



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110300807 A

(43)申请公布日 2019.10.01

(21)申请号 201780086494.1

R·S·布罗迪 M·R·威廉姆斯

(22)申请日 2017.12.21

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

(30)优先权数据

代理人 陈文平 刘盈盈

62/438,068 2016.12.22 US

15/642,800 2017.07.06 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

C12Q 1/6897(2006.01)

G01N 33/50(2006.01)

G01N 33/536(2006.01)

G01N 33/554(2006.01)

G01N 33/569(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

2019.08.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/067787 2017.12.21

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/119173 EN 2018.06.28

(71)申请人 基本解决方案公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72)发明人 T·J·祖潘西克 J·D·基特尔

曾令春 S·维达莫西

权利要求书4页 说明书30页

序列表63页 附图6页

(54)发明名称

用于分析物检测的通用生物传感器系统

(57)摘要

一种用于检测靶分析物的生物传感器系统，其包括预先确定类型的活的生物细胞；与所述活的生物细胞相关的信号生成报告子；与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或其他激活子机制或途径；与所述激活子机制相关的通用检测器元件；和与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件，其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的。

1. 一种用于检测靶分析物的生物传感器系统,其包括:
 - (a) 预先确定类型的活的生物细胞;
 - (b) 与所述活的生物细胞相关的信号生成报告子;
 - (c) 与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制;
 - (d) 与所述激活子机制相关的通用检测器元件;和
 - (e) 与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件,其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的。
2. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述活的生物细胞是原核细胞;真核细胞;酵母细胞;昆虫细胞;哺乳动物细胞;动物细胞;植物细胞;非繁殖细胞;固定的细胞;药物处理的细胞;化学处理的细胞;渗透处理的细胞;放射细胞;人造细胞;合成细胞;滤泡树突状细胞;自然杀伤细胞;巨噬细胞;单核细胞;单核吞噬细胞;中性粒细胞;嗜酸性粒细胞;或嗜碱性粒细胞。
3. 根据权利要求2所述的生物传感器系统,其中所述昆虫细胞是果蝇施耐德2细胞或sf9细胞。
4. 根据权利要求2所述的生物传感器系统,其中所述哺乳动物细胞是HEK细胞;CHO细胞;COS细胞;3T3细胞,或者其他培养的、永生化的或传代的哺乳动物细胞。
5. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述信号生成报告子是具有荧光、紫外或可见特性的染料;适合产生发光或荧光信号的酶;荧光、带电或磁性的纳米粒子、纳米点或量子点;荧光蛋白;或者其他钙敏感的发光或荧光分子。
6. 根据权利要求5所述的生物传感器系统,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白。
7. 根据权利要求5所述的生物传感器系统,其中所述信号生成报告子是螽蛋白;thalassicolin;mitrocomin (halistaurin);clytin (phialidin);mnemopsin;berovin;Indo-1;Fura-2;Quin-2;Fluo-3;Rhod-2;钙绿;BAPTA;cameleons,或者其他钙敏感的发光或荧光分子。
8. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述信号转导通路或激活子机制通过以下激活:所述活的生物细胞的pH或温度的改变;所述活的生物细胞的电或磁的特性的改变;所述活的生物细胞内G蛋白偶联受体信号传导通路的激活;所述活的生物细胞内的磷脂酰肌醇通路的激活;所述活的生物细胞内释放二酰基甘油、神经酰胺或其他亲脂性信使分子的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生一氧化氮、cAMP、cGMP或其他环核苷酸的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生超氧化物、过氧化氢、一氧化碳、硫化氢或其他次级氧化还原信号分子的信号转导通路的激活;或者由所述活的生物细胞表达的受体的构象改变,其中所述构象改变仅在所述通用检测器元件已经结合至靶分析物之后发生。
9. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述通用检测器元件包括活的生物细胞内的:抗体可变多样性连接(VDJ)区域、Fab片段或其他抗体决定子;T细胞可变连接(VJ)、可变多样性连接(VDJ)或其他T细胞受体决定子;合成肽;已知大小的非肽有机决定子;凝集素决定子、碳水化合物结合模块或其他碳水化合物结合决定子;脂质结合决定子;结合金属的金属硫蛋白决定子或其他金属结合决定子;基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM);非共价结合至所述活的生物细胞内的信号转导通路的Fc结合部分的Fc决定子;或者非共价结

合至信号转导通路的生物素或(链霉)亲和素结合部分的生物素或(链霉)亲和素决定子。

10. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述分析物结合元件是亲和体;适体;或可溶的可溶性受体,或者其中所述分析物结合元件包含是单链抗体或单链双抗体的IgG片段。

11. 根据权利要求1所述的生物传感器系统,其中所述靶分析物是相互的、共生的或寄生的微生物、病原微生物、生物样微体或其他微生物;或药品、药物、毒药、毒素、化学战剂、激素、代谢物,或与大分子载体结合的小分子。

12. 一种用于检测靶分析物的生物传感器系统,其包括:

(a) 预先确定类型的活的生物细胞;

(b) 所述活的生物细胞内的信号生成报告子,其中所述信号生成报告子响应于所述活的生物细胞内发生的预先确定的变化;

(c) 与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制,其中所述信号转导通路或激活子机制的运转在所述活的生物细胞内诱导所述预先确定的变化;

(d) 与所述激活子机制相关的通用检测器元件,其中所述通用检测器元件的运转触发所述激活子机制;

(e) 与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件,其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的;和

(f) 其中在分析物结合元件与也与所述通用检测器元件结合的靶分析物结合时,所述通用检测器元件触发所述激活子机制,导致所述预先确定的变化在所述活的生物细胞内发生,从而导致所述信号生成报告子产生可检测信号。

13. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述活的生物细胞是原核细胞;真核细胞;酵母细胞;昆虫细胞;哺乳动物细胞;动物细胞;植物细胞;非繁殖细胞;固定的细胞;药物处理的细胞;化学处理的细胞;渗透处理的细胞;放射细胞;人造细胞;合成细胞;滤泡树突状细胞;自然杀伤细胞;巨噬细胞;单核细胞;单核吞噬细胞;中性粒细胞;嗜酸性粒细胞;或嗜碱性粒细胞。

14. 根据权利要求13所述的生物传感器系统,其中所述昆虫细胞是果蝇施耐德2细胞或sf9细胞。

15. 根据权利要求13所述的生物传感器系统,其中所述哺乳动物细胞是HEK细胞;CHO细胞;COS细胞;3T3细胞,或者其他培养的、永生化的或传代的哺乳动物细胞。

16. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述信号生成报告子是具有荧光、紫外或可见特性的染料;适合产生发光或荧光信号的酶;荧光、带电或磁性的纳米粒子、纳米点或量子点;荧光蛋白;或者其他钙敏感的发光或荧光分子。

17. 根据权利要求16所述的生物传感器系统,其中所述荧光蛋白是绿色荧光蛋白。

18. 根据权利要求16所述的生物传感器系统,其中所述信号生成报告子是螳蛋白;thalassicolin;mitrocomin (halistaurin);clytin (phialidin);mnemopsin;berovin;Indo-1;Fura-2;Quin-2;Fluo-3;Rhod-2;钙绿;BAPTA;cameleons,或者其他钙敏感的发光或荧光分子。

19. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述信号转导通路或激活子机制通过以下中的至少一种激活:所述活的生物细胞的pH或温度的改变;所述活的生物细胞的电

或磁的特性的改变;所述活的生物细胞内G蛋白偶联受体信号传导通路的激活;所述活的生物细胞内的磷脂酰肌醇通路的激活;所述活的生物细胞内释放二酰基甘油、神经酰胺或其他亲脂性信使分子的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生一氧化氮、cAMP、cGMP或其他环核苷酸的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生超氧化物、过氧化氢、一氧化碳、硫化氢或其他次级氧化还原信号分子的信号转导通路的激活;或者由所述活的生物细胞表达的受体的构象改变,其中所述构象改变仅在所述通用检测器元件已经结合至靶分析物之后发生。

20. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述通用检测器元件包括活的生物细胞内的以下中的至少一种:抗体可变多样性连接(VDJ)区域、Fab片段或其他抗体决定子;T细胞可变连接(VJ)、可变多样性连接(VDJ)或其他T细胞受体决定子;合成肽;已知大小的非肽有机决定子;凝集素决定子、碳水化合物结合模块或其他碳水化合物结合决定子;脂质结合决定子;结合金属的金属硫蛋白决定子或其他金属结合决定子;基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM);非共价结合至所述活的生物细胞内的信号转导通路的Fc结合部分的Fc决定子;或者非共价结合至信号转导通路的生物素或(链霉)亲和素结合部分的生物素或(链霉)亲和素决定子。

21. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述分析物结合元件是亲和体;适体;或可溶性受体,或者其中所述分析物结合元件包含是单链抗体或单链双抗体的IgG片段。

22. 根据权利要求12所述的生物传感器系统,其中所述靶分析物是有益肠道细菌;致病细菌;蛋白质生物标志物;小分子毒素、代谢物、或化学战剂;或与大分子载体连接的小分子。

23. 一种用于检测靶分析物的生物传感器系统,其包括:

(a) 预先确定类型的活的生物细胞;

(b) 所述活的生物细胞内的信号生成报告子,其中所述信号生成报告子响应于所述活的生物细胞内发生的预先确定的变化;

(c) 与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制,其中所述信号转导通路或激活子机制的运转在所述活的生物细胞内诱导所述预先确定的变化;

(d) 与所述激活子机制相关的通用检测器元件,其中所述通用检测器元件的运转触发所述激活子机制;

(e) 与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件,其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的;和

(f) 其中在分析物结合元件与也与所述通用检测器元件结合的靶分析物结合时,所述通用检测器抑制所述激活子机制,导致所述预先确定的变化在所述活的生物细胞内减少,从而导致所述信号生成报告子产生减弱的信号或无信号。

24. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述活的生物细胞是原核细胞;真核细胞;酵母细胞;昆虫细胞;哺乳动物细胞;动物细胞;植物细胞;非繁殖细胞;固定的细胞;药物处理的细胞;化学处理的细胞;渗透处理的细胞;放射细胞;人造细胞;合成细胞;滤泡树突状细胞;自然杀伤细胞;巨噬细胞;单核细胞;单核吞噬细胞;中性粒细胞;嗜酸性粒细胞;或嗜碱性粒细胞。

25. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述信号生成报告子是具有荧光、紫外或可见特性的染料;适合产生发光或荧光信号的酶;荧光、带电或磁性的纳米粒子、纳米点或量子点;荧光蛋白;或者其他钙敏感的发光或荧光分子。

26. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述信号转导通路或激活子机制通过以下激活:所述活的生物细胞的pH或温度的改变;所述活的生物细胞的电或磁的特性的改变;所述活的生物细胞内G蛋白偶联受体信号传导通路的激活;所述活的生物细胞内的磷脂酰肌醇通路的激活;所述活的生物细胞内释放二酰基甘油、神经酰胺或其他亲脂性信使分子的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生一氧化氮、cAMP、cGMP或其他环核苷酸的信号转导通路的激活;所述活的生物细胞内释放或产生超氧化物、过氧化氢、一氧化碳、硫化氢或其他次级氧化还原信号分子的信号转导通路的激活;或者由所述活的生物细胞表达的受体的构象改变,其中所述构象改变仅在所述通用检测器元件已经结合至靶分析物之后发生。

27. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述通用检测器元件包括活的生物细胞内的:抗体可变多样性连接(VDJ)区域、Fab片段或其他抗体决定子;T细胞可变连接(VJ)、可变多样性连接(VDJ)或其他T细胞受体决定子;合成肽;已知大小的非肽有机决定子;凝集素决定子、碳水化合物结合模块或其他碳水化合物结合决定子;脂质结合决定子;结合金属的金属硫蛋白决定子或其他金属结合决定子;基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM);非共价结合至所述活的生物细胞内的信号转导通路的Fc结合部分的Fc决定子;或者非共价结合至信号转导通路的生物素或(链霉)亲和素结合部分的生物素或(链霉)亲和素决定子。

28. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述分析物结合元件是亲和体;适体;或可溶的可溶型受体,或者其中所述分析物结合元件包含是单链抗体或单链双抗体的IgG片段。

29. 根据权利要求23所述的生物传感器系统,其中所述靶分析物是有益肠道细菌;致病细菌;蛋白质生物标志物;小分子毒素、代谢物、或化学战剂;或是与大分子载体连接的小分子。

用于分析物检测的通用生物传感器系统

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2016年12月22日提交并且题为“System and Devices for the Rapid Detection of Analytes”的美国临时专利申请序列号62/438,068的权益,并且是于2017年7月6日提交并且题为“Biosensor System for the Rapid Detection of Analytes”的美国专利申请序列号15/642,800(美国专利号9,850,546)的部分连续申请,其全部公开内容通过引用并入本文,并且出于所有目的而成为本美国实用专利申请的一部分。

背景技术

[0003] 所述发明一般涉及用于检测生物样品或其他样品类型中的各种感兴趣的分析物的系统、装置、试剂和方法,更具体地涉及基于当生物传感器与测试样品中感兴趣的分析物反应时发出可检测信号用于实时检测和鉴定感兴趣的分析物的基于生物传感器的系统。以下专利提供了关于本发明的技术的另外的背景信息,并且出于所有目的其全部内容通过引用并入本文:美国专利号申请号9,023,640;9,752,199;9,850,546;9,850,547;和9,850,548。

[0004] 一般而言,生物传感器是将敏感的生物组分与物理化学检测组件结合在一起用于检测分析物的系统或装置。典型的生物传感器系统的组件包括生物元件、变换器或检测器元件、和以有意义且有用的方式显示测试结果的相关电子装置或信号处理器。生物元件通常包括生物材料,例如组织、微生物、细胞器、细胞受体、酶、抗体、核酸和可以通过已知的生物工程方法创建的类似物。变换器或检测器元件以物理化学的方式(例如,光学、压电和/或电化学)工作,其将分析物与生物元件相互作用产生的信号转化为另一能够更容易被测量和量化的信号。生物传感器起源于分子生物学和信息技术(例如,微电路、光纤等)的整合以定性和定量生物分子-分析物的相互作用,例如抗体-抗原相互作用。考虑到对用于检测食品中传染因子、病原体或/和毒素的快速、灵敏、易于操作和成本效益的检测工具的巨大需求(参见,例如,Mead等,Food Related Illness and Death in the United States, Emerging Infectious Diseases; Vol.5, No.5, September-October 1999 (607-625),其全部内容通过引用并入本文),一直有将生物传感器用于实时、便携装置和仪器中以检测和鉴定食品中的传染因子、病原微生物、毒素和其他污染物的需要。

发明内容

[0005] 以下提供了本发明的某些示例性实施方式的概述。该概述不是广泛的概述,并且不旨在识别本发明的关键或重要方面或元件或描绘其范围。但是,应该理解在用于描述和要求保护本发明的语言中不定冠词的使用并不旨在以任何方式将所描述的系统限制为单个组件或元件。而使用“一个/一种(a/an)”在本文中应被解释为指“至少一个/一种”或“一个/一种或多个/多种”。

[0006] 根据本发明的一个方面,提供了一种用于检测靶分析物的第一生物传感器系统。

该系统包括预先确定类型的活的生物细胞；与所述活的生物细胞相关的信号生成报告子；与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制；与所述激活子机制相关的通用检测器元件；与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件，其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的。

[0007] 根据本发明的另一个方面，提供了一种用于检测靶分析物的第二生物传感器系统。该系统包括预先确定类型的活的生物细胞；所述活的生物细胞内的信号生成报告子，其中所述信号生成报告子响应于所述活的生物细胞内发生的预先确定的变化；与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制，其中所述信号转导通路或激活子机制的运转在所述活的生物细胞内诱导所述预先确定的变化；与所述激活子机制相关的通用检测器元件，其中所述通用检测器元件的运转触发所述激活子机制；与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件，其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的；和其中在分析物结合元件与也与所述通用检测器元件结合的靶分析物结合时，所述通用检测器元件触发所述激活子机制，导致所述预先确定的变化在所述活的生物细胞内发生，从而导致所述信号生成报告子产生可检测信号。

[0008] 在本发明的另一方面，提供了一种用于检测靶分析物的第三生物传感器系统。该系统包括预先确定类型的活的生物细胞；所述活的生物细胞内的信号生成报告子，其中所述信号生成报告子响应于所述活的生物细胞内发生的预先确定的变化；与所述信号生成报告子相关的信号转导通路或激活子机制，其中所述信号转导通路或激活子机制的运转在所述活的生物细胞内诱导所述预先确定的变化；与所述激活子机制相关的通用检测器元件，其中所述通用检测器元件的运转触发所述激活子机制；与所述通用检测器元件相关的分析物结合元件，其中所述分析物结合元件对所述通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的；和其中在分析物结合元件与也与所述通用检测器元件结合的靶分析物结合时，所述通用检测器抑制所述激活子机制，导致所述预先确定的变化在所述活的生物细胞内减少，从而导致所述信号生成报告子产生减弱的信号或无信号。

[0009] 在阅读和理解示例性实施方式的以下详细描述后，本发明的另外特征和方面对于本领域普通技术人员而言将变得显而易见。如技术人员将理解的，在不脱离本发明的范围和精神的情况下，本发明的其他实施方式是可能的。因此，附图和相关描述本质上应被视为说明性而非限制性。

附图说明

[0010] 并入本说明书中并形成其一部分的附图示意性地示出本发明的一个或多个示例性实施方式，并且连同上文所给出的总体描述和下文所给出的详细描述，用来解释本发明的原理，并且其中：

[0011] 图1a-b是根据本发明的示例性实施方式的第一生物传感器的图示，其中Jurkat T细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件IgGbp-CD3 ζ ；

[0012] 图2a-b是根据本发明的示例性实施方式的第二生物传感器的图示，其中MC/9肥大细胞已被工程化以产生水母发光蛋白，并且其中MC/9细胞表达结合至可溶性非抗体信号转导元件IgGbp-IgE的天然受体Fc ϵ RI；

[0013] 图3a-b是根据本发明的示例性实施方式的第三生物传感器的图示，其中MC/9肥大

细胞已被工程化以产生水母发光蛋白,并且其中MC/9细胞表达天然受体FcεRI,其结合至已由MC/9肥大细胞排出的可溶性非抗体信号转导元件IgGbp-IgE;

[0014] 图4是根据本发明的示例性实施方式的第四生物传感器的图示,其中生物传感器细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达结合至生物素化检测器元件的跨膜非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ;和

[0015] 图5是根据本发明的示例性实施方式的第五生物传感器的图示,其中生物传感器细胞已被工程化以产生水母发光蛋白并且表达结合至生物素化检测器元件的跨膜非抗体信号转导元件mSA-CD3ζ。

具体实施方式

[0016] 现参考附图对本发明的示例性实施方式进行描述。虽然出于说明目的,以下详细描述含有许多细节,但是本领域普通技术人员将理解,以下细节的许多变化和改变在本发明的范围内。因此,本发明的以下实施方式是在不丧失所要求保护的发明的任何一般性以及不对其强加限制的情况下阐述的。

[0017] 本发明总体上涉及用于检测生物样品或其他样品类型中的各种分析物和/或其他感兴趣的靶标的系统、装置和方法,并且更具体地涉及基于当生物传感器与测试样品中感兴趣的分析物反应时发出可检测信号用于实时检测和鉴定感兴趣的分析物的基于生物传感器的系统。本发明的工程化细胞是极其灵敏和有效的生物传感器,并且因为这些生物传感器细胞具有固有的检测能力,所以它们提供了多功能的系统,其可通过简单地选择对特定病原体或其他感兴趣的靶标具有特异性的替代可溶性检测(例如,抗体)分子而容易地适于检测很多种不同的传染因子或其他靶标。此外,本发明的系统可被容易地配置用于在单个测定中多重检测若干传染因子或其他分析物,提供了极大的灵活性和实用性。本发明的多功能性衍生自独特的元件组合,特别是来自通用生物传感器细胞与特定可溶性检测器(例如,抗体)的组合。通用生物传感器细胞具有响应于可被检测器分子识别的基本上任何靶分子的存在的能力。因为在一些实施方式中,检测器或检测抗体被添加到系统中作为可溶性因子,所以系统可被配置成通过简单地选择适当的替代检测器或检测抗体来检测替代靶标。所公开系统的特异性由检测器分子确定,所述检测器分子是基于其对传染因子或其他靶分析物特有的靶分子的特异性和亲和力来选择。这种通用生物传感器细胞和可溶性检测器的组合还使得能够通过测试系统内简单地包含多种检测器分子(例如,抗体)来实现多重测定的构建,其中基于其对替代传染因子或其他分析物的特异性来选择靶分子。

[0018] 与本发明一起使用的生物传感器细胞类型的遗传操纵和修饰通常涉及使用适当选择的含有在选择细胞类型中有效地起作用的遗传元件的基因递送媒介物(vehicle)。例如,采用引导所导入的转基因在选择特定生物传感器细胞中高水平表达的启动子元件是有用的。在本发明的示例性实施方式中,这样的启动子元件可直接衍生自生物传感器细胞自身,然后用于表达感兴趣的转基因。在本发明的另一个实施方式中,可通过比较替代基因递送媒介物环境中的替代启动子元件的功能凭经验确定适当的元件以鉴定对选择的细胞类型有效的启动子、转基因、载体组合。可使用标准技术(例如电穿孔)或化学转染试剂(例如lipofectamine)将例如编码发光报告蛋白的基因的转基因导入生物传感器细胞中。本领域普通技术人员已知的其他基因工程方法也与本发明相容。

[0019] 本发明的示例性实施方式包括：活的工程化生物传感器细胞，其中活的工程化生物传感器细胞通常是哺乳动物免疫系统的组分；报告蛋白，其中报告蛋白由所述活的工程化细胞表达并存在于其中，并且其中报告蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预先确定的变化而发出可检测信号；由活的工程化细胞表达的信号转导通路，其中信号转导通路控制活的工程化细胞的细胞溶质内的生物或生物化学过程，并且其中至少一种生物或生物化学过程当其发生时导致报告蛋白发出可检测信号；至少一种类型的检测器分子，其中每种检测器分子适于结合至特定分析物；至少一种分析物，其中所述至少一种分析物结合至对所述分析物特异的检测器分子；和由活的工程化细胞表达的多个跨膜非抗体信号转导元件，其中每个信号转导元件适于接收自身适于接收分析物的检测器分子。当足够数量的分析物与足够数量的自身与跨膜非抗体信号转导元件结合的检测器分子结合时，在细胞表面上发生信号转导元件的聚集，信号转导通路被激活，生物或生物化学过程发生，并且报告蛋白发出所述可检测信号。这种系统还可以包括用于将活的细胞与可溶性组分和含有感兴趣的分析物或传染因子的样品混合同时保持活的生物传感器细胞的活力和功能的装置，以及用于检测由生物传感器细胞发出的信号的检测器。

[0020] 本发明的另一个示例性实施方式包括：活的工程化细胞，其中活的工程化细胞是哺乳动物免疫系统的组分，其中活的工程化细胞是肥大细胞，并且其中肥大细胞表达至少一种预先确定的受体；报告蛋白，其中报告蛋白是由活的工程化细胞表达的水母发光蛋白，并且其中水母发光蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预先确定的变化而发出可检测光信号；由活的工程化细胞表达的信号转导通路，其中信号转导通路控制活的工程化细胞的细胞溶质内的生物化学过程，其中由信号转导通路控制的生物化学过程进一步包括细胞内钙的增加，并且其中细胞内钙的增加当其发生时导致水母发光蛋白发出可检测光；至少一种类型的检测器分子，其中每种检测器分子适于结合至特定分析物；至少一种分析物，其中所述至少一种分析物结合至对该分析物特异的检测器分子；和多种可溶性非抗体信号转导元件。每种信号转导元件适于结合至少一种预先确定的受体并接收检测器分子。当足够数量的分析物与足够数量的检测器分子与足够数量的自身与至少一种类型的预先确定的受体结合的跨膜非抗体信号转导元件结合时，在细胞表面上发生受体的聚集，信号转导通路被激活，细胞内钙的增加发生，并且由水母发光蛋白发出可检测光。这种系统还可以包括用于将活的细胞与可溶性组分和含有感兴趣的分析物或感染因子的样品混合同时保持活的生物传感器细胞的活力和功能的装置，以及用于检测由生物传感器细胞发出的信号的检测器。

[0021] 本发明的另一个示例性实施方式包括用于快速检测的生物传感器，其中所述生物传感器还包括：活的工程化细胞，其中所述活的工程化细胞衍生自哺乳动物免疫系统的细胞组分（即免疫细胞）；报告蛋白，其中所述报告蛋白被工程化到活的工程化细胞并由其表达，并且其中所述报告蛋白响应于活的工程化细胞的细胞溶质中的某些预先确定的变化而发出可检测信号；被工程化到或天然存在于活的工程化细胞内的信号转导通路，其中所述信号转导通路控制活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质内的生物过程，并且其中生物过程当其发生时导致报告蛋白发出可检测信号；和多种直接或间接结合至待分析的样品中的分析物的非抗体信号转导元件，其中结合的非抗体信号转导元件然后与生物传感器细胞协作以直接或间接激活信号转导通路。

[0022] 活的生物细胞

[0023] 本发明的示范性实施方式包括通常是哺乳动物免疫系统的组分(例如免疫细胞)的活的工程化生物传感器细胞。在本发明的某些实施方式中,生物传感器细胞是人或小鼠B细胞。B细胞或B淋巴细胞是一类淋巴细胞亚型的白血细胞,其通过分泌抗体在适应性免疫系统的体液免疫组分中起作用。在本发明的其他实施方式中,生物传感器细胞是人或小鼠T细胞。T细胞或T淋巴细胞是另一类淋巴细胞,其作为适应性免疫系统的一部分在细胞介导的免疫中发挥重要作用。由于在细胞表面上存在T细胞受体,所以T细胞可区别于其他淋巴细胞。在本发明的其他实施方式中,生物传感器细胞是肥大细胞。肥大细胞也是一类被称为粒细胞的白血细胞,其衍生自是免疫系统和神经免疫系统的一部分的髓样干细胞。其他类型的细胞与本发明相容,包括嗜碱性粒细胞,其是另一类白血细胞并且在外观和功能两者上类似于肥大细胞。

