



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 00819963.9

[43] 公开日 2004年2月11日

[11] 公开号 CN 1474944A

[22] 申请日 2000.10.12 [21] 申请号 00819963.9

[86] 国际申请 PCT/US00/28261 2000.10.12

[87] 国际公布 WO02/31484 英 2002.4.18

[85] 进入国家阶段日期 2003.4.11

[71] 申请人 塞弗根生物系统股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 人类基因组科学公司

[72] 发明人 斯科特·维恩伯格 蒂娜·莫里斯

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利
商标事务所

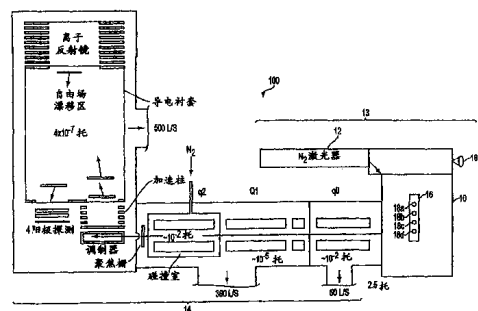
代理人 王永刚

权利要求书6页 说明书40页 附图7页

[54] 发明名称 利用亲和捕获串联质谱分析表征分子间作用的方法

[57] 摘要

本发明给出了包括亲和捕获探针接口、激光解吸电离源以及串联质谱仪的分析仪器。还给出了用于蛋白质发现及识别和利用本发明的仪器来表征分子间相互作用的新方法。



1. 表征第一和第二分子结合配偶体之间结合相互作用的方法, 该方法包括:

将第二结合配偶体与第一结合配偶体结合, 所述第一结合配偶体固定在一个激光解吸电离探针的表面上;

碎裂所述第二结合配偶体; 以及然后

用串联质谱仪测量来探测所述碎片中至少一个, 探测到的碎片的质谱表征了所述结合相互作用。

2. 根据权利要求1的方法, 在将所述第二结合配偶体结合到第一结合配偶体上之前, 进一步包括以下步骤:

将第一结合配偶体固定到一个亲和捕获探针的表面。

3. 根据权利要求2的方法, 其中所述第一配偶体通过直接结合而固定到亲和捕获探针表面。

4. 根据权利要求3的方法, 其中与所述探针表面的直接结合为共价键合。

5. 根据权利要求4的方法, 其中所述共价键合存在于第一结合配偶体的胺和所述探针表面的羧基二咪唑组成部分之间。

6. 根据权利要求4的方法, 其中所述共价键合存在于第一结合配偶体的氨基或硫醇基和探针表面的环氧基之间。

7. 根据权利要求3的方法, 其中与所述探针表面的直接结合为非共价键合。

8. 根据权利要求7的方法, 其中与所述探针表面的直接结合为配位或配价键合。

9. 根据权利要求8的方法, 其中所述配位或配价键合为与探针表面的金属的键合。

10. 根据权利要求9的方法, 其中所述金属为金或铂。

11. 根据权利要求2的方法, 其中亲和捕获探针固定表面为色谱吸取表面。

12. 根据权利要求 11 的方法, 其中所述色谱吸取表面选自下列组中: 反相、阴离子交换、阳离子交换、固定化金属亲和捕获以及混合模式表面。

13. 根据权利要求 2 的方法, 其中所述第一配偶体通过非直接结合而固定到亲和捕获探针的表面;

14. 根据权利要求 13 的方法, 其中所述非直接结合将第一结合配偶体共价结合到亲和捕获探针表面。

15. 根据权利要求 14 的方法, 其中与所述亲和捕获探针表面的非直接共价结合包括可裂解衔接物。

16. 根据权利要求 15 的方法, 其中所述衔接物可由选自下列的作用剂裂解: 化学制剂、酶, 以及辐射。

17. 根据权利要求 13 的方法, 其中所述非直接结合将第一结合配偶体非共价结合到亲和捕获探针表面。

18. 根据权利要求 17 的方法, 其中与所述亲和捕获探针表面的非共价非直接键合包括生物素分子。

19. 根据权利要求 17 的方法, 其中与所述亲和捕获探针表面的非共价非直接键合包括抗生物素蛋白分子。

20. 根据权利要求 17 的方法, 其中与所述亲和捕获探针表面的非共价非直接键合包括抗生蛋白链菌素分子。

21. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述第一分子结合配偶体选自下列组中: 蛋白质、核酸、碳水化合物, 以及脂类。

22. 根据权利要求 21 的方法, 其中所述第一分子结合配偶体为蛋白质。

23. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述蛋白质为自然存在的。

24. 根据权利要求 23 的方法, 其中所述蛋白质自然存在于选自下列的有机物中: 多细胞真核生物、单细胞真核生物、原核生物, 以及病毒。

25. 根据权利要求 24 的方法, 其中所述蛋白质自然存在于多细胞真核生物中。

26. 根据权利要求 25 的方法, 其中所述多细胞真核生物选自下列组中: 哺乳动物、昆虫、线虫、鱼, 以及导管植物。

27. 根据权利要求 26 的方法, 其中所述多细胞真核生物为哺乳动物。

28. 根据权利要求 27 的方法, 其中所述哺乳动物为智人。

29. 根据权利要求 27 的方法, 其中所述哺乳动物为啮齿动物。

30. 根据权利要求 27 的方法, 其中所述啮齿动物为鼠、家鼠, 或天竺鼠。

31. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述蛋白质为非自然存在的。

32. 根据权利要求 31 的方法, 其中所述蛋白质为重组融合蛋白质。

33. 根据权利要求 22 的方法, 其中所述蛋白质选自下列组中: 抗体、受体、转录因子、骨架蛋白质、细胞周期蛋白质, 以及核糖体蛋白质。

34. 根据权利要求 33 的方法, 其中所述蛋白质为抗体。

35. 根据权利要求 33 的方法, 其中所述蛋白质为受体。

36. 根据权利要求 35 的方法, 其中所述受体选自下列组中: 细胞表面受体、横跨膜受体, 以及细胞核受体。

37. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述第二结合配偶体与第一结合配偶体的结合通过以生物样品接触第一结合配偶体来实现。

38. 根据权利要求 37 的方法, 其中所述生物样品为选自下列的流体: 血液、淋巴、尿液、脑脊髓液、滑液、乳汁、唾液、玻璃体液、眼房水、粘液以及精液。

39. 根据权利要求 38 的方法, 其中所述生物流体为血液。

40. 根据权利要求 38 的方法, 其中所述流体为尿液。

41. 根据权利要求 38 的方法, 其中所述生物流体为 CSF。

42. 根据权利要求 37 的方法, 其中所述生物样品为细胞溶解产物。

43. 根据权利要求 1 的方法, 其中所述第二结合配偶体为蛋白质。

44. 根据权利要求1的方法，其中所述第二结合配偶体与第一结合配偶体的结合通过将第一结合配偶体与化学合成组合库的等分试样接触来实现。

45. 根据权利要求1的方法，其中所述第二结合配偶体与第一结合配偶体的结合通过将第一结合配偶体与生物表达组合库的等分试样接触来实现。

46. 根据权利要求45的方法，其中所述库为噬菌体表达库。

47. 根据权利要求1的方法，其中所述碎裂通过将第二结合配偶体与酶接触来实现。

48. 根据权利要求43的方法，其中所述碎裂通过将第二结合配偶体与酶接触来实现。

49. 根据权利要求48的方法，其中所述酶为特异内蛋白酶。

50. 根据权利要求49的方法，其中所述内蛋白酶选自下列组中：胰岛素、Glu-C(V8)蛋白酶、内蛋白酶Arg-C(丝氨酸蛋白酶)、内蛋白酶Arg-C(半胱氨酸蛋白酶)、Asn-N蛋白酶，以及Lys-C蛋白酶。

51. 根据权利要求50的方法，其中所述蛋白酶为胰岛素。

52. 根据权利要求1的方法，其中所述碎裂通过将第二结合配偶体与液相化学试剂接触来实现。

53. 根据权利要求52的方法，其中所述化学试剂为CNBr。

54. 根据权利要求1的方法，在所述第二结合配偶体与第一结合配偶体结合之后，第二结合配偶体碎裂之前，进一步包括以下步骤：

使所述第二结合配偶体改变性质。

55. 根据权利要求1的方法，在碎裂所述第二结合配偶体之后，进一步包括以下步骤：

用第一洗脱液洗涤所述探针。

56. 根据权利要求55的方法，在用第一洗脱液洗涤所述探针之后，用串联质谱仪测量来探测碎片之前，进一步包括以下步骤：

用第二洗脱液洗涤所述探针，第二洗脱液至少在某一洗脱特征方

面与第一洗脱液有所不同。

57. 根据权利要求 56 的方法，其中洗脱特征选自下列组中：pH、离子强度、去污强度，以及疏水性。

58. 根据权利要求 1 或 55 的方法，在碎裂之后，探测所述碎片之前，进一步包括以下步骤：

对所述探针应用能量吸收分子。

59. 根据权利要求 1 的方法，在碎裂之后，探测所述碎片之前，进一步包括以下步骤：

将探针啮合到分析仪器的亲和捕获探针接口中，所述分析仪器包括：

激光解吸电离源；

亲和捕获探针接口；以及

串联质谱仪，

其中所述亲和捕获探针接口能够啮合一个亲和捕获探针并将其定位在与激光源处于可查询的关系且同时与串联质谱仪相联；以及然后

利用所述激光源将第二结合配偶体的碎片从探针上解吸并电离。

60. 根据权利要求 1 的方法，其中所述串联质谱仪测量为对所有离子质量的测量。

61. 根据权利要求 1 的方法，其中所述串联质谱仪测量为对碎片的一个子集的质量的测量。

62. 根据权利要求 1 的方法，其中所述串联质谱仪测量为单离子监控测量。

63. 根据权利要求 1 的方法，在所述探测之后，进一步包括以下步骤：

将所述碎片测量结果与将碎裂酶的裂解规则应用到第二结合配偶体的初级氨基酸序列上所预测的结果进行比较。

64. 根据权利要求 63 的方法，在所述探测之后和所述比较之前，进一步包括以下步骤：

通过 ms/ms 分析鉴定所述第二结合配偶体。

65. 根据权利要求 64 的方法，其中所述通过 ms/ms 分析的鉴定包括以下步骤：

利用质谱分析选择所述第二结合配偶体的第一碎片；

在气相中分离所述第二结合配偶体第一碎片；

测量所述第二结合配偶体第一碎片的碎片谱，以及然后

将所述碎片谱与预先添加在数据库中的氨基酸序列数据所预测的碎片谱进行比较。

66. 根据权利要求 65 的方法，其中所述氨基酸序列数据选自经验数据或预测数据。

67. 根据权利要求 65 的方法，其中所述分离为碰撞诱导分离。

68. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为抗体。

69. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为 T 细胞受体。

70. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为 MHC 分子。

71. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为受体而第二结合配偶体为该受体的激动剂。

72. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为受体而第二结合配偶体为该受体的部分激动剂。

73. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为受体而第二结合配偶体为该受体的拮抗剂。

74. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为受体而第二结合配偶体为该受体的部分拮抗剂。

75. 根据权利要求 1 的方法，其中所述第一结合配偶体为糖蛋白受体而第二结合配偶体为外源凝集素。

利用亲和捕获串联质谱分析表征分子间作用的方法

技术领域

本发明属于化学和生物化学分析领域，尤其涉及利用串联质谱分析对分析物、以及分析物之间的亲和作用力进行改进的鉴定和表征的设备和方法。

背景技术

电喷雾电离 (ESI) 和基质辅助激光解吸/电离 (MALDI) 技术的出现，加上质量分析仪改进的性能和更低的成本，在过去的十年里已使质谱分析 (MS) 在与生物有关的大分子——包括从复杂生物系统中纯化得到的蛋白质——的研究所用的标准分析工具中占有一席之地。

例如，在一种称为肽质指纹图谱的技术中，质谱分析被用于鉴定从生物样品中纯化得到的蛋白质。鉴定受到将纯化蛋白质的蛋白水解碎片的质谱与从预先添加到数据库中的初级序列 (primary sequences) 预测的质量进行对比的影响。Roepstorff, *The Analyst* 117:299-303 (1992); Rappin et al., *Curr. Biol.* 3(6):327-332 (1993); Mann et al., *Biol. Mass Spectrom.* 22:338-345 (1993); Yates et al., *Anal. Biochem.* 213:397-408 (1993); Henzel et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5011-5015 (1993); James et al., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 195:58-64 (1993).

还发展了类似的采掘数据库的方法，利用碰撞诱导分离 (CID) 或 MALDI 源后分离 (PSD) 所得的碎片质谱来鉴定纯化蛋白质。Eng et al., *J. Am. Soc. Mass. Spectrom.* 5:976-989 (1994); Griffin et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 9:1546-1551 (1995); Yates et al., U.S. Patent Nos. 5,538,897 and 6,017,693; Mann et al., *Anal. Chem.* 66:4390-4399 (1994).

还发展了允许隔离蛋白质至少部分重新排序的质谱分析技术。
Chait et al., *Science* 262:89-92 (1993); Keough et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7131-6 (1999); reviewed in Bergman, *EXS* 88:133-44 (2000).

