



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107209176 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201680006512.6

(74)专利代理机构 浙江杭州金通专利事务所有
限公司 33100

(22)申请日 2016.01.19

代理人 刘晓春

(30)优先权数据

1550048-1 2015.01.21 SE

1550640-5 2015.05.20 SE

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2017.07.20

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/SE2016/050031 2016.01.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02016/118066 EN 2016.07.28

(71)申请人 克罗姆尼贡公司

地址 瑞典哥德堡

(72)发明人 佩尔·福格尔斯特朗德

乌尔夫·伊瑞里德

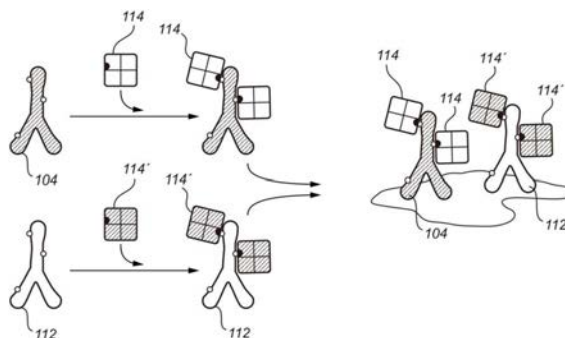
权利要求书2页 说明书8页 附图4页

(54)发明名称

免疫标记复合物的形成方法及用途

(57)摘要

本发明一般涉及用于形成免疫标记复合物的方法,所述免疫标记复合物包括标记的单价生物素结合的组合物。本发明还涉及抗原-报道分子复合物用于检测样品中靶标的用途。



1. 一种免疫标记复合物的形成方法,其特征在于,所述方法包括:
 - 选择第一生物素化的一抗;
 - 选择第一单价生物素结合的组合物,所述组合物标记有第一报道元件;以及
 - 在反应容器中,混合第一生物素化的一抗与第一标记的单价生物素结合的组合物。
2. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,混合第一生物素化的一抗与第一标记的单价生物素结合的组合物使得第一报道元件附着至第一生物素化的一抗。
3. 根据权利要求1和2中任意一项所述的方法,其特征在于,免疫标记复合物随后用于与样品接触。
4. 根据权利要求1和2中任意一项所述的方法,其特征在于,进一步包括:
 - 将免疫标记复合物与样品接触。
5. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,所述样品不同于第一生物素化的一抗。
6. 根据权利要求1-4中任意一项所述的方法,其特征在于,免疫标记复合物随后用于与样品接触,所述样品不同于第一生物素化的一抗。
7. 根据权利要求1所述的方法,进一步包括:
 - 提供使用免疫标记复合物免疫标记样品的指示。
8. 根据权利要求7所述的方法,其特征在于,选择第一生物素化的一抗和选择第一单价生物素结合的组合物跟混合第一生物素化的一抗与第一标记的单价生物素结合的组合物分开执行。
9. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,第一标记的单价生物素结合的组合物基于链霉亲和素、亲和素、traptavidin、captavidin、tamavidin、bradavidin、中性亲和素和rhizavidin中的至少一种。
10. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,所述方法进一步包括:在第一免疫标记复合物形成之后,加入阻断剂以阻断单价生物素结合的组合物的未结合部分。
11. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,所述报道元件选自包括荧光物、酶、肽、量子点和过渡金属的组。
12. 根据权利要求11所述的方法,其特征在于,第一单价生物素结合的组合物与报道元件共轭。
13. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,选择第一单价生物素结合的组合物和第一生物素化的一抗之间的比例使得第一单价生物素结合的组合物阻断第一生物素化的一抗的活性结合位点的风险降低。
14. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述报道元件为寡核苷酸。
15. 根据权利要求1所述的方法,其特征在于,所述报道元件为抗原。
16. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,所述单价生物素结合的组合物修饰为增加共轭位点的数目,以允许附加更多数目的报道元件。
17. 根据前面权利要求中任意一项所述的方法,其特征在于,所述单价生物素结合的组合物与大分子共轭,所述大分子包含多个报道元件分子。
18. 一种检测样品中靶分子的方法,其特征在于,所述方法包括:

- 将根据前面权利要求中任意一项所形成的第一免疫标记复合物和样品接触;
- 培育样品一定时间足以允许第一免疫标记复合物选择性地结合靶标;以及
- 检测靶标。

19. 根据权利要求18所述的方法,其特征在于,所述第一报道元件为荧光物,检测靶标包括照射所述免疫标记复合物。

20. 根据权利要求18所述的方法,进一步包括:

- 将根据权利要求1-17中任意一项所形成的第二免疫标记复合物和样品接触,以及
- 培育样品一定时间足以允许第二免疫标记复合物选择性地结合靶标,

其中,所述第二免疫标记复合物包括与第二单价生物素结合的组合物相混合的第二生物素化的一抗,所述第二生物素化的一抗不同于第一生物素化的一抗,以及所述第二单价生物素结合的组合物标记有第二报道分子,所述第二报道分子不同于第一报道分子。

21. 免疫标记复合物试剂盒,包括:

- 根据权利要求1-17中任意一项所形成的第一免疫标记复合物;以及
- 根据权利要求1-17中任意一项所形成的第二免疫标记复合物,

其中,所述第二免疫标记复合物包括与第二单价生物素结合的组合物相混合的第二生物素化的一抗,所述第二生物素化的一抗不同于第一生物素化的一抗,以及所述第二单价生物素结合的组合物标记有第二报道分子,所述第二报道分子不同于第一报道分子。

22. 免疫标记复合物和增强子步骤的试剂盒,包括:

- 根据权利要求1-17中任意一项所形成的免疫标记复合物;以及
- 至少一个第一增强子组分;

其中,单价生物素结合的组合物包括第一组至少一种抗原和寡核苷酸,至少一种抗原和寡核苷酸的第一组被第一增强子组分识别,以及

- 第一增强子组分和报道元件共轭,或

- 第一增强子组分和第二组至少一种抗原和寡核苷酸共轭,至少一种抗原和寡核苷酸的第二组被第二增强子组分识别,第二增强子组分和第二报道元件共轭,其中第二组不同于第一组。

