

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200410101309.6

G01N 33/68

G01N 33/48

G01N 1/38

G01N 27/447

G01N 30/02

G01N 35/00

[43] 公开日 2005 年 6 月 22 日

[11] 公开号 CN 1629638A

[22] 申请日 2004. 12. 16

[21] 申请号 200410101309.6

[30] 优先权

[32] 2003. 12. 18 [33] EP [31] 03104775.6

[71] 申请人 弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

[72] 发明人 P·伯恩特 S·埃弗斯 H·朗根

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

权利要求书 2 页 说明书 15 页 附图 3 页

[54] 发明名称 通过系列组合稀释定量

[57] 摘要

本发明提供了用于对生物分子的复杂混合物中定量生物分子的方法，其包括将生物分子混合物分级以提供至少两个级分，其中每个级分具有至少一种不同组分。这些级分随后接受系列组合稀释。接着，通过提供了灵敏度阈和鉴定信息的方法使在级分中的生物分子得以检测和鉴定。通过考虑各自的稀释因子，加和各个稀释水平上各个级分中鉴定的生物分子数目，生物分子的量得以确定。为了归一化，用此和除以所有稀释水平上所有级分中所有生物分子的鉴定总数目。

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

1. 用于在生物分子的复杂混合物中定量生物分子的方法，所述方法包括：

a. 提供来自于对生物分子的混合物进行分级获得的至少两种级分，其中所述每一级分包含至少一种不同的组分，

b. 将所述级分进行系列组合稀释，

c. 通过提供灵敏度阈和鉴定信息的方法检测和鉴定在每一初始级分和每一稀释级分中的生物分子，以及

d. 通过考虑各自的稀释因子，加和每一稀释水平上每一级分中生物分子的鉴定数目，从而定量复杂混合物中的生物分子。

2. 根据权利要求1的方法，其中将 d)的和除以全部稀释水平上全部级分中全部生物分子的鉴定总数目。

3. 根据权利要求1或2的方法，其中 a)的级分数目取决于生物分子混合物的复杂度。

4. 根据权利要求1或2的方法，其中 a)的级分数目取决于生物分子的复杂混合物中不同生物分子的浓度。

5. 根据权利要求1或2的方法，其中 a)的级分数目取决于 c)的检测和鉴定方法。

6. 根据权利要求1到5中任意一项所述的方法，其中 b)的稀释水平数目取决于级分中生物分子的起始浓度。

7. 根据权利要求1到5中任意一项所述的方法，其中 b)的稀释水平数目取决于分级后级分的数目。

8. 根据权利要求1到5中任意一项所述的方法，其中 b)的稀释水平数目取决于检测和鉴定方法的检测限度。

9. 根据权利要求1到8中任意一项所述的方法，其中生物分子至多存在于 $n-1$ 个级分中，其中 n 是级分的总数并且其中 n 等于或大于 2。

10. 根据权利要求1到8中任意一项所述的方法，其中生物分子存在

于两个级分中。

11. 根据权利要求 1 到 8 中任意一项所述的方法，其中生物分子存在于一个级分中。

12. 根据权利要求 1 到 11 中任意一项所述的方法，其中 c) 的检测和鉴定方法包括双向凝胶电泳。

13. 根据权利要求 12 的方法，其中 c) 的检测和鉴定方法额外包括质谱分析。

14. 根据权利要求 1 到 11 中任意一项所述的方法，其中 c) 的检测和鉴定方法包括免疫检测法。

15. 根据权利要求 1 到 11 中任意一项所述的方法，其中 c) 的检测和鉴定方法包括结合质谱的气相色谱法。

16. 根据权利要求 1 到 11 中任意一项所述的方法，其中 c) 的检测和鉴定方法包括使用特定标记分子的电泳法。

17. 根据权利要求 1 到 16 中任意一项所述的方法，其中 a) 的级分通过色谱分级法、超速离心法、蛋白沉淀法或免疫沉淀法分离。

18. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是多肽。

19. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是多核苷酸。

20. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是碳水化合物。

21. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是脂类。

22. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是糖蛋白。

23. 根据权利要求 1 到 17 中任意一项所述的方法，其中生物分子是脂蛋白。

通过系列组合稀释定量

本发明涉及用于生物分子的复杂混合物中生物分子的定量方法，方法包括将复杂混合物分级为级分，随后将级分进行系列组合稀释以及通过具有定义的灵敏度阈和鉴定能力的方法检测每一初始级分和每一稀释级分中的生物分子。

当前用于生物分子（例如蛋白）的检测方法是进行双向凝胶电泳并随后对经染色凝胶进行容量分析。然而，很难确定被分析的生物分子的量，尤其是如果要比较它在不同样品中的量时。为了解决样品间生物分子浓度的不同，凝胶必须平行处理并且必须进行凝胶对凝胶的匹配。

需要一种用于生物分子的复杂混合物中对生物分子定量的简单方法。

本发明提供了一种用于生物分子的复杂混合物中定量生物分子的方法，其包括：

- a. 提供来自于对生物分子的复杂混合物进行分级获得的至少两种级分，其中所述每一级分包含至少一种不同的生物分子组分，
- b. 将所述级分进行系列组合稀释步骤，
- c. 用具有稳定的和充分定义的灵敏度阈和鉴定信息的方法检测和鉴定在每一初始级分和每一稀释级分中的生物分子，以及
- d. 通过考虑各自的稀释因子，加和每一稀释水平上每一级分中生物分子的鉴定数目，从而定量生物分子复杂混合物中的生物分子。

为了归一化，可以用 d) 的总数除以全部稀释水平上全部级分（初始级分和稀释级分）中全部生物分子的鉴定总数目。

用于定量生物分子的本发明方法提供了将来自一种来源的生物分子复杂混合物中一种或多种生物分子与来自其它来源的复杂混合物中相应的分子进行比较的相对定量法。

生物分子的复杂混合物可以来自任何来源，包括生物来源，生物来源包括细胞、细胞培养上清液、生物液体例如血清、血浆、尿、支气管灌洗液、痰液、活组织解剖物像脑脊髓液。生物分子的复杂混合物包含至少两种不同生物分子。本发明中的生物分子可以是任何生物分子，包括多聚核苷酸、多肽、碳水化合物、脂类、糖蛋白、脂蛋白、或它们的其它修饰形式或代谢物。检测和鉴定方法可以限制为对单种生物分子进行检测和鉴定，或一次可以检测和分析几类生物分子。

