

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200610140652.0

[51] Int. Cl.

G01N 30/02 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

[43] 公开日 2008年4月9日

[11] 公开号 CN 101158666A

[22] 申请日 2006.10.8

[21] 申请号 200610140652.0

[71] 申请人 许洋

地址 100062 北京市崇文区东兴隆街56号A
-538

[72] 发明人 许洋

权利要求书2页 说明书14页

[54] 发明名称

抗体组及质谱检测变异或修饰生物标志群的
试剂盒和方法

[57] 摘要

本发明涉及一种通过被抗体组吸附表面基质上捕获的生物标志，用标准化质控血清控制下的定量性质谱分析来检测。在一个抗体组基质上同时捕获多个生物标志，并对捕获的变异的或修饰的生物标志进行质谱精确分析。可以同时检测多个生物标志群。本发明的方法可用于检测已经脱离人体的体液中的生物标志组合。这些生物标志组合可以用于同时鉴别正常人及不同种类的病人离体体液的试剂盒的检测方法。本方法精确、方便且快捷。

1. 一种用含有抗体组的基质去捕获生物样品中生物标志的分析方法，其特征是采用质谱法对样品中已被抗体组捕获的生物标志进行精确地鉴别、检测的方法。该方法通过以下步骤实现：

- (1) 样品处理及质谱标准化质控血清制备；
- (2) 基质与多种抗体结合试剂盒制备、样品上样；
- (3) 洗涤；
- (4) 质谱的定量控制及质谱测试；

其中所述步骤(1)将生物样品稀释在稀释缓冲溶液中。用O型血，男女相等，混合制备质谱的标准化质控血清；所述步骤(2)将质谱的标准化质控血清及样品点样在有支持物的基质中的一个位点上。支持物可用金属片、玻璃片、陶瓷片、陶瓷珠、磁性珠、多聚体、液相色谱柱子或 Sepharose beads 等。基质是任何能与抗体选择性或特异性结合的物质；所述步骤(3)用结合缓冲液洗涤。在样品完全干燥前将第一份洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 10 秒。彻底清除第一份洗涤溶液，用第二份洗涤液重复以上步骤。用水彻底洗涤整个阵列点，自然干燥基质及滞留的生物标志；或用三氟乙酸彻底洗涤整个阵列点（当用陶瓷珠、磁性珠、多聚体、液相色谱柱子或 Sepharose beads 为支持物时），将生物标志洗脱至质谱专用金属片或位点上。所述步骤(4)加 0.5 μL 吸能分子（以 50% 乙腈，0.5% 三氟乙酸的制备的饱和标准溶液）用质谱仪去分析滞留与各位点的生物标志或用电喷雾电离已洗脱的生物标志后用质谱仪去分析。用计算机分析数据。定量性质谱调控：每次测试前，用质谱的标准化质控血清，将标准化质控血清中用于定量的标准峰 4091.1Da 或 6634.0 Da 强度调至 50% 信号强度的最大值。

2. 权利要求 1 所述的基质是用于捕获多种抗体的，抗体是用于捕获已知的生物标志。所述的生物标志的分析方法，可以检测多个的、变异的或修饰的生物标志群。

3. 权利要求 1 所述的生物标志的分析方法，所捕获的生物标志群来源于已经脱离人体或动物体的生物样品-血液，体液，分泌物，细胞溶解液，组织溶解物和器官溶解物。

4. 用权利要求 1 的方法分析生物样品中特异的生物标志以检测正常与疾病生物标志的方法。

5. 用权利要求 2 的方法, 可以同时检测出三种以上疾病的生物标志及一种或多种氨基酸变异或甲基化等修饰的生物标志的方法。

6. 权利要求 1 中基质是任何能与抗体结合的物质: 用蛋白 A 和 G 标记的基质, 用 carboxylate-groups 标记的磁性珠上基质, 用 streptavidin 标记的基质, 或用 MEP HyperCel 标记的陶瓷珠上基质等。

7. 权利要求 1 中基质的支持物可以是金属片、玻璃片、陶瓷片、陶瓷珠、磁性珠、多聚体、液相色谱柱子或 Sepharose beads。

8. 一种权利要求 1 所述的生物标志的用途, 其特征在于, 用于制备检测变异或修饰生物标志的试剂盒。

9. 一种权利要求 8 所述的检测变异或修饰生物标志的试剂盒, 其特征在于, 它包括: 一容器以及装于容器中的权利要求 8 所述的检测变异或修饰生物标志的抗体及抗体组。

10. 如权利要求 9 所述的试剂盒, 其特征于, 所述的抗体(组)为单克隆抗体(组)或多克隆抗体(组)。

抗体组及质谱检测变异或修饰生物标志群的试剂盒和方法

技术领域

本发明涉及一种新的生物样品中蛋白质分析方法，一种通过能与抗体结合的基质去捕获生物标志，并用有定量控制的质谱分析来检测生物标志。在此提及的此项发明涉及疾病检测领域，为一种新的非侵入性的体外检测方法。更确切地讲，此发明涉及到生物标志 (biomarkers)，而这些抗原或生物标志能被以更高的特异性和灵敏度的抗体组及定量控制的质谱将多种疾病一次性区分出来。本发明可以应用到已经脱离人体的体液中的生物标志组合的检测方法或试剂盒开发。

