(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111918971 B
(45)授权公告日 2024.09.03

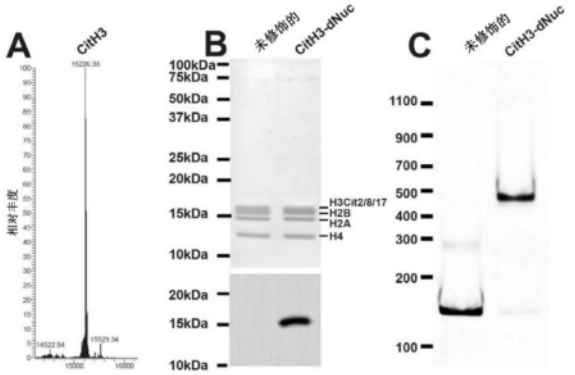
(21)申请号 201980016349.5
(22)申请日 2019.03.01
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111918971 A
(43)申请公布日 2020.11.10
(30)优先权数据
62/637,066 2018.03.01 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.08.31
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/020283 2019.03.01
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/169263 EN 2019.09.06
(73)专利权人 埃皮塞弗公司
地址 美国北卡罗来纳州
(72)发明人 马尔蒂斯·威廉·考尔斯
马修·F·韦利汉
安德烈亚·L·约翰斯通
迈克尔-克里斯托弗·基奥
孙如文 内森·W·哈勒
马修·R·马龙德
(74)专利代理机构 成都超凡明远知识产权代理有限公司 51258
专利代理师 刘明 刘书芝
(51)Int.Cl.
C12Q 1/6851(2006.01)
C12Q 1/6804(2006.01)
G01N 33/53(2006.01)
G01N 33/68(2006.01)
(56)对比文件
US 2007160989 A1,2007.07.12
CN 107002289 A,2017.08.01
审查员 陈多
权利要求书3页 说明书27页 附图7页

(54)发明名称

利用化学确定的重组核小体定量核小体修饰

(57)摘要

本发明涉及携带组蛋白和/或DNA修饰的重组/半合成核小体作为用于定量来自生物样品的共价修饰(在组蛋白上或包裹DNA上)、变体或突变核小体(统称“修饰核小体”或“核小体修饰”)的参考标准品的用途。本发明还涉及使用该测定来准确定量作为疾病生物标志物的单个或组合核小体修饰的方法。



CN 111918971 B

1.一种用于定量生物样品中核小体修饰丰度的非诊断且非预后的方法,其中所述核小体修饰是组蛋白和/或DNA修饰,所述方法包括:

a.分离生物样品;

b.从所述生物样品制备天然单核小体或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

c.制备包括核心组蛋白和/或DNA修饰靶表位的重组单核小体或多核小体样品;

d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入亲和试剂;

f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

2.一种用于定量生物样品中单个核小体上两个或更多个修饰的丰度的非诊断且非预后的方法,其中所述两个或更多个修饰是组蛋白和/或DNA修饰,所述方法包括:

a.分离生物样品;

b.从所述生物样品制备天然单核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含两个或更多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

c.制备重组单核小体样品,所述重组单核小体样品包括携带所述两个或更多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体;

d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入两种或更多种亲和试剂;

f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

3.一种从受试者的生物样品中筛选改变一个或多个核小体修饰的表观遗传状态的剂的方法,其中所述一个或多个核小体修饰是组蛋白和/或DNA修饰,所述方法包括在存在和不存在所述剂的情况下定量一个或多个核小体修饰,其中定量所述一个或多个核小体修饰包括:

a.从所述受试者中分离生物样品;

b.从所述生物样品制备天然单核小体或多核小体文库,其中,所述文库包括在一个或多个靶表位中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

c.制备重组单核小体或多核小体样品,所述重组单核小体或多核小体样品包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体;

d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量

所述靶表位中核小体修饰的丰度;

其中,在所述剂存在和不存在的情况下的表观遗传状态的改变识别出修饰表观遗传状态的剂。

4.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述生物样品用酶处理以将染色质消化成单核小体或多核小体。

5.根据权利要求4所述的方法,其中,所述酶是微球菌核酸酶。

6.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述生物样品包括细胞,并且染色质从所述细胞中分离。

7.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述生物样品是生物流体。

8.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述生物样品包括外周血单核细胞。

9.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述生物样品包括循环核小体。

10.根据权利要求9所述的方法,其中,所述循环核小体来自血液。

11.根据权利要求7所述的方法,其中,所述生物样品是血浆、尿、唾液、粪便、淋巴液或脑脊液。

12.根据权利要求3所述的方法,其中,所述受试者是人。

13.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述亲和试剂是针对所述表位的抗体或其片段。

14.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,对同一核小体上的至少一个核小体修饰进行定量。

15.根据权利要求1或3所述的方法,其中,对不同核小体上的至少一个核小体修饰进行定量。

16.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,至少一个核小体修饰的定量通过基于抗体的检测测定法确定。

17.根据权利要求16所述的方法,其中,所述基于抗体的检测测定法选自由以下组成的组:ELISA、AlphaSCREEN、Luminex和免疫印迹。

18.根据权利要求16所述的方法,其中,所述基于抗体的检测测定法是AlphaLISA。

19.根据权利要求16所述的方法,其中,所述基于抗体的检测测定法使用用于底物捕获和检测的两种不同的抗体。

20.根据权利要求19所述的方法,其中,所述捕获和检测抗体特异性地结合组蛋白PTM和另一核小体结构。

21.根据权利要求20所述的方法,其中,所述另一核小体结构是DNA或未修饰的组蛋白。

22.根据权利要求19所述的方法,其中,所述捕获和检测抗体特异性地结合两种不同的组蛋白PTM。

23.根据权利要求16所述的方法,其中,所述基于抗体的检测测定法使用用于底物捕获和检测的相同的抗体。

24.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述核小体包括选自由以下组成的组的至少一种翻译后氨基酸修饰或DNA修饰:丝氨酸和丙氨酸的N-乙酰化;丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化;赖氨酸的N-酰化;赖氨酸的N6-甲基化、N6,N6-二甲基化、N6,N6,N6-三甲基化;精氨酸的ω-N-甲基化、对称二甲基化、不对称二甲基化;精氨酸的瓜氨酸化;赖氨

酸的泛素化;丝氨酸和苏氨酸的O-甲基化,精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的ADP-核糖基化;和致癌K-至-M突变;5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶、7-甲基鸟苷、黄苷和肌苷。

25.根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中,所述核小体包括选自由以下组成的组的至少一种翻译后氨基酸修饰:赖氨酸的N-巴豆酰化或赖氨酸的SUMO化。

26.根据权利要求24所述的方法,其中,所述致癌K-至-M突变为H3K4M、H3K9M、H3K27M、H3G34R、H3G34V、H3G34W或H3K36M。

27.根据权利要求1或3所述的方法,其中,修饰的重组核小体用作对照以确认在单个或邻近核小体上检测到组合修饰。

利用化学确定的重组核小体定量核小体修饰

[0001] 优先权声明

[0002] 本申请要求提交于2018年3月1日的美国申请序列号62/637,066的优先权,其全部内容通过援引并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明涉及携带组蛋白和/或DNA修饰的重组/半合成核小体作为用于定量来自生物样品的共价修饰(在组蛋白上或包裹DNA上)、变体或突变核小体(统称“修饰核小体”或“核小体修饰”)的参考标准品的用途。本发明还涉及使用该测定来准确定量作为疾病生物标志物的单个或组合核小体修饰的方法。

背景技术

[0004] 核小体是染色质的重复单位,由一体地包裹在组蛋白八聚体(每个核心组蛋白(H2A、H2B、H3和H4)包含两个拷贝)周围的147个碱基对的DNA组成(Margueron et al., Nat.Rev.Genet.11(4):285(2010)).染色质结构和功能的变化调节不同的细胞活性,包括基因表达、DNA修复、染色体传递和细胞分化(Brown et al.,Hum.Mol.Genet.21(R1):R90(2012);Lahtz et al.,J.Mol.Cell.Biol.3(1):51(2011);Lunyak et al., Hum.Mol.Genet.17(R1):R28(2008);Reik,Nature 447(7143):425(2007))。这些过程部分地由可逆的组蛋白翻译后修饰(PTM;例如赖氨酸甲基化或乙酰化)介导,其具有直接作用或被效应结合蛋白“读取”以转导特定的下游信号通路。迄今为止,已鉴定出100多种独特的组蛋白PTM,其中许多与人类疾病相关,从神经退行性变(Landgrave-Gomez et al., Front.Cell.Neurosci.9:58(2015))和代谢综合征(DelCurto et al., Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab.Care 16(4):385(2013);Wang et al.,Antioxid.Redox Signal 17(2):282(2012))到癌症(Chopra et al.,Cancer Genet.208(5):192(2015); Greenblatt et al.,Leukemia 28(7):1396(2014);Gajer et al.,Oncogenesis 4:e137(2015);

[0005] Witt et al.,Curr.Pharm.Des.15(4):436(2009);Hanmod et al., Pediatr.Blood Cancer 62(1):52(2015);Kobayashi et al.,Oncogene 32(21):2640(2013))。值得注意的是,PTM相互作用蛋白(又称“阅读器”)是高度可药物作用的,这使得它们成为多种人类疾病/疾患的特殊治疗靶点(Arrowsmith et al.,Nat.Rev.Drug Discov.11(5):384(2012))。此外,组蛋白PTM是一种新兴的癌症生物标志物,其可用于早期疾病检测和预后,以及告知个性化治疗策略(Khan et al.,World J.Biol.Chem.6(4):333(2015);Chervona et al.,Am.J.Cancer Res.2(5):589(2012))。

[0006] 组蛋白PTM和染色质调节蛋白之间的协同功能代表了复杂的、系统水平的信号转导网络,其有效相互应答需要基于核小体的工具。多价性(即,给定蛋白质内的多个阅读器结构域)是染色质调节剂的共同特征(Ruthenburg et al.,Nat.Rev.Mol.Cell.Biol.8(12):983(2007)),并且被认为是以背景特异性方式调控组蛋白相互作用的关键手段。事实

上,在存在各种PTM或其组合的情况下,阅读器结合(以及随后的细胞调节变化)发生了巨大的改变,这是被称为组蛋白密码的假说(Strahl et al.,Nature403(6765):45(2000);Jenuwein et al.,Science 293(5532):1074(2001)))。例如,溴结构域PHD指状转录因子(BPTF)阅读器蛋白包含对H3K4me3(K_d=~1μM)和H4K12ac(K_d=~60μM)具有低个体结合亲和力的结构域(Li et al.,Nature 442(7098):91(2006)),但在H3K4me3/H4K12ac组合修饰单核小体的存在下,这一亲和力显著增加(与单独的H3K4me3相比,>3倍)(Ruthenburg et al.,Cell 145(5):692(2011))。BPTF是抗癌治疗靶点(Dar et al.,J.Natl.Cancer Inst.107(5)(2015));在肌萎缩侧索硬化症患者中也有很高的水平(Mu et al.,Exp.Neurol.146(1):17(1997))。有趣的是,H3K4me3和H3/H4乙酰化共存在于活性启动子处(Zhang et al.,EMBO Rep.16(11):1467(2015)),并且H3K4me3已经显示出通过效应子募集来促进组蛋白的乙酰化(Tang et al.,Cell 154(2):297(2013))。机制研究刚刚开始揭示组蛋白PTM对细胞生理学的组合影响,这是研究疾病状态的必要前置条件。举例来说,肠道微生物组的变化(由饮食引起)可以对宿主组织中组蛋白PTM的特定组合产生显著影响(Krautkramer et al.,Mol.Cell 64(5):982(2016))。同样,最近的发现表明,组合核小体PTM(相对于单个PTM)可能提供更好的肺癌预后生物标志物(Shema et al.,Science 352(6286):717(2016))。

[0007] 组合组蛋白PTM的有效呈现依赖于完整核小体的三维结构,该结构可作为生理PTM-蛋白相互作用的脚手架。如果我们要将表观遗传调控和疾病之间的联系转化为下一代疗法和生物标志物,那么了解组蛋白组合密码的本质是至关重要的。组蛋白甲基化和乙酰化尤其如此,它们在染色质调节和疾病中起着不可或缺的作用(Greer et al.,Nat.Rev.Genet.13(5):343(2012);Filippakopoulos et al.,Nat.Rev.Drug Discov.13(5):337(2014);Soshnev et al.,Mol.Cell 62(5):681(2016))。

