



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101542287 B

(45) 授权公告日 2014.04.16

-
- (21) 申请号 200780041074.8
(22) 申请日 2007.11.02
(30) 优先权数据
0621894.5 2006.11.02 GB
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2009.05.04
(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/GB2007/004188 2007.11.02
(87) PCT国际申请的公布数据
W02008/053229 EN 2008.05.08
(73) 专利权人 ITI 苏格兰有限公司
地址 英国格拉斯哥
(72) 发明人 普拉把尤特·德哈尔
大卫·普里查德 克莱尔·吉克
(74) 专利代理机构 北京三友知识产权代理有限公司 11127
代理人 丁香兰 谭辉
(51) Int. Cl.
G01N 33/544 (2006.01)
G01N 33/58 (2006.01)
(56) 对比文件
WO 90/06323 A2, 1990.06.14, 说明书倒数 1 段 -11 页, 实施例 1-2, 权利要求 1-37.
WO 95/04753 A1, 1995.02.16, 说明书 5-21 页, 权利要求 1-64.
WO 03/094849 A2, 2003.11.20, 说明书第 3 页最后 1 段 -20 页.
WO 2007/058454 A1, 2007.05.24, 说明书 1-23 页, 权利要求 1-44.
WO 2004/088313 A1, 2004.10.14, 说明书第 3 页倒数第 2 段 - 第 9 页第 6 段, 实施例 1-11, 权利要求 1-13.
WO 2006/099516 A2, 2006.09.21, 全文.
审查员 李影
-

(54) 发明名称
磁性识别系统

(57) 摘要

本发明提供了用于分析物的标记, 该标记与磁性或可磁化物质连接, 所述标记包含: (a) 用于将该标记与所述分析物连接的识别部分; 和 (b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分; 其中, 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白、多肽或肽。

1. 一种处理样品的方法,该方法包括:

(i) 将所述样品与用于分析物的标记接触,所述标记与磁性或可磁化物质相连;

(ii) 将所述标记置于磁场中,以将所述标记和 / 或能够与所述标记连接的分析物与所述样品中的一种或多种其它物质分离、纯化和 / 或隔离;

(iii) 任选地分析所述标记和 / 或所述分析物以获取与能够和所述标记连接的分析物相关的信息;

其中所述标记包含 (a) 用于将所述标记与所述分析物连接的识别部分;和 (b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分,用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白或金属结合蛋白的金属结合域,所述蛋白为铁蛋白,其中所述磁性或可磁化物质包含磁铁,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 ;并且

其中所述标记含有融合蛋白,所述融合蛋白包含所述识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分。

2. 如权利要求 1 所述的方法,其中

(a) 对所述标记和 / 或所述分析物的分析包括检测所述标记和 / 或所述分析物的存在、不存在、特性和 / 或量;和 / 或

(b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分结合或包封一定量的体积不超过 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$ 的所述磁性或可磁化物质;和 / 或

(c) 所述标记包含多个用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分和 / 或多个识别部分;和 / 或

(d) 所述方法使用流体装置执行。

3. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 $1 \times 10^3 \text{nm}^3$ 。

4. 如权利要求 3 所述的方法,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 100nm^3 。

5. 如权利要求 2 所述的方法,其中,所述流体装置为微流体装置或纳流体装置。

6. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的方法,其中,所述识别部分能与分析物结合,所述分析物选自天然或合成的生物分子。

7. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的方法,其中,所述识别部分能与分析物结合,所述分析物选自小分子。

8. 如权利要求 1 ~ 5 中任一项所述的方法,其中,所述识别部分能与分析物结合,所述分析物选自传染性病原体或传染性病原体的组分、细胞或细胞组分。

9. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述分析物包括病毒或病毒组分、蛋白、核酸、代谢物、糖或者脂质。

10. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述分析物包括内源性或外源性小分子。

11. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述分析物包括病毒颗粒、多肽、寡核苷酸或脂肪。

12. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述分析物包括糖蛋白。

13. 如权利要求 9 所述的方法,其中,所述核酸为 DNA 或 RNA,所述糖为复合糖。

14. 如权利要求 10 所述的方法,其中,所述内源性或外源性小分子为药品或药物。

15. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述识别部分选自抗体或抗体片段、受体或受体

片段、蛋白和核酸。

16. 如权利要求 6 所述的方法,其中,所述识别部分选自多肽和适体。

17. 如权利要求 15 所述的方法,其中,所述识别部分选自抗体的可变多肽链 Fv、T 细胞受体或 T 细胞受体片段、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和肝素。

18. 如权利要求 16 所述的方法,其中,所述识别部分选自抗体的可变多肽链 Fv、T 细胞受体或 T 细胞受体片段、抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白和肝素。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述识别部分是单链抗体可变部分 sc-Fv。

20. 如权利要求 18 所述的方法,其中,所述识别部分是单链抗体可变部分 sc-Fv。

21. 用于标记多个分析物的标记组,所述标记与磁性或可磁化物质相连,所述标记组中的每个标记包含:

(i) 用于将该标记与所述分析物连接的识别部分;和

(ii) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分,用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白或金属结合蛋白的金属结合域,所述蛋白为铁蛋白,

其中所述磁性或可磁化物质包含磁铁,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 ;

其中每个标记含有融合蛋白,所述融合蛋白包含所述识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分,并且

其中所述标记组中的每个标记具有不同数目的金属结合部分。

22. 如权利要求 21 所述的标记组,其中:

(a) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分结合或包封一定量的体积不超过 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$ 的所述磁性或可磁化物质;和 / 或

(b) 每个标记包含多个识别部分。

23. 如权利要求 22 所述的标记组,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 $1 \times 10^3 \text{nm}^3$ 。

24. 如权利要求 23 所述的标记组,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 100nm^3 。

25. 如权利要求 21-24 中任一项所述的标记组,其中,所述识别部分和 / 或所述金属结合蛋白如权利要求 6-15 中任一项所定义。

26. 用于分析物的标记在使用微流体或纳流体装置执行的用于处理样品的方法中的应用,所述标记与磁性或可磁化物质相连;其中所述标记包含:

(a) 用于将所述标记与所述分析物连接的识别部分;和

(b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分,用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白或金属结合蛋白的金属结合域,所述蛋白为铁蛋白,其中所述磁性或可磁化物质包含磁铁,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 ;

并且其中所述标记含有融合蛋白,所述融合蛋白包含所述识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分。

27. 如权利要求 26 所述的应用,其中:

(a) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分结合或包封一定量的体积不超过 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$ 的所述磁性或可磁化物质;和 / 或

(b) 所述标记包含多个用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分和 / 或多个识别

部分。

28. 如权利要求 27 所述的应用,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 $1 \times 10^3 \text{nm}^3$ 。

29. 如权利要求 28 所述的应用,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 100nm^3 。

30. 如权利要求 26-29 中任一项所述的应用,其中,所述识别部分和 / 或所述金属结合蛋白如权利要求 6-15 中任一项所定义。

31. 如权利要求 26-29 中任一项所述的应用,所述微流体或纳流体装置包括标记组,其中,所述标记组中的每个标记具有不同数目的金属结合部分。

32. 一种用于分析物的标记,该标记与磁性或可磁化物质连接,所述标记包含:

(a) 用于将所述标记与所述分析物连接的识别部分;和

(b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分,用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白或金属结合蛋白的金属结合域,所述蛋白为铁蛋白,

其中所述标记含有融合蛋白,所述融合蛋白包含所述识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分,

其特征在于,所述磁性或可磁化物质包含磁铁,以使得所述标记适用于如权利要求 1 所述的处理样品的方法,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 。

33. 如权利要求 32 所述的用于分析物的标记,其中:

(a) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分结合或包封一定量的体积不超过 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$ 的所述磁性或可磁化物质;和 / 或

(b) 所述标记包含多个用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分和 / 或多个识别部分。

34. 如权利要求 33 所述的用于分析物的标记,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 $1 \times 10^3 \text{nm}^3$ 。

35. 如权利要求 34 所述的用于分析物的标记,其中,所述磁性或可磁化物质的体积的量不超过 100nm^3 。

36. 如权利要求 32-35 中任一项所述的用于分析物的标记,其中,所述识别部分和 / 或所述金属结合蛋白如权利要求 6-15 中任一项所定义。

37. 一种结合有分析物的标记,所述标记是如权利要求 32 ~ 36 中任一项所定义的标记。

38. 如权利要求 37 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物选自天然或合成的生物分子。

39. 如权利要求 37 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物选自小分子。

40. 如权利要求 37 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物选自传染性病原体或传染性病原体的组分、细胞或细胞组分。

41. 如权利要求 38 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物包括病毒或病毒组分、蛋白、核酸、代谢物、糖或者脂质。

42. 如权利要求 38 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物包括内源性或外源性小分子。

43. 如权利要求 38 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物包括病毒颗粒、多肽、寡核苷酸或脂肪。

44. 如权利要求 38 所述的结合有分析物的标记,其中,所述分析物包括糖蛋白。

45. 如权利要求 41 所述的结合有分析物的标记,其中,所述核酸为 DNA 或 RNA,所述糖为复合糖。

46. 如权利要求 42 所述的结合有分析物的标记,其中,所述内源性或外源性小分子为药品或药物。

47. 结合有一个或多个分析物的标记组,所述标记组是如权利要求 21 ~ 25 中任一项所定义的标记组。

48. 如权利要求 47 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物选自天然或合成的生物分子。

49. 如权利要求 47 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物选自小分子。

50. 如权利要求 47 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物选自传染性病原体或传染性病原体的组分、细胞或细胞组分。

51. 如权利要求 48 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物包括病毒或病毒组分、蛋白、核酸、代谢物、糖或者脂质。

52. 如权利要求 48 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物包括内源性或外源性小分子。

53. 如权利要求 48 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物包括病毒颗粒、多肽、寡核苷酸或脂肪。

54. 如权利要求 48 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述分析物包括糖蛋白。

55. 如权利要求 51 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述核酸为 DNA 或 RNA,所述糖为复合糖。

56. 如权利要求 52 所述的结合有一个或多个分析物的标记组,其中,所述内源性或外源性小分子为药品或药物。

57. 一种用于形成如权利要求 32 ~ 36 中任一项所定义的标记的方法,所述方法包括将用于把所述标记连接到所述分析物的识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分连接在一起,其中所述磁性或可磁化物质包含磁铁,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 。

58. 一种用于形成标记组的方法,所述方法包括将用于把标记连接到分析物的识别部分和用于结合或包封磁性或可磁化物质的部分连接在一起的步骤,并且重复所述步骤以形成如权利要求 21 ~ 25 中任一项所定义的标记组。

59. 用于结合或包封磁性或可磁化物质的部分在使用微流体装置或纳流体装置执行的用于处理样品的方法中的应用,其中用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白或金属结合蛋白的金属结合域,所述蛋白为铁蛋白,

其中用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含在用于分析物的标记中,并且其中所述磁性或可磁化物质包含磁铁,其中所述磁铁为铁磁性氧化铁即 Fe_3O_4 ,

其中所述标记还包含用于将所述标记与所述分析物连接的识别部分 ;和其中所述标记含有融合蛋白,所述融合蛋白包含所述识别部分和用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分。

磁性识别系统

技术领域

[0001] 本发明涉及磁性识别标记,所述标记能够通过分析物用识别剂将少量磁性(或可磁化)物质连接到该分析物上。所述标记的显著优势在于,它们能将很小体积的磁性物质连接到分析物,从而使所述分析物即使在受限空间(如微流体系统)中也能受到磁场影响。所述磁性物质的存在允许对所述分析物进行更复杂的空间操作,这在微流体系统中尤为有益。本发明还涉及与所述标记相关的产物、方法和应用。

背景技术

[0002] 众所周知,磁珠可以用于控制测定方法所涉及的分子(参见,例如US2006/084089)。通常,所述磁珠与能识别和结合分析物的分子(如抗体)相连。所述磁珠的磁性被用于控制或在空间上操作所述分析物,例如将样品中的所述分析物与其它分子分离。

[0003] 然而,磁珠并不适用于所有系统。最近,使用微流体(microfluidic)或纳流体(nanofluidic)装置来对其量一直较少的样品进行处理已经成为可能。这类装置能分析极小的样品(如由针刺得到的血滴)中的特定物质。即使可在微米规模上制成磁珠,所述装置内的通道维度经常通常可能太小以致于无法令人满意地容纳所述磁珠,其原因是所述磁珠比通道大或所述磁珠引起通道内的堵塞或阻滞。在 www.deas.harvard.edu/projects/weitzlab/wyss.preprint.2006.pdf 中对此有进一步的说明。尽管小珠具有大的表面积与体积比(表1),特别小的珠子或颗粒可能遭受空间位阻的影响,其中已连接的蛋白阻挡了其他蛋白的连接。这对于抗体或其它识别实体的随机空间组织尤其成问题,表现在将所述抗体或其它识别实体连接到颗粒上的时候。因为当将蛋白与磁珠或磁性颗粒表面偶联时,该蛋白所要求的取向可能不是最佳的(参见图3),因而使所述问题进一步恶化。

[0004] 表1. 3 μm 和 50nm 珠的表面积与体积比的比较

[0005]

	表面积 (SA) ($4 \pi r^2$)	体积 ($(4/3) \pi r^3$)	SA : Vol 比
3 μm 珠	$4 \pi (1.5)^2$ $= 28 \mu m^2$	$(4/3) \times \pi \times (1.5)^3$ $= 14 \mu m^3$	2 : 1
50nm 珠 (或 0.05 μm)	$4 \pi (0.025)^2$ $= 7.8 \times 10^{-3} \mu m^2$	$(4/3) \pi (0.025)^3$ $= 6.5 \times 10^{-5} \mu m^3$	120 : 1

[0006] 已经尝试将更小的磁性颗粒与蛋白结合,尽管这还未在微流体或纳流体用途上受到很多关注。例如,已公布的 PCT 申请 WO 2006/104700 对可用在检测液体样品中分析物的测定中的磁性蛋白纳米传感器有说明。在该系统中,采用了通常包含 T4 尾丝基因的融合蛋白,所述 T4 尾丝基因被修饰以包含将结合顺磁纳米颗粒的额外官能团(例如肽展示配体)。

[0007] 相似地,WO 2004/083902 公开了细胞内磁成像的磁性纳米颗粒探针。所述探针

通常由围绕所述磁性材料的自组装包被材料如胶束、脂质体或树枝状大分子 (dendrimer) 形成。被包封磁性颗粒的表面可以与诸如肽等递送配体 (delivery ligand) 相连。在 US 5,958,706 中公开一种类似系统,该系统涉及包封于有机膜(如磷脂膜)内并连接到膜蛋白上的磁性颗粒。在 Tomoko Yoshino 等的“Efficient and stable display of functional proteins on bacterial magnetic particles using mms13 as a novel anchor molecule(使用 mms13 作为新型锚定分子在细菌磁性颗粒上有效而稳定地展示功能性蛋白)”,*Applied and Environmental Microbiology*,2006年1月,第465-471页中,公开了在细菌磁性颗粒上展示蛋白的方法。所述磁性颗粒还覆盖有脂质双层膜且新型 mms13 蛋白与所述颗粒相连。

[0008] 在磁性纳米颗粒的病毒包封上也开展了一些工作。US 2006/0240456 公开了磁性钴在 T7 噬菌体的病毒衣壳蛋白壳内的包封。

[0009] 在一项独立的研制中,发现了某些蛋白具有直接与金属离子结合的能力。Meldrum F. C. 等已在 *Science*,257(5069)522-3,1992“Magnetoferritin:invitro synthesis of a novel magnetic protein(磁性铁蛋白:一种新型磁性蛋白的体外合成)”中报道了这类蛋白。该领域内的其它工作包括 Martinez, J. S. 等 2000. “Self-Assembling Amphiphilic Siderophores from Marine Bacteria(由海洋细菌自组装两亲铁载体)”, *Science* 287 1245-47。更早的工作包括如下工作:

[0010] Zborowski 等 1996. “Immunomagnetic isolation of magnetoferritin-labelled cells in a modified ferrograph(磁性铁蛋白标记细胞在铁磁示波器中的免疫磁性分离)” *Cytometry* 24:251-259,其中公开了使用抗生物素蛋白桥偶联的生物素酰化磁性铁蛋白和抗各种细胞目标物的生物素酰化抗体。

[0011] 该领域内的更多公开物包括:Inglis 等 2004. “Continuous microfluidic immunomagnetic cell separation(连续微流体免疫磁性细胞分离)” *Applied physics letters*.85(21)5093-5;Inglis 等 2006. “Microfluidic high gradient magnetic cell separation(微流体高梯度磁性细胞分离)” *Journal of Applied Physics* 99; Lambert 等 2005. “Evolution of the transferrin family: Conservation of residues associated with iron and anion binding(转铁蛋白家族的演化:与铁和阴离子结合有关的残基的保守性)” *Comparative Biochem and Physiol*, (B)142 129 ~ 141; Gider 等 1995. “Classical and quantum magnetic phenomena in natural and artificial ferritin proteins(天然和人造铁蛋白中的经典量子磁性现象)” *Science*. 268 77-80; Haukanes, B. I. 和 Kvam, C. 1993. “Application of magnetic beads in bioassays(磁珠在生物测定中的应用)” *Biotechnology(NY)*. 11(1)60-3; Olsvik, O. 等 1994. “Magnetic separation techniques in diagnostic microbiology(诊断微生物中的磁分离技术)” *Clin Microbiol Rev*. 7(1)43-54; Archer, M. J. 等 2006, “Magnetic bead-based solid phase for selective extraction of genomic DNA(用于选择性提取基因组 DNA 的基于磁珠的固相)” *Anal Biochem*. doi:10.1016/j.ab.2006.05.005; Schneider, T. 等 2006. “Continuous flow magnetic cell fractionation based on antigen expression level(基于抗原表达水平的连续流动磁性细胞分离)” *J Biochem Biophys Methods*. 68(1)1-21; Ramadan, Q. 等 2006, “An integrated microfluidic

platform for magnetic microbeads separation and confinement(用于微磁珠分离和约束的一体化微流体平台)”Biosens Bioelectron. 21(9)1693-702 ;Cotter, M. J. 等 2001. “A novel method for isolation of neutrophils from murine blood using negative immunomagnetic separation(一种使用阴性免疫磁分离从鼠类中分离出嗜中性粒细胞的新型方法)”Am J Pathol. 159(2)473-81 ;<http://www.newscientist.com/article.ns?id=dn3664> ;以及 Chang, C. C. 等 2006, “Mn, Cd-metallothionein-2 : a room temperature magnetic protein(Mn, Cd-金属硫蛋白-2 : 一种室温磁性蛋白)”Biochem Biophys Res Commun. 340(4)1134-8。在后面这篇文章中, 将小的铁结合蛋白金属硫蛋白-2 操纵以结合镉和锰而不是锌, 从而使得该蛋白具有磁性。