免疫标记复合物的形成方法及用途

技术领域

[0001] 本发明一般涉及用于形成免疫标记复合物的方法,所述免疫标记复合物包括标记的单价生物素结合的组合物。本发明还涉及抗原-报道分子复合物用于检测样品中靶标的用途。

背景技术

[0002] 在免疫标记中,抗体用于检测生物和非生物样品中的分子。抗体是通过其抗原结合位点以高特异性结合至抗原(靶分子)的免疫球蛋白(Ig)蛋白。通常,靶分子是蛋白质,但可以是任何免疫原性试剂,例如多糖,脂质,毒素等。结合至抗原的目标分子的一部分成为(抗原)表位。用于免疫标记的抗体可以是多克隆或单克隆(抗体)。多克隆抗体是识别一个靶分子的多个(抗原)表位的抗体的不均匀混合物,而单克隆抗体对单个(抗原)表位显示特异性。通常,单克隆抗体产生更多特异性的免疫标记信号。

[0003] 免疫标记可以是直接或间接的。直接法是一步标记的方法,并且包含用报道分子标记的一抗。报道分子(标记)是可以产生信号的分子,例如酶或荧光物(下文进一步描述)。当标记的一抗被添加到样品中时,其结合并揭示靶分子的位置和/或量。由于直接方法使用仅和样品的一个培育步骤,因此,它简单快速。

[0004] 间接法是两步标记方法,其导致信号扩增。它包含一抗结合至样品中的靶分子(第一步)和标记的二抗结合至已结合的一抗(第二步)。由于多个标记的二抗分子与每个一抗分子结合,与直接法相比,报道信号将被扩增。然而,间接法需要一个额外的培育步骤,并且二抗需要仔细调整至一抗。通常针对动物物种的Ig类产生二抗,动物物种的Ig类中产生一抗。例如,如果一抗是小鼠IgG抗体,则二抗是抗小鼠IgG抗体。如果一抗是兔IgG,则二抗是抗兔IgG等。

[0005] 链霉亲和素(或亲和素的其他衍生物)也可以通过使用生物素化抗体的间接法用于免疫标记中。生物素化抗体是与生物素分子(通常为3-10个生物素分子/抗体分子)共轭的抗体。链霉亲和素与生物素强力结合,因此可用作生物素化抗体的第二试剂。在一些应用中,当样品的性质为可塑的,例如活细胞的膜,常规的链霉亲和素可以引起抗体的聚集。这是因为每个链亲和素分子具有四个生物素结合位点,当作为第二试剂加入时,它可以结合在样品中“漂浮”的多个生物素化的抗体。为了避免这种现象,已经设计了单价形式的链霉亲和素(Howarth M et al, Nature methods, 2006)。单价链霉亲和素具有一个生物素结合位点。因此,它可以用作第二试剂以使生物素化的抗体可视化,生物素化的抗体结合至活细胞膜中的靶分子而没有抗体聚集的风险。

[0006] 用于免疫标记的报道分子根据检测方法的性质而变化。它们直接附着(共轭)至一抗(直接法)或至二抗/链霉亲和素(间接法)。报道分子通过导致报道分子和抗体之间的共价键的化学反应共轭至抗体。因此,报道分子和抗体成为一个单元。通常,多个报道分子共轭至每个抗体分子。最常见的报道分子为用于显色检测的酶或用于荧光信号的荧光物。其他实例为颗粒(例如金颗粒,量子点),磷光化合物(例如碳氰酸染料),放射性化合物(例如

3H或32P标记的分子)和过渡金属(用于质谱)。对于某些类别的报道分子,如荧光物和过渡金属,可以在一个样品内同时分离和分析多个信号。这意味着可以在一个样品内同时免疫标记和检测多种不同的靶分子。该多重免疫标记技术例如通常用于荧光显微镜和流式细胞术。

[0007] 由于报道元件的选择在实验/应用之间变化,因此非常希望在抗体上转换报道分子。然而,在直接法中,报道分子和抗体作为一个单元牢固地彼此附着。因此,如果新的报道分子是优选的,则必须获得新的报道分子-抗体单元,而不是改变报道分子。

[0008] 在这个意义上,间接法更灵活,因为报道分子附着至二抗。因此,可以通过用不同报道分子在二抗之间切换来改变报道分子。然而,如上所述,该技术需要与样品进行额外的培育步骤。此外,二抗的使用引起抗体交叉结合的问题,即二抗不仅结合其旨在结合的一抗,而且还结合其他不希望的抗体。这些其他抗体可以是1)组织内的内源性抗体,2)其他一抗,和3)其他二抗。该问题产生于二抗结合来自相同动物物种的所有抗体。因此,每种一抗需要具有不同的抗体类别(动物物种),并且每种二抗必须仅选择性地识别这些类别之一。另外,二抗都不能是任何其他二抗识别的抗体类别。这是本领域众所周知的问题,并且极大地限制了可以在多重免疫标记中组合的抗体的数量。

[0009] 另一种方法是预先形成一抗和二抗之间的复合物,然后将该复合物用于直接免疫标记法。然而,混合一抗和二抗导致抗体聚集,因为抗体具有两个(抗原)表位结合位点。为了避免形成抗体聚集,可以使用单价二抗。然而,在抗体之间形成复合物需要将二抗调整至每一种一抗的动物物种。此外,由于抗体之间的结合不是那么强,所以复合物是不稳定的,并且需要阻断剂,用于隔离游离活性二抗。阻断剂(部分抗体缺少表位结合位点)也需要调整,以致其源于与一抗相同的动物物种。

[0010] 尽管有一些基于二抗的方法,提供了在报道分子之间灵活切换,但当使用直接免疫标记方法时,直接标记的抗体仍然是优选的。因此,将附着报道分子至一抗用于直接免疫标记法的强大而简单的方法是非常需要的。

