



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105683754 A

(43) 申请公布日 2016. 06. 15

(21) 申请号 201480043647. 0

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2014. 05. 30

G01N 33/53(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01N 33/68(2006. 01)

10-2013-0061869 2013. 05. 30 KR

C07K 1/00(2006. 01)

C12N 15/09(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2016. 02. 01

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2014/004862 2014. 05. 30

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/193193 KO 2014. 12. 04

(71) 申请人 崔武铉

地址 韩国首尔瑞草区

(72) 发明人 崔武铉

(74) 专利代理机构 北京三聚阳光知识产权代理

有限公司 11250

代理人 程钢

权利要求书3页 说明书28页

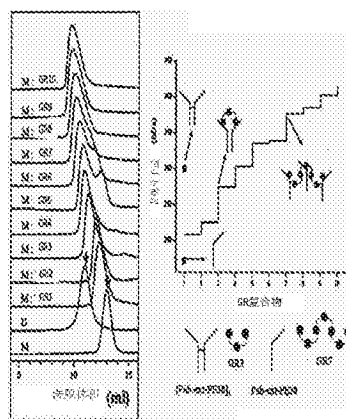
序列表6页 附图42页

(54) 发明名称

由重复链和单体的复合物交叉形成的超级复合物及其应用

(57) 摘要

本发明涉及一种重复链和单体的复合物之间交叉结合形成的超级复合物,以及使用该超级复合物放大单体效应的方法,具体地,涉及:一种超级复合物,是通过形成重复链和单体的复合物,然后在复合物之间进行交叉结合而得到的,其含有结合域重复链作为活性成分,其中所述结合域对所述单体具有结合特异性;以及一种放大单体效应的方法,包括信号放大等,由于该超级复合物包含多个单体,其提供的对单体靶标的效应,比单体的生物和化学效应高出许多倍。



1. 一种用于生产超级复合物的重复链的制备方法,包含生产重复链的步骤,所述重复链含有单一类型的结合域或多种类型的结合域,所述单一类型的结合域或多种类型的结合域在单体中具有至少两个结合位点并且对所述单体具有结合特异性。

2. 一种用于生产超级复合物的多个单体/重复链的复合物的制备方法,包括以下步骤:

1) 制备重复链,单一类型的结合域或多种类型的结合域在所述重复链中重复,所述单一类型的结合域或多种类型的结合域在单体中具有至少两个结合位点,并且对所述单体具有结合特异性;以及

2) 将步骤1)的重复链与所述单体混合,制备多个单体/重复链的复合物,其中所述单体具有至少两个结合位点结合于所述重复链。

3. 一种超级复合物的制备方法,其包括以下步骤:

1) 制备重复链,单一类型的结合域或多种类型的结合域在所述重复链中重复,所述单一类型的结合域或多种类型的结合域在单体中具有至少两个结合位点,并且对所述单体具有结合特异性;

2) 将步骤1)的重复链与所述单体混合,制备多个单体/重复链的复合物,其中所述单体具有至少两个结合位点结合于所述重复链;以及

3) 步骤2)的多个单体/重复链的复合物之间进行交叉结合,形成所述复合物的聚集体。

4. 根据权利要求1至3任一所述的方法,其中所述单体为蛋白质。

5. 根据权利要求1至3任一所述的方法,其中所述单体选自:抗体、配体和受体,以及它们的片段、重组体和衍生物,以及生物/化学效应物基团共轭物。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中所述抗体选自:抗体片段、Fab片段、含有片段的Fab片段、Fv片段、含有片段的Fv片段、Fc片段以及含有片段的Fc片段。

7. 根据权利要求1至3任一所述的方法,其中所述结合域为蛋白质。

8. 根据权利要求1至3任一所述的方法,其中所述结合域为微生物来源的蛋白质。

9. 根据权利要求1至3任一所述的方法,其中所述结合域选自:链球菌G蛋白质、金黄色葡萄球菌A蛋白、大消化链球菌L蛋白、以及它们的衍生物。

10. 一种通过权利要求1所述的方法制得的重复链。

11. 一种通过权利要求2所述的方法制得的多个单体/重复链的复合物。

12. 一种通过权利要求3所述的方法制得的超级复合物。

13. 一种放大单体效应的方法,含有以下步骤:混合权利要求10所述的重复链、权利要求11所述的多个单体/重复链的复合物或者权利要求12所述的超级复合物,形成结合于所述单体靶标的超级复合物。

14. 根据权利要求13所述的放大单体效应的方法,还包括以下步骤:测量单体对所述单体靶标的效应。

15. 根据权利要求13或14所述的放大单体效应的方法,其中所述单体的靶标选自:抗原、抗体、多肽、蛋白质、细菌、病毒和真菌。

16. 根据权利要求15所述的放大单体效应的方法,其中所述细菌选自:幽门螺杆菌、结核分支杆菌和沙眼衣原体。

17. 根据权利要求15所述的放大单体效应的方法,其中所述病毒选自:流感病毒、口蹄疫病毒、人乳头状瘤病毒(HPV)、登革热病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎表面抗原以及乙型肝炎

炎表面抗体。

18. 根据权利要求14所述的放大单体效应的方法,其中,利用二级探针(抗体)-标记物轭合物和所述标记物的生物化学标签功能测量所述单体的效应。

19. 根据权利要求18所述的放大单体效应的方法,其中所述标记物选自:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、胶体金、荧光素、量子点、葡萄糖氧化酶、萤光素酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、苹果酸脱氢酶(MDH)、乙酰胆碱酯酶、同位素以及染料。

20. 根据权利要求18所述的放大单体效应的方法,其中所述底物选自:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPD)、二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基咪唑,5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐/碘硝基氯化四氮唑蓝(BCIP/INT),新品红(NF)以及高纯固红TR盐。

21. 一种分析试剂盒,具有靶标特异性,含有多个单体,并含有结合域的重复链,其中,每个单体具有至少两个结合位点,所述重复链特异性结合于所述单体。

22. 根据权利要求21所述的试剂盒,其中所述试剂盒由下列组成:

- 1) 结合域的重复链,具有单体结合特异性;
- 2) 单体,特异性结合于所述检测靶标;
- 3) 二级探针轭合物,由标记物标记,所述标记物通过与底物反应而激活;
- 4) 底物溶液,用于与所述标记物反应;
- 5) 洗涤缓冲液,用于每个反应阶段;以及
- 6) 停止液,用于终止酶反应。

23. 根据权利要求21或22所述的试剂盒,其中所述试剂盒用于以下分析方法:免疫组织化学技术、免疫印迹法、免疫沉淀反应法、酶联免疫吸附测定(ELISA)法、凝集法、免疫层析测定法以及放射免疫测定法。

24. 一种重复链-检测官能团的制备方法,包含以下步骤:将检测官能团连接、共轭或融合至与单体结合的结合域的重复链。

25. 一种制备多个单体/重复链-检测官能团的复合物的方法,包括以下步骤:

1) 将检测官能团连接、共轭或融合至与单体结合的结合域的重复链,得到重复链-检测官能团;以及

2) 将步骤1)所制得的重复链-检测官能团与多个单体混合,来制备多个单体/重复链-检测官能团的复合物。

26. 一种超级复合物的制备方法,包括以下步骤:

1) 将检测官能团连接、共轭或融合至与单体结合的结合域的重复链,来制备重复链-检测官能团;

2) 将步骤1)所制得的重复链-检测官能团与单体混合,来制备多个单体/重复链-检测官能团的复合物,其中所述单体具有至少两个结合位点结合于所述重复链;以及

3) 使步骤2)的多个单体/重复链-检测官能团的复合物之间形成交叉结合,来形成所述复合物的聚集体。

27. 根据权利要求24、25或26所述的方法,其中所述检测官能团选自: Cy-3、Cy-5、FITC、GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)以及德克萨斯红。

28. 一种通过权利要求24所述的方法制得的单体结合域的重复链-检测官能团。

29. 一种通过权利要求25所述的方法制得的多个单体/重复链-检测官能团的复合物。

30. 一种通过权利要求26所述的方法制得的超级复合物。

31. 一种单体靶标的检测方法,包含以下步骤:将权利要求29所述的多个单体/重复链-检测官能团的复合物,或权利要求30所述的多个单体/重复链-检测官能团的超级复合物,与靶标抗原混合,形成超级复合物。

32. 根据权利要求31所述的单体靶标的检测方法,其中所述方法还包括测量单体的靶标检测水平的步骤。

## 由重复链和单体的复合物交叉形成的超级复合物及其应用

### [0001] 发明背景

#### 1. 技术领域

[0002] 本发明涉及一种超级复合物,其通过重复链和单体形成的复合物之间交叉结合形成,还涉及一种通过该超级复合物放大单体生化效应的方法。

[0003] 具体地,通过采用对单体具有结合特异性的结合域重复链作为活性成分,形成重复链/单体复合物,并通过该复合物之间的交叉结合形成聚集体形式超级复合物。这种超级复合物包含多个单体,因此其可以提供放大的单体效应,特别地,其对单体靶标的生物和化学效应比单一单体大许多倍。

[0004] 此处的重复链可以利用对天然单体显示结合特异性一些域或材料来制备。所述粘合剂可结合多种单体。例如配体、受体、抗体和酶。通过使用多个由单体和重复链制备的复合物,以及使用由该复合物制备的超级复合物,可显著地增加单体的效应。在此单体中,发现生物和化学官能团是连接、共轭和融合的,此时,这些官能团的效应能够被显著的放大。

#### 2. 背景技术

[0005] 为了检测靶标,单体与靶标结合并产生检测信号。此时,该检测信号的强度,即该单体的效应,是由靶标浓度检测材料和检测探针、探针浓度和探针信号的强度之间的亲和力确定的。一般而言,该探针是单体,该检测靶标材料是该单体的靶标材料,该信号表示该单体的效应。

[0006] 免疫层析法,作为使用抗体的检测方法之一,也被称为“快速抗原检测”、“横向流检测”、或简单地“条带检测”,其广泛用于诊断试剂盒的开发。迄今为止,使用所述免疫层析法的靶标诊断,包括药物滥用、血液成分分析、A群链球菌抗原、幽门螺旋杆菌、人类结核分枝杆菌、乙型肝炎表面抗原/抗体、登革热病毒、流行性感冒、寄生虫(用于疟疾诊断的恶性疟原虫)等。免疫层析法比较简单,且测定的持续时间仅为约5~10分钟,这是非常快的。保存在室温下是优异的,测试成本并不昂贵。所以,这可以被认为是最佳的疾病诊断方法,可应用于各种检测。

[0007] 胶体金被广泛用作免疫层析法的色原,胶体金标记的免疫球蛋白被广泛地用于疾病的诊断。免疫球蛋白结合的胶体金颗粒已经被应用于抗原分子的直接检测。1981年,利弗林(Leuvering)等人开发出了金颗粒凝集法,即所谓的溶胶颗粒免疫分析(SPIA),进而开发出了基于该法的妊娠诊断试剂盒。从那以后,使用黄金的膜检测方法已被报道用于由细菌、病毒、寄生虫和真菌等引起的疾病的诊断。快速抗原免疫检测也已经被开发为使用胶体金的快速现场诊断方法,该法容易和简单,且测试的持续时间也短至5~10分钟。快速抗原检测是很重要的,因为它不仅可用于人类传染性疾病的早期诊断,而且也可用于动物传染性疾病的早期诊断和预防。

[0008] 目前所用的快速抗原检测试剂盒的问题是,它只在第一急性疾病症状出现的2~3天之内有效。例如,对于病毒引起的疾病的诊断,如果是在第一症状出现3天后进行检测,该

快速抗原检测试剂盒可以呈现阴性结果,因为该病毒是在引起这些症状3天后迅速消失。如果患者是小孩,病毒浓度维持的较长,在症状发展5天后仍然可以采集测试样品。然而,如果患者是成年人,病毒浓度随着时间的推移迅速下降,所以必须在症状发展4~5天之内采集测试样品,表明抗原诊断是受年龄限制的。常规的快速抗原检测试剂盒的另一个问题是,该诊断试剂盒的试剂的灵敏度是低于预期的,特别是对低浓度的抗原浓度。世界范围内已经广泛地开发了用于各种流感病毒诊断的各种快速抗原检测试剂,这些产品的灵敏度连续不断地增加。然而,季节性疾病的灵敏度只有60~83%,且新的猪病毒的灵敏度只有40~69%。对当今美国市场上的三种诊断性测试“BinaxNow试剂盒”、“EZ流感病毒A+B(碧迪公司)”和“Quickvue(库德尔)”进行效果检查,结果,BinaxNow试剂盒的H1N1病毒检测效率为40%,这是最低的,而Quickvue和EZ流感病毒A+B分别显示了69%和49%的效率(美国疾病控制和预防中心(CDC),用于检测新型甲型流感(H1N1)病毒快速流感诊断测试的评价:美国,2009年,发病率和死亡率每周报道Morb Mortal Wkly Rep,2009年;58期:826-829)。

[0009] 常规的快速抗原检测试剂具有这样低的灵敏度的原因是病毒浓度不足,因为要么是被传染者的病毒浓度很低,要么是未在最好/最佳条件下从患者身上采集样品以保证足够的病毒进行测试。因此,如果来自患者的样品中未含有足够量的抗原,即使该患者已被诊断为感染了病毒,却难以诊断疾病。因此,有必要研究用于样品中低浓度的抗原的检测方法和材料。

[0010] 先前,本发明的发明人使用粘合剂的重复链作为基础(支架)构建了一种包含单体和重复链的复合物,该粘合剂对抗原Fab具有结合特异性,所述抗原Fab例如针对抗原-毒素单体;通过增加单体的局部浓度成功地增加单体的碰撞频率;并通过促进交叉结合的形成相应地开发了增加交联多聚体的产量的方法(韩国专利号10-1161323)。本发明通过利用对单体具有结合特异性的粘合剂的重复链,来促进单体之间交叉结合的形成,从而提供了一种大规模生产交联多聚体的方法。然而,通过在免疫测定中,使用对单体具有结合特异性的结合域的重复链,来放大抗体效应的方法还未见报道。

[0011] 本发明的发明人的研究都集中于促进低浓度抗原在诊断过程中的检测灵敏度。结果,本发明的发明人证实,对于抗原检测方法如蛋白免疫印迹、酶联免疫吸附测定(ELISA)和荧光激活细胞分选(FACS),当使用对抗体单体具有结合特异性的结合域的重复链作为信号放大器时,可增加低浓度抗原的灵敏度。本发明的发明人据此证实抗体可被有效地用作检测单体,以在抗原检测试验中放大检测抗体单体的效应。适用于本发明的单体对和相应的结合域是没有限制的。

## 发明内容

[0012] 本发明的一个目的是提供一种超级复合物,由重复链和单体的复合物之间交叉结合形成,具体而言是这样形成的:形成重复链和单体的复合物,该复合物含有对单体具有结合特异性的结合域的重复链作为活性成分,在该复合物之间进行交叉结合,生成超级复合物。

[0013] 本发明的另一目的是提供一种使用该超级复合物放大单体效应的方法,其中该超级复合物含有多个单体,以使得它对单体靶标的生物/化学效应比单一单体大许多倍,从而放大该单体的效应。

[0014] 为了实现上述目的,本发明提供以下[1]~[13]。

[0015] [1]本发明提供了一种用于生产超级复合物的重复链的制备方法,包含生产重复链的步骤,该重复链含有单一类型的结合域或多种类型的结合域,该结合域在单体中具有至少两个结合位点,并且对该单体具有结合特异性。

[0016] [2]本发明提供了一种用于生产超级复合物的多个单体/重复链的复合物的制备方法,其包括以下步骤:1)制备重复链,单一类型的结合域或多种类型的结合域在该重复链中进行重复,这些结合域在单体中具有至少两个结合位点,并且这些结合域对该单体具有结合特异性;2)将步骤1)的重复链与单体混合来制备多个单体/重复链的复合物,其中所述单体具有至少两个结合位点结合于所述重复链。

[0017] [3]本发明提供了一种超级复合物的制备方法,其包括以下步骤:1)制备重复链,该重复链中单一类型的结合域或多种类型的结合域是重复的,所述结合域在单体中具有至少两个结合位点,并且对该单体具有结合特异性;2)将步骤1)的重复链与单体混合来制备多个单体/重复链的复合物,其中所述单体具有至少两个结合位点结合于所述重复链;以及3)在步骤2)的多个单体/重复链的复合物之间进行交叉结合,形成所述复合物的聚集体。

[0018] [4]本发明提供了通过方法[1]制备的重复链。

[0019] [5]本发明提供了通过方法[2]制备的多个单体/重复链的复合物。

[0020] [6]本发明提供了通过方法[3]制备的超级复合物。

[0021] [7]本发明提供了一种放大单体效应的方法,包括以下步骤:将上述[4]的重复链、[5]的多个单体/重复链的复合物或者[6]的超级复合物与单体靶标混合,形成与该单体靶标结合的超级复合物。

[0022] [8]本发明提供了一种用于分析生化功能、检测、诊断以及治疗的试剂盒,该试剂盒包含单体和结合域重复链;其中,所述单体针对检测靶表具有特异性或者用于诱导特异性生化功能,并且含有用于重复链的两个或更多个结合位点;所述结合域对该单体具有结合特异性。

[0023] [9]本发明提供了一种制备重复链-生物化学官能团的方法,其包括以下步骤:将生物化学效应物基团或检测官能团连接、共轭或融合至具有单体结合特异性的结合域重复链。

[0024] [10]本发明提供了一种制备复合物的方法,该复合物是多个单体/重复链-生物/化学官能团的复合物,该方法包括以下步骤:1)制备重复链-生物化学官能团,包括将生物/化学效应物基团或检测官能团连接、共轭或融合至具有单体结合特异性的结合域重复链的步骤;以及2)将步骤1)制得的重复链-生物/化学效应物基团与单体混合,来制备多个单体/重复链-生物/化学效应物基团的复合物。

[0025] [11]本发明提供了通过[9]的方法制备的重复链-结合域生物/化学效应物基团,该结合域与单体特异性结合。

[0026] [12]本发明提供了通过[10]的方法制备的多个单体/重复链-生物/化学效应物基团的复合物。

[0027] [13]本发明提供了一种用于靶标的生化功能、检测、诊断和治疗的分析方法,其包括形成超级复合物的步骤,在该步骤中,将上述[12]的多个单体/重复链-生物/化学效应物基团的复合物与单体靶标混合。

[0028] 有益效果

[0029] 在本发明中,多个单体与重复链结合,从而形成复合物。然后,通过该复合物之间的交叉结合形成一种不可溶的超级复合物,当其浓度较高时被沉淀析出。该超级复合物的聚集、沉淀和尺寸大小取决于单体和重复链的结构。该重复链中的结合域的重复次数影响复合物之间的交叉结合。同时,单体的水溶性和分子大小影响复合物之间交叉结合的机会。由于所述超级复合物含有多个单体,它对单体靶标可提供的生物和化学效应高于单一单体许多倍,因此其可以用于放大抗体即典型单体的检测信号、功能效应以及治疗效果。

## 附图说明

[0030] 参照附图对本发明的优选实施例进行更好的理解,其中:

[0031] 图1是构建表达质粒GR1~10的示意图。图1a是构建pGR2载体~pGR20载体的示意图。具体地,首先构建pGR1载体,使用该pGR1载体构建pGR2~pGR10载体,并同样地构建pGR11~pGR20载体。每个质粒在域III之间具有一个G4S链接链。图1b示出了pGR2系列,如pGR2-2、pGR2-3和pGR2-4,在两个域III之间分别包含两个、三个和四个G4S链接链。

[0032] 图2示出了纯化的G蛋白域III重复链的SDS-PAGE结果。使用16% SDS-PAGE对纯化的重复链进行分析。泳道1~泳道13分别表示GR1、GR2、GR2-2、GR2-3、GR2-4、GR3、GR4、GR5、GR6、GR7、GR8、GR9和GR10。

[0033] 图3示出了GR系列复合物的尺寸排阻层析的结果。两个垂直箭头表示二硫化物二聚体[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>的峰值(左)和单体Fab-ext-PE38的峰值(右)。右侧的表给出了GR复合物的分子量的比较,其中,给出了单体的表观分子量(■)和二硫桥联二聚体的表观分子量(●)。示意图示出了GR3和Fab-EXT-PE38的复合物或GR7和Fab-EXT-PE38的复合物。

[0034] 图4示出了GR2-2、GR2-3和GR2-4复合物的尺寸排阻层析的结果。A表示尺寸排阻层析。两个垂直箭头中,左箭头表示[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>的峰值,右箭头表示Fab-ext-PE38的峰值。B示出了Fab-ext-PE38和GR2-2、GR2-3或GR2-4的复合物的尺寸排阻层析结果。该些片段在非还原性8%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。对与9mI~15.5mI的洗脱体积相应的片段进行了分析。长箭头表示[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>。短箭头表示Fab-ext-PE38。C表示在还原12%聚丙烯酰胺凝胶上进行的电泳。长箭头、短箭头和白色箭头分别表示Fd-ext-PE38、H6-L和GR蛋白。

[0035] 图5示出了[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>和Fab-ext-PE38与GR2或GR3的复合物的分析结果。A表示尺寸排阻层析。将395μg由[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>和Fab-ext-PE38形成的混合物与GR2或GR3蛋白进行混合。此时,使用了15μgGR蛋白。垂直箭头和数字表示峰的位置。B给出了洗脱片段的SDS-PAGE。[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>和[Fab-ext-PE38]的混合物被用作对照,然后在非还原性8%聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳。与7mI~12.5mI的洗脱体积相对应的片段(#13~#26)进行了比较。黑色箭头和白色箭头分别表示[Fab-ext-PE38]<sub>2</sub>和[Fab-ext-PE38]。

[0036] 图6示出了Fab-PE38单体与GR2-2、GR2-3或GR2-4混合所制备的那些蛋白的尺寸排阻层析结果。那些垂直箭头是对照,其中右边的箭头表示Fab-PE38单体,左边的箭头表示二硫桥联二聚体。Fab-PE38单体和GR2-2~GR2-4的混合物在色谱图上有重叠,表明所生成的复合物中包含两个Fab-PE38单体,其成为单体二聚物形式的复合物。

[0037] 图7示出了纯化GR重复链和Fab-PE38蛋白的复合物的尺寸排阻层析结果。通过尺寸排阻层析对该蛋白进行了最终纯化。所有的色谱图均是在OD<sub>280</sub>获得的记录。色谱图是根

据相同的洗脱体积重叠的。A:使用制备纯Hi Load Superdex-75(径高比26/60)柱进行GR1~6的纯化。B:使用制备纯Hi Load Superdex-200(径高比26/60)柱进行GR7~10的纯化。C:使用制备纯Hi Load Superdex-200(径高比26/60)柱进行抗体-毒素的最终纯化。

[0038] 图8示出了8%非还原性SDS-PAGE的结果,证明了:通过Fab-毒素单体和GR10或GR2-2、GR2-3或GR2-4的复合物中的氧化还原反应,Fab-毒素单体形成了二硫桥联二聚体。第一通路:Fab-毒素单体,即反应原料。第二通路:室温下采用40mM 2-巯基乙醇还原30min的样品。第三通路:于37度采用5mM氧化型谷胱甘肽(GSSG)氧化2小时的样品。由上至下,箭头分别表示二硫桥联二聚体、Fab-毒素单体和Fd链。

[0039] 图9示出了GR10的蛋白免疫印迹的化学发光信号放大,采用常规的蛋白免疫印迹试剂;泳道A:20 $\mu$ g的A431全细胞裂解物(WCL);泳道1:2 $\mu$ g的A431WCL;泳道2:1 $\mu$ g的A431WCL;泳道3:0.5 $\mu$ g的A431WCL;GR10处理的蛋白免疫印迹:相比于常规的蛋白免疫印迹,GR10处理的蛋白免疫印迹提供了32倍的放大信号。

[0040] 图10示出了GR10重复链引起的蛋白免疫印迹化学发光信号放大。a:由小鼠抗- $\beta$ -肌动蛋白单克隆抗体和GR10形成的复合物所制备的超级复合物提供了17倍高的信号。b:与硝酸纤维素膜相似的超级复合物的信号放大,其中该超级复合物是这样获得的:通过10%变性SDS-PAGE对A431透明细胞裂解物进行分离,然后将产物转移到PVDF膜上。

[0041] 图11示出了GR10的ELISA灵敏度的增加。a:将每个孔涂布1g AGS细胞裂解物,对一级抗体进行系列稀释。b:示出了A450的OD值的增加,与单独处理一级抗体进行比较,根据一级抗体与GR10的不同摩尔比并考虑一级抗体的稀释比例,其中添加GR10是为了形成超级复合物。c:固定一级抗体的稀释比例为1:120,对AGS细胞裂解物进行系列稀释,然后,将96孔板的每个孔涂布该细胞裂解物。d:示出了A450的OD值的增加,与单独处理一级抗体进行比较,根据一级抗体与GR10的不同摩尔比并考虑该细胞裂解物涂布每个孔的浓度,其中添加GR10是为了形成超级复合物。

[0042] 图12示出了二级抗体连续稀释的信号放大效应。

[0043] 图13示出了采用GR10的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0044] 图14示出了使用GR1-FITC轭合物的人类鳞癌细胞系A431的免疫荧光结果。

[0045] 图15示出了快速抗原测试过程中GR重复链和测试线抗体之间的交叉结合。

[0046] 图16示出了快速抗原测试过程中AR、LR或LAR重复链和测试线抗体之间的交叉结合。

[0047] 图17示出了采用GR5的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0048] 图18示出了采用GR10的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0049] 图19示出了采用GR15的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0050] 图20示出了采用GR20的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0051] 图21示出了采用AR5的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0052] 图22示出了采用LR5的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0053] 图23示出了采用LAR3的快速抗原试剂盒的检测灵敏度的增加。

[0054] 图24示出了GR10与IgG形成超级复合物,该超级复合物沉淀析出,不溶解于水溶液。由左至右,将IgG和GR10分别按摩尔比1:1、5:1和10:1混合,然后反应。

[0055] 图25示出了SDS-PAGE的结果,证实IgG与GR10混合所得的超级复合物沉淀,大于

IgG与GR1或GR2混合所得的超级复合物沉淀。通过非还原性15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶对各样品的1/36进行了研究。泳道1和泳道2分别是IgG和GR10以及上清液反应所产生的沉淀物。泳道3~泳道6是IgG与GR1、GR2以及上清液按照该顺序发生反应所产生的沉淀物。泳道7和泳道8的是通过BSA和IgG发生反应所制得的对照样品,泳道9和泳道10是只含有IgG的对照样品。

[0056] 图26示出了通过GR/IgG超级复合物的形成所产生的沉淀物。GR1~GR10,与IgG发生反应。作为对照,BSA与IgG发生反应,单独选择IgG,然后在20℃于13,000rpm的转速下离心30分钟。将该微离心管上下翻转,通过肉眼证实沉淀。圆圈标示所形成的沉淀物。

[0057] 图27示出了SDS-PAGE结果,证实了GR/IgG超级复合物的形成所产生的沉淀物。泳道1~泳道20表示通过GR1~10与IgG以及上清液按照该顺序反应所产生的沉淀物。泳道21和泳道22是BSA和IgG之间的反应结果的对照。泳道21和泳道22是通过BSA和IgG发生反应所制得的对照样品,泳道23和泳道24是只含IgG的对照样品。通过还原性15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶对1/30的各样品进行了检查。

[0058] 图28示出了SDS-PAGE的结果,以研究大于GR10的GR是否也可以与IgG形成超级复合物。泳道1~泳道12是由GR1、3、5、10、15和20与IgG以及上清液按照该顺序发生反应所产生的沉淀。泳道13和泳道14是仅由IgG和上清液组成的对照样品沉淀物。通过还原性15%SDS-聚丙烯酰胺凝胶对1/10的各样品进行了检查。

[0059] 图29A示出了两种蛋白免疫印迹结果的对比,与不使用GR的蛋白免疫印迹的结果比较,使用GR扩展了蛋白免疫印迹的检测极限。在图29B中,对图29A的结果进行了图表展示。

[0060] 图30A示出了免疫印迹结果,其证实在等量的抗原存在情况下,通过GR导致了化学发光信号的放大。图30B以图表形式展示了图30A的结果。

[0061] 图31A示出了使用其他抗原证实的GR超级复合物的蛋白免疫印迹信号放大。图31B示出,在不同一级抗体存在下,使用重复链可以实现蛋白质印迹信号放大。

[0062] 图32A示出了重复链的蛋白免疫印迹信号的放大水平的比较。具体地,示出了在相同的条件下由GR10、AR10和MAR5(LAR5重复链,其中L是不同的)引起的蛋白质印迹信号的放大水平比较。图32B示出了使用LR10的蛋白免疫印迹的结果。

[0063] 图33示出了GR系列蛋白的重复链和金抗体复合物或超级复合物检测线抗体之间的交叉结合。

[0064] 图34示出了AR系列蛋白的重复链和金抗体复合物或超级复合物检测线抗体之间的交叉结合。

[0065] 图35示出了LR系列蛋白的重复链和金抗体复合物或超级复合物检测线抗体之间的交叉结合。

[0066] 图36示出了MAR系列蛋白的重复链和金抗体复合物或超级复合物检测线抗体之间的交叉结合。

[0067] 图37示出了非还原性SDS-PAGE的结果,使用纯化的TR1、3、5、10、15和20(=GR1、3、5、10、15、20)蛋白和附着于其上的B3(Fab)-ext-PE38,其中B3(Fab)-ext-PE38通过2-巯基乙醇还原,然后氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG),得到[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>。

[0068] 图38示出了SDS-PAGE结果,使用纯化的GR5、GR10、GR15、GR20和(=TR5、TR10、

TR15、TR20)蛋白和附着于其上的赫赛汀(Fab)-ext-PE38,其中赫赛汀(Fab)-ext-PE38通过2-巯基乙醇还原,然后氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG),得到[赫赛汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>。

[0069] 图39示出了由GR重复链蛋白质和[赫赛汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>单体形成的复合物对SKBR3细胞和BT474细胞的细胞毒性效应。

[0070] 图40示出了由GR重复链蛋白质和[e23(Fab)-ext-PE38]单体形成的复合物对SKBR3细胞和BT474细胞的细胞毒性效应。

[0071] 优选实施方式详述

[0072] 以下,对本发明中使用的术语进行定义。

[0073] 此处所用的术语“粘合剂重复链”表示由材料产生的重组蛋白,其中对单体如抗体具有结合特异性的位点是重复的。本文中的具有结合特异性的位点表示具有单体结合特异性的结合域。在天然蛋白质中,与单体特异性结合的域即是所表示的位点。

[0074] 本发明中所用的术语“抗体单体”表示来源于抗体的分子,用于与所述重复链结合,其包括抗体片段或抗体,所述抗体片段或抗体与其他蛋白质或功能性生物化学分子辄合。天然抗体具有两条重链和两条轻链。当一条重链和一条轻链在一个单元中配对时,被称为二聚物,但在本发明中,当一般的天然抗体与重复链辄合时,它被称为“抗体单体”。

[0075] 本发明中的术语“多个抗体单体/重复链复合物”表示一种复合物,该复合物是通过将所述抗体单体与粘合剂的重复链接触制得的,所述粘合剂的重复链特异性结合于所述单体。

[0076] 术语“多个抗体单体/重复链复合物的超级复合物”表示一种超级复合物,其是这样制得的:将所述抗体单体与粘合剂的重复链接触,该粘合剂的重复链特异性结合于所述单体,得到复合物,在该复合物之间进行交叉反应,形成复合物的聚集体,即为所述的超级复合物。

[0077] 此外,本发明中所用的术语“抗原/多个抗体单体/重复链复合物”表示一种复合物,该复合物是通过将所述多个抗体单体/重复链复合物与抗原接触制得的。

[0078] 本发明中所用的术语“抗原/多个抗体单体/重复链复合物的超级复合物”表示抗原和超级复合物的辄合物,该辄合物由抗原与超级复合物结合形成,制备过程如下:在多个抗体单体/重复链复合物之间进行交叉反应形成复合物的聚集体即超级复合物,将该超级复合物与抗原接触,得到抗原/多个抗体单体/重复链复合物的超级复合物;或者,首先制备抗原/重复链混合物,然后在抗原存在下将该混合物添加到该抗体单体中,形成超级复合物。

[0079] 在下文中,对本发明进行详细描述。

[0080] 本发明提供了一种制备重复链的方法,包含生产重复链的步骤,在该重复链中,单一类型的结合域或多种类型的结合域是重复的,这些结合域与单体特异性结合,并且在每个单体中含有至少两个结合位点。

