



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109891218 A

(43)申请公布日 2019.06.14

(21)申请号 201780047355.8

(22)申请日 2017.06.01

(30)优先权数据

62/344,441 2016.06.02 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.01.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/035375 2017.06.01

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/210387 EN 2017.12.07

(71)申请人 乌尔蒂维尤股份有限公司

地址 美国马萨诸塞

(72)发明人 陈曦

(74)专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 11038

代理人 刘晓东

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

C07K 16/12(2006.01)

C12N 15/115(2010.01)

权利要求书2页 说明书21页

序列表10页 附图6页

(54)发明名称

促进基于抗体的交换成像的组合物和方法

(57)摘要

一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的方法包括(a)提供至少两种或更多种靶标识别抗体,其各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,所述试剂能够单价结合所述靶标识别抗体;(b)将样品与所述两种或更多种靶标识别抗体一起孵育,所述抗体各自与相对应的MTAB-DM试剂结合;(c)顺序、分批或并行施加对应于所述MTAB-DM的至少两个成像物部分;以及(d)顺序、分批或并行地对所述至少两个成像物部分成像。

1. 一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的方法,包括:
 - a. 提供至少两种或更多种靶标识别抗体,其各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,所述试剂能够单价结合所述靶标识别抗体
 - b. 将样品与所述两种或更多种靶标识别抗体一起孵育,所述抗体各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,
 - c. 顺序、分批或并行施加与所述MTAB-DM相对应的至少两个成像物部分,
 - d. 顺序、分批或并行地对所述至少两个成像物部分成像。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述MTAB包括蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中将各自与相对应的MTAB-DM试剂结合的所有所述靶标识别抗体同时与所述样品一起孵育。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述成像物部分分批施加,其中至少一批具有两个或更多个成像物部分,并且所述方法具有至少两个批次,并且其中所述成像发生在至少两个批次中。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中在将所述靶标识别抗体与所述样品一起孵育之前,使用过量的MTAB-DM以防止过量的游离靶标识别抗体。
6. 根据权利要求1所述的方法,其中在将所述靶标识别抗体与所述样品一起孵育之前,使用超滤或凝胶过滤移除游离的MTAB-DM。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中将非特异性抗体添加至染色、洗涤和/或成像缓冲液中。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中所述非特异性抗体是来自与所述靶标识别抗体相同的宿主物种的抗体。
9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述非特异性抗体是存在于正常血清(来自未用任何靶蛋白免疫的动物)中的多克隆抗体。
10. 根据权利要求8所述的方法,其中所述非特异性抗体是针对所述样品中不存在的蛋白质的单克隆抗体。
11. 一种组合物,其包含:
 - a. MTAB;
 - b. 与所述MTAB共价结合的对接部分
 - c. 具有第一结构域和第二结构域的中间部分,其中所述第一结构域能够特异性结合所述对接部分并且其中所述第二结构域不能特异性结合所述对接部分。
12. 根据权利要求11所述的组合物,其中所述MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。
13. 一种制备用于交换成像的试剂的方法,其包括:
 - a. 提供MTAB;
 - b. 将所述MTAB缀合于对接部分以形成MTAB-DM;
 - c. 提供多个中间部分,其各自具有能够特异性结合所述对接部分的第一结构域和不能特异性结合所述对接部分的第二结构域;
 - d. 将所述多个中间部分与所述MTAB-DM配混。

14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。

15. 根据权利要求13所述的方法,其中所述多个中间部分在分批反应中与所述MTAB-DM配混。

16. 根据权利要求13所述的方法,其中所述多个中间部分与所述MTAB-DM单独配混。

17. 一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的试剂盒,其包括:

a. 至少两种不同的MTAB-DM试剂,其包含MTAB和能够特异性结合成像物部分的对接部分;

b. 任选地至少两种不同的靶标识别抗体;

c. 至少两个成像物部分,其用可观察部分标记且能够分别特异性结合所述MTAB-DM试剂,

d. 不特异性结合任何所述靶标的任选地至少一种抗体。

18. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中所述MTAB选自蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或抗体的单价片段。

19. 根据权利要求17所述的试剂盒,其中所述MTAB-DM能够以约1fM至1nM的亲和力结合至少两种不同的靶标识别抗体。

20. 一种方法,其用于使用根据权利要求17所述的试剂进行交换成像。

促进基于抗体的交换成像的组合物和方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年6月2日提交的美国临时申请第62/344,441号的优先权权益，其通过引用整体并入本文以用于任何目的。

[0003] 序列表

[0004] 序列表通过EFS-Web作为ASCII格式的文本文件与本申请同时提交，文件名为“2017-05-11_01168-0006-00PCT_SeqList_ST25.txt”，创建日期为2017年5月11日，并且大小为20,200字节。通过EFS-Web提交的序列表是说明书的一部分并据此通过引用整体并入。

[0005] 说明书

技术领域

[0006] 本申请提供了促进基于抗体的交换成像的组合物和方法。

背景技术

[0007] 超分辨率成像可用于检测单个样品中的多个靶标。以前，针对第一靶标的第一抗体用于标记样品中的第一靶标，对所述标记成像，并且在移除或破坏该抗体或其标记之后用针对第二靶标的第二抗体标记样品，以此类推。然而，这种方法非常耗费人力并且需要用每种抗体进行长时间的单独孵育。

[0008] 交换成像提供了一些改进以实现多任务能力，以使可以在同一样品上对多个靶标成像。交换成像可包括以下步骤：(1) 分别将不同的可解码信息携带分子（称为对接部分或DM）附接至不同的靶标识别分子，(2) 使用一组分子（称为成像物部分）（其各自特异性地识别对接部分并携带可观察部分）标记对接部分的亚组，并对相对应的靶标亚组成像，(3) 移除步骤2中使用的成像物部分组或使所述成像物部分上的可观察部分失活，以及(4) 使用另一组成像物部分（其各自特异性地识别对接部分并携带可观察部分）标记对接部分的另一亚组，并对相对应的靶标亚组成像，以及(5) 任选地，可以重复步骤3和4以可视化多个靶标亚组。

[0009] 交换成像的一个非限制性实例是DNA交换免疫荧光，其中使用抗体作为靶标识别分子以对靶蛋白或其他生物分子成像，DNA寡核苷酸作为对接部分，并且与对接部分互补并用可观察部分诸如荧光团标记的DNA寡核苷酸作为成像物部分。在步骤3中，可使用高温、变性剂、DNA解旋酶、DNA酶和/或链置换剂移除DNA，或可通过化学裂解、酶促裂解、化学漂白、光漂白、和/或光化学漂白移除对接部分上的可观察部分，诸如荧光团。

[0010] 在进行DNA交换免疫荧光时，一个实际的挑战是将对接部分附接至靶标识别抗体（有时称为一抗）。一种常规且便利虽然有限的方法是利用可以区分不同一抗的全长二抗。例如，在2任务DNA交换免疫荧光中，如果两种一抗属于两种宿主物种（例如，一种来自小鼠，另一种来自兔），那么可以使用附接至两个不同的对接部分的两种预制的二抗（一种抗-小鼠且另一种抗-兔）。类似地，如果抗体属于不同的同种型（例如，IgG1、IgG2a和IgG2b），那么可以使用同种型特异性二抗。然而，当多种一抗属于相同的宿主物种和同种型时，不可再使

用这种策略。相反,通常在进行染色之前将对接部分直接附接至靶标识别抗体。尽管存在许多抗体缀合方法(例如,参见Greg T.Hermanson,Bioconjugate Techniques第3版,第2章和第20章,ISBN:978-0-12-382239-0(2013)),但是由于诸如收率低、需要大量昂贵的一抗(其本质上可能是单克隆抗体)、首要需要高纯度、耗费人力或昂贵等原因,大多数方法是不理想的。一抗通常也以包括如白蛋白的载体蛋白的制剂形式出售,并且所述载体蛋白可以干扰某些抗体缀合技术。

[0011] 因此,本领域需要用于将对接部分附接至一抗以用于交换成像的改进方法。

发明内容

[0012] 根据描述,在一些实施方案中,一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的方法包括(a)提供至少两种或更多种靶标识别抗体,其各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,所述试剂能够单价结合靶标识别抗体;(b)将样品与两种或更多种靶标识别抗体一起孵育,所述抗体各自与相对应的MTAB-DM试剂结合;(c)顺序、分批或并行施加对应于MTAB-DM的至少两个成像物部分;(d)顺序、分批或并行地对至少两个成像物部分成像。

[0013] 在一些实施方案中,MTAB包括蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。在一些实施方案中,DM(对接部分)和成像物部分包含核酸。在一些实施方案中,将各自与相对应的MTAB-DM试剂结合的所有靶标识别抗体同时与样品一起孵育。在一些实施方案中,所有成像物部分顺序施加并且成像顺序发生。在一些实施方案中,所有成像物部分并行施加并且成像并行发生。在一些实施方案中,成像物部分分批施加,其中至少一批具有两个或更多个成像物部分,并且该方法具有至少两个批次,并且其中成像发生在至少两个批次中。在一些实施方案中,每个成像物部分用不同的可观察部分标记。在一些实施方案中,每个成像物部分用相同的可观察部分标记。在一些实施方案中,成像物部分中的一些用相同的可观察部分标记,并且成像物部分中的一些用不同的可观察部分标记。在一些实施方案中,在将靶标识别抗体与样品一起孵育之前,使用过量的MTAB-DM以防止过量的游离靶标识别抗体。在一些实施方案中,在将靶标识别抗体与样品一起孵育之前,使用超滤或凝胶过滤移除游离的MTAB-DM。在一些实施方案中,将非特异性抗体添加至染色、洗涤和/或成像缓冲液中。在一些实施方案中,非特异性抗体是来自与靶标识别抗体相同的宿主物种的抗体。在一些实施方案中,非特异性抗体是存在于正常血清(来自未用任何靶蛋白免疫的动物)中的多克隆抗体。在一些实施方案中,非特异性抗体是针对样品中不存在的蛋白质的单克隆抗体。在一些实施方案中,成像物部分直接结合对接部分。在一些实施方案中,成像物部分通过中间部分间接结合对接部分。

[0014] 在一些实施方案中,一种组合物包含:(a)MTAB;(b)与MTAB共价结合的对接部分;(c)具有第一结构域和第二结构域的中间部分,其中第一结构域能够特异性结合对接部分并且其中第二结构域不能特异性结合对接部分。

[0015] 在一些实施方案中,MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。在一些实施方案中,对接部分和中间部分包含核酸。在一些实施方案中,对接部分长约5至20个核酸、约8至15个核酸,或长约10至12个核酸。在一些实施方案中,中间部分长约10至40个核酸、约16至30个核酸,或长约20至24个核酸。

[0016] 在一些实施方案中,一种制备用于交换成像的试剂的方法包括:(a)提供MTAB;(b)

将MTAB缀合于对接部分以形成MTAB-DM；(c) 提供多个中间部分，其各自具有能够特异性结合对接部分的第一结构域和不能特异性结合对接部分的第二结构域；(d) 将多个中间部分与MTAB-DM配混。

[0017] 在一些实施方案中，MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。在一些实施方案中，对接部分和中间部分包含核酸。在一些实施方案中，对接部分长约5至20个核酸、约8至15个核酸，或长约10至12个核酸。在一些实施方案中，中间部分长约10至40个核酸、约16至30个核酸，或长约20至24个核酸。在一些实施方案中，多个中间部分在分批反应中与MTAB-DM配混。在一些实施方案中，多个中间部分与MTAB-DM单独配混。

[0018] 在一些实施方案中，一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的试剂盒包括：(a) 至少两种不同的MTAB-DM试剂，其包括MTAB和能够特异性结合成像物部分的对接部分；(b) 任选地至少两种不同的靶标识别抗体；(c) 至少两个成像物部分，其分别用可观察部分标记并且能够特异性结合MTAB-DM试剂；(d) 不特异性结合任何靶标的任选地至少一种抗体。

[0019] 在一些实施方案中，MTAB选自蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或抗体的单价片段。在一些实施方案中，对接部分为核酸对接部分，并且成像物部分为核酸成像物部分。在一些实施方案中，对接部分为蛋白质、肽或化学化合物，并且成像物部分为互补蛋白质、肽或化学化合物。在一些实施方案中，对接部分和成像物部分分别以任一顺序为链霉抗生物素蛋白和生物素。在一些实施方案中，通过使用链霉抗生物素蛋白或缀合对接部分诸如SNAP-tag®、CLIP-tag™、HaloTag®和AviTag™缀合MTAB和对接部分。在一些实施方案中，MTAB-DM能够以约1fM至1nM的亲和力结合至少两种不同的靶标识别抗体。在一些实施方案中，可观察部分为光学可观察部分。在一些实施方案中，可观察部分为P点(P-dot)、荧光蛋白、荧光核酸、Q点(Q-dot)、纳米颗粒或SERS报告蛋白。在一些实施方案中，本文描述了一种用于使用试剂进行交换成像的方法。

[0020] 另外的目的和优点将部分陈述在随后的描述中，并且将部分通过所述说明而显而易见，或者可通过实践而学到。所述目的和优点将借助在所附权利要求中具体指出的要素和组合来实现和达到。

