



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112469832 A

(43) 申请公布日 2021.03.09

(21) 申请号 201980048949.X

B·弗洛伊德

(22) 申请日 2019.07.23

(74) 专利代理机构 青岛联智专利商标事务所有

限公司 37101

(30) 优先权数据

代理人 阎斌斌 刘丹丹

62/702318 2018.07.23 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2021.01.19

C12Q 1/6816 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C12Q 1/6841 (2006.01)

PCT/US2019/042998 2019.07.23

G01N 33/52 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

G01N 33/58 (2006.01)

W02020/023488 EN 2020.01.30

(71) 申请人 德克萨斯大学系统董事会

地址 美国德克萨斯州

(72) 发明人 E·马科特 E·安斯林

J·斯瓦米纳坦 A·M·巴尔多

C·M·辛森 C·霍华德

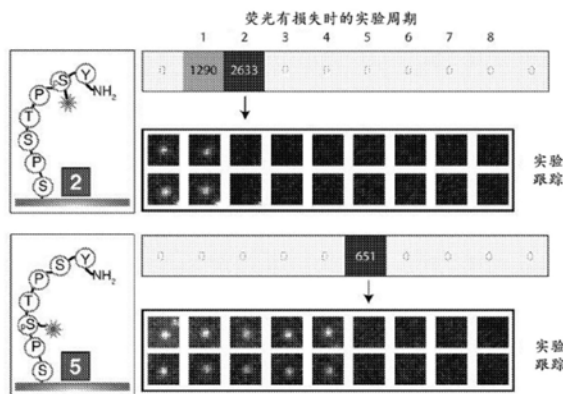
权利要求书4页 说明书28页 附图1页

(54) 发明名称

蛋白质上的翻译后修饰的单分子测序鉴别

(57) 摘要

本公开提供了通过以下方式选择性地标记肽上的氨基酸残基的方法：用标记部分替代翻译后修饰，以及对所述肽进行测序以获得所述氨基酸残基的位置和所述翻译后修饰的特性。在一些方面中，本公开还提供了鉴别肽中的翻译后修饰的位置、数量、特性、或它们的任何组合的方法，所述肽可用于治疗性目的。



1. 一种鉴别肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰的方法,所述方法包括:
 - (A) 在使得标记试剂与所述肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰相互作用的条件下,用所述标记试剂处理所述肽或蛋白质,以使所述标记试剂或其衍生物与所述氨基酸残基共价偶联,并产生经标记的肽或蛋白质;以及
 - (B) 对所述经标记的肽或蛋白质进行测序。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述氨基酸残基上的翻译后修饰为磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。
3. 根据权利要求1或权利要求2所述的方法,其中所述标记试剂为荧光团、寡核苷酸或肽-核酸。
4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述标记试剂为荧光团。
5. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中用所述标记试剂处理所述肽或蛋白质包括:
 - (i) 在使得所述肽或蛋白质上的翻译后修饰转化为反应性基团的条件下,使所述肽或蛋白质发生反应,以形成反应性肽或蛋白质;
 - (ii) 使所述标记试剂与所述反应性肽或蛋白质反应,以形成所述经标记的肽或蛋白质。
6. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用碱处理包含磷酸化翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
7. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用活化试剂和碱处理包含磷酸化翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
8. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用氧化银(Ag₂O)处理包含三甲基翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
9. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用氧化剂处理包含糖基化翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
10. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用还原剂处理包含亚硝基化翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
11. 根据权利要求5所述的方法,其中通过用膦处理包含亚硝基化翻译后修饰的所述肽或蛋白质,来形成所述反应性肽或蛋白质。
12. 根据权利要求1~5中任一项所述的方法,其中使所述肽或蛋白质与所述标记试剂接触,包括使包含翻译后修饰的所述肽或蛋白质与膦反应。
13. 根据权利要求1~4中任一项所述的方法,其中使所述肽或蛋白质与所述标记试剂接触,包括使包含翻译后修饰的所述肽或蛋白质与乙二醛基团反应。
14. 根据权利要求1~13中任一项所述的方法,其中所述测序包括荧光测序方法。
15. 根据权利要求1~14中任一项所述的方法,其中所述测序在单分子水平上进行。
16. 根据权利要求14或权利要求15所述的方法,其中所述荧光测序方法包括,用第二标记试剂,标记所述肽或蛋白质的至少一种不含翻译后修饰的氨基酸。
17. 根据权利要求1~16中任一项所述的方法,其中所述肽或蛋白质结合至固相载体。
18. 根据权利要求1~17中任一项所述的方法,其中所述荧光测序方法还包括,移除所述肽或蛋白质的至少一个氨基酸残基。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述荧光测序方法包括,顺序移除所述肽或蛋白质的氨基酸残基,直至移除经标记的氨基酸,该经标记的氨基酸包含经修饰的翻译后修饰。

20. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法,其中通过埃德曼降解,移除所述氨基酸残基。

21. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法,其中通过用硫脲和酸、微波辐射或热量处理N-末端氨基酸残基,来移除所述氨基酸残基。

22. 根据权利要求18或权利要求19所述的方法,其中通过酶,移除所述氨基酸残基。

23. 根据权利要求1~22中任一项所述的方法,其中所述肽或蛋白质获自生物样品。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述生物样品为不含细胞的生物样品。

25. 根据权利要求1~24中任一项所述的方法,其中在所述肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰与所述标记试剂之间,形成共价键。

26. 根据权利要求1~24中任一项所述的方法,其中所述标记试剂或其衍生物直接共价结合至所述氨基酸残基。

27. 根据权利要求1~24中任一项所述的方法,其中所述标记试剂或其衍生物通过中间分子共价偶联至所述氨基酸残基。

28. 一种确定受试者的疾病或障碍的状态的方法,所述方法包括:

(A) 使用根据权利要求1~27中任一项所述的方法,检测蛋白质或肽上的一种翻译后修饰或多种翻译后修饰的类型、特性、数量或位置的变化;和

(B) 根据至少所述变化,确定所述受试者的疾病或障碍的状态。

29. 根据权利要求28所述的方法,还包括从所述受试者中获得生物样品。

30. 根据权利要求28或权利要求29所述的方法,其中所述生物样品为不含细胞的生物样品。

31. 根据权利要求28~30中任一项所述的方法,其中所述方法传达存在一种或多种翻译后修饰。

32. 根据权利要求28~31中任一项所述的方法,其中所述方法传达不存在一种或多种翻译后修饰。

33. 根据权利要求28~32中任一项所述的方法,其中所述受试者为哺乳动物。

34. 根据权利要求28~33中任一项所述的方法,其中所述方法还包括,在确定所述翻译后修饰的类型、特性、数量或位置之前,富集所述蛋白质。

35. 根据权利要求28~34中任一项所述的方法,其中所述蛋白质被固定在固相载体上。

36. 一种用于确定受试者的疾病或障碍的状态的方法,所述方法包括:

使用根据权利要求1~27中任一项所述的方法,检测与所述疾病或障碍相关的蛋白质或肽上的翻译后修饰的类型、特性、数量或位置的变化。

37. 根据权利要求36所述的测定方法,还包括从所述受试者中获得生物样品。

38. 一种经修饰的肽或蛋白质,包括,含一种或多种翻译后修饰的肽或蛋白质,其中所述含一种或多种翻译后修饰的肽或蛋白质的至少一种翻译后修饰,被至少第一标记部分改变,从而形成含一种或多种翻译后修饰的经标记的肽或蛋白质。

39. 根据权利要求38所述的经修饰的肽或蛋白质,其中至少所述第一标记部分为荧光团。

40. 根据权利要求38或权利要求39所述的经修饰的肽或蛋白质,其中所述至少一种翻译后修饰选自自由磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化、三甲基化或它们的任何组合组成的组。

41. 根据权利要求40所述的经修饰的肽或蛋白质,其中选自由磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化组成的组中的每种翻译后修饰,被不同的标记部分改变。

42. 根据权利要求38~41中任一项所述的经修饰的肽或蛋白质,其中所述肽或蛋白质被固定至与固相载体相邻。

43. 一种对肽或蛋白质进行测序的方法,包括:

(A) 获得不含细胞的生物样品,并从所述不含细胞的生物样品中分离出所述肽或蛋白质;

(B) 在足以与所述肽或蛋白质的至少一个与翻译后修饰相关联的氨基酸残基相互作用的条件下,用第一标记部分标记所述肽或蛋白质,以形成所述肽或蛋白质的至少一个经标记的氨基酸残基;

(C) 使所述肽或蛋白质,经受足以从所述肽或蛋白质中移除一个或多个单独的氨基酸残基的条件;

(D) 检测来自所述至少一个经标记的氨基酸残基的至少一个信号,从而鉴别所述肽或蛋白质的序列。

44. 根据权利要求43所述的方法,其中所述氨基酸残基上的翻译后修饰为磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。

45. 根据权利要求43或权利要求44所述的方法,其中所述第一标记部分为荧光团、寡核苷酸或肽-核酸。

46. 根据权利要求43~45中任一项所述的方法,其中用所述第一标记部分标记所述肽或蛋白质包括:

(i) 在使得所述肽或蛋白质上的翻译后修饰转化为反应性基团的条件下,处理所述肽或蛋白质,以形成反应性肽或蛋白质;

(ii) 用所述反应性肽或蛋白质处理所述第一标记部分,以形成经标记的肽或蛋白质。

47. 根据权利要求43~46中任一项所述的方法,其中所述测序包括荧光测序方法。

48. 根据权利要求43~47中任一项所述的方法,其中所述测序在单分子水平上进行。

49. 根据权利要求47或权利要求48所述的方法,其中所述荧光测序方法包括,用第二标记试剂,标记所述肽或蛋白质的至少一种氨基酸残基。

50. 根据权利要求43~49中任一项所述的方法,其中所述肽或蛋白质结合至固相载体。

51. 根据权利要求43~50中任一项所述的方法,其中所述荧光测序方法还包括,移除所述肽或蛋白质的至少一个氨基酸残基。

52. 根据权利要求51所述的方法,其中所述荧光测序方法包括,顺序移除所述肽或蛋白质的每个氨基酸残基,直至移除经标记的氨基酸,该经标记的氨基酸包含经修饰的翻译后修饰。

53. 一种用于鉴别多肽序列的方法,包括:

(A) 从受试者的不含细胞的生物样品中,获得第一多肽;

(B) 使用所述第一多肽,生成固定至载体的第二多肽,其中所述第二多肽包含经标记的氨基酸;

(C) 使所述第二多肽,经受足以从所述多肽中移除氨基酸的条件;和

(D) 在从所述多肽移除所述氨基酸期间或之后,检测来自所述经标记的氨基酸的至少一个子集的信号,从而鉴别所述第二多肽的序列,以确定来自所述不含细胞的生物样品的所述第一多肽的序列。

54. 一种用于加工或分析含有或疑似含有至少一种翻译后修饰的蛋白质或肽的方法,包括:

(A) 对所述蛋白质或肽进行测序,和

(B) 鉴别所述蛋白质或肽的至少一个氨基酸子单元中的所述至少一种翻译后修饰,或其衍生物。

55. 根据权利要求54所述的方法,其中所述测序包括,使所述蛋白质或肽经受降解条件,以从所述蛋白质或肽中顺序移除氨基酸子单元,以及检测所述氨基酸子单元的至少一个子集。

56. 根据权利要求54所述的方法,其中从样品中获得所述蛋白质或肽并进行加工,以标记所述至少一种翻译后修饰。

57. 根据权利要求56所述的方法,其中所述样品为不含细胞的样品。

58. 根据权利要求54所述的方法,其中所述测序包括,用标签标记所述蛋白质或肽的所述至少一种翻译后修饰,并检测所述标签,从而鉴别所述蛋白质或肽上的所述至少一种翻译后修饰。

59. 一种用于加工或分析蛋白质或肽的方法,包括使所述蛋白质或肽经受足以特异性标记所述蛋白质或肽的不同的翻译后修饰的条件,并检测对应于所述蛋白质或肽的所述不同的翻译后修饰的标签,从而检测所述蛋白质或肽的所述不同的翻译后修饰。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述不同的翻译后修饰包括磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。

蛋白质上的翻译后修饰的单分子测序鉴别

[0001] 本申请要求2018年7月23日提交的美国临时专利申请序列号62/702,318的优先权权益,该美国临时专利申请全部内容据此以引用方式并入。

[0002] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的第R35 GM122480号和第OD009572号政府拨款的支持下完成的。政府对本发明享有某些权利。

背景技术

[0003] 蛋白质的翻译后修饰 (PTM) 是选定氨基酸的侧链或者肽或蛋白质的N和C末端上的化学部分的共价衔接。许多蛋白质的活性和功能通过它们的PTM的性质来调节。PTM的一些非限制性示例包括磷酸化、糖基化、烷基化、酰化、羟基化,或者辅因子或核苷酸的衔接。在许多不同类型的PTM中,一种重要类型的化学修饰—磷酸化—是普遍存在的并广泛研究的。这是由于它们在细胞信号传导和在诊断疾病状态中的重要作用 (Ardito等人,2017; Stowell等人,2015)。检测和定位通过PTM修饰的氨基酸残基在生物学上对研究是重要的,对它的理解可转化成有效的疾病治疗。

[0004] 一个此类示例为蛋白质的表皮生长因子受体 (EGFR) 家族的C末端结构域,其含有大约20个能够被磷酸化的酪氨酸残基。取决于活化细胞中这些磷酸化位点的组合,下游工艺的范围可包括细胞增殖、分化、抗细胞凋亡(存活)、粘合、迁移和血管生成 (Huang等人,2011)。因此,理解和定位这些位点不仅对更好地理解细胞信号传导途径,而且对开发当前治疗药物至关重要。然而,由于其低丰度和样品异质性,定位翻译后修饰一直具有内在挑战性。当前方法不允许在允许定量测定PTM的同时精确地测定PTM的具体位置。因此,仍然存在鉴别允许改善蛋白质或肽中的PTM的检测的方法的未被满足的需求。

发明内容

[0005] 本公开提供了用于蛋白质或肽测序以及/或者蛋白质或肽鉴别的方法和系统。本公开的方法和系统可用于对蛋白质或肽进行测序以确定翻译后修饰和此类翻译后修饰的位置。

[0006] 在一些方面中,本公开提供了鉴别肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰的方法,该方法包括:

[0007] (A) 用标记试剂在使得标记试剂与肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰相互作用的条件下处理肽或蛋白质,以使标记试剂或其衍生物与氨基酸残基共价偶联并产生经标记的肽或蛋白质;以及

[0008] (B) 对经标记的肽或蛋白质进行测序。

[0009] 在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸上的磷酸化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为苏氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为N-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为