[0081] 本发明还提供了一种制备多个单体/重复链的复合物的方法,包含以下步骤:将通过上述方法制得的重复链和多个单体混合,制得多个单体/重复链复合物。

[0082] 本发明还提供了一种制备超级复合物的方法,包含以下步骤:在上述方法制得的多个单体/重复链复合物之间进行交叉反应,形成所述复合物的聚集体。

[0083] 在上述方法中,所述单体优选为蛋白质,其更优选地选自:抗体、配体和受体、以及

它们的片段、重组鞭合物、衍生物,以及生物/化学效应物基团共鞭物。

[0084] 在上述方法中,所述抗体优选地选自:抗体片段、Fab片段、含有片段的Fab片段、Fv片段、含有片段的Fv片段、Fc片段以及含有片段的Fc片段。

[0085] 在上述方法中,所述结合域优选为蛋白质,更优选为微生物来源的蛋白质,其更优选地选自:链球菌G蛋白质、金黄色葡萄球菌A蛋白、大消化链球菌L蛋白、以及它们的衍生物。

[0086] 在本发明的重复链中,可以包括柔性连接链,以便每个域在重复链中的重复结合域之间自由旋转,并且在域之间保持距离。当单体结合在一起时,单体之间的碰撞引起立体阻碍,导致降低结合反应速率常数,这表明防止了结合反应平衡常数的降低,从而能够获得高的结合反应平衡。

[0087] 在结合域重复链中,该结合域可自由地旋转,且由于结合域之间的柔性连接链,链弯曲也是可能的。因此,在由单体和该重复链形成的复合物中,每个结合单体可以具有旋转自由度、振动自由度以及弯曲自由度。所以,每个结合单体可避免相互之间的碰撞,因为它不仅能够在有限的旋转方向或狭窄的弯曲角范围内自由移动,而且能够在宽的方向范围和宽的角度范围内自由移动,从而能够将多个单体同时与该重复链结合。柔性连接链序列使得结合域之间的空间变大,从而使得靠近该重复链的用于鞭合的许多单体能够与该重复链结合而彼此之间不会产生任何的立体障碍。可用于本发明的重复链的具有结合域的天然蛋白质不具有结合域之间的这种柔性。天然蛋白质中的结合域不存在这种自由度,这意味着,当单体靠近该天然蛋白质以便与其上已经结合的多个或一个单体形成复合物时,该单体不可能具有如此高水平的旋转自由度和振动自由度。

[0088] 优选地,用于本发明的重复链的结合域为天然蛋白质片段,且这种天然蛋白质片段具有低于整个天然蛋白质的分子量。上述片段所源自的天然蛋白质具有比较高的分子量,而所述重复链与之相比具有更多的结合域和低分子量,该重复链可以使用人工设计的重复链来构建,这种人工设计的重复链可由低分子量的结合域制得。因此,许多单体可以与低分子量的重复链结合。具有许多结合域但具有低分子量的重复链很容易生产和纯化,这是天然蛋白质所不具有的巨大优势。在本发明中,构建了一种重复链,该重复链中的结合域重复20次,但重复的次数不限于此。

[0089] 当使用具有许多结合域和低分子量的重复链时,单体效应能够被放大,因为此时单体与结合分子(天然微生物蛋白质分子,本发明中的重复链)的比率很高,而这是不可能从天然分子获得的。由于这种重复链具有低的分子量,它对于合成蛋白质的生产是有用的。

[0090] 在本发明中,所述单体必须具有不同的位点a'和b',所述粘合剂必须具有相应的结合位点a和b,从而所述重复链必须具有至少一个重复的a和b,所述单体必须具有至少一个a'和至少一个b',以便形成包含多个单体/重复链复合物的超级复合物。

[0091] 在本发明中,所述单体必须同时具有(a' b')形式的a'和b',并且重复链中的结合域必须同时具有结合位点a与b,以形成(ab)-(ab)-(ab)----(ab)的重复,或结合位点a和b各自独立地位于不同的结合域中,形成a-b-a-b-a-b----a-b形式的重复,这意味着独立的结合位点a和b是分别重复的。重复链中独立域a和b的数量和顺序没有限制。当a=b时,该单体是(a' a'),该重复链的形式为(aa)-(aa)-(aa)----或者a-a-a-a-a-----。

[0092] 在本发明中,用于通过交叉结合以形成复合物的重复链可具有彼此相连的结合域

c和d,此时,这些域是独立的,不参与多个单体和重复链之间的结合。如果该重复链是由c-a-a-a-----d组成,那么所述单体与域a结合,且复合物之间的交叉结合是通过c和d之间的结合实现的。例如,一个超级复合物的组成可以是c-a-a-a-----a-d...c-a-a-a-----a-d...c-a-a-a-----a-d,其中'...'表示该重复链之间的交叉结合。此后,所形成的该超级复合物可放大结合于该重复链的单体的效应。此时,在该重复链的结构中,一个重复链中的域c和d需要被加固,而不弯曲,从而彼此之间不结合。如果一个重复链中的域c和d彼此结合,那么多个单体/重复链的复合物之间的交叉结合几率很低,且相应地形成超级复合物的几率也变得很低。在与单体交叉结合之前,不希望一条重复链中的域c与另一条重复链的域d结合。如果在两个不同的重复链之间发生这种结合,那么该重复链将难以控制,从而很难与单体形成复合物。

[0093] 本发明还提供了一种重复链,在该重复链中,一种结合域或不同种结合域是重复的;该一种或不同种结合域特异性结合于单体,并且在一个单体中具有至少两个结合位点。

[0094] 本发明还提供一种多个单体/重复链的复合物,其中多个单体连接于所述重复链。

[0095] 本发明还提供了一种超级复合物,即多个单体/重复链的复合物之间交叉结合形成的复合物的聚集体。

[0096] 此处的单体优选为蛋白质,其更优选地选自:抗体、配体和受体,以及它们的片段、重组鞭合物和衍生物,以及生物/化学效应基团鞭合物。

[0097] 优选地,此处的抗体选自:抗体片段、Fab片段、含有片段的Fab片段、Fv片段、含有片段的Fv片段、Fc片段以及含有片段的Fc片段。

[0098] 此处的结合域优选为蛋白质,更优选为微生物源蛋白质,其更优选地选自:链球菌G蛋白、金黄色葡萄球菌A蛋白、大消化链球菌L蛋白,以及它们的衍生物。

[0099] 本发明还提供了一种放大单体效应的方法,包含以下步骤:混合本发明的重复链、本发明的多个单体/重复链的复合物或其超级复合物,以在该单体的靶上形成超级复合物。

[0100] 在上述方法中,还可以包括测量单体对靶标的效应的步骤。

[0101] 在上述方法中,该单体的靶优选地选自但不限于:抗原、抗体、多肽、蛋白质、细菌、病毒和真菌,或其片段。

[0102] 所述细菌优选地选自但不限于:幽门螺杆菌、结核分支杆菌和沙眼衣原体。

[0103] 所述病毒优选地选自但不限于:流感病毒、口蹄疫病毒、人乳头状瘤病毒(HPV)、登革热病毒、丙型肝炎病毒、乙型肝炎表面抗原以及乙型肝炎表面抗体。

[0104] 在上述方法中,该单体的效果测量优选地通过使用单体标记鞭合物或二级检测剂(抗体)-标记鞭合物和标记的底物进行,但并不总是限于此。

[0105] 本发明中的超级复合物的形成有利于放大单体的效应,包括信号放大,因为本发明的超级复合物包含多个单体,从而可以增加对单体靶的生物和化学效应,该效应比单一单体可提供的效应高许多倍。

[0106] 本发明提供一种包含结合域重复链的分析试剂盒,该试剂盒对检测的靶标具有特异性,并且含有多个单体且每个单体中具有至少两个结合位点,并具有单体结合特异性。

[0107] 该试剂盒优选地但不限于由下列组成:

[0108] 1)结合域的重复链,具有单体结合特异性;

[0109] 2)单体,特异性结合于检测靶标;

[0110] 3)辅探针轭合物,用标记物标记,该标记物通过与底物反应而被激活;

[0111] 4)底物溶液,用于与标记物反应;

[0112] 5)洗涤缓冲液,用于每个反应阶段;

[0113] 6)停止液,用于终止酶反应。

[0114] 此处的试剂盒可用于以下分析方法:免疫组织化学技术、免疫印迹法、免疫沉淀反应法、酶联免疫吸附测定(ELISA)法、凝集法、免疫层析测定法以及放射免疫测定法。

[0115] 此处的标记物优选地选自但不限于:辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、胶体金、荧光素、量子点、葡萄糖氧化酶、萤光素酶、 $\beta$ -D-半乳糖苷酶、苹果酸脱氢酶(MDH)、乙酰胆碱酯酶、同位素以及染料。

[0116] 此处的底物优选地选自但不限于:3,3',5,5'-四甲基联苯胺(TMB)、2,2'-二氮-双(3-乙基苯并噻唑-6-磺酸)(ABTS)、邻苯二胺(OPD)、二氨基联苯胺(DAB)、3-氨基-9-乙基咪唑,5-溴-4-氯-3-吡啶基磷酸盐/碘硝基氯化四氮唑蓝(BCIP/INT),新品红(NF)以及高纯固红TR盐。

[0117] 本发明提供了一种制备重复链-检测官能团的方法,包含以下步骤:将检测官能团连接、共轭或融合至可与单体结合的结合域的重复链上。

[0118] 本发明还提供了一种制备多个单体/重复链-检测官能团的复合物的方法,包括以下步骤:

[0119] 1)将检测官能团连接、共轭或融合至可与单体结合的结合域的重复链上,制得重复链-检测官能团;以及

[0120] 2)将多个单体与步骤1)中所制得的重复链-检测官能团混合,制得多个单体/重复链-检测官能团的复合物。

[0121] 本发明还提供了一种单体结合域重复链-检测官能团,是通过将检测官能团连接、共轭或融合至可与单体结合的结合域的重复链而制备的。

[0122] 本发明还提供了一种多个单体/重复链-检测官能团的复合物,通过将多个单体轭合至该单体结合域重复链-检测官能团而制备。

[0123] 本发明还提供了一种检测单体靶标的方法,包含以下步骤:将本发明的多个单体/重复链-检测官能团复合物与单体靶标混合,形成超级复合物。

[0124] 在上述方法中,还可以包括以下步骤:测量单体的靶标检测水平。

[0125] 在上述方法中,该检测官能团优选地选自但不限于: Cy-3、Cy-5、FITC、GFP(绿色荧光蛋白)、RFP(红色荧光蛋白)以及德克萨斯红。

[0126] 在上述方法中,如果单体是抗体,则该抗体优选地选自:抗体片段、Fab片段、含有片段的Fab片段、Fv片段、含有片段的Fv片段、Fc片段以及含有片段的Fc片段。

[0127] 通过使用抗体-毒素(抗毒素)和抗癌剂,本发明可用于生产癌细胞特异性抗体-毒素超级复合物。所产生的抗体-毒素超级复合物具有优异的药效,使得可能将大量细胞杀伤官能团递送至靶标癌细胞,从而期望积极的癌症治疗效果。

[0128] 本发明实用的和目前优选的实施例的说明如以下实施例所示。

[0129] 然而,可以理解,本领域的普通技术人员,在考虑本公开的基础上,可以作出包含于本发明的精神和范围之内修改和改进。

[0130] 实施例1:制备G蛋白抗体结合域III的重复链GR8~GR20、GR2-2、2-3和2-4

[0131] G蛋白域III基因是由KCTC 3098的染色体DNA得到的,KCTC 3098来自韩国典型菌种保藏中心(KCTC)。构建质粒pGR2-2~pGR2-4,其中G4S连接链在两个域III之间重复2~4次。通过使用定点诱变,将含有G蛋白域III的质粒pGR1(Y.Lee等人,利用G蛋白的Fab结合域的重复改进制备二硫桥联二聚体(Fab-PE38)<sub>2</sub>,(2010)生物化学杂志,第285期,5127-5131(Y.Lee et al,Enhanced Formation of Disulfide-bridged Dimer(Fab-PE38)<sub>2</sub>Utilizing Repeats of the Fab Binding Domain of Protein G(2010) J.Biol.Chem.285,5127-5131))插入另外的AgeI限制性内切酶位点,使得该AgeI限制性内切酶位点位于域III末端的G4S连接链之前,得到构建的pGR1-A。

[0132] 采用两个引物P3[5'-AGACCTTAC GGTA ACTCAA ACCGGTGGAG GCGGGTCCGG ATA-3'(序列1)]和P4[5'-TATCCGGACC CGCCTCCACC GGTTCAGTT ACCGTAAAGG TCT-3'(序列2)]进行快速变化的定点诱变。诱变之后,利用双脱氧DNA测序对pGR1-A的核酸序列进行了证实。采用NdeI和BspEI消化该质粒pGR1-A,从而纯化所获得的片段。然后,采用位于NdeI位点和6His标签位点之后的AgeI消化pGR1。通过连接两个片段构建pGR2-A,这两个片段即:采用NdeI和AgeI消化pGR1获得的大片段,和采用NdeI和BspEI消化pGR1-A获得的小片段。所得的pGR2-A采用NdeI和AgeI消化,获得一个大片段,其仍然具有G蛋白的第二个域III以及位于其前方的G4S连接链。将此大片段与采用NdeI和BspEI消化pGR1-A所得的小片段连接,从而构建得到pGR2-2,其在第一个域III和第二个域III之间具有两个G4S连接链。进一步地,通过与上述pGR2-2相同的构建方式,构建具有三个G4S连接链的pGR2-3和具有四个G4S连接链的pGR2-4。

[0133] 采用pGR1的论文中所述的方法制备GR8~GR20(Y.Lee等人,利用G蛋白的Fab结合域的重复改进制备二硫桥联二聚体(Fab-PE38)<sub>2</sub>(2010),生物化学杂志,第285期,5127-5131(Y.Lee et al,Enhanced Formation of Disulfide-bridged Dimer(Fab-PE38)<sub>2</sub>Utilizing Repeats of the Fab Binding Domain of Protein G(2010) J.Biol.Chem.285,5127-5131))。采用图1所示的方法进行表达质粒的构建,采用16%SDS-PAGE对纯化的重复链进行分析(图2)。

[0134] 实施例2:Fab-毒素单体和G蛋白域III的重复链GR1~GR10,GR2-2,2-3和2-4的复合物的尺寸排阻层析和该复合物中二硫化物桥联二聚体的形成

[0135] 与免疫球蛋白结合的G蛋白域III可以与IgG Fc和Fab片段结合。根据以前的报道,已知G蛋白免疫球蛋白结合位点(域III)结合于Fab片段CH1。G蛋白域III的第二β链结合于反平行位置的Fab CH1域的第七β链。这两种蛋白质之间的β/β相互作用使CH1域和域III之间形成五个氢键。此外,CH1域的主要原子中也可以找到其他三个氢键。尽管这两种蛋白质形成复合物,但是域III或CH1域的结构未发生变化。

[0136] 在本发明中,制备了具有重复域III的两种不同类型的重复链。首先,制备在域III之间具有G4S氨基酸的重复链。其中域III重复了10次的重复链被用于与Fab-PE38单体结合,以形成复合物。此处所用的重复链是GR1~GR10。当这种类型的重复链与单体结合时,可以制备包含多个单体(2、3或4个单体)的复合物。

[0137] 本发明的发明人还制备了这样一种重复链,其在两个域III之间具有不同长度的G4S连接链。根据所述连接链与Fab-PE38域的结合和与域III结合而不同。对重复链GR2-2、GR2-3和GR2-4进行了相应地制备,它们具有位于两个域III之间的2个、3个和4个G4S连接

链。因此,将两个Fab-PE38单体连接于一个重复链以形成复合物,结果是可以调节该单体的二聚体的长度。

[0138] 采用尺寸排阻层析对GR2-2、GR2-3和GR2-4以非共价键结合形成的复合物进行了分析。

[0139] GR系列复合物的尺寸排阻层析的结果显示于图3。使用Superdex-200TM HR柱进行尺寸排阻层析。Fab-ext-PE38与GR系列的结合按照不同的比例进行。715μg的Fab-ext-PE38与每个GR蛋白结合。Fab-ext-PE38与GR1~GR3的结合以2:1的摩尔比进行。715μg的Fab-ext-PE38与28μg的GR4~GR10结合。所有的色谱图根据洗脱体积来叠放呈现。作为标准材料的[Fab-ext-PE38]2(D)和Fab-ext-PE38(M)的色谱图在相同条件下通过洗脱获得。

[0140] GR2-2、2-3和2-4的尺寸排阻层析结果显示于图4中。

[0141] [Fab-ext-PE38]2和Fab-ext-PE38混合物与GR2或GR3形成的复合物的研究结果显示于图5中。

[0142] Fab-PE38单体和GR2-2、2-3和2-4形成的复合物的尺寸排阻层析结果显示于图6中。

[0143] GR重复链和Fab-PE38蛋白形成的复合物纯化后的尺寸排阻层析结果显示于图7中。

[0144] 8%非还原性SDS-PAGE的结果通过Fab-毒素单体和GR10或GR2-2、GR2-3和GR2-4的复合物中还原/氧化混合反应产生的Fab-毒素单体证实了二硫键二聚体的形成显示于图8(图3~8)中。

[0145] 结果证实,两个Fab-PE38单体可以分别形成具有重复链的复合物,并形成二聚体。

[0146] 【表1】

[0147] 通过Fab-毒素单体的还原/氧化混合反应形成的二硫化物桥联二聚体的比例结合于金属的抗体-毒素

[0148]

螯合珠	二硫二聚体的作用
B3(Fab)-ext-PE38]	n.d.*
B3(Fab)-ext-PE38]:GR1	n.d.*
B3(Fab)-ext-PE38]:GR2	n.d.*
B3(Fab)-ext-PE38]:GR3	0.7
B3(Fab)-ext-PE38]:GR4	0.5
B3(Fab)-ext-PE38]:GR5	0.6
B3(Fab)-ext-PE38]:GR6	0.3
B3(Fab)-ext-PE38]:GR7	0.6
B3(Fab)-ext-PE38]:GR8	0.1
B3(Fab)-ext-PE38]:GR9	0.1
B3(Fab)-ext-PE38]:GR10	0.3
B3(Fab)-ext-PE38]:GR2-2	0.2
B3(Fab)-ext-PE38]:GR2-3	0.4
B3(Fab)-ext-PE38]:GR2-4	0.3

[0149] \*n.d: 未确定的。

[0150] 实施例3:通过免疫印迹证实G蛋白域III重复链GR10的抗体信号放大

[0151] 通过细胞信号技术®提供的蛋白免疫印迹方案以略微改变的方式使用,并使用 abcam®提供的直接ELISA方案的修订版本。

[0152] 用于此实验溶液和试剂的制备如下:使用经Milli-Q过滤的水或相同纯度的水来制备溶液。1)1X SDS样品缓冲液:62.5mM的Tris-HCl(25°C,pH6.8),2%W/V的SDS,10%的甘油,50mM的DTT,0.01%W/V的溴酚蓝或苯酚红。2)流动缓冲液:25mM的Tris碱,0.2M的甘氨酸。3)10X Tris缓冲盐水(TBS):10X TBS,1L:24.2g的Tris碱,80g的氯化钠,使用HCl(pH7.6)(1X)调节酸度。4)卵白蛋白:(重量体积比[W/V])。5)封闭缓冲液:1X TBS,0.1%的吐温20和2%W/V的鸡血清白蛋白。6)洗涤缓冲液:1X TBS,0.1%的吐温20(TBS/T)。7)一级抗体:抗β肌动蛋白小鼠抗体(圣克鲁兹生物科技有限公司(Santa Cruz Biotech))。8)一级抗体稀释缓冲液:1X TBS,0.1%的吐温20和2%W/V的鸡血清白蛋白。9)二级抗体:山羊抗-小鼠β肌动蛋白的HRP。10)印迹膜:硝酸纤维素膜(沃特曼(Whatman)),PVDF膜(PALL)。11)GR重组蛋白:GR10。12)管腔液:100mM的Tris/盐酸pH8.8,1.25mM的鲁米诺,2mM的4IPBA,5.3mM的过氧化氢。13)超强信号毫微微最大灵敏度试剂(热电科学(Thermo Scientific))。

[0153] 蛋白免疫印迹的操作如下。首先使用A431或AGS肿瘤细胞系制备细胞裂解物,然后通过抽吸将培养基去除。具体地,采用1×PBS洗涤细胞,然后还通过抽吸将PBS除去。然后,将1X SDS样品缓冲液加入其中以裂解该细胞,然后在95~100°C加热5分钟。离心5分钟以沉淀样品。然后,将沉淀物放置在SDS-PAGE凝胶(10cm×10cm)中,然后电泳。然后,将该样品转移到硝酸纤维素膜或PVDF膜上。

[0154] 封闭细胞膜和抗体结合反应的操作如下。将溶液的体积调节到适合膜的尺寸10cm×10cm(100cm<sup>2</sup>)。根据膜的尺寸调节体积。

[0155] 对于细胞膜封闭,转移后在室温下采用适当体积的TBS洗涤硝酸纤维或PVDF膜5分钟。将该膜装入适当体积的膜表面封闭缓冲液,将其在室温下温热放置1小时。采用TBS/T洗涤该膜3次每次5分钟。然后,即得到了该超级复合物。具体地,根据所示的结果中列出的摩尔比将GR10与一级抗体混合,然后在37°C加热1小时。在使用之前将所产生的超级复合物置于冰中并存储于冰中。然后,根据所示的结果中列出的稀释比例将10mI的一级抗体稀释缓冲液与膜/一级抗体复合物或一级抗体/重复链复合物混合,以便诱导一级抗体反应,然后在室温下加热1小时。采用15mI的TBS/T洗涤该混合物3次每次5分钟。已经适当地选择以匹配一级抗体的HRP轭合的二级抗体(1:2000),以适当的体积与膜表面封闭缓冲液混合,然后在室温下温和搅拌1小时以保温。采用15mI的TBS/T洗涤该混合物3次每次5分钟。对截面D进行检测。最后,为了检测抗原蛋白,将鲁米诺溶液或超信号毫微微最大灵敏度试剂(Thermo Scientific)与该膜混合,将其在室温下轻轻地搅拌以保温。去除过量的显影液,以留下它但不干燥,然后使用实验室塑料轻轻敲着该膜,随后暴露于X射线胶片。

[0156] 通过蛋白免疫印迹证实的GR10重复链化学发光信号放大的结果显示于图9(图9)。

[0157] 利用GR10重复链放大的化学发光信号通过蛋白免疫印迹证实的结果显示于图10(图10)中。具体地,根据括号内所示的摩尔比制备GR10和一级抗体的超级复合物,以形成一种超级复合物。将一级抗体以1:1000的比例稀释,并制备和一级抗体相同浓度的超级复合物。山羊抗-小鼠-HRP标记的抗体被用作两个试验的二级抗体。一级和二级抗体都在室温下

保温1小时。采用10%的变性SDS-PAGE分离所有的细胞裂解物样品,然后将分离的样品转移到硝酸纤维素膜上。然后将该膜再切成三片,用一级抗体进行检测。使用具有高灵敏度的热电超信号毫微微基材(Thermo Supersignal Femto substrate)作为荧光显色剂。用10%的变性SDS-PAGE分离出A431透明细胞裂解物,然后转移到PVDF膜上,以便研究所得的超级复合物是否可以发出和硝酸纤维素膜同样多的信号放大效应。首先仅使用一级抗体检测该膜,然后使用二级抗体和常规的ECL试剂诱导显色。采用TBST溶液洗涤该膜,然后使用超信号毫微微基材(Supersignal Femto substrate)诱导显色。结果,随着规则信号的增加,检测到非常强的背景噪声信号。该背景噪声信号归因于二级抗体与PVDF膜的非特异性结合和超信号毫微微基材(Supersignal Femto substrate)的高灵敏度。此后,使用SDS和2-巯基乙醇将该抗体从该膜中剥离。与由一级抗体和重复链混合所制备的超级复合物进行连接,然后使用二级抗体与常规的ECL彩色显影试剂进行检测。此时,该超级复合物显示的灵敏度比常规的高15倍以上,与硝酸纤维素膜上观察到的结果一致。在该实验中,采用灵敏度为中等水平的常规化学发光试剂,并采用通过哈恩和Behmann(2007)的方法制备的ECL试剂。该信号放大效应与硝酸纤维素膜上观察到的结果相似,且该放大信号与使用超信号毫微微基材(Supersignal Femto substrate)时的一样高。然而,此时的背景噪声信号并不像之前那么增加,这表明此时的信号放大得到更清晰的信号。细胞裂解物往往容易附着于PVDF上。所以,中等水平灵敏度的显色剂足够检测少量的样品。

[0158] 实施例4:通过酶联免疫吸附试验(ELISA)证实G蛋白域III的重复链GR10的抗体信号放大

[0159] 间接ELISA的操作如下。

[0160] 用于此实验溶液和试剂的制备如下:使用经Milli-Q过滤的水或相等纯度的水制备溶液。1)碳酸氢盐/碳酸盐包被缓冲液(100mM):3.03g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,6.0g NaHCO<sub>3</sub>,1000ml蒸馏水(pH值9.6),将抗原或抗体在包被缓冲液中稀释,用于固定在孔中。2)PBS。3)封闭缓冲液:含有1%BSA血清的PBS。4)洗涤缓冲液:含有0.05%(体积/体积)吐温20的PBS。5)抗体稀释缓冲液:将抗体稀释于1X封闭缓冲液中,以减少一级和二级抗体的非特异性结合。

[0161] 对于微孔板上涂布的抗原,使用A431或AGS细胞系制备细胞裂解物。使用碳酸盐包被缓冲液稀释细胞裂解物,至最终浓度为20 $\mu$ g/ml。然后,将50 $\mu$ l的稀释的细胞裂解物分布在微孔板的孔顶部,然后进行涂敷。将该板盖住,保持在4 $^{\circ}$ C过夜。去除包被缓冲液,并且使用200 $\mu$ l的PBS洗涤每个孔。将该板上下翻转并在水槽中振荡,以去除所用的包被缓冲液或洗涤缓冲液。使用纸巾轻轻敲击以除去剩余的溶液。

[0162] 对于细胞膜封闭,将200 $\mu$ l的1%BSA/PBS封闭缓冲液加入到该板的各孔中,以封闭涂布的孔中剩余的未被涂布的蛋白质结合位点。然后,将该板盖上盖子并在室温下保温至少2小时,然后使用PBS洗涤两次。为了诱导抗体反应,将在使用之前以指定浓度稀释的100 $\mu$ l一级抗体或超级复合物加入到该封闭缓冲液中,然后将该板盖上盖子并在室温下保温1小时。然后,将该板用PBS洗涤两次,将以最佳浓度稀释的100 $\mu$ l二级抗体-HRP加入到该板的各孔中。将该板盖上盖子并在室温下保温1小时。将该板用PBS洗涤两次。

[0163] 对于检测,通过多通道移液器将100 $\mu$ l TMB底物溶液加入到该板的各孔中。当显色被充分诱导(30分钟)时,将100 $\mu$ l终止液加入到该板的各孔中。使用平板读取结果器测量各孔的吸光度(光密度)。

[0164] 结果,GR10显著增加了ELISA的灵敏度,如图11所示。确切地说,进行了两种不同的ELISA。当单克隆抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体和GR10的超级复合物被用作一级抗体时,观察到ELISA信号显著放大。将AGS细胞裂解物置于一般的96孔细胞培养板中,其保持在4℃过夜。根据标准方法进行ELISA。根据括号中所示的摩尔比制备GR10和一级抗体的超级复合物。此处所用的一级抗体是小鼠单克隆抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体。山羊抗-小鼠-HRP标记的抗体被用作两个试验的二级抗体。一级和二级抗体都在室温下反应1小时。该TMB底物在室温下反应30分钟。

[0165] 根据二级抗体的系列稀释的信号放大效应显示于图12中。一级抗体和GR10的超级复合物可显著增加ELISA信号。该信号在二级抗体的测试稀释范围内很规则。当小鼠单克隆抗- $\beta$ -肌动蛋白抗体和GR10的超级复合物被用作上述ELISA的一级抗体时,观察到一个显著的信号放大。此时,使用A431细胞裂解物。根据1:10的摩尔比制备GR10和一级抗体的复合物。山羊抗-小鼠HRP轭合物被用作二级抗体。各孔涂布有1g的A431细胞裂解物。将一级抗体连续稀释10倍。根据指定的稀释比例稀释一级抗体,将二级抗体连续稀释2倍。

[0166] 实施例5:通过G蛋白域III的重复链GR10对流感快速抗原检测试剂盒的灵敏度增加

[0167] 观察到GR10抗体增加了流感快速抗原检测试剂盒的灵敏度,其是最典型的利用抗体的诊断试剂盒。此处使用SD BIOLINE流感抗原快速检测试剂盒或韩国绿十字有限公司提供的试剂盒。该试剂盒包括抗原缓冲液、滴管、试管、采集样品的棉签和试纸。将抗原缓冲液吸入到滴管至刻度线,然后将该抗原缓冲液置于试管中。将抗原样品装入含有抗原缓冲液的试管中,然后充分地混合至少5次。此时,使用该抗原缓冲液中的抗原简单地稀释GR10蛋白。将试纸加入到试管中,10~15分钟后读取结果。

[0168] 结果,当将GR10蛋白与常规的快速抗原检测试剂盒的抗原稀释缓冲液中的抗原一起简单地稀释时,该抗原可被检测出,甚至在1000倍稀释后也可以检出,与不存在GR10时的情形不同(图13)。

[0169] 实施例6:使用GR蛋白作为抗体标记试剂的癌细胞系的免疫荧光法

[0170] 将GR1与异硫氰酸荧光素(FITC)即荧光染料轭合,然后用该轭合的GR1-FITC对所培养的肿瘤细胞系A431(人鳞状癌细胞)进行免疫荧光染色。小鼠抗-LC3抗体被用作一级抗体。用所制备的GR1-FITC代替二级抗体用于检测。通过荧光检测到的细胞使用F-肌动蛋白特异性罗丹明-鬼笔环肽(Sigma Aldrich公司)进行染色。在荧光显微镜下观察显色。

[0171] 结果,当与使用二级抗体-荧光染料轭合物比较时,使用GR1-FITC轭合物可以检测更小量的蛋白质。可以得到清晰的免疫荧光染色图像(图14)。

[0172] 因此,像GR1-FITC一样,GR蛋白可以与检测官能团连接,轭合或融合,所得的轭合物可被用于任何种类的抗体,因此没有必要将检测官能团轭合到每个抗体。GR蛋白是一个非常小的分子,使得GR蛋白的生产很容易,其处理也很简单和容易。

[0173] 实施例7:构建金黄色葡萄球菌A蛋白抗体结合域B的质粒表达重复链

[0174] 将合成的A蛋白域B(表1)的DNA序列引入载体(购自百奥尼公司,Bioneer Corporation),制得质粒。采用该质粒转染大肠杆菌DH5 $\alpha$ 并克隆。

[0175] 采用NdeI和BspEI消化所述质粒。对所得的小DNA片段(245个碱基对)进行纯化。将该DNA片段克隆到用同样的酶消化的pGR1(pTR1)载体上,从而构建含有一个A蛋白域B的pAR1。然后,通过双脱氧DNA测序证实了上述域B的DNA序列。

[0176] 由10个氨基酸组成的(G4S)<sub>2</sub>序列在每个域B之间作为间隔区。为了构建其中A蛋白域B重复两次的pAR2,采用NdeI和BspEI消化上述构建的pAR1(表2)。然后,将编码两个G4S和域B的小DNA片段(245个碱基对)与采用NdeI和AgeI对相同质粒进行消化所得的大片段吻合。所得的pAR2采用NdeI和AgeI消化。所得到的大片段与小片段(245个碱基对)吻合,从而构建了A蛋白域B重复三次pAR3。通过上述相同的克隆方法,构建A蛋白域B重复五次的pAR5。

[0177] 【表2】

[0178] 蛋白A域B的核苷酸序列

[0179]

A蛋白域B的核苷酸序列
5'-
CATATGCATCATCATCATCACCACACCGGTTCTCAAGCCCCAAAAGC
CGACAATAAATTTAATAAAGAGCAGCAGAACGCGTTTTATGAAATCT
TGCATCTGCCGAATCTGAATGAAGAACAACGTAACGGATTCATTCAG
AGCCTTAAAGATGATCCTAGTCAGTCCGCTAACTTACTCGCAGAAGC
TAAGAACTGAATGATGCACAGGCCGCGAAGGGAGGGGGTGGATCC
GGTGGTGGCGGCTCCGGATAAGAATTC-3' (序列 3)

[0180] \*下划线部分:编码序列

[0181] 【表3】

[0182] 本发明中所用的质粒和蛋白

[0183]