[0021] 应理解，上述一般描述和以下详细描述均仅为示例性和解释性的并且不限制权利要求。

[0022] 并入本说明书并且构成本说明书的一部分的附图说明一个(若干)实施方案，并且与描述一起用于解释本文所述的原理。

附图说明

[0023] 图1示出了用于标记两个靶标的MTAB-DM的实施方案。针对靶标1的抗体在结合端具有三角形形状并且针对靶标2的抗体在结合端具有半圆形形状。黑色矩形代表MTAB并且Seq.尾巴代表对接部分。

[0024] 图2示出在使用MTAB-DM时避免纯化的一种策略。非特异性抗体在结合端具有扁平形状，以及如图1所述的其他特征。

[0025] 图3A-3B示出对接部分与成像物部分的直接和间接结合。在图3A中，对接部分直接结合成像物部分。在图3B中，对接部分结合中间部分并且中间部分结合成像物部分。

[0026] 图4示出使用2步染色和连续染色的DNA交换成像的例示性实施方案。

[0027] 图5对应于实施例1,其示出使用Fab作为MTAB和DNA寡核苷酸作为对接部分的可行性。

[0028] 图6A-B对应于实施例2,其提供用靶向TOM20 (线粒体标志物) 的Alexa488-标记的抗体:MTAB-DM复合物和靶向核纤层蛋白B (细胞核膜标志物) 的Alexa647-标记的抗体:MTAB-DM复合物染色的HeLa细胞的FITC通道 (A) 和Cy5通道 (B) 的图像。

[0029] 序列说明

[0030] 表1描述了本申请中引用的某些序列。

[0031]

表1: 序列		
描述	序列	SEQ ID NO
对接部分1	5'-TTGCCACCTTCG-3'	1
对接部分2	5'-TAACGGTCAAGC-3'	2
对接部分3	5'-CGTAGCCCTGAC-3'	3
对接部分4	5'-TGCTGCCTCTTT-3'	4
成像物部分1	5'-CGAAGGTGGCAA-3'	5
成像物部分2	5'-GCTTGACCGTTA-3'	6
成像物部分3	5'-GTCAGGGCTACG-3'	7

成像物部分4	5'-AAAGAGGCAGCA-3'	8
来自金黄色葡萄球菌 (<i>Staphylococcus aureus</i>) 的蛋白 A	MKKKNIYSIR KLGVGIASVT LGTLLISGGV TPAANAAQHD EAQQNAFYQV LNMPLNADQ RNGFIQSLKD DPSQSANVLG EAQKLNDSQA PKADAQQNKF NKDQQSAFYE ILMPLNLEE QRNGFIQSLK DDPSQSTNVL GEAKKLNESQ APKADNNFNK EQQNAFYEIL NMPNLNEEQR NGFIQSLKDD PSQSANLLAE AKKLNESQAP KADNKFNKEQ QNAFYEILHL PNLNEEQRNG FIQSLKDDPS QSANLLAEAK KLNDAAQAPKA DNKFNKEQQN AFYEILHLPN LTFEEQRNGFI QSLKDDPSVS KEILAEAKKL NDAQAPKEED NKKPGKEDGN KPGKEDGNKP GKEDNKKPGK EDGNKPGKED NKKPGKEDGN KPGKEDGNKP GKEDGNKPGK EDGNKPGKED GNGVHVVKPG DTVNDIAKAN GTTADKIAAD NKLADKNMIK PGQELVVDKK QPANHADANK AQALPETGEE NFFIGTTVEG GLSLALGAAL LAGRRREL	9
来自 G 组链球菌属物种 (<i>Streptococcus sp. group G</i>) 的蛋白 G	MEKEKKVKYF LRKSAFGLAS VSAAFVLVGS VFAVDSPIED TPIIRNGGEL TNLLGNSETT LALRNEESAT ADLTA AAVAD TVAAAAAENA GAAAWAAAA ADALAKAKAD ALKEFNKYGV SDYYKNLINN AKTVEGVKDL QAQVVESAKK ARISEATDGL SDFLKSQTPA EDTVKSIELA EAKVLANREL DKYGVSDYHK NLINNAKTVE GVKDLQAQVV ESAKKARISE ATDGLSDFLK SQTPAEDTVK SIELAEAKVL ANRELDKYGV SDYYKNLINN AKTVEGVKAL IDEILALPK TDTYKLIING KTLKGETTTE AVDAATAEKV FKQYANDNGV DGEWTYDDAT KTFTVTEKPE VIDASELTPA VTTYKLVING KTLKGETTTE AVDAATAEKV FKQYANDNGV DGEWTYDDAT KTFTVTEKPE VIDASELTPA VTTYKLVING KTLKGETTTK AVDAETAEKA FKQYANDNGV DGVWTYDDAT KTFTVTEMVT EVPGDAPTEP EKPEASIPLV PLTPATPIAK DDAKKDDTKK EDAKKPEAKK EDAKKAETLP TTGEGSNPFF TAAALAVMAG AGALAVASKR KED	10
来自大消化链球菌 (<i>Peptostreptococcus magnus</i>) 的蛋白 L	MKINKKLLMA ALAGAIVVG GANAYAAEED NTDNNLSMDE ISDAYFDYHG DVSDSVDPVE EEIDEALAKA LAEAKETAKK HIDSLNLHSE TAKKLAKNDI DSATTINAIN DIVARADVME RKTAKEEEAE KLA AAKETAK KHI DELKHLA DKTKELAKRD IDSATTINAI NDIVARADVM ERKTAKEKEEA EKLA AAKETA KKHIDELKHL ADKTKELAKR DIDSATTIDA INDIVARADV MERKLSEKET PEPEEEVTIK ANLIFADGST QNAEFKGTFA KAVSDAYAYA DALKKDNGEY TVDVADKGLT LNIKFAGKKE KPEEPKEEVT IKVNLIFADG KTQTAEFKGT FEEATAKAYA YADLLAKENG EYTADLEDGG NTINIKFAGK ETPETPEEPK EEVTIKVNLIFADGKIQTAE FKGT FEEATA KAYAYANLLA KENGEYTADL EDGGNTINIK FAGKETPETP EEPKEEVTIK VNLIFADGKT QTAEFKGTPE EATAEAYRYA DLLAKVNGEY TADLEDGGYT INIKFAGKEQ PGENPGITID EWLLKNAKEE AIKELKEAGI TSDLYFSLIN KAKTVEGVEA LKNEILKAHA GEETPELKD G YATYEEAEAA AKEALKND DV NNAYEIVQGA DGRYYYYVLKI EVADEEPEGE DTPEVQEGYA TYEEAEAAAK EALKEDKVN AYEVVQGADG RYYYYVLKIED KEDEQPGEEP GENPGITIDE WLLKNAKEDA IKELKEAGIS SDIYFDAINK AKTVEGVEAL KNEILKAHAE KPGENPGITI DEWLLKNAKE AAIKELKEAG ITAEYLFNLI NKAKTVEGVE SLKNEILKAH AEKPGENPGI TIDEWLLKNA KDAIKELKE AGITSDIYFD AINKAKTIEG VEALKNEILK AHKKDEEPGK KPGEDKKPED KKPGEDKKPE DKKPGEDKKP EDKKPGKTDK DSPNKKKKAK LPKAGSEAEI LTLAAAALST AAGAYVSLKK RK	11
5' ATTO488- 标记的寡核苷酸	5'-TCTGCTTCCCGTTATACATCTA-3'	12
对接部分	TCTGCTTCCCG	13

[0032]

具体实施方式

[0033] I. 使用将对接部分附接至靶标识别抗体的改进方法的多任务成像 (Multiplexed Imaging)

[0034] 本文描述了使用将对接部分附接至靶标识别抗体的改进方法的多任务成像。一旦对接部分已附接至靶标识别抗体,用对接部分标记的抗体即可用于多种超分辨率或标准分辨率成像中。

[0035] 例如,在一些上下文中,多任务成像可以是超分辨率成像。一类超分辨率成像技术被称为随机超分辨率,其特征在于包含来自荧光标记的闪烁或闪光信号的图像。根据处理数据的方法,随机超分辨率可分为单分子定位显微术 (SMLM) 和超分辨率光学波动成像 (SOFI)。闪烁或闪光行为可以通过若干机制实现,诸如有机染料的光活化(例如,在广泛已知为随机光学重建显微术或STORM的技术中)、荧光蛋白的光开关(例如,在广泛已知为光激活定位显微术或PALM的技术中),以及量子点固有的闪烁特性。

[0036] PAINT (用于纳米级形貌成像的点积累) 是一种简单而有效的技术,其实现来自荧光标记的闪烁或闪光信号,这是由溶液中附接至靶标识别分子的不可观察的对接部分与可观察分子之间的动态和瞬时非共价相互作用引起的。基于PAINT的超分辨率成像已被 Jungmann等人, Nat methods 11 (3) :313-8 (2014) (Ref:PMID 24487583) 用于免疫荧光,其中抗体用作靶标识别分子。在这里,我们将这种技术称为基于PAINT的超分辨率免疫荧光 (PSRIF)。

[0037] 在任何这些成像方法中,代替 (a) 将对接部分直接附接至靶标识别抗体或 (b) 限制靶标识别抗体的数量和类型,以使靶标识别抗体与可以标记它们的二抗(一种小鼠靶标识别抗体和一种兔抗-小鼠二抗;一种大鼠靶标识别抗体和一种兔抗-大鼠二抗等)之间存在 1:1 的对应关系,对接部分可使用单价紧密抗体结合剂 (MTAB) 间接附接至靶标识别抗体。MTAB及其对靶标识别抗体的亲和力在下文的I.A部分中描述。如图1 (步骤1a和1b) 所示,不同的靶标识别抗体可与它们相对应的MTAB-DM并行复合,从而将不同的对接部分引入不同的靶标识别抗体。

[0038] A. 单价紧密抗体结合剂

[0039] 在一些实施方案中,单价紧密抗体结合剂 (MTAB) 可用于将对接部分附接至靶标识别抗体。MTAB包括蛋白A、蛋白G,以及针对其他抗体的恒定区的单价单克隆和多克隆抗体(例如,Fab、Fab'、Fv和scFv)。蛋白A和蛋白G是已知结合免疫球蛋白的细菌衍生蛋白。下文进一步描述这些类型的MTAB中的每一种。

[0040] 通过解离常数 (K_d) 测量的MTAB对靶标识别抗体的亲和力可以在约1fM至1nM、约1fM至1pM或约1pM至1nM的范围内。在一些实施方案中, K_d 值可小于或等于约1fM、10fM、100fM、1pM、10pM、100pM或1nM。可通过ELISA、表面等离子体共振、等温滴定量热以及基于荧光的测定来评估候选MTAB对用于任何特定成像实验的靶标识别抗体的亲和力,以测量结合速率和/或解离速率。用于评估MTAB是否可与靶标识别抗体配对的其他选项在下文I.C部分中讨论。

[0041] 根据靶标识别抗体类型,可选择不同的MTAB。表2提供了这方面的指导。下表提供了关于蛋白A和蛋白G对各种免疫球蛋白类型的亲和力的信息。

表 2: 蛋白 A 和蛋白 G 对免疫球蛋白类型的亲和力和物种

物种	免疫球蛋白	与蛋白 A 的结合	与蛋白 G 的结合
人	IgG(正常)	++++	++++
	IgG1	++++	++++
	IgG2	++++	++++
	IgG3	-	++++
	IgG4	++++	++++
	IgM	-	-
	IgA	-	-
	IgE	-	-

[0042]

小鼠	IgG1	+	++++
	IgG2a	++++	++++
	IgG2b	+++	+++
	IgG3	++	+++
大鼠	IgG1	-	+
	IgG2a	-	++++
	IgG2b	-	++
	IgG2c	+	++
山羊	IgG	+/-	++
兔	IgG	++++	+++
绵羊	IgG	+/-	++

[0043]

[0044] 在本申请中,MTAB是单价的;这意味着一个MTAB分子仅结合一个靶标识别抗体分子。因此,全长二抗不可以是MTAB。这是因为一个全长二抗分子可以同时结合两个识别靶标的一抗,并且一个一抗分子可以被多个二抗分子同时结合(无论二抗是单克隆的、寡克隆的还是多克隆的);所述多价相互作用可产生也可不穿透样品的高分子量复合物。

[0045] 1. 蛋白A

[0046] 蛋白A由折叠成三螺旋束的五个同源Ig结合结构域组成。每个结构域能够结合来自许多哺乳动物物种的蛋白质,最值得注意的是IgG。它结合大多数免疫球蛋白的Fc区以及一些抗体的Fab区内的重链。蛋白A的一种充分表征的型式来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*),但也可使用蛋白A的其他来源。蛋白A可以从金黄色葡萄球菌中分离出来或者它可通过重组产生。可以使用来自Thermo Fisher Scientific的Pierce™重组蛋白A。也可使用蛋白A的片段、变体和衍生物,只要它们与靶标识别抗体充分结合并且包括在术语蛋白A的任何提及中,除非使用术语全长蛋白A。

[0047] 蛋白A是充分表征的蛋白质并且其结合免疫球蛋白Fc结构域的能力(无论是全长形式还是其片段)在本领域中是公知的。参见Graille等人,Crystal Structure of a *Staphylococcus aureus* Protein A domain complexed with the Fab fragment of a human IgM antibody:Structural basis for recognition of B-cell receptors and super antigen activity,PNAS 97(10):5399-5404(2000)。在一些情况下,蛋白A包括结构域D的螺旋II和III。因此,一旦选择了靶标识别抗体,就可以选择适当的蛋白A。

