



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 113167782 A

(43) 申请公布日 2021. 07. 23

(21) 申请号 201980077641.8

(22) 申请日 2019.10.28

(30) 优先权数据

62/752,947 2018.10.30 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.05.25

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/058302 2019.10.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/092211 EN 2020.05.07

(71) 申请人 私募蛋白质体公司

地址 美国科罗拉多州

(72) 发明人 D·A·齐基 M·J·韦斯塔科特

(74) 专利代理机构 北京汇知杰知识产权代理有限公司 11587

代理人 杨巍 柴春玲

(51) Int.Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

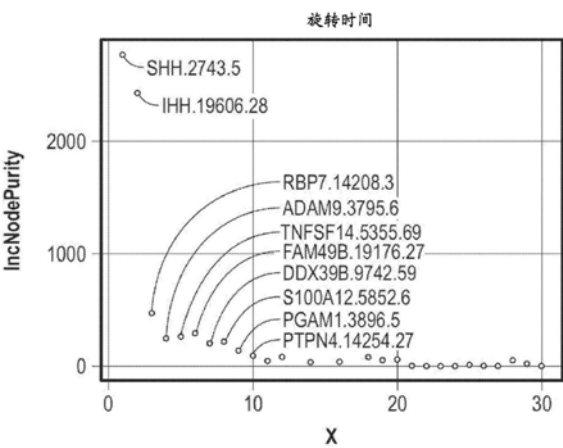
权利要求书13页 说明书31页 附图23页

(54) 发明名称

用于样品质量评估的方法

(57) 摘要

本发明涉及获得质量改善的生物样品的方法。其涵盖鉴定生物样品中由于样品收集、处理和加工中的变化而改变的标记或蛋白质。所述方法还可用于校正疾病生物标记的测量结果的变化。此外,如果确定样品收集方法与预定方案不一致,则所述方法可以允许根据需要拒绝样品或样品组。本文描述了对本领域技术人员有用的其他优点。



1. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中声波刺猬 (SHH) 蛋白质的水平,以及选自由PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和PGAM1、SHH和PTPN4、SHH和TNFSF14、SHH和FAM49B、SHH和RBP7、SHH和IHH、SHH和DDX39B、SHH和S100A12、SHH和PGAM2、SHH和C4A.C4B、SHH和IL21R、SHH和TMEM9或SHH和ADAM9。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括测量SHH、PGAM1和TNFSF14;SHH、PGAM1和RBP7;SHH、PGAM1和PTPN4;SHH、PGAM1和DDX39B;SHH、PGAM1和FAM49B;SHH、PGAM1和IHH;SHH、PGAM1和S100A12;SHH、PGAM1和ADAM9;SHH、PTPN4和RBP7;SHH、PTPN4和TNFSF14;SHH、PTPN4和IHH;SHH、RBP7和FAM49B;SHH、RBP7和IHH;SHH、FAM49B和TNFSF14;SHH、DDX39B和PTPN4;SHH、TNFSF14和S100A12;SHH、IHH和RBP7;SHH、IHH和TNFSF14;SHH、RBP7和TNFSF14;SHH、RBP7和S100A12;SHH、RBP7和DDX39B;SHH、TNFSF14和DDX39B;SHH、S100A12和DDX39B;SHH、FAM49B和S100A12;SHH、IHH和FAM49B;SHH、IHH和DDX39B;SHH、TNFSF14和ADAM9;SHH、FAM49B和DDX39B;SHH、IHH和ADAM9;SHH、PGAM1和C4A.C4B;SHH、PGAM2和RBP7;SHH、PGAM1和IL21R;SHH、PGAM2和PTPN4;SHH、PGAM2和ADAM9;SHH、PGAM2和C4A.C4B;SHH、PGAM2和IL21R;SHH、IHH和PGAM2;SHH、PGAM1和PGAM2;SHH、TMEM9和PGAM2;或SHH、TMEM9和PGAM1。

6. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和PGAM1,以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、IHH、PGAM2、C4A.C4B、IL21R、TMEM9和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

7. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和IHH,以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、IL21R、TMEM9和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

9. 如权利要求8所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

10. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同

蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含声波刺猬(SHH)和选自由PGAM1、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、ADAM9、PGAM2、C4A.C4B、IL21R和TMEM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质;以及

b)用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

11.如权利要求10所述的方法,其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

12.如权利要求10所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

13.如权利要求10所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和PGAM1、SHH和PTPN4、SHH和TNFSF14、SHH和FAM49B、SHH和RBP7、SHH和IHH、SHH和DDX39B、SHH和S100A12、SHH和PGAM2、SHH和C4A.C4B、SHH和IL21R、SHH和TMEM9或SHH和ADAM9。

14.如权利要求10所述的方法,其中所述方法包括测量SHH、PGAM1和TNFSF14;SHH、PGAM1和RBP7;SHH、PGAM1和PTPN4;SHH、PGAM1和DDX39B;SHH、PGAM1和FAM49B;SHH、PGAM1和IHH;SHH、PGAM1和S100A12;SHH、PGAM1和ADAM9;SHH、PTPN4和RBP7;SHH、PTPN4和TNFSF14;SHH、PTPN4和IHH;SHH、RBP7和FAM49B;SHH、RBP7和IHH;SHH、FAM49B和TNFSF14;SHH、DDX39B和PTPN4;SHH、TNFSF14和S100A12;SHH、IHH和RBP7;SHH、IHH和TNFSF14;SHH、RBP7和TNFSF14;SHH、RBP7和S100A12;SHH、RBP7和DDX39B;SHH、TNFSF14和DDX39B;SHH、S100A12和DDX39B;SHH、FAM49B和S100A12;SHH、IHH和FAM49B;SHH、IHH和DDX39B;SHH、TNFSF14和ADAM9;SHH、FAM49B和DDX39B;SHH、IHH和ADAM9;SHH、PGAM1和C4A.C4B;SHH、PGAM2和RBP7;SHH、PGAM1和IL21R;SHH、PGAM2和PTPN4;SHH、PGAM2和ADAM9;SHH、PGAM2和C4A.C4B;SHH、PGAM2和IL21R;SHH、IHH和PGAM2;SHH、PGAM1和PGAM2;SHH、TMEM9和PGAM2;或SHH、TMEM9和PGAM1。

15.如权利要求10所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和PGAM1,以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、IHH和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

16.如权利要求10所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和IHH,以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、PGAM1和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

17.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

18.如权利要求17所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

19.一种方法,其包括:

a)测量在来自受试者的样品中选自由IHH、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12和ADAM9组成的组的至少三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质的水平;以及

b)基于所述三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

20. 如权利要求19所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

21. 如权利要求19所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

22. 如权利要求19所述的方法,其中所述方法包括测量IHH、RB7和PTPN4; IHH、RB7和TNFSF14; IHH、RB7和FAM49B; IHH、RBP7和DDX39B; IHH、RBP7和S100A12; IHH、RB7和ADAM9; IHH、TNFSF14和PTPN4; IHH、TNFSF14和FAM49B; IHH、TNFSF14和DDX39B; IHH、TNFSF14和S100A12; IHH、TNFSF14和ADAM9; IHH、FAM49和PTPN4; IHH、FAM49和TNFSF14; IHH、FAM49和DDX39B; IHH、FAM49和S100A12; IHH、ADAM9和PTPN4; 或IHH、FAM49和ADAM9。

23. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括测量SHH和/或PGAM1。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

25. 如权利要求19所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

26. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对来自受试者的样品中的蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含选自由IHH、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12和ADAM9组成的组的三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

27. 如权利要求26所述的方法,其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

28. 如权利要求26所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

29. 如权利要求26所述的方法,其中所述方法包括测量IHH、RB7和PTPN4; IHH、RB7和TNFSF14; IHH、RB7和FAM49B; IHH、RBP7和DDX39B; IHH、RBP7和S100A12; IHH、RB7和ADAM9; IHH、TNFSF14和PTPN4; IHH、TNFSF14和FAM49B; IHH、TNFSF14和DDX39B; IHH、TNFSF14和S100A12; IHH、TNFSF14和ADAM9; IHH、FAM49和PTPN4; IHH、FAM49和TNFSF14; IHH、FAM49和DDX39B; IHH、FAM49和S100A12; 或IHH、FAM49和ADAM9。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其还包括测量SHH和/或PGAM1。

31. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

32. 如权利要求26所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

33. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1以及选自DDX39B和S100A12的至少一种蛋白质的水平;以及

b) 基于RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和所述至少一种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

34.如权利要求33所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

35.如权利要求33所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

36.如权利要求33所述的方法,其中所述方法包括测量RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和S100A12;或RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和DDX39B。

37.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

38.如权利要求33所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

39.一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和选自DDX39B和S100A12的至少一种蛋白质;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

40.如权利要求39所述的方法,其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

41.如权利要求39所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

42.如权利要求39所述的方法,其中所述方法包括测量RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和S100A12;或RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和DDX39B。

43.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

44.如权利要求39所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

45.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种蛋白质水平用于为所述样品分配质量评分,其中所述质量评分然后用于确定所述样品是分析样品还是非分析样品。

46.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述一种或多种蛋白质水平用于为所述样品分配质量评分,其中所述质量评分然后用于确定所述样品是否用于进一步分析所述样品中的额外蛋白质。

47.一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中PGAM1蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、

C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

48. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中PGAM2蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM1、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

49. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中C4A、C4B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、PGAM1、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

50. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中PTPN4蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PGAM1、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

51. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中TNFSF14蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

52. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中FAM49B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

53. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中RBP7蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

54. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中IHH蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

55. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中DDX39B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋

白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

56. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中S100A12蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

57. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中IL21R蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、DDX39B、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

58. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中TMEM9蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、DDX39B和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

59. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中ADAM9蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和DDX39B组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

60. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同

蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含声波刺猬(SHH)蛋白质和选自由PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

61. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PGAM1蛋白质和选自由SHH、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

62. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PGAM2蛋白质和选自由SHH、PGAM1、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

63. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含C4A.C4B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

64. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PTPN4蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

65. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含TNFSF14蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

66. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含FAM49B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

67. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含RBP7蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

68. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含IHH蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

69. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含DDX39B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

70. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含S100A12蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

71. 一种方法, 其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含IL21R蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、

PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

72. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含TMEM9蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

73. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含ADAM9蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R和TMEM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

74. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中声波刺猬 (SHH) 蛋白质的水平,以及选自由PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

75. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与两种捕获试剂接触,其中一种捕获试剂对SHH蛋白质具有亲和力,且第二捕获试剂对IHH蛋白质具有亲和力;以及

b) 用所述两种捕获试剂测量每种蛋白质的水平。

76. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中SHH和IHH的水平;以及

b) 基于所述SHH和IHH的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

77. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对RBP7蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述RBP7蛋白质的水平。

78. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对FAM94B蛋白质具有亲和力的捕获试

剂测量所述FAM94B蛋白质的水平。

79. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对TNFSF14蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述TNFSF14蛋白质的水平。

80. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对ADAM9蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述ADAM9蛋白质的水平。

81. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对S100A12蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述S100A12蛋白质的水平。

82. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对DDX39B蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述DDX39B蛋白质的水平。

83. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

84. 如权利要求75或76所述的方法,其还包括用对PTPN4蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PTPN4蛋白质的水平。

85. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与四种捕获试剂接触,其中所述四种捕获试剂中的每一种对选自IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4的蛋白质具有亲和力;以及

b) 用所述四种捕获试剂测量每种蛋白质的水平。

86. 如权利要求85所述的方法,其还包括用对SHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述SHH蛋白质的水平。

87. 如权利要求85所述的方法,其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

88. 如权利要求85所述的方法,其还包括用捕获试剂测量选自TMEM9、C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平,每种捕获试剂对所述一种或多种蛋白质中的一种具有亲和力。

89. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平;以及

b) 基于来自所述样品的所述IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

90. 如89所述的方法,其还包括测量SHH蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述SHH蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

91. 如89所述的方法,其还包括测量PGAM1蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述PGAM1蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

92. 如权利要求89所述的方法,其还包括测量选自TMEM9、C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平和基于所述一种或多种蛋白质的水平鉴定所述样品为分析样品或阴性样品。

93. 一种方法,其包括:

a) 使来自人受试者的样品与四种捕获试剂接触,其中所述四种捕获试剂中的每一种对

选自IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4的蛋白质具有亲和力;以及

b) 用所述四种捕获试剂测量所述样品中每种蛋白质的水平。

94. 如权利要求93所述的方法,其还包括用对SHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述SHH蛋白质的水平。

95. 如权利要求93所述的方法,其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

96. 如权利要求93所述的方法,其还包括用对TMEM9蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述TMEM9蛋白质的水平。

97. 如权利要求93所述的方法,其还包括用捕获试剂测量选自C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平,每种捕获试剂对所述一种或多种蛋白质中的一种具有亲和力。

98. 如权利要求93所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

99. 如权利要求93所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

100. 如权利要求93所述的方法,其中所述蛋白质水平用于基于所述蛋白质水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

101. 如权利要求99所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

102. 如权利要求93所述的方法,其中所述捕获试剂选自适体或抗体。

103. 一种方法,其包括:

a) 测量在来自人受试者的样品中IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平;以及

b) 基于来自所述样品的所述IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

104. 如103所述的方法,其还包括测量SHH蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述SHH蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

105. 如103所述的方法,其还包括测量PGAM1蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述PGAM1蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

106. 如103所述的方法,其还包括测量TMEM9蛋白质的水平和基于来自所述样品的TMEM9蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

107. 如权利要求103所述的方法,其还包括测量选自C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平和基于所述一种或多种蛋白质的水平鉴定所述样品为分析样品或阴性样品。

108. 如权利要求103所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

109. 如权利要求103所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

110. 如权利要求109所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

111. 如权利要求103所述的方法,其中所述蛋白质水平的测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

112. 如权利要求103所述的方法,其中所述蛋白质水平用于选自以下的分类器:

决策树;套袋+助推+森林;基于规则推断的学习;巴尔森窗;线性模型;逻辑;神经网络方法;无监督聚类;K-均值;分级上升/下降;半监督学习;原型方法;最近邻;核密度估计;支持向量机;隐马尔可夫模型;玻尔兹曼学习;随机森林模型与所述蛋白质水平一起使用以将样品鉴定为分析样品或阴性样品。

用于样品质量评估的方法

技术领域

[0001] 在医学诊断和药物开发领域中,在来自个体的血液及其他生物样品的组成之间作出比较,以便测定且理解可能与特定状况或疾病有关的那些改变。例如,生物标记可以指示响应某些药物的能力、疾病如癌症的存在或监控过程如对治疗的反应或器官功能方面的改变。一旦确定为可靠和稳固的(robust),这类生物标记测量就可以在临床上使用。

[0002] 关于作为生物标记发现和进一步研究临床效用所需的理想生物标记测量的关键性质包括可靠性和稳固性。

背景技术

[0003] 血液含有用于与损伤或外来因子和感染因子反应的强大的细胞和体液系统。小激发可以诱导先天性免疫系统(补体系统和细胞如巨噬细胞)以释放强大的信号和酶,导致血小板活化且触发血液凝固。由于这些信号与体内过程有关,它们是令人感兴趣的,因为它们可以直接参与防御和修复系统且充当关于疾病的标记。然而,这类过程信号也响应血样制备的效应。仅通过针从血管中抽取血液或使血液暴露于空气可以导致这些机制的非故意活化。例如,改变时间、离心机速度或样品加工步骤的温度可以改变血清或血浆的表观组成,从而使得生理学信息被在收集和加工期间对样品赋予的分析前可变性掩蔽。由于伴随的稳固性的缺乏,这些过程和蛋白质对蛋白质的样品处理中的微妙变化的强易感性可以危害其作为生物标记的用途。

[0004] 在多元生物学中的当前研究努力显示在分析前样品变化(通常称为“批效应)方面的强烈兴趣。目前,样品质量可以测定的程度主要限于视觉上明显的改变,诸如红色指示红细胞裂解,并且混浊指示高脂质或其他污染物。这限制了临床医生可以投入几乎最强健和最稳固的蛋白质测量的信任。证明血清和血浆制剂中的变化的一些复杂和非线性效应的研究在Ostroff,R.等人(2010)J.Proteomics 73:649-666中描述。在此提议基于受样品制备方案中的变化影响的特定蛋白质集的测量的非线性(对数)转化,测定对样品制备方案的顺应性的特定技术。衍生自这些方法的度量可以用于监控顺应性,拒绝样品且作出目标分析物中的校正。这些技术可用于评价在生物标记研究、临床诊断应用、生物库样品质量监控和药物开发中使用的人或动物血样的质量。可以开发类似方法以评估关于许多其他样品类型的样品完整性,所述许多其他样品类型包括尿、脑脊髓液、痰或组织。

发明内容

[0005] 如本文描述,关于生物标记发现和达到临床效应所需的理想生物标记测量的关键性质包括可靠性和稳固性。生物标记的可靠性意指生物标记信号在捕获健康或疾病的潜在生物学中是真实的(即,不是“假阳性”标记)。生物标记的稳固性指示相对于非患病个体,生物标记在患病个体中是差异表达的。为了增加发现真实疾病生物标记的概率,且减少由于样品偏差而鉴定假阳性的机会,用于测量样品质量和一致性的方法是必需的。

[0006] 血浆样品中蛋白质分析物的测量可能会受用于收集和处理样品的方案显著影响。

与特定样品收集和/或处理方案的偏差可以导致样品内蛋白质水平的变化或对测量的其他系统影响,其导致许多分析物(包括阴性对照)的信号变化。这样的偏差可能与用于测量蛋白质分析物的测定类型无关地发生。

[0007] 为了评估临床样品集的质量,已经表征了与方案最明显的偏差的效应。在样品收集和旋转之间,已经评估了蛋白质组成随时间的可变性。此外,在样品旋转和样品倾析的时间之间,已经评估了作为时间的函数的蛋白质组成的可变性。

[0008] 已经鉴定了样品误操作的标志,其可以用作评估临床样品集合的定量分类器。此外,已经为每种分析物产生了度量,所述度量捕获所述分析物的测量对与收集方案的偏差,特别是关于样品收集和旋转之间的延迟以及样品旋转和样品倾析之间的延迟的敏感性。

[0009] 可能想象一些技术对样品处理效应是相对免疫的,但情况并非如此。即使抗体在血液血浆和血清基质的存在下工作良好,并且质谱法可以测量肽和甚至变性的蛋白质,但如果样品中的细胞裂解,或如果血小板脱颗粒,或如果补体系统被活化,则分析物浓度中的急剧改变将在样品已获得后发生,并且任何“高保真度”测量技术将检测到它们。因此,与本文描述的用于测定样品处理变化影响的技术相似的技术可以用于多重测定形式和除蛋白质外的生物标记。这类测定形式可以不同的方式是敏感的,但可以受在样品制备变化方面的相同潜在原因影响。

[0010] 血液处理和加工中的不同步骤的变化可以显示为以重现性方式影响生物样品。每次生物标记蛋白质测量对与多种样品处理和加工步骤相关的参数的敏感性已使用 **SOMAmer[®]** 蛋白质组学阵列进行定量,并且样品处理过程中变化的标记已得到鉴定。样品处理和加工变化已在用于疾病生物标记测量和开发的方法的相同多分析物测量测定内进行定量,以测定哪些处理/加工标记已受影响,并且大约受多少影响。本发明方法也已经使得能够对用于生物标记发现的可接受的样品处理和加工质量度量施加限制。

[0011] 以下编号的段落描述了本发明的其他方面:

[0012] 1. 一种方法,其包括:

[0013] a) 测量在来自人受试者的样品中声波刺猬(Sonic Hedgehog, SHH)蛋白质的水平,以及选自由PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0014] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0015] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0016] 2. 如权利要求1所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0017] 3. 如权利要求1所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0018] 4. 如权利要求1所述的方法,其中所述方法包括测量SHH和PGAM1、SHH和PTPN4、SHH和TNFSF14、SHH和FAM49B、SHH和RBP7、SHH和IHH、SHH和DDX39B、SHH和S100A12、SHH和PGAM2、SHH和C4A、C4B、SHH和IL21R、SHH和TMEM9或SHH和ADAM9。

