

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序及粗體字，請勿任意更動，※記號部分請勿填寫)

※ 申請案號： 95145918

※ 申請日期： 95. 12. 8

※IPC 分類： G01N 33/53 (2006.01)

## 一、發明名稱：(中文/英文)

腸胃疾病生物標記分子及其檢測方法

## 二、申請人：(共 1 人)

姓名或名稱：(中文/英文)

國立台灣大學

代表人：(中文/英文) 李嗣澐

住居所或營業所地址：(中文/英文)

台北市羅斯福路 4 段 1 號

國 籍：(中文/英文) 中華民國/R.O.C.

## 三、發明人：(共 4 人)

姓 名：(中文/英文)

1. 周綠蘋 / CHOW, LU-PING

2. 林玉芬 / LIN, YU-FEN

3. 林肇堂 / LIN, JAW-TOWN

4. 吳明賢 / WU, MING-SHIANG

國 籍：(中文/英文)

1.-4. 中華民國/R.O.C.

四、聲明事項：

☒ 主張專利法第二十二條第二項 ☒ 第一款或 ☐ 第二款規定之事實，其事實發生日期為：95 年 6 月 11 日。

☐ 申請前已向下列國家（地區）申請專利：

【格式請依：受理國家（地區）、申請日、申請案號 順序註記】

☐ 有主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 無主張專利法第二十七條第一項國際優先權：

☐ 主張專利法第二十九條第一項國內優先權：

【格式請依：申請日、申請案號 順序註記】

☐ 主張專利法第三十條生物材料：

☐ 須寄存生物材料者：

國內生物材料 【格式請依：寄存機構、日期、號碼 順序註記】

國外生物材料 【格式請依：寄存國家、機構、日期、號碼 順序註記】

☐ 不須寄存生物材料者：

所屬技術領域中具有通常知識者易於獲得時，不須寄存。

## 九、發明說明：

### 【發明所屬之技術領域】

本發明係關於一種利用偵測幽門螺旋菌 GroES 蛋白質或核苷酸以篩選與幽門螺旋菌有關之腸胃疾病。

### 【先前技術】

幽門螺旋菌 (*Helicobacter pylori*) 會導致慢性活動性胃炎 (Chronic active gastritis)、胃潰瘍 (Gastric ulcer)、十二指腸潰瘍 (Duodenal ulcer; DU) [1,2]，而且與胃癌 (Gastric cancer; GC) 的發展有強烈關聯性 [3,4]。雖然其發生機率以及致死率已經降低，GC 仍是世界上第二種最常導致死亡的癌症 [5]。除了宿主以及環境因子外，幽門螺旋菌慢性感染被認為是導致 GC 的主要原因。案例研究發現幽門螺旋菌與胃癌的關係：幽門螺旋菌血清陽性反應者相較於血清陰性反應者有 2.1 至 16.7 倍高風險發展成胃癌 [3,4]，而且多數 GC 患者 (超過 70 %) 被發現有幽門螺旋菌感染 [6,7]。

臨床上，DU 與 GC 被認為是相歧異的，當酸性產物增加 DU 的風險，即會降低病人得 GC 的風險 [8]。進一步，DU 在發展為 GC 上具有較低風險 [6,9]。此一發現可以解釋 DU 病人多具有胃竇局限性胃炎 (antral-predominant gastritis)，相反地胃上部萎縮性胃炎 (corpus-predominant atrophic gastritis) 則被認為是 GC 的前兆。[10] 近來兩個研究報告藉由比較 DU 以及 GC 血清的二維電泳免疫轉漬分析資料而確認出幽門螺旋菌與 DU 和 GC 有關的抗原。[11,12] 在兩個研究中，不同的抗原係由比較轉漬點的強度而確認，其可能會因為不同疾病以及不同個體的免疫反應不同而有所偏差。然而這些蛋白質的血清反應案是這些抗原會被初步免疫反應中的人類的抗原呈現細胞所確認、處理以

及呈現。

除了引起體液免疫反應，幽門螺旋菌感染會強烈地引起單核球/巨噬細胞(monocyte/macrophages)調控細胞激素(cytokine)的產生。[13]這些免疫反應主要與黏膜產生的IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$ 以及TNF- $\alpha$ [14,15]和上皮細胞分泌的IL-8[16]有關。血清中IL-6以及IL-1 $\beta$ 值與幽門螺旋菌所引起的GC有關。IL-8表現與血管新生有關且與GC的血管密度強烈關聯。[18]進一步，TNF- $\alpha$ 以及IL-1 $\beta$ 的基因的多型性則與增加非贛門GC(non-cardia GC)風險有關。因此這些細胞激素被認為在幽門螺旋菌有關的GC致病機轉中扮演非常重要的角色。

幽門螺旋菌感染的宿主反應會引發胃黏膜的多種變化而形成GC。當幽門螺旋菌感染會使得細胞凋亡減少細胞增生增加而導致胃腺癌(gastric adenocarcinoma)。幽門螺旋菌感染會改變細胞週期調控蛋白p27<sup>Kip1</sup>的表現，造成一抗細胞凋亡的表現型。[22]幽門螺旋菌感染會引起原致癌基因(proto-oncogenes) *c-jun* 和 *c-fos* 的表現。[23]此外，幽門螺旋菌也會活化腸胃上皮細胞表現cyclin D1基因。[24]重要的是，須注意幽門螺旋菌感染所造成的細胞激素反應以及分子改變，係基於宿主的基因背景以及微生物的致病性。因此確認潛在病源-宿主作用之GC相關的幽門螺旋菌致病因子對於進一步了解幽門螺旋菌相關胃十二指腸疾病的致病機轉是相當重要的。

習知技術只能確認幽門螺旋菌與GC有關，然而實際幽門螺旋菌導致GC的致病因子卻尚未發現，若能找出幽門螺旋菌導致GC的致病因子，並應用於腸胃疾病抑制或是預防上，以及胃癌的診斷上對於臨床醫學之治療將有相當大地

助益。

### 【發明內容】

有鑑於臨床上有使用生物標記分子以檢測腸胃疾病之需要，本發明提供一用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其主要目的在於檢測幽門螺旋菌感染與否，以供臨床上針對不同狀態腸胃疾病以進行治療。

本發明之另一目的在於提供一種腸胃疾病之檢測套組，可從檢體的檢測瞭解腸胃疾病發生狀態，以進行臨床上的診斷與治療。

本發明之又一目的在於提供一種腸胃疾病之檢測方法，用以幫助臨床上之腸胃疾病的診斷與治療。

為達上述目的，本發明提供一種用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其係選自：GroES 之寡核苷酸序列、其互補股或其衍生物、其胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。前述 GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。

在一較佳實施例中，GroES 寡核苷酸序列係選自 SEQ ID NO：1。GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：2。

本發明較佳係用於檢測由幽門螺旋菌所導致之胃癌。

本發明另提供一種用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其係選自：SEQ ID NO:1 所示之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。

本發明另提供一種腸胃疾病之檢測套組，包含：生物標記分子，其係選自於 GroES 之寡核苷酸序列、其互補股和衍生物、其胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、

其對應之抗體或其組合物。GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。

在一較佳實施例中，GroES 寡核苷酸序列係為 SEQ ID NO：1。GroES 胺基酸序列係為 SEQ ID NO：2。

在一較佳實施例中，前述之檢測套組可進一步包含可辨識 SEQ ID NO:2 所示之任一胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其組合物或其對應之抗體的二級抗體。

本發明亦提供一種胃癌之檢測方法，係包含下列步驟：(a)提供一檢體；(b)提供一生物標記分子，其係選自：SEQ ID NO:1、所示之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應抗體或其組合物；(c)將前述生物標記分子與檢體中之待測物質接觸，前述待測物質係選自：GroES 之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應抗體或其組合物；及(d)偵測前述步驟(c)中生物標記分子與檢體中之待測物質接觸後之產物。前述檢體係包含血清、唾液及胃部組織。

於本發明之一實施態樣中，前述生物標記分子係可進一步先行固定於基材上。該基材包含，但不限於，薄膜、免疫分析盤或生物晶片。

在一較佳實施例中，前述檢體中待測物質係可進一步先行以螢光標記進行標示。

在一較佳實施例中，前述檢測方法係可於步驟(d)之前增加一利用二級抗體辨識吸附對應抗體之步驟。

在一較佳實施例中，前述步驟(d)當偵測胺基酸序列時，係利用酵素連結免疫吸附分析 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析 (RIA)、西

方墨點法 (western blot) 或免疫螢光分析 (Immunofluorescence) 方法。

在一較佳實施例中，前述步驟(d)當偵測寡核苷酸序列時，係利用反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR) 或原位雜交反應 (*In situ* hybridization)。

本發明又提供一種用於檢測胃癌之生物標記分子，其係選自：GroES 之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。

在一較佳實施例中，GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：2。

本發明又提供一種胃癌之檢測套組，包含：生物標記分子，其係選自於 GroES 之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物；其中前述 GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。

在一較佳實施例中，前述之 GroES 胺基酸序列係為 SEQ ID NO：2。

在一較佳實施例中，前述之檢測套組可進一步包含可辨識 SEQ ID NO:2 所示之任一胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其組合物或其對應之抗體的二級抗體。

本發明所述之”變異體”與 GroES 之原胺基酸序列具有大於 80% 之序列同一性。本發明所述之”衍生物”係指於前述核苷酸之序列或其互補股之 3'端或 5'端修飾其他核苷酸序列，使其仍和原序列具有 70%或以上相似性之寡核苷酸序列，較佳為具有 90%或以上相似性之寡核苷酸序列。

本發明利用 GroES 之寡核苷酸序列或胺基酸序列等分子做為生物標記分子，可有效檢測幽門螺旋菌所導致的腸胃疾病甚至是胃癌，以供臨床上針對不同病因進行治療。

### 【實施方式】

本發明係利用 GroES 之寡核苷酸序列或胺基酸序列等分子做為生物標記分子，用以檢測幽門螺旋菌所導致的腸胃疾病甚至是胃癌，以進行臨床上的診斷與治療。

以下係提供利用本發明之實施例詳細說明書本發明之技術及特點，然本實施例並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾。

### 實施例

#### 實驗材料

#### 菌株

幽門螺旋桿菌 HC5 菌株係由國立台灣大學附屬醫院之具有 GC 病患的胃部之胃活體切片檢體(Endoscopy biopsy sample)分離而得之。該菌株以 BBL™ stacker™ 培養基(BD Biosciences, Palo Alto, CA)於 37°C 微好氧(microaerobic)狀態培養。液態培養係於含有布氏肉湯(Brucella Broth; Difco Laboratories, Detroit, MI)以及 10%胎牛血清(FBS, Gibco, Grand Island, NY)、萬古黴素(Vancomycin; 12.5 mg/l; Sigma, St. Louis, MO)、二性黴素 B (amphotericin B; 2.5 mg/l; Sigma)的平底錐形瓶中，以 150 rpm 速度培養 48-72 小時。培養液以 1000g 離心 10 分鐘，之後上清液以 0.2 μm 孔徑濾膜(Pall,