质粒	蛋白	文献
pLR1~5	LR1~5: (His) <sub>6</sub> -(B1-G <sub>4</sub> S-G <sub>4</sub> S) <sub>n</sub> , n=1~5. <sup>a, b, c</sup> .	本发明

[0184] <sup>a</sup>G4S:GGGGS的氨基酸序列(序列4);

[0185] <sup>b</sup>(His)<sub>6</sub>:6x组氨酸标签;以及

[0186] <sup>c</sup>B:金黄色葡萄球菌A蛋白域B

[0187] 通过先前报道的常规方法(J.H.帕克等人,分子细胞12(2001年)398-402)从该重复链构建过度表达蛋白质。

[0188] 通过Ni<sup>2+</sup>-螯合琼脂糖快速流动层析(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))分离该纯化的裂解物,然后使用制备级HiLoad Superdex-75或制备级HiLoad Superdex-200(径高比26/60)(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))进行尺寸排阻层析。

[0189] 实施例8:构建大消化链球菌L蛋白抗体结合域B1的质粒表达重复链

[0190] 通过将合成的L蛋白域B1的DNA序列引入载体制备质粒,其中该载体来自百奥尼公司(Bioneer Corporation)。采用该质粒转染大肠杆菌DH5α并克隆。

[0191] 采用NdeI和BspEI消化所述的质粒。对所得的小DNA片段(299个碱基对)进行纯化。

将该DNA片段克隆到采用相同的酶消化的pGR1(pTR1)载体上,从而构建含有一个L蛋白域B1的pLR1。然后,通过双脱氧DNA测序证实了上述域B1的DNA序列。

[0192] 由10个氨基酸组成的(G4S)<sub>2</sub>序列在每个域B1之间作为间隔区。为了构建其中L蛋白的域B1重复两次的pLR2,采用NdeI和BspEI消化上述构建的pLR1(表5)。然后,编码两种G4S和域B1的小DNA片段(299个碱基对)与采用NdeI和AgeI消化相同质粒所得的大片段吻合。采用NdeI和AgeI消化所得的pLR2。所得到的大片段与小片段(299个碱基对)吻合,从而构建其中L蛋白域B1重复三次的pLR3。通过上述相同的克隆方法,构建其中L蛋白域B1重复五次的pLR5。

[0193] 【表4】

[0194] L蛋白的域B1的核苷酸序列

[0195]

L蛋白域B1的核苷酸序列	
5'-	
	<u>CATATGCATCACCATCACCATCATACCGGTATCAAGTTCGCCGGTAAAGAAG</u>
	<u>AAACGCCGGAAACCCCTGAGACAGACAGTGAAGAGGAAGTGACAATAAAA</u>
	<u>GCAAATCTGATTTTCGCCAACGGGTCAACCCAGACGGCCGAATTCAAAGGG</u>
	<u>ACATTTGAAAAAGCAACTTCTGAGGCTTATGCATACGCGGACACTCTGAAGA</u>
	<u>AGGATAATGGTGAATATACCGTAGATGTTGCTGATAAAGGTTATACCCTGAA</u>
	<u>TATTAAATTTGCGGGTGGCGGCGGCGGAAGCGGTGGCGGAGGTTCCGGATA</u>
	<u>AGAATTC-3'</u> (序列5)

[0196] \*下划线部分:编码序列

[0197] 【表5】

[0198] 本发明所用的质粒和蛋白

[0199]

质粒	蛋白	文献
pLR1~5	LR1~5:(His) <sub>6</sub> -(B1-G <sub>4</sub> S-G <sub>4</sub> S) <sub>n</sub> ,n=1~5. <sup>a,b,c</sup> .	本发明

[0200] <sup>a</sup>G<sub>4</sub>S:GGGGS的氨基酸序列(序列4);

[0201] <sup>b</sup>(His)<sub>6</sub>:6x组氨酸标签;以及

[0202] <sup>c</sup>B1:.消化链球菌L蛋白域B1。

[0203] 通过先前报道的常规方法从该重复链构建过度表达蛋白质(J.H.帕克等人,分子细胞12(2001)398-402)。

[0204] 通过Ni<sup>2+</sup>-螯合琼脂糖快速流动层析(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))分离该纯化的裂解物,接着使用制备纯HiLoad Superdex-75或制备纯HiLoad Superdex-200(径高比26/60)(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))进行尺寸排阻层析。

[0205] 实施例9:构建大消化链球菌L蛋白抗体结合域B1和金黄色葡萄球菌A蛋白抗体结合域B的质粒表达重复链

[0206] 通过将合成的L蛋白域B1的DNA序列引入载体制备质粒,用于构建pLR1,其中所述

载体来自于百奥尼公司(Bioneer Corporation)。

[0207] 采用NdeI和BspEI消化所述的质粒pLR1。对所得的小DNA片段(299个碱基对)进行纯化。将该DNA片段克隆到采用相同的酶消化的pAR1(包括A蛋白域B)载体上,从而构建pLAR1,在该pLAR1中含有一个L蛋白域B1连接于A蛋白域B(B1-B)。然后,通过双脱氧DNA测序证实了上述域B1(L蛋白域B1)和域B(A蛋白域B)的DNA序列。

[0208] 由10个氨基酸组成的(G4S)<sub>2</sub>序列在每个域B1(L蛋白域B1)和域B(A蛋白域B)之间作为间隔区。为了构建其中LA序列(B1-B,L蛋白域B1-A蛋白域B)重复两次的pLAR2,采用NdeI和BspEI消化上述所得到的质粒pLAR1(表6)。然后,编码B1-(G4S)<sub>2</sub>-B-(G4S)<sub>2</sub>(B1-B)的小DNA片段(521个碱基对)与采用NdeI和AgeI消化相同质粒所得的大片段吻合。采用NdeI和AgeI消化所得的pLAR2。所得到的大片段与小片段(521个碱基对)吻合,从而构建其中LA序列重复三次的pLAR3。通过上述相同的克隆方法,构建其中L蛋白域B1-A蛋白域B序列重复三次的pLAR3。

[0209] 【表6】

[0210] LA蛋白域B1-B的核苷酸序列

[0211]

LA蛋白域 B1-B的核苷酸序列
5'-
<u>CATATGCATCACCATCACCATCATA</u> CCGGTATCAAGTTCGCCGGTAAAGAAGAAACGCC
GGAAACCCCTGAGACAGACAGTGAAGAGGAAGTGACAATAAAAGCAAATCTGATTTTC
GCCAACGGGTCAACCCAGACGGCCGAATTCAAAGGGACATTTGAAAAAGCAACTTCTG

[0212]

AGGCTTATGCATACGCGGACACTCTGAAGAAGGATAATGGTGAATATACCGTAGATGT
TGCTGATAAAGGTTATACCCTGAATATTAAATTTGCGGGTGGCGGCGGCGGAAGCGGT
GGCGGAGGTTCCGGTICTCAAGCCCCAAAAGCCGACAATAAAATTTAATAAAGAGCAGC
AGAACGCGTITTTATGAAATCTTGCATCTGCCGAATCTGAATGAAGAACAACGTAACGG
ATTCATTCAGAGCCITAAAGATGATCCTAGTCAGTCCGCTAACTTACTCGCAGAAGCTA
AGAAACTGAATGATGCACAGGCGCCGAAGGGAGGGGGTGGATCCGGTGGTGGCGGCTC
CGGATAAGAATTC-3' (序列6)

[0213] \*下划线部分:编码序列

[0214] 【表7】

[0215] 本发明所用的质粒和蛋白

[0216]

质粒	蛋白	文献
pLAR1~3	LAR1~3 : (His) <sub>6</sub> -(B1-G <sub>4</sub> S-G <sub>4</sub> S-B-G <sub>4</sub> S-G <sub>4</sub> S) <sub>n</sub> , n=1~3. <sup>a,b,c,d</sup>	本发明

[0217] <sup>a</sup>G4:GGGG的氨基酸序列(序列7);

[0218] <sup>b</sup>(His)<sub>6</sub>:6x组氨酸标签;

[0219] <sup>c</sup>B1:消化链球菌L蛋白域B1;以及

[0220] <sup>d</sup>B:金黄色葡萄球菌A蛋白的域B。

[0221] 通过先前报道的常规方法过度表达该重复链构建(J.H.帕克等人,分子细胞12(2001)398-402)。

[0222] 通过Ni<sup>2+</sup>-螯合琼脂糖快速流动层析(阿默舍姆生物学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))分离该纯化的裂解物,接着使用制备纯HiLoad Superdex-75或制备纯HiLoad Superdex-200(径高比26/60)(阿默舍姆生物学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))进行尺寸排阻层析。

[0223] 实施例10:采用快速抗原测试研究重复链和金抗体复合物或超级复合物和检测线抗体之间的交叉结合

[0224] 采用最典型的利用抗体的检测方法,即流感快速抗原检测试剂盒,在无抗原存在的情况下检测金抗体,检测时利用重复链连接金抗体复合物(repeating chain linked gold antibody complex)或超级复合物与检测线抗体之间的交叉结合。其中产生的检测线是由于重复链/金抗体复合物或超级复合物的重复链之抗体结合域的空白空间与检测线抗体之间的交叉结合。此处使用了SD BIOLINE提供的流感抗原检测试剂盒和韩国绿十字有限公司提供的流感抗原检测试剂盒。该试剂盒包括抗原缓冲液、采集样品的棉签和试纸。将该抗原缓冲液打开并倾倒入试管中。将一系列的GR、AR、LA和LAR重复链加入到含有抗原缓冲液的试管中,然后混合至少5次。将试纸加入到试管中,10~15分钟后读取结果。

[0225] 在SD试纸上,当使用简单地稀释于抗原缓冲液(10μg和1μg)中的GR4、GR5、GR7、GR10、GR15和GR20时,观察到一个条带,这表明它们之间有一个交叉结合。在韩国绿十字试纸上,当使用1μg的蛋白时,观察到一个更强的条带。然而,在浓度为0.1μg时,两种试纸都没有产生任何条带,这表明在没有抗原时,重复链的量为0.1μg浓度不能得出检测线。在存在抗原的情况下,重复链的这个浓度足以检查重复链对抗原检测的影响(图15)。

[0226] 在SD试纸上,当使用AR5、LR3、LR5、LAR1、LAR2和LAR3时,观察到由金抗体产生的检测条带。然而,在韩国绿十字试纸上,当使用LR系列时没有观察到检测条带。该结果表明,韩国绿十字试剂盒中包含的抗体不是由κ轻链组成的抗体,因为LR抗体结合域仅与抗体轻链中的κ轻链结合。在重复链浓度为0.1μg时,SD试纸或韩国绿十字试纸都不产生条带,所以这个量仅足够用于测量重复链对抗原检测的影响(图16)。

[0227] 实施例11:流感快速抗原检测试剂盒中重复链对信号放大的影响

[0228] 通过GR、AR、LR和LAR蛋白研究流感快速抗原检测试剂盒即最典型的利用抗体的抗原检测试剂盒的灵敏度放大。此处使用了SD BIOLINE提供的流感抗原检测试剂盒。该试剂盒包括提取液、采集样品的棉签和试纸。将提取液打开并将该溶液倒入试管中。将抗原H1N1加入到含有该提取液的试管中,然后混合至少5次。此时,对GR、AR、LR和LAR蛋白连同抗原稀释缓冲液中的抗原一起进行简单地稀释。将试纸加入到试管中,10~15分钟后读取结果。

[0229] 结果,与没有包括GR5时比较,当GR5与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至稀释到10<sup>-7</sup>倍(图17)。

[0230] 与没有包括GR10时比较,当GR10与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至稀释到10<sup>-8</sup>倍(图18)。

[0231] 与没有包括GR15时比较,当GR15与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至稀释到10<sup>-9</sup>

倍(图19)。

[0232] 与没有包括GR20时比较,当GR20与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至稀释到 $10^{-10}$ 倍(图20)。

[0233] 与没有包括AR5时比较,当AR5蛋白与抗原一起稀释时,没有特异性效果(图21)。

[0234] 与没有包括LR5时比较,当LR5与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至被稀释到 $10^{-6}$ 倍(图22)。

[0235] 与没有包括LAR3时比较,当LAR3与抗原一起稀释时,可检出该抗原直至稀释到 $10^{-8}$ 倍(图23)。

[0236] 实施例12:重复链GR、AR、LR和LAR与IgG的超级复合物的沉淀

[0237] 在PBS中溶解Equitech生物有限公司提供的小鼠IgG粉末制备IgG溶液。溶解在PBS中的IgG溶液在摇床上摇动2小时,然后于4℃以21,000rpm的转速下离心2小时,以完全去除不能溶解于溶液中的IgG颗粒。通过BCA蛋白定量方法(二喹啉甲酸蛋白测定)对GR1~GR20和IgG进行定量,并在用于实验的合适浓度下进行稀释。将适量的GR1~GR20溶液和IgG溶液在微量离心管中混合,并在室温下过夜以进行结合。然后,于20℃在13,000rpm的转速下离心30分钟。此时,如果形成超级复合物,并沉淀析出,通过肉眼可观察到。使用微量移液管除去上清液。将500mL的75%乙醇加入其中,然后再次除去,由此将微量离心管壁上的所有剩余溶液洗掉。通过蒸发除去其中剩余的75%乙醇,然后进行SDS-PAGE。

[0238] 结果,与IgG和GR10以1:1或10:1的摩尔比混合相比,将IgG和GR10以5:1的摩尔比混合形成更多的沉淀物(图24)。

[0239] 在将IgG和GR10以5:1的摩尔比混合后,与GR10相同浓度的GR1和GR2在其中发生反应。相比于使用GR1和GR2,当将GR10加入其中时形成更多的沉淀物。此结果不仅通过肉眼而且通过SDS-PAGE(图25)可以观察到。当加入等体积时,反应液中抗体结合域DIII的总摩尔数是一样的。在GR10中,10个DIII是重复的,并在一条链上连接在一起。在GR2中,2个DIII是重复的,并在一条链上连接在一起。如果加入的GR蛋白的总量是相同的,那么域DIII的总量是相同的。此时,GR10有助于形成超级复合物,因为GR10的链比GR1或GR2更长。

[0240] 将IgG与GR10以5:1的摩尔比混合,将GR1~GR9也以和GR10相同的浓度与IgG混合。在与GR蛋白混合之后,IgG的最终浓度为 $400\mu\text{g}/\text{mL}$ 。GR3~GR10产生沉淀物,通过肉眼可观察到(图26)。通过SDS-PAGE获得一致的结果(图27)。从上述结果可以证实,通过IgG和GR蛋白质复合物之间的交叉结合形成了超级复合物,其可以沉淀析出。

[0241] 单独含有IgG的对照样品中没有产生沉淀物。未用GR蛋白质但用BSA处理的另一个对照中没有形成沉淀物。因此,其表明,沉淀物不是由于引入异源蛋白质导致的蛋白质溶解度的降低,而是由于重复链所导致的大分子量的超级复合物的形成。

[0242] 为了研究当域DIII重复次数超过GR10的次数时是否形成超级复合物,将IgG与GR10以5:1的摩尔比混合,然后将GR1、3、5、15和20也以和GR10相同的浓度与IgG混合。除了使用GR1和IgG的情况下,在所有的其它情况下均形成了沉淀物。SDS-PAGE的结果也证实了复合物(GR3~GR20)产生沉淀物(图28)。所以,大于GR10的GR15或GR20也可以与IgG形成超级复合物,其可沉淀析出。

[0243] 通过降低IgG的最终浓度再次进行同样的实验。此时,当IgG的最终浓度降低到低于 $25\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,肉眼未观察到GR形成沉淀物。因此,证实了超级复合物的形成所导致的沉淀

物的形成,取决于IgG的浓度。除了GR,AR1、3、5、LR1、3、5、LAR1、2和3也可以与IgG按5:1的摩尔比发生反应。那时,IgG的最终浓度为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 。与GR不同,AR、LR或LAR未产生沉淀物,表明这些重复链没有与IgG结合形成肉眼可以观察到的不溶性沉淀物。

[0244] 实施例13:通过G蛋白抗体结合域III的重复链和绿色荧光蛋白(GFP)之间的融合制备的质粒的构建和表达

[0245] 将含有链球菌G蛋白域III重复链的GR1、GR5和GR10与GFP DNA序列(表8)融合,从而构建质粒GR1-GFP、GR5-GFP和GR10-GFP。

[0246] 构建PCR引物(表9和表10),该引物可重叠GR1和GFP的序列。首先,采用GR1为模板,以GR1正向和反向引物进行PCR,结果得到PCR产物1。

[0247] 使用GFP作为模板,以GFP正向和反向引物进行PCR,结果得到PCR产物2。使用上述的PCR产物1和PCR产物2为模板,以GR1正向引物和GFP反向引物进行PCR。

[0248] GR1和GFP通过G4S链接链连在一起。将GR1和GFP融合在一起,采用限制性内切酶Nde1、EcoR1Nde1和EcoR1(950个碱基对)消化所得的放大片段。将该片段插入采用上述同样的酶消化的载体中。通过双脱氧DNA测序证实了该质粒的DNA序列。

[0249] 采用限制性内切酶Nde1和Age1消化完整的GR1-GFP质粒,从而得到用于本实验的载体。采用Nde1和BspE1酶消化GR4-GFP质粒。将所得的小片段插入该载体中,从而得到GR5-GFP质粒。

[0250] 采用限制性内切酶Nde1和Age1通过上述相同的方法消化GR1-GFP质粒,从而得到用于本实验的载体。采用Nde1和BspE1消化GR9-GFP质粒。将所得到的片段插入该载体中,得到GR10-GFP质粒。通过双脱氧DNA测序证实了该质粒的DNA序列。

[0251] 通过先前报道的常规方法过度表达该蛋白质(J.H.帕克等人,分子细胞12(2001)398-402)。通过 $\text{Ni}^{2+}$ -螯合琼脂糖快速流动层析(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))分离裂解物,然后使用制备纯HiLoad Superdex-75或制备纯HiLoad Superdex-200(径高比26/60)(阿默舍姆生物科学,瑞典(Amersham Bioscience,Sweden))进行尺寸排阻层析。

[0252] **【表8】**

[0253]

GFP的核苷酸序列
5'- ATGGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACCGGGGTGGTGCCCATCCTGGTC GAGCTGGACGGCGACGTAAACGGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGC GAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCCTGAAGTTCATCTGCACCACC GGCAAGCTGCCCGTGCCCTGGCCCACCCTCGTGACCACCCTGACCTACGGCG TGCAGTGCTTCAGCCGCTACCCCGACCACATGAAGCAGCACGACTTCTTCAA GTCCGCCATGCCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAC GACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTG GTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGACTTCAAGGAGGACGGCAACATC CTGGGGCACAAGCTGGAGTACAACACTACAACAGCCACAACGTCTATATCATG GCCGACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACTTCAAGATCCGCCACAAC ATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCC ATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCCGACAACCACTACCTGAGCACCCAGT CCGCCCTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGG AGTTCGTGACCGCCGCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAGT AA-3' (序列8)

[0254] 【表9】

[0255]

GR1正向引物序列
5'-GCC CAT ATG CAT CAC CAT CAC-3' (序列9)
GR1反向引物序列
5'-GCC CTT GCT CAC CAT TCC GGA GGA CCC GCC TCC ACC-3' (序列10)

[0256] 【表10】

[0257]

GFP正向引物序列
5'-GCC TCC GGA ATG GTG AGC AAG GGC GAG-3' (序列11)
GFP反向引物序列
5'-GCC GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC-3' (序列12)

[0258] 例14:通过蛋白免疫印迹证实的重复链GR、AR、LA和LAR的抗体信号放大

[0259] 采用如同实施例3所述的相同方式进行了蛋白免疫印迹。

[0260] 如图29a所示,通过与没有使用GR的蛋白免疫印迹的检测限比较,证实了使用GR扩展了蛋白免疫印迹的检测限。此处使用了GR5、10、15和20。它们的摩尔比如图所示。还证实了通过改变重复链的长度改变最佳比例。当重复链变长时,放大效应增加,从而使该灵敏度增加。当使用GR20时,该灵敏度增加8倍以上。在图29b中,将图29a的内容做成图表,展示可检测的最小抗原浓度的对比(图29b)。

[0261] 如图30A所示,蛋白免疫印迹证实,通过GR放大了化学发光信号,即使是存在相同量抗原的情况下。当使用GR20时,其与初级Ab形成超级复合物,这引起信号放大高达42倍(图30)。图30B以图表形式示出了图30A的内容(图30)。

[0262] 图31显示了在蛋白免疫印迹中使用不同类型抗原形成GR超级复合物所引起的信号放大。此时,使用A431全细胞裂解物替换常规牛组织裂解物,结果同样证实了信号放大(图31)。

[0263] 图31B显示,在不同的一级抗体存在下,通过重复链放大蛋白免疫印迹信号是可能的。此时,使用抗-E-钙黏蛋白鼠单克隆抗体替换抗- $\beta$ -肌动蛋白鼠单克隆抗体(图31)。

[0264] 图32A显示了使用不同重复链的蛋白免疫印迹的放大水平比较。在相同条件下比较由GR10、AR10和MAR5(重复链具有来自LAR5的不同类型的L)引起的放大。当AR10与MAR5比较时,使用具有两个不同的域(A和M)重复5次的MAR5的放大效应,大于仅具有一个域(A)重复10次的AR10。

[0265] 图32B显示了使用LR10的蛋白免疫印迹结果。不像其它的重复链,LR在放大方面未引起大的变化(图32)。

[0266] 实施例15:使用快速抗原测试研究重复链与金抗体复合物或超级复合物与检测线抗体之间的交叉结合

[0267] 采用流感快速抗原检测试剂盒,即使用抗体的最典型的检测方法,在无抗原存在下检测金抗体,检测时利用重复链链接的金抗体复合物或超级复合物和检测线抗体之间的交叉结合。其中产生的检测线是由于重复链/金抗体复合物或超级复合物的重复链之抗体结合域的空白空间与检测线抗体之间的交叉结合。此处使用了SD BIOLINE提供的流感抗原检测试剂盒和韩国绿十字有限公司提供的流感抗原检测试剂盒。该试剂盒包含抗原缓冲液、采集样品的棉签和试纸。将该抗原缓冲液打开并倒入试管中。将一系列的GR、AR、LR和MAR重复链加入含有抗原缓冲液的试管中,随后混合至少5次。将试纸加入到试管中,10~15分钟后读取结果。

[0268] 对于GR的情况,GR5、GR10、GR15和GT20均在各试纸上产生黄金线(图33)。对于AR的情况,AR10在所有的试纸上产生黄金线。AR5在任何浓度下均未产生黄金线(图34)。对于LR的情况,LR5和LR10在SD试纸上产生黄金线,但LR蛋白在韩国绿十字试纸(Korea Green Cross strip)上未显示交叉结合。这是因为韩国绿十字公司提供的抗体VL不是LR蛋白可结合的K链(图35)。在MAR(重复链具有来自LAR5的不同类型的L)情况下,MAR1、MAR5和MAR10在SD试纸上产生黄金线,且MAR5和MAR10在韩国绿十字试纸(Korea Green Cross strip)上产生黄金线。上述两种不同的试纸之间黄金线的形成图案有差异。SD试纸比韩国绿十字试纸能观察到更明显的黄金线(图36)。该图案的改变取决于检测线抗体是否是L结合域可结合的VL的K链。韩国绿十字试纸上的检测线抗体不含有VL的K链,MAR10黄金线比SD试纸上显示的浅,因为MAR10黄金线仅是由A蛋白域B制得的A结合域引起的。

[0269] GR1、AR1和LA1均包含一个域,它们在任何一条试纸上均未形成黄金线,因为只有一个域时不可能形成金抗体和检测线抗体之间的交叉结合。

[0270] 实施例16:通过酶联免疫测定(ELISA)证实GRN(1,5,10,15,20)、ARN(1,5,10)、LRN(1,5,10)和MARN(1,5,10)的抗体信号放大

[0271] 将牛组织裂解物在最终浓度为100 ng/ml的包被缓冲液中稀释。通过移液将稀释

的裂解物装入微量滴定板(50 $\mu\text{l}$ /孔)中,从而涂布该板。将该板盖上盖子,并在4 $^{\circ}\text{C}$ 保温过夜。然后,将该包被缓冲液除去并将该板用200 $\mu\text{l}$ 的洗涤缓冲液(磷酸盐缓冲盐水)洗涤两次。通过摇动水槽中的板除去该洗涤缓冲液(含有0.1%(v/v)吐温20的PBS)。剩余的水滴通过轻轻敲击并用纸巾除去。对于封闭该板,将200 $\mu\text{l}$ 的封闭溶液(3%牛血清白蛋白(BSA),磷酸盐缓冲盐水)加入到该板的每个孔中,以封闭涂布的孔中剩余的蛋白质结合位点。用盖子覆盖该板后,将该板在室温下保温2小时,然后使用PBS洗涤两次。在使用之前,向其中加入100 $\mu\text{l}$ 由稀释缓冲液/一级抗体(小鼠抗肌动蛋白抗体(圣克鲁斯生物技术(Santacruz Biotech)))形成的混合物或由一级抗体/重复链形成的混合物。在覆盖该板后,将板再次在室温下保温1小时,然后使用PBS洗涤两次。在使用之前,加入100 $\mu\text{l}$ 由稀释缓冲液/山羊抗小鼠 $\beta$ 肌动蛋白-HRP抗体(1:2000)形成的混合物。将该板再次覆盖并在室温下保温1小时,然后使用PBS洗涤两次。将100 $\mu\text{l}$ 的TMB(HRP底物)加入其中,并将该板在室温下保温20分钟。将100 $\mu\text{l}$ 的2M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ 加入其中,然后采用酶标仪在450nm处对该板进行读取结果。

[0272] 经证实,GR5、GR10、GR15和GR20诱导了信号放大。在使用GR5的情况下,当它与一级抗体以1:2的摩尔比混合时,信号放大效应是最大的,表明形成了最有效的复合物。该放大的信号比普通抗体信号高6倍。在使用GR10的情况下,像GR5一样,当它与一级抗体以1:2的摩尔比混合时,该放大为9.8倍高,分别以1:1/2的摩尔比加入的GR15和GR20同样形成了有效复合物。此时,放大分别为10.5和12.9倍高(表11)。在使用AR和MAR的情况下,当将AR10和MAR10以1:2和1:1的摩尔比加入时,放大水平分别增加1.8倍和1.6倍。另一方面,在使用LR的情况下没有观察到放大效应。这是因为本发明中所用的一级抗体VL不是 $\kappa$ 链,从而没有产生放大。

[0273] 仅含有一个域的GR1、AR1和LR1,在任何浓度均未产生信号放大。这是因为通过仅具有一个域的复合物之间的交叉结合不可能形成超级复合物。

[0274] 【表11】

[0275] 间接ELISA测量的由GRN(1、5、10、15、20)、ARN(1、5、10)、LRN(1、5、10)和MARN(1、5、10)引起的抗体信号放大

[0276]

样品	A450值	成倍增加
----	-------	------

[0277]

只有IgG	0.188	1.0
IgG+GR1	0.207	1.1
IgG+GR5	1.128	6.0
IgG+GR10	1.842	9.8
IgG+GR15	1.974	10.5
IgG+GR20	2.425	12.9
IgG+AR1	0.195	1.0
IgG+AR5	0.183	1.0
IgG+AR10	0.338	1.8
IgG+LR1	0.190	1.0
IgG+LR5	0.189	1.0
IgG+LR10	0.188	1.0
IgG+MAR1	0.191	1.0
IgG+MAR5	0.190	1.0
IgG+MAR10	0.300	1.6

[0278] 实施例17:由G蛋白域III重复链重组蛋白和B3(Fab)-ext-PE38形成的复合物制备 [B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>

[0279] 为了通过使用纯化的TR1、3、5、10、15和20(=GR1、3、5、10、15、20)蛋白质和B3(Fab)-ext-PE38的复合物构建[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>,该复合物通过2-巯基乙醇还原,然后氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG),然后采用非还原SDS-PAGE进行分析(图37)。

[0280] 具体地,将该蛋白质复合物在10℃下固定于金属螯合琼脂糖珠1小时。将40μl的金属螯合琼脂糖珠[悬浮于100mM的浓度为50%的Tris-HCl(pH为8.2)中]加入各反应混合物中。在室温下,在所固定的蛋白质复合物中加入100mM Tris-HCl(pH值8.2)以诱导还原,其中所用的Tris-HCl补充有40mM 2-巯基乙醇。为了确定B3(Fab)-ext-PE38的半胱氨酸残基还原所必需的2-巯基乙醇的浓度,首先进行了初步实验,证实在2-巯基乙醇浓度为20~40mM时,该B3(Fab)-ext-PE38半胱氨酸残基被完全还原。采用含有100mM MOPS(pH6.5)的洗涤缓冲液对经还原的蛋白质复合物洗涤一次,然后采用100mM的Tris-HCl(pH值8.2)洗涤三次以上。在洗涤后,采用含有5mM的GSSG和100mM的Tris-HCl(pH值8.2)的氧化缓冲液氧化该蛋白复合物。当氧化完成后,该复合物在37℃保温2小时。此后,将2X SDS样品缓冲液加入其中,随后进行SDS-PAGE和考马斯染色。使用密度计分析密度,以研究[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的收率。将TR存在时SDS-PAGE上氧化/还原完成的[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的条带强度值(图37,泳道4),除以TR不存在时通过氧化/还原完成的[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的条带强度值(图37,泳道5),来计算[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的增加率(表12)。

[0281] 结果,当[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>单独使用或与TR1形成复合物时,它的条带强度没有增加。在与TR3、5、10、15和20形成复合物时,单体之间碰撞频率的增加诱发二硫键二聚体的生成。使用与TR3、TR5、TR10、TR15、TR20形成的复合物,[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的生产提高

了4.6倍、3.4倍、16.7倍、3.5倍和2.7倍。[B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的生产从添加氧化剂的2小时之内完成。然而,另外再加热的的时间并没有使得生产显著增加。因此,可以证实,与TR蛋白结合的[B3(Fab)-ext-PE38]分子中的半胱氨酸残基,可以容易地通过重复链接近蛋白质并与其结合。

[0282] 【表12】

[0283] [B3(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的生产率增长

[0284]

抗体-毒素	生产率的增长(倍数)
B3(Fab)-ext-PE38	未检出
B3(Fab)-ext-PE38:TR1	未检出
B3(Fab)-ext-PE38:TR3	4.6
B3(Fab)-ext-PE38:TR5	3.6
B3(Fab)-ext-PE38:TR10	16.7
B3(Fab)-ext-PE38:TR15	3.5
B3(Fab)-ext-PE38:TR20	2.7

[0285] 实施例18:由G蛋白域III重复链重组蛋白和赫塞汀(Fab)-ext-PE38形成的复合物制备[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>

[0286] 为了使用纯化的GR5、GR10、GR15和GR20(=TR5、TR10、TR15和TR20)蛋白质和赫塞汀(Fab)-ext-PE38的复合物构建[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>,该复合物通过2-巯基乙醇还原,然后氧化成氧化型谷胱甘肽(GSSG),随后采用SDS-PAGE进行分析。

[0287] 具体地,将该蛋白质复合物在4℃下固定于金属螯合琼脂糖珠1小时(图38,泳道1)。将40 μl的金属螯合琼脂糖珠[悬浮于100mM的浓度为50%的Tris-HCl(pH为8.2)中)加入各反应混合物中。在室温下,在所固定的蛋白质复合物中添加100mM Tris-HCl(pH值8.2)以诱导还原(图38,泳道2),其中所用Tris-HCl补充有40mM 2-巯基乙醇。采用含有100mM MOPS(pH6.5)的洗涤缓冲液对经还原的蛋白质复合物洗涤一次,然后采用100mM的Tris-HCl(pH值8.2)洗涤三次以上。在洗涤后,采用含有5mM的GSSG和100mM的Tris-HCl(pH值8.2)的氧化缓冲液氧化该蛋白复合物。当氧化完成后,该复合物在37℃保温2小时(图38,泳道3)。此后,将2X SDS样品缓冲液加入其中,然后进行SDS-PAGE和考马斯染色。使用密度计分析密度,以研究[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的收率(表13)。将TR存在时SDS-PAGE上氧化/还原完成的[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的条带强度值(泳道4),除以TR不存在时通过氧化/还原完成的[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的条带强度值(泳道5),来计算[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的增加率(表13)。此时,采用以下作为阴性对照:仅被还原的赫塞汀(Fab)-ext-PE38(图38,泳道2),仅被氧化的赫塞汀(Fab)-ext-PE38(图38,泳道3),和单独的赫塞汀(Fab)-ext-PE38(-TR)。

