[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 03818565.2

[45] 授权公告日 2009 年 12 月 16 日

[11] 授权公告号 CN 100570366C

[22] 申请日 2003.7.31 [21] 申请号 03818565.2

[30] 优先权

[32] 2002. 8. 1 [33] EP [31] 02017313.4

[86] 国际申请 PCT/EP2003/050354 2003.7.31

[87] 国际公布 WO2004/013632 英 2004.2.12

[85] 进入国家阶段日期 2005.2.1

[73] 专利权人 MTM 实验室公司

地址 德国海德尔堡

[72] 发明人 R·里德 A·雷谢尔

M·特伦克-格曼彻 W·鲁迪

M·赫克尔特

M·冯克内贝尔德贝瑞茨

[56] 参考文献

CN 1360059 A 2002.7.24

CN 1307681 A 2001.8.8

EP 0723156 A 1996.7.24

WO 99/04238 A 1999.1.28

审查员 飞竹玲

[74] 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 4 页 说明书 35 页 附图 2 页

[54] 发明名称

基于溶液的检测方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于改进了的医学相关状态检测方法，通过在测试标本溶液中进行基于溶液的生化测试过程而实现。 本发明提供了一种方法，通过从溶液中可获得的分子信息而替代包含在测试标本细胞学和/或组织学数据中基于细胞的形态学信息，其中，将原始的测试标本溶解，并且从溶解的测试标本中能够进行精确且可重复的医学相关检测的评价。 根据本发明的方法包括步骤：测定一个或多个与待检测症状相关的疾病标记物的水平，测定一种或多种标准标记物的水平，该标准标记物适于取代与标本形态学方面相关的信息，比较和/或结合患病和标准标记物的数据，并且对医学相关状态的检测进行评价。

1.一种测试试剂盒，包括：

（a）至少一种试剂，用于检测医学相关状态的至少一种特征性标记物分子，其中所述标记物分子选自 p13.5，p14，p15， $p16^{INK4a}$，p19，p21，p27，p53，pRb，p14ARF，细胞周期素 A，细胞周期素 B，细胞周期素 E，MDM-2，MCM2，MCM5，MCM6，CDC2，CDC6，Id1，骨连接蛋白，GRP，肾二肽酶，TGF β II 受体，与 HPV 相关的标记物， claudin-1 ，MN，her2/neu， bcl-2，EGF-受体，指示人乳头状瘤病毒感染的标记物或 Ki67；以及

（b）至少一种用于检测至少一种标准标记物分子的试剂，该标准标记物具有下述至少一种参数的特性：

在标本溶液中出现的细胞之中是否存在特定的细胞类型或分化模式，以及在标本溶液中出现的细胞是否存在特定增殖特性，其中所述标准标记物分子选自保管基因，PCNA，抑制素，CK20 细胞表面抗原，糖蛋白，人上皮增殖 40kD 蛋白，人上皮抗原 34+39KD，细胞角蛋白 18，细胞角蛋白 8，粘液素抗原，GaLNac 转移酶，寡多糖转移酶，外源凝集素，Plakophilin，波形蛋白，血红蛋白，CD16，CD56，CD68，CD19，CD20，CD3，CD4，CD8，CEA，NMP22，BTA，PreproGRP，PCNA，细胞角蛋白，E-钙粘着蛋白，包壳总苞，尿激酶状的血纤维蛋白溶酶原激活剂，SCCA， α -连接素， β -连接素， γ -连接素，CK8，CK13，CK18 或 Ep-Cam；

（c）用于溶解标本的缓冲液。

2.根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，至少一种试剂固定到固定相上。

3.根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，所述的保管基因选自肌动蛋白，gapdh，组蛋白，磷脂酶或 β 2-微球蛋白。

4.根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，所述的糖蛋白选自蛋白多糖，外源凝集素受体，刀蛋白 A 受体或人上皮细胞表面糖蛋白。

5. 根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，所述的粘液素抗原选自 Tn，STn，MUC1 或 MUC2。

6. 根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，所述的外源凝集素选自 WGA, PNA, UEA I, DBA, SBA 或 SNA。

7. 根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，还包括下述至少一种组分：

（a）至少一种标记物分子，用于进行阳性对照反应，选自：

（i）医学相关状态的特征性相关标记物分子，其选自 p13.5，p14，p15，$p16^{INK4a}$，p19，p21，p27，p53，pRb，p14ARF，细胞周期素 A，细胞周期素 B，细胞周期素 E，MDM-2，MCM2，MCM5，MCM6，CDC2，CDC6，Id1，骨连接蛋白， GRP，肾二肽酶，TGF β II 受体，与 HPV 相关的标记物， claudin-1MN，her2/neu， bcl-2，EGF-受体，指示人乳头状瘤病毒感染的标记物或 Ki67；

（ii）标准标记物分子，其选自保管基因，PCNA，抑制素，CK20 细胞表面抗原，糖蛋白，人上皮增殖 40kD 蛋白，人上皮抗原 34+39KD，细胞角蛋白 18，细胞角蛋白 8，粘液素抗原， GaLNac 转移酶，寡多糖转移酶，外源凝集素，Plakophilin，波形蛋白，血红蛋白，CD16，CD56，CD68，CD19，CD20，CD3，CD4，CD8，CEA，NMP22，BTA，PreproGRP，PCNA，细胞角蛋白，E-钙粘着蛋白，包壳总苞，尿激酶状的血纤维蛋白溶酶原激活剂，SCCA， α -连接素， β -连接素， γ -连接素，CK8，CK13，CK18 或 Ep-Cam；并具有下述至少一种参数的特性：在标本溶液中出现的细胞之中是否存在特定的分化模式，在标本溶液中出现的细胞是否存在特定的增殖特性；以及

（b）通常用于进行检测反应的试剂和缓冲液。

8. 根据权利要求 7 所述的测试试剂盒，其中，所述的保管基因选自肌动蛋白，gapdh，组蛋白，磷脂酶或 β 2-微球蛋白。

9. 根据权利要求 7 所述的测试试剂盒，其中，所述的糖蛋白选自蛋白多糖，外源凝集素受体，刀蛋白 A 受体或人上皮细胞表面糖蛋白。

10. 根据权利要求 7 所述的测试试剂盒，其中，所述的粘液素抗原选自 Tn，STn，MUC1 或 MUC2。

11. 根据权利要求 7 所述的测试试剂盒，其中，所述的外源凝集素选自 WGA, PNA, UEA I, DBA, SBA 或 SNA。

12. 根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，用于检测标记物分子的试剂包括特异于所述标记物分子的结合剂和/或与编码所述标记物分子的核酸杂交的核酸探针。

13. 根据权利要求 12 所述的测试试剂盒，其中，结合剂为抗体、小抗体或者含有抗原结合表位的拟肽。

14. 根据权利要求 1 所述的测试试剂盒，其中，测试试剂盒为诊断试剂盒、研究试剂盒或分析试剂盒。

15. 根据权利要求 1 的测试试剂盒,其中医学相关状态是宫颈发育不良，所述试剂盒包括：

（a）至少一种用于检测子宫颈发育不良的至少一种特征性标记物分子的试剂，所述特征性标记物分子选自 $p16^{INK4a}$、p14ARF、细胞周期素 E、细胞周期素 A、细胞周期素 B、MN、her2/neu、mdm-2、bcl-2、EGF-受体、mcm-2、mcm-5、claudin-1、指示人乳头状瘤病毒感染的标记物、pRb 或 p53，

（b）至少一种用于检测是否存在上皮细胞的至少一种标准标记物分子的试剂，所述标准标记物分子选自 CK8、Ep-Cam、CK13、CK18、E-钙粘着蛋白、α-连接素、β-连接素、γ-连接素或包壳总苞。

16. 根据权利要求 15 所述的测试试剂盒，其中，至少一种试剂固定到固定相上。

17. 根据权利要求 15 所述的测试试剂盒，还包括下述至少一种组分：

（a）至少一种标记物分子，用于进行阳性对照反应，选自：

（i）子宫颈发育不良的特征性相关标记物分子，

（ii）标准标记物分子，具有下述至少一种参数的特性：是否存在柱状上皮细胞；是否存在鳞状上皮细胞；以及

（b） 通常用于进行检测反应的试剂和缓冲液。

18. 根据权利要求 15 所述的测试试剂盒，其中，用于检测标记

物分子的试剂包括特异所述标记物分子的特异性结合剂和/或与编码所述标记物分子的核酸杂交的核酸探针。

19. 根据权利要求 18 所述的测试试剂盒，其中，结合剂为抗体、小抗体或含有抗原结合表位的拟肽。

20. 根据权利要求 15 所述的测试试剂盒，其中，测试试剂盒为检测测试试剂盒、活体外检测装置、研究试剂盒、或分析试剂盒。

21. 根据权利要求 15 的测试试剂盒，包括：

（a）用于检测 $p16^{INK4a}$ 的试剂；以及

（b）用于检测 γ-连接素的试剂。

22. 根据权利要求 21 所述的测试试剂盒，还包括检测 Ep-Cam 的试剂。

23. 根据权利要求 21 所述的测试试剂盒，还包括溶解标本的缓冲液。

24. 根据权利要求 21 所述的测试试剂盒，其中，用于检测 $p16^{INK4a}$ 和 γ-连接素的试剂固定到固定相上。

25. 根据权利要求 21 所述的测试试剂盒，其为一种活体外检测装置。

基于溶液的检测方法

本发明涉及用于进行医学相关状态检测的方法，该方法通过对医学相关状态的特征性相关标记物的水平以及标准标记物的水平进行检测而实现。该方法适于对溶液相中的标本定性，无需依赖于基于细胞形态学的信息。

背景技术

目前通过采用分子标记物作为工具而进行大量医学相关状态的检测。考虑到可对待测标本进行定性的一系列不同参数，分子工具通常被用作复合检测中的一个方面。

在医学上的相关分析中，通过细胞学或组织学方法对标本进行形态学检测是常用的。这些基于标本细胞的形态学特征的方法，例如，可应用于分析临床标本，诸如体液、血液、外科切除术、分泌物、拭子或灌洗物。

在筛选子宫颈癌时，例如，用拭子检测子宫颈的新生肿瘤病变。筛选过程中，必须区分不同来源的病变。例如，病变原因可以是发炎（由于传染物质或者物理或化学的伤害）或者是肿瘤发生前的以及新生肿瘤的变化。在进行形态学检查时，区分具有不同特征的病变很复杂。因此，检查拭子时，细胞学家和病理学者必须经过专门培训，并且在评价基于细胞学样本的检测时，甚至有经验的测试人员也存在明显的相互间的和内在的观察差异。一般而言，检查结果取决于进行检查的病理学者/细胞学者对检测标准的主观解释。结果，在筛选测试中，假阳性和假阴性结果的比例一直高得不能令人满意。

因此，在许多情况下，通过使用分子标记物而支持这些细胞学或组织学的检测过程。这些标记物经常被用于免疫组织化学染色反应，或者原位杂交反应的过程中。在现有技术中，基于组织或细胞的不同医学相关状态的特征性标记物分子，形态学检查和免疫组织化学染色反应的结合可能会导致结果增强。形态学检查一直既费力又费事，并因此很昂贵，即使被可使结果更加可靠的分子方法所支持。此外，基于形态学细胞水平的检测，即使由分子参数支持，也易受各个检测人员对形态学的个人理解的影响。因此，检测依赖于进行检测的人。

仅在非常少的情况下，分子标记物可以被用作检测工具，无需进一步由基于细胞的形态学检测所支持。特别是仅在精确限定的条件下才出现的环境中检测标记物的情况。因此，没有基于细胞的信息所支持，在分子水平上对症状进行检测的方法仅仅被局限于有特异于对症状定性的合适标记物的情况。例如，可以在标本溶液中进行病毒感染的检测，这是由于组织中存在病毒的特征性标记物不会出现在未被影响的人体组织中。

通过使用支持的分子工具可增强检测结果的重复性。然而，仅通过另外使用分子标记物可能不能克服保存和制备标本的问题。

在细胞学或组织学检测中使用分子工具时，在保存标本时必须采取严格的预防措施，以避免人工痕迹和不正确的测试结果。部分原因是由于基于细胞的形态学信息的不稳定性，部分原因是由于测试过程中待测分子标记物的不稳定性。如果不能以正确的方式制备、转移或储存标本，基于细胞的信息或者甚至是分子的信息可能被丢失，或者可能被更改。因此，检测就是不可能的，或者受人工痕迹影响。例如，由于细胞受损（物理的或生化的）而经常使活检组织的解释或细胞学制备变得很难或不可能。对于组织标本或活检组织，由于需要经过一定的时间采用合适的防腐剂使全部标本渗透，这使得保存容易发生快速转换的标本分子构成变得很复杂。

现有技术中常规形态学支持的检测方法表现出两大缺陷。首先，这些方法高度依赖于检测人员的个人判断。第二，形态学信息对延迟过程很敏感，因此可能会在标本制备后导致人工痕迹。这两个方面会引起结果不正确的重复性。

