



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 114651058 B

(45) 授权公告日 2023. 07. 28

(21) 申请号 202080048647.5	(73) 专利权人 禧尔公司
(22) 申请日 2020.08.04	地址 美国加利福尼亚州
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 114651058 A	(72) 发明人 威廉·曼宁 金英 布兰登·关-梁 霍普·里欧 赵晓燕 丹尼尔·霍恩博格 马丁·戈德伯格
(43) 申请公布日 2022.06.21	(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
(30) 优先权数据 62/883,107 2019.08.05 US	专利代理师 韦昌金
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2021.12.31	(51) Int.Cl. C12M 1/14 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2020/044908 2020.08.04	审查员 穆飞航
(87) PCT国际申请的公布数据 W02021/026172 EN 2021.02.11	

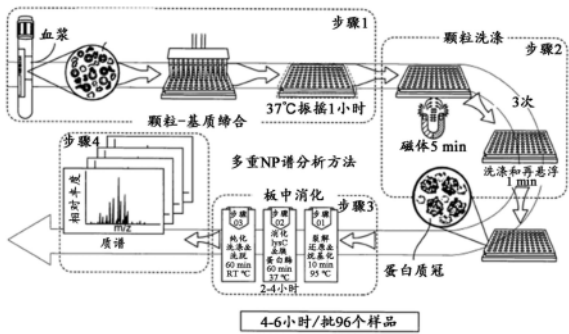
权利要求书2页 说明书54页 附图14页

(54) 发明名称

用于样品制备、数据生成和蛋白质冠分析的系统和方法

(57) 摘要

本文中描述了用于自动化样品制备和处理蛋白质冠的系统和方法,以及其在发现先进的诊断工具和治疗剂中的应用。在一些方面中,本公开内容提供一种用于从复杂生物样品中生成生物分子的子集的自动化装置,所述自动化装置包括:(i)包括多个分区的基底,其中所述多个分区包括多种颗粒;(ii)包括所述复杂生物样品的样品储存单元;以及(iii)至少跨所述基底可移动的加载单元。



1. 一种自动化系统,所述自动化系统包括在利用具有不同的物理化学特性的表面的多种颗粒辨别生物样品的状态方面具有差异化功能的单元的网络,其中:

- (a) 第一单元包括用于在所述系统内的单元之间转移流体的多通道流体转移设备;
- (b) 第二单元包括用于储存所述生物样品的支撑件;
- (c) 第三单元包括用于具有分区的传感器阵列板的支撑件,所述分区包含所述多种颗粒,所述多种颗粒具有不同的物理化学特性的表面以便结合所述生物样品内的分析物群;
- (d) 第四单元包括用于储存多种试剂的支撑件;
- (e) 第五单元包括用于储存要处置的试剂的支撑件;
- (f) 第六单元包括用于储存由所述多通道流体转移设备使用的消耗品的支撑件;并且其中所述系统被编程为执行一系列步骤,所述步骤包括:
 - i. 使所述生物样品与所述传感器阵列的所述分区接触;
 - ii. 将所述生物样品与被包含在所述传感器阵列板的所述分区内的所述多种颗粒一起孵育;
 - iii. 从所述分区中移除除了所述多种颗粒以及与所述多种颗粒相互作用的所述分析物群之外的所有组分;以及
 - iv. 制备用于质谱法的样品。

2. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第一单元包括一定程度的移动性以至能够接近所述系统内的所有其他单元。

3. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第一单元包括执行移液功能的能力。

4. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第二单元和/或所述第三单元的所述支撑件包括用于单板、6孔板、12孔板、96孔板或微型管支架的支撑件。

5. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第二单元和/或单元包括能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。

6. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第二单元和/或所述第三单元包括能够物理地搅动和/或混合样品的旋转单元。

7. 如权利要求1所述的自动化系统,其中具有物理化学特性不同的表面以检测所述生物样品内的分析物群与所述多种颗粒之间的结合相互作用的所述多种颗粒被固定于所述传感器阵列的分区的表面。

8. 如权利要求1所述的自动化系统,其中具有表面的所述多种颗粒包括多种磁性纳米颗粒,所述多种磁性纳米颗粒在溶液中具有不同物理化学特性用于检测所述生物样品内的分析物群与所述多种颗粒之间的结合相互作用。

9. 如权利要求8所述的自动化系统,其包括步骤,其中所述传感器阵列板被转移至附加的第七单元并且被孵育额外的时间量,所述第七单元包括经磁化的支撑件以及能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。

10. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第四单元包括试剂组用于:

- (a) 产生所述传感器阵列板;
- (b) 洗涤未被结合的样品;和/或
- (c) 制备用于质谱法的样品。

11. 如权利要求1所述的自动化系统,其中(i) 使所述生物样品与所述传感器阵列的指

定分区接触包括将指定体积的所述生物样品移液至所述传感器阵列的所述指定分区中。

12. 如权利要求1所述的自动化系统,其中(i)使所述生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触包括将与溶液中的多种颗粒比所述生物样品的比率1:1、1:2:1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15或1:20对应的体积移液。

13. 如权利要求1所述的自动化系统,其中(i)使所述生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触包括将至少10微升、至少50微升、至少100微升、至少250微升、至少500微升或至少1000微升体积的所述生物样品移液至所述传感器阵列的所述指定分区中。

14. 如权利要求1所述的自动化系统,其中(ii)将所述生物样品与被包含在所述传感器阵列板的所述分区内的所述多种颗粒一起孵育包括至少10秒、至少15秒、至少20秒、至少25秒、至少30秒、至少40秒、至少50秒、至少60秒、至少90秒、至少2分钟、至少3分钟、至少4分钟、至少5分钟、至少6分钟、至少7分钟、至少8分钟、至少9分钟、至少10分钟、至少15分钟、至少20分钟、至少25分钟、至少30分钟、至少45分钟、至少50分钟、至少60分钟、至少90分钟、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、至少12小时、至少14小时、至少15小时、至少16小时、至少17小时、至少18小时、至少19小时、至少20小时或至少24小时的孵育时间。

15. 如权利要求1所述的自动化系统,其中(ii)将所述生物样品与被包含在所述传感器阵列板的所述分区内的所述多种颗粒一起孵育包括4℃至40℃的孵育温度。

16. 如权利要求1所述的自动化系统,其中从分区中移除除了所述多种颗粒以及与颗粒相互作用的分析物群之外的所有组分包括一系列洗涤步骤。

17. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述第二单元可以促进用于质谱法的样品转移至质谱单元。

18. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述分区包括3至8种具有不同物理化学特性的表面的颗粒。

19. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述多种颗粒配置为与至少300种不同蛋白质结合。

20. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述多种颗粒配置为与至少600种不同蛋白质结合。

21. 如权利要求1所述的自动化系统,其中其中所述多种颗粒位于所述传感器阵列板的不同分区中。

22. 如权利要求1所述的自动化系统,其中所述制备用于质谱分析的样品包括烷基化和蛋白酶消化。

用于样品制备、数据生成和蛋白质冠分析的系统和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年8月5日提交的美国临时申请号62/883,107的优先权和权益,其全部内容通过引用合并于此。

背景技术

[0003] 蛋白质组学信息在科学和医学中的大规模实施已经落后于基因组学,这大部分地是因为蛋白质分子本身固有的复杂性,需要复杂的工作流程,这限制了这种分析的可扩展性。本文中公开了用于快速且自动化的样品制备、处理蛋白质组学数据以及鉴定与患病状态相关的关键生物标志物的系统、方法和试剂盒。

发明内容

[0004] 本公开内容提供用于蛋白质冠制备和分析的自动化的系统、方法和试剂盒。在一些方面中,本公开内容提供一种用于从复杂生物样品中生成生物分子的子集的自动化装置,所述自动化装置包括:(i)包括多个分区的基底,其中所述多个分区包括多种颗粒;(ii)包括所述复杂生物样品的样品储存单元;以及(iii)至少跨所述基底可移动的加载单元,其中所述加载单元将所述样品储存单元中的一个或多个体积的所述复杂生物样品转移至所述基底上的所述多个分区,从而使所述多个分区中的所述多种颗粒与所述复杂生物样品的生物分子接触而形成生物分子冠,从而生成所述复杂生物样品的生物分子的所述子集,并且其中相对于存在于所述复杂生物样品中的生物分子的动态范围,生物分子的所述子集的动态范围被压缩。在一些实施方案中,所述基底是多孔板。在一些实施方案中,生物分子的所述子集包含来自所述复杂生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少20%至至少60%。在一些实施方案中,生物分子的所述子集包含来自所述复杂生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少20%至至少60%。在一些实施方案中,所述自动化装置在小于7小时内从复杂生物样品生成生物分子的所述子集。

[0005] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括孵育元件,所述孵育元件搅动或加热所述多个分区中所述复杂生物样品的体积内的所述多种颗粒的体积。在一些实施方案中,所述孵育元件被配置为振摇、混合、搅拌、旋转、振动、静止或其任何组合。在一些实施方案中,其中所述孵育元件被配置为将所述基底加热和/或孵育至约20℃至约100℃的温度。

[0006] 在一些实施方案中,所述多个分区至少部分地被覆盖或密封。在一些实施方案中,所述多个分区中的分区被覆盖或密封。在一些实施方案中,所述自动化装置包括添加或移除所述基底上的盖的能力,其中所述盖覆盖所述多个分区中的至少一个分区。

[0007] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括包含重悬浮溶液的单元。在一些实施方案中,所述重悬浮溶液包含Tris EDTA 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。在一些实施方案中,所述重悬浮溶液包含10mM Tris HCl pH 7.4、1mM EDTA。

[0008] 在一些实施方案中,所述装置包括包含变性溶液的单元。在一些实施方案中,所述变性溶液包含蛋白酶。在一些实施方案中,所述变性溶液包含还原剂、甲基化剂、胍、脲、脱

氧胆酸钠、乙腈或其任何组合。在一些实施方案中,所述变性溶液产生质量小于4600道尔顿的平均肽片段。

[0009] 在一些实施方案中,所述加载单元包括多个移液管。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将10uL至400uL的溶液分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将5uL至150uL的溶液分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将35uL至80uL的溶液分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。在一些实施方案中,所述溶液选自洗涤溶液、所述重悬浮溶液、所述变性溶液、缓冲剂和试剂。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将10uL至400uL的所述复杂生物样品分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将5uL至150uL的所述复杂生物样品分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。在一些实施方案中,所述加载单元被配置为将35uL至80uL的所述复杂生物样品分配至所述多个分区中的一个或多个分区中。

[0010] 在一些实施方案中,所述复杂生物样品包含来自受试者的生物流体。在一些实施方案中,所述复杂生物样品包括血浆、血清、尿液、脑脊髓液、滑液、泪液、唾液、全血、乳、乳头抽吸物、导管灌洗物、阴道液、鼻液、耳液、胃液、胰液、小梁液、肺灌洗物、汗液、沟液、精液、前列腺液、痰、粪便物、支气管灌洗物、来自拭子的流体、支气管抽吸物、流态化固体、细针抽吸样品、组织匀浆、淋巴液、细胞培养物样品或其任何组合。

[0011] 在一些实施方案中,所述自动化装置进一步包括磁体。在一些实施方案中,所述多种颗粒中的一种或多种颗粒是磁性颗粒,并且所述基底和所述磁体处于邻近,以至一种或多种所述磁性颗粒被固定化在所述基底上。

[0012] 在一些实施方案中,所述自动化装置进一步包括外壳,所述基底和所述加载单元位于所述外壳中,并且所述外壳是至少部分封闭的。

[0013] 在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的生物分子的6个数量级内的生物分子类型的数量的增高。在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的生物分子的5个数量级内的生物分子类型的数量的增高。在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的生物分子的4个数量级内的生物分子类型的数量的增高。在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的蛋白质的6个数量级内的蛋白质类型的数量的增高。在一些实施方案中,浓度在所述样品中的最浓的生物分子的6个数量级内的生物分子类型的数量的所述增高是至少25%、50%、100%、200%、300%、500%或1000%。在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的蛋白质的6个数量级内的蛋白质类型的数量的增高。在一些实施方案中,浓度在所述样品中的最丰富的蛋白质的6个数量级内的蛋白质类型的数量的所述增高是至少25%、50%、100%、200%、300%、500%或1000%。

[0014] 在一些实施方案中,所述生物分子冠的生物分子的动态范围是在多种生物分子冠中生物分子的前十分位数与生物分子的末十分位数的第一比率。在一些实施方案中,所述生物分子冠的生物分子的动态范围是第一比率,所述第一比率包括在多种生物分子冠中生物分子的四分位数间距的跨度。

[0015] 在一些实施方案中,所述生成从所述复杂生物样品富集低丰度生物分子。在一些

实施方案中,所述低丰度生物分子是在所述复杂生物样品中处于10ng/mL或更小浓度的生物分子。在一些实施方案中,来自所述复杂生物样品的生物分子的所述子集包含蛋白质。

[0016] 在一些实施方案中,所述复杂生物样品的脂质浓度的至多10mg/mL变化导致从所述复杂生物样品生成的生物分子的所述子集中的所述蛋白质的组成的小于10%、5%、2%或1%变化。

[0017] 在一些实施方案中,来自所述多种颗粒中的至少两种颗粒区别在于至少一种物理化学特性。在一些实施方案中,所述至少一种物理化学特性选自:组成、尺寸、表面电荷、疏水性、亲水性、表面官能度、表面形貌、表面曲率、孔隙率、芯材料、壳材料、形状,及其任何组合。在一些实施方案中,所述表面官能度包括氨基丙基官能化、胺官能化、硼酸官能化、羧酸官能化、甲基官能化、N-琥珀酰亚胺基酯官能化、PEG官能化、链霉亲和素官能化、甲基醚官能化、三乙氧基丙基氨基硅烷官能化、硫醇官能化、PCP官能化、柠檬酸盐官能化、硫辛酸官能化、BPEI官能化。在一些实施方案中,所述多种颗粒中的颗粒选自:胶束、脂质体、铁氧化物颗粒、银颗粒、金颗粒、钯颗粒、量子点、铂颗粒、钛颗粒、二氧化硅颗粒、金属或无机氧化物颗粒、合成的聚合物颗粒、共聚物颗粒、三元共聚物颗粒、具有金属芯的聚合物颗粒、具有金属氧化物芯的聚合物颗粒、聚苯乙烯磺酸盐颗粒、聚氧化乙烯颗粒、聚氧乙烯二醇颗粒、聚乙烯亚胺颗粒、聚乳酸颗粒、聚己内酯颗粒、聚乙醇酸颗粒、聚(丙交酯共乙交酯)聚合物颗粒、纤维素醚聚合物颗粒、聚乙烯吡咯烷酮颗粒、聚乙酸乙烯酯颗粒、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、聚乙烯醇颗粒、丙烯酸酯颗粒、聚丙烯酸颗粒、巴豆酸共聚物颗粒、聚乙烯膦酸酯颗粒、聚亚烷基颗粒、羧基乙烯基聚合物颗粒、藻酸钠颗粒、卡拉胶颗粒、黄原胶颗粒、阿拉伯树胶颗粒、阿拉伯胶颗粒、瓜尔胶颗粒、支链淀粉颗粒、琼脂颗粒、几丁质颗粒、壳聚糖颗粒、果胶颗粒、刺梧桐胶(karaya gum)颗粒、角豆胶颗粒、麦芽糖糊精颗粒、直链淀粉颗粒、玉米淀粉颗粒、土豆淀粉颗粒、稻米淀粉颗粒、木薯淀粉颗粒、豌豆淀粉颗粒、红薯淀粉颗粒、大麦淀粉颗粒、小麦淀粉颗粒、羟丙基化高直链淀粉颗粒、糊精颗粒、果聚糖颗粒、elsinan颗粒、谷蛋白颗粒、胶原蛋白颗粒、乳清蛋白分离物颗粒、酪蛋白颗粒、乳蛋白质颗粒、大豆蛋白质颗粒、角蛋白颗粒、聚乙烯颗粒、聚碳酸酯颗粒、聚酸酐颗粒、聚羟基酸颗粒、聚富马酸丙酯(polypropylfumarate)颗粒、聚己内酯颗粒、聚胺颗粒、聚缩醛颗粒、聚醚颗粒、聚酯颗粒、聚(原酸酯)颗粒、聚氰基丙烯酸酯颗粒、聚氨基酯颗粒、聚磷腈颗粒、聚丙烯酸酯颗粒、聚甲基丙烯酸酯颗粒、聚氰基丙烯酸酯颗粒、聚脲颗粒、聚胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、聚(赖氨酸)颗粒、壳聚糖颗粒、葡聚糖颗粒、聚(丙烯酰胺)颗粒、衍生的聚(丙烯酰胺)颗粒、明胶颗粒、淀粉颗粒、壳聚糖颗粒、葡聚糖颗粒、明胶颗粒、淀粉颗粒、聚β-氨基酯颗粒、聚(酰胺基胺)颗粒、聚乳酸共羟基乙酸颗粒、聚酸酐颗粒、生物可还原性聚合物颗粒、和2-(3-氨基丙基氨基)乙醇颗粒、及其任何组合。在一些实施方案中,所述多种颗粒中的一种或多种颗粒在与所述复杂生物样品接触时吸附至少100种类型的蛋白质。在一些实施方案中,所述多种颗粒包括至少2种不同的颗粒类型、至少3种不同的颗粒类型、至少4种不同的颗粒类型、至少5种不同的颗粒类型、至少6种不同的颗粒类型、至少7种不同的颗粒类型、至少8种不同的颗粒类型、至少9种不同的颗粒类型、至少10种不同的颗粒类型、至少11种不同的颗粒类型、至少12种不同的颗粒类型、至少13种不同的颗粒类型、至少14种不同的颗粒类型、至少15种不同的颗粒类型、至少20种不同的颗粒类型、至少25种颗粒类型、或者至少30种不同的颗粒类型。

[0018] 在一些实施方案中,所述生物分子冠的生物分子包括多个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括1至20,000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括100至10,000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括100至5000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括300至2,200个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括1,200至2,200个蛋白质群组。

[0019] 在一些实施方案中,所述多个分区中的至少两个分区包含不同的缓冲剂。在一些实施方案中,所述不同的缓冲剂区别在于pH、盐度、克分子渗透压浓度(osmolality)、粘度、介电常数或其任何组合。在一些实施方案中,所述多个分区中的至少两个分区包含不同比率的缓冲剂与复杂生物样品。在一些实施方案中,所述多个分区中的一个或多个分区包含1pM至100nM纳米颗粒。在一些实施方案中,所述多个分区中的至少两个分区包含不同浓度的纳米颗粒。

[0020] 在一些实施方案中,所述自动化装置进一步包括纯化单元。在一些实施方案中,所述纯化单元包括固相萃取(SPE)板。

[0021] 本公开内容的各种方面提供一种自动化系统,其包括:(i)自动化装置,所述自动化装置被配置为从生物样品中分离生物分子的子集;(ii)质谱仪,所述质谱仪被配置为接收生物分子的所述子集并且生成包括质谱信号或串联质谱信号的数据;以及(iii)计算机,包括一个或多个计算机处理器的计算机以及包括机器可执行代码的计算机可读介质,所述机器可执行代码当由所述一个或多个计算机处理器执行时实施一种方法,所述方法包括:生成生物分子指纹并且基于所述生物分子指纹而确定生物状态。

[0022] 在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括多种不同生物分子冠签名。在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括至少5、10、20、40或者80、150或200种不同生物分子冠签名。在一些实施方案中,所述计算机被配置为处理所述数据,所述数据包括多种不同生物分子冠签名中的质谱信号或串联质谱信号的强度、APEX、光谱计数或肽的数量或离子迁移行为。在一些实施方案中,所述计算机被配置为处理来自多种不同生物分子冠签名中的100至2000个质谱信号或串联质谱信号的数据。在一些实施方案中,所述计算机被配置为处理包括多种不同生物分子冠签名中的10,000至5,000,000个质谱信号或串联质谱信号的强度的数据。在一些实施方案中,所述生物分子指纹由来自单个质谱或串联质谱运行的数据生成。在一些实施方案中,所述单个质谱或串联质谱运行小于一小时。在一些实施方案中,所述计算机被配置为基于质谱信号或串联质谱信号和/或离子迁移和色谱行为而鉴定生物分子或者表征未鉴定的分子特征,并且其中所述计算机提供至少95%的确定性阈值来鉴定特征或表征未鉴定的特征。在一些实施方案中,所述自动化系统被配置为在小于约10小时内从所述复杂生物样品生成所述生物分子指纹。在一些实施方案中,所述确定包括将在所述复杂生物样品中浓度跨度至少7至至少12个数量级的两种生物分子的丰度进行比较。

[0023] 在一些实施方案中,所述计算机能够辨别与差异小于10%、5%、2%或1%的生物分子指纹相关的两种或更多种生物状态。在一些实施方案中,所述生物状态是疾病、病症或组织异常。在一些实施方案中,所述疾病是早期或中期疾病状态。在一些实施方案中,所述疾病是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是0期癌症或1期癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自:肺癌、胰腺癌、骨髓瘤、髓系白血病、脑膜瘤、胶质母细胞瘤、乳癌、食管鳞状细胞癌、胃腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌、

霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、直肠癌、泌尿器官癌、子宫癌、口腔癌、皮肤癌、胃癌、脑瘤、肝癌、喉癌、食管癌、乳房肿瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤文肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸瘤、子宫内膜癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质母细胞瘤、神经瘤(neuronoma)、颅咽管瘤(cranio-pharyngioma)、神经鞘瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病和淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞性真性红细胞增多症、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和重链病、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、非儿童型(childhood-null)急性淋巴样白血病(ALL)、胸腺ALL、B细胞ALL、急性巨核细胞白血病、伯基特淋巴瘤和T细胞白血病、小细胞非癌和大细胞非小细胞肺癌(small and large non-small cell lung carcinoma)、急性粒细胞白血病、生殖细胞肿瘤、子宫内膜癌、胃癌、毛细胞白血病、甲状腺癌以及本领域已知的其他癌症。在一些实施方案中,所述生物状态是病前状态。

[0024] 本公开内容的各种方面提供一种辨别复杂生物样品的生物状态的方法,所述方法包括:将所述复杂生物样品提供至自动化装置以生成生物分子的子集;测定生物分子的所述子集以生成生物分子指纹;以及利用所述生物分子指纹来辨别所述复杂生物样品的生物状态。

[0025] 在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括蛋白质。在一些实施方案中,来自所述复杂生物样品的生物分子的所述子集包括与所述复杂生物样品相比清蛋白与非清蛋白肽的较低比率。在一些实施方案中,生物分子的所述子集包含在所述复杂生物样品中浓度范围跨至少6至至少12个数量级的生物分子。在一些实施方案中,生物分子的所述子集包含在所述复杂生物样品中浓度范围跨至少6至至少12个数量级的蛋白质。在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括1至74,000个蛋白质群组。

[0026] 在一些实施方案中,所述测定包括解吸来自所述多种生物分子冠中的生物分子冠的多种生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括化学修饰来自经解吸的所述多种生物分子中的生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括使来自经解吸的所述多种生物分子中的生物分子碎裂。在一些实施方案中,所述碎裂包括蛋白酶消化。在一些实施方案中,所述碎裂包括化学肽切割。

[0027] 在一些实施方案中,所述测定包括收集经解吸的所述多种生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括纯化收集的经解吸的所述多种生物分子。在一些实施方案中,所述纯化包括固相萃取。在一些实施方案中,所述纯化从收集的经解吸的所述多种生物分子消耗非蛋白质生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括弃去经解吸的所述多种生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括从所述多种生物分子冠中的生物分子冠解吸第一子集生物分子和第二子集生物分子,分析来自所述第一子集生物分子中的生物分子,以及分析来自第二子集生物分子中的生物分子。

[0028] 在一些实施方案中,所述测定包括利用质谱法、串联质谱法、质谱流式细胞术、质谱流式细胞术、电位分析法、荧光测定法、吸收光谱法、拉曼光谱法、色谱法、电泳、免疫组织化学法、PCR、下一代测序(NGS)或其任何组合来分析来自所述多种生物分子冠中的生物分

子冠。在一些实施方案中,所述测定包括质谱法或串联质谱法。在一些实施方案中,所述测定包括鉴定来自生物分子的所述子集中的蛋白质的构象状态。在一些实施方案中,所述测定包括鉴定来自生物分子的所述子集中的蛋白质上的翻译后修饰。在一些实施方案中,所述辨别包括比较来自生物分子的所述子集中的至少200至至少1000种生物分子的相对丰度。在一些实施方案中,所述测定鉴定在所述复杂生物样品中浓度小于10ng/mL的生物分子。

[0029] 本公开内容的各方面提供用于从复杂生物样品生成生物分子的子集的自动化装置,所述自动化装置包括:多种颗粒和所述复杂生物样品,其中所述自动化装置被配置为通过使所述多种颗粒与所述复杂生物样品接触以形成包括生物分子的所述子集的多种生物分子冠而生成生物分子的所述子集,并且其中相对于存在于所述复杂生物样品中的生物分子的动态范围,生物分子的所述子集的动态范围被压缩。在一些实施方案中,所述自动化装置包括基底。在一些实施方案中,所述基底包括多孔板。在一些实施方案中,所述基底是多孔板。在一些实施方案中,所述自动化装置在小于7小时内从复杂生物样品生成生物分子的所述子集。

[0030] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括孵育元件。在一些实施方案中,所述孵育元件被配置为将所述多种颗粒和所述复杂生物样品加热和/或孵育至4℃至40℃的温度。

[0031] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括至少一种溶液,所述至少一种溶液选自洗涤溶液、重悬浮溶液、变性溶液、缓冲剂和试剂。在一些实施方案中,所述重悬浮溶液包含 Tris EDTA缓冲剂、磷酸盐缓冲剂和/或水。在一些实施方案中,所述变性溶液包含蛋白酶。在一些实施方案中,所述变性溶液包含能够进行肽切割的小分子。

[0032] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括加载单元,所述加载单元包括多个移液管。在一些实施方案中,所述多个移液管中的每个移液管被配置为分配约5uL-150uL的所述溶液、所述复杂生物样品和/或所述多种颗粒。在一些实施方案中,所述复杂生物样品包括血浆、血清、尿液、脑脊髓液、滑液、泪液、唾液、全血、乳、乳头抽吸物、导管灌洗物、阴道液、鼻液、耳液、胃液、胰液、小梁液、肺灌洗物、汗液、沟液、精液、前列腺液、痰、粪便物、支气管灌洗物、来自拭子的流体、支气管抽吸物、流态化固体、细针抽吸样品、组织匀浆、淋巴液、细胞培养物样品或其任何组合。在一些实施方案中,所述自动化装置包括磁体。在一些实施方案中,所述自动化装置包括过滤器。

[0033] 在一些实施方案中,经压缩的所述动态范围包括浓度在所述样品中的最丰富的生物分子的4至6个数量级内的生物分子类型的数量的增高。在一些实施方案中,所述生物分子类型包括蛋白质。在一些实施方案中,所述生物分子冠的生物分子的动态范围是在所述多种生物分子冠中生物分子的前十分位数与生物分子的末十分位数的第一比率。在一些实施方案中,所述生成从所述复杂生物样品富集低丰度生物分子。在一些实施方案中,所述低丰度生物分子是在所述复杂生物样品中处于10ng/mL或更小浓度的生物分子。

[0034] 在一些实施方案中,来自所述多种颗粒中的至少两种颗粒区别在于至少一种物理化学特性。在一些实施方案中,所述至少一种物理化学特性选自:组成、尺寸、表面电荷、疏水性、亲水性、表面官能度、表面形貌、表面曲率、孔隙率、芯材料、壳材料、形状、及其任何组合。在一些实施方案中,来自所述多种颗粒中的颗粒选自:胶束、脂质体、铁氧化物颗粒、银颗粒、金颗粒、钯颗粒、量子点、铂颗粒、钛颗粒、二氧化硅颗粒、金属或无机氧化物颗粒、合

成的聚合物颗粒、共聚物颗粒、三元共聚物颗粒、具有金属芯的聚合物颗粒、具有金属氧化物芯的聚合物颗粒、聚苯乙烯磺酸盐颗粒、聚氧化乙烯颗粒、聚氧乙烯二醇颗粒、聚乙烯亚胺颗粒、聚乳酸颗粒、聚己内酯颗粒、聚乙醇酸颗粒、聚(丙交酯共乙交酯)聚合物颗粒、纤维素醚聚合物颗粒、聚乙烯吡咯烷酮颗粒、聚乙酸乙烯酯颗粒、聚乙烯吡咯烷酮-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、聚乙烯醇颗粒、丙烯酸酯颗粒、聚丙烯酸颗粒、巴豆酸共聚物颗粒、聚乙烯磷酸酯颗粒、聚亚烷基颗粒、羧基乙烯基聚合物颗粒、藻酸钠颗粒、卡拉胶颗粒、黄原胶颗粒、阿拉伯树胶颗粒、阿拉伯胶颗粒、瓜尔胶颗粒、支链淀粉颗粒、琼脂颗粒、几丁质颗粒、壳聚糖颗粒、果胶颗粒、刺梧桐胶颗粒、角豆胶颗粒、麦芽糖糊精颗粒、直链淀粉颗粒、玉米淀粉颗粒、土豆淀粉颗粒、稻米淀粉颗粒、木薯淀粉颗粒、豌豆淀粉颗粒、红薯淀粉颗粒、大麦淀粉颗粒、小麦淀粉颗粒、羟丙基化高直链淀粉颗粒、糊精颗粒、果聚糖颗粒、elsinan颗粒、谷蛋白颗粒、胶原蛋白颗粒、乳清蛋白分离物颗粒、酪蛋白颗粒、乳蛋白质颗粒、大豆蛋白质颗粒、角蛋白颗粒、聚乙烯颗粒、聚碳酸酯颗粒、聚酸酐颗粒、聚羧基酸颗粒、聚富马酸丙酯颗粒、聚己内酯颗粒、聚胺颗粒、聚缩醛颗粒、聚醚颗粒、聚酯颗粒、聚(原酸酯)颗粒、聚氰基丙烯酸酯颗粒、聚氨基酯颗粒、聚磷腈颗粒、聚丙烯酸酯颗粒、聚甲基丙烯酸酯颗粒、聚氰基丙烯酸酯颗粒、聚脲颗粒、聚胺颗粒、聚苯乙烯颗粒、聚(赖氨酸)颗粒、壳聚糖颗粒、葡聚糖颗粒、聚(丙烯酰胺)颗粒、衍生的聚(丙烯酰胺)颗粒、明胶颗粒、淀粉颗粒、壳聚糖颗粒、葡聚糖颗粒、明胶颗粒、淀粉颗粒、聚 β -氨基酯颗粒、聚(酰胺基胺)颗粒、聚乳酸共羧基乙酸颗粒、聚酸酐颗粒、生物可还原性聚合物颗粒、和2-(3-氨基丙基氨基)乙醇颗粒、及其任何组合。

