[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷
G01N 33/574
G01N 33/68 G06F 19/00
C07K 14/82 C07K 14/47

[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 01808736.1

[43] 公开日 2003年6月25日

[11] 公开号 CN 1426536A

[22] 申请日 2001.3.19 [21] 申请号 01808736.1

[30] 优先权

[32] 2000. 3.20 [33] US [31] 60/190,725

[86] 国际申请 PCT/US01/08797 2001.3.19

[87] 国际公布 WO01/71360 英 2001.9.27

[85] 进入国家阶段日期 2002.10.28

[71] 申请人 东弗吉尼亚医学院

地址 美国弗吉尼亚州

[72] 发明人 G・L・小赖特 B・L・亚当

L・H・卡扎尔斯

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所

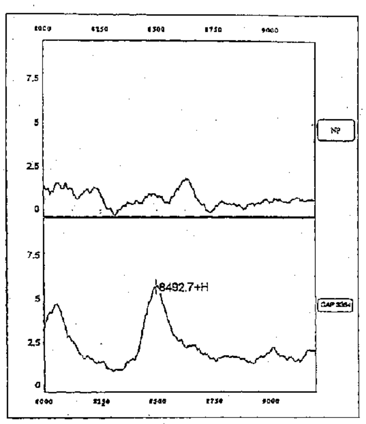
代理人 陈文青

权利要求书6页 说明书31页 附图15页

[54] 发明名称 前列腺癌标记

[57] 摘要

本发明提供了可有效鉴别前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断的有机生物分子标记(例如，蛋白质类)。



与来自相同的前列腺切除标本的正常(NPr)细胞溶解产物比较，前列腺癌(CAP)细胞溶解产物中8.5kDa蛋白质过度表达的典型实例。

ISSN 1008-4274

知识产权出版社出版

1.一种辅助诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法，包括：

a)在来自个体的样品中检测至少一种蛋白质标记，其中，蛋白质标记选自：

标记SP1：9402.68±8.97Da，

标记SP2：26155.30±202.01Da，

标记SP3：54979.27±408.78Da，

标记SP4：9752.30±15.08Da，

标记SP5：8766.93±14.44Da，

标记SP6：6277.97±12.36Da和

标记SP7：2781.72±4.41Da；以及

b)使对标记或多个标记的检测与可能的前列腺癌、良性前列腺增生诊断或阴性诊断相关联，其中，相关性需考虑每次诊断中标记或多个标记的相对可检出性。

2.根据权利要求1所述的方法，其中，样品是精浆。

3.根据权利要求1所述的方法，其中，样品选自血液、血清、尿液、前列腺液、精液(seminal fluid)、精液(semen)和前列腺组织。

4.根据权利要求1所述的方法包括，用气相离子分光法检测标记或多个标记。

5.根据权利要求4所述的方法，其中，气相离子分光法是激光解吸质谱法。

6.根据权利要求1所述的方法包括，用免疫测定检测标记或多个标记。

7.根据权利要求1或4所述的方法包括，检测许多种标记。

8.根据权利要求1或4所述的方法包括，至少检测蛋白质2。

9.根据权利要求8所述的方法进一步包括，至少检测蛋白质1和选自蛋白质4、蛋白质5、蛋白质6和蛋白质7的第三个标记，或其中之一。

10.根据权利要求9所述的方法，其中，第三个标记是蛋白质5。

11.根据权利要求5所述的方法包括：

i)用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据，

ii)将数据转换成计算机可读的形式；

iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中，算法可确定计算机可读数据与表示CaP、BPH诊断或阴性诊断的数据之间的适配紧密度。

12.一种在样品中检测至少一种蛋白质标记的方法，其中，蛋白质标记选自：

标记 SP1：9402.68±8.97Da，

标记 SP2：26155.30±202.01Da，

标记 SP3：54979.27±408.78Da，

标记 SP4：9752.30±15.08Da，

标记 SP5：8766.93±14.44Da，

标记 SP6：6277.97±12.36Da 和

标记 SP7：2781.72±4.41Da；

其中，这一方法包括用气相离子分光法检测标记或多个标记。

13. 根据权利要求 12 所述的方法，其中，气相离子分光法是激光解吸/电离质谱法。

14. 根据权利要求 13 所述的方法包括：

i) 用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据，

ii)将数据转换成计算机可读的形式；以及

iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中，算法可检测代表标记或多个标记的计算机可读数据中的信号。

15. 根据权利要求 12 所述的方法进一步包括，在检测标记之前，用大小排阻色谱法将样品分级并收集包括标记或多个标记的级分。

16. 根据权利要求 12 所述的方法，其中的方法进一步包括，在检测标记之前，用阴离子交换色谱法将样品分级并收集包括标记或多个标记的级分。

17. 根据权利要求 13 所述的方法，其中，激光解吸/电离质谱法包括：

i)提供适合与质谱仪一起使用、其上附有吸附剂的探针；

ii)使标记或多个标记与吸附剂接触；以及

iii)使标记或多个标记从探针上解吸并电离，用质谱仪检测解吸/电离的标记或多个标记。

18. 根据权利要求 13 所述的方法，其中，激光解吸/电离质谱法包括：

i)提供其上附有吸附剂的基质；

ii)使标记或多个标记与吸附剂接触；

iii)将基质放在适合与质谱仪一起使用、其上附有吸附剂的探针上；以及

iv)使标记或多个标记从探针上解吸并电离，用质谱仪检测解吸/电离的标记或多个标记。

19. 根据权利要求 17 所述的方法，其中，吸附剂是亲水性吸附剂或金属螯合吸附剂。

20. 根据权利要求 19 所述的方法，其中，吸附剂是含有氧化硅的亲水性吸附剂。

21. 根据权利要求 19 所述的方法，其中，吸附剂是含有镍的金属螯合吸附剂。

22. 根据权利要求 17 所述的方法，其中，吸附剂包括与标记特异性结合的抗体。

23. 一种纯化的蛋白质标记，选自：

标记 SP1：9402.68±8.97Da，

标记 SP2：26155.30±202.01Da，

标记 SP3：54979.27±408.78Da，

标记 SP4：9752.30±15.08Da，

标记 SP5：8766.93±14.44Da，

标记 SP6：6277.97±12.36Da 和

标记 SP7：2781.72±4.41Da。

24. 根据权利要求 23 所述的纯化的蛋白质，其制造过程包括，用大小排阻色谱法将包含标记或多个标记的样品分级并收集含有标记或多个标记的级分；以及/或用阴离子交换色谱法将包含标记或多个标记的样品分级并收集含有标记或多个标记的级分。

25. 一种试剂盒，包括

(1)附在基质上的吸附剂，其中，吸附剂能保留以下的蛋白质标记：

标记 SP1：9402.68±8.97Da，

标记 SP2：26155.30±202.01Da，

标记 SP3：54979.27±408.78Da，

标记 SP4：9752.30±15.08Da，

标记 SP5：8766.93±14.44Da，

标记 SP6：6277.97±12.36Da 和

标记 SP7：2781.72±4.41Da；以及

(2)检测标记或多个标记的说明，其方法是使样品与吸附剂接触并检测保留在吸附剂上的标记或多个标记。

26. 根据权利要求 25 所述的试剂盒，其中，基质是气相离子分光计的探针，其表面附有吸附剂。

27. 根据权利要求 26 所述的试剂盒，其中，吸附剂包括亲水性吸附剂。

28. 根据权利要求 27 所述的试剂盒，其中，亲水性吸附剂包括氧化硅。

29. 根据权利要求 25 所述的试剂盒进一步包括，(1)洗脱剂，其中，当用这种洗脱剂洗涤时标记或多个标记能保留在吸附剂上，或(2)在使标记或多个标记与吸附剂接触后用洗脱剂洗涤吸附剂的说明。

30.一种辅助诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法，包括：

a)在来自个体的样品中检测至少一种蛋白质标记，其中，蛋白质标记选自：

标记 CL1：8，494.30±10.24Da，

标记 CL2：9，614.62±52.19Da，

标记 CL3：28，472±127.40Da，和

标记 CL4：33，386.85±160.47Da；以及

b)使对标记或多个标记的检测与可能的前列腺癌、良性前列腺增生诊断或阴性诊断相关联，其中，相关性需考虑每次诊断中标记或多个标记的相对可检出性。

31.根据权利要求30所述的方法，其中，样品是前列腺组织提取物。

32.根据权利要求30所述的方法，其中，样品选自血液、血清、尿液、前列腺液、精液(seminal fluid)、精液(semen)、精浆和前列腺组织。

33.根据权利要求30所述的方法包括，用气相离子分光法检测标记或多个标记的存在或不存在。

34.根据权利要求33所述的方法，其中，气相离子分光法是激光解吸质谱法。

35.根据权利要求30所述的方法包括，用免疫测定检测标记或多个标记的存在或不存在。

36.根据权利要求30所述的方法包括，检测多种标记。

37.根据权利要求30所述的方法包括，至少检测标记CL1或标记CL2。

38.根据权利要求30所述的方法包括，测定标记CL3和标记CL4的量，并确定标记CL4与标记CL3数量的比例。

39.根据权利要求30所述的方法包括：

i)用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据，

ii)将数据转换成计算机可读的形式；

iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中，算法可确定计算机可读数据与表示CaP、BPH诊断或阴性诊断的数据之间的适配紧密度。

40.一种检测一种蛋白质标记的方法，其中，蛋白质标记选自：

标记 CL1：8，494.30±10.24Da，

标记 CL2：9，614.62±52.19Da，

标记 CL3：28，47±127.40Da，和

标记 CL4：33，386.85±160.47Da，

其中，这一方法包括用气相离子分光法检测标记或多个标记。

41.根据权利要求40所述的方法，其中，气相离子分光法是激光解吸/电离质谱法。

42.根据权利要求41所述的方法包括：

i)用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据，

ii)将数据转换成计算机可读的形式；以及

iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中，算法可检测代表标记或多个标记的计算机可读数据中的信号。

43.根据权利要求40所述的方法进一步包括，

i)在检测标记或多个标记之前，使样品与包含可保留标记或多个标记的吸附剂的基质接触并除去未保留的样品，从而使含有标记或多个标记的样品分级；以及

ii)在质谱法中使保留的标记从吸附剂上解吸并电离。

44.根据权利要求44所述的方法，其中，基质是质谱仪的探针且探针表面含有吸附剂。

45.根据权利要求44所述的方法，其中，基质是树脂，同时，在样品分级后，带有被吸附剂保留的标记或多个标记的树脂被置于质谱仪的探针上，以通过质谱仪解吸和电离。

46.根据权利要求43所述的方法，其中，吸附剂选自亲水性吸附剂和金属螯合吸附剂。

47.根据权利要求43所述的方法，其中，吸附剂是强阴离子交换吸附剂或镍螯合吸附剂。

48.一种纯化的蛋白质标记，选自：

标记 CL1：8，494.30±10.24Da，

标记 CL2：9，614.62±52.19Da，

标记 CL3：28，472±127.40Da，和

标记 CL4：33，386.85±160.47Da。

49.一种试剂盒，包括：

(1)一种附有吸附剂的基质，其中，吸附剂可保留选自以下的蛋白质标记：

标记 CL1：8，494.30±10.24Da，

标记 CL2：9，614.62±52.19Da，

标记 CL3：28，472±127.40Da，和

标记 CL4：33，386.85±160.47Da，以及

(2)检测标记或多个标记的说明，其方法是使样品与吸附剂接触并检测保留在吸附剂

上的标记或多个标记。

50.根据权利要求 49 所述的试剂盒，其中，基质是气相离子分光计的探针，其表面附有吸附剂。

51.根据权利要求 50 所述的试剂盒，其中，吸附剂包括亲水性吸附剂或金属螯合吸附剂。

52.根据权利要求 50 所述的试剂盒，其中，吸附剂包括阴离子交换吸附剂。

53.根据权利要求 50 所述的试剂盒，其中，吸附剂包括镍金属螯合吸附剂。

54.根据权利要求 49 所述的试剂盒进一步包括，(1)洗脱剂，其中，当用这种洗脱剂洗涤时标记或多个标记能保留在吸附剂上，或(2)在使标记或多个标记与吸附剂接触后用洗脱剂洗涤吸附剂的说明书。

前列腺癌标记

相关发明的相互参照

本发明要求提交于2000年3月20日的美国临时申请第60/190，725的优先权，在此全文并入以供参考。

关于在联邦资助的研究与开发下完成的发明的权利声明

本发明是在政府的支持下完成的，国家癌症研究所授予其的编号为1 U01 CA85067-1。政府在本发明中享有权利。

发明背景

前列腺癌是男性中最普遍的癌症形式。它通常会折磨老年男性，但可以折磨所有年龄的男性。每年有大量男子死于前列腺癌，在造成男性死亡的癌症中位居第二位。在患者中对前列腺癌的早期诊断降低了死亡的可能。

任何诊断实验的有效性依赖于它的特异性和选择性。即真阳性诊断、真阴性诊断、假阳性诊断与假阴性诊断间的相对比率是多少。对任何情况，提高真阳性诊断与真阴性诊断百分比的方法是所需的医学目的。就前列腺癌而言，目前的诊断实验并不非常令人满意，也就是说它们所作出的假阳性诊断与假阴性诊断太多。

通常，前列腺癌是用前列腺特异性抗原(PSA)作为标记进行诊断。简单地说，PSA水平超过4ng/ml即提示有前列腺癌，超过10ng/ml就可以断定。然而，如果在癌症早期，许多前列腺癌患者的PSA水平在诊断时是正常的。由于常规的PSA试验检测的是PSA水平的异常，故常规的PSA试验不能在早期发现前列腺癌的存在。这将导致假阴性诊断。常规的PSA试验在某些情况下(例如，在疾病的早期阶段)不能诊断出前列腺癌的存在，这可能对患者不利。另外，许多血清中PSA水平较高的个体可能并没有患前列腺癌，而只是良性的前列腺增生(BPH)(即，良性肿瘤)。这将导致假阳性诊断。为确定患者是否患有前列腺癌，而不是BPH，需要采用使用其它抗体的免疫测定法和/或前列腺组织的活组织检查。这些另外的试验对病人和他们的护理者而言是费时且昂贵的。

医学界存在着一致的意见，即随着更多的疾病标记的发现，其单独使用或结合使用将产生更好的诊断方法从而提高诊断试验的特异性与选择性。

发明概述

相对于阴性诊断，一些有机的生物分子(例如，蛋白质)被发现在前列腺癌(“CaP”)或良性前列腺增生(“BPH”)中作为标记。与阴性诊断相比，标记有多种多样，可更常被检出，更不常被检出，或是特异地被检出。在患者样品中对这些标记的测量(单独的或结合的)使诊断医生可与前列腺癌、良性前列腺增生的可能诊断或与阴性诊断(例如，正常或无病)相关联。所有的标记都有一定的分子量。通过联用(例如)质谱的色谱分离法可以将它们从样品中其它的蛋白质和其它的有机生物分子中分辨出来。在优选的实施方案中，分辨的方法包括表面增强激光解吸/电离质谱法(Surface-enhanced Laser Desorption/Ionization mass spectrometry)，其中，质谱探针的表面在分析物的解吸与离子化中起积极作用。

标记组 1 在精浆中被鉴定。标记组 1 包括：标记 SP1：9,402.68±8.97Da，pI～5；标记 SP2：26，155.30±202.01Da，pI～5；标记 SP3：54，979.27±408.78Da，pI～9；标记 SP4：9，752.30±15.08Da；标记 SP5：87，66.93±14.44Da；标记 SP6：62，77.97±12.36Da 和标记 SP7：2，781.72±4.41Da，pI～9。与阴性诊断相比，SP1 在 CaP 中常被检出，而在 BPH 中不常被检出(例如，未检出)。SP2 在 CaP 和 BPH 中都常被检出。SP3 在 CaP 中常被检出，而在 BPH 中不常被检出。SP4 在 CaP 和 BPH 中都不常被检出。SP5、SP6 和 SP7 在 CaP 中不常被检出(例如，未检出)，而在 BPH 中常被检出。

