

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200310103143.7

G01N 33/569

G01N 33/576

G01N 33/532

G01N 33/68

G01N 33/58

G01N 23/22

[43] 公开日 2005 年 5 月 11 日

[11] 公开号 CN 1614423A

[22] 申请日 2003. 11. 5

[21] 申请号 200310103143.7

[71] 申请人 许 洋

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

权利要求书 1 页 说明书 5 页

[54] 发明名称 用生物芯片及质谱仪联合检测多种病毒微生物标记的用途

[57] 摘要

本发明涉及一种通过被抗体吸附表面芯片上捕获的病毒微生物标记,并用质谱分析来检测。在一个生物芯片的吸附表面上捕获多个病毒微生物生物标记,并对捕获的生物标记进行分析。可以检测多个生物标记群。本发明的方法可用于检测血液中乙型肝炎,丙型肝炎,艾滋病,梅毒的生物标志组合。用这些生物标记组合的检测法可以同时鉴别正常人,乙型肝炎,丙型肝炎,艾滋病,梅毒。本方法准确、方便且快捷。

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

1. 一种用生物芯片捕获生物样品中病毒微生物蛋白质分析方法，其特征是采用激光解析电离分析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，所用生物芯片的吸附剂是蛋白 A 和 G (Protein A and Protein G)。

10

4. 权利要求 3 所述的吸附剂是用于捕获已知蛋白质组的抗体。

5. 权利要求 1 所述的蛋白质分析方法，所用生物芯片的吸附表面捕获多种或多个病毒微生物生物标记，可以检测多个生物标记群。

15

6. 权利要求 1 所述的蛋白质分析方法，所用生物芯片的吸附表面所捕获的分析物是生物样品-血液，体液，分泌物，细胞溶解液，组织溶解物和器官溶解物。

7. 用权利要求 6 的方法分析生物样品中特异的生物标记以检测正常人，乙型肝炎，丙型肝炎，艾滋病，梅毒生物标记的用途。

20

8. 用权利要求 7，可以同时检测出三种以上的病毒微生物生物标记。

9. 权利要求 5 所述生物标记群来源于血液，体液，细胞溶解物，组织溶解物和器官溶解物。

25

10. 权利要求 1 中生物芯片的支持物可以是金属片，玻璃片，陶瓷片，陶瓷珠或多聚体。

30

## 用生物芯片及质谱仪联合检测多种病毒微生物标记的用途

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，一种通过 Protein A and Protein G 吸附表面芯片捕获的生物标记，并用激光解析电离质谱分析来检测生物标记。在此提及的此项发明大体上与乙型肝炎 (hepatitis B virus, HBV)，丙型肝炎 (hepatitis C virus, HCV)，艾滋病 (human immunodeficiency virus, HIV)，梅毒 (treponema pallidum, TP) 微生物研究领域有关。更确切地讲，此发明涉及到生物标记 (biomarkers)，而这些抗原或生物标记能被用来以更高的特异性和灵敏度将乙型肝炎，丙型肝炎，艾滋病，梅毒一次性区分出来。本发明可以应用到血库或医院的筛查。

15

### 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，鉴定病毒或微生物在人体内表达的蛋白质的区别，可用于疾病诊断及筛查，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定性鉴定和定量分析。

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，这阻碍了此类诊断方法的发展。目前，还没有一种方法能够将四种疾病标志物同时检出。

25

ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 试剂盒利用抗体可以用于检测一种疾病标志物。利用抗体及三色荧光，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。利用生物芯片及抗体与质谱仪联合应用，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

30

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 芯片上。由于每种特异体抗体捕获病毒微生物抗原的分子量是不同的, 故 Protein A/G-抗体芯片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病毒微生物或其他疾病。本发明从而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) 。

#### 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, HBV, HCV, HIV, 梅毒在血液中生物标记的用途。此发明涉及到生物标记 (biomarkers), 而这些生物标记能被用来以更高的特异性和灵敏度将 HBV, HCV, HIV, 梅毒患者同时区分出来。

本发明涉及一种通过标记特异性抗体至 Protein A and G 吸附表面芯片, 并用激光解析电离质谱分析来同时检测 HBV, HCV, HIV, 梅毒等四种微生物生物标记。

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

生物芯片: Protein A and G 吸附表面芯片 (Protein A and G 有捕获抗体 Fc 段功能)。具有吸收剂功能的 Protein A and G 底基与抗体结合, 抗体结合血清中病毒微生物蛋白。经过一段足够的时间使生物标记物/病毒微生物蛋白能与抗体-Protein A / G 芯片结合。底基洗去未吸附的物质。任何适宜的洗液均可使用, 最好用水溶液。

生物标记物首先能够被具有能与生物标记物结合的抗体-Protein A and G 吸附表面芯片捕获, 非吸附物能从芯片上洗脱, 吸附到底基的生物标记物在飞行质谱仪中被检测。生物标记物通过离子发生源, 如激光, 被离子化, 产生的离子被一个离子感受集合器收集, 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。生物标记物的检测明显地将与信号强度的检测有关。这样, 生物标记物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。