[0288] 结果,在与TR5、TR10、TR15、TR20形成复合物时,[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的产量比单独使用赫塞汀(Fab)-ext-PE38(-TR)时高2.3倍、2.3倍、1.7倍和3.3倍。在与TR5、TR10、TR15和TR20形成的复合物中,单体之间碰撞频率的增加诱发二硫桥联二聚体的生产。[赫塞汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的生产从添加氧化剂的2小时之内完成。然而,另外的加热时间并没有使生产显著增加。因此,可以证实,与TR蛋白结合的[B3(Fab)-ext-PE38]分子中的半胱氨酸

残基,可以通过重复链容易地接近蛋白质并与其结合。

[0289] 【表13】

[0290] [赫赛汀(Fab)-ext-PE38]<sub>2</sub>的增长率

[0291]

抗体-毒素	增长率
赫赛汀(Fab)-ext-PE38+无TR	1.0
赫赛汀(Fab)-ext-PE38+TR5	2.3
赫赛汀(Fab)-ext-PE38+TR10	2.3
赫赛汀(Fab)-ext-PE38+TR15	1.7
赫赛汀(Fab)-ext-PE38+TR20	3.3

[0292] 实施例19:GR重复链蛋白和[赫赛汀(Fab)-ext-PE38]单体形成的复合物的细胞毒性效应

[0293] 采用以前报道的常规方法(J.H.帕克等人,分子细胞12(2001)398-402),对赫赛汀(Fd)-ext-PE38、H6-赫赛汀(L)、e23(Fd)-ext-PE38和H6-e23(L)包涵体进行过度表达、制备和重折叠。为了证实与GR蛋白结合后的细胞毒性效应,将[赫赛汀(Fab)-ext-PE38]与GR5~GR20结合。

[0294] 具体地,本实验在37℃对[赫赛汀(Fab)-ext-PE38]和TR5~TR20,以及[e23(Fab)-ext-PE38]和TR5~TR20进行培养1小时。将它们处理到不同浓度的乳腺癌细胞中,然后在37℃反应24小时。然后,将CCK-8溶液处理到该介质中(该介质的1/10),然后在37℃反应4小时。然后,观察效果(图39和图40,表14和表15)。

[0295] 与TR5、TR10、TR15和TR20形成的复合物对SKBR3细胞的细胞毒性效应,比单独赫赛汀(Fab)-ext-PE38的细胞毒性效应分别高2.8倍、2.2倍、1.7倍和2.3倍。与TR5、TR10、TR15和TR20形成的复合物对SKBR3细胞的细胞毒性效应,比单独e23(Fab)-ext-PE38的细胞毒性效应分别高4.5倍、1.4倍、2.4倍和1.7倍。与TR5、TR10、TR15和TR20形成的复合物对BT474细胞的细胞毒性效应,比单独赫赛汀(Fab)-ext-PE38的细胞毒性效应分别高1.9倍、2.8倍、3.4倍和2.9倍。与TR5、TR10、TR15和TR20形成的复合物对SKBR3细胞的细胞毒性效应,比单独e23(Fab)-ext-PE38的细胞毒性效应分别高3.8倍、5倍、23倍和11.3倍。

[0296] 【表14】

[0297]

SKBR3细胞系		BT 474细胞系	
赫赛汀(Fab)-PE38 + 无GR	1.0	赫赛汀(Fab)-PE38 + 无GR	1.0
赫赛汀(Fab)-PE38 + GR5	2.8	赫赛汀(Fab)-PE38 + GR5	1.9
赫赛汀(Fab)-PE38 + GR10	2.2	赫赛汀(Fab)-PE38 + GR10	2.8
赫赛汀(Fab)-PE38 + GR15	1.7	赫赛汀(Fab)-PE38 + GR15	3.4
赫赛汀(Fab)-PE38 + GR20	2.3	赫赛汀(Fab)-PE38 + GR20	2.9

[0298] 【表15】

[0299]

SKBR3细胞系		BT 474细胞系	
e23(Fab)-PE38 + 无 GR	1.0	e23(Fab)-PE38 + 无 GR	1.0

[0300]

e23(Fab)-PE38 + GR5	4.5	e23(Fab)-PE38 + GR5	3.8
e23(Fab)-PE38 + GR10	1.4	e23(Fab)-PE38 + GR10	5.0
e23(Fab)-PE38 + GR15	2.4	e23(Fab)-PE38 + GR15	23.0
e23(Fab)-PE38 + GR20	1.7	e23(Fab)-PE38 + GR20	11.3

- <110> 崔武铉
- <120> 由重复链和单体的复合物交叉形成的超级复合物及其应用
- <130> 2015FPO-11-012/EP
- <140> PCT/KR2014/004862
- <141> 2014-05-30
- <150> KR1020130061869
- <151> 2013-05-30
- <150> KR1020140066001
- <151> 2014-05-30
- <160> 12
- <170> PatentIn 3.2 版本
- [0001] <210> 1
- <211> 43
- <212> DNA
- <213> 人工
- <220>
- <223> 人工序列
- <400> 1
- agacctttac ggttaactcaa accggtggag gcgggtccgg ata 43
- <210> 2
- <211> 43
- <212> DNA
- <213> 人工
- <220>
- <223> 人工序列
- <400> 2
- tatccggacc cgcctccacc ggtttcagtt accgtaaagg tct 43

<210> 3  
 <211> 261  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> A 蛋白 域 B  
  
 <400> 3  
 catatgcate atcatcatca ccacaccgg tctcaagccc caaaagccga caataaattt 60  
  
 aataaagagc agcagaacgc gtttatgaa atcttgcate tgccgaatct gaafgaagaa 120  
  
 caacgtaacg gattcattca gagcctfaaa gatgatccta gtcagtccgc taacttactc 180  
  
 gcagaagcta agaaactgaa tgatgcacag gcgccgaagg gagggggtgg atccgggtgt 240  
  
 ggccgctccg gataagaatt c 261

[0002] <210> 4  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> 人工序列  
  
 <400> 4  
  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 5  
 <211> 315  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> 人工序列

<400> 5		
catatgcate accatcacca tcataccggt atcaagttcg ccggtaaaga agaaaocgeg	60	
gaaacccctg agacagacag tgaagaggaa gtgacaataa aagcaaatct gatttfcgcc	120	
aacgggtcaa cccagacggc cgaattcaaa gggacattfg aaaaagcaac ttctgagget	180	
tatgcatacg cggacactct gaagaaggat aatggtgaat ataccgtaga tgttgctgat	240	
aaaggtfata ccctgaatat taaattfgeg ggtggcggcg gcggaagcgg tggcggaggt	300	
tcgggataag aattc		315
<210> 6		
<211> 537		
<212> DNA		
<213> 人工		
<220>		
<223> LA 蛋白 域 B1-域 B 核酸序列		
[0003]		
<400> 6		
catatgcate accatcacca tcataccggt atcaagttcg ccggtaaaga agaaaocgeg	60	
gaaacccctg agacagacag tgaagaggaa gtgacaataa aagcaaatct gatttfcgcc	120	
aacgggtcaa cccagacggc cgaattcaaa gggacattfg aaaaagcaac ttctgagget	180	
tatgcatacg cggacactct gaagaaggat aatggtgaat ataccgtaga tgttgctgat	240	
aaaggtfata ccctgaatat taaattfgeg ggtggcggcg gcggaagcgg tggcggaggt	300	
tcgggtfctc aagccccaaa agecgacaat aaatttaata aagagcagca gaacgcgftt	360	
tatgaaatct tgcactctgc gaactctgaat gaagaacaac gtaacggatt cattcagage	420	
cttaaagatg atcctagfca gtccgctaac ttactgcag aagctaagaa actgaatgat	480	
gcacagggcg cgaaggagg ggtfgatcc ggtggtggcg gctccggata agaattc	537	
<210> 7		
<211> 4		

<212> PRT  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> 人工序列  
  
 <400> 7  
  
 Gly Gly Gly Gly  
 1  
  
 <210> 8  
 <211> 720  
 <212> DNA  
 <213> 人工  
  
 <220>  
 <223> 绿色荧光蛋白 (GFP) 核酸序列  
  
 <400> 8  
 [0004] atggtgagca agggcgagga gctgtcacc ggggtggtgc ccatactggt cgagctggac 60  
 ggccagctaa acggccacaa gttcagcctg tccggcgagg gcgagggcga tgccacctac 120  
 ggcaagctga cccgaagtt catctgcacc accggcaagc tgcccctgcc ctggcccacc 180  
 ctctgacca cctgacctc eggegctcag tgcctcagcc gctacccca ccacatgaag 240  
 cagcacgact tcttcaagtc cgcctgccc gaaggctacg tccaggagcg caccatcttc 300  
 ticaaggacg acggcaacta caagaccgc gccgaggtga agttcgaggg cgacaccctg 360  
 gtgaaccgca tcgagctgaa gggcctcagc tcaaggagg acggcaacat cctggggcac 420  
 aagctggagt acaactacaa cagccacaac gtctatatca tgcccgacaa gcagaagaac 480  
 ggcatcaagg tgaactcaa gatcgcacc aacatcgagg acggcagcgt gcagctcgcc 540  
 gaccactacc agcagaacac ccccatcgge gacggccccg tgetgctgcc cgacaaccac 600  
 tacctgagca cccagctcgc cctgagcaaa gaccocaacg agaagcgcga tcacatggtc 660  
 ctgctggagt tcgtgaccgc cgccgggatc actctcgcca tggacgagct gtacaagtaa 720

	<210> 9	
	<211> 21	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> 人工序列	
	<400> 9	
	gccccatagc atcaccatca c	21
	<210> 10	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> GR1 反向引物序列	
[0005]	<400> 10	
	gcccttgcgc accattccgg aggaccggcc tccacc	36
	<210> 11	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	
	<223> GFP 正向引物序列	
	<400> 11	
	gcctccggaa tggtagagcaa gggcgag	27
	<210> 12	
	<211> 27	
	<212> DNA	
	<213> 人工	
	<220>	

<223> GFP 反向引物序列

[0006]