标记组 2 在来自激光俘获显微解剖(laser CaPture microdissection)的前列腺上皮细胞溶解产物中被鉴定。标记组 2 包括：标记 CL1：8，494.30±10.24Da，标记 CL2：9，614.62±52.19Da，标记 CL3：28，472±127.40Da，和标记 CL4：33，386.85±160.47Da。用中性洗脱剂、中等浓度的盐和低浓度的非离子型去污剂洗涤，根据它们与阴离子交换剂或金属螯合吸附剂的结合能力可进一步表征这些标记。这说明它们在中性 pH 时是带负电荷的。与阴性诊断相比，标记 CL1 和标记 CL2 在 CaP 和 BPH 中都常被检出。(CL2 在阴性诊断中未能检出)。标记 CL3 和标记 CL4 在所有的三种情况中都被检出。然而，标记 CL4:CL3 的比率大于约 0.4 与 CaP 强烈相关。

目前还没有完全鉴定这些标记，但在患者样品中测量它们并不需要这种知识，因为通过质量和亲和特性来表征它们已经足够了。要指出的是，分子量和相对 pI 是这些标记

的特特殊性质，而它们并不限制检测或分离的方法。另外，一旦获得部分氨基酸序列，就可以通过在蛋白质数据库中匹配序列将它们完全鉴定。

在本发明的一个方面，提供了一种辅助诊断前列腺癌或良性前列腺增生的方法。这一方法包括：a)在来自个体的样品中检测至少一种选自标记组 1 或标记组 2(如这里所定义的)的蛋白质标记；以及 b)将标记或多个标记的检测结果与前列腺癌、良性前列腺增生的可能诊断或阴性诊断相关联，其中的相关性考虑到了每种诊断中标记或多个标记的相对可检出性。

在一个实施方案中，样品选自精浆、血液、血清、尿液、前列腺液、精液、精子、和前列腺组织。在其它实施方案中，标记或多个标记通过气相离子分光计或，更具体的是，激光解吸质谱仪检测。在另一个实施方案中用免疫测定法检测标记或多种标记。在其它实施方案中，这一方法包括检测多种标记。在其它实施方案中，这一方法包括至少检测标记 SP2，或进一步检测 SP1 和选自 SP4、SP5、SP6 和 SP7 的第三个标记中的至少一种或两者。在另一个实施方案中，这一方法包括检测标记 CL1 和/或标记 CL2。在另一个实施方案中，这一方法包括测量标记 CL4 和标记 CL3 的量，并确定标记 CL3 和标记 CL4 的量的比例。在另一个实施方案中，这一方法包括：i)用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据；ii)将数据转换成计算机可读的形式；以及 iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中算法可确定计算机可读数据与表示 CaP、BPH 诊断或阴性诊断的数据之间的适配紧密度(closeness-of-fit)。

本发明的另一方面提供了一种在样品中检测来自标记组 1 或标记组 2 中至少一种蛋白质标记的方法，其中这一方法包括用气相离子分光计检测标记或多个标记。

在一个实施方案中，这一方法包括：i)用质谱仪得出表示质/荷比信号强度的样品数据；ii)将数据转换成计算机可读的形式；以及 iii)用可编程的数字计算机执行算法，其中算法可检测代表标记或多个标记的计算机可读数据的信号。

在另一实施例中，这一方法进一步包括，在检测标记之前，以大小排阻色谱分级样品，并收集包括标记或多个标记的级分。在另一个实施方案中，这一方法进一步包括，在检测标记之前，用阴离子交换色谱分级样品并收集含有标记或多个标记的级分。

在另一实施例中，这一方法进一步包括：i)在检测标记或多个标记之前，使样品与含有吸附剂(能保留标记或多个标记)的基质接触并除去不保留的样品，从而将含有标记或多个标记的样品分级；以及 ii)在质谱过程中使保留的多个标记从吸附剂上解吸并电离。在本方法的一些实施方案中，基质是质谱仪的探针，其表面含有吸附剂。在另一个实施方

案中，基质是树脂，并且在样品分级后，把带有被吸附剂保留的标记或多个标记的树脂放在质谱仪的探针上，以便用质谱仪进行解吸和电离。在另一个实施方案中，吸附剂选自亲水性吸附剂，例如阴离子吸附剂；和金属螯合吸附剂，例如镍螯合吸附剂。

在一个包括激光解吸/电离质谱法的实施方案中，这一方法包括：i)提供适合质谱仪使用的附有吸附剂的探针；ii)使标记或多个标记与吸附剂接触；以及iii)使标记或多个标记从探针上解吸和电离，并用质谱仪检测解吸/电离的标记或多个标记。在另一个实施方案中，这一方法包括：i) 提供附有吸附剂的基质；ii)使标记或多个标记与吸附剂接触；iii)将基质放在适合质谱仪使用的附有吸附剂的探针上；以及iv)使标记或多个标记从探针上解吸和电离，并用质谱仪检测解吸/电离的标记或多个标记。在另一些实施方案中，吸附剂是亲水型吸附剂(例如，氧化硅)或金属螯合吸附剂(例如，镍螯合物)。在另一个实施方案中，吸附剂包括能与标记特异性结合的抗体。

在本发明的另一方面，提供了选自标记组1或标记组2的蛋白质标记的纯化的蛋白质。在一个实施方案中，纯化的蛋白质是通过以下步骤制造的，包括用大小排阻色谱分级含有标记或多个标记的样品，并收集包括标记或多个标记的级分；和/或用阴离子交换色谱分级含有标记或多个标记的样品，并收集包括标记或多个标记的级分。

在另一个实施方案中，本发明提供了一试剂盒，包括：(1)附在基质上的吸附剂，其中的吸附剂可保留选自标记组1或标记组2的蛋白质标记；以及(2)检测标记或多个标记的说明，通过将样品与吸附剂接触并检测被吸附剂保留的标记或多个标记。在本发明的一个实施方案中，基质是表面附有吸附剂的气相离子分光计的探针。吸附剂可以是，例如，亲水型吸附剂(例如氧化硅)。在另一个实施方案中，试剂盒可进一步包括(1)一种洗脱剂，其中当用这种洗脱剂洗涤时标记或多个标记保留在吸附剂上，或(2)在吸附剂与标记或多个标记接触后用洗脱剂洗涤吸附剂的说明。

附图简述

图1显示了在来自患者样品的精浆中对标记组1中七个标记(SP1-SP7)的检测结果，对患者作出了前列腺癌(CAP)、良性前列腺增生(BPH)以及正常或者阴性诊断(NR)。同时给出了通过质谱仪测得的表观分子量以及置信区间。

图 2A-2G 分别是前列腺癌(CAP)、良性前列腺增生(BPH)以及正常(NP)时，标记SP1-SP7 的正相表面的典型质谱图谱。

图3显示了在前列腺上皮细胞溶解产物中对标记组1中四个标记(CL1-CL4)的检测结果，前列腺上皮细胞溶解产物是在患者样品中用激光俘获显微解剖分离的，对患者作出了前列腺癌(CAP)、良性前列腺增生(BPH)以及正常或者阴性诊断(NPr)。同时给出了通过质谱仪测得的表观分子量以及置信区间。

图 4A-4C 分别是前列腺癌(CAP)、良性前列腺增生(BPH)以及正常(NP)时，来自阴离子交换或镍螯合表面的标记 CL1-CL4 的典型质谱图谱。图 4A 显示了标记 CL1。图 4B 显示了标记 CL2。图 4C 显示了标记 CL3 和 CL4。

图 5A 显示了个体的 CaP、BPH 和正常样品中标记 CL3 和标记 CL4 的相对丰度。图 5B 的柱状图显示了正常(NP)、BPN 和 CaP 时 CL4:CL3 的平均比率。

图 6 描绘了含有基质 101 和吸附剂 102 的不连续斑点的探针。探针可拆卸地插入气相离子分光计中。每个斑点都可被能源访问，以使分析物解吸。

特定实施方案的描述

I.定义

除非另有定义，这里使用的所有的技术与科学术语的含义通常都可被精通本发明所属技术领域的技术人员所理解。下面的参考资料为技术人员提供了本发明所用术语的一般定义：Singleton 等，*Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*(第二版，1994)；*The Cambridge Dictionary of Science and Technology*(Wakler 编，1988)；*The Glossary of Genetics*,第五版，R.Rieger 等(编)，Springer Verlag(1991)；以及 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的含义如其所述。

本发明中所使用的“标记”是指有机生物分子，特别是多肽，与取自未患前列腺癌个体(例如，阴性诊断、正常或健康个体)的对照样品相比，它在取自患有前列腺癌或良性

前列腺增生个体的样品存在差别。例如，与阴性诊断的患者的样品相比，在前列腺癌患者的样品中，标记可以是以升高或降低的水平出现的多肽(具有特定的表观分子量)。

“有机生物分子”是指源自生物的有机分子，例如，类固醇类、氨基酸类、核苷酸类、糖类、多肽类、多核苷酸类、复杂的碳水化合物或脂类。

“存在差别”是指，与取自未患前列腺癌的患者(例如，是良性前列腺增生)的相当样品相比，取自患有前列腺癌的患者的样品中有不同量的多肽(有特定的表观分子量)出现。如果一个样品中多肽的量与另一个样品中多肽的量显著不同，则多肽在两个样品间存在差别。例如，如果多肽在一个样品中的出现较在另一个样品中的出现高至少约 150%、至少约 200%、至少约 500%或至少约 1000%，或是在一个样品中可检出而在另一个样品中不可检出，则它在两个样品间存在差别。与未患前列腺癌的个体相比(例如是良性前列腺增生)，在取自前列腺癌患者的样品中存在差别的任何多肽都可以作为标记使用。

“诊断”是指确定某种病理状况的存在或。诊断方法在它们的灵敏度与特异性上存在不同。诊断方法的“灵敏度”是试验呈阳性的患病个体的百分数(“真阳性”的百分率)。未被试验检出的患病个体是“假阴性”。未患病而在试验中呈阴性的个体为“真阴性”。诊断试验的“特异性”是 1 减去假阳性的比率，其中，“假阳性”比率是在试验中呈阳性的未患病者的比率。一个特定的诊断方法不能为疾病提供最终的诊断，但如果这一方法提供能辅助诊断的阳性指示则它也能满足需要。

标记的“试验量”是指在被试验的样品中存在的标记的量。试验量可以是绝对量(例如，μg/ml)或相对量(例如，信号的相对强度)。

标记的“诊断量”是指在个体样品中符合前列腺癌的诊断的标记的量。诊断量可以是绝对量(例如，μg/ml)或相对量(例如，信号的相对强度)。

标记的“对照量”可以是准备与某一标记的试验量相比较的任何量或量的范围。例如，标记的对照量可以是前列腺癌患者、BPH 患者、或非前列腺癌或 BPH 患者中标记(例如，精液碱性蛋白)的量。对照量可以是绝对量(例如，μg/ml)或相对量(例如，信号的相对强度)。

“探针”是一种装置，当对电离源(例如，激光解吸/电离源)以可探寻的关系定位接

合，并在大气压或低于大气压的压力下与气相离子分光计的检测器并行连接时，它可用来将分析物衍生的离子引入分光计。这里使用的“探针”通常是可逆接合的(例如，可拆卸地插入)，其探针界面可将探针以可探寻的关系与电离源定位并与检测器连接。探针一般包括含有样品呈递表面的基质，分析物在其上被呈递到电离源。

“基质”或“探针基质”是指在其上附有吸附剂(例如，通过附着或沉积作用等)的固相。

“电离源”是指能将电离能引向探针的样品呈递表面，以使分析物从探针表面向气相解吸并电离的装置。优选的电离源是激光(用于激光解吸/电离)，特别地，是氮激光器、钕-钇铝石榴石激光器和其它的脉冲激光源。其它的电离源包括快原子(用在快原子攻击中)、等离子能(用在等离子解吸中)和产生次级离子的一级离子(用在次级离子质谱中)。

“气相离子分光计”是指检测气相离子的装置。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。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样品呈递表面上的分析物中产生气相离子，并用气相离子分光计引导气相离子。

“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样品呈递表面上的分析物中产生气相离子，并用质谱仪检测气相离子。

“激光解吸质谱仪”是指通过激光使分析物解吸、挥发和电离的质谱仪。

“吸附剂”是指能吸附标记的任何物质。这里使用的“吸附剂”一词不仅指使标记暴露于其中的单一物质(“单一吸附剂”)(例如，化合物或功能基团)，也指使标记暴露于其中的多个不同的物质(“复合吸附剂”)。复合吸附剂中的吸附材料被称为“吸附剂种类(adsorbent species)”。例如，探针基质上的某个可寻址区域可以包括以许多不同的吸

附剂种类(例如，阴离子交换物质、金属螯合物、或抗体)表征的复合吸附剂，它们有不同的的结合特性。基质材料本身也可吸附标记，故而也可以被认为是“吸附剂”的一部分。

“吸附”或“保留”是指在用洗脱剂(选择性阈修饰剂)或洗涤溶液洗涤之前或之后吸附剂与标记之间可检测的结合。

“洗脱剂”或“洗涤溶液”是指可用来调节吸附剂对标记的吸附作用的试剂。洗脱剂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基质表面洗涤或除去未结合的物质。

“分辨”、“分析”或“标记的分析”是指对样品中至少一种标记进行检测。分辨包括通过分离和随后的示差检测对样品中的多种标记进行检测。分辨不需要在混合物中将一种标记从其它所有标记中完全分离出来。相反，能区分至少两种标记的任何分离就已足够。

“检测”是指鉴定待检测的目标物的存在、不存在或是其数量。

“多肽”、“肽”和“蛋白质”这些术语在这里可以交换使用，是指氨基酸残基的聚合物。这些术语将用于氨基酸聚合物，其中一个或更多的氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸的类似物或模拟物，以及天然存在的氨基酸聚合物。多肽可以被修饰，例如，通过添加糖的残基以形成糖蛋白。“多肽”、“肽”和“蛋白质”这些术语包括糖蛋白，以及非糖蛋白。

“可检测部分”或“标记物”是指可以通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学或化学手段检测的成分。例如，有用的标记包括 ^{32}P、^{35}S、荧光染料、电子密度试剂、酶类(例如，通常用在 ELISA 中)、生物素-链霉亲和素(biotin-streptavadin)、dioxigenin、半抗原和蛋白质(可利用其抗血清或单克隆抗体)、或是与目标物有互补序列的核酸分子。可检测部分经常会产生可检测的信号，例如放射性的、产色的、或荧光信号，它们可被用来对样品中结合的可检测部分进行定量。可检测部分可以共价地，或通过离子键、范德华键或氢键接合或附着在引物或探针上，例如，放射性核苷酸或可被链霉亲和素识别的生物素酰核苷酸的参入。可检测部分可以直接或间接被检测。间接检测包括使第二个可直接或间接检测部分与可检测部分结合。例如，可检测部分可以是结合物(binding partnet)的配体，比如生物素(是链霉亲和素的结合物)，或是核苷酸序列(是互补序列的结合物并可与

其特异性杂交)。结合物自身也可被直接检测，例如，抗体自身可被荧光分子标记。结合物也可被间接检测，例如，含有互补核苷酸序列的核酸可以是分支 DNA 分子的一部分，通过与其它标记过的核酸分子杂交可以被依次检测。(参见，例如，P.D.Fahrlander 和 A.Klausner，Bio/Technology 6:1165(1998))。通过，例如，闪烁计数、光密度测定法或流式细胞计量术可以对信号进行定量。

“抗体”是指实质上由免疫球蛋白基因或多个免疫球蛋白基因、或它们的片段编码的多肽配体，它可识别表位(例如，抗原)并与之特异性结合。被识别的免疫球蛋白基因包括κ和λ轻链恒定区的基因，α、γ、δ、ε和μ重链恒定区的基因，以及大量的免疫球蛋白可变区的基因。抗体以完整的免疫球蛋白，或以经各种肽酶消化所得的大量的经良好鉴定的片段的形式存在。这包括，例如，Fab'和 $F(ab)'_2$ 片段。这里所使用的“抗体”还包括或是通过对整个抗体进行修饰，或是用重组 DNA 技术重新合成所得的抗体片段。还包括多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、人源化抗体或单链抗体。抗体的“Fc”部分是指免疫球蛋白重链的一个部分，包括一个或多个重链的恒定区、CH1、CH2 和 CH3，但不包括重链的可变区。