[0008] 已经开发了几种用于定量来自生物样品的组蛋白PTM的方法(Sidoli et al.,J.Vis.Exp.2016(111);Onder et al.,Expert Rev.Proteomics 12(5):499(2015);Machleidt et al.,J.Biomol.Screen.16(10):1236(2011)),其中大多数方法依赖于使用修饰特异性抗体来进行富集核小体(例如,染色质免疫沉淀;ChIP)或检测(例如,ELISA或Alpha)。ELISA通常用于定量生物样品中的组蛋白或DNA修饰,已使用各种抗体捕获方法开发出特异性测定方法,来直接定量组蛋白或核小体上的修饰。基于核小体的检测优于基于组蛋白的检测,原因有两个:

[0009] 1)基于核小体的方法不需要酸提取步骤,酸提取步骤费力并且会引起变异性;以及,

[0010] 2)基于核小体的测定可定量反式组合修饰(例如,组蛋白-组蛋白、DNA-DNA或组蛋白-DNA组合),这些修饰无法单独使用组蛋白亚基或DNA进行监测。

[0011] 尽管有这些主要优点,但目前基于核小体的测定缺乏适当的定量对照。实际上,使用现有技术的测定是定性的,其中PTM水平报告为相对测量值、或使用外源异染色质(例如,禽类、酵母或昆虫)进行归一化。纯化的外源性染色质制剂的使用可能会带来一系列问题,因为这些试剂的确定性不良(在PTM特异性水平上),并且示出批量的变异性,从而限制了它们用于测定的归一化(跨实验甚至实验室)。除此之外,目前要确定组合标记是否真正存在于同一个核小体上而不是重合地存在于总库中是具有挑战性的。

[0012] 鉴于上述情况,本领域需要用于检测生物样品中组蛋白和/或DNA修饰的基于核小体的测定的改进对照。

发明内容

[0013] 本发明涉及携带组蛋白和/DNA修饰的重组/半合成/设计核小体(以下简称为“重组核小体”)作为用于校准的定量标准品的用途。与目前使用的纯化染色质提取物不同,本测定利用完全确定的重组/半合成核小体精确定量单个或组合核小体修饰。与本领域常用的标准品相似,修饰的核小体将在同一实验中进行分析(与样品处理相同),以产生用于分析定量的标准曲线。与当前使用的相对测量相比,单个或组合核小体PTM的定量可提供更好的疾病生物标志物。

[0014] 值得注意的是,本发明人已经确定只有核小体提供在血浆样品中有用的参考标准品。当组蛋白或核小体被添加到血浆中时,只有后者被恢复到预测值,因此可用于定量。以这种方式,本发明的核小体为直接从血浆或其他体液中定量循环核小体的测定提供了有用的标准品。

[0015] 因此,本发明的一个方面涉及用于一种用于定量生物样品中核小体修饰(组蛋白或DNA)丰度的方法,该方法包括:

[0016] a.分离生物样品;

[0017] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0018] c.制备包括核心组蛋白和/或DNA修饰靶表位的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0019] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0020] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入亲和试剂;

[0021] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0022] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0023] 本发明的另一个方面涉及一种用于定量生物样品中单个核小体上两个或更多个修饰(组蛋白或DNA)的丰度的方法,所述方法包括:

[0024] a.分离生物样品;

[0025] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含两个或更多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0026] c.制备包括携带所述两个或更多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0027] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0028] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入两种或更多种亲和试剂;

[0029] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0030] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,

定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0031] 本发明的又一个方面涉及一种用于定量来自患有疾病或疾患的受试者的生物样品中一个或多个核小体修饰(组蛋白或DNA)的丰度的方法,所述方法包括:

[0032] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0033] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0034] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0035] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0036] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0037] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0038] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0039] 本发明的再一个方面涉及一种基于对一个或多个核小体修饰的定量来确定患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者的预后的方法,所述方法包括:

[0040] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0041] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0042] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0043] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0044] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0045] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0046] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;以及

[0047] h.基于所述一个或多个靶表位的丰度确定所述受试者的预后。

[0048] 本发明的又一个方面涉及一种基于一个或多个核小体修饰的定量鉴定与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的生物标志物的方法,所述方法包括:

[0049] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0050] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0051] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0052] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0053] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0054] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0055] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;以及

[0056] h.将所述一个或多个靶表位的丰度与所述表观遗传修饰相关的疾病或疾患相关联;从而鉴定与所述表观遗传修饰相关的疾病或疾患的生物标志物。

[0057] 本发明的另一个方面涉及一种从受试者的生物样品中筛选修饰一个或多个核小体修饰的表观遗传状态的剂的方法,所述方法包括在存在和不存在所述剂的情况下确定一个或多个核小体修饰的定量,其中确定所述一个或多个核小体修饰的定量包括:

[0058] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0059] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0060] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0061] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0062] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0063] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0064] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;

[0065] 其中,在所述剂存在和不存在的情况下的表观遗传状态的改变识别出修饰表观遗传状态的剂。

[0066] 在下文对本发明的描述中更详细地阐明本发明的这些和其他方面。

附图说明

[0067] 图1A-1C示出修饰的重组设计核小体(dNuc)的合成和质量验证。(A)dNuc组装前,H3R2/R8/R17三瓜氨酸化的组蛋白的质谱分析。预期质量＝15227道尔顿;实际质量＝15226道尔顿。(B)还原SDS-PAGE后,使用考马斯和免疫印迹(ABCAM:ab5103)验证八聚体和PTM。(C)使用天然PAGE验证H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc组装体(无游离DNA)。

[0068] 图2A-2B示出,核小体以预期值回收,并提供人血浆中的可靠校准。以H3R2cit/R8cit/R17cit组蛋白和dNuc为底物,建立了测量核小体瓜氨酸化的夹心ELISA法。使用抗H3R2cit/R8cit/R17cit抗体捕获底物;使用对H3未修饰C末端特异性的HRP缀合的抗体进行检测。(A)使用掺入5％人血浆中的瓜氨酸化的H3或dNuc的标准曲线。(B)掺入100％血浆中的瓜氨酸化的H3或dNuc的回收率。样品在ELISA前稀释20倍,并相对于(A)中的标准品归一化。理论值＝预期归一化值。

[0069] 图3A-3C示出使用组合修饰的dNuc对核小体PTM的ELISA的优化。将一种针对特异性PTM(H3R8cit)的捕获抗体与多种检测抗体配对,检测抗体包括(A)抗H3 C末端抗体,(B)抗H3R2cit抗体,和(C)用于捕获的相同的抗H3R8cit抗体。这些捕获-检测对针对组合修饰的dNuc(H3R2cit/R8cit/R17cit)和未修饰的dNuc在ELISA中进行检测,以鉴定具有低背景和高特异性的试剂。

[0070] 图4A-4B示出,重组修饰的dNuc可从人血浆中可靠地回收和定量。优化的夹心

ELISA使用抗H3R8Cit抗体捕获底物,然后与生物素化的抗H3R2Cit抗体孵育,并用链霉亲和素-HRP检测。(A)将H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc掺入标准ELISA缓冲液中,生成标准曲线。(B)将H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc掺入健康人血浆的不同稀释液中,从(A)中示出的标准曲线内插来获得回收率百分比。

[0071] 图5A-5D示出了dNuc估计人血浆中内源性循环修饰核小体的浓度。(A,C)利用线性(A)和非线性(C)回归方法,使用H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc生成用于定量核小体瓜氨酸化的标准曲线。(B,D)稀释来自诊断为严重和中度类风湿性关节炎(RA)患者的血浆和健康对照患者的血浆并通过ELISA进行分析,RA是一种与血液中高水平核小体瓜氨酸化相关的病理。(B)人血浆样品的线性稀释与线性标准曲线(A)平行,建立起dNuc作为内源性核小体的合适参考。(D)使用非线性标准曲线进行的归一化,跨宽范围的血浆稀释度提供准确一致的回收率,并显示对照和中度至重度RA之间核小体瓜氨酸水平的改变。对于图5A-5D中的所有图像,使用抗H3R8cit抗体进行ELISA以进行底物捕获,随后与生物素化的抗-H3R2cit抗体孵育,并用链霉亲和素-HRP检测。

具体实施方式

[0072] 下面更详细地解释本发明。该描述并不旨在成为可实现本发明的所有不同方式或可添加到本发明的所有特征的详细目录。例如,关于一种实施方式所示的特征可以并入其他实施方式,并且关于特定实施方式所示的特征可以从该实施方式中删除。此外,根据本公开,对于本领域技术人员来说,对本文所建议的各种实施方式的许多变化和添加将是显而易见的,其不脱离本发明。因此,以下说明书旨在说明本发明的一些特定实施方式,而不是穷举地指定其所有排列、组合和变化。

[0073] 除非上下文另有说明,特别地旨在本文描述的本发明的各种特征可以以任何组合方式使用。此外,本发明还设想,在本发明的一些实施方式中,可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。为了举例说明,如果说明书指出复合物包括组分A、B和C,则特别地旨在A、B或C中的任何一个或其组合可以单独地或以任何组合地省略和放弃。

[0074] 除非另有定义,本文使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的相同含义。在本发明的描述中使用的术语仅用于描述特定实施方式的目的,而不旨在限制本发明。

[0075] 除非另外特别地说明,本文的核苷酸序列仅以5'至3'方向上从左至右的单链形式呈现。核苷酸和氨基酸在本文中以IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的方式表示,或者(对于氨基酸)以单字母代码或三字母代码表示,两者均符合37C.F.R.§1.822和既定用法。

[0076] 除另有说明外,本领域技术人员已知的标准方法可用于重组和合成多肽、抗体或其抗原结合片段的生产,核酸序列的操纵,转化细胞的生产,核小体以及瞬时稳定转染细胞的构建。这种技术对于本领域技术人员是公知的。参见,例如,SAMBROOK et al.,MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL 2nd Ed.(Cold Spring Harbor,NY,1989);F.M.AUSUBEL et al.CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY(Green Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York)。

[0077] 本文提及的所有出版物、专利申请、专利、核苷酸序列、氨基酸序列和其他参考文献通过援引整体并入本文。

[0078] 如在本发明的说明书和所附权利要求书所使用的,单数形式“一个”、“一种”和“该”旨在也包括复数形式,除非上下文明确地另有指示。

[0079] 本文使用的“和/或”是指并涵盖一个或多个相关联的列出项目的任何和所有可能的组合,以及当以替代方式(“或”)解释时缺少组合。

[0080] 此外,本发明还设想,在本发明的一些实施方式中,可以排除或省略本文阐述的任何特征或特征的组合。

[0081] 此外,本文所用术语“约”在涉及诸如本发明的化合物或剂的量、剂量、时间、温度等可测量值时,意在涵盖规定量的±10%,±5%,±1%,±0.5%,或甚至±0.1%的变化。

[0082] 本文与核酸或蛋白质结合使用的术语“基本上由以下成分组成”是指除所述能显著改变(例如,大于约1%、5%或10%)核酸或蛋白质的目标功能的元素以外,核酸或蛋白质不包含任何其他元素。

[0083] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。即,针对多肽的描述同样适用于肽的描述和蛋白质的描述,反之亦然。该术语适用于天然存在的氨基酸聚合物以及其中一个或多个氨基酸残基是非天然氨基酸的氨基酸聚合物。本文所用的该术语包括任何长度的氨基酸链,包括全长蛋白质,其中氨基酸残基通过共价肽和/或假肽键连接。

[0084] “核酸”或“核苷酸序列”是核苷酸碱基的序列,可以是RNA、DNA或DNA-RNA混杂序列(包括天然存在和非天然存在的核苷酸),但优选为单链或双链DNA序列。

[0085] 本文所用“分离的”核酸或核苷酸序列(例如,“分离的DNA”或“分离的RNA”)是指与天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分(例如,细胞或病毒结构组分或通常发现与核酸或核苷酸序列相关的其他多肽或核酸)分离或基本上脱离的核酸或核苷酸序列。

[0086] 同样,“分离的”多肽是指与天然存在的生物体或病毒的至少一些其他组分(例如,细胞或病毒结构组分或通常发现与多肽相关的其他多肽或核酸)分离或基本上脱离的多肽。

[0087] 通过“基本上保留”特性,意味着保留至少约75%、85%、90%、95%、97%、98%、99%或100%的特性(例如,活性或其他可测量特性)。

[0088] 术语“表位”是指生物分子上可引发亲和试剂结合的任何位点。亲和试剂可以识别生物分子或生物分子片段的线性序列、生物分子或生物分子片段的形状、生物分子或生物分子片段的化学物理性质、或它们的组合。

[0089] “氨基酸”在本文中可以通过通常已知的三字母符号或通过IUPAC-IUB生化命名委员会推荐的单字母符号来表示。蛋白质或肽中的氨基酸残基缩写如下:苯丙氨酸为Phe或F;亮氨酸是Leu或L;异亮氨酸为Ile或I;蛋氨酸为Met或M;缬氨酸为Val或V;丝氨酸是Ser或S;脯氨酸是Pro或P;苏氨酸是Thr或T;丙氨酸是Ala或A;酪氨酸是Tyr或Y;组氨酸是His或H;谷氨酰胺是Gln或Q;天冬酰胺为Asn或N;赖氨酸是Lys或K;天冬氨酸为Asp或D;谷氨酸是Glu或E;半胱氨酸是Cys或C;色氨酸是Trp或W;精氨酸是Arg或R;甘氨酸是Gly或G。