[0048] 蛋白A的序列如SEQ ID NO:9所提供。术语蛋白A包括在多肽的长度上与SEQ ID NO:9至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的任何

多肽(意味着如果较短序列在较短序列的长度上满足该百分比同源性,那么所述较短序列被包括在内)。在一些实施方案中,蛋白A的片段可以长至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸。

[0049] 蛋白A的衍生物,诸如化学修饰的蛋白A也可包括在本文中。

[0050] 2. 蛋白G

[0051] 与蛋白A一样,蛋白G是由细菌产生的与免疫球蛋白结合的蛋白质。蛋白G由C组和G组链球菌产生并与抗体的Fab和Fc区结合。它还与白蛋白和细胞表面结合,因此可以缺乏白蛋白和细胞表面结合位点的重组形式获得。也可使用蛋白G的片段、变体和衍生物,只要它们与靶标识别抗体充分结合并且包括在术语蛋白G的任何提及中,除非使用术语全长蛋白G。在一些实施方案中,可使用缺乏白蛋白结合位点的重组蛋白G。可以使用来自Thermo Fisher Scientific的Pierce™重组蛋白G,并且所述重组蛋白G缺乏白蛋白和细胞表面结合结构域。

[0052] 蛋白G是充分表征的蛋白质并且其结合免疫球蛋白Fc结构域的能力(无论是全长形式还是其片段)在本领域中是公知的。参见Sjöbring等人,Streptococcal Protein G, JBC 266 (1):399-405 (1991)。在一些实施方案中,蛋白G包括蛋白G的C1结构域。因此,一旦选择了靶标识别抗体,就可以选择适当的蛋白G。

[0053] 蛋白G的序列如SEQ ID NO:10所提供。术语蛋白G包括在多肽的长度上与SEQ ID NO:10至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的任何多肽(意味着如果较短序列在较短序列的长度上满足该百分比同源性,那么所述较短序列被包括在内)。在一些实施方案中,蛋白G的片段可以长至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450或500个氨基酸。

[0054] 蛋白G的衍生物,包括化学修饰的蛋白G,也可包括在本文中。

[0055] 3. 蛋白A/G

[0056] 蛋白A/G是组合了蛋白A和蛋白G的IgG结合结构域的重组融合蛋白。全长蛋白A/G含有来自蛋白A的4个Fc结合结构域和来自蛋白G的2个Fc结合结构域。蛋白A/G与人IgG的所有亚型结合,从而使其可用于结合亚型尚未确定的抗体。

[0057] 也可使用蛋白A/G的片段、变体和衍生物,只要它们与靶标识别抗体充分结合并且包括在术语蛋白A/G的任何提及中,除非使用术语全长蛋白A/G。可以使用来自Thermo Fisher Scientific的Pierce™重组蛋白A/G。蛋白A/G的衍生物,包括化学修饰的蛋白A/G,也可包括在本文中。

[0058] 4. 蛋白L

[0059] 蛋白L是由细菌产生的与免疫球蛋白结合的另一蛋白质。蛋白L由大消化链球菌产生并通过L链(由此得名)相互作用与免疫球蛋白结合。可使用蛋白L的片段、变体和衍生物,只要它们与靶标识别抗体充分结合并且包括在术语蛋白L的任何提及中,除非使用术语全长蛋白L。可以使用来自Thermo Fisher Scientific的Pierce™重组蛋白L。蛋白L与含有κ轻链的抗体结合。

[0060] 蛋白L是充分表征的蛋白质并且其结合免疫球蛋白Fc结构域的能力(无论是全长形式还是其片段)在本领域中是公知的。参见Kastern等人,Structure of Peptostreptococcal Protein L and Identification of a Repeated Immunoglobulin

Light Chain-binding Domain, JBC 267 (18) :12820-12825 (1992)。在一些实施方案中,蛋白L包括至少一个、两个、三个、四个或五个B重复。因此,一旦选择了靶标识别抗体,就可以选择适当的蛋白L。

[0061] 蛋白L的序列如SEQ ID NO:11所提供。术语蛋白L包括在多肽的长度上与SEQ ID NO:11至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的任何多肽(意味着如果较短序列在较短序列的长度上满足该百分比同源性,那么所述较短序列被包括在内)。在一些实施方案中,蛋白L的片段可以长至少约50、100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800、900或950个氨基酸。

[0062] 蛋白L的衍生物,包括化学修饰的蛋白L,也可包括在本文中。

[0063] 5. 抗体的单价片段或衍生物

[0064] 也可使用单价抗体,只要它们与所讨论的靶标识别抗体充分结合即可。该术语包括任何单价抗体形式,包括包含抗体的可变区的任何片段。这些包括但不限于抗体的Fab、Fab'、Fv和scFv片段。针对靶标识别抗体的二抗的单价片段可以用作MTAB。例如,如果靶标识别抗体为鼠抗体,那么可以采用兔-抗-小鼠抗体的单价片段或衍生物作为MTAB。所述抗体片段MTAB可从完整抗体通过酶促片段化,或它们可通过重组制备。

[0065] B. 对接部分

[0066] 如上文所论述,对接部分(或DM)可与MTAB结合,以允许容易地与靶标识别抗体复合。

[0067] 在一些实施方案中,对接部分包含核酸。当对接部分是核酸时,它也可被描述为对接链。在一些实施方案中,核酸为单链核酸,诸如单链DNA、RNA或核酸类似物。核酸类似物可包括改变的磷酸骨架、改变的戊糖和/或改变的核碱基。核酸类似物可包括但不限于2'-O-甲基核糖核酸、2'-氟核糖核酸、肽核酸、吗啉代和锁核酸、二醇核酸(glycol nucleic acid)和苏糖核酸。

[0068] 在一些实施方案中,对接部分包含单链核酸,并且可以长约5至20个核酸、约8至15个核酸、或长约10至12个核酸。在一些实施方案中,对接部分长约5、8、9、10、11、12、13、14、15、18或20个核酸。

[0069] 在一些实施方案中,对接部分为蛋白质、肽或化学化合物。可用作对接部分的许多蛋白质和蛋白质的结构域已知与可用作成像物部分的其他蛋白质、结构域或肽相互作用,如下文I.F.1部分中所描述。一些最知名的结构域包括SH2、SH3和WD40结构域。在许多情况下,这些蛋白质和结构域的结合配偶体是已知的并且可以被工程化为具有期望的亲和力。在一些情况下,来自一种生物体(例如酵母)的天然结合对可用于研究来自另一生物体(例如,人)的样品以避免交叉相互作用。许多化学化合物可以与其他化合物或蛋白质发生特异性相互作用,其中亲和力直接适合于这种背景或可以被工程化为合适的。例如,生物素和抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白以足够的特异性相互作用。许多其他化学化合物,诸如洋地黄毒苷、荧光素、他克莫司和雷帕霉素也具有众所周知的结合配偶体。

[0070] 1. 间接缀合

[0071] 在一些实施方案中,诸如图3B所示的实施方案,对接部分可间接结合成像物部分,诸如通过中间部分。例如,当对接部分和成像物部分为核酸时,可使用包含核酸的中间部分,只要中间部分具有与对接部分互补的第一区域和与成像物部分互补的第二区域即可。

在该实施方案中,对接部分不必与成像物部分互补。使用通用对接部分可以提供以下优点:仅需要制备一种类型的MTAB-DM且易于合成,并且当对接部分为核酸对接部分时,可以使用非常便宜的寡核苷酸作为中间部分。

[0072] 因此,在一些实施方案中,组合物包含MTAB、与MTAB结合的对接部分(任选地共价结合)以及具有第一结构域和第二结构域的中间部分,其中第一结构域能够特异性结合对接部分并且其中第二结构域不能特异性结合对接部分。

[0073] 另外,在一些实施方案中,一种制备用于交换成像的试剂的方法包括提供MTAB;将MTAB缀合于对接部分以形成MTAB-DM(任选地利用共价键);提供多个中间部分,其各自具有能够特异性结合对接部分的第一结构域和不能特异性结合对接部分的第二结构域;将多个中间部分与MTAB-DM配混。在一些实施方案中,多个中间部分在分批反应中与MTAB-DM配混。这导致MTAB-DM:中间部分的混合群体。在一些实施方案中,多个中间部分以单独的并行组合与MTAB-DM配混。这导致MTAB-DM:中间部分的不同的基本上同质的群体。

[0074] 在一些实施方案中,中间部分长约10至40个核酸、约16至30个核酸,或长约20至24个核酸。

[0075] C. 确定MTAB-DM是否可与预先确定的抗体一起使用

[0076] MTAB的许多候选物(例如,蛋白A、蛋白G、蛋白L、蛋白A/G和多克隆Fab)可从诸如Abcam、Jackson ImmunoResearch、Santa Cruz Biotechnology和Thermo Fisher的供应商商购获得。此外,MTAB的一些候选物可以由可商购获得的前体产生。例如,多克隆Fab'可以通过用还原剂诸如DTT还原多克隆F(ab')₂(其则可商购获得)产生(Crivianu-Gaita等人, High efficiency reduction capability for the formation of Fab' antibody fragments from F(ab)₂ units, Biochemistry and Biophysics Reports 2:23-28 (2015))。这些MTAB候选物可用于与对接部分缀合(参见I.D部分)以形成MTAB-DM候选物。

[0077] 尽管存在MTAB-DM的很多选择,但由于多种类型的蛋白质可用作MTAB的事实,因此重要的是确保对于给定抗体,选择的MTAB-DM是合适的,这意味着可满足两个标准。首先,在一些实施方案中,MTAB-DM的结合不导致抗体失去其紧密结合其靶标的能力。第二,在一些实施方案中,MTAB-DM以足够的亲和力结合抗体,使得抗体:MTAB-DM复合物在实验期间不解离至显著水平。

[0078] 至于第二个标准,较低的解离水平可以提供优点;然而,可忍受的解离水平取决于应用。如果应用是定性的,那么靶标是丰富的,或检测方法足够灵敏,甚至可以检测到一小部分的剩余抗体:MTAB-DM复合物。因此,可忍受的解离水平可大于80%。相反,在更定量的应用中,当靶标丰度低时,或当检测方法不灵敏时,可忍受的解离水平可小于5%。在一些实施方案中,小于或等于约1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、60%、70%或80%的MTAB-DM在成像期间与靶标识别抗体解离。

[0079] 众所周知,可用作一些抗体的MTAB的一些蛋白质可能不能用作其他抗体的MTAB。例如,已知蛋白A紧密结合兔IgG但微弱结合小鼠IgG1。除了依赖已知的结合标准外,如果蛋白质用作MTAB的适用性未知,那么可以容易地通过实验测试。

[0080] 给定预先指定的抗体和预先指定的应用,MTAB-DM是否可以足够紧密地结合抗体可以以直截了当的方式进行实验评估。假设(1)一抗的特性决定一抗染色在温度Temp-X下需要X小时,(2)应用决定在抗体:MTAB-DM复合物洗涤后,在对靶标成像之前还存在另外Y小

时的在温度Temp-Y下的其他步骤, (3) 应用决定最大可忍受的解离水平为Z%, 并且(4) 对接部分与成像物部分之间的亲和力已经预先确定为足够高(例如, 使用本领域技术人员已知的许多方法中的任一种, 在温度Temp-X下X小时和在温度Temp-Y下Y小时后预期可忽略的解离), 可以使用以下实施例3和/或4中的方案测试MTAB-DM是否足够稳定地结合抗体。

[0081] D. 用于将对接部分缀合于MTAB的方法

[0082] MTAB可与对接部分缀合以形成MTAB-DM缀合物。

[0083] 大多数蛋白质, 包括可以用作MTAB的那些蛋白质, 在其表面上具有赖氨酸残基(在其侧链上含有伯胺基团)。在这种情况下, 可以使用胺反应性交联剂将对接部分与MTAB缀合。在一些实施方案中, 可以使用双功能交联剂实现连接。对于样品, 4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、SM(PEG)2(Thermo Fisher目录号22102)等可用于将MTAB上的赖氨酸残基与含硫醇的对接部分(例如, 如果对接部分是肽并含有半胱氨酸)或硫醇修饰的对接部分(例如, 硫醇修饰的寡核苷酸)上的硫醇基团连接。另选地, 可使用叠氮基-NHS酯(Thermo Fisher目录号88902)将叠氮基团引入MTAB的赖氨酸残基, 用炔基基团修饰对接部分, 并使用铜辅助的点击化学连接叠氮基和炔基基团。

[0084] 许多蛋白质也具有表面硫醇基团, 作为半胱氨酸残基的一部分, 其可用作缀合柄(conjugation handle)。可以使用SMCC、SM(PEG)2等将MTAB的硫醇基团与含胺对接部分(例如, 如果对接部分是肽并且含有赖氨酸或N-末端胺)或胺修饰的对接部分(例如, 胺修饰的寡核苷酸)上的胺基团连接。类似地, 可以使用叠氮基-PEG3-马来酰亚胺(Santa Cruz Biotechnology目录号sc-496404)、叠氮基-PEG4-马来酰亚胺(Click Chemistry Tools目录号AZ10725)等将叠氮基团引入MTAB的半胱氨酸残基, 用炔基基团修饰对接部分, 并使用铜辅助的点击化学连接叠氮基和炔基基团。