为了改进医学相关状态的检测，期望有不依赖于基于细胞形态学信息的方法。

发明概述

本发明涉及一种方法，用于对病人的医学相关状态进行检测。该方法包括以下步骤：从病人中获得含有细胞或细胞碎片的原始标本；从原始标本中制备标本溶液；检测一种或多种相关标记物的水平，该标记物为所述标本溶液中所述医学相关状态的特征性标记物；检测一种或多种标准标记物的水平；相对于所述标准参数而对检测到的相关标记物的水平进行标准化；并且从标本溶液中所述相关标记物的标准化水平来检测医学相关状态。这些标准标记物至少具有下述一种标准参数特征：在标本溶液中出现的细胞中是否存在特定的细胞类型，在标本溶液中

出现的细胞中是否存在特定的分化模式，以及在标本溶液中出现的细胞中是否存在特定的增殖特性。

在本发明一个实施方式中，医学相关状态是细胞增殖紊乱、癌症或前期损伤。

本发明也涉及一种用于检测医学相关状态的检测试剂盒。

附图的简要描述

本专利申请文件包含至少一幅彩色附图。根据专利局的要求提供彩色附图的本专利或专利申请公开文本的副本，并支付必需的费用。

图 1 表示子宫颈切片中子宫颈内和子宫颈外上皮细胞的特定免疫组织化学染色。图 1A 表示采用抗细胞角蛋白 18（CK18）的抗体在子宫颈内的柱状上皮细胞中检测到阳性反应。图 1B 表示采用抗细胞角蛋白 18（CK18）的抗体,在子宫颈外的柱状上皮细胞中没有显示特异性染色。图 1C 表示采用抗细胞角蛋白 10/13（CK10/13）的抗体,在子宫颈内的柱状上皮细胞中没有显示特异性染色。图 1D 采用抗细胞角蛋白 10/13（CK10/13）的抗体,显示出在子宫颈外的鳞状上皮细胞中的强染色。

图 2 显示出对从子宫颈拭子获得的溶解标本进行 Western 印迹分析。数字 1-4 代表从各个病人获得的标本（子宫颈拭子）。

图 3 显示出 Western 印迹和 ELISA 分析，用以证明标本足量。采用 Western 印迹分析（图的上部）对四位子宫颈严重发育不良病人的标本进行了分析（参见检测）。图的下部显示出 ELISA 分析结果。

发明的详细说明

本发明提供了改进了的用于医学相关状态的检测方法，在测试标本的溶液中进行基于溶液的生物化学测试。本发明提供了一种方法，利用从溶液中获得分子信息替代包含在测试标本的细胞学和/或组织学数据中基于细胞的形态学信息，在其中将原始的测试标本溶解并且从溶解的测试标本中能够对医学相关检测进行精确并可重复的评价。根据本发明的方法包括步骤：测定一个或多个与待检测症状相关标记物的水平，测定一套适合于替代标本形态学相关信息的标准标记物水平，其能够或支持基于细胞测试系统的检测，比较和/或结合与所述标记物水平相关的数据，并且对医学相关状态的检测进行评价。

本发明公开了症状的检测，其在正常情况下（基于细胞的检测系统）通过组织学和/或细胞学检测过程而得以进行或被支持，通过一种方法可以在从含有多种具有不同特性的细胞类型的原始标本所得到的溶液中进行，该方法包括步骤：获得原始标本，将标本溶解在适当的溶剂中，检测一种或多种与待检测症状相关的标记物的水平以及标本溶液中另外的一种或多种标准标记物，相对于标准标记物的数据对与所述症状相关的标记物的数据进行标准化，并且检测标本中是否存在一种症状。

根据本发明的方法，例如，可作为一种初级筛选测试被应用于进行正常细胞学的、组织学的或病理学检测的情况。采用本发明，人们可以区分标本中是否存在待检测的症状。如果基于溶液的检测给出关于一特定症状的阴性结果，进一步检测可以被省略。在给出阳性结果的情况下，可接着采用经典可应用方法进行确定。因此，通过不昂贵的快速初级筛选测试，可以避免昂贵且费事的微观或其它检测。

本发明一方面是一种改进了的医学相关状态检测方法，其中，采用溶解的原始组织或细胞标本的溶液进行检测评价。根据本发明公开的检测方法可以不依赖于形态学参数，而是通过生化分析就能够进行检测。

本发明的第二方面是一种方法，通过所研究参数的特征分子标记物对溶液中的复杂标本进行定性，并因而替代由细胞学或组织学检测而获得的信息。

本发明的第三方面是提供适当的标记物组合，用于检测复杂标本中特定的医学相关状态。选择能够进行或支持检测的标准标记物，使包含在原始标本中的参数可以组成由于标本分解而丢失的参数。

本发明第四方面为测试试剂盒，用于根据本发明进行检测或研究。

本发明能够对原始标本中的症状进行快速简便的检测分析，诸如体液、拭子、灌洗（例如支气管-肺泡灌洗、乳腺管灌洗等）、吸出物（针-吸出物、毛细针-吸出物）或复杂的细胞或组织标本。通常情况下，原料方面的问题就是标本中存在许多不同的细胞类型并存在特定的微生物和细胞外物质。因此，原料含有细胞和组分的混合物，容易给出人工痕迹作为结果。在原始标本中存在不同的细胞类型和具有不同增殖特性的组织和物质会使多种因子升高，那可能是由于标记物分子的特定水平引起的。因此，如果提供有关原始标本的进一步的参数（形态学的），单独检测一种单个分子标记物的水平可能只导致检测上有用的信息。从原始标本可

获得的所有形态学数据由于在溶液中溶解而丢失。然而，与由组织学的、细胞学的方法可获得的特定的形态学或其它参数相对应，也存在合适的分子标记物。

例如，原始标本中单个组份的信息可以通过经典的微观检测而获得。形态学检测暗示出区别、细胞位置以及细胞出现的环境。例如，在通过细胞学制备子宫颈拭子时，特定的细胞可能被鉴定为上皮细胞并且进一步被划分为例如子宫颈内或子宫颈外的上皮细胞。甚至非子宫颈细胞,如子宫内膜的存在,可以通过微观检查而轻易地确定。

根据本发明，原始材料可以直接溶解在一种合适的溶剂中，无需根据标本原料的单相或多相性而进一步制备或定性。通过原料的溶解而被丢失的数据，包含在标本溶液中，由一系列标记物分子的水平编码，对于相应的形态学特性，可能采用正常化的所述分子数据而被重构。这通过对模糊检测所需的每种特征参数采用一套合适的分子标记物来实现。通过检测一种合适的标记物阵列，人们可以对原始标本定性的相关参数进行评价，并因而克服了由于标本溶解而丢失信息的缺陷。

根据本发明的测试过程包括检测所研究细胞症状的特性标记物的水平，以及对相应于测试标本中特定环境的特征参数的数据进行标准化的标记物。适合本发明的标记物可以具有不同的来源。适于检测所研究症状的标记物的表达方式，可能取决于细胞的增殖状况、区别状况、细胞类型或者组织。合适标记物的实例在下面列出。

这里所用的术语检测通常包括任何一种对是否存在医学相关状态的评价。因此，检测包括筛选如医学相关状态的素质的过程，筛选医学相关状态的前体，筛选医学相关状态，医学相关状态的临床或病理学检测等。这里所用的对医学相关状态的检测可以包括任何在细胞学、组织学、生化或分子生物水平上可检测症状的检查，这对于人类健康和/或身体是有用的。这种检查可以包括如医学上的检测方法和生命科学方面的研究。在本发明一个实施方式中，该方法用于检测诸如疾病的医学相关状态。例如，这些疾病可以包括细胞或组织具有非野生类型特征的增殖紊乱。

在一个实施方案中，这种检测适于检测癌症和它们的症前阶段，监测癌症的疾病过程，评价癌症预测以及检测散布的肿瘤细胞，例如在最小的残留疾病检测过程中。根据本发明的方法可以被用于例如临床或病理学检测癌症和它们的症前

阶段的过程中，或者对特定癌症的常规筛选测试中，例如，在对子宫颈损伤的筛选测试中检测拭子，对肺癌的支气管灌注的检测，或作为检测胃肠道损伤的工具，如结肠直肠损伤。

根据本发明的方法可应用于各种医学相关状态。

根据本发明所用的医学相关状态可以是例如组织、体液、分泌物、洗涤物或拭子的组分。这些症状可以包括如体液的细胞组分，如血液组分、药液组分或精液组分。在本文中，例如，组分应当是是否存在特定的细胞类型（例如病原体，如病毒等，肿瘤前的、新生肿瘤的和/或发育不良的细胞等），是否存在特定细胞类型的分化模式，特定细胞类型的总数（例如红血球、白血球、精液等），具有任何细胞类型的全部细胞的总数或者具有其它特定特征的细胞部分。

而且，医学相关状态也可以包括与细胞或组织相关的紊乱。待检测症状可以包括与细胞学或组织学的组织标本中细胞相关的参数。症状可以包括组织标本中细胞的分化模式，如外科切片标本、活体解剖物、拭子、灌注等。例如，这些症状可以包括先天性紊乱、发炎紊乱、机械紊乱、损伤性紊乱、脉管紊乱、变性紊乱、生长紊乱、良性的新生肿瘤、恶性的新生肿瘤。根据本发明症状的另一方面可以包括是否存在增殖特性的特殊状况。例如，具有是否存在增殖特性的特定状态可以是细胞增殖紊乱。

根据本发明的细胞增殖紊乱包括与正常控制的细胞或组织相比，具有细胞或组织异常生长特性的特殊疾病。例如，细胞或组织的生长可以是异常加速、减速或者是异常调控。如上所述的异常调控可以包括细胞或组织对于自然的生长调控影响作出非野生型反应的任何形式的存在或缺失。例如，细胞或组织的生长异常可以是肿瘤或增生。

在一个实施方式中，细胞增殖紊乱为肿瘤。肿瘤可以包括头部和颈部肿瘤，呼吸道肿瘤，肛门与生殖器道肿瘤，胃肠道肿瘤，泌尿系统肿瘤，生殖系统肿瘤，内分泌系统肿瘤，中枢及体表神经系统肿瘤，皮肤及其附件肿瘤，软组织和骨肿瘤，淋巴细胞和造血系统肿瘤等。例如，肿瘤可以包括如良性和恶性肿瘤的瘤，癌症，肉瘤，白血病，淋巴瘤或发育不良。在特定实施例中，例如，肿瘤是头部和颈部的癌症，呼吸道癌症，肛门与生殖器道癌症，胃肠道肿瘤，皮肤及其附件癌症，中枢及体表神经系统癌症，泌尿系统癌症，生殖系统癌症，内分泌系统癌症，软组织和骨癌症，造血和淋巴细胞系统癌症。

肛门与生殖器道肿瘤可以包括会阴、围产期和阴囊皮的癌，子宫颈癌，外阴癌，阴道癌，阴茎癌，肛门癌等。子宫颈癌可以包括鳞状损伤、腺损伤或其它上皮肿瘤。例如，鳞状损伤包括子宫颈内上皮发育不良（轻度、中度和严重的发育不良），原位癌，鳞状细胞癌（例如，角质化的、非角质化的、疣状的、瘤状的、乳头状的、淋巴上皮癌状的）。腺损伤可以包括非典型增殖，原位腺癌，腺癌（例如粘蛋白状的、子宫内膜异位的、透明细胞、良性腺瘤、乳头状的、血浆状的或中肾的腺癌）。其它上皮肿瘤可以包括鳞状腺癌，玻璃质细胞癌，淋巴组织囊肿癌，淋巴组织基底癌，良性肿瘤，小细胞癌和未区分的癌。需要获得更详细的信息，请参照“Kurman，R.，Norris，H.，et al.，Tumors of the Cervix，Vagina，and Vulva，Atlas of Tumor Pathology，1992，AFIP，”，其内容作为参考并入本文。

肠胃肿瘤可以包含结肠癌，结肠上行癌，结肠下行癌，结肠横向癌，乙状癌，直肠癌，小肠癌，空肠癌，十二指肠癌，胃癌，食管癌，肝癌，胆癌，胆汁系统癌，胰腺癌等。对肠胃损伤的详细综述由“Hamilton Sr, Aaltonen LA(Eds.):World Health Organization Classification of Tumours,Pathology and Genetics of Tumors of the Digestive System, IARC Press: Lyon 2000,”给出,其内容作为参考并入本文。

呼吸道肿瘤可以包括呼吸道的任何良性症状，诸如肺癌、肺泡、细支气管、支气管树和支气管病、鼻咽空间、口腔、咽、鼻腔和鼻侧窦。例如，肺癌为小细胞肺癌，非小细胞肺癌，鳞状细胞肺癌，小细胞肺癌，肺腺癌，大细胞肺癌，鳞状腺肺癌，肺的良性肿瘤，支气管腺肿瘤或（良性）间皮瘤。对呼吸道肿瘤的综述可在 Colby TV, et al.: Tumors of Lower Respiratory Tract,Atlas of Tumor Pathology, Third Series,Fascicle 13,AFIP: Washington 1995,”中找到，其内容作为参考并入本文。

泌尿系统肿瘤可以包括膀胱癌、肾癌、肾骨盆、输尿管癌和尿道癌等。生殖系统的肿瘤可以包括卵巢、子宫、睾丸、前列腺、附睾等的癌症和其肿瘤前阶段。

在所用情况下，根据本发明的方法也应用于损伤、肿瘤或癌症的前体阶段。

在一个实施方式中，根据本发明的方法适于检测分散的肿瘤细胞或转移。

在本发明的一个实施方式中，例如，癌症是子宫颈癌，结肠癌，胃癌，乳腺癌，膀胱癌，肺癌，口腔癌等。

本发明提供了许多可靠、快速并且简便的方法来保存标本的分子性能，从而丢失了标本的形态学信息。例如，标本获得后或者甚至是获得标本时将原始标本的细胞组分溶解在适当的溶剂中，以可重复并易于储存和传输方式制备标本。体