[0012] 背景公开物还包括: Odette 等 1984, “Ferritin conjugates as specific magnetic labels(作为特异性磁性标记的铁蛋白偶联物)”Biophys. J. 451219-22 ; Yamamoto 等 2002, “An iron-binding protein, Dpr, from *Streptococcus mutans* prevents iron-dependent hydroxyl radical formation in vitro(一种来自链球菌突变体的铁结合蛋白 Dpr 防止铁依赖性羟基的体外形成)”J Bacteriol. 184(11)2931-9 ; 以及 Ishikawa 等 2003, “The iron-binding protein Dps confers hydrogen peroxide stress resistance to *Campylobacter jejuni*(铁结合蛋白 Dps 使 *Campylobacter jejuni* 具有过氧化氢胁迫耐性)”J Bacteriol. 185(3)1010-17。

[0013] CA 2, 521, 639 公开了利用铁蛋白从溶液中除去污染离子的应用。所述铁蛋白形成了还包含其它离子交换物种(例如卟啉或冠醚)的较大结构的一部分。所述其它离子交换物种被设计来除去所述污染物, 而所述铁蛋白的磁性被用来从溶液中除去所述物种。

[0014] 美国专利 7, 097, 841 号公开了在其它应用中铁蛋白融合蛋白在疫苗中的应用。

[0015] 尽管有如上所述的关于磁性颗粒和纳米颗粒的大量公开物, 但是仍然不断需要在微流体和纳流体系统中的更简单更有效的磁性颗粒标记。

发明内容

[0016] 本发明的目的是解决上述问题并改善如上面所述的已知产品和方法。本发明的另一目的是提供能例如在微流体或纳流体装置中有利地采用的用于分析物的改进标记。本发明的另一目的是提供采用所述标记的方法、试剂盒和应用。

[0017] 于是, 本发明提供了用于分析物的标记, 该标记与磁性或可磁化物质连接, 所述标记包含:

[0018] (a) 用于将该标记与所述分析物连接的识别部分 ; 和

[0019] (b) 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分 ;

[0020] 其中, 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白、多肽或肽。

[0021] 本发明人令人惊讶地确定了量小到足以用于微流体和 / 或纳流体装置中的磁性或可磁化物质可以通过在金属结合蛋白、多肽或肽中引入金属原子或离子(或包含它们的化合物)来与所选的分析物相连, 所述金属结合蛋白、多肽或肽与识别剂连接, 而该识别剂进而与所选的分析物连接。因此, 本发明的标记包含至少两个部分: 用于将所述标记与所需分析物相连的识别部分, 和用于结合所述磁性或可磁化物质的部分。所述标记可简单地使用

诸如亲和纯化或磁场纯化等既定技术来纯化。

[0022] 当所述识别部分为单价时,它们避免了由细胞表面上的受体的交联引起的问题(不像抗体)。本发明人还通过使用既定分子生物学策略将靶向蛋白直接(或间接)与可磁化蛋白偶联来克服已知方法中遇到的“堵塞”问题。

[0023] 本发明的标记的另一优点是它们可使用简单的化学方法进行磁化或去磁。

[0024] 所述标记特别优选为融合蛋白。在本发明的背景下,融合蛋白是已作为单一实体重组蛋白表达的蛋白。融合蛋白还具有若干其它优点。本发明的融合蛋白的识别臂(例如 scFv)的取向会受到控制并因而更有可能与其目标物结合。融合蛋白还提高了在单个融合蛋白中引入多个识别部分的可能性。这些识别位点可以针对相同目标物或不同目标物。当存在两个或多个识别部分时,可以限定和控制所述磁性物质上的识别部分的空间组织,从而减少由空间位阻和与传统磁珠的随机结合造成的问题。随着将各个识别部分在所述融合蛋白内小心隔开(例如通过在表达系统中引入核酸间隔子),可以控制最终蛋白的三级结构,以将识别部分布置在所述蛋白表面上的在空间上所选择的区域。使用融合蛋白的另一优点是,可以指定每个标记内的识别部分的数目且对于每个所述标记分子所述数目都相同。这明显不同于将识别部分连接到磁珠上的传统方法,在所述传统方法中,由于连接的随机特性,指定识别部分的数目要难得多,而连接到每个磁珠的数目会有相当大的变化。

[0025] 在本文背景下,“连接”是指该连接为任何类型,包括特异性和非特异性结合以及包封。因此,用于结合磁性或可磁化物质的部分应该能结合或包封(或者以特异性或非特异性方式连接)颗粒或聚集体等形式的物质。这些颗粒或聚集体比传统磁珠要小得多,通常共有少于 100,000 个原子、离子或分子,更优选为少于 10,000 个原子、离子或分子,最优选为少于 5,000 个原子、离子或分子结合或包封到所述(或每个)部分。最优选的物质是能结合最多 3,000 个原子、离子或分子,特别是大约 2,000 以下或 500 以下的原子、离子或分子。

[0026] 在本发明中采用的一个具体实施例中,铁蛋白(24 个亚基的蛋白壳)的金属组分含有一个 8nm(8×10^{-9} m)无机核。每个核含有大约 2,000 个 Fe 原子。在另一实施例中,来自变形链球菌(*Streptococcus mutans*, 12 个亚基的壳)的 Dpr 含有一个包含 480 个 Fe 原子的 9nm 壳。在另一实施例中,乳铁蛋白结合 2 个 Fe 原子并包含结合有血红素的铁(与在其核内结合铁分子的铁蛋白相反)。金属硫蛋白-2(MT)结合 7 个二价过渡金属。MT 内的锌离子被 Mn^{2+} 和 Cd^{2+} 所代替,从而形成室温磁性蛋白。MT 可以经修饰而进一步引入有一个或多个额外的金属结合位点,由此增加了所述 Mn Cd MT 蛋白的磁性。

[0027] 根据这些结合环境,结合或包封在单一部分的物质的总体积通常不超过 $1 \times 10^5 \text{nm}^3$ (代表所述物质的颗粒或聚集体具有约 58nm 以下的平均直径)。较优选的是,所述物质可具有不超过 $1 \times 10^4 \text{nm}^3$ 的总体积(代表所述物质的颗粒或聚集体具有约 27nm 以下的平均直径)。更优选的是,所述物质可具有不超过 $1 \times 10^3 \text{nm}^3$ 的总体积(代表所述物质的颗粒或聚集体具有约 13nm 以下的平均直径)。最优选的是,所述物质可具有不超过 100nm^3 的总体积(代表所述物质的颗粒或聚集体具有 6nm 以下的平均直径)。然而,所述颗粒的尺寸可以用平均直径作为体积的替代方式来确定。因此,在本发明中还优选的是,结合颗粒的平均直径为 50nm 以下、40nm 以下、30nm 以下、20nm 以下,或最优选的是 10nm 以下。在此背景下,平均是指所述数目的颗粒的直径总和除以颗粒的数目。

附图说明

[0028] 现在将参考下列附图仅以实施例的方式对本发明进行更详细的说明：

[0029] 图 1：该图显示如何将适当基因克隆到载体中以产生本发明的标记。可通过包括所述适当基因的许多（根据需要）拷贝来控制最终标记中的可磁化蛋白亚基的数目。在本实施例中仅包括了抗体的 V_H 和 V_L 区的基因，从而使所述抗体的 scFv 部分被包括到最终优选的嵌合蛋白而不是完整抗体中。

[0030] 可通过使用反转录扩增适当基因（信使 RNA）然后由单克隆的杂交瘤克隆或（噬菌体展示）基因文库的聚合酶链式反应（PCR）来将所述 V_H 和 V_L 区克隆到适当的表达载体内。所述基因与一系列小氨基酸（例如，四个甘氨酸和一个丝氨酸残基）相连，以允许多肽相对于彼此正确排列并形成结合位点而没有受到接头区的干扰。然后，直接在 scFv 后克隆或如上所述由氨基酸接头间隔而克隆所述可磁化蛋白的基因。必要时，可以引入纯化标签（诸如六组氨酸、谷胱甘肽-S-转移酶、 β -半乳糖苷酶、凝血素、绿色荧光蛋白等）以有助于分离所述融合蛋白。在所述融合蛋白的基因的末端引入终止密码子，其后是多聚腺苷酸化位点。如果所选可磁化蛋白包含多个亚基（诸如铁蛋白或 Dpr），可以设想的是，编码这些亚基的基因会在 scFv 之后或之前。也希望将 scFv 基因引入所述可磁化蛋白的基因内，以将所述 scFv 氨基酸序列定位到所述可磁化蛋白的方便定位部分（非氨基末端或羧基末端）。如果选择单体蛋白（如 MT），可将 scFv 和 / 或金属结合部分基因的多个拷贝串联克隆到所述表达载体内（如图 1 所示）。所述 scFv 和金属结合部分在所表达的融合蛋白内的位置可由基因序列限定和控制。对于多聚体蛋白，可能希望将所述 scFv 基因引入所述可磁化蛋白的基因内，以将所述 scFv 氨基酸序列定位到所述可磁化蛋白的方便定位部分（非氨基末端或羧基末端）。然后，将所述载体导入表达系统如哺乳动物或昆虫细胞系或者酵母菌或细菌宿主进行表达。通过适当方法（沉降、免疫沉淀、亲和纯化、高效液相色谱或快速蛋白液相色谱等）来收获融合蛋白。然后使用磁化蛋白的既定方法（Chang 等，Meldrum 等）来修饰经纯化的融合蛋白。

[0031] 图 2：该图显示了使用本发明的标记的示意性纯化方法。使用与离子结合的本发明标记对目的分析物进行标记。施加磁场以防止经结合的分析物被洗掉，同时除去所有污染物。留下被纯化的样品，如果需要可以进行分析（例如检测）。

[0032] 图 3：该图显示，由于目前可商购获得的抗体包被珠通过将抗体与珠子共价偶联来制造，因而存在所述抗体取向不正确的可能性，从而降低了结合效率。

[0033] 图 4a 和 4b：这些图示意性地描绘了诸如 IgG 等抗体的简化结构。在使用酶（如木瓜蛋白酶）进行蛋白酶处理后，将抗体分为接近铰链区的 3 个部分。由于抗体的效应子功能部分（铰链， C_H2 和 C_H3 ）相对容易结晶以用于 X 射线衍射分析，该部分被称作可结晶片段（Fc）区。抗体的抗原结合部分称作抗体片段（Fab）。在酶消化后，所述 Fab 片段可连接在所述铰链区从而形成 $F(ab)_2$ 片段。其它抗体可能在 Fc 区内的域数量上有差别以及在所述铰链区上有变化。

[0034] 图 5a 和 5b：这些图显示了 scFv-铁蛋白融合蛋白的构建。

[0035] 图 6a 和 6b：这些图显示了 scFv-MT2 融合蛋白的构建。

[0036] 图 7：该图显示了 scFv 片段的构建。

[0037] 图 8 :该图显示 cDNA 文库的构建。为了利用组织样品构建 cDNA 文库,提取 mRNA,将其反转录为 cDNA 并连接到质粒载体中。然后,使用这些载体转化细菌细胞。转化的细胞在不需要时冷冻保存。冷冻细胞可通过在适当培养基中生长来扩繁然后纯化质粒。然后,使用特定引物对目的基因进行 PCR 扩增以对进行进一步的分析。

[0038] 图 9a 和 9b :这些图分别显示了铁蛋白重链 (H) 和轻链 (L) 基因的 PCR 扩增子,以及铁蛋白重链和轻链基因的重叠 PCR 产物。图 9C 显示了菌落 PCR 结果,选择菌斑 1、3 和 4 进行测序。

[0039] 图 10a 和 10b :这些图分别显示了显示抗纤连蛋白 scFv 和铁蛋白重多基因和轻多基因 (如箭头所示) 的 PCR 扩增产物的凝胶,以及显示重叠 PCR 产物的凝胶。

[0040] 图 11 :该图显示了显示使用质粒转化的若干菌斑的 PCR 筛查结果的凝胶,所述质粒已连接有 scFv: 铁蛋白融合构建体。

[0041] 图 12 :该图分别显示了细胞裂解液的考马斯蓝 (Coomassie blue) 染色的凝胶和 Western 印迹。关键 :1. 铁蛋白 2 小时诱导 ;2. 铁蛋白 3 小时诱导 ;3. 铁蛋白 4 小鼠诱导 ;4. 基准 (Invitrogen) 蛋白梯带。

[0042] 图 13 :该图显示了显示来自人类肝文库的 MT2 的 PCR 扩增产物的凝胶。

[0043] 图 14 :该图显示了用含 scFv:MT2 构建体的质粒转化的克隆体的菌落分析。

[0044] 图 15 :该图 (分别) 显示 scFv:MT2 (箭头所示) 的考马斯凝胶和 Western 印迹。

[0045] 图 16 :该图显示了再溶解的 scFv: 铁蛋白和 scFv:MT2 融合蛋白 (各自的) 考马斯染色凝胶和 Western 印迹的照片。所述融合蛋白被圈出——两块凝胶上的泳道 2 均为铁蛋白而两块凝胶上的泳道 3 均为 MT2。泳道 1 为蛋白分子量梯带。

[0046] 图 17a 和 17b :这些图分别显示了来自 MT2 和铁蛋白融合蛋白的结合的 SPR 分析的重叠感应图 (Sensogram)。

[0047] 图 18 :该图展示了生成用于本发明的磁性铁蛋白的磁特性。

[0048] 图 19 :该图显示了在磁性铁蛋白的生成和浓缩中铁蛋白的浓度。关键 :MF :磁性铁蛋白 ;ft :流通材料 ;Pre :透析前的 **Macs®** 柱浓缩的磁性铁蛋白 ;post :透析后的 **Macs®** 柱浓缩的磁性铁蛋白。

[0049] 图 20 :该图显示了 scFv: 铁蛋白和热处理 scFv: 铁蛋白与纤连蛋白的结合。

[0050] 图 21a 和 21b :这些图显示了磁化融合蛋白的吸光度测量结果,其中使用 Varioskan Flash 仪器记录。所述蛋白在浓缩后仍被单克隆抗铁蛋白抗体识别 (21a) 且所述磁化的抗纤连蛋白铁蛋白融合蛋白保留了与其目标抗原的结合能力 (21b)。

具体实施方式

[0051] 结合磁性或可磁化物质的部分不受特别限制,只要它能结合所述物质并且不干扰与分析物的结合即可。用于结合所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白、多肽或肽 (或这类蛋白、多肽或肽的金属结合域)。通常,该部分能结合或结合有一种或多种过渡金属和 / 或镧系金属原子和 / 或离子,或包含所述离子的任何化合物。所述离子包括但不限于 Fe、Co、Ni、Mn、Cr、Cu、Zn、Cd、Y、Gd、Dy 或 Eu 中的任意一种或多种离子。

[0052] 在本发明的更优选的实施方式中,所述一种或多种金属离子包括 Fe^{2+} 、 Fe^{3+} 、 Co^{2+} 、 Co^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Mn^{3+} 、 Mn^{4+} 、 Cd^{2+} 和 Ni^{2+} 中的任意一种或多种。用于本发明的最优选的离子为 Fe^{2+} 、

Fe³⁺、Cd²⁺ 和 Mn²⁺ 离子。通常,这些离子在铁的情形中与乳铁蛋白、转铁蛋白和铁蛋白结合,在镉和锰的情形中与金属硫蛋白-2 结合。Fe²⁺ 的结合优选采用酸性条件促进,而 Fe³⁺ 的结合优选采用中性或碱性条件促进。

[0053] 在本发明的优选实施方式中,所述金属结合部分包含蛋白或蛋白的金属结合域,所述蛋白选自乳铁蛋白、转铁蛋白、铁蛋白(脱铁铁蛋白)、金属硫蛋白(MT1 或 MT2)、铁离子结合蛋白(FBP,例如来自流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*))、弗氏共济失调蛋白和铁载体(很小的肽,其功能是将铁运输穿过细菌膜)。

[0054] 在某些实施方式中,本发明的标记可以包含多个用于结合所述磁性或可磁化物质的部分。可以控制所述部分的数目以便控制所述标记的磁性。通常,在这类实施方式中,所述标记可以包含 2 ~ 100 个所述部分,优选的是 2 ~ 50 个所述部分,最优选的是 2 ~ 20 个所述部分,以结合所述磁性或可磁化物质。在最终的嵌合蛋白中,铁结合蛋白的每个拷贝都可通过不带电荷的氨基酸接头序列与相邻拷贝连接以具柔性。

[0055] 本发明还包括标记组,在所述标记组中,每个标记具有不同(独特)数目的金属结合部分。这些标记组因其能允许同时处理来自一个或多个样品的多个分析物而具有优势。

[0056] 识别部分不受特别限制,只要它能结合目的分析物即可。通常,能够与所述部分结合的分析物选自生物分子(天然或合成的)、传染性病原体或传染性病原体的组分(诸如病毒或病毒颗粒或病毒组分)、细胞或细胞组分、以及诸如内源性或外源性小分子等小分子(例如,代谢物或者药品或药物)。在本发明背景下,小分子指不是高分子或寡聚物(不像蛋白、核酸、多肽或其它生物寡聚物或高分子)的诸如生物活性分子的分子化学物质,如代谢物、药品、药物、糖、脂质或脂肪等。通常,小分子具有 2,000 道尔顿(Da) 以下的质量。更具体而言,优选的是能够与所述部分结合的分析物包括病毒或病毒颗粒或病毒组分、蛋白、多肽、糖蛋白、诸如 DNA 或 RNA 等核酸、寡核苷酸、代谢物、诸如复合糖等糖、脂质、脂肪、或者药品或药物。这些分析物包含由细菌产生的糖残基(例如,唾液酸)和许多细菌病毒上的糖衣,以及在一些肿瘤的糖蛋白中存在的改变的糖。优选的是,这些分析物的任意一种或多种都可使用本发明的方法。

[0057] 能结合上述分析物的识别部分自身可以为任何类型的物质或分子,只要它适于结合目的分析物即可。一般而言,所述识别部分选自抗体或抗体片段、受体或受体片段、蛋白、多肽、肽模拟物、核酸、寡核苷酸和适体。在本发明更优选的实施方式中,所述识别部分选自抗体的可变多肽链(Fv)、T 细胞受体或 T 细胞受体片段、抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白。最优选的是,所述识别部分选自单链的抗体可变部分(sc-Fv)。

[0058] 抗体是参与识别外来抗原的免疫球蛋白分子并由脊椎动物表达。抗体由称作 B 淋巴细胞或 B 细胞的专门细胞类型生成。单个 B 细胞仅产生靶向单一表位的一种抗体。当 B 细胞遇到其识别的抗原时,它分裂并分化为抗原生成细胞(或浆细胞)。

[0059] 大多数抗体的基本结构由两种不同类型的四条多肽链构成。较小(轻)链的分子量为 25 千道尔顿(kDa) 而较大(重)链的分子量为 50kDa ~ 70kDa。轻链具有一个可变区(V_L) 和一个恒定区(C_L)。重链具有一个可变区(V_H) 和 3 ~ 4 个恒定区(C_H) (取决于抗体类别)。重链上的第一和第二恒定区被具有不同长度的铰链区分隔开。两条重链在所述铰链区处通过二硫桥连接在一起。铰链后面的重链区也称作 Fc 区(可结晶片段)。铰链前面的轻链和重链复合体称作 Fab 区(抗体片段区),而两个抗体结合位点一起被称 F(ab)₂。