<400> 12

gcegaattct tacttgfaca gctegtc

27



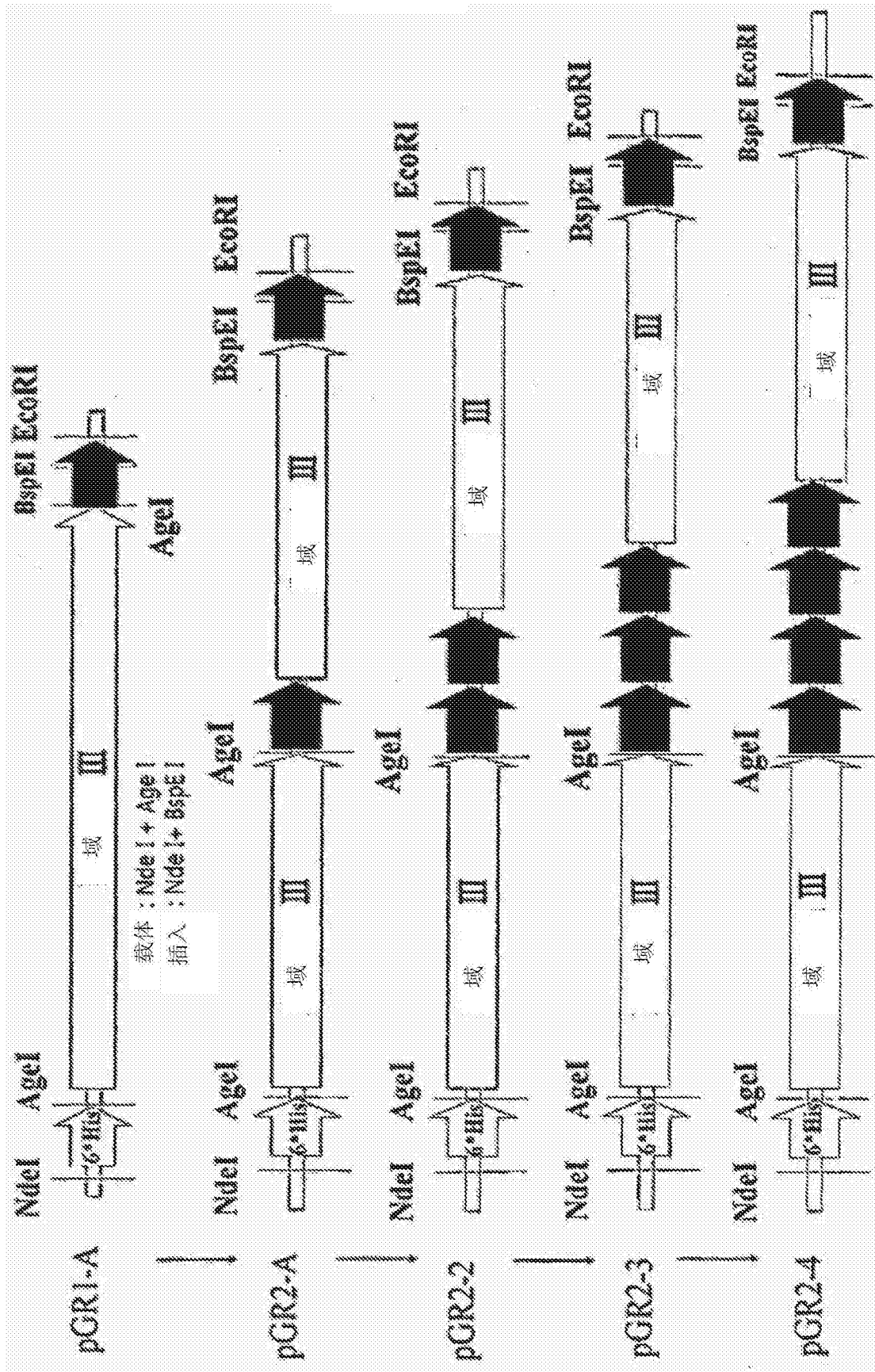


图1b

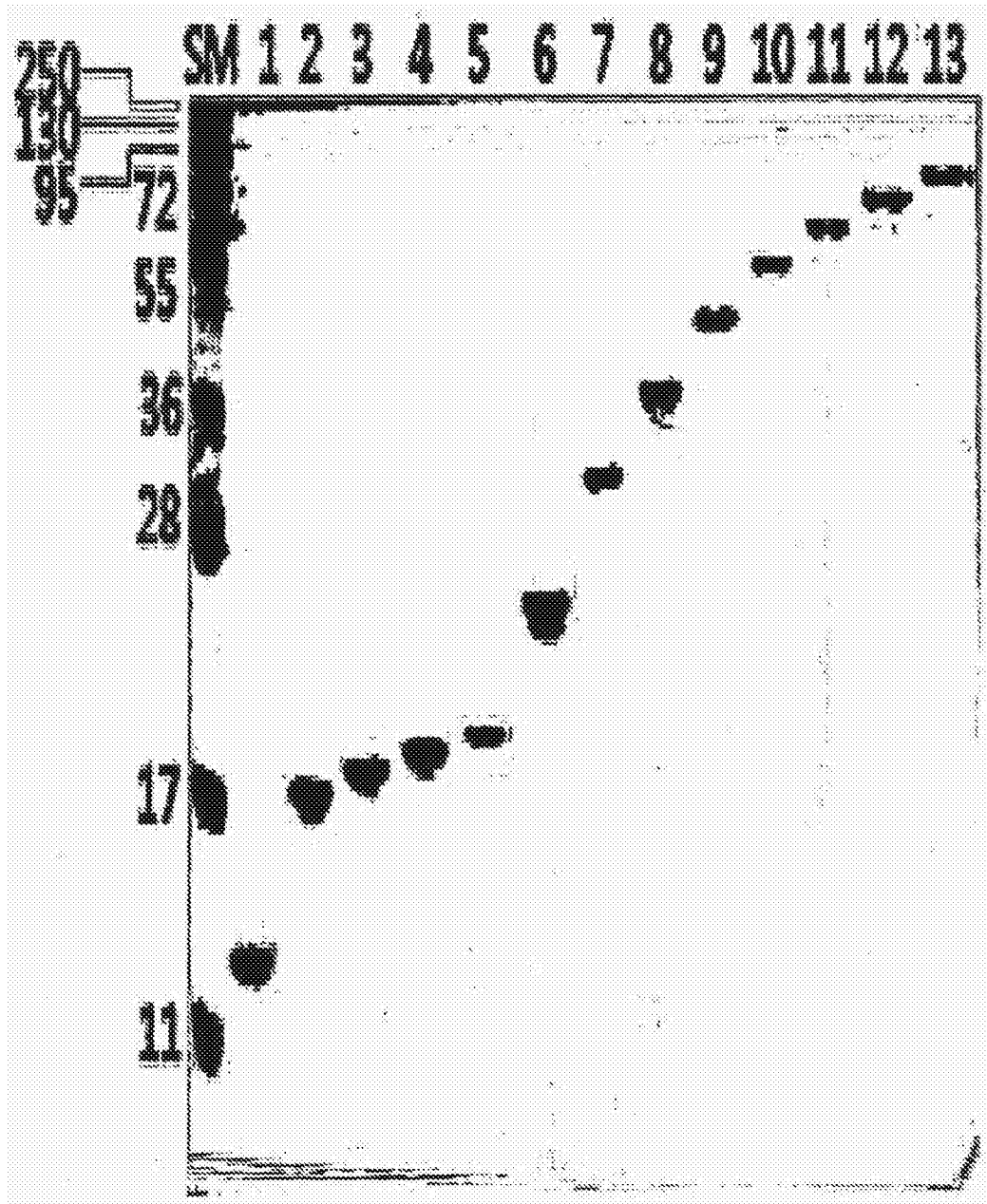


图2

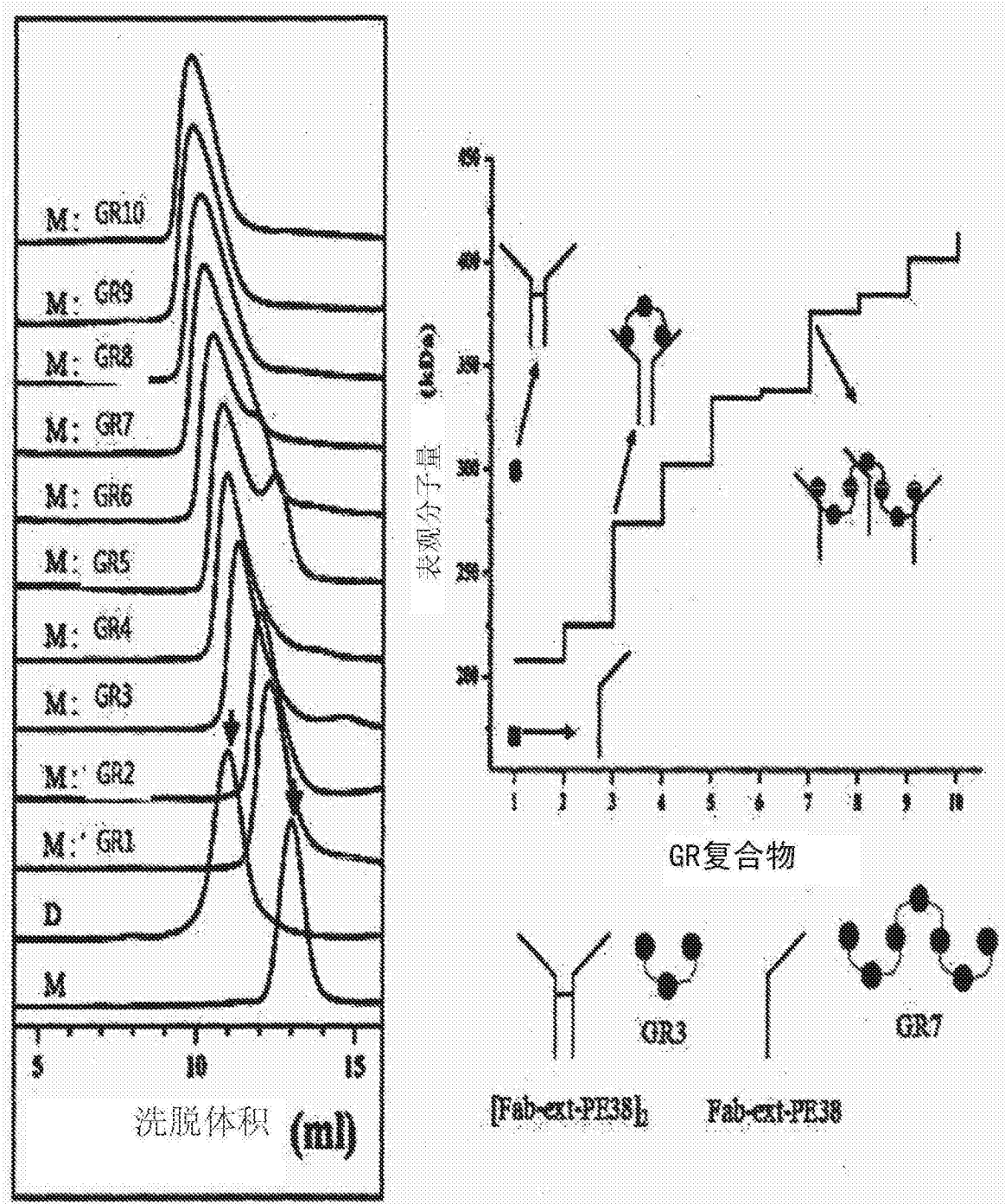


图3

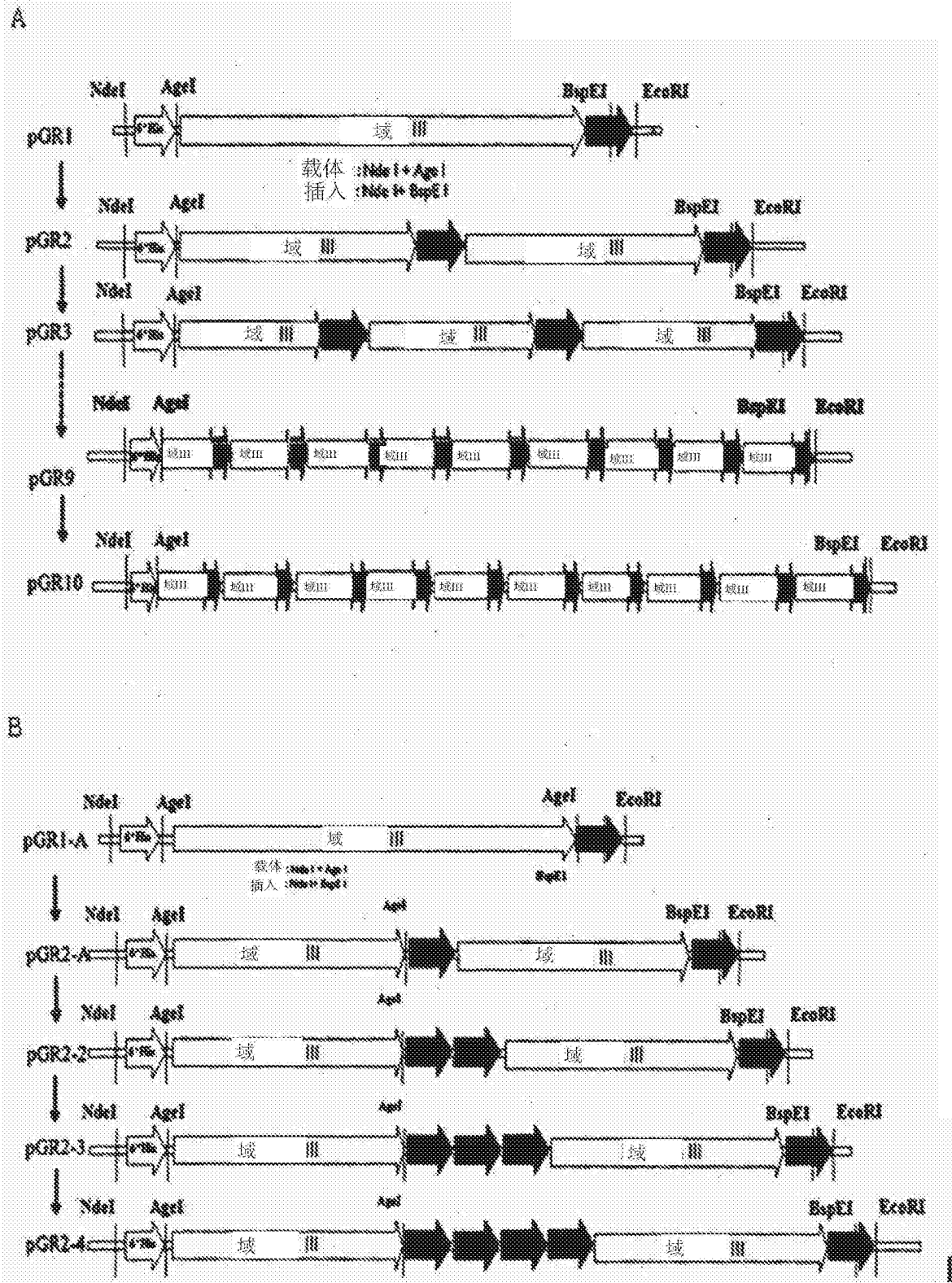


图4

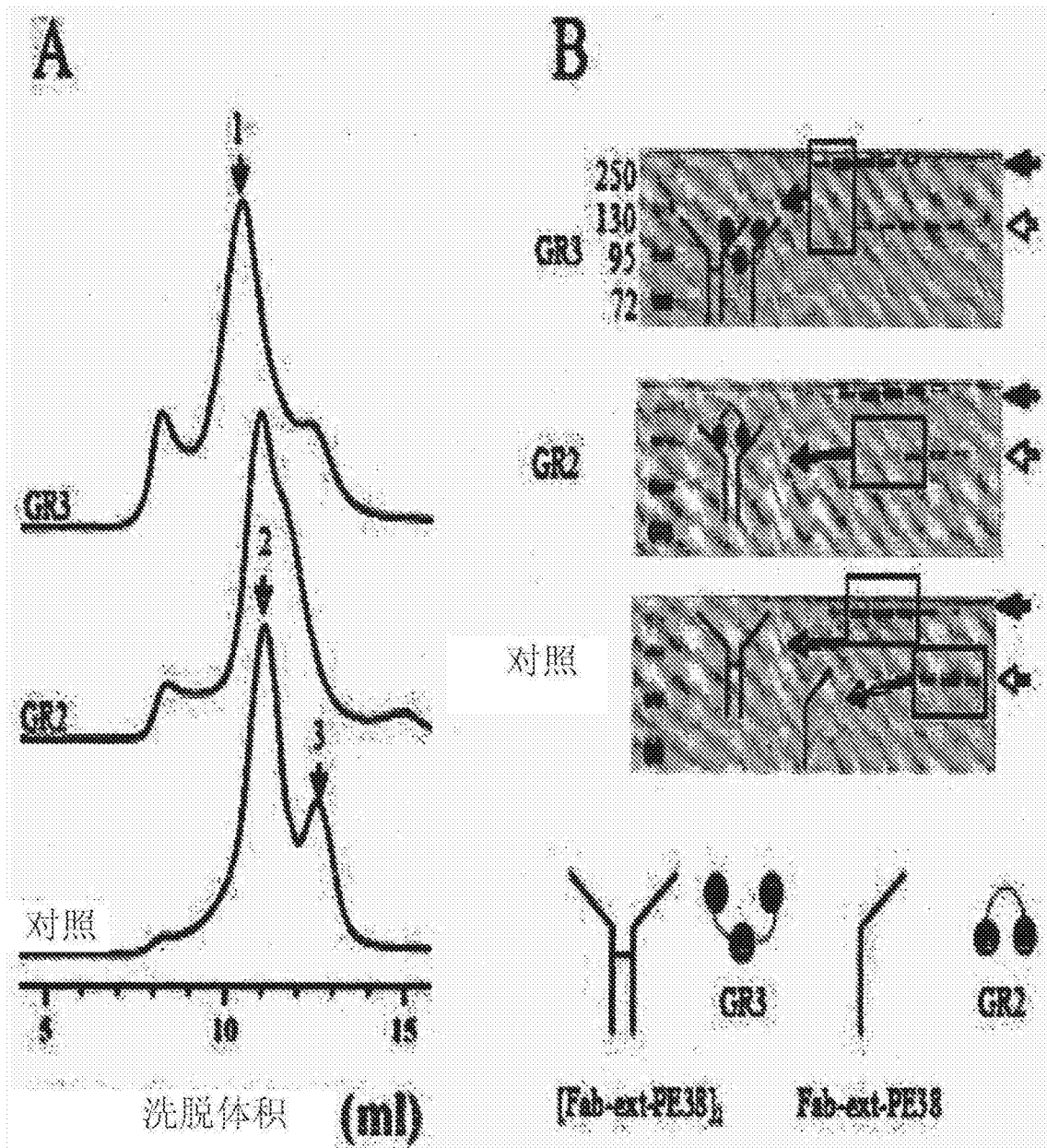


图5

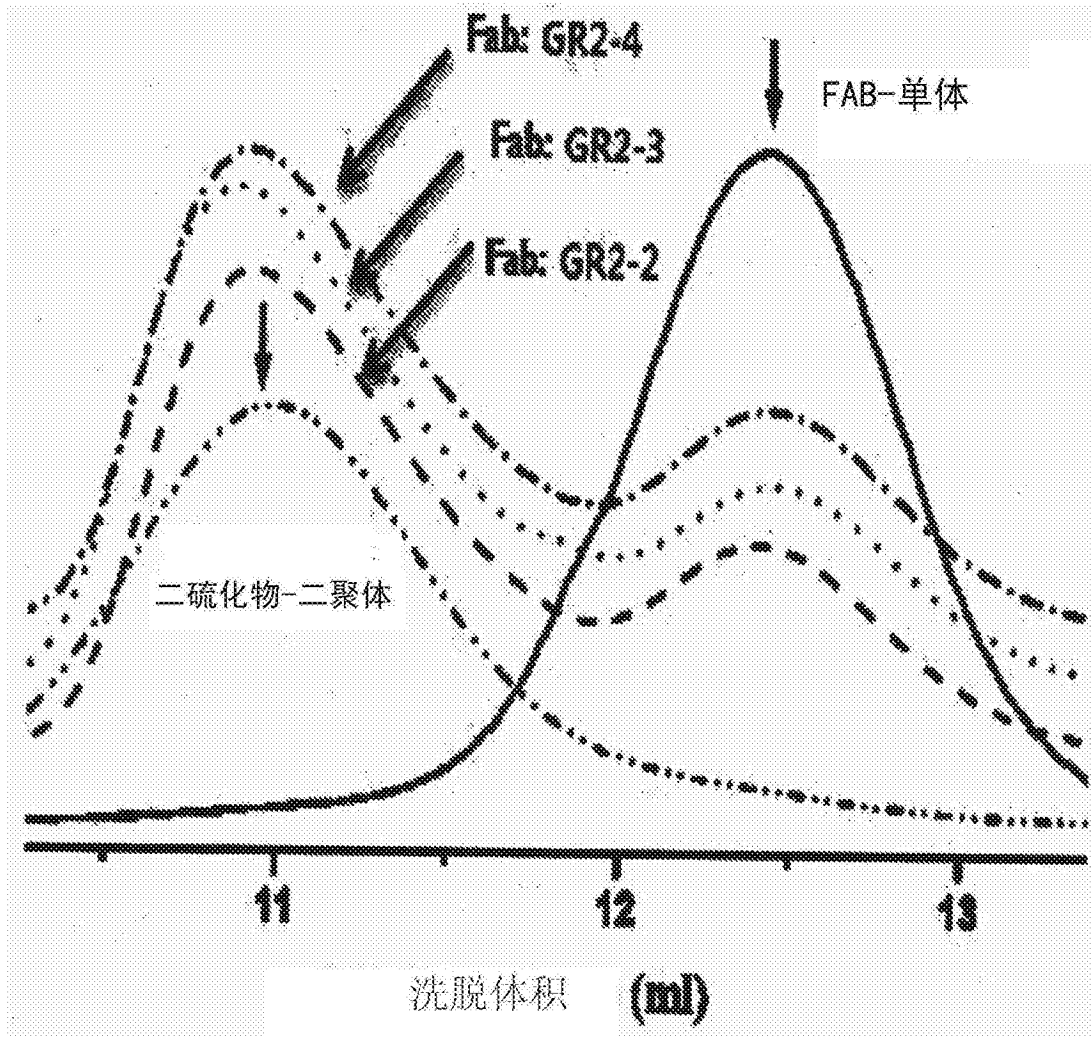


图6

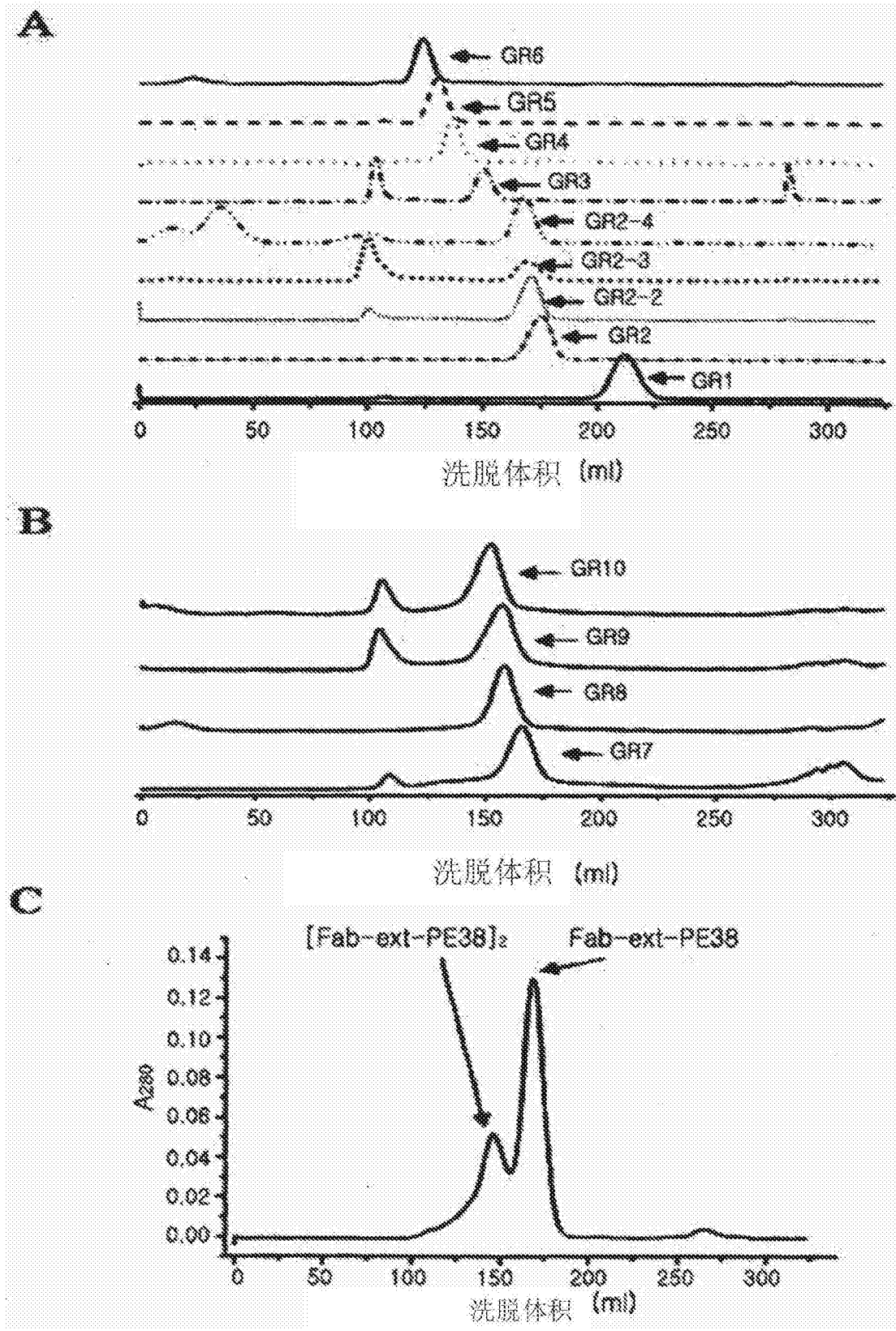


图7

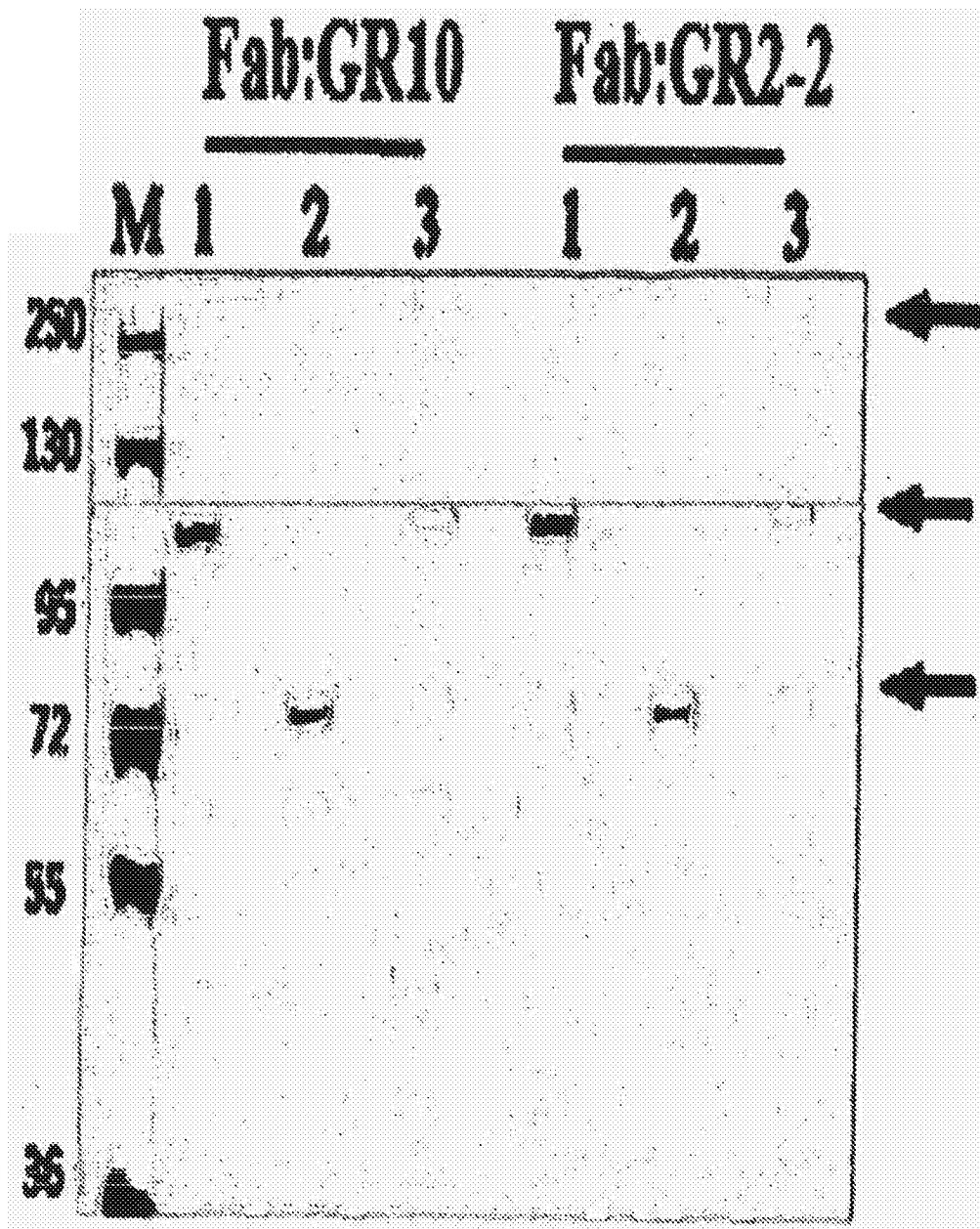


图8

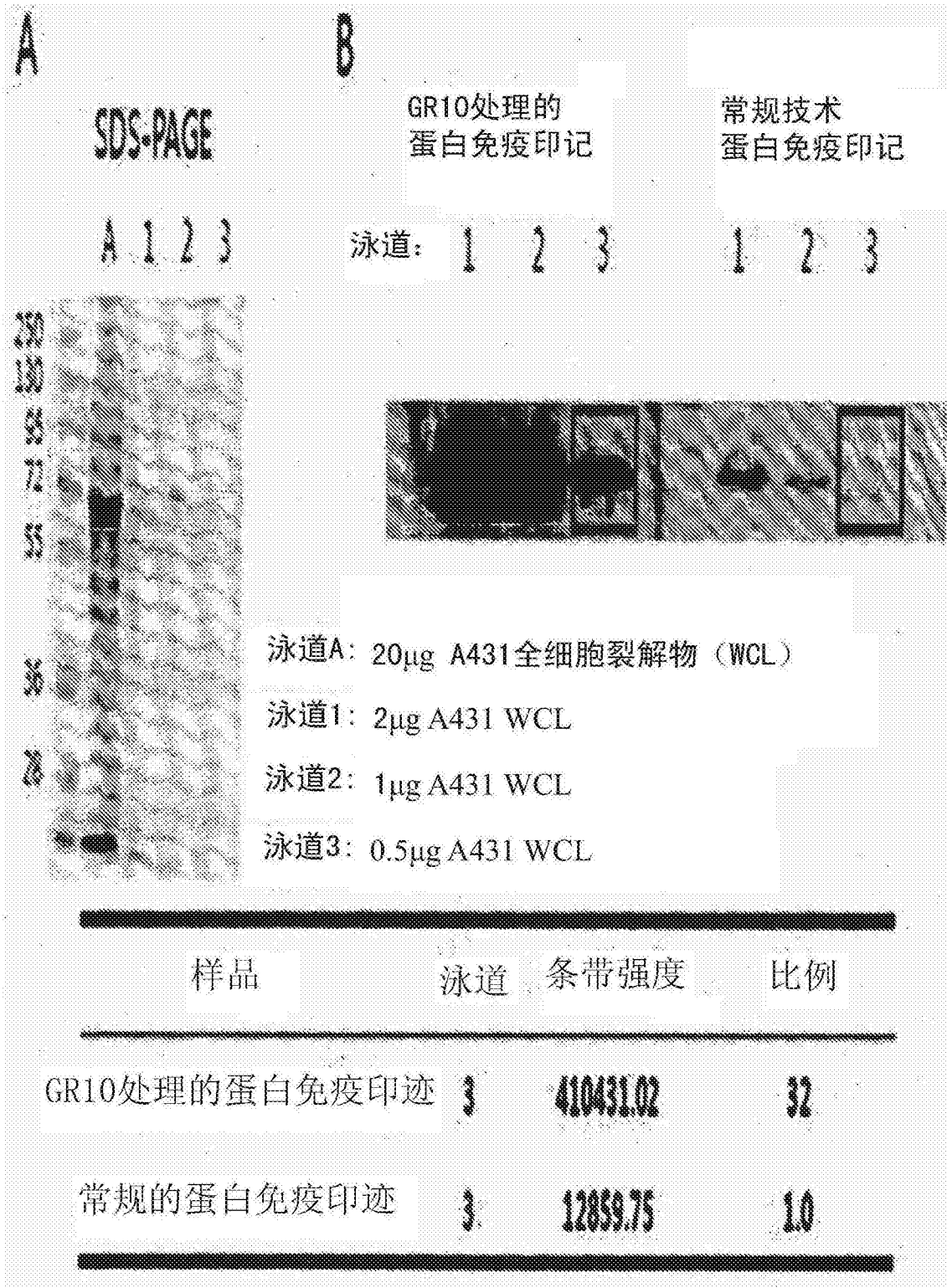


图9

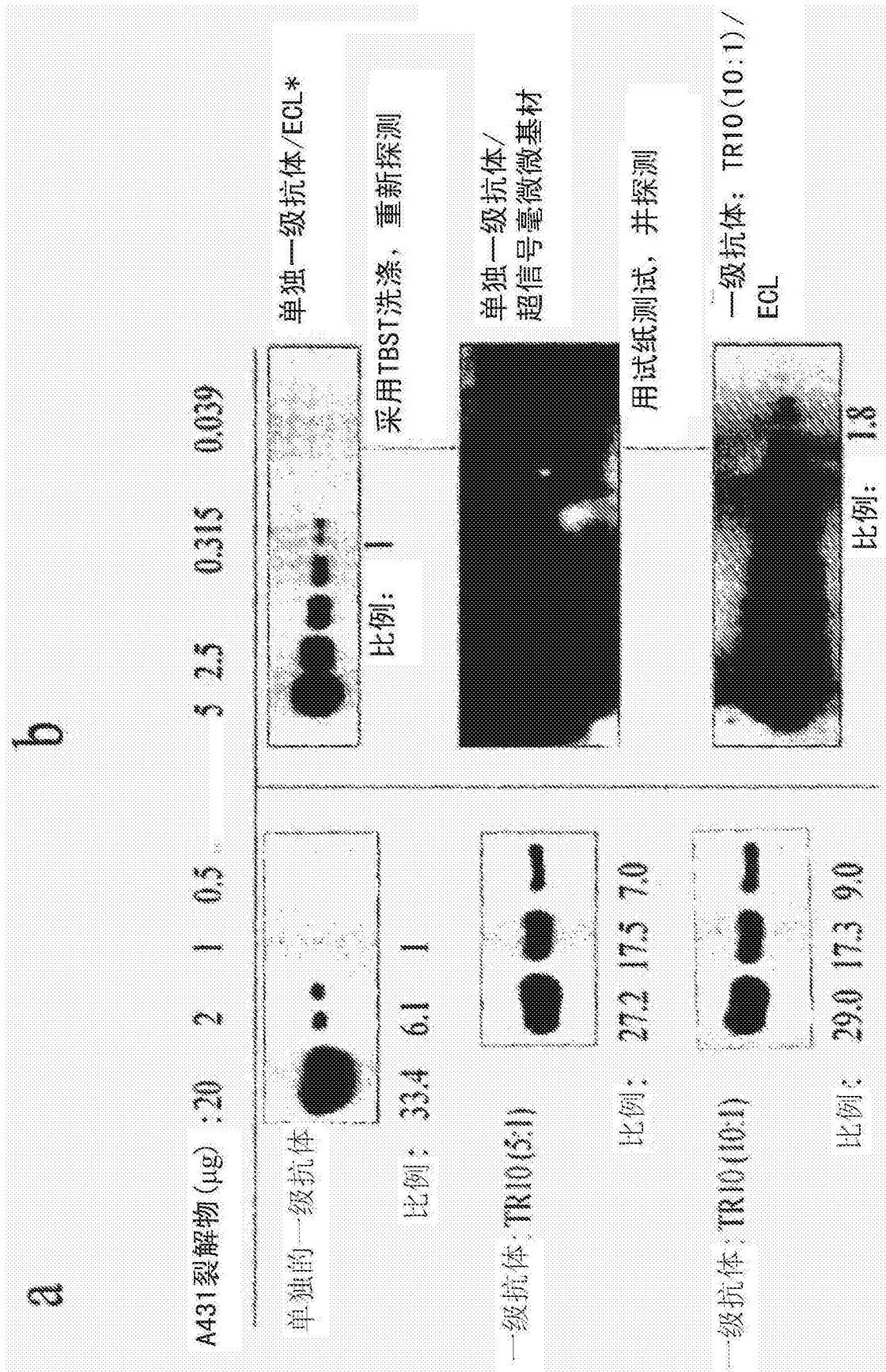


图10

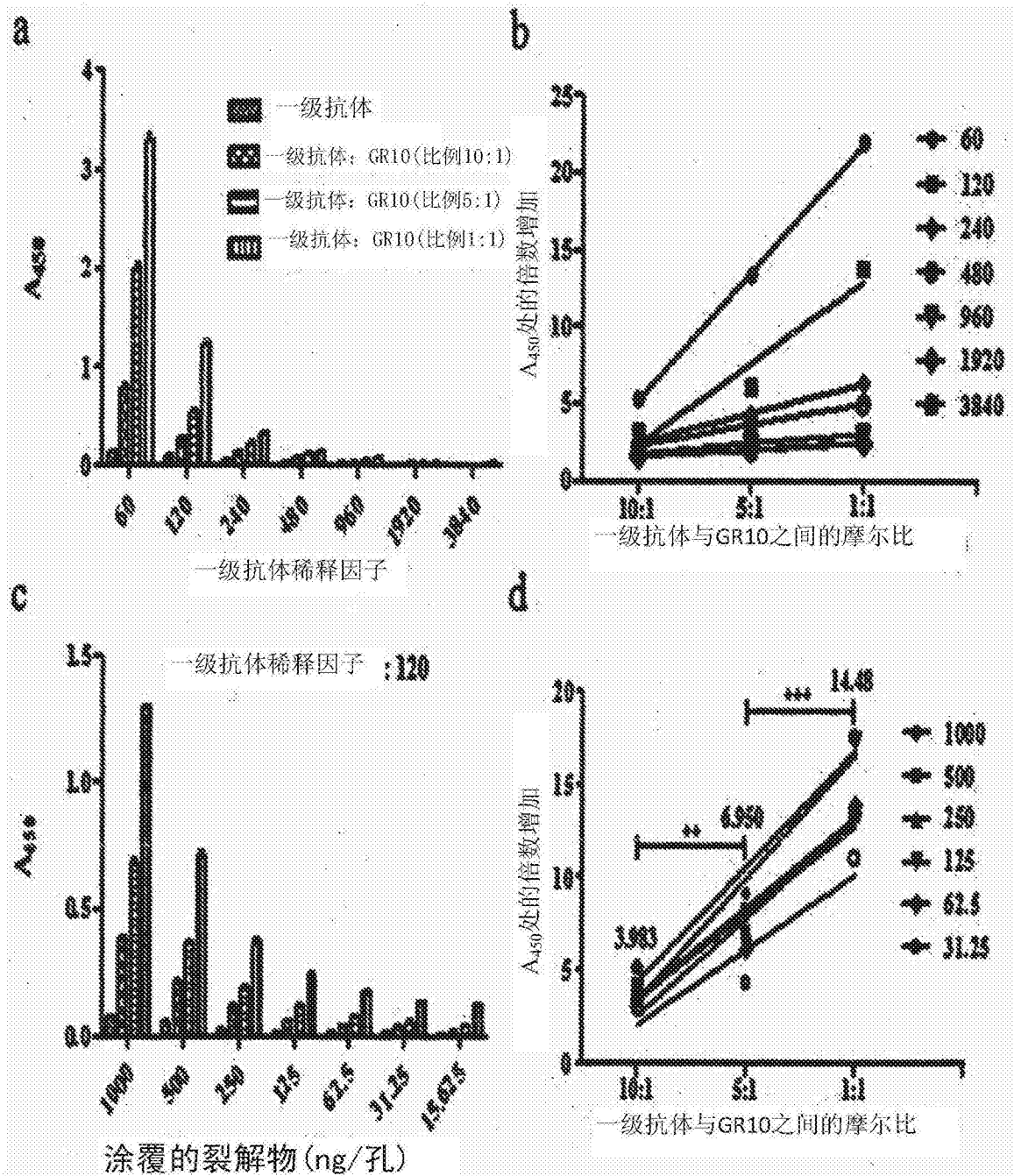


图11

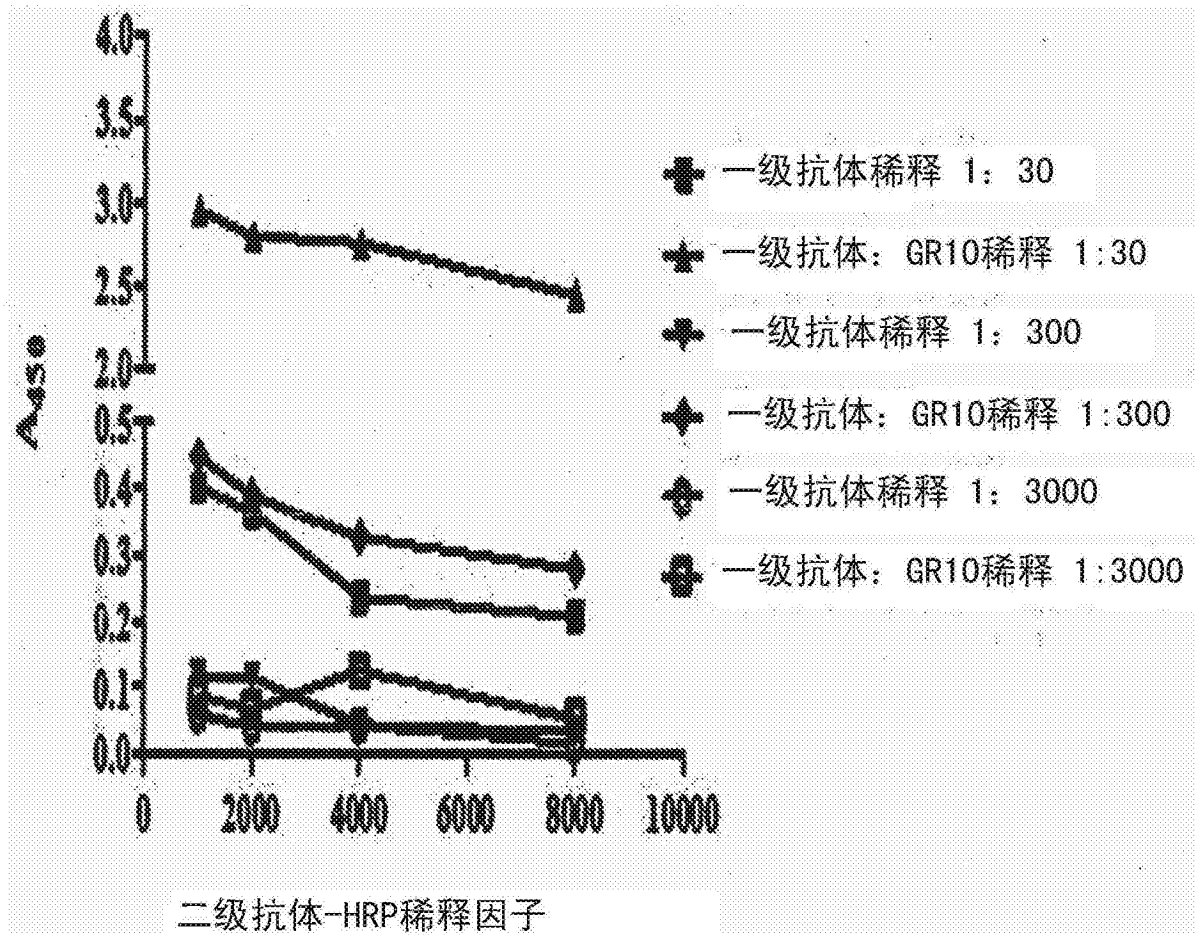


图12

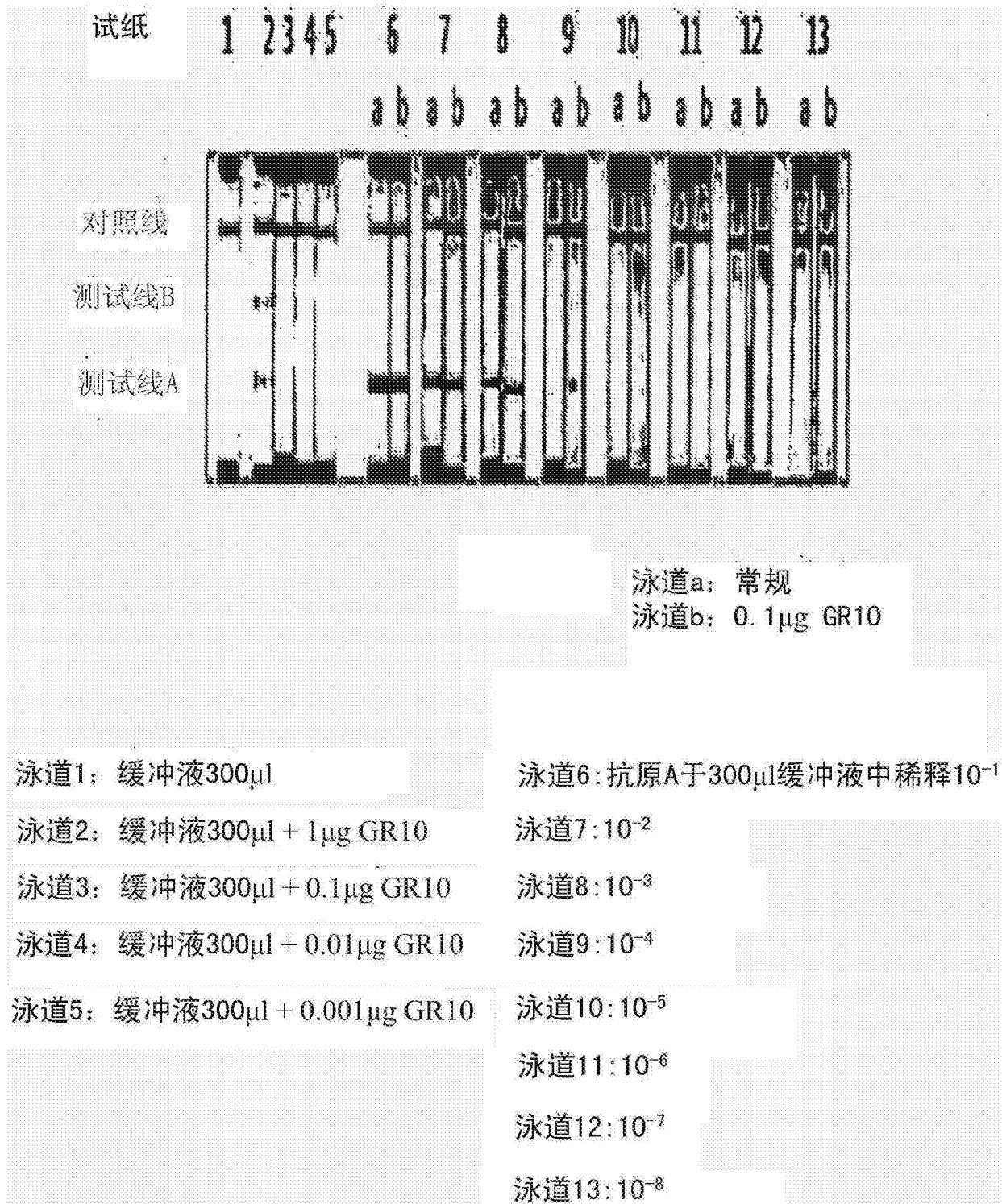
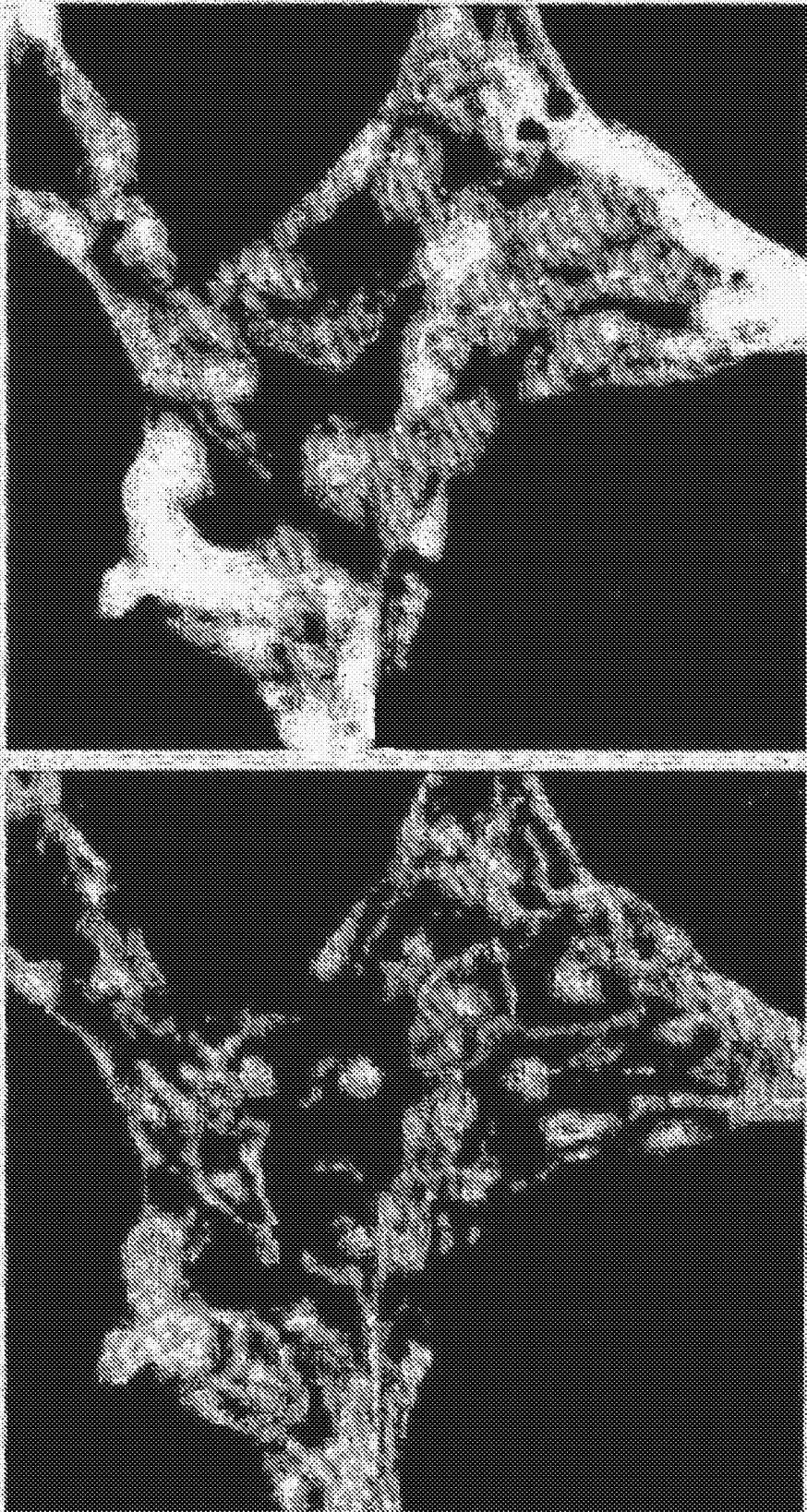