[0085] 如果MTAB通过重组产生, 那么可以融合另一缀合友好的缀合标签蛋白, 诸如链霉抗生物素蛋白(或其衍生物或相关蛋白), 或可商购获得的缀合对接部分, 诸如SNAP-tag[®]、CLIP-tag[™]、HaloTag[®]和AviTag[™], 以便促进与寡核苷酸对接部分的缀合。

[0086] E. 靶标识别抗体

[0087] 靶标识别抗体是指全长抗体及其抗原结合片段, 包括可用于检测靶标分子的抗体样分子和含有用于MTAB的结合的结构域的抗体的任何工程化变型或片段。例如, 单链抗体、scFv-Fc等可用作靶标识别抗体。抗体是指可以特异性识别靶标分子的来自任何物种的任何免疫球蛋白。因此, 除非使用术语全长抗体, 否则术语抗体包括含有用于MTAB的结合的结构域的抗体的抗原结合片段。

[0088] 一旦鉴定了样品中的靶标, 本领域普通技术人员可以生成针对所述靶标的抗体或找到可商购获得的抗体。可使用血清纯化的或重组的抗体。各种商业供应商提供了可以在这些实施方案中用作靶标识别抗体的多种一抗, 包括针对来自供应商的广泛多个靶标的那些, 所述供应商包括Abcam、Sigma-Aldrich以及Pierce Antibodies of Thermo Fisher Scientific。

[0089] 在一些实施方案中, 将所有靶标识别抗体施加至样品并允许同时对样品染色。这允许最大效率和最短的实验持续时间, 因为抗体孵育可能很长, 这取决于所用的每种靶标识别抗体的浓度。在其他实施方案中, 诸如如果两种或更多种抗体干扰它们与其预期靶标的结合中的至少一个, 那么可将它们分成单独的批次进行孵育和结合其样品, 并且成像可

包括至少两组反应,其中至少一组以多任务形式出现,同时将多于一种靶标识别抗体施加至样品。在图1中示出多种靶标识别抗体同时施加至样品。

[0090] F. 成像物部分和可观察部分

[0091] 与可观察部分结合的成像物部分允许对接部分的成像。成像物部分可瞬时或非瞬时地结合对接部分。瞬时结合是指,其中以下中的至少一个是真的结合相互作用:(1) 结合复合物的解离速率常数(通常表示为 k_{off})为 $0.1s^{-1}$ 或更高或(2) 解离常数(通常表示为 K_d)为100nM或更高。非瞬时结合是指结合复合物的解离速率常数(k_{off})低于 $0.1s^{-1}$ 且解离常数(K_d)低于100nM的结合相互作用。瞬时和非瞬时结合的选项在美国临时申请第62/327,604号中进一步讨论。

[0092] 1. 成像物部分

[0093] 成像物部分能够如以上I.B部分中所述的那样特异性结合对接部分。当对接部分为核酸时,成像物部分也包含核酸。如果成像物部分由核酸组成,那么它也可被描述为成像物链。在一些实施方案中,核酸为单链核酸,诸如单链DNA、RNA或核酸类似物。核酸类似物可包括改变的磷酸骨架、改变的戊糖和/或改变的核碱基。核酸类似物可包括但不限于2'-O-甲基核糖核酸、2'-氟核糖核酸、肽核酸、吗啉代和锁核酸、二醇核酸和苏糖核酸。

[0094] 通过特异性结合,如果对接部分和成像物部分是核酸,那么它们可以在高离子强度缓冲条件下杂交;例如,可以在室温下使用高离子强度缓冲条件(例如1x盐水柠檬酸钠缓冲液,或150mM、200mM、300mM、400mM、500mM或600mM的在磷酸盐缓冲液中的氯化钠)来评估杂交。

[0095] 在一些实施方案中,成像物部分包含单链核酸,并且可以长约5至20个核酸、约8至15个核酸、或长约10至12个核酸。在一些实施方案中,成像物部分长约5、8、9、10、11、12、13、14、15、18或20个核酸。

[0096] 在一些实施方案中,成像物部分是蛋白质、肽或化学化合物,作为以上在I.B部分中讨论的对接部分选项的配偶体。

[0097] 在一些实施方案中,对接部分可间接结合成像物部分,诸如通过中间部分。例如,当对接部分和成像物部分为核酸时,可使用包含核酸的中间部分,只要中间部分具有与对接部分互补的第一区域和与成像物部分互补的第二区域即可。在该实施方案中,对接部分不必与成像物部分互补。

[0098] 例如,表3示出可用于标记不同的靶标识别抗体的以下对接部分和成像物部分对,其中对接部分1与成像物部分1配对,以此类推。可以容易地制备其他类似的配对。

描述	序列	SEQ ID NO
对接部分 1	5'-TTGCCACCTTCG-3'	1
对接部分 2	5'-TAACGGTCAAGC-3'	2
对接部分 3	5'-CGTAGCCCTGAC-3'	3
对接部分 4	5'-TGCTGCCTCTTT-3'	4
成像物部分 1	5'-CGAAGGTGGCAA-3'	5
成像物部分 2	5'-GCTTGACCGTTA-3'	6
成像物部分 3	5'-GTCAGGGCTACG-3'	7
成像物部分 4	5'-AAAGAGGCAGCA-3'	8

[0099]

[0100] 2. 可观察部分

[0101] 各种可观察部分可附连于本文所述的成像物部分。在一些实施方案中,可采用任何可观察部分,并且在一些实施方案中,该部分是光学可观察的。该部分可以是信号吸收或信号发射的。在信号发射分子中,可使用发荧光的分子,诸如有机小分子,包括但不限于荧光团,诸如但不限于荧光素、罗丹明、花青素染料、Alexa染料、DyLight®染料,Atto染料等。

[0102] 在一些实施方案中,可以采用有机聚合物,诸如P点。在一些实施方案中,可观察部分可以是生物分子,包括但不限于荧光蛋白或荧光核酸(包括荧光RNA,其包括菠菜及其衍生物)。在一些实施方案中,可观察部分可以是包括Q点的无机部分。在一些实施方案中,可观察部分可以通过散射(弹性或非弹性散射)操作的部分,诸如纳米颗粒和表面增强的拉曼光谱(SERS)报告蛋白(例如,4-巯基苯甲酸、2,7-巯基-4-甲基香豆素)。在一些实施方案中,可观察部分可以是化学发光/电致化学发光发射体,诸如钌络合物和萤光素酶。可观察部分可生成光学信号、电磁信号(在整个电磁光谱上)、原子/分子质量(例如可通过质谱检测)、有形质量(例如,可通过原子力显微镜检测)、电流或电压。

[0103] 在一些实施方案中,单一类型的可观察部分可以与所有不同的成像物部分结合。在这种情况下,可以施加具有可观察部分的成像物部分1并成像,进行洗涤步骤,并且可以施加具有可观察部分的成像物部分2并成像,以此类推。计算机化组装可以产生最终图像。

[0104] 另选地,不同的可观察部分可以与至少一些(或甚至所有)不同的成像物部分结合,以用于成像方案。这允许批量成像步骤(如果一些但并非所有成像物部分具有不同的可观察部分)或单个成像步骤(如果所有成像物部分具有不同的可观察部分)。本领域技术人员可以选择适当的可观察部分或可观察部分系列以配合实验条件、用于成像的靶标的数量、他们手边具有的材料等。

[0105] G. 方法步骤

[0106] 本文所述的成像沿循交换成像的基本轮廓,并具有如本文所述的额外步骤和组分。(1)作为第一步,制备MTAB-DM缀合物,(2)将MTAB-DM与靶标识别抗体配混以形成MTAB-DM:靶标识别抗体复合物;(3)将MTAB-DM:靶标识别抗体复合物与样品一起孵育,然后进行任选的洗涤步骤,(4)施加具有可观察部分的成像物部分,其各自特异性识别对接部分以标记对接部分的全部或亚组,并且对相对应的靶标成像,(5)任选地移除步骤(4)中使用的成像物部分组或使所述成像物部分上的可观察部分失活,然后进行任选的洗涤步骤,并且(6)

任选地使用另一组成像物部分,其各自特异性地识别对接部分并携带可观察部分,以标记对接部分的另一亚组,并对相对应的靶标亚组成像。

[0107] 如果每个成像物部分用不同的可观察部分标记,那么步骤(5)和(6)不是必需的。根据研究者可获得的可观察部分的数量和待成像的靶标的数量,也可以重复步骤(5)和(6)。在一些情况下,所有MTAB-DM:靶标识别抗体复合物在步骤(3)中一起孵育,并且在其他情况下,步骤(3)-(4)或(3)-(6)重复至少一次,其中将多个MTAB-DM:靶标识别抗体复合物在步骤(3)的至少一种情况中一起孵育。

[0108] 用于孵育靶标识别抗体和样品的反应条件是本领域公知的并且考虑研究者可获得的靶标识别抗体的浓度、样品中存在的靶标的量、靶标识别抗体对靶标的亲和力以及研究者可获得用于孵育的时间。染色后,通常进行标准洗涤步骤。

[0109] H. 另外的实施方案

[0110] 1. 调整MTAB-DM的量与靶标识别抗体的量的关系

[0111] 通过调整MTAB-DM的量与靶标识别抗体的量的关系,也可以采用另外的任选实施方案。

[0112] 在一些实施方案中,可以精细调节靶标识别抗体和MTAB-DM的比率,使得在将MTAB-DM和靶标识别抗体施加至样品用于成像之前没有剩余游离抗体或MTAB-DM。如果在成像之前在孵育步骤中存在过量的游离抗体,那么一些游离抗体可结合靶标而不生成信号。如果发生这种情况,那么游离抗体可能降低成像的整体信号传导能力。

[0113] 另外,当旨在结合第一靶标识别抗体的MTAB-DM以过量浓度存在并且与第二靶标识别抗体结合(即,识别不同靶标)时,可以产生准确度降低的信号的可能性。因此,取决于浓度、结合位点的数量以及MTAB-DM对靶标识别抗体的亲和力,旨在标记靶标识别抗体1的一些MTAB-DM 1将在与靶标识别抗体1的缀合中过量存在或可以解离并变得可用于与靶标识别抗体2结合是可能的。如果MTAB-DM1变得与靶标识别抗体2结合,那么可以产生准确度降低的信号。

[0114] 所谓的过量,用户应记住,MTAB-DM制剂可在每种靶标识别抗体上具有多于一个结合位点。例如,如果单价多克隆抗体用作MTAB,那么不同组分抗体可结合在靶标识别抗体上的不同位置。

[0115] 因此,在一些实施方案中,可包括纯化步骤以移除游离的靶标识别抗体和/或游离的MTAB-DM。例如,如果MTAB-DM的分子量小于抗体,那么可以使用超滤或凝胶过滤分离抗体:MTAB-DM复合物和游离MTAB-DM。例如,当MTAB是Fab结构域(~50kD,与~150kD的靶标识别抗体相比)且MTAB-DM的非Fab部分累积量小于50kD时,这可以使用。这可任选地与使用初始过量的MTAB-DM组合,以防止过量的靶标识别抗体。

[0116] 2. 采用非特异性抗体

[0117] 作为任选的实施方案,可将非特异性抗体添加到本文所述的方法中。即使对于靶标识别抗体的浓度存在理想量的MTAB-DM,由于抗体:MTAB-DM相互作用是非共价的,因此可能的是,在染色、洗涤和成像期间,MTAB-DM分子可以与最初与其复合的抗体解离,并随后结合与第二靶标结合的第二类型的靶标识别抗体,从而产生准确度降低的信号。

[0118] 在一些实施方案中,作为任选纯化方法的任选替代物,可添加非特异性分子,其也可以与靶标识别抗体竞争的方式结合MTAB-DM,其中非特异性抗体将不特异性结合所要

成像的样品的组分。可将所述非特异性抗体添加至染色、洗涤和/或成像缓冲液中,使得如果MTAB-DM分子与最初与其复合的抗体解离,那么它将与溶液中的靶标非特异性分子结合,而不是与结合不同靶标的抗体结合。

[0119] 所述非特异性分子的一个实例是抗体或所述抗体的混合物,其可存在于来自靶标识别抗体的宿主物种的正常血清(即,未用任何靶蛋白免疫的)中,或从所述血清纯化的含免疫球蛋白的蛋白质混合物中。另选地,可采用针对与样品无关的蛋白质的单克隆抗体作为非特异性抗体。非特异性抗体用作在与靶标识别抗体缔合后过量存在或在成像过程中可能发生与靶标识别抗体的解离的任何未结合的MTAB-DM的接收物(sink)。

[0120] 3. 使用MTAB-DM进行的2步染色和连续染色

[0121] 此外,图1和图2示出工作流程,其中首先制备抗体:MTAB-DM复合物,然后用复合物对样品染色(我们据此称为‘1步染色’的策略),也可以单独使用抗体对样品染色,然后以与使用二抗类似的方式使用MTAB-DM对样品染色。我们称这种策略为‘2步染色’。在2步染色中,如果使用不同的MTAB-DM同时对样品染色,可以确保MTAB-DM可以特异性结合其各自的预期抗体并且不交叉结合。例如,使用一种小鼠一抗和一种兔一抗对样品进行染色,然后可以使用抗-小鼠Fab作为旨在结合小鼠一抗的MTAB-DM的MTAB,并且可以使用抗-兔Fab作为旨在结合兔一抗的MTAB-DM的MTAB。如果一抗属于不同的亚型(例如,IgG1、IgG2a、IgG2b等),那么也可以使用类似的策略。

