



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113671180 B

(45) 授权公告日 2023.07.07

(21) 申请号 202111096005.5

G01N 33/574 (2006.01)

(22) 申请日 2021.09.16

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号

CN 112362871 A, 2021.02.12

申请公布号 CN 113671180 A

CN 111337678 A, 2020.06.26

(43) 申请公布日 2021.11.19

审查员 陈亚文

(73) 专利权人 郑州大学

地址 450000 河南省郑州市高新区科学大道100号

(72) 发明人 代丽萍 杨倩 李科明 仵金玉

王鹏 叶华 史健翔

(74) 专利代理机构 郑州翊博专利代理事务所

(普通合伙) 41155

专利代理师 周玉青

(51) Int. Cl.

G01N 33/564 (2006.01)

权利要求书1页 说明书7页 附图2页

(54) 发明名称

PAIP1自身抗体在食管鳞癌辅助诊断中的应用

(57) 摘要

本发明属于医药生物技术领域,具体公开了一种用于食管鳞癌辅助诊断的生物标志物及检测试剂盒。本发明提供的用于食管鳞癌辅助诊断的生物标志物为抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体,该标志物在食管鳞癌患者血清中的表达水平高于正常人,且具有显著差异。本发明还提供一种用于食管鳞癌辅助诊断的试剂盒,该试剂盒含有用于检测上述标志物的试剂,所述试剂为通过酶联免疫吸附、蛋白芯片、免疫印迹或微流控免疫检测样本中所述生物标志物的试剂。本发明通过检测人血清中抗肿瘤相关抗原PAIP1的表达水平,可以有效区分食管鳞癌患者和正常人,可用于食管鳞癌的辅助诊断。

1. 用于检测生物标志物的试剂在制备用于食管鳞癌辅助诊断的产品中的应用,所述生物标志物为抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体,所述抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体为受试者血清中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体。

2. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述试剂为通过酶联免疫吸附、蛋白芯片、免疫印迹或微流控免疫检测样本中所述生物标志物的试剂。

3. 根据权利要求2所述的应用,其特征在于,所述试剂为检测所述生物标志物的抗原。

4. 根据权利要求1所述的应用,其特征在于,所述产品为蛋白芯片、试剂盒或制剂。

5. 根据权利要求4所述的应用,其特征在于,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒,所述ELISA检测试剂盒包括固相载体和包被在固相载体上的PAIP1蛋白。

PAIP1自身抗体在食管鳞癌辅助诊断中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于医药生物技术领域,具体公开了PAIP1自身抗体在食管鳞癌辅助诊断中的应用。

背景技术

[0002] 食管癌(esophageal cancer,EC)是常见消化道癌症之一,严重威胁着全世界人类健康。全球癌症流行病学统计数据显示,2020年全球食管癌的发病率和死亡率分别居恶性肿瘤的第8位和第6位。尤其是中国,是全球食管癌发病率高的国家,食管癌发病率和死亡率居中国恶性肿瘤第6位和第4位。而食管鳞癌在中国占有所有食管癌的90%以上,中国最常见的食管癌。

[0003] 食管鳞癌发病隐匿,预后差。早期多无症状或症状不典型而易被忽视,大多数患者在出现典型症状就医时已到癌症中晚期,导致食管鳞癌患者预后差,5年生存率仅为19.9%。研究证实,食管鳞癌患者如能早期诊断、早期根治性治疗,5年生存率可达63.4%。目前食管鳞癌的检查手段主要有X线钡餐检查、CT/PET-CT扫描、电子内窥镜检查及病理组织活检,但由于早期诊断技术有限、费用较高或侵袭性操作限制了广泛用于筛查的可能性,因此急需建立一种非侵袭性的早期食管鳞癌诊断方法。血清肿瘤标志物的检测是经济适用的,并且可以作为某些癌症的早期诊断的准确补充。但是,截至目前,在食管鳞癌中,仍然没有特异性强和灵敏度高的标志物。

[0004] 研究发现,随着肿瘤组织的发生发展,在肿瘤患者的血清中可以产生一些能够激活免疫系统的特异蛋白产物,这类蛋白被称为肿瘤相关抗原,同时机体通过免疫系统的级联放大效应针对这些异常表达的蛋白产生相应的抗体,这类抗体被称为肿瘤相关抗原自身抗体。这些自身抗体可出现于肿瘤患者的临床症状之前,可在患者的血液中存在较长时间,同时易于被检测以及检测过程对患者创伤性小,因此具有肿瘤早期免疫学诊断的潜力。

