

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200810033988.6

[51] Int. Cl.

C07K 16/18 (2006.01)

C07K 17/06 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

G01N 33/53 (2006.01)

A61K 49/16 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 8 月 6 日

[11] 公开号 CN 101235088A

[51] Int. Cl. (续)

A61K 47/42 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

[22] 申请日 2008.2.28

[21] 申请号 200810033988.6

[71] 申请人 上海交通大学

地址 200240 上海市闵行区东川路 800 号

[72] 发明人 崔大祥 韩月东 武国军 高峰
贺 蓉

[74] 专利代理机构 上海交达专利事务所
代理人 王锡麟 王桂忠

权利要求书 3 页 说明书 8 页

[54] 发明名称

抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用
方法

[57] 摘要

一种生物工程技术领域的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法，制备方法：引物设计为在氨基末端带有组氨酸尾巴和跨膜肽苏氨酸 - 丙氨酸 - 苏氨酸，上游引物为：5' - CGCTTAATTA-AA AAG CAG ACC GCG ACC CAT ATG ACC CAG GTC CAA CTG CAG - 3'，下游引物为：5' - TTAGTTAGTTACCGGATCCC ACG TTT GAT CTC CAG - 3'，总长度 783bp，然后应用聚合酶链反应获取抗人 γ - 精浆蛋白单链抗体基因片段；使用该基因片段作模板制备抗人 γ - 精浆蛋白单链抗体。该抗体可直接用于建立各种前列腺癌抗原血清学检测试剂盒；也可与纳米粒子如磁性纳米粒子及量子点连接，制备出 γ 精浆蛋白单链抗体包被的磁性纳米粒子与量子点。

1、一种抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备方法，其特征在于，包括以下步骤：

第一步，设计引物，采用聚合酶链技术获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段：引物设计为在氨基末端带有组氨酸尾巴和跨膜肽苏氨酸-丙氨酸-苏氨酸，上游引物为：5' -CGCTTAATTAAA AAG CAG ACC GCG ACC CAT ATG ACC CAG GTC CAA CTG CAG-3'，下游引物为：5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC ACG TTT GAT CTC CAG-3'，总长度 783bp，然后应用聚合酶链反应获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段；

第二步，使用抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段作模板制备抗人 γ -精浆蛋白单链抗体。

2、根据权利要求 1 所述的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备方法，其特征是，所述应用聚合酶链反应获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段，包含两步聚合酶链反应：

第一步，应用聚合酶链反应 1 获取特异性基因片段：10× PCR 缓冲液 3 μ l，2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 3 μ l，上游引物 1 μ l，下游引物 1 μ l，E4B7ScFv 基因质粒模板 2 μ l，25mmol/L 氯化镁 3 μ l，Taq 聚合酶 1 μ l，将灭菌去离子水定容到 30 μ l；聚合酶链反应 1 条件为：94℃ 2 分钟，然后 94℃ 1 分钟，55℃ 1 分钟，72℃ 1 分钟，共 25 个循环，最后 72℃ 7 分钟，产物作为聚合酶链反应 2 模板；

第二步，应用聚合酶链反应 2 获取足够量的线性特异性基因片段：

上游引物：5' -CGCTTAATTAAA AAG CAG ACC GCG-3'，下游引物：5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC-3'，10× PCR 缓冲液 5 μ l，2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 5 μ l，上游引物 1 μ l，下游引物 1 μ l，PCR 反应 1 产物模板 5 μ l，25mmol/L 氯化镁 5 μ l，Taq 聚合酶 1 μ l，将灭菌去离子水定容到 50 μ l；聚合酶链反应 2 条件为：94℃ 4 分钟，然后 94℃ 1 分钟，55℃ 1 分钟，72℃ 1 分钟，共 25 个循环，最后 72℃ 10 分钟，获得的线性抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段作为下一步反应的模板。