天冬酰胺或精氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为O-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为三甲基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为赖氨酸的三甲基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸或酪氨酸的亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为瓜氨酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚磺酰化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚磺酰化。

[0010] 在一些实施例中,翻译后修饰位于蛋白质的氨基酸残基上。在其他实施例中,翻译后修饰位于肽的氨基酸残基上。在一些实施例中,标记试剂包含硫醇基团。在一些实施例中,标记试剂包含两个硫醇基团。在一些实施例中,标记试剂包含胺反应性基团,诸如琥珀酰亚胺酯。在一些实施例中,标记试剂包含乙二醛基团。在一些实施例中,标记试剂包含1,3-环烷烃二酮基团,诸如1,3-己二酮。

[0011] 在一些实施例中,标记试剂为荧光团、寡核苷酸或肽-核酸。在一些实施例中,标记试剂为荧光团。在一些实施例中,标记试剂为含有硫醇的荧光团。在一些实施例中,荧光团为氧杂蒽染料,诸如罗丹明染料。

[0012] 在一些实施例中,该方法涉及用标记试剂处理肽或蛋白质,其包括:

[0013] (i) 使肽或蛋白质在使得肽或蛋白质上的翻译后修饰转化为反应性基团的条件下反应,以形成反应性肽或蛋白质;

[0014] (ii) 使标记试剂与反应性肽或蛋白质反应以形成经标记的肽或蛋白质。

[0015] 在一些实施例中,反应性肽或蛋白质通过用碱处理包含磷酸化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中,碱为稀土金属氢氧化物,诸如Ba(OH)₂。

[0016] 在其他实施例中,反应性肽或蛋白质通过用活化试剂和碱处理包含磷酸化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中,活化试剂为碳化二亚胺,诸如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)。在一些实施例中,碱为杂芳族碱,诸如咪唑。

[0017] 在其他实施例中,反应性肽或蛋白质通过用氧化银(Ag₂O)处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中,在存在热量的情况下用氧化银处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质。在一些实施例中,反应性肽或蛋白质通过用碱处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中,碱为含氮碱,诸如二异丙基乙基胺或三甲基胺。

[0018] 在其他实施例中,反应性肽或蛋白质是通过用氧化剂处理包含糖基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成的。在一些实施例中,氧化剂为高价碘试剂,诸如高碘酸钠。

[0019] 在其他实施例中,反应性肽或蛋白质是通过用还原剂处理包含亚硝基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成的。在一些实施例中,还原剂为二硫化物还原剂,诸如二硫苏糖醇。在一些实施例中,还原剂还包括亚铁血红素。在一些实施例中,反应性肽或蛋白质通过用磷处理包含亚硝基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三烷基磷、或者未被取代的或被取代的三芳基磷。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三芳基磷。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三苯基磷。在一些实

施例中,该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触,其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与磷反应。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三烷基磷、或者未被取代的或被取代的三芳基磷。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三芳基磷。在一些实施例中,磷为未被取代的或被取代的三苯基磷。在一些实施例中,磷共价连接至标记试剂。

[0020] 在一些实施例中,该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触,其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与乙二醛基团反应。在一些实施例中,乙二醛基团共价连接至标记试剂。在其他实施例中,该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触,其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与1,3-环烷烃二酮基团,诸如1,3-己二酮反应。在一些实施例中,1,3-环烷烃二酮共价结合至标记试剂。在一些实施例中,反应性肽或蛋白质上的反应性基团为双键。在一些实施例中,用包含硫醇烯点击反应的标记试剂处理反应性肽或蛋白质,以形成经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,在存在烯炔复分解试剂的情况下用具有双键的标记试剂处理反应性肽或蛋白质,以形成经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用包含环加成反应的标记试剂处理反应性肽或蛋白质,以形成经标记的肽或蛋白质。

[0021] 在一些实施例中,反应性肽或蛋白质上的反应性基团为醛。在一些实施例中,用反应性肽或蛋白质上的包含亲核加成、亲核置换或自由基加成的反应性基团处理标记试剂。在一些实施例中,当用反应性肽或蛋白质上的反应性基团处理时,标记试剂形成硫醚。在一些实施例中,标记试剂形成二噻烷。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成酰胺键。在一些实施例中,酰胺键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成二硫键。在一些实施例中,二硫键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成杂环烷烃。在一些实施例中,杂环烷基基团的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成硫醚键。在一些实施例中,硫醚键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。

[0022] 在一些实施例中,测序包括荧光测序方法。在一些实施例中,测序在单分子水平上进行。在一些实施例中,荧光测序方法包括用第二标记试剂标记肽或蛋白质的至少一种不含有翻译后修饰的氨基酸。在一些实施例中,荧光测序方法包括标记肽或蛋白质的一种、两种、三种、四种或五种不同的不含翻译后修饰的氨基酸。在一些实施例中,每种氨基酸均用不同的第二标记试剂标记。

[0023] 在一些实施例中,肽或蛋白质结合至固相载体,诸如表面。在一些实施例中,固相载体为树脂、微珠或改性玻璃表面。在一些实施例中,固相载体为改性玻璃表面,诸如氨基硅酸盐表面。

[0024] 在一些实施例中,荧光测序方法还包括移除肽或蛋白质的至少一个氨基酸残基。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的两个或更多个连续氨基酸残基。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的氨基酸残基直至移除包含修饰的翻译后修饰的标记的氨基酸。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的1个至20个氨基酸残基直至移除包含修饰的翻译后修饰的标记的氨基酸。在一些实施例中,通过埃德曼(Edman)降解移除氨基酸残基。在一些实施例中,通过用硫脲和酸、微波辐射或热量处理N末端氨基酸残基来移除氨基酸残基。在一些实施例中,通过酶移除氨基酸残基。

[0025] 在一些实施例中,通过蛋白酶消化肽或蛋白质。在一些实施例中,在标记包含翻译后修饰的氨基酸之前通过蛋白酶消化肽或蛋白质。在一些实施例中,肽或蛋白质从生物样品中获得。在一些实施例中,生物样品为不含细胞的生物样品。在一些实施例中,生物样品来源于血液。在其他实施例中,生物样品来源于尿液。在其他实施例中,生物样品来源于粘液。在其他实施例中,生物样品来源于唾液。

[0026] 在一些实施例中,在肽或蛋白质的氨基酸残基上的翻译后修饰与标记试剂之间形成共价键。在一些实施例中,标记试剂或其衍生物直接共价结合至氨基酸残基。在一些实施例中,标记试剂或其衍生物通过中间分子共价偶联至氨基酸残基。

[0027] 在另一个方面中,本公开提供了确定受试者的疾病或障碍的状态的方法,该方法包括:

[0028] (A) 使用本文所述的方法检测蛋白质或肽上的一个翻译后修饰或多个翻译后修饰的类型、特性、数量或位置的变化;以及

[0029] (B) 根据至少所述变化确定受试者的疾病或障碍的状态。

[0030] 在一些实施例中,该方法还包括从受试者中获得生物样品。在一些实施例中,确定疾病或障碍的状态是确定患有该疾病的患者的预后。在其他实施例中,确定疾病或障碍的状态是诊断患者患有该疾病。在其他实施例中,确定疾病或障碍的状态是确定患者是否处于患有该疾病的风险中。

[0031] 在一些实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的磷酸化的变化。在其他实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的三甲基化的变化。在其他实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的糖基化的变化。在其他实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的亚硝基化的变化。在一些实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的瓜氨酸化的变化。在一些实施例中,蛋白质或肽的翻译后修饰的变化是蛋白质的亚磺酰化的变化。

[0032] 在一些实施例中,生物样品是不含细胞的生物样品,诸如唾液、粘液、尿液、血清、血浆、或全血。在一些实施例中,该方法传达存在一种或多种翻译后修饰。在一些实施例中,该方法传达存在两种或更多种翻译后修饰。在一些实施例中,该方法传达不存在一种或多种翻译后修饰。在一些实施例中,该方法传达不存在一种或多种翻译后修饰并且存在一种或多种翻译后修饰。

[0033] 在一些实施例中,该方法传达蛋白质中的翻译后修饰的类型。在一些实施例中,该方法传达蛋白质中的翻译后修饰的特性。在一些实施例中,该方法传达蛋白质中的翻译后修饰的量。在一些实施例中,该方法传达蛋白质中的翻译后修饰的位置。在一些实施例中,受试者是哺乳动物,诸如人。

[0034] 在一些实施例中,该方法还包括在确定翻译后修饰的类型、特性、数量或位置之前富集蛋白质。在一些实施例中,通过纯化生物样品富集蛋白质。在一些实施例中,在确定翻译后修饰的类型或特性之前使蛋白质经受降解。在一些实施例中,通过蛋白酶降解蛋白质。

[0035] 在一些实施例中,将蛋白质固定在固相载体上。在一些实施例中,固相载体为表面。在一些实施例中,固相载体为树脂、微珠或改性玻璃表面。在一些实施例中,固相载体为改性玻璃表面,诸如氨基硅酸盐表面。

[0036] 在一些实施例中,该方法包括确定两种或更多种肽或蛋白质上的翻译后修饰的类

型、特性、数量或位置。

[0037] 在另一个方面中,本公开提供了用于确定受试者的疾病或障碍的状态的方法,该方法包括:

[0038] 使用本文所述的方法检测与疾病或障碍相关的蛋白质或肽上的翻译后修饰的类型、特性、数量或位置的变化。

[0039] 在一些实施例中,该方法还包括从受试者中获得生物样品。

[0040] 在另一个方面,本公开提供了修饰的肽或蛋白质,其包括包含一种或多种翻译后修饰的肽或蛋白质,其中包含一种或多种翻译后修饰的所述肽或蛋白质的至少一种翻译后修饰被用至少第一标记部分改变,从而形成包含一种或多种翻译后修饰的经标记的肽或蛋白质。

[0041] 在一些实施例中,至少第一标记部分为荧光团。在一些实施例中,肽或蛋白质包含附接到肽或蛋白质的一个或多个氨基酸残基的第二标记部分。在一些实施例中,第二标记部分为荧光团。在一些实施例中,所述至少一种翻译后修饰选自磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化、三甲基化或它们的任何组合组成的组。在一些实施例中,选自磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化组成的组的每种翻译后修饰被不同的标记部分改变。在一些实施例中,经修饰的肽或蛋白质包含3个氨基酸残基至约250个氨基酸残基。在一些实施例中,经修饰的肽或蛋白质包含5个氨基酸残基至约100个氨基酸残基。在一些实施例中,经修饰的肽或蛋白质包含约7个氨基酸残基至约50个氨基酸残基。

[0042] 在一些实施例中,第一标记试剂取代氨基酸残基上的翻译后修饰。在一些实施例中,翻译后修饰位于蛋白质的氨基酸残基上。在其他实施例中,翻译后修饰位于肽的氨基酸残基上。在一些实施例中,第一标记试剂包含硫醇基团。在一些实施例中,第一标记试剂包含两个硫醇基团。在一些实施例中,第一标记试剂包含胺反应性基团,诸如琥珀酰亚胺酯。在一些实施例中,第一标记试剂包含乙二醛基团。在一些实施例中,第一标记试剂包含1,3-环烷烃二酮基团,诸如1,3-己二酮。

[0043] 在一些实施例中,第一或第二标记试剂为荧光团、寡核苷酸或肽-核酸。在一些实施例中,第一或第二标记试剂中的一者为荧光团。在一些实施例中,标记试剂为含有硫醇的荧光团。在一些实施例中,荧光团为氧杂蒽染料,诸如罗丹明染料。

[0044] 在一些实施例中,第二标记部分附接至肽或蛋白质的与第一标记部分不同类型的氨基酸上。在一些实施例中,该方法还包括附接至肽或蛋白质的一种或多种不同氨基酸的一个或多个另外的标记部分。

[0045] 在一些实施例中,肽或蛋白质被固定为与固相载体相邻。在一些实施例中,固相载体为表面。在一些实施例中,固相载体为树脂、微珠或改性玻璃表面。在一些实施例中,固相载体为改性玻璃表面,诸如氨基硅酸盐表面。

[0046] 在一些实施例中,肽或蛋白质已通过蛋白酶降解。在一些实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的磷酸化。在其他实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的三甲基化。在其他实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的糖基化。在其他实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的亚硝基化。在其他实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的瓜氨酸化。在其他实施例中,翻译后修饰为肽或蛋白质的亚磺酰化。

[0047] 在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸上的磷

酸化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为苏氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为N-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为天冬酰胺或精氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为O-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为三甲基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为赖氨酸的三甲基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸或酪氨酸的亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为瓜氨酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚磺酰化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚磺酰化。

[0048] 在另一个方面中,本公开提供了对肽或蛋白质进行测序的方法,该方法包括:

[0049] (A) 获得不含细胞的生物样品并从所述不含细胞的生物样品分离肽或蛋白质;

[0050] (B) 在足以与肽或蛋白质的至少一个与翻译后修饰相关联的氨基酸残基相互作用的条件下用第一标记部分标记肽或蛋白质,以形成肽或蛋白质的至少一个标记的氨基酸残基;

[0051] (C) 使肽或蛋白质经受足以从肽或蛋白质中移除一个或多个单独的氨基酸残基的条件;

[0052] (D) 检测来自至少一个标记的氨基酸残基的至少一个信号,从而鉴别肽或蛋白质的序列。

[0053] 在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸、丝氨酸或苏氨酸上的磷酸化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为苏氨酸上的磷酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为N-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为天冬酰胺或精氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为O-糖基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的糖基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为三甲基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为赖氨酸的三甲基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸或酪氨酸的亚硝基化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为酪氨酸的亚硝基化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为瓜氨酸化。在其他实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为亚磺酰化。在一些实施例中,氨基酸残基上的翻译后修饰为半胱氨酸的亚磺酰化。

[0054] 在一些实施例中,标记试剂取代氨基酸残基上的翻译后修饰。在一些实施例中,翻译后修饰位于蛋白质的氨基酸残基上。在其他实施例中,翻译后修饰位于肽的氨基酸残基上。在一些实施例中,标记试剂包含硫醇基团。在一些实施例中,标记试剂包含两个硫醇基团。在一些实施例中,标记试剂包含胺反应性基团,诸如琥珀酰亚胺酯。在一些实施例中,标

记试剂包含乙二醛基团。在一些实施例中，标记试剂包含1,3-环烷烃二酮基团，诸如1,3-己二酮。

[0055] 在一些实施例中，标记试剂为荧光团、寡核苷酸或肽-核酸。在一些实施例中，标记试剂为荧光团。在一些实施例中，标记试剂为含有硫醇的荧光团。在一些实施例中，荧光团为氧杂蒽染料，诸如罗丹明染料。