Ann Arbor, MI)過濾以去除完整的細菌細胞。

### 病患與血清樣本

血清樣本係由 1999 年 12 月至 2001 年 12 月間參與台灣幽門螺旋菌與胃癌國家研究計畫之個人蒐集而得。該計畫係由行政院衛生署與國科會所核准。實驗組係紀錄於本機構診斷出 GC(n=95)並進行治療性胃切片的病患。非癌症組(對照組)係由健康檢查中篩選，所有人係經由上消化道內試鏡檢查(Upper Gastrointestinal endoscopic examination)且無 GC 損傷者。本實施例紀錄 94 個有胃癌以及 124 個有 DU 的患者。幽門螺旋菌感染狀態係以培養或組織學檢驗胃活體切片樣本。腫瘤在組織學根據 Lauren' s 分類[25]分為腸道型(Intestinal type)以及瀰漫型(Diffuse type)。腫瘤分期與位置係結合病患之醫師所完成之特殊報告表格、病例報告以及病理學報告評估來決定。GC 分期係分為早期(腫瘤侷限於黏膜層(mucosa)或黏膜下層(submucosa))以及進階期(腫瘤侵犯穿透固有肌層(muscularis propria))，腫瘤位置分為胃竇(antrum)、胃體(body)、賁門(cardia)。此外，選擇 32 個胃黏膜層外觀正常且無證據顯示有幽門螺旋菌感染者作為控制組。從所有參與者所蒐集之血清樣本分類並分裝之後冷凍於 - 80°C。分裝瓶在分析之前只被解凍一次。

### 實驗方法

#### 二維電泳與免疫轉漬法(Two-dimensional electrophoresis and immunoblotting)

以一如先前技術所述[26]之酸-甘胺酸萃取方法

(acid-glycine extraction procedure)，由幽門螺旋菌萃取細胞表面蛋白。幽門螺旋菌酸-甘胺酸萃取物以 TCA (20%) 沉澱，並以二維電泳將蛋白分開[27]。蛋白質萃取物浸潤於二維電泳樣本緩衝液(8 M urea, 2% Pharmalyte pH 3-10, 60 mM DTT, 4% CHAPS, 溴酚藍 bromophenol blue)，二維電泳膠第一維跑 IPG 膠條(Immobiline DryStrip pH 3-10, 11 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)，第二維跑 12.5% SDS-聚丙烯醯氨(polyacrylamide)凝膠。為進行免疫偵測，二維電泳膠上的蛋白質被轉漬於一 PVDF 膜(Millipore, Bedford, MA)上，接著於室溫下將該膜於填充緩衝液(blocking buffer; 26 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, pH 7.5, 1% skimmed milk)中浸潤 1 小時，並浸潤於 GC 或 DU 病患的血清樣本或正常混合(pooled)的血清(1:1000 in 0.05% Tween 20/blocking buffer)。二級抗體為山葵過氧化酵素(horseradish peroxidase)接合山羊抗人類 IgG(Chemicon, Temecula, CA)，鍵結抗體之受體為 3-胺基 9-乙基-吡啶(3-amino-9-ethyl-carbazole) (AEC, Sigma)。

### 蛋白質鑑定

將單一蛋白質點切下並分別以膠體內胰蛋白酶分解(In-gel tryptic digestion)。蛋白質點以 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  於 50% CAN 中去染，並於一 SpeedVac 濃縮機乾燥。之後蛋白質浸潤於 37°C 定序級胰蛋白酶(Promega, Madison, WI)( 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 7.8)中隔夜分解。分解的肽鏈連續以 1% TFA 以及 0.1% TFA/60% ACN 萃取。萃取物凍乾後使用 QSTAR<sup>TM</sup> XL Q-TOF (Applied Biosystems, Framingham, MA, USA) 結合 UltiMate<sup>TM</sup> Nano LC system (Dionex/LC Packings, Amsterdam, Netherlands)分析之。MS/MS 光譜波峰表(peak list)係使用

Mascot Search version 1.6b4 in Analyst<sup>®</sup> QS 1.1 (Applied Biosystems) 製作。該波峰表上傳至 Matrix Science 公共網站的 Mascot MS/MS 離子搜尋系統(Mascot version 2.0)並以 NCBI nr 資料庫進行蛋白質確認。至多允許兩個切位被忽略。半胱胺酸胺基甲醯胺基甲基化(Cysteine carbamidomethylation)、麩醯胺酸/天門冬醯胺脫醯化 ( glutamine/asparagine deamidation )、甲硫胺酸(methionine)氧化被設定為可能的修飾。胜肽以及 MS/MS 片段之分子量誤差值在分別為 0.3 與 0.5Da。搜尋時選擇  $MH_2^{++}$  and  $MH_3^{+++}$  作為前驅胜肽價數狀況(charge states)。當離子分數高於 54，表示有一顯著相符的對象。每一胜肽 MS/MS 光譜之單獨數值大於 20。由此一相符名單中，幽門螺旋菌 26695 菌株之蛋白質與位置標記(locus tag)被選擇如表一所示。

表一  
幽門螺旋菌蛋白在 GC 群組被確認之頻率比在 DU 群組高，資料由 nano-LC-MS/MS 分析

| 編號 | 蛋白                                           | 位置標記   | 理論 pI/M,<br>(Da) | 序列覆蓋<br>(%) | 分數   | 血清反應(%)      |              | 比例<br>(G/D) <sup>a</sup> |
|----|----------------------------------------------|--------|------------------|-------------|------|--------------|--------------|--------------------------|
|    |                                              |        |                  |             |      | GC<br>n = 15 | DU<br>n = 15 |                          |
| 1  | ATP synthase subunit A                       | HP1134 | 5.41/55,235      | 38          | 1012 | 93.3         | 86.7         | 1.08                     |
| 2  | Threonine synthase                           | HP0098 | 6.07/54,672      | 18          | 322  | 100          | 46.7         | 2.14                     |
| 3  | Urease protein (UreC)                        | HP0075 | 6.37/49,055      | 11          | 181  | 100          | 60           | 1.67                     |
| 4  | Hemolysin secretion protein precursor (HylB) | HP0599 | 5.85/48,331      | 41          | 840  | 100          | 80           | 1.25                     |
| 5  | ATP synthase subunit B                       | HP1132 | 5.30/51,418      | 46          | 875  | 93.3         | 53.3         | 1.75                     |
| 6  | Glutamine synthetase (GlnA)                  | HP0512 | 5.75/54,479      | 37          | 773  | 100          | 80           | 1.25                     |
| 7  | ATP-dependent protease ATP-binding subunit   | HP1374 | 6.08/50,322      | 13          | 183  | 100          | 80           | 1.25                     |
| 8  | Elongation factor Tu (TufA)                  | HP1205 | 5.17/43,620      | 69          | 1065 | 93.3         | 53.3         | 1.75                     |
| 9  | Rod shape-determining protein (MreB)         | HP1373 | 5.40/37,374      | 16          | 186  | 73.3         | 33.3         | 2.20                     |
| 10 | S-adenosylmethionine synthetase              | HP0197 | 6.04/42,336      | 50          | 763  | 66.7         | 26.7         | 2.50                     |
| 11 | Peptide chain release factor 1               | HP0077 | 5.44/39,563      | 16          | 168  | 73.3         | 20           | 3.67                     |
| 12 | DNA-directed RNA polymerase alpha subunit    | HP1293 | 4.97/38,456      | 60          | 677  | 53.3         | 6.7          | 7.96                     |
| 13 | Elongation factor Tu (TufA)                  | HP1205 | 5.17/43,620      | 40          | 459  | 66.7         | 60           | 1.11                     |

|    |                                           |        |             |    |     |      |      |      |
|----|-------------------------------------------|--------|-------------|----|-----|------|------|------|
| 14 | Co-chaperonin GroES                       | HP0011 | 6.12/12,980 | 22 | 181 | 66.7 | 6.7  | 9.96 |
| 15 | Succinate dehydrogenase                   | HP0191 | 5.34/27,620 | 19 | 172 | 93.3 | 73.3 | 1.27 |
| 16 | Cell division inhibitor (MinD)            | HP0331 | 6.11/29,247 | 22 | 248 | 93.3 | 73.3 | 1.27 |
| 17 | Response regulator                        | HP1043 | 5.24/25,422 | 24 | 194 | 80   | 46.7 | 1.71 |
| 18 | Response regulator (OmpR)                 | HP0166 | 5.27/25,840 | 26 | 241 | 73.3 | 33.3 | 2.20 |
| 19 | Membrane fusion protein (MtrC)            | HP0606 | 8.80/25,941 | 42 | 435 | 46.7 | 20   | 2.34 |
| 20 | Membrane fusion protein (MtrC)            | HP0606 | 8.80/25,941 | 37 | 363 | 46.7 | 20   | 2.34 |
| 21 | Response regulator (OmpR)                 | HP0166 | 5.27/25,840 | 34 | 184 | 80   | 33.3 | 2.40 |
| 22 | Outer membrane protein<br>(Omp22)         | HP0923 | 5.84/20,011 | 37 | 326 | 53.3 | 40   | 1.33 |
| 23 | Biotin carboxyl carrier protein<br>(FabE) | HP0371 | 5.39/17,122 | 35 | 136 | 53.3 | 26.7 | 2.00 |
| 24 | Co-chaperonin GroES                       | HP0011 | 6.12/12,980 | 28 | 203 | 66.7 | 6.7  | 9.96 |

<sup>a</sup> 比例 (G/D): GC 血清陽性反應 vs. DU 血清陽性反應

### 選殖與純化重組蛋白

幽門螺旋菌破菌後以 Rnase 處理，以酚及氯仿 (phenol/chloroform) 純化基因組 DNA (genomic DNA) 並以酒精沉澱。為了以 PCR 放大含有幽門螺旋菌 *groES* 基因的 DNA 片段，所使用之引子對 (primer pair) 表列如補充表一所示。PCR 反應條件為 94°C、1 分鐘，引子結合溫度 (annealing temperature) 1 分鐘，72°C、2 分鐘共 35 循環之後，進行 72°C、2 分鐘，最後於 72°C 延伸 15 分鐘。將此一基因片段選殖至表現載體 pQE30 (Qiagen, Chatsworth, CA) 以表現重組蛋白，細胞生長至  $OD_{600}$  值 0.6 時，以 1 mM IPTG (isopropyl b-D-thiogalactoside) 誘導後於 25°C 六個小時 (GroES) 或於 37°C 三小時 (FlaG) 以後收取。可溶性重組蛋白以一  $Ni^{2+}$  螯合 Sepharose 親和性管柱 (Amersham Biosciences) 純化。為移除重組蛋白溶液中的內毒素 (endotoxin)，樹脂首先以含有 1% Triton X-114 (Sigma) 之結合緩衝液 (binding buffer) (20 mM Tris-HCl, 0.5 M NaCl, 5 mM imidazole, pH 7.9) 進行第一次洗滌，接著裝入一管柱，在沖提之前以含有

0.1% Triton X-114 之結合緩衝液 (binding buffer) 洗滌。  
純化之重組蛋白於 PBS 中透析，內毒素含量以 QCL-1000<sup>®</sup>  
(BioWhittaker, Walkersville, MD) 套組檢測。最終內毒素含量約  
36 EU/mg。