[0122] 如果一抗属于来自同一生物体的相同亚型,那么找到可以区分它们的MTAB可能是不可能的或不切实际的。在这种情况下,仍然可使用2步染色策略,但是连续使用两种一抗。使用相同物种和相同同种型的两种抗体作为实例,图4中示出所述连续染色工作流程的一种实施方式。首先,将样品用旨在针对第一靶标的第一抗体染色,然后用PBS洗涤。然后(步骤A)将样品用旨在针对第一靶标的MTAB-DM(例如Fab-寡核苷酸缀合物)染色,然后在PBS中洗涤。然后(步骤B),用未标记的MTAB(例如,未修饰的Fab,以具有黑色轮廓的灰色圆角矩形示出)处理样品,其可以占据第一一抗上可被旨在针对将在稍后添加的第二靶标的MTAB-DM结合的所有未占据的位点(如果存在的话),然后在PBS中进行洗涤。接下来(步骤C),将样品用旨在针对第二靶标的第二一抗染色,然后用PBS洗涤。可以执行该步骤,因为旨在针对第一靶标的MTAB-DM和先前使用的未标记的MTAB都是单价的。如果使用常规二抗代替MTAB,那么未被第一一抗占据的可变区可结合第二一抗,从而导致二抗的错误定位。接下来(步骤D),用旨在针对第二靶标的MTAB-DM对样品染色。这种MTAB-DM结合仅结合第二一抗而不结合第一一抗,因为第一一抗上的可用结合位点已经被旨在针对第一靶标的MTAB-DM或步骤B中引入的未标记的MTAB占据。如果要将更多靶标可视化,可以使用相对应的一抗和MTAB-DM重复步骤B、C、D。

[0123] 应注意,可以针对同一样品进行1步染色2步染色。例如,可以首先使用1步染色将MTAB-DM引入靶标的一个亚组中,然后使用2步染色将MTAB-DM引入靶标的另一个亚组中,或反之亦然。

[0124] 实施例

[0125] 实施例1. 证实DNA缀合的Fab片段可用作MTAB-DM

[0126] 在该文档中描述的技术的一个实施方案中,Fab片段用作MTAB,并且DNA寡核苷酸用作对接部分。关于该实施方案的可行性的两个关键问题是(a) MTAB-DM: 抗体复合物是否

可以足够快地形成,以及(b)MTAB-DM:抗体复合物对于典型的免疫荧光应用是否足够稳定。该实施例示出回答该问题的程序,并证实通过缀合可商购获得的Fab片段和胺标记的DNA寡核苷酸产生的MTAB-DM可以快速结合一抗并形成足够稳定的复合物。为了产生MTAB-DM,我们用叠氮基-(PEG)₄-NHS(Click Chemistry Tools,目录号A103P-500)修饰山羊抗-小鼠-IgG Fab(Jackson ImmunoResearch,目录号115-007-003),这通过以下方式实现:将两者在PBS中混合1.5h(其中Fab片段和叠氮基-(PEG)₄-NHS的最终浓度分别为1mg/mL和0.1mM),然后使用凝胶过滤柱进行缓冲液交换。然后将叠氮基-(PEG)₄-修饰的Fab片段与过量的序列为:5'-TCTGCTTTCCCG-3'(SEQ ID NO:13)的5'-DBC0-标记的寡核苷酸一起孵育过夜,以产生Fab-DNA缀合物,其用作MTAB对接部分。利用30K分子量截留值通过超滤移除DBC0标记的DNA。为便于检测,将该Fab-DNA缀合物与过量的具有序列5'-TCTGCTTTCCCGTTATACATCTA-3'(SEQ ID NO:12)的5'-ATTO488-标记的寡核苷酸一起孵育,然后利用30K分子量截留值进行超滤以移除未结合的ATTO488-标记的寡核苷酸(SEQ ID NO:12),并使用UV光谱法和光谱线性解混法(spectrum linear unmixing)进行定量。我们将最终的复合物命名为“Fab-DNA:DNA-ATTO488”。

[0127] 我们将64.5pmol Fab-DNA:DNA-ATTO488与1.5微克的小鼠抗- α -微管蛋白抗体(克隆DM1A)一起孵育1.5h。然后向混合物中添加7.5微升正常小鼠血清,以提供靶标非特异性抗体以淬灭未与一抗(即,小鼠抗- α -微管蛋白抗体)结合的Fab-DNA:DNA-ATTO488。然后向混合物中添加136微升抗体稀释缓冲液(具有1%BSA、0.3%Triton-X 100、5 μ M(dT)₃₀寡核苷酸的PBS)。在LabTek室中、4°C下使用最终混合物对预固定(使用3%多聚甲醛和0.1%戊二醛,持续10分钟)并预封闭的(用封闭缓冲液:具有3%BSA+0.2%Triton X-100的PBS,持续1.5h)HeLa细胞染色过夜。然后用PBS洗涤HeLa细胞4次,每次5分钟,并使用488nm激光和FITC通道滤光立方体成像。从图5所示的图像可以看出,微管被清楚地染色,证明(1)1.5h孵育足以形成抗体与MTAB-DM之间的复合物(即,Fab-DNA:DNA-ATTO488),以及(2)在过夜孵育期间,足够水平的抗体:MTAB-DM复合物保持完整。

[0128] 实施例2.抗体:MTAB-DM复合物之间交换的缺乏

[0129] 为了使用此处所述的技术进行多任务免疫荧光,必须确保在实验期间,旨在结合一种一抗的MTAB-DM不与一抗(或用于淬灭MTAB-DM的靶标非特异性抗体)解离并接着与另一种一抗结合。如果多个MTAB可以结合样品中使用的多种抗体,这尤其重要。例如,如果使用不同靶蛋白的两种兔一抗(此处称为抗体1和抗体2),那么使用抗-兔Fab作为两种MTAB-DM分子(此处称为MTAB-DM1和MTAB-DM2)的MTAB,可以分别将抗体1和抗体2与MTAB-DM1和MTAB-DM2复合。在这种情况下,必须确保MTAB-DM1在实验过程中不与抗体2结合。这要求MTAB必须对抗体具有高的固有亲和力,以使MTAB-DM:抗体复合物在实验过程中不过快解离。

[0130] 我们使用荧光标记的Fab片段作为MTAB-DM的替代品来测试Fab片段是否具有对一抗的固有亲和力以实现这种期望的行为。为此,我们制备了两种混合物,此处称为混合物1和混合物2。在混合物1中,我们将~0.3微克的兔抗-TOM20抗体(Santa Cruz Biotechnology,目录号FL-145)和~1.5微克的Alexa488-标记的山羊抗-兔-Fc(IgG)Fab片段在8微升的最终体积中混合~3h。在混合物2中,我们将~1.5微克的兔抗-核纤层蛋白-B抗体(Abcam,目录号ab16048)和Alexa647-标记的山羊抗-兔-Fc(IgG)Fab片段在8微升的最

终体积中混合~3h。两种混合物中的缓冲液均为PBS。应注意,在两种混合物中,一抗具有兔的宿主生物体。接下来,向每种混合物中添加15微升正常兔血清。接下来,向每种混合物中添加75微升抗体稀释缓冲液(具有1%BSA、0.3%Triton-X 100、5 μ M(dT)₃₀寡核苷酸的PBS)。接下来,将两种混合物配混,以在LabTek室中、4℃下对预固定(使用3%多聚甲醛和0.1%戊二醛,持续10分钟)并预封闭的(用封闭缓冲液:具有3%BSA+0.2%Triton X-100的PBS,持续1.5h)HeLa细胞染色过夜。然后用PBS洗涤HeLa细胞4次,每次5分钟,并使用(a) 488nm激光和FITC通道滤光立方体以及(b) ~642nm激光和Cy5-通道滤光立方体成像。图像在图6A-B中示出。可以看出,在FITC通道中,其中TOM20(线粒体标志物)为预期靶标并且是可观察的,没有可观察的核纤层蛋白B(细胞核膜标志物),并且在Cy5通道中,其中核纤层蛋白B是预期靶标并且是可观察的,没有可观察的TOM20。因此,我们可以得出结论,没有观察到抗体:MTAB-DM复合物之间的交换。换句话说,Fab片段对一抗具有足够的固有亲和力。

[0131] 实施例3:评估MTAB-DM与靶标识别抗体的结合

[0132] 以下方案可用于评估MTAB-DM与靶标识别抗体的结合,并评估MTAB-DM与靶标识别抗体解离的程度。

[0133] (1) 在预先确定的最佳温度下,用预先确定的最佳浓度的一抗对预固定、预透化且预封闭(例如,用BSA)的样品染色X小时,其中X小时是指研究者计划用于使用靶标识别抗体对样品染色的时间。

[0134] (2) 用PBS在室温下洗涤样品4次,每次5分钟。

[0135] (3) 在室温下用100nM的MTAB-DM对抗体染色10分钟。

[0136] (4) 用PBS在室温下洗涤样品4次,每次5分钟。

[0137] (5) 在室温下用100nM荧光标记的成像物部分对抗体染色10分钟。

[0138] (6) 用PBS在室温下洗涤样品4次,每次5分钟。

[0139] (7) 对样品成像并记下成像条件(光强度、滤光立方体的身份、曝光时间)

[0140] (8) 将样品在温度Temp-X下孵育X小时,然后在温度Temp-Y下孵育Y小时,其中Temp-X和X小时是指研究者计划用于使用靶标识别抗体对样品染色的温度和时间并且其中Y小时的Temp-Y是指在对靶标成像之前在抗体:MTAB-DM复合物洗涤之后的温度和时间。

[0141] (9) 使用与步骤(7)中相同的成像条件再次对样品成像。

[0142] (10) 对荧光图像定量,并比较步骤(7)和步骤(9)的图像中的相同区域的荧光强度。

[0143] 假设没有观察到MTAB-DM的非特异性结合,如果步骤(7)的信号强度基本上(例如,>90%)低于标准免疫荧光的预期,或如果步骤(9)的图像上的荧光强度比步骤(7)的图像上的荧光强度低得超过期望的百分比阈值(Z%),那么可以得出MTAB-DM的亲和力过低的结论。否则可以得出MTAB-DM的亲和力足够高的结论。

[0144] 实施例4:MTAB-DM的进一步验证

[0145] 除了遵循实施例3中的方案之外,还可以使用本实施例中的方案进一步验证MTAB-DM,以确保MTAB-DM的结合不致使抗体失去其紧密结合其靶标的能力。

[0146] (1) 将1.5 μ g一抗与过量的MTAB-DM混合1小时。

[0147] (2) 添加过量的靶标非特异性抗体,以使未结合的MTAB-DM淬灭1小时,然后用PBS稀释混合物,使体积足以覆盖样品,但小于150 μ L。

[0148] (3) 将混合物施加于预固定、预透化且预封闭的样品上,并在室温下在温度Temp-X下孵育X小时。其中Temp-X和X小时是指研究者计划用于使用靶标识别抗体对样品染色的温度和时间。

[0149] (4) 用PBS在室温下洗涤样品4次,每次5分钟。

[0150] (5) 将100nM荧光标记的成像物部分施加于样品并孵育10分钟。

[0151] (6) 用PBS在室温下洗涤样品4次,每次5分钟。

[0152] (7) 对样品成像并记下成像条件(光强度、滤光立方体的身份、曝光时间)

[0153] (8) 将样品在温度Temp-Y下孵育Y小时,其中Y小时的Temp-Y是指在对靶标成像之前在抗体:MTAB-DM复合物洗涤之后的温度和时间。

[0154] (9) 使用与步骤(7)中相同的成像条件再次对样品成像。

[0155] (10) 对荧光图像定量,并比较步骤(7)和步骤(9)的图像中的相同区域的荧光强度。

[0156] 假设没有观察到MTAB-DM的非特异性结合,如果步骤(7)的信号强度基本上(例如,>90%)低于标准免疫荧光的预期,或如果步骤(9)的图像上的荧光强度比步骤(7)的图像上的荧光强度低得超过期望的百分比阈值Z%,那么可以得出以下结论:MTAB-DM的亲合力过低或MTAB-DM与抗体的结合致使失去其稳定结合其靶标的能力-在任一情况下,MTAB-DM可能是不合格的。否则可以得出MTAB-DM的亲合力足够高并且MTAB-DM可以用于该应用的结论。

[0157] 实施例5:实施方案

[0158] 以下编号的项目提供本文描述的某些实施方案。

[0159] 项目1.一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的方法,包括:

[0160] a. 提供至少两种或更多种靶标识别抗体,其各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,所述试剂能够单价结合所述靶标识别抗体

[0161] b. 将样品与所述两种或更多种靶标识别抗体一起孵育,所述抗体各自与相对应的MTAB-DM试剂结合,

[0162] c. 顺序、分批或并行施加与所述MTAB-DM相对应的至少两个成像物部分,

[0163] d. 顺序、分批或并行地对所述至少两个成像物部分成像。

[0164] 项目2.根据项目1所述的方法,其中所述MTAB包括蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。

[0165] 项目3.根据项目1-2中任一项所述的方法,其中所述DM(对接部分)和所述成像物部分包含核酸。

[0166] 项目4.根据项目1-3中任一项所述的方法,其中将各自与相对应的MTAB-DM试剂结合的所有所述靶标识别抗体同时与所述样品一起孵育。

[0167] 项目5.根据项目1-4中任一项所述的方法,其中所有所述成像物部分顺序施加并且所述成像顺序发生。

[0168] 项目6.根据项目1-4中任一项所述的方法,其中所有所述成像物部分并行施加并且所述成像并行发生。

[0169] 项目7.根据项目1-4中任一项所述的方法,其中所述成像物部分分批施加,其中至少一批具有两个或更多个成像物部分,并且所述方法具有至少两个批次,并且其中所述成