“免疫测定”是一种用抗体去特异性结合抗原的分析法。免疫测定以利用特定抗体的特异性结合性质分离抗原、导向抗原、以及/或定量抗原为特征。

对蛋白质或肽而言，与抗体的“特异性(或选择性)结合”或“与其发生特异性(或选择性)免疫反应”，这一术语是指能确定该蛋白质在不均一的蛋白质和其它生物分子中存在的结合反应。所以，在指定的免疫测定条件下，所述抗体与特定蛋白质的结合至少两倍于背景，且与样品中存在的其它蛋白质实际上不以显著量结合。在这种条件下，抗体的特异性结合可能需要就其对特定蛋白质的特异性选出一种抗体。例如，可以选择由来自诸如大鼠、小鼠或人等特定物种的精液碱性蛋白产生的多克隆抗体，以获得仅与精液碱性蛋白质有特异性的免疫反应而不与其它蛋白质(除精液碱性蛋白的多态变体或等位基因)反应的多克隆抗体。这种选择可以通过排除那些与来自其它物种的精液碱性蛋白分子交叉反应的抗体而达到。可以使用各种免疫测定模式来选择和特定蛋白质有特异性免疫反应的抗体。例如，通常使用固相 ELISA 免疫测定来选择和某一蛋白质有特异性免疫反应的抗体(参见，例如，Harlow & Lane，*Antibodies, A Laboratory Manual*(1988), for a description of immunoassay formats and conditions that can be used to determine specific immunoreactivity)。典型的特异性或选择性反应至少是背景信号或噪音的两倍，更典型的是超过 10-100 倍的背景。

II.气相离子分光法

在一个方面，本发明提供了检测标记的方法，这种标记在前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断的患者的样品中的出现情况是不同的。所描述标记中的任何一个或它们的结合都在本发明这一方面的范围之内，并且是可被检测的。检测这些标记的方法有很多用途。例如，可以测定一个标记或标记的结合以区别前列腺癌和 BPH，这可辅助患者的前列腺癌诊断。在另一个实施例中，检测这些标记的方法可用在体外前列腺癌细胞或为前列腺癌建立的体内动物模型中，以分析并鉴定调节这些标记表达的化合物。在这个检测方法的一个实施方案中，标记或多个标记是通过气相离子分光法检测的。在一个优选的实施方案中，标记或多个标记是通过质谱法检测的，特别是激光解吸质谱法。

适合本发明使用的探针在，例如，美国专利第 5，617，060 号(Hutchens and Yip)和 WO 98/59360 号(Hutchens and Yip)中描述。在一个实施方案中，可拆卸地插入气相离子分光计的探针上可以包括含有吸附剂的基质。例如，基质可以是表面有吸附剂的条带状。在另一个实施方案中，含有吸附剂的基质可放置在另一基质上以形成可拆卸地插入气相离子分光计的探针。例如，含有吸附剂的基质可以是固相，例如是带有能结合标记的官能团的聚合物珠或玻璃珠，它随后可以被放在第二个基质上以形成探针。例如，第二个基质可以是在预定的可寻址的位置上有一系列穴的条带状或板状。这一实施方案的优点在于，标记可用个物理方式被吸附至第一个基质并转移到第二个基质，然后提交气相离子分光法进行分析。探针可以是任何形状，只要它可拆卸地插入气相离子分光计中便可。

探针也可以和气相离子分光计的入口系统和检测器一起使用。例如，探针可以被安装在可水平、垂直和/或旋转移动的台架上，这样就可以将探针移至连续的位置上而不需要手工改变探针的位置了。

探针基质最好用可以负载吸附剂的材料制造。例如，探针基质的材料包括(但不限于)绝缘材料(例如，玻璃、陶瓷)、半导体材料(例如，硅片)、或导电材料(例如，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、或它们的结合体。

可以使探针基质表面适于结合标记。例如，在一个实施方案中，可由使探针基质表面适于(例如，以化学方法，或机械方法如使之便粗糙)将吸附剂放在其表面。吸附剂含有用于和标记结合的官能团。在一些实施方案中，基质材料自身也有吸附剂的特性并可以认为是“吸附剂”的一部分。

可以使用任何种数的不同吸附剂，只有它们有适宜于与本发明的标记结合的特性。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、或是与抗原特异性结合的抗体、或是它们的结合体(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氧化硅(例如，玻璃)，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。含有抗体的示范性的吸附剂包括对这里所提供的任何一种标记有特异性的抗体。在优选的实施方案中，吸附剂与用来富集并鉴定标记的吸附剂实质上是类似的或是一样的。

一个有用的芯片是正相芯片(Normal Phase chip)，由 Ciphergen Biosystems 公司(Palo Alto，CA)制造。正相芯片的基质表面存在含有氧化硅(SiO_2)的亲水型吸附剂。在一些熟知的方法中，氧化硅可以任何熟知的方法涂在表面上。这些方法包括，例如，气相淀积(比如溅射镀膜)。这种探针优选的厚度约为 9000 埃。

另一个有用的芯片是位于 Palo Alto，CA 的 Ciphergen Biosystems 公司制造的 SAX1 ProteinChip™。SAX1 蛋白芯片由涂布有 SiO_2 的铝基质构成。在制造时，将悬浮于蒸馏水中的聚苯乙烯季铵盐的微球体沉积在芯片表面(1ml/斑点，两次)。空气干燥后(室温，5 分钟)用去离子水漂洗芯片并用空气再次干燥(室温，5 分钟)。

另一个有用的芯片是 IMAC3 芯片(固定化金属亲和俘获，表面有次氮基三乙酸)，同样由 Ciphergen Biosystems 公司制造。按如下步骤制造芯片：以-(-)核黄素(0.02wt%)作为光引发剂使 5-甲基丙烯酰胺基-2-(N,N-二羧基甲基氨基戊酸(5-Methacylamido-2-(N,N-biscarboxymethaylammino) pentanoic acid)(7.5wt%)、丙烯酰三(羟甲基)甲胺

(7.5wt%)和N,N'-亚甲双丙烯酰胺(0.4wt%)光聚合。使单体溶液沉积在粗蚀的、有玻璃涂层的基质上(0.4mL，两次)并用近紫外照射装置(汞短弧光灯，20mW/cm2，365nm)照射5分钟。用氯化钠溶液(1M)洗涤表面再用去离子水洗涤两次。

按如下方法活化带有镍(II)的IMAC3。表面用$NiSO_4$(50mM，10mL/斑)溶液处理并用高频混合器表面混合10分钟。除去$NiSO_4$溶液后，重复这一处理步骤。最后，用去离子水流洗涤表面(15秒/芯片)。

吸附剂可以连续或不连续的方式置于探针基质上。如果是连续的，可以在基质表面放置一种或多种吸附剂。如果使用复合类型的吸附剂，基质表面可以一种或多种结合特性在一维或两维梯度内变化的方式进行涂层。如果是不连续的，多种吸附剂可以放在基质表面预定的可寻址的位置上。可寻址的位置可以任何方式排列，但以常规方式较好，比如线形、正交阵列、或常规曲线(如圆)。每个可寻址位置可以含有同样的或不同的吸附剂。在图6中展示了含有不连续斑点的吸附剂的探针。这些斑点是“可寻址的”是指，在质谱过程中，能源(如激光)被指向、或“访问”每个斑点以使分析物有区别地解吸。

根据基质材料和/或吸附剂的选择，可以用任何合适的方法制造探针。例如，金属基质的表面可以用任何允许金属表面衍生化的材料涂布。特别地，可用氧化硅、氧化钛或金涂布金属表面。然后表面可用双功能接头(其一端可与表面上的官能团共价结合，另一端可用起吸附剂功能的基团进一步衍生)衍生。在另一个实施例中，由晶体硅产生的多孔硅表面可以被化学修饰以使其含有用于结合标记的吸附剂。再在另一个实施例中，通过原位聚合含有(例如)取代的丙烯酰胺单体、取代的丙烯酸酯单体、或其衍生物(含有选择作为吸附剂的官能团))的单体溶液，含有水凝胶骨架的吸附剂可以在基质表面直接形成。

含有吸附剂的探针基质与样品接触。样品最好是生物液体样品。生物液体样品的实例包括血液、血清、尿液、前列腺液、精液(seminal fluid)、精液(semen)、精浆和前列腺组织(例如，上皮组织，包括其提出物)。

样品可以溶解在洗脱剂中或与之混合。然后可以用任何手段(包括泡、浸、蘸、喷淋、洗涤、或移液等)使含有吸附剂的探针基质与溶液接触。通常，在约1μl-500μl中有含有几个渺摩至100皮摩标记的样品就足够与吸附剂结合了。

样品可与含有吸附剂的探针基质结合足够长的时间，以使标记与吸附剂结合。通常，

样品与含有吸附剂的基质的接触时间约在30秒与12小时之间，较好的是约在30秒与15分钟之间。

样品与含有吸附剂的探针基质接触的温度可能是特定样品与所选探针的函数。通常，样品与探针基质在环境温度和环境压力的条件下接触。然而，对于某些实例可能需要改进的温度(通常是4℃-37℃)和压力条件，这种条件可由那些精通这一技术的技术人员决定。

含有吸附剂的探针基质与样品或样品溶液接触后，最好将探针基质表面未结合的物质洗掉，这样就只有结合的物质保留在基质表面了。洗涤探针基质表面可以这样进行，例如，用洗脱剂或洗涤溶液泡、浸、蘸、漂洗、喷淋、或洗涤基质表面。当洗涤溶液(例如洗脱剂)被引入探针上的吸附剂斑点时优选使用微流体(microfluidics)方法。通常，洗涤溶液的温度在0℃-100℃之间，较好地是在4℃-37℃。

任何合适的洗涤溶液或洗脱剂都可以用来洗涤探针基质表面。例如，可以使用有机溶液或水溶液。较好地是使用水溶液。示范性的水溶液包括HEPES缓冲液、Tris缓冲液、磷酸盐缓冲盐溶液等。特定洗涤溶液或洗脱剂的选择依赖于其它的实验条件(比如，所用吸附剂或待检测的标记的类型)，这可由精通这一技术的技术人员决定。例如，如果使用含疏水基团和磺酸盐基团作为吸附剂的探针(比如，SAX1 ProteinChip™列阵)，则优选例如HEPES缓冲液的水溶液。在另一个实施例中，如果使用含金属结合基团作为吸附剂的探针(比如，Ni(II) ProteinChip™列阵)，则优选例如磷酸盐缓冲盐的水溶液。再在另一个实例中，如果使用含有疏水基团的探针(比如，H4 ProteinChip™列阵)，则优选水作为洗涤溶液。

可对标记或结合在探针基质表面的其它物质使用吸收的能量分子(比如，在溶液中)。可以使用喷淋、移液、或浸泡等方法。这可以在未结合的物质从探针基质表面洗掉以后进行。吸收能量的分子是指在气相离子分光计中可从能源吸收能量的分子，由此可帮助标记或其它物质从探针表面解吸。示范性的吸收能量的分子包括肉桂酸衍生物、芥子酸和二羟基苯甲酸。

在标记与探针结合后用气相离子分光计进行检测。可用气相离子分光计分析标记或结合在探针吸附剂上的其它物质。可以用气相离子分光计确定标记的数量与特性。用气相离子分光法还可以检测除了感兴趣的标记外的其它物质。

在一个实施方案中，可以用质谱仪检测探针上的标记。在典型的的质谱仪中，带有标记的探针被引入质谱仪的入口系统中。然后用诸如激光、快原子轰击、或高能等离子体的解吸源使分析物解吸。所得解吸的、挥发的物质包括作为解吸操作的直接结果被电离的预先形成的离子或中性粒子。用离子光学装置收集所得离子，然后用质量分析器分散并分析经过的离子。用检测器检测存在于质量分析器中的离子。检测器再将被检测离子的信息转换成质荷比。对标记或其它物质存在情况的检测通常包括对信号强度的检测。这样也可以反映出结合在探针上的标记的数量和特性。

在一个优选的实施方案中，激光解吸飞行时间质谱仪和本发明的探针一起使用。在激光解吸质谱仪中，带有结合的分析物的探针被引入入口系统中。分析物被来自电离源的激光解吸并电离成气相。用离子光学装置收集所得离子，然后在飞行时间质谱分析器中，离子被加速通过短的高压场并漂移进高真空室。在高真空室的远端，被加速的离子在不同的时间撞击灵敏的检测器表面。由于飞行时间是离子质量的函数，故可用离子形成到离子与检测器相撞之间的时间来确定有特定质荷比的分子存在或不存在。正如精通这一技术的任何技术人员所知道的，激光解吸飞行时间质谱仪中的任何部件都可以和这里所描述的质谱仪装置中的其它部件结合使用，这样就可以多种方式进行解吸、加速、检测、测量飞行时间等。

在另一个实施方案中，可用离子迁移分光计来检测标记并确定其性质。离子迁移谱法的原理是基于不同的离子迁移率。特别地，由于有不同的(例如)质量、电荷、或形状，在电场的影响下，由样品电离产生的离子以不同的速率移动通过管子。离子(通常以电流的形式)记录在检测器上，然后可用来鉴别样品中的标记或其它物质。离子迁移谱法的优点在于，它可以在大气压下操作。

在另一个实施方案中，可以用总离子流测量装置来检测标记并确定其性质。当探针有仅允许单一类型的标记结合的表面化学性质时可以使用这种装置。当单一类型的标记结合到探针上时，自电离的标记产生的总电流反映了标记的性质。然后可以将标记产生的总离子流与储存的已知化合物的总离子流进行比较。这样就可以确定标记的性质了。

用可编程的数字计算机可以分析标记解吸和检测所产生的数据。计算机程序通常包括储存代码的可读介质。某些代码可以用于存储器，包括探针上每一部件的位置，那一部件吸附剂的特性以及用来洗涤吸附剂的洗脱条件。利用这些信息，确定某些选择性特性(例

如，吸附剂与所用洗脱剂的类型），程序就可以识别探针上的一组部件。计算机中还包括代码，接受作为输入的自探针上特殊的可寻址位置收集的不同分子质量的信号强度的数据。这些数据可以显示被检测标记的数量，包括信号强度和每个被测标记的已确定的分子质量。

数据分析可包括确定被测标记的信号强度(例如，峰高)和除去“异常值”(偏离预定的统计学分布的数据)的步骤。例如，可以将观察到的峰归一化，即计算每个峰相对于某些参照的峰高。例如，参照可能是由仪器和化学物质(比如吸收能量的分子)产生的背景噪音，应在刻度上将其置零。然后就可以用所需的比例(如，100)以相对强度的形式显示测得的每个标记或其它物质的信号强度了。或者，可以在样品中加入标准物，这样就可以将标准物的峰作为参照，计算观察到的被测标记或其它标记的信号的相对强度。

计算机可将所得数据转换成各种形式显示。在一种被称为“光谱图(spectrum view)或保留图(retentate map)”的形式中，可以显示标准的光谱图，其中描述了在每个特殊的分子量处到达检测器的标记的数量。在另一种被称为“峰图”的形式中，仅仅从光谱图中保留了峰高和质量信息，图像较清晰，可以更容易的观察几乎有着同样分子量的标记。在另一种被称为“凝胶图”的形式中，来自峰图的每个质量信息被转换成了基于每个峰高的灰色标度的图像，结果类似于电泳凝胶上的条带。在另一种被称为“三维覆盖(3-D overlays)”的形式中，几个光谱被重叠以便研究相对峰高的细微变化。在另一种被称为“示差图视图(difference map view)”的形式中，比较了两个或更多的光谱，以便突出特有的标记或多个标记(在样品间正调节或负调节)。来自任何两个样品的标记特点(光谱)可以直观地进行比较。

III.检测标记的方法

A.标记的表征

已经鉴别出两组在区别前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断中有用的标记。标记组 1 是在精浆中鉴别的。标记组 2 是在前列腺上皮组织的细胞溶解产物中鉴别的。