[0090] 术语“氨基酸”是指天然存在的和非天然的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然编码的氨基酸是20种常见氨基酸(丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、蛋氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸和缬氨

酸)以及吡咯赖氨酸和硒代半胱氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即,与氢、羧基、氨基和R基团结合的碳,诸如,高丝氨酸、正亮氨酸、甲硫氨酸亚砜和甲硫氨酸甲基锍。此类类似物具有修饰的R基团(诸如,正亮氨酸)或修饰的肽主链,但保留与天然存在的氨基酸相同的基本化学结构。

[0091] 至于氨基酸序列,本领域技术人员将认识到,对核酸、肽、多肽或蛋白质序列的单独替换、缺失或添加,其改变、添加或删除编码序列中的单个氨基酸或小百分比的氨基酸,是"保守修饰的变体",其中所述改变导致用化学上相似的氨基酸替换氨基酸。提供功能相似的氨基酸的保守取代表是本领域技术人员已知的。此类保守修饰的变体是本文所述的剂的多态性变体、种间同源物/直系同源物和等位基因的补充,并且不排除这些变体。

[0092] 本文所用的"抗原"可以是由抗体识别的任何结构,或者可以针对其产生识别抗体(或类似的亲和试剂,诸如适配体或淘筛的噬菌体)。在某些实施方式中,抗原可包括单个氨基酸残基或2个或更多个残基的氨基酸片段。在某些实施方式中,抗原可包括氨基酸的修饰,诸如乙酰化、甲基化(例如,单-、二-、三-、对称-,不对称-)、磷酸化、泛素化(例如,单-、二-、三-、多-)、SUMO化,ADP-核糖基化、瓜氨酸化、生物素化和顺-反异构化。在某些实施方式中,抗原可包括核苷酸修饰,诸如5-甲基胞嘧啶。在其他实施方式中,抗原可包括特异性突变,诸如点突变。在另一些实施方式中,抗原可包括野生型氨基酸序列或核苷酸序列。

[0093] 术语"翻译后修饰"是指天然或非天然氨基酸在体内或体外并入多肽链后发生或将发生的任何修饰。此类修饰包括但不限于酰化(例如,乙酰基-、丁酰基-、巴豆酰基-)、甲基化(例如,单-、二-、三-)、磷酸化、泛素化(例如,单-、二-、三-,多-)、SUMO化,ADP-核糖基化、瓜氨酸化、生物素化和顺-反异构化。此类修饰可以在多肽合成过程中以合成方式,例如,化学方式引入,或者在多肽合成或多肽纯化后以酶法引入。

[0094] 术语"转录后修饰"是指天然或非天然氨基酸在体内或体外并入多核苷酸链后发生或将发生的任何修饰。这样的修饰包括但不限于5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶、7-甲基鸟苷、黄苷和肌苷。

[0095] 本发明涉及携带组蛋白和/或DNA修饰的重组/半合成核小体作为用于测定定量的标准品的用途。与目前使用的纯化染色质提取物不同,本测定利用完全确定的重组/半合成核小体精确定量单个或组合核小体修饰。本发明的方法有利地能够提供组蛋白和/或DNA修饰的绝对定量,即,检测修饰分子的数量而不是相对丰度或除了相对丰度之外。与本领域常用的标准品相似,修饰的核小体将在同一实验中进行分析(与样品处理相同),以产生用于分析定量的标准曲线。与当前使用的相对测量相比,单个或组合核小体PTM的定量可提供更好的疾病生物标志物。在一些实施方式中,重组核小体可用作对照以确认在单个或邻近核小体上检测到组合修饰。

[0096] 本文所用的重组核小体(也称为设计核小体(dNuc))是通过将组蛋白(包括核心组蛋白H2A、H2B、H3和H4,以及任选的连接组蛋白H1)、DNA和任选的其他因子聚集在一起以形成核小体而制备的核小体。换句话说,重组核小体是合成的,而不是从细胞或染色质中分离出来的。核小体中的每个组蛋白可以独立地是完全合成的、半合成的(例如,重组产生并连接到合成肽)、或重组产生的。核小体中的每个组蛋白可以是组蛋白变体(例如,H3.3、H2A.Bbd、H2A.Z.1、H2A.Z.2、H2A.X、mH2A1.1、mH2A1.2、mH2A2或TH2B)。术语重组核小体涵盖半合成核小体和合成核小体。

[0097] 本发明的重组核小体可以在任何已知的基于染色质的免疫测定中(或基于类似亲和试剂)用作掺入标准品。

[0098] 因此,本发明的一个方面涉及用于一种用于定量生物样品中核小体修饰(组蛋白或DNA)丰度的方法,该方法包括:

[0099] a.分离生物样品;

[0100] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0101] c.制备包括核心组蛋白和/或DNA修饰靶表位的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0102] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0103] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入亲和试剂;

[0104] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0105] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0106] 本发明的另一个方面涉及一种用于定量生物样品中单个核小体上两个或更多个修饰(组蛋白或DNA)的丰度的方法,所述方法包括:

[0107] a.分离生物样品;

[0108] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位中包含两个或更多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0109] c.制备包括携带所述两个或更多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0110] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0111] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入两种或更多种亲和试剂;

[0112] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0113] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0114] 本发明的又一个方面涉及一种用于定量来自患有疾病或疾患的受试者的生物样品中一个或多个核小体修饰(组蛋白或DNA)的丰度的方法,所述方法包括:

[0115] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0116] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0117] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0118] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0119] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0120] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;以及

[0121] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度，定量所述靶表位中核小体修饰的丰度。

[0122] 在本发明的每种方法中，生物样品可以是可以从其分离核小体的任何样品。生物样品可以是例如血液、血清、血浆、尿、唾液、精液、前列腺液、乳头抽吸液、泪液、汗液、粪便、颊拭子、脑脊液、细胞裂解物样品、羊水、胃肠液、活检组织、淋巴液或脑脊液。在一些实施方式中，生物样品包括细胞，并且从细胞中分离染色质。在一些实施方式中，细胞是来自与一种或多种组蛋白翻译后修饰和/或DNA修饰的变化相关的疾患的疾病的细胞，例如，患病细胞。在一些实施方式中，细胞是来自受到与组蛋白突变相关的疾病或疾患影响的组织或器官的细胞，例如，患病的组织或器官。可以通过本领域已知的任何方式从患病的器官或组织获得细胞，包括但不限于活检、抽吸和手术。

[0123] 在其他实施方式中，细胞不是来自受与组蛋白翻译后修饰或DNA修饰变化相关或与组蛋白突变相关的疾病或疾患的影响的组织或器官的细胞。细胞可以是例如充当患病细胞的代用品的细胞。细胞可以是比患病细胞更容易接近的细胞，例如，不需要复杂或痛苦的过程诸如活检即可获得的细胞。合适细胞的实例包括但不限于外周血单核细胞。

[0124] 在一些实施方式中，生物样品是活检物。在其他实施方式中，生物样品是生物流体。在一些实施方式中，生物样品包括外周血单核细胞。在其他实施方式中，生物样品包括循环核小体，例如，从死亡细胞释放的核小体。循环核小体可以例如来自血液或来自与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的细胞。在某些实施方式中，生物样品是血浆、尿、唾液、粪便、淋巴液或脑脊液。在一些实施方式中，可以用酶处理生物样品以将染色质消化成单核小体和/或多核小体。该酶可以是但不限于核酸酶，例如，微球菌核酸酶。

[0125] 受试者可以是本发明方法所期望的任何受试者。在一些实施方式中，受试者是哺乳动物，例如，人。在一些实施方式中，受试者是实验室动物，例如，小鼠、大鼠、狗或猴子，例如，疾病的动物模型。在某些实施方式中，受试者可以是已经被诊断患有或怀疑患有疾病或疾患的受试者。在一些实施方式中，受试者可以是例如由于遗传、家族史、暴露于毒素等而有患疾病或疾患的风险的受试者。

[0126] 本发明方法中使用的亲和剂可以是特异性识别并结合靶表位中存在的目的组蛋白或DNA修饰的任何剂。在一些实施方式中，亲和剂是针对表位的抗体或抗体片段。抗体或其片段可以是全长免疫球蛋白分子、Fab、Fab'、$F(ab)'_2$、scFv、Fv片段、纳米抗体(nanobody)、VHH或最小识别单元。亲和剂可以是适体或非免疫球蛋白脚手架，诸如亲和体、affilin分子、AdNectin、脂质运载蛋白突变蛋白、DARPin、Knottin、Kunitz型结构域、Avimer、Tetranectin或反式体。

[0127] 在一些实施方式中，通过基于抗体的检测测定法来确定至少一个或多个核小体修饰的定量。基于抗体的检测方法的实例包括但不限于ChIP、ELISA、AlphaLISA、AlphaSCREEN、Luminex和免疫印迹。在一些实施方式中，基于抗体的检测测定法使用两种不同的抗体用于底物捕获和检测。在一种实施方式中，捕获和检测抗体可分别特异性结合组蛋白PTM和另一核小体结构，诸如DNA或未修饰的组蛋白(如图3A示出)。在另一个实施方式中，捕获抗体和检测抗体分别针对两种不同的组蛋白PTM(如图3B示出)。在一些实施方式中，基于抗体的检测测定法使用相同的抗体进行底物捕获和检测(如图3C示出)。

[0128] 可通过本发明的方法定量的组蛋白或DNA修饰包括本领域已知的或将来鉴定的任

何修饰。已知的翻译后氨基酸修饰包括但不限于:丝氨酸和丙氨酸的N-乙酰化;丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化;赖氨酸的N-巴豆酰化、N-酰化;赖氨酸的N6-甲基化、N6,N6-二甲基化、N6,N6,N6-三甲基化;精氨酸的ω-N-甲基化、对称二甲基化、不对称二甲基化;精氨酸的瓜氨酸化;赖氨酸的泛素化;赖氨酸的SUMO化;丝氨酸和苏氨酸的O-甲基化,精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的ADP-核糖基化;和致癌突变(例如,H3K4M、H3K9M、H3K27M、H3G34R、H3G34V、H3G34W或H3K36M)。已知的转录后DNA修饰包括但不限于:5-甲基胞嘧啶、5-羟甲基胞嘧啶、5-甲酰基胞嘧啶、5-羧基胞嘧啶、3-甲基胞嘧啶、5,6-二氢尿嘧啶、7-甲基鸟苷、黄苷和肌苷。

[0129] 靶表位可以是需要定量和/或监测的核心组蛋白上或DNA上的任何表位。在一些实施方式中,表位是翻译后修饰或蛋白质异形体。在一些实施方式中,核心组蛋白的表位包括至少一种翻译后氨基酸修饰,例如,选自由以下组成的组:丝氨酸和丙氨酸的N-乙酰化;丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸的磷酸化;赖氨酸的N-酰化(例如,巴豆酰化或丁酰化);赖氨酸的N6-甲基化、N6,N6-二甲基化、N6,N6,N6-三甲基化;精氨酸的ω-N-甲基化、对称二甲基化、不对称二甲基化;精氨酸的瓜氨酸化;赖氨酸的泛素化;赖氨酸的SUMO化;丝氨酸和苏氨酸的O-甲基化;丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸的磷酸化;精氨酸、天冬氨酸和谷氨酸的ADP-核糖基化,及其任意组合。修饰可以是表1(a)-1(f)中所列的任何修饰,可以是单独的修饰,也可以是任何组合的修饰。

[0130] 在一些实施方式中,表位是核心组蛋白中的突变,例如,与疾病或疾患相关的突变。在一些实施方式中,突变是致癌突变,例如,包括但不限于H3K4M、H3K9M、H3K27M、H3G34R、H3G34V、H3G34W、H3K36M及其任意组合的突变。H3突变体可以基于H3的任何变体主链,例如,H3.1、H3.2或H3.3。

[0131] 本发明的再一个方面涉及一种基于对一个或多个核小体修饰的定量来确定患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者的预后的方法,所述方法包括:

[0132] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0133] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0134] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0135] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0136] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0137] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0138] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;以及

[0139] h.基于所述一个或多个靶表位的丰度确定所述受试者的预后。

[0140] 上述用于检测和定量核小体修饰存在的的细节也适用于该方法。

[0141] 在一些情况下,表位的表观遗传状态指示与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的预后。因此,在已被诊断患有或怀疑患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者中确定表位的表观遗传状态可用于确定受试者的预后。许多这样的例子在本领域中是公知的。一

