



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101550441 B

(45) 授权公告日 2011. 11. 23

(21) 申请号 200810103192. 3

审查员 吴希哲

(22) 申请日 2008. 04. 01

(73) 专利权人 博尔诚(北京)科技有限公司
地址 100176 北京市经济技术开发区宏达北路10号5126室

(72) 发明人 韩晓亮 王建铭 范盘生 赵红

(74) 专利代理机构 北京泛华伟业知识产权代理有限公司 11280
代理人 郭广迅 刘丹妮

(51) Int. Cl.

C12Q 1/68(2006. 01)

G01N 33/53(2006. 01)

G01N 33/558(2006. 01)

C40B 50/14(2006. 01)

(56) 对比文件

WO 2007018872 A1, 2007. 02. 15,

EP 1068356 A1, 2001. 01. 17,

EP 1097379 A2, 2001. 05. 09,

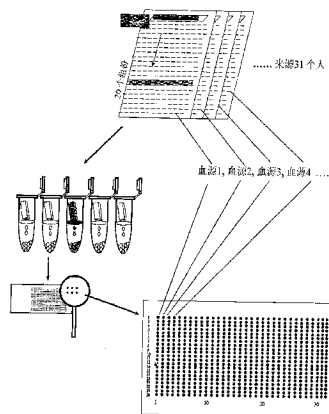
权利要求书 5 页 说明书 21 页 附图 6 页

(54) 发明名称

含有生物标志物样本的高通量分析方法和样本库制备

(57) 摘要

本发明涉及一种对于包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法;本发明还涉及一种制备用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的方法;本发明同时涉及根据本发明所述的方法所制备的样本库。本发明将分子组份化技术优势和微阵列、巨阵列大规模分析的高通量优势相结合。在传统的分子组份化技术基础上,本发明提供更为经济和灵敏地对宝贵样品进行检测的方法。



1. 一种对于包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法,所述方法包括如下步骤:
 - (1)、将包含生物标志物的原始样本以能够分离所述生物标志物的方法进行组份化,并依照其进行组份化方法所产生的参数所设定的一级设定序列和根据所述样本来源所设定的次级设定顺序,使得到的包含生物标志物的组份化样本在组份化介质上进行排列或表达;
 - (2)、从所述组份化介质上回收所述组份化样本,使回收得到的每一个组份化的样本,都确保依照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;
 - (3)、按照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列,将所回收到的包含生物标志物的组份化样本在支持材料上进行矩阵排列即矩阵化上样;
 - (4)、对所述矩阵化上样的样本进行高通量分析,从而对所述生物标志物进行检测、分析和/或预测。
2. 权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中,所述样本来源为组织来源。
3. 权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(3)中,所述支持材料选自硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板和珠。
4. 权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(4)中,所述高通量分析为对所述矩阵化上样的核酸样本进行 Northern blot 分析或对所述矩阵化上样的蛋白样本进行 Western blot 分析。
5. 权利要求1所述的方法,其特征在于,所述方法为检测来源于众多不同或相同组织的生物标志物的表达模式的高通量检测方法,所述方法包括对每个不同或相同组织来源的样本重复步骤(1)和(2),使所有不同或相同组织来源的包含生物标志物的样本都完成组份化过程和回收过程。
6. 权利要求1或5所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的类型包括:核酸,蛋白,多肽,脂质和/或多糖。
7. 权利要求6所述的方法,其特征在于,所述核酸包括:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)和/或cDNA。
8. 权利要求1所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)的组份化处理,是以生物标志物分子的自身属性分离为以所述一级设定序列排列的样本。
9. 权利要求8所述的方法,其特征在于,所述属性为生物医学属性。
10. 权利要求8或9所述的方法,其特征在于,所述属性选自:分子量、电荷、有机相溶解性、亲合性、质量、形状、密度和颜色。
11. 权利要求8所述的方法,其特征在于,所述分离方法选自以下的一种或几种:琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、二维PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲合色谱和梯度离心。
12. 权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所设定的一级设定序列所依据的参数包括距离、时间和/或顺序,所述距离、时间和/或顺序是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介中的迁移距离、时间和/或顺序,或是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介之外的迁移迁移距离、时间和/或顺序。
13. 权利要求1所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所设定的一级设定序列是根据样

本的分点来进行排列的。

14. 权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述切分点为由相伴随的分子量标准所指示的组份的分子量的大小。

15. 权利要求 13 或 14 所述的方法,其特征在于,所述系列样本的分界点与伴随的分子量标准呈线性、对数或指数关系。

16. 权利要求 13 所述的方法,其特征在于,所述一级设定序列为自然形成序列或由任一方式重新安排的序列。

17. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述样本的组织来源选自以下的一种或几种:血液、从胎盘、膀胱、大脑、脑额叶、脑海马、脑枕叶、脑顶页、脑颞叶、乳房、小脑、结肠、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、肌肉、卵巢、胰腺、直肠、皮肤、小肠、十二指肠、小肠回肠、小肠空肠、脾脏、胃、睾丸、扁桃腺、子宫宫颈和子宫宫体。

18. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (2) 中所述回收方法以自动化方式进行,或是使用相关试剂盒或商品化仪器来进行。

19. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (1) 中所述的以一级设定序列排列的在步骤 (3) 所述的每个支持材料上进行上样的系列组份化样本的数目为 2 到 500,000。

20. 权利要求 1 任一项所述的方法,其特征在于,步骤 (3) 中对所述的包含生物标志物的组份化样本矩阵化上样的步骤可以按照任意主观设定的序列或任意次序来进行。

21. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,步骤 (3) 中的所述矩阵化上样的方法为通过仪器自动进行或通过手工进行。

22. 权利要求 21 所述的方法,其特征在于,所述仪器为微阵列点样仪器。

23. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,对步骤 (3) 中所述的支持材料进行电荷或化学修饰操作以增强其分子结合能力,所述操作包括:聚赖氨酸化、甲硅烷基化、硅烷化。

24. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述方法的步骤 (4) 包括如下操作:

(4.1) 选择并设计可以与步骤 (3) 所述的矩阵化排列在支持材料上的生物标志物相结合并相互作用的探针分子;

(4.2) 分析步骤 (3) 中所述的按照步骤 (1) 所述的相应的一级序列和次级序列排列的包含生物标志物的组份化样本所呈现的表达状况;和

(4.3) 检测、分析和 / 或预测步骤 (1) 中所述生物标志物的属性。

25. 权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述探针分子选自:核糖核酸 (RNA)、脱氧核糖核酸 (DNA)、蛋白质、抗体和经化学修饰的蛋白。

26. 权利要求 25 所述的方法,其特征在于,所述经化学修饰的蛋白是指经化学标记、荧光标记、放射同位素标记或质谱分析激光标记的蛋白质探针。

27. 权利要求 24 所述的方法,其特征在于,所述方法包括:将步骤 (4.1) 中所述探针分子与在所述支持材料上矩阵化排列的生物标志物样本之间进行孵育和杂交的步骤。

28. 权利要求 27 所述的方法,其特征在于,所述探针分子的孵育或杂交过程可以手动操作或自动化进行。

29. 权利要求 24 所述的方法,其特征在于,步骤 (4.2) 的分析和 / 或 (4.3) 检测包括:分析和 / 或检测矩阵排列在所述支持材料上与生物标志物相互作用的探针分子。

30. 权利要求 29 所述的方法,其特征在于,所述分析和 / 或检测方法选自化学法、化学

发光法、荧光法、放射法和质谱分析法。

31. 权利要求 29 或 30 所述的方法,其特征在于,所述分析和 / 或检测所述支持材料上与生物标志物相互作用的探针分子数量的操作是以手动或自动进行的;或是使用仪器进行的。

32. 权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述手动或自动进行为使用胶片手工曝光。

33. 权利要求 31 所述的方法,其特征在于,所述使用仪器进行为使用微点阵扫描仪来进行。

34. 权利要求 1 所述的方法,其特征在于,所述步骤 (4) 包含对含有生物标志物的组份化样本的表达模式的分析。

35. 权利要求 34 所述的方法,其特征在于,所述分析为高通量方式处理并生成相应的数据库。

36. 权利要求 35 所述的方法,其特征在于,所述高通量方式包括:通过数学计算、计算机图像处理和 / 或数据分析。

37. 权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述数学计算是用于确定步骤 (1) 中所述的在组份化媒介之中或之外的以所述设定序列排列的包含生物标志物的组份化样本的迁移距离或时间。

38. 权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述计算机图像处理及其数据分析是用于确定步骤 (1) 中所述的以一级设定序列和次级设定序列排列生物标志物分子的数量。

39. 权利要求 36 所述的方法,其特征在于,所述的计算机图像处理及其数据分析是用于放大处理包含生物标志物的系列组份化样本的微点阵图像。

40. 一种制备用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的方法,其特征在于,所述方法包括如下步骤:

(1)、将所述包含生物标志物的原始样本以能够分离所述包含生物标志物的方法进行组份化,并依照其进行组份化方法所产生的参数所设定的一级设定序列和根据所述样本来源所设定的次级设定顺序,使得到的包含生物标志物的组份化样本在组份化介质上进行排列或表达;

(2)、从所述组份化介质上回收所述组份化样本,使回收得到的每一个组份化的样本,都确保依照步骤 (1) 中所设定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

(3)、按照步骤 (1) 中所设定的一级设定序列和次级设定序列,将所回收到的包含生物标志物的系列组份化样本在支持材料上进行矩阵化排列。

41. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述样本来源为组织来源。

42. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述支持材料选自硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板和珠。

43. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述方法中的原始样本为来源于不同个体的不同或相同组织的生物标志物的样本,所述方法包括对每一个体的不同或相同组织来源的样本重复步骤 (1) 和 (2),从而使所有不同或相同组织来源的包含生物标志物的样本都完成组份化过程和回收过程。

44. 权利要求 40 或 43 所述的方法,其特征在于,所述生物标志物的类型包括:核酸,蛋白,多肽,脂质和 / 或多糖。

45. 权利要求 44 所述的方法,其特征在于,所述核酸包括:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)和/或 cDNA。

46. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述步骤(1)的组份化处理,是根据生物标志物分子的自身属性来分离为以所述一级设定序列排列的系列样本。

47. 权利要求 46 所述的方法,其特征在于,所述属性为生物学属性。

48. 权利要求 46 或 47 所述的方法,其特征在于,所述属性选自以下的一种或几种:分子量、电荷、有机相溶解性、亲合性、质量、形状、密度和颜色。

49. 权利要求 46 所述的方法,其特征在于,所述分离方法选自以下的一种或几种:琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、二维 PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱和梯度离心。

50. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所设定的一级设定序列所依据的参数包括距离、时间和/或顺序,所述距离、时间和/或顺序是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介中的迁移距离、时间和/或顺序,或是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介之外的迁移距离、时间和/或顺序。

51. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所设定的一级设定序列是根据样本的切分点来进行排列的。

52. 权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述切分点为由相伴随的分子量标准所指示的组份的分子量的大小。

53. 权利要求 51 或 52 所述的方法,其特征在于,所述系列样本的分界点可与伴随的分子量标准呈线性、对数或指数关系。

54. 权利要求 51 所述的方法,其特征在于,所述一级设定序列为自然形成序列或由任一方式重新安排的序列。

55. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,所述样本的组织来源选自以下的一种或几种:血液、从胎盘、膀胱、大脑、脑额叶、脑海马、脑枕叶、脑顶页、脑颞叶、乳房、小脑、结肠、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、肌肉、卵巢、胰腺、直肠、皮肤、小肠、十二指肠、小肠回肠、小肠空肠、脾脏、胃、睾丸、扁桃腺、子宫宫颈和子宫宫体。

56. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(2)中所述回收方法以自动化方式进行,或是使用相关试剂盒或商品化仪器来进行。

57. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(1)中所述的一级设定序列排列的在步骤(3)所述的每个支持材料上进行上样的系列组份化样本的数目为 2 到 500,000。

58. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(3)中对所述的包含生物标志物的组份化样本矩阵化排列的步骤可以按照任意主观设定的序列或任意次序来进行。

59. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,步骤(3)中的所述矩阵化排列的方法为通过仪器自动进行或通过手工进行。

60. 权利要求 59 所述的方法,其特征在于,所述仪器为微阵列点样仪器。

61. 权利要求 40 所述的方法,其特征在于,对步骤(3)中所述的支持材料进行电荷或化学修饰操作以增强其分子结合能力,所述操作包括:聚赖氨酸化、甲硅烷基化、硅烷化。

62. 根据权利要求 40 所述的方法所制备的样本库,所述样本库包含在支持材料上矩阵

化排列的生物标志物的样本。

含有生物标志物样本的高通量分析方法和样本库制备

技术领域

[0001] 本发明属于生物工程技术领域。具体地,本发明涉及一种对于包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法;本发明还涉及一种用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的方法;本发明同时涉及根据本发明所述方法所制备的样本库。