像发生在至少两个批次中。

[0170] 项目8.根据项目1-8中任一项所述的方法,其中每个成像物部分用不同的可观察部分标记。

[0171] 项目9.根据项目1-5中任一项所述的方法,其中每个成像物部分用相同的可观察部分标记。

[0172] 项目10.根据项目1-5或7中任一项所述的方法,其中所述成像物部分中的一些用所述相同的可观察部分标记,并且所述成像物部分中的一些用不同的可观察部分标记。

[0173] 项目11.根据项目1-10中任一项所述的方法,其中在将所述靶标识别抗体与所述样品一起孵育之前,使用过量的MTAB-DM以防止过量的游离靶标识别抗体。

[0174] 项目12.根据项目1-11中任一项所述的方法,其中在将所述靶标识别抗体与所述样品一起孵育之前,使用超滤或凝胶过滤移除游离的MTAB-DM。

[0175] 项目13.根据项目1-12中任一项所述的方法,其中将非特异性抗体添加至染色、洗涤和/或成像缓冲液中。

[0176] 项目14.根据项目13所述的方法,其中所述非特异性抗体是来自与所述靶标识别抗体相同的宿主物种的抗体。

[0177] 项目15.根据项目14所述的方法,其中所述非特异性抗体是存在于正常血清(来自未用任何靶蛋白免疫的动物)中的多克隆抗体。

[0178] 项目16.根据项目14所述的方法,其中所述非特异性抗体是针对所述样品中不存在的蛋白质的单克隆抗体。

[0179] 项目17.根据项目1-16中任一项所述的方法,其中所述成像物部分直接结合所述对接部分。

[0180] 项目18.根据项目1-17中任一项所述的方法,其中所述成像物部分通过中间部分间接结合所述对接部分。

[0181] 项目19.一种组合物,其包含:

[0182] a.MTAB;

[0183] b.与所述MTAB共价结合的对接部分

[0184] c.具有第一结构域和第二结构域的中间部分,其中所述第一结构域能够特异性结合所述对接部分并且其中所述第二结构域不能特异性结合所述对接部分。

[0185] 项目20.根据项目19所述的组合物,其中所述MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。

[0186] 项目21.根据项目19-20中任一项所述的组合物,其中所述对接部分和所述中间部分包含核酸。

[0187] 项目22.根据项目21所述的组合物,其中所述对接部分长约5至20个核酸、约8至15个核酸,或长约10至12个核酸。

[0188] 项目23.根据项目21或22中任一项所述的组合物,其中所述中间部分长约10至40个核酸、约16至30个核酸,或长约20至24个核酸。

[0189] 项目24.一种制备用于交换成像的试剂的方法,其包括:

[0190] a.提供MTAB;

[0191] b.将所述MTAB缀合于对接部分以形成MTAB-DM;

- [0192] c. 提供多个中间部分,其各自具有能够特异性结合所述对接部分的第一结构域和不能特异性结合所述对接部分的第二结构域;
- [0193] d. 将所述多个中间部分与所述MTAB-DM配混。
- [0194] 项目25. 根据项目24所述的方法,其中所述MTAB为蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或单价抗体片段。
- [0195] 项目26. 根据项目24-25中任一项所述的方法,其中所述对接部分和所述中间部分包含核酸。
- [0196] 项目27. 根据项目26所述的方法,其中所述对接部分长约5至20个核酸、约8至15个核酸,或长约10至12个核酸。
- [0197] 项目28. 根据项目26或27中任一项所述的方法,其中所述中间部分长约10至40个核酸、约16至30个核酸,或长约20至24个核酸。
- [0198] 项目29. 根据项目24-28中任一项所述的方法,其中所述多个中间部分在分批反应中与所述MTAB-DM配混。
- [0199] 项目30. 根据项目24-28中任一项所述的方法,其中所述多个中间部分与所述MTAB-DM单独配混。
- [0200] 项目31. 一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的试剂盒,其包括:
- [0201] a. 至少两种不同的MTAB-DM试剂,其包含MTAB和能够特异性结合成像物部分的对接部分;
- [0202] b. 任选地至少两种不同的靶标识别抗体;
- [0203] c. 至少两个成像物部分,其用可观察部分标记且能够分别特异性结合所述MTAB-DM试剂,
- [0204] d. 不特异性结合任何所述靶标的任选地至少一种抗体。
- [0205] 项目32. 根据项目31所述的试剂盒,其中所述MTAB选自蛋白A、蛋白G、蛋白A/G、蛋白L或抗体的单价片段。
- [0206] 项目33. 根据项目31-32中任一项所述的试剂盒,其中所述对接部分为核酸对接部分并且所述成像物部分为核酸成像物部分。
- [0207] 项目34. 根据项目32-33中任一项所述的试剂盒,其中所述对接部分为蛋白质、肽或化学化合物,并且所述成像物部分为互补蛋白质、肽或化学化合物。
- [0208] 项目35. 根据项目34所述的试剂盒,其中所述对接部分和成像物部分分别以任一顺序为链霉抗生物素蛋白和生物素。
- [0209] 项目36. 根据项目31-35中任一项所述的试剂盒,其中通过使用链霉抗生物素蛋白或缀合对接部分诸如SNAP-tag®、CLIP-tag™、HaloTag®和AviTag™缀合所述MTAB和对接部分。
- [0210] 项目37. 根据项目31-36中任一项所述的试剂盒,其中所述MTAB-DM能够以约1fM至1nM的亲和力结合至少两种不同的靶标识别抗体。
- [0211] 项目38. 根据项目31-37中任一项所述的试剂盒,其中所述可观察部分为光学可观察部分。
- [0212] 项目39. 根据项目38所述的试剂盒,其中所述可观察部分为P点、荧光蛋白、荧光核酸、Q点、纳米颗粒或SERS报告蛋白。

[0213] 项目40.一种方法,其用于使用根据项目19-23或31-39中任一项所述的试剂进行交换成像。

[0214] 上述书面说明书被视为足以使得本领域技术人员能够实践所述实施方案。上述描述及实例详述某些实施方案且描述发明人所预期的最佳方式。然而,应了解无论上述事项在文中可能如何详述,所述实施方案皆可以许多方式实践且应根据所附权利要求及其任何等效物加以解释。

[0215] 如本文所用,术语约是指数值,包括例如整数、分数和百分比,无论是否明确指示。术语约通常是指本领域技术人员将认为等效于所列举的值(例如,具有相同的功能或结果)的数值范围(例如,所列举的范围的 $\pm 5\%$ - 10%)。当术语诸如至少和约在数值或范围列表之前出现时,所述术语改变列表中提供的所有值或范围。在一些情况下,术语约可包括四舍五入成最接近有效数字的数值。

[0216] 本文引用的所有文档均以引用的方式整体并入本文以用于引用它们的信息。

序列表

- <110> ULTIVUE, INC.
- <120> 促进基于抗体的交换成像的组合物和方法
- <130> 01168-0006-00PCT
- <150> US 62/344,441
- <151> 2016-06-02
- <160> 13
- <170> PatentIn 3.5版
- <210> 1
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对接部分1
- <400> 1
- ttgccacctt cg 12
- <210> 2
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对接部分2
- <400> 2
- taacggtcaa gc 12
- <210> 3
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对接部分3
- <400> 3
- cgtagccctg ac 12
- <210> 4
- <211> 12
- <212> DNA
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 对接部分4

<400> 4
tgctgcctct tt 12
<210> 5
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 成像物部分1
<400> 5
cgaaggtggc aa 12
<210> 6
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 成像物部分2
<400> 6
gcttgaccgt ta 12
<210> 7
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 成像物部分3
<400> 7
gtcagggcta cg 12
<210> 8
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 成像物部分4
<400> 8
aaagaggcag ca 12
<210> 9
<211> 508
<212> PRT
<213> 金黄色葡萄球菌
<400> 9

305	310	315	320
Asn Asp Ala Gln	Ala Pro Lys Glu Glu	Asp Asn Asn Lys	Pro Gly Lys
	325	330	335
Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys	Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys
	340	345	350
Glu Asp Asn Lys	Lys Pro Gly Lys	Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys
	355	360	365
Glu Asp Asn Lys	Lys Pro Gly Lys	Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys
	370	375	380
Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys	Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys
385	390	395	400
Glu Asp Gly Asn	Lys Pro Gly Lys	Glu Asp Gly Asn	Gly Val His Val
	405	410	415
Val Lys Pro Gly	Asp Thr Val Asn	Asp Ile Ala Lys	Ala Asn Gly Thr
	420	425	430
Thr Ala Asp Lys	Ile Ala Ala Asp	Asn Lys Leu Ala	Asp Lys Asn Met
	435	440	445
Ile Lys Pro Gly	Gln Glu Leu Val	Val Asp Lys Lys	Gln Pro Ala Asn
	450	455	460
His Ala Asp Ala	Asn Lys Ala Gln	Ala Leu Pro Glu	Thr Gly Glu Glu
465	470	475	480
Asn Pro Phe Ile	Gly Thr Thr Val	Phe Gly Gly Leu	Ser Leu Ala Leu
	485	490	495
Gly Ala Ala Leu	Leu Ala Gly Arg	Arg Arg Glu Leu	
	500	505	
<210> 10			
<211> 593			
<212> PRT			
<213> G组链球菌属物种			
<400> 10			
Met Glu Lys Glu	Lys Lys Val Lys	Tyr Phe Leu Arg	Lys Ser Ala Phe
1	5	10	15
Gly Leu Ala Ser	Val Ser Ala Ala	Phe Leu Val Gly	Ser Thr Val Phe
	20	25	30
Ala Val Asp Ser	Pro Ile Glu Asp	Thr Pro Ile Ile	Arg Asn Gly Gly
	35	40	45
Glu Leu Thr Asn	Leu Leu Gly Asn	Ser Glu Thr Thr	Leu Ala Leu Arg
	50	55	60
Asn Glu Glu Ser	Ala Thr Ala Asp	Leu Thr Ala Ala	Ala Val Ala Asp

65	70	75	80
Thr Val Ala Ala Ala Ala Ala Glu Asn Ala Gly Ala Ala Ala Trp Glu			
	85	90	95
Ala Ala Ala Ala Ala Asp Ala Leu Ala Lys Ala Lys Ala Asp Ala Leu			
	100	105	110
Lys Glu Phe Asn Lys Tyr Gly Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile			
	115	120	125
Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val			
	130	135	140
Val Glu Ser Ala Lys Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu			
145	150	155	160
Ser Asp Phe Leu Lys Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser			
	165	170	175
Ile Glu Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys			
	180	185	190
Tyr Gly Val Ser Asp Tyr His Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr			
	195	200	205
Val Glu Gly Val Lys Asp Leu Gln Ala Gln Val Val Glu Ser Ala Lys			
	210	215	220
Lys Ala Arg Ile Ser Glu Ala Thr Asp Gly Leu Ser Asp Phe Leu Lys			
225	230	235	240
Ser Gln Thr Pro Ala Glu Asp Thr Val Lys Ser Ile Glu Leu Ala Glu			
	245	250	255
Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly Val Ser Asp			
	260	265	270
Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Lys			
	275	280	285
Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Lys Thr Asp Thr Tyr			
	290	295	300
Lys Leu Ile Leu Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Glu			
305	310	315	320
Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val Phe Lys Gln Tyr Ala Asn			
	325	330	335
Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr			
	340	345	350
Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile Asp Ala Ser Glu Leu Thr			
	355	360	365
Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile Asn Gly Lys Thr Leu Lys			
	370	375	380

Gly Glu Thr Thr Thr Glu Ala Val Asp Ala Ala Thr Ala Glu Lys Val
 385 390 395 400
 Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val Asp Gly Glu Trp Thr Tyr
 405 410 415
 Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr Glu Lys Pro Glu Val Ile
 420 425 430
 Asp Ala Ser Glu Leu Thr Pro Ala Val Thr Thr Tyr Lys Leu Val Ile
 435 440 445
 Asn Gly Lys Thr Leu Lys Gly Glu Thr Thr Thr Lys Ala Val Asp Ala
 450 455 460
 Glu Thr Ala Glu Lys Ala Phe Lys Gln Tyr Ala Asn Asp Asn Gly Val
 465 470 475 480
 Asp Gly Val Trp Thr Tyr Asp Asp Ala Thr Lys Thr Phe Thr Val Thr
 485 490 495
 Glu Met Val Thr Glu Val Pro Gly Asp Ala Pro Thr Glu Pro Glu Lys
 500 505 510
 Pro Glu Ala Ser Ile Pro Leu Val Pro Leu Thr Pro Ala Thr Pro Ile
 515 520 525
 Ala Lys Asp Asp Ala Lys Lys Asp Asp Thr Lys Lys Glu Asp Ala Lys
 530 535 540
 Lys Pro Glu Ala Lys Lys Glu Asp Ala Lys Lys Ala Glu Thr Leu Pro
 545 550 555 560
 Thr Thr Gly Glu Gly Ser Asn Pro Phe Phe Thr Ala Ala Ala Leu Ala
 565 570 575
 Val Met Ala Gly Ala Gly Ala Leu Ala Val Ala Ser Lys Arg Lys Glu
 580 585 590