[0035] 在一些实施方案中,所述生物分子冠的生物分子包括多个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括1至20,000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括100至10,000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括100至5000个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括300至2,200个蛋白质群组。在一些实施方案中,所述多个蛋白质群组包括1,200至2,200个蛋白质群组。

[0036] 在一些实施方案中,所述自动化装置包括纯化单元。在一些实施方案中,所述纯化单元包括固相萃取(SPE)板。

[0037] 本公开内容的各种方面提供用于从复杂生物样品生成生物分子的子集的方法,所述方法包括:将所述复杂生物样品提供至自动化装置,其中所述自动化装置使所述复杂生物样品与多种颗粒接触以生成生物分子冠,其中所述自动化装置处理所述生物分子冠以生成生物分子的所述子集,并且其中相对于存在于所述复杂生物样品中的生物分子的动态范围,生物分子的所述子集的动态范围被压缩。

[0038] 在一些实施方案中,所述方法包括测定生物分子的所述子集以生成生物分子指纹。在一些实施方案中,所述测定鉴定在所述复杂生物样品中浓度小于10ng/mL的生物分子。在一些实施方案中,所述测定包括利用质谱法、串联质谱法、质谱流式细胞术、质谱流式细胞术、电位分析法、荧光测定法、吸收光谱法、拉曼光谱法、色谱法、电泳、免疫组织化学法或其任何组合来分析生物分子冠。在一些实施方案中,所述测定包括质谱法或串联质谱法。

[0039] 在一些实施方案中,所述方法包括利用所述生物分子指纹来辨别所述复杂生物样品的生物状态。在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括多种不同生物分子冠签名。在一些实施方案中,所述生物分子指纹包括至少5、10、20、40或80、150或200种不同生物分子冠

签名。在一些实施方案中,所述生物状态是疾病、病症或组织异常。在一些实施方案中,所述疾病是早期或中期疾病状态。在一些实施方案中,所述疾病是癌症。在一些实施方案中,所述癌症是0期癌症或1期癌症。在一些实施方案中,所述癌症选自:肺癌、胰腺癌、骨髓瘤、髓系白血病、脑膜瘤、胶质母细胞瘤、乳癌、食管鳞状细胞癌、胃腺癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、甲状腺癌、神经内分泌癌、结肠癌、卵巢癌、头颈癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、直肠癌、泌尿器官癌、子宫癌、口腔癌、皮肤癌、胃癌、脑瘤、肝癌、喉癌、食管癌、乳房肿瘤、纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、尤文肉瘤、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤、宫颈癌、睾丸瘤、子宫内膜癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质母细胞瘤、神经瘤、颅咽管瘤、神经鞘瘤、胶质瘤、星形细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、白血病和淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞性真性红细胞增多症、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症和重链病、急性非淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓性白血病、非儿童型急性淋巴样白血病(ALL)、胸腺ALL、B细胞ALL、急性巨核细胞白血病、伯基特淋巴瘤和T细胞白血病、小细胞肺癌和大细胞非小细胞肺癌、急性粒细胞白血病、生殖细胞肿瘤、子宫内膜癌、胃癌、毛细胞白血病或甲状腺癌。在一些实施方案中,所述生物状态是病前状态。

[0040] 本公开内容的各种方面提供用于鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种纳米颗粒,并且其中所述自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠。

[0041] 本公开内容的各种方面提供用于鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种纳米颗粒,其中所述自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠,并且其中所述溶液中的至少一种是TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。

[0042] 在一些方面中,所述样品制备单元被配置为利用所述多个移液管将所述多种纳米颗粒添加至所述基底。在一些方面中,所述样品制备单元被配置为利用所述多个移液管将所述生物样品添加至所述基底。在一些方面中,所述样品制备单元被配置为孵育所述多种纳米颗粒和所述生物样品以形成所述蛋白质冠。在一些方面中,所述样品制备单元被配置为从上清液中分离所述蛋白质冠以形成蛋白质冠团粒。在一些方面中,所述样品制备单元被配置为将所述蛋白质冠团粒用TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂复原。

[0043] 在一些方面中,所述自动化装置包括磁性源。在一些方面中,所述自动化装置被配置用于所述蛋白质冠的BCA、凝胶或胰蛋白酶消化。在一些方面中,所述自动化装置是封闭的。在一些方面中,所述自动化装置在使用之前被灭菌。在一些方面中,所述自动化装置被配置为质谱法。在一些方面中,所述自动化装置是温度受控的。

[0044] 本公开内容的各种方面提供一种鉴定生物样品中的蛋白质的方法,所述方法包括:将所述生物样品添加至自动化装置;由所述自动化装置生成蛋白质组学数据;以及量化所述蛋白质组学数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中将多种纳米颗粒与所述生物样品一起孵育以形成蛋白质冠。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中从上清液中分离所述蛋白质冠。在一些实施方案中,所述方法

进一步包括在所述自动化装置中消化所述蛋白质冠以形成经消化的样品。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中洗涤所述经消化的样品。在一些实施方案中,量化所述蛋白质组学数据包括将所述蛋白质组学数据提供至质谱分析。在一些实施方案中,所述生物样品是生物流体。在一些实施方案中,所述生物流体是血清或血浆。

[0045] 在一些方面中,本公开内容提供一种自动化系统,所述自动化系统包括在利用具有物理化学特性不同的表面的多种颗粒辨别复杂生物样品的状态方面具有差异化功能的单元的网络,其中:第一单元包括用于在所述系统内的单元之间转移流体的多通道流体转移设备;第二单元包括用于储存多种生物样品的支撑件;第三单元包括用于具有分区的传感器阵列板的支撑件,所述分区包含所述多种颗粒,所述多种颗粒具有物理化学特性不同的表面以便与所述复杂生物样品内的分析物群结合;第四单元包括用于储存多种试剂的支撑件;第五单元包括用于储存要处置的试剂的支撑件;第六单元包括用于储存由所述多通道流体转移设备使用的消耗品的支撑件;并且其中所述系统被编程为执行一系列步骤,所述步骤包括:使所述复杂生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触;将所述复杂生物样品与被包含在所述传感器阵列板的所述分区内的所述多种颗粒一起孵育;从分区中移除除了所述多种颗粒以及与颗粒相互作用的分析物群之外的所有组分;以及制备用于质谱法的样品。

[0046] 在一些实施方案中,所述第一单元包括一定程度的移动性以至能够接近所述系统内的所有其他单元。在一些实施方案中,所述第一单元包括执行移液功能的能力。

[0047] 在一些实施方案中,所述第二单元和/或所述第三单元的所述支撑件包括用于单板、6孔板、12孔板、96孔板或微型管支架的支撑件。在一些实施方案中,所述第二单元和/或单元包括能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。在一些实施方案中,所述第二单元和/或所述第三单元包括能够物理地搅动和/或混合样品的旋转单元。

[0048] 在一些实施方案中,具有物理化学特性不同的表面以供与所述复杂生物样品内的分析物群结合的所述多种颗粒被固定于所述传感器阵列的分区内的表面。在一些实施方案中,所述多种颗粒包括具有不同物理化学特性以供与所述复杂生物样品内的分析物群结合的多种磁性纳米颗粒。在一些实施方案中,所述系统包括步骤,其中所述传感器阵列板被转移至附加的第七单元并且被孵育额外的时间量,所述第七单元包括经磁化的支撑件以及能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。

[0049] 在一些实施方案中,所述第四单元包括试剂组用于:产生所述传感器阵列板;洗涤未被结合的样品;和/或制备用于质谱法的样品。在一些实施方案中,使所述生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触包括将指定体积的所述生物样品移液至所述传感器阵列的所述指定分区中。在一些实施方案中,使所述生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触包括将与溶液中的多种颗粒比所述生物样品的比率1:1、1:2:1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15或1:20对应的体积移液。

[0050] 在一些实施方案中,使所述生物样品与所述传感器阵列的指定分区接触包括将至少10微升、至少50微升、至少100微升、至少250微升、至少500微升或至少1000微升体积的所述生物样品移液至所述传感器阵列的所述指定分区中。

[0051] 在一些实施方案中,将所述生物样品与被包含在所述传感器阵列板的所述分区内的所述多种颗粒一起孵育包括至少约10秒、至少约15秒、至少约20秒、至少约25秒、至少约

30秒、至少约40秒、至少约50秒、至少约60秒、至少约90秒、至少约2分钟、至少约3分钟、至少约4分钟、至少约5分钟、至少约6分钟、至少约7分钟、至少约8分钟、至少约9分钟、至少约10分钟、至少约15分钟、至少约20分钟、至少约25分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约50分钟、至少约60分钟、至少约90分钟、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约12小时、至少约14小时、至少约15小时、至少约16小时、至少约17小时、至少约18小时、至少约19小时、至少约20小时或至少约24小时的孵育时间。

[0052] 在一些实施方案中,将所述生物样品与被包含在基底的分区内的多种颗粒一起孵育包括约4℃至约40℃的孵育温度。将所述生物样品与被包含在基底的分区内的多种颗粒一起孵育可以包括约4℃至约37℃的孵育温度。将所述生物样品与被包含在基底的分区内的多种颗粒一起孵育可以包括约4℃至约100℃的孵育温度。

[0053] 在一些实施方案中,从分区中移除除了所述多种颗粒以及与颗粒相互作用的分析物群之外的所有组分包括一系列洗涤步骤。

[0054] 在一些实施方案中,所述第二单元可以促进用于质谱法的样品转移至质谱单元。

[0055] 在一些方面中,本公开内容提供一种鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种纳米颗粒,并且其中所述自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠。

[0056] 在一些方面中,本公开内容提供一种鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种纳米颗粒,其中所述自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠,并且其中所述溶液中的至少一种是TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。

[0057] 在一些实施方案中,所述样品制备单元被配置为利用所述多个移液管将所述多种纳米颗粒添加至所述基底。在一些实施方案中,所述样品制备单元被配置为利用所述多个移液管将所述生物样品添加至所述基底。在一些实施方案中,所述样品制备单元被配置为孵育所述多种纳米颗粒和所述生物样品以形成所述蛋白质冠。

[0058] 在一些实施方案中,所述样品制备单元被配置为从上清液中分离所述蛋白质冠以形成蛋白质冠团粒。在一些实施方案中,所述样品制备单元被配置为将所述蛋白质冠团粒用TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂复原。

[0059] 在一些实施方案中,所述自动化装置进一步包括磁性源。在一些实施方案中,所述自动化装置被配置用于所述蛋白质冠的BCA、凝胶或胰蛋白酶消化。

[0060] 在一些实施方案中,所述自动化装置是封闭的。在一些实施方案中,所述自动化装置在使用之前被灭菌。在一些实施方案中,所述自动化装置被配置为质谱法。在一些实施方案中,所述自动化装置是温度受控的。

[0061] 在一些方面中,本公开内容提供一种鉴定生物样品中的蛋白质的方法,所述方法包括:将所述生物样品添加至本文公开的自动化装置;由所述自动化装置生成蛋白质组学数据;以及量化所述蛋白质组学数据。

[0062] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中将多种纳米颗粒与所述生物样品一起孵育以形成蛋白质冠。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中从上清液中分离所述蛋白质冠。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在

所述自动化装置中消化所述蛋白质冠以形成经消化的样品。

[0063] 在一些实施方案中,所述方法进一步包括在所述自动化装置中洗涤所述经消化的样品。在一些实施方案中,量化所述蛋白质组学数据包括将所述蛋白质组学数据提供至质谱分析。

[0064] 在一些实施方案中,所述生物样品是生物流体。在一些实施方案中,所述生物流体是血清或血浆。

[0065] 本公开内容的另一方面提供一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质,所述机器可执行代码当由一个或多个计算机处理器执行时实施本文中上文或其他部分的任何方法。

[0066] 本公开内容的另一方面提供一种系统,所述系统包括一个或多个计算机处理器以及与其耦接的计算机存储器。所述计算机存储器包括机器可执行代码,所述机器可执行代码当由所述一个或多个计算机处理器执行时实施本文中上文或其他部分的任何方法。

[0067] 通过以下在其中仅示出和描述了本公开内容的说明性实施方案的详细描述,本公开内容的其他方面和优点对于本领域技术人员将变得显而易见。将会认识到,本公开内容能够具有其他不同的实施方案,并且其若干细节能够在各个明显的方面进行修改,所有这些都偏离本公开内容。因此,附图和说明书在本质上将被认为是说明性而非限制性的。

[0068] 通过引用并入

[0069] 本说明书中提到的所有出版物、专利和专利申请都以相同的程度通过引用并入本文,就如同每个单独的出版物、专利或专利申请被明确地并单独地指出通过引用的方式并入一样。

附图说明

[0070] 本发明的新颖特征在所附的权利要求书中具体阐述。通过参考以下阐述其中利用了本发明的原理的说明性实施例以及附图的详细描述,可以更好地理解本发明的特征和优点,所述附图是:

[0071] 图1显示了利用纳米颗粒或蛋白质冠方法生成数据的步骤的示意图。

[0072] 图2显示了利用纳米颗粒或蛋白质冠方法生成数据的步骤以及它们在其中可以发生的自动化系统的单元的示例性说明。

[0073] 图3显示了该系统的示例性排布并且耦接至用于高通量应用的连续MS。

[0074] 图4显示了传感器阵列分析物捕获方法的示例性说明。

[0075] 图5显示了对磁性传感器阵列颗粒而言的自动化样品处理的逐步说明。

[0076] 图6显示了对固定化的传感器阵列颗粒而言的自动化样品处理的逐步说明。

[0077] 图7显示了磁性纳米颗粒传感器阵列的表面化学。

[0078] 图8显示了用于检测癌症患者中的疾病生物标志物的基于蛋白质冠的方法的示例(参见US20180172694A1,通过援引以其整体并入本文中)。

[0079] 图9显示了本公开的用于蛋白质组分析的方法的示例。图中所示的方法是针对高通量和自动化进行了优化,可以在数小时内且跨多个样品并行运行。所述方法包括颗粒-基质缔合、颗粒洗涤(x3)、蛋白质冠形成、板内消化和质谱分析。使用该方法,每批96个样品可能只需4至6小时。典型地,每次一种颗粒类型与样品一起孵育。

[0080] 图10显示了在包括1种颗粒类型至12种颗粒类型的多种颗粒上收集的蛋白质计数(从冠分析鉴定的蛋白质的数量)。来自多种颗粒中的每个颗粒可以包含独特的材料、表面官能化和/或物理特性(例如,尺寸或形状)。使用了从健康受试者组合的血浆。计数是从多种颗粒收集并且在约2小时质谱(MS)运行中观察到的独特蛋白质的数量。从与包括12种颗粒类型的多种颗粒接触的样品中鉴定了1318种蛋白质。

[0081] 图11显示了56个样品NSCLC比较研究的经存在过滤(presence-filtered)、聚类质量过滤(cluster quality-filtered)、中值归一化的MS特征强度的分布。每条线代表患病样品或对照样品的 $\log_2$ 特征强度的密度。密度在Y轴上从0.00到0.15绘制,且 $\log_2$ 特征强度在X轴上从15到35绘制。在位于约28的 $\log_2$ 特征强度附近的最高峰处,在密度范围从约0.13到约0.17,两条最高迹线对应于对照样品,而最低迹线对应于患病样品。剩余的对照和患病迹线分布在最高和最低迹线之间。在大约20 $\log_2$ 特征强度和大约23 $\log_2$ 特征强度处出现的两个肩峰处,最高的两条迹线是对照迹线,并且在20 $\log_2$ 特征强度处最低的两条迹线是对照迹线,在23 $\log_2$ 特征强度处最高迹线是患病迹线。

[0082] 图12显示了利用聚(N-(3-(二甲基氨基)丙基)甲基丙烯酰胺)(PDMAEMA)-包覆的SPION颗粒在非小细胞肺癌(NSCLC)先导性研究中的改变的特征。在28例IV期NSCLC患者(具有相关的共病和治疗效果)和28例年龄和性别匹配的明显健康的受试者之间鉴定了7个MS特征在统计学上有显著差异。下面的表列出了7种差异显著的蛋白质,包括5种已知蛋白质和2种未知蛋白质。如果对于与该特征相关联的MS2数据进行肽谱匹配,则指示该肽序列(和电荷)以及潜在的亲本蛋白;如果MS2匹配与该特征无关,则肽和蛋白质都标记为“未知”。

[0083] 图13显示了颗粒冠蛋白质和血浆蛋白质的最大强度与相同蛋白质的公布浓度的相关性。蓝色绘图线是数据的线性回归模型并且阴影区表示该模型拟合的标准误差。用颗粒(“S-003”、“S-007”和“S-011”,表1中详述)测定的样品的动态范围相比于未用颗粒测定的血浆样品(“血浆”)表现出压缩的动态范围,如线性拟合的斜率下降所示。对于无颗粒的血浆、有S-003颗粒的血浆、有S-007颗粒的血浆以及有S-011颗粒的血浆,每幅图的斜率分别是0.47、0.19、0.22和0.18。

[0084] 图14显示了相比于在无颗粒冠形成情况下的质谱用质谱法测定的蛋白质冠分析的动态范围压缩。在图13中测定的血浆样品中的颗粒冠中鉴定的共同蛋白质的蛋白质强度(“纳米颗粒MS强度”)相对于无颗粒的血浆的质谱鉴定的蛋白质强度(“血浆MS强度”)进行绘制。最浅的虚线显示斜率1,指示在无颗粒的情况下质谱的动态范围。对于S-003、S-007和S-011颗粒,蛋白质强度的线性拟合的斜率分别是0.12、0.36和0.093。灰色区域指示回归拟合的标准误差区。

具体实施方式

[0085] 虽然本文已经示出和描述了本发明的各种实施方案,但对于本领域技术人员显而易见,这样的实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员可在不偏离本发明的情况下想到许多变化、改变和替代。应当理解,可以使用本文中所述的本发明的实施方案的各种替代方案。

[0086] 每当术语“至少”、“大于”或“大于或等于”在两个或更多个数值的系列中的第一数值之前时,该术语“至少”、“大于”或“大于或等于”应用于该数值系列中的每个数值。例如,

大于或等于1、2或3等同于大于或等于1、大于或等于2,或大于或等于3。

[0087] 每当术语“不大于”、“小于”、或“小于或等于”在两个或更多个数值的系列中的第一数值之前时,该术语“不大于”、“小于”、或“小于或等于”应用于该数值系列中的每个数值。例如,小于或等于3、2或1等同于小于或等于3、小于或等于2,或小于或等于1。

[0088] 如本文所用,通过质谱法鉴定的“特征”包括保持时间和 m/z (质荷比)的特定组合下的信号,其中每个特征具有相关联的强度。一些特征在第二质谱分析 (MS2) 中进一步破碎以用于鉴定。

[0089] 如本文中使用的术语“传感器元件”是指能够在与样品接触时与多种生物分子结合的元件并且涵盖术语“纳米级传感器元件”。传感器元件可以是颗粒,诸如纳米颗粒或微颗粒。传感器元件可以是表面或表面的部分。传感器元件可以包括一种颗粒或多种颗粒。传感器元件可以包括能够吸附或结合生物分子的多个表面。传感器元件可以包括多孔材料,诸如生物分子可嵌入其中的材料。

[0090] 如本文中使用的,“传感器阵列”可以包括多个传感器元件,其中所述多个传感器元件 (例如颗粒) 包括多种类型的传感器元件。传感器元件可以是至少一种物理化学特性彼此不同的不同类型。传感器阵列可以是具有包含多种传感器元件 (例如颗粒) 的多个分区的基底。例如,传感器阵列可以包括多孔板,多种颗粒分布在多个孔之间。传感器阵列可以是包括多个分区的基底,其中所述多个分区包含多种颗粒。在一些实施方案中,每种传感器元件或颗粒能够与样品中的多种生物分子结合以产生生物分子冠签名。在一些实施方案中,每种传感器元件 (例如颗粒类型) 具有不同的生物分子冠签名。

[0091] 如本文中使用的术语“生物分子冠”是指与传感器元件结合的多种不同生物分子。术语“生物分子冠”可以是指当颗粒 (例如纳米颗粒) 与生物样品或生物系统接触时与颗粒结合的蛋白质、脂质及其他血浆组分。对于本文中使用的,术语“生物分子冠”还涵盖软和硬蛋白质冠,如参见Milani等人,“Reversible versus Irreversible Binding of Transferring to Polystyrene Nanoparticles:Soft and Hard Corona”ACS NANO,2012,6 (3),第2532-2541页;Mirshafiee等人,“Impact of protein pre-coating on the protein corona composition and nanoparticle cellular uptake”Biomaterials 75卷,2016年1月,第295-304页,Mahmoudi等人,“Emerging understanding of the protein corona at the nano-bio interfaces”Nanotoday 11 (6) 2016年12月,第817-832页,以及Mahmoudi等人,“Protein-Nanoparticle Interactions:Opportunities and Challenges”Chem.Rev.,2011,111 (9),第5610-5637页,其内容通过援引以其整体并入。如本文中所述,吸附曲线可以显示强有力结合的单层累积直至单层饱和点 (几何学上界定的蛋白质与NP比率),超过此单层饱和点,就形成了弱结合的第二层。虽然第一层不可逆地结合 (硬冠),但是第二层 (软冠) 可以表现出动态交换。以高亲和力吸附的蛋白质可以形成包含不易于解吸的紧密结合的蛋白质的“硬”冠,而以低亲和力吸附的蛋白质可以形成包含松散结合的蛋白质的“软”冠。软冠和硬冠还可以基于它们的交换时间进行表征。硬冠可以显示出若干小时量级的大得多的交换时间。参见,例如M.Rahman等人,Protein-Nanoparticle Interactions, Spring Series in Biophysics 15,2013,通过援引以其整体并入。

[0092] 术语“生物分子”是指可能参与冠形成的生物组分,包括但不限于,例如,蛋白质、多肽、多糖、糖、脂质、脂蛋白、代谢物、寡核苷酸、代谢物组或其组合。考虑到不同颗粒的生

物分子冠可能包含一些相同的生物分子,可能包含就其他传感器元件而言不同的生物分子,和/或可能区别在于与每种传感器元件结合的生物分子的水平或数量、类型或构象。在一个实施方案中,生物分子选自蛋白质、核酸、脂质和代谢物组。

[0093] 术语“生物分子冠签名”是指与每种颗粒类型或单独的传感器元件结合的不同生物分子的组成、签名或模式。签名可以不仅是指不同的生物分子,而且是指与传感器元件结合的生物分子的量、水平或数量的差异,或者与颗粒或传感器元件结合的生物分子的构象状态的差异。考虑到每种不同类型的传感器元件的生物分子冠签名可能包含一些相同的生物分子,可能包含就其他传感器元件而言不同的生物分子,和/或可能区别在于各种生物分子的水平或数量、类型或构象。生物分子冠签名可能不仅依赖于传感器元件(例如颗粒)的物理化学特性,而且依赖于样品的性质以及暴露于生物样品的持续时间。

[0094] 本文公开了用于多组学(multi-omic)分析的组合物和方法。“多组学”(multiomic)可以是指大规模分析生物分子的分析方法,其中数据集合是多种组学,诸如蛋白质组、基因组、转录物组、脂质组和代谢物组。多组学数据的非限制性示例包括蛋白质组学数据、基因组学数据、脂质组学数据、糖组学(glycomic)数据、转录物组学数据或代谢物组学数据。

[0095] “生物分子冠”中“生物分子”可指可由生物有机体产生或存在于生物有机体中的任何分子或生物组分。生物分子的非限制性示例包括蛋白质(蛋白质冠)、多肽、寡肽、聚酮、多糖、糖、脂质、脂蛋白、代谢物、寡核苷酸、核酸(DNA、RNA、微RNA、质粒、单链核酸、双链核酸)、代谢物组,以及小分子诸如初级代谢物、次级代谢物以及其他天然产物或其任何组合。在一些实施方案中,生物分子选自蛋白质、核酸、脂质和代谢物组。

[0096] 目前,有少量的基于蛋白质的生物标志物用于临床诊断,尽管为了分析血浆蛋白质组以扩展标志物而进行了广泛的努力,但相对较少的新的候选物被接受为临床有用的测试。血浆蛋白质组包含>10,000种蛋白质和潜在的一个数量级以上的蛋白质同种型,其浓度范围跨10个数量级(从mg/mL到pg/mL)。这些特性,加上缺乏蛋白质组分析工作的方便的分子工具(如复制或扩增机制),使得血浆蛋白质组的综合研究异常具有挑战性。克服生物样品中蛋白质的宽动态范围的方法仍然是针对数千种独特蛋白质甚至更多的蛋白质变体的稳健鉴定和定量。然而,不存在能够以足够的通量和实用成本的形成在整个血浆浓度范围内同时测量蛋白质,以允许具有用于验证和重复的稳健前景的适当规模的研究的现有技术。这些挑战不仅限制了基于蛋白质的疾病生物标志物的发现,而且已经成为更快采用蛋白质基因组学和基因组变异的蛋白质注释的瓶颈。质谱(MS)技术的进步以及改进的数据分析技术的发展为蛋白质组学的深入和广泛分析提供了工具。已经进行了若干尝试来实质性地改进低丰度蛋白质的检测,如高丰度蛋白质的耗减、血浆分级、肽分级和同量异位素标记。然而,目前的方法相当复杂和耗时(几天到几周),因此需要在蛋白质覆盖深度和样品通量之间进行折衷。因此,对蛋白质组中可用信息体进行全面和快速分析的简单而稳健的策略仍然是一个尚未满足的需求。

[0097] 此外,疾病被诊断得越早,疾病就越有可能被治愈或成功控制,从而为患者带来更好的预后。当疾病得到早期治疗时,可以预防或延迟疾病的问题,并且可以改善患者的结局,包括延长患者的寿命和/或生活质量。

[0098] 癌症的早期诊断是至关重要的,因为许多类型的癌症可以在其早期阶段得到成功

的治疗。例如,乳腺癌、卵巢癌和肺癌的早期诊断和治疗后的五年生存率分别为90%、90%和70%,而在疾病的最晚期被诊断的患者的五年生存率分别为15%、5%和10%。一旦癌细胞离开其来源组织,使用可获得的已建立的治疗剂的成功治疗变得非常不可能。虽然认识到癌症的警告迹象并迅速采取行动可能导致早期诊断,但大多数癌症(如肺)是在癌细胞已经侵入周围组织并转移到全身之后才表现出症状。例如,超过60%的乳腺癌、肺癌、结肠癌和卵巢癌患者在其癌症被检测出时已有隐匿性甚至转移性集落。因此,迫切需要开发一种有效的癌症早期检测方法。这种方法应具有鉴定不同阶段的癌症的敏感性和在被检测者没有癌症时给出阴性结果的特异性。已经作出了广泛的努力来开发癌症早期检测的方法;尽管大量的风险因素和生物标志物已经被引入,但用于多种癌症的早期检测的广泛相关的平台仍然是难以捉摸的。

[0099] 由于各种类型的癌症可以改变血浆的组成—甚至在其早期阶段—一种有希望的早期检测方法是生物标志物的分子血液分析。虽然这一策略已经对少数癌症起作用(如前列腺癌的PSA),但目前还没有用于大多数癌症的早期检测的特异性的生物标志物。对于这类癌症(例如肺癌),没有明确的候选循环生物标志物已被临床验证,并且极少达到后期临床开发阶段。因此,迫切需要新的方法来提高我们在非常早期检测癌症以及其他疾病的能力。

[0100] 自动化样品制备

[0101] 本公开内容提供了用于自动化样品制备、数据生成、蛋白质冠分析的系统和方法。如图1中所示,所述系统和方法可以包括(1)使样品与在传感器阵列、基底、板上的或在前述任一种上的分区内的颗粒(例如在颗粒混合物中)接触,(2)使该样品中的生物分子得以结合至颗粒,(3)从颗粒移除未被结合的样品,以及(4)制备样品以供(例如利用质谱法(“MS”))分析。例如,在(1)中,本公开内容的方法可以包括使生物样品与多种颗粒接触。在(2)中,所述样品可以与多种颗粒一起孵育以便促使生物分子吸附于颗粒。在(3)中,未被结合的样品可以被移除同时保留颗粒并且生物分子被吸附于颗粒。在(4)中,被吸附的生物分子可以从颗粒解吸并且将它们制备用于质谱分析,由此可以生成示例性数据。

[0102] 本公开内容提供了用于生物分子冠制备和分析的自动化系统、方法和试剂盒。所述自动化装置可以利用图2中所示的各种单元执行至少图1中概括的上述数据生成步骤。自动化装置可以包括具有多个分区的基底,所述多个分区包含传感器元件205和生物样品210。该装置上的加载单元215可以将生物样品210的部分转移至基底205上的分区中,导致生物分子从生物样品吸附至该基底上的分区中的传感器元件上。自动化装置可以随后从该分区移除未被结合的生物分子,任选地将未被结合的样品转移至废物容器220中。其余的生物分子(例如被吸附于传感器元件的生物分子)可以被解吸,收集和制备用于质谱分析。试剂225可以包含缓冲剂,诸如能够将生物分子从生物分子冠解吸的重悬浮缓冲剂,或者能够使生物分子变性或碎裂的变性缓冲剂。试剂(例如缓冲剂或蛋白酶)225还可以利用加载单元215进行加载以促进任何前述功能。

[0103] 在一些方面中,本公开内容提供一种自动化系统,所述自动化系统包括在利用具有物理化学特性不同的表面的多种颗粒辨别复杂生物样品的状态方面具有差异化功能的单元的网络,其中:第一单元包括用于在所述系统内的单元之间转移流体的多通道流体转移设备;第二单元包括用于储存多种生物样品的支撑件;第三单元包括用于具有分区的传

传感器阵列板(例如包括包含传感器元件的多个分区的基底,诸如包含纳米颗粒的96孔板)的支撑件,所述分区包含所述多种颗粒,所述多种颗粒具有物理化学特性不同的表面以便检测复杂生物样品内的分析物群与多种颗粒之间的结合相互作用;第四单元包括用于储存多种试剂的支撑件;第五单元包括用于储存要处置的试剂的支撑件;第六单元包括用于储存由所述多通道流体转移设备使用的消耗品的支撑件;并且其中所述系统被编程为执行一系列步骤,所述步骤包括:使生物样品与传感器阵列的指定分区接触;将生物样品与被包含在传感器阵列板的分区内的多种颗粒一起孵育;从分区中移除除了所述多种颗粒以及与颗粒相互作用的分析物群之外的所有组分;以及制备用于质谱法的样品。

