

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷

G01N 33/53



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02811677.1

G01N 33/569 G01N 33/545

G01N 33/563 C12Q 1/68

C07K 17/08 A61K 38/16

A61K 39/04 A01N 65/00

[43] 公开日 2004 年 8 月 25 日

[11] 公开号 CN 1524180A

[22] 申请日 2002.4.10 [21] 申请号 02811677.1

[30] 优先权

[32] 2001. 4. 10 [33] US [31] 60/282,926

[86] 国际申请 PCT/US2002/011612 2002.4.10

[87] 国际公布 WO2002/083918 英 2002.10.24

[85] 进入国家阶段日期 2003.12.10

[71] 申请人 纽约市哥伦比亚大学信托人

地址 美国纽约市

[72] 发明人 王德农

[74] 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任公
司

代理人 程金山

权利要求书 11 页 说明书 70 页 附图 16 页

[54] 发明名称 新型微列阵及其使用方法

[57] 摘要

本发明提供新型基于硝化纤维或基于水凝胶的微阵列以及制备和使用它们(1)检测样品中一种或多种试剂的存在(2)确定样品中一种或多种试剂的量(3)确定受试者是否受一种疾病的折磨(4)确定已知与第一种化合物特异结合的试剂是否同样与第二种化合物特异结合的方法。本发明还提供包含即用微列阵的试剂盒。本发明另外提供能够与糖酸聚合物特异结合的抗体,所述糖酸聚合物不仅存在于哺乳动物巨噬细胞或肠上皮细胞表面,而且存在于细菌细胞表面。最后,本发明提供使用即用抗体的诊断方法。

I S S N 1 0 0 8 - 4 2 7 4

1. 一种微阵列，其包含在它表面多个离散位置固定众多化合物的一种
5 种硝化纤维或水凝胶载体，其中（a）在至少一个离散位置固定选自糖酸
聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）所述在每个
离散位置的化合物组成不同于所述在至少一个其它离散位置的化合物
组成。

2. 权利要求 1 的微阵列，其中所述硝化纤维或水凝胶载体选自芯片，
10 载玻片，过滤器和平板。

3. 一种微阵列，其包含众多硝化纤维或水凝胶或水凝胶载体，每种
载体在它的表面单个离散位置固定一种或众多化合物或在它的表面多个
离散位置固定众多化合物，其中（a）至少在一个离散位置固定选自糖酸
15 聚合物，不可溶性蛋白，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）所述在每个
离散位置化合物的组成不同于所述在至少一个其它离散位置化合物的
组成。

4. 权利要求 3 的微阵列，其中所述硝化纤维或水凝胶或水凝胶载体
选自芯片，载玻片，过滤器，平板和珠。

5. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中所述离散位置的数量至少是 100。

20 6. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中所述离散位置的数量至少是 1000。

7. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中所述离散位置的数量至少是
10,000。

8. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中所述糖酸聚合物是固定在至少一个
位置。

25 9. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中不溶性蛋白质是固定在至少一个
位置。

10. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中凝集素是固定在至少一个位置。

11. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中抗体是固定在至少一个位置。

12. 权利要求 1 或 3 的微阵列，其中在每个位置只固定一种化合物。

13. 权利要求 1 或 3 的微阵列, 其中在至少一个位置固定众多化合物。
14. 权利要求 1 或 3 的微阵列, 其中所述微阵列在它的表面固定选自糖酸聚合物, 不溶性蛋白质, 凝集素和抗体的两种或多种化合物。
15. 权利要求 1 或 3 的微阵列, 其中所述微阵列在它的表面另外固定
5 选自可溶性蛋白质, 核酸和小分子的一种化合物。
16. 一种制品, 其包含在它的表面多个离散位置固定葡聚糖的一种硝化纤维或水凝胶载体。
17. 权利要求 16 的制品, 其中所述葡聚糖是 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖。
18. 一种包含权利要求 16 的制品的微阵列, 其中在每个离散位置的葡
10 聚糖上固定至少一种化合物, 所述在每个离散位置的化合物组成不同于所述在至少一个其它离散位置的化合物组成。
19. 权利要求 18 的微阵列, 其中所述硝化纤维或水凝胶载体选自芯片, 载玻片, 过滤器和平板。
20. 一种制品, 其包含众多硝化纤维或水凝胶载体, 每个载体在它的
15 表面一个或多个离散位置上固定葡聚糖。
21. 权利要求 20 的制品, 其中所述葡聚糖是 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖。
22. 一种包含权利要求 20 的制品的微阵列, 其中在每个离散位置的葡聚糖上固定至少一种化合物, 所述在每个离散位置的化合物组成不同于所述在至少一个其它离散位置的化合物组成。
- 20 23. 权利要求 22 的微阵列, 其中所述硝化纤维或水凝胶载体选自芯片, 载玻片, 过滤器, 平板和珠。
24. 权利要求 18 或 22 的微阵列, 其中所述离散位置的数目至少为 100。
25. 权利要求 18 或 22 的微阵列, 其中所述离散位置的数目至少为
25 1000。
26. 权利要求 18 或 22 的微阵列, 其中所述离散位置的数目至少为 10,000。
27. 权利要求 18 或 22 的微阵列, 其中在至少一个位置的所述葡聚糖上固定糖酸聚合物。于
- 30 28. 权利要求 18 或 22 的微阵列, 其中在至少一个位置的所述葡聚糖

上固定不溶性蛋白质。

29. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中在至少一个位置的所述葡聚糖上固定凝集素。

5 30. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中在至少一个位置的所述葡聚糖上固定抗体。

31. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中在每个位置只固定一种化合物。

32. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中在至少一个位置固定众多化合物。

10 33. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中所述微阵列已经将选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的两种或多种化合物固定于葡聚糖上。

34. 权利要求 18 或 22 的微阵列，其中所述微阵列已经在它的表面固定选自可溶性蛋白质，核酸和小分子的一种化合物。

15 35. 一种检测样品中与一种或多种已知糖酸聚合物特异结合的一种或多种试剂存在的方法，该方法包含：

(a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中每种已知的糖酸聚合物固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与它在所述微阵列中相应的糖酸聚合物特异结合的条件下进行；和

20 (b) 确定在所述微阵列中任何已知的糖酸聚合物是否具有特异结合到那里的一种试剂，

从而检测所述样品中所述一种或多种试剂的存在。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗体。

25 37. 权利要求 35 的方法，其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。

38. 权利要求 35 的方法，其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗体。

39. 权利要求 35 的方法，其中所述方法包含检测所述样品中众多试剂的存在，所述试剂的每种与众多糖酸聚合物结合。

30 40. 权利要求 35 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试

剂的量，所述试剂的每种与一种糖酸聚合物结合。

41. 一种检测样品中与一种或多种已知不溶性蛋白质特异结合的一种或多种试剂的存在的方法，该方法包含：

5 (a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与它在所述微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和

(b) 确定在所述微阵列中任何已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的一种试剂，

10 从而检测所述样品中所述一种或多种试剂的存在。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述试剂是与一种疾病相关的抗体。

43. 权利要求 41 的方法，其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。

44. 权利要求 41 的方法，其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗体。

15 45. 权利要求 41 的方法，其中所述方法包含检测所述样品中众多试剂的存在，所述试剂的每种与众多不溶性蛋白质结合。

46. 权利要求 41 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量，所述试剂的每种与一种不溶性蛋白质结合。

20 47. 一种检测样品中与一种或多种已知抗体或凝集素特异结合的一种或多种试剂的存在的方法，该方法包含：

(a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与它在所述微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和

25 (b) 确定在所述微阵列中任何已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的一种试剂，

从而检测所述样品中所述一种或多种试剂的存在。

48. 权利要求 47 的方法，其中所述试剂是与一种疾病相关的抗体。

49. 权利要求 47 的方法，其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。

30 50. 权利要求 47 的方法，其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗

体。

51. 权利要求 47 的方法，其中所述方法包含检测所述样品中众多试剂的存在，所述试剂的每种与众多凝集素或抗体结合。

52. 权利要求 47 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量，所述试剂的每种与一种凝集素或抗体结合。

53. 一种测定样品中一种或多种试剂的量的方法，所述试剂的每种与一种或多种已知的糖酸聚合物特异结合，该方法包含：

(a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中每种已知的糖酸聚合物固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与它在所述微阵列中相应的糖酸聚合物特异结合的条件下进行；

(b) 对于在所述微阵列中每种已知的糖酸聚合物，测定特异性结合到那里的试剂的量；和

(c) 将这样测定的量与已知标样比较，
从而确定所述样品中所述一种或多种试剂的量。

54. 权利要求 53 的方法，其中所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗体。

55. 权利要求 53 的方法，其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。

56. 权利要求 53 的方法，其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗体。

57. 权利要求 53 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量，所述试剂的每种与众多糖酸聚合物结合。

58. 权利要求 53 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量，所述试剂的每种与一种糖酸聚合物结合。

59. 一种测定样品中一种或多种试剂的量的方法，所述试剂的每种与一种或多种已知的不溶性蛋白特异结合，该方法包含：

a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与它在所述微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；

- b) 对于在所述微阵列中每种已知的不溶性蛋白, 测定特异性结合到那里的试剂的量; 和
- c) 将这样测定的量与已知标样比较, 从而确定所述样品中所述一种或多种试剂的量。
- 5 60. 权利要求 59 的方法, 其中所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗体。
61. 权利要求 59 的方法, 其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。
62. 权利要求 59 的方法, 其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗体。
- 10 63. 权利要求 59 的方法, 其中所述方法包含测定所述样品中众多的量, 所述试剂的每种与众多不溶性蛋白质结合。
64. 权利要求 59 的方法, 其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量, 所述试剂的每种与一种不溶性蛋白质结合。
65. 一种测定样品中一种或多种试剂的量的方法, 所述试剂的每种
- 15 与一种或多种已知的抗体或凝集素结合, 该方法包含:
- (a) 将所述样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触, 其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置, 并且其中所述接触是在允许一种试剂, 如果在所述样品中存在, 与它在所述微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行;
- 20 (b) 对于在所述微阵列中每种已知的抗体或凝集素, 测定特异性结合到那里的试剂的量; 和
- (c) 将这样测定的量与已知标样比较, 从而确定所述样品中所述一种或多种试剂的量。
66. 权利要求 65 的方法, 其中所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗
- 25 体。
67. 权利要求 65 的方法, 其中所述试剂是与一种感染相关的抗体。
68. 权利要求 65 的方法, 其中所述试剂是与一种肿瘤存在相关的抗体。
69. 权利要求 65 的方法, 该方法包含测定所述样品中众多试剂的量,
- 30 所述试剂的每种与众多凝集素或抗体结合。

70. 权利要求 65 的方法，其中所述方法包含测定所述样品中众多试剂的量，所述试剂的每种与一种凝集素或抗体结合。

71. 一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征在于在所述受折磨的受试者中存在或不存在与已知的糖酸聚合物特异结合
5 的一种试剂，该方法包含：

(a) 将来自所述受试者的合适样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中所述已知的糖酸聚合物固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与所述微阵列中已知的糖酸聚合物特异结合的条件下进行；和

10 (b) 确定在所述微阵列中已知的糖酸聚合物是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而确定所述受试者是否受该疾病的折磨。

72. 权利要求 71 的方法，其中所述受试者是人。

73. 权利要求 71 的方法，其中所述疾病是一种炎性疾病。

15 74. 权利要求 73 的方法，其中所述炎性疾病是腹腔疾病。

75. 一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征在于在所述受折磨的受试者中存在或不存在与已知的不溶性蛋白质特异结合的一种试剂，该方法包含：

(a) 将来自所述受试者的合适样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，
20 其中所述已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与所述微阵列中已知的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和

(b) 确定在所述微阵列中已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的一种试剂，
25 从而确定所述受试者是否受该疾病的折磨。

76. 权利要求 75 的方法，其中所述受试者是人。

77. 一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征在于在所述受折磨的受试者中存在或不存在与已知的抗体或凝集素特异结合的一种试剂，该方法包含：

30 (a) 将来自所述受试者的合适样品与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，

其中所述已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在所述样品中存在，与所述微阵列中已知的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和

5 (b) 确定在所述微阵列中已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的一种试剂，

从而确定所述受试者是否受该疾病的折磨。

78. 权利要求 77 的方法，其中所述受试者是人。

79. 权利要求 77 的方法，其中所述疾病是 HIV-1 感染。

80. 一种确定已知与第一种糖酸聚合物特异结合的抗体是否同样与
10 第二种糖酸聚合物特异结合的方法，该方法包含：

(a) 将所述抗体与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中众多糖酸聚合物，除了第一种糖酸聚合物，固定在所述微阵列的多个离散位置，并且其中所述接触是在允许所述抗体与假设在所述微阵列中存在的
15 第一种糖酸聚合物特异结合的条件下进行；和

(b) 确定所述微阵列中除了第一种糖酸聚合物的任何糖酸聚合物是否有特异性结合到那里的抗体，
从而确定所述抗体是否同样特异性结合至第二种糖酸聚合物。

81. 一种确定已知与第一种不溶性蛋白质特异结合的抗体是否同样与
第二种不溶性蛋白质特异结合的方法，该方法包含：

20 a) 将所述抗体与权利要求 1 或 3 的微阵列接触，其中众多不溶性蛋白质，除了第一种不溶性蛋白质，固定在所述微阵列的多个离散位置，并且其中所述接触是在允许所述抗体与假设在所述微阵列中存在的
第一种不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和

(b) 确定所述微阵列中除了第一种不溶性蛋白质的任何不溶性蛋白质
25 是否有特异性结合到那里的抗体，从而确定所述抗体是否同样特异性结合至第二种不溶性蛋白质。

82. 一种制备包含硝化纤维或水凝胶载体的微阵列的方法，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置已经固定众多化合物，该方法包含在适合的条件将所述硝化纤维或水凝胶载体与所述化合物接
30 触，由此 (a) 在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，

凝集素和抗体的一种化合物, 和 (b) 所述在每个离散位置的化合物组成与所述在至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

83. 一种制备包含众多硝化纤维或水凝胶载体的微阵列的方法, 每一种载体在它的表面单个离散位置固定一种或众多化合物或在它的表面多个离散位置固定众多化合物, 该方法包含在适合的条件将所述硝化纤维或水凝胶载体与所述化合物接触, 由此 (a) 在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物, 不溶性蛋白质, 凝集素和抗体的一种化合物, 和 (b) 所述在每个离散位置的化合物组成与所述在至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

84. 一种制备权利要求 16 的制品的方法, 其包含在适合条件下将硝化纤维或水凝胶载体与在多个离散位置的葡聚糖接触。

85. 权利要求 84 的方法, 其还包含将至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖的步骤, 由此所述在每个离散位置的化合物组成不同于所述在至少一个其它离散位置的化合物组成。

86. 一种制备权利要求 20 的制品的方法, 其包含将众多的硝化纤维或水凝胶载体与葡聚糖接触, 由此每个载体它的表面在一个或多个离散位置固定葡聚糖。

87. 权利要求 86 的方法, 其还包含将至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖的步骤, 由此所述在每个离散位置的化合物组成不同于所述在至少一个其它离散位置的化合物组成。

88. 一种包含权利要求 1, 3, 18 或 22 的微阵列的试剂盒和使用说明书。

89. 一种包含权利要求 1, 3, 18 或 22 的微阵列和一种干燥剂的试剂盒。

90. 一种包含浸渍在一种水溶液中的权利要求 1, 3, 18 或 22 的微阵列的试剂盒。

91. 一种用于实施权利要求 71 的方法的试剂盒, 其包含: (a) 一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列, 所述硝化纤维或水凝胶载体它的表面多个离散位置已固定众多的化合物, 其中 (i) 在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的糖酸聚合

物, 和 (ii) 所述在每个离散位置的化合物组成与所述在至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

92. 一种用于实施权利要求 75 的方法的试剂盒, 其包含: (a) 一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列, 所述硝化纤维或水凝胶载体它的表面多个离散位置已固定众多的化合物, 其中 (i) 在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的不溶性蛋白质, 和 (ii) 所述在每个离散位置的化合物组成与所述在至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

93. 一种用于实施权利要求 77 的方法的试剂盒, 其包含: (a) 一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列, 所述硝化纤维或水凝胶载体它的表面多个离散位置已固定众多的化合物, 其中 (i) 在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的抗体或凝集素, 和 (ii) 所述在每个离散位置的化合物组成与所述在至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

94. 一种抗体, 其能够与在哺乳动物巨噬细胞表面存在的糖酸聚合物特异结合, 该糖酸聚合物或其结构模拟物对于细菌细胞也是内源的并存在于该细菌细胞表面。

95. 权利要求 94 的抗体, 其中所述抗体是一种沟型抗体。

96. 权利要求 94 的抗体, 其中所述抗体被称为 4.3. F1 (ATCC 登记号 PTA-3259)。

97. 权利要求 94 的抗体, 其中所述抗体被称为 45.21.1 (ATCC 登记号 PTA-3260)。

98. 一种抗体, 其能够与在哺乳动物肠上皮细胞表面存在的糖酸聚合物特异结合, 该糖酸聚合物或其结构模拟物对于细菌细胞也是内源的并存在于该细菌细胞表面。

99. 权利要求 98 的抗体, 其中所述抗体是一种腔型抗体。

100. 权利要求 98 的抗体, 其中所述抗体被称为 16.4.12E (ATCC 登记号 PTA-3261)。

101. 一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法, 所述疾病其特征在于在受折磨的受试者中巨噬细胞表面存在一种糖酸聚合物, 该糖酸聚

合物或其结构模拟物对于细菌细胞也是内源的并存在于该细菌细胞表面，该方法包含：(a) 将所述受试者的巨噬细胞样品与权利要求 94 的抗体接触；和 (b) 确定该抗体是否与所述样品中的巨噬细胞特异结合，此结合说明所述受试者受该疾病的折磨。

5 102. 权利要求 101 的方法，其中所述受试者是人。

103. 权利要求 101 的方法，其中所述疾病是一种免疫疾病或一种炎症性疾病。

104. 一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征在于在受折磨的受试者中肠上皮细胞表面存在一种糖酸聚合物，该糖酸
10 聚合物或其结构模拟物对于细菌细胞也是内源的并存在于该细菌细胞表面，该方法包含：(a) 将所述受试者的肠上皮细胞样品与权利要求 98 的抗体接触；和 (b) 确定该抗体是否特异性结合至所述样品中的肠上皮细胞，该结合说明所述受试者受该疾病的折磨。

105. 权利要求 104 的方法，其中所述受试者是人。

15 106. 权利要求 104 的方法，其中所述疾病是一种免疫疾病或一种炎症性疾病。

107. 权利要求 106 的方法，其中所述疾病是一种腹腔疾病。

新型微列阵及其使用方法

5

本发明是一个部分继续申请并且要求 2001 年 4 月 10 日提交的美国临时申请 No. 60/282,926 的利益，该申请的内容通过参考结合于本申请。

贯穿本申请，引用了各种参考文献。这些参考文献全部的公开内容通过参考结合于本申请以更充分地描述本发明所属领域的状况。

10 使用从国立卫生研究所在批号 AI45326 下的政府资助进行在此描述的本发明。因此，美国政府具有本发明中的某些权利。

发明背景

基因组学

15 人基因组计划正迅速趋进它的目标：人基因组的完整作图和测序，和其中所有基因的鉴定。从该成就出现的是新一代的生物技术，共同称为“功能基因组学”。这些技术，包括 DNA 芯片（1）和 cDNA 微阵列（2,3），利用由人基因组计划提供的序列信息和遗传物质，结合先进的激光和荧光传感器技术，并利用计算机辅助的大规模数据管理系统。与
20 集中在一个特定基因或它的产物上的传统分子生物学方法不同，这些新方法在全基因组规模上监控基因的表达，并鉴定它们的特征总体模式。生物学研究的范围因此已经从研究单个基因或蛋白质向同时研究多个基因和/或蛋白质扩展。