1.标记组 1 精浆

通过质谱法鉴别的、在诊断前列腺癌或良性前列腺增生中有用的标记组 1 有以下的

分子量：标记 SP1：9,402.68±8.97Da；标记 SP2：26,155.30±202.01Da；标记 SP3：54,979.27±408.78Da；标记 SP4：9,752.30±15.08Da；标记 SP5：87,66.93±14.44Da；标记 SP6：62,77.97±12.36Da 和标记 SP7：2,781.72±4.41Da。

这些标记可用以下方法进一步表征：先用大小排阻自旋色谱分级精浆，使用能排除分子量大于约 30kD 的蛋白质的基质。SP4 和 SP5 足够丰富，可以不使用正相吸附剂芯片以 SELDI 质谱仪进一步分级而进行检测，。来自排阻柱的级分被加在强阴离子交换亲和自旋柱中，并用洗脱剂(20mM Tris,0.4M NaCl,0.1% TritonX 100)以 pH9.0-pH4.0 的 pH 梯度进行洗脱，从而进一步分级。标记 SP1 和 SP2 出现在后期级分中，说明有较低的 pI(大约在 5 左右)。标记 SP3 和 SP7 出现在早期级分中，说明其 pI 大约在 9 左右。用正相吸附芯片以 SELDI 质谱法检测标记。

2.标记组 2 细胞溶解产物

通过质谱法鉴别的、在诊断前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断中有用的标记组 2 有以下的分子量：标记 CL1：8,494.30±10.24Da，标记 CL2：9,614.62±52.19Da，标记 CL3：28,473±127.40Da，和标记 CL4：33,386.85±160.47Da。

这些标记可用以下方法进一步表征：将通过激光俘获显微解剖从前列腺上皮细胞获得的细胞溶解产物分级，并用保留色谱进行分析。在这个方法中，被测样品被加到含有两个附着着吸附剂(强阴离子交换吸附剂或镍螯合吸附剂)中的一种的基质上。用第一洗脱剂(20mM Tris,pH7.5，0.1% TritonX 100，0.5M NaCl)洗涤吸附剂使蛋白质结合到芯片上，再用第二洗脱剂(水)洗涤除去未结合的物质。用 SELDI 质谱法检测保留在吸附剂上的标记。四种标记可以被两种吸附剂中的任何一种分离。然而，标记 CL1 与 CL2 在阴离子交换吸附剂上分离得更好，标记 CL3 与 CL4 在金属螯合吸附剂上分离得更好。由于标记在中性 pH 下结合到阴离子交换吸附剂上，这说明它们在中性 pH 时带有负电荷。

B.标记的样品来源

可以在来自于患者或个体的许多不同的样品中检测这些标记。样品最好是生物液体样品。在本发明中有用的生物液体样品的实施例包括血液、血清、尿液，前列腺液、精液(seminal fluid)、精液(semen)、精浆和前列腺组织(例如，上皮组织，包括其提取物)。

由于标记组 1 的标记是在精浆中被发现的，对本发明的方法而言，精浆是优选的样品来源。另外，检测精浆样品不需要侵入性的步骤，比如将针插进患者。

由于标记组 2 的标记是在前列腺上皮细胞的溶解产物中发现的，对本发明的方法而言，这种组织是优选的样品来源。特别地，可经这种组织的激光俘获显微解剖以收集样品。因此，对本发明的方法而言，这是获得样品的优选方法。

C.标记的检测

获得样品后，可以用任何合适的方法检测待测个体样品中的标记。例如，可以用气相离子分光法或免疫测定。

1.气相离子分光法

在一个优选的实施方案中，可用气相离子分光法，更好的是用质谱法，再好的是用表面增强激光解吸/电离质谱法（“SELDI”）检测本发明的标记。SELDI 是用于生物分子的经改进的气相离子分光法。在 SELDI 中，其上涂敷有分析物的表面在分析物的捕获、解吸和/或解吸中起积极作用。一种流行的用于生物分子的气相离子分光法是 MALDI(基质辅助激光解吸/电离)质谱法。在 MALDI 中，分析物通常与基质材料(在干燥时，形成捕获分析物的晶体)混合。基质材料从能源(不然它会使生物分子分析物断裂)吸收能量。

a) 样品的制备

(i)预分级

在一个实施方案中，在采用气相离子分光法之前可对样品进行预分级。预分级的优点在于，它为分析提供了不太复杂的样品。另一方面，它在分析过程中引入了额外的步骤，这在(例如)临床环境中可能是不吸引人的。可用本技术领域中任何已知的方法对样品进行预分级，包括(但不限于)大小分级和色谱分级。

在一个实施方案中，在用气相离子分光法分析之前可对精浆样品预分级。优选的分级方法包括用凝胶排阻色谱进行第一次分级。特别有效的是能除去分子量大于 30kD 的分子的大小排阻色谱柱。然后直接检测各种大小的级分，或用基于阴离子交换色谱法的第二分级步骤进行检测。采用阴离子交换 Q 自旋柱，用低强度缓冲液(例如，约 10mM-50mM Tris、 HEPES 或 PBS)与低浓度至中等浓度(例如，约 0.1M-0.6M)的盐以及低浓度的非离子型去污剂(例如，约 0.05-0.2%的 TritonX 100)组成的洗脱剂可以将标记 SP1、SP2、SP3 和 SP7 洗脱。特别有效的缓冲液是 20mM Tris、0.5M NaCl 和 0.1%的 TritonX 100。标记 SP1 和 SP2 在约 pH5 时被洗脱，标记 SP3 和 SP7 在约 pH9 时被洗脱。在一个实施方案中，用 pH 梯度洗脱标记。

(ii) 保留色谱

在另一个实施方案中，在气相离子分光法之前用保留色谱法将样品在生物色谱芯片(biochromatographic chip)上分级。优选的芯片是 Ciphergen Biosystems 公司(Palo Alto, CA)生产的 Protein Chip™。如上所述，这种芯片或探针是适用于质谱仪的。芯片表面附有吸附剂。在某些应用中，吸附剂可以作为原位色谱树脂。在基础的操作中，洗脱剂溶液中的样品被涂敷于吸附剂。在洗涤条件下，与吸附剂亲和的分子结合在吸附剂上。未与吸附剂结合的分子被洗涤除去。吸附剂可依不同水平的严格性进一步洗涤，以使分析物保留或洗脱至适当的水平以供分析。然后，可在吸附剂斑点上加入吸收能量的分子以使解吸与电离更加容易。使分析物从吸附剂上解吸、电离，然后用检测器直接检测。然而，保留色谱法与传统色谱法的不同之处在于，被亲和材料保留的分析物被检测，而在传统的色谱法中，检测的是从亲和材料上洗脱下来的物质。

用于分离标记组 1 中的标记的有效的吸附剂是亲水性吸附剂，特别地，是氧化硅(正相)吸附剂。经大小及阴离子交换色谱预分级的精浆可直接涂敷在正相吸附剂的表面而不用洗涤。相反，样品需在表面上干燥。这是因为预分级步骤除去了足够数量的蛋白质，这样标记就可被分离而不要进一步分级。然后可以使用吸收能量的分子。

另一种至少对标记 SP1 和 SP2 有效的吸附剂是阴离子交换吸附剂。这是因为这些蛋白质的 pI 约在 5 左右。因此，当用中性 pH 的洗脱剂洗涤时，它们可以与阴离子交换吸附剂结合。标记 SP3 和 SP7 的 pI 约为 9。因此预计它们在中性 pH 时带正电。同样，也可以在阳离子吸附剂上用中性 pH 的缓冲液洗涤以分离这些标记。

对分离标记组 2 中的标记有效的吸附剂是阴离子交换吸附剂。这一表面被含有低至中等浓度的盐和低浓度的非离子型去污剂的中性缓冲剂有效洗涤。优选的表面是 Ciphergen Biosystems 公司生产的 SAX-1 型。这种表面是含有季铵离子的强阴离子交换

树脂。

另一种对标记组 2 中的标记有效的吸附剂是金属螯合吸附剂，特别地，是镍。这一表面也可被含有低至中等浓度的盐和低浓度的非离子型去污剂的中性缓冲剂有效洗涤。优选的表面是 Ciphergen Biosystems 公司生产的 IMAC3 型。IMAC3 含有镍螯合吸附剂。

另一种对本发明的任何标记有效的吸附剂是可与标记特异性结合的抗体。含有与一种或多种标记结合的抗体的芯片对除去非标记(不与抗体结合且在检测过程中作为“噪音”出现)特别有效。

对于精通本技术的技术人员显而易见的是，用吸附剂与洗脱剂的不同组合可与更容易的分离不同的标记。

(iii) MALDI

在另一个实施方案中，样品可与基质材料混合并用传统的 MALDI 分析。假若这样，样品/基质混合物可以涂敷在惰性的质谱仪探针表面。MALDI 方法在使用前需要纯化----MALDI 的分离能力受样品中分析物复杂度的限制。

(iv) 分析前对标记的修饰

在另一个实施方案中，标记在检测之前经过修饰以改变它们的分子量。这些方法可以降低检测的不明确性(ambiguity)。例如，在分析之前标记可以被蛋白酶解消化。可以使用任何蛋白酶。诸如胰蛋白酶的蛋白酶类(可将标记切成数目无联系的片段)特别有效。降解所得的片段可作为标记的指纹，由此可使它们间接被检测。当几个标记有近似的分子量可能混淆要讨论的标记时，这种方法特别有效。同时，对高分子量的标记酶解成片段也是有用的，因为用质谱法分离较小的标记更加容易。

在另一个实施方案中，通过附加与分子标记特异结合的有特殊分子量的标记物也可以修饰标记，这样可进一步区别它们。

b) 激光解吸/电离质谱法的实施

标记被气相离子分光法检测后，可以测定标记的试验量。例如，在感兴趣的标记的分子量处有信号出现。根据出现信号的强度或数值可以确定被测样品中标记的量。值得一

提的是，样品中标记的试验量不必以绝对量测量，而可以是相对量，只要它与对照量的标记能定性或定量比较即可。例如，被测标记的量可以根据基于背景噪音的相对强度来显示。较好地，标记的试验量与对照量应在同样的条件下测得。

如果需要的话，通过校准可以确定标记的绝对量。例如，在探针表面的不同的吸附剂斑点中可按逐渐增加的量添加纯化的已知标记。然后可以获得每一点的峰，并可对每一斑点精液碱性蛋白的浓度将它们绘制在图中。通过峰强度对浓度的曲线，可以确定被测样品中标记的绝对量。

2. 免疫测定

在检测方法的另一个实施方案中，可以用免疫测定来定性或定量的检测与分析样品中的标记。这一方法包括：(a)提供与标记特异性结合的抗体；(b)使抗体与样品接触；以及(c)检测结合在样品中标记上的抗体复合物的存在情况。

为制备与标记特异性结合的抗体，可以用纯化的标记或它们的核酸序列。通过进一步鉴定这些标记可以获得标记的核酸序列和氨基酸序列。例如，每个标记可以用许多酶(比如，胰蛋白酶、V8 蛋白酶等)绘制肽图。可以用每个标记消化片段的分子量来检索数据库(比如 SwissProt 数据库)以获得和各种酶所产生的降解片段的分子量相匹配的序列。用这种方法可以确定其它标记的核酸和氨基酸序列，如果这些标记是数据库中已知的蛋白质。

或者，用蛋白质序列梯测序也可以确定蛋白质序列。蛋白质序列梯可以这样产生，例如，使分子断裂并对片段进行酶消化或用其它方法处理，这些方法可依次从片段末端移去一个氨基酸。制备蛋白质序列梯的方法描述于，例如，国际申请 WO93/24834(Chait 等)和美国专利 5，792，664(Chait 等)中。然后用质谱法分析序列梯。由序列梯片段质量的不同可鉴别出从分子末端除去的氨基酸。

如果标记不是数据库中已知的蛋白质，即便只知道标记中氨基酸序列的一部分，也可以确定出核酸与氨基酸序列。例如，基于标记的 N-末端氨基酸序列可以制造出简并探针。然后可以用这些探针来筛选由样品产生的基因组文库或 cDNA 文库，这样就可以从头检测标记了。阳性克隆可以被鉴别、扩增，它们的重组 DNA 序列可以用已经熟知的技术进行亚克隆。参见，例如，*Current Protocols for Molecular Biology*(Ausubel 等，Green Publishing Assoc. and Wiley Interscience 1989)和 *Molecular Cloning:A Laboratory*

Manual，第二版(Sambrook 等，冷泉港实验室，NY 1989)。

用纯化的标记或它们的核酸序列，通过这一技术领域中已知的任何合适方法可以制备与标记特异性结合的抗体。参见，例如，Coligan,*Current Protocols in Immunology*(1991)；Harlow & Lane，*Antibodies:A Laboratory Manual*(1988)；Goding，*Monoclonal Antibodies:Principles and Practice*(第二版，1986)；和 Kohler & Milstein,*Nature* 256:495-497(1975)。这些技术包括(但不限于)，通过从噬菌体或类似载体的重组抗体文库中选择抗体以制备抗体，以及通过免疫兔或小鼠制备多克隆抗体和单克隆抗体(参见，例如，Huse 等，*Science* 246:1275-1281(1989)；Ward 等，*Nature* 341:544-546(1989))。

获得抗体后，可以用很多已深刻认识的免疫结合分析法(参见，例如，美国专利第 4，366，241；4，376，110；4，517，288 和 4，837，168 号)中的任何一种对标记进行检测以及/或定量。有效的分析法包括，例如，酶免疫测定(EIA)(如酶联免疫吸附测定(ELISA))、放射免疫测定(RIA)、蛋白质印迹分析、或狭线印迹分析。至于常规的免疫测定，还可以参看 *Methods in Cell Biology:Antibodies in Cell Biology*，第 37 卷(Asai 编，1993)；*Basic and Clinical Immunology*(Stites & Terr 编，第 7 版，1991)。

通常，来自个体的样品可以和与标记特异性结合的抗体接触。较理想的是，在使抗体与样品接触之前可以将抗体固定于固体载体，以便洗涤以及随后分离复合物。固体载体的实例包括以(例如)微量滴定板、条状、珠状、或微珠状形式存在的玻璃或塑料。抗体也可以附在探针基质或上述 ProteinChip™ 阵列上。样品最好是取自个体的生物液体样品。生物液体样品的实例包括血液、血清、尿液、前列腺液、精液(seminal fluid)、精液(semen)、精浆和前列腺组织(例如，上皮组织，包括其提出物)。在一个优选的实施方案中，生物液体包括精浆。在使样品与抗体接触之前，可以用合适的洗脱剂将样品稀释。

在温育样品和抗体之后，洗涤混合物并检测所形成的抗体-标记复合物。这可以通过将洗涤过的混合物和检测试剂温育完成。检测试剂包括，例如，用可检测的标记物标记的第二抗体。示范性的可检测的标记物包括磁性珠(如，DYNABEADS™)、荧光染料、放射性标记、酶类(如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和其它在 ELISA 中常用的酶类)、和比色标记物(如，胶体金、或有色玻璃或塑料珠)。或者，可以用间接分析法检测样品中的标记，其中，(例如)可以用标记过的第二抗体来检测已结合的标记特异性抗体，和/或用竞争性

或抑制性分析法，其中(例如)将与标记的特殊表位结合的单克隆抗体和混合物同时温育。

在这些分析中，每次与试剂结合后都需要温育和/或洗涤步骤。温育步骤可以从约5秒钟到几个小时，较好的是从约5分钟至24小时。然而，温育时间依赖于分析方式、标记、溶液体积、浓度等。尽管也可以在一定的温度范围内进行分析(例如10℃-40℃)但分析通常是在环境温度下进行的。

免疫测定技术在本技术领域中已被人熟知，在上面提到的 Harlow & Lane 的书中可以找到可适用技术的概述。

免疫测定可以用来在个体样品中确定标记的试验量。首先，可以用上述免疫测定法检测样品中标记的试验量。如果标记存在于样品中，在上述合适的温育条件下，它将和与标记特异性结合的抗体形成抗体-标记复合物。通过与标准物比较可以确定抗体-标记复合物的量。如上所述，不必以绝对量测量标记的试验量，只要测试单位可与对照量比较即可。

