

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 98808077. X

G01N 33/543 (2006.01)
G01N 33/531 (2006.01)
G01N 33/566 (2006.01)
G01N 33/50 (2006.01)
H01J 49/04 (2006.01)

[45] 授权公告日 2007 年 4 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 1308684C

[22] 申请日 1998.6.19 [21] 申请号 98808077. X

[30] 优先权

[32] 1997. 6. 20 [33] US [31] 60/054,333

[32] 1997.12. 1 [33] US [31] 60/067,484

[86] 国际申请 PCT/US1998/012843 1998. 6. 19

[87] 国际公布 WO1998/059360 英 1998. 12. 30

[85] 进入国家阶段日期 2000. 2. 12

[73] 专利权人 赛弗根生物系统股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 T·W·赫琴斯 T·-T·耶

[56] 参考文献

US5135627A 1992. 8. 4

US5118937A 1992. 6. 2

GB2281122A 1995. 2. 22

US5288644A 1994. 2. 22

WO9428418A1 1994. 12. 8

审查员 徐 莉

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

代理人 陈文青

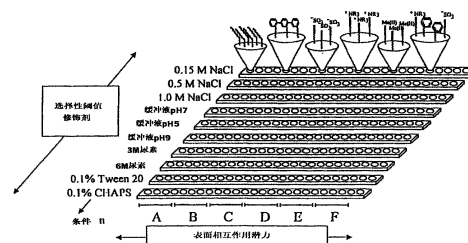
权利要求书 3 页 说明书 71 页 附图 44 页

[54] 发明名称

滞留层析和蛋白质芯片排列在生物学和医学上的应用

[57] 摘要

本发明提供了用滞留层析分辨样品中分析物的方法。该方法涉及在多种选择性条件下让分析物吸附于基质上，和用解吸谱法检测滞留在基质上的分析物。这些方法可用于生物学和医药学，包括临床诊断和药物开发。



1. 一种在样品中检测多肽分析物的方法，包括的步骤有：
 - a)将样品与多种位于不同可定址位置上的不同的选择性条件接触，每一种选择性条件由吸附剂与洗脱剂的组合确定，
 - i)所述不同的选择性条件包括至少两种具有不同引力基础的不同吸附剂，所述引力基础选自生物特异性相互作用，疏水相互作用，亲水相互作用，阴离子相互作用，阳离子相互作用和配位共价键相互作用构成的组，所述生物特异性相互作用具有选择性，而且亲合力至少为 $10^{-7}M$ ；
 - ii)所述接触包括：(I) 将样品与结合在基质上的吸附剂接触；和(II)用洗脱剂从吸附剂上洗去未结合多肽而使得多肽分析物滞留在吸附剂上；和
 - b)用激光解吸质谱法检测每一种吸附剂上滞留的多肽分析物。
2. 如权利要求 1 所述的方法，所述引力基础选自疏水相互作用，阴离子相互作用，阳离子相互作用和配位共价键相互作用构成的组。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的方法，所述不同选择性条件包括至少 4 种各自具有不同引力基础的不同吸附剂。
4. 如权利要求 2 所述的方法，各种不同选择性条件包含不同的洗脱剂。
5. 如权利要求 2 所述的方法，还包括(a')将样品与并行的选择性条件组接触，并行组内各选择性条件包含与多种选择性条件中某一选择性条件相同的吸附剂和不同的洗脱剂；和(b')通过激光解吸质谱检测滞留在各种吸附剂上的多肽分析物。
6. 如权利要求 4 所述的方法，第一吸附剂的引力基础是阴离子相互作用，第二吸附剂的引力基础是金属整合剂相互作用。
7. 如权利要求 4 所述的方法，不同洗脱剂具有不同洗脱特征并选自基于 pH 的洗脱剂，基于离子强度的洗脱剂，基于水结构的洗脱剂，基于除垢剂的洗脱剂和基于疏水性的洗脱剂。
8. 如权利要求 5 所述的方法，针对第一吸附剂的洗脱剂是基于 pH 的洗脱剂，针对第二吸附剂的洗脱剂是基于除垢剂的洗脱剂。
9. 如权利要求 2 所述的方法，滞留的多肽包含肽。
10. 如权利要求 2 所述的方法，滞留的多肽包含蛋白质。
11. 如权利要求 1 或 2 或 4 至 10 中任一项所述的方法，所述基质是质谱探针，各吸附剂结合在该质谱探针表面上可定址的位置上。

12. 如权利要求 1 或 2 或 4 至 10 中任一项所述的方法，各吸附剂结合在不同质谱探针上的可定址位置上。

13. 如权利要求 1 或 2 或 4 至 10 中任一项所述的方法，各吸附剂结合在微珠上，样品与多种不同选择性条件接触后，将定义不同选择性条件的各吸附剂固定到质谱探针上不同的可定址位置上。

14. 如权利要求 1 或 2 或 4 至 10 中任一项所述的方法，还包括在用激光解吸质谱进行检测前向滞留的多肽分析物提供吸能分子。

15. 如权利要求 1 或 2 或 4 至 10 中任一项所述的方法，所述样品是生物样品，选自体液，细胞裂解物，组织裂解物和器官裂解物构成的组。

16. 如权利要求 11 所述的方法，所述质谱探针含金属。

17. 如权利要求 11 所述的方法，所述质谱探针含硅。

18. 如权利要求 14 所述的方法，还包括 c)确定不同选择性条件下多肽分析物滞留的差异。

19. 如权利要求 14 所述的方法，所述样品来源于病理细胞。

20. 一种从不纯样品中制备性纯化分析物的方法，包括的步骤有：

a)如下确定令分析物滞留的一种或多种选择性条件：

i) 将样品与多种位于不同可定址位置上的不同的选择性条件接触，各选择性条件由吸附剂与洗脱剂的组合确定，所述不同的选择性条件包括至少两种具有不同引力基础的不同吸附剂，所述引力基础选自生物特异性相互作用，疏水相互作用，亲水相互作用，阴离子相互作用，阳离子相互作用和配位共价键相互作用构成的组，所述生物特异性相互作用具有选择性，而且亲合力至少为 $10^{-7}M$ ；所述接触包括：(I) 将样品与结合在基质上的吸附剂接触；和(II)用洗脱剂从吸附剂上洗去不结合物质而使得分析物滞留在吸附剂上；

ii)用解吸谱法鉴定出令分析物被滞留的选择性条件；

b)如下纯化分析物：

i)样品与层析柱接触以使分析物在鉴定出的选择性条件下被滞留，该层析柱含有经步骤(a)鉴定出的的吸附剂；

ii)将不结合的物质从层析柱上洗去；和

iii)从层析柱上洗脱分析物。

21. 如权利要求 20 所述的方法，还包括用至少一种鉴定出的滞留分析物的其它选择性条件重复步骤(b)。

22. 如权利要求 20 或 21 所述的方法，所述分析物包含多肽。

23. 如权利要求 20 所述的方法，所述层析柱与至少 10ml 样品接触。

24. 如权利要求 20 所述的方法，所述吸附剂的引力基础选自疏水相互作用，亲水相互作用，阴离子相互作用，阳离子相互作用和配位共价键相互作用。

滞留层析和蛋白质芯片排列在生物学和医学上的应用

相关申请

本发明要求尚未授权的 1997 年 6 月 20 日的申请 60/054,333 和 1997 年 12 月 1 日的申请 60/067,484 的优先权日。以上申请的全部内容在此作为参考。

国家资助的研究或开发

不适用。

发明背景

本发明涉及分离技术和分析生物化学。

本发明的方法可用于生物学或医药，包括分析基因功能，基因差异表达，蛋白质的发现，细胞和临床诊断，以及药物筛选。

不论是细胞的正常功能还是病理特性都在一定程度上取决于细胞所表达的基因(即基因功能)。基因的表达有质与量两方面的内容。即，细胞在所表达的特定基因和同一基因的相对表达量上都可能不同。基因的差异表达表现在，例如，基因编码蛋白质表达的差异，或所表达蛋白翻译后修饰的差异。例如，蛋白质可以被糖基或磷酸基修饰，也可以通过肽剪切加工。所以，在生物化学水平上，细胞代表着有机生物分子的复杂混合物。

基因组学(genomics)(“蛋白组学(protomics)”)的目的之一是鉴定和描述由不同细胞差异表达的有机生物分子。通过比较表达情况可以鉴定出造成细胞特定病理活性的分子。例如，鉴定出只在癌细胞内表达而不在正常细胞内表达的蛋白质可用于诊断，并最终用于药物开发和疾病治疗。人类基因组计划一旦完成，将完成人类全部基因的克隆，测序，并组织成数据库。在这一“后基因组”世界，鉴定差异表达的蛋白质的能力将继而使人能够鉴定编码它们的基因。这样，将可用遗传学来解决细胞功能问题。

基因表达和功能的差异化学分析需要能够分辨细胞内分子的复杂混合物，即使它们以微量存在，并加以定量和鉴定的方法。但是，目前用于这一目的的分析方法在上述各方面都有局限。一种常用的生物分子分离方法是凝胶电泳。通常是用凝胶内等电点聚焦先分离蛋白质，再用十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳

(SDS-PAGE)进行第二次分离。结果得到一张根据等电点范围(净电荷)和大小(质量)来区分蛋白质的图。虽然有用,但是该方法存在以下几方面的局限。首先,该方法只提供生物分子的两项特征—质量和等电点(pI)。其次,各维度(dimension)的分辨率受到凝胶分辨能力的限制。例如,通常很难区分质量差异小于 5%或 pI 差异小于 0.5 的分子。第三,凝胶的容量和灵敏度都有限;可能无法检测出少量表达的生物分子。第四,无法观察到分子量低于约 10-20kDa 的小蛋白或小肽。

其它分析方法可能克服以上局限之一或几项,但是难以将它们有效组合。例如,分析层析能够根据多种分析物/吸附剂相互作用来分离生物分子,但是作多纬度(multi-dimensional)分析却困难而费时。而且,该方法的灵敏度也很有限。

临床诊断要求能够特异性地检测出疾病的已知标记。但是,制备特异性结合标记或能在复杂的混合物中鉴别出标记的试剂需要大量时间,这阻碍了此类诊断方法的发展。

药物开发要求迅速筛选出调节配体/受体相互作用的药物。通常,这类筛选中的限速步骤是对配体/受体相互作用的检测能力。所以,鉴定结合的迅速特异性方法将是该领域的一大进展。

至今,从鉴定潜在标记或配体/受体对的成员到产生药物这一过程一直很难。在一种方法中,将正常组织与病理组织相比,鉴定在病理组织中 mRNA 的增加或减少或被表达的序列标签(“EST”)。用常规重组 DNA 法分离出这些序列并产生它们编码的多肽。然后,将这些多肽分离出来用作免疫原提供标记的特异性抗体。这些抗体可以用于例如 ELISA 试验中测定患者样品中的标记含量。

该方法费时而费事。产生所述抗体可能需要 9 个月到 1 年,其中许多时间耗费在开发能够分离出足量多肽以用于免疫的方法上。而且,该方法寄希望于 RNA 表达的差异所表现的就是蛋白质表达的差异。但是,这一假设并不一定正确。所以,直接检测被差异表达的蛋白并且能够在明显缩短的时间内产生特异性配体的方法将对该领域大有裨益。

所以,分析生物化学、生物学和医药领域所需要的是能够分辨有机生物分子的复杂混合物,鉴定混合物中各生物分子并鉴定出涉及一种或多种靶分析物的特异性分子识别的方法。

发明概述

本发明提供了进行滞留层析的装置和方法。滞留层析是一种组合方法,它使用多维度分离方法提供复杂混合物中分析物的高分辨信息。它为生物学和药学提

供了统一的分析物检测和功能分析能力，其特征是一个直接检测与基因功能、蛋白质功能、细胞功能和生物体整体功能相关的分析物表达方式的单一完整操作系统。本发明内容之一提供一种统一的操作系统，用于基因功能、蛋白质功能、或整个大分子组功能、细胞功能和生物体整体功能的发现和诊断。

更具体的说，可以多种两维度形式分辨分析物，从而提供多维度信息。首先，根据分析物在至少两种不同选择性条件下吸附于固定相的能力(例如阴离子/阳离子，疏水性/亲水性，或特异性生物分子识别作用)在至少两种不同的第一维度上分离分析物。然后，用解吸谱(例如激光解吸质谱)根据质量在第二维度上分离分析物，进一步检测已分离的分析物。分析物所吸附的吸附剂的性质提供了分析物的物理-化学信息。

所以，本发明提供了一种分子发现和诊断装置，其特征是具有并行和多路分析物处理能力。因为是对分析物的直接检测，本发明能够在在一个操作单元中从同一循环(“circuit”)同时发出两种或更多种靶分析物的信号(即，可定址的“芯片”位置)。

滞留层析与常规层析存在以下区别。首先，滞留层析中检测的是滞留在吸附剂上的分析物。在常规层析中，分析物先从吸附剂上洗脱，然后进行检测。在常规层析中没有常规或方便的方法来检测不从吸附剂上洗脱的分析物。所以，滞留层析提供了有关滞留分析物化学或结构特征的直接信息。第二，吸附层析与解吸谱检测相结合提供了毫微微摩尔级的优良灵敏度以及极高的分辨率。第三，在一定程度上，因为允许直接检测分析物，滞留层析提供了用多种不同选择性条件迅速分析滞留物的能力，由此提供对样品中分析物的快速多维度描述。第四，吸附剂可以于预先确定的排列、可定址位置附着于基质上。这就能够对在不同洗脱条件下接触不同吸附位置(即，“亲合性位置”或“位点”)的分析物进行并行处理。

滞留层析在生物学和药学上具有诸多用途。其中包括组合在一起的分析物生物化学分离与纯化，基因差异表达和分子识别的研究，诊断和药物开发。

滞留层析作为分析手段的一种基本用途包括样品与不同吸附剂/洗脱剂组合接触，检测分析物在不同条件下的表现。这样，既纯化了分析物又确定了用于检测样品中某分析物的条件。带有由此鉴定的吸附剂的基质可用作某分析物或多种分析物的特异性检测剂。在一种逐步提取法中，样品与第一吸附剂/洗脱剂组合接触并洗涤，去除了被第一吸附剂吸附的分析物再与第二吸附剂接触，从中去除其它分析物。在制备性纯化过程中也可以使用经鉴定可滞留分析物的选择性条件，此时，含有分析物的不纯样品依次接触保留分析物的吸附剂，从而去除杂质，再

从吸附剂上收集滞留的分析物进行下一轮。

本发明内容之一是，直接检测以排列内可定址位置上特定选择性条件为特征的各类或各种分子识别的情况(例如靶吸附剂-靶分析物的相互作用)，同时，被结合的分子仍然位于(即，滞留在)可定址的位置上。也就是说，直接的选择和检测不需要洗脱、回收、扩增或标记靶分析物。

本发明另一方面的内容是，检测可定址排列内一处或多处的一种或多种分子识别情况只需取出或消耗吸附剂-分析物总量中很小的一部分。这样，未用过的部分可以经一种或多种原位(即在可定址位置内)“二次处理”进一步测知其结构和功能，包括进一步的组装或拆解，修饰，或(直接或间接)扩增。

可以用一种被称为“逐步分辨”的重复过程开发对分析物的特异性提高的吸附剂，该过程中，用其它变量测试已知保留分析物的吸附剂或洗脱剂，由此鉴定具有更好结合特性的吸附剂于洗脱剂的组合。另一种方法则能够迅速形成带有分析物的特异性抗体吸附剂的基质。该方法包括将分析物锚定于某吸附剂，在噬菌体展示文库中筛选与分析物结合的噬菌体。

滞留层析还可以用于分子生物学和细胞生物学。将样品与用于解吸谱分析的多种吸附剂/洗脱剂组合接触，由此利用其它分离和检测系统所无法达到的高信息分辨能力鉴定在两样品中存在情况不同的分析物(即，两份细胞提取物中差异表达的蛋白质)。根据吸附剂/洗脱剂组合的化学特性测定包括分子量在内的理化特征可以鉴定未知靶蛋白，而这一信息可用来在数据库中筛选具有类似特征的蛋白质。

分离生物化学中的这些方法和由这些方法产生的吸附剂具有诊断方面的用途。更具体的说，可以开发出化学或生物特异性吸附剂以检测重要的诊断标记。在某实施例中，基质可具有为诊断某疾病或综合征所用标记组合而选用的吸附位点排列。

滞留层析还可以用于药物开发。将受体/配体对的成员之一锚定于一种吸附剂，并在药物存在下检测其与结合伴侣结合的能力。因为吸附作用的测试很迅速，所以可方便地在药物文库中测试各药物调节相互作用的能力。

本发明内容之一提供了高信息分辨样品中至少一种分析物的方法。该方法是包括并行分离与检测多个分析物在内的组合型分离法。该方法包括的步骤有：a)将分析物置于至少两种不同的选择性条件中，使得吸附剂能够保留分析物，不同的选择性条件由吸附剂与洗脱剂所成的组合确定；和 b)在不同选择性条件下通过解吸谱检测滞留的分析物。不同选择性条件下的滞留分析物检测提供了分析物的

高信息分辨。

在实施例之一中，各种不同的选择性条件被确定在不同的预定可定址位置上，用于并行处理。在另一实施例中，所述的方法包括：i)分析物与确切位置上的第一选择性条件接触，使得分析物被吸附剂保留；ii)在第一选择性条件下用解吸谱检测滞留的分析物；iii)在确切位置上不同的第二选择性条件下洗涤吸附剂，使得分析物滞留在吸附剂上；和iv)在第二选择性条件下用解吸谱检测滞留的分析物。

在另一实施例中，分析物是一种有机生物分子，多元分子复合物或大分子组。在另一实施例中，有机生物分子是酶、免疫球蛋白、细胞表面受体或胞内受体。

在另一实施例中，吸附剂包含阴离子、阳离子、疏水作用吸附剂、多肽、核酸、糖、凝集素、染料、还原剂、烃或它们的组合。在另一实施例中，吸附剂结合在包含玻璃、陶瓷、磁性材料、有机聚合物、导电聚合物、天然生物聚合物、用有机物包被的金属或非金属的基质上。在另一实施例中，吸附剂的形式是微乳液、胶乳、层或珠。在另一实施例中，基质上的位置呈线形或正交排列。在另一实施例中，在分析物与选择性条件接触前，吸附剂在基质上位于不同的位置。在另一实施例中，在分析物与选择性条件接触后，吸附剂在基质上位于不同的位置。在另一实施例中，不同的选择性条件包括不同的结合条件和不同的洗脱条件。

在另一实施例中，检测步骤包括用激光解吸质谱测定分析物的质量。

在另一实施例中，所选的选择性条件尽可能优化吸附剂对分析物的保留。在另一实施例中，所述的至少一种分析物多余一种。在另一实施例中，多种选择性条件的吸附剂不同而洗脱剂相同。

另一实施例还包括一步提供在可定址位置上包含吸附剂的基质，各吸附剂是经鉴定可保留分析物的选择性条件中的吸附剂。在另一实施例中，洗脱条件的差异在于 pH、缓冲能力、离子强度、水结构特征、除垢剂种类、除垢剂强度、疏水性或介电常数。在另一实施例中，多种选择性条件中的洗脱剂相同。

本发明另一实施例提供从样品中顺次抽提分析物的方法。这是一种适合对多种分析物并行的组合型连续分离纯化法。该方法包括：a)将含分析物的样品与第一选择性条件接触，使得分析物被第一吸附剂保留并产生非滞留样品；b)收集含分析物的非滞留样品，将非滞留样品与第二选择性条件接触，使得分析物被第二吸附剂保留并产生非滞留样品；c)在不同选择性条件下用解吸谱检测滞留分析

物。

本发明的另一方面内容提供一种解吸谱用基质，它包含结合特征沿单轴线或多轴线梯度变化的吸附剂。

本发明的另一方面内容提供一种逐步鉴定选择性条件的方法，该条件对样品中的某种分析物具有更高的分辨率。该方法包括：(a)如下鉴定保留样品中一种分析物的选择性条件：i) 将样品与一组选择性条件接触，各选择性条件具有至少一种结合特性和至少一种洗脱特性；ii)用解吸谱检测各选择性条件下被滞留的分析物；iii)鉴定保留该分析物的选择性条件；和(b)鉴定对分析物具有更高分辨率的选择性条件：i) 从已鉴定出的选择性条件中选取至少一种结合特性或洗脱特性，将它加入选择特征常数组；ii)将样品与一组经修饰的选择性条件组接触，该修饰组中的各选择性条件包含(1)常数组中的选择特征和(2)常数组所没有的结合特性或洗脱特性；和 iii)用解吸谱法从修饰组中鉴定出与先前鉴定的选择性条件相比以更高的分辨率保留分析物的选择性条件。实施例之一中重复步骤(b)至少一次。另一实施例重复步骤(b)直到鉴定出只保留样品中靶分析物的选择性条件。

本发明的另一方面提供用于解吸谱法的基质，包含经鉴定可逐步分辨分析物的选择性条件中的吸附剂。实施例之一中，吸附剂来自一试剂盒，该试剂盒还包含选择性条件中的洗脱剂或如何将洗脱剂与吸附剂结合使用的说明书。

本发明的另一方面内容提供一种从不纯样品中制备性纯化分析物的方法。该方法包括：a)在多种不同选择性条件下将样品与基质接触；用解吸谱法检测不同条件下滞留的分析物；鉴定使得分析物被保留的选择性条件；b)对鉴定出的多种不同选择性条件顺次重复以下步骤以纯化分析物：i)在鉴定出的条件下将样品与吸附剂接触使得分析物被吸附剂保留；ii)将分析物与不被基质保留的杂质分离；和 iii)从吸附剂上收集分析物。

本发明的另一方面内容提供一种制备用于检测样品中至少一种分析物的基质的方法。该方法是用于设计和鉴定分析物特异性吸附剂的组合型方法。它可以用于检测靶分析物。该方法包括：a)将样品与至少两种不同的选择性条件接触使得分析物被吸附剂保留，各选择性条件定义为不同的吸附剂与洗脱剂组合；b)用解吸谱法鉴定至少一种使得分析物被保留的选择性条件；和 c)制备包含至少一种所鉴定的选择性条件的吸附剂。在实施例之一中，鉴定步骤包括鉴定至少一种使得多种分析物被保留的选择性条件。另一实施例中的制备步骤包括制备包含多种吸附剂的作为多元吸附剂的基质的方法，所述的吸附剂可在同一洗脱条件下保留分析物。

本发明的另一方面内容提供诊断以至少一种诊断标记为特征的疾病的方法。这是一种用于同时检测多种诊断标记的组合型方法。该方法包括 a) 提供用于解吸谱法的基质，该基质包含至少一个可定址的位置，每个可定址的位置包含在某种洗脱条件下至少分辨一种诊断标记的吸附剂； b) 在洗脱条件下将基质与来自患者的生物样品接触使得诊断标记滞留；和 c) 用解吸谱法检测滞留的生物标记。检测滞留的检测标记即是对疾病的诊断。

本发明另一方面内容提供一种用于检测样品中某分析物的试剂盒，它包括(1) 用于解吸谱法的基质，它包含至少一个可定址的位置，每个可定址的位置上包含在由吸附剂和洗脱剂构成的选择性条件下分辨分析物的吸附剂；和 2) 将样品与选择性条件接触的洗脱剂或说明书。在实施例之一中，试剂盒的特征在于有多种诊断标记，并且，基质包含多个可定址位置，每个可定址位置包含分辨至少一种诊断标记的吸附剂。

本发明的另一方面内容提供用于解吸谱法的基质盒，它包含可定址位置上的至少一种吸附剂，这至少一种吸附剂可分辨患者样品中某种病理状态的多种诊断标记。

本发明的另一方面内容提供选择某蛋白分析物候选特征的方法。该方法是根据至少两种理化特征鉴定蛋白质的组合型方法。该方法包括： a) 测定一组说明样品中某蛋白分析物的至少第一和第二理化特征的匹配参数的数据，这是通过 i) 将分析物置于不同的选择性条件中，由鉴别蛋白分析物某理化特征的引力基础介导分析物被基质所吸附；和 ii) 在不同选择性条件下用解吸谱法检测滞留的分析物；和 b) 在可编程计算机中运行以下步骤： i) 访问数据库，数据库中参比多肽组中的每一成员都具有说明参比多肽至少第一和第二理化特征的一组数据； ii) 输入说明该蛋白分析物理化特征的数据组； iii) 从数据库中选出数据组在匹配参数内的参比多肽。选出的参比多肽提供了蛋白分析物的候选特征。没有被选出的参比多肽无此候选特征。

本发明的另一方面内容提供一种顺次保留分析物的方法。该方法是检测多元大分子或超分子组装的方法。它通过对分子识别的干扰用作药物开发的方法。该方法包括 a) 将第一样品与最初吸附剂和洗脱剂接触使得第一分析物被吸附剂保留，并用解吸谱法检测被吸附的分析物，滞留的第一分析物由此变成第二吸附剂； b) 将第二样品与第二吸附剂和洗脱剂接触使得第二分析物被第二吸附剂保留，用解吸谱法检测被吸附的第二分析物，滞留的第二分析物由此变成第三吸附剂。

本发明的另一方面内容提供一种检测样品中的酶的方法。该方法包括：a)提供包含吸附剂和与该吸附剂结合的酶底物的固相，酶对酶底物的活性产生具有特征性分子量的产物；b)将底物与样品接触；和c)用解吸谱法检测产物。检测产物就是检测酶。

本发明的另一方面内容提供一种确定某分析物在第一和第二样品中是否差异存在(例如差异表达)的方法。该方法可以用于通过差异蛋白质展示检测差异基因表达的组合方法。该方法包括a)测定分析物在第一样品中至少一种选择性条件下的第一滞留图；b)测定分析物在第二样品中相同选择性条件下的第二滞留图；和c)比较第一和第二滞留图之间的差异。两滞留图的差异肯定了分析物在第一和第二样品中的差异存在。

该方法的实施例之一是测定某种蛋白是否在两种不同细胞，包含细胞的第一和第二样品或来自细胞的材料中差异表达。该方法的另一实施例是测定某种药物是否改变生物样品中某蛋白质的表达，这还包括将药物用于第一生物样品但不用于第二生物样品的步骤。在另一实施例中，第一生物样品来自健康者，第二生物样品来自某种病症的患者。样品可选自例如血液、尿液、血清和组织。以在患者样品中增加的分析物作为候选诊断标记。通常，确认一种诊断标记需在多个受试者中检测到该标记物。

本发明的另一方面内容提供鉴定某受体的配体的方法。该方法包括：a)提供包含结合受体的吸附剂的基质；b)在允许受体与配体之间发生结合的条件下将被结合的受体与含配体的样品接触；和c)用解吸谱法检测被结合的配体。

本发明的另一方面内容提供用于测定药物是否调节靶分析物与某吸附剂之间的结合的筛选方法。这是一种用于药物开发的组合型方法。该方法包括：a)提供包含靶分析物在洗脱条件下与之结合的吸附剂的基质；b)在允许靶分析物与吸附剂相互结合的洗脱条件下将基质与靶分析物和药物接触；c)用解吸谱法定量检测靶分析物与吸附剂之间的结合；和d)确定测得的量是否与对照结合量不同，在对照中，基质在不含药物的洗脱条件下与靶分析物接触。测得量与对照量之间的差异说明药物调节了结合作用。

本发明内容之一提供一种检测基因组件(genetic package)的方法，基因组件中包含一段编码特异性结合靶吸附剂的多肽的聚核苷酸。就某一方面而言，这是一种用于从展示文库中挑选出分析物的特异性噬菌体的组合型方法，包括使用通过测定滞留图而分离得到的靶蛋白或在原位通过体外转录和翻译产生的靶蛋白。该方法包括：a)提供包含靶吸附剂的基质；b)提供包含多种不同基因组件的展示文

库，不同的基因组件各自包含一段所含核酸序列编码某种多肽的聚核苷酸，而且，不同的基因组件各自具有展示所编码多肽的表面；c)在允许多肽与靶吸附剂特异性结合的洗脱条件下将基质与展示文库接触，使得含有多肽的基因组件滞留在基质上；和 d)用解吸谱法检测滞留在基质上的基因组件。

该方法的实施例之一中，展示文库是噬菌体文库。另一实施例中，噬菌体是 M13。另一实施例中，多肽是单链抗体。另一实施例中，靶分析物是在不同表型的细胞内差异表达的多肽分析物。另一实施例中，基质包含细胞或细胞膜。

实施例之一中，提供靶吸附剂的步骤包括：i)提供包含吸附剂的基质，所述的吸附剂在某种洗脱条件下保留靶分析物；和 ii)在允许靶分析物被吸附剂保留的洗脱条件下将吸附剂与靶分析物接触，靶分析物由此变成靶吸附剂。在实施例之一中，靶分析物是靶多肽，步骤 ii)接触吸附剂包括通过体外翻译编码靶多肽的聚核苷酸在吸附剂上原位产生靶多肽的步骤，还可以包括在吸附剂上原位扩增靶多肽序列。

在另一实施例中，基质包含(1)结合锚定多肽的吸附剂和(2)至少一个具有展示锚定多肽的表面和靶吸附多肽的靶基因组件，靶基因组件所含的聚核苷酸含有编码靶吸附剂的核酸序列，靶基因组件通过锚定多肽与吸附剂结合。

在另一实施例中，该方法包括任意以下步骤：检测编码多肽的核酸序列；分离滞留的基因组件或产生多肽。

本发明的另一方面内容提供用于解吸谱法的基质，它包含结合展示于基因组件表面的锚定多肽的吸附剂，所述的基因组件表面还展示靶多肽，所述的基因组件包含具有编码靶多肽的核酸序列的聚核苷酸。

本发明的另一方面内容提供检测聚核苷酸翻译的方法。所述方法包括：a)提供用于解吸谱法的包含吸附剂的基质；b)将基质与编码多肽的聚核苷酸和体外翻译聚核苷酸所需的物质接触，由此产生多肽；c)基质与洗脱剂接触使得多肽被吸附剂保留；和 d)用解吸谱法检测滞留的多肽。检测多肽就是检测聚核苷酸的翻译。

附图简述

图 1 是包含多个吸附剂位点的条形基质。基质条有 6 组根据引力基础(疏水力，离子力，配位共价键及混合作用)来区分的不同吸附剂。基质条针对不同吸附剂各有多个位点，允许在不同的时刻用不同的洗脱剂来检查这些位点，或用于记录和后继分析。

图 2 是吸附剂(表面相互作用潜力)位于预定可定址位置上的正交排列。排列也可以呈板式。排列中包含多种吸附剂。在与分析物接触后,各条可用不同的洗脱剂(选择阈值修饰剂)洗涤。分析不同选择性条件下的滞留情况得到滞留图或识别概况。

图 3 表示通过将分析物从排列的给定位置上解吸进行的分析物的定量分析和用激光解吸质谱法进行的解吸分析物的定量分析。

图 4A 显示的是用来执行分析本发明数据所用软件的计算机系统。图 4A 显示的计算机系统 1 包括显示器 3,显示屏 5,机箱 7,键盘 9 和鼠标 11。鼠标 11 可具有一个或多个按键,例如鼠标键 13。机箱 7 内包含 CD-ROM 驱动器 15 和硬盘驱动器(未显示),它们可用来存储和检索包含本发明代码的计算机程序。虽然显示了一个 CD-ROM 17 作为计算机可读记录介质,但也可以使用包括软盘、DRAM、硬盘、内存(flash memory)、磁带等在内的其他计算机可读存储介质。机箱 7 内还有诸如处理器、存储器等常规计算机组件(未显示)。

图 4B 显示的是用于执行使用本发明数据的软件的计算机系统 1 的系统图。如图 4A 所示,计算机系统 1 包括显示器 3 和键盘 9。计算机系统 1 还包括诸如中央处理器 102、系统存储器 104、I/O 控制器 106、显示卡 108、可换磁盘 112、固定磁盘 116、网络界面 118 和话筒 120 等子系统。可换磁盘 112 代表了诸如软盘、磁带、CD-ROM、可换硬盘、内存(flash memory)等可换的计算机可读存储介质。固定磁盘 116 代表内置硬盘驱动器、DRAM 等。适用于本发明的其它计算机系统可能还包括更多或更少的子系统。例如,其它计算机系统可具有一个以上处理器 102(即,多处理器系统)或高速缓冲存储器。

图 5A-5F 是溶菌酶在 6 种不同吸附剂和数种不同洗脱剂组成的选择性条件下的滞留图。

图 6A-6B 是用固定化金属吸附剂分辨人血清中的低分子量和高分子量分析物。

图 7A-7B 是用不同吸附剂和相同洗脱剂分辨人血清中的低分子量和高分子量分析物。

图 8A-8B 是用不同吸附剂并以水为洗脱剂分辨早产婴儿尿液中的低分子量和高分子量分析物。

图 9 显示用疏水性苯基吸附剂和三种洗脱剂分辨早产婴儿尿液中的分析物,结果发现 Tween 洗涤选择性保留一种分析物(*)。

图 10A-10D 是分辨两不同乳腺癌细胞系的细胞培养液中的分析物。

图 11 显示早产婴儿尿液在 6 种吸附剂和 3 种洗脱剂组成的选择性条件下的混合物滞留图。

图 12 显示早产婴儿尿液的两维度聚丙烯酰胺凝胶(pI 和表观分子量)。

图 13 显示用噬菌体文库筛选表面蛋白特异性结合靶分析物的噬菌体的方法。上方的基质显示, 通过检测噬菌体所含的许多包被蛋白, 即使少量的特异性结合噬菌体也能够用解吸谱法检测出来。下方, 本发明开发了具有数个吸附剂位置使得靶分析物与之特异性结合的的基质。使噬菌体接触这些位点, 用解吸谱法检测结合的噬菌体。可以分离出与另一位置结合的噬菌体并进行培养。

图 14 显示如何用筛选法鉴定的配体(此处为一种单链抗体)作为吸附剂固定用于蛋白-蛋白相互作用研究的靶蛋白。原位纯化靶蛋白(位置 2)并用来筛选噬菌体展示文库(位置 4)。分离出单链抗体, 作为吸附剂与基质结 (位置 6)。然后, 靶蛋白与单链抗体结合。这就固定了靶蛋白, 可用于研究蛋白-蛋白相互作用(位置 8)。

图 15 显示筛选能干扰蛋白质结合配体(此处为一种单链抗体)的候选药物的方法。通过例如自身可经蛋白 A 或蛋白 G 固定的抗噬菌体抗体将某靶蛋白的特异性单链抗体固定于基质上的某一位置。使该单链抗体接触靶蛋白和候选药物, 用解吸谱法来检测药物结合蛋白分析物和干扰配体结合分析物的能力。

图 16 显示筛选能干扰蛋白质结合配体的候选药物的方法。该方法与上一图中的相似, 所不同的是通过解吸谱法检测药物本身与配体的结合来检测药物干扰分析物结合的能力。

图 17 显示筛选能干扰靶蛋白(靶蛋白 I)结合第二配体(靶蛋白 II)的候选药物的方法。和前两图一样, 靶蛋白被固定在基质上, 本身由此变成配体的吸附剂。此处, 分析物通过单链抗体被固定。然后, 靶蛋白与配体和候选药物接触。用解吸谱法检测药物干扰分析物与配体之间结合(通过例如与靶分析物结合)的能力。

图 18 是从鉴定差异表达的 mRNA 或多肽开始, 至产生特异性结合用于解吸谱法检测的多肽的诊断平台结束的流程圖。

图 19A-19D 显示嗜血杆菌(*Hemophilus*)裂解液在某吸附剂排列上的滞留图。图 19A: 阴离子吸附剂; 图 19B: 常态吸附剂; 图 19C: Ni(II)吸附剂; 图 19D: 疏水性吸附剂。

图 20A-20C 显示嗜血杆菌裂解液中某分析物的逐步分辨。吸附剂都是阴离子吸附剂。图 20A: 第一步, 在接触样品后, 用 150 μ l 20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, pH7.0 洗涤该位置。第二步, 在一组常数特征中加入吸附剂和洗脱剂的磷酸钠特

征。图 20B: 除 20mM 磷酸钠, pH7.0 之外, 还用 0.05% Triton X100 和 0.15M NaCl(总共 150 μ l)洗涤该位置。图 20C: 除 20mM 磷酸钠, pH7.0 之外, 还用 100mM 咪唑, 0.15M NaCl(总共 150 μ l) 洗涤该位置。

图 21A-21D 显示常人血清和患病血清中成分的比较结果。图 21A: 正常血清在吸附剂排列(Cu(II))位置上的滞留图。图 21B: 患病血清在吸附剂排列(Cu(II))位置上的滞留图。图 21C: 将两种血清样品中的滞留分析物重叠。为了简化表示, 各滞留分析物峰转化成条柱, 虚线柱代表正常血清中被滞留的分析物, 实心柱代表疾病血清中被滞留的分析物。图 21D: 为了更清楚地区分两样品, 绘制了一张比较图, 计算并显示了两样品中滞留分析物之比。用“*”标记的两分析物显示在疾病血清中明显增加(增加 5 至 10 倍)。

图 22A-22D 显示的是对照、疾病和药物治疗的小鼠的尿液在 Cu(II)吸附剂上的滞留图的比较, 以及对疾病和药物处理尿液中标记的定量。

图 23A-23D 显示以“凝胶视图(gel view)”形式显示的 4 名癌症患者尿液中分析物的滞留图。患者 1, 2 和 3 之间的差异图显示有两种共有分析物在患者尿液中增加。

图 24A-24E 显示通过检测基因 VIII 包被蛋白用激光解吸质谱法检测 M13 噬菌体。对原来的 10^{12} 噬菌体/ml 进行 1:10 至 1:100,000,000 的稀释。

图 25A-25B 为解吸谱法显示的以抗 M13 抗体为吸附剂捕获 M13。图 22A 显示被捕获的 M13 噬菌体, 其中的峰代表基因 VIII 和基因 III 蛋白。图 22B 是对照, 其中的峰代表抗体吸附剂(单倍和双倍带电)。

图 26A-26D 显示带有抗-tat 单链抗体的 M13 噬菌体被 tat 蛋白吸附剂吸附的情况。只显示了噬菌体稀释度为 1:10 至 1:10,000 时的强度。

图 27A-27B 显示浓度为 1 μ g/ml(图 27A)和 100ng/ml(图 27B)时, TGF- β 结合固定化 TGF- β 受体融合蛋白的滞留图。实线代表没有游离 TGF- β 受体时的结合。虚线代表有游离 TGF- β 受体时的结合。

图 28 至 31 显示滞留层析的分辨能力。图 28A-28C 显示用疏水性, 阳离子和 Cu(II)吸附剂分辨嗜血杆菌裂解液中分子量范围从 0kD 至 30kD 的蛋白质。各滞留分析物均以条柱表示, 条柱高度代表滞留分析物的强度。图 29A-29C 显示用疏水性, 阳离子和 Cu(II)吸附剂分辨嗜血杆菌裂解液中分子量范围从 30kD 至 100kD 的蛋白质。图 30 显示三种吸附剂联合分辨 0kD 至 30kD 的嗜血杆菌蛋白。图 31 显示三种吸附剂联合分辨的 30kD 至 100kD 的嗜血杆菌蛋白。

图 32 显示 GST 融合蛋白与普通吸附剂的结合。

图 33A-33B 显示特异性配体与固定在吸附剂排列上的 GST 融合蛋白受体的结合(图 33A), 配体与没有 GST 融合蛋白的排列不结合(图 33B)。

本发明的详细说明

I. 定义

除非另作定义, 本发明所用技术和科学术语的含义都是本领域技术人员所熟知的。以下参考文献为本领域技术人员提供了本发明所用许多术语的一般解释: Singleton 等, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*(2ed. 1994); *The Cambridge Dictionary of Science and Technology*(Walder 编, 1988); *The Glossary of Genetics*, 5th ed., R.Rieger 等编, Springer Verlag(1991); 和 Hale & Marham, *The Harper Collins Dictionary of Biology*(1991)。除非另作定义, 本发明中以下术语的定义为:

“分析物”: 样品中需要滞留和检测的组分。它可以表示样品中单独一种组分或一组组分。

“吸附剂”: 任何能够吸附分析物的物质。“吸附剂”在此即表示分析物所接触的单一种物质“单吸附剂(monoplex adsorbent)”(例如一种化合物或官能团), 又表示样品所接触的多种物质“多重吸附剂(multiplex adsorbent)”。多重吸附剂中的吸附性物质称为“吸附剂种类”。例如, 基质上某可定址位置可包含以多种具有不同结合特性的不同吸附剂种类(例如, 阳离子物质, 金属螯合剂或抗体)为特征的多重吸附剂。

“吸附”表示用洗脱剂(选择阈值修饰剂)洗涤前或后, 吸附剂与分析物之间可被测得的结合。

“基质”吸附剂结合或沉淀所在的固相。

“结合特性”指导致吸附剂吸引分析物的化学和物理特征。如果在相同的洗脱条件下, 两种吸附剂结合相同分析物的亲合性程度不同, 则这两种吸附剂具有不同的结合特征。结合特性包括, 例如, 盐促相互作用程度, 疏水性相互作用程度, 亲水性相互作用程度, 静电相互作用程度等。

“结合条件”指分析物所接触的结合特性。

“洗脱剂”指用来介导分析物被吸附剂吸附的物质, 通常是一种溶液。洗脱剂又称“选择阈值修饰剂”。

“洗脱特性”指造成特定洗脱剂(选择阈值修饰剂)能够介导某分析物与某吸附剂之间吸附作用的特征。如果两种洗脱剂与分析物和吸附剂接触时, 分析物与

吸附剂之间的亲合性不同，则这两种洗脱剂具有不同的洗脱特性。洗脱特征包括，例如，pH，离子强度，水结构的修饰，除垢剂强度，疏水相互作用的修饰等。

“洗脱条件”指分析物所接触的洗脱特性。

“选择特征”指具有特定结合特性的吸附剂与具有特定洗脱特性的洗脱剂相结合，产生的特异性使得分析物在用洗脱剂洗涤后仍然滞留的特征。

“选择性条件”指分析物所接触的选择特征。

“引力基础”指使得分子彼此吸引的化学和/或理化特征。

“引力强度”分子彼此吸引的强度(又称亲合力)。

“分辨”“分辨作用”或“分析物的分辨”指对样品中至少一种分析物的检测。分辨包括通过先分离然后差异性检测来检测样品中的多种分析物。分辨不要求将一种分析物与混合物中的其余分析物完全分离。相反，任何分离只要能够区分至少两种分析物就足够了。

“高信息分辨”指分辨分析物的方式不仅能检测出分析物，还可评价分析物的至少一种理化性能，例如分子量。

“解吸谱法”是一种检测分析物的方法，其中，分析物接触能量后，从固定相解吸到气相中，被解吸的分析物或其可区别性部分直接被检测器测得，不需要将分析物捕捉到第二固定相上的中间步骤。