背景技术

[0002] 对生物组织来源的具有一定生物学意义的生物标志物以适当形式进行分析,是生物医学研究中的一项重要命题。这种生物标志物分子是指包括但不限于:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)或cDNA、蛋白、多肽、脂质、多糖,通常要求以其相应生物学属性,如分子量、所带电荷来进行分离组份化,以进行更有价值和准确的分析。

[0003] 生物标志物分子的分离或组份化是由相关生物标志物分子所具有的一种或多种属性而决定的、能够使其与其他成分分子相分离的方法,包括琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、双向PAGE、等离子聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱、梯度离心。经生物标志物分离组份化的方法处理,生物标志物分子(群)以其本身属性与其他分子相区分,这些属性包括:分子量大小、电荷、有机相溶解性、亲合性、质量、形状、密度或颜色。

[0004] 例如,传统的RNA印迹技术(Northern blot)和蛋白免疫印迹技术(Western blot)是广泛应用于分析样品中RNA和蛋白生物标志物分子大小或含量的主要方法。Northern blot(对于RNA分子的分析)和Western blot(对于蛋白分子的分析)由Southern blot(对于DNA分子的分析)演化而来(Southern, E. M. 1975. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503-517, 此处作为文献引用),对一部分细胞或者组织而言这两种方法是检测分析生物标志物基因转录、表达翻译的分子量和表达水平的必备检测方法。

[0005] 尽管例如差异显示、RT-PCR或RNA保护检测(RPA)也适用于此种检测,但Northern blot分析和Western blot分析是对于特定生物标志物基因和特定生物标志物蛋白分子量及表达水平的最佳检测方法。其它的检测方法由于步骤复杂或引入酶的操作等而变得使用不便或者不通用。与其他方法比较,Northern blot分析和Western blot分析是对生物标志物基因和蛋白的实际情况的最好检测方法,这两种方法在确定备选的生物标志物的断裂基因的大小、生物标志物蛋白翻译后修饰、以及生物标志物基因和蛋白表达水平等方面都是必不可少的重要手段。

[0006] Northern blot和Western blot方法使用多年,其具体操作仍同多年前一致。在进行Northern blot时,对RNA生物标志物的琼脂糖电泳使用变性剂诸如甲醛和甲醛胺,因为RNA分子群每分子携带一单位负电子, RNA生物标志物在琼脂糖中的迁移速度取决于其核酸长度和分子大小。

[0007] 凝胶上组份化的RNA核酸生物标志物可以被点样于尼龙或者硝酸纤维膜上制成Northern blot。在Northern blot分析中,可以加入带有标记核苷酸和靶核苷酸互补片段

的探针对特定 RNA 生物标志物片段进行杂交探测。Northern blot 可以同时进行 RNA 生物标志物定量并测定其分子大小。

[0008] Western blot 与 Northern blot 方法的不同是由于蛋白质生物标志物与 RNA 生物标志物的根本性质不同。蛋白质依照其不同的氨基酸构成可以携带负电荷或者正电荷。

[0009] 为了得到基于分子量的整齐一致的梯度或系列排列的组份化蛋白分子标志物,在蛋白上样缓冲液和其电泳凝胶中加入了十二烷基硫酸钠 (SDS),二硫苏糖醇 (DTT) 和 β -巯基乙醇。SDS 是阴离子去垢剂,以特定的 1.4 : 1 质量比同蛋白质结合,其所携带的负离子电荷数同蛋白片的长度成正比。所有的蛋白分子同 SDS 结合后,整齐一致地携带负电荷,另外还原剂如二硫苏糖醇 (DTT) 和 β -mecarptoethanol (β -巯基乙醇) 可以打断蛋白质二硫键,以避免蛋白质的高级结构影响凝胶电泳。

[0010] 经过凝胶电泳后,凝胶可以进行染色分析或者进一步将蛋白转移到支持膜上来进行 Western blot 分析。为检测 Western blot 的特定蛋白生物标志物,针对特定靶生物标志物 (抗原) 的抗体与杂交膜一起孵育。结合的生物标志物-抗体复合物进一步进行化学发光、荧光、或放射测定。如同 Northern blot 一样,Western blot 可以同时进行蛋白生物标志物分子量大小和表达水平定量测定。

[0011] 传统 Northern blot 和 Western blot 分析是对于上述目的最主要的实验方法,然而,它们在一张膜上所能提供的样品容量是很有限的,一般一张膜上不会超过 10 个样品,此种缺陷使 Northern 或 Western blot 在大规模和高通量生物标志物分析中具有很大的局限性。

[0012] 随着人类基因组计划完成而出现的多达 30,000 个以上的新基因,使得对于生物标志物的高通量分析变得紧迫,美国专利 6,582,969 和 6,576,478 (Wagner 等人) 显示一种方法及其微型装置可以对于生物分子进行高通量筛选。

[0013] 这类微型装置包含特别的微型机械或者微型操作通路,带有多个内置非连续反应位点,由固化在单层结构上的生物分子部分通过亲合标记特别分子从而发生底物反应。这些微型装置可以筛选通道中流过的在功能或结构上相关的分子成分。美国专利 6,537,749 (Kuimelis 等人) 显示可溯源的阵列蛋白,其中核酸同蛋白融合物由一个接头层偶连在一固体层上,这个接头层一头是一个空间部分、另一头是另一寡核苷酸序列,同带有阵列分子群的偶连寡核苷酸序列相互补。

[0014] 这些阵列技术可以提供对于生物标志物的高通量的筛选方法,但它们都必须同不可移动的介质和亲合集团相构建,进一步而言,这些技术没有同上述传统 Northern blot 和 Western blot 检测方法相结合的主观意图,因而不能检测如 mRNA 或蛋白分子的片段大小等指标。因此,改进这些装置的相关缺陷,建立一种高通量的筛选系统就变得十分必要,这个系统具备更高的检测灵敏度并能实现高通量的筛选分析,而在同时却只消耗最少的宝贵样品。

[0015] 由于以上原因,很明显地,需要特别设计一种方法和相关仪器来高通量筛选生物标志物,这种仪器和方法可以将分子组份化技术和微阵列技术方法有效结合,从而创建一种更灵敏、消耗更少宝贵样品的方法来进行高通量筛选相关生物标志物。

发明内容

[0016] 除非另外说明,本文中使用的术语“生物标志物”是指对生物组织来源的具有一定生物学意义的物质,其包括但不限于:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)或cDNA、蛋白、多肽、脂质和/或多糖。

[0017] 除非另外说明,本文中使用的表述“组份化”是指由相关生物标志物分子所具有的一种或多种属性而决定的、能够使其于其他成分分子相分离的方法,其包括但不限于:琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、双向PAGE、等离子聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱和/或梯度离心。

[0018] 除非另外说明,本文中使用的术语“一级设定序列”是指在组份化媒介中依照参数如时间、距离或者相应排列设定的序列;本文中使用的术语

[0019] “次级设定序列”是指按照组份化样本的来源而设定的序列。

[0020] 除非另外说明,本文中使用的表述“HT Northern blot”和“HT Western blot”分别表示“高通量核酸印记法”和“高通量蛋白印记法”,是指来源于众多不同样本的经过组份化分离的mRNA或蛋白以矩阵形式进行印迹分析以检测相关mRNA或蛋白生物标志物的表达模式,其原理和应用方式同处理较少样品的传统Northern blot或Western blot相类近。

[0021] 本发明的目的在于,提供一种适应于生物标志物的高通量筛选系统的解决方法,如将上述的Northern blot分析或Western blot分析结合,根据生物标志物的不同属性及由此而产生的不同组份化方法和途径相结合。具体地,本发明的一个目的在于,提供一种对包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法。本发明的另一个目的在于,提供一种用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的制备方法。本发明的又一个目的在于,提供一种根据本发明所述的方法所制备的样本库。

[0022] 针对上述发明目的,本发明提供以下技术方案:

[0023] 一方面,本发明提供一种对于包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法,所述方法包括如下步骤:

[0024] (1)、将所述包含生物标志物的原始样本以能够分离所述包含生物标志物的方法进行组份化,并依照其进行组份化方法所产生的参数所设定的一级设定序列和根据所述样本来源所设定的次级设定顺序,使得到的包含生物标志物的组份化样本在组份化媒介上进行排列或表达,优选地,所述样本来源为生物组织来源;

[0025] (2)、从所述组份化介质上回收所述组份化样本,使回收得到的每一个组份化的样本,都确保依照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

[0026] (3)、按照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列,将所回收到的包含生物标志物的组份化样本在支持材料上进行矩阵排列即矩阵化上样,所述支持材料优选为硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板和磁珠等;

[0027] (4)、进行高通量分析所述矩阵化上样的样本,从而对所述生物标志物进行检测、分析和/或预测;优选地,所述高通量分析为对矩阵化上样的核酸样本进行Northern blot分析或对矩阵化上样的蛋白样本进行Western blot分析。

[0028] 优选地,所述方法为检测来源于众多不同组织的生物标志物的表达模式的高通量检测方法,所述方法包括对每个不同组织来源的样本重复步骤(1)和(2),使所有不同组织来源的包含生物标志物的样本都完成组份化过程和回收过程。

[0029] 优选地,所述生物标志物的类型包括:核酸如核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)和/或cDNA,蛋白,多肽,脂质和/或多糖。

[0030] 优选地,所述步骤(1)的组份化处理,是以生物标志物分子的自身属性优选为生物医学属性来分离为所述一级设定序列排列的样本,优选地,所述属性选自:分子量大小、电荷、有机相溶解性、亲合性、质量、形状、密度和颜色;更优选地,所述分离方法选自以下的一种或几种:琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、二维PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲合色谱和梯度离心。

[0031] 优选地,步骤(1)中所设定的一级设定序列所依据的参数包括距离、时间和/或顺序,所述距离、时间和/或顺序是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介中的迁移距离、时间和/或顺序,或是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介之外的迁移距离、时间和/或顺序。

[0032] 优选地,步骤(1)中所设定的一级设定序列可以根据样本的切分点如由相伴随的分子量标准所指示的组份的分子量的大小作为切分点进行排列;更优选地,所述系列样本的分界点可与伴随的分子量标准呈线性、对数或指数关系;和/或所述一级设定序列为自然形成序列或由任一方式重新安排的序列。

[0033] 优选地,所述样本的组织来源选自以下的一种或几种:血液、胎盘、膀胱、大脑、脑额叶、脑海马、脑枕叶、脑顶页、脑颞叶、乳房、小脑、结肠、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、肌肉、卵巢、胰腺、直肠、皮肤、小肠、十二指肠、小肠回肠、小肠空肠、脾脏、胃、睾丸、扁桃腺、子宫宫颈和子宫宫体。

[0034] 优选地,步骤(2)中所述回收方法以自动化方式进行,或是使用相关试剂盒或商品化仪器来进行。

[0035] 优选地,步骤(1)中所述的一级设定序列排列的包含生物标志物的组份化样本在步骤(3)所述的每个支持材料上进行上样的组份化样本的数目为2到500,000。

[0036] 优选地,步骤(3)中对所述的包含生物标志物的组份化样本矩阵化上样的步骤可以按照任意主观设定的序列或任意次序来进行。

[0037] 优选地,步骤(3)中的所述矩阵化上样的方法为通过微阵列点样仪器自动或不借助仪器手工进行。

[0038] 优选地,对步骤(3)中所述的支持材料进行电荷或化学修饰操作以增强其分子结合能力,所述操作包括:聚赖氨酸化、甲硅烷基化、硅烷化。

[0039] 优选地,所述方法的步骤(4)包括如下操作:

[0040] (4.1) 选择并设计可以与步骤(3)所述的矩阵排列在支持材料上的生物标志物相结合并相互作用的探针分子;优选地,所述探针分子选自:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)、蛋白质、抗体和经化学修饰的蛋白;进一步优选地,所述经化学修饰的蛋白是指经化学标记、荧光标记、放射同位素标记或质谱分析激光标记的蛋白质探针。

[0041] (4.2) 分析步骤(3)中所述的按照步骤(1)所述的相应的一级序列和次级序列排列的包含生物标志物的组份化样本所呈现的表达状况;和

[0042] (4.3) 检测并分析预测步骤(1)中所述生物标志物的属性。

[0043] 进一步优选地,所述方法包括:将步骤(4.1)中所述探针分子与所述支持材料上

矩阵排列的生物标志物样本之间进行孵育和杂交的步骤,优选地,所述探针分子的孵育或杂交过程可以手动操作或自动化进行。

[0044] 进一步优选地,步骤(4.2)的分析和/或(4.3)检测包括:分析和/或检测矩阵排列在所述支持材料上与生物标志物相互作用的探针分子;优选地,其方法选自化学法、化学发光法、荧光法、放射法和质谱分析法。