[0056] 在一些实施例中，该方法还包括用第一标记部分标记肽或蛋白质，其包括：

[0057] (i) 在使得肽或蛋白质上的翻译后修饰转化为反应性基团的条件下处理肽或蛋白质，以形成反应性肽或蛋白质；

[0058] (ii) 用反应性肽或蛋白质处理第一标记部分，以形成经标记的肽或蛋白质。

[0059] 在一些实施例中，反应性肽或蛋白质通过用碱处理包含磷酸化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中，碱为稀土金属氢氧化物，诸如Ba(OH)₂。

[0060] 在其他实施例中，反应性肽或蛋白质通过用活化试剂和碱处理包含磷酸化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中，活化试剂为碳化二亚胺，诸如1-乙基-3-(3-二甲基氨基丙基)碳化二亚胺(EDC)。在一些实施例中，碱为杂芳族碱，诸如咪唑。

[0061] 在其他实施例中，反应性肽或蛋白质通过用氧化银(Ag₂O)处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中，在存在热量的情况下用氧化银处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质。在一些实施例中，反应性肽或蛋白质通过用碱处理包含三甲基翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中，碱为含氮碱，诸如二异丙基乙基胺或三甲基胺。

[0062] 在其他实施例中，反应性肽或蛋白质是通过用氧化剂处理包含糖基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成的。在一些实施例中，氧化剂为高价碘试剂，诸如高碘酸钠。

[0063] 在其他实施例中，反应性肽或蛋白质是通过用还原剂处理包含亚硝基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成的。在一些实施例中，还原剂为二硫化物还原剂，诸如二硫苏糖醇。在一些实施例中，还原剂还包括亚铁血红素。在一些实施例中，反应性肽或蛋白质通过用膦处理包含亚硝基化翻译后修饰的肽或蛋白质而形成。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三烷基膦、或者未被取代的或被取代的三芳基膦。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三芳基膦。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三苯基膦。在一些实施例中，该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触，其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与膦反应。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三烷基膦、或者未被取代的或被取代的三芳基膦。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三芳基膦。在一些实施例中，膦为未被取代的或被取代的三苯基膦。在一些实施例中，膦共价连接至标记试剂。

[0064] 在一些实施例中，该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触，其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与乙二醛基团反应。在一些实施例中，乙二醛基团共价连接至标记试剂。在其他实施例中，该方法涉及使肽或蛋白质与标记试剂接触，其包括使包含翻译后修饰的肽或蛋白质与1,3-环烷烃二酮基团，诸如1,3-己二酮反应。在一些实施例中，1,3-环烷烃二酮共价结合至标记试剂。在一些实施例中，反应性肽或蛋白质上的反应性基团为双键。在一些实施例中，用包含硫醇烯点击反应的标记试剂处理反应性肽或蛋白质，以形成经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中，在存在烯炔复分解试剂的情况下用具有双键的标记试剂处理反应性肽或蛋白质，以形成经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中，用包含环加成反应

的标记试剂处理反应性肽或蛋白质,以形成经标记的肽或蛋白质。

[0065] 在一些实施例中,反应性肽或蛋白质上的反应性基团为醛。在一些实施例中,用反应性肽或蛋白质上的包含亲核加成、亲核置换或自由基加成的反应性基团处理标记试剂。在一些实施例中,当用反应性肽或蛋白质上的反应性基团处理时,标记试剂形成硫醚。在一些实施例中,标记试剂形成二噻烷。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成酰胺键。在一些实施例中,酰胺键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成二硫键。在一些实施例中,二硫键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成杂环烷烃。在一些实施例中,杂环烷基基团的形成提供了经标记的肽或蛋白质。在一些实施例中,用标记试剂处理反应性肽或蛋白质以形成硫醚键。在一些实施例中,硫醚键的形成提供了经标记的肽或蛋白质。

[0066] 在一些实施例中,测序包括荧光测序方法。在一些实施例中,测序在单分子水平上进行。在一些实施例中,荧光测序方法包括用第二标记试剂标记肽或蛋白质的至少一种不含有翻译后修饰的氨基酸。在一些实施例中,荧光测序方法包括标记肽或蛋白质的一种、两种、三种、四种或五种不同的不含翻译后修饰的氨基酸。在一些实施例中,每种氨基酸均用不同的第二标记试剂标记。

[0067] 在一些实施例中,肽或蛋白质结合至固相载体,诸如表面。在一些实施例中,固相载体为树脂、微珠或改性玻璃表面。在一些实施例中,固相载体为改性玻璃表面,诸如氨基硅酸盐表面。

[0068] 在一些实施例中,荧光测序方法还包括移除肽或蛋白质的至少一个氨基酸残基。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的两个或更多个连续氨基酸残基。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的氨基酸残基直至移除包含修饰的翻译后修饰的标记的氨基酸。在一些实施例中,荧光测序方法包括顺序移除肽或蛋白质的1个至20个氨基酸残基直至移除包含修饰的翻译后修饰的标记的氨基酸。在一些实施例中,通过Edman降解移除氨基酸残基。在一些实施例中,通过用硫脲和酸、微波辐射或热量处理N末端氨基酸残基来移除氨基酸残基。在一些实施例中,通过酶移除氨基酸残基。

[0069] 在一些实施例中,通过蛋白酶消化肽或蛋白质。在一些实施例中,在标记包含翻译后修饰的氨基酸之前通过蛋白酶消化肽或蛋白质。

[0070] 在另一个方面中,本公开提供了用于多肽序列鉴别的方法,该方法包括:

[0071] (A) 从受试者的不含细胞的生物样品中获得第一多肽;

[0072] (B) 使用所述第一多肽生成固定至载体的第二多肽,其中所述第二多肽包含标记的氨基酸;

[0073] (C) 使所述第二多肽经受足以从所述多肽中移除氨基酸的条件;以及

[0074] (D) 在从所述多肽中移除所述氨基酸期间或之后,检测来自所述标记的氨基酸的至少一个子集的信号,从而鉴别所述第二多肽的序列以确定来自所述不含细胞的生物样品的所述第一多肽的序列。

[0075] 在一些实施例中,所述第二多肽的不到全部类型的氨基酸被标记。在一些实施例中,所述第一多肽是蛋白质。

[0076] 在另一个方面中,本公开提供了用于加工或分析含有或疑似含有至少一种翻译后

修饰的蛋白质或肽的方法,该方法包括:

[0077] (A) 对所述蛋白质或肽进行测序,以及

[0078] (B) 鉴别所述蛋白质或肽或其衍生物的至少一个氨基酸子单元中的所述至少一种翻译后修饰。

[0079] 在一些实施例中,所述测序包括使所述蛋白质或肽经受降解条件以从所述蛋白质或肽中顺序移除氨基酸子单元,并检测所述氨基酸子单元的至少一个子集。在一些实施例中,所述肽或蛋白质的不到全部的氨基酸子单元被标记,并且其中所述测序包括检测所述氨基酸子单元的子集。在一些实施例中,在所述测序期间鉴别所述至少一种翻译后修饰。在一些实施例中,在所述测序之前鉴别所述至少一种翻译后修饰。在一些实施例中,从样品中获得所述蛋白质或肽并将其加工以标记所述至少一种翻译后修饰。在一些实施例中,所述样品为不含细胞的样品。在一些实施例中,所述测序包括用标签标记所述蛋白质或肽的所述至少一种翻译后修饰,以及检测所述标签,从而鉴别所述蛋白质或肽上的所述至少一种翻译后修饰。

[0080] 在另一个方面中,本公开提供了用于加工或分析蛋白质或肽的方法,该方法包括使所述蛋白质或肽经受足以特异性标记所述蛋白质或肽的不同翻译后修饰的条件,以及检测对应于所述蛋白质或肽的所述不同翻译后修饰的标签,从而检测所述蛋白质或肽的所述不同的翻译后修饰。

[0081] 在一些实施例中,所述不同的翻译后修饰包括磷酸化、糖基化、亚硝基化、瓜氨酸化、亚磺酰化或三甲基化。

[0082] 如本文所用,就特定组分而言,“基本上不含”可指组合中不存在特定组分或者所述组分仅作为污染物或以痕量存在。因此,由组合物的任何意外污染而产生的特定组分的总量可低于0.1%。在一些实施例中,使用标准分析方法无法在组合物中检测出所述特定组分的量。

[0083] 如本文在说明书和权利要求中所使用的,“一”或“一个(种)”可指一个(种)或多个(种)。如本文在说明书和权利要求中所使用的,当与字词“包括”结合使用时,字词“一”或“一个(种)”可指一个(种)或多于一个(种)。如本文在说明书和权利要求中所使用的,“另一”或“另一个(种)”可指第二个(种)或多个(种)。

[0084] 如本文在说明书和权利要求中所使用的,术语“约”用于表示值包括用于确定该值的设备、方法的固有误差变化或研究对象之间存在的变化。在一些实施例中,术语“约”是指所列值的 $\pm 5\%$ 。

[0085] 通过下面详细的描述,本公开的其他目的、特点和优点将会变得显而易见。详细描述和特定实例(尽管指示某些实施例)通过举例的方式给出,因为在精神和范围内的各种变化和修改通过该详细的描述将变得显而易见。

[0086] 附图简要说明

[0087] 以下附图构成本说明书的一部分并包括在本说明书内,以进一步说明本公开的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个附图,结合在此呈现的具体实施例的详细描述,可以更好地理解本公开。

[0088] 图1:通过荧光测序正确鉴别合成的CTD七肽上的磷酸丝氨酸残基(上图)磷酸丝氨酸存在于第2位置。(下图)磷酸丝氨酸存在于第5位置。示出了来自每一实验的两种单独肽

分子的代表性原始成像数据。对于每种单独分子,图像被组织为以肽分子为中心连续TIRF显微图(每幅显微图对应于3微米×3微米正方形)的水平带。每幅图像代表在一连串Edman化学反应之后从该分子发射的荧光的一个连续观察结果。荧光值的急剧减小遵循其中移除了氨基酸与连接的荧光染料的Edman循环,因此显示原始肽中的磷酸化残基的氨基酸序列位置。热图表示记录每次Edman降解循环之后荧光有损失的单独肽分子的计数与背景计数的频率直方图。当通过荧光测序方法分析时,第2位置(上图)和第5位置(下图)中的磷酸化丝氨酸残基分别在第2位置处和第5位置处具有显著更高的荧光损失计数。

[0089] 图2示出了两个生物样品之间的荧光测序位置计数。在荧光测序平台上对来自两种不同HEK-293T样品的蛋白质进行消化、标记和测序。观察到读取计数在这些生物平行测试样之间高度相关(Pearson系数0.9582)。对数据计数并绘制在log10对数尺度上。

具体实施方式

[0090] 在一些方面中,本公开提供了键入、鉴别、定量或定位肽或蛋白质中的翻译后修饰(PTM)的方法。这些方法可用于确定肽或蛋白质中的PTM(诸如磷酸化、糖基化或烷基化)的类型、定位、数量或位置。这些方法可与荧光测序方法(诸如包括用标记部分诸如荧光团标记翻译后修饰的那些方法)结合使用。这些方法还可包括从肽或蛋白质中移除一个或多个氨基酸残基。在一些方面中,这些方法可用于确定患者的疾病或障碍的进展或状态。

[0091] I. 肽测序方法

[0092] 存在许多种鉴别肽的序列的方法,包括荧光测序、质谱法、从核酸序列中鉴别肽序列和Edman降解。已发现,荧光测序为感兴趣的蛋白质的测序提供单分子分辨率(Swaminathan,2010;美国专利号9,625,469;美国专利申请序列号15/461,034;美国专利申请序列号15/510,962)。荧光测序的特征之一是将荧光团或其他标签引入肽序列的特定氨基酸残基中。这可涉及引入具有独特标记部分的一个或多个氨基酸残基。在一些实施例中,用标记部分标记一个、两个、三个、四个、五个或更多个不同的氨基酸残基。可使用的标记部分包括荧光团、发色团或猝灭剂。这些氨基酸残基中的每一个可包括半胱氨酸、赖氨酸、谷氨酸、天冬氨酸、色氨酸、酪氨酸、丝氨酸、苏氨酸、精氨酸、组氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。这些氨基酸残基中的每一个可用不同的标记部分标记。在一些实施例中,多个氨基酸残基可用相同的标记部分(诸如天冬氨酸和谷氨酸或天冬酰胺和谷氨酰胺)标记。虽然该技术可与诸如上述那些的标记部分一起使用,但也设想,在类似荧光测序方法中可使用其他标记部分,诸如可使用合成的寡核苷酸或肽-核酸。具体地,本申请中使用的标记部分可适于承受移除氨基酸残基中的一个或多个的条件。可用于本发明方法中的潜在标记部分的一些非限制性示例包括在红色至红外光谱中发射荧光信号的那些,诸如Alexa Fluor®染料、Atto染料、罗丹明染料或其他类似染料。能够承受移除氨基酸残基的条件的这些染料中的每一种的示例包括Alexa Fluor® 405、罗丹明B、四甲基罗丹明、Alexa Fluor 555、Atto647N和(5)-6-萘荧光素。在其他方面中,设想标记部分可为荧光肽或蛋白质或萘荧光素或量子点。

[0093] 另选地,合成的寡核苷酸或寡核苷酸衍生物可用作肽的标记部分。例如,硫醇化寡核苷酸可使用所提出方法偶联至肽。通常可用的硫醇修饰为5'硫醇修饰、3'硫醇修饰和二硫醇修饰,并且这些修饰中的每一种可用于修饰肽。在寡核苷酸偶联至如上肽之后,肽可经

受Edman降解 (Edman等人, 1950) 并且寡核苷酸可用于确定剩余肽序列中特定氨基酸残基的存在。在其他实施例中, 标记部分可为肽-核酸。肽-核酸可连接至特定氨基酸残基上的肽序列。

[0094] 荧光测序的一个要素是通过此类技术 (诸如Edman降解和后续可视化) 移除标记的肽以检测荧光值的减小, 从而指示特定氨基酸已被切割。通过多种不同的技术 (包括Edman降解和蛋白水解切割) 执行每个氨基酸残基的移除。在一些实施例中, 这些技术包括使用Edman降解来移除末端氨基酸残基。在其他实施例中, 这些技术涉及使用酶来移除末端氨基酸残基。可从肽链的C末端或N末端移除这些末端氨基酸残基。在其中使用Edman降解的情况下, 移除肽链的N末端处的氨基酸残基。