[0024] 在本发明的其他实施方式中,活的生物细胞可以是原核细胞或真核细胞,例如包括Ca²⁺信号传导系统的真核细胞。活的细胞可以是酵母细胞或昆虫细胞,例如是果蝇施耐德2(S2)细胞、sf9细胞的昆虫细胞,或是已被工程化以使用水母发光蛋白作为报告子的昆虫细胞。活的生物细胞可以是哺乳动物细胞,例如HEK细胞、CHO细胞、COS细胞或3T3细胞。活的生物细胞可以是工程化细胞。工程化细胞可以衍生自天然的、传代的或培养的哺乳动物细胞。工程化细胞可以衍生自非繁殖细胞、固定的细胞、药物或化学处理的细胞、渗透处理的细胞、放射细胞、人造或合成细胞,或非活性细胞,只要工程化细胞包含功能性配体、信号转导通路和报告子。细胞可以是人造或合成细胞。工程化细胞可以衍生自于植物细胞、动物细胞、昆虫细胞或其他非哺乳动物细胞、哺乳动物免疫系统的组分、滤泡树突状细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、单核细胞、单核吞噬细胞、中性粒细胞,嗜酸性粒细胞或嗜碱性粒细胞。工程化细胞也可以是表达Fc受体类型的细胞,例如B淋巴细胞、滤泡树突细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞。在某些实施方式中,细胞可以是天然地或通过基因工程或通过化学添加具有合适的受体、信号传导通路和信号输出方法的任何原核或真核细胞。细胞可以是人造或非活的单元,只要它具有功能性受体、信号传导通路和信号输出方法。用于这种系统的细胞的实例是巨噬细胞,例如在细胞表面上表达Fc受体的人细胞系U937。通过向靶标添加抗体,抗原可以与抗体结合,并且该抗原-抗体复合物将结合至细胞上的Fc受体并刺激导致细胞内钙的增加的信号传导。细胞可以被固定、冷冻、干燥或冷冻干燥。

[0025] 信号生成报告子

[0026] 本发明的示范性实施方式包括报告元件,例如由活的工程化生物传感器细胞产生或表达的报告蛋白或酶。报告蛋白响应于活的工程化生物传感器细胞的细胞溶质中的某些预先确定的变化而发出可检测信号。在本发明的某些实施方式中,报告蛋白是生物发光的光蛋白,例如衍生自于水生动物维多利亚多管发光水母(*Aequorea Victoria*)的水母发光蛋白。水母发光蛋白先前已用于工程化的活的生物传感器细胞以响应于各种信号转导通路的激活而产生光信号;因此,用于操纵活的细胞中水母发光蛋白的产生的各种方法是本领域技术人员所公知的。特别地,技术人员可以选择和采用任何合适的基因递送媒介物,例如细菌质粒载体或病毒载体,用于将合适的遗传物质导入生物传感器细胞中。然后通过导入的遗传物质的表达来控制生物传感器细胞内报告蛋白的产生。本领域普通技术人员还将理

解,其他光蛋白或其他类型的报告蛋白、酶和分子可以整合到本发明的各种替代实施方式中并与之一起使用。

[0027] 在本发明的各种实施方式中,报告子可以是具有荧光特性的蛋白质,其响应于活的细胞中至少一种生物化学通路的激活和由此产生的变化而发生可检测的变化。报告子或报告蛋白可以是其他钙敏感的发光或荧光分子,例如螳蛋白、thalassicolin、mitrocomin (halistaurin)、clytin (phialidin)、mnemopsin、berovin、Indo-1、Fura-2、Quin-2、Fluo-3、Rhod-2、钙绿、BAPTA、cameleons (A.Miyawaki等,(1999) Proc.Natl.Acad.Sci.96, 213540) 或类似分子。报告蛋白可以是包含Ca²⁺结合结构域和相关荧光蛋白的嵌合蛋白。相关荧光蛋白可以是绿色荧光蛋白(GFP)。蛋白质可以结合磷脂酰肌醇通路(即本文所述实施方式中使用的途径)的其他组分并改变其荧光。一个实例是已被工程化为结合二酰基甘油的荧光蛋白。报告子可以是适于产生发光或荧光信号的酶。报告蛋白可以是例如分别产生发光或荧光信号的荧光素酶或碱性磷酸酶的酶。它也可以是荧光蛋白或可以包含荧光的、带电的或磁性的纳米颗粒、纳米点或量子点。报告子可以是具有荧光、紫外或可见特性的染料,其中荧光、紫外或可见特性响应于活的生物细胞内至少一种生物化学通路的激活和由此产生的变化而发生可检测的变化。

[0028] 激活子机制

[0029] 本发明的示范性实施方式包括由活的工程化生物传感器细胞表达的以信号转导通路形式的激活子机制。信号转导通路控制活的工程化细胞的细胞溶质内的至少一个生物过程,并且所述至少一个生物过程当其发生时导致报告蛋白发出可检测信号。在本发明的某些实施方式中,信号转导通路是细胞内Ca²⁺浓度的增加响应于细胞表面信号转导分子(例如受体蛋白)的激活而被诱导的任何生物化学途径。用于本发明的生物传感器细胞可以选自能够响应于细胞表面信号转导分子的激活而产生细胞质Ca²⁺的增加的活的细胞组。例如,B细胞、T细胞和肥大细胞具有分别响应于细胞表面信号转导分子例如B细胞受体、T细胞受体和Fcε受体(肥大细胞)的激活而诱导Ca²⁺浓度的增加的能力。

[0030] 因为在培养中生长的哺乳动物细胞通常会生成细胞群,其中特定的个体细胞可能具有不同的诱导Ca²⁺浓度增加的能力,选择或筛选具有强大能力以产生Ca²⁺信号的细胞亚群或克隆细胞系是有用的。例如,这可以通过分析水母发光蛋白诱导的闪光的诱导来实现。特别地,通过将转基因导入细胞中而产生的转染子是衍生自大量独立基因插入事件的混合细胞群。因此,当构建生物传感器细胞时,筛选或选择具有有效信号转导能力以及有用表达水平的导入转基因的特定细胞亚群或克隆细胞系是有用的。使用荧光激活细胞分选(FACS)技术为此目的选择高表达细胞的亚群或产生克隆细胞系是特别有用的。

[0031] 如前所述,水母发光蛋白先前已经用于工程化活的生物传感器细胞以响应于很多种信号转导通路的激活而产生光信号,特别地,其中这样的信号转导通路导致活的细胞内细胞质Ca²⁺离子的增加。在本发明的某些实施方式中,产生水母发光蛋白作为报告蛋白的生物传感器细胞在用于检测测定之前用腔肠素(CTZ)充电。该充电步骤将水母发光蛋白共价连接至疏水性假体基团(例如CTZ),并且在钙(Ca²⁺)结合时,CTZ发生包括构象变化的不可逆反应,并发出蓝光(在469nm处)。

[0032] 如上所述,信号转导通路可以通过从内质网释放钙离子到细胞溶质的方式传递第一信号,并且第二信号可以响应于钙离子由报告子释放。这种信号转导通路是在B细胞、T细

胞、肥大细胞、巨噬细胞和其他免疫细胞中发现的第二信使级联,其中细胞表面受体的交联激活酪氨酸激酶,其随后磷酸化磷脂酶C,其随后将磷脂酰肌醇4,5-二磷酸(PIP2)切割成1,4,5-三磷酸肌醇(IP3)和二酰基甘油;然后,IP3打开钙通道以从细胞内储存库(例如内质网)释放出钙或让细胞外的钙进入,从而提高细胞的细胞溶质中的钙浓度。根据受体类型、细胞类型和期望的信号传导方法,可以使用替代的第二信使级联,例如G蛋白-腺苷酸环-cAMP-蛋白激酶A级联。信号转导通路也可以通过释放二酰基甘油、神经酰胺,或其他亲脂性第二信使分子的方式传递信号,其中报告子响应于二酰基甘油、神经酰胺或其他亲脂性第二信使分子的释放而发出第二信号。信号转导通路也可以通过释放或产生一氧化氮(“NO”)、cAMP、cGMP,或其他环状核苷酸的方式传递信号,其中报告子响应于该释放或产生而发出第二信号。信号转导通路也可以通过释放或产生超氧化物、过氧化氢、一氧化碳、硫化氢,或其他次级氧化还原信使传递信号,其中报告子响应于超氧化物、过氧化氢、一氧化碳、硫化氢或其他次级氧化还原信使分子的释放或产生而发出第二信号。在某些实施方式中,激活子机制包括细胞pH或温度的变化或细胞电或磁性质的变化。

[0033] 通用检测器元件

[0034] 本发明的示范性实施方式包括作为用于识别靶分析物的通用检测器元件发挥功能的各种非抗体信号转导元件。每种信号转导元件通常适于接收(即结合)分析物结合元件(在此也称为“检测器分子”),所述分析物结合元件其自身适于接收(即结合)特定的感兴趣的分析物。在一个实施方式中,信号转导元件是跨膜嵌合融合蛋白,其被工程化到生物传感器细胞中并在其表面上表达,并且其适于激活最终导致报告蛋白发出可检测信号的信号转导通路。在另一个实施方式中,信号转导元件是可溶性嵌合融合蛋白,其适于结合细胞表面信号转导体,例如适于激活最终导致报告蛋白发出可检测信号的信号转导通路的天然受体或受体蛋白。在另一个实施方式中,信号转导元件是可溶的嵌合融合蛋白,其被工程化到生物传感器细胞中并由其表达。然后将可溶的嵌合融合蛋白分泌/排泄到细胞外空间,它在那里与细胞表面信号转导体结合,例如适于激活最终导致报告蛋白发出可检测信号的信号转导通路的天然受体或受体蛋白。

[0035] 本发明的嵌合融合蛋白可包含:(i)适于结合至所述至少一种类型的检测器分子(例如,可溶性抗体)的蛋白质的组分;(ii)通常由所述活的工程化生物传感器细胞表达的受体复合物的组分。在一些实施方式中,适于结合至至少一种类型的检测器分子的蛋白质组分可以衍生自细菌结合蛋白(即,衍生自细菌的抗体结合蛋白),例如,链霉素G蛋白的IgG结合结构域(在本文的图中称为IgGbp或Igbp)。可包含该IgG结合结构域的串联重复以增加结合蛋白对可溶性抗体的亲和力。在一个替代的实施方式中,适于结合至所述至少一种类型的检测器分子的嵌合融合蛋白的组分是衍生自受体蛋白(例如小鼠Fc γ RI(Fc γ RI)受体)的抗体结合结构域。在各种示范性实施方式中,通常由活的工程化生物传感器细胞表达的受体复合物的组分是IgM(对于B细胞生物传感器);Ig α/β (对于B细胞生物传感器);IgE(对于肥大细胞生物传感器);CD19(对于B细胞生物传感器),CD3 ζ (对于T细胞生物传感器)或Fc ϵ RI(用于肥大细胞生物传感器)。

[0036] 本发明的非抗体信号转导元件可以包括完整的蛋白质序列或是工程化的蛋白片段,例如衍生自于较大的蛋白质分子的选择的蛋白结构域。本领域普通技术人员将理解,可以使用标准的基因工程技术例如合成基因技术产生较大分子的片段。当较大蛋白质的片段

用于工程化抗体结合基序作为嵌合融合蛋白的方面时,重要的是设计工程化蛋白质以确保选择的蛋白质片段的正确构象折叠。因此,(在融合蛋白中)包含不易形成蛋白质二级结构的短的间隔子或接头元件是有用的。氨基酸例如甘氨酸、丝氨酸和丙氨酸的短组合可用于这些间隔子或接头元件。在一个示例性实施方式中,氨基酸序列甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、甘氨酸(G)、丝氨酸(S)、甘氨酸(G)被用于在工程化蛋白质分子(参见SEQ ID NO:19)中分离结合结构域和受体复合物的组分。关于用于将检测器元件连接到信号转导元件或将信号转导元件的不同区段互联的肽接头或间隔子:接头通常将一个元件的羧基末端连接到另一个的氨基末端。肽接头的长度可以是0至25个氨基酸不等,或任何中间的整数值,并且通常但不总是包含亲水性氨基酸,例如甘氨酸(G)和丝氨酸(S)。

[0037] 如前所述,信号转导元件各自结合至与特定的感兴趣的分析物结合的检测器分子。已经结合至分析物的检测器分子将(i)结合至跨膜信号转导元件;或(ii)结合至自身将结合至细胞表面信号转导体(例如,天然受体)的信号转导元件。在第一种情况下,当足够数量的分析物与足够数量的自身与跨膜非抗体信号转导元件结合的检测器分子结合时,在生物传感器细胞表面上发生信号转导元件的聚集,信号转导通路被激活,生物过程发生,并且由报告蛋白发出可检测信号。在第二种情况下,当足够数量的分析物与足够数量的检测器分子与足够数量的自身结合至适当的天然受体的非抗体信号转导元件结合时,在细胞表面上发生受体的聚集,信号转导通路被激活,细胞内钙的增加发生,并且由报告蛋白发出可检测光。

[0038] 根据本发明的示例性实施方式的第一非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至IgM重链恒定结构域(B细胞)的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:1提供信号转导元件IgGbp-IgM的DNA序列,并且SEQ ID NO:2提供信号转导元件IgGbp-IgM的蛋白质序列。

[0039] 根据本发明的示例性实施方式的第二非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至B细胞受体的Ig α / β 组分的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:3提供信号转导元件IgGbp-Ig α / β 的DNA序列,并且SEQ ID NO:4提供信号转导元件IgGbp-Ig α / β 的蛋白质序列。

[0040] 根据本发明的示例性实施方式的第三非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至T细胞受体的CD3 ζ 链的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:5提供信号转导元件IgGbp-CD3 ζ 的DNA序列,并且SEQ ID NO:6提供信号转导元件IgGbp-CD3 ζ 的蛋白质序列。

[0041] 根据本发明的示例性实施方式的第四非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至IgM重链恒定结构域(B细胞)的Fc γ RI抗体结合结构域。SEQ ID NO:7提供信号转导元件Fc γ RI-IgM的DNA序列,并且SEQ ID NO:8提供信号转导元件Fc γ RI-IgM的蛋白质序列。

[0042] 根据本发明的示例性实施方式的第五非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至B细胞受体的Ig α / β 组分的Fc γ RI抗体结合结构域。SEQ ID NO:9提供信号转导元件Fc γ RI-Ig α / β 的DNA序列,并且SEQ ID NO:10提供信号转导元件Fc γ RI-Ig α / β 的蛋白质序列。

[0043] 根据本发明的示例性实施方式的第六非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至T细胞受体的CD3 ζ 链的Fc γ RI抗体结合结构域。SEQ ID NO:11提供信号转导元件Fc γ RI-CD3 ζ 的DNA序列,并且SEQ ID NO:12提供信号转导元件Fc γ RI-CD3 ζ 的蛋白质序列。

[0044] 根据本发明的第七示例性非抗体信号转导元件包含具有通过GSASGSG接头融合至

IgE恒定结构域(B细胞)的细菌结合蛋白(IgGbp)。SEQ ID NO:13提供信号转导元件IgGbp-IgE的DNA序列,并且SEQ ID NO:14提供信号转导元件IgGbp-IgE的蛋白质序列。

[0045] 根据本发明的第八示例性非抗体信号转导元件包含具有通过GSASGSG接头融合至IgE恒定结构域(B细胞)的Fc γ RI抗体结合结构域。SEQ ID NO:15提供信号转导元件Fc γ RI-IgE的DNA序列,并且SEQ ID NO:16提供信号转导元件Fc γ RI-IgE的蛋白质序列。

[0046] 根据本发明的第九示例性非抗体信号转导元件包含通过GSASGSG接头融合至T细胞受体的CD3 ζ 链的单体型链霉亲和素。SEQ ID NO:17提供信号转导元件mSA-CD3 ζ 的DNA序列,并且SEQ ID NO:18提供信号转导元件mSA-CD3 ζ 的蛋白质序列。单体型链霉亲和素是链霉亲和素的重组形式,其包含将链霉亲和素四聚体分散成单体并增强所得分离的亚基的溶解度的突变。

[0047] 在各种实施方式中,通用检测器元件包括抗体可变多样性连接(VDJ)区域、Fab片段或其他抗体决定子(determinant)。通用检测器元件可以包括T细胞VJ区域、VDJ区域或其他T细胞受体决定子。通用检测器元件可包括合成肽;不是肽的小的有机决定子;蛋白质或肽决定子;凝集素决定子,碳水化合物结合模块或其他碳水化合物结合决定子;脂质结合决定子;结合金属的金属硫蛋白决定子或其他金属结合决定子。

[0048] 通用检测器元件可以共价结合至由活的生物细胞表达的信号转导通路。一个实例是膜锚定抗体,其中锚定部分是信号转导通路的一部分,即将信号从所述细胞外传递到细胞内。在一些实施方式中,通用检测器元件不是模块化的,而是信号转导通路的整体(integral)部分,例如,形成该通路的嵌合蛋白的部分。通用检测器元件可以非共价结合至信号转导通路。一个实例是从外部结合至信号转导分子上的Fc受体的抗体,其中携带Fc受体的分子将信号传递通过膜。在其他实施方式中,通用检测器元件是模块化的,并且包含信号转导通路的细胞能够用选择的通用检测器元件装载。通用检测器元件可以包含非共价结合至信号转导通路的部分的决定子,或者通用检测器元件可以包含非共价结合至信号转导通路的Fc结合部分的Fc决定子。通用检测器元件可以包含非共价结合至信号转导通路的生物素或(链霉)亲和素结合部分的生物素或(链霉)亲和素决定子。

[0049] 分析物结合元件/检测器分子

[0050] 本发明的示例性实施方式包括至少一种类型的分析物结合元件,在本文中也称为“检测器分子”,其中每种分析物结合元件适于结合至特定的靶分析物。所述分析物结合元件可以是在任何情况不由生物传感器细胞表达的可溶性抗体。用于本发明的特定分析物结合元件基于其明确识别感兴趣的靶分析物的能力来选择。在一个示例性实施方式中,分析物结合元件是可溶性抗体,例如可商购的对特定分析物(例如传染因子)是特异性的IgG。在另一个示例性实施方式中,分析物结合元件是对预先确定的分析物(例如对抗自身抗原抗体是特异性的生物素化的自身抗原分子)是特异性的生物素化的分子(或基于链霉亲和素的分子)。根据本发明的检测器分子或靶分子可包括与自身免疫疾病相关的自身抗原或自身抗体。代表性的自身免疫疾病或病症包括类风湿性关节炎(RA)、青少年类风湿性关节炎(JRA)、1型糖尿病、系统性红斑狼疮、桥本氏甲状腺炎、格雷夫斯病、硬皮病、乳糜泻、克罗恩病、溃疡性结肠炎、干燥综合症、多发性硬化症、肾炎综合症、艾迪生病、韦格纳肉芽肿病、原发性胆汁性肝硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、风湿性多肌痛、颞动脉炎/巨细胞动脉炎和格林-巴利综合症。检测器分子或靶分子还可包括肿瘤特异性或肿瘤相关抗原或针

对这种抗原的抗体；或生物活性分子，例如EGF、肽激素，包括胰岛素和生长激素、细胞因子、白细胞介素、干扰素、TNF等，或这样的生物活性分子的抗体。

[0051] 本发明的系统还可以包括包含IgG片段的分析物结合元件，并且所述IgG片段可以是单链抗体或单链双抗体。检测器还可以是亲和体（即工程化结合蛋白）、适体（例如已被工程化以结合配体的DNA或RNA分子）、或可溶性受体，例如感染性病毒的可溶性受体。

[0052] 靶分析物和测试样品

[0053] 本发明的预期用途是检测待测样品中存在或可能存在的各种分析物。在本发明的示例性实施方式中，待检测的分析物将结合至对该分析物是特异性的检测器分子，例如可溶性抗体。待测样品可取自大量的食物来源，包括：(i) 肉类，例如牛肉、猪肉、羊肉、野牛、家禽和海鲜；和(ii) 植物和蔬菜。待测样品也可以取自许多其他来源，例如水、消耗性流体、防腐性流体和例如血液的体液。可被检测的分析物实际上包括将与检测器或检测器分子特异性结合的任何物质，例如化学物质、毒素和传染因子，例如病毒、细菌和其他生物材料或试剂。在本发明的示例性实施方式中，特异性传染因子是大肠杆菌，尽管可以用本发明检测其他传染因子（如沙门氏菌、李斯特菌和弯曲杆菌）和污染物。在单独的测定中或是在多重测定中，大肠杆菌0157H7、026、045、0103、0111、0121和0145，都可以潜在地使用本发明进行检测。

[0054] 本发明能够检测许多不同的分析物，包括肉类病原体，以及在菠菜、莴苣和其他蔬菜和食品中发现的那些。分析物可含有抗原或过敏原的一个或多个表位，包括线性或构象表位；它还可含有被互为受体或配体识别的一种或多种配体或受体。示例性分析物包括细菌，例如芽孢杆菌（例如炭疽芽孢杆菌）、肠杆菌科（例如沙门氏菌、大肠杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、克雷伯氏菌和志贺氏菌）、耶尔森氏菌（例如，鼠疫耶尔森氏菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌）、葡萄球菌属（例如，金黄色葡萄球菌）、链球菌属、淋病、肠球菌属（例如，粪肠球菌）、李斯特氏菌属（例如，单核细胞增生李斯特氏菌）、布鲁氏菌属（例如，流产布鲁氏菌、马尔他布鲁氏菌或猪布鲁氏菌）、弧菌属（例如，霍乱弧菌）、白喉棒状杆菌、假单胞菌属（例如，类鼻疽假单胞菌或铜绿假单胞菌）、伯克霍尔德菌（例如，鼻疽伯克霍尔德菌或类鼻疽伯克霍尔德菌）、志贺氏菌属（例如，痢疾志贺氏菌）、立克次体属（例如，立氏立克次体、普氏立克次体或伤寒立克次体）、土拉热弗朗西斯杆菌、鹦鹉热衣原体、贝氏柯克斯体、支原体属（例如，牛肺疫支原体）等；过敏原，例如花生粉尘、霉菌毒素、霉菌孢子或细菌孢子（例如肉毒梭状芽孢杆菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌）；毒素，例如蓖麻毒素、霉菌毒素、河豚毒素、炭疽毒素、肉毒杆菌毒素、葡萄球菌肠毒素B或蛤蚌毒素；病毒，例如腺病毒科（例如，腺病毒）、沙粒病毒科（例如，马丘波病毒）、布尼亚病毒科（例如，汉坦病毒或裂谷热病毒）、冠状病毒科、正粘病毒科（例如，流感病毒）、丝状病毒科（例如，埃博拉病毒和马尔堡病毒）、黄病毒科（例如，日本脑炎病毒和黄热病病毒）、嗜肝DNA病毒科（例如，乙型肝炎病毒）、疱疹病毒科（例如，单纯疱疹病毒）、乳多空病毒科（例如，乳头瘤病毒）、副粘病毒科（例如，呼吸道合胞体病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒或副流感病毒）、细小病毒科、小RNA病毒科（例如，脊髓灰质炎病毒）、痘病毒科（例如，天花病毒）、呼肠孤病毒科（例如，轮状病毒）、逆转录病毒科（例如，人类T淋巴细胞病毒（HTLV）和人类免疫缺陷病毒（HIV））、弹状病毒科（例如，狂犬病病毒）和披膜病毒科（例如，脑炎病毒、黄热病病毒和风疹病毒）；原虫，例如小隐孢子虫、脑炎原虫、疟原虫、刚地弓形虫、棘阿米巴、溶组织内阿米巴、兰伯氏贾第虫、阴道毛滴虫、利什曼原虫或锥虫属（例如，

布氏锥虫和克氏锥虫)；蠕虫，例如绦虫类(绦虫)、吸虫类(吸虫)或线虫(蛔虫，例如，人蛔虫、毛首鞭虫、美洲板口线虫或十二指肠钩口线虫)；寄生虫(例如，本文所述的任何原虫或蠕虫)；真菌，例如曲霉、环管苔虫科、粗球孢子菌和隐球菌属；环境污染物；水添加剂；农业标志物；核酸(例如，寡核苷酸、多核苷酸、核苷酸、核苷、DNA分子或RNA分子，包括染色体、质粒、病毒基因组、引物或基因)；蛋白质(例如，糖蛋白、金属蛋白、酶、朊病毒或免疫球蛋白)；代谢物；糖；脂质；脂多糖；盐；或离子。靶标还包括：食源性病原体，例如沙门氏菌属(例如，鼠伤寒沙门氏菌)、致病性大肠杆菌(例如，O157:H7)、芽孢杆菌属(例如，蜡样芽孢杆菌)、肉毒梭状芽孢杆菌、单核细胞增生李斯特氏菌、耶尔森氏菌属(例如，小肠结肠炎耶尔森氏菌)、诺罗病毒(例如，诺沃克病毒)、志贺氏菌属、金黄色葡萄球菌、刚地弓形虫、弧菌属(例如，创伤弧菌、霍乱弧菌、副溶血弧菌)、空肠弯曲菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌；和武器化的病原体，例如炭疽芽孢杆菌、鼠疫耶尔森氏菌、土拉热弗朗西斯杆菌、布鲁氏菌(例如，猪布鲁氏菌)、鼻疽伯克霍尔德菌、类鼻疽伯克霍尔德菌、志贺氏菌属、肉毒梭状芽孢杆菌、天花(例如，重型天花)、丝状病毒科(例如埃博拉病毒和马尔堡病毒)、沙粒病毒科(例如，拉沙病毒和马丘波病毒)、产气荚膜梭状芽孢杆菌、任何食源性病原体(例如，沙门氏菌属种、大肠杆菌O157:H7或志贺氏菌属)、鸚鵡热衣原体、贝氏柯克斯体、金黄色葡萄球菌、立克次体(例如，普氏立克次体或立氏立克次体)、甲病毒属(例如，委内瑞拉马脑炎病毒、东部马脑炎病毒或西部马脑炎病毒)、霍乱弧菌、小隐孢子虫、亨尼帕病毒属(例如，尼帕病毒)、布尼亚病毒科(例如，汉坦病毒或裂谷热病毒)、黄病毒科(例如，日本脑炎病毒和黄热病病毒)和球孢子菌属种。