IV.使用标记的诊断方法

标记组1或标记组2中的标记可以单独使用、与该组中的其它标记组合使用、与其中某一组标记组合使用、或全部与其它标记(如，PSA 或前列腺特异性膜抗原)一起使用，以辅助诊断前列腺癌、良性前列腺增生或做出阴性诊断。与单独使用一种标记相比，一起使用能为诊断提供更多的信息，提高真阳性和真阴性诊断的比例，以及降低假阳性或假阴性诊断的比例。

在一些实施方案中，它可有效的检测出标记存在或不存在而不需对标记进行定量。这种信息是有用的，因为在 CaP、BPH 检测和阴性诊断中，标记显示了频度上的差异。在另一些实施方案中，对标记存在或不存在的检测还包括对标记进行定量。这种信息对几个目的而言都是有用的。首先，个体标记在基于弱峰的一些情况下略微可测出，但在基于强峰的其它情况下就很容易检出。其次，在所有情况下通常都要检测象 CL3 和 CL4 这类的标记，但在 CaP 跟 BPH 及正常之间它们的相对比例是明显不同的。

当然，诊断医师应该认识到，诊断性实验是通过它们的特异性或灵敏性程度测量的。许多诊断性实验的缺点在于它们不能对每个真阳性诊断得出阳性结论，同时有一些不能对每个真阴性诊断得出阴性结论。然而，不是非常特异或灵敏的实验在诊断中是有效的，因

为与没有结果相比，它们提供了更有可能的诊断。例如，CaP 阳性的所有样品有 89%测出标记 SP1，阴性样品仅有 22%测出标记 SP1。所以，检测 SP1 是有用的，它为 CaP 提供了可能的诊断。未检出 SP1 也是有用的，因为它提供了可能的阴性诊断。另外，在与其它标记合用时，诊断医师可进一步增加他们对 CaP 或阴性诊断的把握。应该记住，标记有以下的频度分布。

A.标记组 1 精浆

图 1 是在 CaP、BPH 和阴性诊断时对标记 SP1-SP7 进行检测的图表。利用这张表，诊断医师可以将一种或多种标记的检测结果与不同置信水平的各种诊断结果相关联。与阴性诊断相比，SP1 更常在 CaP 中被检出，而较少在 BPH 中被检出(如，未检出)。SP2 在 CaP 和 BPH 中都常被检出。SP3 在 CaP 中常被检出，而在 BPH 中不常被检出。SP4 在 CaP 和 BPH 中都不常被检出。SP5、SP6 和 SP7 在 CaP 中不常被检出(如，未检出)，而在 BPH 中常被检出。

SP2 是最具差别的一个标记，在 100%的 CaP 样品中、0%BPH 样品、11%的正常样品中可测得。SP1 和 SP3 在 BPH 时未被检出，对它们的检出有助于排除这种情况。所以，检测 SP1、SP2 和 SP3 与 CaP 是高度相关的，而与 BPH 是负相关的。SP5、SP6 和 SP7 在 CaP 时未被检出。因此，检测它们就可以排除这种诊断。良性前列腺增生很难做出阳性诊断。然而，这种情况与 SP2、SP4、SP5、SP6 和 SP7 的检出及未检出 SP1 和 SP3 强烈相关。

B.标记组 2 细胞溶解产物

图 3 是在 CaP、BPH 和阴性诊断时对标记 CL1-CL4 进行检测的图表。与阴性诊断相比，标记 CL1 和标记 CL2 在 CaP 和 BPH 时都常被检出。(CL2 在阴性诊断中未被检出。)因此，检出这些标记中的任一个或两者与病理诊断是正相关的。

标记 CL3 和 CL4 在所有三种状况中都被检出。图 5A 和 5B 是在各种被测组织样品中 CL3 和 CL4 比例的表和图，包括平均比例，它显示在图 5B 的柱状图中。在气相离子分光法中，按峰高或峰面积可以确定此相对量。较好的是，根据样品中的内标物(如，11400D 的峰存在于所有样品)将检出结果归一化。如图所见，CL4:CL3 的比例大于 0.4 是与 CaP 正相关的。当比例至少是 0.75 和 1.0 时，这种诊断的置信度增加了。

C. 标记的检测：与对照物比较

对标记的检测可有效地包括将实验数据与对照作比较。对照对于对常量或对照量校准“正常”量以及定量标记的量是有效的。例如，与对照量相比，在正常与患病状况下都出现的标记是否增加 1.5 倍、2 倍、5 倍、或 10 倍，知道这些是有用的。

在一个实施方案中，对照量可以是来自于正常患者的对照样品中标记的量。对照量是在与测量试验量相同或实质上类似的实验条件下测得的。例如，如果实验样品来自于个体的精浆并用特定的探针检测标记，则最好用同样的探针检测患者精浆样品中标记的对照量。较好的是，基于一定数量的未患前列腺癌的个体(如，BPH 或阴性诊断患者)的样品检测标记的对照量，这样就可以反映该人群中标记量的变异。

D.通过计算机关联

由质谱法产生的数据可以被计算机软件有效地分析。软件包括的程序可将来自于质谱仪的信号转换成计算机可读的形式。软件还包括采用算法分析信号，以确定信号是否代表与本发明的标记或其它有用标记一致的信号的“峰”。软件还包括执行将被测样品的信号与表征“正常”、“BPH”和“CaP”的典型信号进行比较、以及确定这两个信号间适合紧密性的算法。软件还包括指出被测样品最接近哪个，由此做出可能的诊断。

V.试剂盒

另一方面，本发明提供了辅助诊断前列腺癌的试剂盒，其中，试剂盒可用来检测本发明的标记。例如，试剂盒可用来检测上述任一标记或它们的组合，这些标记在前列腺癌、BPH 或正常患者的样品中出现差别。本发明的试剂盒有多种用途。例如，试剂盒可用来鉴别患有前列腺癌、BPH 的个体或阴性诊断的个体，故而可辅助前列腺癌的诊断。在另一个实施例中，试剂盒可以用来鉴定能调节标记在体外前列腺细胞或前列腺癌的体内动物模型中的表达的化合物。

在一个实施方案中，试剂盒包括：(a)其上含有吸附剂的基质，其中的吸附剂适合与标记结合，以及(b) 洗涤溶液或用于制造洗涤溶液的说明，其中吸附剂与洗涤溶液的组合使得可以用气相离子分光法检测标记。可以用上述材料制造这种试剂盒，前面关于这些材料(如，探针基质、吸附剂、洗涤溶液等)的讨论在这一节中是完全适用的，不必赘述。

在一些实施方案中，试剂盒可包括其上含有的吸附剂的第一个基质(如，用吸附剂功能化的粒子)和第二个基质，其上可以放置第一个基质以形成可拆卸地插入气相离子分光计的探针。在另外的实施方案中，试剂盒可以包含以可拆卸地插入的探针形式存在的单一基质，基质上有吸附剂。

较为理想的，试剂盒可进一步包括以标签或独立插页形式存在的对合适的操作参数的说明。例如，试剂盒可以含有标准说明，告诉消费者在精浆样品与探针接触后怎样洗涤探针。

在另一个实施方案中，试剂盒包括(a)与标记特异性结合的抗体；以及(b)检测试剂。可以用上述材料制造这种试剂盒，前面关于这些材料(如，抗体、检测试剂、固定化载体等)的讨论在这一节中是完全适用的，不必赘述。

在任一实施方案中，较为理想的，试剂盒可进一步含有标准物或对照物的信息，这样被测样品就可以与对照信息进行比较，以确定在样品中测得的标记的试验量是否是俘获前列腺癌的诊断的诊断量。

实施例

以下的实施例显示了与前列腺癌或良性前列腺增生呈正相关或负相关的两组标记的鉴别。第一组标记是从精浆样品测定的。第二组标记是以用激光俘获显微解剖分离的细胞溶解产物样品测定的。

I.组织和精液样品

组织和精液样品是从弗吉尼亚前列腺中心的组织和体液库(Virginia Prostate Center tissue and body fluid bank)中获得的。前列腺组织样品是在外科手术时获得的，并立即冷冻在液氮中于-80℃保存。精液是在获得许可之后从泌尿科患者中收集的。精液样品按上述步骤处理并保存在-80℃。精液样品可以在收集后立即处理或先保存在-80℃直至处理时为止。处理时，将精液样品与一半体积的稀释缓冲液(pH 8.0)混合，稀释缓冲液中含有 123mM NaCl，5mM KCl，1mM $MgSO_4$，37mM Tris，1mM EDTA 和 2.5mM 的丝氨酸蛋白酶抑制剂混合物(PMSF 或 PEFABLOC)。然后将样品漩涡搅拌以确保完全混合，在 25，000xG

下离心 5 分钟，将上清分成 100μl-500μl 的等分量并保存在-80℃。

II. 激光俘获显微解剖

用 PixCell™ 激光俘获显微解剖显微镜(Arcturus Engineering 公司，Mountain View, CA)从冷冻的组织切片中获得正常细胞群与前列腺癌细胞群，基本如 Emmert-Buck 等人的描述(“Laser capture microdissection”，*Science* 1996; **274**:998-1001)。也可以参见美国专利第 5，843，644 号(Liotta 等)以及美国专利第 5，843，657 号(Liotta 等)。

III. 激光解吸/电离质谱法

用激光解吸/电离质谱法分析样品。所用系统是 Ciphergen Biosystems 公司(Palo Alto, CA)的 PBSI 或 PBSII 型。这些系统采用 337.1nm 的氮激光。脉宽为 4 纳秒。系统的最大能量输出约为每次脉冲 150 微焦耳。然而，在这些研究中，使用的是每次脉冲约 1-25μJ 的光能。

IV. 精浆中的标记

A. 精浆处理方案

1. 血清和精浆

将血清样品稀释(20μl 稀释在 30μl 含有 8M 尿素、1%CHAPS 的 PBS 溶液中)并用 cibracon blue spin column 除去白蛋白。将精浆(SP)样品稀释(用 30μl 含有 9.5M 尿素、2%CHAPS、50mM pH9.5 Tris 的缓冲液稀释 20μl SP)，再以 1：9 的比例用 50mM 的 HEPES 进一步稀释。对于每一种样品类型，取 5μl 加样于 SAX、Cu-IMAC 或混合模式(阴离子及疏水表面)的 ProteinChip™ 阵列，并以芥子酸作为基质进行质量分析。

2. 精浆的制备

1. 收集精浆样品，将细胞除去并加入蛋白酶抑制剂。将样品分成等分并储存在-70℃。

2. 用 BCA 法测定蛋白浓度并将每一种样品用结合缓冲液(见下)稀释至 23mg/ml 的浓

度以使其标准化。

3. 以14K使样品快速旋转2分钟后，用含有20mM pH9.0的Tris、0.4M NaCl和0.1%Triton X100的结合缓冲液将上清稀释至100微升。(90μl浓的经调节的精浆，10μl 5M NaCl、1μl 10%的Tx100)然后将样品在冰上放置30分钟。

3. 制备大小选择柱并进行大小分级

1. 打开K30自旋柱的出口盖。将柱子放进2ml的螺旋盖试管中。

2. 打开自旋柱的顶盖。在室温下以3000rpm(720g)旋转该柱3分钟。柱基质将压紧并半干，但不裂开。

3. 将自旋柱移至新的2ml试管中。向柱基质中心缓慢加入30μl稀释过的精浆。不要让样品在基质侧面流下。

4. 以3000rpm将柱离心3分钟。试管中收集了分级的蛋白质。这就是级分1。

5. 将自旋柱移至新的试管中。向柱子中加入30μl结合缓冲液(20mM pH9的TRIS、0.4M NaCl、0.1%Tx)并如上旋转。这就是级分2。

6. 重复步骤5并收集另外两种级分。

7. 收集所有的4种级分。将级分保存在冰上。

4. 为蛋白质分级制备阴离子交换柱

1. 将上述经大小选择的级分1、2和级分3、4混合。用结合缓冲液(例如，你将得到约50-60μl的总体积，加60-70μl的结合缓冲液)将总体积调节至120μl。这就是标记过的UN(未分级的)。

2. 打开阴离子交换Q柱的出口盖。放进2ml试管中。打开顶盖。

3. 以1000rpm(80g)将柱子离心1分钟。柱基质将压紧，但不裂开。

4. 将柱子移至新的2ml试管中。向基质中心缓慢加入90μl混合的级分样品(两份，F1&2和F3&4)。将样品于室温下温育5分钟。

5. 以 1000rpm 将柱子离心 1 分钟。收集柱中的蛋白质是流出的级分。由于这些蛋白质在结合缓冲液中是中性的或带有正的净电荷故不和柱子结合，或者是由于树脂的容量问题而导致它们流出。

6. 为获得最大量的蛋白质，柱子可以再加洗脱剂，在室温下温育 3 分钟，按上述方法离心。流出液就是级分 Q1。

7. 将柱子移至新的试管中。用 100μl 的结合缓冲液洗涤柱子，在室温下温育 3 分钟，按上述方法离心。重复这一步骤。共收集 200μl，这就是级分 Q2。

8. 将柱子移至第三根试管中。甲 100μl 洗脱用缓冲液 A(pH8.0)，在室温下温育 3 分钟，按上述方法离心。流出液就是级分 Q3。

9. 继续这一过程以用洗脱用缓冲液(缓冲液 B-E, pH7-4)获得随后的级分。

10. 对于每一个样品，经大小和阴离子柱后收集 16 种级分。UN(1+2)、nl(1+2)、Q2(1+2)、Q4(1+2)、Q5(1+2)、Q6(1+2)、Q7(1+2)、UN(3+4)、Q1(3+4)、Q2(3+4)、Q3(3+4)、Q4(3+4)、Q5(3+4)、Q6(3+4)、Q7(3+4)。

5. 对精浆级分进行 SELDI 处理

1. 在正相芯片(Normal Phase Chip)上将每一级分点上 2μl。在点样之前在每一阵列周围画一疏水圈。使其完全干燥，然后以含有 0.5%TFA 和 0.6%Triton X 的 50%的乙腈作为溶剂，点 0.5μl SPA 基质，共点两次。

2. 在激光强度为 15，灵敏度为 10，有滤光片时阅读芯片以进行低分子量阅读，并在激光强度为 50 且有滤光片时阅读芯片以进行高分子量收集。收集 70 枪(shot)以得到组合平均光谱(在 7 个区域收集 10 枪，即 20-80)。

6. 结果

观察每次阅读的光谱并使用滤光片(对 L-15 和 L50 分别使用 50 和 150 是合适的)。设置 5 倍噪音，使用峰自动鉴别模式。

从九名 CAP(前列腺癌)、九名 BPH(良性前列腺增生)、和九名 NR(前列腺正常)患者

中收集数据。分析数据，每次一个级分。观察到七个潜在的生物标记。图 2A-2G 是来自于阴性、BPH 和 CaP 样品的典型图谱，显示了以下的标记：标记 SP1：9,402.68±8.97Da；标记 SP2：26,155.30±202.01Da；标记 SP3：54,979.27±408.78Da；标记 SP4：9,752.30±15.08Da；标记 SP5：87,66.93±14.44Da；标记 SP6：62,77.97±12.36Da 和标记 SP7：2,781.72±4.41Da。

V. 来自前列腺上皮组织的细胞溶解产物中的标记

以使用金属螯合吸附剂或亲水性吸附剂的 SELDI 鉴定来自前列腺上皮组织的细胞溶解产物的标记。将总数为 2000-3000 个显微解剖的细胞溶解在 5-10μl 存在于缓冲液中的 5M 异硫氰酸胍中，或 20mM 含有 0.1%Triton X-100 的 HEPES 中。然后将整个溶解产物点在 IMAC3(镍金属螯合物)或 SAX2(强阴离子交换剂：季铵)ProteinChip™ 阵列上，洗涤。以α-氰基-4-羟基肉桂酸作为吸收能量的分子在 SELDI PBSI 中进行质量分析。芯片和质谱仪是从 Ciphergen Biosystems 公司(Palo Alto, California)获得的。

