

EB 病毒 BNLF2b 基因编码多肽及其检测用途

技术领域

本发明涉及免疫学检测，特别是肿瘤的免疫学诊断领域。具体而言，本发明提供了基于抗 EB 病毒（EBV）抗体水平来诊断鼻咽癌的方法，以及用于所述方法的试剂盒。本发明还提供了用于上述诊断的 EB 病毒 BNLF2b 基因编码的多肽及其用于诊断鼻咽癌的用途。

背景技术

鼻咽癌是一种好发于鼻咽腔顶部和侧壁的恶性肿瘤，其发病率居耳鼻喉恶性肿瘤之首。我国是鼻咽癌高发区，以广东、广西地区发病率最高[1]。鼻咽癌的发生与 EB 病毒感染、遗传因素、环境因素等多种因素有关[2]。由于鼻咽癌早期症状不明显，而且发病位置较为隐秘，大部分的鼻咽癌到了晚期才能发现[3]。但是，早期鼻咽癌的五年生存率可以达到 90% 以上，而晚期鼻咽癌的预后显著降低[3]。同时，早期鼻咽癌可以通过局部放疗进行治疗，而晚期鼻咽癌则要进行化疗。因此，早期诊断是提高鼻咽癌患者生存率和生存质量的关键。

早在 1976 年，Werner Henle 等就发现，鼻咽癌患者血清中 EBV IgA 抗体显著升高[4]。随后，研究发现，鼻咽癌患者血清中针对 EBNA1、EA-D、VCA 等多种蛋白的抗体水平均显著升高[5-12]。早期 EBV 抗体检测以免疫荧光法为主，通量低、耗时长且结果主观性较强，难以满足大规模筛查的需求[13-15]；随着酶联免疫法（ELISA）的发展，各国科研人员建立了大量的 EB 病毒抗体 ELISA 检测试剂盒，使得检测通量和客观性显著提高[16-23]。此外，研究还发现，通过联合使用不同的血清学标志物，可进一步提高鼻咽癌筛查的灵敏度和特异性，其中应用最多的是 EBNA1-IgA 和 VCA-IgA 联合使用[24-26]。前瞻性队列研究的结果表明，通过筛查，鼻咽癌的早期诊断率可以由 10-20% 提高到 60% 以上[27-29]。在此基础上，本课题组提出了两步法筛查的策略，即：在 EBNA1-IgA 与 VCA-IgA 联合筛查的基础上，对第一步筛查为高危的人群进一步检测 EAD-IgA，EAD-IgA 阳性者再进行鼻咽镜确诊。通过两步法筛查，鼻咽癌筛查的阳性预测值由原来的 4.69% 提高到 18.52%[30]。

除 EBV 抗体水平外，鼻咽癌患者血液中 EBV DNA 和 micro RNA 中的水平也显著升高[31-33]。Allan Chan 等在香港的一项前瞻性研究的结果表明，以持续性 EBV DNA

阳性做为标准进行鼻咽癌筛查，可以显著提高鼻咽癌筛查的特异性，在初筛 EBV DNA 阳性的 1112 人（5.5%）中，仅 309 人 EBV DNA 持续阳性，其中 34 人最终确诊鼻咽癌[34]。以持续性 EBV 阳性做为筛查标准，灵敏度和特异性分别达到 97.1% 和 98.6%，阳性预测值由 3.06% 提高到 11%，通过筛查鼻咽癌的早期诊断率由 20% 提高到 71%[34]。

相比一步法筛查，两步法筛查的阳性预测值显著提高，可以满足更大规模的鼻咽癌筛查的需求。但是，无论是血清学筛查，还是 DNA 筛查，两步法筛查操作均更为复杂，成本也更高。此外，DNA 持续性阳性还需要再次采血，进一步增加了筛查的难度。因此，尽管一步法血清学抗体筛查具有显著的成本效益[35]，但两步法筛查是否具有更高的成本效益还有待进一步评估。此外，目前报导的鼻咽癌筛查方法阳性预测值最高仅为 18.52%，即：在筛查高危的人群中，至少有 71.48% 的非鼻咽癌患者要进行鼻咽镜检查。而鼻咽镜检查耗时长，这就直接限制了鼻咽癌筛查的规模，同时，也会给筛查阳性的非鼻咽癌患者造成心理负担。

因此，本领域仍然需要开发新的鼻咽癌筛查方法，其相比现有方法具有更高的特异性和阳性预测值，同时，具有高通量、成本低的特点，以满足大规模筛查的需求，使更多人能够从筛查中受益。

发明内容

本申请的发明人经过大量的研究后出人意料地发现：受试者血清中针对 EBV BNLF2b 基因编码蛋白的抗体水平（其可以例如，使用 BNLF2b 基因编码蛋白或多肽片段作为包被抗原通过间接法或双抗原夹心法来进行检测）可高效区分鼻咽癌患者与健康对照。此外，发明人还付出了大量的创造性劳动，获得了特别适用于作为捕获试剂（例如，ELISA 中的包被抗原）的 BNLF2b 基因编码多肽片段。由此，发明人基于针对 EBV BNLF2b 基因编码蛋白的抗体水平的检测，成功地建立了用于诊断鼻咽癌的方法和平台，其能够显著提高鼻咽癌筛查的特异性和阳性预测值。

分离的多肽或其变体

在第一方面，本发明提供了一种分离的多肽或其变体，其中，所述多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 7 个连续氨基酸残基组成，且包含至少 1 个（例如至少 2 个、至少 3 个、或全部 4 个）选自下列的序列：BNLF2b 基因编码的野生型蛋

白的第 5-11 位氨基酸残基、第 16-23 位氨基酸残基、第 31-39 位氨基酸残基、或第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）；

其中，所述变体与其所源自的多肽相异仅在于 1 个或几个（例如，1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个或 9 个）氨基酸残基的置换（例如，保守置换或非保守置换），且保留了其所源自的多肽的生物学功能（例如被抗 EBV 抗体识别并结合的活性）。

在某些实施方案中，所述 BNL2b 基因编码的野生型蛋白具有如 SEQ ID NO: 101 所示的序列。

在本文中，本发明的多肽或其变体的生物学功能包括但不限于作为表位肽被抗 EBV 抗体（例如对 BNL2b 基因编码的蛋白特异性的抗体）识别并结合的活性。

在某些实施方案中，所述分离的多肽包含：BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）、第 5-23 位氨基酸残基、第 16-39 位氨基酸残基、第 31-60 位氨基酸残基（例如第 31-61 位氨基酸残基）、第 5-39 位氨基酸残基、第 16-60 位氨基酸残基（例如第 16-61 位氨基酸残基）、或第 5-60 位氨基酸残基（例如第 5-61 位氨基酸残基）。

在一个实施方案中，所述分离的多肽由 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的至少 8 个（例如，至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个或至少 15 个）连续氨基酸残基组成，且包含 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-61 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 51-65 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述第 51-65 位氨基酸残基具有 SEQ ID NO: 97 所示的序列。

在某些实施方案中，所述多肽由 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的至少 15 个连续氨基酸残基组成。

在一个实施方案中，所述分离的多肽由 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的至少 19

个（例如，至少 20 个、至少 21 个、至少 22 个、至少 23 个、至少 24 个、或至少 25 个）连续氨基酸残基组成，且包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 5-23 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 1-25 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述第 1-25 位氨基酸残基具有 SEQ ID NO: 102 所示的序列。

在某些实施方案中，所述多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 25 个连续氨基酸残基组成。

10 在一个实施方案中，所述分离的多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 24 个（例如，至少 25 个、至少 26 个、至少 27 个、至少 28 个、至少 29 个、至少 30 个、至少 31 个、至少 32 个、至少 33 个、至少 34 个、至少 35 个、至少 36 个、至少 37 个、至少 38 个、或至少 39 个）连续氨基酸残基组成，且包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 16-39 位氨基酸残基。

15 在某些实施方案中，所述多肽包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 14-52 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述第 14-52 位氨基酸残基具有 SEQ ID NO: 88 所示的序列。

在某些实施方案中，所述多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 39 个连续氨基酸残基组成。

20

在一个实施方案中，所述分离的多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 30 个连续氨基酸残基组成，且包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 31-60 位氨基酸残基。

25 在某些实施方案中，所述分离的多肽包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 31-61 位氨基酸残基。

在一个实施方案中，所述分离的多肽由 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的至少 35 个（例如，至少 36 个、至少 37 个、至少 38 个、至少 39 个、至少 40 个、至少 41 个、至少 42 个、至少 43 个、至少 44 个、至少 45 个、至少 46 个、至少 47 个、至少 48 个、至少 49 个、至少 50 个、至少 51 个、至少 52 个、或至少 53 个）连续氨基酸残基组成，

且包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 5-39 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 1-52 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述第 1-52 位氨基酸残基具有 SEQ ID NO: 91 所示的序列。

- 5 在某些实施方案中，所述多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 53 个连续氨基酸残基组成。

- 在一个实施方案中，所述分离的多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 45 个（例如，至少 46 个、至少 47 个、至少 48 个、至少 49 个、至少 50 个、至少 51 个、
10 至少 52 个、至少 53 个、至少 54 个、至少 55 个、至少 56 个、至少 57 个、至少 58 个、至少 59 个、至少 60 个、至少 61 个、至少 62 个、至少 63 个、或至少 64 个）连续氨基酸残基组成，且包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 16-60 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 16-61 位氨基酸残基。

- 15 在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 14-74 位氨基酸残基（例如，SEQ ID NO:90 所示的序列）。在某些实施方案中，所述多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 61 个连续氨基酸残基组成。

- 在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 11-65 位氨基酸残基（例如，SEQ ID NO: 103 所示的序列）。在某些实施方案中，所述多肽由
20 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 55 个连续氨基酸残基组成。

在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 11-74 位氨基酸残基（例如，SEQ ID NO: 104 所示的序列）。在某些实施方案中，所述多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 64 个连续氨基酸残基组成。

- 25 在一个实施方案中，所述分离的多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 56 个（例如，至少 57 个、至少 58 个、至少 59 个、至少 60 个、至少 61 个、至少 62 个、至少 63 个、至少 64 个、至少 65 个、至少 66 个、至少 67 个、至少 68 个、至少 69 个、至少 70 个、至少 71 个、至少 72 个、至少 73 个、或至少 74 个）连续氨基酸残基组成，且包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 5-60 位氨基酸残基。

- 30 在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 5-61 位氨基酸残基。

氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述多肽包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 1-74 位氨基酸残基。

在某些实施方案中，所述第 1-74 位氨基酸残基具有 **SEQ ID NO: 89** 所示的序列。

- 5 在某些实施方案中，所述多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的至少 74 个连续氨基酸残基组成。

- 在某些示例性实施方案中，所述分离的多肽由选自下列的序列组成：**BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 51-56 位氨基酸残基、第 1-25 位氨基酸残基、第 14-52 位氨基酸残基、第 1-52 位氨基酸残基、第 14-74 位氨基酸残基、第 11-65 位氨基酸残基、第 11-74 位氨基酸残基、或第 1-74 位氨基酸残基。在某些示例性实施方案中，所述分离的多肽由选自下列的序列组成：**SEQ ID NOs: 88-91、97、102-104**。
- 10

- 在某些实施方案中，本发明的变体与其所源自的多肽相异仅在于 1 个、2 个、3 个或 4 个氨基酸残基的置换（例如，保守置换或非保守置换），且保留了其所源自的多肽的生物学功能（例如被抗 **EBV** 抗体识别并结合的活性）。
- 15

在某些实施方案中，所述变体不包括在相应于如下位置的氨基酸位置中的氨基酸置换，所述如下位置参考由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白所示的氨基酸位置：6、9、10、11、16、31、33、38、39、53、54、56、57、58、59、95、96、97。

- 20 在某些实施方案中，所述变体在相应于如下位置的氨基酸位置中的一处或多处（例如 1 处，2 处，3 处或 4 处）包含氨基酸置换，所述如下位置参考由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白所示氨基酸位置：5、7、8、12、13、14、15、19、22、24、25、32、34、35、36、37、40、41、42、52、55、60、61、89、91、93 或 98。