液可直接从个人的身体传送至含有合适除垢剂及除菌剂的溶液中。而且，组织标本可以立即被转移到变性溶菌条件中（最终由物理作用支持）并被保存。利用溶剂中适当的有效成分，可以保存原始标本的分子组分，并且可以不出现降解。例如，酶活性引起的降解可通过使用酶抑制剂而最小化。因此，测试标本的溶液可以轻易地表征测试标本在溶解时的分子性能，无需附加的保存措施。

原始标本可以包括临床标本，诸如分泌物、拭子、灌注、体液、血液、尿液、精液、粪便、胆汁、液剂、骨髓、活组织切片、细胞和组织标本。本发明文中所用的活组织切片可以包括肿瘤切片标本，例如通过内窥镜方式制备的组织标本，或者穿孔的或针抽的器官活组织切片。而且，根据本发明的标本可以是任何可能含有待检标记物分子的标本。在本发明的一个实施方式中，标本包括子宫颈拭子、支气管灌注、粪便等。本发明文中所用的原始标本可以包括固定的或保存的细胞或组织标本，例如在适当溶液中（乙醇等）保存的细胞，或者固定的组织标本在根据本发明的方法中可以被用作原始标本。

根据本发明方法的原始标本包括含有细胞或细胞碎片的任何标本。例如，细胞可以是原核或真核细胞。

当本发明用于检测感染疾病时，待测细胞可以是诸如衣原体、E.coli、假丝酵母等的微生物细胞。

根据本发明，原始标本的全部或部分分子组分溶解在合适的溶解缓冲液中，例如含有溶剂。例如，这些溶剂可以是离液序列高的试剂，如尿素、GuaSCN、甲酰胺，洗涤剂，如阴离子洗涤剂（例如，SDS，N-十二烷基肌氨酸，去氧胆酸钠，烷基-芳基磺酸盐，长链（脂肪）醇的硫酸盐，烯烃的硫酸盐以及磺酸盐，α烯烃的硫酸盐以及磺酸盐，硫酸盐化的单甘油酯，硫酸盐化的醚，含硫的琥珀酸盐，烷烃磺酸盐，磷酸酯，烷基羟乙基磺酸盐，蔗糖酯），阳离子洗涤剂（例如，十六烷基三甲基氯化铵），非离子洗涤剂（例如，吐温-20，Nonidet P-40，Triton X-100，NP-40，Igepal CA-630，N-辛基-糖甙）或两性洗涤剂（例如，CHAPS，3-十二烷基-二甲基胺-丙烷-1-硫酸盐，十二烷基二甲基胺氧化物）和/或碱的氢氧化物，如NaOH 或 KOH。溶剂设计成可使细胞、细胞碎片、核酸、多肽、脂质体和其它可能存在于原始标本中的生物分子溶解。根据本发明，用于溶解原始标本的溶液可以进一步包括一种或多种可阻止原始标本中组分降解的试剂。例如，这些组分可以包括酶抑制剂，如蛋白酶抑制剂、RNAse 抑制剂、DNASE 抑制剂等。在本发明

的一个实施方式中，标本以从测试个体可获得的形式直接溶解。在本发明另一个实施方式中，标本可以在溶解前进一步被纯化。例如，这些纯化过程可以包括洗去诸如粘液等的污染物，对细胞组分进行分离或浓缩，保存并转移细胞。因此，原始标本中的细胞组分包含在一种单独的标本溶液中。

本文公开的方法中所用标本的制备也可以包括进一步制备标本的几个步骤，诸如分离不溶组分，分离多肽或核酸，制备固相固定肽或核酸，或制备颗粒、膜或待测分子共价或非共价偶联的切片。

根据本发明，标记物分子的检测直接从溶液进行。检测可以在溶液中进行，或者使用固定到固定相的试剂。在本发明的某些实施方案中，从溶解的体标本溶液中进行标记物分子的检测。因此，检测可以在溶液中进行或使用固定在固定相上的试剂。本发明文中所用的固定相可以包括多种固体物质的实例，诸如平坦的表面，颗粒（含有微米、纳米颗粒或者更小的颗粒）。在某种实施例中，颗粒可以作为颗粒、胶体等被提供。在测试试剂盒中，试剂固定到固定相或活体外检测设备上可能受到直接固定或间接固定的影响。例如，直接固定通过共价或非共价结合或者结合到表面上而被影响。间接固定可能通过试剂（例如抗体、探针等）结合到那些本身直接固定到固定相的试剂上而受到影响。这些试剂可以包括抗体或其它结合试剂，如链球菌抗生物素蛋白、生物素等。检测一种或多种分子标记物可以在一种单独的反应混合物中或两种或多种分开的反应混合物中进行。例如，几种标记物分子的检测反应可以同时在多孔反应容器中进行，或者在一个独立的或两个或多个分开的测试条上进行。细胞增殖紊乱的特征性标记物可以通过使用特异性识别这些分子的试剂来检测。与此同时，标准标记物可以通过使用特异性识别它们的试剂被检测。对每一类标记物的检测反应可以包括一个或多个与检测试剂进行的进一步反应，或者识别原始标记物分子，或者优先识别用于识别原始标记物的先前的分子（例如，一抗）。检测方法可以进一步包括报告反应，可指示细胞增殖紊乱的特征性标记物或者标准标记物的水平。

在本发明文中所用的所有语法形式中，术语“标记物”或“标记物分子”指核酸以及多肽分子。因此，标记物或标记物分子包括如 RNA（mRNA，hnRNA 等）、DNA（cDNA，染色体 DNA 等）、蛋白质、多肽、蛋白多糖以及这些分子相应的片断。术语“相关标记物”应当指医学相关状态的特征性标记物分子。术语标准标记物应当指用作标准的标记物分子。

这里所用的标记物分子水平指标本中存在的相关标记物的半定量以及定量值。例如，定量值可以用浓度的形式来表征。半定量值可以用含量来表示，如不可检测量、低含量、中度含量、高含量或其它任何合适的模式。标记物的水平也可以用相关参数的方式来表征，诸如相应于标记物分子的存在而在分析形式中产生的信号强度。

本发明文中所用的检测标记物分子的探针应当是专门结合到所述标记物分子上的任何分子。例如，探针可以是抗原结合剂，诸如抗体（单克隆或多克隆），抗体片断或含有抗原结合表位的人工分子，诸如蛋白质或核酸的 DNA 或 RNA 结合分子。例如，结合到其它核酸上的核酸可以是用于检测目的的缩氨酸核酸（PNAs）或寡聚核苷酸（RNA，DNA，PNA，人工核酸等）或引物。

如果一种分子专门与另一种分子结合的话，就说该分子可识别那种分子。例如，特定反应可以是特定结合或是其它分子。

例如，报告反应可以是产生一种有色化合物的反应。在本发明一个实施方式中，与特异标记物相关的报告物质产生不同的颜色。在另一个实施方式中，标准标记物的特异报告可以是一种对医学相关状态特征性标记物特定的报告分子产生的信号猝灭的分子，依赖于标本中存在的标准标记物的水平。在另一个实施例中，报告反应可以产生具有不同波长特性的荧光染料。在本发明另一个实施例中，报告反应可以包括与特异于任何一种待测标记物的具有不同波长特性的报告物质的发光反应。在本发明另一个实施方式中，报告反应可以包括发射放射线以及用于视觉化或定性射线的其它方法。在一个实施方式中，不同的标记物分子可以被具有放射性核素的试剂识别，其可发射具有不同能量性能的射线，使代表标记物分子的信号可以被识别。

根据本发明，检测反应的应用形式可以是印迹技术，诸如 Western 印迹法、Southern 印迹法、Northern 印迹法。印迹技术对本领域普通技术人员是公知的，例如可作为电子-印迹、半干的-印迹、真空印迹或点印迹实施。而且，可应用检测分子的免疫方法，例如免疫沉降或免疫分析，如 EIA、ELISA、RIA、侧向流动分析、流动透过分析、免疫色谱测试条等。本发明所用的免疫分析可以包括竞争性的和非竞争性的免疫分析。

在本发明某种实施方案中，通过采用临床实验室用的测试设备进行免疫化学或基于核酸的测试。这种测试设备可以含有任何适于免疫化学或者核酸测试的设

备，含有如点仔细测试设备以及墙顶或实验室设备的任何形式。例如，设备可作为开放式的或包被式的平台系统被提供。该系统可以基于任何适当的方法，诸如采用微量滴定板、多孔板、流动通过或侧向流动系统、微芯片或基于阵列的系统或者颗粒或者膜系统。采用的检测方法可以包括本领域普通技术人员公知的对免疫化学或核酸检测反应有用的任何方法。例如，这些检测系统可以是发光系统（电发光、生物发光、光致发光、辐射发光、化学发光、电化学发光），荧光系统，导电检测系统，辐射（光，紫外线，X-射线，γ射线等）或者其它任何公知的方法。

在本发明一个实施方式中，用于检测标记物分子水平的方法是任何一种适于检测生物标本中即使是极少量的特定分子的方法。而且，不考虑灵敏度，可应用检测标记物分子的任何方法。例如，根据本发明的检测反应可以包括在核酸水平上的检测反应，和/或在多肽水平上的检测反应。在本发明一个实施方式中，检测标记物分子可以包括检测特定的剪接变异体。在本发明另一实施例中，检测方法可以包括检测标记物分子的变形，如多肽的磷酸化或糖基化等，或者标本中核酸分子的甲基化。

在本发明一个实施方式中，通过检测对标本中存在的标记物分子或其片断编码的核酸的水平来检测标记物分子的水平。核酸分子的检测方法对本领域技术人员来说是公知的。例如，检测核酸的过程可以通过待测分子与互补核酸探针、专门结合核酸的蛋白质或者其它任何特异于识别和结合所述核酸的实体之间的结合反应得以进行。例如，该方法也可以在活体外进行，如同直接在原位检测染色反应一样。根据本发明的方法，在核酸水平上检测标本中标记物分子的另一种方式为核酸的放大反应，其可以定量的方式进行，如聚合酶链反应。在本发明一个实施方式中，例如，实时 RT PCR 可被用于对具有细胞增殖紊乱的标本中标记物 RNA 的水平进行定性。

在本发明另一个实施方式中，通过测定蛋白质表达的水平来检测标记物分子的水平。例如，在蛋白质水平上测定标记物分子可以在包含特异于检测标记物分子的结合剂的反应中进行。例如，这些结合剂可以包括抗体和抗原结合片断、双功能杂化抗体、含有最少的抗原结合表位等的拟肽域。结合剂可以被用于多种不同的检测技术中，例如在西方-墨迹，ELISA，RIA，EIA，流动透过分析，侧向流动分析，胶乳-凝集，免疫色谱测试条或者免疫-沉降。通常情况下，基于检测的结合剂可以在活体外进行，如同直接在免疫细胞化学原位染色一样。根据本发明，

可采用适于测定生物标本溶液中特定的多肽量的其它任何方法。

对本领域普通技术人员而言，测定核酸分子和/或多肽的修饰状态的方法是公知的。

对本领域技术人员而言，测定核酸甲基化作用的方法是公知的，例如可以包括采用亚硫酸氢钠、高锰酸或肼对核酸的化学预处理方法，以及随后通过专门的限制性核酸内切酶，或者通过如在放大反应过程中的特异探针来检测改性。可以采用甲基化特异的限制性核酸内切酶进一步检测甲基化作用。检测核酸中甲基化状态的方法在如专利申请 EP02010272.9，US5856094，WO0031294，US6331393 等中被公开。引用的文献作为参考并入本文。

例如，检测多肽的修饰状态可以包括特异于识别改性的或未修饰状态的多肽的结合剂。可供选择地，如磷酸酯酶或糖基化酶的酶可以被用于消除分子中的改性。因此，在用相关酶培养前和培养后，通过采用电泳、色谱、质谱等测定分子的质量或电荷来检测是否存在修饰。

在本发明另一个实施例中，在多肽水平上检测一系列标记物分子，与此同时，检测另外的一系列标记物分子，和/或在核酸水平上对相同标记物分子的全部或部分进行检测。

例如，与医学相关细胞状况相关的标记物可以是影响和/或反映细胞和/或组织的增殖和/或分化特性的分子。例如，这些分子可以包括细胞周期调制蛋白、与 DNA 复制相关的蛋白、传导膜蛋白、受体蛋白、信号传导蛋白、钙结合蛋白、含有 DNA-结合域的蛋白、代谢蛋白酶、激酶、激酶抑制剂、伴侣蛋白、胚胎发生蛋白、热震蛋白或对其它蛋白质进行改性并在转译后调节其活性的酶，或者对被命名蛋白质编码的核酸。而且，根据本发明，编码被命名蛋白质的 mRNA 可以是有用的标记物分子。在一个实施方式中，与细胞增殖紊乱相关的标记物例如可以唯一地在受紊乱影响的细胞中被表达，在所述细胞中不被表达或者在所述细胞中被过度表达。

