

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
A23J 1/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580016558.8

[43] 公开日 2007年7月11日

[11] 公开号 CN 1997284A

[22] 申请日 2005.3.23

[21] 申请号 200580016558.8

[30] 优先权

[32] 2004. 3. 23 [33] EP [31] 04290775.8

[32] 2004. 4. 2 [33] US [31] 60/559,108

[32] 2004. 6. 23 [33] US [31] 60/582,650

[32] 2004. 7. 12 [33] US [31] 60/587,585

[32] 2005. 1. 12 [33] US [31] 60/643,483

[86] 国际申请 PCT/US2005/009539 2005.3.23

[87] 国际公布 WO2005/094467 英 2005.10.13

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.23

[71] 申请人 赛弗吉生物系统有限公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申请人 美国国家红十字会

[72] 发明人 E·波斯彻蒂 D·哈蒙德

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 程 淼 刘 玥

权利要求书4页 说明书50页 附图9页

[54] 发明名称

减小样品中分析物品种的浓度范围的方法

[57] 摘要

本发明涉及分子生物学、组合化学和生物化学领域。特别地,本发明描述了用于在动力学上降低取自复合混合物的分析物之间方差的方法和试剂盒。

1. 一种方法，包括以下步骤：

(a) 提供第一样品，该样品中包含多个不同的分析物品种，所述分析物品种以第一浓度范围存在于所述第一样品中；

(b) 将所述第一样品与包含至少 100 种不同的结合部分的一定量文库接触；

(c) 以所述不同的结合部分从所述第一样品中俘获一定量的不同分析物品种以及除去未结合的分析物品种；和

(d) 从所述结合部分上分离所俘获的分析物品种从而产生第二样品，该样品中包含多个不同的分析物品种，所述分析物品种以第二浓度范围存在于所述第二样品中；

其中所述文库的量经过选择以便俘获一定量的不同的分析物品种从而所述第二浓度范围低于所述第一浓度范围。

2. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第一样品包含至少 100、至少 1,000、至少 10,000、至少 100,000、至少 1,000,000 或至少 10,000,000 种不同的分析物品种。

3. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述文库包括至少 1,000、至少 10,000、至少 100,000、至少 1,000,000 或至少 10,000,000 种不同的结合部分。

4. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述结合部分包括生物有机聚合物。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述结合部分与固体载体或多个固体载体结合。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述文库是非选择性文库。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述不同的结合部分包含在完全或不完整的组合文库中。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述第二样品所具有的分析物品种多样性基本上与所述第一样品的相同。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其中所述样品选自羊水、血、脑脊液、关节内液、眼内液、淋巴液、乳液、汗液、唾液精液、精浆、血清、痰液、滑液、泪液、脐带液、尿液、活检组织匀浆液、细胞培养液、细胞提取物、细胞匀浆液、条件培养液、发酵液、组织匀浆液及

其衍生物。

10. 如权利要求 1 所述的方法, 进一步包括检测所述第二样品中的分析物品种。

11. 如权利要求 1 所述的方法, 其中未结合的分析物的除去包括采用洗涤缓冲液洗涤所述俘获的分析物。

12. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述分析物选自多肽、核酸、复合糖、复合脂质、合成无机化合物和合成有机化合物。

13. 如权利要求 1 所述的方法, 进一步包括基于物理或化学特性分级分离所述第二样品中的分析物。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 进一步包括鉴定至少一种所述分离的分析物。

15. 如权利要求 1 所述的方法, 进一步包括将生物特异性结合部分与所述第二样品接触以及测定所述生物特异性结合部分是否从所述第二样品中俘获了分析物品种。

16. 如权利要求 4 所述的方法, 其中所述生物有机聚合物选自肽、寡核苷酸和寡糖。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其中所述结合部分选自抗体和核酸适体。

18. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述固体载体或多个固体载体是珠或颗粒的集合。

19. 如权利要求 5 所述的方法, 其中所述固体载体或多个固体载体选自纤维、整体柱、膜和塑料条带。

20. 如权利要求 6 所述的方法, 其中所述非选择性文库选自生殖系抗体文库、重组结合蛋白质的噬菌体展示文库、染料文库或非组合性文库, 其中成员的结合特异性为非预先选择的、组合文库及其部分。

21. 如权利要求 7 所述的方法, 其中所述组合文库是六肽文库。

22. 如权利要求 10 所述的方法, 其中采用选自比色、光度、磁共振、椭偏光、质谱、电泳、色谱、酶性和序列分析的方法对所述分析物进行检测。

23. 如权利要求 13 所述的方法, 其中分级分离包括采用选自色谱法、电泳、毛细电泳、过滤和沉淀的方法分离所述分析物。

24. 如权利要求 18 所述的方法, 其中各个珠或颗粒连结于基本上

不同的结合部分。

25. 如权利要求 18 所述的方法，其中多个不同的结合部分连结于相同的珠或颗粒。

26. 如权利要求 18 所述的方法，其中所述珠或颗粒的直径小于 $1\mu\text{m}$ 。

27. 如权利要求 18 所述的方法，其中采用选自粉碎、磨碎和声波破碎的方法将所述珠或颗粒制成磨碎的微粒化珠。

28. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述微粒化珠是由天然或合成聚合物形成的聚合物基质。

29. 如权利要求 27 所述的方法，其中所述颗粒与第二固体载体连结从而形成阵列或试纸条。

30. 一种用于检测样品中多种分析物的试剂盒，包括：

- (i) 含有至少 100 种不同结合部分的文库的容器；和
- (ii) 使用所述文库实施权利要求 1 所述方法的说明书。

31. 如权利要求 30 所述的试剂盒，其中所述结合部分与固体载体或多个固体载体连结。

32. 如权利要求 30 所述的试剂盒，其中所述文库包括六肽组合文库或其部分，其中所述六肽与颗粒连结。

33. 如权利要求 30 所述的试剂盒，进一步包括用于以所述结合部分俘获分析物的结合缓冲液。

34. 如权利要求 30 所述的试剂盒，进一步包括用于从结合部分上洗脱所述俘获的分析物的洗脱缓冲液。

35. 一种包含至少 100 种不同的结合部分的水库，其中多种不同的结合部分与相同的固体载体或多个固体载体连结。

36. 如权利要求 35 所述的水库，其中所述结合部分包括组合六肽文库或其部分。

37. 一种鉴定诊断性生物标记的方法，该方法包括以下步骤：

- (a) 提供来自具有第一表型的第一组生物体的第一组生物样品；
- (b) 提供来自具有第二表型的第二组生物体的第二组生物样品；
- (c) 对各个所述的生物样品实施权利要求 1 所述的方法，由此分别产生第三和第四组生物样品；
- (d) 在第三和第四组生物样品的各个样品中检测分析物品种；

(e) 鉴定在第三和第四组生物样品中存在不同的至少一种分析物品种，由此该至少一种分析物品种为用于区分第一表型和第二表型的生物标记。

38. 如权利要求 37 所述的方法，其中步骤 (e) 包括鉴定生物标记图谱以便提供较所述图谱中任一生物标记单独所具有的预测力更佳的预测力。

39. 一种减小样品中分析物的相对量的方法，包括以下步骤：

(a) 提供第一样品，该样品包含第一的多种不同的分析物，所述分析物具有第一量方差；

(b) 将所述第一样品与多种不同的结合部分接触，各结合部分的存在量均为已确定的；

(c) 以所述不同的结合部分从第一样品中俘获一部分第一的不同的分析物以及除去未俘获的分析物；和

(d) 从所述结合部分上分离所述俘获的分析物从而产生第二样品，该样品中包含第二的多种不同的分析物，所述分析物具有第二量方差；

其中多种不同结合部分的各结合部分的所述已确定的量经过选择以便俘获一定量的所述不同的分析物由此所述第二量方差小于第一量方差。

减小样品中分析物品种的浓度范围的方法

相关申请的交叉参考

[01] 本申请是要求临时申请号 60/559,108(2004年4月2日提交)、临时申请号 60/582,650(2004年6月23日提交)、临时申请号 60/587,585(2004年7月12日提交)、临时申请号 60/643,483(2005年1月12日提交),和欧洲专利申请号 04290775.8(2004年3月23日提交)的权益的部分接续申请,上述所有申请在此全文引入以供参考。

技术领域

[02] 本发明涉及组合化学、蛋白质化学和生物化学的领域。

背景技术

[03] 蛋白质组学的目的在于完成生物体全套蛋白质组的同一性图谱,并通过分析该信息从而鉴定可能的诊断性和治疗性实体。目前用于分离蛋白质混合物的方法包括二维凝胶电泳和多维液相色谱法。所有这些方法均可以与质谱法结合。该途径的一个实例是酵母中 1,484 种蛋白质的分离和鉴定(Washburn *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 19(3): 242-2471 (2001))。分离和鉴定蛋白质的方法学另一实例是由 Uetz 等(Uetz *et al.*, *Nature* 403(6770): 623-627(2000))和 Ito 等(Ito *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(8): 4569-4574(2001))发展的酵母双杂交筛选法的改良方法,该方法已在酿酒酵母中鉴定了超过 4,000 种蛋白质-蛋白质相互作用。蛋白质分离和鉴定的定量方法是由 Aebersold 及其同事(Smolka *et al.*, *Anal. Biochem.* 297(1): 25-312(2001))发展的同位素编码亲和标记(isotope coded affinity tag(ICAT))。ICAT 包括采用普通或重同位素性试剂对蛋白质进行位点特异性的、共价的标记从而定量蛋白质表达的水平。

[04] 复合蛋白质混合物还可以在组合产生的配体文库上分离。实体分子与组合文库接触后,该实体分子可与文库中的配体结合。当采用纯化的、放射性标记的初始实体时,可以实施对结合的实体的检测(Mondorf *et al.*, *J. Peptide Research* 52: 526-536(1998))。其它方

法包括通过针对实体的抗体进行的检测 (Buettner *et al.*, *International Journal of peptide & Protein Research* 47: 70-83 (1996); Furka *et al.*, *International Journal Peptide Protein Research* 37(6): 487-493(1991); 和 Lam *et al.*, (1991) 如上)。采用固定在粘着物上的珠联合使用删减筛选法可以检测多种实体的配体。这被称为 QuASAR 法 (国际 (PCT) 专利申请 WO 01/40265), 其已被用于检测结合病毒和朊病毒蛋白质的配体。

[05] FIoNA 检测技术 (Hammond 等国际 (PCT) 专利申请 WO 04/007757) 和其他组合技术能够鉴定配体:实体相互作用。FIoNA 检测技术基于化学、物理、生物学, 和/或生物化学功能从混合物中鉴定蛋白质, 而不仅仅是基于其与文库中配体的结合能力。因此, FIoNA 的目的在于采用现有的蛋白质组学方法, 鉴定结合所需物质的配体-载体, 然后在适宜的珠上解码配体, 以及合成适宜量的珠以便纯化一种, 或若干具有所需活性的蛋白质。

[06] 各分析物之间浓度的巨大差异会妨碍对复合生物提取物中分析物的完全分析。在大多数生物混合物中, 某些分析物的浓度很高, 而其它分析物则仅为痕量水平。结果, 分析物的浓度可能并不适应给定分析方法的动态范围。也就是说, 由样品中最大丰度和最小丰度分析物品种所产生的信号强度差异一般比分析方法检测和精确测定的能力宽。例如, 高度浓缩的蛋白质可能会饱和检测系统, 而非常低的浓度可能会低于分析方法的灵敏度, 人血清即是如此, 人血清中最大丰度蛋白质 (白蛋白-数十 mg/ml) 与最小丰度 (例如, IL-6-小于 1 pg/ml) 之间的浓度差异可能会高达几亿倍。

[07] 目前存在两种方式解决这一巨大差异: 第一种是设计适应性更好的装置而第二种是改变用于分析的样品。

[08] 改变样品的一种方法是减少样品的较高丰度的品种, 由此使得较低丰度的品种更易于检测。例如, 该方法包括使用接头部分 (linker moieties), 诸如针对样品中特定品种的抗体和特异性染料。例如, 对于血浆而言, 丰度高的蛋白质包括白蛋白、免疫球蛋白、纤维蛋白原和 α -1 蛋白酶抑制剂。免疫亲和柱非常昂贵, 很少完全特异性地针对其靶物质, 而且会除去与靶蛋白质相关的蛋白质。而且, 最大丰度的蛋白质一旦被除去, 另一组即成为最大丰度, 其随即需要建立另外的

亲和柱。此外，来自相同物种的不同组织和不同物种的组织的生物样品可能具有的完全不同的最大丰度蛋白质组。该方法还受到如下事实的影响，即除去某些分析物品种同样会除去与它们发生相互作用的品种。因此，会除去某些可能的兴趣品种。虽然除去高丰度的蛋白质在某些情况下会有帮助，但该方法并不能检测那些浓度始终低于检测设备灵敏度的非常低丰度的蛋白质。而且，若干种蛋白质（在某些情况下甚至是数十种）表现为高丰度品种，因此不得不对大量特异性方法进行设计以便寻找每一种不同的高丰度品种。因此，该方法基本上不能压缩剩余分析物品种之间的浓度范围。

[09] 另一方法是对样品进行分级分离（通常通过色谱法）。该方法根据相似的生物化学特性将分析物种类区分为不同的级分。例如，离子交换色谱法能够根据电荷从而将蛋白质区分为级分，而分子排阻色谱法根据分子大小来区分蛋白质。因此，这些方法可以减小分析物的浓度范围，但其代价是在每次区分中实质上降低了分析物品种的群体多样性。

发明概述

[10] 本发明提供了一种压缩复合样品中不同分析物品种间的浓度范围同时基本上保持样品中分析物品种的群体多样性的方法。更具体地，相对于低丰度品种的浓度而言，所述方法基于物理-化学特性降低了高丰度品种的浓度，但基本上不会消除样品分析物品种。

[11] 如上述，各种分析技术均具有检测动态范围。当样品中分析物的量高于动态范围时，其信号将饱和检测系统，故无法准确测定其量。当样品中分析物的量低于检测系统的灵敏度范围时，该分析物也无法得以检测，而且，即使低丰度分析物处于检测动态范围内，来自高丰度分析物的信号也会干扰检测低丰度分析物的能力。本发明的方法压缩了样品中分析物品种之间的浓度范围。这可以为检测器系统提供数量增加的分析物分子以便高于检测的灵敏度阈值，而同时降低了进行检测的高丰度分析物的量因此由高丰度分析物导致的检测系统的饱和度显著降低，因此降低了对检测高于灵敏度阈值的低丰度品种的能力的干扰。其结果是具有了检测样品中更多分析物品种的能力。采用该方法，可以检测的品种数量至少是通过质谱法从血清中检测的品

种数量的 1.5 倍。通常，该数量介于可检测的品种数量的 2-4 倍。

[12] 本发明的方法与检测样品的其它处理方法相反。例如，除去经选择的高丰度品种并不能显著降低样品中大量品种的浓度范围。分级分离降低了分析物的浓度范围，但其代价在于实质上降低了分级物种群中的品种多样性。

[13] 本发明通过将复合样品与经选择量的文库相接触而实现该结果，所述文库中包含多种不同的结合部分。可对所有变量（文库组分的多样性和所用文库的量）进行操作以便有益于本发明。通过操作样品所接触的不同结合部分的多样性，有可能结合遍及所有浓度范围的品种，亦即，无论是高丰度的品种还是稀少的品种。而且，使用的不同结合部分的量越大，样品群体中能够俘获的品种量就越大。

[14] 文库的量同样必须进行选择以便使得结合部分被至少样品中的高丰度品种饱和。通过这种方式，样品中所俘获的高丰度品种和稀少品种的相对量将非常接近于原始样品中它们的相对浓度。这导致浓度范围的压缩，使得在检测期间由高丰度品种和稀少品种所产生的处于经选择检测系统的动态范围之内内的信号量增大。

[15] 本发明的目的在于显著增加样品中可检测的品种的量，亦即尤其是，发现样品中的新品种。优选特定种类的结合部分的水库来实现该目的。尤其，最好通过使用大量不同结合部分的水库来实现该目的，所述结合部分预先未对其结合样品中特定分析物的能力进行选择。在本文中所述文库称为“非选择性”文库。（在使用文库后会明确地显示出所述文库中某些结合部分的结合特异性这一事实并不会导致相同文库具有“选择性”）使用所述文库增加了无差别地俘获完整种群的品种的可能性。例如，因此，抗体文库（其中各抗体针对已知结合位点）仅能选择各抗体所针对的品种，相反地，相同规模的生殖系抗体文库并不包含与预先选择的分析物相结合的抗体。所述文库更有可能选择出样品中存在的未知品种。通过实施组合化学或通过随机组装化学部分可以创建非选择性文库。此外，通过增加文库（选择性或非选择性）的规模，可以增加样品中所俘获的和所检测的不同分析物品种的数量。结合部分的非选择性文库的实例包括生殖系抗体文库、重组结合蛋白质的噬菌体展示文库、染料文库或非组合性文库，其中成员的结合特异性为非预先选择的、多种类型的组合文库及其部

分。

[16] 还应当注意到，浓度压缩的量依赖于结合部分和样品中分析物的相对量。一种极端情况是，结合部分相对分析物的相对量可能非常大以至于结合部分能够俘获样品中所有分析物。在这种情况下，分析物浓度范围不会出现压缩。其它极端情况是，结合部分相对分析物的相对量可能非常小，以至于每一种分析物品种均能饱和结合部分的结合能力。在这种情况下，理论上，所俘获的各个分析物品种的量是相同的，分析物浓度范围被压缩至相等。该极端情况在目的是尽可能多地检测品种时尤为有用。在这两种极端情况之间是如下情况，该情况中高丰度品种饱和了结合部分，而低丰度品种不能饱和结合部分。在这种情况下，高丰度分析物浓度范围之间的差异非常小，而低丰度分析物的浓度差异则得以保留。该结果在用于比较两种不同样品种类之间分析物品种的相对浓度时尤为有用。例如，在探索生物标记时，对取自具有两种不同表型状态（例如癌对比非癌）的生物体的样品进行比较以便鉴定两种状态之间存在不同的分析物品种。通过保留稀少品种之间的浓度差异，本发明的方法能够用于发现这些稀少品种中的生物标记。在一个实施方式中，结合部分与样品中分析物品种的比值最大为 1:500，更优选地，最大为 1:50 或最大为 1:5。

[17] 本发明提供了一种缩小复合样品中不同分析物品种之间的浓度范围同时基本上保持样品中分析物品种的群体多样性的方法。在本发明优选的实施方式中，提供了一种方法，其包括以下步骤（a）提供第一样品，该样品中包含多个不同的分析物品种，所述分析物品种以第一浓度范围存在于所述第一样品中；（b）将所述第一样品与包含至少 100 种不同的结合部分的一定量文库接触；（c）以不同的结合部分从所述第一样品中俘获一定量的不同分析物品种以及除去未结合的分析物品种；和（d）从所述结合部分上分离所述俘获的分析物品种从而产生第二样品，该样品中包含多个不同的分析物品种，所述分析物品种以第二浓度范围存在于所述第二样品中。其中所述文库的量经过选择以便俘获一定量的不同的分析物品种从而所述第二浓度范围低于所述第一浓度范围。

[18] 所述第一样品包含至少 100、至少 1,000、至少 10,000、至少 100,000、至少 1,000,000 或至少 10,000,000 种不同的分析物品种。在某

些实施方式中，所述文库包括至少 1,000、至少 10,000、至少 100,000、至少 1,000,000 或至少 10,000,000 种不同的结合部分。

[19] 优选地，所述结合部分包括生物有机聚合物。优选地，所述生物有机聚合物选自肽、寡核苷酸和寡糖。在本发明的其它实施方式中，所述结合部分选自抗体和核酸适体 (aptamer)。

[20] 在本发明的优选实施方式中，所述结合部分与固体载体或多个固体载体 (a solid support or supports) 结合。优选地，所述固体载体或多个固体载体是珠或颗粒的集合。各个珠或颗粒可连结于基本上不同的结合部分。而且，多个不同的结合部分可连结于相同的珠或颗粒。优选地，所述珠或颗粒的直径小于 $1\mu\text{m}$ 。可采用选自粉碎、磨碎和声波破碎的方法将所述珠或颗粒制成磨碎的微粒化珠。在该方法的优选实施方式中，所述颗粒与第二固体载体连结从而形成阵列或试纸条 (dipstick)。优选的微粒化珠是由天然或合成聚合物形成的聚合物基质。

[21] 在本发明其它优选实施方式中，所述固体载体或多个固体载体选自纤维、整体柱 (monolith)、膜和塑料条带。

[22] 在本发明优选实施方式中，与第一样品接触的所述文库是非选择性文库。可以采用多种非选择性文库实施本发明的方法。优选的非选择性文库可选自生殖系抗体文库、重组结合蛋白质的噬菌体展示文库、染料文库或非组合性文库，其中成员的结合特异性为非预先选择的、组合文库及其部分。

[23] 优选地，所述不同的结合部分包含在完全或不完整的组合文库中。优选的组合文库是六肽文库。

[24] 在本发明的一个实施方式中，所述第二样品所具有的分析物品种多样性基本上与所述第一样品的相同。

[25] 可以采用多种样品实施本发明的方法。在本发明优选的实施方式中，所述样品选自羊水、血、脑脊液、关节内液、眼内液、淋巴液、乳液、汗液、唾液精液、精浆、血清、痰液、滑液、泪液、脐带液、尿液、活检组织匀浆液、细胞培养液、细胞提取物、细胞匀浆液、条件培养液、发酵液、组织匀浆液及其衍生物。

[26] 在一个实施方式中，本发明的方法包括检测所述第二个样品中分析物品种的步骤。优选地，通过采用选自比色、光度、磁共振、

椭偏光、质谱、电泳、色谱、酶性和序列分析的方法对所述分析物进行检测。

[27] 任选地，本发明的方法进一步包括基于物理或化学特性分级分离所述第二样品中所述分析物的步骤或鉴定至少一种所分离的分析物的步骤。优选地，对所述分析物的分级分离包括采用选自色谱法、电泳、毛细电泳、过滤和沉淀的方法分离所述分析物。

[28] 在本发明的一个实施方式中，所述方法进一步包括将生物特异性结合部分与所述第二样品接触以及测定所述生物特异性结合部分是否从所述第二样品中俘获了分析物品种的步骤。

[29] 未结合的分析物的除去可包括采用洗涤缓冲液洗涤所述俘获的分析物。

[30] 可采用不同的分析物实施本发明的方法。在本发明优选的实施方式中，所述分析物选自多肽、核酸、复合糖、复合脂质、合成无机化合物和合成有机化合物。

[31] 本发明还提供了鉴定诊断性生物标记的方法。在优选的实施方式中，所述方法包括以下步骤 (a) 提供来自具有第一表型的第一组生物体的第一组生物样品；(b) 提供来自具有第二表型的第二组生物体的第二组生物样品；(c) 对各个所述的生物样品实施如本文(权利要求1)所述的减小样品中不同分析物品种的浓度范围的方法，由此分别产生第三和第四组生物样品；(d) 在所述第三和第四组生物样品的各个样品中检测分析物品种；和(e) 鉴定在所述第三和第四组样品中存在不同的至少一种分析物品种，由此所述最少一种分析物品种为用于区分所述第一表型和第二表型的生物标记。在优选的实施方式中，该方法的步骤(e) 包括鉴定生物标记图谱以便提供较所述图谱中任一生物标记单独所具有的预测力更佳的预测力。