[0045] 更优选地,所述分析和/或检测在所述支持材料上与生物标志物相互作用的探针分子数量的操作是以手动进行的,例如使用胶片手工曝光;或是使用仪器进行的,例如使用微点阵扫描仪来进行。

[0046] 优选地,所述步骤(4)包含生物标志物的组份化样本的表达模式的分析;优选地,所述分析包括通过数学计算和计算机图像处理和数据分析等高通量方式处理并生成相应数据库。

[0047] 优选地,所述数学计算是用于确定步骤(1)中所述的在组份化媒介之中或之外的以所述设定序列排列的包含生物标志物的组份化样本的迁移距离或时间。

[0048] 优选地,所述计算机图像处理及其数据分析是用于确定步骤(1)中所述的以一级设定序列和次级设定序列排列生物标志物分子的数量。

[0049] 优选地,所述的计算机图像处理及其数据分析是用于放大处理包含生物标志物的组份化样本的微点阵图像。

[0050] 另一方面,本发明提供一种用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的制备方法,所述方法包括如下步骤:

[0051] (1)、将所述包含生物标志物的原始样本以能够分离所述包含生物标志物的方法进行组份化,并依照其进行组份化方法所产生的参数所设定的一级设定序列和根据所述样本来源所设定的次级设定顺序,使得到的包含生物标志物的组份化样本在组份化媒介上进行排列或表达,优选地,所述样本来源为组织来源;

[0052] (2)、从所述组份化介质上回收所述组份化样本,使回收得到的每一个组份化的样本,都确保依照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

[0053] (3)、按照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列,将所回收到的包含生物标志物的组份化样本在支持材料上进行矩阵化排列,所述支持材料优选为硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板和磁珠。

[0054] 优选地,所述方法中的原始样本为来源于不同个体的不同组织的含生物标志物的样本,所述方法包括对每一个体的不同组织来源的样本重复步骤(1)和(2),使所有不同组织来源的包含生物标志物的样本都完成组份化过程和回收过程。

[0055] 优选地,所述生物标志物的类型包括:核酸如核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA)和/或cDNA,蛋白,多肽,脂质和/或多糖。

[0056] 优选地,所述步骤(1)的组份化处理,是以生物标志物分子的自身属性优选为生物学属性来分离为所述一级设定序列排列的样本,优选地,所述属性选自:分子量大小、电荷、有机相溶解性、亲合性、质量、形状、密度和颜色;优选地,所述分离方法选自以下的一种或几种:琼脂糖凝胶电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、二维PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱和梯度离心。

[0057] 优选地,步骤(1)中所设定的一级设定序列所依据的参数包括距离、时间和/或顺序,所述距离、时间和/或顺序是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介中的迁移距离、时间和/或顺序,或是所述包含生物标志物的组份化样本在该组份化媒介之外的迁移距离、时间和/或顺序。

[0058] 优选地,步骤(1)中所设定的一级设定序列可以根据样本的切分点如由相伴随的分子量标准所指示的组份的分子量的大小作为切分点进行排列;优选地,所述系列样本的分界点可与伴随的分子量标准呈线性、对数或指数关系;和/或所述一级设定序列为自然形成序列或由任一方式重新安排的序列。

[0059] 优选地,所述样本的组织来源选自以下的一种或几种:血液、胎盘、膀胱、大脑、脑额叶、脑海马、脑枕叶、脑顶页、脑颞叶、乳房、小脑、结肠、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、肌肉、卵巢、胰腺、直肠、皮肤、小肠、十二指肠、小肠回肠、小肠空肠、脾脏、胃、睾丸、扁桃腺、子宫宫颈和子宫宫体。

[0060] 优选地,步骤(2)中所述回收方法以自动化方式进行,或是使用相关试剂盒或商品化仪器来进行。

[0061] 优选地,步骤(1)中所述的一级设定序列排列的包含生物标志物的组份化样本在步骤(3)所述的每个支持材料上进行上样的组份化样本的数目为2到500,000。

[0062] 优选地,步骤(3)中对所述的包含生物标志物的组份化样本矩阵化排列的步骤可以按照任意主观设定的序列或任意次序来进行。

[0063] 优选地,步骤(3)中的所述矩阵化排列的方法为通过微阵列点样仪器自动或不借助仪器手工进行。

[0064] 优选地,对步骤(3)中所述的支持材料进行电荷或化学修饰操作以增强其分子结合能力,所述操作包括:聚赖氨酸化、甲硅烷基化、硅烷化。

[0065] 另一方面,本发明提供一种根据本发明所述的方法所制备的样本库,所述样本库包含生物标志物的矩阵化排列的样本和所述样本在其上进行矩阵化排列的支持材料。

[0066] 根据本发明的一个优选的实施方案,本发明提供一种对于相同组织(群)或不同组织(群)的包含生物标志物的众多分子(群)而来的多种分子组分(群)进行高通量分析的方法,包括以下步骤:

[0067] (1) 对于所述的众多分子组份(群)依照其生物标志物的属性以至少一种组份化方法或两种及以上的方法组合对其进行组份化,使之成为一种谱系排列或包含生物标志物的组份化分子(群)亚群的一系列分子组份(群)。其中,所述的包含生物标志物的分子组份谱系或一系列组份(群)依照其进行组份化方法所产生的参数,如距离、时间、顺序,所设定的一级设定序列,同时以相关来源样品组织所设定的次级设定顺序在组份化媒介上进行排列或表达;

[0068] (2) 从该组份化介质上回收经组份化的包含生物标志物的系列分子:使所述的回收得到的每一个组份化的包含生物标志物的分子组份,都确保依照步骤(1)中所设定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

[0069] (3) 按步骤(1)所述指定的一级设定序列和次级设定序列,将所回收到的包含生物标志物的组份化系列分子群以矩阵排列在支持材料;

[0070] (4) 选择并设计可以同步骤(3)所述的矩阵排列在支持材料上的生物标志物相结

合并相互作用的探针分子；

[0071] (5) 分析步骤 (3) 中所述的按照步骤 (1) 所述的相应的一级和次级序列排列的包含生物标志物的组份化分子 (群) 所呈现的表达状况；

[0072] (6) 检测并分析预测步骤 (1) 中所述的生物标志物的属性。

[0073] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (4) 所述探针分子同支持材料上矩阵排列的生物标志物分子 (群) 之间的孵育和杂交步骤。

[0074] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (4) 所述的检测矩阵排列在支持介质上的与生物标志物相互作用的探针分子的检测方法, 如化学法、化学发光法、荧光法、放射法或质谱分析法。

[0075] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 所述的含有生物标志物的组份化分子 (群) 是来源于相同或不同组织 (群) 的具有相同或不同属性的, 可以依照其属性而经相应组份化方法进行组份化成为一个谱系排列或者一系列组份 (群) 的相同或不同的包含生物标志物的组份化分子混合物。

[0076] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案, 所述的组份化方法中, 包含生物标志物的组份化分子包含但不限于: 核酸 (DNA, cDNA 或 RNA)、蛋白质、多肽、脂质或多糖。

[0077] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 中所述的经组份化处理的包含生物标志物的分子保持其初始或者进一步处理后的状态。

[0078] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 所述的包含生物标志物的组份化分子 (群) 的属性, 是指包含但不限于: 分子量大小、所带电荷、溶解性、质量、密度、亲合力、体积或颜色。

[0079] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 中所述的组份化方法, 是指由以下分离方法所选取的, 包含但不限于: 琼脂糖凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 二维 PAGE, 等电聚焦, 离子交换色谱, 过滤色谱, 疏水色谱, 高效液相色谱 (HPLC), 薄层色谱 (TLC), 气相色谱, 原子吸收, 亲和色谱和梯度离心。

[0080] 根据本发明的一个进一步更加优选的实施方案, 所述组份化方法可以是其中两个方法的组合或两个以上分离方法的组合。

[0081] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 中所述的距离、时间, 可以是包含生物标志物的组份化分子 (群) 在该组份化媒介中的迁移距离、时间, 也可以是包含生物标志物的组份化分子 (群) 在该组份化媒介之外的迁移距离、时间。

[0082] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 中所述的组份化方法, 可以根据系列的切分点进行。例如由相伴随的分子量标准所指示的组份的分子量的大小作为切分点进行。

[0083] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 所述的主观确定的系列组份分界点可与伴随的分子量标准呈线性, 对数, 或指数关系。

[0084] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (1) 中所述的一级设定序列可以是所述的包含生物标志物的组份化分子 (群) 的自然形成序列, 或由任一方式重新安排的序列。

[0085] 根据本发明的一个更加优选的实施方案, 步骤 (2) 中所述的回收方法可以主观地包含不对所述组份化媒介的包含生物标志物的组份化分子 (群) 进行分离的方法。

[0086] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(2)中所述的回收方法可以自动化方式进行。

[0087] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(2)中所述的回收方法可以使用相关试剂盒或者市场提供的商品化仪器来进行。

[0088] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(3)中所述的包含生物标志物的组份化分子(群)矩阵化上样于支持材料上的方法可以通过微阵列点样仪器自动或不借助仪器手工进行。

[0089] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(1)中所述的一级设定序列排列的包含生物标志物的组份化分子上样于步骤(3)所述的每个支持材料上的组份数量可以在2到500,000之间变化。

[0090] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(3)中所述的包含生物标志物的组份化分子(群)矩阵化上样的步骤可以按照任意主观序列或任意次序进行。

[0091] 根据本发明的一个更加优选的实施方案,步骤(3)中的支持材料可以从以下材料中挑选,包括但不限于:硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板及珠。

[0092] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的支持材料可以进行电荷或化学修饰操作以增强分子结合能力,这些操作包括但不限于:聚赖氨酸化、甲硅烷基化、硅烷化。

[0093] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,步骤(4)中所述的探针分子包括:RNA(核糖核酸),DNA(脱氧核糖核酸),蛋白质,抗体,或经化学修饰的蛋白,这种化学修饰的蛋白是指经化学标记、荧光标记、放射同位素标记或者质谱分析的激光标记的蛋白质探针。

[0094] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的探针分子的孵育或杂交过程可以手动操作或自动化进行。

[0095] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的支持材料上与生物标志物相互作用的探针分子数量的检测步骤可以手动执行,例如在组份化分子(群)数量较少时在实验室条件下使用胶片手工曝光,或者也可以使用仪器进行,例如在支持材料上有较多组份化分子(群)可使用仪器如微点阵扫描仪进行。

[0096] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的包含生物标志物的组份化分子(群)表达模式分析可以通过数学计算、计算机图像处理和数据分析等高通量方式处理并生成相应数据库。

[0097] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的数学计算可以准确确定权利要求1步骤(1)中所述的在组份化媒介之中或之外的以基本设定序列排列的包含生物标志物的组份化分子(群)的迁移距离或时间。

[0098] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的计算机图像处理及其数据分析确定权利要求1步骤(1)中所述的以一级设定序列和次级设定序列排列生物标志物分子的数量。

[0099] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的计算机图像处理及其数据分析可以放大处理包含生物标志物的组份化分子(群)的微点阵图像。

[0100] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的计算机图像处理及其数据分析所需的组份化分子的样品数量比传统的Western blot(免疫印迹)分析或Northern

Blot(RNA 印迹)分析所需的样品数量要少几十甚至几百倍以上。

[0101] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的包含生物标志物的组份化分子(群)直接矩阵化上样于支持材料将比传统的 Western blot(免疫印迹)分析或 Northern Blot(RNA 印迹)分析会产生更强的信号和更高的检测灵敏度。

[0102] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述的计算机图像处理及其数据分析的方法,可直接包含生物标志物的从组份化分子(群)中采集、分析和转换成相应的数据库,而 Western blot(免疫印迹)分析或 Northern Blot(RNA 印迹)分析无法做到。

[0103] 根据本发明的另一个优选的实施方案,本发明提供一种从相同组织(群)或不同组织(群)的众多分子(群)生成的包含生物标志物的分子组份的高通量处理方法,其步骤包括:

[0104] (1) 以可组份化的方式提供所述组织来源的包含生物标志物的众多分子组份(群);

[0105] (2) 对于所述的包含生物标志物的众多分子组份(群)依照其属性以至少一种组份化方法对其进行组份化,使之成为一个谱系排列或包含组份化分子亚群的一系列包含生物标志物的分子组份,在其中,所述的分子组份谱系或所述的一系列组份群依照其组份化方法的参数,如距离、时间、顺序,以特定的一级设定序列同时以相关来源组织(群)的次级设定序列在可以进行组份化的媒介上进行组份化排列或表达;