背景技术

随着人类基因组计划的实施和完成，科学家们提出了后基因组 (post-genome) 计划的概念，研究要点转移到功能基因组学上，而生物功能主要体现物质是蛋白质。1994年，澳大利亚 Macquarie 大学的 Wilkins 和 Williams 首先提出蛋白质组 (proteome) 的概念，指的是“一种基因组所表达的全部蛋白质”，即包括一种细胞乃至一种生物所表达的全部蛋白质。对于蛋白质组的研究是功能基因组学的核心，称为蛋白质组学 (proteomics)。蛋白质组学被认为是后基因组研究中最主要的部分。与基因组相比，蛋白质组的组成更复杂，功能更活跃，应用前景更广泛。蛋白质组学从细胞整体水平进行蛋白质属性的研究，如表达水平、翻译后修饰及相互作用等，并由此获得对于疾病过程、细胞生理生化特征和调控网络的广泛完整的认识。所以，蛋白质组学技术正在逐步成为生物学、医学及制药学等的重要研究手段。

不论是细胞的正常功能还是病理特性都在一定程度上取决于细胞所表达的蛋白质功能。因此，鉴定人体内表达的蛋白质的区别，可用于体外疾病样本诊断及筛查，并最终用于药物开发和疾病治疗。而要进行蛋白质表达和功能的差异化分析，要求能够达到分辨细胞内分子的复杂混合物的程度。但细胞内许多物质往往以微量存在，目前用于分析蛋白的方法在上述各方面都有局限，用这些常规手段难以进行化学结构及蛋白质序列鉴定分析。用抗体及质谱联合可克服这一技术缺点。

本发明用抗体组及质谱联合可同时检测出多种（三种以上）的生物标志的方法。如，血库筛查要求特异性地检测出常见病毒微生物疾病的已知标记。但是，制备特异性结合标

记并且能在复杂的混合物中鉴别出标记的试剂需要大量时间，这阻碍了此类体外诊断试剂盒方法的发展。目前，还没有一种方法能够将四种以上疾病标志物同时检出。ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 试剂盒等利用抗体可以用于检测一种疾病标志物。利用抗体及三色免疫荧光，最多可以做到检测三种疾病标志物，但三种以上疾病标志物就无法同时检测。利用抗体组与质谱仪联合应用，即可以解决同时鉴别三种以上的病毒或微生物抗原标志物。举例讲，将抗 HBV (HBsAg) 抗体，抗 HCV 抗体，抗 HIV p24 antigen (Ribas SG et al. Performance of a quantitative human immunodeficiency virus type 1 p24 antigen assay on various HIV-1 subtypes for the follow-up of human immunodeficiency type 1 seropositive individuals. J Virol Methods 2003; 113: 29-34) 及抗梅毒抗体 (anti-treponemal 17 kDa protein) (George R et al. An analysis of the value of some antigen-antibody interactions used as diagnostic indicators in a treponemal Western blot (TWB) test for syphilis. J Clin Lab Immunol 1998; 50: 27-44) 等抗体联合标记至 Protein A 或 G 的支持物 (磁性珠子、芯片等) 上。由于每种特异抗体捕获生物抗原的分子量是不同的，故 Protein A/G-抗体与质谱仪联合应用时，质谱仪就非常容易地将这四种抗原同时分开了。由此推理，如果同时选择四种以上的抗体，而这四种以上抗体所结合的抗原分子量是不同的，则本发明可同时区分四种以上不同种类的疾病。本发明可以检测窗口期的献血者，这比单纯的 ELISA 抗体试剂盒更安全 (Lau DT, et al. A rapid immunochromatographic assay for hepatitis B virus screening. J Viral Hepat 2003;10: 331-334)。

另外，本发明的方法可同时检测出多种变异的生物标志。抗体与质谱仪联合应用是一种高灵敏度、高准确性的检测方法，它能从一个不同成分的混合体系中检查和区分不同组分、不同分子量 (差别在 1 或 2 个氨基酸之间) 的生物标志 (蛋白质)。将来，它可能成为临床上许多疾病检测的新模式，作为临床检查的常规方法。举例，区别胃癌中血清纤维蛋白肽 A 及变异的纤维蛋白肽 A，应用以往方法不能确定哪种肽类片段与发病有关，现在可以抗体与质谱仪联合应用，将其中这种组分和它们的分子量清晰区分开来，并找到与该病发病有关的特殊组分，这是分子医学的革命。本发明的方法可同时检测出多种修饰生物标志。修饰的生物标记群指的修饰蛋白质为甲基化、乙酰化、羟基化、磷酸化修饰等。在人类肿瘤的发生发展过程中，过去对肿瘤临床检测一直停留在细胞水平上，因此临床医生长期盼望的真正意义上的早期诊断 (如实体瘤在尚未形成包块以前，白血病在骨髓细胞检查不能确诊以前) 是不可能实现的。

发明内容:

本发明的目的是建立一种在生物样品中检测正常人与某种或多种疾病在离体血液中生物标志的方法。此发明涉及到生物标志 (biomarkers), 而这些生物标志能被用来以更高的特异性和灵敏度将某种或多种疾病患者同时区分出来。该方法为疾病的早期检测提供了新的途径, 并为进一步发现新的变异的或修饰的生物标志提供了基础。

