



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102460176 B

(45) 授权公告日 2014. 09. 24

(21) 申请号 201080028735. 5
 (22) 申请日 2010. 05. 20
 (30) 优先权数据
 61/180, 310 2009. 05. 21 US
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2011. 12. 21
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/CN2010/072991 2010. 05. 20
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02010/133173 EN 2010. 11. 25
 (73) 专利权人 李荣秀
 地址 200240 中国上海市东川路 865 弄
 44-102 室
 (72) 发明人 李荣秀
 (74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
 司 31100
 代理人 张睿
 (51) Int. Cl.
 G01N 33/68 (2006. 01)
 G01N 33/531 (2006. 01)
 G01N 33/543 (2006. 01)
 (56) 对比文件
 CN 101363838 A, 2009. 02. 11,
 CN 101382552 A, 2009. 03. 11,

WO 2005036180 A1, 2005. 04. 21,
 EP 2054724 A2, 2009. 05. 06,
 Douglas Hinerfeld 等. Serum/Plasma
 Depletion with Chicken Immunoglobulin Y
 Antibodies for Proteomic Analysis from
 Multiple Mammalian Species. 《Journal of
 Biomolecular Techniques》. 2004, 第 15 卷 (第
 3 期),
 Rembert Pieper 等. Multi-component
 immunoaffinity subtraction
 chromatography: An innovative step towards
 a comprehensive survey of the human plasma
 proteome. 《Proteomics》. 2003, (第 3 期),
 Lei Huang 等. Immunoaffinity separation
 of plasma proteins by IgY microbeads:
 Meeting the needs of proteomic
 sample preparation and analysis.
 《proteomics》. 2005, 第 5 卷 (第 13 期),

审查员 黄晓丽

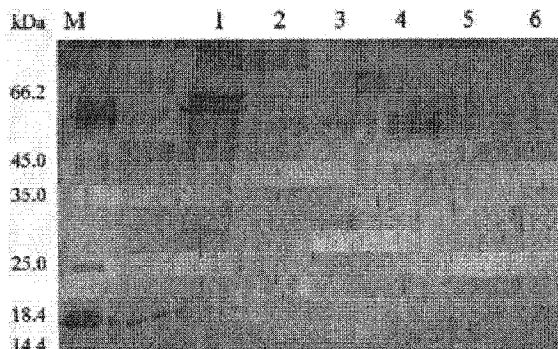
权利要求书1页 说明书26页 附图2页

(54) 发明名称
 差异多肽检测方法及其应用

(57) 摘要

本发明提供了一种使用一亲和介质从待测样
 品中去除与对照样品中相似的蛋白 / 多肽而富集
 和检测在对照样品和待测样品之间有差异的蛋白
 / 多肽的方法。通过该方法检测得到的差异蛋白 /
 多肽在发现生物标志物和药物靶标, 评估健康风
 险, 及个性化用药和治疗方面提供了重要的信息。

CN 102460176 B



1. 一种发现待测样品和对照样品间差异蛋白 / 多肽的方法,所述的方法包括步骤:
 - (a) 从生物对照样品中提取多种可溶性蛋白或多肽,免疫动物制备具有抗原结合能力的蛋白;所述具有抗原结合能力的蛋白是能够结合从生物对照样品中提取的可溶性蛋白 / 多肽的免疫球蛋白;
 - (b) 将具有抗原结合能力的蛋白固定到基质上,制成亲和介质;
 - (c) 从待测生物样品中提取可溶性蛋白或多肽;
 - (d) 将从待测生物样品提取的可溶性蛋白流过装有亲和介质的层析柱,收集流穿样品,浓缩富集差异蛋白或多肽;和
 - (e) 用质谱方法鉴定差异蛋白或多肽。
2. 如权利要求 1 所述的方法,所述结合抗原的蛋白是抗体或抗体片段,或者其组合。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述待测生物样品来自于病人组,所述病人患上了关节炎,自身免疫疾病,细菌感染,血液病,癌症,心血管病,糖尿病,遗传病,炎症,精神病,代谢病,神经系统疾病,呼吸道疾病和病毒感染。
4. 如权利要求 1 所述的方法,所述待测生物样品来自于选自下组的体液,包括:腹水,血液,血浆,血清,乳糜,精液,细胞间液,淋巴液,月经,乳汁,汗液,眼泪,尿液,阴道润滑性分泌物,考珀液或射精前的分泌物,前列腺液,胸膜液,脓,唾液,皮脂,食糜以及呕吐物。
5. 如权利要求 1 所述的方法,所述待测生物样品来自于小鼠,大鼠,猪,豚鼠,兔子,马,牛,狗,猫,猴子以及人。
6. 如权利要求 1 或 2 所述的方法,所述方法用于发现药物靶标,以及从血浆,病理组织中发现疾病的生物标志物。

差异多肽检测方法及其应用

[0001] 相关申请

[0002] 这个申请要求 2009 年 5 月 21 日申请的美国临时专利题目为“差异多肽检测方法及应用”(PROCESS FOR DIFFERENTIAL POLYPEPTIDES DETECTION AND USES THEREOF), 申请号 61/180, 310 的优先权。本发明自始至终引用的所有专利、专利申请和相关文献组成完整的参考文献。

发明领域

[0003] 本发明提供了一种分析待测样品和对照样品之间差异多肽的方法和试剂, 以及这些差异蛋白在个体化用药、诊断及药物研究开发方面的应用。

[0004] 发明背景

[0005] 基因组包含的“遗传蓝图”决定了每种生物的基因型以及对疾病的易感性或抵抗力。然而, 很多常见慢性疾病的发作并不遵守孟德尔遗传规律而难以预测。这些疾病常常是由于还未确定的多基因与多种环境因子相互作用引起的。这些疾病包括冠状动脉心脏病、高血压、糖尿病、肥胖, 各种癌症, 阿尔茨海默病, 帕金森病等。即使两个生物个体基因组相同, 在发育和疾病发生的不同阶段、在不同器官和组织中也能够发育成为功能不同的细胞。对于人类来说, 运动、饮食、社会交往、心理学和环境因子(例如: 毒素)都对形成每个人独一无二的蛋白质谱都具有重要作用, 这些独特的蛋白谱起因于多个基因和环境的相互作用。即使是同一个人, 一个基因的表达在不同组织、器官或细胞中, 以及在不同时间和环境控制下也可能有所不同。

[0006] 因此, 认为个体的疾病发生和药物治疗效果完全取决于遗传因素是不符合实际的。个体化药物治疗除了检测基因、基因表达和代谢产物外, 还必须检测蛋白质的变化。检测结果与药物反应、疾病状态、疾病预防或者疾病治疗, 诊断相关, 有助于医生针对每个患者进行个体化精确治疗。蛋白质的动态性质可以反映出个体实时的生理状态, 有助于为患者恰当的时间选择合适的治疗手段(恰当的药物和合适的剂量)要求更确切的诊断或预防疾病、判断疾病状态、评估风险后果, 以及建立个性化治疗策略。

[0007] 癌症依然是全世界的致死率最高的疾病。癌症诊断过去一直基于癌症发病的身体器官或组织进行分类。然而, 构成恶性肿瘤的细胞明显是不均一的, 如已经发现白血病有~38 种和淋巴瘤有~51 种类型, 仅用基因组信息差异难于解释其差异。尽管诊断技术、治疗手术和治疗方法都在进步, 癌症患者长期生存率依然不容乐观, 因为大部分的癌症发现时已经处于发展晚期, 有些还存在远组织转移, 这些因素都使治疗效果大打折扣。通过细胞表面和(或)细胞内关键蛋白质谱对患者进行诊断和分类提供的新信息能够反映癌细胞扩散速度、治疗方法的效果, 进行尽可能早诊断的可能性, 就可以在临床症状远未表现出来前进行干预和治疗。早期诊断和分类有助于了解临诊前期分子水平的变化和发现处于潜在风险中患者, 避免过去采取的试错治疗策略, 使医生能够一开始就选用副作用最小、疗效最好的药物。还可以研发临床诊断新方法, 而现有检测都是针对具有统计学意义的生物标志物, 无法检测具有未知风险的蛋白质信号。

[0008] 关键蛋白谱的检测和鉴定对加速人们理解疾病的生物过程是至关重要的,对疾病发生过程的理解又促进发现药物新靶点和疾病诊断新标志物。因此,表型或疾病相关的蛋白谱的鉴定在生物学和药学领域亦加重要。

[0009] 目前蛋白功能或疾病相关蛋白谱的检测策略是比较对照样品的蛋白谱。蛋白组分析核心技术有一/二维凝胶电泳和一/多维液相色谱,几乎都与质谱联用。然后比对不同样品蛋白谱间的差异。不同荧光染料如 Cy2, Cy3, or Cy5 标记样品的两维电泳共分析策略比并行分析/依次分析策略具有更高的重复性。

[0010] 一项重要改进是两维色谱分离样品后用同位素标记蛋白,通过质谱图比较分析差异。这种方法包括重同位素(例如 ^{15}N , ^{13}C , 和 ^{18}O) 掺入和同位素标记试剂,在专利 W001/94935 ;W003/102220 ;US20050069961 ;US20050100956 ;US2002/0168644 ;美国专利 6,670,194 ;W003/102018 和 W000/11208 中都有描述。美国专利 US20050074794 描述了另一套标记多种样品的试剂、筛选和富集标记分子、分析及进行可靠比较的标准操作。

[0011] 另一个重要的改进是应用有限数目的免疫亲和方法去除多达 20 多种高丰度的血清蛋白,明显改善了低丰度蛋白的检测 (Yocum AK et al., J. Proteome Res. 2005, 4 : 1722-1731 ;Schuchard MD et al., Origins 2005, 21 :17-23.)。然而,分析鉴定一个样品的完整蛋白表达谱的工作量仍然很大。通过基因拼接和翻译后修饰,人基因组中的约 35,000 基因能够表达出的蛋白种类可达 100,000-500,000 种,估计一个特定样品的蛋白组复杂性可达 30,000-50,000 种蛋白。环境、营养、发育环境都直接影响蛋白的动态表达,因此不同个体间或个体在不同环境下导致更高层次的分子复杂性和多样性。细胞、组织、血清等样品中存在的蛋白数目成千上万。当前技术缺乏可靠地、可重复地检测足够多种类蛋白质需要的分辨率。

[0012] 因此,需要一种更有效的方法来筛选、发现和鉴定样品间的差异蛋白。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供了一种检测待测样品和对照样品间差异多肽的方法和试剂,以及这些差异蛋白在个体化用药、诊断及药物研究开发方面的应用。一方面,本发明提供了提高待测样品中至少一种蛋白或多肽浓度的方法,这种蛋白和多肽在待测样品和对照样品中存在差异,包括:

[0015] (a) 从生物对照样品中提取一种或多种可溶性蛋白或多肽,制备具有抗原结合能力的免疫球蛋白能够结合生物对照样品中至少一种多肽;

[0016] (b) 将免疫球蛋白固定到基质上,制成亲和介质;

[0017] (c) 从生物待测样品中提取可溶性蛋白或多肽;和

[0018] (d) 将从生物待测样品中提取的可溶性蛋白与亲和介质接触,收集未结合的样品,浓缩样品中富集的差异蛋白或多肽。

[0019] 一方面,本发明提供了一种提高待测样品中至少一种多肽浓度的方法,这种多肽在生物对照样品和实验样品间存在差异,包括:

[0020] (a) 从生物对照样品中提取一种或多种可溶性蛋白或多肽,制备具有抗原结合能力的免疫球蛋白,能够结合生物对照样品中至少一种多肽;

[0021] (b) 将免疫球蛋白固定到基质上,制成亲和介质;

[0022] (c) 从生物待测样品中提取可溶性蛋白或多肽;

[0023] (d) 将从生物待测样品中提取的可溶性蛋白流过装有亲和介质的层析柱,收集流穿样品,浓缩其中富集的差异蛋白或多肽。

[0024] 在一个优选的实例中,工艺还包括:

[0025] (e) 鉴定从待测生物样品中富集的多肽。在另一个优选实例中,富集的多肽利用质谱方法进行鉴定。

[0026] 另一方面,本发明提供了一种发现待测样品和对照样品间差异蛋白/多肽的方法,包括:

[0027] (a) 从生物对照样品中提取一种或多种可溶性蛋白或多肽,免疫动物制备具有抗原结合能力的蛋白能够结合可溶性蛋白/多肽结合能力;

[0028] (b) 将具有抗原结合能力的蛋白固定到基质上,制成亲和介质;

[0029] (c) 从待测生物样品中提取可溶性蛋白或多肽;

[0030] (d) 将从待测生物样品提取的可溶性蛋白流过装有亲和介质的层析柱,收集流穿样品,浓缩富集差异蛋白或多肽;和

[0031] (e) 用质谱方法鉴定差异蛋白或多肽。

[0032] 另一方面,本发明提供了一种发现待测样品和对照样品间差异蛋白/多肽的方法,包括:

[0033] (a) 从生物对照样品中提取一种或多种可溶性蛋白或多肽,免疫动物制备具有抗原结合能力的蛋白能够结合可溶性蛋白/多肽的蛋白;

[0034] (b) 将免疫球蛋白固定到基质上,制成亲和介质;

[0035] (c) 从生物待测样品中提取可溶性蛋白或多肽;

[0036] (d) 将从生物待测样品中提取的可溶性蛋白与亲和介质混合,分离收集上清液,浓缩、富集其中所含的差异蛋白或多肽;和

[0037] (e) 用质谱方法鉴定差异蛋白或多肽。

[0038] 在一个实施例中,抗原结合蛋白是抗体或者是抗体片段,或者二者混合物。在另外一个实例中,含差异蛋白的上清液是通过离心收集。在另一个实例中,含差异蛋白的上清液是在磁场中与固体亲和介质分离。在另外一个实例中,含差异蛋白的上清液是真空抽滤与固体亲和介质分离。还有一个实例中,含差异蛋白的上清液是利用压力使液体流过固体亲和介质实现分离。

[0039] 另外一个方面,该发明提供了一种从患者样品中发现至少一种多肽作为相应疾病标志的方法,该多肽在患者样品与健康人对照样品中存在差异,本项发明包括:

[0040] (a) 从生物对照样品中提取可溶性多肽;

[0041] (b) 制备具有抗原结合能力的多肽,能够结合上述提取的可溶性多肽;

[0042] (c) 将上述具抗原结合能力的多肽固定在一个基础介质上,制备一种亲和介质;

[0043] (d) 从生物待测样品中提取可溶性多肽;

[0044] (e) 使提取的可溶性多肽流过装有亲和介质的层析柱,收集流穿样品,从而使疾病标志物的多肽相对于待测样品中总蛋白的百分比得到提高;

[0045] (f) 可选择对流穿样品中多肽进行浓缩;和

[0046] (g) 鉴定疾病标志物多肽。

[0047] 一个较佳实施例中,用该方法发现的疾病标志可进一步用于诊断或者治疗目的。

[0048] 在一较佳实施例中,所述方法中两个样品都来源于人体。

[0049] 在另一较佳实施例中,所述方法中样品都来源于患者人体,所患疾病选自下组的一种或多种疾病:关节炎、自身免疫性疾病、细菌感染,血液病变、癌症、心血管病、糖尿病、遗传性疾病、炎症、精神性疾病、代谢紊乱、神经紊乱、呼吸道疾病和病毒感染。在另一些较佳实施例中,患者所患疾病包括肾上腺癌,胆管癌、肝外胆管癌,膀胱癌,骨癌,脑癌,乳腺癌,宫颈癌、结肠癌、直肠癌,食道癌、胆囊癌,胃癌、头和脖子癌症、霍奇金症、淋巴瘤、肠道癌、肾癌、喉癌,白血病,急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞白血病、慢性淋巴细胞性白血病、肝癌,肺癌,还有小细胞,非小细胞淋巴瘤、B 细胞淋巴瘤、黑素瘤、间皮瘤、多发性骨癌、口腔癌、卵巢癌、胰腺癌、咽部癌症、前列腺癌、直肠癌、皮肤癌,胃癌,睾丸癌、鼻咽癌、甲状腺癌、子宫癌、阴道癌、外阴癌症。在另一些较佳实施例中,患者所患疾病包括神经系统紊乱指阿尔茨海默病,帕金森病,痴呆,癫痫、头痛疾病、多发性硬化、神经系统感染、中风和脑创伤。

[0050] 在另一较佳实施例中,用于所述方法中的生物样品是体液,包括腹水、血液、血浆、血清、乳糜、精液、间质液、淋巴液、月经,母乳,汗液、眼泪、尿液、阴道润滑液,库柏液或射精前流出的液体,女性液体,粘液,胸膜液,脓,唾液,油脂(皮肤油),食糜,和呕吐物。

[0051] 在另一较佳实施例中,用于所述方法中的生物样品是患者的身体组织,取自于主动脉、动脉、膀胱、骨、乳房、子宫颈、结肠、食道、肾、肝、肺、胰脏、胎盘、皮肤、小肠、脊髓、脾脏、胃、甲状腺、扁桃体或子宫。

[0052] 在另一些较佳实施例中,用于所述方法的生物样品取自于小鼠、大鼠、猪、豚鼠、兔子、马、牛、狗、猫、猴子或者人类。

[0053] 在另一些较佳实施例中,该方法用于从血浆中筛选疾病生物标记物。

[0054] 在另一些较佳实施例中,该方法用于从病理组织中筛选疾病生物标记物。

[0055] 在一些较佳实施例中,该方法用来评估个体健康风险。

[0056] 在另一些较佳实施例中,该方法用来发现药物作用靶位。

[0057] 在另一些较佳实施例中,该方法用于监测疾病治疗的效果。

[0058] 在另一些较佳实施例中,该方法用于疾病的个性化治疗。

[0059] 在另一些较佳实施例中,该方法用来确定治疗方法。

[0060] 在一个较佳实施例中,从该方法发现假定蛋白 DKFZp686001196 是来自肝癌患者的疾病标志。

[0061] 在另一较佳实施例中,从该方法发现血红素结合蛋白、甲状腺素运载蛋白或者触珠蛋白相关蛋白的异构体 I 是来自近视眼患者的疾病标志。

[0062] 另一方面,本发明提供了一种利用假定蛋白 DKFZp686001196 作为肝癌患者血浆诊断的标志物。

[0063] 在另一方面,这个发明提供了将来自血红素结合蛋白、甲状腺素、或结合球蛋白相关蛋白异构体 1 的一种或多种组合作为近视患者血浆中的诊断标志物。

[0064] 在其他方面,本发明提供的亲和介质由可结合抗原的多肽和基础层析介质。在一个优选例中,抗原结合蛋白可以是抗体或者是抗体片段,或两者混合物。在另一优选实施例中,可结合抗原的多肽是用对照样品提取的全蛋白免疫脊椎动物制备。在一较佳实施中,脊椎动物可以是鸟类或者哺乳动物。在一个优选实施例中,用于免疫制备抗体的鸟类选自鸽

子、鸡、母鸡、鹅、鸭、公鸡、火鸡、鸵鸟、美洲小鸵、企鹅、鸕鹚、鲸头鹳、秃鹫、火烈鸟、天鹅、秃鹰、鹰、鸢、秃鹫、短尾鹫、茶隼、灰背隼、鹤、鸱、鸢、猫头鹰、犀鸟和巨嘴鸟。在另一实施例中,用于免疫制备抗体的哺乳动物选自狗、猫、公牛、牛犊、驴、马、羔羊、绵羊、山羊、小雄马、公猪和母猪、砂鼠、牛、母牛、公牛、牦牛、骡子、水牛、骆驼、美洲驼、羊驼、豚鼠、仓鼠、兔子、雪貂、金花鼠、松鼠、囊地鼠、土拨鼠、小鼠、大鼠、鼯鼠、豪猪、海狸、袋鼠、沙袋鼠、树袋熊、冬眠鼠、野兔、刺猬、夜猴、长臂猿、穿山甲、海豚、狐狸、狼、熊、熊猫、猎豹、猞猁、美洲虎、狮子、豹、老虎、海豹、海象、象、斑马、獬、犀牛、野猪、河马、骆马、鹿、曲角羚羊、羚羊、大羚羊、摩弗伦羊、瞪羚、印度野牛、喜马拉雅斑羚、驴羚、羚牛、羚羊、狐猴、猴子、白眉猴、狒狒、大猩猩、卷尾猴、婴猴、恒河猴、黑猩猩以及人类。

[0065] 在另一个优选实施例中,免疫动物的全蛋白提取自动物体液包括腹水、血液、血浆、血清、乳糜、精液、组织间液、淋巴液、月经、乳汁、汗水、泪水、尿液、阴道润滑液、库柏液或前射精液、女性射出液、黏液、胸水、脓、唾液、皮脂、食糜、和呕吐物。

[0066] 在另外一个实施例中,免疫动物的全蛋白提取自动物体组织,包括主动脉、动脉、膀胱、骨头、乳房、子宫颈、结肠、食道、肾脏、肝脏、肺、胰腺、胎盘、皮肤、小肠、脊髓、脾、胃、甲状腺、扁桃体、和子宫。