在因特网上现在已可以容易地获取蛋白质质谱和共用的序列数据库采掘之间便捷翻译的软件资源来促进蛋白质鉴定。其中有 Protein Prospector (<http://prospector.ucsf.edu>)、PROWL (<http://prowl.rockefeller.edu>)，以及 Mascot Search Engine (Matrix Science Ltd., London, UK, www.matrixscience.com)。

尽管高精度的质量分配 (mass assignment) 提供了有用的信息——例如，促进了上述技术所进行的纯化蛋白质的鉴定——尽管如此，这样的信息依然是有限的。通过将 MS 分析与目标蛋白质的酶和/或化学改性结合，将能释放更多的分析能力，可进行结构成分的说明、转译成蛋白质后的改性，并促进蛋白质鉴定。

此外，复杂生物材料——例如血液、血清、血浆、淋巴、组织液、尿液、渗出液、完整细胞、细胞溶解产物以及细胞分泌物——通常含有数以百计的生物细胞，以及有机盐和无机盐，这些阻碍了直接的质谱分析。这样，在 MS 研究之前，通常必须进行样品预备和纯化步骤。

经典的样品纯化方法——例如流体色谱法 (离子交换、尺寸排除、亲和，以及反相色谱法)、膜透析、离心法、免疫沉淀法，以及电泳法——通常需要大量启示样品。即使能够获得所需数量的样品，在这些纯化处理中，微量成分也容易丢失，它们因非特定的结合和稀释影响导致的分析物丢失而受损。这些方法还经常需要大量的劳动。

因此，很明显需要便于对异质样品中出现的主要和微量蛋白质都进行质谱探测，而无需事前流体相纯化的方法和设备。进一步还需要不仅容易做到样品纯化，还允许质谱分析之前的串联和并联样品改性方法的 MS 平台。

通过发展亲和捕获激光解吸电离方法部分满足了这些要求。
Hutchens et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:576-580 (1993);

U.S. Patent Nos. 5,719,060, 5,894,063, 6,020,208, and 6,027,942。这种大分子 MS 分析的新策略利用新颖的、至少在一个表面上具有亲和试剂的激光解吸电离探针。亲和试剂从异质样品中吸取所需的分析物，将它们以适于随后的激光解吸电离的形式聚集在探针表面上。分析物的吸取和解吸的结合避开了脱机纯化方法，允许对更小的初始样品进行分析，并进一步便于质谱分析之前直接在探针表面的样品改性方法。

亲和捕获激光解吸电离方法允许质谱分析适合于许多传统的生物分析测定形式，包括免疫分析，Nelson et al., *Anal. Chem.* 67:1153-1158 (1995)，以及亲和色谱，Brockman et al., *Anal. Chem.* 67:4581-4585 (1995)。亲和捕获激光解吸电离方法不仅已应用到肽和蛋白质的研究，Hutchens et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:576-580 (1993); Mouradian et al., *J. Amer. Chem. Soc.* 118:8639-8645 (1996); Nelson et al., *rapid Commun. Mass Spectrom.* 9:1380-1385 (1995); Nelson et al., *J. Molec. Recognition* 12:77-93 (1999); Brockman et al., *J. Mass Spectrom.* 33:1141-1147 (1998); Yip et al., *J. Biol. Chem.* 271:32825-33 (1996)，还应用到低聚核苷酸的研究，Jurinke et al., *Anal. Chem.* 69:904-910 (1997); Tang et al., *Nucl. Acids Res.* 23:3126-3131 (1995); Liu et al., *Anal. Chem.* 67:3482-90 (1995)，细菌的研究，Bundy et al., *Anal. Chem.* 71:1460-1463 (1999)，以及小分子的研究，Wei et al., *Nature* 399:243-246 (1999)。在商业水平上，亲和捕获激光解吸电离包含在 CIPHERGEN 的 ProteinChip® Systems (CIPHERGEN Biosystems, Inc. Fremont, California, USA) 中。

尽管亲和捕获激光解吸电离技术已解决了现有技术的许多问题，但困难依然存在。

当将此方法用于捕获来自生物样品的蛋白质时，通常会看到大约捕获了一皮摩尔的蛋白质用于随后的分析。通常，在色谱仪表面生物芯片上的亲和捕获不会得到完全的纯化。另外，与自由溶液或 2-D 凝胶的变性环境中进行的消化 (digest) 相比，固相萃取的样品所见的消化效率更差。因此，如果大约 50% 为我们所感兴趣的蛋白质，并且

成功地消化了该蛋白质中的 10% 的话，那么至多也只有大约 50 飞摩尔的一些肽可用于探测。

利用数据库采掘实验中牛胎球蛋白的虚拟胰岛素消化，已经表明，例如，即使具有极高的精度 1.0 ppm（大多数 MS 技术现在还无法达到的水平），当检索这个复杂的真核状态基因组时，用单个肽质量只能获得可信度差的蛋白质 ID 匹配。对于两个肽，也只能获得低可信度的结果。只有在给出三个肽时，才能为质量分配返回小于 300 ppm 误差的可信结果。在此情形中，大多数设备都需要内部标准校正。然而，对于五个或更多个肽，无法进一步给出质量精度好于 1000 ppm 误差的可信度。

此外，当同时消化多个蛋白质时，创建了一个异质肽池，并且成功的数据库采掘不仅需要极高的精度，而且在很多情况下还需要初级序列信息。串联 MS/MS 方法在给出初级序列信息方面表现出了很大的可用性。Biemann et al., *Acc. Chem. Res.* 27:370-378 (1994); Spengler et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 1991, 5:198-202 (1991); Spengler et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 6:105-108 (1992); Yates et al., *Anal. Chem.* 67:1426-1436 (1995); Kaufman et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 7:902-910 (1993); Kaufman et al., *Intern. J. Mass Spectrom. Ion Processes* 131:355-385 (1994).

然而，直到最近，基于激光解吸的分析所可用的 MS/MS 方法只有源后衰变分析 (PSD)。虽然 PSD 能够对皮摩尔量级的肽给出合理的序列信息，碎片处理的整个效率也很低；当与该方法中常出现的差质量精度和灵敏度结合时，极大地限制了它分析亲和捕获激光解吸电离探针上常出现的低丰度肽的能力。最近，发展了一种激光解吸电离四极飞行时间质谱仪 (LDI Qq - TOF)，它能够进行碰撞诱导分离 (CID) MS/MS 分析。Krutchinsky et al., *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 12:508-518 (1998).

因此，需要能够提高亲和捕获激光解吸质谱分析的灵敏度和质量精度的设备和方法。需要能够提高针上消化效率、并能使蛋白质的非

同质混合物的消化所产生的肽易于分辨的方法和设备。需要能够提高亲和捕获激光解吸串联质谱分析的效率的设备和方法。

发明内容

本发明的一个目的是给出提高现有的亲和捕获激光解吸电离质谱仪分析的灵敏度、质量精度、质量分辨率，并加入 ms/ms 能力。本发明的又一个目的是给出使用这些改进的分析能力的生物分子分析的方法。

本发明通过给出——在第一方面——一种分析仪器来满足这些和其它目的以及技术中的要求。

本发明的分析仪器包括：激光解吸电离源，亲和捕获探针接口，以及串联质谱仪，其中亲和捕获探针接口能够啮合亲和捕获探针并定位该探针以使它在与串联质谱仪相联系时能接收激光解吸源的查询（interrogate），从而使从探针上解吸的离子进入质谱仪。

通常，激光解吸电离源包括激光激发源和激光光学系统；激光光学系统用于将受激光子从激光激发源送至探针接口。在这样的实施方案中，激光光学系统通常传递受查询探针表面平方毫米上大约 20 - 1000 微焦耳的能量。

激光激发源通常为连续激光器和脉冲激光器之一，在各种实施方案中，选自下列：氦气激光器、Nd:YAG 激光器、掺铒 YAG 激光器，以及 CO₂ 激光器。在具体实施方案中，激光激发源为脉冲氦气激光器。

在一组实施方案中，激光光学系统包括选自下面的光学元件：透镜、反射镜、棱镜、衰减器，以及分束器。

在一组替换实施方案中，激光光学系统包括具有输入端和输出端的光纤，激光激发源与所述光纤输入端耦合。

在一些光纤激光光学系统实施方案中，激光光学系统还包括光学衰减器。衰减器可置于激光激发源和光纤输入端之间，可用来将激光激发源与光纤输入端耦合，或可置于光纤输出端和探针之间。

在某些光纤光学系统实施方案中，光纤输出端的直径在大约 200

- 400 μm 之间，而输入端的直径在大约 400 至 1200 μm 之间。

分析仪器还可包括探针观察光学系统，以在探针接口的啮合之后可看见探针。

在某些实施方案中，激光光学系统可包括激光耦合器，用于将激光激发源与光纤输入端耦合。正如上面所提到过的，耦合器可用作光学衰减器。在其它实施方案中，耦合器可用来提高探针在探针接口中的啮合之后的可视性。

在后面这些实施方案的某些中，耦合器和光纤都是分叉的，分散了一部分来自所述激光激发源的能量。作为选择，这样的分叉可导入可见光来照亮解吸位置。

对于在光学系统中包括可视化光学系统的，或者含有光纤的激光光学系统包括分叉或三分叉的，分析仪器可进一步包括探测来自所述探针的反光的 CCD 相机。

在典型实施方案中，亲和捕获探针接口包括能够可逆啮合亲和捕获探针的探针固定器。接口通常还包括探针引入口，其本身能可逆啮合探针固定器。

在典型实施方案中，探针接口进一步包括探针位置传动组件和接口离子收集系统。当探针固定器啮合在引入口中时，它与探针位置传动器相接触；反过来，探针位置传动器能够相对于激光电离源（通常，相对于激光光学系统）和离子收集系统移动探针固定器（通常和其所啮合的探针一起）将其定位。在典型实施方案中，传动器能够平移和旋转所述探针固定器将其定位。

探针接口通常还包括与探针引入口耦合的抽真空系统，使探针在次大气压下被激光解吸电离源查询。

本发明的分析仪器包括串联质谱仪，在各种实施方案中，它选自下列：QqTOF MS、离子陷阱 MS、离子陷阱 TOP MS，以及傅立叶变换离子回旋共振 MS。在本发明的分析仪器中具体所用的为 QqTOF MS。

在具体实施方案中，串联质谱仪为 QqTOF MS 而激光激发源为

脉冲氦气激光器, 探针处的激光流量为大约 2 至 4 乘以最小解吸阈值, 串联质谱仪的外标准质量精度为大约 20 - 50 ppm。

本发明的分析仪器设计为与亲和捕获激光解吸电离探针啮合。因此, 上述实施方案中的任何一个都可包括啮合在亲和捕获探针接口中的亲和捕获探针。

在这些实施方案中的亲和捕获探针通常将具有至少一个样品吸取表面, 该表面与激光源处于可查询关系, 样品吸取表面选自下列: 色谱吸取表面和生物分子亲和表面。通常, 色谱吸取表面选自下列: 反相、阴离子交换、阳离子交换、固定化金属亲和捕获以及混合模式表面; 而生物分子亲和表面的生物分子选自下列: 抗体、受体、核酸、外源凝集素、酶、生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、Staph 蛋白 A 和 Staph 蛋白 G。

亲和捕获激光解吸电离探针可具有许多可分别寻址的样品吸取表面, 它们可与激光源处于可查询关系, 可包括至少两个不同的吸取表面。

在其它实施方案中, 本发明的分析仪器包括与串联质谱仪的探测器相连的数字计算机。在一些实施方案中, 分析仪器还可进一步包括可由该数字计算机执行的软件程序, 或者存在计算机中, 或者可以被计算机访问。在这样的实施方案中的软件程序能够控制激光解吸电离源, 或能够控制串联质谱仪数据采集的至少一个方面, 或者能够对所述串联质谱仪所采集的数据执行至少一个分析程序, 或者这些功能的任何子集。

在另一方面, 本发明给出用于分析至少一个测试蛋白质的方法。

该方法包括: (a) 在亲和捕获蛋白质生物芯片上捕获测试蛋白质, (b) 利用蛋白水解剂在蛋白质生物芯片上产生测试蛋白质的分解产物; (c) 用串联质谱仪分析至少一块蛋白质分解产物。在这个方面的这些实施方案中, 分析步骤包括: (i) 从蛋白质生物芯片上将蛋白质分解产物解吸成为气相, 以产生相应的母体离子肽, (ii) 用第一质谱仪选择用于随后的碎裂的母体离子肽, (iii) 在气相中将选定的母

体离子肽在选定碎裂条件下进行碎裂以产生产物离子碎片，以及 (iv) 生成产物离子碎片的质谱。在此方式中，质谱提供了测试蛋白质的分析。

在本发明这一方面的某些实施方案中，该方法进一步包括一个附加步骤 (d)，通过将质谱提交给蛋白质数据库采掘协议为一个测试蛋白质确定至少一个蛋白质身份候选，蛋白质数据库采掘协议根据质谱与数据库中蛋白质理论质谱之间的拟合严密度的测量，在数据库中为测试蛋白质鉴定至少一个蛋白质身份候选。

在这些实施方案的特别实施方案中，步骤 (d) 进一步包括将测试蛋白质的质量和测试蛋白质的原始核素提交给协议。

在其它实施方案中，该方法进一步包括 (e) 将身份候选与测试蛋白质通过如下方式进行比较：(i) 生成 (b) 的蛋白质分解产物的质谱；(ii) 将蛋白质分解产物的质谱提交给计算机协议，该协议确定身份候选的被预测为通过使用蛋白水解剂能生成的分解产物的理论质谱与蛋白质分解产物的质谱之间的拟合严密度的测量，从而该测量指示出蛋白质生物芯片上相应于测试蛋白质的蛋白质分解产物。

本发明的其它实施方案进一步包括步骤 (f)，重复步骤 (c)，其中选定的母体离子肽不相应于从身份候选所预测的蛋白质分解产物；然后 (g)，对 (f) 选定的母体离子肽重复 (d)。

在本发明的这一方面，测试蛋白质可以是在第一和第二生物样品间不同地表达的蛋白质。在这些实施方案的一些中，第一和第二生物样品来自正常的和病态的来源。

在第三方面，本发明给出表征第一和第二分子结合配偶体 (binding partner) 之间结合作用的方法。

在这方面，该方法包括：将第二结合配偶体与第一结合配偶体结合在一起，其中所述第一结合配偶体固定在激光解吸电离探针的表面上；碎裂第二结合配偶体；然后用串联质谱仪测量探测至少一块碎片，由此所探测到的碎片的质谱表征了结合作用。

在本发明这一方面的某些实施方案中，第一结合配偶体在第二结

合配偶体结合到第一结合配偶体上之前首先固定到亲和捕获探针的表面上。

这样的固定可通过将第一配偶体直接结合到亲和捕获探针——例如共价键合——来进行。典型的共价键合实施方案包括第一结合配偶体的胺与所述探针表面的羰基二咪唑组成部分（carbonyldiimidazole moiety）之间的共价键合以及所述第一结合配偶体的氨基或硫醇基与探针表面的环氧基之间的共价键合。

固定还可通过直接的非共价键合来进行，例如第一结合配偶体与探针表面的金属——例如金或铂——之间的配位（coordinate）或配价（dative）键合。固定还可通过第一结合配偶体与色谱吸取表面的相互作用来进行，色谱吸取表面选自下列：反相、阴离子交换、阳离子交换、固定化金属亲和捕获以及混合模式表面。

作为选择，固定可以是间接的，虽然是间接的，但也可以是共价的。在后面这些实施方案中的某些中，第一结合配偶体可由共价键合通过衔接物——例如可裂解衔接物——来固定。间接固定也可以是非共价的，例如通过生物素/抗生物素蛋白、生物素/抗生物素蛋白链菌素相互作用固定到探针上。

在本发明的这一方面，第一分子结合配偶体可选自下列：蛋白质、核酸、碳水化合物，以及脂类。通常，第一结合配偶体是蛋白质，可以是有机体上自然存在的蛋白质，所述有机体可选自下列：多细胞真核生物、单细胞真核生物、原核生物，以及病毒；或者是非自然存在的蛋白质，例如重组融合蛋白质。

在第一结合配偶体为蛋白质的实施方案中，蛋白质可选自下列：抗体、受体、转录因子、骨架（cytoskeletal）蛋白质、细胞周期蛋白质，以及核糖体蛋白质，等等。

第二结合配偶体与固定化第一结合配偶体的结合通过——在典型实施方案中——将第一结合配偶体与生物样品接触来实现；样品可以是选自下列的液体：血液、淋巴、尿液、脑脊髓液、滑液、乳汁、唾液、玻璃体、眼房水、粘液以及精液，或者细胞溶解产物，或者另

