

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 30/00

G01N 30/72 G01N 33/53

G01N 33/68 G06K 7/10

H01J 49/04



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 03156862.9

[43] 公开日 2005 年 3 月 16 日

[11] 公开号 CN 1595140A

[22] 申请日 2003.9.11 [21] 申请号 03156862.9

[71] 申请人 北京赛尔迪科技发展有限公司

地址 100176 北京市亦庄天华园 3 里一栋洋房 3 区 4 栋 4 号

[72] 发明人 许 洋 陈国强

权利要求书 1 页 说明书 9 页

[54] 发明名称 用蛋白指纹法检测胰腺癌细胞在血液中蛋白指纹的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种用滞留层析法捕获蛋白质组进行分析的蛋白指纹法。 本方法用质谱法进行鉴别检测蛋白质组。 分析所得数据的形式是可用计算机读取的条码格式(蛋白指纹)。 本发明的方法可用于检测血液中正常人细胞及胰腺癌患者细胞的蛋白指纹。 本方法准确、方便且快捷。

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

1. 一种用滞留层析法捕获生物样品中蛋白质的蛋白质分析方法，其特征是采用蛋白指纹法对样品中蛋白质组进行鉴别检测。

5

2. 权利要求 1 所述的蛋白质分析方法，其中所述的鉴别检测中蛋白质组的方法是质谱法。

3. 权利要求 1 所述的蛋白质分析方法，在滞留层析法中所用的吸附剂包括阴离子、
10 阳离子、亲水、疏水或配位共价金属螯合剂作用吸附剂。

4. 用权利要求 1 的方法分析生物样品中特异的蛋白质组以检测正常人细胞及胰腺癌患者细胞在血液中蛋白指纹的用途。

用蛋白指纹法检测胰腺癌细胞在血液中蛋白指纹的用途

5 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，具体指用于生物样品分析的蛋白指纹法。本发明还涉及用滞留层析法捕获蛋白质组并采用计算机可读取的条码格式(蛋白指纹)分析的蛋白指纹法。

10 背景技术

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，鉴定细胞内表达的蛋白质的区别，可用于诊断疾病，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定性鉴定和定量分析。

如，一种常用的分子分离方法是凝胶电泳。通常是用凝胶内等电点聚焦先分离蛋白质，再用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳进行第二次分离。结果得到一张根据等电点范围（净电荷）和大小（质量）来区分蛋白质的图。虽然有用，但是该方法存在以下几方面的局限。首先，该方法只提供生物分子的两项特征—质量和等电点（pI）。其次，各维度的分辨率受到凝胶分辨能力的限制。例如，通常很难区分质量差异小于 5% 或 pI 差异的生物分子。第三，凝胶的容量和灵敏度都有限，可能无法检测出少量表达的生物分子。第四，无法观察到分子量低于约 10-20 kDa 的小蛋白或小肽。

又如，临床诊断疾病一般方法是要求特异性地检测出疾病的已知标记。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，这阻碍了此类诊断方法的发展。

其它分析方法可能克服以上局限之一或几项，但是难以将它们有效组合。例如，分析层析能够根据多种分析物/吸附剂相互作用来分离生物分子，但是作多维度分析却困难而费时。而且，该方法的灵敏度也很有限。

用质谱的方法测定蛋白质是较新的方法，但目前的质谱分析方法只能对蛋白质进行定性分析，无法进行定量分析，尤其在是样品中混合物复杂，蛋白质含量极小的情况下。

滞留层析法是上世纪 90 年代开发的一种新的生物分析方法 (Singh TK, Fox PF, Healy A. J Dairy Res. 62, 629-640; 1995 and Siegel MM, Tabei K, Bebernitz GA, Baum EZ. J Mass Spectrom. 33, 264-273; 1998), 有人将其用于分子生物学和细胞生物学的研究中。滞留层析中先将待测样品与选定的吸附剂结合, 然后检测滞留在吸附剂上的分析物。与常规层析不同, 进行滞留层析时无需将分析物先从吸附剂上洗脱, 而是直接进行检测。其优点是能够从复杂的样品混合物中准确地分辨出分析物。但目前未见到文献有用滞留层析法进行蛋白指纹鉴定分析。

