

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

C12Q 1/68

G01N 33/53 G01N 33/566

G01N 33/543



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02801851.6

[43] 公开日 2003 年 12 月 24 日

[11] 公开号 CN 1463291A

[22] 申请日 2002.4.18 [21] 申请号 02801851.6

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 19 [33] US [31] 60/285,630

[86] 国际申请 PCT/US02/12418 2002.4.18

[87] 国际公布 WO02/086168 英 2002.10.3

[85] 进入国家阶段日期 2003.1.30

[71] 申请人 赛弗根生物系统股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 L·O·洛马斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

代理人 陈文青

权利要求书 8 页 说明书 52 页 附图 5 页

[54] 发明名称 用质谱法和亲和标记物鉴定生物分子的特性

[57] 摘要

本发明涉及比较生物分子相对量以及用亲和标记物和质谱法鉴别样品中生物分子的方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种检测出现在第一和第二样品中的两种或多种生物分子相对量的方法，包括以下步骤：

5 (a)使第一和第二样品与亲和有 A-R 化学式的亲和标记物平行接触，以产生一种或多种亲和标记产物，其中第一和第二样品分别含有两种或多种生物分子，其中第一和第二样品的生物分子构成重叠，其中 A 包括与捕获试剂特异性结合的亲和标记，其中 R 包括生物分子反应基，其中 R 与生物分子上的官能团反应，以产生在亲和标记物和生物分子之间有键的亲和标记产物；

10 (b)将亲和标记产物平行固定在基质上位置可辨别的地址上以产生固定化的亲和标记产物，其中的基质包含有结合的捕获试剂；

 (c)用质谱法确定固定化的亲和标记产物上亲和标记产物的量，其中的质谱法包括用能量源使亲和标记产物从固定化的亲和标记产物上解吸并电离，并用检测器检测已解吸且电离的亲和标记产物；以及

15 (d)比较被测出的亲和标记产物的量，此处的比较提供了第一和第二样品中出现的生物分子的相对量。

 2. 如权利要求 1 所示的方法，其中所述的生物分子选自：碳水化合物类、脂类、蛋白质类、核酸类、寡核糖核苷酸类和寡脱氧核糖核苷酸类。

 3. 如权利要求 1 所示的方法，其中，所述亲和标记物的分子量小于 5000 Da。

20 4. 如权利要求 1 所示的方法，其中，所述亲和标记物的分子量小于 1000 Da。

 5. 如权利要求 1 所示的方法，其中，亲和标记物和生物分子之间产生的键是共价键。

 6. 如权利要求 1 所示的方法，其中，通过使亲和标记产物与结合在基质上的捕获试剂接触，亲和标记产物被固定在基质上。

25 7. 如权利要求 6 所示的方法，其中，通过使捕获试剂与结合到捕获试剂的基质接触以形成捕获试剂-基质复合体，同时使捕获试剂-基质复合体与亲和标记产物接触，从而亲和标记产物被固定在基质上。

 8. 如权利要求 1 所示的方法，其中，通过使亲和标记产物与捕获试剂接触以形成亲和标记产物-捕获试剂复合体，同时使亲和标记产物-捕获试剂复合体与结合到捕获试剂的基质接触，从而亲和标记产物被固定在基质上。

30 9. 如权利要求 1 所示的方法，进一步包括，在步骤(a)之后使亲和标记产物与

多肽断裂试剂接触。

10. 如权利要求 1 所示的方法, 进一步包括, 在步骤(b)之后使固定化的亲和标记产物与多肽断裂试剂接触。

11. 如权利要求 9 或 10 所述的方法, 其中, 多肽断裂试剂是蛋白酶。

5 12. 如权利要求 11 所述的方法, 其中的蛋白酶选自胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶或 Arg-N 内切蛋白酶。

13. 如权利要求 10 所述的方法, 其中, 多肽断裂试剂是溴化氰或羟胺。

14. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 第一和第二样品独立选自生物样品、血液样品、尿液样品、细胞溶解产物、肿瘤细胞溶解产物、唾液样品、粪便样品、淋
10 巴液样品、前列腺液样品、精液样品、乳汁样品以及细胞培养基样品。

15. 如权利要求 14 所述的方法, 其中的样品是由经试剂处理的细胞制备衍生的细胞溶解产物, 其中的试剂选自化学治疗试剂、紫外光、外源基因和生长因子。

16. 如权利要求 14 所述的方法, 其中的细胞溶解产物选自: 原核细胞溶解产
15 物、植物细胞溶解产物、真核细胞溶解产物和真菌细胞溶解产物。

17. 如权利要求 1 所述的方法, 其中, 亲和标记物进一步包括连接者 L, 以形成有 A-L-R 化学式的亲和标记物。

18. 如权利要求 17 所述的方法, 其中的 L 选自: C₁₋₂₀ 酰胺、C₁₋₂₀ 聚环氧乙烷、C₁₋₂₀ 聚乙二醇、C₁₋₂₀ 聚醚、C₁₋₂₀ 聚醚二胺、C₁₋₂₀ 二胺、C₁₋₂₀ 聚酰胺、C₁₋₂₀ 聚硫醚、
20 C₁₋₂₀ 甲硅烷醚、C₁₋₂₀ 烷基、C₁₋₂₀ 亚烷基、C₁₋₂₀ 以及 C₁₋₂₀ 烷基-芳基基团。

19. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的亲和标记物选自: 生物素基-碘乙酰胺基-4, 7, 10 三噁十三烷二胺; 琥珀酰亚胺基 D-生物素; 6-((生物素酰)氨基)己酸, 琥珀酰亚胺酯; 6-((生物素酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯; 6-((6-((生物素酰)氨基)己酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯; DNP-X-生物胞素-X, 琥珀酰亚胺酯;
25 (1-生物素酰胺基-4-[4'-(马来酰亚胺甲基)环己烷-羧酰胺基]丁烷; (N-[6-(生物素酰胺基)己基]-3'-(2'-吡啶二硫基)丙酰胺; N-碘乙酰基-N-生物素基己烯二胺; [+]-生物素基-碘乙酰胺基-3, 6-二噁辛烷二胺; N-(生物素酰)-N'-(碘乙酰基)乙烯二胺; Na-(3-马来酰亚胺基丙酰基)生物胞素; 顺-四氢-2-氧噻吩并[3, 4-d]-咪唑啉基-4-戊酸酰肼; 生物素-LC-酰肼生物胞素酰肼; 以及 N-(4-叠氮-2-硝基苯基)-氨丙基-N'-(n-d-生物素基-3-氨丙基)-N'-甲基-1, 3-丙烷二胺。
30

20. 如权利要求 1 所述的方法, 其中 A 选自: 生物素、亚氨基生物素、谷胱甘

肽、麦芽糖、次氨基三乙酸基、聚组氨酸基、寡核苷酸、半抗原、二硝基苯基、毛地黄苷、荧光团、Oregon Green 染料、Alexa Fluor 488、荧光素、丹酰基、Marina 蓝、四甲基若丹明、Texas 红和 BODIPY 染料。

21. 如权利要求 1 所述的方法, 其中 R 与选自以下基团的官能团反应: 伯胺基、
5 仲胺基、羟基、胺、咪唑环、羧化物、硫氢基、二硫化物、硫醚、咪唑基、酚环、
吲哚环、胍基和邻二醇。

22. 如权利要求 1 所述的方法, 其中 R 选自: 活化的酰基、活化的烷基、吡啶
-二硫基、马来酰亚胺基、碘乙酰胺基、烷基卤、芳基卤、磺酰卤、腈、 α -卤酰基、
环氧化物、环氧乙烷、重氮基、重氮烷、二乙酰基、琥珀酰亚胺酯、*N*-羟基琥珀酰
10 亚胺酯、硫代琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸盐、异氰酸盐、磺酰氯、二氯三嗪、酰基叠
氮、五氟苯酯、四氟苯酯、4-硫-2, 3, 5, 6-四氟苯酯、酰肼、5'-(4-氟磺酰苯甲酰)
腺苷、以及 5-p-氟磺酰苯甲酰鸟苷。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的捕获试剂选自蛋白质 A、抗生物素蛋白、
链霉抗生物素蛋白、蛋白质 G、次氨基三乙酸、抗体、抗生物素抗体、抗半抗原抗
15 体和寡核苷酸。

24. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的基质是探针, 其中的探针包括结合捕获
试剂的表面。

25. 如权利要求 1 所述的方法, 在进行质谱法之前, 包括将固定化的亲和标记
产物置于可拆卸插入质谱仪的探针上的步骤。

26. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的质谱法是用激光解吸-电离质谱仪进行
20 的。

27. 如权利要求 26 所述的方法, 其中的激光解吸质谱仪与四极飞行时间质谱
仪偶联。

28. 如权利要求 1 所述的方法, 其中的质谱法是用串联质谱仪进行的。

29. 如权利要求 1 或 10 所述的方法, 其中的比较步骤包括: 在第一样品的已
解吸/电离的亲和标记产物上用质谱仪产生第一质谱; 在第二样品的已解吸/电离的
亲和标记产物上用质谱仪产生第二质谱; 用可编程的数字计算机执行算法, 其中的
算法: 鉴别第一质谱和第二质谱中至少一种峰值; 并且将第一质谱峰值的信号强度
与质谱上第二质谱峰值的信号强度进行比较。

30. 一种确定样品中一种或多种蛋白质同一性的方法, 包括以下步骤:

(a) 使样品和有 A-R 化学式的亲和标记物接触以产生一种或多种亲和标记产

物,其中的样品包括一种或多种蛋白质,其中 A 包括与捕获试剂特异结合的亲和标记物其中 R 包括生物分子反应基,其中 R 与生物分子上的官能团反应,从而产生在亲和标记物和生物分子之间有键的亲和标记产物;

5 (b)将亲和标记产物固定在基质上,以产生固定化的亲和标记产物,其中的基质含有结合在其上的捕获试剂;以及

(c)用质谱仪确定蛋白质的同一性,其中的质谱法包括用能量源使亲和标记产物从基质结合的捕获试剂上解吸并电离,并用检测器检测已解吸且电离的亲和标记产物。

31.如权利要求 30 所述方法,进一步包括:使所述固定化的亲和标记产物与
10 多肽断裂试剂接触以产生多肽断裂片段;以及用质谱法分析至少一种多肽断裂片段以确定一种蛋白质的同一性,其中所述的质谱法含有第一和第二质谱仪,包括使蛋白质断裂片段从基质结合捕获试剂上解吸以产生母离子肽,用第一质谱仪为随后的断裂选择母离子肽,在第一质谱仪中,在选择性断裂条件下使选出的母离子肽断裂,以产生产品离子片段;用第二质谱仪产生产品离子片段的第一质谱;以及用可编程
15 的数字计算机访问数据库,其中,数据库包括一个或多个氨基酸序列的已知质谱;以及用可编程的数字计算机执行算法,其中的算法至少确定每个预定质谱的一次测量结果,一次测量结果是一次质谱和各个预定的质谱间的适配紧密度的指征。

32.如权利要求 30 所述的方法,其中,通过使亲和标记产物与结合在基质上的捕获试剂接触,亲和标记产物被固定在基质上。

20 33.如权利要求 32 所述的方法,其中,通过使捕获试剂与结合到捕获试剂的基质接触以形成捕获试剂-基质复合体,同时使捕获试剂-基质复合体与亲和标记产物接触,从而亲和标记产物被固定在基质上。

34.如权利要求 30 所示的方法,其中,通过使亲和标记产物与捕获试剂接触以形成亲和标记产物-捕获试剂复合体,同时使亲和标记产物-捕获试剂复合体与结合到捕获试剂的基质接触,从而亲和标记产物被固定在基质上。
25

35.如权利要求 30 所示的方法,其中,所述亲和标记物的分子量小于 5000 Da。

36.如权利要求 30 所示的方法,其中,所述亲和标记物的分子量小于 1000 Da。

37.如权利要求 30 所示的方法,其中,亲和标记物和生物分子之间产生的键是共价键。

30 38.如权利要求 30 所示的方法,进一步包括,在步骤(a)之后使亲和标记产物与多肽断裂试剂接触。

39. 如权利要求 30 所示的方法, 进一步包括, 在步骤(b)之后使固定化的亲和标记产物与多肽断裂试剂接触。

40. 如权利要求 30 所述的方法, 其中, 多肽断裂试剂是蛋白酶。

41. 如权利要求 40 所述的方法, 其中的蛋白酶选自胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、
5 Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶或 Arg-N 内切蛋白酶。

42. 如权利要求 39 所述的方法, 其中, 多肽断裂试剂是溴化氰或羟胺。

43. 如权利要求 30 所述的方法, 其中, 第一和第二样品独立选自生物样品、
血液样品、尿液样品、细胞溶解产物、肿瘤细胞溶解产物、唾液样品、粪便样品、
10 淋巴液样品、前列腺液样品、精液样品、乳汁样品以及细胞培养基样品。

44. 如权利要求 43 所述的方法, 其中的样品是由经试剂处理的细胞制备衍生的细胞溶解产物, 其中的试剂选自化学治疗试剂、紫外光、外源基因和生长因子。

45. 如权利要求 43 所述的方法, 其中的细胞溶解产物选自: 原核细胞溶解产物、植物细胞溶解产物、真核细胞溶解产物和真菌细胞溶解产物。

15 46. 如权利要求 30 所述的方法, 其中, 亲和标记物进一步包括连接者 L, 以形成有 A-L-R 化学式的亲和标记物。

47. 如权利要求 46 所述的方法, 其中的 L 选自: C_{1-20} 酰胺、 C_{1-20} 聚环氧乙烷、 C_{1-20} 聚乙二醇、 C_{1-20} 聚醚、 C_{1-20} 聚醚二胺、 C_{1-20} 二胺、 C_{1-20} 聚酰胺、 C_{1-20} 聚硫醚、 C_{1-20} 甲硅烷醚、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 亚烷基、 C_{1-20} 以及 C_{1-20} 烷基-芳基基团。

20 48. 如权利要求 30 所述的方法, 其中的亲和标记物选自: 生物素基-碘乙酰胺基-4, 7, 10 三噁十三烷二胺; 琥珀酰亚胺基 D-生物素; 6-((生物素酰)氨基)己酸, 琥珀酰亚胺酯; 6-((生物素酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯; 6-((6-((生物素酰)氨基)己酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯; DNP-X-生物胞素-X, 琥珀酰亚胺酯; (1-生物素酰胺基-4-[4'-(马来酰亚胺甲基)环己烷-羧酰胺基]丁烷; (*N*-[6-(生物素酰胺基)己基]-3'-(2'-吡啶二硫基)丙酰胺; *N*-碘乙酰基-*N*-生物素基己烯二胺;
25 [+]-生物素基-碘乙酰胺基-3, 6-二噁辛烷二胺; *N*-(生物素酰)-*N'*-(碘乙酰基)乙烯二胺; *N*α-(3-马来酰亚胺基丙酰基)生物胞素; 顺-四氢-2-氧噻吩并[3, 4-*d*]-咪唑啉基-4-戊酸酰肼; 生物素-LC-酰肼生物胞素酰肼; 以及 *N*-(4-叠氮-2-硝基苯基)-氨丙基-*N'*-(*n*-d-生物素基-3-氨丙基)-*N'*-甲基-1, 3-丙烷二胺。

30 49. 如权利要求 30 所述的方法, 其中 A 选自: 生物素、亚氨基生物素、谷胱甘肽、麦芽糖、次氨基三乙酸基、聚组氨酸基、寡核苷酸、半抗原、二硝基苯基、

毛地黄苷、荧光团、Oregon Green 染料、Alexa Fluor 488、荧光素、丹酰基、Marina 蓝、四甲基若丹明、Texas 红和 BODIPY 染料。

50. 如权利要求 30 所述的方法，其中 R 与选自以下基团的官能团反应：伯胺基、仲胺基、羟基、胺、咪唑环、羧化物、硫氢基、二硫化物、硫醚、咪唑基、酚环、吡啶环、胍基和邻二醇。

51. 如权利要求 30 所述的方法，其中 R 选自：活化的酰基、活化的烷基、吡啶-二硫基、马来酰亚胺基、碘乙酰胺基、烷基卤、芳基卤、磺酰基、腈、 α -卤酰基、环氧化物、环氧乙烷、重氮基、重氮烷、二乙酰基、琥珀酰亚胺酯、*N*-羟基琥珀酰亚胺酯、硫代琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸盐、异氰酸盐、磺酰氯、二氯三嗪、酰基叠氮、五氟苯酯、四氟苯酯、4-硫-2,3,5,6-四氟苯酯、酰肼、5'-(4-氟磺酰苯甲酰)腺苷、以及 5-p-氟磺酰苯甲酰鸟苷。

52. 如权利要求 30 所述的方法，其中的捕获试剂选自蛋白质 A、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、蛋白质 G、次氨基三乙酸、抗体、抗生物素抗体、抗半抗原抗体和寡核苷酸。

53. 如权利要求 30 所述的方法，其中的基质是探针，其中的探针包括结合捕获试剂的表面。

54. 如权利要求 30 所述的方法，在进行质谱法之前，包括将固定化的亲和标记产物置于可拆卸插入质谱仪的探针上的步骤。

55. 如权利要求 30 所述的方法，其中的质谱法是用激光解吸-电离质谱仪进行的。

56. 如权利要求 55 所述的方法，其中的激光解吸质谱仪与四极飞行时间质谱仪偶联。

57. 如权利要求 30 所述的方法，其中的质谱法是用串联质谱仪进行的。

58. 如权利要求 30 所述的方法，其中用质谱法确定蛋白质同一性的步骤包括：用质谱仪在已解吸/电离的亲和标记组分上产生第一质谱；用可编程的数字计算机访问数据库，其中，数据库包括一个或多个氨基酸序列的已知质谱；以及用可编程的数字计算机执行算法，其中的算法至少确定每个预定质谱的一次测量结果，一次测量结果是一次质谱和各个预定的质谱间的适配紧密度的指征。

59. 如权利要求 38 或 39 所述的方法，其中的比较步骤包括用第一质谱仪在已解吸/电离的亲和标记产物上产生第一质谱；用可编程的数字计算机访问数据库，其中，数据库包括一个或多个氨基酸序列的已知质谱，其中的氨基酸序列已经用多

肽断裂试剂对一个或多个蛋白质进行裂解处理产生;以及用可编程的数字计算机执行算法,其中的算法至少确定每个预定质谱的一次测量结果,一次测量结果是一次质谱和各个预定的质谱间的适配紧密度的指征。

60. 一种确定生物分子质量的方法,包括以下步骤:

5 (a)使生物分子和有 A-R 化学式的亲和标记物接触以产生一种或多种亲和标记产物,其中 A 包括与捕获试剂特异结合的亲和标记物其中 R 包括蛋白质反应基,其中 R 与生物分子上的官能团反应,从而产生在亲和标记物和生物分子之间有键的亲和标记产物;

10 (b)将亲和标记产物固定在基质上,以产生固定化的亲和标记产物,其中的基质含有结合在其上的捕获试剂;以及

 (c)用质谱仪确定固定化的亲和标记产物上亲和标记产物的质量,其中的质谱法包括用能量源使亲和标记产物从固定化的亲和标记产物上解吸并电离,并用检测器检测已解吸且电离的亲和标记产物。

15 61. 如权利要求 60 所示的方法,其中所述的生物分子选自:碳水化合物类、脂类、蛋白质类、核酸类、寡核糖核苷酸类和寡脱氧核糖核苷酸类。

 62. 如权利要求 60 所述的方法,其中,通过使亲和标记产物与结合在基质上的捕获试剂接触,亲和标记产物被固定在基质上。

20 63. 如权利要求 62 所述的方法,其中,通过使捕获试剂与结合到捕获试剂的基质接触以形成捕获试剂-基质复合体,同时使捕获试剂-基质复合体与亲和标记产物接触,从而亲和标记产物被固定在基质上。

 64. 如权利要求 60 所示的方法,其中,通过使亲和标记产物与捕获试剂接触以形成亲和标记产物-捕获试剂复合体,同时使亲和标记产物-捕获试剂复合体与结合到捕获试剂的基质接触,从而亲和标记产物被固定在基质上。

25 65. 如权利要求 60 所示的方法,其中,亲和标记物和生物分子之间产生的键是共价键。

 66. 如权利要求 60 所述的方法,其中,亲和标记物进一步包括连接者 L,以形成有 A-L-R 化学式的亲和标记物。

 67. 如权利要求 60 所示的方法,其中,所述亲和标记物的分子量小于 5000 Da。

 68. 如权利要求 60 所示的方法,其中,所述亲和标记物的分子量小于 1000 Da。

30 69. 如权利要求 60 所示的方法,进一步包括,在步骤(a)之后使亲和标记产物与多肽断裂试剂接触。

70. 如权利要求 60 所示的方法，进一步包括，在步骤(b)之后使固定化的亲和标记产物与多肽断裂试剂接触。

71. 如权利要求 69 或 70 所述的方法，其中，多肽断裂试剂是蛋白酶。

72. 如权利要求 71 所述的方法，其中的蛋白酶选自胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、
5 Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶或 Arg-N 内切蛋白酶。

73. 如权利要求 70 所述的方法，其中，多肽断裂试剂是溴化氰或羟胺。

74. 如权利要求 60 所述的方法，其中，第一和第二样品独立选自生物样品、
血液样品、尿液样品、细胞溶解产物、肿瘤细胞溶解产物、唾液样品、粪便样品、
10 淋巴液样品、前列腺液样品、精液样品、乳汁样品以及细胞培养基样品。