補充表一

增幅標的基因所使用之引子序列

| 標的基因                   | 引子序列 [sense (+), anti-sense (-)]                                                                                             | T <sup>a</sup> (°C) |
|------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| <i>H. pylori groES</i> | (+) 5'-GGATCCATGAAGTTTCAGCCATTAGGAGA-3'<br>(-) 5'-GGTACCTTAGTGTTTTTGTGATCATGACA-3'                                           | 55                  |
| IL-1 $\beta$           | (+) 5'-ATA AGC CCA CTC TAC AGC T-3'<br>(-) 5'-ATT GGC CCT GAA AGG AGA GA-3'                                                  | 60                  |
| IL-6                   | (+) 5'-GTA CCC CCA GGA GAA GAT TC-3'<br>(-) 5'-CAA ACT GCA TAG CCA CTT TC-3'                                                 | 60                  |
| IL-8                   | (+) 5'-GCT TTC TGA TGG AAG AGA GC-3'<br>(-) 5'-GGC ACA GTG GAA CAA GGA CT-3'                                                 | 60                  |
| IL-12                  | (+) 5'-TCA CAA AGG AGG CGA GGT TC-3'<br>(-) 5'-TGA ACG GCA TCC ACC ATG AC-3'                                                 | 60                  |
| GM-CSF                 | (+) 5'-TGG CTG CAG AGC CTG CTG CTC-3'<br>(-) 5'-TCA CTC CTG GAC TGG CTC CCA GCA G-3'<br>(-) 5'-TGA ACG GCA TCC ACC ATG AC-3' | 60                  |
| TNF- $\alpha$          | (+) 5'-GCC GGG CCA ATG CCC TCC TGG CCA A-3'<br>(-) 5'-GTA GAC CTG CCC AGA CTC GGC AAA-3'                                     | 60                  |
| IFN- $\gamma$          | (+) 5'-ATA ATG CAG AGC CAA ATT GTC TC-3'<br>(-) 5'-CTG GGA TGC TCT TCG ACC TC-3'                                             | 60                  |
| COX-2                  | (+) 5'-TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT-3'<br>(-) 5'-AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT-3'                                   | 60                  |
| <i>c-jun</i>           | (+) 5'-GGA AAC GAC CTT CTA TGA CGA GCC C-3'<br>(-) 5'-GAA CCC CTC CTG CTC ATC TGT CAG G-3'                                   | 56                  |
| <i>c-fos</i>           | (+) 5'-ATG ATG TTC TCG GGC TTC-3'<br>(-) 5'-CTC TCC TGC CAA TGC TCT GC-3'                                                    | 48                  |
| GAPDH                  | (+) 5'-GTC TTC ACC AAC CAT GGA GAA GGC T-3'<br>(-) 5'-CAT GCC AGT GAG CTT CCC GTT CA-3'                                      | 60                  |

<sup>a</sup> 黏合溫度 (Annealing temperature)

### 製備抗 *GroES* 多株抗體

將 500  $\mu\text{g}$  純化重組之 *GroES* (r*GroES*) 溶於 1ml PBS，並以 1ml 孚氏完全佐劑(complete freund's adjuvant, Difco)乳化後皮下注射至紐西蘭白兔。500  $\mu\text{g}$  強化劑溶於 PBS 以 1ml 孚氏不完全佐劑(incomplete freund's adjuvant, Sigma)於第三周以及第六週皮下注射之，再最後依次加強後十天取兔子血液，其血清用於免疫轉漬實驗。

### 血清學研究

GC、胃潰瘍、DU 病患或正常控制組之血清檢體以 1:1000 稀釋，並利用免疫轉漬法篩選與 *GroES* 之反應。重組 *GroES* 於 15% SDS-聚丙烯醯氨凝膠(polyacrylamide)中進行電泳後，轉漬至 PVDF 膜，免疫轉漬法如上所述。

### 統計分析

統計分析係使用 SPSS(版本 11.0)分析，離散數據分析係使用卡方檢定(Chi-squared test)。勝算比(Odds Ratio)以及 95 %信賴區間(Confidence Interval)係以邏輯迴歸(Logistic Regression)計算。ELISA 或 MTS 試驗的比較係使用 T 檢定 (Student' s t test)。P 值小於 0.05 被認為在統計上有意義。

### 細胞培養

從健康自願者抽取靜脈全血(Heparinized venous blood)，並使用 Ficoll-Paque<sup>®</sup> Plus (Amersham Biosciences) 密度梯度離心法分離單核球。PBMC( $1.8 \times 10^6$  cells/ml)在 37°C、5% CO<sub>2</sub> 環境下培養於 RPMI 1640(Gibco)培養液中，內含 0.1% FBS。人類胃癌細胞株 KATO-III 取自日本癌症研究中心(Japan Cancer Research Bank)，以內含 10% FBS、

鏈黴素、青黴素之 RPMI 1640 培養液培養於 37°C 和 5% CO<sub>2</sub> 環境下。將 KATO-III ( $7.3 \times 10^4$  cells/ml) 培養於含有 rGroES 之 RPMI 1640 以檢測細胞激素，或是先培養於 RPMI 1640 培養液 16-18 小時，之後培養於含有 rGroES 之 RPMI 1640 用以西方墨點法分析。

**反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, 以下簡稱 RT-PCR) :**

蒐集 rGroES 刺激 4 小時(PBMC)或 6 小時(KATO-III)之細胞，並以 QuickPrep<sup>TM</sup> Micro mRNA 純化套組 (Amersham Biosciences) 純化其 mRNAs。反轉錄反應係根據 SuperScript<sup>TM</sup> First-Strand RT-PCR 合成系統 (Life Technologies Inc., Rockville, MD)之指導手冊進行。以合成之 cDNA 作為模版進行 PCR 增幅，所使用之引子對以及引子結合溫度如補充表一 (Supplemental Table I.)所示。PCR 方式如前所述。此外，一人類 GAPDH 之引子對作為 PCR 的載入量控制組。

### 量測細胞激素以及 PGE<sub>2</sub>

細胞與 rGroES 培養 24 小時後，蒐集上清液並儲存於 -80°C 至測量細胞激素產生量。培養上清液中的細胞激素以及 PGE<sub>2</sub> 係以 Quantikine<sup>®</sup> ELISA 試驗套組 (R & D Systems, Minneapolis, MN) 測量 IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  以及 GM-CSF，或是以 Direct Biotrak Assay ELISA kit (Amersham Biosciences)測量 PGE<sub>2</sub>。所有實驗皆進行三重複。進一步地，為了確認細胞激素釋放是因為 rGroES 而非 LPS 污染，rGroES 和 LPS 以蛋白酶 K(受質莫耳比為 1/10)於 37°C 分解 1 小時，之後蛋白酶 K 加熱至 100°C 10 分鐘以去活化。

經蛋白酶 K 處理的 rGroES 和 LPS 用以處理細胞之方式如上所述。

#### 西方墨點法：

經過 rGroES 處理 12 或 24 小時以後，細胞以溶解緩衝液(0.6% NP-40, 0.9% NaCl, 0.1% SDS, 1 mM EDTA, 10 mM Tris-HCl, pH 7.5)打破，接著以 4°C，18000×g 離心 15 分鐘去除細胞碎屑。免疫轉漬法分析如上所述。一級抗體為山羊抗 COX-2 (1:200, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) 抗體、小鼠抗 cyclin D1 (1:500, Santa Cruz Biotechnology)、小鼠抗 p27<sup>Kip1</sup> (1:1000, BD Biosciences Transduction Laboratories) 抗體以及小鼠抗  $\beta$ -actin (1:100000, CashmereBiotech, Taipei Hsien, Taiwan) 抗體。二級抗體為過氧化酶-綴合的抗小鼠 IgG 抗體(BD Biosciences PharMingen) 或抗山羊 IgG 抗體(Sigma)。接合之抗體使用 ECL<sup>TM</sup> 反應試劑(Amersham Biosciences)偵測，接著曝光於 X 射線底片(Kodak, Rochester, NY)上。 $\beta$ -actin 為載入控制組。

#### 細胞增生試驗

KATO-III 細胞 (8000 cells/well) 培養於 100  $\mu$ l 0.1% FBS/RPMI 1640 含有或不含 rGroES 培養液在 96-well 培養盤 6、24、36、48 小時。存活細胞係以 MTS 試驗(CellTiter 96<sup>®</sup> AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega)測量之。試驗係以於每一 well 中加入 20  $\mu$ l 反應試劑，培養於 37°C 一小時後測量 490 nm 吸收光。結果係以減掉空白值(只有培養液)後除以未處理細胞之吸光值比例表示。本實驗進行三重複試驗。

以下係提供利用本發明之實施例，然本實施例並非用以限定本發明，任何熟悉此技藝者，在不脫離本發明之精神和範圍內，當可作各種之更動與潤飾，因此，本發明之保護範圍，當視後附之申請專利範圍所界定者為準。

#### 實施例一、確認幽門螺旋菌與胃癌有關之抗原

為尋找幽門螺旋桿菌與胃癌相關之抗原，發明人將細菌蛋白以酸性甘胺酸（glycine）萃取後進行二維電泳分析，之後以幽門螺旋桿菌感染且患有 GC 或 DU 的病入之血清為探針進行二維電泳免疫轉漬並比較其結果。根據第一圖 A 所示，顯示一複雜的蛋白質內容。個別以 15 個 GC 血清與 15 個 DU 血清為探針，則各產生獨特且不同的反應結果。兩個代表性的免疫轉漬結果如第一圖 B(GC)和第一圖 C(DU)所示。一般而言，GC 血清所可以確認出的蛋白質點較 DU 多。在 GC 免疫轉漬中，約有 60 個不同的反應蛋白質點，分子量在 14-85kDa 之間，pI 值在 4.5-9.5 之間。其中有些抗原點只有單獨被一個血清樣本確認，但有 49 個點被一個以上的樣本所確認。比較二維電泳免疫轉漬的抗原蛋白內容，有 24 個點/點群被 GC 群組確認的頻率較高，結果如表一以及補充表二所示。被 GC 血清確認頻率較高的蛋白質(GC 對 DU 血清正反應比例大於 2)為酥胺酸合成酶（Threonine synthase）、棒狀外型決定蛋白(rod shape-determining protein)、S-腺核甘甲硫胺酸合成酶(S-adenosylmethionine synthetase)、胜肽鍊釋放因子(peptide chain release factor 1)、RNA 聚合酶(DNA-directed RNA polymerase)、協同伴隨蛋白質

GroES (co-chaperonin GroES)(單體或雙體)、反應調控子 OmpR (response regulator OmpR)、膜融合蛋白(membrane fusion protein)。在這些被確認的蛋白質中，兩種輔分子伴侶 GroES 單體和雙體，如第二圖所示，在 GC 血清中有最高被確認度(66.7%)，而在 15 個 DU 血清中只有一個樣本確認(6.7%)到此蛋白。因此輔分子伴侶 GroES 被認為是重要的免疫反應性蛋白。