[0095] 在一些方面, 肽序列的测序或成像方法可包括将肽固定在表面上。可使用半胱氨酸残基、N末端或C末端固定肽。在一些实施例中, 通过使半胱氨酸残基与表面反应来固定肽。在一些实施例中, 本公开设想将肽固定在折射率介于1.3和1.6之间、厚度介于10nm至50nm之间、耐有机溶剂以及强酸 (诸如三氟乙酸) 化学腐蚀或它们的任何组合的表面 (诸如在可见光谱、红外光谱或它们的组合上光学透明的表面) 上。广泛的底物 (如含氟聚合物 (Teflon-AF (Dupont)、**Cytop**[®] (Asahi Glass, Japan))、芳族聚合物 (聚二甲苯 (Parylene, Kisco, Calif.)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯) 和金属表面 (金涂层))、涂覆方案 (旋涂、浸涂、金属的电子束沉积、热气相沉积和等离子体增强化学气相沉积) 和功能化方法 (聚丙烯胺接枝、在PECVD中使用氨气、掺杂长链端功能化氟烷烃等) 可用于本文所述的方法中, 作为可用的表面。由**Cytop**[®]制成的20nm厚光学透明的含氟聚合物表面可用于本文所述的方法中。本文所使用的表面可用多种含氟烷烃进一步衍生化, 该多种含氟烷烃将隔离用于测序的肽和用于选择的修饰靶标。另选地, 氨基硅烷修饰的表面可用于本文所述的方法中。在其他实施例中, 本文所述的方法可包括将肽固定在微珠、树脂、凝胶、石英颗粒、玻璃微珠或它们的组合的表面上。在一些非限制性示例中, 该方法设想使用肽, 该肽已固定在**Tentagel**[®]微珠、**Tentagel**[®]树脂或其他类似微珠或树脂的表面上。本文所使用的表面可涂覆有聚合物, 诸如聚乙二醇。在其他实施例中, 表面为胺官能化的。在其他实施例中, 表面为硫醇官能化的。

[0096] 这些测序技术中的每一种涉及使肽序列成像以确定肽序列上一个或多个标记部分的存在。在一些实施例中, 在每次移除氨基酸残基之后拍摄这些图像, 并使用这些图像确定肽序列中特定氨基酸的位置。在一些实施例中, 该方法可导致阐明肽序列中特定氨基酸的位置。这些方法可用于确定肽序列中特定氨基酸残基的位置, 或这些结果可用于确定肽序列中氨基酸残基的整个列表。方法可涉及确定肽序列中一个或多个氨基酸残基的位置, 并将这些位置与特定肽序列进行比较并确定肽序列中氨基酸残基的整个列表。

[0097] 在一些方面中, 方法可包括标记一个或多个另外的不含翻译后修饰的氨基酸残基。这些氨基酸可用与用于标记含有翻译后修饰的氨基酸残基的标签不同的标记部分标记。如果在肽上标记多于一个位置, 则设想按以下顺序标记氨基酸: 半胱氨酸、赖氨酸、N末端、C末端、在侧链上具有羧基的氨基酸、色氨酸、或它们的任何组合。设想可标记这些具体氨基酸中的一个或多个, 或者可用不同标签标记这些氨基酸残基的全部。

[0098] 在一些方面, 用于测序技术的成像方法可涉及多种不同的方法, 诸如荧光测定法

和荧光显微法。荧光方法可采用此类荧光技术,诸如荧光偏振、荧光共振能量转移(FRET)或时间分辨荧光。在一些实施例中,荧光显微法可用于确定单分子量的一个或多个荧光团的存在。此类成像方法可用于确定特定肽序列上是否存在标签。在移除氨基酸残基并使肽序列成像的重复循环之后,可在肽中确定标记的氨基酸残基的位置。

[0099] II. 翻译后修饰

[0100] 在一些方面,本发明方法包括标记和确定肽序列的翻译后修饰的存在和位置、定位、数量、类型、或它们的任何组合。翻译后修饰用于指通过蛋白质或肽的酶或非酶修饰的蛋白质或肽的共价修饰。如本文所使用的,翻译后修饰包括天然以及非天然修饰两者。翻译后修饰可用于描述多种不同类型的共价修饰,包括对氨基酸的侧链的修饰或肽(或酰胺)键的切割,或作为氧化应力的结果。通常翻译后修饰连接至氨基酸的侧链。氨基酸的含有亲核侧链的这些侧链通常是翻译后修饰的位点。氨基酸的可经修饰的侧链包括亲核位点,诸如氨基酸丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的羟基基团;氨基酸赖氨酸、精氨酸和组氨酸的胺基团;半胱氨酸的硫醇基团;以及天冬氨酸盐和谷氨酰胺的羧酸基团。

[0101] 翻译后修饰的一些非限制性示例包括疏水基团的加成,诸如可用于引入一个或多个烷基(诸如甲基基团)的烷基化、可用于引入一个或多个酰基基团的酰化(诸如乙酰化、甲酰化或用脂肪酸酰化)、或引入类异戊二烯基团的异戊烯化。其他翻译后修饰可包括引入辅因子或翻译因子,诸如黄素部分、亚铁血红素部分、脂化或白喉酰胺形成。其他翻译后修饰可包括引入另一种蛋白质,诸如连接SUMO蛋白质的SUMO化或连接蛋白质泛素的泛素化。

[0102] 翻译后修饰还可包括将化学基团引入现有氨基酸残基。可用于修饰氨基酸残基的化学基团的一些非限制性示例包括酰化、烷基化、酰胺键形成、羧化、糖基化、羟基化、碘化、磷酸化、亚硝基化、亚磺酸化、亚磺酰化、硫酸化或琥珀酰化。在一些实施例中,本发明方法可用于确定这些翻译后修饰中的一者或多者的存在。在一些实施例中,翻译后修饰为烷基化,具体地讲为向赖氨酸残基的侧链引入一甲胺、二甲胺或三甲胺基团的甲基化。在其他实施例中,翻译后修饰为酪氨酸、苏氨酸或丝氨酸残基,尤其苏氨酸或丝氨酸残基上的羟基基团的磷酸化。在另一个实施例中,翻译后修饰为氨基酸的侧链中氮或氧原子的糖基化。

[0103] 具有本文所述的翻译后修饰的肽或蛋白质可从生物样品中获得。这些生物样品可从动物或植物来源获得。一种可能的动物来源为哺乳动物来源,诸如从人身上获得的样品。人来源可获自婴儿、青少年或成年人。这些生物样品可包括不含细胞的样品。不含细胞的样品可为不含细胞、基本上不含细胞或实质上不含细胞的样品。不含细胞的生物样品可包括蛋白质、肽、氨基酸、核酸分子(例如,核糖核酸分子或脱氧核糖核酸分子)或它们的任何组合。虽然样品可表示为不含细胞,但样品可含有少量的细胞或细胞碎片,同时仍可认为样品是不含细胞的。例如,这些样品可包括少于或等于约50个细胞或更少/毫升样品、45个细胞/毫升、40个细胞/毫升、35个细胞/毫升、30个细胞/毫升、25个细胞/毫升、20个细胞/毫升、15个细胞/毫升、10个细胞/毫升、5个细胞/毫升、1个细胞/毫升、或更少。在一些实施例中,这些样品可包括多于或等于约1个细胞/毫升、5个细胞/毫升、10个细胞/毫升、15个细胞/毫升、20个细胞/毫升、25个细胞/毫升、30个细胞/毫升、35个细胞/毫升、40个细胞/毫升、45个细胞/毫升、50个细胞/毫升、或更多。此类不含细胞的样品可包括例如血液(例如,全血)、血清、血浆、唾液、尿液或粘液。

[0104] III. 定义

[0105] 如本文所使用的,术语“氨基酸”通常是指含有至少一个氨基基团—NH₂(其可以其离子形式—NH₃⁺存在)和一个羧基基团—COOH(其可以其离子形式—COO⁻存在)的有机化合物,其中羧酸在中性pH下去质子化,并具有NH₂CHRCOOH的碱形式。氨基酸和因此肽具有N(氨基)-末端残基区和C(羟基)-末端残基区。氨基酸的类型包括至少20种,认为它们是“天然”的,因为它们包括哺乳动物中的大部分生物蛋白质并包括氨基酸诸如赖氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、苏氨酸等。氨基酸可也基于其侧链分组,诸如具有羧酸基团(在中性pH下)的那些,包括天冬氨酸或天冬氨酸盐(Asp;D)和谷氨酸或谷氨酸盐(Glu;E);以及碱性氨基酸(在中性pH下),包括赖氨酸(Lys;L)、精氨酸(Arg;N)和组氨酸(His;H)。

[0106] 如本文所使用的,术语“末端”是指单个末端和多个末端。

[0107] 如本文所使用的,术语“侧链”或“R”是指连接到 α 碳的独特结构(连接氨基酸的胺和羧酸基团),该独特结构向每种类型氨基酸赋予独特性。R基团具有多种形状、尺寸、电荷和反应性,诸如带正电荷或负电荷的带电极性侧链,诸如赖氨酸(+)、精氨酸(+)、组氨酸(+)、天门冬氨酸(-)和谷氨酸盐(-),氨基酸也可为碱性的(诸如赖氨酸)或酸性的(诸如谷氨酸);不带电极性侧链具有羟基、酰胺或硫醇基团,诸如具有化学反应性侧链的半胱氨酸,即可与另一种半胱氨酸、丝氨酸(Ser)和苏氨酸(Thr)形成键并具有不同尺寸的羟基R侧链的硫醇基团;天冬酰胺(Asn)、谷氨酰胺(Gln)和酪氨酸(Tyr);非极性疏水氨基酸侧链包括氨基酸甘氨酸;具有脂肪族烃侧链的丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,该脂肪族烃侧链的尺寸在甲基基团(就丙氨酸而言)至同分异构丁基基团(就亮氨酸和异亮氨酸而言)的范围内;甲硫氨酸(Met)具有硫醇醚侧链,脯氨酸(Pro)具有环吡咯烷侧基团。苯基丙氨酸(具有苯基部分)(Phe)和色氨酸(Trp)(具有吲哚基团)含有通过大体积以及非极性表征的芳族侧基团。

[0108] 氨基酸也可通过名称或3字母代码或1字母代码指代,例如,分别为半胱氨酸;Cys;C,赖氨酸;Lys;K,色氨酸;Trp;W。

[0109] 氨基酸可被归类为营养必需或非必需氨基酸,需要说明的是非必需氨基酸与必需氨基酸可因生物体而不同,或者可在不同发育阶段而不同。具体生物体的非必需或条件性氨基酸是在机体中使用由若干基因编码的酶通常在途径中充分地合成的氨基酸,因为底物允许蛋白质合成。必需氨基酸是通过从头途径生物体不能产生或不能自然地产生的氨基酸,例如人中的赖氨酸。人通过饮食获得必需氨基酸,包括合成的补充剂、肉、植物和其他生物体。

[0110] “非天然”氨基酸是既不是天然编码或可见于遗传密码中的,也不是通过从头途径在哺乳动物或植物中产生的那些氨基酸。它们可通过添加非正常存在或自然界中很少存在于氨基酸上的侧链来合成。

[0111] 如本文所使用的,如在20种标准生物氨基酸中其氨基基团键合到 β 碳而不是 α 碳上的 β 氨基酸是非天然氨基酸。常见天然存在的 β 氨基酸是 β -丙氨酸。

[0112] 如本文所使用的,术语“氨基酸序列”、“肽”、“肽序列”、“多肽”和“多肽序列”在本文可互换使用,是指通过肽(酰胺)键或肽键的类似物共价连接的至少两个氨基酸或氨基酸类似物。术语“肽”包括氨基酸或氨基酸类似物的低聚物或聚合物。术语“肽”也包括通常含有约两(2)个至约二十(20)个氨基酸的通常被称为肽的分子。术语“肽”也包括通常含有约二十(20)个至约五十(50)个氨基酸的通常被称为多肽的分子。术语“肽”也包括通常含有约

五十(50)个至约三千(3000)个氨基酸的通常被称为蛋白质的分子。肽的氨基酸可为L-氨基酸或D-氨基酸。肽、多肽或蛋白质可为合成的、重组的或天然存在的。合成的肽是在体外人为产生的肽。

[0113] 如本文所使用的,术语“子集”是指单独肽分子的N-末端氨基酸残基。具有N-末端赖氨酸残基的单独肽分子的“子集”与具有非赖氨酸N-末端残基的单独肽分子的“子集”区分开。

[0114] 如本文所使用的术语“被取代的”可指其中亲本分子上的一个或多个氢原子被另一个基团替代,使得该基团基本上不改变化合物的本质功能的化合物。更具体地,术语“被取代的”意指所提及的基团可被一个或多个另外的基团取代,该一个或多个另外的基团各自且独立地选自烷基、环烷基、芳基、杂芳基、杂环烷基、-OH、烷氧基、芳氧基、烷硫基、芳硫基、烷基亚砷、芳基亚砷、烷基砷、芳基砷、-CN、炔基、C₁-C₆烷炔基、卤素、酰基、酰氧基、-CO₂H、-CO₂-烷基、硝基、卤代烷基、氟代烷基和氨基,包括一取代的和二取代的氨基基团(例如-NH₂、-NHR、-N(R)₂)及其受保护的衍生物。通过举例的方式,取代基可为L^sR^s,其中每个L^s独立地选自键-O-、-C(=O)-、-S-、-S(=O)-、-S(=O)₂-、-NH-、-NHC(O)-、-C(O)NH-、S(=O)₂NH-、-NHS(=O)₂-、-OC(O)NH-、-NHC(O)O-、-(C₁-C₆烷基)-、或-(C₂-C₆烯基)-;并且每个R^s独立地选自H、(C₁-C₆烷基)、(C₃-C₈环烷基)、芳基、杂芳基、杂环烷基和C₁-C₆杂烷基。可形成上述取代基的保护性衍生物的保护基团可见于以上来源,诸如Greene and Wuts。可能的化学基团的非限制性列表包括-OH、-F、-Cl、-Br、-I、-NH₂、-NO₂、-CO₂H、-CO₂CH₃、-CO₂CH₂CH₃、-CN、-SH、-OCH₃、-OCH₂CH₃、-C(O)CH₃、-NHCH₃、-NHCH₂CH₃、-N(CH₃)₂、-C(O)NH₂、-C(O)NHCH₃、-C(O)N(CH₃)₂、-OC(O)CH₃、-NHC(O)CH₃、-S(O)₂OH或-S(O)₂NH₂。