个实例是前列腺癌和组蛋白PTM,包括但不限于与显著较高的前列腺癌复发风险相关的增加的H3K18乙酰化和H3K4二甲基化、与肿瘤分期相关的H4K12乙酰化和H4R3二甲基化、以及与具有肿瘤复发风险的低级别前列腺癌患者相关的H3K9二甲基化。另一个实例是乳腺癌患者总生存率与基因CREB5、EXPH5、ZNF775、ADCY3和ADMA8中CpG甲基化状态之间的联系。另一个实例是胶质母细胞瘤和EGFR、PTEN、NF1、PIK3R1、RB1、PDGFRA和QKI等基因内含子区域的超甲基化。另一个实例是结肠癌的较差预后和CNRIP1、FBN1、INA、MAL、SNCA和SPG20基因启动子的甲基化状态。

[0142] 本发明的又一个方面涉及一种基于一个或多个核小体修饰的定量鉴定与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的生物标志物的方法,所述方法包括:

[0143] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0144] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0145] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0146] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0147] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0148] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0149] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;以及

[0150] h.将所述一个或多个靶表位的丰度与所述表观遗传修饰相关的疾病或疾患相关联;从而鉴定与所述表观遗传修饰相关的疾病或疾患的生物标志物。

[0151] 上述用于检测和定量核小体修饰存在的方法的细节也适用于该方法。

[0152] 在该方法中,可以从患有疾病或疾患的许多患者中提取患病组织的生物样品,并确定一个或多个表位的表观遗传状态。然后可以使用本领域公知的分析技术来鉴定表位状态与发生、阶段、亚型、预后等之间的相关性。

[0153] 本发明的另一个方面涉及一种从受试者的生物样品中筛选修饰一个或多个核小体修饰的表观遗传状态的剂的方法,所述方法包括在存在和不存在所述剂的情况下确定一个或多个核小体修饰的定量,其中确定所述一个或多个核小体修饰的定量包括:

[0154] a.从所述受试者中分离生物样品;

[0155] b.从所述生物样品制备天然单核小体和/或多核小体文库,其中,所述文库包括在靶表位(一个或多个)中包含一个或多个核心组蛋白和/或DNA修饰的核小体;

[0156] c.制备包括携带所述一个或多个组蛋白和/或DNA修饰靶表位的核小体的重组单核小体和/或多核小体样品;

[0157] d.提供不同浓度的所述重组核小体样品以产生参考标准品;

[0158] e.向所述天然核小体文库和重组核小体参考物中加入一种或多种亲和试剂;

[0159] f.进行基于亲和试剂的测定以测量所述天然核小体文库和所述重组核小体参考标准品中核小体修饰的量;

[0160] g.通过比较所述天然核小体文库中的相对丰度与所述参考标准品中的相对丰度,

定量所述靶表位中核小体修饰的丰度;

[0161] 其中,在所述剂存在和不存在的情况下的表观遗传状态的改变识别出修饰表观遗传状态的剂。

[0162] 上述用于检测和定量核小体修饰存在的方法的细节也适用于该方法。

[0163] 筛选方法可用于鉴定增加或减少表观遗传修饰的剂。在一些实施方式中,检测到的增加或减少在统计上是显著的,例如,至少$p<0.05$,例如,$p<0.01$、0.005或0.001。在其他实施方式中,检测到的增加或减少是至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%或更多。

[0164] 可以根据本发明筛选任何目的化合物。合适的测试化合物包括有机和无机分子。合适的有机分子可以包括但不限于小分子(小于约1000道尔顿的化合物)、多肽(包括酶、抗体和抗体片段)、碳水化合物、脂质、辅酶和核酸分子(包括DNA、RNA及其嵌合体和类似物)以及核苷酸和核苷酸类似物。

[0165] 此外,可以实践本发明的方法来筛选潜在或靶向调节剂的文库,例如,小分子文库、组合化学化合物文库、多肽文库、cDNA文库、反义核酸文库、siRNA文库等,或化合物的阵列集合,诸如多肽和核酸阵列。

[0166] 可以使用任何合适的筛选测定形式,例如,高通量筛选。

[0167] 该方法还可以用于表征已经被鉴定为修饰染色质中特定基因组位点的表观遗传状态的剂。表征,例如,临床前表征,可包括例如确定有效浓度、确定有效剂量时间表、以及测量药代动力学和药效学。

[0168] 本发明的另一方面涉及使用本发明的方法监测来自受试者的生物样品的染色质中的表观遗传状态随时间变化的方法。

[0169] 上述用于检测和定量核小体修饰存在的方法的细节也适用于该方法。

[0170] 该方法的步骤可根据需要重复多次,以监测表观遗传修饰状态的变化,例如,重复2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、或100次或更多次。该方法可以定期(例如,每天、每周、每月、每年)或根据需要重复进行。该方法可以重复,例如在以下情况下重复:在受试者的治疗之前、期间和/或之后;在诊断出受试者的疾病或疾患之后;作为确定受试者疾病或疾患的诊断的一部分;在确定受试者有患疾病或疾患的风险,或需要监测表观遗传修饰或突变的可能变化的任何其他情况之后。

[0171] 本发明的另一个方面涉及一种用于监测表观遗传疗法在患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者中的有效性的方法,该方法包括使用本发明的方法监测来自受试者的生物样品的染色质中的表观遗传状态随时间的变化。

[0172] 上述用于检测和定量核小体修饰存在的方法的细节也适用于该方法。

[0173] 表观遗传疗法是那些旨在改变蛋白质(例如,组蛋白类)或DNA的表观遗传状态的疗法。表观遗传疗法的一个实例包括赖氨酸去乙酰化酶抑制剂(也称为组蛋白去乙酰化酶抑制剂)(例如,伏立诺他(辛二酰苯胺异羟肟酸)、CI-994(他地那兰)、MS-275(恩替诺特)、BMP-210、M344、NVP-LAQ824、LBH-529(帕比司他)、MGCD0103(莫替司他(mocetinostat))、PXD101(贝利司他)、CBHA、PCI-24781、ITF2357、丙戊酸、曲古抑素A和丁酸钠),其用于治疗皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)或在临床试验中用于治疗血液和实体肿瘤,包括肺癌、乳腺癌、胰腺癌、肾癌和膀胱癌、黑素瘤、成胶质细胞瘤、白血病、淋巴瘤和多发性骨髓瘤。表观遗传疗

法的另一个实例是赖氨酸乙酰转移酶抑制剂(也称为组蛋白乙酰转移酶抑制剂)(例如表没食子儿茶素-3-没食子酸酯、山竹子素、漆树酸、CPTH2、姜黄素、MB-3、MG149、C646和罗米地辛)。表观遗传疗法的另一个实例是DNA甲基转移酶抑制剂(例如,氮胞苷、地西他滨、zebularine、咖啡酸、绿原酸、表没食子儿茶素、肼屈嗪、普鲁卡因胺、普鲁卡因和RG108),它们已被批准用于治疗急性髓系白血病、骨髓增生异常综合征和慢性粒细胞性白血病,并在临床试验中用于治疗实体肿瘤。其他表观遗传疗法包括但不限于赖氨酸甲基转移酶类(例如,pinometostat、他泽司他(tazometostat)、CPI-1205);赖氨酸脱甲基酶类(例如,ORY1001);精氨酸甲基转移酶类(例如,EPZ020411);精氨酸脱亚胺酶(例如,GSK484);和异柠檬酸脱氢酶类(例如,恩西地平(enasidenib)、艾伏尼布(ivosidenib))。参见Fischle et al.,ACS Chem.Biol.11:689(2016);DeWoskin et al.,Nature Rev.12:661(2013);Campbell et al.,J.Clin.Invest.124:64(2014);和Brown et al.,Future Med.Chem.7:1901(2015);各自全文通过援引并入本文。

[0174] 该方法的步骤可根据需要重复多次,以监测治疗效果,例如,重复2、3、4、5、6、7、8、9、10、25、50、或100次或更多次。该方法可以定期(例如,每天、每周、每月、每年)或根据需要重复进行,例如,直到治疗结束。该方法可以例如在受试者的治疗性治疗之前、期间和/或之后,例如,在每次给与治疗之后重复。在一些实施方式中,治疗一直持续到本发明的方法示出治疗有效为止。

[0175] 本发明的另一方面涉及一种方法,用于使用本发明的方法,根据来自受试者生物样品的染色质中的表观遗传状态,为患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者选择合适的治疗。

[0176] 上述用于检测和定量核小体修饰或突变存在的方法的细节也适用于该方法。

[0177] 该方法可应用于例如已经被诊断或怀疑患有与表观遗传修饰相关的疾病或疾患的受试者。确定表位的表观遗传状态可表明表位的状态已被修饰,并且应向受试者实施表观遗传疗法以纠正修饰。相反地,确定表位的状态没有被改变将表明表观遗传疗法将不被期望是有效的,并且应该避免。例如,确定特定的乙酰化组蛋白残基已被脱乙酰化(H3K27ac),可能表明用赖氨酸脱乙酰化酶抑制剂进行治疗是合适的。类似地,确定特定甲基化组蛋白残基已被高度甲基化(H3K27me3),可能表明用赖氨酸甲基转移酶抑制剂治疗是合适的。

[0178] 本文所用的与表观遗传修饰相关的疾病或疾患是任何疾病或疾患,其中表观遗传修饰已知是该疾病或疾患或该疾病或疾患的至少一种症状的原因,或表观遗传修饰是该疾病或疾患的生物标记物的疾病或疾患。在本发明的任何方法中,与表观遗传修饰或突变相关的疾病或疾患可以是癌症、中枢神经系统(CNS)病症、自身免疫病症、炎症病症或感染病。

[0179] 癌症可以是细胞的任何良性或恶性异常生长,包括但不限于听神经瘤、急性粒细胞性白血病、急性淋巴细胞性白血病、急性髓细胞性白血病、腺癌、肾上腺癌、肾上腺皮质癌、肛门癌、间变性星形细胞瘤、血管肉瘤、基底细胞癌、胆管癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、支气管癌、宫颈癌、宫颈增生、脊索瘤、绒毛膜癌、慢性粒细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞性白血病、结肠癌、结直肠癌、颅咽管瘤、囊腺肉瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、内皮肉瘤、室管膜瘤、上皮癌、食管癌、原发性血小板增多症、尤因瘤、纤维肉瘤、泌尿生殖道癌、胶质母细胞瘤、胶质瘤、胶质肉瘤、毛细胞白血病、头颈癌、血管母细胞瘤、肝癌、霍奇金病、卡

波西肉瘤、平滑肌肉瘤、白血病、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴管内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴瘤、恶性类癌癌、恶性高钙血症、恶性黑色素瘤、恶性胰腺胰岛素瘤、肥大细胞瘤、髓质癌、髓母细胞瘤、黑色素瘤、脑膜瘤、间皮瘤、多发性骨髓瘤、蕈样肉芽肿、骨髓瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、非小细胞肺癌、少突胶质细胞瘤、成骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、乳头状腺肉瘤、乳头状肉瘤、松果体瘤、真性红细胞增多症、原发性脑癌、原发性巨球蛋白血症、前列腺癌、直肠癌、肾细胞癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、皮脂腺肉瘤、精原细胞瘤、皮肤癌、小细胞肺癌、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、汗腺癌、滑膜瘤、睾丸癌、喉癌、甲状腺癌和维尔姆斯瘤。

[0180] CNS疾患包括遗传疾患、神经退行性疾患、精神疾患和肿瘤。CNS的说明性疾病包括但不限于阿尔茨海默病、帕金森病、亨廷顿病、卡纳万病、利氏病、雷夫叙姆病、抽动秽语综合征、原发性侧索硬化症、肌萎缩侧索硬化症、进行性肌肉萎缩、皮克病、肌肉营养不良症、多发性硬化症、重症肌无力、宾斯旺格病(Binswanger's disease)、脊髓或头部受伤引起的创伤、泰-萨克斯病、莱希-尼亨综合征、癫痫、脑梗塞、精神疾病,包括情绪障碍(例如,抑郁、双相情感障碍、持续性情感障碍、继发性情绪障碍、躁狂症、躁狂性精神病)、精神分裂症、分裂情感障碍、精神分裂症样障碍、药物依赖(例如,酗酒和其他物质依赖性)、神经症(例如,焦虑、强迫症、躯体形式障碍、分离性障碍、悲伤、产后抑郁症)、精神病(例如,幻觉和妄想、未特别说明的精神病(精神病NOS))、痴呆、衰老、妄想症、注意力缺陷障碍、性心理障碍、睡眠障碍、疼痛障碍、进食或体重障碍(例如,肥胖、恶病质、神经性厌食和食欲过剩)、涉及视网膜、后束和视神经的眼科障碍(例如,视网膜色素变性、糖尿病视网膜病变和其他视网膜变性疾病、葡萄膜炎、年龄相关黄斑变性、青光眼)、以及CNS癌症和肿瘤(例如,垂体瘤)。