[32] 本发明进一步提供了用于减小样品中分析物相对量的方法。在本发明优选的实施方式中，所述方法包括以下步骤 (a) 提供第一样品，该样品包含第一的多种不同的分析物，所述分析物具有第一量方差 (a first variance in amounts)；(b) 将所述第一样品与多种不同的结合部分接触，各结合部分的存在量均为已确定的；(c) 以所述不同的结合部分从所述第一样品中俘获一部分所述第一的不同的分析物以及除去未俘获的分析物；和 (d) 从所述结合部分上分离所述俘获的分

析物从而产生第二样品，该样品中包含第二的多种不同的分析物，所述分析物具有第二量方差（a second variance in amounts）。多种不同结合部分的各结合部分的所述已确定的量经过选择以便俘获一定量的所述不同的分析物由此所述第二量方差小于所述第一量方差。

[33] 本发明还提供了用于检测样品中多种分析物的试剂盒。在本发明优选的实施方式中，试剂盒包括含有至少 100 种不同的结合部分的文库的容器和使用所述文库实施本发明方法的说明书。优选地，所述结合部分与固体载体或多个固体载体连结。所述文库可包括六肽组合文库或其部分，其中所述六肽与颗粒连结。

[34] 任选地，本发明的试剂盒包括用于以所述结合部分俘获分析物的结合缓冲液或用于从所述结合部分上洗脱俘获的分析物的洗脱缓冲液。本发明的其它试剂盒实施方式包括能够允许本领域技术人员实施本文所述任何方法变型的任选的功能性组分。

[35] 本发明还提供了包含结合部分的水库。在本发明优选的实施方式中，文库包含至少 100 种不同的结合部分，其中多种不同的结合部分与相同的固体载体或多个固体载体连结。优选地，所述结合部分包括组合六肽文库或其部分。

附图简介

[36] 图 1 显示了展示本发明的组合配体文库与血浆孵育结果的分析。根据实施例 2 中所述方法将所述文库与血浆孵育。

[37] 图 2 是在与文库孵育之前除去或不除去 IgG 的血浆的比较。按照实施例 3 中所述实施该试验。

[38] 图 3 显示了本发明的组合配体文库与血浆孵育的结果。按照实施例 4 实施该试验。

[39] 图 4 是 Protein G 柱留存物的 PAGE 分析。左栏是考马斯蓝染色；右栏是用 Silver Quest 染色的相同凝胶。

[40] 图 5 是对血液级分的图解说明（基于质量），其中着重显示了大量低丰度蛋白质的痕量特性。

[41] 图 6 是用均一化珠处理之前和之后的样品的质谱比较。质量范围是 2.5kDa-10kDa。根据实施例 1 实施该试验。

[42] 图 7 是用均一化珠处理之前和之后的样品比较。质量范围是

2kDa-30kDa。根据实施例 1 实施该试验。

[43] 图 8 是用均一化珠处理之前和之后的样品比较。质量范围是 30kDa-180kDa。根据实施例 1 实施该试验。

[44] 图 9 是对本发明均一化珠概念的一个实施方式的图解说明。

定义

[45] 除非另有定义，此处所用的所有技术与科学术语具有本发明所属领域的技术人员通常所理解的意义。下列参考文件为所属领域技术人员提供了本发明中所使用的多个术语的一般定义：Singleton *et al.*, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* (2nd ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology* (Walker ed., 1988); *The Glossary of Genetics*, 5th Ed., R. Rieger *et al.* (eds.), Springer Verlag (1991); 以及 Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology* (1991)。如此处所使用的，除非另有定义否则下列术语具有所描述的意义。

[46] “分析物”是指能够与本发明的结合部分相结合的任何分子部分，其结合的方式是不会通过与本文所述洗涤液的接触而完全被断裂的方式。“俘获的分析物”是在接触洗涤液后由本发明的结合部分所结合的任何分析物。

[47] “吸附剂”是指能够结合分析物（例如靶多肽）的任何物质。“色谱吸附剂”是指通常用于色谱法中的物质。例如，色谱吸附剂包括离子交换物质、金属螯合剂、疏水作用吸附剂、亲水作用吸附剂、染料和复合型吸附剂（例如，疏水吸引/静电排斥吸附剂）。“生物特异性吸附剂”是指包含生物分子，例如核苷酸、核酸分子、氨基酸、多肽、单糖、多糖、脂肪酸、脂质、类固醇或其结合物（例如糖蛋白、脂蛋白、糖脂）的吸附剂。在特定情况下，生物特异性吸附剂可以是高分子结构诸如多蛋白质复合体、生物膜或病毒。生物特异性吸附剂的实例是结合了抗体、受体蛋白质、凝集素和核酸的固体载体。生物特异性吸附剂针对靶分析物的特异性通常高于色谱吸附剂。SELDI 中使用的吸附剂的其它实例可见于美国专利 6,225,047 (Hutchens and Yip, "Use of retentate chromatography to generate difference maps," May 1, 2001)。

[48] 结合部分可在适于形成分子相互作用的任何物理状态（包括气体、水性和有机悬浮物和乳状物，最优选地是液态）中存在并与可采用本发明进行检测的分析物发生相互作用。

[49] “固体载体”是指包括颗粒（例如珠）、纤维、整体柱、膜、过滤器、塑料条带等等的任何不溶性物质。

[50] “蛋白质生物芯片”是指适于俘获多肽的生物芯片。在现有技术中记载了多种蛋白质芯片。其包括，例如，由赛弗吉生物系统公司(Ciphergen Biosystems)(Fremont, CA)、Packard BioScience 公司(Meriden CT)、Zyomyx公司(Hayward, CA)以及Phylos公司(Lexington, MA)生产的蛋白质生物芯片。所述蛋白质芯片的实例可见于下列专利或专利申请中：美国专利 6,225,047(Hutchens and Yip, "Use of retentate chromatography to generate difference maps," May 1, 2001); 国际公开 WO 99/51773(Kuimelis and Wagner, "Addressable protein arrays," October 14,1999); 国际公开 WO00/04389(Wagner *et al.*, "Arrays of protein-capture agents and methods of use thereof," July 27,2000) 以及国际公开 WO 00/56934(Englert *et al.*, "Continuous porous matrix arrays," September 28, 2000)。

[51] “表面增强净解吸 (Surface-Enhanced Neat Desorption)” 或“SEND”是 SELDI 的变型，其包括使用包含能量吸收分子层的探针 (“SEND 探针”)，所述能量吸收分子结合在探针表面。例如，可以通过共价或非共价化学键进行结合。与传统的 MALDI 不同的是，SEND 中的分析物不需要在用于解吸/电离的能量吸收分子的晶体基质中俘获。“能量吸收分子 (Energy absorbing molecules)” (“EAM”) 是指能够吸收来自激光解吸/电离源的能量并随后将与其接触的分析物分子解吸和电离的分子。该用语包括 MALDI 中使用的分子 (通常称为“基质”)，且明确地包括肉桂酸 (cinnamic acid) 衍生物、芥子酸 (sinapinic acid) (“SPA”)、氰基-羟基-肉桂酸 (“CHCA”) 和二羟基苯甲酸、阿魏酸、羟基苯乙酮衍生物，以及其它。其还包括 SELDI 中所使用的 EAM。在特定实施方式中，能量吸收分子组成线形或交联的聚合物，例如聚甲基丙烯酸酯。例如，构成可以是 α -氰基-4-甲基丙烯酸酰氧基肉桂酸和丙烯酸酯的共聚物。在另一实施方式中，构成是 α -氰基-4-甲基丙烯酸酰氧基肉桂酸、丙烯酸酯和 3-(三-甲氧基)硅基丙基甲

基丙烯酸酯的共聚物。在另一实施方式中，构成是包含 α -氰基-4-甲基丙烯酸酰氧基肉桂酸和甲基丙烯酸十八烷基酯 (octadecyl methacrylate) (“C18 SEND”) 的共聚物。SEND 可进一步见于美国专利 5,719,060 和 WO 03/64594(Kitagawa, "Monomers And Polymers Having Energy Absorbing Moieties Of Use In Desorption/Ionization Of Analytes", August 7,2003)。

[52] SEAC/SEND 是 SELDI 的变型，其中结合部分和能量吸收分子均结合于样品呈递表面。因此，SEAC/SEND 探针能够通过亲和性俘获和解吸而无需提供外部基质即可俘获分析物。C18 SEND 生物芯片是 SEAC/SEND 的变型，其包括 C18 部分，该部分的功能在于作为结合部分，而 CHCA 部分的功能在于作为能量吸收部分。

[53] 由赛弗吉生物系统公司制造的蛋白质生物芯片包含具有色谱性或生物特异性吸附剂的表面，所述色谱性或生物特异性吸附剂连结于所述表面的可寻址位置。赛弗吉 ProteinChip®阵列包括：NP20、H4、H50、SAX-2、Q10、WCX-2、CM-10、IMAC-30、LSAX-30、LWCX-30、IMAC-40、PS-10 以及 PS-20。这些蛋白质芯片包含条带形铝基质。该条带的表面上涂覆二氧化硅。

[54] 对于 NP-20 生物芯片，氧化硅的功能在于作为亲水性吸附剂俘获亲水性蛋白质。

[55] H4、H50、SAX-2、WCX-2、IMAC-3、PS-10 以及 PS-20 生物芯片进一步包含水凝胶形式的官能化、交联聚合物，该聚合物以物理方式连结于生物芯片表面，或通过硅烷以共价方式连结于生物芯片表面。H4 生物芯片具有用于疏水性结合的异丙基官能基。H50 生物芯片具有用于疏水性结合的壬基苯氧基-多(乙二醇)甲基丙烯酸酯。SAX-2 生物芯片具有用于阴离子交换的四级铵官能基。WCX-2 生物芯片具有用于阳离子交换的羧酸盐官能基。IMAC-3 生物芯片具有通过胺乙酸 (nitriloacetic acid) 或 IDA 固定的用于配位共价结合的铜离子。PS-10 生物芯片具有酰基-咪唑 (acyl-imidazole) 官能团，其能与蛋白质上用于共价结合的基团进行反应。PS-20 生物芯片具有用于与蛋白质共价结合环氧官能团。PS 系列生物芯片用于将生物特异性吸附剂，如抗体、受体、凝集素、肝素、蛋白质 A、生物素/抗生物素蛋白链菌素等，结合至可发挥其特异性俘获样本中分析物功能的芯片表面。LSAX-30(阴离子

交换)、LWCX-30(阳离子交换)及 IMAC-40(金属螯合物)生物芯片在其表面具有功能性乳胶珠(latex bead)。所述生物芯片可进一步见于: WO 00/66265 (Rich *et al.*("Probes for a Gas Phase Ion Spectrometer," November 9, 2000); WO 00/67293 (Beecher *et al.*,"Sample Holder with Hydrophobic Coating for Gas Phase Mass Spectrometer," November 9, 2000); 美国专利申请 09/908,518 (Pohl *et al.*,"Latex Based Adsorbent Chip," July 16, 2002) 以及美国专利申请 60/350,110 (Um *et al.*,"Hydrophobic Surface Chip," November 8, 2001)。

[56] “气相离子光谱仪”是指检测气相离子的装置。气相离子光谱仪包括提供气相离子的离子源。例如,气相离子光谱仪包括质谱仪、离子移动光谱仪及总离子流测定装置。“气相离子光谱法”是指使用气相离子光谱仪检测气相离子。

[57] “质谱仪”是指检测可被转化成气相离子质荷比的参数的气相离子光谱仪。质谱仪一般包括离子源和质量分析仪。质谱仪的实例是飞行时间(time-of-flight)式、扇形磁场(magnetic sector)式、四极子滤过(quadrupole filter)式、离子阱(ion trap)式、离子回旋共振(ion cyclotron resonance)式、静电扇形分析器,以及这些形式的组合。“质谱法”是指使用质谱仪检测气相离子。

[58] 本发明文中的“探针”或“质谱仪探针”是指可用于将来自分析物的离子导入气相离子光谱仪(诸如质谱仪)的装置。“探针”一般包括含有样品呈递表面的固体基质(挠性的或刚性的),分析物在所述样品呈递表面上被呈递至电离能量源。“SELDI 探针”是指包含结合于表面的吸附剂(又称“结合部分”)的探针。“吸附剂表面”是指吸附剂所结合的表面。“化学选择性表面”是指吸附剂或者能够通过反应形成共价或配合共价键的方式与结合部分相结合的反应部分所结合的表面。

[59] “SELDI MS 探针”是指包含结合于表面的吸附剂的探针。

[60] 本发明文中的“方差”是指在试验样品中分析物浓度的数学方差。方差减少是指具有统计学显著性($p > 0.05$)的情况。用最简单的术语表示,方差是通过至少一种检测方法所检测的试验样品中所有分析物浓度的标准差的平方。优选的检测方法是质谱法,其中可检测分析物的量是由检测器所鉴定的质峰下方的区域面积。

[61] “洗涤缓冲液”是指可用于洗涤并从吸附剂表面除去未结合物质的溶液。洗涤缓冲液通常包括盐（可以将其或者也可以不将其 pH 缓冲至特定的范围内），去污剂并且任选地可包括可用于从表面或复合物上除去偶发结合物质的其它成份。

[62] “洗脱缓冲液”是指能够将结合部分和所结合的分析物解离的溶液。在某些情况下，当亚基在复合物中相结合时，洗脱缓冲液能够断裂亚基间的相互作用。如同洗涤缓冲液，洗脱缓冲液可包括单独使用或作为混合物使用的去污剂、盐、有机溶剂等。通常，后面这些试剂在洗脱缓冲液中的浓度要高于在洗涤缓冲液中的浓度，以便使洗脱缓冲液更易于断裂分子的相互作用。断裂分子的相互作用的这种能力称为“严紧性”，而洗脱缓冲液的严紧性高于洗涤缓冲液的严紧性。

发明详述

[63] 本发明提供了试剂盒和方法，该试剂盒和方法能使本领域技术人员减小在复合混合物中发现的兴趣分析物的浓度范围。比较采用分析物特异性试剂的现有技术方法而言，此处所述的方法尤为有益，因为这些方法能够减小样品中分析物的浓度范围，所述样品含有未知组分并且是复合物，该复合物中不仅存在大量不同的分析物（大于 10^3 种），而且存在浓度的动态范围（数量级大于 10^3 ）。结果，采用所主张的发明能够同时分析“深蛋白质组（Deep Proteome）”，其包括来自生物来源（包括血、血浆和血清）的多种液体中所存在的大量低丰度蛋白质。（参见图 5）。由此本发明具有用于分子复合混合物，诸如生物样品的分析性制备的用途。

[64] 分析物浓度范围或浓度方差的减小是通过使用结合部分文库实现的，所述文库具有确定的规模和多样性，所述文库优选在惰性载体上合成或被结合于惰性载体上。当导入包含分析物多样性的溶液中时，所主张的发明的结合部分将结合溶液中的分析物。高丰度分析物的存在量远远高于饱和其各自结合部分的能力所需要的量；因此，这些高丰度分析物总量的高百分比将保持未结合。相反地，痕量分析物的量较低意味着这些分子无法饱和所有适于它们的结合部分；因此，与高丰度分析物相比，痕量分析物起始量的较高百分比将保持与其各自的结合部分相结合。未结合的分析物可通过洗涤而被除去。当从结

合部分上洗脱结合的分析物时，相对起始物质而言，洗脱物质中高丰度分析物的相对量降低。相反，相对起始物质而言，洗脱物质中痕量分析物的量增加。分析物相对浓度的这种同时发生的改变会导致在单一分析，或者比采用起始物质时数目更少的分析中检测洗脱物质中众多（即便不是全部）存在于溶液中的分析物。以血清为例，白蛋白是高丰度的，多种补体相关蛋白、激素结合蛋白具有中间浓度，而旁分泌因子和细胞标记物可能具有微小的浓度。使用本发明，血清中所检测到的分析物丰度范围可被降低，这能够使众多（即便不是大多数或甚至全部）兴趣分析物得以分析。

[65] 采用所主张的发明制备样品是简单易行的。在吸附了兴趣分析物之后，任选地洗涤该分析物从而除去未结合的分析物。随后采用例如通过施以洗脱缓冲液的方式从结合部分上洗脱吸附的分析物。所得溶液包含全部兴趣分析物，而不包含结合部分；但是，与初始复合混合物不同的是，由于相对于初始复合混合物而言高丰度分析物的浓度降低而低丰度分析物的浓度增加，故所得溶液中存在的分析物浓度范围相对较小。分析物的浓度范围或分析物之间的浓度范围所发生的这种改变能够在无须重新校准检测装置的情况下使得所得溶液中分析物的较大百分比得以检测，而对含有非常不同浓度组分的复合混合物直接分析时则必需进行所述重新校准。

[66] 在本发明某些实施方式中，可以将与结合部分结合的分析物直接洗脱至适用于质谱仪的探针或蛋白质芯片上。为有助于分析，在这些实施方式中使用的洗脱缓冲液可包括适用于质谱仪的基质物质。可选地，可在分析物沉积于探针或芯片之后，将该基质物质导入分析物。在这种情况的优选实施方式中，使用 SEND 或 SEAC/SEND 生物芯片，该生物芯片上包含基质物质。这些优选实施方式缓解了对在洗脱缓冲液包含基质物质或在沉积于生物芯片之上后的某些时间点将基质物质导入分析物的需求。

[67] 通过提供多种结合部分（每种结合部分识别复合混合物中存在的单一或较小百分比的兴趣分析物），本发明可以在最低限度地或无须重新校准检测装置的情况下使复合混合物的组成得以检测。这包括对那些除此以外将无法得到检测的品种（其由于被高丰度分析物掩蔽，或者存在的浓度非常低以至于无法通过分析法得到检测）的检测。

这为高通量分析技术提供了非常大的益处，否则由于众多复合混合物中存在大浓度范围分析物而不得不需要多次重新校准、和/或多个通道、和/或多个检测步骤或昂贵且浪费的分级分离技术，故此高通量分析技术将在检测步骤上受到上述需要的限制。此外，通过增加低丰度分析物的相对浓度，本发明能够检测样品中仅以痕量存在的分析物。以血清为例，未浓缩血清中仅存在痕量的特定分析物诸如某些激素。其它分析物，诸如白蛋白是高丰度的，存在量为微摩尔至毫摩尔。相对于高丰度分析物而言，本发明能够浓缩低丰度分析物。因此，采用本发明制备示例性血清样品时，相对于白蛋白和其它高丰度分析物的浓度而言，激素浓度增加。通过将血清中低和高丰度分析物的浓度相靠近，就可仅采用检测分析物的分析装置的一项或若干项灵敏度设定而定性且定量地检测分析物组成。

[68] 通过相同的方法，本发明能够测定生物样品中存在的痕量蛋白质，诸如纯化的治疗性蛋白质，其中对蛋白质杂质含量的容许量非常有限。例如来自细胞培养物上清的纯化抗体可包含痕量的不同蛋白质，该蛋白质来自用于表达抗体的细胞。后者这些蛋白质是不应该存在的，通常可用特异性 ELISA 检测法进行检测。但是，当杂质的浓度非常低时，免疫化学试验是无效的。如果首先根据本发明对要分析的样品进行处理，痕量蛋白质杂质则可被显著地浓缩，由此可通过常规化学或免疫化学方法进行检测。

1. 减小样品中的相对分析物浓度

A. 适宜的试验样品

[69] 本发明的试验样品可以是能使该试验样品中的分析物与本发明的结合部分相接触（如本文所述）的任何形式。适宜的试验样品包括气体、粉末、液体、悬液、乳液、可透过的或粉末化的固体，等等。优选地，试验溶液是液体。试验样品可直接取自来源并用于本发明的方法中，而无须任何预先操作。例如，水样品可直接取自含水层并采用本文所述方法直接进行处理。

[70] 可选地，初始样品可用多种方法进行制备以便增强其对检测的适应性。所述样品制备包括除去特定分析物、浓缩、磨碎、提取、渗滤等。例如，固体样品可被粉末化成为粉末，然后采用水或有机溶

剂进行提取。然后对来自粉末的提取物实施本发明的方法。在对液体实施本发明的方法之前，可将气体样品通过溶液进行发泡或渗滤以便将该气体的组分在液体中溶解和/或浓缩。

[71] 试验样品优选包含至少四种兴趣分析物，更优选地至少 8、15、20、50、100、1000、100,000、1,000,000、10,000,000 或更多种兴趣分析物。在某些情况下，适于采用本发明的方法进行操作的试验样品可包含数百种或数千种兴趣分析物。优选地，试验样品中的分析物浓度至少跨越数量级，更优选地，至少两个、三个、四个或更多个数量级。本发明的方法一经实施，可通过至少一种检测法进行检测的分析物的该浓度范围将减小至少两倍、更优选地，10、20、50、100、1000 或更多倍。

[72] 可以采用任何适宜的方法收集试验样品。例如，可以采用浸渍、挖取、舀取、吸取或捕集来收集环境样品。可以采用抽取、刮取、手术切除或用皮下针等来收集生物样品。各种情况中的收集方法高度依赖于样品来源和状态，而多种可选的适宜收集技术是本领域技术人员众所周知的。

1. 生物试验样品

[73] 试验样品可以取自潜在地包含兴趣分析物任何来源，包括环境样品，诸如空气、水、土、提取物等。本发明优选的试验样品是生物样品，优选是生物液体。可采用本发明的方法操作的生物样品包括羊水、血、脑脊液、关节内液、眼内液、淋巴液、乳液、汗液、唾液、精液、精浆、血清、痰液、滑液、泪液、脐带液、尿液、活检组织匀浆液、细胞培养液、细胞提取物、细胞匀浆液、条件培养液、发酵液、组织匀浆液及其衍生物。生物样品中的兴趣分析物包括蛋白质、脂质、核酸和多糖。更具体地，兴趣分析物是动物中通常存在的，或是与疾病或感染状态诸如癌症、病毒感染、寄生虫感染、细菌感染等相关的细胞代谢产物。特别地，兴趣分析物是针对细胞应激的标记物。显示动物处于应激中的分析物是多种疾病状态（包括特定心理疾病、心肌梗死和感染）的早期指示物。

[74] 兴趣分析物还包括那些对动物异源的，但在动物组织中发现的物质。特别地，在此意义下的兴趣分析物包括治疗性药物（包括抗

生素)，其中的很多种以可由感染性生物体产生的，或来源于环境隐匿于动物内的不同对映体和毒素存在。例如，实例可以是蛋白（egg white）或 *E. Coli* 提取物。