[0115] 如本文所使用的,术语“荧光”是指可见光被已吸收具有不同波长的光的物质发射。在一些实施例中,荧光提供了基于特定波长下荧光的发射追踪生物分子、分析生物分子或追踪生物分子和分析生物分子的组合的非破坏性方式。蛋白质(包括抗体)、肽、核酸、寡核苷酸(包括单链和双链引物)可用被称为荧光团的多种外在荧光分子“标记”。

[0116] 如本文所使用的,肽“在单分子水平下”的测序是指从不同肽分子混合物中的单独(即单一)肽分子中获得的氨基酸序列信息。本公开可不限于其中从单独肽分子中获得的氨基酸序列信息是单独肽分子的完整或连续的氨基酸序列的方法。在一些实施例中,获得部分氨基酸序列信息是足够的,从而允许鉴别肽或蛋白质。部分氨基酸序列信息(包括例如单独肽分子内特定氨基酸残基(即赖氨酸)的模式)可足以独特地鉴别单独肽分子。例如,可搜索给定生物体的特定蛋白质组的指示赖氨酸分子在单独肽分子内的分布的氨基酸的模式诸如X-X-X-Lys-X-X-X-X-Lys-X-Lys以鉴别单独肽分子。肽在单分子水平下的测序并非旨在局限于鉴别赖氨酸残基在单独肽分子中的模式;任何氨基酸残基(包括多个氨基酸残基)的序列信息均可用于鉴别不同肽分子的混合物中的单独肽分子。

[0117] 如本文所使用的,“单分子分辨率”是指从不同肽分子的混合物中的单独肽分子中采集数据(包括例如氨基酸序列信息)的能力。在一个非限制性示例中,可将不同肽分子的混合物固定在固体表面(包括例如,载玻片或其表面已被化学修饰的载玻片)上。在一个实施例中,这可包括同时记录分布在玻璃表面上的多种单独(即单一)肽分子的荧光强度的能力。存在可以这种方式施用的许多光学装置。例如,可获得配备有全内反射照射和强化电荷耦合器件(CCD)检测器的常规显微镜(参见Braslaysky等人,2003)。用高灵敏度CCD相机成

像允许仪器同时记录分布在表面上的多个单独(即,单一)肽分子的荧光强度。在一个实施例中,图像收集可使用图像分割器进行,该图像分割器将光线引导通过两个带通滤波器(适于每种荧光分子的带通滤波器)以在CCD表面上记录为两幅并排图像。使用具有自动对焦控件的机动显微镜载物台来将流通池中的多个载物台位置成像可允许在一个实验中对数百万的单独单肽(或更多)进行测序。

[0118] 属性概率质量函数—对于给定荧光序列,其源蛋白质的后验概率质量函数即每种源蛋白质 p_i 的概率组 $P(p_i/f_i)$ 给出所观察的荧光序列 f_i 。

[0119] III. 实例

[0120] 包括以下实例以说明本公开的某些实施例。以下实例中所公开的技术代表本发明人发现的在本公开的实践中发挥良好作用的技术。然而,根据本公开,在不脱离本公开的精神和范围的情况下,可以对所公开的特定实施例进行许多改变以仍获得相同或相似的结果。

[0121] 实例1—在单分子灵敏度下定位蛋白质上翻译后磷酸化的位置。

[0122] 材料和方法

[0123] 用于磷酸化肽合成和纯化的标记方案—所有肽均使用自动固相肽合成仪(Liberty Blue微波肽合成仪;CEM Corporation),采用标准Fmoc化学法合成。标准Fmoc氨基酸基本单元和Fmoc-O-苄基磷酸丝氨酸(目录号:03734)购自ChemImpex Inc(IL,USA)。使用包含TFA:水:三异丙基硅烷(9.5:0.25:0.25v:v:v混合物)的酸切割混合物将肽切割并去保护。在通过用氮气干燥移除TFA之后,用低温醚将肽析出并在8000rcf下离心10分钟。将沉淀重悬于乙腈/水(1:1v:v混合物)中并通过高效液相色谱(日本岛津公司)在90分钟内使用以10mL/min流速和5–95%甲醇(0.1%甲酸)梯度操作的Agilent® Zorbax®色谱柱(4.6mm×250mm)纯化。收集含有肽的级分,并在冷冻干燥之前使用旋转蒸发仪减少体积。

[0124] 染料-硫醇试剂的合成—将3mg的Atto 647N-NHS(目录号:AD647N35;Atto-tec)与150μL碱性半胱胺溶液(5.1mg半胱胺和7.5μL DIPEA的1500μL无水DMF溶液)混合。将该混合物温育3h并通过质谱确认Atto647N-S-S-Atto647N产物(方案1)。将产物等分到玻璃小瓶中,这些小瓶各自含有200μg的试剂。通过使Atto647N-S-S-Atto647N试剂与1mM三(2-羧基乙基)膦(TCEP)反应并在60°C下温育1h来制备单一染料-硫醇试剂Atto647N-SH。

[0125] 用染料-硫醇试剂标记磷酸根基团—将磷酸化肽溶解在乙腈和水(1:1v:v)的100μL混合物中。向该溶液中添加46μL的饱和氢氧化钡和4μL的4M氢氧化钠,并将该混合物在室温下温育3h。然后将100μL的DMF、100μL的水和1.4mg的TCEP添加到肽溶液中。将整个混合物转移到200μg的染料-硫醇试剂中并温育过夜。在向混合物中添加染料-硫醇试剂之前,可添加TCEP以破坏染料-硫醇试剂中的二硫键。然后用乙腈/水混合物(1:1v:v)将反应的整个内容物稀释至2mL并通过HPLC将其分离(如上所述)。然后收集荧光级分,通过HPLC上的二极管阵列检测器在640nm处监测其吸光度,因为该荧光级分对应于磷酸化肽。不收集存在于54分钟和55分钟保留时间处并且对应于未反应染料-硫醇试剂的两个信号峰。在HPLC纯化之后,将标记的磷酸化肽冷冻干燥。通过将标记的肽溶解在DMF中并将该混合物与N-琥珀酰亚胺碳酸叔丁酯一起温育过夜,肽的N-末端被叔丁氧羰基(“Boc”)保护基团保护。将该溶液稀释并等分成200μg或2mM。

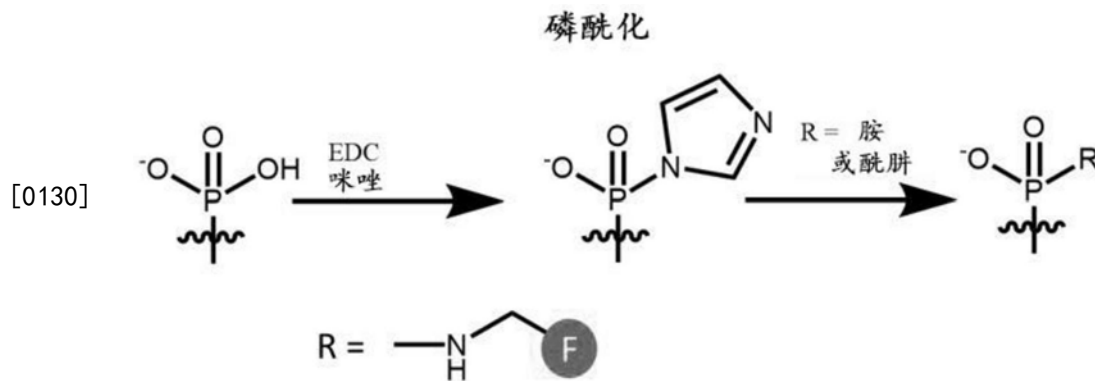
[0126] 检测标记的肽—如Swaminathan等人,2010;美国专利号9,625,469;美国专利申请

序列号15/461,034;美国专利申请序列号15/150,962中那样检测标记的肽,作出很小改动。这些小改动是:(a)在固体基材上通过肽的羧基末端将肽固定到胺官能化载玻片上。(b)在实验周期之前,通过将固定肽与90%三氟乙酸在40°C下温育5h而将保护肽的胺末端的“Boc”基团去保护。(c)将1mM的Trolox(6-羟基-2,5,7,8-四甲基苯并二氢吡喃-2-羧酸)溶解在甲醇中的溶液用作成像缓冲液。

[0127] 用于Pan磷酸化标记的另外的标记策略

[0128] 可通过EDC/咪唑反应机制(示于方案1中)标记存在于任何修饰的氨基酸(丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、组氨酸)上的磷酸根基团。该反应已描述用于寡核苷酸,并且也可用于标记氨基酸上的焦磷酸根,并且已根据Wang等人,1993作出修改。使磷酸化肽与0.1M咪唑、0.1M EDC和0.25M的给体胺(荧光团)在pH为7.5的缓冲液诸如PBS缓冲液(例如<10mM)中反应。将反应体系在50°C下保持20分钟。随后纯化标记的肽并通过单分子测序方法进行测序。

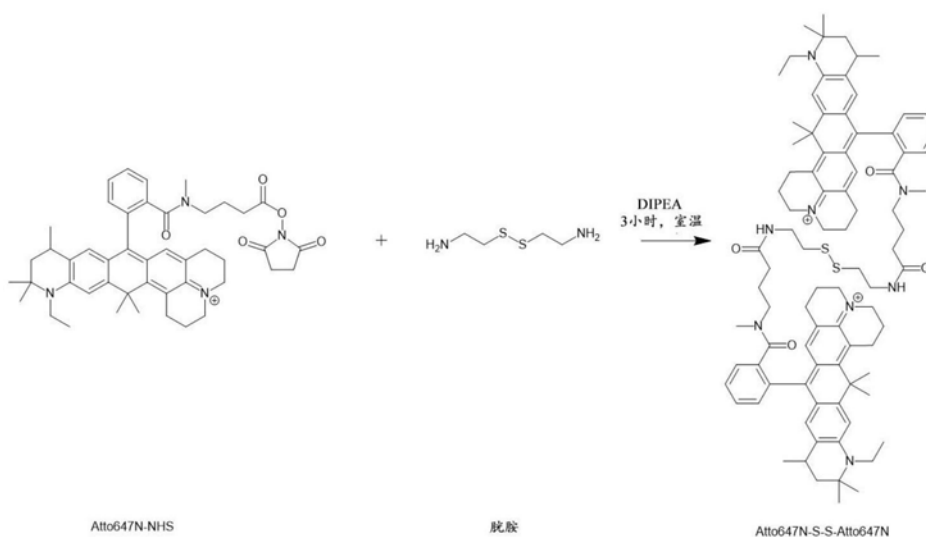
[0129] 方案1:磷酸化氨基酸残基的Pan修饰



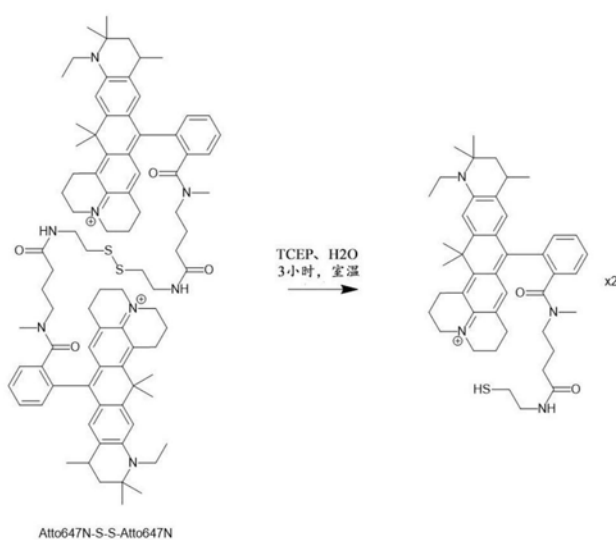
[0131] 结果和讨论

[0132] 已描述,通过硫醇共轭发生的荧光团的 β 消除和迈克尔加成会荧光标记磷酸化肽(Stevens等人,2005;美国专利号7,476,656)。然而,不容易获得用于荧光测序的合适的硫醇染料试剂(诸如Atto647N-硫醇染料试剂),其含有合适的测序染料和适当的官能团柄部两者。因此,通过Atto647N-NHS与半胱胺的反应合成Atto647N-S-S-Atto647N(方案2)。在非还原性且无水条件下进行该反应,因为水的存在可使NHS染料水解并导致反应产率显著降低。

[0133] 方案2:Atto647N-S-S-Atto647N的制备

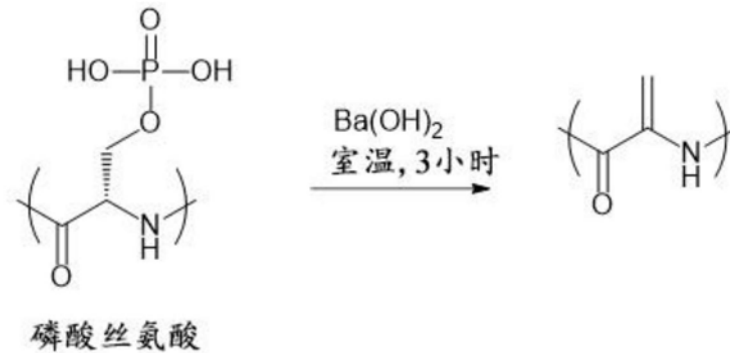


[0134]

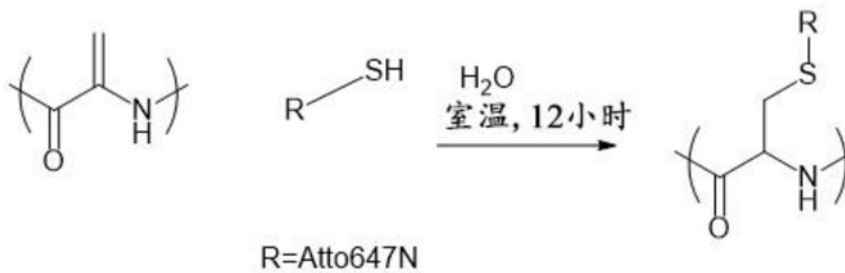


[0135] 为了验证和优化标记和荧光测序程序，合成了七肽的三种磷酸化变体：YpSPTSPS、YSPTpSPS和YpSPTpSPS，其中pS为磷酸丝氨酸。然后通过 β 消除，之后通过迈克尔加成标记这些七肽，以用Atto647N-硫醇染料荧光且共价标记磷酸化丝氨酸残基（参见方案3）。

[0136] 方案3: 标记的磷酸化丝氨酸残基的制备



[0137]