根据本发明使用的标记物分子可以包括一个或多个标记物，选自 p13.5，p14，p15，p16（也称作 $p16^{INK4a}$），p19，p21，p27，p53，pRb，p14ARF，细胞周期素 A，细胞周期素 B，细胞周期素 E，MDM-2，MCM2，MCM5，MCM6，CDC2，CDC6，Id1，骨连接蛋白， GRP，肾二肽酶，her2/neu，TGFβII 受体，与 HPV 相关的标记物，例如从 HPV 基因 L1，L2，E1，E2，E4，E5，E6 或 E7 等衍生得到。

在本发明一个实施方式中，表 1 列出用于检测医学相关状态时所选的有用标记物。

在一个实施方式中，医学相关状态标记物可以是肿瘤的标记物（肿瘤标记物）。肿瘤的特征性标记物分子例如可以是蛋白质，其相对于正常控制的组织在肿瘤中以非野生类型方式被表达。本文中所用的非野生类型的表达可以包括增强或减小的表达水平，或者缺少表达，或者相关分子的非野生类型方式的表达。蛋白质的非野生类型方式的表达可以包括蛋白质突变形式的表达，其由于插入、缺失、取代或框架转移突变或者在蛋白质或核酸中任何其它已知的突变类型而引起。在非野生类型蛋白质或者非野生类型蛋白质水平表达的所有情况下，蛋白质、多肽或其片断、或编码这些蛋白质或多肽的核酸，或者这些核酸的片断，可以被用作与肿瘤相关的分子标记物，并且可以被理解为本发明文中所用的术语“肿瘤标记物”。例如，在文献 WO9904365A2，WO0149716A2，WO0055633A2 和 WO0142792A2 中公开了表现出与肿瘤相关的非野生类型表达的蛋白质，其将作为参考并入本文。

在本发明的一个实施方式中，医学相关状态的特征性标记物例如可以是细胞周期调节蛋白质，如细胞周期素，细胞周期素相关的激酶或者细胞周期素相关的激酶抑制剂。在本发明另一实施例中，医学相关状态的特征性标记物分子可以是与暂时的或持续的病毒感染相关的标记物。病毒感染可以包括由人乳突淋瘤病毒（HPV）造成的感染，诸如高风险的或低风险的 HPV。高风险的 HPV 可以包括 HPV 亚型，诸如 HPV16，18，31，33，35，39，45，51，52，56 和 58。用于 HPV 感染的标记物可以包括如 HPV 基因 L1，L2，E1，E2，E4，E5，E6 或 E7 的 HPV 表达产物。在本发明第三种实施例中，病毒感染的特征性标记物可以与医学相关状态的任何其它标记物结合使用，例如与细胞周期调节蛋白结合使用。与 HPV 结合特别相关的标记物分子的结合，例如在 WO0208764 中被公开，该文献将作为参考并入本文。

在一个实施方式中，用于与 HPV 标记物结合的细胞周期调节蛋白例如可以从含有 pRb，p53，p14ARF，细胞周期素相关的激酶抑制剂的组选出。在一种特定实施例中，例如，$p16^{INK4a}$ 可用于与 HPV 感染的标记物结合（如 L1，L2， E2，E4，E5，E6 或 E7）。

必须理解，如该情况所示，在某种实施例中作为医学相关状态标记物的有用标记物在另一种特定实施例中可作为标准标记物，并且，反之亦然。然而，在每个单独的实施例中，一种标记物只能要么作为医学相关状态的标记物，要么作为

标准标记物。例如，作为细胞增殖标记物的 Ki67，可以在某种实施例中作为有用的标准标记物（例如与 p16，p14ARF，claudin-1 或者其它医学相关状态标记物结合使用），在其它实施例中，Ki67 与合适的标准标记物结合（如细胞角蛋白、连接素或其它），可作为医学相关状态的标记物（例如，作为子宫颈发育不良或者其它发育不良疾病的标记物）。同样地，其它多种标记物要么作为医学相关状态标记物，或者要么作为标准标记物，这取决于特定的应用实例。

根据本发明，标准标记物例如可以包括保管基因，如肌动蛋白，gapdh，组蛋白，磷脂酶，β2- 微球蛋白，与活性细胞增殖相关的蛋白，如 Ki67，PCNA 或抑制素，或者特定细胞类型的特征蛋白质，诸如在上皮细胞中的 CK20 或者任何细胞特异的细胞表面抗原。此外，糖蛋白上出现的碳水化合物结构，蛋白多糖，如刀蛋白 A 受体的外源凝集素受体，粘液素和在这些分子的生物合成中涉及的酶，如 GalNac 转移酶以及寡糖转移酶，也可作为标准标记物。标记物蛋白的类型必须根据标记物所提供的信息而被选择。原则上而言，在某种情况下，对特定的医学相关状态有用的标记物可作为有用的标准标记物。在实施根据本发明的方法时，所选的有用标记物列在表 1 中。

医学相关状态的标记物以及分子修饰状态的标准标记物（诸如多肽和核酸），在根据本发明的方法中可以被用作标记物。例如，磷酸化、糖基化或其它改性多肽、或者甲基化的核酸可以在根据本发明的方法中作为标记物。

根据本发明所用的标准化应当包括任何适于将标记物的检测水平与对评价检测有价值的参数进行相关的方法。这种标准化的一个方面可以通过在标本溶液中可检测的合适的分子标记物，对包含在原始标本中的相关的细胞学和组织学信息重组。例如，标准化可以包括检测标本中存在的细胞总数，标本中是否存在特定的细胞类型，标本中是否存在生物或生物的细胞，标本中是否存在具有特定细胞类型的细胞或生物的数目，标本中存在的细胞的增殖特征或者标本中存在的细胞的分化模式。

在某种实施例中，标准化也可以包括提供足够的测试，如该情况所示，不适当的测试结果可以被去除，或者归类为无效结果。因此，本发明文中所用的标准化可以包括用于标准化的定量和半定量方法。在某种实施例中，半定量的标准化可以包括为标准标记物测定阈值。在一个实施方式中，半定量的标准化例如可以按照如下方式被应用：只有当标准标记物的水平超出限定的阈值时，测定的相关

标记物的水平可以被视为一种有效的测试结果；在未达到阈值的情况下，相关标记物的测试结果视为无效；根据这种测试不能对检测进行评价。在另一个实施方式中，阈值可以被设成不可能被超过的值。在某种实施例中，根据是否存在标准标记物进行定量标准化。例如，在那些情况下，将相关标记物的测定值与是否存在标准标记物进行比较，这是由于预定值仅在达到标准参数（是否存在可检测的标准标记物水平）的情况下是有效的。

表 1

标记物	细胞类型	抗原	抗体	供应商	文献
细胞类型	上皮细胞	人上皮细胞表面糖蛋白	HEA125 IgG1(W,IHC,ICC,IF)	研究诊断有限公司	Kommoss et al., Hum Pathol.2000 Sep;31(9):1055-61
		人上皮增殖40kD蛋白(来自LoVo)	AUA-1 IgG1 (Elisa)	研究诊断有限公司	Gottschalk et al,Pathol Res Pract,1992 Feb; 188 (1-2):182-90
		人上皮抗原（34+39KD）	Ber-EP4,IgG1 (IHC,Elisa)	DaKo	Latza U et al.,J.Clin. Pathol. 1990 Mar; 43(3) : 213-9
		人上皮增殖抗原（40KD）	AUA-1(Elisa,W, IHC)	研究诊断有限公司	Epenetos, A et al., Lancet. 1982 Nov 6; 2(8306):1004-6
	子宫颈内柱状细胞	细胞角蛋白18（45kD）	RGE53, IgG1 (W, IHC, IF)	研究诊断有限公司	Smedts F et al., Am J Pathol.1990 Mar;136(30:657-68
		细胞角蛋白18（45kD）	RCK106 (W, IHF, IHC)	研究诊断有限公司	Smedts F et al., Am J Pathol.1990 Mar;136(30:657-68
		细胞角蛋白18（45kD）	CAM 5.2 (W, IHC)	BD PharMingen	Smedts F et al., Am J Pathol.1990 Mar;136(30:657-68
	子宫颈内柱状细胞	粘液素抗原(Tn, STn, MUC 1, MUC2)	DF3	Centocor	Tashiro et al., Hum Pathol.1994 Apr;25(4):364-72
	子宫颈内柱状细胞	刀豆素A受体			Herckenrode et al., Br J Cancer.1988 Mar; 57 (3)293-4; Koch et al., Br J Cancer. 1986 Jan; 53 (1):13-22
	子宫颈内的	GaLNac 转移胺 寡多糖转移胺			Chilton et al., Endocrinology.1998Sep;123(3):1237-44
	子宫颈内/子宫颈外	外源凝集素（ConA, WGA, PNA, UEA I, DBA, SBA, SNA）			Di Loretto et al., Basic Appl Histochem. 1987; 31(2):143-52; Versura et al., Basic appl Histochem. 1988; 32(2):219-27
	子宫颈外鳞状细胞	Plakophilin（80.5kD）	PP1-5C2 , IgG1(W,Elisa,IHC,IF)		Heid,HW,Differentiation.1994 Dec;58(2):113-31

	子宫内膜细胞	波形蛋白	VIM 3B4, IgG1 (W,ELISA,IF,IHC)		Smedts F et al., Am J Pathol.1990 Mar;136(30:657-68
	红血球	血红蛋白	RDI-CBL63, IgM (RIA, EIA)	研究诊断有限公司	Smith et al., J. Histochen . Cytochem. 1998
发炎	嗜中性的有粒细胞 NK-细胞 巨噬细胞	CD16 (NK, Macro, Gran)	DJ130-c, IgG1 (IHC)	DIANOVA	Grundhoever D 和 Patterson BK, Cytometry 2001; 46: 340-344
		CD56 (NK)	克隆 Ki-M6		Hermann et al., J.Clin. Immunol. 1990
		CD68 (Macro)	(抗 CD68)		Cavayal et al., Eur.J. Immunol:1998(6)1991-2002(CD56)
	B-细胞	CD19 (CD20)	克隆 AE1, FACS	DIANOVA	Harrada et al., Blood 1993;81:2658-63 (CD19) Mason et al., Am.J. Pathol 1990;136:1215-22(CD20)
	T-细胞	CD3(panTcell) (CD4); (CD8)	克隆 CRIS-7 抗 CD3); IF, IHC, WB	DIANOVA	Jones et al.,J Immunol 1993;150:5429-35
肿瘤细胞	发育不良的和新生肿瘤的子宫颈细胞	$P16^{INK4a}$	E6H4, D7D7	MTM	Klaes R et al., Int I Cancer.2001 Apr 15; 92(2):276-84
	不同的癌症细胞类型	P53 (变异)			Mendoza-Rodriguez CA, et al., Rev Invest Clin 2001 May-Jun;53(3):266-73
	腺癌细胞	CEA			Mistretta et al., Experientia. 1974 Oct 15;30(10):1209-10;Rogers et al.,Eur J Cancer Clin Oncol.1984 Oct;20(10):1279-86
	膀胱癌细胞	NMP22, BTA			Van der Poel HG et al., Curr Opin Urol,11,503-509,2001
	肺癌细胞	PreproGRP			Hamid et al., Cancer,63,266-271,1989.Pagani et al., Int.J.Cancer 47,371-375,1991
增殖	所有的增殖细胞	PCNA Ki67	Pc10, IgG2a	Zyrned	Waseem NH,Lane DP,J Cell Sci 1990 :96: 121 (PCNA) Cattoretti et al., J Pathol1992:168:357-63(Ki67)
传染剂	HPV16	E6	BF7, IgG1 (IHC 以及在子宫颈拭子的测试试剂盒中)	研究诊断有限公司	Iftner et al., J Virol. 1988 Oct;62(10):3655-61
		L1	Cam Vir-1, IgG2a(IP, W, IF, IHC)	研究诊断有限公司	Browne L et al., J Gen virol.1988 Jun;69(Pt6):1263-73
	HPV18	L1	RDI-HPV18-5A3, IgG1(W, IHC)	研究诊断有限公司	Iftner et al., J Virol. 1988 Oct;62(10):3655-61
	HPV6, 11, 18		RDI-HPVX-4C4	研究诊断有限公司	Iftner,et al., J Virol. 1988 Oct;62(10):3655-61 Gouillou et al., Am.J. Surg.Pathol.,1991

根据本发明，标准化可以包括测定标本中是否存在所研究的（人）细胞数目。这是本发明的关键方面。特别是，在实施例中，如果测试过程证实测试标本中含有对进行特定的测试很重要的物质（例如，细胞，组织或生物等），只有错误的（尤其是假阴性）结果可以被避免。在不同的测试中，这包括确定标本中含有细胞。在本发明宽范围的实施例中，标本的足量确认将不仅仅包括确定细胞的存在，也包括测定具有不同来源或特定细胞类型的细胞的存在。

因此，标准化也可以包括测定具有特定来源的细胞，诸如来自于一种特定器官或者一种特定的组织区域的细胞，例如检测上皮细胞不同区域的细胞，或者连接组织的细胞，来自组织基底薄片的细胞，或者不同来源的细胞，诸如移位细胞。这在特定的情况下是必要的，在某种情况下，因为细胞可能表达一种标记物，该标记物在某种正常情况下可用于检测医学相关状态，如新生肿瘤或发育异常。根据本发明所用的标准化可以包括检测是否存在任何细胞类型和/或其水平，那可能会影响所选用于检测医学相关状态特征性标记物的总水平。