3、根据权利要求 1 所述的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备方法，其特

征是,所述使用抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段作模板制备抗人 γ -精浆蛋白单链抗体,具体为:大肠杆菌提取物 12 μ l,反应缓冲液 10 μ l,氨基酸溶液 12 μ l,蛋氨酸 1 μ l,重构缓冲液 5 μ l,模板 10 μ l,总体积 50 μ l,反应条件:30 $^{\circ}$ C 6 小时,获得产物通过包被有抗组氨酸抗体的镍柱快速纯化。

4、一种应用抗人精浆蛋白特异性单链抗体的方法,其特征在于,将抗人 γ -精浆蛋白单链抗体与磁性纳米粒子连接,包括以下步骤:

(1) 制备树形分子包裹的磁性纳米粒子

采用常规共沉淀法制备磁性纳米粒子,用胺基硅烷对磁性粒子的表面进行修饰后,获得伯胺基表面的磁性纳米粒子,伯胺基表面的磁性纳米粒子与酯基端的树形分子进行共价结合,形成树形分子包裹的磁性纳米粒子;

(2) 将树形分子包裹的磁性纳米粒子与单链抗体连接成复合物

在戊二醛作用下,树形分子修饰的磁性纳米粒子与抗人 γ 精浆蛋白单链抗体混合,混合条件是: 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的磁性纳米粒子直接混合,在 4 $^{\circ}$ C 反应 10 小时,然后,加入氨基乙醇,在 25 $^{\circ}$ C 搅动反应 2 小时,利用磁铁,分离出单链抗体包被的磁性纳米粒子,在 4 $^{\circ}$ C 保存备用。

5、根据权利要求 4 所述的应用抗人精浆蛋白特异性单链抗体的方法,其特征是,所述的单链抗体包被的磁性纳米粒子,结合酶联免疫反应,用于建立起检测血清中精浆蛋白含量的酶联免疫试剂盒;或结合蛋白芯片技术,用于建立起检测血清中精浆蛋白含量的蛋白芯片。

6、根据权利要求 4 所述的应用抗人精浆蛋白特异性单链抗体的方法,其特征是,所述的单链抗体包被的磁性纳米粒子,与核磁共振结合起来,作为造影剂,用于前列腺癌原位灶与转移灶的分子显像;或与治疗药物连接,随带治疗药物直接进入前列腺癌细胞中,或在体外施加磁场,增强前列腺癌治疗效果。

7、一种应用抗人精浆蛋白特异性单链抗体的方法,其特征在于,将抗人 γ -精浆蛋白单链抗体与量子点连接,包括以下步骤:

(1) 制备树形分子包裹的碲化镉量子点

常规合成水溶性碲化镉量子点,用胺基硅烷对量子点的表面进行修饰后,获得伯胺基表面的量子点,伯胺基表面的量子点与酯基端的树形分子进行共价结合,形成树形分子包裹的量子点;

(2) 将树形分子包裹的量子点与单链抗体连接成复合物

在戊二醛作用下，树形分子修饰的量子点与抗人 γ 精浆蛋白单链抗体混合，混合条件是： 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的量子点混合，在 4°C 反应 10 小时，然后，加入氨基乙醇，在 25°C 搅动反应 2 小时，采用层析柱过滤方法，分离出单链抗体包被的量子点，避光 4°C 保存备用。

8、根据权利要求 7 所述的应用抗人精浆蛋白特异性单链抗体的方法，其特征是，所述的单链抗体包被的量子点，用于建立检测血清中精浆蛋白含量的荧光免疫定量检测试剂盒，或作为分子显像的造影剂。

抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法

技术领域

本发明涉及的是一种生物工程技术领域的方法，具体是一种带有跨膜肽KTAT的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法。