一形式的样品。

在各种实施方案中，包括第一结合配偶体为蛋白质的实施方案，第二结合配偶体都可以是蛋白质。作为选择，第二结合配偶体可以存在于组合库中的化合物，其中第二结合配偶体与第一结合配偶体的结合通过将第一结合配偶体与化学合成组合库的等分试样 (aliquot) 接触来实现。在其它替换方案中，第二结合配偶体可以是生物表达 (biologically displayed) 组合库的某一成分，例如噬菌体表达库。

在某些典型实施方案中，碎裂通过将第二结合配偶体与酶接触来实现；其中第二结合配偶体为蛋白质，酶通常为内蛋白酶 (endoprotease)，例如胰岛素、Glu - C (V8) 蛋白酶、内蛋白酶 Arg - C (丝氨酸蛋白酶)、Asn - N 蛋白酶，以及 Lys - C 蛋白酶。作为选择，碎裂可通过将所述第二结合配偶体与液相化学制品——例如 CNBr——接触来实现。

在一些实施方案中，该方法进一步包括：在第二结合配偶体与第一结合配偶体结合之后，在碎裂第二结合配偶体之前，使第二结合配偶体改变性质。

在各种实施方案中，该方法进一步包括如下步骤：在碎裂第二结合配偶体之后，用第一洗脱液清洗探针，有时用第二洗脱液，第二洗脱液与第一洗脱液至少有一个洗脱特性不同，例如 pH、离子强度、去污强度，以及疏水性。

在典型实施方案中，该方法进一步包括：在碎裂第二结合配偶体之后，探测第二结合配偶体的碎片之前，对探针施用能量吸收分子。在具体实施方案中，探针随后被啮合在本发明的分析仪器的亲和捕获探针接口中，利用仪器的激光源将第二结合配偶体的碎片电离并从探针上解吸。

在本方法中，该仪器可以用来进行若干类有用的测量，包括所有离子质量的测量、部分碎片质量的测量，以及单离子监控测量。

有用地，该方法的实施方案包括：在第二结合配偶体的碎片的质谱测量之后，将碎片测量结果与将碎裂酶的分解规则用到第二结合配

偶体的初始氨基酸序列上所预测的结果相比较，从而，这样的比较表征了分子间作用。

如果第二结合配偶体的身份未知，则该方法可进一步包括：在比较之前，通过 ms/ms 分析鉴定第二结合配偶体。这样的 MS/MS 分析可包括如下步骤：用质谱选择第二结合配偶体的第一碎片；在气相中分离第二结合配偶体的第一碎片；测量第二结合配偶体第一碎片的碎片谱，然后将该碎片谱与预先添加在数据库中的氨基酸序列数据所预测的碎片谱相比较。氨基酸序列数据可以是经验和预测数据之一，而在典型实施方案中，分离为碰撞诱导分离。

在该方法的一些实施方案中，第一结合配偶体选自下列：抗体、T 细胞受体，以及 MHC 分子。在其它实施方案中，第一结合配偶体选自下列：受体激动剂、受体部分激动剂、所述受体的拮抗剂，以及所述受体的部分拮抗剂。在其它实施方案中，第一结合配偶体为糖蛋白受体而第二结合配偶体为外源凝集素。

在第四方面中，本发明给出探测分析物的方法，该方法包括：将亲和捕获探针啮合在本发明的分析仪器的亲和捕获探针接口中，亲和捕获探针上结合了分析物；利用仪器的激光源解吸并电离来自探针的分析物或其碎片；然后通过用串联质谱仪测量解吸离子来探测分析物。

在这一方面，该方法可进一步包括：在解吸和电离步骤之后，探测之前，进行所述解吸离子的碰撞诱导分离。在这样的分离之前，在一些实施方案中，可选择一部分离子用于碰撞分离。

在其它实施方案中，可在此之前进行将分析物吸取到探针上的步骤，而在又一些另外的实施方案中，在吸取分析物之后，将所述探针啮合到所述探针接口中之前，用能量吸收分子接触探针和分析物。

附图说明

在下面的详细描述和附图中将阐明本发明上述和其它目的与优点，在附图中，相似的符号表示相似的部分，其中：

图 1 粗略示出本发明分析仪器的一个实施方案；

图 2 更详细地示出具体用于本发明分析仪器中的正交 QqTOF 串联质谱仪的零件;

图 3 显示一个 BPH 和前列腺癌患者的精液蛋白质剖析图;

图 4 示出在图 3 中可探测的上调节蛋白质中某个的针上分离结果;

图 5 示出利用胰岛素对富集生物标记候选进行在位消化之后由 MS 分析的单相所探测到的肽;

图 6 示出本发明分析设备上同样的纯化蛋白质肽的 LDI Qq-TOF MS 分析; 以及

图 7 示出浓缩标记候选的选定的二价离子由本发明的分析设备所得的 MS/MS 结果。

具体实施方式

I. 定义

在此处, 以下面特性提出的术语具有如下定义。如果没有另外定义, 那么此处所用的所有术语具有本发明所属领域的熟练技术人员所通常理解的含义。

“分析物”指要探测的样品的任何成分。该术语可指样品中单个成分或许多成分。

“探针”指一种设备, 当与激光解吸电离源以可查询关系啮合, 并同时在大气压或次大气压下与气相离子谱仪相联时, 它可用于将来自分析物的离子引入质谱仪。此处, “探针”通常都可由探针接口可逆啮合。

“亲和捕获探针”指一种探针, 通过足够使探针从非同质混合物中萃取并浓缩分析物的相互作用来结合分析物。浓缩为纯净物并无必要。结合作用通常以探针吸取表面对分析物的吸取来进行。术语 ProteinChip® Array 指可从 Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, California 购买的亲和捕获探针, 用于本发明中。

“吸取”指分析物在吸取剂上可探测的非共价结合。

“吸取剂”指任何能够吸取分析物的材料。术语“吸取剂”用于此处指单种材料（“单吸取剂”）（例如化合物或功能基）和许多不同材料（“复合吸取剂”）。复合吸取剂中的吸取剂材料称作“吸取物质（adsorbent species）”。例如，探针衬底上的激光定位吸取表面可包括特征在于许多不同吸取物质（例如，阴离子交换材料、金属螯合剂或抗体）具有不同结合特性的复合吸取剂。

“吸取表面”指具有吸取剂的表面。

“色谱吸取表面”指具有能够色谱鉴别分析物或分离分析物的吸取剂的表面。这样该短语包括具有阴离子交换组成部分（moieties）、阳离子交换组成部分、反相组成部分、金属亲和捕获组成部分，以及混合模式吸取剂的表面，就像在色谱技术中这些术语所被理解的那样。

“生物分子亲和表面”指这样一种表面，它具有包括能够进行特异结合的生物分子的吸取剂。

“特异结合”指同时出现在异质（非同质）样品中的两类分子的互相键合优先于和样品中其它类分子键合的能力。通常，特异结合作用以至少两倍——更通常地，大于10至100倍——鉴别反应中偶然的结合作用。当用于探测分析物时，特异结合足以进行鉴别何时异质（非同质）样品中的分析物出现的决定性。通常，特异结合反应的亲和或亲和力为至少大约 10^{-7} M，具有更大特定性的特异结合反应通常具有至少 10^{-8} M到至少 10^{-9} M的亲和或亲和力。

“能量吸收分子”以及等效缩写“EAM”指附着到探针上时，能从激光解吸电离源吸收能量，并用于与其相接触的分析物的解吸和电离的分子。该短语包括在 U.S Patent Nos. 5,719,060, 5,894,063, 6,020,208 以及 6,027,943 中所称的所有分子，这些专利的公开在此处全部引作参考。该短语明确地包括肉桂酸衍生物、sinapinic 酸（“SPA”）、氰羟肉桂酸（cyano hydroxyl cinnamic acid）（“CHCA”）以及二羟基苯甲酸（dihydroxybenzoic acid）。

“串联质谱仪”指任何能够执行离子混合物中离子的基于两次

级 m/z 的鉴别的气相离子谱仪。该短语包括具有两个质量分析仪的谱仪，以及那些具有单个质量分析仪、能够在质量分析之前进行离子的选择采集和保留的谱仪。这样该短语明确地包括 QqTOF 质谱仪、离子阱质谱仪、离子阱 TOF 质谱仪、TOF-TOF 质谱仪，以及傅立叶变换离子回旋共振质谱仪。

“洗脱液”指用于影响或改变吸取表面的吸取剂对分析物的吸取的制剂，通常为溶液。洗脱液在这里也指“选择阈值调节剂”。

“洗脱特性”指洗脱液的对其影响或改变吸取表面的吸取剂对分析物的吸取的能力有贡献的物理或化学特性。当两种洗脱液与分析物和吸取剂接触时，如果对吸取剂来说分析物的亲和度不同，那么就说明这两种洗脱液具有不同的洗脱特性。洗脱特性包括，例如，pH、离子强度、无序度、去污强度，以及温度。

“生物样品”指来自能够复制的有机体上至少一部分的样品。在此处，生物样品可来自任何已知的分类领域，包括病毒、原核生物、单细胞真核生物以及多细胞真核生物。生物样品可来自整个有机体或其一部分，包括其人工培养的部分。生物样品可以是任何合乎情况的物理形式，包括均匀混合物、亚细胞片断、溶解产物以及流体。

“生物分子”指可以在生物样品中找到，但并不一定必须来自生物样品的分子。

“有机生物分子”指可以在生物样品中找到，但不一定必须来自生物样品的有机分子，例如类固醇、氨基酸、核苷酸、糖、多肽、多核苷酸、合成碳水化合物以及脂类。

“小型有机分子”指尺寸可与医药品中常用的有机分子相比的有机分子。该术语不包括有机生物高分子聚合物（例如蛋白质、核酸等）。这里所用的小型有机分子在尺寸上通常不超过大约 5000 Da、不超过大约 2500 Da、不超过大约 2000 Da，或不超过大约 1000 Da。

“生物高分子聚合物”指可以在生物样品中找到，但不一定必须来自生物样品的聚合物，例如多肽、多核苷酸、多糖以及聚甘油脂（例如，甘油二酸脂或甘油三酸脂）。

“碎片”脂分析物的化学产物、酶促产物或物理分解产物。碎片可以是中性状态或离子状态。

术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”用于此处可互相替换，指包含氨基酸单体（残基）的可自然获得的或人工合成的聚合物，其中这里的氨基酸单体包括可自然获得的氨基酸、可自然获得的氨基酸结构变体，以及能够参与肽键的人工合成相似物（analog）。可通过，例如加入碳水化合物残基，改变多肽以形成糖蛋白质。术语“多肽”、“肽”以及“蛋白质”包括糖蛋白质以及非糖蛋白质。

“多核苷酸”和“核酸”等价，指可自然获得的或人工合成的包含核苷酸单体（基）。多核苷酸包括可自然获得的核酸，例如脱氧核糖核酸（“DNA”）和核糖核酸（“RNA”），以及核酸相似物。核酸相似物包括那些包括非自然获得的碱基的，还包括那些核苷酸单体不是通过可自然获得的磷酸二酯酶键相连的。核苷酸相似物包括，举例来说但不局限于此，phosphorothioate、phosphotriester、磷酰胺化物（phosphoramidate）、硼烷磷酸盐（boranophosphate）、甲基磷酸盐（methylphosphonate）、手性甲基磷酸盐（chiral-methyl phosphonate）、2-O-甲基核糖核酸、肽-核酸（PNA），等等。

在此处，“分子结合配偶体”——以及等价的“特异结合配偶体”——指显示出特异结合的分子对，通常为有机分子对。非局限实施例有受体和配体、抗体和抗原、生物素和抗生物素蛋白，以及生物素和抗生物素蛋白链菌素。

“受体”指可以在生物样品中找到，但并不一定必须来自生物样品，并且能参与和配体的特异结合分子，通常为大分子。该术语进一步包括保留与特定配体结合能力的碎片和衍生物。

“配体”指任何能参与和指定的受体和抗体的特异结合的化合物。

“抗体”指基本上由至少一种免疫球蛋白基因或至少一种免疫球蛋白基因的碎片编码、能参与和配体的特异结合的多肽。该术语包括可自然获得的形式，以及碎片和衍生物。此处所用的该术语范围内

的碎片包括那些用各种肽酶——例如 Fab、Fab' 以及 F(ab)'₂ 碎片——消化的、那些由化学分离、化学分解以及重组产生的，只要这些碎片保留了与目标分子进行特异结合的能力。通过，例如噬菌体表达，产生的典型重组碎片包括单链 Fab 和 scFv（“单链可变区”）碎片。该术语领域中的衍生物包括按序重组但保留了与靶分子进行特异结合能力的抗体（或其碎片），包括种间嵌合抗体以及人源抗体。由于此处，抗体可使用任何已知技术来产生，包括来自天然 B 淋巴细胞培养的收获物、杂种细胞、重组表达系统、噬菌体表达，等等。

“抗原”指可被抗体结合的配体。抗原无需是可产生免疫性的。抗原上与抗体接触的部分称为“抗原决定簇”。

“流量”指受查询图像单位面积通过的能量。

II. 亲和捕获探针串联质谱仪

在第一方面，本发明给出一种分析仪器，结合了亲和捕获激光解吸电离样品导引的优点和高精度、高质量分辨率的串联质谱仪的优点。这一组合给出显著优于现有进行已知技术的设备的优点。此外，新设备使发现蛋白质的新方法成为可能，还使鉴定和表征特异结合配偶体之间分子作用的比现有方法更块更有效且更灵敏的新方法。下面将首先简略地整体描述该仪器，然后，将更详细地描述亲和捕获探针接口的特点。

简要地，参看图 1，仪器 100 包括激光解吸/电离源 13；亲和捕获探针接口 10，以及串联质谱仪 14。图 1 中所示的为具体实施方案，其中激光源 12 为脉冲氦气激光器，而串联质谱仪 14 是正交四极飞行时间质谱仪（QqTOF）串联 MS。

激光解吸/电离源

激光解吸/电离源 13 产生激发光子，经过适当调节和对准，这些光子解吸并电离粘附在亲和捕获探针 16 上的蛋白质和其它分析物。激

光解吸/电离源 13 包括激光源 12、激光光学系统 11，以及可选的探针观察光学系统 18。

激光解吸/电离源 13 通过使用脉冲激光器 12，或者——作为选择——通过利用机械或电子斩波来自连续激光器 12 的光束来产生脉冲激光能量。通常，优选脉冲激光器。具体的脉冲激光源包括：氦气激光器、Nd:YAG 激光器、掺铒 YAG 激光器，以及 CO² 激光器。本发明具体所用的为氦气激光器，因其简单的覆盖区和相对较低的成本。

从激光器 12 发射的光子被激光光学系统 11 引导撞击探针 16 的表面。光学系统 11 可由透镜、反射镜、棱镜、衰减器，和/或分束器排列组成，分束器用于收集、引导、聚焦、细分并控制每个激光脉冲的强度，从而将解吸能量的聚焦斑点形式的适当解吸流量传给探针 16。

