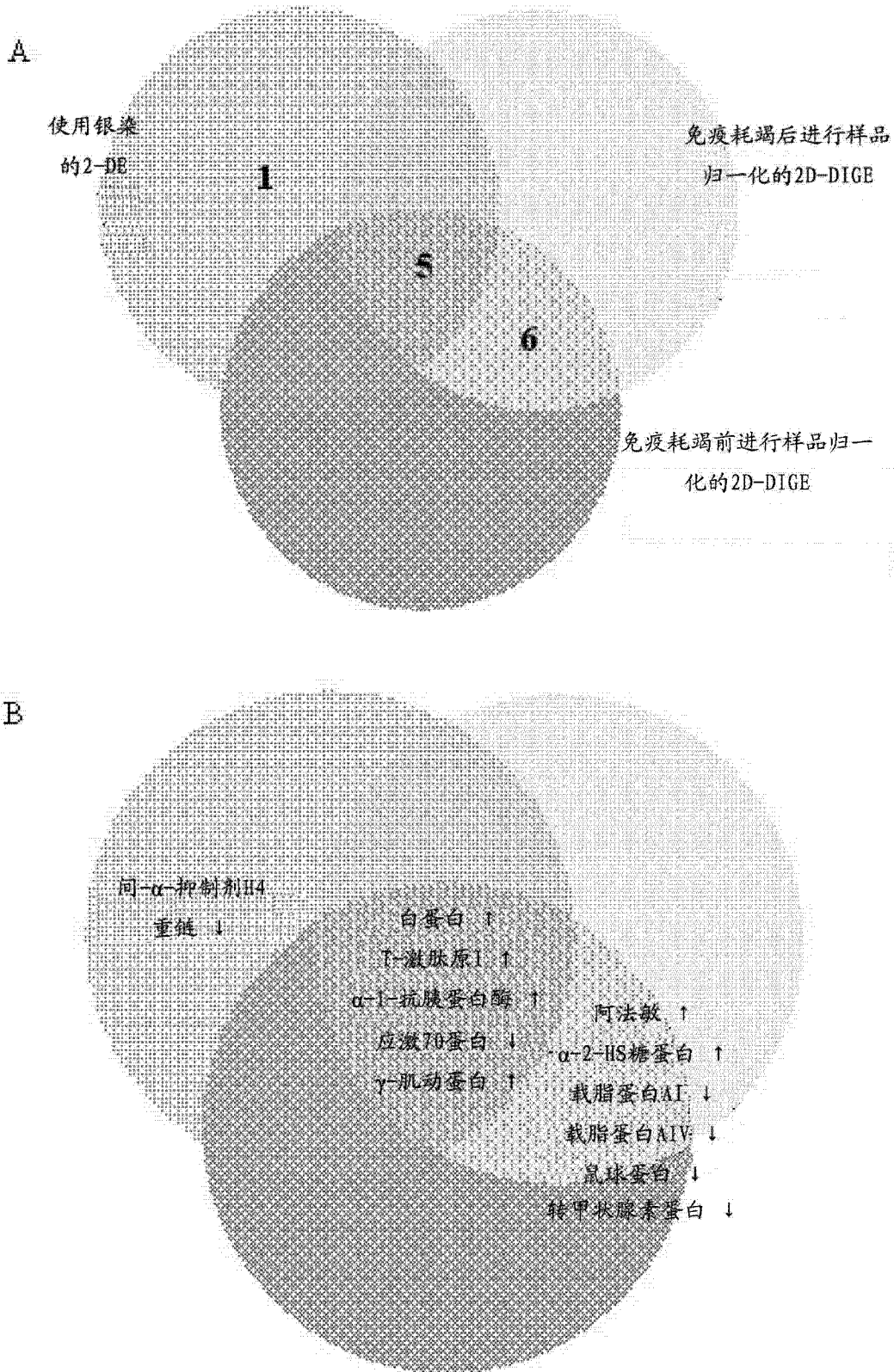


图 17

蛋白身份	登录号	Mr (kDa)/pI	功能	表达
白蛋白	gi 19705431	70.67/6.09	急性期反应, 转运	↑
T-激肽原I	gi 60392582	48.828/6.08	急性期反应	↑
α-2-HS糖蛋白	gi 231468	38.757/6.05	急性期反应	↑
α-1-抗胰蛋白酶	gi 203063	45.978/5.7	急性期反应	↑
阿法敏	gi 27229290	71.172/5.87	转运	↑
γ-肌动蛋白	gi 109507063	42.109/5.31	细胞运动性	↑
应激70蛋白	gi 62664205	73.984/5.87	蛋白折叠	→
载脂蛋白A-I	gi 6978515	30.100/5.52	转运	→
载脂蛋白A-IV	gi 114008	44.429/5.12	转运	→
转甲状腺素蛋白	gi 3212532	13.122/6.04	转运	→
鼠球蛋白	gi 12831225	166.590/5.68	急性期反应	→
间-α-抑制剂H4重链	gi 9506819	103.885/6.08	急性期反应	→

在胃癌的大鼠DRA血清样品中发现的差异化蛋白的身份 (↑ : 在癌症中上调, ↓ : 在癌症中下调)

图 18