背景技术

人 γ -精浆蛋白是前列腺癌分泌的特异性抗原，存在于前列腺癌细胞与其转移的癌细胞中，是前列腺癌的特异性标志物。应用碘元素¹³¹标记的抗人精浆蛋白单克隆抗体进行前列腺癌的放射性免疫显像，具有较高的灵敏度和特异性，优于B型超声波与计算机控制的断层扫描检查。但由于鼠源性抗体在人体内应用会导致人抗鼠抗体的产生，因此限制了其临床应用。针对目前的技术不足，制备的单链抗体因其能较好地保持对抗原的亲合性，分子量小，穿透力强，抗原性弱，体内应用时，具有许多亲本抗体不具备的优点，且易与纳米粒子如磁性纳米粒子、量子点等的联接，构建多种新功能纳米探针，在前列腺癌抗原的血清学检测，核磁共振与荧光分子成像，随带药物靶向定位方面具有应用前景。

经对现有技术的文献检索发现，“Biotechnology Progress”（生物技术的进展）2006年22卷第11期1084-1089页上发表的“Expression of single-chain Fv gene specific for γ -seminoprotein by RTS and its biological activity identification”（利用快速翻译系统制备抗 γ -精浆蛋白单链抗体与抗体生物活性鉴定）文章外，未见其它相关报道。在此文章中，我们通过聚合酶链反应技术，获取了人 γ -精浆蛋白单链抗体的基因片段，然后采用快速翻译系统试剂盒，制备出了人 γ -精浆蛋白单链抗体，并通过前列腺癌细胞抗体荧光染色分析，与抗原抗体结合免疫沉淀方法证明制备的人 γ -精浆蛋白单链抗体具有生物活性。我们报道的这种方法，其优势就是在短时间内，能够获得大量抗体，费用低，可以供研究与检测试剂开发用。但是，此单链抗体跨膜效率与结合效率仍未达到最佳水平。本发明针对其不足，在跨膜肽中增加了一个耐氨酸，增加了单链抗体所随带的正电荷，增强了与纳米粒子结合效率与跨越细胞膜效率。

发明内容

本发明的目的在于针对传统前列腺癌抗体制备周期长、抗体分子量大且不易穿越癌细胞膜的不足,提供一种带有跨膜肽的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法。本发明通过引物设计与聚合酶链反应技术,获得了抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段,并采用快速翻译系统技术,制备出具有高生物活性的带有跨膜肽 KTAT 的抗人 γ 精浆蛋白单链抗体。把抗人 γ 精浆蛋白单链抗体与磁性纳米粒子连接,制备成抗人 γ -精浆蛋白单链抗体包被的磁性纳米粒子复合探针;把抗人 γ 精浆蛋白单链抗体与量子点连接,制备成抗人 γ -精浆蛋白单链抗体包被的量子点复合探针,制备的纳米探针可以应用于血清学检测、分子显像方面等。

本发明是通过以下技术方案实现的:

本发明所涉及的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备方法,包括以下步骤:

第一步,设计引物,采用聚合酶链反应技术获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段

为使制备的抗体更易纯化和穿透细胞膜,引物设计为在氨基末端带有组氨酸尾巴和跨膜肽 KTAT (耐氨酸-苏氨酸-丙氨酸-苏氨酸)。上游引物为: 5' -CGCTTAATTAAA CAG ACC AAG GCG ACC CAT ATG ACC CAG GTC CAA CTG CAG-3', 下游引物为: 5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC ACG TTT GAT CTC CAG-3', 总长度 786bp (碱基对)。

应用聚合酶链反应 (PCR) 1 获取特异性基因片段: 10 $\times$ PCR 缓冲液 3 μ l, 2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 3 μ l, 上游引物 1 μ l (10pmol), 下游引物 1 μ l, E4B7ScFv 基因质粒模板 2 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 3 μ l, Taq 酶 1 μ l (2U)。将灭菌去离子水定容到 30 μ l。聚合酶链反应 1 条件为: 94 $^{\circ}$ C 2min, 然后 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min, 共 25 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 7min, 产物作为 PCR 反应 2 模板。