- 25 在某些实施方案中，所述变体在相应于如下位置的氨基酸位置中的一处或多处（例如 1 处，2 处，3 处或 4 处）包含氨基酸置换，所述如下位置参考由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白所示氨基酸位置：5、7、8、12、13、14、22、25、32、34、35、36、40、41、42、52、55、60、61、89、91、93 或 98。

- 在某些实施方案中，所述变体包含选自下列的 1 个或几个（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个）氨基酸置换：在相应于位置 5 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 7 的
- 30

位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 8 的位置上的氨基酸置换为 G，在相应于位置 12 的位置上的氨基酸置换为 G、T、D 或 S，在相应于位置 13 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 14 的位置上的氨基酸置换为 G，在相应于位置 15 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 22 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 24 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 25 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 32 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 34 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 35 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 36 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 37 的位置上的氨基酸置换为 A、N、Q、S 或 R，在相应于位置 40 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 41 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 42 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 52 的位置上的氨基酸置换为 K、H、A、S 或 D，在相应于位置 55 的位置上的氨基酸置换为 S，在相应于位置 60 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 61 的位置上的氨基酸置换为 K、H、S 或 A，在相应于位置 89 的位置上的氨基酸置换为 A 或 T，在相应于位置 91 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 93 的位置上的氨基酸置换为 Q，在相应于位置 98 的位置上的氨基酸置换为 A。

在某些实施方案中，所述变体包含选自下列的 1 个或几个（例如，1 个、2 个、3 个或 4 个）氨基酸置换：在相应于位置 5 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 7 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 8 的位置上的氨基酸置换为 G，在相应于位置 12 的位置上的氨基酸置换为 G、T、D 或 S，在相应于位置 13 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 14 的位置上的氨基酸置换为 G，在在相应于位置 22 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 25 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 32 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 34 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 35 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 36 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 40 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 41 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 42 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 52 的位置上的氨基酸置换为 K、H、A、S 或 D，在相应于位置 55 的位置上的氨基酸置换为 S，在相应于位置 60 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 61 的位置上的氨基酸置换为 K、H、S 或 A，在相应于位置 89 的位置上的氨基酸置换为 A 或 T，在相应于位置 91 的位置上的氨基酸置换为 A，在相应于位置 93 的位置上的氨基酸置换为 Q，在相应于位置 98 的位置上的氨基酸置换为 A。

在某些实施方案中，所述分离的多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的不多于 97 个（例如，不多于 96 个，不多于 95 个，不多于 94 个，不多于 93 个，不多于 92 个，不多于 91 个，不多于 90 个，不多于 89 个，不多于 88 个，不多于 87 个，不多于 86 个，不多于 85 个，不多于 84 个，不多于 83 个，不多于 82 个，不多于 81 个，不多于 80 个，不多于 79 个，不多于 78 个，不多于 76 个，不多于 75 个，或不多于 74 个）的连续氨基酸残基组成。

在某些实施方案中，所述分离的多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的 15~80 个（例如 15~74 个）连续氨基酸残基组成。在某些实施方案中，所述分离的多肽由 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的 39~74 个连续氨基酸残基组成。

在一个实施方案中，所述分离的多肽或其变体连接于固相载体表面，或者带有可与固相载体连接的修饰基团。在某些实施方案中，所述分离的多肽或其变体的 C 端连接于固相载体表面，或者带有可与固相载体连接的修饰基团。在某些实施方案中，所述修饰基团是生物素或亲和素。在某些实施方案中，所述固相载体选自磁珠或微量滴定板（例如微孔板或酶标板）。

在另一个实施方案中，所述分离的多肽或其变体带有可检测的标记。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。

多肽的制备

本发明的多肽或其变体不受其产生方式的限定，例如，其可以通过基因工程方法（重组技术）产生，也可以通过化学合成方法产生。

在另一个方面，本发明提供了一种分离的核酸分子，其包含编码本发明的多肽或其变体的核苷酸序列。

在另一个方面，本发明还提供了一种载体，其包含如上所述的分离的核酸分子。本发明的载体可以是克隆载体，也可以是表达载体。在一个优选实施方案中，本发明的载体是例如质粒，粘粒，噬菌体，柯斯质粒等等。

在另一个方面，本发明还提供了包含本发明的分离的核酸分子或载体的宿主细胞。

此类宿主细胞包括但不限于，原核细胞例如大肠杆菌细胞，以及真核细胞例如酵母细胞，昆虫细胞，植物细胞和动物细胞（如哺乳动物细胞，例如小鼠细胞、人细胞等）。本发明的细胞还可以是细胞系，例如 **293T** 细胞。

在另一个方面，本发明还提供了制备本发明的多肽或其变体的方法，其包括，在
5 允许所述多肽或其变体表达的条件下，培养本发明的宿主细胞，和从培养的宿主细胞培养物中回收所述多肽或其变体。

检测试剂盒

在第二方面，本发明提供了一种试剂盒，其包含捕获试剂，所述捕获试剂选自第
10 一方面所述的分离的多肽或其变体。在某些实施方案中，所述试剂盒还包含使用所述分离的多肽或其变体作为捕获试剂来检测样品中的对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的说明书，或者使用所述分离的多肽或其变体作为捕获试剂来测定来自受试者的样品中对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平，从而确定所述受试者是否患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中的说明书。

15 在某些实施方案中，所述受试者是哺乳动物，例如人。

在一些实施方案中，所述捕获试剂连接于固相载体表面。在某些实施方案中，所述捕获试剂的 C 端与固相载体连接。在本文中，所述的固相载体包括由聚合物材料（例如聚氯乙烯、聚苯乙烯、聚丙烯酰胺或纤维素）制成或包被的凹孔平板、试管、珠粒（例如乳胶颗粒）或薄膜（例如硝酸纤维素膜），或由功能基团（例如氨基、羧基、
20 生物素或亲和素）预包被的磁珠。在某些实施方案中，所述固相载体选自磁珠或微量滴定板（例如微孔板或酶标板）。

在另一些实施方案中，所述捕获试剂带有可与固相载体连接的修饰基团。在某些实施方案中，所述捕获试剂的 C 端带有可与固相载体连接的修饰基团。在此类实施方案中，所述试剂盒可进一步包含用于将所述捕获试剂包被于所述固相载体上的包被试剂，例如包被缓冲液（例如，碳酸盐缓冲液、磷酸盐缓冲液、**Tris-HCL** 缓冲液或硼酸盐缓冲液）。将蛋白或多肽包被于固相载体上的方法是本领域熟知的，例如物理吸附、
25 通过氨基化或羧基化表面实现的共价偶联或通过亲和素-生物素系统、聚赖氨酸预包被表面、蛋白 A 或蛋白 G 预包被表面实现的介导结合。在某些实施方案中，所述修饰基团是生物素或亲和素，所述固相载体表面带有相应的连接基团。

30 在某些实施方案中，所述试剂盒在单独的容器中或在单个容器单元的隔开的隔壁

中至少包含用抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白包被的固相载体，以及上述捕获试剂。

5 在一些实施方案中，所述测定来自受试者的样品中抗 EB 病毒（EBV）抗体的水平从而确定所述受试者是否患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中的方法以双抗原夹心形式进行。通过双抗原夹心法来测定样品中的抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定中，“捕获抗原”、“检测抗原”使得样品抗体在两种特异性抗原之间形成桥，因此，两种抗原通常是相同的、或具有相同的核心表位、或具有免疫交叉反应性，使得一种抗体能够结合两种抗原。

10 因此，在某些实施方案中，所述试剂盒还包含检测试剂，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体。

在某些实施方案中，所述检测试剂带有可检测的标记。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。在某些示例性实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）。

15 在某些实施方案中，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的多肽序列相同或基本相同。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列包含相同的核心片段，所述核心片段选自 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 5-11 位氨基酸残基、第 16-23 位氨基酸残基、第 31-39 位氨基酸残基、和/或第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）、第 5-23 位氨基酸残基、第 16-39 位氨基酸残基、第 5-39 位氨基酸残基、第 16-60 位氨基酸残基（例如第 16-61 位氨基酸残基）、或第 5-60 位氨基酸残基（例如第 5-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 51-56 位氨基酸残基、第 1-25 位氨基酸残基、第 14-52 位氨基酸残基、第 1-52 位氨基酸残基、第 14-74 位氨基酸残基、第 11-65 位氨基酸残基、第 11-74 位氨基酸残基、或第 1-74 位氨基酸残基。

30 在另一些实施方案中，所述测定来自受试者的样品中抗 EB 病毒（EBV）抗体的水平从而确定所述受试者是否患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中的方法以间接法形式进行。通过间接法来测定样品中的抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定

中，“捕获抗原”首先与样品中的抗体形成免疫复合物，随后通过二级抗体（例如，抗-免疫球蛋白抗体）对被捕获的抗体进行检测。

因此，在某些实施方案中，所述试剂盒还包含检测试剂，所述检测试剂选自带有可检测的标记的二级抗体。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。在某些示例性实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）。

在某些实施方案中，所述二级抗体对待测抗体所来自的物种（例如人）的抗体是特异的。

10 在某些实施方案中，所述二级抗体是抗-免疫球蛋白抗体。

在某些示例性实施方案中，所述试剂盒用于检测抗 **EBV IgG** 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgG** 抗体，例如抗人 **IgG** 抗体。

在某些示例性实施方案中，所述试剂盒用于检测抗 **EBV IgM** 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgM** 抗体，例如抗人 **IgM** 抗体。

15 在某些示例性实施方案中，所述试剂盒用于检测抗 **EBV IgA** 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgA** 抗体，例如抗人 **IgA** 抗体。

在某些实施方案中，本发明的试剂盒还可以包含一种或多种选自下列的试剂或装置：(i)用于收集或贮存来自受试者的样品的装置（例如采血装置）；(ii)用于进行所述测定所需的其他试剂(例如缓冲液，稀释液，封闭液，和/或标准品)。

检测用途及方法

在第三方面，本发明提供了用于检测样品中的对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的方法，其包括以下步骤：

25 (1) 将所述样品与捕获试剂接触，以获得抗原-抗体免疫复合物；所述捕获试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体；

(2) 测定步骤(1)获得的抗原-抗体免疫复合物的量。

在某些实施方案中，在步骤(2)中，通过免疫学检测来测定所述免疫复合物的量。

在某些实施方案中，所述免疫学检测选自酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在一些实施方案中，所述捕获试剂连接于固相载体表面。

在另一些实施方案中，所述捕获试剂带有可与固相载体连接的修饰基团。在此类实施方案中，在步骤(1)之前，所述方法还包含将所述捕获试剂包被于固相载体表面的步骤。

- 5 在某些实施方案中，所述捕获试剂的 C 端连接于固相载体表面，或者带有可与固相载体连接的修饰基团。

10 在一些实施方案中，所述测定以双抗原夹心形式进行。通过双抗原夹心法来测定样品中的抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定中，“捕获抗原”、“检测抗原”使得样品抗体在两种特异性抗原之间形成桥，因此，两种抗原通常是相同的、或具有相同的核心表位、或具有免疫交叉反应性，使得一种抗体能够结合两种抗原。

因此，在某些实施方案中，在步骤(2)中，使用检测试剂来检测所述免疫复合物的量，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体。

15 在某些实施方案中，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体，所述分离的多肽或其变体带有可检测的标记。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。在某些示例性实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）。

20 在某些实施方案中，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的多肽序列相同或基本相同。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列包含相同的核心片段，所述核心片段选自 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 5-11 位氨基酸残基、第 16-23 位氨基酸残基、第 31-39 位氨基酸残基、和/或第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）、第 5-23 位氨基酸残基、第 16-39 位氨基酸残基、第 5-39 位氨基酸残基、第 16-60 位氨基酸残基（例如第 16-61 位氨基酸残基）、或第 5-60 位氨基酸残基（例如第 5-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 BNL2b 基因编码的野生型蛋白的第 51-56 位氨基酸残基、第 1-25 位氨基酸残基、第 14-52 位氨基酸残基、第 1-52 位氨基酸残基、第 14-74 位氨基酸残基、第

25

30

11-65 位氨基酸残基、第 11-74 位氨基酸残基、或第 1-74 位氨基酸残基。

在另一些实施方案中，所述测定以间接法形式进行。通过间接法来测定样品中的抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定中，“捕获抗原”首先与样品中的抗体
5 形成免疫复合物，随后通过二级抗体（例如，抗-免疫球蛋白抗体）对被捕获的抗体进行检测。

