



# (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111239402 A  
(43)申请公布日 2020.06.05

(21)申请号 201811441432.0

(22)申请日 2018.11.29

(71)申请人 北京大学

地址 100871 北京市海淀区颐和园路5号

(72)发明人 白玉 徐姝婷 刘虎威

(74)专利代理机构 北京万象新悦知识产权代理有限公司 11360

代理人 李稚婷

(51)Int.Cl.

G01N 33/68(2006.01)

G01N 27/62(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

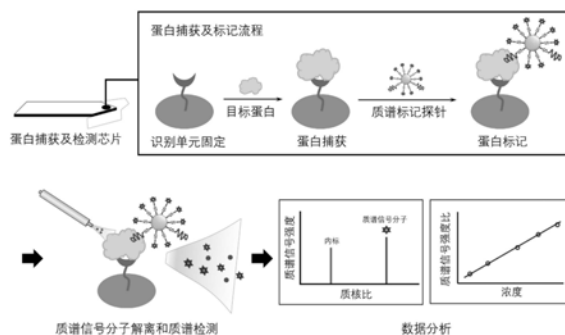
权利要求书5页 说明书10页  
序列表1页 附图5页

## (54)发明名称

一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及应用

## (57)摘要

本发明公开了一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及其应用,包括:目标蛋白在芯片表面的捕获,质谱标记探针对目标蛋白的标记,芯片电喷雾离子化质谱检测标记在目标蛋白上的质谱信号分子,蛋白浓度的定量计算。该方法普适性强,可拓展性强,装置简单,灵敏度高。其中,芯片以阵列形式参与质谱离子化过程,实现快速高效、高通量、低成本的样品分析。质谱标记探针通过适配体的特异性识别作用将大量质谱标记分子标记在目标蛋白上,实现目标蛋白信号的多步放大,达到高灵敏检测。多种质谱标记分子能够实现多目标蛋白的同时检测,进一步提高分析通量和分析效率。本方法在临床早期诊断、肿瘤标志物筛选和预后治疗等领域都具有广阔的应用前景。



1. 一种检测目标蛋白的质谱免疫分析方法,包括以下步骤:

1) 将浓度为 $c_1, c_2, \dots, c_n$ 的标准蛋白样品和待测样品 $x_1, x_2, \dots, x_m$ 分别滴加在固定了识别单元的芯片表面进行目标蛋白识别和捕获,其中 $m, n$ 为自然数,代表样品序号;

2) 将步骤1) 捕获到目标蛋白后的芯片浸入质谱标记探针的分散液中,利用质谱标记探针标记蛋白,所述质谱标记探针包括贵金属纳米粒子内核及通过巯基与贵金属形成M-S键自组装在贵金属纳米粒子表面的核酸适配体和质谱信号分子,其中M代表贵金属元素;

3) 利用芯片电喷雾离子化装置解离步骤2) 处理后芯片上质谱标记探针中的质谱信号分子,并进行质谱检测;

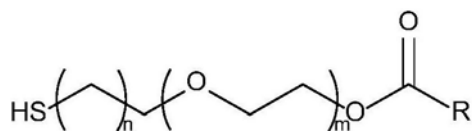
4) 在步骤3) 的质谱结果中,以质谱信号分子或其碎片的质核比的平均信号强度 $T$ 和相同时间内的内标物或其碎片的质核比的平均信号强度 $S$ 的比值 $R=T/S$ 作为定量依据,利用标准蛋白样品的检测结果获得线性方程,并计算待测样品中目标蛋白的浓度。

2. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,在步骤1) 中,所述芯片为能够导电的固态薄片,其一端的形状是顶角为 $30^\circ \sim 60^\circ$ 的等腰三角形,在该等腰三角形中与两腰相切的圆形区域为蛋白捕获区域,在该区域内镀金并修饰上能够识别目标蛋白的识别单元;将一定体积的样品溶液滴加在所述蛋白捕获区域,在一定温度条件下孵育一段时间,然后清洗芯片,除去未识别成分。

3. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,步骤1) 中所述识别单元为抗体或核酸适配体,通过共价连接固定在芯片表面。

4. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,在步骤2) 中所述质谱标记探针中,所述贵金属纳米粒子是金纳米粒子或银纳米粒子,直径为 $20 \sim 30\text{nm}$ 。

5. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,在步骤2) 中所述质谱标记探针中,所述核酸适配体是5' 端或3' 端巯基修饰的核酸适配体,且能够特异性结合目标蛋白;所述质谱信号分子是分子量在 $1500\text{Da}$ 以内,结构通式如式I所示的有机小分子:



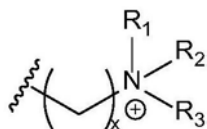
式 I

式I中, $n$ 为6-15的整数, $m$ 为0-8的整数, $R$ 为具有质谱增敏能力、分子量在 $50 \sim 1000\text{Da}$ 的基团。

6. 如权利要求5所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,步骤2) 中所述质谱标记探针采用“一锅反应法”制备:向贵金属纳米粒子的水溶液中先加入核酸适配体的水溶液,室温下避光反应 $10 \sim 16\text{h}$ ;再向该体系中加入质谱信号分子溶液,室温下避光反应 $10 \sim 16\text{h}$ ;离心洗涤,除去未结合的核酸适配体和质谱信号分子;制备过程中,贵金属纳米粒子与核酸适配体的摩尔比为 $1:50 \sim 1:200$ ,贵金属纳米粒子与质谱信号分子的摩尔比为 $1:1000 \sim 1:10000$ 。

7. 如权利要求5所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,在式I所示的质谱信号分子中, $R$ 基为下述a) 至f) 所述基团之一:

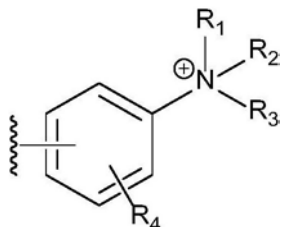
a) 式II所示结构:



式 II

式II中,  $x$ 为1-5的整数,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 相同或不同, 为C1~C4的短链烷基;

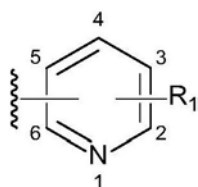
b) 式III所示结构:



式 III

式III中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 相同或不同, 为C1~C4短链烷基;  $R_4$ 代表苯基上的一个或多个取代基, 为氢或C1~C4的短链烷基;

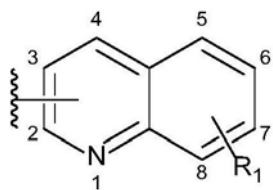
c) 式IV所示结构:



式 IV

式IV中,  $R_1$ 代表吡啶基上的一个或多个取代基, 为氢或C1~C4的短链烷基; 式I中的酯基与式IV的连接位置在吡啶基的1N原子上, 或者连接在2C、3C、4C、5C或6C位上;

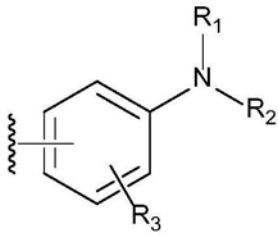
d) 式V所示结构:



式 V

式V中,  $R_1$ 代表喹啉基上的一个或多个取代基, 为氢或C1~C4的短链烷基; 式I中的酯基与式V的连接位置在喹啉基的1N原子上, 或者连接在2C、3C、4C、5C、6C、7C或8C位上;

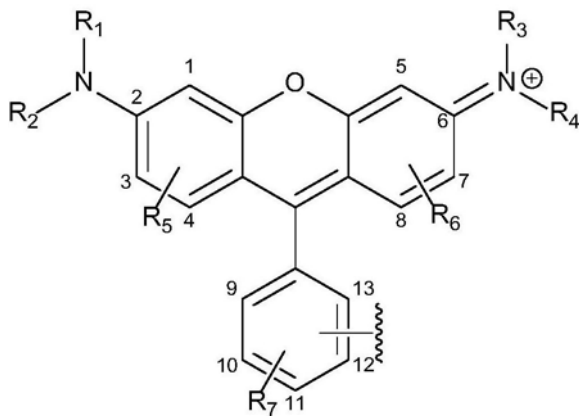
e) 式VI所示结构:



式 VI

式VI中,  $R_1$ 、 $R_2$ 相同或不同,为氢或C1~C4的短链烷基; $R_3$ 代表苯基上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基;式I中的酯基与式VI的连接位置在苯基的邻位、间位或对位;