[0104] 这种装置的示例提供在图3中。该装置包括:能够在生物样品储存单元之间转移体积的自动化移液管、包括包含多种传感器元件的多个分区的基底、废物收集单元、包含变性溶液的单元,以及包含重悬浮溶液的单元。自动化装置可以执行生物分子冠测定,该测定包括将生物样品的部分转移至基底内的包含传感器元件的分区中,将样品的部分与传感器元件一起孵育以允许来自生物样品的生物分子结合至传感器元件,从分区移除包含未被结合至传感器元件的生物分子的内容物,以及随后制备剩余在分区内的生物分子以供质谱(MS)分析(例如LC-MS)。

[0105] 加载可以包括一定程度的移动性以至能够接近该系统内的所有其他单元。该加载可以包括执行移液功能的能力。

[0106] 本公开内容的系统或装置可以包括用于单板、6孔板、12孔板、96孔板、192孔板、384孔板或微型管支架的支撑件。在一些实施方案中,本公开内容的系统或装置可以包括能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。在一些实施方案中,本公开内容的系统或装置可以包括能够物理地搅动和/或混合样品的旋转单元。

[0107] 在一些实施方案中,包括物理化学特性不同的表面以便检测复杂生物样品内的分析物群与多种颗粒之间的结合相互作用的多种颗粒被固定于传感器阵列的分区内的表面。在一些实施方案中,多种颗粒包括在溶液中具有不同物理化学特性的多种磁性纳米颗粒以便检测复杂生物样品内的分析物群与多种颗粒之间的结合相互作用。在一些实施方案中,所述系统包括步骤,其中传感器阵列板被转移至附加的第七单元并且被孵育额外的时间量,所述第七单元包括经磁化的支撑件以及能够调节所述支撑件和样品的温度的热单元。

[0108] 在一些实施方案中,第四单元包括试剂组用于:产生传感器阵列板;洗涤未被结合的样品;和/或制备用于质谱法的样品。在一些实施方案中,使生物样品与传感器阵列的指定分区接触包括将指定体积的所述生物样品移液至传感器阵列的所述指定分区中。在一些实施方案中,使生物样品与传感器阵列的指定分区接触包括将与溶液中的多种颗粒比所述生物样品的比率1:1、1:2:1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:15或1:20对应的体积移液。

[0109] 在一些实施方案中,使生物样品与传感器阵列的指定分区接触包括将至少10微升、至少50微升、至少100微升、至少250微升、至少500微升或至少1000微升体积的所述生物样品移液至传感器阵列的所述指定分区中。

[0110] 自动化装置

[0111] 在一些方面中,本公开内容提供一种用于从生物样品中生成生物分子的子集的自动化装置,所述自动化装置包括:包括多个分区的基底,包含所述生物样品的第一单元,以

及加载单元,所述加载单元是跨所述基底可移动的并且能够在该装置的不同单元之间转移体积(例如缓冲剂的体积)。在一些情况中,所述基底是多孔板。

[0112] 多个分区可以包括多种传感器元件。多种传感器元件可以包括颗粒。多种传感器元件可以是颗粒(例如纳米颗粒或微颗粒)。

[0113] 多个分区中的分区可以包括1至100种类型的传感器元件(例如种不同的颗粒类型)。多个分区中的分区可以包括2至50种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括2至5种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括3至8种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括4至10种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括5至12种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括6至15种类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括8至20种类型的传感器元件。

[0114] 多个分区中的两个或更多个分区可以包括不同数量的传感器元件。多个分区中的两个或更多个分区可以包括不同类型的传感器元件。多个分区中的分区可以包括与多个分区中的其他分区不同的传感器元件的类型和/或数量的组合。多个分区中的分区子集可以各自包括不同于多个分区中的其他分区的不同传感器元件的组合。

[0115] 传感器元件可以以干燥形式储存在分区以内或内部。干燥传感器元件可以在使用之前进行复原或再水合。传感器元件还可以储存在溶液内。例如,基底分区可以包括包含高浓度颗粒的溶液。

[0116] 多个分区中的分区包括不同浓度或量(例如质量/摩尔量/单位体积的样品)的传感器元件。多个分区中的分区可以包括1pM至100nM的传感器元件。多个分区中的分区可以包括1pM至500pM的传感器元件。多个分区中的分区可以包括10pM至1nM的传感器元件。多个分区中的分区可以包括100pM至10nM的传感器元件。多个分区中的分区可以包括500pM至100nM的传感器元件。多个分区中的分区可以包括50μg/ml至300μg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括100μg/ml至500μg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括250μg/ml至750μg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括400μg/ml至1mg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括600μg/ml至1.5mg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括800μg/ml至2mg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括1mg/ml至3mg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括2mg/ml至5mg/ml的传感器元件。多个分区中的分区可以包括大于5mg/ml的传感器元件。

[0117] 加载单元可以被配置为在该装置内的任何单元、隔室或分区之间移动并且转移体积(例如溶液或粉末的体积)。加载单元可以被配置为移动精确的体积(例如指定体积的0.1%、0.01%、0.001%内)。加载单元可以被配置为从基底或从基底内的隔室或分区收集体积,并且将该体积分配回到该基底中或该基底内的隔室或分区中,或者将该体积或该体积的部分分配到不同的单元、隔室或分区中。加载单元可以被配置为同时移动多个体积,诸如2至400个单独的体积。加载单元可以包括多个移液管吸头。

[0118] 加载单元可以被配置为移动液体的体积。该体积可以是约0.1μl、0.2μl、0.3μl、0.4μl、0.5μl、0.6μl、0.7μl、0.8μl、0.9μl、1μl、2μl、3μl、4μl、5μl、6μl、7μl、8μl、9μl、10μl、12μl、15μl、20μl、25μl、30μl、40μl、50μl、60μl、70μl、80μl、90μl、100μl、120μl、150μl、180μl、200μl、250μl、300μl、400μl、500μl、600μl、800μl、1ml或大于1ml。该液体可以是生物样品或溶液。

[0119] 在一些情况中,所述溶液包括洗涤溶液、重悬浮溶液、变性溶液、缓冲剂、试剂(例如还原试剂)或其任何组合。在一些情况中,所述溶液包含生物样品。

[0120] 部分地凭借这些功能,加载单元可以能够将样品分区。在一些实施方案中,这包括将样品分入多个分区中。样品可以被分入至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、100、120、150、180、200、250、300、350、400、500或更多个分区中。样品可以被分入96、192或384个分区中。自动化装置可以包括包含分区的多个基底。自动化装置可以包括包含分区的1、2、3、4、5或更多个基底。在一些情况中,加载单元将不同体积的生物样品加载入不同分区中。在一些情况中,加载单元将相同体积加载入两个或更多个分区中。加载入分区中的生物样品的体积可以是约0.1 μ l、0.2 μ l、0.3 μ l、0.4 μ l、0.5 μ l、0.6 μ l、0.7 μ l、0.8 μ l、0.9 μ l、1 μ l、2 μ l、3 μ l、4 μ l、5 μ l、6 μ l、7 μ l、8 μ l、9 μ l、10 μ l、12 μ l、15 μ l、20 μ l、25 μ l、30 μ l、40 μ l、50 μ l、60 μ l、70 μ l、80 μ l、90 μ l、100 μ l、120 μ l、150 μ l、180 μ l、200 μ l、250 μ l、300 μ l、400 μ l、500 μ l、600 μ l、800 μ l、1ml或大于1ml。加载入分区中的生物样品的体积可以是约10 μ l至400 μ l。加载入分区中的生物样品的体积可以是约5 μ l至150 μ l。加载入分区中的生物样品的体积可以是约35 μ l至80 μ l。在一些情况中,加载单元可以将两种或更多种生物样品分区。例如,样品储存单元可以包含两种生物样品,该系统将其分区在一孔板中。在一些实施方案中,加载单元可以促进用于质谱法的样品转移至质谱单元。

[0121] 该系统可以被配置为对样品或样品分区进行稀释。样品或样品分区可以用缓冲剂、水(例如纯净水)、非水溶剂或其任何组合进行稀释。稀释剂可以在分配至基底分区之前储存在自动化装置中。自动化装置可以储存在pH、盐度、克分子渗透压浓度、粘度、介电常数或其任何组合方面不同的多种稀释剂。稀释剂可以用于调整样品或样品分区的化学特性。自动化装置可以将样品或样品分区稀释2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍、150倍、200倍、300倍、400倍、500倍或更多倍。自动化装置可以对两种样品或样品分区执行不同的稀释。该系统可以对多个分区中的每个分区执行不同的稀释。例如,该系统可以对96孔板中的96个样品分区中的每个分区执行不同的稀释。在一些情况中,不同的稀释包括不同程度的稀释(例如2倍对比4倍)。在一些情况中,不同的稀释包括用不同的溶液(例如不同缓冲剂)稀释。在一些情况中,可以使得两个样品分区在一种或多种化学特性诸如pH、盐度或粘度方面有差异。

[0122] 在一些情况中,该系统可以修改样品或样品分区的化学组成。该系统可以针对样品或样品分区修改或调整pH、盐度、克分子渗透压浓度、介电常数、粘度、缓冲剂类型、盐类型、糖类型、洗涤剂类型或其任何组合。这种修改或调整可以包括将来自第四单元的试剂与样品或样品分区混合。该系统可以不同地修改两种样品或样品分区的化学组成。

[0123] 本公开内容的系统或自动化装置还可以包括孵育元件。所述孵育元件可以接触、支撑或固持自动化装置的另一部件(例如基底或单元)。孵育单元可以接触、支撑或固持自动化装置的多个部件。孵育元件可以接触基底以促进孵育元件与基底之间的热传递。孵育单元可以被配置为诸如通过加热或冷却来控制自动化装置的一个或多个部件的温度。孵育元件可以使该装置的部件能够从20℃冷却至1℃。孵育元件可以使该装置的部件能够从25℃加热至100℃。孵育元件可以将该装置的部件的温度能够从4℃至37℃进行设定。孵育元件可以被配置为将自动化装置的部件的不同部分加热或冷却至不同温度。例如,孵育元件可以使基底中的第一分区保持在30℃而使基底中的第二分区保持在35℃。孵育元件可以控

制样品或分区的温度。孵育元件可以包括用于检测分区或容器内的温度的温度传感器(例如热电偶)。孵育元件可以根据来自温度传感器的读数而校准其加热或冷却。

[0124] 孵育元件可以被配置为物理地搅动自动化装置的部件。该搅动可以是振摇或旋转、振动、摇摆、超声波处理或其任何组合的形式。孵育元件可以能够提供多种搅动强度和/或频率。例如,孵育元件可以包括对以不同的频率和振幅振摇的多种设定。孵育元件还可以能够搅拌和/或混合体积(例如生物样品的部分)。

[0125] 自动化装置可以包括包含重悬浮溶液的单元。加载单元可以能够将重悬浮溶液的体积转移至基底的多个分区中的分区。在一些情况中,这导致稀释存在于该分区内的样品并且可以进一步导致多种生物分子从在分区内的传感器元件上沉积的生物分子冠解吸。从生物分子冠解吸的生物分子的数量可以取决于添加至分区重悬浮溶液的体积、分区的温度、重悬浮溶液的组成(例如盐度、克分子渗透压浓度、粘度、介电常数或pH)、分区内的生物样品的体积,以及生物分子冠中的传感器元件类型和生物分子的组成。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致小于5%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致10%至20%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致20%至30%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致30%至40%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致40%至50%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致50%至60%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致60%至70%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致70%至80%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致80%至90%的生物分子从生物分子冠解吸。重悬浮溶液的体积转移至分区中可以导致大于90%的生物分子从生物分子冠解吸。

[0126] 在一些情况中,进行了多轮解吸。在每一轮中,包含被解吸的生物分子的上清液可以被收集、分析或弃去。上清液中的生物分子的类型和丰度可能在解吸轮次之间有差异。自动化装置可以执行一个或多个解吸和弃去循环(即洗涤),后随包括样品收集和/或分析的一个或多个解吸循环。

[0127] 重悬浮溶液可以被定制为优化对特定生物标志物的富集。重悬浮溶液可以包含缓冲剂,诸如Tris-EDTA(TE)、CHAPS、PBS、柠檬酸盐、HEPES、MES、CHES或其他生物缓冲剂。重悬浮溶液可以包含Tris EDTA(TE) 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。重悬浮溶液可以包含10mM TrisHCl pH 7.4、1mM EDTA。重悬浮溶液还可以包含或是高度纯化的水(例如蒸馏水或去离子水)。生物分子解吸可以通过孵育元件加热或搅动而加强。上清液可以在解吸之后被转移至新分区。重悬浮溶液可以用于稀释样品。

[0128] 自动化装置可以包括包含变性溶液的单元。变性溶液可以包含蛋白酶。变性溶液可以包含能够进行肽切割的化学品(例如溴化氰、甲酸或羟胺、2-硝基-5-硫氰基苯甲酸)。变性溶液可以包含化学变性剂诸如胍、脲、脱氧胆酸钠、乙腈、三氯乙酸、乙酸、磺基水杨酸、碳酸氢钠、乙醇、高氯酸盐、十二烷基硫酸盐或其任何组合。变性溶液可以包含还原剂,诸如2-巯基乙醇、二硫苏糖醇或三(2-羧乙基)膦。蛋白酶可以是胰蛋白酶。变性溶液可以在解吸之后被添加至分区。变性溶液可以被添加至包含生物分子冠的分区。

[0129] 自动化装置可以包括磁体或磁体阵列。自动化装置可以能够移动基底至磁体或磁

体阵列和离开。磁体阵列可以被构造为来自磁体阵列的多个磁体可以直接置于来自基底的多个分区下方。磁体可以能够将磁性传感器元件(例如磁性颗粒诸如有涂层或无涂层的超顺磁性铁氧化物纳米颗粒)固定在基底上的分区内。例如,磁体可以防止磁性纳米颗粒在洗涤步骤期间从分区移除。磁体还可以由一批磁性颗粒产生团粒。磁体可以在小于10分钟内产生颗粒团粒。磁体可以在小于5分钟内产生颗粒团粒。颗粒团粒可以包括具有生物分子冠的颗粒。

[0130] 自动化装置可以包括纯化单元。纯化单元可以包括包含吸附剂或树脂的多个分区。纯化单元可以包括固相萃取阵列或板。固相萃取阵列或板可以包含极性固定相材料。固相萃取阵列或板可以包含非极性固定相材料。固相萃取阵列或板可以包含C18固定相材料(例如十八烷基硅胶)。自动化装置可以包括包含用于纯化单元的调理溶液(例如用于固相萃取材料的调理溶液)的单元。自动化装置可以包括具有用于从纯化单元中移除生物分子的洗脱溶液的单元。

[0131] 在一些实施方案中,将除了多种传感器元件以及与所述多种传感器元件相互作用的分析物群之外的组分从分区中移除(即洗涤步骤)。在一些情形中,自动化装置可以执行一系列洗涤步骤。洗涤步骤可以将分区内的未与传感器元件结合的生物分子移除。洗涤步骤可以使分区内的与传感器元件结合的生物分子的子集解吸。例如,洗涤步骤可以导致软冠分析物的子集的解吸和移除而留下与传感器元件结合的大多数硬冠分析物。

[0132] 在一些方面中,本公开内容提供一种用于鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种颗粒,并且其中自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠。

[0133] 在一些方面中,本公开内容提供一种用于鉴定生物样品中的蛋白质的自动化装置,所述自动化装置包括:样品制备单元;包括多个通道的基底;多个移液管;多种溶液、多种纳米颗粒,其中所述自动化装置被配置为形成蛋白质冠并且消化所述蛋白质冠,并且其中所述溶液中的至少一种是TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。

[0134] 在一些实施方案中,样品制备单元被配置为利用多个移液管将多种纳米颗粒添加至基底。在一些实施方案中,样品制备单元被配置为利用多个移液管将生物样品添加至基底。在一些实施方案中,样品制备单元被配置为孵育多种纳米颗粒和生物样品以形成蛋白质冠。

[0135] 在一些实施方案中,样品制备单元被配置为从上清液中分离蛋白质冠以形成蛋白质冠团粒。在一些实施方案中,样品制备单元被配置为将蛋白质冠团粒用TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂复原。

[0136] 在一些实施方案中,自动化装置进一步包括磁性源。在一些实施方案中,自动化装置被配置用于蛋白质冠的BCA、凝胶或胰蛋白酶消化。

[0137] 在一些实施方案中,自动化装置是封闭的。在一些实施方案中,自动化装置在使用之前被灭菌。在一些实施方案中,自动化装置被配置为质谱法。在一些实施方案中,自动化装置是温度受控的。

[0138] 测定方法

[0139] 在一些方面中,本公开内容提供一种鉴定生物样品中的蛋白质的方法。在一些情况中,所述方法包括:将生物样品添加至本文公开的自动化装置;由所述自动化装置生成蛋

白质组学数据;以及量化所述蛋白质组学数据。

[0140] 在一些实施方案中,所述方法包括在自动化装置中将多种生物分子与生物样品一起孵育以形成蛋白质冠。在一些实施方案中,将生物样品与被包含在基底的分区内的多种传感器元件(例如颗粒)一起孵育包括至少约10秒、至少约15秒、至少约20秒、至少约25秒、至少约30秒、至少约40秒、至少约50秒、至少约60秒、至少约90秒、至少约2分钟、至少约3分钟、至少约4分钟、至少约5分钟、至少约6分钟、至少约7分钟、至少约8分钟、至少约9分钟、至少约10分钟、至少约15分钟、至少约20分钟、至少约25分钟、至少约30分钟、至少约45分钟、至少约50分钟、至少约60分钟、至少约90分钟、至少约2小时、至少约3小时、至少约4小时、至少约5小时、至少约6小时、至少约7小时、至少约8小时、至少约9小时、至少约10小时、至少约12小时、至少约14小时、至少约15小时、至少约16小时、至少约17小时、至少约18小时、至少约19小时、至少约20小时或至少约24小时的孵育时间。在一些情况中,两个孔将具有两种不同的孵育时间。在一些实施方案中,将生物样品与被包含在基底的分区内的多种颗粒一起孵育包括约4℃至约37℃的孵育温度。在一些实施方案中,将生物样品与被包含在基底的分区内的多种颗粒一起孵育包括约4℃至约100℃的孵育温度。

[0141] 本公开内容的方法、系统和装置可以包括覆盖或密封基底上的分区。这可以包括用盖或密封件覆盖该装置的表面。盖或密封件可以防止溶液或物质离开分区(例如从分区中蒸发)。自动化装置可以被配置为安置和/或移除盖或密封件。盖或密封件可以是可刺穿的(例如可以包括塞子),从而允许注射器或针进入基底分区而无需移除盖或密封件。

[0142] 在一些情况中,本公开内容的系统、装置和方法进一步包括从生物分子冠制备分析物以供分析(例如质谱分析)。这可以包括在自动化装置中从上清液中分离生物分子冠。生物分子冠可以通过移除上清液并随后使多种蛋白质从生物分子冠中解吸入解吸剂(desorbate)溶液(例如重悬浮溶液)中而从上清液中分离。在一些情况中,将来自生物分子冠的生物分子的第一部分从生物分子冠中解吸并且弃去,并且将来自生物分子冠的生物分子的第二部分从生物分子冠中解吸并且收集(例如以供分析)。来自生物分子冠的生物分子的多个部分可以分别地被解吸、收集和分析。

[0143] 在一些情况中,将生物分子冠内的生物分子变性、碎裂、化学修饰或其任何组合。这些处理可以对经解吸的生物分子或生物分子冠执行。从生物分子冠中解吸的多种生物分子可以包含来自生物分子冠的生物分子的1%、2%、3%、4%、5%、6%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或大于99%。解吸可以进行不同的时间长度,包括5秒、15秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、6分钟、8分钟、10分钟、12分钟、15分钟、20分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、8小时、12小时或更长。在一些情况中,解吸包括物理搅动,诸如振摇或超声波处理。从颗粒冠中解吸的蛋白质的百分比可能取决于解吸时间、蛋白质被解吸而进入的解吸剂溶液的化学组成(例如pH或缓冲剂类型)、解吸温度、施加的物理搅动的形式和强度,或其任何组合。此外,从蛋白质冠中解吸的蛋白质的类型可能受解吸条件和方法的影响。从蛋白质冠中解吸的蛋白质的类型可能在两种解吸条件或方法之间差异1%、2%、3%、4%、5%、6%、8%、10%、12%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%或更多。

[0144] 在一些情况中,从生物分子冠中制备分析物以供分析包括在自动化装置中消化生

物分子冠、蛋白质冠内的生物分子的子集或从生物分子冠中解吸的生物分子以形成经消化的样品。从生物分子冠中制备分析物以供分析还可以包括化学修饰来自生物分子冠的生物分子,诸如甲基化或还原生物分子。

[0145] 经解吸的生物分子可以被收集以供进一步分析(例如质谱分析)。自动化装置可以例如通过从包含从生物分子冠中解吸的生物分子的基底分区中收集样品体积来进行收集。方法可以包括安置分区或多个分区(例如孔板),可以将所述分区直接置于用于进行所述分析的设备内。

[0146] 方法可以包括从生物分子冠中多轮制备分析物以供分析。方法可以包括1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多轮制备。在一些情况中,每一轮产生单独的样品以供分析(例如经解吸的生物分子可以在每一轮之后被收集并且进行质谱分析)。两轮可以包括从生物分子冠中解吸不同的多种蛋白质。两轮还可以包括不同的解吸方法或条件,诸如不同的解吸剂溶液体积、不同的解吸剂溶液类型(例如包含不同的缓冲剂或克分子渗透压浓度的解吸剂溶液)、不同的温度或不同类型和程度的物理搅动。从单种生物分子冠中相继两轮或更多轮制备(例如从生物分子冠中解吸和收集第一子集生物分子而后从生物分子冠中解吸和收集第二子集生物分子)可以生成两个子集的生物分子。这可以提供在蛋白质冠内生物分子相互作用的检测或分析信息。因此,从单种生物分子冠中多轮制备可以用于生成超过分区或传感器类型的数量的多个生物分子子集。例如,如果每个分区包含颗粒和溶液条件的独特组合并且对每个分区进行10轮分析物制备,则利用具有96个分区的基底(例如96孔板)的方法可以生成多达960个独特生物分子子集。

[0147] 可以在单独的分区内进行不同轮数的分析物制备。分区还可以处于不同的分析物制备条件。进行更多轮分析物制备可能增多收集用于分析的蛋白质的数量或蛋白质类型(例如生成落入可用于同时质谱检测的浓度范围内的更多蛋白质)。当进行多轮分析物制备时被检测的蛋白质数量或蛋白质类型可能比进行单轮分析物制备的情况高10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%或大于200%。

[0148] 在一些情况中,所述方法包括将传感器元件固定在分区内。所述固定可以在从分区中移除体积(例如加载单元从分区中移除95%的溶液)时防止传感器元件从分区中被移除。可以例如化学地(例如与基底共价或非共价结合)进行固定。化学固定可以包括使传感器元件与分区的表面反应。化学固定还可以包括使传感器元件与分区的表面非共价缔合。例如,传感器元件可以包含生物素部分,其与结合于分区表面的链霉亲和素结合。固定可以通过施加磁场以将磁性传感器元件保持在分区内来实现。例如,多种传感器元件可以包括多种磁性颗粒,并且基底和磁体可以处于邻近,以至一种或多种磁性颗粒被固定化在基底中的分区内。固定可以通过提供基底来实现,在所述基底上的分区内形成或嵌有传感器元件。例如,传感器元件可以是在基底内的分区的表面上形成的半颗粒。

[0149] 在一些情况中,传感器元件固定允许将生物分子冠从传感器元件分离。这可以包括将多种生物分子从与传感器元件缔合的生物分子冠中解吸,将传感器元件固定在分区内,以及随后收集含有来自生物分子冠的多种生物分子的溶液,从而将生物分子冠的至少一部分从传感器元件中分离。

[0150] 图4显示包括固定传感器元件的方法的示例,其可以由本公开内容的自动化装置执行。这些方法利用颗粒402和411来捕获样品中的生物分子403和404的子集。

[0151] 子图400显示包含颗粒402和生物分子的分区401。颗粒悬浮在分区内并且具有吸附的来自样品的生物分子403,从而形成生物分子冠。多种生物分子404可能未吸附至颗粒,反而将悬浮于分区内。子图410显示替代方法,包括在分区表面上形成的颗粒411。

[0152] 子图420和430显示用于固定颗粒的两种方法。在子图420中,颗粒通过磁体421而聚集到分区的底部上。在子图430中,颗粒经由接头431而交联至分区。两种方法都导致颗粒固定于分区。在整个固定过程中,颗粒吸附的生物分子403保持吸附于颗粒,而未被结合的生物分子404仍然与颗粒未结合。

[0153] 子图440显示来自子图410、420和430对分区的洗涤步骤的结果。在所有三种情况中,该洗涤将未被结合的生物分子从分区中移除,同时留下经固定的颗粒以及吸附于其的生物分子。子图450则显示生物分子冠的解吸,其中第一多种生物分子451从颗粒洗脱,而第二多种生物分子403仍然吸附于颗粒。被洗脱的生物分子与被吸附的生物分子之比与从颗粒洗脱的生物分子的类型取决于洗脱条件(例如物理搅动的温度、程度和类型、溶液条件诸如pH)。被洗脱的生物分子可以被(例如加载单元)收集以供进一步处理(例如裂解)或直接分析。

[0154] 图5显示可以由本公开内容的自动化装置执行的样品制备方法的示例。此方法利用传感器元件512从生物样品502中生成生物分子的子集。储存在样品容器501中的生物样品(示于子图500中)包含多种生物分子。样品的体积可以任选地被处理504(例如样品内的细胞可以被溶解,核酸和蛋白质可以被裂解,样品可以被过滤以除去大生物分子等),然后被添加至包含传感器元件512的分区511。如子图520中所示,生物分子521的部分可以结合至传感器元件,使它们从生物分子522中的未结合至传感器元件的部分分离。如子图530中所示,传感器元件可以随后通过使分区与磁体531接触而被固定在分区内。分区可以随后经过洗涤循环(例如将缓冲剂添加至分区,而后从分区中移除样品),导致生物分子522中的未结合至传感器元件的部分被移除(示于子图540中)。被结合的生物分子521可以从传感器元件中被洗脱并且收集以供进一步处理或分析。

[0155] 图6显示可以由本公开内容的自动化装置执行的样品制备方法。此方法利用在基底分区511的表面上形成的传感器元件512从生物样品502中收集生物分子503。生物样品从样品固持单元501转移504至基底分区511。如子图520中所示,传感器元件将从样品521中吸附生物分子的第一部分,而第二部分522将保持未被结合。子图530显示移除未被结合的生物分子,由此将传感器元件512和传感器元件结合的生物分子521留在分区内。随后可以将这些生物分子从传感器元件中解吸并且(例如由加载单元)收集以供进一步处理或分析。

[0156] 本文公开的方法可以包括从溶液中过滤传感器元件。例如,该方法可以包括使多种生物分子从与传感器元件缔合的生物分子冠中解吸,以及过滤溶液,从而将传感器元件收集在过滤器上而多种生物分子保留在溶液中。该过滤可以在变性(例如消化)之后进行。该过滤还可以移除多种生物分子或生物物质诸如完整蛋白质(例如来自生物样品的未经消化的蛋白质或蛋白酶)。

[0157] 在一些情况中,该方法包括纯化步骤。纯化步骤可以在从生物分子冠中制备分析物之前或之后。纯化步骤可以包括将生物样品(例如从生物分子冠中洗脱和收集的生物分子)转移至纯化单元(例如色谱柱)或纯化单元内的分区。纯化可以包括将多个样品分区从基底中转移至纯化单元中的单独的分区内。纯化单元可以包括固相萃取板。纯化步骤可以

从变性溶液中移除试剂(例如化学品和酶)。在纯化之后,生物样品可以被再收集以供在基底或纯化单元内进一步富集或化学处理,或可以被收集以供直接分析(例如质谱分析)。

[0158] 总之,本公开内容的方法能够实现对生物样品的高深度谱分析。在本公开内容的方法中收集的生物分子的子集可以在没有进一步操作或修饰生物分子的所述子集的情况下实现对收集的生物分子子集来自的生物样品中的生物分子类型中的至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少12%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%或大于60%进行质谱检测。生物分子的子集可以在没有进一步操作或修饰生物分子的所述子集的情况下实现对样品中的蛋白质类型中的至少2%、至少3%、至少4%、至少5%、至少6%、至少7%、至少8%、至少9%、至少10%、至少12%、至少15%、至少20%、至少25%、至少30%、至少40%、至少50%或大于50%进行质谱检测。在传感器元件上收集的或制备用于分析的生物分子的子集可以在没有进一步操作或修饰生物分子的所述子集的情况下实现对样品中跨6、7、8、9、10、11、12或更多个数量级的两种生物分子(例如蛋白质)进行同时质谱检测。例如,两种生物分子可以在单种样品内在6个数量级内的浓度下进行解吸和收集、碎裂并且随后进行质谱分析。

[0159] 在一些情况中,传感器元件的类型(例如与单种样品接触的给定类型的所有传感器元件)在与生物样品接触时吸附至少100至至少300种类型的蛋白质。传感器元件的类型可以在与生物样品接触时吸附至少200至至少500种类型的蛋白质。传感器元件的类型可以在与生物样品接触时吸附至少300至至少800种类型的蛋白质。传感器元件的类型可以在与生物样品接触时吸附至少400至至少1000种类型的蛋白质。传感器元件的类型可以在与生物样品接触时吸附至少500至至少1200种类型的蛋白质。

[0160] 在一些情况中,从多种传感器元件中收集的蛋白质将在蛋白质群组水平上进行鉴定。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括1至20,000个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括100至10,000个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括100至5,000个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括300至2,200个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括1,200至2,200个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括20,000至25,000个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括25,000至30,000个蛋白质群组。在分区中的传感器元件上收集的多个蛋白质群组可以包括30,000至50,000个蛋白质群组。

[0161] 本公开内容的方法可以导致从生物样品中富集低丰度生物分子(例如蛋白质)。低丰度生物分子可以是在生物样品中处于10ng/mL或更小浓度的生物分子。

[0162] 本公开内容的方法可以导致以比相同样品中的相同类型的最丰富生物分子的浓度低至少6个数量级的浓度存在的生物分子(例如蛋白质)富集(例如低丰度蛋白质可以是浓度比样品中的最丰富蛋白质低至少6个数量级的蛋白质)。数据库诸如表征血浆蛋白质组的Carr数据库(Keshishian等人,Mol.Cell Proteomics 14,2375-2393(2015),Plasma Proteome Database(plasmaproteomedatabase.org))可以提供比较的基础,从而可以确定检测的蛋白质或生物分子相对于血浆样品中存在的其他生物分子是否被富集。相似的数据库可以用于其他类型的生物样品。