[0106] (3) 从该组份化媒介中回收得到的经组份化的包含生物标志物的系列组份化分子(群):使所述回收到的每一个组份化的包含生物标志物的分子组份(群),都确保依照步骤(2)指定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

[0107] (4) 按步骤(2)所述特定的一级设定序列和次级设定序列,将相应的回收得到的包含生物标志物的系列组份化分子(群)以矩阵方式上样于支持材料上,使其可以以一种高通量方式被进一步操作。

[0108] 根据本发明的另一个优选的实施方案,本发明提供从众多不同组织(群)或相同组织(群)而来的生物标志物的一种高通量的表达模式检测方法,所述方法包含以下步骤:

[0109] (1) 以可被组份化的方式提供从上述大量不同组织(群)或相同组织(群)而来的众多包含生物标志物的分子组份;

[0110] (2) 对于所述的包含生物标志物的众多分子群依照其属性以至少一种组份化方法或组合对其进行组份化,使之成为一种谱系排列或包含组份化分子(群)亚群的一系列包含生物标志物的分子组份,在其中,所述的分子组份谱系或包含生物标志物的一系列组份(群)依照其进行组份化方法的参数,如距离、时间、顺序,以特定的一级设定序列同时以相关来源组织样品的次级设定序列在可以进行组份化的媒介上进行组份化排列或表达;

[0111] (3) 从该组份化介质上回收经组份化的包含生物标志物的系列分(群):使所述回收到的每一个包含生物标志物的组份化的分子组份,都确保依照步骤(2)指定的一级设定序列和次级设定序列进行分序和排列;

[0112] (4) 对每个所述的不同组织或相同组织重复步骤(2)和(3),使所有不同组织或相同组织来源的包含生物标志物的分子组份都完成组份化过程和回收过程;

[0113] (5) 根据步骤(2)所述特定的一级设定序列和次级序列将所述的从众多不同组织

或相同组织回收的包含生物标志物的组份化分子排列上样于支持材料上,以进行步骤(6)的操作或进行后续操作;

[0114] (6) 选择并设计适当的探针分子,这种探针分子可以同矩阵化排列于步骤(5)所述的支持材料上的生物标志物相互作用,以使前述众多不同组织或相同组织而来的生物标志物产生理想的表达模式;

[0115] (7) 分析并且对比从所述的众多不同组织或相同组织而来的依照步骤(2)所述的特定一级设定序列和次级设定序列排列的包含生物标志物的矩阵组份化分子(群)的表达特点;

[0116] (8) 检测和分析步骤(2)所述的生物标志物的属性。

[0117] 根据本发明的一个进一步优选的实施方案,所述众多不同组织样品,包括但不限于:由人体或动物组织而来的:血液、胎盘、膀胱、大脑、脑额叶、脑海马、脑枕叶、脑顶页、脑颞叶、乳房、小脑、结肠、食道、心脏、肾脏、肝脏、肺脏、肌肉、卵巢、胰腺、直肠、皮肤、小肠、十二指肠、小肠回肠、小肠空肠、脾脏、胃、睾丸、扁桃腺、子宫宫颈和子宫宫体。

[0118] 本发明是关于采用微点阵矩阵化方式的高通量(HT)生物标志物分析技术。包含生物标志物的分子依据其属性被组份化处理并生成相应的一级设定序列,并以相应分子(群)的组织来源生成其次级设定序列,使每个组份化的包含生物标志物的分子(群)可以实现寻址和溯源。依照一级设定序列和次级设定序列以高通量方式对所述的包含生物标志物的组份化分子(群)进行回收、矩阵点样、分析检测。生物标志物属性可以被检测和分析。本发明同现有生物标志物分析方法相比,提供以下创新点:高敏感性、包含生物标志物的材料的低消耗、高通量的处理平台、可以直接生成相应数据库进行分析。

[0119] 本发明涉及生物标志物高通量矩阵分析技术。本发明的高通量分析技术在传统生物标志物分析技术例如 Northern blot、Western blot、Southern blot 和 protein 2-D blot 的基础上引入采用矩阵模式从而建立起一种高通量分析技术。

[0120] 生物标志物,无论是 DNA、RNA、蛋白、脂类或多糖分子,都是以其分子量大小和电荷而分离组份化。从多种样品而来的被分离组份化的分子(群),同时标记以一级设计序列和次级设计序列,也依照同样的一级设计序列和次级设计序列排列进行组份的回收,然后再点样到支持材料上,依旧以相同的一级设计序列和次级设计序列进行相关组份的排列。

[0121] 为对本发明进行说明的方便,分子量或分子大小在此例中作为 mRNA 和蛋白生物标志物的主要参数,据此特性分离相应分子。对于不同的靶生物标志物可以使用多种不同方法以使分子量或分子大小不易区分的 mRNA 和蛋白生物标志物得到相对应的区别和分析。生物标志物的分子量或者分子大小在基因转录和翻译表达过程中是很关键的参数,在本发明中,众多组织样品中以特别设定的一级设定序列、次级设定序列来标记相关生物标志物用以进行高通量分析相应分子的表达模式及基因和蛋白表达水平。

[0122] 本发明的适用领域包括但不限于升级替代传统的 Northern blot 或 Western blot 分析技术,本发明还适用于由生物标志物不同属性所决定的采用多种不同组份化方法的生物标志物的多种不同的分析检测。

[0123] 本发明所涉及的生物标志物类型包括,但不限于:核酸,(例如:核糖核酸(RNA)、脱氧核糖核酸(DNA))或 cDNA、蛋白、多肽、类脂、多糖。

[0124] 本发明中所涉及的生物标志物分离组份化方法是指依照生物标志物的一种或多

种属性而使其于其他分子相分离并产生一个谱系分子组份或一系列分子组份的方法,这些方法包括但不限于:琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、双向PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱、梯度离心。利用以上组份化方法,生物标志物由以下属性而分离组份化:分子量大小、电荷、有机溶解性、亲合力、质量、形状、密度及颜色等。本发明适用的分离组份化方法包含全部使生物标志物与其他分子相区分并产生分子谱系或一系列分子组份的方法。

[0125] 本发明的一个具体应用是提供一种从相同或不同组织来源的生物标志物分子(群)而来的生物标志物高通量分析方法。

[0126] 第一步骤为组份化,是对于所述的多种生物标志物分子组份(群)依照其相应的分子属性组份化而使之成为包含生物标志物的一个谱系或一系列组份(群)的一个或多个组份化样本。在进行组份化操作的同时或之前,包含生物标志物的谱系排列或者系列都被设计为一级设定序列和次级设计序列。一级设定序列可以依照相关分子以某一组份化方法在组份化媒介中所安排或表现出来的顺序,例如距离、时间或顺序等相关参数来设定。用于设定基本设定序列的距离或时间可以是包含生物标志物的组份化分子(群)在组份化媒介的迁移泳动距离和时间或者是包含生物标志物的组份化分子(群)从媒介中所迁移出的距离或时间。基本设定序列是指以相应系列组份在组份化媒介(如凝胶)中任一自然发生的顺序,或者是主观重新设定的顺序。

[0127] 在本发明中,所指的包含生物标志物的组份化分子(群)可以是由各种分子所具备的相似或不同属性而采取的相似或不同分离组份化的方法处理得到的由相似或不同的生物分子所组成的单一体或混合物。

[0128] 所述包含生物标志物的组份化分子(群)可以包括,但不限于:以相应初始形态(如顺序)或者后续操作方便而变更的形态并经组份化处理及其回收处理而得到的核酸(DNA, cDNA or RNA)、蛋白、多肽、类脂、多糖。组份化分子(群)的属性是指常被用于获得理想的分子组份化形态的属性,包括但不限于:分子量、电荷、溶解性、重量、密度、亲合性、质量、颜色。适用于本发明的组份化方法可以是指由以下众多的方法中所挑选出来的多种分离方法,包括但不限于:琼脂糖电泳、聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)、双向PAGE、等电聚焦、离子交换色谱、过滤色谱、疏水色谱、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、气相色谱、原子吸收、亲和色谱、梯度离心。需要特别说明的是,本发明适用的组份化方法是能够分离组份化生物标志物相关分子组份(群)方法中的一种或者两种以上及其组合。确切地说,当分子组份(群)需要确定其区分位置时,可以主观选择使用如分子量等作为参照,以分子量标准品来判断分子组份的切分位置,包括使用分子量标准品的线性、对数或者指数关系来确定分子组份的切分位置。

[0129] 第二步骤为回收,分离组份化过程一经完成,即可回收在组份化媒介上的包含生物标志物的组份化系列分子组份(群)。

[0130] 为了清楚地显示和回溯所回收的包含生物标志物的组份化分子的特性及来源,同时也为使高通量操作成为可能,每一系列包含生物标志物的组份化分子的排列顺序严格遵守该系列组份化分子(群)在回收时所设定的一级设定序列和相应的次级设定序列进行排列。

[0131] 因此,含有生物标志物的系列组份化分子(群)拥有与组份化媒介上排列或表现

相同的“设计地址”。就此意义而言,本发明区别与其他技术的一个独特特点,即建立一种“可寻址”机制,根据其相关性来追踪、归类相关组份组群。之后,适用于高通量分析的支持材料上系列组份化分子的排列和矩阵方式也依同理进行。在此需要说明的是,以上所述的回收步骤也可以主观进行。具体而言,回收步骤可以采用全自动方式或者借助市场提供的商品化工具或材料进行。

[0132] 第三步骤为矩阵化排列,是对于包含生物标志物的系列组份化分子在支持材料上按照一级设定序列和次级设定序列进行矩阵化排列的过程,以使系列矩阵化的组份化分子可以依照序号而追溯其样品组织来源及群组归属。对于在支持材料上矩阵布置的包含生物标志物的组份化分子(群)的上样过程可以使用自动微型点样仪器自动完成,也可以手工方式完成。本发明中每个支持材料上以一级设定序列和次级设定序列上样的分子组份(群)的数目可以为2个到500,000。

[0133] 另外,上样步骤可以按主观序列进行。支持材料可以包括本行业众多的材料选择。在本发明应用中,本发明的支持材料包括但不限于:硝酸纤维素、尼龙、塑料、玻璃、多孔板或磁珠。本发明中,支持材料还可以进一步被电荷处理或者化学处理使之具有结合增强分子,例如多聚赖氨酸或者甲硅烷基化和硅烷化等支持材料。

[0134] 第四步骤为设计和选择探针,是设计和选择同吸附于支持材料上的包含生物标志物的系列组份化分子(群)相互作用的探针分子。这个步骤进一步包含对探针分子和吸附于支持材料上的包含生物标志物的组份化分子矩阵进行孵育和杂交的过程。这种孵育和杂交的处理过程一经结束,与支持材料上生物标志物相互作用的相关探针分子数量由其检测方法确定,这种方法包括:化学法、化学发光法、荧光法或者放射活性方法。

[0135] 在本发明中,探针分子可以是进行化学标记、荧光标记、放射同位素标记的RNA、DNA、蛋白、抗体或者修饰蛋白。这个检测过程可以是手工进行,例如在包含生物标志物组份化分子(群)的数目较少时在实验室条件下采用胶片曝光法,也可以采用相应仪器来进行,例如当支持材料上具有较多含有生物标志物的组份化分子点阵时使用微点阵阅读仪。

[0136] 第五步骤为分析回归处理,本发明提供一个附加的应用是一种依照其一级设定序列与次级设定序列对于含有生物标志物的组份化分子(群)的表达模式进行分析和回归的步骤。这种对于含有生物标志物的系列组份化分子表达模式的优选应用是借助于计算机化图像和数学分析计算以高通量形式生成所需数据库。这种数学计算分析可以精确测算一级设定序列和次级设定序列的含有生物标志物系列组份化分子(群)在组份化媒介之中或之外的迁移距离和时间,这种计算机图像和数字化分析可以精确测算基本和次级设定序列的含有生物标志物的系列组份化分子数量。进一步地,这种计算机图像和数据分析可以放大含有生物标志物的系列组份化分子(群)的微阵列点的图像。因此,由于计算机化图像和数据处理的应用,本发明中所需的组份化分子数量将远少于传统Northern blot分析或Western blot分析。同时,与传统的Northern blot分析或Western blot分析方法相比,本发明中含有生物标志物的系列组份化分子上样于支持材料可以提供更强信号从而显著加强检测灵敏度。

[0137] 由于计算机化的图像处理和数据采集可以直接采集、分析并实现生物标志物组份化分子(群)信息向数据库的转换。由于本发明可以从大量组织样品而来,例如多种不同或相同组织样品而来的生物标志物系列组份化分子(群)高通量分析处理平台,本发明优

于传统 Northern blot 分析或 Westernblot 分析,具有它们不具备的优势。

[0138] 本发明的一个具体应用是提供一种从相同或不同的组织样品的含有生物标志物的众多分子(群)的高通量操作方法。这种方法包括如下步骤:

[0139] (1) 提供来源于相同或不同组织样品适用于组份化方法的含有生物标志物的大量分子(群);

[0140] (2) 使用至少一种组份化方法将众多含有生物标志物的分子(群)组份化为一个谱系或者包含系列组份化分子亚群的系列组份(群),所述的含有生物标志物的系列分子组份(群)设定以相应一级设定序列和次级设定序列,其中一级设定序列依照相应的组份化方法、根据组份化媒介的组份化参数,如距离、时间、或者组份顺序而设定;

[0141] (3) 以相同的一级设定序列和次级设定序列从该组份化媒介上回收所述的含有生物标志物的系列分子组份;以及

[0142] (4) 为下一步操作方便,以步骤(2)中相同的一级设定序列和次级设定序列将组份化分子群矩阵排列在支持材料上。

[0143] 本发明的另一个具体应用是提供一种高通量地评估众多不同组织起源不同含有生物标志物的分子组份群的表达模式的方法。确切而言,这种方法可以比较不同组织来源的分子组份(群),这种组织来源可以是来自不同的细胞系或不同的组织。因为使用相同的处理方法处理所有的分子组份(群),所以本发明是高通量地评估众多不同组织来源的含有生物标志物的相应分子(群)的特异表达模式和特异生物活性的一种优异方法。

[0144] 在实践中,本方法提供多种不同来源适宜组份化方法的含有生物标志物的分子组份群;对于所述的组织如一个组织而来的含有生物标志物的不同分子组份(群)进行组份化,依照其相应属性,并使用所述的至少一种组份化方法,使所述的分子组份(群)组份化成为一个谱系或一系列包含亚群的系列分子组份(群)。此处所述含有生物标志物的每一谱系或者系列组份(群)是指以一级设定序列和次级设定序列而设定标记的,此一级设定序列是指在组份化媒介中依照参数如距离、时间或者相应排列设定的序列,次级设定序列是指按照该组份样本的组织来源而设定的序列(例如:血液样品1、血液样品2、血液样品3等);重复组份化操作以使上述不同来源的含有生物标志物的分子组份(群)全部被分离组份化;从所述组份化媒介上回收一个组织来源的含有生物标志物的一系列组份(群),并且确保每个分子组份都以相应的一级设定序列和次级设定序列都被全部回收;重复回收步骤,将所述的不同组织来源的含有生物标志物的系列组份化分子进行回收操作;为进行下一步操作,必须将所述的不同组织起源的含有生物标志物的系列组份化分子(群)以相应的一级设定序列和次级设定序列矩阵化上样于支持材料;设计和选择于支持材料上的不同组织来源的含有生物标志物的系列组份化分子(群)相作用的适宜探针分子,以获得不同样品来源的矩阵化排列的生物标志物的理想检测表达模式;同时可以对所述众多不同样品来源的以一级设定序列和次级设定序列矩阵化上样的含有生物标志物的组份化分子(群)所呈现的特征模式进行相应的分析和比较。

[0145] 下面,结合本发明的设计构思,进一步地详细说明本发明:

[0146] 本发明为生物标志物高通量(HT)分析提供一种解决方法,例如生物样品中核酸生物标志物或蛋白生物标志物的矩阵化分析。在本发明的优选具体应用中,对信使RNA(mRNA)生物标志物或者蛋白生物标志物进行表达和分析,用以说明本发明的内涵。

[0147] 矩阵化 HT Northern blot 和矩阵化 HT Western blot, 作为本发明的两种具体应用, 对信使 RNA (mRNA) 生物标志物和蛋白生物标志物进行高通量 (HT) 分析。然而, 在本发明的具体应用中, 含有生物标志物的组份化分子 (群) 的转移过程同当前传统的 Northern blot 或 Western blot 方法有根本不同。

[0148] 本发明的概念由图 1 所示, 此流程图显示 HT Northern/Western blot 分析中的主要步骤:

[0149] 1、组份化分离:

[0150] 多种组织来源的含有生物标志物的蛋白或 mRNA 以凝胶电泳的方式组份化分离, 以图中描述的方式将含有生物标志物的凝胶中所包括的各组份 (群) 分离成为适宜形态的许多个组份。

[0151] 例如, 在图 1 所示的具体应用中, 从血液组织而来的含有生物标志物的蛋白或 mRNA 不同组份被组份化分离为 20 个组份。由在凝胶中所表现的初始距离和顺序 (参数) 来对应生成凝胶中各组份的序号。因而, 以一级设定序列标记相应每一组份, 则每一标记序号 (一级设定序列) 所对应的组份都可以用序号来追溯其起源, 因而凝胶中的各组份群以初始泳动迁移距离和前后条带序列顺序生成其记录序号并可以实现寻址回溯的功能。

[0152] 在对每一组份标记设定一级设定序列的同时, 在凝胶中每一组份也生成次级设定序列 (可以是数字、符号、缩写或者字母), 用于特指此组份 (或者组份化分子) 的组织或者细胞起源。如果出现了较多标本数量或者较多相异组织标本起源, 例如, 样品可以分别来自不同组织捐献者的血液样品, 次级设定序列在本发明的高通量分析中必不可少。

[0153] 本发明用来描述的具体应用可以包括, 但并不限于: 将上述的组份化过程重复地应用于不同样本, 以产生进一步分析处理所需的不同的含有生物标志物的组份化分子 (群) 组。在本发明的具体应用中, 以图 1 所示, 对含有生物标志物的血液蛋白质样品, 来源于 31 个不同的组织捐献者以相同方式进行 31 次处理。

[0154] 为了对所述的众多不同组织的大量组织标本进行准确和高通量的处理, 次级设定序列对于所检测的含有生物标志物的组份化分子的标识、追溯和回归的都至关重要。

[0155] 基于图 1 膜上所示的组份 (群) 或组份化分子 (群) 的空间安排和布置, 相应地, 所有的组份或者组份化分子可以由公式 Fxy_i 得到标示和追溯, 这里 F 就是所指定的组份, x 指代次级设定序列, 相关于组份的来源, y_i 指一级设定序列, 相对于初始在凝胶中的泳动距离、顺序或组份时间, y_i 中的 i 可以是 1, 2, 3, ..., n; 由凝胶中分离的组份数目所决定。

[0156] 由此, 整个高通量的处理过程中每一组份都标记以一级设定序列和次级设定序列, 这种标记将确保对不同组织的大量样本的处理在整个过程是有条理和准确的。

[0157] 2、组份化样本回收:

[0158] 在凝胶组份中的含有生物标志物的组份化分子 (群) 可使用胶回收或溶解回收等方式回收。

[0159] 3、矩阵化点样:

[0160] 从某一组织标本如一个血液捐献者而来的一组系列组份化分子 (群) 以上述在凝胶中所表现的序列及其组织起源或类型的序列 (即一级设定序列和次级设定序列) 矩阵化点样于显微镜载玻片所支持的杂交膜上。

[0161] 如图 1 所示, 在本发明的优选的具体应用中, 多种不同的组织标本的多组系列组

份化分子可以被集成在一张膜上。

[0162] 同集成于杂交膜的来源于多种不同样品的含有生物标志物的组份化 RNA 或蛋白相互作用的探针分子可揭示出在杂交膜上的生物标志物表达模式。生物标志物的关键参数如分子量和片段大小,在这种检测中可以检测和预计。

[0163] 为进一步应用、比较和分析的便利,不同样品而来的含有生物标志物的组份分子(群)以完全一致的方式重复进行上述的分离、回收、点样过程,如图 1,这 31 个从不同组织捐献者而来的组织样品以相同方式进行 31 次处理,以进行 HT Western blot 和进一步分析。

[0164] 以上所述,本发明的具体应用中的一个关键环节是含有生物标志物的各组份的安排、格式和点样,从凝胶条上所回收到的系列组份依照其一级设定序列和次级设定序列完成在支持材料上的矩阵制备。

[0165] 在此强调,如需制备更多的血液样品,在制备高通量 Western blot 时,使用高密度点阵设备时可以在膜上集成更多的样品,然而,为了对本发明的技术要旨进行明白易懂的解说,此处只用了有限的人血液样品量来阐述本发明的内涵。人血液捐献样品而来的生物标志物高能量检测可以使用各种探查方法,如抗体或者大规模质谱法。

[0166] 如上所述,本发明可以直接应用于 Northern blot 分析 Western blot 分析等方法中。尽管不同生物标志物之间,不同组份化方法之间,不同分子的组份化属性之间存在诸多根本不同,但 Northern blot 和 Western blot 分析的共同点是含有生物标志物的分子(群)可以被组份化为一个谱系或系列组份(群)。

[0167] 本发明的核心技术要旨是将含有生物标志物的组份化谱系或系列组份(群)转化为矩阵格式,以进行高通量分析处理,因而众多的含有生物标志物的相关分子(群)只要能满足被相应的组份化方法进行组份化处理为一个谱系或系列组份(群),就是本发明的适合的应用范围。

[0168] 与现有技术相比,本发明具有如下的明显优点:

[0169] 本发明将分子组份化技术优势和微阵列、巨阵列大规模分析的高通量优势相结合。在传统的分子组份化技术基础上,本发明提供更经济和灵敏的对宝贵样品进行检测的一个方法。

[0170] 本发明最重要的一个特征是可以高通量分析处理来源于大量样品的含有生物标志物的分子组份(群),例如在一个微阵列或者大规模阵列上分析某一特定生物标志物在上百种不同组织中的剪切选择表达模式及分子量大小。

[0171] 进一步地,本发明可以实现含有生物标志物的分子组份(群)相关信息的数字化采集处理,由矩阵阅读仪器直接记录并转换生成相关生物标志物数据库,数据分析可以结合微阵列检测技术平台同步进行。

[0172] 具体地,例如:使用计算机图像处理及其数据分析所需的组份化分子的样品数量比传统的 Western blot(免疫印迹)或 Northern Blot(RNA 印迹)分析的所需数量要少很多;所述的包含生物标志物的组份化分子(群)直接矩阵化上样于支持材料将比传统的 Western blot(免疫印迹)或 Northern Blot(RNA 印迹)分析会产生更强的信号和更高的检测灵敏度;所述的计算机图像处理及其数据分析的方法,可直接包含生物标志物的从组份化分子(群)中采集、分析和转换成相应的数据库,而 Western blot(免疫印迹)或

Northern Blot (RNA 印迹) 分析无法做到。

附图说明

[0173] 为使本发明的内涵以及各种特征可以被更好地理解,我们将结合附图来详细说明本发明的实施例,从而便于本发明优先选用的具体运用作详细描述。其中:

[0174] 图 1 为本发明的高通量生物标志物的印记分析方法的流程示意图;图中示出了 HTS Western/Northern blot 分析中的主要步骤,具体地,不同组织来源的蛋白或 mRNA 在凝胶电泳中被组份化分离区隔为多个含有生物标志物的组份群(在本应用例中数目是 20),进而使用胶回收或者溶解技术回收含有生物标志物的各组份化分子(群);一种组织,如肌肉组织而来的组份化的一组系列分子可以以矩阵方式并按照回收前其在凝胶中所呈现顺序矩阵化上样于显微镜载玻片所支撑的杂交膜上,同样方式由多种不同组织,例如供体 1、供体 2、供体 3 等可以矩阵化方式上样排列在一张杂交膜上。

[0175] 图 2 显示使用凝胶电泳法将包含生物标志物的蛋白和包含有生物标志物的 mRNA 进行组化分离,同时使用蛋白分子量标准和 RNA 分子量标准和测量尺作为分子量大小的指示;具体地,在聚丙烯酰胺凝胶上的含有生物标志物的蛋白电泳和在琼脂糖凝胶上的含在生物标志物的 mRNA 电泳,其中 8mg 人血液蛋白在 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行分离组份化, mRNA 在 1% 甲醛琼脂糖上进行分离组份化;mRNA 的分布在凝胶中部最多, RNA 分子量标准和测量尺用来测量 RNA 组份(群)的分子量。

[0176] 图 3 为甲醛 1% 琼脂糖凝胶电泳的分子迁移泳动距离与 mRNA 分子量的相互关系曲线;该图显示 mRNA 电泳中的 mRNA 迁移泳动距离(厘米计)与分子量大小(核酸数目)存在一个指数关系,此两种系数曲线配合系数为 $R^2 = 0.9917$;

[0177] 图 4 为从系列凝胶薄片回收得到的组份化 mRNA 的回收量曲线;该图显示 20 个组份分别经紫外分光光度计所测定的回收量,组份 8 到 20 与组份 1 到 7 相比含有更多的 mRNA,这与图 2 中所示的 mRNA 在不同区段的分布相一致。