作为选择，光学系统 11 也可由用于收集、引导并细分每个激光脉冲的能量的光纤光学系统阵组成。

在本实施方案中，利用光学耦合器将激光器 12 的输出耦合进光纤的输入侧；耦合器通常由焦距和直径适合于光纤的输入数值孔径的透镜组成。

进入光纤的能量总量可通过谨慎调节透镜相对于光纤的位置来控制；在这种情况下，光纤光学耦合器可兼作光学衰减器。在另一具体排列中，激光器的所有输出能量都耦合进光纤中，在光纤的输出侧和光学系统的解吸点聚焦元件之间放置一个衰减器。在又一具体排列中，在激光器和光纤耦合器之间放置一个光学衰减器。在所有情况中，都使用光学衰减来保证向探针 16 的表面传送合适的激光流量，而不依赖于激光器 12 的输出能量。典型的激光流量为 20 - 1000 微焦/平方毫米量级。

众所周知，当接收来自激光的聚焦能量时，光纤光学元件常会受到损伤，因此，使光纤输入侧的接收面积最大化是有利的，这样，入射激光能量的流量就低于光纤的损伤阈值。后者在调节光学耦合器相对于激光器和光纤的相对位置时，还简化了激光束和光纤的对准。然而，为了在探针 16 上得到适当的解吸流量水平，当与最大输出能量大

约为 200 μJ /激光脉冲的氦气激光器一起使用时，输出侧光纤直径不应超过 400 μm （微米）。可以通过引入锥形光纤来解决这一问题，锥形光纤的输入侧直径为 400 至 1200 微米量级，而输出侧直径为 200 至 400 微米。

通常，解吸点应当聚焦至一个使每个脉冲查询探针 16 上最大的面积来产生最多的离子同时保持足够的流量来诱导解吸和电离的尺寸。当在与四极-四极飞行时间串联质谱仪耦合的激光解吸/电离源中使用最大输出能量大约为 200 μJ /脉冲的典型氦气激光器时，已确定优化激光点的面积在 0.4 至 0.2 平方毫米之间。

激光解吸/电离源 13 可包括——通常作为光学系统 11 的一个组成部分——探针观察光学系统 18。观察光学系统 18 可含有照明源、透镜、反射镜、棱镜、分色镜、带通滤波器以及 CCD 相机，对解吸位置——即探针 16 上要被激光查询的区域——进行照明和观察。

虽然激光光学系统 11 包括光纤，观察光学系统 18 可利用来自它自己的光纤的光。

例如，光纤光学耦合器可分叉以将激光激发能量分出一小部分用于监视施用的激光能量，或者也可以分叉以引入可见光来照亮解吸位置。

在这两个实施方案中的第一个中，激发能量的一小部分被引导照射一个光探测器，这个探测器是激光能量电路的组成部分，激光能量电路被校准以反映送至探针 16 的真实的总激光能量。在第二实施方案中，通过与 CCD 相机耦合的一套独立的照相系统，或在光纤和激光激发源之间使用将光从光纤的主枝反射至 CCD 相机上的棱镜或分色镜，引入可见光来照亮解吸位置，使得对这一区域的观察成为可能。作为选择，可在光纤的照明枝和照明源之间排列一个棱镜或分色镜以使任何耦合进这一枝的背反射图像被引导照射 CCD 相机。在又一实施方案中，可将激光分叉，一枝传送解吸/电离激光脉冲，第二枝传送用于照亮解吸位置的可见光，而第三枝将来自解吸位置的反射光送至 CCD 相机。对于这些观察方案中的每一个，都应在 CCD 相机和观察光学系统

之间配置一个合适的带通滤波器，以防止可能具有破坏性的高能光子通过，高能光子可以是入射到探针表面上的激光脉冲的直接反射，也可以是受入射激光脉冲激发而从探针表面上发射的二次光子。

探针接口

亲和捕获探针接口 10 能够可逆啮合亲和捕获探针 16，将探针 16 定位在激光源 12 可访问的关系并与串联质谱仪 14 相连；该相连支持大气压至次大气压。

探针接口 10 包括探针固定器、探针引入口、探针定位传动组件、真空和充气组件，以及接口离子收集系统。

探针固定器为探针接口 10 的一个元件，其形状符合探针 16 的形状因数。探针 16 为 ProteinChip® Array (Ciphergen Biosystem, Inc., Fremont, CA USA)，故探针固定器符合 ProteinChip® Array 的形状因数。

探针固定器可支持单个探针 16 或许多探针 16。固定器定位每个探针 16 使其相对于接口离子收集系统朝向适当的方位，以便被激光解吸/电离源 13 访问。

探针固定器与定位传动组件紧密接触。

传动组件相对于激光解吸/电离源 13 和接口离子收集系统移动探针 16 的相对位置，从而探针的不同位置都可被访问，照射产生的离子被收集以导入串联质谱仪 14。

传动器由电机械设备组成，电机械设备支持探针 16 的平移和旋转移动同时保持探针相对于激光解吸/电离源和离子收集系统的位置不变。这样的电机械设备包括——但不局限于——机械或光学位置传感器、螺线管、步进电机、直接或间接与直线运动传动器相连的 DC 或 AC 同步电机、直线或环形运动导轨、万向固定器、轴承或轴杆。

探针引入口使容纳了探针 16 的探针固定器置于探针位置传动组件上，而不会使过量大气压气体进入探针接口 10 和串联质谱仪 14。

为了实现后者，探针引入口使用抽真空系统（探针引入口抽空系

统)来泵出大气压气体,在将芯片移入工作位置之前获得目标入口压力。在探针交换期间,探针传动组件将探针从工作位置(与激光解吸源 13 和离子收集系统对准的位置)移到交换位置。在这么做时,传动器可将马上就要升至大气压的交换口和质谱仪入口之间密封。在密封质谱仪入口之后,由探针引入口加压系统将大气压气体通入探针引入口。这消除了探针固定器大气压表面和引入口之间的压力差,使探针固定器从探针位置传动组件中移出。

在移出已分析探针 16 并装入新探针 16 之后,探针固定器重新置入位置传动器中,并开始样品载入过程。正如前面所描述的,可利用抽空系统将探针引入口泵至次大气压。在获得靶样品引入压力之后,探针传动系统将探针 16 从交换位置移至工作位置,同时开启质谱仪入口的密封。

作为选择,如果离子产生于支持于大气压下的解吸室中,并最终被导向将离子引入质谱仪入口的离子光学组件,则无需抽空并加压探针引入口,因为它被保持在大气压下。

探针引入口抽空系统由以下几部分组成:真空泵、压力传感器、真空兼容管和连接配件,以及真空兼容阀,当它们协同运作时,这些真空兼容阀使得可以在样品交换之后,对引入口中所含的大气压气体进行受控抽空,从而探针 16 可移入工作位置。真空泵可以是一一但不局限于一一单级或多级油机械泵、涡轮泵,或无油膜片泵。在优选实施方案中,真空兼容阀为电控制螺管阀。在同一实施方案中,压力传感器为能够在大气压至 1 毫托范围内工作的电子传感器。这样的压力传感器包括一一但不局限于一一热电耦压力计和热压力计(pirani 计)。在同一实施方案中,在模拟逻辑电路或数字微处理器的逻辑控制下获得了这一系统的协同工作,模拟逻辑电路或数字微处理器协调来自压力计和位置传感器的输入以使样品进出口的自动抽空作为整个仪器操作的一部分。

探针引入口加压系统由以下几部分组成:气源、压力传感器、导气管和配件,以及气体兼容阀,当它们协同运作时,这些气体兼容阀

对加压交换口的气体进行受控引入，使探针固定器从传动组件移开。

在某一实施方案中，气源为未经处理的大气压气体。在另一实施方案中，气源为首先通过水分吸收剂阱（moisture absorbent trap）然后可选地在进入加压系统之前通过颗粒过滤器的大气压气体。在另一实施方案中，由干燥的不活泼的气体——例如氮气或任何节省成本的惰性气体——提供加压气体，来代替使用大气压气体。

在优选实施方案中，导气管、配件、一些阀门，以及加压系统的压力传感器是抽空系统中所用的那些。在同一实施方案中，在模拟逻辑电路或数字微处理器的逻辑控制下获得了这一系统的协同工作，模拟逻辑电路或数字微处理器协调来自压力计和位置传感器的输入以使样品进出口的自动抽空作为整个仪器操作的一部分。

探针接口压力调节系统用于提供解吸室中存在于探针的样品当前（吸取）表面和离子收集系统之间的选择背景气压。可以接受的解吸室压力范围在大气压至 0.1 微托之间。具体压力范围在 1 托至 1 毫托之间。探针接口压力调节系统由以下几部分组成：气源、导气管和配件、气流调节器，以及压力传感器。气源可以是未经处理的大气压气体。在另一实施方案中，气源为首先通过吸水剂阱然后可选地在进入加压系统之前通过颗粒过滤器的大气压气体。在另一实施方案中，由干燥的不活泼的气体——例如氮气或任何节省成本的惰性气体——纯化源来提供调节气体。气流调节器可以是手动控制的限流器。作为选择，可通过使用电子控制的限流器来进行气流调节。在具体实施方案中，在模拟逻辑电路或数字微处理器的逻辑控制下的自动方式中获得具体解吸室压力的闭环控制，模拟逻辑电路或数字微处理器主动与自动气流调节器作用以获得预建立的从压力计的读取。

接口离子收集系统由以下几部分组成：静电离子收集组件、可选的气动离子收集组件，以及静电或 RF 离子导管（ion guide）。静电离子收集组件由 DC 静电透镜元件的排列组成，DC 静电透镜元件用于收集在解吸室中解吸的离子并将它们导向质谱仪入口。

在某一实施方案中，该组件由两个静电元件组成。第一元件由探

针固定器和探针表面组成，而第二元件为引出器透镜。引出器透镜安排在离列阵表面 0.2 至 4 mm 远的地方。引出器透镜包含一个直径在 2 mm 至 20mm 之间的小孔，这个小孔的圆心位于从解吸位置中心向质谱仪入口中心延伸的垂直轴上。该组件的每个元件都被施以独立的 DC 电位。

在优选实施方案中，引出器透镜距离列阵表面 1 mm，包含一个直径 10 mm 的小孔。在同一实施方案中，在引出器和列阵之间建立了十伏的电位差。

气动离子收集组件由以下几部分组成：气源、导管、管道连接器、气流调节器、气压传感器，以及气体喷射口，从而可产生预定流量的气体来帮助解吸室中的解吸离子向质谱仪入口的批量转移。

气源可以是未经处理的大气压气体。在另一实施方案中，气源为首先通过吸水剂阱然后可选地在进入系统之前通过颗粒过滤器的大气压气体。在另一实施方案中，由干燥的不活泼的气体——例如氮气或任何节省成本的惰性气体——纯化源来提供离子收集气体。

气流调节器可以是手动控制的限流器。作为选择，可通过使用电子控制的限流器来进行气流调节。压力传感器可以是——但不局限于——热电耦压力计和热压力计。气体喷射口位于探针 16 后面，用于引导气体环绕探针并沿位于解吸位置中心和质谱仪入口中心的垂直轴向下运动。

在具体实施方案中，气流处在模拟或数字控制电路系统的自动闭环控制之下，从而产生了精确的离子扫出流，而不会使解吸室超压。

接口离子收集系统的最后一个元件为离子导管。离子导管用于将收集到的离子导入质谱仪 14。它可以是静电的或 RF 的。一个具体实施方案为多极 RF 离子导管。后者的一个实施例为四极或六极离子导管。在下面将更详细描述的具体 Qq - TOF 仪器中，离子导管为四极 RF 离子导管。通过分别由静电和气动离子收集系统产生的静电或气动加速力将离子导入离子导管。在具体实施方案中，离子导管的 DC 静电势通常比引出器透镜的 DC 静电势低 10 至 20 伏。

串联质谱仪

本发明的分析仪器进一步包括串联质谱仪 14。串联质谱仪 14 可用地选自下列：正交四极飞行时间 (Qq-TOF)、离子陷阱 (IT)、离子陷阱飞行时间 (IT-TOF)、飞行时间-飞行时间 (TOF-TOF)，以及离子回旋共振 (ICR)。

本发明所具体应用、并在下面进一步详细描述的是正交 Qq-TOF MS。

QqTOF 的主要长处在于显著的质量精度和分辨能力；对肽的高灵敏度和低的 mw 范围；以及使用低能碰撞诱导分离 (CID) 而带来的优良 ms/ms 性能。从 AB/MDS Sciex 可购买到带有电喷射电离源的正交 QqTOF (QSTAR™; AB/MDS-Sciex, Foster City, California, USA)。

参考图 2，将粗略勾勒出 QqTOF 的原理和特征。

离子在第一四极透镜 “q0” 之前的解吸室中产生。q0 中的压力通常保持在 0.01 至 1 托，但也可以保持在大气压。在该方式中，解吸离子在形成之后，通过与背景气体的碰撞而迅速冷却。

全体离子的冷却或衰减提供了三个主要优点。

第一，冷却消除了解吸离子的初始能量分布并将它们的总能量降低到接近其热能的一个点上。这简化了正交引出的要求，补偿了离子位置和能量的变化，从而提高了最后的分辨能力。分辨率提高的直接后果就是将质量精度提高到了低 ppm 水平。

碰撞冷却的第二个主要优点在于其降低长期离子衰变速率的能力。气体碰撞释放了内部激发并提高了肽和蛋白质离子的稳定性。当在 1 托压力的背景气体中产生离子时，稳定作用最大。其他人发表的测量指出，可实际消除小原子团的丢失和背景碎片，提高了高 mw 蛋白质和其它不稳定生物高分子聚合物（即，糖苷化合物、DNA，等）的传输。更快的衰变机制（即时和源内型衰变（prompt and in-source type decay））依然会发生。

q0 碰撞冷却的最后一个优点在于进入质量分析仪的伪连续离子流的产生。q0 中的离子碰撞导致解吸云沿 q0 的轴铺开。扩展产生了这样一种情况，其中来自不同解吸事件的离子开始交迭，产生了离子进入分析仪的电喷射类连续引入。

在穿过 q0 之后，离子进入第二个四极 22 (“Q1”)。该四极用作离子导管或质量过滤器。在这里，为 ms/ms 或单离子监控 (SIM) 实验建立离子选择。

在离开 Q1 之后，离子进入位于碰撞室 26 中的第三个四极 24 (“q2”)。在简单实验期间，q2 作为简单 rf 离子导管而工作。对于 ms/ms 实验，q2 充满压力大约为 10^{-2} 托的碰撞气体以促进低能 CID。

在离开 q2 之后，离子被 q2 出口和聚焦栅 28 之间的 DC 电位差稍稍加速。这一加速使离子的速度在 Y 轴上偏离了，从而它们的速度现在反比于其 m/z 的平方根。如果所有不同 m/z 的离子要在正交引出和自由飞行之后撞击探测器的话，就必须实现这一偏离。如果这样的偏离没有实现，那么不同 m/z 的离子将以相同的 Y 轴速度进入四极引出区。

由于总是在飞行时间中，较小 m/z 的离子将在较大 m/z 的离子之前撞击探测器。Y 轴的绝对位移量将是离子在 Z 轴的飞行时间于离子的 Y 轴速度的乘积。如果探测器处在对于中等 m/z 离子优化的位置，那么较轻的离子将“下冲”探测器，到达图 2 中探测器的右侧。反过来，较大 m/z 的离子将“过冲”探测器，到达图 2 中探测器的左侧。因此，如果所有离子都要撞击同一探测点，那么必须使所有离子都保持 Z 和 Y 轴速度的比值为常数。前面描述的加栅偏压的方法实现了这一要求。

在通过聚焦栅 28 之后，离子到达四极引出元件的调制器区 30。调制器 30 以接近 10000 脉冲/秒 (10 kHz) 的速率产生脉冲。离子被推进离子光学系统的加速器列 32，并出来进入四极飞行时间 (O-TOF) 的自由飞行区 34。当离子进入离子反射镜 36 时获得了能量修正。在反射镜中，离子转向并被引导撞击快速响应的 V 形排列微沟平

板探测器 38.