蛋白指纹技术最早源于马铃薯/土豆品种鉴定 (Desborough S and Peloquin SJ, American Potato Journal. 45, 220-229; 1968 and Desborough S and Peloquin SJ, Theoretical and Applied Genetics. 39, 43-47; 1969)。当时用电泳技术来区别不同品种土豆。因为不同品种的土豆在电泳下有不同的蛋白指纹组合。由于人体细胞蛋白比土豆要复杂的多, 故仅用电泳来鉴别疾病的蛋白指纹远远不能满足临床需要。

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细胞及胰腺癌患者细胞在血液中蛋白指纹用途的新方法。

本发明采用蛋白指纹法对蛋白质组进行鉴别。

蛋白指纹法是通过鉴别检测特定的蛋白质组用于疾病诊断。蛋白质组学 (Proteomics) 的定义是研究一组蛋白质在细胞终身表达的变化状态。蛋白质组学的目的之一是鉴定和描述由于不同细胞差异表达的有机生物分子。通过比较表达情况可以鉴定细胞内表达的蛋白质的区别。鉴别出可作为某种疾病标志的蛋白质组, 可用于该疾病的诊断及治疗药物的筛选。

本发明所述的鉴别检测蛋白质组的方法是质谱法。

本发明用滞留层析法从复杂的样品混合物中准确地分辨出并捕获到用于检测的蛋白质组。滞留层析法是将样品与用于解吸谱分析的多种吸附剂/洗脱剂组合接触, 由此利用其它分离和检测系统所无法达到的高信息分辨能力鉴定在两样品中存在情况不同的分析物 (即, 两份细胞或组织液提取物中差异表达的蛋白质)。根据吸附剂/洗脱剂组合的化学

特性测定包括分子量在内的理化特征的蛋白质。详述本方法如下：

I 吸附剂

包含阴离子，阳离子，亲水，疏水或配位共价金属螯合剂作用吸附剂，分离生物化学中的这些方法和由这些方法产生的吸附剂具有诊断反面的用途（即阴离子吸附剂捕获阳离子蛋白质，配位共价金属螯合剂上滞留说明多肽分析物内存在组氨酸残基）。更具体的说，可以开发出化学生物特异性吸附剂以检测重要的诊断标记。在某实施例中，基质可具有为诊断疾病或综合征所用标记组合而选用的吸附位点排列。

II 信息处理

在特定洗脱条件下检测被吸附结合的分析物提供了有关样品中分析物及其化学特征的信息。吸附作用在一定程度上取决于吸附剂的结合特性。与吸附剂结合的分析物具有使得结合成为可能性的特性。例如，在特定 pH 下是阳离子的分子在具有该 pH 的洗脱条件下将与阴离子吸附剂结合。强阳离子分子只有在很强的洗脱条件下才从吸附剂上洗脱。所以，样品中特定分析物在特定洗脱条件下结合某种吸附剂的确定不仅通过分析物的彼此分离和与不具有结合所需的相应化学特性的分析物的分离而分辨了混合物中的分析物，而且鉴定出了具有特定化学特性的一类或单一分析物。采集有关分析物在多种洗脱条件下在一种或多种吸附剂上的滞留信息不仅可详细分辨混合物中的分析物，而且提供有关分析物的化学信息，这些信息本身就可以完成对他们的鉴定。这种数据被称为“滞留数据”。

用可编程计算机分析滞留试验得出的数据是最简单的。计算机程序一般包括一个储存编码的可读介质。某计算机编码进入存储，其中包含了基质阵列上各种征点的位置，该处的吸附和用来洗涤吸附剂的洗脱条件。程序于是可用这些信息鉴定出阵列上确定某选择性的一组特征。计算机还包括这样的编码，它们接受来自探针上特定可定址位置的不同分子量的信号强度数据。这些数据指示所测分析物的数量，可能包括所测各分析物的信号强度和测得的分子量。