区。重链的恒定区能结合免疫系统的其它组分,包括细胞表面上的补体级联分子和抗体受体。抗体的重链和轻链形成通常由二硫桥连接的复合体,该复合体在可变端能结合给定的表位(图4)。

[0060] 抗体的可变基因通过突变、体细胞重组(也称作基因改组)、基因转变和核苷酸增加事件形成。

[0061] 可以生成 ScFv 抗体来对抗大量的目标物,所述目标物包括:

[0062] 1. 病毒:Torrance 等 2006.Oriented immobilisation of engineered single-chain antibodies to develop biosensors for virus detection(经改造的单链抗体的定向固定以开发用于病毒检测的生物感应器).J Virol Methods. 134(1-2)164-70;

[0063] 2. 丙型肝炎病毒:Gal-Tanamy 等 2005.HCV NS3 serine protease-neutralizing single-chain antibodies isolated by a novel genetic screen(通过一种新型基因筛查法分离出的 HCV NS3 丝氨酸蛋白酶中和单链抗体).J Mol Biol. 347(5):991-1003, 以及 Li 和 Ilain. 2005.Chimeric monoclonal antibodies to hypervariable region 1 of hepatitis C virus(针对丙型肝炎病毒高变区 1 的嵌合单克隆抗体).J Gen Virol. 86(6)1709-16;

[0064] 3. 癌症:Holliger 和 Hudson.Engineered antibody fragments and their use of single domains(工程抗体片段和单域的出现).Nat Biotechnol. 23(9)1126-36;

[0065] 且 ScFv 抗原能用在包括蛋白组学的各种应用中(Visintin 等,2004. Intracellular antibodies for proteomics(用于蛋白组学的胞内抗体).J Immunol Methods. 290(1-2):135-53)。

[0066] 因此,在其最优选的实施方式中,本发明使用了通常由一种或多种抗体的一个或多个抗原结合臂形成的多部分标记来识别一种或多种分析物,和连接到所述抗原结合臂的金属结合蛋白的一个或多个拷贝。通常,所用抗体片段包含重链和轻链的可变区 V_H 和 V_L , V_H 和 V_L 由柔性接头连接以形成单链肽(sc),通常称为 scFv。当标记内的两个部分都是由蛋白和/或多肽形成时(即所述标记包含嵌合蛋白),可以使用本领域内熟知的重组技术来形成所述标记。在图 1 中提供了这种情况的一个示例。然而,如果任何一个部分由其它物种形成,所述标记可通过一个物种与另一物种的简单连接制得。

[0067] 因此,本发明还提供了用于形成如上定义的分析物所用的标记的方法,该方法包括将用于把所述标记连接到所述分析物的识别部分和用于结合磁性或可磁化物质的部分连接在一起。

[0068] 此外,本发明还提供了处理样品的方法,该方法包括:

[0069] (a) 将所述样品与用于分析物的标记接触,该标记与磁性或可磁化物质相连,所述标记包含:

[0070] - 用于将所述标记与所述分析物连接的识别部分;和

[0071] - 用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的部分;

[0072] (b) 将所述标记置于磁场中以影响该标记;

[0073] (c) 任选地分析所述标记和/或所述分析物以获取与能够和所述标记连接的分析物有关的信息;

[0074] 其中,用于结合或包封所述磁性或可磁化物质的所述部分包含金属结合蛋白、多肽或肽。

[0075] 在上述方法的一个优选实施例中,可以采用磁场来将所述标记和 / 或任何可与所述标记相连的分析物与所述样品中的一种或多种其它物质分离、纯化和 / 或隔离。在此情况中,所述分析步骤不是必要的,因为不用分析也可达到纯化目的。在其它优选方法中,执行所述分析步骤,且所述分析步骤通常包括检测与标记相连的分析物的存在、不存在、特性和 / 或量。

[0076] 本发明还提供了如上定义的标记在核酸、寡核苷酸、蛋白、多肽、传染性病原体(例如病毒、病毒颗粒或病毒组分)或细胞的纯化方法中的应用。所述标记优选用于夹心法(如在微流体装置和 / 或生物传感器中进行的夹心法)中。

[0077] 此外,本发明还提供了用于结合磁性或可磁化物质的部分的用途,其中所述部分包含金属结合蛋白、多肽或肽,且其中所述用途采用微流体或纳流体装置进行。

[0078] 现在将对本发明中采用的包括金属结合蛋白、抗体和融合蛋白的各种部分进行更详细的说明。

[0079] 两个金属结合蛋白被确定为用于进一步说明本发明的良好实例。它们是铁蛋白和金属硫蛋白 II (MT2)。优选的是,融合蛋白由这些金属结合蛋白任一种来形成,所述融合蛋白包含表达为单链 Fv (scFv) 的鼠类抗体的可变域,所述 scFv 与所述铁蛋白或金属硫蛋白 II 在基因水平上融合以得到重组蛋白。

[0080] 金属结合蛋白

[0081] 文献中描述的金属结合蛋白数量还在增加。许多蛋白将铁 (Fe) 存储为羟基氧化物 - 磷酸铁或存储为血红素,因而使磁化方法复杂化。诸如铁蛋白等蛋白能在笼样结构中存储数千个铁离子。

[0082] 由于铁蛋白内的内源性铁不是顺磁性的,因此通常需要将其除去并用顺磁形式替代而不损害所述蛋白。诸如金属硫蛋白 II (MT2) 等其它金属结合蛋白以松弛晶格排列方式保持更少的金属离子,与铁蛋白的情况相比,除去并替代它们更加容易。

[0083] 铁蛋白

[0084] 铁蛋白是直径 12nm、分子量 480kDa 的大蛋白。该蛋白包含包装铁的大空腔(直径 8nm)。该空腔通过折叠为由非共价键维持的四螺旋束的 24 个铁蛋白多肽自发组装形成。铁和氧在生理条件下形成不溶的锈和可溶的自由基。铁离子的溶解度为 10^{-18} M。铁蛋白能在细胞内以 10^{-4} M 的浓度存储铁离子。

[0085] 在动物和植物之间,铁蛋白的氨基酸序列是保守的,因而其二级结构和三级结构也是保守的。该序列与在细菌中发现的不同;然而,细菌内的蛋白结构并没有变化。由于使用基因缺失突变小鼠的研究造成了胚胎死亡,因而铁蛋白对于存活而言具有重要的作用。此外,在厌氧细菌中也发现了铁蛋白。

[0086] 铁蛋白是大的多功能蛋白,带有 8 个 Fe 运输孔、12 个无机物成核位点和多达 24 个氧化酶位点,这些位点由亚铁和氧生成无机前体。在脊椎动物中,铁蛋白由两类亚基(重链(H)和轻链(L))形成,每类亚基都带催化活性(H)或无活性(L)的氧化酶位点。重链和轻链之比根据需要而变。在铁蛋白的中心可以定位有多达 4000 个铁原子。

[0087] 存储在铁蛋白内的铁通常为水合氧化铁即水铁矿($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$)形式。可以用铁

磁性氧化铁即磁铁 (Fe_3O_4) 替代所述水铁矿核。这可通过使用巯基乙酸除去铁以产生脱铁铁蛋白来实现。然后在氩气或其它惰性气体下逐渐添加 $\text{Fe}(\text{II})$ 溶液并通过空气或替代性氧化剂的引入缓慢而有控制地进行氧化。

[0088] 金属硫蛋白 II

[0089] 金属硫蛋白是富含半胱氨酸的小分子量的胞内蛋白。这些蛋白见于所有真核细胞中并具有强力的金属结合和氧化还原能力。MT-1 和 MT-2 在肝脏内由各种金属、药物和炎性介质快速诱导。MT-2 的功能包括锌 (Zn) 的体内平衡、防止重金属 (尤其是镉) 和氧化剂损害以及代谢调节。

[0090] MT2 在羧基末端 (α 域) 和氨基末端 (β 域) 通过两个金属结合簇与七个二价过渡金属结合。20 个半胱氨酸残基参与到该结合过程中。

[0091] Chang 等描述了用锰 (Mn^{2+}) 离子和镉 (Cd^{2+}) 离子替代所述七个锌 (Zn^{2+}) 离子的方法。显示出所生成的蛋白在室温下展示了磁滞回线。这有可能意味着该蛋白是顺磁性的。

[0092] Toyama 等改造了人类 MT2 以构建一个额外的金属结合位点。这有可能增加该 MT2 的顺磁机能,且可以用在本发明中。

[0093] 由于铁蛋白和 MT2 有可能被磁化,因此它们提供了对目前可用的磁珠的替代方案。可以使用分子生物学技术将抗体的可变区连接到编码铁蛋白或 MT2 的基因上以生成磁性抗体样蛋白 (参见图 5a 和 5b)。这可以使用现有 scFv (如抗纤连蛋白 scFv) 基因来说明。纤连蛋白见于结缔组织中、细胞表面上以及血浆和其它体液中。在许多肝癌中发现了纤连蛋白基因的过表达且已显示该蛋白与伤口愈合有关;因此诊断将具有潜在“治疗诊断 (theranostic)”价值。因此,采用抗纤连蛋白 scFv 基因及铁蛋白重基因和轻基因来生成大的多价融合蛋白是本发明的优选实施方式。所述 scFv 还可与人类 MT2 基因相连以产生较小的融合蛋白。

[0094] 基因融合识别和顺磁域在单一蛋白上的应用消除了对化学偶联的需要和由化学操作造成的对蛋白功能活性的潜在损害。可以相对容易地随意替代所述 scFv 或可磁化域。

[0095] 所述 scFv 可包含由甘氨酸和丝氨酸残基短链连接的抗纤连蛋白重链和轻链。已发现 V_H -接头- V_L 构建体牢固且保持结合,因此优选所述构建体。

[0096] Lee 等发现,将铁蛋白重链在基因水平上融合到其轻链的氨基末端显著增加了重组铁蛋白在大肠杆菌中的胞质溶解度。该研究也可用于本发明中。所述 scFv 和铁蛋白基因通过丝氨酸和四个甘氨酸残基组成的短接头域连接到一起,这出于与如上对于 scFv 片段所述相同的原因,即由于这些残基小而灵活,且不容易干扰其它必要残基。

[0097] Ahn 等发现,融合到铁蛋白重链和轻链的 C 端的基因容易在铁蛋白分子内表达而不是在其表面表达。因此,将 scFv 铁蛋白融合构建体设计为优选所述 scFv 处在所述铁蛋白重链的 N 端。

[0098] 抗体

[0099] 在讨论在本发明中可能采用的抗体时将使用下列缩写。

[0100] C_H 抗体重链恒定域

[0101] C_L 抗体轻链恒定域

[0102] CDR (抗体的) 互补决定区

[0103] Fab 由可变域和轻恒定域和 C_{H1} 组成的 (木瓜蛋白酶切割后的) 单一抗体识别片

段

[0104] F(ab)₂ (木瓜蛋白酶切割后的) 抗体识别片段

[0105] Fc 抗体的 (木瓜蛋白酶切割后的) 可结晶片段 (通常 CH₂ 和 CH₃ 域)

[0106] Fr (抗体的可变部分的) 框架区

[0107] Fv (抗体的) 可变区

[0108] Ig 免疫球蛋白

[0109] MT 金属硫蛋白

[0110] MT1 金属硫蛋白 I

[0111] MT2 金属硫蛋白 II

[0112] scFv 单链可变片段

[0113] V_H 抗体可变重域

[0114] V_L 抗体可变轻域

[0115] 本发明提供了磁性抗体类嵌合蛋白。所述蛋白的磁性段由铁结合蛋白的一个或多个拷贝组成,如上所述。所述蛋白的识别臂由结合目的抗原的抗体片段或受体组成,这将在下文详细说明。所述抗体的来源不受特别限制,且抗体可以衍生自任何物种、噬菌体展示库或其它重组系统。

[0116] 本发明的蛋白的典型抗体部分由结合纤连蛋白的鼠类单克隆 IgG1 抗体的抗原结合位点 (下文称作抗纤连蛋白 scFv 域) 组成。

[0117] 抗体是参与特异性适应性免疫应答的免疫球蛋白。每个免疫球蛋白有两个不同的作用。一个作用是结合抗原,另一个作用是介导免疫 (效应子) 功能。这些效应子功能包括所述免疫球蛋白与宿主组织、免疫细胞和其它免疫蛋白的结合。抗体由四条多肽链构成 (图 4)。两条相同的较长链 (称作重链) 由二硫桥在称作铰链的区域相互共价连接。每条重链也通过二硫桥与相同的较短链 (称作轻链) 共价连接。每条多肽链含有数个各自自由基因内的外显子编码的域 (图 4 中对于轻链标记为 V_L 和 C_L, 以及 V_H、C_H1、C_H2 和 C_H3)。每个域具有约 12.5kDa 的分子量。人类中有五个主要抗体类别;即 IgG、IgA、IgM、IgD 和 IgE, 并且它们还可能有亚类。每个抗体类别具有特征性的效应子区并因此以不同方式调节免疫系统。抗原结合域位于免疫球蛋白的称作可变重域 (V_H) 和可变轻域 (V_L) 的区域的氨基末端。所述效应子域在所述抗体的其它区域 (恒定区)。

[0118] 脊椎动物免疫系统能识别和结合数百万的抗原。这部分是因为抗体的非同寻常的抗原多样性。抗体的可变域由可改组以产生变异性的多组基因编码。此外,还会出现所述基因的称作体细胞突变的其它修饰。抗体与抗原直接接触的区域 (识别序列) 是最易变的区域。这些区域称作互补决定区 (CDR)。在每条多肽链上有三个这类区域且在图 4b 中由较浅的线条表示。尽管 CDR 之间的氨基酸残基不直接接触抗原,但是它们在形成抗原结合区的正确结构中的重要性最大。因此,它们被称作框架区。

[0119] 抗体由称作 B 细胞的专门细胞内生成。B 细胞在其表面有能结合特定抗原的抗体。换言之,单一 B 细胞能够通过其表面抗体“识别”单一抗原。当该膜结合抗体遇到抗原时,所述 B 细胞发生熟化,由此最终导致该细胞的分裂和增殖。来自源细胞的子细胞 (或称为克隆细胞) 能生成可溶 (非膜结合) 形式的特异性与源膜结合抗体相同的抗体。由于细胞衍生自单各克隆细胞,因此所有由这些子细胞生成的抗体称作单克隆抗体。

[0120] 很多年前就已经制得用于体外的抗体。最初,来自免疫过的动物的多克隆血清是获得抗体的最容易的方法。1975年,剑桥大学的 Georges J. F. **Köhler** 和 César Milstein 的开创性工作导致了实验室生产单克隆抗体的发展。他们的工作涉及将来自小鼠脾脏的 B 细胞与骨髓瘤细胞融合以产生称作杂交瘤细胞的永生化 B 细胞系。

[0121] 抗体的抗原结合部分可以在没有恒定区的情况下单独使用。这在例如涉及更适应于穿透固体肿瘤的抗体类分子中可能具有某些用途。可以在细胞中以 Fv 片段表达 V_H 域和 V_L 域。作为另一种选择,两个域可以由小氨基酸短链连接以形成分子量约为 25kDa 的称作单链 Fv 片段 (scFv) 的单一多肽 (参见图 7)。所述接头由不干扰所述 scFv 的结合区和框架区的若干小氨基酸 (诸如丝氨酸和甘氨酸) 组成。

[0122] 融合蛋白设计

[0123] 在本发明中,可以使用来自抗纤连蛋白鼠类单克隆 IgG1 抗体的可变区以产生 scFv 域来设计融合蛋白。可以使用铁蛋白的重链和轻链或 MT2 基因来产生所述抗体的磁性域。所述抗纤连蛋白抗体的可变域的基因可以商购获得,且通常将它们克隆到质粒载体中以作为 scFv 表达。所述 scFv 可以以下列顺序翻译:

[0124] ATG 起始密码子: 前导序列 (用于表达): 重链: 甘氨酸丝氨酸接头: 轻链。

[0125] 质粒的产生

[0126] 人类铁蛋白重链和轻链或人类 MT2 的基因可以从人类基因库获取,使用正确设计的引物克隆并插入抗纤连蛋白 scFv 质粒载体,在所述抗体轻链的 3' 端带有末端终止密码子。融合到铁蛋白的重链和轻链的 3' 端的基因可以在所述铁蛋白分子内部表达而非在表面上表达。因此,所述 scFv 铁蛋白融合构建体的 scFv 处在所述铁蛋白重链的 N 端 (对应于 5' 端)。所述 scFv 和铁蛋白或 MT2 融合蛋白通常在该蛋白 C 端的终止密码子前具有组氨酸标签 (由六个组氨酸残基组成)。这允许在诸如 Western 印迹的应用中对所述蛋白进行检测,还允许使用金属亲和柱 (如镍柱) 或如果金属结合功能干扰时用其它标签 (例如 GST、 β -半乳糖苷酶、HA、GFP) 进行可能的纯化。可在质粒生成后检查所述基因的序列以确保没有引入突变。

[0127] 图 5b 是示例性铁蛋白融合蛋白的图示。scFv 重链和轻链分别由前两个箭头表示。

[0128] 所采用的序列是如下所述的 SEQ ID 1:

[0129] SEQ ID 1

[0130] LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLVTVSSGDgssggsggASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTKVEIKsgggMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHEEREHAEKLMKLNQRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKA IKELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNESMSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFD RDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNLQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

[0131] 在该氨基酸序列中, scFv 重链和轻链由斜体字母表示,重链由下划线表示。在该氨基酸序列中,粗体字母表示可变域的 CDR 区。两个甘氨酸 / 丝氨酸接头由小写字母表示,其中的第二个接头连到纯文本 (plain text) 的铁蛋白的重链和轻链序列,重链序列仍由下

划线表示。

[0132] 图 6b 是示例性 MT2 融合蛋白的图示。该序列由如下 SEQ ID2 表示：

[0133] SEQ ID2

[0134] LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSI SGSSGTTYYADSVKGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPPFPYFDYWGGTLVTVSSGDgssggsggASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR
ASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF
GQGTKVEIKsgggMDPNCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKCTSCCKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASDKCSCCAP
GSAGGSGGDSMAEVQLLE

[0135] scFv 序列呈斜体，重链带下划线，粗体字突出了 CDR。两个接头序列为小写字母，第二个接头连接到以正常文本给出的金属硫蛋白序列。

[0136] 所述 scFv- 铁蛋白和 scFv-MT2 融合蛋白可在大肠杆菌菌株内表达。这通常通过用编码所述融合蛋白任一个的质粒转化感受态大肠杆菌细胞实现。所述表达质粒通常含有细菌翻译和表达的元件以及提高表达的增强子序列。