“检测”指鉴定待测物质是否存在或存在量。

“滞留”指经洗脱剂洗涤后分析物被吸附剂所吸附。

“滞留数据”指表明检测到在特定选择性条件下分析物被保留的数据(可包括检测质量)。

“滞留图”指说明多种选择性条件下被保留的某分析物的滞留信息的数据组。

“识别概况”指说明某分析物在多种选择性条件下相对滞留作用的数据组。

“复合物”指两种或两种以上联合而成的分析物。

“片段”指分析物的化学，酶法或物理降解产物。片段可能是中性的，也可能是离子态的。

“差异表达”指某分析物的存在在质与量上可测得的差异。

“生物样品”指来自病毒，细胞，组织，器官或生物体的样品，包括但不限于细胞，组织或器官裂解物或匀浆，或体液样品，例如血液，尿液或脑髓液。

“有机生物分子”指具有生物来源的有机分子，例如甾体，氨基酸，核苷酸，糖，多肽，聚核苷酸，复合糖或脂质体。

“有机小分子”指与药理学中常用有机分子大小相当的有机分子。它不包括有机生物聚合物(例如蛋白质, 核酸等)。较好的有机小分子最大约 5000Da, 最大约 2000Da, 或者, 最大约 1000Da。

“生物聚合物”指生物来源的聚合物, 例如多肽, 聚核苷酸, 多糖或聚甘油酯(例如二或三甘油酯)。

“多肽”指由氨基酸残基、相关天然结构变体及其非天然合成类似物通过肽键连接而成的聚合物, 及其天然变体和非天然合成类似物。可以用自动多肽合成仪来合成多肽。“蛋白质”一般指大多肽。“肽”一般指短多肽。

“聚核苷酸”指由核苷酸单元构成的聚合物。聚核苷酸包括诸如脱氧核糖核酸(“DNA”)和核糖核酸(“RNA”)的天然核酸和核酸类似物。核酸类似物包括非天然碱基和核苷酸以非天然磷酸二酯键与其它核苷酸连接的哪些, 或包含以非磷酸二酯键连接的碱基的哪些。这样, 核苷酸类似物包括但不限于磷酸硫酯, 磷酸二硫酯, 磷酸三酯, 磷酸甲苄咪唑, 磷酸硼烷酯, 磷酸甲酯, 手性-磷酸甲酯, 2-O-甲基核糖核苷酸, 肽-核酸(PNA)等。这些聚核苷酸可以用例如自动 DNA 合成仪来合成。“核酸”一般指大的聚核苷酸, “寡核苷酸”一般指短的聚核苷酸, 一般不超过 50 个核苷酸。可以理解的是, 当用 DNA 序列(即, A, T, G, C)表示核苷酸序列时, 也包括以“U”代替“T”的 RNA 序列(即, A, U, G, C)。

“可测部分”或“标记”指可以用分光学, 光化学, 生物化学, 免疫化学或化学方法测定的组分。例如, 有用的“标记”包括 ^{32}P , ^{35}S , 荧光染料, 电子-密度(electron-dense)试剂, 酶(例如 ELISA 中常用的那些), 生物素-链霉亲和素, 分子氧(dioxygenin), 可以得到其抗血清或单克隆抗体的半抗原或蛋白质, 或者序列与靶分子互补的核酸分子。这些可测部分通常产生一个可测信号, 例如放射性、生色性或荧光信号, 这些信号可用来确定样品中可测部分被结合的量。可测部分可以通过共价键、离子引力, 范德华力或氢键掺入或结合引物或探针, 例如, 掺入放射性核苷酸或可被链霉亲和素识别的生物素化核苷酸。可测部分可能直接可测或间接可测。间接可测可能涉及将第二直接可测或间接可测部分与原可测部分结合。例如, 原可测部分可以是与结合伴侣特异性杂交的配体, 例如作为链霉亲和素结合伴侣的生物素, 或作为互补序列结合伴侣的一段核苷酸序列。结合伴侣本身可能是直接可测的, 例如抗体本身可被荧光分子所标记。结合伴侣也可能是间接可测的, 例如, 具有互补序列的核酸可能是分支 DNA 分子的一部分, 后者再通过与其它经标记核酸分子杂交而被测得。(参见, PD. Fahrlander & A. Klausner, *Bio/Technology*(1988)6:1165)。信号定量可通过例如闪烁计数, 测密度或流动细胞

计数来进行。

“多”表示不少于 2。

“纯化”表示去除待纯化组合中至少一种杂质。纯化并不要求纯化后的化合物 100%纯。

“配体”是与靶分子特异性结合的化合物。

“受体”是与配体特异性结合的化合物。

“抗体”指主要由一个或多个免疫球蛋白基因编码的多肽配体，或其片段，它们特异性地结合并识别某表位(例如抗原)。已知的免疫球蛋白基因包括 κ 和 λ 轻链恒区基因， α 、 β 、 δ 、 ϵ 和 μ 重链恒区基因，以及众多的免疫球蛋白变区基因。抗体是，例如，完整的免疫球蛋白或各种肽酶消化所产生、并已经被充分描述的片段之一。包括 Fab'和 F(ab)₂'片段。本文中的“抗体”还包括修饰完整抗体而产生的或用重组 DNA 方法全新合成的抗体片段。它还包括单克隆抗体，多克隆抗体，嵌合抗体，和人源化抗体。抗体的“Fc”部分指包含一个或多个重链恒区 CH₁，CH₂和 CH₃，不包括重链变区的重链部分。

在确定包含多种化合物的样品中是否存在分析物的试验中，当配体或受体发生作用时就会与分析物化合物“特异性结合”或“发生特异性免疫反应”。这样，在设计好的试验(例如免疫试验)条件下，配体或受体优先结合特定的分析物，与样品中的其它化合物则基本上不结合。例如，一段聚核苷酸在杂交条件下特异性结合一段包含互补序列的聚核苷酸分析物；一种抗体在免疫试验条件下特异性结合带有激发该抗体的表位的抗原分析物；吸附剂在合适的洗脱条件下特异性结合某种分析物。

“制剂”指一种化合物，化合物的混合物，组成尚不确定的样品，小分子组合而成的排列，生物大分子，噬菌体肽展示文库，噬菌体抗体(例如 scFv)展示文库，聚核糖体展示文库，或由细菌、植物、真菌、或动物细胞或组织等生物材料制备的提取物。合适的技术包括噬菌体或类似载体上重组抗体文库的挑选。参见，Huse 等，(1989) Science 246:1275-1281；和 Ward 等，(1989) Nature 341:544-546。Huse 的方法与噬菌体展示文库联用更有效。参见，例如，Dower 等，WO91/17271 和 McCafferty 等，WO92/01047。

“重组聚核苷酸”指包含的序列在天然条件下并不连接在一起的聚核苷酸。可将扩增或组装而成的重组聚核苷酸包含在合适的载体内，再用该载体转化合适的宿主细胞。含有重组聚核苷酸的宿主细胞被称为“重组宿主细胞”。然后在重组宿主细胞内表达基因，产生例如“重组多肽”。重组聚核苷酸也可以是非编码

功能的(例如, 启动子, 复制起点, 核糖体结合位点等)。合适的单细胞宿主包括常用于表达真核或哺乳动物聚核苷酸的哪些, 包括例如大肠杆菌的原核细胞; 包括酵母之类真菌的真核细胞; 包括昆虫细胞(如 sf9)和诸如 CHO, R1.1, B-W, L-M, 非洲绿猴肾细胞(例如 COS1, COS7, BSC1, BSC40 和 BMT10)等动物细胞和培养的人细胞的哺乳动物细胞。

“表达调控序列”指聚核苷酸内一段调节与之操作性连接的核苷酸序列的表达(转录和/或翻译)的核苷酸序列。“操作性连接”指两个部分之间的一种功能性关系, 在这种关系中, 一部分的活性(例如调节转录的能力)对另一部分产生作用(例如序列的转录)。表达调控序列包括但不限于启动子序列(例如诱导型, 抑制型或组成型), 增强子, 转录终止子, 起始密码子(即 ATG), 内含子的剪接信号和终止密码子。

“表达载体”指包含重组聚核苷酸的载体, 该聚核苷酸又包含与待表达核苷酸序列操作性连接的表达调控序列。表达载体含有足量的顺式作用表达元件; 其它表达元件可由宿主细胞或体外表达系统提供。表达载体包括所有本领域已知的那些, 例如含有重组聚核苷酸的粘粒、质粒(例如裸露的或被脂质体包被的)和病毒。

“编码”指聚核苷酸内特殊核苷酸序列(例如基因, cDNA 或 mRNA)的遗传特性, 即作为模板在生物过程中合成具有确切核苷酸序列(即 rRNA, tRNA 和 mRNA)或确切氨基酸序列以及由此产生的生物特性的其它聚合物或大分子。所以, 如果在细胞或其它生物系统内由基因产生的 mRNA 经转录和翻译产生了蛋白质, 则称该基因编码该蛋白。某基因或 cDNA 的编码链(核苷酸序列与 mRNA 的一致而且通常显示在列表内的链)和非编码链(用作转录模板的链)都可以称为编码该基因或 cDNA 的蛋白或其它产物。除非另做说明, “编码某氨基酸序列的核苷酸序列”包括编码相同氨基酸序列的所有简并版本。编码蛋白质和 RNA 的核苷酸序列可包含内含子。

“吸能分子”指在解吸分光光谱仪中从能源吸收能量使得分析物从探针表面解吸的分子。MALDI 中所用的吸能分子常称为“基体(matrix)”。在生物有机分子激光解吸中常用肉桂酸、cinapinic 酸和二羟基苯甲酸作为吸能分子。

II. 滞留层析

滞留层析是一种多维度分辨样品中分析物的方法。该方法包括(1)在多种不同的吸附剂/洗脱剂组合(“选择性条件”)下将样品中的分析物吸附到基质上和(2)

用解吸谱法检测被吸附分析物的滞留情况。各选择性条件提供分离的第一维度，将被吸附分析物与不被吸附的那些分离。解吸质谱提供分离的第二维度，根据质量将吸附分析物与其它的分析物分离。因为滞留层析使用多种不同的选择性条件，所以可以获得分离的许多维度。两种选择性条件下一一种或多种分析物的相对吸附也可以确定。这种多维度分离既分辨了分析物又对它们进行了描述。

而且，由此分离的分析物仍然滞留为一张滞留图，便于以后用来检测(例如)分析物的结构和/或功能。而且，固定分析物本身可以用作吸附剂固定接触基质的其它分析物。总之，本发明提供了一种迅速、多维度而且高信息分辨分析物的方法。

本发明方法可采用多种形式。实施例之一中，分析物在两个不同的物理位置被两种不同的吸附剂吸附，每种吸附剂用相同的洗脱剂(选择阈值修饰剂)洗涤。另一实施例中，分析物在两个不同的物理位置被相同的吸附剂吸附，每种吸附剂用不同的洗脱剂洗涤。另一实施例中，分析物在不同的物理位置被两种不同的吸附剂吸附，并用两种不同的洗脱剂洗涤。另一实施例中，分析物先用一种吸附剂吸附，用第一洗脱剂洗涤，检测滞留情况；然后用不同的第二洗脱剂洗涤，再检测滞留情况。

A. 进行滞留层析的方法

1. 分析物与选择性条件接触

a. 基质的制备

在滞留层析过程中，被吸附剂保留的分析物被呈递给基质上的能源。含分析物的样品可在吸附剂固定于用于向解吸机制呈递分析物的基质之前或之后与吸附剂接触。为了接触，吸附剂可以是液态或固态(即位于基质上或呈固相)。具体地说，吸附剂的形式可以是溶液，悬浮液，分散系，油包水乳液，水包油乳液，或微乳液。当吸附剂的形式是悬浮液，分散系，乳液或微乳液时，可以有合适的表面活性剂存在。在这样的实施例中，可以通过将液态样品与液态吸附剂相互混合来使样品与吸附剂接触。或者，样品可以位于固体支持物上，则可通过含样品的支持物在液体吸附剂中的淋浴、浸泡或蘸来完成接触。此外，可用液体吸附剂喷涂或洗涤固体支持物上的样品来进行接触。在这种实施例中，不同吸附剂可用不同容器提供。

在实施例之一中，吸附剂位于基质上。基质可以是能够结合或固着吸附剂的任何材料。通常，基质包含玻璃；陶瓷；导电聚合物(例如炭化 PEEK)；TEFLON®

包被的材料；有机聚合物；天然生物聚合物；金属(例如镍，铜，钢或铝)；薄膜；多孔和无孔交联聚合物微珠(例如琼脂糖，纤维素或葡聚糖)；其他不溶性聚合物；或以上的组合。

在实施例之一中，基质的形式是插在解吸检测器内的探针或样品呈递机制。例如，见图 1，基质是条形的。固定在基质上的吸附剂可以呈线形排列的位点，位点各自与分析物接触。可将数条基质连在一起，许多吸附剂由此形成在确定列中具有 30 个分开的位点的排列。基质还可以是板型的，具有水平和垂直的吸附剂列，形成诸如正方形、矩形或圆等规则的几何图案。

可如下生产探针。基质可以是任何合适的固体材料，例如不锈钢、铝或硅薄片。然后，可用能修饰表面的材料包被金属基质。例如，可用二氧化硅、二氧化钛或金包被金属表面。

然后用双官能接头修饰表面。双官能接头一端具有的官能团能够共价结合表面上的官能团。这样，该官能团可以是无机氧化物或针对金的巯基。接头的另一端通常具有一个氨基官能团。有用的双官能接头包括氨基丙基三乙氧基硅烷或氨基乙基二硫化物。

一旦与表面结合，接头用作为吸附剂的基团进一步衍生。通常，吸附剂被加在探针上的可定址位置。在一种探针中，直径约 3mm 的位点排列成相互垂直的阵列。吸附剂本身可以是双官能分子的一部分，该双官能分子包含一个与可得氨基反应的基团和另一个作为吸附剂的官能团。官能团包括正常相(氧化硅)，反相(C₁₈ 脂肪烃)，季胺和磺酸酯。还可以用其它双官能分子，例如碳二酰亚胺和 N-羟基琥珀酰亚胺，进一步修饰表面形成一张预-活化毯。可用生物有机吸附剂(例如核酸，抗体和其它蛋白质配体)将这类毯官能化。生物聚合物能够通过胺残基或巯基残基结合毯上的官能团。在实施例之一中，吸附剂与交联聚合物(例如薄膜)结合，交联聚合物本身则通过可得官能团与探针表面结合。这类聚合物包括纤维素，葡聚糖，羧甲基葡聚糖，聚丙烯酰胺和以上的混合物。固定有吸附剂的探针就可供使用了。

在另一实施例中，吸附剂固定在提供固定相的第一基质(例如聚合物或玻璃微珠)上，第一基质再位于用于向解吸检测器的解吸能呈递样品的第二基质上。例如，第二基质可以呈板式，在预定的可定址位置具有一系列孔。这些孔可以作为经吸附剂衍生的第一基质(例如用吸附剂衍生的聚合物珠)的容器。这种实施例的一个优点是分析物可以以一种物理关系吸附于第一基质，再转移到样品呈递基质上进行解吸谱分析。

通常，将基质改变成可用本发明方法中的检测器来检测与吸附剂结合并被保留的分析物。在实施例之一中，基质以非固定方式插在一解吸检测器内，能量源在此击中位点并解吸分析物。可使基质适合水平和/或垂直安装在一可平移管内，从而沿一条路径水平和/或垂直移动基质到连续的预定的吸附剂的可定址位置上，接受能量源的询问，检测结合在位置上的分析物。基质的形式可以是常规的质谱探针。

条、板或探针形式的基质可用常规技术来制造。然后，在与含分析物的样品接触前，吸附剂可直接或间接偶联、装配或沉积在基质上。可用各种合适的固着或固定化方法将吸附剂与基质直接或间接偶联。例如，可用吸附剂衍生基质使得吸附剂通过共价或非共价键与基质直接结合来将吸附剂与基质直接偶联。

吸附剂在基质上的固着可通过多种机制实现。可用制备完全的吸附剂来衍生基质，即将预先制备好的吸附剂与基质连接。或者，可将前体分子固定在基质上，然后再向靠第一前体分子结合在基质上的成长链添加其它前体分子，由此在基质上形成吸附剂。这种在基质上构建吸附剂的方法尤其适用于聚合物，特别是诸如DNA或RNA分子等生物聚合物的吸附剂。可用本领域已知的寡核苷酸芯片技术，通过向固着于基质上的第一碱基连续添加碱基来制成生物聚合物吸附剂。参见，美国专利 5,445,934(Fodor 等)。

如图 2 所示，可与一片基质偶联少到 2 种多达 10 种，100 种，1000 种 10,000 种或更多种吸附剂。吸附剂位点的大小可根据实验设计和实验目的而不同。但是不能超过冲击能源的直径(例如激光点的直径)。连续的位点上可以是相同或不同的吸附剂。有时，宜使同一吸附剂位于基质的多个不同位置，以允许用多种不同的洗脱剂进行评价或保存被吸附的分析物以备后用或参考(可能是在第二过程中)。提供带有多种不同吸附剂的基质就能利用由不同吸附剂与一种样品组合而产生的多种结合特性结合和检测多种不同的分析物。在基质上用多种不同的吸附剂评价一种样品基本上等同于用不同的层析柱同时进行的多个层析，但是本方法的优点在于只需要一个系统。

当基质包含多种吸附剂时，特别有用的是使吸附剂位于预定的可定址位置。吸附剂在预定的可定址位置上就能够在预定第一可定址位置用第一洗脱剂洗涤吸附剂，在预定第二可定址位置用第二洗脱剂洗涤吸附剂。由此，可在以不同方式修饰吸附剂结合特性的不同洗脱剂存在下评价一种吸附剂对分析物的结合特性。可定址位置可排列成各种形式，但以规则图案为宜，例如线形、矩形或如圆等规则曲线。同样，当基质包含多种吸附剂时，可为了评价某给定吸附剂在洗脱

剂存在下的结合特性而就各种不同吸附剂评价一种洗脱剂。还可以在不同洗脱剂存在下评价不同吸附剂的结合特性。

(1) 递增或梯度吸附表面

通过在基质上合成不同的聚合吸附剂，可提供一系列具有不同结合特性的吸附剂。将一个前体分子固定在基质上，引发聚合反应，然后在各吸附剂完成不同程度时终止反应，如此可提供不同的聚合吸附剂。还可以与聚合物的末端官能团反应以使用不同的亲合性试剂(例如 $-\text{NH}_3$ 或 COO^-)对其进行不同程度的化学衍生。通过终止聚合或衍生反应产生出聚合或衍生程度不同的吸附剂。不同的聚合或衍生程度使各种不同的聚合吸附剂具有不同的结合特性。该实施例尤其适合在基质上提供多种不同的吸附剂。

如果需要，可以在容器中而不是就在基质上进行聚合反应。例如，可以在聚合/衍生反应进行过程中从反应器中抽取等份的产物，得到具有不同结合特性的聚合吸附剂。在聚合/衍生反应过程中不同时刻收取的各等份将表现出不同的聚合/衍生程度，由此得到多种不同的吸附剂。然后，可将不同等份的产物用作具有不同结合特性的吸附剂。或者，可以顺次重复终止反应的步骤，抽取等份的产物，然后重新启动聚合/衍生反应，由此产生多种不同的吸附剂。在不同终止点抽取的产物将具有不同的聚合/衍生程度，由此产生多种具有不同结合特性的吸附剂。

实施例之一中，基质是被一种或多种结合特性呈单维或双维梯度改变的吸附剂所包被的条形或板形。例如这样的含吸附剂的条形，其一端为弱疏水性，另一端为强疏水性。或者这样的板形，其一角为弱疏水性阴离子性，对角为强疏水性阴离子性。可通过有控喷涂或令材料按时间流经表面从而在梯度方向上逐步完成反应来形成这样的吸附梯度。可以在垂直方向上重复这一过程，从而形成相同或不同结合特性的不同吸附剂的正交梯度。

可在吸附剂定位在基质上之前或之后，用能令分析物与吸附剂结合的合适方法让含分析物的样品接触吸附剂。可简单地将吸附剂与样品混合或合并。样品与吸附剂接触可以通过将基质浸浴或浸渍在样品中，或基质蘸涂以样品，或将样品喷涂在基质上，用样品淋洗基质，或在与吸附剂的接触中产生样品或分析物。此外，样品与吸附剂的接触还可以通过将样品溶于某种洗脱剂或与其混合，然后用上述技术(即浸浴，浸渍，蘸涂，喷涂或淋洗)使洗脱剂和样品溶液与吸附剂接触。

b. 分析物与吸附剂接触

在分析物结合吸附剂前先让样品接触洗脱剂，这具有在样品接触吸附剂的同时改变吸附剂选择性的作用。结合吸附剂并因此滞留的样品组分将只包括能够在与样品混合的特定洗脱剂存在下结合吸附剂的那些，而不是在没有洗脱剂修饰吸附剂选择性时能结合吸附剂的所有组分。

样品必须与吸附剂接触足够长的时间以令分析物与吸附剂结合。通常，样品与吸附剂接触约 30 秒至 12 小时。较好的是样品与吸附剂接触约 30 秒至 15 分钟。

样品接触吸附剂时的温度与具体样品和选用的吸附剂有关。通常，样品在常温常压条件下接触吸附剂，但是有些样品可能需要改变温度(通常在 4°C 至 37°C 之间)和压力条件，这可由本领域熟练技术人员方便地加以确定。

本发明方法与常规方法相比的另一优点在于本发明能够在少量样品上进行许多不同的实验。通常，含数埃摩尔至 100 皮摩尔分析物的 1 微升至 500 微升样品就足以与吸附剂结合了。分析物可在与吸附剂结合后被保存，以用于以后的实验，因为没有经历解吸和检测所有滞留分析物这些步骤的位置将仍然保留分析物。所以，如果只有小部分样品可供分析，本发明就提供了能够在不同时间用不同吸附剂和/洗脱剂进行多个实验而不浪费样品的优点。

c. 用洗脱剂洗涤吸附剂

在样品与吸附剂接触使得分析物与吸附剂结合后，用洗脱剂洗涤吸附剂。通常，为了进行多维度分析，每个吸附剂位置至少用不同的第一和第二洗脱剂洗涤。洗脱剂洗涤改变了滞留在特定吸附剂上的分析物的量。吸附剂的结合特性与洗脱剂的洗脱特性结合形成了选择性条件，控制着洗涤后被吸附剂保留的分析物的量。所以，洗涤步骤从吸附剂上选择性地去除样品组分。

可用多种技术进行洗涤步骤。例如前文所述，样品可在接触吸附剂前溶于或与第一洗脱剂混合。样品在接触吸附剂之前或同时接触第一洗脱剂中的作用与先让分析物结合吸附剂再用第一洗脱剂洗涤吸附剂的净效果最接近。合并后的溶液与吸附剂接触后，可用第二洗脱剂或后继洗脱剂洗涤吸附剂。

洗涤结合有分析物的吸附剂可通过在洗脱剂中浸浴、浸渍、或蘸涂带吸附剂的基质；或用洗脱剂淋洗、喷涂或洗涤来完成。最好用微流体工艺将洗脱剂引入小直径的亲合性试剂位点。

当分析物与一个位置上的吸附剂结合，并在洗涤步骤中使用了多种不同的洗脱剂时，可获得有关吸附剂在各种洗脱剂存在下的选择性信息。用第一洗脱剂洗涤，解吸并检测滞留分析物，然后用第二洗脱剂洗涤，解吸并检测滞留分析物，

可通过如此重复在每次用洗脱剂洗涤后测定与一个位置上的吸附剂结合的分析物。可用相同的吸附剂以多种不同的洗脱剂重复洗涤，然后解吸和检测。如此，可用多种不同的洗脱剂重复检测一个位置上滞留的分析物的吸附剂，由此得出的一系列有关各次洗涤后滞留的分析物的信息。

以上方法当吸附剂位于多个预定可定址位置时也有用，不论这些吸附剂是否相同。但是，当分析物与不同位置上相同或不同的吸附剂结合时，洗涤步骤可改用包括并行操作的更系统化、更有效的方法进行。即，洗涤步骤可以通过用洗脱剂洗涤第一位置上的吸附剂，再用洗脱剂洗涤第二吸附剂，然后解吸并检测被第一吸附剂保留的分析物，再解吸和检测被第二吸附剂保留的分析物。换言之，所有的吸附剂都用洗脱剂洗涤，然后解吸被各种吸附剂保留的分析物，并检测吸附剂的位置。如有必要，在检测了各吸附剂的位置后，可进行第二阶段的洗涤，然后是第二阶段的解吸和检测。洗涤所有的吸附剂位置，然后在各个吸附剂位置解吸和检测，可对多种不同的洗脱剂重复进行这些步骤。用这种方法，可用整个阵列有效鉴定样品中各分析物。不论在第一阶段洗涤中是用同一种洗脱剂洗涤所有的吸附剂位置还是用多种不同洗脱剂洗涤多个吸附剂，该方法都有用。

2. 检测

洗涤后仍被吸附剂保留的分析物吸附在基质上。用解吸谱法来检测滞留在基质上的分析物：从吸附剂上解吸分析物，然后直接检测解吸下的分析物。

a. 解吸方法

从吸附剂上解吸分析物包括令分析物接触合适的能源。这通常意味着用放射能或能量粒子撞击分析物。例如，能量可以是激光能(例如 UV 激光)或闪光灯能形式的光能。或者，能量可以是一股快速原子流。也可以用热能来诱导/协助解吸。

解吸和/或离子化分析物以便直接分析的方法在本领域是众所周知的。其中之一称为由基体协助的激光解吸/离子化或 MALDI。MALDI 中，分析物溶液与基体溶液混合，混合物沉积在惰性探针表面，然后结晶，分析物因被晶体包埋而解吸。选用的基体吸收激光能并传递给分析物，导致解吸和离子化。通常，基体吸收 UV 范围内的光。有关大蛋白的 MALDI 可参见美国专利 5,118,937(Hillenkamp 等)和美国专利 5,045,694(Beabis 和 Chait)。

由表面强化的激光解吸/离子化或 SELDI 代表了比之 MALDI 在特异性,选择性和灵敏度方面的一大进步。有关 SELDI 参见美国专利 5,719,060(Hutchens 和

Yip)。SELDI 是一种固相解吸法，在其中，分析物被呈递给表面上的能流，该表面强化分析物的捕获和/或解吸。相比之下，MALDI 是一种液相方法，在其中，分析物与液体物质混合，液体物质包围着分析物形成结晶。

SELDI 的一种方式称 SEAC(由表面强化的亲合性捕捉)，包括将分析物呈递给与一亲合性捕捉机构(即吸附剂)偶联的解吸能。已发现，用这种方法将被吸附的分析物呈递给解吸能源时，实现目标分析物解吸的机会更大。可向探针添加吸能物质协助解吸。然后可向能源呈递探针以解吸分析物。

另一种 SELDI 称 SEND(由表面强化的净解吸)，包括使用一吸能物质层，上面放以分析物。基质表面有一层与之化学结合的吸能分子，而且/或者基本无晶体。然后将纯(即净)分析物涂在层的表面，不与其发生实质性混合。吸能分子象基体那样吸收解吸能并使分析物被解吸。这一进步是实质性的，因为：由于消除了溶液混合物和随机结晶的作用，现在可以更简单更均一的方式将分析物呈递给能源。这使得结果更统一更可预计，因此可能实现过程的自动化。吸能物质可以是经典基体材料或者是 pH 被调至中性或碱性的材料。吸能分子可通过共价键或非共价键与探针结合。

另一种 SELDI 称 SEPAR(由表面强化的光不稳定附着与释放)，包括使用光不稳定附着分子。光不稳定分子是一种二价分子，具有一个与固相(例如可作为探针一部分的探针平表面或珠体等其它固相)共价结合的位点，和可与亲合性试剂或分析物共价结合的第二位点。当光不稳定附着分子与表面和分析物结合时另含一个可在光照后释放亲合性试剂或分析物的光不稳定键。光不稳定键可在附着分子内，或者在与分析物(或亲合性试剂)或探针表面附着的位置。

b. 直接检测分析物的方法

有数种方法可检测解吸下的分析物。当分析物在解吸过程(例如激光解吸/离子化质谱法)中被离子化时，检测器可以是离子检测器。质谱仪一般包括测定解吸离子飞行时间的手段。这一信息被转化为质量。但是，没有必要测定解吸离子的质量来分辨和检测它们：离子化的分析物在不同时刻撞击检测器这一事实实现了它们的检测和解吸。

或者，可用例如荧光基团或放射性基团可测性标记分析物。此时，检测器可以是荧光或放射性检测器。

可相继使用多种检测方法来充分获得与阵列中各位置上滞留物相关的分析物组分和功能信息。

c. 解吸检测器

解吸检测器具有将分析物从吸附剂上解吸的机构和直接检测解吸下的分析物的机构。即，解吸检测器不需要将分析物捕捉到另一固相内然后进行分析的中间步骤就可检测解吸分析物。检测分析物一般涉及检测信号强度。后者反映与吸附剂吸附的分析物的量。

解吸检测器还具有除上述两元件外的其它元件。其中之一是加速解吸分析物向检测器移动的机构。另一元件是测定分析物从解吸到被检测器测得之间飞行时间的机构。

较好的解吸检测器是本领域熟知的激光解吸/离子化质谱仪。质谱仪具有一个供插入携带被吸附分析物的基质(例如探针)的端口。解吸通过用能量例如激光能撞击分析物来进行。该设备可具有表面平移机构，使得阵列上的任一点都可与激光束共线。激光撞击分析物使完整的分析物解吸进入飞行管并被离子化。飞行管一般是一个真空。真空管一段内的带电板产生一个电势能，加速离子化的分析物向检测器移动。由时钟测定飞行时间，由系统电子设备测定分析物的速度并转化为质量。本领域技术人员都知道，以上各元件中任何一个都可以与本发明所述的其它元件组合，组装成利用各种解吸、加速、检测、时间测定等手段的解吸检测器。

B. 选择性条件

本发明优点之一是能够令分析物处于多种不同的结合和洗脱条件下，由此既提高了分析物分辨率，又增加了有关它们识别特征形式的信息。和常规层析法一样，吸附剂保留分析物的能力直接与比之分析物与洗脱剂之间或洗脱剂与吸附剂之间的引力或亲合性的分析物对吸附剂的引力或亲合性相关。当样品与吸附剂接触时，样品中的某些组分可能因没有与吸附剂的亲合性而不与之结合。因为不能结合吸附剂，它们可立即与待分辨分析物分离。但是，根据样品的性质和所用的具体吸附剂，许多不同组分在一开始能够与吸附剂结合。

1. 吸附剂

吸附剂即结合分析物的物质。滞留层析可使用多种吸附剂。不同的吸附剂表现出大不相同的结合特性，有些不同的结合特性，或略有不同的结合特性。结合特性大不相同的吸附剂一般在引力基础或相互作用模式上有差异。引力基础一般

是一种化学或生物分子识别功能。吸附剂与分析物之间的引力基础包括，例如：
(1)盐促相互作用，例如疏水性相互作用，亲疏性相互作用和固定化染料相互作用；
(2)氢键和/或范德华力相互作用和电荷转移相互作用，例如在亲水性反应中；
(3)静电相互作用，例如离子电荷相互作用，尤其是正负离子电荷相互作用；
(4)分析物与吸附剂中的金属离子形成配位共价键(即形成配位配合物)的能力；
(5)酶活位置的结合；
(6)可逆共价相互作用，例如二硫键互换作用；
(7)糖蛋白相互作用；
(8)生物特异性相互作用；或(9)上述两种或两种以上相互作用方式的组合。即，吸附剂可以表现出两种或两种以上引力基础，即所谓“混合官能”吸附剂。

a. 盐促相互作用吸附剂

用于评定盐促相互作用的吸附剂包括疏水性相互作用吸附剂。疏水性相互作用吸附剂包括具有脂肪烃，尤其是 C_1 - C_{18} 脂肪烃的基体；和具有芳香烃官能团例如苯基的基体。疏水性相互作用吸附剂所结合的分析物包括暴露于溶剂中的不带电氨基酸残基，特别是常说的非极性、芳香族疏水性氨基酸残基，例如苯丙氨酸和色氨酸。与疏水性相互作用吸附剂结合的分析物的具体例子包括溶菌酶和 DNA。在特定理论之外，DNA 被认为是因为其中的芳香性核苷酸，具体地说即嘌呤和嘧啶基团与疏水性相互作用吸附剂结合的。

用于评定盐促相互作用的其他吸附剂包括亲疏性相互作用吸附剂，例如 T-GEL®，这是 Pierce, Rockford, Illinois 出售的一种亲疏性吸附剂。亲疏性相互作用吸附剂吸附(例如)IgG 等免疫球蛋白。IgG 与 T-GEL®之间相互作用的机制尚不完全清楚，但暴露于溶剂中的 trp 基团可能起着一定的作用。

涉及盐促离子相互作用和疏水性相互作用的第三种吸附剂包括固定化染料相互作用吸附剂。固定化染料相互作用吸附剂包括固定化染料的母质，例如 Pharmacia Biotech, Piscataway, New Jersey 的 CIBACHRON™ 蓝。固定化染料相互作用吸附剂通常结合蛋白质和 DNA。与固定化染料相互作用吸附剂结合的蛋白质的一个具体例子是牛血清白蛋白(BSA)。

b. 亲水性相互作用吸附剂

用于评定基于亲水性相互作用的氢键和/或范德华力的吸附剂包括包含诸如氧化硅(玻璃)的常态吸附剂的表面。常态或氧化硅表面起着官能团的作用。此外，包含亲水性聚合物(例如聚乙二醇，葡聚糖，琼脂糖或纤维素)修饰表面的吸附剂也可以作为亲水性相互作用吸附剂。大多数蛋白质结合亲水性相互作用吸附剂，

因为许多氨基酸残基(即亲水性氨基酸残基)通过氢键或范德华力的亲水性相互作用结合。结合亲水性相互作用吸附剂的蛋白质的例子包括肌红蛋白, 胰岛素和细胞色素 C。

通常, 极性或带电氨基酸比例较高的蛋白质将滞留在亲水性表面上。或者, 亲水性糖基暴露于表面的糖蛋白对亲水性吸附剂的亲合性也很高。

c. 静电相互作用吸附剂

用于评定静电或离子相互作用的吸附剂包括阴离子吸附剂, 例如硫酸根阴离子基体(即 SO_3^-)和羧基阴离子(即 COO^-)或磷酸根阴离子(即 OPO_3^-)基体。带有硫酸根阴离子的基体始终带负电。但是, 带羧基阴离子的基体只有当 pH 高于其 pKa 时才带负电。当 pH 低于 pKa 时, 基体基本上呈电中性。合适的阴离子吸附剂还包括基体带有硫酸根和羧基和磷酸根的组合的的吸附剂。这种组合可令负电荷强度随 pH 连续变化。这类吸附剂吸引并结合带正电的蛋白质或大分子, 例如核糖核酸酶和乳铁蛋白。除特定理论之外, 据信是吸附剂与正电氨基酸残基(包括赖氨酸残基, 精氨酸残基和组氨酸残基)之间的静电相互作用造成了结合。

用于评定静电或离子相互作用的吸附剂还包括阳离子吸附剂。具体例子包括仲胺, 叔胺或季胺基体。季胺总是带正电。但是, 仲胺和叔胺所带电荷具有 pH 依赖性。当 pH 低于 pKa 时, 仲胺和叔胺带正电, 当 pH 高于 pKa 时, 仲胺和叔胺带负电。合适的阳离子吸附剂还有包含仲胺, 叔胺和季胺的组合的基体。这种组合使得正电强度随 pH 连续变化。阳离子吸附剂与分子上的阴离子位置结合, 所述的分子包括氨基酸残基(例如天冬氨酸和谷氨酸残基)暴露于溶剂中的蛋白质。

如果是离子(既包括阴离子也包括阳离子)相互作用吸附剂, 常需要使用既包含阴离子又包含阳离子的混合型离子吸附剂。这样的吸附剂具有与 pH 相关的连续缓冲能力。这种连续缓冲能力使得多种分析物能够与含有不同缓冲组分(尤其是 pH 在 2 至 11 之间)的洗脱剂接触。由此形成由固定化可滴定质子交换基团决定的吸附剂上的局部 pH 环境。这样的系统等同于称为色谱聚焦的固相分离技术。区别主要在于带电糖组分的促卵泡素异构体是在色谱聚焦吸附剂上分离的。

用于评定静电或离子相互作用的其它吸附剂包括偶极-偶极相互作用吸附剂, 其中的相互作用是静电力, 但是不涉及正规的电荷或可滴定蛋白供体或受体。

d. 配位共价键相互作用吸附剂

用于评定与金属离子形成配位共价键的能力的吸附剂包括带有(例如)二价或三价金属离子的基体。固定化金属离子螯合剂基体提供的固定化合成有机分子具有一个或两个供电子基团, 这些基团形成与过渡金属离子之间配位共价键相互作用的基础。作为固定化金属离子螯合剂的基本供电子基团包括氧, 氮和硫。金属离子与固定化金属离子螯合剂结合, 形成留有数个位置与分析物上供电子基团反应的金属离子配合物。合适的金属离子一般为例如铜、镍、钴、锌、铁等过渡金属离子, 以及诸如铝和钙等其它金属离子。除特定的理论之外, 金属离子被认为与肽、蛋白质中的氨基酸残基或核酸选择性反应。通常, 参与这类相互作用的氨基酸残基有组氨酸残基, 酪氨酸残基, 色氨酸残基, 半胱氨酸残基, 以及具有氧基的氨基酸例如天冬氨酸和谷氨酸。例如, 固定化三价铁离子与蛋白质上的磷酸丝氨酸, 磷酸酪氨酸和磷酸苏氨酸残基反应。根据固定化的金属离子, 只有那些上述氨基酸残基的局部密度足够大的蛋白质才被保留。某些金属离子与蛋白质之间的相互作用如此之强以致于无法用常规方法从配合物中切取蛋白质。高度磷酸化的人 β 酪蛋白与固定化 Fe(III)的结合非常强。表达时带有 6-组氨酸标记的重组蛋白与固定化 Cu(II)和 Ni(II) 的结合非常强。

e. 酶活位点相互作用吸附剂

用于评定酶活位点结合的吸附剂包括蛋白酶(例如胰蛋白酶), 磷酸酯酶, 激酶和核酸酶。这种相互作用是分析物(通常是一种生物聚合物)上酶结合位点与酶上催化性结合位点之间的一种序列特异性相互作用。这类酶结合位点包括例如胰蛋白酶上与序列中具有赖氨酸-赖氨酸或赖氨酸-精氨酸的蛋白质和肽相互作用的活性位点。更具体地说, 大豆胰蛋白酶抑制剂与固定化胰蛋白酶吸附剂作用并结合。或者, 丝氨酸蛋白酶选择性滞留在固定化 L-精氨酸吸附剂上。

f. 可逆共价相互作用吸附剂

用于评定可逆共价相互作用的吸附剂包括二硫键互换作用吸附剂。二硫键互换作用吸附剂包括具有固定化巯基(例如巯基乙醇或固定化二硫苏糖醇)的吸附剂。相互作用的基础是在吸附剂与分析物上暴露于溶剂中的半胱氨酸残基之间形成二硫键。这类吸附剂结合具有半胱氨酸残基的蛋白质或肽以及碱基被修饰成包含还原硫化合物的核酸。

g. 糖蛋白相互作用吸附剂

用于评定糖蛋白相互作用的吸附剂包括例如内有固定化凝集素 (即带有寡糖的蛋白质)的吸附剂, 例如 Pharmacia Biotech of Piscataway, New Jersey 出售的 CONCONAVLIN™。这类吸附剂的作用基础涉及对大分子上糖部分的分子识别的相互作用。与糖蛋白相互作用吸附剂反应并与之结合的分析物包括例如糖蛋白, 特别是富含组氨酸的糖蛋白, 全细胞或分离的亚细胞成分。

h. 生物特异性相互作用吸附剂

用于评定生物特异性相互作用的吸附剂通常称为“生物特异亲合性吸附剂”。如果吸附作用有选择性, 而且亲合力(平衡解离常数 K_d)至少为 $10^{-3}M$ 至例如 $10^{-5}M$ 、 $10^{-7}M$, $10^{-9}M$, 则认为是生物特异性的。生物特异亲合性吸附剂的例子包括任何与特定生物分子特异性反应并与之结合的吸附剂。生物特异亲合性吸附剂包括例如结合抗原的固定化抗体; 结合 DNA 结合蛋白、DNA 和 RNA 的固定化 DNA; 结合蛋白质或酶的固定化底物或抑制剂; 结合药物结合蛋白的固定化药物; 结合受体的固定化配体; 结合配体的固定化受体; 结合 DNA 和 RNA 结合蛋白的固定化 RNA; 结合生物素和生物素化分子的固定化亲合素或链霉亲合素; 结合脂质体结合蛋白的磷酸脂质膜和运载体。酶是可用来修饰与之结合的分析物的吸附剂。细胞是有用的吸附剂。它们的表面具有复杂的结合特性。与细胞的吸附可用来鉴定例如结合表面受体的配体或信号分子。病毒和噬菌体也可用作吸附剂。病毒常具有细胞表面受体的配体(例如 CD4 的 gp120)。而且, 在噬菌体展示文库形式中, 噬菌体包被蛋白起着与靶分子结合的检测剂的作用。生物特异性相互作用吸附剂依赖于上述公知的特异性反应。吸附剂可利用的其它生物特异性相互作用的例子对本领域熟练技术人员来说是显而易见的, 而且包括在本发明构思中。

实施例之一中, 生物特异性吸附剂还具有某种助剂, 或“辅助者”, 即不直接参与与靶分析物结合的分子。

i. 结合特异性程度

通过接触具有不同相互作用方式的吸附剂, 样品中的组分根据其与不同吸附剂的相互作用被大致区分。这样, 分析物与具有不同相互作用方式的吸附剂之间的引力提供了第一分离参数。例如, 通过含分析物的样品与以疏水性为引力基础的第一吸附剂和以离子电荷为引力基础的第二吸附剂接触, 可从样品中分离出结合疏水性吸附剂的分析物, 和分离出结合带有特定离子电荷的吸附剂的分析物。

具有不同引力基础的吸附剂能够低特异性地分辨分析物，因为吸附剂不仅结合分析物，而且结合样品中以同一引力基础吸引吸附剂的其它成分。例如，疏水性吸附剂不仅结合疏水性分析物，还结合样品中其它疏水性成分；负电吸附剂不仅结合正电分析物，还结合样品中其它正电成分；等等。

通过采用相对中等特异性的结合特性或改变引力强度可以进一步改善以分析物与吸附剂之间的引力为基础的分析物分辨率。基于中等特异性结合特性的分析物分辨率可用混合官能团吸附剂来实现。当以较低特异性完成分析物的分辨后，可结合多种其它结合和洗脱特性利用吸引感兴趣的分析物的结合特性，以去除仍为不需要的组分，由此分辨出分析物。

