

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日
2007年9月20日 (20.09.2007)

PCT

(10) 国际公布号
WO 2007/104181 A1

(51) 国际专利分类号:

C12Q 1/68 (2006.01) G01N 33/53 (2006.01)
C07K 14/47 (2006.01) G01N 33/50 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) G01N 33/15 (2006.01)
G01N 33/574 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2006/000382

(22) 国际申请日: 2006年3月13日 (13.03.2006)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人 (对除美国外的所有指定国): 上海市
肿瘤研究所(SHANGHAI CANCER INSTITUTE)
[CN/CN]; 中国上海市斜土路2200弄25号, Shanghai
200032 (CN)。

(72) 发明人; 及

(75) 发明人/申请人 (仅对美国): 覃文新(QIN, Wenxin)
[CN/CN]; 中国上海市斜土路2200弄25号, Shanghai
200032 (CN)。 张海涛(ZHANG, Haitao) [CN/CN];
中国上海市斜土路2200弄25号, Shanghai 200032
(CN)。 余艳军(YU, Yanjun) [CN/CN]; 中国上海市

斜土路2200弄25号, Shanghai 200032 (CN)。 游海燕
(YOU, Haiyan) [CN/CN]; 中国上海市斜土路2200
弄25号, Shanghai 200032 (CN)。 杨胜利(YANG,
Shengli) [CN/CN]; 中国上海市斜土路2200弄25
号, Shanghai 200032 (CN)。 顾健人(GU, Jianren)
[CN/CN]; 中国上海市斜土路2200弄25号, Shanghai
200032 (CN)。 黄钢(HUANG, Gang) [CN/CN]; 中
国上海市山东中路145号, Shanghai 200001 (CN)。
盛世乐(SHENG, Shile) [CN/CN]; 中国上海市山东
中路145号, Shanghai 200001 (CN)。 陈涛(CHEN,
Tao) [CN/CN]; 中国上海市山东中路145号, Shanghai
200001 (CN)。

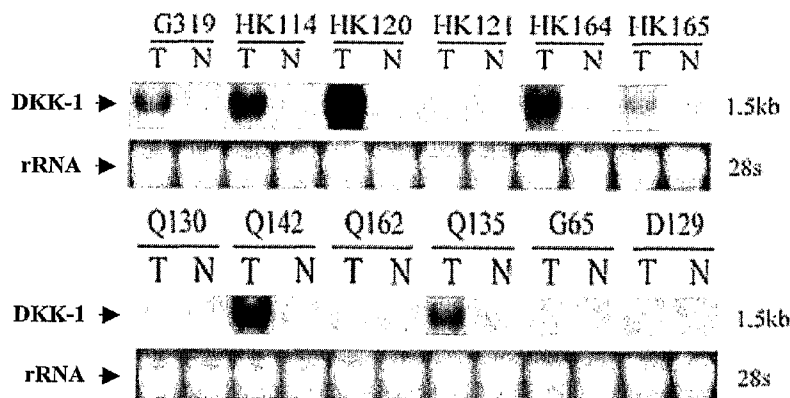
(74) 代理人: 上海专利商标事务所有限公司(SHANGHAI
PATENT & TRADEMARK LAW OFFICE, LLC.);
中国上海市桂平路435号陶家蓉, Shanghai 200233
(CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家
保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE,
DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH,
GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP,
KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD,
MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ,

[见续页]

(54) Title: USES OF DKK-1 PROTEIN IN DIAGNOSIS OF CANCERS

(54) 发明名称: DKK-1 蛋白在癌症诊断中的应用



(57) Abstract: DKK-1 protein or nucleic acid sequence can be used in the manufacturing of reagents or kits for diagnosis of cancers which are selected from the group of liver cancer, lung cancer, breast cancer and glioma. Specific antibodies against DKK-1 protein or specific nucleic acid probes capable of hybridizing to DKK-1 which act as reagents for diagnosis of cancers, are made react with cell samples. The binding amount of the antibodies or probes can be obtained by dint of detecting the detectable labels which couple the antibodies or probes. Then the binding amount can be compared with a standard from normal cells.

[见续页]

WO 2007/104181 A1



OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW。

IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS,

本国际公布:

— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码及其它缩写符号, 请参考刊登在每期PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(57) 摘要:

DKK-1 蛋白或其核酸序列可被用于制备诊断癌症的试剂或试剂盒, 其中癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤。将抗 DKK-1 蛋白特异性抗体或 DKK-1 蛋白特异性核酸探针作为癌症诊断试剂与细胞样品反应, 通过检测与探针或抗体偶联的可检测基团获得抗体或探针的结合量, 与正常细胞的结合量进行比较。

DKK-1 蛋白在癌症诊断中的应用

技术领域

5 本发明涉及分子生物学特别是基因诊断领域，尤其是 DKK-1 蛋白在诊断癌症中的应用。

背景技术

1998 年，Glinka A 等在《Nature》杂志上发表研究文章 (Nature, 1998; 391(6665):357-362) 宣布：他们在非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 胚胎发育研究中发现了一种新的分泌性蛋白，命名为 dickkopf-1 (dkk-1)。他们的研究工作证实：
10 dkk-1 是 Wnt 信号通路的抑制因子，是非洲爪蟾胚胎发育过程“头部 (head induction)”形成的“引发者 (inducer)”。稍后，1999 年 Fedi P 等 (J Biol Chem, 1999; 274(27):19465-72) 采用条件色谱分离方法和 PCR 方法，从人平滑肌肉瘤细胞 SK-LMS-1 及相应 cDNA 文库中，分离获得了 dkk-1 的人的同源基因，其 mRNA
15 转录本约为 2kb，编码 266 个氨基酸。从此，科学家通过近 5 年的研究，初步揭示了 DKK-1 作为 Wnt 信号通路抑制因子的分子机制。

在研究 DKK-1 的功能和作用机制的过程中，科学家亦注意到 DKK-1 与某些人类疾病有关。如骨质疏松症 (Biochem Biophys Res Commun, 2004; 318(1):259-264. N Engl J Med, 2002; 346(20):1513-1521)、多发性骨髓瘤引发的骨损害 (N Engl
20 J Med, 2003; 349(26):2483-2494) 以及某些人类恶性肿瘤，如 Mikheev AM 等 (Carcinogenesis, 2004; 25(1):47-59) 利用人子宫颈癌 HeLa 细胞系建立了两株非致瘤性的回复突变型 (non-tumorigenic revertant) 细胞系，并利用 cDNA 芯片技术发现 DKK-1 在上述两株非致瘤性的回复突变型 HeLa 细胞系中高表达，其研究发现 DKK-1 表达的缺失是 HeLa 致瘤性所必需的，因此认为 DKK-1 是一个候选肿瘤
25 抑制基因；另外，Wirhth O 等 (Lab Invest, 2003; 83(3):429-434) 利用“抑制差减杂交技术 (suppression subtractive hybridization approach)”发现 DKK-1 在儿童肝母细胞瘤 (hepatoblastoma) 和 Wilms' 肿瘤中高表达，其结果表明：32 例儿童肝母细胞瘤中 26 例 DKK-1 高表达 (26/32, 81%)、6 例 Wilms' 肿瘤中 5 例 DKK-1 高表达 (5/6, 83%)，而在 20 例肝癌病人中仅 2 例 DKK-1 高表达 (2/20, 10%)、
30 5 株成神经管细胞瘤 (medulloblastoma) 细胞系中仅 1 例 DKK-1 高表达 (1/5, 20%)，在恶性胶质瘤和乳腺癌中未检测到 DKK-1 表达。