Asp

<210> 11

<211> 992

<212> PRT

<213> 大消化链球菌

<400> 11

Met Lys Ile Asn Lys Lys Leu Leu Met Ala Ala Leu Ala Gly Ala Ile
 1 5 10 15
 Val Val Gly Gly Gly Ala Asn Ala Tyr Ala Ala Glu Glu Asp Asn Thr
 20 25 30
 Asp Asn Asn Leu Ser Met Asp Glu Ile Ser Asp Ala Tyr Phe Asp Tyr
 35 40 45
 His Gly Asp Val Ser Asp Ser Val Asp Pro Val Glu Glu Glu Ile Asp

50	55	60
Glu Ala Leu Ala Lys	Ala Leu Ala Glu Ala Lys	Glu Thr Ala Lys Lys
65	70	75
His Ile Asp Ser Leu	Asn His Leu Ser Glu Thr Ala Lys Lys Leu Ala	80
	85	90
Lys Asn Asp Ile Asp Ser Ala Thr Thr Ile Asn Ala Ile Asn Asp Ile		95
	100	105
Val Ala Arg Ala Asp Val Met Glu Arg Lys Thr Ala Glu Lys Glu Glu		110
	115	120
Ala Glu Lys Leu Ala Ala Ala Lys Glu Thr Ala Lys Lys His Ile Asp		125
	130	135
Glu Leu Lys His Leu Ala Asp Lys Thr Lys Glu Leu Ala Lys Arg Asp		140
	145	150
Ile Asp Ser Ala Thr Thr Ile Asn Ala Ile Asn Asp Ile Val Ala Arg		155
	165	170
Ala Asp Val Met Glu Arg Lys Thr Ala Glu Lys Glu Glu Ala Glu Lys		160
	180	185
Leu Ala Ala Ala Lys Glu Thr Ala Lys Lys His Ile Asp Glu Leu Lys		175
	195	200
His Leu Ala Asp Lys Thr Lys Glu Leu Ala Lys Arg Asp Ile Asp Ser		190
	210	215
Ala Thr Thr Ile Asp Ala Ile Asn Asp Ile Val Ala Arg Ala Asp Val		205
	225	230
Met Glu Arg Lys Leu Ser Glu Lys Glu Thr Pro Glu Pro Glu Glu Glu		210
	245	250
Val Thr Ile Lys Ala Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly Ser Thr Gln Asn		205
	260	265
Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Ala Lys Ala Val Ser Asp Ala Tyr Ala		200
	275	280
Tyr Ala Asp Ala Leu Lys Lys Asp Asn Gly Glu Tyr Thr Val Asp Val		195
	290	295
Ala Asp Lys Gly Leu Thr Leu Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Lys Glu		190
	305	310
Lys Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys Val Asn Leu Ile		185
	325	330
Phe Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu		180
	340	345
Glu Ala Thr Ala Lys Ala Tyr Ala Tyr Ala Asp Leu Leu Ala Lys Glu		175
	355	360

Asn Gly Glu Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly Asn Thr Ile Asn
 370 375 380
 Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Glu Pro Lys
 385 390 395 400
 Glu Glu Val Thr Ile Lys Val Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly Lys Ile
 405 410 415
 Gln Thr Ala Glu Phe Lys Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Lys Ala
 420 425 430
 Tyr Ala Tyr Ala Asn Leu Leu Ala Lys Glu Asn Gly Glu Tyr Thr Ala
 435 440 445
 Asp Leu Glu Asp Gly Gly Asn Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys
 450 455 460
 Glu Thr Pro Glu Thr Pro Glu Glu Pro Lys Glu Glu Val Thr Ile Lys
 465 470 475 480
 Val Asn Leu Ile Phe Ala Asp Gly Lys Thr Gln Thr Ala Glu Phe Lys
 485 490 495
 Gly Thr Phe Glu Glu Ala Thr Ala Glu Ala Tyr Arg Tyr Ala Asp Leu
 500 505 510
 Leu Ala Lys Val Asn Gly Glu Tyr Thr Ala Asp Leu Glu Asp Gly Gly
 515 520 525
 Tyr Thr Ile Asn Ile Lys Phe Ala Gly Lys Glu Gln Pro Gly Glu Asn
 530 535 540
 Pro Gly Ile Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Asn Ala Lys Glu Glu
 545 550 555 560
 Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Thr Ser Asp Leu Tyr Phe
 565 570 575
 Ser Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys
 580 585 590
 Asn Glu Ile Leu Lys Ala His Ala Gly Glu Glu Thr Pro Glu Leu Lys
 595 600 605
 Asp Gly Tyr Ala Thr Tyr Glu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala
 610 615 620
 Leu Lys Asn Asp Asp Val Asn Asn Ala Tyr Glu Ile Val Gln Gly Ala
 625 630 635 640
 Asp Gly Arg Tyr Tyr Tyr Val Leu Lys Ile Glu Val Ala Asp Glu Glu
 645 650 655
 Glu Pro Gly Glu Asp Thr Pro Glu Val Gln Glu Gly Tyr Ala Thr Tyr
 660 665 670
 Glu Glu Ala Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Leu Lys Glu Asp Lys Val

675	680	685
Asn Asn Ala Tyr Glu Val Val Gln Gly Ala Asp Gly Arg Tyr Tyr Tyr		
690	695	700
Val Leu Lys Ile Glu Asp Lys Glu Asp Glu Gln Pro Gly Glu Glu Pro		
705	710	715
Gly Glu Asn Pro Gly Ile Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Asn Ala		
725	730	735
Lys Glu Asp Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Ser Ser Asp		
740	745	750
Ile Tyr Phe Asp Ala Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu		
755	760	765
Ala Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala His Ala Glu Lys Pro Gly Glu		
770	775	780
Asn Pro Gly Ile Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Asn Ala Lys Glu		
785	790	795
Ala Ala Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Thr Ala Glu Tyr Leu		
805	810	815
Phe Asn Leu Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val Glu Gly Val Glu Ser Leu		
820	825	830
Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala His Ala Glu Lys Pro Gly Glu Asn Pro		
835	840	845
Gly Ile Thr Ile Asp Glu Trp Leu Leu Lys Asn Ala Lys Glu Asp Ala		
850	855	860
Ile Lys Glu Leu Lys Glu Ala Gly Ile Thr Ser Asp Ile Tyr Phe Asp		
865	870	875
Ala Ile Asn Lys Ala Lys Thr Ile Glu Gly Val Glu Ala Leu Lys Asn		
885	890	895
Glu Ile Leu Lys Ala His Lys Lys Asp Glu Glu Pro Gly Lys Lys Pro		
900	905	910
Gly Glu Asp Lys Lys Pro Glu Asp Lys Lys Pro Gly Glu Asp Lys Lys		
915	920	925
Pro Glu Asp Lys Lys Pro Gly Glu Asp Lys Lys Pro Glu Asp Lys Lys		
930	935	940
Pro Gly Lys Thr Asp Lys Asp Ser Pro Asn Lys Lys Lys Lys Ala Lys		
945	950	955
Leu Pro Lys Ala Gly Ser Glu Ala Glu Ile Leu Thr Leu Ala Ala Ala		
965	970	975
Ala Leu Ser Thr Ala Ala Gly Ala Tyr Val Ser Leu Lys Lys Arg Lys		
980	985	990

<210> 12
<211> 23
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 5' ATT0488-标记的寡核苷酸
<400> 12
tctgctttcc cgttatacat cta 23
<210> 13
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 对接部分
<400> 13
tctgctttcc cg 12