因此，在某些实施方案中，在步骤(2)中，使用检测试剂来检测所述免疫复合物的量，所述检测试剂选自带有可检测的标记的二级抗体。

在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸
10 酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。

在某些实施方案中，所述二级抗体对待测抗体所来自的物种（例如人）的抗体是特异的。

在某些实施方案中，所述二级抗体是抗-免疫球蛋白抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 IgG 抗体。在此类实施方案中，所述
15 抗-免疫球蛋白抗体选自抗 IgG 抗体，例如抗人 IgG 抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 IgM 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 IgM 抗体，例如抗人 IgM 抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 IgA 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 IgA 抗体，例如抗人 IgA 抗体。

20

在另一方面，本发明还涉及第一方面所述的分离的多肽或其变体在制备试剂盒中的用途，所述试剂盒用于检测样品中的对 BNL2b 基因编码的蛋白特异性的抗体。在某些实施方案中，所述试剂盒通过第三方面所述的方法检测样品中的对 BNL2b 基因编码的蛋白特异性的抗体。

25

诊断用途及方法

在第四方面，本发明提供了用于确定受试者是否患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中的方法，其包括：

(1) 测定来自所述受试者的样品中对 BNL2b 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平；
30 和，

(2) 将所述水平与参考值比较。

在某些实施方案中，如果所述水平高于参考值的话，则判断所述受试者患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中。

在本文中，所述参考值是来源于未患鼻咽癌的对象或健康人（例如，没有可检测到的疾病、并且没有癌症或鼻咽癌历史的对象）的值，或者指示未患鼻咽癌的对象或健康人的相应样品中的对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体水平。

在某些实施方案中，所述样品是血液样品，例如全血、血浆或血清。

在某些实施方案中，所述受试者是哺乳动物，例如人。

在某些实施方案中，通过免疫学测定来测定所述样品中对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平。在某些实施方案中，所述免疫学测定选自酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在某些实施方案中，所述测定包括使用第一方面所述的分离的多肽或其变体作为捕获试剂。

在某些实施方案中，步骤(1)包括以下步骤：

(1a) 将来自所述受试者的样品与捕获试剂接触，以获得抗原-抗体免疫复合物；所述捕获试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体；

(1b) 测定步骤(1a)获得的抗原-抗体免疫复合物的量。

在某些实施方案中，在步骤(1b)中，通过免疫学检测来测定所述免疫复合物的量。

在某些实施方案中，所述免疫学检测选自酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在一些实施方案中，所述捕获试剂连接于固相载体表面。

在另一些实施方案中，所述捕获试剂带有可与固相载体连接的修饰基团。在此类实施方案中，在步骤(1)之前，所述方法还包含将所述捕获试剂包被于固相载体表面的步骤。

在某些实施方案中，所述捕获试剂的 C 端连接于固相载体表面，或者带有可与固相载体连接的修饰基团。

在一些实施方案中，所述测定以双抗原夹心形式进行。通过双抗原夹心法来测定样品中的抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定中，“捕获抗原”、“检测抗原”

使得样品抗体在两种特异性抗原之间形成桥，因此，两种抗原通常是相同的、或具有相同的核心表位、或具有免疫交叉反应性，使得一种抗体能够结合两种抗原。

因此，在某些实施方案中，在步骤(1b)中，使用检测试剂来检测所述免疫复合物的量，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体。

5 在某些实施方案中，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体，所述分离的多肽或其变体带有可检测的标记。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。在某些示例性实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）。

10 在某些实施方案中，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的多肽序列相同或基本相同。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列包含相同的核心片段，所述核心片段选自 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 5-11 位氨基酸残基、第 16-23 位氨基酸残基、第 31-39 位氨基酸残基、和/或第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）、第 5-23 位氨基酸残基、第 16-39 位氨基酸残基、第 5-39 位氨基酸残基、第 16-60 位氨基酸残基（例如第 16-61 位氨基酸残基）、或第 5-60 位氨基酸残基（例如第 5-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序
15 列同时包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 51-56 位氨基酸残基、第 1-25 位氨基酸残基、第 14-52 位氨基酸残基、第 1-52 位氨基酸残基、第 14-74 位氨基酸残基、第 11-65 位氨基酸残基、第 11-74 位氨基酸残基、或第 1-74 位氨基酸残基。

在另一些实施方案中，所述测定以间接法形式进行。通过间接法来测定样品中的
25 抗体水平是本领域技术人员熟知的。在此类测定中，“捕获抗原”首先与样品中的抗体形成免疫复合物，随后通过二级抗体（例如，抗-免疫球蛋白抗体）对被捕获的抗体进行检测。

因此，在某些实施方案中，在步骤(1b)中，使用检测试剂来检测所述免疫复合物的量，所述检测试剂选自带有可检测的标记的二级抗体。

30 在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸

酶)、化学发光试剂(例如吖啶酯类化合物)、荧光染料或生物素。

在某些实施方案中,所述二级抗体对待测抗体所来自的物种(例如人)的抗体是特异的。

在某些实施方案中,所述二级抗体是抗-免疫球蛋白抗体。

5 在某些示例性实施方案中,被检测的抗体是 **IgG** 抗体。在此类实施方案中,所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgG** 抗体,例如抗人 **IgG** 抗体。

在某些示例性实施方案中,被检测的抗体是 **IgM** 抗体。在此类实施方案中,所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgM** 抗体,例如抗人 **IgM** 抗体。

在某些示例性实施方案中,被检测的抗体是 **IgA** 抗体。在此类实施方案中,所述
10 抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgA** 抗体,例如抗人 **IgA** 抗体。

在某些实施方案中,所述方法还包括:在步骤(1)之前,提供来自所述受试者的样品。

在某些实施方案中,所述方法还包括:在步骤(2)之后,给被判断为患有鼻咽癌或
15 处于鼻咽癌的风险中的受试者施用治疗有效量的可治疗鼻咽癌的抗肿瘤疗法(例如,化学疗法、放射疗法和/或免疫疗法)。

在某些实施方案中,所述可治疗鼻咽癌的抗肿瘤疗法选自手术治疗,放射疗法(如体外放射线治疗 **EBRT**,近距离放疗),或化学疗法(如卡铂,紫杉醇,多西他赛,吉西他滨,阿霉素,表阿霉素,博莱霉素,甲氨蝶呤),靶向治疗(如西妥昔单抗),
20 免疫治疗(如 **PD-1** 单抗)以及多种方法联合治疗(如放疗+化疗,放疗+手术)。

在另一方面,本发明还涉及能够测定对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平的试剂在制备试剂盒中的用途,所述试剂盒用于确定受试者是否患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中。

25 在某些实施方案中,所述试剂能够通过免疫学测定来测定对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平。在某些实施方案中,所述免疫学测定选自酶免疫测定法(例如 **ELISA**)、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在某些实施方案中,所述受试者是哺乳动物,例如人。

在某些实施方案中,所述样品是血液样品,例如全血、血浆或血清。

30 在某些实施方案中,所述试剂盒通过下述方法来确定受试者是否患有鼻咽癌或是

否处于鼻咽癌的风险中：

(1) 测定来自所述受试者的样品中对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平；
和，

(2) 将所述水平与参考值比较。

- 5 在某些实施方案中，如果所述水平高于参考值的话，则判断所述受试者患有鼻咽癌或是否处于鼻咽癌的风险中。

在某些实施方案中，所述能够测定对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平的试剂包含捕获试剂，所述捕获试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体。

- 10 在某些实施方案中，上述步骤(1)包括以下步骤：

(1a) 将来自所述受试者的样品与捕获试剂接触，以获得抗原-抗体免疫复合物；所述捕获试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体；

(1b) 测定步骤(1a)获得的抗原-抗体免疫复合物的量。

在某些实施方案中，在步骤(1b)中，通过免疫学检测来测定所述免疫复合物的量。

- 15 在某些实施方案中，所述免疫学检测选自酶免疫测定法（例如 **ELISA**）、化学发光免疫分析法、荧光免疫分析法或放射免疫测定法。

在一些实施方案中，所述捕获试剂连接于固相载体表面。

- 20 在另一些实施方案中，所述捕获试剂带有可与固相载体连接的修饰基团。在此类实施方案中，在上述步骤(1)之前，所述方法还包含将所述捕获试剂包被于固相载体表面的步骤。

在某些实施方案中，所述捕获试剂的 **C** 端连接于固相载体表面，或者带有可与固相载体连接的修饰基团。

- 25 在一些实施方案中，所述能够测定对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平的试剂还包含检测试剂，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体。

在某些实施方案中，在上述步骤(1b)中，使用所述检测试剂来检测所述免疫复合物的量。

- 30 在某些实施方案中，所述检测试剂选自第一方面所述的分离的多肽或其变体，所述分离的多肽或其变体带有可检测的标记。在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、

荧光染料或生物素。在某些示例性实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）。

在某些实施方案中，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的多肽序列相同或基本相同。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列包含相同的核心片段，所述核心片段选自 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 5-11 位氨基酸残基、第 16-23 位氨基酸残基、第 31-39 位氨基酸残基、和/或第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基（例如第 53-61 位氨基酸残基）、第 5-23 位氨基酸残基、第 16-39 位氨基酸残基、第 5-39 位氨基酸残基、第 16-60 位氨基酸残基（例如第 16-61 位氨基酸残基）、或第 5-60 位氨基酸残基（例如第 5-61 位氨基酸残基）。在某些实施方案中，所述基本相同是指，所述检测试剂和捕获试剂中所包含的两个多肽序列同时包含 **BNLF2b** 基因编码的野生型蛋白的第 51-56 位氨基酸残基、第 1-25 位氨基酸残基、第 14-52 位氨基酸残基、第 1-52 位氨基酸残基、第 14-74 位氨基酸残基、第 11-65 位氨基酸残基、第 11-74 位氨基酸残基、或第 1-74 位氨基酸残基。

在另一些实施方案中，所述能够测定对 **BNLF2b** 基因编码的蛋白特异性的抗体的水平的试剂还包含检测试剂，所述检测试剂选自带有可检测的标记的二级抗体。

在某些实施方案中，在上述步骤(1b)中，使用所述检测试剂来检测所述免疫复合物的量。

在某些实施方案中，所述可检测的标记选自酶（例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶）、化学发光试剂（例如吖啶酯类化合物）、荧光染料或生物素。

在某些实施方案中，所述二级抗体对待测抗体所来自的物种（例如人）的抗体是特异的。

在某些实施方案中，所述二级抗体是抗-免疫球蛋白抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 **IgG** 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgG** 抗体，例如抗人 **IgG** 抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 **IgM** 抗体。在此类实施方案中，所述抗-免疫球蛋白抗体选自抗 **IgM** 抗体，例如抗人 **IgM** 抗体。

在某些示例性实施方案中，被检测的抗体是 **IgA** 抗体。在此类实施方案中，所述

抗-免疫球蛋白抗体选自抗 IgA 抗体，例如抗人 IgA 抗体。

术语定义

在本发明中，除非另有说明，否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且，本文中所用的病毒学、生物化学、免疫学实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的常规步骤。同时，为了更好地理解本发明，下面提供相关术语的定义和解释。

如本文中所使用的，术语“BNLF2b”是指，EB 病毒（EBV）的 BNLF2b 基因，其是本领域技术人员公知的（参见，例如 NCBI GENBANK 数据库登录号：CAA24811.1）。由 BNLF2b 基因编码的全长蛋白包含 98 个氨基酸，其序列如 SEQ ID NO:101 所示。在本文中，由 BNLF2b 基因编码的全长蛋白也可简称为 BNLF2b 基因编码的野生型蛋白、或 BNLF2b 基因编码蛋白。