2. 环境试验样品

[75] 环境样品是用于本发明的另一类优选试验样品。优选的环境样品包括土、尘、皮屑、天然和合成纤维、水、植物材料、动物粪便等。环境样品中优选的分析物包括天然和合成毒素、肥料、除草剂和杀虫剂，以及用于细菌和病毒剂的标记，诸如所述兴趣剂的结构蛋白特征。特别地，在环境试验样品中寻找的优选分析物是毒素，特别是诸如肉毒素、蓖麻毒素、炭疽毒素等的毒素。环境试验样品中存在的疾病相关的兴趣分析物包括完整病毒体以及肉毒杆菌、埃博拉病毒（ebola）、HIV、SARS、炭疽、鼠疫、疟疾、天花、牛海绵样脑病相关的蛋白酶传染因子、绵羊瘙痒症、变异体 CJD 等的特征性蛋白质和核酸。

[76] 示例性环境样品可获自多种来源，包括自然环境，诸如天然存在的水体。天然存在的水体例如可以是洋、湖泊、海、河流、沼泽、水塘、三角洲或湾。可选地，环境提取物可以是来自水处理中心的提取物。

[77] 可选地，环境样品可取自人造环境，诸如建筑物。该建筑物可以是任何人造建筑物。优选地，所述建筑物已受到一种或多种生物病原体诸如天花、炭疽，或一种或多种毒剂，诸如沙林、梭曼、神经毒剂、爆炸性化学剂、杀虫剂、VX 和糜烂性毒剂的污染。获取该环境样品的方法包括采用本领域技术人员已知的适宜溶剂从建筑物表面上干燥抹取，或从建筑物表面上潮湿抹取。

B. 适宜的结合部分

[78] 本发明适宜的结合部分包括小有机分子，诸如染料和三嗪，以及生物聚合物诸如肽、蛋白质、多核苷酸、寡糖或脂质。本发明的结合部分可以是分子量为 100KDa 或更高的分子，诸如抗体，但优选是分子量在 10KDa 范围内的较小的分子，更优选是 1KDa 左右，期望是小于 1KDa，例如小于 750、500 或 250Da。理想上，本发明的结合部

分与不溶性颗粒化物质结合。各个不溶性颗粒优选携带有若干拷贝的相同结合部分，而各个颗粒类型结合不同的结合部分。

[79] 本发明的结合部分可以是在溶液、悬液，或在能使所述结合部分与分析物（包括置于固体载体上的）相接触的任何其它状态中。

[80] 结合部分可以是“噬菌体展示文库”（其中肽作为噬菌体外膜的部分而呈递）的一部分。（例如参见，Tang, Xiao-Bo, et al.; *J. Biochem*; 1997; pp. 686-690; vol. 122, No. 4）。在噬菌体颗粒的表面上呈递肽能够实现小肽的组合文库高通量筛选，该方法还有益于筛选组合抗体文库。噬菌体展示文库由噬菌体制成，所述噬菌体已经通过重组操作从而将结合部分作为噬菌体蛋白外膜的部分进行表达。采用噬菌体展示，可以方便地构建结合部分的文库。

[81] 结合部分还可以是可溶性组合分子。可溶性组合分子优选包括俘获部分，该部分能使所述结合部分与互补固体载体相连结。可溶性结合部分实施方式通常是在通过将该结合部分结合至或连结至固体载体从而分离所得复合物之前与样品接触并与兴趣分析物结合。组合文库可以由构建块组成，所述构建块包含手性原子诸如 19 种天然存在的氨基酸。

[82] 本发明的结合部分可以采用本领域技术人员已知的任何技术进行制备。例如，结合部分可以通过化学合成、从天然来源中收集（在此情况下结合部分是生物有机聚合物）、采用重组技术制备。对于该后者情况，具有不多于 15、10、8、6 或 4 个氨基酸的肽尤为有益，因为它们易于采用重组或固相化学技术进行制备。此外，化学合成文库可见于，例如 Fodor et al., *Science* 251: 767-773 (1991) 和 Houghten et al., *Nature* 354: 84-86 (1991)。在裂解-连结-重组固相组合合成（Lam et al., *Nature* 354,82-84 (1991)）中，结合部分的补体的多样性是不同氨基酸的数目与结合部分的长度（在单个结合部分中氨基酸的数目）相乘的结果。

[83] 核酸是另一种优选的生物有机聚合物结合部分。与肽相同，可以采用本领域技术人员众所周知的合成或重组技术制备核酸。本发明优选的核酸结合部分的长度为至少 4 个，更优选 6、8、10、15 或 20 个核苷酸。核酸结合部分包括能够与特异性分子靶（诸如蛋白质或代谢物）结合的单链或双链 DNA 或 RNA 分子（例如，核酸适体）。

[84] 本发明还包括寡糖结合部分。寡糖结合部分的长度优选是至少5个单糖单位，更优选是8、10、15、20、25或更多个单糖单位。

[85] 生物聚合物结合部分可以是脂质。如此处所使用的，术语“脂质”是指疏水性或两亲性部分。由此，结合部分的脂质文库同样可用于本发明的方法和试剂盒中。适宜的脂质包括C14至C50脂肪族、芳基、芳烷基、芳稀基或芳炔基部分，其可包括至少一种杂原子，该杂原子选自氮、硫、氧和磷。其它适宜的脂质包括磷酸甘油酯、糖基甘油酯、鞘脂、固醇、磷脂酰乙醇胺、磷脂酰丙醇胺。结合部分的脂质文库的长度优选是至少5个单位，更优选至少8、10、15、20、25、50或更多个单位。

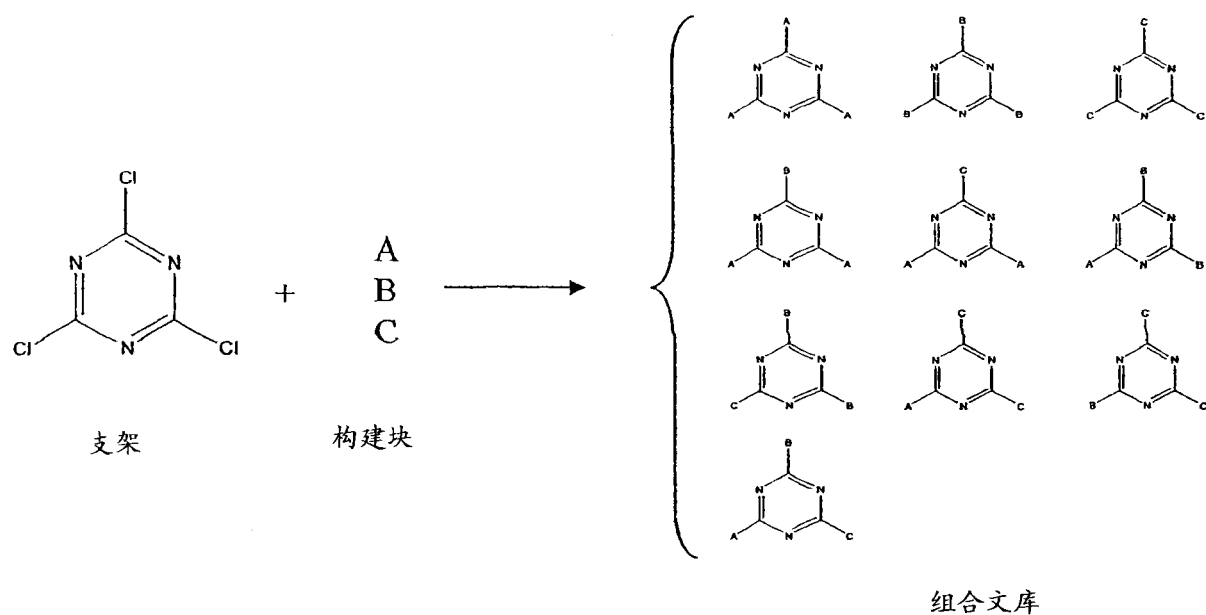
[86] 本发明也可以使用小有机分子作为结合部分。通常，所述分子具有能使其与分析物发生离子性、疏水性或亲和相互作用的特性。小有机结合部分包括通常用于色谱方法中的化学基团，诸如单-、二-和三-甲基氨基乙烷基基团，单-、二-和三-乙烷基氨基乙烷基基团，磺酰基，磷酰基，苯基，羧甲基基团等。例如，文库使用苯二氮卓（例如参见，Bunin et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91:4708-4712 (1994)）和类肽（例如 Simon et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 9367-9371 (1992)）。在其它实施方式中，结合部分使染料或三嗪衍生物。该列表并非穷举的，因为本领域技术人员可以很容易地识别数以千计的化学官能团，这些基团具有离子性、疏水性或亲和特性，适宜用作本发明的结合部分。以下将更详细地描述组合结合部分文库的制备和使用。

[87] 结合部分可以是购买的预先联结于载体的、在载体上合成的，或者可以是采用标准方法直接联结于或直接固定在载体上的（例如参见，Harlow and Lane, *Antibodies*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988); Biancala et al., *Letters in Peptide Science* 7 (291): 297 (2000); MacBeath et al., *Science* 289: 1760-1763(2000); Cass et al., ed., *Proceedings of the Thirteenth American Peptide Symposium*; Leiden, Escom, 975-979(1994); 美国专利5,576,220; Cook et al., *Tetrahedron Letters* 35: 6777-6780 (1994); 和 Fodor et al., *Science* 251(4995): 767-773 (1991))。

组合文库

[88] 在本发明的一个实施方式中，结合部分的文库是组合文库或其部分。组合化学文库是通过将多个化学“构建块”组合成所有可能的组合方式，以化学合成或生物合成方式形成的化合物的集合。例如，完全线形组合化学文库，诸如多肽文库，是通过将一组化学构建块（氨基酸）以每一种可能的方式组合成给定的化合物长度（即，多肽化合物中氨基酸的数目）从而形成的。举例来说，如果构建块的数目是 5 且构建体由五个成员组成，则可能的线形组合的数目是 5^5 或 3,125 个成员。在该情况下，构建块（A、B、C、D 和 E）是线形组合的，诸如：A-A-A-A-A；A-A-A-A-B；A-A-A-A-C；A-A-A-B-A；A-A-A-B-B；A-A-A-B-C；.....；A-A-B-A-A；A-A-B-A-B；A-A-B-A-C；.....；E-E-E-E-C；E-E-E-E-D；E-E-E-E-E。

[89] 组合文库的另一种形式是以支架为基础的。该构建体的基础是单个中心分子或核心，其中包含可被构建块取代的位置。三氯-三嗪（三个可取代位点）即为一种实例，其上可结合若干取代基。如果取代基的数目是三，则可能的组合数目即为 10。还可以考虑各取代基的相对定位，在这种情况下组合的数目会更大。



[90] 作为第三水平，可以将线性组合文库与以支架为基础的文库进行组合，其中后者文库的取代基是组合的线性序列。

[91] 可以通过化学构建块所述组合性混合从而合成数百万种化学

化合物。对于肽结合部分而言，所述长度优选限于 15、10、8、6 或 4 个氨基酸。本发明核酸结合部分的优选长度是至少 4 个，更优选 6、8、10、15，或至少 20 个核苷酸。寡糖长度优选为至少 5 个单糖单位，更优选 8、10、15、20、25 或更多个单糖单位。

[92] 组合文库可以是完全的或不完全的。生物聚合物的完全组合文库是这样一些文库，该文库中包含具有给定聚合物长度和组合的每一种可能的单体排列方式的代表方式。不完全文库是这样一些文库，该文库中缺少具有给定聚合物长度的一种或多种可能的单体排列方式。

[93] 肽结合部分是所主张的本发明的优选实施方式。生成适用于所主张的本发明的肽结合部分的方法是本领域技术人员众所周知的，例如“裂解、结合和重组”方法（例如参见，Furka et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37: 487-493 (1991)；Houghton et al., *Nature* 354:84-88 (1991)；Lam et al., *Nature*, 354: 82-84 (1991)；国际专利申请 WO 92/00091；和美国专利 5,010,175、5,133,866 和 5,498,538）和本领域中已知的其它方法。肽文库的表达还可见于 Devlin et al., *Science*, 249: 404-406 (1990)。

[94] 本领域众所周知的组合和合成化学技术可以生成包含数百万种成员的文库（Lam et al., *Nature* 354: 82-84 (1991) 和国际专利申请（PCT）WO 92/00091），各文库具有独有的结构。例如，由 18 种天然氨基酸制备的线性六聚物配体文库包含 34×10^6 种不同的结构。当还包括氨基酸类似物和异构体时，可能的结构数目事实上是无限的。此外，所述文库的每一成员均有可能具有结合不同分子的能力。组合文库的成员可在固体载体上合成或与固体载体连结，所述固体载体诸如珠，其中各珠的表面上基本上含有文库成员的数百万个拷贝。由于可将不同的珠与不同的文库成员结合以及用于结合文库成员的珠的总数目非常大，故能够与珠所结合的文库成员相结合的不同分子的可能数目非常巨大。

[95] Hammond 等，US 2003/0212253（2003 年 11 月 13 日）公开了组合文库，如下所述。肽结合部分文库可以由氨基酸合成，所述氨基酸能够提供相对于天然氨基酸而言增加的稳定性。例如，半胱氨酸、蛋氨酸和色氨酸可从文库中省略而包括非天然氨基酸诸如 2-萘丙氨酸

和正亮氨酸。N-端氨基酸可以是 D-异构体或可以被乙酰化以在存在氨基肽酶时提供更好的生物化学稳定性。结合部分的密度必须足以提供对靶分子充分的结合力，但又不能太高以防止结合部分与其自身相互反应而不与靶分子相互反应。结合部分的所需密度是 0.1 μmole -500 $\mu\text{mole/g}$ 载体干重，更优选地，结合部分的所需密度是 10 μmole -100 $\mu\text{mole/g}$ 载体。六聚肽文库在 Toyopearl-AF Amino 650M 树脂 (Tosohas, Montgomeryville, Pa) 上合成。树脂珠的大小为 60-130 μm /珠。通过与 Fmoc-Ala-OH 和 Boc-Ala-OH 的混合物 (1:3.8 摩尔比) 相结合从而完成起始树脂的初始置换。结合后，完全净 TFA 除去 Boc 保护基团。然后对所得去保护的氨基进行乙酰化。然后通过树脂珠上残留的 Fmoc-Ala-OH 位点组装肽链。采用标准 Fmoc 合成策略。在典型试验的一种实施方式中，采用 20% 哌啶/DMF 将六克 Fmoc-Ala-(Ac-Ala)-Toyopearl Resin 去保护 (2 x 20 分钟)，然后用 DMF 洗涤 (8 次)，然后等分为 18 个独立反应管。在各独立管中，单个 Fmoc-氨基酸与树脂 (BOP/NMM, 过量 5-10 倍) 结合 4-7 小时。然后洗涤各树脂并采用“裂解/混合”文库技术 (Furka et al., *Int. J. Peptide Protein Res.*, 37,487-493 (1991); Lam et al., *Nature*, 354,82-84 (1991); 国际专利申请 WO 92/00091 (1992); 美国专利号 5,010,175; 美国专利号 5,133,866; 和美国专利号 5,498,538) 进行组合。重复去保护和结合的循环直至完成氨基酸序列 (六聚物文库需六个循环)。在最后的结合循环中，在独立的反应管中采用 20% 哌啶/DMF 从肽中除去最终 Fmoc。采用 TFA 处理 (TFA:H. sub.20: Phenol, 90:5:5) 2 小时以除去侧链保护基团。充分洗涤树脂然后真空干燥。所得的肽密度通常为 0.06-0.12 mmol/g 树脂。所述氨基酸可以是 L 或 D-立体异构体或外消旋混合物。

[96] 测序并证实肽配体-树脂珠复合物的肽组成，通过 Commonwealth Biotechnologies, Inc., Richmond, Va 进行定量氨基酸分析从而计算树脂的置换度。通过采用 Hewlett Packard G1005A 的 Edman 降解于 Protein Technologies Laboratories, Texas A&M University 进行测序。

[97] 用于制备组合文库的装置是商业上可获得的 (例如参见, 357 MPS, 390 MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050

Plus, Millipore, Bedford, MA)。此外,多种组合文库本身即可从商业上获得(例如参见,ComGenex, Princeton, N. J., Tripos, Inc., St. Louis, MO, 3D Pharmaceuticals, Exton, PA, Martek Biosciences, Columbia, MD, 等)。

[98] 在某些肽文库实施方式中,肽在重组噬菌体的表面上表达从而产生大规模、易于筛选的文库。采用“噬菌体”方法(Scott and Smith, *Science* 249: 386-390,1990; Cwirla, *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87: 6378-6382,1990; Devlin *et al.*, *Science*, 49: 404-406, 1990),可以构建非常大规模的文库(10^6 - 10^8 种化学实体)。第二种方法主要使用化学方法,其实例是 Geysen 法(Geysen *et al.*, *Molecular Immunology* 23: 709-715, 1986; Geysen *et al.* *J. Immunologic Method* 102: 259-274,1987; 和 Fodor 等的方法(*Science* 251: 767-773,1991)。Furka 等(14th International Congress of Biochemistry, Volume #5, Abstract FR: 013,1988; Furka, *Int. J. Peptide Protein Res.* 37: 487- 493,1991), Houghton(美国专利号 4,631,211, 1986年12月公布)和 Rutter 等(美国专利号 5,010,175, 1991年4月23日公布)公开了用于制备作为激动剂或拮抗剂而得以检测的肽混合物的方法。

[99] 还可以使用其它用于生成化学多样性文库的化学物质。所述化学物质包括,但不限于:肽(例如, PCT 申请号 WO 91/19735), 编码的肽(例如, PCT 申请号 WO 93/20242), 随机生物寡聚物(例如, PCT 申请号 WO 92/00091), 苯二氮卓类(例如, 美国专利号 5,288,514), diversomer 诸如乙内酰脲、苯二氮卓类和二肽(Hobbs *et al.*, *Proc. Nczt. Acad.Sci. USA* 90 : 6909-6913 (1993)), 插烯酰多肽(vinylopgous polypeptide)(Hagihara *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 6568 (1992)), 具有葡萄糖支架的非肽性肽模拟物(Hirschmann *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 114: 9217-9218 (1992)), 小化合物文库的类似有机合成(Chen *et al.*, *J. Amer. Chem. Soc.* 116: 2661 (1994)), 寡碳酸酯(oligocarbamates)(Cho *et al.*, *Science* 261: 1303 (1993)), 和/或肽基磷酸酯(Campbell *et al.*, *J. Org. Chem.* 59: 658 (1994)), 核酸文库(参见 Ausubel, Berger and Sambrook, 均如上述), 肽核酸文库(例如参见, 美国专利 5,539,083), 抗体文库(例如参见, Vaughn *et al.*, *Nature Biotechnology*, 14 (3): 309-314 (1996) 和

PCT/US96/10287), 糖文库(例如参见, *Liang et al., Science, 274: 1520-1522 (1996)* 和美国专利 5,593,853), 小有机分子文库(例如参见, 苯二氮卓类, *Baum C&EN, Jan 18, page 33 (1993)*); 类异戊二烯, 美国专利 5,569,588; 噻唑烷酮(thiazolidinones)和间噻嗪烷酮(metathiazanones), 美国专利 5,549,974; 吡咯烷, 美国专利 5,525,735 和 5,519,134; 吗啉代化合物, 美国专利 5,506,337; 苯二氮卓类, 5,288,514, 等等)。

接头部分

[100] 本发明的结合部分任选地包括接头部分, 该部分使结合部分靶向地和/或可逆地连结至固体载体。示例性接头部分包括表位和 his-标签, 其可以与所要俘获的生物分子连结从而形成融合蛋白。在这些情况下, 可剪切的接头序列, 诸如特异性针对 Factor XA 或肠激酶的那些序列 (Invitrogen, San Diego, Calif.) 可任选地被包含在生物分子和俘获部分之间以便于融合分子组分的分离和/或分开。特异性识别设计配体的蛋白域也可被用作接头部分(例如参见, *Deisenhofer, J., Biochemistry 20 (1981) 2361-2370*)。本领域中已知多种其它等效的接头部分。例如参见, *Hochuli, Chemische Industrie, 12: 69-70 (1989)*; *Hochuli, Genetic Engineering, Principle and Methods, 12: 87-98 (1990)*, Plenum Press, N. Y.; and *Crowe, et al. (1992) OIAexpress: The High Level Expression & Protein Purification System, QIAGEN, Inc. Chatsworth, Calif.*; 上述文件引入此处作为参考。需要吸附的生物分子的抗原决定簇以及其它特征也可用作俘获部分标签。示例性接头部分包括聚-组氨酸(聚-his)或聚-组氨酸-甘氨酸(聚-his-gly)标签; flu HA 标签多肽及其抗体 12CA5 [*Field et al., Mol. Cell. Biol., 8: 2159-2165 (1988)*]; c-myc 标签及其 8F9、3C7、6E10、G4、B7 和 9E10 抗体 (*Evan et al., Molecular and Cellular Biology, 5: 3610-3616 (1985)*); 和单纯疱疹病毒糖蛋白 D (gD) 标签及其抗体 (*Paborsky et al., Protein Engineering, 3 (6): 547-553 (1990)*)。其它标签多肽包括 Flag-肽 (*Hopp et al., BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)*); KT3 表位肽 (*Martin et al., Science, 255: 192-194 (1992)*); α -微管蛋白表位肽 (*Skinner et al., J. Biol. Chem., 266: 15163-15166 (1991)*); 和 T7 基因 10 种蛋白

质肽标签 (Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6393-6397 (1990))。

C. 采用结合部分从试验样品中俘获分析物

[101] 通过在能使各结合部分与其对应分析物相结合的条件下将试验样品与结合部分接触可以俘获试验样品中存在的分析物。如上所述, 结合部分可以与试验样品直接接触, 或者结合部分可以首先与固体载体, 诸如试纸条、SELDI 探针和不溶性聚合珠、膜或粉末相连结。

[102] 在结合部分是珠文库的一部分的情况下, 珠体积与复合样品诸如血清的样品体积的比率可以是介于例如, 1:150 和 1:1 之间。珠与样品的比率越小, 增加低丰度或稀少分析物品种的相对浓度的能力即越强。在恒定珠:样品体积为 1:10 时, 血清所使用的珠体积可以是至少介于 0.0005 ml 和 15 mL 的珠之间 (包括 0.020 ml)。

[103] 在一个实施方式中, 在与试验样品接触之前, 将结合部分与固体载体结合。在该可选的实施方式中, 将固体载体仅与试验样品接触一段时间, 该时间足以使结合部分与分析物结合, 然后将固体载体撤离试验样品, 而分析物通过在分析物和结合部分之间形成复合体而被结合在固体载体上。

[104] 在一个实施方式中, 结合部分包含接头部分。在该实施方式中, 以能使试验样品中存在的分析物与结合部分结合的方式将结合部分与试验样品直接接触。经过足够的时间之后, 包含针对结合部分的俘获部分的互补俘获部分的固体载体与试验样品接触。这使得结合部分通过俘获部分与固体载体结合, 而保留了结合的分析物。

[105] 将结合部分与试验样品接触可通过如下步骤实施, 将二者混合, 将试验样品拭抹在结合部分上, 使试验样品流经其上结合了结合部分的固体载体, 以及对本领域技术人员而言显而易见的其它方法。将结合部分与分析物持续接触一段时间, 所述时间足以使得结合部分达到与样品的结合平衡。在一般实验室条件下, 该时间至少是 10 分钟。