[0019] 5. 如权利要求1所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH、PGAM1和TNFSF14; SHH、PGAM1和RBB7; SHH、PGAM1和PTPN4; SHH、PGAM1和DDX39B; SHH、PGAM1和FAM49B; SHH、PGAM1和IHH; SHH、PGAM1和S100A12; SHH、PGAM1和ADAM9; SHH、PTPN4和RBP7; SHH、PTPN4和TNFSF14; SHH、PTPN4和IHH; SHH、RBP7和FAM49B; SHH、RBP7和IHH; SHH、FAM49B和TNFSF14; SHH、DDX39B和PTPN4; SHH、TNFSF14和S100A12; SHH、IHH和RBP7; SHH、IHH和TNFSF14; SHH、RBP7和TNFSF14; SHH、RBP7和S100A12; SHH、RBP7和DDX39B; SHH、TNFSF14和DDX39B; SHH、S100A12和DDX39B; SHH、FAM49B和S100A12; SHH、IHH和FAM49B; SHH、IHH和DDX39B; SHH、TNFSF14和ADAM9; SHH、FAM49B和DDX39B; SHH、IHH和ADAM9; SHH、PGAM1和C4A.C4B; SHH、PGAM2和RBP7; SHH、PGAM1和IL21R; SHH、PGAM2和PTPN4; SHH、PGAM2和ADAM9; SHH、PGAM2和C4A.C4B; SHH、PGAM2和IL21R; SHH、IHH和PGAM2; SHH、PGAM1和PGAM2; SHH、TMEM9和PGAM2; 或SHH、TMEM9和PGAM1。

[0020] 6. 如权利要求1所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH和PGAM1, 以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、IHH、PGAM2、C4A.C4B、IL21R、TMEM9和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

[0021] 7. 如权利要求1所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH和IHH, 以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、IL21R、TMEM9和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

[0022] 8. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0023] 9. 如权利要求8所述的方法, 其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时, 和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

[0024] 10. 一种方法, 其包括:

[0025] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含声波刺猬 (SHH) 和选自由PGAM1、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、ADAM9、PGAM2、C4A.C4B、IL21R和TMEM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质; 以及

[0026] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0027] 11. 如权利要求10所述的方法, 其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

[0028] 12. 如权利要求10所述的方法, 其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0029] 13. 如权利要求10所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH和PGAM1、SHH和PTPN4、SHH和TNFSF14、SHH和FAM49B、SHH和RBP7、SHH和IHH、SHH和DDX39B、SHH和S100A12、SHH和PGAM2、SHH和C4A.C4B、SHH和IL21R、SHH和TMEM9或SHH和ADAM9。

[0030] 14. 如权利要求10所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH、PGAM1和TNFSF14; SHH、PGAM1和RBB7; SHH、PGAM1和PTPN4; SHH、PGAM1和DDX39B; SHH、PGAM1和FAM49B; SHH、PGAM1和

IHH; SHH、PGAM1和S100A12; SHH、PGAM1和ADAM9; SHH、PTPN4和RBP7; SHH、PTPN4和TNFSF14; SHH、PTPN4和IHH; SHH、RBP7和FAM49B; SHH、RBP7和IHH; SHH、FAM49B和TNFSF14; SHH、DDX39B和PTPN4; SHH、TNFSF14和S100A12; SHH、IHH和RBP7; SHH、IHH和TNFSF14; SHH、RBP7和TNFSF14; SHH、RBP7和S100A12; SHH、RBP7和DDX39B; SHH、TNFSF14和DDX39B; SHH、S100A12和DDX39B; SHH、FAM49B和S100A12; SHH、IHH和FAM49B; SHH、IHH和DDX39B; SHH、TNFSF14和ADAM9; SHH、FAM49B和DDX39B; SHH、IHH和ADAM9; SHH、PGAM1和C4A.C4B; SHH、PGAM2和RBP7; SHH、PGAM1和IL21R; SHH、PGAM2和PTPN4; SHH、PGAM2和ADAM9; SHH、PGAM2和C4A.C4B; SHH、PGAM2和IL21R; SHH、IHH和PGAM2; SHH、PGAM1和PGAM2; SHH、TMEM9和PGAM2; 或SHH、TMEM9和PGAM1。

[0031] 15. 如权利要求10所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH和PGAM1, 以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、IHH和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

[0032] 16. 如权利要求10所述的方法, 其中所述方法包括测量SHH和IHH, 以及以下选自RBP7、TNFSF14、PTPN4、DDX39B、FAM49B、S100A12、PGAM1和ADAM9的蛋白质中的至少两种。

[0033] 17. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0034] 18. 如权利要求17所述的方法, 其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时, 和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

[0035] 19. 一种方法, 其包括:

[0036] a) 测量在来自受试者的样品中选自IHH、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12和ADAM9组成的组的至少三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质的水平; 以及

[0037] b) 基于所述三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质的水平, 将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0038] 其中, 所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品: 蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法, 并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0039] 20. 如权利要求19所述的方法, 其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0040] 21. 如权利要求19所述的方法, 其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0041] 22. 如权利要求19所述的方法, 其中所述方法包括测量IHH、RBP7和PTPN4; IHH、RBP7和TNFSF14; IHH、RBP7和FAM49B; IHH、RBP7和DDX39B; IHH、RBP7和S100A12; IHH、RBP7和ADAM9; IHH、TNFSF14和PTPN4; IHH、TNFSF14和FAM49B; IHH、TNFSF14和DDX39B; IHH、TNFSF14和S100A12; IHH、TNFSF14和ADAM9; IHH、FAM49和PTPN4; IHH、FAM49和TNFSF14; IHH、FAM49和DDX39B; IHH、FAM49和S100A12; IHH、ADAM9和PTPN4; 或IHH、FAM49和ADAM9。

[0042] 23. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括测量SHH和/或PGAM1。

[0043] 24. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

度。

[0044] 25. 如权利要求19所述的方法, 其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时, 和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

[0045] 26. 一种方法, 其包括:

[0046] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对来自受试者的样品中的蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含选自IHH、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12和ADAM9组成的组的三种、四种、五种、六种、七种或八种蛋白质; 以及

[0047] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0048] 27. 如权利要求26所述的方法, 其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

[0049] 28. 如权利要求26所述的方法, 其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0050] 29. 如权利要求26所述的方法, 其中所述方法包括测量IHH、RB7和PTPN4; IHH、RB7和TNFSF14; IHH、RB7和FAM49B; IHH、RBP7和DDX39B; IHH、RBP7和S100A12; IHH、RB7和ADAM9; IHH、TNFSF14和PTPN4; IHH、TNFSF14和FAM49B; IHH、TNFSF14和DDX39B; IHH、TNFSF14和S100A12; IHH、TNFSF14和ADAM9; IHH、FAM49和PTPN4; IHH、FAM49和TNFSF14; IHH、FAM49和DDX39B; IHH、FAM49和S100A12; 或IHH、FAM49和ADAM9。

[0051] 30. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其还包括测量SHH和/或PGAM1。

[0052] 31. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0053] 32. 如权利要求26所述的方法, 其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时, 和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时; 0.5小时至1.5小时; 1.5小时至3小时; 3小时至9小时; 9小时至24小时或大于24小时。

[0054] 33. 一种方法, 其包括:

[0055] a) 测量在来自人受试者的样品中RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1以及选自DDX39B和S100A12的至少一种蛋白质的水平; 以及

[0056] b) 基于RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和所述至少一种蛋白质的水平, 将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0057] 其中, 所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品: 蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法, 并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0058] 34. 如权利要求33所述的方法, 其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0059] 35. 如权利要求33所述的方法, 其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0060] 36. 如权利要求33所述的方法, 其中所述方法包括测量RB7、FAM49B、TNFSF14、

ADAM9、PGAM1和S100A12；或RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和DDX39B。

[0061] 37. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0062] 38. 如权利要求33所述的方法，其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时；0.5小时至1.5小时；1.5小时至3小时；3小时至9小时；9小时至24小时或大于24小时，和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时；0.5小时至1.5小时；1.5小时至3小时；3小时至9小时；9小时至24小时或大于24小时。

[0063] 39. 一种方法，其包括：

[0064] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触，其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力，所述蛋白质集包含RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和选自DDX39B和S100A12的至少一种蛋白质；以及

[0065] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0066] 40. 如权利要求39所述的方法，其中所述捕获试剂集选自适体、抗体以及适体和抗体的组合。

[0067] 41. 如权利要求39所述的方法，其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0068] 42. 如权利要求39所述的方法，其中所述方法包括测量RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和S100A12；或RB7、FAM49B、TNFSF14、ADAM9、PGAM1和DDX39B。

[0069] 43. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0070] 44. 如权利要求39所述的方法，其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时；0.5小时至1.5小时；1.5小时至3小时；3小时至9小时；9小时至24小时或大于24小时，和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时；0.5小时至1.5小时；1.5小时至3小时；3小时至9小时；9小时至24小时或大于24小时。

[0071] 45. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述一种或多种蛋白质水平用于为所述样品分配质量评分，其中所述质量评分然后用于确定所述样品是分析样品还是非分析样品。

[0072] 46. 如前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述一种或多种蛋白质水平用于为所述样品分配质量评分，其中所述质量评分然后用于确定所述样品是否用于进一步分析所述样品中的额外蛋白质。

[0073] 47. 一种方法，其包括：

[0074] a) 测量在来自人受试者的样品中PGAM1蛋白质的水平，以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平；以及

[0075] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平，将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品；

[0076] 其中，所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品：蛋白质生物标记发现分

析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0077] 48.一种方法,其包括:

[0078] a) 测量在来自人受试者的样品中PGAM2蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM1、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0079] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0080] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0081] 49.一种方法,其包括:

[0082] a) 测量在来自人受试者的样品中C4A、C4B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、PGAM1、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0083] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0084] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0085] 50.一种方法,其包括:

[0086] a) 测量在来自人受试者的样品中PTPN4蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PGAM1、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0087] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0088] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0089] 51.一种方法,其包括:

[0090] a) 测量在来自人受试者的样品中TNFSF14蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0091] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0092] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0093] 52.一种方法,其包括:

[0094] a) 测量在来自人受试者的样品中FAM49B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0095] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0096] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0097] 53.一种方法,其包括:

[0098] a) 测量在来自人受试者的样品中RBP7蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0099] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0100] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0101] 54.一种方法,其包括:

[0102] a) 测量在来自人受试者的样品中IHH蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0103] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0104] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0105] 55.一种方法,其包括:

[0106] a) 测量在来自人受试者的样品中DDX39B蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0107] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、

十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0108] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0109] 56.一种方法,其包括:

[0110] a) 测量在来自人受试者的样品中S100A12蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0111] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0112] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0113] 57.一种方法,其包括:

[0114] a) 测量在来自人受试者的样品中IL21R蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、DDX39B、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0115] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0116] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0117] 58.一种方法,其包括:

[0118] a) 测量在来自人受试者的样品中TMEM9蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、DDX39B和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0119] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0120] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0121] 59.一种方法,其包括:

[0122] a) 测量在来自人受试者的样品中ADAM9蛋白质的水平,以及选自由SHH、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、PGAM1、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和DDX39B组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0123] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0124] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0125] 60.一种方法,其包括:

[0126] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含声波刺猬(SHH)蛋白质和选自由PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0127] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0128] 61.一种方法,其包括:

[0129] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PGAM1蛋白质和选自由SHH、PGAM2、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0130] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0131] 62.一种方法,其包括:

[0132] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PGAM2蛋白质和选自由SHH、PGAM1、C4A.C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0133] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0134] 63.一种方法,其包括:

[0135] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含C4A.C4B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0136] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0137] 64.一种方法,其包括:

[0138] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含PTPN4蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A.C4B、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0139] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0140] 65. 一种方法, 其包括:

[0141] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含TNFSF14蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

[0142] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0143] 66. 一种方法, 其包括:

[0144] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含FAM49B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

[0145] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0146] 67. 一种方法, 其包括:

[0147] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含RBP7蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

[0148] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0149] 68. 一种方法, 其包括:

[0150] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含IHH蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

[0151] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0152] 69. 一种方法, 其包括:

[0153] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含DDX39B蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平; 以及

[0154] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0155] 70. 一种方法, 其包括:

[0156] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触, 其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力, 所述蛋白质集包含S100A12蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、

C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0157] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0158] 71. 一种方法,其包括:

[0159] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含IL21R蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0160] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0161] 72. 一种方法,其包括:

[0162] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含TMEM9蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0163] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0164] 73. 一种方法,其包括:

[0165] a) 使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力,所述蛋白质集包含ADAM9蛋白质和选自由SHH、PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R和TMEM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0166] b) 用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0167] 74. 一种方法,其包括:

[0168] a) 测量在来自人受试者的样品中声波刺猬(SHH)蛋白质的水平,以及选自由PGAM1、PGAM2、C4A、C4B、PTPN4、TNFSF14、FAM49B、RBP7、IHH、DDX39B、S100A12、IL21R、TMEM9和ADAM9组成的组的至少一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平;以及

[0169] b) 基于所述SHH水平和所述一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种、十一种、十二种或十三种蛋白质的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0170] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0171] 75. 一种方法,其包括:

[0172] a) 测量在来自人受试者的样品中HNRNDPDL、PTPN4、PGAM2、C4A、C4B、EIF4A1、IHH、SHH、PGAM1、S100A9和HLA.DRB3的水平;以及

[0173] b) 基于所述HNRNDPDL、PTPN4、PGAM2、C4A、C4B、EIF4A1、IHH、SHH、PGAM1、S100A9和

HLA.DRB3的水平,将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0174] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0175] 76.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0176] 77.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0177] 78.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0178] 79.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

[0179] 80.一种方法,其包括:

[0180] a)使来自人受试者的样品与捕获试剂集接触,其中每种捕获试剂对包含HNRNDPDL、PTPN4、PGAM2、C4A.C4B、EIF4A1、IHH、SHH、PGAM1、S100A9和HLA.DRB3的蛋白质集中的不同蛋白质具有亲和力;以及

[0181] b)用所述捕获试剂集测量所述蛋白质集中每种蛋白质的水平。

[0182] 81.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0183] 82.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0184] 83.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0185] 84.如前述权利要求中任一项所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

[0186] 85.一种方法,其包括:

[0187] a)使来自人受试者的样品与两种捕获试剂接触,其中一种捕获试剂对TMEM9蛋白质具有亲和力,且第二捕获试剂对PGAM1蛋白质具有亲和力;以及

[0188] b)用所述两种捕获试剂测量每种蛋白质的水平。

[0189] 86.一种方法,其包括:

[0190] a)测量在来自人受试者的样品中PGAM1和TMEM9蛋白质的水平;以及

[0191] b)基于所述PGAM1和TMEM9的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0192] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分

析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0193] 87.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对IHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述IHH蛋白质的水平。

[0194] 88.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对C4A.C4B蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述C4A.C4B蛋白质的水平。

[0195] 89.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对SHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述SHH蛋白质的水平。

[0196] 90.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对PGAM2蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM2蛋白质的水平。

[0197] 91.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对ADAM9蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述ADAM9蛋白质的水平。

[0198] 92.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对PTPN4蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PTPN4蛋白质的水平。

[0199] 93.如权利要求84或85所述的方法,其还包括用对IL21R蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述IL21R蛋白质的水平。

[0200] 94.如权利要求85或86所述的方法,其还包括用对RBP7蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述RBP7蛋白质的水平。

[0201] 95.一种方法,其包括:

[0202] a)使来自人受试者的样品与两种捕获试剂接触,其中一种捕获试剂对SHH蛋白质具有亲和力,且第二捕获试剂对IHH蛋白质具有亲和力;以及

[0203] b)用所述两种捕获试剂测量每种蛋白质的水平。

[0204] 96.一种方法,其包括:

[0205] a)测量在来自人受试者的样品中SHH和IHH的水平;以及

[0206] b)基于所述SHH和IHH的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0207] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0208] 97.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对RBP7蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述RBP7蛋白质的水平。

[0209] 98.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对FAM94B蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述FAM94B蛋白质的水平。

[0210] 99.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对TNFSF14蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述TNFSF14蛋白质的水平。

[0211] 100.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对ADAM9蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述ADAM9蛋白质的水平。

[0212] 101.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对S100A12蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述S100A12蛋白质的水平。

[0213] 102.如权利要求95或96所述的方法,其还包括用对DDX39B蛋白质具有亲和力的捕

获试剂测量所述DDX39B蛋白质的水平。

[0214] 103. 如权利要求95或96所述的方法, 其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

[0215] 104. 如权利要求95或96所述的方法, 其还包括用对PTPN4蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PTPN4蛋白质的水平。

[0216] 105. 一种方法, 其包括:

[0217] a) 使来自人受试者的样品与四种捕获试剂接触, 其中所述四种捕获试剂中的每一种对选自IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4的蛋白质具有亲和力; 以及

[0218] b) 用所述四种捕获试剂测量每种蛋白质的水平。

[0219] 106. 如权利要求105所述的方法, 其还包括用对SHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述SHH蛋白质的水平。

[0220] 107. 如权利要求105所述的方法, 其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

[0221] 108. 如权利要求105所述的方法, 其还包括用捕获试剂测量选自TMEM9、C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平, 每种捕获试剂对所述一种或多种蛋白质中的一种具有亲和力。

[0222] 109. 一种方法, 其包括:

[0223] a) 测量在来自人受试者的样品中IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平; 以及

[0224] b) 基于来自所述样品的所述IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0225] 其中, 所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品: 蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法, 并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0226] 110. 如109所述的方法, 其还包括测量SHH蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述SHH蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

[0227] 111. 如109所述的方法, 其还包括测量PGAM1蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述PGAM1蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

[0228] 112. 如权利要求109所述的方法, 其还包括测量选自TMEM9、C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平和基于所述一种或多种蛋白质的水平鉴定所述样品为分析样品或阴性样品。

[0229] 113. 一种方法, 其包括:

[0230] a) 使来自人受试者的样品与四种捕获试剂接触, 其中所述四种捕获试剂中的每一种对选自IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4的蛋白质具有亲和力; 以及

[0231] b) 用所述四种捕获试剂测量所述样品中每种蛋白质的水平。

[0232] 114. 如权利要求113所述的方法, 其还包括用对SHH蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述SHH蛋白质的水平。

[0233] 115. 如权利要求113所述的方法, 其还包括用对PGAM1蛋白质具有亲和力的捕获试剂测量所述PGAM1蛋白质的水平。

[0234] 116. 如权利要求113所述的方法, 其还包括用对TMEM9蛋白质具有亲和力的捕获试

剂测量所述TMEM9蛋白质的水平。

[0235] 117.如权利要求113所述的方法,其还包括用捕获试剂测量选自C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平,每种捕获试剂对所述一种或多种蛋白质中的一种具有亲和力。

[0236] 118.如权利要求113所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0237] 119.如权利要求113所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0238] 120.如权利要求113所述的方法,其中所述蛋白质水平用于基于所述蛋白质水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0239] 121.如权利要求119所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

[0240] 122.如权利要求113所述的方法,其中所述捕获试剂选自适体或抗体。

[0241] 123.一种方法,其包括:

[0242] a) 测量在来自人受试者的样品中IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平;以及

[0243] b) 基于来自所述样品的所述IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品;

[0244] 其中,所述分析样品是用于以下中的一种或多种的样品:蛋白质生物标记发现分析、蛋白质表达水平分析、诊断方法或预后方法,并且所述阴性样品是不用作分析样品的样品。

[0245] 124.如123所述的方法,其还包括测量SHH蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述SHH蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

[0246] 125.如123所述的方法,其还包括测量PGAM1蛋白质的水平和基于来自所述样品的所述PGAM1蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

[0247] 126.如123所述的方法,其还包括测量TMEM9蛋白质的水平和基于来自所述样品的TMEM9蛋白质的水平将所述样品鉴定为分析样品或阴性样品。

[0248] 127.如权利要求123所述的方法,其还包括测量选自C4A、C4B、PGAM2、FAM49B、TNFSF14、S100A12、DDX39B和IL21R的一种或多种蛋白质的水平和基于所述一种或多种蛋白质的水平鉴定所述样品为分析样品或阴性样品。

[0249] 128.如权利要求123所述的方法,其中所述样品选自血液、血浆、血清或尿液。

[0250] 129.如权利要求123所述的方法,其中所述蛋白质水平用于预测自所述人受试者的样品收集与样品离心之间的时间长度和/或样品离心与样品倾析之间的时间长度。