因此，本领域对于特定癌症的准确和特异性的检测有迫切的需求。

发明内容

因此，本发明的目的是提供能够准确诊断选自的癌症的诊断试剂盒、DKK-1
5 蛋白的诊断试剂盒的用途，以及体外检测其表达量的方法。

在本发明的一个方面，提供了一种癌症诊断试剂盒，所述癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤，该试剂盒含有容器，所述容器中含有抗 DKK-1 抗体。在该方面的一个优选例中，抗-DKK-1 抗体偶联有可检测基团。在更优选的实施例中，可检测基团选自生色团、化学发光基团、荧光团或同位素。

10 在本发明的第二个方面，提供了一种癌症诊断试剂盒，所述癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤，该试剂盒含有容器，其中含有 DKK-1 蛋白特异性核酸探针。在该发明的另一个优选例中，探针偶联有可检测基团。在一个更优选的实施例中，可检测基团选自生色团、化学发光基团、荧光团或同位素。

在本发明的第三个方面，DKK-1 蛋白或其核酸序列在制备诊断试剂或试剂盒，
15 针对癌症，选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤的用途。在该方面的一个优选例中，癌症诊断试剂是抗 DKK-1 蛋白特异性抗体或 DKK-1 蛋白特异性核酸探针。

在本发明的第四个方面，提供了一种体外检测特异性 DKK-1 蛋白表达的方法，包括：

20 用抗 DKK-1 蛋白特异性抗体或 DKK-1 特异性核酸探针与细胞样品反应，以正常细胞为对照；

比较抗体或探针的结合量，其中高于对照的量表明该细胞为癌细胞，低于或等于对照的量表明该细胞为正常细胞。

在该方面的一个优选例中，结合量是通过检测与探针或抗体偶联的可检测基团测得的。

25 在本发明的第五个方面，提供了一种检测肝癌的方法，包括下列步骤：

- a) 将与放射性核素偶联的抗 DKK-1 单克隆抗体输给动物；
- b) 检测抗 DKK-1 单克隆抗体在体内的聚集；
- c) 所述聚集表明肝癌的存在。

30 在该方面的一个优选例中，放射性核素是 ^{133}I 。在该方面的另一个优选例中，动物是人。

附图说明

图 1 显示了生物素标记的 cRNA 的电泳图谱。1-5 为样品编号。

图 2 显示了片段化的生物素标记的 cRNA 的电泳图谱。1-5 为样品编号。

图 3 显示了 DKK-1 基因在 12 例肝癌病人中的 Northern 杂交表达情况的分析。

5 图 4 显示了 DKK-1 基因在 16 种人正常组织中表达情况的分析。其中标号分别表示：1 脾；2 胸腺；3 前列腺；4 睾丸；5 卵巢；6 小肠；7 大肠；8 外周血淋巴细胞；9 心脏；10 脑；11 胎盘；12 肺；13 肝脏；14 肌肉；15 肾脏；16 胰腺。

图 5 是对小鼠进行放射性免疫检测的结果。其中 (a) 是 24 小时显像结果；(b) 10 是 48 小时显像结果；(c) 是 96 小时显像结果；(d) 是 120 小时显像结果。

图 6 是 ^{131}I -DKK1 分布趋势图。如图所示， ^{131}I -DKK1 随着时间的推移在瘤体组织出现聚集，120 小时达到高点。 ^{131}I -IgG1 在小鼠体内，96 小时达到高点。

具体实施方式

15 发明人采用基因芯片技术，通过比较肝癌组织和相应的癌旁肝组织基因表达谱的差异，发现与 Wirths 0 等 (Lab Invest, 2003; 83(3):429-434) 报道的 DKK-1 仅在少数人肝癌病人 (2/20, 10%) 中表达的结果相反。在发明人分析和验证的 12 例肝癌病人中 7 例在肝癌组织中高表达 DKK-1 (7/12, 58%)，明显高于 Wirths 0 等在肝癌中报道的结果。因此，还进一步采用 ELISA 方法，首次对肝癌病人血清
20 中 DKK-1 的含量进行了检测分析，提示其高表达和分泌 DKK-1 蛋白，为其应用于肝癌的临床诊断和治疗奠定的基础。

如本文所用，术语“DKK-1”指非洲爪蟾 (*Xenopus laevis*) 胚胎发育研究中发现了一种新的分泌性蛋白，命名为 dickkopf-1 (dkk-1)。该蛋白的序列可通过 NCBI 以登录号 NP 571078 找到。本发明所指的 DKK-1 蛋白包括其完整的氨基酸序列，
25 其分泌蛋白，其突变体，以及其功能上活性的片段。需理解的是，当编码相同的氨基酸时，密码子中的核苷酸的取代是可接受的。另外需理解的是，由核苷酸取代而产生的保守的氨基酸取代时，核苷酸的变换也是可被接受的。

在得到了 DKK-1 的氨基酸片段的情况下，可根据其构建出编码它的核酸序列，并且根据核苷酸序列来设计特异性探针。核苷酸全长序列或其片段通常可以用 PCR
30 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。对于 PCR 扩增法，可根据本发明所公开的有关核苷酸序列，尤其是开放阅读框序列来设计引物，并用市售的 cDNA 库或按

本领域技术人员已知的常规方法所制备的 cDNA 库作为模板，扩增而得有关序列。当序列较长时，常常需要进行两次或多次 PCR 扩增，然后再将各次扩增出的片段按正确次序拼接在一起。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(或其片段，衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本发明的多核苷酸序列可用来表达或生产重组的 DKK-1 多肽。一般来说有以下步骤：

- (1). 用本发明的编码人 DKK-1 多肽的多核苷酸(或变异体)，或用含有该多核苷酸的重组表达载体转化或转导合适的宿主细胞；
- (2). 在合适的培养基中培养的宿主细胞；
- (3). 从培养基或细胞中分离、纯化蛋白质。

本发明中，DKK-1 多核苷酸序列可插入到重组表达载体中。总之，只要能在宿主体内复制和稳定，任何质粒和载体都可以用。表达载体的一个重要特征是通常含有复制起点、启动子、标记基因和翻译控制元件。

本领域的技术人员熟知的方法能用于构建含 DKK-1 编码 DNA 序列和合适的转录/翻译控制信号的表达载体。这些方法包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等。所述的 DNA 序列可有效连接到表达载体中的适当启动子上，以指导 mRNA 合成。表达载体还包括翻译起始用的核糖体结合位点和转录终止子。

此外，表达载体优选地包含一个或多个选择性标记基因，以提供用于选择转化的宿主细胞的表型性状，如真核细胞培养用的二氢叶酸还原酶、新霉素抗性以及绿色荧光蛋白(GFP)，或用于大肠杆菌的四环素或氨苄青霉素抗性。

包含上述的适当 DNA 序列以及适当启动子或者控制序列的载体，可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属的细

菌细胞；真菌细胞如酵母；植物细胞；昆虫细胞；动物细胞等。

用重组 DNA 转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收 DNA 的感受态细胞可在指数生长期后收获，用 CaCl_2 法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用 MgCl_2 。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的 DNA 转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔、脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

在获得了核酸序列后，可根据核酸序列设计特异性核酸探针。设计探针的方法是本领域常规的，可见 Sambrook 等人，分子克隆实验室手册(New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989)中所述。检测生物样品中是否存在 DKK-1 蛋白或核酸的示范性方法包括获得测试受试者的生物样品，使该生物样品接触能与 DKK-1 mRNA 或基因组 DNA 杂交的标记的核酸探针。该核酸探针可以是，例如人的核酸或及一部分，如长至少 15、30、50、100 个核苷酸并能在严谨条件下与 DKK-1 mRNA 或基因组 DNA 充分杂交的核酸探针。用于本发明诊断试验的其它探针如本文所述。