[0137] 所述质粒还优选含有用于抗生素耐性的序列。当将细菌细胞铺在含抗生素的琼脂营养板上时，不含所述质粒的细胞不会分裂。而确实含有所述质粒的那些细胞能在谨慎菌落 (discreet colony) 中生长。所述菌落中的每个细胞遗传自单一细胞或“克隆体”(因此该过程称作克隆)。

[0138] 所述克隆体可从板上挑出并在含抗生素的液体培养基中生长。融合蛋白表达通常通过添加诱导剂(如异丙基-β-D-1-硫代吡喃型半乳糖苷或 IPTG) 引发。这些细胞可以在收获前温育限定量的时间。所述细胞可以使用脲裂解，然后通过例如 SDS-PAGE 或 Western 印迹来分析裂解液。

[0139] 蛋白检测和纯化

[0140] 可以使用 SDS-PAGE(十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳)和 Western 印迹来评估克隆体的蛋白表达概况。在这些测定中，对蛋白进行化学变性(通过使用诸如 β-巯基乙醇的化学物质来切割硫键和/或通过加入消除键内静电荷的 SDS)。将细胞裂解液加入凝胶顶部的孔内。然后对所述凝胶施加电流(DC)，并使蛋白根据其尺寸迁移通过所述凝胶。然后通过用染料将所述凝胶染色来使所述蛋白显像。特定蛋白通过将分离的蛋白转移到硝基纤维素膜上(还是通过使用电流)来探测。特定的酶联抗体在该膜上温育并加入底物(比色、发光或荧光化学物质)来使蛋白显像。

[0141] 表达水平最高的克隆体通常被扩繁并使之大规模生长(1L)。如上所述诱导细胞并收获。

[0142] 裂解所收获的细胞并使用例如金属亲和色谱纯化所述蛋白。如果需要，可采用其它纯化方法，包括纤连蛋白亲和柱。

[0143] 蛋白特征性测定

[0144] 尺寸分析

[0145] 可以使用 SDS-PAGE 和 Western 印迹分析和色谱技术来测定所述蛋白的尺寸。

[0146] 表面等离子共振

[0147] 可以使用表面等离子共振(SPR)来评估所述融合蛋白与纤连蛋白的结合。SPR 是能够测量当分子结合到金属薄膜时光的折射率变化的技术。将纤连蛋白固定在 SPR 芯片的

金属表面,然后让所述融合蛋白流过该芯片表面。当所述融合蛋白结合时,可使用 SPR 来评估结合动力学(结合、解离和亲和力)。使用 SPR 所得的结果通常为感应图形式。

[0148] 还可通过 ELISA 来评估所述融合蛋白的结合。确定结合的测定涉及将微滴定板用纤连蛋白或抗铁蛋白抗体包被。使用牛血清白蛋白封闭板上未被包被的位点。然后在该板上温育所述融合蛋白。接着洗板并用抗铁蛋白抗体温育并再次洗涤。然后在板上温育酶联抗体,之后洗板,接着加入底物。

[0149] 铁蛋白和 scFv-铁蛋白的磁化

[0150] 铁蛋白内的铁不是顺磁性的。该铁通常为 Fe(III) 形式。为了生成顺磁性铁蛋白,除去铁蛋白(最终为融合蛋白)所带的铁而不损害该蛋白;然后用顺磁形式(Fe(III))替代所述铁。

[0151] 氧化铁有数种形式,但是并非所有这些形式都有相同的磁性。例如,FeO、Fe₂O₃ 和 Fe₃O₄。氧化铁(Fe₃O₄)或氧化亚铁,也称作磁铁矿或磁石是最具磁性的形式。

[0152] scFv-铁蛋白和 scFv-MT2 融合蛋白的表征

[0153] 可以通过许多技术对经处理的蛋白进行物理表征,所述技术通常包括电子显微镜、(X 射线和/或电子)衍射和穆斯堡尔(Mossbauer)光谱法的组合。

[0154] 现在将参考下列具体实施方式仅通过实施例来更详细地对本发明进行说明。

[0155] 实施例

[0156] 实施例 1——融合蛋白的设计和制造

[0157] 为了举例说明本发明,使用可商购获得鼠类抗纤连蛋白抗体设计融合蛋白。制得通过柔性短接头与 MT2 或铁蛋白在基因水平上连接的抗纤连蛋白 scFv 的融合蛋白。本实施例详细说明了所述融合蛋白的构建、表征和分离。

[0158] 所述抗纤连蛋白铁蛋白或 MT2 融合蛋白的设计基于将来自小鼠抗纤连蛋白抗体的 V_H 和 V_L 基因克隆到载体中。两个基因都通过由小的不带电荷的氨基酸组成的柔性短接头连接。紧接于 V_L 基因的 3' 端处,将另一柔性短接头连到铁蛋白基因或 MT2 基因。两种融合蛋白都有用在镍柱上纯化的六组氨酸区。融合蛋白翻译在所述铁蛋白轻基因或 MT2 基因的 3' 端处插入的终止密码子处终止。使用包含所有这些元件的质粒载体来转化细菌以进行表达。

[0159] 铁蛋白和 MT2 的基因来自 cDNA 文库。cDNA 文库通过从细胞或组织获取 mRNA、使用称作逆转录酶的酶将所述 RNA 逆转录为 cDNA 然后将每条个体 cDNA 克隆到质粒载体中来建立(参见图 8)。

[0160] 抗纤连蛋白:铁蛋白融合蛋白的产生

[0161] 背景

[0162] 铁蛋白是分子量约为 480kDa 的直径 12nm 的蛋白。该蛋白包含包装有铁的大空腔(直径 8nm)。该空腔通过折叠为由非共价键维持的四螺旋束的 24 个铁蛋白多肽自发组装形成。在动物和植物之间,铁蛋白的氨基酸序列是保守的,因而其二级结构和三级结构也是保守的。细菌中的所述蛋白结构与真核生物中的相同,尽管其序列存在差异。在脊椎动物中,铁蛋白由两类亚基(重链(H)和轻链(L))形成,每类亚基都带催化活性(H)或无活性(L)的氧化酶位点。重链和轻链之比根据需要而变。用在所述融合蛋白的构建中的铁蛋白重链和轻链的氨基酸序列为:

[0163] 铁蛋白重链（分子量 21096.5Da）：

[0164] MTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHEEREHAKL
MKLQNRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIK
ELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNES

[0165] 铁蛋白轻链（分子量 20019.6Da）：

[0166] MSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRDDVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLK
MQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNQALLDLHALGSARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIK
MGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

[0167] 包括抗纤连蛋白 scFv 氨基酸序列一起的所述融合蛋白的单一多肽的预测序列是（在重抗体基因和轻抗体基因之间以及在抗体轻链和铁蛋白重链之间的接头序列以小写字母突出）：

[0168] LVQPGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTSRDNSKNTLY
LQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSGDgssggsggASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQ
SVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTFGQGTK
VEIKsgggMTTASTSQVRQNYHQDSEAAINRQINLELYASYVYLSMSYYFDRDDVALKNFAKYFLHQSHEEREHAKL
MKLQNRGGRIFLQDIKKPDCDDWESGLNAMECALHLEKNVNQSLLELHKLATDKNDPHLCDFIETHYLNEQVKAIK
ELGDHVTNLRKMGAPESGLAEYLFDKHTLGDSDNESMSSQIRQNYSTDVEAAVNSLVNLYLQASYTYLSLGFYFDRD
DVALEGVSHFFRELAEEKREGYERLLKMQNQRGGRALFQDIKKPAEDEWGKTPDAMKAAMALEKKNQALLDLHALG
SARTDPHLCDFLETHFLDEEVKLIKMGDHLTNLHRLGGPEAGLGEYLFERLTLKHD

[0169] 该多肽组分的分子量为 65.550kDa。

[0170] 抗纤连蛋白：铁蛋白融合蛋白基因的组装

[0171] 使用 PCR 从人类肝脏 cDNA 文库扩增出铁蛋白重链和轻链基因（参见图 9a）。PCR 产物为预期尺寸（~ 540bp）。使用重叠 PCR 连接这些 PCR 产物（图 9b——产物为预期尺寸）。

[0172] 对重叠 PCR 产物进行凝胶纯化并连接到测序载体中进行测序分析。这涉及用含所述铁蛋白重链和轻链重叠基因的测序载体转化细菌。然后将转化的细菌铺在含抗生素的板上以分离克隆体。过夜温育所述细胞以允许菌落形成。从板上挑出个体菌落并将其在液体培养基中生长。离析并用 PCR 分析来自各个菌落的质粒（图 9c）。发现菌落 4 含有所述预期序列。因此随即将来自该菌落的 DNA 用于所有进一步的工作中。

[0173] 从单克隆杂交瘤细胞 PCR 扩增出鼠抗人纤连蛋白抗体的可变重链基因和可变轻链基因。这些基因已预先由柔性接头区连接以形成 scFv。使用 PCR 扩增所述 scFv 基因融合体。在图 10a 中可以看到与铁蛋白多基因重叠产物并排的所述扩增的 DNA 凝胶。从所述凝胶上切取有关条带并纯化 DNA。然后将其用在进一步的重叠 PCR 中以偶联所述 scFv 和铁蛋白多基因（图 10b）。箭头所指的条带具有 scFv：铁蛋白融合体的预期尺寸。将其切下并纯化所述 DNA 以备后用。

[0174] 此处所用的引物包含允许所述 DNA 的核酸内切酶（能切割双链 DNA 的特定序列的酶）限制酶切的序列连接到质粒中。

[0175] 在凝胶纯化后，使用限制酶（核酸内切酶）Bam HI 和 EcoRI 限制酶切 scFv：铁蛋白 PCR 产物。随后将纯化的经限制酶切的产物克隆到两个表达载体即 pRSET 和 pET26b 中。

根据前述方法分离克隆体,在图 11 中可看到鉴定为阳性克隆的 PCR 结果。

[0176] 选择来自含 pRSET 质粒的组的菌落 3 ~ 5 和 7 以及来自含 pET26b 质粒的组的菌落 6 用于序列分析。

[0177] 结果数据显示,克隆体 pRSET 4 和 5 以及 pET26b 克隆体 6 包含所述 scFv: 铁蛋白构建体。使用克隆体 pRSET 4 进行蛋白表达。

[0178] 抗纤连蛋白 scFv: 铁蛋白融合蛋白的表达

[0179] 为了验证所述融合蛋白的表达,将三份 5mL 培养物在 LB 培养液 (Luria-Bertani 培养液:每升含有 10g 胰蛋白胍、5g 酵母提取物和 10g NaCl) 中生长。在不同时间使用 IPTG (异丙基- β -D-1-硫代吡喃型半乳糖苷) 诱导所述细胞表达蛋白。然后将所述培养物在 8M 脲中裂解并使用 SDS-PAGE 分析。使用用于蛋白组分的考马斯蓝染色凝胶 (结果如图 12 所示)。使用抗聚组氨酸抗体进行了 Western 印迹以特异地鉴定所述融合蛋白 (图 12)。

[0180] 诱导的时间点是接种后 2 小时、3 小时和 4 小时。

[0181] 在印迹中所见到的条带表明,所述融合蛋白已被表达且使用抗组氨酸抗体可以检测到。所述多肽的尺寸约为 75kDa ~ 85kDa。表达产量相对较高,由于所述融合蛋白条带对应于考马斯蓝染色凝胶中颜色很深的条带,因而明显是过表达。接种后诱导 3 小时得到相对高的表达水平,因此后续表达采用这种方式的表达。

[0182] 抗纤连蛋白:MT2 融合蛋白的产生

[0183] 背景

[0184] 金属硫蛋白是富含半胱氨酸的低分子量的胞内蛋白。这些蛋白见于所有真核生物中且具有强力的金属结合和氧化还原能力。MT-1 和 MT-2 在肝脏中由各种金属、药物和炎性介质快速诱导。MT2 通过羧基末端 (α 域) 和氨基末端 (β 域) 的两个金属结合簇结合七个二价过渡金属。20 个半胱氨酸残基参与到结合过程中。

[0185] MT2 的序列为:

[0186] MDPNCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASDKCSCCAPGSAGGSG
GDSMAEVQLLE

[0187] 包括抗纤连蛋白 scFv 氨基酸序列一起的所述融合蛋白的单一多肽的预测序列是 (在重抗体基因和轻抗体基因之间以及在抗体轻链和 MT2 重链之间的接头序列以小写字母突出):

[0188] LVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSSGTTYADSVKGRFTISRDNKNT
LYLQMNSLRAEDTAVYYCAKPFYFDYWGQGLTVTVSSGDgssggsggASTGEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR
ASQSVSSSFLAWYQQKPGQAPRLLIYYASSRATGIPDRFSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQTGRIPPTF
GQGTKVEIKsgggMDPNCSCAAGDSCTCAGSCKCKECKCTSCKKSCCSCPVGCAKCAQGCICKGASDKCSCCAP
GSAGGSGGDSMAEVQLLE

[0189] 抗纤连蛋白:MT2 融合蛋白基因的组装

[0190] 使用 PCR 从人类肝脏 cDNA 文库扩增出所述金属硫蛋白 II 基因 (图 13)。PCR 产物具有预期的尺寸 (~ 200bp)。

[0191] 所述 PCR 产物使用 Bgl I 限制酶进行限制酶切并连接到预先切割的质粒中 (Xa 因子载体)。

[0192] 被选克隆体的菌落 PCR 显示了所有被选克隆体的条带 (图 14)。菌落 2、4 和 9 被

选用于序列分析。菌落 9 用于后续工作中。

[0193] 抗纤连蛋白 scFv:MT2 融合蛋白的表达

[0194] 为证实所述 scFv:MT2 融合蛋白的表达,将三份 5mL 培养物在 LB 培养液中生长,并如同所述铁蛋白融合蛋白那样,在不同时间点诱导 (IPTG)。将所述培养物在 8M 脲中裂解,然后使用由考马斯蓝染色的 SDS-PAGE 凝胶分析,并使用抗组氨酸抗体印迹 (图 15)。接种后诱导了 4 小时的细胞产生稍多的蛋白 (两个凝胶上均为泳道 3)。这些生长条件在后续蛋白表达中采用。

[0195] 融合蛋白的纯化

[0196] 采用了通过离析、洗涤和再溶解包涵体对可溶性蛋白进行离析。

[0197] 完成所述程序需要约一周的时间。在图 16 中可以看到再溶解的 scFv: 铁蛋白和 scFv:MT2 融合蛋白的考马斯蓝染色凝胶和 Western 印迹的照片。所述融合蛋白被圈出——两块凝胶上的泳道 2 均为铁蛋白而两块凝胶上的泳道 3 均为 MT2。泳道 1 为蛋白分子量梯度。

[0198] 由此可见,所述融合蛋白被成功表达并浓缩。这些蛋白将用于磁化程序和进一步的实验中。

[0199] 实施例 2——SPR 分析

[0200] 将抗纤连蛋白铁蛋白和 MT2 融合蛋白包涵体制备物用于使用 SensiQ 仪 (ICX Nomadics) 的表面等离子共振 (SPR) 分析中。

[0201] 对于这些实验,将纤连蛋白肽偶联到羧基芯片表面。然后使所述融合蛋白制备物流过所述芯片并测定了结合 (K_a) 和解离 (K_d) 动力学。

[0202] 融合蛋白分析样品

[0203] 制备在运行缓冲液 (running buffer) 中的 $0.0013 \mu\text{M} \sim 0.133 \mu\text{M}$ 的不同浓度的各融合蛋白的六个样品,如下表 2 和表 3 所示。

[0204] 表 2——金属硫蛋白融合蛋白 75kDa :

[0205] 由 $40 \mu\text{L} 100 \mu\text{g/mL} 75\text{kDa}/360 \mu\text{L}$ 运行缓冲液得到 $400 \mu\text{L} 10 \mu\text{g/mL}$ ($0.133 \mu\text{M}$), 然后

[0206]

μM FP	$\mu\text{g/mL}$ FP	$10 \mu\text{g/mLFP} (\mu\text{L})$	运行缓冲液 (μL)
0.0013	0.1	20 (of $1 \mu\text{g/mL}$)	180
0.0065	0.5	10	190
0.013	1	20	180
0.05	3.75	75	125
0.1	7.5	150	50
0.133	10	400	0

[0207] 表 3——铁蛋白 ED-B 融合蛋白 270kDa :

[0208] 由 144 μL 100 $\mu\text{g/mL}$ 270kDa/256 μL 运行缓冲液得到 400 μL 36 $\mu\text{g/mL}$ (0.133 μM)，然后

[0209]

μM FP	$\mu\text{g/mL}$ FP	36 $\mu\text{g/mL}$ FP (μL)	运行缓冲液 (μL)
0.0013	0.36	20 (of 3.6 $\mu\text{g/mL}$)	180
0.0065	1.8	10	190
0.013	3.6	20	180
0.05	9	75	125
0.1	18	150	50
0.133	36	400	0

[0210] 金属硫蛋白

[0211] 样品 (周期 1 ~ 6) = 20 μL 0.0013 ~ 0.133 μM 金属硫蛋白融合蛋白

[0212] 分析运行 = MAb & Gly 分析周期 (如上)

[0213] 使用 SensiQ Qdat 分析软件将来自上述周期的感应图重叠, 将模型与数据拟合以计算动力学参数 (K_a, K_d)。通过将模型仅与数据的解离部分拟合得到 K_d 最佳估计值。结果显示于图 17a 中。将这与 0.00503 s^{-1} 的 K_d 关联, 得到 $2.289 \times 10^{-9}\text{M}$ 的 K_d (K_a $2.197 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

[0214] 铁蛋白

[0215] 样品 (周期 1 ~ 6) = 20 μL 0.0013 ~ 0.133 μM 铁蛋白融合蛋白

[0216] 分析运行 = MAb & Gly 分析周期 (如上)

[0217] 使用 SensiQ Qdat 分析软件将来自上述周期的感应图重叠并将模型与数据拟合以计算动力学参数 (K_a, K_d)。通过将模型仅与数据的解离部分拟合得到 K_d 最佳估计值。结果显示于图 17b 中。将这与 0.00535 s^{-1} 的 K_d 关联, 得到 $6.538 \times 10^{-10}\text{M}$ 的 K_d (K_a $8.183 \times 10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)。

[0218] 结果

[0219] 从上述实验数据可以确定, 在所述 SensiQ 芯片上成功地包被了纤连蛋白外域 B (第 16 ~ 42 个氨基酸) 抗原。如同所预期的, 75kDa 的金属硫蛋白融合蛋白和 270kDa 的铁蛋白融合蛋白都以特异性方式识别并结合所述抗原。估算了所述融合蛋白与所述抗原的相互作用的动力学数据, 并发现动力学数据是相似的, 处在两个融合蛋白的预期范围内, 即 K_d 在 10^{-9}M 范围内, 相对而言, 大多数抗体 / 抗原相互作用的 K_d 为 $10^{-8}\text{M} \sim 10^{-10}\text{M}$ 。