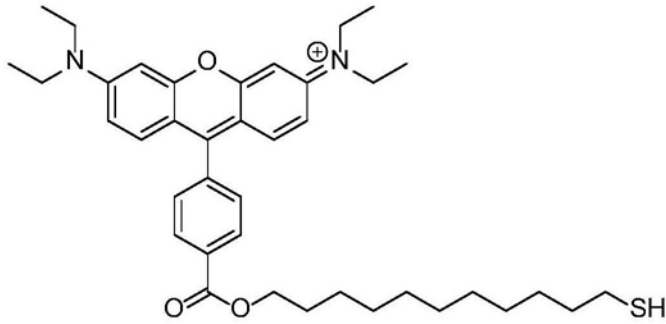
f) 式VII所示结构:



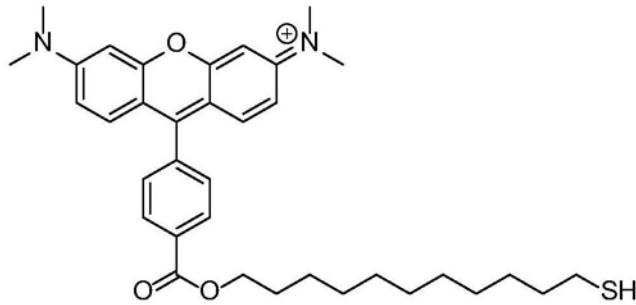
式 VII

式VII中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 相同或不同,为氢或C1~C4的短链烷基; $R_5$ 代表1C、3C和/或4C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基; $R_6$ 代表5C、7C和/或8C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基; $R_7$ 代表9C、10C、11C、12C或13C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基;式I中的酯基与式VII的连接位置在苯基的9C、10C、11C、12C或13C位上。

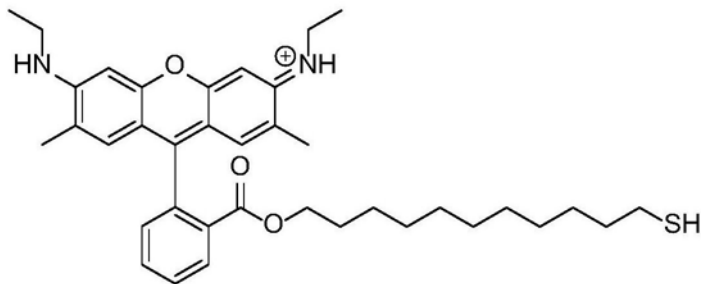
8. 如权利要求7所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,所述质谱信号分子的结构如式VIII、式IX或式X所示:



式 VIII



式 IX



式 X

9. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,步骤3)中所述芯片电喷雾离子化装置为一种常压敞开式的质谱离子化装置,包括双层毛细管组成的电喷雾管,对准待测芯片上的蛋白捕获区域;芯片上质谱标记探针中的质谱信号分子在电喷雾管喷出的喷雾溶剂的作用下解离下来,进入质谱仪进行检测;所述喷雾溶剂中含有一定量的内标物,用于内标法定量。

10. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法,其特征在于,步骤4)包括:

4-1) 在所获得的质谱图的总离子流色谱图中,分别提取质谱信号分子或其碎片的质核比的提取离子流色谱图,以及内标物或其碎片的质核比的提取离子流色谱图,获得每个芯片从检测开始持续一段时间的质谱信号分子或其碎片的质核比的平均信号强度 $T_{c1}, T_{c2}, \dots, T_{cn}$ 和 $T_{x1}, T_{x2}, \dots, T_{xm}$ ,以及相同时间内的内标物或其碎片的质核比的平均信号强度 $S_{c1}, S_{c2}, \dots, S_{cn}$ 和 $S_{x1}, S_{x2}, \dots, S_{xm}$ ;计算 $T_c$ 与 $S_c$ 的平均信号强度比值 $R_c: R_{c1} = T_{c1}/S_{c1}, R_{c2} = T_{c2}/S_{c2}, \dots, R_{cn} = T_{cn}/S_{cn}$ ;计算 $T_x$ 与 $S_x$ 的平均信号强度比值 $R_x: R_{x1} = T_{x1}/S_{x1}, R_{x2} = T_{x2}/S_{x2}, \dots, R_{xm} = T_{xm}/S_{xm}$ ;

4-2) 以  $c_1, c_2, \dots, c_n$  为横坐标值,  $R_{c_1}, R_{c_2}, \dots, R_{c_n}$  为纵坐标值作图, 对图中数据点进行线性拟合, 得到线性方程;

4-3) 将  $R_{x_1}, R_{x_2}, \dots, R_{x_m}$  带入线性方程, 计算得到待测样品中目标蛋白浓度  $x_1, x_2, \dots, x_m$ 。

11. 如权利要求1所述的质谱免疫分析方法, 其特征在于, 利用该质谱免疫分析方法对多种目标蛋白同时进行检测, 步骤1) 中的芯片表面固定对应这些目标蛋白的多种识别单元, 步骤2) 中芯片浸入多种质谱标记探针等体积混合的分散液中, 不同质谱标记探针表面结合的质谱信号分子质核比相差1以上。

## 一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及应用

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种蛋白质免疫分析方法的构建及其应用,具体涉及普适性的蛋白捕获及检测芯片和质谱标记探针的制备方法,基于质谱信号的免疫检测方法及其在蛋白质标志物检测中的应用。

### 背景技术

[0002] 蛋白质分子广泛参与生命体内的重要生命活动中,包括机体防御、物质运输、信号传导等。蛋白质表达水平通常能够反映机体的生命状态,多种蛋白质分子已被用作以肿瘤为主的各种疾病的生物标志物,例如甲胎蛋白、癌胚抗原、前列腺特异性抗原等,为临床诊断、病理分析和预后评估提供重要的参考指标。蛋白质分子的检测主要借助基于抗原抗体相互识别的免疫分析方法,代表性的免疫分析方法为酶联免疫吸附测定(ELISA),即利用抗原与抗体的特异性识别将待测物与酶连接,然后通过酶与底物产生颜色反应,用于定量测定。通常在免疫分析中,蛋白质的含量都会通过标记物信号来反应,常用的标记信号主要是酶、荧光分子、化学发光剂、多种纳米粒子等,由此产生的信号能够通过荧光检测或电化学检测等进行定量。该类免疫分析方法通常能够实现高灵敏、快速检测,但是也受到光漂白、信号重叠、背景干扰等问题的限制,因此在信号稳定性、多目标检测及定量准确性等方面还存在诸多限制。

[0003] 质谱依靠其强大的定性定量和多物质同时检测能力已被广泛应用于疾病相关的蛋白组学研究中。然而,利用质谱对蛋白质进行直接检测存在着离子化效率低、质谱信号响应差、谱图解析困难等问题。将免疫分析与质谱检测相结合的质谱免疫的方法则充分结合了两者的优势,一方面利用免疫分析将大分子蛋白质的检测转化为标记信号的检测,解决蛋白质质谱检测灵敏度不足的问题,另一方面利用质谱定量准确、分辨率高的优势,能够同时对多目标物进行定量分析。

[0004] 质谱免疫分析方法的关键点之一在于设计能够高效解离且质谱响应性好的质谱标记探针。理想的质谱标记探针需要具备蛋白特异性识别、高效解离及信号放大等功能,且需要具有经济型、可拓展性及普适性,能够用于快速、高灵敏、高通量的多蛋白免疫分析。文献(R.Du,L.Zhu,J.Gan,Y.Wang,L.Qiao and B.Liu.Anal.Chem.,2016,88,6767-6772和J.R.Lee,J.Lee,S.K.Kim,K.P.Kim,H.S.Park and W.Yeo.Angew.Chem.Int.Ed.,2008,47,9518-9521)中报道了目前典型的能够应用于质谱免疫方法的标记探针及质谱免疫分析方法,然而由于探针需要借助激光实现解离,大大增加了质谱免疫的分析成本及仪器需求,同时激光解离产生多种形式的信号,分散了标记信号的放大效果,影响检测灵敏度。文献(S.Chen,Q.Wan and A.K.Badu-Tawiah.J.Am.Chem.Soc.,2016,138,6356-6359)中报道了能够利用化学手段解离的标记探针及成本低廉的纸喷雾免疫方法,但该探针结构单一、制备复杂、可拓展性不强,而且信号放大效果不佳,使得该质谱免疫方法不能满足目前临床诊断中的检测灵敏度的需求。

## 发明内容

[0005] 为了弥补现有质谱免疫分析方法中存在的标记探针种类单一、可拓展性不强、仪器需求高、检测成本高以及检测灵敏度不足的问题,本发明旨在提供一种标记探针可拓展性高、检测装置简单、检测灵敏度高的质谱免疫分析方法,能够实现血清等实际样品中蛋白标志物的快速、高灵敏的分析。

[0006] 本发明提供的用于检测目标蛋白的质谱免疫分析方法的实现步骤包括蛋白在芯片表面的识别,利用质谱标记探针对捕获到的蛋白进行标记,利用质谱检测样品芯片,数据处理等步骤,具体如下:

[0007] 1) 将浓度为 $c_1, c_2, \dots, c_n$ 的标准蛋白样品和待测样品 $x_1, x_2, \dots, x_m$ 分别滴加在固定了识别单元的芯片表面进行目标蛋白识别和捕获,其中 $m, n$ 为自然数,代表样品序号;

[0008] 2) 将步骤1) 捕获到目标蛋白后的芯片浸入质谱标记探针的分散液中,利用质谱标记探针标记蛋白,所述质谱标记探针包括贵金属纳米粒子内核及通过巯基与贵金属形成M-S键(M=Au, Ag等贵金属)自组装在贵金属纳米粒子表面的核酸适配体及质谱信号分子;

[0009] 3) 利用芯片电喷雾离子化装置解离步骤2) 处理后芯片上质谱标记探针中的质谱信号分子,并进行质谱检测;

[0010] 4) 数据分析:在步骤3) 的质谱结果中,以质谱信号分子或其碎片的质核比的平均信号强度(T),和相同时间内的内标物或其碎片的质核比的平均信号强度(S)的比值 $R=T/S$ 作为定量依据,利用标准蛋白样品的检测结果获得线性方程,并计算待测样品中目标蛋白的浓度。

[0011] 上述步骤1) 实现蛋白在芯片表面的识别,其中固定了识别单元的芯片称为蛋白捕获芯片,首先将一定体积的待检测溶液滴加在蛋白捕获芯片前端的蛋白识别区域中,在一定温度(如37°C)条件下孵育一段时间(通常为30min-1h);孵育后清洗芯片,以除去未识别成分,其中清洗芯片通常采用磷酸盐缓冲溶液。对于样品中目标蛋白标志物含量测定,需要测定的样品通常包括:将蛋白质标准品溶于磷酸盐缓冲溶液后配制的一系列浓度 $c_1, c_2, \dots, c_n$ 的标准溶液,可选5-10种浓度的标准溶液,每种浓度不少于三个平行样品;待测样品 $x_1, x_2, \dots, x_m$ ,每种浓度不少于三个平行样品。

[0012] 优选的,上述标准溶液和待测样品溶液体积为1 $\mu$ L-10 $\mu$ L,待测样品可以是蛋白溶液,也可以是血清、血浆、尿液、脑脊液等生物体液或细胞裂解液等。

[0013] 其中,所使用的蛋白捕获芯片采用能够导电的固体薄片,例如氧化铟锡玻璃片等。优选的,该薄片的一端形状设计成顶角为30°~60°的等腰三角形,为满足后续质谱检测的需求,将薄片上与该等腰三角形两腰相切的圆形区域作为蛋白捕获区域,在该区域内通过粒子溅射、电化学沉积等方式镀金并修饰上能够识别目标蛋白的识别单元,优选的识别单元例如抗体、核酸适配体等等。

[0014] 本发明中还提供一种蛋白捕获芯片表面抗体或核酸适配体的共价连接固定方法。对于抗体固定,可先将镀金区域浸泡在巯基取代的直链羧酸溶液中,优选碳链长度三个碳原子以上的巯基烷酸,浓度为0.1-10mg/mL,避光放置12h以上;清洗后再将该区域浸泡在N-(3-二甲氨基丙基)-N'-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基丁二酰亚胺(NHS)的混合溶液中,两者浓度均为10-50mg/mL,且EDC浓度不低于NHS浓度,反应30min;清洗后将该区域浸泡在抗体的磷酸盐缓冲溶液中,4°C孵育12h以上,将抗体共价结合在芯片上,优选的抗体固定

浓度为0.1mg/mL。对于核酸适配体固定,优选5'端或3'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-巯基修饰核酸适配体,可以是脱氧核糖核酸适配体或核糖核酸适配体,将镀金区域浸泡在核酸适配体的三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液中,4℃孵育12h以上,将核酸适配体共价结合在芯片上,优选的核酸适配体固定浓度为50μmol/L。蛋白捕获芯片可以先行制备,并在4-8℃条件下保存备用。

[0015] 上述步骤2)利用质谱标记探针标记捕获到的蛋白,典型的操作是:将捕获蛋白后的芯片浸泡在质谱标记探针的磷酸盐缓冲溶液中,在37℃条件下孵育30min-1h;孵育后先用磷酸盐缓冲溶液清洗芯片,再用水清洗芯片,以除去未结合成分,清洗后晾干以备质谱检测。

[0016] 其中,所使用的质谱标记探针为一种高灵敏、普适性多功能纳米探针,其包括贵金属纳米粒子内核及通过巯基与贵金属形成M-S键(M=Au,Ag等贵金属)自组装在贵金属纳米粒子表面的核酸适配体及质谱信号分子。

[0017] 本发明中还提供所述质谱标记探针的制备方法。质谱标记探针采用“一锅反应法”制备,向贵金属纳米粒子的水溶液中先加入核酸适配体的水溶液,室温下避光反应10-16h;再向该体系中加入质谱信号分子溶液(质谱信号分子预先溶解于其非质子型良溶剂中,例如乙腈),室温下避光反应10-16h;离心洗涤3-5遍,除去未结合的适配体和质谱信号分子;最后将纳米粒子分散在磷酸盐缓冲溶液中。

[0018] 上述质谱标记探针的制备方法中,所用金属纳米粒子优选金纳米粒子或银纳米粒子等。金纳米粒子的制备可以通过柠檬酸三钠还原氯金酸的方法,银纳米粒子的制备可以通过柠檬酸三钠和硼氢化钠还原硝酸银的方法,纳米粒子粒径优选为20nm-30nm。

[0019] 所用核酸适配体优选为5'端或3'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-巯基修饰核酸适配体,可以是脱氧核糖核酸适配体或核糖核酸适配体。需选择能够特异性结合目标蛋白的核酸适配体。核酸适配体可预先与1mg/mL的三氯乙基磷酸酯溶液室温下避光反应1-12h,还原易被氧化的巯基。贵金属纳米粒子与核酸适配体的摩尔比可选择为1:50-1:200。

[0020] 所用的质谱信号分子是一类能够实现质谱信号二级放大的有机小分子,分子量在1500Da以内,其分子结构通式如式I所示:



式 I

[0022] 式I中,n为6-15的整数,m为0-8的整数,R为具有质谱增敏能力、分子量在50-1000Da的基团,其中含有但不仅限于季铵根、吡啶基、喹啉基、氨基、烷基取代氨基(如二甲氨基、二乙氨基)等电正性基团或强质子亲和基团中的一种或多种,并优选为具有芳环共轭结构的分子基团。

[0023] 式I所示的质谱信号分子有三个组成部分:结构一端为巯基,能够通过M-S(M=Au,Ag等贵金属)键自组装在贵金属纳米粒子表面;巯基后连接由刚性烷基链和柔性的聚乙二醇链组成的链状结构,能够提高信号分子在纳米粒子表面自组装的效率,增加信号分子在纳米粒子表面的结合数量;结构另一端为通过酯键连接的R基结构。

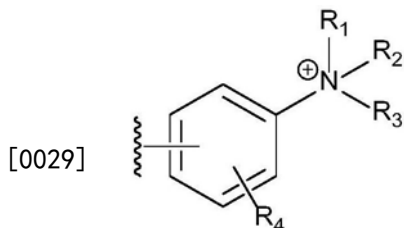
[0024] 优选的,式I中的R基可以是以式II为主体的结构:



[0026] 式 II

[0027] 式 II 中, x 为 1-5 的整数, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 相同或不同, 为 C1~C4 的短链烷基 (如甲基、乙基、丙基等)。

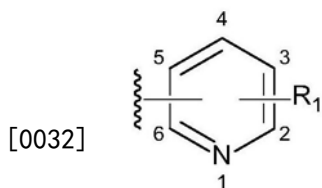
[0028] 优选的, 式 I 中的 R 基还可以是以式 III 为主体的结构:



式 III

[0030] 式 III 中, R<sub>1</sub>、R<sub>2</sub>、R<sub>3</sub> 相同或不同, 为 C1~C4 的短链烷基 (如甲基、乙基、丙基等), R<sub>4</sub> 代表苯基上的一个或多个取代基, 为氢或 C1~C4 的短链烷基 (如甲基、乙基、丙基等)。式 I 中的酯基与式 III 的连接位置可以在苯基的邻位、间位或对位; R<sub>4</sub> 的连接位置可以在苯基上其他未取代位点。

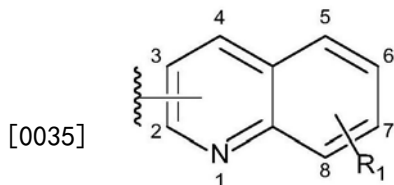
[0031] 优选的, 式 I 中的 R 基还可以是以式 IV 为主体的结构:



式 IV

[0033] 式 IV 中, R<sub>1</sub> 代表吡啶基上的一个或多个取代基, 为氢或 C1~C4 的短链烷基 (如甲基、乙基、丙基等)。式 I 中的酯基与式 IV 的连接位置可以在吡啶基的 1N 原子上, 或连接在 2C、3C、4C、5C 或 6C 位上, R<sub>1</sub> 的连接位置可以在吡啶基上未取代 N 原子上或其他未取代 C 原子上。

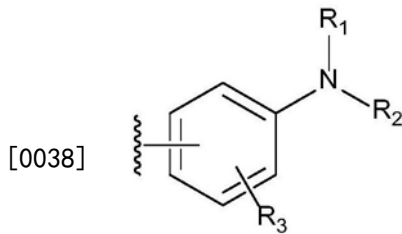
[0034] 优选的, 式 I 中的 R 基还可以是以式 V 为主体的结构:



式 V

[0036] 式 V 中, R<sub>1</sub> 代表喹啉基上的一个或多个取代基, 为氢或 C1~C4 的短链烷基 (如甲基、乙基、丙基等)。式 I 中的酯基与式 V 的连接位置可以在喹啉基的 1N 原子上, 或连接在 2C, 3C, 4C, 5C, 6C, 7C 或 8C 位。R<sub>1</sub> 的连接位置可以在喹啉基上未取代 N 原子上或其他未取代 C 原子上。

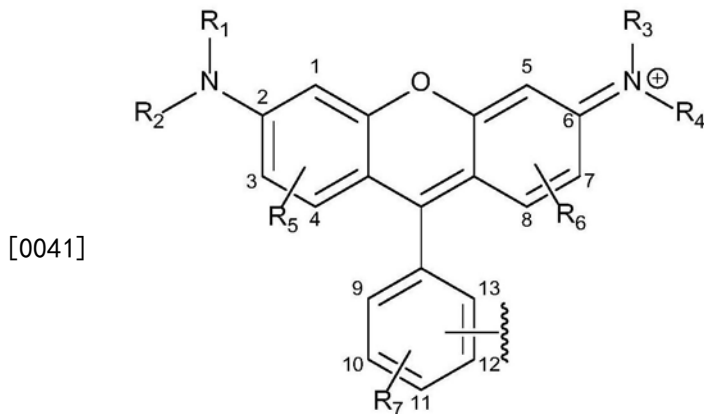
[0037] 优选的, 式 I 中的 R 基还可以是以式 VI 为主体的结构:



式 VI

[0039] 式VI中,  $R_1$ 、 $R_2$ 相同或不同,为氢或C1~C4的短链烷基(如甲基、乙基、丙基等);  $R_3$ 代表苯基上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基。式I中的酯基与式VI的连接位置可以在苯基的邻位、间位或对位,  $R_3$ 的连接位置可以在苯基上其他未取代位点。

[0040] 优选的,式I中的R基还可以是以式VII为主体的结构:



式 VII

[0042] 式VII中,  $R_1$ 、 $R_2$ 、 $R_3$ 、 $R_4$ 相同或不同,为氢或C1~C4的短链烷基(如甲基、乙基、丙基等);  $R_5$ 代表1C、3C和/或4C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基;  $R_6$ 代表5C、7C和/或8C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基;  $R_7$ 代表9C、10C、11C、12C或13C位上的一个或多个取代基,为氢或C1~C4的短链烷基。式I中的酯基与式VII的连接位置可以在苯基的9C、10C、11C、12C或13C位上。

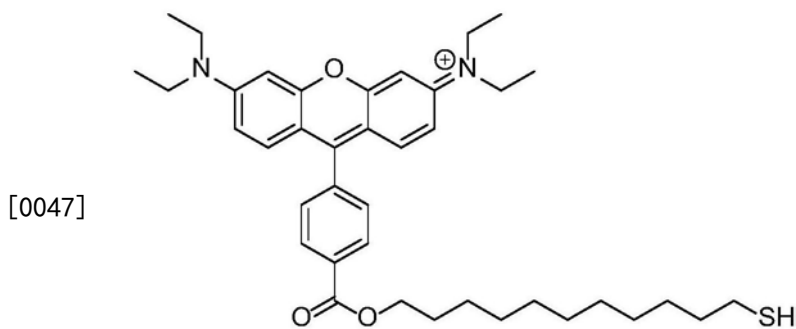
[0043] 上述质谱信号分子的R基部分结构在电喷雾质谱检测中都具有离子化效率高、质谱高响应的特点。

[0044] 所用质谱信号分子具有二级放大的作用,大大增强蛋白免疫检测中的检测灵敏度。一级放大通过质谱信号分子在芯片电喷雾离子化条件下从贵金属纳米粒子表面解离而实现,大量质谱信号分子自组装在贵金属纳米粒子上标记在每个目标蛋白上,制备过程中,纳米粒子与质谱信号分子的摩尔比为可选择为1:1000-1:10000。二级放大通过质谱信号分子在质谱源内碰撞诱导裂解实现,质谱信号分子在质谱源内碰撞诱导裂解中均在酯键位置发生断裂,碎裂产生R基碎片,进一步聚集质谱标记信号。

[0045] 所用的质谱信号分子的可拓展性强,使用式I所示信号分子,通过改变R基中短链烷基链长短即能够产生在质谱检测中响应能力类似,但m/z不同的系列质谱信号分子,用于多蛋白目标物的同时标记和检测。

[0046] 在本发明的一些实施例中,以25nm直径的金纳米粒子为内核,选择5'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-

巯基修饰的20-30碱基长度的脱氧核糖核酸适配体,质谱信号分子的结构如式VIII所示;金纳米粒子、核酸适配体和质谱信号分子制备的摩尔比为1:120:5000。



式 VIII

[0048] 步骤2)中用到的质谱标记探针可先行制备好,并在4-8℃条件下保存备用。

[0049] 上述步骤3)利用质谱检测样品芯片,具体操作是:打开质谱扫描,打开芯片电喷雾离子化装置中的鞘气阀、溶剂注射泵及电源开关,设置质谱采集参数,特别是源内裂解电压值,等待质谱信号稳定,将晾干后的待测芯片放置在芯片轨道上,芯片排成一行,尖端朝向一致,均朝向质谱入口,通过轨道运动将芯片传送至质谱入口前的固定位置,记录芯片检测过程中的质谱数据,每个芯片的检测过程在2min内完成。需要测定的样品包括:标准蛋白 $c_1, c_2, \dots, c_n$ 的一系列浓度标准溶液,依次按照步骤1)、步骤2)操作制备的待测芯片,每个浓度的芯片不少于三个;待测样品 $x_1, x_2, \dots, x_m$ 依次按照步骤1)、步骤2)操作制备的待测芯片,每个浓度的芯片不少于三个。

[0050] 所述芯片电喷雾离子化装置为一种常压敞开式的质谱离子化装置(参见图2),该装置中包括双层毛细管组成的电喷雾管2和蛋白检测芯片3,无需激光、等离子体、高温或特殊化学试剂的辅助。质谱信号分子在解离和质谱源内碰撞诱导裂解后,能产生多步信号放大的效果。该装置在检测中包括以下主要参数:电压值可选2kV-4kV,鞘气压力可选0.1-0.5MPa,溶剂流速可选1-15 $\mu$ L/min,溶剂种类可选甲醇/乙腈/水按比例混合并添加一定浓度的甲酸、乙酸或氨水等,电喷雾管2距离蛋白检测区域的垂直距离可选2-6mm,芯片尖端距离质谱入口的水平距离可选0-4mm,源内裂解电压值可选0-100V。

[0051] 其中,在喷雾溶液中还添加了一定量的内标物,用于内标法定量。可选择的内标物是与质谱信号分子结构类似,且在质谱检测中产生的质核比可以与质谱信号分子明显区分的化合物,例如,采用R基如式VII所示的式I分子为质谱信号分子时,可选择的内标物为结晶紫、甲基紫等化合物,内标物在喷雾溶剂中的浓度可选0.05-0.5 $\mu$ mol/L。获得的质谱图中,质谱信号分子或其碎片的质核比为待测样品信号,内标物质或其碎片的质核比为内标信号。

[0052] 优选的,以式VIII分子作为质谱信号分子,结晶紫作为内标物,电压值设为+3.5kV,鞘气压力设为0.15MPa,溶剂使用添加0.1%甲酸的甲醇溶液流速设为5 $\mu$ L/min,电喷雾管距离蛋白检测区域的垂直距离设为0,芯片尖端距离质谱入口的水平距离设为2.5mm,源内裂解电压设为100V。在获得的质谱图中,质谱信号分子式VIII产生的质核比为 $m/z=443.2$ ,内标物结晶紫产生的质核比为 $m/z=340.2$ 。

