



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108700565 B

(45) 授权公告日 2021. 10. 29

(21) 申请号 201680071446.0	(73) 专利权人 善威生物私人有限公司
(22) 申请日 2016.10.06	地址 澳大利亚新南威尔士州
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 108700565 A	(72) 发明人 伊丽莎白·卡斯滕 本·赫伯特 艾伦·利德尔 卡梅伦·希尔
(43) 申请公布日 2018.10.23	(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理 有限公司 11262
(30) 优先权数据 2015904075 2015.10.07 AU	代理人 贺淑东
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2018.06.06	(51) Int.Cl. G01N 33/49 (2006.01) G01N 33/68 (2006.01)
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/AU2016/000341 2016.10.06	审查员 牛牧川
(87) PCT国际申请的公布数据 W02017/059477 EN 2017.04.13	

权利要求书5页 说明书61页 附图77页

(54) 发明名称
血液制备和图谱分析

(57) 摘要
本披露涉及用于生成富含红细胞的血液样本的血液蛋白质图谱的方法。所披露的方法代表了一种用于由血液产生蛋白质图谱,从而提高蛋白质检测的改进的实验室新技术。

1. 一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

- a.) 获取介于5 μ L至100 μ L的小体积血液样本;
- b.) 分离该血液样本中的血浆以产生细胞沉淀物;
- c.) 使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;
- d.) 将该富含红细胞的样本中的红细胞在培养基中孵育;以及
- e.) 检测该富含红细胞的样本中的红细胞分泌或释放进入至经孵育的培养基中的一种或多种蛋白质,

其中所产生的蛋白质图谱包括在该经孵育的培养基中检测到的一种或多种蛋白质,且该一种或多种蛋白质选自趋化因子、细胞因子、生长因子、受体、激素以及酶。

2. 如权利要求1所述的方法,其中该一种或多种蛋白质是两种或多种蛋白质。

3. 如权利要求1所述的方法,其中该一种或多种蛋白质是三种或多种蛋白质。

4. 如权利要求1所述的方法,其中该一种或多种蛋白质是四种或多种蛋白质。

5. 如权利要求1-4中的任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含测量在该经孵育的培养基中检测到的该一种或多种蛋白质的水平。

6. 如权利要求1至4中的任一项所述的方法,其中该小体积血液样本从对象中获取。

7. 如权利要求5所述的方法,其中该小体积血液样本从对象中获取。

8. 如权利要求6所述的方法,其中该对象是人类或非人类动物。

9. 如权利要求7所述的方法,其中该对象是人类或非人类动物。

10. 如权利要求1-4和7-9中的任一项所述的方法,其中该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺或尾部针刺获取。

11. 如权利要求5所述的方法,其中该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺或尾部针刺获取。

12. 如权利要求6所述的方法,其中该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺或尾部针刺获取。

13. 如权利要求1-4、7-9和11-12中的任一项所述的方法,其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。

14. 如权利要求5所述的方法,其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。

15. 如权利要求6所述的方法,其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。

16. 如权利要求10所述的方法,其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。

17. 如权利要求1-4、7-9、11-12和14-16中的任一项所述的方法,其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存在、或测量该一种或多种蛋白质的水平。

18. 如权利要求5所述的方法,其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存

在、或测量该一种或多种蛋白质的水平。

19. 如权利要求6所述的方法,其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存在、或测量该一种或多种蛋白质的水平。

20. 如权利要求10所述的方法,其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存在、或测量该一种或多种蛋白质的水平。

21. 如权利要求13所述的方法,其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存在、或测量该一种或多种蛋白质的水平。

22. 如权利要求1-4、11-12、14-16和18-21中的任一项所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

23. 如权利要求5所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

24. 如权利要求6所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

25. 如权利要求10所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

26. 如权利要求13所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

27. 如权利要求17所述的方法,其中该检测到的一种或多种蛋白质是细胞因子。

28. 如权利要求1-4、11-12、14-16、18-21和23-27中的任一项所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

29. 如权利要求5所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

30. 如权利要求6所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

31. 如权利要求10所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

32. 如权利要求13所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

33. 如权利要求17所述的方法,其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL,以及VEGF。

34. 如权利要求22所述的方法, 其中该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL, 以及VEGF。

35. 如权利要求28所述的方法, 其中该所产生的蛋白质图谱进一步包含一种或多种蛋白质选自D-多巴色素互变异构酶 (DDT)、Eotaxin、生长调节的癌基因 α (GRO- α)、IL-8、IL-10、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 和活化后调节正常T细胞表达和分泌 (RANTES)。

36. 如权利要求29-34中的任一项所述的方法, 其中该所产生的蛋白质图谱进一步包含一种或多种蛋白质选自D-多巴色素互变异构酶 (DDT)、Eotaxin、生长调节的癌基因 α (GRO- α)、IL-8、IL-10、单核细胞趋化蛋白-1 (MCP-1)、巨噬细胞移动抑制因子 (MIF)、巨噬细胞炎性蛋白-1 α (MIP-1 α) 和活化后调节正常T细胞表达和分泌 (RANTES)。

37. 如权利要求1-4、11-12、14-16、18-21、23-27和29-35中的任一项所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

38. 如权利要求5所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

39. 如权利要求6所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

40. 如权利要求10所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

41. 如权利要求13所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

42. 如权利要求17所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

43. 如权利要求22所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

44. 如权利要求28所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

45. 如权利要求36所述的方法, 其中在该经孵育的培养基中检测或测量的该一种或多种蛋白质是分泌或释放自所述红细胞的表面或内部。

46. 如权利要求1-4、11-12、14-16、18-21、23-27、29-35和38-45中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包含将步骤d.) 中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.) 中的经孵育的培养基中分离。

47. 如权利要求5所述的方法, 其中所述方法进一步包含将步骤d.) 中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.) 中的经孵育的培养基中分离。

48. 如权利要求6所述的方法, 其中所述方法进一步包含将步骤d.) 中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.) 中的经孵育的培养基中分离。

49. 如权利要求10所述的方法, 其中所述方法进一步包含将步骤d.) 中的该富含红细胞

的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

50. 如权利要求13所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

51. 如权利要求17所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

52. 如权利要求22所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

53. 如权利要求28所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

54. 如权利要求36所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

55. 如权利要求37所述的方法,其中所述方法进一步包含将步骤d.)中的该富含红细胞的样本中的经孵育的红细胞自步骤d.)中的经孵育的培养基中分离。

56. 如权利要求1-4、11-12、14-16、18-21、23-27、29-35、38-45和47-55中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

57. 如权利要求5所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

58. 如权利要求6所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

59. 如权利要求10所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

60. 如权利要求13所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

61. 如权利要求17所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

62. 如权利要求22所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

63. 如权利要求28所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

64. 如权利要求36所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

65. 如权利要求37所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

66. 如权利要求46所述的方法,其中所述方法进一步包含裂解从该富含红细胞的样本中分离的红细胞。

67. 如权利要求56所述的方法,其中所述方法进一步包含检测从该富含红细胞的样本中裂解的红细胞中的一种或多种蛋白质。

68. 如权利要求57-66任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含测量从该富含红细胞的样本中裂解的红细胞中的一种或多种蛋白质的水平。

69. 如权利要求1-4、11-12、14-16、18-21、23-27、29-35、38-45、47-55和57-67中的任一项所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

70. 如权利要求5所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

71. 如权利要求6所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

72. 如权利要求10所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

73. 如权利要求13所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

74. 如权利要求17所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

75. 如权利要求22所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

76. 如权利要求28所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

77. 如权利要求36所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

78. 如权利要求37所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

79. 如权利要求46所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

80. 如权利要求56所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

81. 如权利要求68所述的方法,其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

82. 一种产生病蛋白质图谱的方法,其包括:

a.) 从以下获取根据权利要求1至81中的任一项所产生的至少一种蛋白质图谱:

(i) 患有疾病或紊乱的对象,以及

(ii) 未患有该疾病或紊乱的至少一个对象;以及

b.) 将患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱与未患有该疾病或紊乱的该至少一个对象的该蛋白质图谱进行比较,

其中所产生的病蛋白质图谱包括一种或多种蛋白质,相比未患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱,在来自患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱中,该一种或多种蛋白质具有不同的存在或水平。

83. 如权利要求82所述的方法,其中该病蛋白质图谱是包括选自IL-1、TL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF- α 、TGF- β ,以及IFN- γ 的一种或多种蛋白质的癌症蛋白质图谱。

84. 如权利要求82所述的方法,其中该病蛋白质图谱是包括选自TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8,以及IL-12的一种或多种蛋白质的先兆子痫蛋白质图谱。

85. 如权利要求84的方法,其中该先兆子痫蛋白质图谱包括选自IL-6、IL-8和IFN- γ 的一种或多种蛋白质。

血液制备和图谱分析

技术领域

[0001] 本披露总体上涉及血液学领域。本披露还涉及血液中的蛋白质图谱分析,尤其涉及产生或生成富含红细胞的血液样本的血液蛋白质图谱,包括细胞因子和/或趋化因子图谱的方法。

[0002] 交叉引用

[0003] 本申请要求2015年10月7日提交的标题为“血液制备和图谱分析”的澳大利亚申请号2015904075的优先权并与之相关。该申请通过引用整体并入本文。此外,在本披露中提及的其他参考文献或出版物也特此通过引用而整体并入。

[0004] 发明背景

[0005] 血液的蛋白质图谱分析被用于各种目的。例如,外周血单核细胞(PBMC)和血清/血浆中的指示性蛋白质的图谱分析通常被用于疾病诊断。此外,监测血液中的蛋白质图谱可以通过提供一种监测治疗反应性和缓解或消退指征的手段而有助于提供更有效的治疗干预的指导。

[0006] 血液分室中的生物标志物,如细胞因子、趋化因子和生长因子可以提供对炎症、免疫反应和修复的洞察。具体而言,血液中促炎和/或抗炎的细胞因子和趋化因子水平的检测和定量被广泛用于测量免疫状态。这些细胞因子和趋化因子通常被用于诊断某些疾病状态,确定患病的倾向性和/或预测预后结果。

[0007] 典型地,使用分离的血清/血浆和/或PBMC评估该血液分室中各种蛋白质的检测和定量。这实际上忽略了红血球/红细胞(RBC),而该RBC是血液中最丰富的细胞组分,占其体积的40%-50%。在对血浆/血清和/或白细胞(白细胞)进行蛋白质分析之前,RBC经常被移除,因为它们可能使处理/检定复杂化和/或不被认为对血液的总体蛋白质图谱提供显着贡献。RBC对血液的蛋白质图谱有着实质性贡献和/或以其他方式对其产生影响,因此,在这种情况下,目前的分析是不充分的。

[0008] 而且已经显而易见的是,血液采集技术和/或血液加工方式的不一致性会对已知蛋白质图谱分析的准确性产生不利影响。

[0009] 因此,需要更全面的和/或一致的用于测定血液中的蛋白质图谱的方法。相应地,需要用于解决本文披露的这些和其他问题的系统、方法和/或试剂盒。本披露旨在克服和/或改善现有技术的至少一个缺点,这将从本文的讨论中变得显而易见。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明人已经惊讶地发现,尽管作为血液的主要组分在试图测定血液蛋白质图谱的血液蛋白质图谱分析中通常被排除在外,RBC在很大程度上仍然是许多不同蛋白质(例如细胞因子、趋化因子、生长因子)的来源。此外,本发明人已经发现,在各个血液分室(例如红细胞、血浆、白细胞)内检测到的各种蛋白质的水平可能因血液和/或组分的采集和处理方式的不同而显着不同。因此,本发明人已经创建了一种有用的实验室新技术,其用于通过评估RBC中新鉴定的蛋白质的存在或水平来产生富集的红细胞样本的蛋白质图谱。该有用的实验室新技术相对于用于从血液产生蛋白质图谱的现有技术来说,是一种显著的改进,增

加了蛋白质的检测能力(例如增加检测的水平)。在富集的RBC样本中更容易检测到蛋白质,这是因为蛋白质在RBC中的浓度较高,独特的工艺进一步提高了RBC中的蛋白质可检测水平,以及RBC分离方法需要较少的细胞处理。而且,RBC中高浓度的蛋白质使得在少量的血液中也检测到它们。不受理论束缚,假设RBC可以充当各种蛋白质(例如细胞因子、趋化因子和生长因子)的储库,并且血液的处理方式可以影响RBC对这些蛋白质的释放和/或隔离。这又可以改变和/或增强血液的和/或其他血液分室的蛋白质图谱。

[0012] 相应地,本披露提供了改进的方法、试剂盒和/或系统,其用于在小体积的富含红细胞的样本或级分中产生或生成蛋白质图谱,从而减少或消除血液处理对蛋白质图谱的影响。

[0013] 以下列出本披露的某些非限制性实施方式:

[0014] 在本披露的一个方面,本文提供了用于在富含红细胞的血液样本中产生蛋白质图谱的方法,该方法包括获取血液样本;使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;以及检测小体积的该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在,其中该小体积是5 μ L至100 μ L,并且其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质。在一个实施方式中,该方法进一步包括测量在该富含红细胞的样本中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测得的一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该方法进一步包括在检测该一种或多种蛋白质的存在或测量其水平之前,使该富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触,其中该阳离子盐增加了该富含红细胞的样本中一种或多种的蛋白质的可检测水平。

[0015] 在本披露的其他方面,本文提供了产生蛋白质图谱的方法,该方法包括获取血液样本;使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;使该富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触,其中该至少一种阳离子盐增加了该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的可检测水平;以及检测小体积的该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在,其中该小体积是5 μ L至100 μ L,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质。在一个实施方式中,该方法进一步包括测量在该富含红细胞的样本中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测得的一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该至少一种阳离子盐的阳离子是金属离子或铵离子。在其他的实施方式中,该至少一种阳离子盐选自钠盐、钾盐、镁盐、锂盐、铷盐、铯盐、铁盐、钆盐、吡啶盐及其组合。还是在其他的实施方式中,该至少一种阳离子盐是选自氯化钠、氯化钾、氯化铷、氯化铯、氯化锂及其组合的氯化物盐。在另一个实施方式中,该至少一种阳离子盐是选自碳酸钠、碳酸钾、碳酸铷、碳酸铯、碳酸锂及其组合的碳酸盐。在又一个实施方式中,该至少一种阳离子盐是铵盐。还是在其他的实施方式中,该铵盐选自碳酸铵、氯化铵、硝酸铵及其组合。

[0016] 在本披露的另一方面,本文提供了在富含红细胞的血液样本中产生蛋白质图谱的方法,该方法包括获取血液样本;使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;分离该富含红细胞的样本中的红细胞和血浆;测量该红细胞中的一种或多种蛋白质的水平和该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平;以及计算蛋白质比率,该蛋白质比率包括该红细胞中的该一种或多种蛋白质的水平与该血浆中的该一种或多种蛋白质

的水平比率,其中所产生的蛋白质图谱包括具有至少2:1的蛋白质比率的一种或多种蛋白质。

[0017] 在本披露的另一方面,本文提供了在富含红细胞的血液样本中产生蛋白质图谱的方法,该方法包括获取血液样本;使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;将该富含红细胞的样本中的红细胞在培养基中孵育;以及检测该培养基中的一种或多种蛋白质,其中所产生的蛋白质图谱包括在该培养基中检测到的一种或多种蛋白质。在一个实施方式中,该方法进一步包括测量在该培养基中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测得的一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该培养基是选自如下一种或多种:等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)和/或厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)、罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基(EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM);和/或伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(IMDM)。

[0018] 在本披露的又一方面,本文提供了在富含红细胞的血液样本中产生蛋白质图谱的方法,该方法包括:获取小体积血液样本;使该小体积血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;以及检测该富含红细胞的样本中的一种或多种蛋白质,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质。在一个实施方式中,该方法进一步包括测量在该富含红细胞的样本中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测得的一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该小体积血液样本从对象中获取。在另一个实施方式中,该小体积血液样本在5 μ L和100 μ L之间。在另一个实施方式中,该小体积血液样本在5 μ L和20 μ L之间。在其他的实施方式中,该小体积血液样本从指部、脚后跟、耳部或尾部处获取。在进一步的实施方式中,该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺或尾部针刺获取。在某些实施方式中,获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每天一次或更多次,每天两次或更多次,每天三次或更多次,每天四次或更多次,以及每天五次或更多次。在另一个实施方式中,获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。在又一个实施方式中,每天获取该小体积血液样本。在另一个实施方式中,获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:一周一次,每两周一次,每三周一次,以及每四周一次。在其他的实施方式中,每月一次获取该小体积血液样本。

[0019] 在本文提供的方法的某些实施方式中,该血液样本从对象中获取。在另一个实施方式中,该血液样本从该对象的毛细血管或该对象的静脉中获取。在又一个实施方式中,该对象是人类或非人类动物。在某些实施方式中,该对象是人类。在某些其他的实施方式中,该对象是选自小鼠、大鼠、仓鼠、雪貂、沙鼠、兔、猴、黑猩猩、马、小马、驴、绵羊、猪、鸡、山羊、猫和狗的非人类动物。在又一个实施方式中,该对象患有疾病或紊乱。

[0020] 在本披露的方法的其他的实施方式中,该血液样本通过选自流式细胞术、磁珠分离、离心、纤维素柱,以及葡聚糖沉降的一种或多种方法进行白细胞消耗。在某些实施方式中,该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

[0021] 在本披露的方法的某些实施方式中,该小体积的该富含红细胞的样本在5 μ L和20 μ L之间。在又一个实施方式中,该小体积的该富含红细胞的样本是5 μ L。

[0022] 在本文提供的方法的另一个实施方式中,多种蛋白质的一种从选自以下的一个或多个位置处检测或测量,多种蛋白质的一种从选自以下的一个或多个位置处检测或测量:该红细胞的表面、红细胞的内部、红细胞的裂解物、该红细胞的上清液、含有该红细胞的培养基,以及先前含有该红细胞的培养基。

[0023] 在本文提供的方法的其他的实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测两种或更多种蛋白质的存在或者测量两种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测三种或更多种蛋白质的存在或者测量三种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测四种或更多种蛋白质的存在或者测量四种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测五种或更多种蛋白质的存在或者测量五种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测十种或更多种蛋白质的存在或者测量十种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,在该富含红细胞的样本中检测三十种或更多种蛋白质的存在或测量三十种或更多种蛋白质的水平。在某些实施方式中,使用一种或多种抗体检测一种或多种蛋白质的存在或测量一种或多种蛋白质的水平。在一些实施方式中,该一种或多种蛋白质选自趋化因子、细胞因子、生长因子、受体、细胞内信号递质、激素、核转录因子、神经递质,以及细胞外基质组分,以及酶。在又一个实施方式中,该一种或多种蛋白质选自表1中列出的蛋白质或表2中列出的蛋白质的组合。在仍然其他的实施方式中,该一种或多种蛋白质选自碱性FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF、CRP,以及DDT。

[0024] 在本披露的一个方面,本文提供了用于产生富含红细胞的血液样本中的病蛋白质图谱的方法,该方法包括从患有疾病或紊乱的对象,以及未患有该疾病或紊乱的对象中获取根据本文提供的方法所产生的至少一种蛋白质图谱;以及将患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱与未患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱相比较,其中所产生的病蛋白质图谱包括一种或多种蛋白质,相比未患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱,在来自患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱中,该一种或多种蛋白质具有不同的存在或水平。在一个实施方式中,该疾病或紊乱是癌症。在进一步的实施方式中,该病蛋白质图谱是包括选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF- α 、TGF- β ,以及IFN- γ 的一种或多种蛋白质的癌症蛋白质图谱。在另一个实施方式中,该疾病或紊乱是先兆子痫。在又一个实施方式中,该病图谱是包括选自TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8,以及IL-12的一种或多种蛋白质的先兆子痫蛋白质图谱。在进一步的实施方式中,该先兆子痫蛋白质图谱包括选自IL-6、IL-8和IFN- γ 的一种或多种蛋白质。

[0025] 在本披露的另一方面,本文提供了用于确定对象是否患有疾病或紊乱的方法,该方法包括获取根据本文提供的方法所产生的该对象的蛋白质图谱;以及将该对象的该蛋白质图谱与病蛋白质图谱相比较,其中该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或

水平与该病蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质的存在或水平相比较的相似性表明该对象患有该疾病或紊乱。在一个实施方式中,该疾病或紊乱选自癌症、先兆子痫、自身免疫疾病、心血管疾病、神经变性疾病、糖尿病、代谢紊乱、肌肉骨骼疾病、传染病、遗传紊乱、肾功能紊乱,以及胃肠功能紊乱。

[0026] 在本披露的又一方面,本文提供了监测对象治疗的方法,该方法包括在治疗前和治疗后从对象中获取根据本文提供的方法所产生的蛋白质图谱;以及将治疗前该对象的该蛋白质图谱与治疗后该对象的该蛋白质图谱相比较,其中与治疗后该对象的该蛋白质图谱相比,在治疗前该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或水平的差异表明该治疗对该患者有效。在一个实施方式中,将没有接受治疗的对象的该蛋白质图谱与接受治疗后的该对象的该蛋白质图谱相比较。在另一个实施方式中,将治疗后对象的在一个时间点的至少一种蛋白质图谱与治疗后该对象的在不同时间点的至少一种蛋白质图谱相比较。在进一步的实施方式中,该对象已经接受相同的治疗。在仍然其他的实施方式中,该对象已经接受了不同的治疗。在某些实施方式中,该血液样本是小体积血液样本。在某些其他的实施方式中,监测该对象若干次,该若干次选自以下:每天一次或更多次,每天两次或更多次,每天三次或更多次,每天四次或更多次,以及每天五次或更多次。在进一步的实施方式中,监测该对象若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次。在另一个实施方式中,每天监测该对象。在又一个实施方式中,监测该对象若干次,该若干次选自以下:一周一次,每两周一次,每三周一次,以及每四周一次。在又一个实施方式中,每月一次监测该对象。

[0027] 在本披露的其他方面中,提供了确定治疗有效性的方法,该方法包括从已经经历该治疗的对象,以及未经历该治疗的对象中获取根据本文提供的方法所产生的至少一种蛋白质图谱;以及将已经经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱与未经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱相比较,其中相比未经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱,已经经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或水平的相似性表明了该治疗的有效性。

[0028] 在本披露的另一方面,本文提供了用于增加血液样本中一种或多种蛋白质的检测或测量的准确性的方法,该方法包括使该血液样本与葡聚糖接触;允许该血液样本形成含白细胞层和红细胞致密层;分离该红细胞致密层中的该红细胞以创建富含红细胞的血液样本;以及检测该富含红细胞的血液样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平。在一个实施方式中,该血液样本是小体积血液样本。在另一个实施方式中,该小体积血液样本在5 μ L和100 μ L之间。在另一个实施方式中,该血液样本中血液与葡聚糖的比率选自如下:1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1,以及10:1。在其他的实施方式中,该血液样本中白细胞和血小板的平均消耗率是85%至99%。

[0029] 在本披露的另一方面,本文提供了用于测量血液样本的蛋白质图谱的试剂盒,该试剂盒包括用以使血液样本进行白细胞消耗并产生富含红细胞的样本的至少一种试剂;以及用以检测小体积富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的至少一种试剂。在一个实施方式中,该试剂盒进一步包括用以从对象中获取血液样本的至少一种试剂。在另一个实施方式中,用以检测一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的该试剂是

一种或多种抗体。在某些实施方式中,用以检测一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的该试剂是酶联免疫吸附测定(ELISA)装置。

[0030] 在本披露的一个方面中,本文提供了用于由获自对象的血液样本或该血液样本的组分生成蛋白质图谱的方法,该方法包括:测定该血液样本或该血液样本组分中的一种或多种蛋白质的水平,其中该血液样本和该血液样本组分各自包括红细胞(RBC)。

[0031] 在该方法的一个实施方式中,由该血液样本组分生成该蛋白质图谱。在该方法的另一个实施方式中,RBC的数目构成该血液样本组分中存在的血细胞总量的超过:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。在该方法的又一个实施方式中,该血液样本组分是通过使该血液样本进行白细胞消耗而产生的富含RBC的级分。在该方法的其他实施方式中,该白细胞消耗从该血液样本或其部分中除去了原始白细胞数目的超过:90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。在仍然其他的实施方式中,该白细胞消耗提供了富含RBC的级分,其中该级分中血细胞总数目的超过:99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%是RBC。在进一步的实施方式中,该血液样本或其部分经受血小板消耗。在另一个实施方式中,该血小板消耗从该血液样本或其部分中除去了原始血小板数目的超过:90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。

[0032] 在该方法的某些实施方式中,该一种或多种蛋白质选自如下:碱性FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF、CRP、DDT及其组合。在其他的实施方式中,该一种或多种蛋白质包括表1中列出的蛋白质或表2中列出的蛋白质的组合或由其组成。

[0033] 在该方法的一些实施方式中,测定该RBC的表面上的一种或多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,测定该RBC内的一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,测定由该RBC释放的一种或多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,该血液样本是干血斑样本(DBS)。

[0034] 在本披露的一个方面,生成该蛋白质图谱包括:由包括该RBC的细胞群产生细胞裂解物、细胞洗液或细胞上清液;以及测定该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。在一个实施方式中,使用该细胞裂解物进行一种或多种蛋白质的水平的测定。在该方法的其他实施方式中,一种或多种蛋白质的水平的测定通过以下来进行:速冻该RBC;融化该RBC以产生该细胞裂解物;以及测定该细胞裂解物中的一种或多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,使用细胞洗液执行一种或多种蛋白质的水平的测定。在进一步的实施方式中,该细胞洗液通过合并两个或更多个细胞洗液来产生。在又一个实施方式中,该细胞洗液使用包括以下一种或多种的洗液产生:等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)和/或厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)。

[0035] 在一些实施方式中,使用该细胞上清液执行一种或多种蛋白质的水平的测定。在另一个实施方式中,通过在细胞培养基中培养用于产生该细胞上清液的细胞来产生该细胞上清液,该细胞培养基包括以下一种或多种:罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基(EMEM)、达尔伯

克氏改良伊格尔氏培养基 (DMEM) ; 和/或伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基 (IMDM)。在其他的实施方式中, 使用该细胞上清液的多个样本执行测定一种或多种蛋白质的水平的步骤, 并且在不同时间点从用于产生该细胞上清液的该细胞的培养物中提取该细胞上清液的该样本。

[0036] 在某些实施方式中, 方法包括: 使该血液样本与抗凝血剂接触; 以及测定从该RBC中分离的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平。在一个实施方式中, 该方法包括: 速冻该白细胞; 融化该白细胞以产生白细胞裂解物; 以及测定所融化的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中, 该方法包括: 测定通过清洗和/或培养该白细胞生成的细胞洗液和/或细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。在进一步的实施方式中, 该方法包括: 使该血液样本与抗凝血剂接触; 以及测定从该RBC中分离的血小板中的一种或多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中, 该方法包括速冻该血小板; 融化该血小板以产生血小板裂解物; 以及测定所融化的血小板中的一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中, 该方法包括测定通过清洗和/或培养该血小板生成的细胞洗液和/或细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。

[0037] 在一些实施方式中, 该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触; 以及测定从该RBC中分离的血浆中的一种或多种蛋白质的水平。

[0038] 在该方法的其他实施方式中, 速冻处于低于或等于如下的温度: -5°C 、 -10°C 、 -20°C 、 -30°C 、 -40°C 、 -50°C 、 -60°C 、 -70°C 、 -75°C 、 -80°C 、 -100°C 、 -120°C 、 -140°C 、 -160°C 、 -180°C 、 -190°C 、 -195°C 或 -196°C 。在该方法的其他实施方式中, 该速冻和融化包括多个冻融循环。

[0039] 在该方法的另一个实施方式中, 通过流式细胞术和/或葡聚糖沉降将白细胞从该RBC中分离。在其他的实施方式中, 通过离心将血小板从该RBC中分离。

[0040] 在该方法的仍然其他的实施方式中, 该血液样本在采集期间已与血液稳定剂混合。在另一个实施方式中, 在测定一种或多种蛋白质的水平之前, 使从该对象中获取的该血液样本与血液稳定剂接触。在该方法的又一个实施方式中, 该血液稳定剂是以下的一种或多种: 蛋白酶抑制剂、表面活性剂、蛋白质变性剂、RNA稳定剂、抗凝血剂; 和/或抗凝血剂与另一种非抗凝血剂的稳定剂的组合。在该方法的一些实施方式中, 该血液稳定剂不是抗凝血剂。在另一个实施方式中, 该血液稳定剂是选自以下的蛋白酶抑制剂: 抑肽酶、亮肽素、 α 2-巨球蛋白、抗痛素二盐酸盐、钙蛋白酶抑制剂I、钙蛋白酶抑制剂II、糜蛋白酶抑制素、TLCK (CAS 131918-97-3)、胰蛋白酶抑制剂、Pefabloc SC (Roche)、PMSF (C6H5CH2SO2F-Thermo Fisher Scientific)、完整蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 及其组合。在仍然其他的实施方式中, 该抗凝血剂选自以下: 肝素、硫酸肝素、基底膜蛋白聚糖、集聚蛋白、多配体聚糖、 β 聚糖、磷脂酰肌醇蛋白聚糖、丝甘蛋白聚糖、柠檬酸盐、枸橼酸葡萄糖、EDTA及其组合。

[0041] 在该方法的某些实施方式中, 使该血液样本与该血液稳定剂接触的步骤在从该对象中获取该血液样本后以下时间之内执行: 5秒、10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时。

[0042] 在该方法的一个实施方式中, 该血液样本从该对象的毛细血管中获取。在该方法的其他实施方式中, 该血液样本从该对象的静脉中获取。

[0043] 在该方法的一些实施方式中,测定一种或多种蛋白质的水平的步骤在获取该血液样本后以下时间之内执行:2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时或48小时。

[0044] 在某些方面,该方法进一步包括从该对象中获取该血液样本的第一步骤。

[0045] 下文列出了本披露的进一步的非限制性实施方式:

[0046] 在本披露的某些方面,本文提供了一种用于由获自对象的血液样本生成蛋白质图谱的方法,该方法包括以下步骤:由该血液样本或该血液样本的组分产生细胞裂解物、细胞洗液或细胞上清液;以及测定该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平,其中该血液样本或该血液样本组分包括红细胞。在该方法的一个实施方式中,该红细胞构成该血液样本或该血液样本组分中存在的血细胞总数的超过:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。在另一个实施方式中,该方法包括在产生该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液之前使该血液样本和/或该血液样本组分进行白细胞消耗。该方法的其他实施方式包括以下步骤:使该血液样本或该血液样本组分与血液稳定剂接触;和/或速冻该血液样本或该血液样本组分。

[0047] 在本披露的一个方面,本文提供了一种方法,该方法包括由获自对象的血液样本生成蛋白质图谱,该方法包括以下步骤:通过使该血液样本或该血液样本的组分进行白细胞消耗产生富含红细胞(RBC)的级分;由该富含RBC的级分产生细胞裂解物、细胞洗液或细胞上清液;以及测定该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。在一个实施方式中,该白细胞消耗提供了富含RBC的级分,其中该血液样本中存在的白细胞数目的超过:90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%被除去。在该方法的另一个实施方式中,该白细胞消耗提供了富含RBC的级分,该级分包括总血细胞中RBC数目的超过:99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。

[0048] 在其他的实施方式中,该方法包括:使该富含RBC的级分与血液稳定剂接触;和/或在产生该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液之前速冻该血液样本或该血液样本组分。在又一个实施方式中,产生该富含RBC的级分的步骤在该速冻之前进行。在又一个实施方式中,产生该富含RBC的级分的步骤在该速冻之后进行。

[0049] 在该方法的一些实施方式中,该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的该一种或多种蛋白质选自如下:碱性FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF及其组合。在另一个实施方式中,该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的该一种或多种蛋白质包括或由以下组成:表1中列出的蛋白质;或表2中列出的蛋白质的组合。

[0050] 在仍然其他的实施方式中,该方法包括以下的血小板消耗:该血液样本;或该血液样本组分。在一个实施方式中,该血小板消耗除去了该血液样本或该血液样本组分中存在的血小板总数的超过:90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。

[0051] 在另一个实施方式中,使该血液与血液稳定剂接触和/或速冻的步骤在执行从该对象中获取该血液样本的步骤后以下时间之内进行:5秒、10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时。在其他的实施方式中,产生该细胞裂解物的步骤包括:一个或多个细胞速冻和融化循环。

[0052] 在其他的实施方式中,该方法包括:使血液样本与抗凝血剂接触;以及测定通过该血液样本或该血液样本组分的所述白细胞消耗获取的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平。在某些实施方式中,该方法包括:速冻通过该血液样本或该血液样本组分的所述白细胞消耗获取的白细胞;融化该白细胞;以及测定融化的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平。在进一步的实施方式中,该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触;以及测定通过该血液样本或该血液样本组分的所述血小板消耗获取的血小板中的一种或多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,该方法包括:速冻通过该血液样本或该血液样本组分的所述血小板消耗获取的血小板;融化该血小板;以及测定融化的血小板中的一种或多种蛋白质的水平。

[0053] 在仍然其他的实施方式中,该方法包括:使该血液样本与抗凝血剂接触;从该血液样本或该血液样本组分中分离血浆;以及测定该血浆中的一种或多种蛋白质的水平。在进一步的实施方式中,该方法进一步包括:速冻该血浆;融化该血浆;以及测定融化的血浆中的一种或多种蛋白质的水平。

[0054] 在一些实施方式中,该血液样本或该血液样本组分的小血小板消耗是通过离心。在其他的实施方式中,该血液样本或该血液样本的组分的白细胞消耗是通过流式细胞术和/或葡聚糖沉降。在仍然其他的实施方式中,速冻的步骤处于低于如下的温度:-5℃、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-75℃或-80℃。在进一步的实施方式中,融化以生成细胞裂解物的步骤包括:一个冻融循环、两个冻融循环、三个冻融循环、四个冻融循环、五个冻融循环;或者超过两个冻融循环、超过三个冻融循环、超过四个冻融循环或超过五个冻融循环。

[0055] 在该方法的其他实施方式中,该血液样本或该血液样本组分包括肝素和/或EDTA。

[0056] 在该方法的仍然其他的实施方式中,使用该细胞洗液执行测定一种或多种蛋白质的水平的步骤。在另一个实施方式中,该细胞洗液通过合并两个或更多个细胞洗液来产生。在又一个实施方式中,该细胞洗液使用包括以下一种或多种的洗液产生:等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)和/或厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)。

[0057] 在该方法的某些实施方式中,使用该细胞上清液执行一种或多种蛋白质的水平的测定。在另一个实施方式中,通过在细胞培养基中培养用于产生该细胞上清液的细胞来产生该细胞上清液,该细胞培养基包括以下一种或多种:罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基(EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM);以及伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(IMDM)。

[0058] 在该方法的其他实施方式中,使用该细胞上清液的多个样本执行测定一种或多种蛋白质的水平的步骤,并且在不同时间点从用于产生该细胞上清液的该细胞的培养物中提

取该细胞上清液的该样本。

[0059] 在另一个实施方式中,该方法包括:使该血液样本与抗凝血剂接触;以及测定通过该血液样本或该血液样本组分的白细胞消耗获取的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平。在其他的实施方式中,该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触;以及测定通过清洗和/或培养通过该血液样本或该血液样本组分的白细胞消耗获取的白细胞而生成的细胞洗液和/或细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触;以及测定由该血液样本或该血液样本组分的血小板消耗获取的血小板中的一种或多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触;以及测定通过清洗和/或培养由该血液样本或该血液样本组分的血小板消耗获取的血小板而生成的血小板洗液和/或血小板上清液中的一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,该方法包括使该血液样本与抗凝血剂接触;从该血液样本中分离血浆;以及测定该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平。

[0060] 在其他的实施方式中,该血小板消耗包括离心。在另一个实施方式中,该白细胞消耗包括流式细胞术和/或葡聚糖沉降。

[0061] 在其他的实施方式中,该血液样本或该血液样本组分包括肝素和/或EDTA。在进一步的实施方式中,该方法包括以下步骤:在产生该细胞洗液或该细胞上清液的步骤之前使该血液样本或该血液样本组分与血液稳定剂接触。在另一个实施方式中,与该血液稳定剂接触的步骤在从该对象中获取该血液样本后以下时间之内执行:5秒、10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时。

[0062] 在一些实施方式中,该血液稳定剂是:蛋白酶抑制剂,蛋白质变性剂,RNA稳定剂,抗凝血剂和/或抗凝血剂与另一种非抗凝血剂的稳定剂的组合;非抗凝血剂;抗凝血剂与另一种稳定剂(非抗凝血剂;和/或非肝素、EDTA、EGTA、柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)或氟化物(例如氟化钠))的组合。

[0063] 在某些实施方式中,该血液样本从该对象的毛细血管中获取。在其他的实施方式中,该血液样本从该对象的静脉中获取。

[0064] 在该方法的其他实施方式中,测定一种或多种蛋白质的水平的步骤在获取该血液样本后以下时间之内执行:2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时或48小时。

[0065] 在本披露的一个方面,本文提供了用于由对象的血液样本生成蛋白质图谱的方法,该方法包括以下步骤:由获自对象的全血液样本产生细胞裂解物;以及测定该细胞裂解物中的一种或多种蛋白质的水平。在一个实施方式中,该方法包括:速冻该全血液样本;融化该全血液样本以产生该细胞裂解物;以及测定该细胞裂解物中的一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,所述的融化该全血液样本以产生该细胞裂解物的步骤包括超过:一个冻融循环、两个冻融循环或三个冻融循环。在仍然其他的实施方式中,速冻处于低于如下的温度:-5℃、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-75℃、-80℃、-90℃、-100℃、-120℃、-104℃、-160℃、-180℃、-190℃、-200℃。

[0066] 在该方法的某些实施方式中,该细胞裂解物中的该一种或多种蛋白质选自如下:

碱性FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF及其组合。在一些实施方式中,该细胞裂解物中的一种或多种蛋白质包括或由以下组成:表1中列出的蛋白质;或表2中列出的蛋白质的组合。

[0067] 在其他的实施方式中,该方法包括:在产生该细胞裂解物的步骤之前使该全血液样本与血液稳定剂接触。在另一个实施方式中,该血液稳定剂是:蛋白酶抑制剂、蛋白质变性剂、RNA稳定剂、抗凝血剂和/或抗凝血剂与另一种非抗凝血剂的稳定剂的组合;非抗凝血剂;是抗凝血剂与另一种稳定剂(非抗凝血剂;和/或非肝素、EDTA、EGTA、柠檬酸盐(例如柠檬酸钠)或氟化物(例如氟化钠))的组合。在又一个实施方式中,该全血液样本与该血液稳定剂的接触在获取该全血液样本时;或者在获取该全血液样本后以下时间之内发生:5秒、10秒、20秒、30秒、45秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时。在仍然其他的实施方式中,该方法包括:使该全血液样本与抗凝血剂接触。在另一个实施方式中,该抗凝血剂是肝素和/或EDTA。在该方法的进一步实施方式中,该全血液样本从该对象的毛细血管中获取。在另一个实施方式中,该全血液样本从该对象的静脉中获取。

[0068] 在该方法的仍然其他的实施方式中,测定一种或多种蛋白质的水平的步骤在从该对象中获取该全血液样本的步骤后以下时间之内执行:2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时或48小时。

[0069] 除了发明概述中讨论的实施方式之外,在说明书、附图和权利要求书中还披露了其他的实施方式。该概述并不意在涵盖每一个实施方式;本披露涵盖了各种组合或变化。

附图说明

[0070] 参照附图,仅以举例的方式描述了本披露的实施方式。

[0071] 图1A-1C显示了针对IgG对照的CD44的RBC免疫分型结果。细胞(填充有灰色直方图)呈CD44阳性(n=3)。

[0072] 图2显示了针对IgG对照的CD74的RBC免疫分型结果,表明细胞(填充有灰色直方图)呈CD74阴性(n=3)。

[0073] 图3显示了通过血片碱性磷酸酶染色的MIF免疫细胞化学结果,阳性(染色)样本(n=1)。

[0074] 图4显示了通过血片碱性磷酸酶染色的MIF免疫细胞化学结果,阴性(未染色)对照(n=1)。

[0075] 图5显示了通过RA滑膜HRP染色的MIF免疫组织化学结果,阴性对照(n=1)。

[0076] 图6显示了通过RA滑膜HRP染色的免疫细胞化学结果,阳性对照(n=1)。

[0077] 图7是显示使用FACS分离的RBC中的巨噬细胞迁移抑制因子(MIF)浓度的图,其中通过指尖针刺采集血液(n=4)。

[0078] 图8是显示使用FACS分离的RBC中的MIF浓度的图,其中通过指尖针刺和静脉穿刺采集血液(n=1)。

[0079] 图9是显示使用FACS、葡聚糖沉降和RBC裂解缓冲液分离的RBC的图,其中通过静脉穿刺采集血液(n=1)。

[0080] 图10A-10C显示了使用针对IgG的CD45的免疫分型对分离的RBC中的WBC污染进行测试的结果。细胞(填充灰色直方图)大部分呈CD45阴性(n=3)。

[0081] 图11A-11GG这一系列的图显示了与未经清洗处理的RBC相比,已经通过清洗处理的RBC中的各种蛋白质的水平。

[0082] 图12这幅图概述了由BioPlex测量的并报告为pg/mL(100 μ L PBS中2,000万个RBC)的,37 $^{\circ}$ C时24小时期间从RBC分泌或释放入PBS中的蛋白质。数据以平均值 $\pm$ SD表示。

[0083] 图13这幅图概述了由BioPlex测量的并报告为pg/mL(100 μ L PBS中2,000万个RBC)的,37 $^{\circ}$ C时24小时期间从RBC分泌或释放入PBS中的蛋白质。数据以平均值 $\pm$ SD表示。

[0084] 图14这幅图概述了由BioPlex测量的并报告为pg/mL(100 μ L PBS中2,000万个RBC)的,37 $^{\circ}$ C时24小时期间从RBC分泌或释放入PBS中的蛋白质。数据以平均值 $\pm$ SD表示。

[0085] 图15这幅图概述了由BioPlex测量的并报告为pg/mL(100 μ L PBS中2,000万个RBC)的,37 $^{\circ}$ C时24小时期间从RBC分泌或释放入PBS中的蛋白质。数据以平均值 $\pm$ SD表示。

[0086] 图16A-16Z这一系列的图显示了蛋白酶抑制剂(PI)对从RBC分泌的蛋白质浓度(黑色柱)和孵育后该细胞中残留的蛋白质浓度(灰色柱)的影响。

[0087] 图17是显示当针对血浆水平归一化时裂解的全血中CRP的倍数变化的图。

[0088] 图18是显示血浆和纯化的裂解RBC中CRP浓度的图。

[0089] 图19A-19TT这一系列的图显示了小体积全血中各种蛋白质的水平。

[0090] 图20A-20AA这一系列的图显示了从通过指部针刺(FT)或静脉穿刺(V)从健康对象中获取的全血液样本分离的红细胞中的各种蛋白质的水平。

[0091] 图21A-21B是指示红细胞中各种蛋白质的水平与血浆中的该水平的比率的图表。

[0092] 图22A-22G这一系列的图显示了与氯化锂接触的红细胞中各种蛋白质的水平。

[0093] 图23A-23VV这一系列的图显示了从健康个体、健康孕妇、患有先兆子痫的孕妇,以及肿瘤患者中分离的红细胞中的各种蛋白质的水平差异。

[0094] 图24A-24C是指示红细胞中各种蛋白质的水平与从肿瘤患者中分离的血浆中的该水平的比率的图表。

[0095] 图25A-25RR这一系列的图显示了从健康个体、健康孕妇、患有先兆子痫的孕妇,以及肿瘤患者中分离的红细胞分泌或释放的各种蛋白质的水平。

[0096] 定义

[0097] 如在本申请中所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一种”和“该”包括复数指代。例如,术语“一种细胞裂解物”包括多个细胞裂解物。

[0098] 如本文所用,术语“包括”意指“包含”。单词“包括”的变体,例如“包含”和“含有”具有相应变体的含义。因此,例如,“包括”步骤‘A’和‘B’的方法可以仅由步骤‘A’和‘B’组成,或者可以包含一个或多个附加步骤(例如步骤‘A’、‘B’和‘C’)。

[0099] 在发明详述中使用的主题标题是为了便于参考或方便读者而被包括在内的,并且不应该被用于限制见于本披露或权利要求书全文的主题。该主题标题不应用于阐释权利要求书的范围或权利要求限定。

[0100] 如本文所用,术语“对象”包含具有经济、社会或研究重要性的任何动物,包含牛、

马、绵羊、灵长类动物、禽类和啮齿类物种。因此，“对象”可以是哺乳动物，例如人类或非人类哺乳动物。

[0101] 如本文所用，术语“(一种/多种)抗体”包含IgG(包含IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)、IgA(包括IgA1和IgA2)、IgD、IgE；或IgM，以及IgY；全抗体，其包括单个链全抗体；及其抗原结合片段。抗原结合抗体片段包含但不限于Fab、Fab’和F(ab’)2、Fd、单链Fvs(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fvs(sdFv)和包括VL或VH结构域的片段。该抗体可以来自任何动物来源。包括单链抗体在内的抗原结合抗体片段可以包括单独的或与下列的全部或部分组合的可变区：铰链区、CH1、CH2和CH3结构域。还包含(一种或多种)可变区和铰链区、CH1、CH2和CH3结构域的组合。抗体可以是与生物分子特异性结合的单克隆、多克隆、嵌合、多特异性、人源化和人单克隆和多克隆抗体。

[0102] 如本文所用，术语“蛋白质”是指由通过肽键连接在一起的氨基酸组成的聚合物。

[0103] 如本文所用，术语“蛋白质图谱(protein profile)”是指样本中存在的(一种或多种)蛋白质和/或(一种或多种)蛋白质片段。该样本可能包括或不包括细胞。如果该样本包括细胞，则该蛋白质或该蛋白质片段可以存在于细胞内和/或部分或完全存在于该细胞表面。虽然不是必需的，但该蛋白质图谱也可以提供该样本中(一种或多种)蛋白质和/或(一种或多种)蛋白质片段的定量信息。

[0104] 如本文所用，术语“血液样本”是指至少部分地包括血液和/或血液组分的样本。该血液样本可以直接从一个或多个对象或从预先存在的来自一个或多个对象的血液采集中获取。该血液样本可以通过本领域已知的多种方法，例如身体部位(例如手臂、腿部、耳部等)的静脉穿刺(例如蝶形针和真空采血管、直针和真空采血管、蝶形针和注射器)或通过刺入(例如手指、脚后跟或耳部针刺)，从人类对象中获取。该血液样本可以通过本领域已知的多种方法，例如任何身体部位(例如尾部、臂部、腿部(如大腿))、鼻部、脸部、耳部、胸部、颈部/喉咙、舌头、心脏)的静脉穿刺(例如针和注射器)或通过刺入(例如指部、脚后跟、耳部或尾部针刺)，从非人类哺乳动物对象中获取。该血液样本可以通过本领域已知的多种方法，例如身体部位(例如翅膀、喉咙、心脏)的静脉穿刺(例如针和注射器)，从其他非人类动物(例如鸡、鸟)中获取。

[0105] 如本文所用，术语“血细胞”或“该血液样本中存在的细胞”是指该样本中的细胞，包含红细胞和白细胞，但不包含血小板。

[0106] 如本文所用，术语“富含红细胞的血液样本”或“富含RBC的级分”是指与富集前该血液样本中的相比，RBC的比例增加的样本或样本的组分。例如，通过从该样本中除去非RBC的细胞类型(例如除去白细胞(白细胞消耗)和/或除去血小板)；和/或通过从该样本中的其他(一种或多种)细胞类型中除去RBC以提供分离样本可以增加RBC的比例。该富含RBC的级分可以包括总血细胞数目的大于99.5%、大于99.6%、大于99.7%、大于99.75%、大于99.8%、大于99.85%、大于99.9%、大于99.5%、大约100%红细胞；或100%红细胞。

[0107] 如本文所用，术语“速冻”是指通常在较短的时间段内(例如在几毫秒，1-2秒，1-5秒，1-10秒，1-15秒，1-20秒，10-20秒，10-30秒，30-60秒，少于1分钟或少于2分钟的期间内)将血细胞(例如RBC)和/或血浆/血清冷冻至其凝固点以下的温度)。

[0108] 如本文所用，“白细胞消耗(leukodepletion)”是指例如，通过从血液样本或血液样本组分除去白细胞；或者替代性地，通过从该血液样本或该血液样本组分除去(一种或多

种) 其他血液成分以提供白细胞消耗的分离样本来降低该血液样本或该血液组分中白细胞的比例。在一些实施方式中, 白细胞消耗包含血小板消耗。

[0109] 如本文所用, “血小板消耗”是指例如, 通过从血液样本或血液样本组分中除去血小板; 或者替代性地, 通过从该血液样本或血液样本组分中分离(一种或多种) 其他血液成分以提供血小板消耗的分离样本来降低该血液样本或血液样本组分中血小板的比例。

[0110] 如本文所用, “细胞上清液”应理解为是指用于在给定的时间段期间(例如超过: 30分钟、1小时、2小时、3小时、6小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时或120小时), 在给定的温度或给定的温度范围内培养群体细胞的细胞培养基。

[0111] 如本文所用, “细胞洗液”将被理解为是指已用于清洗细胞群的液体, 该液体不同于如上定义的细胞上清液, 因为该细胞洗液不用作细胞培养物的培养基。相应地, 用于生成“细胞洗液”的流体可以与该细胞群体混合少于: 30分钟、20分钟、15分钟、10分钟、5分钟、4分钟、3分钟、2分钟、1分钟或30秒的时间段。

[0112] 如本文所用, “培养基”是指具有维持以下细胞活力的能力的组合物: 血液样本内的细胞、从血液样本中分离的细胞; 或由从血液样本中分离的细胞产生的细胞组分。该培养基可以刺激细胞生长和增殖或将细胞维持在特定和/或现有的状态。培养基的非限制性实例包含等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)、厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)、罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基(EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM), 以及伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(IMDM)。

[0113] 如本文所用, 术语“小体积”是指一毫升或更少的血液体积。小体积可以是1 μ L至100 μ L, 100 μ L至200 μ L, 200 μ L至300 μ L, 300 μ L至400 μ L, 400 μ L至500 μ L, 500 μ L至600 μ L, 600 μ L至700 μ L, 700 μ L至800 μ L, 800 μ L至900 μ L以及900 μ L至1000 μ L。在一些实施方式中, 小体积是50 μ L至100 μ L, 100 μ L至150 μ L, 150 μ L至200 μ L, 200 μ L至250 μ L, 250 μ L至300 μ L, 300 μ L至350 μ L, 350 μ L至400 μ L, 400 μ L至450 μ L, 450 μ L至500 μ L, 500 μ L至550 μ L, 550 μ L至600 μ L, 600 μ L至650 μ L, 650 μ L至700 μ L, 700 μ L至750 μ L, 750 μ L至800 μ L, 800 μ L至850 μ L, 850 μ L至900 μ L, 900 μ L至950 μ L, 950 μ L至1000 μ L。在一些实施方式中, 小体积为1 μ L至10 μ L, 10 μ L至20 μ L, 20 μ L至30 μ L, 30 μ L至40 μ L, 40 μ L至50 μ L, 50 μ L至60 μ L, 60 μ L至70 μ L, 70 μ L至80 μ L, 80 μ L至90 μ L或90 μ L至100 μ L。在其他的实施方式中, 小体积为1 μ L至5 μ L, 5 μ L至10 μ L, 10 μ L至15 μ L, 15 μ L至20 μ L, 20 μ L至25 μ L, 25 μ L至30 μ L, 30 μ L至35 μ L, 35 μ L至40 μ L, 40 μ L至45 μ L, 45 μ L至50 μ L, 50 μ L至55 μ L, 55 μ L至60 μ L, 60 μ L至65 μ L, 65 μ L至70 μ L, 70 μ L至75 μ L, 75 μ L至80 μ L, 80 μ L至85 μ L, 85 μ L至90 μ L, 90 μ L至95 μ L或95 μ L至100 μ L。在一些实施方式中, 小体积是5 μ L至10 μ L, 5 μ L至15 μ L, 5 μ L至20 μ L, 5 μ L至25 μ L, 5 μ L至30 μ L, 5 μ L至35 μ L, 5 μ L至40 μ L, 5 μ L至45 μ L, 5 μ L至50 μ L, 5 μ L至55 μ L, 5 μ L至60 μ L, 5 μ L至65 μ L, 5 μ L至70 μ L, 5 μ L至75 μ L, 5 μ L至80 μ L, 5 μ L至85 μ L, 5 μ L至90 μ L, 5 μ L至95 μ L或5 μ L至100 μ L。在其他的实施方式中, 小体积是1 μ L、2 μ L、3 μ L、4 μ L、5 μ L、6 μ L、7 μ L、8 μ L、9 μ L、10 μ L、11 μ L、12 μ L、13 μ L、14 μ L、15 μ L、16 μ L、17 μ L、18 μ L、19 μ L、20 μ L、21 μ L、22 μ L、23 μ L、24 μ L、25 μ L、26 μ L、27 μ L、28 μ L、29 μ L、30 μ L、31 μ L、32 μ L、33 μ L、34 μ L、35 μ L、36 μ L、37 μ L、38 μ L、39 μ L、40 μ L、41 μ L、42 μ L、43 μ L、44 μ L、45 μ L、46 μ L、47 μ L、48 μ L、49 μ L或50 μ L。

[0114] 如本文所用, 术语“可检测水平”或“检测水平”是指组合物或试剂指示和/或指令样本(例如血液样本)中所需分子(例如蛋白质)存在的能力。在本文披露的方法中描述的富

含红细胞的样本中,例如,蛋白质的可检测水平可能因可用于检测的蛋白质的增加而提高。这种提高可能出于一个或多个原因,例如通过破坏蛋白质-分子(例如蛋白质-蛋白质、蛋白质-膜、蛋白质-核酸)相互作用(其阻止和/或减少蛋白质检测)。

[0115] 如本文所用,来自RBC的蛋白质“释放”是指蛋白质通过主动或非主动机制做以下移动:(i)从RBC的细胞内区域或内部移动至该RBC的表面和/或细胞外或外部区域(例如血浆、血清或培养基)或(ii)从该RBC的细胞外或外部区域(例如从血浆、血清或培养基)移动至该RBC的表面和/或细胞外区域或外部。在一些实施方式中,通过本领域已知的细胞表面-蛋白质结合相互作用(例如受体、共价附着、非共价附着、粘附)将该蛋白质结合到该RBC的表面。在进一步的实施方式中,可以将表面结合的蛋白质释放回到该RBC的细胞外或外部区域(例如进入该血浆、血清或培养基中)。