例如，如果分析物结合疏水性吸附剂，可通过提供以疏水性相互作用为引力基础之一且另含第二种不同的引力基础的混合官能吸附剂将分析物进一步与其它疏水性样品组分分开。混合官能吸附剂可能表现出疏水性相互作用和负电离子相互作用，所以结合带正电的疏水性分析物。或者，混合官能吸附剂可能表现出疏水性相互作用和与金属离子形成配合共价键的能力，所以结合能与吸附剂上金属离子形成配位配合物的疏水性分析物。基于以上公开内容和举例，表现出中等特异性结合特性的其它吸附剂例子对本领域熟练技术人员来说是显而易见的。

基于中等特异性结合特性分辨分析物可以通过利用较高特异性的结合特性来进一步精细化。利用较高特异性的结合特性可以通过使用引力基础相同但引力强度不同的多种吸附剂。换言之，虽然引力基础相同，但是用对分析物亲合性程度不同的吸附剂可以进一步将分析物与其它样品组分区分。

例如，基于自身酸性结合吸附剂的某分析物可用特定酸性 pH 范围内对分析物具有亲合性的吸附剂将其与其它酸性样品组分进一步区分。这样，分辨分析物可以用一种吸附剂吸引 pH1-2 的样品组分，用另一种吸引 pH3-4 的样品组分，用第三种吸附剂吸引 pH5-6 的样品组分。以这种方式，可以将对结合 pH5-6 分析物的吸附剂具有亲合性的分析物与 pH1-4 的分析物分辨开来。通过降低引力间隔，即表现出相同引力基础的吸附剂结合特性间的差异，可以使用更高特异性的吸附剂。

吸附于原吸附剂的原分析物本身可能具有吸附剂性能。此时，吸附于基质的原分析物可变成第二吸附剂用于分离第二分析物。以此类推，滞留的第二分析物可以作为第三吸附剂从样品中分离第三分析物。以上过程可重复数次。

2. 洗脱剂

洗脱剂或称洗涤溶液选择性地改变分析物与吸附剂之间的吸附阈值。洗脱剂解吸和洗脱已结合分析物的能力与其洗脱特性有关。不同的洗脱剂可能表现出大不相同的洗脱特性，有些不同的洗脱特性或略有不同的洗脱特性。

洗脱剂与吸附剂的接触温度与具体的样品和选用的吸附剂有关。通常，洗脱剂在 0℃至 100℃间的某温度接触吸附剂，以 4℃至 37℃为佳。但是，对有某些洗脱剂来说，其它温度更合适，这些，本领域熟练技术人员很容易确定。

和吸附剂一样，洗脱特性大不相同的洗脱剂通常引力基础不同。例如，洗脱剂与分析物之间各种引力基础包括电荷或 pH，离子强度，水结构，特定竞争性试剂的浓度，表面张力，介电常数以及上述数者。

a. 基于 pH 的洗脱剂

基于 pH(即电荷)改变吸附剂选择性的洗脱剂包括已知的 pH 缓冲剂，酸溶液和碱溶液。通过用特定 pH 的缓冲剂洗涤结合的分析物可以改变电荷，所以可能削弱特定 pH 下吸附剂与分析物之间的结合强度。在洗脱剂的 pH 下竞争性较低的分析物将从吸附剂上解吸而洗脱，仅留下在洗脱剂的 pH 下与吸附剂结合更牢固的分析物。

b. 基于离子强度的洗脱剂

在离子强度上改变吸附剂选择性的洗脱剂包括各种类型和浓度的盐溶液。溶于洗脱剂溶液的盐量影响着洗脱剂的离子强度，相应改变吸附剂的结合能力。低盐浓度的洗脱剂在离子强度上对吸附剂结合能力的改变较小。高盐浓度的洗脱剂在离子强度上对吸附剂结合能力的改变较大。

c. 基于水结构的洗脱剂

通过改变水结构或浓度来改变吸附剂选择性的洗脱剂包括尿素和离液性盐溶液。通常，尿素溶液包括浓度在 0.1 至 8M 的溶液。可用来提供洗脱剂的离液盐包括硫氰化钠。基于水结构的洗脱剂因水合作用或结合水的改变而改变吸附剂的吸附能力。这类洗脱剂包括例如甘油，乙二醇和有机溶剂。离液阴离子提高非极性成分的水溶性因而降低分析物与吸附剂之间的疏水作用。

d. 基于除垢剂的洗脱剂

在表面张力和分析物结构上改变吸附剂选择性的洗脱剂包括除垢剂和表面

活性剂。适合用作洗脱剂的除垢剂包括离子型和非离子型除垢剂，例如 CHAPS, TWEEN 和 NP-40。基于除垢剂的洗脱剂改变吸附剂结合分析物的能力是因为，当引入了除垢剂的疏水性和亲水性基团时，疏水相互作用被改变。分析物和吸附剂之间以及分析物内部的疏水相互作用被改变并且引入了带电基团，例如，离子型除垢剂 SDS 引起蛋白质变性。

e. 基于疏水性的洗脱剂

在介电常数上改变吸附剂选择性的洗脱剂是在疏水相互作用方面改变吸附剂选择性的洗脱剂。具有此种能力的洗脱剂的合适实例有尿素有机溶剂(0.1-8M)，例如丙醇、乙腈、乙二醇和甘油，还有前文所述的除垢剂。乙腈常在反相层析中用作洗脱剂。在洗脱剂中包含乙二醇能够从用亲疏型吸附剂进行的盐促反应中洗脱免疫球蛋白。

f. 组合洗脱剂

合适的洗脱剂可以是选自以上的任何一种，也可以由以上两种或两种以上组合而成。包含两种或两种以上上述洗脱剂的洗脱剂能够基于多种洗脱特性改变吸附剂对分析物的选择性。

3. 两参数的可变性

通过选用不同吸附剂来提供不同吸附特性的能力和通过用不同洗脱剂洗涤来提供不同洗脱特性的能力允许两参数各自改变，各自都能影响分析物结合吸附剂的选择性。这两个参数能够作较大范围的改变提供了一个较大范围的结合引力和洗脱条件，使得本发明方法能够用于结合并由此检测多种不同类型的分析物。

即使尚不知道分析物的性质，在分析特定样品时吸附剂和洗脱剂的选择仍取决于样品的性质和有待描述的具体分析物或分析物所属类别。通常，较适宜的是提供一个表现出多种结合特性和多种洗脱特性的系统，尤其是在样品组成未知时。通过提供选择特性范围较宽的系统，目标分析物被一种或多种吸附剂保留的可能性将显著提高。

化学或生物化学分析领域的技术人员都能够确定用于通过提供具有广泛结合和洗脱特性的系统来保留特定分析物的选择性条件，并评定出提供最佳分析物分辨率的结合和洗脱特性。因为本发明提供了具有多种选择性条件的系统，无需过多的试验，本领域熟练技术人员就能够方便地确定特定分析物的最适结合和洗

脱特性。

C. 分析物

本发明能够基于分析物的多种生物、化学、或理化特性通过合适的选择性条件利用这些特性来分辨分析物。众多通过合适的选择性条件可加以利用的分析物特性包括疏水性指数(或分析物中疏水性残基的量度), 等电点(即分析物不带电时的 pH), 疏水性力矩(分析物的两性量度或极性与非极性残基分布的不对称性), 侧向偶极力矩(或分析物内电荷分配布的不对称性), 分子结构因子(引起分析物分子表面构形改变, 例如沿分子骨架大侧链的分布改变), 二级结构组成(例如螺旋、平行和反平行平面), 二硫键, 暴露于溶剂的供电子基团(例如 His), 芳香性(或分析物内芳香基之间 pi-pi 相互作用的量度)和带电原子间的线性距离。

以上是可用本发明方法通过选择合适的选择性特性从样品中分辨出给定分析物的特性种类的代表性举例。可作为分辨样品中特定分析物的基础的其它合适的分析物特性是本领域熟练技术人员熟知的, 并且包括在本发明构思中。

本发明在可分析的样品类型上没有限制。样品可以是固态、液态或气态, 但通常, 样品是液态的。固态或气态样品最好用本领域熟知的技术溶于合适的溶剂成为液态样品。样品可以是生物组合物, 非生物有机组合物或无机组合物。本发明特别适用于分辨生物样品, 尤其是生物液体和提取物中的分析物; 还特别适用于分辨非生物有机组合物中的分析物, 尤其是有机小分子和无机分子的组合物。

分析物可以是分子, 多聚分子复合物, 大分子组合物, 细胞, 亚细胞器, 病毒, 分子片段, 离子或原子。分析物可以是样品中的单独一种组分, 也可以是具有一个或多个相同特性(例如分子量、等电点、离子电荷、疏水/亲水相互作用等)并且具有结构、化学、生物或功能关联的一类组分。

可用本发明滞留层析法分辨的分析物的具体实例包括生物大分子, 例如肽、蛋白质、酶、聚核苷酸、寡核苷酸、核酸、糖、寡糖、多糖; 上述生物大分子的片段, 例如核酸片段、肽片段和蛋白质片段; 上述生物大分子的复合物, 例如核酸复合物, 蛋白质-DNA 复合物, 受体-配体复合物, 酶-底物、酶抑制剂, 肽复合物, 蛋白复合物, 糖复合物和多糖复合物; 生物小分子, 例如氨基酸、核苷酸、核苷、单糖(sugar)、甾体、脂质体、金属离子、药物、激素、酰胺、胺、羧酸、维生素和辅酶、醇、醛、酮、脂肪酸、卟啉、类胡萝卜素、植物生长调节素、磷酸酯和核苷二磷酸、合成小分子, 例如药学或治疗上的有效药物、单体、肽类似物、甾体类似物、抑制剂、诱变剂、致癌物、抗有丝分裂药、抗生素、离子载体、抗

代谢药、氨基酸类似物、抗菌剂、转运抑制剂、表面活性剂、线粒体和叶绿体功能抑制剂、供电子体、运载体和受体，合成的蛋白酶底物，磷酸酶底物，酯酶和脂酶的底物，和蛋白质修饰剂；以及合成的聚合物、寡聚物和共聚物，例如聚烯、聚酰胺、聚(甲基)丙烯酸、聚砜、聚苯乙烯、聚醚、聚乙烯醚、聚乙烯酯、聚羧酸酯、聚卤乙烯、聚硅烷、POMA、PEG 和以上两者或两者以上的共聚物。

III. 信息处理

在特定洗脱条件下检测被吸附剂结合的分析物提供了有关样品中分析物及其化学特征的信息。吸附作用在一定程度上取决于吸附剂的结合特性。与吸附剂结合的分析物具有使得结合成为可能的特性。例如，在特定 pH 下是阳离子的分子在具有该 pH 的洗脱条件下将与阴离子吸附剂结合。强阳离子分子只有在很强的洗脱条件下才从吸附剂上洗脱。具有疏水区的分子将结合疏水性吸附剂，而具有亲水区的分子将结合亲水性吸附剂。同样，相互作用的强度在一定程度上取决于分析物包含疏水区或亲水区的程度。所以，样品中特定分析物在特定洗脱条件下结合某种吸附剂的确定不仅通过分析物的彼此分离和与不具有结合所需的相应化学特性的分析物的分离而分辨了混合物中的分析物，而且鉴定出了具有特定化学特性的一类或单个分析物。采集有关分析物在多种洗脱条件下在一种或多种吸附剂上的滞留信息不仅可详细分辨混合物中的分析物，而且提供有关分析物的化学信息，这些信息本身就可以完成对他们的鉴定。这种数据被称为“滞留数据”。

用可编程计算机分析滞留试验得出的数据是最简便的。计算机程序一般包括一个储存编码的可读介质。某计算机编码进入存储，其中包含了基质阵列上各特征点的位置，该处的吸附剂和用来洗涤吸附剂的洗脱条件。程序于是可用这些信息鉴定出阵列上确定某特定选择性条件的一组特征。计算机还包括这样的编码，它们接受来自探针上特定可定址位置的不同分子量的信号强度数据。这些数据指示所测分析物的数量，可能包括所测各分析物的信号强度和测得的分子量。

计算机还具有处理数据的编码。本发明构思包含了多种处理数据的方法。实施例之一中，处理方法涉及形成一个分析物识别特征概况。例如，可将据分子量测得的特定分析物的滞留情况数据根据特定的结合特性(例如与阴离子吸附剂或疏水性吸附剂结合)分类。收集到的数据提供某特定分析物化学特征的概况。滞留特性反映分析物功能，后者继而反映结构。例如，在配位共价金属螯合剂上滞留说明多肽分析物内存在组氨酸残基。根据不同 pH 洗脱条件下在多种阳离子和阴

离子吸附剂上的滞留水平数据所揭示的信息可以得出某蛋白质的等电点。这进而反映出该蛋白质内离子氨基酸的大致数量。所以，计算机可能包含将结合信息转化为结构信息的编码。而且，对分析物的二次处理(例如翻译后修饰)改变识别特征，这可以由结合或质量差异反映出来。

另一实施例中，在一组相同选择性阈值下对两种不同的细胞进行滞留试验，并将两次试验的滞留数据进行比较。滞留图(即任一特征点信号的存在或强度)内的差异显示由两细胞差异表达分析物。这可能包括，例如，形成一个显示两次滞留试验之间结合信号差异的差异图，由该图显示：在两试验中，那些分析物被吸附剂保留增加或减少。

计算机还可能包含接收程序员输入的指令的编码。阵列内特定、预定位置上分析物选择性解吸的累进和逻辑轨迹是可以预计并编程的。

计算机能够将数据转化成另一种格式供显示。数据分析包括：由收集到的数据确定(例如)与特征点位置有关的信号强度，去除“界外值”(偏离预定统计分布的数据)，和由留下的数据计算分析物的相对结合亲和力。

得出的数据可以各种格式显示。一种格式中，信号强度显示成分子量的函数图。另一种格式又称“凝胶格式”，其中，信号强度沿着线性轴以暗度强度值显示，得出的外观类似于凝胶上的条带。另一格式中，达到一定阈值的信号显示为分子量横轴上的垂直线或条柱。于是，各条柱代表一种所测分析物。数据还可以显示成根据结合特性和/或洗脱特性归类的某分析物的信号强度图。

IV. 滞留层析的应用

滞留层析涉及多种分离方法的组合，包括并行检测和描述多种分析物。这些组合方法具有多种用途。这些用途包括但不限于：发展靶分析物检测法；发展蛋白质纯化策略；蛋白质纯化方法；从噬菌体展示文库中鉴定出结合靶分析物的特定噬菌体，包括用互补噬菌体展示文库鉴定靶表位；基于分析物理化特性的蛋白质鉴定；基因表达监测和差异蛋白质展示；毒理学筛选；多种诊断标记的同时检测；药物开发；聚合蛋白组装监测和体外聚核苷酸翻译检测。

A. 从一样品中依次抽提分析物的方法

滞留层析涉及在多种吸附/洗脱条件下分析某分析物的滞留情况。这种方法的一种改变是依次抽提。在依次抽提中，样品并不是毫无关联地与两种不同的选择性条件接触。相反，样品与第一选择性条件接触，从样品中抽提出某些分析物到

吸附剂上，并在洗脱剂中留下未吸附的分析物。然后，该洗脱剂与第二选择性条件接触。这进一步从洗脱剂中抽提出各种分析物。通常，如果第一和第二次接触中的洗脱剂具有不同的引力基础(例如正常相和疏水性)，吸附剂将从洗脱剂中抽提出一组不同的分析物。第二洗脱剂然后接触第三选择性条件，并以此类推。在进行依次抽提的实施例 中，吸附剂被置于测试格底以便样品在它上面混合。在吸附剂中加入某种洗脱剂，样品中的分析物与吸附剂结合后，收集洗脱剂洗液。集得的洗液然后接触第二吸附剂，并通过结合从样品中抽提出分析物。

实施例之一中，依次抽提的目的是制备而不是分析。更具体地说，目标可能是为了抽提样品中除所需分析物外的所有其它组分。此时，样品量一般很少，例如一个直径几毫米位点上的几微升。吸附剂的选择目的是不吸附希望留在样品中的分析物。数次重复后，最终集得的洗液中没有不需要的分析物，而留有需要的供以后的分析，例如解吸谱法或传统的层析法。

另一实施例中，用各种分析技术分析了没有滞留的样品本身中的分析物。甚至在一步滞留后，该方法允许对吸附于吸附剂的物质和未吸附的分析物进行检测。

B. 逐步分辨样品中分析物的方法

滞留层析的一个目的是从复杂的样品混合物中准确地分辨出分析物。这对于临床诊断、药物开发和功能性基因组来说特别重要。这些领域可能涉及从生物样品中鉴定出一种或多种分析物。本发明提供了一种鉴定改善某分析物分辨率的选择性条件的方法。该方法涉及鉴定这样一种分析物被保留的选择性条件，以及在重复过程中，增加选择性条件的结合特性或洗脱特性，从而提高分析物的分辨率。

一份复杂样品与选择性条件接触的质谱一般包括样品中许多组分的信号。信号的复杂性会干扰分析物的准确分辨。逐步分辨分析物的方法能够鉴定出提高分析物分辨率的选择性条件，从而可准确检测样品中的分析物。如果分析物的信号更易于与其他组分的信号相区分，则该选择性条件表现出与其他选择性条件相比对某分析物“更高的分辨率”。这可能包括(例如)减少吸附于吸附剂的分析物数量，由此减少信号总数，或提高选择性条件对该分析物的选择性，由此比之他信号增强该分析物的信号。当然，当仅有分析物结合吸附剂时，检测过程中只产生分析物信号。

逐步分辨方法涉及一重复过程，在其中，更多的选择性(结合或洗脱)特性依

次加到已知保留分析物的一选择性条件常数组中。第一步中，测试一系列选择性条件以鉴定出保留靶分析物的那个。下一步中，挑选该选择性条件的一种或多种选择性特性作为以后试验中的常数组。

产生一组新的选择性条件。组中各选择性条件包括选在常数组中的特性和至少一个常数组中没有的新条件。例如，常数组包括阴离子吸附剂和低盐洗脱剂，新条件将包括洗脱剂 pH 改变。分别测试这些新变量提高分析物分辨率的能力，鉴定出提高分辨率的修饰选择性条件。后一步中，在常数组中加入提高分辨率的新选择性条件。

以同样方法，通过产生包括常数组特性和一组新特性的新的选择性条件组测试修饰常数组。这样，在每一步，都挑选选择性条件，使得分析物的分辨率与前一步的选择性条件相比有所提高。

实施例对该方法进行了详细的描述。细胞样品通常包含数以百千计的蛋白质。人们可能希望准确分辨出样品中的每一种靶蛋白。第一步，用多种选择性条件建立靶分析物的滞留图。例如，吸附剂可以是阴离子交换剂，阳离子交换剂，正常相吸附剂和反相吸附剂。在各种吸附剂上测试的洗脱条件可以是不同的 pH 水平，不同的离子强度，不同的除垢剂条件和不同的疏水性条件。例如，对各种条件，可进行 4 种不同洗脱条件的测试。这样，在该实施例中，测试了 16 种洗脱剂条件吸附靶分析物的能力。

从该滞留图可以挑选出至少一种靶分析物被保留的选择性条件。可以挑选靶分析物发生最大结合的选择性条件。但是，如果该选择性条件对靶分析物的选择性比其他选择性条件更强，则宜选择靶分析物吸附并非最大的条件。例如，假设滞留图分析显示，在中性 pH 附近，靶分析物被阴离子交换剂保留，但也弱吸附于亲水性吸附剂。

从经鉴定保留分析物的选择性条件中挑选出一种可变吸附剂或洗脱剂，用于所有此后的选择性条件。在此，它被说成是加到“选择性条件常数组”中。

在下一次重复中，测试靶分析物在第二组多选择性条件下的结合能力。第二组中的各选择性条件包括选择性条件常数组的元素。但是，各选择性还包括其他变量—加入选择性条件的不同吸附剂或洗脱剂。这样，限于使用至少一组常数，第二组选择性条件经选择仍比第一组更多样。提高多样性的方法包括，例如，测试某洗脱条件更细的梯级或测试吸附剂的不同强度。还可以包括，例如，在选择性条件加入其他选择性特性。

继续该实施例，可将阴离子交换剂加入常数组中。现在，用改变更大的变量

(例如洗脱剂或吸附剂)测试该条件。被测洗脱剂可包含比之第一次重复梯级更细的不同低 pH 缓冲剂。例如, 第一次重复的被测缓冲液是 pH3.0, pH 5.0, pH 7.0 和 pH 9.0, 显示靶分析物在中性 pH 附近与阴离子交换剂结合。在第二次重复中, 测试缓冲液可以是 pH 5.0, pH 5.5, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0, pH 7.5 和 pH 8.0。此外, 这些缓冲液还可以各自改变成包含其他洗脱特性, 例如离子强度, 疏水性等。

分析该阶段得到的第二滞留图常能够鉴定出比第一轮中鉴定出的选择性条件分辨率更好的条件。同样, 选择该选择性条件的一个变量加入选择性条件常数组, 用于下一次重复的分析。

继续该实施例, 假设第二轮中分辨分析物最佳的选择性条件使用的是 pH6.5 的缓冲液。现在可将该洗脱剂加入常数组, 其中包括阴离子交换树脂和 pH6.5 的缓冲液。在下一轮重复中, 选择性条件包含这一常数组和另一变量。这一变量可能是例如在洗脱剂中加入新的组分, 例如不同的离子强度; 或者, 可将另一种吸附剂加入混合物, 例如与阴离子交换吸附剂混合的多种疏水性吸附剂; 或者, 可以改变阴离子交换树脂的密度。同样, 从这一组中鉴定出提高分析物分辨率的选择性条件。

该过程可重复至分析物被纯化到完全均一。此时, 选择性条件具有对分析物的专一性。可以看出, 增加每一步中被测变量的数目可减少鉴定合适的选择性条件所需的重复次数。

C. 制备性纯化分析物的方法

另一方面, 本发明提供纯化分析物的方法。该方法利用了滞留层析快速鉴定吸附某分析物的引力基础的能力。第一步涉及分析物与多种选择性条件接触和用滞留层析测定这些条件下的滞留。由此得出分析物的识别特征概况。用分析物被保留的选择性条件形成制备性纯化分析物的方法。

为了制备性纯化分析物, 可以在通过分析物结合过程所鉴定的吸附剂/洗脱剂条件中吸附和洗脱分析物。这样, 识别图可能显示分析物结合正常相吸附剂和金属螯合剂。然后, 分析物与含有结合分析物的正常相吸附剂的第一层析柱接触。洗去不结合的物质。用足够严格的洗涤洗脱分析物。然后, 洗脱剂与金属螯合剂柱接触以结合分析物。洗去不结合的物质。然后, 从金属螯合剂柱上洗脱包括分析物在内的被结合物质。用这种方法分离出制备量的分析物。制备量的样品至少为 10 μ l, 100 μ l, 1ml 或 10ml。

逐步分辨分析物过程中得到的信息可用来设计大规模的蛋白质纯化层析(基于洗脱)。对靶分析物蛋白质的吸附剂引力基础,结合条件和洗脱条件(即选择性条件)变成由滞留层析来确定。这一信息可节省目前所用的试差法设计纯化方法所浪费的大量时间、能量和昂贵的分析物。这一部分内容还用市售的吸附剂进行了大规模的纯化。

D. 特异性检测分析物的探针的制备方法

本发明提供用解吸质谱法特异性检测一种或多种分析物的探针和制备这些探针的方法。这类分析物分辨探针可用在诊断和分析方法中特异性检测分析物。

制备分辨一种或多种分析物的探针的方法中,第一步是制作分析物在多种不同吸附剂/洗脱剂组合下的滞留图。例如,可以用全部5种不同洗脱剂洗涤4种吸附剂来测定分析物的分辨情况。这为每种分析物提供了20组滞留数据。对所得滞留图的分析将指明哪一种或哪一些选择性条件分辨分析物最佳。更好的是,可以鉴定出准确分辨所有分析物的一种选择性条件。然后,选取一种或多种选择性条件用在分辨探针中,使得每种分析物在至少一个吸附剂位点上被分辨。探针还可以包含不结合分析物的吸附剂。这一吸附剂位点被用作对照。挑选具有多个可定址位置吸附剂位点的探针,要求它们具有保留和分辨分析物的能力。此时,选择能够在单一洗脱条件下结合分析物的吸附剂。这是有用的,因为在检测过程中可用一种洗脱剂洗涤整个探针。

得出的特定分析物的滞留图可用来创制该分析物的定制吸附剂。例如,一种分析物被多种吸附剂保留显示该分析物的一组引力基础。可通过制备包括提供引力基础的吸附剂要素的复合吸附剂来设计定制吸附剂。这样的定制吸附剂对靶分析物很专一。可能一种或数种定制吸附剂就足以产生分析物的识别图。例如,若发现,在特定的洗脱条件下,分析物被结合具有一定程度疏水性、正电性和芳香性的物质的吸附剂所保留,就可以通过设计或使用组合性合成法创制具有吸引全部上述三个特征的官能团的定制吸附剂。检测与这种吸附剂的结合就可鉴定出分析物。

这类探针可用来检测样品中的一种或多种分析物。样品接触选择性条件,用解吸质谱法检测探针。因为探针分辨分析物,分析物的存在可通过查看特征识别概况来测定。这类探针尤其适用于鉴定某患者样品中的一组诊断标记。

实施例之一中,设计排列来固定特定类型的蛋白质,包括诊断标记以及由功能所确定的分析物。例如,制备能特异性固定细胞表面蛋白,某种类型酶(如激

酶), 转录因子, 细胞内受体等的排列。该吸附剂可能对生物聚合物(例如抗体)有特异性。

实施例之一中, 吸附剂是基因组件, 例如展示一类蛋白的蛋白质配体的噬菌体。此时, 可用一类分子预筛选噬菌体展示文库, 去除与该类分子结合的噬菌体, 然后用从中扣除的噬菌体作为吸附剂。

E. 诊断探针和诊断方法

诊断病理情况一般涉及检测患者样品中疾病的一种或多种分子标记。某些病症可以因存在一种诊断标记而得以诊断。其它病症的诊断可能涉及检测多个诊断标记。而且, 检测多个诊断标记可提高诊断的可靠性。所以, 本发明提供了用于解吸质谱法的探针, 它具有至少一种分辨病理情况的至少一种诊断标记的吸附剂。

制备这类探针包括, 首先, 选择待测标记。这可以是任意疾病的标记, 例如癌症, 心脏病, 自身免疫病, 病毒感染, 老年性痴呆(Alzheimer 氏症)或糖尿病。例如, 前列腺特异性抗原(PSA)检测很能说明是否前列腺癌。HIV 感染可通过检测数种 HIV 蛋白的抗体来诊断, 例如 p17、p24 或 p55 之一和 p31、p51 或 p66 之一和 gp41 或 gp120/160 之一的抗体。脑髓液中检测淀粉样蛋白- β 42 和 tau 蛋白很能说明是否老年性痴呆。而且, 可用本发明方法检测分析物在健康者和病者内存在的差异来鉴定上述标记。

下一步, 产生保留一种或多种诊断标记的吸附剂。较好的是, 制备一种分辨所有分析物的吸附剂。这可以通过创建一个包含数种抗体的位点来实现, 所述抗体各自结合所需标记之一。或者, 探针可具有多个吸附剂位点, 各自能够在一种选择性条件下分辨至少一种分析物。实施例之一中, 吸附剂是复合吸附剂, 包含多种标记的特异性配体。例如, 吸附剂可包含特异性结合靶分析物的抗体、多肽配体或聚核苷酸。实施例之一中, 抗体是筛选组合文库鉴定得到的单链抗体。可通过本发明中所述的方法筛选噬菌体展示文库来创制特定标记的特异性单链抗体。

另一实施例中, 吸附剂具有非有机生物分子组分, 它们或者特异性保留靶分析物, 或者以足够的特异性保留分析物, 供解吸质谱法进行准确分辨。本发明也说明了制备检测特异性分析物的吸附剂的方法。

显然, 这类方法中的单个吸附剂位点不必是单一分析物特异性的, 所以, 不要求生物聚合物介导的靶分析物与吸附剂之间的特异性亲合。在此之前的亲合性

检测方法主要依赖于生物聚合物与靶分析物之间的特异性结合。这包括，例如抗体与蛋白质，互补聚核苷酸之间或凝集素与糖的特异性亲合。这些特异性是必需的，因为那些检测方法是间接的：鉴定的不是靶分析物，而是通常结合于吸附剂的标记。所以，吸附剂的特异性越高，杂质结合吸附剂干扰特异性检测的可能性就越小。但是，解吸谱法直接检测分析物。所以，杂质的存在不干扰特异性检测，除非杂质信号与靶信号重合。

诊断方法包括，首先，选择待测的患者样品。样品可以是例如组织、血液、尿液、粪便或其他体液(淋巴液、脑髓液、关节内滑液等)。然后，样品与含有诊断吸附剂的基质在允许诊断标记滞留的条件下接触。用合适的洗脱剂洗涤吸附剂。然后用解吸谱法(例如质谱法)检测(例如分辨)标记。

本发明还提供了特异性检测诊断标记的试剂盒，它具有(1)用在解吸谱法中的基质，具有至少一个可定址位置内的至少一种吸附剂，该吸附剂在至少一种包括吸附剂和洗脱剂的选择性条件下分辨至少一种诊断标记；和(2)洗脱剂或制备洗脱剂的说明书。在样品与吸附剂接触并用洗脱剂洗涤后，即经历了选择性条件后，分析物被充分纯化或被特异性结合，供解吸谱法分辨。

F. 鉴定蛋白质的方法

另一方面，本发明提供了一种协助鉴定蛋白质的方法。该方法涉及用滞留层析法测定蛋白质分析物理化特征的匹配参数和检索蛋白质数据库以鉴定出具有匹配参数的蛋白质。由基于滞留特性的信息得出理化特性的方法已在前文说明过。数据库一般提供各蛋白质的氨基酸序列和/或编码氨基酸序列的核苷酸序列。由这些信息可方便地得出诸如分子量、疏水性、pI、片段质量等结构特征。分析物蛋白质将只与数据库中一个子集的蛋白质具有相同的特定结构特征。所以，根据与分析物蛋白质相同的结构特征将蛋白质分类，就能够找到候选特征。这样，就鉴定参比物一种或多种理化特性固有的准确性、特异性程度或可靠性程度来看，数据库中的蛋白质与参比物的所有特征不可能完全吻合。所以，可以设定匹配参数来鉴定例如蛋白分析物特征与数据库中参比多肽特征的近似程度。

随着鉴定基因组中基因的增多，蛋白分析物在数据库中成为参比多肽的机会也随之增加。所以，该方法能够迅速分辨样品中感兴趣的蛋白质，得到该蛋白质的结构信息，然后用这种信息鉴定蛋白质。

G. 组装多聚分子的方法

吸附剂固定所需分子的能力可用来构件多聚分子和评价影响其组建的化合物。多聚分子的一个单元与吸附剂结合。然后接触含有多聚分子其他单元的样品。接触可以在多种条件下进行以测定结合参数。可用解吸谱法来监测亚基与多聚物的结合。然后，可用相同的方法测试下一亚基的结合。可用本发明所述的药物筛选法来测试试剂干扰这种组装的能力。所以，过程中某一阶段的分析物在下一阶段变成吸附剂。

H. 进行酶试验的方法

本发明还提供了进行酶试验的方法。酶试验通常包括在酶呈活性的条件下将待测样品与酶底物接触。任酶作用于底物后，检测酶反应的产物。在定量试验中，测定的是产物量。通常将该量与对照或标准曲线比较，得出样品中酶活的量。

本发明提供了检测样品中一种酶的方法，包括检测酶活的量。该方法利用了这一事实，即，酶活性通常产生质量与原底物不同的产物。在该方法中，制备含有结合底物的吸附剂的固相。一定量的底物与吸附剂结合。然后，吸附剂在一定条件下与样品接触一段时间，让酶作用于底物。然后，用解吸谱法检测被结合的物质。检测具有酶活产物分子量特征的分析物可说明酶的存在。信号强度将与样品中酶活量相关联。

I. 鉴定生物材料间差异表达的分析物的方法

本发明的另一方面内容提供了鉴定在两种或两种以上样品中差异表达的有机生物分子，特别是蛋白质的方法。“差异表达”指两样品间分析物量或质上的差异。这些差异可能缘于蛋白质表达的任一阶段，即从转录到翻译后修饰。该方法利用了滞留层析的超常分辨能力和灵敏度。首先，使用同一组选择性条件制备来自两种生物样品的分析物的识别概况图。所用选择性条件越多，样品中分析物的分辨率越高，所以，可比较的分析物数量也越多。然后，比较识别图以鉴定被两组吸附剂差异保留的分析物。差异滞留包括定量滞留。这提示表达的正调控或负调控。差异滞留还包括分析物质的差异。例如，蛋白质翻译后修饰的不同会造成识别图的不同，检测时表现为结合特性差异(例如，如果蛋白质被糖基化则与凝集素结合将不同)或质量差异(例如翻译后切割的不同)。这种分析也可以用可编程计算机进行。

该方法特别适用于检测两种细胞差异表达的基因。两种细胞可以是正常细胞

和病理细胞例如癌细胞，或不同水平的细胞，或不同发育或分化阶段的细胞，或细胞周期内不同部分的细胞。但是，该方法也可用来检测不同条件下的两同种细胞。在这样的方法中，一份生物样品与测试试剂接触，另一份不接触。然后，比较两者的滞留图。根据滞留特性或质量的不同，该方法可以显示蛋白质或其他生物分子表达的增加或减少，或发生了某种改变。

利用由滞留图获得的差异表达蛋白质理化特性信息，用本发明方法可测定蛋白质的候选特征。

本方法适用于鉴定疾病的诊断标记。与正常样品或细胞相比，患者样品或病理培养细胞中差异表达的蛋白质可能就是诊断标记。一般，最好将来自具有统计意义的患者群的样品与正常样品比较。这样，可将信息集合起来鉴定出对于表现出疾病的所有个体或大多数个体来说共同的诊断标记。

I. 通过分解代谢信号扩增提高灵敏度

将大蛋白分裂成小片段然后检测这些小片段能够显著提高检测大蛋白在复杂混合物中差异存在(例如，因为差异表达)的灵敏度。灵敏度的提高有几个原因。首先，当样品中所有蛋白都被(例如)酶解而片段化时，大蛋白可能产生更多片段而不是小蛋白。其次，解吸谱法的整体灵敏度在低分子量时高于高分子量时。第三，蛋白片段化增加了来自靶分析物的信号数量，因此提高了测得靶分析物的可能性。第四，蛋白片段化提高了捕获可能性，因此提高了测得蛋白至少一种片段的可能性。第五，如果蛋白质在两种样品中差异存在，那么通过增加来自该蛋白的信号数量，量的差异更可能被测得。

而且，该方法是反直观的。通常，人们希望在分析前降低分析物混合物的复杂性。片段化却提高了这种复杂性。

所以，在本发明实施例之一中，在检测前将分析物转化为低分子量片段提高了检测灵敏度。片段化可以用本领域已知方法进行。例如，可用内切蛋白酶将蛋白分析物片段化。可用糖苷酶将糖分析物片段化。可用内切核酸酶将核酸片段化。样品的片段化可在用吸附剂固定之前或之后进行。

J. 鉴定受体的配体的方法

生物系统的功能性路径常涉及受体与配体间的相互作用。例如，转录激活中的结合常涉及在此之前配体与某转录因子的结合。许多病理情况与受体与其配体间异常的相互作用有关。阻断受体与配体间的相互作用常是药物开发的目的之

一。但是，某受体的配体的特征经常是未知的；受体是“孤儿”受体。

本发明提供了一种用滞留层析来鉴定受体的配体的方法。该方法涉及将受体固定于吸附剂。然后，可能含有该受体配体的样品在适合受体与配体间结合的洗脱条件下与固定化受体接触。然后，用解吸谱法检测与受体结合的配体。该方法能够利用解吸谱法的灵敏度来检测固定于吸附剂的少量物质。

将受体固定于吸附剂需要鉴定一种保留，最好是特异性结合受体的吸附剂。本发明已经描述了鉴定特异性结合蛋白质的吸附剂的方法。在方法之一中，吸附剂含有该受体的特异性抗体。另一实施例中，受体是生产出的融合蛋白，具有一个特异性结合部分。例如，受体可与抗体的 Fc 部分融合。Fc 部分可与蛋白 A 结合，后者可掺入吸附剂中。

由操作者考虑用来检测是否存在某配体的样品。例如，如果受体是核受体，则样品可以是核提取物。如果受体是细胞质受体，则样品可以是细胞质提取物。如果受体是细胞表面受体，则样品可以是来自细胞所接触表面的液体，例如用于上皮细胞表面受体的血清。

样品一般与受体在生理条件下培育足够的时间以允许结合，例如 37°C 数小时。然后，洗去不结合的物质。该方法能够迅速鉴定出常规技术需数月鉴定的配体。

滞留层析允许并行处理数个吸附剂位点上的样品。所以，该方法可能涉及检测多种样品中是否存在某配体，以及在多种培育和洗脱条件下测试一种样品。

通过测定鉴定到的配体的质量和各种理化特性，用基因组数据库中的信息能够正确鉴定配体。

本发明另一实施例中制备了一组探针，它们已经接触过并固定了某细胞中的蛋白质。这种探针本身可以用作第二探针来鉴定细胞中与固定化分子结合的分子。在由探针制备滞留图后，探针再与测试物质接触，条件严谨性一般低于制备第二探针时的条件，分析可定址位置。新结合探针的分子即结合已固定分子的那些。

K. 药物开发方法

鉴定干扰受体与配体间结合的分子是药物开发中的重要步骤。本发明提供了筛选化合物调节吸附剂与分析物(例如受体吸附剂和配体分析物)之间结合能力的方法，这是通过将吸附剂和分析物与测试化合物接触，用解吸谱法检测吸附剂与分析物之间的结合。

迅速筛选组合文库以找出候选药物要求能使靶分子受数以千计药物的作用，并鉴定出干扰或促进该作用的药物。滞留层析能够将配体/受体对的成员之一固定到基质上作为第二吸附剂。然后，在该成员接触其伴侣和药物后，可用解吸谱法测定伴侣是否结合以及结合程度。滞留层析筛选分子的优点包括能够通过吸附剂将受体特异性固定于基质，能够将受体迅速布置在许多吸附剂位点以进行并行处理，和因为通过解吸谱法读结果而加速完成。

1. 筛选试验

该方法包括：提供一种吸附剂；在有和没有药物存在下，在一种或多种选择性条件下，将吸附剂与靶分析物接触；测定有和没有药物存在下的结合量。结合量是用解吸谱法测定的(例如通过制作识别图)。实验中有不加药物的对照，或加有不同量或不同种药物的对照，用外推法确定零点量。结合量上的统计学显著差异($p < 0.05$)说明测试药物调节结合。

该方法特别适用于筛选作为靶候选药物的分析物(例如蛋白质)。在由血清或其他种类靶细胞形成蛋白滞留图或识别图后，药物与滞留分析物阵列在它们的可定址位置上接触。结合后，洗脱或洗去不结合的药物。用解吸质谱法直接鉴定特定选择性条件下保留被结合药物的那些分析物，因为药物本身表现为滞留图上的新组分(即，解吸药物并直接检测)。该方法尤其适用于筛选候选药物(包括活化剂和拮抗剂)结合分析物或调节一种或多种生物过程的能力。

2. 受体与配体

吸附剂与靶分析物不必发生特异性结合。但是，在特别有用的方法中，吸附剂和靶分析物是配体/受体对。

实施例之一中，配体/受体对是激素和细胞表面受体或胞内受体。吸附剂可以是完整细胞，或者，如果是细胞膜结合受体则可以是细胞膜。可用蛋白受体或其他靶候选药物作用吸附剂筛选组合药物文库。可将数百种或数千种药物作用于一种受体或可定址位置。在去除不结合或弱结合的候选药物后，检测结合的药物并用解吸谱法鉴定。

另一实施例中，吸附剂是结合并修饰靶底物的酶。筛选药物酶转化分析物的能力。例如，可以检测酶活，因为分析物的识别图将因为酶活而不同于产物。差异滞留说明药物改变结合。

受体/配体可以多种方式滞留在基质上。方法之一中，受体/配体被非特异性

吸附剂直接滞留。另一方法中，吸附剂是受体/配体特异性的。例如，吸附剂可含有对受体/配体的特异性抗体。受体/配体可以是融合蛋白，其中的融合部分特异性结合吸附剂，例如，Fc 片段结合蛋白 A。一方法中，表面具有特异性结合受体/配体的多肽的基因组，例如噬菌体展示文库中的一个噬菌体，与基质结合。该配体被多肽捕获。而且，吸附剂可以是已经固定在基质上的分析物，即，它可以是第二吸附剂、第三吸附剂等。

本发明提供了特别适用于评价药物(或其他物质)结合靶分析物后直接和间接效果的方法。在由一种靶细胞的蛋白质得出的滞留图上鉴定一种或多种分析物会因物质(例如候选药物)的以下作用而改变：1)对结合靶分析物的蛋白质本身的作用，2)对其他分析物(非药物结合蛋白)的作用，或3)对基因表达的作用(正调或负调)。是滞留层析的高分辨率和高信息性检测出了这些改变：即，药物诱导了基因滞留图或识别图在有和没有药物时的差异，使得该方法成为用于蛋白质、功能性基因组、药物开发、治疗药物检测和临床诊断最有效的方法之一。

3. 测试药物

将有待筛选其调节凝血酶原(prothymosin)表达的能力的测试药物给予受试动物或体外培养的细胞。待检药物的选择由医师的处方决定。但是，考虑到药物多样性和给药方便，优选小分子作为测试药物。

a. 化学

待测药物可选自多种来源。例如，可得到分子的组合文库用于筛选。用这类文库可筛选数千分子的调控活性。一优选实施例中，高处理量的筛选方法涉及提供一个包含大量潜在治疗性化合物(候选化合物)的文库。然后，如本发明所述，在一个或多个试验中筛选这样的“组合化学文库”，鉴定表现出所需特征活性的成员(特定种类或亚类的化学物质)。由此鉴定出的化合物可作为常规“引导”化合物，或其本身就可用作潜在或实际治疗药。

制备和筛选组合化学文库是本领域熟练技术人员所熟知的。这类组合化学文库包括但不限于：肽文库(参见美国专利 5,010,175, Furka(1991) *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 37:487-493, Houghton 等(1991) *Nature*, 354:84-88)。肽合成绝不是本发明唯一考虑和准备使用的方法。产生化学多样性文库的其它化学机制也可以使用。这些机制包括但不限于：类肽(peptoid)(PCT 公开 WO91/19735, 1991 年 12 月 26 日)，编码的肽((PCT 公开 WO93/20242, 1993 年 10 月 14 日)，随机生物寡聚物(PCT