[0005] 综上所述,为了最终实现降低食管鳞癌的死亡率,提高生存率,本领域迫切需要筛选和鉴定更加敏感、特异的血清学自身抗体标志物,并开发操作简单、成本低、适用范围广泛的检测食管鳞癌自身抗体的试剂盒。

发明内容

[0006] 针对现有技术中存在的问题和不足,本发明的目的之一是提供一种用于食管鳞癌辅助诊断的生物标志物,本发明的目的之二旨在提供一种用于检测上述生物标志物的试剂在制备用于食管鳞癌辅助诊断的产品中的应用,本发明的目的之三在于提供一种用于食管鳞癌辅助诊断的试剂盒。

[0007] 基于上述目的,本发明采用的技术方案如下:

[0008] 本发明第一方面提供了一种用于食管鳞癌辅助诊断的生物标志物,所述生物标志物为抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体。抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体在食管鳞癌患者血清中的表达水平明显高于正常人,且具有显著差异。

[0009] 根据上述的生物标志物,优选地,所述抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体为受试者血清、血浆中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体。更加优选地,所述抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体为受试者血清或血浆中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体。

[0010] 根据上述的生物标志物,优选地,所述抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体为受试者接受肿瘤治疗之前血清或血浆中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体。更加优选地,所述肿瘤治疗为化疗、放疗或肿瘤手术切除。

[0011] 根据上述的生物标志物,优选地,所述受试者为哺乳动物,更加优选地,所述受试者为灵长类哺乳动物;最优选地,所述受试者为人。

[0012] 本发明第二方面提供了用于检测上述第一方面所述生物标志物的试剂在制备用于食管鳞癌辅助诊断的产品中的应用。

[0013] 根据上述的应用,优选地,所述试剂为通过酶联免疫吸附、蛋白芯片、免疫印迹或微流控免疫检测样本中所述生物标志物的试剂。

[0014] 根据上述的应用,优选地,所述样本为血清、血浆、组织间隙液或尿液。

[0015] 根据上述的应用,优选地,所述试剂为检测所述生物标志物的抗原。更加优选地,所述试剂为PAIP1蛋白。

[0016] 根据上述的应用,优选地,所述产品为蛋白芯片、试剂盒或制剂。

[0017] 本发明第三方面提供了一种用于食管鳞癌辅助诊断的试剂盒,所述试剂盒包含用于检测上述第一方面所述生物标志物的试剂。

[0018] 根据上述的试剂盒,优选地,所述试剂盒通过酶联免疫吸附、蛋白芯片、免疫印迹或微流控免疫检测样本中的所述生物标志物。更加优选地,所述试剂盒通过抗原抗体反应对样本中的所述生物标志物进行检测。

[0019] 根据上述的试剂盒,优选地,所述试剂盒为ELISA检测试剂盒。更加优选地,所述ELISA检测试剂盒包括固相载体和包被在固相载体上的PAIP1蛋白。

[0020] 根据上述的试剂盒,优选地,所述样本为血清、血浆、组织间隙液或尿液。

[0021] 根据上述的试剂盒,优选地,所述ELISA检测试剂盒还包括样品稀释液、第二抗体、第二抗体稀释液、洗涤液、显色液和终止液。

[0022] 本发明中肿瘤相关抗原PAIP1的基本信息为:PAIP1 (Polyadenylate-binding protein-interacting protein 1), 即多聚腺苷酸相互作用蛋白1,是哺乳动物特有的蛋白质,与多聚腺苷酸结合蛋白及真核生物翻译起始因子4A相互作用,参与了翻译起始及蛋白质的生物合成,然而PAIP1调节翻译的具体机制还不是很清楚。在含多聚(a)的mRNAs的翻译起始调控中起辅助激活子的作用。它对翻译的刺激作用是通过其对PABPC1的作用来介导的。与PAIP2竞争绑定到PABPC1。它与EIF4A和PABPC1的结合可能加强mRNA末端之间的接触。也可能参与翻译偶联mRNA的转换。与其他RNA结合蛋白一起参与由主要编码区不稳定性决定簇(mCRD)介导的FOS mRNA的细胞质去烯基化/翻译和衰变相互作用。本研究所应用的PAIP1蛋白在NCBI中的蛋白序列号为NP_006442.2。