[0178] 图 5 为人胎盘组织的组份化 mRNA 各组份的琼脂糖凝胶电泳图;该图显示人胎盘 mRNA 各组份的相对含量和组份分子量的大小,其中组份 8 到 20 含有比其它组份更多的 mRNA 数量,这与图 2 所示的 mRNA 在凝胶中的不同区段的分布相一致。

[0179] 图 6 为 32 个组织的 Northern blot 高通量分析图;该图显示利用高通量 Northern blot 分析从 31 个不同组织中所制备的 mRNA 样品所显示的相对基因表达比较,杂交膜的大小与显微镜载玻片相同,杂交信号强弱不同指示 GAPDH 基因在这些组织的表达水平的高低;

[0180] 其中,图 6. A. 是高通量 Northern blot 的实际尺寸大小(1×2 英寸),而图 6. B. 为肉眼观察而准备的 9 倍放大图;

[0181] 点样的组织从左到右分别是:1. 胎盘;2. 阴性对照;3. 膀胱;4 大脑;5 脑额叶;6. 脑海马;7. 脑枕叶;8. 脑顶叶;9. 脑颞叶;10. 乳腺;11. 小脑;12. 结肠;13. 食道;14. 心脏;15. 肾脏;16. 肝脏;17. 肺;18. 肌肉;19. 卵巢;20. 胰腺;21. 胎盘;22. 直肠;23. 皮肤;24. 小肠十二指肠;25. 小肠回肠;26. 小肠空肠;27. 脾脏;28. 胃;29. 睾丸;30. 扁桃腺;31. 子宫宫颈;32. 子宫宫体。

[0182] 图 7 显示从血液样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳组份化方法获得含有生物标志物的

组份化蛋白分子的方法,在聚丙烯酰胺凝胶小分子量蛋白质分子及多肽分子被良好地分离,并被浓缩,来源于血液的蛋白质生物标志物是多肽及小分子蛋白质。

[0183] 图 8 为 32 个组织的 Western blot 高通量分析图;该图显示 30 种不同人类组织的高通量 Western blot 的 GAPDH 蛋白的表达模式;人类 30 种不同组织所得到的总蛋白被组份化分离后进行回收操作,以相应的一级设定序列和次级设定序列将回收到的组份化蛋白上样于相应杂交膜上,高通量 Western blot 分析中的 GAPDH 信号以其相应分子大小出现在预定的组份;

[0184] 其中,图 8. A 是采用化学发光底物进行的高通量 Western blot 筛选,图 8. B 是采用荧光染料方法的高通量 Western blot 筛选;

[0185] 图 8 中,所述组织从左到右依此为:1. 分子量标准;2. 胎盘;3. 阴性对照;4. 脂肪;5. 膀胱;6 大脑;7. 乳腺;8. 小脑;9. 子宫颈;10. 结肠;11. 横隔膜;12. 十二指肠;13. 食道;14. 胆囊;15. 心脏;16. 回肠;17. 空肠;18. 肾脏;19. 肝脏;20. 肺;21. 卵巢;22. 胰腺;23. 直肠;24. 骨骼肌;25. 皮肤;26. 脾脏;27. 胃;28. 睾丸;29. 胸腺;30. 甲状腺;31. 扁桃腺;32. 子宫。

具体实施方式

[0186] 下面结合具体实施例,进一步阐述本发明。必需指出,这些实施例仅限于说明本发明而不适用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体实验条件的实验方法,通常按照常规条件,或按照厂商所建议的条件。

[0187] 实施例中所涉及的设备、材料举例如下:1) 微点阵相关设备:A32 针载玻片点样机(VP478A)及其附件,一个索引单元(VP470)和手持式微芯片点样系统(VP472A),美国 V&P Scientific(San Diego,CA) 购买;2) 全凝胶洗胶仪(165-1251):美国伯乐公司(Hercules, CA);3) RNaid:从 Qiogene(Carlsbad, CA) 购买,用于从凝胶上回收 mRNA;4) 杂交膜:Hybond N+(正电荷尼龙膜)Amersham Biotech;5) PCR 试剂盒、DNA 聚合酶和 PCR 缓冲液:Promega 公司(Madison,WI);6) 杂交液:配方来源于 Church and Gilbert(Church,1984),包含以下:1% BSA,0.5M 磷酸钠缓冲液 pH 8.0,和 7%十二烷基硫酸钠(SDS);7) 检测试剂盒:CDP-star AP 底物和抗荧光素 AP 耦合抗体(Cat.No. 1064285)从 Amersham Biotech 购买;8) 0.24-9.5Kb RNAladder(Cat.No. 15620-016)从 Life Technologies 购买;9) 荧光素-12-dUTP(Cat.No. 1373242)从 Roche Molecular Biochemicals 购买。

[0188] 实施例 1

[0189] 本实施例提供一种高通量核酸印记法(HT Northern blotting),其制备与分析过程包含以下步骤:

[0190] 1) mRNA 的分离与纯化;

[0191] 2) 有 RNA 分子量标准的 mRNA 琼脂糖凝胶电泳;

[0192] 3) 基于 RNA 分子量标准电泳迁移的 mRNA 分子量计算;

[0193] 4) 带有 mRNA 的琼脂糖凝胶被切分为凝胶组份胶条;

[0194] 5) 依据每个凝胶切片在琼脂糖凝胶中的距离与顺序等标记组份的一级设定序列,依据 mRNA 来源组织标记组份的次级设定序列;

[0195] 6) 从相应的凝胶条中抽提回收组份化的 mRNA;

[0196] 7) 依据相应的凝胶条组份生成的一级设定序列和相关组织来源生成的次级设定序列在相应支持组织上点样组份化 mRNA ;和

[0197] 8) 依照相应的组份凝胶条的一级设定序列及其组织来源而定的次级设定序列进行 HT Northern blotting 的数据分析。

[0198] 具体地,由以下提供的本应用实施例 1 及其相应数据将进一步说明上述操作步骤:

[0199] 步骤 1)、首先,将来自 31 种不同人体组织的 mRNA 分离并应用于带有 RNA 分子量标准的琼脂糖凝胶电泳。

[0200] 步骤 2)、图 2 显示一个蛋白样本或 mRNA 样本同蛋白分子量标准或 RNA 分子量标准一起上样于聚丙烯酰胺或琼脂糖凝胶,设置一个标尺作为蛋白或 RNA 分子量标准与蛋白或 mRNA 样品迁移的定量依据。

[0201] 步骤 3)、图 3 所示 mRNA 分子量与 mRNA 迁移距离的可以量化并建立相应数学模型。

[0202] 步骤 4) 和 5)、含 mRNA 的琼脂糖凝胶被组份化为 20 个组份,从第一个凝胶条带到最后一个凝胶条带依照其距离关系标记为一级设定序列。

[0203] 步骤 6)、每一胶条带进行回收操作得到相应 mRNA 组份样品,从凝胶中 mRNA 胶回收得到的组份化 mRNA 样品的平均回收率为 43%。图 4 和图 5 显示每个组份 mRNA 具有与预计相符的分子量和数量。

[0204] 步骤 7)、mRNA 组份的样本制备完成后可以进行上样操作:

[0205] 在本发明优选的具体应用中,此应用例中同时使用了 VP Scientific 的设备来制备低密度的点阵,每一针吸取 5 到 10nl 溶液点样于支持材料,如图 1 所示,按照其在分离组份化的凝胶条的过程中所生成和记录的一级设定序列和次级设定序列,从第一个组织捐献者而来的含有生物标志物样品的全部 20 个蛋白组份上样于第一列。依照此法,从第二个组织捐献者而来的含有生物标志物 20 个组也依照其一级设定序列和次级设定序列被点样。其余的 29 个不同人类组织捐献者而来的组织样品按照以上方式重复处理并点样。从 31 个不同人类组织捐献者的样品和一个阴性对照而来的含有生物标志物的各蛋白质组份,以一级设定序列和次级设定序列设计和排列在支持材料上。如图 1 所示,每个组织来源的含有生物标志物的蛋白组份群都包含 20 个组份,这些组份按照其顺序在相应的膜上点样为 20 个点,排成一列。重复相同的以上步骤 32 次使 31 种不同样品来源的含有生物标志物的蛋白组份和一个阴性对照排列成 32 列。含有生物标志物的蛋白质组份来源于 31 个不同的人体组织捐献者以及一个阴性对照被依次标记为次级设定序列,在膜上完成各组份的点样和固化后即制备完成。

[0206] 步骤 8)、在本发明的具体应用中,一个 GAPDH 探针应用于制备完成的 HT Northern Blot,如图 6 所示,次级设定序列所示的 31 种不同人体组织中的第 13 个组份呈现出各种强弱不同的信号,依照组份凝胶条所记录的一级设定序列及其所代表的不同凝胶条的样品迁移距离,mRNA 组份 13 的分子量约为 1.5×1000 个核苷酸,这与 GAPDH 的 mRNA 大小相符,依照 mRNA 分子量可以完成相关分子的分离组份化,而在此过程中相关分子的分子量属性则可以被探测和确认。在本发明的具体应用中,依照一级设定序列和次级设定序列在一致的实验背景下所制备的高通量 Northern Blot 可以高通量地同时分析多种基因的大小及其表达模式。HT Northern Blot 分析的图像数据可以直接从微点阵扫描器中读取并转换成数字信号

存入相应数据库。

[0207] 见图 6B 所示,计算机处理图像所示的各个组织的微阵列可以被放大,以便像传统 Northern Blot 一样进行肉眼观察。

[0208] 实施例 2

[0209] 本实施例提供一种高通量蛋白印记法 (HT Western Blot)。制备高通量 Western Blot 的原则与高通量 Northern Blot 原则是一样的,虽然组份化分离蛋白分子的方法不同。本实施例提供一种高通量核酸印记法 (HT Northernblotting),其制备与分析过程包含以下步骤:

[0210] 1) 蛋白的提取和组份化分离;

[0211] 2) 有蛋白分子量标准的蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳;

[0212] 3) 基于蛋白分子量标准电泳迁移的蛋白分子量计算;

[0213] 4) 带有蛋白的聚丙烯酰胺凝胶被切分为凝胶组份胶条;

[0214] 5) 依据每个凝胶切片在聚丙烯酰胺凝胶中的距离与顺序等标记组份的一级设定序列,依据蛋白来源组织标记组份的次级设定序列;

[0215] 6) 从相应的凝胶条中抽提回收组份化的蛋白;

[0216] 7) 依据相应的凝胶条组份生成的一级设定序列和相关组织来源生成的次级设定序列在相应支持组织上点样组份化蛋白;和

[0217] 8) 依照相应的组份凝胶条的一级设定序列及其组织来源而定的次级设定序列进行 HT Western Blot 的数据分析。

[0218] 具体地,由以下提供的本应用实施例 2 及其相应数据将进一步说明上述操作步骤:

[0219] 步骤 1)、从冰冻的人体组织中使用包含清洁剂和蛋白酶抑制剂混合物的匀浆缓冲器来提取总蛋白。

[0220] 步骤 2)、如图 1 所示 1.25mg 组织总蛋白上样于 20% 的 Tris-glycineSDS-PAGE 凝胶中 (Bio-Rad Laboratories) 进行蛋白组份化分离。

[0221] 步骤 3)、凝胶中的蛋白组份可以通过不同方法进行回收,比如像在 HTNorthern Blot 那样从凝胶条中萃取,或者通过专用仪器从凝胶中电转移出来。在本发明的一个优选的具体应用中,使用全凝胶洗脱仪 (Bio-Rad Laboratories) 来洗脱凝胶中的组份化蛋白。洗脱缓冲液中包含 25mM Tris-HCl、192mM 甘氨酸、0.1% SDS。洗脱的蛋白组份通过真空吸引来收集,此步骤中,30 种不同的人体组织的组份使用一级设定序列和次级设定序列来标记。蛋白组份液体使用 Amicon (Millipore) 试管浓缩达到相同体积。为验证分离的蛋白组份,回收的蛋白组份在同样条件的凝胶中进行相同条件的电泳,

[0222] 步骤 4)、使用同样的微点阵设备按照一级设定序列将蛋白组份连续地点样于杂交膜。根据设计并记录的一级设定序列和次级设定序列,不同人体组织来源的蛋白组份被回收和矩阵化点样于膜上。

[0223] 步骤 5)、在 HT Western Blot 分析的应用例中,管家基因甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 被作为目标蛋白检测。使用含 5% 脱脂牛奶的 TBST (0.1% Tween 20 in TBS) 封闭液封闭杂交膜抗原结合表位,小鼠抗 GAPDH 单克隆抗体 (MAB374, Chemicon International) 被加入 TBST 溶液中 4 摄氏度过夜孵育。在三轮 TBST 清洗后,加入二抗