用于本发明方法的分级方法应该有效地将生物分子的复杂混合物分离为不同级分。优选地，生物分子的复杂混合物被分级成不同级分，使得每一不同的生物分子至多仅存在于 $n-1$ 个级分中，其中 n 是级分的总数并且 n 等于或大于 2。优选地，不同生物分子存在于两个不同的级分中，更优选地在一个级分中。可以用于本发明的分级方法可以选自适用于目标种类生物分子复杂混合物分离的任何方法。可以用于本发明方法的分级方法可以选自基于吸附、重力或沉降速度的分级方法、电泳分级方法或这些方法的组合。例如，在蛋白作为目标分子的情况下，所述分级方法包括但不限于色谱分级法、超速离心法、蛋白沉淀法、亲和纯化法或免疫沉淀法。在肽（例如从蛋白水解消化物得到）作为目标分子的情况下，所述分级方法包括但不限于高压液相色谱法（HPLC）。

级分然后用以系列的组合稀释。所述系列组合稀释要求至少两种级分来开始。优选地，将生物分子的复杂混合物分级为尽可能多的级分，以允许在接着的检测步骤中检测和鉴定足够数量的不同目标生物分子。优选地，初始级分的数目不是素数，更优选地初始级分的数目是偶数，并且优选地，每一初始级分包含至少一种不同的组分。

用来开始系列组合稀释的级分的数目取决于生物分子混合物的复杂度，取决于生物分子复杂混合物中的单个生物分子的浓度、分离方法的效率，以及取决于分级和系列组合稀释后使用的检测和鉴定方法。

对于系列组合稀释，将至少两种不同的包含至少一种不同生物分子的级分进行合并。优选地，合并两种级分。这将改变合并的级分中生物分子

的浓度，所述合并级分中生物分子的浓度为将每一级分中生物分子浓度与每一级分的体积相乘所获得的点值除以所有合并级分总体积的比值。一般的，和初始级分中的各个生物分子的最大浓度相比较，这将导致稀释的级分中任何生物分子组分的更小浓度。在下面的稀释步骤中，将单个蛋白质的浓度降低至低于接着进行的检测和鉴定方法的灵敏度阈。

稀释步骤的数目取决于初始级分中生物分子的起始浓度、分级后初始级分的数目以及检测和鉴定方法的检测限。

本发明方法还包括检测和鉴定方法。检测方法必须描述明确的灵敏度阈和提供关于被检测生物分子的鉴定信息。因此，可确定初始级分或稀释的级分中特定生物分子的存在或不存在。本发明的检测和鉴定方法可以依赖生物分子的化学组成、结构，或序列以及由此产生的物理-化学或酶促特性。这些包括使用特定探针的杂交、与特定抗体或凝集素反应、和特定分子探针的酶促或化学反应、等电点、分子量、从生物分子的酶消化物中产生的片断的分子质量、NMR谱或它们的组合。以蛋白质定量为例，本发明的检测和鉴定方法可以选自单向或双向凝胶电泳和质谱的组合、免疫检测法（例如 western 印迹法）、气相色谱/质谱联用法（GS/MS）、或使用特定标记分子例如荧光标记、化学标记（例如生物素）或放射性标记的电泳法的这类方法。

为了得到生物分子的定量，对每一稀释步骤的级分的鉴定或特定指纹谱（肽质量指纹谱）进行了计算，其中考虑了每个稀释步骤各自的稀释因子。得到的生物分子的鉴定数目在全部稀释水平上得以加和。为了归一化，可以用这个总数处以全部级分（初始级分和稀释级分）中的全部生物分子的鉴定总数目。

$$\text{相对量 (q)} = \frac{\sum(d_i \times N_i)}{N_{\text{total}}}$$

其中 N_i 是稀释水平 i 上的单种生物分子的鉴定数目 N ， d_i 是各个稀释

水平 i 的稀释因子 d_i , 以及 N_{total} 是全部稀释水平上全部级分中全部生物分子的鉴定总数目 N 。

本发明与不同生物分子的特性无关。对多核苷酸和多肽或碳水化合物均同样可定量。本发明的其它优势是它以简单的方式将定量和鉴定结合而不需要针对生物分子定量进行额外努力。而且, 如果需要将来自一种来源的生物分子的量与来自另一来源的生物分子的量进行比较, 则可对生物分子混合物相互独立地处理。

现在已经一般地描述了本发明, 通过参考具体的实施例及下列附图将能更好地理解本发明, 其中所述的具体实施例除非另有说明在此仅是为了阐述的目的而不用于限制本发明。

图 1 说明了本发明的方法: 在第一步中将复杂混合物分级成不同级分。然后将这些级分进行系列组合稀释。在第二步中对样品库用例如双向凝胶电泳法和随后的质谱法鉴定检测生物分子。(AU:吸收单位; 8 到 23: 级分)

图 2 展示了生物分子的相对量的计算。

q_i : 生物分子的相对量; N_i : 稀释水平 i 上单个生物分子的鉴定数目 N ; d_i : 各个稀释水平 i 的稀释因子 d ; N_{total} : 全部稀释水平上所有级分中的所有生物分子的鉴定总数目 N 。(图解: N_1 : 未稀释, N_2 : 2 倍稀释, N_3 : 4 倍稀释, N_4 : 8 倍稀释)

图 3 显示了在双向凝胶电泳中从水平 1(未稀释)、水平 2(2 倍稀释)、水平 3(4 倍稀释)和水平 4(8 倍稀释)上对糖蛋白磷酸化酶(a), 波形蛋白和热休克蛋白 105(c)的鉴定的数目。从重复三次进行的试验加和值。(对照: 5mM 葡萄糖; 高葡萄糖: 10mM)

实施例

除非另外指出, 实施例中涉及的市售试剂根据生产商指导手册使用。

实施例 1:

细胞培养

将 INS-1 细胞 (Asfari, Janjic 等, 1992) 培养于补充有 10% FCS (Invitrogen, 热灭活)、10mM Hepes 溶液 (Invitrogen)、1mM 丙酮酸钠 (Sigma)、50 μ M β -巯基乙醇 (Sigma)、1%青霉素/链霉素溶液 (SIGMA) 和低 (5mM) 或高 (10mM) 浓度葡萄糖 (SIGMA) 的 RPMI 1640 培养基 (Invitrogen) 中。细胞一般培养于低葡萄糖浓度中。为了准备培养, 将细胞传代然后在低葡萄糖浓度培养基中孵育直到细胞融合。然后将培养基换成低葡萄糖或高葡萄糖培养基, 并且继续孵育四天。为了收获细胞, 将细胞首先用 Hanks 平衡盐溶液 (HBSS, Invitrogen) 洗涤一次, 然后用胰蛋白酶/EDTA 溶液覆盖 1-2 分钟直到细胞变圆并从瓶表面分离。弃去胰蛋白酶/EDTA 溶液, 并将细胞悬浮于胰蛋白酶抑制剂溶液中 (SIGMA), 转移进离心管中并在 1200 \times g 下离心 5 分钟。之后, 将细胞在 HBSS 中洗涤三次, 用同样的参数再次离心。吸出上清液并弃去, 然后将细胞沉淀在 -80 $^{\circ}$ C 下冷冻储存直到用于细胞溶质制备。

细胞溶质制备

将所有溶液冷却至 4 $^{\circ}$ C (HBSS 除外) 而且所有步骤在冰冷环境中进行 (冰浴)。将约 10^8 个细胞重悬于细胞匀浆培养基 (CHM; 150 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10mM Tris, 0.25M 葡萄糖, 1mM EDTA, pH 7.4) 中。然后置于冰上 2 分钟。将细胞悬液转移到 Potter Elvehjem 匀浆器容器中。将 Potter Elvehjem 匀浆器的冷的杵和高架高扭矩电动机连接, 然后 1000 转/分钟下用 10 冲程将细胞匀浆化。通过相差显微技术确认匀浆化效率 (> 90% 的破裂细胞)。1000xg 离心 5 分钟除去细胞碎片和细胞核。5000xg 离心分离线粒体。200000xg 离心并通过将上清液转移至洁净试管内, 最后富集的细胞溶质级分得以回收。在该制备物中最终的蛋白质浓度为 2.5-5.0 mg/ml。

色谱分级

全部分级步骤用 ÄKTAexplorer 10 色谱系统 (Amersham) 在室温下进行。将细胞溶质制备物 (10 mg 的全部蛋白质) 通过 0.45 μ M Millex-HV 针筒式过滤器, 上样到脱盐柱上 (串联连接的三个 5 ml HiTrap 脱盐柱,

Amersham)。用缓冲液 A (25 mM NaHPO₄⁻ pH 7.5; 1mM EDTA; 0.5mM 二硫赤藓糖醇; 1×Complete EDTA-free (购自 Roche Diagnostics 的蛋白酶抑制剂混合片剂; pH 调整到 7.5)) 以 1.5ml/分钟流速洗脱蛋白质。以 UV 吸光值 (280nm) 增加和最小电导率作为蛋白质级分的界限, 将蛋白质回收在 20ml 注入式套管 (injectionloop) 中。然后通过使用 TSK DEAE-5PW 7.5 cm×7.5 mm 柱 (TOSOH BIOSEP) 的阴离子交换色谱在 1ml/分钟流速下分离蛋白质。将缓冲液 A 用作结合缓冲液, 缓冲液 B (25 mM NaHPO₄⁻ pH 7.5; 1 mM EDTA; 0.5mM 二硫赤藓糖醇; 1×Complete EDTA-free (购自 Roche Diagnostics 的蛋白酶抑制剂混合片剂; 1M NaCl, pH 调整到 7.5)) 作为洗脱缓冲液。将样品上样到柱上, 用 7 个柱体积 (CV) 的缓冲液 A 洗脱未结合物质。随后用三段梯度 (第一段: 3 CV 0—11% 的缓冲液 B; 第二段: 10 CV 11—30% 的缓冲液 B; 1.5 CV 30—50% 的缓冲液 B) 洗脱结合的蛋白。最后用 5 CV 50% 的缓冲液 B 洗涤柱子。以 1ml 的量收集级分并且加上流透液组合形成八个库。电导率边界为: FT: UV280 增加到电导率的增加; 1 (电导率增加开始到 12 ms); 2 (12 到 15 ms); 3 (15 到 18 ms); 4 (18 到 21 ms); 5 (21 到 24 ms); 6 (24 到 27ms); 7 (27 到 30 ms); 8 (30 到 40 ms)。

双向电泳

通过使用充填有 100 mg POROS 20 R1 材料 (PerSeptive Biosystems) 的自填充针筒式小型柱 (MoBiTec M1002) 进行反相色谱将级分浓缩和脱盐。用 10 ml 0.1% 的三氟乙酸 (TFA) 和用 70% 乙腈/0.1% TFA 洗涤柱。上样样品后, 柱用 10 ml 0.1% TFA 洗涤, 并用 2ml 70% 乙腈/0.1% TFA 洗脱。洗脱物随后在 SpeedVac 蒸发器中干燥然后置于 IEF 样品缓冲液 (7 M 尿素, 2 M 硫脲, 50 mM Tris pH 7.5, 2% (w/v) CHAPS, 0.4% (w/v) 二硫赤藓糖醇, 0.5% (w/v) 两性电解质)。将包含 0.5mg 蛋白的等分试样从各个级分中留出并标记为样品 1 到 8。后面的样品从剩余级分制备: 样品 9: 0.25 mg 级分 1 + 0.25 mg 级分 2; 样品 10: 0.25 mg 级分 3 + 0.25 mg 级分 4; 样品 11: 0.25 mg 级分 5 + 0.25 mg 级分 6; 样品 12: 0.25 mg 级分