发明内容

[0011] 本发明涉及使用生物素“点击化学”连接报道元件至抗体的方法。报道分子单元由单价形式的生物素结合组合物组成,一个或多个报道元件与其连接。抗体单元由生物素化抗体组成。两个分开的单元可以轻松地通过点击化学连接成免疫标记复合物,免疫标记复合物包含抗体功能和报道元件功能,因此,与直接共轭的抗体具有相同的功能。

[0012] 本发明的优点包括:抗体功能和报道元件功能从一开始就是分开的单元,并且它们可以通过简单混合形成非常稳定的复合物。此外,该方法不依赖于抗体的抗体类别。一起,这创建了一个灵活和简单的系统来附着各种报道元件至抗体。重要的是,标记的抗体随后可用于直接免疫标记方法(一步法)。

[0013] 此外,使用点击化学与常规共轭化学相比的优点包括:快速,不需要额外的反应性化学品,不形成副产物(产品立马使用),并且试剂的量和浓度可以从非常低改变到非常高。这些特征使得本发明的方法适合于“在实验台上”的小规模共轭以进行大规模共轭以用于分布。

[0014] 根据本发明的一个方面,至少部分地通过形成(稳定的)免疫标记复合物的方法实

现上述目的,其中,所述方法包括:选择第一生物素化的一抗,选择第一单价生物素结合的组合物,所述组合物标记有第一报道元件,以及在反应容器中,混合第一生物素化的一抗与第一标记的单价生物素结合的组合物。

[0015] 如上所述,可以使用生物素化的一抗和常规链霉亲和素在样品的免疫标记期间实现扩增。然而,这种方法必须分两步进行,因为常规链霉亲和素包含四个生物素结合位点,因此只能用于结合固相(如固定组织样品)的生物素化抗体。在液相中向生物素化抗体添加常规链霉亲和素具有快速聚集成大抗体复合物的非常不利的效果。然而,根据本发明,代替使用单价生物素结合组合物,其中仅有一个生物素的功能结合位点,从而避免了在液相(在反应容器中)中混合步骤期间的抗体聚集。因此,单价生物素结合组合物不用作二级标记试剂,而是作为报道分子的载体与生物素化抗体形成稳定的复合物,用作直接共轭的抗体。应当理解,样品不同于第一生物素化的一抗。

[0016] 此外,该方法允许更多的报道元件分子连接到每个抗体分子,而不是将报道元件直接共轭至抗体。因此,该方法可以用于产生比直接共轭的抗体更强的信号。此外,当使用单价生物素结合组合物,如单价链霉亲和素,以形成免疫标记复合物时,新的技术参数变得重要。必须注意保留抗体(其表位结合位点)的结合功能。用单价链霉亲和素过载抗体可以空间阻断其表位结合位点。因此,抗体不能被视为任何蛋白质,但必须被视为具有特殊功能质量的蛋白质。为了最小化其表位结合位点的空间位阻,必须仔细选择单价链霉亲和素与抗体之间的分子比。此外,即使在最优单价链霉亲和素-抗体比例下,单价链霉亲和素与生物素化抗体之间的快速结合反应引起免疫标记技术的意外现象。由于反应是快速的,与液体混合物中的链霉亲和素紧密接触的第一生物素化抗体将完全负载链霉亲和素,导致链霉亲和素相对于混合物中剩余抗体短缺。

[0017] 因此,混合物将含有不均匀的免疫标记复合物群体,其中一些抗体的单价链霉亲和素过量,而其他抗体不含或含少量单价链霉亲和素。当这种不均匀的混合物用于样品的免疫标记时,具有低单价链霉亲和素货物的抗体将具有结合样品中的表位的优点,因为:1) 抗体的表位结合位点的空间位阻较小,以及2) 单价链霉亲和素-抗体复合物的尺寸较小。因此,具有低或无单价链霉亲和素货物的抗体将优先结合样品中的靶分子(表位),导致弱免疫标记信号。由于明亮的信号是免疫标记技术的关键,因此单价链霉亲和素的均匀分布和正确的单价链霉亲和素与抗体的比例对免疫标记复合物至关重要。相比之下,当使用常规的链霉亲和素作为间接方法时,链霉亲和素可以多余地添加,而无需考虑会改变抗体的结合功能或链霉亲和素的分布,因为生物素化的抗体已经结合到样品中的固体表面(下面进一步讨论)。

[0018] 为了促进抗体分子之间单价链霉亲和素的均匀分布,可以使用与生物素结合具有较慢速率的单价生物素结合组合物的变体,例如,trapavidin,其结合至生物素的速率比链霉亲和素慢十倍(Nat Methods. 2010,7(5):391-3)。也可以改变混合条件,温度,粘度等,以实现单价链霉亲和素在生物素化抗体上的更均匀分布。

[0019] 如前所述,可以使用生物素化的一抗和常规链霉亲和素进行样品的免疫标记。然而,这种方法必须在两个步骤中顺序进行,因为常规链霉亲和素含有四个生物素结合位点,因此只能用于结合固相(如固定组织样品)的生物素化抗体。在液相中向生物素化抗体添加常规链霉亲和素具有快速聚集成大抗体复合物的非常不利的效果。因此,常规链霉亲和素

只能用于间接免疫标记方法,类似于二抗,而不是直接法。

[0020] 从上述可以理解,优选随后使用免疫标记复合物与样品接触。然而,免疫标记复合物本身可以作为单独组分提供给例如研究人员,其中,研究人员将执行使用免疫标记复合物免疫标记样品的步骤。在本发明的一个可能实施例中,生物素化抗体和单价生物素结合的组合物作为两个单独的单元提供,并具有如何形成用于与样品接触的免疫标记复合物的指示。因此,选择第一生物素化的一抗和选择第一单价生物素结合的组合物可以与第一生物素化的一抗跟第一标记的单价生物素结合组合物相混合分开实施。可能地,在相对于选择第一生物素化一抗和第一单价生物素结合的组合物为单独的位置进行混合。

[0021] 根据本发明,术语“单价生物素结合的组合物”应广泛地解释。例如,单价生物素结合的组合物可以基于链霉亲和素(streptavidin),亲和素(avidin),traptavidin,captavidin,tamavidin,bradavidin,中性亲和素(neutravidin)和 rhizavidin等中的至少一种,或任何进一步开发或发现的等同分子或具有适当生物素结合构型的分子的组合。