在一个实施方式中，该方法可以被应用于检测子宫颈损伤。子宫颈损伤可以包括任何类型的子宫颈发育不良，诸如上面定义的子宫颈癌症以及癌症前期状况。例如，用于检测目的的有用标记物和其组合物在 WO0208764 和 EP1217377 中被公开，该文献作为参考将并入本文。在该实施例中，采用任何适当的子宫颈区的标本进行测试。例如，标本可以包括子宫颈的活检标本或微量的活组织切片，或者是取自子宫颈区域的拭子。例如，这里所用的子宫颈拭子为通过采用如刷子、棉球、调药刀等适当的设备而获得的标本，其在采样过程中与子宫的子宫颈相连。采样设备可以是任何一种适当的设备，可用于由内科医师进行的常规测试中，或是一种自我采样设备。

为了增强对子宫颈拭子的评价，具有应用前景的分子标记物例如是 $p16^{INK4a}$，p14ARF，细胞周期素 E，细胞周期素 A，细胞周期素 B，MN，her2/neu，mdm-2，bcl-2，EGF-受体，mcm-2，mcm-5，claudin-1，指示人乳突淋瘤病毒感染的标记物，pRb，p53 等。其可被用于检测新生的或发育异常的细胞。为分析子宫颈拭子，根据本发明的标准化可包括检测人细胞的存在，检测子宫颈上皮细胞，检测子宫颈内和子宫颈外细胞的存在以及检测子宫内膜区域的细胞。子宫颈内上皮细胞为腺性柱状上皮细胞。来自于子宫颈内的细胞可以被标记物鉴定，其选择性地被柱状上皮细胞或者腺性上皮细胞中的细胞表达。子宫颈外上皮细胞为鳞状上皮细胞。

通过检测鳞状上皮细胞的特征性标记物来确定子宫颈外的上皮细胞。在某种实施例中，检测上皮细胞（包含鳞状以及柱状上皮细胞）就足够了。在其它实施例中，区分特殊的子宫颈内细胞可能是关键的。确定标本中存在子宫颈内和子宫颈外细胞是关键一步，以确定样本取自子宫颈变形区域，大多数发育不良和新生肿瘤在那里发生。如果没有这些细胞，对检测过程而言标本是不足量的，这是由于容易给出假阴性结果。由于 $p16^{INK4a}$ 在正常的子宫内膜细胞中可以被表达，根据子宫内膜细胞的数量对 $p16^{INK4a}$ 的表达水平标准化可能是必要的。

为了能够进行可靠的检测，标准化可以进一步包括测定标本中是否存在 被命名的细胞组分，此外还要检测特定的细胞类型或其片断的总水平，因为特定的细胞类型对标本中的细胞总量有影响。

因此，在一个实施方式中，测定的 $p16^{INK4a}$ 蛋白水平可以被标准化到由特定标本所代表的细胞状况，因此人们可以断言，如果测定的 $p16^{INK4a}$ 蛋白水平可指示子宫颈细胞的 $p16^{INK4a}$ 过度表达，或者如果标本中有足量的子宫内膜细胞，因此就能模拟 $p16^{INK4a}$ 的过度表达。在这个方面，标准化可以包括根据分子标记物来测定子宫颈标本中子宫内膜细胞的数量。将在子宫颈标本中测定的作为医学相关状态标记物的 $p16^{INK4a}$ 的水平与由分子标记物估计的子宫内膜细胞的数量进行比较，人们就可以判断，p16 的总数是否仅由标本溶液中存在的子宫内膜细胞而引起。因此，在检测子宫颈发育不良的 $p16^{INK4a}$ 过度表达时，由于存在高水平的子宫内膜细胞而导致的假阳性结果可以被排除。本发明文中所用的量可以指定量或半定量评价。例如，这可以包括细胞总数的评价，对与细胞总数相关的片断的评价。在本发明某种实施例中，量的测定可以指对细胞的特定类型有影响的综合标记物水平中的部分进行评价。

为了提供一种用于估价子宫颈样本的标准标记物，有几种标准标记物看起来是有用的并可以选自：例如，细胞角蛋白，E-钙粘着蛋白，包壳总苞，尿激酶状的血纤维蛋白溶酶原激活剂，SCCA（鳞状细胞癌抗原），连接素（例如，α-连接素，β-连接素，γ-连接素（血小板球蛋白）），Ep-Cam。

由于具有对子宫颈标本定性的特征，对几种候选的标准标记物进行了检测。结果在表 2 和表 3 中给出。

表 2

名称	组织学/细胞学	临床/生化数据	文献
UPA-1	子宫颈组织	↑在子宫颈 CA	Horn L C Aust N Z J

（尿激酶类的血纤溶酶原激活物；Swissprot 登记号 P00749；也称为 EC 3.4.21.73，U-血纤溶酶原激活物 uPA）	正常的上皮显示出存在 t-PA 和 u-PA，免疫反应仅出现在细胞的表面层，然而，在进攻前的损伤中，存在于所有层。		Obstet Gynaecol,2002 Larsson G Thromb.Haemost.1987
PAI-1 （血纤溶酶原激活物抑制剂 1；Swissprot 登记号 P05121；也称为 PAI-1 内皮的血纤溶酶原激活物抑制剂 PAI；异形体：PAI-2 P05120 和 PAI-3 P05154）	子宫颈组织 正常的上皮显示出存在 t-PA 和 u-PA，免疫反应仅出现在细胞的表面层，然而，在进攻前的损伤中，存在于所有层。	↑在子宫颈 CA 阳性的预后性标记物	Horn L C Aust N Z J Obstet Gynaecol,2002 Larsson, G Thromb.Haemost.1987
包壳总苞 （Swissprot 登记号 P07476）	只有鳞状上皮，没有柱状细胞；未成熟的和成熟的鳞状变形组织细胞。 在正常的上皮中，首先在上部的棘层中被表达，在角质形成细胞中被具有左基础层的所有细胞表达	包壳总苞表达在鳞状细胞癌以及癌前病变中为异常的，并且在严重的喉和子宫颈发育不良中降低。用于末端区分的标记物	Shirley A, Human Pathology , 2001 De Boer et al., 1999, Am J of Pathol, 155: 505-515 Nair SA, Pathobio- logy, 1996
γ-连接素 （Swissprot 登记号 Q86W21；也称为血小板球蛋白；例如表位：C-端；AA553-738）	鳞状上皮	在正常子宫颈上皮的细胞-细胞边界处高。在高度的 SILS 中中度降低	De Boer et al., 1999, Am J of Pathol, 155: 505-515
α-1 连接素 （Swissprot 登记号 P35221；也称为与钙粘着蛋白相关的蛋白；αE-钙粘着蛋白）	鳞状上皮	在正常子宫颈上皮的细胞-细胞边界处高。在高度的 SILS 中强烈的降低	De Boer et al., 1999, Am J of Pathol, 155: 505-515
α-2 连接素 （Swissprot 登记号 P26232；也称为α-连接素相关的蛋白；αN-连接素）			
β-连接素 （Swissprot 登记号 P35222；也称为 PRO2286）	鳞状上皮	在正常子宫颈上皮的细胞-细胞边界处高。在高度的 SILS 中强烈的降低	De Boer et al., 1999, Am J of Pathol, 155: 505-515
粒桥蛋白 （Swissprot 登记号 P15924；也称为 DP250/210 kDa 肿瘤形成征兆的天疱疮抗原）	层状上皮，简单的上皮，含有腺、膀胱上皮、胸腺的网状上皮、肝细胞，心肌和脑膜的蛛网膜细胞嵌入的风险，子宫颈的超基础层（表层细胞为很大的阴性）	↓在 HSIL 区域	De Boer et al., 1999, Am J of Pathol, 155:.505-515

↓：下调；↑：上调；

表 3

标记物	组织学的测试	细胞学的测试	Western 印迹分析（临床标本刚用 MTM 缓冲液溶解）
E-钙粘着蛋白 （Swissprot 登记号为 P12830；也称为 Uvomorulin，钙粘着蛋	鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞） 无柱状上皮	接近基础的、中间的细胞，无柱状细胞	对 HT-29 只有弱信号。所有临床标本都是阴性的

-1，CAM120/80；例如表位：C-端；AA735-883）			
P120（Swissprot 登记号为 O60716；p120 连接素，p120（ctn），与钙粘着蛋白相关的 Src 基质，CAS，p120（cas）；例如表位：C-端；AA790-911 ）	鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞） 在柱状上皮中也非常强	接近基础的、中间的细胞非常强的染色 很强的柱状细胞	只有阴性控制（淋巴细胞）和阳性对照（C4.1）为阳性的
γ-连接素（Swissprot 登记号为 Q86W21；也称为血小板球蛋白；例如表位：C-端；AA553-738）	鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞）无柱状上皮，所有的上皮被染色未发育不良	接近基础的、中间的细胞非常强的染色 无柱状细胞	标本的 60%为双带（82/95kD）；在用丙酮沉降 150μl 标本后：87%（13/15）为阳性
Ep-Cam（与肿瘤相关的钙信号转换器 1，Swissprot 登记号为 P16422；也称为与大胃肠肿瘤相关的蛋白，GA733-2，上皮细胞表面抗原，上皮细胞糖蛋白，EGP，与腺癌相关的抗原，KSA KS 1/4 抗原，细胞表面糖蛋白 Trop-1）	在非常高的浓度时有很强的柱状上皮，而不是鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞）的非特定（细胞质的）染色	在非常高的浓度时有很强的柱状细胞，而不是鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞）的非特定（细胞质的）染色	
包壳总苞（Swissprot 登记号为 P07476）	鳞状上皮（接近基础的、中间的细胞）和柱状上皮的强染色；基质细胞的非特异性染色	所有细胞和结构都是阳性的	

例如，标准标记物可被用于指示存在特定细胞分化分化模式的标记物，如末端分化或者作为特定的上皮细胞分化。在某种实施例中，标准标记物可以是鳞状上皮细胞的特征性标记物分子，例如可指示子宫颈标本中存在子宫颈外细胞。例如，适当的标记物可以包括 CK13，E-钙粘着蛋白，γ-连接素，或包壳总苞。在另一个实施方式中，标记物可以具有指示存在柱状上皮细胞的特性，指示标本中存在子宫颈内细胞。适当的标记物包括：Ep-Cam，CK18，CK8。

在某种实施例中，标准化通常可以包括检测上皮细胞；在这些情况下，可以采用任何适于检测上皮细胞的标记物。例如，标记物可以是表 2 和表 3 中所给出的。

在本发明另一个实施例中，这里公开的方法可用于检测呼吸道的紊乱。在检测小细胞肺癌时，检测神经细胞特定烯醇酶（NSE）是一种采用的标记物。肿瘤样本的标本通过支气管镜检产生，并通过刷子或气管肺泡灌洗收集细胞。由于 NSE 也在肺内少数几种正常细胞中被表达，在溶解的标本中检测到的 NSE 的表达水平必须根据标准标记物（例如肌动蛋白）而设定，以检测标本中存在的细胞量。

本发明第三种实施例为检测胃肠道的损伤，例如粪便标本中的结肠直肠损伤。

在这种情况下，在粪便标本中可检测的指示性核酸和/或多肽的来源可能对于评价检测很关键。根据本发明，测定所采用的标记物分子的来源（细胞类型/生物）是可能的。因此，可以消除基于来源于个体消化的粮食中的标记物分子检测的错误结果，而不是来自胃肠道的粘膜损伤。而且，可以通过采用本文公开的方法消除由于血液循环或源于吞咽的唾液等中存在痕量标记物而产生的人工痕迹。

本发明另一方面为一种测试试剂盒，用于实施根据本发明的方法。例如，该试剂盒可以是检测试剂盒、分析试剂盒或研究试剂盒。

根据本发明所用的术语试剂盒可以包括试剂盒以及检测设备。试剂盒或设备可设计成用于 ELISA（例如，夹心的，竞争性的，非竞争性的等），EIA（竞争性的，非竞争性的等），RIA 测试，基于颗粒的测试系统，侧向流动分析，流动透过分析，测试条测试分析，浸量尺分析，或者其它任何已知的实验室的、台式或监护测试点形式。在某种实施例中，根据本发明的试剂盒可以包括用于实施检测测试的活体外检测设备。例如，活体外检测设备可以是本领域技术人员公知的任何一种类型的ELISA 设备。这些设备包括用于夹心ELISA 形式、用于竞争性的ELISA 形式和其它任何 ELISA 形式的设备。在另一个实施方式中，活体外检测设备可以是一种侧向流动分析设备，或者是一种流动透过分析设备，例如采用至少一种结合到医学相关状态的特征性标记物上的试剂，以及一种结合到标准标记物上的试剂，两者都固定到固定相上。为了将测试结果可视化，这些设备可以采用多种机构。在某种实施例中，可采用抗耦合到可检测部分的标记物分子的二级检测试剂进行测试。该可检测的部分可以包括胶体金，（有色的）乳胶颗粒以及其它物质。