[0163] 在特定的情况中,生物样品包括血液、血浆或血清,并且生物分子冠包含与该生物

样品相比清蛋白与非清蛋白蛋白质的较低比例。与在样品（从其中吸附蛋白质）中相比，在生物分子冠中清蛋白与非清蛋白蛋白质的比率可以低20%、30%、40%、50%、60%或70%。

[0164] 多种生物分子的浓度范围可以在形成生物分子冠时被压缩。例如，自动化装置可以使浓度在样品中的最浓的生物分子的6个数量级内的生物分子类型的数量增高至少25%、50%、100%、200%、300%、500%或1000%。类似地，经压缩的动态范围可以包括浓度在样品中的最丰富生物分子的6个数量级内的蛋白质类型数量的增高。自动化装置可以使浓度在样品中的最浓的蛋白质的6个数量级内的蛋白质类型的数量增高至少25%、50%、100%、200%、300%、500%或1000%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少10%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少20%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少30%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少40%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少50%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少60%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的生物分子类型的至少70%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少10%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少20%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少30%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少40%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少50%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少60%。自动化装置可以从生物样品中富集生物分子的子集，并且生物分子的子集可以包含来自生物样品的在6个数量级浓度范围内的蛋白质类型的至少70%。

[0165] 本公开内容的方法和传感器元件可以被定制为生物分子冠组成就样品脂质浓度而言是不变的。生物样品中的脂质浓度的至多10%变化可能导致生物分子冠中的蛋白质组成的小于5%、2%、1%或0.1%的变化。生物样品中的脂质浓度的至多10%变化可能导致生物分子冠中的蛋白质类型的数量的小于5%、2%、1%或0.1%的变化。生物样品中的脂质浓度的至多10%变化可能导致生物分子冠中的蛋白质总数的小于5%、2%、1%或0.1%的变化。

[0166] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括在自动化装置中洗涤经消化的样品。在

一些实施方案中,量化蛋白质组学数据包括将蛋白质组学数据提供至质谱仪。在一些实施方案中,生物样品是生物流体。在一些实施方案中,生物流体是血清或血浆。

[0167] 在一些情况中,整个测定时间(从单种样品诸如合并的血浆样品起,包括样品制备和LC-MS)可能是约8小时。整个测定时间(从单种样品诸如合并的血浆样品起,包括样品制备和LC-MS)可能是约至少1小时、至少2小时、至少3小时、至少4小时、至少5小时、至少6小时、至少7小时、至少8小时、至少9小时、至少10小时、不足20小时、不足19小时、不足18小时、不足17小时、不足16小时、不足15小时、不足14小时、不足13小时、不足12小时、不足11小时、不足10小时、不足9小时、不足8小时、不足7小时、不足6小时、不足5小时、不足4小时、不足3小时、不足2小时、不足1小时、至少5min至10min、至少10min至20min、至少20min至30min、至少30min至40min、至少40min至50min、至少50min至60min、至少1小时至1.5小时、至少1.5小时至2小时、至少2小时至2.5小时、至少2.5小时至3小时、至少3小时至3.5小时、至少3.5小时至4小时、至少4小时至4.5小时、至少4.5小时至5小时、至少5小时至5.5小时、至少5.5小时至6小时、至少6小时至6.5小时、至少6.5小时至7小时、至少7小时至7.5小时、至少7.5小时至8小时、至少8小时至8.5小时、至少8.5小时至9小时、至少9小时至9.5小时,或至少9.5小时至10小时。

[0168] 动态范围

[0169] 本文所述的生物分子冠分析方法可以包括在宽动态范围中测定本公开内容的样品中的生物分子。样品中测定的生物分子的动态范围可以是生物分子丰度的测量信号的范围,如通过测定方法(例如质谱法、色谱法、凝胶电泳、光谱法或免疫测定)测量样品内包含的生物分子。例如,能够在宽动态范围中检测蛋白质的测定可以能够检测极低丰度的蛋白质至极高丰度的蛋白质。测定的动态范围可能与作为生物分子丰度的函数的测定信号强度的斜率直接相关。例如,具有低动态范围的测定可以具有作为生物分子丰度的函数的测定信号强度的低(但正)斜率,例如高丰度生物分子的检测信号的比率相比于低丰度生物分子的检测信号的比率可以是对于具有低动态范围的测定而言比对于具有高动态范围的测定而言更低。在特定的情况中,动态范围可以是指样品或测定方法内蛋白质的动态范围。

[0170] 本文所述的生物分子冠分析方法可以压缩测定的动态范围。如果作为生物分子丰度的函数的测定信号强度的斜率低于另一测定,则该测定的动态范围可能相对于所述另一测定被压缩。例如,相比于直接对样品单独地用质谱法测定的血浆样品,或相比于数据库(例如Keshishian等人在Mol.Cell Proteomics 14,2375-2393(2015)中提供的数据库,本文中也称为“Carr数据库”)中为血浆蛋白质提供的丰度值,利用蛋白质冠分析和质谱法测定的血浆样品可以具有压缩的动态范围,如图13和图14中所示。经压缩的动态范围可以与单独使用质谱法相比能够实现利用生物分子冠分析和质谱法来检测生物样品中更低丰度的生物分子。

[0171] 在一些实施方案中,蛋白质组学分析测定的动态范围可以是由最高丰度蛋白质(例如最高10%的蛋白质丰度)产生的信号与由最低丰度蛋白质(例如最低10%的蛋白质丰度)产生的信号的比率。压缩蛋白质组学分析的动态范围可以包括相对于第二蛋白质组学分析测定,使第一蛋白质组学分析测定的由最高丰度蛋白质产生的信号与由最低丰度蛋白质产生的信号的比率降低。本文公开的蛋白质冠分析测定可以相对于总蛋白质分析方法(例如质谱法、凝胶电泳或液相色谱法)的动态范围压缩动态范围。

[0172] 本文中提供了用于压缩生物分子分析测定的动态范围的若干方法以促进相对于高丰度生物分子检测低丰度生物分子。例如,本公开内容的颗粒类型可以用于串行地探询样品。当孵育样品中的颗粒类型时,生物分子冠形成在该颗粒类型的表面上。如果在不使用所述颗粒类型的情况下直接检测样品中的生物分子(例如对样品的直接质谱分析),则与生物分子定向于颗粒类型的表面上的情况相比动态范围可以跨过更宽的浓度范围或更多数量级。因此,本文公开的颗粒类型可以用于压缩样品中的生物分子的动态范围。不受理论限制,可以观察到此效应,因为颗粒类型的生物分子冠中更多地捕获较高亲和力的较低丰度的生物分子,并且颗粒类型的生物分子冠中更少地捕获较低亲和力的较高丰度的生物分子。

[0173] 蛋白质组学分析测定的动态范围可以通过蛋白质组学分析测定测量的作为样品中的蛋白质的总丰度的函数的蛋白质信号图的斜率。压缩动态范围可以包括,相对于通过第二蛋白质组学分析测定测量的作为样品中的蛋白质的总丰度的函数的蛋白质信号图的斜率,降低通过蛋白质组学分析测定测量的作为样品中的蛋白质的总丰度的函数的蛋白质信号图的斜率。本文公开的蛋白质冠分析测定可以相对于总蛋白质分析方法(例如质谱法、凝胶电泳或液相色谱法)的动态范围压缩动态范围。

[0174] 自动化系统

[0175] 本公开内容的各方面提供一种自动化系统,包括自动化装置、质谱仪和计算机,所述自动化装置被配置为从生物样品中分离生物分子的子集,所述质谱仪被配置为接收生物分子的子集并且生成包括质谱信号或串联质谱信号的数据,包括一个或多个计算机处理器的计算机以及包括机器可执行代码的计算机可读介质,当执行所述代码时,生成生物指纹并且基于该生物指纹而确定生物状态。

[0176] 在许多情况中,自动化装置包括传感器元件或多种传感器元件,其从生物溶液中吸附生物分子,从而形成生物分子冠。构成这些生物分子冠的生物分子的类型、量和类别与传感器元件本身的物理化学特性以及不同生物分子本身和传感器元件之间的复杂相互作用强相关。这些相互作用导致产生每种传感器元件的独特生物分子冠签名。换言之,取决于哪种生物分子与传感器元件相互作用,不仅影响生物分子冠的构成,而且可能改变那些其他不同生物分子也可以与特定的所述传感器元件相互作用。

[0177] 各自具有其自身的生物分子冠签名的不同传感器元件可以与样品接触以产生该样品的独特生物分子指纹。此指纹随后可以用于确定受试者的疾病状态。多种传感器元件可以能够与样品中的多种生物分子结合以产生生物分子冠签名。多种传感器元件可以具有不同的生物分子冠签名。在特定情况中,每种类型的传感器元件具有不同的生物分子冠签名。例如,包含各自5pM的5种类型颗粒的多种颗粒可以每种颗粒类型具有一种生物分子冠签名。

[0178] 多种传感器元件当与样品接触时产生共同形成生物分子指纹的多种生物分子冠签名。“生物分子指纹”是多种传感器元件的至少两种生物分子冠签名的生物分子的合并的组成或模式。生物分子指纹可以包括至少5、10、20、40、80、150或200种不同生物分子冠签名。

[0179] 在一些情况中,自动化系统被配置为生物分子冠可以针对每种传感器元件分别地被测定,允许对每种元件测定生物分子冠签名。更广泛地,自动化系统可以被配置为每个样

品分区(例如基底中的每个孔)可以分别地被测定,从而可以对每个分区测定生物分子冠签名的合并集合。

[0180] 类似地,计算机可以被配置为比较来自多种生物分子冠签名、分区或从各个分区(例如通过多轮解吸)收集的生物分子的单独子集的数据。这可以提供对于常规方法不可能的谱分析灵敏度。许多生物状态(诸如许多病前状态)在患者的生物样品(例如血液、尿液等)中产生通常单独地由生物标志物分析不可分辨的细微差异。本发明装置、系统、方法和传感器元件的能力部分地源于传感器元件特征和生物样品组成对生物分子冠组成的相互依赖性,从而稀少群的生物分子的群体、化学状态(例如翻译后修饰状态)或甚至构象的小变化可能对特定传感器元件的生物分子冠签名具有主要影响。此外,根据数据的单集合可能不明显的生物状态可以通过在多种生物分子冠签名或样品分区测量值中各异的生物分子丰度之间的相关性来清楚地解释。因此,几乎等同的生物分子冠签名的组合可以以高准确度从患有癌症的受试者辨别健康受试者。

[0181] 在一些情况中,计算机被配置为处理包括多种不同生物分子冠签名的质谱信号或串联质谱信号的强度、APEX、光谱计数或肽数量、离子迁移行为的数据。计算机可以被配置为处理多种不同生物分子冠签名或样品分区的5,000至5,000,000个信号。计算机可以被配置为处理多种不同生物分子冠签名或样品分区的10,000至5,000,000个信号。计算机可以被配置为比较多种不同生物分子冠签名或样品分区之间的20,000至200,000个信号。计算机可以被配置为比较多种不同生物分子冠签名或样品分区之间的400,000至1,000,000个信号。计算机可以被配置为比较多种不同生物分子冠签名或样品分区之间的600,000至2,000,000个信号。计算机可以被配置为比较多种不同生物分子冠签名或样品分区之间的1,000,000至5,000,000个信号。在一些情况中,所述信号包括质谱信号或串联质谱信号。

[0182] 本公开内容的方面提供用于从质谱数据、串联质谱数据、色谱数据、离子迁移性数据或其任何组合的一个或多个集合生成生物分子指纹的方法。在一些情况中,质谱数据、串联质谱数据、色谱数据或离子迁移性数据可以用于确定来自生物样品的生物分子的浓度。多个样品分区可以运行单独的质谱或串联质谱。多个样品分区也可以在单个质谱或串联质谱运行中进行合并和共同地分析。多次质谱运行可以与多种不同色谱方法(例如不同的柱、缓冲剂或梯度)偶联。单个质谱或串联质谱运行在小于两小时、小于一小时或小于半小时内进行。

[0183] 本公开内容的方面提供以高可信度和高准确度鉴定生物状态和生物分子的方法。计算机可以被配置为以至少95%的概率或确定性阈值基于质谱信号或串联质谱信号和/或离子迁移和色谱行为而鉴定生物分子或表征未经鉴定的分子特征。计算机可以以至少70%准确度、至少75%准确度、至少80%准确度、至少85%准确度、至少90%准确度、至少92%准确度、至少95%准确度、至少96%准确度、至少97%准确度、至少98%准确度、至少99%准确度或100%准确度将生物分子指纹与生物状态相关联。计算机可以以至少70%灵敏度、至少75%灵敏度、至少80%灵敏度、至少85%灵敏度、至少90%灵敏度、至少92%灵敏度、至少95%灵敏度、至少96%灵敏度、至少97%灵敏度、至少98%灵敏度、至少99%灵敏度或100%灵敏度将生物分子指纹与生物状态相关联。计算机可以能够辨别与差异小于20%、15%、10%或8%、5%、3%、2%或1%的生物指纹相关联的两种生物状态。在一些方面中,如果检测到诊断信号的阈值水平,则验证了生物分子鉴定。例如,如果在质谱测定中为蛋白质群组

鉴定提供三个独特地可指定的肽片段信号的阈值数,则与特定蛋白质群组对应的两个肽片段信号将不被算入。

[0184] 传感器元件

[0185] 如本文中使用的术语“传感器元件”是指当与样品接触时能够与多种生物分子结合的元件并且涵盖术语“颗粒”。传感器元件可以是在至少一个方向上约5纳米(nm)至约50000nm的元件。适合的传感器元件包括但不限于,例如,在至少一个方向上约5nm至约50,000nm的传感器元件,包括约5nm至约40000nm、或者约5nm至约30000nm、或者约5nm至约20,000nm、或者约5nm至约10,000nm、或者约5nm至约5000nm、或者约5nm至约1000nm、或者约5nm至约500nm、或者约5nm至50nm、或者约10nm至100nm、或者约20nm至200nm、或者约30nm至300nm、或者约40nm至400nm、或者约50nm至500nm、或者约60nm至600nm、或者约70nm至700nm、或者约80nm至800nm、或者约90nm至900nm、或者约100nm至1000nm、或者约1000nm至10000nm、或者约10000nm至50000nm,及介于其间的任何组合或量(例如5nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50 nm、55nm、60nm、65nm、70nm、80nm、90nm、100nm、125nm、150nm、175nm、200nm、225nm、250nm、275nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、1000nm、1200nm、1300nm、1400nm、1500nm、1600nm、1700nm、1800nm、1900nm、2000nm、2500nm、3000nm、3500nm、4000nm、4500nm、5000nm、5500nm、6000nm、6500nm、7000nm、7500nm、8000nm、8500nm、9000nm、10000nm、11000nm、12000nm、13000nm、14000nm、15000nm、16000nm、17000nm、18000nm、19000nm、20000nm、25000nm、30000nm、35000nm、40000nm、45000nm、50000nm及其间的任何数)。纳米级传感器元件是指在至少一个方向上小于1微米的传感器元件。纳米级传感器元件的范围的适合示例包括但不限于,例如,在一个方向上约5nm至约1000nm的元件,包括例如,约5nm至约500nm、或者约5nm至约400nm、或者约5nm至约300nm、或者约5nm至约200nm、或者约5nm至约100nm、或者约5nm至约50nm、或者约10nm至约1000nm、或者约10nm至约750nm、或者约10nm至约500nm、或者约10nm至约250nm、或者约10nm至约200nm、或者约10nm至约100nm、或者约50 nm至约1000nm、或者约50nm至约500nm、或者约50nm至约250nm、或者约50nm至约200nm、或者约50nm至约100nm,以及其间的任何组合、范围或量(例如5nm、10nm、15nm、20nm、25nm、30nm、35nm、40nm、45nm、50 nm、55nm、60nm、65nm、70nm、80nm、90nm、100nm、125nm、150nm、175nm、200nm、225nm、250nm、275nm、300nm、350nm、400nm、450nm、500nm、550nm、600nm、650nm、700nm、750nm、800nm、850nm、900nm、1000nm等)。在提及本文所述的传感器阵列时,术语传感器元件的使用包括纳米级传感器元件用于传感器元件及相关方法。

[0186] 术语“多种传感器元件”是指多于一种(例如至少两种)传感器元件。在一些实施方案中,多种传感器元件包括至少两种传感器元件至至少 10^{15} 种传感器元件。在一些实施方案中,多种传感器元件包括 10^6-10^7 、 10^6-10^8 、 10^6-10^9 、 10^6-10^{10} 、 10^6-10^{11} 、 10^6-10^{12} 、 10^6-10^{13} 、 10^6-10^{14} 、 10^6-10^{15} 、 10^7-10^8 、 10^7-10^9 、 10^7-10^{10} 、 10^7-10^{11} 、 10^7-10^{12} 、 10^7-10^{13} 、 10^7-10^{14} 、 10^7-10^{15} 、 10^8-10^9 、 10^8-10^{10} 、 10^8-10^{11} 、 10^8-10^{12} 、 10^8-10^{13} 、 10^8-10^{14} 、 10^8-10^{15} 、 10^9-10^{10} 、 10^9-10^{11} 、 10^9-10^{12} 、 10^9-10^{13} 、 10^9-10^{14} 、 10^9-10^{15} 、 $10^{10}-10^{11}$ 、 $10^{10}-10^{12}$ 、 $10^{10}-10^{13}$ 、 $10^{10}-10^{14}$ 、 $10^{10}-10^{15}$ 、 $10^{11}-10^{12}$ 、 $10^{11}-10^{13}$ 、 $10^{11}-10^{14}$ 、 $10^{11}-10^{15}$ 、 $10^{12}-10^{13}$ 、 $10^{12}-10^{14}$ 、 $10^{12}-10^{15}$ 、 $10^{13}-10^{14}$ 、 $10^{13}-10^{15}$ 或 $10^{14}-10^{15}$ 种不同传感器元件。

[0187] 在一些实施方案中,多种传感器元件包括多种类型的传感器元件。多种传感器元

件可以包括至少两种至至少1000种类型的传感器元件、或者至少两种至至少50种类型的传感器元件、或者至少2至30种类型的传感器元件、或者至少2至20种类型的传感器元件、或者至少2至10种类型的传感器元件、或者至少3至至少50种类型的传感器元件、或者至少3至至少30种类型的传感器元件、或者至少3至至少20种类型的传感器元件、或者至少3至至少10种类型的传感器元件、或者至少4至至少50种类型的传感器元件、或者至少4至至少30种类型的传感器元件、或者至少4至至少20种类型的传感器元件、或者至少4至至少10种类型的传感器元件,并且包括介于其间考虑的任何类型数的传感器元件(例如至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、60、70、80、90、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190、200、225、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800种等)。多种传感器元件可以包括至少6种类型的传感器元件至至少20种类型的传感器元件,或者至少6种类型的传感器元件至至少10种类型的传感器元件。

[0188] 在一些情况中,增大传感器元件的数量可以是用于增大在给定样品中可被鉴定的生物分子(例如蛋白质)的数量。增大组大小如何可以增高鉴定的蛋白质数量的示例示于图10中。此图显示利用具有1至12种颗粒类型的组在测定中从冠分析中鉴定的蛋白质数量。在这些测定中,不同蛋白质而不是蛋白质群组通过质谱分析进行鉴定。鉴定的蛋白质类型的数量随着颗粒类型的数量增大而增大,包括从当一种颗粒类型用于收集蛋白质时419种独特鉴定的蛋白质至当12种颗粒类型用于收集蛋白质时1318种独特鉴定的蛋白质。

[0189] 传感器元件可以被官能化为具有范围广泛的物理化学特性。官能化传感器元件的适合方法是本领域已知的并且取决于传感器元件的组成(例如金、铁氧化物、二氧化硅、银等),并且包括但不限于,例如氨基丙基官能化、胺官能化、硼酸官能化、羧酸官能化、甲基官能化、琥珀酰亚胺基酯官能化、PEG官能化、链霉亲和素官能化、甲基醚官能化、三乙氧基丙基氨基硅烷官能化、硫醇官能化、PCP官能化、柠檬酸盐官能化、硫辛酸官能化、BPEI官能化、羧基官能化、羟基官能化及诸如此类。在一个实施方案中,传感器元件可以用胺基团($-NH_2$ 或羧基($COOH$))官能化。在一些实施方案中,纳米级传感器元件被极性官能团官能化。极性官能团的非限制性示例包括羧基、羟基、巯基、氰基、硝基、铵基、咪唑鎓基、铈基、吡啶鎓基、吡咯烷鎓基、磷基或其任何组合。在一些实施方案中,官能团是酸性官能团(例如磺酸基、羧基及诸如此类)、碱性官能团(例如氨基、环仲胺基(诸如吡咯烷基和哌啶基)、吡啶基、咪唑基、胍基等)、氨基甲酰基、羟基、醛基及诸如此类。在一些实施方案中,极性官能团是离子官能团。离子官能团的非限制性示例包括铵基、咪唑鎓基、铈基、吡啶鎓基、吡咯烷鎓基、磷基。在一些实施方案中,传感器元件被可聚合的官能团官能化。可聚合的官能团的非限制性示例包括乙烯基和(甲基)丙烯酸基。在一些实施方案中,官能团是吡咯烷基丙烯酸酯、丙烯酸、甲基丙烯酸、丙烯酰胺、甲基丙烯酸2-(二甲基氨基)乙基酯、甲基丙烯酸羟乙基酯及诸如此类。

[0190] 传感器元件的物理化学特性可以通过修饰表面电荷进行修改。例如,表面可以被修饰为提供净中性电荷、净表面正电荷、净表面负电荷或两性电荷。表面的电荷可以通过表面官能化在元件的合成期间或通过合成后修饰电荷进行控制。对于聚合物传感器元件(例如聚合物颗粒),电荷差异可以在合成期间通过使用不同的合成程序、不同的带电荷共聚单体和在具有混合氧化态的无机物质中获得。

[0191] 多种传感器元件的非限制性示例包括但不限于(a)由相同材料制成但物理化学特性不同的多种传感器元件,(b)多种传感器元件,其中一种或多种传感器元件由具有相同或不同物理化学特性的不同材料制成,(c)由相同材料制成但尺寸不同的多种传感器元件,(d)由不同材料制成的具有相对相同尺寸的多种传感器元件;(e)由不同材料制成并且制成不同尺寸的多种传感器元件,(f)其中每种元件由不同材料制成的多种传感器元件,(g)具有不同电荷的多种传感器元件等。多种传感器元件可以是两种或更多种传感器元件的任何适合的组合,其中每种传感器元件都提供独特生物分子冠签名。例如,多种传感器元件可以包括本文所述的一种或多种脂质体和一种或多种颗粒。在一个实施方案中,多种传感器元件可以是具有变化的脂质含量和/或变化的电荷(阳离子/阴离子/中性)的多种脂质体。在另一实施方案中,多种传感器可以包含由相同材料制成但具有不同的尺寸和物理化学特性的一种或多种纳米颗粒。在另一实施方案中,多种传感器可以包含由不同材料(例如二氧化硅和聚苯乙烯)制成的具有相似或不同的尺寸和/或物理特性(例如修饰例如,-NH₂、-COOH官能化)的一种或多种颗粒。这些组合纯粹地作为示例而提供并且对本公开内容的范围是非限制性的。

[0192] 传感器元件可以包含颗粒诸如纳米颗粒或微颗粒。传感器元件可以是颗粒诸如纳米颗粒或微颗粒。传感器元件可以包含材料的表面或表面的部分。传感器元件可以包含多孔材料(例如聚合物基体),其中可以间插生物分子。传感器元件可以包含具有凸出物的材料,诸如聚合物、低聚物或金属树枝状物。传感器元件可以包含颗粒的聚集物,诸如纳米虫(nanoworm)。

[0193] 颗粒材料

[0194] 本文公开的多种颗粒可以由各种不同材料制成。多种颗粒可以包括特定类型的纳米颗粒以鉴定样品中的范围广泛的蛋白质或者以选择性地测定特定的蛋白质或目的蛋白质的集合。

[0195] 多种颗粒可以包括至少1种不同的颗粒类型、至少2种不同的颗粒类型、至少3种不同的颗粒类型、至少4种不同的颗粒类型、至少5种不同的颗粒类型、至少6种不同的颗粒类型、至少7种不同的颗粒类型、至少8种不同的颗粒类型、至少9种不同的颗粒类型、至少10种不同的颗粒类型、至少11种不同的颗粒类型、至少12种不同的颗粒类型、至少13种不同的颗粒类型、至少14种不同的颗粒类型、至少15种不同的颗粒类型、至少16种不同的颗粒类型、至少17种不同的颗粒类型、至少18种不同的颗粒类型、至少19种不同的颗粒类型、至少20种不同的颗粒类型、至少25种不同的颗粒类型、至少30种不同的颗粒类型、至少35种不同的颗粒类型、至少40种不同的颗粒类型、至少45种不同的颗粒类型、至少50种不同的颗粒类型、至少55种不同的颗粒类型、至少60种不同的颗粒类型、至少65种不同的颗粒类型、至少70种不同的颗粒类型、至少75种不同的颗粒类型、至少80种不同的颗粒类型、至少85种不同的颗粒类型、至少90种不同的颗粒类型、至少95种不同的颗粒类型、至少100种不同的颗粒类型、1至5种不同的颗粒类型、5至10种不同的颗粒类型、10至15种不同的颗粒类型、15至20种不同的颗粒类型、20至25种不同的颗粒类型、25至30种不同的颗粒类型、30至35种不同的颗粒类型、35至40种不同的颗粒类型、40至45种不同的颗粒类型、45至50种不同的颗粒类型、50至55种不同的颗粒类型、55至60种不同的颗粒类型、60至65种不同的颗粒类型、65至70种不同的颗粒类型、70至75种不同的颗粒类型、75至80种不同的颗粒类型、80至85种不同的颗粒

类型、85至90种不同的颗粒类型、90至95种不同的颗粒类型、95至100种不同的颗粒类型、1至100种不同的颗粒类型、20至40种不同的颗粒类型、5至10种不同的颗粒类型、3至7种不同的颗粒类型、2至10种不同的颗粒类型、6至15种不同的颗粒类型或10至20种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括3至10种颗粒类型。多种颗粒可以包括4至11种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括5至15种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括5至15种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括8至12种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括9至13种不同的颗粒类型。多种颗粒可以包括10种不同的颗粒类型。颗粒类型可以包括纳米颗粒。

[0196] 例如,本公开内容的多种颗粒具有至少2种不同的颗粒类型、至少3种不同表面化学、至少4种不同表面化学、至少5种不同表面化学、至少6种不同表面化学、至少7种不同表面化学、至少8种不同表面化学、至少9种不同表面化学、至少10种不同表面化学、至少11种不同表面化学、至少12种不同表面化学、至少13种不同表面化学、至少14种不同表面化学、至少15种不同表面化学、至少20种不同表面化学、至少25种不同表面化学、至少30种不同表面化学、至少35种不同表面化学、至少40种不同表面化学、至少45种不同表面化学、至少50种不同表面化学、至少100种不同表面化学、至少150种不同表面化学、至少200种不同表面化学、至少250种不同表面化学、至少300种不同表面化学、至少350种不同表面化学、至少400种不同表面化学、至少450种不同表面化学、至少500种不同表面化学、2至500种不同表面化学、2至5种不同表面化学、5至10种不同表面化学、10至15种不同表面化学、15至20种不同表面化学、20至40种不同表面化学、40至60种不同表面化学、60至80种不同表面化学、80至100种不同表面化学、100至500种不同表面化学、4至15种不同表面化学,或2至20种不同表面化学。

[0197] 本公开内容提供了多种颗粒,所述多种颗粒具有至少2种不同物理特性、至少3种不同物理特性、至少4种不同物理特性、至少5种不同物理特性、至少6种不同物理特性、至少7种不同物理特性、至少8种不同物理特性、至少9种不同物理特性、至少10种不同物理特性、至少11种不同物理特性、至少12种不同物理特性、至少13种不同物理特性、至少14种不同物理特性、至少15种不同物理特性、至少20种不同物理特性、至少25种不同物理特性、至少30种不同物理特性、至少35种不同物理特性、至少40种不同物理特性、至少45种不同物理特性、至少50种不同物理特性、至少100种不同物理特性、至少150种不同物理特性、至少200种不同物理特性、至少250种不同物理特性、至少300种不同物理特性、至少350种不同物理特性、至少400种不同物理特性、至少450种不同物理特性、至少500种不同物理特性、2至500种不同物理特性、2至5种不同物理特性、5至10种不同物理特性、10至15种不同物理特性、15至20种不同物理特性、20至40种不同物理特性、40至60种不同物理特性、60至80种不同物理特性、80至100种不同物理特性、100至500种不同物理特性、4至15种不同物理特性,或2至20种不同物理特性。

[0198] 颗粒可以由各种材料制成。例如,根据本公开内容的纳米颗粒材料包括金属、聚合物、磁性材料和脂质。磁性纳米颗粒可以是铁氧化物纳米颗粒。金属材料的实例包括金、银、铜、镍、钴、钯、铂、铌、钽、钨、钼、钨、钽、铁和镉中的任何一种或任何组合,或US7749299中描述的任何其他材料。

[0199] 聚合物的实例包括如下任何一种或任何组合:聚乙烯、聚碳酸酯、聚酸酐、聚羧基酸、聚富马酸丙酯、聚己内酯、聚酰胺、聚缩醛、聚醚、聚酯、聚(原酸酯)、聚氰基丙烯酸酯、聚

乙烯醇、聚氨酯、聚磷腈、聚丙烯酸酯、聚甲基丙烯酸酯、聚氰基丙烯酸酯、聚脲、聚苯乙烯或聚胺、聚亚烷基二醇(例如聚乙二醇(PEG))、聚酯(例如聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)、聚乳酸或聚己内酯)、聚苯乙烯、或两种或更多种聚合物的共聚物,例如聚亚烷基二醇(例如,PEG)和聚酯(例如PLGA)的共聚物。在一些实施方案中,聚合物是脂质封端的聚亚烷基二醇和聚酯,或US9549901中公开的任何其他材料。聚合物还可以是脂质体。