如本文中所使用的，当提及 BNLF2b 基因编码蛋白的氨基酸序列时，其使用 SEQ ID NO: 101 所示的序列来进行描述。例如，表述“BNLF2b 基因编码的野生型蛋白的第 53-60 位氨基酸残基”是指，SEQ ID NO: 101 所示的多肽的第 53-60 位氨基酸残基。然而，本领域技术人员理解，在 BNLF2b 基因编码蛋白的氨基酸序列中，可天然产生或人工引入突变或变异，而不影响其生物学功能。因此，在本发明中，术语“BNLF2b 基因编码蛋白”及其类似表述应包括所有此类序列，包括例如 SEQ ID NO: 101 所示的序列以及其天然或人工的变体。并且，当描述 BNLF2b 基因编码蛋白的序列片段时，其不仅包括 SEQ ID NO: 101 的序列片段，还包括其天然或人工变体中的相应序列片段。例如，表述“BNLF2b 基因编码蛋白的第 53-60 位氨基酸残基”包括，SEQ ID NO: 101 的第 53-60 位氨基酸残基，以及其变体（天然或人工）中的相应片段。根据本发明，表述“相应序列片段”或“相应片段”是指，当对序列进行最优比对时，即当序列进行比对以获得最高百分数同一性时，进行比较的序列中位于等同位置的片段。

如本文中所使用的，术语“特异性结合”是指，两分子（即结合分子与靶分子）之间的非随机的结合反应，如抗体和其所针对的抗原之间的反应。两分子之间的结合亲和力可用 K_D 值描述。 K_D 值是指由 k_d （特定的结合分子-靶分子相互作用的解离速率；亦称为 k_{off} ）与 k_a （特定结合分子-靶分子相互作用的缔合速率；亦称为 k_{on} ）之比得到的解离常数，或者指表示为摩尔浓度（M）的 k_d/k_a 。 K_D 值越小，两分子结合越紧密，亲和力越高。在某些实施方式中，特异性结合某抗原的抗体（或对某抗原具有特异

性的抗体)是指, 抗体以小于大约 10^{-5} M, 例如小于大约 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M 或 10^{-10} M 或更小的亲和力(K_D)结合该抗原。 K_D 值可通过本领域熟知的方法确定, 例如使用表面等离子体共振术(SPR)在 **BIACORE** 仪中测定。

如本文中所使用的, 术语“免疫学测定”是指, 利用抗原-抗体之间的特异性相互作用/结合亲和力来进行的测定, 其一般可用于检测特定抗原或者抗体在样品中的存在或水平。此类免疫学检测是本领域技术人员公知的, 包括但不限于, 酶免疫测定法(EIA)、化学发光免疫分析法(CLIA)、放射免疫测定法(RIA)、荧光免疫测定法(FIA)、Western 印迹法、免疫比浊法、表面等离子共振法等。在某些实施方式中, 所述免疫学检测为酶免疫测定法(EIA), 例如 ELISA 检测法、Elispot 检测法或 CLEIA 检测法。关于免疫学检测的详细描述, 可参见例如, **Fundamental Immunology, Ch. 7 Paul, W., ed., 第 2 版, Raven Press, N.Y. (1989)**。

如本文中所使用的, 术语“表位”是指, 抗原上被免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。“表位”在本领域内也称为“抗原决定簇”。例如, 表位通常以独特的空间构象包括至少 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 或 15 个连续或非连续的氨基酸, 其可以是“线性的”或“构象的”。在线性表位中, 蛋白质与相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用的点沿着蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象表位中, 相互作用的点跨越彼此分开的蛋白质氨基酸残基而存在。

如本文中所使用的, 术语“可检测的标记”可以是可通过荧光、光谱、光化学、生物化学、免疫学、电学、光学或化学手段检测的任何物质。特别优选的是, 此类标记能够适用于免疫学检测(例如, 酶联免疫测定法、放射免疫测定法、荧光免疫测定法、化学发光免疫测定法等)。这类标记是本领域熟知的, 包括但不限于, 酶(例如, 辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、脲酶、葡萄糖氧化酶, 等)、放射性核素(例如, ^3H 、 ^{125}I 、 ^{35}S 、 ^{14}C 或 ^{32}P)、荧光染料(例如, 异硫氰酸荧光素(FITC)、荧光素、异硫氰酸四甲基罗丹明(TRITC)、藻红蛋白(PE)、德克萨斯红、罗丹明、量子点或花菁染料衍生物(例如 Cy7、Alexa 750))、发光物质(例如化学发光物质, 如吖啶酯类化合物)、磁珠(例如, Dynabeads®)、测热标记物例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如, 聚苯乙烯、聚丙烯、乳胶, 等)珠、以及用于结合上述标记物修饰的亲合素(例如, 链霉亲和素)的生物素。教导该标记物的使用的专利包括, 但不限于, 美国专利 3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,277,437; 4,275,149; 及 4,366,241 (全部通过引用并入本文)。本发明中涵盖的标记物可通过本领域已知的方

法检测。例如，放射性标记可使用摄影胶片或闪烁计数器检测，荧光标记物可使用光检测器检测，以检测发射的光。酶标记物一般通过给酶提供底物及检测通过酶对底物的作用产生的反应产物来检测，及测热标记物通过简单可视化着色标记物来检测。在某些实施方案中，可通过不同长度的接头将如上所述的可检测的标记连接至检测抗体或抗原，以降低潜在的位阻。

如本文中所使用的，术语“抗体”是指，通常由两对多肽链（每对具有一条轻链(LC)和一条重链(HC)）组成的免疫球蛋白分子。抗体轻链可分类为 κ (kappa) 和 λ (lambda) 轻链。重链可分类为 μ 、 δ 、 γ 、 α 或 ϵ ，并且分别将抗体的同种型定义为 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE。在轻链和重链内，可变区和恒定区通过大约 12 或更多个氨基酸的“J”区连接，重链还包含大约 3 个或更多个氨基酸的“D”区。各重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由 3 个结构域(CH1、CH2 和 CH3)组成。各轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。轻链恒定区由一个结构域 CL 组成。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合，但展现出多种效应子功能，如可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子，包括免疫系统的各种细胞(例如，效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)的结合。VH 和 VL 区还可被细分为具有高变性的区域(称为互补决定区(CDR))，其间散布有较保守的称为构架区(FR)的区域。各 V_H 和 V_L 由按下列顺序：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4 从氨基末端至羧基末端排列的 3 个 CDR 和 4 个 FR 组成。各重链/轻链对的可变区(VH 和 VL)分别形成抗原结合部位。

如本文中所使用的，术语“分离的”或“被分离的”指的是，从天然状态下经人工手段获得的。如果自然界中出现某一种“分离”的物质或成分，那么可能是其所处的天然环境发生了改变，或从天然环境下分离出该物质，或二者情况均有发生。例如，某一活体动物体内天然存在某种未被分离的多聚核苷酸或多肽，而从这种天然状态下分离出来的高纯度的相同的多聚核苷酸或多肽即称之为分离的。术语“分离的”或“被分离的”不排除混有人工或合成的物质，也不排除存在不影响物质活性的其它不纯物质。

如本文中所使用的，术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动

物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。一种载体可以含有多种控制表达的元件，包括但不限于，启动子序列、转录起始序列、增强子序列、选择元件及报告基因。另外，载体还可含有复制起始位点。

- 5 如本文中所使用的，术语“宿主细胞”是指，可用于导入载体的细胞，其包括但不限于，如大肠杆菌或枯草菌等的原核细胞，如酵母细胞或曲霉菌等的真菌细胞，如 S2 果蝇细胞或 Sf9 等的昆虫细胞，或者如纤维原细胞，CHO 细胞，COS 细胞，NSO 细胞，HeLa 细胞，BHK 细胞，HEK 293 细胞或人细胞等的动物细胞。

- 如本文中所使用的，术语“同一性”用于指两个多肽之间或两个核酸之间序列的匹配情况。当两个进行比较的序列中的某个位置都被相同的碱基或氨基酸单体亚单元占据时(例如，两个 DNA 分子的每一个中的某个位置都被腺嘌呤占据，或两个多肽的每一个中的某个位置都被赖氨酸占据)，那么各分子在该位置上是同一的。两个序列之间的“百分数同一性”是由这两个序列共有的匹配位置数目除以进行比较的位置数目 $\times 100$ 的函数。例如，如果两个序列的 10 个位置中有 6 个匹配，那么这两个序列具有 60% 的同一性。例如，DNA 序列 CTGACT 和 CAGGTT 共有 50% 的同一性(总共 6 个位置中有 3 个位置匹配)。通常，在将两个序列比对以产生最大同一性时进行比较。这样的比对可通过使用，例如，可通过计算机程序例如 Align 程序(DNAstar, Inc.)方便地进行的 Needleman 等人(1970)*J. Mol. Biol.* 48: 443-453 的方法来实现。还可使用已整合入 ALIGN 程序(版本 2.0)的 E. Meyers 和 W. Miller (*Comput. Appl Biosci.*, 4:11-17 (1988))
- 10 的算法，使用 PAM120 权重残基表(weight residue table)、12 的缺口长度罚分和 4 的缺口罚分来测定两个氨基酸序列之间的百分数同一性。此外，可使用已整合入 GCG 软件包(可在 www.gcg.com 上获得)的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch (*J Mol Biol.* 48:444-453 (1970))算法，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵以及 16、14、12、10、8、6 或 4 的缺口权重(gap weight)和 1、2、3、4、5 或 6 的长度权重来测定两个氨基酸
- 15 序列之间的百分数同一性。

- 如本文中所使用的，术语“保守置换”意指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白/多肽的预期性质的氨基酸置换。例如，可通过本领域内已知的标准技术例如定点诱变和 PCR 介导的诱变引入保守置换。保守氨基酸置换包括用具有相似侧链的氨基酸残基替代氨基酸残基的置换，例如用在物理学上或功能上与相应的氨基酸残基相似
- 20 (例如具有相似大小、形状、电荷、化学性质，包括形成共价键或氢键的能力等)的残基

进行的置换。已在本领域内定义了具有相似侧链的氨基酸残基的家族。这些家族包括具有碱性侧链(例如, 赖氨酸、精氨酸和组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、不带电荷的极性侧链(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸)、 β 分支侧链(例如, 苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链(例如, 酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)的氨基酸。因此, 优选来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基替代相应的氨基酸残基。鉴定氨基酸保守置换的方法在本领域内是熟知的(参见, 例如, Brummell 等人, *Biochem. 32:1180-1187 (1993)*; Kobayashi 等人 *Protein Eng. 12(10):879-884 (1999)*; 和 Burks 等人 *Proc. Natl Acad. Set USA* 94:412-417 (1997), 其通过引用并入本文)。

本文涉及的二十个常规氨基酸的编写遵循常规用法。参见例如, *Immunology-A Synthesis (2nd Edition, E. S. Golub and D. R. Gren, Eds., Sinauer Associates, Sunderland, Mass. (1991))*, 其以引用的方式并入本文中。在本发明中, 术语“多肽”和“蛋白质”具有相同的含义且可互换使用。并且在本发明中, 氨基酸通常用本领域公知的单字母和三字母缩写来表示。例如, 丙氨酸可用 A 或 Ala 表示。

如本文中所使用的, 术语“受试者”包括但不限于各种动物, 特别是哺乳动物, 例如人。

有益效果

本发明首次发现, 针对 EB 病毒 BNLF2b 基因编码蛋白的抗体水平能够用于诊断鼻咽癌或评估鼻咽癌风险, 且其诊断效果显著优于现有标志物, 可显著提升鼻咽癌筛查的特异性和阳性预测值。本发明还首次提供了基于 EB 病毒 BNLF2b 基因编码蛋白或多肽片段的鼻咽癌血清学筛查试剂盒。

与现有技术相比, 本发明的技术方案能够达到与已知的 EB 病毒抗体联合检测方法相当的检测灵敏度, 甚至更优的检测特异性, 且可以实现快速、高通量检测, 具备重大临床应用价值。

下面将结合附图和实施例对本发明的实施方案进行详细描述, 但是本领域技术人员将理解, 下列附图和实施例仅用于说明本发明, 而不是对本发明的范围的限定。根据附图和优选实施方案的下列详细描述, 本发明的各种目的和有利方面对于本领域技

术人员来说将变得显然。

附图说明

图 1 显示了实施例 2 和 3 中 1 份鼻咽癌混合血清 (NPC) 和 3 份健康对照血清 (H1-H3) 中 IgA 和 IgG 抗体与 87 条 EBV 多肽 (编号 1-87) 的反应性。左图为 IgA 抗体，右图为 IgG 抗体，横轴代表不同的血清样本，纵轴代表不同的 EBV 多肽，颜色越深，代表反应性越高。