[0116] 如本文所用,“治疗”是指可用于预防、管控、缓解或改善疾病、紊乱或病症(包含疾病、紊乱或病症的一种或多种症状和/或与其有关的症状的预防、缓解或改善)的一种或多种疗法、方案、方法和/试剂。在某些实施方式中,术语“(一种或多种)治疗”是指生物疗法、支持性疗法和/或本领域技术人员(例如医务人员)已知的其他可用于预防、管控、缓解和/或改善疾病、紊乱或病症的疗法。

[0117] 如本文所用,短语“基本相似”或“基本上相同”表示两个数值之间的相似性足够高,以至于本领域技术人员会认为这两个值(例如蛋白质浓度/水平)之间的差在由该值测量的生物学特征的上下文中,具有很小的或没有生物学和/或统计学显著性。例如,这两个值之间的差可以小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%;或小于约5%。

[0118] 如本文所用,术语“试剂盒”是指具有执行本文所述的方法所必需的所有组分的递送系统。作为非限制性实例,该试剂盒可以包括用于以下的装置:采集血液、一种/多种抗凝血剂、一种/多种血液稳定剂;RBC的富集;非RBC血液组分的除去/分离;速冻血液或其一种/多种组分;裂解细胞;清洗细胞;培养细胞;一种/多种特异性靶蛋白的细胞内和/或细胞外检测;或其组合。在一些实施方式中,试剂盒可以包括以下的一种或多种:用于从对象中获取血液样本的一种/多种装置(如注射器、针、蝶形针、管、持针器、血液采集装置、转运装置、真空采血管、hemaPENTM);用于从对象中获取干血液样本的一种/多种装置(如滤纸、卡片、HemaSpotTM);用于从液体血液样本(如抗体包被的磁珠)获取红细胞级分、白细胞级分和/或血小板级分的一种/多种装置;抗凝血剂;蛋白酶抑制剂;蛋白质变性剂;以及诸如此类。这样的输送系统包含允许反应试剂(例如在适当的容器中的标签、基准样本、支持材料等)和/或支持材料(例如缓冲液、检定执行书面说明书等)的存储、从一个位置到另一个位置的运输或递送的系统)。例如,试剂盒可以包含一个或多个含有相关反应试剂和/或支持材料的外壳,例如盒子。术语“试剂盒”包含分段和组合式试剂盒。

[0119] 如本文所用,术语“分段式试剂盒”是指包括两个或更多个独立的容器的递送系统,该容器含有全部试剂盒组分的子部分。这些容器可以一起或单独地被递送到预期的接收者。包括两个或更多个独立的容器(每个容器含有全部试剂盒组分的子部分)的递送系统被包含在术语“分段式试剂盒”的含义内。

[0120] 如本文所用,“组合式试剂盒”是指将所有的反应检定组分包含在单个容器中(例如在容纳每种所需组分的单个盒子中)的递送系统。

[0121] 本文对现有技术文件的任何描述;或者本文中来源于或基于那些文件的陈述并不是承认,该文件或衍生的陈述是相关技术领域的一部分公知常识。

[0122] 发明详述

[0123] 目前用于图谱分析血液中蛋白质水平的技术通常将分析限制于血清/血浆和/或PBMC。在生成蛋白质图谱之前,通常在血液处理过程中就把RBC除去。

[0124] 本发明人已经做出意想不到的确定,即RBC提供了一种蛋白质标记物(包含各种细胞因子和趋化因子)的重要来源。相应地,已经确认了,现有技术的不足之处在于,先前没有认识到RBC提供了本文所述的各种蛋白质标记物的来源,并且现有技术将蛋白质图谱分析排除在外,从而提供了不充分和/或不准确的评估。本披露通过提供用于由血液生成的并入RBC分析的蛋白质图谱的方法来弥补这个缺陷。具体而言,本披露提供了一种有用的实验室新技术,其用于通过评估RBC中新鉴定的蛋白质的存在或水平来产生富集的红细胞样本的蛋白质图谱。

[0125] 另外,本发明人已经确定,血液中的蛋白质图谱分析可能根据许多因素而变化,该因素包含,例如血液的来源(例如静脉、毛细血管等),是否使用抗凝血剂,所采用的抗凝血剂的类型,采集后测量蛋白质含量的时间范围,血液在采集后最初是否稳定,以及所分析的(一种或多种)特定血液分室。在不限制特定作用模式的情况下,由包括上述那些因素引起的血液蛋白质图谱的变化被假设为至少部分地起因于先前未知的RBC隔离和释放许多不同蛋白质(例如细胞因子和趋化因子)的能力。认为RBC蛋白释放(或替代性地,隔离)的程度受血液采集和处理期间出现的各种因素的影响。相应地,已经确定,现有技术的另一个缺陷在于不知道具体的血液分室(例如血浆/血清)的蛋白质图谱受诸如血液来源(例如静脉、毛细血管等)、抗凝血剂、采集后测量前的时间范围;和/或稳定剂的存在/不存在之类的因素的显着影响。本披露通过提供用于由血液生成蛋白质图谱的方法来弥补这个缺陷,其方式是在血液的采集和处理期间,使RBC蛋白质图谱的变化最小化,同时还考虑到了RBC分室的蛋白质图谱。

[0126] 以下描述足够详细地传达了本披露的示例性实施方式,以使本领域的普通技术人员能够实践本披露。所描述的各种实施方式的特征或限定不一定限制整个本披露或本披露的其他实施方式。因此,本披露的范围不由下面的详述限制,而仅由权利要求书限定。

[0127] 红细胞(RBC)的蛋白质图谱分析(Protein profiling)

[0128] 通常使用分离的血清/血浆和/或PBMC进行血液蛋白质分析。尽管RBC代表了血液的主要组分,是迄今为止最富足的细胞类型(通常是总血细胞的>99%),在蛋白质图谱分析检定中却通常将其排除在外。

[0129] 本披露至少部分地来自意外的观察结果,即RBC含有许多与,例如对象的诊断和预后结果有关的不同蛋白质标记物。鉴于RBC代表了血液的重要部分及其几乎全部的细胞组分,评估RBC的蛋白质图谱对于更全面地了解血液中的总体蛋白质标记物含量是有用的。

[0130] 本披露还提供了用于由血液样本、富含红细胞的样本;和/或包括RBC的血液样本组分生成蛋白质图谱的方法。在一些实施方式中,RBC的数量构成该血液样本或该血液样本组分中的血细胞总数的超过:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。

[0131] 血液样本

[0132] 该方法中获取的血液样本如本文所定义(参见,例如“血液样本”)并且可以从对象或现有血液采集(例如先前从一个或多个对象中获取的血液)中获取。血液样本可以使用本领域普通技术人员已知的示例性手段从对象中获取(参见,例如世界卫生组织,“Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives”, 世界卫生组织技术报告丛刊, 第840号, 1994, 附件2)。作为非限制性实例, 血液样本可以使用静脉血、毛细血管血、动脉血或其组合从对象中获取。

[0133] 在一些实施方式中, 小体积血液样本从对象或现有血液采集中获取。该小体积可以通过本领域普通技术人员已知的方法从对象中获取, 包含, 例如通过刺入(例如指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺、尾部针刺)。在一个实施方式中, 该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺或耳部针刺(例如从人类中)获取。在另一个实施方式中, 该小体积血液样本通过尾部针刺(例如从小鼠或大鼠中)获取。在其他的实施方式中, 该小体积血液样本通过手指部针刺伤获取。在其他的实施方式中, 该小体积血液样本通过脚后跟针刺(例如从婴儿中)获取。在仍然其他的实施方式中, 该小体积血液样本通过耳部针刺获取。在进一步的实施方式中, 该小体积血液样本通过尾部针刺获取。

[0134] 在一些实施方式中, 该小体积如本文所定义(参见, 例如“小体积”)。在其他的实施方式中, 该小体积是5 μ L至100 μ L。在另一个实施方式中, 该小体积是5 μ L至50 μ L。在其他的实施方式中, 该小体积是5 μ L至20 μ L。在仍然其他的实施方式中, 该小体积是5 μ L至10 μ L。在仍然其他的实施方式中, 该小体积是5 μ L。

[0135] 与较大体积血液样本相比, 获取小体积血液样本允许对, 例如对象的更频繁的采样, 因为采用小体积血液样本降低了对该对象的伤害(例如疼痛、失血、血液水平的缓慢恢复)。比如, 使用现有的方法, 对小动物(例如大鼠、小鼠)的频繁血液采样是不可实现的, 因为全面的血液分析需要的血液太多, 以至于必须要牺牲该动物。同样, 为了防止失血造成的伤害, 通常对婴儿只能通过刺入(例如脚后跟针刺)才能安全地取样。根据本文提供的方法, 在某些实施方式中, 小体积血液样本可以以如下频率获取: 每天一次或更多次, 每天两次或更多次, 每天三次或更多次, 每天四次或更多次, 以及每天五次或更多次。在其他的实施方式中, 小体积血液样本的获取为每周一次或更多次, 每周两次或更多次, 每周三次或更多次, 每周四次或更多次, 每周五次或更多次, 每周六次或更多次, 以及每周七次或更多次。在其他的实施方式中, 每天获取该小体积血液样本。在仍然其他的实施方式中, 每周一次, 每两周一次, 每三周一次, 以及每四周一次获取该小体积血液样本。在某些实施方式中, 每月一次获取该小体积血液样本。

[0136] 富含红细胞样本或级分

[0137] 在一些实施方式中, 该方法涉及由富含红细胞的血液样本或富含红细胞的级分产生或生成蛋白质图谱以及测定该富含红细胞的样本或级分中的一种或多种蛋白质的水平。该富含红细胞的样本和富含红细胞的级分可以例如, 通过白细胞消耗和/或血小板消耗, 由取自对象的血液样本产生。附加地或可替代地, 可以从样本中除去RBC以产生该富含红细胞的样本或级分。

[0138] 白细胞消耗和血小板消耗的方法学为本领域普通技术人员所熟知(参见, 例如 Wenz, B., “Methods for leukodepletion” in “Clinical Benefits of Leukodepleted

Blood Products”, pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg; Novotny V., 以及 Brand, A., “Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions” in “Modern Transfusion Medicine”, pp 117-121, 1995, CRC Press, Inc.; White 和 Jennings, “Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory Procedures”, 1999, Academic Press)。用于白细胞消耗的合适技术的非限制性实例包含流式细胞术、葡聚糖沉降、ficoll/percol 密度梯度离心, 以及诸如此类。

[0139] 本披露还提供了通过产生富含红细胞的样本并检测该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平来提高血液样本中一种或多种蛋白质的检测或测量的灵敏度的方法。在某些实施方式中, 血液与葡聚糖的比例在 1:1 和 2:1, 1:1 和 3:1, 1:1 和 4:1, 1:1 和 5:1, 1:1 和 6:1, 1:1 和 7:1, 1:1 和 8:1, 1:1 和 9:1, 1:1 和 10:1 之间。在其他的实施方式中, 血液与葡聚糖的比例为 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1。在仍然其他的实施方式中, 血液与葡聚糖的比例为 2:1。在进一步的实施方式中, 血液与葡聚糖的比例为 4:1。

[0140] 作为非限制性实例, 该富含红细胞的样本或级分可以通过对该血液样本中存在的白细胞数目的超过 90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75% 或 99.9% 进行白细胞消耗而生成。此上下文中的“白细胞消耗”可以通过直接从该血液样本中消耗白细胞; 和/或通过从该样本中除去 RBC 来提供分离的白细胞消耗 (富含 RBC) 的级分来实现。在一些实施方式中, 白细胞消耗包括血小板消耗。

[0141] 附加地或可替代地, 该富含红细胞的样本或级分可以通过对该血液样本中存在的血小板数目的超过 90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75% 或 99.9% 进行血小板消耗而生成。此上下文中的“血小板消耗”可以通过直接从该血液样本中消耗血小板; 和/或通过从该样本中除去 RBC 以提供分离的血小板消耗 (富含 RBC) 的级分来实现。

[0142] 在一些实施方式中, 该富含红细胞的样本或级分可以包括超过 99.75%、超过 99.8%、超过 99.9%、超过 99.95%、大约 100% 或 100% 的红细胞 (作为该富含 RBC 的级分内存在的血细胞总数的组分)。

[0143] 给定的富含样本或级分中 RBC 的百分比可以使用本领域普通技术人员已知的常规方法评估, 包含, 例如流式细胞术、荧光显微镜术、其他基于抗体的技术, 以及诸如此类。

[0144] 小体积的富含红细胞的样本

[0145] 本披露还提供了由小体积的富含红细胞的血液样本生成蛋白质图谱的方法。通过本领域已知的方法, 并且这些方法, 如本领域普通技术人员认为的适合于该富含红细胞的样本中的蛋白质检测或蛋白质测量的后续方法 (参见, 例如下文的蛋白质图谱分析), 可以从富含红细胞的血液样本中获取小体积。小体积是如本文所定义的体积 (参见, 例如“小体积”)。作为非限制性实例, 在其他的实施方式中, 该小体积可以是 5 μ L 至 10 μ L, 5 μ L 至 20 μ L, 5 μ L 至 30 μ L, 5 μ L 至 40 μ L, 5 μ L 至 50 μ L, 5 μ L 至 60 μ L, 5 μ L 至 70 μ L, 5 μ L 至 80 μ L, 5 μ L 至 90 μ L 或 5 μ L 至 100 μ L。在一个实施方式中, 该小体积是 5 μ L 至 100 μ L。在另一个实施方式中, 该小体积是 5 μ L 至 50 μ L。在仍然其他的实施方式中, 该小体积是 5 μ L 至 20 μ L。在仍然其他的实施方式中, 该小体积为 5 μ L 至 10 μ L。在某些实施方式中, 该小体积是 5 μ L。

[0146] 包括 RBC 的全血

[0147] 在其他的实施方式中, 本披露的方法涉及对包括 RBC 的全血液样本的分析。在这些

实施方式中,对该全血液样本进行蛋白质图谱的分析,而没有或基本上不改变该样本内血细胞类型的相对比例并且没有分离血浆/血清。

[0148] 该全血液样本可以使用本领域普通技术人员已知的示例性手段获取(参见,例如世界卫生组织,“Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives”, 世界卫生组织技术报告丛刊, 第840号, 1994, 附件2)。本说明书的实施例中也提出了方法学。

[0149] 作为非限制性实例,该全血液样本可以使用静脉血、毛细血管血、动脉血或其组合获取。

[0150] 在一些实施方式中,本披露的涉及全血分析的方法可以使用干血斑(DBS)采样来进行。DBS采样的非限制性优点包含以下中的一个或多个:样本稳定性,最小体积要求(例如每个点30-100 μ L),样本采集(例如指部、脚趾或后脚跟针刺)和运输的容易程度。获取的用于本披露的DBS样本可以,例如在冷藏和/或环境温度下保持数月至数年的稳定性。

[0151] 适用于DBS的方法学为本领域普通技术人员所熟知(参见,例如McDade等人; Demography 2007, 44:899-925; De Jesus等人 Clin Chem 2009, 55:1; 158-164; Sharma等人 Drug Testing and Analysis, 2014, 6(5), 399-414)。

[0152] 简而言之,并且再次仅作为非限制性实例,全血可以使用合适的仪器(例如无菌手术刀片或一次性刺血针)从有关对象(例如指部、后脚跟或脚趾针刺)中获取并且被点在,例如膜或纸(例如滤纸卡)上。对于定量分析,可以应用测量的血液量。然后可以使该血液,例如在室温下和/或在氮气流和/或受控湿度下干燥。干燥时间通常至少部分取决于样本体积。DBS膜或纸可以储存在环境温度下或冷藏,并且可以适当加以包装以避免湿度。然后可以在合适的时间提取DBS用于分析(例如使用提取溶剂或类似物)。

[0153] 附加的血液分室的分析

[0154] 除了对富含RBC的级分或包括RBC的全血液样本的蛋白质图谱分析之外,本披露的方法可以进一步包括进行一个或多个附加的血液分室的蛋白质图谱分析。

[0155] 例如,可以在选自血浆、血清、血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞的混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,以及诸如此类中的一种或多种);及其组合。

[0156] 用于分析的附加血液分室可以使用已知技术来制备。例如,细胞组分可以通过流式细胞术、磁珠分离、离心,以及诸如此类进行分离。血浆/血清分离技术在本领域中也是众所周知的。许多标准文本和协议可用并且被广泛用于这些目的,并且作为非限制性实例,参考以下:世界卫生组织,“Requirements for the collection, processing and quality control of blood, blood components and plasma derivatives”, 世界卫生组织技术报告丛刊, 第840号, 1994, 附件2; Wenz, B., “Methods for leukodepletion” in “Clinical Benefits of Leukodepleted Blood Products”, pp 5-16, 1995, Springer Berlin Heidelberg; Novotny V., 以及 Brand, A. “Leukocyte-Poor Blood and Platelet Transfusions” in “Modern Transfusion Medicine”, pp 117-121, 1995, CRC Press, Inc.; White 和 Jennings, “Platelet Protocols: Research and Clinical Laboratory

Procedures”, 1999, Academic Press)。

[0157] 血液稳定剂和抗凝血剂

[0158] 如上所述且不限于特定的机理特征,假设RBC可能具有隔离和释放不同蛋白质(例如细胞因子和趋化因子)的能力,并且认为RBC的蛋白质释放(或可替代性地,隔离)的程度受血液采集和加工过程中出现的各种因素的影响。

[0159] 在一些实施方式中,本披露的方法中使用的血液样本或其组分可以与血液稳定剂混合。具有稳定RBC的能力的药剂是有用的,以便减少或防止加工过程中蛋白质与RBC的隔离和/或从中的释放。

[0160] 该血细胞稳定剂可以在从该对象中采集该血液样本的时刻和/或在血液样本或其组分的随后处理期间与该血液样本混合。作为非限制性实例,该血液稳定剂可以在从该对象中获取该血液样本后以下时间之内进行:1秒、2秒、3秒、4秒、5秒、10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时。

[0161] 合适的血液稳定剂的非限制性实例包含蛋白酶抑制剂(例如抑肽酶、亮肽素、 α 2-巨球蛋白、抗痛素二盐酸盐、钙蛋白酶抑制剂I、钙蛋白酶抑制剂II、糜蛋白酶抑制素、TLCK (CAS 131918-97-3)、胰蛋白酶抑制剂、Pefabloc SC (Roche)、PMSF ($C_6H_5CH_2SO_2F$ -Thermo Fisher Scientific)、完整蛋白酶抑制剂混合物 (Roche),以及诸如此类)、抗凝血剂、RA稳定剂(例如RNALater-Thermo Fisher Scientific)、蛋白质变性剂;或其组合。

[0162] 在示例性实施方式中,该血液稳定剂是抗凝血剂。该抗凝血剂可以在从该对象中采集该血液样本的时刻(例如,其中采集有该血液样本的器皿或容器可能含有该抗凝血剂);和/或在血液样本或其(一种或多种)组分的随后处理期间,与该抗凝血剂混合。

[0163] 合适的抗凝血剂的非限制性实例包含肝素、乙二胺四乙酸(EDTA)、EDTA二钠盐、EDTA四钠盐、EDTA二钾盐、EDTA二铵盐、乙烯双(氧乙烯次氨基)四乙酸(EGTA)、EDTA三钠盐、EDTA三钾盐、乙二醇-0,0-双(2-氨基乙基)-N,N,N,N-四乙酸、N-(2-羟乙基)乙二胺-N,N,N-三乙酸三钠盐、柠檬酸盐、酸-柠檬酸盐-右旋糖、柠檬酸氢二铵、酒石酸二铵、华法林、N-(2-双(羧甲基)氨基乙基)-N-(2-羟乙基)甘氨酸盐二水合物、柠檬酸、柠檬酸单钠盐、柠檬酸二钠盐、柠檬酸三钠盐、柠檬酸单钾盐、柠檬酸三钾盐、蛋白质C/蛋白质S、次氨基三乙酸、酒石酸钾钠、D-酒石酸氢钾、L-酒石酸单钠盐、L-酒石酸二钠盐、L-酒石酸二钾盐、链激酶、硫酸鱼精蛋白、三(羧甲基)胺、抗凝血酶III、苯丙香豆醇、水蛭素、nicoumalone、香豆定、糖胺聚糖、布洛芬、乙酰水杨酸、吲哚美辛、前列腺素类、磺吡酮、尿激酶、水蛭肽、组织纤溶酶原激活剂、香豆素;或其组合。

[0164] 除了对富含RBC的级分进行分析时之外,例如,当需要对白细胞(白血球)、血小板和/或血浆的一种或多种进行蛋白质图谱分析时,抗凝血剂的使用也可能是有利的。如果需要对血液的全部细胞组分(即,混合的血细胞群体减去血浆组分)进行蛋白质图谱分析,则抗凝血剂的使用也可能是有益的。

[0165] 在其他的实施方式中,用于本披露的方法中的血液样本不可以与抗凝血剂混合。这种情况可能是在对RBC、富含RBC或全血液样本进行蛋白质图谱分析时。在这种情况下,其他的不具有抗凝血活性或仅具有标称量的抗凝血活性的稳定剂可以与该血液样本或其组分混合。在其他的实施方式中,本披露的方法中使用的血液样本或其组分可以通过冷冻(例

如速冻)或通过干燥(例如干血斑)来稳定化。

[0166] 裂解物分析

[0167] 在一些实施方式中,本披露的方法包括由细胞裂解物生成蛋白质图谱。

[0168] 仅作为非限制性实例,根据本披露的方法制备的富含RBC的级分可以经处理以提供一种裂解物,其中一种或多种蛋白质的水平得以测定。例如,该裂解物可以产自选自以下的一种或多种其他血液分室:全血、血浆、血清、血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞的混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,以及诸如此类中的一种或多种);及其组合。

[0169] 附加地或替代性地,非RBC或含有最小量的RBC(如小于:10%、5%、4%、3%、2%、1%或0.5%的RBC)的血液的其他细胞组分可以经处理以提供一种裂解物,其中一种或多种蛋白质的水平得以测定。

[0170] 用于本披露的方法的细胞裂解物可以使用合适的手段产生,包含,例如液体均质化、机械破碎、冷冻/融化循环、高频声波、手动研磨、化学透化、酶促透化、使用链球菌溶血素的透化,以及诸如此类。

[0171] 在一些实施方式中,细胞裂解物通过一、二、三、四、五或超过五个冷冻/融化循环来制备。这项技术提供的潜在益处是,提供了在冰点稳定血液样本或其(一种或多种)组分的手段,并且在裂解和分析蛋白质含量之前允许储存。通常,速冻可以在等于或低于如下的温度下进行:-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃的、-75℃、-80℃、-90℃、-100℃、-120℃、-140℃、-160℃、-180℃、-190℃、-195℃或-196℃。在又一个实施方式中,速冻在低于如下的温度下进行:-5℃、-10℃、-20℃、-30℃、-40℃、-50℃、-60℃、-70℃、-75℃、-80℃、-90℃、-100℃、-120℃、-104℃、-160℃、-180℃、-190℃、-200℃。在仍然另一个实施方式中,速冻在低于如下的温度下进行:-190℃、-191℃、-192℃、-193℃、-194℃、-195℃、-196℃、-197℃、-198℃或-199℃。可将全血液样本、富含RBC的样本或级分和/或另一种不同的细胞组分速冻以稳定细胞。这可以减少或防止,例如蛋白质与RBC和/或加工期间存在的其他细胞类型的隔离和/或从中的释放。

[0172] 细胞洗液和上清液的分析

[0173] 在一些实施方式中,本披露的方法包括由细胞洗液和/或细胞上清液生成蛋白质图谱。

[0174] 该细胞洗液和/或细胞上清液可以由血液样本或包括RBC的血液样本组分产生。在一些实施方式中,RBC的数目构成该血液样本或该血液样本组分中存在的血细胞总数的超过:0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%。

[0175] 在一些实施方式中,该细胞洗液可以通过清洗富含RBC的细胞和/或通过单独清洗选自以下的一种或多种细胞血液分室而产生:全血、血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞的混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、以及诸如此类中的一种或多

种);及其组合。

[0176] 在一些实施方式中,该细胞上清液可以通过孵育或培养富含RBC的细胞和/或通过单独孵育或培养选自以下的一种或多种细胞血液分室而产生:血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、以及诸如此类中的一种或多种);及其组合。然后可以将细胞上清液从细胞中分离出来并分析孵育或培养的细胞(从细胞内和/或从细胞表面)所释放的蛋白质。任选地,该上清液除去后残余的细胞可以经清洗并被用以生成蛋白质图谱。该细胞洗液可以与该细胞上清液合并以生成该蛋白质图谱;或者替代性地,单个蛋白质图谱可以单独地生成自该细胞洗液和该细胞上清液。在需要的时候,这将允许这两个单个图谱的比较。

[0177] 一系列细胞上清液可以通过如上培养细胞一段时间并在不同时间点采集一系列上清液来产生。每种上清液可以经蛋白质含量分析以提供多个时间点的蛋白质图谱分析。任选地,孵育或培养条件(例如培养基的含量,温度等)可能因上清液采样时间点的不同而不同。任选地,在一个或多个时间点上该上清液除去后残余的细胞可以经清洗并被用以生成蛋白质图谱。该细胞洗液可以与给定时间点(例如相同时间点)的该细胞上清液合并以生成该蛋白质图谱。替代性地,单个蛋白质图谱可以生成自单个细胞洗液和单个细胞上清液。替代性地,来自多个时间点的细胞洗液可以经汇集和分析以生成该蛋白质图谱。同样,来自多个时间点的细胞上清液可以经汇集和分析以生成该蛋白质图谱。

[0178] 用于孵育或培养该富含RBC的细胞和/或单独地孵育或培养其他(一种或多种)细胞血液分室的合适的示例性方案和/或培养基为本领域普通技术人员已知(参见,例如Koller、Palsson、Masters,(编辑)“Human Cell Culture:Vol IV.Primary Hematopoietic cells”,2006,Springer Science and Business Media;Mirty和Hughes(编辑)2001,“Human Cell Culture Protocols,第三版”,2011,Humana Press)。本说明书的实施例中也提出了方法学。

[0179] 细胞清洗可以使用合适的培养基进行,例如(作为举例),磷酸盐缓冲盐水(PBS)、等渗盐溶液、生长培养基、培养基或其组合。

[0180] 在本披露的方法中用作细胞洗液、细胞培养基或细胞孵育介质的合适介质的非限制性实例包含等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)、厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)、罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基(EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基(DMEM)、以及伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基(IMDM);或其组合。在一些实施方式中,该培养基是PBS或HBSS以保持该RBC处于非生长或增殖状态。在其他的实施方式中,该培养基是RPMI以刺激该RBC的生长或增殖。

[0181] 阳离子盐的使用

[0182] 在一些实施方式中,本披露的方法包括使富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触,该阳离子盐接触增加和/或增强该样本中一种或多种蛋白质的可检测水平。正如本领域普通技术人员所确定的,该阳离子盐可以是适用于该方法的一种或多种阳离子盐。在一个实施方式中,该阳离子盐是单价或多价(例如二价、三价)金属离子盐。在其他的实施方式

中,该阳离子盐是铵盐。

[0183] 适用于该方法的单价金属阳离子盐可以包含,例如钠盐、钾盐、锂盐,以及诸如此类;或其组合。合适的钠盐可以包含,例如氯化钠、柠檬酸钠、硫酸钠、乳酸钠、乙酸钠、碳酸氢钠、碳酸钠、硬脂酸钠、抗坏血酸钠、苯甲酸钠、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠、亚硫酸氢钠、硼酸钠、葡萄糖酸钠、偏硅酸钠、丙酸钠以及诸如此类;或其组合。合适的钾盐可以包含,例如氯化钾、柠檬酸钾、溴化钾、碘化钾、碳酸氢钾、亚硝酸钾、过硫酸钾、亚硫酸钾、硫酸钾、亚硫酸氢钾、磷酸钾、乙酸钾、柠檬酸钾、谷氨酸钾、鸟苷酸二钾、葡萄糖酸钾、苹果酸钾、抗坏血酸钾、山梨酸钾、琥珀酸钾、酒石酸钾;及其组合。

[0184] 合适的锂盐包含,例如氯化锂、溴化锂、碳酸锂、硝酸锂、硫酸锂、乙酸锂、乳酸锂、柠檬酸锂、天冬氨酸锂、葡萄糖酸锂、苹果酸锂、抗坏血酸锂、乳清酸锂、琥珀酸锂;或其组合。

[0185] 适用于本方法的二价金属阳离子盐可以包含,例如钙盐、钾盐、铍盐、锶盐、钡盐、镭盐、铁(亚铁)盐以及诸如此类;或其组合。合适的钙盐包含,例如氯化钙、硫酸钙、乳酸钙、柠檬酸钙、碳酸钙、乙酸钙、磷酸钙、海藻酸钙、硬脂酸钙、山梨酸钙、葡萄糖酸钙以及诸如此类;或其组合。合适的镁盐可以包含,例如氟化镁、氯化镁、溴化镁、碘化镁、乳酸镁、磷酸镁、硫酸镁、亚硫酸镁、碳酸镁、氧化镁、硝酸镁、硼酸镁、乙酸镁、柠檬酸镁、葡萄糖酸镁、马来酸镁、琥珀酸镁、苹果酸镁、牛磺酸镁、乳清酸镁、甘氨酸镁、环烷酸镁、乙酰丙酮镁、甲酸镁、氢氧化镁、硬脂酸镁、六氟硅酸镁、水杨酸镁;或其组合。合适的铍盐可以包含,例如磷酸铍、乙酸铍、酒石酸铍、柠檬酸铍、葡萄糖酸铍、马来酸铍、琥珀酸铍、苹果酸铍、 α -溴樟脑磺酸铍、乙酰丙酮铍、甲酸铍;或其组合。合适的锶盐可以包含,例如氯化锶、磷酸锶、硫酸锶、碳酸锶、氧化锶、硝酸锶、乙酸锶、酒石酸锶、柠檬酸锶、葡萄糖酸锶、马来酸锶、琥珀酸锶、苹果酸锶、L-和/或D-型天冬氨酸锶、富马酸锶、L-和/或D-型谷氨酸锶、戊二酸锶、乳酸锶、L-苏糖酸锶、丙二酸锶、雷尼酸锶(有机金属螯合物)、抗坏血酸锶、丁酸锶、氯膦酸锶、伊班膦酸锶、水杨酸锶、乙酰水杨酸锶;或其组合。合适的钡盐可以包含,例如氢氧化钡、氟化钡、氯化钡、溴化钡、碘化钡、硫酸钡、硫化钡(S)、碳酸钡、过氧化钡、氧化钡、硝酸钡、乙酸钡、酒石酸钡、柠檬酸钡、葡萄糖酸钡、马来酸钡、琥珀酸钡、苹果酸钡、谷氨酸钡、草酸钡、丙二酸钡、环烷酸钡、乙酰丙酮钡、甲酸钡、苯甲酸钡、对叔丁基苯甲酸钡、己二酸钡、庚二酸钡、辛二酸钡、壬二酸钡、癸二酸钡、邻苯二甲酸钡、间苯二甲酸钡、对苯二甲酸钡、邻氨基苯甲酸钡、扁桃酸钡、水杨酸钡、钛酸钡;或其组合。合适的镭盐可以包含,例如氟化镭、氯化镭、溴化镭、碘化镭、氧化镭、氮化镭;或其组合。合适的镭盐包含了,例如氟化镭、氯化镭、溴化镭、碘化镭、氧化镭、氮化镭,以及诸如此类。合适的铁(亚铁)盐可以包含,例如硫酸亚铁、亚铁氧化物、乙酸亚铁、柠檬酸亚铁、柠檬酸亚铁铵、葡萄糖酸亚铁、草酸亚铁、富马酸亚铁、马来酸亚铁、苹果酸亚铁、乳酸亚铁、抗坏血酸亚铁、赤藓糖酸亚铁、甘油酸亚铁、丙酮酸亚铁,以及诸如此类;或其组合。

[0186] 在某些实施方式中,该阳离子盐是可以防止和/或最小化该富含红细胞的样本(如氯化物或碳酸盐)中的pH变化的阳离子盐。因此,在某些实施方式中,该阳离子盐是碳酸盐。在进一步的实施方式中,该阳离子盐还可以防止或最小化对细胞膜(如RBC膜)的损害。在某些实施方式中,该阳离子盐是氯盐。在其他的实施方式中,该阳离子盐是氯化钙、氯化钾、氯化锶、氯化钡、氯化镭或其组合。在仍然其他的实施方式中,该阳离子盐是氯化钠、氯化、

氯化铷、氯化铯、氯化锂或其组合。在又一个实施方式中,该阳离子盐是氯化锂。在另一个实施方式中,该阳离子盐可以是氯化钠。在某些实施方式中,该阳离子盐可以是碳酸钙、碳酸钾、碳酸铈、碳酸钡或碳酸镭。在仍然其他的实施方式中,该阳离子盐是碳酸钠、碳酸钾、碳酸铷、碳酸铯、碳酸锂或其组合。在仍然其他的实施方式中,该阳离子盐是碳酸锂。在其他的实施方式中,该阳离子盐是碳酸钠。

[0187] 单价或二价金属阳离子盐以外的盐可以用于该方法中,包含,例如三价或其他多价盐,如铝、硅、钪、钛、钒、铬、钴、镍、铜、锰、锌、锡、银以及诸如此类;或其组合。

[0188] 铵盐也可以用于该方法中,其中合适的铵盐包含碳酸铵、氯化铵、硝酸铵、乙酸铵、生物酸铵、溴化铵、氨基甲酸铵、硫酸铈铵(IV)、铬酸铵、重铬酸铵、磷酸二氢铵、氟化铵、甲酸铵、磷酸铵、磷酸氢二钠铵四水合物、硫代硫酸铵、锆铵,以及诸如此类;或其组合。

[0189] 在某些实施方式中,该阳离子盐是氯化铵。在其他的实施方式中,该阳离子盐是碳酸铵。

[0190] 在某些实施方式中,使该富含红细胞的样本与前述阳离子盐的一种或多种组合接触以增加和/或增强该样本中一种或多种蛋白质的可检测水平。在一些实施方式中,使该富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触。在其他的实施方式中,使该富含红细胞的样本与至少两种阳离子盐接触。在仍然其他的实施方式中,使该富含红细胞的样本与至少三种阳离子盐接触。

[0191] 在某些实施方式中,使该血液样本与前述阳离子盐的一种或多种组合接触,以在该血液样本富含该红细胞之前,增加和/或增强该样本中一种或多种蛋白质水平的可检测水平。在一些实施方式中,使该血液样本与至少一种阳离子盐接触。在其他的实施方式中,使该血液样本与至少两种阳离子盐接触。在仍然其他的实施方式中,使该血液样本与至少三种阳离子盐接触。

[0192] 本文提到的盐(例如含钠的盐)包括盐的无水形式和水合形式。

[0193] 在某些实施方式中,使全血液样本与至少一种前述阳离子盐接触以产生蛋白质图谱。该全血液样本可以使用本领域普通技术人员已知的方法,从静脉血、毛细血管血、动脉血或其组合中获取。

[0194] 在其他的实施方式中,使选自如下的一种或多种附加血液分室接触至少一种前述阳离子盐以产生蛋白质图谱:血浆、血清、血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞的混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,以及诸如此类中的一种或多种);及其组合。用于分析的该(一种或多种)附加血液分室可以使用已知技术(如流式细胞术、磁珠分离、离心,以及诸如此类)来制备。

[0195] 蛋白质图谱分析

[0196] 本披露提供了用于由包括RBC(例如富含RBC的级分或全血液样本)的血液样本产生蛋白质图谱的方法。这样的图谱的产生可以提供对重要生物过程的洞察,包括但不限于炎症、免疫应答;和/或细胞修复或疾病状态。

[0197] 虽然对于可以通过本披露的方法,在生成蛋白质图谱中检测到的蛋白质的类型,没有给予特别的限制,但非限制性实例包含信号传导分子,例如趋化因子、细胞因子、生长

因子、受体、细胞内信号递质、激素、核转录因子、神经递质,以及细胞外基质组分,以及酶。例如,生长因子可以包含刺激,例如以下物质的生长、增殖、愈合或分化的那些生长因子:皮肤细胞(如表皮生长因子(EGF)、角化细胞生长因子(KGF)、迁移刺激因子(MSF))、神经细胞/神经系统(如神经调节蛋白(如神经调节蛋白1-4)和神经营养蛋白(如神经生长因子(NGF)、脑源性神经营养因子(BDNF)、神经营养因子-3(NT-3)、神经营养因子-4(NT-4)))、结缔组织和间充质细胞(如成纤维细胞生长因子(FGF))、血管细胞(如血小板衍生生长因子(PDGF)、胎盘生长因子(PGF)、血管内皮生长因子(VEGF))、血细胞(如促红细胞生成素、粒细胞集落刺激因子(G-CSF)、粒细胞巨噬细胞集落-刺激因子(GM-CSF));以及细胞增殖(如胰岛素样生长因子(IGF-1)、胰岛素样生长因子-2(IGF-2))连同多效生长因子(如转化生长因子- β (TGF- β)、转化生长因子- α (TGF- α)、肿瘤坏死因子(TNF))。

[0198] 受体可以包含细胞内受体(如核受体(如转录因子)、细胞质受体(如类固醇)和内质再生物受体(如IP3))或细胞表面受体(如离子通道连接受体、G-蛋白质连接受体、酶联受体、Toll门控和配体门控受体、整联蛋白)。激素可以包含脂质衍生的(如前列腺素类、白细胞三烯、前列腺环素、凝血噁烷);氨基酸衍生的(如肾上腺素、褪黑激素、甲状腺素);肽(如胰淀素、脂联素、血管紧张素原、降钙素、脑利钠肽(BNP)、促红细胞生成素、卵泡刺激素(FSH)、饥饿激素、胰高血糖素样肽-1(GLP-1)、人绒毛膜促性腺激素(hCG)、胰岛素、胰岛素样生长因子(IGF),以及诸如此类);以及类固醇(如雄激素、雌激素、糖皮质激素、孕激素、开环甾类化合物,以及诸如此类)。细胞内信号递质或转导体可以包含蛋白质和蛋白激酶家族(例如Ras和Src家族),以及Wnt信号传导家族蛋白质。神经递质可以包含氨基酸、肽(例如 β -内啡肽、阿片样物质)、单胺、痕量胺、嘌呤和气体递质。核转录因子可以包含DNA转录调节剂(如fos、myc、N-myc),以及mRNA转录调节剂,以及细胞分裂抑制剂(如p53、pRb)。酶可以包含氧化还原酶(例如醇、醛、氨基酸、硫、二酚、过氧化物,以及诸如此类)NADH、NADPH、核酸酶、蛋白酶、激酶、转移酶、水解酶、裂解酶、异构酶,以及连接酶。趋化因子和细胞因子有很多,可以包含,例如下文表1和表2中列出的那些。

[0199] 在某些实施方式中,该方法包括产生包括下文表1和表2中列出的单个蛋白质或蛋白质组合的或者由其组成的蛋白质图谱。该图谱可以生成自包括RBC的血液样本(如富含红细胞的样本、富含RBC的级分或全血液样本)。附加的(一种或多种)图谱可以生成自其他细胞分室,包括但不限于血浆、血清、血小板、白细胞、富含血小板的级分、富含白细胞的级分、富含血小板的血浆、富含白细胞的血浆、血小板和白细胞的混合物、具体的(一种或多种)白细胞(如T淋巴细胞(如CD4+T淋巴细胞、CD8+T淋巴细胞)、B淋巴细胞、NK细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞,以及诸如此类中的一种或多种);及其组合。

[0200] 表1:可以包含在由本披露的方法生成的蛋白质图谱中的单个蛋白质的非限制性实例。该蛋白质图谱可以包括列出的一种或多种蛋白质或由其组成。

[0201]

单一蛋白质 (首字母缩写)	单一蛋白质 (全名)
碱性 FGF	碱性成纤维细胞生长因子
CTACK (CCL27)	皮肤 T 细胞吸引趋化因子
Eotaxin 1	CCL11 #1
G-CSF (GCSF)	粒细胞集落刺激因子
GM-CSF (CSF2)	粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子
HGF	肝细胞生长因子
IFN- α 2	干扰素 α 亚型 α 2
IFN- γ	干扰素 γ
IL-10	白细胞介素 10
IL-12 (IL-12p70)	白细胞介素 12 p35 和 p40 异质二聚体
IL-13	白细胞介素 13
IL-12p40	白细胞介素 12 p40 亚基
IL-15	白细胞介素 15
IL-16	白细胞介素 16
IL-17A	白细胞介素 17A
IL-18	白细胞介素 18
IL-1 α	白细胞介素 1 α
IL-1 β	白细胞介素 1 β
IL-2	白细胞介素 2
IL-2ra	白细胞介素 2 受体 α 链
IL-3	白细胞介素 3
IL-5	白细胞介素 5
IL-6	白细胞介素 6
IL-7	白细胞介素 7
IL-9	白细胞介素 9
IP-10 (CXCL10)	干扰素 γ 诱导蛋白 10

[0202]

LIF	白血病抑制因子
M-CSF (CSF1)	巨噬细胞集落刺激因子
MIG (CXCL9)	由 IFN γ 诱导的单核因子, 趋化因子 (C-X-C 基序) 配体 9
MIP-1 α (CCL3)	巨噬细胞炎性蛋白-1 α
MIP-1 β (CCL4)	巨噬细胞炎性蛋白-1 β
PDGF-BB	血小板衍生生长因子 B 链同二聚体
SDF-1 α (CXCL12)	基质细胞衍生因子 1
TNF- α (恶质素)	肿瘤坏死因子 α
TNF- β (淋巴毒素)	肿瘤坏死因子- β
TRAIL	TNF 相关凋亡诱导配体
VEGF	血管内皮生长因子
IL-8	白细胞介素 8
MCP-1 (CCL2)	单核细胞趋化蛋白-1
MGSA	基因组稳定性维持蛋白 A
PGE-2	前列腺素 E2
RANTES (CCL5)	活化后调节, 正常 T 细胞表达和分泌
MIF (MMIF)	巨噬细胞移动抑制因子
GRO- α (CXCL1)	生长调节的癌基因 α
CRP	C-反应蛋白
DDT (MIF-2)	D-多巴色素互变异构酶
IGF-1	胰岛素样生长因子 1

[0203] 表2:可以包含在由本披露的方法生成的蛋白质图谱中的蛋白质对的非限制性实例。该蛋白质图谱可以包括列出的一种或多种蛋白质或由其组成。

[0204]

蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
碱性 FGF	CTACK	CTACK	Eotaxin 1	Eotaxin 1	G-CSF	G-CSF	GM-CSF
碱性 FGF	Eotaxin 1	CTACK	G-CSF	Eotaxin 1	GM-CSF	G-CSF	HGF
碱性 FGF	G-CSF	CTACK	GM-CSF	Eotaxin 1	HGF	G-CSF	IFN- α 2
碱性 FGF	GM-CSF	CTACK	HGF	Eotaxin 1	IFN- α 2	G-CSF	IFN- γ
碱性 FGF	HGF	CTACK	IFN- α 2	Eotaxin 1	IFN- γ	G-CSF	IL-10
碱性 FGF	IFN- α 2	CTACK	IFN- γ	Eotaxin 1	IL-10	G-CSF	IL-12
碱性 FGF	IFN- γ	CTACK	IL-10	Eotaxin 1	IL-12	G-CSF	IL-13
碱性 FGF	IL-10	CTACK	IL-12	Eotaxin 1	IL-13	G-CSF	IL-12p40
碱性 FGF	IL-12	CTACK	IL-13	Eotaxin 1	IL-12p40	G-CSF	IL-15
碱性 FGF	IL-13	CTACK	IL-12p40	Eotaxin 1	IL-15	G-CSF	IL-16
碱性 FGF	IL-12p40	CTACK	IL-15	Eotaxin 1	IL-16	G-CSF	IL-17A
碱性 FGF	IL-15	CTACK	IL-16	Eotaxin 1	IL-17A	G-CSF	IL-18

[0205]

碱性 FGF	IL-16	CTACK	IL-17A	Eotaxin 1	IL-18	G-CSF	IL-1 α
碱性 FGF	IL-17A	CTACK	IL-18	Eotaxin 1	IL-1 α	G-CSF	IL-1 β
碱性 FGF	IL-18	CTACK	IL-1 α	Eotaxin 1	IL-1 β	G-CSF	IL-2
碱性 FGF	IL-1 α	CTACK	IL-1 β	Eotaxin 1	IL-2	G-CSF	IL-2ra
碱性 FGF	IL-1 β	CTACK	IL-2	Eotaxin 1	IL-2ra	G-CSF	IL-3
碱性 FGF	IL-2	CTACK	IL-2ra	Eotaxin 1	IL-3	G-CSF	IL-5
碱性 FGF	IL-2ra	CTACK	IL-3	Eotaxin 1	IL-5	G-CSF	IL-6
碱性 FGF	IL-3	CTACK	IL-5	Eotaxin 1	IL-6	G-CSF	IL-7
碱性 FGF	IL-5	CTACK	IL-6	Eotaxin 1	IL-7	G-CSF	IL-9
碱性 FGF	IL-6	CTACK	IL-7	Eotaxin 1	IL-9	G-CSF	IP-10
碱性 FGF	IL-7	CTACK	IL-9	Eotaxin 1	IP-10	G-CSF	LIF
碱性 FGF	IL-9	CTACK	IP-10	Eotaxin 1	LIF	G-CSF	M-CSF
碱性 FGF	IP-10	CTACK	LIF	Eotaxin 1	M-CSF	G-CSF	MIG
碱性 FGF	LIF	CTACK	M-CSF	Eotaxin 1	MIG	G-CSF	MIP-1 α
碱性 FGF	M-CSF	CTACK	MIG	Eotaxin 1	MIP-1 α	G-CSF	MIP-1 β
碱性 FGF	MIG	CTACK	MIP-1 α	Eotaxin 1	MIP-1 β	G-CSF	PDGF-BB
碱性 FGF	MIP-1 α	CTACK	MIP-1 β	Eotaxin 1	PDGF-BB	G-CSF	SDF-1 α
碱性 FGF	MIP-1 β	CTACK	PDGF-BB	Eotaxin 1	SDF-1 α	G-CSF	TNF- α
碱性 FGF	PDGF-BB	CTACK	SDF-1 α	Eotaxin 1	TNF- α	G-CSF	TNF- β
碱性 FGF	SDF-1 α	CTACK	TNF- α	Eotaxin 1	TNF- β	G-CSF	TRAIL
碱性 FGF	TNF- α	CTACK	TNF- β	Eotaxin 1	TRAIL	G-CSF	VEGF
碱性 FGF	TNF- β	CTACK	TRAIL	Eotaxin 1	VEGF	G-CSF	IL-8
碱性 FGF	TRAIL	CTACK	VEGF	Eotaxin 1	IL-8	G-CSF	MCP-1
碱性 FGF	VEGF	CTACK	IL-8	Eotaxin 1	MCP-1	G-CSF	MGSA
碱性 FGF	IL-8	CTACK	MCP-1	Eotaxin 1	MGSA	G-CSF	PGE-2
碱性 FGF	MCP-1	CTACK	MGSA	Eotaxin 1	PGE-2	G-CSF	RANTES
碱性 FGF	MGSA	CTACK	PGE-2	Eotaxin 1	RANTES	G-CSF	MIF
碱性 FGF	PGE-2	CTACK	RANTES	Eotaxin 1	MIF	G-CSF	GRO- α
碱性 FGF	RANTES	CTACK	MIF	Eotaxin 1	GRO- α	G-CSF	CRP
碱性 FGF	MIF	CTACK	GRO- α	Eotaxin 1	CRP	G-CSF	DDT
碱性 FGF	GRO- α	CTACK	CRP	Eotaxin 1	DDT		
碱性 FGF	CRP	CTACK	DDT				
碱性 FGF	DDT						

[0206]

蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
GM-CSF	HGF	HGF	IFN- α 2	IFN- α 2	IFN- γ	IFN- γ	IL-10
GM-CSF	IFN- α 2	HGF	IFN- γ	IFN- α 2	IL-10	IFN- γ	IL-12
GM-CSF	IFN- γ	HGF	IL-10	IFN- α 2	IL-12	IFN- γ	IL-13
GM-CSF	IL-10	HGF	IL-12	IFN- α 2	IL-13	IFN- γ	IL-12p40
GM-CSF	IL-12	HGF	IL-13	IFN- α 2	IL-12p40	IFN- γ	IL-15
GM-CSF	IL-13	HGF	IL-12p40	IFN- α 2	IL-15	IFN- γ	IL-16
GM-CSF	IL-12p40	HGF	IL-15	IFN- α 2	IL-16	IFN- γ	IL-17A
GM-CSF	IL-15	HGF	IL-16	IFN- α 2	IL-17A	IFN- γ	IL-18
GM-CSF	IL-16	HGF	IL-17A	IFN- α 2	IL-18	IFN- γ	IL-1 α
GM-CSF	IL-17A	HGF	IL-18	IFN- α 2	IL-1 α	IFN- γ	IL-1 β
GM-CSF	IL-18	HGF	IL-1 α	IFN- α 2	IL-1 β	IFN- γ	IL-2
GM-CSF	IL-1 α	HGF	IL-1 β	IFN- α 2	IL-2	IFN- γ	IL-2ra
GM-CSF	IL-1 β	HGF	IL-2	IFN- α 2	IL-2ra	IFN- γ	IL-3
GM-CSF	IL-2	HGF	IL-2ra	IFN- α 2	IL-3	IFN- γ	IL-5
GM-CSF	IL-2ra	HGF	IL-3	IFN- α 2	IL-5	IFN- γ	IL-6
GM-CSF	IL-3	HGF	IL-5	IFN- α 2	IL-6	IFN- γ	IL-7
GM-CSF	IL-5	HGF	IL-6	IFN- α 2	IL-7	IFN- γ	IL-9
GM-CSF	IL-6	HGF	IL-7	IFN- α 2	IL-9	IFN- γ	IP-10
GM-CSF	IL-7	HGF	IL-9	IFN- α 2	IP-10	IFN- γ	LIF
GM-CSF	IL-9	HGF	IP-10	IFN- α 2	LIF	IFN- γ	M-CSF
GM-CSF	IP-10	HGF	LIF	IFN- α 2	M-CSF	IFN- γ	MIG
GM-CSF	LIF	HGF	M-CSF	IFN- α 2	MIG	IFN- γ	MIP-1 α
GM-CSF	M-CSF	HGF	MIG	IFN- α 2	MIP-1 α	IFN- γ	MIP-1 β
GM-CSF	MIG	HGF	MIP-1 α	IFN- α 2	MIP-1 β	IFN- γ	PDGF-BB
GM-CSF	MIP-1 α	HGF	MIP-1 β	IFN- α 2	PDGF-BB	IFN- γ	SDF-1 α
GM-CSF	MIP-1 β	HGF	PDGF-BB	IFN- α 2	SDF-1 α	IFN- γ	TNF- α
GM-CSF	PDGF-BB	HGF	SDF-1 α	IFN- α 2	TNF- α	IFN- γ	TNF- β
GM-CSF	SDF-1 α	HGF	TNF- α	IFN- α 2	TNF- β	IFN- γ	TRAIL
GM-CSF	TNF- α	HGF	TNF- β	IFN- α 2	TRAIL	IFN- γ	VEGF
GM-CSF	TNF- β	HGF	TRAIL	IFN- α 2	VEGF	IFN- γ	IL-8
GM-CSF	TRAIL	HGF	VEGF	IFN- α 2	IL-8	IFN- γ	MCP-1
GM-CSF	VEGF	HGF	IL-8	IFN- α 2	MCP-1	IFN- γ	MGSA
GM-CSF	IL-8	HGF	MCP-1	IFN- α 2	MGSA	IFN- γ	PGE-2
GM-CSF	MCP-1	HGF	MGSA	IFN- α 2	PGE-2	IFN- γ	RANTES
GM-CSF	MGSA	HGF	PGE-2	IFN- α 2	RANTES	IFN- γ	MIF
GM-CSF	PGE-2	HGF	RANTES	IFN- α 2	MIF	IFN- γ	GRO- α
GM-CSF	RANTES	HGF	MIF	IFN- α 2	GRO- α	IFN- γ	CRP
GM-CSF	MIF	HGF	GRO- α	IFN- α 2	CRP	IFN- γ	DDT
GM-CSF	GRO- α	HGF	CRP	IFN- α 2	DDT		
GM-CSF	CRP	HGF	DDT				
GM-CSF	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
IL-10	IL-12	IL-12	IL-13	IL-13	IL-12p40	IL-12p40	IL-15

[0207]