為確認 GroES 的生化特性，吾人表現一重組 His-tagged GroES 融合蛋白(以下簡稱 rGroES)於 *E. coli* M15，並且使用一純化之 rGroES 於兔子體內產生一抗 GroES 抗體。根據第三圖 A，欄一為表現之 rGroES 具有一 17kDa 分子量，欄二為以 nano-LC-MS/MS 確認的純化之 rGroES，而欄三為以兔子抗 GroES 抗體進行免疫轉漬分析觀察到 rGroES 具有單體與雙體型式。

進一步地，以 GC 血清以及抗 GroES 抗體對酸-甘胺酸萃取蛋白質的二維電泳轉漬膜進行免疫分析。如第三圖 B 所示，實驗結果偵測到除了被鑑定為與 GC 有關的抗原點-GroES 單體以及雙體以外，幽門螺旋菌的原態 GroES 還存在著多體。使用病患的血清作為抗體，原態 GroES 雙體型式比單體或三體的抗原性要來得強。根據第三圖 C，GroES 雖然主要在幽門螺旋菌的萃取液中，但在過濾的培養液中也可發現該蛋白，因此推測 GroES 會由幽門螺旋菌分泌釋出。

補充表二  
確認幽門螺旋菌免疫反應蛋白在 GC 顯示有較高頻率的確認(由奈米 LC-MS/MS 分析)

| 編號 | 蛋白                     | 位置標記   | NCBI accession no. | 分數   | 序列覆蓋 (%) | 肽數量<br>(unique/matched) | 肽序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|------------------------|--------|--------------------|------|----------|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1  | ATP synthase subunit A | HP1134 | gi 18075728        | 1012 | 38       | 23/39                   | KLEISSVIEEK.I<br>K.VVSYADGVAK.V<br>K.VPVGDVAVGR.V<br>R.VLNALGEPIDGKG<br>R.KSVHEPLQTGIK.A<br>K.SVHEPLQTGIK.A<br>K.AIDALVPIGR.G<br>K.ESTVAQVVR.K<br>R.HALIYDDLSKH<br>R.EISLIIR<br>R.EAFPGDVFYHSRL<br>R.LDLAQYRE<br>R.ELQAFIQFASDILDEASK.K<br>R.ELQAFIQFASDILDEASK.Q<br>K.QAPYSPLEK.Q<br>K.GFLDSVSVK.K<br>K.KVVDFFEEQLHPFLEAK.Y<br>K.VVDFFEEQLHPFLEAK.Y<br>K.YPQVLEEHTK.K<br>K.KVLDKDLLEAMLR.K<br>K.VLDKDLLEAMLR.K<br>K.DLEAMLR.K<br>R.KVLEEFKL |
| 2  | Threonine synthase     | HP0098 | gi 15644728        | 322  | 18       | 8/8                     | K.KIDFEAILNPAPK.G<br>K.IDFEAILNPAPK.G<br>K.INPAPFALNERL<br>R.LFVQELYHGFSLAFK.D<br>K.LQMVTQSASNLK.V<br>K.VFGSGDFDDAQNALK.N<br>K.LSVANSVNFGR.I<br>K.TLVSATASYEKF                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 3  | Urease protein (UreC)  | HP0075 | gi 15644705        | 181  | 11       | 5/5                     | K.FFNSYGYKL<br>R.IVLDTANGAAYK.V<br>R.ADLGFADGDADRL<br>K.LLGLGVYQKS<br>K.ELDKLEIR.H                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |

|   |                                              |        |             |     |    |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|---|----------------------------------------------|--------|-------------|-----|----|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 4 | Hemolysin secretion protein precursor (HyIB) | HP0599 | gi 15645224 | 840 | 41 | 15/32 | K.SGNLASLNLEEQSVHFKE<br>K.ENAESVNLQGVSYSLK.S<br>K.SQNIDGVQYFSLAKN<br>K.NGEAHSTEGLTGVNK.T<br>K.TQODIESLYEKM<br>K.MQNATSLADSLNQR.S<br>R.GFAVVADEVK<br>R.GFAVVADEVKRL<br>K.NNMVAQAAY<br>K.YTYNNINR.V<br>K.LDHVVFKN<br>K.NNLYGMVFGNLNSFDITSHKN<br>K.WYYEGAGKE<br>K.ENFSNTSGYRA<br>R.ALESHHASVHAEANDLVKA                                |
| 5 | ATP synthase subunit B                       | HP1132 | gi 2197129  | 875 | 46 | 16/33 | K.SLVLEVAHLLGNR.V<br>R.AIAMDMTEGLVRN<br>K.MIEVPVGEVLGRI<br>K.TEMFETGK.V<br>K.VIDLLAPYSKG<br>K.VGLFGGAGVGKT<br>K.TVIMELHNVAYKH<br>K.HNGYSVFAGVGER.T<br>R.IAFTGLTMAEYFRD<br>R.YAQSGAEMSALLGRI<br>R.IPSAVGYOPTLACEMGKL<br>K.GIYPADVPLDTSRI<br>R.ILSPQMICEKH<br>K.HYEIATGQQVLQKY<br>K.FLSQPFVFAEVFTGSPGK.Y<br>K.YDHIPENAFYMVGSIQEVLEKA |
| 6 | Glutamine synthetase (GlnA)                  | HP0512 | gi 15645139 | 773 | 37 | 15/24 | K.ENEVFVDFR.F<br>K.GWQQGHSDMLTDLVR.Y<br>R.SPENGVNFGHRPGKQ<br>K.VLNVQGLETFVVHHEVAQAQGEVGVK.F<br>K.FGDLVEAADNVQKL<br>K.NNENLFSGETYKG<br>R.GLAFTNASTNSYKR<br>R.GLAFTNASTNSYKRL<br>R.LIPGYEAPSILTYSANNR.S<br>K.NKIDPCEAMDINLFLK<br>K.IDPCEAMDINLFLK<br>K.LTLDEIRE<br>R.SLEEMLADKQ<br>R.SLEEMLADKQYLKE<br>K.ESQVFEFFQATQSLK.F           |

|    |                                            |        |             |      |    |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|--------------------------------------------|--------|-------------|------|----|-------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 7  | ATP-dependent protease ATP-binding subunit | HP1374 | gi 15645984 | 183  | 13 | 6/6   | R.IIFASNLNKD<br>K.AVLNYYVIGQEQAKK<br>K.SNILLGPTSGSK.T<br>K.GIVFIDEIDKI<br>K.GIVFIDEIDKSR.L<br>R.ITQNVLGFQEK.M                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 8  | Elongation factor Tu (TufA)                | HP1205 | gi 15645819 | 1065 | 69 | 22/48 | R.TKPHVNGTGHVDHGK.T<br>K.TTLSAAISAVLSLK.G<br>K.GLAEMKDYNIDNAPEEKE<br>K.DYDNIDNAPEEKE<br>K.DYDNIDNAPEEKE.G<br>R.GTITATSHIEYETENR.H<br>K.NMITGAAQMDGAILVYSAADGPMIPQTR.E<br>R.EHILLSR.Q<br>R.QVGVPHIVVFLNK.Q<br>K.QDMVDDQELLEIVEMEVRE<br>R.ELLSAYEPGDDTPVAGSALR.A<br>K.LMAEVDAYITPERD<br>K.LMAEVDAYITPERDTEK.T<br>K.THLMPEVEDVESIAGR.G<br>K.TTVTGVEMFR.K<br>R.KELEKCEAGDNVGVLLR.G<br>K.KELEKCEAGDNVGVLLR.G<br>K.GEAGDNVGVLLR.G<br>K.KFEGEIVVLSKE<br>R.TTDTVTCSTLPEGVEMVMFGDNV.KI<br>K.ITVELISPALELGT.KF<br>R.TV'GAGVVSNIIE.- |
| 9  | Rod shape-determining protein (MreB)       | HP1373 | gi 15645983 | 186  | 16 | 4/4   | K.AYDILAVGSEAKE<br>R.VAGDKLDDQSIVEYIR.K<br>K.LPVYVGDPEILLAAK.G<br>K.GTGCAIQDILL.SR.V                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 10 | S-adenosylmethionine synthetase            | HP0197 | gi 15644826 | 763  | 50 | 14/28 | K.DSFLFTSESVTGHPDK.M<br>K.MADQISDAVLDYIER.D<br>K.TSVYAPMQEIARE<br>K.IGYTDALYGFYR.S<br>R.SAAVLNGVGEQSPDINQGVDR.E<br>K.ETETLMP.LPHLAHQLTALAQR.R<br>R.KDNTLP.LRPDGK.S<br>K.DNTLP.LRPDGK.S<br>R.YENNKPVSIDTIVISTQHSPEVSQKH<br>K.EAVIEEVYK.V<br>K.FVIGGPQGDAGLTGR.K<br>K.YSSAELEK.C<br>K.TNKAAEEIKAFFR.R<br>K.AEEIKAFFR.R                                                                                                                                                                                                      |

|    |                                           |        |             |     |    |       |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
|----|-------------------------------------------|--------|-------------|-----|----|-------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 11 | Peptide chain release factor 1            | HP0077 | gi 15644707 | 168 | 16 | 4/4   | KEYLSVLENKE<br>KELLEDKELSELAKELKI<br>KDPNDKNIYELRA<br>RAGTGDGEAGIF/GDLFK.A<br>K.TAPLPSEIK.V<br>KISLAPFEGYAVTLAHPIR.R<br>RLILSSVGYAPVGLKI<br>KIEGVHHEHDSLR.G<br>RGVTEDVSLFMNLKN<br>K.ALVGQDSSLENQSVVDYSFK.G<br>K.GMGYVPSENRE<br>RELMPGYMPLDGSFTPIKN<br>KNVVEIENVLVEGDPNYEKI<br>K.IFDIETDQIDPYK.A<br>K.QLGVFGERPIANTEYSQDYAQR.D<br>K.IESMNL.SAR.C<br>K.YVGELVLMSEELK.G<br>K.SYDEIAEKL |
| 12 | DNA-directed RNA polymerase alpha subunit | HP1293 | gi 4155841  | 677 | 60 | 14/36 | R.GITATSHIEYETENR.H<br>REHLLSR.Q<br>R.QVGVPHIVVFLNK.Q<br>RELLSAYEFGDDTIVAGSALR.A<br>KLMAEVDAYIPTPERD<br>K.TELMPVEDVFSIAGR.G<br>K.TTVTCVEMER.K<br>KELEKGEAGDNVGVLLR.G<br>K.GEAGDNVGVLLR.G<br>K.FEGEIVVLSKE<br>K.FEGEIVVLSKE<br>R.TTDVTCSTLPEGVEMVMPGDNVKI<br>R.TVGAGVVSNIE.-                                                                                                         |
| 13 | Elongation factor Tu (TufA)               | HP1205 | gi 15645819 | 459 | 40 | 13/16 | K.FQPLGER.V<br>R.LEEENKTSSGIIPDNAKE<br>K.TSSGIIPDNAKE<br>K.EKPLMGVVK.A<br>K.EGDVIAFGK.Y                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
| 14 | Co-chaperonin GroES                       | HP0011 | gi 712830   | 181 | 36 | 5/10  | K.FDPQSAVSKPHFKE<br>R.IEPDEAQEVFELDRC<br>R.FMIDSHDER.S<br>K.ELPQSSIAITLR.N                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
| 15 | Succinate dehydrogenase                   | HP0191 | gi 2058520  | 172 | 19 | 4/5   | M.AIVVITTSK.G<br>R.NLDMILGLENR.I<br>R.IVYDVVDVMEKN<br>K.NLSFLAASQSKD<br>K.VAILNALR.A<br>R.VIGIIDAK.S                                                                                                                                                                                                                                                                                |
| 16 | Cell division inhibitor (MinD)            | HP0331 | gi 4154852  | 248 | 22 | 6/7   |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |

|    |                                        |        |             |     |    |      |                                                                                                                                                                                                     |
|----|----------------------------------------|--------|-------------|-----|----|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 17 | Response regulator                     | HP1043 | gi 154918   | 194 | 24 | 5/9  | KNSVLGGEIEK.G<br>RNYDLVMVSDKN<br>KNALSFVSR.I<br>KGGPFVLTJLAR.H<br>KMDKPLGISTVETVR.R<br>KALDYGADDYLPKPYDPKE<br>KKEEVSEPGDANIFR.V<br>KKEEVSEPGDANIFR.V<br>RAEYELSLJISK.K<br>KSIDVIIGRL<br>KQPYIISVR.G |
| 18 | Response regulator (OmpR)              | HP0166 | gi 15644795 | 241 | 26 | 6/6  | KVVAIFNVKA<br>KLTLDSTGIVDSIK.V<br>KKGDVLLILYNQDK.Q<br>KGDVLLILYNQDK.Q<br>RAPFDGVIASK.N<br>KNIQVGEGVSANNVLLRL<br>RKLVEFDSK.Y<br>KVGDTYTYSIDGDSNQHEAK.I<br>KIYPTVDENR.K                               |
| 19 | Membrane fusion protein (MtrC)         | HP0606 | gi 15645231 | 435 | 42 | 9/10 | KVVAIFNVKA<br>KLTLDSTGIVDSIK.V<br>KKGDVLLILYNQDK.Q<br>KGDVLLILYNQDK.Q<br>RAPFDGVIASK.N<br>KNIQVGEGVSANNVLLRL<br>RKLVEFDSK.Y<br>KVGDTYTYSIDGDSNQHEAK.I<br>KIYPTVDENR.K                               |
| 20 | Membrane fusion protein (MtrC)         | HP0606 | gi 15645231 | 363 | 37 | 8/9  | KVVAIFNVKA<br>KLTLDSTGIVDSIK.V<br>KKGDVLLILYNQDK.Q<br>KGDVLLILYNQDK.Q<br>KNIQVGEGVSANNVLLRL<br>KLVIEFDSK.Y<br>KVGDTYTYSIDGDSNQHEAK.I<br>KIYPTVDENR.K                                                |
| 21 | Response regulator (OmpR)              | HP0166 | gi 15644795 | 184 | 34 | 6/6  | KALDYGADDYLPKPYDPKE<br>KKEEVSEPGDANIFR.V<br>RAEYELSLJISK.K<br>RESIAESESINPESSNK.S<br>KSIDVIIGRL<br>KQPYIISVR.G                                                                                      |
| 22 | Outer membrane protein (Omp22)         | HP0923 | gi 4098205  | 326 | 37 | 5/13 | KHNMDKETVAGDVS.AK.A<br>KESDQETLDEIVQK.A<br>KAKENHMQVLLGENTDERGSSEYNOALGVK.R<br>KENHMQVLLGENTDERGSSEYNOALGVK.R<br>KTSFGETKPKC                                                                        |
| 23 | Biotin carboxyl carrier protein (FabE) | HP0371 | gi 15644999 | 136 | 35 | 4/6  | -MNLSEIELIKE<br>KLKHEHFELVLDKESAYAK.K<br>KHEHFELVLDKESAYAK.K<br>KKEDEVLSPMVGTFTYHAPSGAEPYVKA                                                                                                        |
| 24 | Co-chaperonin GroES                    | HP0011 | gi 712830   | 203 | 28 | 4/32 | KFQPLGER.V<br>RLEENKTSCHIIPDNAKE<br>KTSSGHIIPDNAKE<br>KEGDVIAFGK.Y                                                                                                                                  |

## 實施例二、GroES 的血清反應與胃癌有關

為檢驗幽門螺旋菌之 GroES 的血清敏感度與臨床病理顯著關係，使用 GroES 免疫轉漬法對一系列臨床檢體進行試驗。若 rGroES 被血清 IgG 所認出則定義為 GroES 血清陽性反應。32 個無幽門螺旋菌感染者之任一血清皆無血清陽性反應(控制組)。接著檢驗 313 個幽門螺旋菌感染病患中具有 GC(95 個病患)、胃潰瘍(gastritis)(94 個病患)、或 DU(124 個病患)。超過 42.8% 的幽門螺旋菌感染患者有陽性反應。GroES 的血清反應與患者年齡有關，低於 30 歲的患者約有 18.8% 至 30-49 歲患者為 40.2%(OR, 2.9; 95% CI, 0.8-10.9;  $p=0.1$ )，超過 50 歲患者為 46.2% (OR, 3.7; 95% CI, 1.0-13.4;  $p=0.04$ )(補充表三)。更進一步，具有 GC、胃潰瘍與 DU 的病人中其 GroES 血清反應的普遍率分別為 64.2%、30.9% 與 35.5%。年齡差異經過調整以後 GroES 血清反應在 GC 病人顯著地高於胃潰瘍 (OR, 3.9; 95% CI; 2.1-7.4;  $p<0.001$ ) 或 DU 之病患 (OR, 2.7; 95% CI; 1.5-4.9;  $p<0.001$ )。在統計上，控制組與幽門螺旋菌感染者之 GroES 血清反應也有顯著不同，但相較於胃潰瘍或 DU 病患則無顯著差異(表二)。為進一步定性 GC 與 GroES 之間的關係，95 個 GC 患者依照性別、癌症分期、組織態樣以及腫瘤位置等，被分為 7 個子群在統計上分析 GroES 陽性反應，結果如表三所示。雖然性別、癌症分期、組織態樣以及腫瘤位置對於 GroES 血清反應並無很大的影響，但 GC 位於胃竇者相對於非位於胃竇者顯示有一較高的 GroES 血清反應。(71.9% 與 48.4% ; OR, 2.7; 95% CI; 1.1-6.7;  $p=0.03$ )

表二  
血清 IgG GroES 在各種腸胃疾病的陽性反應

| 疾病           | GroES         |               | Adjusted OR (95% CI)     |                      |              |
|--------------|---------------|---------------|--------------------------|----------------------|--------------|
|              | 陽性<br>no. (%) | 陰性<br>no. (%) | P value <sup>b</sup>     |                      |              |
|              |               |               | GC                       | 胃潰瘍                  | DU           |
| GC (n = 95)  | 61 (64.2)     | 34 (35.8)     | 1.0 <sup>a</sup>         | —                    | —            |
| 胃潰瘍(n= 94)   | 29 (30.9)     | 65 (69.1)     | 3.9 (2.1-7.4)<br>< 0.001 | 1.0 <sup>a</sup>     | —            |
| DU (n = 124) | 44 (35.5)     | 80 (64.5)     | 2.7 (1.5-4.9)<br>< 0.001 | 0.8 (0.4-1.4)<br>0.3 | —            |
| 控制組 (n = 32) | 0 (0)         | 32 (100)      | —<br>< 0.001             | —<br>< 0.001         | —<br>< 0.001 |

<sup>a</sup> 當作 OR 計算時之比較參考點.  
<sup>b</sup> ORs, 95% CI 和 P 值在控制年齡以後以邏輯迴歸運算.

補充表三

在 313 個幽門螺旋菌感染病患中年齡對 GroES 血清陽性反應的影響

| 年齡群組       | 平均年齡 $\pm$ SD<br>(yr) | 病患數 | GroES-血清陽<br>性反應 (%) | OR <sup>a</sup>  | (95% CI) <sup>a</sup> | P value <sup>a</sup> |
|------------|-----------------------|-----|----------------------|------------------|-----------------------|----------------------|
| <b>加總</b>  | 54.2 $\pm$ 14.1       | 313 | 42.8                 |                  |                       |                      |
| 16-29      | 23.6 $\pm$ 3.5        | 16  | 18.8                 | 1.0 <sup>b</sup> |                       |                      |
| 30-49      | 42.3 $\pm$ 5.1        | 102 | 40.2                 | 2.9              | (0.8-10.9)            | 0.1                  |
| $\geq 50$  | 63.0 $\pm$ 8.7        | 195 | 46.2                 | 3.7              | (1.0-13.4)            | 0.04                 |
| <b>GC</b>  | 61.6 $\pm$ 14.4       | 95  | 64.2                 |                  |                       |                      |
| 16-29      | 28                    | 1   | 100                  | —                | —                     | —                    |
| 30-49      | 42.4 $\pm$ 5.1        | 22  | 63.6                 | 1.0 <sup>b</sup> |                       |                      |
| $\geq 50$  | 67.9 $\pm$ 9.8        | 72  | 63.9                 | 1.0              | (0.4-2.7)             | 0.9                  |
| <b>胃潰瘍</b> | 53.3 $\pm$ 10.1       | 94  | 30.9                 |                  |                       |                      |
| 16-29      | —                     | 0   | —                    | —                | —                     | —                    |
| 30-49      | 42.5 $\pm$ 4.8        | 35  | 28.6                 | 1.0 <sup>b</sup> |                       |                      |
| $\geq 50$  | 59.7 $\pm$ 6.3        | 59  | 32.2                 | 1.2              | (0.5-3.0)             | 0.7                  |
| <b>DU</b>  | 49.4 $\pm$ 14.2       | 124 | 35.5                 |                  |                       |                      |
| 16-29      | 23.3 $\pm$ 3.4        | 15  | 13.3                 | 1.0 <sup>b</sup> |                       |                      |
| 30-49      | 42.1 $\pm$ 5.3        | 45  | 37.8                 | 3.9              | (0.8-19.6)            | 0.09                 |
| $\geq 50$  | 60.6 $\pm$ 6.6        | 64  | 39.1                 | 4.2              | (0.9-20.0)            | 0.07                 |