7 + 0.25 mg 级分 8; 样品 13: 0.125 mg 级分 1 + 0.125 mg 级分 2 + 0.125 mg 级分 3 + 0.125 mg 级分 4; 样品 14: 0.125 mg 级分 5 + 0.125 mg 级分 6 + 0.125 mg 级分 7 + 0.125 mg 级分 8; 样品 15: 0.0625 mg 级分 1 + 0.0625 mg 级分 2 + 0.0625 mg 级分 3 + 0.0625 mg 级分 4 + 0.0625 mg 级分 5 + 0.0625 mg 级分 6 + 0.0625 mg 级分 7 + 0.0625 mg 级分 8; 因而, 样品 1-8 包含 0.5 mg 蛋白质级分, 样品 9-12 各自对应这些样品的两倍稀释, 样品 13 和 14 对应四倍稀释, 以及样品 15 对应这些初始级分的八倍稀释。用具有 pH 3 到 10 的固相 pH 梯度 (IPG) 胶条 (IPG 3-10 L; Amersham) 在 Protean IEF Cell (BioRad) 中 20°C 下进行等电聚焦。将干胶条在包含 7M 尿素、2M 硫脲、2% (w/v) CHAPS、0.4% (w/w) 二硫赤藓糖醇和 0.5% (w/v) 两性电解质的溶液中重泡胀。在胶条的阴极端将蛋白质级分杯状上样。将电压在 8 小时内直线上升到 5000V, 接着在 5000V 的稳定水平进行 10 小时。通过依次在平衡溶液 I (6M 尿素, 50mM Tris pH 7.5, 30%甘油, 2.0%SDS, 30mM 二硫赤藓糖醇) 和平衡溶液 II (6M 尿素, 50mM Tris pH 8.8, 30%甘油, 2.0%SDS, 0.23M 碘乙酰胺) 中洗涤, 各 10 分钟, 胶条得以平衡和烷基化。将胶条上样到 11% 丙烯酰胺/PDA (37 : 1) 梯度凝胶 (240mm×200mm×1.5mm) 上。在 80V O/N 下于 ETTAN Dalt 电泳仪器 (Amersham) 中, 伴随持续冷却 (20°C), 通过电泳使蛋白质得以分辨。

凝胶染色和处理

将凝胶在 50% 甲醇/10% 乙酸中固定并用考马斯蓝 (胶体蓝, Invitrogen, Carlsbad, CA) 染色过夜, 接着在超高纯水中多次洗涤总共 7 小时。扫描凝胶并且用自动胶点挖取设备切取直径为 1.2mm 的凝胶点。在包含 100mM 碳酸氢铵和 30% 乙腈的溶液中退染凝胶点。干燥的退染凝胶片在 5 μ l 10 μ g/ml 胰蛋白酶溶液 (Roche Diagnostics) 中室温下消化过夜。加入 10 μ l 超高纯水后, 用 5 μ l 包含 75% 乙腈和 0.3% (v/v) TFA 的溶液提取蛋白质。将肽溶液点样到 MALDI 靶上, 它和 α -氰基-4-羟基肉桂酸一起作为基质。

质谱分析和蛋白质鉴定

在 Bruker Ultraflex Instrument (Bruker, Bremen, 德国) 上, 用促肾上腺皮质激素 (ACTH) 和缓激肽 (Bradykinin) 作为内部质量标准。如下面解释, 单种同位素的肽段质量从质谱中自动监测并且和来自蛋白质序列数据库 (例如 SwissProt 或 NCBI 大鼠基因组草图) 的源自计算机产生的全部蛋白质的胰蛋白酶消化液的肽的理论质量比较。

MALDI 质谱的峰值注释

质谱分析数据用低通中值参数样条滤波器两次过滤以便确定仪器的基准线。将对基准线的平滑化的残余平均标准偏差用于数据中仪器噪音水平的估计。

在基线校正和噪音水平上的坐标中的数据重新调节后, 具有对基准线最大偏差的数据点被用来产生一个非线性 (Levenberg-Marquardt 算法) 数据拟合程序以检测可能的肽峰。特别地, 拟合程序准备用于产生最好拟合的用峰高度、分辨率和单种同位素质量参数化的平均理论肽同位素分布。用平常的方法通过跟踪 σ 值确定收敛到有效的拟合。

收敛成功之后, 通过使用十六次重复 1/3 的数据点的随机交换的引导程序可以产生对经确定参数的误差估计。

将得到的拟合值从数据中减除, 将拟合值附近的噪音水平调整到外推的噪音水平和对峰值拟合值的偏差之和, 并且将此过程迭代, 只要候选的峰多于五倍的噪音水平, 就找到下一个峰。当找到多于 50 个峰停止这一过程。

自检测的内部标准峰线性外推校正飞行时间对质量换算的第零和第一阶段, 并且从峰的质量精确度和标准评价对单种同位素质量的置信区间。

谱峰对计算机产生的蛋白质酶解物的概率匹配

将质谱的峰质量列表直接和对于整个蛋白质序列数据库的理论酶解物比较。对每个理论酶解物, 计算 $[1 - \prod(1 - NP(p_i))]^{cMatches}$, 其中 N 是酶解物中肽的数目, $p(p_i)$ 是匹配对于峰的单种同位素质量的置信区间的肽的数目除以序列数据库中所有肽的数目, $cMatches$ 是酶解物和质谱之间匹配的数目。可以看出这个值与获得酶解物和质谱之间的假阳性匹配概率成比例。将概

率值进一步过滤寻找产生匹配的谱峰高的显著性。第一轮鉴定后，将在同一条件下获得的质谱鉴定的偏差用来校正飞行时间对质量换算的第二和第三阶项。得到的质量值通常具有不到 10ppm 的绝对偏差。这些质量值接着用于最后一轮的匹配，其中所有具有不到 0.01/N 蛋白（用 Bonferoni 校正具有 1%显著水平）的 Pmism 的匹配得以接受。

数据库分析

对数据库中的每个蛋白质，统计本研究中分析的每一 2D-PAGE 胶的鉴定数目。在本实例中将稀释水平 1 设为参考。然后得到下列值：

- 稀释水平 1 鉴定的数目（未稀释样品，样品 1-8）=N₁；
- 稀释水平 2 鉴定的数目（2 倍稀释，样品 9-12）=N₂；
- 稀释水平 3 鉴定的数目（4 倍稀释，样品 13, 14）=N₃；
- 稀释水平 4 鉴定的数目（8 倍稀释，样品 15）=N₄；