A. IMAC3 蛋白质芯片

1. 步骤

1. 在芯片上每一个吸收剂斑点周围画一个疏水圈。

2. 点 10μl 50mM 的 $NiSO_4$。将芯片在保湿室中温育 5 分钟，摇动。重复这一步骤。

3. 在斑点周围用 DI 水洗涤芯片 10 秒钟，除去多余的水。

4. 点 5μl 结合缓冲液(20mM Tris pH7.5、0.1%Triton X100、0.5M NaCl)。将芯片在保湿室中温育 5 分钟，摇动。

5. 用 Kim wipe 纸巾小心除去结合缓冲液。

6. 直接在盖子上将显微解剖的细胞(500-1000 枪)溶解在 5μl 的 20mM HEPES+0.1% NP 40 中。在细胞上端用移液管反复吸取溶解缓冲液直至溶解作用发生。将细胞溶解产物涡流搅拌 1 分钟然后旋转减慢。

7. 将整个溶解产物(5μl)点在斑点上并在保湿室中温育 30 分钟至一小时。

8. 用 5μl 结合缓冲液将每个斑点洗涤 5 次，或整批洗涤。

9. 用 5μl 水洗涤两次。

10. 在斑点仍湿润时，以 0.5μl SPA 或 CHCA(溶解在 50%ACN、0.5%TFA 和 0.06% Tx 中)点两次。

11. 空气干燥。

2. SELDI 阅读器数据收集

1. 在 Ciphergen Biosystems PBSI 上以激光强度为 15、30 和 50(无滤光片)收集峰，并在 PBSII 上以激光强度为 230 和 260、检测器灵敏度为 10 时收集峰。收集 70 枪并计算平均值。

2. 用内标物进行峰强度的归一化：即，在所有被测标本中某一峰以同一水平(或大概以同一水平)出现。

注意：

LCM 样品平均有 1000 枪，这相当于 2000-3000 个细胞。

B. SAX-1 蛋白质芯片

1. 步骤

1. 在阵列上每一个吸收剂斑点周围画一个疏水圈。

2. 点 5μl 20mM Tris pH7.5+0.1%Triton X100(结合缓冲液)。将芯片在保湿室中温育 30 分钟。重复一次。

3. 直接在盖子上将显微解剖的细胞溶解在 5μl 5M 的 GITC 缓冲液中。在细胞上端用移液管反复吸取溶解缓冲液直至溶解作用发生。

4. 以 1：10 的比例用结合缓冲液将溶解产物稀释至总体积为 10μl。溶解产物点样 4μl 并在保湿室中温育 30 分钟至一小时。除去多余的样品并用另外的 4μl 溶解产物重复这一步骤。

5.用5μl结合缓冲液(20mM TRIS pH7.5、0.1%Triton X100)洗涤每个斑点共5次。用5μl水洗涤共两次。

6.当斑点仍湿润时，以0.5μl CHCA(溶解在50%ACN、0.5%TFA中)点两次。

7.空气干燥。

C.结果

图4A-4C是来自于阴性、BPH和CaP样品的典型图谱，显示了有用的以下标记：标记CL1：8，494.30±10.24Da，标记CL2：9，614.62±52.19Da，标记CL3：28，472±127.40Da，和标记CL4：33，386.85±160.47Da。图5A的图表显示了在各个样品中CL4:CL3的相对量。图5B的柱状图显示了带有统计误差的这些比例。

本发明使用在前列腺癌患者样品和未患前列腺癌个体(例如，良性前列腺增生)样品中存在差异的标记，为辅助前列腺癌的诊断提供了新的材料和方法。虽然提供了特别的实施例，上面的描述只是为了阐述而不是限制。前面描述的实施方案中的任何一个或更多的特征都可以任何方式与本发明任何其它的实施方案中的一个或更多的特征相结合。另外，本发明的任何变化对熟练掌握本技术的技术人员而言，在看过此说明书之后都是显而易见的。因此，本发明的范围不应局限在上面所描述的范围之内，相反，它应由所附的权利要求以及等价的全部范围所决定。

这里以同等程度全文并入本说明书中所提到的所有出版物和专利文件，以供参考，这就仿佛每个出版物或专利文件都被单独表述。在这一文件中引证了各种参考资料，但申请人并不认为任何特殊的参考资料对他们的发明而言是“先有技术”。

在液浆中检测的与前列腺癌症相关的蛋白质

蛋白质	洗涤	质量(Da) (平均+/_标准差)	CAP (N=9)	CAP中 阳性百分比	BPH (N=9)	BPH中 阳性百分比	NR (N=9)	NR中阳性 百分比
SP1	1+2,Q6-L15	9402.68 +/- 8.97	8/9	89%	0/9	0%	2/9	22%
SP2	1+2,Q6-L15	26155.30 +/- 202.01	9/9	100%	2/9	22%	1/9	11%
SP3	3+4,Q1-L50	54979.27 +/- 408.78	6/9	67%	0/9	0%	1/9	11%
SP4	1+2,UN-L15	9752.30 +/- 15.08	2/9	22%	3/9	33%	7/9	78%
SP5	1+2,UN-L15	8766.93 +/- 14.44	0/9	0%	3/9	33%	8/9	89%
SP6	1+2,UN-L15	6277.97 +/- 12.36	0/9	0%	2/9	22%	7/9	78%
SP7	1+2,Q2-L15	2781.72 +/- 4.41	0/9	0%	3/9	33%	7/9	78%

* 所有样品都是在正相芯片上测量的
*1+2, Q6-L15 ===> 用洗脱缓冲液(20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 5.0), 激光强度15
*3+4, Q1-L50 ===> 用结合缓冲液(20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0), 激光强度50
*1+2, UN-L15 ===> 用结合缓冲液(20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0), 激光强度15
*1+2, Q2-L15 ===> 用结合缓冲液(20mM Tris-HCl, 5mM NaCl, pH 9.0), 激光强度15