用质谱法和亲和标记物鉴定生物分子的特性

5

相关申请的相互参照

本申请要求提交于 2001 年 4 月 19 日的美国临时专利申请第 60/285,630 号的优先权，出于所有的目的，在此将其全文并入以供参考。

关于在联邦资助的研究与开发下完成的发明的权利声明

10

不适用。

发明背景

随着对人类基因组和其它基因组（例如，*Drosophila*, *C. elegans*, *E. coli*, *S. cerevisiae*, *Arabidopsis*, *Oryza sativa* 等）大规模测序的发展，已经能够用寡核苷酸探针阵列迅速鉴定所表达的基因。寡核苷酸探针首先可以被设计成结合在样品中的目标核苷酸上，这是由于发生在杂交过程中的核酸氢键结合的特性造成的。寡核苷酸探针阵列可被用来确定样品中基因表达模式的特性以及因刺激物导致的任何表达模式的改变。

为对样品中的蛋白质或其它生物分子进行大规模快速分析需要类似的方法和组合物。这种方法和组合物能够定性分析试剂对细胞和动物中蛋白质表达的影响。与蛋白质和生物分子纯化技术结合的质谱法能够对样品中存在的蛋白质进行鉴定和分析。然而，由于样品损失以及纯化技术固有的低效率，纯化通常需要大量的起始材料。此外，纯化技术通常包括一个或几个从固相中洗脱样品的步骤，以便用质谱法进行分析。而且，纯化技术必需经常对蛋白质进行单独处理，先前蛋白质特性的知识通常有助于纯化步骤的设计。因此，在这一技术领域中对组合物进行蛋白质分类以便随后进行质谱分析。本发明满足了这一需要以及这一技术领域上的其它需要。

发明概要

本发明提供了在第一和第二样品（两者都含有两种或多种分子）中测定一种或多种生物分子相对量的方法。还包括对第一和第二样品进行生物分子纯化。在某些

实施方案中,生物分子是蛋白质。在一些测定蛋白质相对量的实施方案中,这些方法包括使第一和第二样品与有 A-R 化学式的亲和标记物接触以产生一种或多种被亲和标记的产物。被亲和标记的产物在亲和标记和生物分子之间包含着键。A-R 的“ A ”基团中含有与捕获试剂特异结合的亲和标记物,“ R ”基团含有生物分子反应基。被亲和标记的产物然后被平行固定在基质(其上含有结合的捕获试剂)的位置可辨别地址上以产生固定化的亲和标记产物。然后用质谱法测定固定化的亲和标记产物上亲和标记产物的量。质谱法包括,用能源使亲和标记产物从固定化的亲和标记产物中解吸并电离,并用检测器检测已解吸并电离的亲和标记产物。然后比较第一和第二样品中亲和标记产物的量以测定第一和第二样品中存在的蛋白质的相对量。

10 在一些实施方案中,使亲和标记产物与多肽断裂试剂接触是有利的。在一些实施方案中,多肽断裂试剂是蛋白酶,如胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶或 Arg-N 内切蛋白酶。其它实施方案中,多肽断裂试剂是溴化氰或羟胺。

在本发明的另一方面,这些方法包括激光解吸电离质谱仪。在其它实施方案中,15 激光解吸质谱仪是与四极飞行时间质谱仪偶联。

在本发明的另一方面,用串联质谱仪进行本发明的方法。

在本发明的某些实施方案中,亲和标记物选自生物素基-碘乙酰胺基-4,7,10 三噁十三烷二胺;琥珀酰亚胺基 D-生物素;6-((生物素酰)氨基)己酸,琥珀酰亚胺酯;6-((生物素酰)氨基)己酸,硫代琥珀酰亚胺酯;6-((6-((生物素酰)氨基)己酰)氨基)己酸,硫代琥珀酰亚胺酯;DNP-X-生物胞素-X,琥珀酰亚胺酯;(1-生物素酰胺基-4-[4'-(马来酰亚胺甲基)环己烷-羧酰胺基]丁烷;*N*-[6-(生物素酰胺基)己基]-3'-(2'-吡啶二硫基)丙酰胺;*N*-碘乙酰基-*N*-生物素基己烯二胺;[+]-生物素基-碘乙酰胺基-3,6-二噁辛烷二胺;*N*-(生物素酰)-*N'*-(碘乙酰基)乙烯二胺;Na-(3-马来酰亚胺基丙酰基)生物素;顺-四氢-2-氧噻吩并[3,4-d]-咪唑啉基-4-戊酸酰肼;生物素-LC-酰肼生物胞素酰肼;以及 *N*-(4-叠氮-2-硝基苯基)-氨丙基-*N'*-(n-d-生物素基-3-氨丙基)-*N'*-甲基-1,3-丙烷二胺。25

本发明还提供了在样品中检测一种或多种蛋白质同一性的方法。在某些实施方案中,生物分子是蛋白质。在一些检测蛋白质相对量的实施方案中,这些方法包括使样品与有 A-R 化学式的亲和标记物接触以产生一种或多种被亲和标记的产物。被亲和标记的产物在亲和标记物和生物分子之间包含着键。A-R 的“ A ”基团中含有与捕获试剂特异结合的亲和标记物,“ R ”基团含有生物分子反应基。被亲和标记30

的产物然后被固定在基质(其上含有有结合捕获试剂)上以产生固定化的亲和标记产物。然后用质谱法确定固定化的亲和标记产物上亲和标记产物中蛋白质的同一性。质谱法包括,用能源使亲和标记产物从固定化的亲和标记产物中解吸并电离,并用检测器检测已解吸并电离的亲和标记产物。

- 5 在一些实施方案中,固定化的亲和标记产物与多肽断裂试剂接触以产生多肽断裂片段。然后用质谱法(包括一级和二级质谱仪)检测其中一种蛋白质的同一性。质谱法包括使蛋白质断裂试剂片段从基质结合捕获试剂中解吸以产生母离子肽。然后挑选一种母离子肽用一级质谱仪进行随后的裂解。然后在一级质谱仪中在选择性裂解条件下裂解选出的母离子肽以产生产物离子片段。再用二级质谱仪产生产物离子片段的一级质谱。之后用可编程的数字计算机访问数据库。数据库包含一种或更多的氨基酸顺序的可预测质谱用可编程的数字计算机执行算法以便对每个预测的质谱至少确定初次测量结果。次测量结果是一次质谱和各个预测的质谱间的适配紧密度(closeness-of-fit)的指征。
- 10

- 在另一方面,本发明提供了测定生物分子质量的方法。这些方法包括这些方法包括使生物分子与有 A-R 化学式的亲和标记物接触以产生一种或多种被亲和标记的产物。A 中含有与捕获试剂特异结合的亲和标记物, R 含有蛋白质反应基。R 基团与生物分子上的官能团反应以产生在亲和标记物和生物分子之间含有键的亲和标记产物。被亲和标记的产物然后被固定在基质(其上含有结合的捕获试剂)上以产生固定化的亲和标记产物。之后用质谱法测定亲和标记产物的质量。质谱法包括,
- 15
- 20 用能源使亲和标记产物从固定化的亲和标记产物中解吸并电离,并用检测器检测已解吸并电离的亲和标记产物。

本发明的这些方面和其它方面显然参考了以下详细描述。

定义

- 25 除非另有定义,这里使用的所有的技术和科学术语有着通常可被精通本发明所属领域的技术人员所理解的含义。以下参考资料为熟练技术人员提供了本发明所用术语的一种常规定义: Singleton 等, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*(第二版, 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology*(Walker 编, 1988); *The Glossary of Genetics*, 第五版, R. Rieger 等(编), Springer Verlag(1991); Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*(1991)。除非另有说明,在这里使用的以下术语由这些资料定义。
- 30

“分析物”是指样品的任何需要被检测的组分。这一术语可指样品中单一的组分或多种组分。

“洗脱液”是指一种试剂，典型的是一种溶液，用来影响或修饰分析物对吸附表面的吸附剂的吸附作用。洗脱液在这里还可以指“选择性修饰剂”。

5 “洗脱特性”是指洗脱剂的物理或化学特性，它可影响或修饰分析物在吸附表面的吸附剂上的吸附作用。如果两种洗脱液有不同的洗脱特性，当将其与分析物和吸附剂接触时，分析物对吸附剂的亲和程度是不同的。洗脱特性包括(例如)pH、离子强度、离液序列的程度、去污剂强度以及温度。

10 “确定相对量”是指定量或定性测量一种或多种分析物(如，蛋白质、生物分子等)的量。

当两种或多种生物分子存在于在各个样品中且样品中至少有一种生物分子相同时，这两种样品有“重叠的生物分子分布”。

“生物分子”一词是指由一种或多种氨基酸、核苷酸、碳水化合物、脂等构成的分子，如蛋白质、多糖、碳水化合物类、脂类、核酸、糖脂类糖蛋白类、脂蛋白类等。

“生物高聚物”是指聚合形态的生物分子，如多肽、聚核苷酸、多糖和聚甘油酯类(如，甘油二酯或甘油三酯)。

“蛋白质类”一词是指氨基酸多聚体，如肽类、蛋白质、多肽类等。“肽类”、“蛋白质类”和“多肽类”被理解为是可以互换的。“蛋白质类”包括被磷酸基、糖基、脂质基团等翻译后修饰的氨基酸多聚物。

25 “生物样品”和“生物学样品”同样是指至少是从能够复制的有机体的一部分中分离出来的样品。用在这里时，生物样品能够分离自任何已知的分类学界，包括病毒、原核生物、单细胞真核生物以及多细胞真核生物。生物样品可以分离自有机体的全部或部分，包括其培养的部分。生物样品可以是适合本文的任何物理形式，包括匀浆、亚细胞组分、溶解产物和液体。“复合生物样品”是指含有至少 100 种不同蛋白质种类的生物样品。“中等复合生物样品”是指含有至少 20 中不同蛋白质种类的生物样品。

30 “有机小分子”是指大小类似于那些通常被用于药物的有机分子的有机分子。这一术语排除有机生物高聚物(例如蛋白质类、核酸类等)。这里使用的有机小分子的大小典型范围从至约 5000Da，至约 2500Da，至约 2000Da，或是至约 1000Da。

“分子结合伴侣”一等价于“特异结合伴侣”一是指能够特异结合的分子对，

通常是生物分子对。非限制性的例子有受体和配体,抗体和抗原、生物素和抗生物素蛋白、以及生物素和链霉抗生物素蛋白。

“受体”是指能够在生物样品中发现(但不一定要来自于生物样品)并参与配体特异性结合的分子,通常是大分子。这一术语进一步包括能够特异性结合配体的片段或衍生物。

“配体”是指任何参与指定受体或抗体特异性结合的化合物。

“生物分子反应基”是能够和官能团(例如,伯胺基、仲胺基、羟基、氨基、咪唑环、羧化物、硫氢基、二硫基、硫醚、咪唑基、酚环、吡啶环、胍基、邻二醇等)形成键(例如,共价键、非共价键等)的化学实体或部分,如存在于生物分子中的那些。这些官能团包括(但不限于)蛋白质类、氨基酸类、碳水化合物类、核酸类、脂类、以及其它生物分子。此外,可以在蛋白质类、氨基酸类、碳水化合物类、核酸类、脂类、以及其它生物分子上使它们与试剂(如,邻二醇的高碘酸还原作用)反应产生造官能团。生物分子反应基的例子包括(但不限于)活化的酰基、活化的烷基、吡啶-二硫基、马来酰亚胺基、碘乙酰胺基、烷基卤化物、芳基卤化物、磺酰卤化物、腈、 α -卤酰基、环氧化物、环氧乙烷、重氮基、重氮烷、二乙酰基、琥珀酰亚胺酯、*N*-羟基琥珀酰亚胺酯、硫代琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸盐、异氰酸盐、磺酰氯、二氯三嗪、酰基叠氮、五氟苯酯、四氟苯酯、4-硫-2,3,5,6-四氟苯酯、酰肼、5'-(4-氟磺酰苯甲酰)腺苷、以及 5-p-氟磺酰苯甲酰鸟苷。

“固定”是指使第一分子直接或间接地粘在、附在或结合在表面上或另一分子上。

“捕获试剂”是指能够选择性结合到亲和标记上的物质。

本文中,“特异性(或选择性)结合到”亲和标记或亲和标记物上是指一种结合反应,其中捕获试剂结合到含有亲和标记物(如,亲和标记产物、亲和标记等)的分子上。通常,捕获试剂“特异性(或选择性)结合到”亲和标记物的亲和标记部分。因此,在设计的结合条件下,特异性结合的捕获试剂将结合到含有必需亲和标记的分子上,同时,在同样设计的结合条件下,特异性结合的捕获试剂不会以明显的量结合到不含必需亲和标记的分子上。通常,当结合到捕获试剂上的含有亲和标记的分子的数目至少是结合背景(用不含亲和标记的分子作为对照观察)的两倍,最好是背景的 10-100 倍时,捕获试剂与含有亲和标记的分子“特异”结合。

“多肽断裂试剂”可以是任何能用来打断肽键或其它的可将肽变成较小单位(即“多肽断裂片段”)例如较小的肽或氨基酸的试剂、化合物或物质。“多肽断裂

试剂”的例子包括(但不限于)蛋白酶和化学物质。蛋白酶的例子包括胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶、Arg-N 内切蛋白酶、Xa 蛋白酶、凝血酶、肠激酶、V5 蛋白酶、以及烟草花叶病毒蛋白酶。“多肽断裂试剂”的例子还进一步包括溴化氰或羟胺。

- 5 “亲和标记的产物”包括生物分子和亲和标记之间形成的键。这些键可以是共价或非共价键(例如, 离子键、氢键等)。

“平行”一词是指在两个或多个不同的样品上分别进行一个步骤。这一步骤可以在样品上同时进行, 或者不同时进行。

- 10 “位置上可辨别地址”是同一目标上各个的区域或分开目标上各个的区域, 根据它们在目标(多个目标)上的位置可被识别。

“生物分子断裂试剂”是任何能用来在生物分子中打断键, 或是可将生物分子变成较小单位即“生物分子断裂片段”例如, 较小的肽或氨基酸、限制性核酸片段、较小的多糖或碳水化合物类等的试剂、化合物或物质。

- 15 “生物断裂片段”是通过用生物断裂试剂对生物分子进行处理而产生的生物分子。

“多糖断裂试剂”是任何能用来在多糖中打断键, 将多糖变成较小单位即“多糖断裂片段”, 例如, 较小的多糖或碳水化合物类或是从生物分子上除去一个或多个碳水化合物的试剂、化合物或物质。“多糖断裂试剂”的例子包括糖苷酶、糖苷内切酶和糖苷外切酶。

- 20 “DNA 断裂试剂”是任何能用来在 DNA 分子中打断键或将 DNA 分子变成较小单位即“DNA 断裂片段”, 例如, DNA 分子的片段或核苷酸类等的试剂、化合物或物质。DNA 断裂试剂的例子有限制性核酸内切酶。

- 25 “RNA 断裂试剂”是任何能用来在 RNA 分子中打断键或将 RNA 分子变成较小单位即“RNA 断裂片段”, 例如, RNA 分子的片段或核苷酸类等的试剂、化合物或物质。RNA 断裂试剂的例子有核酶和 RNA 酶。

“探针”是指一种设备, 当以可探寻的关系定位接合到激光解吸电离源, 并在大气压或低于大气压的压力下与气相离子分光计同时传达信息时, 该设备可用来将来自分析物的离子引入分光计。这里使用的“探针”通常是通过探针界面可逆地接合的。

- 30 “亲和捕获探针”是指一种通过相互作用结合分析物的探针, 这种作用足以使探针从非均匀的混合物中提取并浓缩分析物。浓缩至纯净是不需要的。结合的相

互作用通常是由分析物吸附到探针的吸附表面介导的。亲和捕获探针通常也被称为“蛋白质芯片”，因此，这一术语在这里与“亲和捕获探针”是等同的。

“ProteinChip®阵列”是指亲和捕获探针，当用于本发明时，它在商业上来自于Ciphergen Biosystems 公司，弗里蒙特, 加利福尼亚。亲和捕获探针可以有色谱吸附表面或生物分子亲和表面，这在以后将定义。

“吸附剂”是指任何能够吸附分析物的物质。这里使用的“吸附剂”一词是指单一物质(“一元吸附剂”)(例如，一种化合物或一个官能团)和几种不同的物质(“多元吸附剂”)。多元吸附剂中的吸收物质被称为“吸附剂类”。例如，探针基质上的激光寻址吸附表面可以含有由许多不同的吸附剂品种(如阴离子交换物质类、金属螯合物类或抗体类)具有不同结合特性构成的多元吸附剂。

“吸附表面”是指含有吸附剂的表面。

“色谱吸附表面”是指含有能够在分析物中进行色谱辨别或分离吸附剂的表面。因此，这一术语包括含有离子萃取部分、阴离子交换部分、阳离子交换部分、正相部分、反向部分、金属亲和捕获部分、和/或混合模式吸附剂的表面，此类术语在色谱技术领域是能被理解的。

“生物分子亲和表面”是指含有包括能够特异性结合生物分子在内的吸附剂的表面，(如)蛋白质类、寡糖类、抗体类、受体类、小分子配体类、以及各种脂蛋白和复合糖蛋白。

吸附亲和捕获探针的吸附表面上的样品的“复杂度”是指被吸附的不同蛋白质种类的数量。

“特异性结合”是指同时存在于一种非均匀(不均一)样品上的两种分子种类对另一种分子优先结合于样品中的其它分子种类结合的能力。通常在反应中，特异性结合相互作用以至少两倍(更典型的是超过 10 倍至 100 倍)区别于偶然的结合相互作用。当用来检测分析物时，特异性结合足以辨别分析物是否存在于非均匀(不均一)样品中。通常，特异性结合反应的亲和力或活动性至少约 10^{-7}M ，而特异性较强的特异性结合反应的亲和力或活动性从至少 10^{-8}M 到至少约 10^{-9}M 。

“气相离子分光计”是指检测可转化成当样品挥发并电离时所形成离子的质荷比的参数的装置。在本文中，气相离子分光计包括用来产生气相离子的电离源。通常，人们所感兴趣的离子是单电荷的，其质荷比一般就仅仅代表质量。气相离子分光计包括，例如，质谱仪、离子迁移分光计(ion mobility spectrometer)、以及总离子流测量装置。

“气相离子分光法”是指一种方法，包括采用电离源以从探针表面样品呈现的分析物中产生气相离子，并用气相离子分光计检测气相离子。

“质谱仪”是指气相离子分光计，它能测量可转换成气相离子质荷比的参数。质谱仪通常包括入口系统、电离源、离子光学装置、质量分析仪、和检测器。质谱
5 仪的实例有飞行时间、磁扇、四极滤色片、离子阱、离子回旋共振、扇形静电分析器和这些东西的综合。

“质谱法”是指一种方法，包括采用电离源以从探针表面样品呈现的分析物中产生气相离子，并用质谱仪检测气相离子。

“串联质谱仪”是指能够展示对离子(包括离子混合物中的离子)进行的基于
10 m/z 的辨别或测量的两个连续阶段的任何气相离子分光计。这一术语包括有两个质量分析器的分光计，并进一步包括有单个质量分析器能在质量分析之前选择性捕获或保留离子的分光计。因此，这一术语显然包括 QqTOF 质谱仪、离子阱质谱仪、离子阱-TOF 质谱仪、TOF-TOF 质谱仪、以及傅里叶变换离子回旋共振质谱仪。

“激光解吸质谱仪”是指通过使用激光作为一种手段使分析物解吸、挥发和
15 电离的质谱仪。如这一领域中所熟知的那样，生物高聚物的激光解吸质谱法通常包括使用 EAM 使完整的生物高聚物的解吸变得容易以便检测。

“四极飞行时间质谱仪”是指含有碰撞阻尼界面可在离子进入四极 Q 之前冷却由能量源形成的离子的质谱仪。四极飞行时间质谱仪也可以含有碰撞小室。

“流量”是指每单位考察影像面积上传递的能量。

20 “检测”是指确定被测物体的存在、不存在或数量。

“洗脱液”或“洗涤溶液”是指可用来调节对亲和标记产物捕获试剂的吸附作用的试剂。洗脱液和洗涤溶液也可以被称作“选择性阈修饰剂(selectivity threshold modifier)”。洗脱剂和洗涤溶液可以用来从探针或基质表面洗涤或除去未结合的物质(如未特异性结合的几种物质)。

25 “吸附”或“保留”是指在用洗脱液(选择性阈修饰剂)或洗涤溶液洗涤前或洗涤后，吸附剂和亲和标记产物之间可检测的结合。

“抗体”是指实质上由至少一个免疫球蛋白基因或至少一个免疫球蛋白基因的片段编码的、可参与配体特异性结合的多肽。这一术语包括天然产生的形式，以及片段和衍生物。这里使用的之一术语范围内的片段包括各种肽酶消化产生的片段，
30 例如 Fab、Fab' 和 F(ab)'₂ 片段；用化学分解、化学裂解和重组产生的片段；只要片段保留与目标分子特异性结合的能力。典型的重组片段是由(例如)噬菌体展