IL-10	IL-13	IL-12	IL-12p40	IL-13	IL-15	IL-12p40	IL-16
IL-10	IL-12p40	IL-12	IL-15	IL-13	IL-16	IL-12p40	IL-17A
IL-10	IL-15	IL-12	IL-16	IL-13	IL-17A	IL-12p40	IL-18
IL-10	IL-16	IL-12	IL-17A	IL-13	IL-18	IL-12p40	IL-1 α
IL-10	IL-17A	IL-12	IL-18	IL-13	IL-1 α	IL-12p40	IL-1 β
IL-10	IL-18	IL-12	IL-1 α	IL-13	IL-1 β	IL-12p40	IL-2
IL-10	IL-1 α	IL-12	IL-1 β	IL-13	IL-2	IL-12p40	IL-2ra
IL-10	IL-1 β	IL-12	IL-2	IL-13	IL-2ra	IL-12p40	IL-3
IL-10	IL-2	IL-12	IL-2ra	IL-13	IL-3	IL-12p40	IL-5
IL-10	IL-2ra	IL-12	IL-3	IL-13	IL-5	IL-12p40	IL-6
IL-10	IL-3	IL-12	IL-5	IL-13	IL-6	IL-12p40	IL-7
IL-10	IL-5	IL-12	IL-6	IL-13	IL-7	IL-12p40	IL-9
IL-10	IL-6	IL-12	IL-7	IL-13	IL-9	IL-12p40	IP-10
IL-10	IL-7	IL-12	IL-9	IL-13	IP-10	IL-12p40	LIF
IL-10	IL-9	IL-12	IP-10	IL-13	LIF	IL-12p40	M-CSF
IL-10	IP-10	IL-12	LIF	IL-13	M-CSF	IL-12p40	MIG
IL-10	LIF	IL-12	M-CSF	IL-13	MIG	IL-12p40	MIP-1 α
IL-10	M-CSF	IL-12	MIG	IL-13	MIP-1 α	IL-12p40	MIP-1 β
IL-10	MIG	IL-12	MIP-1 α	IL-13	MIP-1 β	IL-12p40	PDGF-BB
IL-10	MIP-1 α	IL-12	MIP-1 β	IL-13	PDGF-BB	IL-12p40	SDF-1 α
IL-10	MIP-1 β	IL-12	PDGF-BB	IL-13	SDF-1 α	IL-12p40	TNF- α
IL-10	PDGF-BB	IL-12	SDF-1 α	IL-13	TNF- α	IL-12p40	TNF- β
IL-10	SDF-1 α	IL-12	TNF- α	IL-13	TNF- β	IL-12p40	TRAIL
IL-10	TNF- α	IL-12	TNF- β	IL-13	TRAIL	IL-12p40	VEGF
IL-10	TNF- β	IL-12	TRAIL	IL-13	VEGF	IL-12p40	IL-8
IL-10	TRAIL	IL-12	VEGF	IL-13	IL-8	IL-12p40	MCP-1
IL-10	VEGF	IL-12	IL-8	IL-13	MCP-1	IL-12p40	MGSA
IL-10	IL-8	IL-12	MCP-1	IL-13	MGSA	IL-12p40	PGE-2
IL-10	MCP-1	IL-12	MGSA	IL-13	PGE-2	IL-12p40	RANTES
IL-10	MGSA	IL-12	PGE-2	IL-13	RANTES	IL-12p40	MIF
IL-10	PGE-2	IL-12	RANTES	IL-13	MIF	IL-12p40	GRO- α
IL-10	RANTES	IL-12	MIF	IL-13	GRO- α	IL-12p40	CRP
IL-10	MIF	IL-12	GRO- α	IL-13	CRP	IL-12p40	DDT
IL-10	GRO- α	IL-12	CRP	IL-13	DDT		
IL-10	CRP	IL-12	DDT				
IL-10	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
IL-15	IL-16	IL-16	IL-17A	IL-17A	IL-18	IL-18	IL-1 α
IL-15	IL-17A	IL-16	IL-18	IL-17A	IL-1 α	IL-18	IL-1 β
IL-15	IL-18	IL-16	IL-1 α	IL-17A	IL-1 β	IL-18	IL-2
IL-15	IL-1 α	IL-16	IL-1 β	IL-17A	IL-2	IL-18	IL-2ra
IL-15	IL-1 β	IL-16	IL-2	IL-17A	IL-2ra	IL-18	IL-3
IL-15	IL-2	IL-16	IL-2ra	IL-17A	IL-3	IL-18	IL-5
IL-15	IL-2ra	IL-16	IL-3	IL-17A	IL-5	IL-18	IL-6
IL-15	IL-3	IL-16	IL-5	IL-17A	IL-6	IL-18	IL-7
IL-15	IL-5	IL-16	IL-6	IL-17A	IL-7	IL-18	IL-9
IL-15	IL-6	IL-16	IL-7	IL-17A	IL-9	IL-18	IP-10
IL-15	IL-7	IL-16	IL-9	IL-17A	IP-10	IL-18	LIF
IL-15	IL-9	IL-16	IP-10	IL-17A	LIF	IL-18	M-CSF
IL-15	IP-10	IL-16	LIF	IL-17A	M-CSF	IL-18	MIG
IL-15	LIF	IL-16	M-CSF	IL-17A	MIG	IL-18	MIP-1 α
IL-15	M-CSF	IL-16	MIG	IL-17A	MIP-1 α	IL-18	MIP-1 β
IL-15	MIG	IL-16	MIP-1 α	IL-17A	MIP-1 β	IL-18	PDGF-BB
IL-15	MIP-1 α	IL-16	MIP-1 β	IL-17A	PDGF-BB	IL-18	SDF-1 α
IL-15	MIP-1 β	IL-16	PDGF-BB	IL-17A	SDF-1 α	IL-18	TNF- α
IL-15	PDGF-BB	IL-16	SDF-1 α	IL-17A	TNF- α	IL-18	TNF- β
IL-15	SDF-1 α	IL-16	TNF- α	IL-17A	TNF- β	IL-18	TRAIL
IL-15	TNF- α	IL-16	TNF- β	IL-17A	TRAIL	IL-18	VEGF

[0208]

IL-15	TNF- β	IL-16	TRAIL	IL-17A	VEGF	IL-18	IL-8
IL-15	TRAIL	IL-16	VEGF	IL-17A	IL-8	IL-18	MCP-1
IL-15	VEGF	IL-16	IL-8	IL-17A	MCP-1	IL-18	MGSA
IL-15	IL-8	IL-16	MCP-1	IL-17A	MGSA	IL-18	PGE-2
IL-15	MCP-1	IL-16	MGSA	IL-17A	PGE-2	IL-18	RANTES
IL-15	MGSA	IL-16	PGE-2	IL-17A	RANTES	IL-18	MIF
IL-15	PGE-2	IL-16	RANTES	IL-17A	MIF	IL-18	GRO- α
IL-15	RANTES	IL-16	MIF	IL-17A	GRO- α	IL-18	CRP
IL-15	MIF	IL-16	GRO- α	IL-17A	CRP	IL-18	DDT
IL-15	GRO- α	IL-16	CRP	IL-17A	DDT		
IL-15	CRP	IL-16	DDT				
IL-15	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
IL-1 α	IL-1 β	IL-1 β	IL-2	IL-2	IL-2ra	IL-2ra	IL-3
IL-1 α	IL-2	IL-1 β	IL-2ra	IL-2	IL-3	IL-2ra	IL-5
IL-1 α	IL-2ra	IL-1 β	IL-3	IL-2	IL-5	IL-2ra	IL-6
IL-1 α	IL-3	IL-1 β	IL-5	IL-2	IL-6	IL-2ra	IL-7
IL-1 α	IL-5	IL-1 β	IL-6	IL-2	IL-7	IL-2ra	IL-9
IL-1 α	IL-6	IL-1 β	IL-7	IL-2	IL-9	IL-2ra	IP-10
IL-1 α	IL-7	IL-1 β	IL-9	IL-2	IP-10	IL-2ra	LIF
IL-1 α	IL-9	IL-1 β	IP-10	IL-2	LIF	IL-2ra	M-CSF
IL-1 α	IP-10	IL-1 β	LIF	IL-2	M-CSF	IL-2ra	MIG
IL-1 α	LIF	IL-1 β	M-CSF	IL-2	MIG	IL-2ra	MIP-1 α
IL-1 α	M-CSF	IL-1 β	MIG	IL-2	MIP-1 α	IL-2ra	MIP-1 β
IL-1 α	MIG	IL-1 β	MIP-1 α	IL-2	MIP-1 β	IL-2ra	PDGF-BB
IL-1 α	MIP-1 α	IL-1 β	MIP-1 β	IL-2	PDGF-BB	IL-2ra	SDF-1 α
IL-1 α	MIP-1 β	IL-1 β	PDGF-BB	IL-2	SDF-1 α	IL-2ra	TNF- α
IL-1 α	PDGF-BB	IL-1 β	SDF-1 α	IL-2	TNF- α	IL-2ra	TNF- β
IL-1 α	SDF-1 α	IL-1 β	TNF- α	IL-2	TNF- β	IL-2ra	TRAIL
IL-1 α	TNF- α	IL-1 β	TNF- β	IL-2	TRAIL	IL-2ra	VEGF
IL-1 α	TNF- β	IL-1 β	TRAIL	IL-2	VEGF	IL-2ra	IL-8
IL-1 α	TRAIL	IL-1 β	VEGF	IL-2	IL-8	IL-2ra	MCP-1
IL-1 α	VEGF	IL-1 β	IL-8	IL-2	MCP-1	IL-2ra	MGSA
IL-1 α	IL-8	IL-1 β	MCP-1	IL-2	MGSA	IL-2ra	PGE-2
IL-1 α	MCP-1	IL-1 β	MGSA	IL-2	PGE-2	IL-2ra	RANTES
IL-1 α	MGSA	IL-1 β	PGE-2	IL-2	RANTES	IL-2ra	MIF
IL-1 α	PGE-2	IL-1 β	RANTES	IL-2	MIF	IL-2ra	GRO- α
IL-1 α	RANTES	IL-1 β	MIF	IL-2	GRO- α	IL-2ra	CRP
IL-1 α	MIF	IL-1 β	GRO- α	IL-2	CRP	IL-2ra	DDT
IL-1 α	GRO- α	IL-1 β	CRP	IL-2	DDT		
IL-1 α	CRP	IL-1 β	DDT				
IL-1 α	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
IL-3	IL-5	IL-5	IL-6	IL-6	IL-7	IL-7	IL-9
IL-3	IL-6	IL-5	IL-7	IL-6	IL-9	IL-7	IP-10
IL-3	IL-7	IL-5	IL-9	IL-6	IP-10	IL-7	LIF
IL-3	IL-9	IL-5	IP-10	IL-6	LIF	IL-7	M-CSF
IL-3	IP-10	IL-5	LIF	IL-6	M-CSF	IL-7	MIG
IL-3	LIF	IL-5	M-CSF	IL-6	MIG	IL-7	MIP-1 α
IL-3	M-CSF	IL-5	MIG	IL-6	MIP-1 α	IL-7	MIP-1 β
IL-3	MIG	IL-5	MIP-1 α	IL-6	MIP-1 β	IL-7	PDGF-BB
IL-3	MIP-1 α	IL-5	MIP-1 β	IL-6	PDGF-BB	IL-7	SDF-1 α
IL-3	MIP-1 β	IL-5	PDGF-BB	IL-6	SDF-1 α	IL-7	TNF- α
IL-3	PDGF-BB	IL-5	SDF-1 α	IL-6	TNF- α	IL-7	TNF- β
IL-3	SDF-1 α	IL-5	TNF- α	IL-6	TNF- β	IL-7	TRAIL
IL-3	TNF- α	IL-5	TNF- β	IL-6	TRAIL	IL-7	VEGF
IL-3	TNF- β	IL-5	TRAIL	IL-6	VEGF	IL-7	IL-8
IL-3	TRAIL	IL-5	VEGF	IL-6	IL-8	IL-7	MCP-1

[0209]

IL-3	VEGF	IL-5	IL-8	IL-6	MCP-1	IL-7	MGSA
IL-3	IL-8	IL-5	MCP-1	IL-6	MGSA	IL-7	PGE-2
IL-3	MCP-1	IL-5	MGSA	IL-6	PGE-2	IL-7	RANTES
IL-3	MGSA	IL-5	PGE-2	IL-6	RANTES	IL-7	MIF
IL-3	PGE-2	IL-5	RANTES	IL-6	MIF	IL-7	GRO- α
IL-3	RANTES	IL-5	MIF	IL-6	GRO- α	IL-7	CRP
IL-3	MIF	IL-5	GRO- α	IL-6	CRP	IL-7	DDT
IL-3	GRO- α	IL-5	CRP	IL-6	DDT		
IL-3	CRP	IL-5	DDT				
IL-3	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
IL-9	IP-10	IP-10	LIF	LIF	M-CSF	M-CSF	MIG
IL-9	LIF	IP-10	M-CSF	LIF	MIG	M-CSF	MIP-1 α
IL-9	M-CSF	IP-10	MIG	LIF	MIP-1 α	M-CSF	MIP-1 β
IL-9	MIG	IP-10	MIP-1 α	LIF	MIP-1 β	M-CSF	PDGF-BB
IL-9	MIP-1 α	IP-10	MIP-1 β	LIF	PDGF-BB	M-CSF	SDF-1 α
IL-9	MIP-1 β	IP-10	PDGF-BB	LIF	SDF-1 α	M-CSF	TNF- α
IL-9	PDGF-BB	IP-10	SDF-1 α	LIF	TNF- α	M-CSF	TNF- β
IL-9	SDF-1 α	IP-10	TNF- α	LIF	TNF- β	M-CSF	TRAIL
IL-9	TNF- α	IP-10	TNF- β	LIF	TRAIL	M-CSF	VEGF
IL-9	TNF- β	IP-10	TRAIL	LIF	VEGF	M-CSF	IL-8
IL-9	TRAIL	IP-10	VEGF	LIF	IL-8	M-CSF	MCP-1
IL-9	VEGF	IP-10	IL-8	LIF	MCP-1	M-CSF	MGSA
IL-9	IL-8	IP-10	MCP-1	LIF	MGSA	M-CSF	PGE-2
IL-9	MCP-1	IP-10	MGSA	LIF	PGE-2	M-CSF	RANTES
IL-9	MGSA	IP-10	PGE-2	LIF	RANTES	M-CSF	MIF
IL-9	PGE-2	IP-10	RANTES	LIF	MIF	M-CSF	CRP
IL-9	RANTES	IP-10	MIF	LIF	GRO- α	M-CSF	DDT
IL-9	MIF	IP-10	GRO- α	LIF	CRP		
IL-9	GRO- α	IP-10	CRP	LIF	DDT		
IL-9	CRP	IP-10	DDT				
IL-9	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
MIG	MIP-1 α	MIP-1 α	MIP-1 β	MIP-1 β	PDGF-BB	PDGF-BB	SDF-1 α
MIG	MIP-1 β	MIP-1 α	PDGF-BB	MIP-1 β	SDF-1 α	PDGF-BB	TNF- α
MIG	PDGF-BB	MIP-1 α	SDF-1 α	MIP-1 β	TNF- α	PDGF-BB	TNF- β
MIG	SDF-1 α	MIP-1 α	TNF- α	MIP-1 β	TNF- β	PDGF-BB	TRAIL
MIG	TNF- α	MIP-1 α	TNF- β	MIP-1 β	TRAIL	PDGF-BB	VEGF
MIG	TNF- β	MIP-1 α	TRAIL	MIP-1 β	VEGF	PDGF-BB	IL-8
MIG	TRAIL	MIP-1 α	VEGF	MIP-1 β	IL-8	PDGF-BB	MCP-1
MIG	VEGF	MIP-1 α	IL-8	MIP-1 β	MCP-1	PDGF-BB	MGSA
MIG	IL-8	MIP-1 α	MCP-1	MIP-1 β	MGSA	PDGF-BB	PGE-2
MIG	MCP-1	MIP-1 α	MGSA	MIP-1 β	PGE-2	PDGF-BB	RANTES
MIG	MGSA	MIP-1 α	PGE-2	MIP-1 β	RANTES	PDGF-BB	MIF
MIG	PGE-2	MIP-1 α	RANTES	MIP-1 β	MIF	PDGF-BB	GRO- α
MIG	RANTES	MIP-1 α	MIF	MIP-1 β	GRO- α	PDGF-BB	CRP
MIG	MIF	MIP-1 α	GRO- α	MIP-1 β	CRP	PDGF-BB	DDT
MIG	GRO- α	MIP-1 α	CRP	MIP-1 β	DDT		
MIG	CRP	MIP-1 α	DDT				
MIG	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
SDF-1 α	TNF- α	TNF- α	TNF- β	TNF- β	TRAIL	TRAIL	VEGF
SDF-1 α	TNF- β	TNF- α	TRAIL	TNF- β	VEGF	TRAIL	IL-8
SDF-1 α	TRAIL	TNF- α	VEGF	TNF- β	IL-8	TRAIL	MCP-1
SDF-1 α	VEGF	TNF- α	IL-8	TNF- β	MCP-1	TRAIL	MGSA
SDF-1 α	IL-8	TNF- α	MCP-1	TNF- β	MGSA	TRAIL	PGE-2
SDF-1 α	MCP-1	TNF- α	MGSA	TNF- β	PGE-2	TRAIL	RANTES
SDF-1 α	MGSA	TNF- α	PGE-2	TNF- β	RANTES	TRAIL	MIF

[0210]

SDF-1 α	PGE-2	TNF- α	RANTES	TNF- β	MIF	TRAIL	GRO- α
SDF-1 α	RANTES	TNF- α	MIF	TNF- β	GRO- α	TRAIL	CRP
SDF-1 α	MIF	TNF- α	GRO- α	TNF- β	CRP	TRAIL	DDT
SDF-1 α	GRO- α	TNF- α	CRP	TNF- β	DDT		
SDF-1 α	CRP	TNF- α	DDT				
SDF-1 α	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
VEGF	IL-8	IL-8	MCP-1	MCP-1	MGSA	MGSA	PGE-2
VEGF	MCP-1	IL-8	MGSA	MCP-1	PGE-2	MGSA	RANTES
VEGF	MGSA	IL-8	PGE-2	MCP-1	RANTES	MGSA	MIF
VEGF	PGE-2	IL-8	RANTES	MCP-1	MIF	MGSA	GRO- α
VEGF	RANTES	IL-8	MIF	MCP-1	GRO- α	MGSA	CRP
VEGF	MIF	IL-8	GRO- α	MCP-1	CRP	MGSA	DDT
VEGF	GRO- α	IL-8	CRP	MCP-1	DDT		
VEGF	CRP	IL-8	DDT				
VEGF	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2	蛋白质#1	蛋白质#2
PGE-2	RANTES	RANTES	MIF	MIF	GRO- α	GRO- α	CRP
PGE-2	MIF	RANTES	GRO- α	MIF	CRP	GRO- α	DDT
PGE-2	GRO- α	RANTES	CRP	MIF	DDT		
PGE-2	CRP	RANTES	DDT				
PGE-2	DDT						
蛋白质#1	蛋白质#2						
CRP	DDT						

[0211] 在某些实施方式中,检测或者测量富含红细胞的样本中一种或更多种,两种或更多种,三种或更多种,四种或更多种,五种或更多种,六种或更多种,七种或更多种,八种或更多种,九种或更多种,十种或更多种,十一种或更多种,十二种或更多种,十三种或更多种,十四种或更多种,十五种或更多种,十六种或更多种,十七种或更多种,十八种或更多种,十九种或更多种,二十种或更多种,二十一种或更多种,二十二种或更多种,二十三种或更多种,二十四种或更多种,二十五种或更多种,二十六种或更多种,二十七种或更多种,二十八种或更多种,二十九或更多种或三十种或更多种蛋白质的存在或水平。

[0212] 在某些其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中一种或更多种蛋白质的存在或测量一种或多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中两种或更多种蛋白质的存在或者测量两种或更多种蛋白质的水平。在其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中三种或更多种蛋白质的存在或者测量三种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中四种或更多种蛋白质的存在或者测量四种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中五种或更多种蛋白质的存在或测量五种或更多种蛋白质的水平。在其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中六种或更多种蛋白质的存在或测量六种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中七种或更多种蛋白质的存在或者测量七种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中八种或更多种蛋白质的存在或者测量八种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中八种或更多种蛋白质的存在或测量八种或更多种蛋白质的水平。在其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中九种或更多种蛋白质的存在或测量九种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十种或更多种蛋白质的存在或者测量十种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十一种或更多种蛋白质的存在或者测量十一种或更多种蛋白质的水平。在一些实施方式中,检测富含红细胞的

样本中十二种或更多种蛋白质的存在或测量十二种或更多种蛋白质的水平。在另一些实施方式中,检测富含红细胞的样本中十三种或更多种蛋白质的存在或测量十三种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十四种或更多种蛋白质的存在或者测量十四种或更多种蛋白质的水平。在进一步的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十五种或更多种蛋白质的存在或测量十五种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中十六种或更多种蛋白质的存在或测量十六种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十七种或更多种蛋白质的存在或测量十七种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中十八种或更多种蛋白质的存在或测量十八种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中十九种或更多种蛋白质的存在或者测量十九种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十种或更多种蛋白质的存在或者测量二十种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十一种或更多种蛋白质的存在或测量二十一种或更多种蛋白质的水平。在其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十二种或更多种蛋白质的存在或测量二十二种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十三种或更多种蛋白质的存在或测量二十三种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十四种或更多种蛋白质的存在或测量二十四种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十五种或更多种蛋白质的存在或测量二十五种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十六种或更多种蛋白质的存在或测量二十六种或更多种蛋白质的水平。在仍然其他的实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十七种或更多种蛋白质的存在或测量二十七种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十八种或更多种蛋白质的存在或测量二十八种或更多种蛋白质的水平。在另一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中二十九种或更多种蛋白质的存在或测量二十九种或更多种蛋白质的水平。在又一个实施方式中,检测富含红细胞的样本中三十种或更多种蛋白质的存在或者测量三十种或更多种蛋白质的水平。

[0213] 蛋白质图谱可以,例如通过检测根据本披露的方法制备的裂解物、细胞洗液、细胞上清液或其组合中一种或多种蛋白质的存在来产生或生成。所检测到的(一种或多种)蛋白质也可以经定量(例如测量水平)以产生或生成该蛋白质图谱。

[0214] 用于检测和/或定量单个或混合血细胞群体和血浆/血清中的蛋白质的方法为本领域普通技术人员所熟知。合适方法的非限制性实例一般包含基于抗体的方法、流式细胞术、ELISA、横向流、免疫染色、免疫荧光、免疫电泳(包含,例如Western印迹),以及诸如此类。替代性地,蛋白质可以使用质谱法、光谱学、色谱法、电泳、二辛可宁酸测定法(BCA)、酶测定法,以及诸如此类来检测和/或定量。再次仅举例来说,蛋白质定量方法在美国专利号7,501,286、美国专利号8,530,182,以及美国专利公开号2013028838中有描述。方法也在本说明书的实施例中给出。

[0215] 本披露还提供了通过计算包括红细胞中的一种或多种蛋白质的水平与血浆中那些相同的一种或多种蛋白质的水平的比率的蛋白质比率由富含红细胞的样本产生蛋白质图谱的方法。该蛋白质比率可以通过将该RBC和该血浆中测量的蛋白质浓度归一化,然后将

该RBC中的(一种或多种)蛋白质的浓度除以该血浆中的(一种或多种)蛋白质的浓度来计算。该RBC和血浆中的(一种或多种)蛋白质的浓度通过计算全血中每毫升其相对浓度(全血中的百分比)来归一化。

[0216] 在某些实施方式中,包括红细胞中的一种或多种蛋白质的水平与血浆中那些一种或多种蛋白质的水平的比率的该蛋白质比率是至少2:1、至少10:1、至少20:1、至少30:1、至少40:1、至少50:1、至少60:1、至少70:1、至少80:1、至少90:1、至少100:1、至少110:1、至少120:1、至少130:1、至少140:1、至少150:1、至少160:1、至少170:1、至少180:1、至少190:1或者至少200:1。在其他的实施方式中,该蛋白质比率是至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1、至少10:1、至少11:1、至少12:1、至少13:1、至少14:1、至少15:1、至少16:1、至少17:1、至少18:1、至少19:1、至少20:1、至少21:1、至少22:1、至少23:1、至少24:1、至少25:1、至少26:1、至少27:1、至少28:1、至少29:1、至少30:1、至少31:1、至少32:1、至少33:1、至少34:1、至少35:1、至少36:1、至少37:1、至少38:1、至少39:1或者至少40:1。

[0217] 疾病图谱

[0218] 本披露在此提供了用于产生富含红细胞的血液样本中的病蛋白质图谱的方法。对于某些疾病或紊乱来说,与富含红细胞的样本相关的一种或多种蛋白质的存在或水平存在差异,针对任何这种疾病或紊乱可以产生疾病图谱。作为非限制性实例,对于某些疾病或紊乱来说,表1中列出的一种或多种蛋白质或表2中列出的一种或多种蛋白质组合的存在或水平存在差异,针对任何这种疾病或紊乱可以产生疾病图谱。例如,在某些实施方式中,成图谱的疾病或紊乱选自如下:癌症、先兆子痫、自身免疫疾病、心血管疾病、神经退行性疾病、糖尿病、代谢紊乱、肌肉骨骼疾病、传染病、遗传疾病、肾脏疾病,以及胃肠道疾病。

[0219] 根据该方法,(一种或多种)病蛋白质图谱通过获取由患有疾病或紊乱的一个或多个对象产生的蛋白质图谱和由未患有该疾病或紊乱的一个或多个对象产生的蛋白质图谱来产生。在一个实施方式中,至少一种蛋白质图谱从患有疾病或紊乱的对象中获取,以及至少一种谱图从未患有该疾病或紊乱的对象中获取。在另一个实施方式中,该血液样本从患有疾病或紊乱的一个或多个对象中获取并汇集。在另一个实施方式中,血液样本从未患有该疾病或紊乱的一个或多个对象中获取并汇集。然后,蛋白质图谱获自患有该疾病或紊乱的该一个或多个对象和/或未患有该疾病或紊乱的该一个或多个对象的所汇集的血液样本。在另一个实施方式中,一种或多种蛋白质图谱获自患有疾病或紊乱的对象以及一种或多种蛋白质图谱获自未患有该疾病或紊乱的对象,以及进行蛋白质测定的统计分析,包括(通过蛋白质存在和/或水平的统计学相关差异)患有疾病或紊乱的对象的蛋白质图谱和未患有该疾病或紊乱的对象的蛋白质图谱。患有疾病或紊乱的对象的该蛋白质图谱和未患有该疾病或紊乱的对象的该蛋白质图谱可以在确定病蛋白质图谱之前的任何时间产生。

[0220] 在一个实施方式中,该病蛋白质图谱包括存在于患有疾病或紊乱的对象中但不存在于未患有该疾病或紊乱的对象中的一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该病蛋白质图谱包括不存在于患有疾病或紊乱的对象中但存在于未患有该疾病或紊乱的对象中的一种或多种蛋白质。在仍然其他的实施方式中,该病蛋白质图谱包括与未患有疾病或紊乱的对象中的一种或多种蛋白质相比,患有该疾病或紊乱的对象中水平较高的该一种或多种蛋白质。在另一个实施方式中,该病蛋白质图谱包括与未患有疾病或紊乱的对象中的一种或多种蛋白质相比,患有该疾病或紊乱的对象中水平较低的该一种或多种蛋白质。在某些

实施方式中,病蛋白质图谱包括这样的蛋白质,其中患有疾病或紊乱的对象中的一种或多种蛋白质与未患有该疾病或紊乱的对象中的该一种或多种蛋白质相比,水平不同(例如较高、较低;或较高和较低)。

[0221] 在某些实施方式中,该病蛋白质图谱是包括选自以下中的一种或多种蛋白质的癌症蛋白质图谱:IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF- α 、TGF- β 和IFN- γ 。在其他的实施方式中,该病蛋白质图谱是包括由以下组成的一种或多种蛋白质的先兆子痫蛋白质图谱:TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8和IL-12。在具体的实施方式中,该先兆子痫蛋白质图谱包括选自以下中的一种或多种蛋白质:IL-6、IL-8和IFN- γ 。

[0222] 本披露还提供用于使用由本文提供的方法产生的疾病图谱来确定对象是否患有疾病或紊乱的方法。蛋白质图谱可以获自对象,通过本文提供的方法之一产生。该对象的该蛋白质图谱可以与病蛋白质图谱进行比较,得出这两种蛋白质图谱(例如,在蛋白质存在或蛋白质水平方面)之间的相似性。对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱之间的相似性可能表明该对象患有该疾病或紊乱。在一个实施方式中,在至少一种蛋白质,至少两种蛋白质,至少三种蛋白质,至少四种蛋白质,至少五种蛋白质,至少六种蛋白质,至少七种蛋白质,至少八种蛋白质,至少九种蛋白质,至少十种蛋白质,至少十一种蛋白质,至少十二种蛋白质,至少十三种蛋白质,至少十四种蛋白质,至少十五种蛋白质,至少十六种蛋白质,至少十七种蛋白质,至少十八种蛋白质,至少十九种蛋白质,至少二十种蛋白质,至少二十一种蛋白质,至少二十二种蛋白质,至少二十三种蛋白质,至少二十四种蛋白质,至少二十五种蛋白质,至少二十六种蛋白质,至少二十七种蛋白质,至少二十八种蛋白质,至少二十九种蛋白质或至少三十种蛋白质之间存在相似性。在另一个实施方式中,至少一种蛋白质之间存在相似性。在又一个实施方式中,在至少3种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,在至少5种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,在至少10种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,在至少15种蛋白质之间存在相似性。在其他的实施方式中,在至少20种蛋白质之间存在相似性。在其他的实施方式中,在至少30种蛋白质之间存在相似性。

[0223] 在某些实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱具有相同的一种或多种蛋白质存在,这表明该对象可能患有该疾病或紊乱。在其他的实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱具有相同或基本相似的一种或多种蛋白质水平,这表明该对象可能患有该疾病或紊乱。该相同或基本相似的一种或多种蛋白质水平可以包含,例如与为本领域普通技术人员,通过,例如统计分析或测定的阈值倍数差异(如小于两倍的差异)而测定为足够不同的蛋白质水平相同(如由本领域技术人员所测定,相关统计分析内)的蛋白质水平。在一些实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质的水平相同。在又一个实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质的水平基本相似。在另一个实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异通过本领域技术人员已知的统计学方法测定(如p值为0.05或更大的T-检验)。在又一个实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异通过与本领域技术人员已知的预定参考范围(例如健康或正常浓度范围)比较来测定。在其他的实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于0.5倍。

在某些其他的实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于1倍。在又一个实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于1.5倍。在仍然其他的实施方式中,对象的蛋白质图谱和病蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于2倍。

[0224] 治疗评估

[0225] 本披露还提供了使用通过本文提供的方法产生的蛋白质图谱来监测对象的治疗方法。根据本文提供的方法产生的蛋白质图谱在治疗前和治疗后从对象中获取以及两种蛋白质图谱之间进行差异(如蛋白质存在或蛋白质水平方面的差异)比较。在一个实施方式中,接受治疗的对象可以经历一次或更多次治疗或许多次治疗。在另一个实施方式中,该对象已经接受和/或正在接受特定的治疗。在一个实施方式中,治疗前获取的蛋白质图谱可以从没有经过治疗的对象中获取并且与治疗后的该对象的蛋白质图谱相比较。在另一个实施方式中,在治疗的过程期间测量蛋白质图谱,以及将在该治疗期间的一个时间点获取的对象的至少一个蛋白质图谱与在该治疗期间的不同时间点获取的该对象的至少一个蛋白质图谱相比较。在某些实施方式中,治疗前和治疗后的蛋白质图谱从治疗的过程期间正在经历相同治疗的对象中获取。在另一个实施方式中,治疗前和治疗后的蛋白质图谱从治疗的过程期间正在经历不同治疗的对象(例如已转换治疗的对象)中获取。

[0226] 治疗前和治疗后对象的蛋白质图谱(如蛋白质存在或水平)之间的差异可能表明该治疗对该对象有作用。在一个实施方式中,至少一种蛋白质,至少两种蛋白质,至少三种蛋白质,至少四种蛋白质,至少五种蛋白质,至少六种蛋白质,至少七种蛋白质,至少八种蛋白质,至少九种蛋白质,至少十种蛋白质,至少十一种蛋白质,至少十二种蛋白质,至少十三种蛋白质,至少十四种蛋白质,至少十五种蛋白质,至少十六种蛋白质,至少十七种蛋白质,至少十八种蛋白质,至少十九种蛋白质,至少二十种蛋白质,至少二十一种蛋白质,至少二十二种蛋白质,至少二十三种蛋白质,至少二十四种蛋白质,至少二十五种蛋白质,至少二十六种蛋白质,至少二十七种蛋白质,至少二十八种蛋白质,至少二十九种蛋白质或至少三十种蛋白质之间存在差异。在另一个实施方式中,至少一种蛋白质之间存在差异。在又一个实施方式中,至少3种蛋白质之间存在差异。在仍然其他的实施方式中,至少5种蛋白质之间存在差异。在仍然其他的实施方式中,至少10种蛋白质之间存在差异。在仍然其他的实施方式中,至少15种蛋白质之间存在差异。在其他的实施方式中,至少20种蛋白质之间存在差异。在其他的实施方式中,至少30种蛋白质之间存在差异。

[0227] 在某些实施方式中,治疗前获取的对象的蛋白质图谱包括与治疗后的该蛋白质图谱不同的(一种或多种)蛋白质,这表明该治疗可能对该对象有作用。在其他的实施方式中,与治疗后的该蛋白质图谱相比,治疗前获取的对象的蛋白质图谱具有不同的一种或多种蛋白质水平,这表明该治疗可能对该对象有作用。该不同的一种或多种蛋白质水平可以包含,例如大于1倍差异的水平。在某些实施方式中,治疗前后,对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于1倍,大于1.5倍,大于2倍,大于2.5倍,大于3倍,大于3.5倍,大于4倍,大于4.5倍,大于5倍,大于5.5倍,大于6倍,大于6.5倍,大于7倍,大于7.5倍,大于8倍,大于8.5倍,大于9倍,大于9.5倍,以及大于10倍。在一些实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于1.5倍。在其他的实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于2倍。在其他的实施方式

中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于2.5倍。在仍然其他的实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于3倍。在仍然其他的实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于4倍。在另一个实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于5倍。在其他的实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于6倍。在又一个实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱的该一种或多种蛋白质水平的差异大于7倍。在另一个实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于8倍。在又一个实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于9倍。在又一个实施方式中,治疗前后对象的蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质水平的差异大于10倍。

[0228] 在某些实施方式中,获取小体积血液样本以在治疗前和治疗后产生该蛋白质图谱,以监测对象的治疗。小体积血液样本允许对该对象频繁采样,因此允许以前所未有的频率进行治疗监测。在一些实施方式中,可以以每天一次或更多次,每天两次或更多次,每天三次或更多次,每天四次或更多次,以及每天五次或更多次的频率获取小体积血液样本。在其他的实施方式中,每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次地获取小体积血液样本:。在其他的实施方式中,每天获取小体积血液样本。在仍然其他的实施方式中,每周一次,每两周一次,每三周一次,以及每四周一次地获取小体积血液样本。在某些实施方式中,每月一次地获取小体积血液样本。

[0229] 本披露还提供了使用由本文提供的方法产生的蛋白质图谱来确定对象治疗效果的方法。在一个实施方式中,从已经经历过治疗的对象中获取至少一种蛋白质图谱。在另一个实施方式中,从未经历过治疗的对象中获取至少一种蛋白质图谱,以及将经历过治疗的该对象的该蛋白质图谱与未经过治疗的该对象的该蛋白质图谱进行比较。在另一个实施方式中,使用从未经过治疗的一个或多个对象中获取的血液样本来产生该蛋白质图谱并使该血液样本汇集。在另一个实施方式中,使用从已经经历过治疗的对象中获取的一种或多种血液样本产生蛋白质图谱并使该血液样本汇集。然后根据未经历过治疗的一个或多个对象的汇集的血液样本和/或来自未经历过治疗的对象的一种或多种血液样本获取蛋白质图谱。在另一个实施方式中,从未经历过治疗的一个或多个对象中获取一种或多种蛋白质图谱和/或从已经经历过治疗的对象中获取一种或多种蛋白质图谱,并且通过本领域已知的手段进行统计分析以测定蛋白质,该蛋白质将包括(通过存在和/或水平的差异)未经历过治疗的对象的蛋白质图谱和已经经历过治疗的对象的蛋白质图谱。已经经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱可以在这两种蛋白质图谱的比较之前的任何时间产生。

[0230] 该已经经历过治疗的对象的蛋白质图谱与该未经历过治疗的对象的蛋白质图谱之间的一种或多种蛋白质的存在或水平的相似性可以指示治疗的有效性。在一个实施方式中,在至少一种蛋白质,至少两种蛋白质,至少三种蛋白质,至少四种蛋白质,至少五种蛋白质,至少六种蛋白质,至少七种蛋白质,至少八种蛋白质,至少九种蛋白质,至少十种蛋白质,至少十一种蛋白质,至少十二种蛋白质,至少十三种蛋白质,至少十四种蛋白质,至少十五种蛋白质,至少十六种蛋白质,至少十七种蛋白质,至少十八种蛋白质,至少十九种蛋白

质,至少二十种蛋白质,至少二十一种蛋白质,至少二十二种蛋白质,至少二十三种蛋白质,至少二十四种蛋白质,至少二十五种蛋白质,至少二十六种蛋白质,至少二十七种蛋白质,至少二十八种蛋白质,至少二十九种蛋白质或至少三十种蛋白质之间存在相似性。在另一个实施方式中,至少一种蛋白质之间存在相似性。在又一个实施方式中,至少3种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,在至少5种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,在至少10种蛋白质之间存在相似性。在仍然其他的实施方式中,至少15种蛋白质之间存在相似性。在其他的实施方式中,至少20种蛋白质之间存在相似性。在其他的实施方式中,至少30种蛋白质之间存在相似性。

[0231] 在某些实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱具有相同的一种或多种蛋白质存在,这个表明该治疗可能已经生效。在其他的实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱具有相同或基本相似的一种或多种蛋白质水平,这表明该治疗可能已经生效。该一种或多种蛋白质的相同或基本相似的水平可以包含,例如与为本领域普通技术人员,通过,例如统计分析或测定的阈值倍数差异(如小于两倍的差异)而测定为足够不同的蛋白质水平相同(如由本领域技术人员所测定,相关统计分析内)的蛋白质水平。在一些实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质的水平和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱是相同的。在又一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质的水平和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的水平基本相似。在另一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异通过本领域技术人员已知的统计学方法测定(如p值为0.05或更大的T-检验)。在又一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异通过与本领域技术人员已知的预定参考范围(例如健康或正常浓度范围)比较来测定。在另一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于0.5倍。在另一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于1倍。在又一个实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于1.5倍。在仍然其他的实施方式中,已经历过治疗的对象的蛋白质图谱和未经历过治疗的对象的蛋白质图谱的一种或多种蛋白质水平的差异小于2倍。

[0232] 对象

[0233] 某些实施方式涉及测定来自对象的血液样本或其组分的蛋白质图谱。

[0234] 该对象可以血液里包括红细胞的动物(例如哺乳动物、鸟、鱼、爬行动物或两栖动物)。合适的对象的非限制性实例包括牛、马、羊、灵长类动物、禽类和啮齿类物种。因此,在一些实施方式中,该对象可以是人类、非人类哺乳动物、小鼠、大鼠、仓鼠、雪貂、沙鼠、兔子、猴子、黑猩猩、马、小马、驴、绵羊、猪、鸡、山羊、猫或狗。

[0235] 试剂盒

[0236] 本披露还提供了包括实施本文所述的方法所必需的组分的试剂盒。

[0237] 作为非限制性实例,该试剂盒可以包括用于以下的装置:采集血液、(一种或多种)抗凝血剂、(一种或多种)血液稳定剂;RBC的富集;非RBC血液组分的除去/分离;速冻血液或

其(一种或多种)组分;裂解细胞;清洗细胞;培养细胞;(一种或多种)特异性靶蛋白的细胞内和/或细胞外检测;或其组合。在某些实施方式中,该试剂盒包括用以使血液样本进行白细胞消耗并产生富含红细胞的样本的至少一种试剂;以及用以检测小体积富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的至少一种试剂。在一个实施方式中,用以检测一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的该试剂是ELISA装置。在其他的实施方式中,该试剂盒进一步包括用以从对象中获取血液样本的至少一种试剂。

[0238] 在一些实施方式中,根据本披露的试剂盒可以包括以下中的一种或多种:用于从对象中获取血液样本的(一种或多种)装置(如注射器、针、蝶形针、管、持针器、血液采集装置、转运装置、真空采血管、hemaPENTM);用于从对象中获取干血液样本的(一种或多种)装置(如滤纸、卡片、HemaSpotTM);用于从液体血液样本(如抗体包被的磁珠)获取红细胞级分、白细胞级分和/或血小板级分的(一种或多种)装置;抗凝血剂;蛋白质变性剂;以及诸如此类。

实施例

[0239] 现在将参考具体的(一个或多个)实施例来描述本披露,其不应被解释为以任何方式进行限制。

[0240] 实施例1.研究RBC表面上MIF受体的存在

[0241] 红细胞含有MIF。为了测定RBC是否具有结合MIF的受体,对它们进行了最为人熟知的MIF(一种形成在细胞表面上CD44和CD74之间的复合物)受体的分析。使用免疫分型来鉴定RBC上是否存在CD44和CD74。将全血(WB)采集到EDTA真空采血管中,在PBS+FBS(2%)中清洗两次(500g离心5分钟),最后重悬为1mL溶液。向每个相应的管中加入5μL溶液。然后用5μL或20μL每种抗体(抗CD44、抗CD74、抗CD45和IgG对照)和50μL的PBS+FBS(2%)对细胞染色。细胞溶液在黑暗中室温孵育15分钟,孵育后,细胞在1x PBS(500g,5分钟)中清洗三次。将细胞重悬于200μL的PBS中,并使用象限统计和叠加直方图通过流式细胞术进行分析。

[0242] 如图1A-1C所示,RBC对受体CD44呈阳性。但是,它们似乎没有对CD74呈阳性(图2)。正如所料,RBC对白细胞(WBC)标记CD45不呈阳性(数据未显示)。由于红细胞是CD44阳性,但不是CD74阳性,所以RBC不具有初级MIF受体。因此,如果MIF在RBC的表面上,它必须通过另一种机制进行结合。

[0243] 实施例2.RBC中MIF的定位

[0244] 使用免疫细胞化学对RBC进行MIF定位分析。将全血采集到注射器中并在1x PBS中清洗两次(在500g的离心机中旋转5分钟)。然后用细胞沉淀物来制备血液涂片(每个推片10μL),并将血液推片在室温下至少干燥2小时。一旦该推片完全干燥,将该涂片在室温下在100%甲醇中固定5分钟。该推片固定后,将它们从该甲醇中取出并放置在空气中干燥~10分钟。将推片用1x PBS彻底清洗,然后使血液涂片印迹干燥。用PBS+5%BSA将该涂片在室温下封闭1小时。封闭后,用或不用初级MIF抗体(抗人、兔MIF抗体,1μg/mL)将该样本4℃孵育过夜。孵育后,用1x PBS充分清洗推片,然后用二级抗体(抗兔、AP缀合抗体,1:50稀释)室温孵育30分钟。用1x PBS将推片充分漂洗并除去多余的流体。将新鲜制备的底物(AP显影缓冲液:底物A:底物B=100:1:1)滴在该推片上,在室温下孵育20分钟,并用Milli-Q水终止反应。干燥并安装推片,并使用光学显微术收集图像。

[0245] 接下来,将RA滑膜(人)的石蜡包埋的样本切片并涂覆于载玻片。使用二甲苯(2次,

5分钟)和乙醇(100%、100%、95%、70%,每次3分钟)洗液,最后使用流动的自来水从该样本中除去石蜡。然后使用沸水浴通过以下方法进行热诱导的表位恢复:将Tissue-Tek容器填充缓冲液(pH 6)并在水浴中加热至95℃;将载玻片置于沸水浴中的容器中并孵育20分钟;将载玻片从该水浴中取出并在室温下冷却20分钟;逐渐加入冷水,最后在冷的自来水中清洗载玻片2-3分钟。将载玻片附接到Sequenza托盘上并用清洗缓冲液(TBST)清洗6分钟。使用Dako Protein Block Serum Free(100μL,10分钟)封闭切片。在制备的浓度下将初级抗体(或相应的阴性IgG对照)加入载玻片并孵育过夜(100μL,4℃;0.5μg/mL、1μg/mL、2μg/mL、4μg/mL)。孵育后,用TBST(6分钟,室温)清洗载玻片。将二级抗体(EnVision聚合物,兔,HRP)加入载玻片(3滴),并将载玻片在室温下孵育30分钟。然后将载玻片用TBST(6分钟,室温)清洗,从Sequenza托盘中取出;以及通过直接将其滴到每个载玻片上,将HRP底物试剂(NovaRED)加入到每个载玻片(200μL)中。将载玻片在室温下孵育15分钟。然后将载玻片在流动的自来水中清洗5分钟以停止反应,并将样本用苏木精(2分钟,室温)和斯科特蓝(30秒,室温)复染。然后将样本在浓度增加的乙醇,然后二甲苯中脱水,固定,并使用光学显微镜观察。

[0246] 如预期的那样,观察到了白细胞的清晰细胞内染色(图3)(WBC含有高量的细胞内MIF库)。这些结果还显示了RBC的细胞表面被染色(图3),这表明MIF存在于该细胞表面。在RBC上没有明显的细胞内染色(图3)。阴性对照如图4所示。

[0247] 染色滑膜切片也是成功的。阴性对照几乎没有染色(图5),阳性对照中的内皮细胞和炎性细胞染色良好(图6)。血管内的RBC似乎有染色;然而,染色的定位未测定。

[0248] 这些结果表明了,该MIF位于细胞膜上,但不在细胞内。相反,RBC鬼影(ghosts)和RBC裂解物未显示出MIF染色(数据未显示)。WBC确实含有细胞内MIF。

[0249] 实施例3.研究RBC中MIF的存在

[0250] 由于红细胞中的MIF水平是血浆中的~1000倍,因此对RBC进行细胞内MIF水平分析。从毛细血管床采集全血(指尖采集)。用EDTA(30mg/mL)溶液使血液抗凝(1:1)并用PBS+FBS(2%)清洗两次。在室温下黑暗中用CD45-FITC(5μL)将细胞染色15min。孵育后,将细胞用1xPBS清洗两次,然后使用流式细胞术(FACS)进行负向分选来分离RBC。通过离心(2000g,10分钟)将RBC和WB沉淀,并重悬至250,000个细胞/50μL。于-80℃冷冻细胞,并使样本经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。然后通过Hu MIF ELISA分析样本。至于指尖血和静脉血,从毛细血管床(指尖采集)或从静脉采集全血。用EDTA(30mg/mL)溶液使血液抗凝(1:1),用PBS+FBS(2%)清洗两次,并用CD45-FITC(5μL)将细胞在室温下黑暗中染色15min。孵育后,将细胞用1x PBS清洗两次,并在FACS上使用负向分选分离RBC。通过离心(2000g,10分钟)将RBC和WB沉淀并重悬浮为250,000个细胞/50μL。于-80℃冷冻细胞,并使样本经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。通过Hu MIF ELISA分析样本。

[0251] 如图7所示,在FACS分离的RBC中鉴定出高浓度的MIF。然而,水平是全血中测量的水平的大约1/10。如图8所示,通过指尖采集相比静脉采集而采集到的RBC中MIF浓度存在差异。全血中MIF浓度过高,无法通过ELISA分析(数据未显示)。结果证实了,MIF存在于红细胞中,但可测量的MIF浓度因采集部位(指尖或静脉)和所选择的抗凝血剂(EDTA或肝素)的不同而不同。

[0252] 实施例4.RBC分离的优化

[0253] 4.1 葡聚糖沉降对比流式细胞术

[0254] 通过静脉采集将全血采集到EDTA和肝素真空采血管中。使用FACS、葡聚糖沉降或RBC裂解缓冲液分离RBC。对于FACS分离,通过离心(1000g达5分钟)用FACS清洗缓冲液(PBS+2%FBS)清洗血液两次。将得到的细胞沉淀物重悬浮在50 μ L的FACs清洗缓冲液中,用CD45-FITC(5 μ L,FITC-小鼠抗人CD45,H130,eBioscience 11-0459-42)染色,并在室温下黑暗中孵育15min。孵育后,用FACS清洗缓冲液(1000g达5分钟)清洗该细胞两次,然后在FACS(FACSAria III流式细胞仪,4个激光器)上使用负向分选分离被重悬于该缓冲液中的RBC。通过前向散射和侧向散射,根据大小从血小板中对RBC和WBC进行门控。然后通过缺乏CD45染色的WBC,从WBC中对RBC进行门控。对于葡聚糖沉淀,将抗凝WB加入到高分子量葡聚糖(含于0.15M氯化钠中6%w/v,1:1血液:葡聚糖)中,将溶液轻轻混合并在室温下($\sim$ 23 $^{\circ}$ C)静置长达60分钟以使该RBC沉淀,沉淀后,将RBC分离并在1x PBS中清洗两次。通过离心(2000g,10分钟)将RBC和WB沉淀并重悬至250,000个细胞/50 μ L)。然后裂解RBC:将2.5亿个细胞加入到6mL冰冷的Milli-Q水中,并孵育30秒;孵育后,加入2mL冰冷的0.6M KCl以恢复等渗性;用冰冷的PBS将该溶液稀释至50mL;以及将污染的细胞沉淀并采集裂解物(等于250,000个细胞/50 μ L);最后于-80 $^{\circ}$ C冷冻样本,并使其经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。

[0255] 使用MIF ELISA(R&D Systems,美国)测量裂解细胞中MIF的浓度,并且用Synergy 2板读数器(BioTeck,美国)在450nm处收集该MIF ELISA的吸光度数据(570nm处的吸光度校正)。使用对数/对数曲线拟合(GraphPad Prism软件(版本6,美国))分析校准曲线。

[0256] 为了测定分离的RBC的纯度,将全血采集到EDTA真空采血管中,并如上所述,使用葡聚糖沉淀分离RBC。在PBS+FBS(2%)中将RBC清洗两次(500g,5分钟),最后重悬至1mL溶液。向每个相应的管中加入5 μ L溶液,并用5 μ L或20 μ L每种抗体(抗CD45,以及IgG对照)和50 μ L的PBS+FBS(2%)对细胞染色。将细胞溶液在室温下黑暗中孵育15分钟,孵育后,将细胞在1x PBS(500g,5分钟)中清洗三次。将细胞重悬于200 μ L的PBS中并使用象限统计和叠加直方图(Coulter AcT Diff,Beckman Coulter)通过流式细胞术进行分析。

[0257] 如图9所示,与使用RBC裂解缓冲液或FACS分离法(浓度归一化为对1mL全血的相对贡献)相比,RBC的葡聚糖沉降导致了更高的MIF测量浓度。葡聚糖本身的存在并不改变所测量的MIF的水平(数据未显示)。此外,使用葡聚糖沉淀分离的RBC经染色以确认是否存在污染CD45+细胞(WBC)。该RBC的纯度大约为0.0025%(图10A-10C)。

[0258] 结果证实了,在RBC群体中测量的MIF的量取决于RBC分离的方法。葡聚糖沉降是最佳的RBC分离技术,收获了最高数量的具有高纯度水平的RBC。结果表明了,葡聚糖沉淀与其他常用的RBC分离技术一样有效,甚至更有效。此外,葡聚糖沉降导致检测到更高水平的MIF,这表明了该方法可能比用于测量蛋白质水平的其他方法准确得多。

[0259] 4.2 RBC处理:葡聚糖沉淀对比其他方法

[0260] 通过静脉穿刺(n=1)将全血从健康志愿者处直接采集到EDTA真空采血管(k_2 EDTA真空采血管,BD Biosciences)中。采集血液的所有级分并在采集后4小时内在室温下处理。为了多重分析(BioPlex分析),所有样本都储存于-80 $^{\circ}$ C,并于-80 $^{\circ}$ C经受3次冻融循环以确保分析之前细胞完全裂解。

[0261] 如下使用葡聚糖沉淀分离红细胞。离心全血(1500g,10分钟)并丢弃上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠(0.15M)中。然后将葡聚糖(含于0.15M氯化钠

中6%w/v)以1:4的比例(葡聚糖:细胞悬浮液)加入到细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后,丢弃上部富含白细胞层并采集下部红细胞级分。将下部红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水(PBS,500g,5分钟)中清洗一次或在PBS中倒转彻底清洗三次。得到的红细胞要么新鲜使用,要么冷冻(-80℃)。

[0262] 将等份的红细胞在PBS中稀释至4亿个细胞/mL,并于37℃和5%CO₂条件下下孵育24小时。孵育后,将该红细胞和得到的调理PBS分离并冷冻(-80℃)。

[0263] 使该红细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后,将红细胞裂解物在PBS中稀释至相当于4亿个细胞/mL。然后在多重细胞因子检定中分析这些裂解物。利用两种多重检定。第一种是27-plex人细胞因子平板,其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α ,以及VEGF,而第二种是21-plex人细胞因子平板,其检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL(Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex,Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II,Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex®200™系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集荧光值。使用BioPlex管理软件(版本5.0,Bio-Rad,美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0264] 数据再次表明了,通过葡聚糖沉降对红细胞的分离导致白细胞和血小板平均消耗率大于95%(表3)。

[0265] 表3.使用葡聚糖沉淀产生的富含红细胞的级分中白细胞和血小板的百分比消耗。

	白血球消耗 (%)	血小板消耗 (%)	红细胞纯度 (%)
[0266]	95.5 $\pm$ 5.0	96.1 $\pm$ 5.5	99.992 $\pm$ 0.004

[0267] 评估通常用于RBC分离方法的清洗步骤的效果。在红细胞的葡聚糖沉淀分离之后添加彻底的清洗步骤导致了,与未经受这个清洗步骤的细胞相比,细胞因子图谱的改变。清洗过的细胞中可测量的细胞因子总体减少(图11A-11GG)。

[0268] 清洗过的红细胞中大部分蛋白质的浓度显着低于在未清洗的红细胞中观察到的浓度,见于,例如IFN- γ (2倍以下)、G-CSF (4倍以下)和PDGF-bb (6倍以下)。就此点进一步来说,与未清洗的对照不同,蛋白质集合的水平低于检测水平。在未清洗的红细胞中可检测到IFN- α 2和IL-17,而在清洗过的细胞中它们却完全不存在。这些结果证实,过度清洗红细胞可以改变它们的细胞因子图谱。这种清洗在大多数红细胞分离技术中是关键步骤。

[0269] 由于RBC裂解是不完全的,数据表明葡聚糖沉降对MIF水平给出了最准确的答案。RBC分离技术的主要区别在于每种技术的处理程度。葡聚糖沉降法相对温和并涉及最少的清洗步骤,而FAC方法需要细胞经受许多清洗步骤以及高速流过细胞计数器以进行细胞分选。

[0270] 实施例5.血液组分上MIF的分布

[0271] 为了测定RBC是否是MIF的主要储库,对RBC中MIF的存在进行了分析。通过静脉采

集将全血采集到EDTA真空采血管中。离心后采集血浆以及使用FACS或葡聚糖沉降分离细胞。对于FACS分离,用PBS+FBS (2%) 清洗血液两次,将细胞在室温下黑暗中用CD45-FITC (5 μ L) 染色15min,然后用1x PBS清洗两次。然后使用FACS上负向分选分离RBC;使用CD45阳性染色分离WBC;以及根据大小分离血小板。如上所述进行葡聚糖沉降,之后,通过离心从上清液中分离WBC和血小板。通过离心 (2000g, 10分钟) 将细胞和WB沉淀,并重悬以设定浓度。将样本在-80℃下冷冻,并使样本经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。然后通过HuMIF ELISA分析样本。

[0272] 通过FACS或葡聚糖沉降分离细胞时的MIF分布显示在表4和表5中。虽然MIF存在于血液的所有组分中,但是RBC贡献了MIF总量的最大比例。WBC含有最高浓度的MIF/细胞;然而,血液中的RBC有1000倍之多。

[0273] 表4:使用葡聚糖沉降分离后,与全血相比血液组分之间MIF分布 (n=1)

血液级分	MIF 贡献的 百分比 (%)	对 1 mL 全血 的总 MIF 贡 献 (ng/mL)	测量的 MIF/细胞 (fg/细胞)	先前报道的 MIF/细胞 (fg/细胞)
全血	100	21,179	n/a	n/a
RBC	82.6	17,500	2.97	n/a
WBC	2.0	416	70.6	3.9 – 100
血小板	1.2	258	1.49	0.3
血浆	0.05	11.53	n/a	n/a

[0275] 表5:使用FACS分离后,与全血相比血液组分之间MIF分布 (n=1)

血液级分	MIF 贡献的 百分比 (%)	对 1 mL 全血 的总 MIF 贡 献 (ng/mL)	测量的 MIF/细胞 (fg/细胞)	先前报道的 MIF/细胞 (fg/细胞)
全血	100	21,179	n/a	n/a
RBC	11.4	2,420	0.41	n/a
WBC	0.7	157	2.67	3.9 – 100
血小板	0.3	72	0.42	0.3
血浆	0.05	11.53	n/a	n/a

[0277] 表6:使用葡聚糖沉降分离后,与全血相比血液组分之间MIF分布,数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差 (n=3)

血液级分	MIF 贡献的 百分比 (%)	对 1 mL 全 血的总 MIF ¹ 贡献 (ng/mL)	测量的 MIF/细胞 (fg/细胞)	先前报道的 MIF/细胞 (fg/细胞)
[0278] 全血	100	17,297 ± 3,682	n/a	n/a
RBC	43.9	7,591 ± 1,223	1.4 ± 0.2	n/a
WBC	0.13	23.1 ± 13.6	4.0 ± 3.3	3.9 – 100
血小板	0.04	7.1 ± 0.5	0.02 ± 0.02	0.3
血浆	0.10	16.8 ± 1.3	n/a	n/a

[0279] 实施例6. 存在于RBC中的蛋白质的鉴定.