固体载体

[106] 用于本发明的可接受的载体的种类非常广泛。载体可以是可透过性的或不可透过性的。其可以是连续性的或非连续性的, 挠性的

或非挠性的。载体可以由多种材料制成，所述材料包括陶瓷、玻璃、金属、有机高分子材料，或其组合。

[107] 优选的载体包括有机聚合物载体，诸如颗粒化或珠化载体、编织网和非编织网（诸如纤维网）、微孔纤维、微孔膜、空心纤维或空心管。还可以使用聚丙烯酰胺和矿物质载体诸如硅酸盐和碳酸盐（例如，羟基磷灰石）。编织网和非编织网可以具有规则或不规则的表面物理构型。尤为优选的实施方式包括球形的载体或不规则形状的珠或颗粒。

[108] 可以使用多孔材料，因为其能够提供大的表面积。多孔载体可以是合成的或天然的、有机的或无机的。具有多孔结构的适宜固体的孔径是至少大约 1.0 纳米 (nm) 而其孔体积是至少大约 0.1 立方厘米/克 (cm^3/g)。优选地，孔径是至少大约 30 nm，因为较大的孔对扩散的限制较小。优选地，孔体积是至少大约 $0.5\text{cm}^3/\text{g}$ ，因为孔周围较大的表面积会产生较大可能容量。优选的多孔载体包括颗粒载体或珠载体，诸如琼脂糖、亲水性聚丙烯酸酯、聚苯乙烯、矿物质氧化物和 Sepharose，包括球形和不规则形状的珠和颗粒。

[109] 为获得显著的优点，结合部分的载体优选是亲水性的。优选地，亲水聚合物是可水膨胀的以便使分析物得以更好的渗透。所述载体的实例包括天然多糖诸如纤维素、变性纤维素、琼脂糖、交联的葡聚糖、氨基变性的交联葡聚糖、瓜尔胶、变性瓜尔胶、黄胞胶、豆角胶和水凝胶。其它实例包括交联的合成亲水聚合物诸如聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯醇 (PVA) 和修饰的聚乙二醇。

[110] 可以通过多种机制实施结合部分与固体载体的连结。可以通过将预先制备的结合部分与固体载体连结从而用完全制备的结合部分衍生固体载体。可选地，可以通过将前体分子与固体载体连结以及随后在生长链（其通过第一前体分子与固体载体连结）中加入另外的前体分子，从而在固体载体上形成结合部分。当结合部分是聚合物，尤其是生物聚合物诸如多肽、多核苷酸或多糖分子时，这种将吸附剂构建在固体载体上的机制尤为有用。可以采用本领域已知的方法，通过连续地将单体组分（例如，氨基酸、核苷酸或单糖）添加至与固体载体相连的第一单体组分，从而得到生物聚合物吸附剂。例如参见，美国专利号 5,445,934 (Fodor *et al.*)。

[111] 例如，在特定实施方式中，组合文库，各固体载体，例如各个珠，可仅具有一种结合部分与其连结（受组合化学的限制）。

[112] 但是，在另一实施方式中，各固体载体可结合多种不同的结合部分。例如，可以采用裂解-和-合并的方法制备肽组合文库。可以将这些肽从其结合的珠上剪切下来，混合，然后与新的珠组结合，而不通过珠对肽进行任何分选。以这种方法，各个珠可结合多种不同的结合部分。由此，本发明提供了结合部分的组合文库，其中组合文库的多种不同成员与相同的固体载体相结合。少至一种而多至 10、100、1000、10,000、1,000,000、1,000,000,000 或更多种不同的结合部分可与单个固体载体相结合。在特定的实施方式中，固体载体的形式是珠，而单个的、不同类型的结合部分与各个珠相结合。例如，在肽结合部分文库中，代表一种可能的氨基酸排列的肽与一个珠结合，而代表另一种可能的氨基酸排列的肽与另一个珠结合，等等。

[113] 可采用可逆性或不可逆性相互作用将结合分子与固体载体连结。例如，可以采用下述载体来实现不可逆的相互作用，所述载体包括与结合部分化学连结的（任选地通过间隔基团）至少一个反应官能团，诸如羟基、羧基、巯基或氨基。适宜的官能团包括 N-羟基琥珀酰亚胺酯、磺酰酯、碘代乙酰基、醛、环氧、咪唑基氨基甲酸酯和溴化氰以及其它卤素活性载体。可以通过多种已知技术将所述官能团装备至载体。例如，可通过已知的方式采用氨基丙基三乙烯醚衍生玻璃表面。在某些实施方式中，结合部分在合成期间与固体载体结合，如本领域技术人员所已知的（例如，固相肽和核酸合成）。

[114] 可选地，可以采用与固体载体和/或结合部分相连结的接头部分，来实现固体载体与结合部分之间的可逆性相互作用。适用于本发明的多种接头部分均是已知的，其中某些在上面已经描述过。对本领域技术人员而言，接头部分用于连结不同的试剂的用途是众所周知的，本领域技术人员能够使用该公知技术仅通过常规试验即可制备适用于本发明的固体载体/结合部分结合物。

微粒化固体载体

[115] 本发明优选的实施方式采用小型、珠化、微粒化固体载体，其直径小于 1000 μm ，优选小于 100、10、1 或 0.1 μm 。所述载体通常

通过机械碾磨或其它将较大珠减小为粉末一致性的方式制得。微粒化固体载体是合乎需要的，因为相对于较大的珠而言，微粒化固体载体的表面积和体积的比率增大。微粒化固体载体还减小了包含本发明的组合文库时所需要的载体体积，由此可以使用更为复杂和有效的文库。然而采用现有的设备，由于受到所用滤器系统的原料大小的限制，故难以在非常小 ($<10\mu\text{m}$) 的珠上合成组合文库。为了克服这一问题，可以在珠上大批量合成组合文库，然后通过机械碾磨、粉碎或声粉碎将其碎裂化，从而形成粉末或微粒的集合。

[116] 使用这些技术，可以制备与不同结合部分相连结的微粒化固体载体。这又可以广泛地进行混合从而形成相对于混合更大或多种大小的不同珠而言，更为均一的组成。

[117] 微粒化固体载体可与活性表面共价连结，通过环氧基团、N-羟基琥珀酰亚胺、二甲基 3,3'-二硫代丙亚氨酸酯 (dithiopropionimide) 或戊二醛以形成与组合文库的配体形成化学键或与聚合物 (配体在其上合成) 的基础基质形成化学键，从而制成“试纸条”或芯片。这可以通过与肽文库的 N-端氨基交联而得以实现。

[118] 在表面上的非反应的交联基团可与小化学物质诸如巯基乙醇进行反应从而防止进一步的反应性。此外，还可对表面作进一步处理从而防止蛋白质的非特异性结合。

[119] 与微粒化固体载体所连结的结合部分相结合的靶分子可采用一种或多种方法进行洗涤，所述方法例如采用具有不同盐浓度和 pH 的缓冲液而结合的蛋白质被洗脱至具有低 pH、低或高离子强度的溶液、强离液剂、乙腈/甲酸等中。

[120] 可以采用多种方法根据分子量针对洗脱的靶分子分析蛋白质组成，所述方法例如包括，但不限于质谱法、SDS-PAGE、毛细管电泳，或通过等电聚焦进行 pI。

[121] 可选地，可以通过电泳洗脱靶分子。在该实施方式中，可用适宜的溶液诸如 Laemmli 缓冲液浸泡包含结合的靶分子的微粒化固体载体，并用 SDS-PAGE 分析确定蛋白质。可选的缓冲液可以包含脲，而蛋白质可通过在等电聚焦凝胶中的电泳进行分离。

[122] 可选地，微粒化固体载体可与填充剂混合并被压制成片剂形式。以这种形式，可以将其直接加入样品溶液或可替换地首先将其在

缓冲液中悬浮。

[123] 可将微粒化固体载体置于溶液诸如琼脂糖或丙烯酰胺中，并通过纤维上的交联剂的聚合反应而与凝胶自身交联或彼此交联从而形成整体柱物质。

[124] 可选地微粒化固体载体可固定在粘合剂薄膜上。

[125] 另一方法是将微粒化固体载体包埋多孔基质中。所述基质可包括能够使颗粒在融解充气阶段整合至其中的非编织纤维或网。

[126] 可根据需要将微颗粒整合至单张膜或层叠膜之中以便获得适宜的所需结合能力；其中微粒化固体载体通过压延或水缠绕（hydroentanglement）而被包埋在层之间。

[127] 膜组成可以选自天然或合成来源，包括聚酯聚丙烯纤维网。当然，本领域技术人员能够理解本节所描述的多种技术通常可用于本发明的其它实施方式。

1. 除去未结合的分析物

[128] 本发明的一个特征是根据本文所述方法的分析物的处理优选除减小分析物浓度之间的差异之外浓缩并部分纯化了结合的分析物。该特征的完全实现包括任选地将未结合的分析物与固体载体上的结合部分所结合的分析物洗涤分离。

[129] 优选通过将结合部分所结合的分析物与温和洗涤溶液相接触来实施洗去未结合的分析物。温和洗涤溶液意在除去通常见于初始包含分析物的试验样品中的污染物和未结合分析物。通常，洗涤溶液具有生理 pH 和离子强度而且在环境温度和压力条件下实施洗涤。

[130] 本领域技术人员无须过度试验即可实施适用于本发明的洗涤溶液的制备。除去污染物的方法，包括低严紧性洗涤方法，已有报道，例如见于 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Ausubel, *et al.* (1987 和定期增刊); *Current Protocols in Molecular Biology*; Deutscher (1990) "Guide to Protein Purification" in *Methods in Enzymology* vol. 182, 以及该系列中的其它卷。

D. 从结合部分分离俘获的分析物

[131] 可以采用多种方法，优选采用能够破坏结合部分和分析物之

间相互作用的水洗脱缓冲液从结合部分洗脱结合的分析物并进行分离。任何适宜的洗脱缓冲液均可用于此目的，包括变性剂诸如离液剂和有机溶剂。示例性洗脱缓冲液包括具有非常低或高离子强度的盐水溶液、去污剂溶液和有机溶剂。竞争性结合本发明的结合部分的试剂的溶液和悬液也可用于洗脱缓冲液，只要所述竞争性结合试剂不妨碍随后兴趣分析物的收集或分析。所选择的洗脱缓冲液具有高度的应用特异性，而且本领域技术人员通过公众领域中一般可获得的材料或通过常规试验即可很容易地对其进行鉴别（例如参见，*Protein Purification: Principles and Practice* (1982); 和 Deutscher (1990) "*Guide to Protein Purification*" in *Methods in Enzymology* vol. 182, 以及该系列中的其它卷）。

[132] 典型的顺序包括用氯化钠洗涤（以便通过优势离子交换作用收集蛋白质），然后使用乙二醇（主要通过疏水缔合针对蛋白质相互作用的洗脱液），然后将 pH 降低至 2.5（变性缓冲液）而最后使用盐酸胍。

[133] 适宜的洗脱缓冲液的实例包括修饰分析物和/或结合部分的表面电荷的那些缓冲液，诸如 pH 缓冲溶液。用于通过修饰酸度而破坏表面电荷的 PH 缓冲溶液优选是强缓冲液，足以将溶液的 pH 保持在酸性范围，即，pH 小于 7，优选小于 6.8、6.5、6.0、5.5、5.0、4.0 或 3.0；或保持在碱性范围内 pH 大于 7，优选大于 7.5、8.0、8.3、8.5、9.0、9.3、10.0 或 11.0。在特定实施方式中，洗脱缓冲液可包含 9 M 脲 pH 为 3、9 M 脲 pH 为 11 或 6.66% MeCN/ 13.33% IPA/79.2% H₂O/0.8% TFA 的混合物。一种方法对比另一种方法的选择要依赖于用于均衡样品的分析方法。

[134] 可选地，可以使用高盐浓度溶液，该溶液具有充分的离子强度以便遮蔽分析物和/或结合部分的电荷特性。此时，尤为优选的是具有多价离子的盐，例如碱土金属或过渡金属平衡离子的硫酸盐和磷酸盐，虽然解离为一个或多个单价的盐也适用于本发明，假若所得溶液的离子强度为至少 0.1，优选 0.25、0.3、0.35、0.4、0.5、0.75、1.0 mol l⁻¹ 或更高。举例来说，多种蛋白质分析物/结合部分相互作用对其环境的离子强度改变敏感。因此，可通过结合的分析物与盐溶液（优选无机盐溶液诸如氯化钠）接触而将分析物与结合部分分离。这可以采用

多种方法来完成,所述方法包括在洗脱缓冲液中水浴、浸透或浸渍固体载体,该载体上结合了分析物,或通过用洗脱缓冲液对固体载体冲洗、喷雾或洗涤。所述处理能够从与固体载体结合的结合部分上释放分析物。然后可以从洗脱缓冲液中回收所述分析物。

[135] 离液剂,诸如胍和脲,破坏围绕结合部分和所结合分析物的水封结构,这导致分析物和结合部分之间的复合解离。适于用作本发明的洗脱缓冲液的离液盐溶液是应用特异性的且本领域技术人员可通过常规实验进行制备。例如,适宜的离液洗脱缓冲液可包含浓度范围为 0.1-9M 的脲或胍。

[136] 基于去污剂的洗脱缓冲液从表面张力以及分子复合结构的方面修饰亲和性分子的选择性。适宜用作洗脱缓冲液的去污剂包括离子型和非离子型去污剂。非离子型去污剂通过修饰溶液的介电常数而破坏分子间的疏水性相互作用,而离子型去污剂通常以传递均一电荷的方式遮蔽感受性分子,这导致被遮蔽的分子排斥相似地被遮蔽的分子。例如,离子型去污剂十二烷基硫酸钠(SDS)以传递均一负电荷的方式遮蔽蛋白质。非离子型去污剂的实例包括 Triton X-100、TWEEN、NP-40 和辛基-糖苷。两性离子去污剂的实例包括 CHAPS。

[137] 另一类通过修饰溶液的介电常数而破坏疏水性相互作用的去污剂类化合物包括乙二醇、丙二醇和有机溶剂诸如乙醇、丙醇、乙腈和甘油。

[138] 本发明优选的洗脱缓冲液包括适用于质谱仪的基质物质。基质物质可包括洗脱缓冲液中。本发明的某些实施方式可任选地包括将分析物从结合部分上直接洗脱至质谱仪探针,诸如蛋白质或生物芯片。在本发明其它实施方式中,所述基质可与从结合部分上洗脱之后的分析物混合。而其它实施方式包括将分析物直接洗脱至 SEND 或 SEAC/SEND 蛋白质芯片,该芯片包括预先置于蛋白质芯片上的能量吸收基质。在后者这些实施方式中,洗脱缓冲液中即无须存在其它基质物质。

[139] 适用于本发明的其它洗脱缓冲液包括上述缓冲液组分的组合。由两种或多种上述洗脱缓冲液组分所制成的洗脱缓冲液能够基于多种洗脱特性而修饰复合物亚单位之间分子相互作用的选择性。

[140] 采用本发明分离的分析物所具有的分析物浓度范围或分析

物之间的浓度方差低于试验样品中初始存在的分析物浓度范围或浓度方差。例如，相对于针对试验样品实施本文所述的任何方法之前试验样品中所存在的相同分析物之间的浓度方差而言，在采用本发明的方法进行操作后，分离的分析物所具有的分析物浓度范围或与其它分离的分析物的浓度方差降低至少两倍，更优选地降低 10、20、25、50、100、1000 或更多倍。优选地，本发明的方法以最小限量的洗脱缓冲液进行实施，以确保洗脱缓冲液中分离的分析物的浓度最大化。更优选地，洗脱缓冲液中至少一种分离的分析物的浓度大于先前在试验样品中的浓度。

[141] 在分离俘获的分析物之后，可对该分析物进一步进行基于某些化学或物理特性诸如分子量、等电点或对化学或生物化学配体的亲和力的浓缩或分级分离处理。用于核酸、蛋白质和多糖的分级分离方法是本领域众所周知的，例如可见于 Scopes, *Protein Purification: Principles and Practice* (1982); Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning-A Laboratory Manual* (2nd ed.) Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Press, N. Y., (Sambrook) (1989); 以及 *Current Protocols in Molecular Biology*, F. M. Ausubel *et al.*, eds., *Current Protocols*, a joint venture between Greene Publishing Associates, Inc. and John Wiley & Sons, Inc., (1994 Supplement) (Ausubel)。

E. 检测分离的分析物

[142] 在已将分析物洗脱并分离以使其不含结合部分之后，可以采用本领域技术人员可获得的任何技术对分析物进行检测、定量或其它特征分析。将本发明的分析技术施用于复合试验样品的特征是相对于在初始试验样品中所检测的大范围的分析物浓度而言，所分离的分析物的浓度范围发生动态性方差减小。分析物浓度范围的这种减小能使，比较使用初始试验样品自身的分析物检测可用的百分比而言，初始试验样品中所检测的分析物大得多的百分比得以检测和特征分析，而不需要重新校准设备。实现分析物浓度范围的实际减小需要依赖多种因素，所述因素包括包括初始试验样品的性质和所用结合部分的性质和多样性。一般地，采用本文所述技术对分析物浓度方差的减小足以使至少 25%，更优选至少 30%、40%、50%、60%、70%、75%或

80%分离的分析物得以检测，而不需要重新校准设备。理想上，本发明能使至少 90%、95%、98%或更多分离的分析物得以检测，而不需要重新校准设备。

[143] 可以采用本领域技术人员已知的任何适宜方法实施对采用本文所述技术分离的分析物的检测。例如，使用染料的比色测定的适用范围非常广泛。可选地，可通过光谱法实施检测。光谱检测仪依靠的是反射率、紫外线和/或可见光吸收，或用适宜波长激发后的荧光中的变化来检测反应组分。示例性检测方法包括荧光分析法，吸光度、反射率和透光度光谱法。双折射、反射率或衍射中的变化还可用于监测复合物形成或反应进程。检测分子相互作用尤为有用的技术包括表面等离子共振、椭率检测法、共振镜技术、光栅偶联波导技术和多极共振光谱法。这些技术以及其它技术是本领域技术人员众所周知的，而且在无须过度试验的情况下，本领域技术人员可以很容易地将其应用于本发明。例如，这些技术以及其它技术的多种方式可见于 "Spectrochemical Analysis" Ingle, J.D.和 Crouch, S.R., Prentice Hall Publ. (1988) 以及 "Analytical Chemistry" Vol. 72, No. 17。

[144] 优选的检测方法是质谱分析法。质谱分析技术包括（但不限于）离子化（I）技术诸如基质辅助激光解吸（MALDI），连续或脉冲电喷雾（ESI）和相关方法（例如，IONSPRAY 或 THERMOSPRAY），或大集束撞击（massive cluster impact（MCI））；这些离子源可与检测形式相匹配，所述检测形式包括线形或非线形反射飞行时间（TOF）、单个或多个四极子、单个或多个扇形磁场、傅立叶变换离子回旋共振（FTICR）、离子阱，及其组合（例如，离子阱/飞行时间）。可以实施多种基质/波长组合（MALDI）或溶剂组合（ESI）以使用于离子化。例如，采用 ESI (Valaskovic, G. A. et al., (1996) Science 273: 1199-1202) 或 MALDI (Li, L. et al., (1996) J. Am. Chem. Soc. 118: 1662-1663) 质谱法检测分析物的 Subattomole 水平。ES 质谱法已经由 Fenn 等 (J. Phys. Chem. 88,4451-59 (1984); PCT 申请号 WO 90/14148) 提出而且在当前综述文章 (R. D. Smith et al., Anal. Chem. 62,882-89 (1990)以及 B. Ardrey, Electrospray Mass Spectrometry, Spectroscopy Europe, 4,10-18 (1992)) 中已经总结了目前的用途。Hillenkamp 等已经提出了 MALDI-TOF 质谱法 ("Matrix Assisted UV-Laser

Desorption/Ionization: A New Approach to Mass Spectrometry of Large Biomolecules," Biological Mass Spectrometry (Burlingame and McCloskey, editors), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, pp. 49-60,1990)。采用 ESI, 由于存在可用于质量计算的多个离子峰, 故可以在飞克分子量的样品中非常精确地测定分子量。本发明优选的分析法使用表面增强净解吸激光解吸/离子化(SELDI), 例如参照美国专利号 6,020,208 中所述。质谱法是本发明的实施方式中尤其优选的检测方法, 其中分析物的洗脱物直接置于质谱仪的探针或生物芯片上, 或其中洗脱缓冲液包含基质物质或在从结合部分上洗脱分析物之后与基质物质结合。

[145] 另一种广泛使用的检测方法是基于兴趣分析物的一种或多种物理特性的电泳分离。分析多肽和蛋白质分析物的特别优选的实施方式是二-维电泳。优选的应用是通过在第一维中的等电点, 以及通过第二维中的大小来分离分析物。用于分析物电泳分析的方法随所研究的分析物而广泛地变化, 但用于鉴定适用于给定分析物的特定电泳方法的技术是本领域技术人员众所周知的。

II. 鉴定生物标记

[146] 本发明的其它实施方式是采用上述珠化的结合部分来鉴定用于诊断疾病、感染或污染的生物标记。生物标记可以在上述任何样品中鉴定, 但优选是从取自活体(最优选是人)的诸如血、尿、脑脊液等的样品中鉴定。可以采用多种方法来鉴定生物标记。

[147] “生物标记”事实上可以是在生物样品中存在的且可被分离的或可在生物样品中检测的任何生物化合物, 诸如蛋白质及其片段、肽、多肽、蛋白聚糖、糖蛋白、脂蛋白、糖、脂质、核酸、有机或无机化合物、天然结合物和小分子。此外, 生物标记可以是整个的完整分子, 或者其可以是完整分子的一部分, 该部分可具有部分功能或例如可被抗体或其它特异性结合蛋白质所识别。生物标记可以是表位特异性抗体。如果生物标记的可检测方面与给定表型(诸如生命体中的特定疾病状态, 或水体中的污染水平)相关, 则生物标记即被视为有益的。例如, 所述可检测方面可以包括来自个体的生物样品中生物标记的存在、缺失或浓度, 和/或其作为生物标记图谱一部分的呈现。生

物标记的所述可检测方面在本文中称为“特征”。例如，特征还可以是生物标记的两个或多个可检测方面的比率，所述生物标记可以具有或不具有已知的识别性。“生物标记图谱”包括至少两种所述特征，其中所述特征可与生物标记（诸如核酸和糖）的相同或不同分类相对应。生物标记图谱还可包括至少 3、4、5、10、20、30 或更多种特征。在一个实施方式中，生物标记图谱包括数百种，或甚至数千种特征。在其它实施方式中，生物标记图谱包括至少一种内标的至少一种可检测的方面。

[148] “表型”是生物体的可观测的物理和生物化学特性，其由遗传构成和环境影响二者所决定。可选地，在本发明的文中，表型还可以与自然的无生命方面相关联，例如水体的表型包括水体可（物理地或化学地）检测的那些方面。例如，湖泊的表型包括水温、酸度、矿物质含量、氧含量，无论其是否能够维持生命以及何种生命形式。