公开 WO92/00091, 1992 年 1 月 9 日), 苯并二吡庚因(美国专利 5,288,514), 乙内酰胺、苯并二吡庚因和二肽之类 diversomer(Hobbs 等, (1993) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 90: 6909-6913), 插烯类(vinylogous)多肽(Hagihara 等, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218), 具有 β -D-葡萄糖骨架的非肽类拟肽(Hirschmann 等, (1992) *J. Amer. Chem. Soc.* 114:9217-9218), 小化合物文库的同类有机合成(Chen 等, (1993) *J. Amer. Chem. Soc.*, 116:2661), 寡聚氨基甲酸酯(Cho 等, (1993) *Science* 261:1303), 和/或磷酸肽酯(Campell 等(1994) *J. Org. Chem.* 59:658)。一般参见, Gordon 等, (1994) *J. Med. Chem.* 37:1385, 核酸文库, 肽核酸文库(参见美国专利 5,539,083), 抗体文库(参见, Vaughn 等, (1996) *Nature Biotechnology*, 14(3):309-314), 和 PCT/US96/10287), 糖文库(参见, Liang 等(1996) *Science* 274: 1520-1522, 和美国专利 5,593,853), 和小有有机分子文库(参见, 苯并二吡庚因, Baum(1993) *C&EN*, Jan 18, p.33, 异戊二烯化合物, 美国专利 5,569,588, 噻唑烷酮(thiazolidinone)和间噻嗪烷酮(metathiazanone), 美国专利 5,549,974, 吡咯烷酮, 美国专利 5,525,735 和 5,519,134, 吗啉化合物, 美国专利 5,506,337, 苯并二吡庚因, 5,288,514, 等)。

制备组合文库的设备可以购买(参见, 375MPS, 390MPS, Advanced Chem Tech, Louisville KY, Symphony, Rainin, Woburn, MA, 433A Applied Biosystems, Foster City, CA, 9050 Plus, Millipore, Bedford, MA)。

L. 产生特异性结合分析物的制剂的方法

本发明提供了产生特异性结合靶分析物的制剂(例如单链抗体)的方法。这些制剂可用作特异性诊断试剂在配体/受体相互作用研究中用于固定靶分析物。该方法特别适用于产生只可能分离到少量的针对靶分析物的物质, 通过免疫动物来获取它们是不可能或不可行的。该方法涉及: 提供附着有靶分析物的基质; 提供展示待筛选物质的基因组件展示文库; 将文库与靶分析物接触, 通过与靶分析物的反应选择性保留基因组件; 和用解吸谱法检测滞留的基因组件。

可以对复杂样群中的大量候选吸附剂-分析物并行进行以上步骤, 没有分开选择和检测过程中的转移损耗和混淆, 这些步骤包括间接检测方法中的离线扩增和标记。

1. 提供基质

该方法的第一步是提供包含吸附剂的基质, 该吸附剂是待筛选文库中某多肽

的作用靶。实施例之一中，提供的基质具有已经附着的靶吸附剂。另一实施例中，基质的提供是：提供具有结合靶分析物的吸附剂的基质，在使得分析物滞留的洗脱条件下将吸附剂与分析物接触，将靶吸附剂用作展示文库的目标。实施例之一中，目标在进行比较的两种细胞内差异表达。例如，目标可以来自差异表达的 mRNA 或者可以是差异表达的多肽。前文已经说明了用滞留层析鉴定这种差异表达的蛋白的方法。

差异表达的蛋白一旦得以鉴定，就可以形成准确分辨分析物的选择性条件。更好的是，分析物的滞留是特异性或唯一性的。前文中逐步分辨分析物的方法能够鉴定出特异性结合复杂样品中某靶分析物的选择性条件。实施例之一中，结合的靶分子可能被修饰，例如被酶修饰。

或者，该方法可以从 mRNA 或 EST 阶段开始。这种方法中，用常规方法鉴定差异表达的 mRNA 或 EST。然后，体外和在吸附剂上原位转录和翻译这些分子以供固定。例如，制备具有许多吸附剂位点的用于解吸谱法的基质。基质上置一根试管，由它形成一格，吸附剂位于格底。在该格中加入用于体外转录和翻译差异表达的 mRNA 的试剂(一般是 cDNA 的形式)。(有关方法参见，Sambrook 等，*Molecular Cloning—A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY(1989)和 *Current Protocols in Molecular Biology*, F.M.Ausubel 等编辑，(Current Protocols 是 Green Publishing Association Inc.和 John Wiley & Sons, Inc.的联合企业))。mRNA 或 EST 的翻译产生了被吸附的多肽。移去试管，用洗脱剂洗涤吸附剂位点，鉴定保留多肽分析物的选择性条件。

2. 提供展示文库

第二步是提供展示文库。展示文库由在表面展示各种肽组合文库(多肽)的基因组件组成。但较好的是单链抗体，因为它们能够用于以后的免疫试验。

本领域已知多种展示文库及其用途。展示方法的一个基本概念是建立待选多肽配体与编码多肽的可回收聚核苷酸之间的物理联系。这种物理联系是由多聚分子复合物提供的，在这里是基因组件，例如噬菌体颗粒，它展示作为衣壳组成部分的多肽，衣壳内包含编码多肽的噬菌体基因组。建立多肽与其基因材料之间的物理联系允许对带有不同多肽的大量基因组件同时进行质量筛选。展示的多肽对靶分子具有亲合性的基因组件与靶分子结合，并通过与靶分子的亲合性筛选富集这些基因组件。可根据对应的基因组来鉴定这些基因组件所展示的多肽的特征。用这些方法，然后可以用常规方法大量合成经鉴定与所需分析物具有结合亲合性

的多肽。

展示文库最常用的基因组件是噬菌体，尤其是丝状噬菌体，特别是噬菌体 M13、Fd 和 F1。大多数工作将编码待展示多肽的文库插入这些噬菌体的 gIII 或 gVIII 形成融合蛋白。参见 Dower, WO91/19818; Devlin, WO91/18989; MacCafferty, WO92/01047(基因 III); Huse, WO92/06204; Kang, WO92/18619(基因 VIII)。还可参见 Cwirla 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87, 6378-6382(1990); Devlin 等, *Science* 249, 404-406(1990), Scott & Smith, *Science* 249, 386-388(1990); Ladner 等的 U.S.5,223,409 和 Ladner 等的 U.S.5,571,698。这样的融合蛋白具有一段通常来自分泌蛋白而不是噬菌体包被蛋白的信号序列，待展示多肽和基因 III 或基因 VIII 的蛋白或其片段。常将外源编码序列插入基因 III 或基因 VIII 的 N 末端或附近，但也可以插入在其它插入位置。有些丝状噬菌体载体经基因工程改造而产生了基因 III 或基因 VIII 的第二拷贝。这类载体中，外源序列只插入在两拷贝之一中。其它拷贝的表达有效地稀释了噬菌体内的融合蛋白，这对减少针对多肽(对噬菌体生长有害)的选择操作是有利的。在感染细菌的病毒(噬菌体)表面展示抗体片段可以产生具有多种亲合性和动力学特征的人 sFv。

在另一种改变形式中，将外源多肽序列克隆入编码噬菌体包被蛋白和噬菌体包装序列但不能复制的噬菌粒中。将噬菌粒转染到细胞内，通过辅助噬菌体感染进行包装。用噬菌粒的效果还在于稀释了融合蛋白，该融合蛋白由包被蛋白和展示的带有辅助噬菌体表达的包被蛋白的野生型拷贝的多肽形成。参见 Garrard, WO92/09690。

可以类似的方法用真核病毒展示多肽。例如，Han 等在 *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 9747-9751(1995)中报道了与 Moliney 小鼠白血病病毒的 gp70 融合的人 heregulin。孢子也可以用作可复制的基因组件。此时，多肽由孢子的外表面展示。例如，据报道可用枯草杆菌孢子。这些孢子的包被蛋白的序列参见 Donovan 等, *J. Mol. Biol.* 196, 1-10(1987)。

也可用细胞作为可复制基因组件。展示多肽被插入在编码细胞表面蛋白的基因。细菌细胞包括鼠伤寒沙门氏菌，枯草杆菌，绿脓杆菌，霍乱弧菌，肺炎克雷伯氏杆菌，淋病奈瑟氏菌，脑膜炎奈瑟氏菌，结节状类杆菌(*Bacteroides nodosus*)，牛莫拉氏菌，和优选的大肠杆菌。有关外表面蛋白的细节参见 Lander 等，美国专利 5,571,698 和 Georgiou 等, *Nature Biotechnology* 15:29-34(1997)和其中的参考文献。例如，合适的有大肠杆菌的 λ 蛋白。

3. 筛选展示文库

第三步是筛选展示文库，鉴定特异性结合靶分子的配体。在适合多肽与靶分子特异性结合的洗脱条件下让带有靶分子的基质与展示文库接触。具有靶分子识别物质的基因组件与已经附着在基质上的靶分子结合。与洗脱条件接触后去除了没有结合的粒子，保留了结合的粒子。

在基质上引入每 mL 含约 10^{11} 噬斑形成单位的基因组件群(在这里是 M13 噬菌体)，基质具有结合靶吸附剂(例如蛋白质)的可定址阵列。接触后，选出对靶吸附剂(即选择性阈值修饰剂或洗脱剂)来说的最适选择性条件，以便只选择性保留全部噬菌体基因型中的一个小子集，最好少于 5-10 个。注意，通过接触干扰除最具选择性的分析物-靶吸附剂相互作用之外所有其他相互作用的洗脱剂，去除不结合靶吸附剂(即不与靶吸附剂结合的噬菌体)或结合松散的噬菌体。展示与靶吸附剂具有最高亲合性的多肽的噬菌体被选择性保留。

4. 检测含有特异性结合靶分子的物质的基因组件

第四步中，用解吸谱法检测基因组件(M13 噬菌体)与靶分子的结合。例如，M13 噬菌体具有一种包被蛋白的数千拷贝。在解吸谱法中，用激光撞击噬菌体，包被蛋白于是被释放而可以被测得。这样可以测定文库是否包含具有靶分子结合物质的噬菌体。为了获得用于以后分析的基因组件，筛选步骤可在探针上多个不同位置同时进行，或者，可使基质足够大使激光不至于释放所有结合于表面的基因组件。该方法特别有效，因为少量噬菌体与分析物结合也能被测得。

以 M13 为例，较好的检测方法是用解吸谱法监测作为“标记”蛋白信号的基因 gIII 包被蛋白的出现。用这种方式，我们已经测得了结合少至 5 个噬菌体颗粒(pfu)的“阳性”靶吸附剂(噬菌体颗粒数量是根据已知稀释度估算的)。其它噬菌体标记依照优先次序包括基因 V，基因 X 和基因 III(包括它们的融合产物)。

检测了最高亲合性吸附剂的位置(即接触高选择性条件后阵列内保留噬菌体最少的位置)后，就可将结合的基因组件作为跳离点用于其它用途。

5. 分离基因组件

实施例之一中，该方法还涉及分离基因组件供以后分析。这种分析可能涉及复制基因组件和从中分离聚核苷酸。可用常规方法复制分离后的噬菌体。例如，可让滞留的噬菌体与生物扩增载体例如大肠杆菌接触，加入营养培养基令基因组件生长，以供以后分析。可进一步检测单个集落结合滞留于基质的分析物的能

力。

6. 编码多肽的核苷酸序列的测序

对结合基因组中编码多肽的核苷酸序列测序，提供了用于生产多肽的信息。测序包括从吸附剂上分离基因组，复制，分离聚核苷酸和用现有方法测定核苷酸序列。另一方法中，将基质与合适的物质(例如会被基因组感染的细胞)接触可原位复制该基因组。另一实施例中，测序原位进行。该方法包括裂解基因组，用已知方法(例如 PCR)扩增核苷酸序列。可能有几个不同的基因组与表面上不同的表位结合。此时，可以改变洗脱条件使得只有一种噬菌体与一种表位结合。

7. 生产多肽

有价值的下一步是生产多肽。分离后的多肽可用作吸附剂在诊断中特异性检测靶分子或用于研究配体/受体相互作用。

方法之一中，生产多肽涉及首先进行编码多肽的核苷酸序列测序。氨基酸序列衍生自该核苷酸。可用上述方法测序。序列是重组法或化学合成多肽的基础。

另一方法中，多肽可通过复制基因组来生产。这在基因组包含多肽的多份拷贝时特别有效。基因组可在原位分离或复制。

一种重组法生产多肽的方法可如下进行。用所述的方法测序或分离编码多肽的核苷酸序列。然后，将核苷酸序列包含在表达载体中。表达载体含有与编码多肽的核苷酸序列操作性连接的调控序列。然后用本领域熟知的方法，用表达载体重组表达多肽。

已知，靶分子具有一个或多个表位。所以，该方法能够生产对靶分子具有特异性的一种以上多肽。

然后可将靶特异性多肽作为探针的吸附剂用于临床诊断或药物开发。即，因为这样的探针表面具有特异性结合靶分子的多肽，它们可用来从复杂的混合物(例如生物样品)中分离靶分子，和用解吸谱法检测靶分子。而且，因为多肽与靶分子间的相互作用可能是生物特异性的，所以很可能所涉及的两者间的亲合性比用前述逐步分辨法获得的吸附剂更高。

8. 分离靶分子的肽表位

在一种形式中，该方法允许分离靶分析物上的肽表位。该方法采用类“抗独

特型”法。概括地说，用(例如)噬菌体展示文库筛选靶分析物的表位。分离后的噬菌体含有例如识别分析物上表位的单链抗体。接着，用这些噬菌体筛选第二展示文库。第二展示文库中结合第一文库中单链抗体的噬菌体含有展示的多肽，它们具有与单链抗体所识别的表位相似的结构。

这种方法的实施例之一中，用编码一种结合靶分析物的多肽的核苷酸序列产生 M13 噬菌体，多肽在其中展示为与基因 VIII 的融合体。这样，该噬菌体的外表面上具有靶多肽的数百份拷贝。然后将该噬菌体固定在基质上。固定可通过例如结合基因 III 的配体实现，或者可将基因 III 修饰成具有基质表面配体的受体。然后，该噬菌体与第二展示文库接触。如前所述检测文库中结合固定噬菌体的基因组件并分离。较好的是，第二展示文库具有某种质量标记，使得它们的基因 VIII 蛋白能够与固定于基质的噬菌体的基因 VIII 的相区别。这样，某物质是“靶分析物”还是吸附剂取决于是否用结合的吸附剂再结合其它物质。可以看出，可以继续将物质与已固定的物质结合，就象鉴定分离最终结合物质的选择性条件的方法一样。

实施例

以下实施例用于说明而非限定。

以下实施例中，使用的以下产品和术语。鸡蛋白溶菌酶(1 μ l 稀释成 10pmol/ μ l 水溶液)，购自 Sigma Chemical Company, St. Louis, MO。“人血清”指 1 μ l 血清在 pH7.0, 0.5M NaCl 的 20mM 磷酸钠缓冲液中的 1 至 5 倍稀释液。

本发明中，“mg”表示毫克；“ml”表示毫升；“ μ l”表示微升；“cm”表示厘米；“nm”表示纳米；“M”表示摩尔浓度；“mM”表示毫摩尔浓度；“min”表示分钟；“%”表示重量百分比，除非另作说明；“NaCl”表示氯化钠；“TFA”表示三氟乙酸。

I. 滞留层析方案

以下方案是进行滞留层析的实施例。

A. 制作滞留图的方案(用层析系列阵列)

1. 样品处理

将生物样品稀释在 0.01%的 Triton X100 HEPES 溶液或磷酸钠溶液中，pH7.2。视需要离心澄清样品。

2. 上样

将样品点样在阴离子，正常相或 TED-Cu(II)吸附剂阵列的一个位点上。如果是疏水性吸附剂阵列，事先用 0.5 μ l 含 0.5%TFA 的乙腈润湿各位点。在乙腈干燥前将样品加到该位点。任样品在位点上浓缩(几乎变干)。

3. 洗涤

a. 阴离子吸附剂阵列

位点 1, 用 pH7.2 的 20mM HEPES 或磷酸钠洗涤。在样品完全干燥前将第一份 2 μ l 洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进吸出 10 次。彻底清除第一份洗涤溶液，用第二份 2 μ l 洗涤溶液重复以上步骤。

位点 2, 用 NaCl 在 20mM 磷酸钠中所成的 0.2M、pH7.2 溶液如上洗涤。

位点 3, 用 NaCl 在 20mM 磷酸钠中所成的 1M、pH7.2 溶液如上洗涤。

位点 4, 用 20mM、pH8.5 TrisHCl 如上洗涤。

位点 5, 用 0.1M、pH4.5 乙酸钠如上洗涤。

位点 6, 用 Triton X100 在 20Mm HEPES 或磷酸钠中所成的 0.05%、pH7.2 溶液如上洗涤。

位点 7, 用尿素在 20Mm HEPES 或磷酸钠中所成的 3M、pH7.2 溶液如上洗涤。

位点 8, 用 10%的乙腈水溶液如上洗涤。

用水彻底洗涤整个阵列。

自然干燥芯片。

加 0.3 μ l 吸能分子(以 50%乙腈，0.5%三氟乙酸制备的标准溶液)。

自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留于各位点的蛋白质。

b. 正常相吸附剂阵列

位点 1, 用 pH7 的 5mM HEPES 洗涤。在样品完全干燥前将第一份 2 μ l 洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进吸出 10 次。彻底清除第一份洗涤溶液，用第二份 2 μ l 洗涤溶液重复以上步骤。

位点 2, 用 20mM 磷酸钠，0.15M NaCl，pH7.2，如上洗涤。

位点 3, 用 20mM 磷酸钠，0.5M NaCl，pH7.2，如上洗涤。

位点 4, 用 0.1M 乙酸钠，pH4.0 如上洗涤。

位点 5, 用 Triton X100 在 20Mm 磷酸钠中所成的 0.05%溶液、0.15M NaCl, pH7.2 如上洗涤。

位点 6, 用尿素在 20Mm 磷酸钠中所成的 3M 溶液, 0.15M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 7, 用 1%TFA 如上洗涤。

位点 8, 用 30%的异丙醇:乙腈(1:2)水溶液如上洗涤。

用水彻底洗涤整个阵列。

自然干燥芯片。

加 0.3 μ l 吸能分子(以 50%乙腈, 0.5%三氟乙酸制备的标准溶液)。

自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留于各位点的蛋白质。

c. TED-Cu(II)吸附剂阵列

位点 1, 用 pH7.2, 0.5M NaCl, 20mM 磷酸钠洗涤。在样品完全干燥前将第一份 2 μ l 洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进吸出 10 次。彻底清除第一份洗涤溶液, 用第二份 2 μ l 洗涤溶液重复以上步骤。

位点 2, 用咪唑在 20mM 磷酸钠所成的 20mM 溶液, 0.5M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 3, 用咪唑在 20mM 磷酸钠所成的 100mM 溶液, 0.5M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 4, 用 0.1M 乙酸钠, 0.5M NaCl, pH4.0 如上洗涤。

位点 5, 用 Triton X100 在 20Mm 磷酸钠中所成的 0.05%溶液、0.15M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 6, 用尿素在 20mM 磷酸钠中所成的 3M 溶液, 0.15M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 7, 用 1%TFA 如上洗涤。

位点 8, 用 10%的乙腈水溶液如上洗涤。

用水彻底洗涤整个阵列。

自然干燥芯片。

加 0.3 μ l 吸能分子(以 50%乙腈, 0.5%三氟乙酸制备的标准溶液)。

自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留于各位点的蛋白质。

d. 疏水性吸附剂阵列

位点 1, 用乙腈在 0.1%TFA 中所成的 5%溶液洗涤。在样品完全干燥前将第一份 2 μ l 洗涤溶液加到该位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进吸出 10 次。彻底清除第一份洗涤溶液, 用第二份 2 μ l 洗涤溶液重复以上步骤。

位点 2, 用乙腈在 0.1%TFA 中所成的 50%溶液如上洗涤。

位点 3, 用 Triton X100 在 20mM 磷酸钠中所成的 0.05%溶液、0.15M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

位点 4, 用尿素在 20mM 磷酸钠中所成的 3M 溶液, 0.15M NaCl, pH7.2, 如上洗涤。

用水彻底洗涤整个阵列。

自然干燥芯片。

加 0.3 μ l 吸能分子(以 50%乙腈, 0.5%三氟乙酸制备的标准溶液)。

自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留于各位点的蛋白质。

B. 抗原-抗体试验; 受体-配体试验的方案(用预先活化的吸附剂阵列)

1. 抗体在预先活化的吸附剂阵列上的固定

将一预先活化的吸附剂阵列置于一洁净的平整表面上。该阵列上各位点预先用 0.5 μ l 异丙醇润湿, 然后将抗体或受体或对照点样在各位点上(在异丙醇干燥前加 1 μ l 抗体/点)。

在湿润的培养箱中孵育(4 $^{\circ}$ C 或室温培养 2-18 小时)。

用移液管去除各点上残留的溶液。

在整个芯片上各残留活性位点位置加 1ml pH7.4 的 1M 乙醇胺 PBS 溶液进行封闭, 并在湿润的培养箱中孵育(室温 30 分钟)。

用 1%的 Triton X-100 PBS 溶液洗涤芯片两次。在 15ml 塑料锥形试管中将芯片浸没在 9ml 洗涤溶液中, 在台式(benchtop)搅拌仪上振摇至少 15 分钟。

用 NaCl 在 0.1M 乙酸钠中所成的 0.5 溶液, pH4.0 如前洗涤。

用 NaCl 在 0.1M TrisHCl 中所成的 0.5 溶液, pH8.0 如前洗涤。

用 PBS 如前所述进行漂洗。然后 PBS 覆盖整个芯片, 使用前于 4 $^{\circ}$ C 保存。

2. 抗原或配体的结合

温和抖去或粘去芯片上的 PBS。

在各点加以 1-5 μ l 样品。对于抗原或配体浓度很低的样品，将吸附剂阵列放入生物处理仪(bioprocessor)中。用 200 μ l PBS 两次洗涤芯片上的各点和生物处理仪的各格。在各格加 300 μ l 样品。

用胶带密封。

振荡孵育(4 $^{\circ}$ C 或室温下 1-18 小时)。

3. 洗涤

去除位点上的样品，用 2 μ l 0.1%的 Triton X100 PBS 溶液，pH7.2 洗涤各格两次。将第一份 2 μ l 洗涤溶液加到位点。洗涤溶液在位点上至少停留 15 秒。用移液管吸进吸出 10 次。彻底清除第一份洗涤溶液，用第二份 2 μ l 洗涤溶液重复以上步骤。然后用 NaCl 在 0.1M HEPES 中所成的 0.5M 溶液，pH7.4 洗涤。用水彻底洗涤整个阵列。

4. 滞留蛋白的分析

自然干燥芯片。

加 0.3 μ l 吸能分子(以 50%乙腈，0.5%三氟乙酸制备的标准溶液)。

自然干燥芯片。

用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留于各位点的蛋白质。

II. 溶菌酶的识别特征概况

我们用高信息分辨滞留层析得到溶菌酶的识别特征概况。所述的概况包括用 6 种吸附剂，各自在多种不同选择性阈值修饰剂存在下分辨溶菌酶。结果得到 40 幅不同的谱图，以不同方式描述了溶菌酶的理化特性。

A. 用亲水性吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到不锈钢基质上氧化硅层析系列吸附剂阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后，分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点：

- (1) 20mM 磷酸钠缓冲液，pH7.0，
- (2) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.2M 溶液，pH7.0，
- (3) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.4M 溶液，pH7.0，

- (4)25mM 乙酸钠缓冲液, 0.125M NaCl, pH4.5,
- (5)1%TFA,
- (6)10%乙腈水溶液,
- (7)20%乙腈水溶液,
- (8)Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 和
- (9)尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在吸附剂位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后, 用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用质谱仪, 用氮激光仪(335nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据, 输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5A 显示了正常相层析系列吸附剂阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。底下的谱线显示, 仅用 pH7 的缓冲液洗涤后, 溶菌酶信号强度保留在氧化硅吸附剂上。在选择性阈值修饰剂中加进氯化钠(0.2-0.4M)减少了溶菌酶的滞留。这表明, 溶菌酶(碱性蛋白)与氧化硅吸附剂(在 pH7 时带负电)的相互作用涉及离子交换机制。将选择性阈值修饰剂的 pH 降低至例如乙酸钠溶液的 pH4.5 或 1%TFA 的 pH 2 以下, 氧化硅吸附剂上的负电几乎完全消除, 不再有溶菌酶滞留。在选择性阈值修饰剂中加进极性调节剂, 有机溶剂(例如乙腈)或除垢剂(例如 Tween20)或尿素, 也削弱溶菌酶与氧化硅吸附剂之间的相互作用。这表明, 其它作用机制包括亲水性相互作用。

B. 用疏水性吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到氧化硅包被的不锈钢基质上的聚乙烯(C₃ 疏水性)吸附剂包被的层析系列吸附剂阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后, 分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1) 0.1%TFA,
- (2)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 10%溶液,
- (3)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 20%溶液,
- (4)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 50%溶液,
- (5)Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 和
- (6)尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤

溶液重复以上过程。然后,用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA),任其自然干燥。用质谱仪,用氮激光仪(335nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据,输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5B 显示 C₃ 疏水性层析系列吸附剂阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。底下的谱线显示,仅用 0.1%TFA 洗涤后,溶菌酶信号强度保留在 C₃ 疏水性吸附剂上。在选择性阈值修饰剂中加进极性调节剂(例如乙腈)减少溶菌酶在 C₃ 疏水性吸附剂上的滞留。将溶菌酶从 C₃ 疏水性吸附剂上洗脱的乙腈浓度范围是 20-50%。在选择性修饰剂中加进除垢剂(Tween20),或尿素没显著减少溶菌酶在 C₃ 疏水性吸附剂上的滞留。

C. 用苯基疏水性吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到氧化硅包被的不锈钢基质上的聚苯乙烯(苯基疏水性)吸附剂阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后,分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1)0.1%TFA,
- (2)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 10%溶液,
- (3)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 20%溶液,
- (4)乙腈在 0.1%TFA 中所成的 50%溶液,
- (5)Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 和
- (6)尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后,用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA),任其自然干燥。用质谱仪,用氮激光仪(335nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据,输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5C 显示疏水性苯基层析系列吸附剂阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。底下的谱线显示,仅用 0.1%TFA 洗涤后,溶菌酶信号强度保留在疏水性苯基吸附剂上。在选择性阈值修饰剂中加进极性调节剂(例如乙腈)减少溶菌酶滞留。将溶菌酶从 C₃ 疏水性吸附剂上洗脱的乙腈浓度范围是 20-50%,但是,比较 20%乙腈洗涤条件下滞留在 C₃ 和苯基表面上的溶菌酶强度峰值时,溶菌酶与苯基吸附剂的相互作用较弱。在选择性阈值修饰剂中加进除垢剂(Tween20),或尿素也明显减

少溶菌酶在疏水性苯基吸附剂上的滞留。

D. 用阴离子吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到氧化硅包被的不锈钢基质上的阴离子吸附剂阵列(SO_3^- , 即阴离子交换吸附剂)的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后, 分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1) 20mM 磷酸钠缓冲液, pH7.0,
- (2) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.1M 溶液, pH7.0,
- (3) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.2M 溶液, pH7.0,
- (4) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.4 M 溶液, pH7.0,
- (5) 25mM 乙酸钠缓冲液, 0.125M NaCl, pH4.5,
- (6) Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 和
- (7) 尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μl 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后, 用 1 μl 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μl sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用质谱仪, 用氮激光仪(335nm) 和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据, 输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5D 显示阳离子交换层析系列阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。底下的谱线显示, 仅用 pH7.0 的缓冲液洗涤后, 溶菌酶信号强度保留在阴离子吸附剂上。随着选择性阈值修饰剂中氯化钠浓度的升高(0.1-0.4M), 溶菌酶滞留减少。这表明, 溶菌酶(碱性蛋白)与阴离子吸附剂的相互作用涉及离子交换机制。洗脱溶菌酶所需的氯化钠浓度为 0.4M。将选择性阈值修饰剂的 pH 降低至乙酸钠缓冲液的 pH4.5 不影响溶菌酶在强阴离子吸附剂上的滞留。在选择性阈值修饰剂中加进极性调节剂(例如除垢剂 Tween20, 或尿素)削弱溶菌酶与阴离子吸附剂的相互作用。这表明, 疏水性溶菌酶蛋白与阴离子吸附剂间的相互作用受洗脱剂极性的调节。

E. 用阳离子吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到氧化硅包被的不锈钢基质上的阳离子吸附剂(季胺)阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后, 分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1) 20mM 磷酸钠缓冲液, pH7.0,
- (2) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.1M 溶液, pH7.0,
- (3) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.2M 溶液, pH7.0,
- (4) NaCl 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.4M 溶液, pH7.0,
- (5) 25mM 乙酸钠缓冲液, 0.125M NaCl, pH4.5,
- (6) Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15M NaCl, pH7.0, 和
- (7) 尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后, 用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用质谱仪, 用氦激光仪(335nm) 和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据, 输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5E 显示阳离子(阴离子交换)吸附剂层析系列吸附剂阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。碱性溶菌酶在阳离子吸附剂上的滞留很弱。改变选择性阈值修饰剂对溶菌酶滞留的作用极小。

F. 用固定化金属离子吸附剂阵列的溶菌酶识别概况

将鸡蛋白溶菌酶加到氧化硅包被的不锈钢基质上的固定化金属(亚氨基乙酸 Cu) 吸附剂阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后, 分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1) 20mM 磷酸钠缓冲液, 0.5M NaCl, pH7.0,
- (2) 咪唑在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 5mM 溶液, 0.5M NaCl, pH7.0,
- (3) 0.1M 乙酸钠缓冲液, 0.5M NaCl, pH4.5,
- (4) Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 或
- (5) 尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, 0.5M NaCl, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后, 用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用质谱仪, 用氦激光仪(335nm) 和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据, 输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 5F 显示固定化金属层析系列吸附剂阵列上的溶菌酶识别概况组分质谱。底下的谱线显示, 仅用 pH7.0 的缓冲液洗涤后, 溶菌酶信号强度保留在固定化铜

离子吸附剂上。在选择性阈值修饰剂中加入结合氨基酸的竞争性亲合配体(例如咪唑)消除了溶菌酶的滞留。这表明溶菌酶(在序列中仅有一个组氨酸残基)与固定化铜离子吸附剂的相互作用涉及形成配位共价键的机制。将选择性阈值修饰剂的 pH 降低至乙酸钠缓冲液的 pH4.5 也减少溶菌酶在固定化铜离子吸附剂上的滞留。据信这是因为溶菌酶上组氨酸的质子化抑制配位共价相互作用。加除垢剂(Tween20)不影响此相互作用。加进尿素完全消除溶菌酶在固定化铜吸附剂上的滞留。

III. 人血清中分析物的分辨

我们用多种吸附剂和洗脱剂分辨人血清中的分析物。结果显示,分析物被不同的吸附剂差异保留,滞留层析图能够在低分子量和高分子量时提供信息。

A. 用固定化金属离子吸附剂阵列的人血清蛋白识别概况

将人血清蛋白加到氧化硅包被的不锈钢基质上的固定化金属离子(三(羧基甲基)亚乙基二胺-Cu)吸附剂阵列的不同位点。在一湿润培养箱中室温孵育 15 分钟后,分别用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)洗涤不同的各点:

- (1) 20mM 磷酸钠缓冲液, 0.5M NaCl, pH7.0,
- (2) 咪唑在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 5mM 溶液, 0.5M NaCl, pH7.0,
- (3) 0.1M 乙酸钠缓冲液, 0.5M NaCl, pH4.5,
- (4) Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 0.05%溶液, 0.15 M NaCl, pH7.0, 或
- (5) 尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液所成的 3M 溶液, 0.5M NaCl, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后,用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA),任其自然干燥。用质谱仪,用氮激光仪(335nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据,输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 6A 和 6B 显示低分子量和高分子量时,固定化金属层析系列吸附剂阵列上的血清蛋白识别概况组分质谱。底下的谱线显示,仅用 pH7.0 的缓冲液洗涤后,血清蛋白滞留在固定化铜吸附剂上。在选择性阈值修饰剂中加入结合氨基酸的竞争性亲合配体(例如咪唑),或除垢剂(例如 Tween20),或尿素,或将选择性阈值修饰剂的 pH 降低至 pH4.5 不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物中不同组分在相同吸附剂上的滞留。

G. 用不同吸附剂的人血清蛋白识别概况

将人血清加到以下不同吸附剂组成的吸附剂阵列的不同位点：

- (1) C₃ 疏水性,
- (2) 苯基疏水性,
- (3) 阴离子交换,
- (4) 阳离子交换,
- (5) 固定化金属(三(羧基甲基)亚乙基二胺-Cu)。

将各吸附剂涂在氧化硅包被的不锈钢基质上。在湿润的培养箱中孵育 15 分钟后,用 Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.05%溶液,0.15M NaCl, pH7.0 作为选择性阈值修饰剂洗涤各位点。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后,用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA),任其自然干燥。用质谱仪,用氦激光仪(335nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机分析数据,输入 GRAMS/32c(购自 Galactic Industries Corporation)进行数据重叠展示。

图 7A 和 7B 显示层析系列吸附剂阵列内不同吸附剂上血清蛋白识别概况的组分质谱。对不同的吸附剂(结合特征不同)使用同一种选择性阈值修饰剂不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物中不同组分在不同吸附剂上的滞留。

IV. 早产(preterm)婴儿尿液中分析物的分辨

我们用不同的吸附剂和洗脱剂分辨早产婴儿尿液中的分析物。结果显示,因为吸附剂差异保留分析物,使用不同的吸附剂具有很强的分辨能力。它们还能够鉴定出优先保留特定分析物的吸附剂,这可以用于开发纯化方法。

A. 用不同吸附剂和相同的洗脱剂(水)分辨早产婴儿尿液中的分析物

将早产婴儿的尿液(2 μ l)加到用以下不同吸附剂包被的碳化 PEEK 聚合物基质的不同位点：

- (1) C8 疏水性(辛基琼脂糖, 购自 Sigma),
- (2) 苯基疏水性(苯基琼脂糖, 购自 Sigma),
- (3) 阴离子交换(Q 琼脂糖, 购自 Sigma),
- (4) 阳离子交换(S 琼脂糖, 购自 Sigma),
- (5) 固定化金属(IDA-Cu, 螯合琼脂糖, 购自 Pharmacia), 和

(6) 固定化金属(三(羧基甲基)亚乙基二胺-Cu 琼脂糖)

在湿润的培养箱中孵育 15 分钟后, 用水作为选择性阈值修饰剂洗涤各吸附剂位点。每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用购自 Hewlett Packard 的激光解吸/离子化-飞行时间质谱仪(2030 型), 用氮激光仪(355nm)和 150cm 飞行管分析阵列。用 HP MALDI TOF 软件分析数据, 输入 GRAMS/32c 进行重叠展示。

图 8A 和 8B 显示在低分子量和高分子量时, 层析系列不同吸附剂上早产婴儿尿液蛋白识别概况的组分质谱。对不同吸附剂(结合特性不同)使用同一种洗脱剂(即水)不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物中不同组分在不同吸附剂上的滞留。

B. 用与基质间接偶连的疏水性苯基吸附剂和三种不同洗脱剂分辨早产婴儿尿液中的分析物

将早产婴儿的尿液(2 μ l)加到苯基疏水性吸附剂(苯基琼脂糖, 购自 Sigma)包被的碳化 PEEK 聚合物基质的不同位点。在湿润的培养箱中孵育 15 分钟后, 各吸附剂位点用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)之一洗涤:

(1)水

(2)尿素在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 2M 溶液, 0.15M NaCl, pH7.0, 和

(3)Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.1%溶液, 0.15M NaCl, pH7.0。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后, 用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈: 0.5%TFA), 任其自然干燥。用购自 Hewlett Packard 的激光解吸/离子化-飞行时间质谱仪(2030 型), 用氮激光仪(355nm)和 150cm 飞行管分析阵列。用 HP MALDI TOF 软件分析数据, 输入 GRAMS/32c 进行重叠展示。

图 9 显示层析系列疏水性苯基吸附剂上早产婴儿尿液蛋白识别概况的组分质谱。对同一种吸附剂使用洗脱特性不同的不同洗脱剂不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物中不同组分的滞留。当以 0.1%Tween20 PBS 溶液作为洗脱剂时, 组分之一被疏水性苯基吸附剂选择性保留(以*标记)。

V. 两种不同细胞的培养基中蛋白质的鉴定

本实施例说明用吸附剂阵列: 层析系列鉴定由细胞差异表达的蛋白质。

两种乳腺癌细胞系在常数组成的培养基中培养相同的时间。在过滤浓缩后，各取 1 μ l 培养基加到氧化硅包被的不锈钢基质上固定化金属(三(羧基甲基)亚乙基二胺-Cu)吸附剂阵列(Ciphergen Biosystems, Inc., Palo Alto, CA)的不同位点。在湿润的培养箱中室温孵育 15 分钟后，各吸附剂位点用以下洗脱剂(选择性阈值修饰剂)之一洗涤：

- (1)20mM 磷酸钠缓冲液，0.5M NaCl，pH7.0，
- (2)咪唑在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 20mM 溶液，0.5M NaCl，pH7.0，
- (3)0.1M 乙酸钠缓冲液，0.5 M NaCl，pH4.5，
- (4)Tween20 在 20mM 磷酸钠缓冲液中所成的 0.1%溶液，0.15M NaCl，pH7.0，
- (5)尿素在 10mM 磷酸钠缓冲液中所成的 3M 溶液，0.5 M NaCl，pH7.0，或
- (6)1%TFA。

每次洗涤都包括用 1 μ l 洗涤溶液在位点上吸进吸出 3 次。用一份新鲜的洗涤溶液重复以上过程。然后，用 1 μ l 水洗涤各吸附剂位点 2 次。加一份 0.3 μ l sinapinic 酸(5mg/ml 50%乙腈：0.5%TFA)，任其自然干燥。用激光解吸/离子化-飞行时间质谱仪(2030 型)，用氮激光仪(355nm)和 60cm 飞行管分析阵列。用计算机软件分析数据，输入 GRAMS/32c(Galactic Industries Corporation)进行重叠展示。

图 10A 显示固定化金属(Cu)层析系列吸附剂阵列上细胞系 1 分泌蛋白识别概况的组分质谱。对同一吸附剂使用不同选择性阈值的洗脱剂不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物中不同组分的滞留。

图 10B 显示固定化金属(Cu)层析系列吸附剂阵列上两细胞系分泌蛋白识别概况的组分质谱。用同一洗脱剂，0.1%Tween20+尿素在 10mM 磷酸钠缓冲液中所成的 3M 溶液，0.5M NaCl，pH7.0 洗去未滞留的物质。标记为 7532Da 的峰是细胞系 1 分泌蛋白的主滞留峰，细胞系 2 不表达该蛋白。

图 10C 显示固定化金属(Ni)层析系列吸附剂阵列上细胞系 1 分泌蛋白识别概况的组分质谱。用同一洗脱剂，0.1%Tween20+尿素在 10mM 磷酸钠缓冲液中所成的 3M 溶液，0.5M NaCl，pH7.0，但用表面反应能力不同的另一吸附剂(即固定化 Ni 而不是固定化 Cu)，7532Da 峰是细胞系 1 所有分泌蛋白中唯一滞留的蛋白。插入的图显示放大后的同一质谱。3766 Da 小峰是同一种蛋白带双电荷的形式。

图 10D 显示在胰蛋白酶原位消化前(下图)和后(上图)，固定化金属(Ni)层析系列吸附剂阵列上细胞系 1 分泌蛋白识别概况的组分质谱。用纯蛋白产生的肽图是该蛋白的指纹，可用于鉴定。

VI. 滞留层析与 2D 凝胶电泳的比较

滞留层析的优点之一是能够以不同维度迅速分辨分析物，得到有关多种理化特性的高信息内容。相反，2D 凝胶电泳只提供 2 维度的分辨。

图 11 显示层析系列苯基疏水性吸附剂上的早产婴儿尿液识别概况。用不同的洗脱剂和吸附剂得到多维度的信息。使用不同选择性条件不同程度地加强或削弱复杂蛋白质混合物(例如早产婴儿尿液)中不同组分的滞留，得到分析物的详细分辨。

相反，图 12 显示早产婴儿尿液中蛋白质根据 pI 和分子量的两维度分辨。与在滞留层析中用作吸附剂的 6 维度相比，凝胶提供有关两个维度的信息。位点的分辨不及质谱法，分子量很高和很低时的分辨率很有限。

VII. 从样品中依次提取分析物

可以通过样品与选择性条件的依次接触然后收集未滞留的样品从样品中依次提取分析物。

在 10%乙二醇 50mM EDTA 中制备嗜血杆菌 (*Hemophilus*)敲除突变株裂解液。离心后，将上清液以 1:3 稀释在 0.01% Triton X100 的 25mM HEPES, pH7.4 溶液中。取一份 2 μ l 稀释样品加到吸附剂阵列阴离子部位的一个位置上。室温孵育 30 分钟后，将阴离子位置上滞留的样品转移到吸附剂阵列正常相部位的一个位置上。阴离子位置用 2 μ l 0.01%Triton X100 25mM HEPES 洗涤 2 次。每次洗涤都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。将各洗液与最初加到正常相位点的样品合并。

室温孵育 30 分钟后，将正常相位置上滞留的样品转移到吸附剂阵列 Ni(II) 部位的一个位点。该正常相位点用 2 μ l 磷酸盐缓冲液洗涤 2 次。每次都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。将各份洗液与最初加到 Ni(II)位点的样品合并。

样品在 Ni(II)位点上浓缩近干燥后，用 2 μ l 100mM 咪唑磷酸盐缓冲液溶液洗涤 2 次，回收未结合的分析物。每次都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。将各份洗液转移到吸附剂阵列脂肪族疏水性部位的一个位点。

样品在脂肪族疏水性吸附剂位点上浓缩近干燥后，用 2 μ l 乙腈在 0.1%三氟乙酸中所成 5%溶液洗涤 2 次，去除未结合的分析物。每次都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。

阴离子、正常相、Ni(II)和疏水性部位各位点用 2 μ l 水洗去残留的缓冲液。在各位点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解

吸/离子化飞行时间质谱仪分析各部位上的滞留分析物。

图 19A-19D 显示吸附剂阵列上嗜血杆菌(*Hemophilus*)裂解液的滞留图。在吸附剂上,可观察到质量在 3000 至 25000Da 范围内的多个峰。注意,每种吸附剂表现出对样品中不同分析物的不同保留作用。

VIII. 逐步分辨一种分析物

给分辨一种分析物的选择性条件增加新的结合或洗脱特性可以形成分辨分析物更好的选择性条件。在该实施例中,样品与 Cu(II)吸附剂结合,并与第一和第二洗脱剂接触。第二洗脱剂与第一洗脱剂的区别在于增加了另一洗脱条件。每一种新加的条件都改善对分析物的分辨。