图 2 显示了实施例 2 和 3 中鼻咽癌患者和健康对照血清中抗体与不同 EBV 多肽的反应性。其中，横坐标代表 EBV 多肽，纵坐标为反应的 OD 值 (对数刻度)。

图 3 显示了实施例 4 中鼻咽癌患者和健康对照血清中 IgG 抗体与 BNLF2b 编码蛋白 aa14-52 的反应性。其中，图 3A 为不同样本的检测 OD 值 (对数刻度)；图 3B 为 ROC 曲线分析的结果，横坐标代表 100-特异性%，纵坐标代表灵敏度%。

图 4 显示了实施例 4 中鼻咽癌患者和健康对照者血清中 IgA、IgM 和 IgG 抗体与 BNLF2b 编码蛋白 aa1-74 的反应性。其中，图 A 为检测 OD 值，横坐标代表血清分类，纵坐标代表 OD 值 (对数刻度)；图 B 为 ROC 曲线分析的结果，横坐标代表 100-特异性%，纵坐标代表灵敏度%；图 C 为健康对照血清中 IgA 和 IgM 抗体与 BNLF2b 编码蛋白 aa1-74 的反应性，横坐标代表抗体类型，纵坐标代表 OD 值 (对数刻度)。

图 5 显示了实施例 5 中 BNLF2b 抗体双抗原夹心法检测 50 份鼻咽癌血清和 500 份健康对照血清的结果。其中，图 5A 为检测的 OD 值，横坐标为血清分类，纵坐标为 OD 值 (对数刻度)；图 5B 为 ROC 曲线分析结果，横坐标为 100-特异性%，纵坐标为灵敏度%。

图 6 显示了实施例 6 中 74 份鼻咽癌血清和 250 份健康对照血清与 EBNA1/IgA、VCA/IgA 的反应性以及二者联合检测计算出的发生鼻咽癌的风险率。其中，横坐标代表血清分类，图 6A 和图 6B 中纵坐标为检测 OD 值 (对数刻度)，图 6C 纵坐标为发生鼻咽癌的风险率。

图 7 显示了实施例 6 中 BNLF2b 抗体双抗原夹心法检测鼻咽癌患者血清和健康对照血清的结果。其中，横坐标代表血清分类，纵坐标代表反应的 OD 值。

图 8 显示了实施例 6 中 BNLF2b 抗体双抗原夹心法和 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的 ROC 曲线图。其中，横坐标为 100-特异性%，纵坐标为灵敏度%。

图 9 显示了实施例 10 中鼻咽癌血清中 IgG 抗体与 BNLF2b 编码蛋白不同肽段的反

应性。其中，横坐标代表不同的 BNLf2b 多肽，纵坐标代表鼻咽癌混合血清编号，颜色越深，代表反应性越高。

图 10 显示了实施例 10 中两份鼻咽癌混合血清中 IgG 抗体与 BNLf2b 编码蛋白不同肽段的反应性。其中，A-D 分别代表鼻咽癌血清与 aa1-25 区段内截短肽，aa31-45 区段内截短肽，aa51-65 区段内截短肽和 aa81-98 区段内截短肽的反应性，横坐标代表多肽位置（例如 1-25 表示第 1-25 位氨基酸），纵坐标代表检测 OD 值与未截短的肽段的检测 OD 值的比值。

图 11 显示了实施例 10 中鼻咽癌血清与 aa1-25 区段内不同截短多肽的反应性。其中，图 11A 显示不同鼻咽癌患者血清与 aa1-25，aa1-15 和 aa11-25 的反应性，图 11B 显示这些血清与 aa1-25 及其截短多肽的反应性。横坐标代表合成肽的氨基酸位置，纵坐标代表鼻咽癌血清编号，颜色越深，代表反应性越高。

图 12 显示了实施例 10 中鼻咽癌患者中 IgG 抗体与 BNLf2b 编码蛋白突变体的反应性。其中，A-D 分别代表鼻咽癌血清与 aa1-25 区段内突变体，aa31-45 区段内突变体，aa51-65 区段内突变体和 aa81-98 区段内突变体的反应性，横坐标代表突变位置，纵坐标代表检测 OD 值与相应未突变的肽段的检测 OD 值的比值。

图 13 显示了实施例 11 中鼻咽癌患者和健康对照血清中 IgG 抗体与不同的 BNLf2b 编码多肽的反应性。其中，横坐标代表多肽片段，纵坐标代表检测 OD 值。

序列信息

表 1：本申请涉及的序列的信息描述于下面的表中。

SEQ ID NO:	描述	SEQ ID NO:	描述
1	EBV ORF 1, aa467-486	53	EBV ORF 57, aa326-345
2	EBV ORF 2, aa90-109	54	EBV ORF 59, aa55-74
3	EBV ORF 3, aa138-157	55	EBV ORF 59, aa231-250
4	EBV ORF 15, aa12-31	56	EBV ORF 60, aa195-214
5	EBV ORF 16, aa103-122	57	EBV ORF 60, aa82-101
6	EBV ORF 16, aa340-359	58	EBV ORF 61, aa18-37
7	EBV ORF 17, aa26-45	59	EBV ORF 62, aa41-60
8	EBV ORF 18, aa110-129	60	EBV ORF 63, aa280-299
9	EBV ORF 19, aa394-413	61	EBV ORF 64, aa88-107
10	EBV ORF 19, aa372-391	62	EBV ORF 64, aa154-173
11	EBV ORF 20, aa63-82	63	EBV ORF 65, aa118-137
12	EBV ORF 20, aa101-120	64	EBV ORF 66, aa88-107
13	EBV ORF 21, aa670-689	65	EBV ORF 66, aa359-378
14	EBV ORF 22, aa330-349	66	EBV ORF 67, aa244-263

15	EBV ORF 23, aa205-224	67	EBV ORF 68, aa120-139
16	EBV ORF 26, aa110-129	68	EBV ORF 69, aa17-36
17	EBV ORF 27, aa256-275	69	EBV ORF 70, aa171-190
18	EBV ORF 28, aa9-28	70	EBV ORF 71, aa201-220
19	EBV ORF 29, aa1-20	71	EBV ORF 72, aa143-162
20	EBV ORF 30, aa789-801	72	EBV ORF 73, aa195-214
21	EBV ORF 31, aa185-204	73	EBV ORF 73, aa154-173
22	EBV ORF 32, aa246-265	74	EBV ORF 75, aa514-533
23	EBV ORF 33, aa26-45	75	EBV ORF 75, aa432-451
24	EBV ORF 34, aa134-153	76	EBV ORF 76, aa149-168
25	EBV ORF 34, aa61-80	77	EBV ORF 77, aa180-199
26	EBV ORF 35, aa665-684	78	EBV ORF 78, aa19-38
27	EBV ORF 35, aa822-841	79	EBV ORF 79, aa323-342
28	EBV ORF 36, aa60-79	80	EBV ORF 79, aa579-598
29	EBV ORF 37, aa92-111	81	EBV ORF 80, aa32-51
30	EBV ORF 38, aa1-20	82	EBV ORF 81, aa11-30
31	EBV ORF 39, aa105-124	83	EBV ORF 82, aa155-174
32	EBV ORF 39, aa593-612	84	EBV ORF 83, aa66-85
33	EBV ORF 40, aa568-587	85	EBV ORF 84, aa188-207
34	EBV ORF 41, aa63-82	86	EBV ORF 85, aa31-50
35	EBV ORF 41, aa177-196	87	EBV ORF 86, aa19-38
36	EBV ORF 42, aa179-198	88	EBV ORF 85, aa14-52
37	EBV ORF 42, aa1-20	89	EBV ORF 85, aa1-74
38	EBV ORF 43, aa444-463	90	EBV ORF 85, aa14-74
39	EBV ORF 44, aa126-145	91	EBV ORF 85, aa1-52
40	EBV ORF 44, aa2-21	92	EBV ORF 85, aa1-15
41	EBV ORF 45, aa495-514	93	EBV ORF 85, aa11-25
42	EBV ORF 45, aa10-29	94	EBV ORF 85, aa21-35
43	EBV ORF 47, aa60-79	95	EBV ORF 85, aa31-45
44	EBV ORF 48, aa212-231	96	EBV ORF 85, aa41-55
45	EBV ORF 50, aa45-64	97	EBV ORF 85, aa51-65
46	EBV ORF 52, aa211-230	98	EBV ORF 85, aa61-75
47	EBV ORF 53, aa166-185	99	EBV ORF 85, aa71-85
48	EBV ORF 53, aa1-20	100	EBV ORF 85, aa81-98
49	EBV ORF 54, aa209-228	101	BNLF2b 基因编码的全长蛋白
50	EBV ORF 54, aa104-123	102	EBV ORF 85, aa1-25
51	EBV ORF 55, aa357-376	103	EBV ORF 85, aa11-65
52	EBV ORF 56, aa50-69	104	EBV ORF 85, aa11-74

实施例 1：EB 病毒基因编码多肽的合成

根据 GenBank 中 EBV B95-8 毒株的 86 个开放阅读框（ORF）编码蛋白的氨基酸序列信息（GenBank ID: V01555.2），通过生物信息学工具在线预测每个蛋白的 B 细

胞表位，根据预测结果，每个蛋白选取 1-2 条可能的 B 细胞表位多肽委托厦门精聚生物科技有限公司进行合成。在合成时，在多肽 N 末端偶联生物素，以便于后续实验。最终成功合成 87 条 EB 病毒基因编码多肽（SEQ ID NO: 1-87），这些多肽来自 68 个 ORF，其具体信息如表 1 所示。

5

实施例 2：EB 病毒多肽与血清 IgA 抗体的反应性评价

将实施例 1 中获得的生物素标记的多肽（编号 1-87）分别稀释至 500 ng/ml，按每孔 100μL 的标准加入链亲和素包被的 96 孔微孔板中，37 摄氏度反应 2 小时。反应结束后，用 PBST 洗涤 2 次，每孔加入 200μL 封闭液，37 摄氏度封闭 2 小时。封闭结束后，倒掉封闭液，每孔分别加入 100μL 1:20 稀释的鼻咽癌患者混合血清或阴性对照血清，37 摄氏度反应 30 分钟。反应结束后，用 PBST 洗涤 5 次，并加入 1:20000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgA（KPL, Gaithersburg, MD），37 摄氏度继续反应 30 分钟。PBST 洗涤 5 次后，每孔加入 100 μL TMB 显色液，37 摄氏度温育 15 分钟后，每孔加入 50 μL 终止液，混匀后通过酶标仪测定 450 和 630 nm 处的吸光度。

15

结果如图 1 所示，在 87 条多肽中，有 8 条多肽对鼻咽癌混合血清反应的 OD 值在 0.3 以上（表 2-1）。在这 8 条多肽中，有 BSRL1、BLLF1b、BGLF3、BDLF2 和 BVRF2 基因编码的 5 条多肽在之前的研究中未被报导用于鼻咽癌的辅助诊断。

我们进一步通过 36 份阴性血清评价了这 5 条多肽的特异性，结果如图 2 及表 2-2 所示，BSRF1、BGLF3 和 BVRF2 基因编码的 3 条多肽的特异性相对较好。同时，我们通过 12 份鼻咽癌血清对上述 3 条多肽的检测灵敏度进行评价，结果如图 2 所示，这 3 条多肽的反应性均较低，其中，BSRF1 和 BVRF2 编码多肽与 6 份血清的反应性高于 0.1，而 BGLF3 编码多肽仅与 3 份血清的反应性高于 0.1。

20

表 2-1：EB 病毒多肽与鼻咽癌患者血清 IgA 抗体的反应性

序列编号	基因	开放阅读框顺序	对应蛋白	阳性血清 OD _{450/630}
21	BSRF1	31	-	0.403
27	BLLF1b	35	gp220	0.808
36	BZLF1	42	Zta	0.341
38	BRLF1	43	Rta	0.787
54	BGLF3	59	UL14	0.382
65	BDLF2	66	-	0.390
75	BVRF2	75	Protease	0.783
76	BdRF1	76	VCA-p40	0.424