[0181] 自身免疫性和炎症性疾病和疾患包括但不限于心肌炎、心肌梗死后综合征、心包切开后综合征、亚急性细菌性心内膜炎、抗肾小球基底膜肾炎、间质性膀胱炎、狼疮性肾炎、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、抗合成酶综合征、鼻窦炎、牙周炎、动脉粥样硬化、皮炎、变态反应、变应性鼻炎、变应性气道炎症、慢性阻塞性肺疾病、嗜酸性粒细胞性肺炎、嗜酸性粒细胞性食管炎、嗜酸细胞增多综合征、移植物抗宿主病、特应性皮炎、结核、哮喘、慢性消化性溃疡、斑秃、自身免疫性血管水肿、自身免疫性孕酮皮炎、自身免疫性荨麻疹、大疱性天疱疮、瘢痕性天疱疮、疱疹样皮炎、盘状红斑狼疮、获得性大疱性表皮松解症、结节性红斑,妊娠性天疱疮、化脓性汗腺炎、紫癜风、硬化性苔藓、线性IgA疾病、硬斑病、寻常性天疱疮、急性苔藓痘疮样糠疹、Mucha-Habermann病、银屑病、系统性硬皮病、白癜风、艾迪生病、自身免疫性多内分泌综合征1型、自身免疫性多内分泌综合征2型、自身免疫性多内分泌综合征3型、自身免疫性胰腺炎、1型糖尿病、自身免疫性甲状腺炎、奥德氏甲状腺炎(Ord's thyroiditis)、格雷夫斯病、自身免疫性卵巢炎、子宫内膜异位症、自身免疫性睾丸炎、干燥综合征、自身免疫性肠病、乳糜泻、克罗恩病、肠易激综合征、憩室炎、显微镜性结肠炎、溃疡性结肠炎、抗磷脂综合征、再生障碍性贫血、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性淋巴增生综合征、自身免疫性中性粒细胞减少症、自身免疫性血小板减少性紫癜、冷凝集素病,原发性混合型冷球蛋白血症、伊文思综合征、恶性贫血,纯红细胞再生障碍、血小板减少症、痛性肥胖病、成年斯蒂尔病、强直性脊柱炎、CREST综合征、药物性狼疮、附着点炎相关性关节炎(enthesitis-related arthritis)、嗜酸性筋膜炎、Felty综合征、IgG4相关疾病、幼年关节炎、莱姆病(慢性)、混合结缔组织病、复发性风湿病、帕罗综合征、牧师-特

纳综合征(Parsonage-Turner syndrome)、银屑病关节炎、反应性关节炎、复发性多软骨炎、腹膜后纤维化、风湿热、类风湿性关节炎、结节病,Schnitzler综合征、系统性红斑狼疮、未分化结缔组织病、皮肌炎、纤维肌痛、肌炎、重症肌无力、神经肌强直、副肿瘤性小脑变性、多发性肌炎、急性弥漫性脑脊髓炎、急性运动轴索神经病、抗N-甲基-D-天冬氨酸受体脑炎、Balo同心圆性硬化、Bickerstaff脑炎、慢性炎性脱髓鞘性多发性神经病、格林-巴利综合征、桥本脑病、特发性炎性脱髓鞘疾病、兰伯特-伊顿肌无力综合征、多发性硬化、奥舒兰综合征(Oshtoran syndrome)、与链球菌相关的儿童自身免疫性神经精神障碍疾病(PANDAS)、进行性炎症性神经病、不宁腿综合征、僵硬人综合征、辛登南氏舞蹈症、横贯性脊髓炎、自身免疫性视网膜病、自身免疫性葡萄膜炎、科根综合征(Cogan syndrome)、格雷夫斯眼病、中间葡萄膜炎、木质结膜炎、蚕蚀性角膜溃疡(Mooren's ulcer)、视神经脊髓炎、斜视性眼阵挛-肌阵挛综合征、视神经炎、巩膜炎、Susac综合征、交感神经眼炎、托洛萨-亨特综合征、自身免疫性内耳病、梅尼埃病、贝赛特氏症、嗜酸性肉芽肿病伴多脉管炎、巨细胞动脉炎、肉芽肿病伴多脉管炎、IgA血管炎、川崎病、白细胞碎裂性血管炎、狼疮性血管炎、类风湿性血管炎、显微镜下多血管炎、结节性多动脉炎、风湿性多肌痛、荨麻疹性血管炎、血管炎和原发性免疫缺陷。

[0182] 本文所用术语“感染性疾病”是指与感染性病原体感染相关的任何疾病。感染性病原体的实例包括但不限于病毒和微生物(例如,细菌、寄生虫、原生动物、隐孢子虫)。病毒包括但不限于嗜肝DNA病毒科,包括甲、乙、丙、丁、戊、己、庚型肝炎等;黄病毒科,包括人类丙型肝炎病毒(HCV)、黄热病病毒和登革热病毒;逆转录病毒科,包括人类免疫缺陷病毒(HIV)和人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV1和HTLV2);疱疹病毒科,包括单纯疱疹病毒(HSV-1和HSV-2)、EB病毒(EBV)、巨细胞病毒、水痘-带状疱疹病毒(VZV)、人疱疹病毒6(HHV-6)、人疱疹病毒8(HHV-8)和B型疱疹病毒;乳头瘤病毒科,包括人乳头瘤病毒;弹状病毒科,包括狂犬病病毒;副粘病毒科,包括呼吸道合胞病毒;呼肠孤病毒科,包括轮状病毒;布尼亚病毒科,包括汉坦病毒;丝状病毒科,包括埃博拉病毒;腺病毒科;细小病毒科;包括细小病毒B-19;沙粒病毒科,包括拉沙病毒;正粘病毒科,包括流感病毒;痘病毒科包括Orf病毒、传染性软疣病毒、天花病毒和猴痘病毒;披膜病毒科,包括委内瑞拉马脑炎病毒;冠状病毒科,包括冠状病毒,诸如严重急性呼吸综合征(SARS)病毒;以及微小RNA病毒科,包括脊髓灰质炎病毒;鼻病毒;环状病毒;微小核糖核酸病毒;脑心肌炎病毒(EMV);副流感病毒、腺病毒、柯萨奇病毒、埃可病毒、麻疹病毒(Rubeola virus)、风疹病毒(Rubella virus)、人乳头瘤病毒、犬瘟热病毒、犬传染性肝炎病毒、猫杯状病毒、猫鼻气管炎病毒、TGE病毒(猪)、口蹄疫病毒、猿猴病毒5、人副流感病毒2型、人类偏肺病毒(human metapneuomovirus)、肠道病毒和任何已知或以后发现的其他病原性病毒(参见例如,Fundamental Virology,Fields et al.,Eds.,3rd ed.,Lippincott-Raven,New York,1996,其全部内容通过援引并入本文作为对病原性病毒的教导)。

[0183] 病原微生物包括但不限于立克次氏体、衣原体、嗜衣体、分枝杆菌、梭菌、棒状杆菌、支原体、脲原体属、军团菌、志贺氏菌、沙门氏菌、致病性大肠杆菌(Escherichia coli)种、博德氏菌属、奈瑟氏菌、密螺旋体属、芽孢杆菌、嗜血杆菌、莫拉氏菌、弧菌、葡萄球菌属菌种、链球菌属菌种、弯曲杆菌属菌种、疏螺旋体属菌种、钩端螺旋体属菌种、埃利氏菌属菌种、克雷伯氏菌属菌种、假单胞菌属菌种、螺杆菌属菌种和任何已知或以后发现的其他病原

微生物(参见例如,Microbiology,Davis et al,Eds.,4th ed.,Lippincott,New York,1990,其全部内容通过援引并入本文作为对病原微生物的教导)。微生物的具体实例包括但不限于幽门螺杆菌(Helicobacter pylori)、肺炎衣原体(Chlamydia pneumoniae)、沙眼衣原体(Chlamydiatrachomatis)、解脲脲原体(Ureaplasma urealyticum)、肺炎支原体(Mycoplasma pneumoniae)、金黄色葡萄球菌(Staphylococcus aureus)、化脓性链球菌(Streptococcus pyogenes)、肺炎链球菌(Streptococcus pneumoniae)、绿色链球菌(Streptococcus viridans)、粪肠球菌(Enterococcus faecalis)、脑膜炎奈瑟菌(Neisseria meningitidis)、淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhoeae)、梅毒螺旋体(Treponema pallidum)、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)、伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi)、霍乱弧菌(Vibrio cholera)、鼠疫巴氏杆菌(Pasteurella pestis)(鼠疫耶尔森菌(Yersinia pestis))、铜绿假单胞菌(Pseudomonas aeruginosa)、空肠弯曲菌(Campylobacter jejuni)、艰难梭菌(Clostridium difficile)、肉毒梭菌(Clostridium botulinum)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、伯氏疏螺旋体(Borrelia burgdorferi)、杜克雷嗜血杆菌(Haemophilus ducreyi)、白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheria)、百日咳鲍特菌(Bordetella pertussis)、副百日咳鲍特菌(Bordetella parapertussis)、支气管败血鲍特菌(Bordetella bronchiseptica)、流感嗜血杆菌(Haemophilus influenza)、单核细胞增生李斯特菌(Listeria monocytogenes)、福氏志贺菌(Shigella flexneri)、嗜吞噬细胞无形体(Anaplasma phagocytophilum)、肠毒性大肠杆菌(enterotoxic Escherichia coli)和埃及血吸虫(Schistosoma haematobium)。

[0184] 本发明的另一方面涉及确定检测试剂(例如,抗体或其片段、适体,等)对核心组蛋白和/或DNA修饰靶表位的特异性的方法,包括使用包括核心组蛋白和/或DNA修饰靶表位的本发明的重组单核小体和/或多核小体样品。

[0185] 在一些实施方式中,疾病或疾患包括但不限于肥胖、糖尿病、心脏病、自闭症、脆性X综合征、ATR-X综合征、快乐木偶综合征、普拉德-威利综合征、贝-维综合征、雷特综合征、鲁宾斯坦-泰比综合征、科芬-劳里综合征、免疫缺陷-着丝粒不稳定-面部异常综合征、α-地中海贫血、白血病、德朗热综合征、歌舞伎脸谱综合征、进行性系统性硬化症和心脏肥大。

[0186] 在一些实施方式中,与表观遗传修饰相关的疾病或疾患选自由以下组成的组:肾细胞癌、胶质瘤、胶质肉瘤、间变性星形细胞瘤、髓母细胞瘤、肺癌、小细胞肺癌、宫颈癌、结肠癌、直肠癌、脊索瘤、喉癌、卡波西氏肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、结直肠癌、子宫内膜癌、卵巢癌、乳腺癌、胰腺癌、前列腺癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、睾丸肿瘤、维尔姆斯瘤、尤因氏瘤、膀胱癌、血管肉瘤、内皮肉瘤、腺癌、汗腺癌、皮脂腺肉瘤、乳头状肉瘤、乳头状腺肉瘤、囊腺肉瘤、支气管癌、髓样癌、肥大细胞瘤、间皮瘤、滑膜瘤、黑色素瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤、胶质母细胞瘤、少突胶质细胞瘤、听神经瘤、血管母细胞瘤、脑膜瘤、松果体瘤、室管膜瘤、颅咽管瘤、上皮癌、胚胎癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、纤维肉瘤、粘液瘤、粘液肉瘤、胶质瘤、脂肪肉瘤,幽门螺杆菌、单核细胞增生李斯特菌、福氏志贺菌、嗜吞噬细胞无形体、嗜衣体属、EB病毒、疱疹、HIV、埃及血吸虫引起的感染;肥胖、糖尿病、心脏病;自闭症、脆性X综合征、ATR-X综合征、快乐木偶综合征、普拉德-威利综合征、贝-维综合征、雷特综合征、鲁宾斯坦-泰比综合征、科芬-劳里综合征、免疫缺陷-着丝粒不稳定-面部异常综合征、α-地中海贫血、白血病、亨廷顿病、精

神分裂症、双相情感障碍症、衰老、痴呆、阿尔茨海默病、帕金森病、德朗热综合征、歌舞伎脸谱综合征、干燥综合征、白癜风、进行性系统性硬化病、银屑病、原发性胆汁性肝硬化、克罗恩病和溃疡性结肠炎、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病、炎症性肠病、动脉粥样硬化和心脏肥大。

[0187] 本发明的另一个方面提供了用于实施本文所述方法之一的试剂和包括试剂的试剂盒。试剂可以包括在合适的包装或容器中。试剂盒可包括一种或多种试剂,该试剂含有本文所述的重组核小体,用于例如在基于抗体的检测测定中对表位进行定量。试剂盒还可包括至少一种如本文所述的亲和试剂,例如抗体或其片段或变体。