图13



LC3免疫荧光染色

罗丹明-鬼笔环肽染色

图14

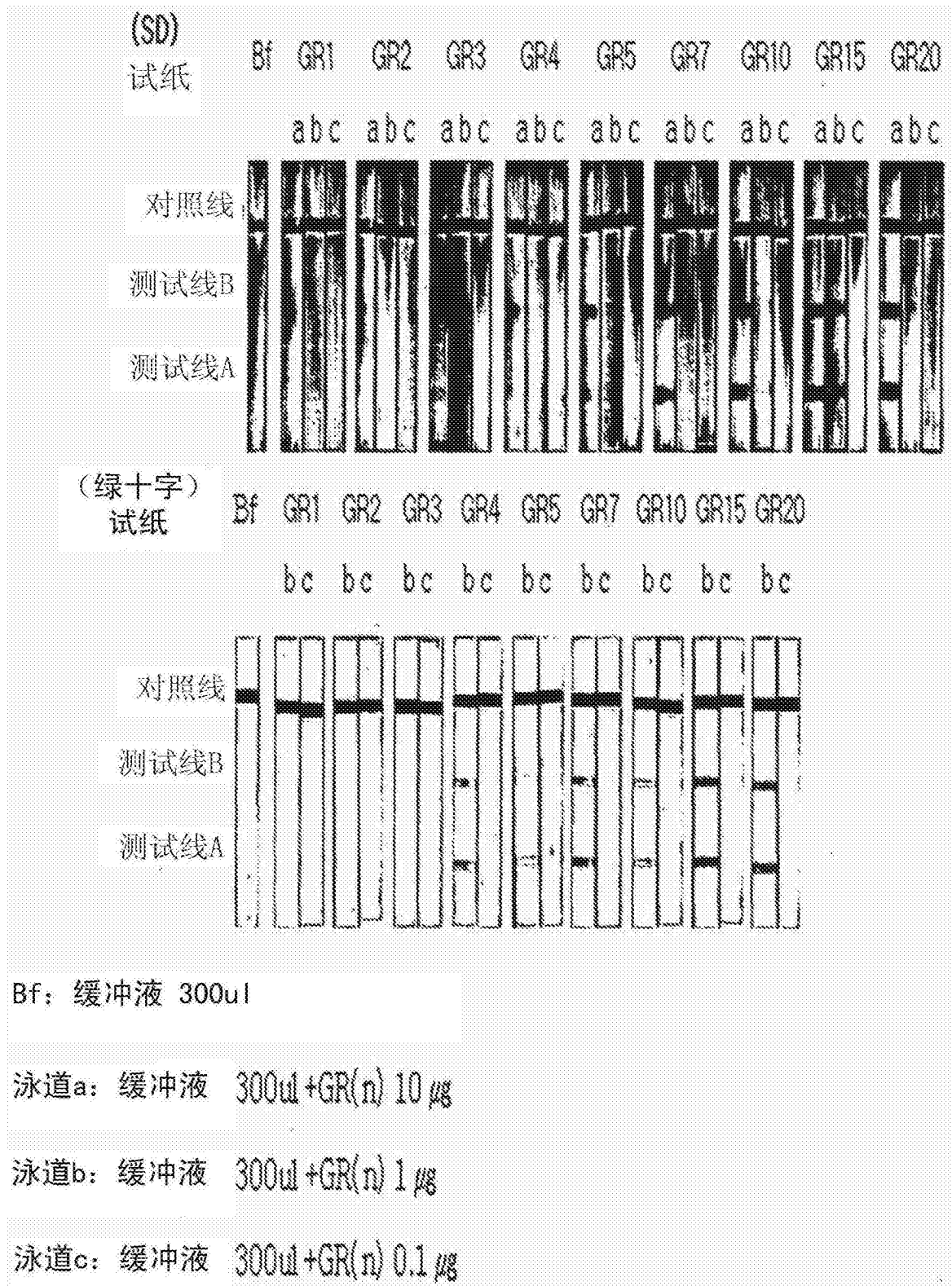


图15

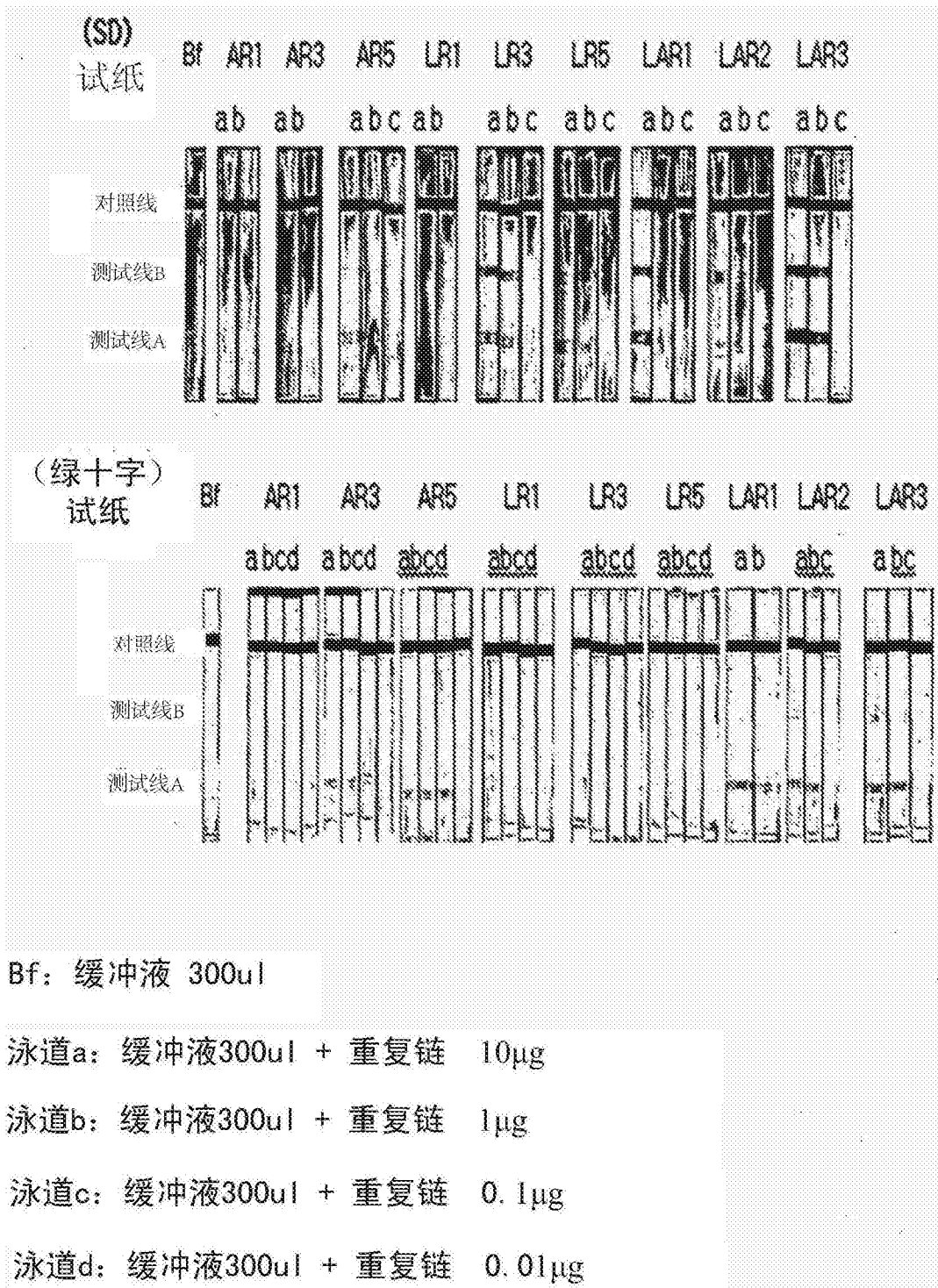


图16

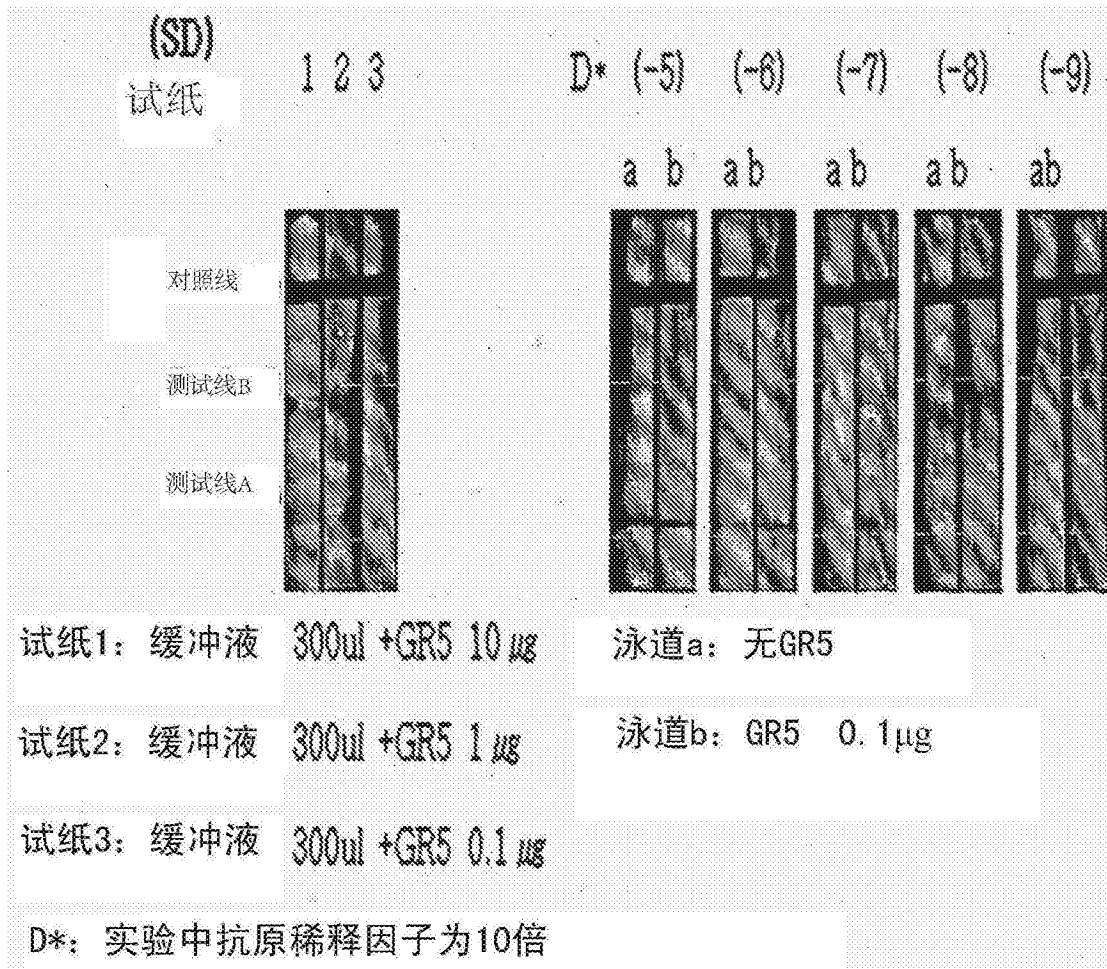


图17

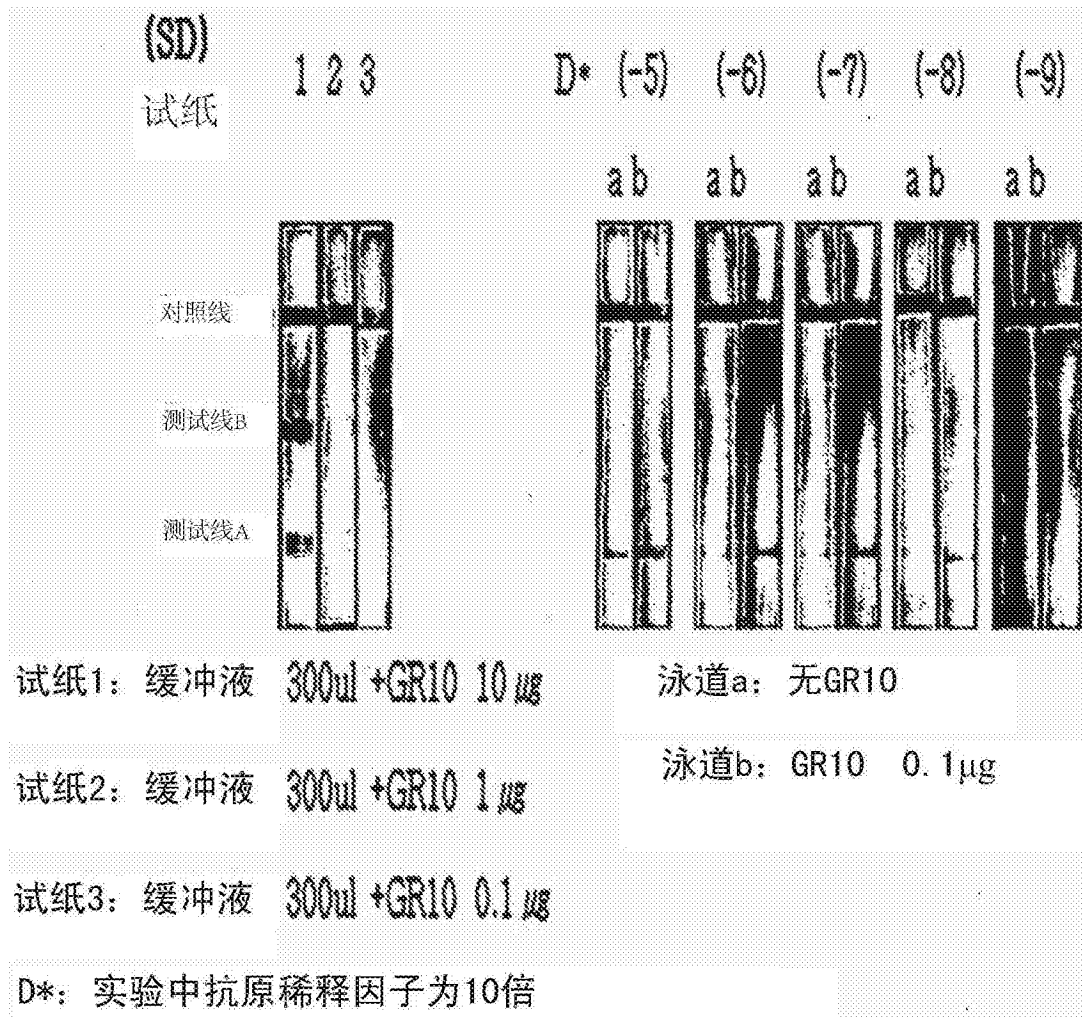


图18

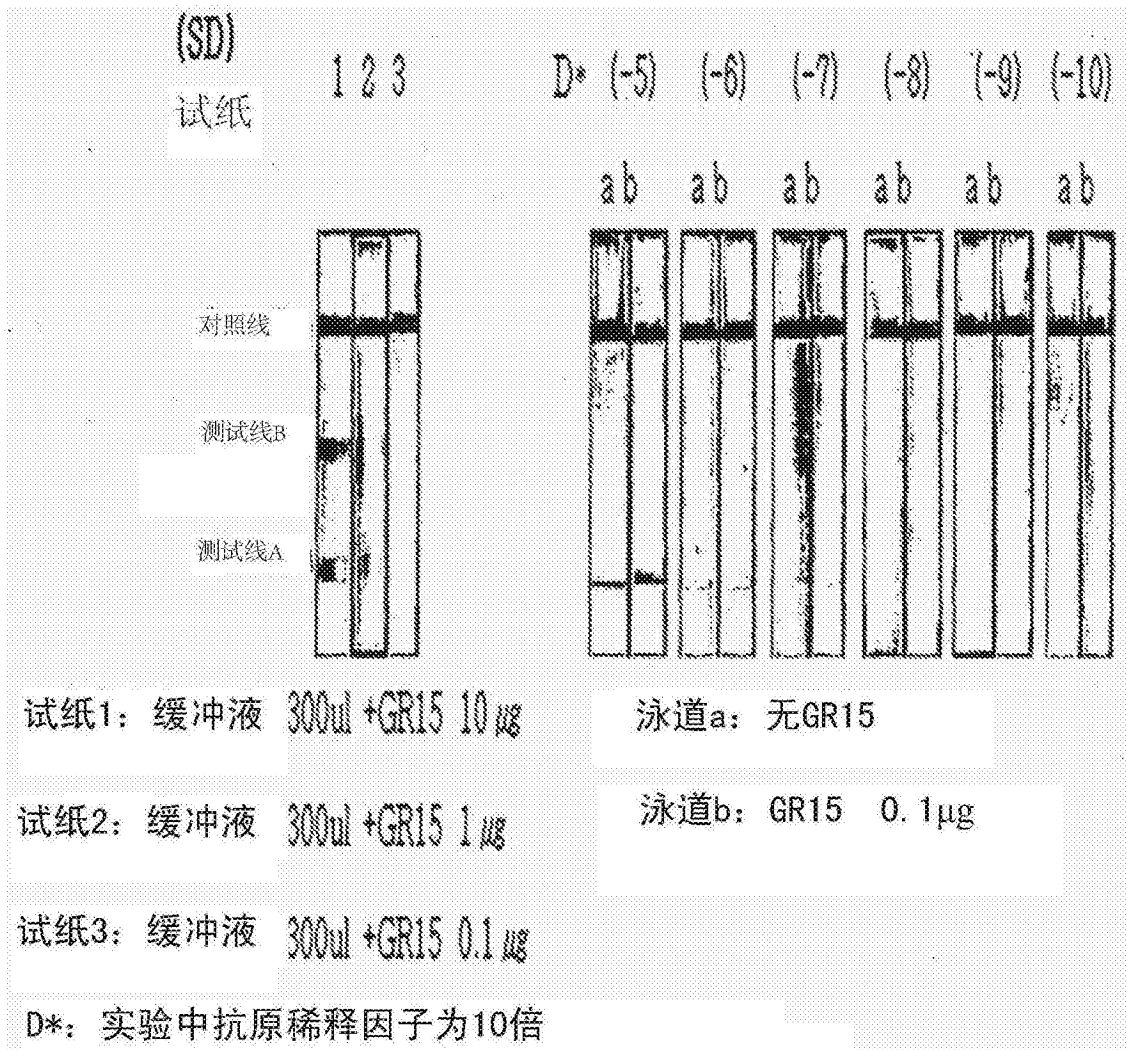


图19

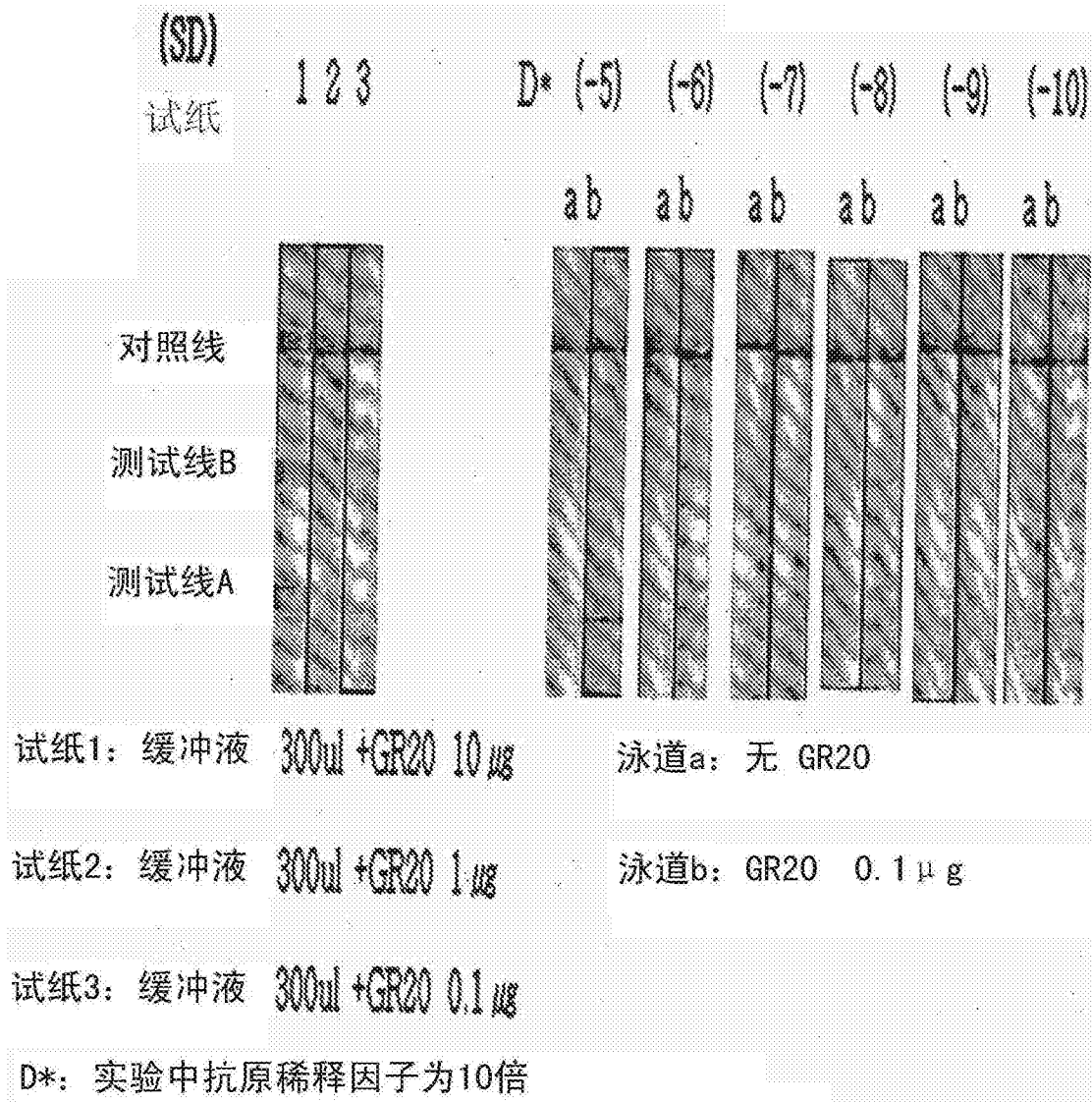


图20

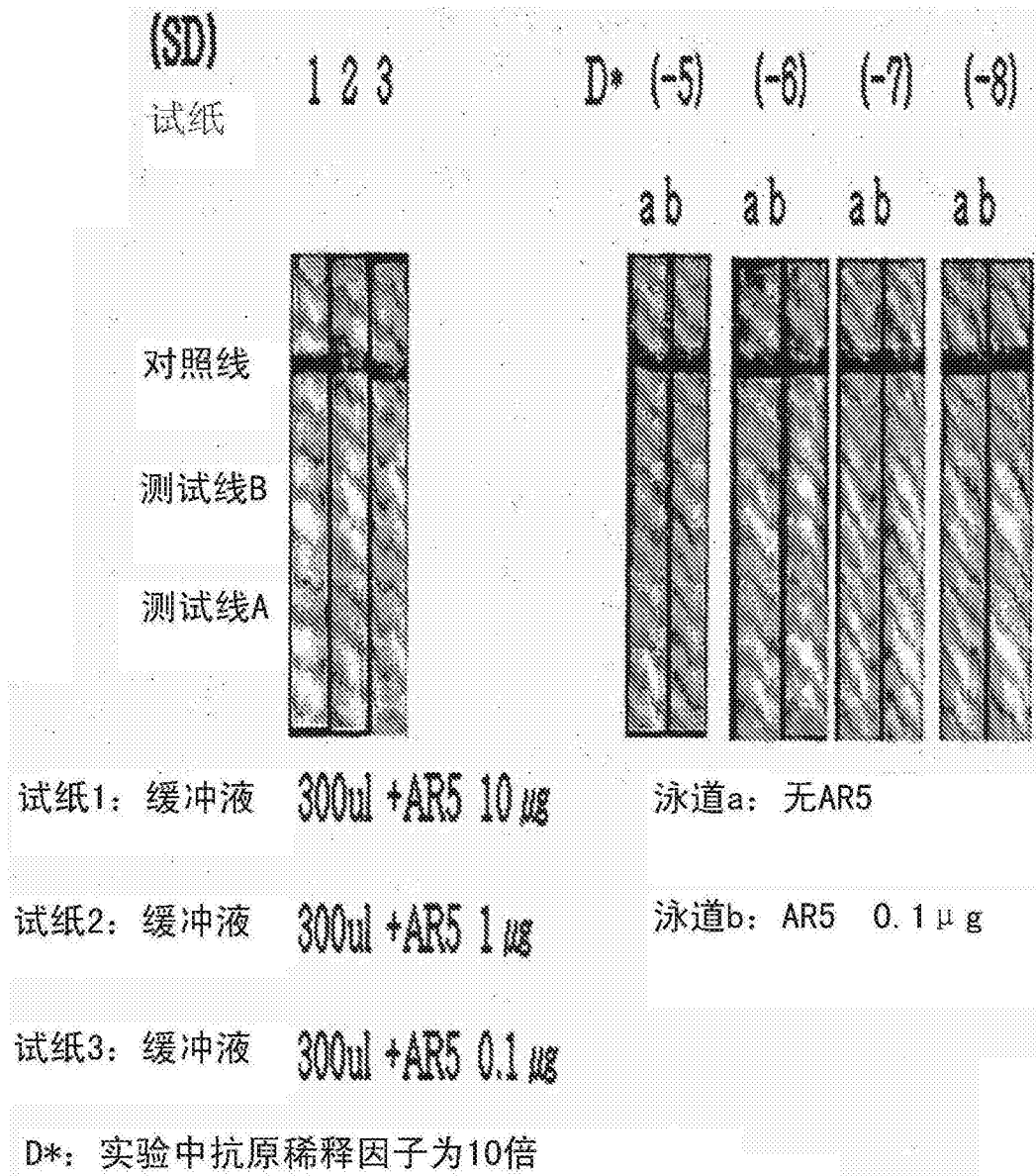


图21

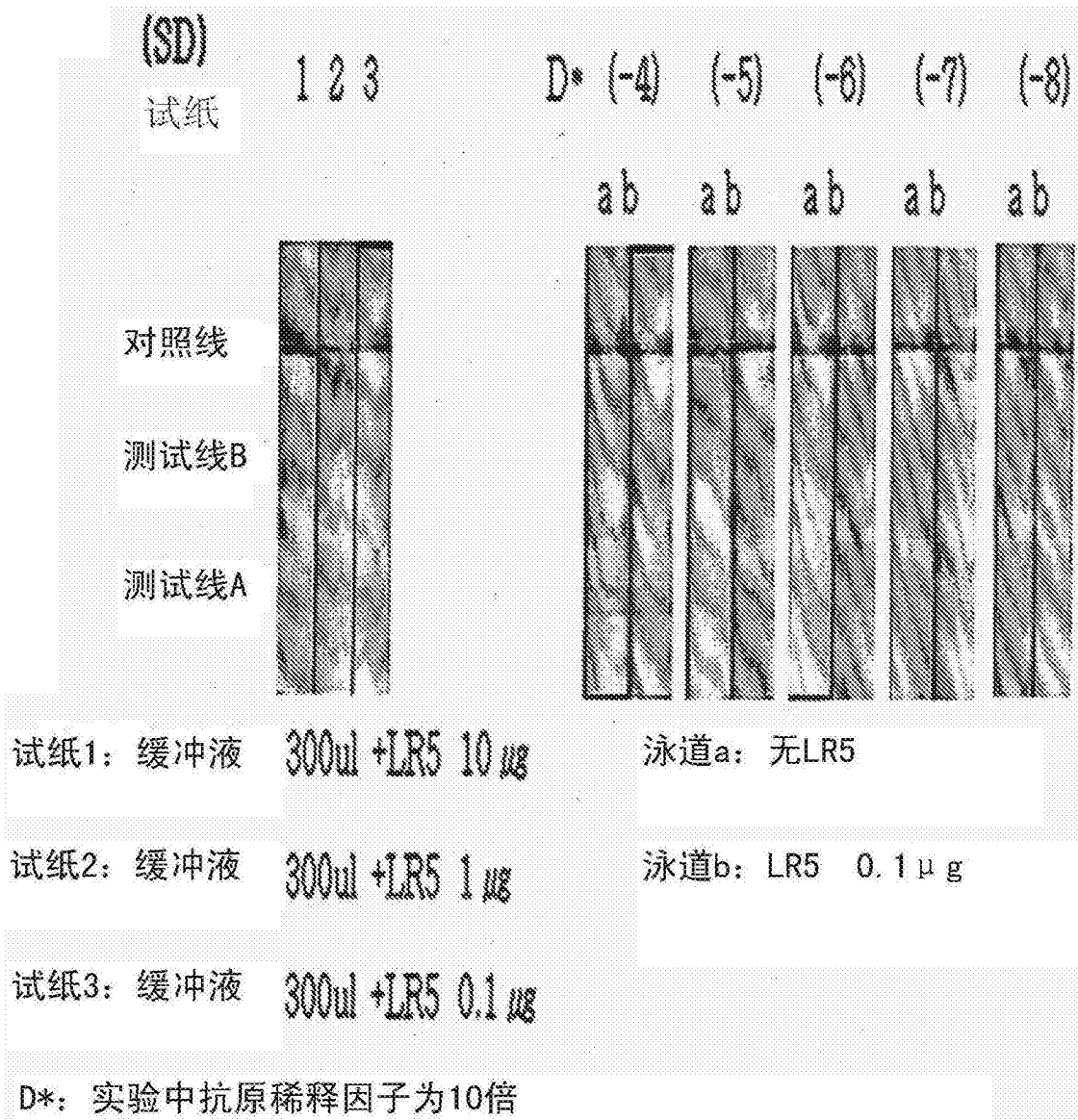


图22

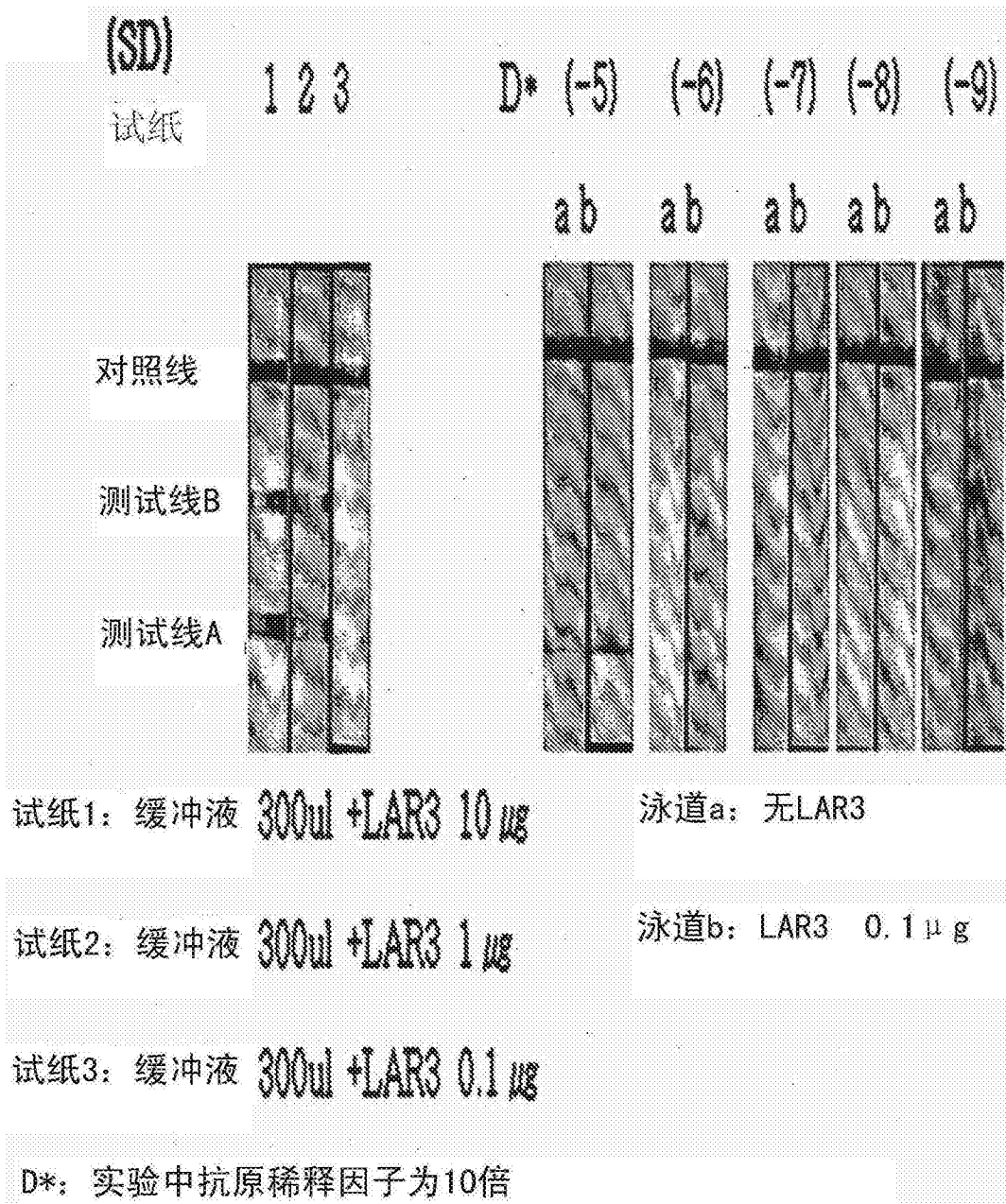


图23

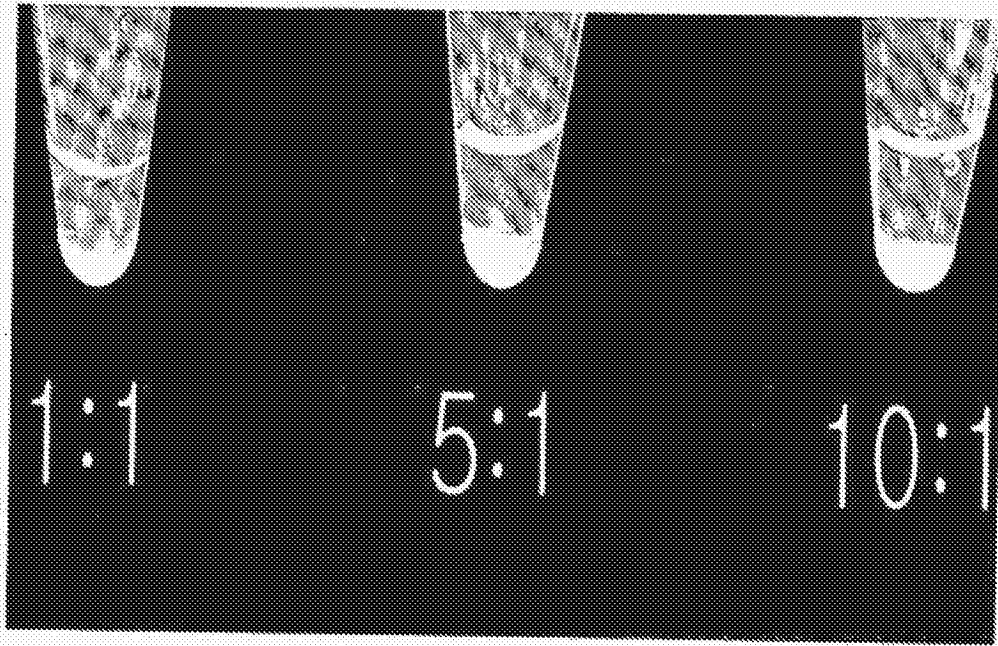


图24

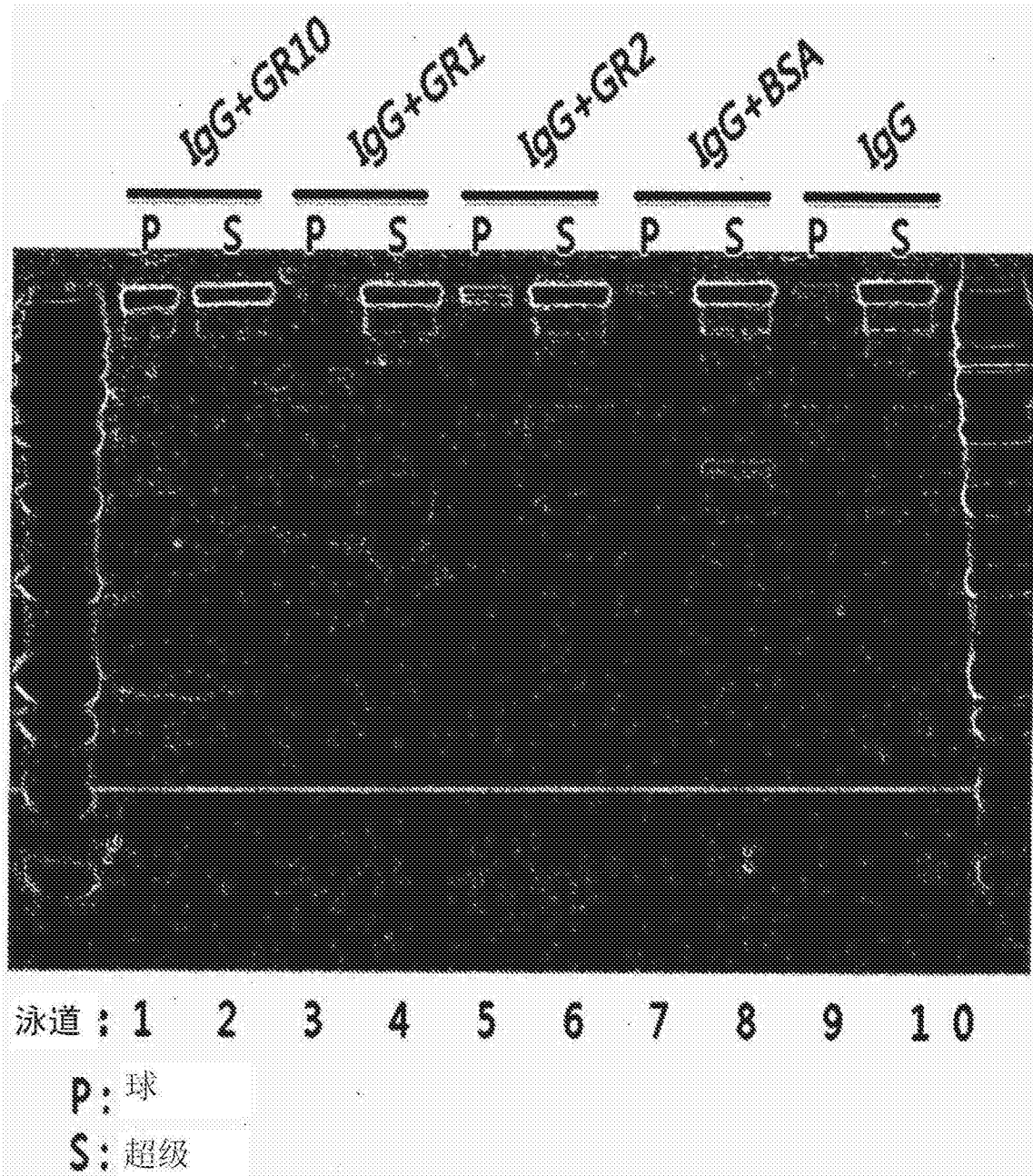


图25

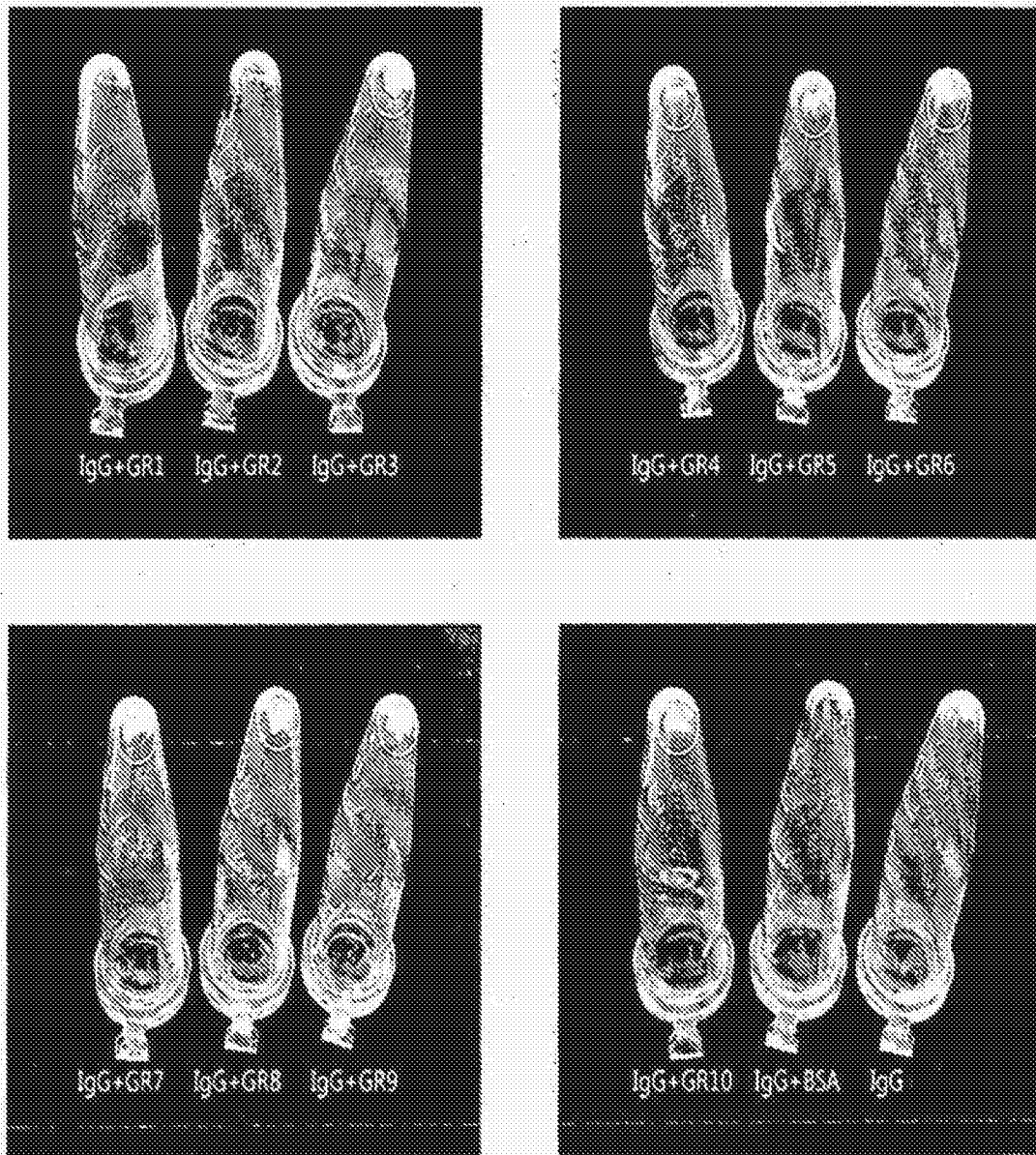


图26

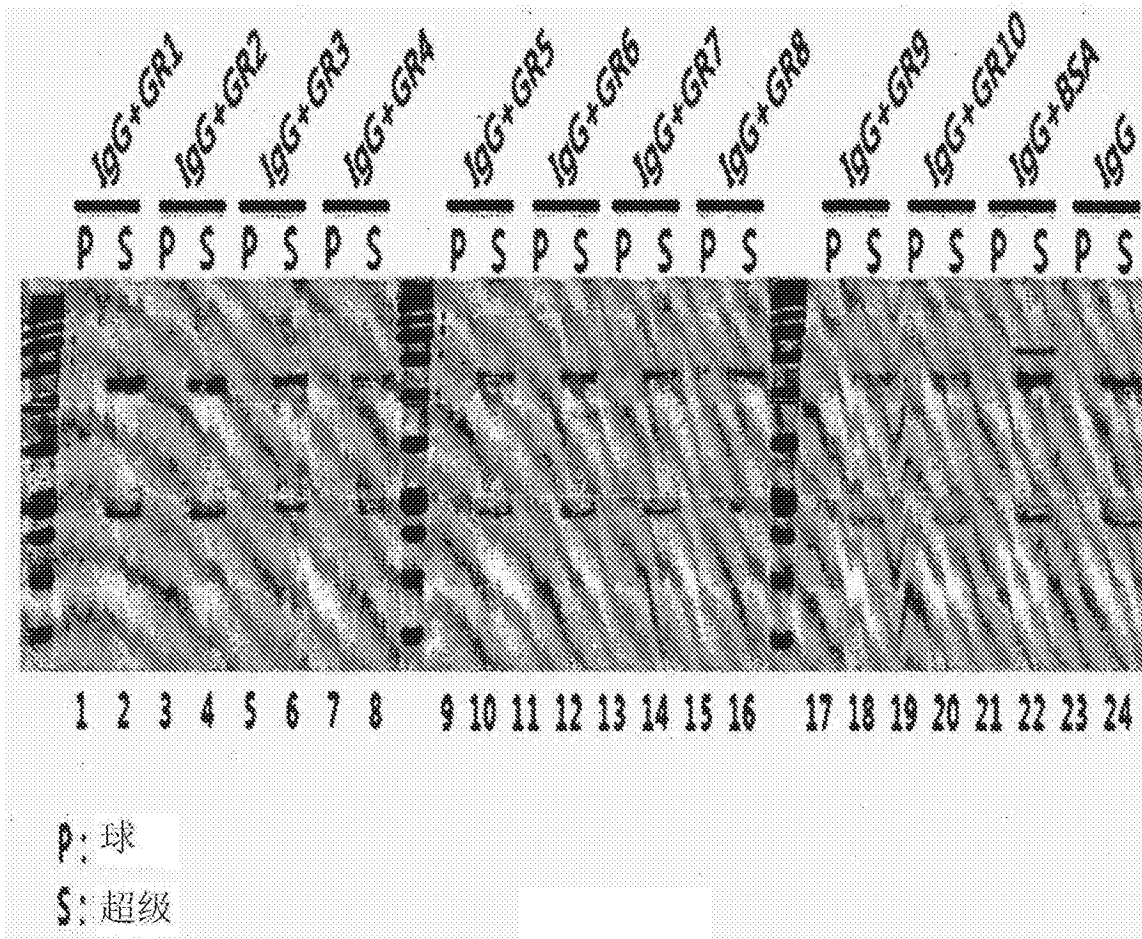


图27