[0055] 可以作为分析物或分析物的部分进行检测的表位通常是抗原上能够特异性地被免疫球蛋白(或其抗原结合片段)结合的抗原决定簇位点。表位可由蛋白质的三级折叠来并置的连续的氨基酸或者非连续的氨基酸两者形成。表位可以在免疫球蛋白的Fab(可变)区域(称为“独特型决定子”)上找到并且包含所述免疫球蛋白的“独特型”。表位和抗原可以是天然存在的或人造产生的。根据表位或抗原的性质，表位或抗原可以从例如来源的基质或物质中分离或纯化，合成或重组产生。可用作分析物的表位和抗原可以来自人或非人动物、植物、细菌、原生动物、寄生虫、病毒等。在一些实施方式中，分析物是多肽、核酸分子、碳水化合物、糖蛋白、脂质、脂蛋白、糖脂或小分子。在一些实施方式中，分析物选自癌抗原、自身抗原、过敏原、内源性抗原、传染因子抗原、药物(小分子)抗原、毒素、毒液、生物抗原、环境抗原、移植抗原和植入抗原。

[0056] 分析物可以包含癌抗原的表位。在一些实施方式中，分析物是肿瘤相关抗原。在一些实施方式中，分析物是肿瘤特异性抗原。在本发明的一些实施方式中，分析物是肿瘤相关抗原(TAA)，并且TAA是具有不同于野生型蛋白质的一种或多种翻译后修饰的碳水化合物抗原，其包含由存在于恶性细胞中但不存在于非恶性细胞中的基因融合产生的蛋白质的融合区域，和/或其中TAA包含由于受体酪氨酸激酶(RTK)基因或蛋白质中自分泌激活、染色体易位、RTK过表达或功能获得性突变而在肿瘤细胞中去调节和/或功能失调的受体酪氨酸激酶(RTK)。在本发明的一些实施方式中，分析物是由B细胞恶性肿瘤表达的免疫球蛋白。B细胞恶性肿瘤的实例包括但不限于非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、慢性淋巴细胞白血病、套细胞淋巴瘤和多发性骨髓瘤。另外的B细胞恶性肿瘤包括例如B细胞幼淋巴细胞白血病、淋巴浆细胞白血病、脾边缘区淋巴瘤、边缘区淋巴瘤(结外淋巴结和淋巴结)、浆细胞肿瘤(如浆

细胞性骨髓瘤、浆细胞瘤、单克隆免疫球蛋白沉积疾病、重链疾病)和滤泡性淋巴瘤(例如, I、II、III或IV级)。

[0057] 在一些实施方式中,分析物是衍生自从受试者获得的肿瘤细胞的肿瘤相关抗原。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原是选自以下的一种或多种抗原:17-1A、707-AP、AFP、膜联蛋白II、ART-4、BAGE、BAGE-1、 β -连环蛋白、BCG、bcr/abl、Bcr/abl e14a2融合连接、bcr-abl (b3a2)、bcr-abl (b3a2)、bcr-abl p190 (e1a2)、bcr-abl p210 (b2a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、bcr-abl p210 (b3a2)、大疱性类天疱疮抗原-1、CA19-9、CA125、CA215、CAG-3、CAMEL、睾丸癌抗原、Caspase-8、CCL3、CCL4、CD16、CD20、CD3、CD30、CD55、CD63、CDC27、CDK-4、CDR3、CEA、聚簇5、聚簇-5A、细胞周期蛋白依赖性激酶-4、Cyp-B、DAM-10、DAM-6、Decalcin、E7、EGFR、EGFRvIII、EGP40、ELF2M、EpCAM、FucGM1、G250、GA733、GAGE、GAGE-1-8、胃泌素癌相关抗原、GD2、GD3、globoH、血型糖蛋白、GM1、GM2、GM3、GnTV、Gn-TV、gp100、Her-2/neu、HERV-K-ME、高分子量相关抗原、高分子量蛋白聚糖(HMPG)、HPV-16E6、HPV-16E7、HPVE6、HSP70-2M、HST-2、hTERT、人绒毛膜促性腺激素(HCG)、人乳脂肪球(HMFG)、iCE、KIAA0205、KK-LC-1、KM-HN-1、L6、LAGE-1、Lcose4Cer、LDLR/FUT、Lewis A、Lewis v/b、M蛋白、MAGE-1、MVC、MAGE-A1-12、MAGE-C2、MAHGE-3、MART-1/Melan-A、MC1R、ME491、MUC1、MUC2、粘蛋白、MUM-1、MUM-2、MUM-3、突变的p53、肌球蛋白、MZ2-E、N9神经氨酸酶、NA88、NA88-A、鼻咽癌抗原、NGA、NK1/c-3、具有ABL外显子4的新型bcr/abl融合BCR外显子1、13、14、NY-ESO-1/LAGE-2、NY-ESO-1b、OC125、骨肉瘤相关抗原-1、P15、p190mimor bcr-abl (e1a2)、p53、Pm1/RARa、多聚唾液酸、PRAME、PSA、PSM、RU1、RU2、SAGE、SART-1、SART-2、SART-3、Sialyl LeA、Sp17、SSX-2、SSX-4、表面免疫球蛋白、TAG-1、TAG-2、TEL/AML1、TPI、TRAG-3、TRP-1 (gp75)、TRP-2、TRP2-INT2、hTRT、肿瘤相关糖蛋白-72 (TAG-72)、酪氨酸酶、u-PA、WT1和XAGE-1b、或任何前述抗原的免疫原性片段。在一些实施方式中,通过SEREX(重组cDNA表达文库的血清学分析)方法或基于从各种来源的肿瘤组织或癌细胞系产生的cDNA表达文库的血清学筛选鉴定肿瘤相关抗原,并且基于它们与自体患者血清的反应性鉴定免疫原性肿瘤蛋白。在一些实施方式中,分析物是肿瘤相关抗原,其是具有不同于野生型蛋白质的一种或多种翻译后修饰的碳水化合物抗原。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原包含由存在于恶性细胞中但不存在于非恶性细胞中的由基因融合产生的蛋白质的融合区域。在一些实施方式中,肿瘤相关抗原包含由于受体酪氨酸激酶(RTK)基因或蛋白质中自分泌激活、染色体易位、RTK过表达或功能获得性突变而在肿瘤细胞中去调节和/或功能失调的受体酪氨酸激酶(RTK)。

[0058] 分析物可以包括感染性或非感染性试剂的抗原的表位,所述感染性或非感染性试剂可以对受试者具有病原性或非病原性。分析物可以衍生自于互生、寄生或共生微生物,包括动物或植物生物群系中的任何微生物,例如人消化道、粘膜表面或上皮组织中的益生菌或共生微生物。在一些实施方式中,细菌病原体选自鲍氏不动杆菌(以前称为醋酸钙不动杆菌);放线杆菌;化脓放线菌(以前称为化脓棒状杆菌);衣氏放线菌;星状诺卡菌、巴西诺卡菌;嗜水气单胞菌;自养无枝酸菌;溶血隐秘杆菌(以前称为溶血棒状杆菌);欣肖亚利桑那菌——所有血清型;炭疽杆菌;脆弱拟杆菌;汉赛巴尔通体、五日热巴尔通体、文森巴尔通体;博德特氏菌、包括百日咳博德特氏菌;回归热疏螺旋体、伯氏疏螺旋体;伯克霍尔德菌(以前称为假单胞菌种)除BSL III中列出的那些);大肠弯曲杆菌、胎儿弯曲杆菌、空肠弯曲

杆菌;鸚鵡热衣原体、砂眼衣原体、肺炎衣原体;肉毒梭状芽孢杆菌(产生神经毒素的物种)、肉毒梭状芽孢杆菌神经毒素、鸣疽梭状芽孢杆菌、溶血梭状芽孢杆菌、溶组织梭状芽孢杆菌、诺维氏梭状芽孢杆菌、败血梭状芽孢杆菌、破伤风梭状芽孢杆菌、产气荚膜梭状芽孢杆菌ε毒素;白喉棒状杆菌、假结核棒状杆菌、牛肾盂炎棒状杆菌;刚果嗜皮菌;迟钝爱德华菌;猪红斑丹毒丝菌;所有肠致病性、肠毒性、肠侵袭性大肠杆菌和携带K1抗原的菌株,包括大肠杆菌0157:H7;杜克雷嗜血杆菌、流感嗜血杆菌;幽门螺杆菌;克雷伯氏菌——除产酸克雷伯氏菌(RG1)之外的所有种类;军团杆菌,包括嗜肺军团杆菌;问号钩端螺旋体——所有血清型;李斯特氏菌;莫拉克斯氏菌;分支杆菌(除BSL III中列出的那些之外),包括鸟分枝杆菌复合体、亚洲分枝杆菌、牛分枝杆菌BCG疫苗株、龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、麻风分枝杆菌、莫尔门分枝杆菌、海洋、分枝杆菌、副结核分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、猴分枝杆菌、斯氏分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、蟾分枝杆菌;支原体;淋病奈瑟菌,脑膜炎奈瑟菌;星状诺卡菌,巴西诺卡菌,豚鼠耳炎诺卡菌,南非诺卡氏菌;奇异变形杆菌,普通变形杆菌;马红球菌;沙门氏菌,包括亚利桑那沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌、鸡-鸡白痢沙门氏菌、鸡病沙门氏菌、甲型、乙型、丙型副伤寒沙门氏菌、伤寒沙门氏菌、鼠伤寒沙门氏菌;志贺氏菌,包括鲍氏志贺氏菌、痢疾志贺氏菌1型、福氏志贺氏菌、索氏志贺氏菌;坏死厌氧丝杆菌;金黄色葡萄球菌;念珠状链杆菌;链球菌,包括肺炎链球菌、酿脓链球菌;苍白密螺旋体,斑点病密螺旋体;霍乱弧菌,副溶血弧菌,创伤弧菌;小肠结肠炎耶尔森氏菌;巴尔通体;布鲁氏菌,包括流产布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、羊布鲁氏菌;鼻疽伯克霍尔德菌(假单胞菌),类鼻疽伯克霍尔德菌;贝氏柯克斯体;土拉热弗朗西丝菌;牛分枝杆菌(除BCG菌株、BSL II——包括衣原体的细菌剂之外),结核分枝杆菌;非结核的分枝杆菌(MOTT);乙型多杀巴斯德氏菌——“水牛”和其他毒性菌株;小蛛立克次体,澳洲立克次体,加拿大立克次体,康氏立克次体,普氏立克次体,立氏立克次体,西伯利亚立克次体,恙虫病立克次体,伤寒立克次体(莫氏立克次体);鼠疫耶尔森氏菌。

[0059] 分析物可衍生自病毒病原体。例如,在一些实施方式中,分析物衍生自选自以下的病毒病原体:腺病毒;人类病毒——所有类型;甲病毒属(披膜病毒);东部马脑炎病毒;东部马脑脊髓炎病毒;委内瑞拉马脑脊髓炎疫苗株TC-83;西部马脑脊髓炎病毒;沙粒病毒;淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(非嗜神经株);塔卡里伯病毒复合体;布尼亚病毒;布尼奥罗病毒;裂谷热病毒疫苗株MP-12;卡里西病毒;冠状病毒;黄病毒(披膜病毒)——B群虫媒病毒;登革热病毒血清型1、2、3和4;黄热病病毒疫苗株17D;甲型、乙型、丙型、丁型和戊型肝炎病毒;巨细胞病毒;埃巴二氏病毒;1型和2型单纯疱疹病毒,带状疱疹病毒;6型和7型人类疱疹病毒;A型、B型和C型流感病毒;乳多空病毒;乳头瘤病毒;新城疫病毒;麻疹病毒;腮腺炎病毒;1型、2型、3型和4型副流感病毒;多瘤病毒(JC病毒、BK病毒);呼吸道合胞体病毒;人类细小病毒(B 19);A型和B型柯萨奇病毒;埃可病毒;脊髓灰质炎病毒;鼻病毒;类天花病毒(轻型天花病毒);天花病毒(重型天花病毒);乳白痘呼肠孤病毒;科罗拉多壁虱热病毒;人类轮状病毒和环状病毒(科罗拉多壁虱热病毒);狂犬病病毒;水泡性口炎病毒;风疹病毒(风疹);塞姆利基森林病毒;圣路易斯脑炎病毒;委内瑞拉马脑炎病毒;委内瑞拉马脑脊髓炎病毒;沙粒病毒(又名南美出血热病毒);Flexal病毒;淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCM)(嗜神经株);汉坦病毒属,包括汉坦病毒;裂谷热病毒;日本脑炎病毒;黄热病病毒;猴痘病毒;1型和2型人类免疫缺陷病毒(HIV);1型和2型人类嗜T淋巴细胞病毒(HTLV);猴免疫缺损病毒

(SIV)；水泡性口炎病毒；瓜纳里托病毒；拉沙热病毒；胡宁病毒；马丘波病毒；沙比亚病毒；克里米亚-刚果出血热病毒；埃博拉病毒；马尔堡病毒；蜱传脑炎病毒复合体(黄病毒)，包括中欧蜱传脑炎、远东蜱传脑炎、汉扎洛瓦、Hypr、Kumlinge、科萨努尔森林病、鄂木斯克出血热和俄罗斯春夏型脑炎病毒；猴疱疹病毒(疱疹B病毒或猴B病毒)；猕猴疱疹病毒1型(疱疹B病毒)；马麻疹病毒(亨德拉病毒和亨德拉样病毒)；尼帕病毒；重型天花病毒(天花病毒)；轻型天花病毒(类天花病毒)；非洲猪瘟病毒；非洲马瘟病毒；赤羽病病毒；禽流感病毒(高致病性)；蓝舌病毒；骆驼痘病毒；猪瘟病毒；反刍类考德里氏体(心水病)；口蹄疫病毒；山羊痘病毒；日本脑炎病毒；结节性皮肤病病毒；恶性卡他热病毒；梅南高病毒；新城疫病毒(VVND)；小反刍兽疫病毒；牛瘟病毒；绵羊痘病毒；猪水泡病病毒；水泡性口炎病毒(外来)。

[0060] 分析物可衍生自寄生虫。例如，在一些实施方式中，分析物衍生自选自以下的寄生虫：人体钩口线虫，包括十二指肠钩口线虫、锡兰钩口线虫；蛔虫，包括人蛔虫、猪蛔虫；巴贝虫，包括分歧巴贝虫、田鼠巴贝虫；布鲁格丝虫，包括马来丝虫、帝纹丝虫；球虫；隐孢子虫，包括小隐孢子虫；猪囊尾蚴(棘球蚴、猪带绦虫的幼虫)；棘球绦虫，包括细粒棘球绦虫、多房棘球绦虫、和伏氏棘球绦虫；溶组织内阿米巴；蛲虫；片吸虫，包括巨片吸虫、肝片吸虫；贾第虫，包括兰伯氏贾第虫；异形吸虫；膜壳绦虫，包括缩小膜壳绦虫、微小膜壳绦虫；等孢球虫；利什曼原虫，包括巴西利什曼原虫、杜氏利什曼原虫、埃塞俄比亚利什曼原虫、硕大利什曼原虫、墨西哥利什曼原虫、秘鲁利什曼原虫、热带利什曼原虫；罗阿罗阿线虫；微孢子虫；福氏耐格里阿米巴；人体板口线虫，包括美洲板口线虫；盘尾丝虫，包括旋盘尾丝虫；食蟹猴疟原虫、恶性疟原虫、三日疟原虫、卵形疟原虫、间日疟原虫；肉孢子虫，包括猪人肉孢子虫；血吸虫，包括埃及血吸虫、间插血吸虫、日本血吸虫、曼氏血吸虫、湄公血吸虫；类圆线虫，包括粪类圆线虫；猪带绦虫；弓蛔虫，包括犬弓蛔虫；弓浆虫，包括刚地弓形虫；旋毛形线虫；锥虫，包括布氏布氏锥虫、布氏冈比亚锥虫、布氏罗得西亚锥虫、克氏锥虫；或者班氏丝虫。

[0061] 分析物可以是真菌病原体。例如，在一些实施方式中，分析物衍生自选自以下的真菌病原体：烟曲霉、皮炎芽生菌、斑替枝孢霉、白假丝酵母菌、毛样(木丝霉)枝孢霉、新型隐球菌、奔马指霉(奔马赭霉)、表皮癣菌属、皮炎(王氏霉)外瓶霉、裴氏着色霉、小孢子菌、巴西副球孢子菌、马尔尼菲青霉菌、卡氏肺孢菌、申克孢子丝菌、毛癣菌属、粗球孢子菌、*Coccidioides posadasii*、荚膜组织胞浆菌、荚膜组织胞浆菌杜波氏变种。

[0062] 分析物可以是毒素。在一些实施方式中，分析物是选自以下项的毒素：相思豆毒素、肉毒杆菌神经毒素、产气荚膜梭状芽孢杆菌 ϵ 毒素、芋螺毒素、蛇形菌素、蓖麻毒素、蛤蚌毒素、志贺样核糖体失活蛋白、志贺毒素、葡萄球菌肠毒素、T-2毒素和河豚毒素。

[0063] 在一些实施方式中，分析物是选自乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、伯氏疏螺旋体OspA、HPV L1、RSV F蛋白、流感血凝素、流感茎环区、流感M2、恶性疟原虫裂殖子表面蛋白1-10、GLURP、SERA、S-抗原、6-半胱氨酸家族、AMA1、EBA175、140、181、MTRAP、PTRAMP、ASP、Rh1、2a、2b、4、5、RAP1、2、3、RAMA、RHOPH1、2、3、间日疟原虫环子孢子蛋白、子孢子表面蛋白2、SSP2/TRAP、CSP-N、CSP-R、CSP-C、MSP-1、MSP-9、DBPRIII、AMA-1、Pvs25、Pvs28、金黄色葡萄球菌荚膜多糖、聚-N-乙酰葡萄糖胺、HIV gp120、gp41以及登革热病毒保守区。

[0064] 在另一个实施方式中，分析物包含过敏原的至少一个表位。过敏原可以是自然存在的或人工的(例如过敏症疫苗中所含有的过敏原)。过敏原的实例包括但不限于：动物产品(例如，Fel d 1、毛皮皮屑、蟑螂萁、羊毛、尘螨排泄物)、药物(例如，青霉素、磺酰胺类、水

杨酸盐、局部麻醉剂)、食物(例如,芹菜和块根芹、玉米、蛋(例如,白蛋白)、水果、豆类(例如,菜豆、豌豆、花生、黄豆)、乳、海鲜(例如,贝类)、芝麻、大豆、木本坚果(例如,山核桃、杏仁)、小麦、昆虫毒液(例如,火蚁、蜜蜂螫针毒液、黄蜂螫针毒液)、乳胶、金属、植物花粉(例如,草(例如,黑麦草、梯牧草、杂草(例如,豚草、车前、荨麻、艾草、藜、酸模)和树木(例如,桦树、桤木、榛树、角树、七叶树、柳树、杨树、法国梧桐、椴树、洋橄榄、阿什杜松)。

[0065] 在一些实施方式中,分析物是衍生自乳胶蛋白的过敏原,例如未加工的乳胶树液、含有氨的生乳胶或其中蛋白质已经暴露于化学品和高温的乳胶成品。在一些实施方式中,过敏原是螨虫的过敏原,例如粉尘螨、屋尘螨、粗脚粉螨、热带无爪螨、拱殖嗜渣螨、埋内欧尘螨(*Euroglyphus cannei*)、害嗜鳞螨、腐食酪螨或家甜食螨。在一些实施方式中,过敏原来自毒液,例如熊蜂属种、黄边胡蜂、意蜂、长黄胡蜂属种、马蜂属种、黄胡蜂属种、斑长黄胡蜂或长黄胡蜂。在一些实施方式中,分析物是来自昆虫的过敏原,例如宾夕法尼亚弓背蚁、红火蚁、黑火蚁、美洲大蠊、德国小蠊、东方蠊、虻属种、家蝇、蜉蝣属种、蚊属种或蛾属种。

[0066] 在一些实施方式中,过敏原分析物是来自生物的上皮、皮屑或毛发,例如金丝雀、猫(家猫)、家牛、红原鸡(家鸡)、家犬、绿头鸭、长爪沙鼠、家山羊、家鹅、豚鼠(荷兰猪)、叙利亚仓鼠、野猪、家马、小家鼠、鸚鵡科、斑尾鸽、穴兔、褐家鼠或家绵羊。

[0067] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自真菌,例如:顶头孢霉、细交链孢霉、灰绿曲霉、黄曲霉、烟曲霉、构巢曲霉、黑曲霉、土曲霉、杂色曲霉、出芽短梗霉(出芽茁霉)、麦根腐德氏霉、麦根腐长蠕孢霉、灰葡萄孢霉、白假丝酵母菌、球毛壳霉、腊叶芽枝霉、枝孢属(*Cladosporium sphaerospermum*) (着色真菌(*Homodendrum hordei*))、特别德氏霉(穗状孢霉)、黑附球菌(紫附球菌)、絮状表皮癣菌、串珠镰刀菌、腐皮镰刀菌、白地霉、绿粘帚霉、茄长蠕孢、犬小孢子菌、卷枝毛霉原变型、卷枝毛霉拉斯坦变种、密丛毛霉、菌盖疣孢霉、间型脉孢菌、稻黑孢菌、宛氏拟青霉、短密青霉、沙门柏干酪青霉、产黄青霉、指状青霉、扩展青霉、点青霉、萎地青霉、甜菜茎点霉、草茎点霉、稻根霉、匍枝根霉、胶红酵母、酿酒酵母、短帚霉、泪菌、真菌禾长蠕孢菌、匍柄霉、茄匍柄霉、哈茨木霉、须毛癣菌、红色毛癣菌或粉红单端孢霉。在一些实施方式中,过敏原来自黑粉菌,例如大麦散黑粉菌、狗牙根黑粉菌、*Ustilago candidis*、高粱散孢堆黑粉菌、燕麦散黑粉菌或小麦散黑粉菌。

[0068] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自草,例如百喜草、狗牙根、加拿大早熟禾、无芒雀麦、鹼草、*Zea cans*、偃麦草(匍匐冰草)、石茅、草地早熟禾、草甸羊茅(牛尾草)、燕麦、鸭茅、巨序剪股颖(小糠草)、黑麦、巨型滨麦草(披碱草属)、多花黑麦草、多年生黑麦草、黄花茅、猫尾草、绒毛草、普通小麦或史密斯披碱草(冰草属)。

[0069] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自杂草,例如多果滨藜、香根菊、沙漠扫帚、美国海墨菊、绿穗苋、苍耳(耳(*commune*))、皱叶酸模、泽兰属泥炭藓(*Eupathium capillifolium*)、一枝黄花属、糙果苋(*Acnida tamariscina*)、*Allenrolfea occidentalis*、香藜、地肤、藜、假苍耳、*Iva angustifolia*、土荆芥、北艾、银叶艾、大荨麻、刺苋、长叶车前、小花假苍耳(*Iva axillaris*)、大滨藜(*Atriplex lentiformis*)、豚草属铁杉(*Ambrosia dumosa*)、刺果豚草(*Ambrosia acanthicarpa*)、三裂叶豚草、普通豚草、密花豚草、牛膝豚草(*Ambrosia bidentata*)、裸穗猪草、钾猪毛菜(*pestifer*)、加州蒿、冷蒿、三齿蒿、瑞氏滨藜(*Atriplex wrightii*)、密叶滨藜或黄花蒿。

[0070] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自树木,例如:相思树属种、普通赤杨、美国赤

杨、斑点桤木(*Alnus incana* ssp.*rugosa*)、菱叶桤木、绒毛白蜡、美国红栲、俄勒冈白蜡、美国白蜡、美洲山杨、蜡杨梅、国山毛榉(美洲山毛榉)、木麻黄、山桦、垂枝桦、河桦、水桦(红色桦树)、灰桦(*Betula populifolia*)、栲叶槭、日本柳杉、阿希刺柏(*Juniperus ashei* (*sabinoides*))、北美圆柏、红花多枝怪柳、毛果香脂杨、美洲黑杨、弗里氏杨、*Populus wislizeni*、美洲黑杨念珠杨(*Populus monilifera*) (*sargentii*)、绿干柏、落羽杉、地中海柏木、美国榆、硬叶榆(*Ulmus crassifolia*)、垂枝榆、蓝桉、美洲朴、美洲榛、欧榛、鳞皮山核桃、糙皮山核桃、*Carya alba*、樱桃圆柏、*Juniperus princhtotii*、落矾山圆柏、北美西部圆柏、刺槐、芒果、大叶枫、美国红枫、糖枫、五脉白千层(白千层)、腺牧豆树(柔黄花牧豆树)、构树、红桑、白桑、甘氏栎(*Quercus gambelii*)、美洲黑栎、大果栎、加州黑栎、海岸栎、加州白栎、冬青栎、星毛栎、北美红栎、加州丛栎、弗吉尼亚栎、黑栎、奥里根白栎、白栎、油橄榄、沙枣、甜橙、皇后葵(*Cocos plumosa*)、长山核桃、秘鲁胡椒木、巴西胡椒木、火炬松、北美乔松、长叶松、西黄松、湿地松、矮松、西部白松、萌芽松、黑杨、银白杨、欧洲女贞、北美枫香、一球悬铃木、三球悬铃木、加利福尼亚悬铃木、二球悬铃木、黑胡桃、加州胡桃、普通胡桃、黄柳(*Salix lasiolepis*)、黑柳或褪色柳。在一些实施方式中,过敏原来自花,例如法兰西菊、西洋蒲公英或向日葵。在一些实施方式中,过敏原来自农场植物,例如紫花苜蓿、蓖麻、红三叶草、芸苔属种或甜菜。