正如期望的，对于大多数蛋白质 N 值从一级到下一级降低大概两倍。考虑稀释因子以及为了得到对于每个蛋白质的粗略绝对量，用下式计算量值 q：

$$q=(N_1+2 \times N_2+4 \times N_3+8 \times N_4)/$$

对全部稀释水平上同一起来源的所有样品确定的蛋白点的总数目

除以对同一起来源的所有样品鉴定的总数目，被用来解决蛋白质浓缩物中样品间的不同。

对于每个蛋白质，计算和比较对于混合物样品（高和低糖）两者的 q 值。

选择下列三种蛋白质作为实例以说明本定量方法的可行性：糖原磷酸化酶（肝脏中的形式）；波形蛋白和热休克蛋白 105（表 1，图 3）。

	q(5mM 葡萄糖) × 10 ⁻⁵	q(10mM 葡萄糖) × 10 ⁻⁵
糖原磷酸化酶		
实验 1	112	0
实验 2	8	0
实验 3	124	44
波形蛋白		
实验 1	0	2130
实验 2	80	305
实验 3	0	1758
热休克蛋白 105		
实验 1	17	13
实验 2	121	39
实验 3	200	89

表 1: 对于三个实例蛋白从三个实验获得的细胞溶质中存在的蛋白质的相对量 (q 值)。

实施例 2: 胶原蛋白 α I (IV)

来自三个胰岛素抗性和胰岛素敏感病人 (白种人, 女性) 的血清样品按下面描述分级。如通过高胰岛素正常血糖钳方法 (Garvey 等 Diabetes 34 (1985) 222-234) 测定的体重指数 (BMI) 和葡萄糖处理率 (GDR) 在表 2 中有简要说明。组合系列稀释按专利申请中描述的实施例而且得到的样品按下面描述用于双向-SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (2D-PAGE)。将所有可检测的蛋白斑点从每一凝胶上切取。将蛋白用胰蛋白酶降解并且将所得的肽用于基质辅助激光解析电离飞行时间质谱 (MALDI-MS)。蛋白鉴定可以通过如下面描述的肽质量指纹图谱分析得到, 而且将蛋白列表如实施例 1 中描述的比较。

患者	胰岛素-敏感 (IS)		患者	胰岛素-抗性 (IR)	
	BMI	GDR		BMI	GDR
IS1	22.4	21.9	IR1	31.3	10.2
IS2	22.4	19.7	IR2	33	11.65
IS3	29.5	20.4	IR3	33.1	8.0

表 2: 六个受试者的通过高胰岛素正常血糖钳方法检测的体重指数

(BMI)和葡萄糖处理率(GDR)。对于GDRs,认为15以上为胰岛素抗性鉴定的断点,在方格左边的病人归为胰岛素敏感(IS),而在右边的那些为胰岛素抗性(IR)。来自这些个体的血浆通过系列组合稀释,随后进行2D-PAGE、斑点切取、胰酶处理、MALDI-MS,并且最后通过肽质量指纹图谱比较鉴定蛋白质而得以分析。

样品制备

通过应用蛋白质组学技术建立一种方法用来搜索人类血浆中的胰岛素抗性标记。用蛋白质组学技术很难分析血浆,因为血浆包含约十种高丰度蛋白,它表现了大约98%的总蛋白质量。通过应用色谱技术除去高丰度蛋白、清蛋白和抗体链,并在离子交换器上分级流通级分。描述的方案包括三个层析步骤(matrix blue、G蛋白和离子交换),并且是高度可重复的。所有层析步骤在FPLC系统(Pharmacia)上实施。

通过在Mimetic Blue上亲和层析除去清蛋白和通过在G蛋白上亲和层析除去免疫球蛋白

从三个对照个体和三个患糖尿病II型的病人获得人类血浆。将蛋白酶抑制混合剂(Roche Diagnostics, Mannheim,德国)加至血浆(每片剂对50 ml)。用25mM MES, pH 6.0,三倍稀释血浆,以减少盐的浓度并调整PH至约6.0。顺序连接两个柱,Mimetic Blue SA P6XL(50ml,ProMetic 生物科学有限公司)和HiTrap G蛋白HP(5ml,Amersham 生物科学),并用25mM MES, pH 6.0平衡。将对应大约一克血浆蛋白的体积(15ml,66mg/ml)滤过0.22 μ m过滤器并以5ml/分钟施加到Mimetic Blue柱上。将此柱子的流透液直接上样到G蛋白柱上并且收集来自后面柱的流透级分(约120mg)。用100ml的25mM MES, pH 6.0,洗涤这两个柱,随后将它们分开。Mimetic Blue柱用分步梯度以在50mM Tris-HCL, pH 7.5中的2M NaCl洗脱以及用100mM甘氨酸-HCL, pH 2.8洗脱G蛋白并且用1M Tris碱中和洗出液。通过双向凝胶分析此流透级分和这两个洗出液并且通过MALDI-MS鉴定蛋白。在来自Mimetic Blue的洗出液中,检测到了主要为全长和片断化的清蛋白。在来自G蛋白柱的洗脱液中,主要

检测到重和轻的 Ig 链。在流透级分中大多数其它血浆蛋白得以回收。

通过离子交换层析进行蛋白质分级

将来自 Mimetic Blue 和 G 蛋白柱的流透级分和洗涤级分合并，用 2M Tris 碱调整到 pH 8.0 并施加到 HiTrap Q HP 柱 (5ml, Amersham Biosciences)，用 50 mM Tris-HCL, pH 8.0, 以 5ml/分钟平衡。用在 50 mM Tris-HCL, pH 7.5 中的从 0 到 1M NaCl 的线性梯度上升的盐浓度洗脱柱子。收集 5ml 级分并用单向凝胶分析。大约 50 mg 总蛋白从此柱得以回收。基于凝胶分析，将级分合并以形成八种组合，使得每种组合包括约 5mg 的总蛋白。用 Utrafree-15 离心过滤器 (5kMWCO, Millipore) 浓缩并且通过 2-D 凝胶分析八个组的每一个。从各个胶上切取大约 400 个斑点并用 MALDI-MS 分析。