[0023] 与现有技术相比,本发明取得的积极有益效果为:

[0024] (1)本发明首次发现抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体在食管鳞癌患者血清中的表达水平明显高于正常人,且具有显著差异,因此,抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体能够作为食管鳞癌辅助诊断的标志物;采用抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断食管鳞癌的

ROC曲线的AUC为0.627(95%CI:0.541-0.713),而且,当截断值为0.3225时,采用抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断食管鳞癌的灵敏度达到30.9%,特异度达到了90.1%,因此,通过检测抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平,能够实现食管鳞癌的辅助诊断,为临床医生对食管鳞癌的诊断提供参考依据。

[0025] (2)本发明的试剂盒通过间接ELISA的方法检测人血清中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平,可以较准确地将食管鳞癌患者和健康对照,其检测灵敏度和特异度分别达到30.9%、90.1%,其检测灵敏度和特异度显著高于现有临床内镜对食管鳞癌的检测,有利于无症状食管鳞癌高危人群筛查和早期发现,从而大大降低了食管鳞癌患者的死亡率,为食管鳞癌患者和家庭带来极大的福祉。

[0026] (3)本发明的试剂盒的检测样本为血清,可避免侵入性诊断,通过微创方式取血清检测即可在早期获得食管鳞癌的患病风险,需血量少,被检测人员痛苦小、依从性高;而且,操作简单,检测出结果时间短,具有广阔的市场前景和社会效益。

附图说明

[0027] 图1为蛋白芯片检测抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体在食管鳞癌食管鳞癌血清和正常血清中的表达水平结果图;其中,EC表示食管鳞癌,NC表示正常对照;

[0028] 图2为ELISA检测抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的血清表达水平结果图;

[0029] 图3为抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断区分食管鳞癌组和正常对照组的ROC曲线图。

具体实施方式

[0030] 以下详细说明都是示例性的,旨在对本发明提供进一步的说明。除非另有指明,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的含义。

[0031] 需要注意的是,这里所使用的术语仅是为了描述具体实施方式,而非意图限制根据本发明的示例性实施方式。如在这里所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式也意图包括复数形式,此外,还应当理解的是,当在本说明书中使用术语“包含”和/或“包括”时,其指明存在特征、步骤、操作、部件和/或它们的组合。

[0032] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,均采用本技术领域常规技术,或按照生产厂商所建议的条件;所用试剂或仪器未注明生产厂商者,均为可以通过市购获得的常规产品。

[0033] 为了使得本领域技术人员能够更加清楚地了解本发明的技术方案,以下将结合具体的实施例详细说明本发明的技术方案。

[0034] 实施例1:采用人类蛋白质组芯片筛选用于食管鳞癌诊断的标志物

[0035] 1、实验样本:

[0036] 收集来自河南省肿瘤流行病学重点实验室标本库的30例食管鳞癌患者血清(食管鳞癌组)和24例正常人血清(正常对照组);其中,30例食管鳞癌患者血清来源于经病理组学确诊且未经任何治疗的食管鳞癌患者;24例正常人血清来源于健康受试者,健康受试者的入组标准为:无心血管、呼吸、肝脏、肾脏、胃肠道、内分泌、血液、精神、或神经系统疾病以及

上述疾病病史,无急性或者慢性疾病,无自身免疫性疾病,无任何肿瘤相关的证据;而且,30例食管鳞癌患者和24例健康受试者在性别和年龄之间的差异没有统计学意义。本研究获得郑州大学伦理委员会批准,所有的研究对象均已签署知情同意书。

[0037] 将30例食管鳞癌患者血清中每3例血清混合为1例混合食管鳞癌血清样本,共得到10例混合食管鳞癌血清样本;将21例正常人血清中每3例混合为1例混合正常血清样本,共得到7例正常血清样本。

[0038] 血清采集:采集研究对象在空腹状态时的外周血液5 ml放于无抗凝剂的采血管中,室温静置1h后置于离心机中,设定为4℃,3000 rpm离心10 min。然后将采血管上层的血清吸出并分装至1.5 ml的EP管中,在EP管的顶部和侧面均标记样本编号,放于-80℃冰箱进行冷冻保存,记录采血日期以及储存位置。在使用之前,取出血清放于4℃冰箱解冻并分装,避免反复冻融血清。