25 蛋白质组学

蛋白质是最终基因产物，其作为活生物的基本成分。然而，mRNA 表达的量并不总是显示它所编码蛋白质在细胞中的水平。蛋白质分子有它自身的寿命和代谢动力学。存在特化的细胞机器，如蛋白质降解的遍在蛋白依赖性和非依赖性途径，使当它的功能不再需要时蛋白质能够快速更新。新合成的蛋白质的命运同样受在特定氨基酸残基处的翻译后修
30

饰，如磷酸化，糖基化，乙酰化或十四烷基化的显著影响。对于一个特定蛋白，该分子修饰经常是在分化上和/或在发育上调节，确定一种特定功能，或发挥一种结构作用。因此，通常认可没有蛋白质分析将不可能更好地理解基因组的功能。开发蛋白质表达和翻译后修饰的全基因组分析技术是对于科学共同体(4,5)的一个主要挑战。

糖组学 (Glycomics)

含有糖的高分子是基因的二级产物。它们的合成要求多步酶促反应和多步胞内运输，转运和修饰。多个基因帮助含有复合糖的细胞组分的合成。“糖组学”，一个新的科学学科，已经出现，以建立对一个细胞糖类分子的结构，功能，合成和遗传调节的全面理解。

在细胞表面的糖类是丰富的，其作为膜被的糖缀合物或者分泌物存在。这些分子起基本的结构和保护作用。它们在胞间也是丰富的，并作为一种活跃的和动态的能量存储器。

近来研究进一步证明许多重要的信号和调节过程是由糖-配体和它们的受体的相互作用介导(6,7)。在正进行恶性转化的细胞中可发生糖部分的异常表达。这些部分可因此作为用于肿瘤诊断或治疗的分子靶。

微生物的糖分子在建立微生物和它们宿主的生物关系中是重要的(7-9)。这些关系特别包括微生物的宿主识别和由微生物抗原诱导的免疫反应。微生物抗原的糖部分经常作为用于免疫识别的关键结构(10)。对于理解宿主识别和免疫反应的分子机制而言鉴定该决定簇是根本重要的。

现有技术

适合在全基因组规模上监控蛋白表达和鉴定广泛范围的配体-受体相互作用如蛋白质-蛋白质作用，糖-蛋白质作用以及合成小分子和细胞组分相互作用的技术还有待开发。当前用于特定地检测和定量蛋白质或微生物多糖的方法包括基于抗原/抗体的免疫测定。该测定包括(a)传统的直接免疫测定，如免疫扩散，免疫电泳，凝集和免疫沉淀法测定，和(b)近来开发的方法如免疫荧光，放射免疫测定法(RIA)，酶-免疫测定(EIA)和蛋白质印迹测定。这些方法利用抗原抗体相互作用的特异

性。然而，它们是设计用于每次分析一种试剂，因此在单次测定中能够分析的分子的量的方面受到限制。

总而言之，强烈需要一种用于同时研究许多分子的单一技术以发展蛋白质组和糖组学，所述分子它们是蛋白质，糖类或其组合物。

5

发明概述

本发明提供四种微阵列和两种用于制备它的制品。第一种微阵列包含一种硝化纤维或水凝胶载体，其在它的表面多个离散位置已固定众多的化合物，其中（a）在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物、不溶性蛋白，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第二种微阵列包含众多的硝化纤维或水凝胶载体，每种载体在它的表面单个离散位置固定一种或众多化合物或在它表面多个离散位置固定众多化合物，其中（a）至少在一个离散位置固定选自糖酸聚合物、不溶性蛋白，凝集素和抗体的一种化合物，并且（b）每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第一种制品包含具有在其表面多个离散位置固定的葡聚糖的纤维或水凝胶载体。在一个实施方案中该葡聚糖是 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖。

第三种微阵列包含第一种制品，其中至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖，每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第二种制品包含众多的硝化纤维或水凝胶载体，每种载体具有在一个或多个离散位置固定到它表面的葡聚糖。在一个实施方案中该葡聚糖是 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖。

第四种微阵列包含第二种制品，其中至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖，每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

本发明提供三种用于检测样品中试剂存在的方法。第一种方法是检测样品中与一种或多种已知的糖酸聚合物 特异结合的一种或多种试剂存在的方法，其方法包含：（a）将样品与第一种或第二种微阵列接触，其

中每种已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；和（b）确定在微阵列中任何已知的糖酸聚合物 是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多
5 种试剂的存在。

第二种方法是检测样品中与一种或多种已知的不溶性蛋白质特异结合的一种或多种试剂的存在的的方法，其方法包含：（a）将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它
10 在微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和（b）确定在微阵列中任何已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多种试剂的存在。

第三种方法是检测样品中与一种或多种已知的抗体或凝集素特异结合的一种或多种试剂的存在的的方法，其方法包含：（a）将样品与第一种
15 或第二种微阵列接触，其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和（b）确定在微阵列中任何已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多种试剂的存在。

20 本发明进一步提供三种定量方法。第一种方法是测定样品中一种或多种试剂的量的方法，每种试剂与一种或多种已知的糖酸聚合物 特异结合，该方法包含：（a）将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；（b）对于在微阵列中每种已知的糖酸聚合物，测定特异性结合到那里的试剂的量；和（c）将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。

第二种方法是测定样品中一种或多种试剂数量的方法，每种试剂特异地结合于一种或多种已知的不溶性蛋白，该方法包含：a）将样品与第
30 一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一

个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；(b) 对于在微阵列中每种已知的不溶性蛋白，测定特异性结合到那里的试剂的量；和(c) 将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。

第三种方法是测定样品中一种或多种试剂数量的方法，每种试剂特异地结合于一种或多种已知抗体或凝集素该方法包含：(a) 将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；(b) 对于在微阵列中每种已知的抗体或凝集素，测定特异性结合到那里的试剂的量；和(c) 将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。

本发明进一步提供三种诊断方法。第一种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病特征在于在受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知的糖酸聚合物 特异结合的试剂，该方法包含：(a) 将来自受试者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与在微阵列中已知的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；和(b) 确定在微阵列中已知的糖酸聚合物 是否具有特异结合到那里的试剂，从而确定受试者是否受该疾病折磨。

第二种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病特征在于在受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知的不溶性蛋白质特异结合的试剂，该方法包含：(a) 将来自患者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与在微阵列中已知的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和(b) 确定在微阵列中已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的试剂，从而确定受试者是否受该疾病折磨。

第三种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病特

征在于在受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知抗体或凝集素特异结合的试剂，该方法包含：(a) 将来自患者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与在微阵列中已知的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和 (b) 确定在微阵列中已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的试剂，从而确定受试者是否受该疾病折磨。

本发明进一步提供一种确定已知与第一种糖酸聚合物 特异结合的抗体是否同样与第二种糖酸聚合物 特异结合的方法，该方法包含：(a) 将抗体与第一种或第二种微阵列接触，其中众多的糖酸聚合物，而不是第一种糖酸聚合物，固定在微阵列多个离散位置，并且其中所述接触是在允许该抗体与假设在微阵列中存在的第一种糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；和 (b) 确定微阵列中除了第一种糖酸聚合物 任何糖酸聚合物是否有特异性结合到那里的抗体，从而确定该抗体是否同样特异性结合至第二种糖酸聚合物。

本发明进一步提供一种确定已知与第一种不溶性蛋白质特异结合的抗体是否同样与第二种不溶性蛋白质特异结合的方法，该方法包含：(a) 将抗体与第一种或第二种微阵列接触，其中众多不溶性蛋白质，而不是第一种不溶性蛋白质固定在微阵列的多个离散位置，并且其中所述接触是在允许该抗体与假设在微阵列中存在第一种不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和 (b) 确定微阵列中除了第一种不溶性蛋白质的任何不溶性蛋白质是否有特异性结合到那里的抗体，从而确定该抗体是否同样特异性结合至第二种不溶性蛋白质。

本发明进一步提供一种制备包含硝化纤维或水凝胶载体的微阵列的方法，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置已经固定众多化合物，该方法包含在适合的条件将硝化纤维或水凝胶与化合物接触，由此 (a) 至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的一种化合物，和 (b) 在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

本发明另外提供一种制备包含众多硝化纤维或水凝胶载体的微阵列

的方法，每一种所述载体在它的表面单个离散位置固定一个或众多化合物或在它的表面多个离散位置固定众多的化合物，该方法包含在适合的条件将硝化纤维或水凝胶载体与化合物接触，由此（a）至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的一种化合物，
5 和（b）在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

本发明另外提供一种制备第一种制品的方法，其包括在适合条件下在多个离散位置将硝化纤维或水凝胶载体与葡聚糖接触。

本发明另外提供一种制备第二种制品的方法，其包括将众多的硝化
10 纤维或水凝胶载体与葡聚糖接触，由此每个载体在它表面一个或多个离散位置固定葡聚糖。

本发明另外提供六种试剂盒。第一种试剂盒包含一种即用(instant)微阵列 和使用说明书。第二种试剂盒包含一种即用微阵列和一种干燥剂。第三种试剂盒包含一种浸渍在水溶液中的即用微阵列。

15 第四种试剂盒是用于实行第一种诊断方法的试剂盒，其包括：（a）一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物，其中（i）在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的糖酸聚合物，和（ii）在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的
20 化合物组成不同；和（b）使用说明书。

第五种试剂盒是用于实行第二种诊断方法的试剂盒，其包括：（a）一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物，其中（i）在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的不溶性
25 蛋白质，和（ii）在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同；和（b）使用说明书。

第六种试剂盒是用于实行第三种诊断方法的试剂盒，其包括：（a）一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物，其中（i）在至少一个离散
30 位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的抗体或

凝集素，和 (ii) 在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同；和 (b) 使用说明书。

本发明另外提供一种第一抗体，其能够与在哺乳动物巨噬细胞表面存在的糖酸聚合物 特异结合，其糖酸聚合物 或其结构模拟物 (structural mimic) 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面。

本发明另外提供一种第二抗体，其能够与在哺乳动物肠上皮细胞表面存在的糖酸聚合物 特异结合，其糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面。

本发明另外提供一种确定受试者是否受疾病折磨的方法，所述疾病其特征在在于在受折磨的受试者中巨噬细胞表面存在一种糖酸聚合物，其糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面，该方法包含：(a) 将受试者的巨噬细胞样品与第一抗体接触；和 (b) 确定该抗体是否与样品中的巨噬细胞特异结合，此结合说明受试者受该疾病折磨。

最后，本发明提供一种确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征在在于在受折磨的受试者中的肠上皮细胞表面存在一种糖酸聚合物，其糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面，该方法包含：(a) 将受试者的肠上皮细胞样品与第二抗体接触；和 (b) 确定该抗体是否特异性结合至样品中的肠上皮细胞，该结合说明受试者受该疾病折磨。

附图简述

图 1

本图显示一种糖微阵列和它在表征单克隆抗体 (“mAb”) 表位结合的特异性中的应用。将确定结构特征的葡聚糖制剂，包括 N279, LD7, B1299S 和 B1355S，以连续稀释的方式固定在硝化纤维包被的微型载玻片上，并用抗 α -(1,6) 葡聚糖抗体染色。这些抗体或者是一种沟-型抗体，即 4.3. F1，或者是一种腔-型抗体，即 16. 4.12E，并且与荧光偶联。通过使用 GMS 418 微阵列扫描仪扫描糖微阵列显示它们不同的表位结合特异性。

图 2

本图显示一种基于抗原的微阵列和它在研究单克隆抗体交叉反应性中的应用。将 49 种不同的抗原制剂, 包括微生物多糖, 血型物质和其它糖缀合物, 排列在载玻片上并与荧光标记的 mAbs 一起温育。图 2A: 抗-DEX 4.3. F1; 图 2B: 抗-DEX 16.4.12E。将交叉反应斑点的强度值与特异结合至 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 N279 的那些相比较。以 100 $\mu\text{g/ml}$ 溶液 (a) 的一系列 1:5 稀释使用 N279。以 500 $\mu\text{g/ml}$ 使用其它抗原。在图 2A 和图 2B 中排列相同的抗原。

10

图 3

本图显示用沟型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖抗体 4.3. F1 (IgG3)检测成熟小鼠小肠中的细胞群, 其对硫酸软骨素 B 制剂显示交叉反应。用 mAb 4.3. F1 (IgG3)或者用从 BD PharMingen 获得的 IgG3 同型对照 mAb 将小肠恒冷箱切片染色。两种 mAbs 是荧光偶联物。切片是用针对细胞核的 DAPI 共染, 以显示总体组织结构。在小肠固有层发现 4.3. F1-阳性细胞。图 3A-3D: mAb 4.3. F1; 图 3E-3H: 同型对照。

15

图 4

本图显示沟型和腔型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖单克隆抗体识别不同的细胞标记: 沟型 mAb 45.21.1 (IgA)鉴定在小肠固有层中的细胞群 (图 4C 和 4F), 腔型 mAb 16.4.12E (IgA)将小肠小囊中的上皮细胞 染色 (图 4B 和 4E)。将购自 BD PharMingen 的 IgA 同型对照 mAb 作为背景对照 (图 4A 和 4D)。

25

图 5

本图显示使用抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖抗体识别人小肠组织中的细胞群。正常人小肠切片 (图 5A 和 5B) 和患有腹腔疾病个体 (celiac individual) 的小肠切片 (图 5C 和 5D) 用 mAb 16.4.12E 的荧光偶联物染色 (图 5B 和 5D) 并用 DAPI 共染以显示肠结构 (图 5A 和 5C)。

30

图 6

本图显示将多糖固定在硝化纤维包被的载玻片上。图片 A: 洗涤前和洗涤后的糖微阵列的图像(葡聚糖和菊粉微阵列)斑点。图片 B: 荧光强度和印迹的糖微阵列浓度在洗涤前和洗涤后的关系的定量说明。将葡聚糖或菊粉的荧光偶联物溶解于盐水中(0.9% NaCl), 并以 10 mg/ml 的起始浓度点样, 然后以 1: 5 的系列稀释进行稀释。在洗涤前和洗涤后扫描微阵列载玻片。统计学分析和显示相同实验六次重复的数据。图表符号: —■— : 2000k; —▲— : 70k; —●— : 20k; —◆— : 菊粉。

图 7

本图显示表面固定的葡聚糖分子的免疫特性。图片 A: 沟型抗-Dex 4.3F1 (IgG3/κ) 和腔型抗-葡聚糖 16.4.12E (IgA/κ) 对不同结构的葡聚糖分子的微阵列结合曲线。将葡聚糖分子以 0.1 mg/ml 的起始浓度印迹并通过 1: 5 系列滴定进行稀释。洗涤已印迹的阵列以去除未结合的抗原并且随后用生物素化的抗葡聚糖, 或者 4.3F1 或者 16.4.12E 以 1 μg/ml 的浓度染色, 然后用 1: 500 稀释的 Cys3-链霉抗生物素以染色。实验的示值读数(即微斑点的荧光强度)反映了固定的抗原和用于抗体识别展示的表位的量。腔型 mAb 16.4.12E 与 N279 和 B12995 结合, 但不和 LD7 结合。相反, 沟型 mAb 4.3F1 与葡聚糖制剂 N279 和 LD7 结合, 但与 B1299S 微弱结合。图片 B: 抗-葡聚糖 4.3F1 和 16.4.12E 的 ELISA 结合曲线。将葡聚糖制剂以 10 μg/ml 的起始浓度包被在 ELISA 平板上, 然后在 0.02 M 硼酸盐缓冲盐水, pH 8.0 中通过 1: 5 系列滴定进行稀释。将抗原包被的平板与 1 μg/ml 的生物素化的抗-葡聚糖温育。使用碱性磷酸酶(AP)-链霉抗生物素偶联物和 AP 底物显示结合的抗体。图表符号: —◆— : N279; —□— : LD7; —▲— : B-1299S。左图: 4.3F1 (沟型); 右图: 16.4.12 (腔型)。

图 8

炭疽杆菌暴露和释放许多不同结构特征的抗原以引发和诱导一个广

泛的宿主应答景象。左：炭疽杆菌生命周期示意图。体外存在的休眠孢子对于不利的环境条件是高度耐受的。在合适的环境条件中，孢子确立营养生长。在早期感染中，这些感染性的颗粒被吞噬细胞摄食并累积在局部淋巴组织中。一些可能幸免于吞噬细胞而引发它们的萌发和营养生长。该细菌的营养体型是方形末端的和包于胶囊内的。在晚期感染中，它们迅速繁殖，表达它们的毒力因子以杀死宿主和发展到体内重新孢子形成阶段。抗原&毒素：营养型杆菌释放多种因子，如毒素，蛋白质因子，和可溶性多糖（第三组实验的 1-3,4）。蛋白质部分，如保护性抗原，名为 PA，对于免疫动物可以提供强大保护。现在已清楚了解 PA 是炭疽杆菌致死毒素的一个整合成分。它结合至特定的细胞受体并与水肿因子（EF）和致死因子（LF）形成有毒的细胞结合复合体（第三组实验的 1-3）。对于 PA 的中和抗体或抑制复合体的形成的多价因子可保护动物不受毒素的致死攻击（第三组实验的 5）。在生长细菌的培养基中还存在相当数量的多糖。它的糖组成与细胞壁 Gal-NAG 多糖类似（如果不相同）。右：人免疫系统略图。天然免疫形成宿主抗感染应答的第一条线。这些包括巨噬细胞，天然杀伤细胞（NK），IgM 同型原始“天然抗体”和可能一种特定的 B 细胞系，B-1 细胞，TCR $\gamma\delta$ T 细胞和其它细胞。在炭疽感染中，吞噬细胞在宿主—微生物相互作用中起多种作用。这些可能包括保护和致病作用（详见下文）。获得性免疫系统包括 B 细胞（骨髓衍生的 B 细胞或 B-2 细胞）和 T 细胞（胸腺衍生的 TCR $\alpha\beta$ T 细胞）。B 细胞产生 对微生物抗原，不依赖胸腺的抗原，如一种炭疽多糖，或依赖胸腺的抗原，例如炭疽杆菌的保护性抗原（PA）的特定抗体应答；通过一种 TD 蛋白质抗原可激活特定的 T 细胞来积极地（T 辅助细胞，Th1 和 Th2）或消极地调节 B 细胞应答。还激活特定的细胞毒性 T 细胞（Tc），其可以杀死表达外源抗原的细胞。很多宿主细胞，包括免疫细胞和非免疫细胞类型，可产生细胞因子或其它炎症因子以促进宿主抗感染应答。

图 9

本图显示一种用于生产糖微阵列的简单而有效的方法。显微点样：
使用带有 STEALTH 3 针头的 Cartesian Technologies 的 PIXSYS 5500C

(Irvine, CA)印迹糖抗原。支持基质: FAST Slides (Industrial partner A, Schleicher & Schuell, Keene, NH)。将印迹了的糖微阵列风干并在应用前保存在不含干燥剂地室温中。免疫染色: 即将使用前, 用磷酸缓冲盐水 (PBS) 漂洗微阵列。使用的染色方法与组织切片常规免疫荧光染色基本上相同。微阵列扫描: 将 ScanArray 5000 标准生物芯片扫描系统和它的 QuantArray 软件 (Packard Biochip Technologies, Inc.) 应用于扫描和数据捕捉。