[0071] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自植物性食物(可食用的植物),例如扁桃、苹果、杏、香蕉(大蕉)、大麦、棉豆、菜豆、菜豆属种、菜豆属种、菜豆、黑莓、越橘属种、花椰菜、荞麦、甘蓝、可可、甜瓜、野胡萝卜、花椰菜、甜芹(*Apium graveolens* var.*dulce*)、李属种、锡兰肉桂、小果咖啡、*Zea mays*、蔓越莓、黄瓜、大蒜、姜、葡萄属种、葡萄柚、蛇麻、柠檬、莴苣、蘑菇、芸苔属种、肉豆蔻、燕麦、油橄榄、分蘖洋葱(*Allium cepa* var.*cepa*)、甜橙、豇豆、豌豆、桃、西洋梨、黑胡椒、灯笼椒(*Capsicum annuum* var.*annuum*)、菠萝、番薯、马铃薯、华北覆盆子(*Rubus idaeus* var.*idaeus*)、水稻、黑麦、芝麻(胡麻)、大豆、菠菜、密生西葫芦(*Cucurbita pepo* var.*meloepo*)、智利草莓、普通番茄(番茄)、芜菁(*Brassica rapa* var.*rapa*)、香荚兰、野生西瓜种质(*Citrullus lanatus* var.*lanatus*)或普通小麦。

[0072] 在一些实施方式中,过敏原分析物来自鱼类或贝类,例如黑鲈属种、斑点叉尾鲷、硬壳蛤、大西洋鳕、蓝蟹、川鲈属种、庸鲈属种、美洲螯龙虾、大西洋鲑鱼、美洲牡蛎、海平鲑、大西洋鲑、鲱形目、海扇贝、对虾属种、红点鲑属种或金枪鱼属种。在一些实施方式中,过敏原是动物性食物产品,例如来自家牛、家绵羊或野猪。在一些实施方式中,过敏原是家禽产品,例如鸡(红原鸡)产品或火鸡(普通火鸡)产品。在一些实施方式中,过敏原来自乳制品,例如牛酪蛋白或牛乳。在一些实施方式中,过敏原是坚果,例如巴西坚果、腰果、椰子、美洲榛、花生、美国山核桃、黑胡桃或普通胡桃。在一些实施方式中,过敏原是粉尘,例如大麦谷物粉尘、玉米谷物粉尘、房屋粉尘、床垫粉尘、燕麦谷物粉尘、小麦谷物粉尘、室内装潢粉尘或乳胶粉尘。

[0073] 在一些实施方式中,抗原分析物是与自身免疫性病症相关联的自身抗原。在一些实施方式中,自身免疫性病症是细胞或器官特异性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:乙酰胆碱受体(重症肌无力)、肌动蛋白(慢性活动性肝炎、原发性胆汁性肝硬化)、嘌呤核苷酸转运体(ANT)(扩张性心肌病、心肌炎)、 β -肾上腺素受体(扩张程度的心肌病)、芳香族L-氨基酸脱羧酶(I型自身免疫性多内分泌腺病综合症(APS-1))、去唾液酸糖蛋白受体

(自身免疫性肝炎)、杀菌/增加渗透性的蛋白(Bpi)(囊性纤维化血管炎)、钙敏感受体(获得性甲状旁腺功能减退)、胆固醇侧链裂解酶(CYPIIa)(APS-1)、IV型胶原 α 3-链(肺出血肾炎综合症)、细胞色素P450 2D6(CYP2D6)(自身免疫性肝炎)、肌间线蛋白(克隆氏病、冠状动脉疾病)、桥粒芯蛋白1(落叶型天疱疮)、桥粒芯蛋白3(寻常型天疱疮)、F-肌动蛋白(自身免疫性肝炎)、GM神经节苷脂(格-巴二氏综合症)、谷氨酸脱羧酶(GAD65)(1型糖尿病、僵人综合症)、谷氨酸受体(GLUR)(拉斯穆森脑炎)、H/K ATP酶(自身免疫性胃炎)、17- α -羟化酶(CYP17)(APS-1)、21-羟化酶(CYP21)(艾迪生氏病)、IA-2(ICA512)(1型糖尿病)、胰岛素(1型糖尿病、胰岛素低血糖综合症(Hirata病)、B型胰岛素抵抗、棘皮症、系统性红斑狼疮(SLE))、1型内在因子(恶性贫血症)、白细胞功能相关抗原(LFA-1)(抗治疗性莱姆关节炎)、髓鞘相关糖蛋白(MAG)(多发性神经病)、髓鞘碱性蛋白(多发性硬化症、脱髓鞘疾病)、髓鞘少突胶质细胞糖蛋白(MOG)(多发性硬化症)、肌球蛋白(风湿热)、p-80-螺旋蛋白(特应性皮炎)、丙酮酸脱氢酶复合体-E2(PDC E2)(原发性胆汁性肝硬化)、钠碘同向转运体(NIS)(格雷夫斯病、自身免疫性甲状腺功能减退症)、SOX-10(白癜风)、甲状腺和眼肌共享蛋白(自身免疫性甲状腺炎)、甲状腺过氧化物酶(自身免疫性桥本甲状腺炎)、促甲状腺素受体(格雷夫斯病)、组织型转谷氨酰胺酶(乳糜泻)、转录共激活剂p75(特应性皮炎)、色氨酸羟化酶(APS-1)、酪氨酸酶(白癜风、转移性黑素瘤)以及酪氨酸羟化酶(APS-1),其中在每种自身抗原分析物之后立即附带地列出相关的自身免疫性病症。

[0074] 在一些实施方式中,自身免疫性病症是系统性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:ACTH(ACTH缺陷)、氨酰基-tRNA组氨酰合成酶(肌炎、皮炎)、氨酰基-tRNA合成酶(多发性肌炎、皮炎)、心磷脂(SLE)、碳酸酐酶II(SLE、干燥综合症、系统性硬化症)、胶原(类风湿性关节炎(RA)、SLE、进行性系统性硬化症)、着丝粒相关蛋白(系统性硬化症)、DNA依赖性核小体刺激性ATP酶(皮炎)、纤维蛋白(硬皮病)、纤连蛋白(SLE、RA、硬斑病)、葡萄糖-6-磷酸异构酶(RA)、 β 2-糖蛋白I(β 2-GPI)(原发性抗磷脂综合症)、高尔基体蛋白(95、97、160和/或180)(干燥综合症、SLE、RA)、热休克蛋白(各种免疫相关病症)、半桥粒蛋白180(大疱性类天疱疮、妊娠疱疹、瘢痕性类天疱疮)、组蛋白H2A-H2B-DNA(SLE)、IgE受体(慢性特发性荨麻疹)、角蛋白(RA)、Ku-DNA-蛋白激酶(SLE)、Ku-核蛋白(结缔组织综合症)、La磷蛋白(La 55-B)(干燥综合症)、髓过氧化物酶(坏死性和新月体性肾小球肾炎(NCGN)、系统血管炎)、蛋白酶3(PR3)(韦格纳肉芽肿病、变应性肉芽肿性血管炎)、RNA聚合酶I-III(RNP)(系统性硬化症、SLE)、信号识别蛋白(SRP54)(多发性肌炎)、拓扑异构酶-1(Sc1-70)(硬皮病、雷诺综合症)、微管蛋白(慢性肝病、内脏利什曼病)以及波形蛋白(系统性自身免疫性疾病),其中在每种自身抗原之后立即附带地列出相关的自身免疫性病症。

[0075] 在一些实施方式中,自身免疫性病症是血浆蛋白自身免疫性病症或细胞因子自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:C1抑制剂(自身免疫性C1缺陷)、C1q(SLE、膜增生性肾小球肾炎(MPGN))、细胞因子(例如,IL-1 α 、IL-1 β 、IL-、IL-10、LIF)(RA、系统性硬化症)、凝血因子II(延长凝血时间)、凝血因子V(延长凝血时间)、凝血因子VII(延长凝血时间)、凝血因子VIII(延长凝血时间)、凝血因子IX(延长凝血时间)、凝血因子X(延长凝血时间)、凝血因子XI(延长凝血时间)、凝血因子XII(延长凝血时间)、凝血酶(延长凝血时间)、vWF(延长凝血时间)、糖蛋白IIb/IIIg和Ib/IX(自身免疫性血小板减少性紫癜)、IgA(免疫缺陷)以及氧化型LDL(OxLDL)(动脉粥样硬化),其中在每种自身抗原分析物之后立即附带地列出相

关的自身免疫性病症。

[0076] 在一些实施方式中,自身免疫性病症是癌症或副肿瘤性自身免疫性病症,并且自身抗原分析物选自:两性蛋白(神经病、小细胞肺癌)、细胞周期蛋白B 1(肝细胞癌)、DNA拓扑异构酶II(肝癌)、桥粒斑蛋白(副肿瘤性天疱疮)、桥尾蛋白(副肿瘤性僵人综合症)、Hu蛋白(副肿瘤性脑脊髓炎)、神经元烟碱型乙酰胆碱受(亚急性自主神经病、癌症)、p53(癌症、SLE)、p62(IGF-II mRNA-结合蛋白)(肝细胞癌)、恢复蛋白(癌症相关的视网膜病)、R1蛋白(副肿瘤性眼阵挛肌阵挛性共济失调)、 β IV血影蛋白(下运动神经元综合症)、突触结合蛋白(朗伯-伊顿肌无力症候群)、电压门控钙通道(朗伯-伊顿肌无力症候群)和Yo蛋白(副肿瘤性小脑变性)。

[0077] 在一些实施方式中,抗原分析物是内源性抗原,其为异常表达的多肽。这样的内源性抗原的实例包括但不限于: β 淀粉样蛋白(A- β 或A. β)、 α 突触核蛋白、半胱氨酸蛋白酶抑制剂C、tau、ABri、ADan、超氧化物歧化酶(SOD)、突变亨廷顿蛋白、PrP. sup. sc或任何前述蛋白质的片段。

[0078] 在本发明的一些实施方式中,分析物包括待引入到受试者中的植入物的至少一个表位、植入材料的代谢或降解产物或者特异性结合到植入材料的表位的物质,例如开发成植入材料或其降解产物的抗体。这样的植入物可包括例如电动植入物(例如,人工起搏器)、生物植入物(通过外科手术植入受试者体内以替代受损组织(例如,矫形重建假体)的生物材料、心脏假体(人工瓣膜)、皮肤和角膜)、避孕植入物、牙齿植入物、矫形植入物和粘附防止装置。可携带表位的植入材料的实例包括:乳胶;硅树脂;金属,例如钴铬(Co—Cr)合金、钛和钛合金;聚合物,例如超高分子量聚乙烯(UHMWPE)和聚甲基丙烯酸甲酯粘固剂(PMMA);以及生物陶瓷,例如羟基磷灰石和生物玻璃。

[0079] 在某些实施方式中,非抗体结合元件可以是细菌的结合蛋白或抗体结合结构域。预先确定的分析物可选自有益的肠细菌、致病细菌、蛋白质毒素、蛋白质生物标志物、小分子毒素、代谢物或化学战剂。对于这样的分析物,在一些实施方式中,修改测试方法为竞争性形式,其中小分子分析物与蛋白质或其他大分子载体连接,使得抗游离分析物的抗体也识别固定的分析物(如果没有抗体可用,它们可以通过用固定的分析物免疫动物而产生)。固定的分析物将聚集结合至抗分析物抗体并产生发光信号的细胞受体。如果固定的分析物与不会导致聚集的待测量的游离分析物混合,则发光信号将减少。激活剂可以是受体,并且非抗体结合元件可以是对受体特异的配体,并且当与受体结合时导致受体的构象变化(而不是聚集),其中配体只有在它与预先确定的分析物结合后才适于结合受体。配体可以与检测器融合,其中检测器的运转防止配体与受体结合,除非配体首先已经结合至预先确定的分析物。激活剂也可以是经过工程化以结合预先确定的分析物的受体,其中受体在结合预先确定的分析物后发生构象变化。同样,这一变体不依赖于聚集效果。然而,在其他实施方式中,聚集事件可由载体分子介导,例如血清白蛋白,其结合靶标的多个拷贝,例如生理或药物代谢物。

[0080] 示例生物传感器I

[0081] 如前所述,参考图1a-b,根据本发明示例性实施方式的第一生物传感器100包括Jurkat T细胞102,其已经被工程化以产生水母发光蛋白104并且已经用CTZ 106充电以形成水母发光蛋白/CTZ复合物。这种特定的生物传感器也已经被工程化以表达跨膜非抗体信

号转导元件108,其是IgGbp-CD3 ζ (SEQ ID NO:5-6),尽管跨膜非抗体信号转导元件的Fc γ RI-CD3 ζ (SEQ ID NO:11-12)也可以与生物传感器100一起使用。生物传感器细胞102还包括至少一个信号转导通路110,对其的激活导致细胞内Ca²⁺112增加。如图1b所示,当靶分析物116(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检测器分子114(例如,可溶性抗体)结合至跨膜非抗体信号转导元件108时,信号转导通路110被激活,细胞内Ca²⁺112增加,水母发光蛋白/CTZ复合物发生构象变化并发出光的信号(光子)118,其由光电倍增管120检测,信号峰(spike)122以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示待测样品中靶分析物116的存在。关于靶分析物116,显示可以是定性和定量两者。

[0082] 示例生物传感器II

[0083] 如前所述,参考图2a-b,根据本发明的示例性实施方式的第二生物传感器200包括MC/9(ATCC®CRL-8306™)肥大细胞202,其已经被工程化以产生水母发光蛋白204并且已经用CTZ 106充电以形成水母发光蛋白/CTZ复合物。这种特定的生物传感器也已经被工程化以表达结合至可溶性非抗体信号转导元件208的天然Fc ϵ 受体(即Fc ϵ RI)207,其是IgGbp-IgE (SEQ ID NOS:13-14),尽管非抗体转导元件Fc γ RI-IgE (SEQ ID NO:15-16)也可以与生物传感器200一起使用。如图2b所示,当靶分析物216(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检测器分子214(例如,可溶性抗体)结合至之前已经结合至天然Fc ϵ 受体207的非抗体信号转导元件208时,信号转导通路210被激活,细胞内Ca²⁺212增加,水母发光蛋白/CTZ复合物发生构象变化并发出光的信号(光子)218,其由光电倍增管220检测,信号峰222以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示待测样品中靶分析物216的存在。关于靶分析物216,显示可以是定性和定量两者。

[0084] 示例生物传感器III

[0085] 如前所述,参考图3a-b,根据本发明的示例性实施方式的第三生物传感器300包括MC/9(ATCC®CRL-8306™)肥大细胞302,其已经被工程化以产生水母发光蛋白304并且已经用CTZ 306充电以形成水母发光蛋白/CTZ复合物。这种特定的生物传感器表达结合至非抗体信号转导元件308的天然Fc ϵ 受体(即Fc ϵ RI)307,其是IgGbp-IgE (SEQ ID NO:13-14),尽管非抗体信号转导元件Fc γ RI-IgE (SEQ ID NO:15-16)也可以与生物传感器300一起使用。在这个特定实施方式中,生物传感器细胞302已被进一步工程化以表达IgGbp-IgE并将这种非抗体信号转导元件分泌到细胞外空间中,其中所述信号转导元件结合至细胞表面上表达的天然Fc ϵ RI。如图3b所示,当靶分析物316(例如,大肠杆菌0157)所结合的足够数量的检测器分子314(例如,可溶性抗体)结合至之前已经结合至天然Fc ϵ 受体307的非抗体信号转导元件308时,信号转导通路310被激活,细胞内Ca²⁺312增加,水母发光蛋白/CTZ复合物发生构象变化并发出光的信号(光子)318,其由光电倍增管320检测,信号峰322以图形方式显示在测试装置上(参见下文描述),指示待测样品中靶分析物316的存在。关于靶分析物316,显示可以是定性和定量两者。

[0086] 示例生物传感器IV

[0087] 参考图4,根据本发明的示例性实施方式的第四生物传感器400包括生物传感器细胞402,其已经被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件408,其是mSA-CD3 ζ (SEQ ID NO:17-18)。非抗体信号转导元件mSA-CD3 ζ (单体型链霉亲和素CD3 ζ)结合至生物素化的检测器分子414,其特异性地结合至靶分子416,例如,表皮生长因子(EGF)。

如前所述,抗靶分子抗体417(例如,抗EGF)产生聚集多个信号转导元件并诱导信号转导的靶多聚体。在其他实施方式中,单体型链霉亲和素组分被生物素化组分替代,并且可以使用替代的连接方式。

[0088] 示例生物传感器V

[0089] 参考图5,根据本发明的示例性实施方式的第五生物传感器500包括生物传感器细胞502,其已经被工程化以产生水母发光蛋白并且表达跨膜非抗体信号转导元件508,其是mSA-CD3 ζ (SEQ ID NO:17-18)。非抗体信号转导元件mSA-CD3 ζ (单体型链霉亲和素CD3 ζ)结合至生物素化的检测器分子514,其在一些实施方式中是自身抗原分子。生物素化的检测器分子514特异性结合至靶分子516,其在一些实施方式中是抗自身抗原分子。如前所述,血清样品中的自身抗体产生聚集多个信号转导元件并诱导信号转导的靶多聚体。在其他实施方式中,单体型链霉亲和素组分被生物素化组分替代,并且可以使用替代的连接方式。

[0090] 用于产生本发明的嵌合蛋白的信号转导多肽的氨基酸序列可与由以下登录号鉴别或以下登录号中的蛋白质或结构域具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列同一性或相似性: IgM重链(GenBank: CAC20458.1)、Ig- α (P11912.2, GI: 547896)、Ig- β (P40259.1, GI: 728994)、CD19(AAA69966.1, GI: 901823)、CD3 ζ (P20963.2, GI: 23830999)、IgE α (1F2Q_A, GI: 9257150)和Fc- ϵ 1亚基 α (P12319.1, GI: 119865)。

[0091] 金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)蛋白A(P02976.3, GI: 110283003)由金黄色葡萄球菌的spa基因编码,它的结构(包括其Ig结合片段)和免疫球蛋白结合特性是公知的并通过引用Graille,等,Proc Natl Acad Sci US A.2000May 9;97(10):5399-404;和Roben,等J Immunol.1995Jun 15;154(12):6437-45并入。蛋白A或其免疫球蛋白结合区段的变体与已知的蛋白A氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列同一性或相似性,并且具有结合至免疫球蛋白或其他分析物的能力,例如Graille,等和Roben,等中描述的那些可以通过本领域公知的分子生物学技术产生,包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0092] 其他细菌的免疫球蛋白结合蛋白,例如链球菌(*Streptococcus*)蛋白G和这样的蛋白的工程化变体,是已知的并且通过引用Bailey,等,J Immunol Methods.2014Dec 15;415:24-30(doi:10.1016/j.jim.2014.10.003)(Epub 2014年10月22日);和Watanabe,等,J Biol Chem.2009May 1;284(18):12373-8(doi:10.1074/jbc.M809236200)(Epub 2009年3月6日)并入。蛋白G或其免疫球蛋白结合区段的变体与已知的蛋白G氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列同一性或相似性,并且具有结合至免疫球蛋白或其他分析物的能力,例如Bailey等和Watanabe等中描述的那些可以通过本领域公知的分子生物学技术产生,包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0093] Fc受体(FcR)结合至免疫球蛋白的Fc部分,并且许多类型的这样的Fc受体是已知的,包括Fc γ RI和Fc ϵ RI。这些FcR的结构和功能结合特征通过引用Fridman,FASEB J.1991Sep;5(12):2684-90并入。FcR或其免疫球蛋白结合区段的变体与已知的FcR氨基酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、8.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列同一性或相似性。例如Fridman中描述的序列可以通过本领域公知的分子生物学技术产生,

包括通过直接合成编码免疫球蛋白结合氨基酸序列的核酸。

[0094] 根据本发明的信号转导蛋白可与所公开的由SEQ ID NO:2、4、6、8、10、12、14、16和18描述的嵌合信号转导蛋白具有至少70%、75%、80%、85%、87.5%、90%、92.5%、95%、97.5%、98%、99%的序列同一性或相似性,并且还具具有结合至分析物(例如免疫球蛋白)然后将信号转导进入工程生物传感器细胞中的能力。这样的变体可以通过分子生物学中公知的方法构建,或是通过化学合成编码变体嵌合报告蛋白的多核苷酸、将编码序列插入载体和用载体转化或转染感受态细胞来构建。

[0095] 细胞分选和克隆

[0096] 本发明的生物传感器的设计和构建在培养时产生生物传感器细胞的混合群。一些细胞并不表达工程化因子,而其他细胞则在不同水平上表达因子。在成功的电穿孔和基因插入后,培养生物传感器细胞并测试其作为混合群的生物响应(闪光信号)。使用流式细胞仪进行单细胞分选。对细胞进行分离、然后扩增用于分析,以选择表达高水平期望蛋白质的那些。对于这个过程,使用荧光标记的抗体靶向生物传感器细胞上的不同受体,从而实现分选过程。对个体克隆进行信号传导筛选,并且选择最佳克隆。通过这个过程鉴定和分离最合适的克隆。如下所述进行荧光激活细胞分选(FACS)和针对细胞外蛋白的活细胞染色。

[0097] 对工程化生物传感器细胞进行计数,轻轻离心,并且重悬于洗涤缓冲液(HBSS+2% BSA)中至最终浓度为 1×10^7 - 1×10^8 个细胞/mL。在每个实验中,使用具有Fc区的完整抗体或F(ab)₂。当使用完整抗体时,将1-0.5 μ g Fc受体阻断抗体添加到待接收细胞的每个空的12x15mm管中。在Fc阻断抗体的顶部,将100 μ L细胞(1×10^6 至 1×10^7 个细胞)添加到这些管中的每个中。将细胞轻轻混合并在4 $^{\circ}$ C或室温下孵育15分钟。当使用F(ab)₂时,省略了先前的阻断Fc的步骤。添加总共1 μ g的一抗(针对选择的受体),然后将细胞轻轻混合,之后在冰上(或在4 $^{\circ}$ C下)孵育20-40分钟。这个温度阻止受体内化。将细胞间歇地轻轻搅拌(涡旋)以促进标记。添加2mL体积的冷洗涤缓冲液,然后将细胞在4 $^{\circ}$ C下离心并且弃去上清液。在将细胞重悬于100 μ L洗涤/分选缓冲液中之前重复洗涤步骤。向细胞中添加FITC标记的二抗(0.5-1 μ g)并混合,之后在冰上(或在4 $^{\circ}$ C下)孵育20-40分钟。在整个过程期间,保护细胞免受光照。添加2mL体积的冷洗涤缓冲液,然后将细胞离心并且弃去上清液。重复洗涤步骤,并且将细胞重悬于0.5-1mL洗涤缓冲液中。将细胞在冰上孵育直到分选的时间。尽快进行分选(至少在同一天)。如下所述进行单细胞分选后的细胞克隆和培养。

[0098] 将生物传感器细胞分选到96孔板中,其中每个孔含有一个细胞和100-200 μ L细胞生长培养基。在接下来的10至14天内对板进行扫描/监测,以确定生长速率并判断何时转移到24孔板。在扫描期间,不同的标记用于不同的条件。如果一些孔含有活细胞但是还没有准备好转移,则对其进行标记,并且对污染的孔也进行标记。将细胞转移到每个孔中含有1.0mL适当培养基的24孔板中。在细胞污染的情况下,通过将来自孔的所有细胞悬浮液添加到15mL锥形管中的5mL无菌1x PBS中来洗涤。然后将细胞在170RCF下离心10分钟并且弃去上清液。将沉淀物重悬于24孔板中的1.0mL新鲜培养基中待培养。在继续生长后,将细胞转移到每孔具有1.5mL新鲜培养基的12孔板中。

[0099] 对于克隆筛选,在12孔板中生长之后,对细胞进行计数,以确定它们是否准备好进行充电和闪光测试。在闪光测试期间,单次迭代涉及25,000个细胞。使足够的细胞生长以适应测试,并且还留一些继续生长。这个步骤标志着第一轮克隆筛选。使所选择的克隆进一步

生长并根据期望的特性经受后续的测试。对于生物响应,例如,使用抗CD3 ϵ 抗体(阳性对照)和针对细菌的单克隆抗体与相应细菌筛选Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 克隆,而洋地黄皂苷用于化学响应测试。使用抗Fc ϵ RI抗体(生物响应)和洋地黄皂苷(化学响应)筛选MC/9-Aeq克隆。

[0100] 总之,使用荧光抗体标记进行荧光激活细胞分选(FACS),以选择和分离高度表达期望蛋白质(在这种情况下所述蛋白质是工程化受体)的细胞。这个过程产生高度表达的生物传感器细胞群,其通过使用测试装置中的PMT的闪光测试进一步确认。在整个过程期间,使用自动细胞计数器对细胞进行计数,以消除人为误差并增强一致性和效率。当用抗大肠杆菌0111mAb和大肠杆菌0111细菌测试时,Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 的不同克隆产生不同水平的生物响应。以相同的方式对许多克隆进行测试,并且将最高响应者保存在克隆库中。同样,获自使用化学品洋地黄皂苷测试不同MC/9-Aeq克隆的化学响应结果表明,不同的克隆根据水母发光蛋白表达的水平产生不同水平的化学响应。将具有最高信号的克隆保存在克隆库中。