[0138] 然后通过HPLC纯化标记的七肽并将其固定在氨基硅烷玻璃表面上以通过荧光测序进行测序,如Swaminathan, 2010; 美国专利号9,625,469; 美国专利申请序列号15/461034; 美国专利申请序列号15/150,962中所述, 这些文献各自通过引用方式并入本文。如所描述的, 可通过频率直方图最恰当地描述用于均一肽群体的荧光测序。在Edman降解循环之后通过成像并将单独肽分子对齐, 可获得在Edman循环之后荧光有损失的肽分子的计数。然后, 通过记录荧光有损失的肽的计数作为Edman循环的函数, 可获得频率直方图。通过减去由于光漂白和染料损失导致的背景计数, 可表示显著损失事件的计数(图1)。如从图1可以明显看出, 在第2Edman循环之后(对应于肽的第2位置中的磷酸丝氨酸)以及在第5Edman循环之后(对应于第5位置处的磷酸丝氨酸), 肽荧光有所降低。这些结果指示, 荧光标签的硫醇共轭和随后另外的荧光测序循环可用于定位蛋白质上翻译后磷酸化修饰的位置。

[0139] 本文中描述了用于鉴别从细胞提取的蛋白质的磷酸化残基的方法的示例。培养并使用修饰的RIPA缓冲液裂解人胚肾293转基因(HEK-293T)细胞。在标记之前将蛋白质定量并与细胞裂解液分离。然后使蛋白质变性, 并用蛋白酶胰蛋白酶以1:50的胰蛋白酶与蛋白质比率消化。在消化之后, 使用10kDa过滤器来滤出肽。然后使用以下技术标记溶液中的所有磷酸化丝氨酸和苏氨酸。使用Ba(OH)₂将磷酸化残基转化为β消除的变体。然后使用迈克尔加成反应将荧光团Atto 647N与硫醇修饰偶联至β消除的残基。然后将荧光标记的肽纯化并冷冻干燥。

[0140] 将纯化的肽样品偶联到胺官能化载玻片表面上并在荧光测序平台上进行测序。对于所测序的样品, 对所有氨基酸位置处的荧光下降进行计数。用具有相同细胞类型(HEK-293T)的不同生物样品重复该实验, 该生物样品以相同方式制备并测序并充当生物平行测试样的来源。对这些样品进行测序, 并获得所有氨基酸位置处的荧光下降的计数。然后对来自第一生物样品的计数和来自第二生物样品的计数相对于彼此作图以绘制成图2所示的图形。一致的模式表示从细胞中获得的蛋白质上的多个磷酸化残基并且可作为细胞的磷酸化

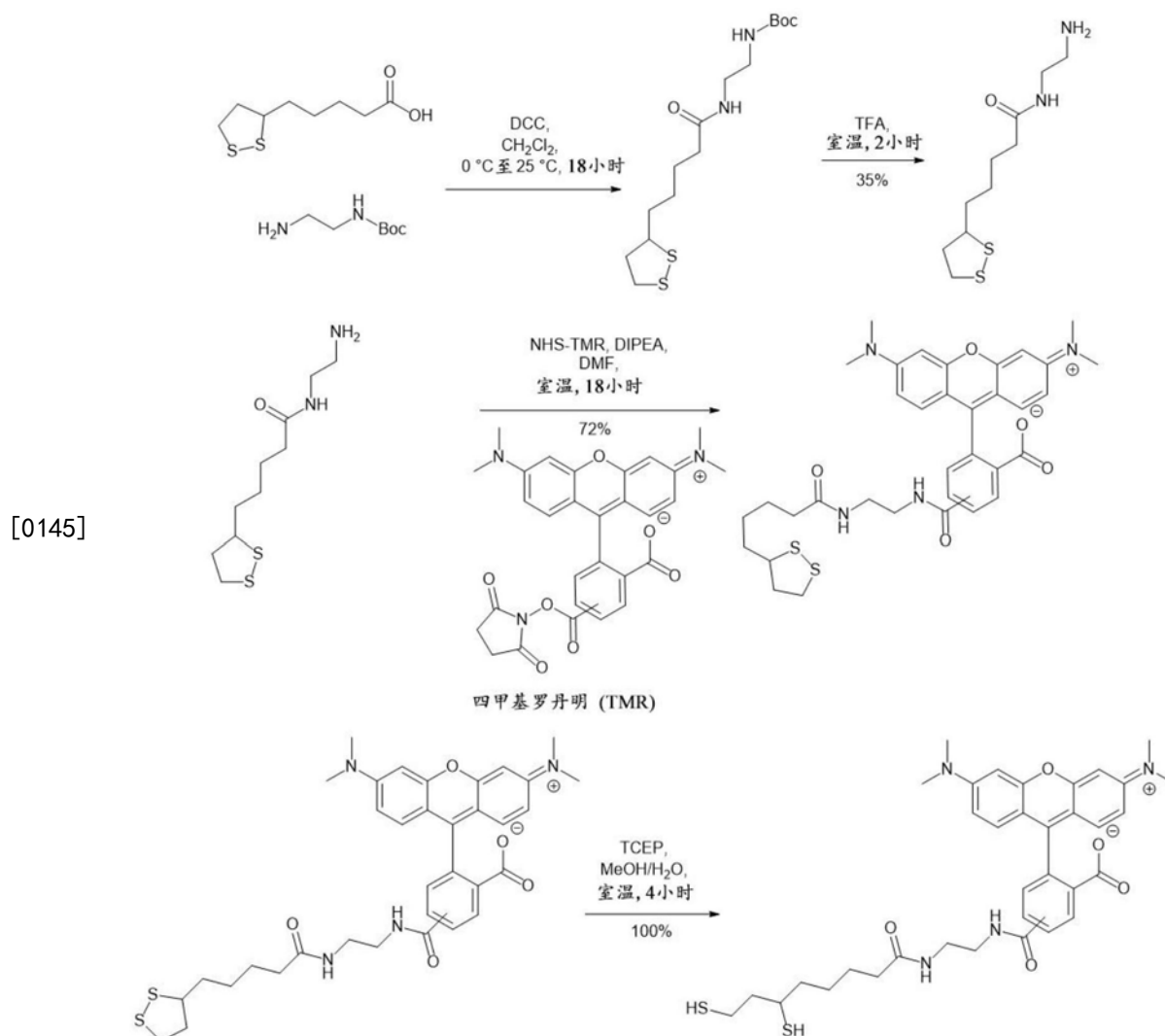
状态的特征。结果跨越四个数量级的定量性质表明可用于定量磷酸化蛋白质组学。

[0141] 实例2—在单分子灵敏度下定位蛋白质上翻译后糖基化的位置。

[0142] 材料和方法

[0143] 1,3-二硫醇修饰的荧光团的合成—使用N,N'-二环己基碳二亚胺使硫辛酸与氨基甲酸叔-丁基(2-氨基乙基)酯反应(方案4)。然后将样品溶解在三氟乙酸(TFA)中并用二乙醚析出来移除Boc保护基团。然后通过HPLC(如上所述的)纯化该反应的产物5-[1,2]二硫戊环-3-基-戊酸(2-氨基-乙基)-酰胺。

[0144] 方案4:含荧光团二硫醇的制备

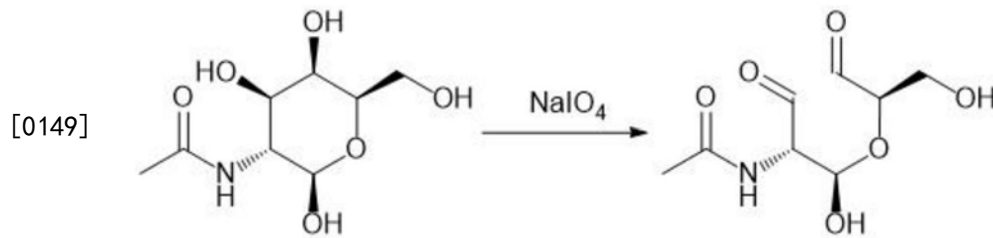


[0146] 然后将9.5mg的5-[1,2]二硫戊环-3-基-戊酸(2-氨基-乙基)-酰胺与10mg的NHS-TMR溶解于400 μ L的8mM DIPEA溶液溶解于二甲基甲酰胺中并振荡过夜,使5-[1,2]二硫戊环-3-基-戊酸(2-氨基-乙基)-酰胺产物与NHS活化的四甲基罗丹明(TMR)偶联(方案3)。通过HPLC纯化该反应的产物,如上该1,2-二硫戊环产物然后具有二硫戊环基团,使用三(2-羧基乙基)膦(TCEP)可将该二硫戊环基团还原至1,3-二硫醇以便形成反应性部分以连接至醛(方案3)。

[0147] 糖中的1,2-二醇转化成醛—用高碘酸钠处理N-乙酰基-D-葡萄糖胺(方案5)并用LCMS和NMR验证1,2-二醇的切割。同样地处理糖基化肽以切割1,2-二醇基团,并制备糖基化

肽以供荧光团结合。

[0148] 方案5:1,2-二醇转化为二醛



[0150] 结果和讨论

[0151] 荧光测序允许鉴别蛋白质/肽分子的低丰度变体并描述于Swaminathan, 2010; 美国专利号9,625,469; 美国专利申请序列号15/461034; 美国专利申请序列号15/150,962中。该方法依赖用荧光团特定地标记氨基酸以确定其在肽链中的位置。该方法可类似地扩展至通过使用糖特异性荧光团鉴别修饰的氨基酸的位置。

[0152] 标记糖基化氨基酸的概念为两步工艺。第一步:将糖部分的醇基团氧化为醛。第二步:然后使二硫醇试剂与糖分子的醛基团反应。已证实,当暴露于测序条件时,1,3-二噻烷不降解,因此本发明人鉴别出修饰荧光团以使1,3-二硫醇固定剂标记糖基化氨基酸的方式。

[0153] 1,3-二硫醇固定的荧光团的制备—硫辛酸被确定为用于偶联化学反应的优异候选物,因为它在一个末端处具有受保护的1,2-二硫戊环并且在另一个末端处具有羧酸。根据方案4使硫辛酸和NHS活化的四甲基罗丹明(TMR)反应以便生成1,3-二硫醇修饰的荧光团。因此,1,3-二硫醇修饰的荧光团(方案4,化合物10)可能与糖基化肽反应以形成Edman稳定的1,3-二噻烷。重要的是需注意,该方法可用于将任何NHS活化的荧光团(诸如Atto657N或其他物质)连接至1,3-二硫醇固定剂。

[0154] 糖中的1,2-二醇转化为醛—为了确认使用高碘酸钠将1,2-二醇氧化切割成醛,同时保持其余糖结构的可行性,选择N-乙酰基-D-葡糖胺。用高碘酸钠处理N-乙酰基-D-葡糖胺(方案5)并用LCMS和NMR验证1,2-二醇的切割。有趣的是,N-乙酰基-D-葡糖胺的环上的1,2-二醇将产生彼此共价键合的两种醛(方案5)。这增加了将荧光团连接至氧化物质的可能性,并且可能导致两个荧光团在肽的相同位置处连接,因此增大亮度范围并可能有利于糖肽的荧光测序。

[0155] 糖基化氨基酸的荧光测序测定—据信该氧化切割1,2-二醇的方案然后可施用于糖蛋白和糖肽以提供底物以供荧光团结合。在荧光团结合之后,可通过荧光测序对这些结合的糖蛋白或糖肽进行测序。荧光测序可如上进行,以便确定标记的糖基化残基的位置。该标记和测序方案不随糖苷键的类型而变,并提供了用于确定已知蛋白质或肽上的糖基化残基的位置的从头方法。

[0156] 实例3—在单分子灵敏度下定位翻译后赖氨酸三甲基化的位置。

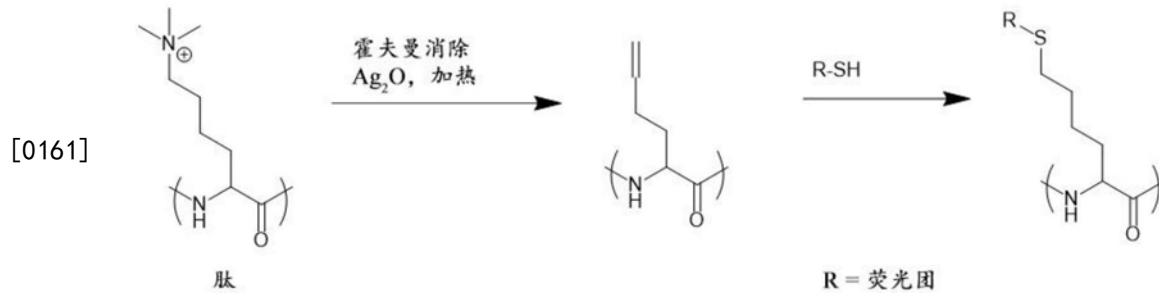
[0157] 材料和方法

[0158] 染料-硫醇试剂的合成—如用于检测翻译后磷酸化所制备的,3mg的Atto 647N-NHS(目录号:AD647N35;Atto-tec)与150 μ L碱性半胱胺溶液(5.1mg半胱胺和7.5 μ L DIPEA的1500 μ L无水DMF溶液)混合。将该混合物温育3h并通过质谱确认Atto647N-S-S-Atto647N产物(图1)。将产物等分到玻璃小瓶中,这些小瓶各自含有200 μ g的试剂。通过使Atto647N-S-

S-Atto647N试剂与1mM三(2-羧基乙基)膦 (TCEP) 反应并在60°C下温育1h来制备单一染料-硫醇试剂Atto647N-SH。

[0159] 霍夫曼消除和肽与荧光团的反应—修改霍夫曼消除反应中所用的技术并根据Brown等人,1997,加热并用氧化银或DIPEA处理肽以在三甲基化赖氨酸残基处生成烯烃(方案6)。这些含烯烃肽然后可与硫醇-连接的荧光团诸如如上所述的Atto647N-SH反应以生成在赖氨酸三甲甲基化的位点处用荧光团标记的肽。

[0160] 方案6:三甲甲基化氨基酸残基的标记



[0162] 预期结果

[0163] 已证实,荧光测序在单分子的灵敏度下精确地定位肽上荧光标记的氨基酸残基的位置,并且可用于鉴别赖氨酸三甲甲基化,如Swaminathan,2010;美国专利号9,625,469;美国专利申请序列号15/461034;美国专利申请序列号15/150,962中所述。荧光团与三甲甲基化赖氨酸残基的特定连接将扩展荧光测序技术以定位组蛋白蛋白质上的三甲甲基化标记,从而有利于鉴别组蛋白代码。