示产生的, 包括单链 Fab 和 scFv(“单链可变区”)片段。这一术语范围内的衍生物包括序列上经过修饰但仍可与目标分子特异性结合的抗体类(或其片段), 包括种间嵌合抗体和人源化抗体。用在这里时, 这些抗体可用任何已知的技术制造, 包括通过噬菌体展示等方法, 从天然 B 淋巴细胞的细胞培养物、杂交瘤、重组表达系统中收获。

抗体可以是多克隆混合物或单克隆的。“抗体”可分离自哺乳动物、非哺乳动物(如鸟类、鸡类、鱼类等)的序列, 或是完全合成抗体序列。“哺乳动物”是哺乳纲的成员。哺乳动物的例子包括(但不限于)人类、灵长类、黑猩猩类、啮齿类、小鼠类、大鼠类、兔类、羊类以及牛类。“抗体”一词还指抗体的片段和取代物, 如 F(ab')₂、Fab' 和 Fab 片段。

制造多克隆抗体的方法对精通这一领域的技术人员是熟悉的。简单地说, 将免疫原(最好是纯化的蛋白质或生物分子)与佐剂混合并将动物免疫。当抗体对免疫原的滴定度较高时, 从动物中收集血液并制造抗血清。

单克隆抗体可以由精通这一领域的技术人员熟知的各种方法获得。简单地说, 用所需抗原免疫的动物的脾细胞无限增殖, 这通常是和骨髓瘤细胞融合(见 Kohler & Milstein, *Eru. J. Immunol.* 6:511-519(1976))。其它的使细胞无限增殖的方法包括用 EB 病毒、癌基因或逆转录病毒转化, 或采用在这一技术领域熟知的其它方法。由单个无限增殖细胞产生集落进行筛选以获得对抗原有所需特异性和亲和性的抗体, 通过各种技术, 包括向脊推动物宿主进行腹腔注射, 可以增强由此类细胞产生单克隆抗体。

“抗原”是指可结合抗体的配体。抗原不需要是被免疫原的。与抗体接触的抗原部分被称为“抗原决定簇”。

“外源基因”是指在体外制备的基因、cDNA 或蛋白质的编码核酸。“外源基因”可以含有 70% 或更多的序列与细胞的核酸序列一致。“外源基因”可以在质粒、病毒、或是含有必要元素以表达外源基因编码的蛋白质的表达盒中构建。

“生长因子”是刺激细胞分化或细胞增殖的化合物。生长因子的例子包括(但不限于)EGF、NGF、FGF 等。

“化学治疗剂”是用来控制细胞尤其是癌症、癌细胞和肿瘤细胞生长的化合物或治疗(如 X-射线、辐射等)。化学治疗剂的例子包括 X-射线、辐射、长春新碱、长春碱、长春瑞宾、paclitaxel(Taxol®)、氨甲蝶呤、柔红霉素、环磷酰胺、阿霉素、美法仑, 以及苯丁酸氮芥、顺氯氨铂、六甲蜜胺、硫唑嘌呤、博来霉素、白消

安、卡铂、CCNU(洛莫司汀)、Cladribine、依托泊甙、氟尿嘧啶、Gemcitabine、羟基脲、黄胆素、异环磷酰胺、干扰素、药薯、L-天冬酰胺酶、巯嘌呤、甲基-CCNU(司莫司汀)、普卡霉素、丝裂霉素-C、米托坦、米托蒽醌、丙卡巴肼、链佐星、他莫昔芬、替尼泊甙、Topotecan 以及曲莫沙明。

5 “紫外光”一词是指波长约在 4-400 纳米之间的电磁辐射。

“C₁₋₂₀”是指含有 1-20 个碳原子的基团。

“酰基”一词是指那些衍生自有机酸通过除去酸中的羟基部分的基团。因此，酰基意味着包括(例如)乙酰基、丙酰基、丁酰基、癸酰基、新戊酰基、苯甲酰基等。

“C₁-C₂₀ 酰基”是含有 1-20 个碳的酰基。

10 除非另有说明，“烷基”一词，其本身或作为另一取代基的一部分，意味着直链或支链、或是环状的烃基，或是其结合物，它们可以是完全饱和的、单不饱和或是多不饱和的，并包括含有指定碳原子数的二价或多价的基团(即，“C₁-C₂₀ 烷基”是含有 1-20 个碳原子的取代或未取代的烷基)。饱和烃基的例子包括如甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、叔丁基、异丁基、仲丁基、环己基、(环己基)甲基、环
15 丙基甲基、(例如)正戊基、正己基、正庚基、正辛基的同系物和异构体等。不饱和烷基是含有一个或多个双键或三键的烷基。不饱和烷基的例子包括乙烯基、2-丙烯基、丁烯基、2-异戊烯基、2-(丁间二烯基)、2,4-戊二烯基、3-(1,4-戊二烯基)、乙炔基、1-和 3-丙炔基、3-丁炔基及较高的同系物和异构体。除非另有说明，“烷基”一词还包括以下详细定义为“杂烷基”的烷基的那些衍生物。仅限于由烃基团
20 构成的烷基被称为“同烷基”。

“亚烷基”一词其本身或作为另一取代基的一部分，意味着衍生自链烷烃(如 -CH₂CH₂CH₂CH₂-)的二价基，并进一步包括那些被称为“杂亚烷基”的基团。

“亚烷基”一词其本身或作为另一取代基的一部分，意味着衍生自链烷烃(如 -CH₂CH₂CH₂CH₂-)的二价基，并进一步包括那些以下称为“杂亚烷基”的基团。通常，
25 烷基(或亚烷基)基团有 1-24 个碳原子，在本发明中优选那些有 10 个或更少的碳原子的基团。“低级烷基”或“低级亚烷基”是短链的烷基或亚烷基基团，通常有 8 个或更少的碳原子。

“烷氧基”、“烷基氨基”和“烷基硫代”(或硫代烷氧基)其以常规意义使用，并指那些分别通过氧原子、氨基或硫原子附在分子残余部分上的烷基。

30 除非另有说明，“杂烷基”一词其本身或与其它术语结合意味着稳定的直链或支链、或环状烃基或是其结合物，其含有一定数目的碳原子和 1-3 个杂原子，选自

由 O、N、Si 和 S 组成的基团, 其中, 氮原子和硫原子可以任意被氧化, 同时氮杂原子可以任意被季铵化。杂原子 O、N 和 S 可以被放在杂烷基团中内部任何位置上。杂原子 Si 可以被放在杂烷基团的任何位置, 包括烷基与分子残余部分结合的位置。例如 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$ 、 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$ 、 $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 、 $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{OCH}_3$ 以及 $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$ 。最多两个杂原子可以连续, 比如例如, $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ 和 $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ 。同样, “杂亚烷基”一词其自身或作为其它取代基的一部分意味着衍生自杂亚烷基(如 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2\text{CH}_2-$ 和 $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$)的二价基。对杂亚烷基而言, 杂原子可占居在链末端之一或在两个末端(例如, 亚烷基氧、亚烷基二氧、亚烷基氨基、亚烷基二氨基等)。此外, 对亚烷基和杂亚烷基的结合基团而言, 并不包含结合基团的定位。

除非另有说明, “环烷基”和“杂环烷基”它们自身或与其它术语结合分别代表“烷基”和“杂烷基”的环状形式。此外, 对杂环烷基而言, 杂原子可以占居在杂环附着到分子残余部分的位置上。环烷基的例子包括环戊基、环己烷基、1-环己烯基、3-环己烯基、环庚烷基等。杂环烷基的例子包括 1-(1, 2, 5, 6-四氢吡啶基)、1-哌啶基、2-哌啶基、3-哌啶基、4-吗啉基、3-吗啉基、四氢呋喃-2-基、四氢呋喃-2-基、四氢噻吩-2-基、四氢噻吩-3-基、1-哌嗪基、2-哌嗪基等。

除非另有说明, “卤”或“卤素”一词其自身或作为其它取代基的一部分是指氟、氯、溴或碘原子。此外, “卤烷基”之类的术语包括单卤烷基和多代卤烷基。例如, “卤(C_1-C_4)烷基”一词包括三氟甲基、2, 2, 2-三氟甲基、4-氯丁基、3-溴丙基等。

除非另有说明, “芳基”一词是指多不饱和(通常是芳香性的)烃取代基, 它可以是单环或多环(最多 3 个), 多环可以连在一起或共价结合。“杂芳基”是指含有 0-4 个选自 N、O 和 S 的杂原子的芳基(或环), 其中的氮原子和硫原子可任意被氧化, 氮原子可任意被季铵化。杂芳基团可以通过杂原子连接在分子残余部分上。芳基和杂芳基的非限制性的例子包括苯基、1-萘基、2-萘基、4-联苯基、1-吡咯基、2-吡咯基、3-吡咯基、3-吡嗪基、2-咪唑基、4-咪唑基、吡唑基、2-噁唑基、4-噁唑基、2-苯基-4-噁唑基、5-噁唑基、3-异噁唑基、4-异噁唑基、5-异噁唑基、2-噻唑基、4-噻唑基、5-噻唑基、2-呋喃基、3-呋喃基、2-噻吩基、3-噻吩基、2-吡啶基、3-吡啶基、4-吡啶基、2-嘧啶基、4-嘧啶基、5-苯并噻唑基、嘌呤基、2-苯并咪唑基、5-吡啶基、1-异喹啉基、5-异喹啉基、2-喹啉基、5-喹啉基、3-

喹啉基和 6-喹啉基。上面提到的每一种芳基和杂芳基环状系统的取代基选自下述可接受的取代基。

为简单起见, 当将“芳基”用在和其它术语(例如, 芳氧基、芳硫基、芳烷基)的结合时, 它包括上面定义的芳基和杂芳基。因此, “芳烷基”一词包括那些其中的芳基附在烷基(如苯甲基、苯乙基、吡啶基甲基等)上的基团, 其中, 烷基中的碳原子(如亚甲基)已被(例如)氧原子(如苯氧基甲基、2-吡啶氧基甲基、3-(1-萘氧基)丙基等)替代。

上述术语(如“烷基”、“杂烷基”、“芳基”和“杂芳基”)包括所提到基的取代或未取代的形式。下面提供了对每种基团的优选的取代基。

烷基和酰基的取代基(包括亚烷基、链烯基、杂亚烷基、杂链烯基、炔基、环烷基、杂环烷基、环链烯基以及杂环链烯基)可以是选自以下各种基团: $-OR'$ 、 $=O$ 、 $=NR'$ 、 $=N-OR'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、-卤素、 $-SiR'R''R'''$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-NR-C(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(NRR'R'')=NR'''$ 、 $-NR'C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRSO_2R'$ 、 $-CN$ 以及 $-NO_2$, 数量从 $0-(2m'+1)$ 个, 其中 m' 是此类基团中的碳原子总数。 R' 、 R'' 和 R''' 各自任意地是指氢以及杂烷基、未取代的芳基、有 1-3 个卤素被取代的芳基、未取代的烷基、烷氧基或硫烷氧基、或是芳基- (C_1-C_4) 烷基。当本发明的化合物中含有多于一个的 R 基团(例如)时, 每一个 R 基团都是任意地挑选的, 如同多个 R' 、 R'' 和 R''' 基团时当有多于一个也是这样。当 R' 和 R'' 连接到同一个氮原子时, 它们可以与氮原子结合从而形成五元、六元或七元环。例如, $-NR'R''$ 是指 1-吡咯烷基和 4-吗啉基。从上述对取代基的讨论, 精通这一领域的技术人员将能理解, “烷基”这一术语包括向卤代烷基(如 $-CF_3$ 和 $-CH_2CF_3$) 和酰基(如 $-C(O)CH_3$ 、 $-C(O)CF_3$ 、 $-C(O)CH_2OCH_3$ 等)之类的基团。

类似的, 芳基和杂芳基的取代基也是多样的, 可选自: -卤素、 $-OR'$ 、 $-OC(O)R'$ 、 $-NR'R''$ 、 $-SR'$ 、 $-R'$ 、 $-CN$ 、 $-NO_2$ 、 $-CO_2R'$ 、 $-CONR'R''$ 、 $-C(O)R'$ 、 $-OC(O)NR'R''$ 、 $-NR'C(O)R'$ 、 $-NR'C(O)_2R'$ 、 $-NR-C(O)NR'R''$ 、 $-NR-C(NR'R'')=NR'''$ 、 $-S(O)R'$ 、 $-S(O)_2R'$ 、 $-S(O)_2NR'R''$ 、 $-NRS(O)_2R'$ 、 $-N_3$ 、 $-CH(Ph)_2$ 、氟 (C_1-C_4) 烷氧基和氟 (C_1-C_4) 烷基, 其数量为 0 至芳香环系统中的总开放价数; 其中, R' 、 R'' 和 R''' 任意地选自氢、 (C_1-C_8) 烷基以及杂烷基、未取代的芳基和杂芳基、(未取代的芳基)- (C_1-C_4) 烷基以及(未取代的芳基)氧- (C_1-C_4) 烷基。当本发明的化合物含有多于一个的 R 基团(例如)时, 每一个 R 基团都是任意地挑选的, 如同每个 R' 、 R'' 和 R'''

基团当有多于一个时也是这样。

芳香环或杂芳香环邻近原子上的两个取代基可以任意地被 $-T-C(O)-(CRR')_q-U$ -化学式的取代基所替代,其中,T和U任意地是 $-NR-$ 、 $-O-$ 、 CRR' -或单键,q是从0-3的整数。或者,芳香环或杂芳香环邻近原子上的两个取代基可以任意地被 $-A-(CH_2)_r-B$ -化学式的取代基所替代,其中,A和b任意地是 $-CRR'$ -、 $-O-$ 、 $-NR-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 、 $-S(O)_2NR'$ -或单键,r是从1-4的整数。如此形成的新环上的一个单键可以任意地被一个双键所替代。或者,芳香环或杂芳香环邻近原子上的两个取代基可以任意地被 $-(CRR')_s-X-(CR'R'')_t$ -化学式的取代基所替代,其中,s和t是任意地从0-3的整数,X是 $-O-$ 、 $-NR'$ -、 $-S-$ 、 $-S(O)-$ 、 $-S(O)_2-$ 或 $-S(O)_2NR'$ -。取代基R、R'、R'和R''是任意地选自氢或未取代的(C₁-C₆)烷基。

这里所使用的“杂原子”一词包括氧(O)、氮(N)、硫(S)和硅(Si)。

本发明的某些化合物可以未溶剂化的形式存在,也可以溶剂化型(包括水化的形式)存在。通常,溶剂化形式相当于未溶剂化的形式并都包含在本发明的范围内。本发明的某些化合物可以多晶形或无定形的形式存在。通常,对于本发明所期待的用法,所有的物理形式都是等同的,并都纳入在本发明的范围内。

本发明的某些化合物具有不对称的碳原子(光学中心)或双键;消旋物、非对映体、几何异构体和单一异构体都包含在本发明的范围内。本发明的化学化合物可以(+)和(-)形式存在,也可以外消旋形式存在。

用已知的方法和技术可以能将外消旋形式折分旋光对映体。一种分离外消旋形式的方法是将外消旋物转化成有旋光活性的酸的非对映体的盐,从而分离外消旋的胺类。用一种或多种公认的方法将非对映体的盐折分。随后用碱处理已折分的盐以释放有光学活性的胺。另一种将外消旋物折分成旋光对映体的方法是基于在光学活性的基质上进行色谱分离。因此,(例如)通过使d-或l-酒石酸盐、-扁桃酸盐或-樟脑磺酸盐分级结晶可将本发明的外消旋化合物折分成它们的旋光对映体。

也可以通过形成非对映体的酰胺来折分本发明的化学化合物,方法是使本发明的化学化合物与有光学活性的羧酸(如衍生自(+)或(-)苯丙氨酸、(+)或(-)苯基甘氨酸、(+)或(-)樟脑酸等的酸)反应。或者也可以通过形成非对映体的氨基甲酸酯来折分本发明的化合物,方法是使本发明的化学化合物与有光学活性的氯甲酸酯等反应。

此领域中还知道其它折分旋光对映体的方法。这些方法包括 Collet 和 Wilen,方法中 ENANTIOMERS、RACEMATES、AND RESOLUTIONS, John Wiley and Sons, 纽

约(1981)。

另外,本发明的一些化学化合物能够以顺式和反式(Z-型和 E-型)存在,这取决于取代基在双键周围的排列。因此,本发明的化学化合物可以是顺式或反式(Z-型和 E-型),或者可以是它们的混合物。

5 “能量吸收分子”和同等的缩写“EAM”是指能够从激光解吸电离源中吸收能量并随后将能量贡献给与其接触的分析物的解吸和电离的分子。这一术语包括用在MALDI(通常被称为“阵列”)中的分子,明确地包括肉桂酸衍生物、芥子酸(“SPA”)、氰羟基肉桂酸(“CHCA”)和二羟基安息香酸。还包括如美国专利5,719,060(Hutchens 和 Yip)所描述的 EAM,在此全文并入以供参考。

10

附图简述

图 1 显示了辣根过氧化物酶、牛 IgG、鸡伴清蛋白、牛血清白蛋白和超氧化物歧化酶的亲和标记产物在 2.5 和 15kDa 之间质量范围内的三种质谱图。亲和标记产物分别是在三个试管(反应试管 A、反应试管 B 和反应试管 C)中 PEO 碘乙酰生物素
15 (Pierce Chemical Co.)与蛋白质反应而产生的。每个试管都含有牛 IgG(147.3kDa; 1.6nmol)、鸡伴清蛋白(77.49kDa; 0.6nmol)、牛血清白蛋白(66.43kDa; 0.6nmol)和超氧化物歧化酶(15.59kDa; 0.3nmol)。辣根过氧化物酶在各个试管中以不同的量存在:在反应试管 A 中有 1nmol,反应试管 B 中有 2nmol,反应试管 C 中有 3nmol。然后用胰蛋白酶消化亲和标记产物并固定在涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2
20 ProteinChip® (Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA) 上。然后用 ProteinChip®系统 II(PBSII, Ciphergen Biosystems, Inc.)分析固定化的亲和标记产物,并将质谱图绘制在图 1 中。

图 2 显示了图 1 的质谱图在低质量范围(2.5kDa-6kDa)的部分。箭头指明对应于辣根过氧化物酶的亲和标记产物的峰。

25 图 3A 是对辣根过氧化物酶(如实施例 4B 所示)生物素化的报告肽的捕获。两个报告片段一致被保留在涂有链霉抗生物素蛋白的蛋白质芯片阵列上。这些报告肽的质量分别对应于 2955Da 和 3495Da。

图 3B 是以重现性的方法表示的对两种生物素化的 HRP 报告片段的捕获。(A)七次重复测定,每次将 40pmol 和 61pmol HRP 加入蛋白质混合物模型系统中。采集
30 数据后,(B)和(C),计算每个不同浓度的报告物的平均值和标准偏差。经计算,2955Da 型的总 CV 为 28%,3495Da 型的总 CV 为 34%。

如 4 是对辣根过氧化物酶(来自 spiked 无白蛋白的人血清) 2955Da 生物素化的报告肽的捕获。

详细描述

5 I. 简介

本发明提供了用质谱法可有效确定出现在第一和第二样品中的一种或多种生物分子(如蛋白质、肽、翻译后修饰的蛋白质、核酸、碳水化合物、脂类等)的同一性和相对量的方法和组合物(如捕获试剂、亲和标记物、基质等)。本发明包括使用含有亲和标记“A”和生物分子反应基团“R”的亲和标记物。依靠生物分子反应基团 R, 这种亲和标记物被用来标记一种或多种蛋白质以产生亲和标记产物。亲和标记产物然后被固定在基质上的捕获试剂。然后用质谱法(没有预先洗脱或从结合在基质上的捕获试剂除去亲和标记产物)分析基质上的固定化的亲和标记产物。下面将更加详细的描述本发明的组分和方法。

15 II. 本发明的方法

本发明的方法可有效的确定样品中生物分子(如蛋白质)的质量、数量和同一性。因此, 这些方法可用于临床诊断、药物发现以及药靶发现等范围。下面将讨论操作时所包括的步骤, 随后描述了在执行本发明时所用的各种组合物和设备。这些方法通常从待分析样品的制备开始。这些样品可从各种原料中制造, 采用生物化学和物理技术进行任意分级。

制备样品以后, 将样品与亲和标记物反应, 这使得亲和标记物通过生物分子反应基(通过键, 包括共价键和非共价键)与生物分子连接。亲和标记物中还含有能够特异性结合捕获试剂的亲和标记。亲和标记物与生物分子反应形成亲和标记产物。然后将这些亲和标记产物通过捕获试剂固定在基质上。然后可以用生物分子断裂试剂处理固定化的亲和标记产物, 以提供更加适合质谱法分析的亲和标记产物的片段。也可以用洗涤溶液处理固定化的亲和标记产物以除去非特异性结合的物质和未结合的物质。

然后用质谱法分析固定在基质上的分子。在优选的实施方案中, 激光解吸质谱法和串联质谱法被用来分析样品。然后可以分析质谱图以提供出现在两种不同样品中的生物分子相对量的信息, 某些情况下还可以提供有关样品中出现的生物分子的结构的信息。因此, 这些方法对生物样品中出现的生物分子确定特性是很有用的。