[0101] 培养生物传感器细胞

[0102] 不同的培养基配方用于不同的细胞系,以确保最佳生长条件。将MC/9肥大细胞培养于肥大细胞完全培养基(DMEM-Sigma,目录号D5796;1x青霉素/链霉素;10%FBS;10%T-Stim补充剂;50 μ M β -巯基乙醇)中。将Jurkat T细胞培养于完全RPMI培养基(RPMI-ThermoFisher;10%FBS;1x青霉素/链霉素)中。根据电穿孔的构建体的特征,不同的抗生素用于细胞培养中的选择。在电穿孔后2-3天向生长培养基中添加适当的抗生素,以选择已经成功整合线性化DNA构建体的细胞。为了最佳细胞生长,将细胞浓度保持在4.0x 10⁵与1.0x 10⁶个细胞/mL之间。为了长期储存,对不同的细胞系和克隆进行加工,并且将库存如下冻存在液氮中:(i)将细胞在150RCF下离心10分钟并且弃去上清液;(ii)将细胞沉淀物以5.0x 10⁵个细胞/mL的浓度重悬于冻存培养基(RPMI;50%FBS;10%DMSO)中;并且(iii)将1mL的体积等分到2mL Nunc Cryo小瓶中,并且在-80 $^{\circ}$ C下冻存24小时,之后转移到液氮中长期储存。

[0103] 对生物传感器细胞充电

[0104] 将本发明的生物传感器细胞在50mL锥形管中在150RCF下离心10分钟。弃去上清液,并且将沉淀物以25,000个细胞/180 μ L的浓度重悬于充电培养基(RPMI;10%抗体耗尽的FBS;1x青霉素/链霉素;0.1%Pluronic F68和1.5mM腔肠素)中。另外,细胞还于不同的浓度进行充电,例如100,000个细胞/180 μ L和400,000个细胞/180 μ L。在室温下轻轻振荡/摇动24-26小时,对细胞进行充电。在使用之前,可使用其他抗体耗尽系统进一步纯化可商购获得的抗体耗尽的FBS。

[0105] 浓缩细胞

[0106] 证实本发明的生物传感器细胞在较低浓度而非较高浓度下被更有效地充电。例如,与400,000个细胞/180 μ L相比,以25,000个细胞/180 μ L的密度对细胞进行充电显示导致可检测信号增加两倍。将Jurkat-Fc γ RI-CD3 ζ 克隆P5G7细胞以400,000个细胞/180 μ L和25,000个细胞/180 μ L两者进行充电,然后在每个反应中以400,000个细胞/180 μ L进行测试。过夜大肠杆菌0111细菌培养物与23nM抗大肠杆菌0111mAb一起使用。以较低浓度进行充电的生物传感器细胞对于相同数量的测试细菌细胞产生更高的信号。生物传感器细胞密度主要通过充电之后对细胞进行浓缩来改变,以允许最佳病原体检测。当检测器分子是可溶性

抗体时,根据靶病原体和抗体品质使用不同浓度进行病原体检测。通过在150RCF下离心10分钟来对生物传感器细胞进行浓缩,并且将细胞沉淀物重悬于期望体积的测试培养基中。充电培养基也可充当测试培养基。在某些情况下,由于正常FBS中的抗体浓度高,向培养基中添加正常FBS触发生物响应,从而产生生物传感器信号(闪光)。因此,在充电过程中使用可商购获得的抗体耗尽的FBS,其在不完全消除抗体的情况下降低抗体触发的信号。使用另外的方法来进一步耗尽可商购获得的抗体耗尽的FBS中的痕量抗体。

[0107] 生物测定

[0108] 在本发明的示例性实施方式中,用生物传感器细胞和对分析物(例如,病原体)特异的可溶性单克隆抗体(mAb)对分析物生物测定进行格式化。在这些实施方式中,生物测定的特异性与可溶性抗体选择性结合到靶分析物直接相关,并且通过生物发光的检测和测量来确定生物传感器的特异性和灵敏度。在这种方法中,首先使用发光分子即腔肠素(CTZ)对生物传感器细胞进行充电。然后添加选择的可溶性抗体和分析的样品。如果靶病原体存在于样品中,则它与结合到由生物传感器细胞表达的融合蛋白的可溶性抗体相互作用,从而最终触发导致从生物传感器细胞发出光的信号级联。所发出的光由测试装置中的光电倍增管(PMT)检测,并且由生物传感器细胞发出的信号显示为每秒的光子计数。如下所述,已经开发基于可溶性抗体和靶病原体检测病原体的各种方法。下文所详细描述三种这样的方法包括:(i)即时添加检测器分子(例如,抗体);(ii)用检测器分子(例如,抗体)包被生物传感器细胞;以及(iii)用抗体包被分析物(例如,细菌)。

[0109] 测试单元

[0110] 本文的本发明生物测定方面可在设计用于与台式或便携式测试系统和装置一起使用的测试子单元或测试盒中进行,例如美国专利申请号13/711,296(美国专利号9,023,640)中所公开的,所述美国专利的全部内容通过引用并入本文。可以是单次使用的一次性物品的测试盒接收样品和生物传感器两者,并且以可预测和受控的方式将生物传感器引入到测试盒中混合样品和生物传感器。测试盒还包括用于接收测试样品和生物传感器的反应室,其中反应室具有预先确定的内部几何结构,并且出于改善总体信噪比的目的,已经进一步适于最小化或消除背景噪音。至少一个稳定器可位于反应室中,以在混合过程期间最小化对测试样品和生物传感器的剪切力损伤。

[0111] 在示例性实施方式中,测试盒内的反应室和通向反应室的流体通道被设计来实现若干目的。用于流体进入反应室的入口通道包括管状形状,并且管的直径相对较小并且在反应室的入口处逐渐变细而变得更小。这增加流体进入反应室的速度,并且由于反应室内的试剂的牵连运动而促进更剧烈和均匀的混合。期望将试剂和样品以分子扩散以外的促进混合的方式混合,以便通过确保存在于样品中的任何传染因子快速碰撞生物传感器来最小化测试的持续时间。入口通道可从反应室的中心轴线偏移,以在混合流体时促进试剂围绕测试室的中心轴线顺时针或逆时针旋转运动,以便增加混合物的均匀性。入口通道还大致与反应室的内部表面相切以允许进入的流体从入口通道行进到反应室,同时与反应室的侧表面保持接触,这允许湍流流动最小以及引入到混合流体中的气泡最少。由于气泡在由试剂发出的光在行进穿过混合试剂内或混合试剂表面上的气泡时引起不可预测的光折射,所以气泡是不期望的。入口通道的轴线可在水平面上方成角度(例如,约30度),以向进入的流体流提供部分向下的方向,以便确保试剂与驻留于反应室底部处的流体混合。可替代地,可

通过以下方式将试剂引入到测试室：使用替代的流体输送装置（例如竖直通道），以将试剂输送到反应室的底部；或者将流体直接输送到测试室的中心轴线上，以便产生流入测试室中的试剂柱，从而通过夹带促进混合。

[0112] 反应室的形状（即，预先确定的几何结构）可以是有利于混合流体围绕反应室的中心轴线顺时针或逆时针运动的旋转剖面。可替代地，如果期望，可使用除例如矩形或不规则形状的旋转剖面之外的反应室形状。在一个实施方式中，用于形成反应室的旋转剖面是椭圆的一部分，以有利于收集由试剂发出的杂散光并将这种光朝向检测器的表面反射，所述检测器可以是光电倍增管（PMT）（Hamamatsu）。反应室的表面可以是反射性的，以便增强椭圆形的光收集特性。在一些实施方式中，对PMT表面的最大直径进行限制，以实现系统的输出的最大信噪比。反应室的直径可被设计来大致匹配PMT的直径，所述直径影响在被设计来容纳特定体积的流体的反应室中可实现的椭圆形。在受约束的椭圆形的情况下，由于当不会以另外的方式直接反射到PMT表面的光被白色表面部分地漫射并且这种漫射的一小部分朝向PMT表面引导时发生的另外光收集，反应室表面颜色可以是部分漫射的白色。可替代地，如果期望，可使用其他表面抛光和材料，例如近镜面抛光铝或透明材料。此外，为了防止从反应室本身发出的光遮蔽从试剂发出的任何光并妨碍检测，期望反应室材料是最低磷光性的。虽然已经发现例如丙烯腈丁二烯苯乙烯的白色聚合物材料或其他此类聚合物材料表现出低水平的磷光，但是已经发现由光反射和漫射的组合提供的另外光收集对光感测电路输出的信噪比有利。

[0113] 在示例性实施方式中，测试子单元提供用于样品分析中的系统。系统包括：生物传感器试剂，其中生物传感器试剂包括活的生物细胞；储液卡，其具有长环部分和短环部分，其中储液卡储存生物传感器试剂；以及测试盒底座，其中测试盒底座被配置来接受储液卡。测试盒底座还包括：(i) 具有中心轴线的反应室，其中反应室的形状为旋转半椭圆；以及(ii) 连接到反应室的入口通道，其中入口通道以水平面上方15-60度的角度定位于反应室上方，其中入口通道从反应室的中心轴线偏移，并且其中在通过入口通道将待分析样品引入到测试盒底座中后，样品与生物传感器试剂均匀混合，同时最小化对活的生物细胞的损伤。

[0114] 在另一个示例性实施方式中，测试子单元提供用于快速检测生物样品中分析物的存在的系统。这种系统包括生物传感器试剂，其包括对预先确定的分析物和生物发光剂特异的至少一种抗体，其中至少一种抗体在活的工程化淋巴细胞的表面上表达，并且其中生物发光剂由活的工程化淋巴细胞表达，生物传感器试剂被操作以：(i) 检测待测试样品中特异性分析物的存在；以及(ii) 当生物传感器试剂与样品反应并检测样品中特异性分析物的存在时，发出可检测的光信号。还包括测试盒。测试盒还包括：(i) 储液卡，其中储液卡还包括生物传感器试剂；以及(ii) 测试盒底座，其中测试盒底座被配置来接受储液卡。测试盒底座还包括：a) 具有中心轴线的反应室，其中反应室的形状为旋转半椭圆；b) 连接到反应室的入口通道，其中入口通道以水平面上方15-60度的角度定位于反应室上方，并且其中入口通道从反应室的中心轴线偏移；以及c) 其中在通过入口通道将样品引入到测试盒底座中后，样品与生物传感器试剂均匀混合，同时最小化对活的工程化淋巴细胞的损伤并且最小化反应室中混合的生物传感器试剂和样品的任何鼓泡。还包括适于接收测试盒的测试单元。测试单元包括用于检测生物传感器试剂在与样品反应时发出的可检测光信号的传感器，检测

发出的可检测光信号指示样品中分析物的存在,并且其中样品中的特异性分析物的检测实时发生。

[0115] 示例生物测定1:即时添加抗体

[0116] 在本发明的生物测定的示例性实施方式中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将生物传感器细胞引入到测试样品之前将可溶性抗体和待测试的样品立即混合在一起。在这个实施方式中,带电的生物传感器细胞在充电培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于单个反应)。然后将180 μ L(约400,000个细胞)等分试样的带电的生物传感器细胞加载到储液卡的长环部分中。对于阳性对照,将在RPMI培养基中的30 μ L抗CD3 ϵ 抗体加载到储液卡的短环部分中。然后将储液卡锁定到测试盒底座中。将2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),例如抗大肠杆菌O111(其中靶病原体是大肠杆菌O111),与28 μ L待测试样品在盒混合室中混合。将测试盒底座插入测试装置中,并且将带电的生物传感器细胞注入到反应室中以引发反应。记录所得的信号持续4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷(Digitonin)而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预先确定的病原体进行阴性对照测试。

[0117] 示例生物测定2:用抗体包被生物传感器细胞

[0118] 在本发明的生物测定的另一个示例性实施方式中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将待测试样品与生物传感器细胞混合之前,将生物传感器细胞用可溶性抗体包被一段时间。在这个实施方式中,将带电的生物传感器细胞在充电培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于一个反应)。然后将180 μ L(约400,000个细胞)等分试样的生物传感器细胞与2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),例如抗大肠杆菌O111(其中靶病原体是大肠杆菌O111),在Eppendorf管中混合。将与抗体混合的生物传感器细胞在室温下孵育10分钟,然后加载到储液卡的长环部分中。对于阳性对照,将在RPMI培养基中的30 μ L抗CD3 ϵ 抗体加载到储液卡的短环部分中。然后将储液卡锁定到测试盒底座中。将30 μ L体积的待测试样品添加到反应室中。将测试盒底座插入测试装置中,并且将生物传感器细胞注入到混合室中以引发反应。记录所得的信号持续4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预先确定的病原体进行阴性对照测试。

[0119] 示例生物测定3:用抗体包被分析物

[0120] 在本发明的生物测定的另一个示例性实施方式中,其中检测器分子是可溶性抗体,在将待测试样品与生物传感器混合之前,将分析物(例如,致病性细菌)用可溶性抗体包被一段时间。在这个实施方式中,将带电的生物传感器细胞在充电培养基中离心并浓缩至约400,000个细胞/180 μ L(适合于一个反应)。将180 μ L(约400,000个细胞)等分试样的生物传感器细胞加载到储液卡的长环部分中。对于阳性对照,将在RPMI培养基中的30 μ L抗CD3 ϵ 抗体加载到储液卡的短环部分中。然后将储液卡锁定到盒底座中。将2 μ L体积的针对靶病原体的抗体(在0.5mg/mL下),例如抗大肠杆菌O111(其中靶病原体是大肠杆菌O111),与28 μ L待测试样品在Eppendorf管中混合。将样品在室温下孵育10分钟,然后添加到盒混合室中。将盒插入PMT中,并且将生物传感器细胞注入到混合室中以引发反应。记录所得的信号持续

4至8分钟,并且在测试周期结束时,将30 μ L抗CD3 ϵ 抗体从储液器的短环注入到反应室中作为阳性对照反应,对其进行记录持续2分钟。作为替代阳性对照,可使用30 μ L的0.61mM洋地黄皂苷而非抗CD3 ϵ 抗体。可使用对所使用的抗体没有特异性的预先确定的病原体进行阴性对照测试。

[0121] 本文所述的示例性生物测定可包括降低背景噪音和增强信号的其他添加物。使用抗CD3 ϵ 抗体作为阳性对照,系统已经被证实在50,000个不带电的生物传感器细胞的混合物中检测到少于10个带电的生物传感器细胞。生物传感器本身已经被证实在30 μ L的样品中检测到230个细菌CFU。在上述生物测定中,针对大肠杆菌O111细菌的专有单克隆抗体(1F11)用于检测大肠杆菌O111细菌,其中大肠杆菌O157用作阴性对照。证实大肠杆菌O157产生阴性结果,从而证明系统的特异性。多种可商购获得的抗体也可与所描述的生物测定一起使用。关于专有单克隆抗体(1F11),如下所述实现抗体分析和单克隆抗体的选择。

[0122] 通过在96孔多孔板中进行的ELISA确定抗体产生。每个孔用不同的LPS(大肠杆菌O157、大肠杆菌O127、大肠杆菌O111、大肠杆菌O26、肺炎克雷伯氏菌、肠道沙门氏菌和未处理(*naïve*)血清)或细菌细胞(大肠杆菌O157、大肠杆菌O111、大肠杆菌26和大肠杆菌DH5 α)包被。将来自mAb O157或mAb O111的不同克隆的杂交瘤上清液添加到孔中。辣根过氧化物酶缀合(HRP)的山羊抗小鼠IgG用于检测(附录III.A.3)。大肠杆菌O157的两种杂交瘤克隆(1B10和6G1)唯一地识别大肠杆菌O157的LPS和大肠杆菌O157。大肠杆菌O111的九种杂交瘤克隆特异性地识别大肠杆菌O111的LPS和大肠杆菌O111。选择来自最高光密度(OD)读数的克隆进行验证,其如下所述来实现。

[0123] 收集杂交瘤细胞沉淀物,并在RNA提取之前储存于-80 $^{\circ}$ C下。将提取的RNA用作用于逆转录为cDNA的模板,随后进行巢式PCR扩增。将所有阳性PCR产物克隆到TA克隆载体中并送去进行测序。在分析序列之后确定轻链和重链的可变区。重组表达O157(1B10)的四种单链抗体(scFv)(由FSC产生的定制mAb)和ATCC HB 10452以及由FSC产生的O111的两种单链抗体(1F11和1F2),并且通过固定化金属离子亲和色谱法(IMAC)纯化。scFv的序列按以下顺序进行构建:pe1 B分泌信号+氨基酸丙氨酸+组氨酸标签+氨基酸甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸+TEV切割位点+氨基酸甘氨酸-丝氨酸-丝氨酸-甘氨酸+重链可变区+接头区丝氨酸-丙氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸-丙氨酸-赖氨酸-赖氨酸-天冬氨酸-天冬氨酸+轻链可变区。使用包被有O157或O111的LPS的多孔板测试纯化的scFv。

[0124] 本研究的目的是调查单克隆抗体(mAb)与全细菌细胞(大肠杆菌O157或大肠杆菌O111)的相互作用,并估计抗体-细菌相互作用的动力学常数(KD)。在这些测定中,使用山羊抗大肠杆菌O157多克隆抗体、山羊抗大肠杆菌O111多克隆抗体、针对大肠杆菌O157的三种单克隆抗体(1022、1024和1061)以及针对大肠杆菌O111的一种单克隆抗体。还使用CM5传感器芯片和胺偶联试剂盒。所有测定均在Biacore X100仪器上进行。在方案中,将一种多克隆抗体(针对所选择的细菌)固定到CM5传感器芯片上。然后结合选择的细菌,随后在连续缓冲液流中注入针对相同细菌的单克隆抗体。对相互作用进行实时监测。以共振单位(RU)记录抗体与每种细菌的相对结合。大肠杆菌O157特异性抗体(mAb FF754)与大肠杆菌O157和大肠杆菌O111结合的BIAcore分析的结果表明O157mAb对其靶抗原是特异性的。

[0125] Fc受体

[0126] 本发明所使用的受体,例如作为配体或检测器,可包括替代的携带Fc的嵌合受体。本文所述的嵌合受体包含对免疫球蛋白的Fc部分具有结合亲和力和特异性的细胞外结构域(“Fc结合子”)、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域、和包含ITAM的胞质信号传导结构域。所述嵌合受体被配置成使得当其在宿主细胞上表达时,细胞外配体结合结构域位于细胞外以结合靶分子(例如,抗体或Fc-融合蛋白),并且共刺激信号传导结构域和含有ITAM的胞质信号传导结构域位于细胞质中以触发激活和/或效应子的信号传导。在一些实施方式中,如本文所述的嵌合受体构建体从N末端到C末端包含Fc结合子、跨膜结构域、至少一个共刺激信号传导结构域和含有ITAM的胞质信号传导结构域。在其他实施方式中,如本文所述的嵌合受体构建体从N末端到C末端包含Fc结合子、跨膜结构域、含有ITAM的胞质信号传导结构域和至少一个共刺激信号传导结构域。

[0127] 本文所述的任何嵌合受体还可包含铰链结构域,其可以位于Fc结合子的C-末端和跨膜结构域的N末端。可替换地,或另外地,本文描述的嵌合受体构建体可含有两个或更多个共刺激信号传导结构域,其可以相互连接或者由含ITAM的胞质信号传导结构域分离。嵌合受体构建体中的细胞外Fc结合子、跨膜结构域、共刺激信号传导结构域和含有ITAM的胞质信号传导结构域可以直接相互连接,或通过肽接头连接。

[0128] 本文描述的嵌合受体构建体包含其是Fc结合子的细胞外结构域,即能够结合至合适的哺乳动物(例如,人、小鼠、大鼠、山羊、绵羊或猴)的免疫球蛋白(例如,IgG、IgA、IgM,或IgE)的Fc部分。合适的Fc结合子可以衍生自天然存在的蛋白质,例如哺乳动物Fc受体或某些细菌蛋白质(例如蛋白质A、蛋白质G)。此外,Fc结合子可以是合成的多肽,其被特别工程化以高亲和力和特异性结合本文所述的任何Ig分子的Fc部分。例如,这样的Fc结合子可以是特异性结合免疫球蛋白的Fc部分的抗体或其抗原结合片段。实例包括但不限于单链可变片段(scFv)、结构域抗体,或纳米抗体。或者,Fc结合子可以是特异性结合Fc部分的合成肽,例如Kunitz结构域、小的模块化免疫药物(SMIP)、adnectin、avimer、亲合体(affibody)、DARPin或anticalin,其可以通过筛选肽组合文库来鉴定对Fc的结合活性。

[0129] 在一些实施方式中,Fc结合子是哺乳动物Fc受体的细胞外配体结合结构域。如本文所用,“Fc受体”是在许多免疫细胞(包括B细胞、树突细胞、自然杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞和嗜酸性粒细胞)的表面上表达并且显示出对抗体的Fc结构域的结合特异性的细胞表面结合受体。Fc受体通常包含至少2个对抗体的Fc(可结晶片段)部分具有结合特异性的免疫球蛋白(Ig)样结构域。在一些情况下,Fc受体与抗体的Fc部分的结合能够触发抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)效应。用于构建如本文所述的嵌合受体的Fc受体可以是相比于野生型对应物对Fc可以具有增加或降低的亲和力的天然存在的多态性变体(例如,CD16V158变体)。或者,Fc受体可以是野生型对应物的功能变体,其携带改变对Ig分子的Fc部分的结合亲和力的一个或更多个突变(例如,多达10个氨基酸残基替换)。在一些情况下,所述突变可以改变Fc受体的糖基化模式,从而改变对Fc的结合亲和力。

[0130] 下表中列出了Fc受体细胞外结构域的一些示例性多态性(参见,例如Kim等, *J.Mol.Evol.* 53:1-9, 2001):

[0131] 表1

[0132]

Fc 受体中的示例性多态性										
氨基酸编号	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (FcαεI)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V

[0133] Fc受体基于其所能够结合的抗体的同种型进行分类。例如,FC-γ受体(FcγR)通常结合至IgG抗体,例如其一种或多种亚型(即,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4);Fc-α受体(FcαR)通常结合至IgA抗体;和Fcε受体(FcεR)通常结合至IgE抗体。在一些实施方式中,Fc受体是Fcγ受体、Fcα受体或Fcε受体。Fcγ受体的实例包括但不限于CD64A、CD64B、CD64C、CD32A、CD32B、CD16A和CD16B。Fcα受体的一个实例是的FcαR1/CD89。Fcε受体的实例包括但不限于FcεRI和FcεRII/CD23。下表中列出了用于构建本文所述的嵌合受体的示例性Fc受体及其对相应Fc结构域的结合活性:

[0134] 表2

[0135]

示例性 Fc 受体		
受体名称	主要抗体配体	对配体的亲和力
FcγRI (CD64)	IgG1 和 IgG3	高 (Kd~10 ⁻⁹ M)
FcγRIIA (CD32)	IgG	低 (Kd > 10 ⁻⁷ M)
FcγRIIB1 (CD32)	IgG	低 (Kd > 10 ⁻⁷ M)
FcγRIIB2 (CD32)	IgG	低 (Kd > 10 ⁻⁷ M)
FcγRIIIA (CD16a)	IgG	低 (Kd > 10 ⁻⁶ M)
FcγRIIIB (CD16b)	IgG	低 (Kd > 10 ⁻⁶ M)
FcεRI	IgE	高 (Kd~10 ⁻¹⁰ M)
FcεRII (CD23)	IgE	低 (Kd > 10 ⁻⁷ M)
FcαRI (CD89)	IgA	低 (Kd > 10 ⁻⁶ M)
Fcα/μR	IgA 和 IgM	对 IgM 高, 对 IgA 中等
FcRn	IgG	

[0136] 用于在本文所述的嵌合受体中使用的Fc受体的配体结合结构域的选择对本领域技术人员将是显而易见。例如,它可以取决于例如Fc受体期望结合的抗体的同种型和结合相互作用的期望亲和力等因素。在一些实例中,(a)是整合可以调节对Fc的亲合力的天然存

在的多态性的CD16的细胞外配体结合结构域。在一些实例中，(a)是在第158位整合多态性（例如，缬氨酸或苯丙氨酸）的CD16的细胞外配体结合结构域。在一些实施方式中，(a)是在改变其糖基化状态及其对Fc的亲合力的条件下产生的。在一些实施方式中，(a)是CD16的细胞外配体结合结构域，其整合使得整合它的嵌合受体对IgG抗体的子集具有特异性的修饰。例如，可以整合增加或减少亲和力的IgG亚型（例如，IgG1）的突变。

[0137] 在其他的实施方式中，Fc结合子衍生自于能够结合至IgG分子的Fc部分的天然存在的细菌蛋白质。用于构建如本文所述的嵌合受体的Fc结合子可以是全长蛋白质或其功能片段。蛋白质A是最初在细菌金黄色葡萄球菌的细胞壁中发现的42kDa表面蛋白。它由五个结构域组成，每个结构域折叠成三螺旋束，并且能够通过其Fc区以及人VH3家族抗体的Fab区的相互作用来结合IgG。蛋白质G是与哺乳动物IgG的Fab和Fc区结合的在C组和G组链球菌中表达的约60kDa蛋白。虽然天然蛋白质G也结合白蛋白，但重组变体已经被工程化以消除与白蛋白的结合。