本发明涉及一种通过标记特异性抗体至能与抗体结合的基质表面, 并用定量性质谱分析来同时检测某种疾病的多种生物标志或多种疾病状态。生物标志群可以是不变异的、变异的、修饰的。变异的生物标志群是指变异蛋白质为增加或减少一个或多个氨基酸。修饰的生物标志群是指修饰蛋白质为甲基化、乙酰化、羟基化、磷酸化修饰等。

本发明中的生物标志是利用一台质谱仪来发现的。该设备的质量精确度约为 $\pm 0.1\%$ 。

基质是任何能与抗体选择性或特异性结合的物质。举例说明, Protein A 和 G 基质吸附抗体 Fc 段的功能。具有吸收剂功能的 Protein A 和 G 底基与抗体结合, 抗体结合血清中生物标志。经过一段足够的时间使生物标志能与抗体-Protein A 和 G 结合。底基洗去未吸附的物质。任何适宜的洗液均可使用。

生物标志首先能够被具有能与生物标志物结合的抗体-基质吸附表面捕获, 非吸附物能从基质上洗脱, 吸附到底基的生物标志物在质谱仪中被检测。生物标志通过离子发生源, 如激光, 被离子化, 产生的离子被一个离子感受收集器收集, 然后质量分析器分析那些通过的离子。之后, 检测器将检测的离子信息转换为质荷比。定量性控制及质谱激光能量调控: 每次测试前, 用质谱的标准化质控血清, 将标准化质控血清中用于定量的标准峰 4091.1Da 或 6634.0 Da 强度调至 50% 质谱信号强度的最大值。生物标志的检测明显地将与信号强度的检测有关。这样, 生物标志的数量与质量都可以被检测出来。

飞行质谱对待分析物的分析生成飞行时间谱。该飞行时间谱的最终分析并不表示离子化能量攻击一个样本产生的单独的脉冲信号, 而是一系列脉冲的信号之和。这样降低了干扰, 并增加了动态范围。该飞行时间数据受数据处理软件的影响。软件中数据处理主要包括转换飞行时间与质荷比而产生质谱, 降低基线而减少仪器的偏移量, 和过滤高频噪音而减轻高频噪音。

通过对生物标志的吸附和检测而产生的数据可利用计算机的数据分析程序进行分析。该计算机程序分析这些数据以显示检测出的生物标志的数量, 并显示信号的强度和确定

被检测的每个生物标志的分子量。数据分析还能包括一系列确定生物标志的信号强度和校正数据对预定统计分布状态的偏离。例如，通过计算与某些参数相关的每个峰值的高度，可规范观测到的峰。该参数可能是由仪器和类似能量吸收分子等化学成分产生的不重要的干扰，这可以设置调零。

计算机可以将计算结果数据转换成各种形式来表现。其标准谱可以表示，但在一种形式中只有峰高和质量信息可以在谱带中保留，产生一个较清晰的图，并使具有几乎相同分子量的生物标志物更易显现。在另一种形式中，两个或更多的谱比较，便于突显独特的生物标志物和那些高于或低于校准样本的生物标志物。

分析一般包括展示从待分析物得到的信号的图谱中峰的鉴定。峰可以通过视图进行选择，软件是可用的，它可自动检测峰。一般情况下，该软件通过鉴定信号具有信噪比高于一个选择阈值并标记出在峰信号的质心处的峰的质量这样的方式操作。在一个有效的程序中，比较许多谱线以认定出现在质谱中某一选定范围内同样的一些峰。该软件的一个版本聚集所有出现在确定的质量范围内的各条光谱的峰，对所有在质量（质荷比）中值附近的峰指定一个质量（质荷比）簇。

发明中使用的生物标志是被抗体所捕。这些生物标记是进一步通过质谱（mass spectrometry）测定其不同分子量来知道它们特定的身份。

对生物标志的检测需要将一个样本放基质的一个吸附点上，接着进行清洗。电喷雾电离质谱（electrospray ionization mass spectrometry, ESI-MS）是在毛细管的出口处施加一高电压，所产生的高电场使从毛细管流出的液体雾化成细小的带电液滴，随着溶剂蒸发，液滴表面的电荷强度逐渐增大，最后液滴崩解为大量带一个或多个电荷的离子，致使分析物以单电荷或多电荷离子的形式进入气相。基质辅助激光解析/电离飞行时间质谱（matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS）的基本原理是向吸附点上加入 SINAPINIC 酸等并让其干燥，将分析物分散在分子中并形成晶体，当用激光照射晶体时，由于基质分子经辐射所吸收的能量，导致能量蓄积并迅速产热，从而使基质晶体升华，致使连同分析物一起进入气相。而后，用质谱测定法对基质进行分析，而一个显示了蛋白质分子的遗留物图将生成，这张图是在蛋白质分子的质量-电荷比的基础上，以彼此分开的峰图的形式显示出来的。

因为本项发明中的生物标志是通过质谱和抗体基质来标识的，因而它们可通过质谱测定法进行检测而直接知道它们特定的身份。这种方法比抗体为基础的 ELISA 及免疫荧光法更准确。实施例 1 胃癌中血清纤维蛋白肽 A 变异表达的应用。查已知基因组或 cDNA 库

数据库中的正常纤维蛋白肽 A 分子的化学结构（从 N 端至 C 端排列 16 个氨基酸，分子量为 1536 Da）：

N 端 Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端

纤维蛋白肽 A 的抗体与质谱仪联合应用发现分子量为 1465 ± 1 Da 变异的纤维蛋白肽 A。则化学结构及分子量可以（从 N 端至 C 端）排列为 15 个氨基酸：