[0220] 因此, 使用该仪器所得的值表明结合亲和力与相对高亲和力的抗体的结合亲和力相比而言是有利的。此外, 所得数据表明, 所述融合蛋白具有对抗原的多个结合位点。这是对所述铁蛋白融合蛋白所预期的。然而, 对于 MT2 融合蛋白并没有这样的预期, 从而这将表明该融合蛋白形成了增加结合亲和力的二聚体或更高级的多聚体蛋白。

[0221] 实施例 3——磁化铁蛋白

[0222] 铁蛋白通常含有水合氧化铁 (III)。为了产生顺磁性铁蛋白, 用具有更强磁性质的

磁铁矿 (Fe_3O_4) 替代这些离子。用于本实验的方法包括将铁离子添加到脱铁铁蛋白中并在受控条件下对这些离子进行氧化。

[0223] 材料

[0224] ● 反渗透水 (RO 水)

[0225] ● 50mM N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸 (AMPSO) 缓冲液 (pH8.6) (Sigma A6659)

[0226] ● 0.1M 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)

[0227] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 10mM 磷酸盐, 140mM NaCl (pH 7.4)

[0228] ● 三甲胺-N-氧化物 (TMA) (Sigma 317594)

[0229] ● 0.1M 硫酸亚铁 (II) 铵

[0230] ● 马脾脏脱铁铁蛋白 (Sigma A3641)

[0231] 方法

[0232] 在烘箱中将三甲胺-N-氧化物 (TMA) 加热至 80°C (30 分钟), 以除去 Me_3N , 然后冷却至室温。将 114mg TMA 加入 15mL RO 水中, 以生成 0.07M 溶液。铁和 TMA 溶液在使用前用 N_2 吹扫 15 分钟。

[0233] 用 N_2 对 AMPSO 缓冲液 (1L) 脱气 1 小时。将 3.0mL 脱铁铁蛋白 (66mg/mL) 加入所述 AMPSO 缓冲液中, 然后将该溶液再脱气 30 分钟。将 1 升容器中的 AMPSO/ 脱铁铁蛋白溶液置于经 65°C 预热的水浴中。从溶液内取走 N_2 供应线, 并将其悬于溶液表面上方, 以保持所述溶液处在厌氧环境下。硫酸铁铵的初始加入清除了可能存在于所述溶液中的任何残留氧离子。

[0234] 每 15 分钟加入 0.1M 硫酸铁铵和 TMA 缓冲液的等分试样如下:

[0235] 第 1 次加入 600 μL 0.1M 硫酸铁铵

[0236] 第 2 次加入 600 μL 0.1M 硫酸铁铵和 400 μL LTMA

[0237] 第 3 次加入 600 μL 0.1M 硫酸铁铵和 400 μL LTMA

[0238] 第 4 次加入 600 μL 0.1M 硫酸铁铵和 400 μL LTMA

[0239] 第 5 次加入 900 μL 0.1M 硫酸铁铵和 600 μL LTMA

[0240] 第 6 次加入 900 μL 0.1M 硫酸铁铵和 600 μL LTMA

[0241] 第 7 次加入 900 μL 0.1M 硫酸铁铵和 600 μL LTMA

[0242] 第 8 次加入 900 μL 0.1M 硫酸铁铵和 600 μL LTMA

[0243] 在后期加入 Fe 和 TMA 时, 溶液颜色从稻草色变为深褐色, 并在整个溶液中分散有深色颗粒物。从这时起, 该溶液被称为“磁性铁蛋白”。

[0244] 所述磁性铁蛋白溶液在室温下温育过夜, 并在紧靠瓶子处保持有强钕圈磁体。次日, 深色固体材料被吸向磁体, 如图 18 中照片所示。

[0245] 磁性铁蛋白的浓缩

[0246] 使 500 毫升磁性铁蛋白溶液通过磁体上的 5 **Macs®** LS 柱 (每柱通过约 100mL 磁性铁蛋白)。在 Duran 瓶中收集流经该柱的溶液 (称为“流通液”)。通过将柱从磁体上取走、加入 3mL PBS 并使用所提供的柱塞, 使用 3mL PBS 来洗脱每支柱所捕获的材料, 从而从每支柱得到约 4.5mL。将大约 1mL 储存于 $2^\circ\text{C} \sim 8^\circ\text{C}$ 以用于后期分析 (称为“透析前浓缩磁性铁蛋白”)。剩余的洗脱液 (约 20mL) 在 4°C 用 5L PBS 进行透析 (称为“透析后浓缩磁性

铁蛋白”)过夜,以除去过量的Fe和TMA。记录溶液颜色的变化。原始磁性铁蛋白为深褐色,流通液为稻草色,而Macs®柱浓缩材料为深褐色至黑色。

[0247] 在RO水中温育透析管(Medicell International Ltd.,分子量截留值为12~14000Da,约15cm)10分钟以软化该管。将经磁性分离的浓缩磁性铁蛋白转移到透析管并在2°C~8°C的5L PBS中搅拌温育过夜。次日将所述PBS溶液按两小时的间隔更新三次,并在2°C~8°C继续透析。

[0248] 磁性铁蛋白分析

[0249] 为了比较使用磁体分离的磁性蛋白的量,进行了酶联免疫吸附测定(ELISA)分析。

[0250] 材料

[0251] ● 碳酸盐缓冲液(100mL RO水中的0.159g碳酸钠和0.3g碳酸氢钠)

[0252] ● 磷酸盐缓冲盐水(PBS),10mM磷酸盐,140mM NaCl(pH 7.4)

[0253] ● 在PBS中的1%牛血清白蛋白(BSA(CeIIiance 82-045-2))

[0254] ● 马脾脏脱铁铁蛋白(Sigma Aldrich A3641)

[0255] ● 兔抗马铁蛋白抗体(SigmaAldrich F6136)

[0256] ● 山羊抗兔抗体(Sigma A3687)

[0257] ● 液体稳定的磷酸酚酞底物

[0258] ● 终止溶液(212g碳酸钠,110.5g 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸(CAPS),217g乙二胺四乙酸(EDTA),80g氢氧化钠,加水至5L)

[0259] ● Maxisorb微滴定板(NUNC Cat:468667)

[0260] 方法

[0261] 制得用于定量磁性铁蛋白的脱铁铁蛋白稀释溶液(50 μg/mL、25 μg/mL、12.5 μg/mL、6.25 μg/mL、3.125 μg/mL和1.5625 μg/mL)。

[0262] 在碳酸盐缓冲液中以如下稀释度稀释(未纯化)磁性铁蛋白、透析前浓缩磁性铁蛋白、透析后浓缩磁性铁蛋白和流通液:

[0263] 磁性铁蛋白、透析前浓缩磁性铁蛋白和透析后浓缩磁性铁蛋白的稀释液:

[0264] 100、200、400、800、1600、3200、6400和12800倍稀释。

[0265] 流通液:

[0266] 10、20、40、80、160、640和1280倍稀释。

[0267] 将100 μL每种溶液加入微滴定板的孔中,设两次重复。在两个孔中加入碳酸盐缓冲液(100 μL)作为阴性对照。将所述板在4°C温育过夜。次日,将溶液弹出并使用200 μL 1% BSA在室温下将孔封闭1小时。将每孔用300 μL PBS洗涤三次后,将孔拍干,然后加入100 μL 10 μg/mL抗马铁蛋白抗体。将其在室温温育1小时,然后除去并如前所述对孔进行洗涤。将AP偶联的抗兔抗体在PBS中以1:3500稀释以得到7.43 μg/mL的浓度并在室温下温育1小时。除去抗体偶联物并如前所述对孔进行洗涤。在每孔中加入AP底物(100 μL)并使其显色15分钟,然后加入终止溶液。使用Varioskan Flash仪(Thermo Fisher)记录吸光度。

[0268] Macs®柱保留超过在流通液中发现的35倍的磁性铁蛋白量,表明所述蛋白已经成功磁化。

[0269] 脱铁铁蛋白的制备 / 马脾脏铁蛋白的除盐

[0270] 材料

[0271] ● 0.1M 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)

[0272] ● 巯基乙酸 (Sigma T6750)

[0273] ● 马脾脏铁蛋白 (Sigma 96701)

[0274] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 10mM 磷酸盐, 140mM NaCl (pH 7.4)

[0275] 方法

[0276] 将透析管在 RO 水中软化 10 分钟。将 10mL 0.1M 醋酸钠缓冲液加入到两头被夹住的透析管中的 1mL 马脾脏铁蛋白 (125mg/mL) 中。将透析袋转移到已用 N₂ 吹扫 1 小时的 0.1M 醋酸钠缓冲液 (约 800mL) 中。在所述缓冲液中加入巯基乙酸 (2mL) 并继续用 N₂ 吹扫两小时。在所述醋酸钠缓冲液中再加入 1mL 巯基乙酸, 然后再用 N₂ 吹扫 30 分钟。更换醋酸钠缓冲液 (800mL) 并继续吹扫。重复该除盐过程直至所述铁蛋白溶液变为无色。停止 N₂ 吹扫, 并将所述脱铁铁蛋白溶液在 PBS (2L) 中在搅拌下透析 1h (小时)。更换所述 PBS (3L), 并将所述脱铁铁蛋白溶液在 2°C ~ 8°C 的 PBS 中透析过夜。

[0277] 结果

[0278] 铁蛋白溶液在所述过程中从浅褐色变为无色, 表明铁已被除去。

[0279] 抗纤连蛋白: 铁蛋白融合蛋白的热处理分析

[0280] 材料

[0281] ● 碳酸盐缓冲液 (100mL 水中的 0.159g 碳酸钠和 0.3g 碳酸氢钠)

[0282] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS)

[0283] ● 在 PBS 中的 1% 牛血清白蛋白 (BSA (Celliance 82-045-2))

[0284] ● 纤连蛋白肽

[0285] ● 抗纤连蛋白: 铁蛋白融合蛋白 (scFv: 铁蛋白)

[0286] ● 抗人类铁蛋白鼠类单克隆抗体 (Santa Cruz SC51887)

[0287] ● 抗小鼠碱性磷酸酶抗体 (Sigma A3562)

[0288] ● 液体稳定的磷酸酚酞底物

[0289] ● 终止溶液 (212g 碳酸钠, 110.5g 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸 (CAPS), 217g 乙二胺四乙酸 (EDTA), 80g 氢氧化钠, 加水至 5L)

[0290] ● Maxisorb 微滴定板 (NUNC Cat :468667)

[0291] 方法

[0292] 将 100 μL scFv: 铁蛋白 (100 μg/mL) 转移到薄壁 PCR 管中并在 60°C 的热循环仪中加热 30 分钟。

[0293] 用在碳酸盐缓冲液中稀释到 15 μg/mL 的纤连蛋白肽 (以 1.5mg/mL 提供) 包被微滴定板的孔并在 4°C 温育过夜。将过剩溶液弹出并使用 1% BSA 的 PBS 溶液在室温下封闭该板 1 小时。将该溶液弹出, 并用 PBS 洗涤所述板三次。将 scFv: 铁蛋白融合蛋白和经热处理的 scFv: 铁蛋白融合蛋白以 33 μg/mL 的浓度 (各 100 μL) 加入孔内。将所述铁蛋白融合蛋白在室温下温育 2 小时, 然后将其除去并如前所述对孔进行洗涤。以每孔 100 μL 的体积加入浓度为 20 μg/mL 的小鼠抗铁蛋白抗体并在室温下温育 1 小时。将所述抗体除去并如前所述对孔进行洗涤。将山羊抗小鼠 AP 偶联抗体稀释 (50 μL+950 μL PBS), 并以 100 μL

的体积加入到所有孔中。将其在室温下温育 1 小时然后如前所述将其除去。在所有孔中加入底物并在室温下温育 45 分钟,然后使用终止缓冲液终止反应。使用 Varioskan Flash 仪 (Thermo Fisher Electron) 记录吸光度。

[0294] 所述 scFv: 铁蛋白保留了与纤连蛋白的结合能力,并且在加热至 60°C 30 分钟后仍保持可被抗人类铁蛋白单克隆抗体检测到的能力 (图 20)。

[0295] 抗纤连蛋白: 铁蛋白融合蛋白除盐

[0296] 材料

[0297] ● 抗纤连蛋白: 铁蛋白融合蛋白 (scFv: 铁蛋白)

[0298] ● 0.1M 醋酸钠缓冲液

[0299] ● 巯基乙酸 (70 重量%, Sigma T6750)

[0300] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 10mM 磷酸盐, 140mM NaCl (pH 7.4)

[0301] 方法

[0302] 将 scFv: 铁蛋白融合蛋白从 -20°C 冻融至室温。将 9mL 100 μ g/mL 的所述蛋白分装到经软化的透析管内。用总量为 1mL 的醋酸钠缓冲液冲洗装过所述融合蛋白的管,并将所述醋酸钠缓冲液加入所述 9mL 的蛋白中 (得到 0.9mg/mL 溶液)。用 N₂ 吹扫 800mL 醋酸钠缓冲液 15 分钟,然后加入所述透析袋。接着对所述溶液再吹扫 2 小时。在所述缓冲液中加入 2mL 巯基乙酸,继续用 N₂ 吹扫。再过 2 小时后,加入另外 1mL 的巯基乙酸。更换所述缓冲液 (含 3mL 巯基乙酸的 800mL 预吹扫过的醋酸钠缓冲液) 并继续在 N₂ 下透析 1 小时。然后将所述透析袋转移到室温下的 2LPBS (无 N₂) 中,然后在 4°C 于 3L PBS 中过夜。然后通过如下所述的铁添加和受控氧化,使用该经除盐的融合蛋白来制备顺磁性融合蛋白。

[0303] 磁性 scFv: 铁蛋白的制备

[0304] 材料

[0305] ● 反渗透水 (RO 水)

[0306] ● 50mM N-(1,1-二甲基-2-羟乙基)-3-氨基-2-羟基丙磺酸 (AMPSO) 缓冲液 (pH8.6) (Sigma A6659)

[0307] ● 0.1M 醋酸钠缓冲液 (pH 4.5)

[0308] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 10mM 磷酸盐, 140mM NaCl (pH 7.4)

[0309] ● 三甲胺-N-氧化物 (TMA) (Sigma 317594)

[0310] ● 0.1M 硫酸亚铁 (II) 铵

[0311] 在烘箱中将三甲胺-N-氧化物 (TMA) 加热至 80°C (30 分钟),以除去 Me₃N,然后冷却至室温。将 114mg TMA 加入 15mL RO 水中,以生成 0.07M 的溶液。铁和 TMA 溶液在使用前用 N₂ 吹扫 15 分钟。

[0312] 装在透析袋内的经除盐的融合蛋白 (详述如上) 在室温在氮气下用 1LAMPSO 缓冲液搅拌透析 2 小时。将经除盐的 scFv: 铁蛋白 (约 10mL) 转移到锥形瓶中。将 18 μ L 铁溶液加入经除盐的蛋白溶液中,同时用 N₂ 吹扫以清除任何残留的氧。25 分钟后,加入 15 μ L 铁和 10 μ L TMA。

[0313] 然后按 15 分钟为间隔加入如下的额外量的铁和 TMA 缓冲液:

[0314] 第 3 次加入: 30 μ L 铁和 20 μ L TMA

[0315] 第 4 次加入: 15 μ L 铁和 10 μ L TMA

[0316] 第 5 次加入 :15 μ L 铁和 10 μ L TMA

[0317] 第 6 次加入 :15 μ L 铁和 10 μ L TMA

[0318] 将经磁化的蛋白通过**Macs®** LS 柱。将流通液再次通过以试图增加捕获效率。通过从磁体上取走该柱并加入 1mLPBS 和使用柱塞将所述经磁化的蛋白从所述柱上洗脱（洗脱液约 2mL）。这代表该柱上的蛋白的两倍稀释液。

[0319] 将经洗脱的蛋白和对照包埋在微滴定板上以用于如下所详细描述的分析。

[0320] 用 ELISA 对 scFv: 磁性铁蛋白融合蛋白进行的分析

[0321] 为了确认所述磁性融合蛋白是否保持与抗铁蛋白单克隆抗体的结合,进行了酶联免疫吸附测定。

[0322] 材料

[0323] ● 碳酸盐缓冲液（在 100mL RO 水中的 0.159g 碳酸钠和 0.3g 碳酸氢钠）(pH 9.6)

[0324] ● 磷酸盐缓冲盐水 (PBS), 10mM 磷酸盐, 140mM NaCl (pH 7.4)

[0325] ● 纤连蛋白肽

[0326] ● 抗纤连蛋白: 铁蛋白融合蛋白 (scFv: 铁蛋白)

[0327] ● 抗人类铁蛋白鼠类单克隆抗体 (Santa Cruz SC51887)

[0328] ● 抗小鼠碱性磷酸酶抗体 (Sigma A3562)

[0329] ● 液体稳定的磷酸酚酞底物

[0330] ● 终止溶液 (212g 碳酸钠, 110.5g 3-(环己基氨基)-1-丙磺酸 (CAPS), 217g 乙二胺四乙酸 (EDTA), 80g 氢氧化钠, 加水至 5L)

[0331] ● Maxisorb 微滴定板 (NUNC Cat :468667)

[0332] 方法

[0333] 融合蛋白包被孔

[0334] 用在碳酸盐缓冲液中 1 : 3 的浓度的流通液、scFv: 铁蛋白 (无损)、scFv: 磁性铁蛋白和从**Macs®**柱洗脱的 scFv: 磁性铁蛋白包被孔。将板在 4°C 经过一个周末温育。弹去过量溶液并使用 1% BSA 的 PBS 溶液在室温下封闭该板 1 小时。将该溶液弹去并用 PBS 洗涤所述板三次 (每次洗涤每孔用 300 μ L)。将小鼠抗铁蛋白抗体以 20 μ g/mL 的浓度按每孔 100 μ L 的体积加入并在室温下温育 1 小时。将其除去并如前所述对孔进行洗涤。将山羊抗小鼠 AP 偶联抗体稀释至 10 μ g/mL, 并以 100 μ L 的体积加入所有孔内。将其在室温下温育 1 小时并如前所述除去。将底物加入所有孔内并在室温下温育 1 小时, 然后使用终止缓冲液终止反应。使用 Varioskan Flash 仪 (Thermo Fisher Electron) 记录吸光度 (参见图 21a)。

[0335] 纤连蛋白包被孔

[0336] 用 100 μ L 在碳酸盐缓冲液中稀释到 15 μ g/mL 的纤连蛋白肽 (以 1.5mg/mL 提供) 包被微滴定板孔。将该板在 2°C ~ 8°C 温育过夜。弹去过量溶液, 并用 300 μ L PBS 洗涤板孔三次。将所述 scFv: 铁蛋白融合蛋白直接加入适当孔中 (100 μ L), 设两次重复。然后将所述板在室温下温育 1 小时。弹去溶液并用 300 μ L PBS 洗涤板孔三次。以 20 μ g/mL 的浓度将小鼠抗铁蛋白抗体以 100 μ L 的体积加入每个孔内并在室温下温育 1 小时。将其除去并如前所述洗涤板孔。将山羊抗小鼠 AP 偶联抗体稀释至 10 μ g/mL 并以 100 μ L 的体积加入所有孔内。将其在室温温育 1 小时并如前所述予以除去。将底物加入所有孔内, 并在室温