[0251] 130.如权利要求129所述的方法,其中样品收集与样品离心之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时,和/或样品离心与样品倾析之间的所述时间为约0小时至0.5小时;0.5小时至1.5小时;1.5小时至3小时;3小时至9小时;9小时至24小时或大于24小时。

[0252] 131. 如权利要求123所述的方法, 其中所述蛋白质水平的测量使用质谱法、基于适体的测定和/或基于抗体的测定进行。

[0253] 132. 如权利要求123所述的方法, 其中所述蛋白质水平用于选自以下的分类器: 决策树; 套袋+助推+森林; 基于规则推断的学习; 巴尔森窗 (Parzen Windows); 线性模型; 逻辑; 神经网络方法; 无监督聚类; K-均值; 分级上升/下降; 半监督学习; 原型方法; 最近邻; 核密度估计; 支持向量机; 隐马尔可夫模型; 玻尔兹曼学习; 随机森林模型与所述蛋白质水平一起使用以将样品鉴定为分析样品或阴性样品。

附图说明

[0254] 图1示出PGAM1 RFU与旋转时间的关系, 其显示信号随旋转时间的稳固变化。

[0255] 图2示出分析物RFU与旋转时间的关系, 其显示非常低的区别性质。

[0256] 图3示出旋转时间模型中的分析物重要性。在约10种分析物之后, 额外分析物的相对重要性降低到稳定状态。

[0257] 图4示出旋转时间模型中的样本决策树。第一节点在TNFSF14RFU上分割样本, 如果RFU大于756.2, 则其以24小时的预测终止, 否则沿额外的分支向下。

[0258] 图5示出随机森林中预测相对树数量的误差。

[0259] 图6示出单分析物随机森林模型中的预测误差。水平条和垂直条指示类阈值, 并且黑色实线指示真实的预测线。

[0260] 图7示出随机森林和朴素贝叶斯 (Naive Bayes) 中的模型稳定性。尽管朴素贝叶斯模型在单分析物上移位信号时显示连续变化, 但随机森林显示更大稳定性。

[0261] 图8示出当缩放个别分析物时的模型稳定性。当通过效应大小缩放每种分析物时, 将在每个小图标上给出的真实旋转时间与预测时间进行比较。单条线表示当缩放分析物并保持剩余九种恒定时随机森林的预测。

[0262] 图9示出对于蛋白质标记SHH, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0263] 图10示出对于蛋白质标记IHH, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0264] 图11示出对于蛋白质标记RBP7, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0265] 图12示出对于蛋白质标记FAM49B, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0266] 图13示出对于蛋白质标记TNFSF14, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0267] 图14示出对于蛋白质标记ADAM9, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0268] 图15示出对于蛋白质标记S100A12, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0269] 图16示出对于蛋白质标记DDX39B, 在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0270] 图17示出对于蛋白质标记PGAM1,在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0271] 图18示出对于蛋白质标记PTPN4,在不同旋转时间下18个个体的累积分析物分布函数。

[0272] 图19示出分析物模型的性能,其中每个模型的性能对于每个个体和时间点使用预测旋转时间相对于真实旋转时间的RMSE来定量。

[0273] 图20示出基于在模型性能的每个分组中使用的分析物的倍数分数以阐明每种分析物对模型性能的重要性的低性能分析物。

[0274] 图21示出基于在模型性能的每个分组中使用的分析物的倍数分数以阐明每种分析物对模型性能的重要性的中等性能分析物。

[0275] 图22示出基于在模型性能的每个分组中使用的分析物的倍数分数以阐明每种分析物对模型性能的重要性的高性能分析物。

[0276] 图23示出与指定数量的分析物一起使用的模型数量的分布。

具体实施方式

[0277] 现在将详细参考本发明的代表性实施方案。虽然本发明将结合例举的实施方案进行描述,但应当理解本发明并不旨在限制于这些实施方案。相反,本发明旨在涵盖所有替代方案、修饰和等价物,其可以包括在如由权利要求限定的本发明的范围内。

[0278] 本领域技术人员将认识到与本文描述的那些相似或等价的许多方法和材料,其可以用于本发明的实践中并且在本发明的实践的范围内。本发明决不限于所述方法和材料。

[0279] 除非另外定义,否则本文使用的技术和科学术语均具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解相同的含义。虽然可以在本发明的实践或测试中使用与本文描述的那些相似或等价的任何方法、装置和材料,但现在描述优选的方法、装置和材料。

[0280] 本申请中引用的所有出版物、公开的专利文件和专利申请指出本申请所属的一个或多个领域的技术水平。本文引用的所有出版物、公开的专利文件和专利申请在此通过引用并入,其程度与每个个别出版物、公开的专利文件或专利申请特别并个别地指出通过引用并入相同。

[0281] 如包括所附权利要求的本申请中所用,除非内容另有明确说明,否则单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”包括复数参考,并且可与“至少一个/种”和“一个/种或多个/种”互换使用。因此,提及“适体”包括适体混合物,提及“探针”包括探针混合物等等。

[0282] 如本文所用,术语“约”表示无关紧要的数值修饰或变化,从而使得数值与其有关的项目的基本功能未改变。

[0283] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“含有”及其任何变化旨在涵盖非排他性包括,从而使得包含、包括或含有元件或元件列表的过程、方法、过程产物(product-by-process)或物质组合物不仅仅包括这些元件,而是可以包括未明确列出或者此类过程、方法、过程产物或物质组合物固有的其他元件。

[0284] 如本文所用,“生物标记”用于指这样的靶分子,其指示个体中的正常或异常过程或者个体中的疾病或其他状况,或是个体中的正常或异常过程或者个体中的疾病或其他状况的征兆。更具体而言,“生物标记”是与特定生理学状态或过程的存在相关的解剖学、生理

学、生物化学或分子参数,无论是正常的还是异常的,并且如果是异常的,则无论是慢性还是急性的。生物标记是可通过包括实验室测定和医学成像的多种方法检测和测量的。当生物标记是蛋白质时,还能够使用相应基因的表达作为生物样品中的相应蛋白质生物标记、或编码生物标记的基因的甲基化状态或控制生物标记表达的蛋白质的量或存在或不存在的替代量度。

[0285] 关于特定疾病状态的生物标记选择涉及首先鉴定这样的标记,与关于特定医学应用的对照群体相比较,所述标记在疾病群体中具有可测量和统计上显著的差异。生物标记可以包括分泌或脱落的分子,其与疾病发展或进展平行,并且从受疾病或状况影响的组织或者响应疾病或状况从周围组织和循环细胞容易地扩散到血流中。鉴定的生物标记或生物标记集通常是经临床验证的,或显示为用于它就其选择的原始预期用途的可靠指标。生物标记可以包含多种分子,包括小分子、肽、蛋白质和核酸。影响生物标记鉴定的关键问题中的一些包括可用数据的过拟合和所述数据中的偏差,包括样品处理方案变化。

[0286] 如本文所用,“生物标记值”、“值”、“生物标记水平”和“水平”可互换地使用,以指这样的测量,其使用用于检测生物样品中的生物标记的任何分析方法作出,并且指示生物样品中的生物标记、关于生物样品中的生物标记或对应于生物样品中的生物标记的存在、不存在、绝对量或浓度、相对量或浓度、滴度、水平、表达水平、测量水平的比等等。“值”或“水平”的确切性质取决于用于检测生物标记的具体分析方法的特定设计和组分。

[0287] “疾病生物标记对照范围”或“生物标记对照范围”可互换使用,并且意指在非患病或正常个体中的生物标记的正常或非疾病范围。它们通常衍生自对照群体。

[0288] “样品”、“病例”或“测试集”可互换使用,并且意指这样的个别或病例患者,其被怀疑患病或可能患病并且可以最终被确定为患病或非患病的。

[0289] 如本文所用,“样品处理和加工标记”、“处理/加工标记”、“对样品处理和加工方案中的变化敏感的标记”、“对分析前可变性敏感的标记”等等可互换使用,以指这样的标记,其已通过本文描述的方法发现对样品处理和加工方案中的变化是敏感的。“样品处理和加工标记”可以包括或不包括生物标记。

[0290] 样品处理和加工标记可以由正常个体的对照群体中的候选标记鉴定。得自所述对照群体的样品就候选标记进行分析,以选择对样品处理和加工方案中的变化敏感的候选标记。变化包括但不限于在样品测定前,在样品加工时间、加工温度、储存时间、储存温度、储存器皿组成和其他储存条件中的变化;在用于从正常个体中提取样品的方法中的变化,包括但不限于样品对氧的暴露、用于静脉穿刺的针的孔大小、收集装置、收集管添加剂;样品加工中的变化,其包括但不限于离心速度、温度和时间、过滤和滤器孔径;收集容器或器皿、冷冻方法;等等。鉴定为对变化基本上敏感的这些候选标记有资格作为样品处理和加工标记。候选标记包含包括小分子、肽、蛋白质和核酸的多种分子。

[0291] 在一些情况下,可以希望在测定中区分所选处理/加工标记,以去除还可以是疾病标记或关于所讨论的具体疾病的标记的那些。另一方面,如果待使用的处理/加工标记数量很大,例如大于约20、30、50或更多中的任何数量,则在这类情况下可能无需消除处理/加工标记。

[0292] 如本文所用,在本文中可互换使用的“测定”、“检测”等等指使用任何合适方法的分子检测或定量(测量),所述方法包括荧光、化学发光、放射性标记、表面等离子体共振、表

面声波、质谱法、红外光谱法、拉曼光谱法、原子力显微镜检查、扫描隧道显微镜检查、电化学检测方法、核磁共振、量子点等等。“检测”及其变化指生物样品中分子的存在鉴定或观察,和/或分子值的测量。

[0293] 如本文所用,“生物样品”、“样品”和“测试样品”在本文中可互换使用,以指得自或另外衍生自个体的任何材料、生物流体、组织或细胞。这包括血液(包括全血、白细胞、外周血单核细胞、血沉棕黄层、血浆、血清和在滤纸上收集的干燥血斑)、痰、泪、粘液、鼻洗涤物、鼻抽吸物、呼吸物(breath)、尿、精液、唾液、囊液、脑膜液、羊水、腺液、淋巴液、乳头抽吸物、支气管抽吸物、胸膜液、腹膜液、滑液、关节抽吸物、器官分泌物、腹水、细胞、细胞提取物和脑脊髓液。这还包括所有前述的实验上分离的级分。例如,血样可以分级成血清或含有具体类型的血细胞如红血细胞或白血细胞(白细胞)的级分。需要时,样品可以是来自个体的样品的组合,诸如组织和流体样品的组合。术语“生物样品”还包括例如含有匀浆化固体材料的材料,诸如来自粪便样品、组织样品或组织活组织检查。术语“生物样品”还包括衍生自组织培养物或细胞培养物的材料。可以采用用于获得生物样品的任何合适方法;示例性方法包括例如放血、拭子(例如颊拭子)、灌洗、吸液和细针抽吸活组织检查工序。还可以例如通过显微解剖(例如激光捕获显微解剖(LCM)或激光显微解剖(LMD))、膀胱洗涤、涂片(例如PAP涂片)或导管灌洗收集样品。得自或衍生自个体的“生物样品”包括任何这类样品,其已在得自个体后以任何合适的方式进行加工。

[0294] 另外,应认识到生物样品可以通过从许多个体取得生物样品且合并其或合并每个个体的生物样品的等分试样而得到。

[0295] “细胞虐待”包括但不限于细胞污染、细胞裂解、细胞破碎、细胞片段、内部细胞组分等等。

[0296] 如本文使用,“拒绝样品”可以指拒绝样品所属的子集、组或收集物。

[0297] 如本文使用,“SOMAmer”或“缓慢解离速率修饰的适体”指具有改善的解离速率特征的适体。可以使用题为“Method for Generating Aptamers with Improved Off-Rates.”的美国公开号2009/0004667,现在的美国专利号7,947,447中所述的改善的SELEX方法产生SOMAmer。

[0298] 在本申请中,关于样品处理和加工的标记蛋白质的测量已得到测量且发现具有关于样品收集和制备中的变化的确定和重现性行为。

[0299] 此处的中心思想是使用可以在每种样品中测量的许多加工和处理标记蛋白质中的一些,以提供对样品收集和样品制备步骤中的变化的递级反应。在这个意义上,这些处理/加工标记蛋白质信号可以例如用于监控血样加工中的过去事件,诸如在离心前的延迟和在倾析前的延迟。这不同于直接监控目标生物标记蛋白质的降解,并且可以是更灵敏的和在广泛范围上提供信息的。通过使用本文描述的方法,通过将处理/加工标记对于每个过程变化的已知敏感性应用于生物标记的估计值,可能可以表征关于特定目标生物标记蛋白质抽取后的改变的样品质量。通过从表观蛋白质浓度中扣除样品处理组分,样品加工和处理标记的监控还可以用于校正疾病生物标记中每个变化的估计效应。在通过包括抗体测定、质谱法等等多种测量系统评估疾病的生物标记之前,这些样品处理和加工生物标记测量可以用于表征样品。

[0300] 以这种方式,血液的生物学机制中的一些用于充当时钟、定时器和记录装置。为了

这种技术起作用,我们必须能够区分各种机制的体内生物活化,和在血液已离开机体后发生的活化,或“体外”改变。用于区分体内疾病生物标记和处理/加工标记降解与体外遭受的那些的主要工具是同时测量非常多蛋白质的能力,从而使得样品不仅可以对于单一样品处理/加工变化进行表征,还可以对于几种样品处理/加工变化进行表征。指示具体样品处理方案变化的关联蛋白质测量提供样品处理/加工标记的实验对象组。

[0301] 通过评价少数样品以发现在一个或多个场所或是在样品的一些级分中的样品处理和加工技术将使得难以测量目标生物标记蛋白质中的差异,通过我们的系统在每个样品上递送的度量使得能够拒绝来自临床场所的样品集。也就是说,度量允许确定所讨论的样品是否将由于样品处理效应而隐瞒健康或疾病的真实生物学,或样品处理效应是否将产生“假阳性”生物标记结果,其并非真实地反映健康或疾病的潜在生物学。样品收集/加工度量也已提供关于可靠和稳固生物标记发现的窗口。通过选择具有一致样品制备度量的样品组,非故意的偏差可以降到最低并且疾病特异性生物标记发现得到增强。通过与充分校正的标准样品相比较,所述度量还可以用于校正轻度样品处理效应。在临床使用中,样品处理度量可以用于就其收集工序对场所提出建议,以便在广泛进一步评价前拒绝一些样品,并且以便调整提供的测量或报告,以反映由于样品处理产生的任何不确定性。

[0302] 简短地讲,现在可以:

[0303] 1. 确定样品之间的样品处理变化的形式且定量程度。这允许样品集进行分流且分离出适于生物标记发现的样品。

[0304] 2. 鉴定或确定优选的样品处理/加工方案,以基本上减少样品之间的变化或使样品之间的变化降到最低。

[0305] 3. 类似地,收集场所或样品分批的样品处理/加工值可以与参考样品处理/加工生物标记值相比较,以确定个别场所是否顺应优选的收集方案。

[0306] 4. 样品集可以进行检查且与参考样品处理/加工生物标记值相比较,以确定可以存在于病例和对照样品之间的预期的处理和加工变化程度。以这种方式,可以选择样品子集用于在相似样品收集条件的基础上比较,从而使得鉴定的生物标记是潜在生物学的可靠反映。

[0307] 5. 如果确定样品未以顺应优选样品处理/加工方案的方式进行收集,则个别样品可以用于诊断测试加以拒绝。

[0308] 6. 可以调整一个或多个病例样品的蛋白质测量,以反映样品处理/加工可变性。

[0309] 7. 可以选择对样品处理/加工可变性较不敏感的稳固蛋白质子集用于临床或商业用途。

[0310] 因此,本发明包括一种用于定量与理想血样收集条件的偏差效应的方法。这种方法包括在蛋白质组学测定测量前,鉴定受涉及血样抽取和处理的步骤中的变化影响的生物学过程。这些生物学过程通过特定分析物(例如蛋白质)测量列表监控,所述分析物由这类过程独特鉴定且可以加以监控。使用对于待测量的每种蛋白质特异性的蛋白质系数,使用蛋白质丰度的对数测量投影定量地应用这些蛋白质列表。来自这些投影的称为样品加工标记SMV(样品标记变化)的评分可以用于评估在每个样品和每组样品的基础上的工序变化血样收集。

[0311] 在一个方面,本发明保护通过其产生SMV系数的方法。具体地,已鉴定了用于定量

与理想血样收集条件的偏差效应的方法。这种方法包括在蛋白质组学测定测量前,鉴定受涉及血样抽取和处理的步骤中的变化影响的生物学过程。这些生物学过程通过特定蛋白质测量列表监控,所述分析物由这类过程独特鉴定且可以由我们加以监控。使用对于待测量的每种蛋白质特异性的蛋白质系数,使用蛋白质丰度的对数蛋白质测量投影定量地应用这些蛋白质列表。来自这些投影的称为SMV的评分可以用于评估在每个样品和每组样品的基础上的工序变化血样收集。这些生物学过程可以用于监控血样收集条件中的变化,并且特定蛋白质向量可以用于监控且定量这类生物学过程。这提供了样品收集变化的定量,所述样品收集变化在样品自身中记录,并且在收集时无需独立监控诸如时间、温度、离心速度的变量。

[0312] 为了鉴定SMV蛋白质组分,使用靶向实验,其涉及诸如补体活化、血小板活化和细胞裂解的特定生物学过程的生物化学操作。这些实验与以与临床实践一致的方式改变血样收集条件的实验组合,以独特地鉴定可以用于在每个样品的基础上定量评估临床样品收集中的变化的生物学过程。

[0313] 本文描述的技术可以用于关于直接涉及这些生物学过程的蛋白质测量的质量评价样品。这提供了样品质量的定量测量,其可以应用以告知关于这些样品中的蛋白质测量的决定,所述蛋白质可以受样品处理变化影响,而不是简单地直接与此处测量的生物学过程联系。例如,一般蛋白裂解活性可以受补体活化和细胞裂解影响。然而,受累蛋白质不形成简单的闭合组或过程,并且不能用于监控补体和细胞裂解,因为其他蛋白质可以具有在样品之间变化的多种原因,其与诸如疾病过程或肾功能的样品处理变化不相关。

[0314] 本发明是具有系数的蛋白质集监控生物学过程和间接地监控样品收集条件中的变化的用途,其具有超过单一蛋白质的优点,因为它不太可能遭受个体变异的缺点,并且形成可以解释为给出生物学过程活化的稳固估计量的测量总体。对数尺度测量的使用允许监控生物学过程活化中的相对倍数变化,并且可以使用对应于线性空间中的比率的差异,简单地与参考样品相比较。这种对数的使用还含蓄地标定蛋白质测量,从而使得当使用参考样品时,在集或向量中的蛋白质之间的不同浓度范围自动标准化。

[0315] SMV计算对个体血样的直接应用提供了这样的评分,其可以在生物学过程方面或间接地在特定样品收集条件与参考样品的理想条件的偏差方面加以解释。这些评分随后可以用于限定哪些样品符合标准或落入可接受限度内。所述信息可以用于拒绝个别样品。拒绝个别样品在生物标记发现过程中是重要的,以便避免将蛋白质丰度中的变化指定为其处于关于生物标记发现的研究下的疾病或过程,当这类变化可能已在不同样品收集方案或条件下,由待处理样品的个别集的一些集引起时。

[0316] 关于个别样品的SMV评分可以用于分组样品集,其对应于样品收集参数的特定范围。这允许限定匹配样品集,其中来自一个集样品具有与来自先前或不同收集研究的样品可比较的样品收集工序和参数。这种形成匹配集的能力在比较可以在不同条件下收集的样品组之间中是无价的。如果可以确定其他蛋白质中的关联变化,则由个别样品计算的SMV评分还可以用于校正样品处理中的变化,并且基于受过程影响的每种蛋白质中的变化构建数学模型,导致具有不同SMV评分的样品间的变化。

[0317] 在其SMV评分基础上的个别样品拒绝允许进行更敏感的生物标记发现,因为我们已知由临床上不同的个体收集的样品间的差异指那些个体间的差异,而不是样品如何收集

方面的差异。如果所述变化是由于通过其收集血样的工序,而不是由于个体的临床状态,则涉及蛋白质丰度的诊断测试可能是误导的。这通过拒绝不满足SMV评分阈值的样品得到避免,所述SMV评分阈值对应于合理的样品收集工序变化。