[0280] 为了研究RBC是否是除MIF以外的蛋白质的储库,评估了RBC中其他蛋白质的水平。通过静脉采集将全血采集到EDTA真空采血管中。离心后采集血浆以及如上所述使用FACS或葡聚糖沉降分离细胞。通过离心(2000g, 10分钟)将分离的细胞和WB沉淀,并重悬以设定浓度。于-80℃冷冻样本,并使其经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。在Hu 27-plex BioPlex上分析样本。另外,分析由RBC释放或分泌的蛋白质。如前所述,通过静脉采集将全血采集到EDTA真空采血管中并通过葡聚糖沉降分离RBC。在100uL的PBS或PBS+蛋白酶抑制剂(1x)中将分离的RBC等分为2,000万个细胞,并于37℃, 5%CO₂条件下将细胞孵育24小时。孵育后,通过离心分离上清液和细胞;于-80℃冷冻样本,并使其经受3次冷冻/融化循环以裂解所有细胞。在Hu 27-plex BioPlex上分析该样本。

[0281] 在该BioPlex上运行样本后,许多蛋白质经鉴定存在于RBC以及其他血液组分中。该分析报告了大量存在于全血和RBC中的16种蛋白质(总共27种)的相应浓度(表7-11)。总收率报告为与前述全血中测量的蛋白质相比,来自每种血液组分的蛋白质的总收率(表7-11)。

[0282] 表7:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的促炎细胞因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告(n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。

血液组分	IFN- γ	IL-1b	IL-5	IL-8	IL-9	IL-12 (p70)	IL-15	IL-17	TNF- α
[0283] 全血	2,401	<u>71</u>	<u>38</u>	<u>242</u>	728	<u>484</u>	2,546	5,044	1687
RBC	805	<u>50</u>	<u>18</u>	<u>242</u>	321	<u>165</u>	2,366	4,885	<u>401</u>
WBC	324	<u>20</u>	<u>4</u>	159	48	59	83	323	323
血小板	380	<u>28</u>	<u>7</u>	<u>114</u>	238	<u>195</u>	890	2,188	419
血浆	36	0.71	1	6	5	7	5	12	21
总收率 (%)	64.3	<u>139</u>	<u>79</u>	<u>215</u>	84.1	<u>88</u>	131.3	146.8	<u>69</u>

[0284] 表8:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的抗炎细胞因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告(n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。

	血液组分	表9:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的生长因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告 (n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。			
		IL-1ra	IL-4	IL-10	IL-13
[0285]	全血	-	106	991	<u>124</u>
	RBC	-	-	<u>760</u>	<u>53</u>
	WBC	684	17	<u>46</u>	54
	血小板	-	39	<u>391</u>	<u>39</u>
	血浆	76	0.98	3.55	31
	总收率 (%)	-	<u>54</u>	<u>121</u>	<u>143</u>

[0286] 表9:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的生长因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告 (n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。

[0287]	血液组分	bFGF	G-CSF	GM-CSF	PDGF	VEGF	IL-7
	全血	5,381	6,340	109,454	28,586	2,950	-
	RBC	2,717	2,844	107,721	2,287	2,254	-
	WBC	368	773	3,355	18,349	92	43
	血小板	2,027	921	41,436	1007	800	-
	血浆	23	36	-	50	11	3
	总收率 (%)	95.4	72.1	139.3	75.9	107.0	-

[0288] 表10:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的趋化因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告 (n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。

[0289]	血液组分	Eotaxin	IP-10	MCP-1	MIP-1a	MIP-1b	RANTES
	全血	1617	3,233	2,738	133	732	432,325
	RBC	<u>486</u>	1,494	1,636	77	610	37,197
	WBC	91	273	84	38	347	26,163
	血小板	<u>167</u>	618	748	28	<u>89</u>	50,907
	血浆	14	81	7	1	7	741
	总收率 (%)	<u>47</u>	76.3	90.4	108.3	<u>144</u>	26.6

[0290] 表11:通过BioPlex测量的全血和血液组分中的具有多种功能的趋化因子的总结,报告为全血的pg/mL,总收率根据全血中蛋白质浓度报告 (n=1)。下划线值已经从标准曲线的底部外推出来。

	血液组分	IL-2		IL-6	
		IL-2		IL-6	
[0291]	全血	1,345		540	
	RBC	834		218	
	WBC	72		59	
	血小板	441		154	
	血浆	5		7	
	总收率 (%)	100.5		81.1	

[0292] 于37℃在PBS中将RBC培养24小时后,释放或分泌了许多蛋白质。蛋白质分类为抗炎因子、促炎因子、趋化因子或生长因子,见表7-11。图12-15显示了由BioPlex测量的并报告为pg/mL (100uL PBS中2,000万个RBC)的,37℃时24小时期间从RBC分泌或释放入PBS中的分析物的总结。根据每种蛋白质的平均检测浓度分离图形。在RBC培养期间加入蛋白酶抑制剂改变了蛋白质的释放或分泌(37℃24小时)。

[0293] 培养条件如下:

[0294] 1.RBC+PBS (100uL PBS中2,000万个RBC)

[0295] 2.RBC+PBS+蛋白酶抑制剂(PI) (100uL PBS+PI中2,000万RBC)

[0296] 图16A-16Z所示的一系列图描绘了蛋白酶抑制剂(PI)对从RBC释放或分泌的蛋白质浓度(黑色柱)和分泌后该细胞中残留的蛋白质浓度(灰色柱)的影响。尽管存在一些例外(即MIP-1b),但在培养溶液中包含蛋白酶抑制剂通常导致释放或分泌和细胞裂解物的可检测浓度较低。数据以平均值±标准差(SD)表示。

[0297] 数据证实了,RBC中存在许多细胞因子。由于全血中的细胞因子水平与血浆相比有很大不同,因此它们给出了完全不同的有关外周血细胞因子图谱,并且这对生物标志物分析具有影响。

[0298] 实施例7.RBC中或其上CRP的存在

[0299] 为了研究CRP炎症标志物是否与RBC相关,使用柳叶刀通过指部针刺采集WB。使用iChroma仪器对新鲜血液(其检测血浆水平)或在三次冻融循环以裂解所有细胞后的血液(针对全血水平)进行CRP水平分析。采集纯化的RBC(葡聚糖沉降后)并使用3次冻融循环加以裂解,在iChroma仪器上运行,并且将蛋白质水平与存储的血浆样本中的那些相比较。

[0300] 如图17所示,裂解的全血中CRP的可检测水平高于血浆组分中的该水平。与相应的血浆浓度相比,RBC裂解物中CRP的可检测比例类似(图18)。结果表明了,CRP与RBC有关,并且该RBC贡献了全血中可检测的CRP总量的大约50%。

[0301] 实施例8.在小血量中蛋白质水平的测量

[0302] 红细胞中各种蛋白质的水平与,例如相同体积的血浆中其水平相比,较高,这一发现表明了,可以使用少量的全血和/或RBC来鉴定蛋白质标记。分析了少量全血和RBC中许多蛋白质的水平。

[0303] 通过指部针刺(n=1)将全血从健康志愿者处直接采集到EDTA溶液(3mg/mL)中。为了多重分析(BioPlex分析),所有样本都储存于-80℃,并于-80℃经受3次冻融循环以确保

分析之前细胞完全裂解。使红细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后,以5 μ L全血(含于45 μ L PBS中),10 μ L全血(含于40 μ L PBS中),15 μ L全血(含于35 μ L PBS中),20 μ L全血(含于30 μ L PBS中)或25 μ L全血(含于25 μ L PBS中)通过多重细胞因子检定分析全血。利用两种多重检定。第一种是27-plex人细胞因子平板,其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α ,以及VEGF,而第二种是21-plex人细胞因子平板,其检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL (Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex, Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II, Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex[®]200[™]系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集荧光值。使用BioPlex管理软件(版本5.0, Bio-Rad, 美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0304] 各种稀释度(1:10、1:5、1:3.3、1:2.5、1:2)的全血中指示蛋白质的浓度如图19A-19TT中所示(计算回未稀释的浓度)。全血分析揭示了许多蛋白质的存在,并且这些蛋白质还以一系列的稀释度存在。然而,经分析的蛋白质中许多没有稀释线性,这不是全血所特有的;在Luminex平台,例如BioPlex上的血浆分析中也观察到这个现象(更多的蛋白质通常在稀释时被检测到)。结果表明了可以在小体积(低至5 μ L)的全血中监测到蛋白质。全血中众多蛋白质检测的容易性证实了,可以采集非常小的血量(从,例如指尖处获取)并用于分析蛋白质水平。

[0305] 实施例9. 指尖对比静脉血样本中的蛋白质的存在。

[0306] 为了进一步探索小血量中蛋白质的检测,将指部针刺中的众多蛋白质的水平与通过已知方法采集的静脉血中的该水平进行比较。

[0307] 通过静脉穿刺或通过指部针刺($n > 12$)将全血从健康志愿者处直接采集到EDTA真空采血管(k_2 EDTA真空采血管, BD Biosciences)或EDTA溶液(3mg/mL)中。采集血液的所有级分并在采集后4小时内室温下处理。为了多重分析(BioPlex分析),所有样本都储存于-80 $^{\circ}$ C,并于-80 $^{\circ}$ C经受3次冻融循环以确保分析之前细胞完全裂解。如下使用葡聚糖沉淀分离血浆和红细胞。离心全血(1500g, 10分钟)并采集上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠(0.15M)中。然后将葡聚糖(含于0.15M氯化钠中的6%w/v)以1:4的比例(葡聚糖:细胞悬浮液)加入到该细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后,丢弃上部富含白细胞层并分离出下部红细胞级分。将该红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水(PBS, 500g, 5分钟)中清洗两次,并对剩余的红细胞沉淀物进行计数(Coulter Act Diff, Beckman Coulter),然后冷冻(-80 $^{\circ}$ C)直至分析。

[0308] 使该红细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后,将红细胞裂解物在PBS中稀释至相当于4亿个细胞/mL。然后通过多重细胞因子检定分析这些裂解物。利用一种多重检定。它是27-plex人细胞因子平板,其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α ,以及VEGF (Bio-Plex Pro 27-plex, Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II, Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex[®]200[™]系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集

荧光值。使用BioPlex管理软件(版本5.0, Bio-Rad, 美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0309] 从静脉血和指尖血分离的血浆中;或从静脉血和指尖血中分离的红细胞的裂解物中指示蛋白质的浓度如图20A-20AA中所描绘。使用学生T检验测定显著差异($p < 0.05$)。当指尖血和静脉血相比较时,该血浆与该红细胞中的蛋白质水平之间存在一致的趋势。例如,从指尖分离的血浆中IL-6的浓度明显高于静脉血浆中的该浓度。在该红细胞中观察到了同样的趋势,在从指尖血分离的该细胞中观察到显著更高的蛋白质水平。观察到许多蛋白质有这种趋势,包含,例如IL-2、RANTES和IP-10。对于许多蛋白质,在从指尖血分离的血浆和红细胞中观察到较高浓度,包括,例如IL-1 β 、IL-8和TNF- α 。

[0310] 对于红细胞,指尖样本中的生物变异(标准偏差)低于静脉样本(如MIP-1 β 、G-CSF)。这表明了,从指尖采集的红细胞的分析将比静脉血的分析有更多的可重复性。对于血浆中的许多蛋白质观察到相反情况,其中静脉血浆比指尖血(如IL-7、PDGF-bb)的变化较小。这些结果支持了对来自指尖的红细胞进行分离和分析的情况,在这种情况下,可以使用频繁的血液采集。

[0311] 实施例10.RBC对比血浆中蛋白质的图谱

[0312] 鉴于红细胞中蛋白质水平相对较高,将红细胞裂解物中的蛋白质水平与血浆中的蛋白质水平进行比较。通过静脉穿刺($n=6$)将全血从健康志愿者处直接采集到EDTA真空采血管(k_2 EDTA真空采血管, BD Biosciences)中。采集血液的所有级分并在采集后4小时内在室温下处理。为了多重分析(BioPlex分析),所有样本都储存于 -80°C ,并于 -80°C 经受3次冻融循环以确保分析之前细胞完全裂解。如下使用葡聚糖沉降分离血浆、红细胞和白细胞。离心全血($1500g$, 10分钟)并丢弃上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠($0.15M$)中。然后将葡聚糖(含于 $0.15M$ 氯化钠中 $6\%w/v$)以1:4的比例(葡聚糖:细胞悬浮液)加入到该细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后,分离上部富含白细胞层和下部红细胞级分并加入各个管中。将该下部红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水(PBS, $500g$, 5分钟)中清洗两次,并将剩余的红细胞沉淀物冷冻(-80°C)。该上部富含白细胞层在PBS($1000g$, 10分钟)中清洗两次。丢弃上清液,通过将细胞沉淀物重悬于3mL Milli-Q水中30秒,通过低渗休克裂解任何污染的红细胞。此后,通过加入1mL氯化钾($0.65M$)恢复等渗性并将该溶液用PBS稀释至15mL。将剩余的细胞沉淀并用PBS($1000g$, 5分钟)清洗两次。将剩余的细胞沉淀物重悬于PBS中并立即于 -80°C 冷冻。

[0313] 使红细胞和白细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后,将红细胞裂解物在PBS中稀释至相当于4亿个细胞/mL,并将白细胞裂解物稀释至20,000个细胞/mL。然后通过多重细胞因子检定分析这些裂解物。利用两种多重检定。第一种是27-plex人细胞因子平板,其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α ,以及VEGF,而第二种是21-plex人细胞因子平板,其检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- $\alpha 2$ 、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL(Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex, Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II, Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex®200™系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集荧光值。

使用BioPlex管理软件(版本5.0,Bio-Rad,美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0314] 指示血浆和红细胞裂解物(4亿个细胞/mL)中指示蛋白质浓度的图表如图21A-21B中所示。将蛋白质浓度计算回每mL全血的相对浓度(大约5亿个细胞/mL)并进行白细胞污染校正。校正的红细胞蛋白质浓度和血浆蛋白质浓度之间的倍数差异也被测定(图21A-21B)。在分析的48种蛋白质(如细胞因子、趋化因子)中,有31种蛋白质,其在RBC中的浓度基本上高于血浆中的浓度。RBC对比血浆中蛋白质浓度的倍增变化的范围(RBC:血浆比例)是3.6至3970。RBC:血浆比例的中值是11.3。这些结果表明了,小血量(如从小血量中分离出的全血或RBC的体积的1/10)可用于检测有关蛋白质(包含实验中鉴定的蛋白质)。此外,采样小血量(通过,如指部针刺)的能力将允许频繁的微创采样。

[0315] 实施例11. 使用阳离子盐的RBC中的蛋白质图谱

[0316] 如下使用葡聚糖沉淀分离红细胞。离心全血(1500g,10分钟)并丢弃上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠(0.15M)中。然后将葡聚糖(含于0.15M氯化钠中6%w/v)以1:4的比例(葡聚糖:细胞悬浮液)加入到该细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后,分离上部富含白细胞层和下部红细胞级分并丢弃白细胞。将该下部红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水(PBS,500g,5分钟)中清洗两次。丢弃上清液,将红细胞沉淀物重悬于PBS或含有100mM LiCl的PBS中。

[0317] 使红细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后,将红细胞裂解物在PBS中稀释至相当于4亿个细胞/mL。在21-plex人细胞因子平板上分析该红细胞裂解物,该平板检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL(Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex,Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II,Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex®200™系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集荧光值。使用BioPlex管理软件(版本5.0,Bio-Rad,美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0318] 如图22所示,氯化锂增加和/或增强了该检定中几种蛋白质的水平。

[0319] 实施例12. 来自健康个体对比患有先兆子痫或癌症的个体的RBC中的蛋白质图谱。

[0320] 测量了健康个体的血液中蛋白质水平与患有疾病或紊乱的个体中该水平的差异。全血从四组人中采集,包含:1)健康的志愿者,2)健康的孕妇,3)患有先兆子痫的孕妇,以及4)肿瘤患者(见表12)。根据妊娠,将健康的怀孕对照与先兆子痫样本匹配。通过静脉穿刺($n \geq 3$)从每个志愿者处将血液直接采集到EDTA真空采血管(k_2 EDTA真空采血管,BD Biosciences)中。

[0321] 表12. 参与者总结。

[0322]

对象	病症	相关信息
OBS-101	淋巴瘤	化学疗法和放射疗法
OBS-102	淋巴瘤	化学疗法
OBS-103	癌症(具体类型未知)	化学疗法
PE-001	先兆子痫	妊娠末三个月
PE-002	先兆子痫	妊娠末三个月

PE-003	先兆子痫	妊娠末三个月
--------	------	--------

[0323] 采集血液的所有级分并在采集后4小时内室温下处理。为了多重分析 (BioPlex 分析), 所有样本都储存于-80℃, 并于-80℃经受3次冻融循环以确保分析之前细胞完全裂解。

[0324] 如下使用葡聚糖沉淀分离血浆和红细胞。离心全血 (1500g, 10分钟) 并采集上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠 (0.15M) 中。然后将葡聚糖 (含于0.15M氯化钠中6%w/v) 以1:4的比例 (葡聚糖:细胞悬浮液) 加入到该细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后, 丢弃上部富含白细胞层并分离出下部红细胞级分。将该红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水 (PBS, 500g, 5分钟) 中清洗两次, 并对剩余的红细胞沉淀进行计数 (Coulter Act Diff, Beckman Coulter), 然后冷冻 (-80℃) 直至分析。

[0325] 使红细胞经受3次冻融循环以确保细胞完全裂解。裂解后, 将红细胞裂解物用PBS稀释至相当于4亿个细胞/mL。然后通过多重细胞因子检定分析这些裂解物和血浆样本 (未稀释)。利用两种多重检定。第一种是27-plex人细胞因子平板, 其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12 (p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α , 以及VEGF, 而第二种是21-plex人细胞因子平板, 其检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- α 2、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL (Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex, Bio-Rad)。根据制造商的说明, 进行该检定, 其中使用自动磁力清洗站 (BioPlex Pro II, Bio-Rad) 进行清洗步骤。在 Luminex® 200™ 系统 (Bio-Rad) 上运行该检定, 并收集荧光值。使用BioPlex管理软件 (版本5.0, Bio-Rad, 美国) 用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0326] 图23A-23VV显示来自参与者组的血浆和红细胞的裂解物 (4亿个细胞/mL) 中的指示蛋白质的浓度, 该浓度被计算回每mL全血的相对浓度 (大约 5×10^9 个细胞/mL)。使用学生T检验测定显著差异 ($p < 0.05$)。将健康 (未孕) 个体的血液中的蛋白质水平与肿瘤患者的该水平进行比较, 以及将健康的怀孕个体的蛋白质水平与患有先兆子痫的怀孕个体的该水平进行比较。图24A-24C显示了红细胞与血浆中蛋白质浓度之间的倍数差异。

[0327] 在蛋白质集合中, 健康对照个体中的蛋白质水平与患有疾病或紊乱的个体中的蛋白质水平之间存在显著差异。例如, 从肿瘤组采集的红细胞中的IL-2显著低于健康组 (大约1/10), 并且从先兆子痫组采集的红细胞中的趋化因子CTACK显著高于健康的怀孕组。另外, 48种细胞因子中的二十八种其RBC中的蛋白质水平基本上超过血浆水平 (大于2:1), 其中倍数变化范围为2:1至~280:1 (RBC:血浆比例)。RBC:血浆比例的中值是5.9:1。研究结果证实了, 红细胞可能是一种有用的鉴别疾病中生物标记物的工具。此外, 特别是在单独血浆中蛋白质水平没有明显差异, 而红细胞 (如bFGF) 中或红细胞与血浆之间有可识别的差异的情况下, 红细胞结合血浆的分析可提供更多关于目前无法知晓的疾病状态的信息。

[0328] 实施例13. 健康个体对比患有先兆子痫或癌症的个体中RBC中的蛋白质图谱以及RBC蛋白质的释放。

[0329] 评估健康个体和患有疾病或紊乱的个体中由红细胞释放的蛋白质水平。全血从四组人中采集, 包含: 1) 健康的志愿者, 2) 健康的孕妇, 3) 患有先兆子痫的孕妇, 以及4) 肿瘤患

者(表13)。

[0330] 表13.参与者总结

[0331]	对象	病症	相关信息
	OBS-101	淋巴瘤	化学疗法和放射疗法
	OBS-102	淋巴瘤	化学疗法
	OBS-103	癌症(具体类型未知)	化学疗法
	PE-001	先兆子痫	妊娠末三个月
	PE-002	先兆子痫	妊娠末三个月
	PE-003	先兆子痫	妊娠末三个月

[0332] 根据妊娠,将健康的怀孕对照样本与先兆子痫样本匹配。通过静脉穿刺($n \geq 3$)从每个志愿者处将血液直接采集到EDTA真空采血管(k_2 EDTA真空采血管, BD Biosciences)中。采集血液的所有级分并在采集后4小时内室温下处理。为了多重分析(BioPlex分析),所有样本都储存于 -80°C ,并于 -80°C 经受3次冻融循环以确保分析之前细胞完全裂解。

[0333] 如下使用葡聚糖沉淀分离红细胞。离心全血(1500g, 10分钟)并采集上部血浆层。将剩余的细胞沉淀物重悬于等体积的氯化钠(0.15M)中。然后将葡聚糖(含于0.15M氯化钠中6%w/v)以1:4的比例(葡聚糖:细胞悬浮液)加入到该细胞悬浮液中。将该溶液在室温下放置30分钟以使红细胞沉降至管的底部。此后,丢弃上部富含白细胞层并分离出下部红细胞级分。将该红细胞级分在磷酸盐缓冲盐水(PBS, 500g, 5分钟)中清洗两次,并对剩余的红细胞沉淀进行计数(Coulter Act Diff, Beckman Coulter)。然后将红细胞在PBS中稀释至4亿个细胞/mL,并于 37°C 和5% CO_2 条件下孵育24小时。孵育后,通过离心(500g, 5分钟)分离所得到的调理PBS。所有样本储存于 -80°C ,并于分析前经历3次冷冻/融化循环。然后通过多重细胞因子检定分析调理的PBS样本。利用两种多重检定。第一种是27-plex人细胞因子平板,其检定FGF碱性、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12(p70)、IL-13、IL-15、IL-17、IP-10、MCP-1、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、RANTES、TNF- α ,以及VEGF,而第二种是21-plex人细胞因子平板,其检定IL-1 α 、IL-2Ra、IL-3、IL-12、IL-16、IL-18、CTACK、GRO- α 、HGF、IFN- $\alpha 2$ 、LIF、MCP-3、M-CSF、MIF、MIG、 β -NGF、SCF、SCGF- β 、SDF-1 α 、TNF- β 、TRAIL(Bio-Plex Pro 27-plex和21-plex, Bio-Rad)。根据制造商的说明,进行该检定,其中使用自动磁力清洗站(BioPlex Pro II, Bio-Rad)进行清洗步骤。在Luminex®200™系统(Bio-Rad)上运行该检定,并收集荧光值。使用BioPlex管理软件(版本5.0, Bio-Rad, 美国)用5参数logistic曲线回归来分析每种细胞因子的校准曲线。

[0334] 图25A-25RR显示来自参与者组的红细胞调理的PBS中指示蛋白质的浓度。于 37°C 孵育红细胞24小时后制备了调理的PBS。使用学生T检验测定了显著差异($p < 0.05$)。健康对照个体与疾病组个体之间蛋白质水平存在显著差异。例如,与健康对照相比,从患有癌症的人中分离的红细胞释放的IL-1 α 和GCS-F显著较少,并且相比健康个体,从癌症患者中分离的红细胞释放的IL-12(p40)和Eotaxin显著较多。类似地,健康妊娠组和患有先兆子痫的组之间少许细胞因子(例如MIF)显著不同。

[0335] 结果表明了,对红细胞分泌物的分析可能是一种有用的鉴定和追踪疾病中生物标志物的诊断工具。对红细胞的分泌(红细胞蛋白释放)的分析可以提供关于疾病状态的额外

信息。

[0336] 实施例14.其他示例性的非限制性实施方式

[0337] 以下实施例描述了所要求保护的主题的某些实施方式,根据该实施例,所要求保护的主题的其他优点将变得显而易见。

[0338] 1.一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

[0339] a.)获取血液样本;

[0340] b.)使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;以及

[0341] c.)检测小体积的该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在,其中该小体积是5 μ L至100 μ L,

[0342] 其中所产生的蛋白质图谱包括该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质;

[0343] 其中该方法进一步包括测量该富含红细胞的样本中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测得的一种或多种蛋白质;

[0344] 其中该方法进一步包括在检测该一种或多种蛋白质的存在或测量其水平之前,使该富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触,其中该阳离子盐增加该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的可检测水平。

[0345] 2.一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

[0346] a.)获取血液样本;

[0347] b.)使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;

[0348] c.)使该富含红细胞的样本与至少一种阳离子盐接触,其中该阳离子盐增加该富含红细胞样本中一种或多种蛋白质的可检测水平;以及

[0349] d.)检测小体积的该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在,其中该小体积是5 μ L至100 μ L,

[0350] 其中所产生的蛋白质图谱包括该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质;

[0351] 其中该至少一种阳离子盐的阳离子是金属离子或铵离子;

[0352] 其中该至少一种阳离子盐选自钠盐、钾盐、镁盐、锂盐、铷盐、铯盐、铁盐、钆盐、吡啶盐及其组合;

[0353] 其中该至少一种阳离子盐是选自氯化钠、氯化钾、氯化铷、氯化铯、氯化锂及其组合的氯化物盐;

[0354] 其中该至少一种阳离子盐是选自碳酸钠、碳酸钾、碳酸铷、碳酸铯、碳酸锂及其组合的碳酸盐;

[0355] 其中该至少一种阳离子盐是铵盐;

[0356] 其中该铵盐选自碳酸铵、氯化铵、硝酸铵及其组合。

[0357] 3.一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

[0358] a.)获取血液样本;

[0359] b.)使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;

[0360] c.)分离该富含红细胞的样本中的红细胞和血浆;

[0361] d.) 测量该红细胞中的一种或多种蛋白质的水平和该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平;以及

[0362] e.) 计算蛋白质比率,该蛋白质比率包括该红细胞中的该一种或多种蛋白质的水平与该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平的比率,

[0363] 其中所产生的蛋白质图谱包括具有至少2:1的蛋白质比率的一种或多种蛋白质;

[0364] 其中测量来自该富含红细胞的样本的小体积中该红细胞和该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平;

[0365] 其中该蛋白质比率选自至少10:1、至少20:1、至少30:1、至少40:1、至少50:1、至少60:1、至少70:1、至少80:1、至少90:1、至少100:1、至少110:1、至少120:1、至少130:1、至少140:1、至少150:1、至少160:1、至少170:1、至少180:1、至少190:1,以及至少200:1。

[0366] 其中该蛋白质比率选自至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1,以及至少10:1。

[0367] 4. 一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

[0368] a.) 获取血液样本;

[0369] b.) 使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;

[0370] c.) 分离该富含红细胞的样本中的红细胞和血浆;

[0371] d.) 使该红细胞与阳离子盐接触,其中至少一种该阳离子盐增加该红细胞中一种或多种蛋白质的可检测水平;

[0372] e.) 在小体积的该富含红细胞的样本中测量该红细胞中的一种或多种蛋白质的水平和该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平;以及

[0373] f.) 计算蛋白质比率,该蛋白质比率包括该红细胞中的该一种或多种蛋白质的水平与该血浆中的该一种或多种蛋白质的水平的比率,

[0374] 其中所产生的蛋白质图谱包括具有至少2:1的蛋白质比率的一种或多种蛋白质;

[0375] 其中该蛋白质比率选自至少10:1、至少20:1、至少30:1、至少40:1、至少50:1、至少60:1、至少70:1、至少80:1、至少90:1、至少100:1、至少110:1、至少120:1、至少130:1、至少140:1、至少150:1、至少160:1、至少170:1、至少180:1、至少190:1,以及至少200:1。

[0376] 其中该蛋白质比率选自至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1,以及至少10:1。

[0377] 5. 一种产生蛋白质图谱的方法,其包括:

[0378] a.) 获取血液样本;

[0379] b.) 使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;

[0380] c.) 将该富含红细胞的样本中的红细胞在培养基中孵育;以及

[0381] d.) 检测该培养基中的一种或多种蛋白质,

[0382] 其中所产生的蛋白质图谱包括在该培养基中检测到的一种或多种蛋白质;

[0383] 其中该方法进一步包括测量在该培养基中检测到的该一种或多种蛋白质的水平,其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测量的一种或多种蛋白质;

[0384] 其中该培养基是选自如下一种或多种:等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、汉克氏平衡盐溶液(HBSS)和/或厄尔氏平衡盐溶液(EBSS)、罗斯威尔公园纪念研究所培养基(RPMI)、最小必需培养基(MEM)、改良最小必需培养基(IMEM)、伊格尔氏最

小必需培养基 (EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (DMEM) ; 和/或伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基 (IMDM) 。

[0385] 6. 一种产生蛋白质图谱的方法, 其包括:

[0386] a.) 获取血液样本;

[0387] b.) 使该血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本;

[0388] c.) 将该富含红细胞的样本中的红细胞在培养基中孵育, 其中该培养基含有提高该富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的可检测水平的阳离子盐; 以及

[0389] d.) 检测该培养基中的一种或多种蛋白质,

[0390] 其中所产生的蛋白质图谱包括在该培养基中检测到的一种或多种蛋白质;

[0391] 其中该方法进一步包括测量在该培养基中检测到的该一种或多种蛋白质的水平, 其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测量的一种或多种蛋白质;

[0392] 其中该培养基是选自如下一种或多种: 等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、汉克氏平衡盐溶液 (HBSS) 和/或厄尔氏平衡盐溶液 (EBSS)、罗斯威尔公园纪念研究所培养基 (RPMI)、最小必需培养基 (MEM)、改良最小必需培养基 (IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基 (EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (DMEM) ; 和/或伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基 (IMDM) 。

[0393] 7. 一种产生蛋白质图谱的方法, 其包括:

[0394] a.) 获取小体积血液样本;

[0395] b.) 将该小体积血液样本的至少一部分进行白细胞消耗以产生富含红细胞的样本; 以及

[0396] c.) 检测该富含红细胞的样本中的一种或多种蛋白质,

[0397] 其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中检测到的一种或多种蛋白质;

[0398] 其中该方法进一步包括测量在该富含红细胞的样本中检测到的该一种或多种蛋白质的水平, 其中所产生的蛋白质图谱包括在该富含红细胞的样本中测量的一种或多种蛋白质;

[0399] 其中该小体积血液样本是 5 μ L 至 100 μ L;

[0400] 其中该小体积血液样本是 5 μ L 至 20 μ L;

[0401] 其中该血液样本从对象中获取;

[0402] 其中该对象是人类或非人类动物;

[0403] 其中该小体积血液样本从指部、脚后跟、耳部或尾部处获取;

[0404] 其中该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺或耳部针刺获取;

[0405] 其中该对象是人类;

[0406] 其中该小体积血液样本从指部、脚后跟或耳部处获取;

[0407] 其中该小体积血液样本通过指部针刺、脚后跟针刺、耳部针刺或尾部针刺获取;

[0408] 其中该对象是选自小鼠、大鼠、仓鼠、雪貂、沙鼠、兔、猴、黑猩猩、马、小马、驴、绵羊、猪、鸡、山羊、猫和狗的非人类动物;

[0409] 其中该小体积血液样本通过尾部针刺或耳部针刺获取;

[0410] 其中获取该小体积血液样本若干次, 该若干次选自以下: 每天一次或更多次, 每天

两次或更多次,每天三次或更多次,每天四次或更多次,以及每天五次或更多次;

[0411] 其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:每周一次或更多次,每周两次或更多次,每周三次或更多次,每周四次或更多次,每周五次或更多次,每周六次或更多次,以及每周七次或更多次;

[0412] 其中每天获取该小体积血液样本;

[0413] 其中获取该小体积血液样本若干次,该若干次选自以下:一周一次,每两周一次,每三周一次,以及每四周一次;

[0414] 其中每月一次获取该小体积血液样本。

[0415] 8. 一种产生病蛋白质图谱的方法,其包括:

[0416] a.) 从以下获取根据上述实施例中的一或多项所产生的至少一种蛋白质图谱:

[0417] (i) 患有疾病或紊乱的对象,以及

[0418] (ii) 未患有该疾病或紊乱的至少一个对象;以及

[0419] b.) 将患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱与未患有该疾病或紊乱的该至少一个对象的该蛋白质图谱进行比较,

[0420] 其中所产生的病蛋白质图谱包括一种或多种蛋白质,相比未患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱,在来自患有该疾病或紊乱的该对象的该蛋白质图谱中,该一种或多种蛋白质具有不同的存在或水平;

[0421] 其中该疾病或紊乱是癌症;

[0422] 其中该病蛋白质图谱是包括选自IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、TNF- α 、TGF- β ,以及IFN- γ 的一种或多种蛋白质的癌症蛋白质图谱;

[0423] 其中该疾病或紊乱是先兆子痫;

[0424] 其中该病图谱是包括选自TNF- α 、IFN- γ 、IL-4、IL-5、IL-10、IL-1 β 、IL-6、IL-8,以及IL-12的一种或多种蛋白质的先兆子痫蛋白质图谱;

[0425] 其中该先兆子痫蛋白质图谱包括选自IL-6、IL-8和IFN- γ 的一种或多种蛋白质。

[0426] 9. 一种用于确定对象是否患有疾病或紊乱的方法,其包括:

[0427] a.) 获取根据上述实施例中的一或多项产生的该对象的蛋白质图谱;以及

[0428] b.) 将该对象的该蛋白质图谱与病蛋白质图谱相比较,

[0429] 其中该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或水平与该病蛋白质图谱中该一种或多种蛋白质的存在或水平相比较的相似性表明该对象患有该疾病或紊乱;

[0430] 其中该疾病或紊乱选自癌症、先兆子痫、自身免疫疾病、心血管疾病、神经变性疾病、糖尿病、代谢紊乱、肌肉骨骼疾病、传染病、遗传紊乱、肾功能紊乱,以及胃肠功能紊乱。

[0431] 10. 一种监测对象治疗的方法,其包括:

[0432] a.) 在治疗前和治疗后从对象中获取根据上述实施例中的一或多项所产生的蛋白质图谱;以及

[0433] b.) 将治疗前该对象的该蛋白质图谱与治疗后该对象的该蛋白质图谱相比较,

[0434] 其中与治疗前该对象的该蛋白质图谱相比,在治疗前该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或水平的差异表明该治疗对该患者有效;

[0435] 其中将没有接受治疗的对象的该蛋白质图谱与接受治疗后的该对象的该蛋白质图谱相比较;

- [0436] 其中将治疗后对象的在一个时间点的至少一种蛋白质图谱与治疗后的该对象的在不同时间点的至少一种蛋白质图谱相比较；
- [0437] 其中该对象已经接受相同的治疗；
- [0438] 其中该对象已经接受了不同的治疗；
- [0439] 其中该血液样本是小体积血液样本；
- [0440] 其中监测该对象若干次，该若干次选自以下：每天一次或更多次，每天两次或更多次，每天三次或更多次，每天四次或更多次，以及每天五次或更多次；
- [0441] 其中监测该对象若干次，该若干次选自以下：每周一次或更多次，每周两次或更多次，每周三次或更多次，每周四次或更多次，每周五次或更多次，每周六次或更多次，以及每周七次或更多次；
- [0442] 其中每天监测该对象；
- [0443] 其中监测该对象若干次，该若干次选自以下：一周一次，每两周一次，每三周一次，以及每四周一次；
- [0444] 其中每月一次监测该对象。
- [0445] 11. 一种确定治疗有效性的方法，其包括：
- [0446] a.) 从以下获取根据上述实施例中的一项或多项所产生的至少一种蛋白质图谱：
- [0447] (i) 已经经历该治疗的对象，以及
- [0448] (ii) 未经历该治疗的对象；以及
- [0449] b.) 将已经经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱与未经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱相比较，
- [0450] 其中相比未经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱，已经经历该治疗的该对象的该蛋白质图谱中一种或多种蛋白质的存在或水平的相似性表明了该治疗的有效性。
- [0451] 12. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该血液样从对象中获取。
- [0452] 13. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该血液样本从该对象的毛细血管或该对象的静脉中获取。
- [0453] 14. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该对象是人类或非人类动物。
- [0454] 15. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该对象是人类。
- [0455] 16. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该小体积的该富含红细胞的样本是5 μ L至20 μ L。
- [0456] 17. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中该小体积的该富含红细胞的样本是5 μ L。
- [0457] 18. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中使用一种或多种抗体检测该一种或多种蛋白质的存在或测量该一种或多种蛋白质的水平。
- [0458] 19. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中检测该富含红细胞的样本中三种或更多种蛋白质的存在或者测量三种或更多种蛋白质的水平。
- [0459] 20. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中检测该富含红细胞的样本中五种或更多种蛋白质的存在或测量五种或更多种蛋白质的水平。
- [0460] 21. 上述实施例中的一项或多项所述的方法，其中检测该富含红细胞的样本中十种或更多种蛋白质的存在或者测量十种或更多种蛋白质的水平。

[0461] 22. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中检测该富含红细胞的样本中二十种或更多种蛋白质的存在或者测量二十种或更多种蛋白质的水平。

[0462] 23. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中检测该富含红细胞的样本中三十种或更多种蛋白质的存在或者测量三十种或更多种蛋白质的水平。

[0463] 24. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该一种或多种蛋白质选自趋化因子、细胞因子、生长因子、受体、细胞内信号递质、激素、核转录因子、神经递质, 以及细胞外基质组分, 以及酶。

[0464] 25. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该一种或多种蛋白质选自表1中列出的蛋白质或表2中列出的蛋白质的组合。

[0465] 26. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该一种或多种蛋白质选自碱性 FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF、CRP, 以及 DDT。

[0466] 27. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该血液样本通过选自流式细胞术、磁珠分离、离心、纤维素柱, 以及葡聚糖沉降的一种或多种方法进行白细胞消耗。

[0467] 28. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该红细胞通过葡聚糖沉降进行白细胞消耗。

[0468] 29. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该一种或多种蛋白质从选自以下的一个或多个位置处检测或测量: 该红细胞的表面、红细胞的内部、红细胞的裂解物、该红细胞的上清液、含有该红细胞的培养基, 以及先前含有该红细胞的培养基。

[0469] 30. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其中该对象患有疾病或紊乱。

[0470] 31. 一种用于增加血液样本中一种或多种蛋白质的检测或测量的准确性的方法, 其包括:

[0471] a.) 使该血液样本与葡聚糖接触;

[0472] b.) 允许该血液样本形成含白细胞层和红细胞致密层;

[0473] c.) 分离该红细胞致密层中的红细胞以创建富含红细胞的血液样本; 以及

[0474] d.) 检测该富含红细胞的血液样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平,

[0475] 其中该血液样本是小体积血液样本;

[0476] 其中该小体积血液样本在5 μ L和100 μ L之间。

[0477] 其中该血液样本中血液与葡聚糖的比率选自如下: 1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1, 以及10:1;

[0478] 其中该血液样本中白细胞和血小板的平均消耗率是85%至99%。

[0479] 32. 一种用于测量血液样本的蛋白质图谱的试剂盒, 其包括:

[0480] a.) 用以使血液样本进行白细胞消耗并产生富含红细胞的样本的至少一种试剂; 以及

[0481] b.) 用以检测小体积富含红细胞的样本中一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的至少一种试剂,

[0482] 其中阳离子盐增加该血液样本中一种或多种蛋白质的可检测水平;

- [0483] 其中该方法进一步包括用以从对象中获取血液样本的至少一种试剂；
- [0484] 其中用以检测一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的该试剂是一种或多种抗体；
- [0485] 其中用以检测一种或多种蛋白质的存在或测量其水平的该试剂是酶联免疫吸附测定 (ELISA) 装置。
- [0486] 33. 一种用于由获自对象的血液样本或该血液样本的组分产生蛋白质图谱的方法, 该方法包括
- [0487] a.) 测定该血液样本或该血液样本组分中的一种或多种蛋白质的水平,
- [0488] b.) 其中该血液样本和该血液样本组分各自包括红细胞 (RBC) 。
- [0489] 其中由该血液样本组分生成该蛋白质图谱；
- [0490] 其中该RBC构成该血液样本组分中存在的血细胞总数目的超过: 0.5%、1%、5%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97.5%、98%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%；
- [0491] 其中该血液样本组分是通过使该血液样本进行白细胞消耗而产生的富含RBC的级分；
- [0492] 其中该白细胞消耗从该血液样本或其部分中除去了白细胞数目的超过: 90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%；
- [0493] 其中该白细胞消耗提供了富含RBC的级分, 其中该级分中血细胞数目的超过: 99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%是RBC；
- [0494] 其中该血液样本或其部分经受血小板消耗；
- [0495] 其中该血小板消耗从该血液样本或其部分中除去了血小板数目的超过: 90%、92.5%、95%、97.5%、99%、99.5%、99.75%、99.9%或99.95%；
- [0496] 其中该一种或多种蛋白质选自如下: 碱性FGF、CTACK、Eotaxin、G-CSF、GM-CSF、HGF、IFN- α 2、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70、IL-13、IL-12p40、IL-15、IL-16、IL-17A、IL-18、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-2ra、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IP-10、LIF、M-CSF、MIG、MIP-1 α 、MIP-1 β 、PDGF-BB、SDF-1 α 、TNF- α 、TNF- β 、TRAIL、VEGF、CRP、DDT及其任意组合；
- [0497] 其中该一种或多种蛋白质包括如下或由其组成：
- [0498] a.) 表1中列出的蛋白质；或者
- [0499] b.) 表2中列出的蛋白质的组合。
- [0500] 34. 根据上述实施例中的一或多项的方法, 其包括如下一步或多步：
- [0501] a.) 测定该RBC的表面上的一种或多种蛋白质的水平；
- [0502] b.) 测定该RBC内的一种或多种蛋白质的水平；
- [0503] c.) 测定由该RBC释放的一种或多种蛋白质的水平，
- [0504] 其中该血液样本是干血斑样本 (DBS) 。
- [0505] 35. 根据上述实施例中的一或多项的方法, 其中生成该蛋白质图谱包括：
- [0506] a.) 由包括该RBC的细胞群产生细胞裂解物、细胞洗液或细胞上清液；以及
- [0507] b.) 测定该细胞裂解物、该细胞洗液或该细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平，
- [0508] 其中使用该细胞裂解物进行一种或多种蛋白质的水平的测定。

- [0509] 36. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其包括:
- [0510] a.) 速冻该RBC;
- [0511] b.) 融化该RBC以产生该细胞裂解物; 以及
- [0512] c.) 测定该细胞裂解物中的一种或多种蛋白质的水平,
- [0513] 其中使用该细胞洗液执行一种或多种蛋白质的水平的测定;
- [0514] 其中该细胞洗液通过合并两个或更多个细胞洗液来产生;
- [0515] 其中该细胞洗液使用包括以下一种或多种的洗液产生: 等渗盐溶液、平衡盐溶液、盐水、磷酸盐缓冲盐水 (PBS)、汉克氏平衡盐溶液 (HBSS) 和/或厄尔氏平衡盐溶液 (EBSS);
- [0516] 其中使用该细胞上清液执行一种或多种蛋白质的水平的测定;
- [0517] 其中通过在细胞培养基中培养用于产生该细胞上清液的细胞来产生该细胞上清液, 该细胞培养基包括以下一种或多种: 罗斯威尔公园纪念研究所培养基 (RPMI)、最小必需培养基 (MEM)、改良最小必需培养基 (IMEM)、伊格尔氏最小必需培养基 (EMEM)、达尔伯克氏改良伊格尔氏培养基 (DMEM); 和/或伊斯科夫氏改良达尔伯克氏培养基 (IDDM);
- [0518] 其中使用该细胞上清液的多个样本执行测定一种或多种蛋白质的水平的步骤;
- [0519] 其中在不同时间点从用于产生该细胞上清液的该细胞的培养物中提取该细胞上清液的该样本;
- [0520] 37. 上述实施例中的一项或多项所述的一种方法, 其包括:
- [0521] a.) 使该血液样本与抗凝血剂接触;
- [0522] b.) 测定从该RBC中分离的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平;
- [0523] 其中该方法进一步包括:
- [0524] i.) 速冻该白细胞;
- [0525] ii.) 融化该白细胞以产生白细胞裂解物; 以及
- [0526] iii.) 测定所融化的白细胞中的一种或多种蛋白质的水平,
- [0527] 其中该方法包括, 测定通过清洗和/或培养该白细胞生成的细胞洗液和/或细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。
- [0528] 38. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其包括:
- [0529] a.) 使该血液样本与抗凝血剂接触;
- [0530] b.) 测定从该RBC中分离的血小板中的一种或多种蛋白质的水平,
- [0531] 其中该方法进一步包括:
- [0532] i.) 速冻该血小板;
- [0533] ii.) 融化该血小板以产生血小板裂解物; 以及
- [0534] iii.) 测定所融化的血小板中的一种或多种蛋白质的水平;
- [0535] 其中该方法进一步包括测定通过清洗和/或培养该血小板生成的细胞洗液和/或细胞上清液中的一种或多种蛋白质的水平。
- [0536] 39. 上述实施例中的一项或多项所述的方法, 其包括:
- [0537] a.) 使该血液样本与抗凝血剂接触;
- [0538] b.) 测定从该RBC中分离的血浆中的一种或多种蛋白质的水平,
- [0539] 其中该速冻处于低于或等于如下的温度: -10°C 、 -20°C 、 -30°C 、 -40°C 、 -50°C 、 -60°C 、 -70°C 、 -75°C 、 -80°C 、 -100°C 、 -120°C 、 -140°C 、 -160°C 、 -180°C 、 -190°C 、 -195°C 或 -196°C

℃。

[0540] 40. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中该速冻和融化包括多个冻融循环。

[0541] 41. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中通过流式细胞术和/或葡聚糖沉降将白细胞从该RBC中分离。

[0542] 42. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中通过离心将血小板从该RBC中分离。

[0543] 43. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中该血液样本在采集期间已与血液稳定剂混合。

[0544] 44. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其进一步包括在测定一种或多种蛋白质的水平之前, 使从该对象中获取的该血液样本与血液稳定剂接触,

[0545] 其中该血液稳定剂是以下的一种或多种: 蛋白酶抑制剂、蛋白质变性剂、RNA稳定剂、抗凝血剂; 和/或抗凝血剂与另一种非抗凝血剂的稳定剂的组合;

[0546] 其中该血液稳定剂不是抗凝血剂;

[0547] 其中该血液稳定剂是选自以下的蛋白酶抑制剂: 抑肽酶、亮肽素、 α 2-巨球蛋白、抗痛素二盐酸盐、钙蛋白酶抑制剂I、钙蛋白酶抑制剂II、糜蛋白酶抑制素、TLCK (CAS 131918-97-3)、胰蛋白酶抑制剂、Pefabloc SC (Roche)、PMSF (C₆H₅CH₂SO₂F-Thermo Fisher Scientific)、完整蛋白酶抑制剂混合物 (Roche) 及其组合;

[0548] 其中该血液稳定剂是选自以下的抗凝血剂: 肝素、柠檬酸盐、枸橼酸葡萄糖、EDTA 及其组合;

[0549] 其中与该血液稳定剂接触的步骤在执行从该对象中获取该血液样本的步骤后以下时间之内执行: 5秒、10秒、20秒、30秒、1分钟、2分钟、3分钟、4分钟、5分钟、10分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、7.5小时或10小时;

[0550] 45. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中该血液样本从该对象的毛细血管中获取。

[0551] 46. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中该血液样本从该对象的静脉中获取。

[0552] 47. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其中测定一种或多种蛋白质的水平的步骤在获取该血液样本后以下时间之内执行: 2分钟、5分钟、10分钟、15分钟、20分钟、25分钟、30分钟、40分钟、50分钟、1小时、1.5小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、9小时、10小时、11小时、12小时、18小时、24小时、36小时或48小时。

[0553] 48. 上述实施例中的一或多项所述的方法, 其进一步包括从该对象中获取该血液样本的第一步骤。

[0554] 本领域的普通技术人员将认识到, 在不背离所广泛描述的本披露的精神或范围的情况下, 可以对具体实施方式中披露的本实施例进行多种变化和/或修改。因此, 本实施方式在所有方面都被认为是说明性的而非限制性的。