下温育 45 分钟,然后使用终止缓冲液终止反应。使用 Varioskan Flash 仪 (Thermo Fisher Electron) 记录吸光度 (参见图 21b)。

[0337] 所述 **Macs®** 柱已经将所述经磁化的融合蛋白浓缩,并且它仍被所述抗铁蛋白的单克隆抗体所识别,表明所述抗纤连蛋白-铁蛋白融合蛋白已被磁化并保持结构的完整性。数据还表明,所述经磁化的抗纤连蛋白铁蛋白融合蛋白保留了与其目标抗原结合的能力,并因此说明是一个既可磁化又能选择性地结合目标的双功能单链融合蛋白。

[0338] 实施例 4——其它方案

[0339] scFv:MT2 融合蛋白的磁化

[0340] 可通过用锰离子和镉离子替代锌离子来磁化所述 scFv:MT2 融合蛋白。用以实施所述磁化的方法可根据需要进行优化。实现所述磁化的方法包括通过透析消耗锌然后仍然使用透析进行替代,如有必要可对已公开的方案进行适当改进。

[0341] 具体地说,这些方案如下:

[0342] 1. 将 5mg MT2 溶解在 5mL 缓冲液 (4.5M 脲,10mM Tris 碱,0.1M 二硫苏糖醇 (DTT), 0.1% 甘露醇和 0.5mM Pefabloc, pH 11) 中,以将金属离子从所述蛋白中清除。

[0343] 2. 在相同缓冲液中透析 1 小时。

[0344] 3. 通过在缓冲液 1 (10mM Tris 碱,2M 脲,0.1M DTT,0.1% 甘露醇,0.5 μ M Pefabloc 和 1mM Cd^{2+}/Mn^{2+} , pH 11) 中透析 72 小时来重新折叠 (refold) 所述蛋白。