HRP(辣根过氧化物酶)偶连的抗鼠 IgG(NA 931, Amersham Biotech) 或 CY3 偶连的抗鼠 IgG,图 8A 是使用 ECL-Plus 试剂(Amersham Biotech)的显色结果,图 8B 是使用微点阵阅读仪所显示的结果。

[0224] 图 8 显示 32 道 HT Western Blot 一个应用实例,使用从 30 种不同组织中所回收到的蛋白组份。这些组织从左到右分别是:1,分子量标准。2,胎盘。3,阴性对照。4,脂肪。5,膀胱。6,脑。7,胸部。8,小脑。9,子宫颈。10,结肠。11,横隔膜。12,十二指肠。13,食道。14,胆。15,心脏。16,回肠。17,空肠。18,肾。19,肝脏。20,肺。21,卵巢。22,胰腺。23,直肠。24,骨骼肌。25,表皮。26,脾。27,胃。28,睾丸。29,胸腺。30,甲状腺。31,扁桃腺。32,子宫。

[0225] 同预期的 GAPDH 蛋白 38kDa 的分子量相一致,依照一级设定序列,在 24 个组份中的第 16 组份中 GAPDH 蛋白被检测出来。依照分子量完成相关分子的分离组份化,而在此过程中相关分子的分子量属性则可以被探测和确认。如图所示,依据次级设定序列,不同强度的一系列信号变化显示了 30 种不同人体组织中表达的 GAPDH 蛋白的不同高低水平。

[0226] 综合上述两个实施例可以看出,由于采用微点阵矩阵模式,显而易见本发明的具体应用具有高通量的处理能力。

[0227] 图 6 和图 8 分别显示了本发明的高通量 Northern Blot 和高通量 Western Blot 的两个具体实施例。传统的方法通常 10 个样品集成在一张 2x4 英寸的杂交膜上,与传统方法相比较,本发明具体实施例中的 32 个样品的组份化分子点样于一张 1x2 英寸的杂交膜。

[0228] 但是,此处应该特别强调的是,依照本发明的技术要旨,样品的实际应用数量不受以上实施例的限制。例如,一个高密度的微点阵可以在每张膜上集成超过 500,000 点。因此,本发明的具体应用中,参照样品可被处理的组份数量,本发明的具体应用在更高密度的微点阵中可以提供更高通量的分析处理能力,例如,每一样本被组份化为 50 个组份,来自 10,000 样本的分子组份可以被集成在一张杂交膜上。

[0229] 因此,本发明的具体应用 HT Northern Blot 和 HT Western Blot 可以提供更高通量的处理、分析能力,比如,10,000 个组织样品而来的分子组份可以集成于一张膜上。进一步而言,在本发明的具体应用中,高通量分析产生的大量数据可直接通过微点阵扫描仪阅读并转换生成相应数据库,这些特点对于传统 Northern Blot 或 Western Blot 分析而言,是本发明的一个创新点。

[0230] 通过以上对于本发明的具体应用及具体实施例的描述,本发明的技术要旨可以概括为,使用微阵列或超级阵列等方式对相关生物标志物进行高通量的分析处理。本发明将分子分离组份技术的优势和微阵列和超级阵列的优势相结合,所产生新的优势超越了传统分子组份技术的局限。另一方面,在传统分子组份化技术的基础上,本发明还创造出一种更敏感和更节省宝贵原材料的方法。进一步而言,在本发明的具体应用中,组份分子群可以通过多种方法探测,包括但不限于:核酸杂交,抗体结合,质谱测定等。本发明的一个最重要的优势是可以对百计或千计以上的样本进行高通量处理和分析,如使用微阵列或超阵列检测特定生物标志物在上百种不同组织中的表达和选择剪切模式。而且,关于包含生物标志物的分子组份的信息可以数字化直接从微阵列扫描仪阅读并转换存入数据库,并使数据处理在一个微阵列技术平台上高通量进行。目前,没有已知的其他技术方法可以达到这种技术要求。因此本发明对于分子组份分析,特别是针对 Northern/Western blot 分析技术是一

种创新性变革。

[0231] 本发明以上述优选具体实施方式详细地描述了本发明的技术要旨。但是,对于所属技术领域的一般技术人员而言,本发明上述优选的具体实施方式可以被进一步改编或修改以用于新的应用目的,并不与本发明的基本精神相抵触。因此,本发明的应用领域包括但不限于以上所公布的本发明具体实施方式。进一步地,本发明的应用范围还包括了各种基于相同操作原则的对于本发明的修改及相似的安排。因而,对于本发明的权利要求书所要求的保护范围应给予最广泛的解释,以涵盖所有这些对本发明的修改或相类似的应用范围。