[0318] 许多现有样品收集物被样品收集工序中的变化系统地损害。SMV评分可以用于定量样品收集物内或样品收集场所之间的这类变化,并且可以用于在可能误导研究者的变化基础上拒绝整个研究,所述变化例如病例和对照之间的样品收集物中的系统变化。需要仅待测量收集物的子集以评估这类变化;在样品收集物被视为无法接受的情况下,大量节省是可能的。还可以监控在研究的样品采集阶段期间的样品收集物,因此提供正确建议且检测对研究方案的不顺应性。为了监控现有或进行中的研究中的变化,仅需要测量整个收集物的一些子样品。

[0319] 用于监控和评估样品收集变化的这些技术可以应用于研究方案的最佳化,并且可以应用于诸如生物库的大量样品收集努力的经济最大化,其中采用专门样品收集设备和器皿的成本可以与由于使用较不昂贵的方案操作的变化和损害的准确评估相比较。

[0320] 在一些情况下,不能获得原始样品收集物,可能是由于生物样品的最常见收集物的回顾性质。另外,一些比较可能必然在不同场所收集的样品之间和在不同时间收集的样品组之间发生。这些样品收集物将显示收集工序中的差异,所述差异将引起蛋白质组学谱中的变化,其将由预期的差异临床比较混淆。通过在样品组之间产生匹配集,可以比较等价收集的样品子集。

[0321] 血浆样品中蛋白质分析物的测量可能会受用于收集和处理样品的方案显著影响。与特定样品收集和/或处理方案的偏差可以导致样品内蛋白质水平的变化或对测量的其他系统影响,其导致许多分析物(包括阴性对照)的信号变化。这样的偏差可能与用于测量蛋白质分析物的测定类型无关地发生。

[0322] 为了评估临床样品集的质量,已经表征了与方案最明显的偏差的效应。在样品收集和旋转之间,已经评估了蛋白质组成随时间的可变性。此外,在样品旋转和样品倾析的时间之间,已经评估了作为时间的函数的蛋白质组成的可变性。

[0323] 已经鉴定了样品误操作的标志,其可以用作评估临床样品集合的定量分类器。此外,已经为每种分析物产生了度量,所述度量捕获所述分析物的测量对与收集方案的偏差,特别是关于样品收集和旋转之间的延迟以及样品旋转和样品倾析之间的延迟的敏感性。

[0324] 实施例

[0325] 以下实施例仅出于说明性目的提供,并且并非旨在限制如由所附权利要求限定的本申请的范围。本文描述的所有实施例均使用本领域技术人员众所周知且常规的标准技术进行。以下实施例中描述的常规分子生物学技术可以如标准实验室手册中所述进行,所述标准实验室手册诸如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(2001)。

[0326] 实施例1样品收集

[0327] 从一组十八个个体收集血浆样品,其中除了目标变量之外,所有样品收集变量在定义的方案下都保持恒定。从同一个体集中抽取多个管以评估不同个体之间的反应变化。

[0328] 样品收集-步骤

[0329] 1. 检查紫色顶部EDTA管的有效期。如果过期,则用新管替换。

- [0330] 2.将紫色顶部EDTA管用正确的参与者ID和收集日期标记。
- [0331] 3.按照机构指南,遵照标准健康和安全工序进行静脉穿刺。
- [0332] 4.将紫色顶部EDTA管用来自静脉穿刺的样品完全填充。
- [0333] 5.如果实验室同时进行抽取,则按以下顺序收集管:
- [0334] a.血清
- [0335] b.柠檬酸盐血浆
- [0336] c.肝素血浆
- [0337] d.紫色顶部EDTA血浆
- [0338] 6.将紫色顶部EDTA管倒置8-10次,并直立于架子上。

[0339] 旋转时间

[0340] 将样品收集在真空采血管中,且如上文样品收集-步骤中所述倒置。随后,在对十八个个体中的每一个进行样品旋转之前,允许经过六个不同的时间,即0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时。将紫色顶部EDTA管在2200xg (非RPM) 下旋转15分钟。用正确的参与者ID标记微量离心管。将1.0ml血浆移液到微量离心管中。仅抽出血浆层。小心不要在等分时扰乱血沉棕黄层,留下一些血浆并避开细胞层。将微量离心管的顶部封闭,且置于-80℃的冰箱中。

[0341] 倾析/冷冻时间

[0342] 如以上样品收集-步骤和旋转时间至样品旋转中所述收集样品。随后,对于十八个个体中的每一个的旋转样品进行倾析和冷冻之前,允许经过六个不同的时间,即0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时。

[0343] 单变量分析

[0344] 在模型产生之前,对所有分析物信号进行关于旋转时间/倾析时间的单变量分析,以减少模型构建中使用的特征(分析物)的数量(图1至图2)。

[0345] 对于约5K分析物中的每一种计算18个个体的RFU的皮尔逊关联性(方程1),以评估在不同的旋转时间/倾析时间下的一般功能影响。

[0346]
$$\rho = \frac{Cov(X,Y)}{\sigma_X \sigma_Y} \quad (1)$$

[0347] 尽管存在连续的行为,但是可以将分析物表征为高区别性质(图1),其中皮尔逊关联系数>0.95,或具有非常低的区别性质,其中关联系数<1E-3(图2),显示实际上在18个个体中不随旋转时间而变化。

[0348] 具有高旋转时间/倾析时间关联性的少数几种分析物的总结统计数据显示在表1和表2中。表3列出了旋转时间/倾析时间对分析物的重要性。在旋转时间模型中存在分析物的定性组;随旋转时间增加而显示RFU的负或正关联偏移的那些和随不同程度的旋转间时间反应而显示RFU的负或正相关偏移的那些。表4显示所测量的分析物水平和旋转时间之间的关联性(例如,所测量的SHH水平随着从收集到旋转的时间增加而降低(负关联))。

[0349] 使用计算的分析物关联性,我们将可用于旋转时间/倾析时间分类的潜在标记的数量从约5K减少到约100,其计算出皮尔逊关联性>|0.7|。使用所述初始分析物集,我们在构建分类器时进行了进一步的特征减少。

[0350] 实施例2分类器产生

[0351] 选择随机森林分类器以产生样品处理模型。下面是对随机森林、其使用SOMAscan数据的实施以及其相对于另一机器学习技术的强度的简要介绍。

[0352] 随机森林模型

[0353] 简言之,随机森林是如在以下实施例(图4)中的许多(数百)决策树的集合。在节点处的RFU水平将在两个方向上分割树-通向终点和分类预测,或通向另一节点,在所述另一节点处,额外的分析物RFU值将再次分割树并且进一步向下通向多个分支。

[0354] 随机森林的益处在于,其中一个决策树将倾向于预测误差,诸如图4中的多个不正确的分箱,数百棵树上的平均预测将减少任何给定预测上的误差(图5)。

[0355] 模型产生

[0356] 随机森林模型使用Caret (Kuhn, M. (2008). *Caret package*. Journal of Statistical Software, 28 (5)) 和randomForest (A. Liaw和M. Wiener (2002). *Classification and Regression by randomForest*. R News 2 (3), 18-22) 包在 $\log_{10}$ 转换的RFU数据上的R方面进行训练。我们通过评价IncNodePurity (分类中的Gini指数), 即每种分析物对模型性能的相对重要性的量度, 来进行进一步的特征减少。由此我们进一步减少特征以产生在旋转时间/倾析时间方面包括10种最重要的分析物的模型(表3, 图3)。

[0357] 当使用个别分析物评价模型性能时(图6; PGAM1模型), 我们使用两种度量。首先通过使用均方根误差(RMSE)相对于真实时间评估预测时间, 或者通过根据我们认为是良好收集的样品(真实旋转时间/倾析时间小于2小时)或不良收集的样品(真实时间大于2小时)来对取样时间进行阈值处理。使用这种二元分类, 我们可以将预测分配为真阳性(TP), 意味着预测时间准确地描述良好收集的样品, 将预测分配为真阴性(TN), 意味着预测时间准确地描述不良收集的样品, 以及将预测分配为交叉项假阳性(FP)和假阴性(FN)。仅使用PGAM1作为旋转时间的预测因子(图X), 我们观察到二元分类系统中良好水平的敏感性/特异性, 尽管在较长的旋转时间下, 我们经常低估或高估真实值。

[0358] 模型稳定性

[0359] 随机森林模型显示的额外益处是在测定噪声的情况下的稳定性。考虑具有9小时的真实旋转时间的样品(图7)。如果单种分析物(在所述实施例中为SHH)上的RFU值增加/减少了一定的效应大小, 则模型预测(实线曲线)比类似的朴素贝叶斯模型(虚线曲线)更稳定。

[0360] 当对于给定的样品和旋转时间独立地调整10种分析物中的每一种上的RFU时, 我们观察到存在相对稳定点, 在所述点周围实际预测没有显著变化(图8)。在分析物信号的更极端变化下, 我们观察到预测时间的适度跳跃而不是连续变化。

[0361] 二进制分类性能

[0362] 使用2小时的预定截止时间(其中具有低于2小时的实际旋转时间/倾析时间的样品作为“好”样品, 而具有大于2小时的实际旋转时间/倾析时间的样品作为“受损/坏”样品), 将总体敏感性和特异性定义为相对于已知的实际类别而言的每个模型预测。使用这种二元分类, 将预测分配为真阳性(TP), 意味着预测时间准确地描述良好收集的样品, 将预测分配为真阴性(TN), 意味着预测时间准确地描述不良收集的样品, 以及交叉项假阳性(FP)错误地描述不良收集的样品且假阴性(FN)错误地描述良好收集的样品。例如, 基于PGAM1模型(图6), 在实际时间为1.5小时或3小时, 产生表5二元分类性能。

[0363] 混淆矩阵含有以下信息：

[0364]	参考		
	预测	假	真
	假	15	1
	真	3	17

[0365] 其中17个样品被标记为真阳性,15个样品被标记为真阴性,1个样品被标记为假阴性,3个样品被标记为假阳性。

[0366] 模型的敏感性计算为：

$$[0367] \quad \text{敏感性} = \frac{\text{真阳性}}{\text{真阳性} + \text{假阴性}}$$

$$[0368] \quad \text{敏感性} = \frac{\text{真阳性}}{\text{真阳性} + \text{假阴性}}$$

[0369] 并且特异性计算为：

$$[0370] \quad \text{特异性} = \frac{\text{真阴性}}{\text{真阴性} + \text{假阳性}}$$

$$[0371] \quad \text{特异性} = \frac{\text{真阴性}}{\text{真阴性} + \text{假阳性}}$$

[0372] 对于这18个个体,在2个时间点,敏感性/特异性对应于：

$$[0373] \quad \text{敏感性} = \frac{17}{17+1} = 0.94$$

$$[0374] \quad \text{敏感性} = \frac{17}{17+1} = 0.94$$

$$[0375] \quad \text{特异性} = \frac{15}{15+3} = 0.83$$

$$[0376] \quad \text{特异性} = \frac{15}{15+3} = 0.83$$

[0377] 完全敏感性/特异性对18个个体在6种旋转时间/倾析时间下计算。

[0378] RMSE计算

[0379] 均方根误差 (RMSE) 是在每个样品和时间下真实旋转时间相对于预测计算的性能的连续测量。

$$[0380] \quad \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{预测}_i - \text{实际}_i)^2}{N}}$$

$$[0381] \quad \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (\text{预测}_i - \text{实际}_i)^2}{N}}$$

[0382] 对于在示例性PGAM1标记中实际旋转时间为9小时的18个个体,所述方程的分子含有表6的数据。

[0383] 对平方差求和,并且使用N=18个样品,将方程简化为:

[0384]
$$\sqrt{\frac{219.09}{18}} = 3.488 \text{ 小时}$$

[0385]
$$\sqrt{\frac{219.09}{18}} = 3.488 \text{ 小时}$$

[0386] 减小预测时间和实际时间之差降低了RMSE,因此是模型性能的良好指标。在所有时间点和样品上的RMSE为0将对应于等于实际旋转时间的每个预测(即,完美预测因子)。

[0387] 模型训练和性能

[0388] 将18个个体用于训练模型和评价模型性能。“良好”样品定义为具有小于2小时的预测旋转时间以产生二元分类系统。另外,与预测时间相对于实际时间相关联的相对误差是模型性能(RMSE)的额外指标。随机森林模型将预测限制在0小时和24小时之间(其中数据是可用的)。图6表明具有单分析物预测因子的模型相对于作为模型准确度的指标的真实旋转时间而绘制的性能,其通过样品是否被正确地鉴定为真阳性而着色,所述真阳性样品是具有小于2小时的正确预测的旋转时间以及替代分类预测的那些。

[0389] 在图9至图18中发现了18个个体在不同旋转时间下的累积分布函数。

[0390] 分析物模型性能

[0391] 定量分析物的个体和组合的性能的分析总结于表7至表24中。表7显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的单标记模型性能的旋转时间。表8显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的两标记模型性能的旋转时间。表9显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的三标记模型性能的旋转时间。表10显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有声波刺猬(SHH)的模型的旋转时间性能。表11显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有印度刺猬(IHH)的模型的旋转时间性能。表12显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有ADAM9的模型的旋转时间性能。表13显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有DDX39B的模型的旋转时间性能。表14显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有FAM49B的模型的旋转时间性能。表15显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有PGAM1的模型的旋转时间性能。表16显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有PTPN4的模型的旋转时间性能。表17显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有RBP7的模型的旋转时间性能。表18显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有S100A12的模型的旋转时间性能。表19显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有TNFSF14的模型的旋转时间性能。表20显示所有预测时间

点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的单标记模型性能的倾析时间。表21显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的两标记模型性能的倾析时间。表22显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的三标记模型性能的倾析时间。表23显示所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的具有IHH、RBP7、ADAM9和PTPN4的模型的旋转时间性能。表24显示对于具有分析物组合的模型且对于所有预测时间点(旋转前静置样品0小时、0.5小时、1.5小时、3小时、9小时和24小时)的旋转时间性能,所述分析物组合中的一些包含PGAM1和/或PTPN4。

[0392] 分析物模型聚类

[0393] 对于每个个体和时间使用对于预测旋转时间相对于真实旋转时间的RMSE定量每个模型的性能。图19显示1023个模型的RMSE值的分布。所述分布被分成4组模型性能-对于高性能模型,RMSE在0和0.35之间,对于中等范围性能模型,RMSE在0.35至0.5之间,对于低性能模型,RMSE在0.5至1之间,且对于非常低性能模型,RMSE在1至2之间。

[0394] 所用分析物

[0395] 如图20至图22所示,定量在每组模型性能中使用的分析物的倍数分数,以阐明各分析物对模型性能的重要性。

[0396] 模型性能中的分析物组

[0397] 在高性能模型中,所需分析物数量的分布显示在图23中。对于所有分析物,良好性能模型可以使用少至2种分析物。

[0398] 实施例3.样品的多重适体分析

[0399] 本实施例描述了用于分析样品和对照以鉴定表1中列出的样品收集/加工可变性标记的多重适体测定。

[0400] 多重适体测定方法

[0401] 除非另外指明,否则多重适体测定的所有步骤均在室温下进行。

[0402] 适体主混合溶液的制备。

[0403] 将5272种适体分组成三种独特的混合物:Di11、Di12和Di13,分别对应于20%、0.5%和0.005%的血浆或血清样品稀释液。通过测定与每种适体匹配的血浆和血清样品的稀释系列并鉴定产生最大线性范围信号的样品稀释,凭经验确定适体向混合物的分配。适体的分离和与不同稀释度的血浆或血清样品(20%、0.5%或0.005%)混合允许测定跨越 10^7 倍范围的蛋白质浓度。适体主混合物的储备液在HE-吐温缓冲液(10mM Hepes, pH 7.5、1mM EDTA、0.05%吐温20)中以每种适体4nM制备,并冷冻储存在-20℃下。将4271种适体混合在Di11混合物中,将828种适体混合在Di12中,且将173种适体混合在Di13混合物中。使用前,将储备液在HE-吐温缓冲液中稀释至每种适体0.55nM的工作浓度,并等分成个别使用的等分试样。在使用适体主混合物用于Catch-0板制备之前,将工作溶液加热冷却以通过在使用前在95℃下孵育10分钟并且然后在25℃下孵育至少30分钟来再折叠适体。

[0404] Catch-0板制备。

[0405] 将60μL链霉亲和素磁性琼脂糖10%浆液(GE Healthcare, 28-9857)分配到96孔板(Thermo Scientific, AB-0769)的每个孔中。将珠粒用175μL的测定缓冲液(40mM HEPES, pH 7.5、100mM NaCl、5mM KCl、5mM MgCl₂、1mM EDTA、0.05%吐温20)洗涤一次,然后将100μL加

热冷却的适体主混合物添加到每个孔中。在25℃下,在ThermoMixer C摇动器(Eppendorf)上以850rpm摇动下,将板孵育30分钟。孵育30分钟后,将6μL MB封闭缓冲液(50mM D-生物素,在50mM Tris-HCl,pH 8,0.01%吐温中)添加到板的每个孔中,且在摇动下将板进一步孵育2分钟。然后将板用175μL测定缓冲液洗涤,洗涤循环为在ThermoMixer C上以850rpm摇动1分钟,然后在磁体上分离30秒。在去除洗涤溶液后,将珠粒再悬浮于175μL测定缓冲液中且在-20℃下储存直至使用。

[0406] Catch-2珠粒制备。

[0407] 在测定的机器人加工开始之前,将用于多重适体测定的Catch-2步骤的10mg/mL MyOne链霉亲和素C1珠粒(Dynabeads,零件号35002D,Thermo Scientific)的珠粒浆液用MB Prep缓冲液(10mM Tris-HCl,pH8,1mM EDTA,0.4%SDS)整体洗涤5分钟,然后用测定缓冲液洗涤两次。最后一次洗涤后,将珠粒以10mg/mL浓度再悬浮,并且将75μL珠粒浆液分配到Catch-2板的每个孔中。在测定开始时,将Catch-2板置于铝适配器中,且置于Fluent平台上的适当位置。

[0408] 样品解冻和稀释。

[0409] 将在-80℃下储存在Matrix管中的100%血浆或血清样品的65μL等分试样通过在室温下孵育十分钟而解冻。为了便于解冻,将管置于风扇单元的顶部,所述风扇单元使空气循环通过Matrix管架。解冻后,将样品以1000xg离心1分钟,并置于Fluent机器人平台上用于样品稀释。通过将35μL解冻样品转移到含有140μL适当样品稀释剂的96孔板中制备20%样品溶液。血浆的样品稀释剂是50mM Hepes,pH 7.5、100mM NaCl、8mM MgCl₂、5mM KCl、1.25mM EGTA、1.2mM 胍、37.5μM Z-Block和1.2%吐温20。血清样品稀释剂含有75μM Z-block,其他组分的浓度与在血浆样品稀释剂中的相同。在Fluent机器人上使用连续稀释在测定缓冲液中随后稀释,制备0.5%和0.005%稀释样品。为了制备0.5%样品稀释液,通过将45μL的20%样品与180μL的测定缓冲液混合将20%样品中间稀释成4%样品,然后通过将25μL的4%稀释样品与175μL的测定缓冲液混合制备0.5%样品。为了制备0.005%的样品,通过将20μL 0.5%的样品与180μL测定缓冲液混合制备0.05%的中间稀释液,然后通过将20μL 0.05%样品与180μL测定缓冲液混合制备0.005%样品。

[0410] 样品结合步骤。

[0411] 通过将适体混合物固定在如上所述的链霉亲和素磁性琼脂糖珠粒上制备的Catch-0板。将冷冻的板在25℃下解冻30分钟,且用175μL测定缓冲液洗涤一次。将100μL的每种样品稀释液(20%、0.5%和0.005%)添加到含有具有三种不同适体主混合物(分别为Di11、Di12和Di13)的珠粒的板中。然后将Catch-0板用铝箔密封件(Microseal 'F' 箔,Bio-Rad)密封,且置于设定在850rpm,28℃下的4-板旋转摇动器(PHMP-4,Grant Bio)中。样品结合步骤进行3.5小时。