[0345] 4. 将透析缓冲液变为缓冲液 2 (同上,但脲浓度为 1M) 并透析 24 小时。

[0346] 5. 将所述透析缓冲液变为如上所述但不含脲的缓冲液。透析 24 小时。

[0347] 6. 将步骤 5 中的透析缓冲液变为 pH 8.8 的缓冲液。透析 24 小时。

[0348] 7. 将步骤 6 中的透析缓冲液变为不含甘露醇的缓冲液并如前所述进行透析。

[0349] 8. 将步骤 7 中的缓冲液变为不含 Cd^{2+}/Mn^{2+} 的缓冲液并透析 24 小时。

[0350] 可用与以上实施例 2 中对于铁蛋白融合蛋白相同的方法来评估结合特性。

[0351] 使用融合蛋白测定微流体装置中的分析物的方案

[0352] 将所需量的融合蛋白与含目的分析物的粗血浆样品在微流体装置内混合。

[0353] 所述目的分析物被俘获在所述微流体装置的可磁化侧而污染物被洗掉。关闭磁体然后将经纯化的蛋白移到检测系统。

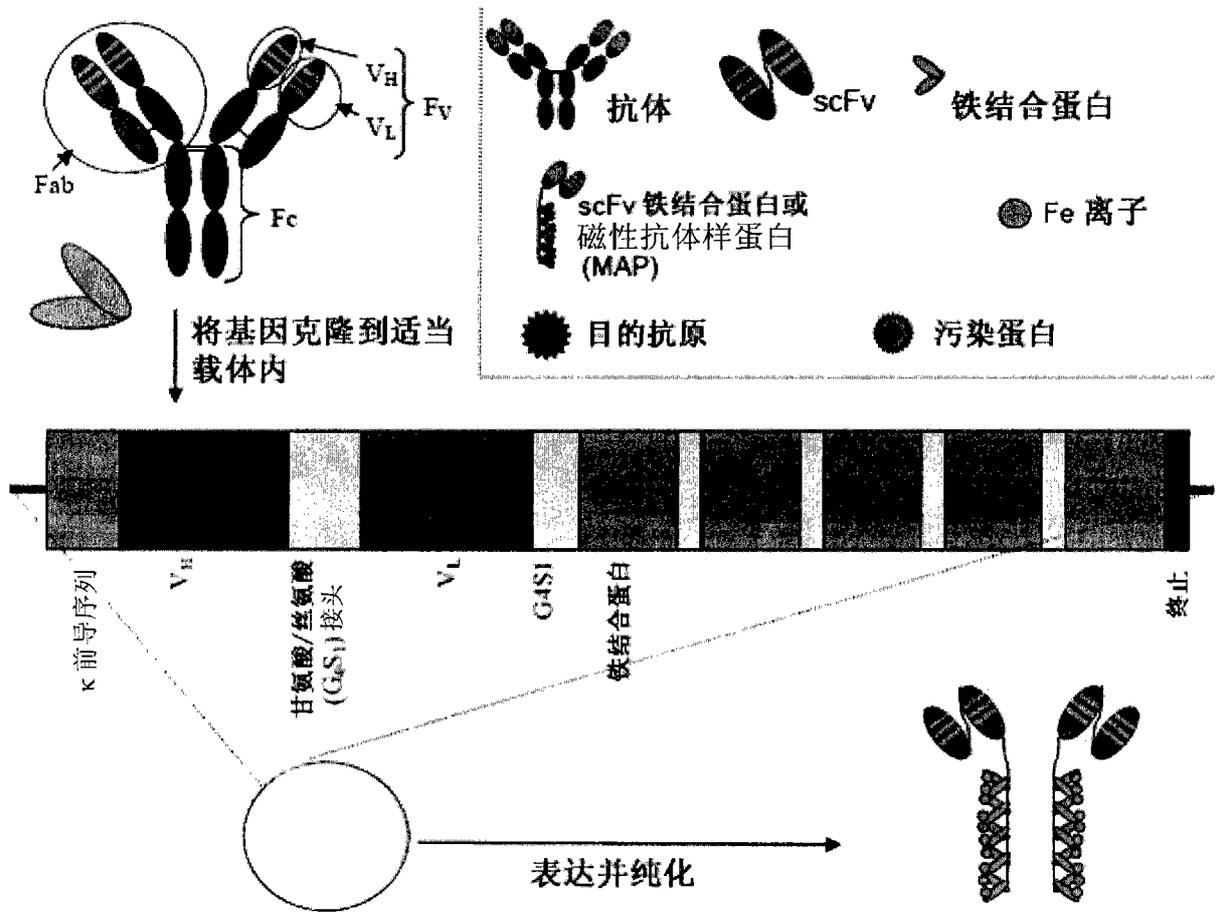


图 1

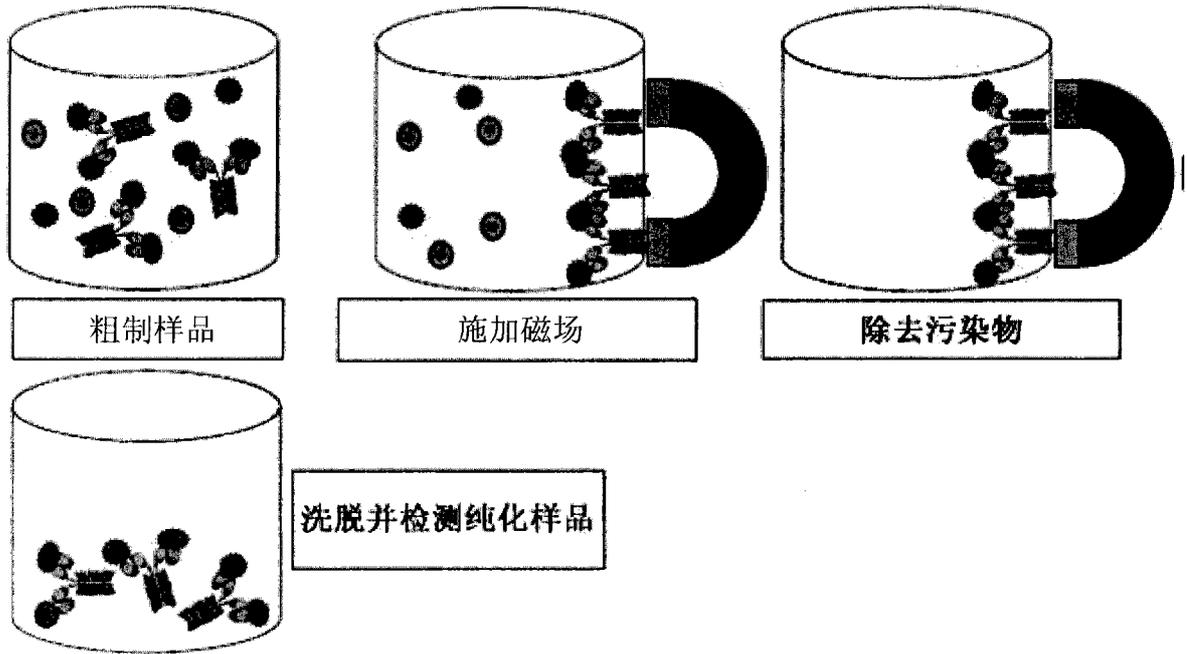


图 2

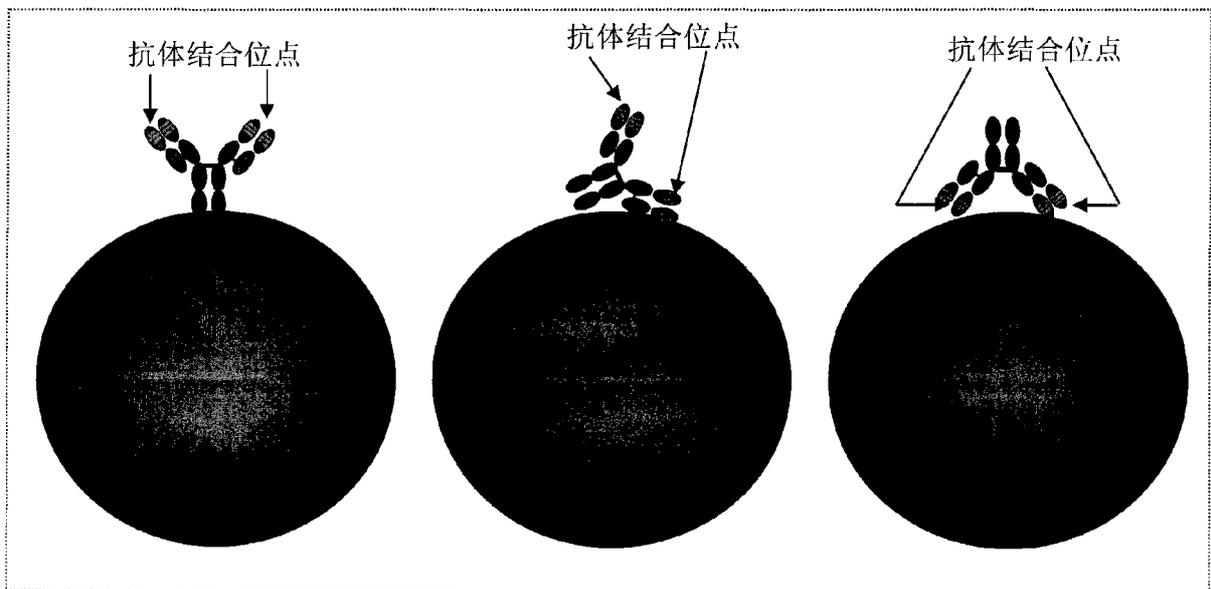


图 3

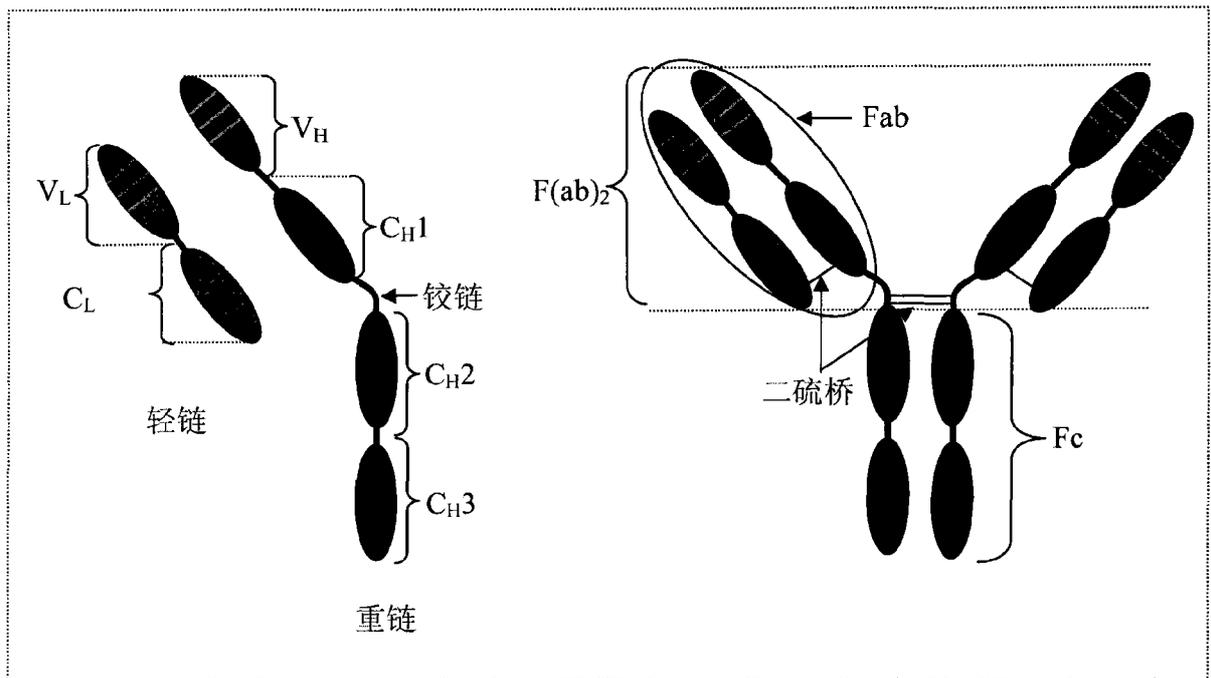


图 4a

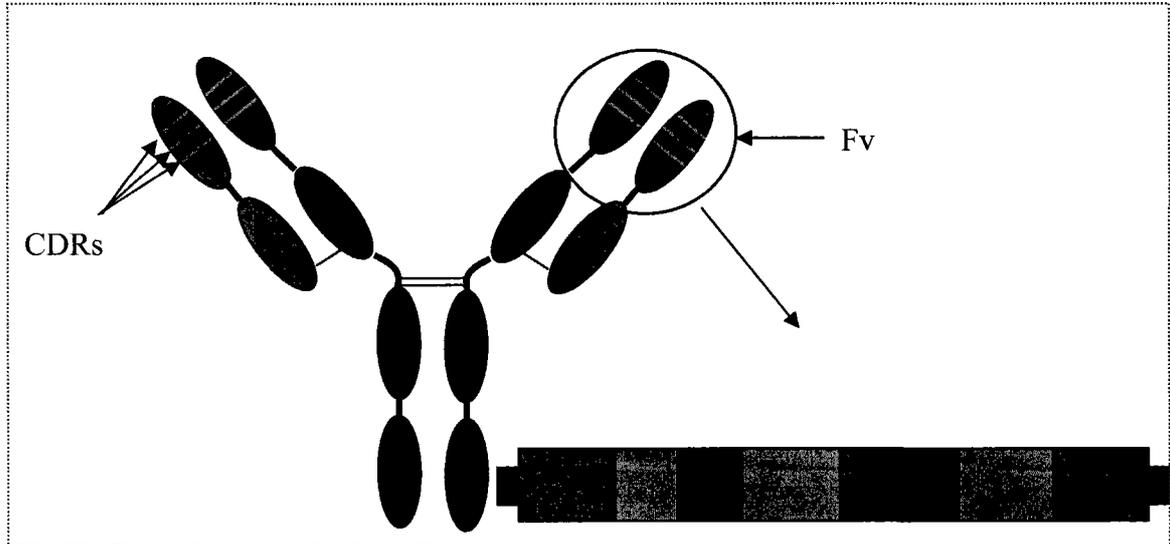


图 4b

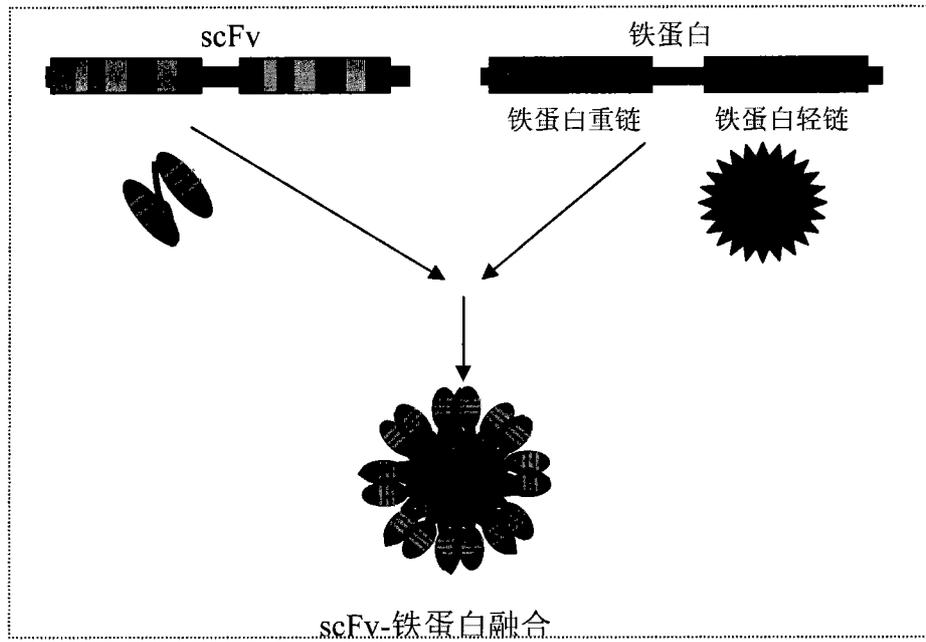


图 5a

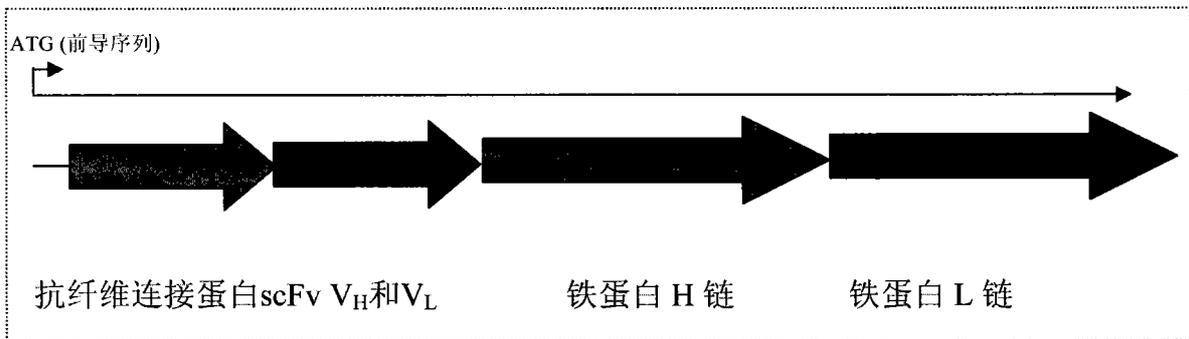


图 5b

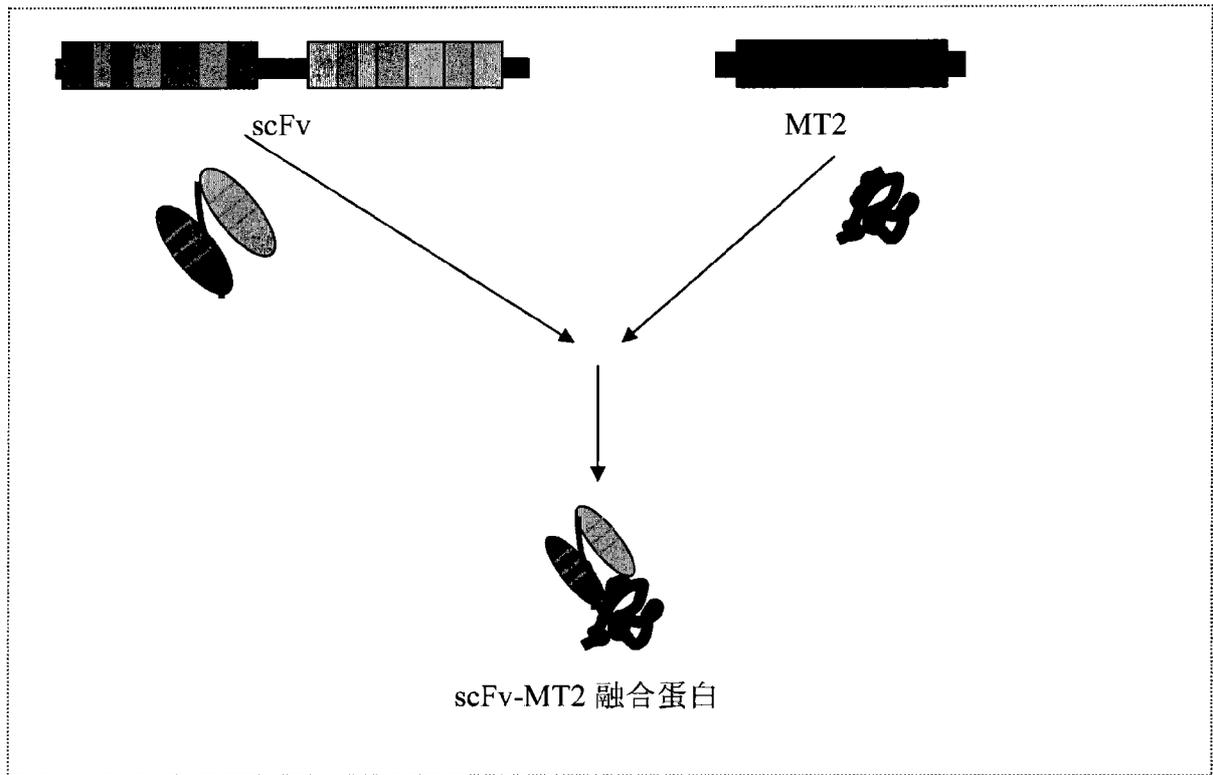


图 6a

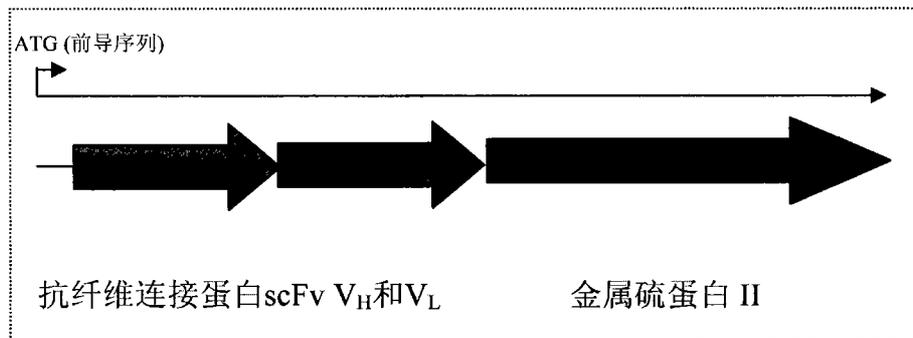


图 6b

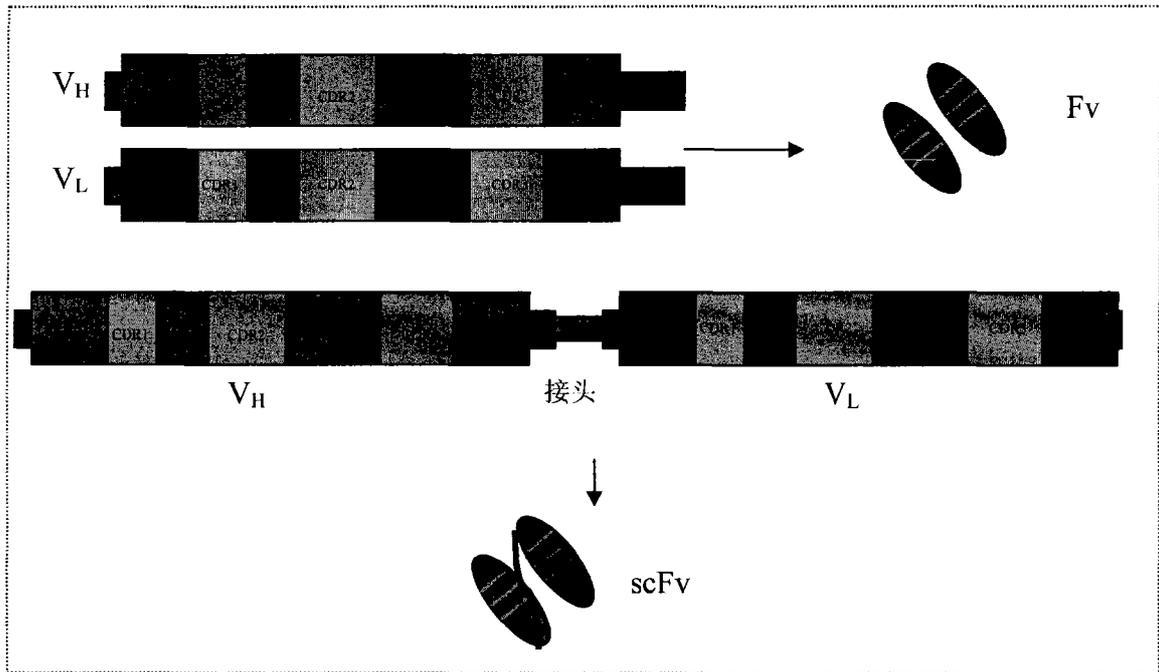