[149] “表型改变”是一种可以检测的与给定表型相关的参数的改变。例如，表型改变可包括体液中生物标记的增加或减少，其中所述变化与疾病状态相关。表型改变可进一步包括患者的给定状态的可检测方面的改变，所述患者在生物标记的可检测方面无改变。例如，表型的改变可包括体温、呼吸率、脉搏、血压或其它生理学参数的可检测改变。所述改变可借助临床观察和检测采用本领域技术人员众所周知的常规技术进行测定。如本文所使用的，“常规技术”是指可根据表型改变对个体进行分类但不会获得根据本发明的生物标记图谱的那些技术。

[150] 采用所主张的发明来鉴定物种或组织中的诊断性生物标记需要至少两种生物样品的可用性。所提供的生物样品可以是如下形式：对照组和试验组、对照组和试验个体，在不同的时间取自相同的个体或对本领域技术人员来说显而易见的任何其它排列形式。

[151] 按照本文所述用珠化的结合部分文库处理所得到的各个样品。以这种方式，能够检测更多的推定生物标记，如下面实施例部分所述。其发生的原因是因为所述结合部分缩窄了样品中存在的分析物浓度范围的方差，由此使低丰度和高丰度分析物均能得以检测。

[152] 在用本发明的结合部分文库处理之后，对于各个生物样品，分别针对与所述结合部分相结合的分析物进行洗脱和合并。然后分析

合并的样品以确定样品中的任何共同分析物是否表现出差异表达（一种样品中的表达增强比其它样品），或者在一种样品中表达而在其它样品中无表达。表现出所述差异表达的分析物即可被视为针对在各生物样品源之间观察到的表型改变或差异的推定生物标记。然后可以实施进一步的统计学和分析检测以便以所需确定度将该生物标记与表型改变相关联。

[153] 用于鉴定生物标记的优选分析性分析法是与上述用于一般鉴定分析物的那些方法相同的方法，所述分析物与本发明的结合部分相结合。

III. 试剂盒

[154] 本发明还包括试剂盒，其含有能够使本领域技术人员实施本文所述技术的组分。为此目的，试剂盒最基本的要素是提供多种结合部分，每一种结合部分具有经选择的量以便俘获预先确定量的不同分析物。在本发明的某些试剂盒实施方式中，提供了与固体载体，优选不溶性珠结合的结合部分。在其它实施方式中，分别提供固体载体和结合部分。当分别提供时，结合部分和/或固体载体包括俘获部分，该部分能够使本发明的操作者在实施本文所述发明期间将结合部分结合于固体载体。分别提供结合部分和固体载体的试剂盒可任选地提供实施结合部分与固体载体的结合反应所需的其它试剂。

[155] 本发明的试剂盒还包括多种容器，该容器中含有用于样品制备和分析物分离的组分。具有该特性的示例性组分包括一种或多种洗涤溶液，该溶液足以从特异性结合分析物的结合部分上除去未结合物质，和至少一种洗脱溶液，该溶液足以释放与结合部分特异性结合的分析物。

[156] 试剂盒实施方式可任选地包含在本发明的方法中使用结合部分的文库的说明书。

[157] 虽然为了清楚和便于理解而通过例证和实施例的方式对上述发明给出了某些详细的描述，但对本领域技术人员来说，在本发明的教导下，在不背离本发明的精神和范围的情况下，作出等同物的特定变型、改变、修饰和替换是显而易见的。故此，本文所描述的实施方式涉及的是多种修饰、改变等等，而本发明的范围单独地参照所附

权利要求而确定。本领域技术人员能够很容易地识别多种能够变化、改变或修饰而产生基本上相似的结果的非关键参数。

[158] 虽然本文所描述的本发明的各个元素包含多个实施方式，但是应当理解的是（除非另有描述），所给出的本发明的元素的各个实施方式能够与本发明的其它元素的各个实施方式一同使用，所述各个使用方式的目的在于构成本发明独特的实施方式。

[159] 根据上述内容可以理解，本发明的应用非常广泛的。通过以下实施例进一步描述本发明，所述实施例仅为描述性的，并不意在以任何方式对本发明的定义和范围进行限制。

实施例

实施例 1: 人血清蛋白浓度范围的减小

[160] 本实施例举例说明了上述本发明的一种实施方式如何施用于复合生物样品（在此例中是人血清）。在本实施例中，通过选择性地使血清蛋白吸附至与不溶性珠结合的六肽来实现血清蛋白浓度方差的减小。在本例的结合部分群体（其形式为分拆、重组和合并的珠组合文库）中，可以呈递超过 1×10^6 种可能的六肽排列方式。以这种形式，高丰度血清分析物（诸如白蛋白）与六肽结合部分相结合，但其仅能达到与特定结合部分的饱和度相等的水平。相反，由于识别低丰度分析物的结合部分的量是非限制性的，故低丰度血清分析物几乎全部被结合。该选择性结合的结果导致由所用结合部分所识别的蛋白质的分析物浓度范围减小，而不会出现在意在选择性地除去高丰度分析物的方法中，丢失固有的低丰度分析物的风险。因此，使用所述方法分离的血清分析物的大部分可以在一种批量分析中进行检测，而无需重新校对检测装置。这与下述情况相反，即当必须反复重新校准检测装置以便检测未处理的血清中相同分析物，从而在血清试验样品中检测相同分析物时所出现的情况。在本实施例中，以 4°C ，14,000 rpm 离心 30m L 血清 15 分钟，然后从上层小心地除去全部脂质物质。将所余血清通过 $0.8 \mu\text{m}$ 滤器过滤，然后通过 $0.45 \mu\text{m}$ 滤器过滤。保留 $500 \mu\text{l}$ 该过滤的血清作为非均一化对照样品。将大约 1mL 六肽文库（在 20% 甲醇中溶胀过夜，然后以含有 140mM 氯化钠的 20mM 柠檬酸钠缓冲液 pH7 过夜，然后洗涤 3 次以除去细小颗粒物质）等分加入三个重力流

动柱的各个柱中。六肽文库的各个等份与 7.6 mL 等份的过滤血清于室温下温和搅动孵育 2 小时。孵育后，排干柱，收集的体积代表流通液（flow-through）。保留 1mL 的流通液用于分析。然后立即用 20 mL 柠檬酸盐缓冲液(20 mM 柠檬酸钠, 140 mM 氯化钠, pH= 7)洗柱。另外收集第一个 1 mL 的洗出液用于分析。洗涤后，从三个柱重复份的每个中除去若干个 200 uL 等份的树脂，然后按下述进行处理。针对来自各个重复份的第一个 200 μ L 等份的树脂，用 200uL 2x LDS 缓冲液+DTT 还原剂（通过混合 500 uL 4x LDS, 200 uL 10x DTT, 和 300 uL dH₂O 制备）于 90℃加热该样品 10 分钟。该样品冷却后，将其以 2,000 rpm 离心 1 分钟。收集上清液，然后保存于-20℃以备 1D-凝胶分析。针对来自各个重复份的第二个 200 μ L 等份的树脂，用 400uL 6M 尿素以批量形式孵育该样品 1 小时，伴以温和搅动。然后 2,000 rpm 离心该样品 1 分钟以形成片状六聚物配体珠文库，然后收集上清液用 SELDI-质谱仪进行分析。针对来自各个重复份的第三个 200 μ L 等份的树脂，用 400uL 6M GuHCl 以批量形式孵育样品 1 小时，伴以温和搅动。然后 2,000 rpm 离心该样品 1 分钟以形成片状六聚物配体珠文库，然后收集上清液用 SELDI-质谱仪进行分析。

[161] 随后在 IMAC-Cu ProteinChip Arrays 上对为了 SELDI-质谱仪分析而保留的全部样品进行处理。首先使用 50uL 100mM CuSO₄ 孵育 5 分钟以使用 Cu 使表面带电来制备 IMAC 阵列。在室温下持续摇动从而完成孵育。孵育阶段过后，用蒸馏水冲洗阵列以便除去过剩的 CuSO₄。然后用 pH4.0 100mM 醋酸钠于室温下持续摇动中和带电的 IMAC-Cu 阵列 5 分钟。孵育期过后，除去醋酸钠并用蒸馏水冲洗 IMAC-Cu 阵列。然后对 IMAC-Cu 阵列预处理两次，采用 150ul 结合缓冲液（0.1M NaPO₄, 0.5M NaCl, pH7）于室温下持续摇动 5 分钟。预处理后，除去这种缓冲液然后加入新的 90ul 等份的结合缓冲液，随后加入 10ul 的来自均一化试验的样品（总孵育体积为 100ul）。然后在 IMAC-Cu 阵列上持续摇动孵育样品 30 分钟。孵育后，除去过剩的样品体积，然后用 150 uL 结合缓冲液洗涤阵列三次；每次洗涤 5 分钟并持续摇动。最终洗涤之后，用 150uL 蒸馏水冲洗 IMAC-Cu 阵列两次，然后干燥。作为最终步骤，将 1uL 50%饱和 SPA（在 50%乙腈, 0.5%三氟乙酸中）加至各点，干燥，然后用额外的 1 ul 50% SPA 重复添加

基质。该阵列随后即可用于 SELDI-质谱仪的分析。

[162] 图 6-8 中描述了均一化前后过滤血清的 SELDI-质谱的对比。样品的质谱分析显示出，由于高丰度分子的减少还降低了能够隐匿初始样品中的峰的离子抑制作用，故此峰高度平缓增加而且可见峰的数目增加。预期这种方法将增加复合溶液（诸如血清）中可检测分析物的数量，该增加的数量超过使用原始复合溶液（未施以本发明方法）的可检测分析物数量至少 0.5，更为可能的是 1、2、3 或更大的数量级。

[163] 已经发现，具有 700,000 种不同成员的六肽文库对血清所产生的结果与具有 6400 万种成员或 300 万种成员的文库所产生的结果相似。

表 1: 蛋白的峰检测, 所述蛋白 (S/N 比>3) 来自未经均一化珠处理的血清。所检测的全部峰= 191

M/z	质量	TOF	强度	MZ面积	TOF面积	S/N
2015.66	2014.65	17.177	6.4172	127.90	0.5429	49.02
2036.48	2035.47	17.265	5.3084	143.63	0.6038	40.64
2088.13	2087.12	17.482	2.2443	48.87	0.2033	17.28
2158.14	2157.14	17.771	1.1293	8.45	0.0346	8.76
2236.71	2235.71	18.090	1.4596	19.01	0.0765	11.41
2274.25	2273.24	18.240	2.6476	59.30	0.2367	20.78
2297.37	2296.36	18.332	1.7593	25.74	0.1021	13.84
2348.05	2347.05	18.532	1.1940	16.12	0.0632	9.44
2387.06	2386.06	18.685	1.0549	10.47	0.0408	8.38
2433.77	2432.76	18.865	1.1221	9.13	0.0352	8.95
2510.49	2509.48	19.159	1.1701	13.08	0.0497	9.41
2548.37	2547.36	19.302	1.4879	17.14	0.0645	12.01
2588.13	2587.13	19.451	1.1253	24.23	0.0903	9.12
2645.66	2644.65	19.665	0.8016	6.61	0.0244	6.53
2672.54	2671.53	19.764	0.7100	7.81	0.0287	5.80
2701.93	2700.92	19.872	0.6059	1.89	0.0069	4.96
2714.04	2713.03	19.916	0.7967	5.25	0.0192	6.53
2744.23	2743.22	20.026	1.5753	15.67	0.0569	12.96
2765.83	2764.82	20.105	1.9933	35.32	0.1277	16.43
2798.60	2797.60	20.223	1.8114	17.06	0.0614	14.98
2822.57	2821.56	20.309	2.2505	28.31	0.1013	18.66
2841.99	2840.98	20.378	1.0515	13.66	0.0487	8.73
2874.68	2873.68	20.494	1.3501	16.29	0.0578	11.25
2882.13	2881.12	20.521	1.0852	7.18	0.0254	9.05
2986.19	2985.19	20.886	1.6218	16.72	0.0582	13.66
3008.50	3007.50	20.964	0.7147	2.51	0.0087	6.03
3035.73	3034.72	21.058	0.6588	4.37	0.0151	5.58
3051.05	3050.04	21.111	0.3948	1.66	0.0057	3.35
3069.95	3068.95	21.176	0.4739	1.33	0.0046	4.02
3092.47	3091.47	21.253	1.1918	16.40	0.0561	10.14
3114.57	3113.56	21.328	0.4997	1.64	0.0056	4.26
3151.05	3150.05	21.452	0.6513	5.28	0.0179	5.57
3164.53	3163.52	21.498	0.9793	11.19	0.0378	8.39
3232.23	3231.22	21.725	1.5813	18.92	0.0633	13.63
3243.48	3242.47	21.763	0.7721	6.38	0.0213	6.66
3298.21	3297.21	21.945	3.4654	36.61	0.1212	30.07
3313.89	3312.88	21.997	5.1135	76.84	0.2537	44.43
3333.83	3332.82	22.063	2.5432	37.75	0.1242	22.14
3384.92	3383.91	22.230	2.1432	65.06	0.2129	18.75
3407.63	3406.63	22.304	1.0824	12.54	0.0408	9.49
3429.51	3428.51	22.375	0.6049	3.05	0.0099	5.31
3452.91	3451.90	22.451	0.8204	7.29	0.0236	7.22
3476.39	3475.38	22.527	0.5334	4.42	0.0142	4.71
3503.26	3502.25	22.614	0.5524	2.93	0.0094	4.89
3511.64	3510.63	22.641	0.4732	2.83	0.0091	4.19
3528.97	3527.96	22.696	0.4620	5.10	0.0163	4.10
3546.06	3545.06	22.751	0.5973	6.70	0.0214	5.30
3568.26	3567.25	22.821	1.0034	9.59	0.0305	8.93
3590.14	3589.14	22.891	1.0356	32.09	0.1018	9.23
3623.82	3622.81	22.998	0.4337	3.89	0.0123	3.88
3637.24	3636.23	23.040	0.4513	6.62	0.0208	4.04
3694.92	3693.91	23.221	0.5609	5.95	0.0186	5.05
3729.43	3728.42	23.329	0.4638	2.79	0.0087	4.19
3764.53	3763.52	23.438	0.4174	1.51	0.0047	3.78
3805.09	3804.09	23.563	0.8459	10.90	0.0336	7.69
3823.32	3822.31	23.619	1.7052	28.82	0.0886	15.54
3848.08	3847.07	23.695	1.0869	14.13	0.0433	9.93
3855.69	3854.69	23.719	0.8424	8.51	0.0260	7.70
3898.88	3897.87	23.850	2.3732	28.05	0.0854	21.77
3921.25	3920.25	23.919	1.1576	12.73	0.0387	10.64
3942.17	3941.16	23.982	0.5628	6.01	0.0182	5.18
3966.53	3965.52	24.056	0.5595	7.51	0.0227	5.16
3980.76	3979.76	24.099	0.4952	3.90	0.0118	4.58

4027.93	4026.93	24.240	0.3813	2.66	0.0080	3.54
4058.52	4057.52	24.332	0.5159	5.65	0.0169	4.80
4076.90	4075.89	24.386	1.2618	21.95	0.0653	11.77
4161.26	4160.25	24.636	9.0816	189.47	0.5588	85.34
4187.94	4186.94	24.715	3.9580	98.13	0.2882	37.28
4211.39	4210.38	24.784	1.9753	20.07	0.0588	18.65
4225.32	4224.31	24.824	1.7662	17.90	0.0524	16.69
4237.59	4236.58	24.860	1.0754	10.50	0.0307	10.18
4259.14	4258.13	24.923	1.1283	15.93	0.0464	10.70
4277.21	4276.20	24.976	0.9969	9.99	0.0290	9.47
4306.31	4305.31	25.060	1.4922	28.79	0.0835	14.21
4317.27	4316.27	25.092	1.4477	27.75	0.0803	13.80
4387.42	4386.41	25.294	0.5169	3.99	0.0114	4.96
4421.28	4420.27	25.391	0.6385	10.89	0.0311	6.14
4476.55	4475.55	25.549	1.6525	25.13	0.0714	15.98
4498.63	4497.62	25.611	0.8303	12.41	0.0352	8.04
4524.12	4523.11	25.683	0.5423	5.72	0.0162	5.27
4545.86	4544.85	25.745	0.7655	15.04	0.0424	7.45
4574.44	4573.43	25.825	0.2026	0.70	0.0020	1.98
4589.43	4588.42	25.867	0.2134	1.61	0.0045	2.08
4610.07	4609.07	25.925	0.1564	0.29	0.0008	1.53
4632.98	4631.97	25.989	0.9352	10.71	0.0299	9.17
4653.41	4652.40	26.046	0.3656	2.90	0.0081	3.59
4673.98	4672.97	26.104	0.2227	0.95	0.0026	2.19
4705.09	4704.08	26.190	0.1266	0.60	0.0017	1.25
4721.34	4720.33	26.235	0.5855	7.57	0.0209	5.79
4746.55	4745.55	26.305	0.5041	8.28	0.0228	4.99
4760.71	4759.70	26.344	0.4023	4.44	0.0122	3.99
4776.82	4775.81	26.388	0.5845	8.39	0.0231	5.81
4795.96	4794.95	26.441	0.8917	14.07	0.0386	8.87
4817.65	4816.64	26.500	0.7853	15.13	0.0414	7.83
4900.93	4899.92	26.727	0.5187	5.56	0.0151	5.21
4946.35	4945.35	26.850	0.3060	3.20	0.0086	3.09
4963.56	4962.55	26.897	0.4123	6.74	0.0182	4.16
5010.78	5009.78	27.024	12.5885	211.54	0.5681	127.69
5031.99	5030.99	27.081	5.8531	84.84	0.2273	59.48
5053.19	5052.18	27.137	3.0847	47.31	0.1265	31.41
5074.18	5073.17	27.193	1.7893	33.97	0.0906	18.25
5109.70	5108.69	27.288	1.4186	37.78	0.1004	14.52
5174.52	5173.52	27.460	0.4570	6.47	0.0171	4.70
5215.36	5214.36	27.568	0.7393	7.91	0.0208	7.64
5234.38	5233.38	27.618	0.5442	9.17	0.0241	5.63
5273.44	5272.43	27.720	0.2111	1.10	0.0029	2.19
5340.59	5339.58	27.895	0.5133	5.40	0.0140	5.36
5504.23	5503.22	28.318	0.3130	3.85	0.0099	3.32
5525.79	5524.79	28.373	0.3048	4.10	0.0105	3.24
5584.59	5583.58	28.523	0.4938	16.84	0.0429	5.27
5710.82	5709.81	28.842	0.2989	6.40	0.0161	3.23
5758.22	5757.21	28.961	0.3075	2.85	0.0071	3.33
5832.21	5831.20	29.146	0.4003	4.57	0.0114	4.37
5871.67	5870.66	29.244	0.3528	4.17	0.0103	3.86
5885.14	5884.13	29.277	0.3028	7.90	0.0195	3.32
6013.84	6012.83	29.595	0.7071	19.42	0.0477	7.84
6034.06	6033.06	29.644	0.4344	5.55	0.0136	4.83
6396.04	6395.03	30.517	3.0543	118.14	0.2814	35.06
6455.26	6454.25	30.657	26.1287	771.78	1.8272	301.52
6477.39	6476.38	30.710	12.0491	218.47	0.5159	139.32
6499.00	6497.99	30.761	7.2773	135.33	0.3190	84.31
6521.19	6520.18	30.813	5.3012	97.81	0.2302	61.54
6542.80	6541.79	30.864	4.2675	88.66	0.2083	49.63
6638.04	6637.03	31.087	20.2348	631.52	1.4750	237.36
6654.30	6653.29	31.125	19.0952	360.62	0.8401	224.32
6675.85	6674.84	31.175	9.8609	187.44	0.4359	116.07
6698.42	6697.41	31.227	6.2424	112.83	0.2620	73.63
6718.01	6717.00	31.273	4.2544	83.96	0.1946	50.27
6739.45	6738.44	31.322	2.7267	46.03	0.1065	32.28
6765.34	6764.34	31.382	1.9976	39.64	0.0916	23.70
6810.67	6809.66	31.487	2.0664	79.46	0.1831	24.62
6858.73	6857.73	31.597	1.8896	104.59	0.2400	22.61
7151.49	7150.48	32.262	0.9514	22.94	0.0516	11.69
7172.92	7171.91	32.310	1.0333	43.31	0.0971	12.72
7472.88	7471.87	32.977	0.4560	13.01	0.0286	5.77
7617.94	7616.93	33.294	0.4693	11.51	0.0251	6.02
7654.14	7653.13	33.373	1.3314	67.51	0.1465	17.12
7827.96	7826.96	33.748	0.2802	7.57	0.0163	3.66

7926.90	7925.89	33.960	2.4904	114.75	0.2450	32.85
7958.23	7957.23	34.027	1.3527	31.25	0.0665	17.89
8133.31	8132.30	34.398	7.5286	658.02	1.3865	101.22
8303.10	8302.09	34.754	0.8155	44.66	0.0931	11.14
8365.08	8364.07	34.883	0.5422	19.48	0.0405	7.45
8612.18	8611.18	35.393	10.6716	1028.00	2.1038	150.06
8774.36	8773.35	35.723	2.1558	178.91	0.3625	30.78
8940.04	8939.03	36.058	4.2497	277.17	0.5570	61.65
9028.23	9027.22	36.235	0.5131	9.18	0.0184	7.51
9116.51	9115.50	36.411	0.6114	14.83	0.0295	9.02
9162.72	9161.71	36.503	0.8263	59.88	0.1189	12.25
9307.46	9306.45	36.789	0.5852	23.46	0.0462	8.80
9454.10	9453.09	37.077	1.5935	140.29	0.2741	24.30
9585.08	9584.07	37.332	0.1746	4.40	0.0085	2.70
9683.68	9682.67	37.523	0.2391	6.15	0.0119	3.73
9743.77	9742.76	37.639	0.4345	27.31	0.0525	6.82
10072.71	10071.70	38.267	0.2760	15.39	0.0291	4.47
11533.88	11532.87	40.940	0.2410	19.15	0.0339	4.56
11691.05	11690.04	41.217	0.2518	35.15	0.0617	4.84
12454.78	12453.77	42.538	0.5778	57.72	0.0983	12.12
13574.94	13573.93	44.405	1.1111	178.32	0.2910	26.75
13715.41	13714.41	44.633	0.4473	42.34	0.0686	10.97
13866.02	13865.01	44.877	0.3384	35.35	0.0570	8.46
14034.19	14033.19	45.148	0.2951	53.00	0.0849	7.55
14392.29	14391.28	45.719	0.5330	106.02	0.1676	14.32
15118.66	15117.65	46.855	0.3627	57.41	0.0886	10.83
15313.34	15312.33	47.155	0.1527	18.28	0.0280	4.70
15870.49	15869.48	48.003	0.1483	34.49	0.0519	4.99
16659.22	16658.21	49.178	0.1152	23.78	0.0350	4.45
17261.53	17260.53	50.057	0.2182	48.44	0.0702	9.49
17403.26	17402.25	50.262	0.2735	94.70	0.1356	12.26
22185.18	22184.17	56.732	0.6056	798.59	1.0136	49.97
28054.19	28053.18	63.781	0.2571	107.68	0.1221	39.27
29051.79	29050.78	64.903	0.1030	74.85	0.0832	16.04
33245.74	33244.73	69.421	1.6601	1750.64	1.8258	281.43
34281.46	34280.45	70.492	0.5196	597.67	0.6025	89.96
39898.16	39897.15	76.038	0.0257	11.52	0.0110	4.98
44457.39	44456.39	80.258	0.3417	989.32	0.8917	69.77
49939.53	49938.52	85.055	0.0226	19.83	0.0169	4.91
51350.04	51349.03	86.246	0.0499	94.72	0.0792	10.85
55656.75	55655.74	89.784	0.0711	186.88	0.1514	15.47
59215.94	59214.93	92.607	0.1083	250.62	0.1967	23.63
66317.60	66316.59	97.995	2.2783	6680.56	4.9211	498.39
72737.16	72736.15	102.622	0.1259	350.29	0.2456	27.61
75001.97	75000.96	104.206	0.1127	216.04	0.1488	24.73
80013.65	80012.64	107.627	0.0678	279.89	0.1869	14.91
88591.36	88590.35	113.242	0.0472	171.17	0.1093	10.41
99724.32	99723.31	120.139	0.0857	436.66	0.2624	18.82
110663.70	110662.70	126.550	0.0315	123.51	0.0705	7.11
115751.09	115750.08	129.423	0.0392	84.89	0.0477	9.03
116910.94	116909.93	130.069	0.0411	256.88	0.1413	9.53
132576.48	132575.47	138.501	0.2015	1519.36	0.7867	49.62
175561.80	175560.79	159.360	0.0192	204.64	0.0927	5.21