图 10

10 本图显示 8-隔室子阵列 (8-chamber subarrays) 示意图

图 11

本图显示使用 Antigen Chip 4000 探测人血清抗体的所有组成成分 (repertoires)。左: HIV 阴性正常血清。右: HIV-1 感染个体的血清。对于每个微阵列分析, 将 10 ml 血清以 1:10 稀释加样至抗原芯片上。应用带有不同荧光标记的抗-人抗体以识别和定量结合的人 IgG, IgM 和 IgA。在本图中, 人 IgG 是以 Red/Cy5 染色并且人 IgM 是以 Green/Cy3 染色。覆盖对比颜色的两种图象。在相同芯片上用抗-人 IgA^{FITC} 检测 IgA 人抗体 (数据未显示)。

20

图 12

本图显示使用基于蛋白质的微阵列生物芯片对大批 HIV 蛋白质特异的人抗体扫描。用展示大批 HIV-1 蛋白质的蛋白质生物芯片表征四名正常个体和六名 AIDS 病人的血清样品。在相同生物芯片上印迹每个制剂四次。对于每个试验, 将 10 μ l 血清以 1:10 稀释的量加样至单块芯片上。用 Cy3-标记的第二抗体识别和定量被固定抗原捕获的人 IgG。统计学分析每组, 正常的和 HIV-感染的个体的数据。结果表示为荧光强度对给定微斑点背景比率的平均值 (柱形图)。还显示了它们的标准偏差 (standard division)。在 HIV-1 感染组中观察到的显著变异可能反映 HIV-1 特异性抗体应答的多样性, 以及由 HIV-1 病毒不同分化体或毒株表达的 HIV-1 蛋

30

白质的抗原交叉反应性的水平。

图 13

该图显示血型物质 II 型主链结构, XIV 型肺炎球菌多糖和细胞壁
5 Gal-NAG 多糖的假拟结构和免疫关系的示意图。

图 14

该图显示人和鼠抗体的糖微阵列表征。以 0.5 mg/ml 和 0.02 mg/ml 的
抗原浓度将 48 种不同抗原制剂排列在载玻片上。将它们与以相当于每个
10 样品 1:100 稀释的浓度的组合人血清样品或与 1 mg/ml 的生物素化的鼠单
克隆抗体孵育。利用抗人 IgM-AP 偶联物和使用 Vector Red 显示的颜色
来检验被微阵列捕获的人 IgM。使用生物素化的抗-人 IgG 检测人 IgG 抗
-糖。然后加入 Cy3-链霉抗生物素偶联物以显示结合在微阵列上的人 IgG
或鼠单克隆抗体。实验的示值读数, 即微斑点的荧光强度, 反映了固定
15 的抗原和用于抗体识别展示的表位的数量。微阵列染色的四次重复数据
归纳于表 2 中。

图 15

本图显示使用 TMHMM 2.0 版本预测蛋白质结构 (第三组实验的
20 55): 炭疽杆菌的 PX01-54 编码一个 S-层蛋白, 一个用于炭疽诊断和接
种的新分子靶。

图 16

本图显示生物芯片检测在混合人血清样品中对于炭疽多糖或肺炎球
25 菌属 XIV 型多糖的人抗体反应活性, 其证实这些抗原制剂可适用于生产
诊断微阵列。

发明详述

定义

30 如在本发明中使用, 除非于此另外特别规定, 下列术语的每一个应

该具有下面阐明的含义。

“固定”应指通过任何方式的附着。在一个实施方案中，固定应该意指通过共价键附着。在另一个实施方案中，固定应该意指非共价附着。

“试剂”应指任何化学本体，没有限制地包括糖酸聚合物，蛋白质，
5 抗体，凝集素，核酸，小分子和它们的任何结合。

“抗体”应指（a）包含两条重链和两条轻链并且识别抗原的免疫球蛋白分子；（b）多克隆和单克隆免疫球蛋白分子；和（c）其单价和二价片段。免疫球蛋白分子可衍生于任何通常已知的类型，包括但不限于 IgA，分泌性 IgA，IgG 和 IgM。IgG 亚类也为本领域的那些技术人员众
10 所周知，并且包括但不限于人 IgG1，IgG2，IgG3 和 IgG4。抗体既可以是天然存在又可以是非天然存在。另外，抗体包括嵌合抗体，完全合成抗体，单链抗体和其片段。抗体可以是人类的或非人类的。非人类抗体可以通过重组方法人源化以降低它们在人体内的免疫原性。

“水溶液”应指其中水是溶剂的任何溶液。水溶液的实例包括水和
15 基于水的缓冲溶液。

“复合糖”应指一种包含多于两种类型糖单体单元的糖聚合物。复合糖的实例包括血型物质如 Lewis X 和 Lewis Y。

在离散位置的“化合物组成”应该意指在那个位置一种或更多种化合物的同一性。例如，如果位置 1 含有化合物 A 和 B，并且位置 2 含有
20 化合物 A 和 C，那么在位置 1 的化合物组成不同于在位置 2 的化合物组成。

“化合物”应指任何分子。化合物包括但不限于蛋白质，核酸，糖酸聚合物，脂类和小分子。

“葡聚糖”应指主要含有 $\alpha(1, 6)$ -糖苷键的葡萄糖的一种支化聚合物。
25

“离散位置”应指用于固定化合物的一个点，区域或面积，其不与另一个这样的点，区域或面积重叠，并且可以由实际空格从另一个这样的点，区域或范围进一步分开。

“糖酸聚合物”应指任何含糖部分。糖酸聚合物不限制地包括（a）复合糖，（b）多糖，和（c）糖缀合物。“糖缀合物”不限制地包括糖蛋
30 白和糖脂。

“不溶性蛋白质”应指不在水溶液中溶解的任何蛋白质。不溶性蛋白质的实例包括跨膜蛋白。

“凝集素”应指一种能够凝集红细胞，结合糖，和/或刺激有丝分裂的蛋白质。凝集素的实例包括刀豆素 A(concavalin A)。

- 5 “微阵列”应指 (a) 其表面多个离散位置固定一种或多种化合物的固体载体，或 (b) 众多固体载体，每个载体表面多个离散位置固定一种或众多化合物。即用微阵列可包含在本发明的参数内化合物所有可能的排列。例如，即用微阵列可以是全-糖酸聚合物 微阵列，全-不溶性蛋白质微阵列，全-抗体微阵列，疾病特异性微阵列，物种特异性微阵列或组织特异性微阵列。
- 10

“硝化纤维或水凝胶载体”应指其表面固定硝化纤维或水凝胶的任何固体载体。硝化纤维或水凝胶载体不限制地包括，硝化纤维包被或水凝胶包被的芯片（例如硅氧烷芯片），载片（例如载玻片），过滤器，平板和珠。

- 15 “多糖”应指包含一种或两种类型的糖单体单元的糖聚合物。多糖的实例包括细菌细胞表面糖。

当与即用方法连同使用时，“样品”包括但不限于任何形体组织，皮肤病灶，血液，血清，血浆，脑脊液，淋巴细胞，尿，溢泌物或源于细胞培养物的上清。

- 20 “特异性结合”应指第一本体与第二本体基于彼此三维结构之间的互补性的结合。在一个实施方案中，发生小于 10^{-5} K_D 的特异性结合。在另一个实施方案中，发生小于 10^{-8} K_D 的特异性结合。在另一个实施方案中，发生小于 10^{-11} K_D 的特异性结合。

- “受试者”应指任何生物，其不限制地包括小鼠，大鼠，狗，豚鼠，雪貂，兔和灵长类。在优选实施方案中，受试者是人。
- 25

发明实施方案

- 本发明提供四种微阵列和两种用于制备其的两种制品。第一种微阵列包含一种在其表面多个离散位置已经固定众多化合物的硝化纤维或水凝胶载体，其中 (a) 在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不可溶
- 30

性蛋白，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第二种微阵列包含众多硝化纤维或水凝胶载体，每个载体具有在其表面单个离散位置固定的一种或众多化合物或在其表面多个离散位置固定的众多化合物，其中（a）在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不可溶性蛋白，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第一种制品包含一种其表面多个离散位置固定的葡聚糖的硝化纤维或水凝胶载体。在一个实施方案中葡聚糖是 α (1,6)葡聚糖。

第三种微阵列包含第一种制品，其中将至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖，每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

第二种制品包含众多的硝化纤维或水凝胶载体，每个载体具有它表面一个或多个离散位置固定的葡聚糖。在一个实施方案中该葡聚糖是 α (1,6)葡聚糖。

第四种微阵列包含第二种制品，其中将至少一种化合物固定于每个离散位置的葡聚糖，每个离散位置化合物的组成与至少一个其它离散位置化合物的组成不同。

在第一种和第三种微阵列的一个实施方案中，硝化纤维或水凝胶载体是选自芯片，载玻片，过滤器，平板。在第二种和第四种微阵列的实施方案中，硝化纤维或水凝胶载体选自芯片，载玻片，平板和珠。

在上述微阵列的一个实施方案中，离散位置的数目是至少 100。在另一个实施方案中，离散位置的数目是至少 1000。在另外一个实施方案中，离散位置的数目是至少 10,000。在另外一个实施方案中，离散位置的数目是至少 50,000。

在第一种和第二种微阵列的一个实施方案中，将糖酸聚合物固定在至少一个位置上。在另一个实施方案中，将不溶性蛋白质固定在至少一个位置上。在另一个实施方案中，将凝集素固定在至少一个位置上。在另一个实施方案中，将抗体固定在至少一个位置上。在另一个实施方案中，微阵列表面已经固定了选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和

抗体的两种或多种化合物。在另一个实施方案中，微阵列表面已经另外固定了选自可溶性蛋白，核酸和小分子的一种化合物。

在第三种和第四种微阵列的一个实施方案中，将糖酸聚合物 固定于至少一个位置的葡聚糖上。在另一个实施方案中，将不可溶性蛋白质固
5 定于至少一个位置的葡聚糖上。在另一个实施方案中，将凝集素固定于至少一个位置的葡聚糖上。在另一个实施方案中，将抗体固定于至少一个位置的葡聚糖上。另一个实施方案中，微阵列已经固定了选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的两种或多种化合物在葡聚糖上。在另一个实施方案中，微阵列已经在其表面固定了选自可溶性蛋白，核
10 酸和小分子的一种化合物。

在即用微阵列的一个实施方案中，在每个位置只固定一种化合物。在另一个实施方案中，在至少一个位置固定众多化合物。

本发明提供三种用于检测样品中试剂存在的方法。第一种方法是检测样品中与一种或多种已知糖酸聚合物 特异结合的一种或多种试剂存在
15 的方法，该方法包含：(a) 将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；和 (b) 确定在微阵列中任何已知的糖酸聚合物 是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多种
20 试剂的存在。

第二种方法是检测样品中与一种或多种已知不溶性蛋白质特异结合的一种或多种试剂的存在的方法，该方法包含：(a) 将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它
25 在微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和 (b) 确定在微阵列中任何已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多种试剂的存在。

第三种方法是检测样品中与一种或多种已知抗体或凝集素特异结合的一种或多种试剂的存在的方法，该方法包含：(a) 将样品与第一种或
30 第二种微阵列接触，其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散

位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和（b）确定在微阵列中任何已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而检测样品中一种或多种试剂的存在。

- 5 在上述方法的一个实施方案中，所述试剂是与一种疾病相关的抗体。在第一种方法的另一个实施方案中，所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗体。在上述方法的另一个实施方案中，所述试剂是与一种感染或一种肿瘤存在相关的抗体。

- 10 在即用方法的一个实施方案中，所述方法包含检测样品中众多试剂的存在，作为适用，每种试剂与众多糖酸聚合物，众多不溶性蛋白质，或者与众多凝集素或抗体结合。在即用方法的另一个实施方案中，所述方法包含测定样品中众多试剂的量，作为适用，每种试剂与一种糖酸聚合物，一种不溶性蛋白质，或者与一种凝集素或抗体结合。

- 15 按照本领域众所周知的方法可以进行“测定”一种试剂是否与微阵列中的一种化合物结合。该方法包括但不限于荧光，放射免疫测定法和免疫标记检测。

- 20 在检测的即用方法中，提供几个实施方案，其不限制地包括下列各项：（a）样品中的一种试剂与在即用微阵列上的一种化合物结合；（b）检测样品中与微阵列上多于一种化合物结合的一种试剂；（c）检测一个样品中众多试剂的共同存在，其中每种这样的试剂与微阵列上的一种或多种化合物结合；和（d）个别地检测在一个样品中众多试剂的每一种，其中每种这样的试剂与微阵列上的一种或多种化合物结合。

- 25 本发明进一步提供三种定量方法。第一种方法是测定样品中每个与一种或多种已知糖酸聚合物 特异结合的一种或多种试剂的量的方法，该方法包含：（a）将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；（b）对于在微阵列中每种已知的糖酸聚合物，测定特异性结合到那里的试剂的量；和（c）将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。
- 30

第二种方法是测定样品中每个与一种或多种已知不溶性蛋白质特异结合的一种或多种试剂的量的方法，该方法包含：a) 将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；(b) 对于在微阵列中每种已知的不溶性蛋白质，测定特异性结合到那里的试剂的量；和(c) 将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。

第三种方法是测定样品中每个与一种或多种已知抗体或凝集素特异结合的一种或多种试剂的量的方法，该方法包含：(a) 将样品与第一种或第二种微阵列接触，其中每种已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中相应的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；(b) 对于在微阵列中每种已知的抗体或凝集素，测定特异性结合到那里的试剂的量；和(c) 将这样测定的量与已知标样比较，从而确定样品中一种或多种试剂的量。

在即用定量方法的一个实施方案中，试剂是与一种疾病相关的抗体。在第一种方法的另一个实施方案中，所述试剂是与一种炎性疾病相关的抗体。在上述方法的另一个实施方案中，所述试剂是与一种感染或一种肿瘤存在相关的抗体。

在即用定量方法的一个实施方案中，所述方法包含测定样品中众多试剂的量，作为适用，每种试剂与众多糖酸聚合物，众多不溶性蛋白质，或者与众多凝集素或抗体结合。在即用定量方法的另一个实施方案中，所述方法包含测定样品中众多试剂的量，作为适用，每种试剂与一种糖酸聚合物，一种不溶性蛋白质，或者与一种凝集素或抗体结合。

按照本领域众所周知的方法进行“测定”与微阵列中的一种化合物结合的试剂的量。用于即用定量方法的“已知标样”包括例如，在对照样品中试剂的已知浓度和使用即用微阵列测定的它们的对应值之间的相关性。

在即用定量方法中，提供几个实施方案，其不限制地包括下列各项：

- (a) 样品中的一种试剂与即用微阵列上的一种化合物结合；(b) 定量样品中与微阵列上多于一种化合物结合一种试剂；(c) 定量样品中众多试剂的总量，其中每种这样的试剂与微阵列中的一种或多种化合物结合；和(d) 单独定量样品中众多试剂的每一种，其中这样的试剂与微阵列上的一种或多种化合物结合。

本发明进一步提供三种诊断方法。第一种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征存在于受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知糖酸聚合物 特异结合的试剂，该方法包含：(a) 将来自受试者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的糖酸聚合物 固定在至少一个离散位置上，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与它在微阵列中已知的糖酸聚合物 特异结合的条件下进行；和(b) 确定在微阵列中已知的糖酸聚合物 是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而确定该受试者是否受该疾病的折磨。

第二种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征存在于受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知不溶性蛋白质特异结合的一种试剂，该方法包含：(a) 将来自受试者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的不溶性蛋白质固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与在微阵列中已知的不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和(b) 确定在微阵列中已知的不溶性蛋白质是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而确定该受试者是否受该疾病的折磨。

第三种方法是确定受试者是否受一种疾病折磨的方法，所述疾病其特征存在于受折磨的受试者中存在或不存在与一种已知抗体或凝集素特异结合的一种试剂，该方法包含：(a) 将来自受试者的合适的样品与第一种或第二种微阵列接触，其中已知的抗体或凝集素固定在至少一个离散位置，并且其中所述接触是在允许一种试剂，如果在样品中存在，与在微阵列中已知的抗体或凝集素特异结合的条件下进行；和(b) 确定在微阵列中已知的抗体或凝集素是否具有特异结合到那里的一种试剂，从而确定该受试者是否受该疾病的折磨。

在即用诊断方法的一个实施方案中，所述受试者是人。在第一种方

法的一个实施方案中，所述疾病是一种炎性疾病。在第一种方法的另一个实施方案中，所述炎性疾病是腹腔疾病。在第三种方法的一个实施方案中，所述疾病是 HIV-1 感染。

下列各项是即用诊断方法的具体实施例。在第一个实施例中，分析
5 受试者的血清 HIV-1 gp120 和 IgG-抗-HIV-1 gp120 的存在，两者都存在说明活性 HIV-1 感染。在第二个实施例中，分析受试者的血清 HIV-1 gp120 和 IgG-抗-HIV-1 gp120 任一个的存在，HIV-1 gp120 的缺少和 IgG-抗-HIV-1 gp120 抗体的存在说明 HIV-1 感染或免疫。在第三个实施例中，分析受试者的血清 HIV-1 gp120 和 IgG-抗-HIV-1 gp120 的存在，两个都不存在说明受试者即未被 HIV-1 也未被免疫。在第四个实施例中，分析
10 受试者的血清 IgA-抗麦醇溶蛋白和 IgA-抗-TGt 的存在，两者都存在说明该受试者受腹腔疾病的折磨。最后，在第五个实施例中，分析受试者的血清 IgA-抗麦醇溶蛋白的存在，该抗体的存在说明受试者受腹腔疾病折磨的可能性。

15 本发明进一步提供一种确定已知与第一种糖酸聚合物 特异结合的抗体是否同样与第二种糖酸聚合物 特异结合的方法，该方法包含：(a) 将抗体与第一种或第二种微阵列接触，其中众多糖酸聚合物，不同于第一种糖酸聚合物，固定在微阵列的多个离散位置，并且其中所述接触是在允许抗体，与假设在微阵列中存在的第一种糖酸聚合物特异结合 的条件下进行；和 (b) 确定微阵列中任何糖酸聚合物，不同于第一种糖酸聚
20 合物，是否有特异性结合到那里的抗体，从而确定该抗体是否同样特异性结合至第二种糖酸聚合物。

本发明进一步提供一种确定已知与第一种不溶性蛋白质特异结合的抗体是否同样与第二种不溶性蛋白质特异结合的方法，该方法包含：a)
25 将抗体与第一种或第二种微阵列接触，其中众多不溶性蛋白质，不同于第一种不溶性蛋白质，固定在微阵列中的多个离散位置，并且其中所述接触是在允许抗体与假设在微阵列中存在的第一种不溶性蛋白质特异结合的条件下进行；和 (b) 确定微阵列中任何不溶性蛋白质，不同于第一种不溶性蛋白质，是否有特异性结合到那里的抗体，从而确定该抗体是
30 否同样特异性结合至第二种不溶性蛋白质。

本发明进一步提供一种制备包含硝化纤维或水凝胶载体的微阵列的方法，所述硝化纤维或水凝胶载体在它的表面多个离散位置已经固定众多化合物，该方法包含在适合的条件将硝化纤维或水凝胶载体与化合物接触，由此（a）在至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

本发明另外提供一种制备包含众多硝化纤维或水凝胶载体的微阵列的方法，每一种载体具有在它的表面单个离散位置固定的一个或众多化合物或在它的表面多个离散位置固定的众多化合物，该方法包含在适合的条件将硝化纤维或水凝胶载体与化合物接触，由此（a）至少一个离散位置固定选自糖酸聚合物，不溶性蛋白质，凝集素和抗体的一种化合物，和（b）在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同。

本发明另外提供一种制备第一种制品的方法，其包含在适合条件下在多个离散位置将硝化纤维或水凝胶载体与葡聚糖接触。

在该方法的一个实施方案中，所述方法另外包含将至少一种化合物固定在每个离散位置的葡聚糖的步骤，由此在每个离散位置的化合物的组成不同于至少一个其它离散位置的化合物的组成。