[0067] 在一个实施例中,免疫动物的全蛋白提取于培养的细胞,细胞源于动物体组织包括主动脉、动脉、膀胱、骨头、乳房、子宫颈、结肠、食道、肾脏、肝脏、肺、胰腺、胎盘、皮肤、小肠、脊髓、脾、胃、甲状腺、扁桃体和子宫。

[0068] 在另一实施例中,支持介质是一种颗粒状或非微颗粒状,可溶性的或不溶性的,多孔状或无孔的化合物或材料。

[0069] 在另一实施例中,支持介质包括琼脂糖、纤维素、羟乙基甲基丙烯酸酯,聚丙烯酰胺,二乙烯基苯交联的聚苯乙烯、hyper D, toyopearl 填料,以及玻璃、硅、金属氧化物、全氟化碳、膨胀床介质、磁化介质珠、磁性胶体、滤器、滤纸、滤布,或者是毛细管管壁,及其数种的组合,并选择性地带有有机聚合物涂层。

[0070] 在另一些实施例中,抗原结合多肽固定到支持介质上的化学反应包括胺基反应化学、巯基反应化学、羰基化学、羟基反应化学、活性氢反应化学、或者光活性反应化学。在一优选实施例中,巯基反应化学包括用溴化氰、羰基二咪唑、二乙烯基砷、吡内酯、三氯三氮嗪、2-氟-1-甲基吡啶(盐)对甲苯磺酸酯、对甲苯磺酰氯、三氟乙基磺酰氯、碘乙酸、溴乙酸、马来酰亚胺、吡啶基二硫化物、环氧基、双环氧烷、或者5-硫代-2-硝基苯甲酸作为活化偶联试剂。在另一优选实施例中,羰基化学利用酰肼或者还原胺化反应。在另一优选的实施例中,羟基反应化学利用溴化氰、三氯三氮嗪、环氧基或双环氧烷。在另一个优选实施例中,活性氢反应化学利用重氮化合物或曼尼希缩合反应。在另一个实施例中,光活性反应化学利用对重氮苯基乙二醛、重氮苯甲酰肼、磺基琥珀酰-6-(4'-重氮-2'-硝基苯胺)己酸、或N-[4-(对叠氮水杨酰胺基)丁基]-3'-(2'-二硫代吡啶)丙酰胺。在另一方面,本发明提供了一种能够用于本发明方法的亲和介质。因此,在一实施例中,本发明提供了一种亲和介质,包含基础介质和结合对照样品中至少一个多肽的抗原结合免疫球蛋白,其中免疫球蛋白是用对照样品提取的一种或多种可溶性蛋白质或多肽制备,因此亲和介质可用于获得和富集待测样品中至少一种蛋白质或多肽,这些蛋白质或多肽在待测样品和对照样品之间存在差异。

附图说明

[0071] 图 1 描述了健康志愿者个体血浆中差异多肽的 SDS-PAGE 分析。从左至右各泳道分别是：蛋白分子量标准,原始样品,差异部分样品和去除部分样品。

[0072] 图 2 描述了肝癌患者血浆中差异多肽的 SDS-PAGE 分析。泳道从左至右是：泳道 M：蛋白分子量标准；泳道 1：健康志愿者的差异部分；泳道 2～6：肝癌患者的差异部分。

[0073] 图 3 描述了深度近视患者血浆中差异多肽的 SDS-PAGE 分析。泳道从左至右分别是：泳道 1～9：深度近视患者的差异部分。

[0074] 图 4 描述了健康孕妇志愿者血浆中差异多肽的 SDS-PAGE 分析。泳道从左至右是：泳道 M：蛋白分子量标准；泳道 1：健康志愿者差异部分。泳道 2～6：健康孕妇志愿者的差异部分。

[0075] 发明详述

[0076] 对正常及异常个体样品之间的差异蛋白质进行分离及鉴定有着十分重要的意义,尤其是在鉴定疾病生物标志物及药物靶标方面。这些差异蛋白的信息可以帮助从生化水平诊断疾病,临床分析各种药物的治疗效果及辨别不同患者对相同治疗手段反应的差异。对个体化医疗而言,检测与药物反应及疾病状态相关的差异蛋白,将有助于实施个性化的疾病预防或治疗。因此,制药及卫生保健机构均十分关注蛋白差异和/或差异蛋白的检测鉴定方法。

[0077] 由于异常的生理和/或病理状态通常是从正常/健康的生理状态发展而来的,因此两种状态下绝大多数蛋白都是一样的,蛋白差异和/或差异蛋白在两种样品中一般都极少,且相同蛋白的种类多、丰度高。这些丰度高种类多的蛋白,多为具有正常生理功能的蛋白(持家蛋白)是检测及鉴定蛋白/多肽差异和/或差异蛋白/多肽的巨大障碍。传统分析方法是使用一维或二维凝胶电泳,一维或多维液相色谱,与质谱联用分别测定鉴定目标样品和对照样品中的所有蛋白,然后进行蛋白谱比较分辨差异。但这些方法在多方面都存在局限性,如分辨率不够,蛋白数量分析通量及对丰度高低不同蛋白检测灵敏度范围不同,且数量巨大的持家蛋白所产生的高背景噪音会掩盖低丰度蛋白信息。

[0078] 最有效的改进方法是使用针对血浆高丰度蛋白特异抗体去除对应的蛋白(如 6 个, 20, 或 60 个血浆高丰度蛋白),从而检测血清低丰度蛋白。这种方法克服了某些高丰度蛋白对低丰度蛋白的掩盖效应,但是对照样品及待测样品间共有的众多种类的持家蛋白造成的复杂性并没有明显降低。

[0079] 本发明检测差异蛋白的方法依赖于设计一种能结合对照样品中所有蛋白的亲介质。该介质能与对照样品中存在的所有蛋白发生特异性亲和作用。当待测样品与这种固相亲和介质混合后,待测样品中存在的与对照样品中相同蛋白会结合到亲和介质上被去除分离,仅留下对照样品中不存在的蛋白。残留在待测样品中的蛋白都是差异蛋白,能很容易地通过质谱或者其它蛋白分析及工具检测鉴定。该方法消除了试样中存在对照样品也同样存在的蛋白产生的高背景噪音的掩盖效应,降低了蛋白分析及鉴定如质谱分析的工作量,这些优点使其成为一种理想的差异多肽检测及鉴定技术。反过来用,该方法也可用于鉴定只存在于对照样品而不存在于待测样品中的多肽。

[0080] 为了便于理解本发明,需要先定义一些术语。其它术语在发明详细介绍部分解释。

[0081] 术语“样品”包括“生物样品”，“病理样品”，“蛋白样品”，“存在于样品中的蛋白”，及“样品中的蛋白”，也包括蛋白裂解物，蛋白提取物，腹水，血液，血浆，血清，尿液，淋巴液，细胞间液，羊水，房水，耳垢，科伯氏腺液，食糜，母乳，粪便，粘液（鼻涕及痰），胸膜液，脓，口水，皮脂，精液，汗液，眼泪，阴道分泌物，呕吐物，任何生物学样品或者任何含蛋白质的样品。

[0082] 术语“对照样品”指发生变化前的生物学或生理状态下的样品。在本发明一个实施例中，对照样品指健康个体的血浆。

[0083] 术语“待测样品”指相对于一个生物学或生理学起点发生变化、病理发展及 / 或疾病状态下的样品。通常，“待测样品”与某个特定的生物功能、某种生理状态及 / 或某种疾病相关。在本发明一优选实施例中，待测样品指肝癌患者、深度近视患者、或孕妇血浆。在本发明另一优选实施例中，待测样品包括癌症患者的组织样品，或者癌症患者手术切下的组织及病理样品。在本发明另一优选实施例中，待测样品是心血管手术切下的组织及病理样品。

[0084] 在本发明一优选实施例中，样品中蛋白或者多肽是去除血细胞的血浆蛋白或者多肽。

[0085] 术语“蛋白”及“多肽”指由 2 个或者多个天然氨基酸或非天然氨基酸形成的聚合物。

[0086] 术语“低丰度蛋白”指待测样品中浓度很低的蛋白，如低丰度蛋白浓度低于样品中总蛋白浓度 50% 的蛋白，也可能低于总蛋白浓度的 40%，30%，25%，20%，15%，10%，5%，1%，0.1%，0.01%，0.001%，0.0001%，0.00001%，0.000001%，或 0.0000001%。

[0087] 作为对照，术语“高丰度蛋白”包括高浓度蛋白，蛋白浓度高于样品中总蛋白浓度的 50%，40%，30%，25%，20%，15%，10%，5%，1%，0.1%，0.01%，0.001%，0.0001%，0.00001%，0.000001%，或 0.0000001%。

[0088] 术语“基质”包括术语“支持基质”。在一实施例中，基质是固相支持介质。在一优选实施例中，基质也指活化的琼脂糖。

[0089] 将配体交联到支持介质上的活化试剂有很多（如琼脂糖），本领域的熟练人员熟知这些活化试剂和操作步骤。在一优选实施例中，基质是 CNBr 活化的琼脂糖珠。

[0090] 术语“亲和介质”指交联有抗体的基质，这些抗体能与样品溶液中的蛋白 / 多肽结合。

[0091] 术语“抗体”指抗体完整分子和任何抗原结合片段（如“抗原结合部分”，“抗原结合多肽”，或者“免疫结合物”）或者单链抗体。“抗体”是一种由至少两条重链（H）及两条轻链（L）构成的糖蛋白，链间通过二硫键相交联，或是抗原结合部分。每条重链由一个重链可变区（简写成 VH）及重链保守区组成。重链保守区由三个结构域组成，CH1，CH2，及 CH3。每条轻链由一个轻链可变区（简写成 LH）及一个轻链保守区组成。轻链保守区由一个结构域组成，CL。VH 和 VL 区域能被进一步划分为超变区域，称为互补决定区（CDR），中间夹杂着更加保守的区域，称为框架区（FR）。每个 VH 和 LH 由 3 个 CDRs 和 4 个 FRs 组成，它们从氨基末端到羧基末端的排列顺序为：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区含有一个与抗原结合的结构域。抗体的保守区可能介导免疫球蛋白结合到宿主组织或者因子上，包括免疫系统中的各种细胞（如，效应淋巴细胞）及补体系统中的第一个组分