核酸探针与扩增的标记序列接触。该探针优选连接到一种发色团，但可被放射标记。在另一个实施例中，探针连接到一种结合伴侣上，如抗体或生物素，或另一种携带可检测结构域的结合伴侣上。

在传统的方法中，检测可通过 Southern 印迹以及与标记的探针杂交来进行。Southern 印迹所涉及的技术是本领域技术人员所熟知的(参见 Sambrook 等, 1989)。常规的检测还有生物芯片、荧光显影技术、细胞流式计数等。

另一方面，本发明还包括对 DKK-1 DNA 或是其片段编码的多肽具有特异性的多克隆抗体和单克隆抗体，尤其是单克隆抗体。这里，“特异性”是指抗体能结合于 DKK-1 基因产物或片段。较佳地，指那些能与 DKK-1 基因产物或片段结合但不识别和结合于其它非相关抗原分子的抗体。本发明的抗体可以通过本领域内技术人员已知的各种技术进行制备。

本发明不仅包括完整的单克隆或多克隆抗体，而且还包括具有免疫活性的抗体片段，如 Fab' 或 (Fab)₂ 片段；抗体重链；抗体轻链；遗传工程改造的单链 Fv 分子；或嵌合抗体。

抗 DKK-1 蛋白的抗体可用于免疫组织化学技术中，检测活检标本中的 DKK-1 蛋白。

血样或尿液中的 DKK-1 的直接测定可以作为肿瘤的辅助诊断和愈后的观察指标，也可作为肿瘤早期诊断的依据。

抗体可以通过 ELISA、Western 印迹分析，或者与检测基团偶联，通过化学发光、同位素示踪等方法来检测。

本发明也包括试剂盒，以进行这里描述的任何方法。在一个非限制的实例中，所述试剂盒将以适当的容器形式包含这些试剂中的一种或多种。所述试剂盒也可包含用于 RNA 分离、扩增细胞中 RNA 的纯化的试剂、标记等。

试剂盒的组分可以以水介质的形式或以冻干的形式来包装。试剂盒中适当的容器通常至少包括一种小瓶、试管、长颈瓶、宝特瓶、针筒或其它容器，其中可放置一种组分，并且优选地，可进行适当地等分。在试剂盒中存在多于一种的组分时，试剂盒中通常也将包含第二、第三或其它附加的容器，其中分离地放置附加的组分。然而，不同组合的组分可被包含在一个小瓶中。本发明的试剂盒通常也将包括一种用于容纳反应物的容器，密封以用于商业销售。这种容器可包括注模或吹模的塑料容器，其中可保留所需的小瓶。

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用来限制本发明的范围。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。

实施例 1. 肝癌病人癌组织和癌旁肝组织样品的收集

12 例人原发性肝癌患者的癌组织 (Tumor tissues from human hepatocellular carcinomas, 简称 T) 及癌旁肝组织 (Non-cancerous liver tissues, 简称 N) 标本, 分别来自中国的上海、广西、江苏启东和杭州地区的肝癌患者。其中, 上海地区 1 例 (D129), 广西地区 2 例 (G65 和 G319), 江苏启东地区 4 例 (Q130, Q135, Q142, Q162), 杭州地区 5 例 (HK114, HK120, HK121, HK164, HK165)。手术后组织标本立即置液氮中冷冻, 随后保存于 -80°C 超低温冰箱。

实施例 2. RNA 的分离

- 10 1) 取组织样品约 1 克, 液氮中研磨成粉末状, 加入到 10 毫升 TRIZOL (Invitrogen, 目录号 15596-026) 中立即匀浆, 室温下放置 10-15 分钟。
- 2) 加入 2 毫升氯仿, 剧烈震荡 15 秒, 室温下放置 2~3 分钟, 10,000g 于 4°C 离心 15 分钟。
- 3) 取出上清液, 加入等体积的异丙醇, 室温下放置 15 分钟, 10,000g 于 4°C 15 离心 15 分钟。
- 4) 弃上清, 加入 6 毫升 75%乙醇洗涤沉淀, 10,000g 于 4°C 离心 5 分钟。
- 5) 轻微干燥 RNA 沉淀, DEPC 水溶解。
- 6) 上述粗提的总 RNA 样品, 使用 RNeasy Mini Kit (Qiagen, 目录号 74104) 纯化, 纯化步骤遵照 Qiagen 公司该试剂盒提供的说明书进行。纯化的 RNA 样品 -70°C 保存备用。

实施例 3 cDNA 芯片杂交分析

- 1) 紫外定量和检测: 用紫外分光光度计检测 RNA 的量, 在 260nm 处的吸光度, 1 个吸光值 (OD) 约为 $40\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 RNA。根据在 260nm 和 280nm 处的吸光值, 检测 RNA 的纯度, 较纯 RNA 的 $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ 比值应接近 2.0 (比值最好在 1.9~2.1 之间)。
- 2) cDNA 的合成和纯化:
第一链 cDNA 的合成。取总 RNA 约 $5\mu\text{g}$, 用 RNase-free 水补至总体积 $20\mu\text{l}$, 加入 T7-(dT)₂₄ 引物 $1\mu\text{l}$ ($100\text{pmol}/\mu\text{l}$), 混匀, 70°C 温浴 10 分钟, 置于冰上至少 2 分钟, 离心片刻。然后, 加入 $5\times$ 第一链 cDNA 的合成缓冲液 $4\mu\text{l}$ 、DTT (0.1M) $2\mu\text{l}$ 和 dNTP (10mM) $1\mu\text{l}$, 混匀, 42°C , 温浴 2 分钟。再加入 SuperScript II RT ($200\text{u}/\mu\text{l}$) $1\mu\text{l}$ ($5\sim 8\mu\text{g}$ 起始 RNA)。混匀, 42°C , 温浴 1 小时。

第二链 cDNA 的合成。将上述逆转录合成的第一链 cDNA 产物置于冰上，加入下列试剂：RNase-Free 水 92 μ l、5 \times 第二链 cDNA 的合成缓冲液 30 μ l、dNTP(10mM)3 μ l、E. coli DNA 连接酶 (10u/ μ l)1 μ l、E. coli DNA 聚合酶 (10u/ μ l)4 μ l、E. coli RNase H(10u/ μ l)0.2 μ l，混匀，16 $^{\circ}$ C，反应 2 小时。再加入 T4 DNA 聚合酶 3.3 μ l，混匀，16 $^{\circ}$ C，5 分钟。加入 10 μ l EDTA(0.5M)，混匀，终止反应，-20 $^{\circ}$ C 保存。

cDNA 纯化。用 Eppendorf 公司 PLG(Phase Lock Gel)纯化上述 cDNA，12,000g 离心 PLG 管 30 秒，酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)以 1:1 的比例加入到 cDNA 反应产物中，剧烈振荡后将全部液体移入 PLG 管中，不要振荡，12,000g 室温离心 2 分钟。吸取上层液体到一新的离心管，加入 0.5 倍体积醋酸铵(7.5M, pH 8.0)和预冷 2.5 倍体积无水乙醇，振荡混匀，12,000g 室温离心 20 分钟。倒出上清，加入 75%的乙醇 500 μ l，12,000g 室温离心 5 分钟；重复用 75%的乙醇洗涤 cDNA 沉淀一次。倒出离心管中的液体，晾干；沉淀用 RNase-Free 的水溶解。

3) 生物素标记的(Biotin-labeled)cRNA 合成:

采用 Enzo[®] BioArray[™] HighYield[™] RNA 转录标记试剂盒(Enzo life sciences, INC)制备 Biotin-labeled cRNA。取上述 cDNA 5 μ l，用 RNase-Free 水补足至 22 μ l，加入 10 \times HY 反应缓冲液(1 号管)4 μ l、10 \times 生物素标记的核苷酸(2 号管)4 μ l、10 \times DTT(3 号管)4 μ l、10 \times RNase 抑制剂混合液(4 号管)4 μ l、20 \times T7 聚合酶(5 号管)2 μ l，混匀，稍离心，37 $^{\circ}$ C 温浴 4.5 小时，每隔 35 分钟以 600rpm 振荡 10 秒。合成产物可保存在-20 $^{\circ}$ C 或直接进行下一步纯化。

纯化 cRNA。用 Qiagen 公司提供的试剂盒纯化 cRNA，方法基本与总 RNA 的纯化相同(见步骤 2-6)。

cRNA 的定量和检测。用紫外分光光度计测量 cRNA 的浓度和 OD260/OD280 比值，变性胶检测 cRNA 质量。取 2 μ g cRNA 在 1.2%的甲醛变性凝胶上电泳，纯化的 cRNA 应该呈弥散状长条带(见图 1)。

cRNA 片段化。cRNA 约 30 μ g，加入 5 \times 片段化缓冲液 12 μ l，补充 RNase-Free 水至 60 μ l。混匀，94 $^{\circ}$ C 温浴 35 分钟，之后置于冰上。片段化 cRNA 的质检：取 2 μ g 片段化 cRNA 在 1.2%的甲醛变性琼脂糖凝胶上电泳，可见片段化的 cRNA 约为 35~200bp(图 2)。

4) 芯片杂交:

配制杂交液。根据芯片类型按下表配制适当量的杂交液，一张样品芯片需

250 μ l 杂交液，一张测试芯片需 90 μ l 杂交液。配制方法见表 1。

表 1. 芯片杂交液配制

	配方	600 μ l	终浓度
1.	片段化 cRNA(0.5mg/ml)	60 μ l	0.05 μ g/ μ l
2.	Oligo B2 对照(3nM)	10 μ l	50pM
3.	20 \times 真核杂交对照	30 μ l	1 \times
4.	鱼精 DNA(9.3mg/ml)	6.46 μ l	0.1mg/ml
5.	乙酰化 BSA(20mg/ml)	15 μ l	0.5mg/ml
6.	2 \times 杂交缓冲液	300 μ l	1 \times
7.	去核糖核酸酶水	178.6 μ l	

根据 Affymetrix 公司提供的芯片杂交方法，先进行测试芯片的杂交、洗染和
5 分析。然后，根据测试芯片的结果再进行样品芯片杂交分析。芯片杂交分析过程
简述如下，“步骤一”和“步骤二”同时进行，直到“步骤三”完成。

步骤一：预杂交芯片。取出芯片，平衡至室温；加入 1 \times 杂交缓冲液；45 $^{\circ}$ C，
60rpm，预杂交 10 分钟。

步骤二：杂交液的准备。杂交液混匀，离心片刻；99 $^{\circ}$ C，温浴 5 分钟；将杂
10 交液转至 45 $^{\circ}$ C，温浴 5 分钟；离心机最大转速离心 5 分钟。

步骤三：杂交芯片。吸出芯片中的 1 \times 杂交缓冲液；将杂交液加入到芯片中；
45 $^{\circ}$ C，60rpm，杂交 16 小时。杂交结束后，吸出芯片中的杂交液，加入洗液 A，
进行后面的洗染过程。

5) 洗脱芯片

15 在洗脱工作站上按照芯片类型，根据 Affymetrix 公司提供的芯片洗脱方法，
运行洗脱程序。

6) 扫描芯片

根据 Affymetrix 公司提供的芯片扫描方法，在扫描仪上完成芯片扫描。

Affymetrix 公司的人全基因组表达芯片(Affymetrix, GeneChip $^{\circ}$ human
20 genome U133 plus 2.0 arrays)包含人类全基因组约 3.85 万基因的 4.7 万个基因
转录本及其剪切变体。我们采用该芯片对人肝癌病人的癌组织和癌旁肝组织的基
因表达谱进行了研究分析，发现 DKK-1 基因在肝癌中高表达，肝癌组织中的表达

倍数约高于癌旁肝组织 30 倍。

实施例 4. Northern 杂交

1) Northern 膜片的制备:

5 准备工作。电泳槽，制胶板，梳子均用 3%双氧水浸泡 15 分钟以上，再用高压后的 DEPC 处理水冲洗干净。量筒，三角烧瓶 DEPC 水浸泡过液后，180℃干烤 8 小时。10×MOPS 甲醛凝胶电泳缓冲液(华舜公司，目录号 W67)。配制 1×甲醛凝胶电泳缓冲液 1000ml: 取 10×MOPS 甲醛凝胶电泳缓冲液 100ml、37%甲醛 20ml，加无 RNA 酶的水 880ml。5×RNA 上样缓冲液的配制: 80μl 500mM EDTA(pH8.0)、
10 720μl 37%甲醛、2ml 100%甘油、3084μl 甲酰胺和 4ml 10×MOPS 甲醛凝胶电泳缓冲液，加入适量的溴酚蓝，用无 RNA 酶的水补充体积至 10ml。1%甲醛变性凝胶的制备: 称取琼脂糖 1 克(GIBCO BRL, 目录号 15510-027)，加入无 RNase 水 90ml，微波融化后加入 1.8ml 37%的甲醛、10ml 的 10×MOPS 甲醛凝胶电泳缓冲液，混匀后灌胶。电泳之前，把胶置于 1×甲醛凝胶电泳缓冲液中至少平衡 30 分钟。RNA
15 样品的变性: 每份样品取总 RNA 10μg，按照每 4 倍体积的样品加入 1 倍体积的 5×RNA 上样缓冲液，混匀后 65℃温浴 10 分钟，立即置于冰上。

电泳、转移。变性处理的 RNA 样品进行甲醛凝胶变性电泳，电泳时间 4 小时。上行毛细管法将凝胶上的 RNA 转移到尼龙膜(S&S, 目录号 99J071)上，压重物 500 克，转移时间 18~24 小时。取出膜片，在 Milli Q 水中漂洗数分钟，将膜片置于
20 37℃干燥，80℃干烤 1.5 小时使 RNA 固定于尼龙膜上。

2) DNA 探针的标记与纯化:

探针的制备。PCR 扩增 DKK-1 基因，根据 NCBI 网站提供的人 DKK-1 基因的 cDNA 序列设计包括其编码区的特异引物(使用引物设计软件 primer3.cgi v 0.2a)，正向引物 5' GACCCAGGCTTGCAAAGTGACGGT3' 和反向引物
25 5' AGGAGTTCCTGATTTGGATAGCTGG3'，以人胎盘 cDNA(BD Clontech)为模板扩增 DKK-1，PCR 试剂盒为 BD Advantage™ 2 PCR kit(目录号 639206)反应体系如下: 10×反应缓冲液 1.25μl、正反向引物(10μM)各 1μl、人胎盘 cDNA 模板 1μl、Advantage2 聚合酶 0.5μl 和无菌水 7.75μl，总反应体积为 12.5μl。温度条件为: 94℃ 30sec, 72℃ 3min, 5 个循环; 94℃ 30sec, 70℃ 30sec, 72℃ 3min, 5
30 个循环; 94℃ 30sec, 68℃ 30sec, 72℃ 3min, 27 个循环。反应结束后，1%琼脂糖凝胶电泳，将特异条带回收、纯化。PCR 产物连接 TA 克隆后转化感受态菌