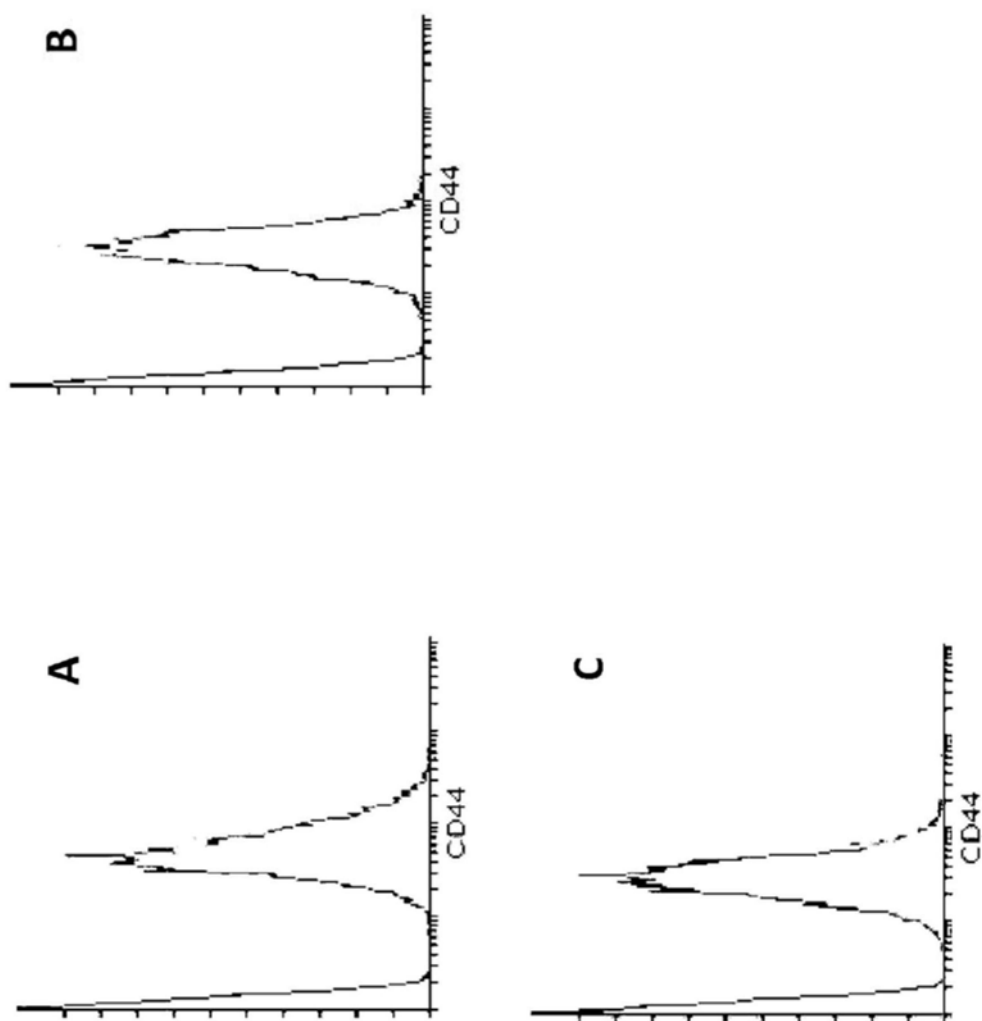


图1

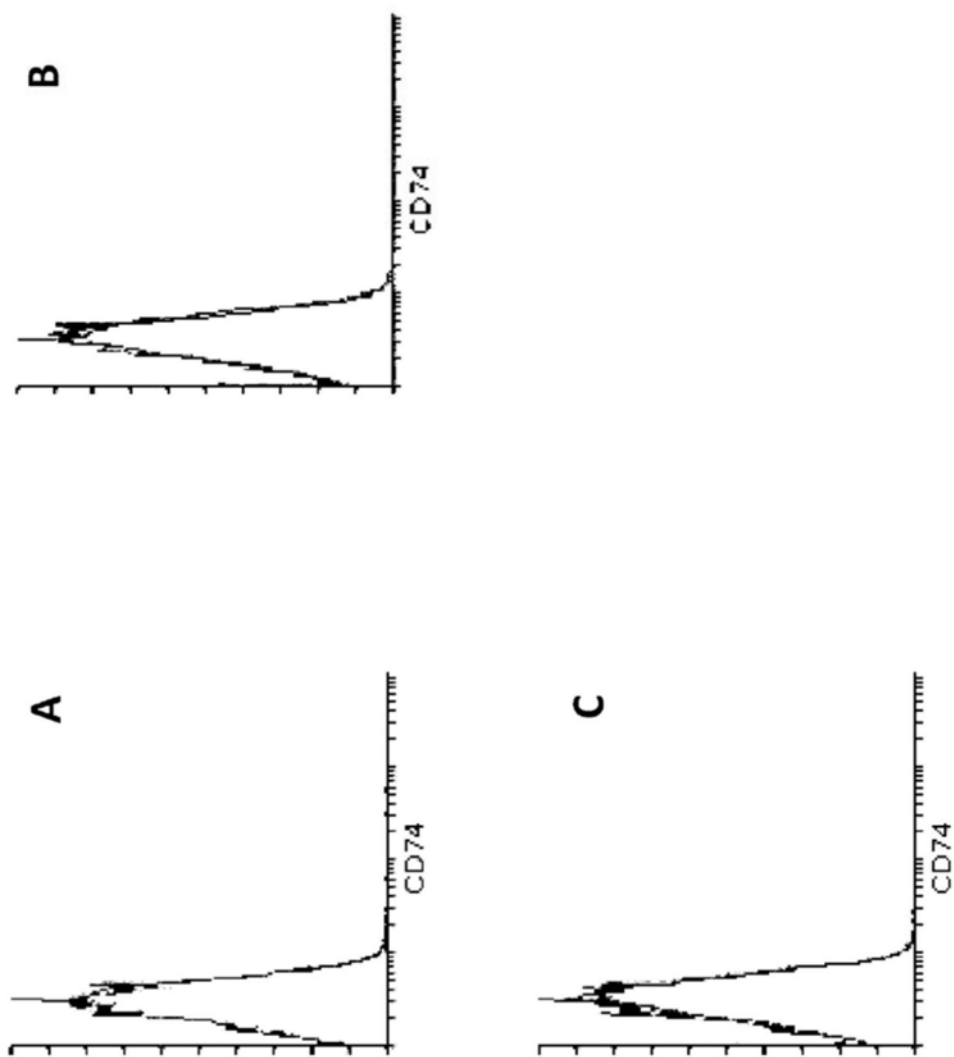


图2

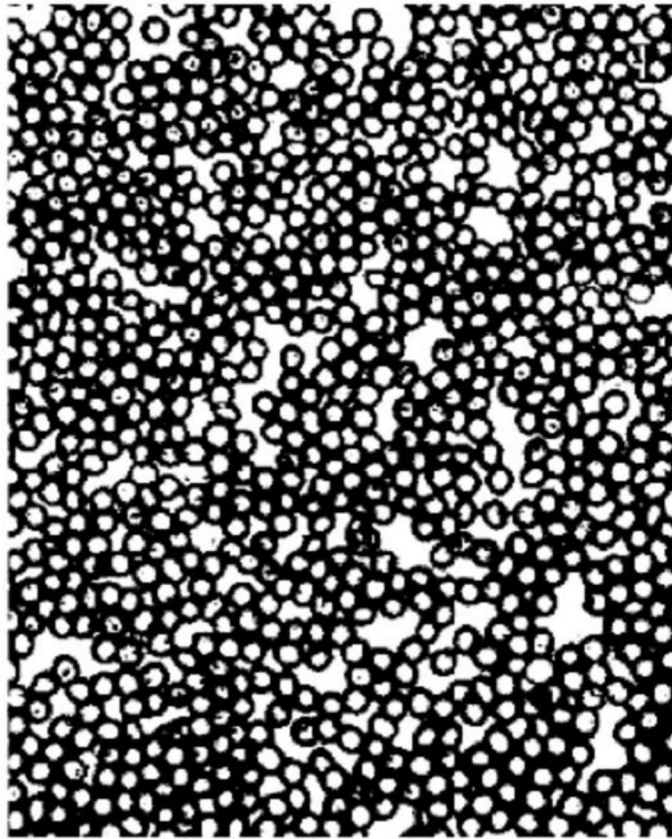


图3

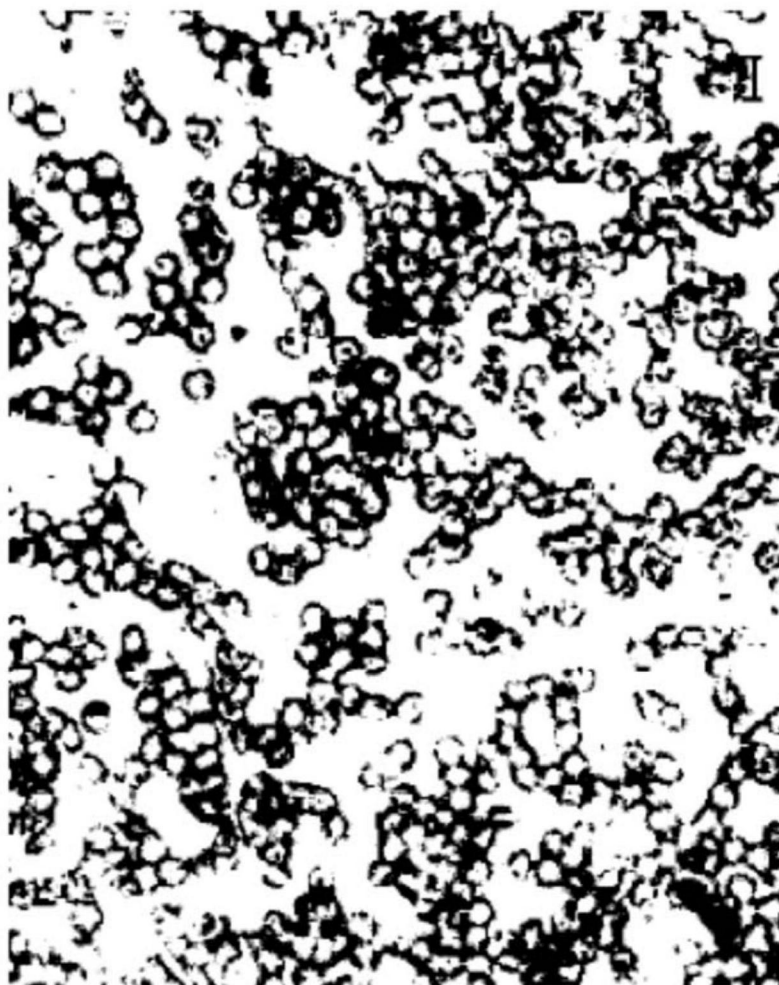


图4



图5



图6

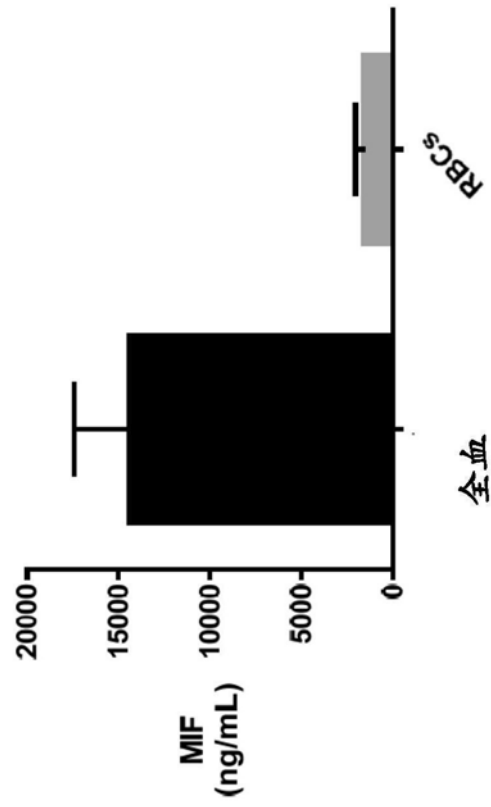


图7

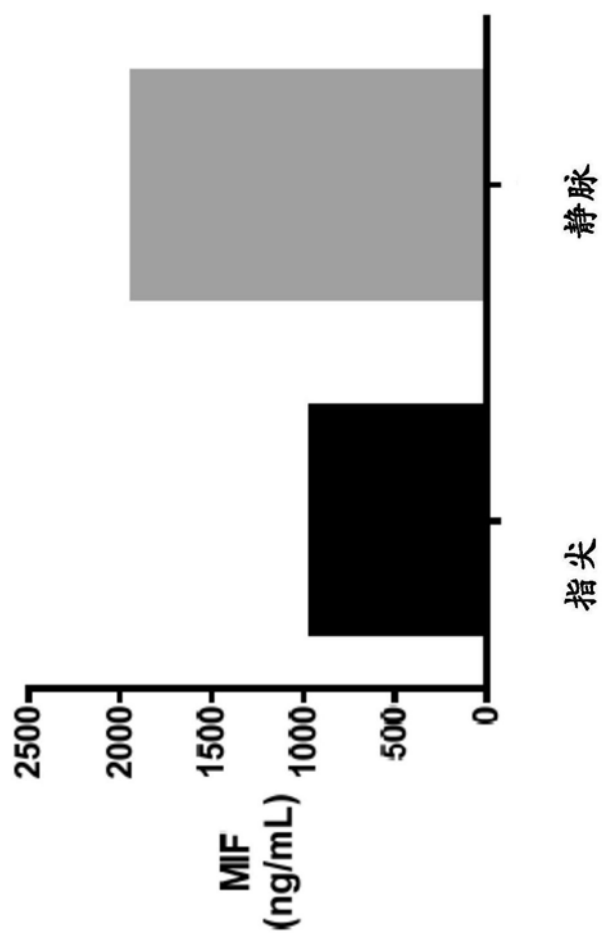


图8

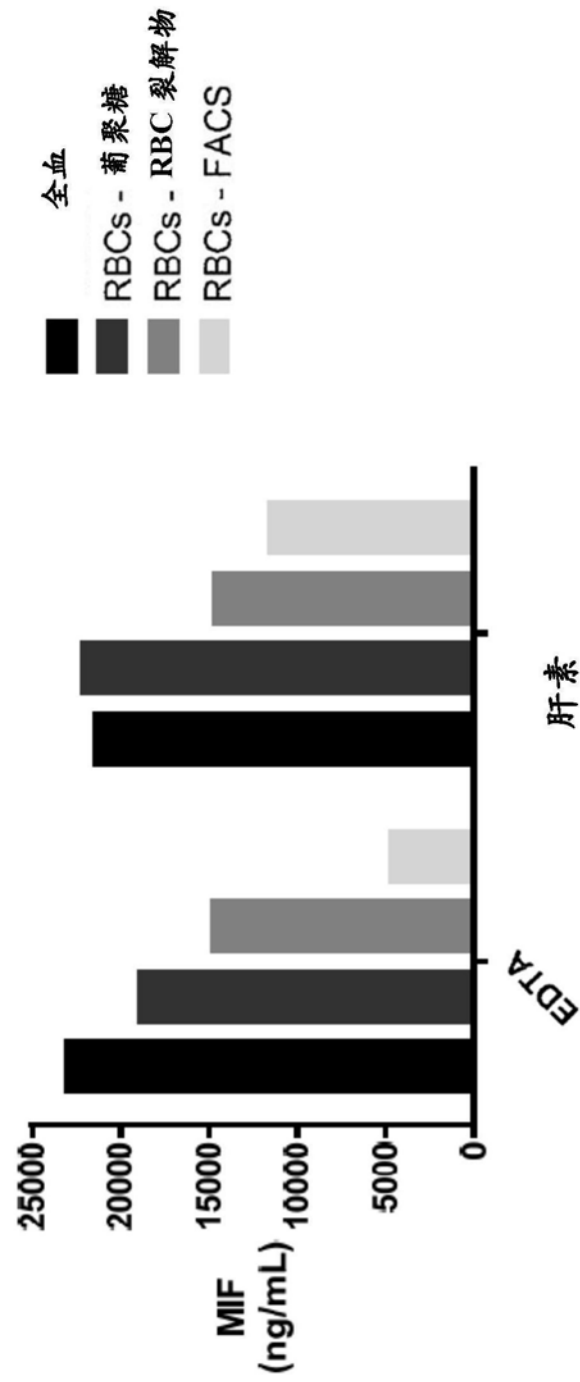


图9

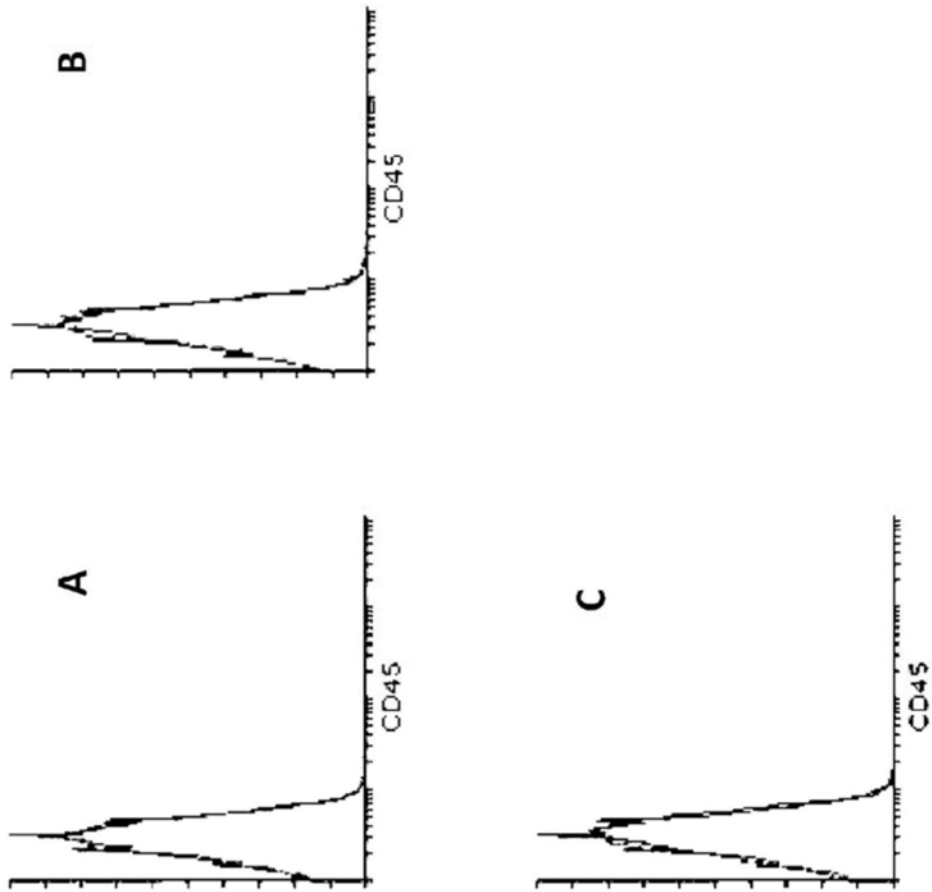
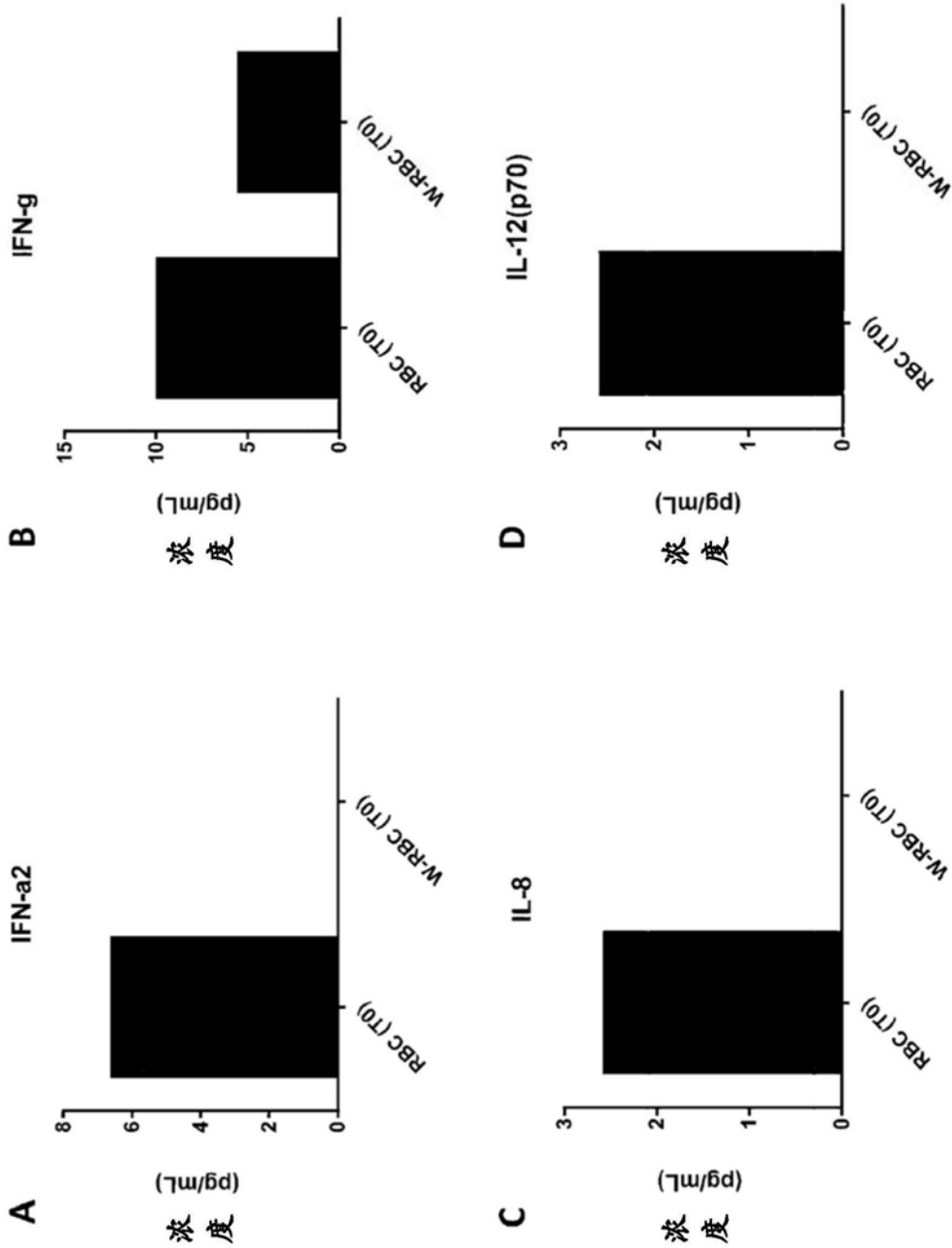
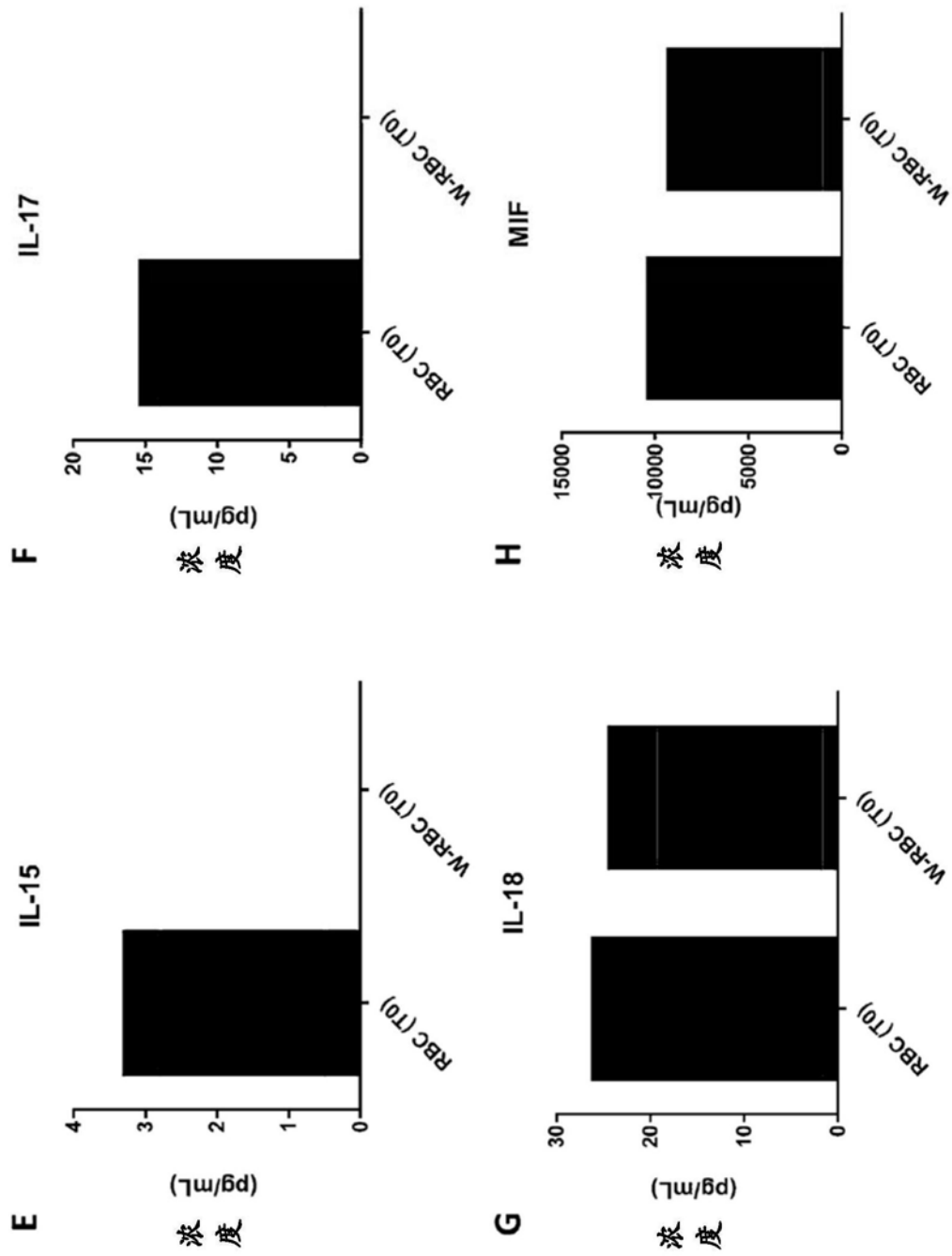
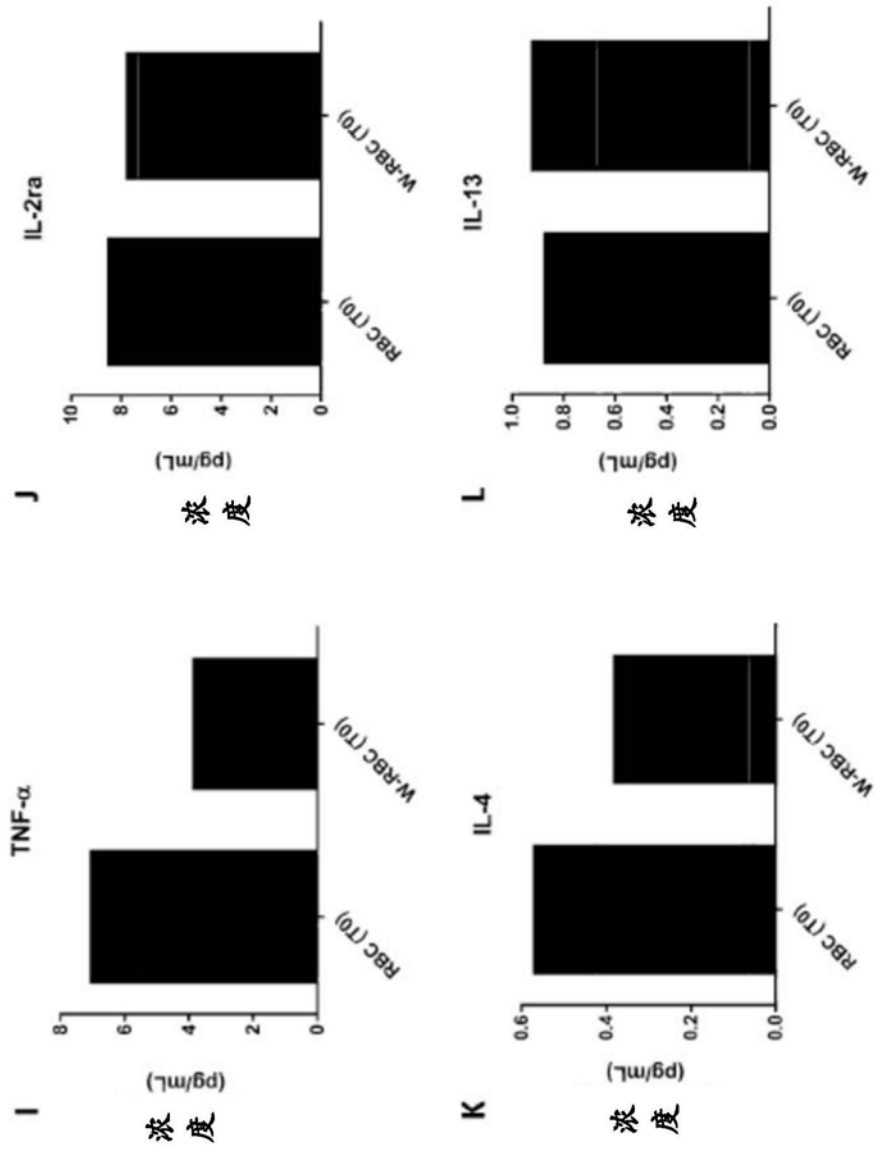
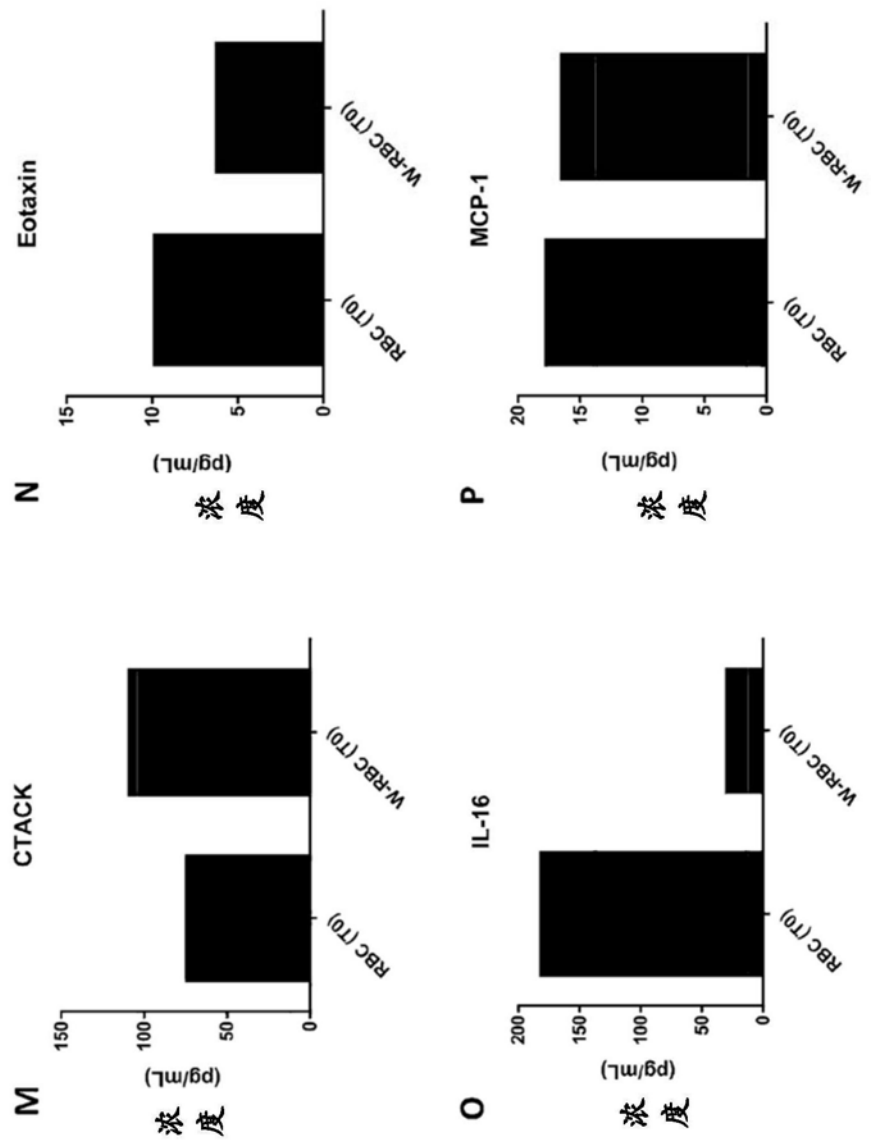


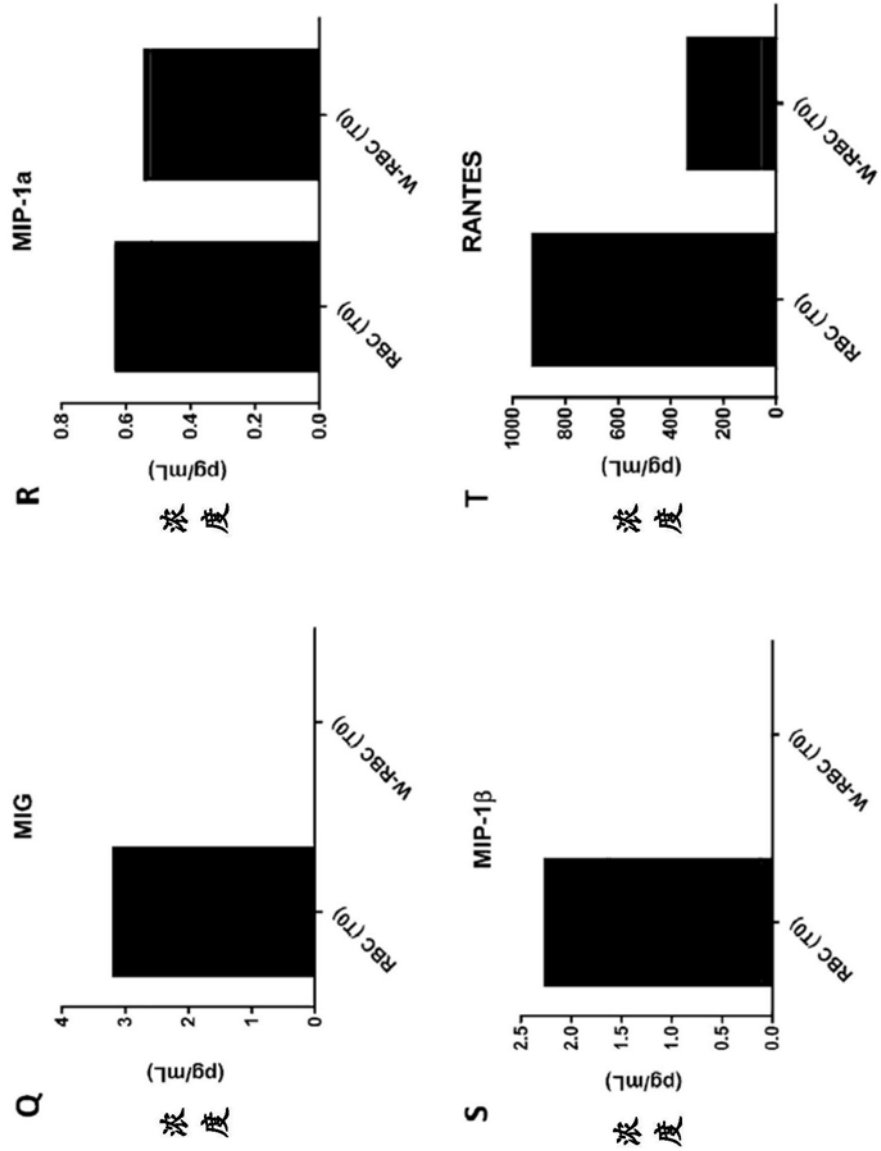
图10

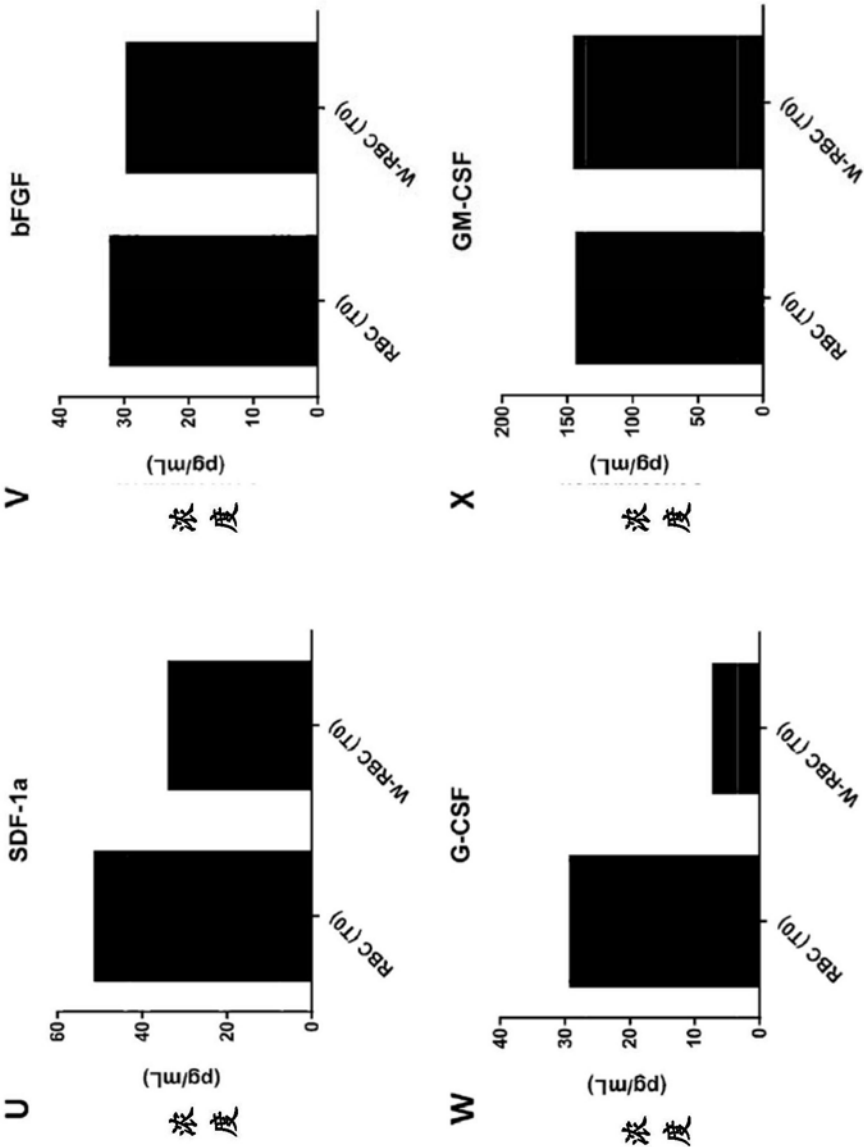


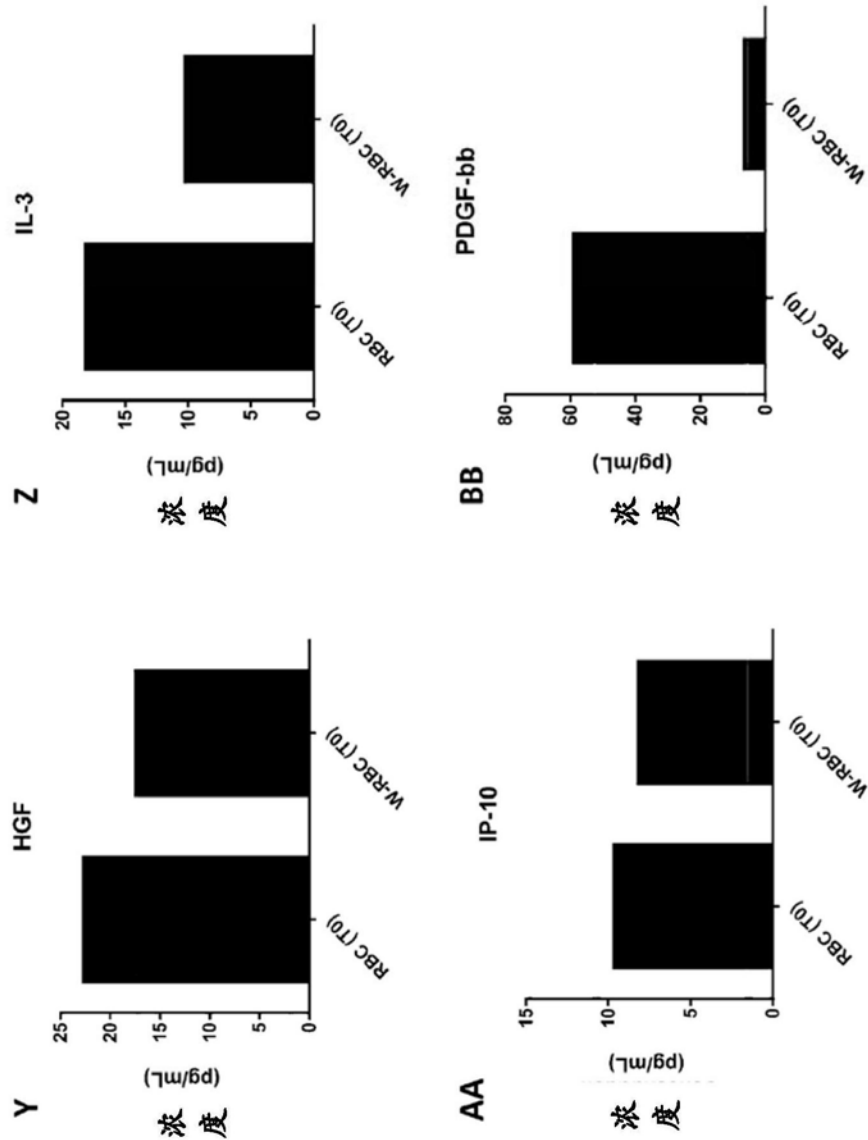


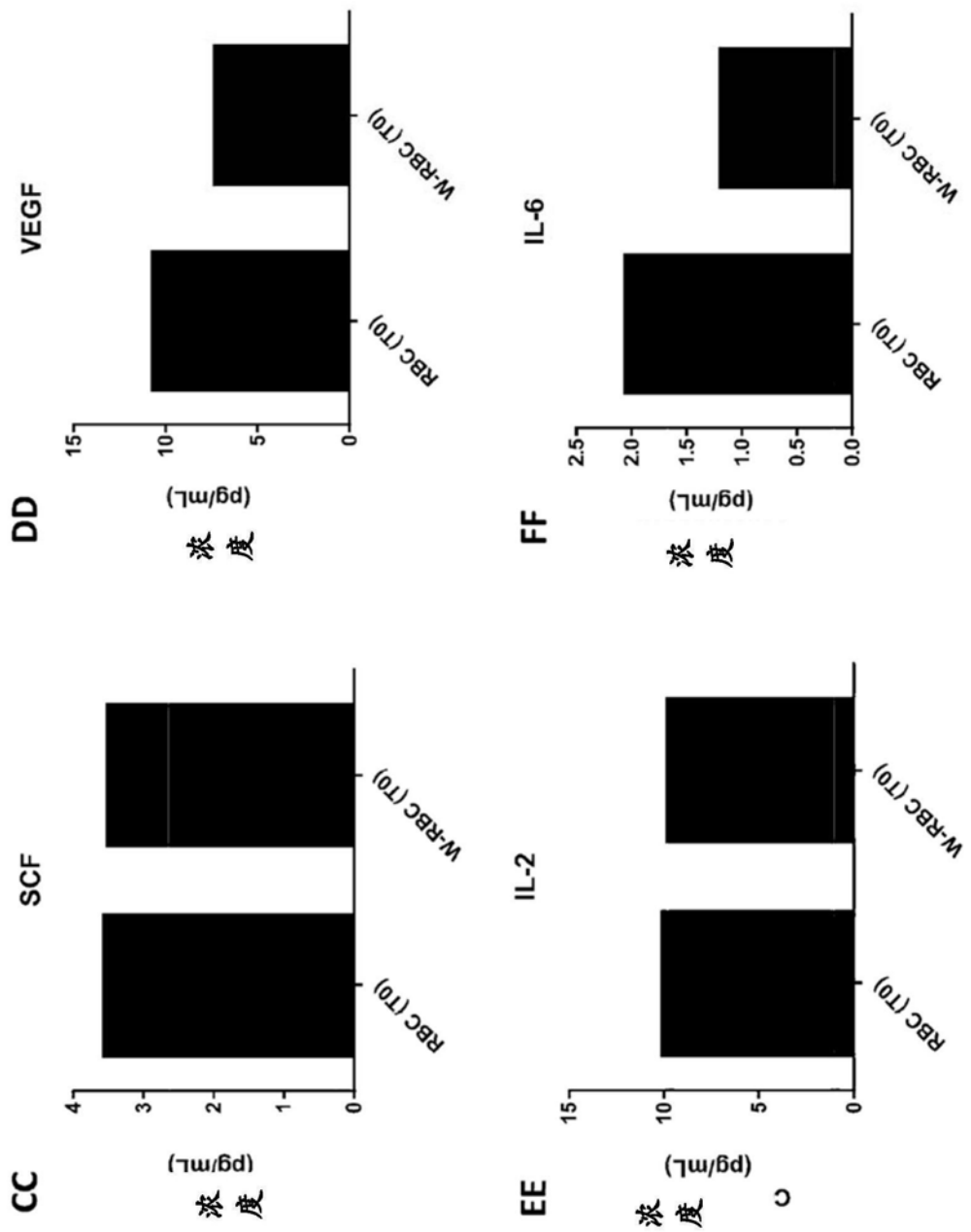












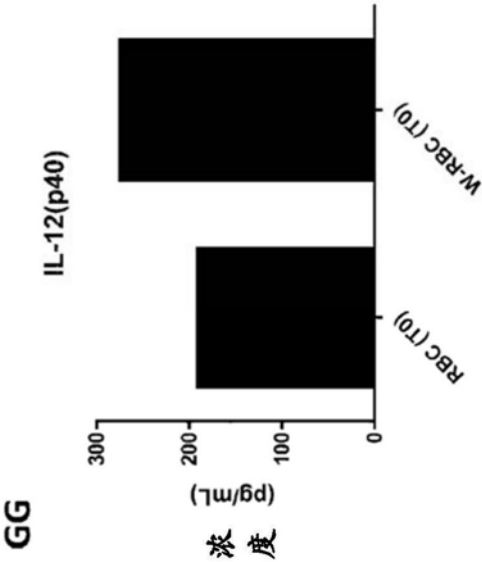


图11

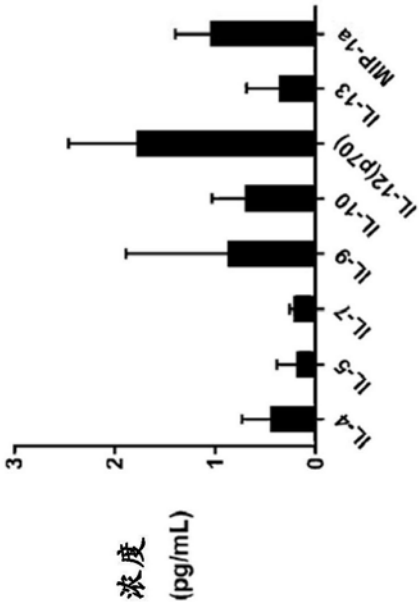


图12

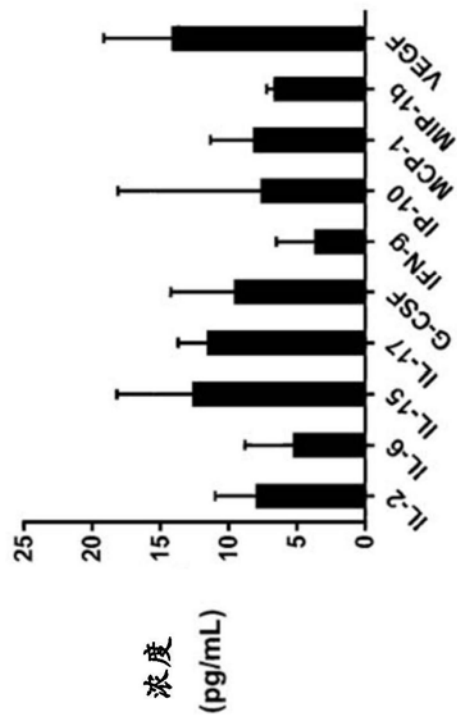


图13

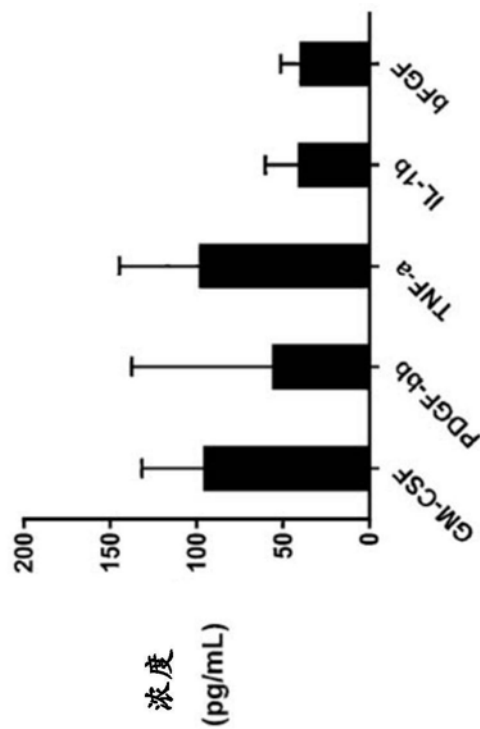


图14

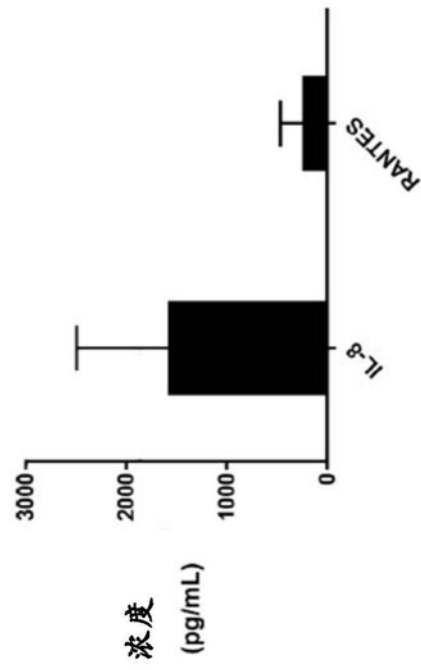
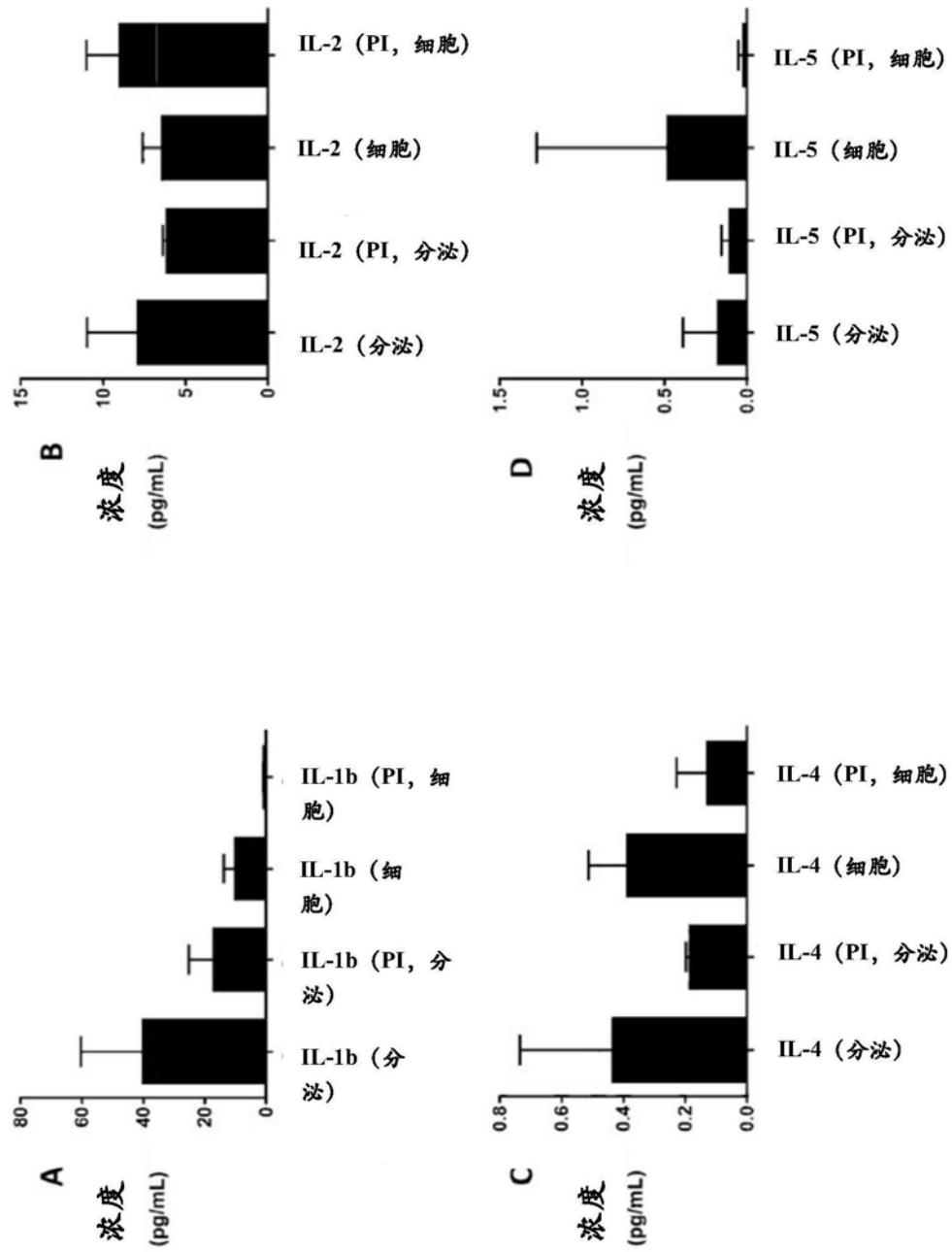
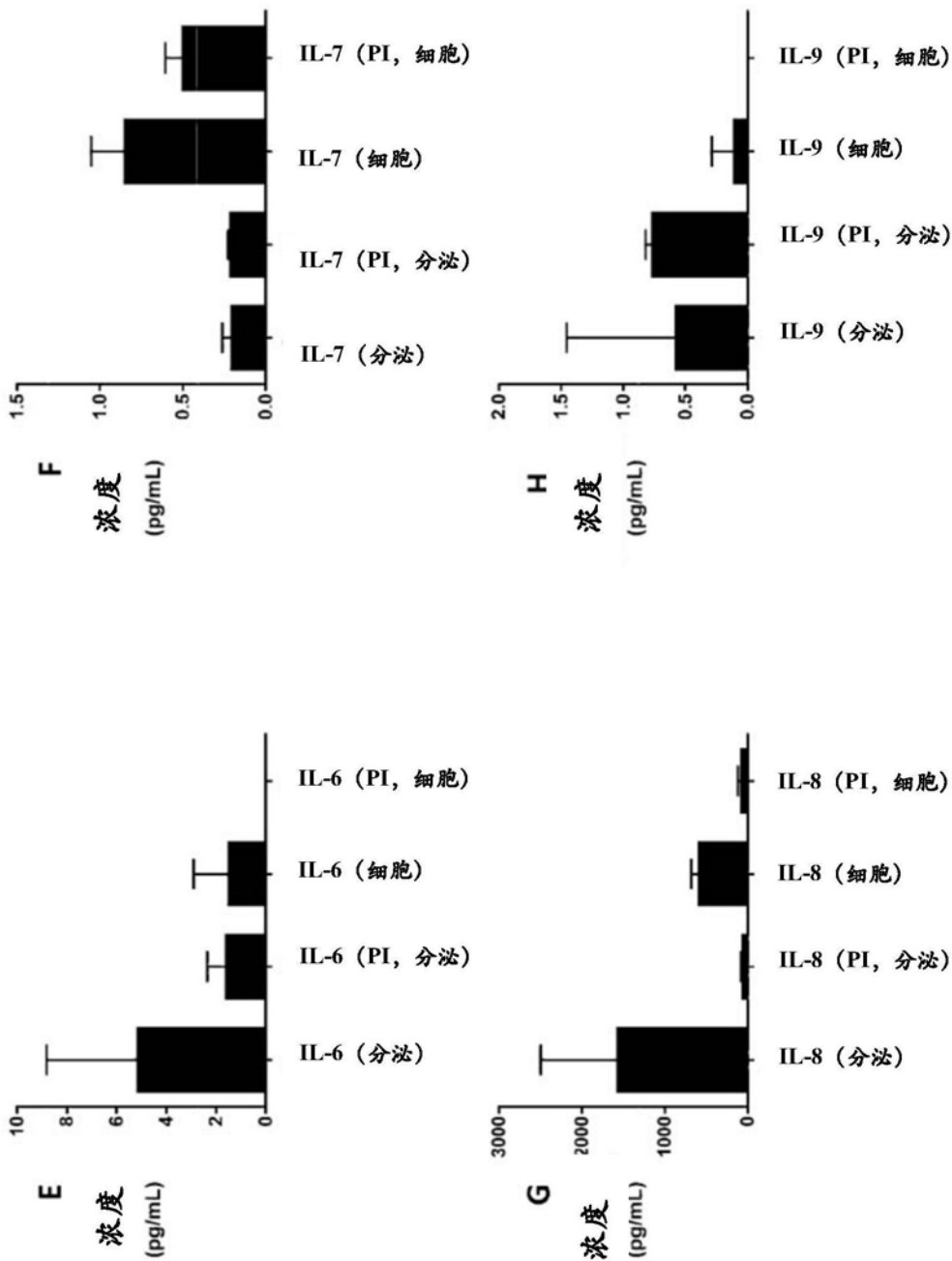
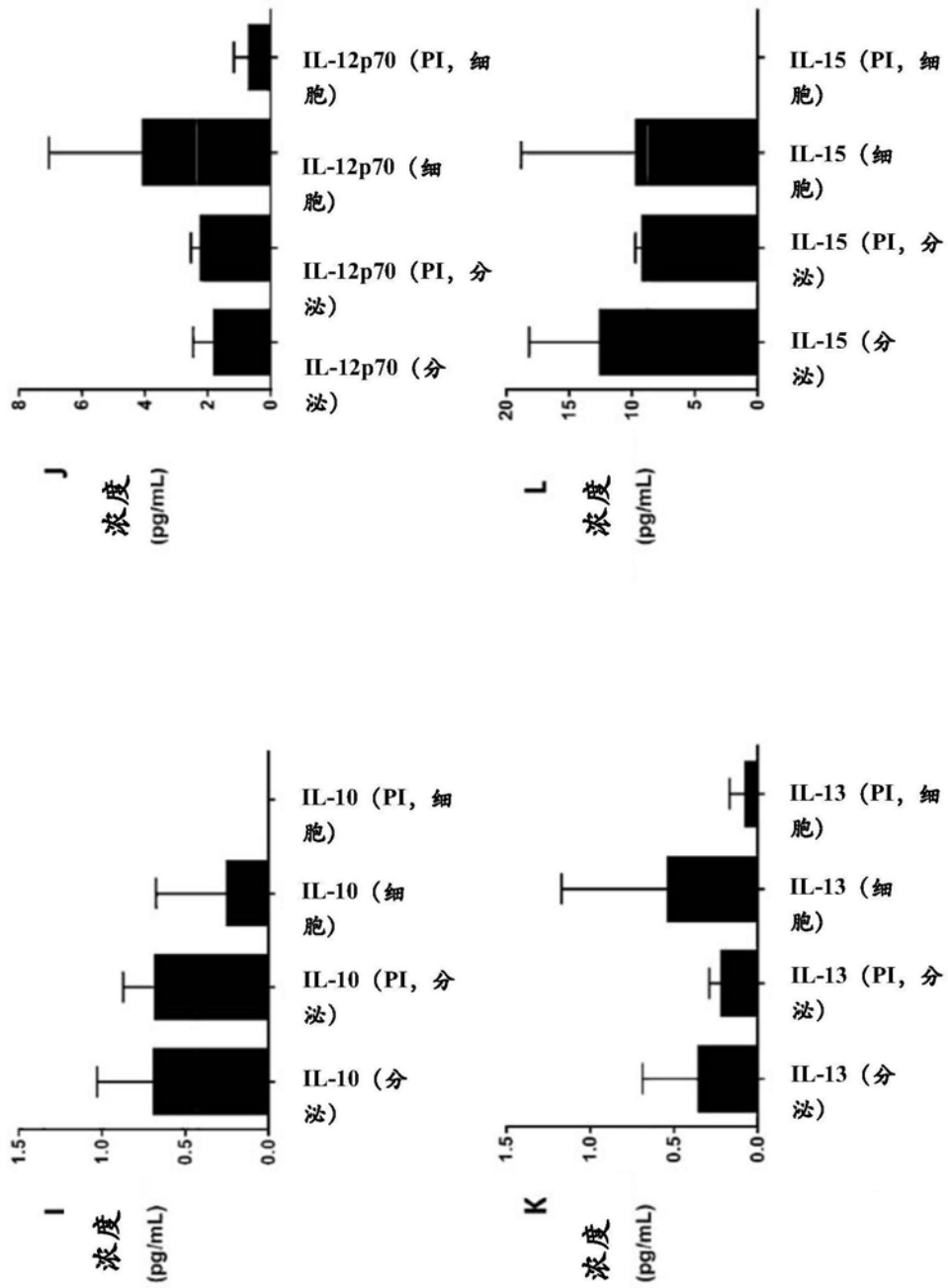
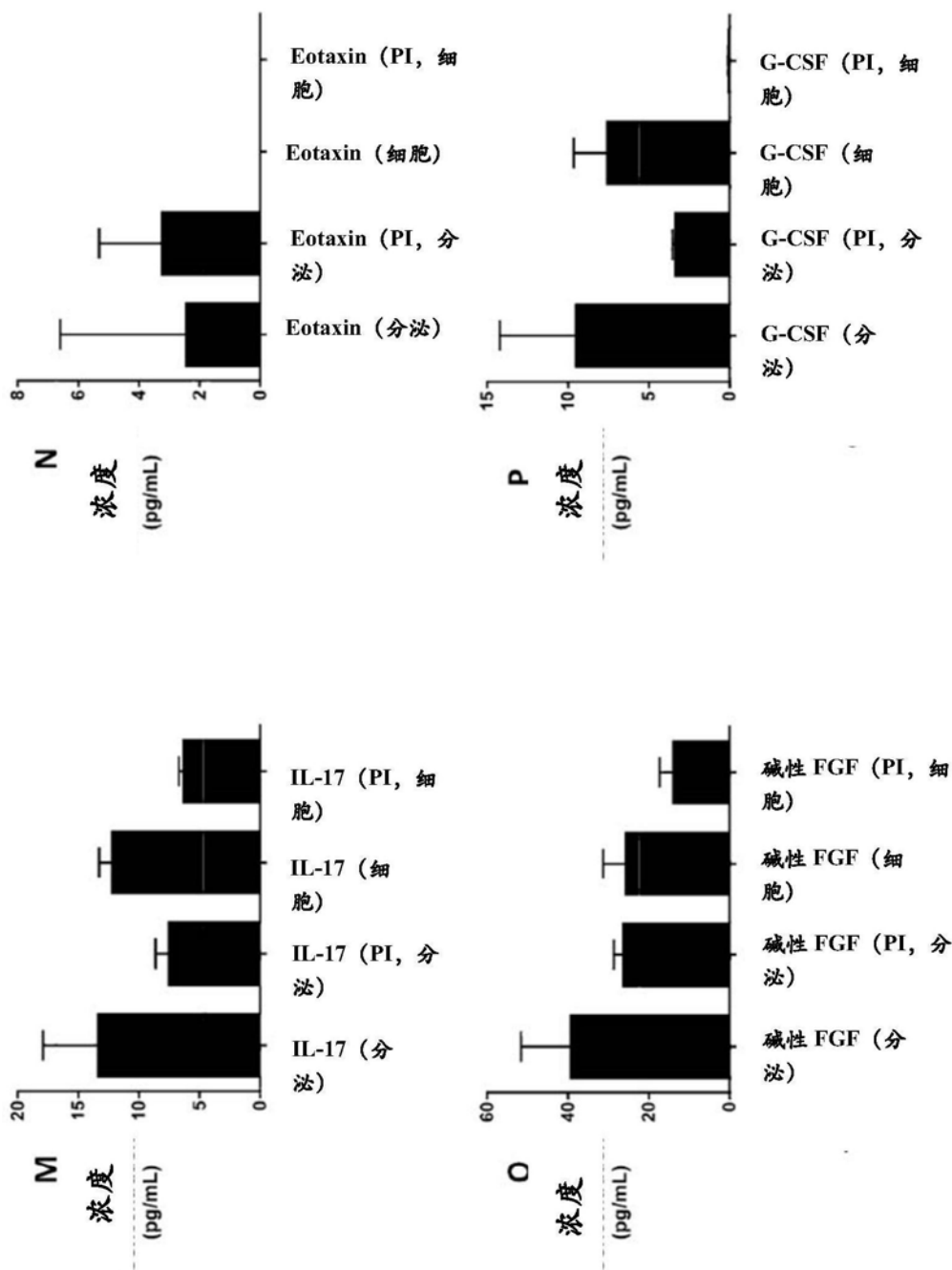