在 10%乙二醇中制备的嗜血杆菌(*Hemophilus*)野生型稳定期裂解液以 1:1 稀释在 20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, pH7.0 中。离心后,取一份 150 μ l 上清液与生物处理仪中吸附剂阵列 Cu(II)部位的各位点一起孵育。低温混合 30 分钟后,除去样品。各位点用不同的裂解液洗涤。第一点用 150 μ l 20mM 磷酸钠, 0.5M 氯化钠, pH7.0 洗涤。第二点用 150 μ l Triton X100 在 20mM 磷酸钠中所成的 0.05%溶液, 0.15 M 氯化钠, pH7.0 洗涤。第三点,用 150 μ l 咪唑在 20mM 磷酸钠中所成的 100mM 溶液, 0.15 M 氯化钠, pH7.0 洗涤。每次洗涤包括洗涤溶液与各位点混合孵育 5 分钟。重复洗涤 2 次。用水洗涤各位点,去除除垢剂和缓冲液。

从生物处理仪中取出吸附剂阵列。在各点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。图 20A-20C 显示在上述 3 种洗脱条件下洗涤后,嗜血杆菌(*Hemophilus*)裂解液在吸附剂阵列 Cu(II)部位的滞留图。在 2000-18000Da 质量范围内可观察到多个峰。在图 20A 滞留图中,用“*”标记的蛋白只是一个次要组分。当选择性条件因相同的缓冲液中增加一种除垢剂(Triton X100)而改变时(图 20B),蛋白“*”的滞留比其他分析物都好,分辨得更好。当选择性条件因相同的缓冲液中增加一种亲合性取代物而改变时(图 20C),在滞留图中,蛋白“*”与其它分析物高度区分。

这种逐步鉴定更好地分辨某种分析物的选择性条件的策略可用来开发从全嗜血杆菌裂解液中逐步纯化该蛋白的方法。

IX. 分析物的差异表达：标记蛋白的开发

A. 人血清

每份 0.5 μ l 正常和疾病人血清用等体积 20mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH7.0 稀释。将各等份加在吸附剂阵列 Cu(II)部位的不同位点上。4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时后, 各位点用 2 μ l 20mM 磷酸钠, 0.5M NaCl, pH7.0 洗涤 2 次。每次洗涤都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。最后用 2 μ l 水洗涤各点, 去除残留的缓冲液。在各点加一份 0.3 μ l sinapinic 酸在 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸中所成的溶液。0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析各部位上的滞留分析物。

在图 21D 中, 疾病血清中蛋白 “*” 的量显著高于正常血清。结果显示了一种开发可用于临床诊断的疾病标记的方法。

B. 鼠尿

每份 1 μ l 正常、疾病或药物治疗过的鼠尿加在吸附剂阵列 Cu(II)部位的不同位点上。室温孵育 10 分钟后, 各点用 2 μ l 咪唑在 20mM 磷酸钠所成的 100mM 溶液, 0.15M NaCl, pH7.0 洗涤 2 次。每次洗涤都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。最后用 2 μ l 水洗涤各点, 去除残留的缓冲液。在各点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析各部位上的滞留分析物。

图 1 显示了正常(对照)、疾病和药物治疗过的鼠的尿的滞留图。发现有一种分析物在疾病鼠尿(中图)中较多, 该分析物在正常鼠尿(上图)中没有, 在药物治疗的鼠的尿中少得多(下图)。可用该分析物作为潜在的疾病标记。为了体现定量诊断试验的可行性, 计算了滞留蛋白峰的面积, 并显示在表格中。在疾病和药物治疗过的鼠的尿之间可观察到明显的量差。为了补偿实验的不稳定性使用了一个内标分析物。底下的分图显示了各鼠尿样品校正后的疾病标记峰面积(即标记峰面积除以内标峰面积)。在药物治疗后, 疾病尿液中的标记减少至少 10 倍。

C. 人尿

将常人和癌症患者的尿液以 1:2 稀释在 Triton X100 在磷酸盐缓冲液中所成的 0.01%溶液中。每份 1.5 μ l 的正常或疾病人尿加在吸附剂阵列脂肪族疏水性部位的不同位点, 这些位点预先用 0.5 μ l 异丙醇/乙腈(1:2)0.1%三氟乙酸润湿。4 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟后, 各点用 2 μ l 乙二醇在 10Mm TrisHCl 中所成的 50%溶液, 0.05M NaCl,

pH7.5 洗涤 2 次。每次洗涤都是用移液管将洗涤溶液吸进吸出 10 次。最后用 2 μ l 水洗涤各点，去除残留的乙醇和缓冲液。在各点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析各部位上的滞留分析物。

图 23A 显示了 4 名癌症患者和 1 名常人的尿液的滞留图。用乙二醇在 Tris/NaCl 缓冲液中所成 50%溶液洗涤后，有多个滞留在吸附剂阵列疏水性部位的蛋白峰。为了鉴定出可能的疾病标记，绘制了各患者以及与常人尿液之间的差异图。差异图中基线以上的各条柱代表分析物在患者尿液中存在更多。(图 23B-23D)。患者差异图模式的变动反映了群体中的个体波动性。但是，5000Da 附近的一种分析物(以“*”标记)和 7500 Da 附近的一簇分析物被发现在所有患者中总是较多，所以，这些可鉴定为潜在疾病标记。

X. 从噬菌体展示文库中捕捉噬菌体

可用解吸谱法检测吸附于蛋白芯片表面的病毒。用抗病毒外被蛋白的抗体作为吸附剂可以捕获病毒。用作吸附剂的靶蛋白可以捕获展示抗靶蛋白单链抗体的噬菌体。

A. 吸附剂基质检测噬菌体展示的抗体的灵敏度

在 Triton X100 在 25mM HEPES 所成 0.01%溶液，pH7.4 中，连续稀释生长培养基中的 M13 噬菌体(10^{12} 粒/ml)。每份 0.25 μ l 的稀释噬菌体悬浮液加到吸附剂阵列脂肪族疏水性部位的位点上。加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 CHCA 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析样品。

在阵列上，可以高灵敏度地检测到 M13 噬菌体基因 VIII 蛋白。图 24A-24E。当噬菌体悬浮液稀释 10,000,000 倍时可以获得可测信号(信号/干扰 \geq 2)。

B. 用吸附剂阵列鉴定 M13 噬菌体

将兔抗 M13 抗体(Strategene)固定在蛋白 A Hyper D(BioSeptra)上，用 pH7.0 的磷酸盐缓冲液彻底洗涤。每份 1-10 μ l M13 噬菌体生长培养基悬浮液(10^{12} 颗粒/ml)与每份 1 μ l 的固定化抗 M13 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育通宵。用 0.05%的 Tween20 pH7.0 磷酸盐缓冲液溶液洗涤，然后用水洗去除垢剂和缓冲液，在 sinapinic 酸存在下，用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析每份捕获的噬菌体。

抗 M13 抗体对照只显示抗体信号(单一和双电荷)。图 25A。当 M13 噬菌体

被抗体捕获,最容易鉴定的噬菌体蛋白峰是基因 VIII 蛋白和与单链抗体融合的基因 VIII 蛋白。图 25B。因为本方法以高度灵敏度检测到了 M13 噬菌体基因 VIII 蛋白,所以它可以用作捕捉噬菌体的灵敏检测剂。

C. 特异性捕捉展示单链抗体的 M13 噬菌体

HIV-1 Tat 蛋白(McKesson BioServices)与预先活化的基质偶合。用乙醇胺封闭后,先后用 0.005%的 Tween20 pH7 磷酸盐缓冲液溶液,和 0.1%BSA pH7 磷酸盐缓冲液溶液洗涤。展示抗 Tat 蛋白单链抗体的 M13 噬菌体系列稀释液与 Tat 蛋白吸附剂阵列 4℃孵育通宵。阴性对照,即不展示抗 Tat 蛋白单链抗体的 M13 噬菌体系列稀释液也与 Tat 蛋白吸附剂阵列同法孵育。依次用 0.05%的 Tween20 磷酸盐缓冲液溶液,1M 的尿素 pH7 磷酸盐缓冲液溶液洗涤阵列,最后用水洗去缓冲液和尿素。加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈和 0.5%三氟乙酸配成的 CHCA 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析滞留的噬菌体。

可以观察到展示抗 Tat 蛋白单链抗体的 M13 噬菌体的特异性结合呈浓度依赖方式(实线)。图 26A-26D。非特异性 M13 噬菌体在吸附剂阵列上的非特异性结合极小(虚线)。这证明了一种检测噬菌体的高灵敏度方法,所述的噬菌体包含编码特异性识别靶分析物的单链抗体的基因。

XI. 筛选测定化合物是否抑制受体与配体间的结合

本发明方法可用来测定某测试物质是否调节配体与受体的结合。在该实施例中,我们证明滞留层析能够检测游离 TGF- β 受体对于 TGF- β 与结合的 TGF- β 受体(作为吸附剂)结合的抑制作用。

TGF- β 重组受体-Fc 融合蛋白(R&D, Minnesota)特异性地结合在蛋白 G 吸附剂阵列上。将 TGF- β (R&D, Minnesota)以细胞条件培养基(2.5 倍浓缩)连续稀释,与受体-Fc 蛋白 G 吸附剂阵列 4℃孵育通宵。另一组 TGF- β 以细胞条件培养基连续稀释液在调节剂存在下与受体-Fc 蛋白 G 吸附剂阵列一起孵育。此处的调节剂是游离 TGF- β 受体。相同条件孵育后,先后用 0.05% Triton X100 的 PBS 溶液和 3M 尿素 PBS 溶液洗涤芯片。在各位点加每份 0.3 μ l sinapic 酸,并用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析。

图 27A 显示 1 μ g/ml TGF- β 特异性结合受体-Fc 蛋白 G 吸附剂阵列(实线)。细胞条件培养基中没有发现有蛋白质结合。图 27B 显示 100ng/ml TGF- β 特异性结合受体-Fc 蛋白 G 吸附剂阵列(实线)。当 TGF- β 与受体-Fc 蛋白 G 吸附剂阵列在调节

剂(游离 TGF- β 受体)存在下孵育时, 100ng/ml TGF- β 时的吸附完全消除(图 27A, 虚线), 1 μ g/ml TGF- β 时只有微量结合(图 27B, 虚线)。在此, 调节剂(同一受体)对配体具有高度特异性结合亲和力, 所以高效竞争靶分析物的结合。在其它时候, 有和没有调节剂时结合于吸附剂的靶分析物之比体现调节剂的效率。

XII. 滞留层析的分辨能力

本实施例证明滞留层析通过不同选择性条件下的并行处理分辨样品中蛋白质的能力。

在 10%乙二醇中制备嗜血杆菌流感裂解液。离心后, 将上清液以 1:3 稀释在 Triton X100 在 25mM HEPES 中所成的 0.01%溶液, pH7.4 中。将每份 2 μ l 稀释样品加到吸附剂阵列阳离子部位的一位点上。室温孵育 30 分钟后, 用 25mM HEPES, pH7.4 洗涤位点。另一份 2 μ l 稀释样品加到吸附剂阵列脂肪族疏水性部位的一位点上。室温孵育 30 分钟后, 用水洗涤位点。第三份 2 μ l 稀释样品加到吸附剂阵列 Cu(II)部位的一位点上。室温孵育 30 分钟后, 用 0.05%的 Triton X100 pH7.4 磷酸盐缓冲液溶液洗涤。在各位点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈 0.5%三氟乙酸中配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析各位点上滞留的分析物。

结果显示在图 28-31 中。滞留分析物总计约 550。结果证明了一种组合性分离方法, 包括并行分离和检测多种分析物。

XIII. 依次组装多聚结构

本实施例说明在初始吸附剂上构建第二吸附剂的方法。然后, 第二吸附剂可以作为靶分析物的特异性吸附剂。

将 GST 融合受体稀释于 20mM Tris, 100mM 氯化钠, 0.4%NP40, pH7.2 中, 取一份 0.5 μ l 加到吸附剂阵列正常相部位的一位点上。任溶液在此位点上浓缩到接近干燥。位点用 2 μ l 10mM Tris, 50mM 氯化钠, pH7.2 洗涤 3 次。每次洗涤将洗涤溶液吸进吸出 5 次。各位点最后用水洗涤 2 次去除残留缓冲液。在各位点加一份 0.3 μ l 以 50%乙腈 0.5%三氟乙酸中配成的 sinapinic 酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析各位点上滞留的分析物。(图 32)。

将 GST 融合受体溶于 20mM Tris, 100mM 氯化钠, 0.4%NP40, pH7.2, 取一份 0.5 μ l 加到吸附剂阵列正常相部位的一位点上。将只含 GST(没有受体)蛋白的样品加到另一个位点作为阴性对照。任溶液在此位点上浓缩到接近干燥。在各位

点加 0.5 mM Tris, 50mM 氯化钠, pH7.2。室温静置 10 秒后去除溶液。

立即在各位点加 1 μ l 含有文库(另有 96 种其它配体)中一种特异性配体溶液。吸附剂阵列在湿润的培养箱中室温孵育 1 小时。各点用 2 μ l 异丙醇:乙腈(1:2)的 30%水溶液洗涤两次。每次洗涤将洗涤溶液吸进吸出 10 次。在各点加 0.3 μ l 以 50%乙腈 0.5%三氟乙酸中配成的 α -氰基-4-羟基肉桂酸溶液。用激光解吸/离子化飞行时间质谱仪分析被受体捕获的配体。

图 33A 显示另含 96 种其它配体的文库中一种特异性配体与 GST 融合受体的结合, 它被吸附剂阵列的正常相部位捕获。图 33B 显示该陪同与同一阵列上作为阴性对照的纯 GST 蛋白不结合。

本发明提供了滞留层析的新材料和新方法。虽然以上给出了具体的实施例, 但这些是说明性的而不是限制性的。根据以上说明, 许多修改对本领域技术人员来说是显而易见的。所以, 本发明的范围并不限于以上说明, 相反, 它是参照后文权利要求限定的, 并包括与之对等的全部范围。

本申请对引用的全部出版物和专利文献都按照它们各自的内容进行了同等程度的全面的参考。虽然在此引用的大量文献, 但是申请人不认为任何一处参考是覆盖本发明的“现有技术”。

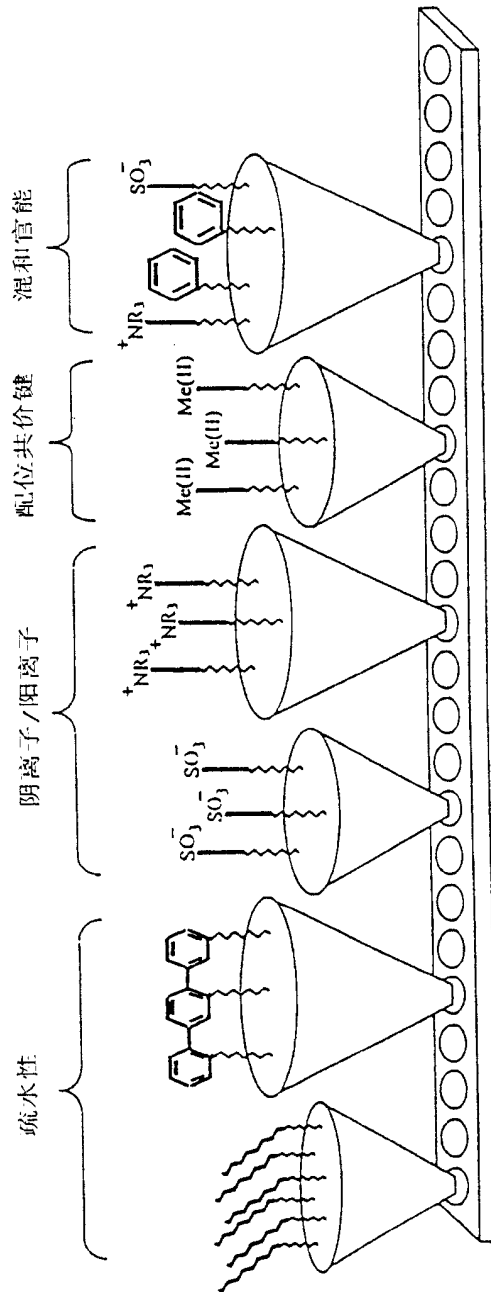


图 1

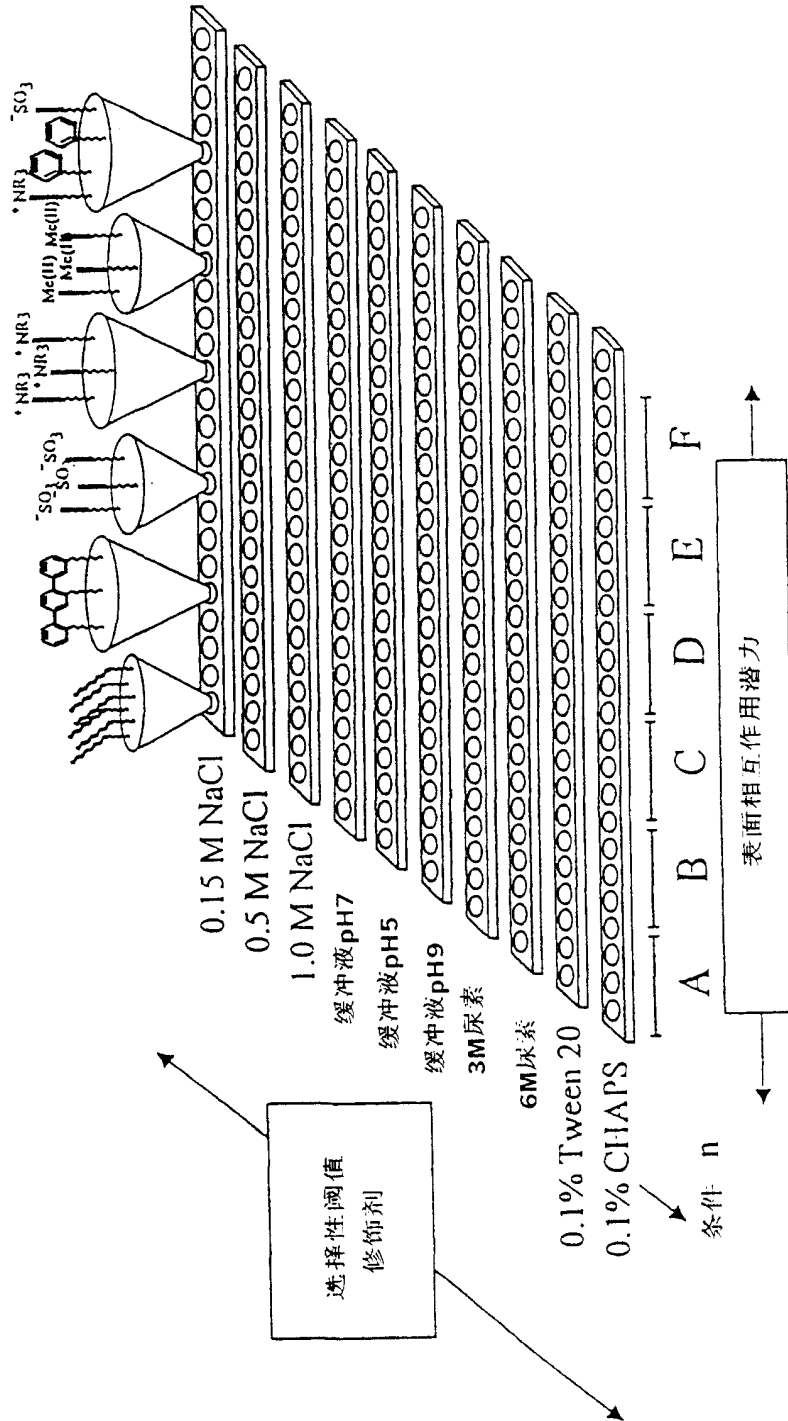
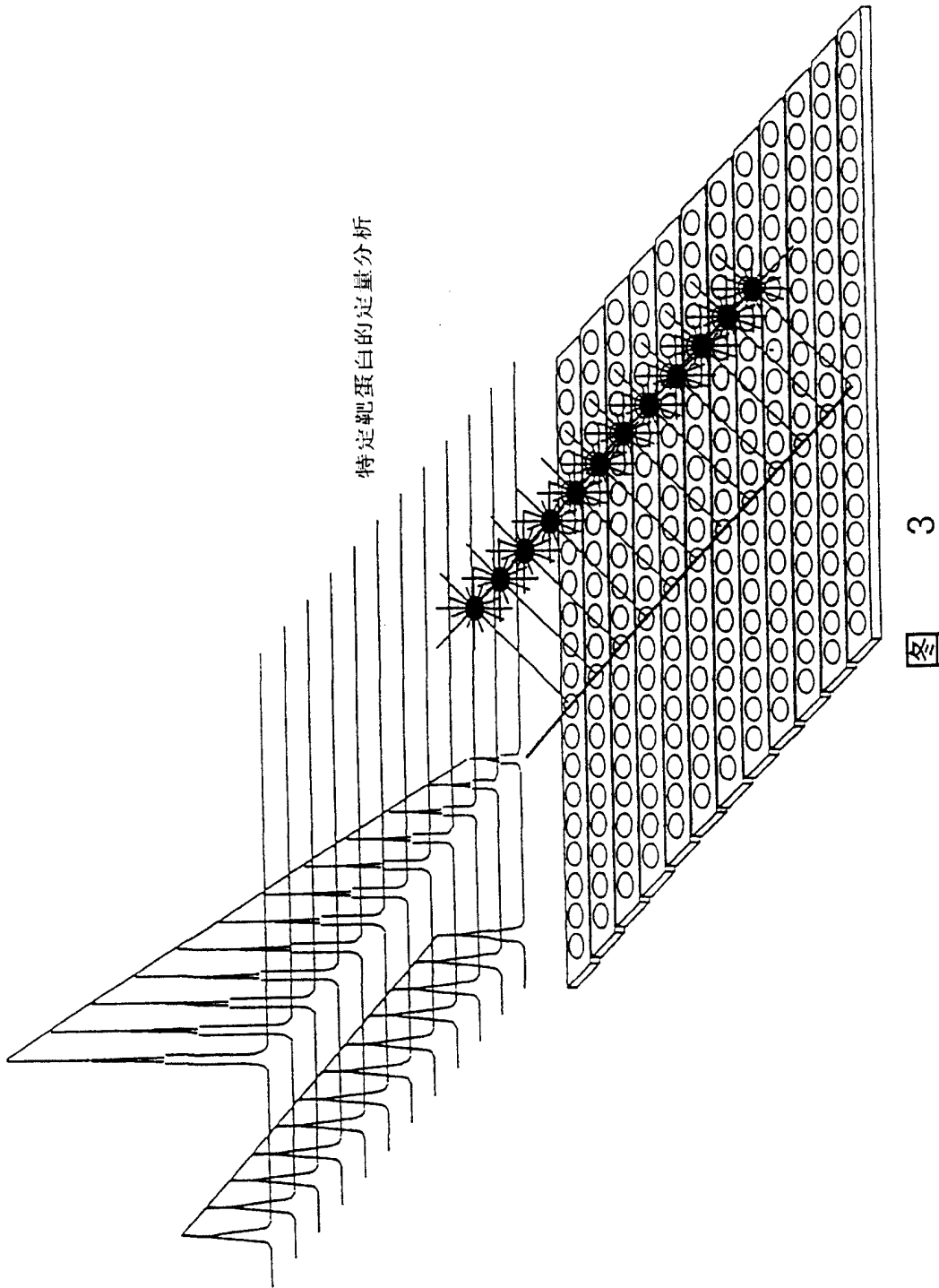