[0188] 在一些实施方式中,重组核小体包括用组蛋白、组蛋白异形体、组蛋白翻译后修饰或组蛋白突变制备的DNA-蛋白复合物。在各种实施方式中,本领域已知的核心组蛋白序列的任何变体,或包括表1(a)-1(f)中限定的那些翻译后修饰,可以安装在包括组蛋白八聚体的组蛋白上。在一种实施方式中,提供了一组重组核小体。

[0189] 在其他实施方式中,试剂盒可包括一种或多种洗涤缓冲液(例如,磷酸盐缓冲盐水)和/或包装或容器中的其他缓冲液。试剂盒还可以包括用于测量捕获的标准品或样品的量所必需的试剂。

[0190] 当提供试剂盒时,不同的组分可以包装在单独的容器中,并在使用前立即混合。组分的这种单独包装可允许长期储存而不损失活性组分的功能。试剂盒还可提供说明材料。说明书可以打印在纸或其他基底上,和/或可以作为电子可读介质提供。

[0191] 在一些实施方式中,试剂盒可包括代表特定类别PTM的部分或全部不同可能性的标准小组,例如,单个组蛋白或多个组蛋白的,例如,赖氨酸甲基化、赖氨酸酰化或精氨酸甲基化。该小组可包括被认为与一种或多种疾病相关的一些或全部修饰。在一些实施方式中,试剂盒可包括代表组蛋白突变的大多数或全部不同可能性的一组标准品,例如,单个组蛋白或多个组蛋白的,例如,致癌组蛋白突变。该小组可用于评估亲和试剂的特异性、监测技术变异性并归一化实验。

[0192] 在描述了本发明之后,将在下面的实施例中更详细地解释本发明,这些实施例包括在本文中仅出于说明的目的,并且不旨在限制本发明。

[0193] 实施例

[0194] 实施例1:修饰的重组设计核小体(dNuc)的合成和质量验证

[0195] 重组dNuc是理想的ELISA标准品,因为它们是高度确定的并且模拟内源性抗体靶标。图1A-1C示出了dNuc组装的代表性质量(品质)度量。在该实施例中,使用基于公开方法的天然化学连接方法(Chen et al.,Chembiochem 15(14):2071(2014))生成H3R2/R8/R17三瓜氨酸化的组蛋白(H3R2cit/R8cit/R17cit)。通过分析型HPLC,所得的修饰组蛋白的纯度>95%,并且通过高分辨率质谱法,所得的修饰组蛋白在预期质量的1道尔顿内(图1A)。为了产生瓜氨酸化的dNuc,在八聚体组装过程中,未修饰的组蛋白H3亚基被H3R2cit/R8cit/R17cit组蛋白取代。如预期的那样,所得的dNuc与抗瓜氨酸化的组蛋白(H3R2cit/R8cit/R17cit)抗体呈免疫反应性(图1B;上),并显示出相等的组蛋白化学计量比(图1B;下),未检测到游离DNA(图1C)。这些数据示出,重组dNuc是高度纯的,使其成为旨在定量组蛋白PTM的ELISA中的优异的标准品。

[0196] 实施例2:核小体以预期值回收,并提供人血浆中的可靠校准

[0197] 无细胞核小体(CFN)分析的最新进展已使无创、染色质靶向的液体活检成为可能

(Holdenrieder et al.,Int.J.Cancer 95(2):114(2001);Holdenrieder et al.,Ann.NY Acad.Sci.1137:180(2008);Rumore et al.,J.Clin.Invest.86(1):69(1990);Holdenrieder et al.,Clin.Chem.51(8):1544(2005))。然而,现有的核小体PTM定量测定通常使用修饰的组蛋白亚基作为测定标准品。这些不能概括天然染色质的结合特性,因此当用作测定中的对照时只能提供相对的测量。此外,组蛋白在血浆/血清中不稳定,限制了其在液体活检中的应用,而液体活检正迅速成为核小体PTM测定和生物标记物开发的新焦点。

[0198] 在图2A-2B中,比较了掺入到健康人血浆中的瓜氨酸化的dNuc和组蛋白H3亚基的回收率。为此,建立了测量组蛋白瓜氨酸化的标准夹心ELISA:用抗H3R2cit/R8cit/R17cit抗体捕获底物,然后用对H3未修饰C末端特异的HRP缀合的抗体进行检测。在图2A中,将H3R2cit/R8cit/R17cit组蛋白或dNuc以1000倍范围(1nM至1μM)加入5%人血浆中。请注意,当在血浆中用瓜氨酸化的组蛋白H3时,与dNuc定量相比,ELISA信号显著降低。这些结果显示:1)掺入血浆中的瓜氨酸化dNuc的线性回收;以及2)与瓜氨酸化H3相比,血浆中瓜氨酸化dNuc检测的灵敏度提高(即,分析物检测的范围更广)。

[0199] 可靠的校准品在测定基质(例如,血浆或细胞裂解物)中是稳定的。为了确定观察到的组蛋白信号的丢失是否由于异常聚集或与血浆蛋白的相互作用引起的,将H3R2cit/R8cit/R17cit组蛋白或dNuc底物掺入100%血浆中,然后将样品稀释到5%血浆中并定量H3的瓜氨酸化(图2B)。将样品相对于在5%血浆中制备的标准品归一化(图2A)。值得注意的是,瓜氨酸化的dNuc很容易以预期值回收(图2B)。然而,瓜氨酸化的组蛋白H3在加入100%血浆时比5%时显著更低(即,检测不到)。这些数据显示,只有瓜氨酸化的dNuc(不是组蛋白H3)才能在血浆样品中提供可靠的校准。此外,该结果支持将dNuc开发为下一代液体活检测定的可靠标准品,使直接从患者血浆中精确定量组蛋白PTM成为可能。

[0200] 实施例3:使用组合修饰的dNuc对核小体PTM的ELISA的优化

[0201] 由于dNuc在结构上相似并显示与内源性核小体相似的结合特性(Shah et al.,Mol.Cell 72(1):162(2018)),因此推论它们可用于设计高灵敏度和特异性的组蛋白PTM检测测定。在此,将H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc用于开发检测核小体瓜氨酸化的ELISA。dNuc首次用于鉴定具有低脱靶PTM结合活性的高特异性抗体。然后,将dNuc作为高度纯化的底物用于开发使用各种成对的捕获和检测抗体的ELISA。图3A-3C中描述的所有三个示例均使用了PTM特异性(抗H3R8cit)捕获抗体,该捕获抗体三种不同类型的生物素化检测抗体成对:1)针对组蛋白H3未修饰部分的抗体(图3A);2)识别另一种同时存在的PTM的抗体,H3R2cit(图3B);以及3)用于dNuc捕获的相同的抗H3R8Cit抗体(图3C)。使用链霉亲和素缀合的HRP(SA-HRP)产生ELISA信号。对于示出的所有三个实验,未修饰的dNuc作为阴性对照,以监测背景信号。

[0202] 令人惊讶的是,具有最高灵敏度和最低背景的测定是使用相同的抗H3R8Cit抗体进行捕获和检测(图3C,底部)。靶向不同的PTM(图3B)具有相似的特异性,但在未修饰的Nuc对照中显示出稍微升高的背景。这些实验显示抗体结合同一核小体上的多个PTM的非凡能力(例如,H3R8Cit/H3R2Cit或H3R8cit/H3R8cit),这可能使得在未来的研究中能够定量同时存在的PTM。值得注意的是,核小体中每个组蛋白亚基(例如,H2A、H2B、H3和H4)有两个拷贝。因此,目前尚不清楚H3R8cit/H3R2cit ELISA联合检测的是顺式还是反式组蛋白PTM。为

了确定这些潜在的作用方式,需要开发带有不对称修饰的核小体(即,其中只有一个组蛋白亚基被修饰)。

[0203] 与用PTM-抗体进行检测相比,用抗组蛋白H3抗体进行检测(图3A,底部)显示出显著降低的灵敏度。值得注意的是,这种类型的捕获/检测设置是用于组蛋白PTM ELISA的常规工业方法(使用基于组蛋白的底物或标准品),这表明通过借助核小体结构,在测定特异性和灵敏度方面有显著的提高。事实上,现有的测定核小体PTM的方法是使用纯化的组蛋白提取物或含有未知内源水平的目标分析物的人血浆来开发的。如图3A-3C显示,高纯度dNuc的产生使人们能够根据经验确定灵敏度和特异性最高的ELISA抗体对,从而以无与伦比的准确性和精确度进行测定。此外,dNuc信号的线性回收支持了dNuc作为核小体PTM特异性测定校准品的继续开发。

[0204] 实施例4:dNuc可从人血浆中可靠地回收并定量

[0205] 在临床分析中,dNuc作为校准品的用途取决于它们从生物基质诸如血浆中准确回收的能力。这里,来自使用了图3A-3C中的一种优化的夹心ELISA,使用抗H3R8Cit抗体进行底物捕获,然后用生物素化的抗H3R2Cit抗体和链霉亲和素-HRP进行检测。首先,使用以六点浓度范围掺入ELISA缓冲液中的H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc生成标准曲线(图4A)。标准曲线显示dNuc在ELISA缓冲液中具有一致的线性回收率,$R^2=0.98$。在平行实验中,将H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc(50ng/ml)掺入健康人血浆的不同稀释液中,从标准曲线内插来获得回收率百分比(图4B)。这些结果显示,在2X-32X稀释的血浆中,dNuc信号的回收率>95%,表明最小的测定基质的干扰,并且表明dNuc在跨宽范围血浆稀释度内提供了高度稳定和可靠的定量标准品。

[0206] 实施例5:dNuc估计人血浆中内源性循环修饰核小体的浓度

[0207] dNuc作为测定校准物的全面应用要求它们的行为(即,结合和检测特性)与内源性核小体相似。为此,从患有中度和重度类风湿关节炎(RA)症状(基于DAS28评分(Prevoo et al.,Arthritis Rheum.38(1):44(1995))的患者中收集血浆。RA患者具有高水平的核小体瓜氨酸化(Pratesi et al.,Ann.Rheum.Dis.73(7):1414(2014);Dwivedi et al.,FASEB J.28(7):2840(2014);Sohn et al.,Arthritis Rheumatol.67(11):2877(2015)),使其成为该概念验证研究的理想候选者。来自RA患者的血浆(以及年龄和性别匹配的健康对照)被稀释2X至128X,并在ELISA中进行分析(图5B、5D)。本研究采用用于核小体瓜氨酸化检测的ELISA,用抗H3R8Cit抗体进行核小体捕获,用生物素化的抗H3R2Cit抗体和链霉亲和素-HRP进行检测。使用以六点浓度范围掺入ELISA缓冲液中的H3R2cit/R8cit/R17cit dNuc生成标准曲线,并使用线性(图5A)和非线性(图5C)回归方法进行分析。这里示出(图5B、5D)是我们正在进行的研究中每个类别(健康、中度RA和重度RA)的一名患者的平均值。

[0208] 如图5B示出,人血浆样品的稀释产生的线性曲线与图5A中的标准曲线相似。这些数据证实了标准曲线准确地代表了样品-稀释曲线,从而验证了所选校准物用于定量内源性物质的有效性。还使用非线性标准曲线对ELISA数据进行归一化(图5C、5D),其在跨宽范围的血浆稀释度范围内提供一致的回收率。此外,这些分析显示,对照和中度到重度RA之间的核小体瓜氨酸水平的改变,从而支持将dNuc用作临床相关测定中定量的标准品。

[0209] 上述内容是对本发明的说明,而不应被解释为对本发明的限制。本发明由以下权利要求书限定,其中包括与权利要求书等同的内容。

[0210] 表1(a)人组蛋白H2A 1/2/3型、H2A.X、H2A.Z和H2A.V异形体1/2/3/4/5的翻译后修饰

[0211]

位置	修饰类型说明
人组蛋白 H2a 1/2/3 型	
1	N-乙酰丝氨酸
1	磷酸丝氨酸
3	瓜氨酸
5	N6-乙酰赖氨酸
36	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
118	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
119	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
120	磷酸苏氨酸
126	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
13	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
15	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
119	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
人组蛋白 H2A.X	
1	N-乙酰丝氨酸
1	磷酸丝氨酸
36	N6-乙酰赖氨酸
119	磷酸丝氨酸
142	磷酸酪氨酸
13	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
15	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
119	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
人组蛋白 H2A.Z	
1	N-乙酰丙氨酸
4	N6-乙酰赖氨酸
7	N6-乙酰赖氨酸
11	N6-乙酰赖氨酸

13	N6-乙酰赖氨酸
121	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
人组蛋白 H2A.V 异形体 1/2/3/4/5	
4	N6-乙酰赖氨酸
7	N6-乙酰赖氨酸
11	N6-乙酰赖氨酸
121	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）