[0022] 在本发明的一个可能的实施例中,单价生物素结合的组合物包含单价链霉亲和素(或链霉亲和素的衍生物)。存在用于工程化单价链霉亲和素的不同方法。链霉亲和素分子是由四个相同的亚基组成的四聚体,其中每个亚基具有生物素的结合位点。单价链霉亲和素可以通过产生链霉亲和素的单体得到,即单个亚基,形成单体链霉亲和素。然而,单体链霉亲和素的结合亲和力比四聚体链霉亲和素低得多,因为其部分生物素结合位点来自相邻的亚基。通过至少两种不同的方法可以产生对生物素具有高结合亲和力的单价四聚链霉亲和素。第一,通过组装链霉亲和素,其由一个功能亚基(活性亚基)和三个对生物素(死亡亚基)没有亲和力的突变亚基组成(Nature Methods. 2006, 4:267-73)。第二,通过用三聚生物素化的寡核苷酸处理四聚体链霉亲和素,阻断链霉亲和素上的四个生物素结合位点中的三个(Angew Chem Int Ed Engl. 2013, 52(21):5509-12)。应当理解的是,任何未来设计的单价生物素结合分子都是可能的,并且被认为与通用术语单价链霉亲和素组合物相当并且包含在其中。然而,当使用单价链霉亲和素作为单价生物素结合组合物时,目前优选使用单价四聚物链霉亲和素。

[0023] 应当理解的是,链霉亲和素与生物素非常紧密地结合,本方法使用生物素化的一抗与链霉亲和素形成复合物。生物素化抗体是与几种生物素分子共价共轭的抗体,通常每抗体3-10个生物素分子。因为几种链霉亲和素分子与每个生物素化的抗体结合,所以,可以实现信号扩增。链霉亲和素-生物素结合是最强的已知非共价结合,比抗体可产生的结合强度高1000-1000000倍。因此,生物素化的一抗和链霉亲和素之间的复合物导致比一抗和二抗之间的结合更加稳定的复合物。

[0024] 在形成第一免疫标记复合物之后,优选(但可选地)进一步包括加入阻断剂以阻断单价生物素结合组合物的单价未结合部分。阻断剂优选为游离生物素。加入阻断剂将使任何过量的例如单价链霉亲和素不具有反应性,从而降低了过量单价链霉亲和素与另外的生物素化的一抗之间不希望的风险。可以通过引入小心滴定步骤并允许“足够”长的混合步骤(生物素化的一抗和单价链霉亲和素组合物之间的反应)来替代地减少这种不希望的风险。

[0025] 在一个实施例中,报道元件可以选自包含荧光物、酶、肽、量子点和过渡金属的组。一些所公开的报道元件是本领域技术人员已知的,但是应当理解的是,其他/将来的报道元

件可以与本发明相等地使用。

[0026] 例如,使用荧光物作为与“常规”四价链霉亲和素相关的报道元件是本领域技术人员所熟知的。使用一系列不同分子标记常规链霉亲和素,包括荧光物、蛋白、肽、寡核苷酸,同样为一个众所周知的工艺,以类似的方式可以用于标记例如用于形成第一单价链霉亲和素组合物的单价链霉亲和素。

[0027] 在本发明的一个优选实施例中,选择第一单价生物素结合的组合物与第一生物素化一抗之间的比例使得第一单价生物素结合组合物阻止第一生物素化一抗的活性结合位点的风险降低。

[0028] 另一方面,如果将单价生物素结合组合物的分子太少地附着于每个抗体分子,则将是弱检测信号。然而,可以通过几种不同的手段进一步增强信号。首先,可以修饰单价生物素结合组合物以使得例如更多的荧光物分子可以附着(共轭)至其上。这可以通过使单价生物素结合组合物更大而获得,即是,增加可用于荧光物共轭的表面,或增加荧光物的可用共轭位点的密度,即是,增加可用于例如荧光物共轭的化学基团的数目,例如-NH₂基团或醛基。例如,关于使用单价链霉亲和素,后者可以通过添加富含荧光物共轭位点的标签,例如赖氨酸富集标签来获得。标签可以并入链霉亲和素的氨基酸序列中,或在单独的步骤中化学加入。还可以将包含多个报道元件分子的大分子化学附着至单价生物素结合组合物上。该大分子可以为聚合物,例如葡聚糖和聚乙二醇(PEG)。

[0029] 增强信号的另一个策略是添加一个单独的增强子步骤。例如,关于使用单价链霉亲和素,可以用被用于增强信号的抗体识别的抗原标签来标记链霉亲和素。抗原标签可以并入链霉亲和素的氨基酸序列中,或者在单独的后续步骤中化学加入。用于抗原检测(扩增步骤)的抗体可以与报道分子,例如荧光物,直接共轭,或与报道分子共轭的二抗所识别的另外的第二抗原共轭。该概念在申请人的SE1550041-6中进一步公开,该内容通过引用完全并入。链霉亲和素还可以用被锁式探针识别用于滚环扩增的寡核苷酸探针(Nature Methods. 2006, 3: 725-727)或含有反义探针和报道元件的大复合物,例如附着有反义探针和荧光物的基于葡聚糖的复合物,来标记。因此,通过添加下游扩增步骤,可以将与每个生物素化抗体结合的单价生物素结合分子的数目保持为低,这最小化了抗体的抗原结合位点的空间位阻的风险。

[0030] 根据本发明,本发明的免疫标记复合物用于检测样品中的靶,样品为生物样品或非生物样品。因此,在本发明的一个实施例中,如上所述的第一免疫标记复合物与样品接触,并培育足够的时间以允许第一免疫标记复合物选择性地结合靶标,然后通过开发来自标签的信号来检测免疫标记复合物,例如,在显微镜下照射样品以检测来自荧光物的光。在此实施例中,报道元件优选为荧光物。