图 2



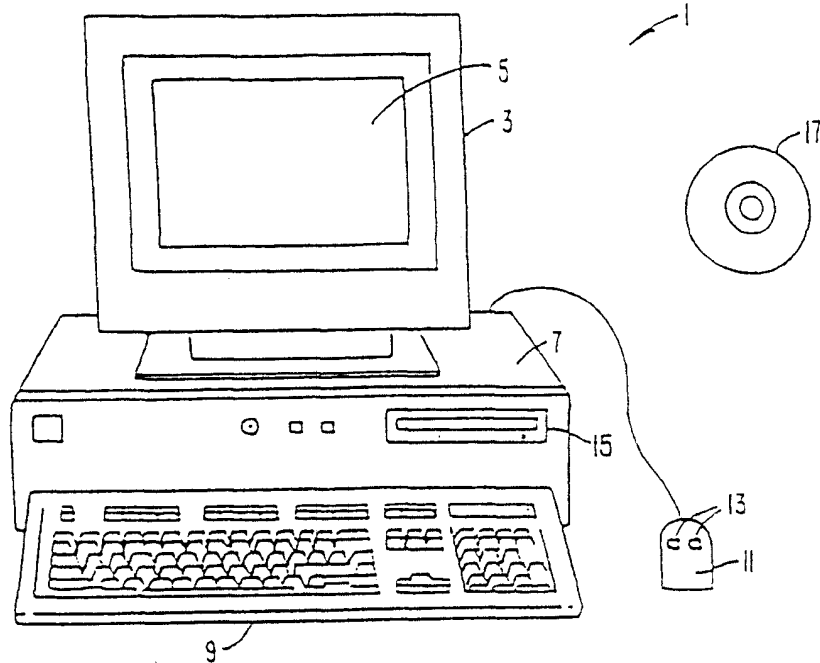


图 4A

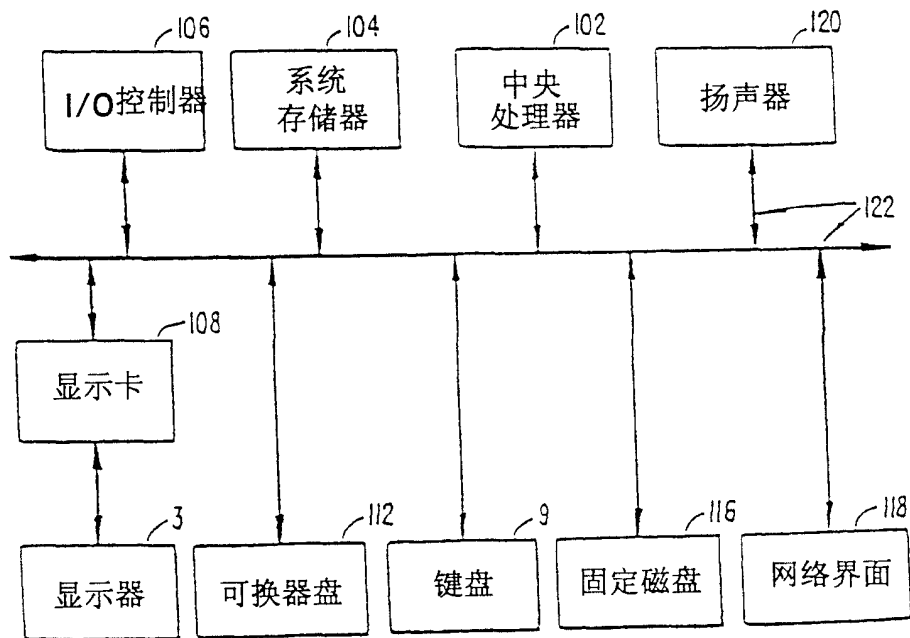


图 4B

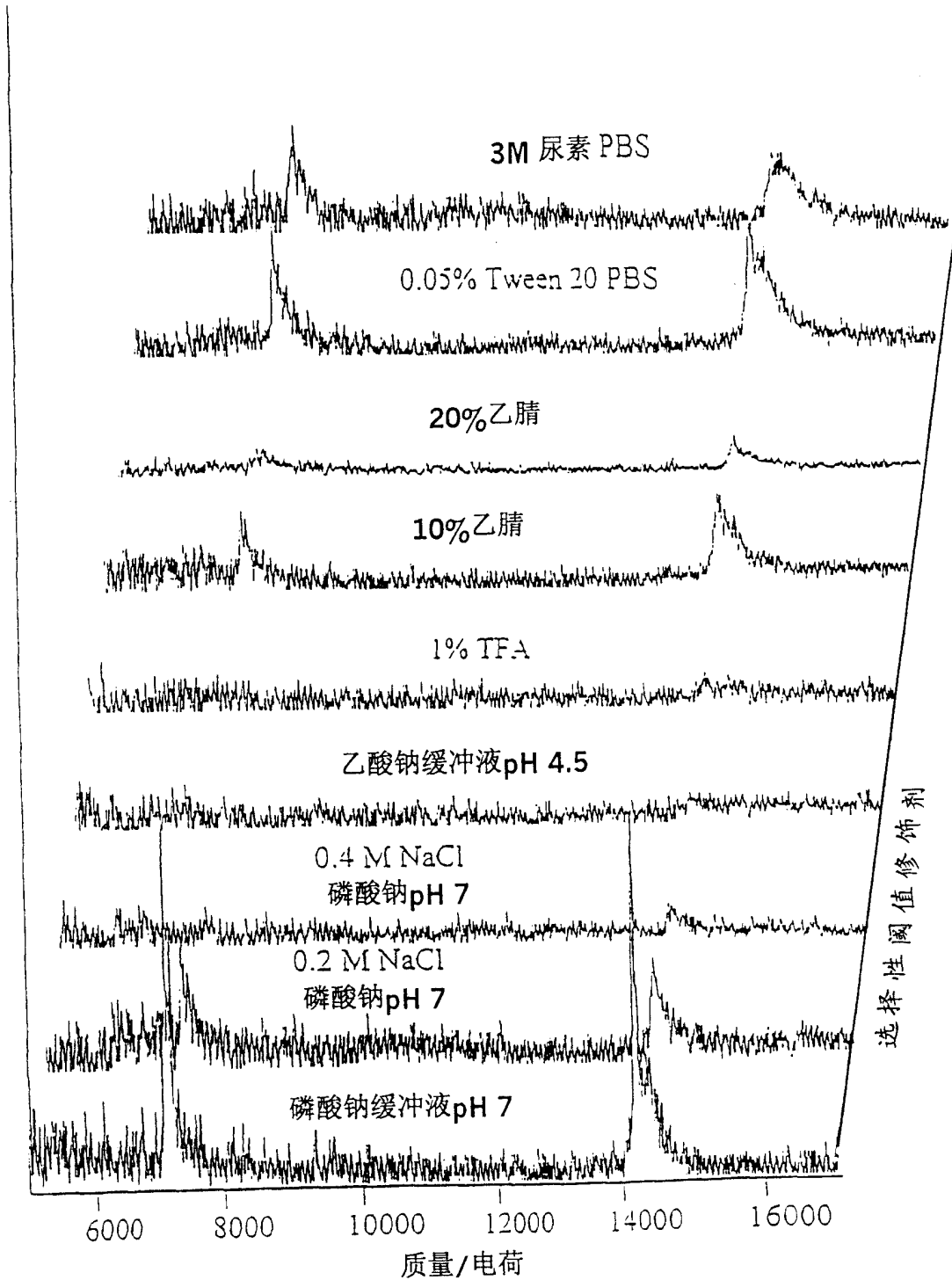


图 5A

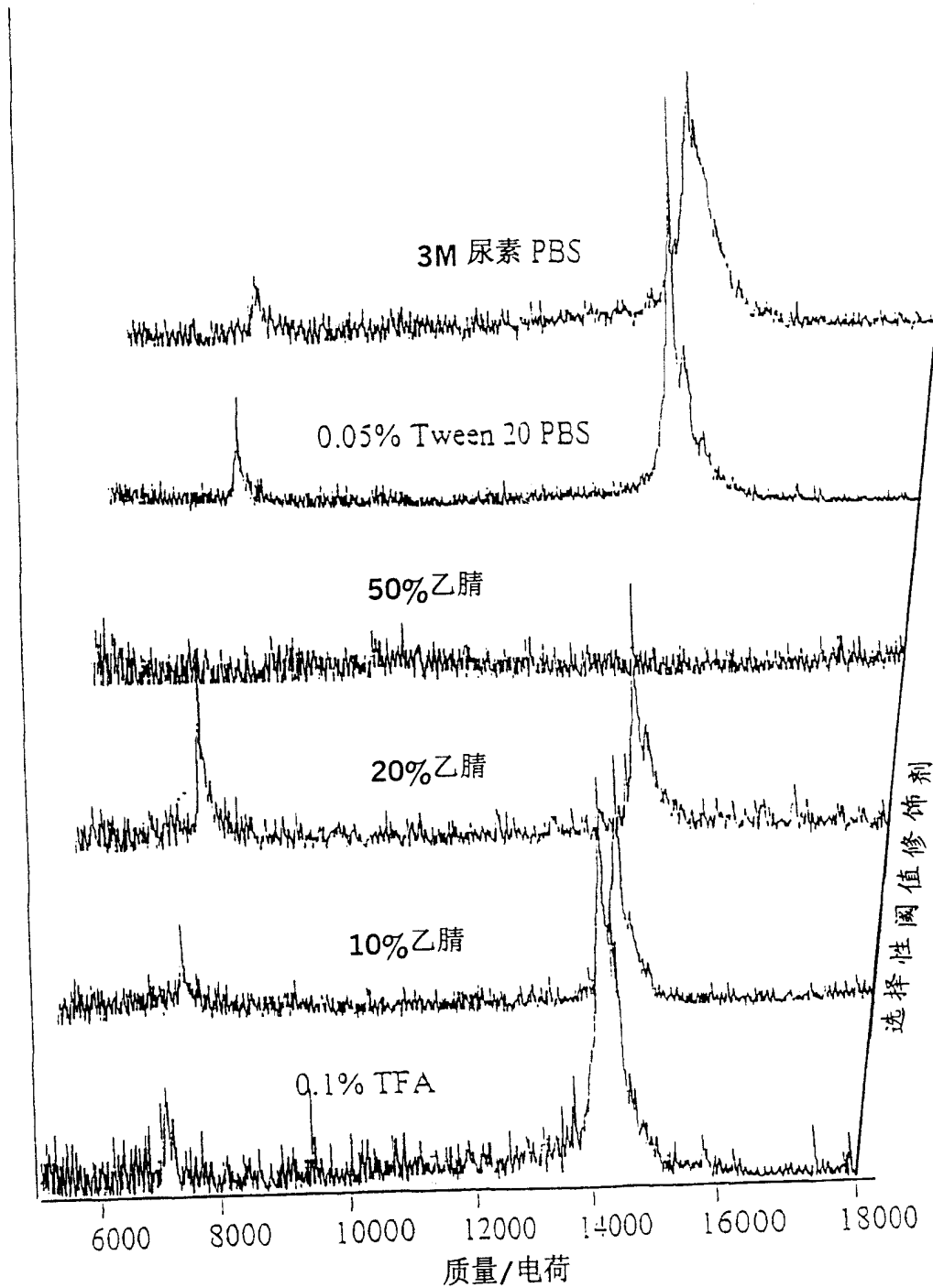


图 5B

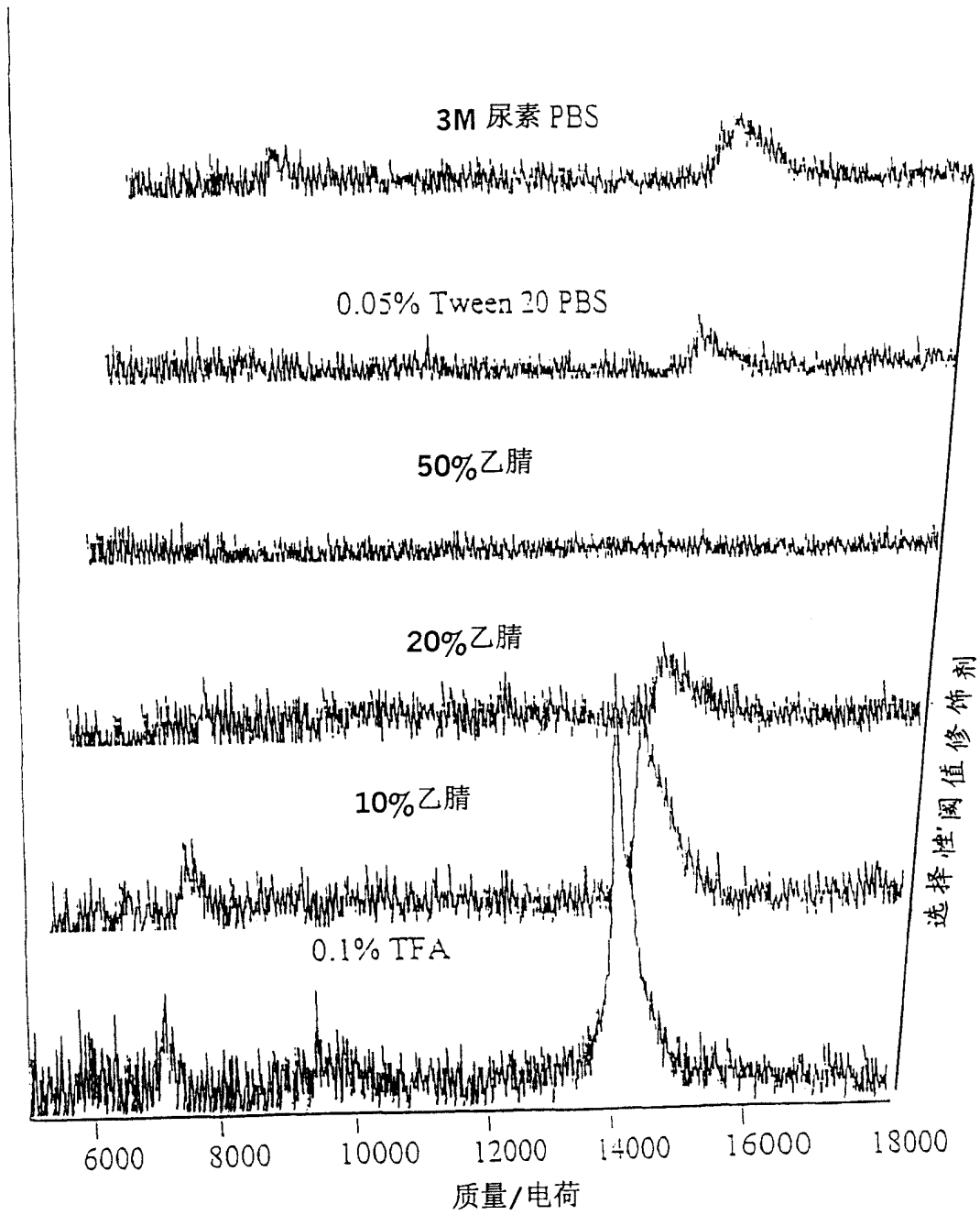


图 5C

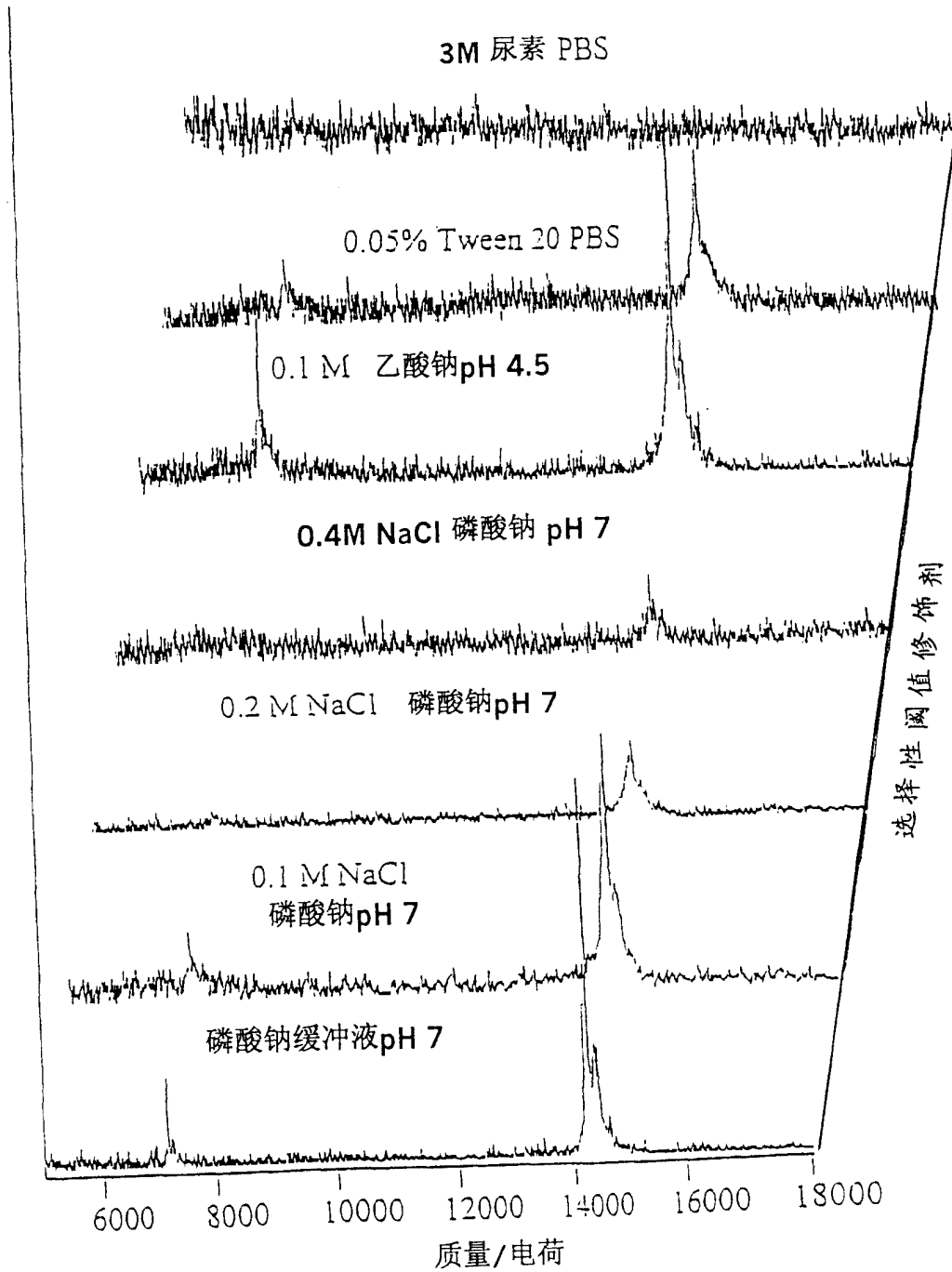


图 5D

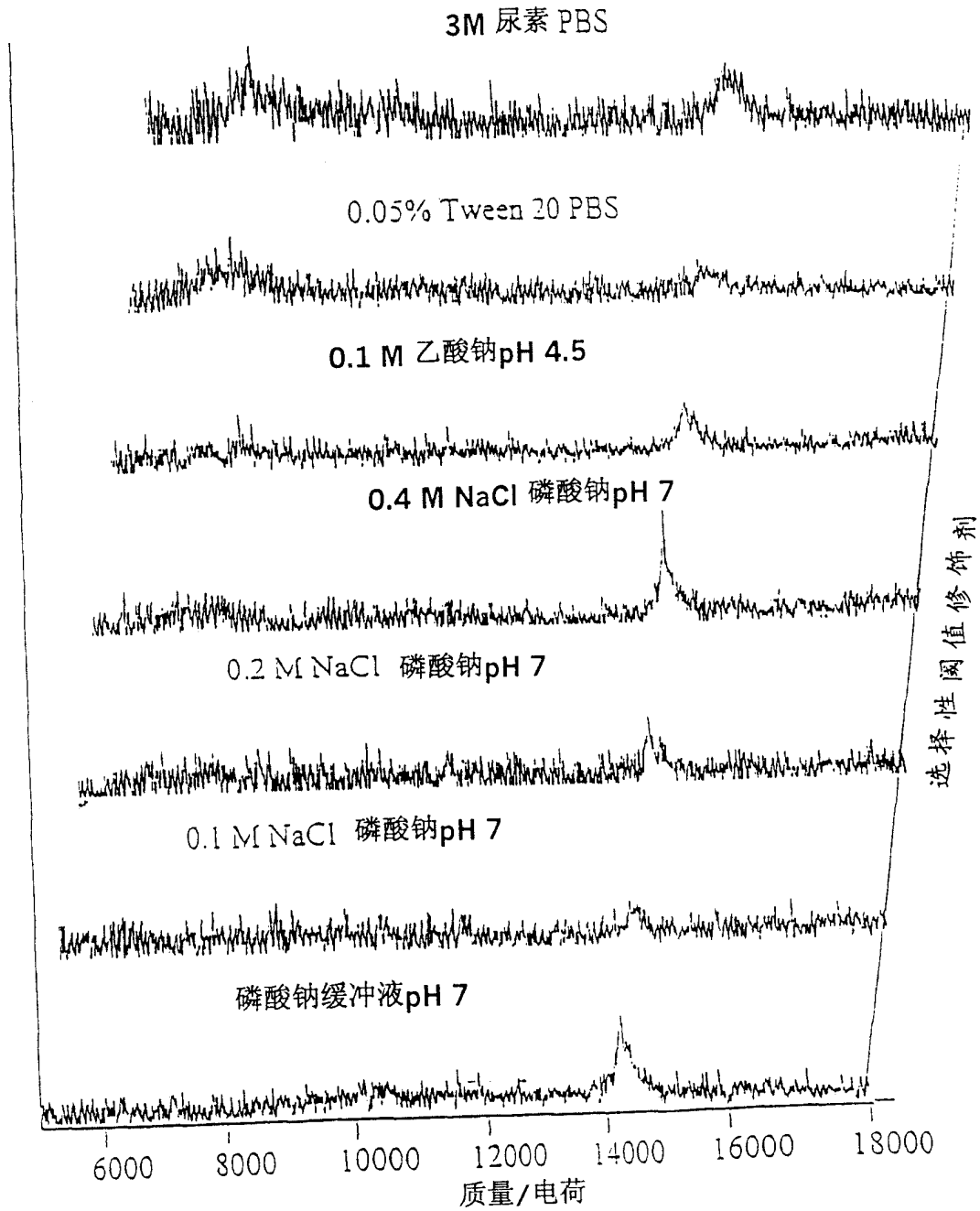


图 5E

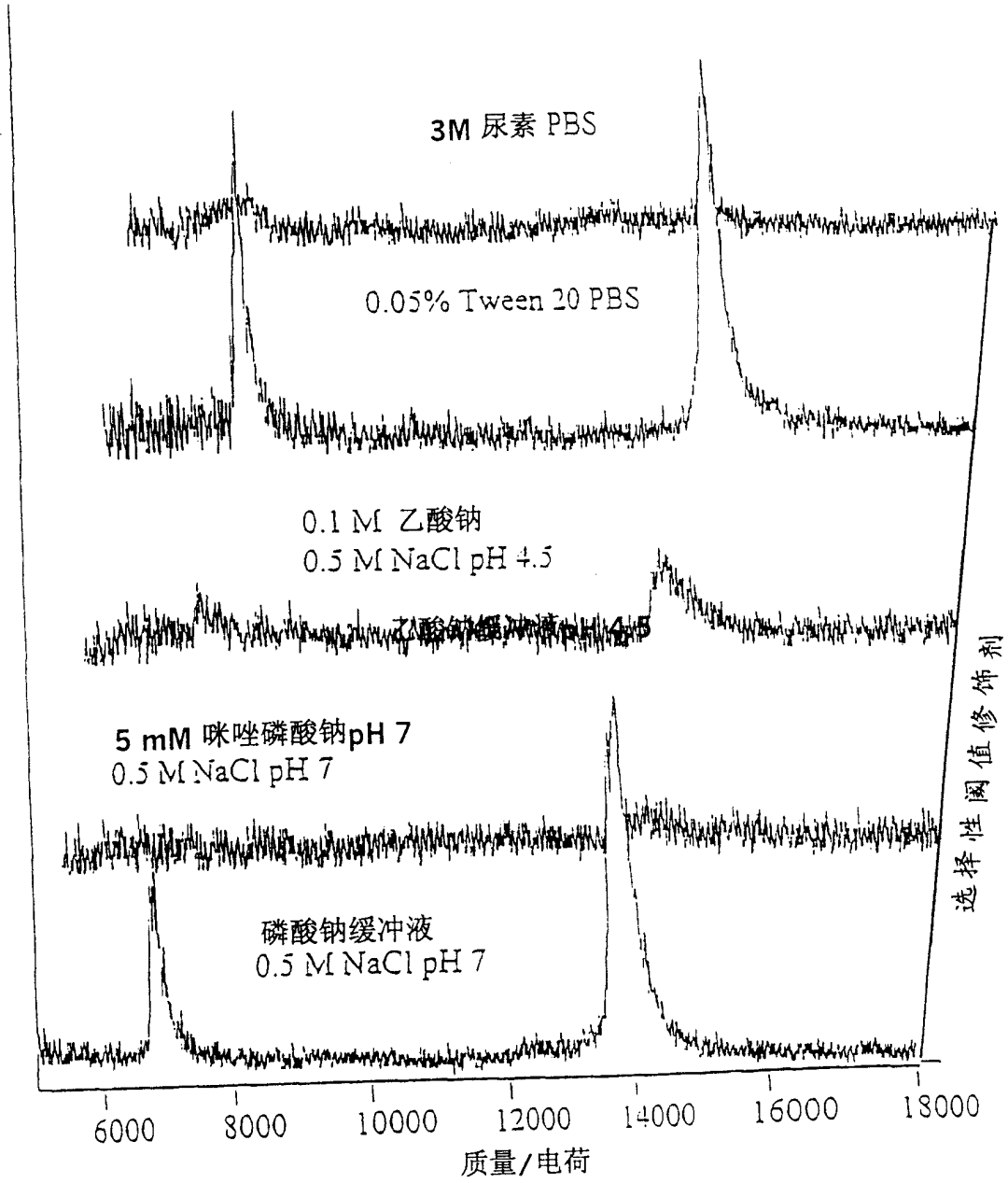


图 5F

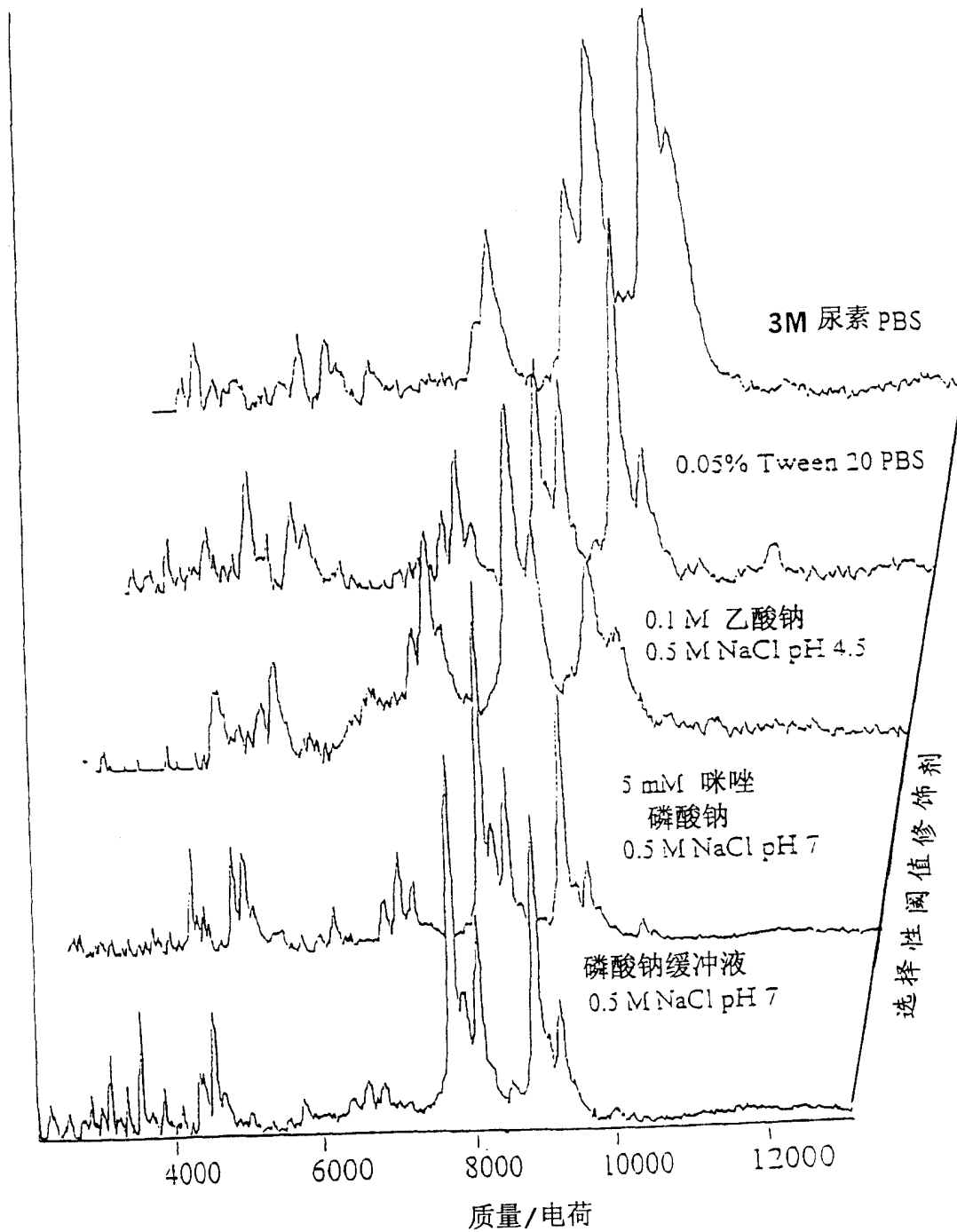


图 6A

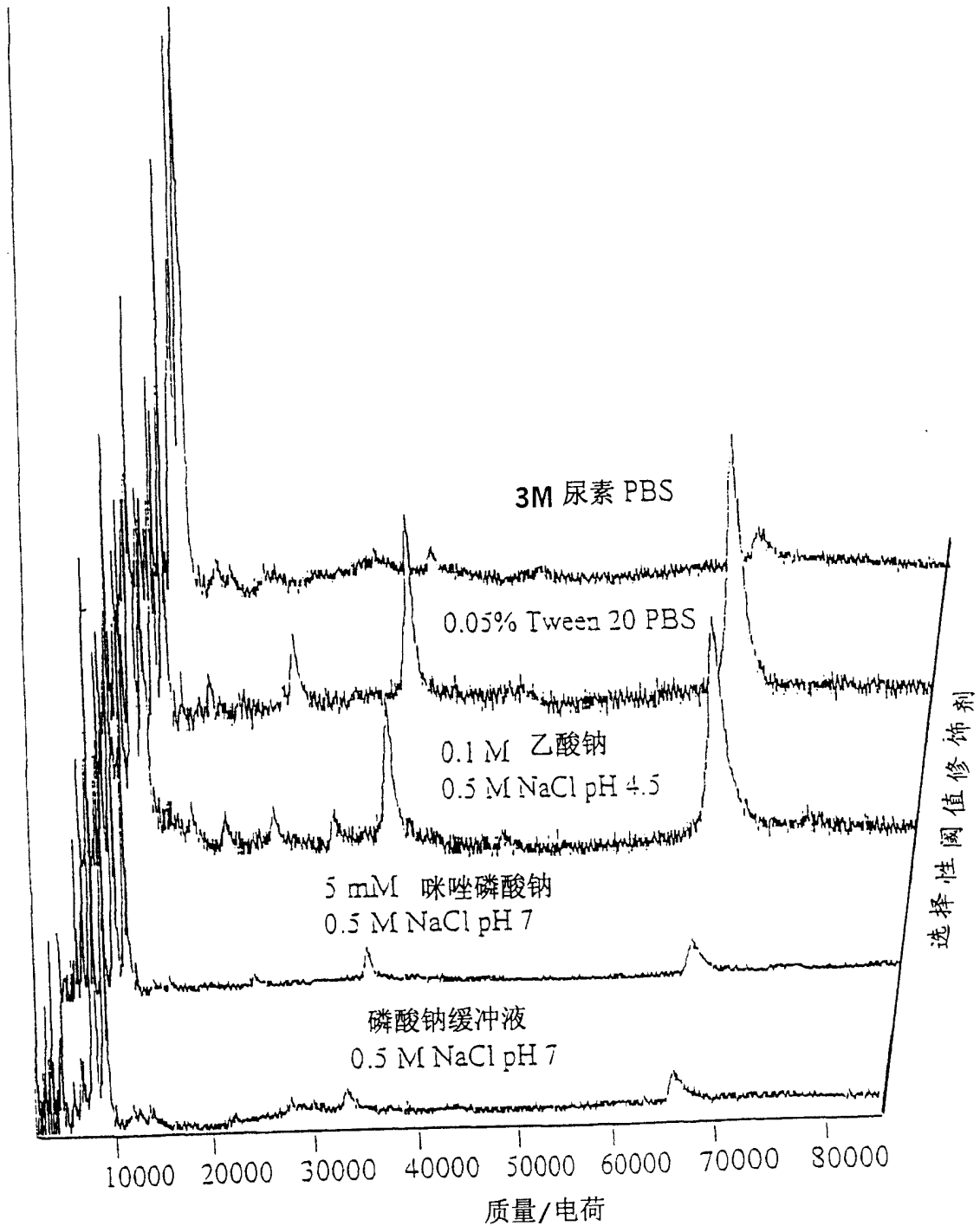


图 6B

选择性阈值修饰剂:0.05% Tween 20 PBS

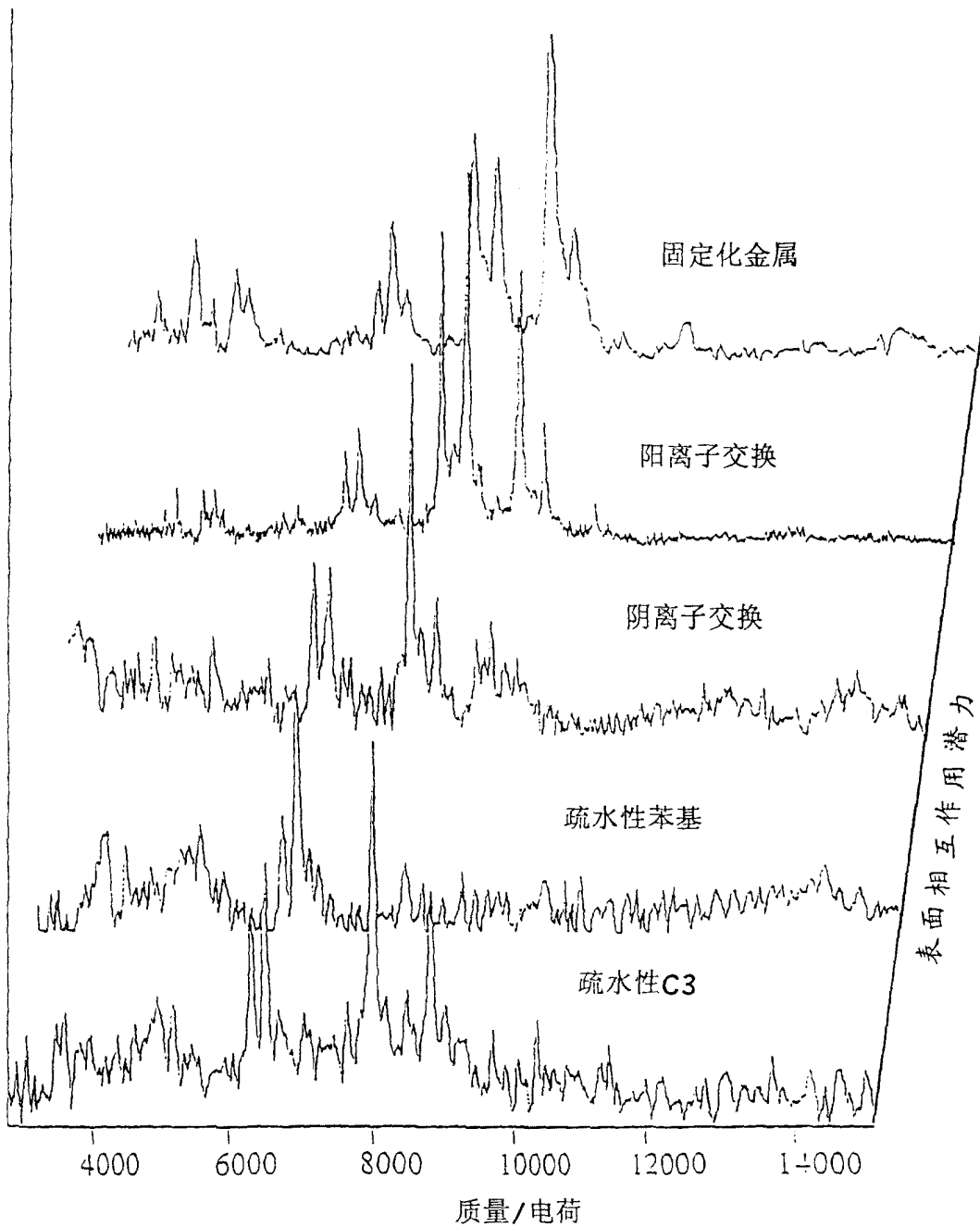


图 7A

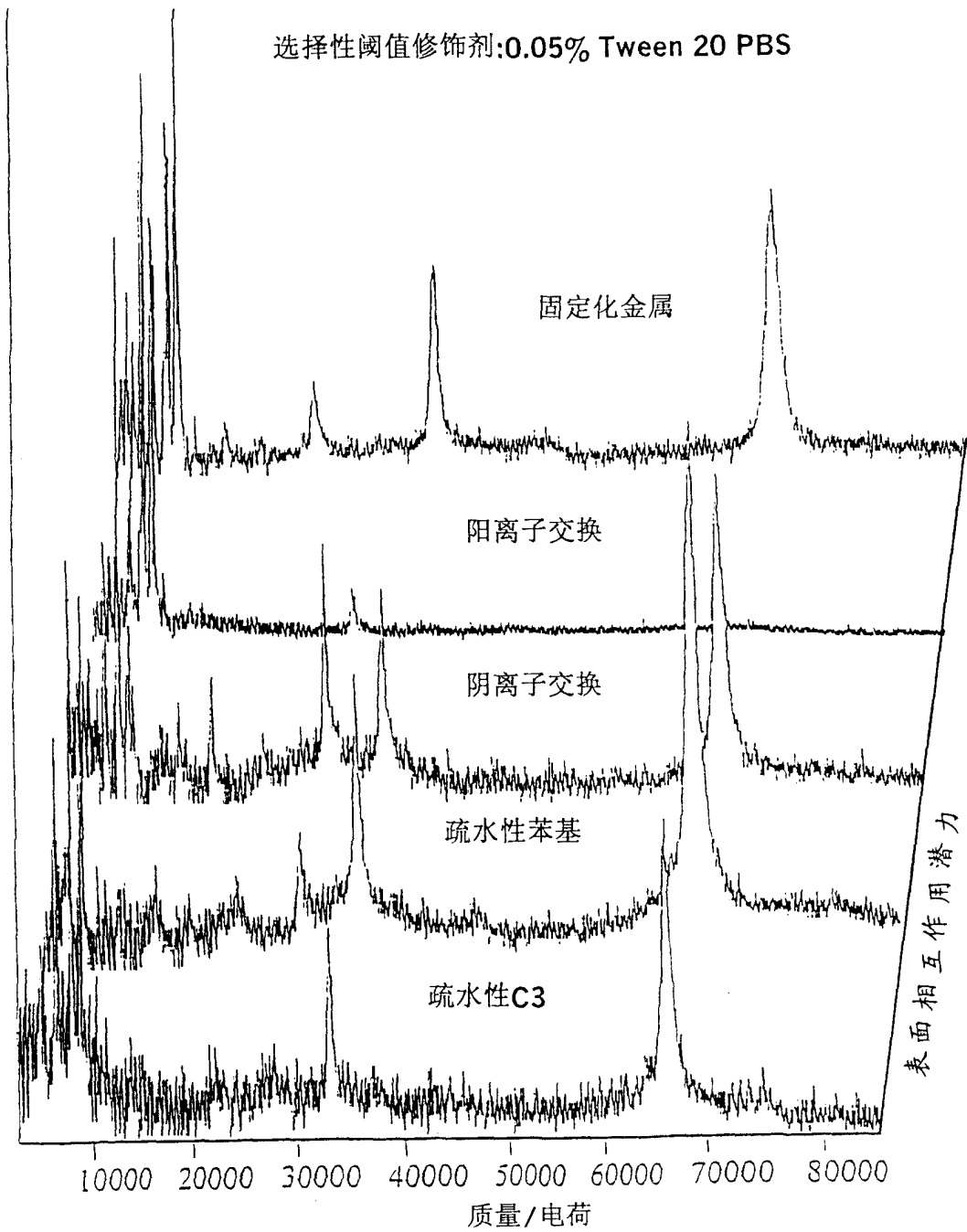


图 7B

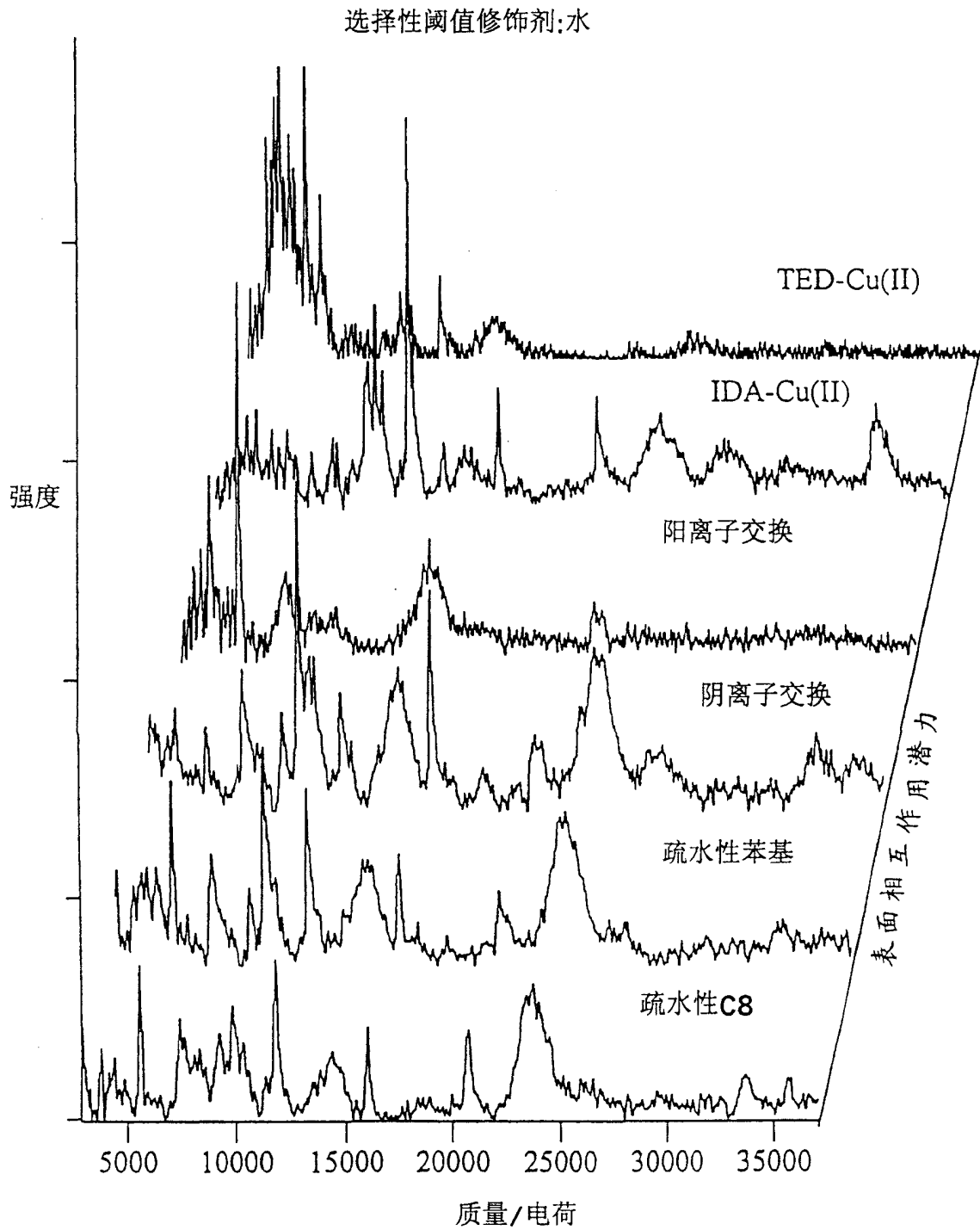


图 8A

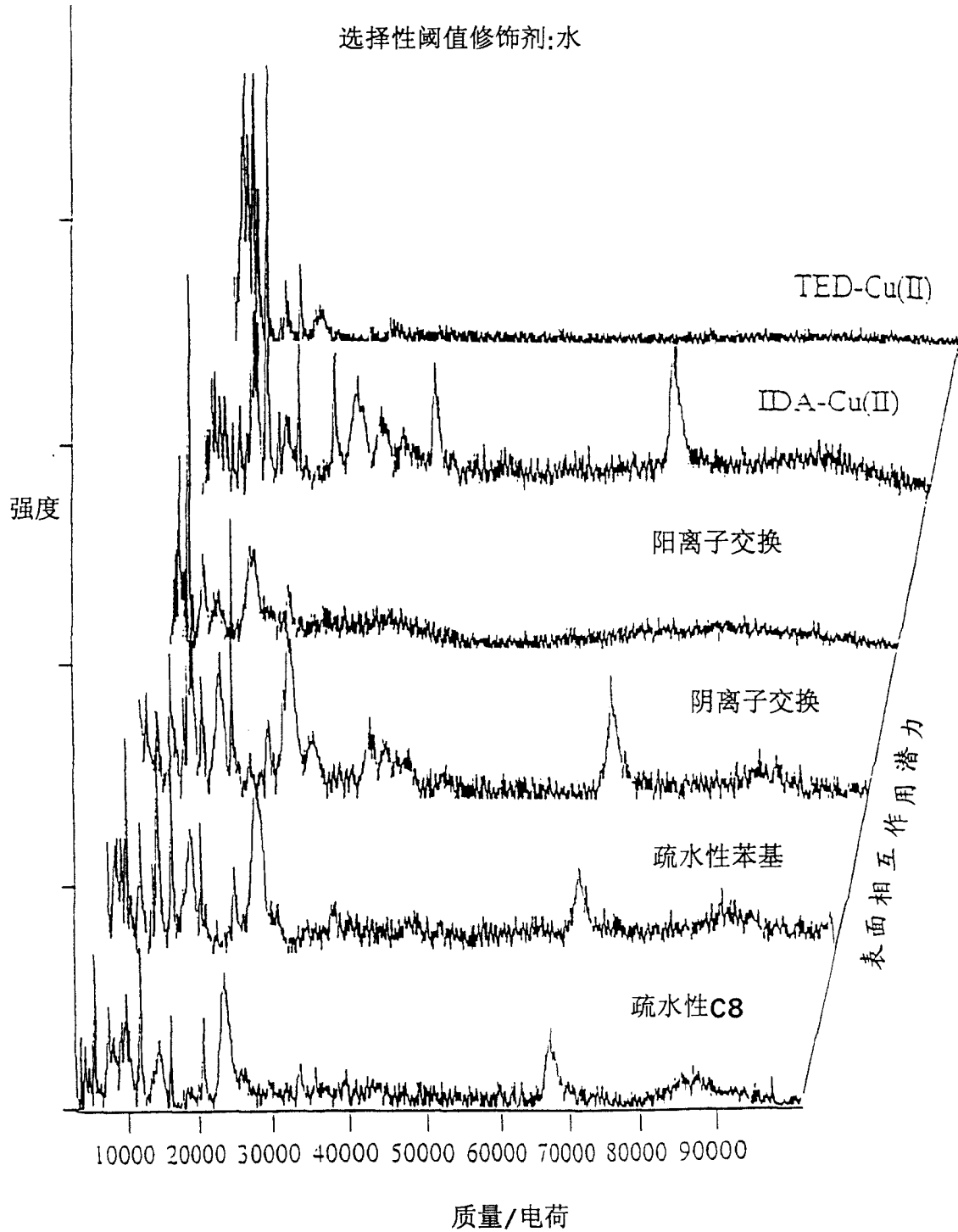


图 8B