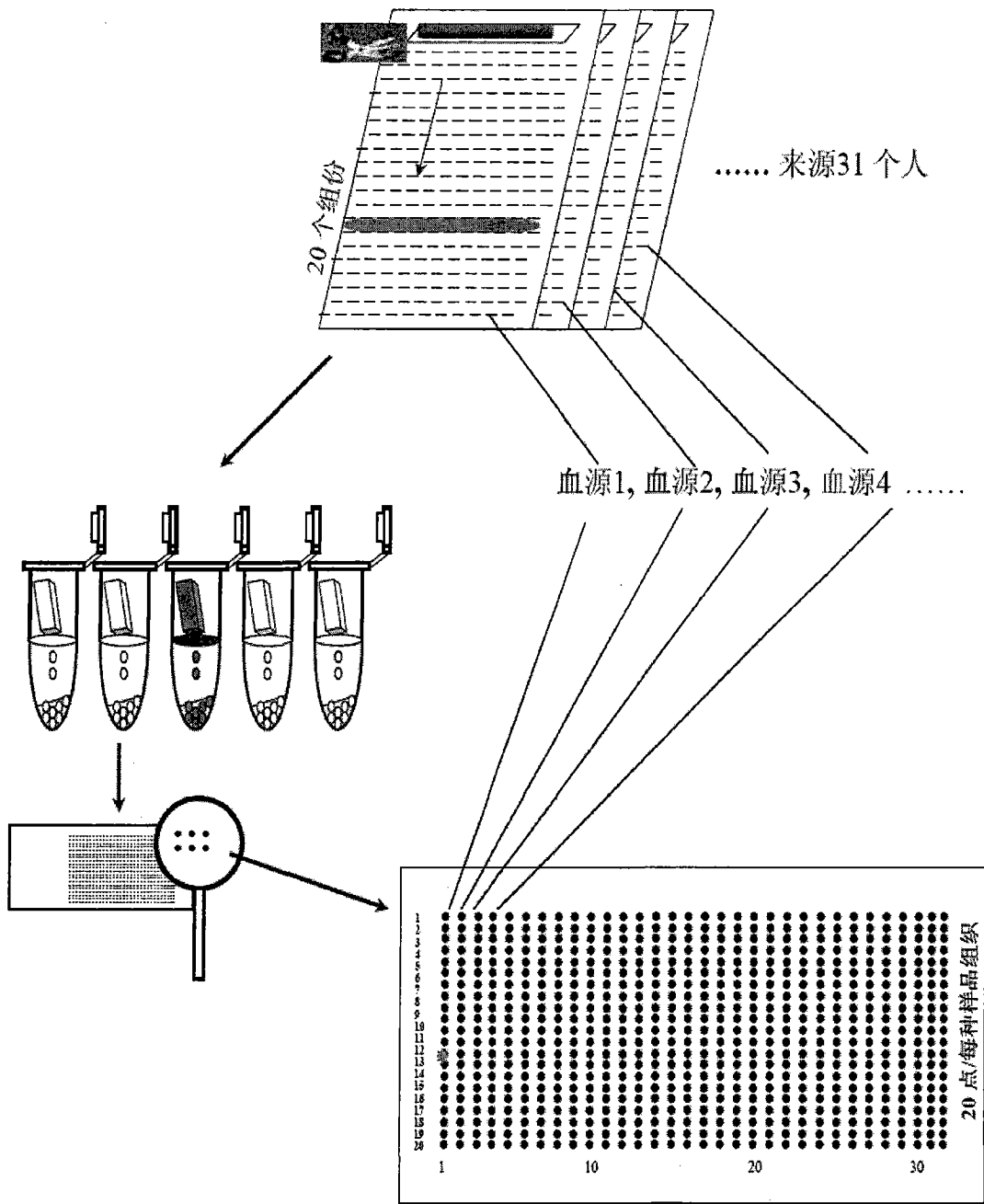


图 1

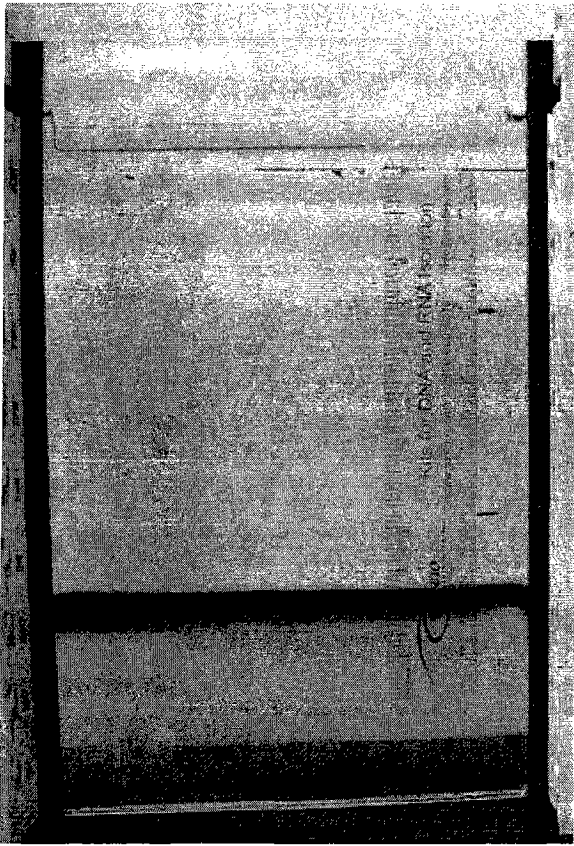


图 2A

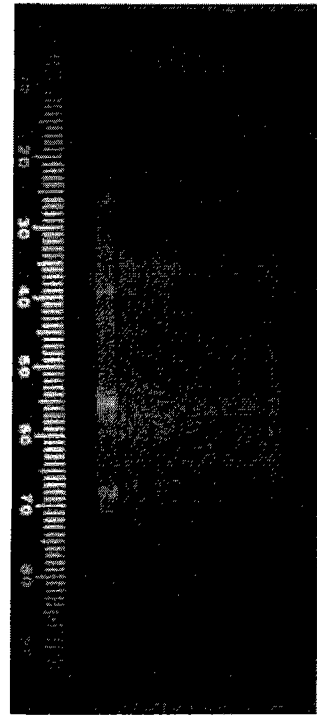


图 2B

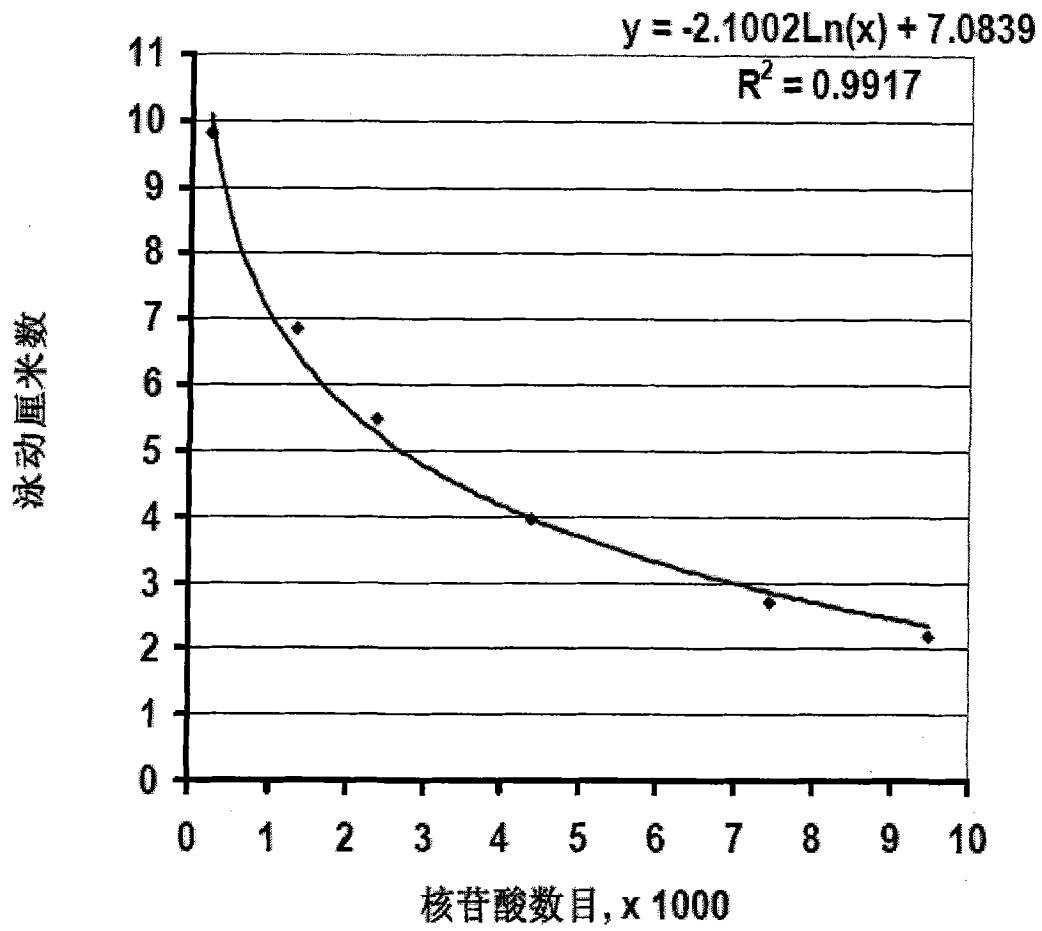


图 3

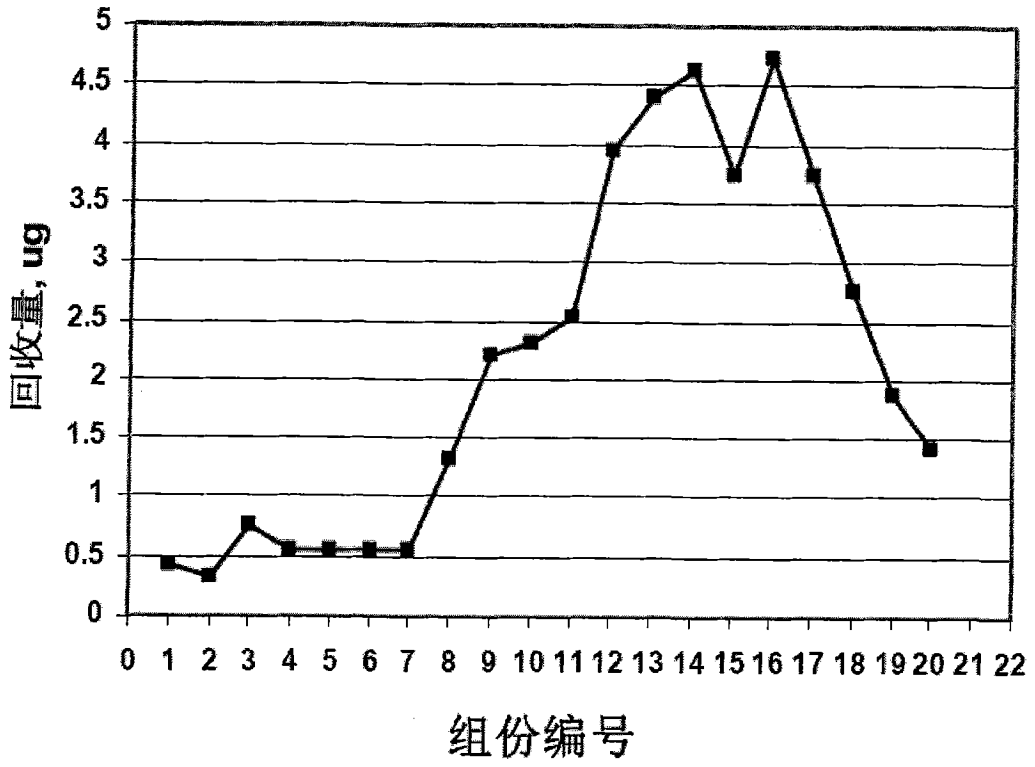


图 4

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

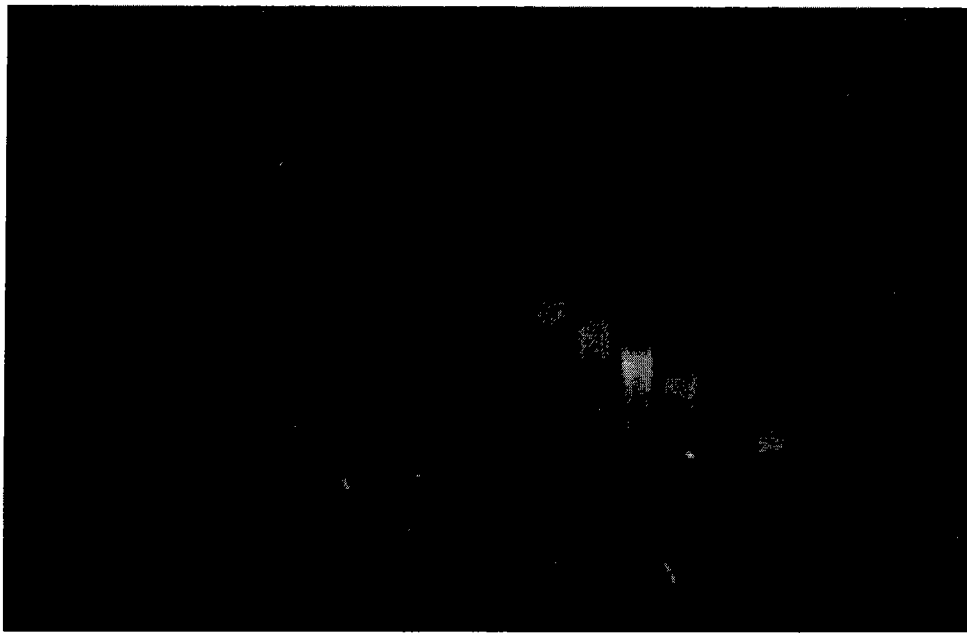


图 5

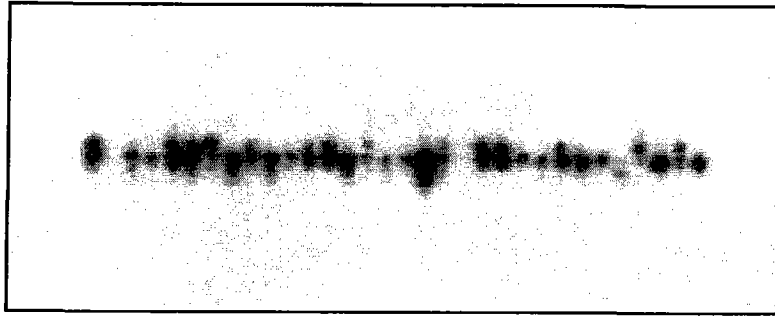


图 6A

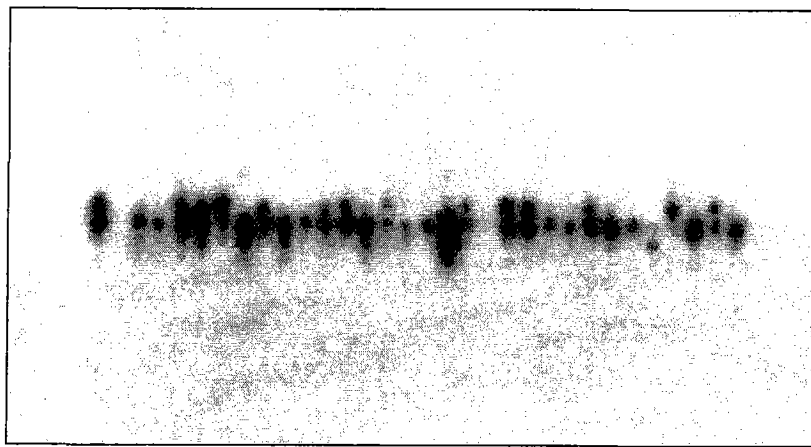


图 6B

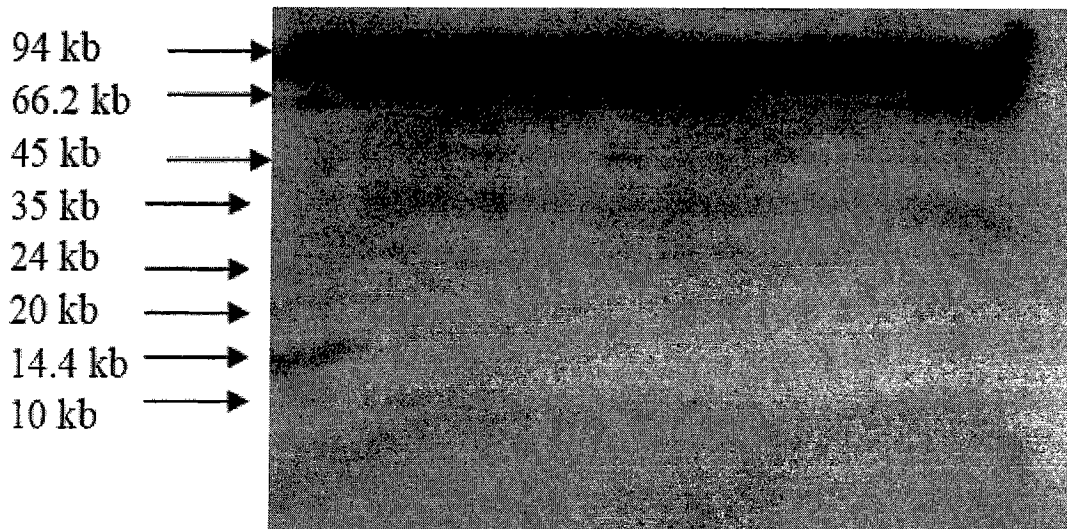


图 7

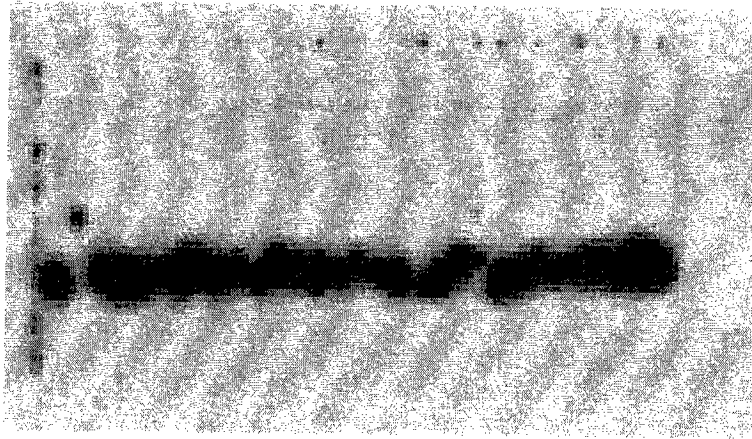


图 8A

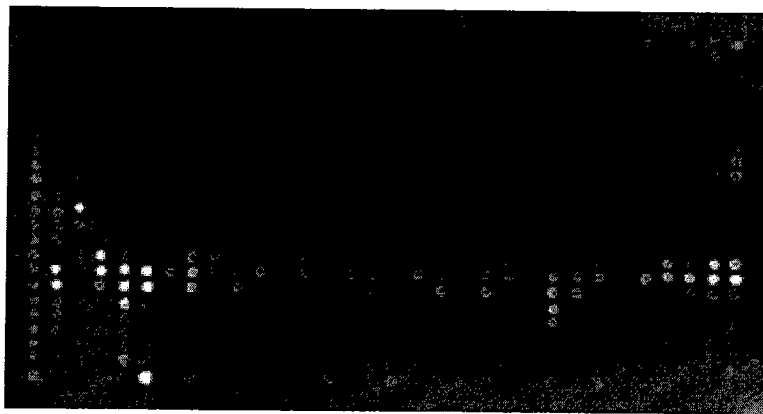


图 8B

专利名称(译)	含有生物标志物样本的高通量分析方法和样本库制备		
公开(公告)号	CN101550441B	公开(公告)日	2011-11-23
申请号	CN200810103192.3	申请日	2008-04-01
[标]申请(专利权)人(译)	博尔诚(北京)科技有限公司		
申请(专利权)人(译)	博尔诚(北京)科技有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	博尔诚(北京)科技有限公司		
[标]发明人	韩晓亮 王建铭 范盘生 赵红		
发明人	韩晓亮 王建铭 范盘生 赵红		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 G01N33/558 C40B50/14		
代理人(译)	刘丹妮		
审查员(译)	吴希哲		
其他公开文献	CN101550441A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种对于包含生物标志物的样本进行高通量分析的方法；本发明还涉及一种制备用于高通量分析的矩阵化排列样本的样本库的方法；本发明同时涉及根据本发明所述的方法所制备的样本库。本发明将分子组份化技术优势和微阵列、巨阵列大规模分析的高通量优势相结合。在传统的分子组份化技术基础上，本发明提供更为经济和灵敏地对宝贵样品进行检测的方法。