N 端 Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端。

抗体为基础的 ELISA 及免疫荧光法则无法区别胃癌中血清纤维蛋白肽 A 及变异的纤维蛋白肽 A。

然而，如果有必要，这些生物标志也可通过，比如，确定多肽的氨基酸序列来进行鉴别。在蛋白质化学及蛋白质组学研究中，为了增加蛋白质鉴定的可信度，获得一段蛋白质肽片段内部序列信息通常是非常重要的。对于蛋白质及多肽的序列测定，传统的方法是采用 Edman 降解方法，而该方法最大的不足之处在于费时太长（一个残基需花费 30-40 分钟）。近年来，随着质谱技术的飞速发展，尤其是多级质谱（MS/MS）以及源后裂解（PSD）等技术的发展，应用质谱测序已成为一种流行的方法。

例如，一个生物标志能用许多酶描绘出来，例如 V8 蛋白酶（V8 protease）或胰蛋白酶，而且消化片段（digestion fragments）的分子量可被用来在数据库中搜索序列，这些序列与由多种酶生成的消化片段的分子量相吻合。或者，如果此生物标志不是已知数据库中的蛋白质分子，在生物标志的 N 极氨基酸序列（N-terminal Amino Acid Sequence）的基础上，可使用降解探针，而后，这些探针会被用来描绘由探测到了生物标志的样本所生成的基因组或 cDNA 库。最后，蛋白质生物标志可用蛋白质梯状排序法（protein ladder sequencing）进行排序。通过将分子碎成碎片并将碎片用酶解作用或其他可按顺序从碎片末端除去一个单个氨基酸分子的方法进行处理后，可生成蛋白质梯度（protein ladders）。然后，用质谱对此梯度进行分析。阶梯状碎片（ladder fragments）在质量上的差异可鉴别出从分子末端被除去的氨基酸。因此，本发明可以用于生物标志鉴定的金标准。

特异性是指某一物质或某种疾病的专一属性，它是代表某种物质或某种疾病的特征。通过某些特征可以识别某种物质或某种疾病，从而把它和其他物质或疾病区分开来。对专有特征的识别往往依赖于特殊的检测方法，例如要了解某种疾病是否存在有特异性抗原就要用有关特异性抗体来检测。自蛋白质组学研究有新发展以来，这种传统意义上特异性检测和界定方法有了很大的突破。如一个蛋白质不同片段变异是不同类型肿瘤的标志。根据基因到蛋白质表达的复杂过程，一种特异性基因的产物—蛋白质必定有相关多组分蛋白质

的表达。通过对这些不同组分的检测形成一个综合模式图(蛋白指纹质谱图),将这种图谱(如某种肿瘤)与其他图谱(如正常人或其他疾病)相比较,进而识别这种特异蛋白(如肿瘤抗原或其片段),从而将正常人与患某种疾病病人区分开来。

抗体组及质谱检测变异或修饰生物标志群的试剂盒和方法的具体操作步骤:

以下是用本发明提供的一个操作方案及试剂盒实例。

1. 样品处理及标准化质控血清制备

将生物样品稀释在稀释缓冲溶液中,视需要离心澄清样品。质谱的标准化质控血清制备定义符合如下标准:供血者 10 人,5 男 5 女,血型为 O 型;年龄为 18-30 岁;民族 汉。生化指标正常,包括:总胆固醇、甘油三酯、空腹血糖、乙肝表面抗原、肝功检查、肾功检查;无遗传病家族史;无重大传染病史。女性不能怀孕,男性为不吸烟者。

2. 基质与多种抗体结合制备、样品上样

将质谱的标准化质控血清及样品点样在有支持物的基质中的一个位点上。样品来自于血液,体液,分泌物,细胞溶解液,组织溶解物和器官溶解物。支持物可用金属片、玻璃片、陶瓷片、陶瓷珠、磁性珠、多聚体、液相色谱柱子或 Sepharose beads 等。基质是用于标记、结合多种抗体的。抗体为单克隆抗体或多克隆抗体。无限量地增加抗体组来达到无限量地检测多个或多种生物标志物或抗原标记(只须生物标志的分子量差异在质谱检测误差率内)。将合成的变异的或修饰的生物标志免疫小鼠,待免疫反应出现后,从外周血中分离 B 细胞。用 ELISA 法筛选出效价最高的单抗株,大量制备,并从培养上清中提取所需抗体。此抗体可用于制备检测变异或修饰生物标志的所需试剂盒。基质与多种抗体结合制备试剂盒的方法可用任何能与抗体结合的方法及任何能与抗体选择性或特异性结合的物质,举例:用蛋白 A 和 G(Protein A and G)标记的 Sepharose beads 上基质与抗体 Fc 段结合;用 Carbodiimide 方法(Carbodiimide Method)将带有 carboxylate-groups 标记的磁性珠上基质与抗体的氨基端(amino-groups)结合(Gunn DL, et al. Preparation of sensitive and stable erythrocytes by the carbodiimide method for the detection of primary and secondary IgM and IgG antibody. J Immunol Methods. 1972; 1(4):381-389.);用 streptavidin 标记的基质与 biotin 标记的抗体结合;用 MEP HyperCel 标记的陶瓷珠与抗体结合(through high capacity and high selectivity interaction and the cooperative influence of a thioether group);等等方法。多