5 通过对生物标记物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标记物的数量，并显示信号的强度和确定被检测的每个生物标记物的分子量。数据分析还能包括一系列确定生物标记物的信号强度和矫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。

10 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记物更易显现。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记物和那些高于或低于校准样本的生物标记物。

15 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。

20 发明中使用的病毒微生物生物标记是被抗-HBV，抗-HCV，抗-HIV，抗-梅毒等抗体所捕。这些生物标记是通过由质谱（mass spectrometry）测定其不同分子量。

25 对生物标记的检测需要将一个样本放芯片的一个吸附点上，接着进行清洗。向吸附点上加入 SINAPINICS 酸并让其干燥。而后，用质谱测定法对芯片进行分析，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。

30 因为本项发明中的生物标记是通过质量和抗体芯片来标识的，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。然而，如果有必要，这些生物标记也可通过，比如，确定多肽的氨基酸序列来进行鉴别。例如，一个生物标记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断的分子量相吻合。或者，如果此生物标记不是已知数据库中的蛋白质分子，在生物标记的 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记的样本所生成的基因组或 cDNA 库。最后，蛋白质生物标记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，本发明可以用于病毒微生物鉴定的金标准。举例讲，如果用抗 HIV gP120 芯片去捕获血清 HIV gP120，质谱图显示一个 120 kDa 蛋白，我们可以诊断 HIV；如果出现一个 100 kDa 蛋白，则可能是 HIV gP120 降解产物；如果出现一个 140 kDa 蛋白，则可能是非特异性蛋白。这时就可以用质谱来做氨基酸序列鉴定：即最精确鉴别 (金标准)。

## 具体实施方式

15 实施例 1 正常人, HBV, HCV, HIV, 梅毒 (TP) 微生物在血液中生物标记的区分

### (1) 实验方法

#### 一、材料

1. 标本来源：收集临床诊断病人的血清/血浆样本。70 例对照组 (正常人)，71 例 HBV 患者，45 例 HCV 患者，30 例 HIV 患者，10 例梅毒患者。

20 2. 试剂：乙腈、三氟乙酸、SINAPINIC 酸 (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  $-80^{\circ}\text{C}$  保存；

2. 样品的准备：HBV 阳性血清，HCV 阳性血清，HIV 阳性血清，梅毒阳性血清。

25 3. 芯片的预处理：100  $\mu\text{l}$  稀释样本加载到覆盖一个芯片位点的槽中并在室温条件下轻微震荡 0.5 小时。从槽中移去缓冲液。200  $\mu\text{l}$  同样的结合缓冲液加到每个槽中并震荡洗涤 5 分钟。重复洗涤。移去缓冲液并在每个槽中加 200  $\mu\text{l}$  HPLC-梯度水快速冲洗。水从槽中去除。在分析前，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。

30 4. 芯片检测：芯片放入质谱中，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

分析 156 例 HBV, HCV, HIV, 梅毒病人与 70 例对照组 (正常人) 血清中蛋白质的组成, 结果发现 4 个蛋白质组成的生物标志物可将对照组 (正常人) 与患者准确的分组。

5 预测准确率: 用统计学分析及双盲分析中, 结果显示: 用这 4 个蛋白质组成的生物标志物进行检测, 发现, 71 例 HBV 患者, 45 例 HCV 患者, 30 例 HIV 患者, 10 例梅毒患者, 与 70 例对照组 (正常人) 被正确分组, 准确率为 100% (226/226)。灵敏度为 100% (71/71 例 HBV 患者, 45/45 例 HCV 患者, 30/30 例 HIV 患者, 10/10 例梅毒患者, 被正确分组), 特异性为 100% (70/70 例对照组正常人被正确分组)。

## (3) 结论

10 将来自具有统计意义患者群的样品与对照组 (正常样品) 比较, 用 Protein A/G 抗体吸附表面芯片所捕获的 4 种血清微生物蛋白生物标记, 可以用于鉴别诊断。

本发明利用吸附表面芯片对 156 例确诊患者与 70 人对照组 (正常人) 血清进行蛋白质对比分析, 结果发现血清中 4 个蛋白质组有差异, 并且 4 个蛋白质所组合成的分组标准其诊断的灵敏度为 100%, 特异性为 100%。

专利名称(译)	用生物芯片及质谱仪联合检测多种病毒微生物标记的用途		
公开(公告)号	<a href="#">CN1614423A</a>	公开(公告)日	2005-05-11
申请号	CN200310103143.7	申请日	2003-11-05
[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	G01N23/22 G01N33/532 G01N33/569 G01N33/576 G01N33/58 G01N33/68		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

#### 摘要(译)

本发明涉及一种通过被抗体吸附表面芯片上捕获的病毒微生物标记，并用质谱分析来检测。在一个生物芯片的吸附表面上捕获多个病毒微生物标记，并对捕获的生物标记进行分析。可以检测多个生物标记群。本发明的方法可用于检测血液中乙型肝炎，丙型肝炎，艾滋病，梅毒的生物标志组合。用这些生物标记组合的检测法可以同时鉴别正常人，乙型肝炎，丙型肝炎，艾滋病，梅毒。本方法准确、方便且快捷。