[0039] 2、人类蛋白质组芯片检测

[0040] 使用HuProt™ 人类蛋白质组芯片(购自广州博绅生物科技有限公司)检测10例混合食管鳞癌血清样本,7例混合正常血清样本和3例正常人血清样本中自身抗体的表达水平。每张芯片可以同时检测14个血清样本,固定在芯片上的蛋白与血清中的特异性抗体相互作用以结合。

[0041] (1)实验方法:

[0042] 1)复温:将人类全蛋白组蛋白芯片从-80℃冷冻冰箱中取出,置于4℃冰箱,30 min,然后置于室温15 min。

[0043] 2)封闭:将每个复温的蛋白芯片固定14个围栏,向每个围栏中加入封闭液(3ml 10% BSA,加入7ml 1×PBS溶液,混匀置于冰上),然后将蛋白芯片置于侧摆摇床上,轻摇,室温封闭3 h。

[0044] 3)血清样本孵育:待封闭完成后,弃去封闭液,然后迅速向围栏中加入已稀释好的血清样本(用稀释液将血清样本按1:50的比例进行稀释,血清稀释液为:1ml 10%BSA,加入9ml 1×PBST溶液),加样量为200u1/围栏;然后将蛋白芯片置于4℃冷库,在侧摆摇床(转速为20 rpm)中过夜孵育;每张蛋白芯片可以孵育14例血清样本。

[0045] 4)清洗:将蛋白芯片及芯片夹从侧摆摇床中取出,弃去血清样本,迅速加入PBST缓冲液(加样量为200u1/围栏),按此操作循环数次。用镊子取出芯片夹,将蛋白芯片放在装有清洗液(1×PBST,存放于4℃冰箱)的盒子中,在水平摇床(转速为80rpm)上室温清洗3次,每次清洗10min。

[0046] 5)二抗孵育:将蛋白芯片置于加入了3ml二抗孵育液(用稀释液将二抗按1:100的比例进行稀释,得到二抗孵育液,二抗为荧光标记的抗人IgM、IgG抗体,稀释液为:1ml 10%BSA,加入9ml 1×PBST溶液)的盒中,然后转移到侧摆摇床(转速为40rpm)避光室温孵育60min。

[0047] 6)清洗:按上述步骤4)进行清洗,完成之后,再使用双蒸水清洗2次,每次10min(注意避光)。

[0048] 7)干燥:将经步骤6)处理后的蛋白芯片放于芯片干燥机里进行离心干燥。

[0049] 8)扫描:按照扫描仪器的操作说明对干燥后的蛋白芯片进行规范性扫描并记录荧光信号,荧光信号的强弱与相应抗体的亲和力以及数量具有正相关关系。

[0050] 9)数据提取:打开对应的GAL文件,将GAL文件上的每个阵列与芯片图像整体对齐后,点击自动对齐按钮,提取每个血清样本的数据并保存为GPR。

[0051] (2)数据处理:

[0052] F532 Median是指在532 nm通道下的信号点前景值的中位数,B532 Median是指在532nm 通道下的信号点背景值的中位数。为了消除由于背景值不一带来的样本间的偏差,对于每个血清样本提取的数据,进行背景归一化处理,即定义信噪比(signal-noise ratio,SNR)= F532 Median/B532 Median,按照SNR的计算公式进行计算,分别得到10例混合食管鳞癌血清样本、7例混合正常血清样本和3例正常血清样本的SNR值。分别对10例混合食管鳞癌血清样本、7例混合正常血清样本和3例正常血清样本的SNR值进行z-score标准化处理,使其服从N(0,1)的标准正态分布。对于任意一个自身抗体,计算食管鳞癌组与正常对照组的差异倍数(差异倍数=食管鳞癌组z-score标准化后的SNR均值/正常对照组z-score标准化后的SNR均值),用以表示食管鳞癌组高于正常对照组的程度,进一步设置筛选条件:差异倍数>2、灵敏度 \geq 60%、特异度 \geq 90%,从中筛选出符合条件的抗肿瘤相关抗原自身抗体。

[0053] (3)实验结果:

[0054] 经筛选发现,抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的差异倍数(fold change)为2.242,灵敏度和特异度分别为60%和90%。进一步绘制抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体在食管鳞癌组和正常对照组的SNR值的柱状图,其结果如图1所示。由图1可知,抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体在食管鳞癌组血清中的表达水平显著高于正常对照组血清,且差异具有统计学意义。