计算机还具有处理数据的编码。实施例之一中，处理方法涉及形成一个分析物识别特征概况。例如，可将据分子量测得的特定分析物的滞留数据根据特定的结合特性（例如与阴离子吸附剂）分类。收集到的数据提供某特定分析物化学特征的概况。滞留特性反映分析物功能，后者继而反映结构。例如，根据不同 pH 洗脱条件下在多种阳离子和阴离子吸附剂上的滞留水平数据所揭示的信息可以得出某蛋白质的等电点。这进而反映出该蛋白质内离子氨基酸的大致数量。所以，计算机可能包含将结合信息转化结构信息的编码。而且，对分析物的二次处理（例如翻译后修饰）改变识别特征，这可以由结合或质量差异

反映出来。

得出的数据即蛋白指纹，它可以各种格式显示。一种格式中，信号强度显示成分子量的函数图。另一种格式又称“条码格式”，其中，信号强度沿着线性轴以暗度强度值显示，得出外观类似商场上所用条码带读取商品名称。

- 5 III 滞留层析涉及多种分离方法的组合，包括并行检测和描述多种分析物。这些组合方法具有多种用途。发展靶分析物检测法；差异蛋白质展示；毒理学筛选；多种诊断标记的同时检测；药物开发。

10 实施例对该方法进行了详细的描述。细胞样品通常包含数以百千计的蛋白质。人们可能希望准确分辨出样品中的每一种靶蛋白。第一步，用多种选择性条件建立靶分析物的滞留图。例如，吸附剂可以是阴离子交换剂。

从该滞留图可以挑选出至少一种靶分析物被保留的选择条件。可以挑选靶分析物发生最大结合的选择性条件。但是，如果该选择性条件对靶分析物的选择性比其他选择性条件更强，则宜选择靶分析物吸附并非最大的条件。例如，假设滞留图分析显示，在中性 pH 附近，靶分析物被阴离子交换保留，但也弱吸附于亲水性吸附剂。

- 15 IV 鉴定生物材料间差异表达的分析物的方法

本发明的另一方面内容提供了鉴定在两种以上样品中差异表达的有机生物分子，特别是蛋白质的方法。“差异表达”指两样品间分析物量或质上的差异。这些差异可能缘于蛋白质表达的任一阶段，该方法利用了滞留层析的超常分辨能力和灵敏度。首先，使用同一组选择性条件制备的分辨率越高，所以，可比较的分析物数量也越多。然后，比较识别图
20 以鉴定被两组吸附剂差异保留的分析物。差异滞留包括定量滞留。这提示表达的正调控或负调控。差异滞留还包括分析物质的差异。例如，蛋白质翻译后修饰的不同会造成识别图的不同，检测时表现为结合特性差异（例如，如果蛋白质被糖基化与凝集素结合将不同）或质量差异（例如翻译后切割的不同）。这种分析也可以用可编程计算机进行。

该方法特别适用于检测两种细胞差异表达的蛋白。两种细胞可以是正常细胞和病理细胞
25 例如癌细胞，或不同水平的细胞，或不同发育或分化阶段的细胞，或细胞周期内不同部分的细胞。但是。该方法也可用来检测不同条件下的同种细胞。在这样的方法中，一份生物样品与测试试剂接触，另一份不接触。然后，比较两者的滞留图。根据滞留特性或质量的不同，该方法可以显示蛋白质或其他生物分子表达的增加或减少，或发生了某种改变。

利用滞留图获得的差异表达蛋白质理化特性信息，用本发明方法可测定蛋白质的候选
30 特征。

本方法适用于鉴定疾病的诊断标记。与正常样品或细胞相比，患者样品或病理培养细胞中差异表达的蛋白质可能就是诊断标记。

V 通过分解代谢信号扩增提高灵敏度

将大蛋白分裂成小片段然后检测这些小片段能够显著提高检测大蛋白在复杂混合物
5 差异存在（例如，因为差异表达）的灵敏度。灵敏度的提高有几个原因。首先，当样品中所有蛋白质都被（例如）酶解而片段化时，大蛋白可能产生更多片段而不是小蛋白。其次，解吸谱法的整体灵敏度在低分子量时高于高分子量时。第三，蛋白片段化增加了来自靶分析物的信号数量，因此提高了测得分析物的可能性。第四，蛋白片段化提高了捕获可能性，因此提高了测得靶分析物的可能性。第五，如果蛋白质在两种样品中差异存在，那么通过
10 增加来自该蛋白的信号数量，量的差异更可能被测得。