2D-PAGE

从 Amersham Biosciences(Uppasla, 瑞典) 购买固相 PH 梯度 (IPG) 胶条。从 Biosolve (Valkenswaard,荷兰) 获得丙烯酰胺并且用于聚丙烯酰胺凝胶制备的其它试剂来自 Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, 美国)。CHAPS 来自 Roche Diagnostics(Mannheim, 德国)，尿素来自 Applichem(Darmstadt,德国)，硫脲来自 Fluka (Buchs,瑞士)以及二硫赤藓糖醇来自 Merck(Darmstadt)。

将 0.5mg 总蛋白的样品施加到 3-10NL IPG 胶条上，在它们的碱性和酸性端位于样品杯中。在 200V 开始聚焦，并且用计算机-控制电源将电压以 3V/分钟逐渐上升到 5000V，并接下来保持恒定 6 小时。40 mA/胶下在 12%的恒定 SDS 聚丙烯酰胺凝胶 (18 × 200 × 1.5mm) 上实施双向凝胶电泳分离。在 40%的包含 5%磷酸的甲醇中固定蛋白 12 小时后，用胶体考马斯蓝 (Novex,San Diego,CA,美国) 染色凝胶 24 小时。用 H₂O 将多余的染料从凝胶上洗掉，并且将凝胶用 Agfa DUOSCAN 光密度计 (分辨率 400) 扫描。凝胶的电子图像用 Photoshop(Adobe)软件记录。图像以 tiff(约 5 兆字节/文件)和 jpeg (约 50 千字节/文件) 格式存储。凝胶保存在 4℃直到用于 MS 分析。

MALDI-MS

用国产斑点挖取器(在欧洲申请 EP 1 384 994 中描述)切取 1.2mm 直径的经选取斑点,放入 96-孔微量滴定板并且用 100 μ l 在 50mM 碳酸氢铵中的 30%乙腈在 CyBi™-Well 仪器(Cybio AG, Jena, 德国)中将每一凝胶块脱色。脱色后,用 100 μ l H₂O 洗涤凝胶块 5 分钟,并在 speedvac 蒸发器中不加热干燥 5 分钟。每个干燥凝胶块用 5 μ l 包含 50ng 胰蛋白酶(Roche Diagnostics, Mannheim, 德国)的 1mM 碳酸氢铵重泡胀。室温下 16 小时后,将 20 μ l 50%的乙腈(其包含 0.3%三氟乙酸)加至每一凝胶块。将凝胶块孵育 15 分钟,保持恒定摇动。将肽混合物(1.5 μ l)和 1 μ l 基质溶液同时施加至 AnchorChip™,其中所述基质溶液由 0.025%的 α -氰基-4-羟基肉桂酸(Sigma)组成,并且包含在 65%乙醇、32%乙腈和 0.03%三氟乙酸中的标准肽:脱精氨酸血管舒缓激肽(des-Arg-bradykinin)(Sigma, 20nM, 904.4681Da)和促肾上腺皮质激素片段 18-39(Sigma, 20nM, 2465.1989Da)。用 CyBi-Well 仪器进行样品施加。样品以反射模式在飞行时间质谱仪(Ultraflex TOF-TOF, Bruker Daltonics)中分析。使用 20KV 的加速电压。基于肽-质量匹配鉴定蛋白。

MALDI 质谱的谱峰注解

质谱分析数据用低通中值参数样条滤波器两次过滤以便确定仪器的基准线。将对基准线的平滑化残差平均标准偏差用于数据中仪器噪音水平的估计。在基准线校正和噪音水平上的坐标中的数据重新调节后,具有对基准线最大偏差的数据点被用来产生一个非线性(Levenberg-Marquardt 算法)数据拟合程序去检测可能的肽峰值。特别地,拟合程序尝试用来产生最好拟合的用峰值高度、分辨率和单种同位素质量参数化的平均理论肽同位素分布。用常规的方法通过跟踪 σ 值确定收敛到有效的拟合。收敛成功之后,通过使用十六次重复 1/3 数据点的随机交换的引导程序可以产生对所确定参数的误差估计。将得到的拟合值从数据中减除,将拟合值附近的噪音水平调整到外推的噪音水平和对峰值拟合值的偏差之和,并且将此过程迭代,只要候选的峰多于五倍的噪音水平,就找到下一个峰。当找到

多于 50 个峰停止这一过程。用从检测内部标准峰的线性外推校正飞行时间对质量换算的第二百零一阶，并且从峰的质量精确度和标准评价对单种同位素质量的置信区间。

谱峰对计算机产生的蛋白质酶解物的概率匹配

将质谱的峰质量列表直接和对于整个蛋白质序列数据库的理论酶解物比较。对每一理论酶解物，计算 $[1 - \prod(1 - NP(p_i))]^{cMatches}$ ，其中 N 是酶解物中肽的数目， $p(p_i)$ 是匹配对于峰的单种同位素质量的置信区间的肽的数目除以序列数据库中所有肽的数目， $cMatches$ 是酶解物和质谱之间匹配的数目。可以看出这个值与获得酶解物和质谱之间的假阳性匹配概率成比例。将概率值进一步过滤寻找产生匹配的谱峰高的显著性。第一轮鉴定后，将在同一条件下获得的质谱鉴定的偏差用来校正飞行时间对质量换算的第二和第三阶项。得到的质量值通常具有不到 10ppm 的绝对偏差。这些质量值接着用于最后一轮的匹配，其中所有具有不到 $0.01/N$ 蛋白（用 Bonferoni 校正具有 1% 显著水平）的 P_{mism} 的匹配得以接受。

结果

在两个胰岛素抗性病人（IR2 和 IR3，见表 3）中独有地检测到胶原蛋白 αI (IV)(胶原蛋白 IV;Swissprot 登录号 P12109;O00117;O00118;Q14040;Q14041;Q16258)。在一个病人（IR2）中，在第二水平上（二倍稀释样品）检测到斑点，然而在第二个病人（IR3）中在第四水平（八倍组合稀释）上检测到蛋白两次。将鉴定数目和稀释因子相乘（在这个例子，分别是一和四）并且用各自样品鉴定的蛋白斑点的总数校正。