图 7

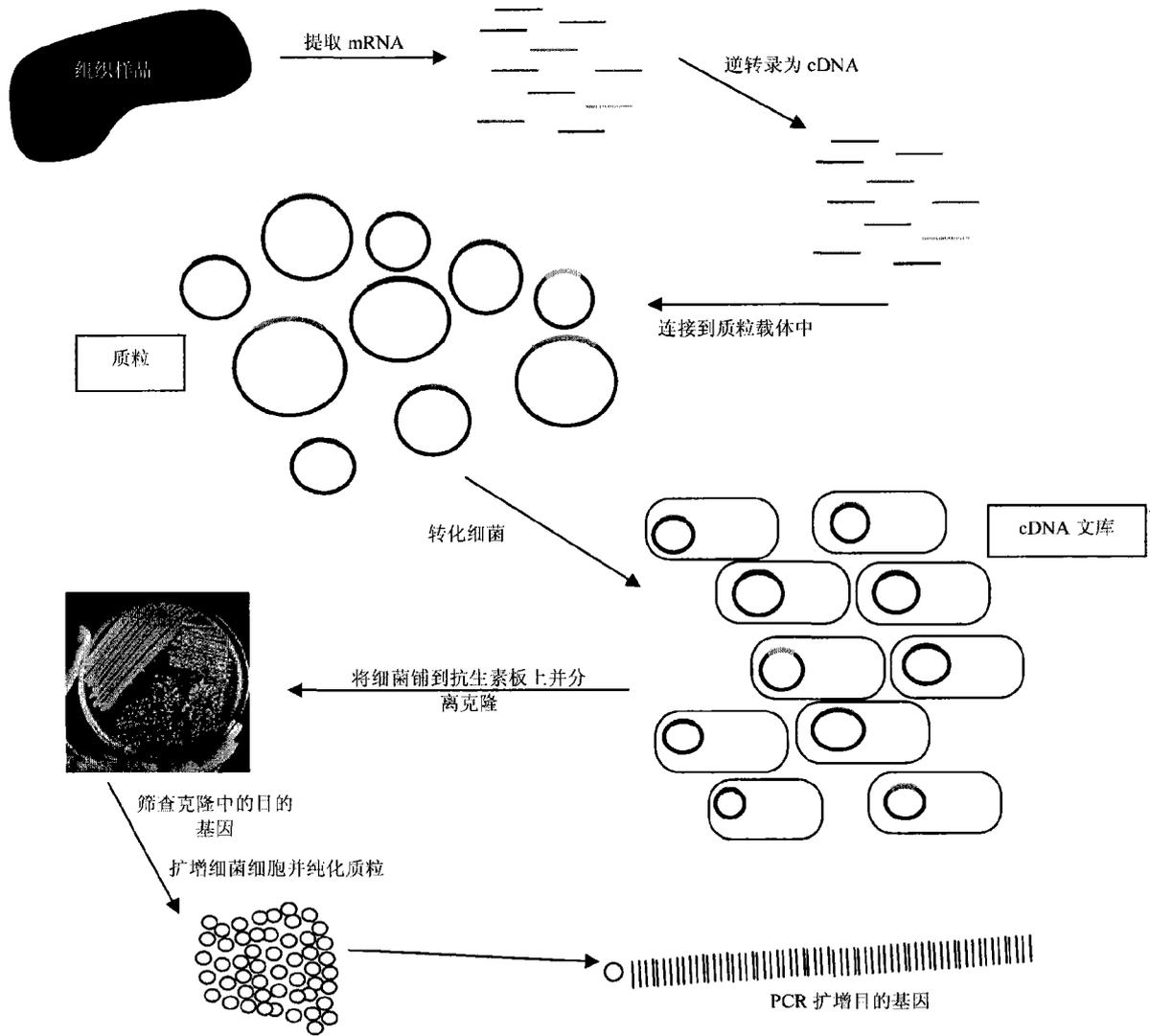


图 8

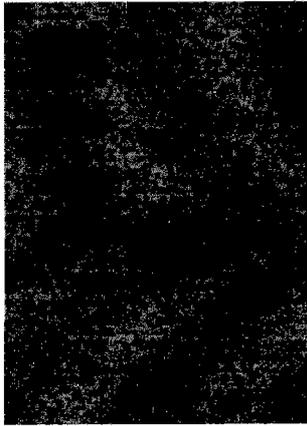


图 9a

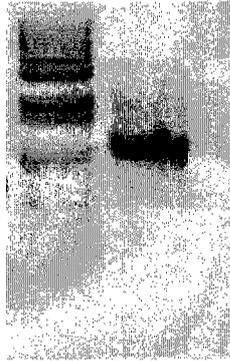


图 9b

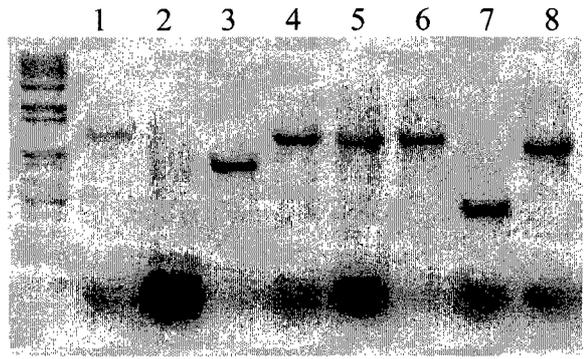


图 9c

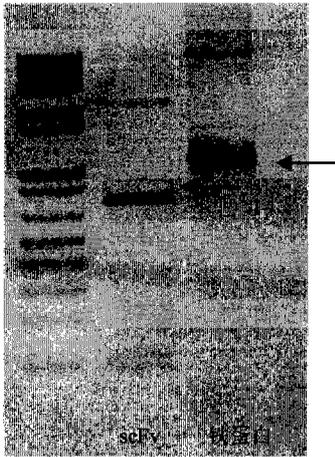


图 10a

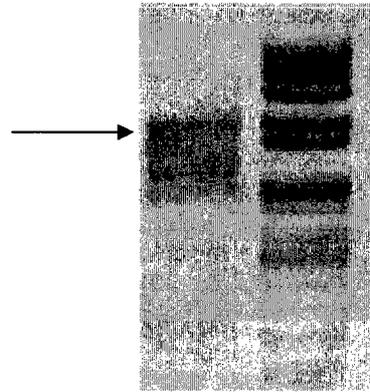


图 10b

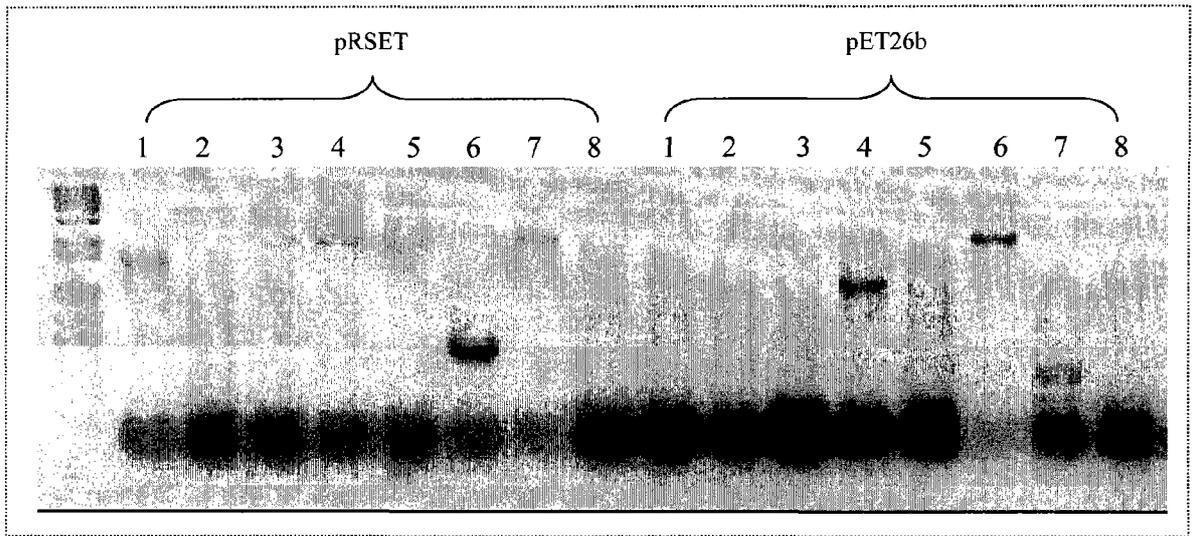


图 11

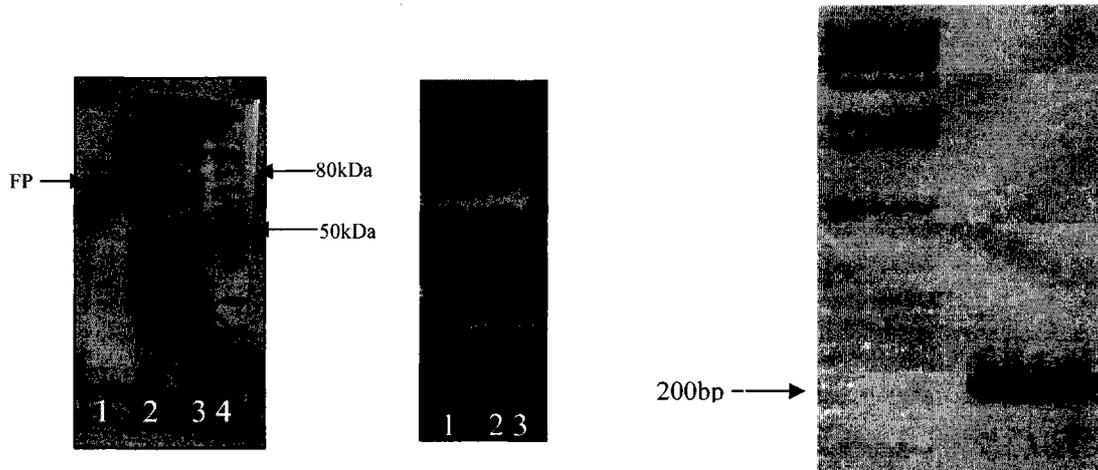


图 12

图 13

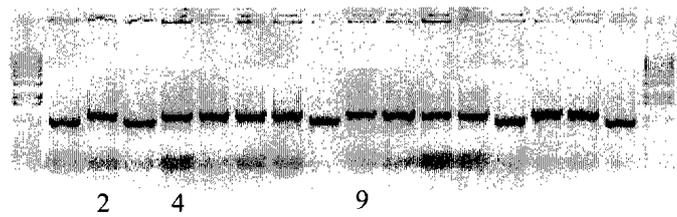


图 14

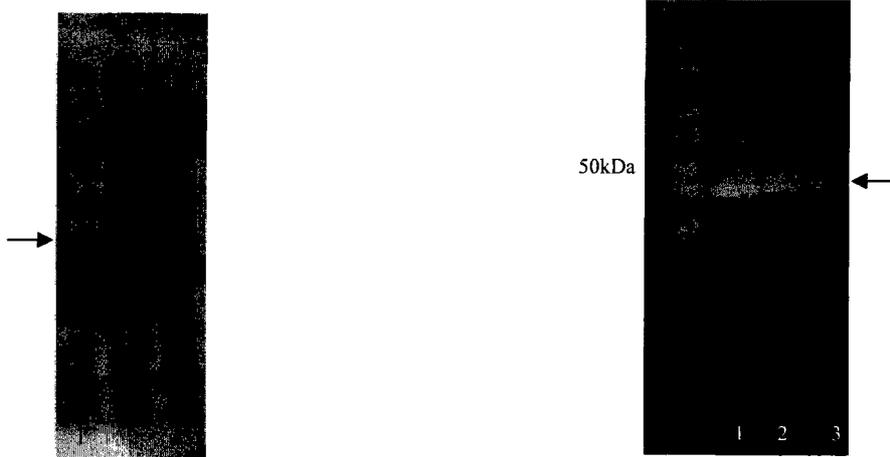


图 15

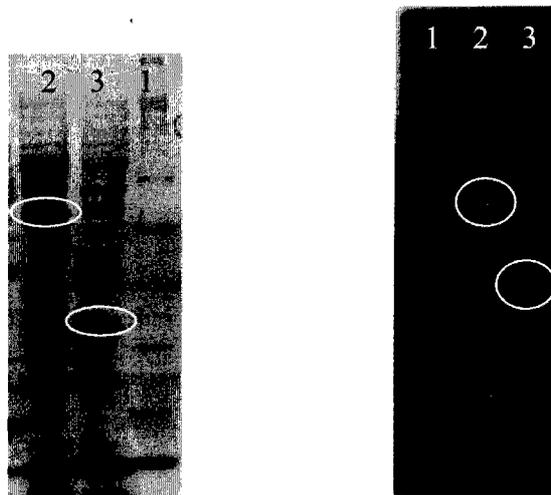


图 16

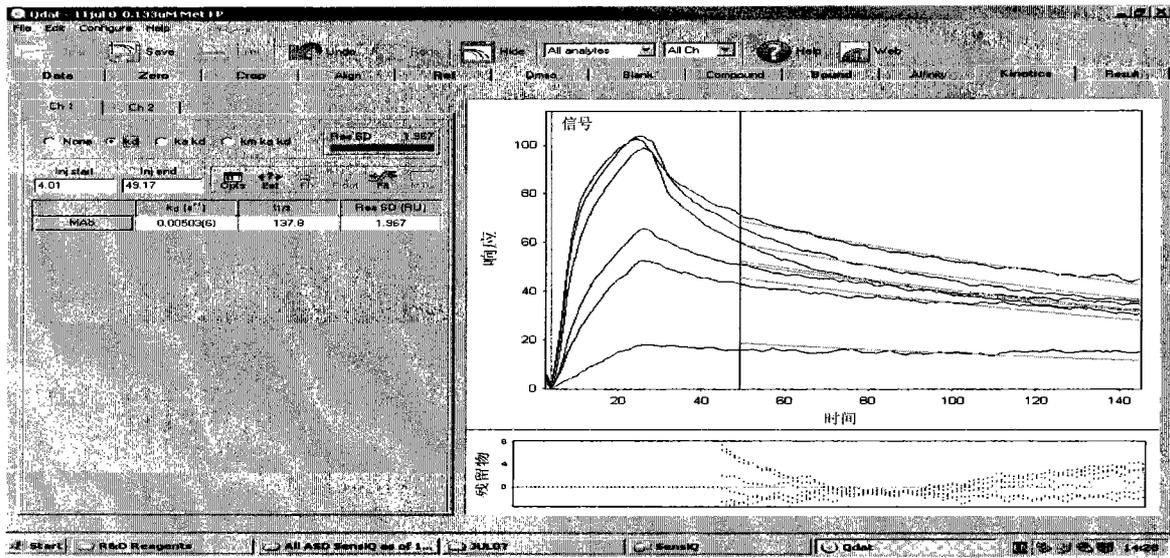


图 17a

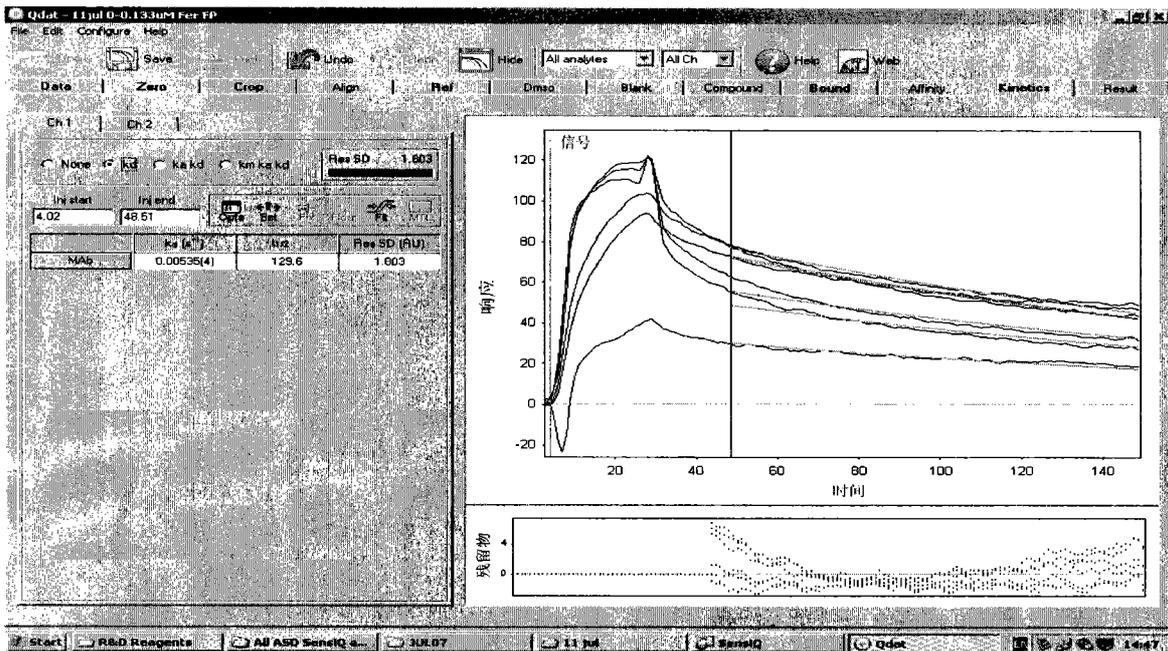


图 17b

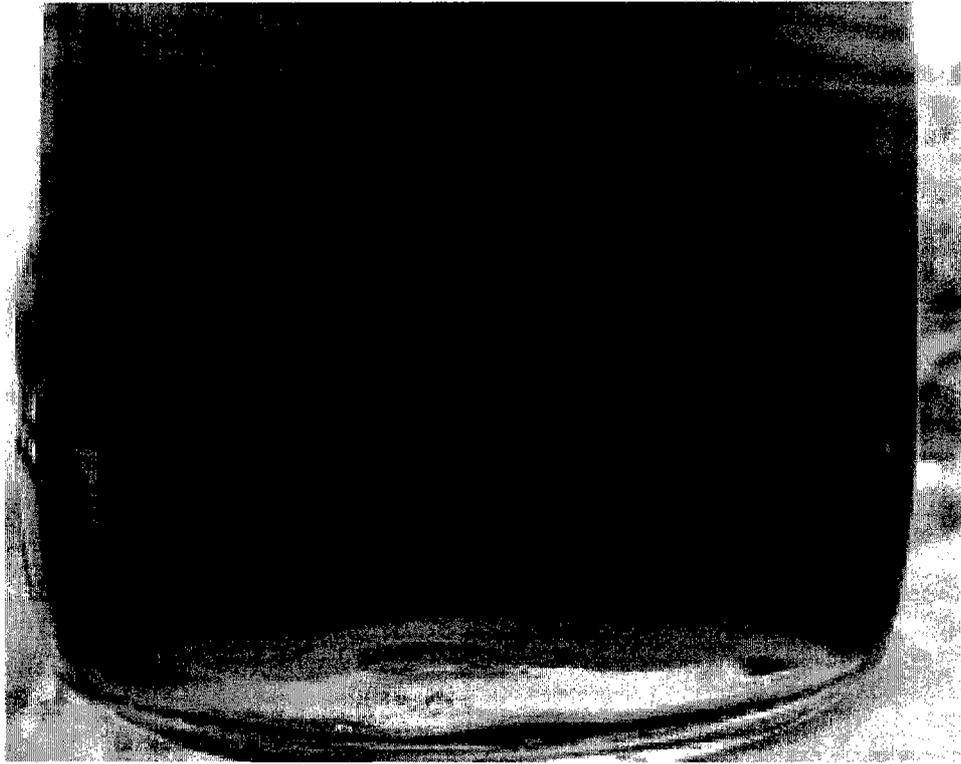


图 18

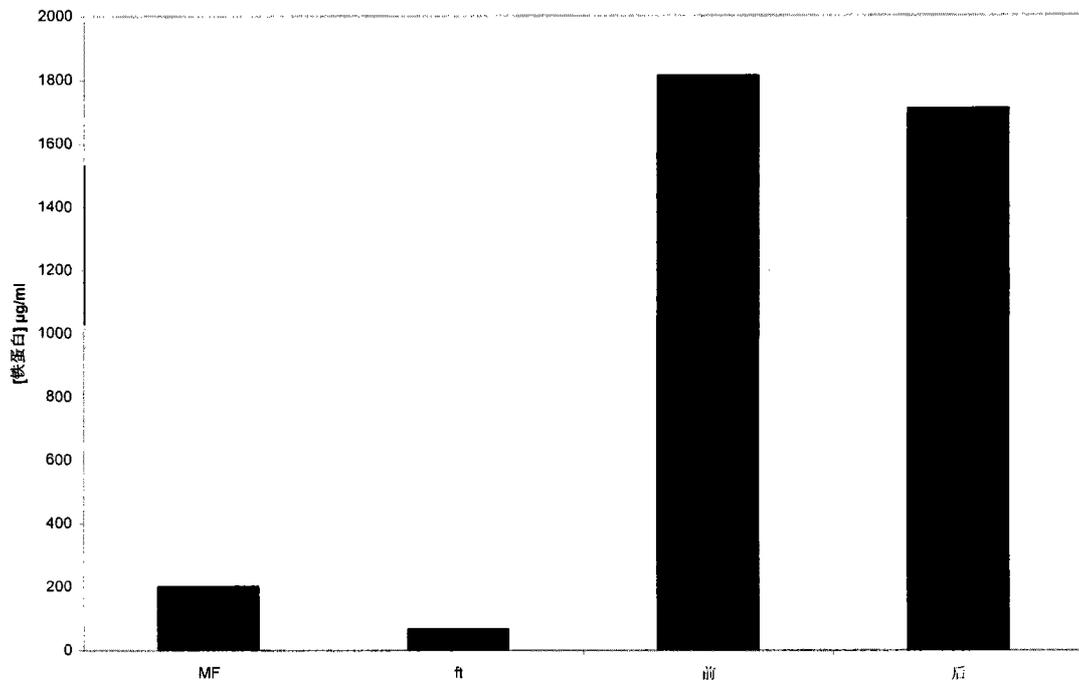


图 19

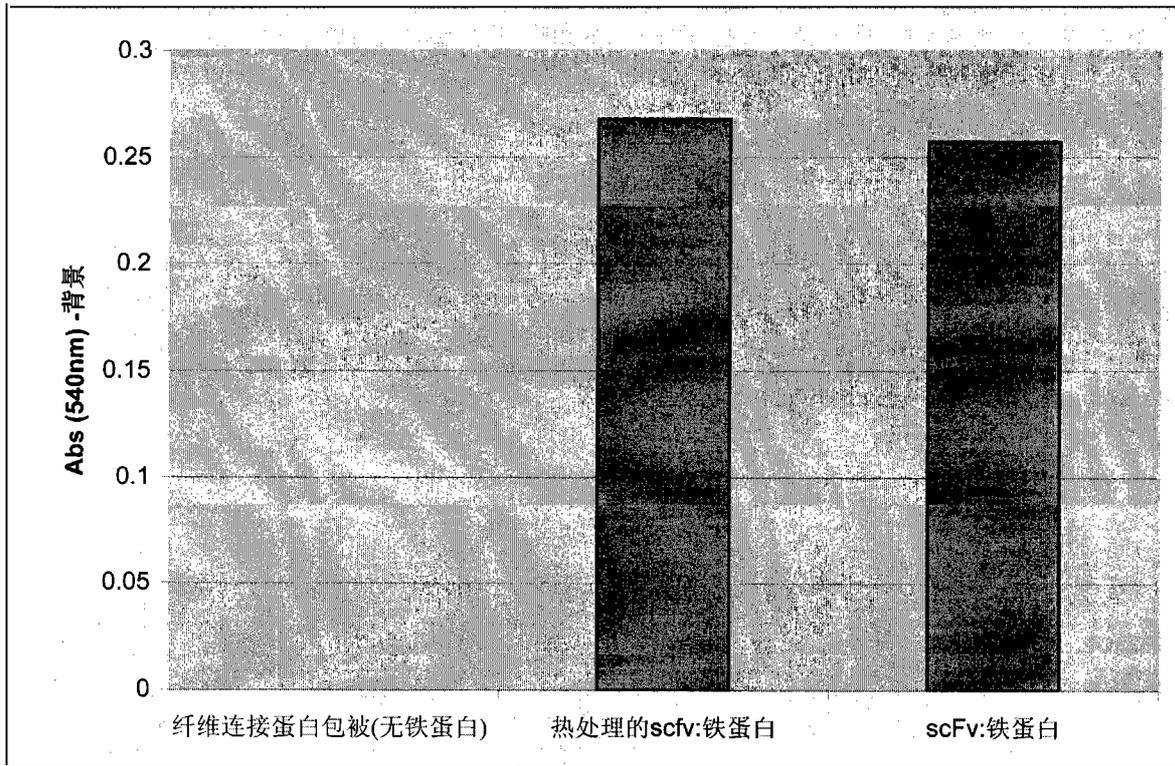


图 20

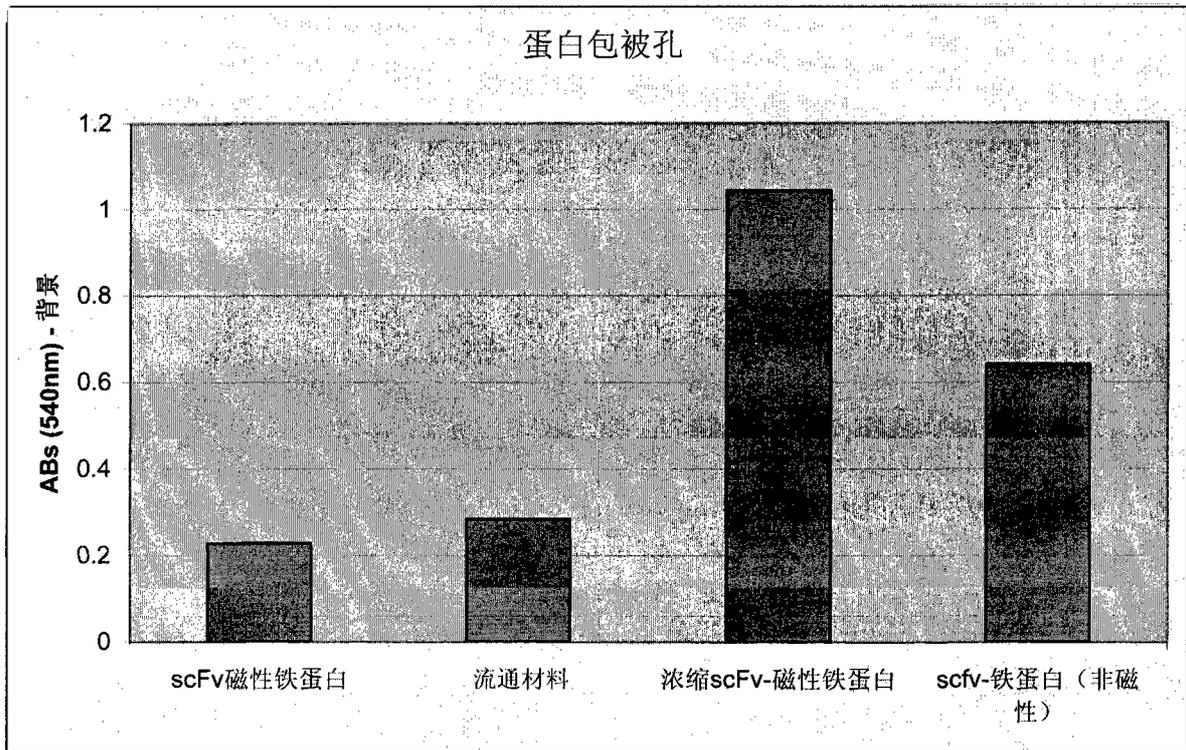


图 21a

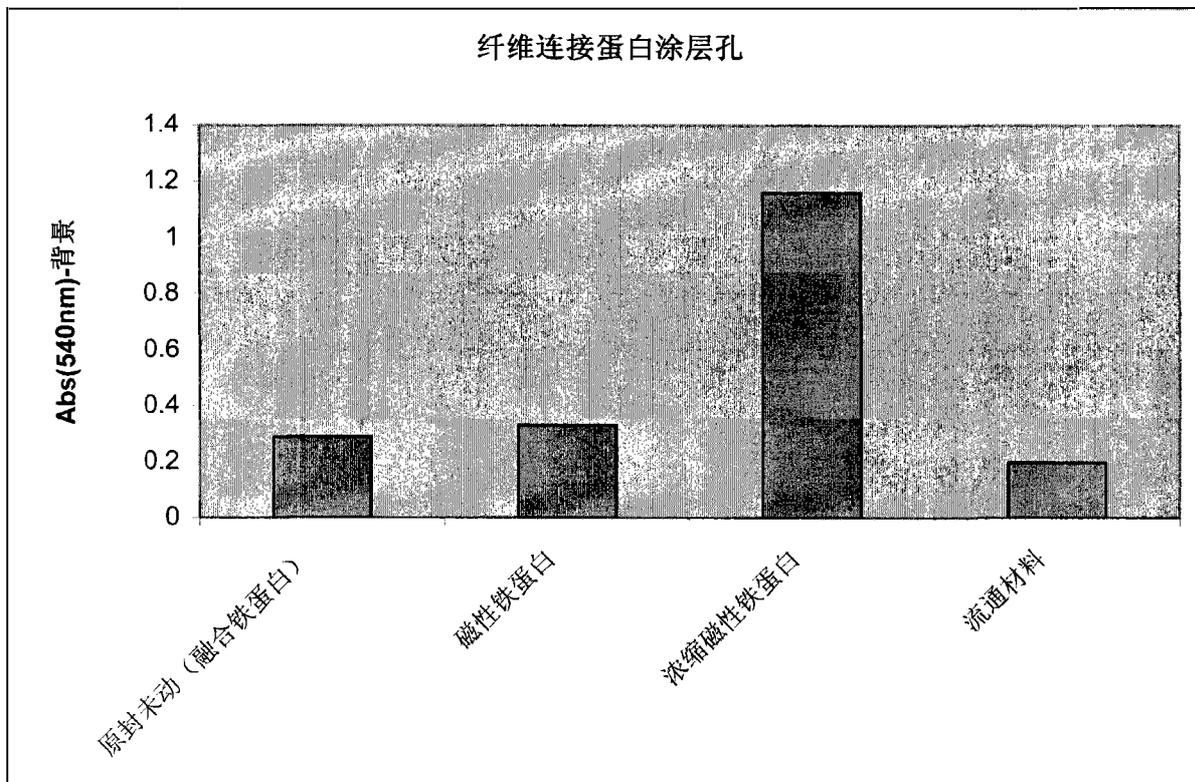


图 21b