作为替代, 可使用原型排列。

例如, 上面给出的几何结构在高加速能量下进行 O - TOF 存在困难。人们已经广为接受, 随着总离子能量的增加, 肽和蛋白质的离子探测灵敏度提高了。对于人胰岛素 (MW = 5807.65 Da), 当使用典型的微沟平板探测器时, 在 35 keV 的离子能量下, 获得了接近 100% 的探测效率。如果离子要被加速至 20 或 30 keV 的能量, 那么自由飞行管衬套 (free flight tube liner) 40 和其它相应的元件必须被加以 -20 kV 或 -30 kV。众所周知, 在这样的电位下在简单离子光源元件上给出稳定的电隔离是很困难的。要安全可靠地使许多元件处在这样的电位下是很困难的。一种解决方法就是使用后加速技术。

与上述设备不同, 这样的提到设备使用探测器后加速器 (未示出)。离子在离开正交引出元件之后, 被加速至大约 4 keV 的能量, 自由飞行区被加以 -4 kV 的电压。离子进入后加速器探测器组件之后获得进一步的加速。在该组件中, 离子穿过保持衬套电位的保场 (field-retaining) 栅极。然后离子在保场栅极和探测器的一次离子转换表面之间所建立的电场中得到额外的加速度。这样的加速场大约为 4 至 10 nm 距离内 10 至 20 kV 的量级。

因为正交设计使飞行时间测量和离子形成脱钩, 所以实现了许多优点。

因为解吸柱 (desorption plume) 的离子在正交引出并加速进入 TOF 质量分析仪之前可以有一段时间 (通常为几个毫秒) 来扩展和冷却, 因而消除了与激光流量相关的问题, 例如由于离子屏蔽和离子加速场衰减 (collapse) 而造成的波峰展宽。另外, 正交引出消除了在高激光能量的传统引出谱 (extraction spectra) 起始时, 由于 EAM 的过量中性负荷产生的化学噪声而造成的反常的大的凸起和基线。由于中性粒子在调制器区中不引出, 只有离子向下传送至探测器, 大大减少了化学噪声。

这些因素使得可以使用比并联连续或延迟离子引出方法中所用

的大 2-3 倍的激光流量。最终结果就是，几乎完全消除了搜寻和查找“最有效点 (sweet spot)”的需要，即使在差的样品——EAM 均匀性——情况下也是如此，同时还提高了外标准质量精度的确定（典型的误差为 20-50 ppm），提高了定量重复性，并提高了信噪比。另一个好处是无需进行低和高激光能量扫描来分析一个宽 m/z 范围的离子。现在可使用单激光能量来观察高和低 m/z 离子，极大地简化了未知混合物的分析。

在与传统的并行引出方法相比，也许该设备最令人印象深刻的优点之一在于其无需严格定位样品的能力。因为，实际上从离子形成过程中去掉了 TOF 测量，离子的初始位置不再重要。而且，由于离子形成在没有高电压引出场的高气压环境中完成，故而大大地减小了固态样品入口系统的设计要求。可采用简单的方法来使用 2 维样品控制器，同时保持优良的外标准质量精度性能。另外，样品承载表面再也无需金属或其它导电介质来制作。

总的说来，激光解吸电离 (LDI) Qq-TOF MS 相对于现有 LDI-TOF MS 技术来说具有下列优点：（1）增大了外标准质量精度（典型的 20-50 ppm）；（2）增强了分辨率；（3）改进了 m/z 效率；（4）使用单个高激光能量水平改进了信号产生的简易性，无需高和低能扫描；（5）通过使用 TDC 技术和在最小解吸阈值之上 2-4 倍的激光流量，提高了定量能力；（6）降低了对 2 维样品传动器的需要；（7）使用塑料元件作为样品承载探针表面（例如，注模成型的二维探针阵列）的潜力；（8）通过使用单离子监控降低了化学噪声，提高了测量在 EAM 化学噪声领域中的离子的能力。

激光解吸电离 (LDI) Qq-TOF MS 相对于现有 MALDI-PSD 方法来说，在蛋白质表征和鉴定方面具有如下优点。

LDI-QqTOF 提供了更高的质量分辨能力和质量精度；在数据库采掘方法中，这一增强的能力减少了错误阳性数据库命中 (positive database hits) 的数量，简化了鉴定。而且，QqTOF 还提供了比 PSD MS/MS 大了不止一个数量级的灵敏度。

本发明的分析仪器展示了令人印象深刻的 MS/MS 能力以及对于单 MS 分析小于 20 ppm 的质量分配误差。后者使得可以同时鉴定许多保留在单个亲和捕获探针表面上的蛋白质。

其它元件

亲和捕获探针串联 MS 仪器 100 通常还包括与串联质谱仪探测器相连的数字计算机。数字计算机通常还与激光解吸源 12 相连，使其能够控制离子发生，还能参与数据采集和分析。

分析软件可安装在计算机上或不在计算机上但是计算机可以使用。例如，计算机可与因特网相连使其可以使用像 Protein Prospector、PROWL 或 Mascot Search Engine 这样的分析程序包，它们都可从万维网上获得。分析软件也可存在于 LAN 或 WAN 服务器上。

亲和捕获探针

为了进行像以下部分中详细描述的那些分析，至少要在探针接口 10 中啮合一个具有吸附了的分析物的亲和捕获探针 16，它处在可被激光解吸/电离源 13 查询的位置上，将解吸离子送入串联质谱仪 14。

探针 16 通常具有一个或多个吸取表面 18，不同表面之间可互不相同（18a、18b、18c、18d）。通常，如果有许多吸取表面 18，那么它们全部暴露在探针 16 的一个公共面上。

吸取表面 18 通常为色谱吸取表面或生物分子亲和表面。

色谱亲和表面具有在分析物中进行色谱鉴别或分离分析物的吸附能力。因此这样的表面可包括：阴离子交换组成部分、阳离子交换组成部分、反相组成部分、金属亲和捕获组成部分，以及混合模式的吸取剂，就像色谱技术中所理解的术语那样。生物分子亲和表面具有包括能够进行特异结合的生物分子的吸取剂。因此这样的表面可包括：抗体、受体、核酸、外源凝集素、酶、生物素、抗生物素蛋白、抗生蛋白链菌素、Staph 蛋白质 A 和 Staph 蛋白质 G。吸取剂表面将在下面的部分中进行进一步的描述。

接口 10 使探针 16 处于激光解吸/电离源 13 可查询的关系。通常，需要激光查询探针吸取表面 18。因此，接口 10 使探针 16 的吸取表面 18 处于激光解吸/电离源 13 可查询的关系。如果吸取表面 18 只在探针 16 的一个面上，那么探针 16 和/或接口 10 的探针固定器可以做成不对称的，这样承担了将探针 16 沿将吸取表面 18 朝向激光解吸源 13 的方向的插入。

如果探针 16 具有许多吸取表面 18，那么就要求激光源 12 能够分立地寻址每个吸取表面 18。这可以通过在激光源 12 和接口 10 之间放置光学系统并使激光源 12 和/或接口 10 可动——或者其组合——来实现。

探针 16 可以是用于单个 MS 分析中的那种亲和捕获探针（例如，可从 CIPHERGEN Biosystems, Inc., Fremont, CA USA 购买的那些）。

III. 亲和探针串联 MS 仪器的应用

本发明的上述分析仪器在下列方面提供了意义重大的优点，并给出了新颖的方法：（1）蛋白质发现和鉴定，以及（2）特异结合对之间相互作用的表征，现在将依次对其进行描述。

一般而言，上述分析仪器的优点包括：在与亲和捕获探针技术——尤其是与特定受体结合系统——结合的单个质量 MS 和串联 MS 模式中进行高质量精度测量的能力。

A. 蛋白质发现和鉴定

1. 本发明的方法的优点

蛋白质生物学家企图解决的一组相关问题是蛋白质发现、鉴定和测定开发（assay development）。蛋白质发现是在一个系统中寻找具有生物学意义的蛋白质的过程，因为，例如，它们用作诊断标记或执行关键的细胞功能。蛋白质鉴定是确定已发现的蛋白质的身份的过程。测定是进行可靠的测定来探测蛋白质的过程。本发明的方法为专业人员提供了进行这些过程时相较于早先技术来说的优点。

本发明的主要优点在于它给出了一个单个平台，在其上可进行从蛋白质发现到蛋白质鉴定到测定开发的步骤。基于 SELDI 技术的单个平台的给出大大地减少了发现和测定确认之间的时间：使用早先技术需要数月时间的过程现在可在几周或几天内完成。本发明的方法还大大地降低了进行实验所需的样品总量。早先技术需要微摩尔的分析物，而本方法可用皮摩尔的分析物进行同样的实验。这克服了缺乏样品或增大样品比较困难时的一个显著的障碍。

以前，蛋白质发现和分离是通过使用 2D 凝胶或 Western Blots 来完成的。然而，将凝胶互相比以探测不同表达的蛋白质是个困难的过程。

已发现的蛋白质现在可使用质谱分析方法来进行鉴定。重要的蛋白质可被分离并在凝胶中最终用蛋白酶使其变成碎片，可用质谱仪和合适的生物信息学方法分析肽碎片。然而，凝胶与本质谱分析方法并不兼容，肽碎片必须从凝胶中分离出来。因为后一过程必然导致样品丢失，所以该方法需要大量起始蛋白质和材料。当蛋白质很稀少时——重要的蛋白质可能会这样——这增加了该过程的难度。

一旦被鉴定了，研究人员需要进行可靠的测定来探测蛋白质。通常，这包括进行 ELISA 测定。反过来，该技术需要抗体的产生。这会是一个费时的的工作，尤其是如果我们感兴趣的蛋白质难以大量制造来免疫的话更是如此。

这样，先前的技术会需要三种不同的技术来完成蛋白质发现、蛋白质鉴定和蛋白质测定。本发明的方法可用一种技术来完成这些。

2. 蛋白质发现、鉴定和测定开发的方法

本发明用于蛋白质发现、鉴定和测定开发的方法包括：准备差别图（difference map）来发现感兴趣的一个或多个蛋白质，用亲和捕获探针串联 MS 鉴定蛋白质，利用亲和捕获探针激光解吸电离色谱表面测定或亲和捕获探针激光解吸电离生物特异表面分析来进行确认。

这一过程可如下进行。通过，例如，使用滞留物研究的差异定位（difference mapping）给出或发现感兴趣的蛋白质。这些方法在，例

如, WO 98/59362 (Hutchens 和 Yip) 中进行了描述。简单地说, 用滞留物色谱方法检验在某些重要方面有所不同(例如, 正常的 v. 患病的; 功能的 v. 非功能的) 的两个样品。这些方法包括将样品置于许多不同色谱亲和与洗涤条件下, 然后用亲和捕获探针激光解吸电离来进行“残留蛋白质”的检验。在两样品之间不同表达的蛋白质作为进一步检验的候选者。因为它们在质谱仪上进行检验, 所以知道了这些候选蛋白质的分子量。

一般地, 除了感兴趣的蛋白质之外, 还有其它蛋白质的记录被保留在芯片上。因此, 下一可选步骤就是改进亲和与洗涤条件, 在改进的条件下, 保留了感兴趣的一个或多个蛋白质, 从而为进一步的分析简化了样品。(这些在 Hutchens 和 Yip 申请中也进行了描述。) 虽然捕获单个感兴趣的蛋白质是理想的, 但是捕获不超过大约十个可探测的蛋白质也是可以的。改进的方法为感兴趣的蛋白质提供了改良的色谱测定。

然后, 在探针上利用特别的蛋白水解剂将残留蛋白质碎裂, 产生用于后续研究的肽池。用像胰岛素这样的特异内蛋白酶来进行消化是有利的, 因为裂解模式是已知的而且与包括存于数据库中的蛋白质的硅上 (in silico) 解离的生物信息学方法兼容。然后用高分辨率、高精度的 MS-MS (例如, 质量分配误差小于每百万 20 份 (part), 并且分辨能力大约为 10000) 来分析得到的肽。此时, 还不清楚特异肽碎片是否就是感兴趣的蛋白质的分解产物, 还是其它残留蛋白质中某个的分解产物。尽管如此, 通过选择肽碎片中的一块(也许随机地, 也许基于其相应于感兴趣的蛋白质的信息) 并将其进行气相碎裂, 分析继续进行下去。一种这样的方法是碰撞诱导分离 (CID)。肽无需从芯片上分离下来, 因为 MS-MS 设备在质谱仪中将感兴趣的肽从其它肽中分离出来。这将生成选定肽碎片的进一步的碎裂模式。

利用技术中已有的方法——例如数据库采掘协议, 使用来自碎裂模式的信息来查询蛋白质数据库以生成一个或多个假定的蛋白质身分候选者, 肽碎片就来自于该蛋白质。该协议通常进行测量蛋白质的预

测质谱与选定碎片的实际质谱有多匹配的拟合严密度分析。然后可将数据库中的蛋白质根据蛋白质碎片相应于数据库蛋白质的可信度测量进行分级。母体蛋白质和原始种类的质量知识——它们都是已知的——将有助于限制所产生的鉴定候选的数量。

然后，核实生成肽碎片的蛋白质的假定身份。利用来自假定身份候选的主序列的数据库的知识和所用的蛋白水解剂的解离模式，可以预测身份候选被蛋白水解剂解离所应产生的肽碎片以及，特别地，它们的分子量。然后将这组预测的碎片与残留在芯片上的蛋白质水解分解之后生成的一组实际的碎片根据它们的质量进行比较。如果解释了预测碎片，那么就可确定假定身份候选确实相应于残留在芯片上的某蛋白质之一的鉴定。如果没有，那么就必须通过一系列排除来测试其它假定身份候选，直到鉴定了生成碎片的蛋白质。在此处，生成的相应于已鉴定蛋白质的碎片可作为已解释的碎片从所有碎片中去掉。

如果在改进亲和与洗涤条件之后只有一种蛋白质残留，那么将解释所有肽碎片，程序结束。然而，如果残留的蛋白质超过一种，那么情况将更复杂。例如，分析中所用的碎片可来自感兴趣的蛋白质，也可以来自残留在芯片上但并非感兴趣的蛋白质。在此情形中，用上述MS-MS方法重复分析未解释的肽碎片的步骤直到鉴定了感兴趣的蛋白质或所有残留蛋白质都被鉴定了将是很有用的。