种抗体标记至液相色谱柱子上的基质可用液相色谱质谱联用仪 (LC-MS) 的标准方法去分析。可以将质谱的标准化质控血清用于质谱仪试剂盒的定量方法。

3. 洗涤

用结合缓冲液洗涤。在样品完全干燥前将第一份洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 10 秒。彻底清除第一份洗涤溶液, 用第二份洗涤液重复以上步骤。以下可有不同步骤:

- (1) 用水彻底洗涤整个阵列点, 自然干燥基质及滞留的生物标志, 加 0.5 μL 吸能分子 (以 50% 乙腈, 0.5% 三氟乙酸的制备的饱和标准溶液);
- (2) 或用 0.05%~1% 三氟乙酸彻底洗涤整个阵列点 (当用陶瓷珠、磁性珠、多聚体或 Sepharose beads 为支持物时), 将生物标志洗脱至质谱专用金属片 (有 3x3 mm 圆孔) 上, 自然干燥金属片, 加 0.5 μL 吸能分子 (以 50% 乙腈, 0.5% 三氟乙酸制备的饱和标准溶液)。

吸能分子可用 Sinapinic acid 或 α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid 等。

3. 质谱的定量控制及测试

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪, 用氮激光仪 (337 nm) 和 80 cm 或 120 cm 飞行管分析阵列, 或用电喷雾电离已洗脱的生物标志后用液相色谱质谱联用仪 (LC-MS) 标准方法去分析滞留于各位点的生物标志或蛋白质。串联四极杆质谱或线性离子阱质谱来鉴定修饰的与变异的生物标志及多肽 de novo 的测序。用计算机分析数据进行数据重叠展示。

定量性质谱调控: 每次测试前, 用质谱的标准化质控血清, 将标准化质控血清中用于定量的标准峰 4091.1Da 或 6634.0 Da 等强度调至 50% 信号强度的最大值。

本发明可用于体外细胞和非侵入性的临床疾病体外检测方法, 如离体体液的试剂盒用于临床疾病的检测方法。

本发明中的试剂盒及方法与其他非侵入性的体外检测方法比较, 具有以下的特点:

(1) 准确及精确

用多种抗体及质谱联合精确检测多种生物标志方法的一个特点是能够从复杂的样品混合物中准确地分辨出分析物。抗体与抗原结合的准确率超过 95%。这是 ELISA 及免疫荧光试剂盒等的基楚。

质谱直接分析有很强的精确性, 一般误差率只有 0.1 Da。因为蛋白质是由氨基酸组成的, 而氨基酸的平均质量是已知的, 如果知道了抗原或生物标志的总分子量, 那么抗原

的变异（指氨基酸变化）就很容易被推测出来。但 ELISA 及免疫荧光试剂盒无法知道抗原的变异。所以，用抗体及质谱联合精确检测生物标志方法可提供被分析物（抗原或生物标志）化学或结构特征的直接信息。举例：

已知纤维蛋白肽 A 分子的分子量为 1536 Da，化学结构为 16 个氨基酸（N 端 Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端）。纤维蛋白肽 A 的抗体与质谱仪联合应用发现分子量为 1536 Da 的纤维蛋白肽 A。则 100%可确定被分析物是纤维蛋白肽 A，即最精确鉴别（金标准）。

用纤维蛋白肽 A 的抗体与质谱仪联合应用发现被分析物是分子量为 1465 ± 1 Da 变异的纤维蛋白肽 A。则化学结构可以（从 N 端至 C 端）推测为 15 个氨基酸：N 端 Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端。即抗体及质谱联合，可省去变异的纤维蛋白肽 A 的排序鉴定（实施例 1 及实施例 2）。

(2) 便于联合检测

用三种以上抗体组标在基质上与质谱联合，可同时检测出多种（三种以上）的生物标志及一种或一种以上变异的或修饰的生物标志。这样产生了一种可用质谱仪直接进行分析多种（三种以上）的生物标志及一种或一种以上变异的或修饰的生物标志的方法（实施例 4）。三色免疫荧光法可以同时分析三种生物标志，但无法达到三种以上的生物标志的分析或像抗体与质谱联合来精确地、高效地确定一种变异的或修饰的被分析物（抗原或生物标志）。基质可用任何能与抗体选择性或特异性结合的物质。

(3) 快捷

用本发明提供的多种已知抗体组及质谱联合精确检测多种生物标志方法进行多种疾病检测时，无需对蛋白质进行测序即可知“变异的或修饰的生物标志”。不像免疫荧光法试剂盒，一个试剂盒最多可同时标记三种抗体，无法知道“变异的或修饰的生物标志”。修饰的生物标志指甲基化、乙酰化、羟基化、磷酸化修饰等的高表达或低表达变化。质谱直接分析有很强的精确性，一般误差率只有 0.1 Da。举例，在肝癌的血清中发现了 4302 Da 带正电的蛋白质，而在正常人中只有 4287 Da 带正电的蛋白质。两种蛋白质分子量差额为 15 Da，即甲基(-CH₃)。用去甲基化酶验证 4302 Da 的蛋白质为甲基化的 4287 Da 蛋白质，即在去甲基化酶的处理下，4302 Da 蛋白质转变为 4287 Da 的蛋白质。修饰蛋白可以用去甲基化酶、去乙酰化酶、去羟基化酶、去磷酸化酶来验证。甲基化试剂盒对肿瘤细胞检测的应用，可以用于区分正常人样品与癌症患者群的样品。