E. coli. TOP10^f, 挑取白色菌斑, 接种于 LB 培养液中, -37°C 过夜。抽质粒 DNA, 用 PCR 方法和 EcoR I (Promega, 目录号 R6011) 酶切鉴定, 含插入片段的阳性克隆测序分析。测序正确的阳性克隆, 提取质粒、EcoR I 酶切, 电泳回收 DKK-1 片段, -20°C 保存作为探针备用。

- 5 探针标记。随机引物法用放射性 [α -³²P]dCTP (Amersham Biosciences, 目录号 PB10205) 标记 DNA 探针 (NEBlot kit, 目录号 N1500S), 方法如下: 用无核酸酶的水 (1~33 μ l) 溶解 25ng 的 DKK-1 探针 DNA, 在沸水中煮 5min, 变性 DNA, 立即置冰上 5min, 迅速冷冻离心。于上述 DNA 样品中按以下顺序添加试剂, 10 \times 标记缓冲液 (包含随机引物) 5 μ l、dNTPs (dATP、dTTP、dGTP 各 2 μ l) 6 μ l、
- 10 [α -³²P]dCTP (3000Ci/mmol, 50 μ Ci) 5 μ l、DNA 多聚酶 I-klenow 片段 (5u) 1 μ l。于 37°C 孵育 1hr。

标记好的 DNA 探针用 QIAquick Nucleotide Removal kit (Qiagen, 目录号 28304) 纯化, 方法参照公司提供的说明书。

3) 杂交:

- 15 将制备好的膜片用 Milli Q 水润湿, 置入 68°C 预热的杂交液 (BD Bioscience, 目录号 636832) 中预杂交 3 小时以上, 补充鱼精 DNA 至 100 μ g/ml。

将纯化的探针在 95~100°C 水中煮 5min, 立即置于冰浴上 5min, 加入到杂交管中, 68°C 杂交 18~24 小时。

- 20 洗膜除去多余的以及非特异杂交上探针, 洗膜所用的溶液是溶液 1 (2 \times SSC, 0.05%SDS) 与溶液 2 (0.5 \times SSC, 0.1%SDS)。

4) 压片:

将洗好的膜片用塑料膜封闭, 压上 X-光片, -70°C 曝光。

- 25 我们采用 Northern 杂交实验对 12 例肝癌病人的癌组织和癌旁肝组织中 DKK-1 的表达情况进行了分析, 发现有 7 例患者只在癌组织中高表达 DKK-1, 而在同一患者相应的癌旁肝组织中不表达 (图 3), 每份样品的上样量约为 10 μ g 总 RNA。另外, 在分析的全部 16 种人正常组织中 DKK-1 仅表达于胎盘组织, 而在其它 15 种正常成人组织中不表达 (图 4), 每份正常人组织约 2 μ g polyA⁺ RNA。

实施例 5. ELISA 方法对肝癌病人外周血中 DKK-1 蛋白含量的测定

- 30 96 孔酶标板的包被。将 50 μ l 羊抗人 DKK-1 多体 (R&D systems, Inc., 目录号 AF1096, 100ng/ μ l) 稀释在 4, 950 μ l 的 PBS 溶液中, 96 孔酶标板每孔加入 50 μ l

上述稀释液，4℃过夜。0.05%PBST 溶液 200μl 洗 3 次，每次 3 分钟。

每孔加入 100μl 含 4%BSA(Sigma, 目录号 A3059-50G)的 PBS 溶液，室温封闭 2 小时。200μl 0.05%PBST 洗三次，每次 3 分钟。

取血清 10μl 加至 90μl 的含有 0.1%Tween 和 1%BSA 的 PBS 中，每个样品加复
5 孔，50μl/孔。取 2μl 重组人 DKK-1 蛋白标准品(R&D systems, Inc., 目录号 1096-DK, 10ng/μl)加至 400μl 的含有 0.1%BSA 的 PBS 中，然后作倍比稀释，设 7 个稀释度，每个标准品加复孔，50μl/孔。室温 2 小时，200μl 0.05%PBST 洗三次，每次 3 分钟。

取 20μl 生物素标记的羊抗人 DKK-1 抗体(R&D systems, Inc., 目录号
10 BAF1144, 50ng/μl)稀释在 4,980μl 含 0.1%BSA 的 TBS 溶液中，每孔加入 50μl 的上述稀释液。室温 2 小时，200μl 0.05%PBST 洗三次，每次 3 分钟。

取链霉亲和素偶联的辣根过氧化物酶(Vector laboratories, Inc., 目录号 SA-5004)0.5μl，加入到 5ml 的缓冲液(10mM 磷酸盐, 0.15M 氯化钠, 0.1%Tween20, pH7.8)中进行稀释，每孔加入 50μl 的上述稀释液，室温 30 分钟。200ul 0.05%PBST
15 洗 3 次，每次 3 分钟。

每孔加入 100μl OPD 底物溶液[8mg OPD(DakoCytomation, 目录号 S2045)溶于 12ml 水和 5μl H₂O₂中]显色，室温 30 分钟。

每孔加入 100μl 的 0.5M H₂SO₄ 终止液，将未加标准品的孔设为空白对照，酶标仪 490nm 处测各孔 OD 值。

20 根据标准品作 log-log 标准曲线(浓度对数为横坐标，OD 值对数为纵坐标)，再计算出每个血清样品中的 DKK-1 含量。

肝癌病人血清 DKK-1 的 ELISA 检测结果：34 例正常人血清中 DKK-1 的平均值约为 3.61μg/L(其中最高值为 8.21μg/L)。14 例肝硬化病人的平均值约为 2.93μg/L(其中最高值为 10.73μg/L)。128 例肝癌病人的平均值约为 4.85μg/L[其中：
25 10 例 10μg/L<DKK-1<20μg/L；1 例 DKK-1=144.4μg/L。11/128 约占本次总检测肝癌病人的 8.59%。在这 11 例检出高 DKK-1 的肝癌病人中，有 2 例是 AFP 阴性的肝癌病人，1 例是 AFP<200μg/L 的肝癌病人(AFP=60.15μg/L)，占 27.3%(3/11)]。

30 实施例 6. ELISA 方法检测和分析体外培养的多种人肿瘤细胞分泌的 DKK-1 蛋白

35mm 皿复苏细胞，待细胞长至 90%满度时传代于 35mm 皿中，每个皿加入约 3

×10⁵的细胞数和 1mL 培养液，24 小时后收集细胞培养上清液。

96 孔酶标板的包被条件和方法与实施例 5 完全相同。取细胞培养上清 20μl 加至 80μl 的含有 0.1%Tween 和 1%BSA 的 PBS 中，每个样品加复孔，50μl/孔。余下实验完全按实施例 5 进行操作。

5 在对照的小牛血清全培养液和胎牛血清全培养液中，DKK-1 蛋白浓度基本为零(表 2)；在对照的小鼠成纤维细胞 NIH3T3 和小鼠正常肝纤维样细胞 HSC-T6 的培养上清中也未检出 DKK-1 蛋白(表 2)；但在 8 种人类肿瘤细胞或人胚肾细胞 293 的培养上清中检出有高表达的 DKK-1 蛋白，其中人脑胶质瘤细胞 U251 为最高(214.6μg/L)(表 2)。