[0412] 在Fluent机器人上进行多重适体测定加工。

[0413] 在完成样品结合步骤之后,将Catch-0板置于铝板适配器中,且置于机器人平台上。使用温度控制板进行磁珠洗涤步骤。对于所有机器人加工步骤,除了如下所述的Catch-2洗涤,将板设定在25℃温度下。将板用175μL测定缓冲液洗涤4次,每个洗涤循环程序设定为以1000rpm摇动板至少1分钟,随后分离磁珠至少30秒,然后进行缓冲液抽吸。在最后一次洗涤循环期间,标签试剂通过将100x标签试剂(EZ-Link NHS-PEG₄-生物素,零件号21363,

Thermo, 在无水DMSO中制备的100mM溶液) 以1:100在测定缓冲液中稀释制备并倒入机器人平台上的槽中。将100μL标签试剂添加到板中的每个孔中, 且在以1200rpm摇动下孵育5分钟, 以使捕获在珠粒表面上的蛋白质生物素化。通过将175μL淬灭缓冲液(在测定缓冲液中的20mM甘氨酸) 添加到每个孔中淬灭生物素化反应。将板静置孵育3分钟, 然后用175μL测定缓冲液洗涤4次, 洗涤是在与上述相同的条件下进行。

[0414] 光裂解和动力学激发。

[0415] 最后一次洗涤板后, 向板的每个孔中添加90μL光裂解缓冲液(在测定缓冲液中的2 μM寡核苷酸竞争物; 所述竞争物具有5' - (AC-Bn-Bn)₇-AC-3' 的核苷酸序列, 其中Bn指示5-位苄基取代的脱氧尿苷残基)。将板移至Fluent平台上的光裂解分站。所述分站由BlackRay光源(UVP XX系列台灯, 365nm) 和三个Bioshake 3000-T摇动器(Q Instruments) 组成。将板在1000rpm摇动下照射20分钟。

[0416] Catch-2珠粒捕获。

[0417] 在光裂解过程结束时, 通过磁性分离从Catch-2板中去除缓冲液, 用100μL测定缓冲液洗涤板一次。从稀释3板开始, 从每个Catch-0板中去除含有适体-蛋白质复合物的光裂解洗脱液。首先将所有90μL的溶液转移到位于具有升起的磁体的摇动器上的Catch-1洗脱液板, 以捕获可能已经被吸出的任何链霉亲和素磁性琼脂糖珠粒。之后, 将溶液转移到Catch-2板, 且将板在25℃下以1400rpm摇动下孵育3分钟。孵育3分钟后, 将磁珠分离90秒, 从板中去除溶液, 且将光裂解的Di12板溶液添加到板中。按照相同的方法, 添加来自Di11板的溶液并将其孵育3分钟。在3分钟孵育结束时, 将6μL的MB封闭缓冲液添加到磁珠悬浮液中, 且在25℃下以1200rpm摇动下孵育珠粒2分钟。在所述孵育后, 将板转移到预设到38℃温度的不同摇动器中。在去除溶液之前, 将磁珠分离2分钟。然后, 用175μL MB洗涤缓冲液(在测定缓冲液中的20%甘油) 洗涤Catch-2板4次, 每个洗涤循环程序设定为以1200rpm摇动珠粒1分钟, 且允许珠粒在磁体上分配3.5分钟。在最后的珠粒分离步骤期间, 将摇动器温度设定为25℃。然后用175μL测定缓冲液洗涤珠粒一次。对于所述洗涤步骤, 将珠粒以1200rpm摇动1分钟, 然后允许在磁体上分离2分钟。洗涤步骤后, 使用洗脱缓冲液(1.8M NaClO₄、40mM PIPES, pH 6.8, 1mM EDTA, 0.05% Triton X-100) 从纯化的适体-蛋白质复合物洗脱适体。使用75μL洗脱缓冲液在25℃下以1250rpm摇动珠粒的情况下进行洗脱10分钟。将70μL洗脱液转移到Archive板且在磁体上分离以分配可能已被吸出的任何磁珠。将10μL洗脱的物质转移到黑色一半区域板上, 在测定缓冲液中以1:5稀释, 且用于测量被监控为内部测定QC的Cy3荧光信号。将20μL洗脱的物质转移到含有5μL杂交封闭液(Oligo aCGH/ChIP-on-Chip杂交试剂盒, 大体积, Agilent Technologies 5188-5380, 含有与Agilent阵列上的拐角标记探针互补的一串花青3-标记的DNA序列) 的板。将所述板从机器人平台上移出, 并进一步加工以进行杂交(见下文)。使用铝箔将具有剩余洗脱溶液的Archive板热封, 且在-20℃下储存。

[0418] 杂交。

[0419] 将25μL 2x Agilent杂交缓冲液(Oligo aCGH/ChIP-on-chip杂交试剂盒, Agilent Technologies, 零件号5188-5380) 手动移液到板的含有洗脱样品和阻断缓冲液的每个孔中。将40μL的所述溶液手动移液到杂交垫片载玻片(杂交垫片载玻片-每个载玻片8个微阵列形式, Agilent Technologies) 的每个“孔”中。根据制造商的方案, 将定制的SurePrint

G3 8x60k Agilent微阵列载玻片置于垫片载玻片上,每个阵列含有与每种适体互补的10个探针。将每个组装件(启用杂交盒试剂盒-SureHyb,Agilent Technologies)紧紧夹住,并在55℃下以20rpm旋转的情况下,将其装载到杂交烘箱中19小时。

[0420] 杂交后洗涤。

[0421] 载玻片洗涤使用Little Dipper Processor (650C型,Scienge) 进行。将大约700mL洗涤缓冲液1 (Oligo aCGH/ChIP-on-chip洗涤缓冲液1,Agilent Technologies) 倒入大玻璃染色皿中,且用于将微阵列载玻片与垫片载玻片分离。一旦拆开,就将载玻片迅速转移到在Little Dipper上在含有洗涤缓冲液1的浴中的载玻片架中。在通过磁力搅拌棒混合的情况下,将载玻片在洗涤缓冲液1中洗涤五分钟。然后将载玻片架转移到具有37℃洗涤缓冲液2 (Oligo aCGH/ChIP-onchip洗涤缓冲液2,Agilent Technologies) 的浴中,且允许在搅拌下孵育五分钟。将载玻片架从第二浴中缓慢移出,然后转移到含有乙腈的浴中,且在搅拌下孵育五分钟。

[0422] 微阵列成像。

[0423] 用微阵列扫描仪 (Agilent G4900DA微阵列扫描仪系统,Agilent Technologies) 在花青3-通道中以3μm分辨率在100%PMT设置和启用的20位选项下对微阵列载玻片成像。使用Agilent Feature Extraction软件 (10.7.3.1版本或更高版本) 以GE1_1200_Jun14方案处理所得tiff图像。

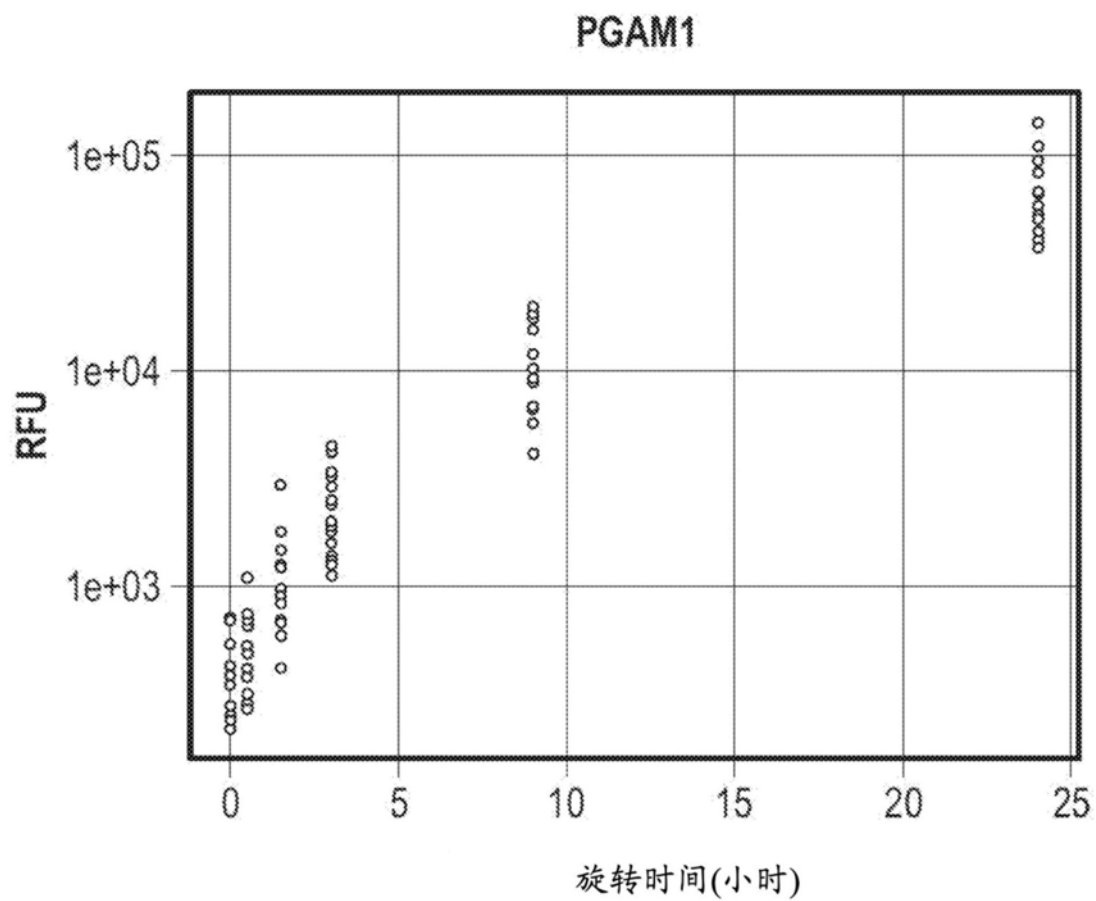


图1

非关联分析物

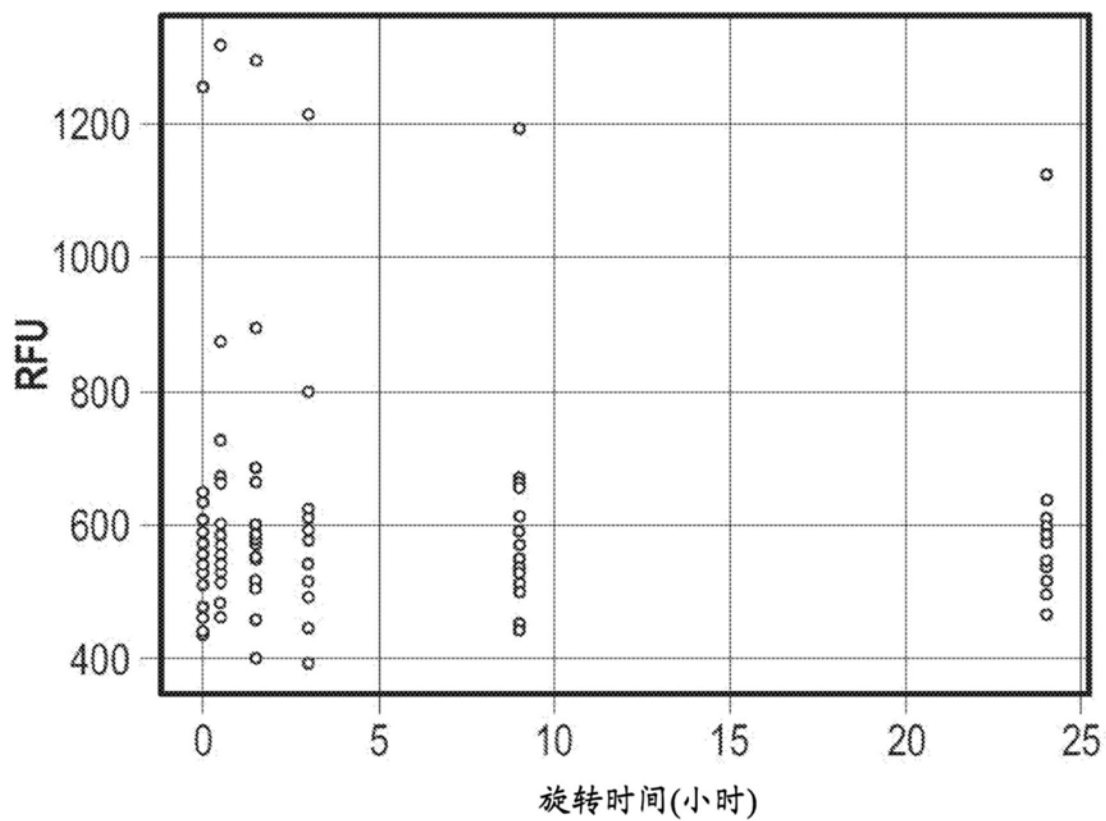


图2

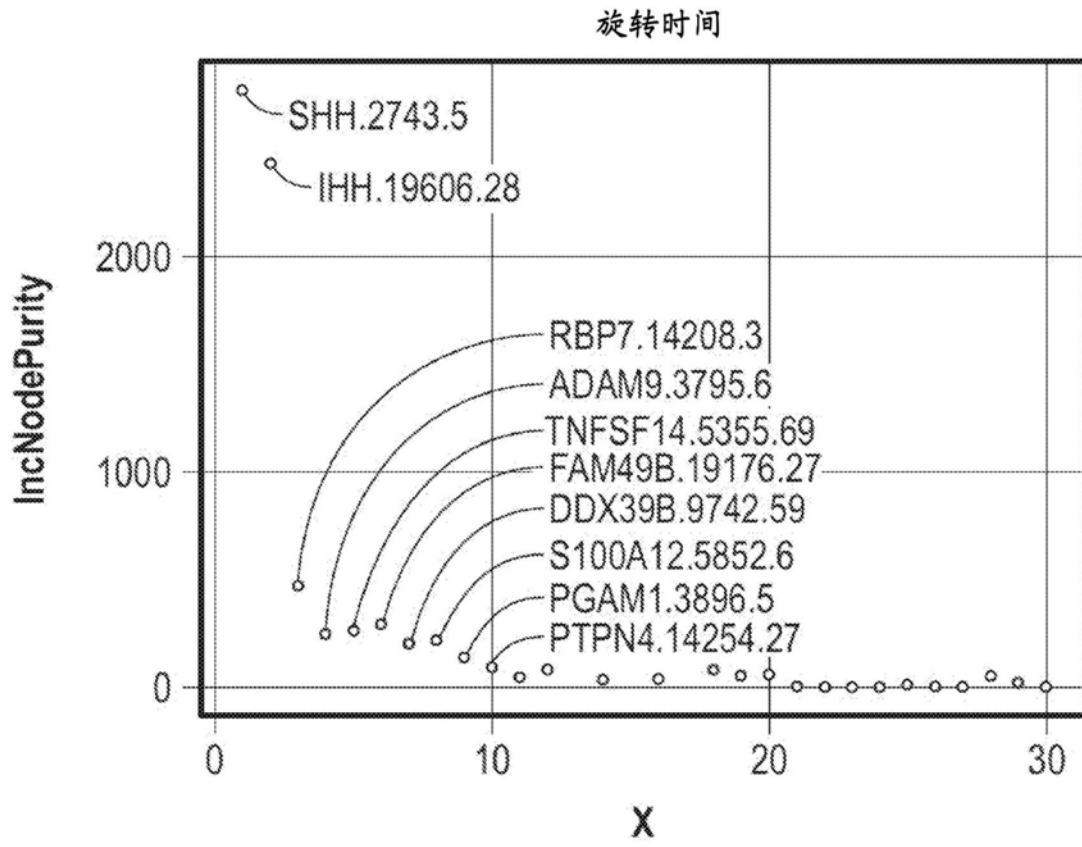


图3

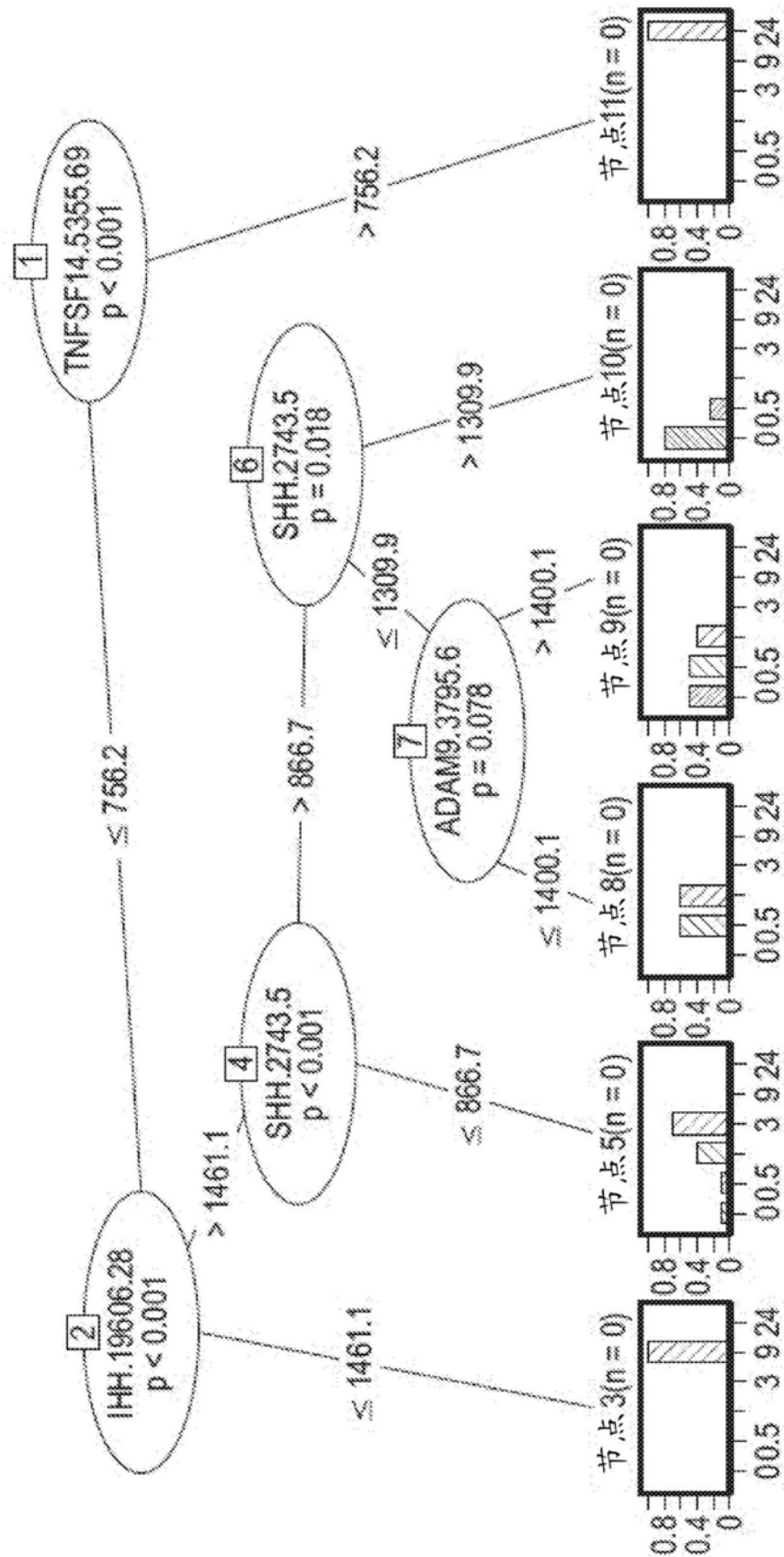


图4

树数量相对误差(旋转时间)