[0055] 实施例2:ELISA检测抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的血清表达水平

[0056] 采用酶联免疫吸附实验(enzyme linked immunosorbent assay,ELISA)进一步在大样本人群血浆中检测抗-PAIP1自身抗体的表达水平。

[0057] 1、实验样本:

[0058] 本研究纳入的160例原发性食管鳞癌患者(食管鳞癌组)和229例正常对照血清(正常对照组)样本均来源于河南省肿瘤流行病学重点实验室标本库;其中,160例食管鳞癌患者血清来源于经病理组学确诊且未经任何治疗的食管鳞癌患者;160例正常人血清来源于健康受试者,健康受试者的入组标准为:无心血管、呼吸、肝脏、肾脏、胃肠道、内分泌、血液、精神、或神经系统疾病以及上述疾病病史,无急性或者慢性疾病,无自身免疫性疾病,无任何肿瘤相关的证据;而且,160例食管鳞癌患者和160例健康受试者在性别和年龄之间的差异没有统计学意义。本研究获得郑州大学伦理委员会批准,所有的研究对象均已签署知情同意书。

[0059] 血清采集:采集研究对象在空腹状态时的外周血液5 ml放于无抗凝剂的采血管中,室温静置1h后置于离心机中,设定为4℃,3000 rpm离心10 min。然后将采血管上层的血清吸出并分装至1.5 ml的EP管中,在 EP 管的顶部和侧面均标记样本编号,放于-80℃冰箱进行冷冻保存,记录采血日期以及储存位置。在使用之前,取出血清放于 4℃冰箱解冻并分装,避免反复冻融血清。

[0060] 2、实验材料及试剂:

[0061] (1)PAIP1重组蛋白,购买于武汉华美生物工程有限公司;

- [0062] (2) 96孔酶标板(8行×12列)；
- [0063] (3) 包被液:含0.15% 碳酸钠(Na_2CO_3)和0.29%碳酸氢钠(NaHCO_3)的水溶液；
- [0064] (4) 封闭液:含2%(v/v)牛血清白蛋白(BSA)的0.2%(v/v)吐温20的PBST缓冲液；
- [0065] (5) 血清样本稀释液:含有1%(W/V)BSA的PBST缓冲液；
- [0066] (6) 酶标第二抗体:辣根过氧化物酶(HRP)标记小鼠抗人免疫球蛋白抗体(以下简称HRP标记小鼠抗人IgG抗体)；
- [0067] (7) 抗体稀释液:含有1%(W/V)BSA的PBST缓冲液；
- [0068] (8) 洗涤液:含0.2%(v/v)吐温20的PBST缓冲液；
- [0069] (9) 显色液:显色液由显色液A和显色液B组成,其中,显色液A为20%的四甲基联苯胺二盐酸的水溶液,显色液B为含3.7% $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、0.92%柠檬酸以及0.75%(V/V) 过氧化氢脲素水溶液;使用时将显色液A和显色液B按照1:1等体积混合均匀；
- [0070] (10) 终止液:10%的硫酸。

[0071] 3、实验方法:

[0072] (1) 制备肿瘤相关抗原PAIP1包被的酶标板:

[0073] 制备肿瘤相关抗原PAIP1包被的酶标板的具体操作步骤如下:

[0074] 1) 制备肿瘤相关抗原PAIP1溶液:将PAIP1重组蛋白溶解于包被液中,配制成浓度为0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的PAIP1蛋白溶液。

[0075] 2) 包被酶标板:将步骤1)制备的PAIP1蛋白溶液加入到96孔酶标板的第1-11列反应孔中,加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$;在96孔酶标板第12列的每个反应孔中均加入人IgG标准品(第12列不同反应孔中包被系列浓度梯度的人IgG标准品,包被的系列浓度梯度的人IgG标准品即可用于制作标准曲线,同时还能够保证实验操作的稳定性),加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$,保鲜膜封闭防止挥发,在4 $^{\circ}\text{C}$ 下包被过夜,然后弃去反应孔中的包被液。

[0076] 3) 封闭:向包被后的96孔酶标板的反应孔中加入封闭液,加样量为100 $\mu\text{l}/\text{孔}$,在37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴中封闭2h,然后去除封闭液,用洗涤液洗涤3次并拍干,得到肿瘤相关抗原PAIP1包被的酶标板。

[0077] (2) 血清样本中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体表达水平的检测:

[0078] 采用上述制备的肿瘤相关抗原PAIP1包被的酶标板通过ELISA方法检测血清样本中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体表达水平。其具体操作步骤如下:

[0079] 1) 血清样本孵育:

[0080] 将待检测的血清样本用血清样本稀释液按体积比1:100的比例进行稀释,然后将稀释后的血清样本加入已包被PAIP1重组蛋白的96孔酶标板第1~10列的反应孔中,加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$;在已包被PAIP1重组蛋白的96孔酶标板的第11列的第1-5反应孔加入质控血清(质控血清是作为质控,以进行不同酶标板之间的归一),加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$,在第11列的第6-8反应孔加入不含血清的抗体稀释液(作为空白对照),加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$;在第12列的每个反应孔加入不含血清的抗体稀释液,加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$;然后将96孔酶标置于37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴孵育1h,然后弃去反应孔中液体,用洗涤液(加样量为300 $\mu\text{l}/\text{孔}$)洗涤5次并拍干。

[0081] 2)、酶标二抗孵育:

[0082] 将HRP标记小鼠抗人IgG抗体用抗体稀释液按1:10000(v/v)的比例进行稀释,然后将稀释后的HRP标记小鼠抗人IgG抗体加入96孔酶标板的反应孔中,加样量为50 $\mu\text{l}/\text{孔}$,置于

37℃水浴孵育1h,然后弃去反应孔中液体,用洗涤液洗涤(加样量为300 μ l/孔)5次并拍干。

[0083] 3)显色及终止反应:

[0084] 将显色液A和显色液B按照1:1等体积混合均匀,然后将混合后的显色液迅速加入96孔酶标板的每个反应孔中,加样量为50 μ l/孔,室温避光显色反应10min,然后向每个反应孔中再加入25 μ l终止液,终止显色反应;然后使用酶标仪读取其在450nm和620 nm波长处的吸光度(optical density, OD),其中,620 nm 波长的吸光度值为背景值,以450nm、620 nm波长处的吸光度的差值作为吸光度值,并用空白对照孔调零。

[0085] 4、数据处理

[0086] 对食管鳞癌组和正常对照组血清样本的吸光度值进行Kolmogorov-Smirnova检验,经Kolmogorov-Smirnova检验发现,研究对象血清样本中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平不符合正态分布($P < 0.05$),因此采用第25百分位数(P25)、中位数(P50)以及第75百分位数(P75)来描述抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平分布;然后采用非参数检验(Mann-Whitney U)比较食管鳞癌组和正常对照组中自身抗体的表达水平是否有差异。根据测得食管鳞癌组和正常对照组中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平,使用GraphPad Prism5.0绘制抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断区分食管鳞癌的ROC曲线,根据ROC曲线的曲线下面积(AUC),分析抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体对食管鳞癌的诊断价值;以特异度大于90%时,约登指数最大的OD值为截断值,高于此值判定为阳性,低于此值判定为阴性。所有统计分析使用SPSS 26.0软件进行, $P < 0.05$ 为统计判断标准。

[0087] 5、实验结果

[0088] 食管鳞癌组和正常对照组血清样本中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平如图2所示。由图2可知,食管鳞癌组血清样本中抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体的表达水平显著高于正常对照组($P < 0.05$)。由此说明,抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体可以用于食管鳞癌的辅助诊断。

[0089] 图3为抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断区分食管鳞癌组和正常对照组的ROC曲线图。由图3可知,采用抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体诊断食管鳞癌时,其AUC为0.627(95%CI:0.541-0.713),当截断值0.3225时,相应的灵敏度、特异度分别是30.9%和90.1%。由此说明,抗肿瘤相关抗原PAIP1的自身抗体能够用于诊断区分食管鳞癌患者和正常人。

[0090] 综上所述,本发明有效克服了现有技术中的不足,且具高度产业利用价值。上述实施例的作用在于说明本发明的实质性内容,但并不以此限定本发明的保护范围。本领域的普通技术人员应当理解,可以对本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的实质和保护范围。