图 1

图 2A SP1: 9,402 Da

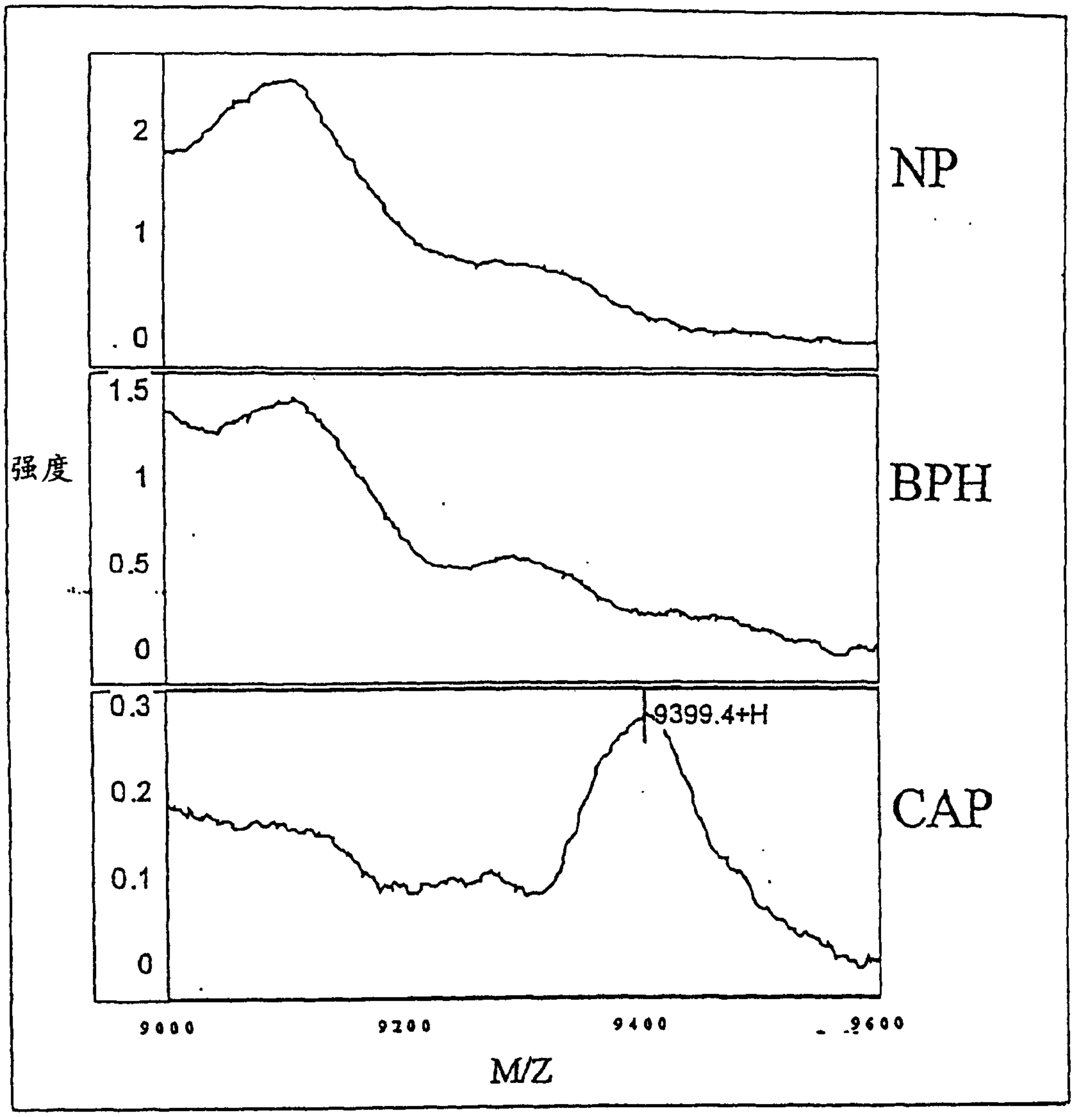


图 2

CAP、BPH、正常(NR)个体精液浆中SP标记的典型质谱

A. SPI，B. SP2，C. SP3，D. SP4，E. SP5，F. SP6和

G. SP7

图 2B SP2: 26,155 Da

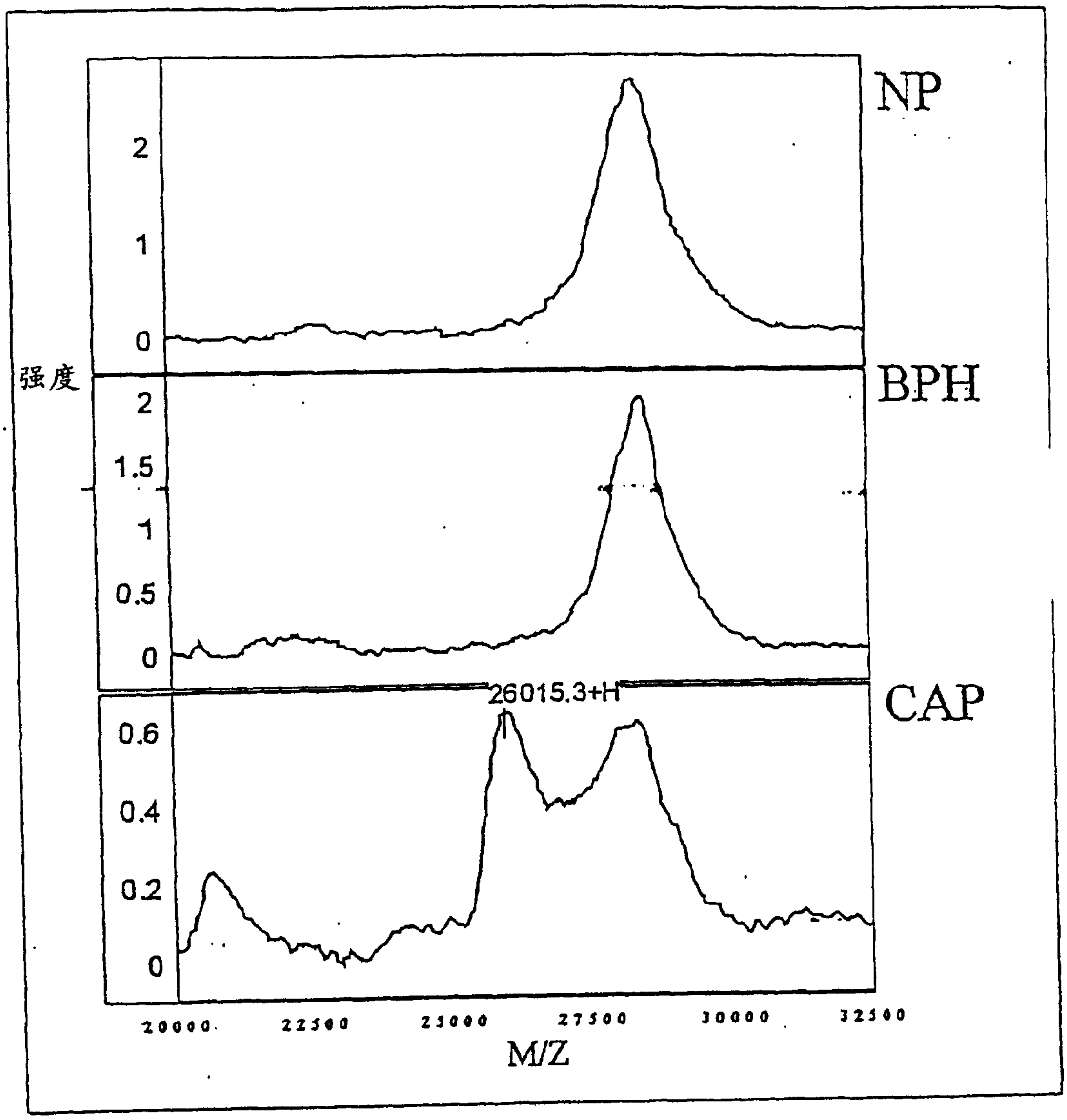


图 2C SP3: 54,979 Da

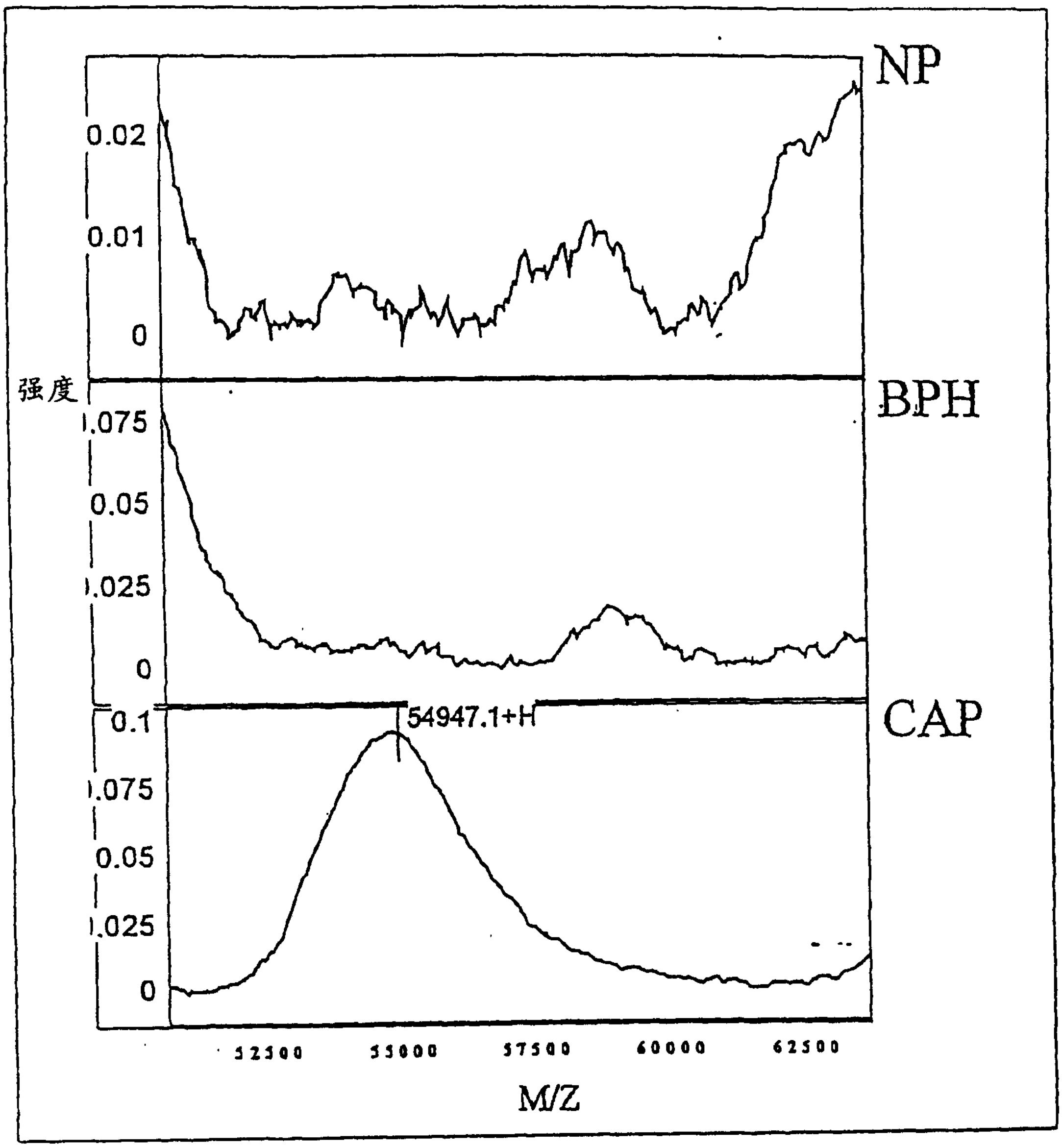


图 2D SP4: 9,752 Da

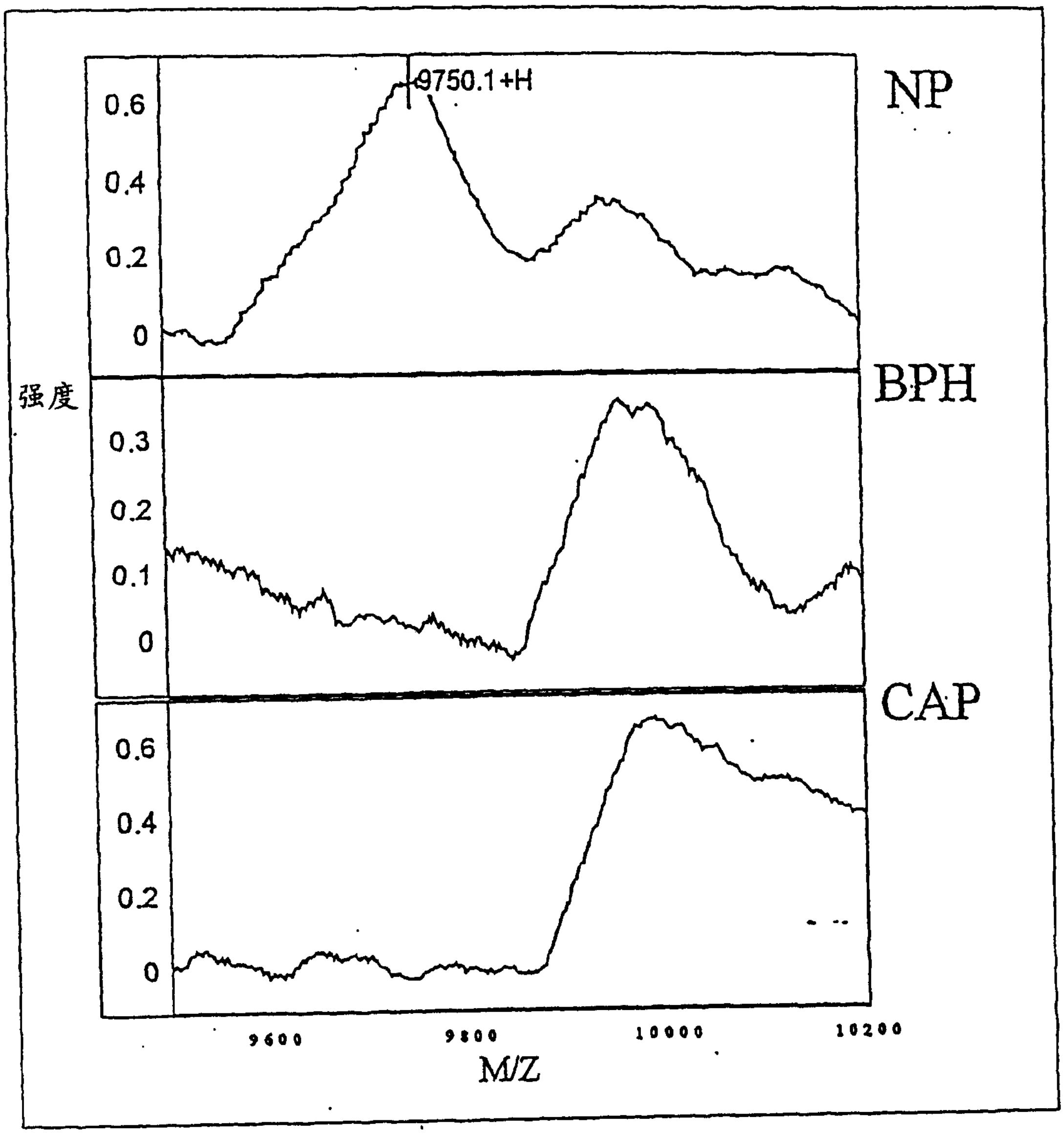


图 2E SP5: 8,766 Da

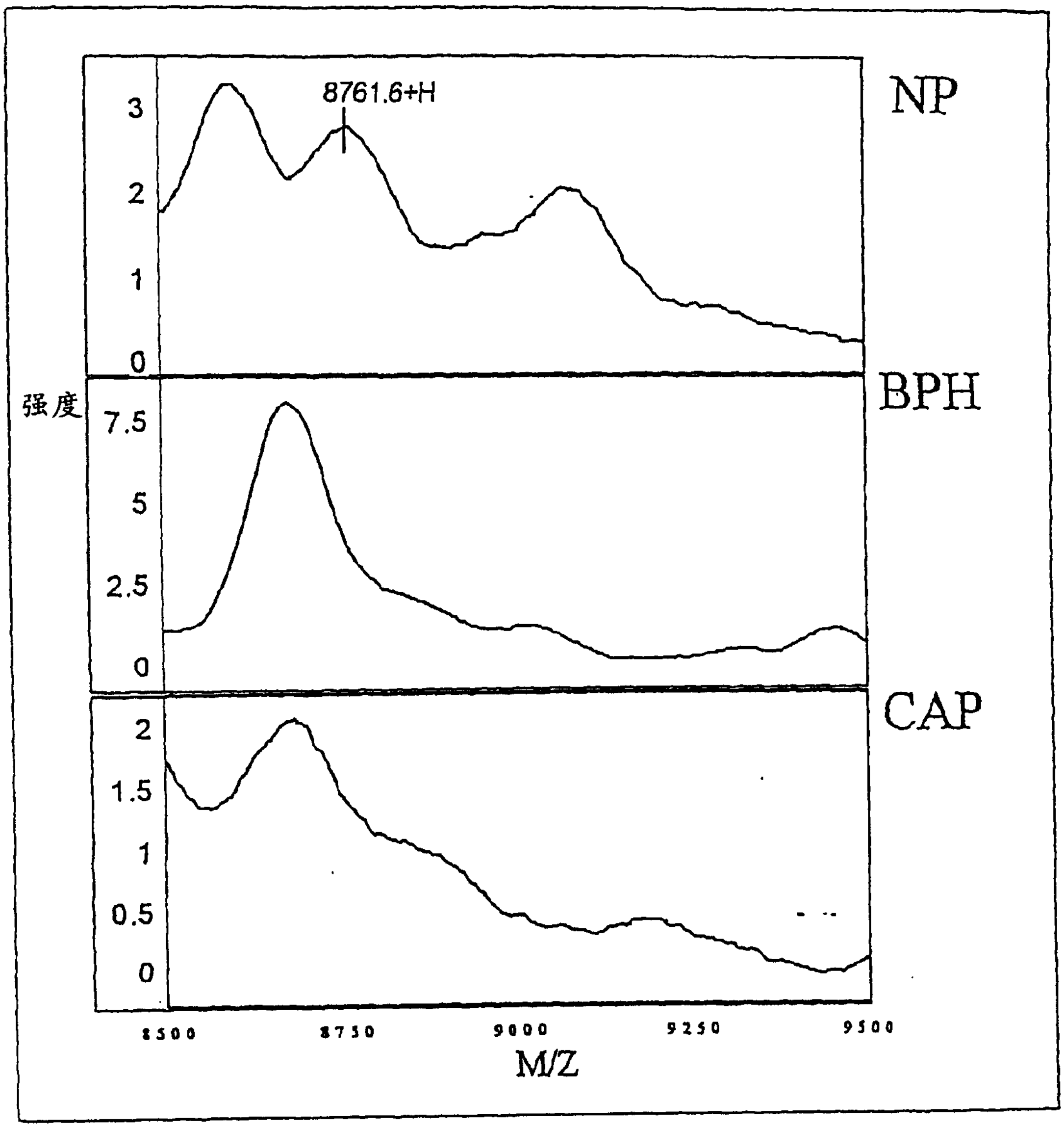


图 2F SP6: 6,277 Da

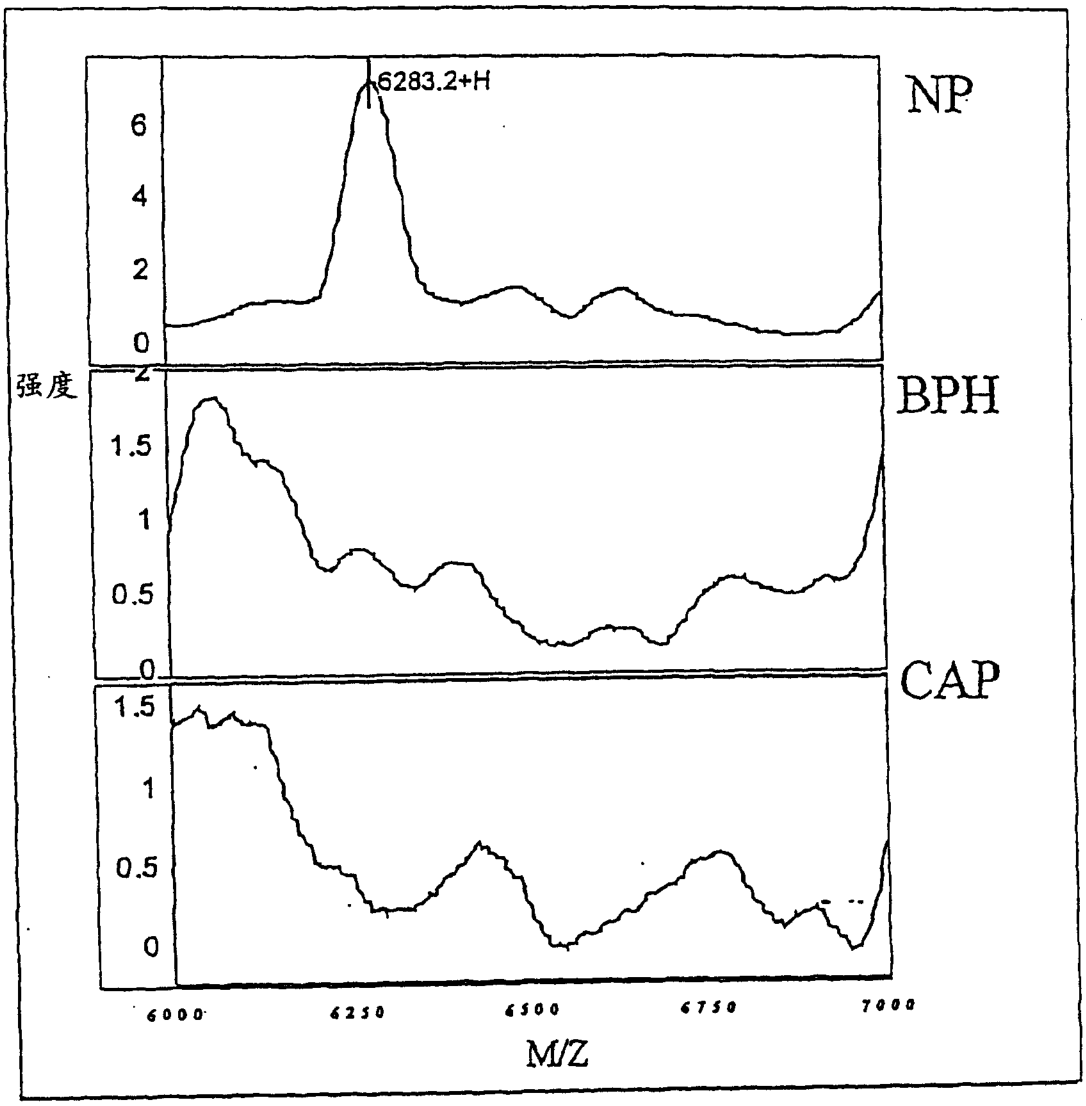
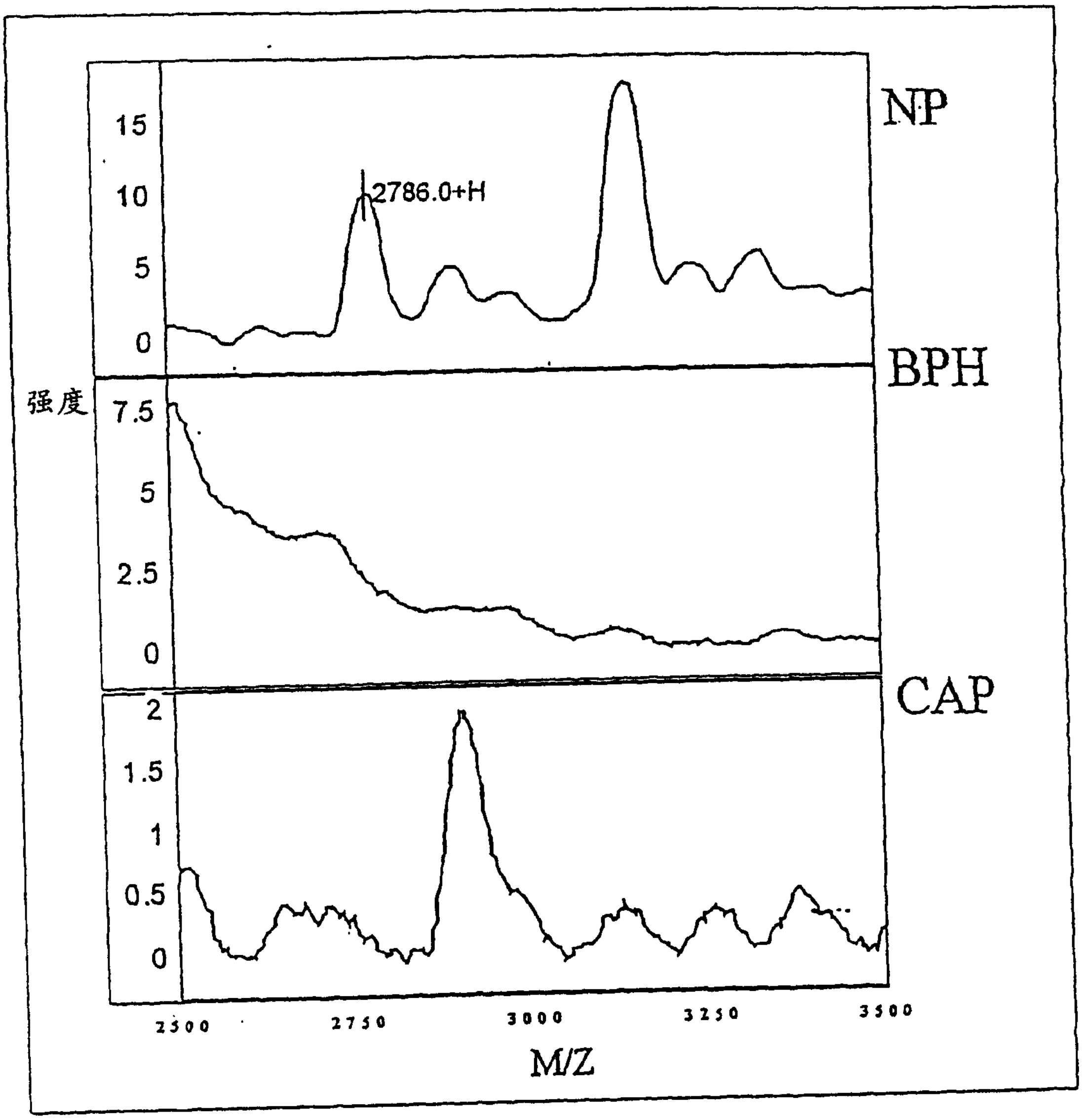