人体内的疾病蛋白标志物往往会受血液中酶的降解。这样，我们就可以用滞留层析法来捕获这种分解代谢信号，从而提高蛋白指纹的灵敏度。滞留层析分辨的分析物的具体实例包括生物大分子，例如肽，蛋白质，酶，糖，寡糖，多糖；上述生物大分子的片段，例如肽片段和蛋白质片段；上述生物大分子复合物，蛋白质-DNA 复合物，受体-配体复合物，酶-底物，酶抑制剂，肽复合物，蛋白质复合物，糖复合物和多糖合物；生物小分子，
15 例如氨基酸，药物，激素，合成小分子，例如药学或治疗上的有效药物。

本发明提供一种统一的操作系统，用于蛋白质功能，细胞功能和生物整体功能的发现和诊断。

20 更具体的说，根据分析物在至少两种不同选择条件下吸附固定相的能力（例如阴离子/阳离子，疏水性/亲水性，或特异性生物分子识别作用）在至少两种不同的第一维度上分离分析物。然后，用解吸谱（例如激光解吸质谱）根据质量在第二维度上分离分析物，进一步检测已分离的分析物。分析物所吸附的性质提供了分析物的物理化学信息。

在实施例1中，所述的方法包括：I) 分析物与确切位置上的第一选择性条件（吸附剂）
25 接触，使得分析物被吸附剂保留。II) 在第一选择性条件下用解吸谱检测滞留的分析物。III) 检测步骤包括用激光解吸质谱测定分析物的质量。

洗脱条件的差异在于 pH，缓冲能力，离子强度，水结构特征，除垢剂种类，除垢剂强度，疏水性或介电常数。

本发明提供一种确定某分析物在第一和第二品中是否差异存在（例如差异表达）的方法。
30 该方法可以用于通过差异蛋白质展示检测差异蛋白表达的组合方法。该方法包括 A)

测定分析物在第一样品中至少一种选择性条件下的第一滞留图；B) 测定分析物在第二样品中相同选择性条件下的第二滞留图；和 C) 比较第一和第二滞留图之间的差异。两滞留图的差异肯定了分析物在第一和第二样品中的差异存在。

5 实施例之一是测定某种蛋白是否在两种不同样品，包含细胞的第一和第二样品或来自细胞的材料中差异表达。在实施例中，第一生物样品来自健康者，第二生物样品来自某种病症的患者。样品可选自例如血液，尿液，血清和组织。以在患者样品中增加的分析物作为候选诊断标记。通常，确认一种诊断标记需在多个受试者中检测到该标记物。

10 本发明在可分析的样品类型上没有限制。本发明特别适用于分辨生物样品，尤其是生物液体和提取物中的分析物；还特别适用于分辨非生物有机组合物中的分析物，尤其是有

滞留层析及蛋白指纹方法的具体操作步骤：

以下是用本发明提供的滞留层析及蛋白指纹方法的一个操作方案实例。

1. 样品处理

15 将生物样品稀释在溶液中。视需要离心澄清样品。

2. 上样

将样品点样在基质（包括阴离子、阳离子、亲水、疏水或配位共价金属螯合剂）一个位点上。

3. 洗涤

20 用结合溶剂洗涤。在样品完全干燥前将第一份 2 μ L 洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进几次。彻底清除第一份洗涤溶液，用第二份 2 μ L 洗涤液重复以上步骤。

用水彻底洗涤整个阵列。

自然干燥芯片。

25 加 0.5 μ L 吸能分子 SINAPINIC 酸（以 50% 乙腈，0.5% 三氟乙酸的制备的标准溶液）。自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪用氮激光仪（335 nm）和 80 cm 飞行管分析阵列分析滞留与各位点的蛋白质。用计算机分析数据进行数据重叠展示。