另外按照供应商的方法用免疫检测法（Biotrin 胶原蛋白 IV EIA;目录号 NoBIO82;Biotrin,Dublin, 爱尔兰）测定胶原蛋白 IV 水平。来自两种检测法的结果在表 3 中比较。

病人	IS1	IS2	IS3	IR1	IR2	IR3
系列组合稀释	0	0	0	0	10	1
胶原蛋白 IV EIA(ng/ml)	108	111	139	86	208	158

表 3:来自系列组合稀释的结果和来自免疫检测的结果比较。

IS=胰岛素敏感病人, IR=胰岛素抗性病人。

系列组合稀释: 用稀释因子和全部斑点数目调整鉴定的数目。

免疫检测(胶原蛋白IV EIA): 通过使用 Biotrin 胶原蛋白IV EIA 检测胶原蛋白IV水平。所给出的结果是重复测量的平均。

描述的蛋白质组学方法的检测限度在用于免疫检测的限度之上, 其大约是 150 ng/ml。在此水平以上, 通过与描述的鉴定方法相结合的系列组合稀释, 蛋白质可以得以检测并且能粗步定量。虽然没有观察到绝对的定量, 但有一些等级相关性, 也就是具有最高和第二高水平的样品得以正确的鉴定。

与蛋白质组学相结合进行系列组合稀释而进行大规模蛋白鉴定是一种有效的工具, 用以平行定量成百上千的蛋白和鉴定在浓度上具有显著不同的能用于差异蛋白表达分析例如用于生物标记物鉴定研究的蛋白。