在另一个实施方式中，活体外检测测试设备可以是基于毛细管或多孔膜（诸如膜、颗粒或其它多孔物质的三维排布）的流动透过分析设备。需要根据实施例来调整孔的尺寸或毛细管，以确保最佳的流动条件。

根据本发明的试剂盒，可以包括

a）检测标记物分子的试剂，

b）用于进行检测反应的常用试剂和缓冲液，诸如缓冲液，检测-标记物，载体物质以及其它，

c）一种或多种标记物和/或代表待检测的医学相关状态的标本，用于进行阳性和/或控制反应，以及

d）一种或多种标准标记物标本，用于进行阳性和/或控制反应。

优选的测试试剂盒可以包括用于溶解原始标本的溶解缓冲液。一般地，溶解缓冲液可以是本领域技术人员公知的任何适当的溶剂。例如，该试剂盒中所用的溶解缓冲液可以是高离液序列试剂的水溶液，如尿素、GuaSCN、甲酰胺，洗涤剂，如阴离子洗涤剂（例如，SDS，N-十二烷基肌氨酸，去氧胆酸钠，烷基-芳基磺酸盐，长链（脂肪）醇的硫酸盐，烯烃的硫酸盐以及磺酸盐，α烯烃的硫酸盐以及磺酸盐，硫酸盐化的单甘油酯，硫酸盐化的醚，含硫的琥珀酸盐，烷烃磺酸盐，磷酸酯，烷基羟乙基磺酸盐，蔗糖酯），阳离子洗涤剂（例如，十六烷基三甲基氯化铵），非离子洗涤剂（例如，吐温-20，Nonidet P-40，Triton X-100，NP-40，Igepal CA-630，N-辛基-糖甙）或两性洗涤剂（例如，CHAPS，3-十二烷基-二甲基胺-丙烷-1-硫酸盐，十二烷基二甲基胺氧化物）和/或碱的氢氧化物，如 NaOH 或 KOH。

溶解缓冲液的实例在表 4 中给出。

表 4

细胞溶解缓冲液	在 Western 印迹中 $p16^{INK4a}$ 的溶解性	与 ELISA 的兼容性
清洁剂：		
0.1-1%SDS	+	+/-
0.2-3%SDS	+	<0.5%
0.2-3%DOC	++	+/-
0.1-1%n-辛基配糖	+	是
0.1-3%Triton x-100%	+	是
0.1-1%Chaps	+	nd
清洁剂-混合：		
RIPA（1%NP40，0.5%DOC，0.1%SDS，PBS）40-100%	++	是
SOX（0.5%DOC，0.5% n-辛基配糖）40-100%	+	是
mtm 溶解缓冲液（3%Tritonx-100，0.4%SDS，PBS）	++	是
商用细胞溶解缓冲液：		
Dynal（Dynal，Oslo，Norway）	++	是

M-PER/B-PER（Pierce，Rockford，1L）各种的：	++	是
PBS 中含有 0.5-8M 尿素	+++	相容的<2M
Lammli 标本缓冲液	+++	否
10-80%DMSO	+++	否
10-80%甲酰胺	nd	否
50-70%甲酸	++	否
PBS	+/-	是
pH6.0 的柠檬酸盐缓冲液	+/-	是
在磷酸盐缓冲液含有 500mM NaCl	+/-	是

nd：不能检测；：+/-：弱；+：好；++：很好；+++：非常好；

溶解缓冲液可以进一步包括一种或多种可防止原始标本中组分降解的试剂。例如，这些组分可以包括酶抑制剂，如蛋白酶抑制剂、RNAse 抑制剂、DNAse 抑制剂等。抑制剂可以包括蛋白酶抑制剂，由表 5 给出的组分中选出。在某种实施例中，溶解缓冲液通过提供一种降解抑制剂而能够检测标本中的 p16。在某种实施例中，糖相关激酶抑制剂 p16 在溶解的标本中降解，并因此不被检测。如果标本直接转移到溶解介质中并在其中储藏一段时间的话，这是特别明确的。

表 5

抑制剂	抑制的蛋白酶的类别	浓度	在水中的溶解度	在水中的稳定性
抑肽酶	丝氨酸	0.6-2μg/ml	很好	好
苯甲脒	丝氨酸	0.5-4mM	好	好
抑氨肽酶 B	氨基肽酶	1-10μM	好	好
Calpeptin	半胱氨酸	0.3-1μM	好	好
半胱氨酸蛋白酶抑制剂	半胱氨酸	1μM	好	好
E-64	半胱氨酸	1-10μM	好	好
EDTA	金属	0.5-5mM	好	好
Elastatinal	丝氨酸	0.5-2μg/ml	弱	好
EST	半胱氨酸	20-50μg/ml	差	弱

胎儿的血清	小牛的所有种类	10%	好	好
亮抑肽酶	丝氨酸/半胱氨酸	10-100μM	好	好
α2-巨球蛋白	所有的种类	1μM	好	好
NCO-700	半胱氨酸	0.5-100 mM	弱	弱
Pefabloc= AEBSF	丝氨酸	0.2-10μM	好	很弱
胃酶抑素 A	天冬氨酸	1μM	差	弱
PMSF	丝氨酸	0.2-10μM	差	很弱
o-菲咯啉	金属	1-10 mM	差	弱

为了稳定，溶解缓冲液也可以包括大体积的蛋白（例如白蛋白，诸如牛血清白蛋白或小牛血清白蛋白或其它大体积的白蛋白）以便在降解中与标本中的蛋白竞争。例如，大体积蛋白质可以与蛋白酶抑制剂结合而存在，或者代替蛋白酶抑制剂而被加入。在一个实施方式中，溶剂可选自与测试性能（EIA，ELISA 或试纸条测试性能）兼容的试剂，以使溶解的标本可以直接用于测试。文中所用的测试可以包括任何用于检测是否存在和或标记物分子水平的过程。

用于检测标记物分子的试剂可以包括任何能与标记物分子结合的试剂。这些试剂可包括蛋白质，（多）肽，核酸，肽核酸（PNAs），糖蛋白类，蛋白聚糖，多醣或类脂。

例如，医学相关状态的特征性标记物和/或用于进行阳性和/或阴性控制的标准标记物标本可以包括如溶液或盐的可应用形式的核酸，可应用形式的肽，组织切片标本，微生物或阳性或阴性细胞系。

在本发明的一个实施方式中，在多肽水平上检测标记物分子。在该实施例中，结合剂可以是例如特异于标记物分子或其片断的抗体。而且，结合剂可以包括抗原结合的片断，诸如 Fab 片断，单链抗体，双功能杂化抗体，含有最少抗原结合表位的拟肽等。而且，结合剂可以是结合到标记物分子上特定碳水化合物结构的外源凝集素。

在测试试剂盒的另一个实施方式中，在核酸水平上进行标记物分子的检测。在本发明的这种实施例中，用于检测的试剂例如可以是核酸探针，或者是反补到所述标记物核酸上的引物。

下面给出的实例仅仅为了进行解释说明，并非是用于限制这里所公开的本发明

的范围。

实施例

实施例 1：特异子宫颈切片中的子宫颈内和子宫颈外上皮细胞的免疫组织化学特异性检测

为了对可指示子宫颈拭子是否足量的标记物进行评价，子宫颈切片（固定在 4%的甲醛溶液中并由石蜡包埋）用抗-细胞角蛋白 18（子宫颈内柱状上皮细胞的标记物）和抗-细胞角蛋白 10/13（子宫颈外鳞状上皮细胞的标记物）的抗体染色。图 1 显示出专门用抗-细胞角蛋白 18 抗体对子宫颈内上皮细胞进行的特异性染色以及专门用抗-细胞角蛋白 10/13 抗体对子宫颈外上皮细胞进行的特异性染色。试验过程如下：

由福尔马林固定、石蜡包埋的切片在二甲苯浴中去除石蜡 5min（重复该步骤一次），敲掉过量的液体并将载玻片在 95-96%乙醇中放置 3（±1）min，在 70%乙醇中放置 3（±1）min（重复该步骤一次），最后在蒸馏水中至少放置 30 秒。为了恢复表位，将载玻片放在科普林缸内并在 pH6.0 的 10mM 柠檬酸盐缓冲液中于 95-99℃沸腾 40min。允许载玻片在该缓冲液中于 RT 时冷却 20min（±1min）。用过氧化酶-包被剂（3%H_2O_2; NaN_3 15mM）覆盖载玻片,并于 RT 时培养 5（±1）min。5min 后，在洗涤液中冲洗，载玻片用一抗（CK10/13：DE-K13，1：50，DAKO；CK18：K18.7，1μg/ml，dianova）培养 30min。之后，载玻片用清洗液洗涤，并于 RT 时用清洗液冲洗 5min。用 EnVision（使用抗-鼠辣根过氧化酶络合物；DAKO）培养 30min 后，载玻片被冲洗 3×5min，并在 DAB 基质中培养 10min，用苏木精复染并用 Faramount 封片剂封片。

在免疫组织化学染色过程中，采用抗-细胞角蛋白 18（CK18）的抗体，在子宫颈内膜的柱状上皮细胞上检测到阳性反应（图 1A），然而，子宫颈内膜的鳞状上皮细胞却未表现出专门的染色（图 1B）。采用抗-细胞角蛋白 10/13（CK10/13）的抗体进行免疫组织化学染色时，在子宫颈内膜的柱状上皮细胞未表现出染色（图 1C），然而，在子宫颈内膜的鳞状上皮细胞却表现出很强的染色（图 1D）。因此，CK18 可被用于检测子宫颈内膜的柱状上皮细胞的特异标记物，CK10/13 可被用于检测子宫颈内膜的鳞状上皮细胞的特异标记物。

实施例 2：子宫颈拭子溶解标本的 Western 印迹分析

为了评价对溶解标本的 Western 印迹分析是否可允许对子宫颈损伤的检测进行评估，以标记物分子为基础，将材料溶解后，对具有已知检测结果的临床标本进行免疫化学分析。

采用如下的标准 Western 分析法对临床材料（子宫颈拭子）标本进行分析。

简言之，在第一步，超声处理前，通过沸腾（5min，95℃）将临床材料溶解在 Lammli 蛋白质标本缓冲液（100mM Tris pH 6.8, 2% SDS, 200mM DTT, 0.05% BpB）中。在第二步，将蛋白质标本溶解在 SDS-PAGE（12% 的丙烯酰胺），随后，通过槽印迹方法（Towbin,et al.,1979,Proc Natl Acad Sci:76:4350-4354）转移到硝化纤维膜上。接着，膜被包被以防止非特定的抗体结合(在 PBS 中， 10%的非脂肪干牛奶)，并且随后用特定的单克隆鼠抗体（CK8:35βH11, 1:100, DAKO; $p16^{INK4a}$:D7D7, 1:140, MTM 实验室）进行培养。通过辣根过氧化酶共轭的二抗（结合到标记物特异抗体上）催化发光物质而使特异抗体的结合可视化的。

细胞角蛋白 8（CK8）用作子宫颈外细胞特异特异标记物，可指示在当前实验中所收集的标本是否足量。细胞周期素相关的激酶抑制剂 $p16^{INK4a}$ 被用作与特定疾病相关的标记物。

图 2 给出了当前的实验结果。数字 1-4 代表从单个病人获得的标本（子宫颈拭子）。采用抗细胞角蛋白 8（CK8）的特异特异抗体和抗 $p16^{INK4a}$（p16）的特异抗体进行免疫检测。1、2 和 3 号病人的标本对 $p16^{INK4a}$ 未表现出信号。这就意味着在这些标本中不存在发育不良的子宫颈细胞。4 号病人的标本对 $p16^{INK4a}$ 表现出很强的信号。这就表明在该标本中存在发育不良的子宫颈细胞。上面的带子表明了细胞角蛋白 8 的特征信号。在 1、3 和 4 号标本中检测到细胞角蛋白 8，然而，在 2 号标本中未观察到信号。这表明子宫颈内柱状细胞存在于 1、3 和 4 号标本中，2 号标本中不存在。由于存在子宫颈内柱状上皮细胞为子宫颈拭子足量的一个参数，2 号标本被认为不足量，从 $p16^{INK4a}$ 检测的阴性结果中不能得出检测结果。1、3 和 4 号标本被认为是足量的。因此，基于 1 和 3 号标本对 $p16^{INK4a}$ 的阴性信号，可以得出这些病人没有子宫颈发育不良的结论。4 号标本对 $p16^{INK4a}$ 表现出阳性信号，表明在该病人中存在发育不良的子宫颈损伤。

对拭子的平行细胞学分析表明 1 和 3 号妇女具有正常的细胞成分。在 2 号妇女中，由于细胞材料稀少而不能获得检测结果。在 4 号妇女中，检测出严重的发

育不良。应当指出的是，上面的带子（CK8）指的是子宫颈内细胞特异标准标记物细胞角蛋白 8，暗示出标本收集足量。下面的带子暗示出与标记物 $p16^{INK4a}$ 相关的特殊疾病。对于 4 位病人，印迹法对 $p16^{INK4a}$ 呈阳性信号，与严重的子宫颈发育不良一致。1 和 3 号病人仅表现出 CK8 的特征带，暗示出标本收集适当，但没有与疾病相关的标记物（$p16^{INK4a}$），这与正常的、健康的子宫颈上皮细胞一致。2 号病人的标本未表现出 CK8 信号，这与该标本中细胞数量较低一致，因而从 $p16^{INK4a}$ 的阴性信号中不能得出检测结果。