[0053] 优选的,样品检测顺序为:一系列标准品按照从低到高的浓度检测,随后检测样

品。

[0054] 上述步骤4) 数据分析中, 质谱信号分子或其碎片的质核比和内标物或其碎片的质核比的提取均从芯片检测开始, 取一段相同时间内的平均信号强度; 以两者比值作为质谱测定值, 用于定量分析; 对于一种目标蛋白, 对所有标准溶液和待测样品所取平均信号强度时间相同。质谱信号分子或其碎片的质核比在所取平均信号强度的时间终点已回到基线值, 而内标物或其碎片的质核比在检测过程中信号保持稳定。数据分析具体包括:

[0055] 4-1) 在所获得的质谱图的总离子流色谱图中, 分别提取质谱信号分子或其碎片的质核比的提取离子流色谱图, 以及内标物或其碎片的质核比的提取离子流色谱图, 获得每个芯片从检测开始持续一段时间(如1min)的质谱信号分子或其碎片的质核比的平均信号强度( $T_{c1}, T_{c2}, \dots, T_{cn}; T_{x1}, T_{x2}, \dots, T_{xm}$ ), 和相同时间内的内标物或其碎片的质核比的平均信号强度( $S_{c1}, S_{c2}, \dots, S_{cn}; S_{x1}, S_{x2}, \dots, S_{xm}$ )。计算 $T_c$ 与 $S_c$ 的平均信号强度比值 $R_c: R_{c1} = T_{c1}/S_{c1}, R_{c2} = T_{c2}/S_{c2}, \dots, R_{cn} = T_{cn}/S_{cn}$ ; 计算 $T_x$ 与 $S_x$ 的平均信号强度比值 $R_x: R_{x1} = T_{x1}/S_{x1}, R_{x2} = T_{x2}/S_{x2}, \dots, R_{xm} = T_{xm}/S_{xm}$ 。

[0056] 4-2) 以 $c_1, c_2, \dots, c_n$ 为横坐标值,  $R_{c1}, R_{c2}, \dots, R_{cn}$ 为纵坐标值, 作图, 对图中数据点进行线性拟合, 得到线性方程。

[0057] 4-3) 将 $R_{x1}, R_{x2}, \dots, R_{xm}$ 带入线性方程, 计算得到待测样品中目标蛋白浓度 $x_1, x_2, \dots, x_m$ 。

[0058] 本发明提供的质谱免疫分析方法是一种高普适性、且适用于多目标同时检测的免疫分析方法。所采用的质谱标记探针可通过更换识别单元, 实现对不同目标蛋白的检测。可选择的质谱信号分子种类繁多, 且由于质谱的高质量分辨率, 质核比有微小差异的质谱信号分子都能够在质谱图的轻易分开, 各信号之前不会相互干扰, 因此确保了本发明中的质谱免疫分析方法在多蛋白标志物同时检测中的应用。

[0059] 本发明中的质谱免疫方法可扩展至多种目标蛋白同时检测。在对多种目标蛋白进行同时检测时, 步骤1) 中的芯片需要固定对应这些目标蛋白的多种识别单元, 步骤2) 中芯片需浸入多种质谱标记探针等体积混合的分散液中, 不同质谱标记探针表面结合的质谱信号分子质核比相差1以上。例如使用R基如式VII所示的式I分子系列物作为质谱信号分子, 其中 $n=11, m=0, R_1 \sim R_7$ 使用不同基团。

[0060] 本发明的质谱免疫分析方法是一种高灵敏的蛋白质检测方法。该方法应用了多种信号放大策略。通过检测质谱响应性好的质谱信号分子来代替目标蛋白解决了蛋白质分子在质谱检测过程中离子化效率低、质谱响应低的问题; 通过质谱标记探针标记蛋白质分子, 使大量的质谱信号分子标记在一个蛋白质分子上, 在数量上放大了检测信号; 通过质谱检测中的源内诱导裂解实现一种质谱信号分子解离后多种质核比形式的汇集, 进一步实现放大信号的聚集。

[0061] 本发明中用于质谱免疫检测的芯片电喷雾离子化装置是一种常压敞开式装置, 无需激光、等离子体、高温或特殊化学试剂的辅助, 能够实现质谱信号分子从质谱标记探针表面的高效解离, 装置结构简单, 成本低廉。采用自动化控制的样品轨道, 能够实现大量样品芯片的快速、高通量筛查。

## 附图说明

[0062] 图1为本发明质谱免疫分析方法流程示意图。

[0063] 图2为本发明质谱免疫分析方法的质谱检测装置示意图,其中:1-质谱仪,2-双层毛细管组成的电喷雾管,3-蛋白检测芯片。

[0064] 图3为实施例1中制备得到的质谱标记探针的扫描电子显微镜图。

[0065] 图4为实施例1中凝血酶标准蛋白检测的得到的质谱图,用于绘制关系曲线。

[0066] 图5为实施例1中凝血酶标准蛋白检测结果的关系曲线,用于待测样品中凝血酶浓度的计算。

[0067] 图6为实施例2中CA125标准蛋白检测结果的关系曲线,用于待测样品中CA125浓度的计算。

[0068] 图7为实施例3中多个质谱标记探针同时检测的质谱图。

## 具体实施方式

[0069] 下面结合附图,通过实施例进一步阐述本发明的技术方案,但是本申请的保护范围不受这些实施例的具体条件的限制。

[0070] 实施例1:采用本发明的质谱免疫分析方法测定血浆中的凝血酶。

[0071] 具体步骤如下:

[0072] (1) 采用尺寸为长20mm、宽5mm的氧化铟锡玻璃片作为蛋白捕获芯片,芯片一端为尖端角度45°的等腰三角形,在氧化铟锡的导电面上、与尖端等腰三角形两腰相切的直径1.5mm圆形区域中利用离子溅射沉积了20nm厚的金层作为蛋白捕获区域。

[0073] 将金层区域浸泡在2 $\mu$ L浓度为50 $\mu$ mol/L的5'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-巯基修饰凝血酶脱氧核糖核酸凝血酶适配体中,该适配体溶解于三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液(25mmol/L,pH=7.4,含100mmol/L氯化钠和5mmol/L氯化镁)中,适配体序列为:5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GTG GTT GGT GTG GTT GG-3' (SEQ ID No:1)。在湿润环境下,4℃避光孵育16h,孵育后用三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲溶液洗涤两次,除去未结合的适配体。制备得到用于凝血酶测定的芯片备用。

[0074] 在2mL浓度为1nmol/L的直径25nm的金纳米粒子水溶液中加入24 $\mu$ L浓度为10 $\mu$ mol/L的5'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-巯基修饰凝血酶脱氧核糖核酸凝血酶适配体水溶液,适配体序列为5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-GTA GCC GTG GTA GGG CAG GTT GGG GTG ACT-3' (SEQ ID No:2),室温下避光反应16h。在向体系中加入100 $\mu$ L浓度为100 $\mu$ mol/L的质谱信号分子乙腈溶液,质谱信号分子结构如式II所示。室温下继续避光反应12h。6000rpm离心15min,弃去上清液,再分散在水中,离心洗涤2次,最后分散在2mL磷酸盐缓冲溶液(10mmol/L,pH=7.4)中,制备得到特异性识别凝血酶的质谱标记探针,备用,制备得到的质谱标记探针的透射电子显微镜图片见图3。

[0075] (2) 将凝血酶标准蛋白溶解于磷酸盐缓冲溶液,得到1fmol/L,10fmol/L,100fmol/L,1pmol/L,10pmol/L,100pmol/L六个浓度的标准蛋白溶液。在适配体固定的芯片表面滴加2 $\mu$ L待测样品:6个标准蛋白溶液,3个待测血浆样品,1个空白对照磷酸缓冲溶液,每个样品平行滴加在3个芯片上,在湿润环境下,37℃避光孵育1h。用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次,除去未结合成分。

[0076] (3) 将芯片浸泡在50 $\mu$ L质谱标记探针分散液中,37 $^{\circ}$ C避光孵育1h,用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次,除去未结合的标记探针,再用水洗涤两次,晾干待测。

[0077] (4) 将待测样品放置在质谱入口前的样品轨道上,依次检测样品芯片,每个芯片采集2min的质谱数据。质谱检测参数设定为:电压值设为+3.5kV,鞘气压力设为0.15MPa,溶剂使用添加0.1%甲酸的甲醇溶液,流速设为5 $\mu$ L/min,电喷雾管距离蛋白检测区域的垂直距离设为0,芯片尖端距离质谱入口的水平距离设为2.5mm,源内裂解电压设为100V。在喷雾溶剂中添加0.12 $\mu$ mol/L的结晶紫作为内标。