10

表 2. 肿瘤细胞培养上清中 DKK-1 蛋白含量的测定

细胞种类	细胞培养上清中
小牛血清全培养液对照	0.0
胎牛血清全培养液对照	1.8
小鼠成纤维细胞 NIH3T3	0.8
小鼠正常肝纤维样细胞 HSC-T6	0.5
大细胞肺癌 A549	143.1
卵巢癌 SKV03	15.5
胃癌 SW-1900	51.0
乳腺癌 MCF-7	69.5
人胚肾细胞 293	51.9
大鼠脑胶质瘤 C6	55.4
人脑胶质瘤 U251	214.6
宫颈癌 C33A	85.2
宫颈癌 HeLa	102.3
黑色素瘤 A375	74.8
高转移黑色素瘤 SCI-375	61.1
低转移肝癌细胞 MHCC97-L	112.0
高转移肝癌细胞 HCCLM3	118.2
肝癌细胞 HepG2	182.8

肝癌细胞 Hep3B	58.7
肝癌细胞 BEL-7402	79.1
肝癌细胞 SMMC-7721	52.3
肝癌细胞 HuH7	76.7

实施例 7

试剂盒

制备了一试剂盒，其含有针对 DKK-1 的核酸探针(实施例 4 所述制备)，PCR
5 反应液(用于扩增 DKK-1)。根据标准方法扩增了 100 个肝癌病人的正常组织和癌细胞的 cDNA。检测结果发现，100 个肝癌病人中的肝癌细胞的 DKK-1 表达量是正常细胞的将近 100 倍。

同理，对肺癌、乳腺癌、胶质瘤患者进行了检测，也得到了同样的高达 50-100 倍的 DKK-1 表达量的结果。

10

实施例 8

根据实施例 5 的方法，用一试剂盒，其含有针对 DKK-1 的特异性抗体(实施例
5 所述制备)以及 ELISA 所需的相关试剂。根据标准方法对 100 个肝癌病人的正常
15 组织和癌细胞进行 ELISA 分析。检测结果发现，100 个肝癌病人中的肝癌细胞的
DKK-1 表达量是正常细胞的将近 100 倍。

同理，对肺癌、乳腺癌、胶质瘤患者进行了检测，也得到了同样的高达 50-100 倍的 DKK-1 表达量的结果。

实施例 9

20 用 DKK-1 的特异性单克隆抗体对荷人肝癌裸鼠模型进行了放射性免疫学显像
及生物学分布研究

1. 材料和方法

1.1 BALB / C 裸鼠，均为雄性，4—6 周龄，体重 20 g 左右，共 11 只，上海
25 市肿瘤研究所培养。抗 DKK1 单克隆抗体 500ug/1ml, mIgG1 抗体 1mg/1ml 购自 R&D
systems, Inc。

1.2 细胞培养 (1)细胞复苏：取出冻存的人肝癌 SMMC-7721 细胞冻存管后
迅速投入 37℃水浴中复温，尽快融化。(2)从水浴中取出冻存管打开，用吸管吸

出细胞悬液，注入离心管并滴加 5ml 培养液(DMEM+10%小牛血清)，混合后 1000 rpm 离心 5 min，除去上清重复清洗 3 遍。(3)清洗后细胞用培养液稀释，接种培养瓶，培养瓶内加 5 ml 培养液，放 37°C CO₂ 培养箱，次日更换培养液，继续培养。(4)培养至贴壁细胞占 80%时，消化分瓶。吸管将培养液吸净，用 PBS 液洗两遍，吸净 PBS 液，加几滴胰酶，混匀平放至 37°C 温箱消化 1 min，在倒置显微镜下见细胞皱缩成圆形，加 2 ml 培养液中止消化，将细胞从瓶壁吹打下来，移至干净试管内 1000 rpm 离心 5min，吸去上清，加 2 ml 培养液将沉淀细胞吹起，混匀。(5)细胞进行计数，计算平均值。

1.3. 荷人肝癌裸鼠模型建立 将 SMMC-7721 细胞用 PBS 制成单细胞悬液，取裸鼠 4 只每只于其背部皮下注射 SMMC-7721 细胞 $0.2-1 \times 10^7 / 0.2$ ml，待肿瘤长至直径 0.8 cm 左右时，手术取出肿瘤。立即浸入无菌生理盐水中，剪碎成 2.0 mm 直径的小块，用套置管针于裸鼠背右侧皮下移植，如此反复移植几次(每次移植裸鼠不少于三只)。使得 SMMC-7721 细胞的体内生物性状得以稳定。选取 11 只裸鼠以上述过程行背右侧皮下移植，5 周后肿瘤长到直径 1cm 备用。

1.4. 抗 DKK1 单抗的标记用改良氯胺 T 法，用碘 [¹³¹I] 分别标记抗 DKK1 单抗和 IgG1，SephadexG50 柱分离纯化。测定碘 [¹³¹I]-DKK1 的放射化学纯度为 95%，放射性浓度为 200uCi/ml，放射性比活度为 5uCi/ug。碘 [¹³¹I]-IgG1 的放射化学纯度为 94%，放射性浓度为 75uCi/ml，放射性比活度为 1μCi/ug。

1.5. 实验前 24 小时饮用 1% 的 KI 水，封闭甲状腺。实验具体步骤如下：(1) 实验分组及给药方法：将裸鼠分为 A、B 组，每组分别为 6 只和 5 只裸鼠，A 组均在尾静脉分别注射 30uCi 的碘 [¹³¹I]-DKK1，B 组在尾静脉分别注射 12μCi 的碘 [¹³¹I]-IgG1。(2)生物学分布及其显像：SPECT 显像。注射标记抗体后于 24、48、96、120 小时分批吸入乙醚麻醉，胶布固定行 SPECT。使用 ADAC WeltesPlus 双探头 SPECT，配备高能准直器，能峰 364Kev±10%窗宽，矩阵 64×64，放大倍数 2.02，预置采集计数 100K。(3)于行 SPECT 后 24、48、96、120 小时拉颈处死，取肿瘤、血、肝、肺和其它脏器，称重测其放射性计数(Cpm 值)。

2. 结果

2.1 SPECT 结果：实验 I 组 6 只实验鼠中有 1 只出现阳性显像(见图 5)，实验 II 组未出现阳性显像，I 组明显优于 II 组。

2.2 ¹³¹I-DKK1 分布趋势图(见图 6)显示，¹³¹I-DKK1 随着时间的推移在瘤体组织出现聚集，120 小时达到高点。¹³¹I-IgG1 在小鼠体内，96 小时达到高点。

3. 讨论

核素肿瘤显像特异性高，灵敏度好，无创伤又具系统性的特点对某些疾病成为首选的筛选检查，是一些肿瘤治疗前有效的分期工具。本实验通过用 ^{131}I 标记的抗 DKK1 单抗的体内分布实验显示抗 DKK1 单抗注射后肿瘤区出现明显的放射性浓聚，说明抗 DKK1 单抗能识别肿瘤和正常组织，对人肝癌细胞的亲和性较高。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

权 利 要 求

1. DKK-1 蛋白或其核酸序列在制备癌症诊断试剂或试剂盒中的用途，所述癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤。
- 5 2. 如权利要求 1 所述的用途，其特征在于，所述癌症诊断试剂是抗 DKK-1 蛋白特异性抗体或 DKK-1 蛋白特异性核酸探针。
3. 一种检测肝癌的方法，其特征在于，该方法包括下列步骤：
a) 将与放射性核素偶联的抗 DKK-1 单克隆抗体输给动物；
b) 检测抗 DKK-1 单克隆抗体在体内的聚集；
10 c) 所述聚集表明肝癌的存在。
4. 如权利要求 3 所述的方法，所述放射性核素是 ^{133}I 。
5. 如权利要求 3 所述的方法，所述动物是人。
6. 一种癌症诊断试剂盒，所述癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤，其特征在于，该试剂盒含有容器，所述容器中含有抗 DKK-1 抗体；以及标签，所述标
15 签说明所述试剂盒用于诊断癌症。
7. 一种癌症诊断试剂盒，所述癌症选自肝癌、肺癌、乳腺癌和胶质瘤，其特征在于，该试剂盒含有容器，所述容器中含有 DKK-1 蛋白特异性核酸探针；以及标签，所述标签说明所述试剂盒用于诊断癌症。
8. 一种体外检测特异性 DKK-1 蛋白表达的方法，其特征在于，该方法包括：
20 用抗 DKK-1 蛋白特异性抗体或 DKK-1 特异性核酸探针与细胞样品反应，以正常肝细胞为对照；
 比较抗体或探针的结合量，其中高于对照的量表明该细胞为癌细胞，低于或等于对照的量表明该细胞为正常细胞。
9. 如权利要求 8 所述的方法，其特征在于，所述结合量是通过检测与探针或
25 抗体偶联的可检测基团测得的。
10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述可检测基团选自生色团、化学发光基团、荧光团或同位素。