本发明另外提供一种制备第二种制品的方法，其包含将众多的硝化纤维或水凝胶载体与葡聚糖接触，由此每个载体在它表面一个或多个离散位置固定葡聚糖。

在该方法的一个实施方案中，所述方法另外包含将至少一种化合物固定在每个离散位置的葡聚糖的步骤，由此在每个离散位置的化合物的组成不同于至少一个其它离散位置的化合物的组成。

本发明另外提供六种试剂盒。第一种试剂盒包含一种即用微阵列和使用说明书。第二种试剂盒包含一种即用微阵列和一种干燥剂。第三种试剂盒包含一种浸渍在水溶液中的即用微阵列。

第四种试剂盒是用于实行第一种诊断方法的试剂盒，其包含：（a）一种含有硝化纤维素或水凝胶载体的微阵列，所述硝化纤维素或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物，其中（i）在至少一个

离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的糖酸聚合物, 和 (ii) 在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

第五种试剂盒是用于实行第二种诊断方法的试剂盒, 其包含: (a) 一种含有硝化纤维素或水凝胶载体的微阵列, 所述硝化纤维素或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物, 其中 (i) 在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的不溶性蛋白质, 和 (ii) 在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

第六种试剂盒是用于实行第三种诊断方法的试剂盒, 其包含: (a) 一种含有硝化纤维或水凝胶载体的微阵列, 所述硝化纤维素或水凝胶载体在它的表面多个离散位置固定众多的化合物, 其中 (i) 在至少一个离散位置固定与在受折磨的受试者中存在或不存在的试剂特异结合的抗体或凝集素, 和 (ii) 在每个离散位置的化合物组成与至少一个其它离散位置的化合物组成不同; 和 (b) 使用说明书。

本发明另外提供一种第一抗体, 其能够与在哺乳动物巨噬细胞表面存在的糖酸聚合物 特异结合, 该糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面。在一个实施方案中, 所述抗体是沟型抗体。在另一个实施方案中, 抗体命名为 4.3. F1 (ATCC 登记号 PTA-3259)。在另一个实施方案中, 抗体命名为 45.21.1 (ATCC 登记号 PTA-3260)。

本发明另外提供一种第二抗体, 其能够与在哺乳动物肠上皮细胞表面存在的糖酸聚合物 特异结合, 该糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面。在一个实施方案中, 所述抗体是腔型抗体。在另一个实施方案中, 抗体命名为 16. 4.12E (ATCC 登记号 PTA-3261)。

本发明另外提供一种确定受试者是否受疾病折磨的方法, 所述疾病其特征在于在受折磨的受试者中的巨噬细胞表面存在一种糖酸聚合物, 该糖酸聚合物 或其结构模拟物 对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面, 该方法包含: (a) 将受试者的巨噬细胞样品与第一抗体接触;

和（b）确定该抗体是否与样品中的巨噬细胞特异结合，此结合说明该受试者受该疾病的折磨。

最后，本发明提供一种确定受试者是否受疾病折磨的方法，所述疾病其特征存在于受折磨的受试者中的肠上皮细胞表面存在一种糖酸聚合物，该糖酸聚合物或其结构模拟物对于细菌细胞也是内源的并存在于细菌细胞表面，该方法包含：（a）将受试者的肠上皮细胞样品与第二抗体接触；和（b）确定该抗体是否特异性结合至样品中的肠上皮细胞，该结合说明该受试者受该疾病的折磨。在一个实施方案中所述受试者是人。在另一个实施方案中，所述疾病是免疫疾病或炎性疾病。在另外一个实施方案中，所述疾病是腹腔疾病。

从随后的实验细节将更好地理解本发明。然而，本领域的一名技术人员将容易地理解讨论的具体方法和结果只是作为后附的权利要求中更充分描述的本发明的例证。

15 实验细节

第一组实验

本发明提供用于监控和定量广谱生物分子和它们分子相互作用的新型基于抗原和基于抗体的微阵列。使用微阵列技术在一个固体表面点样数千个抗原和/或抗体。本策略适用于任何分子靶，其包括天然存在的蛋白质，糖类，脂类和核酸，以及合成的化合物。即用微阵列是用于监控体液中特定抗体和其它细胞因子的表达，因此用于疾病诊断和基础免疫学研究。当排列大量的（a large repertoire of）不同单克隆抗体时，产生一个抗体库微阵列。预见了将这些微阵列应用于在翻译和翻译后水平上基因表达的整体分析。将哥伦比亚大学 Elvin A. Kabat 抗原抗体收集用于实施该技术。

I. 材料，方法和结果

（A）用于抗原/抗体固定化的方法

此处实验证明硝化纤维涂层可以作为用于将多糖，糖蛋白，糖脂，蛋白质和抗体没有化学偶联地固定于玻璃表面的合适基底。比较一套可

商购的载玻片，包括用硝化纤维包被的那些（ONCYTE Film-Slides, Grace Bio-Labs, Inc., Bend, OR），聚-L-赖氨酸（POLY-PREP™, Sigma），氨烷基硅烷（SILANE-PREP™, Sigma）和常规的微型载玻片它们固定不同结构性能的高分子的能力。在初始实验中，使用荧光偶联的葡聚糖分子。

- 5 然后研究扩大范围（extended panel）的抗原制剂，其包括多糖，糖蛋白，糖脂，蛋白质和抗体。这些研究的实施例在图 1 和图 2 中显示。

（B）抗原/抗体微阵列的印迹和长期保存

- 使用一种设计用来生产 cDNA 微阵列的高精度机器人（GMS 417
10 Arrayer, Genetic Microsystems, Inc., Woburn MA）将糖抗原点样至用硝化纤维聚合物（ONCYTE Film-Slides, Grace Bio-Labs, Inc., Bend, OR）预先包被的载玻片上。

- 以斑点大小约为 200 微米和中心之间间距为 400 微米来印迹抗原斑点。将它们风干并在使用前保存在室温。比较用于印迹的抗原/抗体微阵列长期保存的条件。结果显示（1）风干的糖微阵列可以在室温下保存至少一年而它们的免疫活性不显著失活；和（2）抗体微阵列可以保存在 4
15 ℃水溶液中至少一年而未显著降低它们的抗原结合活性，如使用具有抗-糖特异性的抗体所举例说明。

- 20 （C）用于偶联更小的生物活性分子和将它们展示在溶剂可及的表面的合适的高分子

- 葡聚糖制剂，特别是 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖，可以作为偶联其它生物活性分子的载体分子。可以将该含葡聚糖的偶联物没有另外化学偶联地固定于硝化纤维表面。该方法通过将 35 kD-2000 kD 的不同分子量的荧光- $\alpha(1, 6)$
25 葡聚糖偶联物固定于硝化纤维包被的载玻片上而得到证明。在溶液中荧光基团对于抗-荧光抗体是可及的，从而证明特异性结合。生产用于表面固定的葡聚糖-偶联物的方法如下。

（1）葡聚糖的温和高碘酸钠氧化以产生高反应活性的醛官能团（CHO）

- 将 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖，制剂 N279（B512）以 10 mg/ml 溶解于 0.01 M 醋
30 酸钠缓冲液，pH 5.5，并在 37℃水浴中温热 30 分钟。然后加入 NaIO_4 至

最终浓度为 1×10^{-2} M。彻底混合溶液并在室温下黑暗中静止一小时。将制剂对 0.02M BBS（硼酸盐缓冲盐水）pH 8.0, 4℃透析过夜。

(2) IgG 糖结构的温和氧化 以产生用于表面固定的 CHO 基团

上述方案也用于在 IgG 分子的 C 区域中天然存在的糖分子中产生活性 CHO 基团。然后将该 CHO-活化的 IgG 与固定在硝化纤维包被的载玻片上的氨基-葡聚糖分子的氨基共价连接。氨基-葡聚糖制剂可商购 (Molecular Probes, Eugene)。该 IgG 固定方法利用附着在 IgG 的 Fc 区域中的糖结构, 其远离抗体分子的抗体结合位点, 因此保持抗体结合活性。

10 (3) 将生物素-LC-酰肼与氧化的葡聚糖偶联

将上述氧化的葡聚糖在 0.1 M 醋酸钠, pH 5.5 中稀释 10 倍。逐滴加入 1/3 体积的 5 mM 生物素-LC-酰肼。在室温下振荡混合物一小时。通过加入 0.5 ml 1M Tris HCl, pH 7.5 终止反应, 然后将混合物对 Tris 缓冲液 (0.1 M Tris pH 7.5, 0.1 M NaCl, 2.0 mM $MgCl_2$) 透析。然后准备将生物素化的葡聚糖固定于硝化纤维包被的载玻片上以使它们的生物素基团对于溶液中的其它分子是可及的。

(4) 表面固定化生物素化的分子

应用标准方法将 NHS-生物素 (BRL # 5533LA) 与靶分子, 即蛋白质或多糖偶联。以适当的摩尔比将生物素化的分子与抗生物素蛋白孵育, 所述摩尔比取决于靶分子的分子量和它与生物素的摩尔比。然后将该分子点样于预先用生物素-葡聚糖包被并用 BSA 或明胶封闭的表面上。该策略允许抗原或抗体微阵列为了期望目的灵活的排列, 并且避免靶分子在表面上非特异性的结合。

(5) 戊二醛偶联以产生葡聚糖小分子偶联物

25 用戊二醛可将含有胺基的小生物活性分子与氨基葡聚糖 (Molecular Probes) 偶联。将戊二醛加入靶分子和氨基葡聚糖的混合物 (以适当的摩尔比) 至最终浓度为 0.2%。将它们置于室温两小时。通过加入 6.1 μ l/ml 1 M 乙醇胺 终止反应。将混合物置于室温另外两小时, 然后对 1X PBS 或其它适当的溶液透析过夜。然后将葡聚糖-小分子偶联物点样于硝化纤维包被的载玻片上。该方法适于生产具有大量小分子的微阵列, 并可用

于高通量药物筛选或其它生物医学研究。

(D) 用于制备不同物化性能的高分子的溶液

(1) 溶液保存

- 5 将微生物多糖，血型物质和糖脂以大约 1 mg/ml 的浓度溶解和保存在 4℃ 盐水中。加入一小滴氯仿以防止微生物。以这种简单方法，大多数溶液可以保存多年。在即将点样前将试剂在盐水中以需要的浓度来稀释。

(2) 蛋白质抗原

- 10 在加入 20%甘油的 1X PBS (mg/ml)中以相对高的浓度制备可溶性蛋白质制剂并在-80℃冷冻。使用前在 1X PBS 中将它们稀释并短期（几天）保存在 4℃。除非特殊情形，通常将抗体制剂保存在 4℃ 1X PBS 中。一些大肠杆菌表达的蛋白质抗原是水不溶性的。在变性条件下将制剂纯化并保存在 4℃相同溶液中。对于这些蛋白质避免冷冻过程。在大多数情形中，可以将这些制剂不特殊处理固定在硝化纤维基质上。该方法在申请人的实验室已经成功应用于杂交瘤筛选。
- 15

(E) 抗原/抗体微阵列的染色和扫描

(1) 常规使用方案

- 20 即将使用前，用含有 0.05% 吐温 20 的 1X PBS 漂洗印迹的抗原/抗体微阵列，然后通过将载玻片在 1% BSA 的含有 0.05% NaN_3 的 PBS 中 37℃孵育 30 分钟封闭。然后在室温下将微阵列与适当滴定的荧光-抗体偶联物在含有 0.05% NaN_3 和 0.05%吐温 20 的 1% BSA PBS 中温育。用含有 0.05%吐温 20 的 1XPBS 漂洗载玻片五次，室温风干然后扫描荧光信号。使用用多个激光器，发射滤色片，扫描阵列捕获软件（ScanArray Acquisition Software）和 QuantArray 微阵列分析软件装备的 ScanArray 5000 标准生物芯片扫描系统（GSI Lumonics, Inc. and Packard BioChip Technologies, Inc.）扫描染色的抗原微阵列，定量斑点相关的荧光信号和分析数据。
- 25

- 30 (2) 特殊应用方案

(a) 用于改善信号检测的方法

已限制硝化纤维包被的载玻片的应用的技术问题是在扫描时它伴随着“白色”和非特异性荧光信号。使用下列方法解决该问题。(a) 在将微阵列载玻片染色后, 允许它风干几分钟(在该阶段, 硝化纤维包被的区域是白色)。(b) 将载玻片浸泡在 100%的乙醇中 1-2 分钟直至硝化纤维包被区域的白色消失并且整个载玻片变得透明。(c) 快速旋转载玻片以去除多余的乙醇。(d) 当它完全透明时扫描载玻片。在保存几天或更长时间之后, 取决于空气中的湿度水平, 载玻片可回复成白色。如果需要可以重复上述方法以使载玻片再次透明。

10 (b) 使用非荧光染料将抗原/抗体微阵列染色

可以使用与非荧光染料偶联的抗体, 抗原或其它反应剂将抗原/抗体微阵列染色。通常使用的碱性磷酸酶(AP)和过氧化物酶是有用的备选物。可以如下实行该方法。(a) 如上所述用适当稀释的人血清样品将抗原微阵列染色。(b) 在洗涤后, 用适当稀释的 AP-偶联的抗-人 IgG 抗体将载玻片染色。(c) 洗涤载玻片并通过只加入 AP 底物 BCIP 或加入 BCIP 加上 NBT 显色。(d) 通过加入 Tris-EDTA 溶液(20mM Tris, pH 7.5, 5mM EDTA) 终止反应。(e) 用蒸馏水洗涤载玻片, 然后用非荧光载玻片扫描仪对它进行扫描, 或在常规显微镜下观察颜色反应。

20 (F) 抗原微阵列的敏感性

敏感性是确定抗原微阵列诊断价值的关键参数。在预备实验中(图 1), 将葡聚糖制剂以 100 $\mu\text{g/ml}$ -3.3 ng/ml 的浓度排列在硝化纤维包被的载玻片上。用浓度为 1 $\mu\text{g/ml}$ 荧光标记的抗-葡聚糖 mAbs, 4.3. F1 或 16.4.12E 将它们染色。在两种情形中, 检测的捕捉荧光信号(强度)与抗原浓度正相关。例如只有当 N279, LD7 和 B1299S 的浓度分别高于 0.4, 20 或 100 $\mu\text{g/ml}$ 时才可检测 4.3.F1 (在图 1 中未显示浓度低于 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 的抗原斑点)。甚至在 100 $\mu\text{g/ml}$ 的最高浓度下也没有观察到信号饱和, 显示了对于提高抗原微阵列敏感性的技术潜力。

30 (G) 表位特异性抗原微阵列

使用糖缀合物技术生产“表位特异性抗原微阵列”。天然存在的抗原可包括多个抗原决定簇。经常，它们的一种或几种作为用于宿主识别的主要抗原决定簇。对于一些微生物多糖的糖表位特异的抗体可以比与其它反应的那些更有保护性。也存在在微生物菌株乃至种之间共有的交叉反应性的抗原决定簇。这些交叉反应性可导致难以测定相应的传染物的类型。因此，确定由感染或接种引发的抗体的细微的特异性是有益的。

为了生产表位特异性微阵列，在微阵列实验中使用展示 $\alpha(1, 6)$ 连接的葡萄糖的糖蛋白制剂，即异麦芽三糖偶联的 BSA (IM3-BSA) 或它的 KLH-偶联物 (IM3-KLH)。这些偶联物具有共有的 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖末端非还原性的末端表位，但它们的蛋白质载体不同。不出所料，mAb 16.4.12E (腔型)，而不是 mAb 4.3. F1 (沟型) 与 IM3-蛋白质偶联物的微斑点结合 (图 1E 和 2E)。因此，可以将糖蛋白固定在硝化纤维包被的载玻片上并且它们的抗原决定簇保持可接近溶液中的抗体。

使用新糖脂，即糖脂偶联物生产表位特异性微阵列，其中使用硬脂胺-异麦芽糖基寡糖偶联物，ST-IM3，ST-IM5 和 ST-IM7 (数据未显示)。由于每个脂分子只能被单个寡糖偶联，这类糖脂偶联物是均一的。不像糖蛋白偶联物，糖链可以偶联至蛋白质分子的多个位点上，产生不均一的抗原决定簇群体。糖表位和与它相邻的氨基酸残基都可在结构上参与形成这些抗原决定簇。

20

(H) 抗体微阵列

进行实验开发基于抗体的微阵列。将一组抗-葡聚糖 mAbs 以 0.5 mg/ml 的浓度固定在一套载玻片上。这些包括 (a) 硝化纤维包被的载玻片 (ONCYTE Film-Slides, Grace Bio-Labs, Inc., Bend, OR); (b) 聚赖氨酸处理的载玻片 (POLY-PREP™, Sigma) (c) 硅烷处理的载玻片 (SILANE-PREP™, Sigma) 和 (d) 未处理的，预清洗的载玻片。然后将这些载玻片与不同结构的荧光标记的葡聚糖制剂反应。只有硝化纤维-载玻片显示特异的荧光信号斑点。因此，排列在硝化纤维-载玻片上的抗-葡聚糖 mAbs 保持了它们的抗原结合特异性。如上所述，抗体微阵列可以在室温风干条件下保存几个月而保持它们的抗体结合活性。研究的抗

30

体包括不同同型 (IgM, IgG 和 IgA) 的单克隆抗体。

II. 将抗原-抗体生物芯片技术用于基础研究和临床研究

(A) 通过应用抗原/抗体微阵列将抗体结合位点作图

5 将良好建立的抗原-抗体系统, 即葡聚糖和抗葡聚糖单克隆抗体 (mAbs) [10,11]用于这些研究。将一组纯化的不同键组成和不同末端/内部表位比率的葡聚糖制剂[10]固定在硝化纤维包被的载玻片上, 然后与确定特异性的单克隆抗体, 腔型或沟型抗-葡聚糖[12]孵育。前者对于 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖的末端非还原末端结构是特异性的; 后者识别多糖的内部直链。

10 当将腔型 mAb, 16.4.12E 施用于载玻片时, 它与固定的具有分支的 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖制剂结合, 但不与只具有内部直链结构的那些结合。相反, 沟型 mAb, 4.3. F1, 与直链结构占优势的葡聚糖制剂结合, 但不与大量支化的 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖结合 (图 1)。因此, 在微阵列中使用确定结构的多糖对于研究抗体特异性和表征对微生物感染的免疫应答是一种重要的策略。

15 如上所述, 还建立了生产表位特异性微阵列的方法, 使可以表征抗体的细微特异性。考虑到在许多多糖中内部链表位和末端非还原末端表位的存在, 将多糖高分子和它们的寡糖偶联物都使用在即微阵列上将显著增强系统的能力, 其包括它的敏感性, 特异性和检测抗原决定簇的所有组成成分。

20

(B) 研究抗体/受体的特异性和交叉反应性

即用微阵列的一个优势是它提供一种表征抗体或凝集素分子特异性和交叉反应性的高通量策略。图 2 显示该方法的一个实施例。将一批大约 50 种含糖抗原, 包括微生物多糖, 血型物质和其它糖缀合物排列在硝

25 化纤维包被的载玻片上。然后用抗-葡聚糖 mAbs, 4.3.F1, 或 16.4.12E 将它们染色。如图 2 中所示, 对于几个抗原制剂检测到某些交叉反应信号, 对于 mAb 4.3.F1 是斑点 2a, 3a 和 6a, 对于 16.4.12E 是 2a, 3a, 4a, 6a, 1e 和 2e。在这些位置的排列的抗原是: 2a. 克雷伯氏杆菌属多糖类型 11; 3a. 克雷伯氏杆菌属类型 13; 4a. 克雷伯氏杆菌属类型 21; 6a. 硫酸软骨素 B 多糖; 1e. IM3-BSA 和 2e. IM3-KLH。