(CIq)。

[0092] 术语“抗体片段”包括 scFv 抗体, F(ab')₂ 片段, Fab 片段, Fd 片段, Fv 片段, 及单结构域抗体片段 (DAbs)。

[0093] 术语“蛋白差减”指利用交联有抗体的亲和介质, 这些抗体是抗对照样品中蛋白质, 因而能结合对照样品中存在的蛋白, 去除待测样品存在的相同蛋白 / 多肽, 仅留下“差异蛋白” / “不同蛋白” / “有差异的蛋白”。

[0094] 术语“差异蛋白”包括“不同的蛋白”, “有差异的蛋白”, 都是指存在于一种样品 (待测样品), 而不存在于另一种样品 (对照样品) 的蛋白。

[0095] 术语“受试者”是一个为本领域技术人员熟知的术语, 在本发明中指温血动物, 优选指哺乳动物, 包括除人之外的大鼠, 小鼠, 兔子, 猫, 狗, 羊, 马, 牛。在本发明一优选实施例中指人。总之, 受试者指适用于本发明结合可溶性抗原多肽检验的生物体。

[0096] 术语“疾病”是一个为本领域技术人员熟知的术语, 在本发明中包括癌症、心脑血管疾病, 心脏疾病, 神经系统疾病, 自身免疫疾病, 传染病, 遗传疾病, 行为障碍, 或精神障碍。

[0097] 术语“癌症”是一个为本领域技术人员熟知的术语, 在本发明中指一类能侵染身体各部位的疾病的统称, 具有如下特征: 异常细胞能迅速增殖侵染邻近组织进而转移到另一器官。癌症可能是各种恶性肿瘤, 包括脑癌, 肺癌, 乳腺癌, 胃癌, 肝癌, 胰腺癌, 膀胱癌, 宫颈癌, 结肠癌, 前列腺癌, 结肠直肠癌, 皮肤癌 (如黑色素瘤), 食道癌, 淋巴瘤, 和白血病。

[0098] 术语“神经系统疾病”是一个为本领域技术人员熟知的术语, 在本发明中指中枢神经及外周神经系统相关的疾病, 包括脑, 脊髓, 头盖骨神经, 外周神经, 神经根, 自主神经系统, 神经肌肉接头及肌肉等相关的疾病。疾病类型包括癫痫, 阿尔兹海默病, 及其它痴呆, 脑血管疾病, 如中风, 偏头痛及其它头疼病, 多硬化症, 帕金森, 神经感染, 脑瘤, 神经系统外伤, 如由脑创伤及由营养不良导致的神经疾病。

[0099] 术语“心脑血管疾病”是一个为本领域技术人员熟知的术语, 在本发明中指一种心血管疾病或者更确切的讲是一种影响心血管系统和 / 或涉及心脏或血管 (动脉和静脉) 的疾病, 如动脉粥样硬化 (动脉疾病), 冠心病 (心脏病), 脑血管疾病, 高血压, 动脉末梢疾病, 风湿性心脏病, 先天性心脏病及心脏衰竭, 深静脉血栓及肺栓塞。

[0100] 术语“治疗”定义为对患者用药, 或者对从患者, 即有疾病、有病症、或由患病倾向的人, 体内分离出的组织或细胞系用药, 目的为治愈, 缓解, 改变, 治疗, 改进或影响病症, 或患病倾向。

[0101] 术语“有效剂量”定义为能够达到预期效果或者至少部分达到预期效果的剂量。术语“治疗有效剂量”定义为能够治愈疾病或者至少部分缓解疾病及疾病对患者造成的痛苦。达到这种效果的剂量决定于疾病的严重程度及患者自身免疫系统。

[0102] 术语“患者”包括接受预防或治疗的人或者其它哺乳动物受试者。

[0103] 在本发明的一个实施例中, 首先制备抗对照样品中蛋白的抗体或抗体片段, 再固定到基质上制备成免疫亲和介质。在一优选例中, 用制备的免疫亲和介质处理生物待测样品, 在待测样品和对照样品中同时存在的蛋白被结合而去除, 使在待测样品存在而对照样品不存在的至少一种多肽得到富集浓缩。

[0104] 在某些实施例中, 将肝癌患者血浆样品作为对照样品上到固定有抗健康人血浆蛋

白抗体或抗体片段的亲和介质柱中,正常功能多肽结合到柱上,肝癌患者血浆中特异的多肽流穿下来得到富集浓缩。

[0105] 本发明的另一实施例中从混合物中去除多肽,操作方式为将混合物与亲和介质混合结合亲和介质上实现从样品溶液中去除。

[0106] 本发明也提供了一种从待测样品中差减去除对照样品中也存在的多肽的方法。本发明一优选例提供了一种从待测蛋白样品中分离功能或病理相关的多肽。本发明的另一实施例中提供一种鉴定蛋白表达变化的方法,如在疾病状态下不表达和 / 或在健康样品中表达量很低的蛋白,在健康样品中不表达和 / 或在疾病状态下表达量很低的蛋白。

[0107] 本发明的一个优选实施例中,本发明方法分离出的蛋白可以用作新药研究中疾病药物靶标。在另一优选实施例中,本发明方法分离出的蛋白可以被用作诊断患病的疾病状态。另一个实施例中,用本发明分离出的蛋白可用作病理状态的指标,指导为患者选择最适合的治疗方案。另一个实施例中,用本发明分离出的蛋白可用于监测、跟踪和评估为患者所选择治疗方案的治疗效果。

[0108] 本发明也设计在基质上制备一种新亲和介质,基质可以是固体,半固体,微粒或胶状材料或可溶性多聚物。在一个实施例中,亲和介质不是特制的。本发明也涉及一种新的亲和介质及在蛋白质组学研究中,鉴定差异表达蛋白 / 多肽,和 / 或消除持家蛋白 / 多肽,和 / 或消除与对照样品中也存在的蛋白 / 多肽。

[0109] 本发明还涉及一种亲和色谱介质及其制备方法和用途。所述色谱介质可用于富集差异蛋白 / 多肽,和 / 或消除持家蛋白 / 多肽,和 / 或消除与对照样品中也存在的蛋白 / 多肽。

[0110] 本发明基于这样一种假设,即对照样品中存在的大多数蛋白 / 多肽能刺激实验动物,如小鼠,大鼠,和兔子等发生免疫反应产生这些蛋白的抗体。抗体固定后能识别并结合免疫原性与制备这些抗体所用抗原相似的多肽。当待测样品与固定化抗体混合后,与制备抗体所用抗原相同的蛋白被吸附除去,未结合的蛋白留在待测样品溶液中,通过质谱鉴定。这些蛋白中就包括在对照样品中不存在的差异蛋白。

[0111] 本发明中的亲和介质是固相的,通常具有渗透性,抗体通过共价交联方式固定。亲和介质可装成色谱柱,或滤器,或者本领域技术人员熟知的类似装置中。当样品在接近生理条件下流过时,目标蛋白被结合滞留。流穿组分中未结合蛋白可被浓缩和鉴定。

[0112] 本发明的目的之一用提供一种蛋白质组学研究通用工具进行富集(提高丰度)差异蛋白,及在去除(除去和 / 或降低丰度)蛋白。亲和介质上固定的抗体或抗体片段能够结合对照样品和待测样品中同时存在的蛋白。例如,一组在待测样品和对照样品中同时存在蛋白能结合到亲和介质上,待测样品中存在而对照样品中不存在的蛋白留在流穿液中。

[0113] 下面将举例进一步详细描述本发明。这些实施例仅用于说明本发明,而不是为了限制发明的使用范围。

实施例

[0114] 除了特别说明,以下材料在例子中都将用到。

[0115] 材料和方法

[0116] 本发明用到的传统化学技术,分子生物学技术,重组 DNA 技术,免疫学技术

(尤其抗体技术)及标准的多肽制备技术可参照冷泉港实验室出版社出版的分子克隆(Sambrook, Fritsch and Maniatis, Molecular Cloning: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), 抗体工程方法 (Antibody Engineering Protocols, Methods in Molecular Biology, 510, Paul, S., Humana Pr, 1996), 抗体工程实用方法 (Antibody Engineering: A Practical Approach, Practical Approach Series, 169, McCafferty, Ed., Irl Pr, 1996), 抗体实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow et al., C. S. H. L. Press, Pub., 1999) 和分子生物学流行方法 (Current Protocols in Molecular Biology, eds., Ausubel et al., John Wiley & Sons, (1992)。

[0117] 实施例 1

[0118] 制备亲和介质

[0119] 新西兰大白兔在初次免疫及每次加强免疫前两天, 用 21 号针头从耳缘动脉抽取 0.5ml 血液, 于 37°C 放置过夜使其凝固, 2,500rpm 离心 15 分钟收集血清, 于 -40°C 保存用于后续 ELISA 分析。将健康人血浆 (1ml, ~50mg/ml) 和 1.0ml 完全费氏佐剂充分混匀形成稳定的乳状液, 然后对 3 只 8 周龄的兔子在肩部区域进行多点皮下注射。每隔 2 周用与 1ml 不完全费氏佐剂进行乳化的健康人血浆 (1ml, ~50mg/ml) 加强免疫。通过 FLISA 法监测抗体的产生情况。第三次加强免疫后, 当滴度达到 10^5 , 对兔子进行颈动脉取血, 收集血液, 加入枸橼酸钠作为抗凝剂。4°C 1,000rpm 离心 10 分钟除去血细胞, 收集血浆, -70°C 保存。

[0120] ELISA: 用包被缓冲液 (50mmol/L 碳酸氢盐缓冲液, pH9.6) 将健康人的血浆稀释到蛋白浓度为 100ng/100 μ l, 然后转移到聚苯乙烯 96 孔板上 (每孔加 100 μ l), 4°C 孵育过夜, 用 PBST (0.02M 磷酸盐, 0.15M NaCl, 0.15% Tween-20, pH 7.4) 洗 5 次, 每次洗 5 分钟。再加入 200 μ l 脱脂奶粉 (溶于 PBST, 蛋白浓度为 2%), 37°C 孵育 2 小时进行封闭。用 PBST (0.02M 磷酸盐, 0.15M NaCl, 0.15% Tween-20, pH 7.4) 洗 5 次, 每次洗 5 分钟。然后用脱脂奶粉 (溶于 PBST, 蛋白浓度为 2%) 将兔血清稀释到 1/100, 1/1,000, 1/10,000, 1/100,000, 1/1,000,000, 每孔加 100 μ l, 37°C 孵育 1 小时, 用 PBST (0.02M 磷酸盐, 0.15M NaCl, 0.15% Tween-20, pH 7.4) 洗 5 次, 每次洗 5 分钟。加入 100 μ l 羊抗兔 IgG-辣根过氧化物酶交联物 (1:10,000 稀释), 37°C 孵育 1 小时, 用 PBST (0.02M 磷酸盐, 0.15M NaCl, 0.15% Tween-20, pH 7.4) 洗 5 次, 每次洗 5 分钟。最后加入 100 μ l 底物溶液 (10ml 底物溶液含 4mg 邻苯二胺 (OPD), 0.0074g 柠檬酸钠, 0.0184g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 15 μ l 30% H_2O_2 (过氧化氢, pH 4.8), 37°C 孵育 30 分钟。加入 50 μ l 2mol/L H_2SO_4 终止反应。在酶标仪上对每个孔测 492nm 处的值, 当 492nm 处的读数减半时, 对照稀释度得出滴度。