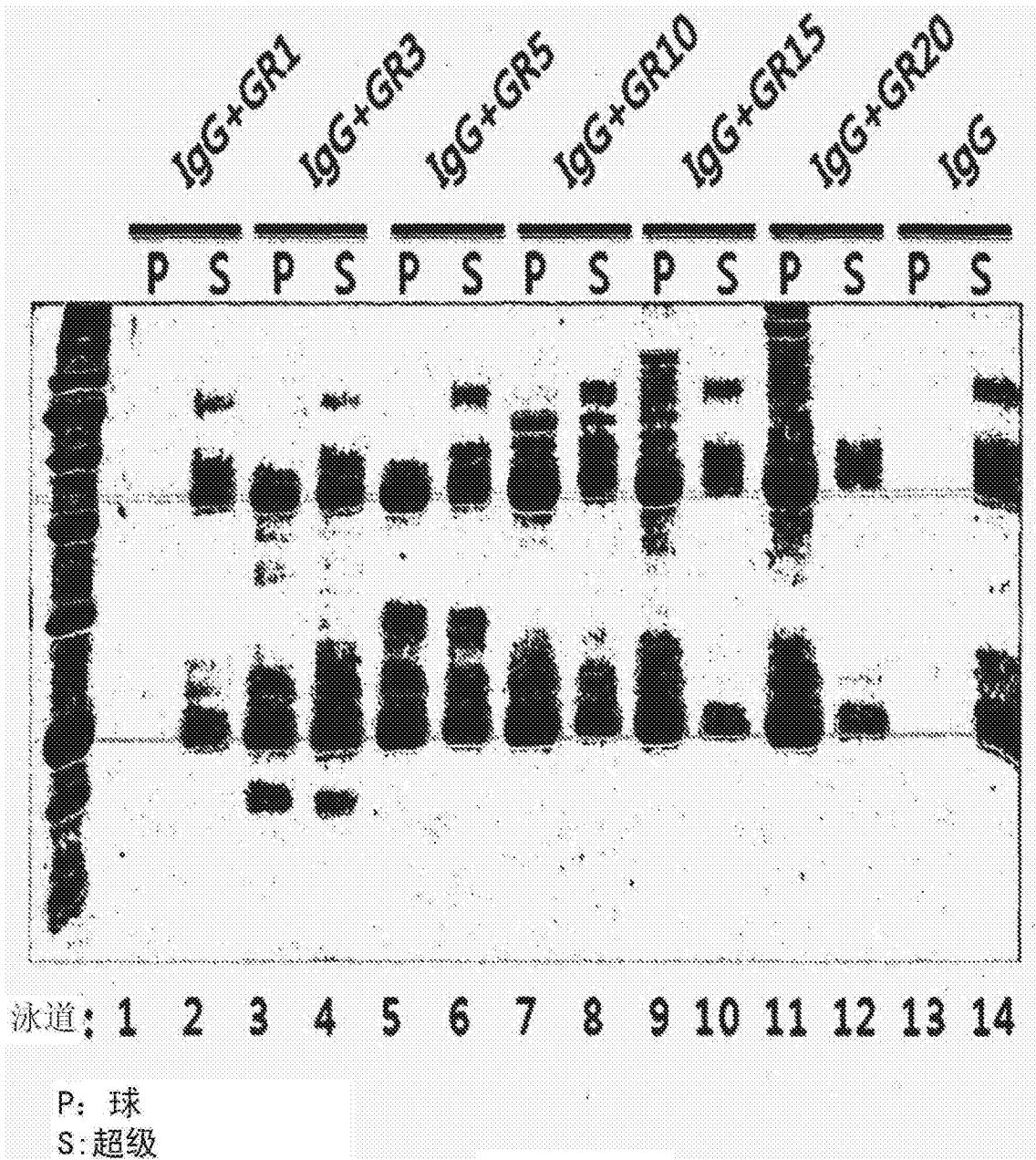


图28

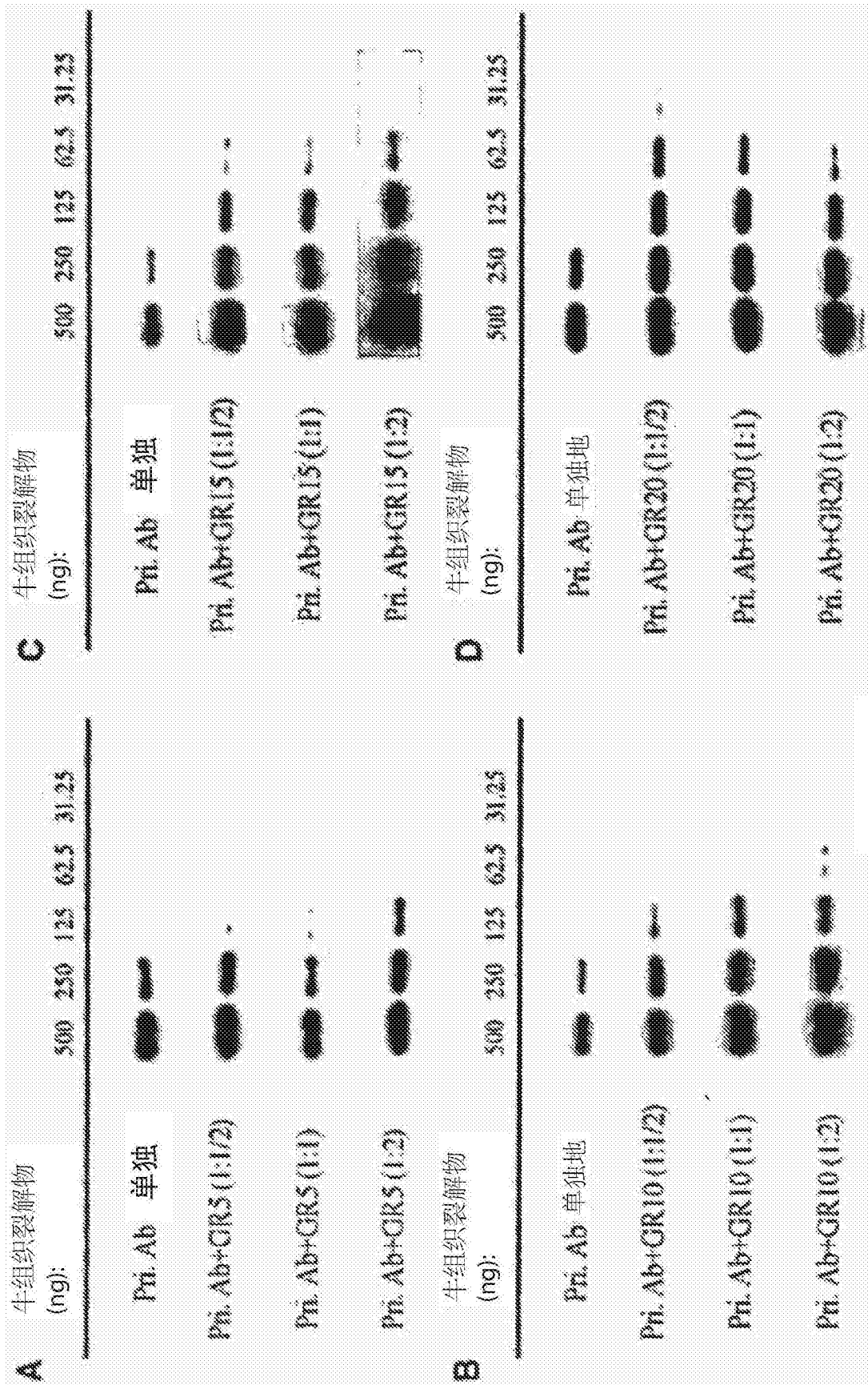


图29a

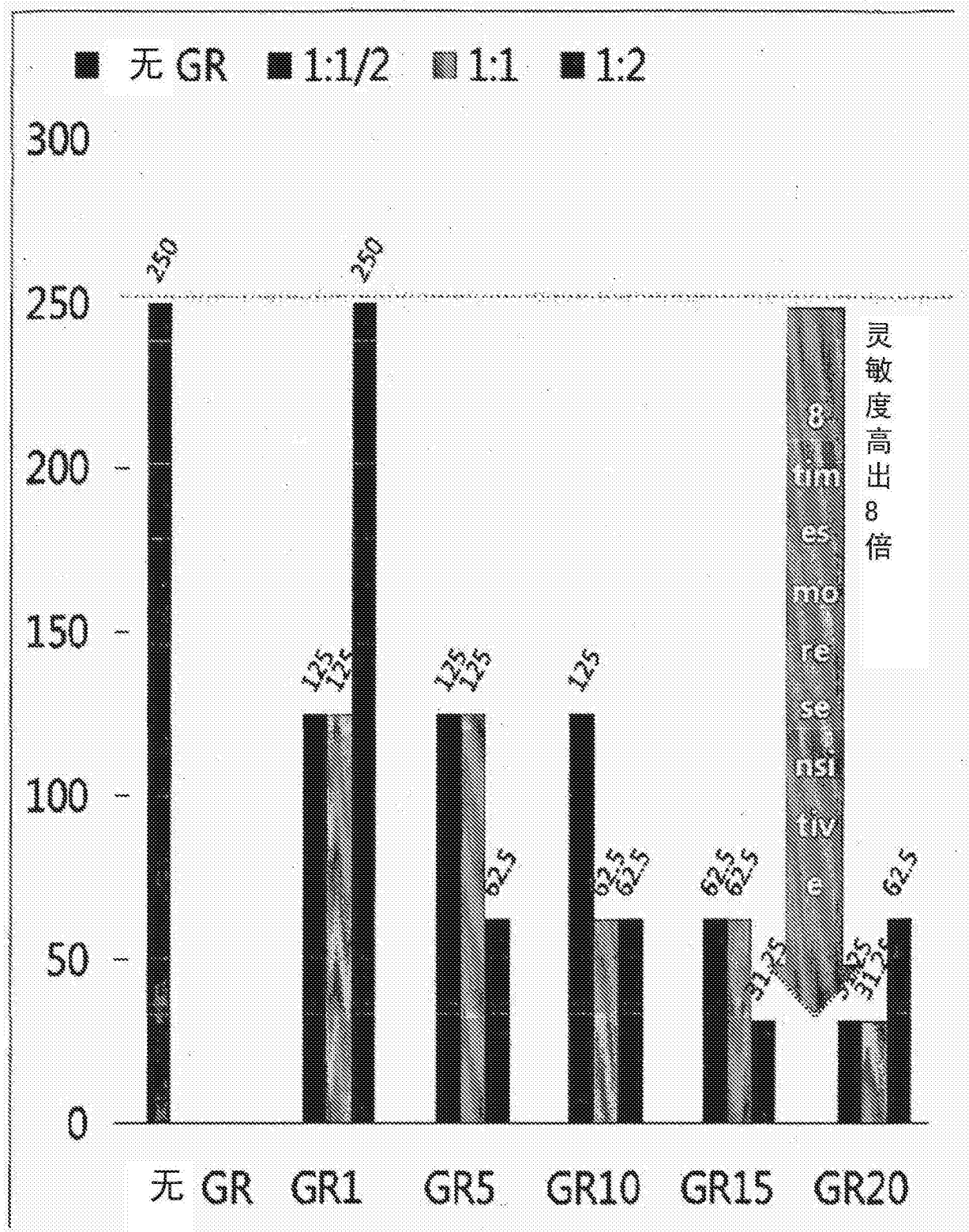


图29b

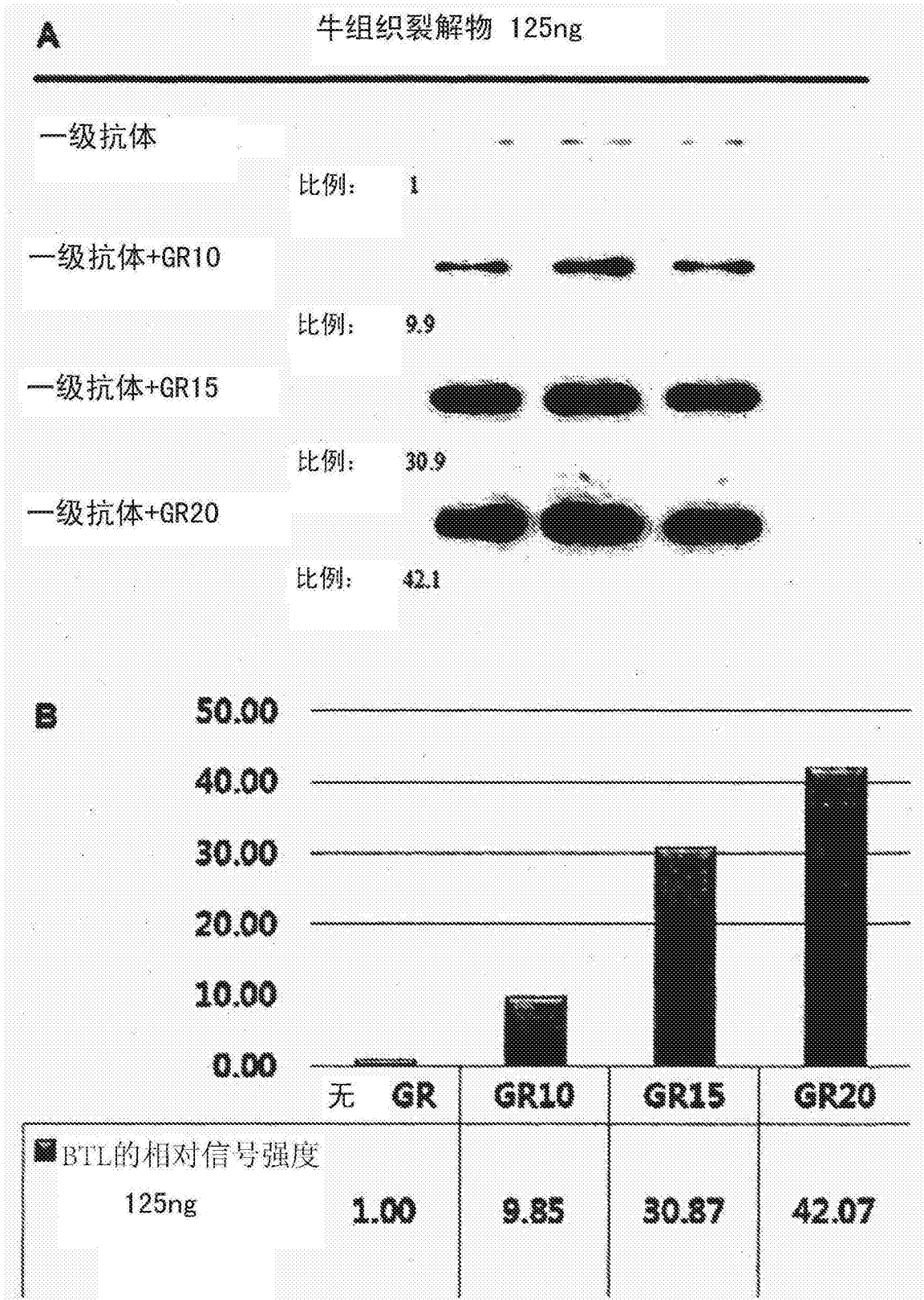


图30

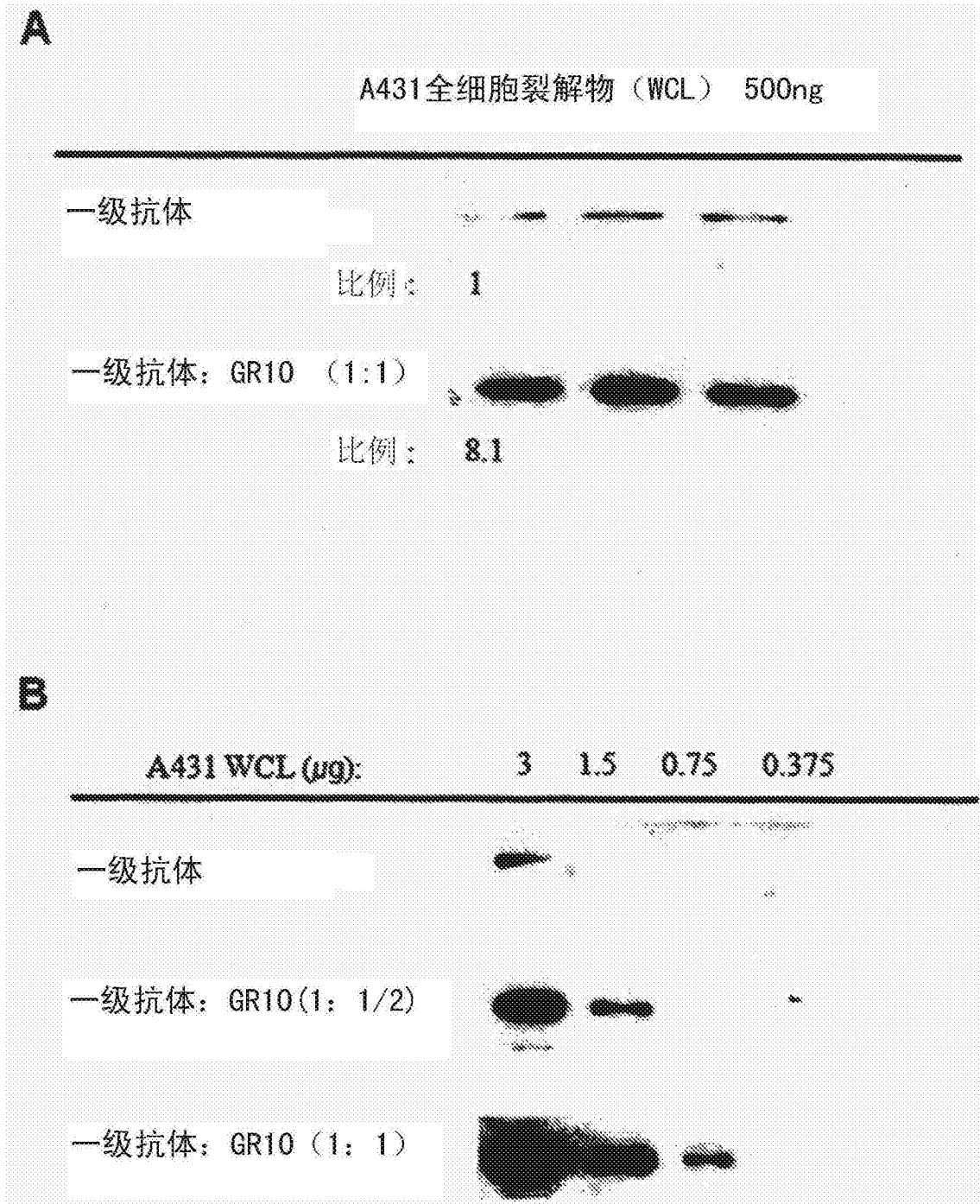


图31

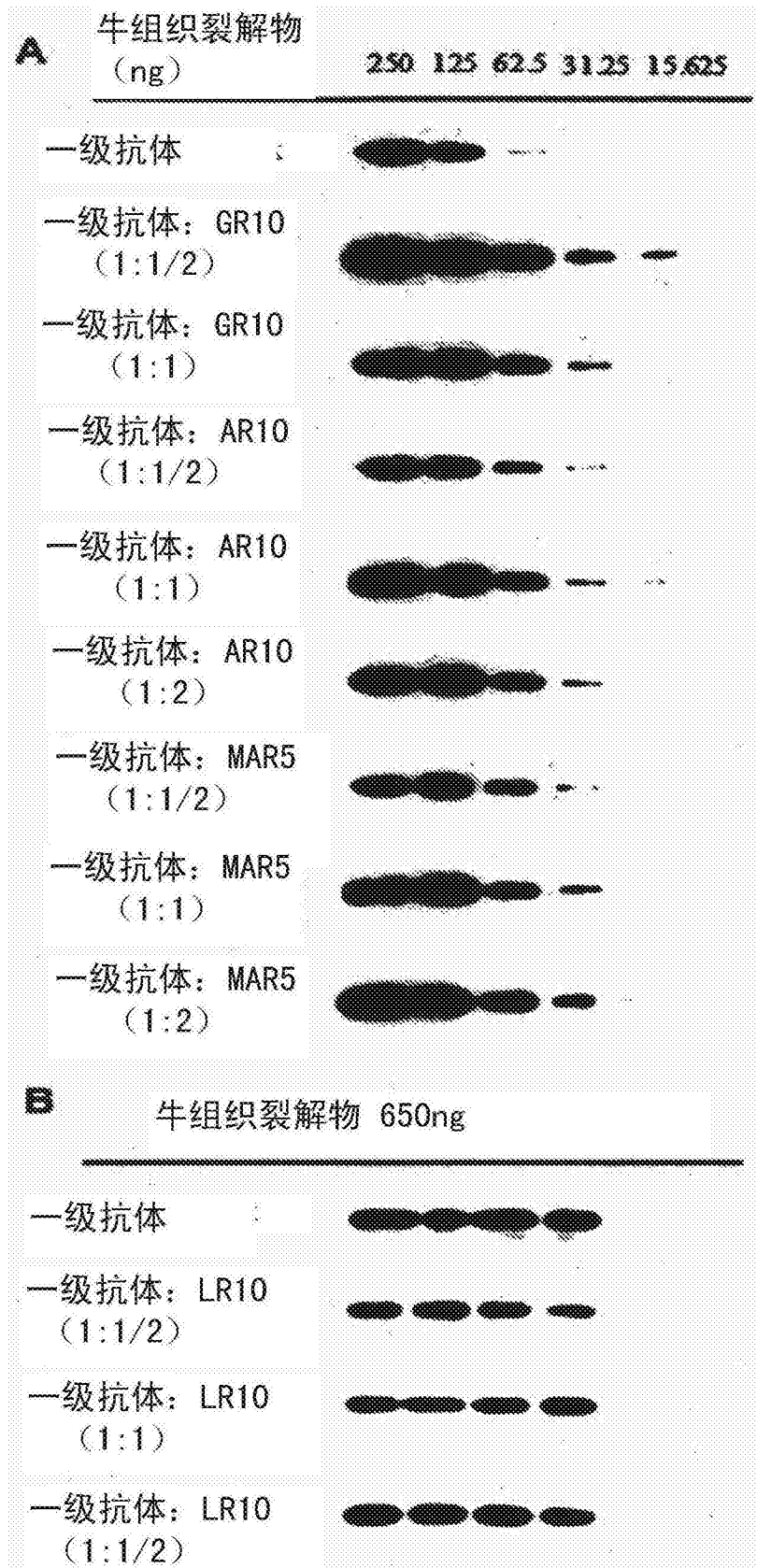


图32

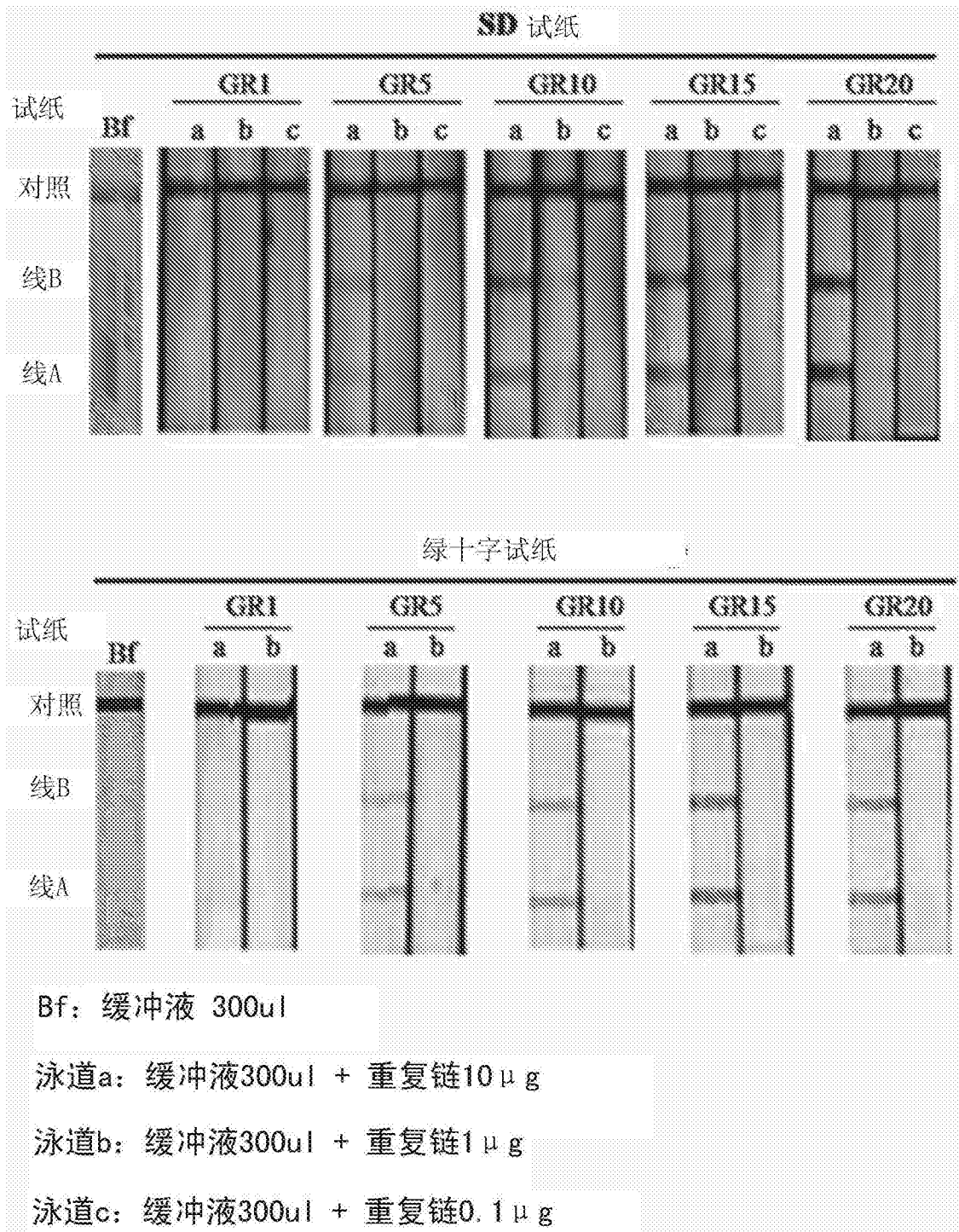


图33

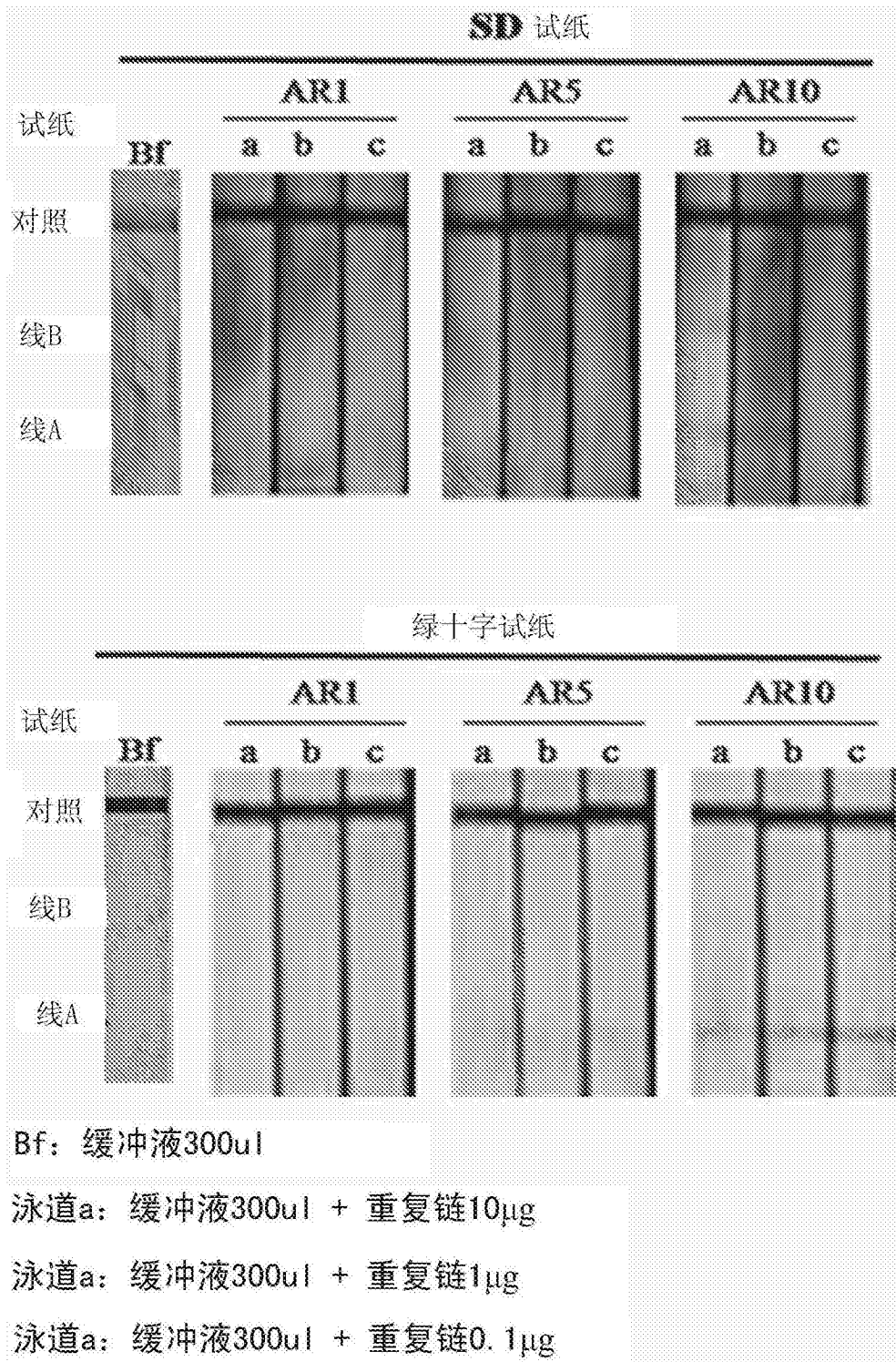


图34

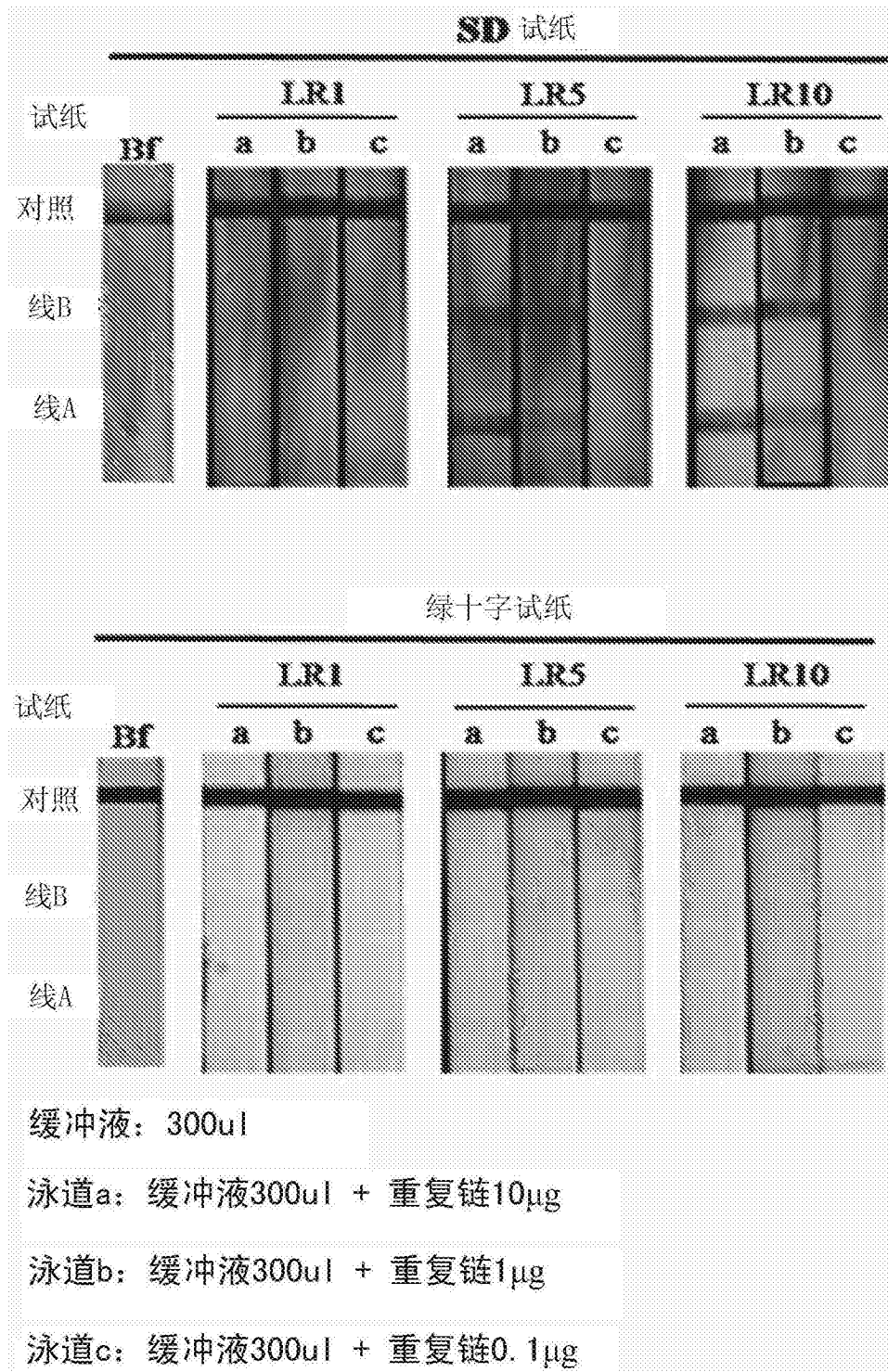


图35

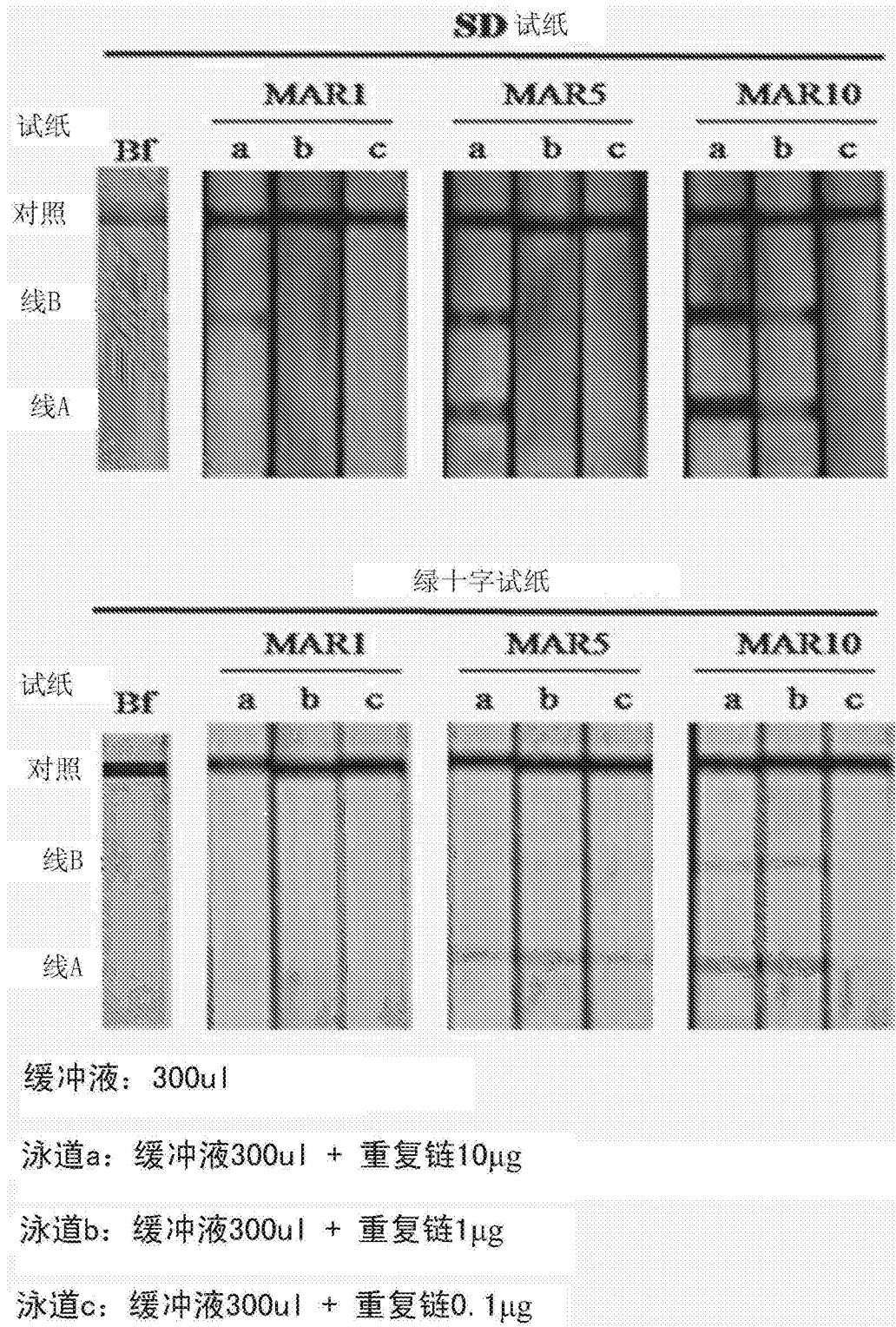


图36

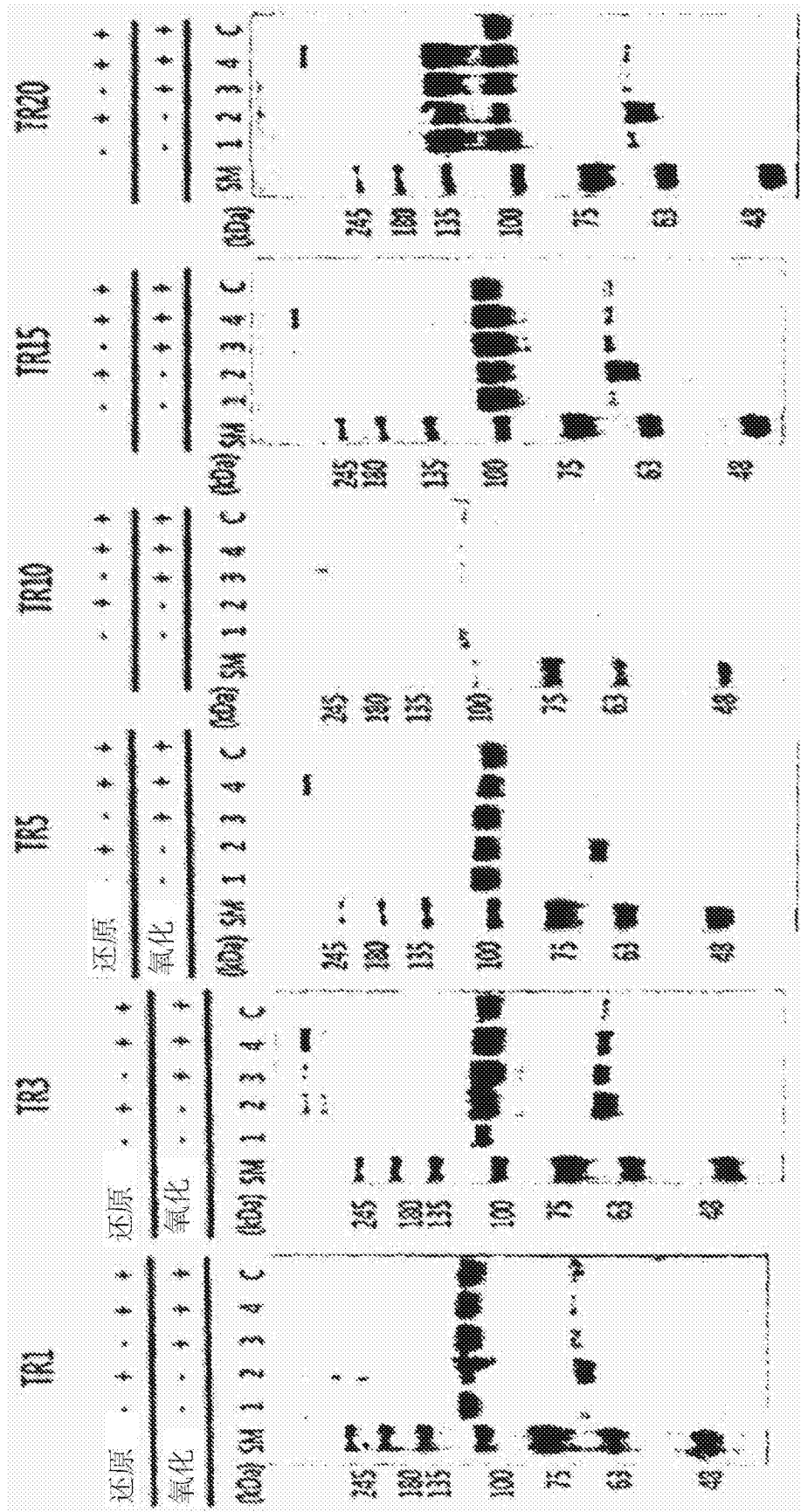


图37

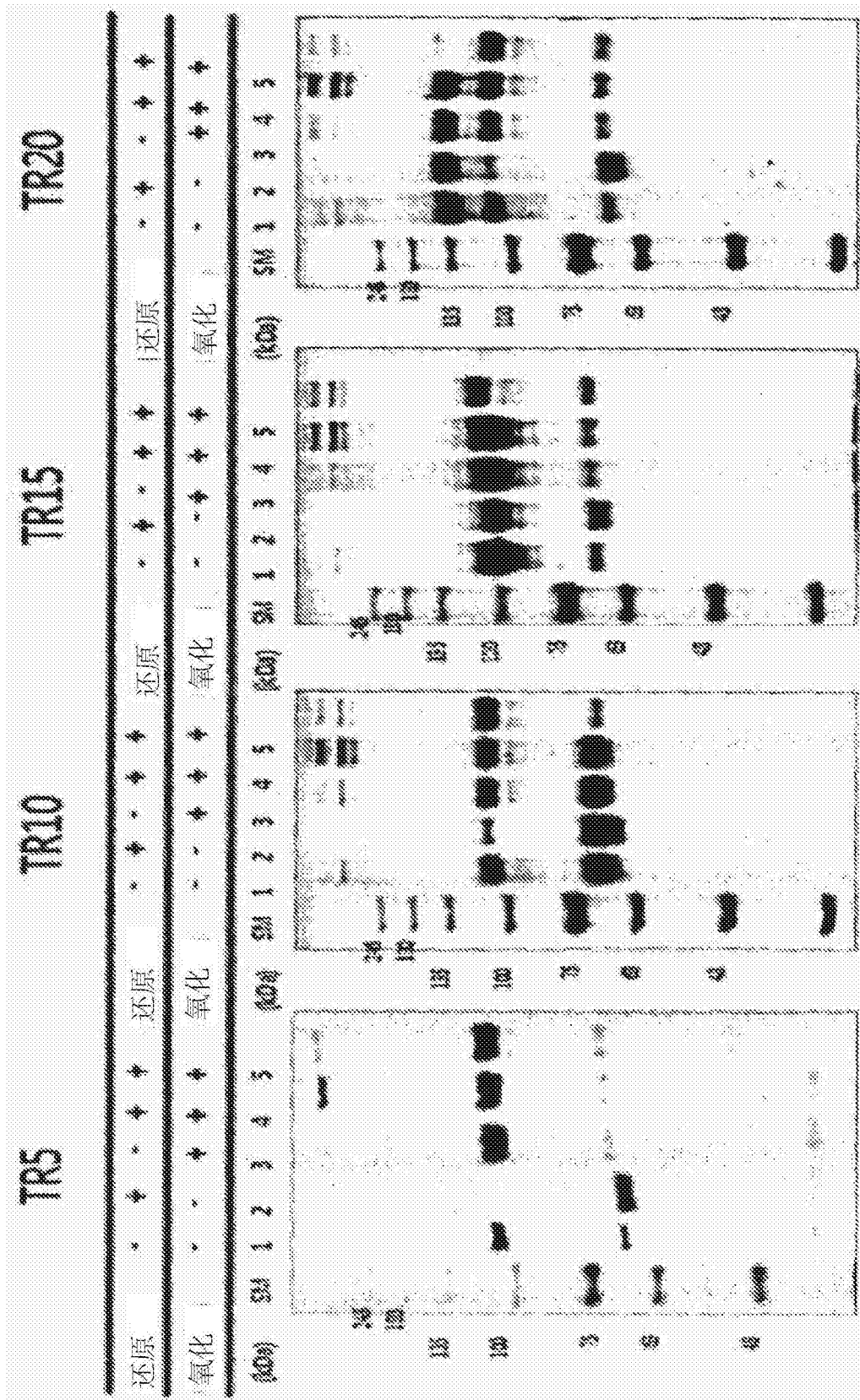


图38

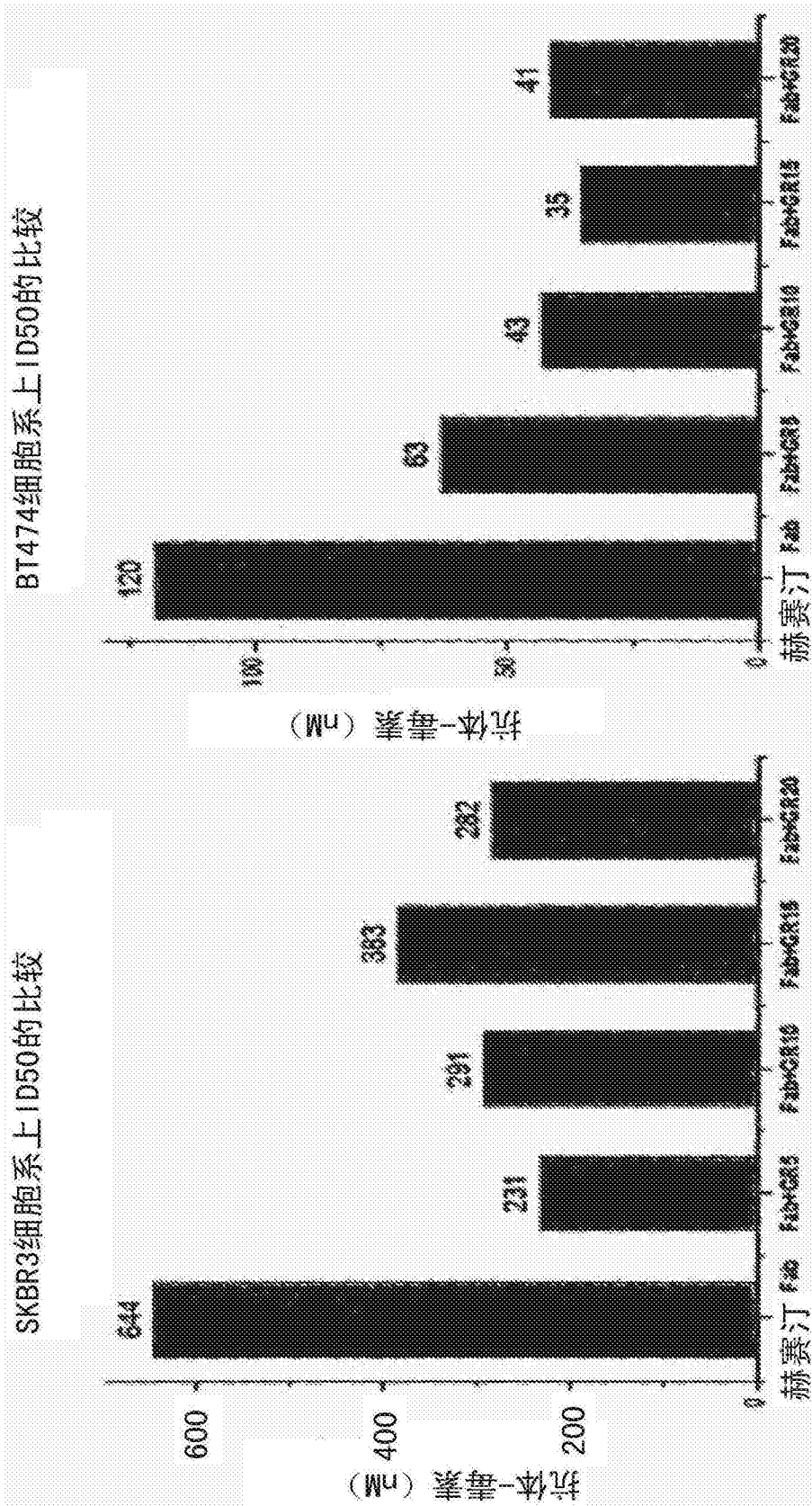
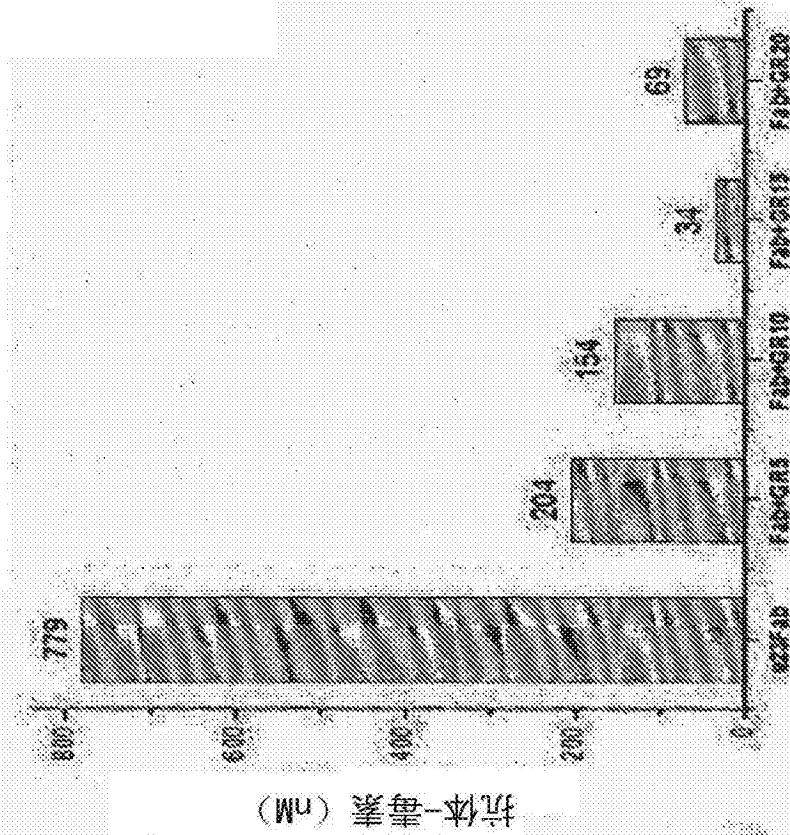


图39

BT474细胞系上ID50的比较