[0212]

[0213] 表1(b)人组蛋白H2A.J和H2B 1型的翻译后修饰

位置	修饰类型说明
人组蛋白 H2A.J	
1	N-乙酰丝氨酸
1	磷酸丝氨酸
5	N6-乙酰赖氨酸
120	磷酸苏氨酸
122	磷酸丝氨酸
13	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
15	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
119	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
人组蛋白 H2B 1 型	
1	N-乙酰脯氨酸
6	N6-乙酰赖氨酸
6	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
12	N6-乙酰赖氨酸
12	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
13	N6-乙酰赖氨酸
13	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
16	N6-乙酰赖氨酸
16	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
17	N6-乙酰赖氨酸
17	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
21	N6-乙酰赖氨酸

[0214]

[0215]

21	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
24	N6-乙酰赖氨酸
24	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
35	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
37	磷酸丝氨酸
47	N6-甲基赖氨酸
58	N6,N6-二甲基赖氨酸
80	二甲基化精氨酸
85	磷酸丝氨酸
86	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
86	N6-乙酰赖氨酸
87	ω-N-甲基精氨酸
93	ω-N-甲基精氨酸
109	N6-甲基赖氨酸
116	磷酸苏氨酸
117	N6-甲基化赖氨酸
35	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
121	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）

[0216] 表1(c)人组蛋白H2B 2/3/F-S型的翻译后修饰

[0217]

位置	修饰类型说明
1	N-乙酰脯氨酸
5	N6-乙酰赖氨酸
5	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
11	N6-乙酰赖氨酸
11	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
12	N6-乙酰赖氨酸
12	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
14	磷酸丝氨酸
15	N6-乙酰赖氨酸
15	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
16	N6-乙酰赖氨酸
16	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
20	N6-乙酰赖氨酸
20	N6-巴豆酰-L-赖氨酸

23	N6-乙酰赖氨酸
23	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
34	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
36	磷酸丝氨酸
46	N6-甲基赖氨酸
57	N6,N6-二甲基赖氨酸
79	二甲基化精氨酸
85	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
85	N6-乙酰赖氨酸
86	ω-N-甲基精氨酸
92	ω-N-甲基精氨酸
108	N6-甲基赖氨酸
115	磷酸苏氨酸
116	N6-甲基化赖氨酸
112	O-连接的（GlcNAc）
34	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）
121	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）

[0218]

[0219] 表1(d)人推定组蛋白H2B 2-D/2-C型的翻译后修饰

位置	修饰类型说明
1	N-乙酰脯氨酸
5	N6-乙酰赖氨酸
5	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
11	N6-乙酰赖氨酸
11	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
12	N6-乙酰赖氨酸
12	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
14	磷酸丝氨酸
15	N6-乙酰赖氨酸
15	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
16	N6-乙酰赖氨酸
16	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
20	N6-乙酰赖氨酸
20	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
23	N6-乙酰赖氨酸

[0220]

[0221]

23	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
34	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
36	磷酸丝氨酸
46	N6-甲基赖氨酸
57	N6,N6-二甲基赖氨酸
79	二甲基化精氨酸
85	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
85	N6-乙酰赖氨酸
86	ω-N-甲基精氨酸
92	ω-N-甲基精氨酸

[0222] 表1(e)人组蛋白H3.1/H3.1t/H3.2/H3.3/H3.3C的翻译后修饰

[0223]

位置	修饰类型
2	不对称二甲基精氨酸
3	磷酸苏氨酸
4	醛赖氨酸
4	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
4	N6,N6-二甲基赖氨酸
4	N6-乙酰赖氨酸
4	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
4	N6-甲基赖氨酸
6	磷酸苏氨酸
8	瓜氨酸
8	不对称二甲基精氨酸
9	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
9	N6,N6-二甲基赖氨酸
9	N6-乙酰赖氨酸
9	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
9	N6-甲基赖氨酸
10	磷酸丝氨酸
11	磷酸苏氨酸
14	N6-乙酰赖氨酸
17	不对称二甲基精氨酸
17	瓜氨酸
18	N6-乙酰赖氨酸
18	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
18	N6-甲基赖氨酸

[0224]

23	N6-乙酰赖氨酸
23	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
23	N6-甲基赖氨酸
27	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
27	N6,N6-二甲基赖氨酸
27	N6-乙酰赖氨酸
27	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
27	N6-甲基赖氨酸
28	磷酸丝氨酸
36	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
36	N6,N6-二甲基赖氨酸
36	N6-乙酰赖氨酸
36	N6-甲基赖氨酸
37	N6-甲基赖氨酸
41	磷酸酪氨酸
56	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
56	N6-乙酰赖氨酸
56	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
56	N6-甲基赖氨酸
57	磷酸丝氨酸
64	N6-甲基赖氨酸
79	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
79	N6,N6-二甲基赖氨酸
79	N6-乙酰赖氨酸
79	N6-甲基赖氨酸
80	磷酸苏氨酸
107	磷酸苏氨酸
115	N6-乙酰赖氨酸
122	N6-乙酰赖氨酸
122	N6-甲基赖氨酸

[0225] 表1(f)人组蛋白H3样着丝粒蛋白A和人组蛋白H4的翻译后修饰

[0226]

位置	修饰类型说明
人组蛋白 H3 样着丝粒蛋白 A	
6	磷酸丝氨酸;由 AURKA 和 AURKB
16	磷酸丝氨酸
18	磷酸丝氨酸

[0227]

26	磷酸丝氨酸
人组蛋白 H4	
1	N-乙酰丝氨酸
1	磷酸丝氨酸
3	不对称二甲基精氨酸
3	瓜氨酸
3	ω-N-甲基精氨酸
3	不对称二甲基精氨酸
5	N6-乙酰赖氨酸
5	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
8	N6-乙酰赖氨酸
8	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
12	N6-乙酰赖氨酸
12	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
16	N6-乙酰赖氨酸
16	N6-巴豆酰-L-赖氨酸
20	N6,N6,N6-三甲基赖氨酸
20	N6,N6-二甲基赖氨酸
20	N6-甲基赖氨酸
31	N6-乙酰赖氨酸
47	磷酸丝氨酸
51	磷酸酪氨酸
88	磷酸酪氨酸
91	N6-乙酰赖氨酸
91	甘氨酰赖氨酸异肽（Lys-Gly）（在泛素中与 G-Cter 互链）

。

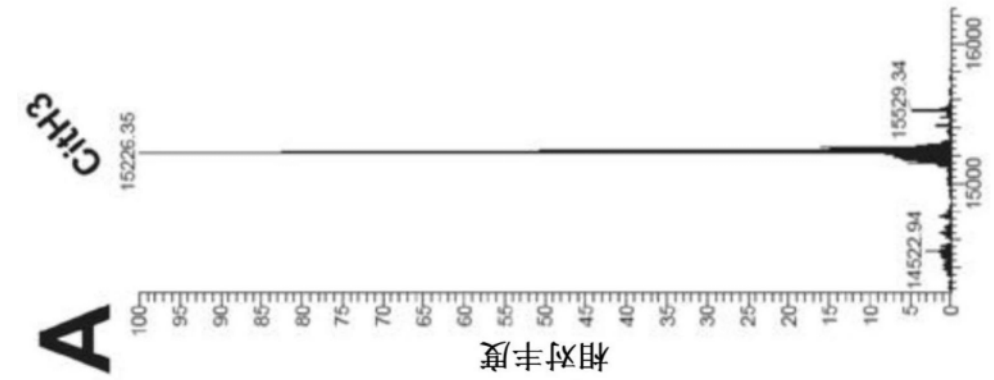

A
Cit H3
15226.35
15529.34
14522.94
相对丰度

图1A

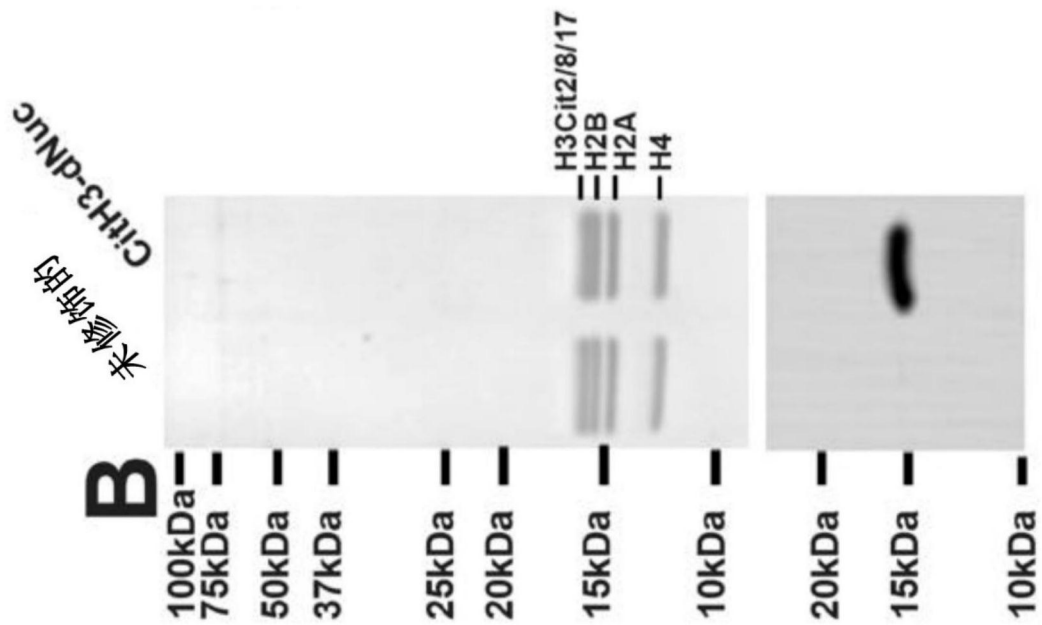

B
未感染的
Cit H3-dNuc
H3Cit2/8/17
H2B
H2A
H4
100kDa
75kDa
50kDa
37kDa
25kDa
20kDa
15kDa
10kDa
20kDa
15kDa
10kDa

图1B

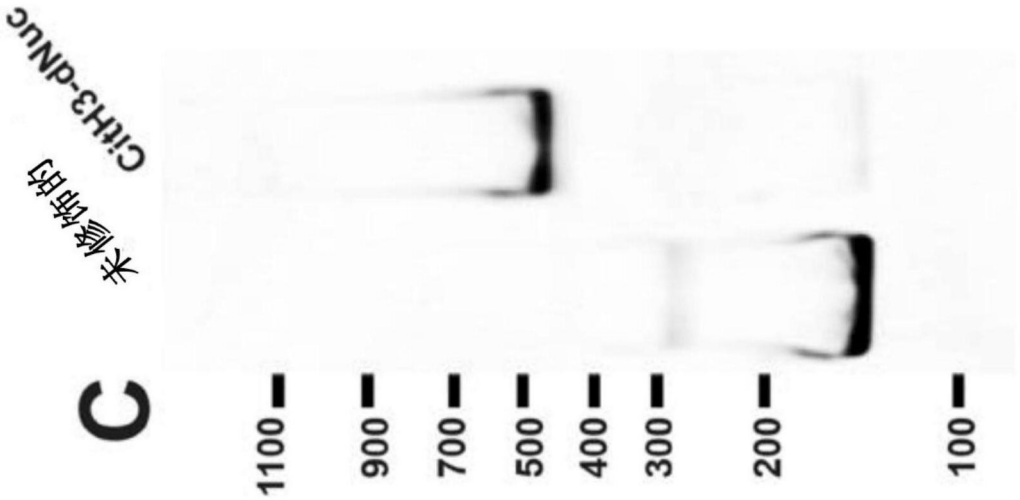

C
未感染的
Cith3-dNuc
1100
900
700
500
400
300
200
100

图1C

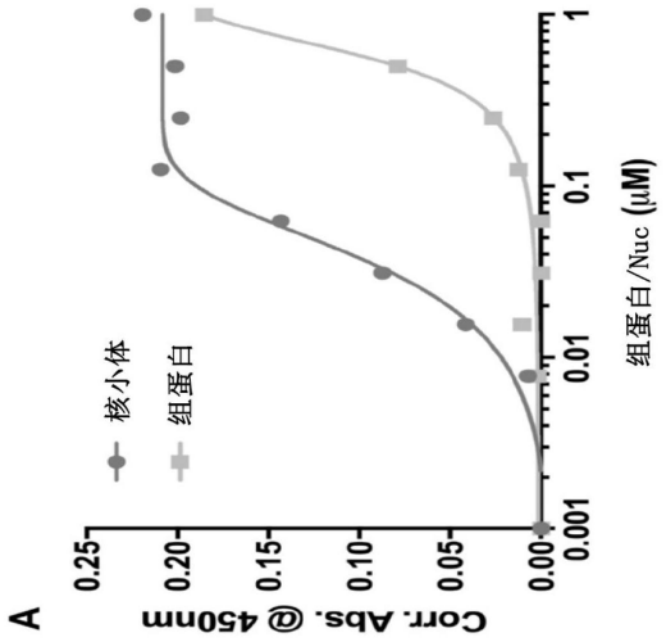

A
Corr. Abs. @ 450nm
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0.00
核小体
组蛋白
0.001
0.01
0.1
1
组蛋白/Nuc (μM)