本发明提供的一个多种抗体试剂盒方法用于质谱来同时检测，可不限于三种抗体。从

而有助于临床复杂的检测，如可用此法进行疾病检测试剂盒、法医学分析、人群基因的变异分析、结核菌耐药株在人群中的变化分析等。

具体实施方式

本发明将结合具体实施例作进一步说明，这些实例仅用于说明日的，而不用于限制本发明范围。

实施例1 胃癌中血清纤维蛋白肽A变异表达的应用

(1) 实验方法

一、材料

1. 标本来源：A. 50例正常人对照组的血清；B. 50例胃癌病人无淋巴结侵犯者的血清；C. 50例胃癌病人伴淋巴结侵犯者的血清。
2. 质量控制：A. 人标准化质控血清 B. 质谱激光能量调控：每次测试前，用上述标准化质控血清。

二、方法

1. 样品的收集：全血采集后吸取血清，置于 -80°C 保存； -80°C 冰箱中取出血清样品，置冰盒上融解；以10,000 转/分， 4°C 离心2分钟；取上清液。
2. 样品的准备：每个吸附剂支持物点需要血清 $3\mu\text{l}$ ，将血清用2倍体积缓冲液稀释（例如： $3\mu\text{l}$ 血清用 $6\mu\text{l}$ 缓冲液稀释）。将样品充分混匀。将 $9\mu\text{l}$ 上述样品加入 $111\mu\text{l}$ 相应的结合缓冲液，使得血清的总稀释倍数达到约40倍。将处理好的血清样品 $40\mu\text{l}$ 上样到吸附剂上。
3. 样品检测：上样，在吸附剂支持物（基质含已标记纤维蛋白肽A的抗体）中加入 $40\mu\text{l}$ 处理好的样品，置振荡器，400-600转/分， 4°C 震荡1小时。甩出样品，每孔加入 $200\mu\text{l}$ 的结合缓冲液。室温置振荡器400-600转/分，震荡5分钟，甩去孔中液体，再次加入结合缓冲液 $200\mu\text{l}$ ，重复操作一次。每孔加入 $200\mu\text{l}$ HPLC水，立刻甩出。取出吸附剂支持物后，待干后，样品加入 $0.5\mu\text{l}$ 的SINAPINIC 酸（5 mg/mL 50% 乙腈；0.5% 三氟乙酸），任其自然干燥。
4. 将上述样品加入质谱中，就会生成飞行时间质谱。外部使用多肽分子质量标准来校正质量精确性。

(2) 实验结果

用统计学方法，通过分析血清蛋白指纹峰，发现下述一种分子量为 1465 ± 1 Da 生物标志可以用于区分正常人细胞、早期胃腺癌无淋巴结侵犯者细胞及胃腺癌病人伴淋巴结侵

犯者细胞（表一）。

表一、区分正常人、早期胃腺癌无淋巴结侵犯者及胃腺癌病人伴淋巴结侵犯者

筛选试验	正常人	早期胃腺癌病人	胃腺癌病人伴淋巴结侵犯者
1536 Da	50 (+)	50 (+)	0 (-)
1465 Da	0 (-)	0 (-)	50 (++)
合计 (例)	50	50	50

50 例正常人对照组的血清：阴性

50 例早期胃腺癌病人无淋巴结侵犯者的血清：阴性

50 例胃腺癌病人伴淋巴结侵犯者的血清：阳性

发现分子量为 1465 ± 1 Da 生物标志的变化对于诊断胃腺癌淋巴结侵犯具有重要意义。通过这个峰的鉴别，本实验中 50 例胃腺癌病人伴淋巴结侵犯者的样品中有 50 例被准确的检出，50 例早期胃腺癌病人无淋巴结侵犯者中有 50 例确定为非淋巴结侵犯。此结果表明，该方法的灵敏度为 100% (50/50)，特异性 100% (50/50)。

查已知基因组或 cDNA 库数据库中的正常纤维蛋白肽 A 分子的化学结构（从 N 端至 C 端排列 16 个氨基酸，分子量为 1536 Da）：

N 端 Ala-Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端

纤维蛋白肽 A 的抗体与质谱仪联合应用发现分子量为 1465 ± 1 Da 变异的纤维蛋白肽 A。则化学结构及分子量可以（从 N 端至 C 端）排列为 15 个氨基酸：

N 端 Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端。

以抗体为基础的 ELISA 及免疫荧光法则无法区别胃癌中血清纤维蛋白肽 A (FPA, 1536 Da) 及变异的纤维蛋白肽 A (1465 ± 1 Da)。

实施例 2 胃癌中血清变异的纤维蛋白肽 A 的排序鉴定

将 1465 ± 1 Da 生物标志用多级质谱 (MS/MS)、源后裂解 (PSD) 及蛋白质梯状排序法 (protein ladder sequencing) 进行排序。通过将分子碎成碎片，可生成蛋白质梯度 (protein ladders)。然后，用质谱对此梯度进行分析。鉴别出 1465 ± 1 Da 生物标志为变异表达的纤维蛋白肽 A (Fibrinopeptide A with alanine truncation at N-terminal)。其化学结构为（从 N 端至 C 端排列为 15 个氨基酸）：