[0138] 用于嵌合受体的Fc结合子也可以使用组合生物学或定向进化方法从头产生。从蛋白质支架（例如，衍生自IgG的scFv、衍生自Kunitz型蛋白酶抑制剂的Kunitz结构域、锚蛋白重复、蛋白质A的Z结构域、脂质运载蛋白、纤连蛋白III型结构域、来自Fyn或其他SH3结构域）开始，用于表面上的残基的氨基酸侧链可以被随机替换，以产生大的变体支架文库。通过首先选择结合，然后通过噬菌体、核糖体或细胞展示进行扩增，有可能从大型文库中分离出对靶标如Fc结构域具有亲和力的稀有变体。可以使用选择和扩增的重复轮次来分离那些对靶标具有高亲和力的蛋白质。

[0139] 本文描述的任何Fc结合子可以具有对治疗性抗体的Fc部分的合适的结合亲和力。如本文所用，“结合亲和力”意指表观结合常数或 K_A 。所述 K_A 是解离常数 K_D 的倒数。本文所述的嵌合受体的Fc受体结构域的胞外配体结合结构域可具有对抗体的Fc部分的至少 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10M} 或更低的结合亲和力 K_D 。在一些实施方式中，Fc结合子对抗体、抗体的同种型或其亚型相比于Fc结合子对另一抗体、抗体的同种型或其亚型的结合亲和力具有高结合亲和力。在一些实施方式中，Fc受体的细胞外配体结合结构域相比于Fc受体的细胞外配体结合结构域与另一抗体、抗体的同种型或其亚型对抗体、抗体的同种型或其亚型具有特异性。具有高亲和力结合的Fc γ 受体包括CD64A、CD64B和CD64C。具有低亲和力结合的Fc γ 受体包括CD32A、CD32B、CD16A和CD16B。具有高亲和力结合的Fc ϵ 受体是Fc ϵ RI，具有低亲和力结合的Fc ϵ 受体是Fc ϵ RII/CD23。

[0140] 包含Fc结合子（例如，Fc受体的细胞外配体结合结构域）的Fc受体或嵌合受体的结合亲和力或结合特异性可通过多种方法测定，包括平衡透析、平衡结合、凝胶过滤、ELISA、表面等离子体共振或光谱学。

[0141] 在一些实施方式中，Fc受体的细胞外配体结合结构域包含与天然存在的Fc- γ 受体、Fc α 受体或Fc ϵ 受体的细胞外配体结合结构域的氨基酸序列至少90%（例如，91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%）相同的氨基酸序列。两个氨基酸序列的“百分比同一性”可以使用Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-68,1990、在Karlin和Altschul Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:25873-77,1993中修改的算法确定。这样的算法被整合入Altschul等J.Mol.Biol.215:403-10,1990的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)中。可以用XBLAST程序，得分=50，字长=3进行BLAST蛋白质搜索，以获得与本公开的蛋白质分子

同源的氨基酸序列。当两个序列之间存在缺口时,可以如Altschul等,Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402,1997中所述使用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0142] 本发明的另一个实施方式提供了一种系统,其包括用于使工程化细胞与分析物接触的空间或隔室;包含配体、信号转导通路和报告子的工程化细胞;其中通用检测器元件结合至预先确定的分析物,信号转导通路接收由分析物与配体的结合诱导的第一信号,将第一信号传递给报告子,并且报告子在收到来自信号转导通路的第一信号时发出第二可检测信号;和检测器。

[0143] 本发明的另一个实施方式提供了一种系统,其包括用于使工程化细胞与预先确定的分析物接触的空间或隔室;包含配体和信号转导元件的聚集体的工程化细胞,其组成性地将信号传递至发射光或另一可检测信号的检测器;和检测器;其中预先确定的分析物与配体和信号转导元件的聚集体的结合减弱了信号转导并减弱了报告子的光或其他可检测信号。配体和信号转导元件的聚集体通过粘性接头维持,并且当接头被预先确定的分析物结合时,其维持配体和信号转导元件的聚集体的能力减弱。

[0144] 本发明的另一个实施方式提供了一种系统,其包括用于使工程化细胞与预先确定的分析物接触的空间或隔室;工程化细胞,其包含配体、在结合至预先确定的分析物时传递抑制性信号的信号转导元件,和组成型发出光或另一可检测信号的报告子;检测器;其中预先确定的分析物与通用检测器元件的结合诱导减弱报告子发出的光或其他可检测信号的抑制信号。在这个实施方式中,通用检测器元件可包括基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。ITIM在Staub E,Rosenthal A,Hinzmann B(2004)“Systematic indentification of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs in the human proteome”Cell Signal 16(4):435-456中进一步描述并通过引用并入。

[0145] 虽然已经通过描述其示例性实施方式来对本发明进行阐明,并且虽然已经在一定细节上对实施方式进行描述,但是并不旨在将所附权利要求的范围限定或以任何方式限制于这样的细节。本领域技术人员将很容易想到另外的优势和修改。因此,本发明在其更广泛的方面不限于任何具体细节、代表性装置和方法/或显示和描述的说明性实例。因此,在不脱离申请人的总体发明构思的精神或范围的情况下,可偏离这样的细节。

序列表

	<110> Fundamental Solutions Corporation	
	<120> 用于分析物检测的通用生物传感器系统	
	<130> 0136023-0647057-WO	
	<150> 62/438,068	
	<151> 2016-12-22	
	<150> 15/642,800	
	<151> 2017-07-06	
	<160> 19	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 1929	
[0001]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 嵌合蛋白: BBP-IgM	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(1929)	
	<400> 1	
	atg gtg ctg cag acg caa gtg ttt atc tcc ctg ctg ctc tgg atc agc	48
	Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser	
	1 5 10 15	
	gga gcg tac ggc act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag	96
	Gly Ala Tyr Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys	
	20 25 30	
	ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc	144
	Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val	

	35	40	45	
	ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac			192
	Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr			
	50	55	60	
	gat gac gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att			240
	Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile			
	65	70	75	80
	gac gcg tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc			288
	Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile			
		85	90	95
	aac ggc aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc			336
	Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala			
		100	105	110
	gcc acc gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg			384
	Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val			
		115	120	125
[0002]	gac ggg gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc			432
	Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr			
	130	135	140	
	gag aag ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca			480
	Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr			
	145	150	155	160
	ggt tct get tct ggt tct ggt ggt tca gca tca gca cca act ttg ttt			528
	Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe			
		165	170	175
	cca ctt gtc tca tgt gag aac tcg cca tcg gat acc tcg agc gta gcg			576
	Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala			
		180	185	190
	gtc gga tgt ctc gct caa gac ttt ctt ccg gac agc atc acg ttt tca			624
	Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser			
		195	200	205
	tgg aag tat aag aac aat tcg gat att tcg agc acg cga gga ttt ccc			672
	Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro			

210	215	220	
agc gta ttg aga ggg gga aag tac gcg gca aca agc cag gtg ctg ctc			720
Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu			
225	230	235	240
cca agc aag gat gtg atg cag ggc act gac gag cat gta gta tgc aag			768
Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys			
	245	250	255
gta cag cac ccc aat gga aac aag gaa aag aat gtc cct ctg cct gta			816
Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val			
	260	265	270
att gcc gag ctc cct cct aaa gtg tca gtg ttc gtg ccg ccc aga gat			864
Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp			
	275	280	285
ggg ttc ttt gga aac ccg cga tcg aag tcg aaa ctg atc tgc cag gcc			912
Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala			
	290	295	300
[0003] acg gga ttc agc cct cgg cag att caa gtg tcg tgg ttg cgg gag gga			960
Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly			
305	310	315	320
aaa cag gtg gga tcg ggg gtg acc aca gac cag gtg cag gcg gag gct			1008
Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala			
	325	330	335
aaa gaa agc ggt ccc acc aca tat aag gtc act tcc acc ctt act att			1056
Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile			
	340	345	350
aag gaa tcg gat tgg ttg tca cag tcg atg ttc aca tgt aga gtc gat			1104
Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp			
	355	360	365
cat cgc gga ctc acg ttt caa cag aac gcg tca tca atg tgt gta ccc			1152
His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro			
	370	375	380
gat caa gat acg gcg atc aga gta ttc gcc att ccg cct agc ttc gca			1200
Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala			

385	390	395	400	
tcc att ttt ctc acc aaa agc aca aag ctg aca tgt ctt gtg aca gac				1248
Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp				
	405	410	415	
ctc aca acg tac gat tca gtc aca att tca tgg acc agg cag aat ggg				1296
Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly				
	420	425	430	
gag gcg gta aag acg cac acc aac att tcg gaa agc cat ccc aac gcc				1344
Glu Ala Val Lys Thr His Thr Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala				
	435	440	445	
acg ttt tcg gcg gtc ggg gag gca tcg att tgt gag gac gat tgg aat				1392
Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn				
	450	455	460	
tca ggg gag cgc ttc aca tgc acg gtc act cac acg gat ctc cca tcc				1440
Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser				
	465	470	475	480
[0004]				
ccg ttg aag cag aca atc tcg cga ccc aaa ggt gtc gca ctg cac agg				1488
Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg				
	485	490	495	
ccc gac gtc tac ctc ctg cct cct gcc agg gaa cag ctc aac ctc cgg				1536
Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg				
	500	505	510	
gaa tca gca acg atc acg tgt ctt gta acc ggg ttt tca ccg gct gac				1584
Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp				
	515	520	525	
gtc ttt gtc caa tgg atg cag cgg gga caa ccc ttg tca cca gag aag				1632
Val Phe Val Gln Trp Met Gln Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys				
	530	535	540	
tat gtg aca tca gcg ccc atg ccc gag cca cag gct ccg ggt agg tat				1680
Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr				
	545	550	555	560
ttt gcc cat tcc atc ctc act gtg tcc gag gaa gag tgg aac acc ggc				1728
Phe Ala His Ser Ile Leu Thr Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly				

565	570	575	
gaa acg tac acg tgc gtc gta gca cac gaa gcg ttg ccc aat aga gtg			1776
Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val			
580	585	590	
act gag aga act gta gat aag tcc act gag ggc gaa gta agc gcg gat			1824
Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp			
595	600	605	
gaa gaa ggt ttc gaa aac ttg tgg gct aca gcg agc acg ttt atc gtg			1872
Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val			
610	615	620	
ttg ttc ttg ctt tea ctc ttc tac tcc aca act gta acc ctg ttc aag			1920
Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys			
625	630	635	640
gtc aag tag			1929
Val Lys			

[0005]

<210> 2

<211> 642

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Met Val Leu Gln Thr Gln Val Phe Ile Ser Leu Leu Leu Trp Ile Ser

1

5

10

15

Gly Ala Tyr Gly Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys

20

25

30

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val

35

40

45

	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr
	50					55					60					
	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile
	65				70					75						80
	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile
				85					90						95	
	Asn	Gly	Lys	Thr	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala
			100					105						110		
	Ala	Thr	Ala	Glu	Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val
			115					120						125		
[0006]	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr
	130						135					140				
	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr
	145					150					155					160
	Gly	Ser	Ala	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Thr	Leu	Phe
				165						170					175	
	Pro	Leu	Val	Ser	Cys	Glu	Asn	Ser	Pro	Ser	Asp	Thr	Ser	Ser	Val	Ala
				180					185						190	
	Val	Gly	Cys	Leu	Ala	Gln	Asp	Phe	Leu	Pro	Asp	Ser	Ile	Thr	Phe	Ser
			195					200					205			
	Trp	Lys	Tyr	Lys	Asn	Asn	Ser	Asp	Ile	Ser	Ser	Thr	Arg	Gly	Phe	Pro
	210						215					220				

Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu
 225 230 235 240

Pro Ser Lys Asp Val Met Gln Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys
 245 250 255

Val Gln His Pro Asn Gly Asn Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val
 260 265 270

Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp
 275 280 285

Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala
 290 295 300

[0007] Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly
 305 310 315 320

Lys Gln Val Gly Ser Gly Val Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala
 325 330 335

Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile
 340 345 350

Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp
 355 360 365

His Arg Gly Leu Thr Phe Gln Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro
 370 375 380

Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala
 385 390 395 400

	Ser	Ile	Phe	Leu	Thr	Lys	Ser	Thr	Lys	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Asp	
						405				410					415		
	Leu	Thr	Thr	Tyr	Asp	Ser	Val	Thr	Ile	Ser	Trp	Thr	Arg	Gln	Asn	Gly	
				420					425					430			
	Glu	Ala	Val	Lys	Thr	His	Thr	Asn	Ile	Ser	Glu	Ser	His	Pro	Asn	Ala	
			435					440					445				
	Thr	Phe	Ser	Ala	Val	Gly	Glu	Ala	Ser	Ile	Cys	Glu	Asp	Asp	Trp	Asn	
		450					455					460					
	Ser	Gly	Glu	Arg	Phe	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	His	Thr	Asp	Leu	Pro	Ser	
	465					470					475					480	
[0008]	Pro	Leu	Lys	Gln	Thr	Ile	Ser	Arg	Pro	Lys	Gly	Val	Ala	Leu	His	Arg	
						485				490					495		
	Pro	Asp	Val	Tyr	Leu	Leu	Pro	Pro	Ala	Arg	Glu	Gln	Leu	Asn	Leu	Arg	
			500						505					510			
	Glu	Ser	Ala	Thr	Ile	Thr	Cys	Leu	Val	Thr	Gly	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	
			515					520					525				
	Val	Phe	Val	Gln	Trp	Met	Gln	Arg	Gly	Gln	Pro	Leu	Ser	Pro	Glu	Lys	
		530					535					540					
	Tyr	Val	Thr	Ser	Ala	Pro	Met	Pro	Glu	Pro	Gln	Ala	Pro	Gly	Arg	Tyr	
	545					550					555					560	
	Phe	Ala	His	Ser	Ile	Leu	Thr	Val	Ser	Glu	Glu	Glu	Trp	Asn	Thr	Gly	
						565				570					575		

Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val
 580 585 590

Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp
 595 600 605

Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val
 610 615 620

Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys
 625 630 635 640

Val Lys

- [0009] <210> 3
- <211> 1884
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 嵌合蛋白: BBP-IgAB
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1884)

<400> 3
 atg ccg ggt gga ccc gga gtg ctc cag gca ttg cct gca acc atc ttc 48
 Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
 1 5 10 15

ctg ctg ttc ttg ttg tcc gcc gtc tac ctt gga cct ggt tgc cag gca 96
 Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
 20 25 30

act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg aag ggt gag acc acc 144

	Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr	
	35 40 45	
	act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag gtc ttt aaa cag tat	192
	Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr	
	50 55 60	
	gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc tac gat gac gcc act	240
	Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr	
	65 70 75 80	
	aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att gac gcg tcc gaa	288
	Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu	
	85 90 95	
	ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc aac ggc aag act	336
	Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr	
	100 105 110	
	ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc gcc acc gcc gag	384
	Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu	
	115 120 125	
[0010]		
	aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg gac ggg gag tgg	432
	Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp	
	130 135 140	
	acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag ccc gaa	480
	Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu	
	145 150 155 160	
	gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca ggt tct gct tcg	528
	Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser Ala Ser	
	165 170 175	
	ggc tca gga ctg tgg atg cat aag gtg cct gca tcg ctc atg gtg agc	576
	Gly Ser Gly Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser	
	180 185 190	
	ctg ggc gaa gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac	624
	Leu Gly Glu Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn	
	195 200 205	
	gcg aac gtg acc tgg tgg cgg gtg ctc cat ggc aat tac acc tgg ccg	672

	Ala Asn Val Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro	
	210	215 220
	cct gaa ttt ctc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc	720
	Pro Glu Phe Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile	
	225	230 235 240
	cag aac gtg aat aag tcc cac gga gga atc tac gtc tgc cgc gtg caa	768
	Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln	
	245	250 255
	gag gga aat gag agc tac caa cag tca tgc gga acg tac ctc cgc gtc	816
	Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val	
	260	265 270
	cgg cag cca cca ccg agg ccg ttc ctc gat atg gga gag gga act aag	864
	Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys	
	275	280 285
	aac cgg atc att acc gcc gaa ggc atc atc ctc ctc ttc tgc gcc gtc	912
	Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val	
[0011]	290	295 300
	gtg ccg ggg act ctg ctt ctg ttc cgg aaa agg tgg caa aac gaa aag	960
	Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys	
	305	310 315 320
	ctg ggt ctg gac gct ggg gac gaa tac gag gat gaa aac ttg tac gag	1008
	Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu	
	325	330 335
	ggc ctg aat ctg gac gat tgc tcg atg tat gag gac att agc aga gga	1056
	Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly	
	340	345 350
	ctg cag ggt acc tac caa gac gtg gga agc ctg aac atc ggg gat gtg	1104
	Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val	
	355	360 365
	cag ctc gag aaa cca agg aaa aga aga gct agc gaa gga cgc gga tca	1152
	Gln Leu Glu Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser	
	370	375 380
	ctg ctt act tgc ggc gat gtc gaa gaa aat ccc gga cca atg gcc aga	1200

Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
 565 570 575

ctg ctc ttg gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac 1776
 Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His
 580 585 590

acg tac gaa ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att 1824
 Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
 595 600 605

gtg acc ctc cgg act ggc gaa gtc aag tgg tcc gtg ggt gaa cac cct 1872
 Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
 610 615 620

gga cag gaa tag 1884
 Gly Gln Glu
 625

[0013] <210> 4
 <211> 627
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 4

Met Pro Gly Gly Pro Gly Val Leu Gln Ala Leu Pro Ala Thr Ile Phe
 1 5 10 15

Leu Leu Phe Leu Leu Ser Ala Val Tyr Leu Gly Pro Gly Cys Gln Ala
 20 25 30

Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr
 35 40 45

Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr
 50 55 60

	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr
	65					70					75					80
	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu
					85					90						95
	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Thr	Tyr	Lys	Leu	Val	Ile	Asn	Gly	Lys	Thr
				100						105						110
	Leu	Lys	Gly	Glu	Thr	Thr	Thr	Glu	Ala	Val	Asp	Ala	Ala	Thr	Ala	Glu
			115					120						125		
	Lys	Val	Phe	Lys	Gln	Tyr	Ala	Asn	Asp	Asn	Gly	Val	Asp	Gly	Glu	Trp
	130						135							140		
[0014]	Thr	Tyr	Asp	Asp	Ala	Thr	Lys	Thr	Phe	Thr	Val	Thr	Glu	Lys	Pro	Glu
	145						150						155			160
	Val	Ile	Asp	Ala	Ser	Glu	Leu	Thr	Pro	Ala	Val	Thr	Gly	Ser	Ala	Ser
					165						170					175
	Gly	Ser	Gly	Leu	Trp	Met	His	Lys	Val	Pro	Ala	Ser	Leu	Met	Val	Ser
				180						185						190
	Leu	Gly	Glu	Asp	Ala	His	Phe	Gln	Cys	Pro	His	Asn	Ser	Ser	Asn	Asn
			195							200						205
	Ala	Asn	Val	Thr	Trp	Trp	Arg	Val	Leu	His	Gly	Asn	Tyr	Thr	Trp	Pro
	210							215								220
	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Pro	Gly	Glu	Asp	Pro	Asn	Gly	Thr	Leu	Ile	Ile
	225						230					235				240

Gln Asn Val Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln
 245 250 255

Glu Gly Asn Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val
 260 265 270

Arg Gln Pro Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys
 275 280 285

Asn Arg Ile Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val
 290 295 300

Val Pro Gly Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys
 305 310 315 320

[0015]

Leu Gly Leu Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu
 325 330 335

Gly Leu Asn Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly
 340 345 350

Leu Gln Gly Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val
 355 360 365

Gln Leu Glu Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser
 370 375 380

Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg
 385 390 395 400

Leu Ala Leu Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu
 405 410 415

Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg
 420 425 430

Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro
 435 440 445

Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr
 450 455 460

Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met
 465 470 475 480

Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu
 485 490 495

[0016]

Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe
 500 505 510

Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser
 515 520 525

Glu Val Tyr Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser
 530 535 540

Thr Leu Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile
 545 550 555 560

Met Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
 565 570 575

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His
 580 585 590

Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
 595 600 605

Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
 610 615 620

Gly Gln Glu
 625

<210> 5

<211> 936

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: BBP-CD3Z

[0017]

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(936)

<400> 5

atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg 48

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15

ccg att aca gag gca act tac aag ctg gtg atc aac ggt aaa acc ttg 96

Pro Ile Thr Glu Ala Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu
 20 25 30

aag ggt gag acc acc act gag gca gtc gac gcc gcc act gcc gag aag 144

Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys
 35 40 45

gtc ttt aaa cag tat gcc aat gat aac ggc gtg gac ggc gag tgg acc 192

Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr
 50 55 60

225	230	235	240
Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly			
	245	250	255
Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu			
	260	265	270
Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu			
	275	280	285
Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His			
	290	295	300
Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg			
305	310		

[0021]

<210> 7
 <211> 2340
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 嵌合蛋白: FcgammaR1-IgM

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(2340)

<400> 7
 atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg 48
 Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu
 1 5 10 15
 cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct 96
 Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala
 20 25 30

	gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat	144
	Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn	
	35 40 45	
	gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca	192
	Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr	
	50 55 60	
	caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat	240
	Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr	
	65 70 75 80	
	agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag	288
	Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln	
	85 90 95	
	ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat	336
	Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn	
	100 105 110	
[0022]	gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa	384
	Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu	
	115 120 125	
	ccc ctg gcc ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat	432
	Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn	
	130 135 140	
	gtg gtt ttc tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg	480
	Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser	
	145 150 155 160	
	gag gtc gcc att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac	528
	Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His	
	165 170 175	
	tgc tca ggc acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc	576
	Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile	
	180 185 190	
	acg gtg aaa gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca	624
	Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser	
	195 200 205	

	tct ccc ttc ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat	672
	Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn	
	210 215 220	
	ttg ctc ctg cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg	720
	Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val	
	225 230 235 240	
	ggc agc aag atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata	768
	Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile	
	245 250 255	
	gca agg gcg gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc	816
	Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala	
	260 265 270	
	acg gag gac agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa	864
	Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln	
	275 280 285	
[0023]	gtg ctt ggt ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt	912
	Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly	
	290 295 300	
	ggt tca gca tca gca cca act ttg ttt cca ctt gtc tca tgt gag aac	960
	Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn	
	305 310 315 320	
	tcg cca tcg gat acc tcg agc gta gcg gtc gga tgt ctc gct caa gac	1008
	Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp	
	325 330 335	
	ttt ctt ccg gac agc atc acg ttt tca tgg aag tat aag aac aat tcg	1056
	Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser	
	340 345 350	
	gat att tcg agc acg cga gga ttt ccc agc gta ttg aga ggg gga aag	1104
	Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys	
	355 360 365	
	tac gcg gca aca agc cag gtg ctg ctc cca agc aag gat gtg atg cag	1152
	Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln	
	370 375 380	

	aca att tca tgg acc agg cag aat ggg gag gcg gta aag acg cac acc	1728
	Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr	
	565 570 575	
	aac att tcg gaa agc cat ccc aac gcc acg ttt tcg gcg gtc ggg gag	1776
	Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu	
	580 585 590	
	gca tcg att tgt gag gac gat tgg aat tca ggg gag cgc ttc aca tgc	1824
	Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys	
	595 600 605	
	acg gtc act cac acg gat ctc cca tcc ccg ttg aag cag aca atc tcg	1872
	Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser	
	610 615 620	
	cga ccc aaa ggt gtc gca ctg cac agg ccc gac gtc tac ctc ctg cct	1920
	Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro	
	625 630 635 640	
[0025]	cct gcc agg gaa cag ctc aac ctc cgg gaa tca gca acg atc acg tgt	1968
	Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys	
	645 650 655	
	ctt gta acc ggg ttt tca ccg gct gac gtc ttt gtc caa tgg atg cag	2016
	Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln	
	660 665 670	
	cgg gga caa ccc ttg tca cca gag aag tat gtg aca tca gcg ccc atg	2064
	Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met	
	675 680 685	
	ccc gag cca cag gct ccg ggt agg tat ttt gcc cat tcc atc ctc act	2112
	Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr	
	690 695 700	
	gtg tcc gag gaa gag tgg aac acc ggc gaa acg tac acg tgc gtc gta	2160
	Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val	
	705 710 715 720	
	gca cac gaa gcg ttg ccc aat aga gtg act gag aga act gta gat aag	2208
	Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys	
	725 730 735	

tcc act gag ggc gaa gta agc gcg gat gaa gaa ggt ttc gaa aac ttg 2256
 Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu
 740 745 750

tgg gct aca gcg agc acg ttt atc gtg ttg ttc ttg ctt tca ctc ttc 2304
 Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe
 755 760 765

tac tcc aca act gta acc ctg ttc aag gtc aag tag 2340
 Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys Val Lys
 770 775

<210> 8
 <211> 779
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

[0026]

<400> 8

Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu
 1 5 10 15

Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala
 20 25 30

Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn
 35 40 45

Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr
 50 55 60

Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr
 65 70 75 80

Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala
 260 265 270

Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln
 275 280 285

Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly
 290 295 300

Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn
 305 310 315 320

Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp
 325 330 335

[0028]

Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Phe Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser
 340 345 350

Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys
 355 360 365

Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln
 370 375 380

Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn
 385 390 395 400

Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro Val Ile Ala Glu Leu Pro Pro Lys
 405 410 415

Val Ser Val Phe Val Pro Pro Arg Asp Gly Phe Phe Gly Asn Pro Arg
 420 425 430

Ser Lys Ser Lys Leu Ile Cys Gln Ala Thr Gly Phe Ser Pro Arg Gln
 435 440 445

Ile Gln Val Ser Trp Leu Arg Glu Gly Lys Gln Val Gly Ser Gly Val
 450 455 460

Thr Thr Asp Gln Val Gln Ala Glu Ala Lys Glu Ser Gly Pro Thr Thr
 465 470 475 480

Tyr Lys Val Thr Ser Thr Leu Thr Ile Lys Glu Ser Asp Trp Leu Ser
 485 490 495

Gln Ser Met Phe Thr Cys Arg Val Asp His Arg Gly Leu Thr Phe Gln
 500 505 510

[0029] Gln Asn Ala Ser Ser Met Cys Val Pro Asp Gln Asp Thr Ala Ile Arg
 515 520 525