下面将进一步详细讨论本发明方法所包括的步骤。

样品制备

某些实施方案中，样品(多种样品)(例如第一样品、第二样品等)是生物样品。

- 5 生物样品是来自人类、小鼠、植物、真菌、酵母等活体的样品。在某些实施方案中，样品以生物样品形式来自人类，它包括一种或多种生物分子。生物样品的例子包括(但不限于)血液样品、尿液样品、细胞溶解产物、肿瘤细胞溶解产物、唾液样品、粪便样品、淋巴液样品、前列腺液样品、精液样品、乳汁样品以及细胞培养基样品等。通常，样品是有重叠的生物分子分布的复杂的生物样品或中等复杂的生物样品，
10 其中，样品至少共有 80%或 90%的普通生物分子类型。在与亲和标记物接触之前，这些样品可以经过细胞溶解、分级、纯化等步骤处理。

- 在某些实施方案中，比较了两种或多种样品中生物分子的相对量。通常，样品有重叠的生物分子分布。使用本发明的方法，可以比较生物分子的数量以确定所出现的生物分子的分布在性质和数量方面有什么不同。这些方法可有效辨别生物分子
15 子在性质和数量上发生的变化，这种变化表征了疾病状态(如，疾病生物标记、PSA、BRCA1 等)或是病原体(如 HIV、细菌性病原体、病毒性病原体、蛋白感染素等)的存在。这些方法还可有效发现与疾病状态相关联的生物分子(如生物标记)以用于药物发现、诊断等。特别地，它可有效比较样品(来自不同个体，或经不同条件或处理)的生物分子的分布。例如，在某些实施方案中，第一样品是未经处理的对照样品，
20 第二样品经过了试剂或条件的处理。试剂的例子包括(但不限于)：化学治疗试剂、紫外光、外源基因、生长因子。精通这一技术领域的技术人员将认识到，在细胞中引入外源基因有很多方法(参见，例如，Ausubel 等编，(1994)，同上)。在其它的实施方案中，第一样品是疾病样品，而第二样品是非疾病样品。此外，试剂可以是候选药物的形式。例如，可以将经候选药物处理的第一样品中的生物分子并与作阴
25 性对照的第二样品进行比较。候选药物对在第一和第二样品中出现的生物分子(如蛋白质)的相对量影响可作为候选药物药效的指标。那些精通这一技术的技术人员将评坐，这些方法可适用于分析任何试剂对疾病症状的作用，或是分析样品中出现的疾病标记的数量。此外，可以鉴定样品中分子的同一性，这可导致新型药靶的发现。在某些实施方案中，本发明的方法可有效鉴别样品中 HIV、致病病毒和致病细菌
30 菌之类的生物剂的存在情况。此外，本发明中被分析的样品可以是细胞溶解产物。细胞溶解产物可以由(例如)原核细胞、植物细胞、真核细胞和真菌细胞产生。这些

细胞溶解产物分别指原核细胞溶解产物、植物细胞溶解产物、真核细胞溶解产物和真菌细胞溶解产物。

使样品或亲和标记产物与生物分子断裂试剂接触

5 某些实施方案中，进行质谱分析之前，样品或亲和标记产物可以和一种或多种生物分子断裂试剂接触。生物分子断裂试剂可以和样品、亲和标记产物、或固定化的亲和标记产物等接触，以使感兴趣的生物分子断裂。在生物分子断裂试剂处理的选择和特性上应当要小心，以免打断固定化的亲和标记产物或减少亲和标记物的活性。生物分子断裂试剂处理有助于提供生物分子断裂片段，它可便于对样品(多
10 种样品)中生物分子相对量和生物分子同一性的质谱分析。特别是，生物分子断裂试剂处理可以有助于对分子量超过 25kDa 的生物分子的分析。

在优选的实施方案中，多肽断裂试剂被用于本发明。在更加优选的实施方案中，亲和标记产物与一种或多种多肽断裂试剂接触以制得多肽断裂片段。多肽断裂试剂可以在亲和标记产物被吸附到基质结合的捕获试剂之前或之后与亲和标记产
15 物接触。多肽断裂试剂可以是蛋白酶类。可被用作多肽断裂试剂的蛋白酶类的例子包括(但不限于)胰凝乳蛋白酶、胰蛋白酶、Glu-C 内切蛋白酶、Asp-N 内切蛋白酶、Lys-C 内切蛋白酶、Arg-C 内切蛋白酶、Arg-N 内切蛋白酶、Xa 因子蛋白酶、凝血酶，肠激酶、V5 蛋白酶、以及烟草花叶病毒蛋白酶。多肽断裂试剂还包括化学物质和能够断裂多肽和肽键的化合物，比如溴化氰(在甲硫氨酸残基处切断)、羟胺
20 (在 Asn 和 Gly 残基处切断)和酸性 pH(可切断 Asp-Pro 键)(参见，例如，Ausubel 等，见上)。多肽断裂试剂的活性可被热处理、蛋白酶抑制剂、金属螯合物(例如，EGTA、EDTA)等抑制。

在其它的包括样品(含有糖基、多糖和碳水化合物残基)分析的实施方案中，可以使用“多糖断裂试剂”。某些实施方案中，“多糖断裂试剂”是糖苷酶，它被用
25 来断裂生物分子。像内切糖苷酶 H(New England Biolabs, Beverly, MA)和内切糖苷酶 Hf(New England Biolabs)之类的内切糖苷酶是商业上可以获得的，并可用来打断糖蛋白、多糖等。这些内切糖苷酶切断高甘露糖的壳二糖核心和 N-连接糖蛋白的一些杂化寡糖。外切糖苷酶也是商业上可以获得的，例如 New England Biolabs，它包括 β -N-乙酰氨基己糖苷酶、 α 1-2 岩藻糖苷酶、 α 1-3, 4 岩藻糖苷酶、 α 1-2, 3 甘露糖苷酶、 α 1-6 甘露糖苷酶、神经氨酸苷酶、 α 2-3 神经氨酸苷酶、 β 1-3 半乳糖苷酶、以及 α -N-乙酰-半乳糖苷酶。
30

在其它的包括样品(含有 DNA 和 RNA 分子)分析的实施方案中,可以使用“DNA 断裂试剂”和/或“RNA 断裂试剂”以消化含有生物分子的 DNA/RNA。可以使用限制性内切核酸酶(如 Alu I、Ase I、BamH I、Bgl II、Cla I、Dra I、EcoR I、Hind III、Hpa II、Nco I、Not I、Sal I、Sau3A I、Sfi I、Sca I 以及 Sph I)以切断含有各自的限制性内切酶位点的脱氧核苷酸。

仍在其它的实施方案中,磷酸酶(如,碱性磷酸酶、酸性磷酸酶、蛋白丝氨酸磷酸酶、蛋白酪氨酸磷酸酶以及蛋白苏氨酸磷酸酶等)、酯酶和其它的酶类可被用作生物分子断裂试剂。

10 亲和标记产物的形成

这里所描述的亲和标记物是与样品(例如,第一样品、第二样品等)接触的。某些实施方案中,两种样品与亲和标记物平行(例如,分别地)接触并分别(例如,不相互结合)发挥作用。亲和标记物可预先吸附到捕获试剂上,或可游离在溶液中,之后再固定在捕获试剂上(参见以下对亲和标记产物固定化的描述)。在亲和标记物上的生物分子反应基与生物分子(如蛋白质)上的官能团发生反应并形成亲和标记产物,它在生物分子和亲和标记物之间含有键。在优选的实施方案中,这些键是共价键。在优选的实施方案中,这些反应是在含水环境中进行的,但也包括有机溶剂的存在,它对于增溶某些亲和标记物是有利的。

在本发明的某些实施方案中,有必要在待分析的样品与亲和标记物接触之前对其进行预处理。因此,有必要将生物分子上的官能团转变为一个(几个)更加容易与特定的生物分子反应基发生反应的基团。例如,生物分子(如糖蛋白)上的邻二醇可先用高碘酸盐处理,然后再与带有生物分子反应基的含有胺或酰肼的亲和标记物反应。此外,将二硫键断裂并/或使蛋白质和其它生物分子变性,以使生物分子反应基(如,与巯基等反应的生物分子反应基)与最大量的潜在位点发生反应,这样做可能是有利的。样品与亲和标记物反应之后,再将亲和标记产物固定。

亲和标记产物在基质上的固定化

亲和标记产物的固定化可由捕获试剂完成。捕获试剂可间接(如,经过吸附剂)或直接地固定到基质上。某些实施方案中,样品被平行固定在位置可辨别地址上(例如,在同一物体的不同区域、在两个独立物体的不同区域等)。

在本发明的某些实施方案中,亲和标记产物是通过捕获试剂与基质接触固定

化的,这样可使基质结合到捕获试剂上从而形成第一复合体(即捕获试剂/基质复合体),然后使第一复合体与亲和标记产物接触以形成第二复合体(即亲和标记产物/捕获试剂/基质复合体)。

- 在其它的实施方案中,捕获试剂/基质组合物可以提前制备以用于样品分析。
- 5 捕获试剂/基质组合物一旦制得,它们就可以与亲和标记产物接触以形成亲和标记产物。亲和标记产物可以和与基质结合的捕获试剂接触足够长的时间,以使亲和标记产物与捕获试剂结合。

- 在其它的实施方案中,亲和标记产物是,通过亲和标记产物与捕获试剂接触固定化的,以形成第一复合体(即亲和标记产物-捕获试剂复合体),然后使第一复合体与基质(或涂有吸附剂的基质)接触,这样可使基质与捕获试剂接触以形成第二复合体(即亲和标记产物/捕获试剂/基质复合体)。基质,可以包括基底和涂层(如吸附剂等),使与捕获试剂的结合变得容易。
- 10

通常,应使亲和标记产物和捕获试剂接触一段时间,这段时间约在 30 秒钟和 12 小时之间,较好的是约在 30 秒钟和 15 分钟之间。

- 15 亲和标记产物与捕获试剂接触的温度是特定样品和经选择的捕获试剂的函数。通常,样品在环境温度和/或高于环境温度可能是最佳的。此外,特定分析中,非环境压力的条件也可证明是最佳的。最佳条件可由精通这一领域的技术人员通过调节参数并进行所需分析而决定的。

20

固定化的亲和标记产物的色谱分析

某些实施方案中,基质上的固定化的亲和标记产物是在可保留固定化的亲和标记产物并将未特异性结合到捕获试剂上的物质洗脱的条件下处理的。除去这些物质可由提高随后质谱分析时峰的信噪比。

- 25 用于处理基质的条件最好是只让固定化的亲和标记产物仍旧结合在基质表面。洗涤基质表面可由用洗脱液或洗涤溶液泡、浸、蘸、漂洗、喷淋、或洗涤基质表面完成。当洗涤溶液(例如洗脱液)被引入探针上的吸附剂斑点时优选使用微流体(microfluidics)方法。

- 实施方案中,洗脱液与基质接触的温度是特定的亲和标记产物、捕获试剂、
30 基质结合物的函数。通常,洗脱液在 0℃和 100℃之间与固定化的亲和标记产物接触,较好的是在 4℃和 37℃之间。然而,对于一些洗脱液、基质、固定化的亲和产

物和捕获试剂结合物，其它的温度可能是最佳的，精通这样技术的技术人员可以很容易的确定这些温度。

任何合适的洗涤溶液或洗脱液都可用来洗涤基质表面。例如，可以使用有机溶液或含水溶液。更好的是使用含水溶液。示范性的水溶液包括 HEPES 缓冲液、Tris 缓冲液、磷酸缓冲盐溶液 (PBS) 等。为提高缓冲液的洗涤严格性，缓冲液中可以加入添加剂。添加剂包括 (但不限于) 离子相互作用修饰剂 (如，pH、盐的类型和强度、离子强度等)、非离子去污剂 (如，Tween、Triton X-100)、表面活性剂、水结构修饰剂 (如，尿素和离液盐溶液等)、疏水相互作用修饰剂、离液剂、介电常数修饰剂 (如，尿素、丙醇、乙腈、乙二醇、甘油、去污剂等)、亲和相互作用转换剂及它们的结合物。这些添加剂的特定的例子可以在 (例如) PCT 出版物 WO 98/59360 和 WO 98/59361 中找到。特殊洗脱液或洗脱液添加剂的选择依赖于其它的试验条件 (如，捕获试剂、吸附剂、基质和待分析的生物分子等)，并可由精通这一技术的技术人员确定。可以对基质进行处理以使固定化的亲和标记产物的损失最小，并使非特异结合的物质的损失最大。

15

III. 质谱分析法

洗涤或未洗涤的位于基质上的固定化的亲和标记产物与能量吸收分子结合后再用质谱法进行分析。本发明的一个优点是，固定化的亲和标记产物被保留在基质上而未被洗脱以便随后进行质谱分析。因此，不像常规色谱分析中所使用的方法 (需要在检测之前对所需分析物进行洗脱)，固定化的亲和标记产物不需要被转换成新的形式。此外，没有固定的常规或简单的方法可以检测常规色谱分析中的那种未除去吸附剂的固定化亲和标记产物。因此，本发明的方法提供了有关被保留的固定化的亲和标记产物的化学特性或结构特性的直接信息。

用质谱法分析了本发明的亲和标记多肽或其片段。质谱法被用来定量和/或鉴定生物分子，比如蛋白质 (例如可参见 Li 等，(2000) *Tibtech* 18:151-160; Rowley 等，(2000) *Methods* 20:383-397; 以及 Küster 和 Mann (1998) *Curr. Opin. Structural Biol.* 8:393-400)。质谱技术经过发展后至少能够对分离的蛋白质进行部分重新测序。Chait 等，*Science* 262:89-92 (1993); Keough 等，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:7131-6 (1999); 在 Bergman *EXS* 88:133-44 (2000) 中又回顾了这一点。

某些实施方案中，使用了气相离子色谱。在其它的实施方案中，使用了激光解吸/电离质谱法来分析固定化的亲和标记产物上的样品。现代激光解吸/电离质谱

法(“LDI-MS”)可以用在两个主要的方面:基质辅助激光解吸/电离(“MALDI”)质谱法和表面增强激光解吸/电离(“SELDI”)。在MALDI中,分析物(可含有生物分子)与含有基质的溶液混合,并将液滴置于基质表面。然后使混合溶液和生物分子共结晶。将基质插入质谱仪中。激光能量被定向基质表面,并在这里使生物分子解吸并电离,但没有使它们明显断裂。然而,MALDI作为分析工具也有限制。它不能提供使样品分级的方法,同上混合物质会干扰检测,尤其是对低分子量的分析物。例如可参见美国专利 5,118,937 号(Hillenkamp 等)和美国专利 5,045,694 号(Beavis&Chait)。

在 SELDI 中,基质表面经过修饰,这样它在解吸过程中就比较活跃。一种选择,可以用吸附剂和/或能选择性结合亲和标记产物的捕获试剂将表面衍生化。另一种选择,可以用当用激光打击时不被解吸的能量吸收分子使表面衍生化。再一种选择,可以与亲和标记产物结合并含有光解键(在应用激光时可被打断)的分子使表面衍生化。上述每个方法中,衍生化试剂通常被定位在施加样品基质表面特定的位置上。例如可参见美国专利 5,719,060(Hutchens & Yip)WO 98/59361(Hutchens & Yip)。这两方法可以结合,方法是(例如)用 SELDI 亲和表面去捕获分析物并在被捕获的分析物中添加包含基质的液体以提供能量吸收物质。

在一个实施方案中,质谱仪是与本发明的基质联用的。置于本发明的基质部件上的样品被引入质谱仪的入口系统。样品然后被电离源电离。典型的电离源包括(例如)激光、快原子轰击或等离子体。产生的离子被离子光学装置收集,然后用质量分析器分散并分析经过的离子。用检测器检测离开质量分析器的离子。检测器然后将检测离子的信息转换成质荷比。对分析物的检测通常包括对信号强度的检测。这反过来反应了结合到基质上的分析物的量。为得到更多的关于质谱仪的知识,可以参见(例如)*Principles of Instrumental Analysis*,第四版, Skoog Saunders Bollege publishing, Philadelphia, 1985; 以及 *Kirt-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology*, 第三版, 卷 15(John Wiley & Sons, New York 1995), 1071-1094 页。

一个实施方案中,用质谱仪来检测基质上的亲和标记产物。在典型的质谱仪中,含有亲和标记产物的基质被引入质谱仪的入口系统。分析物然后被激光、快原子轰击、高能等离子体、电喷射电离化、热喷射电离化、液体二级离子 MS、场解吸等解吸源解吸。产生的解吸的可挥发物是由预制的离子或中子组成,作为解吸过程的直接结果它们是电离的。产生的离子被离子光学装置收集,然后用质量分析器

分散并分析经过的离子。用检测器检测离开质量分析器的离子。

检测器然后将检测离子的信息转换成质荷比。对标记或其它物质的检测通常包括对信号强度的检测。这反过来反应了结合到基质上的多肽的数量和特性。例如，在某些实施方案中，为确定特殊生物分子的相对量，可以比较第一样品和第二样品图谱峰值的信号强度(例如，通常是用计算机分析(见下)等来比较)。质谱仪及其技术是精通这一技术的技术人员所熟知的。任何精通这一技术的技术人员应理解，质谱仪的任何组成部件(如，解吸源、质量分析器、检测器等)都可以与这里所描述的其它合适部件或与这一技术中已知的那些部件结合。

在优选的实施方案中，激光解吸飞行时间质谱仪用于本发明的基质。在激光解吸质谱法中，有结合标记的基质被引入入口系统。标记被电离源的激光解吸并电离成气相。产生的离子被离子光学装置收集，然后在飞行时间质量分析器中，离子通过短的高电压场被加速并漂移入高真空室。在高真空室的远端，被加速的离子在不同时间撞击到敏感的检测器表面。由于飞行时间是离子质量的函数，离子形成和离子检测器被撞击之间的延迟可被用来鉴别有特定质荷比的分子存在与否。

在某些实施方案中，质谱法被用来检测亲和标记产物与结合到基质上的捕获试剂之间的复合体形成。复合体形成可以通过监控与所用试验条件(如，吸附剂、基质、洗涤条件、被分析的亲和标记产物等)相关的特定质荷比峰的信号强度大小来优化。样品中亲和标记产物的质量可以很容易确定以获得样品中亲和标记产物的精确分子量。如果质量之一是亲和标记产物(如亲和标记蛋白质)，则可以从基础分子量中减去亲和标记物的分子量，以得到产物(如蛋白质)自身的分子量。对产物(如蛋白质)的鉴别(如，它的结构)可用生物信息学的方法(见下)来确定。

此外，结合在基质上的多肽分析物可被生物分子断裂试剂(如多肽断裂试剂)切断，这样就可以确定生物分子断裂试剂片段的分子量。可以将这些分子量与数据库中的分子量进行比较以对已经鉴别出了适当的生物分子提供更多的可信度(参见下面的数据分析部分)。

串联质谱法

可以用串联质谱法(例如，MS/MS、MS/MS/MS、ESI-MS/MS 等)以获得蛋白质和多肽等生物分子的序列信息。串联质谱法是指一组能够产生母离子的质谱法，母离子随后被裂解成子离子，然后在子离子进行质量分析。通常，用滤质器来选择供裂解的有特殊质荷比的母离子。在某些实施方案中，裂解是碰撞诱导解离(CID)。

CID 可以在位于第一质谱仪和第二质谱仪之间的碰撞室中进行。碰撞室中充满了缓冲气体，通常是惰性气体，如氦气。或者，可以用表面诱导解离、光解离(如用激光)和电子诱导解离(如，用电子束)使母离子裂解。

在使用飞行时间分析器的质谱仪中，使用了源后衰变(PSD)和源中衰变(ISD)来产生裂解事件(例如可参见 Li 等，(2000)同上)。PSD 包括用定时离子选择器从多肽离子组合物中“滤”出起始离子。有选择质量的离子自发衰变成分散在反射器中的碎片离子。ISD 使用不同于 PSD 的条件，它在离子源中有快的亚稳态衰变。

在优选的实施方案中，串联质谱法是用进一步与四极飞行时间质谱仪 QqTOF MS 偶联的激光解吸/电离质谱仪进行的(例如可参见 Krutchinsky 等，WO 99/38185)。前面已经描述了 MALDI-QqTOF MS(Krutchinsky 等，WO 99/38185; Shevchenko 等(2000) *Anal. Chem.* 72:2132-2141)、ESI-QqTOF MS(Figeys 等(1998) *Rapid Comm'ns. Mass Spec.* 12-1435-144)和芯片毛细管电泳(chip-CE)-QqTOF MS(Li 等(2000) *Anal. Chem.* 72:599-609)之类的方法。

15 IV. 质谱的数据分析

用本发明的质谱法所获得的质谱数据可用于获得关于亲和标记产物数量和同一性的信息。可以用任何合适的方法(例如用计算机等)分析由解吸和检测多肽所产生的数据。在一个实施方案中，数据是用可编程的数字计算机分析的。计算机程序通常包括存储代码的可读介质。包括基质上每个特征的位置、那一特征上吸附剂的同一性以及洗涤吸附剂所用的洗脱条件在内的某些代码被送到存储器。通过这些信息，程序然后可以鉴定在确定某些选择性特性的基质上一系列(如所用吸附剂和洗脱液的类型)的特征。计算机还包括作为入口，在接受来自基质上特殊的可寻址位置的各种分子质量上有关信号强度的数据的代码。这些数据可说明被检测的亲和标记产物的数目，最好包括峰值信号的强度和各个被检测的亲和标记产物的已测定分子量。