N 端 Asp-Ser-Gly-Glu-Gly-Asp-Phe-Leu-Ala-Glu-Gly-Gly-Gly-Val-Arg C 端。

用实施例 1 “胃癌中血清纤维蛋白肽 A 变异表达的应用”，即抗体及质谱联合，可省

去变异的纤维蛋白肽 A 的排序鉴定。

实施例 3 变异的或修饰的生物标记抗体的制备

变异的或修饰的生物标记的合成及序列： Transthyretin fragment (2380.1 Da, LGISPFHEHAENVFTANDSGPR) , Bradykinin fragment (904.5 Da, RPPGFSPF) , Methyl-Arg-Bradykinin (1075.2 Da, Methyl-RPPGFSPFR) , Dehydro-Ala-FPA (1518.7 Da) , FPA fragment (1465.7 Da, DSGEGDFLAEGGGVR) , Fibrinogen alpha fragment (3190.4 Da, SSSYSKQFTSSTSYNRGDSTFESKSYKM) , Apo E fragment (2409.1 Da, AATVGLAGQPLQERAQAWGERL) , C3f fragment (1865.0 Da, SSKITHRIHWESASLL)。将合成的变异的或修饰的生物标记免疫小鼠，待免疫反应出现后，从外周血中分离 B 细胞。用溶血噬菌斑分析法选择并分离出能分泌所需抗体的单个淋巴细胞。将单个细胞扩增至 1×10^7 个以上，用 Quick mRNA Purification Kit 提取 mRNA。以提取的 mRNA 为模板，合成 cDNA 链。以此 cDNA 为模板，加入鼠抗体重链可变区 (V_H) 通用引物，轻链可变区 (V_L) 通用引物，进行聚合酶链反应，获得扩增的 V_H 基因片段和 V_L 基因片段。将扩增产物在 15g/L 琼脂糖凝胶电泳鉴定和分离。用 glass milk 回收扩增的 V_H 基因片段和 V_L 基因片段。与等摩尔尝试的 Limker Primer Mix 混合，进行聚合酶链反应，连接 V_H 和 V_L 。扩增产物分离纯化后，获得特异性单链抗体 (ScFV)。此 ScFV 可用于制备检测所需 DNA 片。将此扩增产物两端加限制性酶切位点，纯化定量后，连接到 P^{CMV} 载体上。将连接产物转化感染大肠杆菌 TOP10。经蓝白斑筛选及酶切鉴定，筛选出重组质粒。在 96 孔板形成单克隆抗体。用 ELISA 法筛选出效价最高的单克隆抗体株，大量制备，并从培养上清中提取所需抗体。此抗体可用于制备检测所需试剂盒。

实施例 4 用多种抗体及质谱联合精确地检测多种、变异的或修饰的生物标志

(1) 实验方法

1. 标本来源：质谱的标准化质控血清。A 组 (加 Transthyretin、Bradykinin) , B 组 (加 Transthyretin、Transthyretin fragment) , C 组 (加 Bradykinin、Bradykinin fragment) , D 组 (加 FPA、Dehydro-Ala-FPA、FPA fragment、Bradykinin、Methyl-Arg-Bradykinin) , E 组 (加 Fibrinogen alpha、Fibrinogen alpha fragment、C3f、

C3f fragment、Bradykinin fragment), F组(加Apo E、Apo E fragment、C3f、C3f fragment、FPA fragment、Bradykinin、Fibrinogen alpha)。

2. 试剂: Transthyretin (2451.1 Da, ALGISPFHEHAEVVFTANDSGPR), Transthyretin fragment (2380.1 Da, LGISPFHEHAEVVFTANDSGPR), Bradykinin (1060.6 Da, RPPGFSPFR), Bradykinin fragment (904.5 Da, RPPGFSPF), Methyl-Arg-Bradykinin (1075.2 Da, Methyl-RPPGFSPFR), FPA (1536.7 Da, ADSGEGDFLAEGGGVR), Dehydro-Ala-FPA (1518.7 Da), FPA fragment (1465.7 Da, DSGEGDFLAEGGGVR), Fibrinogen alpha (3261.4 Da, SSSYSKQFTSSTSINRGDSTFESKSYKMA), Fibrinogen alpha fragment (3190.4 Da, SSSYSKQFTSSTSINRGDSTFESKSYKM), Apo E (2565.5 Da, AATVGS LAGQPLQERAQAWGERLR), Apo E fragment (2409.1 Da, AATVGS LAGQPLQERAQAWGERL), C3f (2021.1 Da, SSKITHRIHWESASLLR), C3f fragment (1865.0 Da, SSKITHRIHWESASLL) 均来自合成或赠送。Transthyretin抗体、Bradykinin抗体、FPA抗体、Fibrinogen alpha抗体、Apo E抗体、C3f抗体均来自合成、制备或赠送。乙腈、三氟乙酸、SINAPINIC 酸 (Sinapinic acid) 均购自Sigma公司。