[0031] 在本发明的优选实施例中,如上所述形成的第二免疫标记复合物也与样品接触,并且样品以相似的方式培育足够时间以允许第二免疫标记复合物选择性地结合靶标。在优选的实施例中,第二免疫标记复合物包含与第二单价生物素结合组合物混合的第二生物素化的一抗,第二生物素化的一抗不同于第一生物素化的一抗,第二单价生物素结合组合物用不同于第一报道分子的第二报道分子标记。第二免疫标记复合物优先与第一免疫标记复合物一起添加到样品中。

[0032] 该方法可以单独使用或与任何其它免疫标记方法组合使用,例如与直接共轭的一

抗(直接法)组合或与一抗+标记的二抗(两步法)组合使用,或与生物素化的一抗+标记的常规链霉亲和素(两步法)组合使用。后者要求,在用生物素化的一抗+标记的常规链霉亲和素标记之后添加本方法,并且在加入本方法的免疫标记复合物之前,用游离生物素阻断标记的样品。或者,可以在两步法中使用单价链霉亲和素,以避免在添加本方法的免疫标记复合物之前对生物素阻断步骤的需要。

[0033] 根据本发明的另一方面,提供了免疫标记复合物的试剂盒,其包含根据上述讨论形成的第一和第二免疫标记复合物,其中,所述第二免疫标记复合物包含与第二单价生物素结合组合物混合的第二生物素化的一抗,所述第二生物素化的一抗不同于所述第一生物素化的一抗,所述第二单价生物素结合组合物用不同于第一报道分子的第二报道分子标记。

[0034] 如本领域技术人员将理解的,本发明将例如允许在一个实施方案中具有标记四种一抗的自由的可能性,独立地,如果在小鼠、大鼠、兔或山羊中制备,对于这,你只需要四种不同荧光物标记的四个单价链霉亲和素的一个试剂盒。具有单价二抗的等效试剂盒需要四种不同的二抗(抗小鼠,抗大鼠,抗兔和抗山羊),每种二抗用四种不同的荧光物标记,总共为16种不同的单价二抗。

[0035] 此外,虽然使用单价链霉亲和素的本发明实施方案仅需要游离生物素作为阻断剂,但是单价二抗需要四种不同的阻断剂(每种动物物种一种)。因此,单价链霉亲和素的五个组分的试剂盒(四个标记的单价链霉亲和素+一个阻断剂)需要一个20个组分的试剂盒,用于相应的单价二抗试剂盒(16个标记的单价抗体+四个阻断剂)。

[0036] 根据本发明的另一方面,提供了免疫标记复合物和增强子步骤的试剂盒,包含根据上述讨论所形成的免疫标记复合物和至少一种第一增强子组分。其中,单价生物素结合的组合物包括第一组至少一种抗原和寡核苷酸,至少一种抗原和寡核苷酸的第一组被第一增强子组分识别,第一增强子组分和报道元件共轭,或第一增强子组分和第二组至少一种抗原和寡核苷酸共轭,至少一种抗原和寡核苷酸的第二组被第二增强子组分识别,第二增强子组分和第二报道元件共轭,其中第二组不同于第一组。增强子组分优选为如上述所形成。

[0037] 在研究所附权利要求和以下描述时,本发明的其它特征和优点将变得显而易见。本领域技术人员认识到,在不脱离本发明的范围的情况下,本发明的不同特征可以组合以创建除了下面描述的那些之外的实施例。

附图说明

[0038] 本发明的各个方面,包括其特征和优点,将从以下详细描述和附图中容易地理解,其中:

图1a和1b显示已经与生物素化抗体一起培育的生物样品的实例,

图2a和2b示出在液相中的预培育过程,包含常规的四价链霉亲和素和单价链霉亲和素。

[0039] 图3举例说明根据本发明的实施例的一个多重免疫标记过程,预培育过程使用单价生物素结合分子。

具体实施方式

[0040] 现在将参照附图更全面地描述本发明,其中示出了本发明的当前优选实施例。然而,本发明可以以许多不同的形式实施,并且不应被解释为限于本文所阐述的实施例;而是提供这些实施例是为了全面性和完整性,并将本发明的范围充分地传达给技术人员。全文上下,相同的参照符号指代相同的元件。

[0041] 现在参考附图,特别是图1a,显示使用常规链霉亲和素的标准免疫标记程序。常规链霉亲和素只能用于间接两步法,只能用于一种生物素化抗体。在左手侧描绘了已经与生物素化的抗体104一起培育的生物样品102。生物素化的抗体104结合至生物样品102中的第一靶标抗原,并且已经被特异性地选择用于允许在例如随后的免疫荧光过程中后续检测/分析。为了允许检测第一靶标抗原,将具有结合的生物素化抗体104的样品102与已标记的链霉亲和素106(图1a的右侧)一起培育。设置在链霉亲和素上的标记组分是报道元件,例如,与链霉亲和素共轭的荧光物,从而形成标记的链霉亲和素106。其他类型的报道元件是可能的。报道元素的选择是基于手头的应用进行的。在图1a中,标记的链霉亲和素106的生物素结合位点被表示为指代为108的“黑色圆圈”。类似地,生物素分子110表示为在生物素化抗体104处的“白色圆圈”,其中,生物素分子110共轭至抗体104。

[0042] 链霉亲和素只能用于间接免疫标记法(两步法)中一种生物素化抗体的检测。如果样品和第一生物素化抗体104和第二生物素化抗体112一起培育,第一生物素化抗体识别第一靶标抗原,第二生物素化抗体识别第二靶标抗原,随后与两种(不同)标记的链霉亲和素106和106'一起培育,抗体104和112都将用标记的链霉亲和素106和106'标记,图1b。因此,在该两步法中,每个生物素化抗体将产生两个信号的混合,例如,如果标记为荧光物,以两种不同颜色发光。

[0043] 人们可能相信,在将它们添加至样品102之前,通过用第一标记的链霉亲和素106预标记第一生物素化抗体104,用第二标记的链霉亲和素106'预标记第二生物素化抗体112,可以解决该问题。然而,当使用具有四个生物素结合位点(四价)的“常规”链霉亲和素时,将形成聚集体,因为每个链霉亲和素分子106将结合多于一个生物素化的抗体分子104,并且每个生物素化的抗体104将结合多于一个链霉抗生物素蛋白分子106,如图2a所示,且如上面进一步讨论的。