30 本发明滞留层析及蛋白指纹法可用于细胞和临床疾病的诊断，如肿瘤的诊断。

本发明提供的方法的特点为：

(1) 准确

滞留层析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。滞留层析
5 中检测的是滞留在吸附剂上的分析物。所以，滞留层析可提供有关滞留分析物化学或结构特征的直接信息。

滞留层析与常规层析存在以下区别。首先，滞留层析中检测的是滞留在吸附剂上的分析物。在常规层析中，分析物先从吸附剂上洗脱，然后进行检测。用常规方法检测不出吸附剂上洗脱下的分析物。第二，吸附层析与解吸质谱检测相结合提供了毫微微摩尔级的优良灵敏以及极高的分辨率。第三，在一定程度上，因为允许直接检测分析物，滞留层析提供了用多种不同选择性条件迅速分析滞留物的能力，由此提供多样品中分析物的快速维度描述。第四，吸附剂可以于预先确定的排列，可定址位置附着于基质上。这就能够对在不同洗脱条件下接触不同吸附位置（即，“亲合性位置”或“位点”）的分析物进行并行处理。

质谱直接分析有很强的准确性，一般误差率只有 0.1-1.0 Da。例如，检测出 8131 Da
15 及 8221 Da 被配位共价金属螯合剂表面的基质所捕捉的蛋白，由于质谱差率只有 0.1-1.0 Da，蛋白 8131 Da 及 8221 Da 不可能是一种蛋白质。因为蛋白质是由氨基酸组成的而氨基酸的平均质量为 100 Da，因此，必须有 50 Da 以上的差距，才可能是第二种蛋白质。

(2) 方便

本方法将血清蛋白分成了几大类，即阴离子、阳离子、亲水、疏水或配位共价金属螯
20 合剂作用蛋白。这样，可用质谱仪直接进行分析。

(3) 快捷

用本发明提供的蛋白指纹法进行疾病血清诊断时，无需对蛋白质进行测序。本发明采用了计算机“条码格式”，信号强度沿着线性轴以暗度强度值显示。此强度可以用扫描仪记录并用分析软件自动分析对比强弱，从而有助于临床复杂的诊断，如可用此“蛋白指纹”
25 或条码格式进行医学分析。

我国胰腺癌发病率已上升，其死亡率为肿瘤第 4 位。因此，胰腺癌是一个严重危害我国人民健康的常见病，应引起重视。目前已有的肿瘤标志物单项指标的灵敏度<50%，难以作为早期诊断。因此从血清中寻求特异生物标志物用于胰腺癌的诊断是临床急需解决的
30 难题。本研究利用滞留层析法捕获生物样品中特异蛋白指纹的蛋白质分析方法，对胰腺癌

患者与正常人的血清中的蛋白质进行分析, 对比, 筛选, 可用于临床胰腺癌早期诊断。

具体实施方式

实施例1 正常人细胞及胰腺癌患者细胞在血液中蛋白指纹的区分

5

(1) 实验方法

一、材料

1. 标本来源: 胰腺癌患者组有33例, 均经病理诊断为胰腺癌。正常人组(自经健康查体正常的健康志愿者)有33例。

10 2. 试剂: 尿素、乙腈、三氟乙酸、SPA (Sinapinic acid) 均购自Sigma公司。

二、方法

1. 样品的收集: 全血采集后吸取血清, 置于 -80°C 保存;

2. 样品的准备: 取 $20\mu\text{l}$ 血清, 按1:7用 $\text{pH}7.0$ 缓冲液(100mmol/L 磷酸钠, 250mmol/L 氯化钠)稀释至 $150\mu\text{l}$ 。