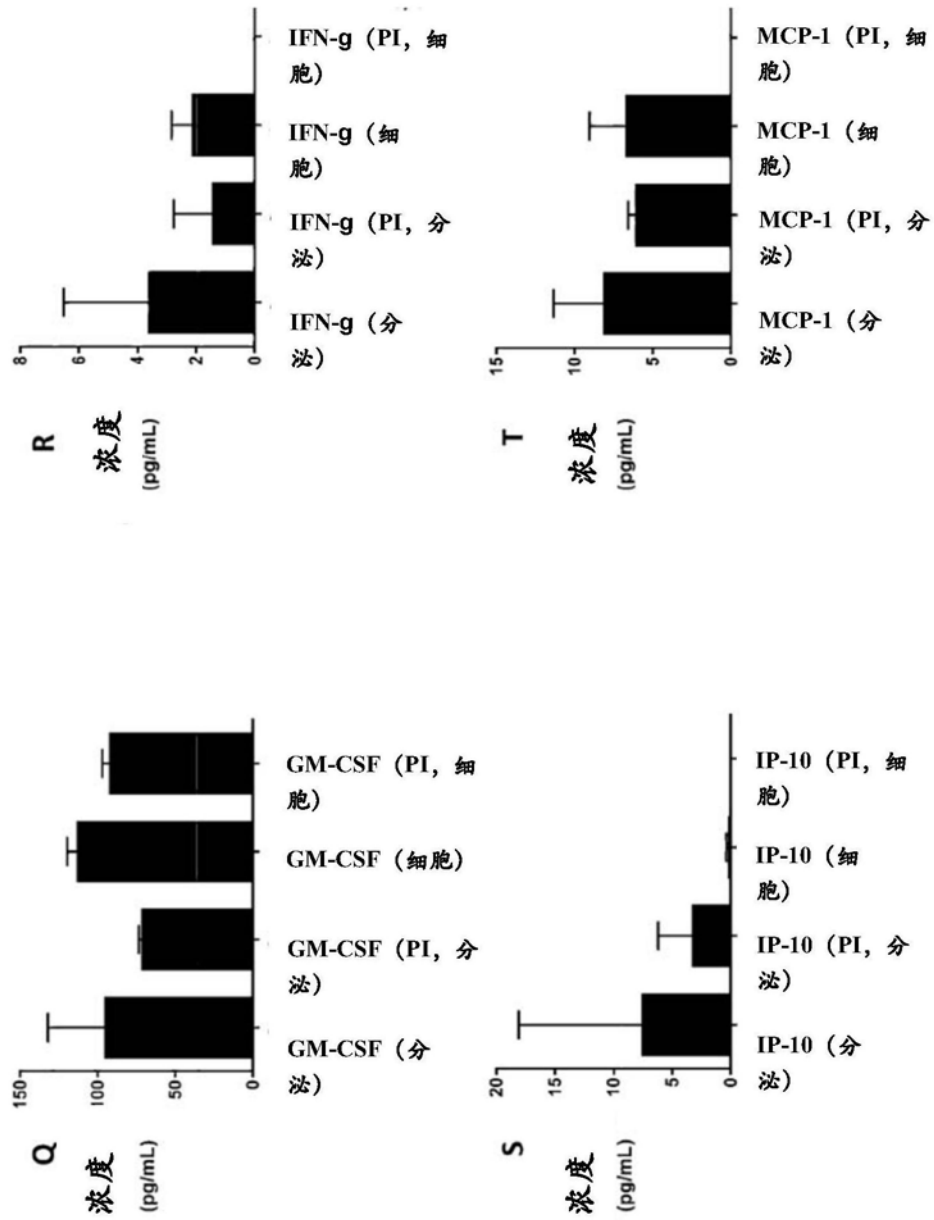
图15

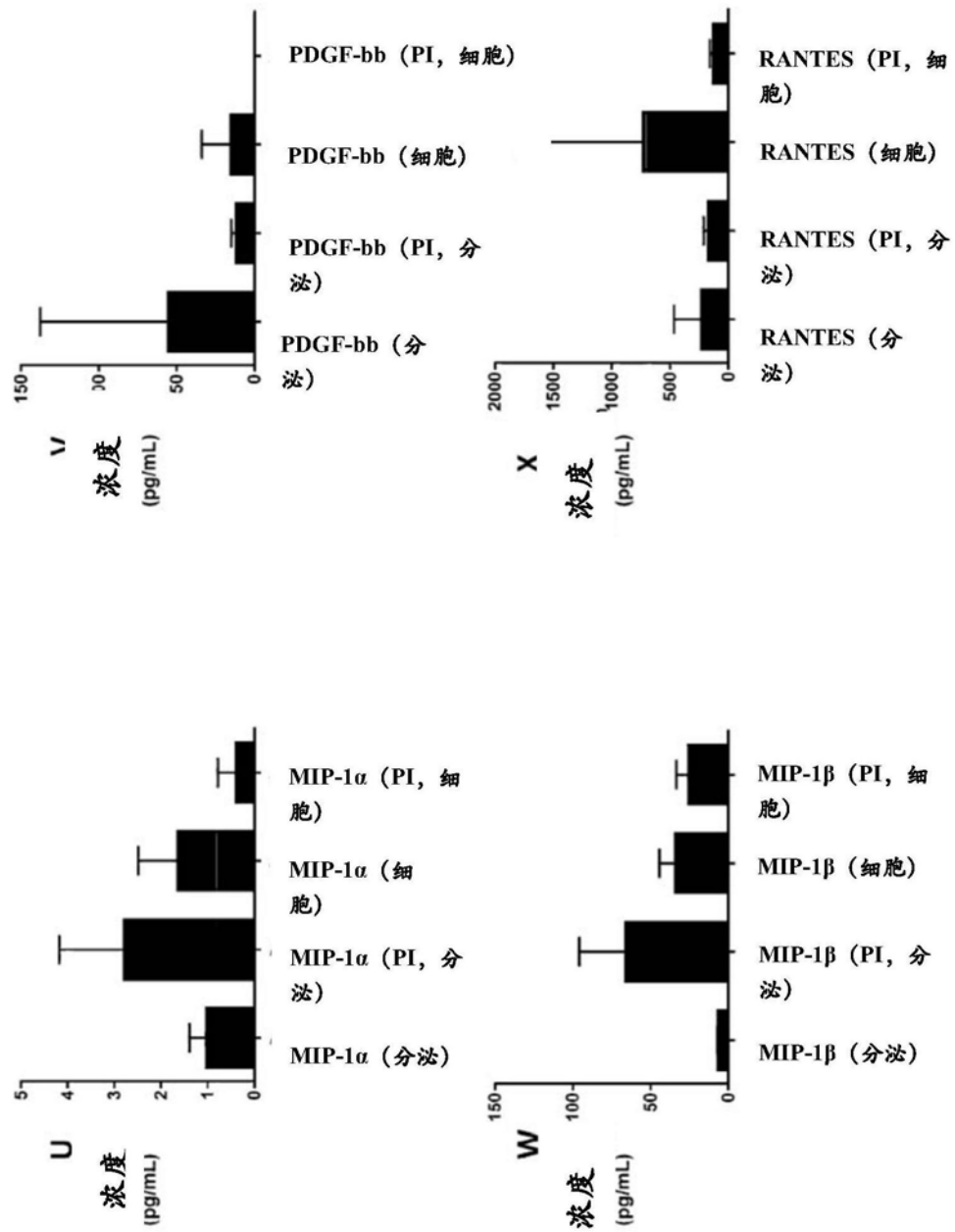












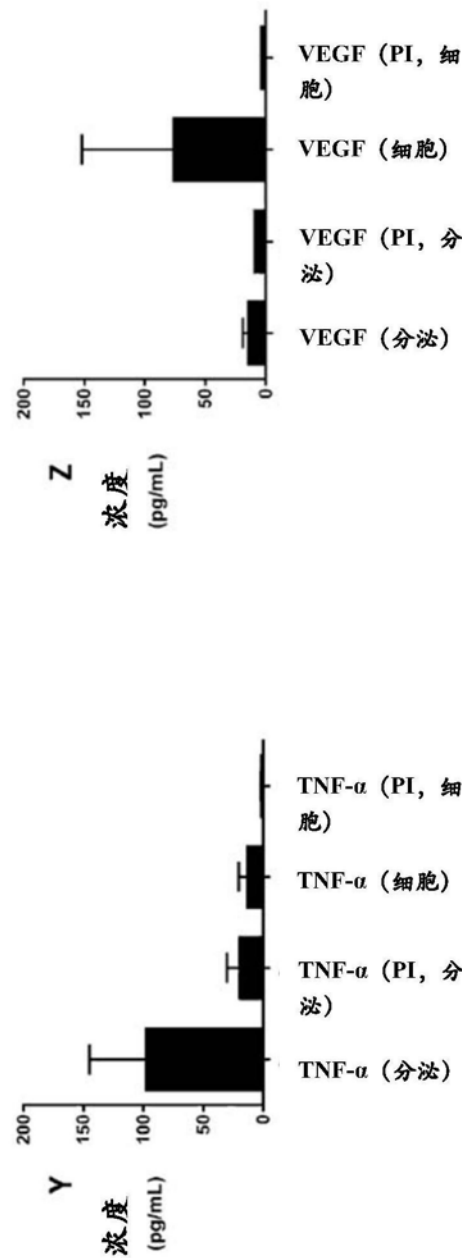


图16

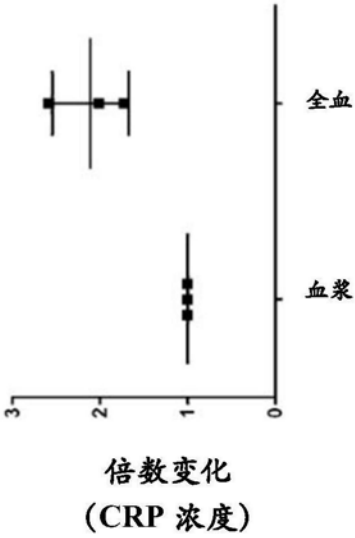


图17

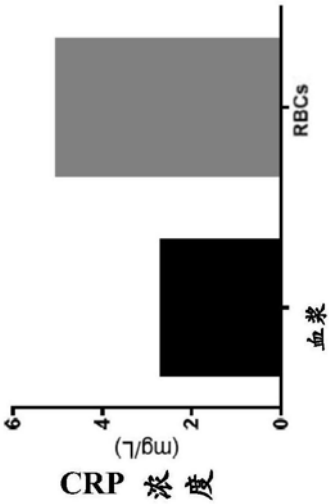
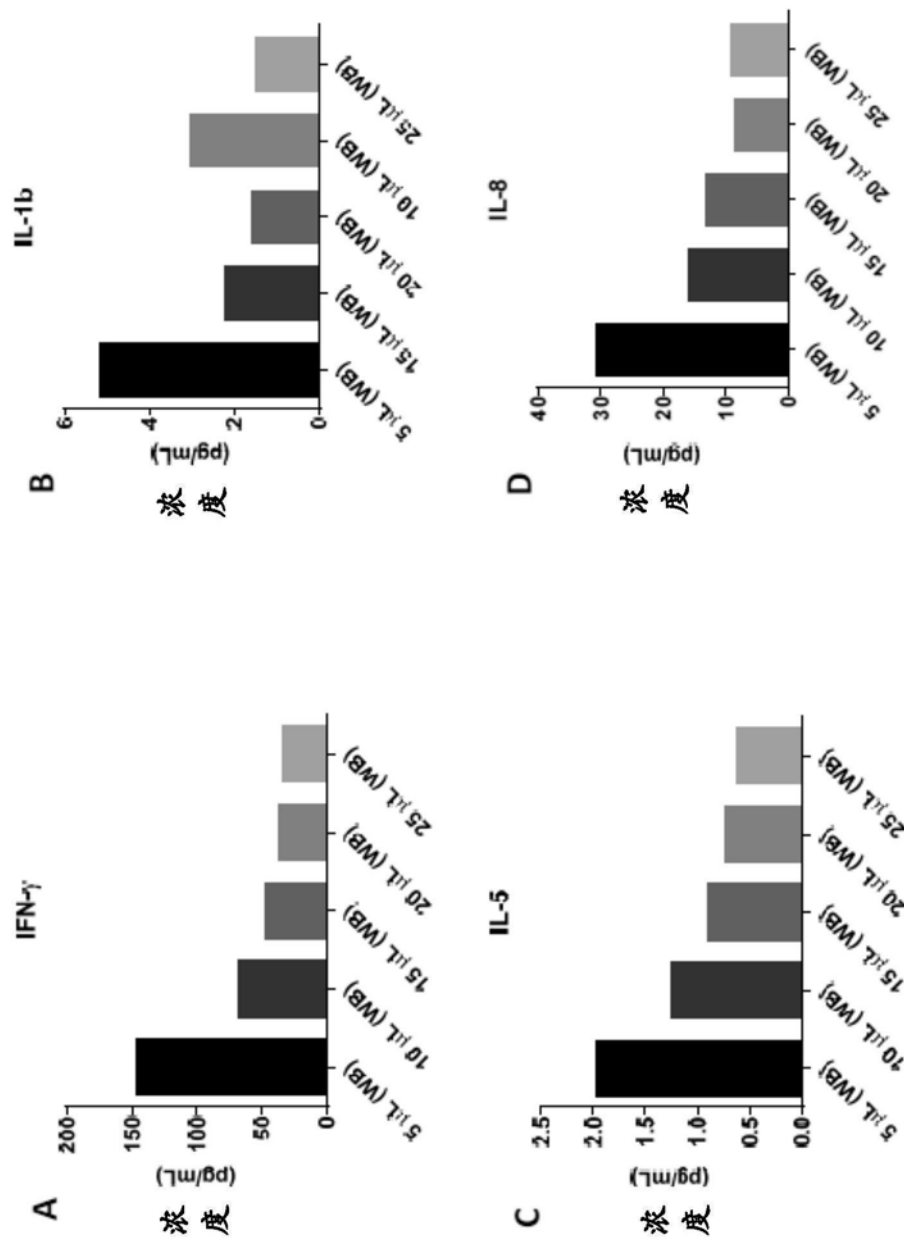
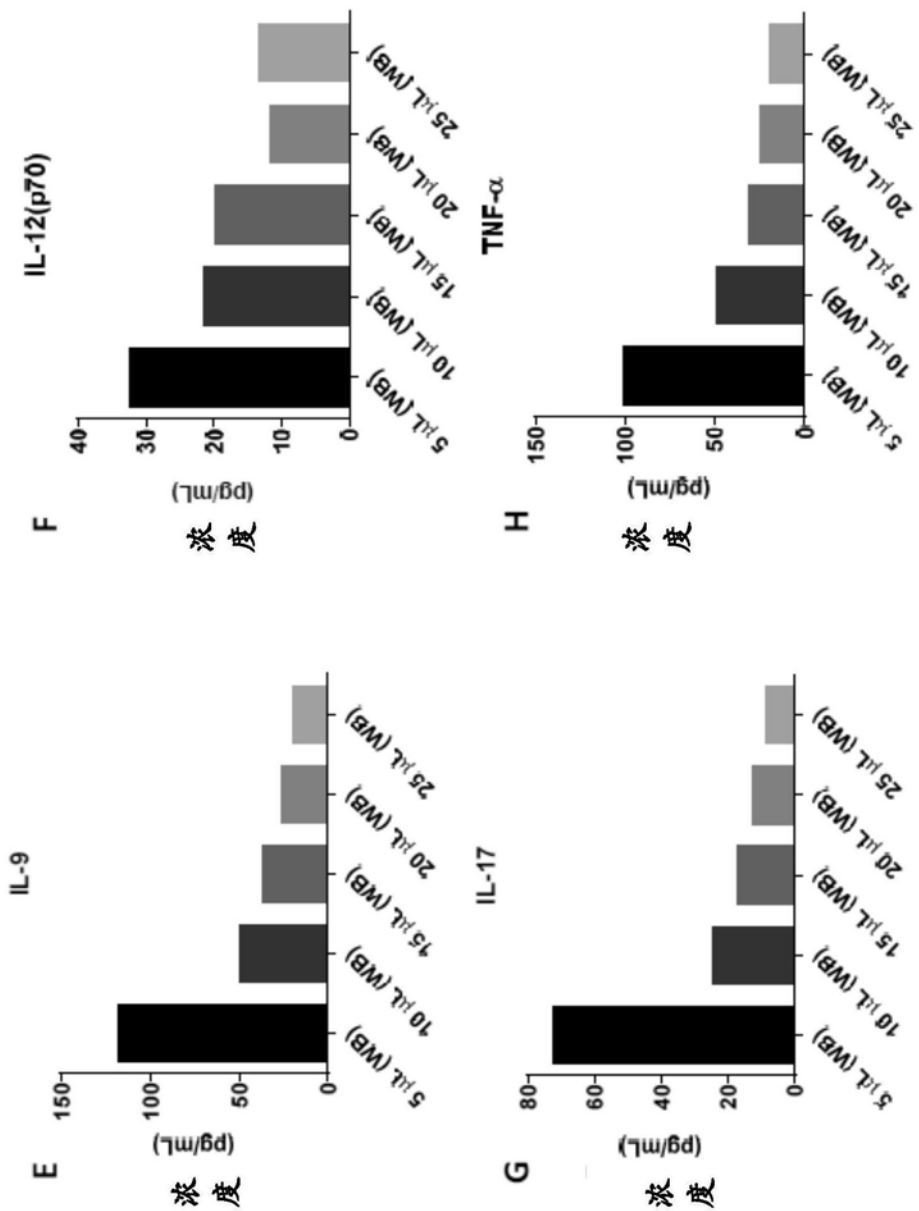
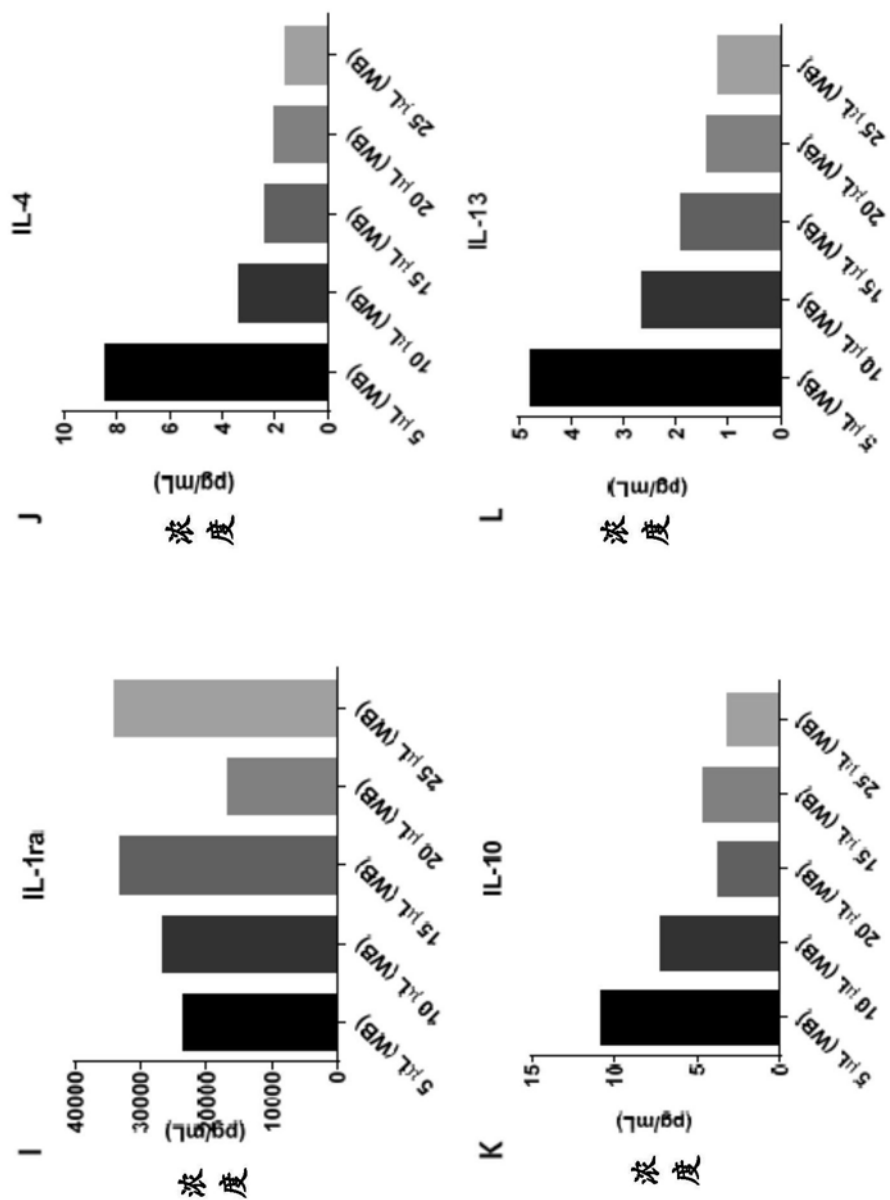
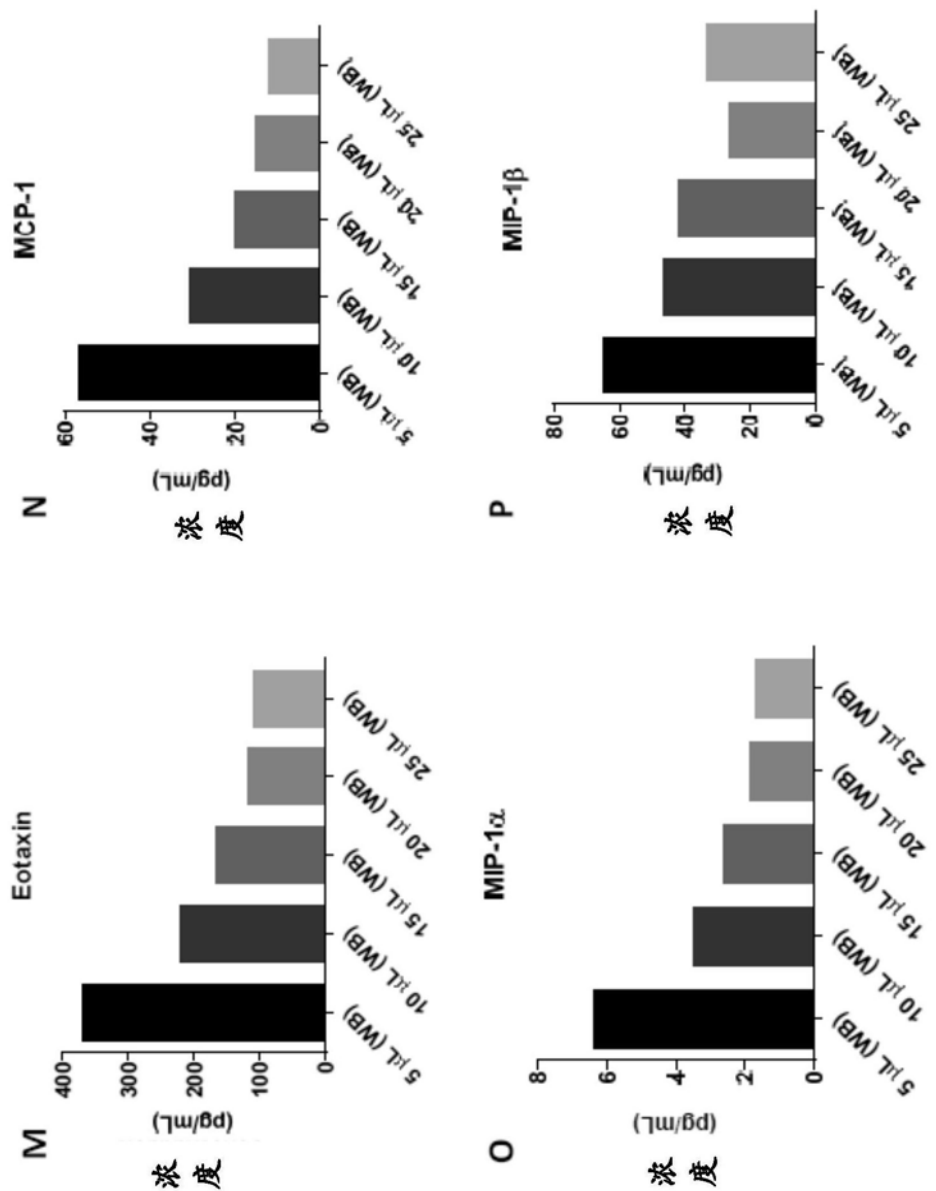