[0078] (5) 在采集到的质谱图中记录各个样品 $m/z=443.2$ 和 $m/z=340.2$ 在开始检测1min内的平均信号强度(图4),并计算 $m/z443.2$ 比 $m/z340.2$ 平均信号强度比值 $R_c$ , $R_x$ 用于定量计算。对于1fmol/L-100pmol/L的标准凝血酶蛋白溶液,在标准凝血酶蛋白溶液浓度10fmol/L-100pmol/L之间,信号强度比值与浓度对数呈现线性关系, $R_c=0.5721\lg c(\text{fmol/L})-0.353(R^2=0.998)$ (图5),将血浆样品测定结果的 $R_x$ 值带入方程计算得到三个血浆样品中凝血酶含量为104fmol/L,185fmol/L,96fmol/L。

[0079] 实施例2:采用本发明中的质谱免疫方法测定血清中的癌胚抗原125(CA125)。

[0080] 具体步骤如下:

[0081] (1) 蛋白捕获芯片原料与实施例1中相同。在其表面制备抗体固定的CA125检测芯片。

[0082] 将金层其余浸泡在200 $\mu$ L浓度为1mg/mL的11-巯基十一烷酸的乙醇溶液中,避光放置12h,用乙醇清洗两遍,去离子水清洗两遍,在该区域浸泡在200 $\mu$ L浓度10mg/mL NHS和浓度50mg/mL的EDC水溶液中,室温反应30min,去离子水清洗一遍,将该区域浸在2 $\mu$ L浓度为0.1mg/mL的anti-CA125的磷酸盐缓冲溶液中,4 $^{\circ}$ C避光孵育12h,再用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次得到抗体固定的芯片,备用。

[0083] 特异性识别CA125的质谱标记探针,将加入的适配体换为5'端HS-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-巯基修饰的CA125脱氧核糖核酸适配体,序列为5'-SH-(CH<sub>2</sub>)<sub>6</sub>-ACC ACC ACC ACG ACG CAC GAG TAC CCC GCG-3'(SEQ ID No:3),其余步骤与实施例1(1)中相同,得到质谱标记探针,备用。

[0084] (2) 将CA125标准蛋白溶解于磷酸盐缓冲溶液,得到0.2U/mL,4U/mL,20U/mL,30U/mL,40U/mL,100U/mL六个浓度的标准蛋白溶液。在适配体固定的芯片表面滴加2 $\mu$ L待测样品:6个标准蛋白溶液,3个待测血清样品,1个空白对照磷酸缓冲溶液,每个样品平行滴加在3个芯片上,在湿润环境下,37 $^{\circ}$ C避光孵育1h。用磷酸盐缓冲溶液洗涤两次,除去未结合成分。

[0085] (3) 利用实施例2(1)中制备的质谱标记探针标记捕获到的CA125蛋白,步骤与实施例1(3)相同。

[0086] (4) 将待测样品放置在质谱入口前的样品轨道上,依次检测样品芯片,每个芯片采集2min的质谱数据。质谱检测参数设定与实施例1(4)中相同。在喷雾溶剂中添加0.24 $\mu$ mol/L的结晶紫作为内标。

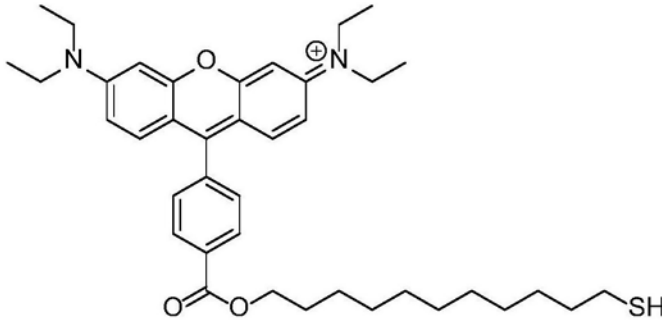
[0087] (5) 在采集到的质谱图中记录各个样品 $m/z=443.2$ 和 $m/z=340.2$ 在开始检测1min内的平均信号强度,并计算 $m/z443.2$ 比 $m/z340.2$ 平均信号强度比值 $R_c$ , $R_x$ 用于定量计算。在标准CA125蛋白溶液浓度0.2U/mL-40U/mL之间,信号强度比值与浓度呈现线性关系, $R_c=0.0322c(\text{U/mL})+0.198(R^2=0.995)$ (图6),将血清样品测定结果的 $R_x$ 值带入方程计算得到

三个血清样品中CA125含量为13.8U/mL,30.2U/mL,38.0U/mL。

[0088] 实施例3:

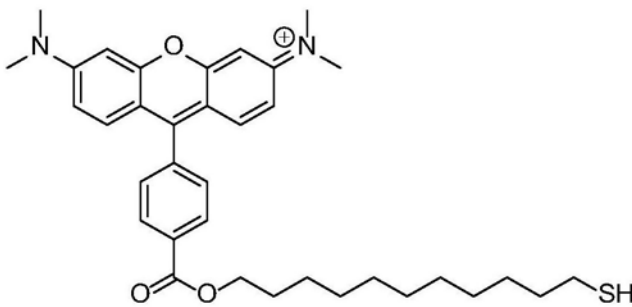
[0089] 制备多种质谱标记探针,尝试多种质谱标记探针同时检测,其具体步骤如下:

[0090] (1) 分别将100 $\mu$ L浓度为100 $\mu$ mol/L式VIII、式IX、式X的乙腈溶液添加到2mL浓度为1nmol/L的直径25nm金纳米粒子分散液中,室温避光反应12h。6000rpm,15min离心分离,弃去上清液,再加水分散离心洗涤两次,最后分散在2mL水中。将分别修饰了式VIII、式IX、式X的金纳米粒子分散液按照体积比1:1:1混合。

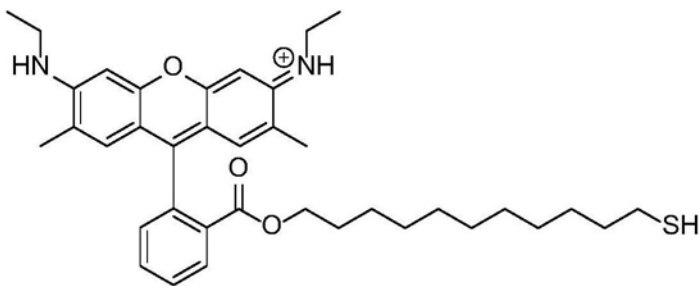


式 VIII

[0091]



式 IX



式 X

[0092] (2) 将2 $\mu$ L混合后的分散液滴加在芯片上,晾干。

[0093] (3) 将芯片放置在质谱入口前的样品轨道上,检测芯片表面三种质谱信号分子的解离情况,质谱检测参数设定与实施例1(4)中相同。得到的质谱图(图7)中,三种质谱信号分子能够清晰分辨,其中,式VIII的质谱信号为 $m/z=443.2$ 、式IX的质谱信号为 $m/z=387.2$ 、式X的质谱信号为 $m/z=415.2$ ,三种信号相互之间无信号干扰,满足多蛋白标志物同时检测的需求。