最后，感兴趣的蛋白质可由亲和捕获探针激光解吸电离方法进行测定，该方法使用本身已可保留蛋白质的色谱表面或可发展来用于亲和捕获探针激光解吸电离测定的生物特异表面。生物特异表面的形成包括：对已鉴定蛋白质——例如抗体或如果受体已知的话则为受体——给出结合配偶体，使其附在芯片表面。然后，可如上所述那样用SELDI测定感兴趣的蛋白质。

B. 分子相互作用的表征

本发明的分析仪器使特异结合配偶体之间的相互作用研究的灵敏、高效、单平台方法第一次成为可能。

特异结合配偶体相互作用处于生物过程的宽谱的核心。因此，测量并表征这种相互作用的能力是完全了解这种过程所必须先决条件；在临床水平上，测量并表征这种相互作用的能力对于了解那些过程中的病态畸变是很重要的，对于可用于调节甚至消除这种相互作用的试剂的合理设计也是很重要的。

例如，在有机物的真核组织水平上，哺乳动物神经系统系统中的细胞间信号传递以神经递质和它们的同源受体之间的相互作用为媒介。对于这种信号传递机制的完整理解来说，理解这种结合相互作用的分子特性是必须的。在临床水平上，对于信号传递反常的机制的完整理解来说需要理解这种结合相互作用的分子特性，对于合理设计可减轻这种信号传递反常的药剂以及可用于从 Parkinson 氏综合症到精神分裂症、从强迫症到癫痫症的各种疾病的治疗的药剂来说也需要理解这种结合相互作用的分子特性。

例如，在循环水平（circulatory level）上，需要 B 细胞受体和循环抗原之间的相互作用来触发 B 细胞克隆扩增、分化以及抗原-特异体液免疫反应。对于免疫反应性的完整理解来说，理解对抗原识别有贡献的抗原决定簇是很关键的。在临床水平上，这种理解对于设计能使体液免疫更强的疫苗来说是很重要的。类似地，T 细胞受体与跟 MHC 一起显示在抗原表达细胞上的肽之间的相互作用对于细胞免疫的触发是很关键的。对于设计能使细胞免疫更强的疫苗来说，理解对抗原识别有贡献的 T 细胞决定簇是很重要的。

在个体细胞的水平上，对细胞外信号的表型响应以至少一个——最常见的是一串——细胞间相互作用——从细胞表面受体和配体之间的初始相互作用，到将信号传导至细胞核的胞质内相互作用，到蛋白质转录因子和 DNA 之间的相互作用——为媒介，然后基因表达的变更图导致观测到的表型反应。

例如，排卵需要雌激素和黄体酮通过卵巢细胞的识别结合。对于理解激素反应来说，一方面理解类固醇激素受体和激素配体之间的结合相互作用的分子特性，另一方面理解配体受体和基因组中的类固

醇激素反应元素之间的结合相互作用的分子特性是很重要的。反过来，对于理解不孕和对于合理设计要消除排卵、胚胎着床和/或胚胎成活力的药剂来说，这样的理解是很重要的。

不仅在真核系统中发现了这样的相互作用，在原核系统和原核生物与真核生物的相互作用中也发现了这样的相互作用。例如，某些革兰氏阴性细菌具有真核 eukarya 的入侵所需的纤毛；对于完全理解患病过程以及合理设计可防止这种入侵的试剂来说，理解这种相互作用是很重要的。

在该技术中使用了許多技术来研究和映射特异结合配偶体之间的这种分子间相互作用。每种都有重大的缺点。

在第一种这样的方法中，特异结合对中的一个固定在填塞在色谱柱中的吸取剂上。为了在结构中定位 (map) 与第一 (约束) 结合配偶体接触的第二 (自由) 结合配偶体的位置，将第二 (自由) 配偶体解离。通常，这样的分解由特异的蛋白水解酶来进行，尽管可以进行特异的化学分解 (例如，用 CNBr) 甚至非特异的化学水解。之后，对整个柱进行消化来结合第二 (自由) 配偶体的还与第一 (固定) 配偶体结合的那些部分。

然后洗脱第二配偶体的肽——通常利用盐或 pH 梯度，并对其进行分析——通常通过将肽送入使用 MALDI 或电喷射电离的质谱仪来进行。

该方法具有一些众所周知的重大问题。首先，需要大量纯化的第一结合配偶体来产生特异吸取剂。第二，需要大量第二结合配偶体——通常是纯化的——用于消化、吸取和洗脱，因为这其中的每一步都会产生稀释作用和分析物丢失。此外，尽管随后的质谱分析可以是高灵敏度的，将液相分析引入 MS 也会引起分析物丢失。

也许更基本的缺点在于，通过在结合到第一配偶体之前解离第二结合配偶体，只有第二结合配偶体上完全留在肽碎片中的分子结构会结合并在之后被探测。如果，例如，抗体和抗原在不连续的——而不是线性的——抗原决定簇处结合，那么这样的不连续抗原决定簇将会

受到碎裂的破坏；无法支持与固定抗体的结合，这样的抗原决定簇不能被探测到。

技术中第二个典型的方法是利用点突变在蛋白质结合配偶体中定位（map）对分子间结合有贡献的那些残余物。

后面的这种方法需要克隆蛋白质结合配偶体，产生所需的点突变，重组转化的蛋白质的表达，并将其纯化。之后，测量转化的蛋白质与其它配偶体的结合动力学来确定突变残余物对分子间相互作用的影响。

结合配偶体之间的接触的特性可用已结合配偶体的 X 射线晶体学来阐明，这种方法更为少用。该技术非常有效，而且提供了原子水平的分辨率，但是需要每个结合配偶体高度纯化并需要形成合适的晶体。

本发明的亲和捕获串联质谱仪器给出一种改进的方法，只需极少的起始材料，消除了点突变分析、结晶，充分降低了纯度要求。

第一步是将结合配偶体之一固定到亲和捕获探针上。

可固定任何一个配偶体；然而，所能获得的是自由配偶体关于结合接触的结构信息。利用作为本方法例子的受体/配体相互作用，将配体固定在探针上可进行受体参与结合配体的区域的鉴定；将受体固定在探针上可进行配体参与结合受体的区域的鉴定。在配体是蛋白质——例如蛋白质激素、细胞因子或化学增活剂（chemokine）——的情况下，依次使用每个配偶体的分离实验将得出分子间接触的双边理解。

探针结合的配偶体可用共价或强的非共价作用来固定。选择取决于要固定的配偶体上合适反应基的可用性以及探针表面的化学特性。在分析技术中，合适的化学处理是众所周知的。

例如，在要固定的结合配偶体具有自由氨基时，可在结合配偶体的自由氨基和探针表面的羧基二咪唑根之间形成共价键合。类似地，结合配偶体的自由氨基或硫醇基可用来将该配偶体共价结合到具有环氧基的探针表面上。在结合配偶体的自由氢硫基和探针表面上的金或铂之间可形成强的配位或配价（dative）键。

可选地，随后可填塞探针表面上剩余的活性位置以减少与活化的探针表面的非特异结合。

然后将第二(自由)结合配偶体与亲和捕获芯片接触并与第一(固定)结合配偶体结合。

第二(自由)结合配偶体可以是融化状态的纯净物——如果已知并且可以获得的话，或者更通常地，从异质混合物——例如怀疑含有第二结合配偶体的生物样品——中获取。像前述生物标记发现方法中的生物样品可以是生物液体，例如血液、血清、血浆、淋巴、组织液、尿液、渗出液，可以是细胞溶解产物、细胞分泌物，或者它们的部分分馏和纯化部分。

然后用一种或多种具有规定的洗脱特征的洗脱液洗涤探针。洗涤是用来减少非特异结合到探针上的种类的数量。

然后应用通常处于液相的能量吸收分子，并干燥。能量吸收分子的应用受到亲和捕获探针的现有使用的同样方式的影响；在使用 ProteinChip® Array (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA, USA) 的情况下，根据厂商的说明来应用能量吸收分子。

然后，非共价结合到亲和捕获探针上的种类——例如，特异结合到第一(固定)结合配偶体上的第二结合配偶体、非特异结合到探针表面上的分子、非特异结合到第一结合配偶体上的分子——在激光解吸电离质谱分析的第一相中进行探测。

质谱仪可以是单级亲和捕获 LDI-MS 设备，例如 Ciphergen Biosystems, Inc. (Fremont, CA USA) 的 PBS II。然而，优选提供了更高质量精度和更高质量分辨率的本发明的亲和捕获串联 MS。

通常，从先前的研究将可已知第二(自由)结合配偶体，用质谱分析可以容易地确定它是否存在。如果第二(自由)结合配偶体未知，则可依次探查结合到探针上的每个种类。如果可探测种类的数量太大，那么可使用具有不同洗脱特征(通常，增大的严格度(increased stringency))的洗脱液来洗涤亲和捕获探针，以减少要分析的种类的数量。

一旦确认了第二（“自由”）结合配偶体与第一（固定）结合配偶体的结合，则使第二结合配偶体碎裂。这通常通过将第二结合配偶体（此时它非共价但特异地结合在第一结合配偶体上，而后者反过来固定在探针表面上）与特定内蛋白酶——例如胰岛素、Glu - C(V8)蛋白酶、蛋白酶 Arg - C（丝氨酸蛋白酶或半胱氨酸蛋白酶 Arg - C 酶）、Asn - N 蛋白酶，或 Lys - C 蛋白酶——接触来完成。

在消化之后，用质谱分析来探测肽。

如果要鉴定第二结合配偶体的所有碎片——例如用肽质指纹图谱分析来确认第二结合配偶体的身份，那么可应用能量吸收分子，和用以通过激光解吸电离将肽送入质谱分析的探针。为此，可使用 CIPHERGEN PBS II 单加速级线性 TOF MS；优选提供更佳质量精度和质量分辨率的本发明的串联 MS，因为增大的分辨率和精度降低了在任何给定数据库查询中任何给定置信度下返回的假定“命中”的数量。

然而，更通常地，需要分析和固定的第一结合配偶体结合最紧密的第二结合配偶体的碎片。在这样的情形中，在加入能量吸收分子之前用一种和多种洗脱液来洗涤探针。

此时，探针插入本发明的串联 MS 的接口，第二结合配偶体的碎片（通常是肽）被探测。

如果第二（自由）结合配偶体的身份已知，可将已探测碎片的质量与将碎裂酶的已知分解规则用于第二结合配偶体的初级氨基酸序列所预测的质量进行比较。照这样，可鉴定每个碎片，从而在第二结合配偶体的结构中定位了那些担负与第一结合配偶体的结合的部分。

尽管在理论上可使用单级 MS 设备，但是实际上，除了来自第二结合配偶体的碎片之外，还会出现其它碎片，混淆了这样的分析。这样，本发明的仪器的高质量分辨率和质量精度将给普通情况中的最后鉴定带来好处，而且 ms/ms 分析也常给普通情况中的最后鉴定带来好处。

如果第二（自由）结合配偶体未知，可使用 ms/ms 分析来鉴定该

配偶体。

通常，这样的分析采取如下形式：在 MS 的第一级中选择第一母体肽，碎裂选定的肽，然后在 MS 分析的第二级中产生碎片质谱。碎裂在气相中进行，优选地采用碰撞诱导分离。在本发明的亲和捕获串联质谱仪的具体实施方案中，CID 在 q2 中通过与氮气在大约 10^{-2} 托下碰撞而起作用。

然后利用已知的算法——例如在 Yates et al., U.S. Patent Nos. 5,538,897 and 6,017,693 中公开的以及 Protein Prospector MS-TAG (<http://prospector.ucsf.edu>) 模块中所用的——将碎片谱用于查询序列数据库。

通过选择第二母体肽并重复该方法，可进一步检验假定鉴定，要确认所有肽来自可鉴定母体，这是必须的。

之后，一旦鉴定了第二结合配偶体，则可如上面所提出的那样对分子间相互作用的特性进行研究。将碎裂酶(或化学制剂，例如 CNBr) 已知的分解规则用于现在鉴定的第二结合配偶体的初级序列，将经验测得的肽定位到理论消化上，从而鉴定了结合到固定的第一结合配偶体上、并且处在对结合有贡献的本地分子中的肽。同上，可以提高洗涤严格度来重复实验以鉴定那些结合最紧密的肽。

可进行其它干扰以进一步阐明分子间相互作用的特性。

可改变在第二结合配偶体碎裂后用于洗涤探针的洗脱液的洗脱特征来鉴定对相互作用贡献最大的碎片，或鉴定对结合有贡献的与 pH 相关或与盐相关的接触。

在色谱和分子生物技术中，原理当然是众所周知的：随着洗涤严格度的提高(例如，提高盐的浓度、升高温度)，那些与固定的第一结合配偶体结合更不紧密的碎片将被从第一结合配偶体上洗脱掉。在本几何结构中，如此差结合的碎片将被从探针上洗脱掉，不参与随后的质谱分析。这样可进行一系列实验，其中在增加严格度下洗涤探针和同样的对应探针，从而产生了一系列逐渐变化的第二结合配偶体的碎片子集，其中每个相继子集都具有由更紧密结合的碎片组成的更小

的子集。

正如上面所指出的，第一（固定）和第二（自由）结合配偶体是可以互换的，使得可以阐明其它配偶体的结合接触。

又一有用的干扰是在某一或两个结合配偶体上移除或平移后改性的改变。例如，如果第一结合配偶体是糖蛋白质，在与第二结合配偶体结合之前和/或之后用一种或多种特异或非特异糖苷酶对其进行处理将有助于阐明糖残余物对结合的贡献。

类似地，在某一结合配偶体是核酸的情况下，在与另一结合配偶体结合之前用核酸酶对核酸结合配偶体进行处理将有助于鉴定关键性的结合残余物。

上述表征分子间相互作用的方法用单平台、流水线化、灵敏的方法取代了现有技术中多平台、大劳动密度、不灵敏的技术。该方法适用于很多种不同的生物系统和问题。

如上所建议的，本发明的方法可用于抗原决定簇定位（mapping）——也就是，在抗原中鉴定对与抗体、T 细胞受体或 MHC 的结合有贡献的接触。该方法可用于阐明多蛋白质复合体中生物配体与其受体、转录因子与核酸、转录因子与其它转录因子的结合的特性。

尽管在上面关于蛋白质/蛋白质相互作用进行了特别讨论，本发明的方法可实际用于阐明外源凝集素与糖蛋白质、蛋白质与核酸、以及小分子与受体之间的结合相互作用。

特别地关于小分子配体，该方法也可用于已知受体的激动剂和拮抗剂的设计。

在过去的几十年里，发展了用于组合地产生大量小分子和用于在各种同质和活细胞测定中筛选（screen）这种分子（因为它们能够影响一种或多种生物过程）的技术。例如，同质闪烁邻近测定（homogeneous scintillation proximity assay）可用来联筛选组合库用于和已知受体的结合；基于数字图像的分子测定可用来筛选来自组合库的化合物用于下游效应（downstream effect），例如受体的细胞质/细胞核输送、细胞内钙分布的改变、细胞活动性的改变。