图1

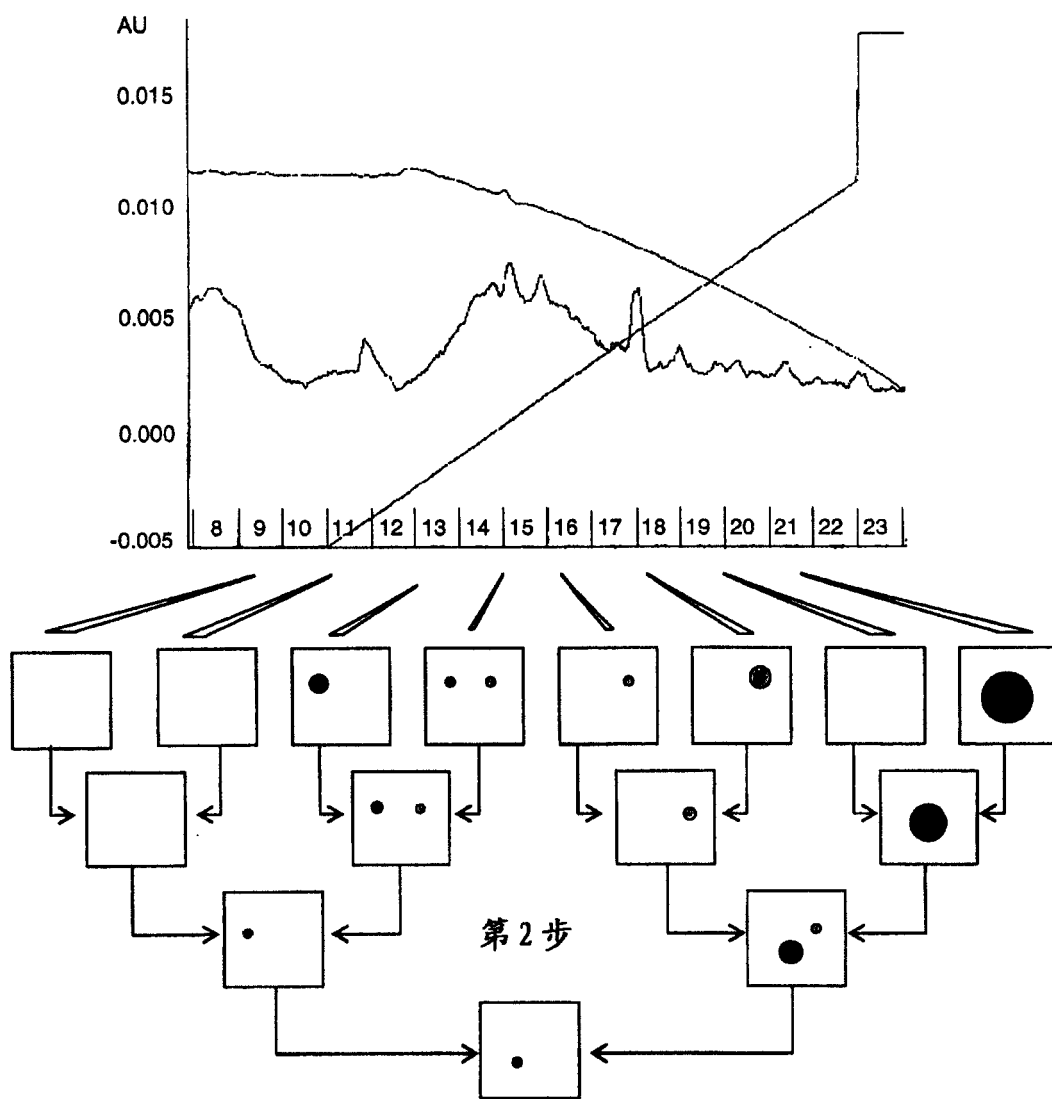
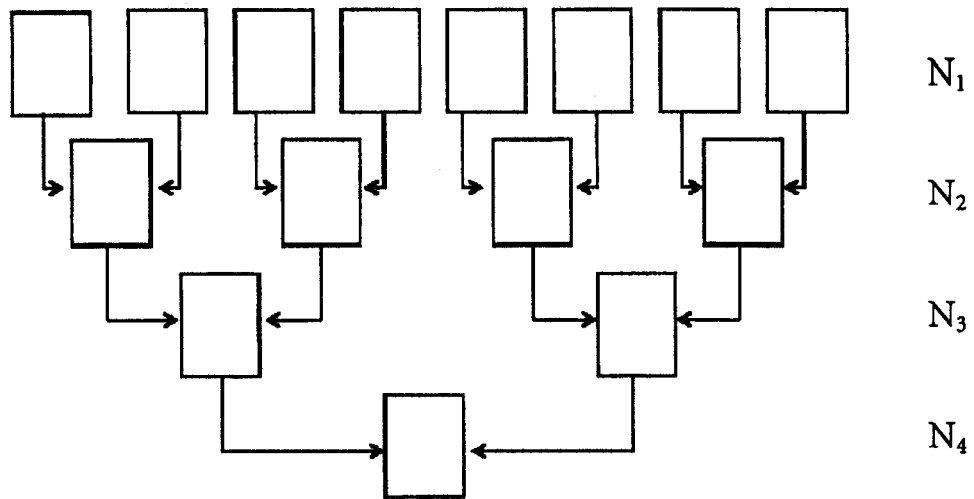
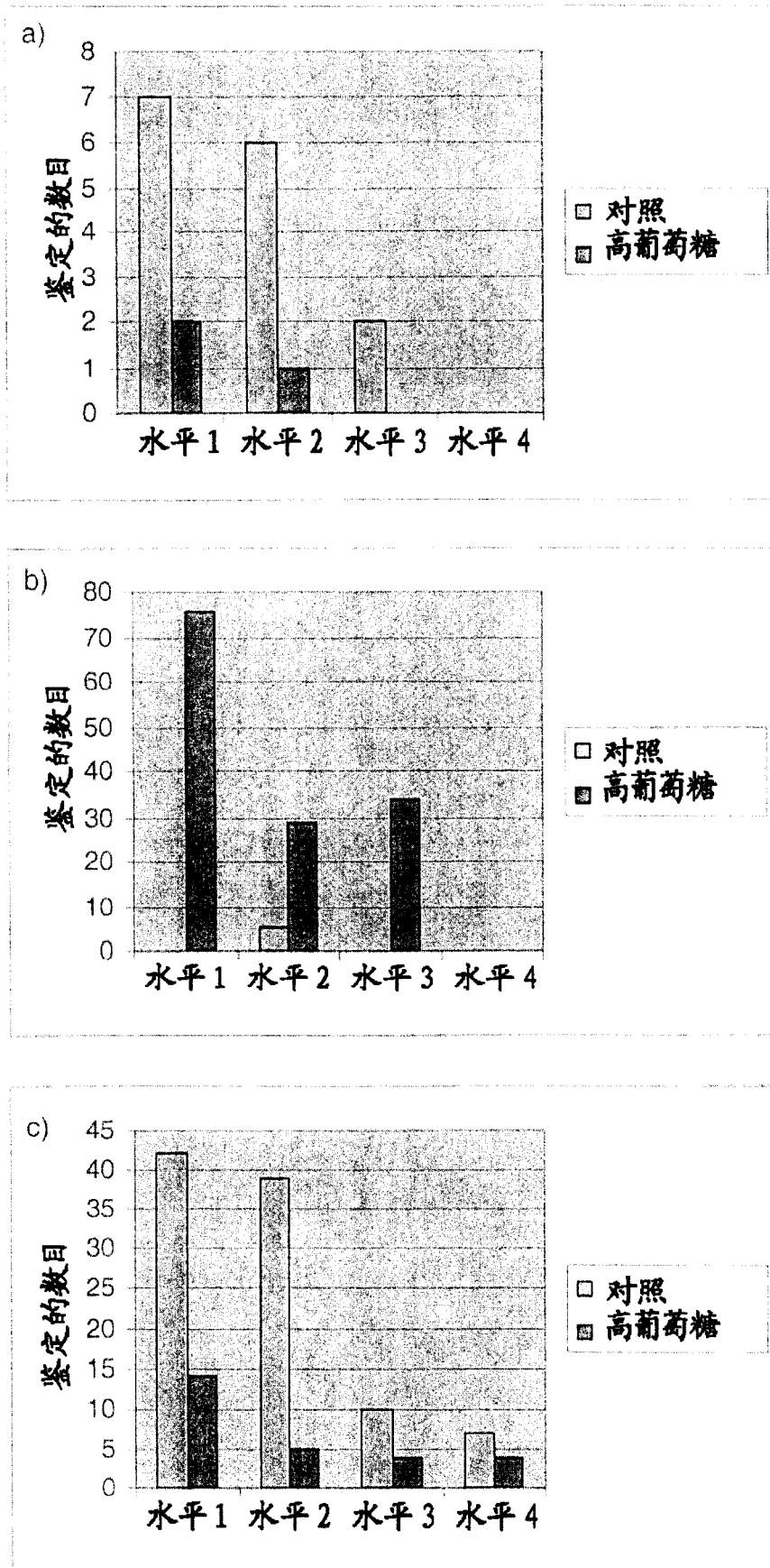


图 2



$$q = \frac{\sum (d_i \times N_i)}{N_{\text{total}}}$$

图3



专利名称(译)	通过系列组合稀释定量		
公开(公告)号	CN1629638A	公开(公告)日	2005-06-22
申请号	CN200410101309.6	申请日	2004-12-16
申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼 - 拉罗切有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	弗·哈夫曼-拉罗切有限公司		
[标]发明人	P伯恩特 S埃弗斯 H朗根		
发明人	P·伯恩特 S·埃弗斯 H·朗根		
IPC分类号	G01N27/62 C12Q1/06 C12Q1/68 G01N1/38 G01N27/447 G01N30/02 G01N30/72 G01N33/48 G01N33/483 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/566 G01N33/68 G01N33/92 G01N35/00		
CPC分类号	G01N33/6803		
优先权	2003104775 2003-12-18 EP		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了用于对生物分子的复杂混合物中定量生物分子的方法，其包括将生物分子混合物分级以提供至少两个级分，其中每个级分具有至少一种不同组分。这些级分随后接受系列组合稀释。接着，通过提供了灵敏度阈和鉴定信息的方法使在级分中的生物分子得以检测和鉴定。通过考虑各自的稀释因子，加和各个稀释水平上各个级分中鉴定的生物分子数目，生物分子的量得以确定。为了归一化，用此和除以所有稀释水平上所有级分中所有生物分子的鉴定总数目。