表 2: 蛋白的峰检测, 所述蛋白 (S/N 比>3) 来自采用均一化珠处理后的血清。所检测的全部峰= 271

M/z	质量	TOF	强度	MZ面积	TOF面积	S/N
2021.84	2020.83	17.207	0.6376	12.12	0.0503	8.96
2067.93	2066.93	17.398	0.6601	6.51	0.0267	9.31
2087.13	2086.12	17.476	0.7201	7.41	0.0303	10.18
2106.09	2105.09	17.554	0.4864	3.56	0.0145	6.89
2180.24	2179.23	17.853	0.5382	3.23	0.0129	7.67
2221.86	2220.85	18.019	1.4170	8.54	0.0339	20.27
2240.96	2239.96	18.095	0.5589	6.06	0.0240	8.01
2266.94	2265.93	18.198	0.5494	3.98	0.0157	7.89
2293.08	2292.07	18.300	0.3779	2.12	0.0083	5.44
2339.18	2338.18	18.480	0.9868	7.77	0.0301	14.26
2378.63	2377.62	18.632	0.6337	4.75	0.0183	9.19
2396.27	2395.27	18.700	0.5728	5.76	0.0221	8.32
2439.97	2438.96	18.867	1.0408	6.19	0.0235	15.17
2467.12	2466.12	18.969	0.9706	8.52	0.0322	14.18

2497.92	2496.92	19.086	0.9600	7.48	0.0281	14.06
2526.24	2525.23	19.192	0.8088	7.31	0.0273	11.88
2553.87	2552.86	19.295	2.9512	30.44	0.1132	43.44
2625.36	2624.35	19.559	0.5117	2.40	0.0088	7.58
2655.34	2654.33	19.669	0.9776	9.38	0.0343	14.51
2683.62	2682.62	19.772	19.4999	144.76	0.5259	290.17
2706.16	2705.15	19.853	2.6950	27.91	0.1010	40.18
2729.04	2728.03	19.936	1.1192	9.74	0.0351	16.72
2801.03	2800.03	20.194	1.4372	7.80	0.0278	21.60
2841.72	2840.71	20.338	5.3061	38.45	0.1359	80.01
2864.83	2863.82	20.420	0.9591	9.76	0.0344	14.49
2889.55	2888.55	20.507	3.5170	27.58	0.0967	53.24
2930.16	2929.15	20.649	0.6606	5.11	0.0178	10.03
2946.66	2945.66	20.706	1.4513	12.23	0.0425	22.07
2991.41	2990.41	20.861	1.0116	11.76	0.0406	15.44
3068.43	3067.42	21.125	2.6692	27.74	0.0946	41.00
3091.47	3090.47	21.204	0.5713	6.74	0.0229	8.79
3104.33	3103.32	21.247	2.7977	23.84	0.0808	43.10
3128.84	3127.84	21.330	0.4361	3.91	0.0132	6.73
3159.53	3158.53	21.434	1.1023	8.52	0.0286	17.06
3186.78	3185.78	21.525	0.2998	2.51	0.0084	4.65
3203.52	3202.51	21.581	0.6912	5.44	0.0182	10.73
3224.18	3223.17	21.650	2.4947	24.72	0.0823	38.81
3237.12	3236.11	21.693	1.2228	9.75	0.0324	19.04
3247.56	3246.55	21.728	0.4539	3.69	0.0122	7.07
3289.31	3288.30	21.866	13.5948	102.60	0.3383	212.58
3311.94	3310.93	21.940	1.9602	14.93	0.0491	30.71
3336.82	3335.81	22.022	4.7302	36.91	0.1209	74.25
3346.26	3345.25	22.053	1.2829	10.27	0.0336	20.15
3358.47	3357.46	22.093	0.6222	3.29	0.0108	9.78
3373.64	3372.63	22.142	0.5314	4.59	0.0149	8.37
3385.05	3384.04	22.179	0.8139	6.98	0.0227	12.82
3415.17	3414.17	22.277	0.4451	3.75	0.0121	7.03
3427.49	3426.48	22.317	2.3109	15.05	0.0487	36.53
3438.79	3437.78	22.353	1.0937	8.77	0.0283	17.31
3447.05	3446.04	22.380	0.8280	5.94	0.0191	13.11
3459.90	3458.90	22.421	0.3291	1.87	0.0060	5.22
3467.20	3466.19	22.445	0.2547	1.29	0.0042	4.04
3485.27	3484.26	22.503	0.9642	6.74	0.0216	15.31
3495.20	3494.20	22.535	0.4776	3.13	0.0100	7.59
3506.27	3505.26	22.570	0.7766	5.56	0.0178	12.35
3524.49	3523.48	22.628	0.6243	5.34	0.0170	9.95
3530.57	3529.57	22.648	0.8564	6.82	0.0217	13.65
3552.77	3551.76	22.718	0.2099	1.07	0.0034	3.35
3573.00	3572.00	22.783	1.7464	12.44	0.0394	27.93
3642.53	3641.53	23.002	0.8032	4.85	0.0152	12.92
3660.13	3659.12	23.057	1.7988	14.34	0.0449	28.96
3683.85	3682.84	23.131	0.5319	4.38	0.0137	8.58
3702.01	3701.00	23.188	2.5079	18.21	0.0567	40.52
3746.51	3745.50	23.326	0.4842	3.69	0.0114	7.85
3774.17	3773.16	23.412	1.1931	13.41	0.0414	19.38
3789.41	3788.40	23.459	20.8035	191.08	0.5886	338.38
3811.60	3810.59	23.527	3.5547	39.12	0.1201	57.92
3833.14	3832.13	23.593	4.2186	38.90	0.1192	68.85
3848.99	3847.98	23.642	1.9147	24.85	0.0760	31.29
3887.00	3885.99	23.757	0.2288	0.81	0.0025	3.75
3907.37	3906.36	23.819	0.3720	1.41	0.0043	6.11
3916.17	3915.16	23.846	1.1685	9.34	0.0283	19.19
3931.92	3930.92	23.894	1.1141	11.11	0.0336	18.32
3946.05	3945.04	23.937	6.4985	54.40	0.1644	106.99
3960.15	3959.14	23.979	1.3249	16.05	0.0484	21.84
3979.74	3978.73	24.038	0.8035	6.65	0.0200	13.26
3996.40	3995.39	24.088	1.4516	16.40	0.0492	23.99
4013.73	4012.72	24.140	0.5642	5.43	0.0163	9.34
4037.17	4036.16	24.210	1.1069	9.51	0.0284	18.35
4079.33	4078.32	24.336	0.5052	2.25	0.0067	8.40
4101.88	4100.87	24.403	0.3796	2.87	0.0085	6.33
4116.36	4115.35	24.446	1.2880	7.31	0.0217	21.49
4123.41	4122.40	24.467	1.5143	14.62	0.0432	25.27
4147.47	4146.46	24.538	7.6159	67.57	0.1993	127.35
4161.38	4160.38	24.579	31.9075	291.83	0.8593	534.10
4181.81	4180.81	24.639	9.1974	127.91	0.3757	154.19
4205.75	4204.74	24.709	5.5891	74.72	0.2189	93.87
4227.41	4226.41	24.772	2.0620	29.87	0.0873	34.69
4249.76	4248.75	24.838	0.9303	10.38	0.0302	15.68

4272.77	4271.76	24.905	4.3852	39.31	0.1143	74.03
4295.30	4294.29	24.970	1.7984	15.14	0.0439	30.41
4316.14	4315.13	25.030	1.0213	13.60	0.0393	17.30
4334.00	4332.99	25.082	2.6466	26.85	0.0775	44.89
4356.55	4355.54	25.147	0.6608	5.66	0.0163	11.23
4367.67	4366.67	25.179	3.5704	34.89	0.1004	60.71
4386.58	4385.57	25.233	0.8809	9.31	0.0267	15.00
4412.41	4411.41	25.308	0.6081	2.58	0.0074	10.38
4435.68	4434.67	25.374	0.0322	-1.50	-0.0043	0.55
4445.90	4444.89	25.403	0.2572	0.77	0.0022	4.40
4494.15	4493.15	25.540	5.1702	62.47	0.1772	88.76
4516.89	4515.89	25.605	0.4659	3.11	0.0088	8.01
4540.00	4538.99	25.670	0.4298	6.56	0.0185	7.40
4573.91	4572.90	25.766	0.3421	4.53	0.0127	5.91
4607.33	4606.33	25.860	0.5394	7.83	0.0219	9.34
4622.34	4621.34	25.902	0.8686	6.78	0.0190	15.06
4651.23	4650.22	25.982	0.5581	4.93	0.0138	9.70
4680.47	4679.46	26.064	0.7940	11.05	0.0307	13.82
4717.86	4716.86	26.168	0.3405	3.24	0.0090	5.94
4737.63	4736.62	26.222	1.6830	16.14	0.0446	29.43
4746.03	4745.02	26.246	0.7521	4.57	0.0126	13.16
4759.22	4758.21	26.282	0.3119	3.05	0.0084	5.46
4787.60	4786.60	26.360	0.1802	0.99	0.0027	3.16
4816.82	4815.82	26.441	0.3586	2.73	0.0075	6.31
4829.31	4828.30	26.475	0.5449	7.60	0.0208	9.59
4849.72	4848.71	26.531	0.9698	9.32	0.0255	17.10
4869.86	4868.85	26.586	0.3755	3.13	0.0085	6.63
4899.44	4898.44	26.666	0.4979	5.97	0.0162	8.81
4918.11	4917.11	26.717	0.3938	4.58	0.0124	6.98
4963.85	4962.84	26.841	1.1185	16.74	0.0453	19.89
5062.61	5061.60	27.107	1.4525	17.55	0.0470	26.02
5094.27	5093.26	27.191	1.1946	17.48	0.0467	21.45
5108.24	5107.23	27.229	1.5213	20.68	0.0551	27.35
5128.79	5127.79	27.283	2.5384	26.47	0.0704	45.70
5145.89	5144.88	27.329	0.7368	10.95	0.0291	13.28
5173.86	5172.85	27.403	0.7359	13.56	0.0360	13.29
5187.50	5186.49	27.439	0.7046	7.49	0.0198	12.74
5205.84	5204.83	27.488	0.6291	8.47	0.0224	11.39
5274.33	5273.32	27.668	0.4129	4.92	0.0129	7.51
5315.83	5314.82	27.777	1.2730	19.00	0.0497	23.24
5341.10	5340.09	27.843	0.2176	2.07	0.0054	3.98
5359.34	5358.33	27.890	0.2531	2.97	0.0077	4.64
5402.17	5401.16	28.002	1.0504	16.14	0.0419	19.30
5433.21	5432.20	28.082	1.1667	14.37	0.0372	21.48
5454.45	5453.44	28.137	0.2116	2.89	0.0075	3.90
5504.70	5503.70	28.267	1.0223	19.86	0.0511	18.93
5546.41	5545.40	28.374	0.4939	6.77	0.0173	9.17
5609.12	5608.11	28.534	0.4736	9.68	0.0247	8.83
5624.76	5623.76	28.574	0.4185	4.48	0.0114	7.82
5682.49	5681.49	28.720	0.1958	1.06	0.0027	3.67
5733.38	5732.37	28.849	1.7600	31.18	0.0786	33.14
5755.15	5754.14	28.904	0.8682	12.82	0.0322	16.37
5797.90	5796.89	29.011	1.3933	36.06	0.0904	26.36
5847.40	5846.39	29.135	1.2801	24.84	0.0620	24.30
5874.14	5873.13	29.201	1.8388	62.45	0.1554	34.98
5934.72	5933.72	29.352	0.5579	12.73	0.0315	10.66
5978.50	5977.49	29.460	0.3853	7.29	0.0180	7.39
6013.90	6012.90	29.548	0.3552	2.90	0.0071	6.83
6032.85	6031.85	29.594	0.4093	3.60	0.0089	7.88
6133.82	6132.81	29.841	0.5865	6.96	0.0170	11.37
6162.34	6161.33	29.911	1.3553	20.48	0.0498	26.33
6184.57	6183.56	29.965	0.6588	9.78	0.0238	12.82
6216.02	6215.01	30.041	0.9219	19.68	0.0477	17.98
6236.00	6235.00	30.090	0.8304	10.75	0.0260	16.22
6255.36	6254.35	30.136	0.2361	2.34	0.0057	4.62
6320.39	6319.39	30.293	1.1214	17.58	0.0423	22.04
6342.23	6341.22	30.346	1.5366	26.64	0.0639	30.25
6456.30	6455.29	30.618	21.3573	431.55	1.0263	424.01
6498.25	6497.24	30.718	1.8487	25.84	0.0613	36.82
6521.67	6520.66	30.773	2.3440	32.22	0.0763	46.76
6551.22	6550.21	30.843	1.5207	32.41	0.0765	30.40
6614.06	6613.06	30.991	1.7907	21.31	0.0501	35.96
6653.73	6652.72	31.084	40.0260	990.54	2.3211	806.22
6696.04	6695.03	31.183	5.5580	89.50	0.2091	112.30
6718.43	6717.42	31.236	3.9535	70.52	0.1645	80.01

6740.82	6739.81	31.288	3.0803	58.81	0.1370	62.44
6763.08	6762.07	31.339	2.6139	47.31	0.1100	53.07
6832.17	6831.17	31.500	29.3327	769.05	1.7805	598.61
6852.89	6851.88	31.548	12.8114	225.11	0.5200	261.85
6873.74	6872.73	31.596	6.7676	115.78	0.2670	138.53
6895.96	6894.95	31.647	4.0495	126.91	0.2920	83.03
6968.15	6967.14	31.813	2.6462	48.81	0.1119	54.54
6987.83	6986.82	31.858	9.1160	179.49	0.4107	188.17
7007.18	7006.18	31.902	3.5064	48.01	0.1097	72.48
7035.74	7034.73	31.967	2.8179	55.45	0.1265	58.37
7054.79	7053.78	32.011	2.6118	69.35	0.1578	54.18
7219.97	7218.97	32.385	6.0098	205.68	0.4631	126.18
7323.59	7322.59	32.617	1.4502	43.84	0.0980	30.68
7354.38	7353.37	32.686	0.8418	14.96	0.0334	17.85
7426.45	7425.44	32.847	0.2530	8.63	0.0192	5.39
7632.91	7631.90	33.302	25.1248	922.09	2.0212	543.77
7697.48	7696.47	33.443	2.3440	94.17	0.2053	50.97
7781.99	7780.98	33.627	4.0191	140.62	0.3052	87.95
7839.40	7838.39	33.752	2.0650	82.17	0.1776	45.38
7929.48	7928.47	33.946	0.4065	11.97	0.0257	8.99
8003.12	8002.12	34.104	0.6177	20.19	0.0432	13.74
8070.02	8069.01	34.247	0.7401	21.61	0.0461	16.54
8141.70	8140.69	34.399	2.3180	68.48	0.1454	52.09
8158.61	8157.60	34.435	1.6675	29.11	0.0617	37.52
8251.98	8250.97	34.633	0.3282	9.23	0.0195	7.43
8294.07	8293.06	34.721	1.2292	37.02	0.0779	27.93
8372.44	8371.43	34.886	0.5741	27.10	0.0568	13.12
8484.99	8483.99	35.121	0.3754	8.50	0.0177	8.65
8589.51	8588.50	35.338	2.4703	105.46	0.2180	57.39
8651.75	8650.75	35.466	1.8591	59.08	0.1217	43.39
8713.50	8712.49	35.593	5.5491	204.46	0.4198	130.11
8756.81	8755.80	35.682	1.7265	52.13	0.1067	40.61
8833.41	8832.40	35.838	2.4403	133.47	0.2724	57.73
8939.05	8938.04	36.053	22.2153	1128.34	2.2880	529.75
9019.22	9018.21	36.216	2.3984	92.32	0.1862	57.54
9091.97	9090.96	36.362	2.3245	113.49	0.2282	56.07
9144.69	9143.68	36.468	2.3181	121.61	0.2437	56.14
9309.12	9308.12	36.796	3.6153	148.49	0.2952	88.65
9374.68	9373.68	36.926	2.4549	109.39	0.2167	60.49
9437.96	9436.95	37.051	2.7925	165.50	0.3267	69.14
9516.91	9515.90	37.207	1.8864	104.50	0.2055	46.99
9581.85	9580.84	37.334	1.3051	70.92	0.1390	32.67
9637.19	9636.19	37.443	1.0115	54.07	0.1056	25.43
9724.00	9722.99	37.612	0.3754	16.30	0.0317	9.50
9785.71	9784.70	37.732	0.2852	9.89	0.0192	7.25
9939.68	9938.68	38.029	0.7471	35.29	0.0679	19.22
10063.40	10062.39	38.267	4.5744	203.31	0.3889	118.81
10144.76	10143.75	38.422	0.5690	31.57	0.0601	14.87
10273.13	10272.12	38.666	0.7631	38.76	0.0734	20.15
10497.57	10496.57	39.089	0.2782	13.21	0.0247	7.47
10561.30	10560.29	39.208	0.4082	21.74	0.0406	11.02
10635.46	10634.45	39.346	0.5930	35.52	0.0661	16.10
10718.48	10717.47	39.500	0.9040	61.40	0.1139	24.71
10802.36	10801.36	39.656	0.8599	66.95	0.1236	23.66
10921.46	10920.45	39.875	0.4378	23.17	0.0426	12.16
11046.41	11045.40	40.104	0.1310	5.23	0.0096	3.68
11147.95	11146.94	40.289	0.1517	7.75	0.0141	4.29
11431.94	11430.93	40.802	1.5601	85.67	0.1542	45.13
11515.49	11514.48	40.952	3.4607	316.45	0.5666	100.79
11667.57	11666.56	41.223	5.1984	534.22	0.9496	153.29
11874.61	11873.61	41.590	0.8999	92.25	0.1626	26.99
12135.29	12134.28	42.047	0.3472	20.90	0.0365	10.64
12213.21	12212.20	42.183	0.1927	12.50	0.0217	5.94
12421.55	12420.55	42.543	0.4176	25.40	0.0438	13.11
12553.09	12552.08	42.770	0.3921	26.02	0.0446	12.44
12837.97	12836.97	43.255	0.7051	53.27	0.0904	22.92
13035.41	13034.40	43.589	0.2257	19.66	0.0331	7.46
13517.28	13516.27	44.393	1.7454	207.59	0.3436	60.20
13664.19	13663.19	44.635	1.0656	136.20	0.2239	37.24
13826.26	13825.25	44.901	0.9339	96.11	0.1572	33.11
14005.24	14004.23	45.193	4.3241	437.10	0.7106	155.80
14103.83	14102.82	45.353	2.4578	213.14	0.3450	89.36
14335.82	14334.81	45.727	8.7632	1030.75	1.6560	325.47
14534.46	14533.45	46.045	2.5813	335.53	0.5351	97.66
14717.09	14716.08	46.335	0.8605	197.18	0.3118	33.12

15187.24	15186.24	47.075	0.4437	75.60	0.1177	17.87
15657.41	15656.40	47.803	0.0897	8.45	0.0130	3.78
15820.39	15819.38	48.053	0.0865	9.75	0.0149	3.71
16443.65	16442.64	48.997	0.1190	11.73	0.0176	5.45
17066.08	17065.07	49.923	1.3076	165.52	0.2444	64.05
17175.08	17174.07	50.083	2.5670	301.87	0.4434	127.30
17296.48	17295.47	50.261	2.7701	417.80	0.6109	139.28
17482.10	17481.09	50.532	1.0341	142.54	0.2072	53.11
17766.54	17765.53	50.944	0.6228	131.11	0.1894	33.08
17945.02	17944.01	51.201	0.6698	282.23	0.4026	36.33
21092.56	21091.55	55.543	0.1325	101.64	0.1341	11.26
23718.05	23717.04	58.924	0.0883	65.37	0.0812	13.41
25789.62	25788.62	61.462	0.0509	34.02	0.0407	10.83
27804.46	27803.45	63.835	2.9497	1524.96	1.7606	669.03
28548.76	28547.75	64.689	0.8053	668.67	0.7571	187.12
31256.57	31255.56	67.709	0.0260	14.77	0.0161	6.61
32717.17	32716.17	69.284	0.0180	7.30	0.0078	4.81
34145.25	34144.24	70.791	0.1024	84.34	0.0879	28.83
34918.38	34917.37	71.593	0.0511	38.33	0.0394	14.78
37428.16	37427.16	74.139	0.0394	67.81	0.0677	12.55
39114.93	39113.92	75.802	0.0493	57.70	0.0560	16.80
41845.54	41844.54	78.421	0.1089	116.05	0.1097	40.17
42589.26	42588.26	79.120	0.0904	94.91	0.0883	33.69
44703.94	44702.93	81.073	0.0546	86.72	0.0788	20.98
50260.95	50259.94	85.996	0.0194	29.77	0.0255	8.06
55322.52	55321.51	90.250	0.1770	349.83	0.2859	79.52
65162.70	65161.69	97.996	0.0237	72.94	0.0551	11.64
69555.70	69554.69	101.264	0.0206	80.68	0.0584	10.46
82925.12	82924.12	110.623	0.0246	73.37	0.0490	13.93
89416.65	89415.64	114.894	0.0060	23.19	0.0148	3.43
97397.95	97396.94	119.939	0.0063	12.81	0.0079	3.57
110339.51	110338.50	127.698	0.0057	46.50	0.0263	3.26

实施例 2. 文库与未分级分离的、未稀释的人混合血浆的孵育

[164] 为有助于分析复合样品，本方法可用于减小浓度差异。人血浆是一种最复杂和难以分析的物质：蛋白质存在的浓度范围大于 10^{10} (Anderson 和 Anderson)；减小该范围将有助于分析痕量蛋白质。在该方法的条件下，与未经处理的起始物质相比，血浆与配体文库的孵育将增加可检测的并随后可分析的蛋白质的数量。