应用聚合酶链反应 (PCR) 2 获取足够量的线性特异性基因片段:

上游引物: 5' -CGCTTAATTAAA CAG ACC GCG-3', 下游引物: 5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC-3'。10 $\times$ PCR 缓冲液 5 μ l, 2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 5 μ l, 上游引物 1 μ l (10pmol), 下游引物 1 μ l, PCR 反应 1 产物模板 5 μ l, 25mmol/L MgCl₂ 5 μ l, Taq 酶 1 μ l (2U)。将灭菌去离子水定容到 50 μ l。聚合酶

链反应 2 条件为：94°C 4min, 然后 94°C 1min, 55°C 1min, 72°C 1min, 共 25 个循环, 最后 72°C 10min。获得的线性抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段作为下一步反应的模板。

第二步, 抗人 γ -精浆蛋白单链抗体的制备

制备反应 3, 使用聚合酶链反应 2 的产物作模板, 制备带有跨膜肽 KTAT 的单链抗体: 大肠杆菌提取物 12 μ l, 反应缓冲液 10 μ l, 氨基酸溶液 12 μ l, 蛋氨酸 1 μ l, 重构缓冲液 5 μ l, 模板 10 μ l, 总体积 50 μ l。反应条件: 30°C 6h。获得产物通过带有抗组氨酸抗体的镍柱快速纯化。以抗组氨酸抗体为一抗, 将表达的蛋白通过 Western 杂交 (检测蛋白活性的常规杂交技术) 进行鉴定活性, 证明单链抗体具有生物活性。

本发明所涉及的带有跨膜肽 KTAT 的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的应用方法, 有两种:

第一种, 抗人 γ -精浆蛋白单链抗体与磁性纳米粒子连接

(1) 制备树形分子包裹的磁性纳米粒子

采用常规共沉淀法制备磁性纳米粒子, 用胺基硅烷对磁性粒子的表面进行修饰后, 获得伯胺基表面的磁性纳米粒子, 伯胺基表面的磁性纳米粒子与酯基端的树形分子进行共价结合, 形成树形分子包裹的磁性纳米粒子。

(2) 将树形分子包裹的磁性纳米粒子与单链抗体连接成复合物

在戊二醛作用下, 树形分子修饰的磁性纳米粒子与抗人 γ 精浆蛋白单链抗体混合, 混合条件是: 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的磁性纳米粒子 (0.05 M 磷酸缓冲液, pH 7.4, 0.04% Tween-20) 混合, 在 4°C 反应 10 小时, 然后, 加入氨基乙醇, 在 25°C 搅动反应 2h。利用磁铁, 分离出单链抗体包被的磁性纳米粒子, 低温保存备用。

第二种, 抗人 γ -精浆蛋白单链抗体与量子点连接

(1) 制备树形分子包裹的碲化镉 (CdTe) 量子点

常规合成水溶性碲化镉 (CdTe) 量子点, 用胺基硅烷对量子点的表面进行修饰后, 获得伯胺基表面的量子点, 伯胺基表面的量子点与酯基端的树形分子进行共价结合, 形成树形分子包裹的量子点。

(2) 将树形分子包裹的量子点与单链抗体连接成复合物

在戊二醛作用下, 树形分子修饰的量子点与抗人 γ 精浆蛋白单链抗体混合, 混合条件是: 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的量子点 (0.05 M 磷酸缓冲液, pH 7.4, 0.04% Tween-20) 混合, 在 4°C 反应 10 小时, 然后, 加入氨基乙醇, 在 25°C 搅动反应 2h。采用层析柱过滤方法, 分离出单链抗体包被的量子点, 避光低温保存备用。