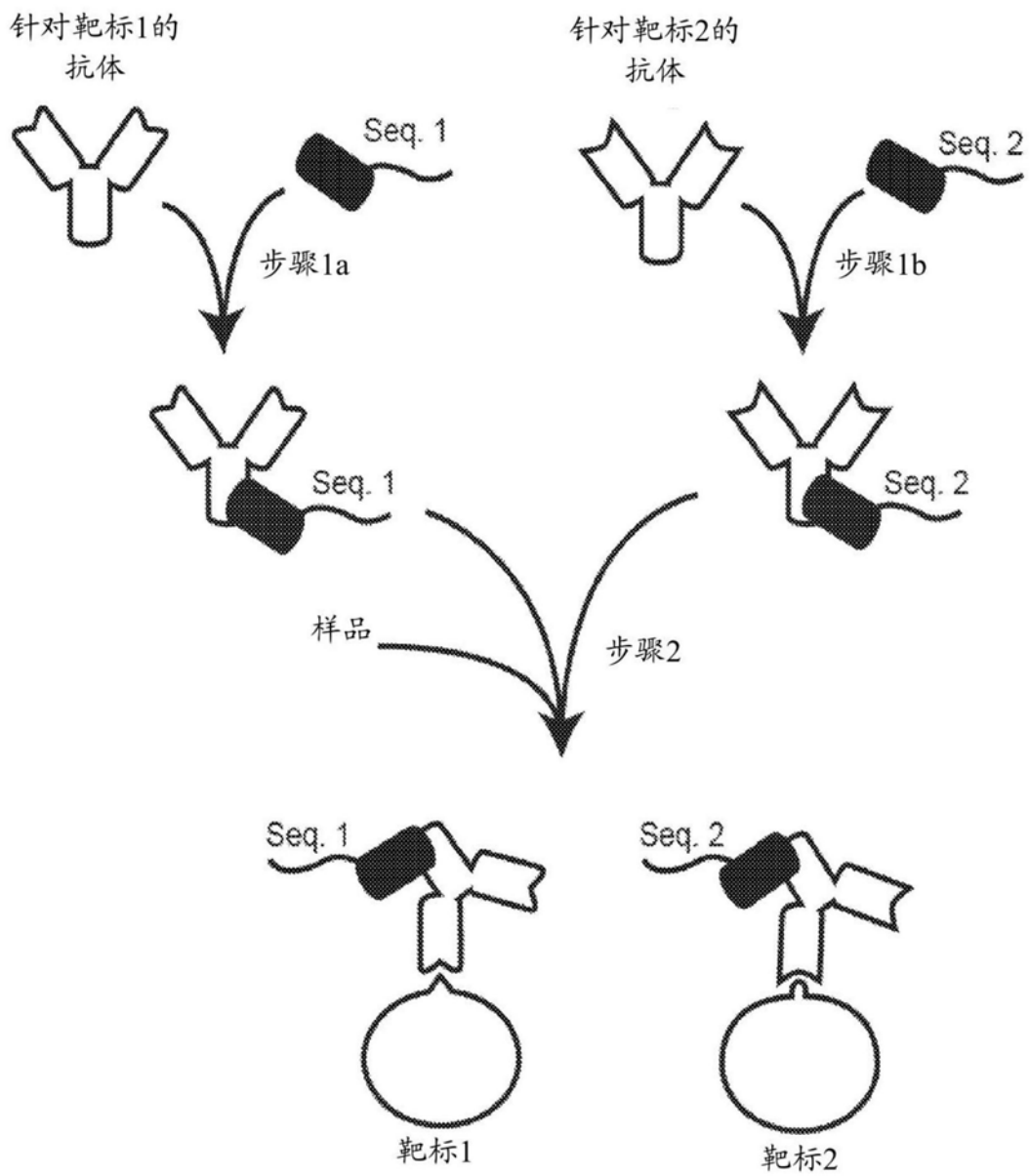


图1

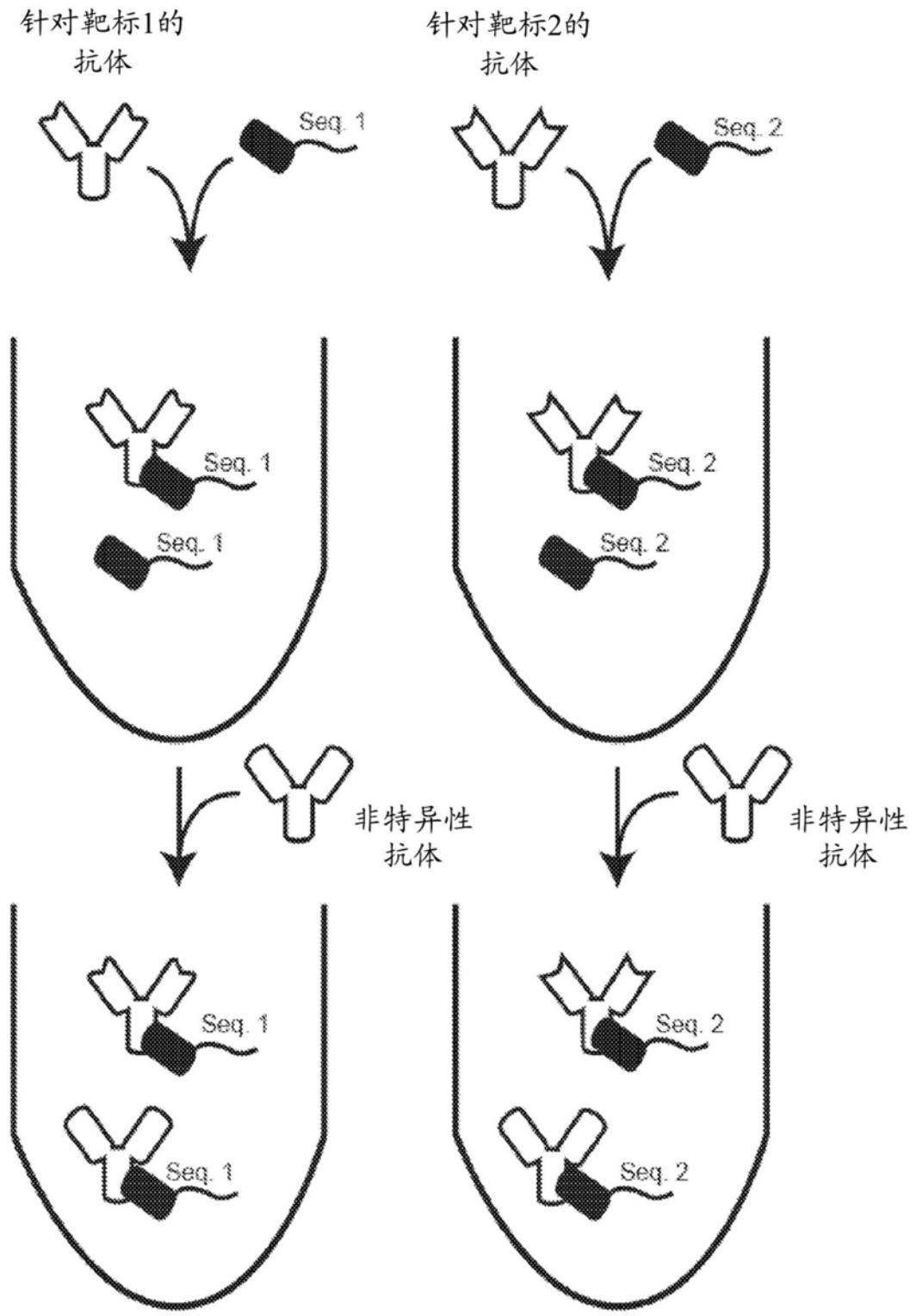


图2

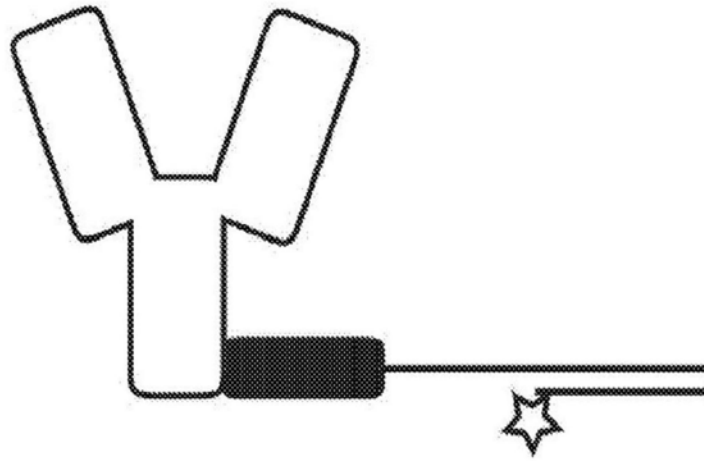


图3A

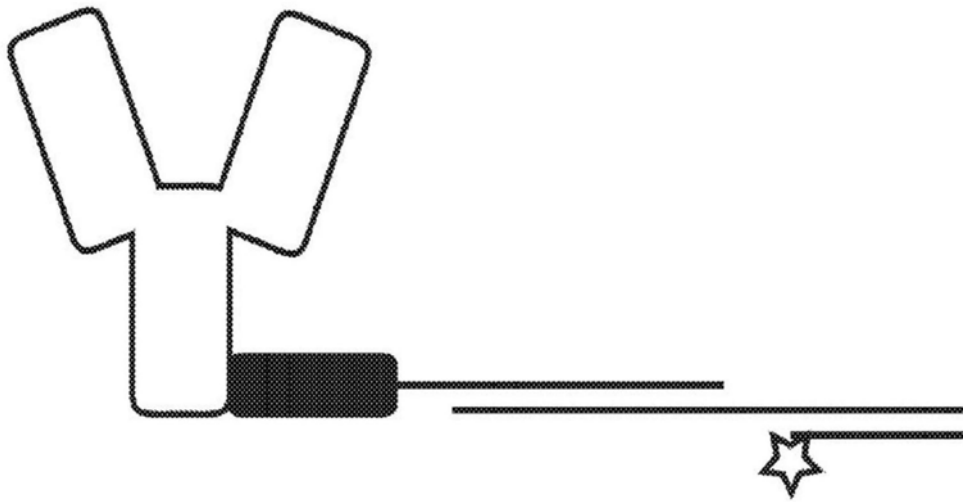


图3B

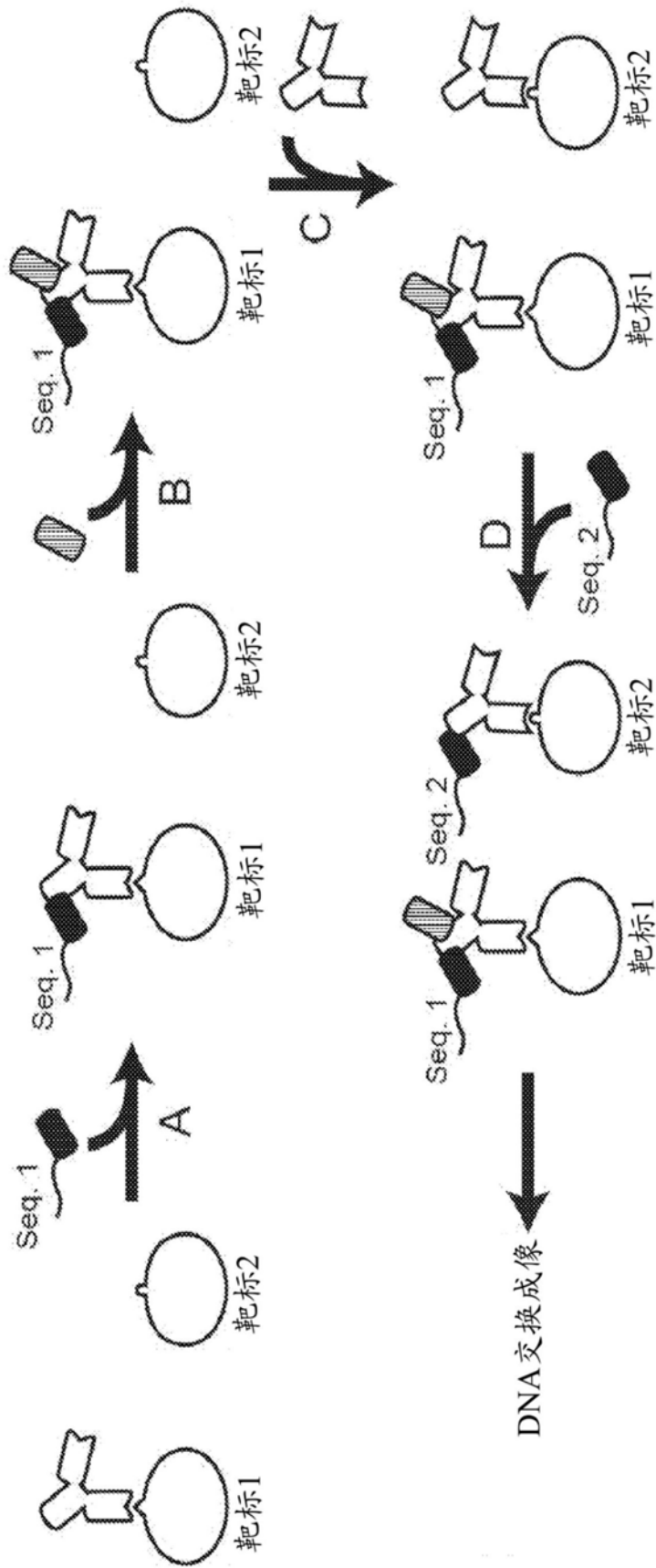


图4

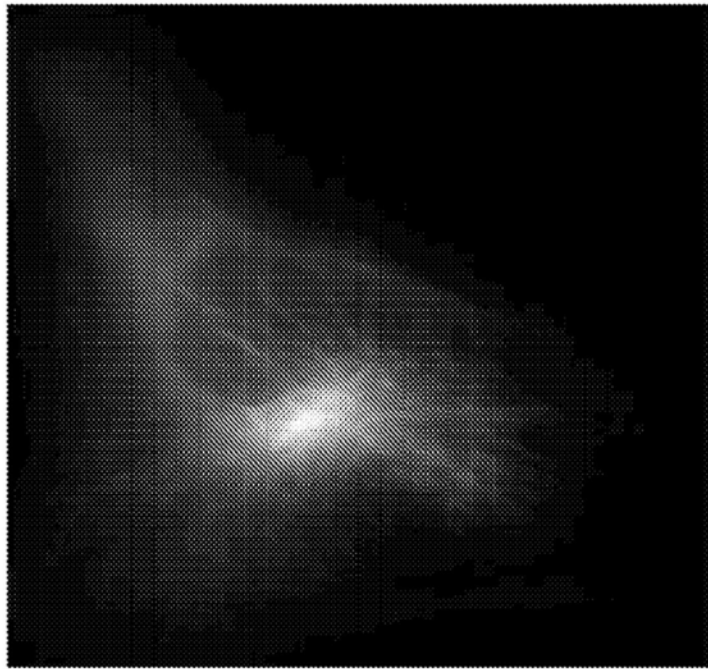


图5

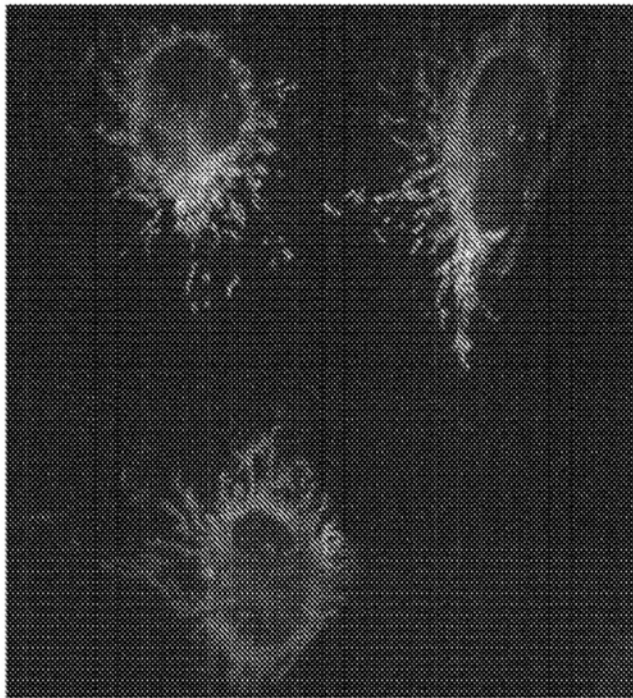


图6A

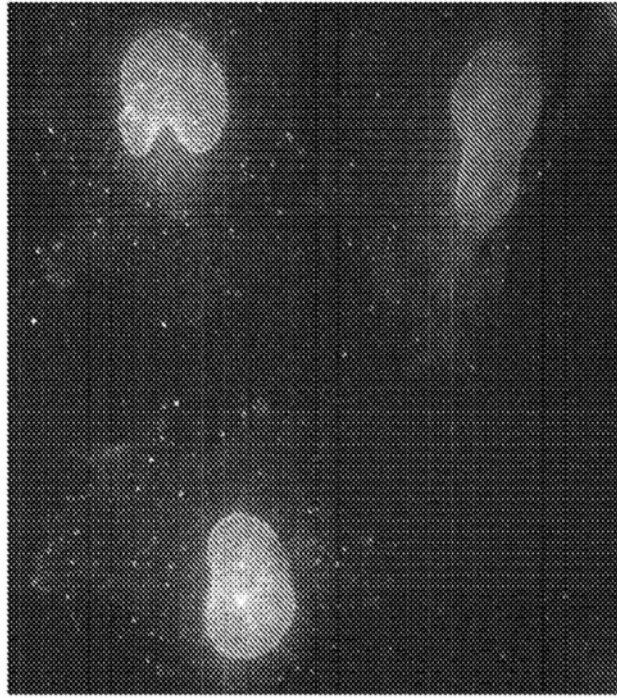


图6B

专利名称(译)	促进基于抗体的交换成像的组合物和方法		
公开(公告)号	CN109891218A	公开(公告)日	2019-06-14
申请号	CN201780047355.8	申请日	2017-06-01
[标]发明人	陈曦		
发明人	陈曦		
IPC分类号	G01N21/64 G01N33/68 G01N33/58 G01N33/533 C07K16/12 C12N15/115		
CPC分类号	C07K16/12 C07K2317/55 G01N33/58 G01N33/6854 A61K47/6849 A61K47/6873 C07K16/42 C07K2317/30 G01N33/536		
代理人(译)	刘晓东		
优先权	62/344441 2016-06-02 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种用于样品中的至少两个靶标的交换成像的方法包括(a)提供至少两种或更多种靶标识别抗体，其各自与相对应的MTAB-DM试剂结合，所述试剂能够单价结合所述靶标识别抗体；(b)将样品与所述两种或更多种靶标识别抗体一起孵育，所述抗体各自与相对应的MTAB-DM试剂结合；(c)顺序、分批或并行施加对应于所述MTAB-DM的至少两个成像物部分；以及(d)顺序、分批或并行地对所述至少两个成像物部分成像。