[0044] 然而,根据本发明,使用单价生物素结合组合物,其仅具有单个生物素结合位点。如图2b所示,使用标记的单价链霉亲和素106'与液相中的第一抗104在预培养过程中将能够通过点击化学过程在生物素化的抗体104和标记的单价链霉亲和素114之间形成免疫标记复合物而不产生聚集。使用点击化学与常规共轭化学相比的优点包括:快速,不需要额外的反应性化学品,不会形成副产物(产品立即使用),并且试剂的量和浓度可从非常低改变到非常高。这些特征使得本发明的方法适合于“在实验台上”的小规模共轭至用于分布的大规模共轭。此预培育步骤将进一步使得形成在生物素化抗体和单价链霉亲和素之间的多重免疫标记复合物;以使得可以形成大量多个不同的一抗104,每个与标记的单价链霉亲和素114共轭,(即是,与图2a相比,不产生聚集)。

[0045] 由于单价链霉亲和素不仅可以用单一类型的报道分子标记,而且可以用大量不同的报道分子标记,例如,在不同波长范围内有活性的不同荧光物,根据本发明可以产生包括

多个不同一抗的组(例如,如图3所示,第一一抗104和第二一抗112,一抗中的每个标靶一个不同的抗原,抗原包括在生物样品102中),一抗中的每一个(单独地)和不同标记的单价链霉亲和素一起预培育,例如标记的单价链霉亲和素114和114'。这是可能的,因为免疫标记复合物可以用于直接免疫标记方法(1步法)。

[0046] 因此,可以将第一一抗104和第一单价链霉亲和素组合物114预培育,在液相中形成第一免疫标记复合物,第二一抗112和第二单价链霉亲和素组合物114'预培育,在液相中形成第二免疫标记复合物。由于第一单价链霉亲和素组合物114和第二单价链霉亲和素114'有利地标记有不同类型报道元件,例如标记有不同类型的荧光物,在随后的分析过程中,可以通过将样品与第一和第二免疫标记复合物培育来单独检测/分析样品中的第一和第二靶标抗原。

[0047] 应当注意的是,期望在第一一抗104和第二一抗112中的每一个的预培育过程之后,加入阻断剂以阻断未结合的单价链霉亲和素。这种阻断剂优选为游离生物素。加入阻断剂将使任何过剩的单链链霉亲和素失去活性,从而降低了过剩的单链链亲和素与另外的生物素化的一抗之间的不希望的风险,例如第一一抗104 vs. 第二一抗112。

[0048] 总之,本发明涉及通过使用生物素点击化学将报道分子附着于抗体的方法。通过形成免疫标记复合物可以缓解这种情况,其中,方法包括选择第一生物素化一抗,选择第一单价生物素结合的组合物,其标记有第一报道元件,以及在反应容器中的液相中,混合第一生物素化一抗与第一标记单价生物素结合的组合物。

[0049] 根据本发明,使用仅具有一个生物素功能结合位点的单价生物素结合组合物,从而避免在液相中的混合步骤期间产生抗体聚集。作为对比,例如常规链霉亲和素具有四个生物素结合位点,如果在液相中与生物素化的抗体预混合,则其引起快速聚集。

[0050] 本发明的优点包括仅需要一种标记试剂(例如单价链霉亲和素)和一种阻断剂(生物素)。这是因为本发明是完全抗体级独立的。其他可比较的方法通常基于二抗,因此依赖于将二抗和阻断剂调整到一抗所属于的类别。这使得本发明的标记方法更加通用,例如当在多重免疫标记设置中使用。此外,本发明产生比两种抗体之间的复合物更稳定的免疫标记复合物。复合物的高稳定性使其与使用常规共轭化学的直接共轭的抗体相当。

[0051] 上述描述已经具体示例使用单价四聚链霉亲和素作为单价生物素结合组合物的组分,单价生物素结合组合物标记有报道元件。然而,如上所述,根据本发明可以允许单价生物素结合组合物基于不同的单价生物素结合分子,例如,单体链霉亲和素、亲和素、traptavidin、captavidin、tamavidin、bradavidin、中性亲和素(neutravidin)和根瘤菌亲和素(rhizavidin)或任何进一步开发或发现的等价分子或具有适当生物素结合构型的分子的组合。

[0052] 虽然图可以显示方法步骤的具体顺序,但步骤的顺序可能与所描绘的不同。还可以同时或部分同时执行两个或多个步骤。这种变化将取决于设计师的选择。所有这些变化都在本公开的范围内。另外,尽管已经参考具体示例性实施例描述了本发明,但是对于本领域技术人员来说,许多不同的改变,修改等将是显而易见的。本领域技术人员根据研究附图,公开内容和所附权利要求书,可以在实践所要求保护的发明时,理解和实现所公开的实施例的变化。此外,在权利要求中,“包括”一词不排除其他元件或步骤,并且不定冠词“一个”不排除多个。