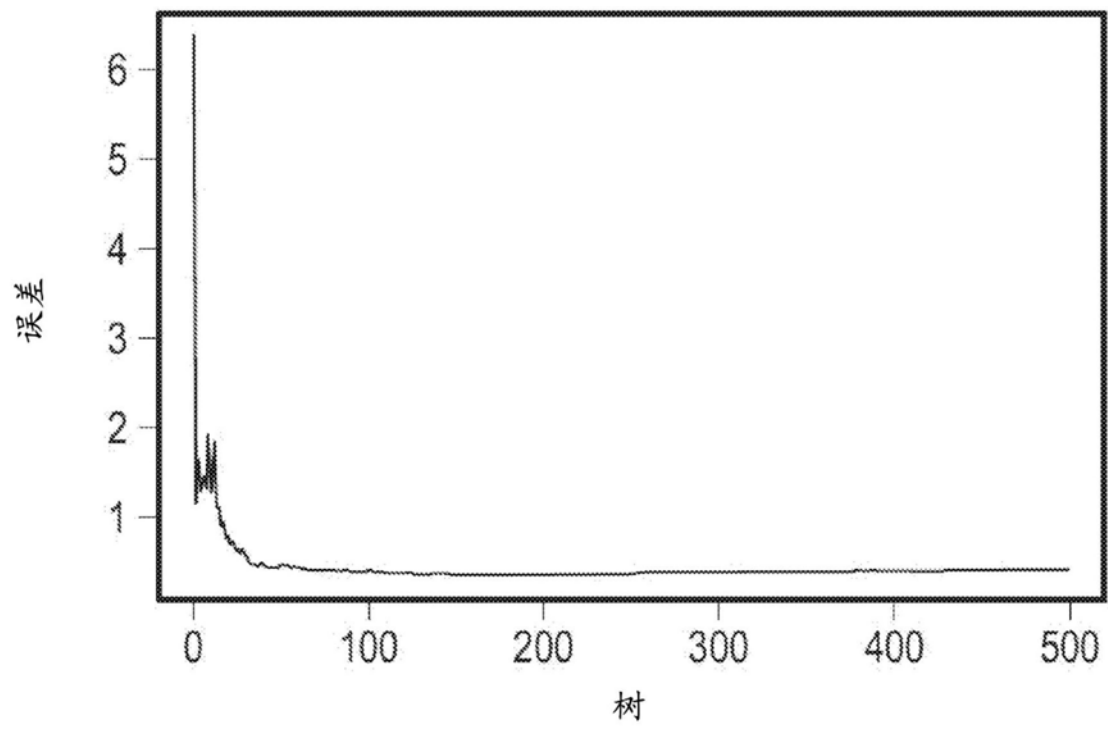


图5

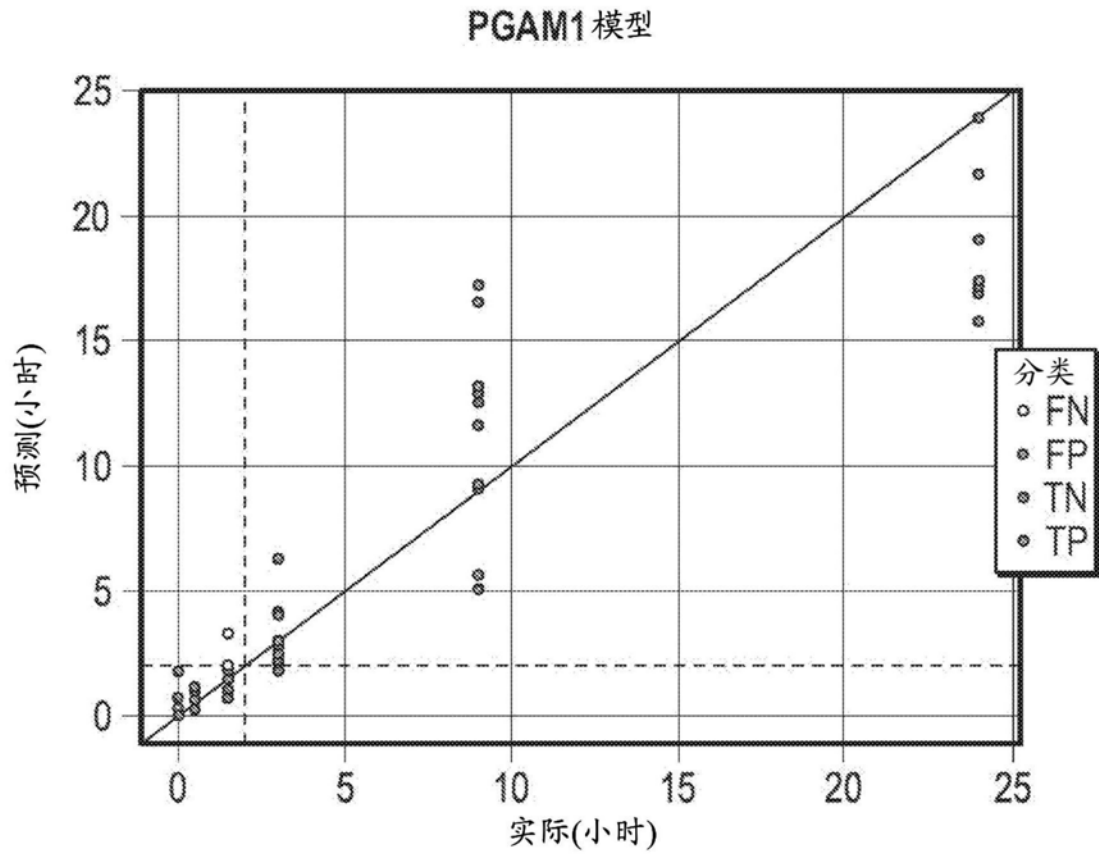


图6

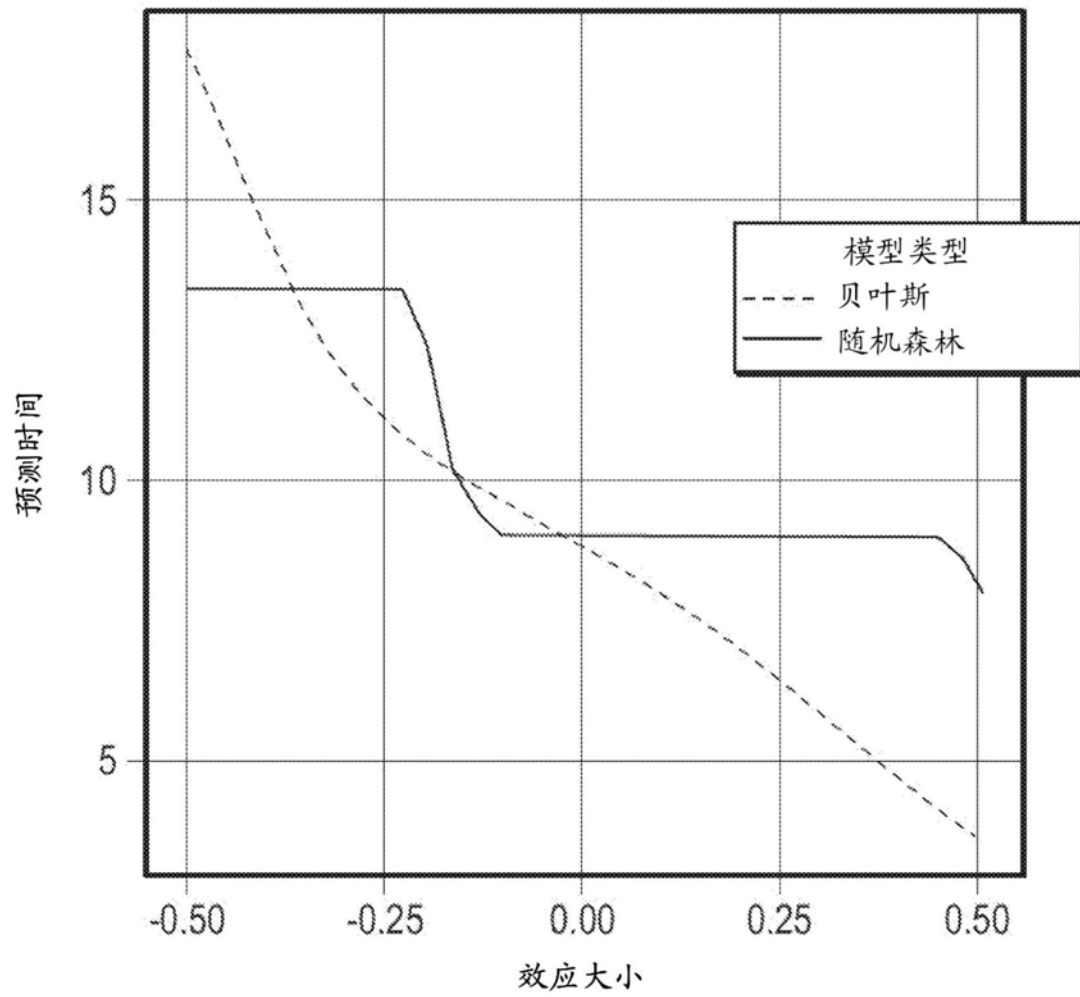


图7

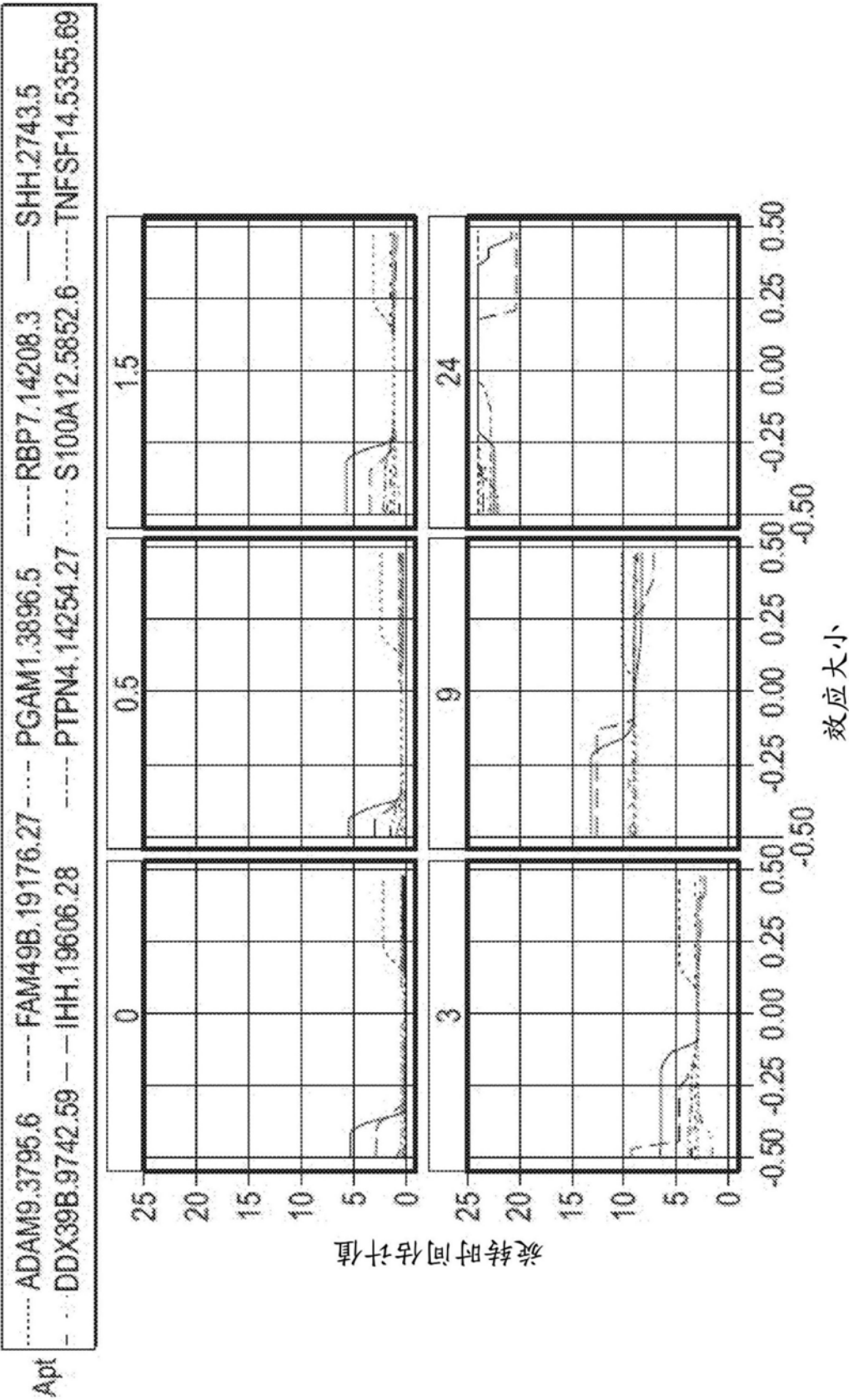


图8

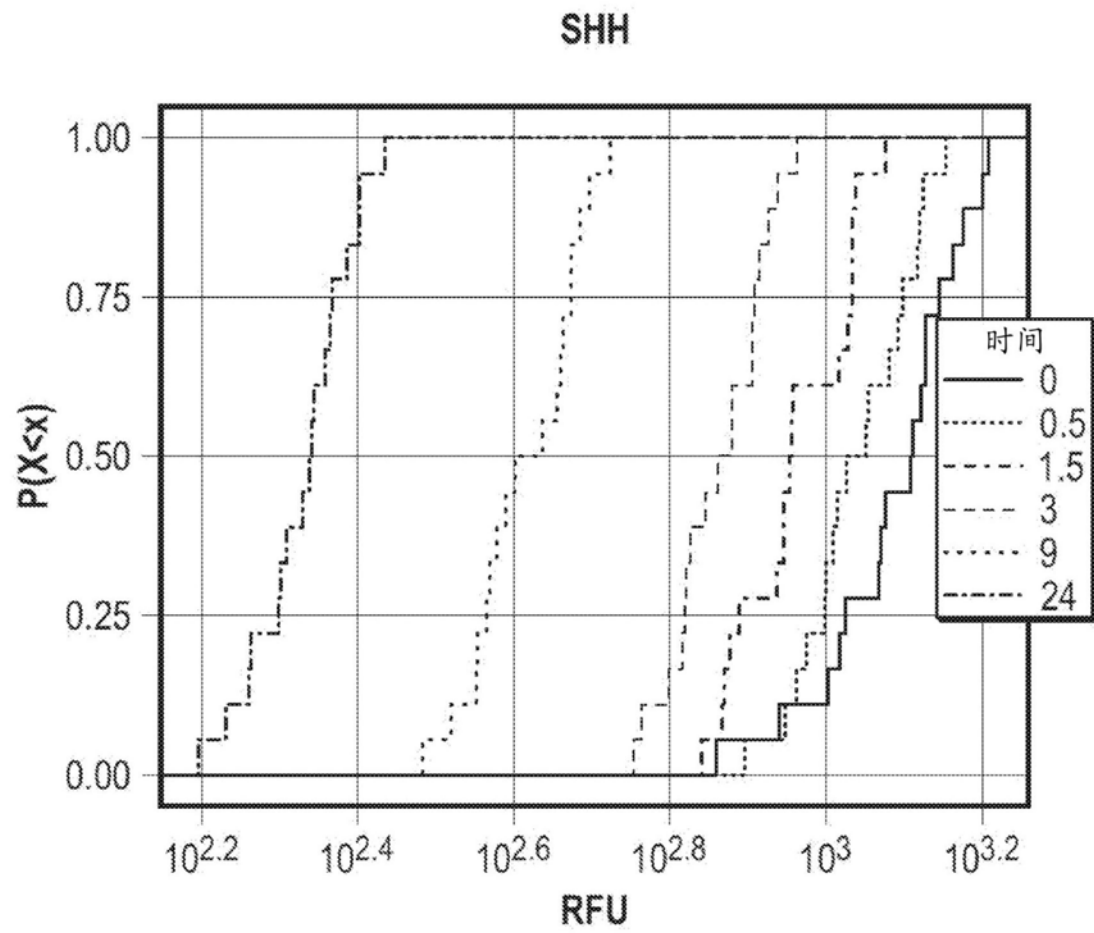


图9

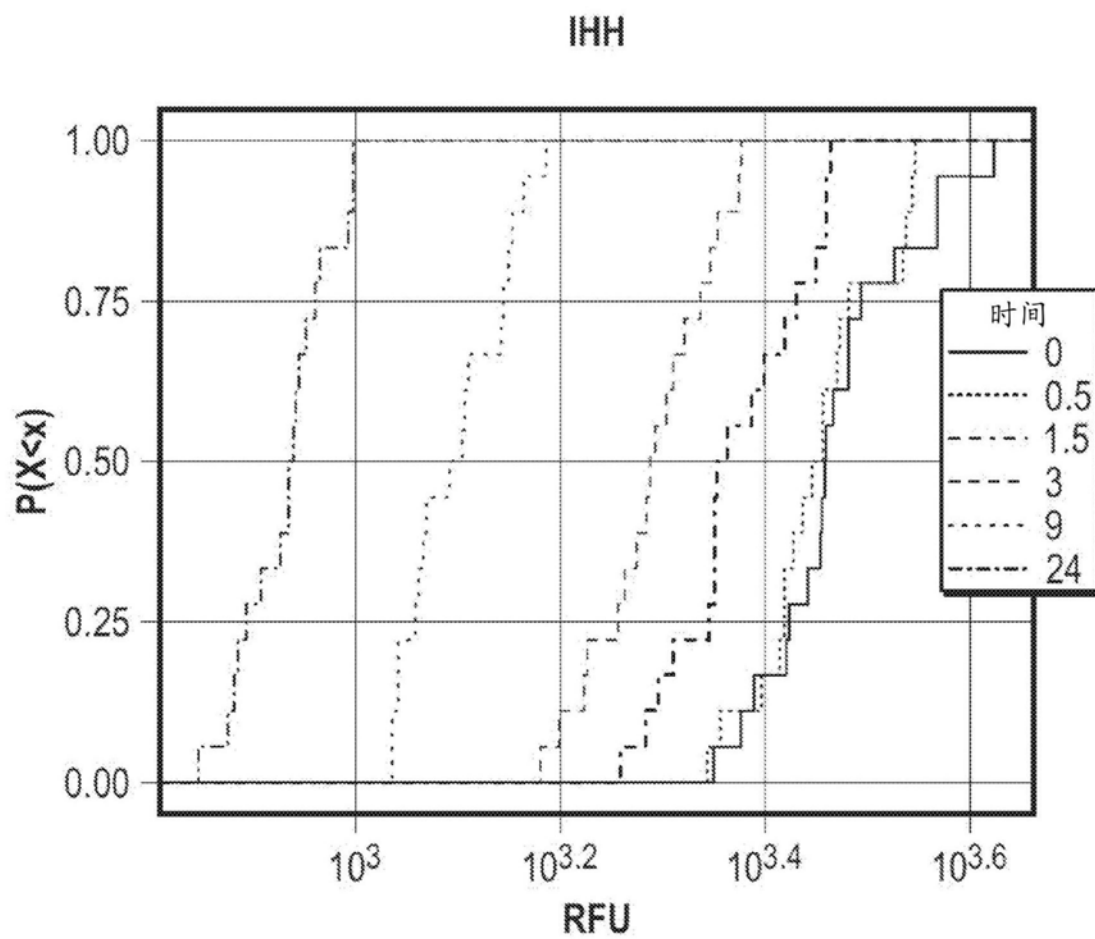


图10

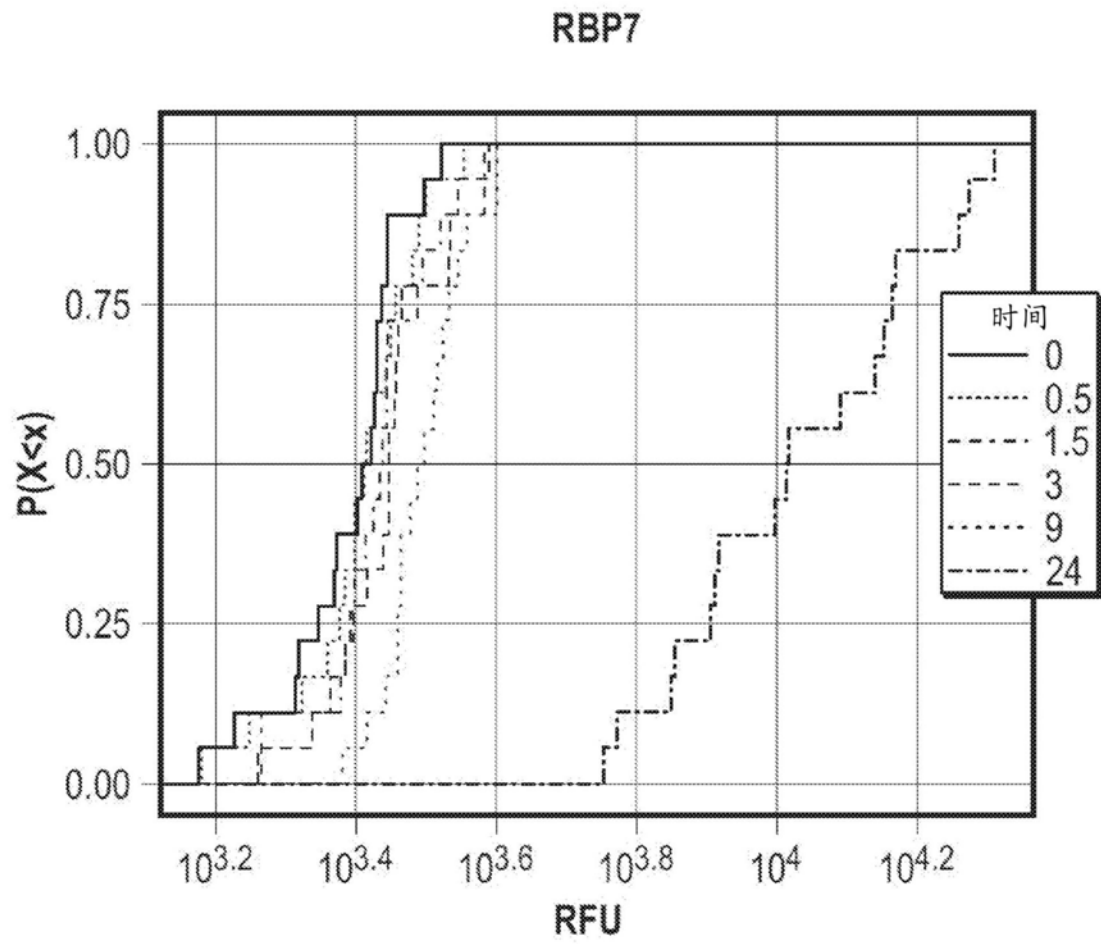