表 2-2: EB 病毒多肽与阴性对照血清 IgA 抗体的反应性

序列编号	基因	阴性血清 OD _{450/630}	
		几何平均值 (范围)	大于 0.1 的比例
21	BSRF1	0.027 (0.001, 0.126)	1/36
27	BLLF1b	0.194 (0.031, 2.54)	26/36
54	BGLF3	0.025 (0.006, 0.164)	1/36
65	BDLF2	0.128 (0.036, 1.766)	19/36
75	BVRF2	0.036 (0.011, 0.128)	2/36

实施例 3: EB 病毒多肽与血清 IgG 抗体的反应性评价

- 5 按照实施例 2 中的方法检测实施例 1 中合成的 87 种多肽 (1-87) 与血清 IgG 的反应性, 其中用 1:5000 稀释的 HRP 标记的鼠抗人 IgG (万域美澜, 北京) 代替羊抗人 IgA。结果如图 1 所示, 在这些多肽中, 有 BZLF1, BRLF1 等 5 条基因编码多肽与鼻咽癌混合血清的反应性高于 0.1 (表 3-1), 其中有 BNLF1 (ZTA), BRLF1 (RTA) 和 BILF2 (gp78) 已有报导。
- 10 我们进一步通过 36 份阴性血清评价了 BVRF2 和 BNLF2b 编码多肽的特异性, 结果如图 2 及表 3-2 所示, BNLF2b 基因编码多肽与 36 份阴性血清反应的 OD 值均低于 0.034, 具有良好的特异性。同时, 我们通过 12 份鼻咽癌血清对 BNLF2b 基因编码多肽的检测灵敏度进行评价, 结果如图 2 所示, 12 份鼻咽癌患者血清中, 有 6 份的反应 OD 值高于 0.1。

15 表 3-1: EB 病毒多肽与阳性血清 IgG 抗体的反应性

序列编号	基因	开放阅读框顺序	对应蛋白	阳性血清 OD _{450/630}
36	BZLF1	42	Zta	0.367
38	BRLF1	43	Rta	0.334
75	BVRF2	75	protease	0.883
77	BILF2	77	gp78	0.171
86	BNLF2b	85	-	0.539

表 3-2: EB 病毒多肽与阴性血清 IgG 抗体的反应性

序列编号	基因	阴性血清 OD _{450/630}	
		几何平均值 (范围)	大于 0.1 的比例
75	BVRF2	0.072 (0.020, 3.139)	8/36

实施例 4: 抗 BNLf2b 抗体间接法的建立及性能初步评价

我们进一步通过 DNASTAR 软件包中 Protean 软件对 BNLf2b 编码蛋白 (SEQ ID NO: 101) 的亲疏水性以及抗原性进行分析, 合成了两段多肽 aa14-52 (SEQ ID NO: 88) 和 aa1-74 (SEQ ID NO: 89), 将其分别作为包被抗原用于间接法检测。

4.1 基于多肽 aa14-52 的间接法检测

将多肽 aa14-52 用碳酸盐缓冲液 (pH9.6) 稀释至 125 ng/ml, 每孔包被 100 μ L, 按照实施例 3 中的方法对 86 份鼻咽癌患者和 195 份健康人血清进行检测。结果如图 3A 所示, 当以 aa14-52 作为包被抗原时, 86 份鼻咽癌患者血清中有 57 份的 OD 值高于 0.1, 195 份健康人血清的 OD 值均低于 0.025。同时, 使用相同的方法对 122 位 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合筛查 (该联合检测方法可参见实施例 6) 为高危但最终确诊为非鼻咽癌者的受试者血清进行了检测, 结果如图 3A 所示, 仅 3 例 OD 值超过 0.1。对上述基于多肽 aa14-52 的间接法检测数据通过 MedCalc 16.2.1 软件 (MedCalc Software, Ostend, Belgium) 进行 ROC 曲线分析, 结果如图 3B 所示, 曲线下面积 AUC 为 0.942, 当 cut-off 值为 0.025 时, 约登指数为 0.80, 特异性为 100%, 灵敏度为 80.23% (69/86)。

4.2 基于多肽 aa1-74 的间接法检测

以多肽 aa1-74 作为包被抗原, 按照与 4.1 相同的方法对 63 份健康人血清和 221 份鼻咽癌血清进行检测。结果如图 4A 所示, 63 份鼻咽癌患者血清中 55 份检测 OD 值超过 0.1, 而 221 份健康对照者血清中仅 10 份检测 OD 超过 0.1。进一步对对上述基于多肽 aa1-74 的间接法进行 ROC 曲线分析, 结果如图 4B 所示, 该方法能够高效的区分鼻咽癌患者和健康人, AUC 为 0.950。当 cut-off 值设为 0.1 时, 灵敏度为 87.30% (55/63), 特异性为 95.48% (211/221)。

此外, 同样以多肽 aa1-74 为包被抗原, 通过间接法检测 221 份健康对照血清中 IgA 和 IgM 抗体的水平, 其中, IgA 抗体检测使用 1:20000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgA (KPL, Gaithersburg, MD), IgM 抗体检测使用 1:50000 稀释的 HRP 标记的羊抗人 IgM (万域美澜, 北京)。结果如图 4C 所示, 抗 BNLf2b IgA 抗体和抗 BNLf2b IgM 抗体检测均具有较好的特异性, 分别仅有 4 份和 7 份血清的检测值超过 0.1, 特异性分别为 98.19% (217/221) 和 96.83% (214/221)。

表 4 显示了上述各方法区分鼻咽癌和非鼻咽癌的性能, 结果表明, 无论是以多肽 aa14-52 为包被抗原的 IgG 抗体间接法, 还是以多肽 aa1-74 为包被抗原的 IgG、IgA 和 IgM 抗体间接法均能够高效区分鼻咽癌与健康对照, 具有良好的检测灵敏度和特异性。

表 4: 抗 BNLF2b 抗体间接法区分鼻咽癌和非鼻咽癌的性能

包被肽段	抗体类型	AUC	临界值	灵敏度	特异性
aa14-52	IgG	0.942	0.1	66.3% (57/86)	100% (195/195)
aa14-52	IgG	0.942	0.025	80.23% (69/86)	100% (195/195)
aa1-74	IgG	0.950	0.1	87.30% (55/63)	95.48% (211/221)
aa1-74	IgA	-	0.1	-	98.19% (217/221)
aa1-74	IgM	-	0.1	-	96.83% (214/221)

5

实施例 5: 抗 BNLF2b 抗体双抗原夹心法的建立

由于实施例 4 的结果显示 IgA、IgM 和 IgG 三种抗体在鼻咽癌风险预测中均具有较好的特异性, 因此, 可通过检测针对 BNLF2b 的总抗体进行鼻咽癌风险预测。基于此, 本实施例建立了检测抗 BNLF2b 抗体的双抗原夹心法, 以评价其筛查鼻咽癌的性能。

10

用碳酸盐缓冲液 (pH 9.6) 将 BNLF2b 编码多肽 aa1-74 稀释成 100 ng/mL, 按每孔 100 μ L 的标准 96 孔微孔板中, 37 摄氏度反应 2 小时。反应结束后, 用 PBST 洗涤 2 次, 每孔加入 200 μ L 封闭液, 37 摄氏度封闭 2 小时。封闭结束后, 倒掉封闭液, 每孔分别加入 50 μ L 含有 67 ng/ml 生物素化的多肽 aa1-74 的稀释液和 50 μ L 鼻咽癌患者血清或阴性对照血清, 37 摄氏度反应 60 分钟。反应结束后, 用 PBST 洗涤 5 次, 并加入 1:

15

5000 稀释的 HRP 标记的链霉亲和素和 1:15000 稀释的 HRP 标记的 aa1-74, 37 摄氏度继续反应 30 分钟。PBST 洗涤 5 次后, 每孔加入 100 μ L TMB 显色液, 37 摄氏度温育 15 分钟后, 每孔加入 50 μ L 终止液, 混匀后通过酶标仪测定 450 nm 和 630 nm 处的吸光度。用该方法对 50 份鼻咽癌患者血清和 500 份健康人血清进行检测, 结果如图 5A 所示, 在 50 份鼻咽癌患者血清中, 有 46 份的反应 OD 值高于 0.1, 而与 500 份阴性血清中, 仅 1 份 OD 值超过 0.1。进一步对上述结果进行 ROC 曲线分析, 结果如图 5B 所示, 曲线下面积为 0.977, 当阈值为 0.1 时, 该试剂的灵敏度和特异性分别为 92.0%和 99.8%, 约登指数为 0.91。

20

此外，为了比较 BNLf2b 不同肽段在鼻咽癌诊断中的性能，除 aa1-74 外，我们还合成了 aa1-52 (SEQ ID NO: 91) 和 aa14-74 (SEQ ID NO: 90) 两个肽段，并且均在 C 端标记了生物素。取另外 175 份鼻咽癌患者血清，按照相同的方法进行检测，结果如下表所示，以 0.1 作为临界值时，三段多肽的灵敏度均在 85% 以上，表明以 aa1-52、

5 aa14-74 或 aa1-74 为包被抗原时，该方法均具备较高的检测灵敏度和特异性。

表 5: 不同 BNLf2b 多肽用于标记抗原时检测灵敏度的比较

包被肽段	吸光度均值	95%置信区间	临界值	阳性数量	灵敏度
aa1-74	0.604	0.008-2.422	0.1	160	91.43%
aa1-52	0.575	0.009-2.809	0.1	155	88.57%
aa14-74	0.422	0.007-1.694	0.1	155	88.57%

实施例 6: 抗 BNLf2b 抗体双抗原夹心法与现有鼻咽癌筛查试剂的比较

选取 74 份鼻咽癌患者血清和 250 份健康体检人群血清，用中山生物 EBNA1/IgA 检测试剂盒、欧盟 VCA/IgA 检测试剂盒 (货号: EI 2791-9601A) 以及实施例 5 的双抗原夹心法 (aa1-74) 进行平行检测。EBNA1/IgA 的检测结果如图 6A 所示，VCA/IgA 的检测结果如图 6B 所示。EBNA1/IgA 与 VCA/IgA 通常需要联合作为筛查指标，当两者联合检测时，鼻咽癌发生的风险率计算公式为: $\text{LogitP} = -3.934 + 2.203 \times \text{VCA/IgA} + 4.797 \times \text{EBNA1/IgA}$ (Liu, Z., et al.2013, Am J Epidemiol), 阈值为 0.98。

15 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的结果如图 6C 所示，在 74 例鼻咽癌患者和 250 份健康体检人群中分别有 69 份和 8 份风险率超过 0.98，灵敏度和特异性分别为 93.64% 和 96.80%。

抗 BNLf2b 抗体检测结果如图 7 所示，在鼻咽癌患者和健康体检人群血清中分别有 70 份和 1 份检测 OD 值超过 0.1，以 0.1 做为 cut-off 值，抗 BNLf2b 抗体检测的灵敏度和特异性分别为 94.59% 和 99.60%。进一步通过 SPSS 软件进行卡方检验发现，抗 BNLf2b 抗体检测与 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的灵敏度无显著差异 ($P=1.00$)，但抗 BNLf2b 抗体检测的特异性显著高于 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测 ($P=0.037$)。

20

对上述抗 BNLf2b 抗体检测和 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的结果分别进行 ROC 曲线分析，结果如图 8 所示，抗 BNLf2b 抗体检测和 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的 AUC 分别为 0.97 和 0.99，整体上无显著差异 ($P=0.316$)，但是在灵敏度在 94.59% 或以下时，抗 BNLf2b 抗体检测的特异性均高于联合检测。此外，74 例鼻咽癌患者中有 28 份为 I/II 期，在这 28 例患者中，BNLf2b 和 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合

25

检测均有一份漏检，灵敏度为 96.43%。

将实施例 5 与实施例 6 中的数据合并计算，抗 BNLF2b 抗体检测的灵敏度为 93.55% (116/124)，特异性为 99.73% (748/750)。按照文献 (Liu, Z., et al.2013, Am J Epidemiol) 中的发病率计算公式，抗 BNLF2b 抗体检测的阳性预测值为 33.2%，相比 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的阳性预测值 (4.4%，38/862) 显著提高 ($P<0.0001$)。以上结果说明，抗 BNLF2b 抗体检测相比现有 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合筛查方法可显著提升鼻咽癌筛查的特异性和阳性预测值。