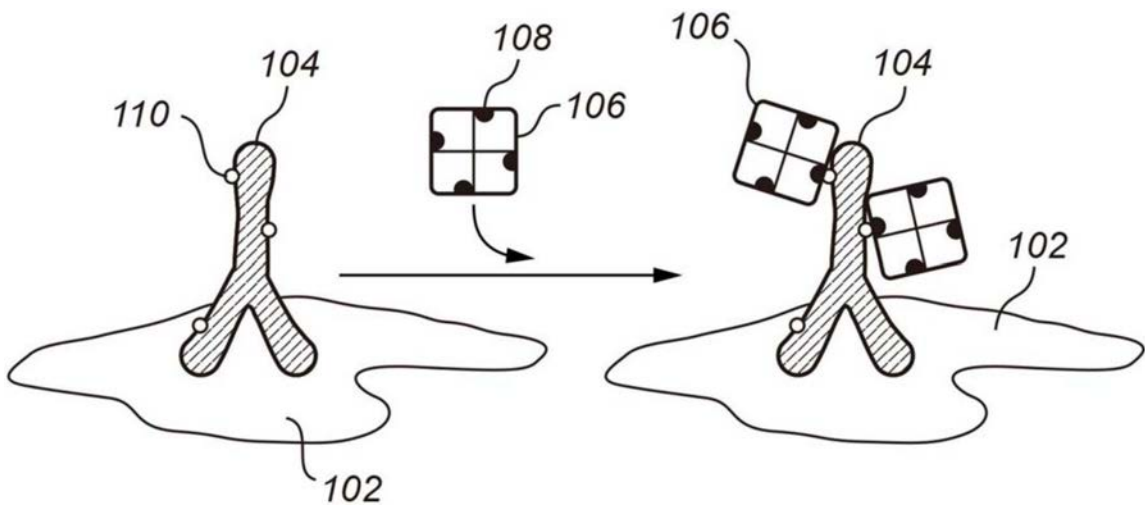


图1a

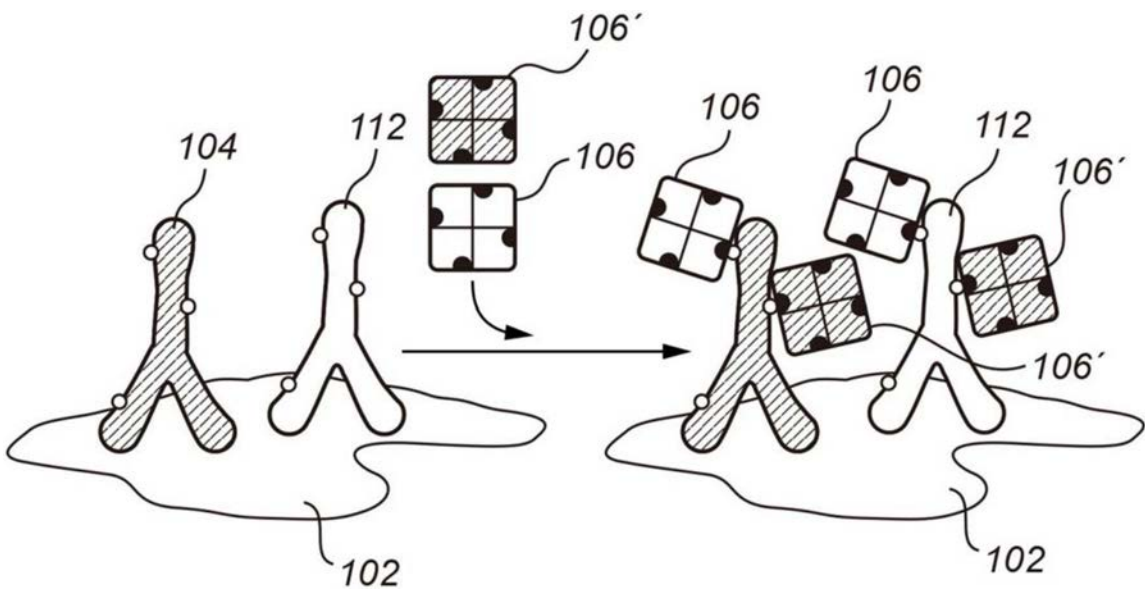


图1b

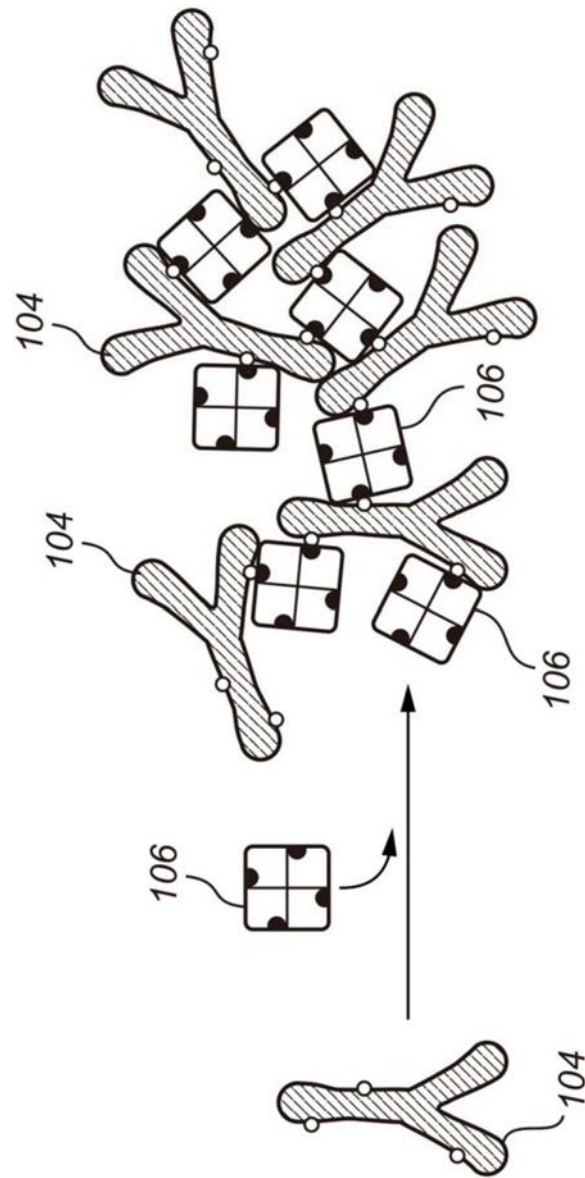


图2a

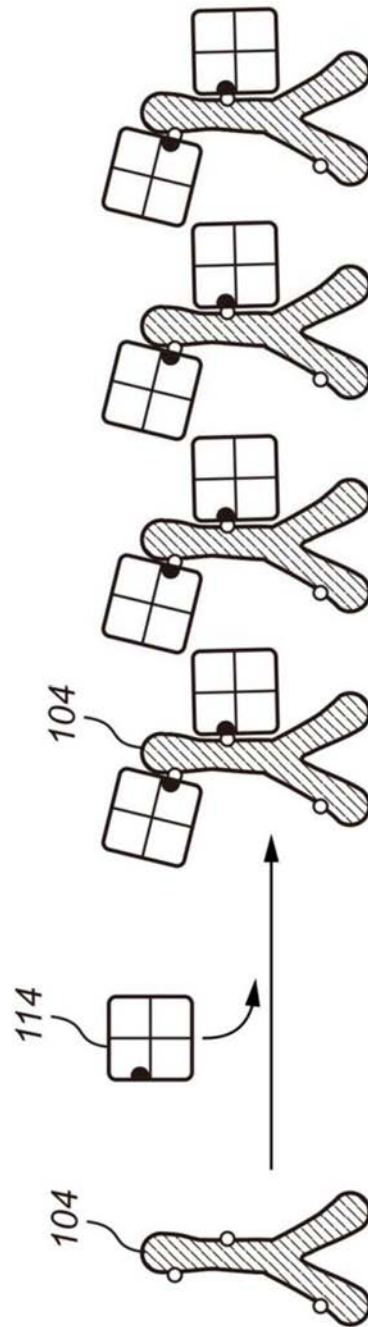


图2b

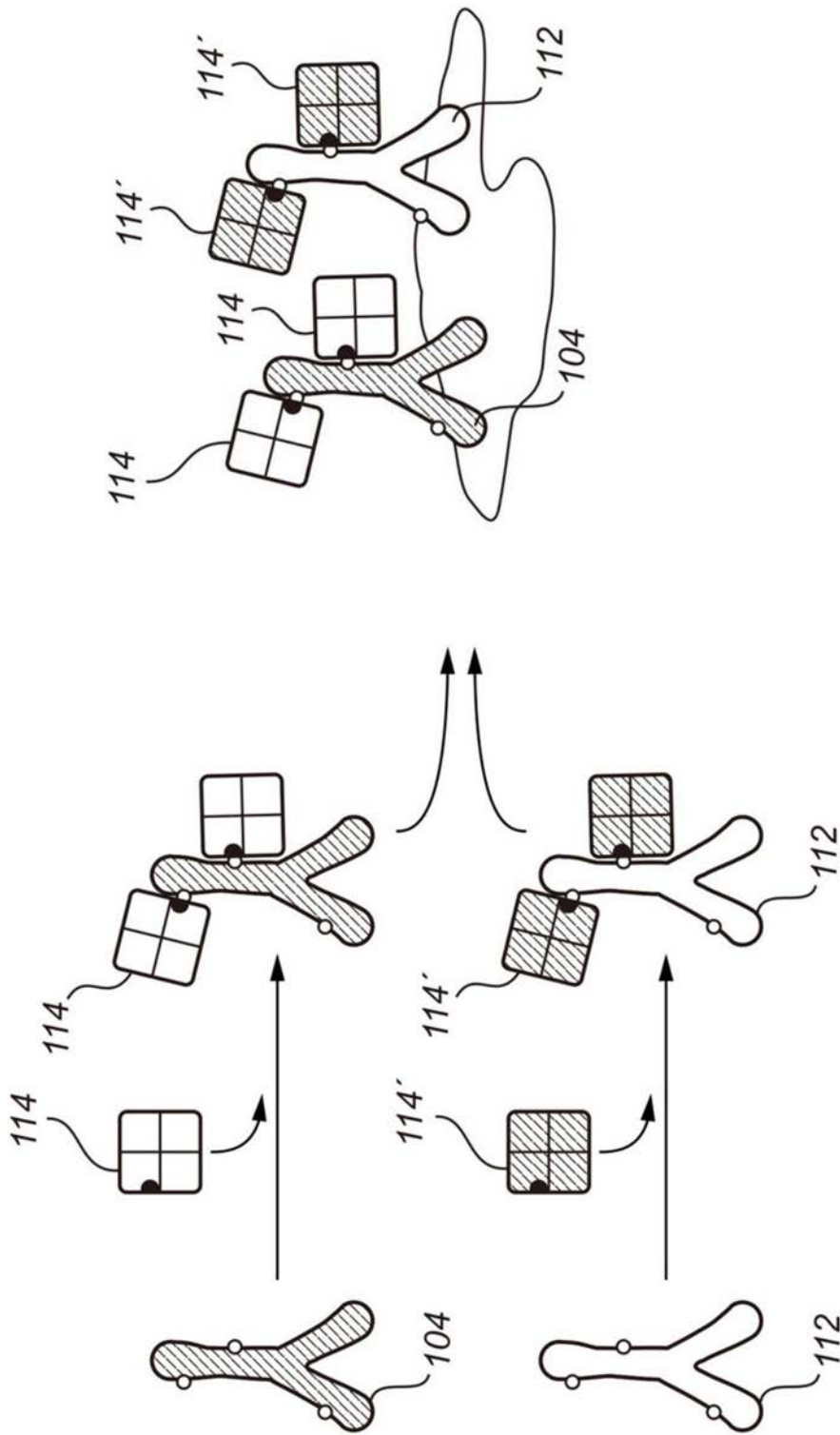


图3

专利名称(译)	免疫标记复合物的形成方法及用途		
公开(公告)号	CN107209176A	公开(公告)日	2017-09-26
申请号	CN201680006512.6	申请日	2016-01-19
[标]申请(专利权)人(译)	克罗姆尼贡公司		
申请(专利权)人(译)	克罗姆尼贡公司		
当前申请(专利权)人(译)	克罗姆尼贡公司		
[标]发明人	佩尔福格尔斯特兰德 乌尔夫伊瑞里德		
发明人	佩尔·福格尔斯特兰德 乌尔夫·伊瑞里德		
IPC分类号	G01N33/53		
CPC分类号	G01N33/542 G01N33/5306 G01N33/58 G01N33/583		
代理人(译)	刘晓春		
优先权	1550640 2015-05-20 SE 1550048 2015-01-21 SE		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般涉及用于形成免疫标记复合物的方法，所述免疫标记复合物包括标记的单价生物素结合的组合物。本发明还涉及抗原-报道分子复合物用于检测样品中靶标的用途。