[0200] 可用于形成本公开的颗粒的脂质的示例包括阳离子、阴离子和带中性电荷的脂质。例如,颗粒可以由以下中的任一种或以下中的任何组合制成:二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二酰基磷脂酰胆碱、二酰基磷脂酰乙醇胺、神经酰胺、鞘磷脂、脑磷脂、胆固醇、脑苷脂和二酰基甘油、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二肉豆蔻酰磷脂酰胆碱(DMPC)、和二油酰磷脂酰丝氨酸(DOPS)、磷脂酰甘油、心磷脂、二酰基磷脂酰丝氨酸、二酰基磷脂酸、N-十二酰基磷脂酰乙醇胺、N-琥珀酰磷脂酰乙醇胺、N-戊二酰磷脂酰乙醇胺、赖氨酰磷脂酰甘油、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、卵磷脂、溶血卵磷脂、磷脂酰乙醇胺、溶血磷脂酰乙醇胺、二油酰磷脂酰乙醇胺(DOPE)、二棕榈酰磷脂酰乙醇胺(DPPE)、二肉豆蔻酰磷脂乙醇胺(DMPE)、二硬脂酰磷脂酰乙醇胺(DSPE)、棕榈酰油酰磷脂酰乙醇胺(POPE)、棕榈酰油酰磷脂酰胆碱(POPC)、卵磷脂酰胆碱(EPC)、二硬脂酰磷脂酰胆碱(DSPC)、二油酰磷脂酰胆碱(DOPC)、二棕榈酰磷脂酰胆碱(DPPC)、二油酰磷脂酰甘油(DOPG)、二棕榈酰磷脂酰甘油(DPPG)、棕榈酰油酰磷脂酰甘油(POPG)、16-0-一甲基PE、16-0-二甲基PE、18-1-反式PE、棕榈酰-磷脂酰乙醇胺(POPE)、1-硬脂酰-2-油酰-磷脂酰乙醇胺(SOPE)、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰肌醇、鞘磷脂、脑磷脂、心磷脂、磷脂酸、脑苷脂、磷酸二鲸蜡脂和胆固醇,或US9445994中列出的任何其他材料。

[0201] 在各种情况中,纳米颗粒的芯可以包括有机颗粒、无机颗粒或包含有机材料和无机材料二者的颗粒。例如,颗粒可以具有芯结构,该芯结构是或包括金属颗粒、量子点颗粒、金属氧化物颗粒或芯-壳颗粒。例如,芯结构可以是或包括聚合物颗粒或基于脂质的颗粒,并且接头可以包括脂质、表面活性剂、聚合物、烃链或两性聚合物。例如,接头可以包括聚乙二醇或聚亚烷基二醇,例如接头的第一端可以包含与聚乙二醇(PEG)结合的脂质而第二端可以包含与PEG结合的官能团。颗粒可以具有芯-壳结构。在一些情况中,颗粒具有芯和多个壳,所述芯包含第一材料或复合材料,所述多个壳包含不同的材料或复合材料。在一些情况中,颗粒具有由非磁性或多种非磁性壳包围的磁性芯。例如,颗粒可以包含由非磁性聚合物壳包围的磁性铁氧化物芯。在一些情况中,磁性芯具有10nm至500nm直径,并且壳具有5nm至100nm厚度。

[0202] 根据本公开内容的颗粒类型的示例示于下表1中。颗粒的其他示例,诸如磁性芯纳米颗粒(MNP)和对应的表面化学示于图7中。

[0203] 表1-颗粒类型

[0204]

P#	描述	销售商
HX-13 或 S-001	羧酸盐(柠檬酸盐)	Seer
HX-19 或 S-002	酚醛树脂包覆的	Seer
HX-31 或 S-004	聚苯乙烯包覆的	Seer
HX-38 或 S-005	聚苯乙烯/羧酸盐包覆的	Seer
HX-42 或 S-006	二氧化硅包覆的, 胺	Seer
HX-57 或 S-008	苯甲酸	Seer
HX-58 或 S-009	PVBTMAC 包覆的(乙烯基苄基三甲基氯化铵)	Seer
HX-	羧酸盐、PAA 包覆的	Seer

[0205]

P#	描述	销售商
59 或 S-010		
P-033	羧酸盐	Polysciences
P-039	聚苯乙烯羧基	Micro Particles
P-041	羧酸	OceanNanoTech
P-047	二氧化硅	OceanNanoTech
P-048	羧酸	OceanNanoTech
P-053	氨基	Spherotech
P-056	二氧化硅氨基	Spherotech
P-063	吉夫胺	Spherotech
P-064	聚苯乙烯	Spherotech
P-065	二氧化硅	Spherotech
P-069	原始涂层	OceanNanoTech
P-073	基于右旋糖酐	Kisker Biotech
P-074	二氧化硅硅醇	Kisker Biotech
HX- 20 或 S-003	二氧化硅包覆的超顺磁氧化铁纳米颗粒 (SPION)	Seer
HX- 56 或 S-007	聚(N-(3-(二甲基氨基)丙基)甲基丙烯酰胺) (PDMAEMA)-包覆的 SPION	Seer
HX- 86 或 S-011	聚(低聚(乙二醇)甲基醚甲基丙烯酸酯) (POEGMA)-包覆的 SPION	Seer

[0206] 颗粒性质

[0207] 根据本公开内容的纳米颗粒可以在生物流体中孵育之后以范围广泛的尺寸在形成蛋白质冠的方法中进行制备和使用。例如,本文公开的纳米颗粒可以是至少10nm、至少100nm、至少200nm、至少300nm、至少400nm、至少500nm、至少600nm、至少700nm、至少800nm、至少900nm,或10nm至50nm、50nm至100nm、100nm至150nm、150nm至200nm、200nm至250nm、250nm至300nm、300nm至350nm、350nm至400nm、400nm至450nm、450nm至500nm、500nm至550nm、550nm至600nm、600nm至650nm、650nm至700nm、700nm至750nm、750nm至800nm、800nm至850nm、850nm至900nm、100nm至300nm、150nm至350nm、200nm至400nm、250nm至450nm、

300nm至500nm、350nm至550nm、400nm至600nm、450nm至650nm、500nm至700nm、550nm至750nm、600nm至800nm、650nm至850nm、700nm至900nm、或10nm至900nm。

[0208] 此外,颗粒可以具有均匀的尺寸分布或非均匀的尺寸分布。可以通过诸如动态光散射等技术测量的多分散性指数(PDI)是对尺寸分布的一种度量。较低的PDI表示较均匀的尺寸分布,较高的PDI表示较不均匀的尺寸分布。在一些情况中,多种颗粒具有0.01至0.1、0.1至0.5、0.5至1、1至5、5至20或大于20的PDI。

[0209] 本文公开的颗粒可以具有不同的表面电荷范围。颗粒可以为带负电荷的、带正电荷的或带中性电荷的。在一些实施方案中,颗粒的表面电荷为-500mV至-450mV、-450mV至-400mV、-400mV至-350mV、-350mV至-300mV、-300mV至-250mV、-250mV至-200mV、-200mV至-150mV、-150mV至-100mV、-100mV至-90mV、-90mV至-80mV、-80mV至-70mV、-70mV至-60mV、-60mV至-50mV、-50mV至-40mV、-40mV至-30mV、-30mV至-20mV、-20mV至-10mV、-10mV至0mV、0mV至10mV、10mV至20mV、20mV至30mV、30mV至40mV、40mV至50mV、50mV至60mV、60mV至70mV、70mV至80mV、80mV至90mV、90mV至100mV、100mV至110mV、110mV至120mV、120mV至130mV、130mV至140mV、140mV至150mV、150mV至200mV、200mV至250mV、250mV至300mV、300mV至350mV、350mV至400mV、400mV至450mV、450mV至500mV、-500mV至-400mV、-400mV至-300mV、-300mV至-200mV、-200mV至-100mV、-100mV至0mV、0mV至100mV、100mV至200mV、200mV至300mV、300mV至400mV、或400mV至500mV。

[0210] 各种颗粒形态与本公开的组中的颗粒类型一致。例如,颗粒可以是球形、胶体、方体、正方形、棒状、线状、锥形、金字塔形和椭圆形。

[0211] 生物分子冠

[0212] 本文提供了能够生成包含多种传感器元件、基本上由多种传感器元件组成或由多种传感器元件组成的生物分子冠的自动化装置、系统、方法和传感器元件,其中所述多种传感器元件在至少一种物理化学特性方面彼此不同。多种传感器元件可以包含多种颗粒(例如纳米颗粒)。多种传感器元件可以是多种颗粒。多种传感器元件可以能够与复杂生物样品中的多种生物分子结合以产生生物分子冠签名。多种传感器元件可以包含多种不同生物分子冠签名。

[0213] 目的生物分子(例如低丰度蛋白质)可以相对于未经处理的样品(例如未用颗粒测定的样品)被富集于生物分子冠中。目的生物分子可以是蛋白质。生物分子冠可以是蛋白质冠。富集水平可以是,相比于从其中收集生物分子冠的生物样品,在生物分子冠中目的生物分子的相对丰度(例如相对于生物分子的总数,目的生物分子的拷贝数)的增长百分比或增长倍数。目的生物分子可以通过相比于尚未与传感器元件接触的样品使生物分子冠中的目的生物分子的丰度增高而被富集在生物分子冠中。目的生物分子可以通过降低高丰度生物样品中的生物分子的丰度而被富集。

[0214] 生物分子冠分析测定可以用于快速鉴定生物样品(例如生物流体)中的低丰度生物分子。生物分子冠分析可以用于在从首先使生物样品与传感器元件(例如颗粒)接触时起不超过约8小时内鉴定生物样品中的至少约500种低丰度生物分子。生物分子冠分析可以在从首先使生物样品与传感器元件接触时起不超过约8小时内鉴定生物样品中的至少约1000种低丰度生物分子。生物分子冠分析可以在从首先使生物样品与传感器元件接触时起不超过约4小时内鉴定生物样品中的至少约500种低丰度生物分子。生物分子冠分析可以在从首

先使生物样品与传感器元件接触时起不超过约4小时内鉴定生物样品中的至少约1000种低丰度生物分子。

[0215] 生物分子冠签名可以包含蛋白质、肽、多糖、寡糖、单糖、代谢物、脂质、核酸或其任何组合。生物分子冠签名可以是蛋白质冠签名。生物分子冠签名可以是多糖冠签名。生物分子冠签名可以是代谢物冠签名。生物分子冠签名可以是脂质组冠签名。生物分子冠签名可以包含存在于软冠和硬冠中的生物分子。软冠可以是软蛋白质冠。硬冠可以是硬蛋白质冠。

[0216] 生物分子冠签名是指与每种单独的传感器元件或每种纳米颗粒结合的不同生物分子的组成、签名或模式。在一些情况中,生物分子冠签名是蛋白质冠签名。在另一种情况中,生物分子冠签名是多糖冠签名。在又一种情况中,生物分子冠签名是代谢物冠签名。在一些情况中,生物分子冠签名是脂质组冠签名。签名可以是指不同的生物分子。它还可以是指与传感器元件或纳米颗粒结合的生物分子的量、水平或数量的差异,或与传感器元件或颗粒结合的生物分子的构象状态的差异。考虑到每种传感器元件的生物分子冠签名可能包含一些相同的生物分子,可能包含就其他传感器元件或纳米颗粒而言不同的生物分子,和/或可能区别在于生物分子的水平或数量、类型或构象。生物分子冠签名可能不仅取决于传感器元件或颗粒的物理化学特性,而且取决于样品的性质和暴露的持续时间。在一些实施方案中,生物分子冠签名包含存在于软冠和硬冠中的生物分子。

[0217] 在一些实施方案中,多种传感器元件包括第一传感器元件以及至少一种第二传感器元件(例如至少一种纳米颗粒),当传感器阵列与复杂生物样品接触时,所述第一传感器元件产生第一生物分子冠签名,所述第二传感器元件产生至少一种第二生物分子冠签名。在一些情况中,多种传感器元件中的每种类型的传感器元件产生不同的生物分子冠签名。

[0218] 多种传感器元件在与样品接触时产生可共同形成生物分子指纹的多种生物分子冠签名。“生物分子指纹”是指多种传感器元件的至少两种生物分子冠签名的生物分子的合并的组成或模式。考虑到生物分子指纹可以由至少两种生物分子冠签名至多达测定的不同生物分子签名例如至少1000种不同生物分子冠签名形成。生物分子冠可以分别地针对每种传感器元件进行测定以确定每种传感器元件(例如每种纳米颗粒或每种脂质体)的生物分子冠签名,并且进行组合而形成生物分子指纹。在一些情况中,生物分子指纹可以通过同时测定两种或更多种生物分子冠而形成。

[0219] 鉴定的蛋白质

[0220] 本文公开的自动化装置、系统、方法和传感器元件(例如颗粒)可以用于鉴定生物分子、蛋白质、肽或蛋白质群组的数量。如本文公开的,特征强度是指来自分析测量的信号的强度,例如来自样品的质谱的质荷比的强度。使用本文所述的数据分析方法,特征强度可以被分类到蛋白质群中。蛋白质群是指由共享的肽序列鉴定的两种或更多种蛋白质。可替代地,蛋白质群可以指使用唯一的鉴定序列鉴定的一种蛋白质。例如,如果在样品中,测定了两种蛋白质(蛋白质1:XYZZX和蛋白质2:XYZYZ)之间共享的肽序列,则蛋白质群可以是具有两个成员(蛋白质1和蛋白质2)的“XYZ蛋白质群”。可替代地,如果肽序列对单个蛋白质(蛋白质1)是唯一的,则蛋白质群可以是具有一个成员(蛋白质1)的“ZZX”蛋白质群。每个蛋白质群可以由一个以上的肽序列支持。根据本发明检测或鉴定的蛋白质可指在样品中检测到的独特蛋白质(例如,相对使用质谱法检测到的其他蛋白质独特)。因此,对存在于与颗粒组中独特颗粒类型相对应的独特冠中的蛋白质进行分析,产生大量的特征强度。数字随着

特征强度被处理成独特肽而减少,随着独特肽被处理成独特蛋白质而进一步减少,并且随着肽被分组成蛋白质群(共享独特肽序列的两个或更多个蛋白质)而进一步减少。

[0221] 本文公开的自动化装置、系统、方法和传感器元件(例如颗粒)可用于鉴定至少100种蛋白质群组、至少200种蛋白质群组、至少300种蛋白质群组、至少400种蛋白质群组、至少500种蛋白质群组、至少600种蛋白质群组、至少700种蛋白质群组、至少800种蛋白质群组、至少900种蛋白质群组、至少1000种蛋白质群组、至少1100种蛋白质群组、至少1200种蛋白质群组、至少1300种蛋白质群组、至少1400种蛋白质群组、至少1500种蛋白质群组、至少1600种蛋白质群组、至少1700种蛋白质群组、至少1800种蛋白质群组、至少1900种蛋白质群组、至少2000种蛋白质群组、至少2100种蛋白质群组、至少2200种蛋白质群组、至少2300种蛋白质群组、至少2400种蛋白质群组、至少2500种蛋白质群组、至少2600种蛋白质群组、至少2700种蛋白质群组、至少2800种蛋白质群组、至少2900种蛋白质群组、至少3000种蛋白质群组、至少3100种蛋白质群组、至少3200种蛋白质群组、至少3300种蛋白质群组、至少3400种蛋白质群组、至少3500种蛋白质群组、至少3600种蛋白质群组、至少3700种蛋白质群组、至少3800种蛋白质群组、至少3900种蛋白质群组、至少4000种蛋白质群组、至少4100种蛋白质群组、至少4200种蛋白质群组、至少4300种蛋白质群组、至少4400种蛋白质群组、至少4500种蛋白质群组、至少4600种蛋白质群组、至少4700种蛋白质群组、至少4800种蛋白质群组、至少4900种蛋白质群组、至少5000种蛋白质群组、至少10000种蛋白质群组、至少20000种蛋白质群组、至少50000种蛋白质群组、至少100000种蛋白质群组、100至5000种蛋白质群组、200至4700种蛋白质群组、300至4400种蛋白质群组、400至4100种蛋白质群组、500至3800种蛋白质群组、600至3500种蛋白质群组、700至3200种蛋白质群组、800至2900种蛋白质群组、900至2600种蛋白质群组、1000至2300种蛋白质群组、1000至3000种蛋白质群组、3000至4000种蛋白质群组、4000至5000种蛋白质群组、5000至6000种蛋白质群组、6000至7000种蛋白质群组、7000至8000种蛋白质群组、8000至9000种蛋白质群组、9000至10000种蛋白质群组、10000至11000种蛋白质群组、11000至12000种蛋白质群组、12000至13000种蛋白质群组、13000至14000种蛋白质群组、14000至15000种蛋白质群组、15000至16000种蛋白质群组、16000至17000种蛋白质群组、17000至18000种蛋白质群组、18000至19000种蛋白质群组、19000至20000种蛋白质群组、20000至25000种蛋白质群组、25000至30000种蛋白质群组、10000至20000种蛋白质群组、10000至50000种蛋白质群组、20000至100000种蛋白质群组、2000至20000种蛋白质群组、1800至20000种蛋白质群组、或10000至100000种蛋白质群组。

[0222] 本文公开的自动化装置、系统、方法和传感器元件(例如颗粒)可用于鉴定至少100种蛋白质、至少200种蛋白质、至少300种蛋白质、至少400种蛋白质、至少500种蛋白质、至少600种蛋白质、至少700种蛋白质、至少800种蛋白质、至少900种蛋白质、至少1000种蛋白质、至少1100种蛋白质、至少1200种蛋白质、至少1300种蛋白质、至少1400种蛋白质、至少1500种蛋白质、至少1600种蛋白质、至少1700种蛋白质、至少1800种蛋白质、至少1900种蛋白质、至少2000种蛋白质、至少2100种蛋白质、至少2200种蛋白质、至少2300种蛋白质、至少2400种蛋白质、至少2500种蛋白质、至少2600种蛋白质、至少2700种蛋白质、至少2800种蛋白质、至少2900种蛋白质、至少3000种蛋白质、至少3100种蛋白质、至少3200种蛋白质、至少3300种蛋白质、至少3400种蛋白质、至少3500种蛋白质、至少3600种蛋白质、至少3700种蛋白质、

至少3800种蛋白质、至少3900种蛋白质、至少4000种蛋白质、至少4100种蛋白质、至少4200种蛋白质、至少4300种蛋白质、至少4400种蛋白质、至少4500种蛋白质、至少4600种蛋白质、至少4700种蛋白质、至少4800种蛋白质、至少4900种蛋白质、至少5000种蛋白质、100至5000种蛋白质、200至4700种蛋白质、300至4400种蛋白质、400至4100种蛋白质、500至3800种蛋白质、600至3500种蛋白质、700至3200种蛋白质、800至2900种蛋白质、900至2600种蛋白质、1000至2300种蛋白质、1000至3000种蛋白质、3000至4000种蛋白质、4000至5000种蛋白质、5000至6000种蛋白质、6000至7000种蛋白质、7000至8000种蛋白质、8000至9000种蛋白质、9000至10000种蛋白质、10000至11000种蛋白质、11000至12000种蛋白质、12000至13000种蛋白质、13000至14000种蛋白质、14000至15000种蛋白质、15000至16000种蛋白质、16000至17000种蛋白质、17000至18000种蛋白质、18000至19000种蛋白质、19000至20000种蛋白质、20000至25000种蛋白质、25000至30000种蛋白质,或10000至20000种蛋白质。

[0223] 本文公开的传感器元件可以用于在宽动态范围中鉴定本文公开的不同蛋白质数量和/或本文公开的任何特定蛋白质。例如,本文公开的包括不同颗粒类型的多种颗粒可以富集样品中的蛋白质,所述蛋白质可以利用本公开内容的方法在样品(例如血浆样品)中存在的蛋白质的整个动态范围中被鉴定。颗粒组可以包括本文公开的任何数量的不同颗粒类型,并且可以在样品中在至少2至至少12个数量级的浓度范围中富集和鉴定生物分子。

[0224] 疾病检测

[0225] 本文所述的系统和方法可以用于检测来自受试者的样品中的标志物,其与特定的生物(例如疾病)状态相符。生物状态可能是疾病、病症或组织异常。疾病状态可能是早期或中期疾病状态。

[0226] 本公开内容的系统和方法可以用于检测给定样品中的范围广泛的疾病状态。例如,本公开内容的系统和方法可以用于检测癌症。所述癌症可能是脑癌、肺癌、胰腺癌、胶质母细胞瘤、脑膜瘤、骨髓瘤或胰腺癌。

[0227] 在一些情况中,生物分子指纹可以用于确定受试者的疾病状态、诊断或预测受试者的疾病,或者鉴定与疾病状态或疾病或病症相关联的独特生物标志物模式。例如,在受试者中生物分子指纹随着时间(数天、数月、数年)的变化赋予跟踪受试者的疾病或病症(例如疾病状态)的能力,其可以广泛地应用于确定可能与疾病或任何其他疾病状态的早期相关联的生物分子指纹。如本文公开的,对疾病例如癌症早期(甚至在其充分形成或转移之前)的检测能力允许那些患者的积极结果显著增高并且能够增大预期寿命和降低与该疾病相关联的死亡率。

[0228] 本文公开的自动化装置、系统、方法和传感器元件(例如颗粒)可以提供能够以高通量方式开发与疾病的前期或前兆状态相关联的生物分子指纹的独特良机。本公开内容实现以高通量方式大规模快速处理样品以生成生物分子指纹,从而允许在许多受试者中大规模确定受试者的疾病状态,诊断或预测受试者的疾病,或者鉴定与疾病状态或疾病或病症相关联的独特生物标志物模式。

[0229] 在一些实施方案中,提供了一种检测受试者中的疾病或病症的方法。该方法包括步骤:(a)从受试者获得样品;(b)使样品与本文所述的传感器阵列接触,以及(c)确定与样品相关联的生物分子指纹,其中所述生物分子指纹表明受试者的健康和疾病状态(例如,无疾病或病症、具有疾病或病症的前兆,以及患有疾病或病症)之间的差别。

[0230] 确定与样品相关联的生物分子指纹可以包括检测至少两种传感器元件的生物分子冠签名,其中至少两种生物分子冠签名的组合产生生物分子指纹。在一些实施方案中,对至少两种传感器元件的生物分子冠签名分别地进行测定,并且将结果组合以确定生物分子指纹。在一些实施方案中,至少两种元件的生物分子冠签名在相同时间或在相同样品中进行测定。

[0231] 本文所述的自动化装置、系统、传感器阵列和方法可以用于确定疾病状态和/或预测或诊断疾病或病症。考虑的疾病或病症包括但不限于,例如,癌症、心血管疾病、内分泌疾病、炎性疾病、神经疾病及诸如此类。

[0232] 在一个实施方案中,所述疾病或病症是癌症。术语“癌症”意在涵盖以细胞的异常生长(包括肿瘤和良性生长)为特征的任何癌症、肿瘤性(neoplastic)和肿瘤前(preneoplastic)疾病。癌症可以是例如,肺癌、胰腺癌或皮肤癌。在适合的实施方案中,本文所述的自动化装置、系统、传感器阵列和方法不仅能够诊断癌症(例如确定受试者是否(a)没有癌症、(b)处于癌前发展阶段、(c)处于癌症早期、(d)处于癌症晚期),在一些实施方案中,而且能够确定癌症的类型。如以下实施例所示,包括六种传感器元件的传感器阵列能够准确地确定存在或不存在癌症的疾病状态。此外,实施例表明包括六种传感器元件的传感器阵列能够辨别不同的癌症类型(例如肺癌、胶质母细胞瘤、脑膜瘤、骨髓瘤和胰腺癌)。

[0233] 本公开内容的自动化装置、系统、传感器阵列和方法还可以用于检测其他癌症,例如急性淋巴细胞白血病(ALL);急性髓系白血病(AML);青少年癌症;肾上腺皮质癌;儿童期肾上腺皮质癌;儿童期不常见的癌症;AIDS相关癌症;卡波西肉瘤(软组织肉瘤);AIDS相关淋巴瘤(淋巴瘤);原发性中枢神经系统淋巴瘤(淋巴瘤);肛门癌;阑尾癌-参见胃肠道类癌;星形细胞瘤,儿童期(脑癌);非典型畸胎瘤/横纹肌瘤,儿童期,中枢神经系统(脑癌);皮肤基底细胞癌-参见皮肤癌;胆管癌;膀胱癌;儿童期膀胱癌;骨癌(包括尤文肉瘤和骨肉瘤以及恶性纤维组织细胞瘤);脑瘤;乳腺癌;儿童期乳腺癌;支气管肿瘤,儿童期;伯基特淋巴瘤-参见非霍奇金淋巴瘤;类癌瘤(胃肠道);儿童期类癌瘤;不明原发癌;儿童期不明原发癌;心脏(心)肿瘤,儿童期;中枢神经系统;非典型畸胎瘤/横纹肌肿瘤,儿童期(脑癌);胚胎肿瘤,儿童期(脑癌);生殖细胞肿瘤,儿童期(脑癌);原发性中枢神经系统淋巴瘤;宫颈癌;儿童期宫颈癌;儿童期癌症;儿童期不常见癌症;肝胆管型肝癌-参见胆管癌;脊索瘤,儿童期;慢性淋巴细胞白血病(CLL);慢性粒细胞白血病(CML);慢性骨髓增生性肿瘤;结直肠癌;儿童期结直肠癌;颅咽管瘤,儿童期(脑癌);皮肤T细胞淋巴瘤-参见淋巴瘤(蕈样肉芽肿和赛塞里综合征(sézary syndrome));导管原位癌(DCIS)-参见乳腺癌;胚胎肿瘤,中枢神经系统,儿童期(脑癌);子宫内膜癌(子宫癌);室管膜瘤,儿童期(脑癌);食道癌;儿童期食管癌;鼻腔神经胶质瘤(头颈癌);尤文肉瘤(骨癌);颅外生殖细胞瘤,儿童期;性腺外生殖细胞瘤;眼癌;儿童期眼内黑色素瘤;眼内黑色素瘤;视网膜母细胞瘤;输卵管癌;骨纤维组织细胞瘤、恶性和骨肉瘤;胆囊癌;胃(胃部的)癌;儿童期胃(胃部的)癌;胃肠道类癌瘤;胃肠道间质瘤(GIST)(软组织肉瘤);儿童胃肠道间质瘤;生殖细胞肿瘤;儿童期中枢神经系统生殖细胞肿瘤(脑癌);儿童期颅外生殖细胞肿瘤;性腺外生殖细胞肿瘤;卵巢生殖细胞肿瘤;睾丸癌;妊娠滋养细胞疾病;毛细胞白血病;头颈癌;心脏肿瘤,儿童期;肝细胞(肝)癌;组织细胞增生症,朗格汉斯细胞;霍奇金淋巴瘤;下咽癌(头颈癌);眼内黑色素瘤;儿童期眼内黑色

素瘤;胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤;卡波西肉瘤(软组织肉瘤);肾(肾细胞)癌;朗格汉斯细胞组织细胞增生症;喉癌(头颈癌);白血病;唇癌、口腔癌(头颈癌);肝癌;肺癌(非小细胞和小细胞);儿童期肺癌;淋巴瘤;男性乳腺癌;骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤;黑色素瘤;儿童期黑色素瘤;黑色素瘤,眼内(眼);儿童期眼内黑色素瘤;默克尔细胞癌(皮肤癌);间皮瘤,恶性;儿童期间皮瘤;转移癌;伴有隐匿性原发性的转移性鳞状颈部癌(头颈癌);伴有nut基因改变的中线癌;口腔癌(头颈癌);多发性内分泌肿瘤综合征;多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤;蕈样肉芽肿(淋巴瘤);骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增生性肿瘤;骨髓性白血病,慢性(cml);急性髓系白血病(AML);慢性骨髓增生性肿瘤;鼻腔和鼻窦癌(头颈癌);鼻咽癌(头颈癌);神经母细胞瘤;非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;口腔癌、唇口腔癌、口咽癌(头颈癌);骨肉瘤和骨恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌;儿童期卵巢癌;胰腺癌;儿童期胰腺癌;胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤);乳头状瘤病(儿童喉癌);副神经节瘤;儿童期副神经节瘤;副鼻窦和鼻腔癌(头颈癌);甲状旁腺癌;阴茎癌;咽癌(头颈癌);嗜铬细胞瘤;儿童嗜铬细胞瘤;垂体瘤;浆细胞瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;妊娠与乳腺癌;原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤;原发性腹膜癌;前列腺癌;直肠癌;复发性癌;肾细胞(肾)癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童期(软组织肉瘤);唾液腺癌(头颈部癌);肉瘤;儿童期横纹肌肉瘤(软组织肉瘤);儿童期血管肿瘤(软组织肉瘤);尤文肉瘤(骨癌);卡波西肉瘤(软组织肉瘤);骨肉瘤(骨癌);软组织肉瘤;子宫肉瘤;赛塞里综合征(淋巴瘤);皮肤癌;儿童期皮肤癌;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤;皮肤鳞状细胞癌-参见皮肤癌;伴有隐匿性原发性转移性鳞状颈部癌(头颈癌);胃(胃部的)癌;儿童期胃(胃部的)癌;T细胞淋巴瘤,皮肤(蕈样肉芽肿和赛塞里综合征);睾丸癌;儿童期睾丸癌;喉癌(头颈癌);鼻咽癌;口咽癌;下咽癌;胸腺瘤和胸腺癌;甲状腺癌;肾盂输尿管移行细胞癌(肾(肾细胞)癌);不明原发癌;儿童期不明原发癌;儿童期不常见的癌症;输尿管和肾盂移行细胞癌(肾(肾细胞)癌);尿道癌;子宫癌,子宫内膜;子宫肉瘤;阴道癌;儿童期阴道癌;血管肿瘤(软组织肉瘤);外阴癌;肾母细胞瘤和其他儿童肾脏肿瘤;或年轻成人中的癌症。

[0234] 在一些情况中,疾病或病症是心血管疾病。如本文中使用的术语“心血管疾病”(CVD)或“心血管病症”用于分类影响身体的心脏、心脏瓣膜和脉管系统(例如静脉和动脉)的多种状况,并且涵盖的疾病和状况包括但不限于动脉粥样硬化、心肌梗死、急性冠脉综合征、心绞痛、充血性心力衰竭、主动脉瘤、主动脉夹层、髂动脉瘤或股动脉瘤、肺栓塞、心房颤动、中风、短暂性脑缺血发作、收缩功能障碍、舒张功能障碍、心肌炎、房性心动过速、心室颤动、心内膜炎、周围血管疾病和冠心病(CAD)。此外,术语心血管疾病是指最终具有心血管事件或心血管并发症的受试者,心血管事件或心血管并发症是指在受试者中由心血管疾病所致的不良状况的表现,诸如心脏性猝死或急性冠脉综合征,包括但不限于,心肌梗死、不稳定性心绞痛、动脉瘤、中风、心力衰竭、非致死性心肌梗死、中风、心绞痛、短暂性脑缺血发作、主动脉瘤、主动脉夹层、心肌病、心导管异常、心脏成像异常、支架或移植物再血管化、经历异常应激试验的风险、经历异常心肌灌注的风险和死亡。