[0121] 兔抗体纯化: 用 PBS (0.02M 磷酸盐, 0.15M NaCl, pH 7.2) 将 10ml 兔血浆稀释 5 倍, 每次 10ml 上到用 PBS 平衡的蛋白 G-sepharose 柱 (1m) 上, 用 PBS 冲洗柱至 280nm 吸光值稳定到基线, 然后用 Gly-HCl 缓冲液洗脱 (0.2M, pH 2.5), 收集洗脱峰。重复操作 5 次直至兔血浆用完, 合并洗脱组分, 通过测定 280nm 和 260nm 处的吸光值计算蛋白为 35mg。通过还原性 SDS-PAGE 分析抗体纯度, 灰度积分计算抗体重链和轻链占总量 95% 以上。

[0122] 亲和介质制备: 用 500ml 双蒸水洗 Sepharose CL 4B。取 45ml Sepharose 树脂加入到 250ml 玻璃烧杯中, 用 4°C 预冷的双蒸水悬浮, 将烧杯放在冰上, 用磁力搅拌器搅拌。称 42g 溴化氰溶于 50ml 乙腈中, 搅拌倒入装 Sepharose 树脂烧杯中。用 NaOH (20% w/v) 调节 pH 至 10.5-11.5 (10-15 分钟内 pH 不会下降到 10 以下), 体系 pH 不再降低后, 将介质倒入烧

结玻璃漏斗中,在适度真空下用 1L 4℃预冷的双蒸水清洗,再与溶于 0.1M NaHCO₃(pH 8.5)的纯兔抗体混匀,4℃反应 35 小时。再加入 0.5ml 氨基乙醇,4℃反应 5 小时以终止交联反应。所制备的交联上兔抗体的亲和介质用 400ml 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0) 清洗,4℃保存。

[0123] 实施例 2

[0124] 健康志愿者血浆中差异多肽的检测

[0125] 差异多肽制备方法:取健康志愿者血浆 20 μL 用 980 μL 磷酸缓冲液 (10mM, pH7.0) 稀释后测定其在 280nm 和 260nm 处的吸光度,并依据方程 $C(\text{mg/mL}) = 1.45 \times A_{280\text{nm}} - 0.74 \times A_{260\text{nm}}$ 计算其总蛋白大约为 1mg。稀释后的血清上加到实施例 1 制备的亲和介质层析柱 (1mL) 上,收集流穿峰并浓缩到 20 μL,取其中 5 μL 进行 12% 还原性 SDS-PAGE 检测,银染分析结果可见 9 条浅带,洗脱峰和原样品有相似的带型。还原 SDS-PAGE (12%) 分析证实了此方法能够有效除去健康人血清中大多数的正常功能蛋白。

[0126] 差异多肽的鉴定和表征:

[0127] 胰蛋白酶消化相关缓冲液配制如下:

[0128] 消化缓冲液:30mg 碳酸氢铵溶于 15mL 超纯水中。

[0129] 还原缓冲液:200 μL 的 TCEP 用 2ml 的消化缓冲液稀释。

[0130] 烷基化反应缓冲液:60mg 的碘乙酰胺 (IAA) 溶解在 3mL 消化缓冲液中。

[0131] 胰蛋白酶激活溶液:20 μL 的胰蛋白酶保存液加入 20 μg 的修饰过的胰蛋白酶冻干粉。并再加入 180 μL 的超纯水,之后再加入 1.8mL 的消化缓冲液使终体积为 2mL。

[0132] 用 2.5mL 甲苯磺酰基-L-氨基联苯氯甲基酮 (TCPK) 溶解 25 μg 的修饰的胰蛋白酶,并与 250 μL 0.1% 重蒸乙腈混合。混合液取 15 μL 用 100 μL 50mM 的 NH₄HCO₃ 活化。取 5 μL 上述穿流蛋白,用 100 μL 还原缓冲液 (200 μL TCEP 溶在 2mL 消化缓冲液) 还原,并在 60℃ 温育 10 分钟。之后再加入 100 μL 的烷基化缓冲 (60mg 的碘乙酰胺 IAA, 溶于 3mL 消化缓冲液) 继续在黑暗室温下孵育 1 小时。然后加入 20 μL 胰蛋白酶激活溶液到 37℃ 孵育 1 小时后 25℃ 轻搅过夜。

[0133] 多肽混合物用 Zorbax 300 的 SB-C18 的柱 (安捷伦, 威尔明顿, DE) 进行脱盐。用 Zorbax 300SB-C18 的反相毛细管柱 (150 μm 内径 × 15cm, 安捷伦) 分离,流速为 250nL/min, 梯度设定为:溶液 B 浓度梯度为 4-50%, 洗脱时间为 50 分钟 (组分 A 溶液:0.1% 甲酸; B 溶液:84% 乙腈和 0.1% 甲酸), 之后 4 分钟内溶液 B 浓度线性增至 100%, 然后再以溶液 B 100% 洗脱 10 分钟。在线检测的分离峰注入到 Finnigan LTQ (线性四极管离子阱) 进行多肽质谱鉴定。

[0134] 质谱操作在 Finnigan LTQ 线性离子阱上进行。质谱分析方法为 1 个一级质谱分析后接 10 个二级质谱分析 (25% 裂解能)。动态排除持续时间设为 30 秒。每一轮分析所得的二级质谱峰进行搜库处理, 所用软件为 BLOWORKS 蛋白鉴定软件, 数据库为 ipi HUMAN v3.36。SEQUEST 筛选参数设置如下: +1 价, Xcorr ≥ 1.9; +2 价, Xcorr ≥ 2.2; +3 价, Xcorr ≥ 3.75; 和 DelCN ≥ 0.1。

[0135] 为了对差异不同的蛋白 / 多肽的制备过程的有效性进行确认, 另一个健康人的血浆样品进行了测试, 37 份蛋白 / 多肽的结果列于表 1。其中包括一些正常血浆高丰度蛋白残留, 如白蛋白, 免疫球蛋白, 转铁蛋白, 纤维蛋白原, 补体蛋白 C3。其他 31 种蛋白质 / 肽属

于含量不足总蛋白 1% 的低丰度蛋白, 其中人源性多肽 dermcidin (DCD), 人半胱氨酸蛋白酶抑制剂 -A, 生长激素 CSH2 异构体, 生长激素, α 2- 巨球蛋白。也检测到一些细胞内功能蛋白, 包括酪氨酸磷酸酶, RNA 聚合酶 II 延伸因子, UBB 泛素和核糖体蛋白 S27, 锌指蛋白 57 同源异构体 2, 肌联蛋白异构体 2, γ - 分泌酶组件蛋白 Nicastrin 异构体 1, Armadillo 重复的蛋白 3 异构体 2, 3', 5' - 环磷酸二酯酶 4A 亚型 3, 一磷酸腺苷脱氨酶 2, 信号识别颗粒 54kDa 蛋白等。虽然血浆样品采自健康志愿者, 检测到的蛋白 / 多肽还包括, 1 号染色体的开放阅读框 113 和 DKFZp686D0972 假定蛋白 LOC345651, 功能尚待确认。Nicastrin 是一种跨膜糖蛋白, 它是 γ - 分泌酶的重要组成部分, 与 presenilin 结合, 在 γ - 分泌酶的稳定和定位 presenilin 到膜上的 γ - 分泌酶的过程中发挥重要作用。Nicastrin 还起到 γ - 分泌酶结合点的作用, APP 和 Notch 可以直接结合到这个结合点, 通过直接结合并提供给 γ - 分泌酶, 确保保酶切过程不出错。血浆中 Nicastrin 的存在可能与阿尔茨海默氏病 (AD) 有关。血浆中检测到范可尼贫血 J 蛋白的 BRIP1 异构体 1, 预示可能与范可尼贫血 (FA) 有联系。范可尼贫血是一种特征为骨髓衰竭, 出生缺陷和癌症的常染色体隐性遗传疾病。疾病相关蛋白质的血浆检测提供了一个建立生物标志物的早期诊断良好的起点。

[0136] 在表 1 中, 从三组健康的志愿者的血浆中检测多肽, 它的初步归类和分析如下:

[0137] 表 1

[0138] 健康志愿者 1

[0139]

分组	检测到的蛋白
有意义的蛋白	Gene_Symbol= BRIP1 范可尼贫血 J 组蛋白异构体 1
	Gene_Symbol= NCSTN Nicastrin 异构体 1 的前体
	Gene_Symbol=RP5-1054A22.3 新蛋白
	Gene_Symbol=- 染色体 1 开放阅读框 113
	Gene_Symbol=DKFZp686D0972 计算机预测的蛋白 LOC345651
血浆蛋白	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=FGA 纤维蛋白原 α 链异构体 1 前体
	Gene_Symbol=FGG 纤维蛋白原 γ 链的 γ -B 异构体前体
	Gene_Symbol=FGB 纤维蛋白原 β 链前体
	Gene_Symbol=LOC653879 类似补体 C3 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=IGKV1-5 蛋白 IGKV1-5
	Gene_Symbol=DCD 人源性多肽 dermcidin 前体
	Gene_Symbol=CSTA 半胱氨酸蛋白酶抑制剂-A
	Gene_Symbol=GH1; CSH1; 生长激素 CSH2 异构体前体
	Gene_Symbol=PTPRK 蛋白酪氨酸磷酸酶, K 型受体
细胞蛋白	Gene_Symbol=ELL RNA 聚合酶 II 延伸因子 ELL
	Gene_Symbol=RPS27A;UBC; 泛素 UBB 和核糖体蛋白 S27a 前体
	Gene_Symbol=ZFP57 锌指蛋白 57 同系物的异构体 2
	Gene_Symbol=TTN 肌联蛋白的异构体 2
	Gene_Symbol=- 42 kDa 蛋白
	Gene_Symbol=ARMC3 含 Armadillo 重复的蛋白 3 异构体 2
	Gene_Symbol=PDE4A cAMP 特异的 3', 5'-环磷酸二酯酶 4A 的异构体 3

[0140]