SKBR3细胞系上ID50的比较

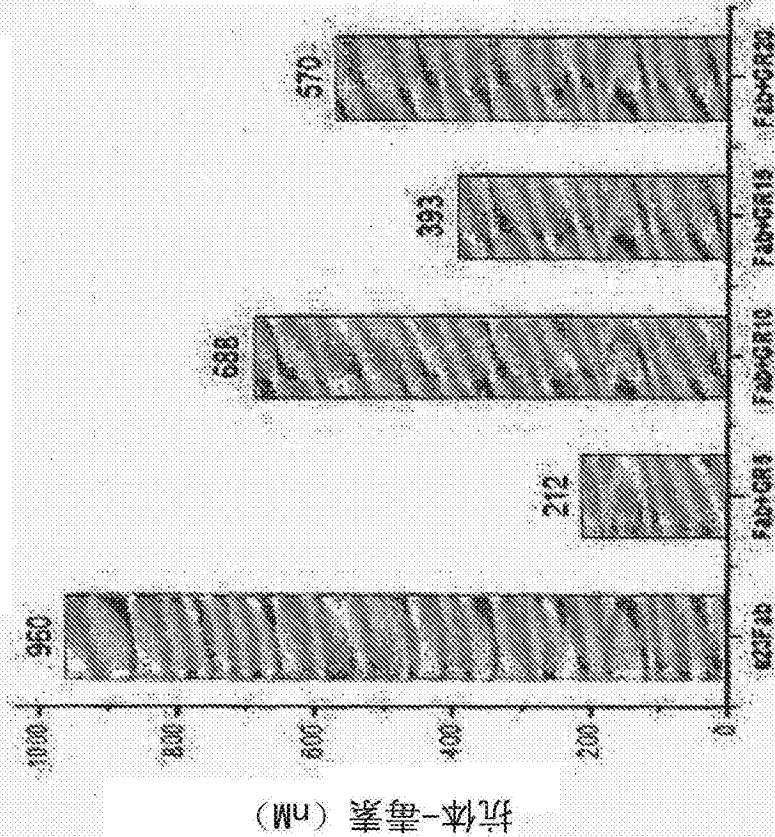


图40

专利名称(译)	由重复链和单体的复合物交叉形成的超级复合物及其应用		
公开(公告)号	<a href="#">CN105683754A</a>	公开(公告)日	2016-06-15
申请号	CN201480043647.0	申请日	2014-05-30
[标]发明人	崔武铉		
发明人	崔武铉		
IPC分类号	G01N33/53 G01N33/68 C07K1/00 C12N15/09		
CPC分类号	C12N15/10 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/68		
代理人(译)	程钢		
优先权	1020130061869 2013-05-30 KR		
其他公开文献	CN105683754B		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明涉及一种重复链和单体的复合物之间交叉结合形成的超级复合物，以及使用该超级复合物放大单体效应的方法，具体地，涉及：一种超级复合物，是通过形成重复链和单体的复合物，然后在该复合物之间进行交叉结合而得到的，其含有结合域重复链作为活性成分，其中所述结合域对所述单体具有结合特异性；以及一种放大单体效应的方法，包括信号放大等，由于该超级复合物包含多个单体，其提供的对单体靶标的效应，比单体的生物和化学效应高出许多倍。