[0235] 如本文中使用的,检测、诊断或预测心血管疾病的例如动脉粥样硬化的能力可以包括确定患者是否处于心血管疾病的前期、已经出现心血管疾病的早期、中期或严重形式,或者已经患有与心血管疾病相关联的一种或多种心血管事件或并发症。

[0236] 动脉粥样硬化(也称为动脉硬化性血管病或ASVD)是一种心血管疾病,其中由于包

含白细胞的动脉斑块侵袭和积聚和沉积在动脉壁的最内层上而使动脉壁增厚,导致动脉变窄和变硬。动脉斑块是巨噬细胞或碎片的积聚,并且包含脂质(胆固醇和脂肪酸)、钙和可变量的纤维结缔组织。与动脉粥样硬化相关的疾病包括但不限于,动脉粥样硬化血栓形成、冠心病、深部静脉血栓形成、颈动脉疾病、心绞痛、外周动脉疾病、慢性肾病、急性冠脉综合征、血管狭窄、心肌梗死、动脉瘤或中风。在一个实施方案中,本公开内容的自动化装置、组合物和方法可以辨别受试者中动脉粥样硬化的不同阶段,包括但不限于狭窄的不同程度。

[0237] 在一些情况中,所述疾病或病症是内分泌疾病。术语“内分泌疾病”用来指与受试者的内分泌系统失调相关联的病症。内分泌疾病可能起因于腺体产生过多或过少的内分泌激素而导致激素失衡,或者由于内分泌系统中出现损伤(诸如节结或肿瘤),其可能影响或不影响激素水平。能够被治疗的适合内分泌疾病包括但不限于,例如肢端肥大症、Addison病、肾上腺癌、肾上腺病症、间变性甲状腺癌、库欣综合征、De Quervain甲状腺炎、糖尿病、滤泡性甲状腺癌、妊娠糖尿病、甲状腺肿、格雷夫斯病、生长障碍、生长素缺乏症、桥本甲状腺炎、Hurthle细胞甲状腺癌、高血糖症、甲状旁腺功能亢进症、甲状腺功能亢进症、低血糖症、甲状旁腺功能减退症、甲状腺功能减退症、低睾酮、甲状腺髓样癌、MEN 1、MEN 2A、MEN 2B、绝经、代谢综合征、肥胖、骨质疏松症、乳头状甲状腺癌、甲状旁腺疾病、嗜铬细胞瘤、垂体障碍、垂体肿瘤、多囊性卵巢综合征、前驱糖尿病、无症状甲状腺炎、甲状腺癌、甲状腺疾病、甲状腺结节、甲状腺炎、特纳综合征、1型糖尿病、2型糖尿病及诸如此类。

[0238] 在一些情况中,所述疾病或病症是炎性疾病。如本文中提及的,炎性疾病是指由受试者身体中不受控的炎症所致的疾病。炎症是受试者对有害刺激(其可能是外部或内部的诸如病原体、坏死的细胞和组织、刺激物等)的生物反应。然而,当炎症反应变得异常时,它导致自身组织损害并且可能导致各种疾病和病症。炎性疾病可以包括但不限于,哮喘、血管球性肾炎、炎性肠病、类风湿性关节炎、过敏、盆腔炎性疾病、自身免疫性疾病、关节炎;坏死性小肠结肠炎(NEC)、胃肠炎、盆腔炎性疾病(PID)、肺气肿、胸膜炎、肾盂炎、咽炎、心绞痛、寻常痤疮、尿路感染、阑尾炎、滑液囊炎、大肠炎、膀胱炎、皮炎、静脉炎、鼻炎、腱炎、扁桃腺炎、血管炎、自身免疫性疾病;乳糜泻;慢性前列腺炎、过敏、再灌注损伤;结节病、移植排斥、血管炎、间质性膀胱炎、枯草热、牙周炎、动脉粥样硬化、银屑病、强直性脊柱炎、幼年特发性关节炎、白塞氏病、脊椎关节炎、葡萄膜炎、系统性红斑狼疮和癌症。例如,关节炎包括类风湿性关节炎、银屑病关节炎、骨关节炎或幼年特发性关节炎及诸如此类。

[0239] 所述疾病或病症可能是神经疾病。神经病症或神经疾病可互换地使用并且是指脑部、脊柱及连接它们的神经的疾病。神经疾病包括但不限于脑瘤、癫痫、帕金森病、阿尔茨海默病、ALS、动静脉畸形、脑血管疾病、脑动脉瘤、癫痫、多发性硬化、周围神经病、疱疹后神经痛、中风、额颞叶痴呆、脱髓鞘病(包括但不限于多发性硬化、德维克病(即视神经脊髓炎)、脑桥中央髓鞘溶解、进行性多灶性白质脑病、脑白质营养不良、Guillain-Barre综合征、进行性炎性神经病、Charcot-Marie-Tooth病、慢性炎性脱髓鞘多神经病和抗MAG周围神经病)及诸如此类。神经病症还包括免疫介导的神经病症(IMND),其包括具有免疫系统的与存在于中枢或周围神经系统中的宿主蛋白质反应并且促成疾病病理学的至少一种组分的疾病。IMND可以包括但不限于脱髓鞘病、副肿瘤性神经综合征、免疫介导的脑脊髓炎、免疫介导的自主神经病、重症肌无力、自身抗体相关脑病和急性播散性脑脊髓炎。

[0240] 本公开内容的方法、系统和/或装置可以能够准确地辨别患有或无阿尔茨海默病

的患者。这些还可以能够检测症状前的并且可能在筛查后数年表现出阿尔茨海默病的患者。这提供了能够在极早阶段甚至在疾病出现之前治疗该疾病的优点。

[0241] 本公开内容的系统、方法和装置可以检测疾病或病症的病前阶段。病前阶段是患者尚未表现出该疾病的任何征兆或症状的阶段。癌前阶段将是在受试者内尚未鉴定出癌细胞或肿瘤细胞或癌性细胞的阶段。神经疾病前阶段将是个体尚未表现出神经疾病的一种或多种症状的阶段。在疾病的一种或多种征兆或症状存在之前诊断该疾病的能力允许密切监测受试者,并且在极早阶段治疗该疾病的能力允许增大能够中断进展的前景,或者减轻该疾病的严重性。

[0242] 在一些实施方案中,本公开内容的自动化装置、系统、传感器阵列和方法能够检测疾病或病症的早期。疾病的早期可以是指受试者内可能表现出疾病的第一征兆或症状之时。疾病的早期可以是没有外表征兆或症状的阶段。例如,在阿尔茨海默病中,早期可以是阿尔茨海默病前阶段,其中尚未检测到症状,患者将在数月或数年后出现阿尔茨海默病。

[0243] 在发病前或在早期鉴定疾病时常可能导致患者的积极结果的较高可能性。例如,在早期(0期或1期)诊断癌症可能使存活的可能性增高超过80%。0期癌症可以描述在癌症开始传播至邻近组织之前的癌症。癌症的此阶段通常通过用手术移除整个肿瘤而时常是高度可治愈的。1期癌症通常可能是小癌或小肿瘤,其尚未生长深入邻近组织中并且尚未传播至淋巴结或身体的其他部分。

[0244] 图8显示可利用本公开内容的自动化装置执行的癌症检测方法的示意概述。全血样品可以从包括健康患者以及患有不同的类型和阶段的癌症的患者范围中收集。全血可以被分级处理为血浆样品,并且随后与多种类型的颗粒(包括带正电荷的、带负电荷的和中性颗粒)接触。每种颗粒类型从血浆样品中收集不同类型的蛋白质,导致每位患者具有独特生物分子指纹。生物分子指纹不仅包括每种颗粒类型上的蛋白质的相对丰度,而且包括在各种颗粒类型中蛋白质的相对丰度。例如,仅当在第二颗粒类型上互补组分4的丰度低时,第一颗粒类型上的纤连蛋白的丰度增大才可以是相关指示。生物分子指纹不仅可以用于确定哪些患者患有癌症,而且用于确定癌症的阶段和类型。

[0245] 在一些实施方案中,自动化装置、系统、传感器阵列和方法能够检测疾病的中间阶段。疾病的中间阶段描述已经经过第一征兆和症状的疾病阶段并且患者正在经受该疾病的一种或多种症状。例如,对于癌症而言,II或III期癌症被视为中间阶段,指示较大的癌或肿瘤已经生长更深入邻近组织中。在一些情形中,II或III期癌症还可能已经传播至淋巴结但没有传播至身体的其他部分。

[0246] 此外,自动化装置、系统、传感器阵列和方法能够检测疾病的后期或晚期。疾病的后期或晚期还可以称为“重度”或“晚期”,并且通常表示受试者正在遭受该疾病的多种症状和影响。例如,重度癌症包括IV期,其中癌症已经传播至身体的其他器官或部分,并且有时称为晚期或转移性癌症。

[0247] 本公开内容的方法可以包括针对与多种疾病和/或多种疾病状态相关联的生物分子指纹集处理样品的生物分子指纹以确定该样品是否指示疾病和/或疾病状态。例如,可以随着时间从受试者群收集样品。一旦受试者患有疾病或病症,本公开内容赋予随着时间表征和检测受试者中的生物分子指纹变化的能力,这是通过在计算上分析来自相同受试者的在其患有疾病之前的样品的生物分子指纹和已经患有疾病的该受试者的生物分子指纹来

实现。样品还可以从全部患有相同疾病的患者队列获取,从而允许分析和表征与这些患者的疾病的不同阶段(例如病前状态至疾病状态)相关联的生物分子指纹。

[0248] 在一些情况中,本公开内容的装置、系统、组合物和方法不仅能够辨别疾病的不同类型,而且能够辨别疾病的不同阶段(例如癌症的早期)。这可以包括辨别健康受试者与病前状态受试者。病前状态可以是0期或1期癌症、神经变性疾病、痴呆、冠心病、肾病、心血管疾病(例如冠心病)、糖尿病或肝病。辨别疾病的不同阶段可以包括辨别癌症的两种阶段(例如0期与1期,或者1期与3期)。

[0249] 样品

[0250] 本公开的组可用于从蛋白质冠生成蛋白质组数据,并随后与本文所述的任何生物状态相关联。与本公开一致的样品包括来自受试者的生物样品。受试者可以是人或非人的动物。生物样品可以是生物流体。例如,所述生物流体可以是血浆、血清、CSF、尿液、泪液、或唾液。所述生物样品可包含多种蛋白质或蛋白质组数据,可在将蛋白质吸附到组中的各种颗粒类型的表面并随后消化蛋白质冠之后对蛋白质或蛋白质组数据进行分析。蛋白质组数据可以包括核酸、肽或蛋白质。

[0251] 范围广泛的生物样品可兼容地用在本公开内容的自动化装置内。生物样品可以包括血浆、血清、尿液、脑脊髓液、滑液、泪液、唾液、全血、乳、乳头抽吸物、导管灌洗物、阴道液、鼻液、耳液、胃液、胰液、小梁液、肺灌洗物、汗液、沟液、精液、前列腺液、痰、粪便物、支气管灌洗物、来自拭子的流体、支气管抽吸物、流态化固体、细针抽吸样品、组织匀浆、淋巴液、细胞培养物样品或其任何组合。生物样品可以包括多种生物样品(例如从多个受试者合并的血浆,或者来自单个受试者的多种组织样品)。生物样品可以包括来自单个来源的单种类型的生物流体或生物材料。

[0252] 生物样品可以被稀释或预处理。生物样品可以在自动化装置内使用之前经过消耗(例如生物样品包含血清)。生物样品还可以在自动化装置内使用之前经过物理(例如均质化或超声波)或化学处理。生物样品可以在自动化装置内使用之前被稀释。稀释介质可以包含缓冲剂或盐,或者是纯净水(例如蒸馏水)。生物样品的不同分区可以经过不同程度的稀释。生物样品或样品分区可以经过1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、8倍、10倍、12倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、75倍、100倍、200倍、500倍或1000倍稀释。

[0253] 在一些实施方案中,本公开内容的组经由消化在传感器元件上形成的冠通过处理蛋白质组学数据而提供对生物样品中的特定蛋白质的鉴定和测量。可被鉴定和测量的蛋白质的示例包括高丰度蛋白质、中等丰度蛋白质和低丰度蛋白质。高丰度蛋白质的蛋白质示例包括清蛋白和IgG。

[0254] 在一些实施方案中,可被测量和鉴定的蛋白质示例包括:清蛋白、免疫球蛋白G(IgG)、溶菌酶、癌胚抗原(CEA)、受体酪氨酸蛋白激酶erbB-2(HER-2/neu)、膀胱肿瘤抗原、甲状腺球蛋白、甲胎蛋白、前列腺特异性抗原(PSA)、粘蛋白16(CA125)、糖抗原19-9(CA19.9)、癌抗原15-3(CA15.3)、瘦蛋白、催乳素、骨桥蛋白、胰岛素样生长因子2(IGF-II)、4F2细胞表面抗原重链(CD98)、肌成束蛋白、sPigR、14-3-3eta、肌钙蛋白I、B型利尿钠肽、乳腺癌1型易感性蛋白(BRCA1)、c-Myc原癌基因蛋白(c-Myc)、介白素-6(IL-6)、纤维蛋白原、表皮生长因子受体(EGFR)、胃泌素、PH、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、结蛋白、烯醇化酶1(NSE)、促滤泡激素(FSH)、血管内皮细胞生长因子(VEGF)、P21、增殖细胞核抗原(PCNA)、降

钙素、发病机制相关蛋白质 (PR)、黄体生成激素 (LH)、生长抑素、S100、胰岛素、 α -催乳素、促肾上腺皮质激素 (ACTH)、B细胞淋巴瘤2 (Bcl 2)、雌激素受体 α (ER α)、抗原k (Ki-67)、肿瘤蛋白 (p53)、组织蛋白酶D、 β 连环蛋白、von Willebrand因子 (VWF)、CD15、k-ras、胱天蛋白酶3、包含ENTH结构域的蛋白质 (EPN)、CD10、FAS、乳癌2型易感性蛋白 (BRCA2)、CD30L、CD30、CGA、CRP、凝血酶原、CD44、APEX、运铁蛋白、GM-CSF、E-钙粘蛋白、介白素-2 (IL-2)、Bax、IFN- γ 、 β -2-MG、肿瘤坏死因子 α (TNF α)、分化群340、胰蛋白酶、周期蛋白D1、MG B、XBP-1、HG-1、YKL-40、S- γ 、NESP-55、netrin-1、geminin、GADD45A、CDK-6、CCL21、乳癌转移抑制剂1 (BrMS1)、17 β HDI、血小板衍生的生长因子受体A (PDGRFA)、P300/CBP相关因子 (Pcaf)、趋化因子配体5 (CCL5)、基质金属蛋白酶-3 (MMP3)、claudin-4和claudin-3。

[0255] 分析方法

[0256] 样品的蛋白质组数据可以使用多种不同的分析技术进行鉴定、测量和定量。例如，蛋白质组数据可以使用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 或任何基于凝胶的分离技术来分析。肽和蛋白质也可以使用免疫分析法如酶联免疫吸附测定 (ELISA) 进行鉴定、测量和定量。可替代地，蛋白质组数据可以使用质谱法、高效液相色谱、LC-MS/MS和其他蛋白质分离技术来鉴定、测量和量化。

[0257] 在一些情况中，确定生物分子指纹的方法包括检测和确定至少两种传感器元件的生物分子冠签名。此步骤可以通过分离与每种传感器元件附接的多种生物分子 (例如将生物分子冠从传感器元件中分离) 并且测定多种生物分子以确定多种生物分子冠的组成而确定生物分子指纹来完成。在一些情况中，每种传感器元件的每种生物分子冠签名的组成被独立地测定，并且将结果组合以产生生物分子指纹 (例如每种传感器元件处于单独的通道或隔室中，在其中该特定传感器元件的生物分子冠的特定组成可以被单独地分析 (例如通过使生物分子脱离并且通过质谱法和/或色谱法测定，或通过荧光、发光或其他手段检测仍然与传感器元件附接的多种生物分子))。至少两种传感器元件也可以处于相同分区中，并且至少两种传感器元件的生物分子冠的组成通过将生物分子冠从两种传感器元件解离至一种溶液中并且测定该溶液以确定生物分子签名来同时测定。

[0258] 测定构成生物分子冠签名或生物分子指纹的多种生物分子的方法可以包括但不限于，例如，凝胶电泳、液相色谱法、质谱法、核磁共振光谱法 (NMR)、傅里叶变换红外光谱法 (FTIR)、圆二色性、拉曼光谱法及其组合。在一些情况中，所述测定包括分析物特异性鉴定技术，诸如ELISA、免疫染色或通过杂交进行核酸捕获。在优选的实施方案中，所述测定包括液相色谱法、质谱法或其组合。

[0259] 如本文中公开的，核酸可以通过标准分子生物学技术进行处理以供下游应用。本文中公开的方法和组合物的实施方案涉及核酸 (多核苷酸) 测序。在本文所述的一些方法和组合物中，靶核酸的部分或其片段的核苷酸序列可以利用各种方法和装置进行确定。测序方法的示例包括包括电泳、合成法测序、连接法测序、杂交法测序、单分子测序和实时测序方法。在一些实施方案中，确定靶核酸或其片段的核苷酸序列的方法可以是自动化方法。在一些实施方案中，捕获探针可以充当引物，从而允许利用来自核酸样品的多核苷酸作为模板来引发核苷酸合成反应。以此方式，可以获得关于供至阵列的多核苷酸的序列的信息。在一些实施方案中，如果与结合至捕获探针和测序试剂的多核苷酸杂交的引物被进一步供至阵列，则在阵列上与捕获探针杂交的多核苷酸可以用作测序模板。利用阵列测序的方法先

前已经在本领域中描述。

[0260] 在一些实施方案中,通过包括在基底诸如阵列上测序,配对末端读序可以在核酸簇上获得。用于获得配对末端读序的方法描述在WO/07010252和WO/07091077中,其各自都通过援引以其整体并入本文中。配对末端测序促进在一次配对末端读取期间读取每个簇的正向和反向模板链二者。通常,模板簇可以通过桥式扩增在基底(例如流动池)的表面上进行扩增并且通过相继地配对引物进行测序。当扩增模板链时,可以产生桥接的双链结构。这可以被处理以便从表面释放每种双链体的链之一的部分。单链核酸可以用于测序、引物杂交和引物延伸循环。在第一测序运行之后,第一单链模板的末端可以与从初始簇扩增程序剩余的固定化的引物杂交。固定化的引物可以利用杂交的第一单链作为模板进行延伸以再合成原始的双链结构。双链结构可以被处理以移除第一模板链的至少一部分而留下以单链形式固定的再合成的链。再合成的链可以被测序以确定第二读段,其位置起源于从裂解过程获得的原始模板片段的相反末端。

[0261] 核酸测序可以是单分子测序或合成法测序。测序可以是大规模并行阵列测序(例如IlluminaTM测序),其可以利用固定于支撑件诸如流动池上的模板核酸分子进行。例如,测序可以包括第一代测序方法,诸如Maxam-Gilbert或Sanger测序或高通量测序(例如下一代测序或NGS)方法。高通量测序方法可以同时(或基本上同时)对至少约10,000、100,000、1百万、10百万、100百万、10亿或更多种多核苷酸分子进行测序。测序方法可以包括但不限于:焦磷酸测序、合成法测序、单分子测序、纳米孔测序、半导体测序、连接法测序、杂交法测序、数字基因表达(Helicos)、大规模并行测序例如Helicos、克隆单分子阵列(Solexa/Illumina)、利用PacBio、SOLiD、Ion Torrent或Nanopore平台测序。

[0262] 传感器元件可以包含复合物,所述复合物具有第一组分以及与该第一组分化学上互补的聚合物荧光团或其他猝灭剂组分,其中这种复合物具有初始背景或参考荧光。一旦第一组分与生物分子接触(例如在形成生物分子冠时),它就可以影响荧光团的猝灭,并且可以测量此荧光变化。在用激光照射和/或激发传感器之后,每种传感器元件的荧光的效果和/或变化可以被测量,并且与背景荧光进行比较或者针对背景荧光进行处理以产生生物分子指纹。

[0263] 计算机系统

[0264] 本公开提供被编程以实现本公开的方法的计算机控制系统。这种确定、分析或统计分类是通过本领域已知的方法来完成的,包括但不限于,例如,多种有监督和非监督的数据分析和聚类方法,诸如层次聚类分析(HCA)、主成分分析(PCA)、偏最小二乘判别分析(PLSDA)、机器学习(也称为随机森林)、逻辑回归、决策树、支持向量机(SVM)、K-最近邻、朴素贝叶斯、线性回归、多项式回归、用于回归的SVM、K-均值聚类和隐马尔可夫模型等。计算机系统可以执行分析本公开的蛋白质群组或蛋白质冠的各个方面,例如,比较/分析多个样品的生物分子冠,以统计学显著性确定各个生物分子冠之间的共同模式,从而确定与生物状态相关联的蛋白质群组。计算机系统可用于开发分类器,以检测和鉴别不同的蛋白质群组或蛋白质冠(例如,蛋白质冠的组成的特征)。从本文所公开的传感器阵列收集的数据可用于训练机器学习算法,特别是从患者接收阵列测量并从每个患者输出特定生物分子冠组成的算法。在训练算法之前,可以首先对来自阵列的原始数据进行降噪,以减少单个变量中的可变性。

[0265] 机器学习可以概括为学习机器在经历了一个学习数据集之后,对新的、未见的示例/任务进行精确执行的能力。机器学习可以包括以下概念和方法。监督学习概念可以包括AODE;人工神经网络,如反向传播、自动编码器、Hopfield网络、玻尔兹曼机器、受限玻尔兹曼机器和尖峰神经网络;贝叶斯统计,如贝叶斯网络、贝叶斯知识库;基于案例推理;高斯过程回归;基因表达式编程;数据分组处理方法(GMDH);归纳逻辑编程;基于实例的学习;惰性学习;

[0266] 学习自动机;学习矢量量化;逻辑模型树;最小消息长度(决策树、决策图等),如最近邻算法和类比建模;可能近似正确学习(Probably approximately correct learning, PAC)学习;链波下降规则,知识获取方法;符号机器学习算法;支持向量机;随机森林;分类器的集合,如自助聚集(套袋法)和提升方法(元算法);有序分类;信息模糊网络(IFN);条件随机场;ANOVA;线性分类器,如费雪线性判别准则、线性回归、逻辑回归、多项式逻辑回归、朴素贝叶斯分类器、感知机、支持向量机;二次分类器;k近邻算法;提升方法;决策树,如C4.5、随机森林、ID3、CART、SLIQ、SPRINT;贝叶斯网络,如朴素贝叶斯;和隐马尔可夫模型。无监督学习概念可能包括;期望最大化算法;矢量量化;生成地形图(Generative topographic map);信息瓶颈法;人工神经网络,如自组织映射;关联规则学习,如Apriori算法,Eclat算法,FPgrowth算法;层次聚类,如单点聚类和概念聚类;聚类分析,如K-平均算法、模糊聚类、DBSCAN和OPTICS算法;和离群值检测,如局部离群值因子。半监督学习概念可以包括;生成模型;低密度分离;基于图的方法;和协同训练。

[0267] 强化学习概念可以包括;时间差分学习;Q学习;学习自动机;和SARSA。深度学习概念可能包括;深度信念网络;深度玻尔兹曼机;深度卷积神经网络;深度循环神经网络;和层级时间记忆(Hierarchical temporal memory)。计算机系统可适于实现本文所述的方法。该系统包括中央计算机服务器,所述中央计算机服务器被编程以实现本文所述的方法。该服务器包括中央处理单元(CPU,也称为“处理器”),其可以是单核处理器、多核处理器或用于并行处理的多个处理器。服务器还包括存储器(例如,随机存取存储器、只读存储器、闪存);电子存储单元(例如,硬盘);用于与一个或多个其他系统通信的通信接口(例如,网络适配器);以及外围设备,所述外围设备可以包括高速缓存、其他存储器、数据存储器 and/或电子显示适配器。存储器、存储单元、接口和外围设备通过诸如主板的通信总线(实线)与处理器通信。存储单元可以是用于存储数据的数据存储单元。服务器借助于通信接口可操作地耦合到计算机网络(“网络”)。该网络可以是因特网、内联网和/或与因特网、远程通信或数据网络通信的内联网和/或外联网。在一些情况下,在服务器的帮助下,网络可以实现对等网络,所述对等网络可以使耦合到服务器的设备表现为客户端或服务器。

[0268] 存储单元可以存储文件(如受试者报告)、和/或与关于个体的数据、或者与本公开相关联的数据的任何方面的通信。

[0269] 计算机服务器可以通过网络与一个或多个远程计算机系统通信。所述一个或多个远程计算机系统可以是,例如个人计算机、笔记本电脑、平板电脑、电话、智能电话或掌上电脑。

[0270] 在某些应用中,计算机系统包括单个服务器。在其他情况下,该系统包括通过内联网、外联网和/或因特网彼此通信的多个服务器。

[0271] 服务器可适于存储本文提供的测量数据或数据库、来自受试者的患者信息,例如

病史、家族史、人口统计数据和/或与特定应用潜在相关的其他临床或个人信息。这样的信息可以存储在存储单元或服务器上,并且这样的数据可以通过网络传输。

[0272] 如本文所述的方法可以通过存储在服务器的电子存储位置(例如,存储器或电子存储单元上)上的机器(或计算机处理器)可执行代码(或软件)来实现。在使用过程中,代码可以由处理器执行。在一些情况下,代码可以从存储单元中检索并存储在存储器上,以供处理器随时访问。在某些情况下,可以排除电子存储单元,而将机器可执行指令存储在存储器中。

[0273] 可替代地,代码可以在第二计算机系统上执行。

[0274] 在此提供的系统和方法的方面,例如服务器,可以在编程中体现。技术的各个方面可以被认为是作为通常以机器(或处理器)可执行代码和/或相关联的数据的形式的“产品”或“制品”,所述机器(或处理器)可执行代码和/或相关联的数据被承载在一类机器可读介质上或包含在一类机器可读介质中。机器可执行代码可以存储在电子存储单元上,如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪存)或硬盘。“存储”型介质可包括计算机、处理器等的任何或所有有形存储器或其相关模块,如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,其可随时为软件编程提供非瞬时存储。软件的全部或部分有时可以通过因特网或各种其他电信网络进行通信。例如,这类通信可以使软件从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器,例如,从管理服务器或主计算机加载到应用服务器的计算机平台。因此,可以承载软件元件的另一类型的介质包括光波、电波和电磁波,例如通过有线和光学陆线网络以及通过各种空中链路、跨本地设备之间的物理接口使用的。携带这类波的物理元件,例如有线或无线链路、光链路等,也可以被认为是承载软件的介质。如本文所使用的,除非限定为非暂时性的有形“存储”介质,否则诸如计算机或机器“可读介质”之类的术语可以指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0275] 这里描述的计算机系统可以包括用于执行这里描述的任何算法或基于算法的方法的计算机可执行代码。在一些应用中,本文描述的算法将利用包括至少一个数据库的存储器单元。

[0276] 与本公开有关的数据可以通过网络或连接传输以供接收者接收和/或查看。接收者可以是、但不限于报告所涉受试者;或其照料者,例如,健康护理提供者、管理者、其他健康护理专业人员或其他护理者;执行和/或订购分析的人或实体。接收者也可以是用于存储此类报告的本地或远程系统(例如,“云计算”架构的服务器或其他系统)。在一个实施方案中,计算机可读介质包括适于传输使用本文所述方法的生物样品的分析结果的介质。

[0277] 本文提供的系统和方法的方面可以包含在程序中。技术的各个方面可以被认为是作为通常以机器(或处理器)可执行代码和/或相关联的数据的形式的“产品”或“制品”,所述机器(或处理器)可执行代码和/或相关联的数据被承载在一类机器可读介质上或包含在一类机器可读介质中。机器可执行代码可以存储在电子存储单元,例如存储器(例如,只读存储器,随机存取存储器,闪存)或硬盘上。“存储”型介质可包括计算机、处理器等的任何或所有有形存储器或其相关模块,如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,其可随时为软件编程提供非瞬时存储。软件的全部或部分有时可以通过因特网或各种其他电信网络进行通信。例如,这类通信可以使软件从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器,例如,从管理服务器或主计算机加载到应用服务器的计算机平台。因此,可以承载软

件元件的另一类型的介质包括光波、电波和电磁波，例如通过有线和光学陆线网络以及通过各种空中链路、跨本地设备之间的物理接口使用的。携带这类波的物理元件，例如有线或无线链路、光链路等，也可以被认为是承载软件的介质。如本文所使用的，除非限定为非暂时性的有形“存储”介质，否则诸如计算机或机器“可读介质”之类的术语可以指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0278] 因此，诸如计算机可执行代码的机器可读介质可以采用许多形式，包括但不限于，有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括例如光盘或磁盘，如任何计算机等中的任何存储设备，如可用于实现附图中所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器，例如这类计算机平台的主存储器。有形传输介质包括同轴电缆；铜线和光纤，包括构成计算机系统内的总线的线。载波传输介质可以采用电信号或电磁信号，或声波或光波的形式，例如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间产生的那些。因此，计算机可读介质的常见形式例如包括：软盘(floppy disk)、软磁盘(flexible disk)、硬盘、磁带、任何其他磁介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡纸带、任何其他带孔图案的物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储器芯片或盒式磁带、传输数据或指令的载波、传输此类载波的电缆或链路、或计算机可从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。许多这些形式的计算机可读介质可涉及将一个或多个指令的一个或多个序列传送到处理器以供执行。

[0279] 实施例

[0280] 包括以下实施例以进一步描述本公开的一些方面，并且不应当用来限制本发明的范围。

[0281] 实施例1：在充分重悬浮的情况下用磁性纳米颗粒和生物流体形成蛋白质冠

[0282] 此示例性操作步骤应用于在生物流体样品中利用磁性纳米颗粒的组在纳米颗粒充分重悬浮的情况下产生蛋白质冠。本公开内容的系统和方法可以应用本文所述的操作步骤。

[0283] 材料：

[0284] 用于产生蛋白质冠的材料示于表2中。

[0285] 表2：用于产生蛋白质冠的设备和试剂

[0286]