<sup>a</sup> ORs, 95% CI 與 P 值以邏輯迴歸計算<sup>b</sup> 當作 OR 計算時之比較參考點

表三  
以抗 GroES 抗體分析胃癌特性

| 變異參數             | 抗 GroES 抗體    |               | 調整之 OR (95% CI)<br><i>P</i> 值 |
|------------------|---------------|---------------|-------------------------------|
|                  | 陽性<br>no. (%) | 陰性<br>no. (%) |                               |
| 性別               |               |               |                               |
| 男性               | 37 (64.9)     | 20 (35.1)     | 1.0 <sup>d</sup> (0.4-2.5)    |
| 女性               | 24 (63.2)     | 14 (36.8)     | 0.9                           |
| 癌症分期             |               |               |                               |
| <sup>b</sup> EGC | 12 (70.6)     | 5 (29.4)      | 1.4 <sup>d</sup> (0.4-4.3)    |
| <sup>c</sup> AGC | 49 (62.8)     | 29 (37.2)     | 0.5                           |
| 組織態樣 (1)         |               |               |                               |
| 瀰漫型              | 22 (53.7)     | 19 (46.3)     | 0.1 <sup>e</sup>              |
| 腸道型              | 26 (68.4)     | 12 (31.6)     |                               |
| 混合               | 4 (100)       | 0 (0)         |                               |
| 未分類              | 9 (75)        | 3 (25)        |                               |
| 組織態樣 e (2)       |               |               |                               |
| 瀰漫型              | 22 (53.7)     | 19 (46.3)     | 0.4 <sup>d</sup> (0.2-1.1)    |
| 非瀰漫型             | 39 (72.2)     | 15 (27.8)     | 0.07                          |
| 腫瘤位置 (1)         |               |               |                               |
| 胃竇               | 46 (71.9)     | 18 (28.1)     | 0.01 <sup>e</sup>             |
| 胃體               | 7 (38.9)      | 11 (61.1)     |                               |
| 賁門               | 4 (44.4)      | 5 (55.6)      |                               |
| Diffuse          | 4 (100)       | 0 (0)         |                               |
| 腫瘤位置(2)          |               |               |                               |
| 胃竇               | 46 (71.9)     | 18 (28.1)     | 2.7 <sup>d</sup> (1.1-6.7)    |
| 非胃竇              | 15 (48.4)     | 16 (51.6)     | 0.03                          |

<sup>a</sup> 胃癌血清檢體: *n* = 95

<sup>b</sup> EGC: 早期胃癌, 癌細胞侵入限於黏膜層或黏膜下層

<sup>c</sup> AGC: 進行性胃癌, 癌細胞侵入固有肌肉層 (muscularis propria)

<sup>d</sup> ORs, 95% CI 與 *P* 值係於控制年齡之後以邏輯迴歸處理

<sup>e</sup> *P* 值係由卡方檢驗而得

### 實施例三、以 GroES 刺激 PBMC 可誘導表現前發炎組織細胞激素 (proinflammatory cytokine) 與 COX-2

實施例二顯示 GroES 與 GC 有密切關聯，而 GC 係由於幽門螺旋菌造成的慢性發炎所致。進一步可知，GroES 為分泌型蛋白且直接與宿主接觸可能媒介幽門螺旋菌與宿主之間重要的相互作用。因此在本實施例中，吾人探討 GroES 對於單核球發炎反應的效果。PBMC 先與 rGroES 培養，接著以 RT-PCR 測量七種細胞激素的 mRNA 層級的表現。結果如第四圖 A 所示，rGroES 的刺激會致使 IL-8、IL-6、IL-1 $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  等一些常常出現於幽門螺旋菌感染病患的細胞激素有顯著的增加。此外，GM-CSF 則會因 rGroES 有些微增加，而干擾素  $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) 與 IL-12 並無改變。更進一步，COX-2 為一種發炎反應之重要酵素，其 mRNA 也會大幅增加。這些結果顯示幽門螺旋菌的 GroES 會在轉錄階段調高 (up-regulation) 前發炎組織細胞激素 (proinflammatory cytokine) 與 COX-2 的表現。

接著分析以 rGroES 刺激 PBMC 之培養上清液以了解細胞激素於蛋白質階段的表現。結果如第四圖 B-F 所示，rGroES 會誘導分泌型的 IL-8、IL-6、GM-CSF、IL-1 $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  產生一劑量依賴性 (dose-dependent) 增加。而 rGroES 的濃度在 0.1  $\mu$ g/ml 時仍可誘導細胞激素釋出。刺激 IL-6 產生的近於最大量的濃度為 0.5  $\mu$ g/ml，然而其他細胞激素於此濃度則仍有大量分泌的現象。

為排除細胞激素分泌增加係因 LPS 污染的可能性，rGroES 在處理 PBMC 前以蛋白酶 K 分解，並以銀染 SDS-PAGE 確認完全分解。結果如第四圖 G 所示，被分解的物質只產生基本的 IL-8，若為 LPS 污染所產生的 IL-8 分

泌則不會被蛋白酶 K 分解所影響。此數據確認了前述細胞激素產生係由 rGroES 所導致。

接著在驗證 rGroES 在蛋白質階段誘導 COX-2 表現上，結果如第四圖 H 所示，rGroES 會誘導 COX-2 產生一劑量依賴性增加。再者，檢驗以 rGroES 處理的 PBMC 分泌 PGE<sub>2</sub> 的狀況，PGE<sub>2</sub> 的產生需要靠 COX-2，對於發炎反應有重要影響。由實驗結果第四圖 I 可知，rGroES 會刺激 PGE<sub>2</sub> 產生一劑量依賴性增加。並在 rGroES 為 5  $\mu$ g/ml 時達到飽和。

綜上所述，rGroES 可增加前發炎反應細胞激素、COX-2 與 PGE<sub>2</sub> 的在 mRNA 以及蛋白質階段的表現，故可知 GroES 在幽門螺旋菌感染的發炎反應上扮演一促進的角色。

#### 實施例四、GroES 對胃上皮細胞的影響

為測試 GroES 是否對於胃上皮細胞是否有直接的效果，將 KATO-III 細胞，一種胃癌細胞株，以 rGroES 處理後，進行 RT-PCR 以確認前發炎反應之細胞激素表現狀況。結果如第五圖 A 所示，在以 rGroES 處理之 KATO-III 細胞中，IL-8、GM-CSF、IL-1 $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  在 mRNA 階段增加，IL-6 則未改變。而在這四種在 mRNA 階段增加的細胞激素當中，只有 IL-8 在蛋白質分泌上具有劑量依賴性的增加。(第五圖 B)

除了促進發炎反應以外，GroES 會造成 GC 有可能是因為幫助細胞增生。為驗證此一假設，KATO-III 細胞增生係於 rGroES 刺激後以 MTS 試驗測試。當以 rGroES 5  $\mu$ g/ml 處理時，KATO-III 細胞的存活細胞相較於未處理細

胞顯著增加至 1.2 倍。(第五圖 C)

接著利用 RT-PCR 評估 rGroES 處理後 *c-jun* 或 *c-fos* 在胃上皮細胞的表現。結果如第五圖 D 所示，雖然在未處理細胞中無 *c-jun* mRNA 且 *c-fos* 的 mRNA 量很低，但在 rGroES 刺激後的 KATO-III 細胞，兩種原致癌基因(proto-oncogene)的表現則有劇烈增加。

進一步藉由分析與細胞週期調控有關的標記分子之蛋白質階段表現，以檢驗 GroES 在 GC 發展中所扮演的角色。根據第五圖 E 顯示，細胞週期素 D1(Cyclin D1)之蛋白質表現為 GroES 所調高。過去文獻指出在 GC 中細胞週期素 D1 有顯著的表現[28]。更進一步我們發現 p27<sup>kip1</sup> 蛋白表現會被 rGroES 所調降(第五圖 E)，文獻中指出在與幽門螺旋菌有關的腸化生(intestinal metaplasia)中，可發現到 p27<sup>kip1</sup> 有降低表現的現象。由上述幽門螺旋菌 GroES 對於細胞週期分子的影響與文獻中癌前期病灶(precancerous gastric lesion) 與 GC 臨床研究相符。

#### 實施例五、GroES 與 FlaG 在發炎反應以及細胞增生上之不同效果

為了解幽門螺旋菌之 GroES 在發炎反應以及細胞增生之顯著性，我們比較幽門螺旋菌蛋白 FlaG(HP0751)與 GroES 的效果。FlaG 為一極性鞭毛蛋白 (Flagellin)，與 GroES 有相似的分子量，且與 GC 和 DU 之血清反應頻率低(分別為 3.1% ,n=95；12.5% ,n=124)。重組 FlaG(rFlaG)也被純化且去除內毒素以處理 PBMC 與 KATO-III。

結果如第六圖 A 所示，PBMC 以 rGroES 處理後，IL-8、GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> 蛋白質階段表現有

顯著增加的現象。相反地，rFlaG 則只有輕微誘導 PBMC 產生 IL-8，但未產生其他細胞激素與 PGE<sub>2</sub>。在 KATO-III 細胞中，由 rGroES 誘導大量產生 IL-8，而 rFlaG 對 IL-8 則無影響(第六圖 B)。又根據第六圖 C 評估這兩種重組蛋白對 KATO-III 細胞之細胞增生的影響，由數據顯示細胞與 rGroES 培養 24-36 小時後，細胞數大量增加，相反地 rFlaG 對細胞增生則無影響。

經由以上實施例可知幽門螺旋菌的 GroES 蛋白在臨床血清學上與 GC 病患者有高關聯性。實施例二的數據顯示有 64.2% 的 GC 血清與 GroES 有反應相較於 DU 的 30.9% 比例相當高。且 GC 早期與末期血清對於 GroES 無顯著差異。須注意，上述實驗結果與先前研究不同，在已開發國家及墨西哥之研究發現 GroES 血清陽性率在幽門螺旋菌感染者中會隨著年齡增加而增加[30-32]，Pérez-Pérez 等學者的研究指出在貴門胃腺癌患者中 GroES 的具有高血清陽性率，但貴門附近的腺瘤與幽門螺旋菌感染無關[30]。而 Ng 等學者的研究指出 GroES 抗原性與幽門螺旋菌造成之臨床疾病無關[31]。相反地，根據實施例二，本發明發現 GroES 血清反應與 GC 的高相關性。更進一步，根據實施例三，rGroES 會誘導分泌型的 IL-8、IL-6、GM-CSF、IL-1 $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  產生一劑量依賴(dose-dependent)增加。而 rGroES 的濃度在 0.1  $\mu$ g/ml 時仍可誘導細胞激素釋出。IL-6 係與腫瘤細胞成長和分化有關，IL-8 則作用於血管新生促使腫瘤細胞生長，GM-CSF 和 IL-1 $\beta$  為腸胃上皮細胞的生長因子，IL-1 $\beta$  以及 TNF- $\alpha$  則為胃酸的抑制因子[45]，而減少酸的分泌會促使胃泌素(gastrin)增加，進而促進上皮細胞生長[46]。申請人證明本發明所提供之 GroES 為一與發炎反應有關的

侵入性因子。申請人亦證明 GroES 會經由強化 COX-2 表現促進發炎反應導致 PGE<sub>2</sub> 的產生，PGE<sub>2</sub> 與抑制細胞凋亡、血管新生以及腫瘤產生有關[47-50]。

進一步由實施例四，本發明亦證明了 GroES 藉由促進細胞增生有關的蛋白表現例如 *c-jun*、*c-fos*、細胞週期素 D1 以促進腸胃上細胞增生，並抑制 p27<sup>kip1</sup> 的產生。

綜上所述，本發明利用 GC 以及 DU 病患血清找到與 GC 有關之幽門螺旋菌之蛋白 GroES，並找出 GroES 的作用機制，進一步利用 GroES 之寡核苷酸序列或胺基酸序列等分子做為生物標記分子，檢測幽門螺旋菌所導致的腸胃疾病甚至是胃癌，以供臨床上針對不同病因進行治療，對於臨床診斷與治療上有相當大的助益。