## SEQUENCE LISTING

<110> 北京大学

<120> 一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及应用

<130> WX2018-03-176

<160> 3

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 17

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 1

gtggttggtg tggttgg 17

<210> 2

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 2

gtagccgtgg tagggcaggt tggggtgact 30

<210> 3

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<400> 3

accaccacca cgacgcacga gtaccccgcg 30

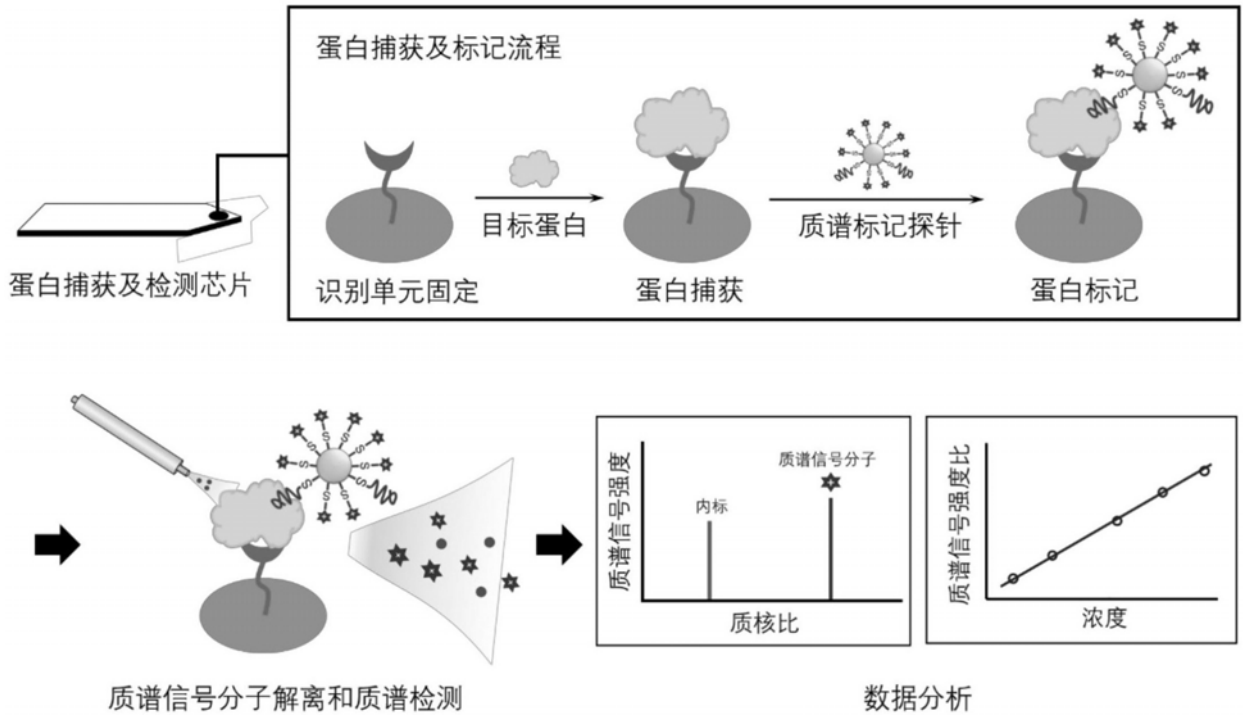


图1

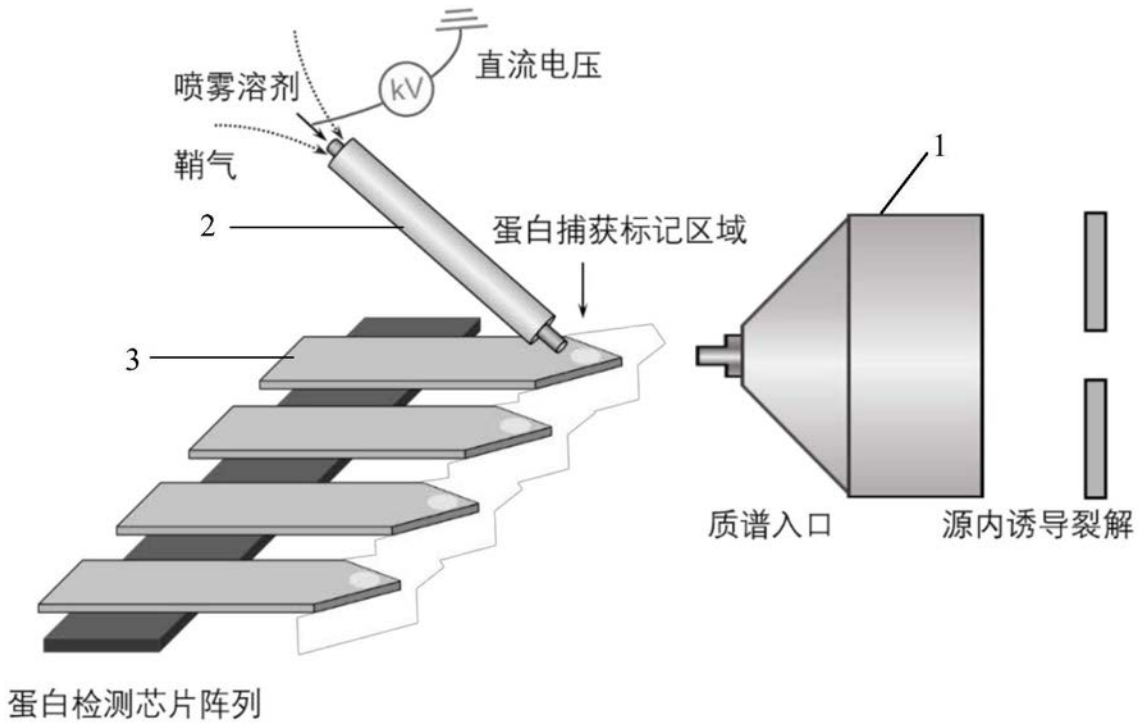


图2

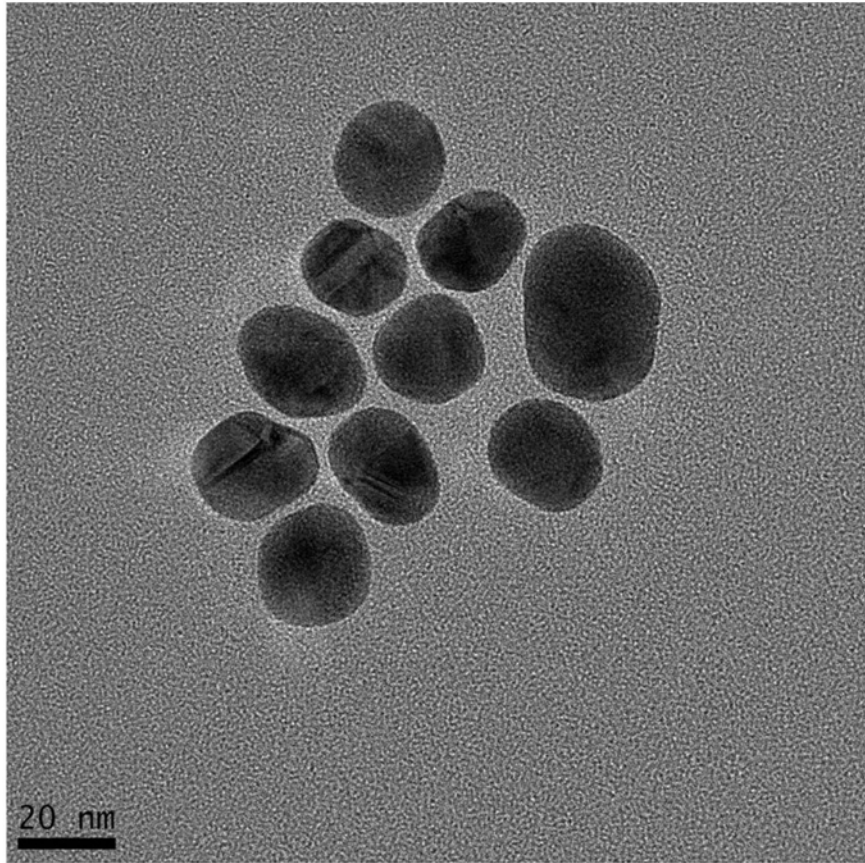


图3

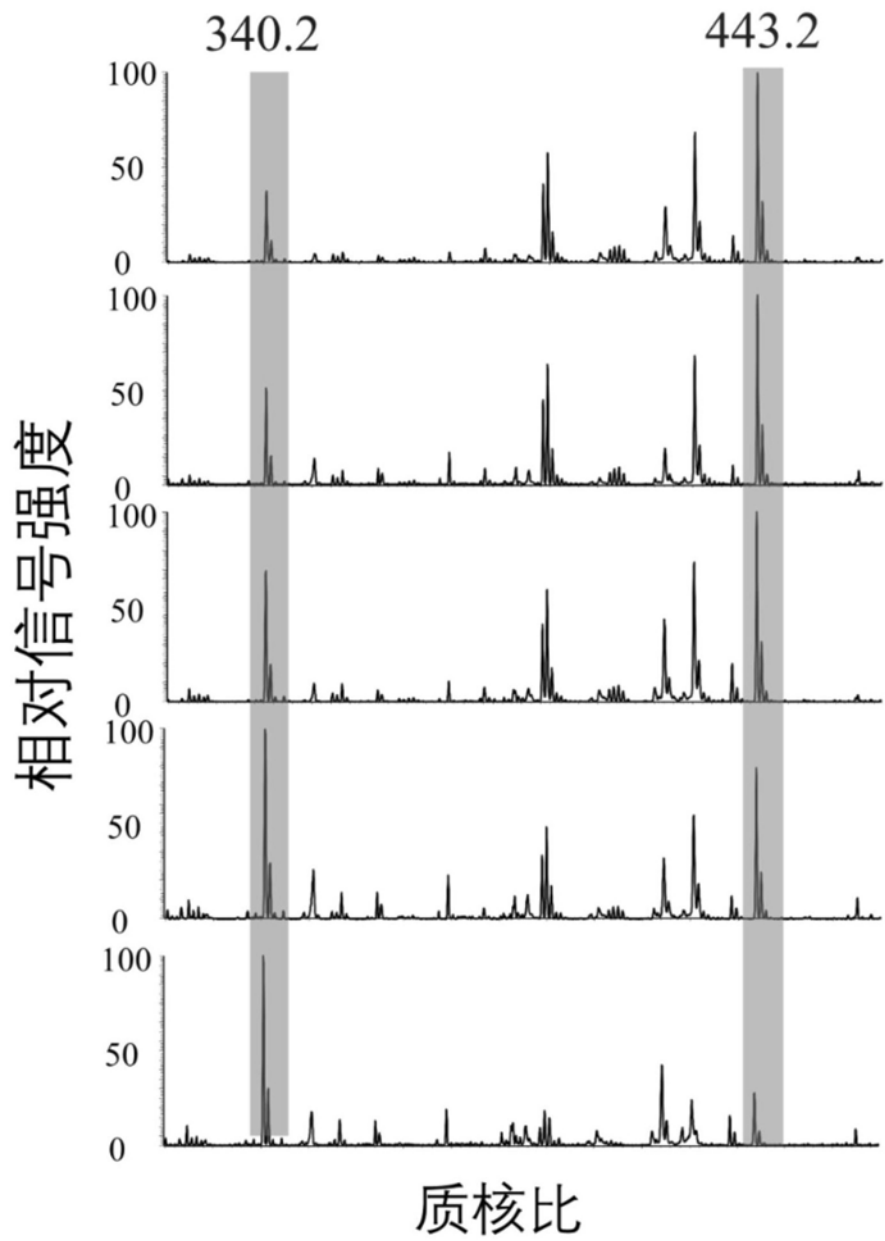


图4

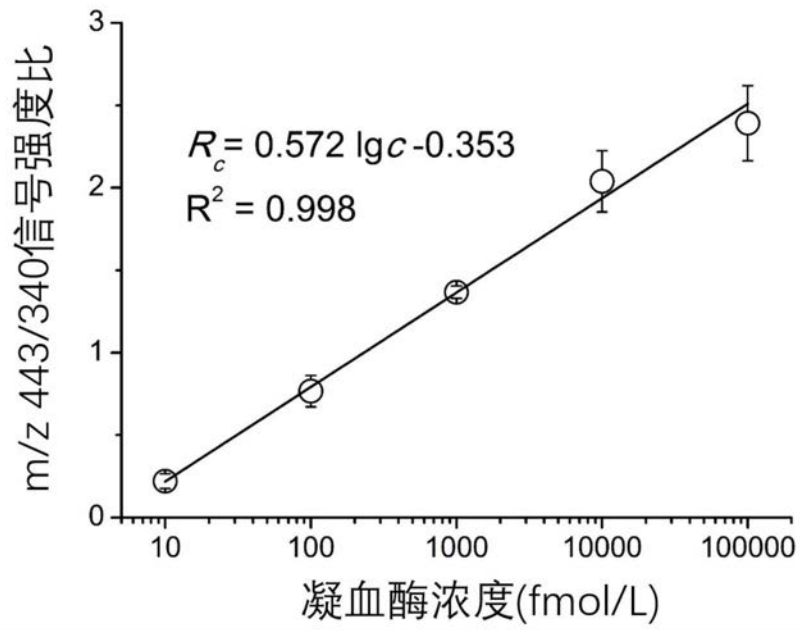


图5

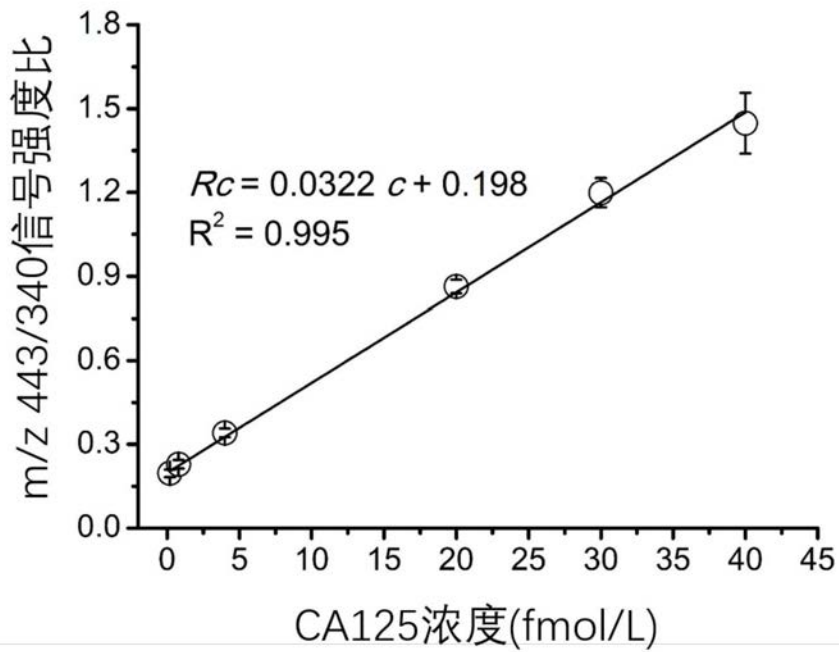