数据分析可以包括确定被检测峰值(如，特殊的质荷比值或值的范围)的信号强度(如峰高)和除去“异常值”(偏离预定统计分布的数据)的步骤。可以将所得峰标准化，其中计算了各个峰相对于某些参考值的高度。例如，参考值可以是仪器和化学物质(如能量吸收分子)产生的背景噪音，在刻度上可将其归零。然后所检测的各个多肽或其它物质的信号强度可以相对强度的形式展现在所需刻度上(如，100)。或者，可以在样品中加入标准物质，这样就可用标准物质的峰作为参照来计算在被

检测的各个亲和标记产物上观察到的信号的相对强度。可以使用像 Biomarker Wizard 程序(Ciphergen Biosystems, Inc., Fremont, CA)之类的程序软件辅助分析质谱。

一些实施方案中,通过用可编程的数字计算机执行算法,部分地检测了在第一或第二样品中出现的一种或多种生物分子的相对量。算法鉴别了至少一个在第一质谱和第二质谱中的峰值。算法然后将第一质谱峰值的信号强度与质谱上第二质谱峰值的信号强度进行比较。相对信号强度是出现在第一和第二样品中的生物分子的数量指征。可以将含有已知量生物分子的标准物作为第二样品分析,以对第一样品中出现的生物分子的量进行较好的量化。某些实施方案中,还可以确定第一和第二样品中生物分子的同一性(见下)。

本发明还提供了确定生物分子(如,蛋白质)同一性的方法。某些实施方案中,采用了可编程的数字计算机来获得包括一个或多个质谱的数据库。然后用可编程的数字计算机执行算法以便至少对各个预定质谱进行一次测量。初次测量结果是在生物分子的一次质谱和各个预定的质谱多样性间的适配紧密度的指征。

通过用可编程的数字计算机执行算法,质谱数据可被用来鉴定样品中的蛋白质和生物分子,可编程的数字计算机可将 MS 数据与数据库中记录的数据进行比较。当用 MS 法分析时,每个分子都提供了特征质谱(MS)数据(也可被称为质谱“标记图”或“指纹”)。通过与数据库中所含的(尤其是)实际或理论 MS 数据或生物分子序列信息进行比较可以对数据进行分析。另外,可以将生物分子断裂成片段以供 MS 分析。也可以将对片段进行 MS 分析所得的信息与数据库进行比较,从而确定样品中生物分子(如蛋白质)的同一性(例如可参见 Yates(1998) *J. Mass Spec.* 33:1-19; Yates 等,美国专利 5,538,897 号;Yates 等,美国专利 6,017,693 号;WO 00/11208 和 Gygi 等(1999) *Nat. Biotechnol.* 10:994-999)。软件资源可使对质谱的解释变得容易,尤其是蛋白质质谱,同时,现在可以在互联网上很容易访问公共区域序列数据库,这会有助于蛋白质鉴定。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)。

某些实施方案中,将 MS 数据以及由此数据获得的信息与包括有关生物分子的数据和信息的数据库进行了比较。例如,数据库中可以含有核苷酸或氨基酸序列。数据库可以含有已表达序列标志(ESTs)的核苷酸或氨基酸序列。或者,数据库可以

含有核苷酸或氨基酸水平的基因序列。数据库可以含有(但不限于)任何物种的基因组中所含的核苷酸序列、氨基酸序列、或是核苷酸序列的翻译的集合。

通常用计算机程序或是最好在计算机上执行的搜索算法分析有关生物分子信息(如核苷酸或氨基酸序列)的数据库。序列数据库中与用本发明方法所得的数据和信息最为匹配的信息被检出(例如可参见 Yates (1998) *J. Mass Spec.* 33:1-19; Yates 等, 美国专利 5,538,897 号; Yates 等, 美国专利 6,017,693 号)。

可以使用任何可有效检索数据库的合适的算法或计算机程序。检索算法和数据库应经常更新,根据本发明将使用更新的版本。程序或数据库的例子可以在万维网(WWW)中找到, <http://base-peak.wiley.com/>, <http://mac-mann6.embl-heidelberg.de/MassSpec/Software.html>, <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/databases/>, 以及 <http://donatello.ucsf.edu>。美国专利第 5,632,041; 5,964,860; 5,706,498; 以及 5,701,256 号也描述了用于序列比较的算法或方法。

一个实施方案中,蛋白质、肽或核苷酸序列的数据库是各种数据库的结合。数据库的例子包括(但不限于)UCSF 网址下的 ProteinProspector (prospector.ucsf.edu)、Genpept 数据库、GenBank 数据库(描述在 Burks 等 (1990) *Methods in Enzymology* 183:3-22)、EMBL 数据库(描述在 Kahn 等 (1990) *Methods in Enzymology* 183:23-31)、蛋白质序列数据库(描述在 Barker 等 (1990) *Methods in Enzymology* 183:31-49)、SWISS-PROT(描述在 Bairoch 等 (1993) *Nucleic Acids Res.*, 21:3093-3096) 以及 PIR-International(描述在 (1993) *Protein Seg. Data Anal.* 5:67-192)。

在进一步的实施方案中,产生了新的数据库以与由质谱确定的 MS 数据(例如,断裂的蛋白质或肽片段的质量或质谱)进行比较。例如,产生了关于所有可能的氨基酸序列(由已经确定质量的肽组成)的理论数据库(Parekh 等, Wo 98/53323)。然后,将数据库与用质谱法确定的实际质量进行比较,以便确定样品中肽的氨基酸序列。

某些实施方案中,来自于质谱的多肽的质量被用来查询数据库,以获得那些来自可提供最紧密适配的核酸序列的蛋白质或预测蛋白质的质量。这种情况下,不用氨基酸序列就可以快速鉴定未知的蛋白质。本发明的其它实施方案中,可以将多肽片段提供的质量与蛋白质或预测蛋白质(来自于可提供最紧密适配的核酸序列)数据库的预计质谱进行比较。采用与用来断裂由 MS 法分析的生物分子同样的断裂

试剂, 算法或计算机程序在数据库中产生了序列的理论断裂。此外, 所用生物分子反应基的性质有助于鉴别亲和标记产物中的生物分子。例如, 如果生物分子反应基对特殊的官能团有特异性, 那么, 作亲和标记产物的可能性, 就可能除去没有特殊官能团的生物分子。例如, 如果采用与巯基反应生物分子反应基, 那么, 作为亲和标记产物的候选物, 就可能除去不含半胱氨酸的蛋白质。

来自序列数据库的序列或模拟断裂片段, 它与由母体分子或片段分子的 MS 数据产生的序列相互对应, 落在类似序列所需范围内的被称为“匹配”或“击中”。这时, 可以迅速确定生物分子或其片段的同一性。根据各个特殊的分析, 研究者可以制定或改变可接受序列同源性比较值的范围。

10

V. 系统

本发明还包括对生物分子进行定性的系统。在某些实施方案中, 这种系统包括气相离子分光光度计、基质(例如, 含有吸附剂的芯片)、捕获试剂、亲和标记物和带有本地数据库能够储存至少一种质谱记录的计算机。系统还可以包括输入设备、输出设备以及与输入设备电子连接的计算设备。输出设备和本地数据库被设置成从质谱仪分光光度中接受质谱数据。计算设备被用来执行算法, 其中它在数据库中比较序列记录或将第一样品的第一质谱与第二样品的第二质谱进行比较。在其它的实施方案中, 系统可以含有被设置成通过计算机网络从质谱分光光度仪接受质谱数据的远程计算装置。这种远程计算装置与含有质谱或生物分子序列记录的远程数据库、远程输出装置和远程输入装置连接。远程计算装置含有代码以便执行算法, 其中它比较质谱记录或将数据库中的生物分子序列记录与样品的质谱进行比较。

20

VI. 亲和标记物

本发明中, 亲和标记物含有附在生物反应基(“R”)上的亲和标记(“A”)以形成有 A-R 结构的化合物。一些实施方案中, 亲和标记物还含有连接者(L)以形成含有 A-L-R 化学式的化合物。亲和标记物不需要被同位素(如, ^{13}C 、 ^2H 、 ^{34}S 、 ^{18}O 、 ^{17}O 、 ^{15}N 等)标记。

25

亲和标记

亲和标记能够和捕获试剂特异性结合。因此, 由于亲和标记物的亲和标记部分, 亲和标记产物能够与捕获试剂结合。实际上, 任何能够附着到生物分子反应基

30

上并能选择性结合捕获试剂的分子都可作为亲和标记。亲和标记的例子包括(但不限于)生物素、亚氨基生物素、谷胱甘肽、麦芽糖、次氨基三乙酸基、聚组氨酸基、寡核苷酸、半抗原(也可以参见 WO 00/11208 以获得关于亲和标记的描述)。表 1 中列出了有关捕获试剂-亲和标记对的例子:

5

表 1

亲和标记	捕获试剂
生物素	抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、NeutrAvidin 生物素结合蛋白 (Molucular Probes)、链霉抗生物素蛋白琼脂糖 (Molucular Probes)、CaptAvidin 琼脂糖 (Molucular Probes)、CaptAvidin 生物素结合蛋白 (Molucular Probes)、链霉抗生物素蛋白丙烯酰胺 (Molucular Probes) 或抗生物素抗体
亚氨基生物素	抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、NeutrAvidin 生物素结合蛋白 (Molucular Probes)、链霉抗生物素蛋白琼脂糖 (Molucular Probes)、CaptAvidin 琼脂糖 (Molucular Probes)、CaptAvidin 生物素结合蛋白 (Molucular Probes)、链霉抗生物素蛋白丙烯酰胺 (Molucular Probes) 或抗生物素抗体
谷胱甘肽	谷胱甘肽 S-转移酶
麦芽糖	麦芽糖结合蛋白
次氨基三乙酸基	聚组氨酸
聚组氨酸基	次氨基三乙酸基
寡核苷酸	补体寡核苷酸
半抗原	抗半抗原抗体
毛地黄苷	抗毛地黄苷抗体
二硝基苯基	抗二硝基苯基抗体
荧光素	抗荧光素抗体

某些实施方案中, 生物素和亚氨基生物素较可取, 因为它的可利用性, 已知有大量的捕获试剂可结合生物素并且是商业上可获得的(例如可参见表 1)。此外, 含有生物素或亚氨基生物素作为亲和标记的亲和标记物可商业上从卖主获得(如,

Pierce Chemical 公司, Molecular Probes 等)。

寡核苷酸可被用作亲和标记和捕获试剂对。寡核苷酸包括像 DNA、RNA 以及 RNA/DNA 混合物分子之类的核酸。被用作亲和标记的寡核苷酸应能与出现在捕获试剂中的寡核苷酸序列杂交。精通这一技术的技术人员应认识到,可以设计出许多不同的寡核苷酸序列,它们可以彼此杂交并可作为捕获试剂/亲和标记对。设计这类寡核苷酸对的重要因素包括实际的核苷酸序列、寡核苷酸的长度、杂交条件(如,温度、盐浓度、有机化学物质的存在情况等)以及寡核苷酸对的熔解温度。较好的是,寡核苷酸的长度至少为 7 个碱基对,更可取的是至少为 10 个碱基对,最好是至少有 15 个碱基对。寡核苷酸对应具有至少 50% 的同一性,更高是有 70% 的同一性,最好是有 100% 的同一性。本文的两个或多个核酸序列中,“同一的”或“同一性”百分数是指,当通过比较窗口对最大一致性进行比较并排列,用以下序列比较算法之一或通过手工排列和视觉检测进行检测时,两个或多个序列或亚序列是一样的,或有特定百分比例的核苷酸(如 70% 的同一性)是同样的。这些序列就被称为“实质上同一的”。

在本发明其它的实施方案中,使用了含有次氨基三乙酸(NTA)基的亲和标记。典型地,含有聚组氨酸(例如,6 个或更多的组氨酸,较好的是 10 个组氨酸,更好是 12 个组氨酸)分子的捕获试剂被用来结合含有次氨基三乙酸基的亲和标记。为使 NTA 基结合聚组氨酸,金属物质(如镍等)的存在是必要的。(参见 Current Protocols in Molecular Biology(Ausubel 等编,(1994)),对固定化的亲和技术的综述)。

可以用含有 Ni-NTA 基(镍-次氨基三乙酸)的捕获试剂—如 Ni-NTA 琼脂糖(Qiagen)或 Ni-NTA 磁性琼脂糖珠(Qiagen)一来结合含有聚组氨酸分子的亲和标记物和亲和标记产物。那些精通这些技术的技术人员应认识到,聚组氨酸能被用作亲和标记,含有分子的 NTA 和 Ni-NTA 可被用作捕获试剂。

在本发明的其它实施方案中,抗原被用作亲和标记,与抗原特异性结合的抗体被用作捕获试剂。分子“抗原”是一种被抗体识别和结合的分子(如,肽、碳水化合物、有机分子或许多像糖脂和糖蛋白之类的复杂分子)结合。作为抗体结合靶点的抗原部位是抗原决定簇,与单个抗原决定簇对应的小型官能团被称为半抗原。半抗原是一种化合物,通常是低分子量(如,小于 10,000kDa),当注射给动物时是没有免疫原性的,但与载体蛋白(如钥孔鲷血蓝蛋白等)或细胞结合后可以诱导免疫原性反应和抗半抗原抗体形成,变得有免疫原性,并能诱导体抗体,它能特异性地结合半抗原或半抗原-载体共轭物。这一领域中已知有许多半抗原的例子(如,二硝

基苯基、毛地黄苷、荧光团、Oregon Green 染料、Alexa Fluor 488(Molecular Probes)、荧光素、丹酰基、Marina 蓝(Molecular Probes)、四甲基若丹明、Texas 红(Molecular Probes)、BODIPY(4,4-二氟-4-硼-3a,4a-二氮杂-s-indacene; 美国专利 4,774,339 号)染料等),它们可被用作本发明的亲和标记。能与半抗原特异性结合的作为捕获试剂的抗体可从商业上获得,如来自尤金,俄勒冈州的 Molecular Probes 公司。这些抗体包括可与二硝基苯基、毛地黄苷、荧光团、Oregon Green 染料、Alexa Fluor 488(Molecular Probes)、荧光素、丹酰基、Marina 蓝(Molecular Probes)、四甲基若丹明、Texas 红(Molecular Probes)以及 BODIPY 染料特异性结合的抗体。一些实施方案中,可用分光光度法或荧光法可检测亲和标记物或亲和标记产物上发色半抗原的存在情况。

生物分子反应基

生物分子与含有生物分子反应基的分子在含水溶剂或含水溶剂/有机溶剂的混合物环境中接触是一项此领域中已知的技术。例如,可参见 Means 等, CHEMICAL MODIFICATION OF PROTEINS, Holden-Day, 旧金山, 1971; Feeney 等, MODIFICATION OF PROTEINS: FOOD, NUTRITIONAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS, Advances in Chemistry Series, 198 卷, American Chemical Society, 华盛顿特区, 1982; Feeney 等, FOOD PROTEINS: IMPROVEMENT THROUGH CHEMICAL AND ENZYMATIC MODIFICATION, Advances in Chemistry Series, 160 卷, American Chemical Society, 华盛顿特区, 1977; Hermanson, BIOCONJUGATE TECHNIQUES, Academic Press, 圣地亚哥, 1996 以及 WO 00/11208。

亲和标记物上的生物分子反应基通常选自各种熟知的部分、基团和试剂,它们能够与蛋白质、衍生蛋白质和生物分子(如,用高碘酸盐处理的蛋白质)以及其它生物分子反上的官能团应形成键(如,共价键等)。官能团的例子包括(但不限于)伯胺、仲胺、羟基、胺、咪唑环、羧化物、巯基、二硫化物、硫醚、咪唑基、苯环、吡啶环、胍基、邻二醇、醛等。

巯基生物分子反应基

巯基(如,位于半胱氨酸侧链)能够与生物分子反应基—如活化的酰基、活化的烷基、吡啶-二硫化物基、马来酰亚胺基等(例如可参见 Hermanson, 同上)—发生反应。巯基生物分子反应基的例子包括碘乙酰胺基、马来酰亚胺基、烷基卤、芳

基卤、磺酰卤、腈、 α -卤酰基、环氧化物等(例如可参见 Hermanson, 同上; Feeney 等, MODIFICATION OF PROTEINS:FOOD, NUTRITIONAL AND PHARMACOLOGICAL ASPECTS, 同上)。

用二硫断裂试剂, 如还原剂、 β -巯基乙醇、盐酸 2-巯基乙胺(MEA; Pierce
5 Chemical 公司, 20408 号产品)、二硫苏糖醇(DTT; Pierce Chemical 公司, 20290
号产品)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、巯基乙醇酸盐、三-(2-羧乙基)磷、以
及三丁基磷(5mM; Fluka, 90827), 可以将胱氨酸分子还原成含有巯基的半胱氨酸。
某些实施方案中, 有必要与二硫断裂试剂结合使用变性剂, 如加热、盐酸胍
(Sigma, G7153)、尿素等, 以使随后与巯基生物分子反应基反应的可接近的巯基的
10 数目最大。此外, 有必要通过透析、洗涤等除去多余的二硫断裂试剂。二硫断裂试
剂会干扰随后的巯基生物分子反应基的反应。

在其它的实施方案中, 可用固定化的二硫反应物(Hermansman, 同上)将二硫
键打断形成巯基。这些反应物可以包括用含有巯基的化合物(如, N-乙酰-高半胱氨
酸、半胱氨酸或二氢硫辛酰胺)修饰的、附着到间隔分子上(如二氨基丙胺间隔基)
15 的固体支撑物。

羟基生物分子反应基

羟基生物分子反应基可与出现在生物分子中的羟基(如酪氨酸侧链上的羟基)
反应。酪氨酸侧链上的羟基可与活化的烷基化试剂以及活化的酰基化试剂(例如可
20 参见 Hermanson, 同上)之类的生物分子反应基发生反应。此外, 环氧化物和环氧
乙烷可被用作羟基生物分子反应基以使亲和标记与羟基偶联, 从而产生酯键。或者,
羟基还可被转换成能与其它生物分子反应基反应的官能团。例如, 羰二咪唑可以和
羟基反应形成咪唑氨基甲酸酯, 它将会与胺生物分子反应基反应形成氨基甲酸酯
键。同样, 可以使用 *N,N'*-二琥珀酰亚胺碳酸酯使生物分子上的羟基转变成琥珀酰
25 亚胺氨基甲酸酯(例如可参见 Hermanson, 同上)。琥珀酰亚胺氨基甲酸酯然后朝含
有生物分子反应基的胺方向进行反应。

咪唑基和酚环生物分子反应基

可以使用咪唑基和酚环生物分子反应基以使亲和标记和咪唑环和酚环(如组
30 氨酸和酪氨酸侧链上的那些基团)反应。芳族的氨基酸基团(如亲和标记 *N* α -(4-氨
基苯甲酰生物胞素)(Molecular Probes, 尤金, 俄勒冈州)上的那些基团)的重氮化

作用会导致咪唑基、酚环和鸟苷反应基的形成(例如可参见 Hermanson, 同上); 用亚硝酸钠处理对-氨基苯甲酰生物胞素以形成重氮基, 它随后会与组氨酸和酪氨酸之类的残基反应从而形成共价重氮键。

5 羧化物生物分子反应基

本领域中已知可与羧化物官能团特异性反应的生物分子反应基(例如可参见 Hermanson, 同上)。羧化物生物分子反应基包括(但不限于)重氮烷、二乙酰化合物以及羰二咪唑。碳化二亚胺可用来活化羧化物基团以便所有与胺生物分子反应基反应。

10

胺生物分子反应基

某些实施方案中, 胺生物分子反应基包括(但不限于)琥珀酰亚胺酯、*N*-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯、磺基琥珀酰亚胺酯、异硫氰酸酯、异氰酸酯、磺酰氯、二氯三嗪、芳基卤、以及酰基叠氮化物等。伯胺反应基包括活化的酰基基团和活化的烷基基团(例如可参见 Hermanson, 同上)。此外, 五氟苯酯、四氟苯酯(如 4-硫-2, 3, 5, 6-四氟苯酯等)可与伯胺和仲胺反应以形成共价键。

15

蛋白质的衍生物以形成生物分子反应基

生物分子上的官能团一如糖蛋白上的邻二醇、多糖、RNA、*N*-末端丝氨酸残基, *N*-末端苏氨酸残基等一可与化合物反应, 这将使官能团衍生或转变成能与亲和标记上特殊的生物分子反应基反应的不同的官能团。例如, 可以用高碘酸盐处理生物分子上的邻二醇以产生乙醛残基(例如可参见 Hermanson, 同上)。这些乙醛残基可以和含有生物分子反应基的亲亲和标记物反应, 生物分子反应基上带有胺或酰肼部分(例如, 6-((6-((生物素酰)氨基)己酰)氨基)己酸、酰肼(生物素-XX-酰肼; 目录 B-2600 号; Molecular Probes 公司)、以及生物胞素酰肼(L-酪氨酸, N6-[5-(六氢-2-氧-1H-噻吩并[3, 4-d]咪唑-4-基)-1-氧戊基]-、酰肼、[3aS-(3a α , 4 β , 6a α)]-; 目录 B-1603 号; Molecular Probes 公司)等)。此外, 核苷酸(如, 除嘌呤和除嘧啶的损害)上的无碱基位点含有醛, 可以和透过亲和标记 ARP(*N*-(氨基氧乙酰基)-*N'*-(D-生物素酰)肼、三氟乙酸盐; 目录 A-10550 号; Molecular Probes 公司)的膜上的羟胺生物分子反应基反应。同时, 它可以用半乳糖氧化酶处理含有半乳糖残基的生物分子以形成醛。这一方法已经被用来在糖蛋白上氧化半乳糖残基以