实施例 3：为证明标本足量而进行 Western 印迹和 ELISA 分析

为了评价不同于标本检测结果的溶液分析结果是否可能是由于标本不足量而引起，对具有已确定的检测结果（根据 Pap IVa 和 Pap IVb 细胞学检测，患有严重的子宫颈内上皮发育不良）的四位不同病人的子宫颈拭子进行了 Western 印迹分析。抗 $p16^{INK4a}$ 的抗体被用于指示存在发育不良的细胞，然而，抗 CK18 和 CK10/13 的抗体被用于证明标本足量。

Western 印迹分析过程如下：用子宫颈刷收集病人标本（1×10^7 细胞/ml）并直接溶解在 Laemmli 标本缓冲液（2% SDS,60mM Tris pH 6.8, 100mM , 0.01%，DTT）中，随后于 95℃时进行超声处理 5min（5×5 秒脉冲，最大强度）。在微型离心机中将溶解产物于 16，600xg 下离心 12min，上清液转移到一个新的试管中。加入预制的 4-20%的线性梯度丙烯酰胺凝胶（标准系统，Bio-Rad）和 10μl（10^5 细胞）全部的细胞提取物，蛋白质在 25mA 恒流下分离 45min。采用 Bio Rad 标准印迹装置（在 100V 的恒电压下进行 15min，随后在 50V 的恒电压下进行 45min），通过标准的罐印迹，将蛋白质从凝胶转移到 Hybond ECL 硝酸纤维素膜（Amersham）上。将硝酸纤维素膜在 Ponceau S 溶液中染色 5min 以确保蛋白质转移。通过在 PBS 中冲洗 2 次，每次 10min 而去除 Ponceau S 溶液。为了进行免疫检测，将印迹在包被缓冲液（在 PBS 中 10%的奶粉和 0.1%Tween-20）中包被过夜。根据生产商的要求将一抗于 RT 时在包被缓冲液中稀释培养 1h，同时进行搅拌（CK18：MAB3236，1：1000，CHEMICON；CK10/13：DE-K13，1：500，DAKO，$p16^{INK4a}$：D7D7，1：140，MTM 实验室）。用 PBS/0.1% Tween-20 冲洗 6 次 10min 后，将膜在基质液（Super Signal West Femto Maximum Substrate,Pierce）中培养 5min，包裹在塑料袋中并于 X-射线薄膜中暴露 1-5min。最后，将 X-射线薄膜显影、固定、干燥并用成像系统

（Bio-Rad）作纪录。相同的标本被用于对 $p16^{INK4a}$、CK10/13、CK18 进行 ELISA 分析。检测的信号和结果与 Western 印迹分析相似，并得出相同的结论。

ELISA 分析过程如下：将平底 96 孔的标本板（MaxiSorb；Nunc）涂敷捕获抗体（$p16^{INK4a}$:MTM-E6H4, 在 PBS 中为 2μg/ml, MTM 实验室; CK10: MS481P1ABX, 2μg/ml, dianova; CK18:K18.7, 2μg/ml, dianova; 50μl/孔），于 4℃时过夜。用 PBS/0.1% Tween-20 冲洗标本板 6 次，并用超包被缓冲液（Pierce）包被。从子宫颈拭子提取的溶解蛋白质溶解在培养缓冲液（PBS，3%超包被液，0.1%Tween20）中，并对每个孔加入 3 倍的量。在 RT 时培养 1h 后，用 PBS/0.1% Tween-20 冲洗标本板，并用生物素化的检测抗体（$p16^{INK4a}$:MTM-D7D7（0.2μg/ml），MTM 实验室; CK10: MS481-BO, 200μg/ml, dianova; CK18:MS142-BO，200μg/ml, dianova;在培养液中）在 RT 时培养 1h。用 PBS/0.1% Tween-20 TMB 冲洗 6 次后，30min 内加入 50μl 涂敷-Streptavidin 的碱性磷酸酯酶。此后，标本板用 PBS/0.1% Tween-20 冲洗，并且向每个孔加入 100μl p-硝基苯基磷酸盐基质。30min、1h、2h 后，用 ELISA 读取仪（Tecan）于 405nm（620nm 参考波长）测量 OD。本实施例表明，三明治 ELISA 形式表现出适合在根据本发明方法中使用的灵敏度。为了在本文公开的方法中使用，如在本实施例中描述的三明治 ELISA 形式可用于多个标记物分子，诸如用作标准/足量标记物以及医学相关状态的特征性标记物。

采用 Western 印迹分析法，对具有严重的子宫颈发育不良（参见检测结果）的四位病人的标本进行了分析（图上部）。对于左侧的印迹，采用 β-肌动蛋白和 $p16^{INK4a}$ 的特异抗体进行免疫印迹检测，对于中间的印迹，采用了细胞角蛋白 10/13 的特异抗体并且对于右侧的印迹，采用了细胞角蛋白 18 的特异抗体。β-肌动蛋白、CK18 和 CK10/13 用作标记物以证明标本足量。β-肌动蛋白指示存在任何细胞，CK10/13 指示存在子宫颈外鳞状细胞，CK18 指示存在子宫颈内柱状细胞。

如图 3 所示，对于 1 和 2 号病人的标本，免疫印迹检测对所有应用的足量标记物（CK10/13，CK18，β-肌动蛋白）以及对于指示发育不良细胞的标记物（$p16^{INK4a}$）都表现出阳性信号。在 Western 印迹中，3 和 4 号标本对 $p16^{INK4a}$ 带是阴性的。然而，在这些情况下，β-肌动蛋白和两种细胞角蛋白标记物在 Western 印迹分析中显示出相当弱的（3 号病人，β-肌动蛋白）或阴性的（4 号病人，所用的标记物；3 号病人，CK 标记物）信号。因此，从对 $p16^{INK4a}$ 的阴性信号中不能得出检测结论。

该图的下面部分显示出 ELISA 分析的结果。对于 1 和 2 号病人的标本，检测到足量标记物（CK10/13，CK18）的阳性信号，然而，对于 3 和 4 号病人的标本，未观察到 CK10/13 和 CK18 的信号。因此，ELISA 分析结果与 Western 印迹分析相像，可得出相同的结论。

实施例 4：对肺来源的不同标本标本进行 Western 印迹分析

为了评价对溶解标本的 Western 印迹分析是否允许评价肺病变的检测，以标记物和标准分子为基础，将具有已知检测结果的临床标本溶解并进行免疫化学分析，

对临床标本（用刷子收集的细胞或气管肺泡病变）进行标准 Western 分析的过程如下：气管肺泡损伤的细胞通过离心而颗粒化（5min，1000rpm），颗粒溶解在 Lammli 蛋白标本缓冲液中（100mM Tris pH 6.8，2% SDS，200Mm DTT，0.05% BpB）。用刷子获得的标本直接溶解在 Lammli 蛋白标本缓冲液中（100mM Tris pH 6.8，2% SDS，200Mm DTT，0.05% BpB）。超声前使原料沸腾（5min，95℃）。在第二步，在 SDS-PAGE（12%丙烯酰胺）上将多份蛋白标本溶解成两份，随后通过罐印迹（Towbin et al.,1979,Proc Natl Acad Sci;76:4350-4354）转移到硝酸纤维素膜上。在接下来的一步中，膜被包被以防止非特异的抗体结合（在 PBS 中 10%非脂肪干奶），随后，用抗 NSE（DAKO，德国，克隆 BSS/NC/VI-H14，鼠单克隆，稀释 1：1000）的特异特异单克隆鼠抗体培养一个膜，用标准标记物肌动蛋白（ICN，USA，克隆 C4，鼠单克隆，稀释 1：400）培养一个膜。通过辣根过氧化酶共轭的二抗（结合到标记物特异抗体上）催化发光物质而使特异抗体的结合可视化。

在具有已知的小细胞肺癌病人的气管肺泡损伤中，与肌动蛋白的表达水平相比，检测到高水平的 NSE，然而，在无肿瘤的病人中，几乎没有检测到任何 NSE，然而，肌动蛋白水平与癌症病人的水平是可比的。（数据未示出）

该结果暗示出，根据本方法提出的基于溶液的测试过程的标准能够评价疾病的检测结果，不需要依靠形态学的信息。

实施例 5：在 ELISA 测试形式中检测子宫颈内部上皮发育不良

在由拭子中所含细胞制备的溶液中，基于检测到的与细胞周期素相关的激酶抑制剂 $p16^{INK4a}$ 的过度表达，将溶菌缓冲液中的 34 个子宫颈拭子进行 ELISA。ELISA 测试过程如下：

（A） 细胞的溶解

将子宫颈拭子刷放入 15ml 的容器中，其含有 2ml mtm 溶菌缓冲液。将刷子中存在的子宫颈细胞至少溶解 20h。然后，将子宫颈拭子标本的溶解产物转移到 2ml 的试管中，并于 4℃时在 28.000xg（16.600rpm 高速离心，JEC Multi RF）下离心（15min）；上清夜转移到新试管中。如同该情况一样，上清液可以在-20℃时储存。

（B）进行 ELISA

涂敷 ELISA 标本板

$p16^{INK4a}$-特异抗体克隆 mtm E6H4，Ep-Cam 特异抗体 Ber-Ep4 和 γ-连接素特异抗体克隆 15 的储备液在 PBS 中稀释，以获得备用的涂敷溶液。

将备用的捕获抗体涂敷溶液每种 50μl 加入到 ELISA 标本板上。

为了涂敷，标本板于 4℃时过夜培养。

从 ELISA 标本板上除去涂敷溶液，并且用自动 ELISA 清洗器清洗标本板，操作如下：

7×250μl 清洗缓冲液（在 PBS 中，0.1%Tween 20（v/v））

去除残留的清洗缓冲液后，向每个孔加入 300μl 包被缓冲液（在 PBS 中，2%BSA）。室温下，标本板在震荡装置中培养 1h。

用标本培养

去除包被缓冲液后，向每个孔加入 100μl 溶解的细胞标本。HeLa-细胞的溶解产物用作检测 $p16^{INK4a}$ 和 γ-连接素的特异抗体的阳性对照；HT29-细胞的溶解产物用作对 Ep-Cam 的特异抗体的阳性对照；

为了进行校准测试，测试中使用了不同浓度的重组 p16 蛋白质，重组 γ-连接素和 Ep-Cam（0pg/ml，50 pg/ml，100 pg/ml，200 pg/ml，400 pg/ml，800 pg/ml）。

标本在室温下培养 1h。

之后，在自动 ELISA 清洗器上进行清洗，过程如下：

7×250μl 清洗缓冲液，去除残留的缓冲液。

与检测抗体培养

通过稀释储备液而制备生物素化的二抗工作液（$p16^{INK4a}$ 特异的克隆 mtm D7D7， Ep-Cam 特异的克隆 A5B4 以及 γ-连接素特异的克隆 MAB2083）

将 100μl 生物素化的二抗工作液加入到孔中，与相应的抗原和捕获抗体共同培养。在 RT 时培养 1h 后，除去抗体溶液并用自动 ELISA 清洗器清洗标本板。

7×250μl 清洗缓冲液

检测

链霉抗生物素蛋白-HPR-聚合物（1mg/ml）预稀释到 1：10（4μl +36μl 培养缓冲液）；通过在培养缓冲液（在 PBS 中，0.1%BSA）中按照 1：300 的比例进行稀释而制备最终的培养液，使最终浓度为 0.33μg/ml。

将 100μl 该溶液加入到每个孔并在 RT 时培养 1h。

之后，除去缓冲液并用 200μl 清洗缓冲液人工清洗每个标本板 5 次。

基质培养

在黑暗中，将 TMB-基质于 25℃时平衡 1h。

将 100μl 基质溶液加入到每个孔。

在黑暗中，将 ELISA 标本板于 25℃时培养刚好 15min。然后，通过加入 80μl 2.5M H_2SO_4 而停止反应。

反应停止 5min 内，在 450nm 测定 OD。评价结果后，每种标本有一 OD 值。

结果评价

对于标本是否足量，γ-连接素的所有标本的 OD 值必须超出限定的阈值，以证明恰当的细胞最少取样量。而且，为了确保恰当的取样，指示存在子宫颈内细胞的 Ep-Cam 的 OD 值的阈值必须被超过。

为了测定发育不良的细胞，$p16^{INK4a}$ 的 OD 值必须超过限定的阈值，以证明存在 p16-阳性的发育不良细胞的最小值。

表 6 中给出实验结果。

表 6

标本号	$P16^{INK4a}$	γ-连接素	结论
3	+	+	标本是足量的；$P16^{INK4a}$ 指示出存在发育不良的细胞
30	-	+	标本是足量的；不存在可检测的 $P16^{INK4a}$ 指示出无发育不良的细胞
1	-	-	标本量不足；需要重新取样

将 $p16^{INK4a}$ 和 34 个标本的γ-连接素的 OD 值与相应的阈值进行对比，表明 33 个标本是足量的并可以被进一步评价。从这 33 个标本中，30 个标本对 $p16^{INK4a}$ 是阴性的，3 个是阳性的。