	Gene_Symbol=AMPD2 腺苷单磷酸脱氨酶 2
	Gene_Symbol=DIO2 II 型碘化甲腺氨酸脱碘酶
	Gene_Symbol=MYH11 肌球蛋白-11
	Gene_Symbol=SRP54 信号识别颗粒 54 kDa 蛋白
	Gene_Symbol=KIAA0372 Tetratricopeptide 重复蛋白 37
	Gene_Symbol=-Hind III 重复元素 DNA3' -末端 Lamin 样蛋白
	Gene_Symbol=SLC22A11 溶质载体家族 22 第 11 异构体 1
	Gene_Symbol=ZCCHC11 含锌指 CCHC 结构域的蛋白 11 异构体 1
	Gene_Symbol=GRHL1 未鉴定 蛋白 GRHL1
	Gene_Symbol=B3GALT6 B3GALT6 蛋白 (片段)

[0141] 健康志愿者 2

[0142]

分组	检测到的蛋白
有意义的蛋白	Gene_Symbol=RP5-1054A22.3 新蛋白
	Gene_Symbol=- 计算机预测的保守蛋白
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686I04196
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
细胞蛋白	Gene_Symbol=UCHL1 泛素羧基端水解酶 同工酶 L1
	Gene_Symbol=LOC100093698 共济失调蛋白 3 异构体 3 类似蛋白
	Gene_Symbol=- 42 kDa 蛋白
	Gene_Symbol=PREPL 脯氨酰肽内切酶样异构体 C
	Gene_Symbol=LOC728378 POTE-肌动嵌合蛋白
	Gene_Symbol=PDE4A cAMP 特异 3', 5' -环磷酸二酯酶 4A 异构体 3
	Gene_Symbol=BRIP1 范可尼贫血 J 组蛋白异构体 1
	Gene_Symbol=MNT Max 结合蛋白 MNT
	Gene_Symbol=CSPP1 中心小体和纺锤极相关蛋白 1 异构体 1
	Gene_Symbol=NF1 神经纤维瘤蛋白异构体 2

[0143]

	Gene_Symbol=HNRPDL 核不均一核糖体蛋白 D 样蛋白异构体 1
	Gene_Symbol=CNTN4 接触蛋白-4 异构体 1 前体
	Gene_Symbol=MTHFD1 胞质 C-1-四氢叶酸合酶
	Gene_Symbol=C6orf204 含卷曲螺旋结构域蛋白 C6orf204 的异构体 1
	Gene_Symbol=MYH11 肌球蛋白-11
	Gene_Symbol=GALNT5 多肽 N-乙酰氨乳糖转移酶 5
	Gene_Symbol=- CDNA FLJ43087 fis, 克隆 BRTHA3019105
	Gene_Symbol=CXCL6 Line-1 逆转录酶
	Gene_Symbol=GYG2 糖原蛋白-2 的异构体 α
	Gene_Symbol=GRIN2C N-甲基-D-天冬氨酸受体 2C 亚基前体
	Gene_Symbol=PAK2 p21-活化激酶 2 类似物
	Gene_Symbol=PPM1J 蛋白磷酸酶 1J 异构体 1
	Gene_Symbol=TTN 肌联蛋白异构体 2
	Gene_Symbol=AKAP10 线粒体 A 激酶 PPKA 锚固蛋白 10
	Gene_Symbol=CRIM1 富含半胱氨酸的运动神经元 1 蛋白前体
	Gene_Symbol=B3GALT6 B3GALT6 蛋白 (片段)

[0144] 健康志愿者 3

[0145]

分组	检测到的蛋白
有意义的蛋白	Gene_Symbol=LOC731914 计算机预测的蛋白
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686I04196
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
细胞蛋白	Gene_Symbol=ILF2 白介素增强子结合因子 2
	Gene_Symbol=PIK3C2A 含磷脂酰环己六醇-4-磷酸 3-激酶 C2 的 α 蛋白
	Gene_Symbol=JUP 接合斑珠蛋白
	Gene_Symbol=TTN 肌联蛋白异构体 2
	Gene_Symbol=C6orf204 含卷曲螺旋结构域的蛋白异构体 1 C6orf204
	Gene_Symbol=MYH11 肌球蛋白-11

[0146]

	Gene_Symbol=BMP3 骨形成蛋白 3 前体
	Gene_Symbol=UCHL1 泛素羧基端水解酶同工酶 L1
	Gene_Symbol=GSN 凝溶胶蛋白异构体 1 前体
	Gene_Symbol=LMOD1 平滑肌蛋白 1
	Gene_Symbol=SLC05A1 溶质载体有机阴离子转运蛋白家族 5A1
	Gene_Symbol=SEC23A 蛋白转运蛋白 Sec23A
	Gene_Symbol=- 42 kDa 蛋白

[0147] 实施例 3

[0148] 肝癌患者血浆的差异多肽的检测

[0149] 肝癌患者相关的差异多肽制备方法:取肝癌患者的 20 μ L 血浆用 980 μ L 磷酸缓冲液 (10mM, pH 7.0) 稀释。总蛋白调到大约为 1mg。稀释后的血浆上到实施例 1 制备的亲亲和介质层析柱 (1mL), 收集流穿峰并浓缩到 20 μ L, 取其中 5 μ L 进行 12% 还原性 SDS-PAGE 检测, 银染分析结果可见几条浅带, 证实可以有效除去健康人血浆中大多数正常功能蛋白和制备肝癌患者血清中相关的差异多肽。

[0150] 5 μ L 上述肝癌患者血浆的多肽, 用 100 μ L 还原性缓冲液并在 60 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟。再加 100 μ L 的烷基化缓冲液在黑暗室温下孵育 1 小时。之后加入 20 μ L 胰蛋白酶激活溶液到管中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后 25 $^{\circ}$ C 轻搅过夜。

[0151] 然后, 多肽混合物采用 Zorbax 300 的 SB-C18 的柱 (安捷伦, 威尔明顿, DE) 进行脱盐。用 Zorbax 300SB-C18 的反相毛细管柱 (150 μ m 内径 \times 15cm, 安捷伦) 分离, 流速为 250nl/min, 梯度设定为: 溶液 B 浓度梯度为 4-50%, 洗脱时间为 50 分钟 (组分 A 溶液: 0.1% 甲酸; B 溶液: 84% 乙腈和 0.1% 甲酸), 之后 4 分钟内溶液 B 浓度线性增至 100%, 然后再以溶液 B 100% 洗脱 10 分钟。在线检测的分离峰注入到 Finnigan LTQ (线性四极管离子阱) 进行多肽质谱鉴定。

[0152] 质谱操作在 Finnigan LTQ 线性离子阱上进行。质谱分析方法为 1 个一级质谱分析后接 10 个二级质谱分析 (25% 裂解能)。动态排除持续时间设为 30 秒。每一轮分析所得的二级质谱峰进行搜库处理, 所用软件为 BIOWORKS 蛋白鉴定软件, 数据库为 ipi HUMAN v3.36。SEQUEST 筛选参数设置如下: +1 价, Xcorr \geq 1.9; +2 价, Xcorr \geq 2.2; +3 价, Xcorr \geq 3.75; 和 DelCN \geq 0.1。

[0153] 从两位肝癌患者血浆分别检测出 17 和 19 中蛋白, 分别列在表 2 和表 3 中。除了正常血浆蛋白残留, 如白蛋白, 免疫球蛋白, 转铁蛋白, 纤维蛋白原, 或补体 C3, 还有一些肝癌相关的蛋白质。

[0154] 载脂蛋白 E: 这种蛋白质与体内脂肪 (脂质) 结合形成脂蛋白。脂蛋白负责包裹胆固醇和其他脂肪在血液中循环。载脂蛋白 E 是脂蛋白极低密度脂蛋白 (VLDLs) 的一个重要组成部分。VLDLs 可以从血液中清除多余胆固醇并把它们运输到肝进行处理。维持正常胆固醇水平对于预防心脏和血管障碍 (心血管疾病) 至关重要, 包括心脏病和中风。

[0155] 免疫球蛋白片段检测到的频率较高,预示其中可能癌症有联系。在两位肝癌患者血浆样品中都检测到未知功能假设蛋白 DKFZp686001196 (Gene_Symbol = IGHG1),该蛋白 cDNA 最初是从食管肿瘤组织中克隆序列提交到 EMBL/GenBank/DDBJ 数据库中 (2005 年 1 月)。另有一个 45kDa 的蛋白 (ENSP00000382824 ;蛋白质模型 :ENSP00000382824 :角蛋白细胞骨架细胞角蛋白 CK II 型角蛋白) 属于细胞角蛋白家族,在正常血浆中丰度非常低,癌症患者血浆或血清中存在各种角蛋白的研究已经进行多年,并作为在癌症患者中的肿瘤标志物。

[0156] 在一位肝癌患者样品中检测到一个 31kDa 的蛋白 (KRT13,角蛋白 13),与文献中报道的角蛋白作为酒精性肝病和上皮肿瘤的标志物一致。

[0157] 在一位肝癌患者的血浆样品也检测到载脂蛋白 E (Apo E)。它是一个检测肝功能的一个指标。载脂蛋白 E 在肝癌患者和由肝癌慢性病毒性引起的肝炎患者的血浆水平都升高。而在健康志愿者样品中未检测到。

[0158] 血浆中肝癌相关蛋白的检测为建立早期诊断标志物提供了出发点。

[0159] 在表 2 中,列出了检测到的多肽和初步对肝癌患者分类和讨论。

[0160] 肝癌患者 1

[0161]

分组	检测到的蛋白
癌症相关蛋白	Gene_Symbol=APOE 载脂蛋白 E 前体
	Gene_Symbol=- 45 kDa 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686001196
正常血浆蛋白	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=LOC653879 补体 C3 类似物前体

[0162]

	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG1 IGHG1 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=DCD 人源性多肽 Dermcidin 前体
	Gene_Symbol=CSTA 半胱氨酸蛋白酶抑制剂-A

[0163] 肝癌患者 2

[0164]

分组	检测到的蛋白
癌症相关蛋白	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686001196
	Gene_Symbol=KRT13 31 kDa 蛋白
	Gene_Symbol=- 45 kDa 蛋白
血浆蛋白	Gene_Symbol=ALB 未鉴定 蛋白 ALB
	Gene_Symbol=LOC653879 补体 C3类似物前体
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686P15220
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG1 IGHG1 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGKV3-20 Ig kappa 链 V-III 区 HAH 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=CFB 补体 因子 B异构体 1 前体 (片段)
Gene_Symbol=- 42 kDa 蛋白	