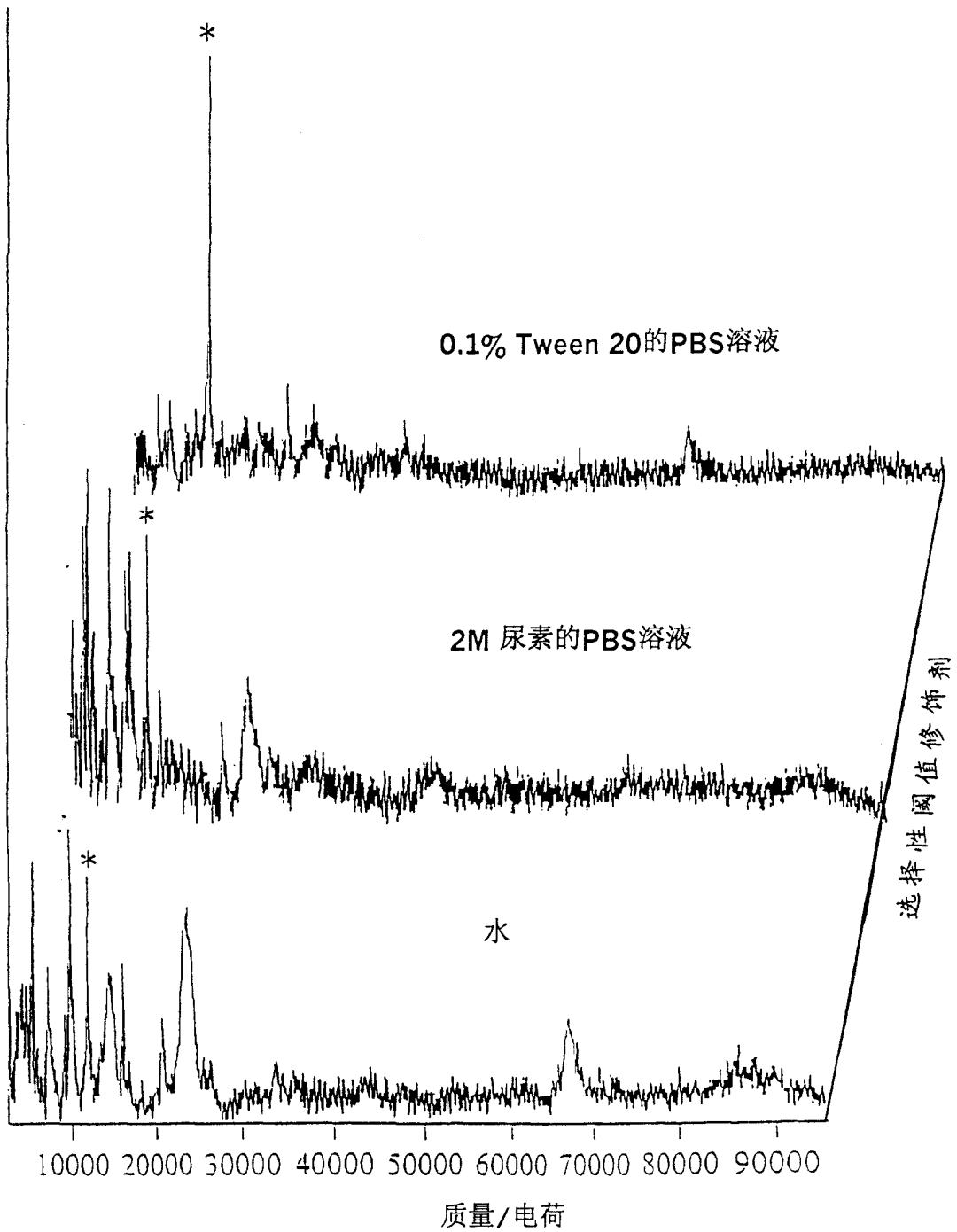


图 9

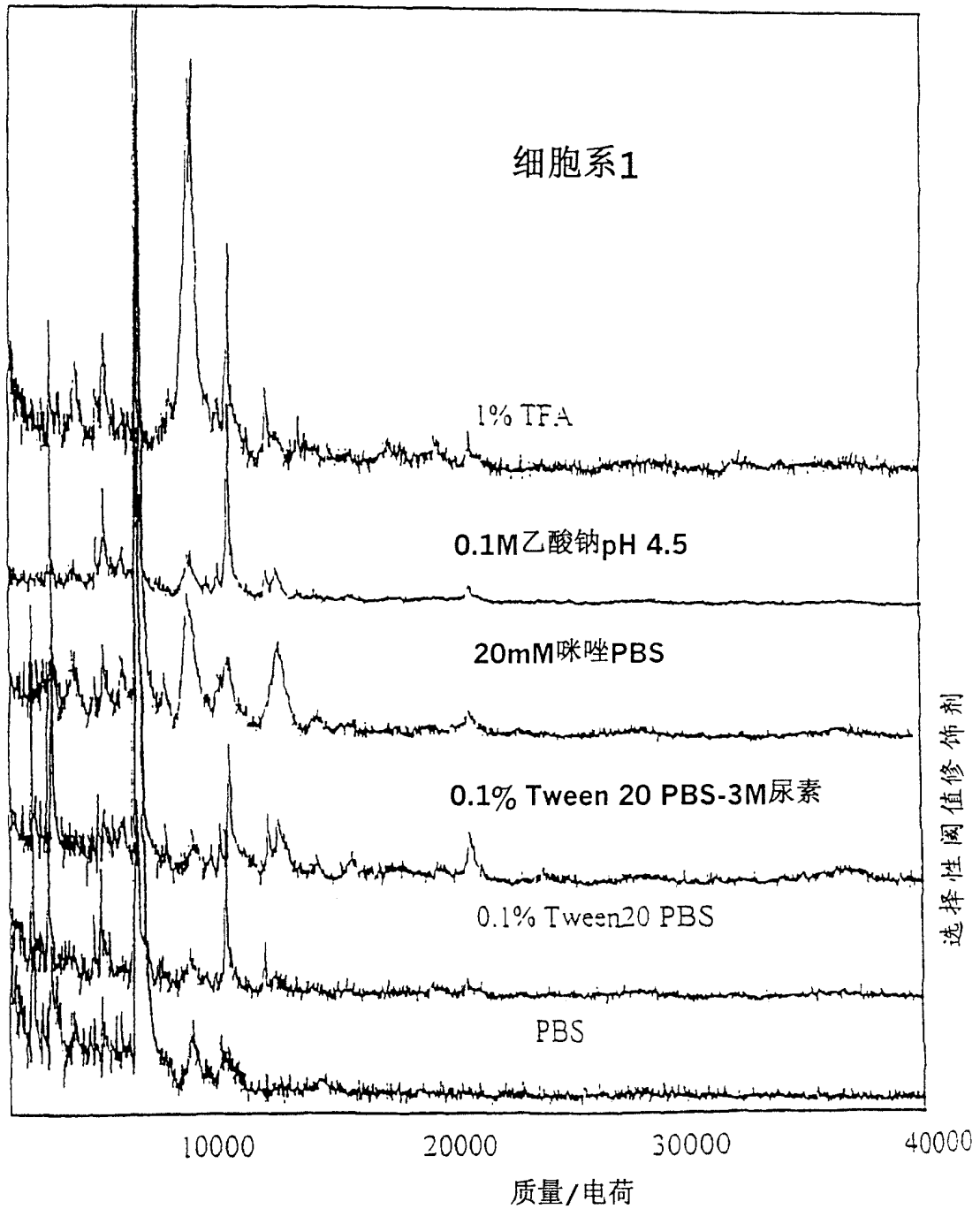


图 10A

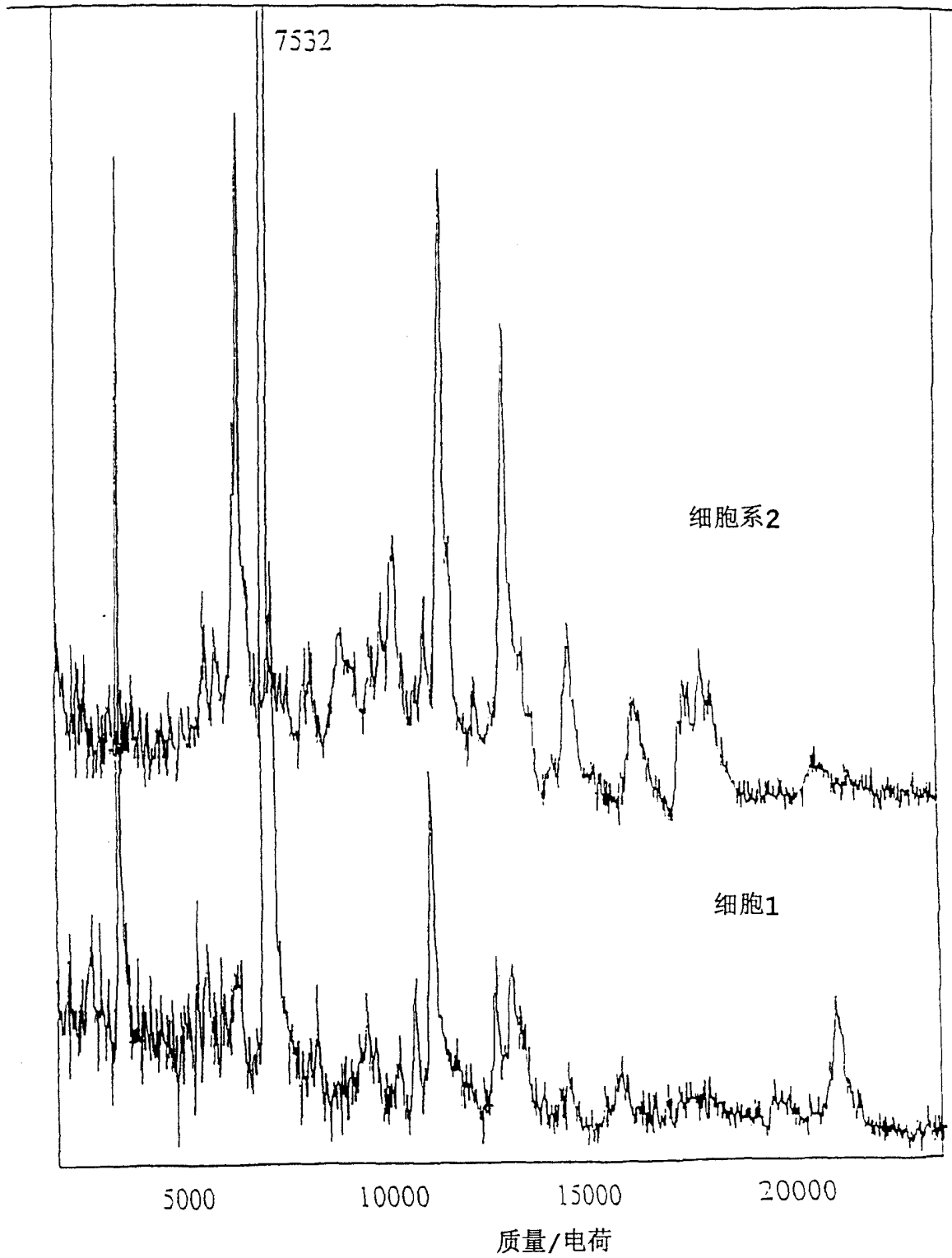


图 10B

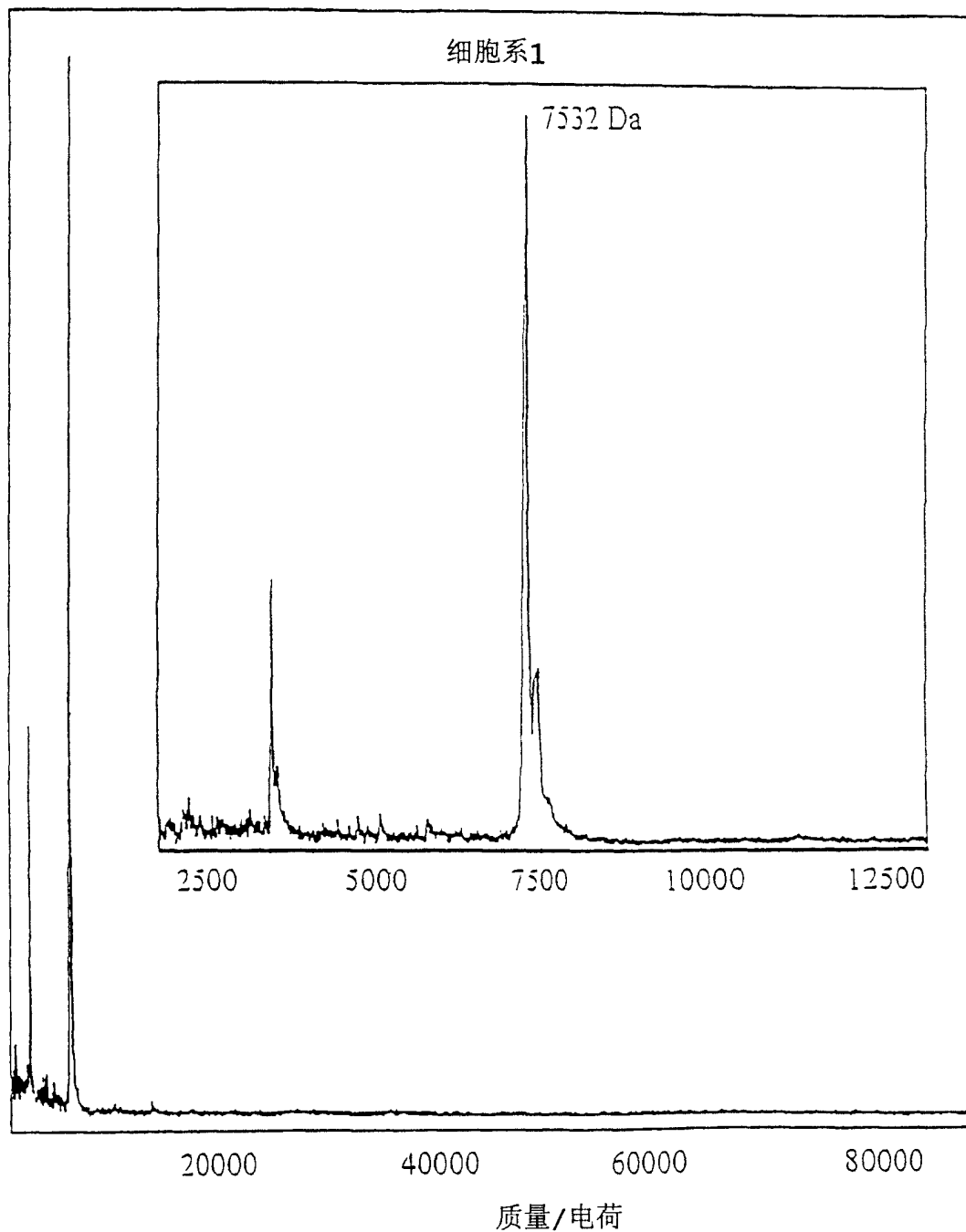


图 10C

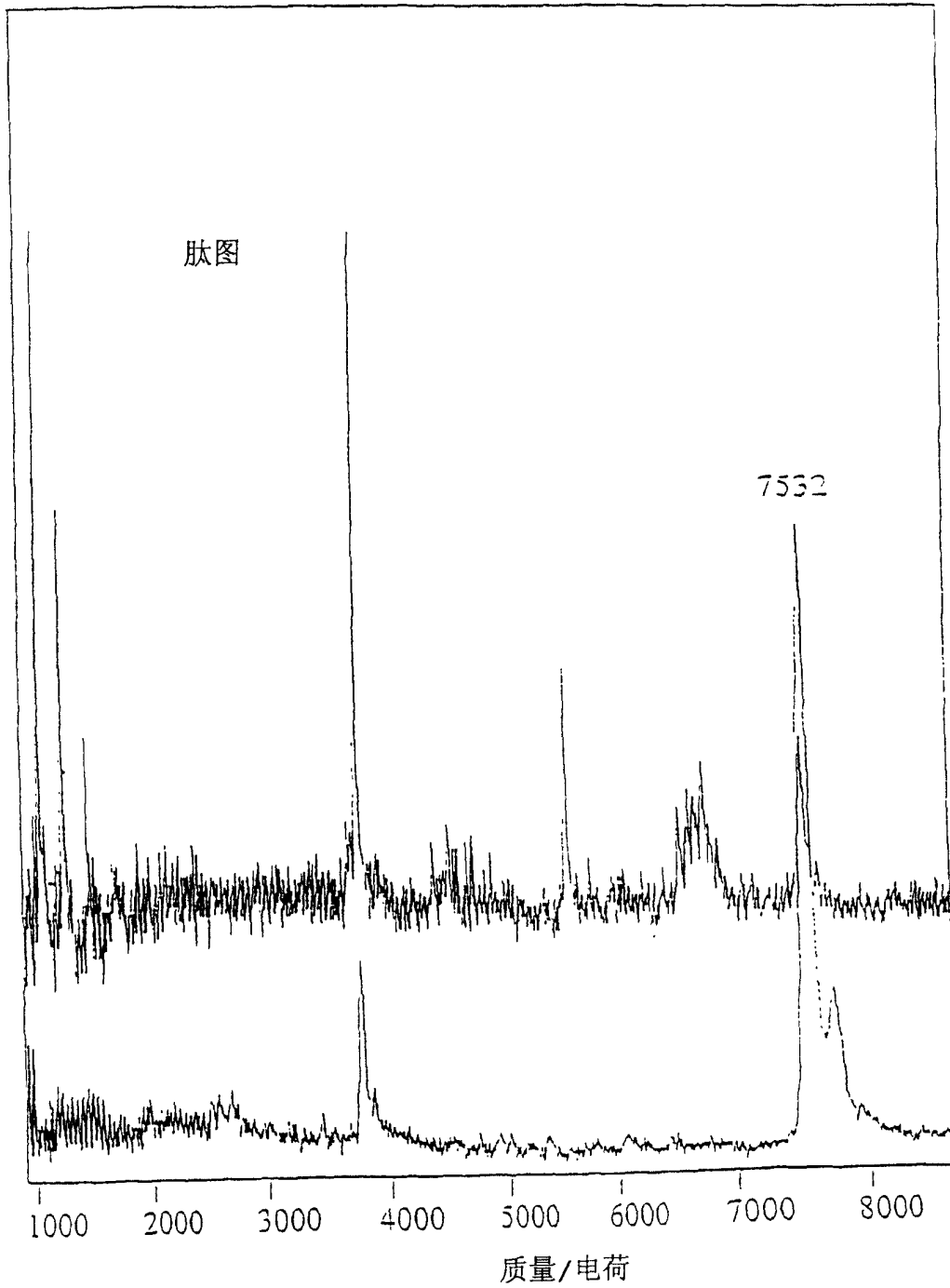


图 10D

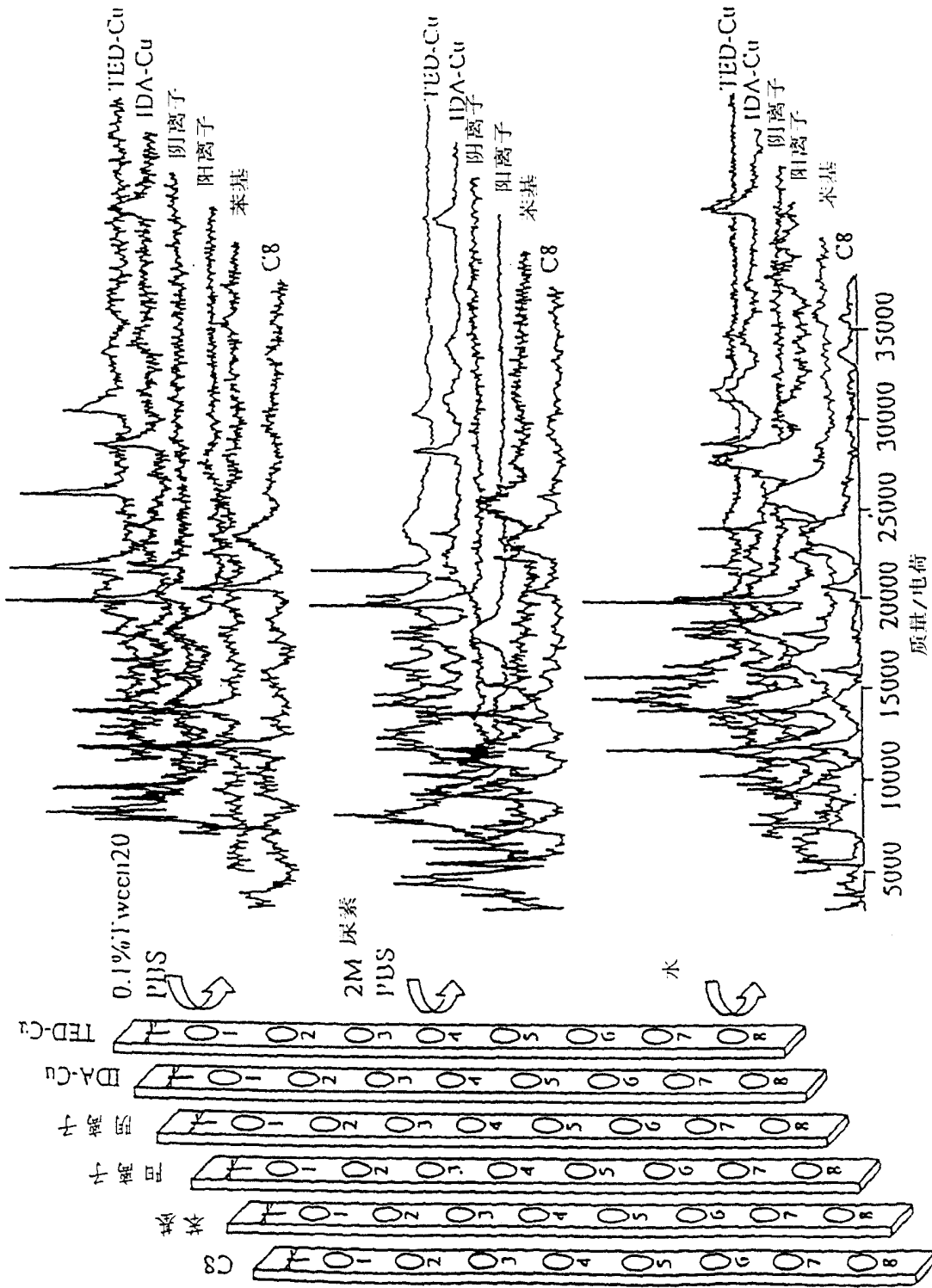
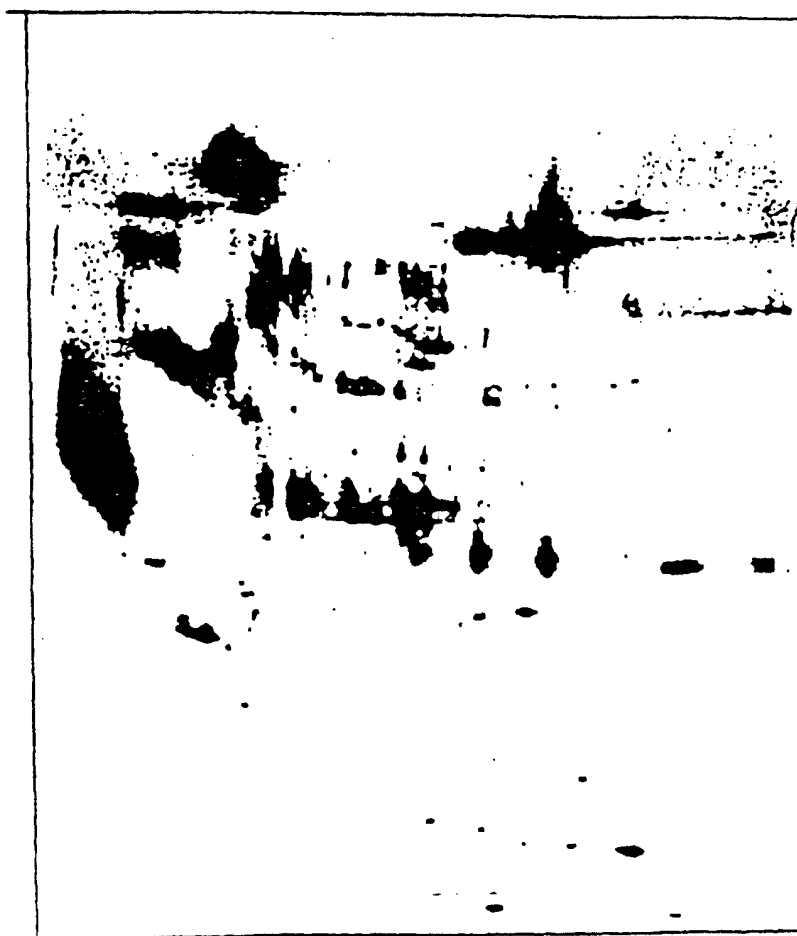


图 11

第1维：等电总聚焦



第2维：
SDS PAGE

图 12

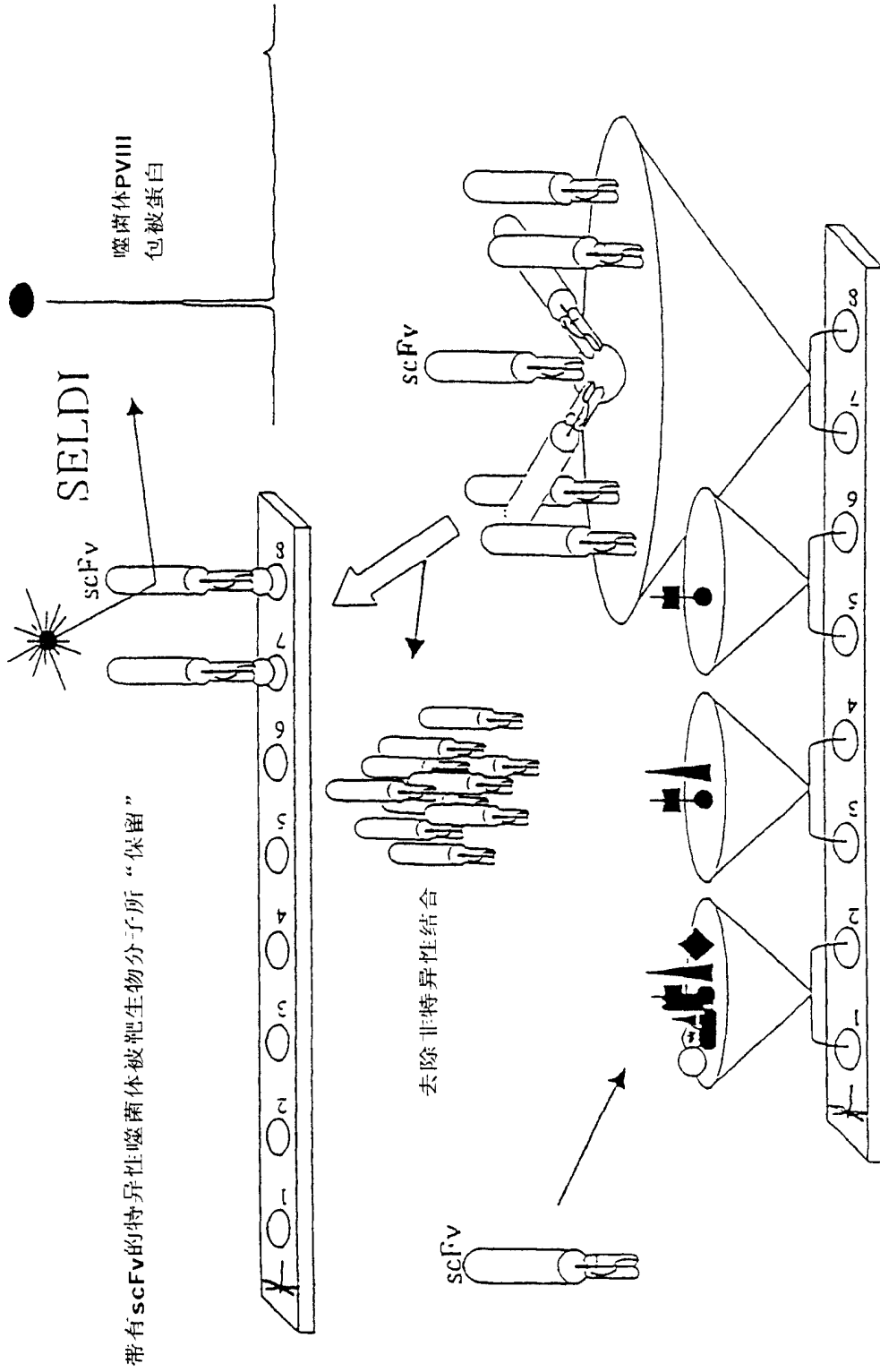


图 13

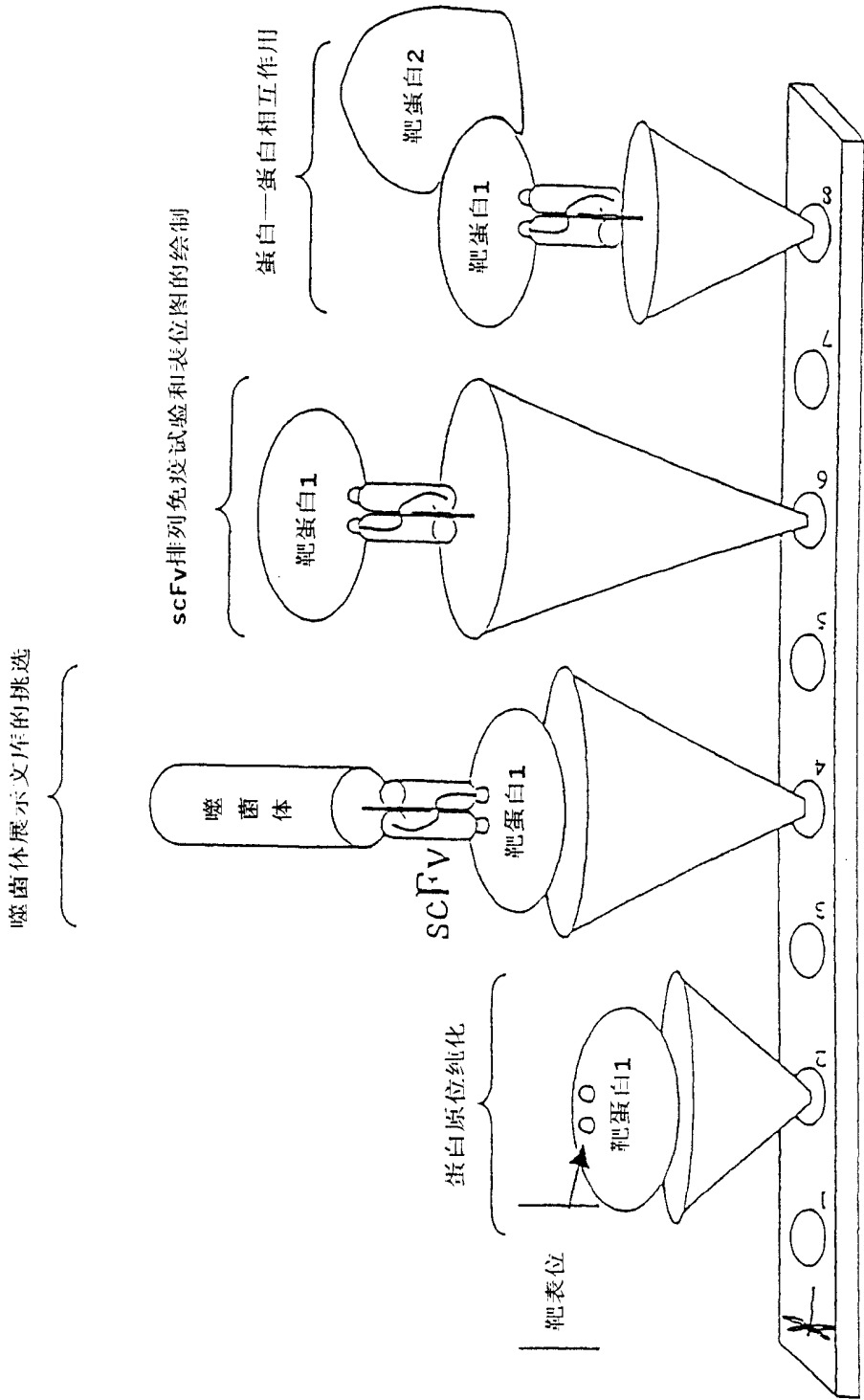


图 14

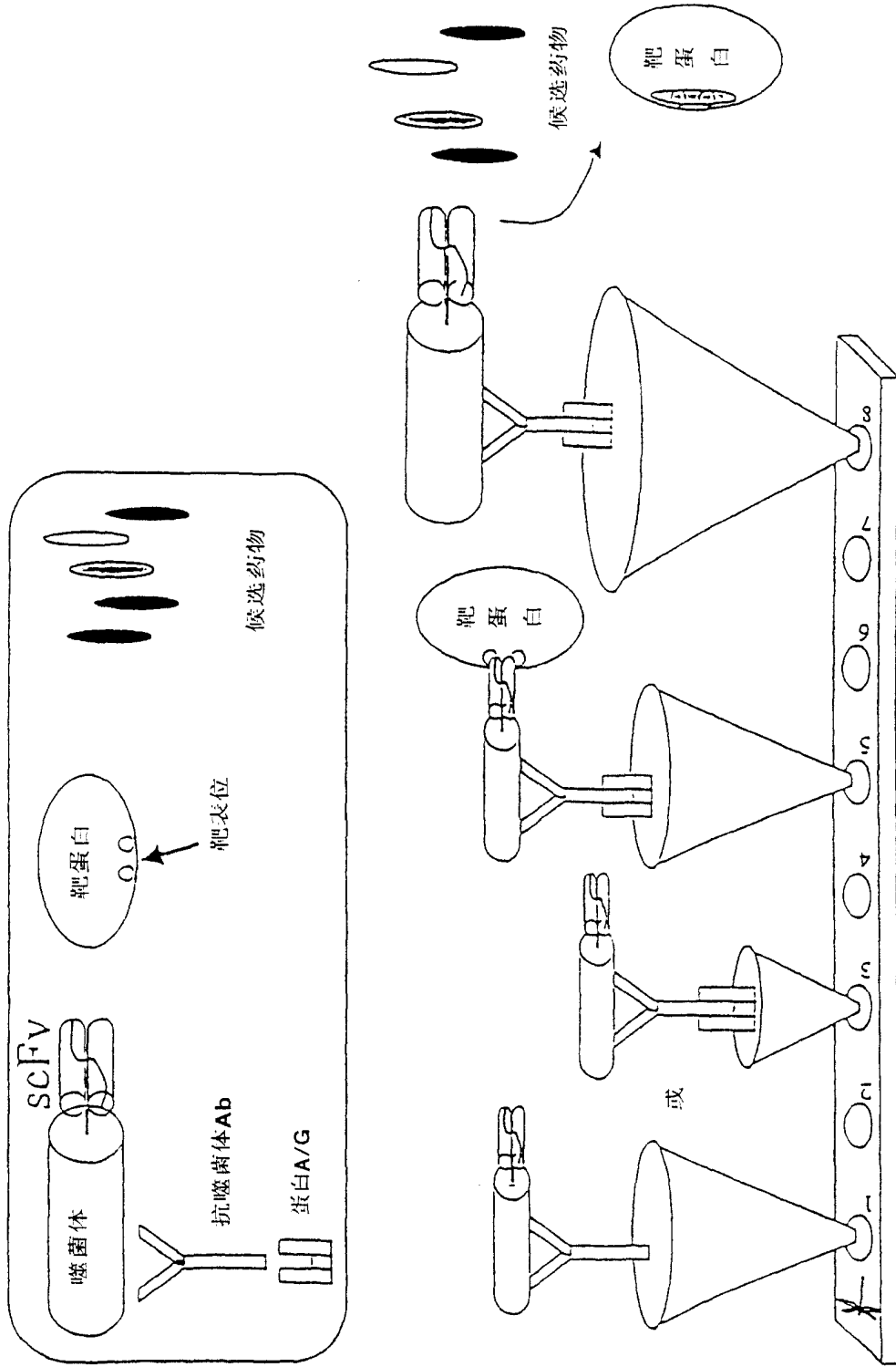


图 15

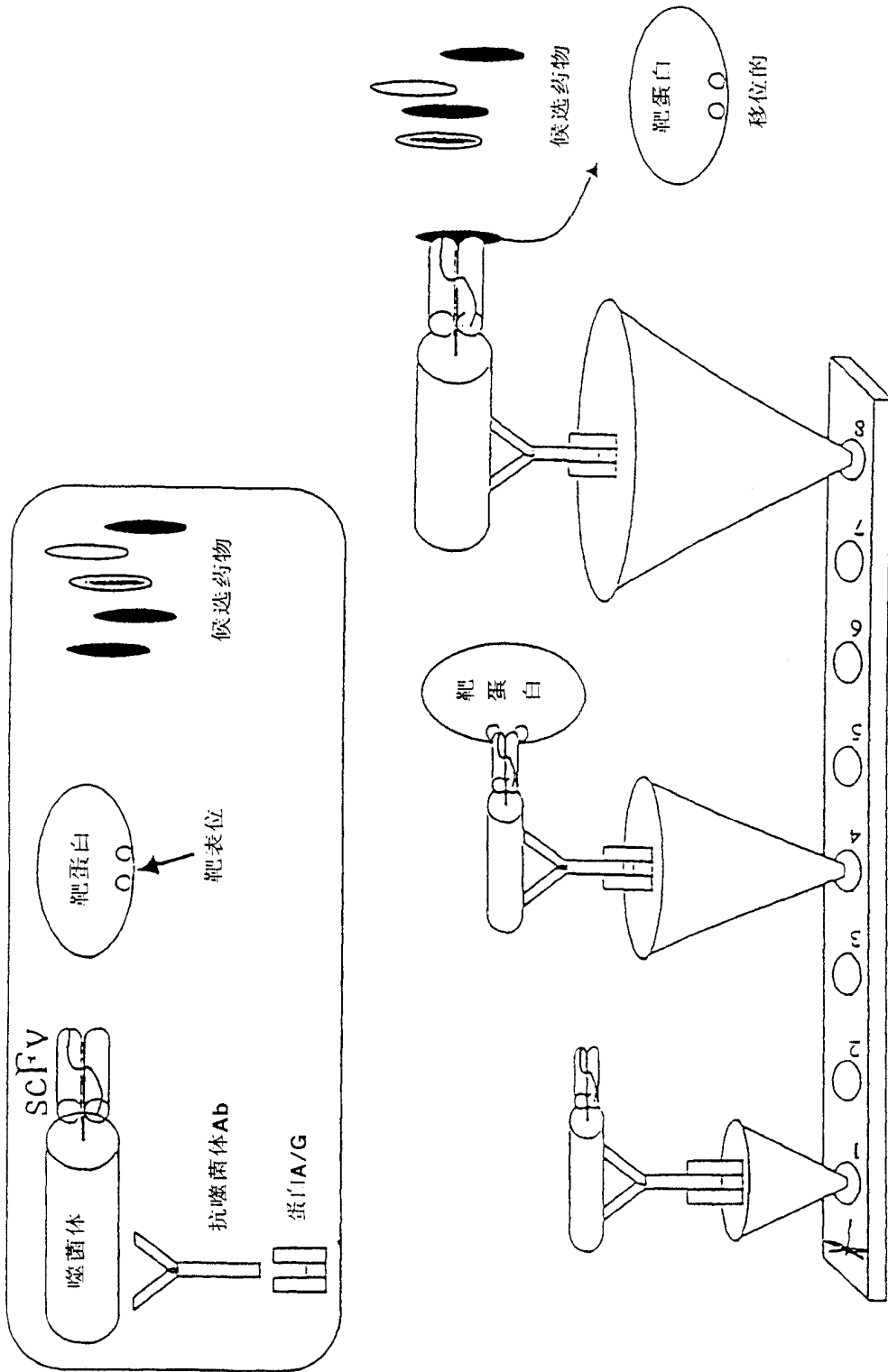


图 16

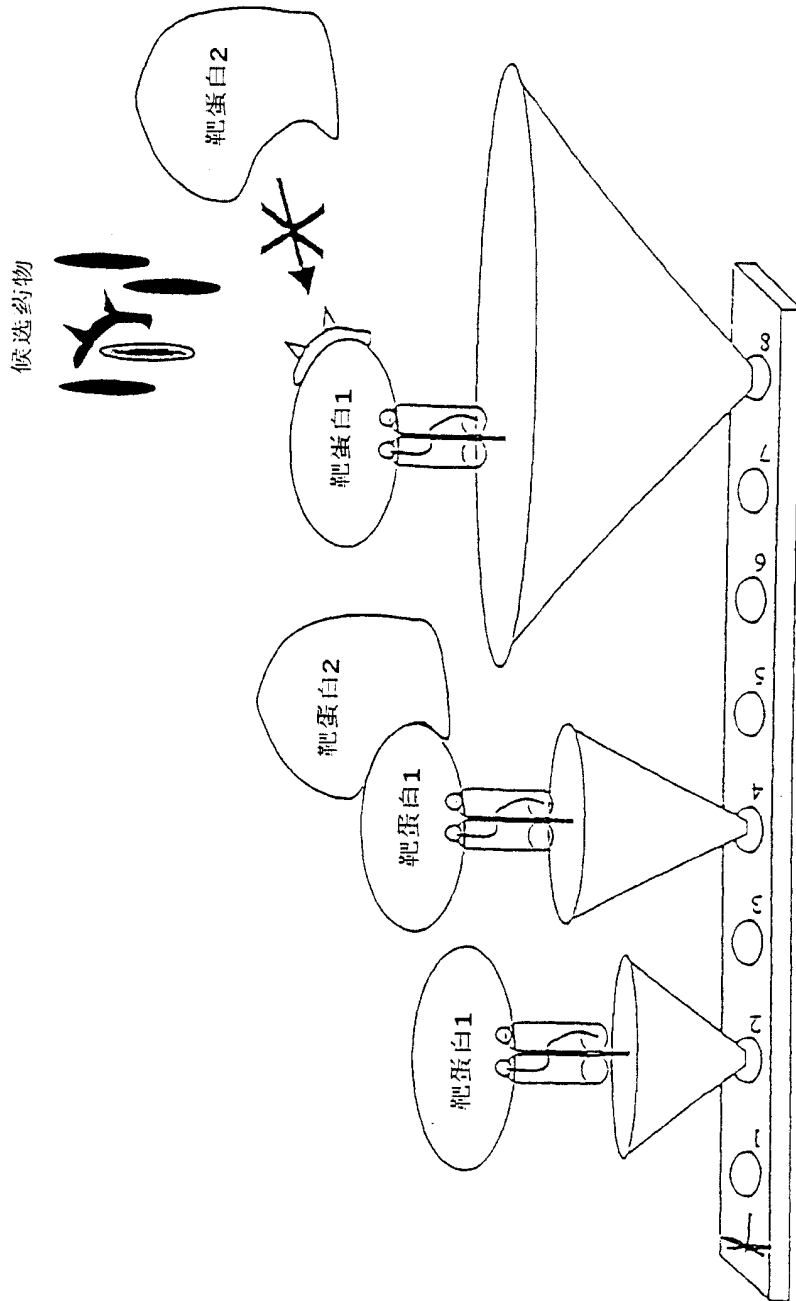


图 17

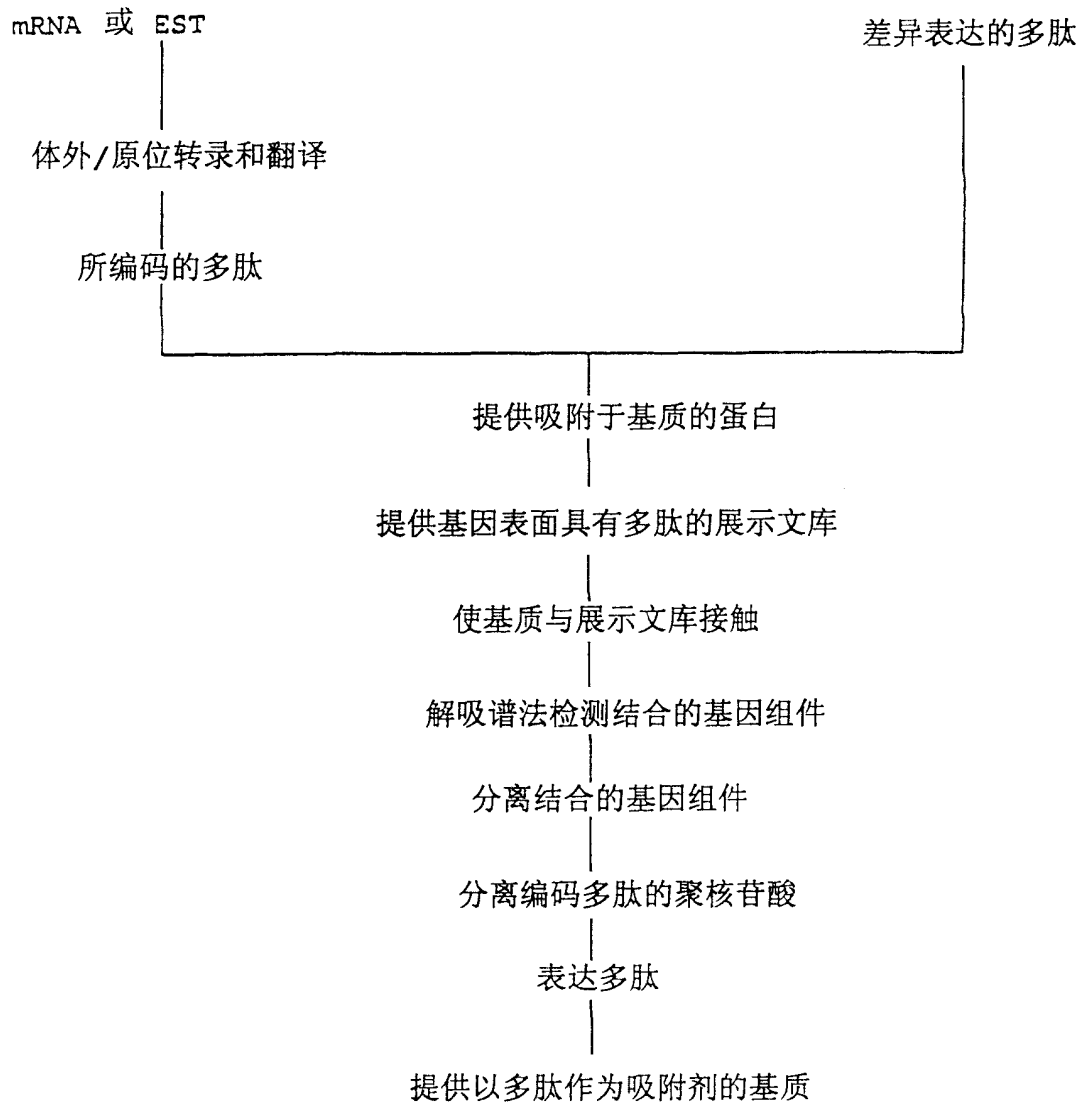


图 18

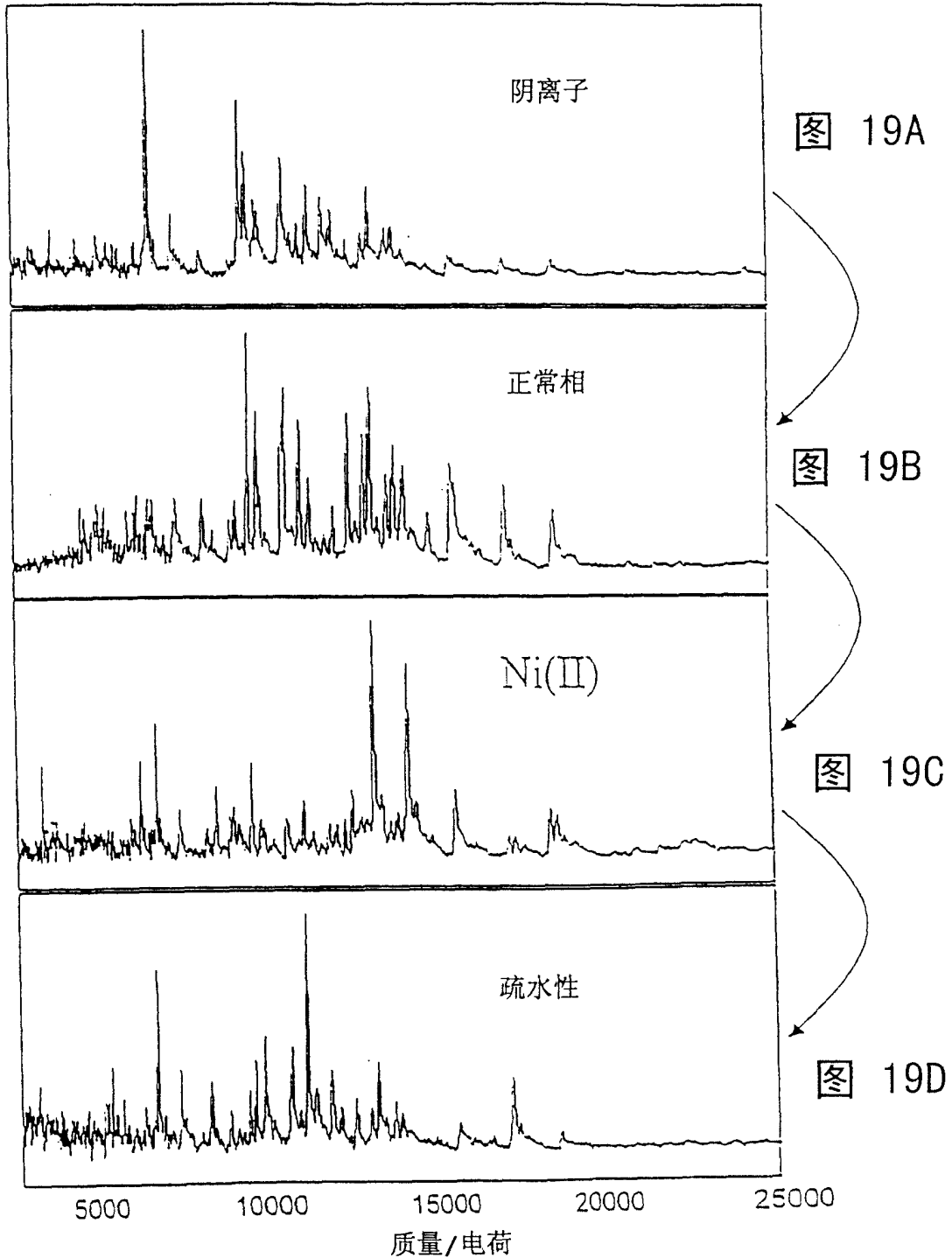
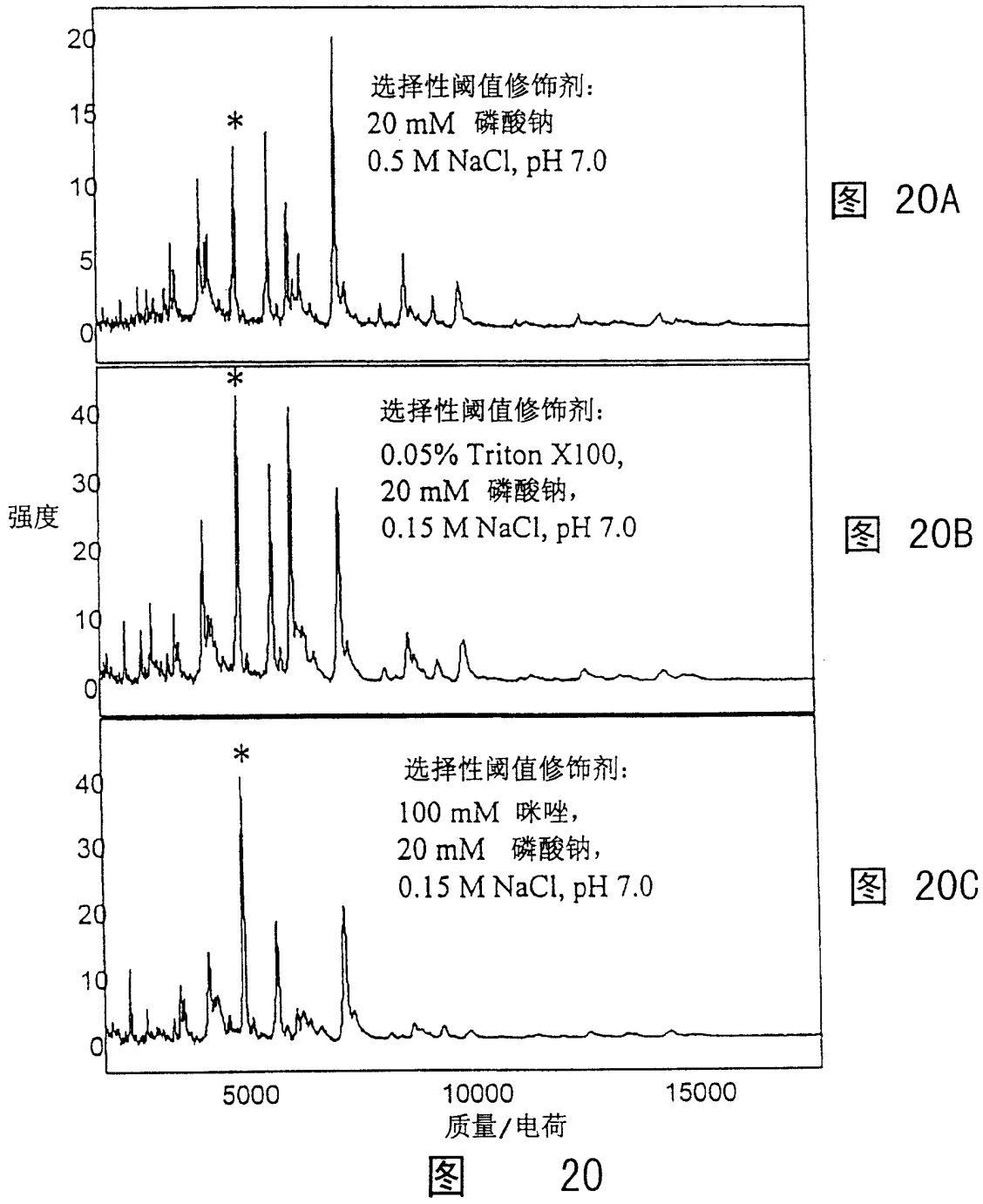