然而，一旦鉴定了这样一个前导物，对小分子和其受体之间相互作用的详细理解将促进具有改进药物动力学和治疗指数的分子的巧妙设计。本发明的技术很适合于这样的应用。

如果小分子给出了靠近能量吸收分子的信号，则 MS 进行单离子监控，仅为组合库成分寻找已知质量。

实例 1

前列腺癌生物标记的鉴定

传统上，在发现前列腺特异抗原 (PSA) 在血液中的含量升高之后，通过活体组织切片检查来诊断前列腺癌。在正常男性的身体中，PSA 的含量小于 1 ng/ml。对于 BPH 和前列腺癌，PSA 的含量会提高到 4 - 10 ng/ml。Chen et al., *J. Urology* 157:2166-2170 (1997); Qian et al., *Clin. Chem.* 43:352-359 (1997)。PSA 已知具有胰岛素活性，在酪氨酸和亮氨酸的 C 端处裂解。Qian et al., *Clin. Chem.* 43:352-359 (1997)。

用 ProteinChip® 差别显示技术来分析来自诊断为 BPH 的病人和诊断为前列腺癌的病入的精浆。图 3 显示了一个 BPH 和前列腺癌患者的精液蛋白质图。利用虚拟的凝胶显示来提高样品之间的可视化比较。在凝胶视图的下方显示了前列腺癌的蛋白质图减去 BPH 的蛋白质图的差别曲线。差别曲线正向显示的信号表示在前列腺癌中上调整 (upregulated) 的蛋白质，而负的峰代表前列腺癌向下的蛋白质调整。探测到了一些独特地上调整的信号，它们表示可能的前列腺癌生物标记。

通过使用混合模式表面和中性 pH 缓冲洗涤得到了这些上调整蛋白质中的某种的片上分离 (见图 4)。在此情形中，蛋白质被富集成接近于同质 (homogeneity)。然后利用胰岛素对富集的生物标记候选进行在位消化。在培育 (incubation) 之后，加入 CHCA (matrix) 的饱和溶液，并用 SELDI-TOF 对随后的消化产物进行分析。

探测了一些肽 (见图 5)。对合成的肽信号进行蛋白质数据库分

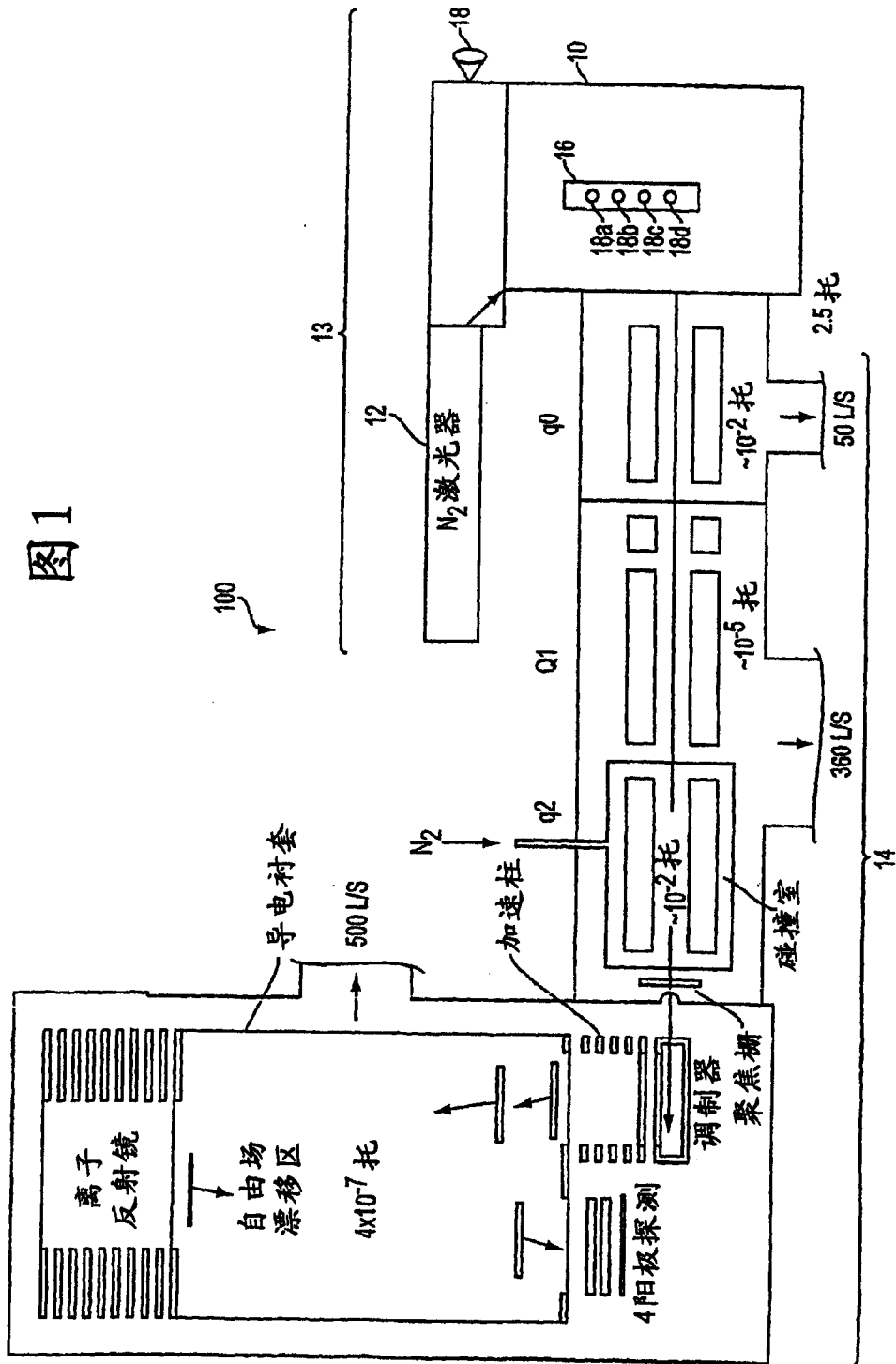
析并进行人类 semenogelin I 的初步鉴定。这一鉴定稍微有点复杂，因为生物标记的分子量为大约 5751 Da，远小于 semenogelin I 的分子量（MW 52,131 Da）。

对同一纯化蛋白质进行 ProteinChip LDI Qq-TOF MS 探测（见图 6）。因为 5751 Da 处的母体离子超过了 LDI Qq-TOF MS/MS 分析的现有质量限制（3000 M/z），因此为 CID MS/MS 定序使用带两个电荷的离子（见图 7）。利用 CID MS/MS 结果来进行蛋白质数据库采掘。26 ms/ms 离子中的 15 个被映射（mapped）回人类精液碱性蛋白质（SBP），semenogelin I 的蛋白水解导出碎片，给出了该候选生物标记的最后鉴定。

尽管像这些初始研究很快揭示了潜在的生物标记，任何生物标记的完全确认需要分析数十甚至数百个相关样品来获得表达和发病率的统计意义上的信息。

这里提到的所有专利、专利发表以及其它已出版的参考都在此引入其所有内容作为参考，并假定它们中的每一份都单独并特定地在此引入作为参考。虽然在此文件中引入各种参考，申请者并不承认任何特别的参考为其发明的“现有技术”。

虽然给出了特定的实施例，上面的描述都是说明性的而非限制性的。前述实施方案中的任何一个或多个特点都可以任何方式与本发明中任何其它实施方案的一个或多个特点相结合。而且，在复查了本说明书之后，对于熟练的技术人员来说，本发明的许多变化都是显而易见的。因此，本发明的范围并不能比照上面的描述来确定，而应比照所附的权利要求连同其等效的完整范围来进行确定。