本发明上述的单链抗体包被的磁性纳米粒子, 可以结合酶联免疫反应, 建立起检测血清中精浆蛋白含量的酶联免疫试剂盒; 可以结合蛋白芯片技术, 建立起检测血清中精浆蛋白含量的蛋白芯片; 也可与核磁共振结合起来, 作为造影剂, 用于前列腺癌原位灶与转移灶的分子显像; 也可与治疗药物连接, 随带治疗药物直接进入前列腺癌细胞中, 发挥治疗作用, 也可在体外施加磁场, 增强前列腺癌治疗效果。

本发明上述的单链抗体包被的量子点, 因为量子点是个带有荧光信号的纳米粒子, 单链抗体包被的量子点可用于建立检测血清中精浆蛋白含量的荧光免疫定量检测试剂盒; 也可作为分子显像的造影剂。

与现有技术相比, 本发明制备的 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子与量子点, 具有以下优势: 体积小, 灵敏度显著提高, 既具有识别精浆蛋白的特异性, 又具有磁性纳米粒子或量子点的特性, 是一种技术集成创新, 可开发成前列腺癌早期分子影像试剂盒, 血清学免疫检测试剂盒, 也可用于前列腺癌纳米靶向试剂, 在前列腺癌细胞早期检测方面具有重要应用前景。

具体实施方式

下面对本发明的实施例作详细说明: 本实施例在以本发明技术方案为前提下进行实施, 给出了详细的实施方式和具体的操作过程, 但本发明的保护范围不限于下述的实施例。

实施例 1

根据上述技术方案, 通过聚合酶链反应 1 与聚合酶链反应 2, 结合制备反应 3, 制备出了抗 γ 精浆蛋白单链抗体, 具体步骤如下:

第一步, 设计引物, 采用聚合酶链反应技术获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段

为使制备的抗体更易纯化和穿透细胞膜, 引物设计为在氨基末端带有组氨酸

尾巴和跨膜肽 KTAT（耐氨酸-苏氨酸-丙氨酸-苏氨酸）。上游引物为：5' -CGCTTAATTAAA CAG ACC AAG GCG ACC CAT ATG ACC CAG GTC CAA CTG CAG-3'，下游引物为：5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC ACG TTT GAT CTC CAG-3'，总长度 783bp（碱基对）。

应用聚合酶链反应 1 获取特异性基因片段：10× PCR 缓冲液 3μl，2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 3μl，上游引物 1μl (10pmol)，下游引物 1μl，E4B7ScFv 基因质粒模板 2μl，25mmol/L MgCl₂ 3μl，Taq 酶 1μl (2U)。将灭菌去离子水定容到 30μl。PCR 反应 1 条件为：94℃ 2min，然后 94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min，共 25 个循环，最后 72℃ 7min，产物作为 PCR 反应 2 模板。

应用聚合酶链反应 2 获取足够量的线性特异性基因片段：

上游引物：5' -CGCTTAATTAAA AAG CAG ACC GCG-3'，下游引物：5' -TTAGTTAGTTACCGGATCCC-3'。10× PCR 缓冲液 5μl，2.5mmol/L 碱磷酸脱氧核苷酸 5μl，上游引物 1μl (10pmol)，下游引物 1μl，PCR 反应 1 产物模板 5μl，25mmol/L MgCl₂ 5μl，Taq 酶 1μl (2U)。将灭菌去离子水定容到 50μl。PCR 反应 1 条件为：94℃ 4min，然后 94℃ 1min，55℃ 1min，72℃ 1min，共 25 个循环，最后 72℃ 10min。获得的线性抗人γ-精浆蛋白单链抗体基因片段作为下一步反应的模板。

第二步，抗人γ-精浆蛋白单链抗体的制备

制备反应 3，使用聚合酶链反应 2 的产物作模板，制备单链抗体：大肠杆菌提取物 12μl，反应缓冲液 10μl，氨基酸溶液 12μl，蛋氨酸 1μl，重构缓冲液 5μl，模板 10μl，总体积 50μl。反应条件：30℃ 6h。获得产物通过带有抗组氨酸抗体的镍柱快速纯化，获取抗γ 精浆蛋白单链抗体。