20

25

30

便随后与含有生物分子反应基的酰肼和胺反应。

靶向生物分子类的生物分子反应基

生物分子反应基也可以是有特殊配体结合或酶特性的一类靶向生物分子。例如，对嘌呤核苷结合蛋白的亲标记在本领域中是已知的（参见 Colman, (1983) Ann. Rev. Biochem. 52:67-91）。尤其是生物分子反应基 5'-FSBA (5'-4-氟磺酰苯甲酰) 腺苷 (Aldrich)，已经发现它在 ATP 结合分子亲和标记中有广泛的应用，如 ATP 结合分子有蛋白激酶 (cAMP-依赖的蛋白激酶、cGMP 依赖的蛋白激酶、酪蛋白激酶、EGF 受体激酶等)、谷氨酸脱氢酶、 $3\alpha, 20\beta$ -羟基类固醇脱氢酶、谷氨酰胺合成酶等 (Colman, 同上)。已证明结构上与 5' FSBA (如, 3' FSBA、5-对-氟磺酰苯甲酰尿苷等) 有关的化合物可有效作为标记核苷酸结合蛋白的生物分子反应基 (Colman, 同上)。因此，本发明的含有 FSBA 和 FSBA 样生物分子反应基的亲标记可被用来定性样品中的 FSBA 和 FSBA 样的生物分子反应基。此类亲和标记可有效分析激酶串联 (如可被肿瘤抑制剂、生长因子等影响的那些) 的活化。

连接者

A 和 R 可以直接地相互连接，或者，它们可以通过连接者 L 结合从而形成有 A-L-R 化学式的化合物。用于本发明使用的连接者可以有一系列结构、取代基和取代模式 (例如可参见 WO 00/11208)。例如，它们可以被含有氮、氧和/或硫的基团衍生，这些基团是悬挂或连接在连接者基团的主链上。连接者的例子包括 (但不限于) 酰胺、聚环氧乙烷、聚乙二醇、聚醚、聚醚二胺、二胺、聚酰胺、聚硫醚、甲硅烷醚、烷基、亚烷基、以及烷基-芳基基团。这些连接者可以含有一个或多个杂原子 (如, N、O 或 S 原子)。在本发明中有效的连接者的例子包括在这里描述和作为参考的亲标记物中出现的那些连接者 (如, [+]-生物素基-碘乙酰胺基-3, 6-二噁辛烷二胺等)。某些实施方案中，连接者含有 C_{1-20} 分子。某些实施方案中，连接者含有 C_{1-20} 酰胺、 C_{1-20} 聚环氧乙烷、 C_{1-20} 聚乙二醇、 C_{1-20} 聚醚、 C_{1-20} 聚醚二胺、 C_{1-20} 二胺、 C_{1-20} 聚酰胺、 C_{1-20} 聚硫醚、 C_{1-20} 甲硅烷醚、 C_{1-20} 烷基、 C_{1-20} 亚烷基、 C_{1-20} 以及 C_{1-20} 烷基-芳基基团。连接者可以适用于促使生物分子反应基和官能团的反应和/或捕获试剂与亲和标记的结合这一目的。

亲和标记物的获得

许多亲和标记物可由商业上获得，如尤金，俄勒冈州的 Molecular Probes 公司和罗克福德，伊利诺斯州的 Pierce Chemical 公司（参见以下对这些标记物的描述）。此外，可以合成在本发明中有效的亲和标记物。许多制造 A-R 亲和标记物和 A-L-R 亲和标记物的合成途径是对精通这一技术的技术人员熟知的，其中一种技术能够为此类标记物的形成选择合适的反应条件。例如可以参见 Sandler 等, ORGANIC FUNCTIONAL GROUP PREPARATIONS 第二版, Academic Press 公司, 圣地亚哥 1983; WO 00/11208。此外，在这一技术中描述了硫代-N-羟基琥珀酰亚胺亲和标记物的合成（例如可参见 Hermanson, 同上; WO 00/11208; 以及美国专利 5, 942, 628、5, 892, 057 和 5, 872, 261 号）。WO 00/11208 描述了亲和标记物（如生物素基-碘乙酰基胺基-4, 7, 10 三噁十三烷二胺等）的合成，它能靶向包括巯基和胺官能团在内的生物分子上的官能团。美国专利 5, 872, 261 中描述了制备硫代-N-羟基琥珀酰亚胺的方法，它包括使硫代琥珀酸酯化，然后将其与羟胺反应以形成硫代-N-羟基琥珀酰亚胺。在本发明中有效的亲和标记物可以由亲和标记连接者以及这里所描述的生物分子反应基的组合物组成，理想的是，这种组合物应能产生可与生物分子反应的亲和标记物，从而制造亲和标记产物。其中的亲和标记产物可被捕获试剂特异性结合，并且随后可用质谱法进行分析。某些优选的实施方案中，含有生物素的亲和标记物是商业上可获得的。这些含有生物素的亲和标记物可来自于卖方，例如，Molecular Probes 和 Pierce Chemical 公司，并且可以靶向生物分子上的各种官能团。以下是这些类型的亲和标记物的概要。

20

用于胺的含有生物素的亲和标记物

EZ-Link™ PFP-Biotin (Pierce Chemical 公司) 含有五氟苯酯，它能够与伯胺和仲胺反应形成亲和标记的生物分子、蛋白质、肽等。类似的，由于其四氟苯酯基，EZ-Link™ PFP-Biotin (Pierce Chemical 公司) 可用向伯胺和仲胺方向反应。EZ-Link™ PFP-Biotin 在水溶液中还有很好的溶解性，这是由于连接四氟苯基基团和生物素基团的聚环氧乙烷连接者基团的缘故。

Molecular Probes 公司是另一个胺反应生物素化的供应商，并提供了这些试剂：B-1513，琥珀酰亚胺基 D-生物素，2, 5-琥珀酰亚胺，1-((5-六氢-2-氧-1H-噻吩并(3, 4-d)咪唑-4-基)-1-氧戊基)-(3aS-(3a- α , 4 β , 6a- α))-；目录 B-1582 号，6-((生物素酰)氨基)己酸，琥珀酰亚胺酯，1H-噻吩并[3, 4-d]-咪唑-4-戊酸酰胺，N-(6-((2, 5-二氧-1-吡咯烷基)氧)-6-氧代己基)六氢-2-氧，(3aS-(3a α , 4

β , 6a- α))-; 目录 B-6353 号, 6-((生物素酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯, 钠盐, 硫代-NHS-LC-生物素; 目录 B-6352 号, 6-((6-((生物素酰)氨基)己酰)氨基)己酸, 硫代琥珀酰亚胺酯, 钠盐, (生物素-XX, SSE); 目录 B-2604 号, 生物素-X2, 4-二硝基苯-X-L-赖氨酸, 以及 NDP-X-生物胞素-X。

5

用于巯基的含有生物素的亲和标记物

亲和标记物 Biotin-BMCC(1-生物素酰胺-4-[4'-(马来酰亚胺酰甲基)环己烷-氨甲酰]丁烷; Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州)将和多肽或其它生物分子上的巯基形成硫醚键(例如可参见 Hermanson, 同上)。另一种亲和标记物是

10 Biotin-HPDP(N-[6-(生物素酰胺酰)己基]-3'-(2'-吡啶二巯基)丙酰胺; Pierce Chemical 公司), 它可用与游离的巯基形成二硫键(Hermanson, 同上)。通过使用还原剂, 如 DTT(二硫苏糖醇), 可以使这种键断裂。其它有效的可与巯基反应的含有生物素的亲和标记物包括那些含有碘乙酰基或碘乙酰胺基部分的亲和标记物, 如, 碘乙酰基-LC-生物素(N-碘乙酰基-N-生物素基己烯二胺; Pierce Chemical 公

15 司, 罗克福德, 伊利诺斯州)和 EZ-Link™ PEO-Iodoacetyl Biotin([+]-生物素基-碘乙酰胺基-3, 6-二噁辛烷二胺; Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州, 目录 21334 号。

Molecular Probes 也提供含有生物素亲和标记和与巯基反应的生物分子反应基的亲和标记物。这些亲和标记物的例子包括(但不限于)目录 B-1591 号, N-(生物

20 素基)-N'-(碘乙酰基)乙烯二胺和 N α -(3-马来酰亚胺基丙酰)生物素; 目录 M-1602 号。

用于羧基的含有生物素的亲和标记

其它含有生物素的亲和标记物含有可与羰基或羧基反应的亲和标记物, 如生

25 物素酰肼(顺-四氢-2-氧噻吩并[3, 4-d]-咪唑啉-4-戊酸酰肼; Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州)、生物素-LC-酰肼(Pierce chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州)以及生物胞素酰肼(Pierce chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州)。

含有生物素的光反应的亲和标记物

30 本发明的某些实施方案中使用了光反应生物分子反应基。光反应的含有生物素的亲和标记, 如 N-(4-叠氮-2-硝基苯)-氨丙基-N'-(N-d-生物素基-3-氨丙基)-

N'-甲基-1,3-丙二胺(光敏生物素;Pierce chemical 公司,罗克福德,伊利诺斯州),可以在 350nm 处用光活化。

VII. 捕获试剂

5 上面已经描述了许多可有效作为捕获试剂的物质(例如可参见表 1)。在某些优选的实施方案中,结合生物素和生物素类似物(如亚氨基生物素)的分子被用作捕获试剂。这些结合生物素的捕获试剂包括(但不限于)抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白、NeutrAvidin 生物素结合蛋白(Molecular Probes)、链霉抗生物素蛋白琼脂糖(Molecular Probes)、CaptAvidin 琼脂糖(Molecular Probes)、CaptAvidin 生物素结合蛋白(Molecular Probes)、链霉抗生物素蛋白丙烯酰胺(Molecular Probes)
10 或抗生物素抗体(例如,小鼠单克隆 2F5 抗体(Molecular Probes))。

VIII. 基质

用在本发明中的基质可由任何合适的材料制成。例如,这些基质材料可以包
15 括(但不限于)绝缘材料(如,玻璃(如二氧化硅)、陶瓷)、半导体材料(如硅胶片)或导电材料(如,金属(如镍、黄铜、钢、铝、金)或导电聚合物)、有机聚合物、生物聚合物、丙烯酰胺、丙烯酰胺凝胶、塑料或它们的任何组合物。适合用在本发明的实施方案中的基质被描述在(例如)美国专利 5,617,060 号(Hutchens 和 Yip)和 WO 98/59360 中。

20 基质可以有各种特性。基质通常是非多孔的(如固体)并且实际上是刚性的可以提供结构稳定性。此外,基质可以是绝缘或可导电的。在一个优选的实施方案中,基质正在导电以便减少表面电荷并促进物质溶解。导电性可通过使用以下物质获得,如导电聚合物(如,碳化的聚乙醚乙醚酮、聚炔、聚苯撑、聚吡咯、聚苯胺、聚噻吩等),或是导电的颗粒填充物(如,碳黑、金属粉末、导电聚合物颗粒、填有
25 玻璃纤维的塑料/聚合物、弹性体等)。

基质可以是任何合适的形状,只要能够与气相离子色谱仪一起使用即可(例如,可拆卸地插入气相离子分光计中)。例如,基质可以是在预先确定的可寻址的位置上有一系列坑的条带状、平板状或是碟状。通常,基质可以是棒状,其中,棒一端的表面是样品呈递表面,带状或长方形或是圆板状。此外,基质的厚度约在
30 0.1mm 至约 10cm(或更大)之间,较好的是约在 0.5mm 至约 1cm(或更大)之间,最好是约在 0.8mm 至约 0.5cm(或更大)之间。较好的是,基质本身应足够大,这样它就

能够被手握住。例如，基质的最长的横向尺寸至少约为 1cm 或更大，较好的是约为 2cm 或更大，最好是至少约为 5cm 或更大。基质也可被成型以和气相离子色谱仪的入口系统和检测器一起使用。例如，基质可以适合安装于水平和/或垂直移动的滑动架上，它可水平和/或垂直地将基质移动到连续位点而不需要用手对基质重新定位。

在一个优选的实施方案中，本发明的基质适用于 SELDI(表面增强激光解吸/电离)。由此，将形成特征的基质表面区域可以让将选择性结合分析物的吸附剂附于其上。吸附剂可以对分析物高度特异性的(如抗体)，或者可以是相对非特异性的(如阴离子或阳离子交换树脂)。或者，表面可以有能量吸收分子或附有对光不稳定的附加基团。这两者的例子可以参见美国专利 5,719,060(Hutchens 和 Yip)和 WO 98/59361(Hutchens 和 Yip)。

本发明的捕获试剂可以被直接或间接地吸附到基质以辅助对亲和标记产物的固定化。基质可以使用任何数量的不同吸附剂涂布，只有它们对结合捕获试剂有适宜结合特性。吸附剂可以包含疏水基团、亲水基团、阳离子基团、阴离子基团、金属离子螯合基团、或是植物血凝素、肝素、特异性结合标记的抗体、或是它们的组合体(有时被称作“混合模式”吸附剂)。含有疏水基团的示范性的吸附剂包括含有脂肪烃(例如， C_1 - C_{18} 的脂肪烃)的基质以及含有芳香烃官能团(例如，苯基基团)的基质。含有亲水基团的示范性的吸附剂包括玻璃(例如，氧化硅)，或亲水聚合物，比如聚乙二醇、葡聚糖、琼脂糖、或纤维素。含有阳离子基团的示范性的吸附剂包括仲胺、叔胺或季铵的基质。含有阴离子基团的示范性的吸附剂包括硫酸盐阴离子(SO_3^-)的基质和羧酸盐阴离子(即 COO^-)或磷酸盐阴离子(OPo_3^-)的基质。含有金属离子螯合基团的示范性的吸附剂包括，含有一个或多个电子供体基团并与金属离子(例如，铜、镍、钴、锌、铁、以及诸如铝和钙的其它金属离子)形成配位共价键的有机分子。含有 G 蛋白或 A 蛋白的吸附剂能用来与含有 Fc 域的捕获试剂结合。

实施例

提供以下实施例是为了阐述而不是限制申请的本发明范围。

实施例 1—用含有生物素的亲和标记分析含有蛋白质的样品

第一部分：样品的变性和还原

由于碘乙酰胺对半胱氨酸残基的特异性(试剂对游离的巯基有选择性)，可以

使复杂样品中所有含二硫化物的生物分子(蛋白质等)品种首先变性(使蛋白质中所有潜在的胱氨酸偶联部位暴露以便进一步反应)并还原(以打断二硫键)。

1. 在以含 5mM EDTA(Sigma;E5134) 作为抗氧化剂的 0.1M 的磷酸钠缓冲液(pH6.0)中将样品中的蛋白质含量调至 1-10mg/ml。

5 2. 在 100 μ l 蛋白质混合物中加入还原剂, 如下所示:

A) 600 μ g 盐酸 2-巯基乙胺(MEA; Pierce Chemical 公司, 20408 号产品)。MEA 最终浓度为 50mM。

B) 二硫苏糖醇(DTT; Pierce Chemical 公司, 20290 号产品), 使其最终浓度为 10mM; 或者

10 C) 溶于 Tris 缓冲液(50mM; pH8.5) 盐酸胍(6M; Sigma, G7153) 以及三丁基膦(5mM; Fluka, 90827)。

3. 在 37°C 温育 90 分钟。

4. 冷却至室温, 然后在脱盐柱(Pierce Chemical 公司, 43230 或 43231 号产品)上将多余的还原剂除去, 通过脱盐至含有 5mM EDTA 的 Tris 缓冲液(50mM; pH8.3) 中。

一旦对蛋白质混合物的还原完成, 有必要除去还原剂(如, 通过透析), 否则它会妨碍方案中以后的步骤。作为上面提到的还原和脱盐步骤的替换步骤, 可以参考下面讲述的实施例 2。

20 第二部分: 生物素化的标记物与游离的巯基基团的偶联

对游离的巯基基团的标记是按照由生物素化试剂, EZ-Link™ PEO-Iodoacetyl Biotin([+]-生物素基-碘乙酰胺基-3,6-二噁辛烷二胺; Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州, 目录 21334 号)所提供的标准方案完成的。

25 1. 在 1ml 第一部分中被还原的蛋白质混合物中加入 15 μ l PEO-Iodoacetyl 生物素溶液。

2. 混合并在室温下于黑暗中放置 90 分钟。

3. 在脱盐柱(Pierce Chemical 公司, 43230 或 43231 号产品)上脱盐, 从生物素化的蛋白质/肽混合物中将多余的生物素化标记物基质除去, 至含有 0.1% 十二烷基硫酸钠(SDS; Sigma, 目录 L6026 号)的碳酸铵缓冲液(50mM, pH8.3)中。

30 一旦生物素化反应完成, 有必要除去任何未反应的 PEO-Iodoacetyl 生物素(如, 通过透析), 否则它会妨碍方案中以后的步骤。作为上面提到的脱盐步骤的替

换步骤，可以参考下面讲述的实施例 3。

第三部分：生物素化的蛋白质/肽的消化

1. 在生物素化的蛋白质/肽中加入测序级修饰的胰蛋白酶 (Promega Corporation, Madison, WI, 目录第 V5111 号)。胰蛋白酶应被重新悬浮在 50mM 的乙酸中。为温育胰蛋白酶和生物素化的蛋白质/肽，应使 5 μ g 胰蛋白酶和 100 μ g 生物素化的蛋白质/肽一起在 37°C 下温育 18 小时。

第四部分：将生物素化的肽片段捕获在链霉抗生物素蛋白 ProteinChip®阵列上

1. 用链霉抗生物素蛋白制备作为捕获试剂的 ProteinChip®阵列 (Sigma; S4762)
 - A. 将有 8 个孔的 PS2 ProteinChip®阵列 (CIPHERGEN Biosystems 公司，弗里蒙特，加利福尼亚) 放在平板上，清洁表面。
 - B. 对 8 孔阵列的一个或多个孔采用 1 μ l PBS (50mM; pH7.2)，然后是 1 μ l 链霉抗生物素蛋白 (0.1mg/ml 浓度的蛋白溶解于 50mM pH7.2 的 PBS 中)。
 - C. 将芯片立即转移到湿度箱中 (相对湿度>95%)，然后在室温下温育 1-2 小时，或在 4°C 下过夜。
 - D. 将整个阵列放在含有 8ml 封闭缓冲液 (0.5M 乙醇胺 (Sigma; E9508) 溶于 50mM pH8.0 的 PBS) 的 15ml 锥形试管中以封闭芯片上其余的活性位点。在摇动平板上于室温下小心混合 15 分钟。注意：为简便起见，这里进行了成批封闭，但也可以在每个孔中加入 5 μ l 0.5M 的乙醇胺来完成。
 - E. 倒掉封闭缓冲液并加入 8ml PBS+0.5% 的 Triton X-100 (Sigma; 目录 T9284 号)，然后在振荡器上剧烈搅拌 15 分钟。倒出洗涤缓冲液并重复一次。
2. 生物素化的肽的捕获和纯化
 - F. 将生物素化的肽制品稀释至含有 5% Triton X-100 的 PBS 贮存液中，使 Triton X-100 的最终浓度为 0.5%。
 - G. 倒出步骤 E 中的洗涤缓冲液，并在已与链霉抗生物素蛋白偶联的 ProteinChip®阵列的每个孔中加入 5 μ l 消化的、生物素化的肽混合物。在高湿度下于 4°C 下培养 2 小时。
 - H. 除去并弃去多余的生物素化的肽混合物。加入 10 μ l 含 0.5% Triton X-100 的 PBS。除去洗涤缓冲液并再重复三次以上。最后，单独用 10 μ l PBS 洗涤两次，

再用 HPLC 级的水洗涤两次。

I. 从试管中取出 ProteinChip®阵列，拂去水并在空气中干燥。

J. 用 Mini PAP 笔(Zymed Laboratories 公司，旧金山，加利福尼亚，目录第 00-8877 号)小心露出小孔并使其在空气中干燥。Mini PAP 笔在小孔周围提供了防

5 水的疏水屏障。

3. 加入 CHCA

A. 在试管中加入 250 μ l 含 0.5%三氟乙酸(Sigma，目录 T0274 号)的 50%的乙腈(Aldrich)以使 5mg α -氰基-7-羟基肉桂酸(CHCA; CIPHERGEN Biosystems 公司)粉末溶解。

10 B. 在每个孔中加入 0.5 μ l CHCA，小心操作以确保溶液没有流到孔区域外。

C. 将芯片干燥并将其插入 ProteinChip®阅读器(CIPHERGEN Biosystems 公司)。用低激光强度在每一孔发射收集 50-100 平均激光发射。

实施例 2—实施例 1 的修改 1

15 消除包括多余的样品制备在内的步骤可以导致随后步骤中修饰的肽/蛋白质的得率增加。例如，像实施例 1 那样，加入常规还原剂(如盐酸 2-巯基乙胺(MEA)或二硫苏糖醇(DTT))会妨碍随后的反应(包括将亲和标记物的巯基反应蛋白基团与游离的巯基连接)因此必需通过透析或缓冲交换柱除去。作为在还原步骤中使用 MEA 或 DTT 的替代，基于固相还原作用已可以进行以下还原步骤。