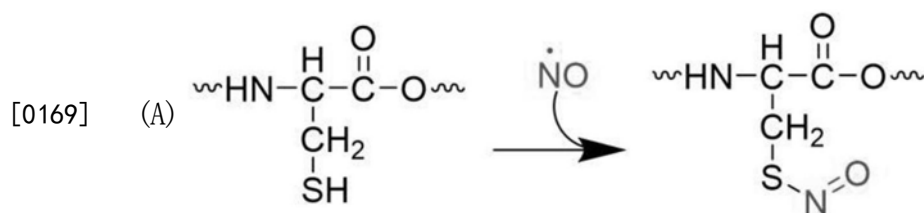
[0164] 霍夫曼消除化学反应可用于将三甲甲基化赖氨酸残基修饰成反应性烯基基团,这可允许用如上所述含有硫醇基团的荧光团有效地标记。然后可通过荧光测序方法对标记的肽进行测序以在单分子分辨率下获得三甲甲基化赖氨酸的位置。

[0165] 实例4—在单分子灵敏度下定位翻译后亚硝基化的位置。

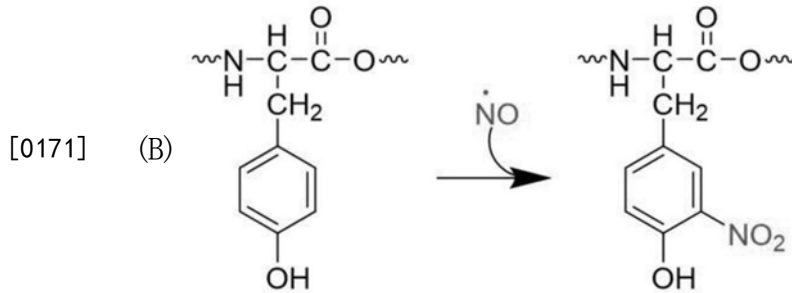
[0166] 一氧化氮(NO)是通过被称为一氧化氮合成酶的酶家族合成的细胞信号传导分子。NO可与金属蛋白反应或通过氧化或产生反应性氮物质而共价修饰酪氨酸和半胱氨酸残基。亚硝基化是这种类别的翻译后修饰,其在半胱氨酸上产生S-亚硝基化的共价加成或在酪氨酸残基上产生硝化的共价加成(参见方案7)。检测并定量分析修饰对更好地理解压力或炎症期间的信号传导过程或开发诊断法有启示(Abello等人,2009)。由于(a)硝基基团的不稳定性质和(b)极低丰度修饰(估计1/10⁶个酪氨酸残基),使用肽质谱法来鉴别亚硝基化的位点是有挑战性的(Zhan等人,2015)。因此,单分子荧光测序方法将提供检测并定量酪氨酸或半胱氨酸上的低水平亚硝基化修饰的理想解决方案。

[0167] 方案7:亚硝基化氨基酸的形成

[0168] 半胱氨酸-S-亚硝基化



[0170] 酪氨酸-硝化



[0172] 通过反应性NO物质形成S-亚硝基化半胱氨酸(A)和3-亚硝基酪氨酸(B)

[0173] 类似于用于通过荧光测序定量其他翻译后修饰的位点的原则,已开发出具体地靶向亚硝基修饰的标记反应。下面描述了靶向两种不同类型的亚硝基修饰的策略。

[0174] A. 半胱氨酸—S-亚硝基化

[0175] 已通过基于有机磷的反应(Devarie-Baez等人,2013),利用一步二硫键形成说明SNO修饰的生物正交标记。使用相同反应原理,在方案7中提出将荧光团(试剂2B)共价连接至S-亚硝基化半胱氨酸残基上的一步反应。这类试剂包括具有末端柄部(炔烃,叠氮化物)的有机磷基团或荧光团试剂。两步反应,第一步与非荧光试剂反应,之后与末端柄部的荧光团反应将产生S-亚硝基特异性荧光团共轭加成。对涉及修饰这些氨基酸的技术的一般概述为:

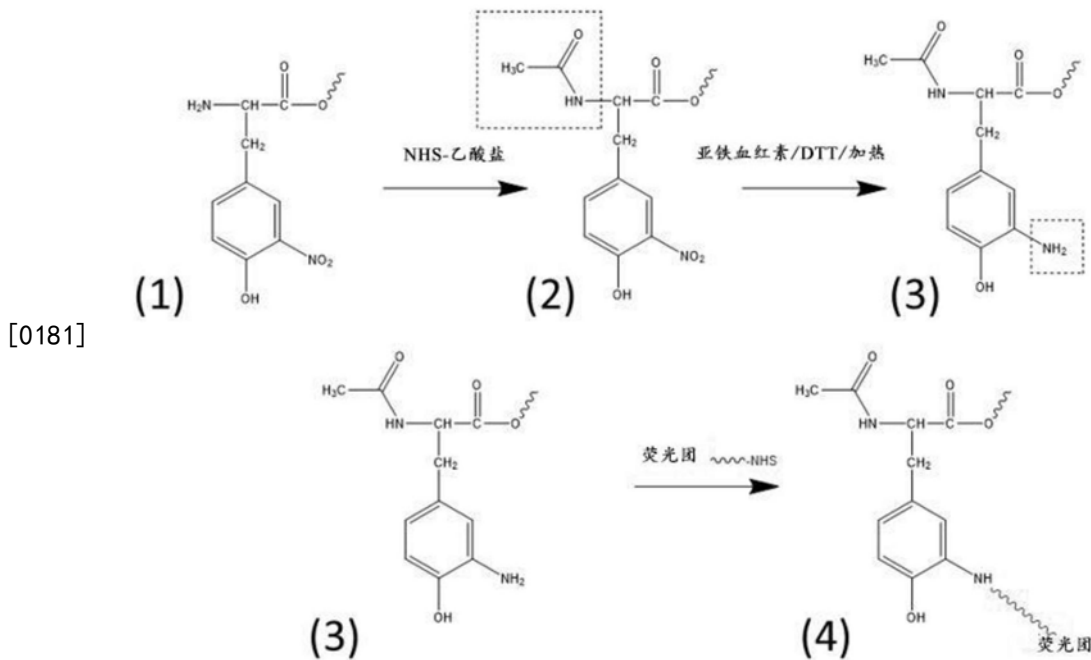
[0176] 1. 蛋白质/肽分离:使用分子生物学中常见的方案(Lee,2017)从细胞中收获蛋白质并通过常见蛋白酶诸如胰蛋白酶或GluC将其消化成肽。在一些情况中,可行的是通过用低温甲醇(-20℃)处理或其他细胞固定方法来固定细胞。在固定之后,细胞可直接与试剂反应以标记表面可及的PTM。

[0177] 2. 阻断游离硫醇:为了进行S-亚硝基化标记反应,应当阻断存在于半胱氨酸上的游离硫醇。用于程序中的两种常见试剂为碘乙酰胺和N-甲基马来酰亚胺。使用pH为7.5的2-20mM的试剂,以便阻断肽上的硫醇。

[0178] 3. 标记SNO基团:在室温下将高达3mM的试剂(含有或不含荧光团)与肽或固定细胞一起温育约30分钟至约2小时。通过冲洗/HPLC分离或其他方法诸如渗析来分离过量试剂。

[0179] 4. 荧光测序:在荧光标记的肽上进行荧光测序。

[0180] 方案8:亚硝基化酪氨酸的标记



[0182] 用荧光团标记肽或蛋白质中的3-硝基酪氨酸残基的技术的示意图。使(1)硝化酪氨酸(在本实例中示为N-末端残基)与NHS-乙酸盐反应,该乙酸盐乙酰化存在于肽(2)上的全部游离胺。在沸腾条件下加入亚铁血红素/DTT将硝基基团转化成胺部分(3)。该胺基团与荧光团—琥珀酰亚胺酯反应以共价标记3-硝基酪氨酸残基(4)。荧光标记的肽现在可经受荧光测序以供分析。

[0183] 该方法因此可定位修饰的残基并定量半胱氨酸残基的PTM标记的化学计量学。可进行荧光团与中间体膦加合物的连接的其他变型,诸如脱氢丙氨酸形成,如文献(Devarie-Baez等人,2013)中所示。

[0184] B. 酪氨酸硝化:

[0185] 用于质谱法蛋白质组学中的硝基酪氨酸的常见化学衍生化策略为两步工艺。第一步是将硝基基团还原成氨基基团,之后用专门试剂共价标记氨基基团。在该步骤之前,通常通过乙酰化(Abello等人,2010;Devarie-Baez等人,2013)阻断肽/蛋白质上的其他氨基基团。可直接修改该策略(参见方案8)以使用不同的荧光团标记硝基酪氨酸基团以进行荧光测序。用于荧光测序应用的一种用于标记硝基酪氨酸的方法如下所述:

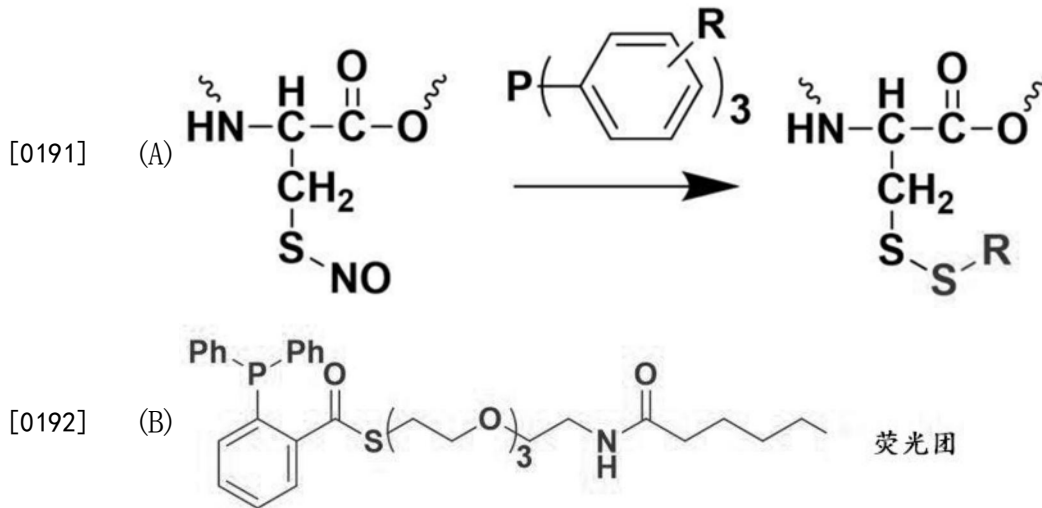
[0186] 1. 蛋白质/肽分离:将分离的蛋白质和肽溶解在磷酸钠缓冲液(pH7.5)中。在分析之前可将消化的蛋白质或肽冷冻干燥。肽的近似浓度为10 μ M。

[0187] 2. 胺的乙酰化:通过在室温下将190 μ L的硝化肽与NHS-乙酸盐(最终浓度为25mM)温育2h来将所有游离胺和其他亲核试剂乙酰化。将O-乙酰化逆转,并且通过将反应体系煮沸15分钟来使过量试剂水解。

[0188] 3. 硝基酪氨酸还原成氨基酪氨酸:将DTT(最终浓度:20mM)和Hemin(25 μ M)加入样品中并在沸腾水浴中温育15分钟。

[0189] 4. 荧光标记:将Atto-NHS或其他荧光团-NHS(2mM)加入溶液中并在室温下温育2h。在荧光测序之前通过HPLC或其他分离方法移除过量染料。

[0190] 方案9:亚硝基化半胱氨酸的标记



[0193] 用于选择性标记S-亚硝基化半胱氨酸的一锅反应的示意图。(A) 在将游离硫醇烷基化之后,使用有机磷试剂产生二硫键。(B) 提供荧光团连接至磷基团的试剂的一般示例。

[0194] 以上部分中所述的一锅法非常适合定位和定量肽和蛋白质上的硝基酪氨酸位置。

[0195] 实例5—在单分子灵敏度下定位翻译后瓜氨酸化的位置。

[0196] 瓜氨酸化是由酶蛋白质精氨酸脱亚胺酶 (PAD) 引起的翻译后修饰,其中精氨酸侧链被转化为瓜氨酸(过程称为去亚胺基化)。这种转化导致质量变化1Da、失去正电荷和两个可能的氢键供体。修饰对蛋白质结构和稳定性具有主要影响,并且与自身免疫障碍、神经退化性疾病并与肿瘤生物学有关(György 等人,2006)。在肽质谱中小质量变化与未修饰的精氨酸残基的同位素分布重叠,从而使其鉴别具有挑战性。与PTM中的其他问题类似,开发用于定位和定量低丰度瓜氨酸化残基的测定法是重要的。

[0197] 用于靶向瓜氨酸化残基的化学选择性策略已进行说明。苯甲酰甲醛试剂与精氨酸(在碱性条件下)和瓜氨酸(在酸性条件下)反应,从而形成五元环。虽然在酸性条件下,试剂另外地结合至高瓜氨酸和半胱氨酸,但与半胱氨酸形成的硫代半缩醛环在中性pH中水解。已描述使用苯甲酰甲醛试剂,用罗丹明荧光标记瓜氨酸化残基的方法(Bicker等人,2012)。如下修改该程序以进行荧光测序(参见方案10):

[0198] 1. 蛋白质/肽分离:根据标准良好优化的程序将分离的蛋白质消化或将肽分离。将约50 μ M的瓜氨酸化肽冷冻干燥或溶解在50 mMHEPES缓冲液(pH 7.5)中。

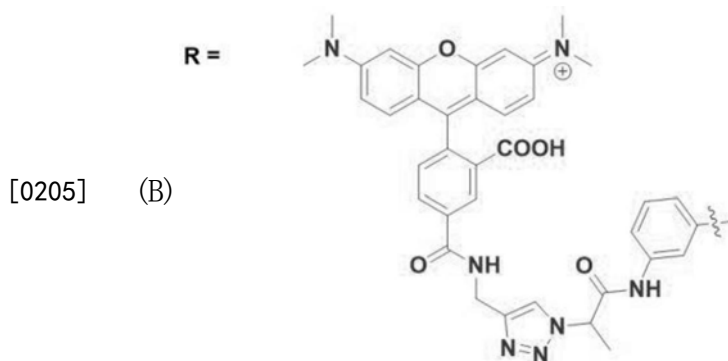
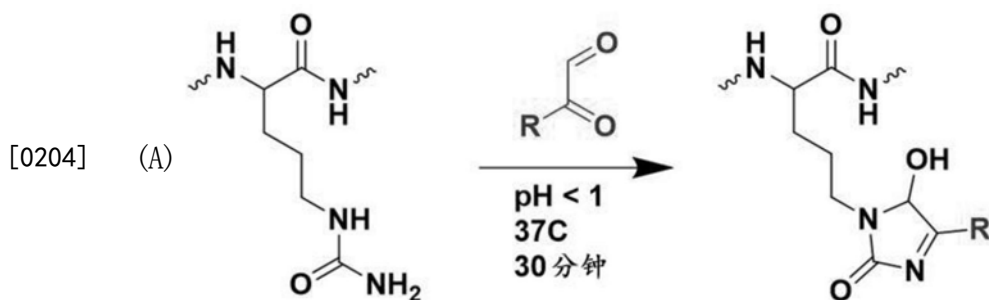
[0199] 2. 使用碘乙酰胺或荧光染料将半胱氨酸上的硫醇基团封端,这阻止瓜氨酸特异性试剂的交叉反应性。2mM碘乙酰胺将蛋白质消化液中的硫醇基团烷基化。