采用 Western 杂交（蛋白质活性杂交鉴定技术）方法，在约 24.8kd(千道尔顿)处出现明显的结合条带，证明制备的单链抗体具有生物活性。

按照技术方案，制备单链抗体修饰的磁性纳米粒子，具体步骤如下：

（1）制备树形分子包裹的磁性纳米粒子

采用常规共沉淀法制备磁性纳米粒子，用胺基硅烷对磁性粒子的表面进行修饰后，获得伯胺基表面的磁性纳米粒子，伯胺基表面的磁性纳米粒子与酯基端的树形分子进行共价结合，形成树形分子包裹的磁性纳米粒子。

(2) 将树形分子包裹的磁性纳米粒子与单链抗体连接成复合物

在戊二醛作用下, 树形分子修饰的磁性纳米粒子与抗人 γ 精浆蛋白单链抗体混合, 混合条件是: 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的磁性纳米粒子在 0.05 M 磷酸缓冲液中混合, 在 4°C 反应 10 小时, 然后, 加入氨基乙醇, 在 25°C 搅动反应 2h。利用磁铁, 分离出单链抗体包被的磁性纳米粒子, 低温保存备用。

制备的单链抗体修饰的磁性纳米粒子, 加入到培养的前列腺癌细胞株 (LNCaP) 细胞中, 采用电镜观察, 证实单链抗体修饰的磁性纳米粒子位于前列腺癌细胞内, 而加入到白血病细胞株 (HL-60) 细胞中, 则未发现精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子位于细胞内, 表明精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子具有特异性识别前列腺癌细胞的功能。进入前列腺癌细胞的磁性粒子, 可以利用磁铁吸附的方法, 把前列腺癌细胞分离出来。也可在细胞外施加高强度磁场, 利用磁性粒子产热功能, 杀死癌细胞。

实施例 2

采用采用与实施例 1 中相同的技术手段, 制备出具有生物活性的带有跨膜肽 KTAT 的抗精浆蛋白单链抗体, 然后与树形分子修饰的碲化镉量子点溶液混合, 反应的条件为: 1ml 0.85mg/ml 单链抗体与 1ml 2.5mg/ml 树形分子修饰的量子点 (0.05 M 磷酸缓冲液, pH 7.4, 0.04% Tween-20) 混合, 在 4°C 反应 10 小时, 然后, 加入氨基乙醇, 在 25°C 搅动反应 2h。采用层析柱过滤方法, 分离出单链抗体包被的量子点。然后, 取 5 μ l 单链抗体包被的量子点加入到培养的前列腺癌细胞株 LNCaP 细胞瓶与对照的胃癌细胞株 7901 中, 共同培养 1 小时, 然后用磷酸缓冲液 (pH7.4) 反复冲洗 4 次, 再在荧光显微镜下观察, 可以看到前列腺癌细胞带有荧光信号, 单链抗体包被的量子点进入到癌细胞中; 而在胃癌细胞株 7901 中看不到荧光信号, 表明精浆蛋白单链抗体修饰的量子点具有特异性识别前列腺癌细胞能力, 可用于前列腺癌细胞的鉴定。

实施例 3

采用与实施例 1 中相同的技术手段, 制备出带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体, 然后与树形分子修饰的磁性纳米粒子连接, 制备出抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子。采用注射 200 μ l 前列腺癌细胞株 LNCaP 细胞到裸鼠背

部皮下，饲养 2 周，可看到肿瘤形成。然后，把制备的抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子直接注射进入裸鼠尾静脉，4 小时后，在核磁共振下，可以看到磁性纳米粒子聚集在前列腺癌部位，表明抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子可用作前列腺癌造影剂。