图6

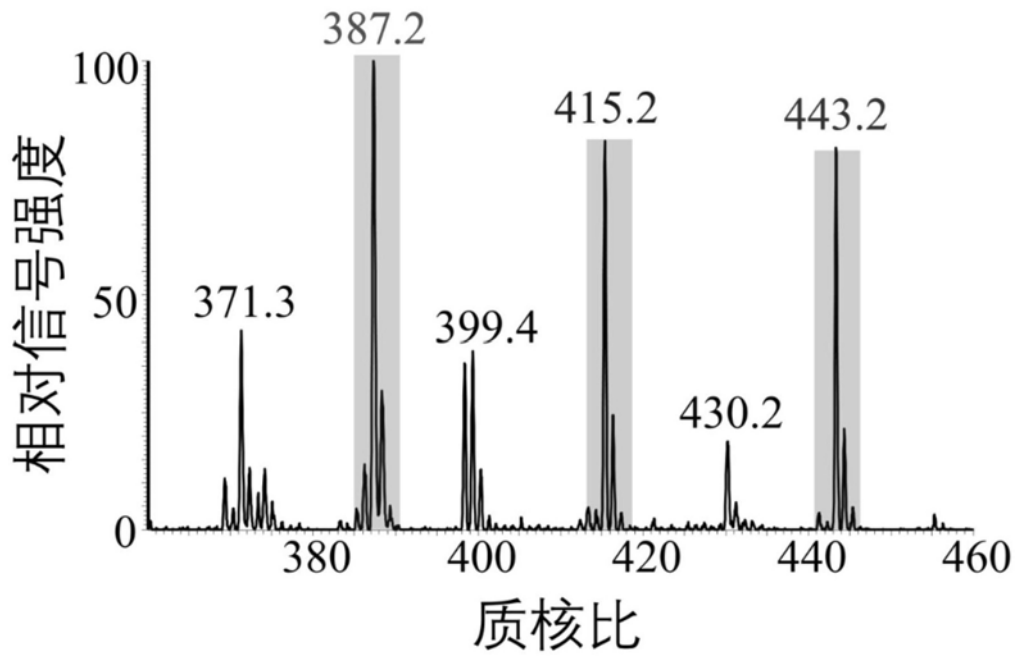


图7

专利名称(译)	一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN111239402A</a>	公开(公告)日	2020-06-05
申请号	CN201811441432.0	申请日	2018-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	北京大学		
申请(专利权)人(译)	北京大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京大学		
[标]发明人	白玉 刘虎威		
发明人	白玉 徐姝婷 刘虎威		
IPC分类号	G01N33/68 G01N27/62 G01N33/536		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种可用于疾病标志物检测的质谱免疫分析方法及其应用，包括：目标蛋白在芯片表面的捕获，质谱标记探针针对目标蛋白的标记，芯片电喷雾离子化质谱检测标记在目标蛋白上的质谱信号分子，蛋白浓度的定量计算。该方法普适性强，可拓展性强，装置简单，灵敏度高。其中，芯片以阵列形式参与质谱离子化过程，实现快速高效、高通量、低成本的样品分析。质谱标记探针通过适配体的特异性识别作用将大量质谱标记分子标记在目标蛋白上，实现目标蛋白信号的多步放大，达到高灵敏检测。多种质谱标记分子能够实现多目标蛋白的同时检测，进一步提高分析通量和分析效率。本方法在临床早期诊断、肿瘤标志物筛选和预后治疗等领域都具有广阔的应用前景。