图2A

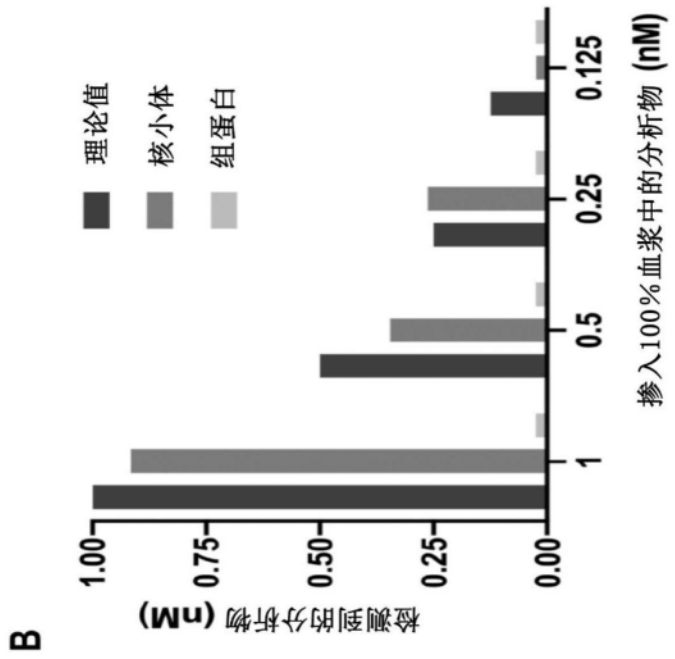

B
检测到的分析物 (nM)
1.00
0.75
0.50
0.25
0.00
理论值
核小体
组蛋白
1
0.5
0.25
0.125
掺入100％血浆中的分析物 (nM)

图2B

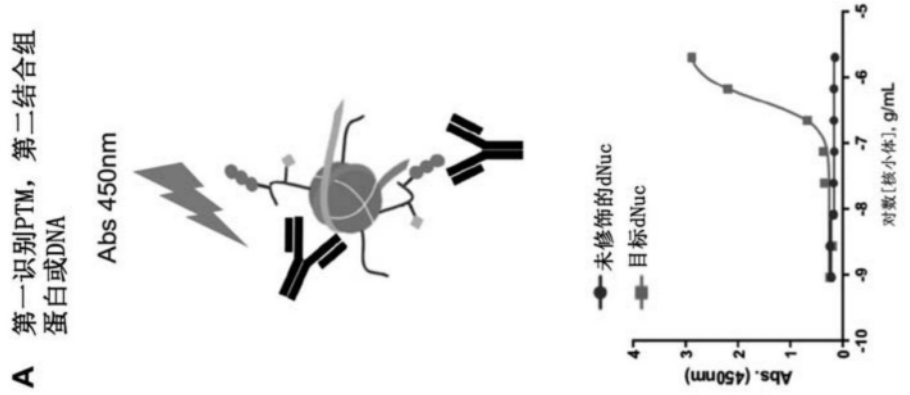

A 第一识别PTM，第二结合组
蛋白或DNA
Abs 450nm
未修饰的dNuc
目标dNuc
Abs. (450nm)
对数[核小体], g/mL

图3A

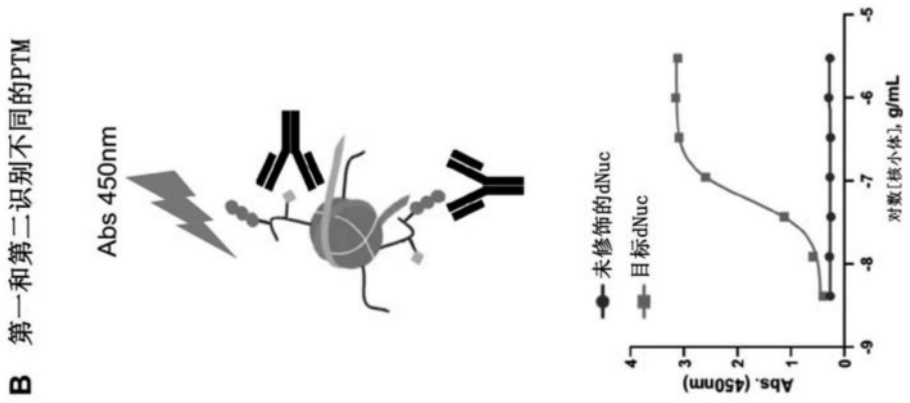

B 第一和第二识别不同的PTM
Abs 450nm
未修饰的dNuc
目标dNuc
Abs. (450nm)
对数[核小体], g/mL

图3B

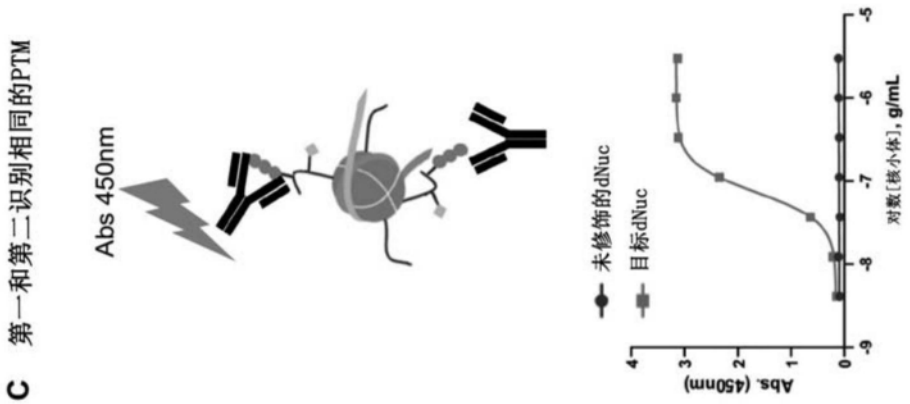

C 第一和第二识别相同的PTM
Abs 450nm
未修饰的dNuc
目标dNuc
Abs. (450nm)
对数[核小体], g/mL

图3C

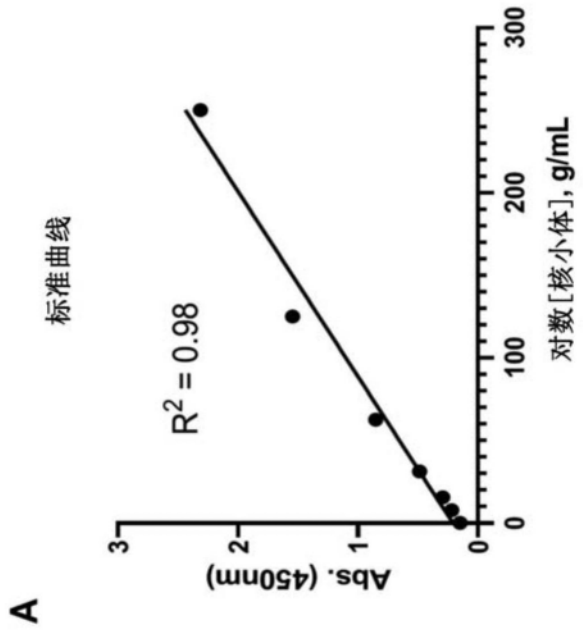

A
标准曲线
Abs. (450nm)
R^2 = 0.98
对数[核小体], g/mL
0
1
2
3
0
100
200
300

图4A

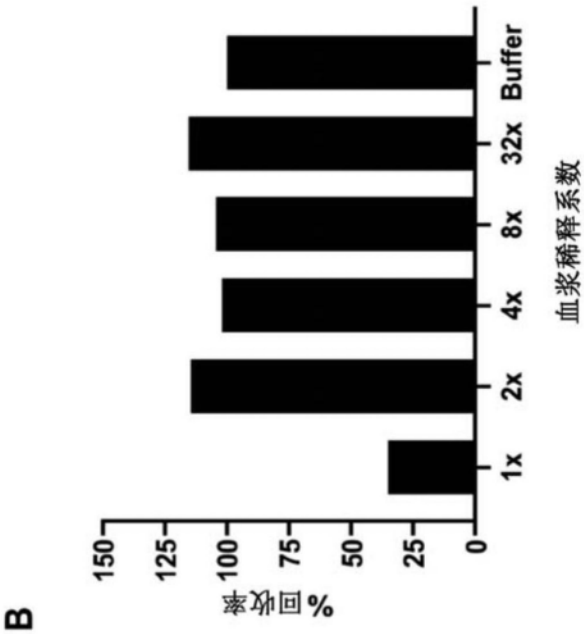

B
% 回收率
0
25
50
75
100
125
150
1x
2x
4x
8x
32x
Buffer
血浆稀释系数

图4B

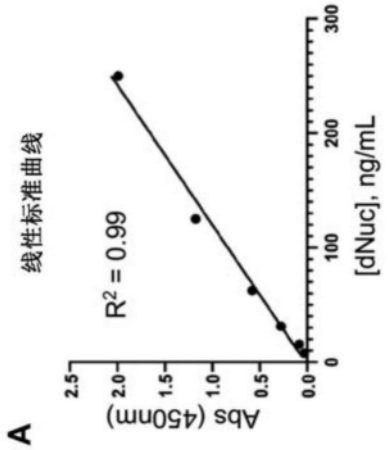

A
线性标准曲线
R^2 = 0.99
Abs (450nm)
[dNuc], ng/mL
0.0
0.5
1.0
1.5
2.0
2.5
0
100
200
300

图5A

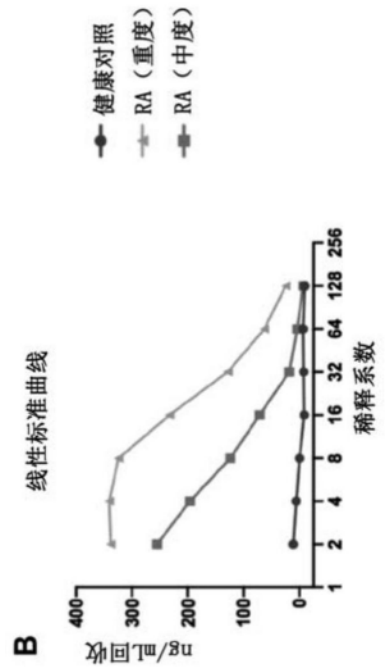

B
线性标准曲线
健康对照
RA（重度）
RA（中度）
ng/mL回收
稀释系数
0
100
200
300
400
1
2
4
8
16
32
64
128
256

图5B

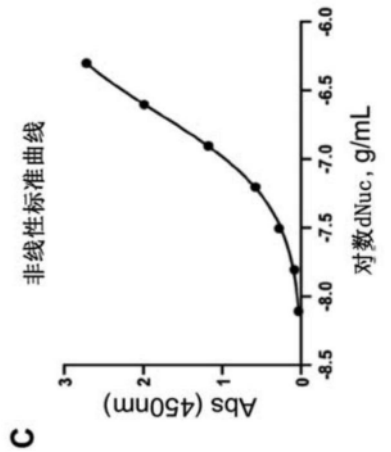

C
非线性标准曲线
Abs (450nm)
对数dNuc, g/mL
-6.0
-6.5
-7.0
-7.5
-8.0
-8.5
0
1
2
3

图5C

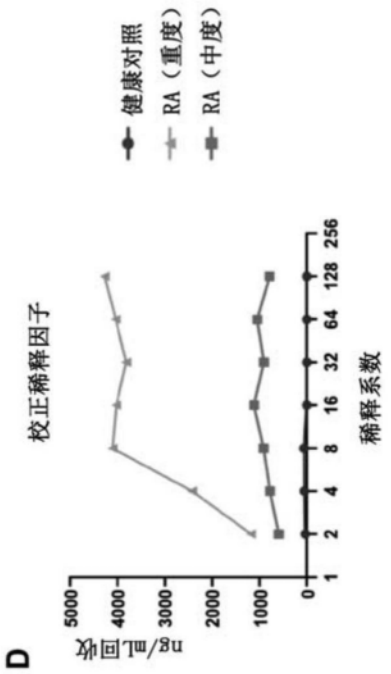

D
校正稀释因子
ng/mL回收
稀释系数
健康对照
RA（重度）
RA（中度）
0
1000
2000
3000
4000
5000
1
2
4
8
16
32
64
128
256

图5D