实施例 4

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出了带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体，然后与树形分子修饰的碲化镉量子点连接，制备出抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的碲化镉量子点。采用注射 200 μ l 前列腺癌细胞株 LNCaP 细胞到裸鼠背部皮下，饲养 2 周，可看到肿瘤形成。然后，把制备的抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的量子点直接注射进入裸鼠尾静脉，3 小时后，在荧光显微镜下可看到量子点聚集在前列腺癌部位，也可用手提式紫外灯照射，可以看到前列腺癌部位呈现出荧光信号，表明抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的量子点可以用于前列腺癌分子显像。

实施例 5

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出了带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体，然后与树形分子修饰的碲化镉量子点连接，制备出抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的碲化镉量子点。先制备出膜芯片，把前列腺癌抗原 SPA 抗体固定到膜芯片表面，然后加入待测血清，充分反应 1 小时，然后洗膜芯片表面，最后滴加抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的碲化镉量子点进入膜芯片表面，反应 30 分钟，然后洗膜，去掉未结合的抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的碲化镉量子点，然后利用荧光信号检测仪，可定量检测出荧光信号，可进一步计算出血清中精浆蛋白抗原浓度。

实施例 6

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体，与传统的酶联免疫检测方法结合，可直接建立前列腺癌抗原血清学检测试剂盒，如酶联免疫检测试剂盒，蛋白质芯片检测试剂盒，胶体金检测试剂盒或试纸条。

实施例 7

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白

单链抗体，然后制备出精浆蛋白单链抗体修饰的磁性纳米粒子复合物，可作为前列腺癌核磁共振造影剂、前列腺癌磁热治疗的靶向递送药物载体，也可用于血液中前列腺癌细胞的快速分类，用于流式细胞仪分析。

实施例 8

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体，然后制备出抗 γ 精浆蛋白单链抗体修饰的量子点，利用其荧光特性，结合荧光免疫检测方法，可建立前列腺癌抗原荧光免疫检测试剂盒，也可作为捕获探针，用于捕获前列腺癌细胞，也可用于前列腺癌分子显像。

实施例 9

采用与实施例 1 中相同的技术手段，制备出带有跨膜肽 KTAT 的抗 γ 精浆蛋白单链抗体，抗 γ -精浆蛋白单链抗体可与其它纳米粒子如金粒子等连接，或其它治疗纳米药物如干扰素等连接，制备成纳米复合物或纳米药物，可用于前列腺癌治疗。

专利名称(译)	抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法		
公开(公告)号	CN101235088A	公开(公告)日	2008-08-06
申请号	CN200810033988.6	申请日	2008-02-28
[标]申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
当前申请(专利权)人(译)	上海交通大学		
[标]发明人	崔大祥 韩月东 武国军 高峰 贺蓉		
发明人	崔大祥 韩月东 武国军 高峰 贺蓉		
IPC分类号	C07K16/18 C07K17/06 C12N15/13 C12N15/70 G01N33/53 A61K49/16 A61K47/42 A61P35/00		
代理人(译)	王锡麟 王桂忠		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种生物工程技术领域的抗人精浆蛋白特异性单链抗体的制备及应用方法，制备方法：引物设计为在氨基末端带有组氨酸尾巴和跨膜肽苏氨酸 - 丙氨酸 - 苏氨酸，上游引物为：5' - CGCTTAATTAAA AAG CAG ACC GCG ACC CAT ATG ACC CAG GTC CAA CTG CAG - 3'，下游引物为：5' - TTAGTTAGTTACCGGATCCC ACG TTT GAT CTC CAG - 3'，总长度783bp，然后应用聚合酶链反应获取抗人 γ -精浆蛋白单链抗体基因片段；使用该基因片段作模板制备抗人 γ -精浆蛋白单链抗体。该抗体可直接用于建立各种前列腺癌抗原血清学检测试剂盒；也可与纳米粒子如磁性纳米粒子及量子点连接，制备出 γ 精浆蛋白单链抗体包被的磁性纳米粒子与量子点。