[0165] 实施例 4

[0166] 从深度近视患者的血浆中检测差异多肽

[0167] 差异蛋白 / 多肽制备方法:采集深度近视患者 20 μ L 血浆用 980 μ L 磷酸缓冲液 (10mM, pH 7.0) 稀释总蛋白大约为 1mg。稀释后的血浆上例 1 制备好亲和介质层析柱 (1mL)。收集流穿峰并浓缩到 20 μ L, 取其中 5 μ L 进行 12% 还原性 SDS-PAGE 检测, 银染分析结果可见几条浅带此方法除去健康人血浆中大多数的正常功能蛋白的有效性。

[0168] 5 μ L 上述穿流蛋白, 用 100 μ L 还原性缓冲液 (200 μ L TCEP 溶在 2ml 消化缓冲液) 还原, 在 60 $^{\circ}$ C 温育 10 分钟后加入 100 μ L 的烷基化缓冲 (60 毫克的碘乙酰胺 (IAA), 3 毫升消化缓冲液) 加到离心管中在黑暗室温下孵育 1 小时。然后加入 20 μ L 胰蛋白酶到管中, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 25 $^{\circ}$ C 轻搅过夜。

[0169] 然后, 多肽混合物采用 Zorbax 300 的 SB-C18 的柱 (安捷伦, 威尔明顿, DE) 进行脱盐。用 Zorbax 300SB-C18 的反相毛细管柱 (150 μ m 内径 \times 15cm, 安捷伦) 分离, 流速为 250nl/min, 梯度设定为: 溶液 B 浓度梯度为 4-50%, 洗脱时间为 50 分钟 (组分 A 溶液: 0.1% 甲酸; B 溶液: 84% 乙腈和 0.1% 甲酸), 之后 4 分钟内溶液 B 浓度线性增至 100%, 然后再以溶液 B 100% 洗脱 10 分钟。在线检测的分离峰注入到 Finnigan LTQ (线性四极管离子陷阱) 进行多肽质谱鉴定。质谱操作在 Finnigan LTQ 线性离子陷阱上进行。质谱分析方法为 1 个一级质谱分析后接 10 个二级质谱分析 (25% 裂解能)。动态排除持续时间设为 30 秒。每一轮分析所得的二级质谱峰进行搜索处理, 所用软件为 BIOWORKS 蛋白鉴定软件, 数据库为 ipi HUMAN v3.36。SEQUEST 筛选参数设置如下: +1 价, Xcorr \geq 1.9; +2 价, Xcorr \geq 2.2; +3 价, Xcorr \geq 3.75; 和 DelCN \geq 0.1。

[0170] 在对 8 位深度近视患者的血浆进行测试后检测到 7 到 29 种差异蛋白质 / 肽。其

中包含一些正常血清蛋白 / 多肽 : 白蛋白, 免疫球蛋白, 转铁蛋白, 纤维蛋白原, HBB 血红蛋白 β 亚基和血小板碱性蛋白等, 也有一些细胞内的具有生物学功能的蛋白。

[0171] 检测到一些深度近视相关蛋白。其中 APOB (载脂蛋白 B-100) 属于血清蛋白家族。然而, 在健康的志愿者体内并没有检测到 APOB。据报道, 载脂蛋白 B 与老年性黄斑变性 (AMD) 是相关的, AMD 是工业化国家造成失明的原因, 在中国发病率不断上升。AMD 是一种复杂的疾病由环境因素造成的, 并具有遗传易感性。在深度近视患者的血清检测载脂蛋白 B 为深度近视的研究提供了一种新颖的角度。

[0172] 在深度近视患者的血浆中甲状腺素运载蛋白 (TTR) 同样也被检测到, 它通过与视黄醇结合蛋白 (RBP) 的结合可以运载视黄醇。正常的血液甲状腺素运载蛋白含量是 25-30mg/L, 而在本次实验的健康的志愿者未检测到甲状腺素。

[0173] 据报道, 家族性腺瘤息肉病 (FAP) 与甲状腺素运载蛋白 (TTR) 基因的突变有关, 是家族性腺瘤息肉病的最常见形式。在深度近视患者的血浆中检测甲状腺素将为阐明近视的加深过程提供另一条线索。

[0174] 在深度近视患者血浆检测到结合珠蛋白为游离血红蛋白的氧化应激提供了相关依据。血液中的触珠蛋白 (简称为 HP) 与游离红细胞的血红素具有高亲和性, 从而抑制其氧化活性。该触珠蛋白血红素复合体可以由网状内皮系统清除 (主要存在于脾脏中)。在临床上, 结合珠蛋白检测可以用来筛查和监测血管内容血性贫血。

[0175] 触珠蛋白表型可用于预测糖尿病血管病的风险。随着结合珠蛋白对血管的风险测试, 开发的药物将大大改善糖尿病和心血管疾病的临床病症, 最终帮助和发展个性化治疗。

[0176] 血红素或血红蛋白是哺乳动物和其他动物血液中血红细胞中含铁的氧气运输金属蛋白。在深度近视患者血浆中存在的自由血红素可能是导致无差别氧化效应的原因。

[0177] 血液结合素 (HPX) 是已知蛋白中对亚铁血红素蛋白亲和力最强的血浆蛋白。它是一种主要在肝脏中表达的应急蛋白, 在炎症产生之后被诱导大合成。亚铁血红素具有潜在的高毒性, 因为她能插入脂质细胞膜并产生羟基自由基。

[0178] 检测深度近视患者血浆中的血液结合素 (HPX), 可能证实近视患病过程中的无差别氧化效应。

[0179] 检测血浆中疾病相关蛋白, 为鉴定早期诊断和个性化治疗的生物标记, 提供了一个好的出发点。

[0180] 表格 3 是在深度近视患者血浆中检测到的差异蛋白 / 肽的初步的分类和注释。

[0181] 表格 3

[0182] 深度近视患者 1

[0183]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和和验证的蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=CSTA 半胱氨酸蛋白酶抑制剂-A
	Gene_Symbol=PPBP 血小板碱性蛋白前体
	Gene_Symbol=- 抗-(ED-B) scFV (片段)

[0184] 深度近视患者 2

[0185]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=HP HP 触珠蛋白
细胞蛋白	Gene_Symbol=DSP 桥粒斑蛋白的异构体 DPI
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=ALB 血清白蛋白异构体 2 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白

[0186] 深度近视患者 3

[0187]

分组	检测到的蛋白
----	--------

[0188]

深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素前体
	Gene_Symbol=HP 触珠蛋白前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白前体
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=FGA 纤维蛋白原 α 链异构体 1 前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=- 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686K04218 (片段)
	Gene_Symbol=PPBP 血小板碱性蛋白前体
	Gene_Symbol=HBB 血红蛋白亚基 β
	Gene_Symbol=HBG1 血红蛋白亚基 γ -1
	Gene_Symbol=CA1 碳酸酐酶 1

[0189] 深度近视患者 4

[0190]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素前体
	Gene_Symbol=HP 触珠蛋白前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白前体
细胞蛋白	Gene_Symbol=GSN 凝溶胶蛋白异构体 1 前体
	Gene_Symbol=POTE2 在前列腺、卵巢、睾丸和中胎盘 2 表达的蛋白 2
血浆蛋白	Gene_Symbol=TTN 肌联蛋白的异构体 2

[0191]

	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白前体
	Gene_Symbol=FGG 纤维蛋白原 γ 链异构体 γ -B 前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定蛋白 ALB
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白前体
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=- 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686M24218
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=CSTA 半胱氨酸蛋白酶抑制剂-A
	Gene_Symbol=HBB 血红蛋白 亚基 β
	Gene_Symbol=APOE 载脂蛋白 E 前体
	Gene_Symbol=TPI1 磷酸丙糖异构酶的异构体 2

[0192] 深度近视患者 5

[0193]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白 前体
	Gene_Symbol=HPR 触珠蛋白相关蛋白 前体的异构体 1
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清铁传递蛋白 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白 前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定 蛋白 ALB
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHA1 CDNA FLJ14473 fis, 克隆 MAMMA1001080, 高度类似于 Homo sapiens SNC73 蛋白(SNC73) mRNA

[0194] 深度近视患者 6

[0195]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=TXN 硫氧还蛋白
	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体
	Gene_Symbol=HPR 触珠蛋白相关蛋白异构体 1 前体
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白 前体
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白

[0196] 深度近视患者 7

[0197]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=TTR 甲状腺素运载蛋白 前体
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白 前体
	Gene_Symbol=FGA 纤维蛋白原 α 链异构体 1 前体
	Gene_Symbol=ALB 未鉴定 蛋白 ALB
	Gene_Symbol=IGKV3-20 Ig kappa 链 V-III 域 HAH 前体
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHA1 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=CSTA 半胱氨酸蛋白酶抑制剂-A

[0198] 深度近视患者 8

[0199]

分组	检测到的蛋白
深度近视相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=HP 触珠蛋白 前体
	Gene_Symbol=APOE 载脂蛋白 E 前体
细胞蛋白	Gene_Symbol=PDE4A cAMP 特异 3', 5' -环磷酸二酯酶 4A 的异构体 3
	Gene_Symbol=GSN 凝溶胶蛋白异构体 1 前体
血浆蛋白	Gene_Symbol=ALB 未鉴定 蛋白 ALB
	Gene_Symbol=TF 血清转铁传递蛋白 前体
	Gene_Symbol=A2M α -2-巨球蛋白 前体
	Gene_Symbol=FGA 纤维蛋白原 α 链异构体 1 前体
	Gene_Symbol=FGB 纤维蛋白原 β 链 前体
	Gene_Symbol=FGG 纤维蛋白原 γ 链异构体 γ -B 前体
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=IGKC IGKC 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGHA1 SNC66 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=- 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686K04218(片段)
	Gene_Symbol=IGHA1 IGHAI 蛋白
	Gene_Symbol=IGL@ IGL@ 蛋白
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=- Ig 重链 V-III 域 HIL
	Gene_Symbol=- 单-链 Fv (片段)
	Gene_Symbol=- 抗-(ED-B) scFV (片段)

[0200] 实施例 5

[0201] 健康妊娠妇女志愿者血浆中检测差异多肽

[0202] 差异多肽的制备:从健康妊娠妇女志愿者中收集 20 μ l 血浆,用 980 μ l 磷酸缓冲液 (10mM, pH7.0) 稀释,总的蛋白含量大约 1mg,添加到带有实施例 1 中制备亲和介质的亲

和柱 (1ml), 收集穿透样品浓缩至 20 μ l, 吸取 5 μ l 用还原性 SDS-PAGE (12%) 和琼脂糖凝胶电泳分析。结果只能看到很少的微弱的条带, 这证明健康人血浆中大多数正常功能蛋白被有效清除。