设备和试剂	供应商	部件号或型号
试剂级水	TEKNOVA	W1210 或等同物
试剂级水	Corning	46-002-LF 或等同物
微量板 F 底	Greiner	655901
铝粘合板密封件	VWR	29445-080 或等同物
微量板振摇器	VWR	12620-926 或等同物
涡旋器	VWR	33570 或等同物
分析天平	Mettler Toledo	XP205
单通道移液管 (100-1000 μL)	Rainin	L-1000 或等同物
单通道移液管 (20-200 μL)	Rainin	L-200 或等同物
多通道移液管 (100-1200 μL)	Rainin	E12-1200 或等同物
移液管吸头(1000 μL)	Rainin	GPS-L1000 或等同物
移液管吸头 (20-200 μL)	Rainin	GPS-L250 或等同物
50 mL 试剂储器	VWR	82026-355 或等同物
1x TE pH7.4	Quality Biological	351-010-131
CHAPS	Fisher	BP571-5
氯化钾(KCl)	J.T. Baker	4001-01

[0287]

设备和试剂	供应商	部件号或型号
Corning 1L 瓶	Corning	430518
Nalgene Rapid Flow 1000mL 0.1 μm 或 0.2 μm 过滤器组	Nalgene	567-0010 或 567-0020

[0288]

储存和操作:

[0289]

以下试剂在室温储存,如表3中所示:

[0290]

表3:室温储存的试剂

	试剂	供应商	部件号
	1x TE pH7.4	Quality Biological	351-010-131
	CHAPS	Fisher	BP571-5
[0291]	氯化钾(KCl)	J.T. Baker	4001-01
	试剂级水	TEKNOVA	W1210
	试剂级水	Corning	46-002-LF
	TE 150mM KCl 0.05% CHAPS	Seer Inc.	SOP003

[0292] 以下试剂在约2-8℃储存,如表4中所示:

[0293] 表4:在2-8℃储存的试剂

	试剂	供应商	部件号
[0294]	TE 150mM KCl 0.05% CHAPS	Seer Inc.	SOP003

[0295] 制备:

[0296] 将生物流体样品从冷冻器移出并且完全解冻。在使用之前,将纳米颗粒超声波处理并且涡旋约10分钟。在开始测定之前,制备了TE150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂。

[0297] TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂制备。将11.18g氯化钾和500mg CHAPS添加至Corning 1L瓶。将998.3g的1X TE pH7.4缓冲剂加入。利用室内真空,将缓冲剂用0.1μm或0.2μm 1000mL过滤器组过滤。缓冲剂可以储存在室温(约1个月)或在2-8℃(比1个月更久)。将缓冲剂在使用之前充分混合。

[0298] 纳米颗粒制备。将纳米颗粒(含水)在试剂级水中稀释至适当的指定浓度。对于干粉纳米颗粒,在添加适量的水以产生所需的浓度之前,在天平上测量出干粉纳米颗粒。

[0299] 样品制备。将样品从冷冻器中移出。将样品完全解冻并且将样品以16,000G离心约2分钟。

[0300] 将样品用TE 150mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂(1:5)稀释或保持无掺加的。

[0301] 图9显示根据本公开内容的样品制备方法。此方法包括4步骤,该方法从生物样品中生成生物分子的子集,然后使用生物分子的子集来生成生物分子指纹。第一步骤包括将血浆样品转移至包含多种传感器元件(例如磁性纳米颗粒)的多个分区(例如孔板内的孔)中。将样品在振摇下在分区内在37℃孵育1小时,从而在传感器元件上生成生物分子冠。然后使多个分区经受足够强的磁场以将传感器元件固定在多个分区内。然后,对多个分区进行三次洗涤(例如相继添加和移除重悬浮缓冲剂)以移除未吸附于传感器元件的生物分子。在第3次洗涤之后,使颗粒再悬浮于缓冲剂中,导致生物分子的子集从生物分子冠解吸。然后,使生物分子的子集经受一系列变性和化学处理步骤,包括加热至95℃、还原和烷基化、蛋白酶消化和进一步洗涤。然后,对生物分子的子集进行质谱分析,由此生成样品的生物分子指纹。

[0302] 操作过程:

[0303] 对试剂和设备按照先前部分(参见“制备”)中所述进行准备。将100 μ L稀释的纳米颗粒利用多通道移液管加载至每个孔中。将100 μ L稀释的样品/纳米颗粒孔利用移液管进行添加。将孔通过用移液管吸取约10次进行混合。将板用粘合板密封件覆盖并且在设定至300rpm的板振摇器上在37 $^{\circ}$ C孵育约1小时。在约1小时孵育之后,将粘合板密封件移除,并且将板置于磁体上约5分钟而在孔底部形成纳米颗粒冠团粒。为了洗涤,将上清液用多通道移液管移除。利用移液管来添加约200 μ L的TE 150 mM KCl 0.05%CHAPS缓冲剂,并且使纳米颗粒完全再悬浮。将溶液置于磁体上约5分钟。将洗涤步骤重复3次。将纳米颗粒团粒再悬浮于用于BCA、凝胶或胰蛋白酶消化的适当的试剂中。

[0304] 实施例2:胰蛋白酶gold消化

[0305] 材料:

[0306] 用于胰蛋白酶gold消化中的材料示于表5中。

[0307] 表5:用于胰蛋白酶gold消化中的试剂

试剂	供应商	部件号
Seppro碳酸氢铵	Sigma	52454-200mL
尿素	Fisher	BP169-500
DL-二硫苏糖醇(DTT)	Sigma	4381-5G
碘乙酰胺(IAA)	GBiosciences	786-078
胰蛋白酶Gold	Promega	V5280
乙酸	VWR	BDH3096-2.5LPC

[0309] 制备:

[0310] 50mM ABC(碳酸氢铵)。将0.25mL的2M ABC添加至9.75mL水而产生10mL的50mM ABC。将该溶液涡旋并且在4 $^{\circ}$ C储存长达一周。

[0311] 8M尿素。将4.8g尿素称量并且将50mM的ABC加入直至接近约10mL标度。将该溶液涡旋并且任选地在37 $^{\circ}$ C孵育器中旋转以促进溶解。将50mM ABC添加至10mL标度并且涡旋。

[0312] 200mM DTT。将0.031g的DTT称量并且将1mL 50mM ABC加入。将该溶液涡旋并且在4 $^{\circ}$ C避光储存。

[0313] 200mM IAA。将400 μ L 50mM ABC添加至0.015g预先称量的IAA。将该溶液涡旋并且储存在4 $^{\circ}$ C。该溶液在即将使用之前进行配制。

[0314] 胰蛋白酶Gold复原。该溶液按照生产商PI说明书进行制备。将100 μ L的50mM乙酸添加至100 μ g胰蛋白酶并且涡旋。最终浓度是1 μ g/ μ L胰蛋白酶。

[0315] 样品/胰蛋白酶配制

[0316] 将40 μ L的8M尿素添加至每种样品。将该溶液涡旋和超声波处理约1min。将2 μ L的200mM DTT添加至每种样品并且涡旋。将该溶液在黑暗中以室温孵育约30min。将8 μ L的200mM IAA添加至每种样品并且涡旋。将该溶液在黑暗中以室温孵育约30min。将8 μ L的200mM DTT添加至每种样品并且涡旋。将该溶液在黑暗中以室温孵育约30min。将50mM ABC加入,以至添加的尿素小于2M。将110 μ L的50mM ABC添加至58 μ L样品中。将适量的胰蛋白酶添加至样品。将3 μ L经复原的胰蛋白酶添加至每个管。蛋白质:胰蛋白酶之比= $\sim$ 30 μ g蛋白质:1 μ g胰蛋白酶。将该溶液在37 $^{\circ}$ C孵育过夜。将17 μ L的10%FA加入以终止消化。

[0317] 实施例3:对NSCLC样品和健康对照的蛋白质组学分析

[0318] 此实施例描述对NSCLC样品和健康对照的蛋白质组学分析。为了显示冠分析平台的实用性,评价了该平台通过使用单一颗粒类型聚(N-(3-(二甲基氨基)丙基)甲基丙烯酸酰胺)(PDMAEMA)-包覆的SPION以及来自56位受试者(28位患有IV期NSCLC以及28位年龄和性别匹配的对照)的血清样品来观察各组之间的差异的能力。所选择的受试者样品代表了一项合理平衡的研究,以鉴定各组之间不同的潜在MS特征。在表5中汇总了关于受试者说明的完整数据,包括疾病状态和共存疾病。

[0319] 表5:血清样品来自的患者的性别和年龄信息

[0320]	种类	性别	年龄 平均值(标准偏差)	数量
	健康(对照)	女性	71.1 (7.7)	19
		男性	72.4 (11.1)	9
	非小细胞肺癌(患病)	女性	70.7 (7.5)	19
		男性	75.6 (13.6)	9

[0321] 在收集和过滤MS1特征,然后对它们的强度进行log2变换,数据集在不考虑类别情况下进行中值缩放。图11显示所有56个受试者数据集的归一化强度分布。来自NSCLC与对照研究的所有56个样品MS原始数据文件用OpenMS线脚本(pipeline script)处理,以提取MS1特征及其强度,并根据指定容差内重叠的mz和RT值将其聚类为特征群。仅保留以下特征群:1)在来自比较的至少一个分支(arm)的群中存在至少50%的特征,以及2)特征群聚类质量高于第25百分位。将保留的特征进行中值归一化,不考虑类别,并用于随后的单变量分析比较。通过对分布的检查,没有异常值,所有数据集都保留用于单变量分析。

[0322] 通过检查,似乎没有任何异常数据集。使用非参数Wilcoxon检验(双侧)执行类别之间的特征群强度的单变量比较。使用Benjamini-Hochberg法对比较所得P值进行多次检验校正。使用调整后的p值截止值(cut-off)0.05,共有七个特征群显示出统计学显著性,如图12中总结。

[0323] 在NSCLC患者组和对照组中之间被鉴定为丰度差异的所有五种蛋白质以前都与癌症有关,如果不是NSCLC本身的话。PON1或对氧磷酶-1,在肺癌中具有复杂的模式,包括作为危险因素的相对常见的次要等位基因变体(Q192R)参与。在蛋白水平上,PON1在肺腺癌中轻度降低。SAA1是一种急性期蛋白,在MS相关研究中显示在NSCLC中过表达,并且发现在患病受试者中鉴定的肽增加了5.4倍。基质体因子腱生蛋白C(matrisome factor tenascin C)(TENA)已经表现出与正常组织相比在原发性肺肿瘤和相关淋巴结转移中增高,并且在此研究发现了相关MS特征增高2倍。神经细胞粘附分子1(NCAM1)作为诊断肺神经内分泌肿瘤的标志物。通过MS分析发现FIBA肽的水平随肺癌的进展而升高。特别值得注意的是两个未知的特征,群2和群7,它们显示了对照和患病受试者之间的差异。群2在56名受试者中的54名受试者中发现,在患病受试者中有33%的适度减少。相比之下,群7只在患病受试者中发现(该类别的28名成员中有14名)。这些结果证明了颗粒冠有助于鉴定不同疾病状态的已知和未知标志物的潜在效用。

[0324] 实施例4:使用蛋白质冠分析血浆的动态范围压缩

[0325] 此实施例描述利用颗粒从血浆样品中收集蛋白质的动态范围压缩。

[0326] 为了评估颗粒压缩测量的动态范围的能力,将测量的和鉴定的蛋白质特征强度与相同蛋白质浓度的公布值进行比较。首先,用蛋白质的所有可能特征的最大MS确定强度(使用OpenMS MS数据处理工具提取单同位素峰值)选择每种蛋白质的所得的肽特征,然后对照那些相同蛋白质的公开丰度水平对强度进行建模。图13显示了颗粒冠蛋白质和血浆蛋白质的最大强度与相同蛋白质的公布浓度之间的相关性。蓝色绘图线是数据的线性回归模型并且阴影区表示该模型拟合的标准误差。用颗粒(“S-003”、“S-007”和“S-011”,表1中详述)测定的样品的动态范围相比于未用颗粒测定的血浆样品(“血浆”)表现出压缩的动态范围,如线性拟合的斜率下降所示。对于无颗粒的血浆、有S-003颗粒的血浆、有S-007颗粒的血浆以及有S-011颗粒的血浆,每幅图的斜率分别是0.47、0.19、0.22和0.18。图14显示了相比于在无颗粒冠形成情况下的质谱用质谱法测定的蛋白质冠分析的动态范围压缩。在图13中测定的血浆样品中的颗粒冠中鉴定的共同蛋白质的蛋白质强度(“纳米颗粒MS强度”)相对于无颗粒的血浆的质谱鉴定的蛋白质强度(“血浆MS强度”)进行绘制。最浅的虚线显示斜率1,指示在无颗粒的情况下质谱的动态范围。对于S-003、S-007和S-011颗粒,蛋白质强度的线性拟合的斜率分别是0.12、0.36和0.093。灰色区域指示回归拟合的标准误差区。

[0327] 通过比较测得数据的回归模型斜率和强度跨度,与血浆相比,生物分子冠包含更多种(测量或报告的)丰度较低的蛋白质。与血浆测量相比,颗粒测量的这些测量值的动态范围被压缩(回归模型的斜率减小)。这与以前的观察结果是一致的,即与血浆中的原始动态范围相比,颗粒可以有效地压缩所得的冠中的丰度的测量动态范围,这可以归因于蛋白质的绝对浓度、其与颗粒的结合亲和力以及其与邻近蛋白质的相互作用的组合。以上结果表明,多颗粒型蛋白质冠策略有助于广谱血浆蛋白的鉴定,特别是那些低丰度的血浆蛋白,这对于通过常规蛋白质组学技术进行快速检测是具有挑战性的。

[0328] 虽然已经示出和在本文所述了本发明的优选实施方案,对本领域技术人员将是显而易见的是,仅通过举例的方式来提供这样的实施方案。在不脱离本发明的情况下,本领域技术人员现在将清楚许多变型、改变和替代。应当理解,在实践本发明时可以采用本文所述的本发明实施例的各种替代方案。所附权利要求旨在限定本发明内容的范围,并且由此覆盖这些权利要求及其等同物的范围内的方法和结构。

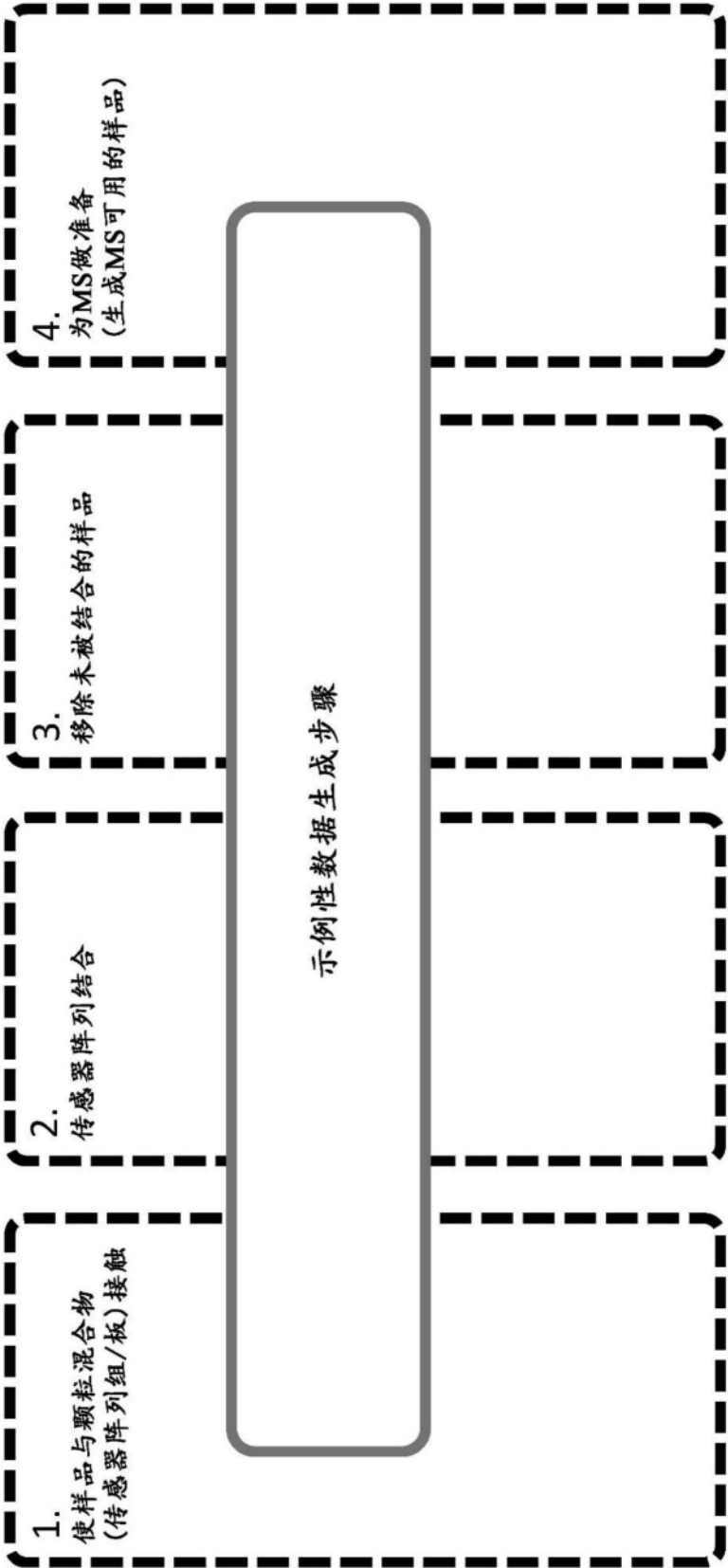


图1

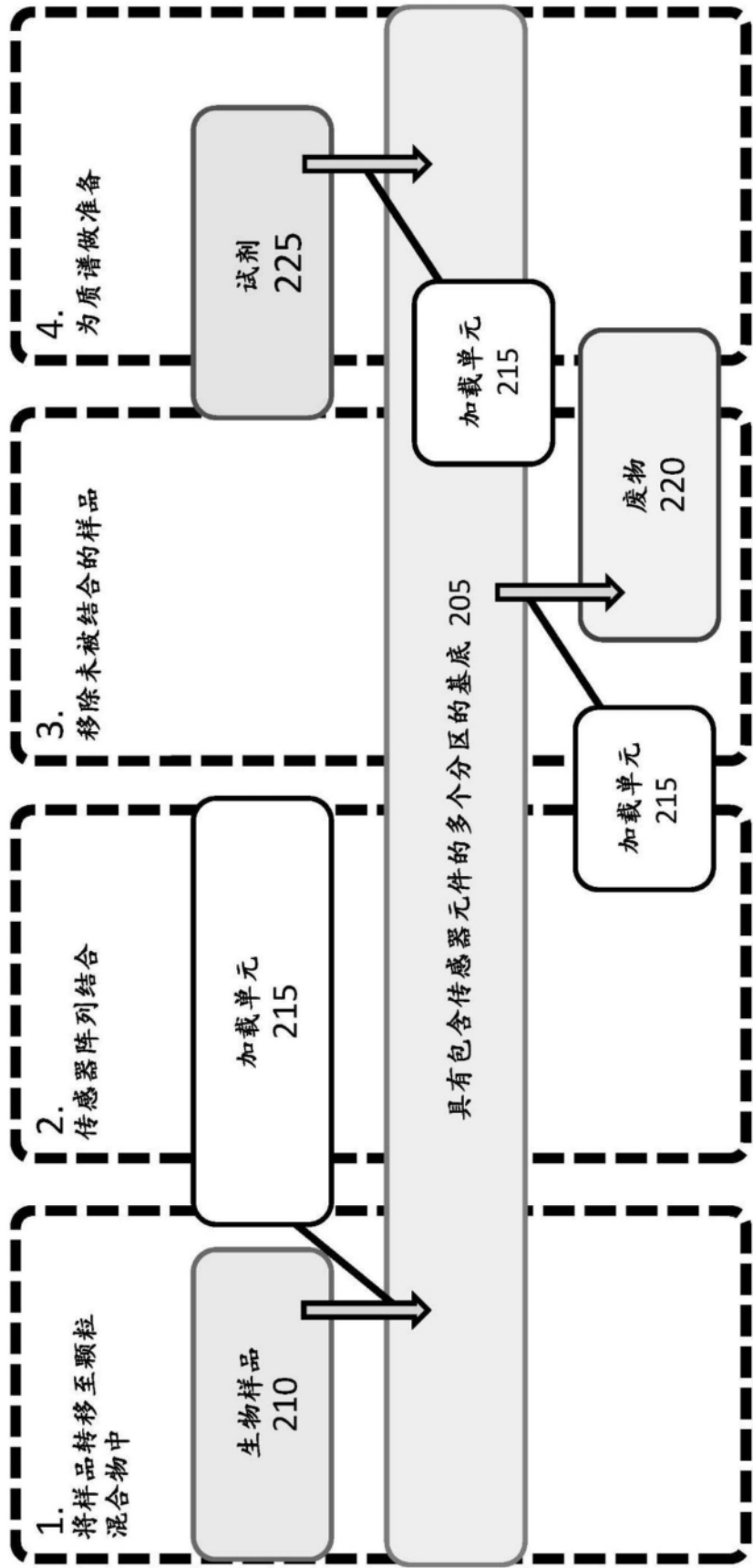


图2

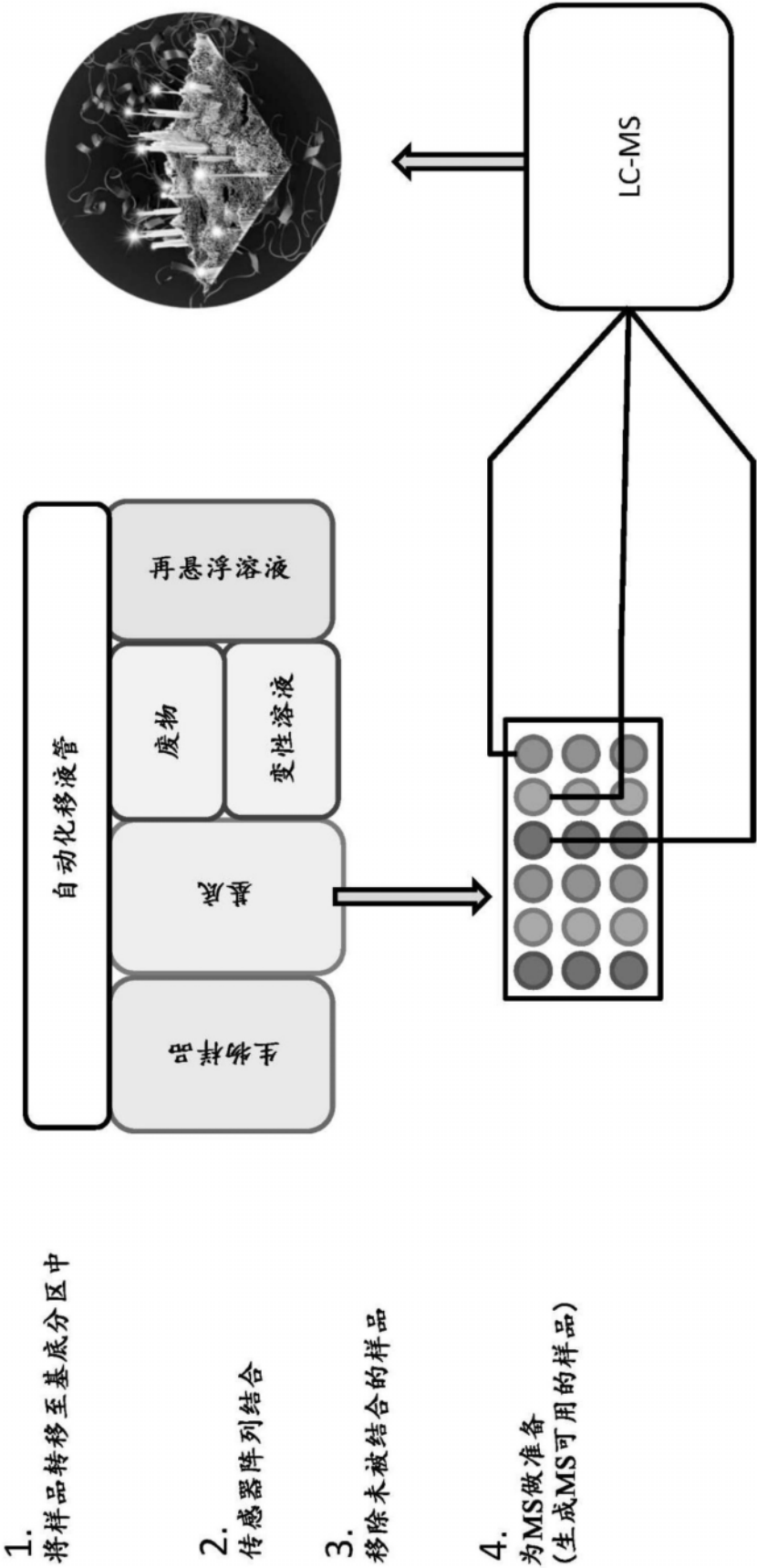


图3

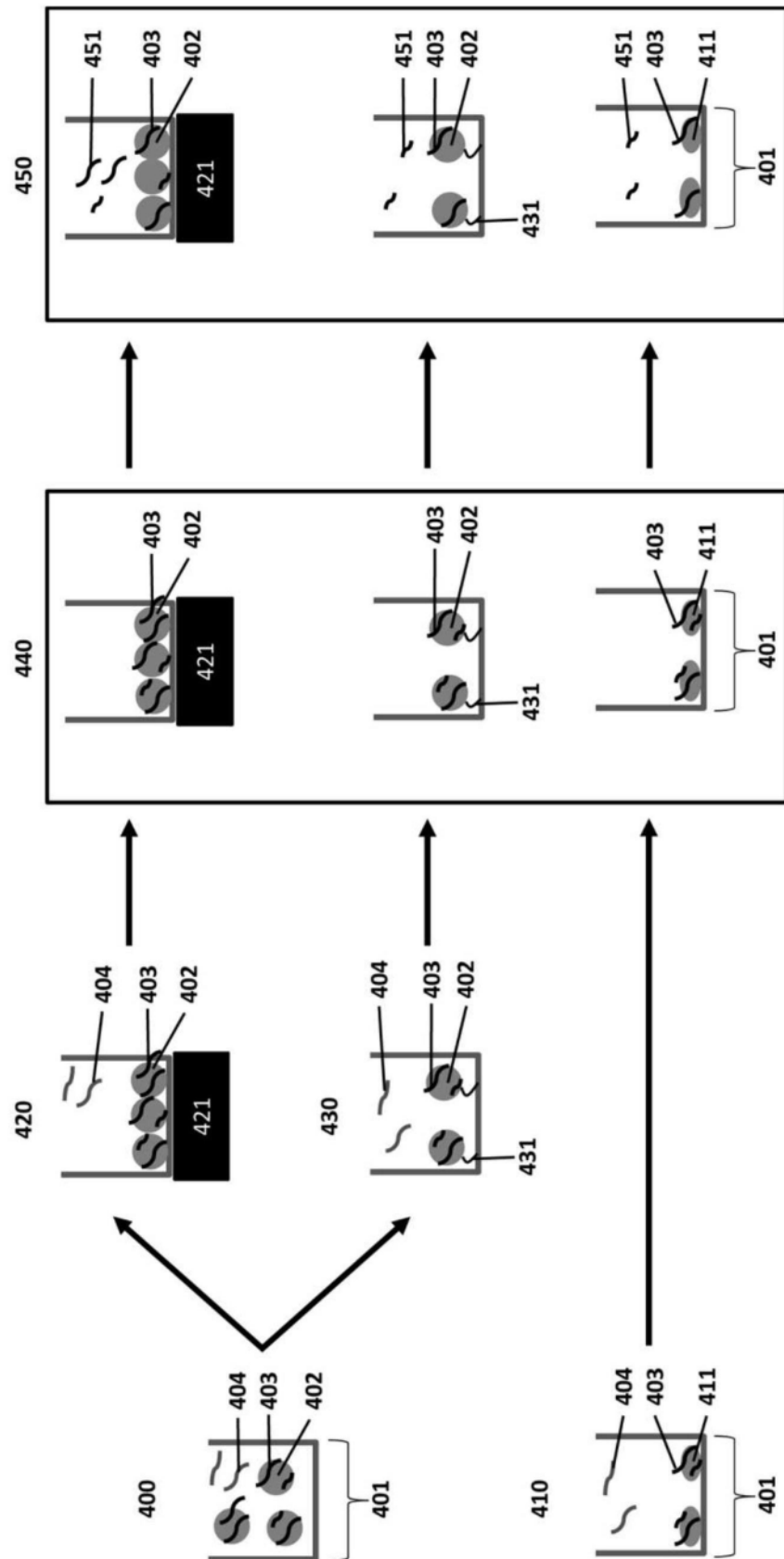


图4

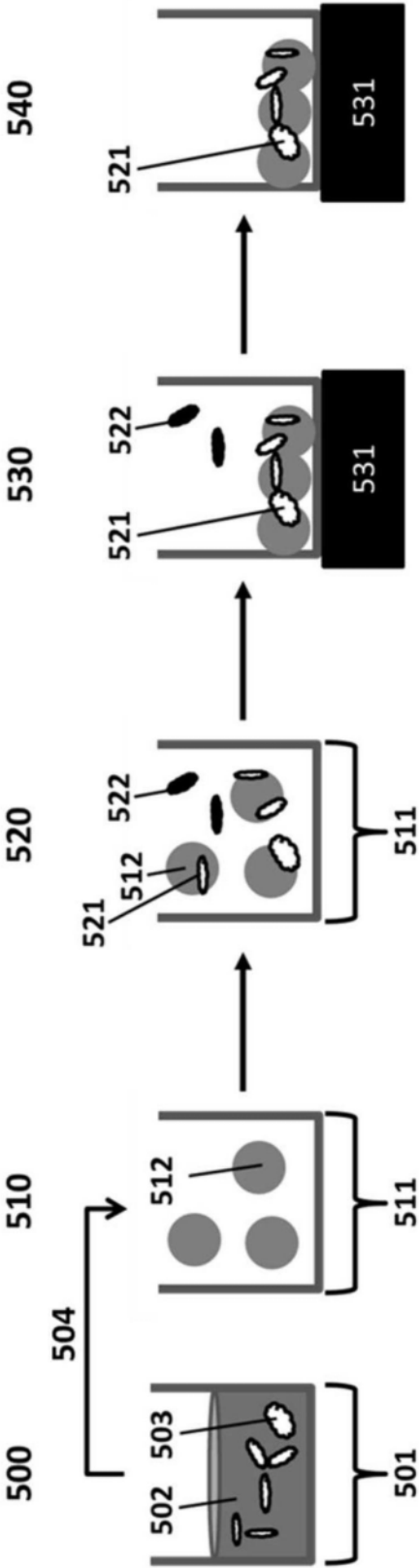


图5

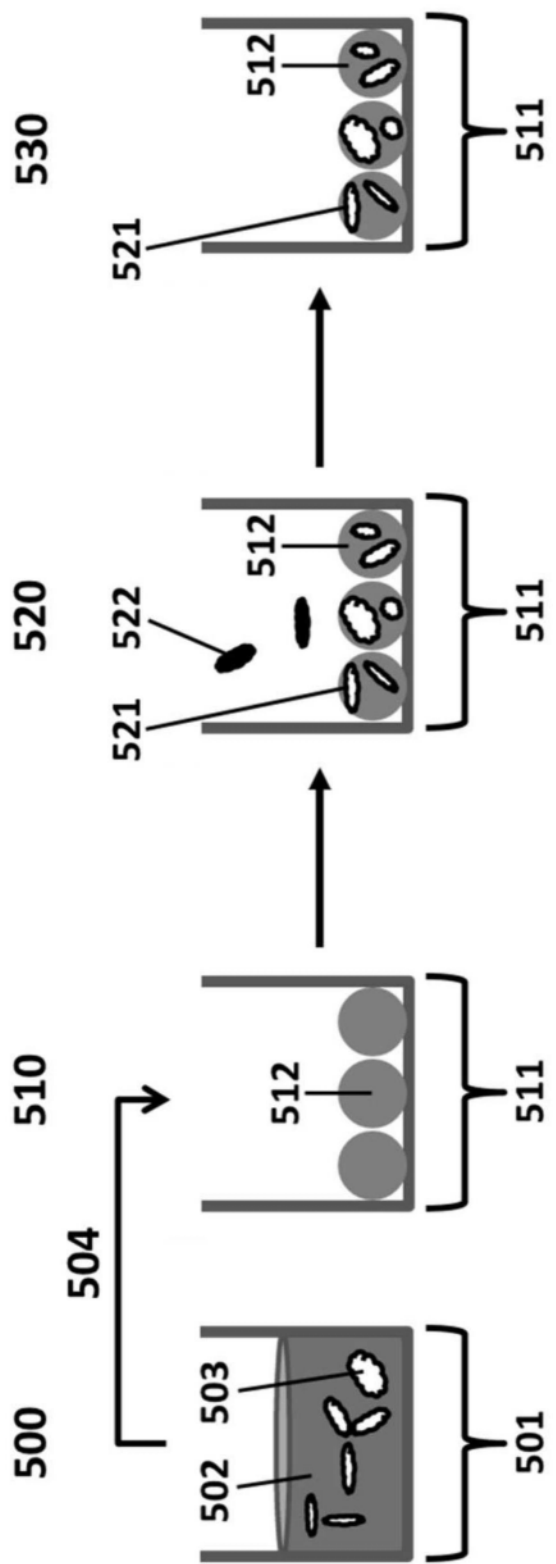


图6

磁性芯纳米颗粒(MNP)的并用于冠实验的表面化学

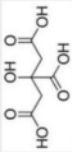
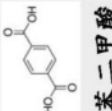
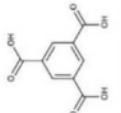
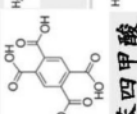
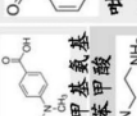
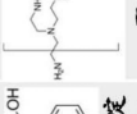
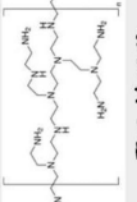
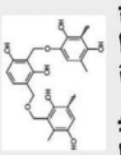
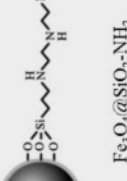
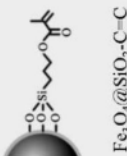
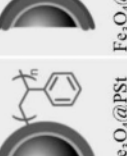
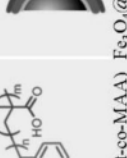
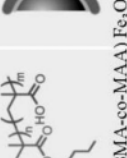
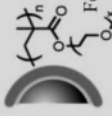
颗粒类型	表面官能化									
铁氧化物	顺磁性聚丙烯酸(PAA)									
铁氧化物 (超顺磁性)	柠檬酸	苯二甲酸	苯三甲酸	苯四甲酸	己二胺	二甲基氨基苯甲酸	吡啶-4-甲酸	聚乙烯胺	聚羧酸	间苯二酚甲醛
										