[0200] 3. 在37 $^{\circ}$ C下将含有瓜氨酸的肽与5mM苯甲酰甲醛试剂和20%三氯乙酸(pH<1)一起温育3小时。

[0201] 4. 苯甲酰甲醛试剂可与荧光团直接偶联或含有柄部(点击柄部)以便后续与荧光团反应。

[0202] 5. 从标记的瓜氨酸化肽中纯化过量试剂以进行荧光测序。

[0203] 方案10:瓜氨酸化修饰的氨基酸的标记

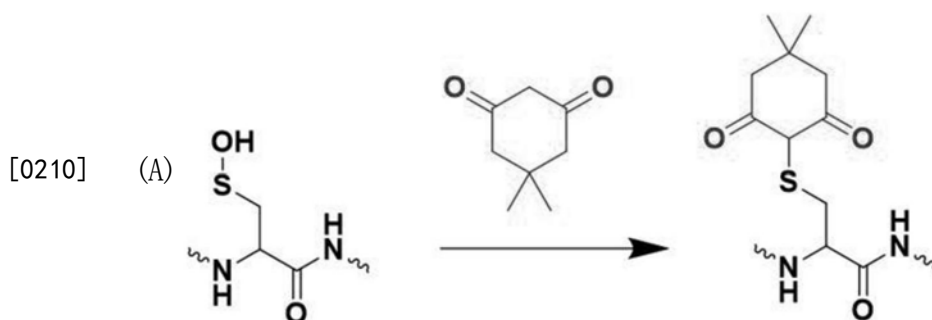


[0206] 用罗丹明-苯甲酰甲醛试剂选择性地标记瓜氨酸化残基。(A) 用于标记瓜氨酸化残基的反应条件。(B) 用于荧光标记瓜氨酸化残基以进行荧光测序的罗丹明-苯甲酰甲醛试剂。

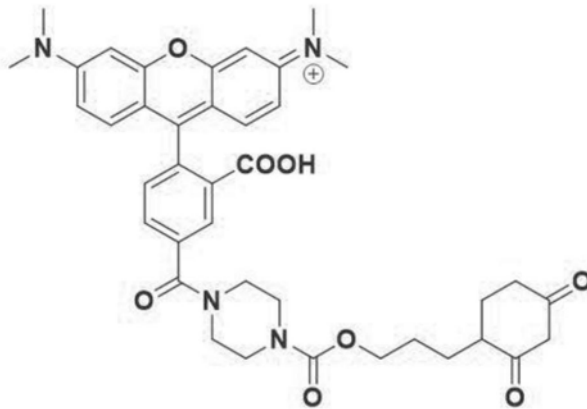
[0207] 实例6—在单分子灵敏度下定位翻译后亚磺酰化的位置。

[0208] 次磺酸是在硫醇侧链与温和氧化环境反应时形成的半胱氨酸残基的特定氧化修饰之一。该修饰是反应性氧化物形成早期的显示,用于形成二硫键的中间体步骤,并且也涉及氧化还原信号传导(Poole等人,2004)。在质谱中常用离子化条件下键的不稳定性质使得定位和定量修饰极有挑战性。然而,基团的反应性性质使得化学品偶联和修饰的肽的富集可行(Poole等人,2007;Reddie等人,2008)。原理是次磺酸与已连接至若干荧光试剂的双甲酮(5,5-二甲基-1,3-环己二酮)的选择性反应(参见方案11)。另外,可使用生物素标记的试剂(Millipore;目录号NS1226-1MG)。

[0209] 方案11:次磺酸修饰的氨基酸的标记



[0211] (B)



[0212] 反应示出次磺酸用1,3-环己二酮试剂衍生物的选择性标记。(A)通过使用双甲酮(5,5-二甲基-1,3-环己二酮)说明高产率反应(B)适用于荧光测序的用于标记次磺酸修饰的罗丹明衍生物的示例

[0213] 以下是使用用于荧光测序的衍生化罗丹明标记肽上的次磺酸的反应方法:

[0214] 1. 蛋白质/肽分离:使用常见标准化程序将蛋白质消化或将肽分离。将约1-10 μ mol肽冷冻干燥或溶解在磷酸盐缓冲液(pH 7;25mM)和1mM EDTA中。

[0215] 2. 次磺酸的标记:加入荧光试剂至5mM的浓度并在37 $^{\circ}$ C下温育2h。试剂可为两个一半部分——一个一半部分具有叠氮化物柄部并且第二个一半部分具有具体地与连接基反应的荧光团。

[0216] 3. 在荧光测序之前纯化除去过量试剂和荧光团。

[0217] 存在许多其他标记反应,这些反应涉及不同试剂和反应机制并且也已进行说明(Gupta and Carroll,2014)。

[0218] 实例7—作为生物标记物测量翻译后修饰。

[0219] 如上所述,翻译后修饰的精确位点(诸如磷酸化状态)影响蛋白质的功能并且可用作疾病状态的可靠指示。一种此类分子肌钙蛋白是用于心脏紊乱的诊断生物标记物(Wijnker等人,2014)。然而,磷酸化的位点特异性性质是用于了解和治疗心脏衰竭的重要的诊断和治疗性标记(Zhang等人,2012)。根据肌钙蛋白分子上的磷酸化状态和位点,诊断的范围可从锻炼至像心肌病一样严重的疾病状态。

[0220] 以上呈现的方法可容易采用以评估多种潜在磷酸化相关生物标记物的磷酸化状态。第一步将为对感兴趣的蛋白质即肌钙蛋白执行标准抗体pull down。然后可使用蛋白酶(诸如GluC或胰蛋白酶)将富集的蛋白质消化成较短肽,从而产生特定长度的肽。然后可在肽分子上标记磷酸化位点,如实例1中所述。这将允许通过荧光测序鉴别并定量翻译后修饰的精确位置,从而提供优于现有诊断测试诸如半定量抗体测定法如用于测量样品中肌钙蛋白或磷酸化肌钙蛋白的水平的显著优势。也可应用该方法以评估任何蛋白质的甲基化或糖基化,从而为通过蛋白质的翻译后修饰表征的疾病提供新型生物标记物。

[0221] ***

[0222] 鉴于本公开,可以在不进行过度实验的情况下进行和执行本文所公开和要求保护的所有方法。尽管已经根据某些实施例描述了组合物和方法,但是在不背离本公开的概念、精神和范围的情况下,可以对本文所述的方法以及方法的技术或技术的顺序施加变化。更具体地,将显而易见的是,化学上和生理上均相关的某些药剂可以代替本文所述的药剂,同

时将实现相同或相似的结果。所有此类类似的替代和修改都被认为在由所附权利要求书所限定的本公开的精神、范围和概念内。

[0223] 参考文献

[0224] 以下参考文献以提供对本文所述的那些的程序或其他细节补充的程度以引用方式明确地并入本文。

[0225] Abello et al., *Talanta Analytical Proteomics*, 80:1503-1512, 2010.

[0226] Abello et al., *J. Proteome Res.*, 8:3222-3238, 2009.

[0227] Aebersold et al., *Nat Chem Biol.*, 14:206-214, 2018.

[0228] Ardito et al., *Int J Mol Med.*, 40:271-280, 2017. doi:10.3892/ijmm.2017.3036.

[0229] Bicker et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 134:17015-17018, 2012.

[0230] Braslaysky et al., *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 100 (7) :3960-4, 2003.

[0231] Brown et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 119 (14) :3288-3295, 1997.

[0232] Czernik et al., *Regulatory Protein Modification*, Humana Press, pp.219-250, 1997.

[0233] Devarie-Baez et al., *Methods San Diego Calif*, 62:171-176, 2013.

[0234] Du and Huang, *Yi chuan=Hered.*, 29:387-92, 2007.

[0235] Frese et al., *J Proteome Res.* 12:1520-5, 2013.

[0236] Garcia et al., *Nat Methods.*, 4:487-489, 2007.

[0237] Gupta and Carroll, *Acta BBA-Gen. Subj., Current Methods to Study Reactive Oxygen Species-Pros and Cons*, 1840, 847-875, 2014.

[0238] György et al., *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 38:1662-1677, 2006.

[0239] Huang and Chang, *Prostate Cancer-From Bench to Bedside*, Ch.8, 2011.

[0240] Korff et al., *Heart*, 92:987-93, 2006.

[0241] Lee, *Endocrinol. Metab.*, 32:18-22, 2017.

[0242] Mondragón-Rodríguez et al., *Neuropathol Appl Neurobiol.*, 40 (2) :121-35, 2014.

[0243] Önder et al., *Expert Rev Proteomics*, 12:499-517, 2015.

[0244] Poole et al., *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 44:325-347, 2004.

[0245] Poole et al., *Bioconjug. Chem.*, 18:2004-2017, 2007.

[0246] Reddie et al., *Mol. Biosyst.*, 4:521-531, 2008.

[0247] Solari et al., *Mol Biosyst.*, 11:1487-93, 2015.

[0248] Stevens et al., *Rapid Commun Mass Spectrom.*, 19:2157-2162; 2005.

[0249] Stowell et al., *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 10:473-510, 2015.

[0250] Swaminathan R, *Biology S. Jagannath Swaminathan. Education.* doi:10.1002/rcm.3179, 2010.

[0251] U.S. Patent Application Serial No. 15/510,962.

[0252] U.S. Patent Application Serial No. 15/461,034.

- [0253] U.S.Patent No.7,476,656.
- [0254] U.S.Patent No.9,625,469.
- [0255] von Hofmann,Ann der Chemie und Pharm.,78:253-286,1851。
- [0256] Wagner and Carpenter,Nat Rev Mol Cell Biol.,13:115-126,2012。
- [0257] Wijnker et al.,Neth Heart J.,22:463-9,2014.
- [0258] Zhan et al.,Mass Spectrom.Rev.,34:423-448,2015。
- [0259] Zhang et al.,Circulation,126:1828-1837,2012.

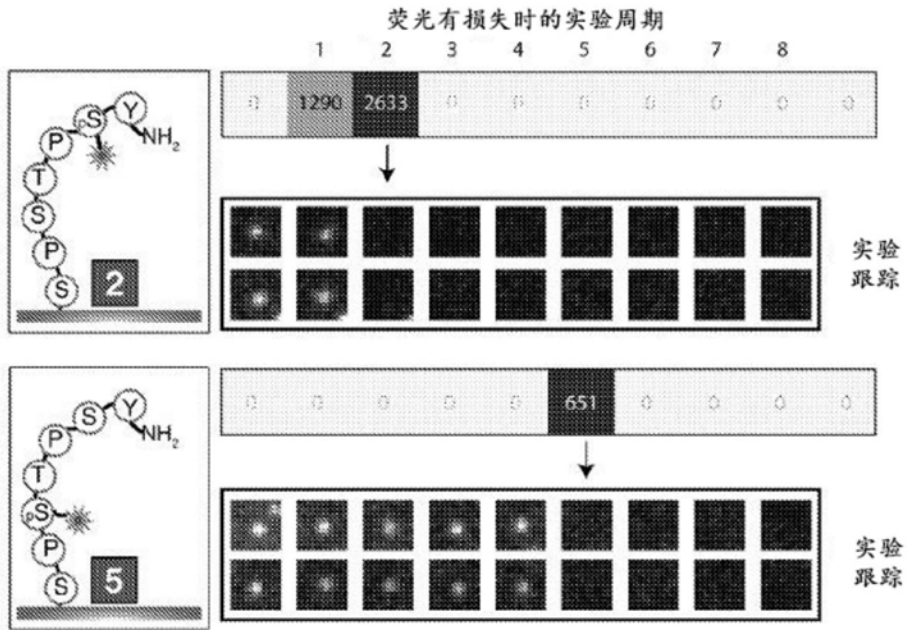


图1

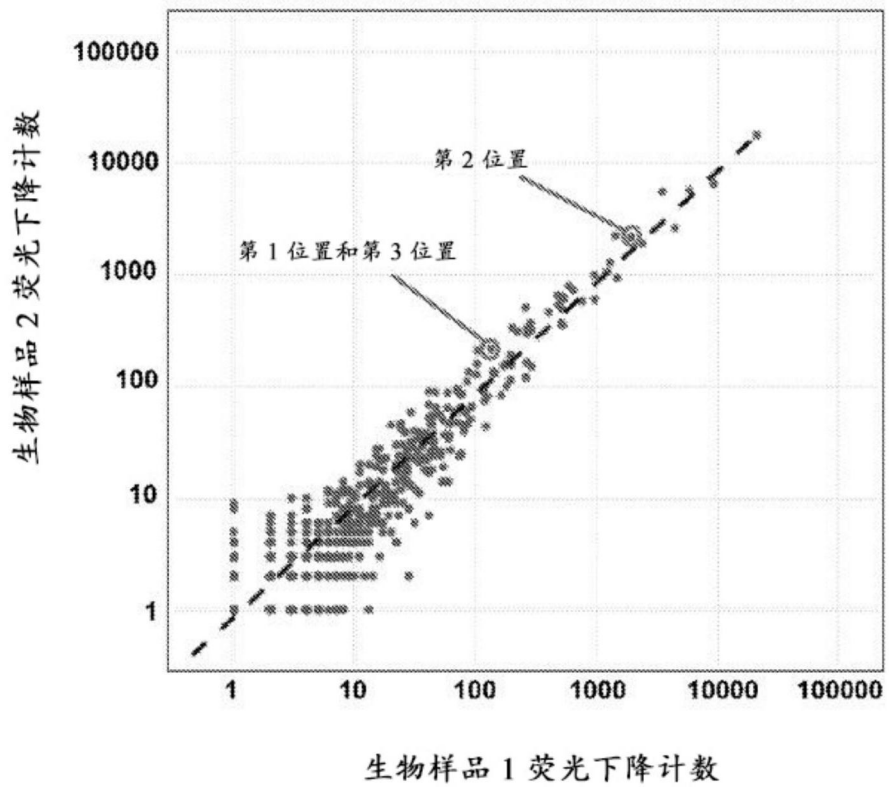


图2