30

如上讨论, 16.4.12E (腔型) 而不是 4.3. F1 (沟型) 与 IM3-BSA (1e) 和 IM3-KLH (2e) 结合反映这两种单克隆抗体的表位特异性结合活性。然而未预料到它们与其它抗原结合。交叉反应性的荧光强度比与 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 N279 的结合要弱得多。在高抗原浓度下 (500 $\mu\text{g/ml}$) 检测到它们, 相当于或比在低得多的抗原浓度 (0.8-4 $\mu\text{g/ml}$) 下特异性结合的信号更低。在 ELISA 平板上, 该微弱的交叉反应性是不可检测的 (数据未显示)。因为 CS-B 不是一种微生物抗原而是从猪肠粘膜制备的, 对 CS-B 多糖的交叉反应性 (图 2A 和图 2B) 是有趣的。进一步的研究该反应性导致在小鼠和人中作为一种细胞类型特异性标记的 Dex-IdX 的发现 (图 3-5)。

(C) 抗原微阵列的临床应用

基于抗原的微阵列可以用于检测和表征广泛范围的微生物感染。在感染过程中, 不管病毒的, 细菌的, 真菌的还是寄生的, 宿主通常以形成抗体来应答, 所述抗体可以通过用于抗原检测的方法中任一种的改进形式来检测。抗体的形成和它们的时程取决于由感染提供的抗原刺激。这些模式的识别提供近来或过去感染的证据。大批抗原的微阵列使可以在单次试验中检测多种特异性并因此可以迅速诊断感染。随着更多的微生物抗原和/或它们的抗原决定簇被表征和应用即用微阵列的诊断能力将只会增加。

为了证明该原理, 生产具有大约 50 种抗原的小规模抗原微阵列 (图 2) 并使用来源于正常个体和患有腹腔疾病患者的人血清检验。将该样品在含有 0.025% 吐温 20 的 1% BSA-PBS 中以 1: 20 稀释并且加至微阵列。通过应用与荧光分子偶联的对人 IgG 或 IgA 特异性的第二抗体 (抗人 IgG^{Cy3} 和抗人 IgA^{Cy5}) 显示结合的人抗体。使用血清样品的这些排列抗原微斑点的阳性染色为 6% (检测到五十个斑点中的三个) 至 12% (检测到五十个斑点中的六个)。检测的抗原主要是微生物多糖, 其包括克雷伯氏杆菌属多糖类型 7, 13, 14, 21 和 33, Dudmans Rhizobium Trifelli TA1 和果聚糖。

尽管还检测到 IgAs, 阳性染色的大多数是人 IgG 抗体。该研究已经

证明即用微阵列具有检测人血清中特异性抗体的敏感性。在本领域微点样技术当前能力的条件下，在单块载玻片上可以排列大约两万种抗原。因此期望该微阵列能够在单次实验中使用非常有限的样品表征广泛范围的微生物感染。

5

III. 讨论

即用微阵列显著不同于已知的仅靶向核酸的 cDNA 微阵列和寡芯片技术。申请人已经使用高通量微阵列技术开发一种用于检测，定量和表征蛋白质，糖类和其它生物分子的新策略，并且其可用于后基因组研究的新领域，即蛋白质组学和糖组学。

不同于逐个检测特定分子的当前的免疫测定，该技术是设计用来在单次试验中检测和定量大量不同的生物分子。结合高通量微阵列技术和敏感的聚焦荧光扫描方法，该技术可用于使用少量的生物样品，如一滴血或其它体液检测数千种不同的分子。该技术可以扩展到蛋白质表达和翻译后修饰的全基因组扫描。

15

参考文献

1. Ramsay, G., DNA chips: state-of-the art. *Nature Biotechnology*, 1998.16 (1) : p. 40-4.
- 20 2. Brown, P. O. and D. Botstein, Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature Genetics*, 1999.21 (1 Suppl) : p. 33-7.
3. DeRisi, J. L., V. R. Iyer, and P. O. Brown, Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, 1997.278 (5338): p. 680-6.
- 25 4. Lueking, A., et al., Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical Biochemistry*, 1999.270 (1) : p. 103-11.
5. Ge, H., UPA, a universal protein array system for quantitative detection of protein-protein, protein DNA, protein-RNA and protein-ligand interactions. *Nucleic Acids Research*, 2000.28 (2): p. e3.
- 30 6. Varki, A., Biological roles of oligosaccharides: all of the theories are correct.

- Glycobiology, 1993. 3 (2): p. 97-130.
7. Feizi, T., Carbohydrate recognition systems in innate immunity. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 1998.435: p. 51-4.
8. Feizi, T. and R. W. Loveless, Carbohydrate recognition by *Mycoplasma pneumoniae* and pathologic consequences. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine*, 1996.154 (4 Pt 2): p. S133- 6.
- 5 9. Zareba, T. W., et al., Binding of extracellular matrix proteins by enterococci. *Curr Microbiol*, 1997.34 (1) : p. 6-11.
10. Wang, D. and E. A. Kabat, Carbohydrate Antigens (Polysaccharides), in *Structure of Antigens*, M. H. V. V. Regenmortal, Editor. 1996, CRC Press: Boca Raton New York London Tokyo. p. 247-276.
11. Wang, D., et al., The repertoire of antibodies to a single antigenic determinant. *Molecular Immunology*, 1991.28 (12): p. 1387-97.
12. Cisar, J., et al., Binding properties of immunoglobulin combining sites
15 specific for terminal or nonterminal antigenic determinants in dextran. *J. Exp. Med.*, 1975.142: p. 435-459.
13. Matsuda, T. and E. A. Kabat, Variable region cDNA sequences and antigen binding specificity of mouse monoclonal antibodies to isomaltosyl oligosaccharides coupled to proteins T-dependent analogues of α (1,6)
20 dextran. *J. Immunol.*, 1989.142: p. 863-870.
14. Chen, H. T., S. D. Makover, and E. A. Kabat, Immunochemical studies on monoclonal antibodies to stearyl-isomaltotetraose from C58/J and a C57BL/10 nude mouse. *Mol. Immunol.*, 1987.24: p. 333-338.
15. Wang, D., et al., Two families of monoclonal antibodies to α (1, 6) dextran, V_H 19.1.2 and V_H 9.14.7, show distinct patterns of J_k and J_H minigene
25 usage and amino acid substitutions in CDR3. *J. Immunol.*, 1990.145: p. 3002-3010.

第二组实验

30 I. 材料与方法

A. 糖抗原和抗体

在图 7 中使用的含糖高分子和抗- $\alpha(1,6)$ 葡聚糖 mAbs, 16.4.12E (IgA/ κ) (6), 4.3F1 (IgG3/ κ) (5), 和 45.21.1 (IgA/ κ) (8)是采自哥伦比亚大学已故教授 Elvin A. Kabat 的收集。如同所描述 (9), 通过亲和纯化的方法获得纯化的蛋白 4.3F1, 45.21.1 和 16.4.12E。在我们实验室按照标准方法 (10) 制备了生物素化或 FITC-偶联的抗-葡聚糖抗体。从 Sigma (St. Louis, MO) 购买分子量 20 kDa, 70 kDa, 和 2,000 kDa 的 FITC-偶联的 $\alpha(1,6)$ 葡聚糖, FITC 菊粉, 生物素化的抗-人 IgG 抗体, 碱性磷酸酶偶联的抗-人 IgM 和链霉抗生物素偶联物。用于细胞类型/谱系分析的抗体购自 BD PharMingen (San Diego, CA), 其包括对鼠 CD11b/MAC1, MAC3, TCR- α , TCR- β , CD3, CD4, CD5, CD8, CD19, B220 特异性的抗体, 多配体聚糖-1, 小鼠 IgG3 同型标样 (A12-3) 和德克萨斯红的链霉抗生物素偶联物。链霉抗生物素-Cy3 偶联物是购自 Amersham Pharmacia (Piscataway, NJ), 碱性磷酸酶的红色荧光底物, Vector Red 是来自 Molecular Probes, Inc. (Burlingame, CA)。

B. 印迹糖微阵列

使用一种设计用来生产 cDNA 微阵列的高精度机器人 (GMS 417 Arrayer; Genetic Microsystems, Inc., Woburn, MA) 将糖抗原点样至用硝化纤维聚合物预先包被的载玻片上 (FAST Slides; Schleicher & Schuell, Keene, NH)。将糖抗原以在图形图例中指定的浓度溶解在盐水 (0.9% NaCl) 中。以 $\sim 150 \mu\text{m}$ 的斑点大小和 $375\text{-}\mu\text{m}$ 的中心间距印迹它们。将印迹的糖微阵列风干并在使用前不含干燥剂地室温保存。

C. 糖微阵列的染色和扫描

即将使用前, 用含有 0.05% (体积/体积) 吐温 20 的 PBS, pH 7.4 漂洗印迹了的糖微阵列, 然后通过将载玻片在 1% (重量/体积) BSA 的含 0.05% (重量/体积) NaN_3 的 PBS 中 37°C 孵育 30 分钟封闭。然后在室温下将它们与指示滴定的抗体在 1% (重量/体积) BSA 的含有 0.05% (重量/体积) NaN_3 和 0.05% (体积/体积) 吐温 20 的 PBS 中温育。第二抗体或

链霉抗生物素偶联物的使用在图形图例中指定。用含有 0.05%（体积/体积）吐温 20 的 PBS 漂洗染色的载玻片五次，室温下风干，然后扫描荧光信号。用 ScanArray 5000 标准生物芯片扫描系统（Packard BioChip Technologies, Inc., Billerica, MA）扫描染色的微阵列，并且用与系统相关的 Quant Array 2.1 版软件分析数据。

D. ELISA 和原位免疫荧光

如所描述（6,11）进行 ELISA 和原位免疫荧光染色。通过将组织切片与 0.5 单位/ml 的葡聚糖酶（Sigma）在 100 mM 磷酸钾缓冲盐水（potassium PBS），pH 6.0 中 37℃ 预温育 60 分钟进行葡聚糖酶处理。该条件可以完全去除 FITC- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖分子，其被 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖免疫的小鼠的脾切片中的免疫细胞特异性捕获。

II. 结果和讨论

用于建立糖微阵列技术的模型体系。使用葡聚糖和抗-葡聚糖抗体（1, 2）建立将糖聚合物固定于载玻片上的方法。葡聚糖是完全由葡萄糖组成的聚合物，其主要由 Lactobacillaceae 科和明串球菌属和链球菌属的细菌生产。然而，来源于不同菌株的葡聚糖分子在它们的糖苷键组成中可能显著不同。不像只通过肽键连接的蛋白质，糖类利用许多可能的糖苷键使它们的结构广泛多样化。一些葡聚糖制剂主要或完全是 $\alpha(1, 6)$ 连接，形成具有占优势的直链结构的分子；其它包括多种糖苷键，其包括 $\alpha(1, 6)$ -， $\alpha(1, 3)$ -， $\alpha(1, 2)$ -和其它，产生大量支化的分子（3）（表 1）。先前的免疫研究（2, 4）已经证明通过对葡聚糖分子的不同抗原决定簇或表位特异的抗体可检测该结构特征。因此，该系统适合于开发用于固定糖抗原和在一种表面固定化的构型中研究它们免疫性能的方法。

我们使用异硫氰酸荧光素（FITC）偶联的多糖作为探针来研究硝化纤维包被的载玻片是否可用来非共价结合地固定糖聚合物微斑点。使用显微印迹装置将不同分子量的 FITC- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖制剂和结构上不同的多糖，菊粉印迹在载玻片上以生产糖微阵列（图 6A）。然后通过针对扫描互补 DNA（cDNA）微阵列开发的显微扫描系统捕捉和定量它们的荧光

信号。通过分析在彻底洗涤后保留在载玻片上的荧光强度，我们证明了 20 kDa-2,000 kDa 的葡聚糖制剂和 3.3 kDa 的菊粉全部非化学偶联地稳定固定在硝化纤维包被的载玻片上。然而，它们的固定化效率显著受分子量影响。较大的葡聚糖分子比较小的分子更好的保留（图 6A, B）。

5 为了研究固定的糖高分子是否保持它们的抗原决定簇或表位，将不同键组成（3）和不同末端对内部表位比率的葡聚糖制剂印迹在硝化纤维包被的载玻片上。这些制剂包括展示内部线状的和末端非还原末端表位的 N279；大量支化和主要表达末端表位的 B1299S；和合成的由 100% $\alpha(1, 6)$ -连接的内部直链结构组成的葡聚糖 LD7。将葡聚糖微阵列与确定特异性的单克隆抗体（mAbs），沟型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 4.3F1 (IgG3) (5) 或腔型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 16.412E (IgA) (6) 温育。前者识别 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 ($\alpha(1, 6)$ destrans) 的内部直链；后者对于多糖的末端非还原末端结构是特异的。如图 7A（左）中所示，沟型 mAb, 4.3F1 (参考文献 5,7) 与主要具有直链结构的葡聚糖制剂 N279 和 LD7 结合，而与大量支化的 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖，
10 B1299S 微弱地结合。相反，当使用腔型 mAb 16.4.12E（图 7A, 右）时，它与固定的具有分支的葡聚糖制剂（N279 和 B1299S）结合而不与只具有内部直链结构的那些（LD7）结合。该抗原-抗体反应性模式在特征上与通过 ELISA 结合测定（图 7B）和其它适于沟型（4, 5, 7）或腔型（4, 6）抗葡聚糖 mAbs 的传统定量免疫测定所鉴定的相同。因此，我们得出结论：固定在硝化纤维包被的载玻片上的葡聚糖分子很好地保持了它们的免疫性能。它们被腔型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖识别的非还原末端结构和被沟型抗- $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖结合的内部直链表位在固定后均展示在表面并对于水溶液中的抗体是可及的。
15

25 参考文献

1. Wang, D. & Kabat, E. A. Carbohydrate antigens (polysaccharides); *Structure of Antigens*, Vol. 3 (ed. M. H. V. V. Regenmortal) 247-276 (CRC Press, Boca Raton FL; 1996).
2. Wang, D. et al., The repertoire of antibodies to a single antigenic
30 determinant. *Mol. Immunol.* 28, 1387-1397 (1991).

3. Jeanes, A. Immunochemical and related interactions with dextrans reviewed in terms of improved structural information. *Mol. Immunol.* 23, 999-1028 (1986).
4. Cisar, J., Kabat, E. A., Dörner, M. M. & Liao, J. Binding properties of
5 immunoglobulin combining sites specific for terminal or nonterminal
antigenic determinants in dextran. *J. Exp. Med.* 142, 435-459 (1975).
5. Wang, D. et al., Two families of monoclonal antibodies to α (1, 6) dextran, $V_H19.1.2$ and $V_H9.14.7$, show distinct patterns of J_K and J_H minigene usage and amino acid substitutions in CDR3. *J. Immunol.* 145, 3002-3010 (1990).
- 10 6. Matsuda, T. & Kabat, E. A. Variable region cDNA sequences and antigen
binding specificity of mouse monoclonal antibodies to isomaltosyl
oligosaccharides coupled to proteins. T-dependent analogues of α (1, 6)
dextran. *J. Immunol.* 142, 863-870 (1989).
7. Chen, H. T., Makover, S. D. & Kabat, E. A. Immunochemical studies on
15 monoclonal antibodies to stearyl-isomaltotetraose from C58/J and a C57BL/10
nude mouse. *Mol. Immunol.* 24, 333-338 (1987).
8. Sharon, J., Kabat, E. A. & Morrison, S. L. Association constants of
hybridoma antibodies specific for α (1-6) linked dextran determined by
affinity electrophoresis. *Mol. Immunol.* 19, 389-397 (1982).
- 20 9. Lai, E. & Kabat, E. A. Immunochemical studies of conjugates of
isomaltosyl oligosaccharides to lipid: production and characterization of
mouse hybridoma antibodies specific for stearyl-isomaltosyl oligosaccharides.
Mol. Immunol. 22, 1021-1037 (1985).
10. O'Shannessy, D. J., Dobersen, M. J. & Qarles, R. H. A novel procedure for
25 labeling immunoglobulins by conjugation to oligosaccharide moieties.
Immunol. Lett. 8, 273-277 (1984).
11. Wang, D., Wells, S. M., Stall, A. M. & Kabat, E. A. reaction of germinal
centers in the T-cell-independent response to the bacterial polysaccharide α
(1-6) dextran. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 2502-2506 (1994).

第三组实验

I.介绍

微生物感染可对宿主暴露和释放多种抗原物质，引发广泛的宿主免疫应答，其包括产生特异性抗体的 B 细胞应答，和导致特异性 T 细胞激活和产生细胞因子的 T 细胞应答。还存在巨噬细胞，树突细胞和其它佐细胞的激活，其导致差异分布型（differential profiles）的细胞因子和炎症因子的产生。当它们直接释放或在与宿主细胞或细胞因子相互作用后一些微生物物质对于宿主是致死性的。不同类型的宿主细胞和多种蛋白质因子的相互作用以及它们与侵入病原体的相互作用决定微生物感染的进程和结果。例如，在炭疽感染中，病原体炭疽杆菌可对宿主暴露和释放许多不同结构特征的抗原，其引发广泛的宿主应答图景（图 8）。

为了更好地理解传染病的病理机制，监控整个范围的多参数宿主应答和鉴定应答的特征模式是极其重要的。对于生物医学科学家和临床医师而言，监控如此复杂的宿主应答和宿主-微生物相互作用长期以来是一个挑战。许多抗原-抗体结合测定当前用于传染和非传染病的临床诊断。这些包括传统的直接免疫测定，如免疫扩散，免疫电泳，凝集和免疫沉淀法，和近来开发的方法，其包括免疫荧光，放射免疫测定法（RIA），酶-免疫测定（EIA）和蛋白质印迹测定。这些方法利用抗原-抗体相互作用的特异性，但是它们是被设计用来在逐个的基础上操作。

基因组测序计划的迅速发展已经导致一代用于生物学和医学研究的高通量技术的开发。这些包括基于核酸的微阵列（6，7）或 DNA 芯片（8），和基于蛋白质的微阵列（9，10）。我们近来的努力已经集中在开发基于糖和蛋白质的微阵列技术以扩展关于糖介导的分子识别和抗-感染应答的生物医学研究的范围（对于我们最新的进展参见参考文献 11 和下一部分）。

表面展示生物分子的微斑点形式具有取得高度敏感性和同时检测溶液中多种结合伙伴（binding partner）的优势。由于在溶液相中饱和表面固定的分子微斑点所需的分子数量是相当小的，可以使用相对较低摩尔浓度的溶液中的分子实现结合。简而言之，认为较小的微斑点比较大的

斑点在测定系统中它的检测敏感性方面要好（12，13）。

（A）A类病原体和它们的基因组信息

对我们国家安全造成当前危险的高度优先（High-priority）传染物包括作为 A 类病原体已知的多种微生物病原体，如炭疽杆菌（炭疽），肉毒梭菌（肉毒中毒），鼠疫杆菌（天花），痘疮病毒（痘疮），土拉热弗朗西丝氏菌（土拉菌病）和病毒性出血热（拉沙病毒，埃博拉病毒，马尔堡病毒和淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒）。当前难以获得允许在单次测定中使用有限的临床样品检测和表征这些病原体的测定系统。