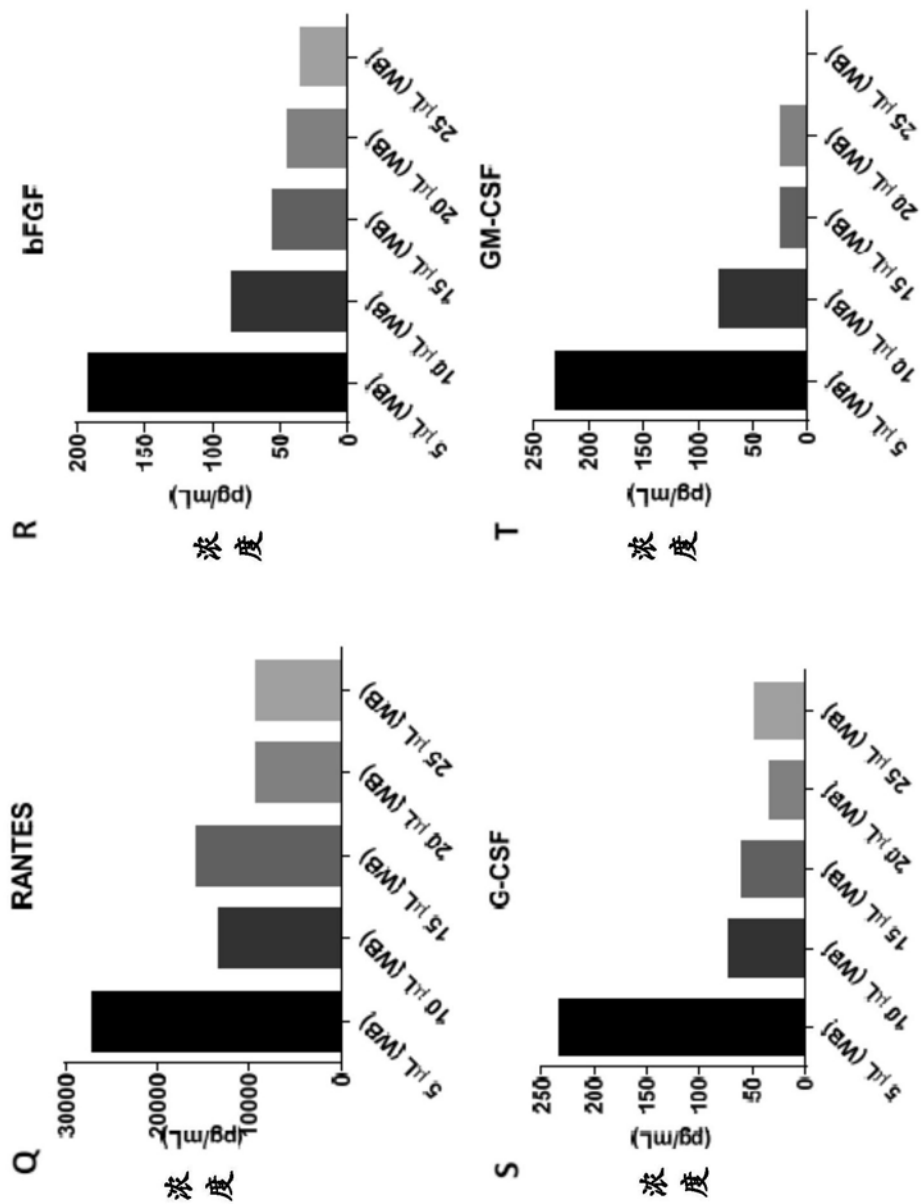
图18

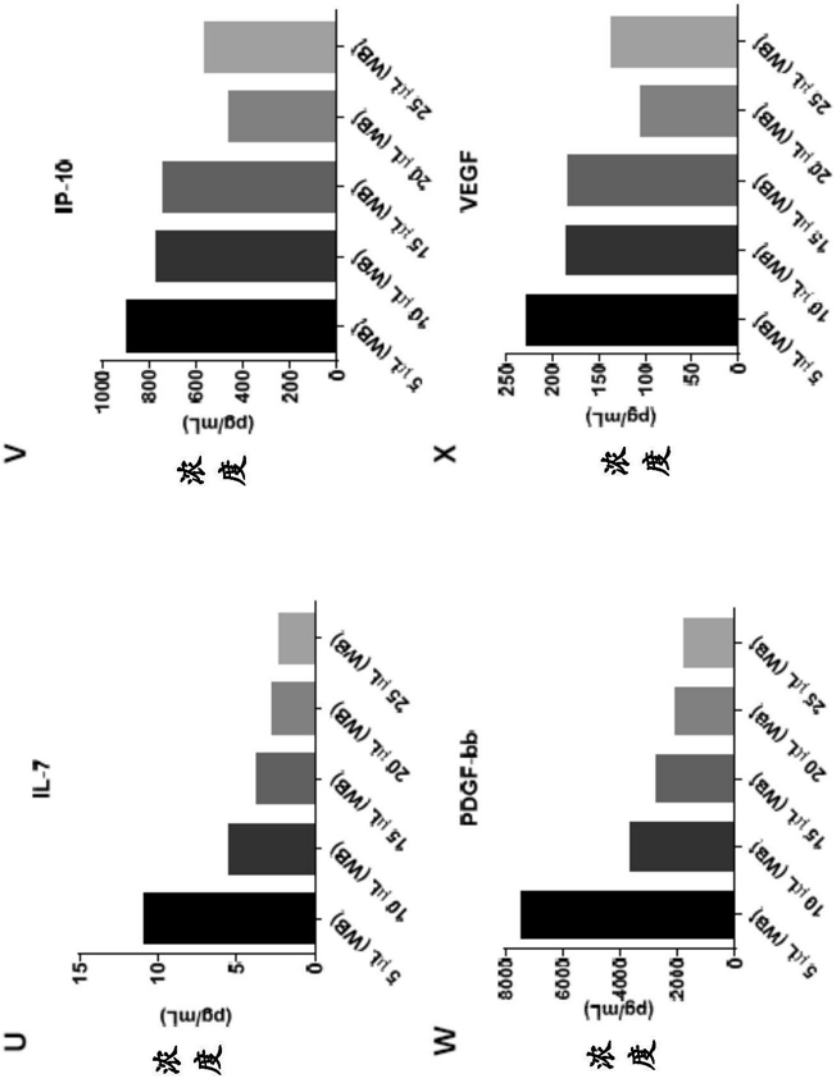


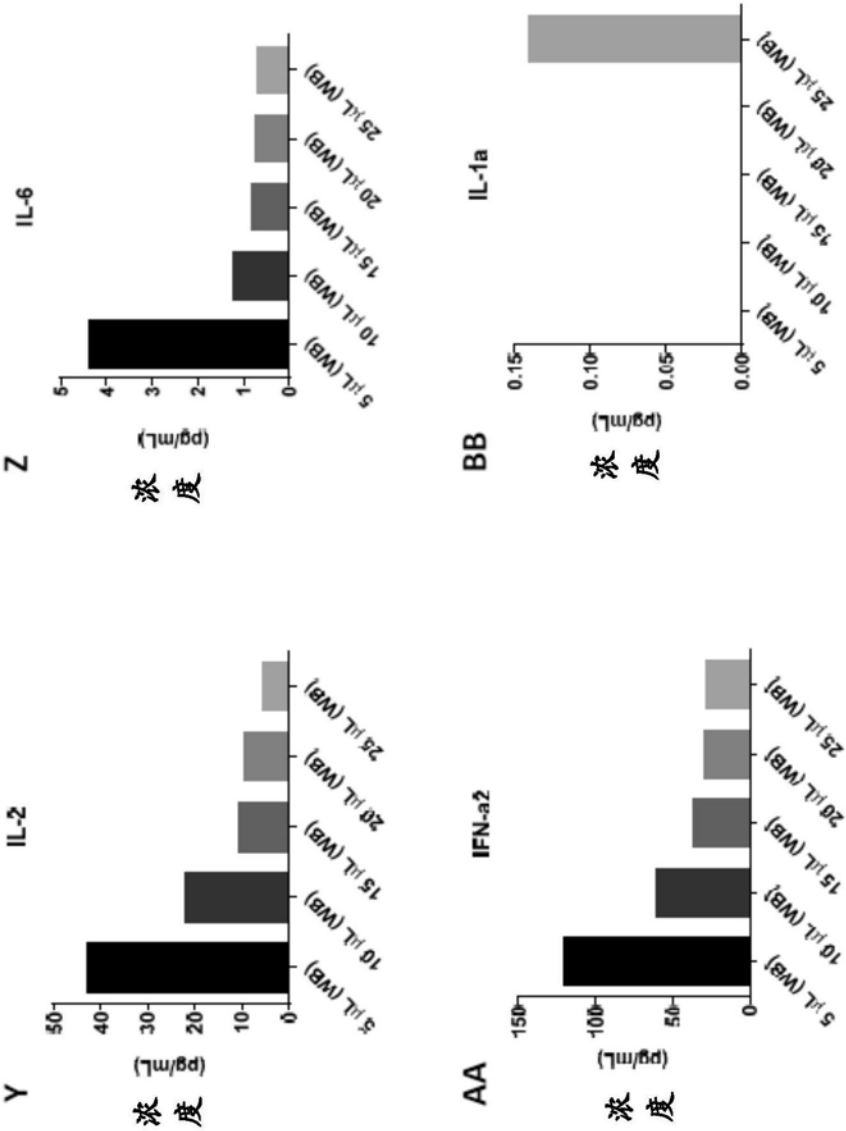


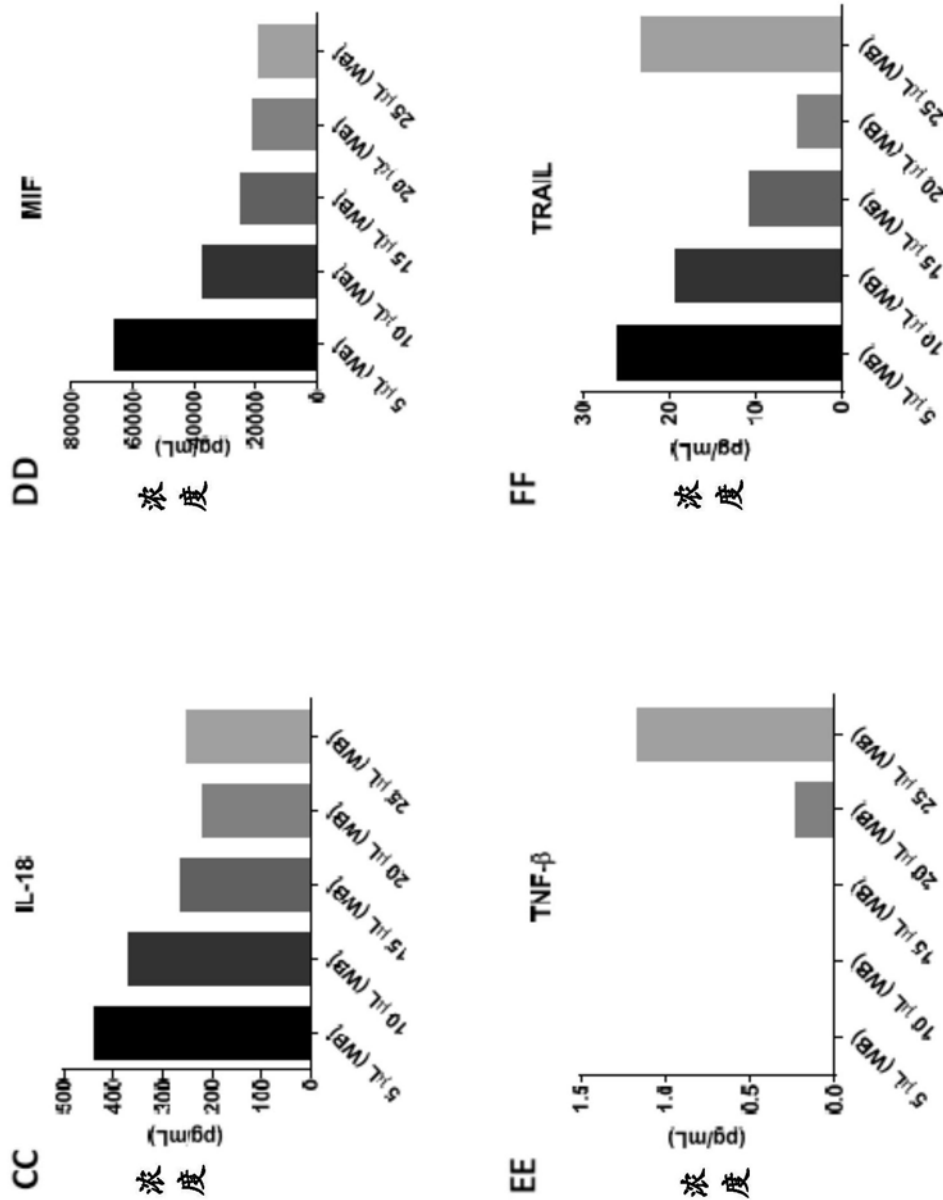


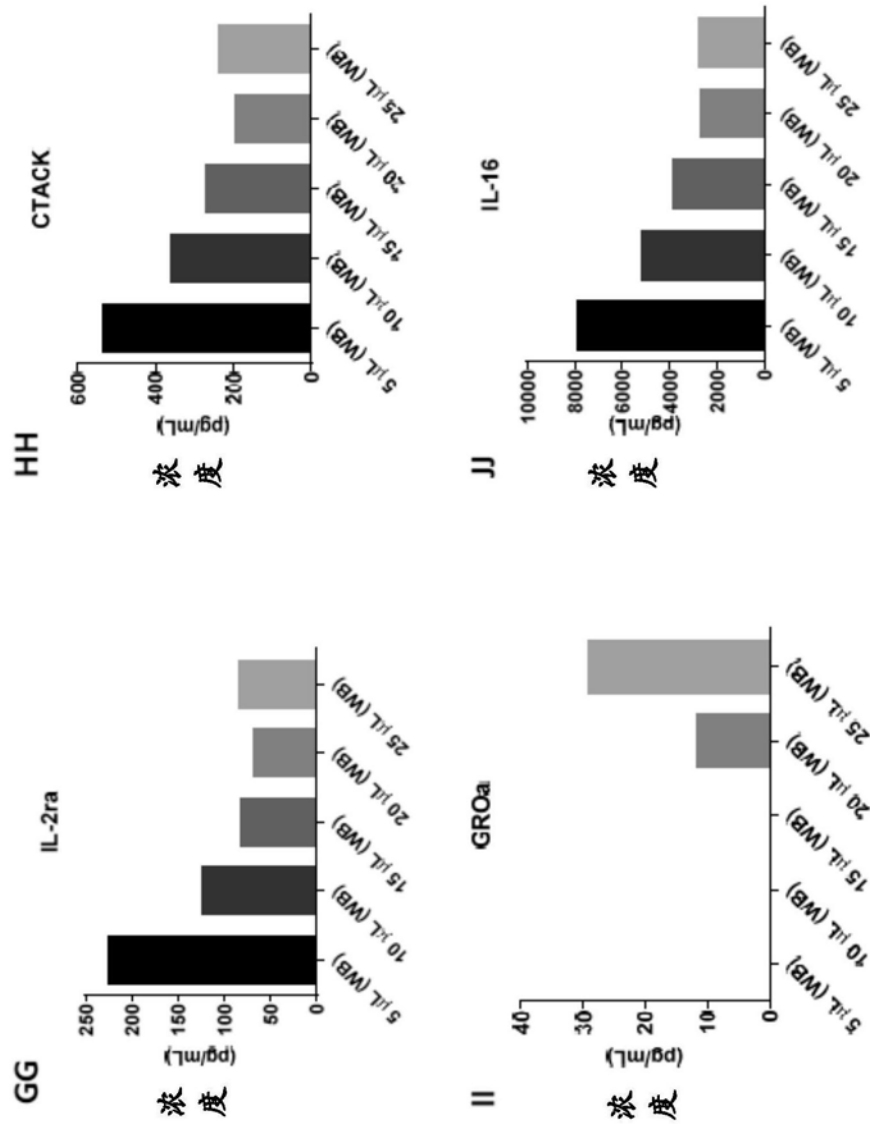


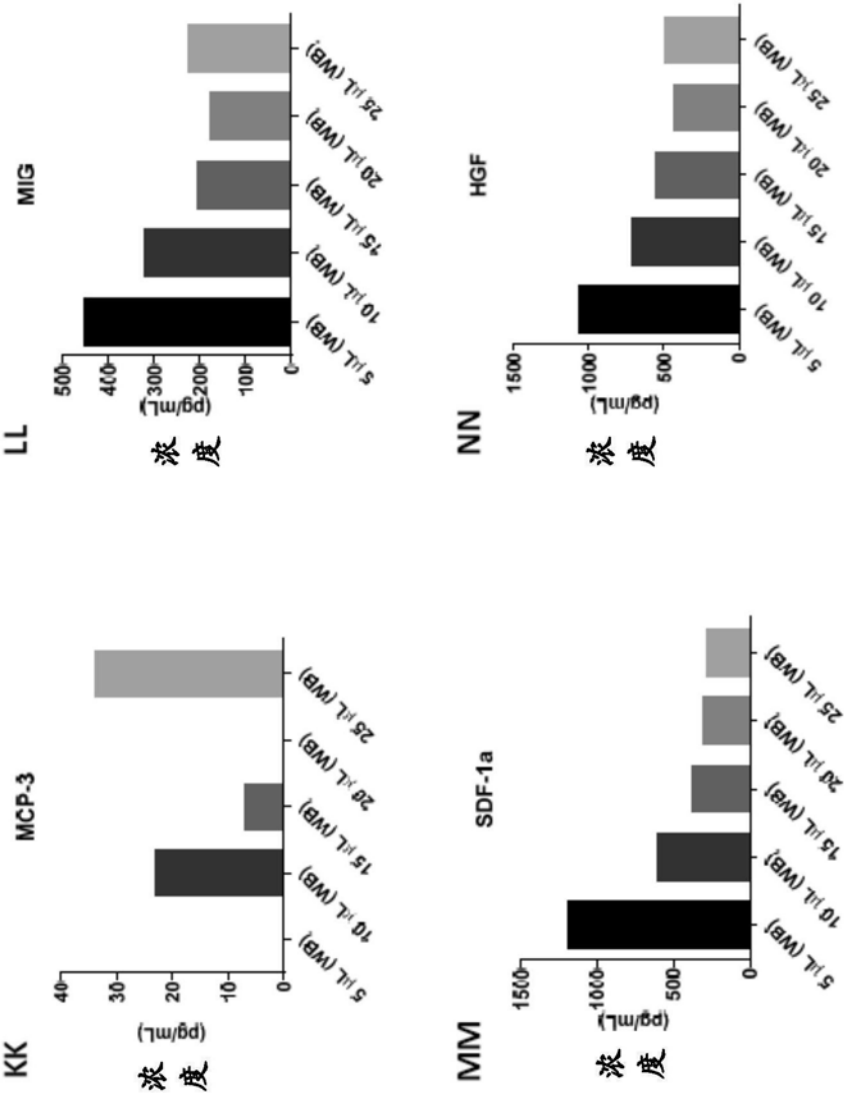


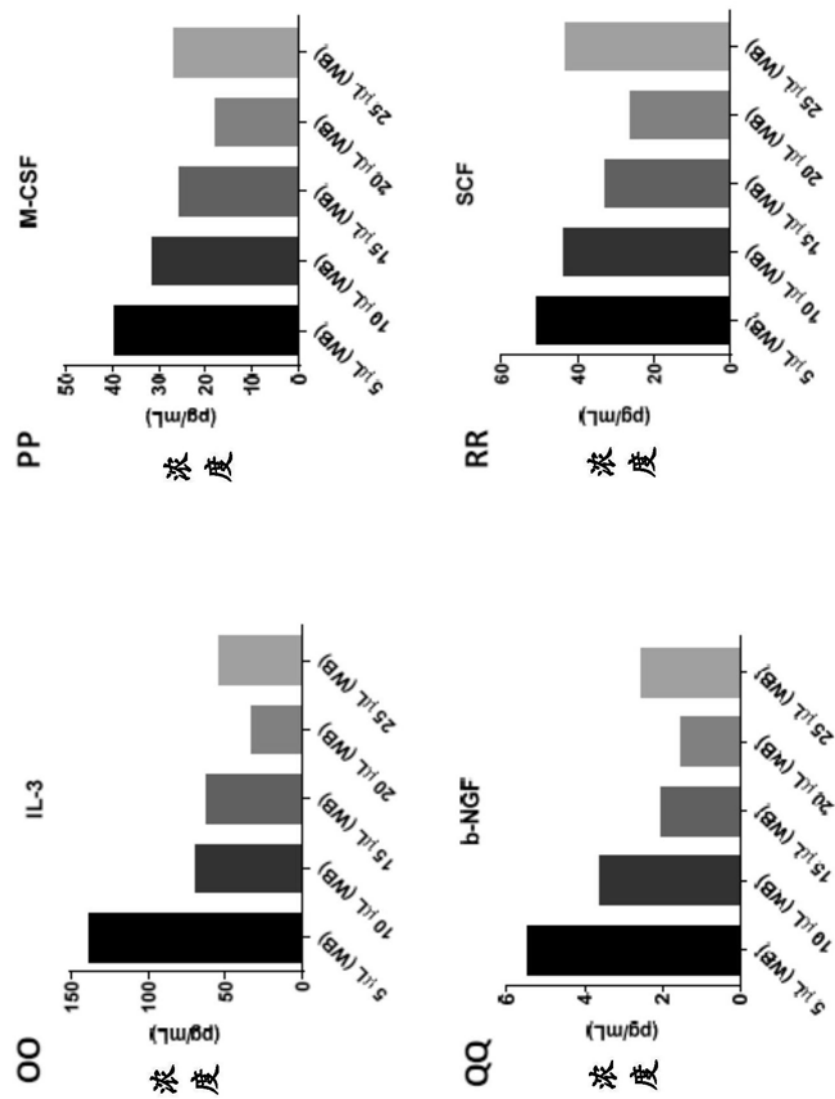












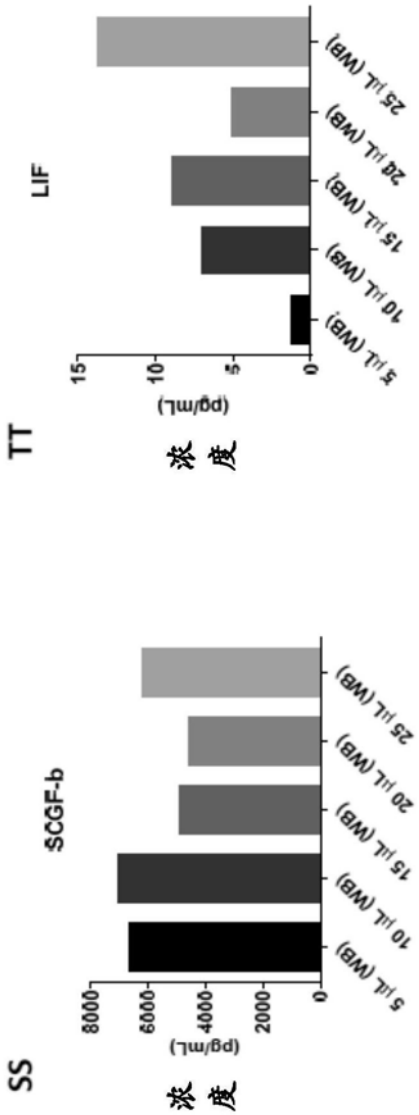
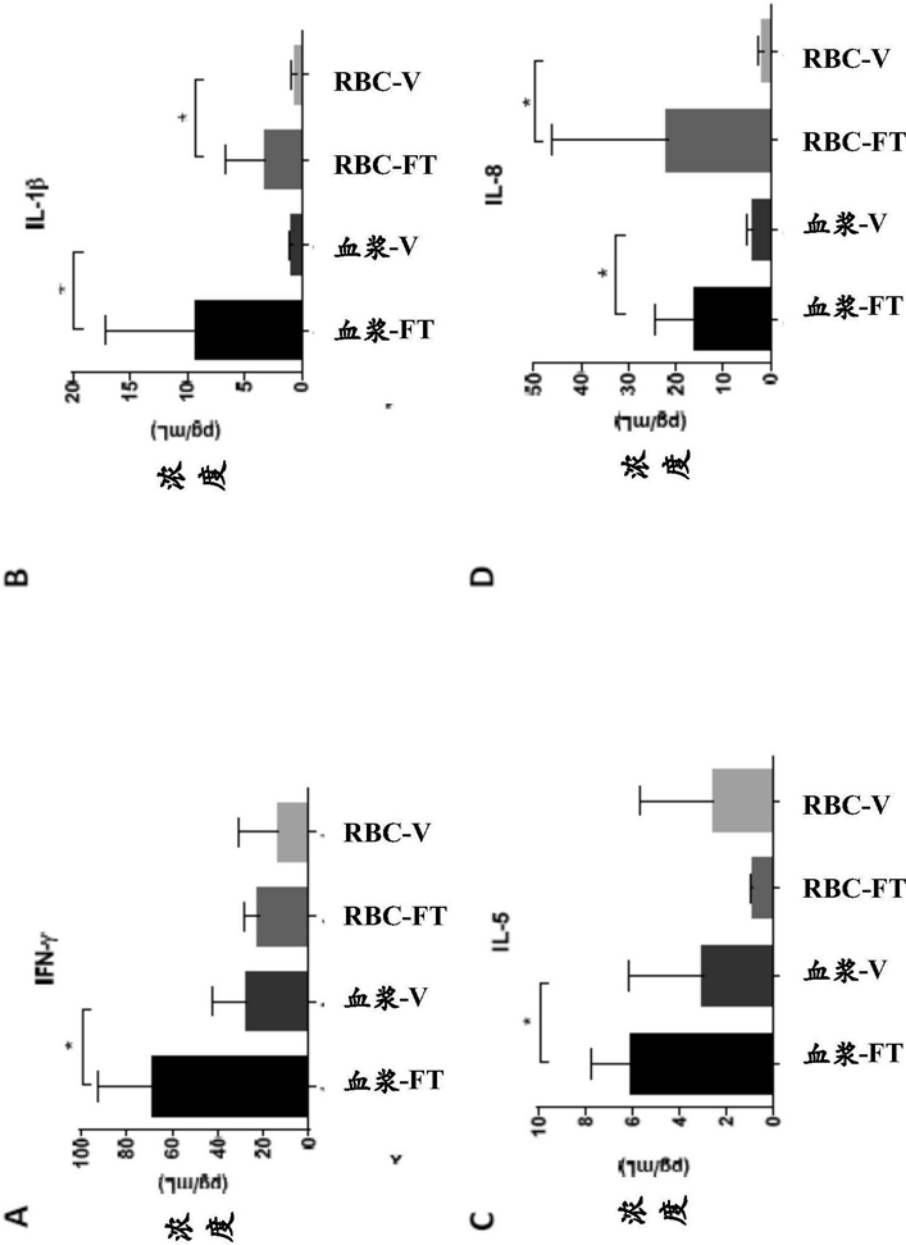
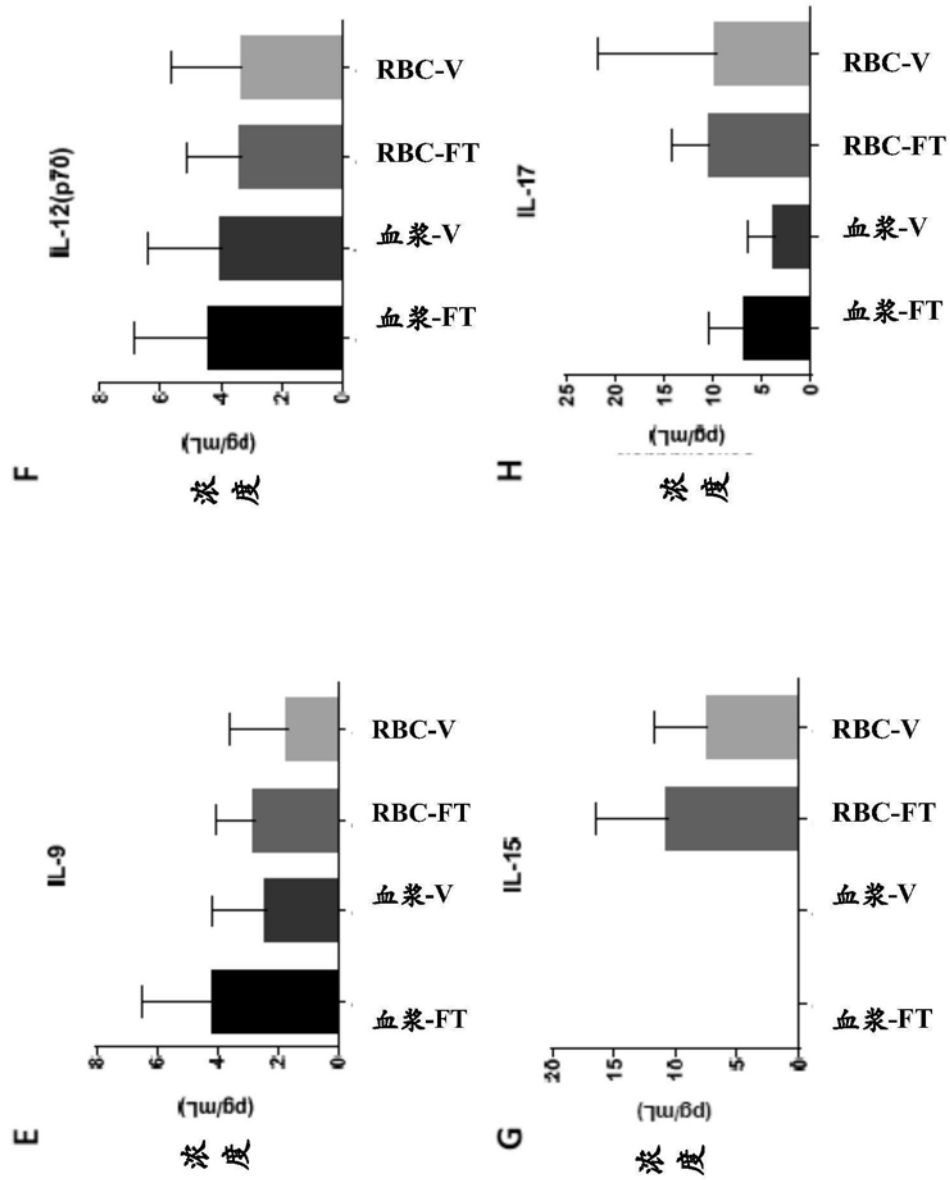
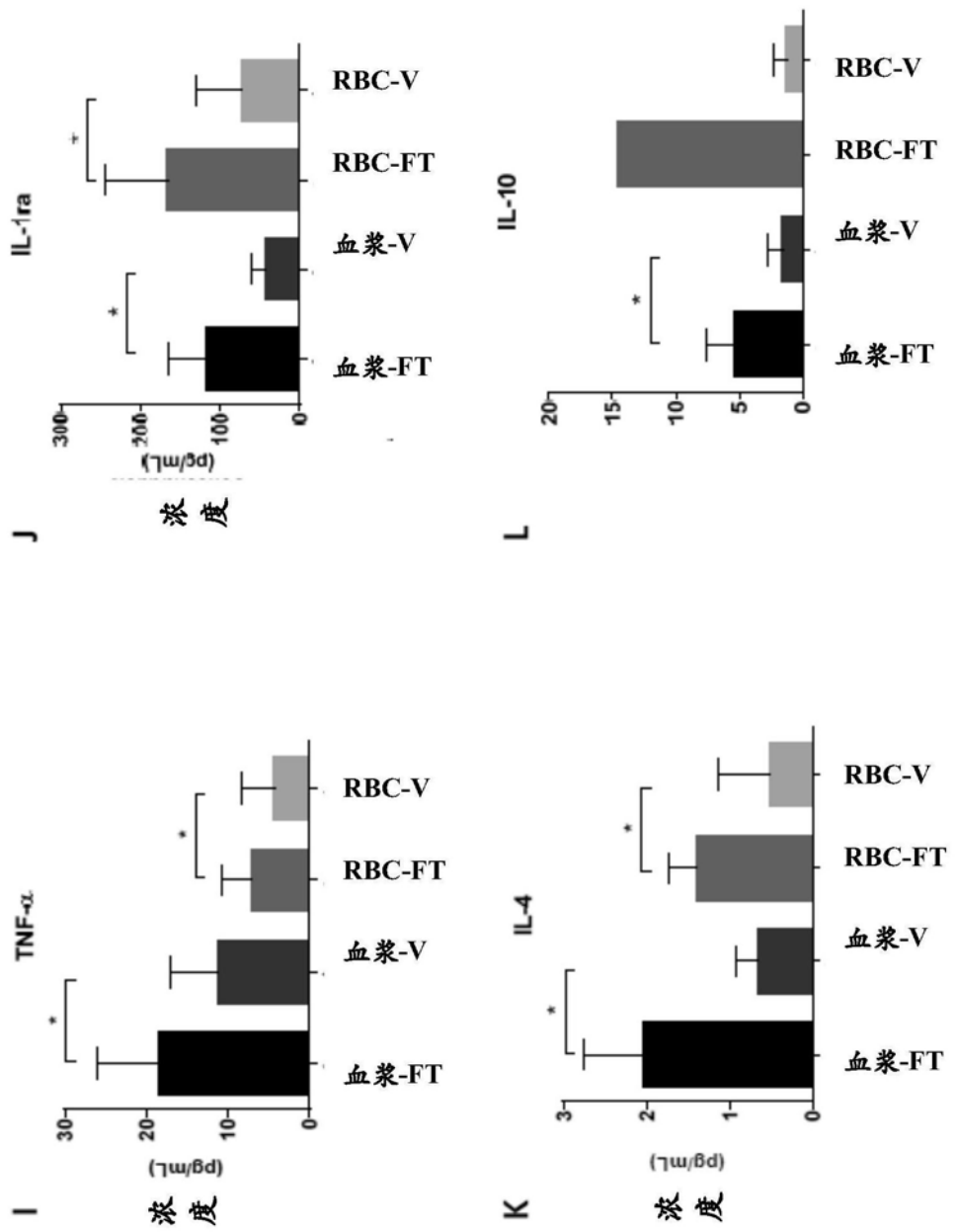
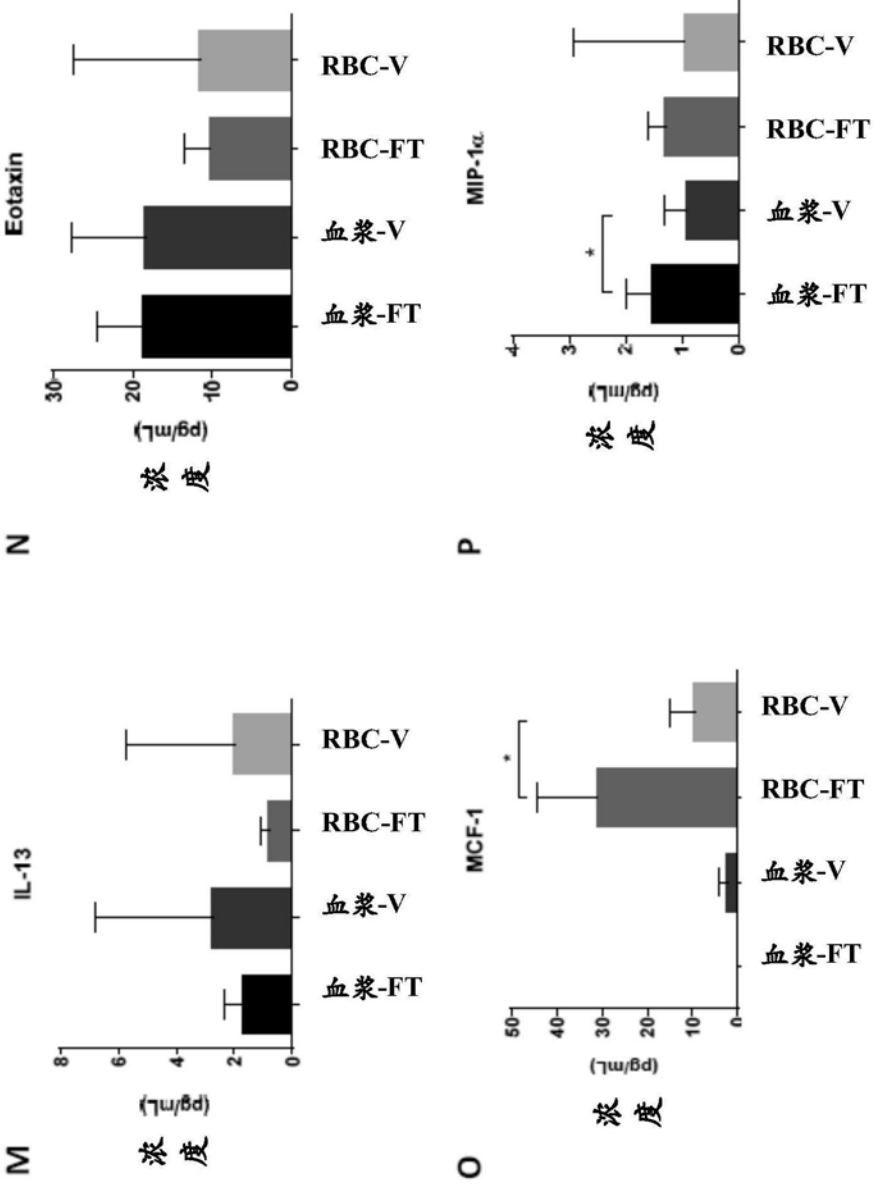


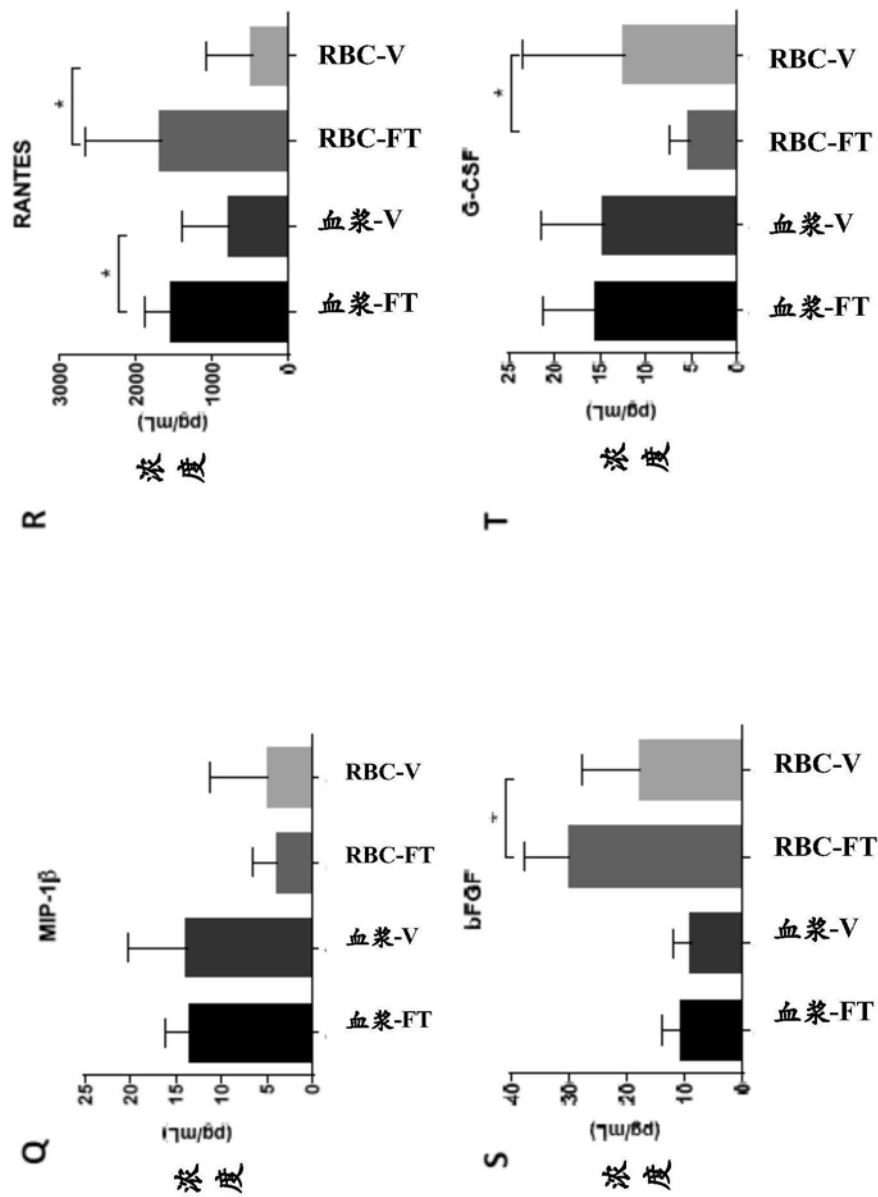
图19

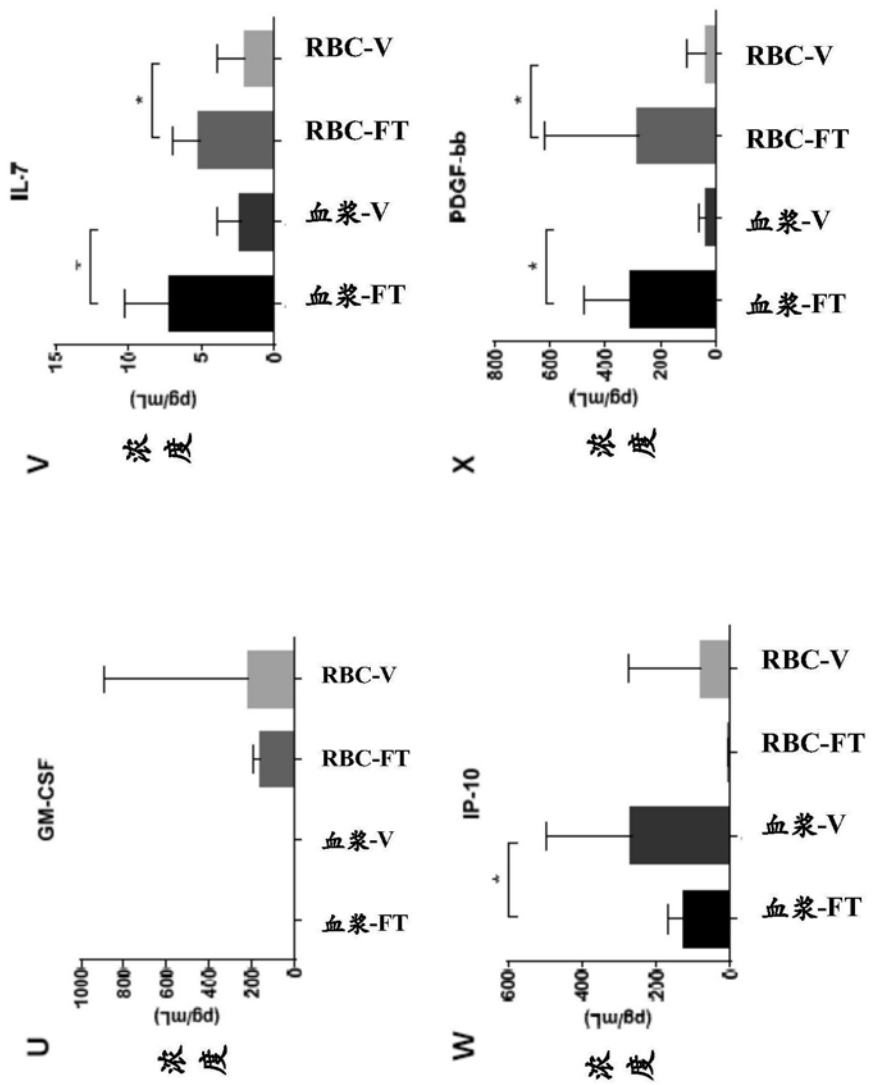












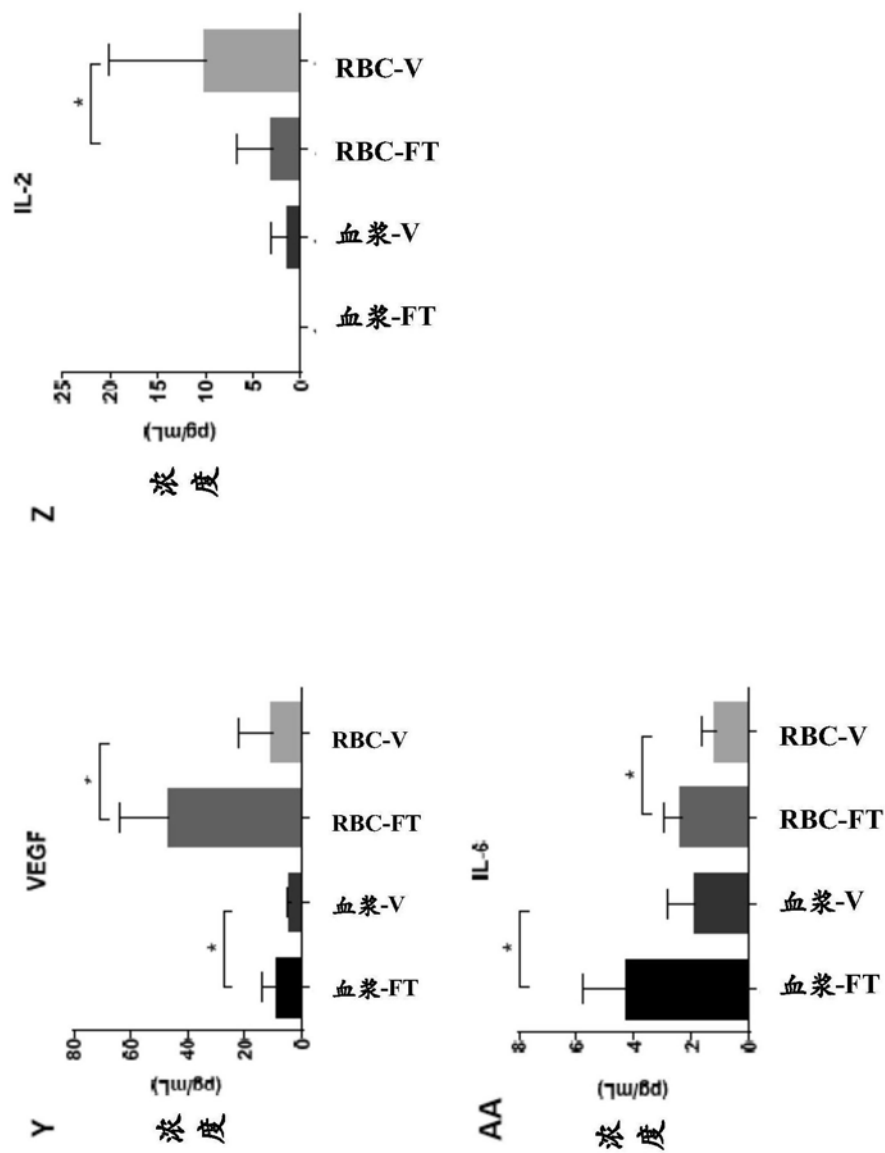


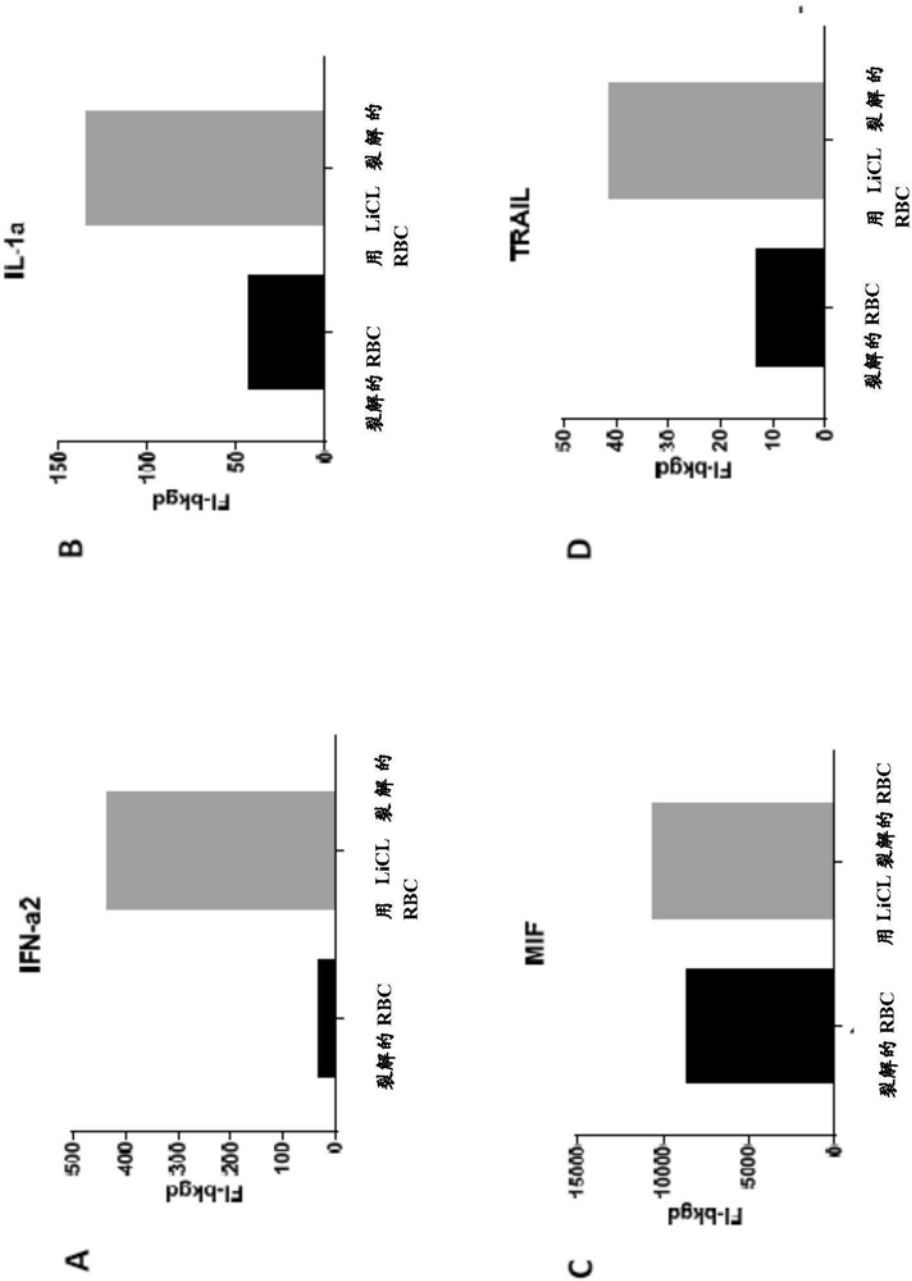
图20

蛋白质	血浆*			RBCs*					倍数变化
	对象号	全血的 pg/mL		对象号	全血的 pg/mL		WBC 浓度校正 (pg/mL)		
		浓度	SD		浓度	SD	浓度	SD	
抗炎									
IL-1ra	5	20.8	6.6	1	299.6	-	-	-	-
IL2-ra	6	29.3	5.3	3	282.6	31.7	280.9	28.8	10
IL-4	4	0.4	0.2	2	4.6	0.8	3.3	0.9	8
IL-10	1	1.4	-	0	-	-	-	-	-
IL-13	5	2.0	1.0	3	2.3	2.3	1.4	2.3	1
趋化因子									
CTACK	6	36.3	9.3	5	222.2	85.7	131.4	100.5	4
Eotaxin	5	6.4	2.2	6	79.3	38.4	74.6	38.4	12
GRO-α	3	6.0	1.7	4	187.3	47.8	184.0	54.3	31
IL-16	6	46.6	11.2	5	2904.9	3231.7	2904.9	3231.7	62
MCP-1	0	-		2	55.0	6.8	36.1	7.7	-
MCP-3	4	23.4	5.5	0	-	-	-	-	-
MIG	6	70.2	34.5	0	-	-	-	-	-
MIP-1α	6	0.5	0.3	4	5.2	2.3	3.9	2.1	8
MIP-1β	6	6.3	3.5	2	42.7	56.3	25.7	48.9	4
RANTES	6	510.7	268.5	6	8744	11,785	5618	10,489	11
SDF-1α	6	121.9	11.3	6	872.4	206.2	811.8	193.4	7

图21A

蛋白质	血浆*		RBCs*				倍数变化		
	对象号	全血的 pg/mL	对象号	全血的 pg/mL		WBC 污染校正 (pg/mL)			
				浓度	SD				
								浓度	SD
生长因子									
bFGF	6	4.8	2.0	197.1	6	72.4	147.2	87.3	31
G-CSF	6	5.3	3.6	148.8	3	79.0	131.1	79.1	25
GM-CSF	0	-	-	939.7	5	460.2	772.3	538.5	-
HGF	6	39.8	7.8	800.3	6	490.5	691.2	500.3	17
IL-3	6	18.1	2.0	345.8	6	209.7	334.2	217.6	18
IL-7	5	1.7	0.9	34.6	2	5.2	34.0	6.2	20
IP-10	6	132.5	142.7	147.8	4	87.1	134.0	83.3	1
M-CSF	6	4.3	3.2	115.6	3	7.9	99.5	13.2	23
β-NGF	5	1.2	0.2	-	0	-	-	-	-
PDGF-bb	6	20.3	17.4	1073.5	5	2004.9	115.4	2095.6	6
SCF	6	6.5	1.5	54.1	1	-	51.9	-	8
SCGF-β	3	944.3	563.9	-	0	-	-	-	-
VEGF	5	2.1	0.8	113.9	6	50.3	82.8	53.7	39
具有多功能的分析物									
IL-2	0	-	-	-	0	-	-	-	-
IL-6	2	0.5	0.1	-	0	-	-	-	-
IL-12p40	1	44.5	-	1914.7	3	357.9	1693.7	254.7	38
LIF	6	5.7	3.2	119.5	3	27.5	119.5	27.5	21

图21B



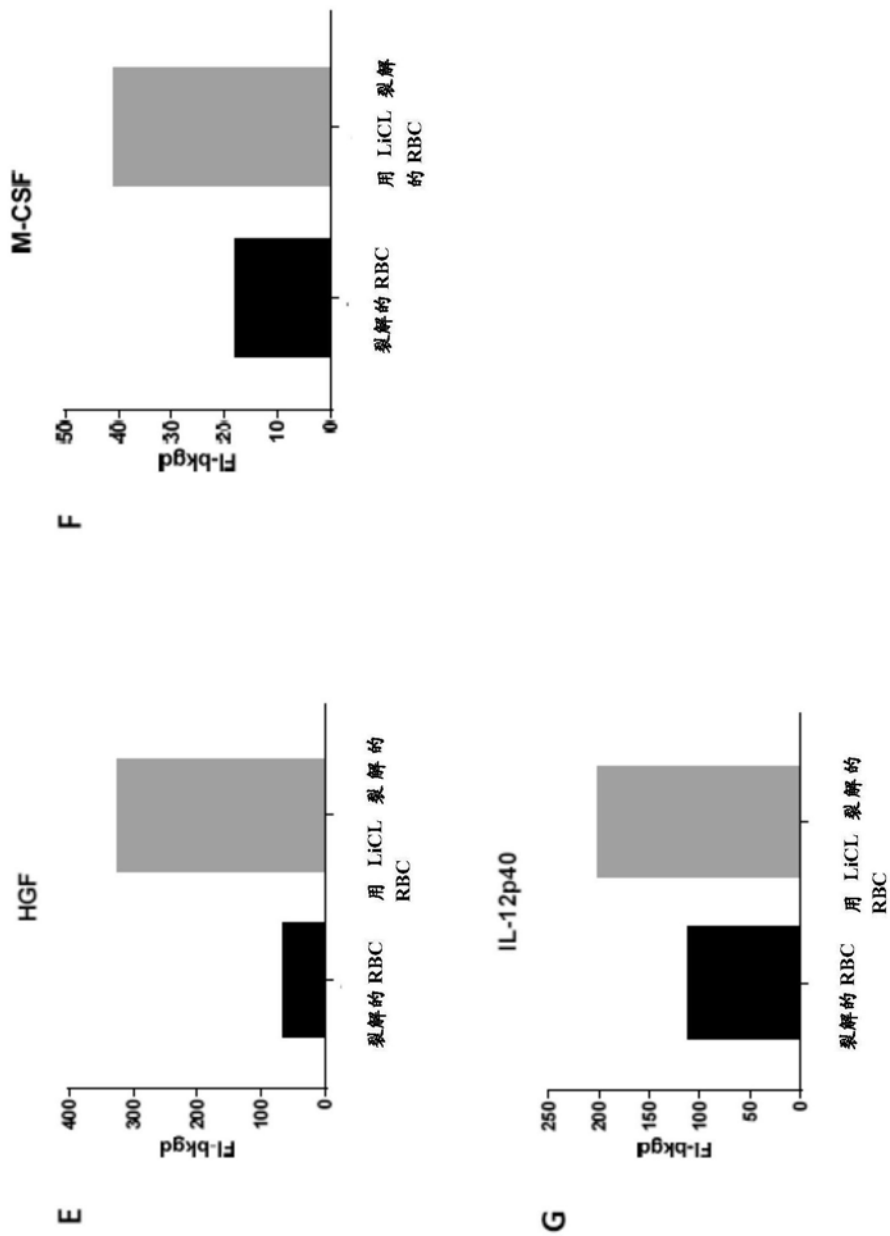
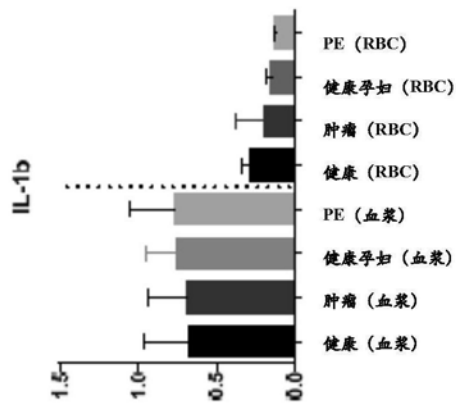
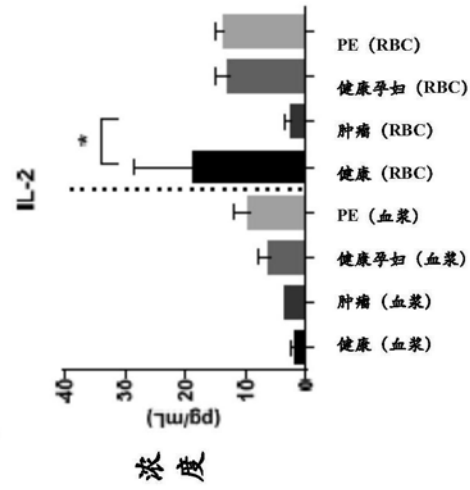


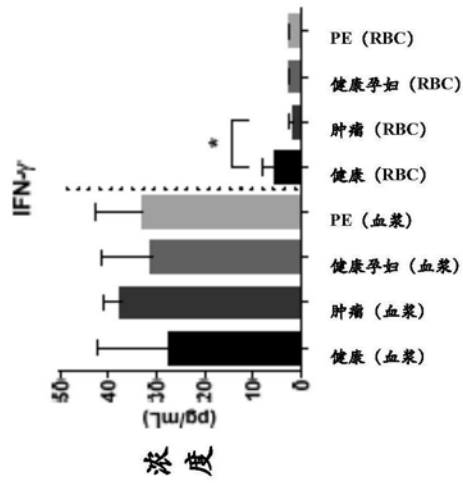
图22



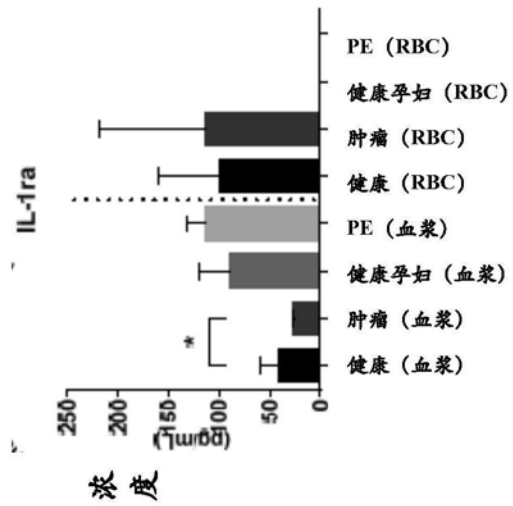
B



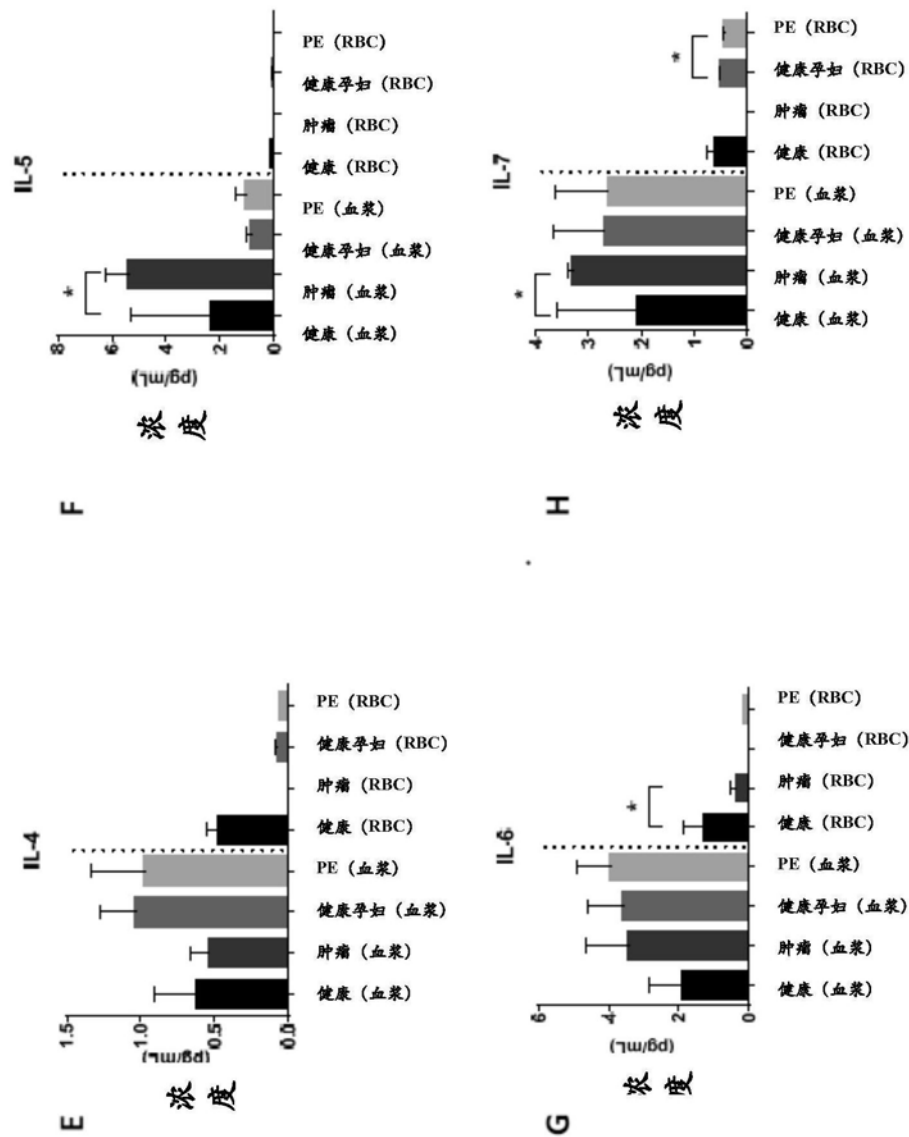
D

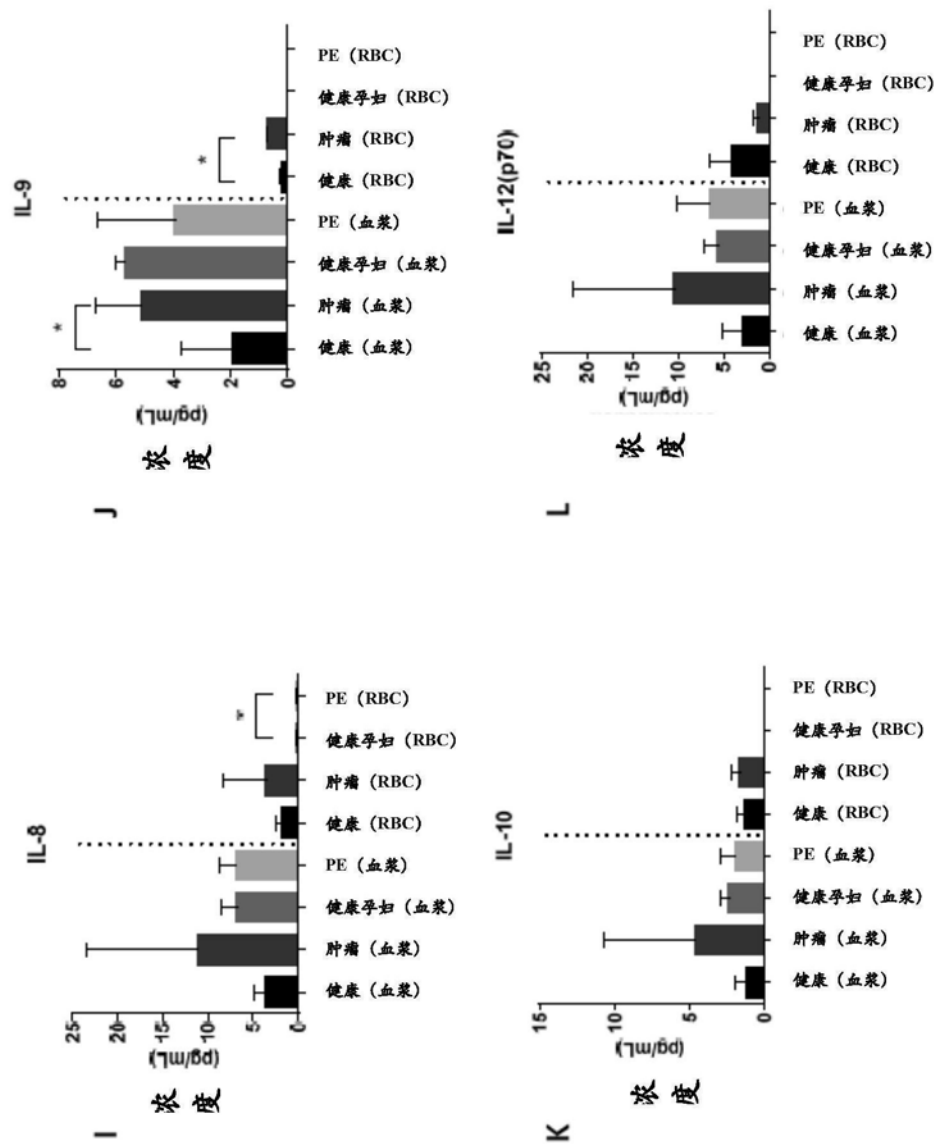


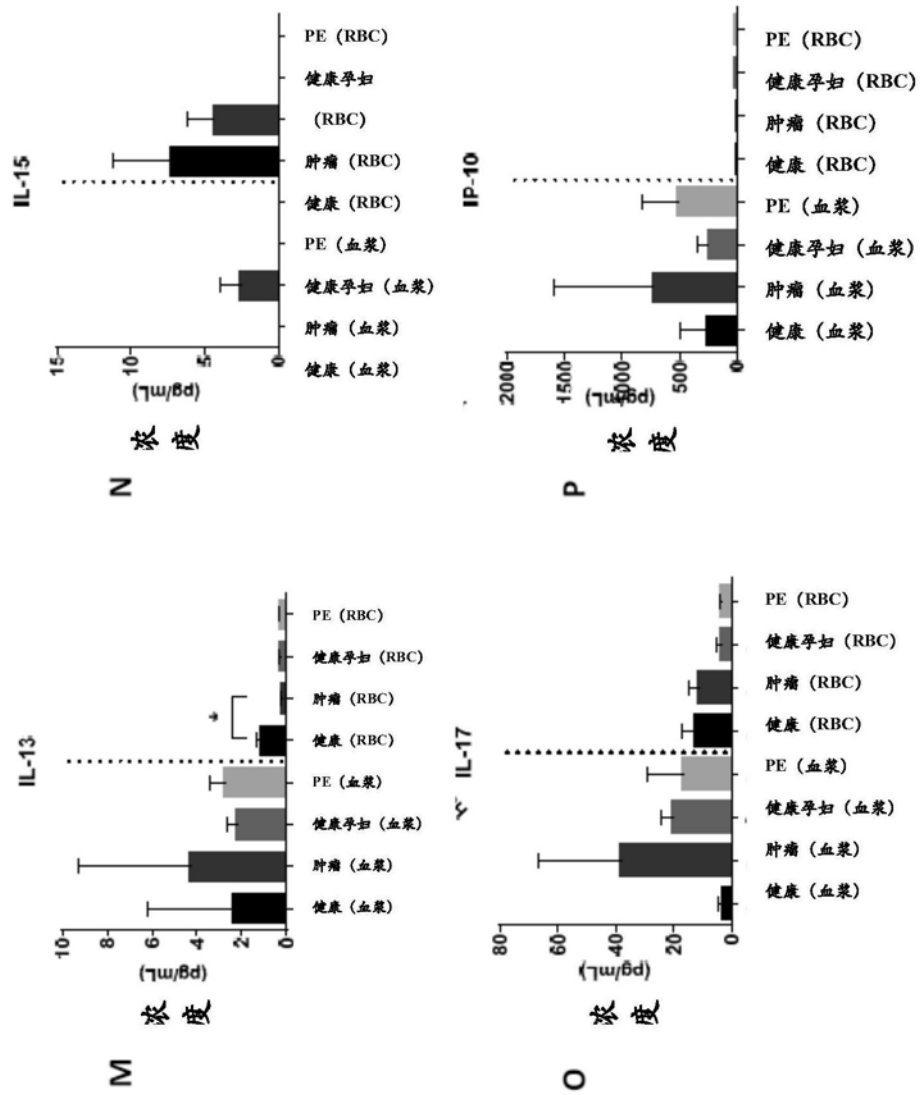
A

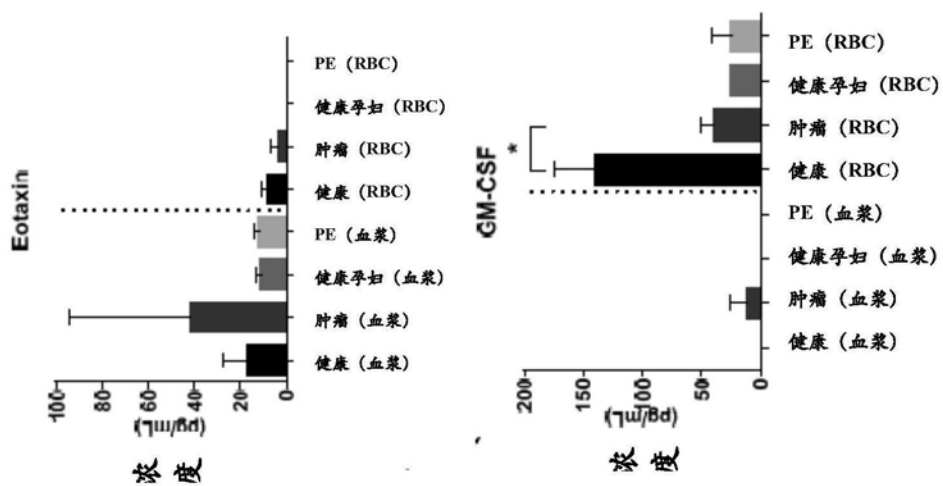


C



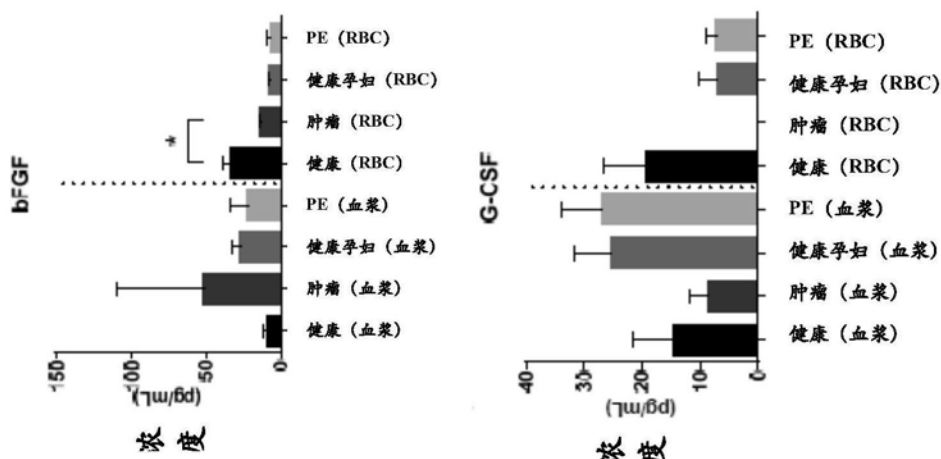






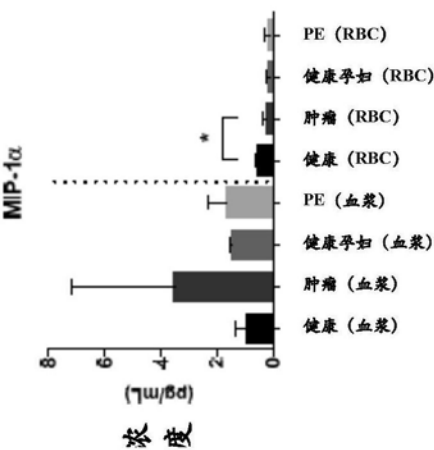
R

T

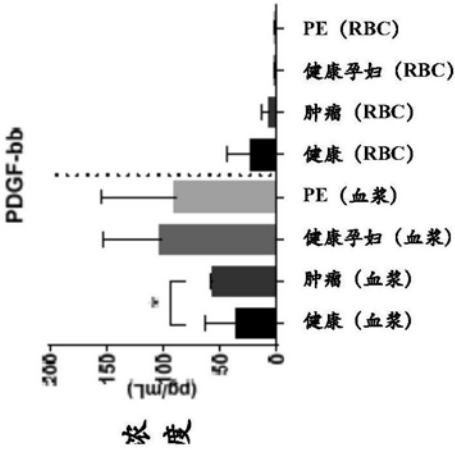


Q

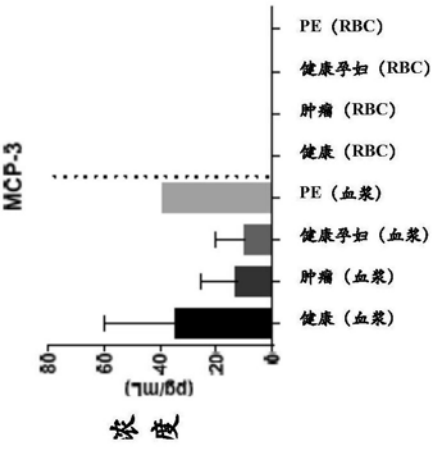
S



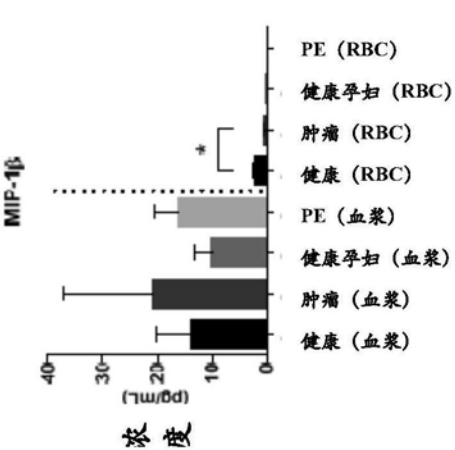
V



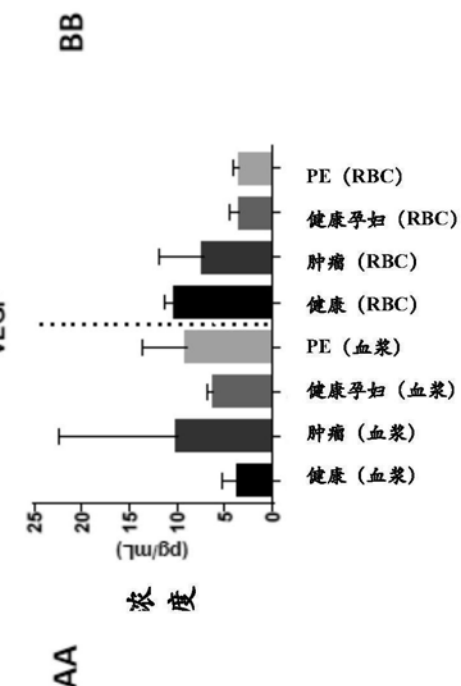
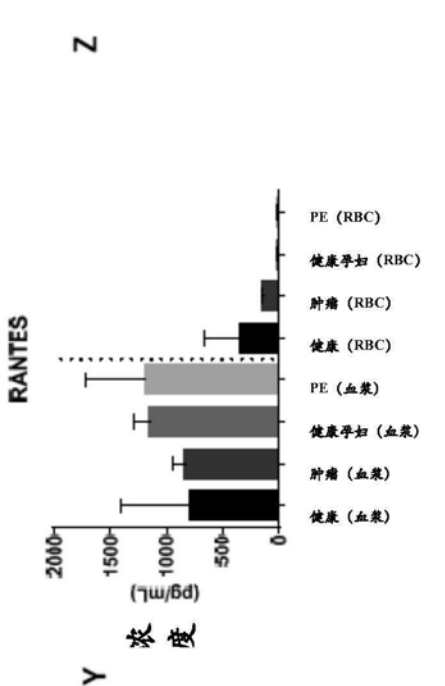
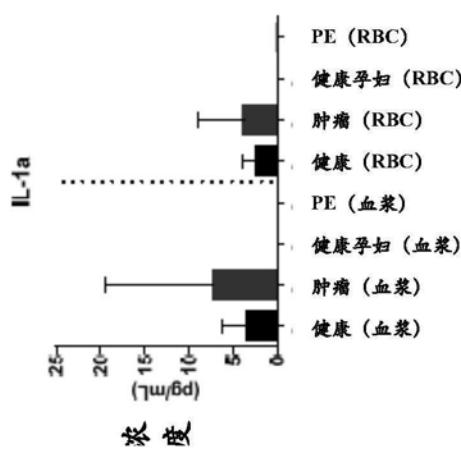
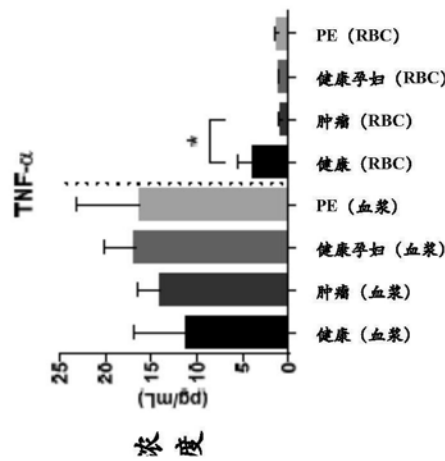
X