图11

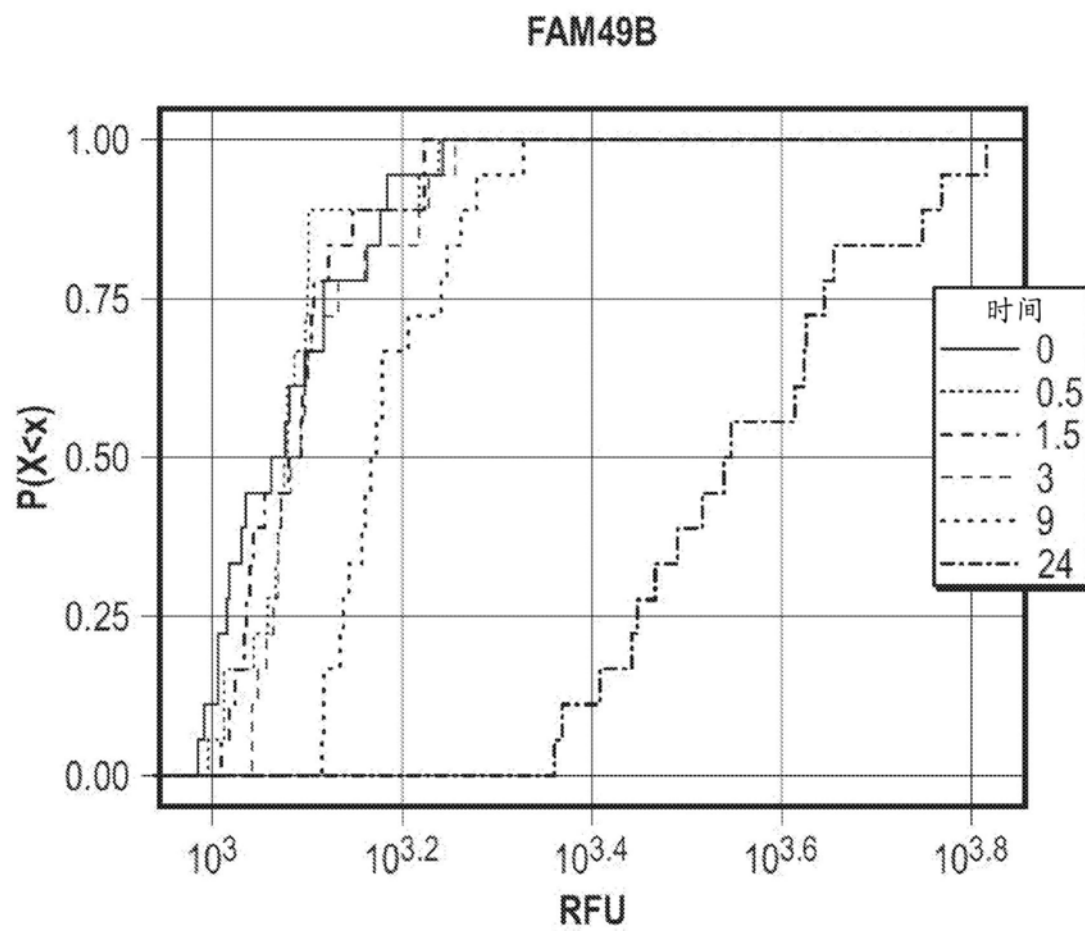


图12

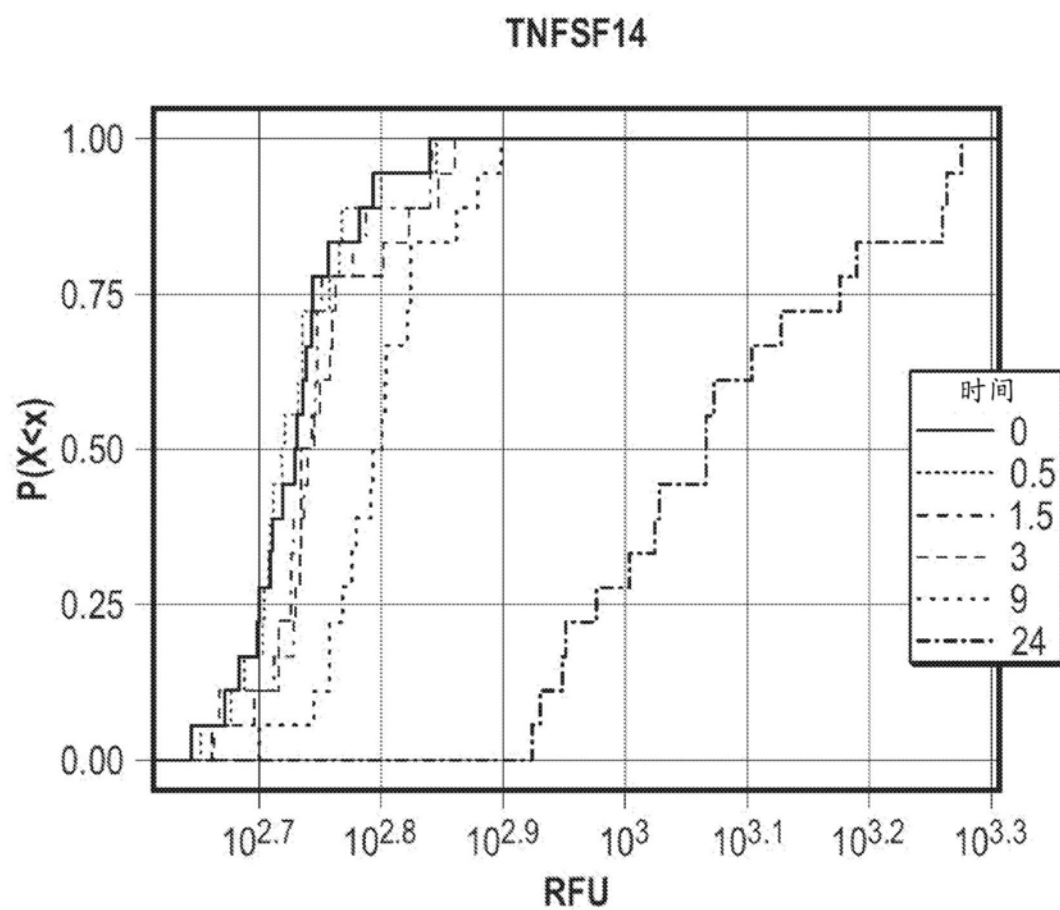


图13

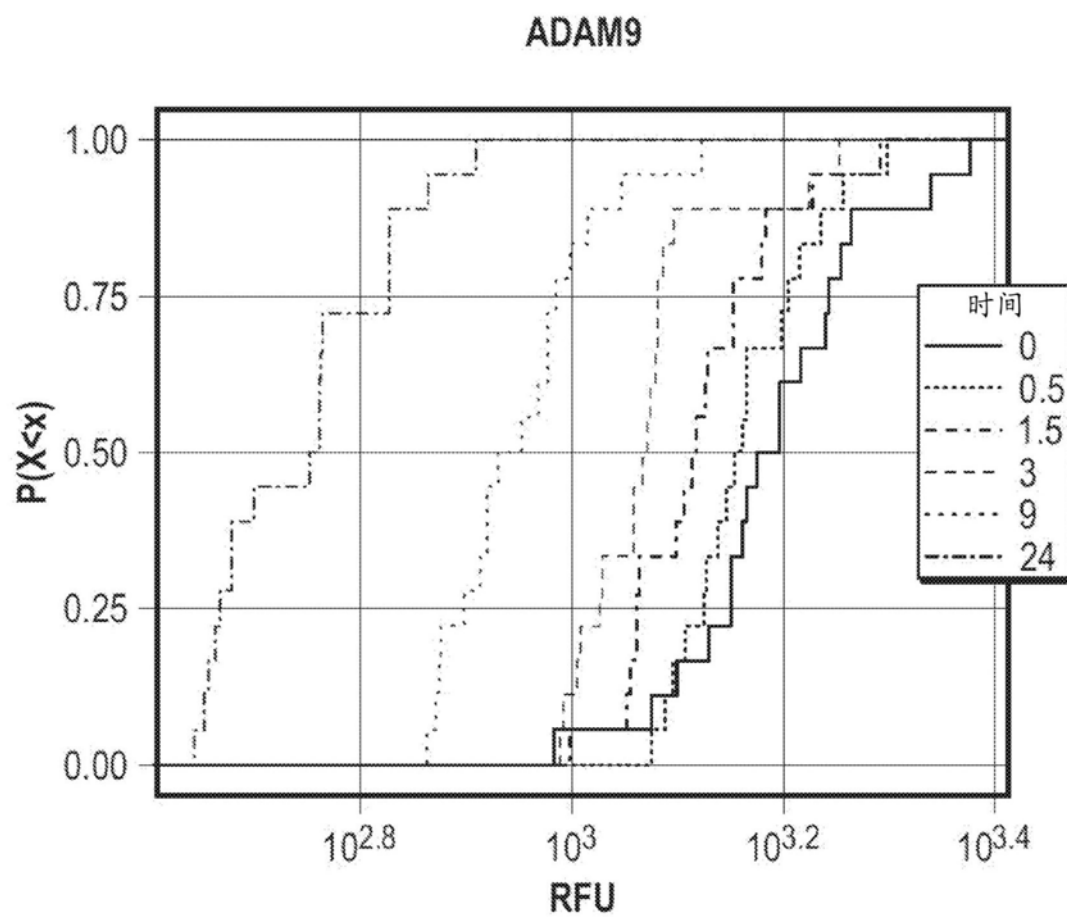


图14

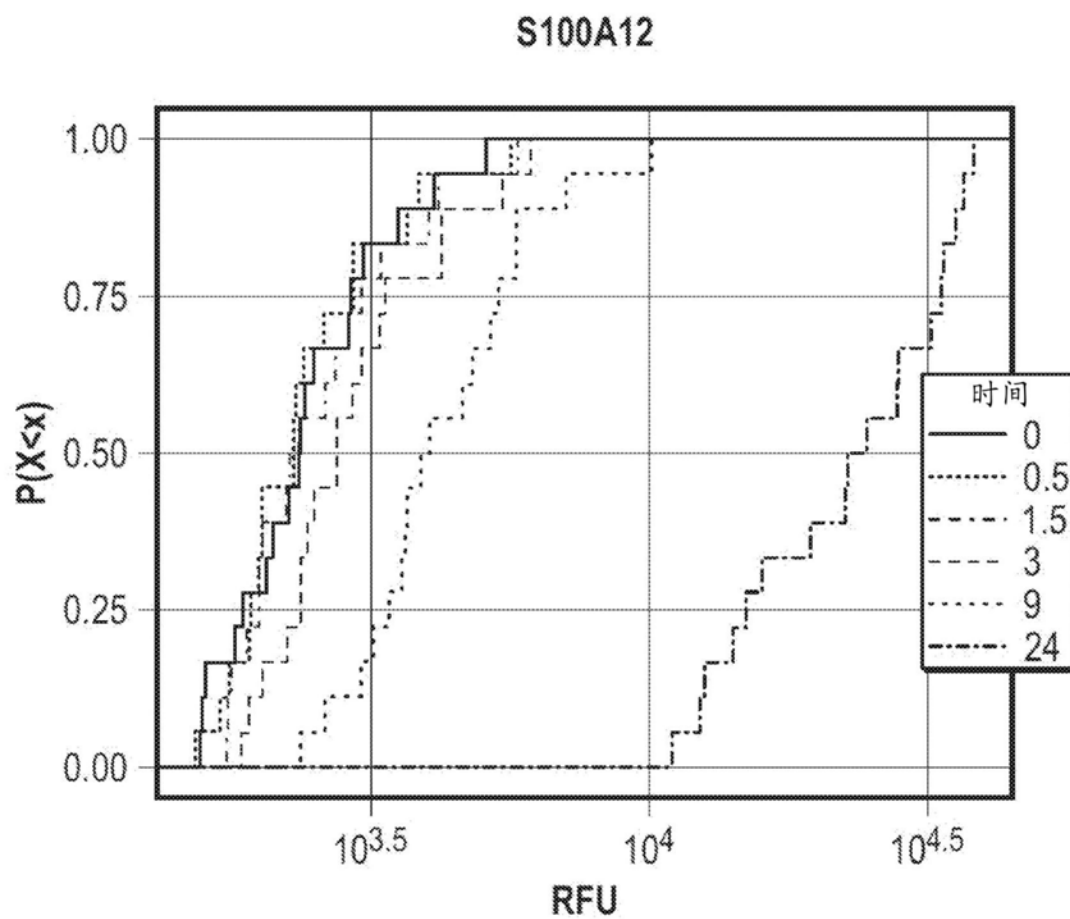


图15

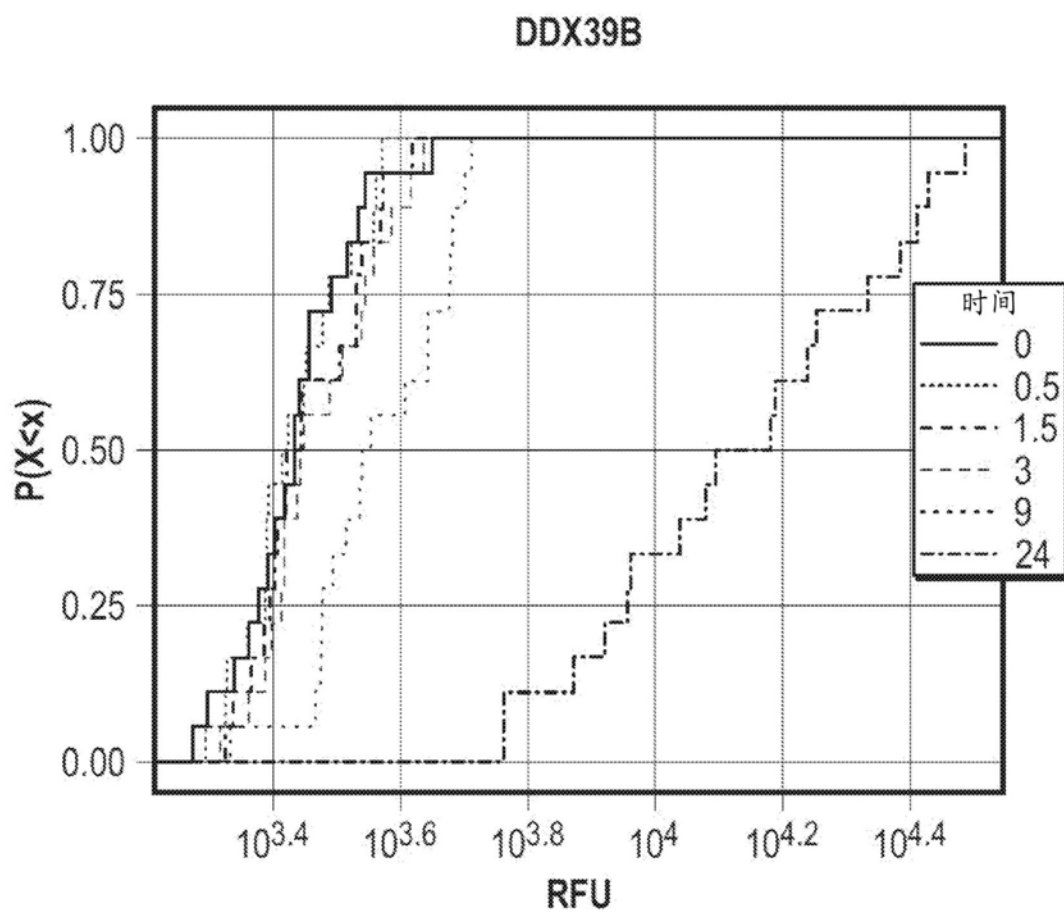


图16

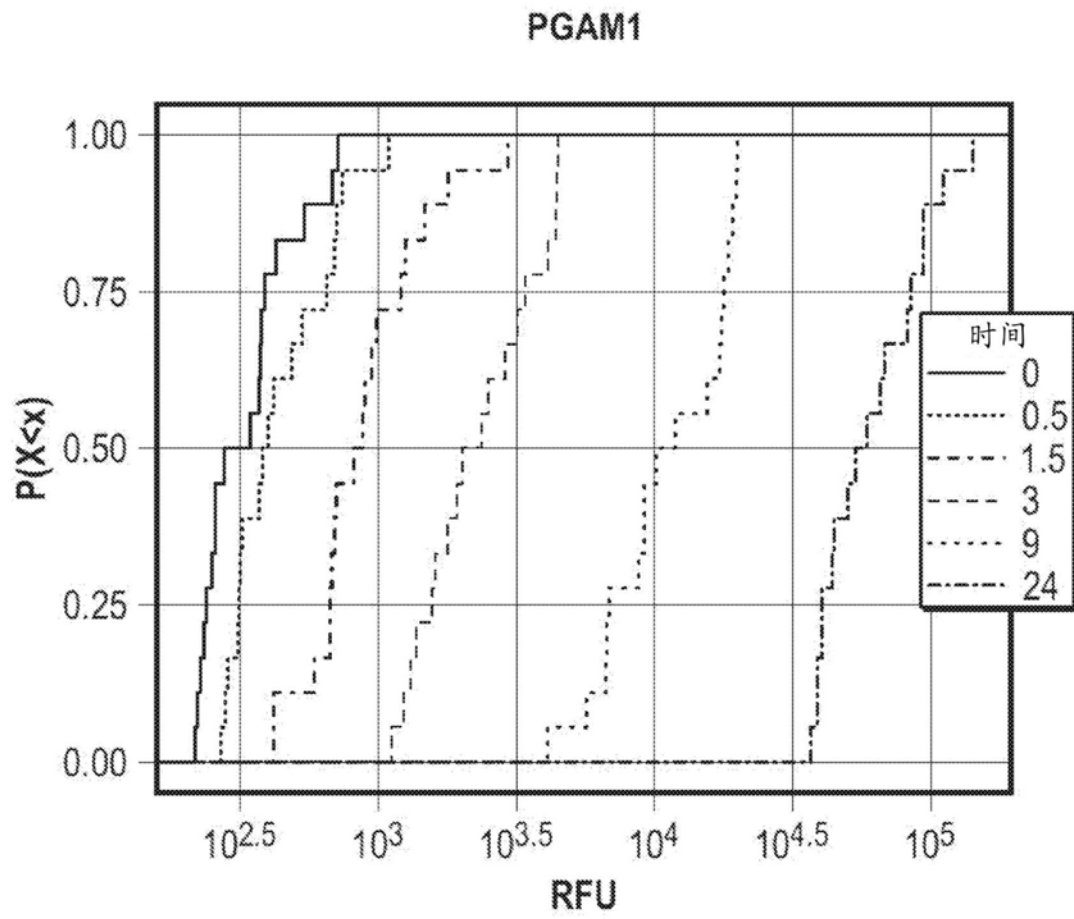


图17