图 19



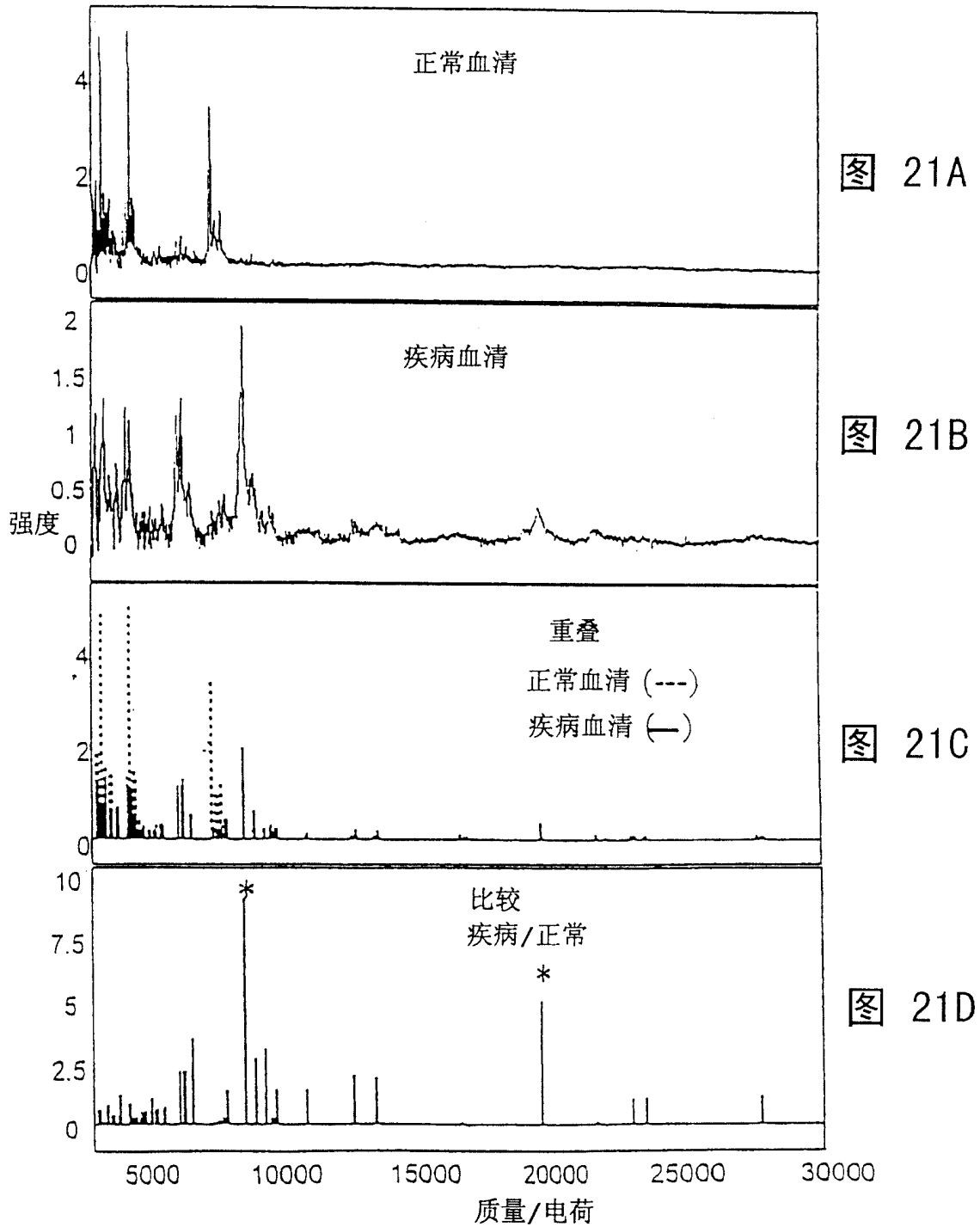


图 21

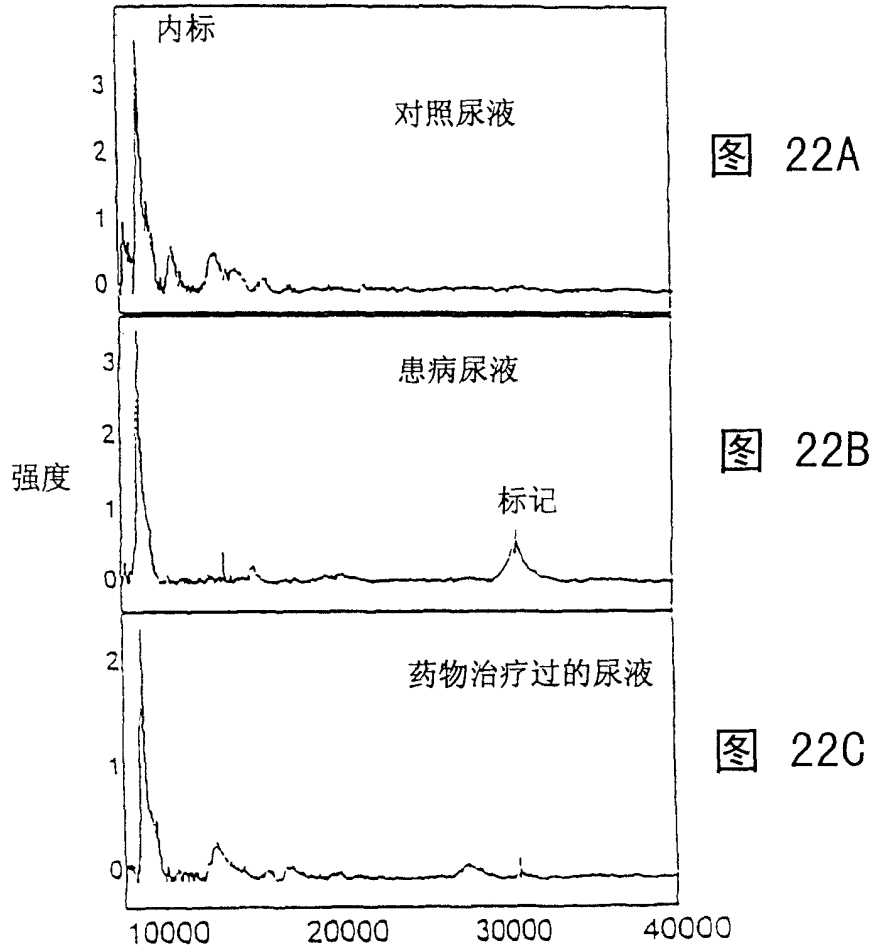


图 22A

图 22B

图 22C

样品	蛋白质	面积
患病	内标	1139
	标记	695
药物治疗的	内标	1383
	标记	71

图 22D

校正后的标记峰面积 (标记/内标) :

对照	0.0
患病	0.61
药物治疗	0.05

图 22

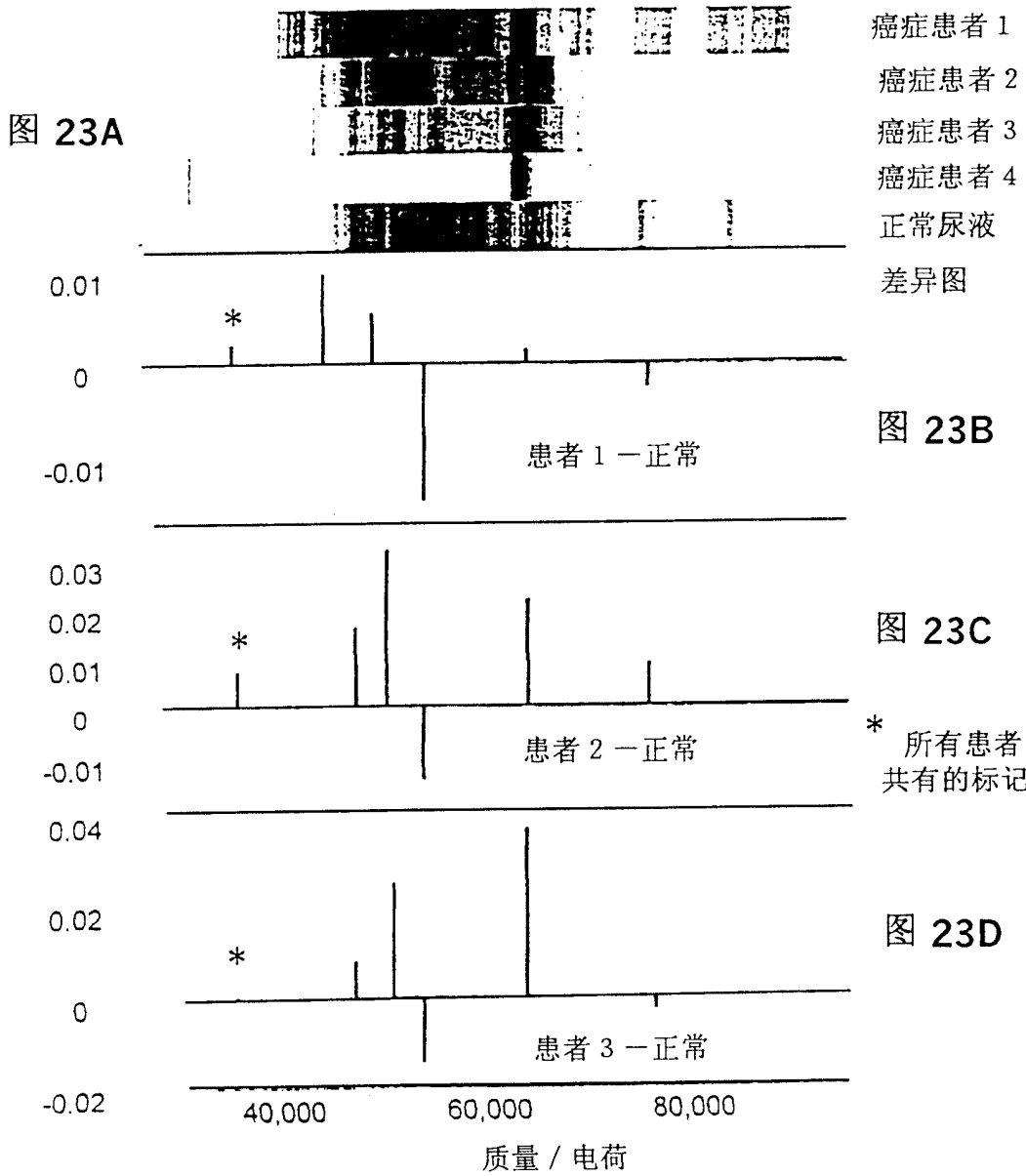


图 23

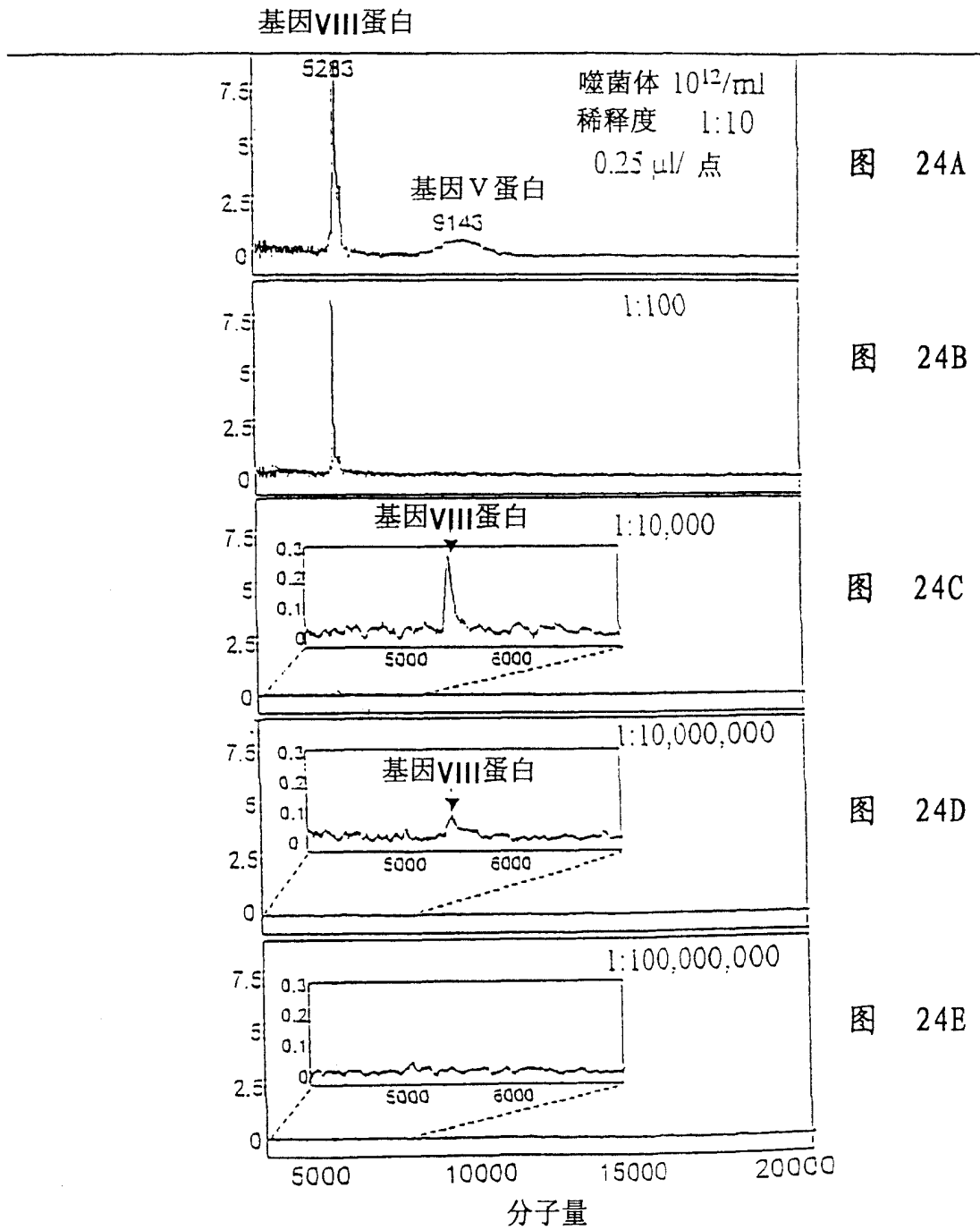


图 24

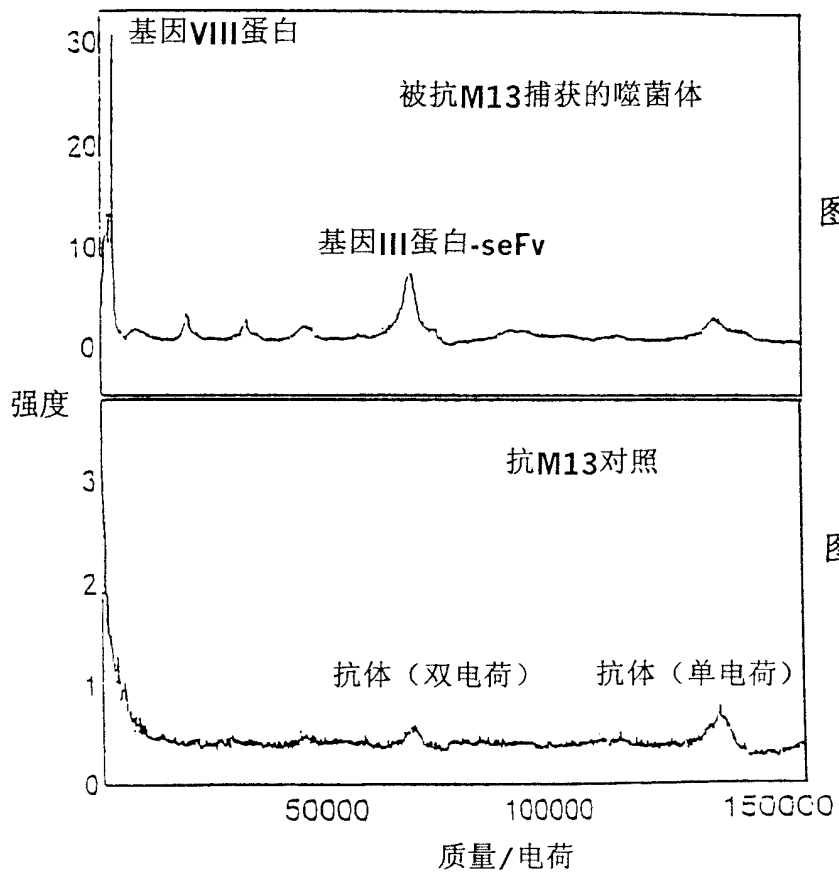


图 25A

图 25B

图 25

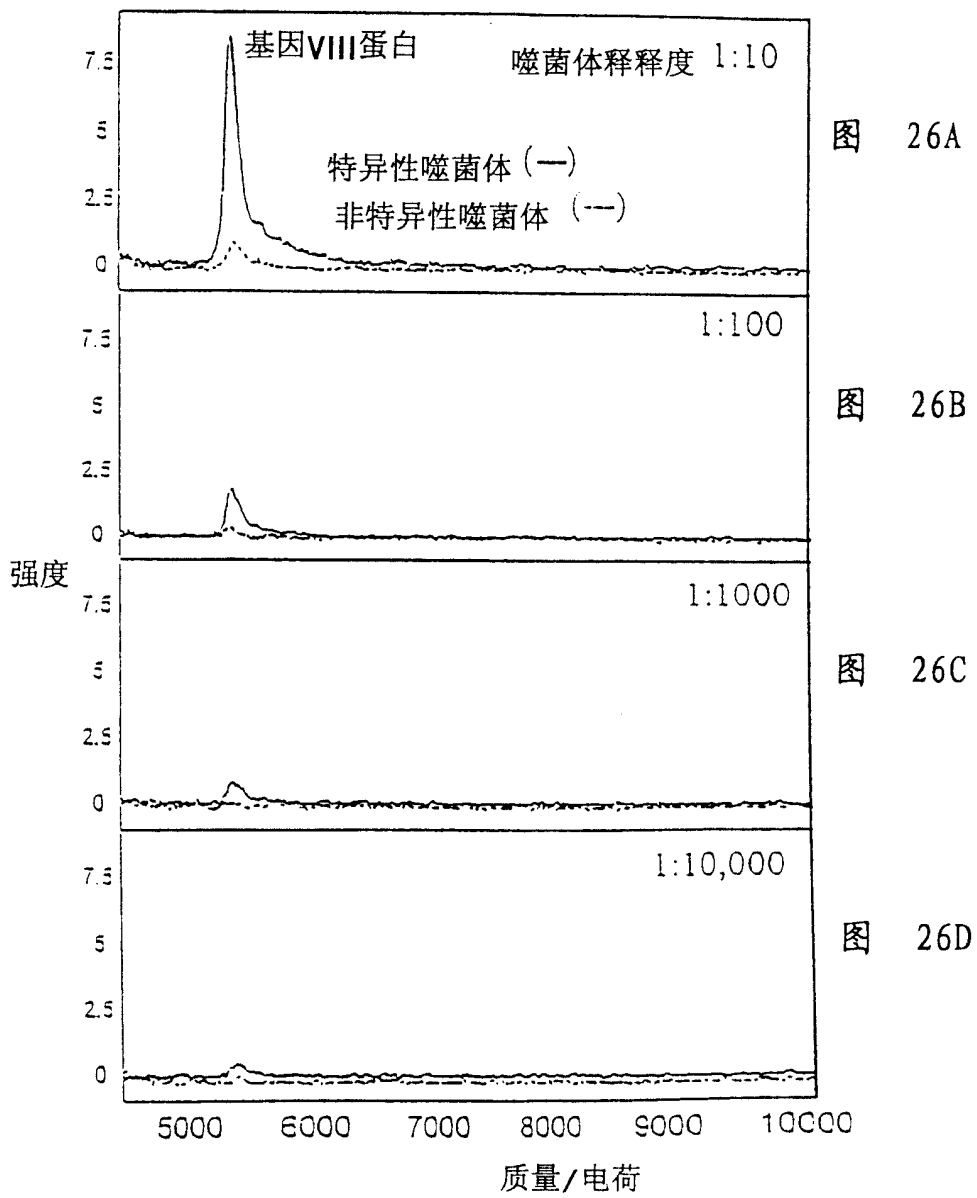
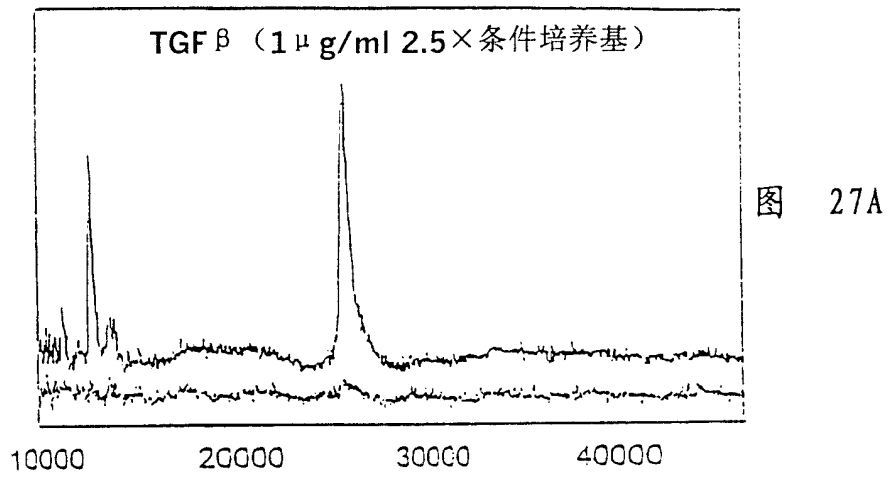


图 26



无游离受体时的结合 (一)
有调节物 (游离受体) 时的结合 (一)

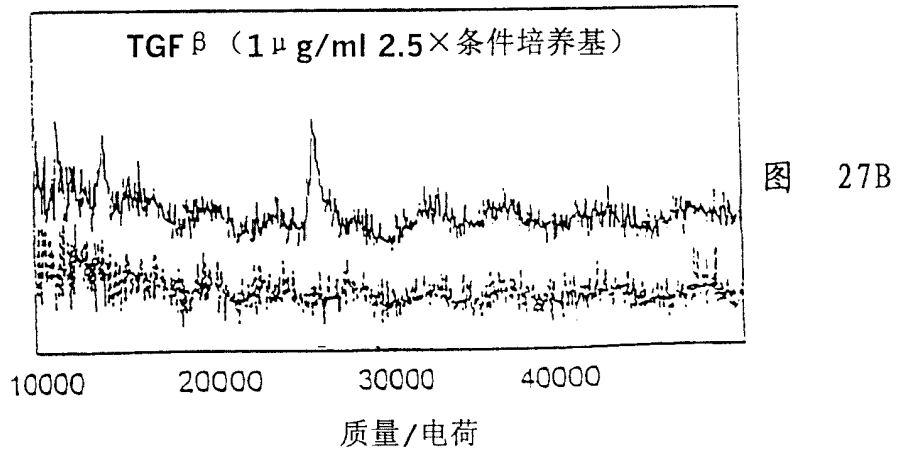


图 27

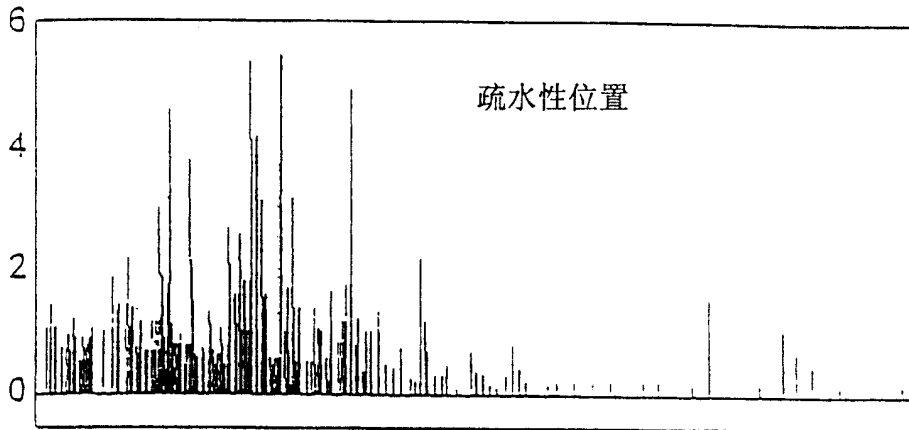


图 28A

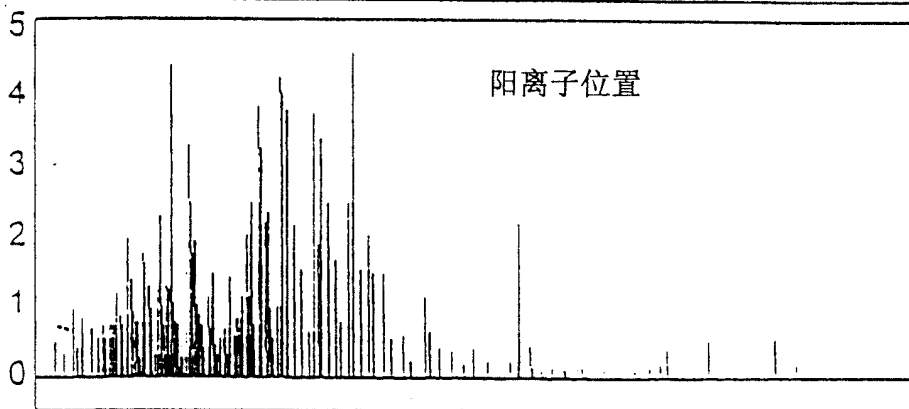


图 28B

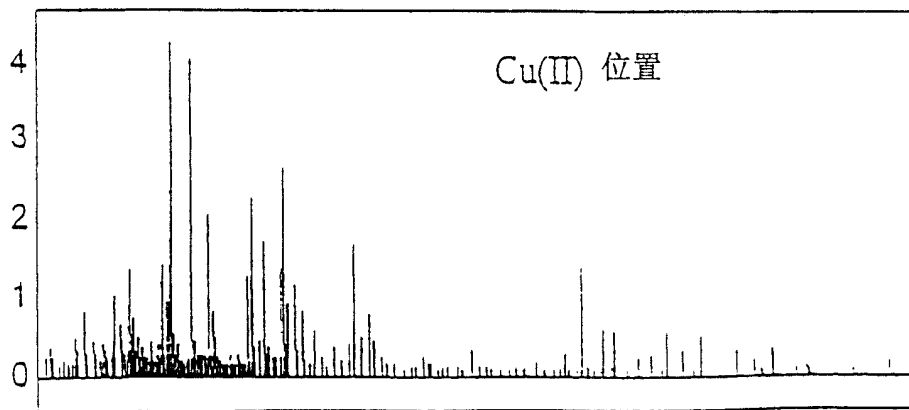


图 28C

5000 10000 15000 20000 25000 30000

质量/电荷

图 28

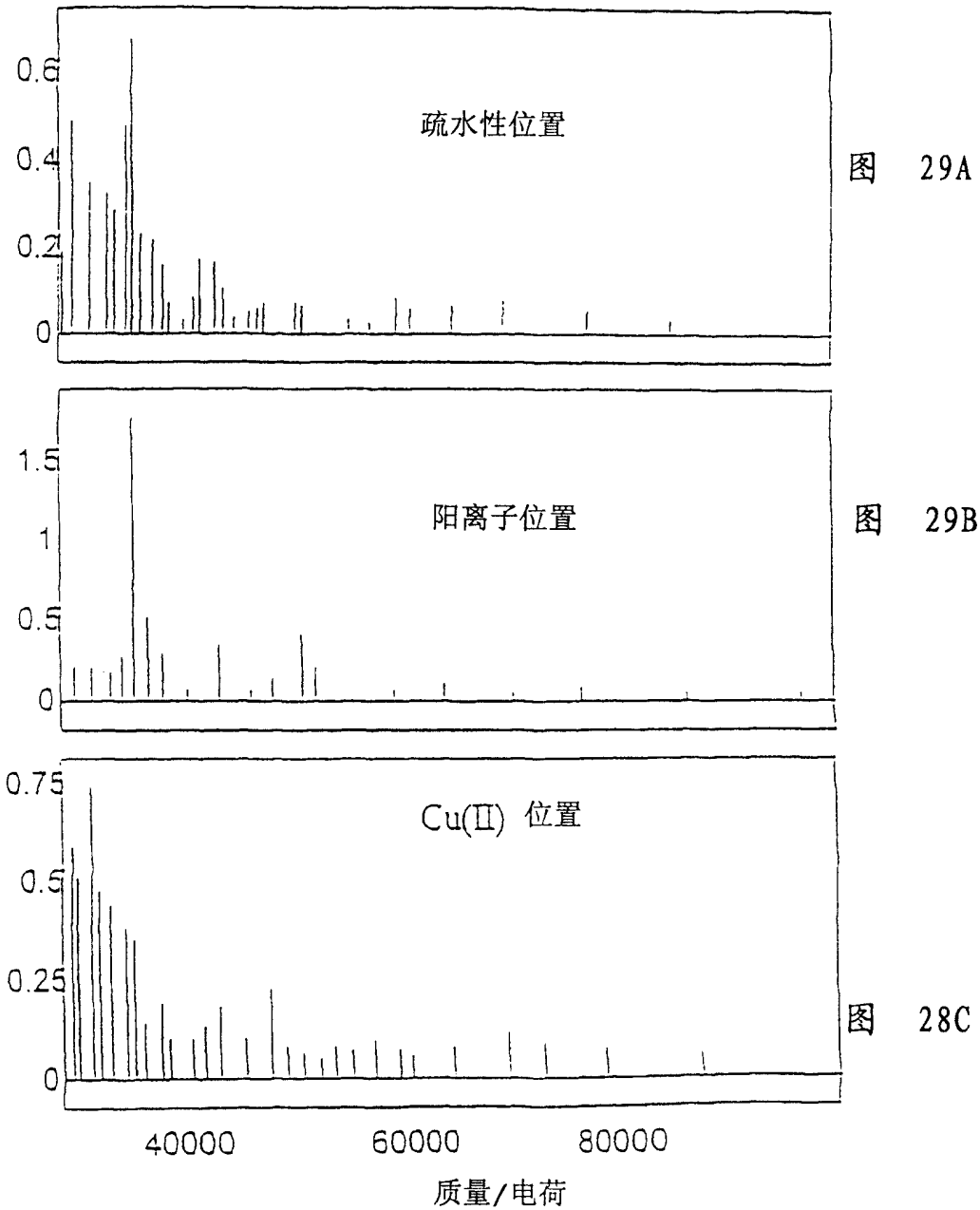


图 29

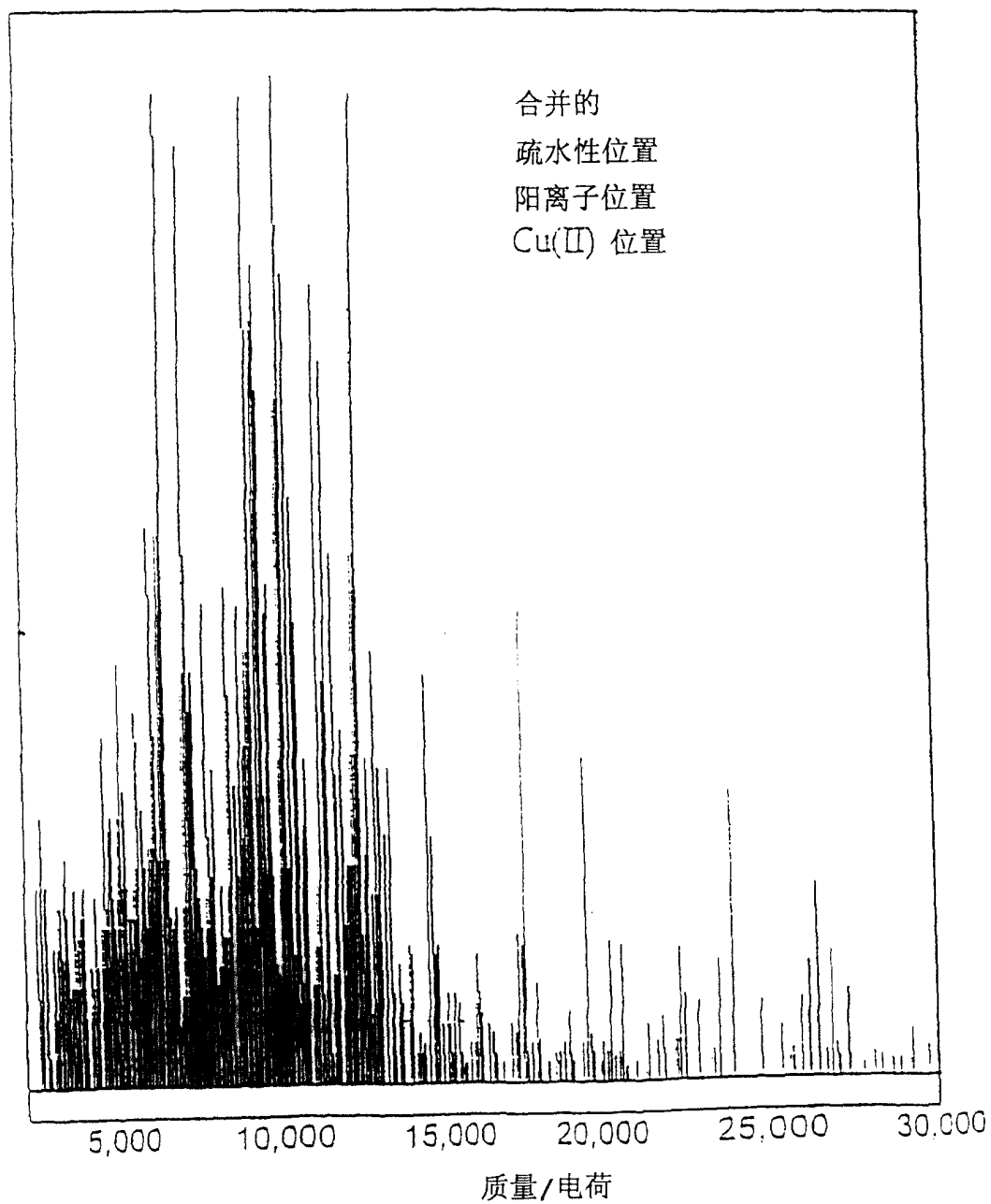


图 30

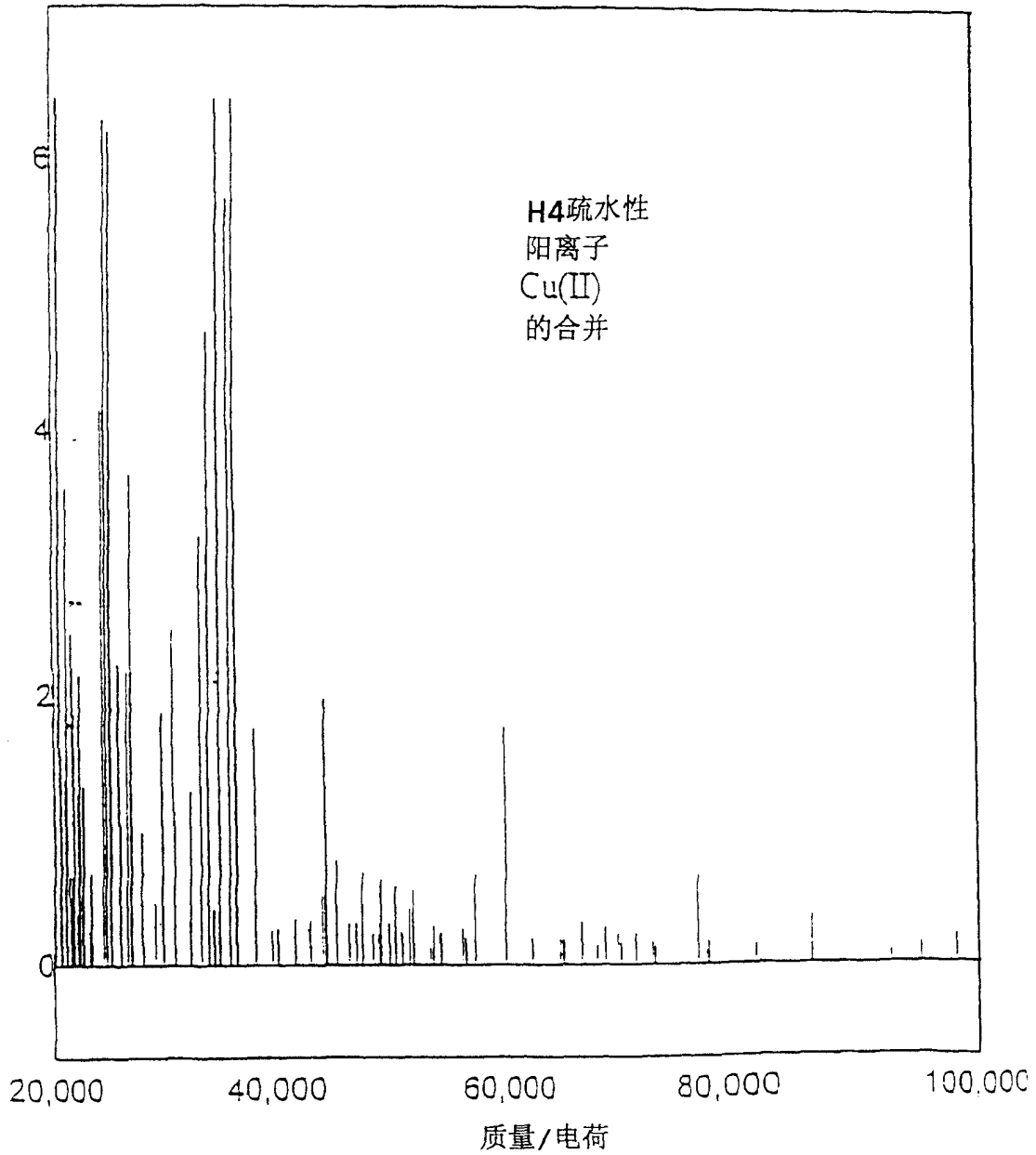


图 31

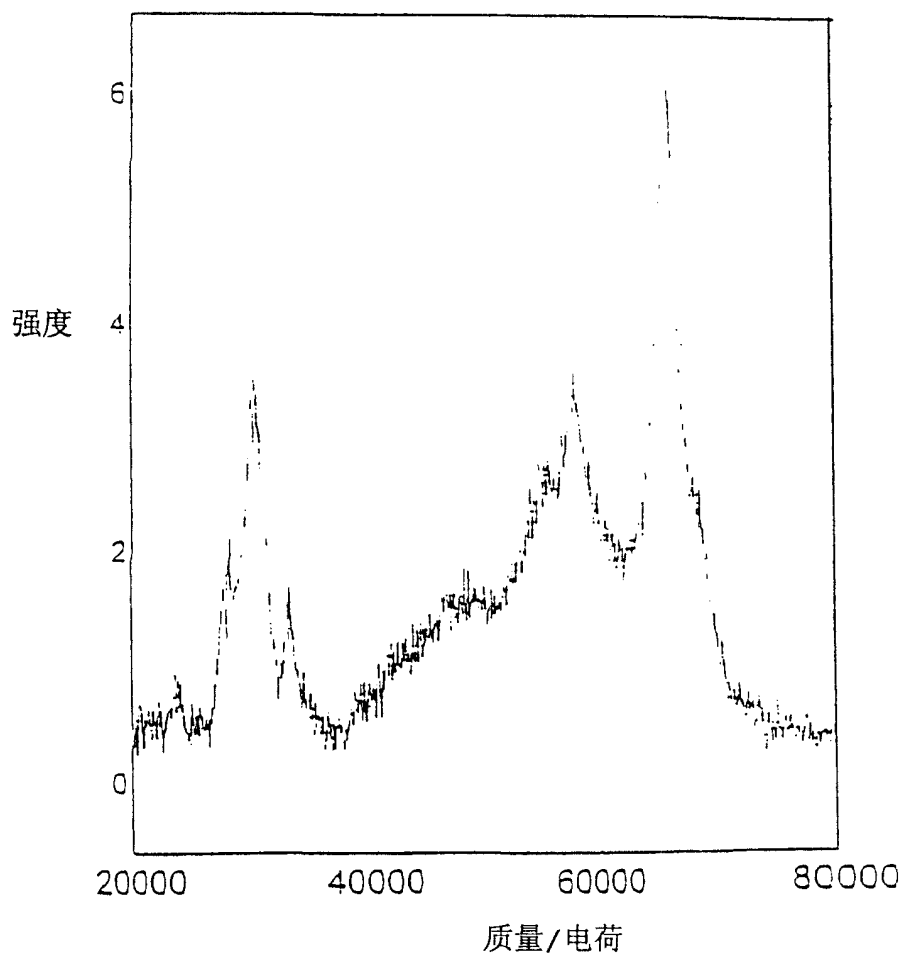


图 32

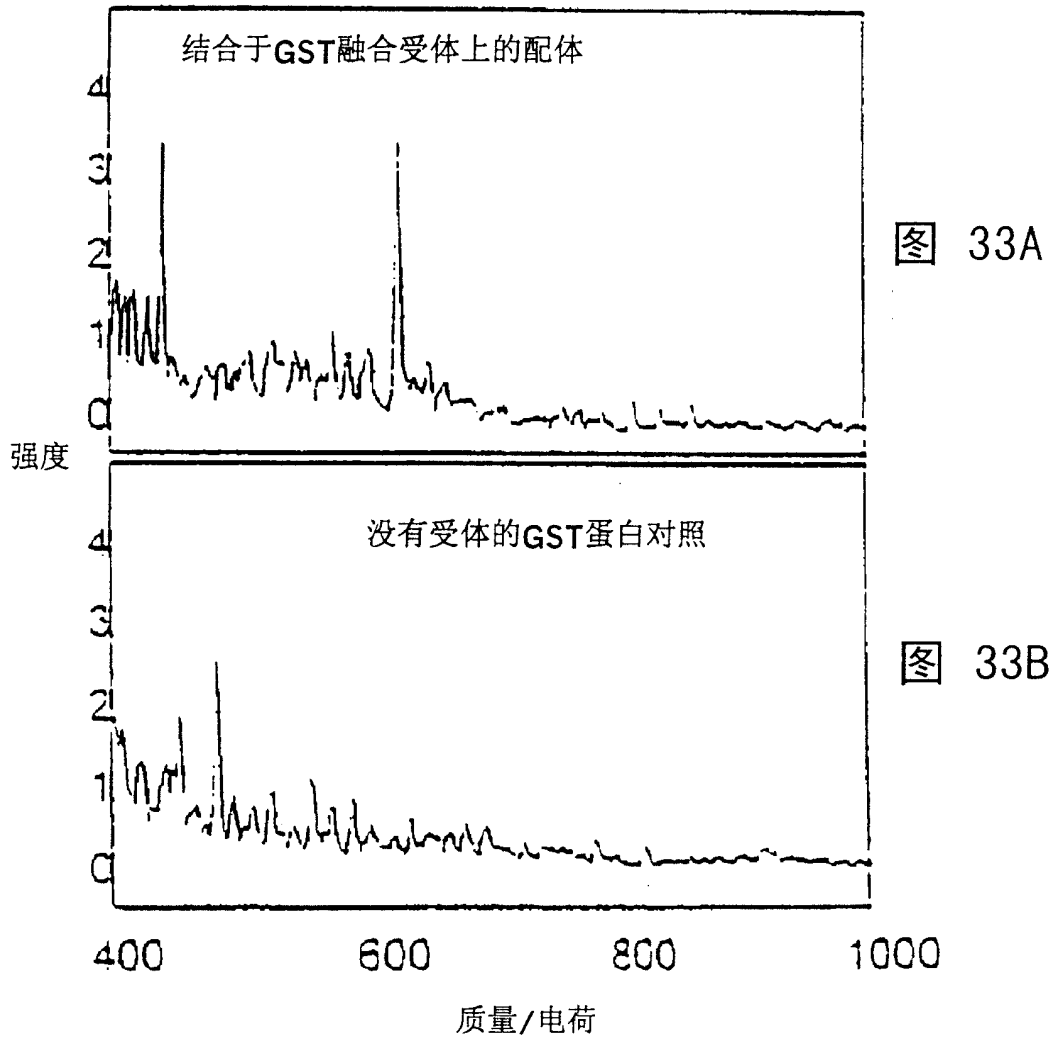


图 33