实施例 7：抗 BNLF2b 抗体双抗原夹心法在鼻咽癌筛查中的应用

在鼻咽癌高发区广东省中山市阜沙和南朗两个镇开展人群筛查，其中阜沙入组 496 人，南朗入组 829 人，合计 1325 人。根据实施例 6 中的方法 (以下简称为抗 BNLF2b 抗体检测)，对这些标本同时检测 EBNA1/IgA、VCA/IgA 和抗 BNLF2b 抗体，根据 EBNA1/IgA 和 VCA/IgA 联合检测公式 ($\text{LogitP} = -3.934 + 2.203 \times \text{VCA/IgA} + 4.797 \times \text{EBNA1/IgA}$) 计算发生鼻咽癌的风险系数。结果如下表所示，在 1325 人中，EBNA1/IgA、VCA/IgA 和抗 BNLF2b 抗体阳性分别为 163 人，218 人和 32 人。在风险系数超过 0.98 的 126 人中，最终 5 人确诊为鼻咽癌，而风险系数不超过 0.98 的人中，在肿瘤登记系统中未发现有提前确诊的鼻咽癌。在该 5 份确诊为鼻咽癌的标本中，VCA/IgA 仅能检出 1 份，其余方法能够 100% 检出。而在 1320 例非鼻咽癌标本中，抗 BNLF2b 抗体检测的特异性和阳性预测值分别为 97.95% 和 15.63%，均高于 EBNA1/IgA、VCA/IgA 以及二者联合检测。

表 6：抗 BNLF2b 抗体与现有标志物在人群筛查中的性能比较

筛查方案	灵敏度 (n=5)	特异性 (n=1320)	阳性预测 值	阴性预测值
EBNA1/IgA	100% (5/5)	88.03% (1162/1320)	3.07% (5/163)	100.00% (1162/1162)
VCA/IgA	20% (1/5)	83.56% (1103/1320)	0.46% (1/218)	99.64% (1103/1107)
风险系数	100% (5/5)	90.83% (1199/1320)	3.97% (5/126)	100.00% (1199/1199)
抗 BNLF2b 抗体	100% (5/5)	97.95% (1293/1320)	15.63% (5/32)	100.00% (1293/1293)

实施例 8：抗 BNLF2b 抗体双抗原夹心法与现有鼻咽癌筛查试剂联合使用

将实施例 6 和实施例 7 中的数据进行合并，共 79 例鼻咽癌和 1570 例非鼻咽癌。79

例鼻咽癌标本的检测结果如表 7-1 所示，抗 BNLF2b 抗体检测与 EBNA1/IgA、VCA/IgA 和风险系数同时为阳性的样本分别有 70、67 和 72 例。1570 例非鼻咽癌标本的检测结果如表 7-2 所示，抗 BNLF2b 抗体检测与 EBNA1/IgA、VCA/IgA 和风险系数同时为阳性的标本分别仅为 5、5 和 4 例。抗 BNLF2b 抗体检测与 EBNA1/IgA、VCA/IgA、EBNA1/IgA+VCA/IgA 的进一步联合检测的结果如表 7-3 所示，与 EBNA1/IgA 联合检测后，阳性预测值从 15.15%提高至 50%，与风险系数联合检测后，阳性预测值从 15.15%提高 55.56%。

表 7-1: 对 79 例鼻咽癌标本的检测结果

Anti-BNLF2b	EBNA1/IgA		VCA/IgA		风险系数	
	阳性	阴性	阳性	阴性	>0.98	≤0.98
阳性	70	5	67	8	72	3
阴性	3	1	2	2	2	2

10

表 7-2: 1570 例非鼻咽癌标本的检测结果

Anti-BNLF2b	EBNA1/IgA		VCA/IgA		风险系数	
	阳性	阴性	阳性	阴性	>0.98	≤0.98
阳性	5	23	5	23	4	24
阴性	153	1389	228	1314	125	1417

表 7-3: 抗 BNLF2b 抗体检测以及与现有标志物联合检测用于鼻咽癌筛查的性能

性能	抗 BNLF2b 抗体检测			
	-	EBNA1/IgA	VCA/IgA	风险系数
灵敏度	94.94%	88.61%	84.81%	91.14%
特异性	98.22%	99.68%	99.68%	99.75%
阳性预测值	15.15% (5/32)	50% (5/10)	16.67% (1/6)	55.56% (5/9)
阴性预测值	100%	100%	99.75%	100%

我们进一步选取中山市人民医院在前期筛查队列中经 EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测确定为高危的标本 227 份（样本 2），其中 8 份经鼻咽镜检查确诊为鼻咽癌。结果如表 8 所示，抗 BNLF2b 抗体阳性有 24 份，其中 7 份为鼻咽癌，联合检测的灵敏度和阳性预测值分别为 87.50%和 29.17%。

将样本 2 与样本 1 合并，其中样本 1 包括实施例 6 中 250 人健康对照中风险系数>0.98 的 8 例、以及实施例 7 中 1325 人的筛查队列中风险系数>0.98 的 126 例（5 例为鼻咽癌）。将两个样本合并后，合计 13 份鼻咽癌，348 份非鼻咽癌，

EBNA1/IgA+VCA/IgA 联合检测的阳性预测值为 3.60%。在此基础上，经抗 BNLF2b 抗体检测后，13 例鼻咽癌中 12 例为阳性，而 348 例非鼻咽癌中仅 21 例为阳性，联合使用的阳性预测值提高到 36.36%（表 8）。因此，抗 BNLF2b 抗体检测与 EBNA1/IgA+VCA/IgA 的联合使用能够进一步提高鼻咽癌筛查的特异性和阳性预测值。

5 为了降低工作量，可以先检测抗 BNLF2b 抗体，再进一步检测 EBNA1/IgA 和 VCA/IgA。

表 8：抗 BNLF2b 抗体检测在高风险系数人群中的性能					
标本	总数量	鼻咽癌患者数量	灵敏度	特异度	阳性预测值
1	134	5	100% (5/5)	96.90% (125/129)	55.56% (5/9)
2	227	8	87.50% (7/8)	92.24% (202/219)	29.17% (7/24)
合计	361	13	92.31% (12/13)	94.24% (327/348)	36.36% (12/33)

实施例 9：抗 BNLF2b 抗体双抗原夹心法在鼻咽癌辅助诊断中的应用

鼻咽癌的临床症状不够特异，难以与其它头颈部疾病区分，临床上，对于疑似病
10 例主要依靠鼻咽镜以及病理检查确诊。我们收集了 63 份疑似鼻咽癌病例，其中 31 份最终确诊为鼻咽癌。我们按照实施例 6 中的方法通过双抗原夹心法对这 63 份标本进行检测，结果显示，以 0.1 为 cut-off 值，在 31 份鼻咽癌病例中，有 30 份 BNLF2b 抗体检测结果为阳性，而在 32 例非鼻咽癌病例中，仅 2 例为 BNLF2b 抗体阳性。BNLF2b 抗体检测的灵敏度为 96.78%（30/31），特异性为 93.75%（30/32），阳性预测值为
15 93.75%（30/32）。以上结果说明，在门诊病例中，通过 BNLF2b 抗体检测可以显著降低不必要的鼻咽镜检查的数量，减轻患者的经济负担和身体负担。

实施例 10：BNLF2b 编码蛋白的免疫优势表位的研究

BNLF2b 基因共编码 98 个氨基酸（SEQ ID NO:101），为了分析 BNLF2b 编码蛋白的免疫优势表位，我们通过步移法设计了 9 条多肽。每条多肽 15 个氨基酸（最后一条多肽为 18 个氨基酸），相邻两条多肽间重叠 5 个氨基酸，并在 C 端标记生物素以便于后续检测（SEQ ID NOs: 92-100）。按照实施例 3 中的方法以上述多肽片段为包被抗原，对 1:300 稀释的鼻咽癌患者血清中 IgG 进行检测。结果如图 9 所示，BNLF2b 编码蛋白表位主要位于 aa1-25，aa31-45，aa51-65 以及 aa81-98 四个区段。

25 我们进一步按照实施例 3 中的方法，通过 43 份鼻咽癌血清初步评价了 aa1-25

(SEQ ID NO: 102)、aa31-45 (SEQ ID NO: 95)、aa51-65 (SEQ ID NO: 97)、aa81-98 (SEQ ID NO: 100) 四个区段多肽在鼻咽癌筛查中的灵敏度, 结果发现, 以 0.1 做为临界值, aa51-65 的检测灵敏度为 76.7% (33/43), aa1-25 为 72.1% (31/43), 另外两条多肽的灵敏度均为 55.8% (24/43)。aa14-52 和 aa1-74 的灵敏度为 90.7% (39/43) 和 93.0% (40/43), 且 aa1-74 漏检的 3 份血清 4 段多肽均为阴性, 而 aa14-52 阴性, aa1-74 阳性的血清与 aa51-65 反应的 OD 值为 0.393。

为了进一步确定构成这些表位的关键氨基酸, 我们在 aa1-25, aa31-45, aa51-65 和 aa81-98 的基础上进一步进行 N 端和 C 端截短, 合成了一系列多肽。本次实验将 40 份鼻咽癌血清混合形成两份混合血清, 1:300 稀释后按照实施例 3 中的方法进行 IgG 检测。结果如图 10 所示。

(1) aa1-25 区段 (图 10A): 固定 C 端, 当 N 端截短至 16 位时仍能够与鼻咽癌血清中 IgG 结合, 而截短至 19 位时则完全丧失与鼻咽癌血清 IgG 的反应性; 类似的, 固定 N 端, 当 C 端截短至第 7 位时, 多肽仍能与鼻咽癌血清 IgG 反应, 而当 C 端截短至第 4 位时, 则完全丧失与鼻咽癌血清中 IgG 的反应性。因此, aa1-15 和 aa11-25 含有两个独立的表位, 关键氨基酸分别为 aa5-7 和 aa16-18。

(2) aa31-45 区段 (图 10B): 无论是 N 端截短还是 C 端截短, 不含 37-39 位氨基酸 EDR 时, 多肽将完全丧失与鼻咽癌血清中 IgG 的反应性, 因此, KER (aa31-33) 和 EDR (aa37-39) 为构成该表位的关键氨基酸。

(3) aa51-65 区段 (图 10C): N 端不含 aa54-56 或者 C 端不含 aa60 时, 多肽完全丧失与鼻咽癌血清的反应性完全丧失。

(4) aa81-98 区段 (图 10D): N 端不含 aa87-89 或者 C 端不含 aa96-98 时, 多肽完全丧失与鼻咽癌血清的反应性完全丧失。

为了分析 aa1-25 区段是否含有跨 aa1-15 和 aa11-25 两段的表位, 我们分别以 aa1-15、aa11-25 和 aa1-25 为包被抗原, 检测了 43 份鼻咽癌血清 IgG。结果如图 11A 所示, 14 份血清对 aa1-25 反应的 OD 值高于 aa1-15 和 aa11-25 之和。进一步以 aa1-25 区段内不同截短的多肽为包被抗原对这 14 份血清进行检测, 结果如图 11B 所示, 能够与阳性血清反应的多肽至少包含了 aa10-16。

除此之外, 对于上述四个关键区段, 我们还合成了一系列变体, 包括自然变体和人工变体。按照实施例 3 中的方法, 以这些变体为包被抗原检测其与 1:300 稀释的鼻咽癌混合血清 IgG 的反应性。结果如图 12 所示。

(1) aa1-25 (图 12A)：第 6 位、第 9-11 位以及第 16 位氨基酸突变后降低最为明显；第 12 位存在 3 个自然突变，分别为 T、D 和 S，将丙氨酸突变为这三个氨基酸并不会显著降低 aa1-25 与鼻咽癌血清的反应性；此外，第 5、7、8、13、14、15、19、22、24、25 位氨基酸突变的影响相对较小。

5 (2) aa31-45 (图 12B)：K31、R33 以及 D38 和 R39 突变为丙氨酸后，多肽与鼻咽癌血清的反应性出现明显下降，说明这些氨基酸是构成该表位的关键氨基酸；此外，第 32、34、35、36、37、40、41、42 位氨基酸突变的影响相对较小。