对于许多病原体可获得大量的基因组信息（14-16），其提供很多机会给传染病研究领域。然而，为了开发诊断蛋白质芯片，从包括大批功能未知基因的大量基因中鉴定候选物是当前的挑战。如下详述，我们已经建立一种促进基因选择和鉴定的策略，所述基因具有作为用于接种和诊断的新分子靶的潜力。由微生物全基因组测序提供的信息也可推进在期望特性的人工物种的分子工程方面的发展。还有关注将实验室扩增的遗传物质释放至环境中可促进重组或新进化的微生物物种或菌株的自然发生。取决于微生物的本性以及使用它们的方式，如此出现的微生物对公共健康可以是有益的或有害的。因此，在设计高通量的免疫测定中，必须考虑现存的病原体以及它们的突变型或重组形式的检测。如果使用给定微生物的一批抗原和/或它们的特异性抗体生产诊断生物芯片来检测病原体的多种分子靶，该目标是可实现的。申请人通过将一批 HIV-1 蛋白质印迹在单块芯片上以检测由不同种类或进化枝的 HIV-1 病毒导致的 HIV-1 感染已经检验了该建议的可行性（参见图 11 和 12）。

（B）基于抗原的生物芯片

设计一种抗原生物芯片以检测和定量在体液中的抗体。在无论病毒的，细菌的，真菌的或是寄生的感染中，宿主通常随着形成抗体产生应答，所述抗体可以通过更改用于抗原检测的方法的任何一种来检测。抗体的形成和它们的时程取决于由感染提供的抗原刺激。这些模式的识别给我们提供了近来或过去感染的证据。建立展示大批微生物抗原和源于

宿主的自身抗原的生物芯片将大大地扩展关于宿主和微生物之间的生物关系以及理解传染病分子机制的生物医学研究范围。糖抗原和蛋白质抗原对于设计和生产诊断生物芯片都是重要的。

微生物来源的糖结构，包括多糖，糖脂和糖蛋白，经常作为宿主细胞识别和产生应答的主要抗原结构（17）。然而，单个的微生物抗原可展示多种抗原决定簇，在一种给定的感染中它们中的一种或几种占优势。例如，一种相对简单的微生物多糖， $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖 N279 展示内部直链和末端非还原末端结构作为独特的抗原决定簇。当将该多糖注射于 Balb/c 小鼠时，它引发指向 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖内部直链表位的主要的抗体应答。内部直链表位因此定义为对于宿主的优势抗原决定簇。引发的抗体完全或主要是沟型抗-葡聚糖。在该情形中，末端非还原末端结构显然是次要的抗原决定簇。因此，将优势抗原决定簇寄予为高度优先作为用于疫苗设计或开发用于诊断的免疫测定的目标。

然而，鉴定次要抗原决定簇也是重要的，因为可能优势抗原结构不适合接种或诊断应用；而次要抗原决定簇可用作适于这些应用的分子靶。一些微生物抗原可共有或模拟宿主组分。这已知为抗原交叉反应性。例如，在人组织糖蛋白和神经节苷脂上发现在 B 类脑膜炎球菌和大肠杆菌 K1 的荚膜中的 $\alpha(1 \rightarrow 8)$ NeuNAc，复杂化了荚膜多糖在接种中的应用，特别是在具有糖结构聚合形式表达的婴儿中。也存在优势抗原结构可用于诊断但不可用于接种的情形。例如，HIV-1 的 Gag p24 蛋白在大多 AIDS 患者中引发优势抗体应答。检测抗-Gag 抗体具有诊断价值。然而，这些抗体没有 HIV-1 中和活性，因为 Gag 不表达在 HIV-1 病毒表面。甚至对于 HIV-1 的包膜蛋白，gp120，其是表面展示的并且对于抗体识别是可及的，只存在在病毒中和过程中抗体能够对其有效的几种糖蛋白表位（18）。

随着当前免疫学的发展，将次要抗原决定簇转变为优势抗原决定簇在技术上是可实现的。例如，抗原可以与一种载体分子偶联，形成一种高度抗原性的偶联分子。如使用模式抗原系统 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖所证明，可将异麦芽三糖（IM3），其源于多糖 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖，与 BSA 或 KLH 偶联产生一种半合成糖蛋白来展示多糖的次要抗原决定簇，即 $\alpha(1, 6)$ 葡聚糖的末端非还原末端表位。当将该糖缀合物注射于 Balb/c 时，诱导了对末

端抗原决定簇的优势抗体应答。用这样一种人造的半合成糖缀合物免疫现在众所周知为结合疫苗 (conjugate vaccine)。一个显著的实例是使用流感嗜血杆菌 b 类多糖的蛋白质-缀合物接种, 其导致流感嗜血杆菌脑膜炎和其它在婴儿和儿童中的发生率下降 (19, 20)。认识到在炭疽杆菌中
5 存在多糖和糖蛋白已经一段时间 (4, 21, 22)。然而, 这些糖结构是否是适于炭疽接种的合适的靶子是一个未决问题。

交叉反应性抗原决定簇的识别经常显示是具有生物学和医学意义。存在许多证明了的情形, 其中微生物抗原模拟宿主组分的结构, 帮助微生物逃避宿主的免疫防卫 (23, 26)。这类模拟微生物抗原还可诱导自身
10 免疫病并有助于传染病的发病 (23, 27)。鉴定和表征这类抗原结构可导致对传染病分子机制的更好理解。

不表达在微生物表面的抗原结构 also 具有重要诊断价值。例如, 检测对乙型肝炎 表面抗原 (HBsAg) 特异性的抗体可显示早期病毒感染或成功接种; 检测对多种病毒抗原如表面抗原 (HBsAg) 加上核心抗原
15 (HBcAg) 或 HbsAg 加上相关的 e 抗原 (HBcAg) 特异性的抗体提示活性感染或疾病的发展 (28, 29)。微生物病原体, 病毒或细菌, 可释放引发宿主抗体应答的多种抗原物质。在早期感染中, 作为一种初始免疫应答, 引发的抗体主要是与表面抗原结合的那些并且主要是 IgM 抗体。随着传染病的发展, 例如在一位血清转化数月后的 AIDS 患者中, 在患者
20 的血清中可以检测到大批的具有不同特异性的 IgG 抗体, 包括 HIV-1 的抗-gp120 (包膜蛋白) 和抗-Gag p55 多蛋白。因此, 将生物芯片上的表面和非表面抗原的组合用于诊断可以帮助识别感染的阶段或步骤并提供信息来预测疾病发展和评估治疗药剂或策略的功效。

开发针对微生物感染的药物或治疗策略要求更好地理解传染病的致病机制。例如, 炭疽毒素在它激活时是致死的。该过程涉及炭疽蛋白质, 宿主细胞和蛋白质因子的分子和细胞相互作用的多个步骤 (1-3)。炭疽
25 保护性抗原, 名为 PA, 是炭疽杆菌致死毒素的一个整合组分。它与一种特异性细胞受体结合并与水肿因子 (EF) 和致死因子 (LF) 形成有毒的, 结合细胞的复合物 (1-3)。该理解导致一种保护宿主不受由毒素导致的
30 致死攻击的基于多价抑制剂的治疗策略的开发 (5)。技术上, 鉴定在形

成有毒复合体中或在 PA 和它的巨噬细胞受体相互作用中起关键作用的结构部分或表位非常重要。一般而言, 与它们的伙伴相互作用或被它们的伙伴识别的蛋白质或糖酸聚合物表位是暴露于表面的, 并且因此可被特异性抗体识别。鉴定该抗原-抗体对是非常重要的。这些对可以作为用于筛选较小分子以鉴定可封闭炭疽毒素作用的候选药物的特异性探针。开发一种大容量和多样性的基于抗原结构的生物芯片将促进鉴定该关键结构成分和筛选用于药物开发的它们的特异性抗体的成就。

因此, 为了诊断, 接种和药物开发的目的, 识别针对特定的抗感染抗体应答的优势和次级抗原决定簇以表征抗原结构的特异性和交叉反应性; 和全范围扫描由感染引发的抗体所有组成成分的特异性是重要的。由于缺乏高通量, 多参数测定系统, 该研究已是不可能。开发一种基于糖和蛋白质的生物芯片以呈现大量的抗原结构, 包括在每个微斑点上展示单个抗原决定簇的那些, 将大大地促进这些研究。

15 (C) 基于抗体的生物芯片

原则上, 基于抗原的生物芯片是设计来检测和定量特定的抗体并因此诊断感染。该方法不是为了检测和定量从传染物释放的抗原。在血清或其它体液中检测微生物抗原通常比检测抗体更困难。然而, 前者比后者具有更高的诊断价值。因此, 需要建立一种高度敏感的基于抗体的微阵列以检测微生物抗原。

宿主抗感染应答的复杂性进一步挑战开发一种用于表征传染病的多参数免疫测定。在感染过程中, 可释放大批不同结构特征的抗原物质, 其包括蛋白质, 多糖, 糖脂, 糖蛋白和核酸, 以引发宿主免疫应答。这些物质在它们的免疫性能方面可能显著不同, 因此引发特征模式的宿主应答。例如, 蛋白质抗原在缺少胸腺的小鼠中未能引发抗体应答, 而多糖和其它具有重复抗原决定簇的高分子在这些小鼠中可诱导未削弱的抗体应答 (30-32)。前者称为依赖胸腺 (TD) 的抗原, 后者称为不依赖胸腺 (TI) 的抗原。可通过体外免疫测定识别的 TI-和 TD-抗原应答的差异包括一系列体液因素, 如抗原特异性抗体, 它们的 Ig-同型, 细胞因子和其它炎性因子。

为了更好地理解传染病，必须研究整体范围的抗感染应答。这些包括特异性的抗体应答以及抗原-非特异性细胞因子应答和其它宿主应答。细胞因子是可溶性蛋白质或糖蛋白，其在控制淋巴细胞的发育或分化和调节它们的抗感染应答中起关键作用。例如，微生物感染或接种可激活特定的 T 细胞亚型，或者 T 辅助 1 (Th1) 细胞或 T 辅助 2 (Th2) 细胞。这些特化的 Th 细胞可产生独特的细胞因子分布型。Th1 分泌 IL-2, IL-3, TNF- α 和 IFN- γ ; Th2 分泌 IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 和一些 TNF- α 。对于抗感染应答，在粘膜位置诱导 IgA-抗体是非常重要的。已经显示 T 细胞和它们的细胞因子在 IgA 应答的不同阶段起关键作用 (33-35)，其包括诱导 IgM 至 IgA 的 Ig 类别转换和 IgA-定向 B 细胞的终末分化。因为有证据表明需要 Th2 细胞因子如 IL-4, IL-5 和 IL-6 来诱导 IgA-定向 B 细胞的终末分化，许多研究者认为 IgA 应答是高度依赖 Th-2 (36-39)。相反，Th1 细胞因子，IFN- γ 在它的 IgA 诱导中对抗 IL-4。

我们当前的努力集中在开发高通量后基因组技术以扩展关于人传染病和人免疫应答的生物医学研究的范围。已经制备了基于糖和蛋白质的微阵列，其使得可以在单块生物芯片上展示大批的抗原以探测抗体所有组成成分的特异性和大规模研究糖和蛋白质介导的分子识别。该微阵列平台已经实现用少至数微升的血清样品检测广泛范围的人抗体的敏感性，并已经达到包括大多数普通病原体的抗原制剂的容量。因此，该技术容易适用于大规模生产抗原/抗体微阵列。在本发明中，我们描述建立用于工业化规模生产诊断生物芯片的详细方法以使能够同时检测和表征广泛范围的微生物感染，其包括所有列出的 A 类生物战争病原体 (agent)。这些包括 (a) 设计和生产基于糖的微阵列，其由微生物多糖，它的衍生物和大批的不同糖结构的含糖高分子组成；(b) 利用对于特定病原体可获得的基因组信息设计和生产蛋白质组微阵列以鉴定用于接种，诊断和药物开发的新分子靶的一种方法；(c) 生产基于抗体的微阵列系统以体内和体外监控微生物抗原并使能够用有限量的临床样品全范围扫描细胞因子和其它炎性因子的一种方法；和 (d) 设计和生产高度敏感的诊断生物芯片，其包括用于迅速检测由 CDC 作为 A 类病原体列出的所有生物战争病原体的诊断生物芯片 A 和 B 以及用于同时检测和表征由大约 200

种人病原体导致的广泛范围的普通传染病的诊断生物芯片 C。

II. 生产大容量和高密度生物芯片 (~30,000 微斑点/微芯片) 的方法

与基于 DNA 和蛋白质的微阵列相比, 糖微阵列技术具有某些技术优点和缺点。一个显著优点是纯化的多糖通常在各种条件下, 作为干燥固体或在水溶液中, 在室温或 4°C 保存中是稳定的。不像蛋白质微阵列, 其中在微阵列印迹和保存中蛋白质变性和/或构象改变是对技术的主要挑战, 对于大多数 (如果不是全部) 糖抗原没有如此严重的忧虑。糖微阵列技术的一个缺点是与用于扩增 DNA 的 PCR 或用于生产蛋白质的克隆和表达方法相当的用于高通量生产糖高分子或复合糖的方法还有待开发。获得纯的糖抗原的传统方法包括 (a) 从生物材料如细胞, 组织或生物流体分离和纯化; (b) 化学合成; 和 (c) 体外酶促合成。在建立用于体外合成糖高分子或复合糖分子的高通量技术方面的迅速发展最可能是意想不到的。因此, 纯化的糖抗原的可获量(availability)是对糖微阵列工业的潜在的限速因素。

我们优化的印迹微阵列的方法允许任何人: (i) 减少微阵列印迹需要的抗原量; (ii) 提高检测敏感性和生物芯片的容量; (iii) 减少微阵列印迹周期需要的时间; (iv) 防止在印迹微阵列过程中的交叉污染; 和 (v) 大大减少生产诊断生物芯片的成本。

20

(A) 印迹较小大小和高密度的微斑点

常规的印迹方法在图 9 中图解说明。使用一种设计来生产 cDNA 微阵列的高精度机器人将糖抗原点样在用硝化纤维聚合物预先包被的载玻片上。另外, 还使用到下列各项:

- 25 a) 用于将 150 微米直径微斑点印迹于硝化纤维载玻片上的 STEALTH 3 针头。这能够在每块 FAST-载玻片上排列斑点中心间距为 250 微米的 10,368 个斑点; 和
- b) 用于在表面上印迹直径为约 100 微米的斑点的 STEALTH 2.5 针头。
- 在单块 FAST 载玻片上可组合 28,800 个斑点。如果将每种抗原制剂作为四个相同斑点的排列来印迹 (参见下图 12), 可将 7,200 种抗原分
- 30

子包括在单块的载玻片上。因此该系统具有足够的容量来包括大多数已知的人微生物病原体和肿瘤相关抗原。

III. 诊断生物芯片

5 (A) 诊断生物芯片 A

该芯片是设计来能够同时检测所有 A 类传染病。在它的临床应用中，要求两步染色。对于每种病原体将许多精心选择的抗原和抗体对印迹在载玻片上。固定的抗原作为检测溶液中抗体的探针；表面展示的抗体是用于捕捉溶剂中特定的抗原。因此，该测定能够在单次测定中检测抗原和抗体。由于固定的抗原可展示多个抗原决定簇，抗原微斑点可捕捉识别由抗原分子表达的不同抗原决定簇的抗体。这使得生物芯片系统高度敏感。然而，它的检测特异性是在抗原分子水平而不是在单个抗原决定簇水平。在抗原表达交叉反应性抗原决定簇的情形中，它的检测特异性将降低（为了进一步讨论参见诊断生物芯片 B 的设计）。

15 (1) 8-隔室子阵列（参见图 10）：

每个微型载玻片含有八个充分分开的相同内容物的子阵列。每个子阵列有 600 个微斑点，斑点尺寸大约为 200 微米，中心间距 300 微米。因此，单块载玻片是设计用来能够进行八次检测；

(2) 含有：

20 (a) 微斑点：每个 600-点的子阵列是由糖和蛋白质抗原以及对微生物抗原特异的抗体组成。固定的抗原可以检测由感染引发的人的抗体；而固定抗体是用于检测微生物抗原；

(b) 重复和稀释：将以 0.5-1.0 mg/ml 和以 1:10 稀释的初始浓度为第二浓度来印迹每种抗原/抗体。每种给定浓度的制剂将重复三次；和

25 (c) 抗体同型标准曲线：已知浓度的 IgG, IgA 和 IgM 同型的人抗体将作为用于抗体检测和标准化的标准曲线。

(3) 测定机制：

(a) 检测抗体：使用固定抗原来捕捉溶液中的抗体，其然后被标记的抗人抗体识别。原则上这是一种间接免疫测定；

30 (b) 检测微生物抗原：使用固定抗体来捕捉溶液中的抗原，并使用标记

的对相应抗原特异的抗体鉴定捕捉的抗原。这已知为“夹心”免疫测定。

(4) 使用和染色方法:

将 0.5-1.0 微升血清样品用于检测 a) 在体液中的特异性抗体和 b) 体内和体外抗原的存在。需要两步染色和大约 5 小时来完成生物芯片分析。

(5) 特异性&敏感性:

一种高度敏感的具有抗原分子水平上特异性的生物芯片系统。

(B) 诊断生物芯片 B

10 该生物芯片是设计用来能够迅速诊断 A 类传染病，在临床诊断中其只需要单个染色步骤。因此，生物芯片测定需要的时间大大地缩短了。竞争性免疫测定用来快速诊断。竞争性免疫测定需要一种抗原/抗体对。可以将抗原或抗体固定在固体表面，其随后将与溶液中的抗原或抗体相互作用。固定的抗原和溶液中的标记抗体形成一种特异的探针来检测临床样品中的抗原和抗体。游离的抗原或抗体竞争性抑制标记抗体与固定在固体表面上的抗原的结合。该“竞争性”一步生物芯片不同于诊断生物芯片 A 的关键特征概述如下:

(1) 芯片含量:

20 使用上述方法将一批精心选择的可获得它特异抗体的微生物抗原印迹在芯片上。

(2) 测定机制:

25 游离的抗原或抗体可和标记的抗原或抗体竞争来与固定的抗原或抗体结合。假定抗体在溶液中通常比其它蛋白质分子更稳定并适合标准化生产，优选将抗原印迹在一系列的载玻片上并使用荧光标记的抗体染色。如果所考虑的临床样品含有对靶抗原决定簇或抗原特异的抗体，则标记抗体与抗原的结合将被竞争性地抑制。

(3) 使用和染色方法:

一步染色的生物芯片可以体内和体外检测抗原的体液中的特异抗体。因此，生物芯片分析需要的时间被缩短了 4 小时。

30 (4) 特异性和敏感性:

诊断生物芯片 B 是一种高度敏感和特异的生物芯片系统。它的特异性是在单个抗原决定簇的水平。

(C) 诊断生物芯片 C

- 5 诊断生物芯片 C 是由大量的糖和蛋白质抗原以及抗体组成。这是一种大规模扩展了的诊断生物芯片 A。该生物芯片使得能够使用数微升的血清样品诊断和表征广泛范围的微生物感染。该微阵列具有包括大多数普通病原体的印迹容量。实际上, 它被特异的抗原制剂和它们抗体的可获得量所限制。可以将 1000-2000 种不同的抗原和抗体印迹在芯片上。
- 10 这使得可以同时检测大约 300 种微生物, 其包括大约 50-100 种人病原体。标准微阵列 (master microarray) 的常规性能概述如下:

(1) 容量:

每块微型载玻片 15,000-20,000 斑点, 斑点大小直径大约为 150 微米中心间距为 200 微米。

15 (2) 多样性:

1000-1500 种不同的抗原制剂, 大约 100 种对于微生物抗原特异的抗体和大约 30-50 种用于检测人细胞因子和其它炎性因子的抗体。

(3) 重复和稀释

每种抗原四个稀释 (0.5 mg/ml 开始) 并且每个稀释有三个重复。

20 (4) 抗体标准曲线:

将已知浓度的 IgG, IgA 和 IgM 同型的人抗体印迹在芯片上以产生用于贯穿实验的标准化和定量计算由糖抗原捕获的给定同型的特异性抗体的效价的标准曲线。

25 (D) 诊断生物芯片 D

- 该生物芯片是由大约 4,000 个抗原和抗体制剂的微斑点组成。将每种给定稀释的抗原或抗体制剂以在微斑点垂直线中四次重复的方式印迹在生物芯片上。这使我们可以视觉观察和统计学分析微阵列印迹和染色的重复性。也可统计学计算对于给定抗原浓度的每种抗原的抗体检测的显著性和敏感性。将一些制剂例如在图 11 中以正方形突出的 HIV-1
- 30

的 gp120 糖蛋白从左到右以 1:5 的系列稀释, 从 0.5-1.0 mg/ml 开始其后稀释四次来印迹。使用上述方法用正常或 HIV-1 感染的人血清样品将这些生物芯片染色。在图 11 中显示多颜色荧光染色的生物芯片 ScanArray 显示的照片。

5 在本实验中, 我们已经证明: (a) 用于微阵列印迹, 抗原/抗体固定和抗体染色的程序是精确可重复的。在相同的生物芯片上, 交叉相同制剂不同微斑点的数据的相关因子是在(0.98)-(1.00)的范围内; (b) 用该方法检测人血清抗体是高度敏感的。数微升的血清样品允许在单次测定中全范围扫描不同 Ig-同型的人抗体的所有组成成分。在正常和 HIV 感染的个体中识别了大量的抗体特异性; (c) 通过识别单克隆抗-葡聚糖抗体的表位结合特异性和特异性的检测针对 AIDS 患者中 HIV-1 的 gp120 糖蛋白和 gag p24 的人血清抗体举例说明了该系统的特异性; (d) 可以在单块微型载玻片上组合大量的微生物抗原, 达到包括大多数普通和传统病原体的容量; 和 (e) 基于生物芯片的高通量技术需要丰富生物信息的存在来支持它。虽然对于一种给定的临床样品一个人可能需要一天来进行生物芯片测定, 但一个人可能需要许多天来处理由生物芯片分析产生的大量数据。开发先进的计算机算法来促进该方法与提高生物芯片技术的硬件是同样重要。

20 (E) 诊断生物芯片 E

这是一种使用用于生产糖微阵列的微阵列平台生产的基于蛋白质组微阵列的生物芯片。在微生物基因组中大量的基因的发现已经提供了新的用于针对微生物感染的接种, 诊断和药物开发的目标。为了利用这个, 此处使用基因组相对较小并已经完全测序的 HIV-1 来建立基于蛋白质的微阵列技术。将大批纯化的 HIV 蛋白质, 包括来源于 HIV-1 不同分化体的 gp120 蛋白质, Gag p55, p24, P6, P7, P17 和/或它们的大肠杆菌表达的 GST-融合蛋白, Tat, Nef, 整合酶和逆转录酶 (RT) 印迹和固定在化学修饰的载玻片上。然后将这些蛋白质芯片用于探测正常个体和 AIDS 患者中的抗体。如图 12 所示, 大多数印迹在芯片上的 HIV 蛋白质在 HIV-
30 感染个体中给出阳性的抗体检测但在正常对照中不给出, 显示了该蛋白

质芯片的敏感性和特异性。

因此，我们得出结论：(a) 这些阳性染色的 HIV 蛋白质被稳定固定在生物芯片上并保持了它们的免疫学性能；(b) 蛋白质微阵列系统已经达到了探测临床样品中抗体的所有组成成分的敏感性；和最重要的，(c) 针对我们的生物芯片的生产和诊断应用，引入大批的基因的蛋白质产物，其包括表面和非表面蛋白质，以及新发现的基因是可行的。由于它使我们可以研究已由基因组计划累积的基因组信息和遗传物质的应用，该发现是非常重要的。

10 F) 诊断生物芯片 F

这是一种基于抗体的微阵列，并且被设计成能够全范围扫描人细胞因子。蛋白质水平上的细胞因子检测在技术上是困难的。这些蛋白质是在非常低浓度下发挥作用的有效的生物制剂 (7)。一些细胞因子分子在分泌或激活后不稳定 (7)。检测这些分子需要一种高度敏感的特异性检测。当前用于细胞因子检测的方法，基于 ELISA 的测定或者放射免疫测定法，利用夹心-抗体测定。具体地，将第一种细胞因子特异性抗体固定在固体表面来捕捉溶液中的细胞因子，然后使用第二种抗细胞因子抗体来检测表面固定的细胞因子。第二种抗细胞因子可以被生物素化，允许用标记的链霉抗生物信号扩增。这些方法是高度敏感的但限于在逐个基础上检测细胞因子。

我们已经扩展了我们的微阵列平台来生产基于抗体的生物芯片。排列的抗原允许特异地捕捉来源于体液的抗体并且固定在玻璃芯片上的抗体可以用于检测可溶性抗原和宿主因子，如细胞因子和其它炎性因子。我们以 0.5 mg/ml 的浓度将一批抗-葡聚糖 mAbs 固定在一套载玻片上。这些包括硝化纤维包被的载玻片，聚赖氨酸处理的载玻片，硅烷处理的载玻片和未处理的、预清洗的载玻片。然后将这些载玻片与不同结构的、荧光标记的葡聚糖制剂反应。只有硝化纤维-载玻片显示特异的荧光信号斑点。因此，抗-葡聚糖 mAbs 固定在了硝化纤维-载玻片上 并保持了它们的抗原结合特异性。

30 我们进一步提出硝化纤维包被的载玻片是否可用于将抗体固定在芯

片上长期保存。为了研究保存抗体微阵列的条件，我们将这些微阵列放置在不同条件下：(a) 在室温风干条件下；和 (b) 在 4℃ 保存的封闭溶液中。六个月后，我们用标记的抗原将这些抗体微阵列染色。我们发现 (a) 组和 (b) 组的载玻片都保持捕获抗原的活性和特异性。然而，由

5 两组获得的信号显著不同，后者比前者强得多。这些实验已经说明用于抗体微阵列生产的基于硝化纤维的非化学固定方法的潜力。

制备了一种用于全范围扫描人细胞因子的抗体微阵列。当前从各种来源可获得对于人细胞因子特异的多克隆和单克隆抗体，为开发能够高度敏感、高通量、全范围细胞因子扫描的抗体微阵列提供一个强大的基础。

10

我们已经发现当前的微阵列平台有利于检测溶液中的 IgG 抗体但不检测 IgM 抗体。前者是免疫球蛋白 (Ig) 单体而后者是 Ig 五聚体。对于该结果的一个理论是 FAST 载玻片的孔径太小而不允许 IgM 抗体进入和与固定在 3D 硝化纤维架型结构更深层的抗原结合 (关于硝化纤维涂层的 3D 说明参见参考文献 40)。因为它为开发用于生产诊断生物芯片的改善的表面提供信息，该发现是重要的。

15

IV. 寻找和鉴定新的用于诊断和接种的糖靶的方法

将大批含有高分子的糖类印迹在硝化纤维包被的载玻片上，然后用

20 抗体制剂或凝集素将糖微阵列染色以探测展示所考虑的抗原决定簇的微斑点。由微生物抗原或病原体引发的单克隆和多克隆抗体，以及感染个体的血清样品对于这些分析都是有用的试剂。阳性染色的微斑点说明靶分子或抗原决定簇的存在。进一步的表征该抗原制剂可导致对于给定传染病合适诊断分子的鉴定。

25 使用我们的糖微阵列技术从鉴定靶分子到进一步表征结构，我们已经使用炭疽杆菌作为模式病原体来举例说明我们的研究方法。

(A) 作为诊断分子靶的炭疽杆菌相关糖抗原

在炭疽杆菌中存在的糖结构是用于疫苗开发和诊断应用的潜在的分子靶。这些糖结构包括糖蛋白和多糖。糖蛋白是由炭疽杆菌的休眠孢子

30

表达并由特异性凝集素如甘氨酸 max 识别 (41)。由于在炭疽感染最初孢子表面与宿主相互作用, 这些结构很可能是宿主识别和抗体应答的目标。因此它们对于接种和诊断是重要的。多糖是由炭疽杆菌的萌发孢子表达, 其用针对病原体的细胞壁 Gal-NAG 多糖产生的单克隆抗体检测 (22)。可以从微生物细胞壁中分离胞外和/或细胞壁 Gal-NAG 多糖 (22, 42), 其存在于适于生长炭疽杆菌的培养基中 (4)。假定 Gal-NAG 多糖是普遍存在于炭疽杆菌菌株中并且对于炭疽杆菌菌株是特异的 (22), 它在溶液中的存在和它的结构稳定性使该分子成为用于鉴定炭疽杆菌和开发炭疽疫苗的潜在的目标。

- 10 早期研究是由已故 Michael Heidelberger 教授 (关于描述参见参考文献 43, 451 页) 和 Elvin A. Kabat 教授 (44-46) 进行以研究在血型物质 (ABO), 肺炎球菌属类型 14 多糖和炭疽杆菌细胞壁多糖之间的抗原交叉反应性。在哥伦比亚大学 KABAT 中心可获得炭疽多糖制剂。在糖微阵列上检验炭疽多糖并证实该制剂已经保持它的对抗肺炎球菌属类型 14 多糖抗体的交叉反应性 (数据未显示)。

- 下面各项是细胞壁 Gal-NAG 多糖的一些重要特性: (a) 它的分子量是 12,000 Da, 并且以约 3: 2: 1 (22) 或 10: 2: 1 的摩尔比包含半乳糖, N-乙酰氨基葡萄糖和 N-乙酰甘露糖胺。该摩尔比的细微差别是由于使用的水解条件的差异 (47); (b) 它被丙酮酸化, 尽管糖残基和丙酮酸化的位置有待确定 (47); (c) 它最可能是炭疽杆菌特异性的并且由萌芽孢子和营养型杆菌表达 (22); (d) 它显示对肺炎球菌属类型 14 多糖交叉反应性的抗原决定簇 (43); (e) 它不具有人血型物质 A, B, 或 H 活性; 和 (f) 然而, 由炭疽多糖引发的抗血清具有与水解的含有 II 型 Gal-GlcNAc 序列 (Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc) 的血型物质 A 制剂的交叉反应性 (关于 Ivanovicx 25 的研究(1940)的描述参见参考文献 43, 452 页)。

- 这些特征导致结论: (i) 由于丙酮酸化的 Gal-NAG 结构在宿主中不存在, Gal-NAG 多糖表达对小鼠和人有效的抗原决定簇; (ii) 然而, 因为它是一种具有相对低分子量 (1.2 KDa) 的、不依赖胸腺的抗原多糖, 它本身在溶液中是微弱的抗原性的。在这个考虑的条件下, 多糖对被炭疽杆菌攻击的动物不是保护性的早期观察可以归结为在它的天然构型中 30

微弱免疫原性的本性；(iii) 它的 Gal-NAG 核心结构与血型 II 型链的核心结构，Gal β 1 $\rightarrow$ 4GlcNAc 相似。然而，主链结构的丙酮酸化阻遏了它的血型物质 H 活性；和 (iv) 在丙酮酸基团在肺炎球菌属类型 14 多糖中不出现的条件下，炭疽多糖可含有模拟肺炎球菌属类型 14 多糖的那些的非丙酮酸化的抗原决定簇。因此，这导致我们得出结论炭疽杆菌的细胞壁多糖含有多于一种的抗原决定簇。

使用下列方法设计一种糖微阵列来最大化它的潜在抗原结构的表面展示：(a) 将多糖印迹在微阵列上以展示它自然构型形式的抗原决定簇；(b) 分离多糖的丙酮酸化和未丙酮酸化部分，并按照 Mesnage 等描述 (47) 将它们使用在微阵列上。这使得可以研究丙酮酸化的糖结构在它的抗原性中潜在的支配作用；和 (c) 合成一批寡糖-蛋白质偶联物。

在芯片设计中，我们也已经包括寡糖结构，其相同于或来源于与肺炎球菌属类型 14 多糖的那些和与识别一种假定的炭疽杆菌孢子糖蛋白的凝集素甘氨酸 max 反应的那些（对于 α -D-半乳糖或 2-乙酰氨基-2-脱氧- α -D-半乳糖残基是特异性的）(41)。

V. 寻找和鉴定用于抗原/抗体微阵列的抗原和抗体对的方法

检测血清或其它体液中的微生物抗原可用于诊断传染病但通常它是困难的。因此，需要建立一种高度敏感的基于抗体的微阵列来检测微生物抗原。另外，该基于抗体的微阵列将使我们可以环境中以及在宿主体液中监控微生物病原体。为了开发诊断生物芯片，鉴定对于每种病原体高度特异性的抗原和抗体是关键性的。

我们已经建立了一种简单和有效的策略来筛选这些用于微阵列生产的试剂。使用上面建立的方法我们将一批四十八种不同结构特征的含糖高分子印迹在载玻片上。在先前的研究中，将这些抗原成功地用于对人骨髓瘤和淋巴瘤蛋白质筛选具有抗糖活性的抗体 (48, 52, 53)。将糖微阵列用于检测人血清抗体。从正常个体中随机收集总数为二十的血清样品。将来源于每个个体的少至一微升的血清样品用于微阵列染色。如图 14 所示，鉴定了十二种不同特异性的 IgM 抗体 (12/48) 和三十五种 IgG 抗糖抗体 (35/48)。被阳性染色的糖分子包括二十种多糖 (20/24)，十一

种细胞来源的复合糖（11/19）和四种半合成的糖缀合物（4/5）。对于 IgM 同型的抗糖抗体，鉴定了十二种不同的特异性。多数（7/12）与克雷伯氏杆菌属多糖结合。这与我们先前的观察，在人骨髓瘤抗糖抗体的所有组成成分中最经常发现克雷伯氏杆菌属多糖结合的抗体相似（48-52）。

- 5 然而，人 IgG 抗糖抗体的所有组成成分比 IgM 同型的那些广泛。有二十种对于微生物多糖（20/24）是特异的，所述多糖包括微生物病原体，大肠杆菌-K92 和-K100；肺炎球菌属类型 C，VIII，IX，SIV，XIV 和 27；B 类脑膜炎球菌，A 类流感嗜血杆菌和不同种类的克雷伯氏杆菌属的多糖。还检测到对于复合糖结构的糖酸聚合物（11/19）和半合成糖缀合物的糖部分的那些（4/5）特异性的人 IgG 抗体。

- 10 然后将该抗原微阵列用于表征单克隆抗体（图 14，图片 III 和 IV）以严格评估它们的抗原或表位结合特异性和交叉反应性。证明了在微生物多糖 α （1，6）葡聚糖和来源于猪肠粘膜的硫酸软骨素 B 多糖制剂之间的抗原交叉反应性。这已经导致识别一种新的微生物和宿主细胞的交叉反应的分子标记（11）。另外，这些实验证明半合成糖蛋白可适用于构建糖微阵列。因为它允许将合理设计的合成寡糖用于微阵列构建并允许严格检测糖介导的分子识别的特异性和交叉反应性，这是非常重要的。

- 15 如上所述，灵活的 8-隔室生物芯片系统对于一批分子靶的此类初筛是足够的。以此形式，可将所有可获得的八种 A 类病原体的抗原制剂以不同的稀释印迹在单个的子阵列隔室中。可将一种特异性抗体，例如与炭疽多糖结合的小鼠单克隆抗体使用在子阵列生物芯片上来与所有在芯片上的抗原反应。还可以将它以一系列稀释的形式使用在不同的子阵列隔室中。该简单实验使我们可以严格地评估（a）抗体结合特异性和交叉反应性；（b）抗原-抗体相互作用的亲和力；和（c）印迹抗原的质量和用于固定抗原的方法。

- 25 如果通过 8-隔室生物芯片分析将抗原/抗体对定量，使用一种大规模的生物芯片，其展示微生物抗原和来源于人和其它哺乳动物种类的那些，来进行进一步的评估。高度特异的抗原和抗体对是用于诊断相应微生物感染的候选物。与人组织抗原具有交叉反应性的那些也可用于印迹微阵列。如上概述，鉴定该交叉反应性可导致更好地理解微生物和它们的宿
- 30

主之间生物关系以及传染病的发病机制。

VI.寻找和鉴定用于诊断和接种的新蛋白质靶的方法

如上所述，我们已经确定我们的微阵列平台可用于印迹蛋白质微阵列，并且已经证明将大批的蛋白质抗原用于扩展我们微生物感染研究的范围的原理和方法。该研究已经提供了一个人如何将通过基因组测序计划累积的基因组信息和遗传物质结合到开发诊断蛋白质生物芯片中去的洞察力。我们在此报道确定一种策略来有效利用来源于各种病原体基因组计划的信息以帮助鉴定用于诊断和接种的新分子靶。炭疽杆菌的 pX01 质粒将作为一个模型来举例说明我们的策略。

(A) 寻找和鉴定用于蛋白质微阵列的候选物的方法

不同类别的蛋白质可以用来生产诊断蛋白质微阵列。例如 (a) 病原体的膜结合蛋白和分泌蛋白，其在感染中可引发初始免疫应答，使得它们成为用于早期诊断和接种的理想目标；(b) 非表面表达的蛋白质，其可用于鉴定和表征感染的发展阶段；和 (c) 对于给定病原体独特的候选基因，即种特异性或菌株特异性的分子靶，从而能够在最终的生物芯片上高度特异性检测。

当前可在线获得预测的和比较的两类生物信息学软件。可以使用两步分析来鉴定包括在微阵列上的候选基因产物。首先，预测基因组测序计划新发现基因的结构，细胞定位和功能。然后进行比较分析以预测通过上述结构-功能预测分析选择的候选基因的特异性和潜在的交叉反应性。可在线获得将有助于推断一种蛋白质的功能的“预测”软件的目录。这些包括(a)用于预测蛋白质中跨膜螺旋的 TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/>)；(b) 用于预测哺乳动物蛋白中粘蛋白类型 GalNAc O-糖基化位点的 NetOGlyc 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/>)；(c) 用于预测二级结构，溶剂可接近性和跨膜片断的 PredictProtein (<http://www.embl-heidelberg.de/predictprotein/predictprotein.html>)；和 (d) 用于蛋白质折叠识别的 3D-PSSM Web Server V 2.6.0 (<http://www.bmm.icnet.uk/~3dpssm/>)。

通过基因组序列完成时公开的基因注释，或通过预测生物信息学软件，关于现在已知蛋白的预测的定位和结构，通过比较蛋白质组分析确定感兴趣基因对物种是否是独特的是同样重要的。如果我们希望设计一种可特异性鉴定患者是否遭受炭疽杆菌的生物芯片，这是关键性的。在炭疽杆菌和枯草芽孢杆菌中相似的一个基因对于生物芯片将不是一个好的选择，因为当在该领域中使用它时将导致不确定的结果。因此，应该进行仔细的研究以鉴定基因对物种是否是高度独特的，其又导致具有很少交叉反应的、不确定结果的生物芯片。致力于这个问题的潜在有价值的生物信息学工具的一个实例称为 COGnitor 程序。该程序采用氨基酸序列并通过将未知蛋白的氨基酸序列与来源于其它在一系列基因组中表征了功能的基因的氨基酸序列比较来推断它的功能（54）。使用 COGnitor 程序将可以鉴定在进化中高度保守的基因；对于给定生物独特的那些不能为 COGnitor 搜索识别。COGnitor 程序不能识别的蛋白质可能是对于诊断应用的高度优选的候选物，因为它们编码的蛋白质最可能是物种特异性抗原。对于程序识别和分类的基因，必须采取附加的研究步骤来确定它们是否是适合诊断应用的目标。

(B) 举例说明我们鉴定独特基因的比较基因组策略的模型

炭疽杆菌的 pX01 质粒已经完全测序，并且 142 个鉴定的基因中的 46 个已经在文献中在功能上被表征（16）。这给我们提供了使用我们全面的生物信息学策略如何研究具有一些基因注释的完整 DNA 序列的极佳的一个实例。