20 材料：

Reduce-Imm™ 还原试剂盒(目录 77700 号; Pierce Chemical 公司，罗克福德，伊利诺斯州，61105)

平衡缓冲液 1: 0.1M 磷酸钠、5mM EDTA, pH8.0

平衡缓冲液 2: 0.1M 磷酸钠、6M 胍、5mM EDTA, pH8.0

25 还原/再生缓冲液: 0.1M 磷酸钠、10mM 二硫苏糖醇、5mM EDTA, pH8.0

方案：

所有的步骤都在室温下进行。用溶液稀释肽/蛋白质样品使稀释的溶液中含有 0.1M 磷酸钠、6M 胍、5mM EDTA, pH 为 8.0。

30

固相基质的活化：

1. 拆开含有固相还原基质的柱子, 采用 Reduce-Imm™ 还原试剂盒以释放固相凝胶基质(珠)并将这种基质转移到 1.5ml 的 Eppendorf 管中。

2. 用 5ml 平衡缓冲液 1 洗涤使珠子平衡。

3. 用 10ml DTT 溶液还原并活化珠子。

5 4. 用平衡缓冲液 1 洗涤珠子以除去游离的 DTT, 并用平衡缓冲液 2 洗涤若干次(20ml)。

5. 使肽/蛋白质混合物还原。

6. 在室温下温育 60 分钟, 保持不断的振动。

7. 将混合物离心并取上清(还原的肽/蛋白质)进行随后的分析。

10

实施例 3—实施例 1 的修改 2

制得生物素化的蛋白质/肽之后(使还原的蛋白质/肽与生物素化的基质标记物以 1:5 的摩尔比例反应), 在随后的将生物素化的蛋白质/肽特异性捕获在涂有涂层的基质上之前, 必须除去所有未消耗的生物素化的基质标记物。这原来是通过脱盐柱完成的。作为替换步骤, 建议使用以下方法。它依赖于将生物素化反应混合物与过量的与半胱氨酸(含有游离的巯基基团)偶联的琼脂糖珠一起温育。由胱氨酸偶联的琼脂糖珠提供的过量的游离巯基基团起着清除所有未消耗的生物素化的基质的作用, 并可以通过离心从样品制品中除去。

20 制备半胱氨酸-琼脂糖

试剂

免疫纯环氧-活化的琼脂糖(目录 20241 号; Pierce Chemical 公司, 罗克福德, 伊利诺斯州, 61105)。

L-胱氨酸(目录 C6195 号; Sigma Chemical 公司)。

25 磷酸缓冲盐溶液(0.2M; pH7.2)。

乙醇胺(1M, pH8.5)

方案

1. 在 10ml 胱氨酸(1M)溶液中加入 1g 环氧-活化的琼脂糖, 并使其凝胶溶胀。

30 2. 使凝胶在 37°C 混合下反应 12-20 小时。

3. 用 PBS 洗涤凝胶 3-5 次。

4. 将缓冲液换成 1M pH8.5 的乙醇胺并在 37℃ 下温育 10-20 小时。

5. 用 PBS 洗涤凝胶 3-5 次。

6. 还原半胱氨酸上的-SH 基团, 然后再按实施例 1, 第一部分: 样品的变性和还原所描述的使用。

5

应该理解, 这里所描述的实施例和实施方案仅为了阐述的目的, 建议精通这一技术的技术人员可以对它们进行各种修饰或变化, 且这也包括在本申请精神和权限以及附加的权利要求的范围之内。为了所有的目的, 在此全文并入这里所提到的所有的公布、专利、以及专利申请, 以供参考。

10 本发明提供了用来分析样品中生物分子分析物的新的材料和方法。由于已经提供了特定的实施例, 上述描述只是为了阐述而不是限制。上述实施方案的任何一个或多个特征都可以任何方式与本发明任何其它实施方案的一个或多个特征相结合。此外, 通过阅读此说明书, 本发明的许多改变对精通这一技术的技术人员而言都是显而易见的。因此, 本发明的范围不因由上述描述决定, 而应该有附加的权利
15 要求以及与它们等价的完整范围来确定。

为了所有的目的, 在此以同等程度(就像各个公布或专利文献被单独提到一样)并入这里所引用的所有的公布和专利文献, 以供参考。对于此文件中引用各种参考资料, 申请人不承认任何特定的参考资料是他们发明的“先有技术”。

20 实施例 4—三个样品中辣根过氧化物酶相对量的比较

在两组实验中, 在含有其它蛋白质: 牛 IgG、鸡伴清蛋白、牛血清白蛋白、辣根过氧化物酶和超氧化物歧化酶的样品中加入不同量的辣根过氧化物酶。然后使样品与亲和标记物、PEO-碘乙酰生物素反应, 并用胰蛋白酶消化。然后将亲和标记产物固定在涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2 ProteinChip®上, 并用质谱法分析。对
25 些实验的详细描述如下。

实施例 4A—检测三种样品中辣根过氧化物酶模型系统:

试剂:

磷酸钠缓冲液(0.1M, 5mM EDTA; pH6.0)

30 PBS(Sigma P4417)

EDTA(Sigma E5134, 0.372g/200ml)

- 磷酸钠缓冲液(0.1M, pH7.5)
PBS(Sigma P4417, 每200ml水一片)
- 5 Tris 缓冲液(50mM, 5mM EDTA; pH8.5)
TRISma 碱(Sigma T1503; 2.4g/400ml)
EDTA(Sigma E5134, 0.744g/400ml)
- 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA; pH8.3)
碳酸氢铵(Sigma A6141; 790.6mg/400ml)
10 EDTA(Sigma E5134, 0.744g/400ml)
- 盐酸胍(6M Sigma G7153)
- 三丁基膦(5mM; Fluka 90827, 3 μ l 溶于 97 μ l Tris 缓冲液(50mM, 5mM EDTA;
15 pH8.5)
- PEO-碘乙酰生物素(Pierce 21334; 50mg; Fwt=542.4)
在磷酸钠缓冲液(0.1M, 5mM EDTA; pH6)中制备 4mM 溶液, 方法是在 100 μ l
缓冲液中加入 216.8 μ g PEO-碘乙酰生物素
- 20 胰蛋白酶, 测序级, 修饰的(Promega V511A)
加入 100 μ l 足量的乙酸并立即使用。
- 乙醇胺(Sigma E9508)
25 溶于磷酸钠(0.01M, pH7.5)的 1M 的溶液, 方法是在最终体积为 50ml 的磷酸
钠缓冲液中加入 3.05ml 乙醇胺, 用浓盐酸将 pH 调至 8.0。
- Triton-X-100(Sigma T9284)
在去离子水中制备 10%的贮存液
- 30 标准蛋白(都由 CIPHERGEN 提供; 分别溶解于 100 μ l 的 Tris 缓冲液(50mM,
含 5mM EDTA)
牛 IgG(147.3kDa; 5nmol)
鸡伴清蛋白(77.49kDa; 2 nmol)
35 牛血清白蛋白(66.43kDa; 2nmol)
辣根过氧化物酶(43.24kDa; 6nmol)
超氧化物歧化酶(15.59kDa; 1nmol)

Microcon 离心过滤器 YM-3(Amicon Bioseparations)

含有蛋白质的样品的还原和变性

1. 按如下方法制备蛋白质试剂。一起加入 BSA(牛血清白蛋白)(100 μ l)、
5 SOD(超氧化物歧化酶)(100 μ l)、伴清蛋白(100 μ l)和 IgG(100 μ l)，并充分混合。
总体积=400 μ l。

2. 准备了三个反应试管(1.5ml Eppendorf 管)，其中分别含有：

表 2			
试剂	反应试管 A	反应试管 B	反应试管 C
步骤 1 的蛋白质混合物	130 μ l	130 μ l	130 μ l
标准辣根过氧化物酶蛋白	50 μ l	100 μ l	150 μ l
Tris. EDTA 缓冲液	50 μ l	50 μ l	0 μ l
盐酸胍	160mg	160mg	160mg
三丁基膦	10 μ l	10 μ l	10 μ l

- 10 3. 将各个试管中的物质充分混合并在 37℃下温育 90 分钟，然后冷却至室温。

1. 将各个反应试管中的物质转移到 Microcon 离心过滤器(YM-3)并在
10,000xg 下离心直至体积减少至约 50 μ l。用 400 μ l 磷酸钠缓冲液(0.1M, 5mM
EDTA; pH6.0)装满滤器，将离心步骤重复 3 次。每次洗涤后都要弃去洗脱液。

5. 将保留物转移到洁净的反应试管中，加入 50 μ l 磷酸钠缓冲液(0.1M, 5mM
15 EDTA; pH6.0)使最终的体积约为 100 μ l。

生物素化—亲和标记产物的产生

6. 在各个反应试管中加入 15 μ l EPO-碘乙酰生物素。

7. 将反应试管充分混合并于黑暗在室温下培育 90 分钟。培育后，加入 30
 μ l 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA; pH8.3)。

- 20 8. 将各个反应试管中的物质转移到 Microcon 离心过滤器(YM-3)并在
10,000xg 下离心直至体积减少至约 50 μ l。用 400 μ l 碳酸氢铵缓冲液装满滤器，
将离心步骤重复 3 次。每次洗涤后都要弃去洗脱液。

9. 将保留物转移到洁净的反应试管中。

- 25 用胰蛋白酶消化蛋白质混合物

10. 在各个反应试管中加入胰蛋白酶(25 μl)并于 37℃下温育过夜。温育过夜后，将反应试管立即储存在-20℃下直到进一步分析的时候。

PS2 ProteinChip®阵列的制备

- 5
11. 将链霉抗生物素蛋白贮存液(5mg/ml)以 1:10 的比例稀释在 PBS (0.1M, pH7.5)中。
12. 如表 3 所示，在 8 孔 PS2 ProteinChip®阵列(Ciphergen Biosystems)的孔中直接加入 2 μl 链霉抗生物素蛋白，并在室温下于高湿度中培育 1 小时。
13. 培育后，在链霉抗生物素蛋白液滴上直接加入 1 μl 乙醇胺(1M, pH8)并再
- 10 培育 30 分钟。
14. 用 5 μl 含 0.5% Triton-X-100 的磷酸盐缓冲液(0.01M, pH7.5)将 ProteinChip®阵列的每个孔洗涤三次。最后再用含 0.05% Triton-X-100 的磷酸盐缓冲液将孔洗涤一次。
15. 如下制备 ProteinChip®阵列 aaac0739、aaac1182、aaac1203:

15

表 3		
孔号	链霉抗生物素蛋白	反应混合物
A	+	A
B	+	B
C	+	C
D		
E	-	A
F	-	B
G	-	C
H		

16. 在已干燥的孔中加入 CHCA 并用质谱法按以下步骤进行分析。

质谱法

- 20
- 品。所用设备如下:

目标显示:

- 高质量: 20000 Da
- 孔号: A

- 数字转换器速率: 250.0 MHz
- 离子模式: 阳性
- 室真空度: 3.209e-007 Torr
- 电压源: 20000.0V
- 5 • 检测电压: 1900V
- 时间滞后聚焦: 开
- 脉冲电压: 3000 V
- 脉冲延迟时间: 528 ns
- 聚焦质量: 5000.0 Da

10

统计:

- 射击:
- 发射: 91 持续: 65 高: 0 低 0
- 强度:
- 15 • 低: 259 高: 264
- 灵敏度:
- 低: 10 高: 10
- 高质量设定为 20000 道尔顿, 最适是从 2000 道尔顿-10000 道尔顿
- 起始激光强度设定为 259
- 20 • 起始检测计灵敏度设定为 10
- 在 5000 道尔顿出聚焦质量
- 数据获得方法设定为 SELDI 定量
- 设定 SELDI 获得参数 20, Δ 设定为 5, 每次瞬间为 5, 结束位置为 80
- 设定在强度为 264 时 2 次发射的加热位置且不包括加热发射
- 25 • 处理样品
- 用自动辨认从 2000 道尔顿-10000 道尔顿辨别峰

数据分析

得到了在涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2 ProteinChip®上进行的反应 A、B 和 C
30 的质谱图(见图 1 和 2), 用 Biomarker Wizard 程序(Ciphergen Biosystems 公司,
弗里蒙特, 加利福尼亚)进行低分子范围的检测, 鉴别了三种质量与辣根过氧化物酶

片段一致，这部分是由于原始样品(例如，1nmol、2nmol 和 3nmol)中存在的辣根过氧化物酶的量增加造成的(见图 2 的箭头)。

Biomarker Wizard 的目的是根据图谱产生一致的峰组。当将给定蛋白质的峰与各种样品进行比较时，获得每个图谱的强度值是很重要的，即使用给定的自动峰检测装置也可能无法检出它们。Biomarker Wizard 有两个通道操作步骤。第一个通道步骤是用低灵敏度以检测明显且容易辨认的峰。第二个步骤用高灵敏度装置以在第一通道步骤发现的质量值内寻找较小的峰。Biomarker Wizard 操作的第一通道步骤是用灵敏度最低的设置(在自动峰检测选项对话框中确定)来搜寻峰。Biomarker Wizard 操作的第二通道步骤试图用高灵敏度值检测峰来完成峰组设定。

Biomarker Wizard 还可以目测给定质量上图谱的强度值。例如，两个不同样品中蛋白质浓度不同将导致两个样品的图谱之间在整体强度上都有显著的不同。Biomarker Wizard 还可以允许输出数据以便在 Microsoft Excel (Microsoft 公司，雷蒙德，华盛顿州)等程序中进一步分析。Biomarker Wizard 能提供质谱中各个峰的输出强度和 M/Z 数据等参数。

用 Biomarker Wizard，在图 2 中鉴别的三种辣根过氧化物酶的数据被输出到 Microsoft Excel，并且，对最初加到反应物中的辣根过氧化物酶的量，显示了各个峰的平均强度(+/- CV)，见表 4：

表 4

	1nmol		2nmol		3nmol	
质量(Da)	Avg	+/- CV	Avg	+/- CV	Avg	+/- CV
3001.4	6.07	0.22	10.66	0.68	22.12	1.57
3843	3.37	0.13	4.56	0.21	14.06	0.68
4325.2	4.41	0.58	5.55	0.31	11.08	1.10

实施例 4B：掺入含有牛 IgG、鸡伴清蛋白、牛血清白蛋白和超氧化物歧化酶的简单的蛋白质混合物中的辣根过氧化物酶的模式系统

材料和方法

模式系统的成分：

1. 制备标准蛋白质混合物

作为标准蛋白质混合物，在最终体积为 400 μ l 的 TRIS 缓冲液(50mM pH8.5，含有 5mM EDTA)中同时加入超氧化物歧化酶(1nmol)、牛血清白蛋白(2nmol)、鸡伴

清蛋白(2nmol)和牛 IgG(5nmol)。

2. 掺入的蛋白质制品

作为蛋白质使用的辣根过氧化物酶被掺入到各种浓度标准蛋白质混合物中。

将 6nmol 蛋白质溶解在 300 μ l TRIS 缓冲液(50mM, pH8.5, 含有 5mM EDTA)中制成

5 辣根过氧化物酶的贮存液。

还原和变性

3. 根据下面的表 1, 将上述蛋白质试剂一起混合。将已称重的试剂直接加到反应试管中制成最终摩尔浓度为 6M 的盐酸胍溶液。将 3 μ l 纯净的三丁基膦加到 97

10 μ l TRIS 缓冲液(50mM, 5mM EDTA; pH8.5)中制成 5mM 的三丁基膦贮存液。

表 5: 反应混合物组成用于操作程度

试剂	试管 0	试管 1	试管 2	试管 3
标准蛋白质混合物	130 μ l	130 μ l	130 μ l	130 μ l
辣根过氧化物酶	0 μ l	75 μ l	115 μ l	75 μ l
TRIS (50mM, 5mM EDTA; pH8.5)	160 μ l	160 μ l	160 μ l	160 μ l
盐酸胍	160mg	160mg	160mg	160mg
三丁基膦	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

4. 通过漩涡混合所有的试管, 并在 37°C 温育 90 分钟。

15 5. 温育后, 将各个反应试管中的物质转移到分子量截止离心过滤器(Microcon YM-10)并在 9,000xg 下离心直至体积减少至约 50 μ l。加入 400 μ l PBS(0.1M, 5mM EDTA, pH6)将这一步骤重复 3 次, 以完全除去盐酸胍和三丁基膦。将保留物(约 50 μ l)转移到新的微型离心管中并加入 50 μ l PBS(0.1M, 5mM EDTA, pH6)。

20 生物素化:

6. 在每个微型离心管中加入 15 μ l PEO-碘乙酰生物素(Pierce 目录第 21334 号; 0.1M, 溶于含 5mM EDTA 的 pH 为 6 的 PBS)并通过漩涡混合。在室温下于黑暗中培育 90 分钟。

7. 培养后, 加入 300 μ l 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA, pH8.3)并用漩涡充
25 分混合。

8. 将内容物转移到分子量截止离心过滤器(Microcon; YM-10)并在 9500xg 下

离心直至体积减少至约 50 μ l。加入新鲜的碳酸氢铵缓冲液并重复 3 次。

9. 将保留物(约 50 μ l)转移到新的微型离心管中并加入 50 μ l 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA, pH6)。

5 **胰蛋白酶消化:**

10. 在每个微型离心管中加入 5 μ l 修饰过的胰蛋白酶(在 20 μ g 冻干粉 [Promega]中加入 100 μ l 10mM 的乙酸, 新鲜制备)。

11. 然后在 37℃下温育过夜。

12. 过夜消化后, 将各个样品在-20℃下冷冻并保存直至分析。

10

在以链霉抗生物素蛋白为基底的 ProteinChip™阵列上捕获:

13. 将冻干的链霉抗生物素蛋白(Sigma, S-4762)粉末稀释在 PBS(0. 1M, pH7. 5)中, 制成 5mg/ml 的链霉抗生物素蛋白贮存液。

15 14. 在预先活化的蛋白芯片阵列 PS2 的小孔中加入 2 μ l 链霉抗生物素蛋白贮存液, 并与 4℃培育过夜, 从而制得涂有链霉抗生物素蛋白的蛋白芯片阵列。

15. 链霉抗生物素蛋白偶联后, 用 10 μ l 乙醇胺(1M, pH8)封闭表面, 并在室温下培育 30 分钟。

16. 大量洗涤后, 用 PBS(0. 01M, pH7. 5, 0. 5%triton-X-100)大量洗涤表面, 总共三次, 每次洗涤 5 分钟。

20 17. 然后仅仅用 PBS(0. 01M, pH7. 5)最后洗涤两次, 每次冲洗 5 分钟。

18. 将试管 0-3 中制得的肽混合物在冰上解冻。根据表 6 和表 7 在链霉抗生物素蛋白-蛋白芯片阵列上加入等分量的每种制品。

表 6. 用于肽报告者检测的涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2 阵列制品

孔标号	链霉抗生物素蛋白	所加样品	HRP
A	+	试管 0(8 μ l)	0
B	+	试管 1(8 μ l)	40 pmol
C	+	试管 2(8 μ l)	61 pmol
D	+	试管 3(8 μ l)	40 pmol
E	-	试管 0(8 μ l)	0
F	-	试管 1(8 μ l)	40 pmol
G	-	试管 2(8 μ l)	61 pmol
H	-	试管 3(8 μ l)	40 pmol

表 7. 用于可再现性研究的涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2 阵列制品

孔标号	链霉抗生物素蛋白	所加样品	HRP
A	+	试管 1 (8 μ l)	40 pmol
B	+	试管 2 (8 μ l)	61 pmol
C	+	试管 1 (8 μ l)	40 pmol
D	+	试管 2 (8 μ l)	61 pmol
E	+	试管 1 (8 μ l)	40 pmol
F	+	试管 2 (8 μ l)	61 pmol
G	+	试管 1 (8 μ l)	40 pmol
H	+	试管 2 (8 μ l)	61 pmol

19. 添加样品后，将阵列在室温下和高湿度下培育 2 小时。

20. 培育后，用 PBS (0.01M, pH7.5, 0.5% triton X-100) 将阵列小孔洗涤三
5 次，每次 5 分钟。

21. 用 PBS (0.01M, pH7.5) 再将阵列的小孔洗涤 2 次，每次 5 分钟，然后用快
速的流水冲洗。

22. 制备 α -氰基-7-羟基肉桂酸 (CHCA)，最终得到 50% 乙腈 (MeCN) 中的 20% 的
饱和的 CHCA 溶液，并含有 0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 的组成物。向每个孔中加入 0.5
10 μ l CHCA 制品并使其干燥。

23. 在 PBSII 质量阅读器中阅读阵列，结果显示在图 3A 和 3B 中。

步骤实施例#5：掺入复杂蛋白质混合物的辣根过氧化物酶模式系统

15 **材料和方法**

模式系统的成分：

1. 血清制品

根据产品说明，用 Cibarcon 蓝染料树脂 (Sigma) 除去人血清中的白蛋白。最
终以 1:1 的比例将已除去的血清稀释在 TRIS 缓冲液 (50mM pH8.5 含 5mM EDTA) 中。

20

2. 掺料的蛋白质制品

辣根过氧化物酶被作为一种将以可变浓度被掺入标准蛋白质混合物的蛋白
质。将 6nmol 蛋白质溶解在 300 μ l TRIS 缓冲液 (50mM pH8.5 含 5mM EDTA) 中制成
辣根过氧化物酶贮存液。