(3) aa51-65 (图 12C)：R53 和 N54 以及 aa56-59 突变为丙氨酸时，多肽与鼻咽癌血清的反应性出现显著降低，而 52、55、60 和 61 位氨基酸突变的影响相对较小。

10 (4) aa81-98 (图 12D)：aa95-97 三个氨基酸突变为丙氨酸时，多肽与鼻咽癌血清的反应性下降最为明显；此外，第 89、91、93、98 位氨基酸突变的影响相对较小。

以上结果显示，BNLF2b 编码蛋白的 aa5-11、aa16-23、aa31-33、aa37-39、aa53-60 和 aa89-98 为核心区段。

15 实施例 11：BNLF2b 编码蛋白不同表位联合使用对鼻咽癌筛查性能的影响

在之前已经合成的 aa14-52、aa1-74、aa1-52、aa1-25 的基础上，进一步合成了 aa11-65 (SEQ ID NO: 103) 和 aa11-74 (SEQ ID NO: 104) 两条多肽，并在 C 端标记生物素。按照实施例 3 中的方法，分别检测这些多肽与 84 份鼻咽癌患者血清和 168 份健康人血清进行反应。6 段多肽与鼻咽癌血清的反应性均显著高于健康对照人群 (图 13)。

20 通过 Medcal 软件进行 ROC 曲线分析的结果显示，6 段多肽的曲线下面积均在 0.95 以上，灵敏度和特异性分别均在 89% 和 96% 以上 (表 9)。以上结果表明，包含一个或多个核心区段 (aa5-11、aa16-23、aa31-33、aa37-39、aa53-60) 的 BNLF2b 编码多肽片段均具备优良的筛查鼻咽癌的性能。

表 9：不同多肽作为捕获抗原在鼻咽癌筛查中的性能比较

包被多肽	几何平均值 (95% CI)		ROC 曲线分析				
	鼻咽癌 (n=84)	健康对照 (n=168)	AUC	临界值	灵敏度	特异性	约登指数
aa1-25	0.646 (0.014-3.897)	0.016 (0.007-0.125)	0.968	0.071	89.29%	96.43%	0.857
aa14-52	0.758 (0.030-4.446)	0.011 (0.004-0.054)	0.990	0.054	94.05%	97.62%	0.917
aa1-52	1.112 (0.026-4.462)	0.011 (0.004-0.051)	0.989	0.052	95.24%	97.62%	0.929

WO 2021/136082			PCT/CN2020/139310				
aa11-65	1.236 (0.029-4.464)	0.011 (0.005-0.058)	0.986	0.058	94.05%	97.62%	0.917
aa11-74	1.484 (0.032-4.463)	0.013 (0.005-0.061)	0.990	0.061	95.24%	97.62%	0.929
aa1-74	1.724 (0.045-3.911)	0.013 (0.005-0.072)	0.992	0.072	96.43%	97.62%	0.941

尽管本发明的具体实施方式已经得到详细的描述，但本领域技术人员将理解：根据已经公布的所有教导，可以对细节进行各种修改和变动，并且这些改变均在本发明的保护范围之内。本发明的全部分为由所附权利要求及其任何等同物给出。

5

参考文献：

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:87-108.
- [2] Tsao SW, Yip YL, Tsang CM, Pang PS, Lau VM, Zhang G, et al. Etiological factors of nasopharyngeal carcinoma. *Oral Oncol.* 2014;50:330-8.
- [3] Lee AW, Foo W, Law SC, Poon YF, Sze WM, O SK, et al. Nasopharyngeal carcinoma: presenting symptoms and duration before diagnosis. *Hong Kong medical journal = Xianggang yi xue za zhi.* 1997;3:355-61.
- [4] Henle G, Henle W. Epstein-Barr virus-specific IgA serum antibodies as an outstanding feature of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer.* 1976;17:1-7.
- [5] Zhu XX, Zeng Y, Wolf H. Detection of IgG and IgA antibodies to Epstein-Barr virus membrane antigen in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma and from normal individuals. *International journal of cancer.* 1986;37:689-91.
- [6] Zeng J, Gong CH, Jan MG, Fun Z, Zhang LG, Li HY. Detection of Epstein-Barr virus IgA/EA antibody for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma by immunoautoradiography. *International journal of cancer.* 1983;31:599-601.
- [7] Chen JY, Liu MY, Hsu TY, Cho SM, Yang CS. Use of bacterially-expressed antigen for detection of antibodies to the EBV-specific deoxyribonuclease in sera from patients with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of virological methods.* 1993;45:49-66.
- [8] Connolly Y, Littler E, Sun N, Chen X, Huang PC, Stacey SN, et al. Antibodies to Epstein-Barr virus thymidine kinase: a characteristic marker for the serological detection of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer.* 2001;91:692-7.
- [9] Zhang X, Zhang Y, Nie Y, Wang S, Chen Y, Sun D. Serum Zta antibody of Epstein-Barr virus exerts potential function in the diagnosis of nasopharyngeal cancer. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine.* 2014;35:6879-86.

- [10] Littler E, Newman W, Arrand JR. Immunological response of nasopharyngeal carcinoma patients to the Epstein-Barr-virus-coded thymidine kinase expressed in *Escherichia coli*. *International journal of cancer*. 1990;45:1028-32.
- [11] Gu AD, Lu LX, Xie YB, Chen LZ, Feng QS, Kang T, et al. Clinical values of multiple Epstein-Barr virus (EBV) serological biomarkers detected by xMAP technology. *Journal of translational medicine*. 2009;7:73.
- [12] Wout M. J. van Grunsven WJMS, and Jaap M. Middeldorp. Localization and Diagnostic Application of Immunodominant Domains of the BFRF3-Encoded Epstein-Barr Virus Capsid Protein. *The Journal of infectious diseases*. 1994;170:13-9.
- [13] Zong YS, Sham JS, Ng MH, Ou XT, Guo YQ, Zheng SA, et al. Immunoglobulin A against viral capsid antigen of Epstein-Barr virus and indirect mirror examination of the nasopharynx in the detection of asymptomatic nasopharyngeal carcinoma. *Cancer*. 1992;69:3-7.
- [14] Zeng Y, Zhong JM, Li LY, Wang PZ, Tang H, Ma YR, et al. Follow-up studies on Epstein-Barr virus IgA/VCA antibody-positive persons in Zangwu County, China. *Intervirology*. 1983;20:190-4.
- [15] Zeng Y, Zhang LG, Li HY, Jan MG, Zhang Q, Wu YC, et al. Serological mass survey for early detection of nasopharyngeal carcinoma in Wuzhou City, China. *International journal of cancer*. 1982;29:139-41.
- [16] Chan KH, Gu YL, Ng F, Ng PS, Seto WH, Sham JS, et al. EBV specific antibody-based and DNA-based assays in serologic diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of cancer*. 2003;105:706-9.
- [17] Chen H, Chi P, Wang W, Li L, Luo Y, Fu J, et al. Evaluation of a semi-quantitative ELISA for IgA antibody against Epstein-Barr virus capsid antigen in the serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *International journal of infectious diseases : IJID : official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2014;25:110-5.
- [18] Tang JW, Rohwader E, Chu IM, Tsang RK, Steinhagen K, Yeung AC, et al. Evaluation of Epstein-Barr virus antigen-based immunoassays for serological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology*. 2007;40:284-8.
- [19] Paramita DK, Fachiroh J, Haryana SM, Middeldorp JM. Two-step Epstein-Barr virus immunoglobulin A enzyme-linked immunosorbent assay system for serological screening and confirmation of nasopharyngeal carcinoma. *Clinical and vaccine immunology : CVI*. 2009;16:706-11.
- [20] Coghill AE, Hsu WL, Pfeiffer RM, Juwana H, Yu KJ, Lou PJ, et al. Epstein-Barr virus serology as a potential screening marker for nasopharyngeal carcinoma among high-risk individuals from multiplex families in Taiwan. *Cancer epidemiology, biomarkers &*

- prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology. 2014;23:1213-9.
- [21] Coghill AE, Bu W, Nguyen H, Hsu WL, Yu KJ, Lou PJ, et al. High Levels of Antibody that Neutralize B-cell Infection of Epstein-Barr Virus and that Bind EBV gp350 Are Associated with a Lower Risk of Nasopharyngeal Carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2016;22:3451-7.
- [22] Chang C, Middeldorp J, Yu KJ, Juwana H, Hsu WL, Lou PJ, et al. Characterization of ELISA detection of broad-spectrum anti-Epstein-Barr virus antibodies associated with nasopharyngeal carcinoma. *Journal of medical virology*. 2013;85:524-9.
- [23] Li RC, Du Y, Zeng QY, Tang LQ, Zhang H, Li Y, et al. Epstein-Barr virus glycoprotein gH/gL antibodies complement IgA-viral capsid antigen for diagnosis of nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*. 2016;7:16372-83.
- [24] Fachiroh J, Paramita DK, Hariwiyanto B, Harijadi A, Dahlia HL, Indrasari SR, et al. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA1- and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44:1459-67.
- [25] Cai YL, Li J, Lu AY, Zheng YM, Zhong WM, Wang W, et al. Diagnostic significance of combined detection of Epstein-Barr virus antibodies, VCA/IgA, EA/IgA, Rta/IgG and EBNA1/IgA for nasopharyngeal carcinoma. *Asian Pacific journal of cancer prevention : APJCP*. 2014;15:2001-6.
- [26] Liu Y, Huang Q, Liu W, Liu Q, Jia W, Chang E, et al. Establishment of VCA and EBNA1 IgA-based combination by enzyme-linked immunosorbent assay as preferred screening method for nasopharyngeal carcinoma: a two-stage design with a preliminary performance study and a mass screening in southern China. *International journal of cancer*. 2012;131:406-16.
- [27] Ji MF, Wang DK, Yu YL, Guo YQ, Liang JS, Cheng WM, et al. Sustained elevation of Epstein-Barr virus antibody levels preceding clinical onset of nasopharyngeal carcinoma. *British journal of cancer*. 2007;96:623-30.
- [28] Ji MF, Yu YL, Cheng WM, Zong YS, Ng PS, Chua DT, et al. Detection of Stage I nasopharyngeal carcinoma by serologic screening and clinical examination. *Chinese journal of cancer*. 2011;30:120-3.
- [29] Liu Z, Ji MF, Huang QH, Fang F, Liu Q, Jia WH, et al. Two Epstein-Barr virus-related serologic antibody tests in nasopharyngeal carcinoma screening: results from the initial phase of a cluster randomized controlled trial in Southern China. *American journal of epidemiology*. 2013;177:242-50.
- [30] Li T, Guo X, Ji M, Li F, Wang H, Cheng W, et al. Establishment and validation of a two-

- step screening scheme for improved performance of serological screening of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Med.* 2018;7:1458-67.
- [31] Ji MF, Huang QH, Yu X, Liu Z, Li X, Zhang LF, et al. Evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA load to distinguish nasopharyngeal carcinoma patients from healthy high-risk populations in Southern China. *Cancer.* 2014;120:1353-60.
- 5 [32] Chen Y, Zhao W, Lin L, Xiao X, Zhou X, Ming H, et al. Nasopharyngeal Epstein-Barr Virus Load: An Efficient Supplementary Method for Population-Based Nasopharyngeal Carcinoma Screening. *PloS one.* 2015;10:e0132669.
- [33] Zhang G, Zong J, Lin S, Verhoeven RJ, Tong S, Chen Y, et al. Circulating Epstein-Barr virus microRNAs miR-BART7 and miR-BART13 as biomarkers for nasopharyngeal carcinoma diagnosis and treatment. *International journal of cancer.* 2015;136:E301-12.
- 10 [34] Chan KCA, Woo JKS, King A, Zee BCY, Lam WKJ, Chan SL, et al. Analysis of Plasma Epstein-Barr Virus DNA to Screen for Nasopharyngeal Cancer. *The New England journal of medicine.* 2017;377:513-22.
- 15 [35] 饶东平, 柳青, 曹素梅. 利用 Markov 模型进行鼻咽癌筛查的成本效果评价. *中华肿瘤杂志.* 2012;34:549-53.