Val Phe Ala Ile Pro Pro Ser Phe Ala Ser Ile Phe Leu Thr Lys Ser
 530 535 540

Thr Lys Leu Thr Cys Leu Val Thr Asp Leu Thr Thr Tyr Asp Ser Val
 545 550 555 560

Thr Ile Ser Trp Thr Arg Gln Asn Gly Glu Ala Val Lys Thr His Thr
 565 570 575

Asn Ile Ser Glu Ser His Pro Asn Ala Thr Phe Ser Ala Val Gly Glu
 580 585 590

Ala Ser Ile Cys Glu Asp Asp Trp Asn Ser Gly Glu Arg Phe Thr Cys
 595 600 605

Thr Val Thr His Thr Asp Leu Pro Ser Pro Leu Lys Gln Thr Ile Ser
610 615 620

Arg Pro Lys Gly Val Ala Leu His Arg Pro Asp Val Tyr Leu Leu Pro
625 630 635 640

Pro Ala Arg Glu Gln Leu Asn Leu Arg Glu Ser Ala Thr Ile Thr Cys
645 650 655

Leu Val Thr Gly Phe Ser Pro Ala Asp Val Phe Val Gln Trp Met Gln
660 665 670

Arg Gly Gln Pro Leu Ser Pro Glu Lys Tyr Val Thr Ser Ala Pro Met
675 680 685

[0030]

Pro Glu Pro Gln Ala Pro Gly Arg Tyr Phe Ala His Ser Ile Leu Thr
690 695 700

Val Ser Glu Glu Glu Trp Asn Thr Gly Glu Thr Tyr Thr Cys Val Val
705 710 715 720

Ala His Glu Ala Leu Pro Asn Arg Val Thr Glu Arg Thr Val Asp Lys
725 730 735

Ser Thr Glu Gly Glu Val Ser Ala Asp Glu Glu Gly Phe Glu Asn Leu
740 745 750

Trp Ala Thr Ala Ser Thr Phe Ile Val Leu Phe Leu Leu Ser Leu Phe
755 760 765

Tyr Ser Thr Thr Val Thr Leu Phe Lys Val Lys
770 775

	<210> 9	
	<211> 2259	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 嵌合蛋白: FcgammaR1-IgAB	
	<220>	
	<221> CDS	
	<222> (1)..(2259)	
	<400> 9	
	atg att ctt acc agc ttt gga gat gac atg tgg ctt cta aca act ctg	48
	Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu	
	1 5 10 15	
	cta ctt tgg gtt cca gtc ggt ggg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct	96
	Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala	
	20 25 30	
[0031]	gtg atc acc ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat	144
	Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn	
	35 40 45	
	gtc act tta tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca	192
	Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr	
	50 55 60	
	caa tgg ttt atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat	240
	Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr	
	65 70 75 80	
	agc atc cca gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag	288
	Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln	
	85 90 95	
	ata ggt tcc tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat	336
	Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn	
	100 105 110	
	gat tgg ctg cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa	384
	Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu	

	115	120	125	
	ccc ctg gcc ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat			432
	Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn			
	130	135	140	
	gtg gtt ttc tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg			480
	Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser			
	145	150	155	160
	gag gtc gcc att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac			528
	Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His			
	165	170	175	
	tgc tca ggc acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc			576
	Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile			
	180	185	190	
	acg gtg aaa gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca			624
	Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser			
	195	200	205	
[0032]	tct ccc ttc ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat			672
	Ser Pro Phe Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn			
	210	215	220	
	ttg etc ctg cag aga ccc ggc tta cag ett cac ttc tcc ttc tac gtg			720
	Leu Leu Leu Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val			
	225	230	235	240
	ggc agc aag atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata			768
	Gly Ser Lys Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile			
	245	250	255	
	gca agg gcg gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc			816
	Ala Arg Ala Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala			
	260	265	270	
	acg gag gac agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa			864
	Thr Glu Asp Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln			
	275	280	285	
	gtg ctt ggt ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tcg ggc tca gga			912
	Val Leu Gly Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly			

290	295	300	
ctg tgg atg cat aag gtg cct gca tcg ctc atg gtg agc ctg ggc gaa			960
Leu Trp Met His Lys Val Pro Ala Ser Leu Met Val Ser Leu Gly Glu			
305	310	315	320
gat gca cat ttt cag tgt ccc cat aac agc tcc aac aac gcg aac gtg			1008
Asp Ala His Phe Gln Cys Pro His Asn Ser Ser Asn Asn Ala Asn Val			
	325	330	335
acc tgg tgg cgg gtg ctc cat ggc aat tac acc tgg ccg cct gaa ttt			1056
Thr Trp Trp Arg Val Leu His Gly Asn Tyr Thr Trp Pro Pro Glu Phe			
	340	345	350
ctc gga ccg gga gag gac ccg aat ggg acc ctt atc atc cag aac gtg			1104
Leu Gly Pro Gly Glu Asp Pro Asn Gly Thr Leu Ile Ile Gln Asn Val			
	355	360	365
aat aag tcc cac gga gga atc tac gtc tgc cgc gtg caa gag gga aat			1152
Asn Lys Ser His Gly Gly Ile Tyr Val Cys Arg Val Gln Glu Gly Asn			
	370	375	380
[0033]			
gag agc tac caa cag tca tgc gga acg tac ctc cgc gtc cgg cag cca			1200
Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro			
385	390	395	400
cca ccg agg ccg ttc ctc gat atg gga gag gga act aag aac cgg atc			1248
Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile			
	405	410	415
att acc gcc gaa ggc atc atc ctc ctc ttc tgc gcc gtc gtg ccg ggg			1296
Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly			
	420	425	430
act ctg ctt ctg ttc cgg aaa agg tgg caa aac gaa aag ctg ggt ctg			1344
Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu			
	435	440	445
gac gct ggg gac gaa tac gag gat gaa aac ttg tac gag ggc ctg aat			1392
Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn			
	450	455	460
ctg gac gat tgc tcg atg tat gag gac att agc aga gga ctg cag ggt			1440
Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly			

465	470	475	480	
acc tac caa gac	gtg gga agc ctg aac atc ggg gat	gtg cag ctc gag		1488
Thr Tyr Gln Asp	Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp	Val Gln Leu Glu		
	485	490	495	
aaa cca agg aaa aga aga gct agc gaa gga cgc gga tca ctg ctt act				1536
Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr				
	500	505	510	
tgc ggc gat gtc gaa gaa aat ccc gga cca atg gcc aga ttg gcg ctg				1584
Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg Leu Ala Leu				
	515	520	525	
tcg ccg gtc cct tcg cac tgg atg gtg gcc ctg ctg ctc ttg ctt tcg				1632
Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser				
	530	535	540	
gcg gct gag ccg gtg cca gcg gct aga tcg gag gac cgc tac aga aat				1680
Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn				
	545	550	555	560
[0034] ccg aag ggt tcc get tgc tca cgc atc tgg caa tca cca cgc ttc atc				1728
Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile				
	565	570	575	
gcg cgc aaa cgc ggc ttc act gtc aag atg cac tgc tat atg aac tcg				1776
Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser				
	580	585	590	
gcc agc ggg aat gtg tcg tgg ctg tgg aag cag gaa atg gac gag aat				1824
Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn				
	595	600	605	
ccg cag caa ctg aaa ctg gag aag ggc cgg atg gaa gaa tcc cag aat				1872
Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn				
	610	615	620	
gag tcg ctg gcc acc ctt act atc caa ggt atc cgg ttt gaa gat aac				1920
Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn				
	625	630	635	640
ggg atc tac ttc tgt caa cag aag tgt aac aac act tca gag gtg tac				1968
Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr				

	645	650	655	
	cag gga tgc ggc acc gaa ctc cgc gtc atg gga ttc tcc acc ctc gcc			2016
	Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala			
	660	665	670	
	caa ctg aag cag cgc aac acg ctg aag gac ggc atc att atg atc cag			2064
	Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln			
	675	680	685	
	acc ctg ctg atc atc ctg ttc atc att gtg ccg atc ttt ctg ctc ttg			2112
	Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu			
	690	695	700	
	gat aag gac gac tcg aaa gcc gga atg gaa gag gac cac acg tac gaa			2160
	Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu			
	705	710	715	720
	ggt ctg gac atc gac caa act gcg act tac gag gac att gtg acc ctc			2208
	Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu			
	725	730	735	
[0035]	cgg act ggc gaa gtc aag tgg tcc gtg ggt gaa cac cct gga cag gaa			2256
	Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu			
	740	745	750	
	tag			2259
	<210> 10			
	<211> 752			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建体			
	<400> 10			
	Met Ile Leu Thr Ser Phe Gly Asp Asp Met Trp Leu Leu Thr Thr Leu			
	1	5	10	15
	Leu Leu Trp Val Pro Val Gly Gly Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala			

	20		25		30
Val Ile Thr Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn					
	35		40		45
Val Thr Leu Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr					
	50		55		60
Gln Trp Phe Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr					
65		70		75	80
Ser Ile Pro Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln					
		85		90	95
Ile Gly Ser Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn					
	100		105		110
[0036]					
Asp Trp Leu Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu					
	115		120		125
Pro Leu Ala Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn					
	130		135		140
Val Val Phe Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser					
145		150		155	160
Glu Val Ala Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His					
	165		170		175
Cys Ser Gly Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile					
	180		185		190
Thr Val Lys Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser					

370 375 380

Glu Ser Tyr Gln Gln Ser Cys Gly Thr Tyr Leu Arg Val Arg Gln Pro
385 390 395 400

Pro Pro Arg Pro Phe Leu Asp Met Gly Glu Gly Thr Lys Asn Arg Ile
405 410 415

Ile Thr Ala Glu Gly Ile Ile Leu Leu Phe Cys Ala Val Val Pro Gly
420 425 430

Thr Leu Leu Leu Phe Arg Lys Arg Trp Gln Asn Glu Lys Leu Gly Leu
435 440 445

Asp Ala Gly Asp Glu Tyr Glu Asp Glu Asn Leu Tyr Glu Gly Leu Asn
450 455 460

[0038]

Leu Asp Asp Cys Ser Met Tyr Glu Asp Ile Ser Arg Gly Leu Gln Gly
465 470 475 480

Thr Tyr Gln Asp Val Gly Ser Leu Asn Ile Gly Asp Val Gln Leu Glu
485 490 495

Lys Pro Arg Lys Arg Arg Ala Ser Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr
500 505 510

Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Ala Arg Leu Ala Leu
515 520 525

Ser Pro Val Pro Ser His Trp Met Val Ala Leu Leu Leu Leu Ser
530 535 540

Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn

545	550	555	560
Pro Lys Gly Ser	Ala Cys Ser Arg Ile	Trp Gln Ser	Pro Arg Phe Ile
	565	570	575
Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser			
	580	585	590
Ala Ser Gly Asn Val Ser Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn			
	595	600	605
Pro Gln Gln Leu Lys Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn			
	610	615	620
Glu Ser Leu Ala Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn			
625	630	635	640
[0039]			
Gly Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr			
	645	650	655
Gln Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala			
	660	665	670
Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln			
	675	680	685
Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu			
	690	695	700
Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr Glu			
705	710	715	720
Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val Thr Leu			

	725	730	735	
	Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro Gly Gln Glu			
	740	745	750	
<210>	11			
<211>	1335			
<212>	DNA			
<213>	人工序列			
<220>				
<223>	嵌合蛋白: FcgammaR1-CD3Z			
<220>				
<221>	CDS			
<222>	(1)..(1335)			
<400>	11			
[0040]	atg aag tgg aag gcg ctt ttc acc gcg gcc atc ctg cag gca cag ttg			48
	Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu			
	1	5	10	15
	ccg att aca gag gca gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc			96
	Pro Ile Thr Glu Ala Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr			
	20	25	30	
	ttg cag cct cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act tta			144
	Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu			
	35	40	45	
	tgg tgt gag ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt			192
	Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe			
	50	55	60	
	atc aac gga aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca			240
	Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro			
	65	70	75	80
	gag gcc agt ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc			288
	Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser			
	85	90	95	

	tca atg cca agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat gat tgg ctg	336
	Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu	
	100 105 110	
	cta ctc cag gcc tcc cgc aga gtc ctc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc	384
	Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala	
	115 120 125	
	ttg agg tgt cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc	432
	Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe	
	130 135 140	
	tat aga aat gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tcg gag gtc gcc	480
	Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala	
	145 150 155 160	
	att ctg aaa acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac tgc tca ggc	528
	Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly	
	165 170 175	
[0041]	acg gga aga cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc acg gtg aaa	576
	Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys	
	180 185 190	
	gag ctg ttt acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca tct ccc ttc	624
	Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe	
	195 200 205	
	ccg gag ggg agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat ttg ctc ctg	672
	Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu	
	210 215 220	
	cag aga ccc ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg ggc agc aag	720
	Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys	
	225 230 235 240	
	atc ctg gag tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata gca agg gcg	768
	Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala	
	245 250 255	
	gaa aga gaa gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc acg gag gac	816
	Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp	
	260 265 270	

	agc agt gtc ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa gtg ctt ggt Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly 275 280 285	864
	ccc cag tca tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt cag agc ttt Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe 290 295 300	912
	ggc ctg ctg gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga atc ctc ttc Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe 305 310 315 320	960
	atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg aag ttc agc Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser 325 330 335	1008
	agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac cag ctc tat Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr 340 345 350	1056
[0042]	aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt ttg gac aag Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys 355 360 365	1104
	aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag aga agg aag Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys 370 375 380	1152
	aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat aag atg gcg Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala 385 390 395 400	1200
	gag gcc tac agt gag att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg agg ggc aag Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys 405 410 415	1248
	ggg cac gat ggc ctt tac cag ggt ctc agt aca gcc acc aag gac acc Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr 420 425 430	1296
	tac gac gcc ctt cac atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg 435 440	1335

<210> 12
 <211> 444
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 12

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr
 20 25 30

Leu Gln Pro Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu
 35 40 45

[0043]

Trp Cys Glu Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe
 50 55 60

Ile Asn Gly Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro
 65 70 75 80

Glu Ala Ser Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser
 85 90 95

Ser Met Pro Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu
 100 105 110

Leu Leu Gln Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala
 115 120 125

Leu Arg Cys His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe
 130 135 140

Tyr Arg Asn Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala
 145 150 155 160

Ile Leu Lys Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly
 165 170 175

Thr Gly Arg His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys
 180 185 190

Glu Leu Phe Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe
 195 200 205

[0044] Pro Glu Gly Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu
 210 215 220

Gln Arg Pro Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys
 225 230 235 240

Ile Leu Glu Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala
 245 250 255

Glu Arg Glu Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp
 260 265 270

Ser Ser Val Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly
 275 280 285

Pro Gln Ser Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Gln Ser Phe
 290 295 300

Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe
305 310 315 320

Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser
325 330 335

Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
340 345 350

Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
355 360 365

Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys
370 375 380

[0045] Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
385 390 395 400

Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
405 410 415

Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
420 425 430

Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
435 440

<210> 13

<211> 1848

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: Fcγ1-IgE

	<220>		
	<221>	CDS	
	<222>	(1)..(1848)	
	<400>	13	
	cat atg gaa gtg gtt aat gcc acc aag gct gtg atc acc ttg cag cct		48
	His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro		
	1 5 10 15		
	cca tgg gtc agt att ttc cag aag gaa aat gtc act tta tgg tgt gag		96
	Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu		
	20 25 30		
	ggg cct cac ctg cct gga gac agt tcc aca caa tgg ttt atc aac gga		144
	Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly		
	35 40 45		
	aca gcc gtt cag atc tcc acg cct agt tat agc atc cca gag gcc agt		192
	Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser		
	50 55 60		
[0046]	ttt cag gac agt ggc gaa tac agg tgt cag ata ggt tcc tca atg cca		240
	Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro		
	65 70 75 80		
	agt gac cct gtg cag ttg caa atc cac aat gat tgg ctg cta etc cag		288
	Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln		
	85 90 95		
	gcc tcc cgc aga gtc etc aca gaa gga gaa ccc ctg gcc ttg agg tgt		336
	Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys		
	100 105 110		
	cac gga tgg aag aat aaa ctg gtg tac aat gtg gtt ttc tat aga aat		384
	His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn		
	115 120 125		
	gga aaa tcc ttt cag ttt tct tca gat tgc gag gtc gcc att ctg aaa		432
	Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala Ile Leu Lys		
	130 135 140		
	acc aac ctg agt cac agc ggc atc tac cac tgc tca ggc acg gga aga		480
	Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly Thr Gly Arg		

145	150	155	160	
cac cgc tac aca tct gca gga gtg tcc atc acg gtg aaa gag ctg ttt				528
His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys Glu Leu Phe				
	165	170	175	
acc acg cca gtg ctg aga gca tcc gtg tca tct ccc ttc ccg gag ggg				576
Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe Pro Glu Gly				
	180	185	190	
agt ctg gtc acc ctg aac tgt gag acg aat ttg ctc ctg cag aga ccc				624
Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu Gln Arg Pro				
	195	200	205	
ggc tta cag ctt cac ttc tcc ttc tac gtg ggc agc aag atc ctg gag				672
Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys Ile Leu Glu				
	210	215	220	
tac agg aac aca tcc tca gag tac cat ata gca agg gcg gaa aga gaa				720
Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala Glu Arg Glu				
225	230	235	240	
[0047]				
gat gct gga ttc tac tgg tgt gag gta gcc acg gag gac agc agt gtc				768
Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp Ser Ser Val				
	245	250	255	
ctt aag cgc agc cct gag ttg gag ctc caa gtg ctt ggt ccc cag tca				816
Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Pro Gln Ser				
	260	265	270	
tca gct cct ggt tct gct tct ggt tct ggt gtt cga cca gtt aac atc				864
Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile				
	275	280	285	
acc gag ccc aca ctg gaa ctg ctg cac agc agc tgc gac ccc aac gcc				912
Thr Glu Pro Thr Leu Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala				
	290	295	300	
ttc cac agc acc atc cag ctg tat tgc ttc atc tac ggc cac atc ctg				960
Phe His Ser Thr Ile Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu				
305	310	315	320	
aac gac gtg tcc gtg tcc tgg ctg atg gac gac aga gag atc acc gac				1008
Asn Asp Val Ser Val Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp				

	325	330	335	
	acc ctg gcc cag acc gtg ctg atc aaa gag gaa ggc aag ctg gcc tct			1056
	Thr Leu Ala Gln Thr Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser			
	340	345	350	
	acc tgc agc aag ctg aat atc aca gag cag cag tgg atg agc gag agc			1104
	Thr Cys Ser Lys Leu Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser			
	355	360	365	
	acc ttc acc tgt aaa gtg acc tcc cag ggc gtg gac tac ctg gcc cac			1152
	Thr Phe Thr Cys Lys Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His			
	370	375	380	
	acc aga aga tgc ccc gac cac gaa ccc aga ggc gtg atc acc tac ctg			1200
	Thr Arg Arg Cys Pro Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu			
	385	390	395	400
	atc ccc cct agc ccc ctg gac ctg tac cag aac ggc gct cct aag ctg			1248
	Ile Pro Pro Ser Pro Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu			
	405	410	415	
[0048]	acc tgc ctg gtg gtg gac ctg gaa agc gag aag aac gtg aac gtg aca			1296
	Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr			
	420	425	430	
	tgg aac cag gaa aag aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc			1344
	Trp Asn Gln Glu Lys Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr			
	435	440	445	
	aag cac cac aac aac gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg			1392
	Lys His His Asn Asn Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val			
	450	455	460	
	gtg gcc aag gac tgg atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac			1440
	Val Ala Lys Asp Trp Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp			
	465	470	475	480
	cac ccc gac ttc cct aag ccc atc gtg cgg agc atc acc aag acc cct			1488
	His Pro Asp Phe Pro Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro			
	485	490	495	
	ggc cag aga tct gcc ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa			1536
	Gly Gln Arg Ser Ala Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu			

500	505	510	
gag tcc gag gac aag aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc			1584
Glu Ser Glu Asp Lys Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe			
515	520	525	
cca gag gac atc agc gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc			1632
Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser			
530	535	540	
aac agc cag cac agc aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac			1680
Asn Ser Gln His Ser Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn			
545	550	555	560
cag ggc ttc ttc atc ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg			1728
Gln Gly Phe Phe Ile Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp			
565	570	575	
acc cag aga aag cag ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag			1776
Thr Gln Arg Lys Gln Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln			
580	585	590	
[0049]	aag ccc aga aag ctg gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc		1824
	Lys Pro Arg Lys Leu Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr		
	595	600	605
	tcc ctg cgc cct agt tag ctc gag		1848
	Ser Leu Arg Pro Ser Leu Glu		
	610	615	
<210> 14 <211> 613 <212> PRT <213> 人工序列 <220> <223> 合成构建体 <400> 14			
His Met Glu Val Val Asn Ala Thr Lys Ala Val Ile Thr Leu Gln Pro			
1	5	10	15

Pro Trp Val Ser Ile Phe Gln Lys Glu Asn Val Thr Leu Trp Cys Glu
 20 25 30

Gly Pro His Leu Pro Gly Asp Ser Ser Thr Gln Trp Phe Ile Asn Gly
 35 40 45

Thr Ala Val Gln Ile Ser Thr Pro Ser Tyr Ser Ile Pro Glu Ala Ser
 50 55 60

Phe Gln Asp Ser Gly Glu Tyr Arg Cys Gln Ile Gly Ser Ser Met Pro
 65 70 75 80

Ser Asp Pro Val Gln Leu Gln Ile His Asn Asp Trp Leu Leu Leu Gln
 85 90 95

[0050] Ala Ser Arg Arg Val Leu Thr Glu Gly Glu Pro Leu Ala Leu Arg Cys
 100 105 110

His Gly Trp Lys Asn Lys Leu Val Tyr Asn Val Val Phe Tyr Arg Asn
 115 120 125

Gly Lys Ser Phe Gln Phe Ser Ser Asp Ser Glu Val Ala Ile Leu Lys
 130 135 140

Thr Asn Leu Ser His Ser Gly Ile Tyr His Cys Ser Gly Thr Gly Arg
 145 150 155 160

His Arg Tyr Thr Ser Ala Gly Val Ser Ile Thr Val Lys Glu Leu Phe
 165 170 175

Thr Thr Pro Val Leu Arg Ala Ser Val Ser Ser Pro Phe Pro Glu Gly
 180 185 190

Ser Leu Val Thr Leu Asn Cys Glu Thr Asn Leu Leu Leu Gln Arg Pro
 195 200 205

Gly Leu Gln Leu His Phe Ser Phe Tyr Val Gly Ser Lys Ile Leu Glu
 210 215 220

Tyr Arg Asn Thr Ser Ser Glu Tyr His Ile Ala Arg Ala Glu Arg Glu
 225 230 235 240

Asp Ala Gly Phe Tyr Trp Cys Glu Val Ala Thr Glu Asp Ser Ser Val
 245 250 255

Leu Lys Arg Ser Pro Glu Leu Glu Leu Gln Val Leu Gly Pro Gln Ser
 260 265 270

[0051]

Ser Ala Pro Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile
 275 280 285

Thr Glu Pro Thr Leu Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala
 290 295 300

Phe His Ser Thr Ile Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu
 305 310 315 320

Asn Asp Val Ser Val Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp
 325 330 335

Thr Leu Ala Gln Thr Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser
 340 345 350

Thr Cys Ser Lys Leu Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser
 355 360 365

Thr Phe Thr Cys Lys Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His
370 375 380

Thr Arg Arg Cys Pro Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu
385 390 395 400

Ile Pro Pro Ser Pro Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu
405 410 415

Thr Cys Leu Val Val Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr
420 425 430

Trp Asn Gln Glu Lys Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr
435 440 445

[0052]

Lys His His Asn Asn Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val
450 455 460

Val Ala Lys Asp Trp Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp
465 470 475 480

His Pro Asp Phe Pro Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro
485 490 495

Gly Gln Arg Ser Ala Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu
500 505 510

Glu Ser Glu Asp Lys Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe
515 520 525

Pro Glu Asp Ile Ser Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser
530 535 540

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp	
35 40 45	
gcc act aag aca ttc act gtg act gaa aag ccc gag gtg att gac gcg	192
Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala	
50 55 60	
tcc gaa ttg aca cct gcg gtg acc acc tac aaa ctg gtt atc aac ggc	240
Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly	
65 70 75 80	
aag act ctg aag ggc gag acc acc aca gag gca gtc gat gcc gcc acc	288
Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr	
85 90 95	
gcc gag aag gtc ttc aag caa tat gcc aac gac aac ggg gtg gac ggg	336
Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly	
100 105 110	
gag tgg acc tac gat gat gcc acc aag acc ttc acc gtg acc gag aag	384
Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys	
115 120 125	
[0054]	
ccc gaa gtg atc gat gcg agt gaa ctg act ccc gcc gtg aca ggt tct	432
Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser	
130 135 140	
gct tct ggt tct ggt gtt cga cca gtt aac atc acc gag ccc aca ctg	480
Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile Thr Glu Pro Thr Leu	
145 150 155 160	
gaa ctg ctg cac agc agc tgc gac ccc aac gcc ttc cac agc acc atc	528
Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala Phe His Ser Thr Ile	
165 170 175	
cag ctg tat tgc ttc atc tac ggc cac atc ctg aac gac gtg tcc gtg	576
Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu Asn Asp Val Ser Val	
180 185 190	
tcc tgg ctg atg gac gac aga gag atc acc gac acc ctg gcc cag acc	624
Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp Thr Leu Ala Gln Thr	
195 200 205	
gtg ctg atc aaa gag gaa ggc aag ctg gcc tct acc tgc agc aag ctg	672

	Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser Thr Cys Ser Lys Leu	
	210	215 220
	aat atc aca gag cag cag tgg atg agc gag agc acc ttc acc tgt aaa	720
	Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser Thr Phe Thr Cys Lys	
	225	230 235 240
	gtg acc tcc cag ggc gtg gac tac ctg gcc cac acc aga aga tgc ccc	768
	Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His Thr Arg Arg Cys Pro	
		245 250 255
	gac cac gaa ccc aga ggc gtg atc acc tac ctg atc ccc cct agc ccc	816
	Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu Ile Pro Pro Ser Pro	
		260 265 270
	ctg gac ctg tac cag aac ggc gct cct aag ctg acc tgc ctg gtg gtg	864
	Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu Thr Cys Leu Val Val	
		275 280 285
	gac ctg gaa agc gag aag aac gtg aac gtg aca tgg aac cag gaa aag	912
	Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr Trp Asn Gln Glu Lys	
[0055]		290 295 300
	aaa acc agc gtg tcc gcc agc cag tgg tac acc aag cac cac aac aac	960
	Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr Lys His His Asn Asn	
		305 310 315 320
	gcc acc acc tcc atc acc agc atc ctg ccc gtg gtg gcc aag gac tgg	1008
	Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Ala Lys Asp Trp	
		325 330 335
	atc gag ggc tac ggc tac cag tgc atc gtg gac cac ccc gac ttc cct	1056
	Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp His Pro Asp Phe Pro	
		340 345 350
	aag ccc atc gtg cgg agc atc acc aag acc cct ggc cag aga tct gcc	1104
	Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro Gly Gln Arg Ser Ala	
		355 360 365
	ccc gag gtg tac gtg ttc ccc cca cct gag gaa gag tcc gag gac aag	1152
	Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu Glu Ser Glu Asp Lys	
		370 375 380
	aga acc ctg acc tgt ctg atc cag aac ttc ttc cca gag gac atc agc	1200

Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Ser	
385	400
gtg cag tgg ctg ggc gac ggc aag ctg atc tcc aac agc cag cac agc	1248
Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser Asn Ser Gln His Ser	
405	415
aca acc acc cct ctg aag tcc aac ggc agc aac cag ggc ttc ttc atc	1296
Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn Gln Gly Phe Phe Ile	
420	430
ttc agc aga ctg gaa gtg gcc aag acc ctg tgg acc cag aga aag cag	1344
Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp Thr Gln Arg Lys Gln	
435	445
ttt aca tgc caa gtg atc cat gag gcc ctg cag aag ccc aga aag ctg	1392
Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln Lys Pro Arg Lys Leu	
450	460
gaa aag acc atc agc acc agc ctg ggc aac acc tcc ctg cgc cct agt	1440
Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Arg Pro Ser	
465	480
[0056] tag ctc gag	1449
Leu Glu	

<210> 16

<211> 480

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 16

His Met Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu			
1	5	10	15

Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys		
20	25	30

Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp
 35 40 45

Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala
 50 55 60

Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly
 65 70 75 80

Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr
 85 90 95

Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly
 100 105 110

[0057] Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys
 115 120 125

Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Gly Ser
 130 135 140

Ala Ser Gly Ser Gly Val Arg Pro Val Asn Ile Thr Glu Pro Thr Leu
 145 150 155 160

Glu Leu Leu His Ser Ser Cys Asp Pro Asn Ala Phe His Ser Thr Ile
 165 170 175

Gln Leu Tyr Cys Phe Ile Tyr Gly His Ile Leu Asn Asp Val Ser Val
 180 185 190

Ser Trp Leu Met Asp Asp Arg Glu Ile Thr Asp Thr Leu Ala Gln Thr
 195 200 205

Val Leu Ile Lys Glu Glu Gly Lys Leu Ala Ser Thr Cys Ser Lys Leu
210 215 220

Asn Ile Thr Glu Gln Gln Trp Met Ser Glu Ser Thr Phe Thr Cys Lys
225 230 235 240

Val Thr Ser Gln Gly Val Asp Tyr Leu Ala His Thr Arg Arg Cys Pro
245 250 255

Asp His Glu Pro Arg Gly Val Ile Thr Tyr Leu Ile Pro Pro Ser Pro
260 265 270

Leu Asp Leu Tyr Gln Asn Gly Ala Pro Lys Leu Thr Cys Leu Val Val
275 280 285

[0058] Asp Leu Glu Ser Glu Lys Asn Val Asn Val Thr Trp Asn Gln Glu Lys
290 295 300

Lys Thr Ser Val Ser Ala Ser Gln Trp Tyr Thr Lys His His Asn Asn
305 310 315 320

Ala Thr Thr Ser Ile Thr Ser Ile Leu Pro Val Val Ala Lys Asp Trp
325 330 335

Ile Glu Gly Tyr Gly Tyr Gln Cys Ile Val Asp His Pro Asp Phe Pro
340 345 350

Lys Pro Ile Val Arg Ser Ile Thr Lys Thr Pro Gly Gln Arg Ser Ala
355 360 365

Pro Glu Val Tyr Val Phe Pro Pro Pro Glu Glu Glu Ser Glu Asp Lys
370 375 380

Arg Thr Leu Thr Cys Leu Ile Gln Asn Phe Phe Pro Glu Asp Ile Ser
 385 390 395 400

Val Gln Trp Leu Gly Asp Gly Lys Leu Ile Ser Asn Ser Gln His Ser
 405 410 415

Thr Thr Thr Pro Leu Lys Ser Asn Gly Ser Asn Gln Gly Phe Phe Ile
 420 425 430

Phe Ser Arg Leu Glu Val Ala Lys Thr Leu Trp Thr Gln Arg Lys Gln
 435 440 445

Phe Thr Cys Gln Val Ile His Glu Ala Leu Gln Lys Pro Arg Lys Leu
 450 455 460

[0059] Glu Lys Thr Ile Ser Thr Ser Leu Gly Asn Thr Ser Leu Arg Pro Ser
 465 470 475 480

<210> 17

<211> 864

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 嵌合蛋白: mSa-CD3Z

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(864)

<400> 17

atg aag tgg aaa gcc ctt ttt acc gcc gcc att ctg caa gcg caa ttg
 Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
 1 5 10 15

48

	ccg atc act gaa gcc gca tcg gcc gag gcc ggt atc act gga acc tgg	96
	Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp	
	20 25 30	
	tac aac cag cac gga tcc aca ttc acc gtg acc gcc ggt gct gac gga	144
	Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly	
	35 40 45	
	aat ctg acc gga cag tac gag aat cgg gct cag ggc acc ggt tgt cag	192
	Asn Leu Thr Gly Gln Tyr Glu Asn Arg Ala Gln Gly Thr Gly Cys Gln	
	50 55 60	
	aac tcc cct tac acc ctc act ggg aga tac aac ggc acc aag ctg gaa	240
	Asn Ser Pro Tyr Thr Leu Thr Gly Arg Tyr Asn Gly Thr Lys Leu Glu	
	65 70 75 80	
	tgg agg gtg gaa tgg aac aac tcc acc gaa aac tgc cat tcc cgc act	288
	Trp Arg Val Glu Trp Asn Asn Ser Thr Glu Asn Cys His Ser Arg Thr	
	85 90 95	
[0060]	gag tgg cgc gga cag tat cag ggg gga gcc gaa gcg cgg atc aac acc	336
	Glu Trp Arg Gly Gln Tyr Gln Gly Gly Ala Glu Ala Arg Ile Asn Thr	
	100 105 110	
	caa tgg aac ctg acc tac gag ggc ggg agc gga ccc gcg act gag cag	384
	Gln Trp Asn Leu Thr Tyr Glu Gly Gly Ser Gly Pro Ala Thr Glu Gln	
	115 120 125	
	ggc cag gat acg ttc act aag gtc aag ggc agc gca tca ggc tcg gga	432
	Gly Gln Asp Thr Phe Thr Lys Val Lys Gly Ser Ala Ser Gly Ser Gly	
	130 135 140	
	cag agc ttt ggc ctg ctg gat ccc aaa ctc tgc tac ctg ctg gat gga	480
	Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys Tyr Leu Leu Asp Gly	
	145 150 155 160	
	atc ctc ttc atc tat ggt gtc att ctc act gcc ttg ttc ctg aga gtg	528
	Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala Leu Phe Leu Arg Val	
	165 170 175	
	aag ttc agc agg agc gca gac gcc ccc gcg tac cag cag ggc cag aac	576
	Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn	
	180 185 190	

	cag ctc tat aac gag ctc aat cta gga cga aga gag gag tac gat gtt	624
	Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val	
	195 200 205	
	ttg gac aag aga cgt ggc cgg gac cct gag atg ggg gga aag ccg cag	672
	Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Gln	
	210 215 220	
	aga agg aag aac cct cag gaa ggc ctg tac aat gaa ctg cag aaa gat	720
	Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp	
	225 230 235 240	
	aag atg gcg gag gcc tac agt gag att ggg atg aaa ggc gag cgc cgg	768
	Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg	
	245 250 255	
	agg ggc aag ggg cac gat ggc ctt tac cag ggt ctc agt aca gcc acc	816
	Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr	
	260 265 270	
	aag gac acc tac gac gcc ctt cac atg cag gcc ctg ccc cct cgc taa	864
[0061]	Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg	
	275 280 285	

<210> 18

<211> 287

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 18

Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Ala Ser Ala Glu Ala Gly Ile Thr Gly Thr Trp
20 25 30

Tyr Asn Gln His Gly Ser Thr Phe Thr Val Thr Ala Gly Ala Asp Gly

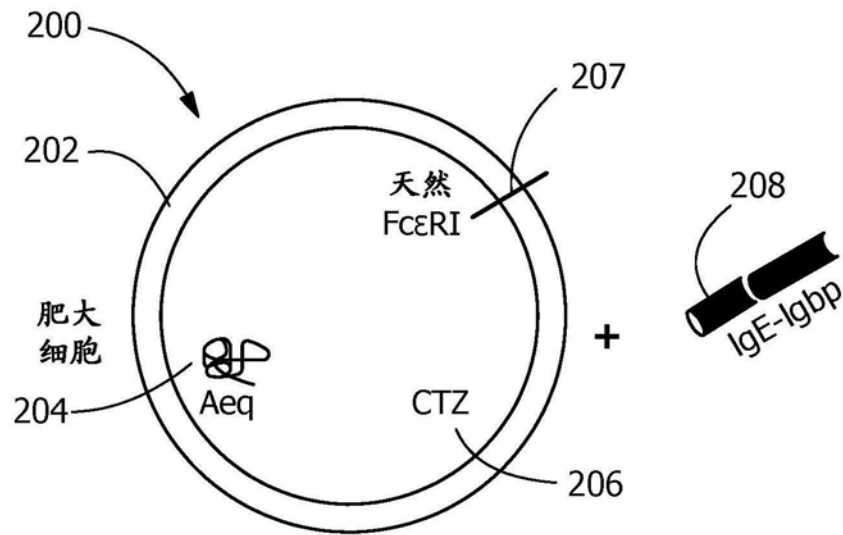


图2a

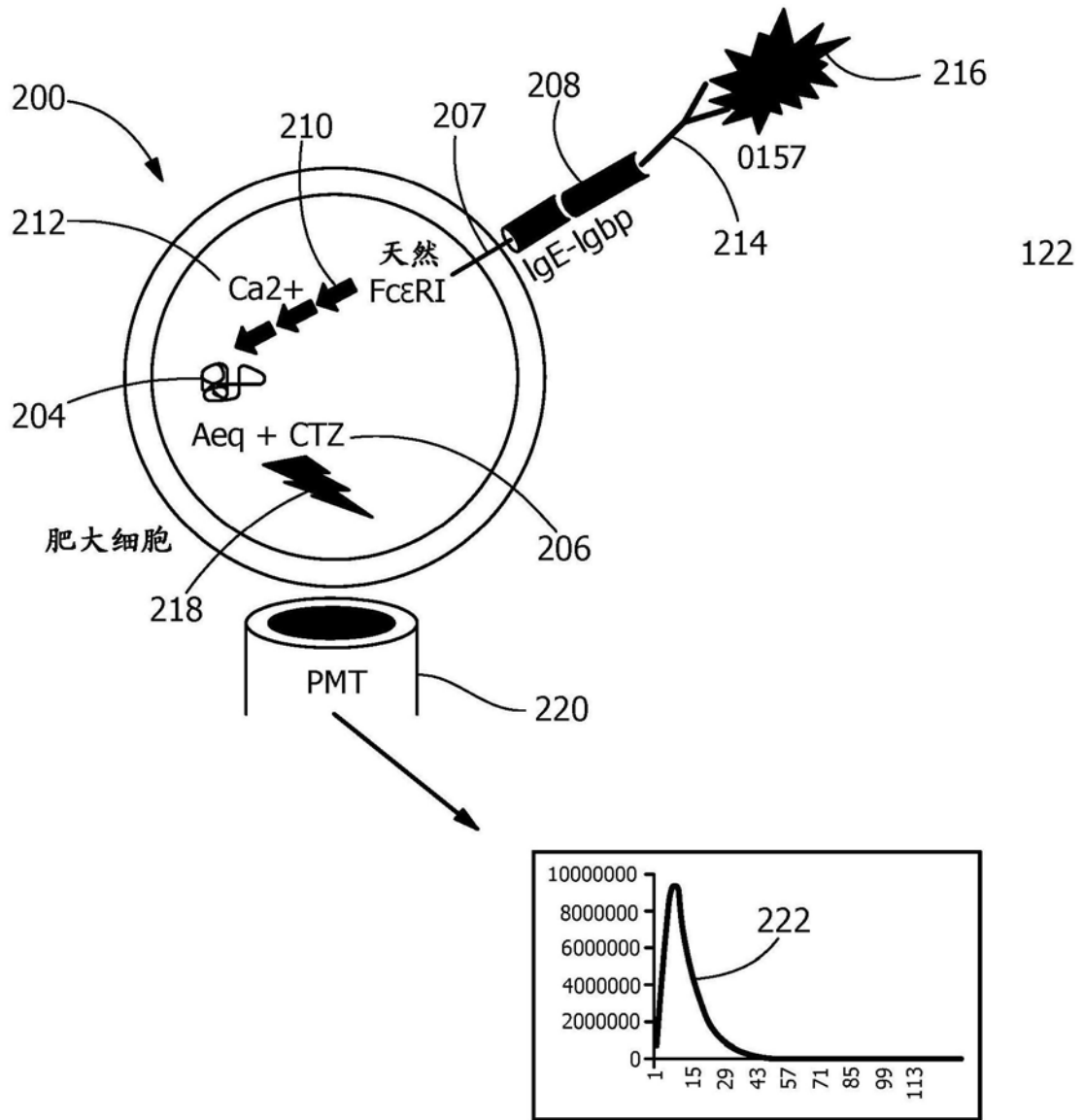


图2b

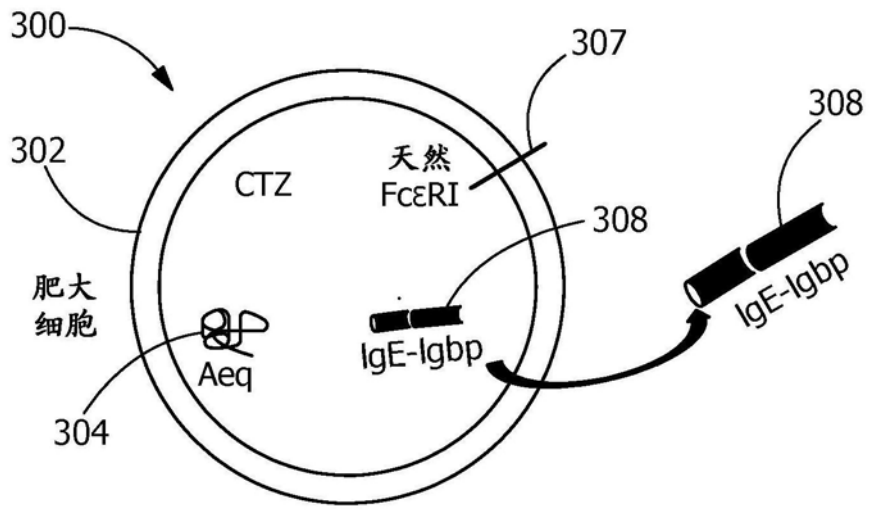


图3a

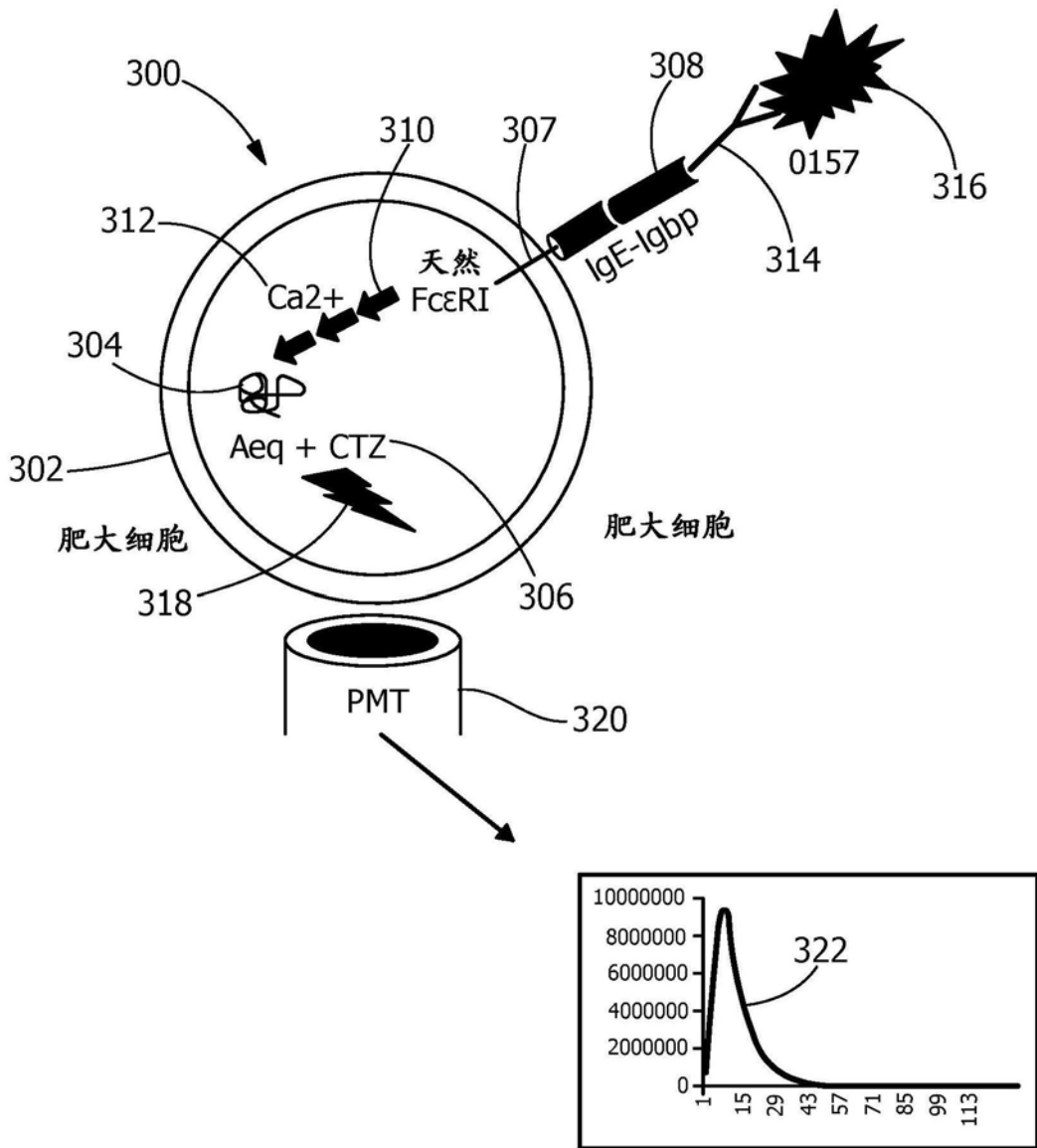


图3b

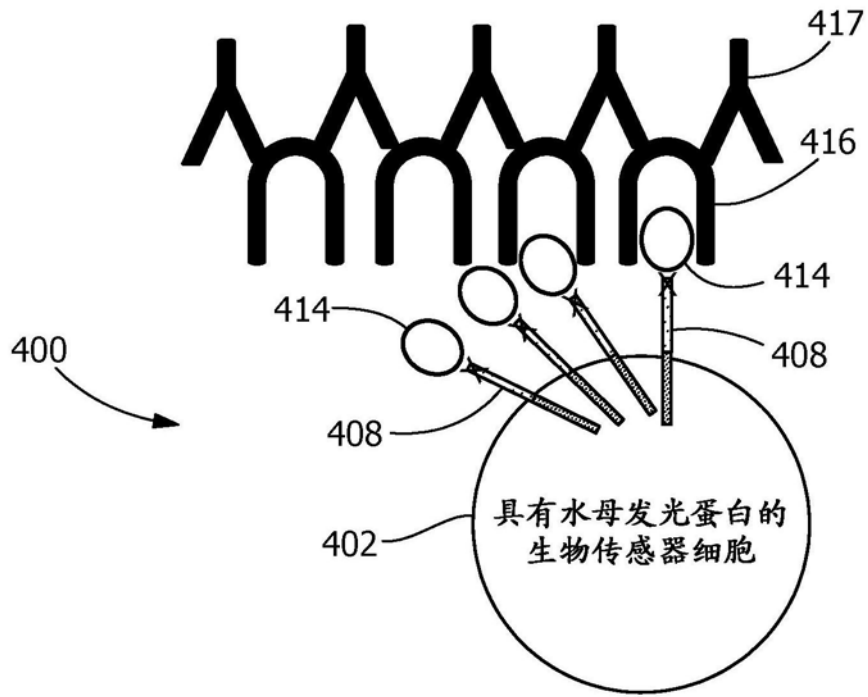


图4

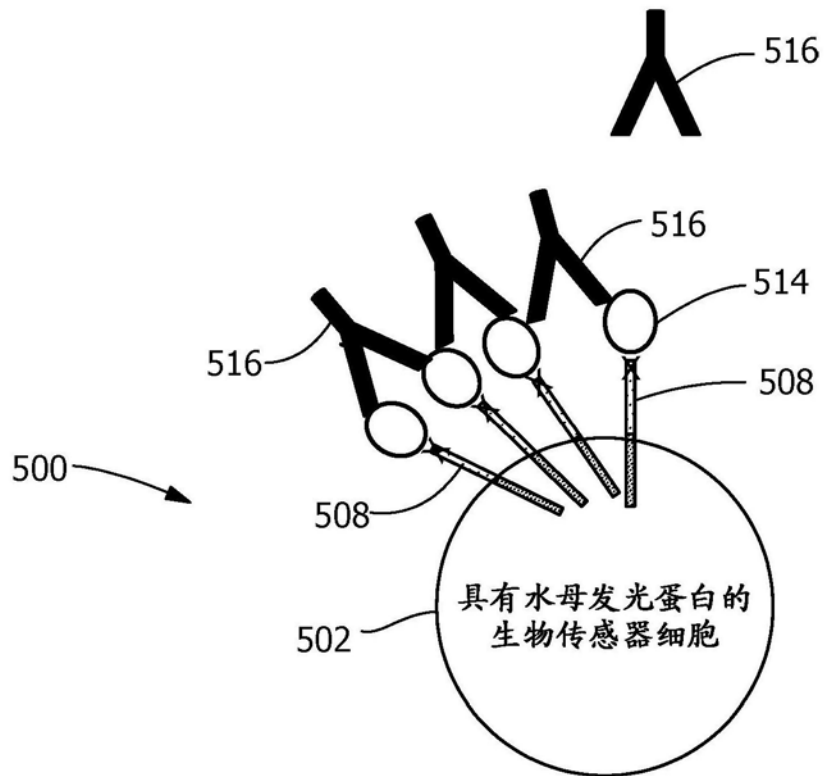


图5

专利名称(译)	用于分析物检测的通用生物传感器系统		
公开(公告)号	CN110300807A	公开(公告)日	2019-10-01
申请号	CN201780086494.1	申请日	2017-12-21
[标]发明人	T J 祖潘西克 J D 基特尔 曾令春 S 维达莫西 RS 布罗迪 MR 威廉姆斯		
发明人	T·J·祖潘西克 J·D·基特尔 曾令春 S·维达莫西 R·S·布罗迪 M·R·威廉姆斯		
IPC分类号	C12Q1/6897 G01N33/50 G01N33/536 G01N33/554 G01N33/569 G01N33/58		
CPC分类号	C07K2319/60 C12Q1/6897 G01N33/5005 G01N33/5047 G01N33/536 G01N33/554 G01N33/56911 G01N33/56983 G01N33/582 G01N33/6893 G01N33/84 G01N33/50 G01N33/569 G01N33/58		
代理人(译)	陈文平 刘盈盈		
优先权	62/438068 2016-12-22 US 15/642800 2017-07-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于检测靶分析物的生物传感器系统，其包括预先确定类型的活的生物细胞；与所述的生物细胞相关的信号生成报告子；与所述的信号生成报告子相关的信号转导通路或其他激活子机制或途径；与所述的激活子机制相关的通用检测器元件；和与所述的通用检测器元件相关的分析物结合元件，其中所述分析物结合元件对所述的通用检测器元件和靶分析物两者是特异性的。

氨基酸编号	Fe 受体中的示例性多态性									
	19	48	65	89	105	130	134	141	142	158
FCR10	R	S	D	I	D	G	F	Y	T	V
P08637	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	F
S76824	R	S	D	I	D	G	F	Y	I	V
J04162	R	N	D	V	D	D	F	H	I	V
M31936	S	S	N	I	D	D	F	H	I	V
M24854	S	S	N	I	E	D	S	H	I	V
X07934	R	S	N	I	D	D	F	H	I	V
X14356 (FcγRII)	N	N	N	S	E	S	S	S	I	I
M31932 (FcγRI)	S	T	N	R	E	A	F	T	I	G
X06948 (Fcα1)	R	S	E	S	Q	S	E	S	I	V