[0203] 5 μ l 上述穿透蛋白用 100 μ l 还原性缓冲液 (200 μ l TCEP 溶解在 2ml 的消化性缓冲液) 还原, 60°C 处理 10min。加入 100 μ l 烷化缓冲液 (3mg 碘乙酰胺溶解在 3ml 消化缓冲液) 到试管中, 室温黑暗中处理一个小时。然后加入 20 μ l 活性胰蛋白酶溶液, 37°C 处理一小时, 25°C 过夜温和振荡处理。

[0204] 然后, 将肽混合物用 Zorbax 300SB-C18 肽分离柱 (Agilent Technologies, Wilmington, DE) 脱盐, Zorbax 300SB-C18 反相毛细管柱 (150 μ m 内径 \times 15cm, Agilent Technologies) 上以 250nl/min 的流速分离, 50min 内 4-50% B 的线性梯度 (A: 0.1% 甲酸; B: 84% CH₃CN 和 0.1% 甲酸), 然后 4min 内到升 100% B, 保持 10min。峰经过 Finnigan LTQ 质谱 (线性四极管离子陷阱) 鉴定。

[0205] 用 Finnigan LTQ 线性离子阱采集质谱数据。质谱方法包括一次全扫描和十次二级质谱扫描 (25% 碰撞能量) 的循环。动态排除延迟设定为 30s。所有二级质谱的数据通过 BOWORKS 蛋白质鉴定软件在 ipi HUMAN v3.36 数据库里搜索。SEQUEST 过滤条件设置为 Charge+1, Xcorr \geq 1.9; Charge+2, Xcorr \geq 2.2; Charge+3, Xcorr \geq 3.75; 和 De1CN \geq 0.1。

[0206] 从采集的健康妊娠妇女血浆中检测出的不同蛋白 / 肽为 8 和 12。剩余的正常血浆蛋白 / 肽包括免疫球蛋白、铁传递蛋白和丝氨酸蛋白酶抑制剂。

[0207] 这里检测到一些与怀孕有关的蛋白:

[0208] APOB (载脂蛋白 B-100) 属于血浆蛋白家族。然而在非妊娠的健康者愿者中没有检测到。据报道 APOB 蛋白水平在血清胆酸与妊娠肝内胆汁郁积症 (ICP) 中会有上升。从一个健康妊娠志愿者中的血浆中检测到 APOB, 表示这个志愿者应该为了保护自己 and 孩子的健康而进行一次全面检查。

[0209] 血色素结合蛋白 (HPX) 是已知蛋白中结合亚铁血红素能力最强的一种低丰度血浆蛋白。血浆血色素结合蛋白的活性与增强的血管渗透性有关。据报道血液结合素的丰度在妊娠健康志愿者中要高于非妊娠健康志愿者。

[0210] 性激素结合蛋白 (SHBG) 是另一种低丰度的血浆蛋白。据报道它的丰度会在妊娠期内不断上升, 直到高达非妊娠志愿者的 12 倍。在实施例 2 中, 在健康志愿者中没有检测到这种蛋白。

[0211] 补体因子 B (BF) 是一种相对较高丰度的血浆蛋白, 据报道含量在出生前明显升高。

[0212] 在妊娠妇女志愿者血浆中成功检测到妊娠相关蛋白再次证明了这种差异蛋白检测方法的有效性。

[0213] 表 4 是妊娠妇女志愿者中检测的差异蛋白 / 肽的初步分类和注释。

[0214] 表 4

[0215] 妊娠妇女志愿者 1

[0216]

分组	检测到的蛋白
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白 前体
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=IGHG1 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686N02209
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
细胞蛋白	Gene_Symbol=C1orf131 未鉴定 蛋白 C1orf131 的异构体 2
妊娠相关蛋白	Gene_Symbol=CFB 补体因子 B 前体的异构体 1 (片段)
	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体

[0217] 妊娠妇女志愿者 2

[0218]

分组	检测到的蛋白
血浆蛋白	Gene_Symbol=TF 血清转铁蛋白 前体
	Gene_Symbol=IGHG2 未鉴定和验证的 蛋白 DKFZp686I04196 (片段)
	Gene_Symbol=IGHM IGHM 蛋白
	Gene_Symbol=IGHM FLJ00385 蛋白 (片段)
	Gene_Symbol=IGKV1-5 IGKV1-5 蛋白
	Gene_Symbol=FETUB 未鉴定 蛋白 FETUB
	Gene_Symbol=SERPINA5 血浆丝氨酸蛋白酶抑制剂 前体

[0219]

细胞蛋白	Gene_Symbol=TTN 肌联蛋白的异构体 2
妊娠相关蛋白	Gene_Symbol=HPX 血液结合素 前体
	Gene_Symbol=SHBG 性激素结合球蛋白异构体 1 前体
	Gene_Symbol=APOB 载脂蛋白 B-100 前体
	Gene_Symbol=CFB 补体因子 B 前体的异构体 1 (片段)

[0220] 等同性

[0221] 本领域的专业人员只进行常规改变的实验将等同本发明方法。这些等同方法将在本发明的权利要求范围之内。此申请的参考文献列出了所有参考文献,专利和专利申请的内容。这些专利申请和其他文件的成分,过程以及方法都可以用于本发明实施例。

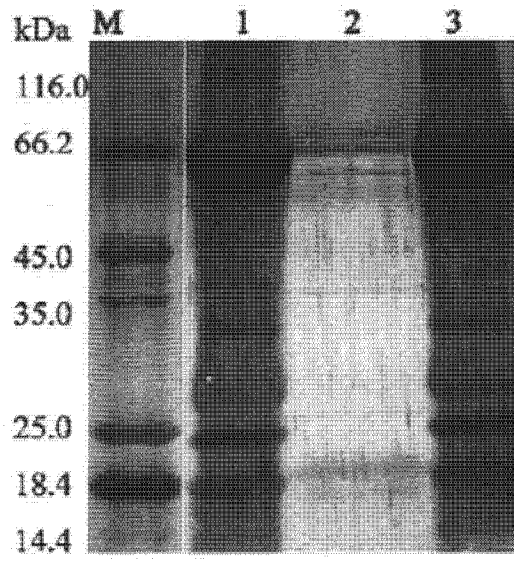


图 1

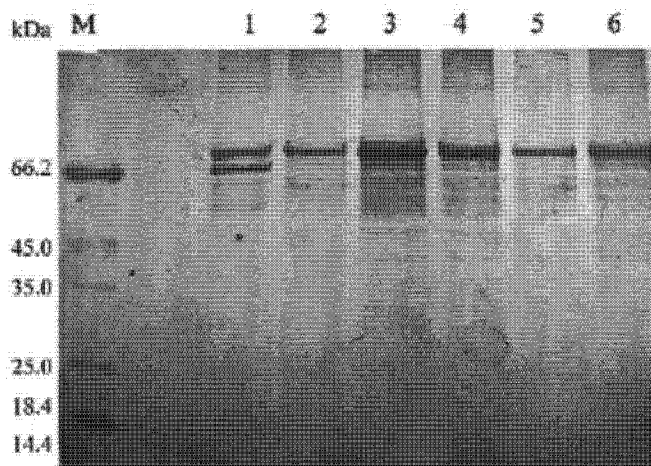


图 2

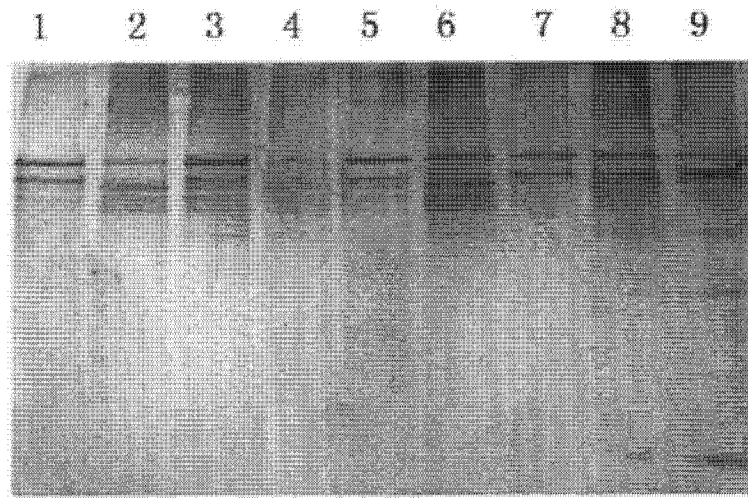


图 3

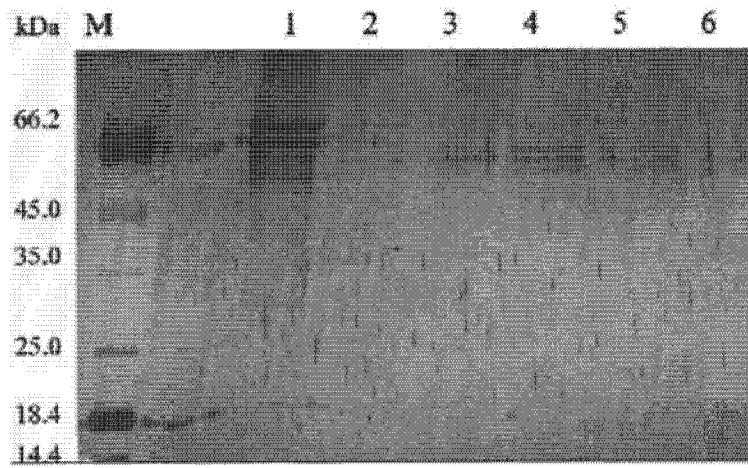


图 4

专利名称(译)	差异多肽检测方法及其应用		
公开(公告)号	CN102460176B	公开(公告)日	2014-09-24
申请号	CN201080028735.5	申请日	2010-05-20
[标]申请(专利权)人(译)	李荣秀		
申请(专利权)人(译)	李荣秀		
当前申请(专利权)人(译)	李荣秀		
[标]发明人	李荣秀		
发明人	李荣秀		
IPC分类号	G01N33/68 G01N33/531 G01N33/543		
CPC分类号	G01N33/6842 Y10T436/25375		
代理人(译)	张睿		
审查员(译)	黄晓丽		
优先权	61/180310 2009-05-21 US		
其他公开文献	CN102460176A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了一种使用一亲和介质从待测样品中去除与对照样品中相似的蛋白/多肽而富集和检测在对照样品和待测样品之间有差异的蛋白/多肽的方法。通过该方法检测得到的差异蛋白/多肽在发现生物标志物和药物靶标，评估健康风险，及个性化用药和治疗方面提供了重要的信息。