A. 样品制备

[165] 冷冻的、混合的人贫血小板血浆 (PPP) 于 37°C 下解冻，然后经 0.8 和 $0.45\ \mu\text{m}$ 滤器过滤。位于具有 EA CA-Ala 间隔子的 Toyopearl 650 M 氨基树脂 (平均直径 $65\ \mu\text{m}$, $\sim 2 \times 10^6$ 珠/ml; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) 上的，四个重复份的大约 $1\ \text{ml}$ 六聚体肽配体文库各自与 $9\ \text{ml}$ 血浆于室温下旋转孵育 1 小时。树脂排干，然后用 $1\ \text{ml}$ 柠檬酸盐缓冲液 ($20\ \text{mM}$ 柠檬酸盐, $140\ \text{mM}$ NaCl, pH 7.0) 洗涤。保留该洗涤溶液，以及上样血浆和起始流通的样品。随后用 20 个柱体积的柠檬酸盐洗涤珠文库。

[166] $100\ \mu\text{l}$ 来自样品 2 和 4 的树脂与等体积 ($100\ \mu\text{l}$) 的 $2 \times$ LDS

缓冲液+ DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) 在 90℃ 下孵育 10 分钟, 然后离心。收集并保存上清液以备分析。

[167] 200 μ l 来自重复份 1-4 的树脂与 400 μ l 6M GuHCl 或 400 μ l 6M 脲以批量形式孵育 1 小时。树脂排干, 然后收集流通液以备分析。在 G-25 柱上将洗脱液中 GuHCl 和脲的浓度减低至 1M 脲, 步骤如下: 用 200 μ l 1M 脲 5 分钟平衡 G-25 柱两次, 然后 2000 rpm 离心 3 分钟。在试管中加入 20 μ l 脲和 GuHCl 样品, 然后在相同的条件下再次离心。收集流通液。

B.LDS-PAGE 分析

[168] 起始 PPP、流通液和洗涤液用柠檬酸盐缓冲液按 1: 25 稀释, 然后用 2x 样品缓冲液按 1: 2 稀释。14 μ l 处理的 GuHCl 和脲上清液在 5 μ l 4x LDS 缓冲液+2 μ l DTT 还原剂中于 90℃ 加热 10 分钟。用大约 10 μ l 来自样品 2 和 4 的珠上样两个孔。在 MOPS 缓冲液中, 23 μ l 的各个保留的样品在 4-12% Bis-Tris 凝胶 (NuPage, Invitrogen) 上于 200 V 进行电泳。凝胶用 Simply Blue (Invitrogen) 按照厂商说明书进行染色。结果显示于图 1 和图 4 中。

[169] 经过处理的样品中存在若干条带, 这些条带未能见于初始血浆中, 而初始血浆中存在的非常明显的白蛋白条带 (~ 64 kD) 基本上被减小了。这些结果表明, 所述方法确实减少了蛋白质的浓度范围, 如该方法所检测到的, 因此与初始物质的分析相比, 所述方法增加了可检测和可分析的蛋白质的数量。

实施例 3. 除去 IgG 后浓度方差的减小

[170] 在多种蛋白质组应用中, 样品制备的首要步骤之一是除去白蛋白和 IgG, 因为这些高丰度蛋白质掩蔽了低丰度品种的检测。然而除去这些蛋白, 也常常除去了与它们相关的痕量品种, 而且还会有样品的损失。在分析前不需要除去 IgG 的样品制备方法将会是有益的。本实施例表明, 使在完整血浆中不能检测的蛋白质品种可视化并不需要除去 IgG。在除去或未除去 IgG 的血浆中, 比较了在 LDS-PAGE 中检测到的蛋白质图谱。

A. 样品制备

[171] 冷冻的、混合的人贫血小板血浆 (PPP) 于 37°C 下解冻, 然后经 0.8 和 0.45 μm 过滤器过滤。按照如下步骤除去血浆中的 IgG: 在 Bio-Rad 柱中填充 5 ml Protein G Sepharose Fast-flow 树脂 (Amersham, T&S), 以 10 cm/h 流速 (通过振动泵控制) 加入 10 ml 过滤的 PPP, 然后收集流通液。

[172] 位于具有 EA CA-Ala 间隔子的 Toyopearl 650 M 氨基树脂 (平均直径 65 μm , $\sim 2 \times 10^6$ 珠/ml; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) 上的, 大约 1 ml 六聚体肽配体文库与 9 ml 流通液 (如上) 孵育 1 小时/室温/旋转。用手除去孵育期间形成的凝块。树脂排干, 然后用 1 ml 柠檬酸盐缓冲液 (20 mM 柠檬酸盐, 140 mM NaCl, pH 7.0) 洗涤, 接着用 10 ml T-柠檬酸盐 (柠檬酸盐缓冲液 + 0.05% Tween-20) 和 10 ml 柠檬酸盐缓冲液洗涤。收集流通液和最初 1 ml 的洗涤液以备分析。将树脂大约分为 3 等份, 每等份 200 μl 。

[173] 一个树脂等份与等体积 (200 μl) 2x LDS 缓冲液 + DTT (Invitrogen, Carlsbad, CA) 于 90°C 加热 10 分钟, 然后离心。收集并保存上清液以备分析。剩余的树脂等份与 500 μl 6M GuHCl 或 500 μl 6M 脲以批量形式孵育 1 小时。树脂排干, 然后收集流通液已备分析。

[174] 洗脱液中的 GuHCl 和脲浓度从 6M 减少至 1M 浓度, 而一半的初始体积 (2x 浓缩的) 在 G-25 柱上通过缓冲液交换。

B. LDS-PAGE 分析

[175] 初始的 PPP、除去 IgG 的 PPP、流通液和洗涤液, 以及 GuHCl 和脲上清液的样品在 LDS 缓冲液 + DTT 还原剂中于 90°C 加热 10 分钟。LDS 缓冲液、GuHCl 和脲洗脱液的最佳稀释度分别为 0.25x、1x 和 1x。PPP、除去 IgG 的血浆、流通液和洗涤液被稀释为 50X。Protein G LDS 和 Glycine 洗脱液与 2x LDS 缓冲液 + DTT 孵育。23 μl 各样品在 4-12% Bis-Tris 凝胶上电泳, MOPS 缓冲液, 200 V。根据上述方法先前所制备的血浆样品 (从中除去 IgG) 同样进行电泳。随后通过 SilverQuest 按照厂商说明书使用 Simply Blue 对凝胶染色。数据显示于图 2 中。

[176] 虽然开始时，流通液和洗涤液样品的 MW 50 和 25 KDa 的蛋白质（减少的免疫球蛋白重链和轻链的大小）有明显的减少，但如凝胶所示，来自包含和不包含 IgG 的血浆的 LDS-PAGE 洗脱液中均没有显著性差异。由于样品处理的问题，来自脲和 GuHCl 样品的信号是不明显的。这些数据表明除去 IgG 的影响不明显。优选除去和保留 IgG 可能是为了其它的原因，或许是为了独立分析；但是，对于通过该方法分析痕量蛋白而言，并不需要除去 IgG。

实施例 4. 人血清中蛋白质浓度范围的减小

[177] 前面的实施例已表明所述方法可用于未稀释和未分级分离的人血浆的用途。在临床诊断中起始样品通常是血清，而非血浆。下面的实施例表明使用所述方法制备血清用于分析的可行性。

A. 血清制备

[178] 5 个 7ml 装有人血的试管在 4℃ 过夜使其凝固成血块。凝固的血块在 Sorvall 离心机 RT7 中 4,000 rpm 离心 5 分钟，收集血清，然后经 0.8 和 0.45 μm 滤器过滤。

B. 样品制备:

1. 基于 TentaGel 的文库孵育

[179] 将 250 μl TentaGel 文库[含有 Gly 间隔子的 TentaGel M NH₂ 10 μm (Rapp Polymer) 文库 (Peptides International, Louisville, KY) 平均直径 10 μm, ~5.6×10⁸ 珠/ml]置于 15 ml 锥形管中与 2.25 ml (1:9 v/v) 血清在室温 (RT) 下孵育 1 小时。4000 rpm 离心树脂 2 分钟，然后保存上清液以备分析 (FT Tenta)。用 1.25 ml 柠檬酸盐缓冲液摇动洗珠，然后在 2 ml Eppendorf 管中 4,000 rpm 离心 2 分钟。保留洗涤液用于分析 (W Tenta)。再加入 4 x 1.25 ml 柠檬酸盐缓冲液洗珠。将珠分成 3 等份，每等份大约 75 μl。

[180] 一个树脂等份与 75 μl 2x LDS/DTT 于 90℃ 孵育 10 分钟。离心珠，然后将上清液保存于 -20℃。其它等份与 200 μl 6M 脲或 6M GuHCl 于 RT 下孵育 1.5 小时。初始及未结合的血清部分用柠檬酸盐按 1:25 稀释，然后用 2x LDS/DTT 按 1:2 稀释。样品于 90℃ 加热 10 分钟，然后冷冻于 -20℃。

2. 基于 Toyopearl 的文库孵育

[181] 将大约 1 ml Toyopearl 文库 (平均直径 65 μm , $\sim 2 \times 10^6$ 珠/ml; Tosoh Biosciences, Montgomeryville, PA) 与 9ml 血清孵育 1 小时/RT/旋转。200 μl 树脂在 200 μl 2x (LDS 缓冲液+ DTT 还原剂) 中于 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟。收集上清液并保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 以备分析。200 μl 树脂与 400 μl (v/v) 6M 脲以批量形式孵育 1 小时。收集流通液以备分析并保存于室温下。200 μl 树脂与 400 μl 6M GuHCl 以批量形式孵育 1 小时。收集流通液以备分析并保存于室温下。初始及未结合的血清部分用柠檬酸盐按 1:25 稀释, 然后用 2x LDS/DTT 按 1:2 稀释。样品于 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟, 然后冷冻于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 。200 μl 血清和 200 μl 各未结合部分交付于 Analytical Chemistry 分析。

C. LDS-PAGE 分析

[182] 14 μl 的 1 M 脲和 GuHCl 样品用 5 μl 4x LDS 缓冲液和 2 μl 10x DTT 于 90 $^{\circ}\text{C}$ 加热 10 分钟。冷冻的 LDS 样品于 90 $^{\circ}\text{C}$ 再加热 10 分钟。在 4-12% Bis Tris 凝胶中每孔上样各样品 20 μl 。凝胶用 MOPS 电泳缓冲液于 200V 进行电泳, 直至染料前端到达凝胶底部。根据厂商说明书用 Simply Blue 蛋白质染色剂染色凝胶, 然后用 H_2O 脱色。凝胶显示于图 3 中。

[183] 用文库孵育后, 血清中可见条带的数目有实质性增加 (泳道 2 与 3 和 8 相比)。条带的图谱与使用血浆孵育文库所得图谱非常相似 (泳道 3, 图 3 与泳道 7, 图 1 相比)。这些结果表明用本发明的方法制备的血清样品增加了可用 LDS-PAGE 分析的条带的数目, 而且与初始血清相比, 洗脱液中大部分高丰度蛋白质的浓度减小。

[184] 虽然为了清楚和理解而通过例举说明和实施例的方式已经对上述发明作出了某些细节描述, 但对于本领域的普通技术人员来说显而易见的是, 在本发明的教导下在不背离所附权利要求的精神和范围的情况下可对其作出特定的变化和修改。

[185] 正如具体地而且独立地将各个独立出版物或专利申请引入作为参考一样, 本说明书中所引用的全部出版物和专利申请均被引入此处作为参考。

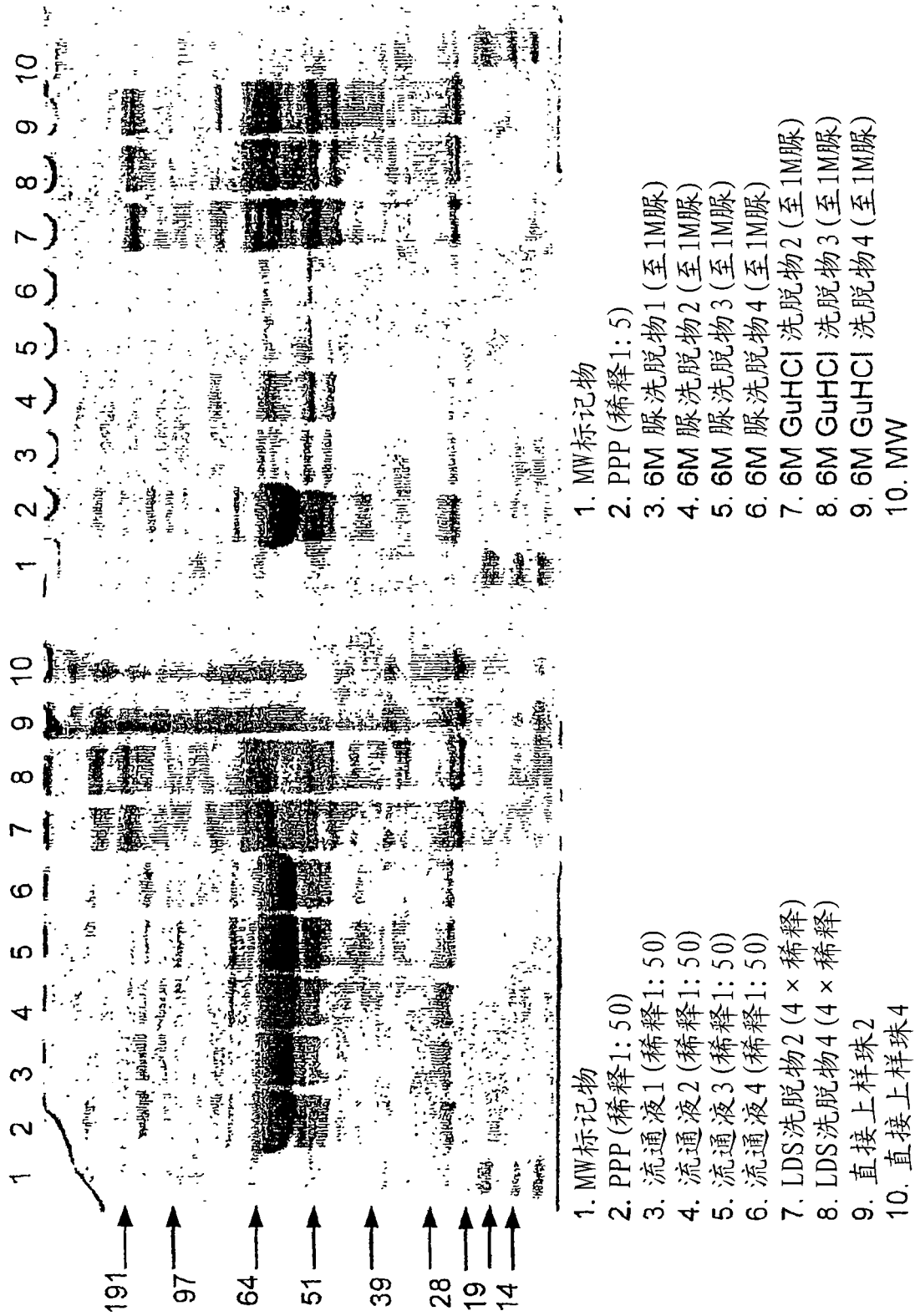


图 1

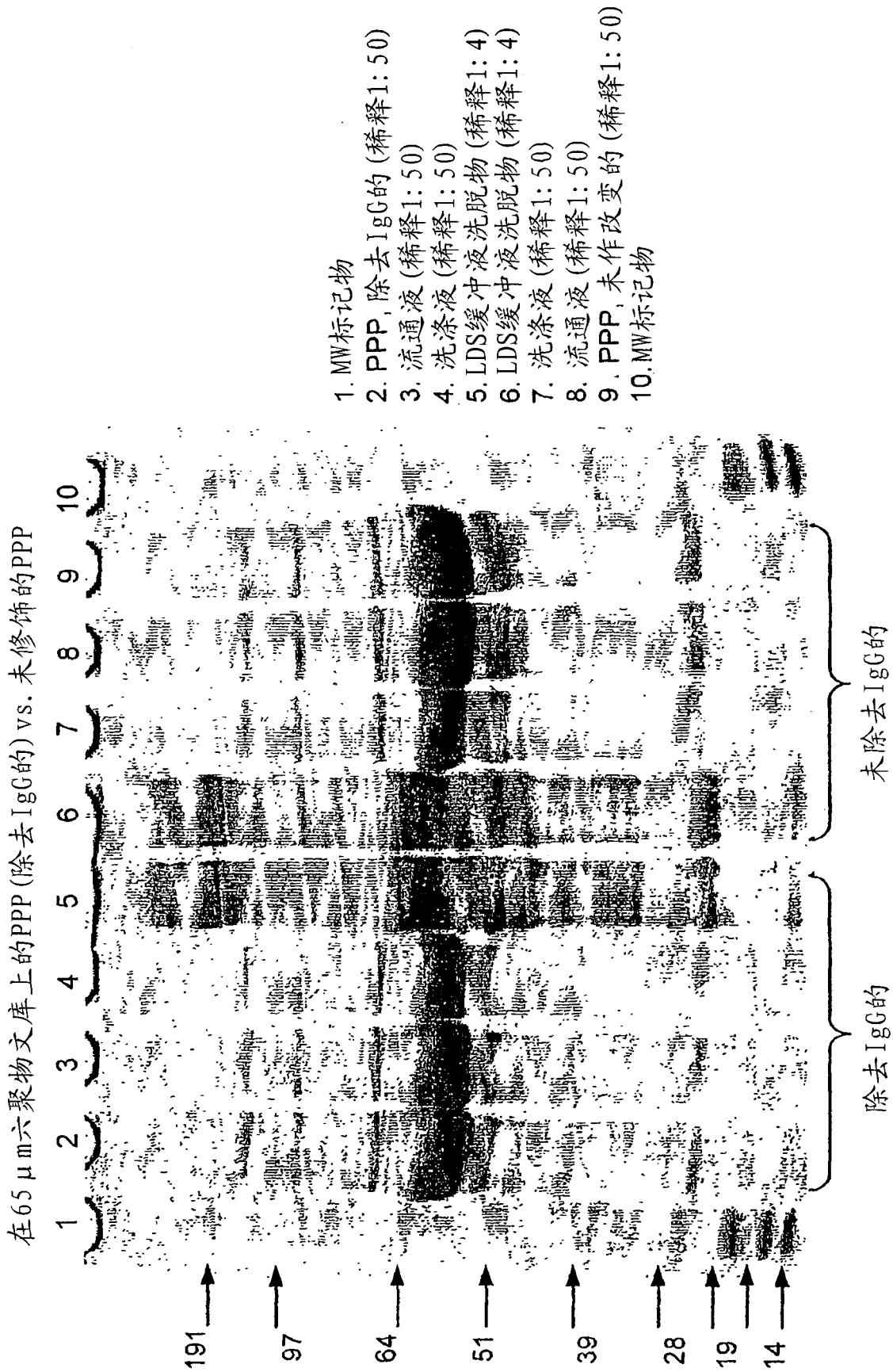


图 2

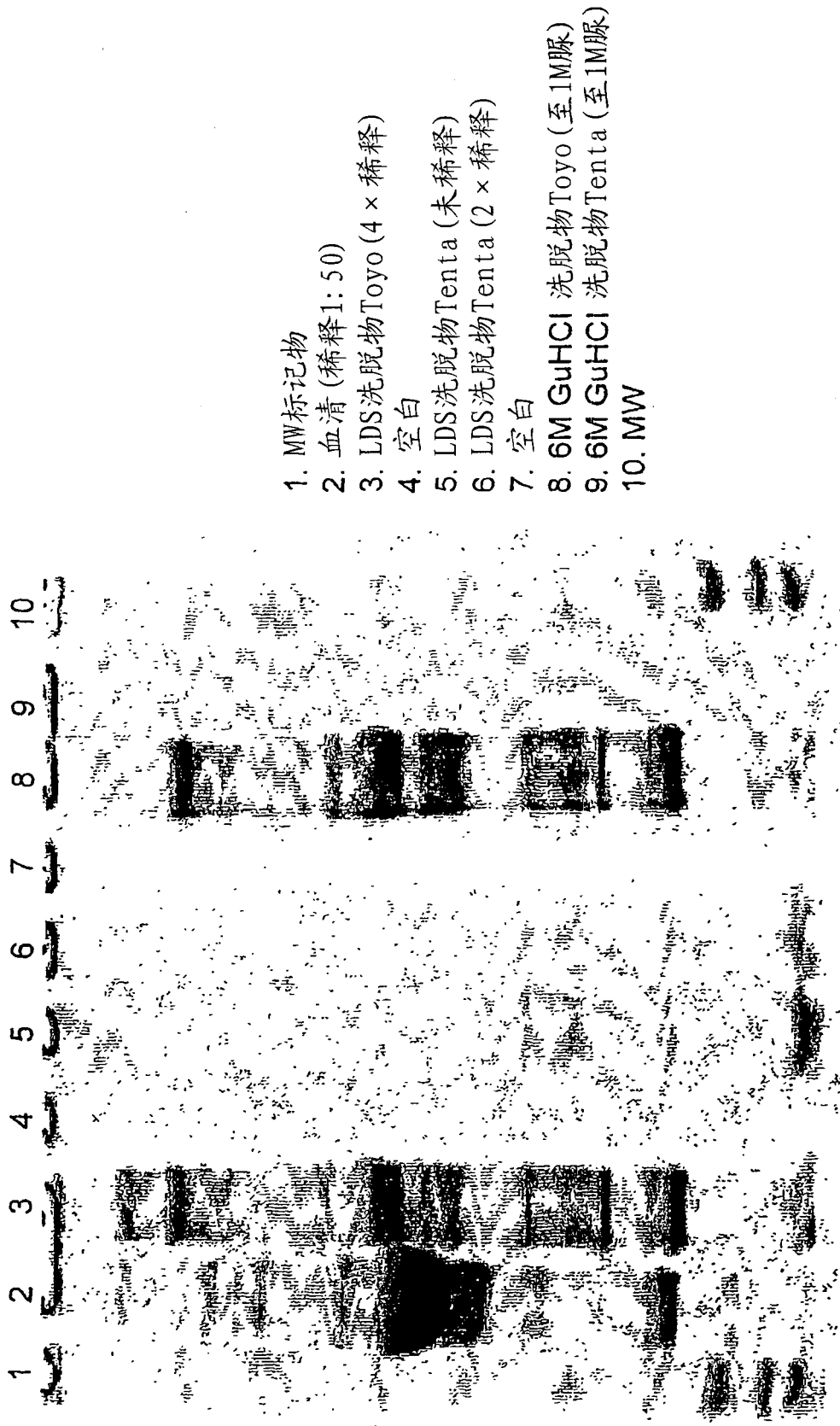
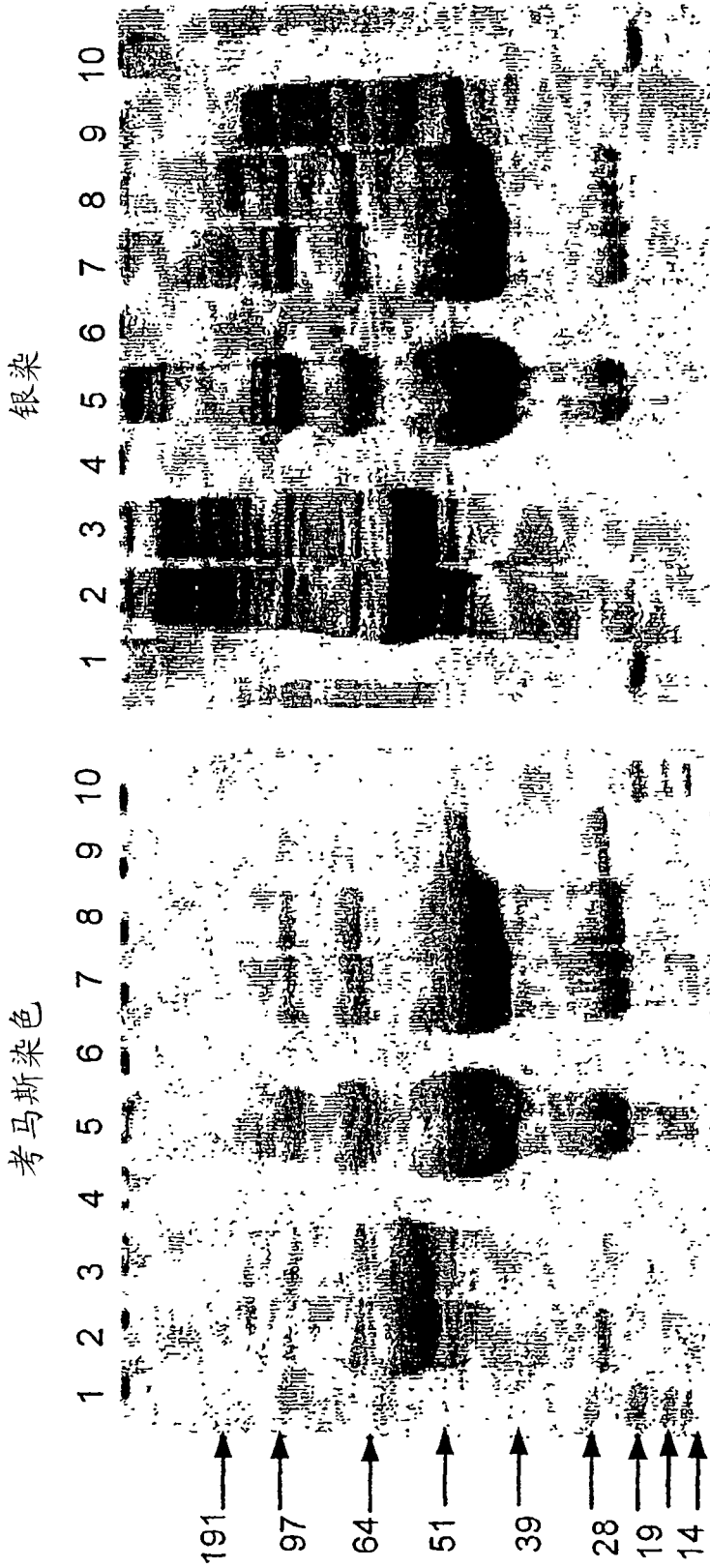