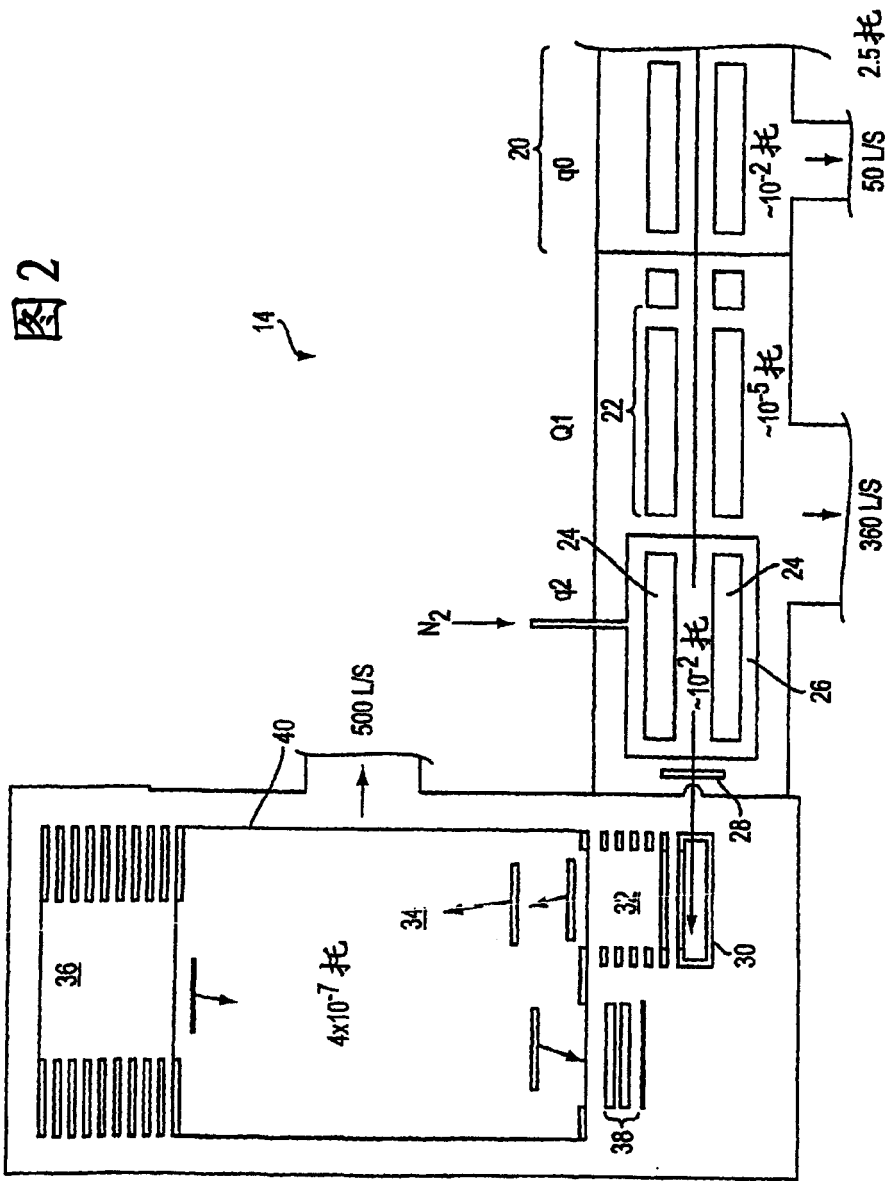


图 3

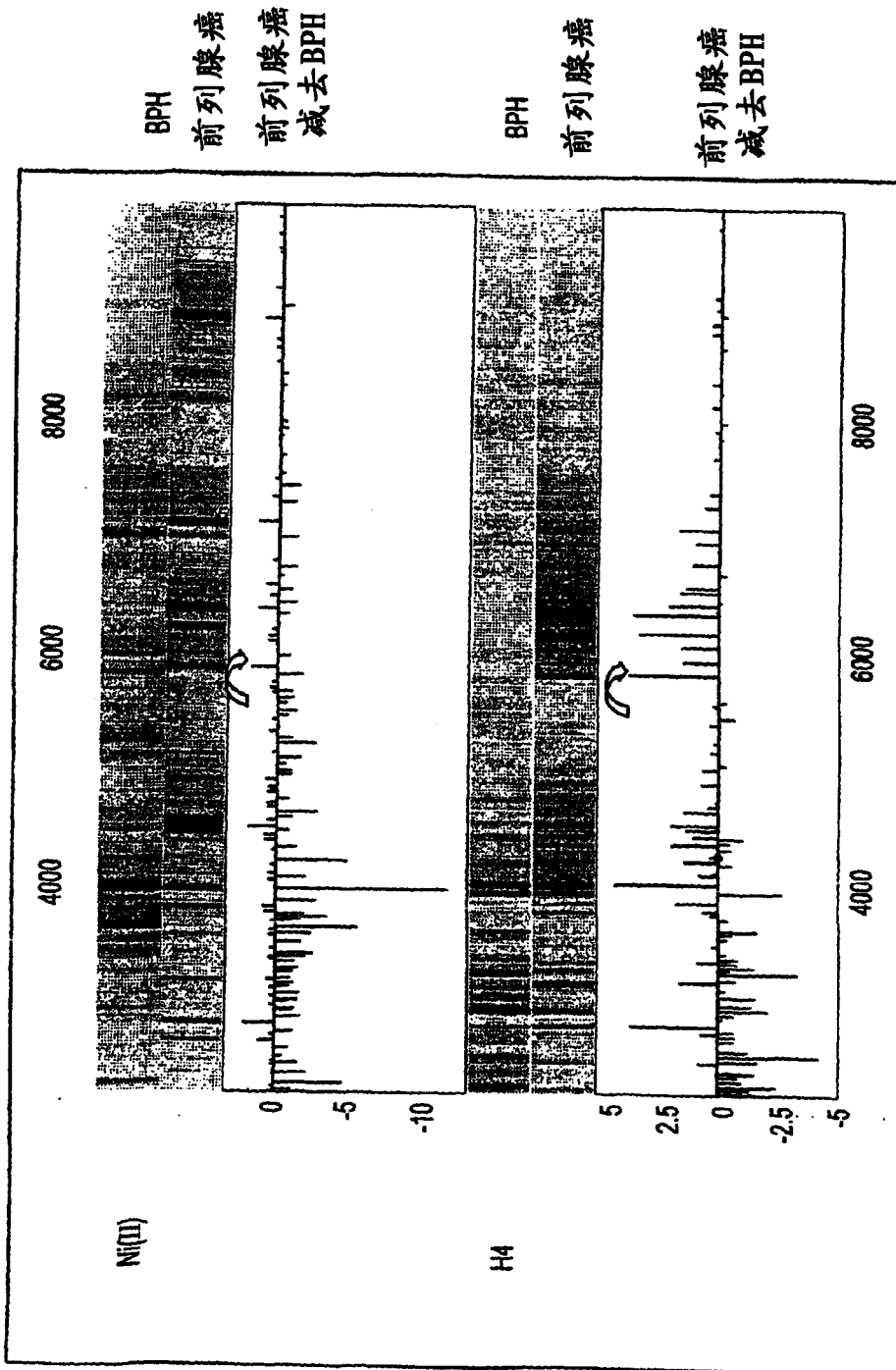


图 4

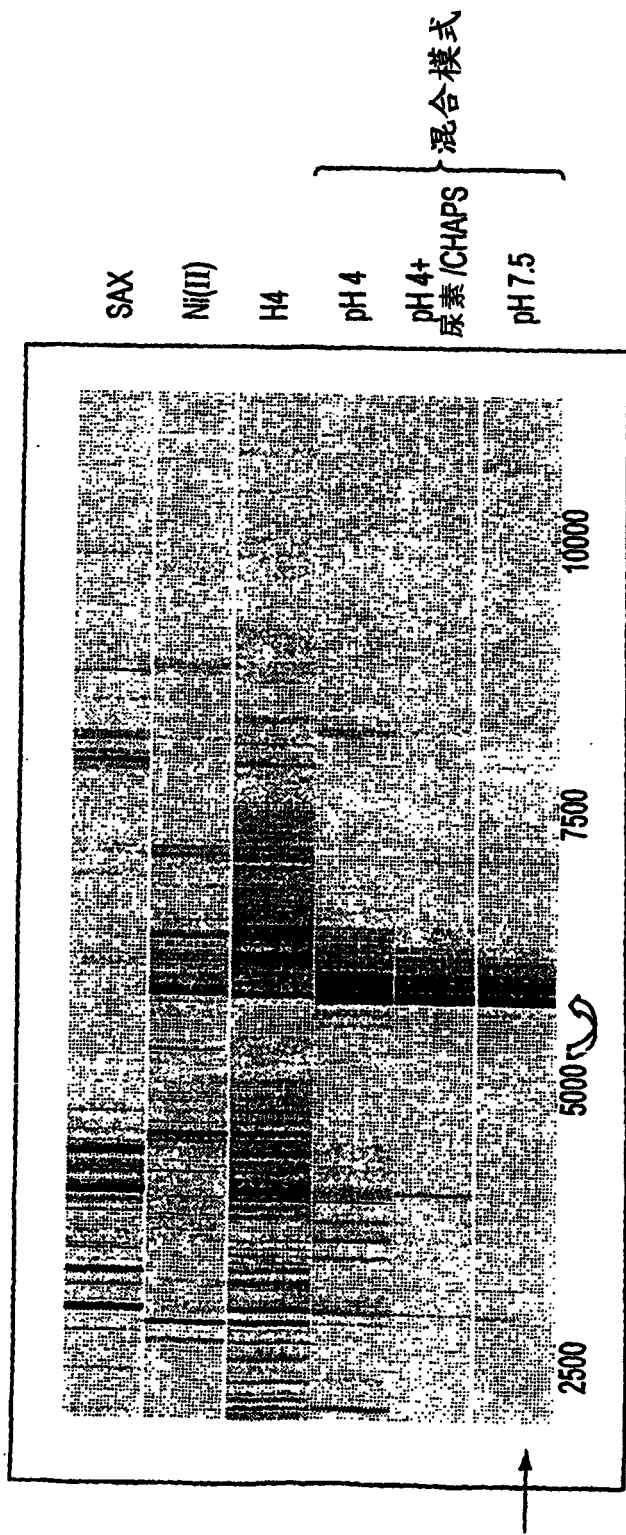


图 5

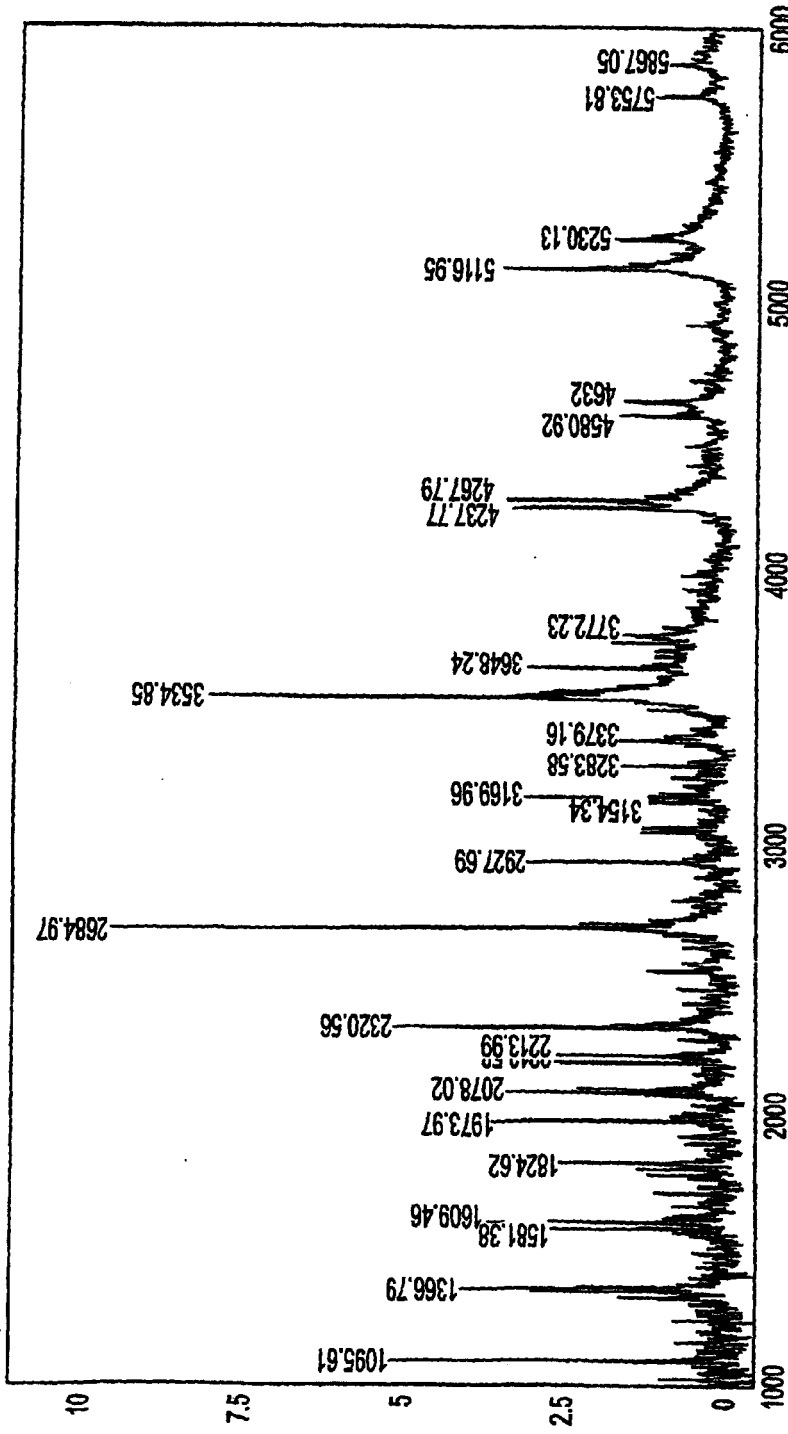


图6

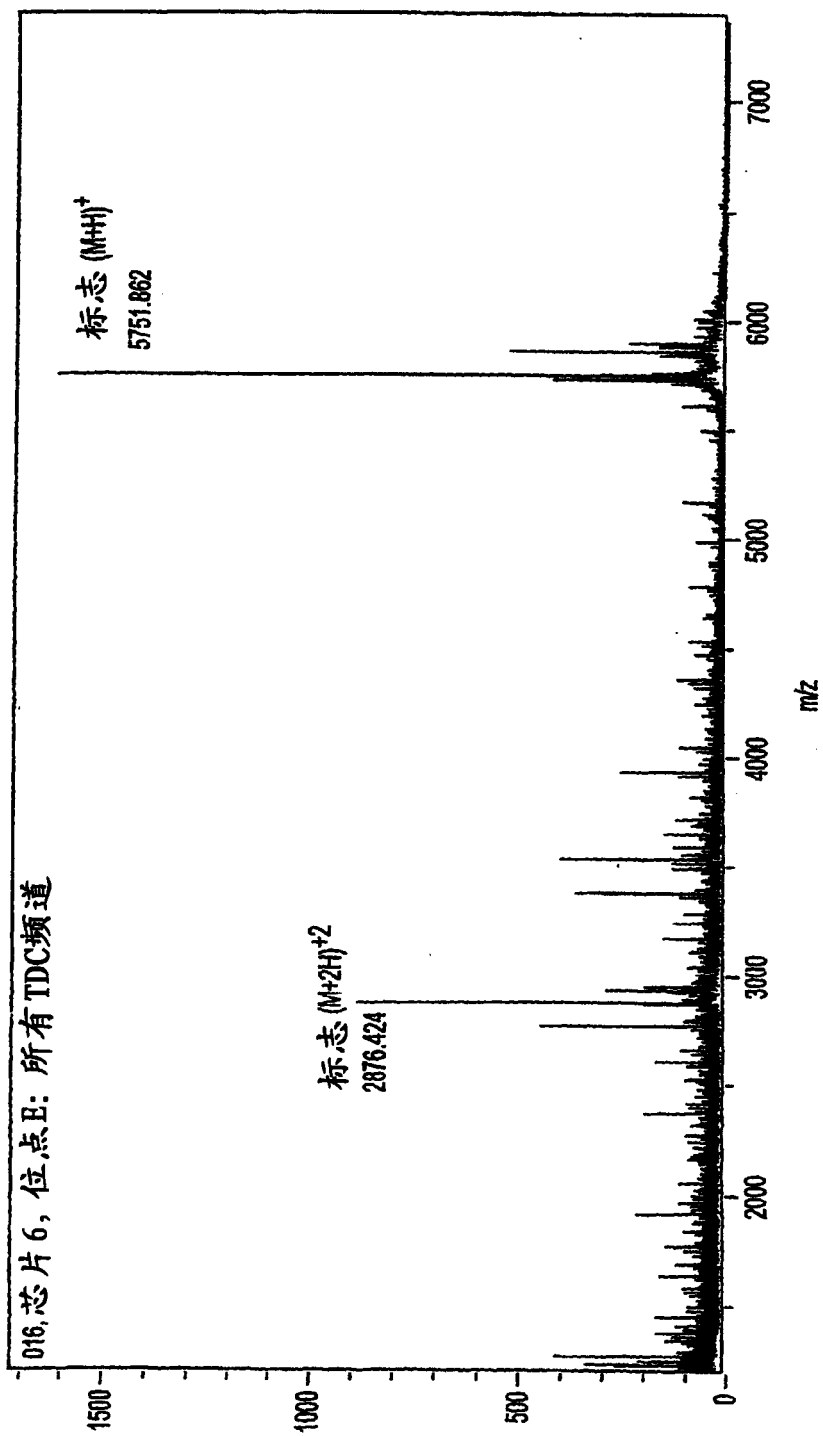
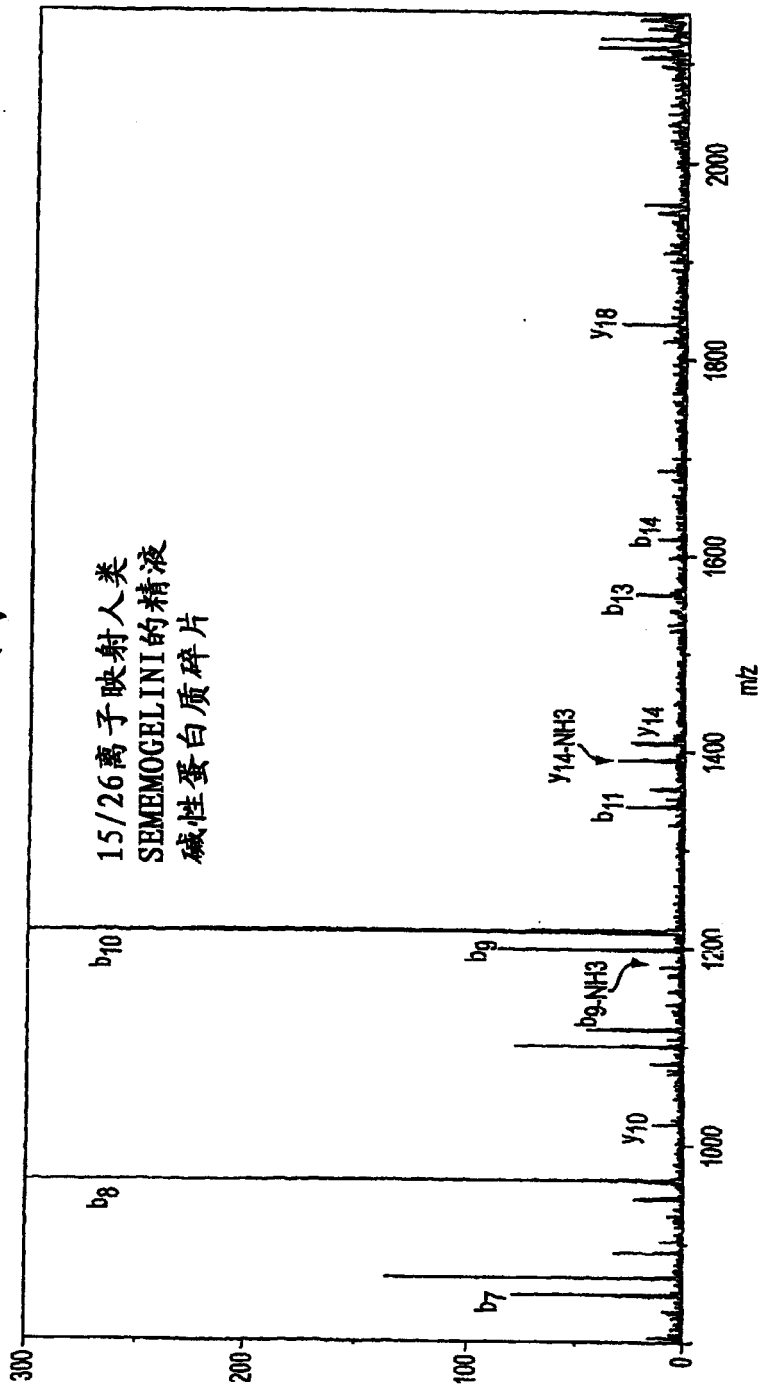


图7



专利名称(译)	利用亲和捕获串联质谱分析表征分子间作用的方法		
公开(公告)号	CN1474944A	公开(公告)日	2004-02-11
申请号	CN00819963.9	申请日	2000-10-12
[标]申请(专利权)人(译)	人类基因科学公司		
申请(专利权)人(译)	人类基因组科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	人类基因组科学公司		
[标]发明人	斯科特·维恩伯格 蒂娜·莫里斯		
发明人	斯科特·维恩伯格 蒂娜·莫里斯		
IPC分类号	G01N27/62 C12Q1/37 G01N27/64 G01N33/483 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 H01J49/42 H01J49/00		
CPC分类号	G01N33/6851 H01J49/004 G01N33/6848 H01J49/164 G01N33/6818 G01N33/6803		
代理人(译)	王永刚		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明给出了包括亲和捕获探针接口、激光解吸电离源以及串联质谱仪的分析仪器。还给出了用于蛋白质发现及识别和利用本发明的仪器来表征分子间相互作用的新方法。