### 其他實施態樣

本發明之實施方法已詳述於前述實施例中，任何熟悉本技術領域之人士皆可依本發明之說明，在不背離本發明之精神與範圍內視需要更動、修飾本發明，因此，其他實施態樣亦包含在本發明之申請專利範圍中。

### 【圖式簡單說明】

第一圖 A-C 係為本發明實施例一中，GC 相關免疫蛋白的二維電泳圖譜。細胞表面蛋白以酸性甘胺酸萃取後使用線性 pH=3 至 10 梯度進行第一相，並以 12.5% SDS-PAGE 跑第二相。分離之蛋白以銀染偵測或轉漬於 PVDF 膜並以 GC 或 DU 病人血清偵測。

第二圖係為本發明實施例一中，幽門螺旋菌 GroES 的人類 IgG 鍵結分析。細胞表面蛋白以酸性甘胺酸萃取後進

行二維電泳。圖中顯示銀染膠與免疫轉漬含有 GroES 同質體 (Isoform)。二維電泳免疫轉漬分別以 15 個胃癌血清樣本為探針加以偵測。GroES 的同質體如箭頭所示。mGroES 為單體而 dGroE 為雙體，WB 為西方轉漬法。

第三圖 A-C 係為本發明實施例一中，定性原始 GroES 以及重組 GroES 圖。A 為純化之 rGroES 與抗 rGroES 抗體反應，欄一為 IPTG 誘導 M15 細胞的溶解液，欄二與欄三為純化的 rGroES，以 12.5% SDS-PAGE 進行電泳並以考馬斯藍 (Coomassie Blue) 染色 (欄一、欄二) 或以抗 GroES 多株抗體型免疫轉漬。B 為幽門螺旋菌二維電泳免疫轉漬以酸性甘胺酸萃取，再以 GC 病患的血清偵測 (左欄) 或以抗 rGroES 抗體反應 (右欄)。GroES 的單體分子量從 14-20kDa 以下方框線表示，上方框線為雙體。C 為以抗 rGroES 抗體進行西方墨點法分析，顯示 GroES 分泌至培養液當中 (欄二) 而單獨培養液則無 (欄一)。( \* 表示單體， \*\* 表示雙體)。

第四圖 A-H 係為本發明實施例三中，GroES 對 PBMC 刺激所產生之發炎反應的結果。A 為 PBMC 以 rGroES 處理 (5  $\mu$ g/ml) 4 小時後，以 RT-PCR 偵測 IL-8、IL-6、GM-CSF、IL-1  $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、COX-2 以及 GAPDH (控制組)。PBMC 與不同濃度 rGroES 培養 24 小時以 ELISA 定量上清液結果如 B-F 所示。G 為 rGroES 與 LPS 先以蛋白酶 K 分解後再將蛋白酶 K 去活化，之後分別與 PBMC 培養如上述。(rGroES 與 LPS 分別為 5 和 1  $\mu$ g/ml)，並測量上清液的 IL-8。H 為以西方墨點法分析 COX-2 蛋白表現。I 為 PGE<sub>2</sub> 分泌至 rGroES 處理 24 小時 PBMC 培養液。

第五圖 A-D 係為本發明實施例四中，GroES 導致 KATO-III 潛在腫瘤變化之實驗數據。A 為細胞以 rGroES (5

$\mu$ g/ml)處理 6 小時後，進行 RT-PCR 以確認 IL-8、GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  和 GAPDH 在 mRNA 階段表現狀況。B 為細胞以 rGroES 處理 24 小時後，以 ELISA 測量上清液中的 IL-8。C 為細胞以 rGroES 處理 24 小時後，以 MTS 試驗測量存活細胞數。D 為細胞以 rGroES 處理 24 小時後，以 RT-PCR 偵測原致癌基因 *c-jun* 與 *c-fos*。E 為細胞以 rGroES 處理 12 小時後，以西方墨點法偵測細胞週期素 D1、p27<sup>kip1</sup> 與肌動蛋白  $\beta$  之蛋白質。

第六圖 A-C 係為本發明實施例五中，比較 GroES 與 FlaG 在 PBMC 與 KATO-III 細胞中之作用。PBMC(A)與 KATO-III(B)細胞以各重組蛋白(5  $\mu$ g/ml)處理 24 小時後，以 ELISA 測量 IL-8、GM-CSF、IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、PGE<sub>2</sub> 蛋白質階段表現。C 為 KATO-III 細胞以各重組蛋白(5  $\mu$ g/ml)處理 6-48 小時後以 MTS 試驗計算存活細胞數目。

#### 【元件符號說明】

無

## 參考文獻：

1. Marshall, B. and Warren, J. R. (1983) Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* **1**, 1273-1275.
2. Peterson, W. L. (1991) *Helicobacter pylori* and peptic ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* **324**, 1043-1048.
3. Parsonnet, J., Friedman, G. D., Vandersteen, D. P., Chang, Y., Vogelstein, J. H., Orentreich, N., and Sibley, R. K. (1991) *Helicobacter pylori* infection and the risk of gastric carcinoma. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1127-1131.
4. Nomura, A., Stemmermann, G. N., Chyou, P. H., Kato, I., Perez-Perez, G. I., and Blaser, M. J. (1991) *Helicobacter pylori* infection and gastric carcinoma among Japanese Americans in Hawaii. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1132-1136.
5. Murray, C. J. and Lopez, A. D. (1997) Alternative projections of mortality and disability by cause 1990-2020: Global Burden of Disease Study. *Lancet* **349**, 1498-1504.
6. Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., Matsumura, N., Yamaguchi, S., Yamakido, M., Taniyama, K., Sasaki, N., and Schlemper, R. J. (2001) *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N. Engl. J. Med.* **345**, 784-789.
7. Ekstrom, A. M., Held, M., Hansson, L. E., Engstrand, L., and Nyren, O. (2001) *Helicobacter pylori* in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. *Gastroenterology* **121**, 784-791.
8. Blaser, M. J. and Atherton, J. C. (2004) *Helicobacter pylori* persistence: biology and disease. *J. Clin. Invest* **113**, 321-333.
9. Hansson, L. E., Nyren, O., Hsing, A. W., Bergstrom, R., Josefsson, S., Chow, W. H., Fraumeni, J. F., Jr., and Adami, H. O. (1996) The risk of stomach cancer in patients with gastric or duodenal ulcer disease. *N. Engl. J. Med.* **335**, 242-249.
10. Suerbaum, S. and Michetti, P. (2002) *Helicobacter pylori* infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 1175-1186.
11. Haas, G., Karaali, G., Ebermayer, K., Metzger, W. G., Lamer, S., Zimny-Arndt, U., Diescher, S., Goebel, U. B., Vogt, K., Roznowski, A. B., Wiedenmann, B. J., Meyer, T. F., Aebischer, T., and Jungblut, P. R. (2002) Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric disease. *Proteomics* **2**, 313-324.
12. Krah, A., Miehke, S., Pleissner, K. P., Zimny-Arndt, U., Kirsch, C., Lehn, N., Meyer, T. F., Jungblut, P. R., and Aebischer, T. (2004) Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori*-infected patients with gastric carcinoma. *Int. J. Cancer* **108**, 456-463.
13. Harris, P. R., Smythies, L. E., Smith, P. D., and Dubois, A. (2000) Inflammatory cytokine mRNA expression during early and persistent *Helicobacter pylori* infection in nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* **181**, 783-786.

25. Lauren, P. (1965) The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. An attempt at a histo-clinical classification. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* **64**, 31-49.
26. Utt, M., Nilsson, I., Ljungh, A., and Wadstrom, T. (2002) Identification of novel immunogenic proteins of *Helicobacter pylori* by proteome technology. *J. Immunol. Methods* **259**, 1-10.
27. Kao, S. H., Su, S. N., Huang, S. W., Tsai, J. J., and Chow, L. P. (2005) Sub-proteome analysis of novel IgE-binding proteins from Bermuda grass pollen. *Proteomics*. **5**, 3805-3813.
28. Gao, P., Zhou, G. Y., Liu, Y., Li, J. S., Zhen, J. H., and Yuan, Y. P. (2004) Alteration of cyclin D1 in gastric carcinoma and its clinicopathologic significance. *World J. Gastroenterol.* **10**, 2936-2939.
29. Yu, J., Leung, W. K., Ng, E. K., To, K. F., Ebert, M. P., Go, M. Y., Chan, W. Y., Chan, F. K., Chung, S. C., Malfertheiner, P., and Sung, J. J. (2001) Effect of *Helicobacter pylori* eradication on expression of cyclin D2 and p27 in gastric intestinal metaplasia. *Aliment. Pharmacol. Ther.* **15**, 1505-1511.
30. Perez-Perez, G. I., Thiberge, J. M., Labigne, A., and Blaser, M. J. (1996) Relationship of immune response to heat-shock protein A and characteristics of *Helicobacter pylori*-infected patients. *J. Infect. Dis.* **174**, 1046-1050.
31. Ng, E. K., Thompson, S. A., Perez-Perez, G. I., Kansau, I., van der, E. A., Labigne, A., Sung, J. J., Chung, S. C., and Blaser, M. J. (1999) *Helicobacter pylori* heat shock protein A: serologic responses and genetic diversity. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **6**, 377-382.
32. Eamranond, P. P., Torres, J., Munoz, O., and Perez-Perez, G. I. (2004) Age-specific immune response to HspA in *Helicobacter pylori*-positive persons in Mexico. *Clin. Diagn. Lab Immunol.* **11**, 983-985.
33. Thirumalai, D. and Lorimer, G. H. (2001) Chaperonin-mediated protein folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **30**, 245-269.
34. Macario, A. J., Malz, M., and Conway de, M. E. (2004) Evolution of assisted protein folding: the distribution of the main chaperoning systems within the phylogenetic domain archaea. *Front Biosci.* **9**, 1318-1332.
35. Xu, Q. (2003) Infections, heat shock proteins, and atherosclerosis. *Curr. Opin. Cardiol.* **18**, 245-252.
36. Retzlaff, C., Yamamoto, Y., Hoffman, P. S., Friedman, H., and Klein, T. W. (1994) Bacterial heat shock proteins directly induce cytokine mRNA and interleukin-1 secretion in macrophage cultures. *Infect. Immun.* **62**, 5689-5693.
37. Yokota, S., Tsubaki, K., Kuriyama, T., Shimizu, H., Ibe, M., Mitsuda, T., Aihara, Y., Kosuge, K., and Nomaguchi, H. (1993) Presence in Kawasaki disease of antibodies to mycobacterial heat-shock protein HSP65 and autoantibodies to epitopes of human HSP65 cognate antigen. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **67**, 163-170.

49. Kim, J. M., Kim, J. S., Jung, H. C., Song, I. S., and Kim, C. Y. (2000) Upregulated cyclooxygenase-2 inhibits apoptosis of human gastric epithelial cells infected with *Helicobacter pylori*. *Dig. Dis. Sci.* **45**, 2436-2443.
50. Leung, W. K., To, K. F., Go, M. Y., Chan, K. K., Chan, F. K., Ng, E. K., Chung, S. C., and Sung, J. J. (2003) Cyclooxygenase-2 upregulates vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis in human gastric carcinoma. *Int. J. Oncol.* **23**, 1317-1322.