图 2G SP7: 2,781 Da

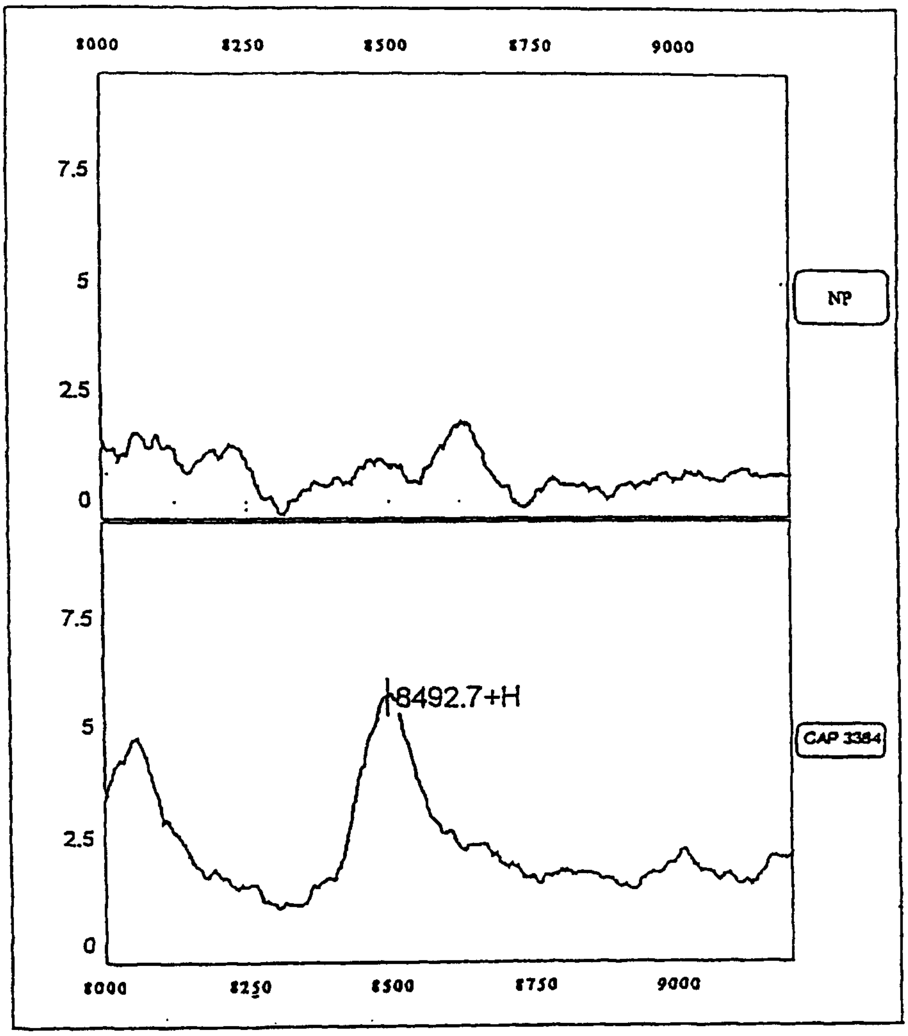


ICM显微解剖细胞溶解产物中对前列腺癌相关蛋白质的检测

蛋白质#	质量 ±	阳性例数/试验例数			阳性百分比		
		NPr	BPH	CAP	NPr	BPH	CAP
CL1	8,494.30 ± 10.24 Da	4/16	4/8	12/15	25%	50%	80%
CL2	9,614.62 ± 52.19 Da	0/16	2/8	9/15	0%	25%	60%
CL3	28,472.15 ± 127.40 Da	14/15	9/9	16/16	93%	100%	100%
CL4	33,386.85 ± 160.47 Da	9/15	6/9	14/16	60%	67%	93%

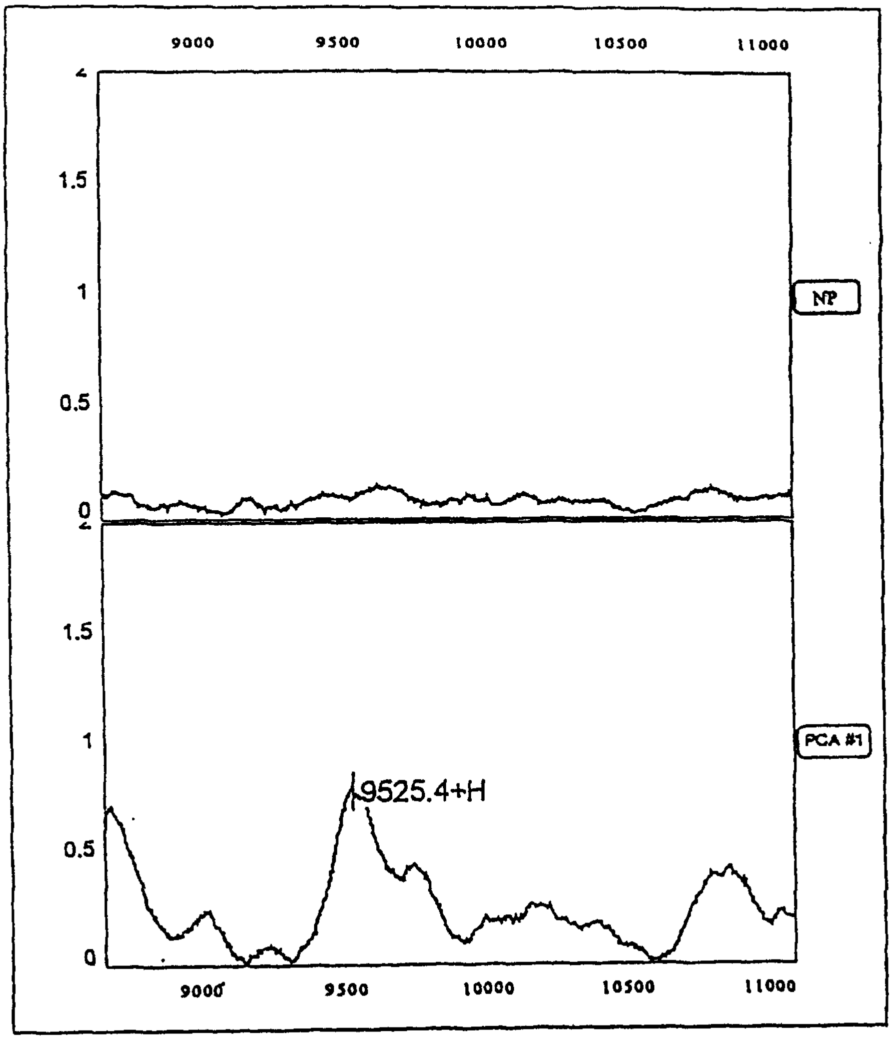
数据是以CHCA或SPA在MAC3或SAXⅡ芯片表面收集的。任一表面都可以用来检测这些标记，但SAXⅡ给出的结果较好对低分子量的标记应使用CHCA，使用SPA检测28kDa和33kDa的标记时，IMAC3是优选的表面。

图 3



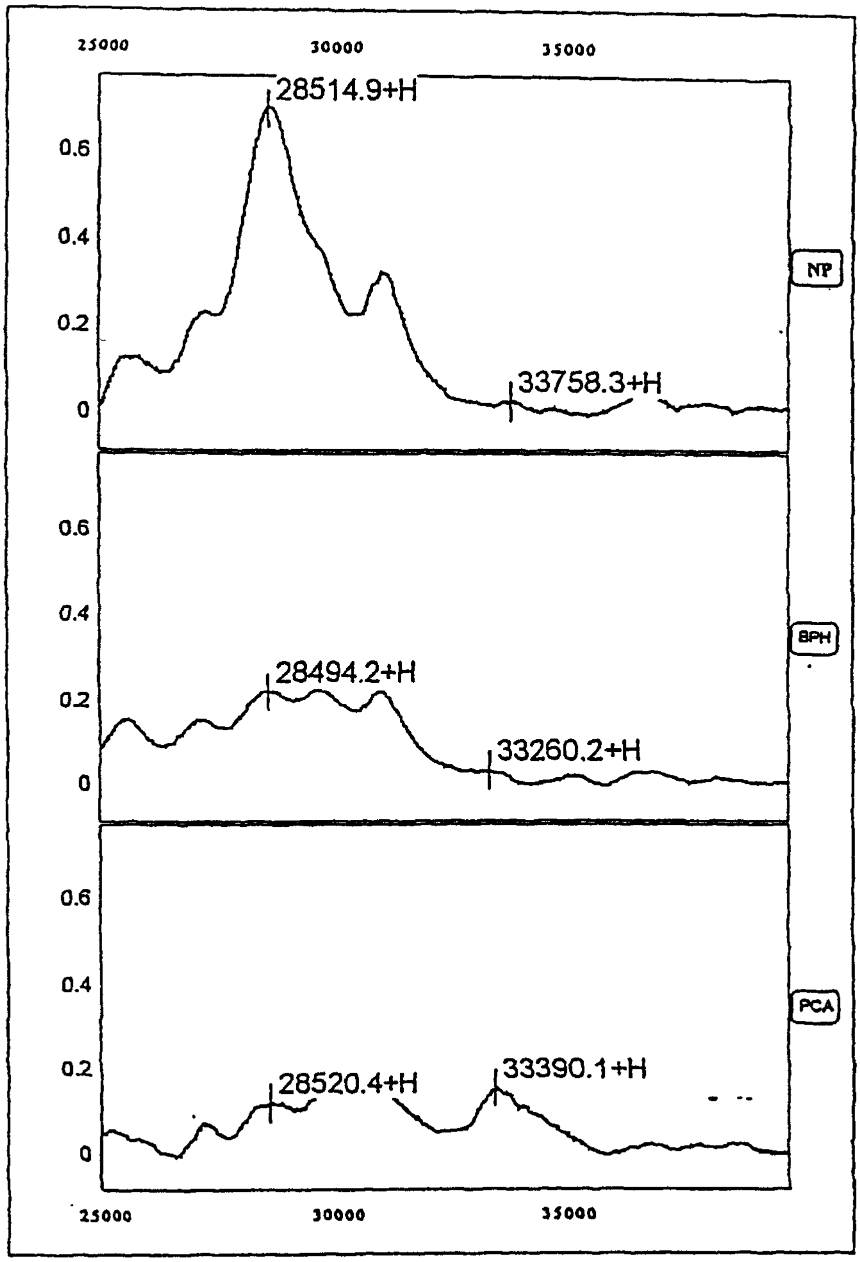
与来自相同的前列腺切除标本的正常(NPr)细胞溶解产物比较，前列腺癌(CAP)细胞溶解产物中8.5kDa蛋白质过度表达的典型实例。

图 4A



与来自相同的前列腺切除标本的正常(NPr)细胞溶解产物比较，前列腺癌(CAP)细胞溶解产物中8.5kDa蛋白质过度表达的典型光谱。

图 4B



与良性前列腺增生(BPH)和正常(NPr)的显微解剖细胞比较，前列腺癌(CAP)细胞溶解产物中28和33KDa蛋白质表达差异的典型图谱

图 4C

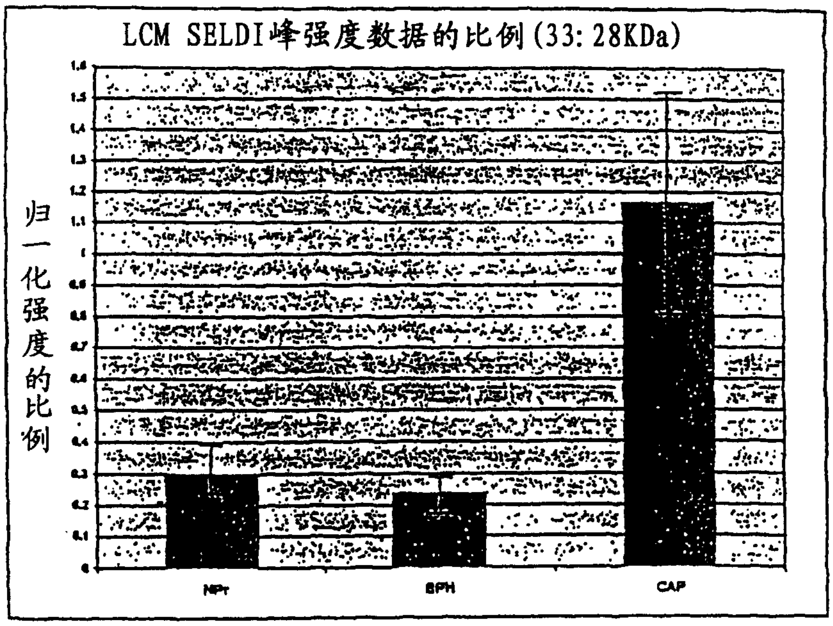
28KDa与33KDa蛋白质的比例

组织*	NP	BPH	CAP
CA3408	0.042		1.320
CA3409	0.214	0.264	
CA3411	1.049		4.139
CA3412	0.425		0.200
CA3413	0.297	0.416	1.270
CA3414	0.206	0.020	
CA3420	0.050	0.154	0.412
CA3422	0.131	0.266	0.676
CA3424	0.122	0.142	0.752
CA3435	0.204		1.073
CA3432	0.444	0.395	1.256
CA3442	0.416		0.568
平均	**0.300**	**0.237**	**1.167**
标准误差	**0.079**	**0.054**	**0.352**
+ 标准误差	0.379	0.291	1.519
- 标准误差	0.221	0.183	0.814

CAP vs. NP = <0.017; CAP vs. BPH = p <0.045

* 匹配样品

图 5A



蛋白质的平均比例(8/9或88.9%的CAP患者这一比例是超过0.40这一比例限度)

图 5B

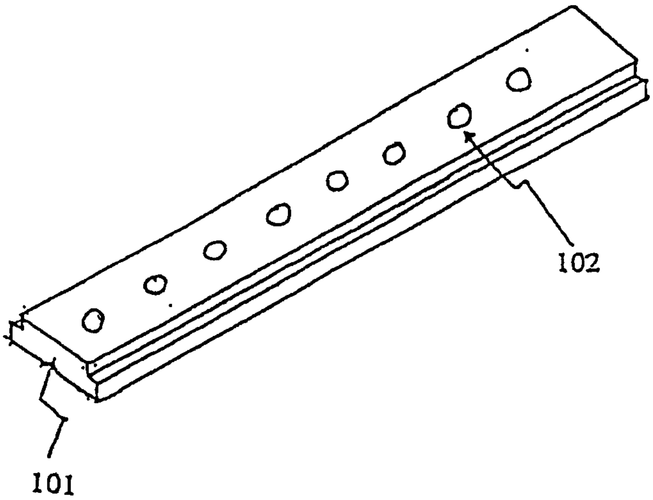


图 6

专利名称(译)	前列腺癌标记		
公开(公告)号	CN1426536A	公开(公告)日	2003-06-25
申请号	CN01808736.1	申请日	2001-03-19
[标]申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
当前申请(专利权)人(译)	东弗吉尼亚医学院		
[标]发明人	GL小赖特		
发明人	G·L·小赖特 B·L·亚当 L·H·卡扎尔斯		
IPC分类号	G01N27/62 G01N30/02 G01N33/53 G01N33/574 G01N33/68 G06F19/00 C07K14/82 C07K14/47		
CPC分类号	G01N33/57434		
代理人(译)	陈文青		
优先权	60/190725 2000-03-20 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了可有效鉴别前列腺癌、良性前列腺增生和阴性诊断的有机生物分子标记(例如，蛋白质类)。