15 3. 芯片的预处理: 配位共价金属螯合剂作用吸附剂芯片每孔加 $50\mu\text{l}$ 100mmol/L 硫酸铜, 室温下振荡5 min, 倒除硫酸铜, 用去离子水冲洗5次后甩干, 每孔中加入 $50\mu\text{l}$ 100mmol/L 醋酸钠($\text{pH}4.0$)室温下振荡5 min, 以除去没有结合的铜离子, 芯片每孔加入 $150\mu\text{l}$ 结合/洗脱缓冲液(50mmol/L HEPES $\text{pH}7.0$), 置于振荡器上, 室温孵育5 min后除去缓冲液, 重复1次后, 每孔加入 $50\mu\text{l}$ 稀释好的样品, 置于振荡器上, 4°C 孵育60 min
20 后除去缓冲液, 接着用 $150\mu\text{l}$ 结合/洗脱缓冲液冲洗3次, 每次振荡5 min, 最后1次用 1mM HEPES $\text{pH}7.0$ 快速冲洗, 取出芯片, 在每孔周围用疏水笔圈样品孔并风干, 加入 $0.5\mu\text{l}$ 的 SINAPINIC 酸(5mg/mL 50% 乙腈; 0.5% 三氟乙酸), 任其自然干燥。

4. 芯片检测: 用质谱仪直接分析。结果用计算机分析质谱数据。

(2) 实验结果

25 用统计学方法, 分析所得数据的形式是用计算机读取的条码格式, 蛋白指纹显示为沿蛋白指纹着线性轴的暗度强度值信号, 此强度可以用扫描仪记录并用分析软件自动分析对比强弱。通过分析几千种血清蛋白指纹峰, 发现下述5种蛋白指纹可以用于区分正常人细胞及胰腺癌患者细胞。

30 分析33例病人与33例正常人血清中蛋白质的组成, 结果发现 $3955\pm 1\text{ Da}$, $6430\pm 1\text{ Da}$, $7562\pm 1\text{ Da}$, $9134\pm 1\text{ Da}$, $3816\pm 1\text{ Da}$ 中5个蛋白质组成的蛋白指纹可将正常人与及胰

腺癌患者准确的分组。

预测准确率：用统计学分析，结果显示：用这 5 个蛋白质组成的蛋白指纹进行检测，发现 28/33 例胰腺癌患者与 27/33 例正常人被正确分组，准确率为 83.3% (55/66)。

敏感度和特异性：33 例患者中有 28 例患者被本方法诊断为胰腺癌患者, 27 例正常人
5 被本方法诊断为非胰腺癌患者。灵敏度为 84.8% (28/33)，特异性为 81.8% (27/33)。

(2) 结论

将来自具有统计意义的患者群的样品与正常样品比较，用配位共价金属螯合吸附剂
-Cu(铜)芯片所捕获的 5 种血清蛋白指纹，可以用于鉴别诊断。本研究利用配位共价金属
10 螯合剂-Cu 芯片对 33 例确诊为胰腺癌患者与 33 正常人血清进行蛋白指纹对比分析，结果
发现血清中质量 3955 ± 1 Da, 6430 ± 1 Da, 7562 ± 1 Da, 9134 ± 1 Da, 3816 ± 1 Da 中的 5 个
蛋白指纹相对含量有明显的差异，并且 5 个蛋白质所组合成的分组标准诊断灵敏度为
84.8% (28/33)，特异性为 81.8% (27/33)。因此，这是目前胰腺癌最好的无创性诊断方
法。

15

专利名称(译)	用蛋白指纹法检测胰腺癌细胞在血液中蛋白指纹的用途		
公开(公告)号	CN1595140A	公开(公告)日	2005-03-16
申请号	CN03156862.9	申请日	2003-09-11
[标]发明人	许洋 陈国强		
发明人	许洋 陈国强		
IPC分类号	G01N30/00 G01N30/72 G01N33/53 G01N33/68 G06K7/10 H01J49/04		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及一种用滞留层析法捕获蛋白质组进行分析的蛋白指纹法。本方法用质谱法进行鉴别检测蛋白质组。分析所得数据的形式是可用计算机读取的条码格式(蛋白指纹)。本发明的方法可用于检测血液中正常人细胞及胰腺癌患者细胞的蛋白指纹。本方法准确、方便且快捷。