### 五、中文發明摘要：

本發明提供一種用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其係選自：GroES 之寡核苷酸序列、其互補股或其衍生物、其胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。利用上述標記分子，本發明亦提供一種腸胃疾病之檢測套組以及一種腸胃疾病之檢測方法，尤其是篩選與幽門螺旋菌有關之胃癌。

### 六、英文發明摘要：

## 十、申請專利範圍：

1. 一種用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其係選自：  
GroES 之寡核苷酸序列、其互補股或其衍生物、其胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。
2. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物標記分子，其中前述 GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。
3. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物標記分子，其中前述之 GroES 寡核苷酸序列係選自 SEQ ID NO：1。
4. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物標記分子，其中前述之 GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：2。
5. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物標記分子，其中前述變異體與 GroES 之原胺基酸序列具有大於 80% 之序列同一性。
6. 如申請專利範圍第 5 項所述之生物標記分子，其中前述衍生物係指於前述核苷酸之序列或其互補股之 3'端或 5'端修飾其他核苷酸序列，使其仍和原序列具有 90%或以上相似性之寡核苷酸序列。
7. 如申請專利範圍第 1 項所述之生物標記分子，其中前述腸胃疾病為胃癌。
8. 一種用於檢測腸胃疾病之生物標記分子，其係選自：SEQ ID NO:1 所示之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。
9. 如申請專利範圍第 8 項所述之生物標記分子，其中前述變異體與原胺基酸序列具有大於 80% 之序列同一性。
10. 如申請專利範圍第 8 項所述之生物標記分子，其中前述

SEQ ID NO:1 之衍生物係指於前述核苷酸之序列或其互補股之 3'端或 5'端修飾其他核苷酸序列，使其仍和原序列具有 90%或以上相似性之寡核苷酸序列。

11. 一種腸胃疾病之檢測套組，包含：生物標記分子，其係選自於 GroES 之寡核苷酸序列、其互補股和衍生物、其胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。
12. 如申請專利範圍第 11 項所述之檢測套組，其中前述 GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。
13. 如申請專利範圍第 11 項所述之檢測套組，其中前述之 GroES 寡核苷酸序列係選自 SEQ ID NO: 1。
14. 如申請專利範圍第 11 項所述之檢測套組，其中前述之 GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO: 2。
15. 如申請專利範圍第 11 項所述之檢測套組，其中前述之檢測套組可進一步包含可辨識 SEQ ID NO:2 所示之任一胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其組合物或其對應之抗體的二級抗體。
16. 一種胃癌之檢測方法，係包含下列步驟：
  - (a) 提供一檢體；
  - (b) 提供一生物標記分子，其係選自：SEQ ID NO:1、所示之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或 SEQ ID NO:2 所示之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應抗體或其組合物；
  - (c) 將前述生物標記分子與檢體中之待測物質接觸，前述待測物質係選自：GroES 之寡核苷酸序列、其互補股、其衍生物或胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應抗體或其組合物；及

(d)偵測前述步驟(c)中生物標記分子與檢體中之待測物質接觸後之產物。

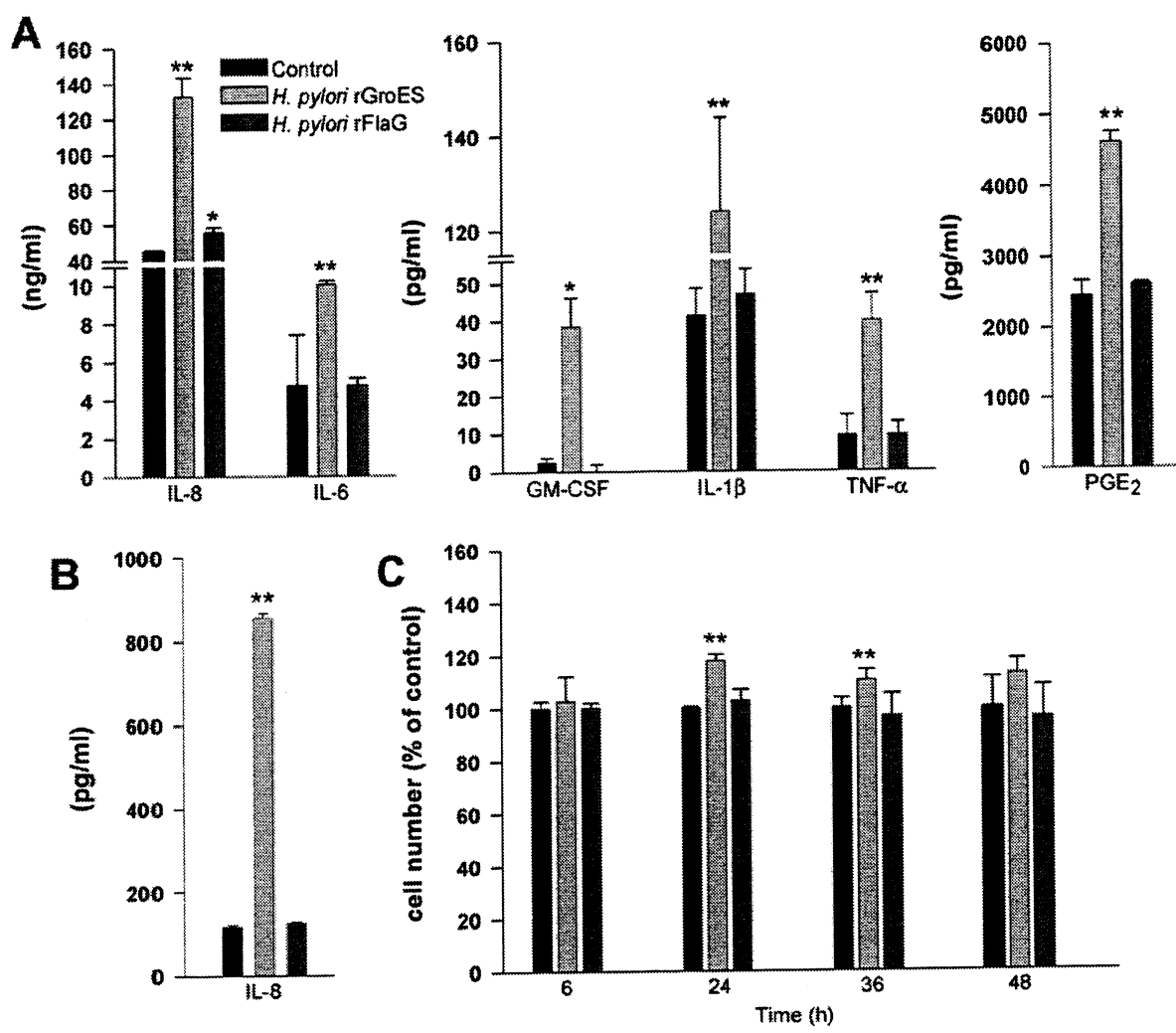
- 17.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述檢體係包含血清、唾液及胃部組織。
- 18.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述生物標記分子係可進一步先行固定於基材上。
- 19.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述基材係為薄膜、免疫分析盤或生物晶片。
- 20.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述檢體中待測物質係可進一步先行以螢光標記進行標示。
- 21.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述檢測方法係可於步驟(d)之前增加一利用二級抗體辨識吸附對應抗體之步驟。
- 22.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述步驟(d)當偵測胺基酸序列時，係利用酵素連結免疫吸附分析(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)、放射免疫分析(RIA)、西方墨點法(western blot)或免疫螢光分析(Immunofluorescence)方法。
- 23.如申請專利範圍第 16 項所述之檢測方法，其中前述步驟(d)當偵測寡核苷酸序列時，係利用反轉錄酶-聚合酶鏈鎖反應(reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)或原位雜交反應(*In situ* hybridization)。
- 24.一種用於檢測胃癌之生物標記分子，其係選自：GroES之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物。
- 25.如申請專利範圍第 24 項所述之生物標記分子，其中前述GroES係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。

26. 如申請專利範圍第 24 項所述之生物標記分子，其中前述之 GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：2。
27. 如申請專利範圍第 24 項所述之生物標記分子，其中前述變異體與 GroES 之原胺基酸序列具有大於 80% 之序列同一性。
28. 一種胃癌之檢測套組，包含：生物標記分子，其係選自於 GroES 之胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其對應之抗體或其組合物；其中前述 GroES 係為一幽門螺旋桿菌之特異蛋白。
29. 如申請專利範圍第 28 項所述之檢測套組，其中前述之 GroES 胺基酸序列係選自 SEQ ID NO：2。
30. 如申請專利範圍第 28 項所述之檢測套組，其中前述之檢測套組可進一步包含可辨識 SEQ ID NO:2 所示之任一胺基酸序列或其衍生物、其片段、其變異體、其組合物或其對應之抗體的二級抗體。

06P0383.ST25

SEQUENCE LISTING

<110> 台灣大學  
<120> 腸胃疾病生物標記分子及其檢測方法  
<130> 06P0383  
<160> 2  
<170> PatentIn version 3.3  
<210> 1  
<211> 357  
<212> DNA  
<213> GroES nucleotide sequence  
  
<400> 1  
atgaagtttc agccattagg agaaagggtc ttagtagaaa gacttgaaga agagaacaaa 60  
accagttcag gcatcatcat cccgtataac gctaaggaaa agcctttaat gggcgtagtc 120  
aaagcggtta gccataaaat cagtgagggt tgcaaatgcg ttaaagaagg cgatgtgatc 180  
gcttttggca aatacaaagg cgcagaaatc gttttagacg gcactgaata catggtgcta 240  
gaactagaag acattctagg cattgtgggc tcaggctctt gttgtcatac aggtaatcat 300  
gaccataaac atgctaaaga gcatgaagct tgctgtcatg atcacaaaaa acactaa 357  
  
<210> 2  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> GroES protein sequence  
  
<400> 2  
Met Lys Phe Gln Pro Leu Gly Glu Arg Val Leu Val Glu Arg Leu Glu  
1 5 10 15  
  
Glu Glu Asn Lys Thr Ser Ser Gly Ile Ile Ile Pro Asp Asn Ala Lys  
20 25 30  
  
Glu Lys Pro Leu Met Gly Val Val Lys Ala Val Ser His Lys Ile Ser  
35 40 45  
  
Glu Gly Cys Lys Cys Val Lys Glu Gly Asp Val Ile Ala Phe Gly Lys  
50 55 60  
  
Tyr Lys Gly Ala Glu Ile Val Leu Asp Gly Thr Glu Tyr Met Val Leu  
65 70 75 80  
  
Glu Leu Glu Asp Ile Leu Gly Ile Val Gly Ser Gly Ser Cys Cys His  
85 90 95  
  
Thr Gly Asn His Asp His Lys His Ala Lys Glu His Glu Ala Cys Cys  
100 105 110  
  
His Asp His Lys Lys His  
115



第六圖

七、指定代表圖：

(一)本案指定代表圖為：第(三)圖。

(二)本代表圖之元件符號簡單說明：

無

八、本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式：

無