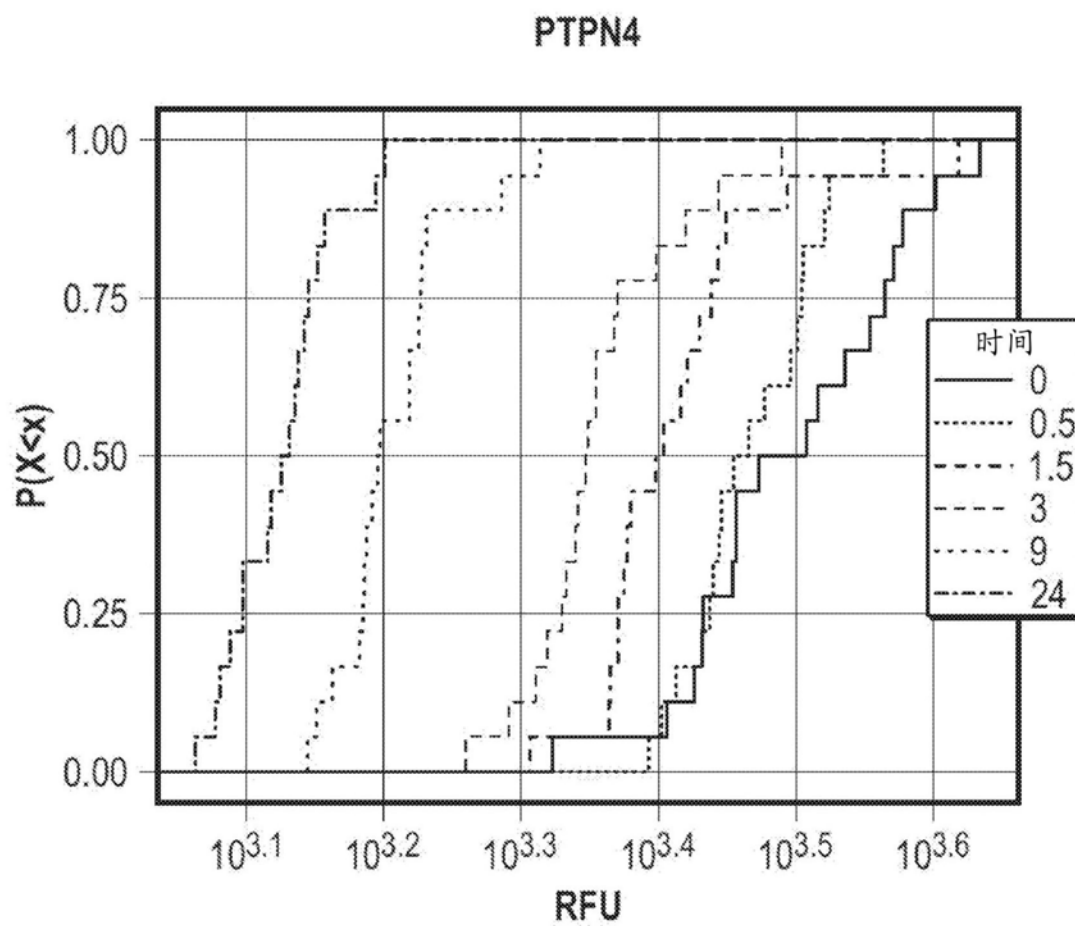


图18

分析物模型聚类

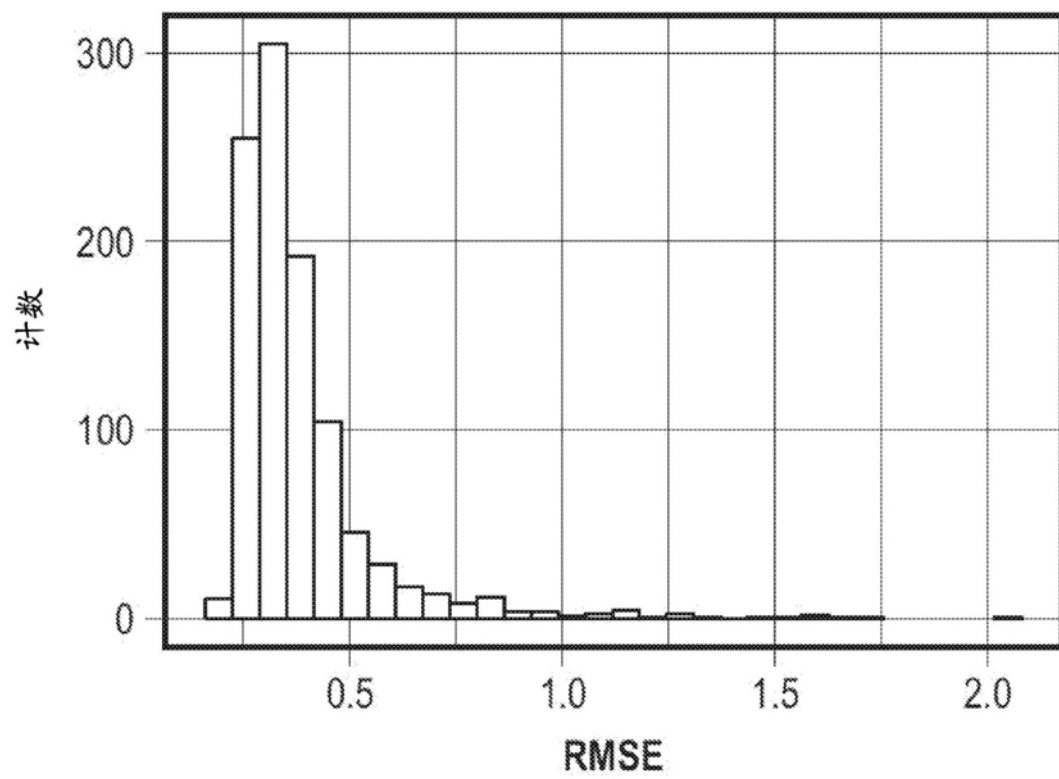


图19

使用的分析物，低

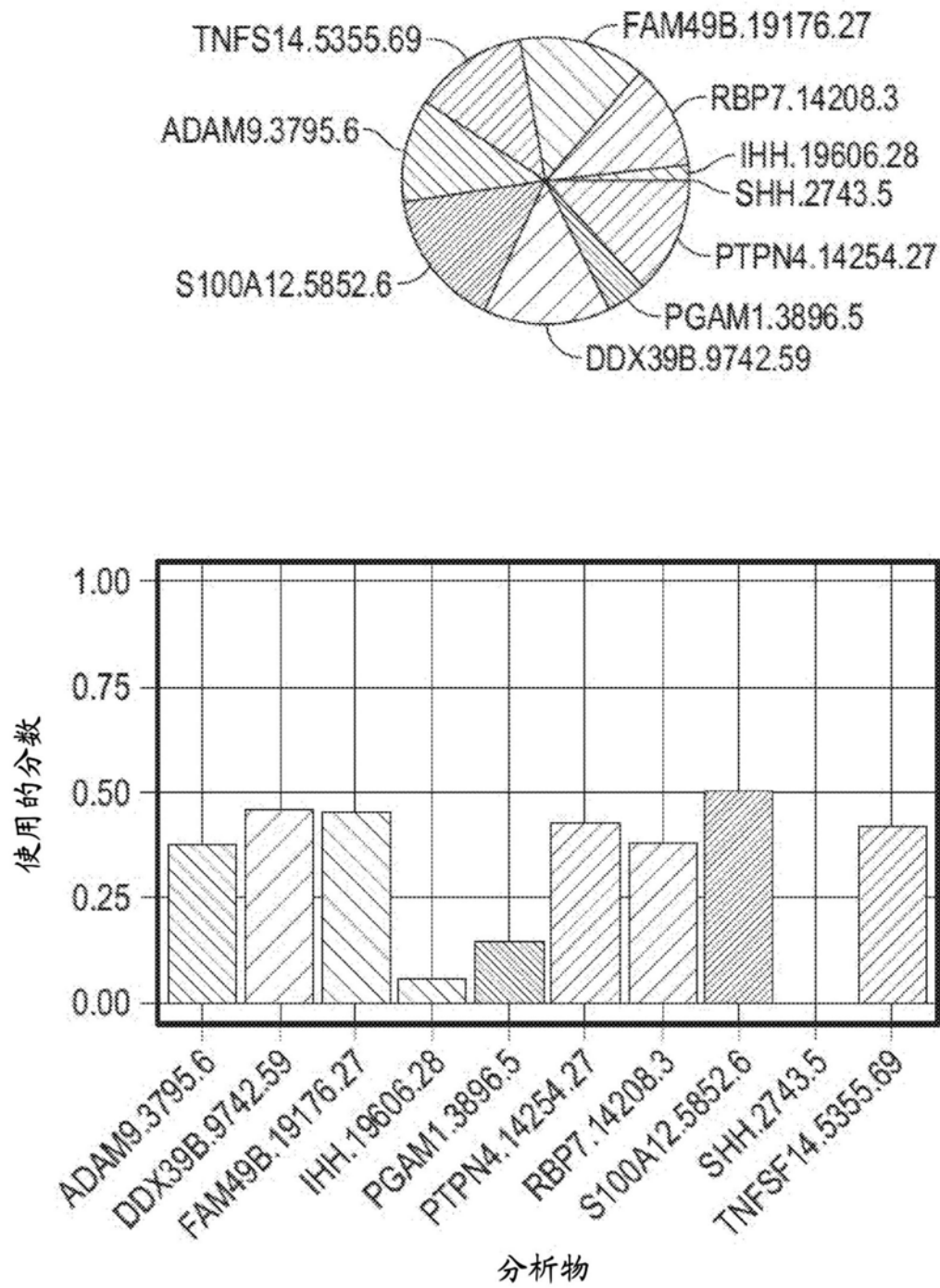


图20

使用的分析物，中等

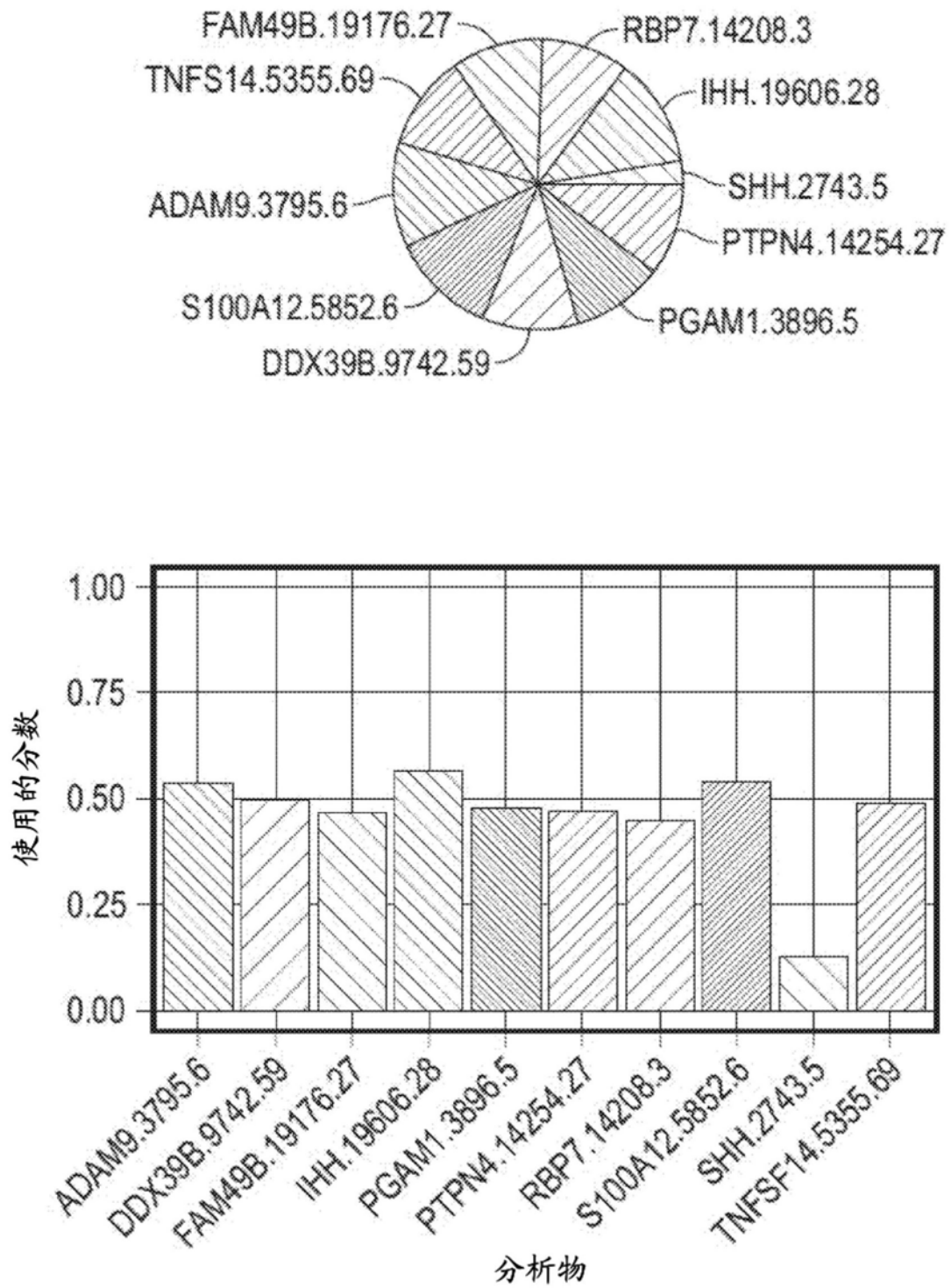


图21

使用的分析物，高

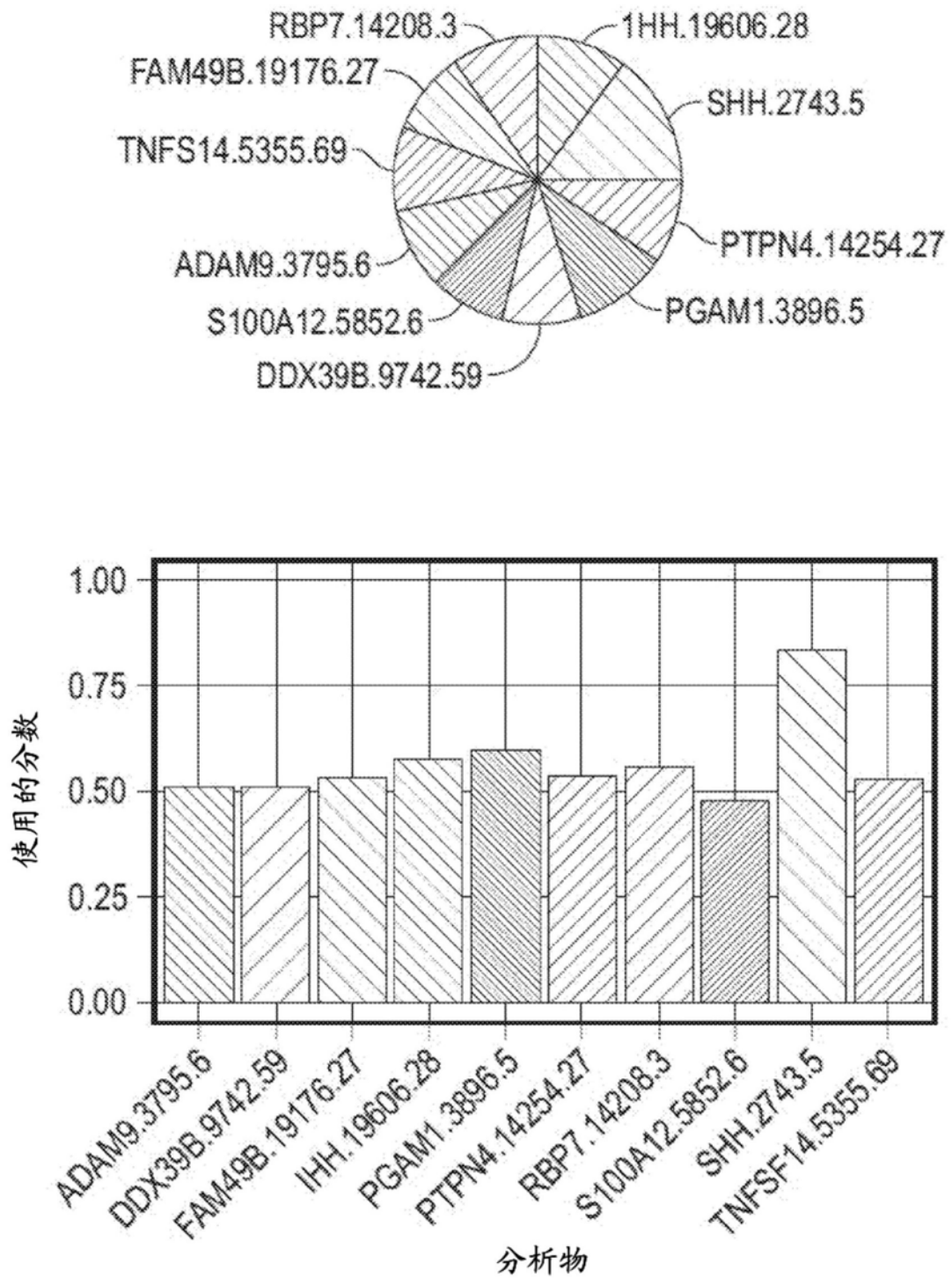


图22

模型性能中的分析物组

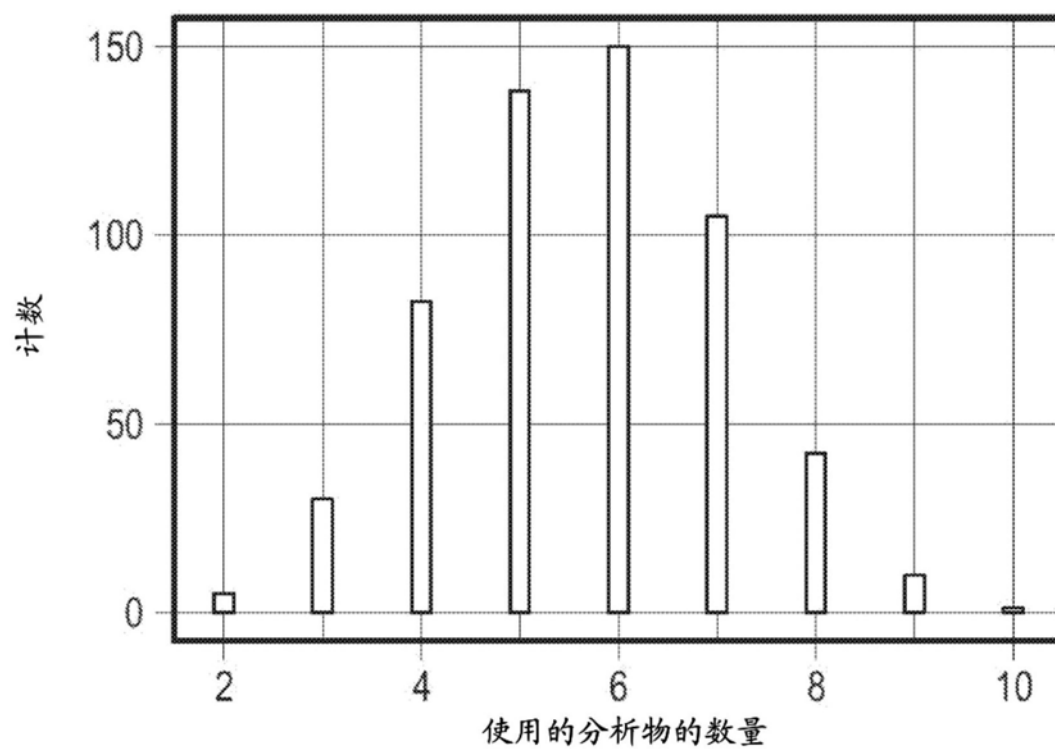


图23