图 3

蛋白G Sepharose上的PPP



- 6. 空白
- 7. 洗脱的级分I
- 8. 洗脱的级分II
- 9. 洗脱的级分III
- 10. MW标记物

- 1. MW标记物
- 2. PPP (稀释1: 50)
- 3. PPP, 除去IgG的 (稀释1: 50)
- 4. 空白
- 5. ProteinG Sepharose的LDS缓冲液洗脱物

图 4

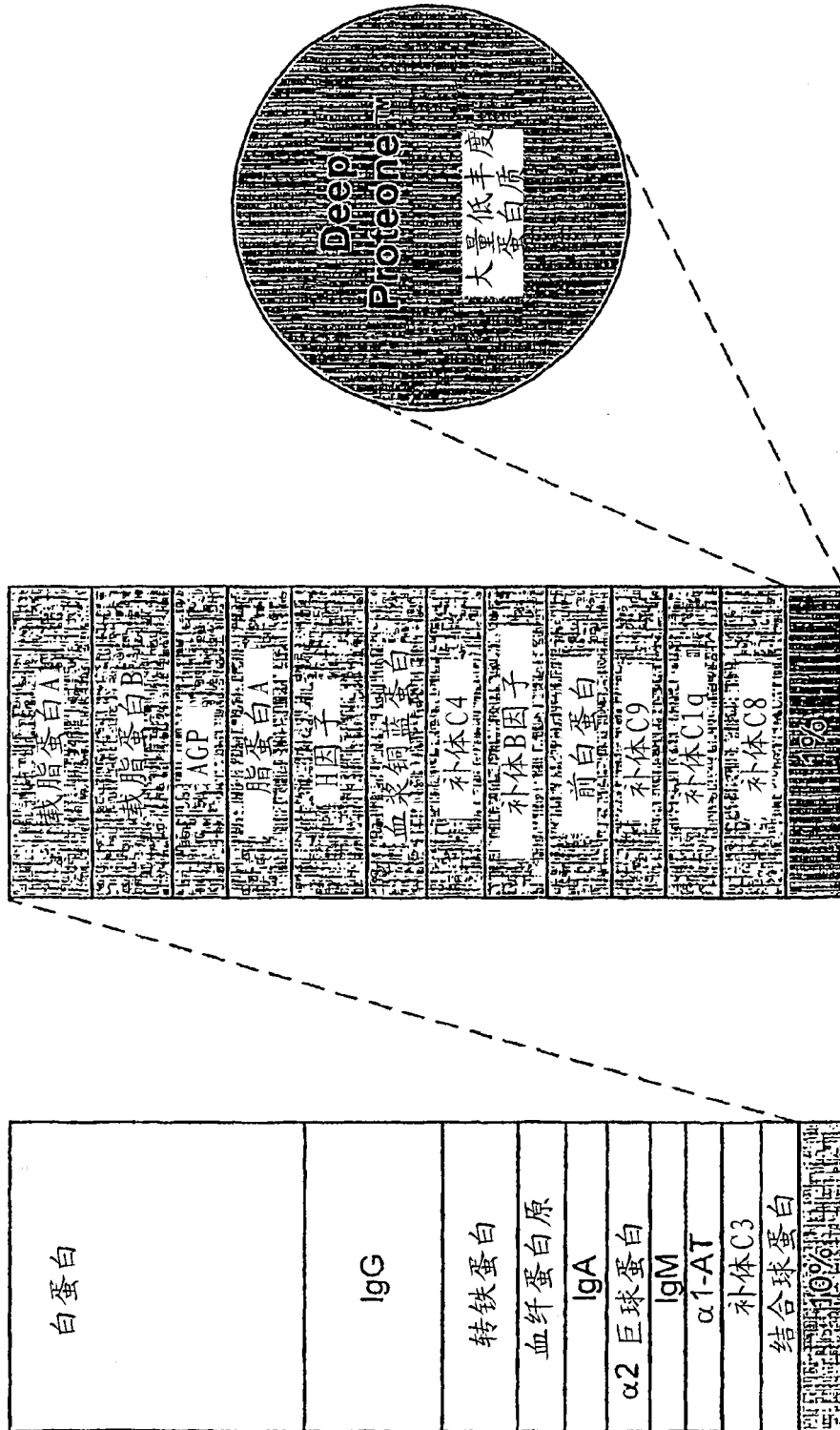


图 5

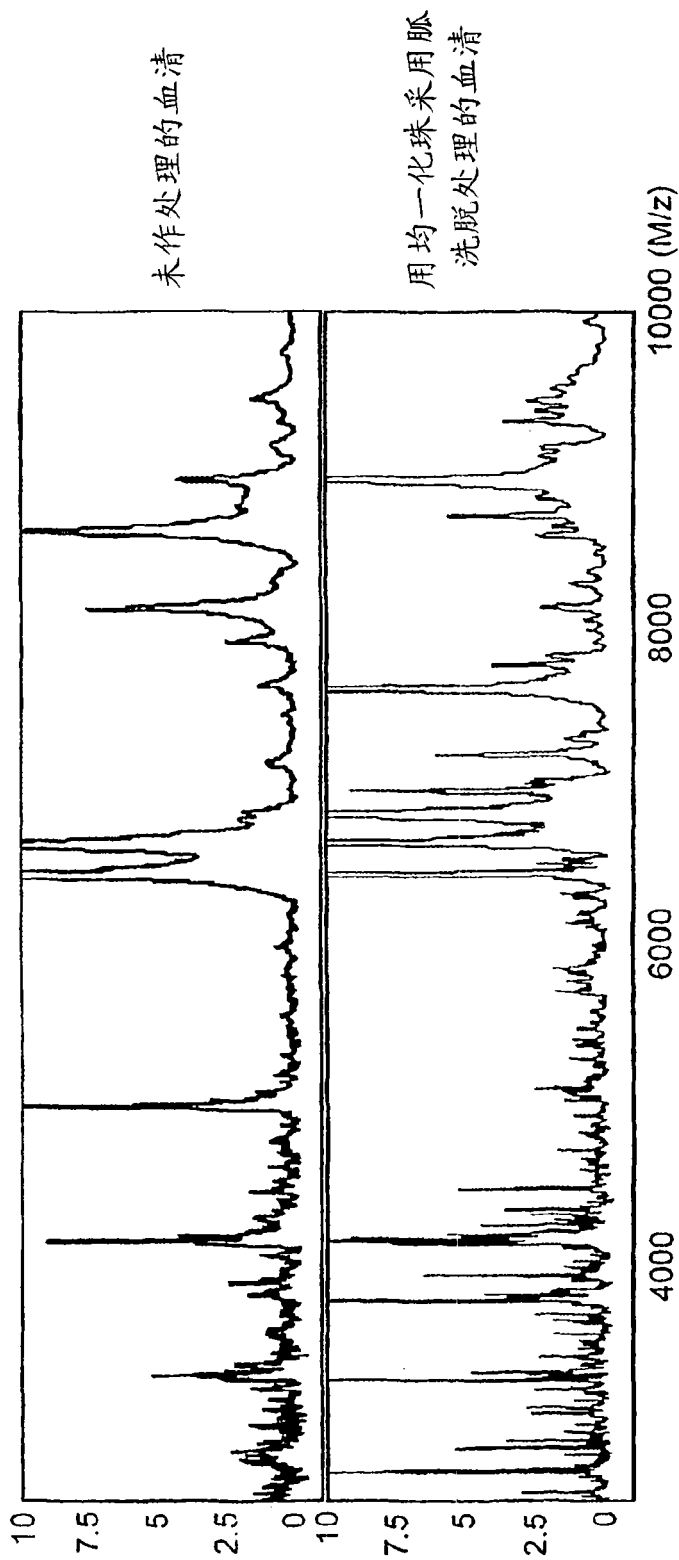


图 6

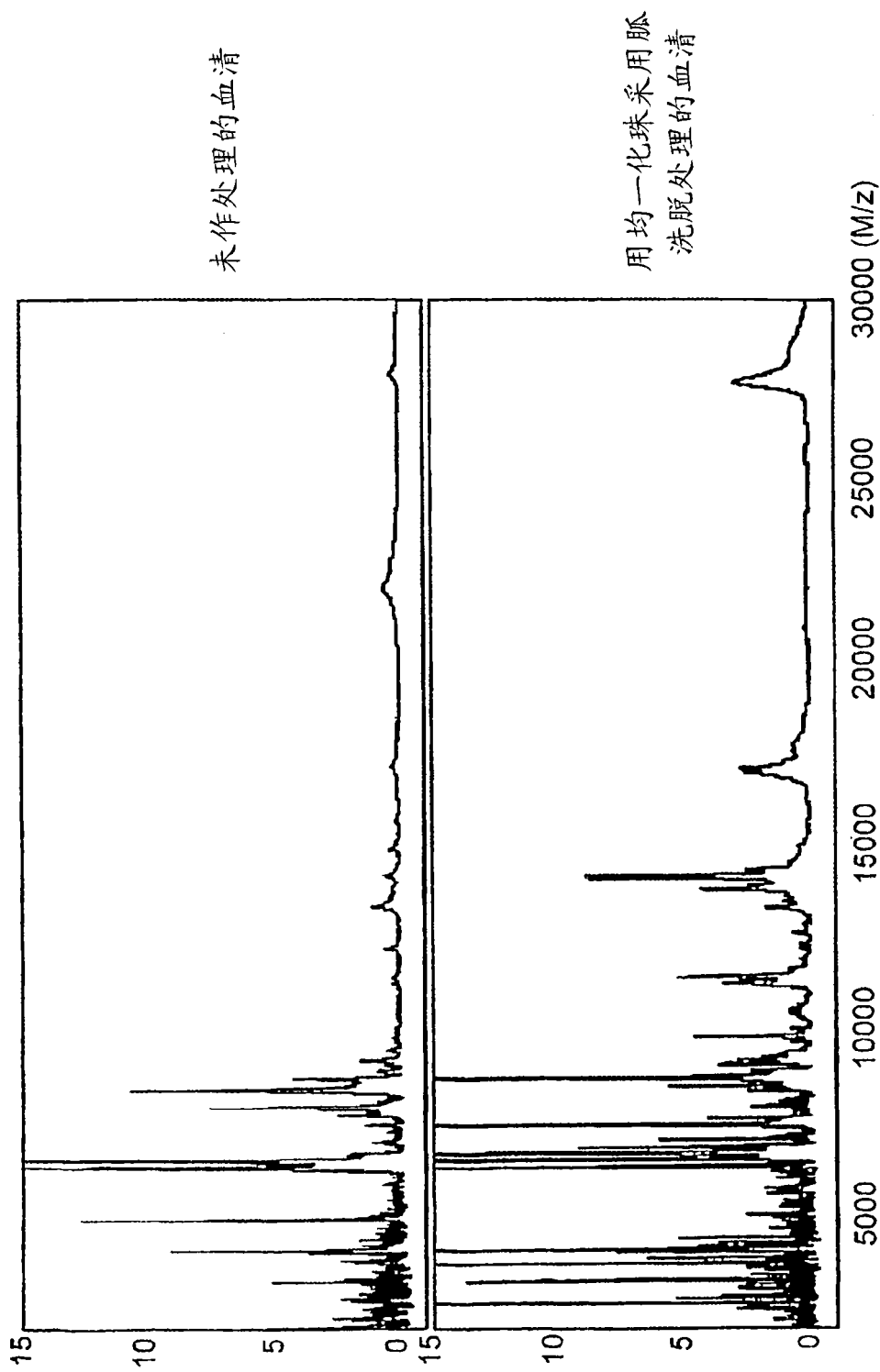


图 7

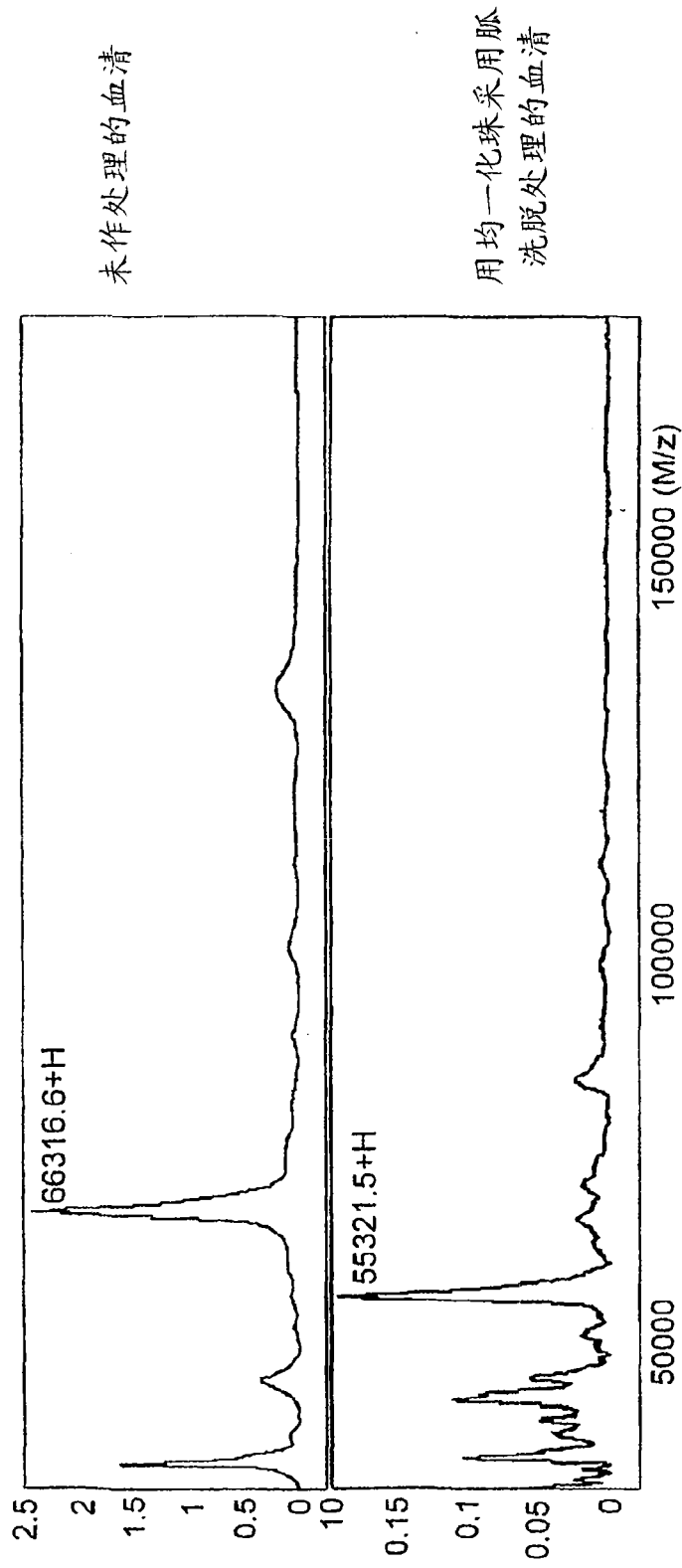


图 8

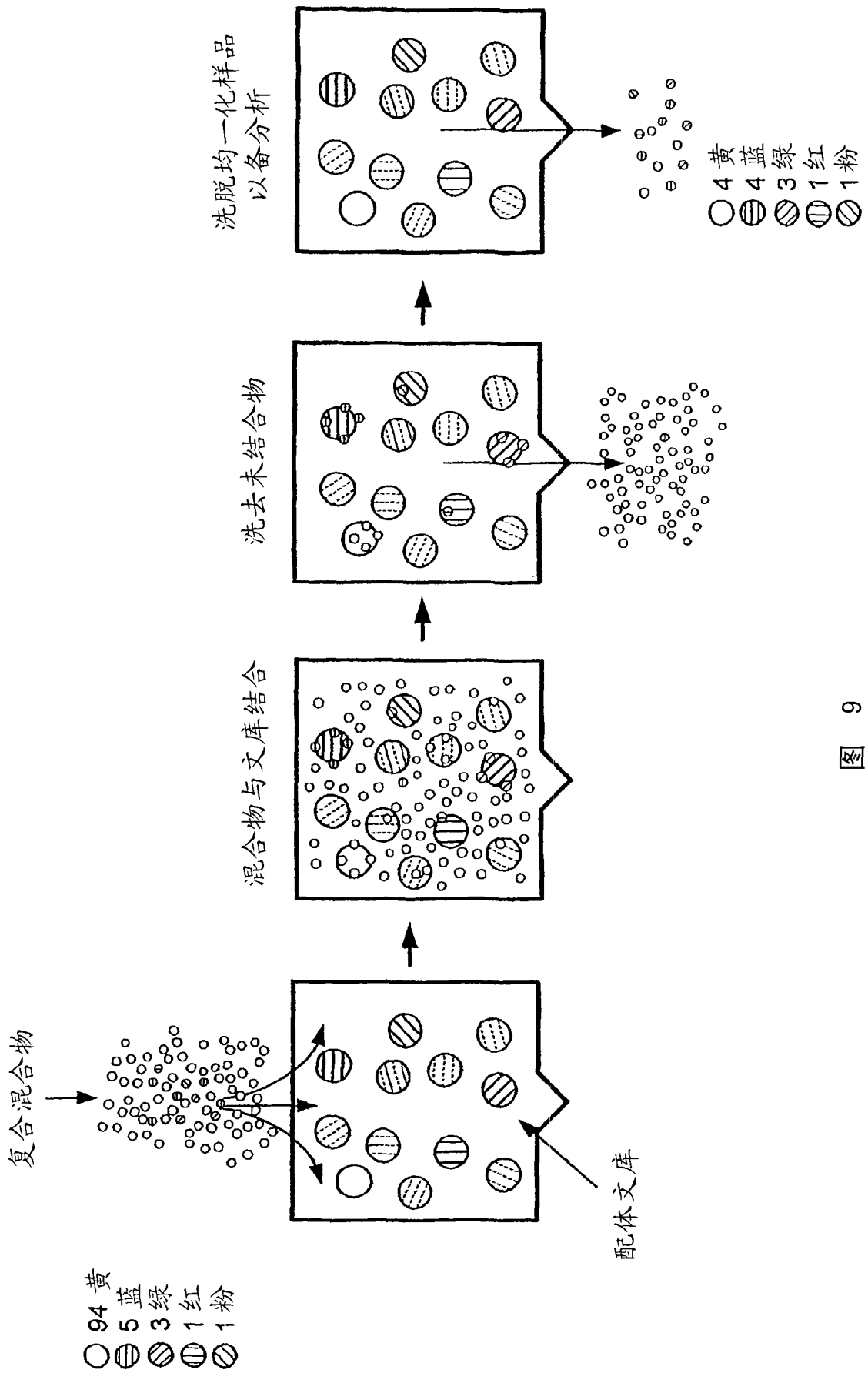


图 9

专利名称(译)	减小样品中分析物品种的浓度范围的方法		
公开(公告)号	CN1997284A	公开(公告)日	2007-07-11
申请号	CN200580016558.8	申请日	2005-03-23
[标]申请(专利权)人(译)	赛弗吉生物系统公司		
申请(专利权)人(译)	赛弗吉生物系统有限公司 美国国家红十字会		
当前申请(专利权)人(译)	赛弗吉生物系统有限公司 美国国家红十字会		
[标]发明人	E·波斯彻蒂 D·哈蒙德		
发明人	E·波斯彻蒂 D·哈蒙德		
IPC分类号	A23J1/00 C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68		
CPC分类号	C40B30/04 G01N33/6803 G01N33/54306 G01N33/543 G01N33/6845		
代理人(译)	程淼 刘玥		
优先权	60/582650 2004-06-23 US 60/559108 2004-04-02 US 60/643483 2005-01-12 US 2004290775 2004-03-23 EP 60/587585 2004-07-12 US		
其他公开文献	CN1997284B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及分子生物学、组合化学和生物化学领域。特别地，本发明描述了用于在动力学上降低取自复合混合物的分析物之间方差的方法和试剂盒。