将 ELISA 结果与相同病人的巴氏试验（PAP 试验，子宫颈细胞学）检测结果进行对比。根据 Munich 分类 II 对子宫颈细胞学进行评估。Pap II 包括良性细胞、子宫颈炎和组织变形，Pap IV 包括严重的发育不良和原位癌。结果是，相应于用常规的细胞学 PAP 试验被划分为发育不良标本，在 ELISA 中对 $p16^{INK4a}$ 标本返回一个大于 0.9 的 OD。

为了评价标本，应用 OD 0.9 作为阈值，ELISA 结果报道如下。

表 7

检测/ELISA 结果	ELISA 对 $p16^{INK4a}$ 表现为阳性	ELISA 对 $p16^{INK4a}$ 表现为阴性
Pap II	0	30
Pap IV	3	0
无足够的细胞	0	1

在所有患有严重发育不良的妇女中得到的 3 个标本（100%）中，ELISA 试验为阳性的，而且在所有未患有发育不良的妇女的 30 个标本（100%）为阴性的。仅有一种标本含有非常少的细胞，由于标本量不足而从评估中被排除。

在溶解的病人标本中，与存在上皮细胞的标准特征性标记物相应，$p16^{INK4a}$ 蛋白水平的标准允许对标本中发育不良的检测进行评价。在当前情况下，标准特别允许避免由于取样不足量（例如，病人原料的总量不足以进行分析，或者病人原料未取自正确的解剖位置）而造成的假阴性结果。在测试形式中，通过采用在 ELISA 中测定的 γ-连接素标准标记物的 OD 阈值进行标准，高于该阈值，标本被划分为足量。低于确定的阈值（相当于 200.000 个鳞状子宫颈外细胞），标本就不含有足量的病人原料。使用指示存在子宫颈内细胞的第二标准标记物可进一步提供关于标本足量的信息。在测试形式中，通过采用在 ELISA 中测定的 Ep-Cam 标准标记物的 OD 阈值进行标准，高于该阈值，标本被划分为足量。低于确定的阈值（相当于 2000 个柱状子宫颈内细胞），标本不含有足量的子宫颈内细胞。（必须理解，本实施例中应用的阈值被调整到特定的反应条件下。对于细胞以及 OD 的数值可以根据反应条件而变。因此，这里的数值是为了解释说明条件而并非是限制本发明的范围。本领域技术人员知道对于特定的试验形式如何建立适当的阈值。）子宫颈内细胞的存在提供了有关拭子或刷子已经与子宫颈内的柱状上皮细胞接触

的信息，从而暗示出拭子或刷子与变形区发生接触，那里经常会出现子宫颈发育不良。特别是对确定量的子宫颈外细胞（γ-连接素）和确定量的检测子宫颈外细胞（Ep-Cam）的检测在有关病人材料取自正确的解剖位置（子宫颈变形区）的信息方面可提供一种很高的可能性。

在这些试验中采用阈值进行评价，在当前的 ELISA 试验方式中对 300 个病人的细胞学种类进行了测定。试验中，由细胞学检测鉴定为发育不良的物种也可能在 ELISA 试验方式中被鉴定为发育不良的种类。

实施例 6：以 ELISA 试验方式测定子宫颈上皮内瘤

基于对拭子所含细胞制备的溶液中的 HPV E7 蛋白的过度表达以及一种足量标记物的检测，对实施例 5 中所用的溶解缓冲液中的 34 个子宫颈拭子进行了 ELISA 检测。ELISA 测试过程如下：

（A）细胞的溶解

将子宫颈拭子刷放入 15ml 的容器中，其含有 2ml mtm 溶菌缓冲液。将刷子中存在的子宫颈细胞至少溶解 20h。然后，将子宫颈拭子标本的溶解产物转移到 2ml 的试管中，并于 4℃时在 28.000xg（16.600rpm 高速离心，JEC Multi RF）下离心（15min）；上清夜转移到新试管中。如同该情况一样，上清液可以在-20℃时储存。

（B） 进行 ELISA

包被 ELISA 标本板

E7-特异抗体克隆 NM2 和 γ-连接素特异抗体克隆 15 的储备液在 PBS 中稀释，以获得备用的涂敷溶液。

将备用的捕获抗体涂敷溶液每种 50μl 加入到 ELISA 标本板上。

为了涂敷，标本板于 4℃时过夜培养。

从 ELISA 标本板上除去涂敷溶液，并且用自动 ELISA 清洗器清洗标本板，操作如下：

7×250μl 清洗缓冲液（在 PBS 中，0.1%Tween 20（v/v））

去除残留的清洗缓冲液后，向每个孔加入 300μl 包被缓冲液（在 PBS 中，2%BSA）。室温下，标本板在震荡装置中培养 1h。

用标本培养

去除包被缓冲液后，向每个孔加入 100μl 溶解的细胞标本。HeLa-细胞的溶解

产物用作检测γ-连接素的特异抗体的阳性对照；为了进行校准测试，测试中使用了不同浓度的重组HPV 16 E7-蛋白质，重组γ-连接素（0pg/ml，50 pg/ml，100 pg/ml，200 pg/ml，400 pg/ml，800 pg/ml）。

标本在室温下培养1h。

之后，在自动ELISA清洗器上进行清洗，过程如下：

7×250μl清洗缓冲液，去除残留的缓冲液。

与检测抗体培养

通过稀释储备液而制备生物素化的二抗工作液（HPV 16 E7 蛋白特异的克隆NM13以及γ-连接素特异的克隆MAB2083）。

将100μl生物素化的二抗工作液加入到孔中，与相应的抗原和捕获抗体共同培养。在RT时培养1h后，除去抗体溶液并用自动ELISA清洗器清洗标本板。

7×250μl清洗缓冲液

检测

链霉抗生物素蛋白-HPR-聚合物（1mg/ml）预稀释到1：10（4μl +36μl培养缓冲液）；通过在培养缓冲液（在PBS中，0.1%BSA）中按照1：300的比例进行稀释而制备最终的培养液，使最终浓度为0.33μg/ml。

将100μl该溶液加入到每个孔并在RT时培养1h。

之后，除去缓冲液并用200μl清洗缓冲液人工清洗每个标本板5次。

基质培养

在黑暗中，将TMB-基质于25℃时平衡1h。

将100μl基质溶液加入到每个孔。

在黑暗中，将ELISA标本板于25℃时培养刚好15min。然后，通过加入80μl 2.5M H_2SO_4而停止反应。

反应停止5min内，在450nm测定OD。评价结果后，每种标本有一OD值。

结果评价

对于标本是否足量，γ-连接素的所有标本的OD值必须超出限定的阈值，以证明存在最少的上皮细胞（参见实施例5）。

为了测定发育不良的细胞，HPV 16 E7 的OD值必须超过限定的阈值，以证明存在转化细胞的最小值。在我们的测试形式中，阈值取决于采用的ELISA条件并且OD被设定为0.7。

将34个标本的HPV 16 E7和γ-连接素的OD值与相应阈值进行的对比结果显示出通过检测γ-连接素，33个标本被证明含有上皮细胞。

尽管通过参照当前的优选实施例已经对本发明进行了描述，但是应当理解可以进行许多变化，而没有偏离本发明的范围。

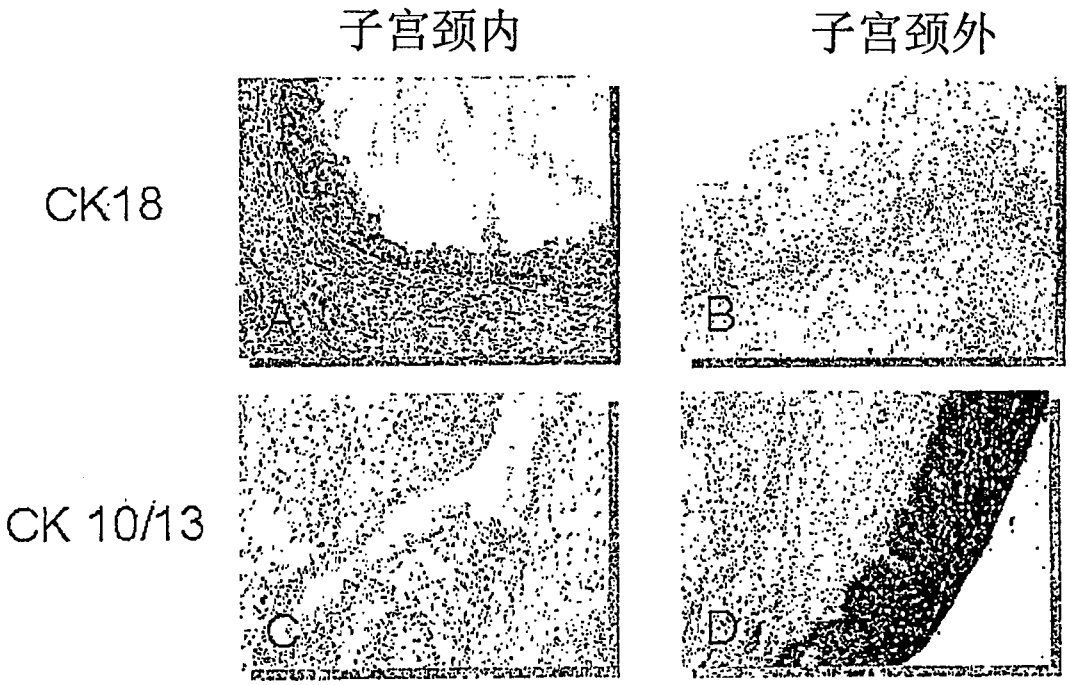


图1

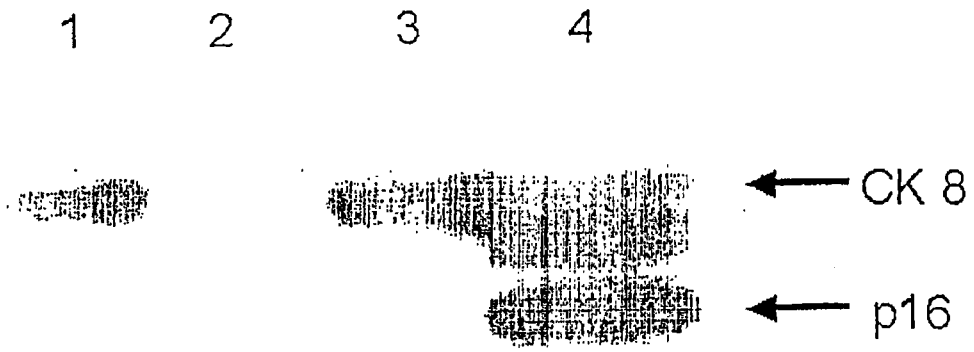


图2

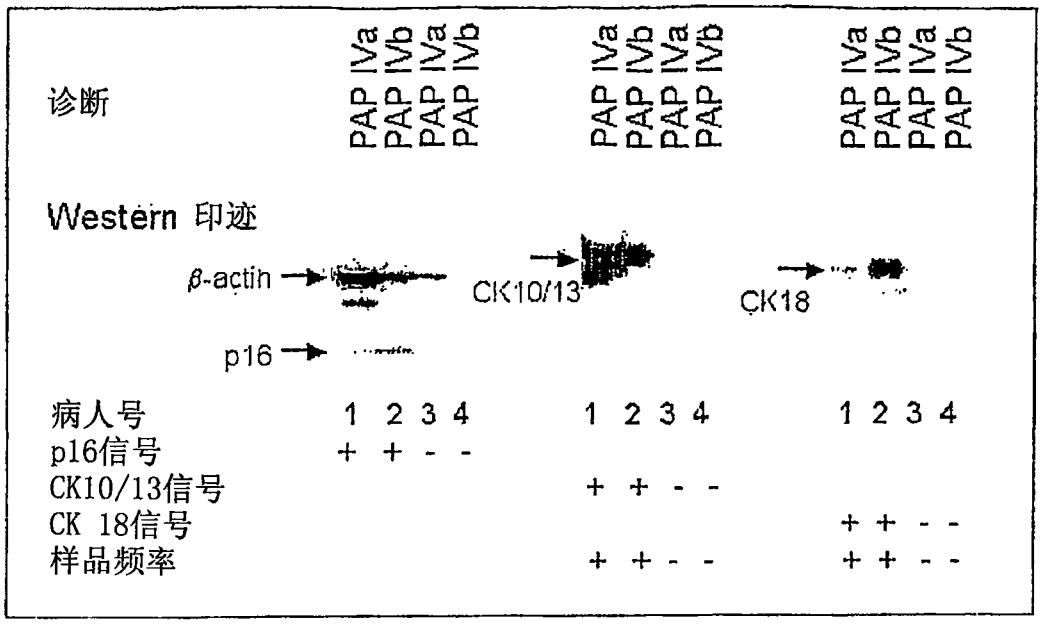

诊断
PAP IVa
PAP IVb
PAP IVa
PAP IVb
PAP IVa
PAP IVb
PAP IVa
PAP IVb
PAP IVa
PAP IVb
PAP IVa
PAP IVb
Western 印迹
β-actin
CK10/13
CK18
p16
病人号 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
p16信号 + + - -
CK10/13信号 + + - -
CK 18信号 + + - -
样品频率 + + - - + + - -
ELISA测定 p16 CK 10/13 CK 18
病人号 1 2 3 4 1 2 3 4 1 2 3 4
结果 + + - - + + - - + + - -

图3