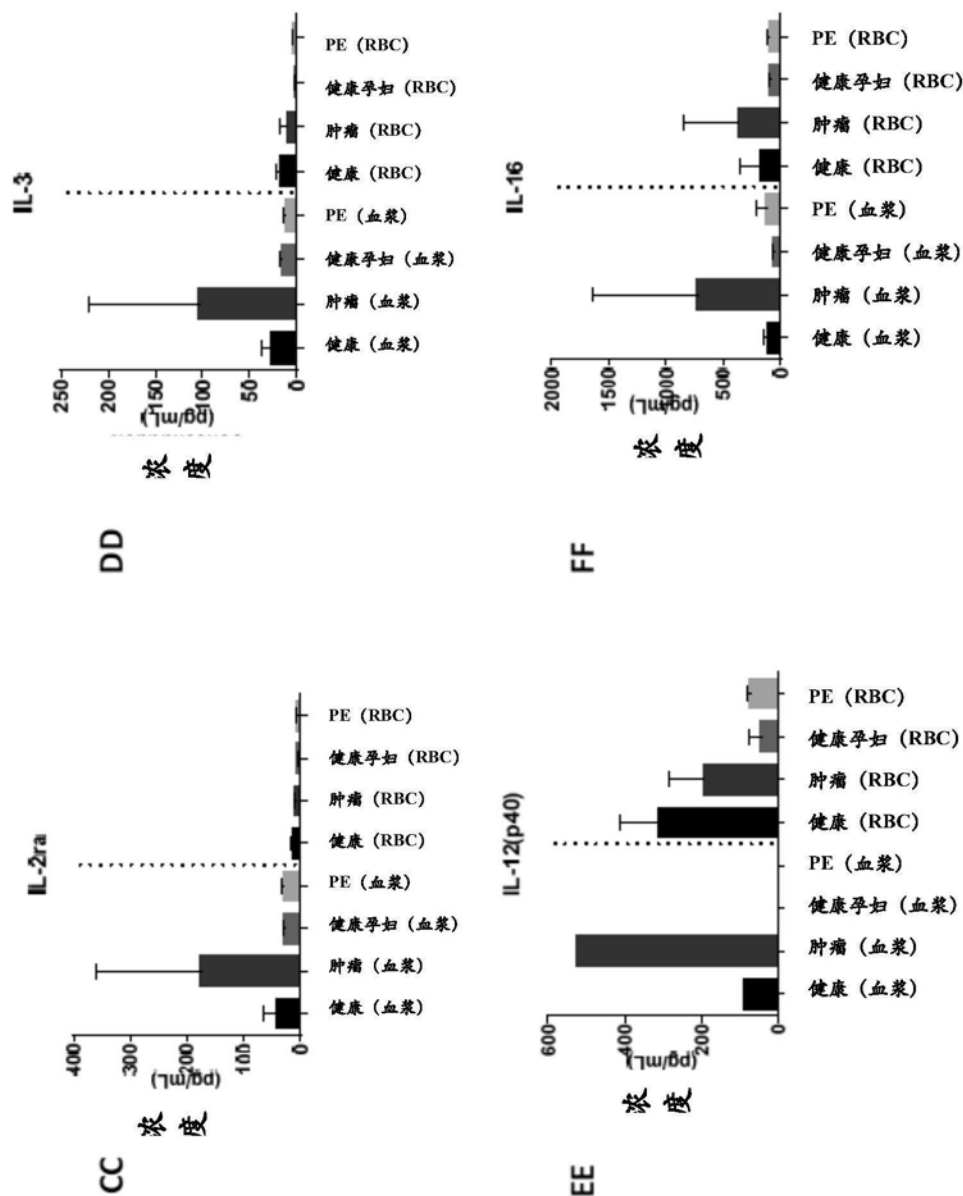


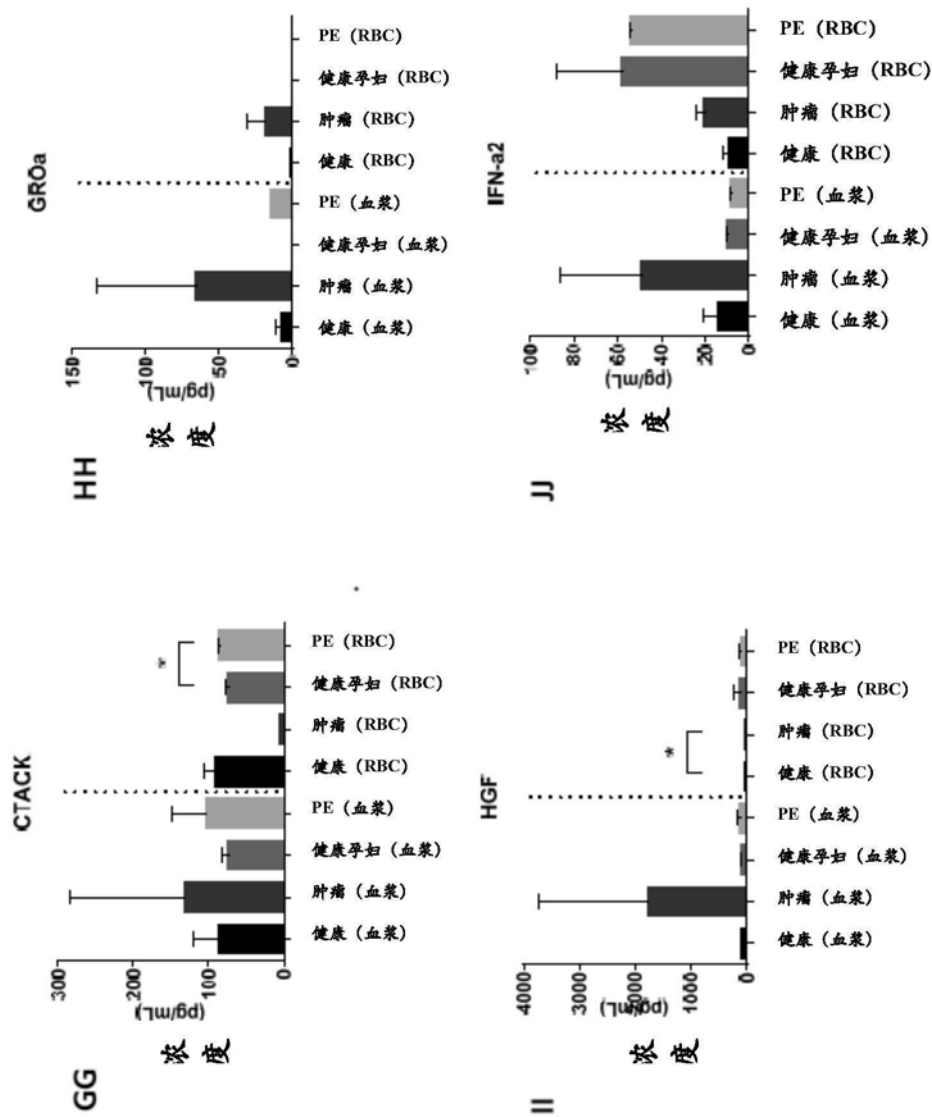
U

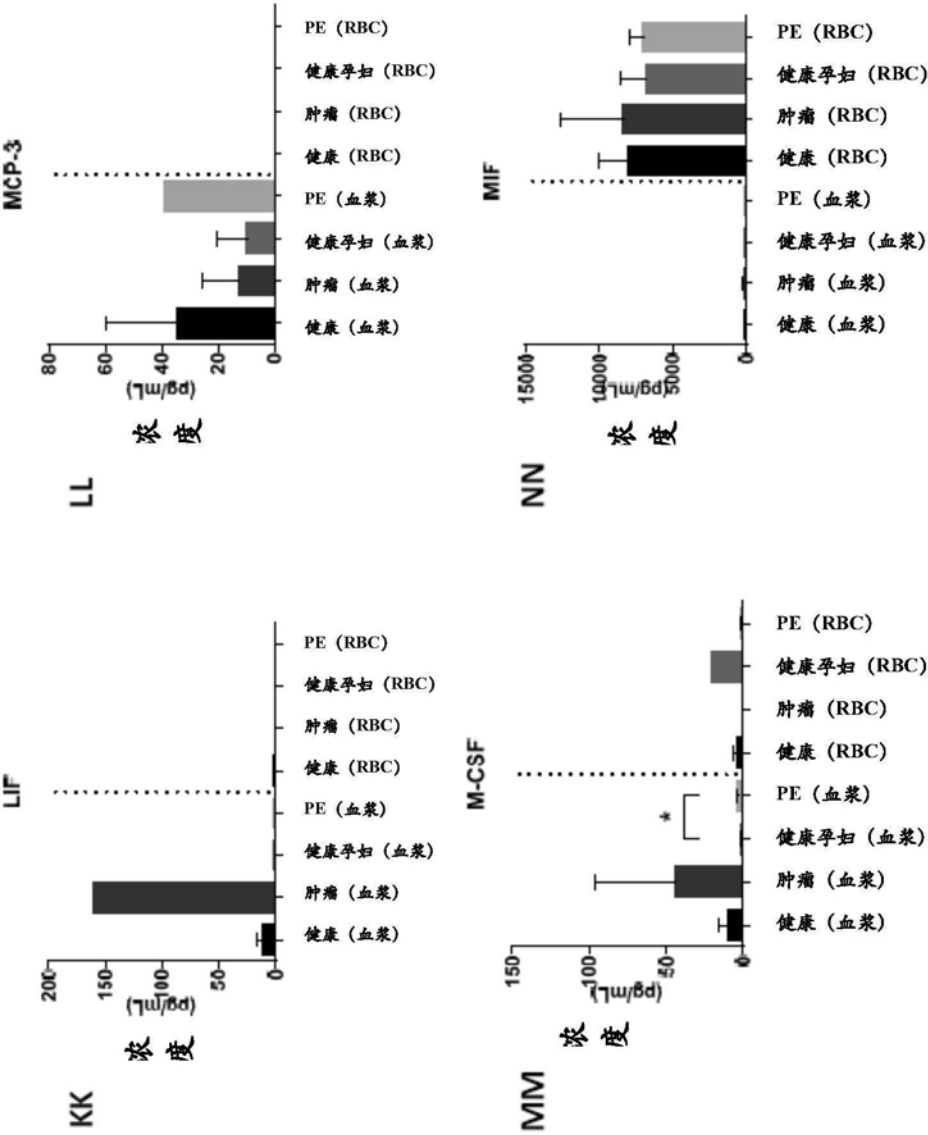


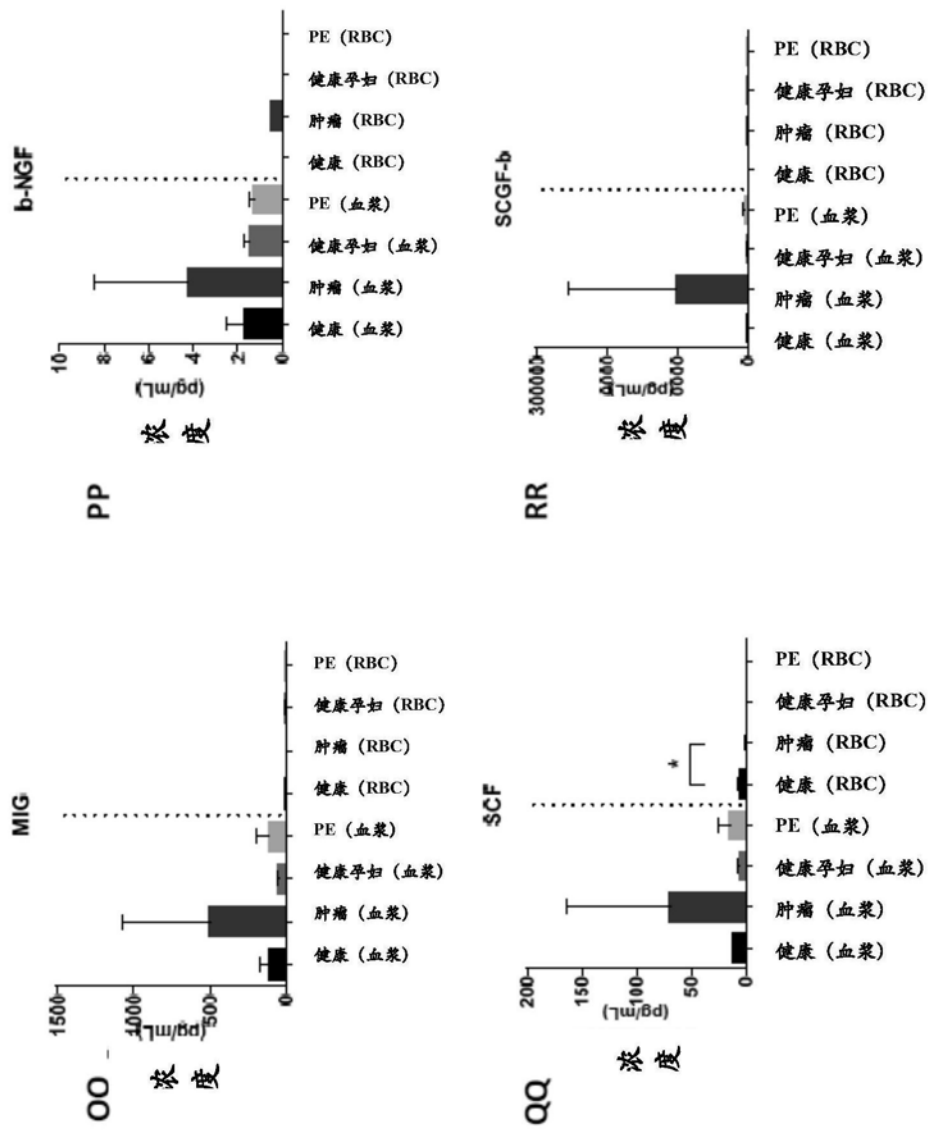
W











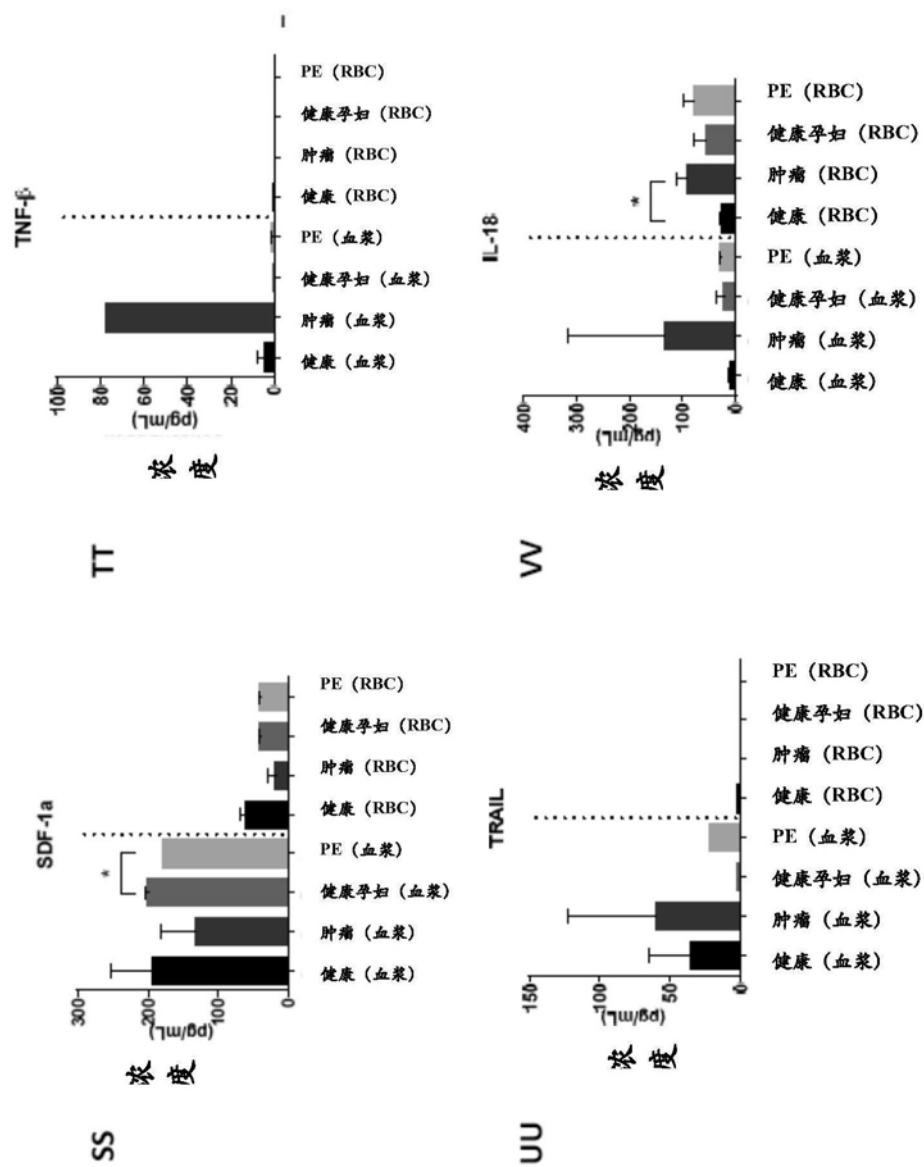


图23

分析物	血浆*		RBCs*				倍数变化
	对象号	全血的 pg/mL		对象号	全血的 pg/mL		
		浓度	SD		浓度	SD	
促炎							
IFN-α2	3	24.4	18.9	3	251.5	32.4	14.97
IFN-γ	3	18.6	1.9	3	18.3	12.2	0.96
IL-1α	3	3.6	6.2	3	35.9	44.3	156.39
IL-1β	3	0.3	0.1	3	1.9	1.5	7.28
IL-5	3	2.7	0.4	0	-	-	-
IL-8	3	5.5	6.2	2	31.9	41.8	1.93
IL 9	3	2.6	0.8	2	7.8	2.5	2.10
IL-12(p70)	3	5.2	5.6	3	15.3	5.6	6.11
IL-15	3	1.3	0.7	3	53.6	20.3	62.29
IL-17	3	19.1	14.4	3	132.8	26.2	9.75
IL-18	3	67.0	91.9	3	1209.7	535.3	79.51
MIF	3	45.5	47.2	3	8348.1	4259.3	280.31
TNF-α	3	7.0	1.3	2	8.5	6.0	0.83
TNF-β	1	77.24	-	0	-	-	-
TRAIL	3	29.9	31.2	0	-	-	-

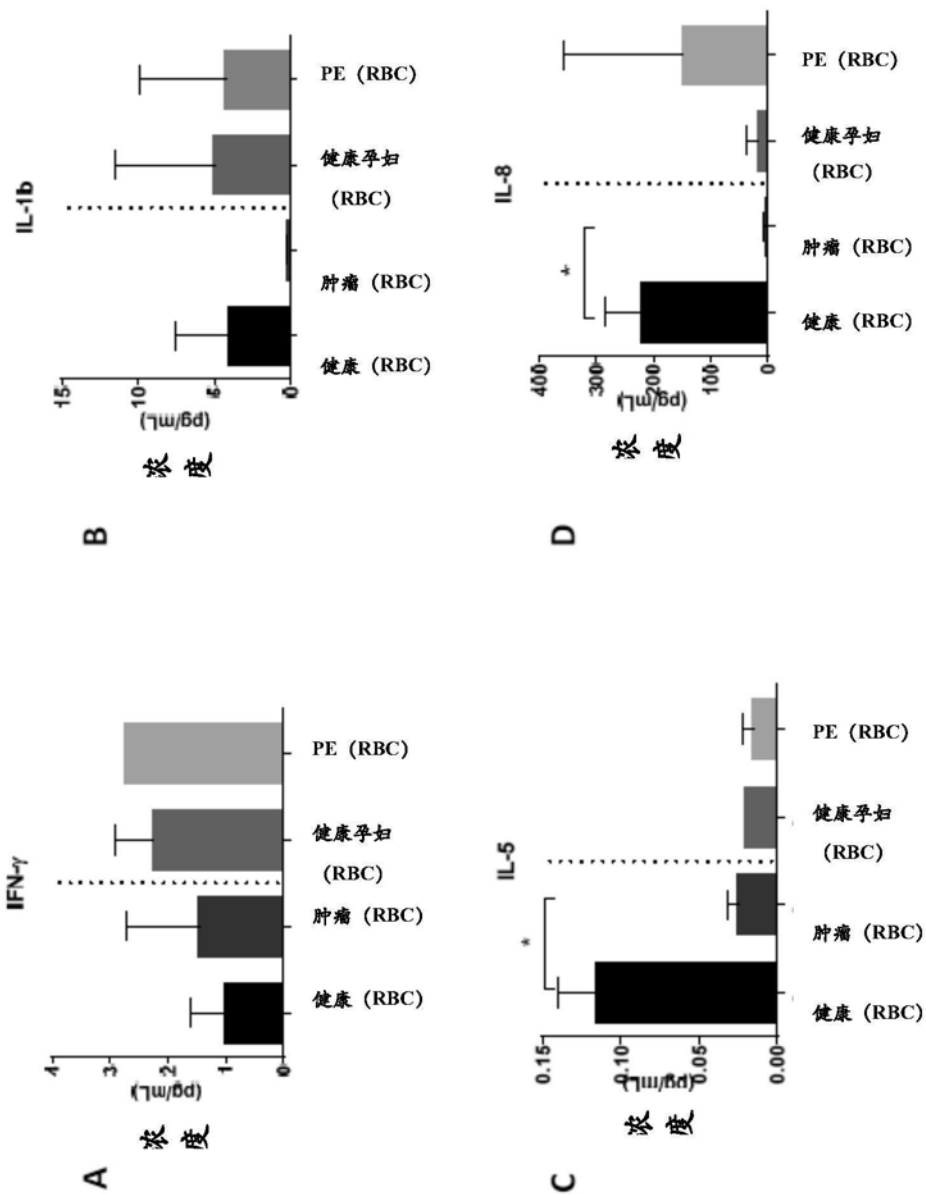
图24A

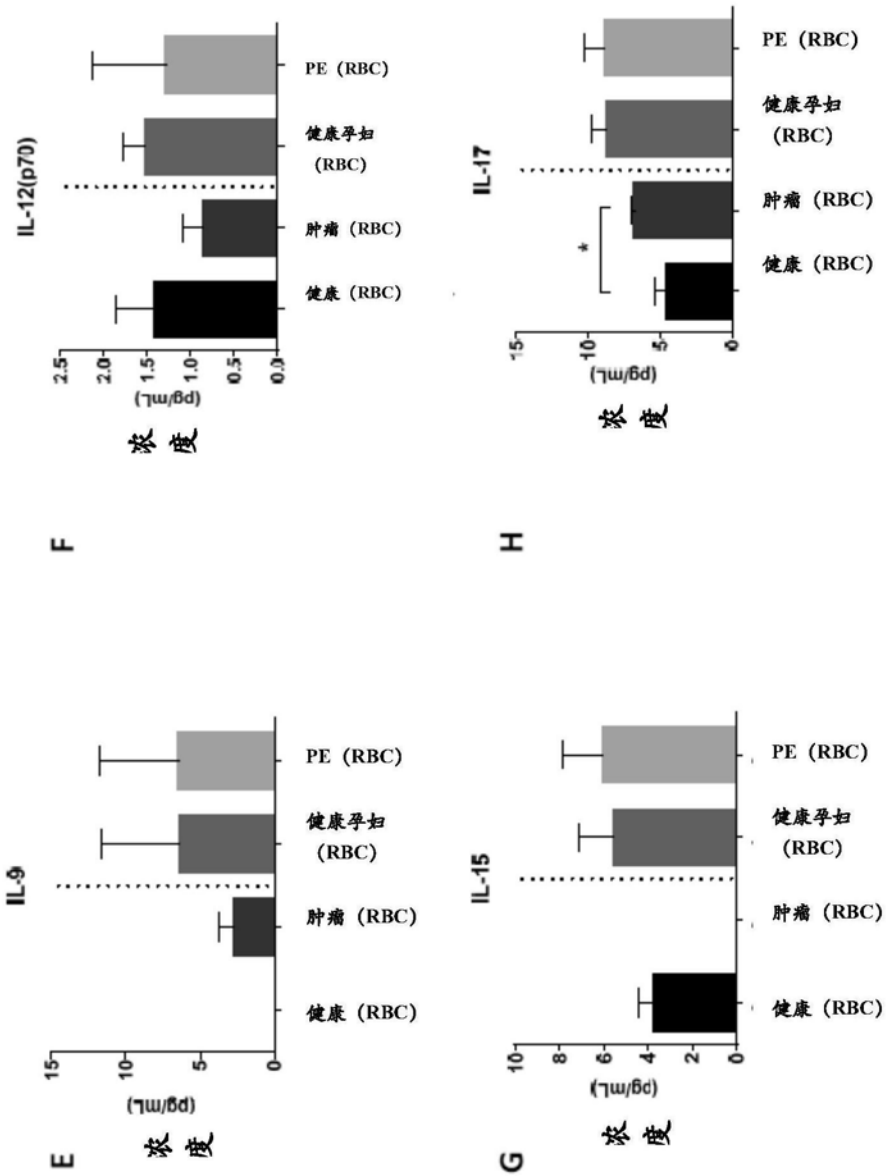
分析物	血漿*		RBCs*		对象号	全血的 pg/mL		对象号	全血的 pg/mL		倍数变化
	对象号	浓度	对象号	SD		浓度	SD				
抗炎											
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87.35				
IL2-ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63				
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-				
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47				
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42				
趋化因子											
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81				
Eotaxin	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67				
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10.11				
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12.29				
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95.56				
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-				
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-				
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3.76				
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87				
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4.10				
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82				

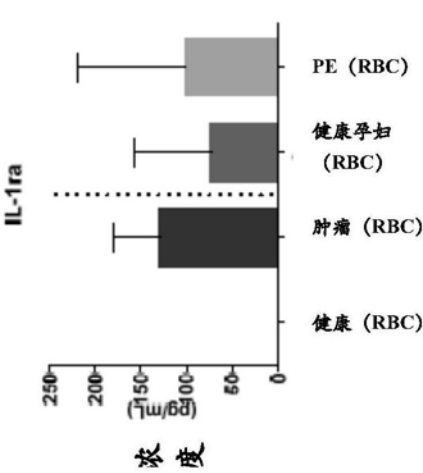
图24B

分析物	血浆*				RBCs*			倍数变化
	对象号	全血的 pg/mL		对象号	全血的 pg/mL			
		浓度	SD		浓度	SD		
抗炎								
IL-1ra	3	13.1	0.9	3	1182.4	970.5	87.35	
IL2-ra	3	87.3	93.7	3	108.5	73.6	2.63	
IL-4	3	0.3	0.1	-	-	-	-	
IL-10	3	2.3	3.0	3	19.0	6.0	118.47	
IL-13	3	2.2	2.5	3	2.4	1.4	3.42	
趋化因子								
CTACK	3	65.9	76.9	1	64.9	-	1.81	
Eotaxin	3	20.9	26.3	3	38.6	23.1	3.67	
GRO-α	3	32.9	33.7	3	217.6	98.0	10.11	
IL-16	3	361.8	461.0	3	3563.4	3915.3	12.29	
MCP-1	3	7.0	7.8	3	285.2	63.1	95.56	
MCP-3	2	6.3	6.5	0	-	-	-	
MIG	3	249.7	285.1	0	-	-	-	
MIP-1α	3	1.8	1.8	3	3.0	2.4	3.76	
MIP-1β	3	10.4	8.2	3	4.6	1.8	0.87	
RANTES	3	415.3	58.0	3	1717.1	398.8	4.10	
SDF-1α	3	65.7	25.0	2	246.5	231.5	2.82	

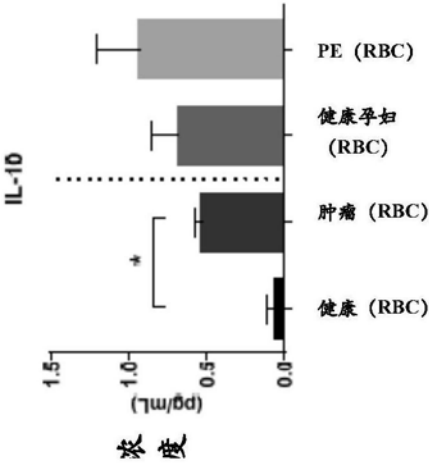
图24C



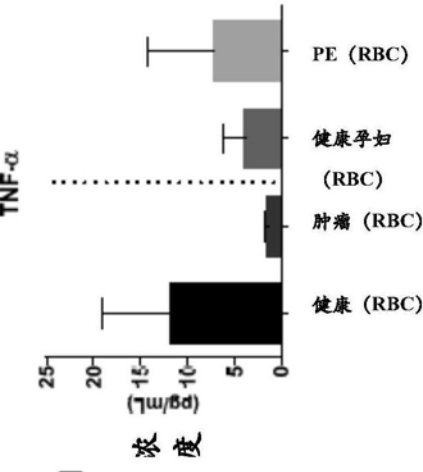




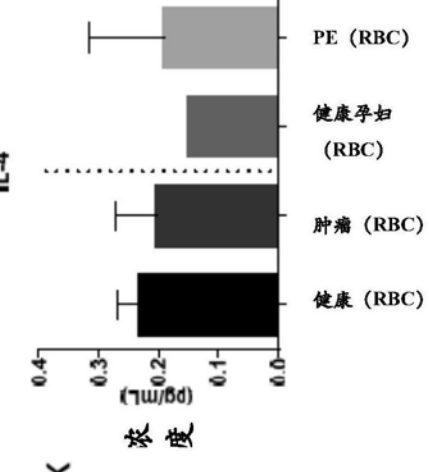
J



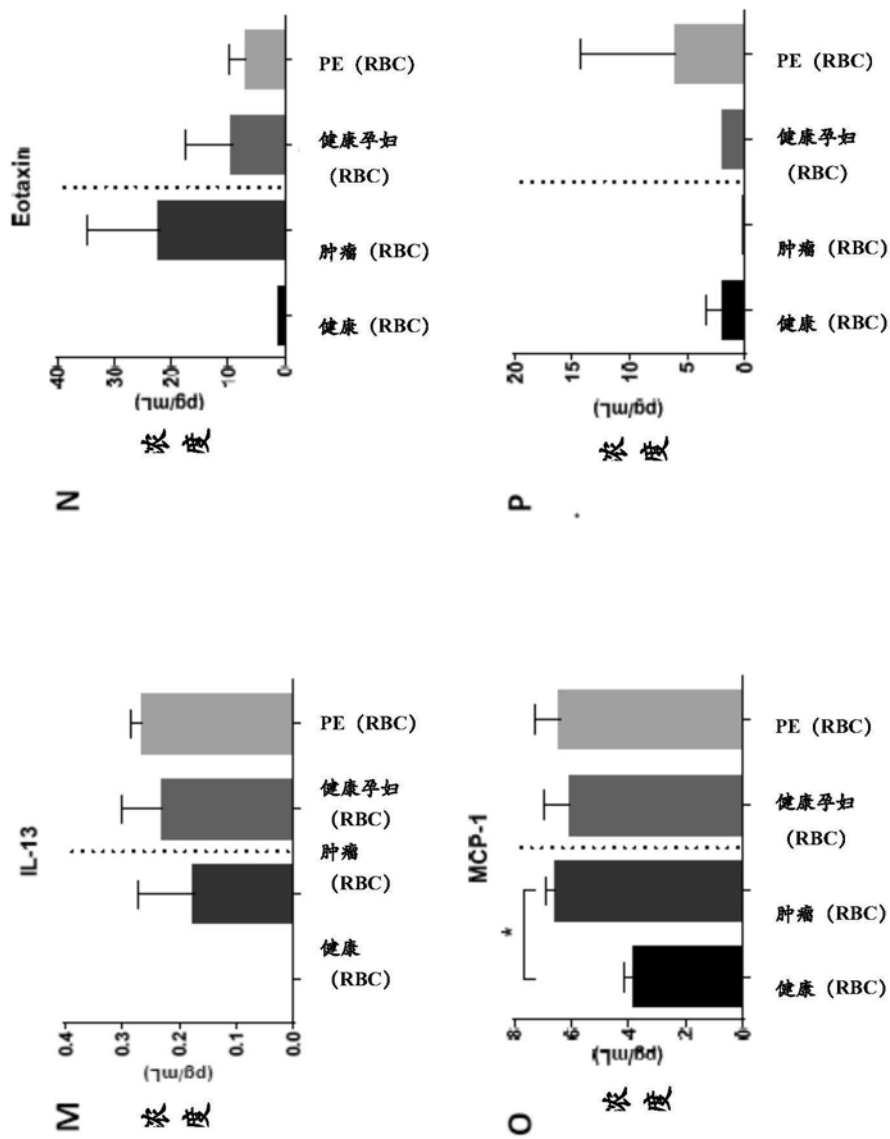
L

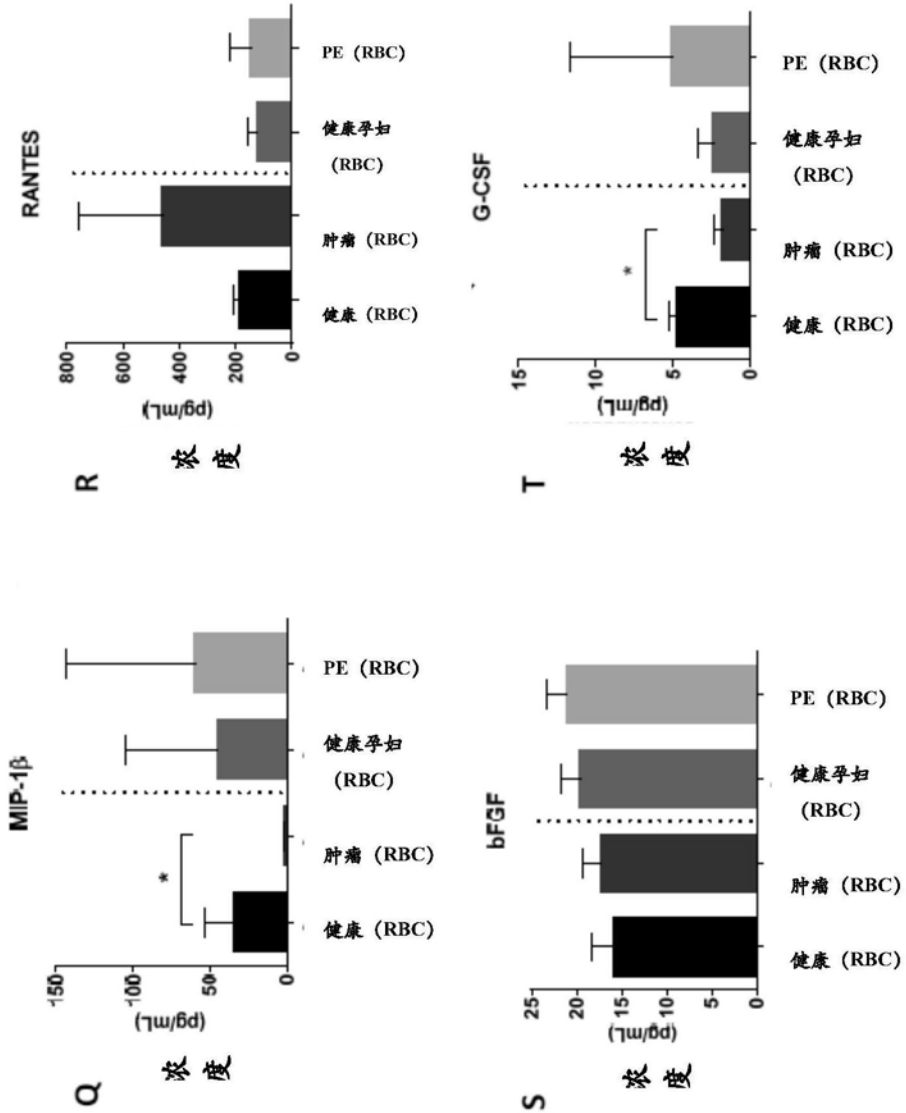


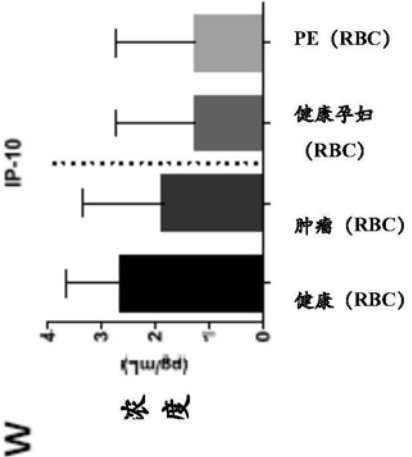
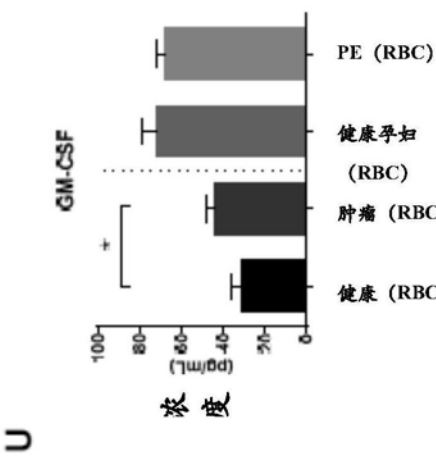
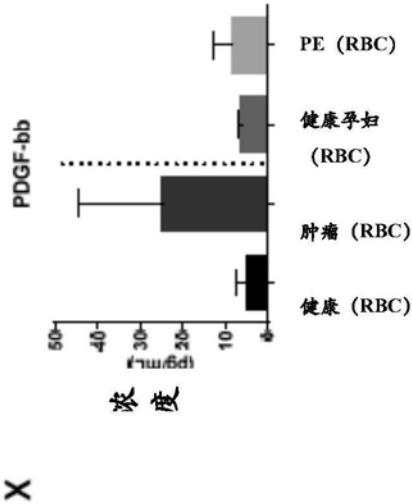
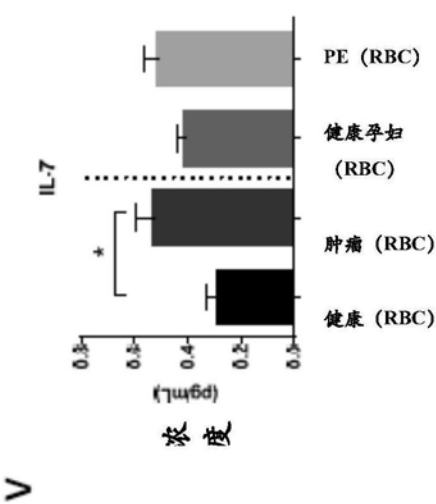
I

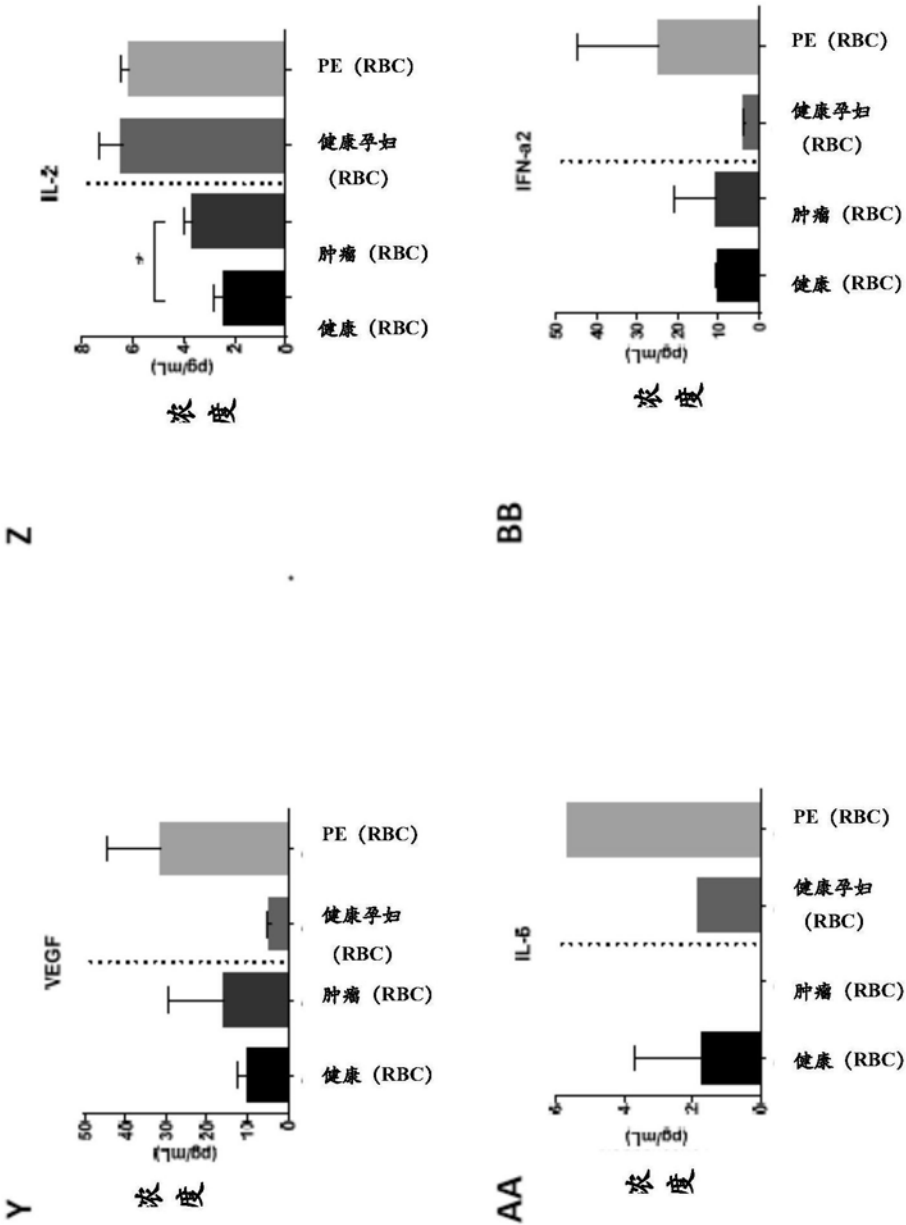


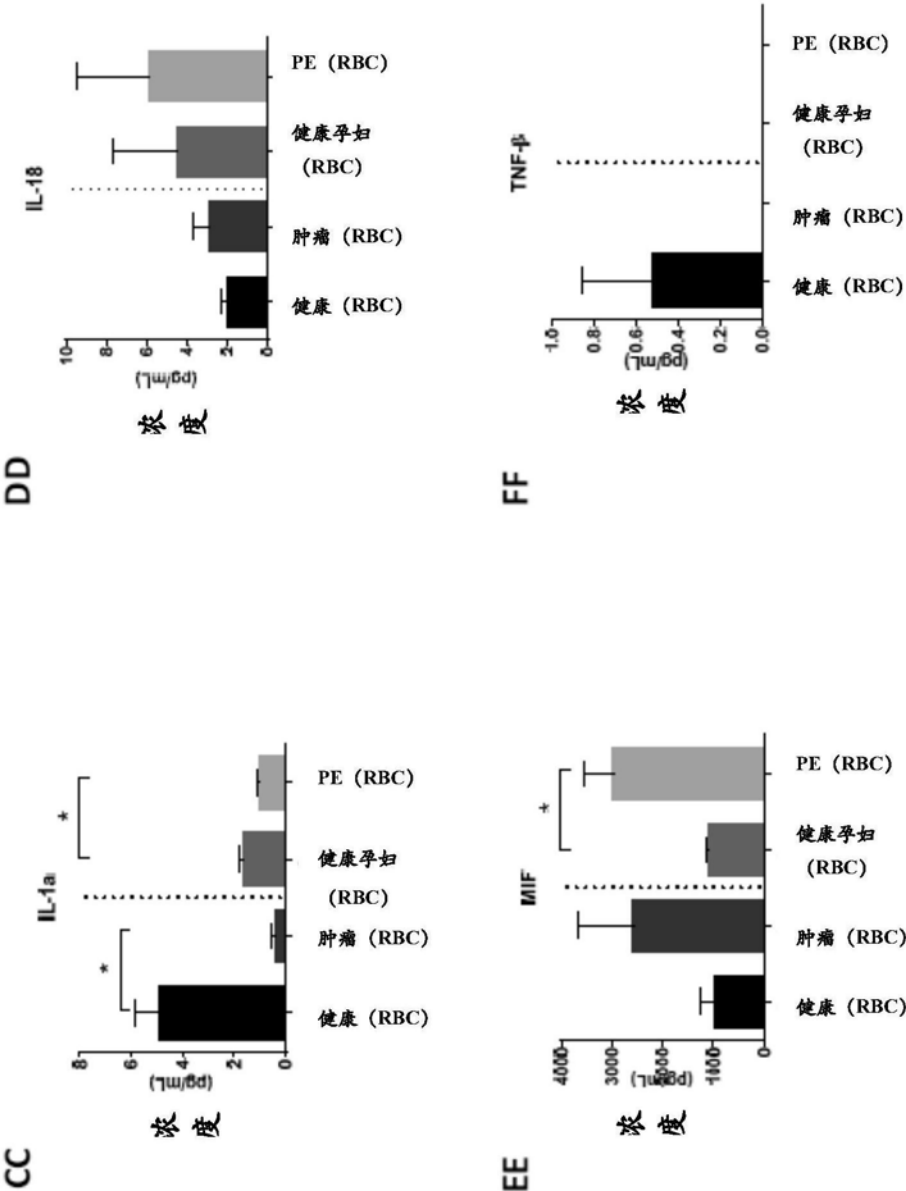
K

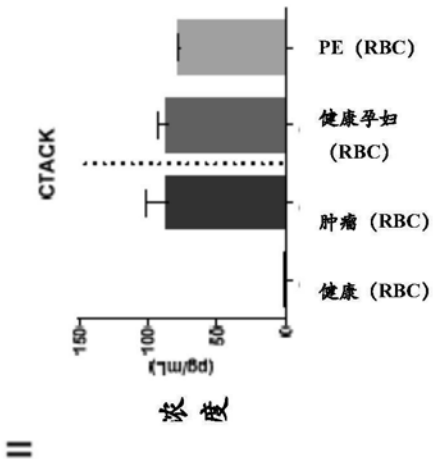
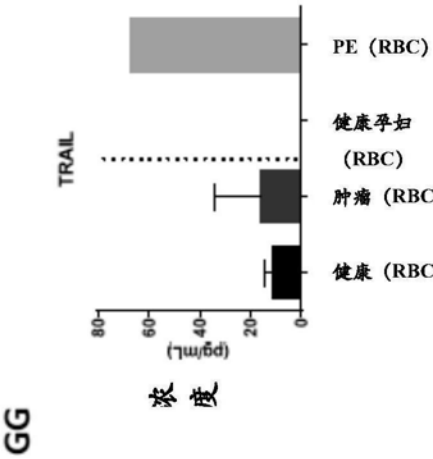
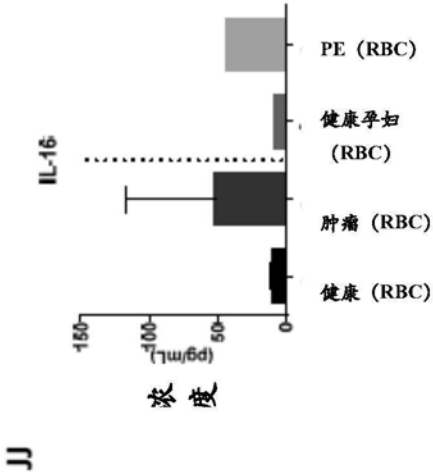
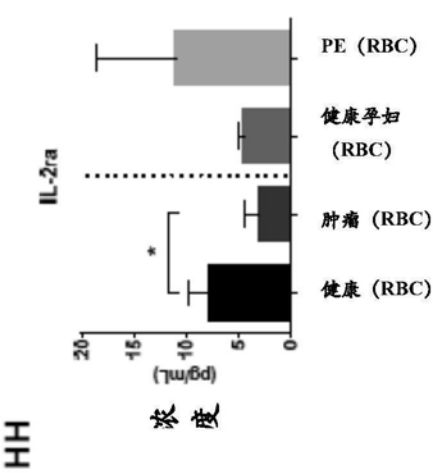


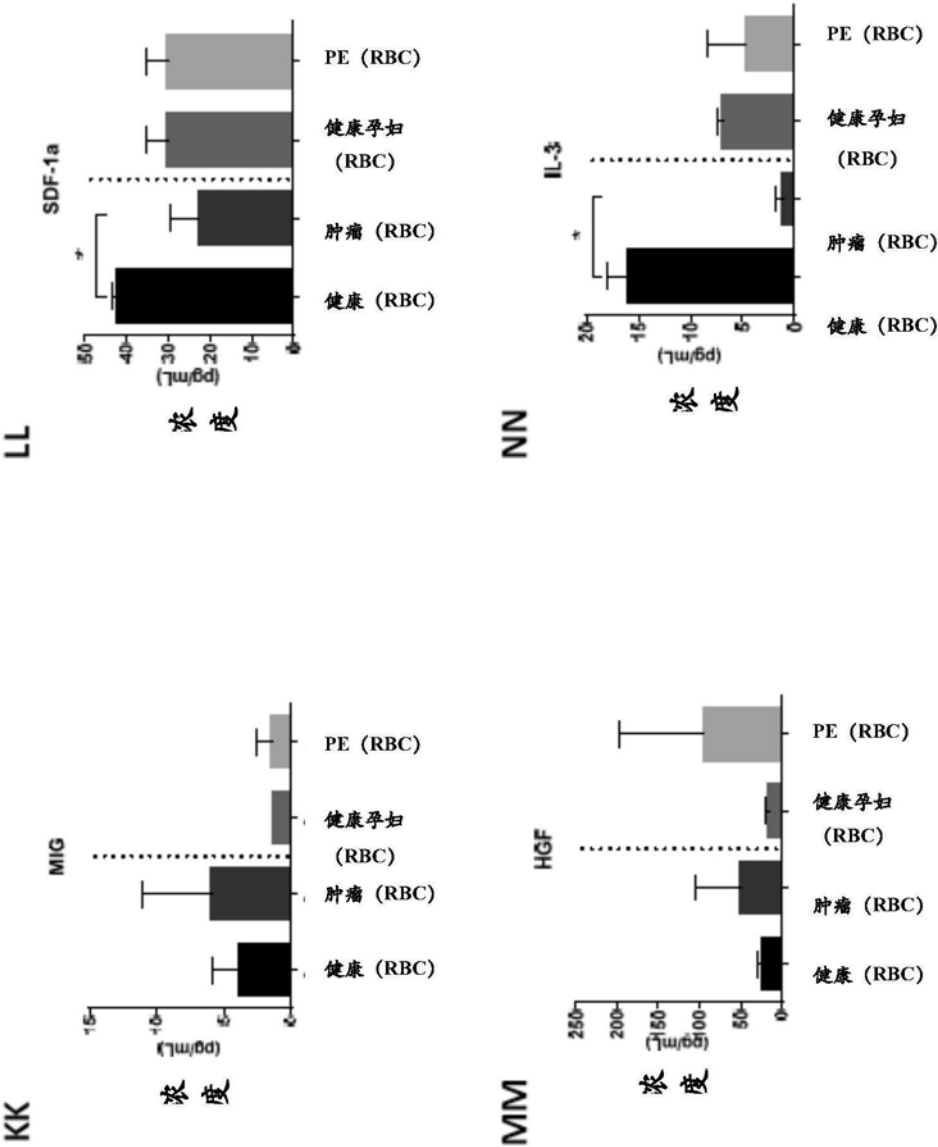












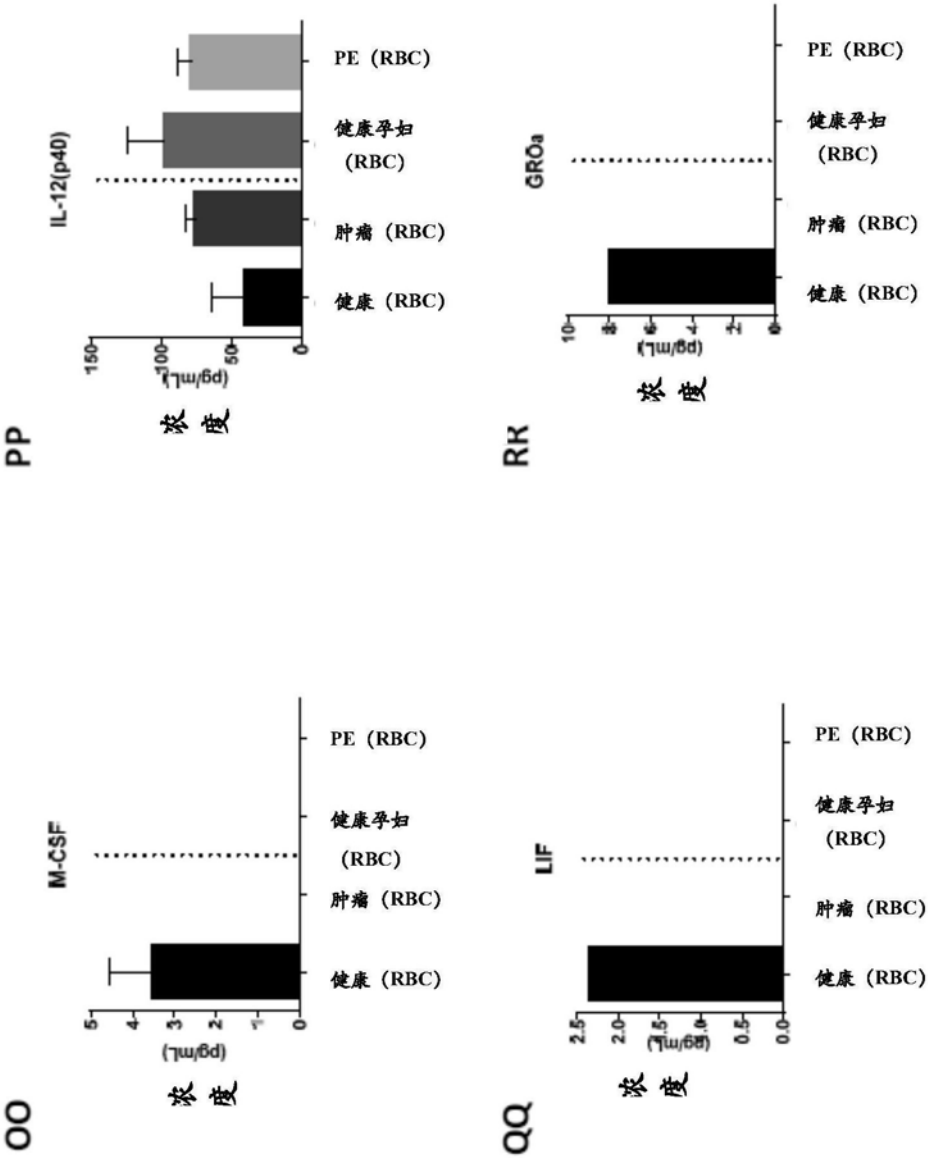


图25