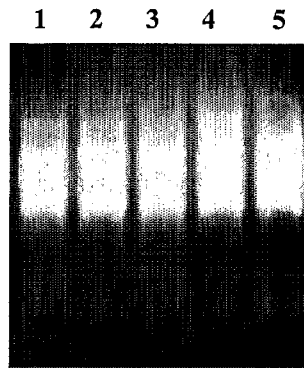


图 1

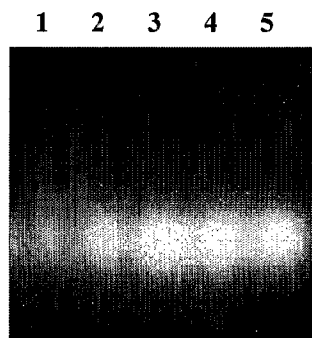


图 2

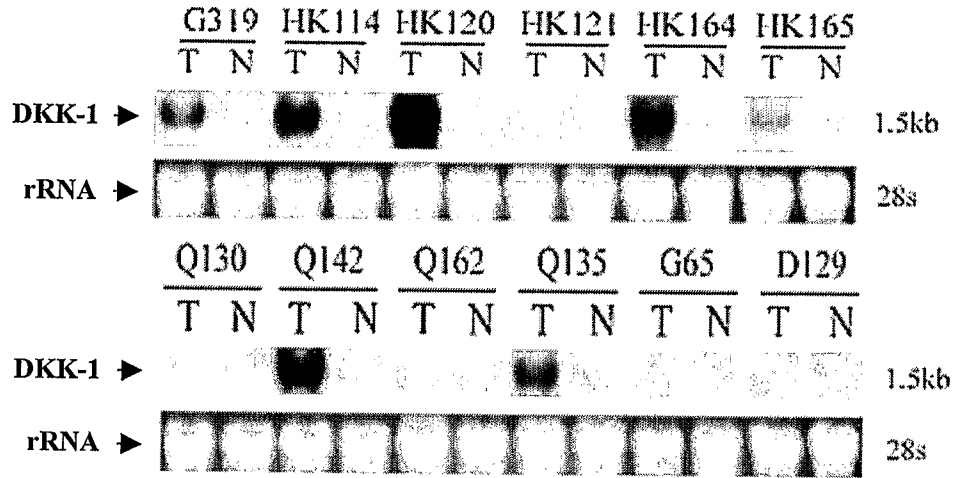


图 3

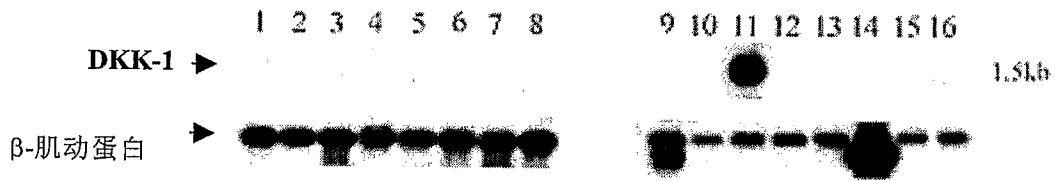


图 4

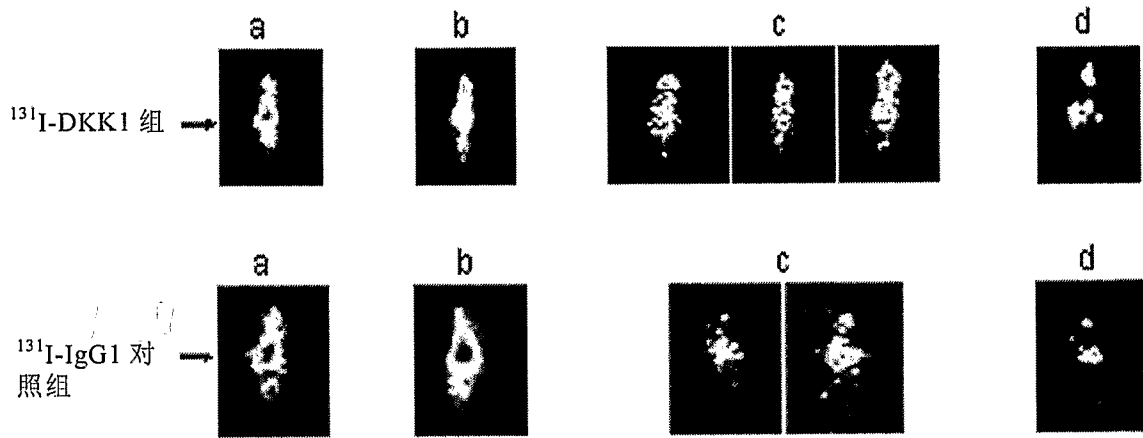
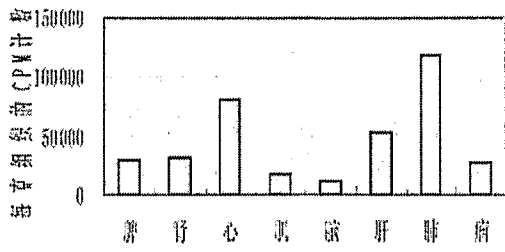
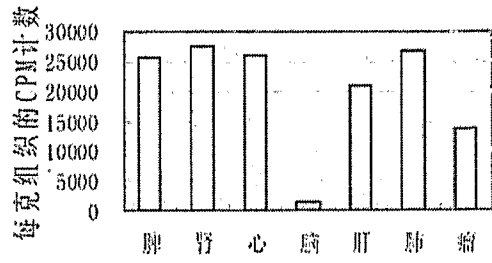