铁氧化物 芯-壳 (超顺磁性)										
										

图7

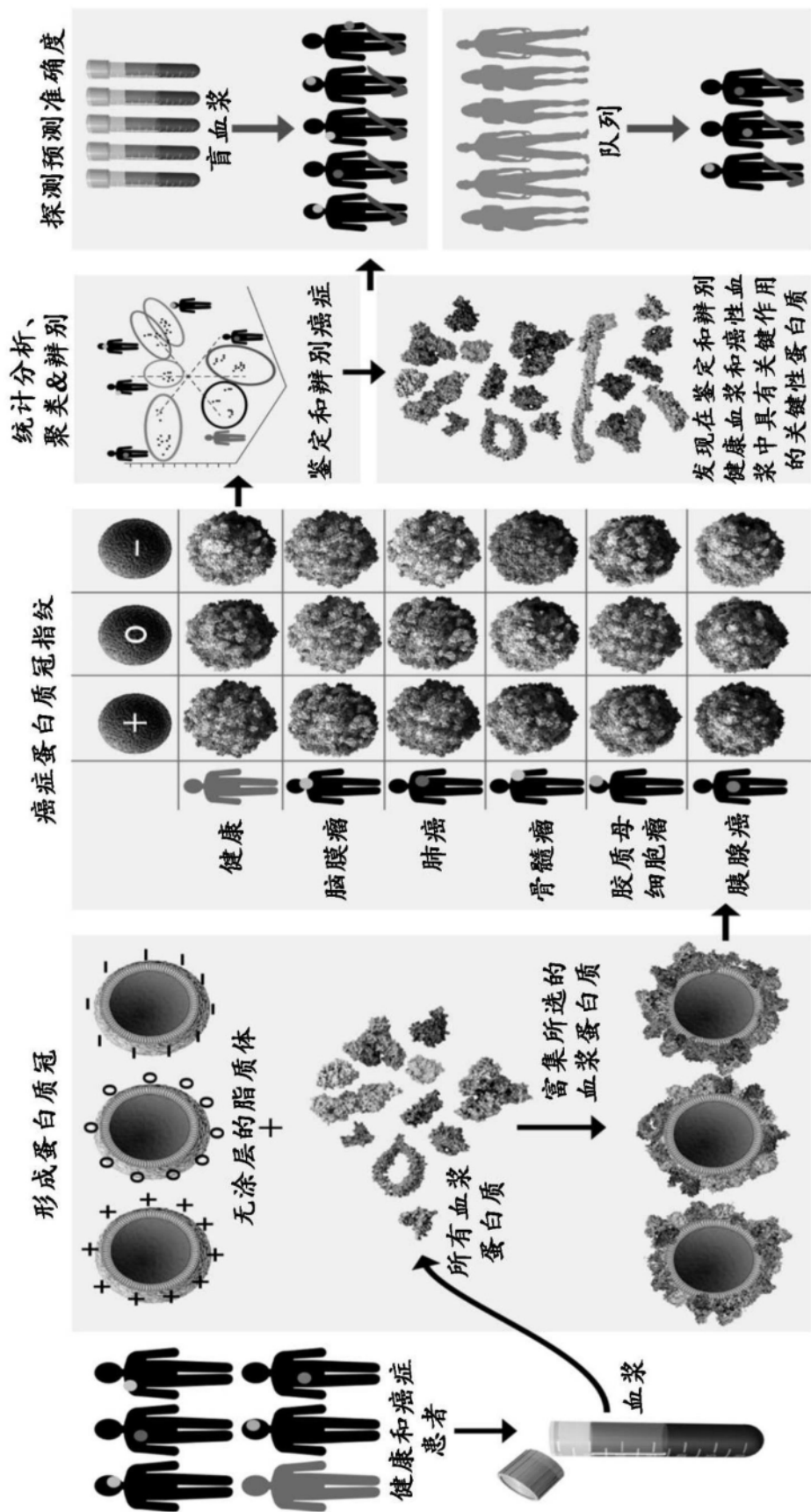


图8

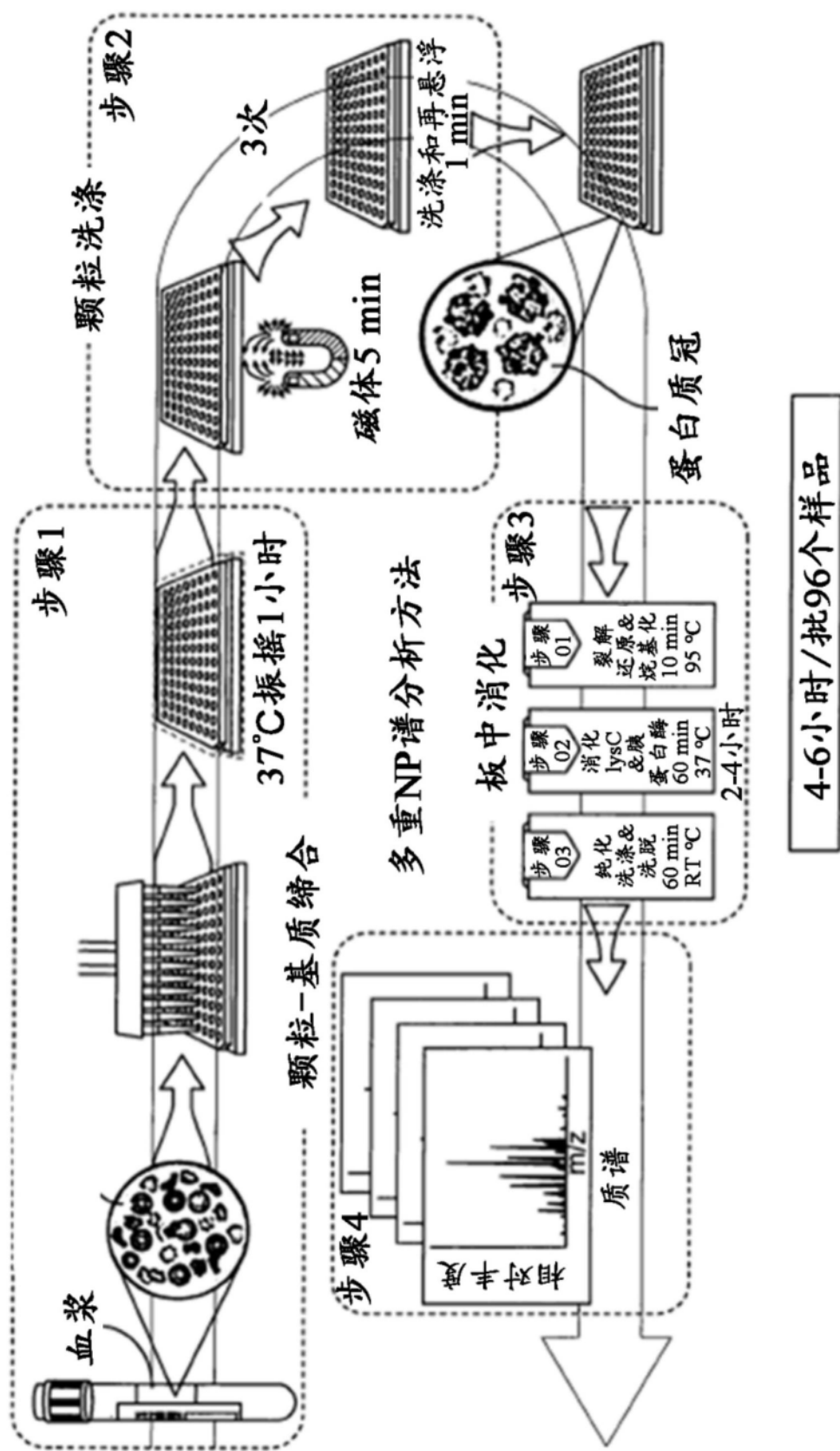


图9

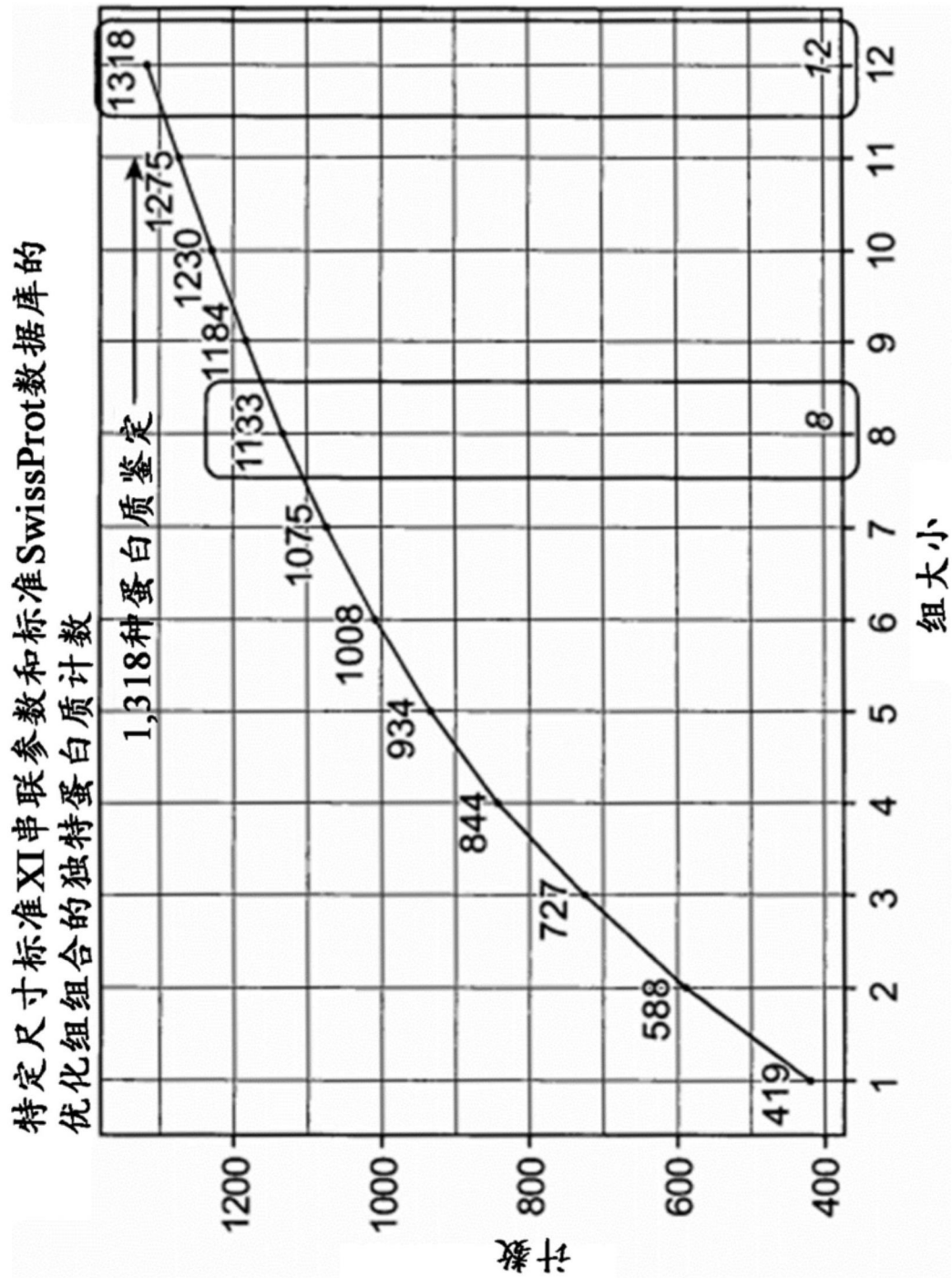


图10

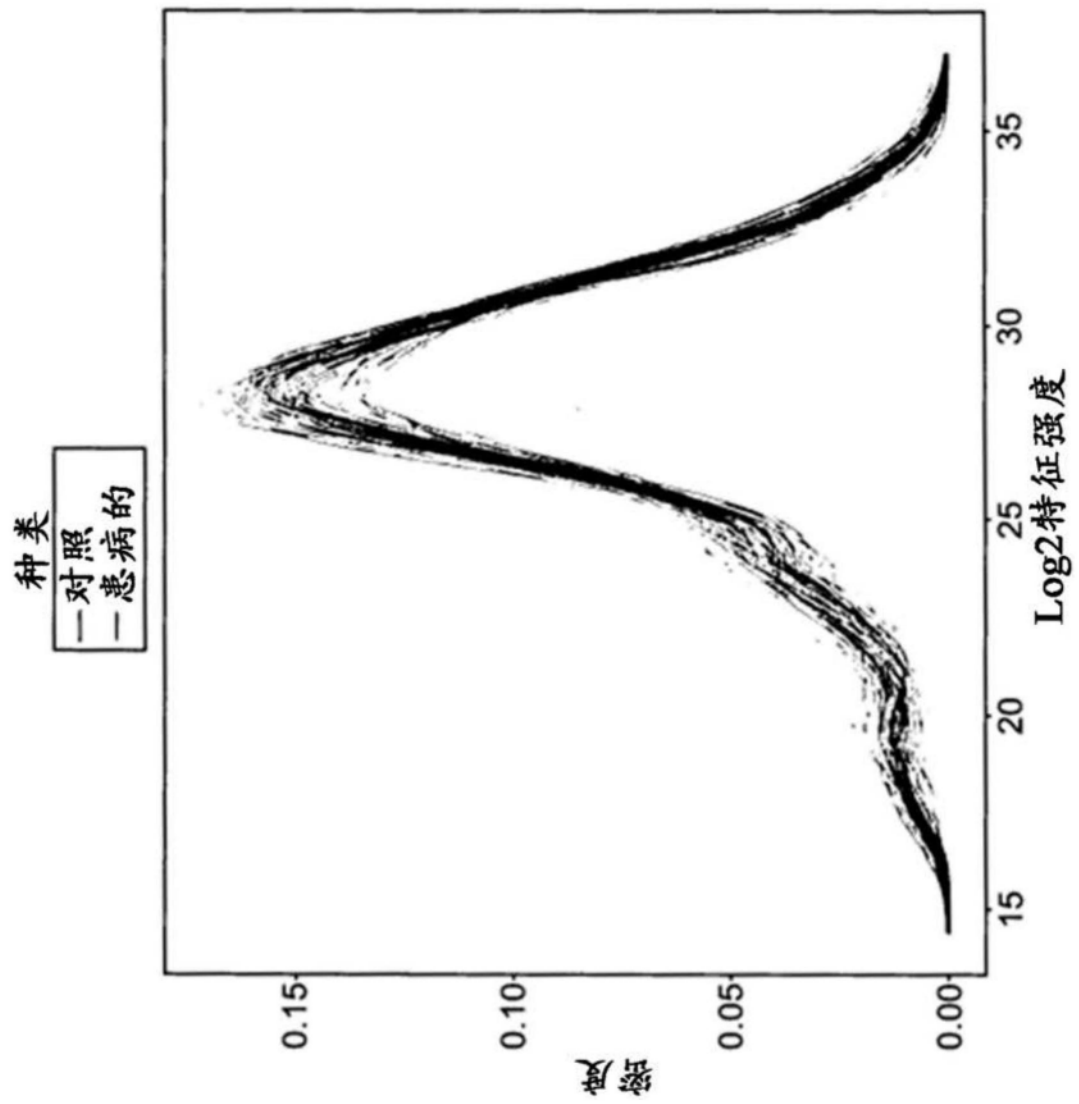


图11

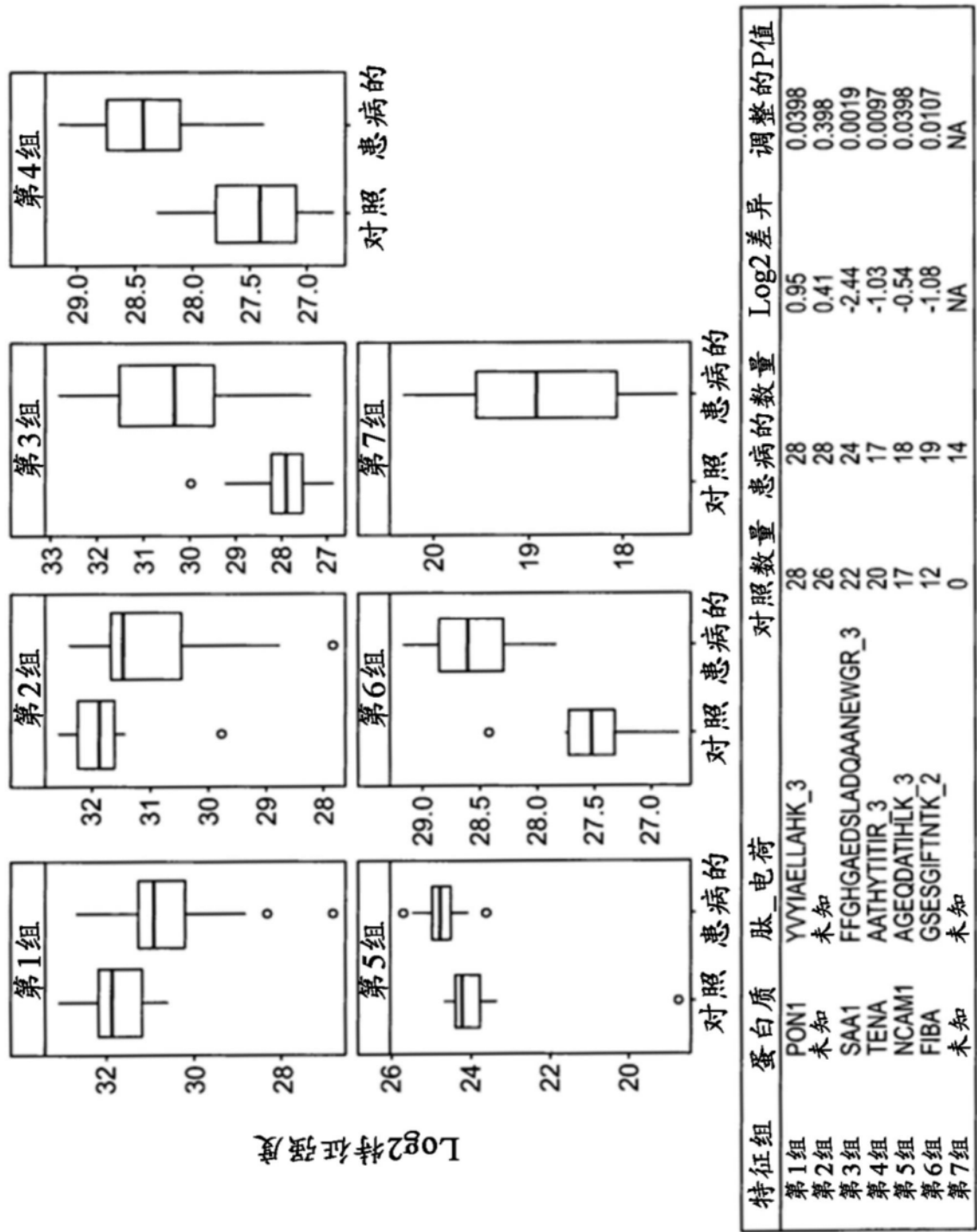


图12

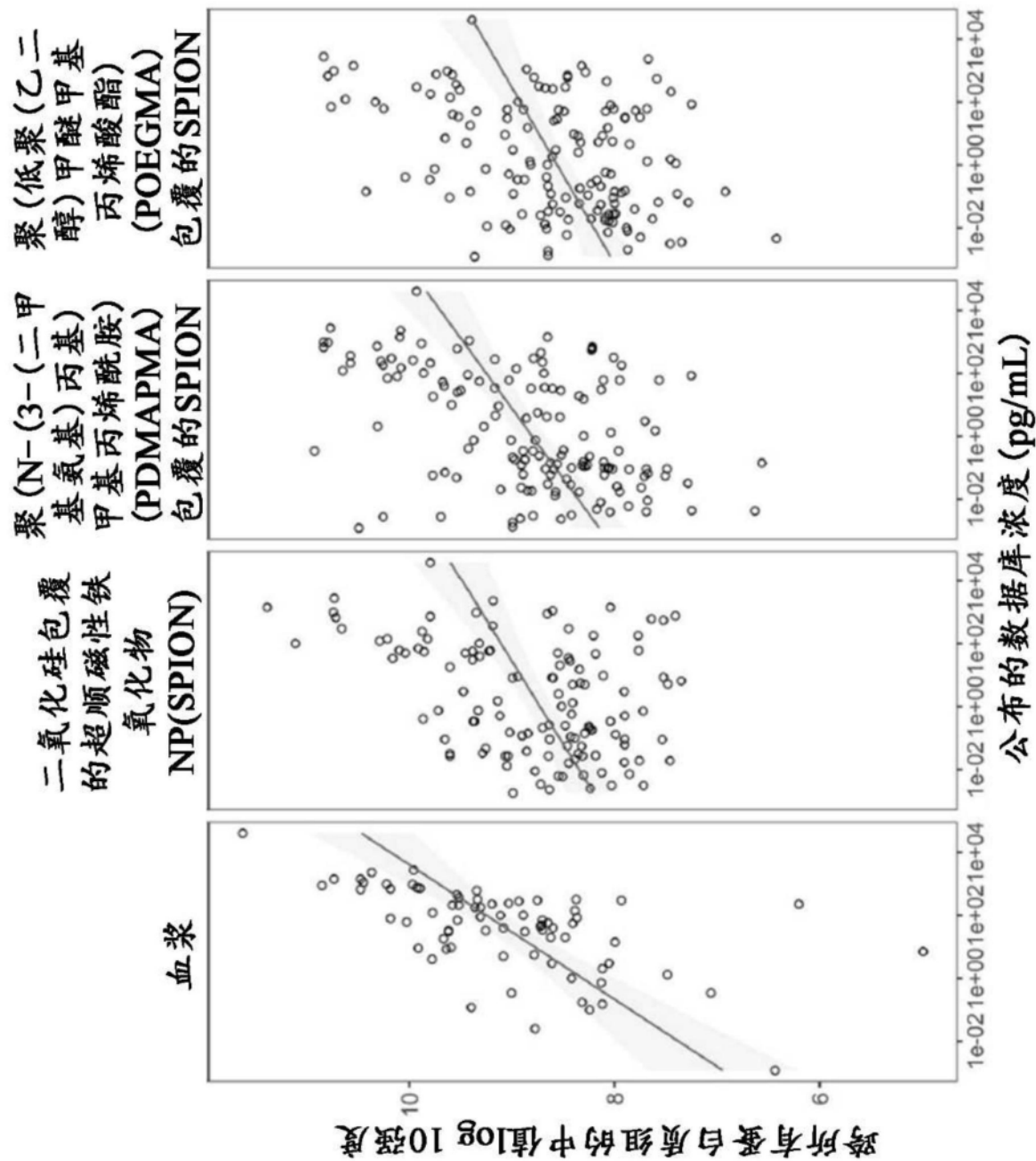


图13

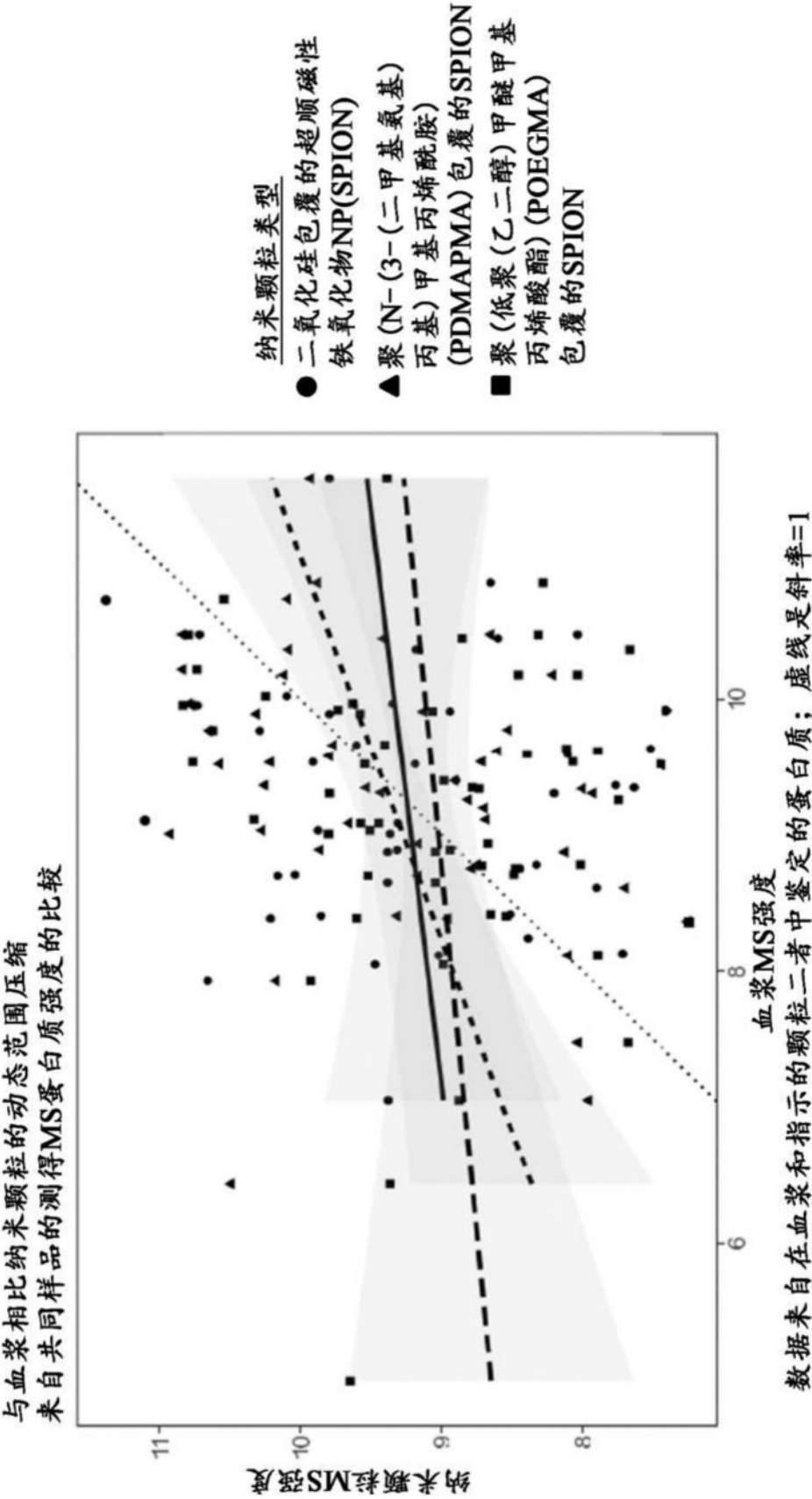


图14