还原和变性

3. 根据下面的表 8, 将上述蛋白质反应成物一起混合。将已称重的试剂直接加到反应试管中制成最终摩尔浓度为 6M 的盐酸胍溶液。将 3 μ l 纯净的三丁基膦加到
- 5 97 μ l TRIS 缓冲液(50mM, 5mM EDTA; pH8.5)中制成 5mM 的三丁基膦贮存液。

表 8: 用于实施例 2 操作程序的反应混合物组成

试剂	试管 4	试管 5	试管 6	试管 7
去除白蛋白的血清	130 μ l	130 μ l	130 μ l	130 μ l
辣根过氧化物酶	0 μ l	150 μ l	150 μ l	150 μ l
TRIS (50mM, 5mM EDTA; pH8.5)	160 μ l	160 μ l	160 μ l	160 μ l
盐酸胍	160mg	160mg	160mg	160mg
三丁基膦	10 μ l	10 μ l	10 μ l	10 μ l

4. 通过漩涡混合所有的试管, 并在 37°C 温育 90 分钟。
- 10 5. 温育后, 将各个反应试管中的物质转移到分子量截留离心过滤器(Microcon YM-10)并在 9,000xg 下离心直至体积减少至约 50 μ l。加入 400 μ l PBS (0.1M, 5mM EDTA, pH6) 将这一步骤重复 3 次, 以完全除去盐酸胍和三丁基膦。将保留物(约 50 μ l)转移到新的微型离心管中并加入 50 μ l PBS (0.1M, 5mM EDTA, pH6)。

15 生物素化:

6. 在每个微型离心管中加入 15 μ l PEO-碘乙酰生物素(Pierce 目录第 21334 号; 0.1M, 溶于含 5mM EDTA 的 pH 为 6 的 PBS)并通过漩涡混合。在室温下于黑暗中培育 90 分钟。
7. 培养后, 加入 300 μ l 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA, pH8.3)并用漩涡混
- 20 合。
8. 将保留物转移到分子量截留离心过滤器(Microcon; YM-10)并在 9500xg 下离心直至体积减少至约 50 μ l。加入新鲜的碳酸氢铵缓冲液并重复 3 次。
9. 将保留物(约 50 μ l)转移到新的微型离心管中并加入 50 μ l 碳酸氢铵缓冲液(25mM, 5mM EDTA, pH6)。

25

胰蛋白酶消化:

- 5
- 10
- 15
- 20
10. 在每个微型离心管中加入 5 μl 修饰过的胰蛋白酶(在 20 μg 冻干粉 [Promega]中加入 100 μl 10mM 的乙酸, 新鲜制备)。
 11. 然后在 37℃下温育过夜。
 12. 过夜消化后, 将各个样品在-20℃下冷冻并保存直至分析。
- 在以链霉抗生物素蛋白为基底的 ProteinChip™阵列上捕获:
13. 将冻干的链霉抗生物素蛋白(Sigma, S-4762)粉末稀释在 PBS (0.1M, pH7.5) 中, 制成 5mg/ml 的链霉抗生物素蛋白贮存液。
 14. 在预先活化的蛋白芯片阵列 PS2 的小孔中加入 2 μl 链霉抗生物素蛋白贮存液, 并与 4℃培育过夜, 从而制得涂有链霉抗生物素蛋白的蛋白芯片阵列。
 15. 链霉抗生物素蛋白偶联后, 用 10 μl 乙醇胺(1M, pH8)封闭表面, 并在室温下培育 30 分钟。
 16. 大量洗涤后, 用 PBS (0.01M, pH7.5, 0.5%triton-X-100)大量洗涤表面, 总共三次, 每次洗涤 5 分钟。
 17. 然后仅仅用 PBS (0.01M, pH7.5)最后洗涤两次, 每次冲洗 5 分钟。
 18. 将试管 0-3 中制得的肽混合物在冰上解冻。根据表 8 在链霉抗生物素蛋白-蛋白芯片阵列上加入等分量的每种制品。

表 8. 用于肽报告者检测的涂有链霉抗生物素蛋白的 PS2 阵列的最终制品

孔标号	链霉抗生物素蛋白	所加样品	HRP
A	+	试管 4 (8 μl)	0
B	+	试管 5 (8 μl)	40 pmol
C	+	试管 6 (8 μl)	61 pmol
D	-	试管 7 (8 μl)	61 pmol
E	+	试管 4 (8 μl)	0
F	+	试管 5 (8 μl)	40 pmol
G	+	试管 6 (8 μl)	61 pmol
H	-	试管 7 (8 μl)	61 pmol

20

19. 添加样品后, 将阵列在室温下和高湿度下培育 2 小时。
20. 培育后, 用 PBS (0.01M, pH7.5, 0.5% triton X-100)将阵列小孔洗涤三次, 每次 5 分钟。
20. 用 PBS (0.01M, pH7.5)再将阵列的小孔洗涤 2 次, 每次 5 分钟, 然后用快

速的流水冲洗。

21. 制备 α -氰基-7-羟基肉桂酸(CHCA)，最终得到 50%乙腈(MeCN)中的 20%的饱和的 CHCA 溶液，并含有 0.1%的三氟乙酸(TFA)的组成物。向每个孔中加入 0.5 μ l CHCA 制品并使其干燥。

5 22. 在 PBSII 质量阅读器中阅读阵列，结果显示在图 4 中。

光谱

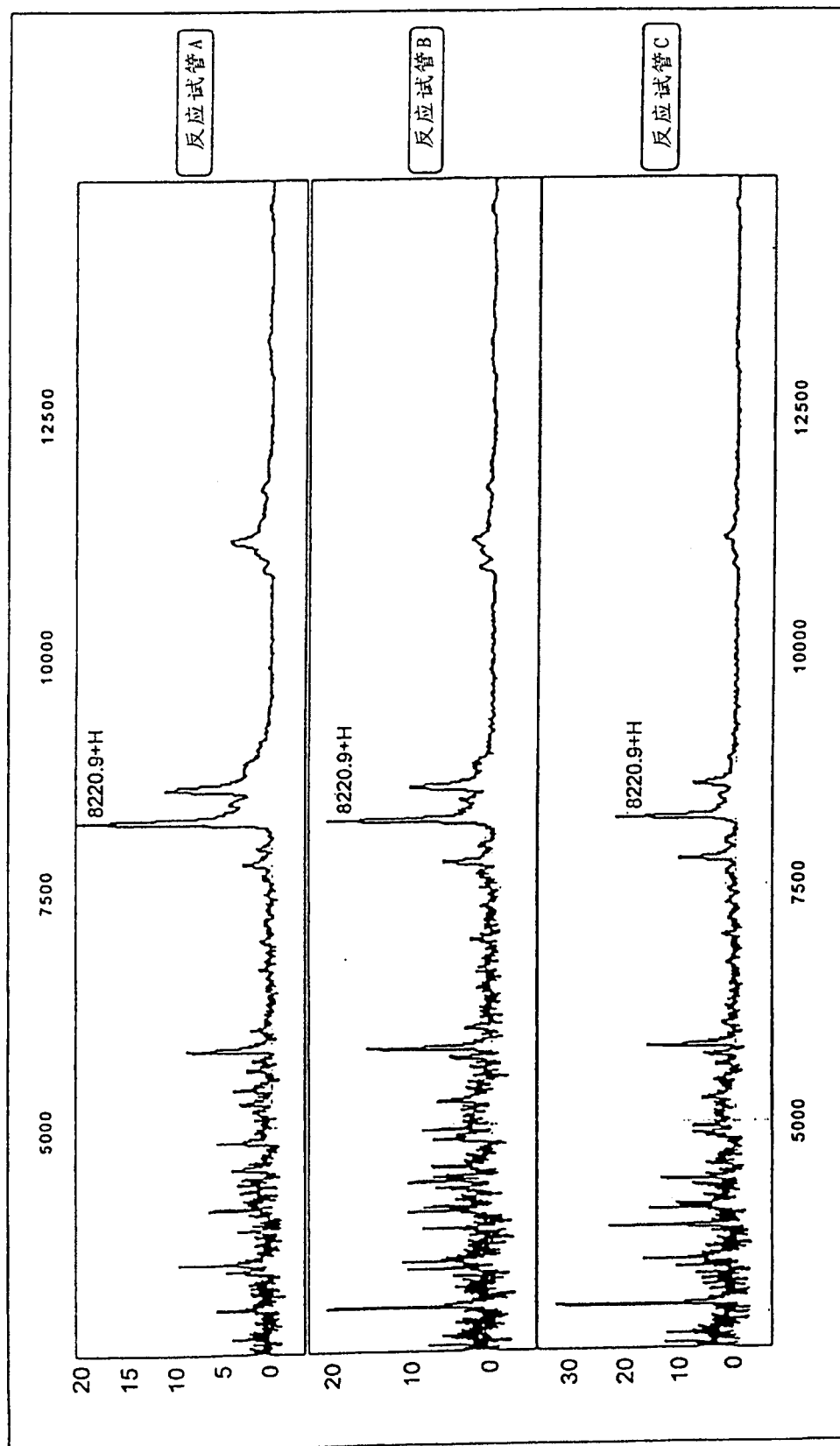


图 1

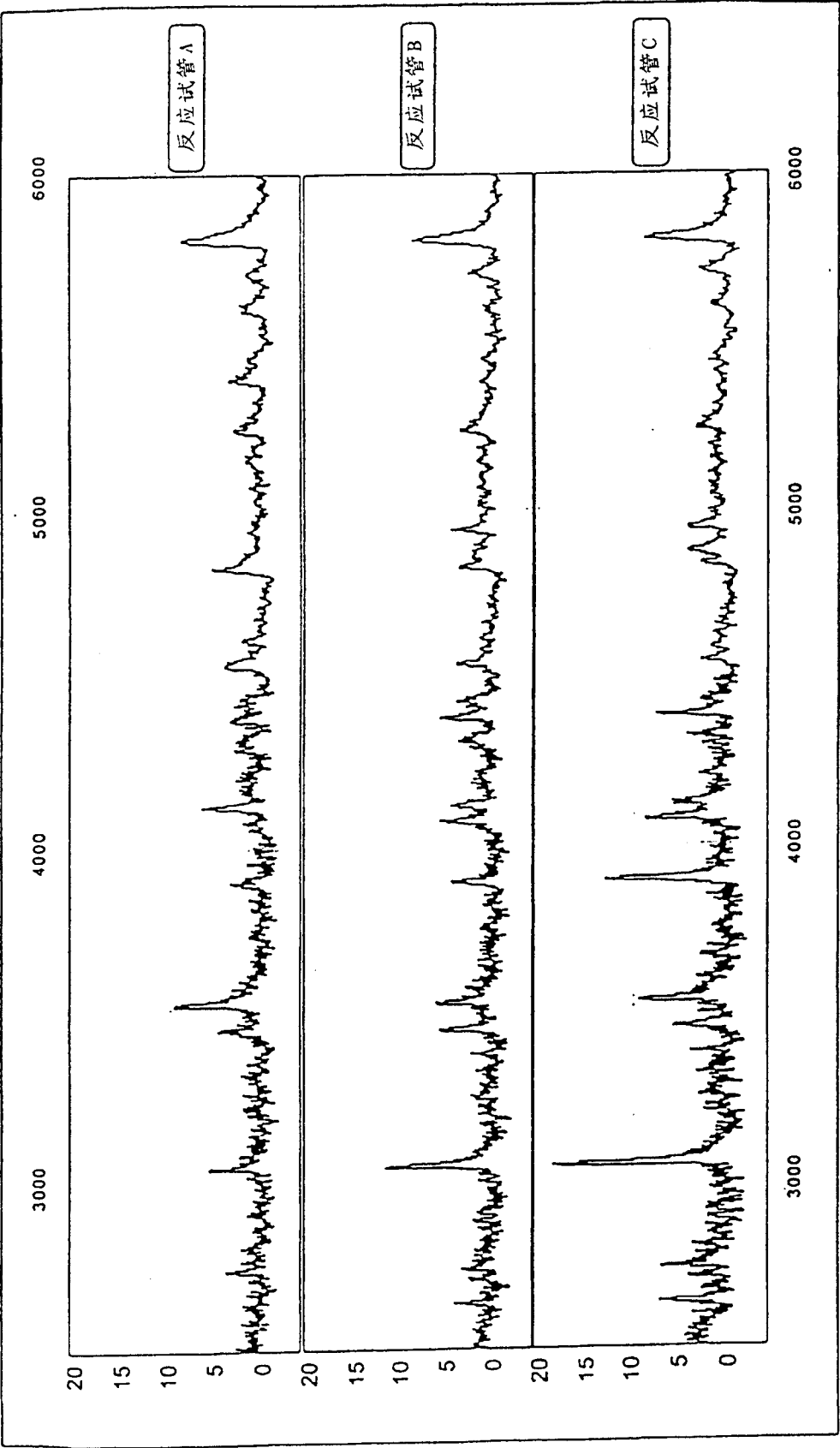


图 2

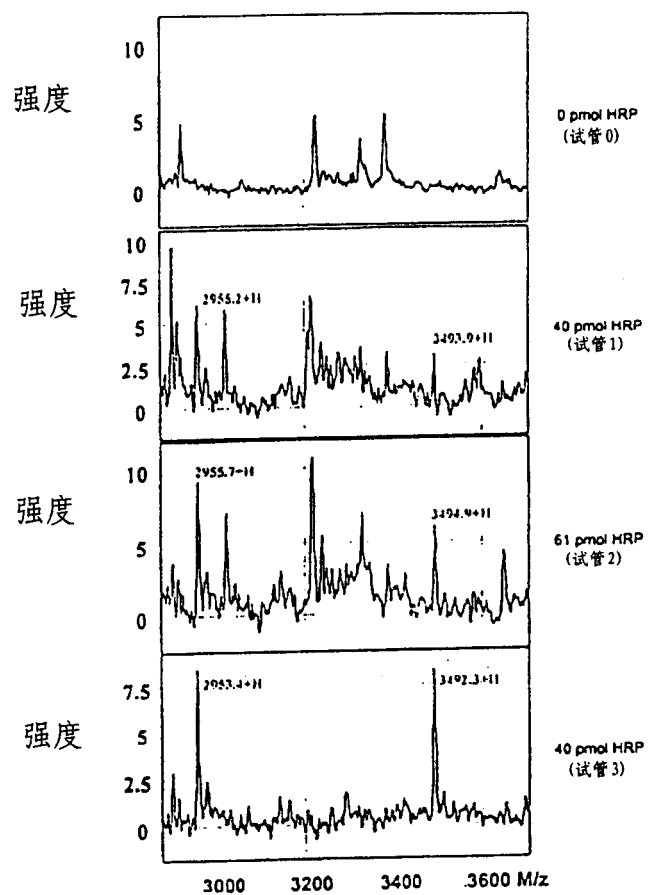


图 3A

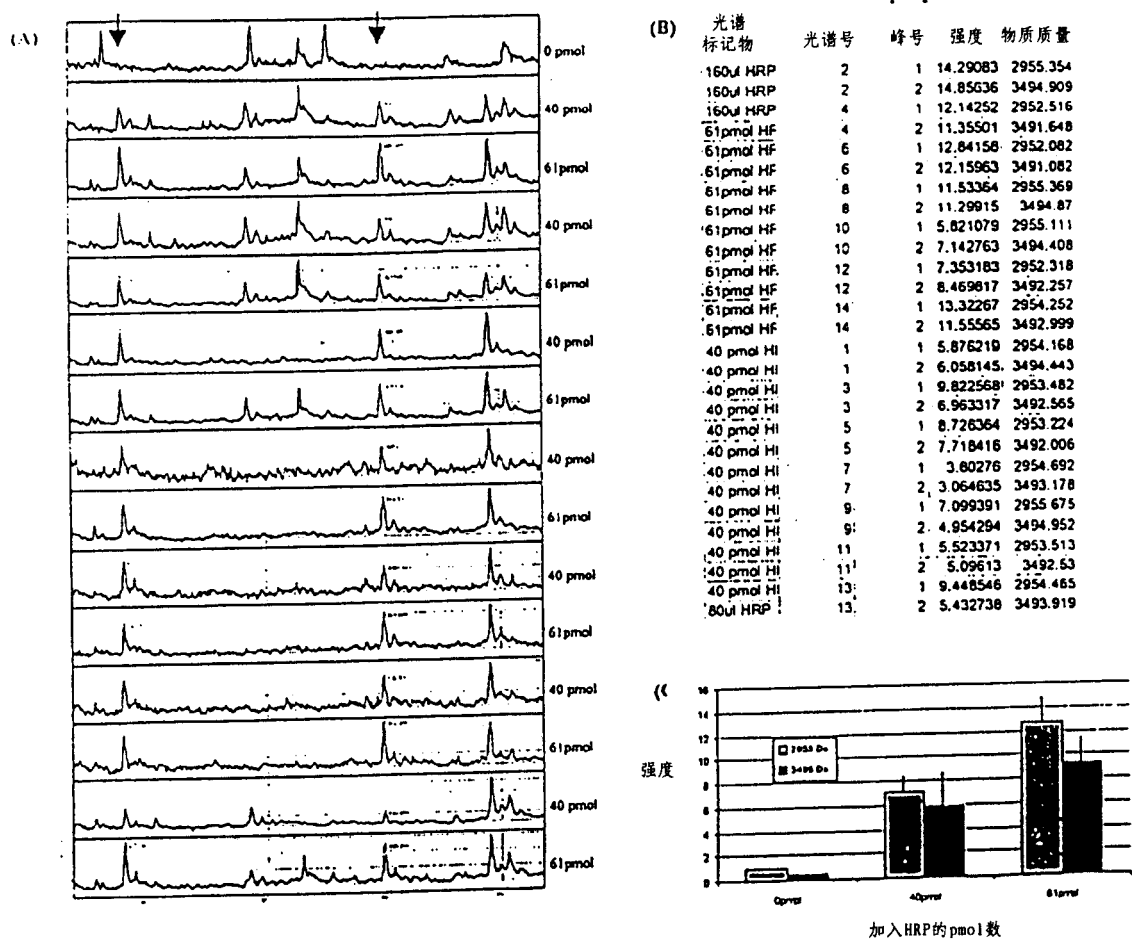


图 3B

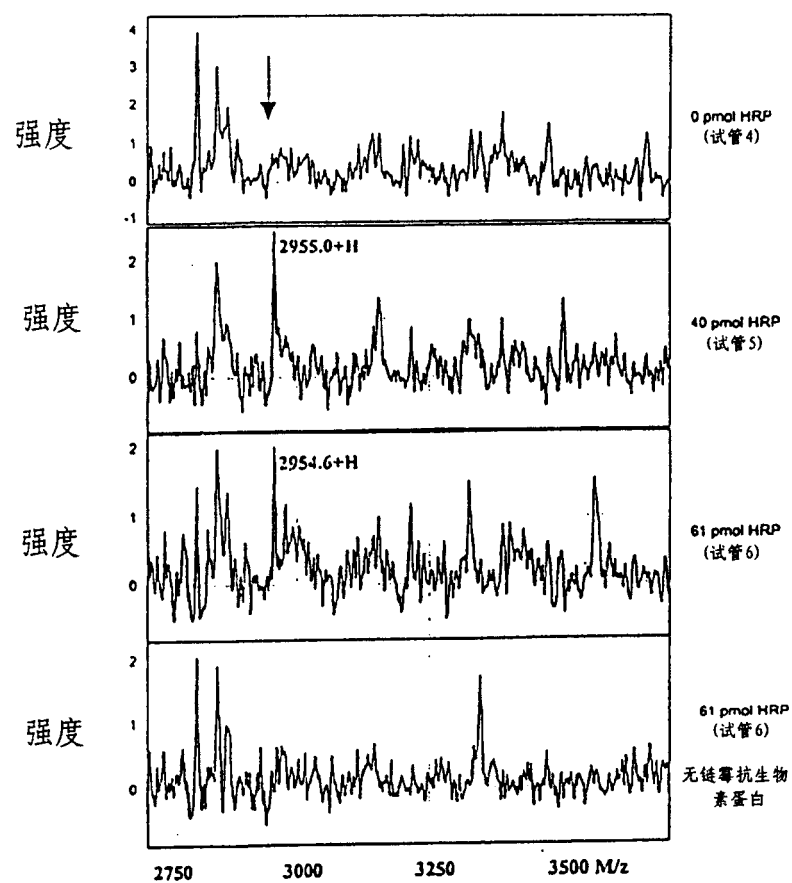


图 4

专利名称(译)	用质谱法和亲和标记物鉴定生物分子的特性		
公开(公告)号	CN1463291A	公开(公告)日	2003-12-24
申请号	CN02801851.6	申请日	2002-04-18
[标]申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司		
申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	赛弗根生物系统股份有限公司		
[标]发明人	LO洛马斯		
发明人	L·O·洛马斯		
IPC分类号	C12Q1/68 C12Q1/6872 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/68 G01N33/566		
CPC分类号	G01N33/6851 G01N33/6848 G01N2458/15 G01N33/543 G01N33/6818 C12Q1/6872		
代理人(译)	陈文青		
优先权	60/285630 2001-04-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及比较生物分子相对量以及用亲和标记物和质谱法鉴别样品中生物分子的方法。