图 5

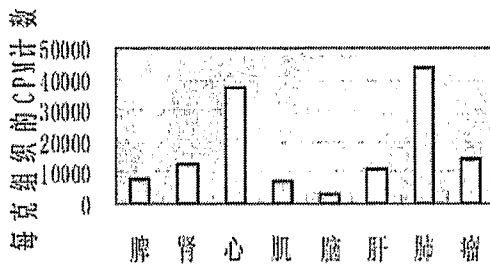
DKK1的单抗在24小时的分布趋势图



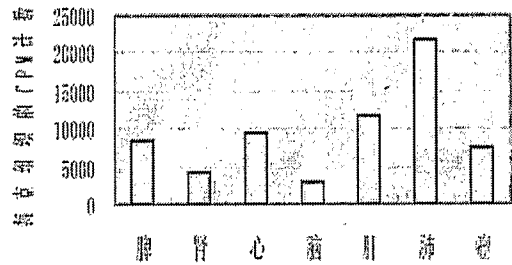
IgG1的体内24小时的分布趋势图



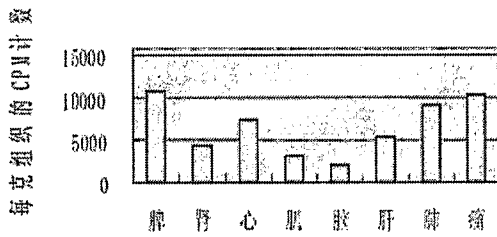
DKK1的单抗48小时的分布趋势图



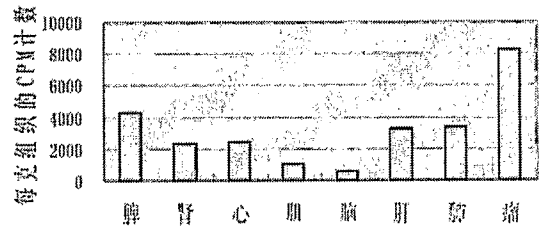
IgG1的48小时的分布趋势图



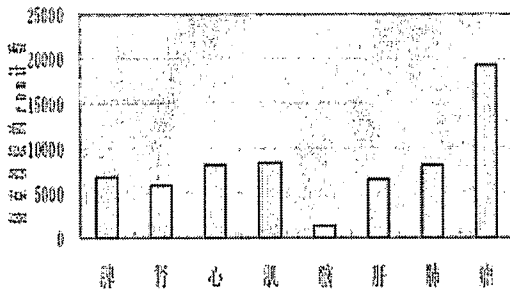
DKK1的单抗 96 小时的分布趋势图



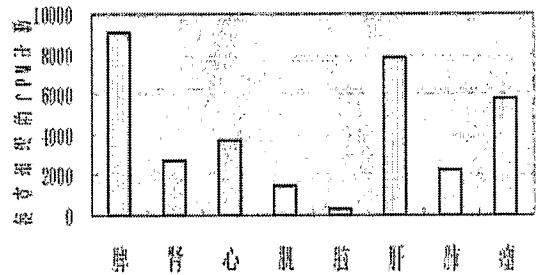
IgG1的96小时的分布趋势图



DKK1的单抗120小时的分布趋势图



IgG1的120小时的分布趋势图



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000382

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See supplemental box

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q (2006.01), C07K (2006.01), C12N (2006.01), G01N (2006.01)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

EPODOC, WPI, PAJ, SCI, Embase, Nature, CNPAT, CNKI
DKK, dickkopf, diagnose, detect, cancer, tumor, tumour

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 0052047 A (MILL-N), 08.09.2000, see Pages 80,93-96, Claims.	1-2, 6-10
X	WO 2005033343 A (CHIR), 14.04.2005, see the abstract.	1-2, 6-10
A	WO 2004053063 A (SHAU-I), 24.06.2004, see the whole document.	1-2, 6-10
E	JP 2006217844 A (UYTY), Filing Date: 09.02.2005, Publication Date: 24.08.2006, see the whole document.	1-2, 6-10

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 Dec. 2006 (08.12.2006)

Date of mailing of the international search report

28 DEC 2006 (28.12.2006)

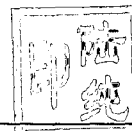
Name and mailing address of the ISA/CN

The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. 86-10-62019451

Authorized officer

LU, Chun

Telephone No. (86-10) 62085058



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000382

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.: 3-5
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

methods for treatment of the human or animal body by surgery or therapy, as well as diagnostic methods.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2006/000382

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 0052047 A	2000.09.08	AU3510200A	2000.09.21
		EP1161445A	2001.12.12
WO 2005033343 A	2005.04.14	EP1678325A	2006.07.12
WO 2004053063 A	2004.06.24	US2004137489A	2004.07.15
		AU2003302926A	2004.06.30
		EP1567663A	2005.08.31
		US2006019895A	2006.01.26
		JP2006512911T	2006.04.20
		AU2003302926A	2005.11.13
		MXPA05006033A	2006.03.01
JP 2006217844 A	2006.08.24	None	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2006/000382

CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12Q1/68 (2006.01) i

C07K14/47 (2006.01) i

C12N15/12 (2006.01) i

G01N33/574 (2006.01) i

G01N33/53 (2006.01) i

G01N33/50 (2006.01) i

G01N33/15 (2006.01) i

A. 主题的分类

参见附加页

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C12Q (2006.01), C07K (2006.01), C12N (2006.01), G01N (2006.01)

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

EPODOC, WPI, PAJ, SCL, Embase, Nature, CNPAT, CNKI
DKK, dickkopf, diagnose, detect, cancer, tumor, tumour, 诊断, 检测, 癌, 肿瘤

C. 相关文件

类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 0052047 A (MILL-N), 08.09.2000, 见说明书第 80、93-96 页, 权利要求书	1-2, 6-10
X	WO 2005033343 A (CHIR), 14.04.2005, 见摘要	1-2, 6-10
A	WO 2004053063 A (SHAU-I), 24.06.2004, 见全文	1-2, 6-10
E	JP 2006217844 A (UYTY), 申请日为 09.02.2005, 公开日为 24.08.2006, 见全文	1-2, 6-10

其余文件在 C 栏的续页中列出。

见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

08.12 月 2006 (08.12.2006)

国际检索报告邮寄日期

2006.12.28 2006.12.28

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

陆纯

电话号码: (86-10) 62085058



第II 栏 关于某些权利要求不能作为检索主题的意见(接第 1 页第 2 项)

按条约 17(2)(a)对某些权利要求未作国际检索报告的理由如下:

1. 权利要求: 3-5

因为它们涉及到不要求本国际检索单位进行检索的主题, 即:

治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法以及诊断方法

2. 权利要求:

因为它们涉及到国际申请中不符合规定的要求的部分, 以致不能进行任何有意义的国际检索,
具体地说:

3. 权利要求:

因为它们是从属权利要求, 并且没有按照细则 6.4(a)第 2 句和第 3 句的要求撰写。

第III 栏 关于缺乏发明单一性时的意见(接第 1 页第 3 项)

本国际检索单位在该国际申请中发现多项发明, 即:

1. 由于申请人按时缴纳了被要求缴纳的全部附加检索费, 本国际检索报告针对全部可作检索的权利要求。

2. 由于无需付出有理由要求附加费的劳动即能对全部可检索的权利要求进行检索, 本国际检索单位未通知缴纳任何附加费。

3. 由于申请人仅按时缴纳了部分被要求缴纳的附加检索费, 本国际检索报告仅涉及已缴费的那些权利要求。具体地说, 是权利要求:

4. 申请人未按时缴纳被要求的附加检索费。因此, 本国际检索报告仅涉及权利要求中首次提及的发明; 包含该发明的权利要求是:

关于异议的说明: 申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 缴纳了异议费。

申请人缴纳了附加检索费, 同时提交了异议书, 但未缴纳异议费。

缴纳附加检索费时未提交异议书。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2006/000382

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 0052047 A	2000.09.08	AU3510200A	2000.09.21
		EP1161445A	2001.12.12
WO 2005033343 A	2005.04.14	EP1678325A	2006.07.12
WO 2004053063 A	2004.06.24	US2004137489A	2004.07.15
		AU2003302926A	2004.06.30
		EP1567663A	2005.08.31
		US2006019895A	2006.01.26
		JP2006512911T	2006.04.20
		AU2003302926A	2005.11.13
		MXPA05006033A	2006.03.01
JP 2006217844 A	2006.08.24	无	

主题的分类

C12Q1/68 (2006.01) i

C07K14/47 (2006.01) i

C12N15/12 (2006.01) i

G01N33/574 (2006.01) i

G01N33/53 (2006.01) i

G01N33/50 (2006.01) i

G01N33/15 (2006.01) i