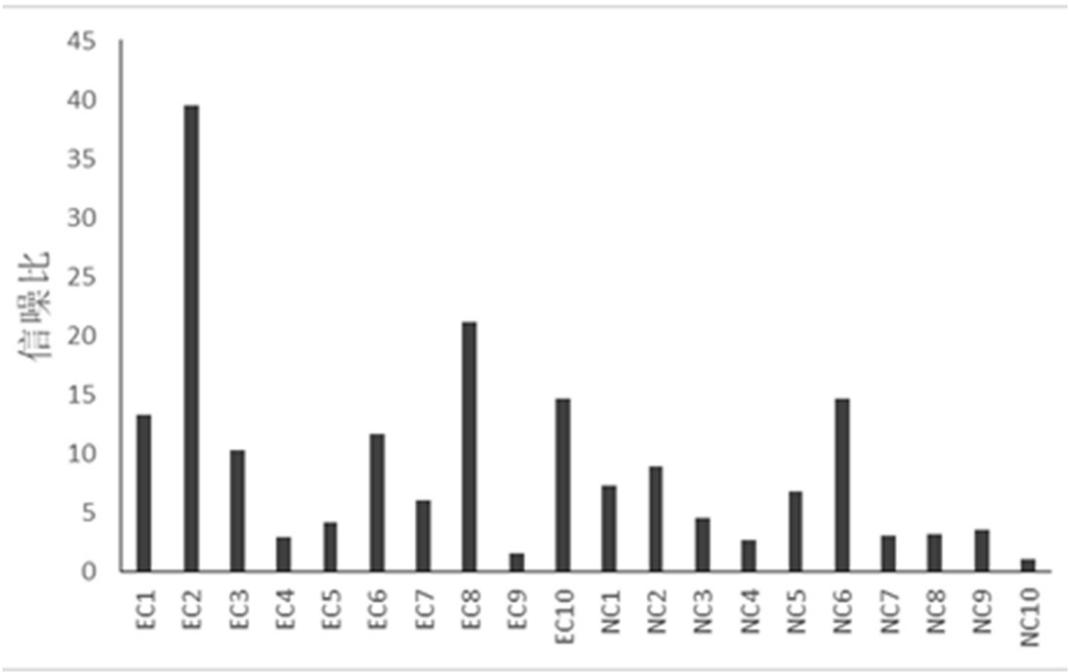


图1

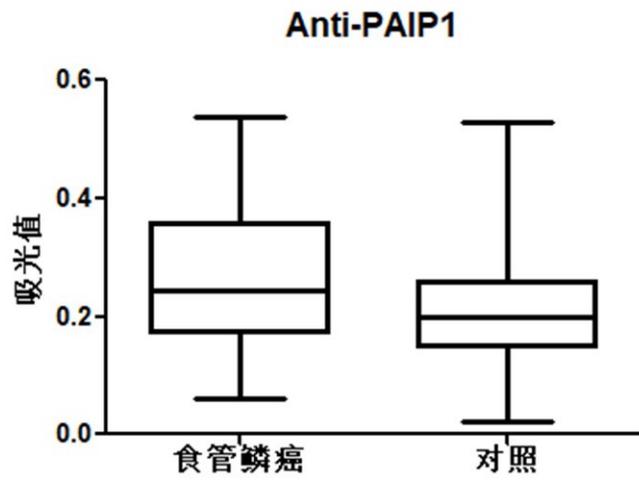


图2

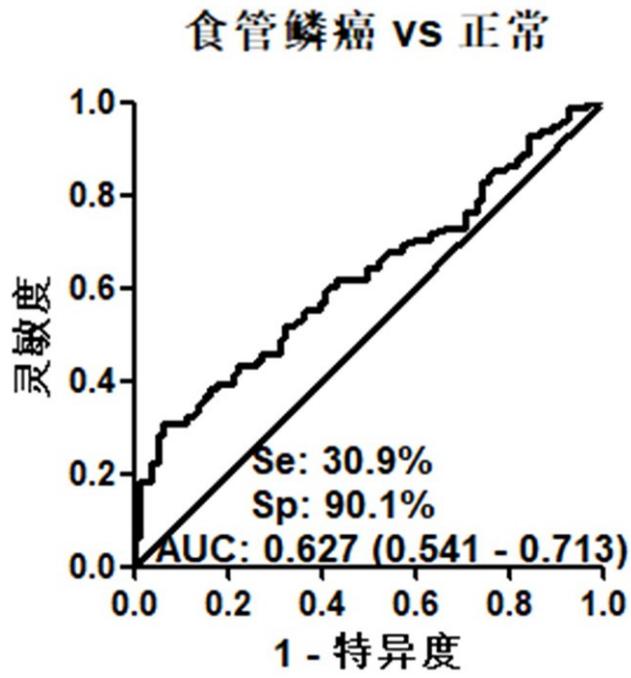


图3