3. 方法

基质与多种抗体结合制备试剂盒、样品上样

将样品点样在有支持物的基质中的一个位点上。支持物用磁性珠。取 50 μL 有 carboxylate-groups 标记的磁性珠加在 500 μL 的试管中。用 Carbodiimide 方法, 将带有 carboxylate-groups 标记的磁性珠上基质与多种抗体 (Transthyretin 抗体、Bradykinin 抗体、FPA 抗体、Fibrinogen alpha 抗体、Apo E 抗体、C3f 抗体) 的氨基端 (amino-groups) 结合 (Gunn DL, et al. Preparation of sensitive and stable erythrocytes by the carbodiimide method for the detection of primary and secondary IgM and IgG antibody. J Immunol Methods. 1972; 1:381-389.)。多抗体磁珠试剂盒可用于质谱测试了。将质谱的标准化质控血清用于质谱的定量。

洗涤

用结合缓冲液洗涤。在样品完全干燥前将第一份洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 10 秒。彻底清除第一份洗涤溶液, 用第二份洗涤液重复以上步骤。用 1%三氟乙酸彻底洗涤整个阵列点, 将生物标志洗脱至质谱专用金属片 (有 3x3 mm 圆孔) 上, 自然干燥金属片, 加 0.5 μL Sinapinic acid 吸能分子 (以 50% 乙腈, 0.5%三氟乙酸制备的饱和标准溶液)。

质谱的定量控制及测试

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪，用氮激光仪（337 nm）和 80 cm 或 120 cm 飞行管分析阵列去分析试剂盒各位点的生物标志或蛋白质。用计算机分析数据进行数据重叠展示。

定量性质谱调控：每次测试前，用质谱的标准化质控血清，将标准化质控血清中用于定量的标准峰 4091.1 Da 或 6634.0 Da 强度调至 50% 信号强度的最大值。

(2) 实验结果

分析 A 组至 F 组， 结果发现用多种抗体及质谱联合试剂盒可将对照组与 A 组至 F 组准确的分组。预测准确率：用统计学分析及双盲分析中，结果显示：用抗体组及质谱联合精确检测多种生物标志群及变异的或修饰的生物标志的方法准确率为 100%，灵敏度为 100%，特异性为 100%（表二）。

表二、用抗体组及质谱联合精确地检测多种、变异的或修饰的生物标志

	抗体组与质谱联合检测
A 组 Transthyretin、Bradykinin	2451.1 Da (+) 1060.6 Da (+)
B 组 Transthyretin、Transthyretin fragment	2451.1 Da (+) 2380.1 Da (+)
C 组 Bradykinin、Bradykinin fragment	1060.6 Da (+) 904.5 Da (+)
D 组（修饰的生物标志） FPA、Dehydro-Ala-FPA、FPA fragment、Bradykinin、 Methyl-Arg-Bradykinin	1536.7 Da (+) 1518.7 Da (+) 1465.7 Da (+) 1060.6 Da (+) 1075.2 Da (+)
E 组 Fibrinogen alpha、Fibrinogen alpha fragment、C3f、 C3f fragment、Bradykinin fragment	3261.4 Da (+) 3190.4 Da (+) 2021.1 Da (+) 1865.0 Da (+) 904.5 Da (+)
F 组 Apo E、Apo E fragment、C3f、C3f fragment、FPA fragment、Bradykinin、Fibrinogen alpha	2565.5 Da (+) 2409.1 Da (+) 2021.1 Da (+) 1865.0 Da (+) 1465.7 Da (+) 1060.6 Da (+) 3261.4 Da (+)

试剂加至血浆、体液，分泌物，细胞溶解液，组织溶解物和器官溶解物的实验结果与血清一致。

(3) 结论

本发明利用多种抗体及质谱联合对 A 至 F 组进行蛋白质对比分析，结果发现分组检测的灵敏度为 100%，特异性为 100%。本发明用抗体组及质谱联合，可同时精确地检测出多种、变异的（A 至 F 组）或修饰（D 组）的生物标志群。

本发明涉及一种通过被抗体组吸附表面基质上捕获的生物标志，用标准化质控血清控制下的定量性质谱分析来检测。在一个抗体组基质上同时捕获多个生物标志，并对捕获的变异的或修饰的生物标志进行质谱精确分析。可以同时检测多个生物标志群。本发明的方法可用于检测已经脱离人体的体液中的生物标志组合。这些生物标志组合可以用于同时鉴别正常人及多种病人离体体液的试剂盒的检测方法。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

专利名称(译)	抗体组及质谱检测变异或修饰生物标志群的试剂盒和方法		
公开(公告)号	CN101158666A	公开(公告)日	2008-04-09
申请号	CN200610140652.0	申请日	2006-10-08
[标]申请(专利权)人(译)	许洋		
申请(专利权)人(译)	许洋		
当前申请(专利权)人(译)	许洋		
[标]发明人	许洋		
发明人	许洋		
IPC分类号	G01N30/02 G01N33/53 G01N33/577		
CPC分类号	G01N33/54373 G01N33/6848 G01N33/96 G01N30/7233		
其他公开文献	CN101158666B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种通过被抗体组吸附表面基质上捕获的生物标志，用标准化质控血清控制下的定量性质谱分析来检测。在一个抗体组基质上同时捕获多个生物标志，并对捕获的变异的或修饰的生物标志进行质谱精确分析。可以同时检测多个生物标志群。本发明的方法可用于检测已经脱离人体的体液中的生物标志组合。这些生物标志组合可以用于同时鉴别正常人及不同类型的病人离体体液的试剂盒的检测方法。本方法精确、方便且快捷。