首先，我们使用预测生物信息软件从它们的氨基酸序列确定蛋白质的定位和结构特征。这个的一个实例是在预测一种蛋白质是否具有跨膜区域，如同由 TMHMM 2.0 版本所确定（55）。我们已选择蛋白质 Px01-54 作为一个实施例。Okinaka 等已经给出该蛋白作为一种“S-层前体/表层蛋白质”的描述。该蛋白被跨膜预测软件 TMHMM 2.0 版本处理（参见图 15）。

看起来该蛋白质包括一个跨膜区域以及一个大的胞外组件。基于该结果，任何人可假设该蛋白质是在细菌的表面上，并且是印迹在微阵列

上的一个理想候选物，因为它在引发初次免疫应答过程中可起作用。因此，即使 Okinaka 等没有表征该基因，我们也可以使用该软件来鉴定它为可诱导初次免疫应答的一种理想表面目标。

随着完成了对于蛋白质功能和定位的预测阶段，进行下一阶段的生物信息学分析，即确定该目的基因是否是对一种生物独特的。如上所述，COGnitor 程序（54）可以用来鉴定用于印迹诊断蛋白质芯片的物种特异性基因/蛋白质。为了检验该想法，我们用 COGnitor 程序处理炭疽杆菌 Px01 质粒所有 46 个注释了的基因的氨基酸序列。我们在表 2 展示该检验的结果。

10 依照 COGnitor 程序，在 46 个被分析的基因中，34 个可以被识别和分类。大量的 COG-分类基因是 L 类，即 DNA 复制，重组和修复。的确，很可能这类蛋白质包含跨越许多物种的高度保守区域。在另一个极端，十二个基因不为 COGnitor 程序识别，并且因此不能归于 COG 类别。这些不可分类的蛋白质已经在表 2 中列为 “No Cog”。该 “No Cog” 分类
15 说明这些蛋白质不具有与当前数据库中的其它蛋白质的相似性。由于 COG 数据库包括源于 43 个原核动物和真核生物物种基因组（但不包括人基因组）的 74,059 个分类的蛋白质序列，“No Cog” 结果提示考虑中的蛋白质更可能是对于病原体物种或菌株特异性的。最低限度，任何人可以声称对于 “No Cog” 蛋白质含有一种已知进化上保守的跨越许多物
20 种基因组存在的古老结构域（ancient domain）是非常不可能的。能够对显示这类保守结构域的基因进行选择的是受欢迎的工具，因为这可以有助于降低选择可在最终生物芯片上由于交叉反应性而产生不确定结果的蛋白质的可能性。有趣地，因为它们不与其它物种的基因匹配，最独特的致死性的基因以及一系列表面抗原不被 COGnitor 程序识别。已经提出
25 选择的一种理想基因的一个实施例，即炭疽杆菌的 px01-54 蛋白质。依照 Okinaka 等该蛋白质被表达在生物的表面（16），依照 TMHMM 程序该蛋白质跨越膜，并且不被 COGnitor 程序识别，使得它更可能是对于物种独特的。

总之，结合来源于公开文献和生物信息学软件关于一个基因产物的
30 功能，定位和 ‘物种独特’ 水平的知识将极大地增强最终生物芯片的利

用，因为它将能够清楚和准确临床诊断患者对于广泛范围的病原体的免疫应答。

参考文献

- 5 1. Blaustein, R. O., Koehler, T. M., Collier, R. J. & Finkelstein, A. Anthrax toxin: channel-forming activity of protective antigen in planar phospholipid bilayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86, 2209-2213. (1989).
2. Thorne, C. B. Bacilluse anthracis. In *Bacillus subtilis and Other Gram-positive Bacteria*, ed. AL Sonenshein, JA Hoch, R Losick., 113-124 (1993).
- 10 3. Escuyer, V. & Collier, R. J. Anthrax protective antigen interacts with a specific receptor on the surface of CHO-K1 cells. *Infect Immun* 59, 3381-3386. (1991).
4. Strange, R. E. & Belton, F. C. Studies on a protective antigen produced in vitro from bacillus anthracis: Purification and chemisty of the antigen. *Bri. J.Exp. Pathol.* 35,153-165 (1953).
- 15 5. Mourez, M. et al. Designing a polyvalent inhibitor of anthrax toxin. *Nat Biotechnol* 19, 958-961. (2001).
6. Brown, P. O. & Botstein, D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nature. Genetics.* 21, 33-37 (1999).
- 20 7. DeRisi, J. L., Iyer, V. R. & Brown, P. O. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science.* 278, 680-686 (1997).
8. Ramsay, G. DNA chips: state-of-the art. *Nature. Biotechnology.* 16, 40-44 (1998).
- 25 9. MacBeath, G. & Schreiber, S. L. Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination. *Science* 299, 1760-1763 (2000).
10. Lueking, A. et al. Protein microarrays for gene expression and antibody screening. *Analytical. Biochemistry.* 270, 103-111 (1999).
11. Wang, D., Liu, S., Trummer, B. J., Deng, C. & Wang, A. Carbohydrate
30 microarray leading to the recognition of cross-reactive molecular markers of

- microbes and host cells. *Nature Biotechnology* 20 (2002).
12. Ekins, R. P. Multi-analyte immunoassay. *J Pharm Biomed Anal* 7, 155-168 (1989).
13. Stoll, D. et al. Protein microarray technology. *Front Biosci* 7, C13-32. 5 (2002).
14. Volchkov, V. E. Ebola virus, complete genome. Institute of Virology, Philipps-University (2000).
15. Shchelkunov, S. N., Totmenin, A. V. And Sandakhchiev, L. S. Analysis of the nucleotide sequence of 23.8 kbp from the left terminus of the genome of 10 variola major virus strain India-1967. *Virus Res.* 40, 169-183 (1996).
16. Okinaka, R. T. et al. Sequence and organization of pXO1, the large *Bacillus anthracis* plasmid harboring the anthrax toxin genes. *J Bacteriol* 181, 6509-6515. (1999).
17. Wang, D. & Kabat, E. A. in *Structure of Antigens.*, Vol. Three. (ed. M. H. 15 V. V. Regenmortel) 247-276 (CRC Press, Boca Raton New York London Tokyo; 1996).
18. Wyatt, R. et al. The antigenic structure of the HIVgp120 envelope glycoprotein. *Nature* 393, 705-711 (1998).
19. Robbins, J. B. & Schneerson, R. Polysaccharide-protein conjugates: a new 20 generation of vaccines. *J. Infct. Dis.* 161, 821-832 (1990).
20. Schneerson, R., Barrera, O., Sutton, A. & Robbins, J. B. Preparation, characterization, and immunogenicity of *Haemophilus influenzae* type b polysaccharide-protein conjugates. *J Exp Med* 152, 361-376. (1980).
21. Gladstone, G. P. & Walton, E. Effect of iron on the bactericidal proteins 25 from rabbit polymorphonuclear leukocytes. *Nature* 227, 849-851. (1970).
22. Ezzell, J. W., Jr., Abshire, T. G., Little, S. F., Lidgerding, B. C. & Brown, C. Identification of *Bacillus anthracis* by using monoclonal antibody to cell wall galactose-N-acetylglucosamine polysaccharide. *J Clin Microbiol* 28, 223-231.(1990).
- 30 23. Finne, J., Leinonen, M. & Makela, P. H. Antigenic similarities between

- brain components and bacteria causing meningitis. Implications for vaccine development and pathogenesis. *Lancet*. 2, 355-357 (1983).
24. Finne, J. & Makela, P. H. Cleavage of the polysialosyl units of brain glycoproteins by a bacteriophage endosialidase. Involvement of a long oligosaccharide segment in molecular interactions of polysialic acid. *Journal of Biological Chemistry*. 260, 1265-1270 (1985).
25. Mandrell, R. E. et al. Lipooligosaccharides (LOS) of some *Haemophilus* species mimic human glycosphingolipids, and some LOS are sialylated. *Infection & Immunity*. 60, 1322-1328 (1992).
26. Mandrell, R. E. Further antigenic similarities of *Neisseria gonorrhoeae* lipooligosaccharides and human glycosphingolipids. *Infection & Immunity*. 60, 3017-3020 (1992).
27. Feizi, T. & Loveless, R. W. Carbohydrate recognition by *Mycoplasma pneumoniae* and pathologic consequences. *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 154, S133-136. (1996).
28. Burrell, C. J. Serological markers of hepatitis B. *Clin Gastroenterol* 9, 47-63. (1980).
29. Boxall, E. H., Peterson, S., Diment, J., Graham, S. E. & Shirley, J. A. A novel assay for hepatitis B markers. *J Med Virol* 52, 280-285. (1997).
30. Basten, A. & Howard, J. G. in *Contemporary Topics in Immunobiology*, Vol. 2. (ed. A. J. S. Davies) 265 (Plenum, New York; 1973).
31. Humphrey, J. H., Parrott, D. M. V. & East, J. Studies on globulin and antibody production in mice thymectomised at birth. *Immunology* 7, 419-439 (1964).
32. Weissman, I. L., Gutman, G. A., Friedberg, S. H. & Jerabek, L. Lymphoid tissue architecture. III. Germinal centers, T cells, and thymus-dependent vs thymus-independent antigens. *Adv. Exp. Med. Biol.* 66, 229-237 (1976).
33. Beagley, K. W., Black, C. A., Dunkley, M. L. & McGhee, J. R. in *Cytokine Regulation of Humoral Immunity*. (ed. C. M. Snapper) 391-408 (John Wiley & Sons Ltd, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore; 1996).

34. McGhee, J. R., Mestecky, J., Elson, C. O. & Kiyono, H. Regulation of IgA synthesis and immune response by T cells and interleukins. [Review]. *Journal of Clinical Immunology* 9, 175-199 (1989).
35. Mestecky, J. The common mucosal immune system and current strategies
5 for induction of immune responses in external secretions. [Review]. *Journal of Clinical Immunology* 7, 265-276 (1987).
36. Mongini, P. K. A., Stein, K. E. & Paul, W. E. T-cell regulation of IgG subclass antibody production in response to T-independent antigens. *J. Exp. Med.* 153, 1-12 (1981).
- 10 37. Kagnoff, M. F. & Murray, P. D. T dependent induction of an IgA and IgM anti-polysaccharide response. *Advances in Experimental Medicine & Biology*, 155-167 (1987).
38. Ivars, F., Nyberg, G., Holmberg, D. & Coutinho, A. Immune response to bacterial dextrans. II. T cell control of antibody isotypes. *Journal of*
15 *Experimental Medicine* 158, 1498-1510 (1983).
39. Ehrhardt, R. O. et al. Differential activation requirements of isotype-switched B cells. *Eur. J. Immunol.* 26, 1926-1934 (1996).
40. Tonkinson, J. L. & Stillman, B. A. Nitrocellulose: a tried and true polymer finds utility as a post-genomic substrate. *Front Biosci* 7, C1-C12. (2002).
- 20 41. Cole, H. B., Ezzell, J. W., Jr., Keller, K. F. & Doyle, R. J. Differentiation of *Bacillus anthracis* and other *Bacillus* species by lectins. *J Clin Microbiol* 19, 48-53. (1984).
42. Cohen, S. et al. Attenuated nontoxinogenic and nonencapsulated recombinant *Bacillus anthracis* spore vaccines protect against anthrax. *Infect*
25 *Immun* 68, 4549-4558. (2000).
43. Smith, H. & Zwartouw, H. T. The polysaccharide from *Bacillus anthracis* grown in vivo. *Biochem J* 63, 447-452 (1956).
44. Kabat, E. A., Bezer, A. E., Baer, H. & Knaub, V. Immunochemical studies on blood groups. VII. Chemical changes associated with destruction of blood
30 group activity and enhancement of the type XIV cross-reactivity by partial

- hydrolysis of hog and human blood group A, B, and O, substances. *J. Exp. Med.* 88, 43-57 (1948).
45. Kabat, E. A., Howe, C. & Schiffman, G. Immunochemical studies on blood groups. *J. Am. Chem. Soc.* 80, 6656 (1958).
- 5 46. Kabat, E. A. Immunochemical studies on blood groups. *J. Immunol.* 82, 358-372 (1958).
47. Mesnage, S. et al. Bacterial SLH domain proteins are non-covalently anchored to the cell surface via a conserved mechanism involving wall polysaccharide pyruvylation. *Embo J* 19, 4473-4484. (2000).
- 10 48. Kabat, E. A. et al. Human monoclonal macroglobulins with specificity for Klebsiella K polysaccharides that contain 3,4-pyruvylated-D-galactose and 4,6 pyruvylated-D-galactose. *J. Exp. Med.* 152, 979-995 (1980).
49. Kabat, E. A. et al. The epitope associated with the binding of the capsular polysaccharide of the group B meningococcus and of Escherichia coli K1 to a human monoclonal macroglobulin, IgM Nov. *J. Exp. Med.* 168, 699-711
- 15 (1988).
50. Kabat, E. A., Liao, J., Sherman, W. H. & Osserman, E. F. Immunochemical characterization of the specificities of two human monoclonal IgM's reacting with chondroitin sulfates. *Carbohydr. Res.* 130, 289-297 (1984).
- 20 51. Kabat, E. A., Liao, J., Shyong, J. & Osserman, E. F. A monoclonal IgM lambda macroglobulin with specificity for lacto-N-tetraose in a patient with bronchogenic carcinoma. *J. Immunol.* 128, 540-544 (1982).
52. Kabat, E. A. et al. A human monoclonal macroglobulin with specificity for a (2----8)-linked poly-N-acetyl neuraminic acid, the capsular polysaccharide of group B meningococci and Escherichia coli K1, which crossreacts with polynucleotides and with denatured DNA. *J. Exp. Med.* 164, 642-654 (1986).
- 25 53. Nickerson, K. G., Liao, J. & Kabat, E. A. A monoclonal IgM kappa from a blood group B individual with specificity for alpha-galactosyl epitopes on partially hydrolyzed blood group B substance. *Carbohydr. Res.* 243, 345-357
- 30

(1993).

54. Tatusov, R. L., Koonin, E. V. & Lipman, D. J. A genomic perspective on protein families. *Science* 278, 631-637. (1997).

55. Krogh, A., Larsson, B., von Heijne, G. & Sonnhammer, E. L. Predicting
5 transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes. *J Mol Biol* 305, 567-580. (2001).

第四组实验

由 Packard BioScience 生产用于印迹蛋白质微阵列的 HydroGel™ 载
10 玻片。我们研究了水凝胶是否可作为用于生产糖微阵列和用于生产 HIV 诊断蛋白质微阵列的备选基底。

I.材料和方法

A. 用于基于水凝胶的生物芯片的印迹和染色方法

15 (1) 用于在水凝胶包被的载玻片上印迹的方法

用于将糖类和蛋白质印迹在水凝胶包被的载玻片上的方法与用于在硝化纤维载玻片上印迹的方法基本上相同。唯一的区别是水凝胶的预处理按照如下由制造商描述的方法进行：(a) 将水凝胶 载玻片放置于 40℃ 培养箱中 20 分钟；和 (b) 在印迹前移开并将载玻片冷却至室温 5 分钟。

20 (2) 用于印迹后处理的方法

用于印迹后处理的方法如下改自产品说明书：(a)将阵列在湿润的 30℃箱中孵育过夜；(b) 在 PBST (PBS + 0.05%吐温 20) 中简短地漂洗 (20 秒)，接着用 PBST 洗涤 3, 30 分钟。在 PBS (pH7.4) 中漂洗 20 秒；和 (c) 通过在台式离心机中 1600RPM 将干燥载玻片离心 5 分钟。

25 (3) 用于染色的方法

用于将水凝胶生物芯片染色的方法与用于将硝化纤维生物芯片染色的那些方法相同。

II.结果和讨论

30 申请人已经展示下列意外的结果：

1) 将蛋白质和含糖高分子印迹在水凝胶上可以使用 Cartesian's PIXSYS 5500A 微阵列仪 (CHIPMAKER 4), 使用一种接触排列 (contact arraying) 方法进行。

2) 可以将蛋白质制剂, 包括抗体, BSA, 抗生物素蛋白和 HIV-1 gap120, RT 和 gag 蛋白定量地固定在水凝胶上, 提供大约 150 微米直径的精细斑点, 并因此可以生产高密度蛋白质微阵列。

3) 可以将糖制剂, 包括多糖, 糖胺聚糖, 糖蛋白, 半合成糖缀合物和糖酯定量固定在水凝胶上, 提供大约 200 微米直径的精细斑点, 并因此可以生产高密度糖微阵列。

4) 在用特定的抗体将载玻片染色的时候, 分析的固定蛋白质和糖抗原很好地保持了它们的免疫性能。

5) 由于它们的低荧光背景使用基于水凝胶的蛋白质和糖微阵列是有利的。水凝胶基底的一个缺点是它吸收相对较低量的生物芯片上的材料。对于相同的抗原制剂, 在水凝胶载玻片上检测的荧光信号比在硝化纤维载玻片上检测的那些低得多。

6) 当计算给定微斑点的荧光强度对背景的比率时, 硝化纤维-芯片结果和水凝胶-芯片的那些结果在大多数情形中是紧密相关的 (关于在不同结构特征的抗原之间的比较参见表 4)。

7) 基于硝化纤维的生物芯片偏爱检测溶液中的 IgG 抗体但不偏爱检测 IgM 抗体。前者是免疫球蛋白 (Ig) 单体; 后者是 Ig 五聚体。在基于水凝胶的生物芯片中未发现这种偏爱。因为它提供信息来改善用于生产诊断生物芯片的硝化纤维表面, 该发现是重要的。

PC030790

表 1. 葡聚糖和菊粉制剂的结构性能

	纯葡聚糖			FITC 偶联物		
	N279	LD7	B1299S	Dex-20K	Dex-70K	Dex-2000K
						菊粉
结构特征						
分子量 (kDa)	~10,000	42	~20,000	19.6	71.2	2,000
糖残基	葡萄糖	葡萄糖	葡萄糖	葡萄糖	葡萄糖	葡萄糖
构象特征	直链占优势	只有直链	大量支化	直链占优势	直链占优势	直链占优势
摩尔比 (FITC: 糖)	0	0	0	0.01	0.005	0.008
键比率(%)*						0.007
α(1,6) 末端非还原末端基团	5	0	31	5	5	0
α(1,6)主链	90	100	32	90	90	0
α(1,3)α(1,6) 主链	0	0	1	0	0	0
α(1,2)α(1,6) 主链	0	0	5	0	0	0
α(1,3)分支	5	0	1	5	5	0
α(1,2)分支	0	0	30	0	0	0
β (2,1)键	0	0	0	0	0	100 (?)

*数值是从甲基化和高碘酸盐氧化作用分析测定 (关于概述参见参考文献 18)

表 2. 微阵列检测和鉴定人和鼠抗-糖抗体^a

抗原微斑点				I. 人 IgM			II. 人 IgG			III. 抗 -Dex 4.3F1			IV. 抗 -Dex 16.4.12E		
抗原名称	分类 ^b	ID	位置	平均	s.d.	Int./Bk ^c	平均	s.d.	Int./Bk	平均	s.d.	Int./Bk	平均	s.d.	Int./Bk
克雷伯氏菌属类型 7	1	1	A1	19,293	1,788	1.12	32,140	3,367	3.88	9,074	215	1.01	11,432	324	1.02
克雷伯氏菌属类型 K11	1	2	A2	19,960	3,349	1.13	15,262	7,630	1.52	9,584	837	1.06	11,432	262	1.03
克雷伯氏菌属类型 K13	1	3	A3	38,103	4,384	2.17	26,997	719	3.20	23,003	3,573	2.86	12,256	648	1.10
克雷伯氏菌属类型 K21	1	4	A4	22,847	2,131	1.27	29,355	890	3.63	8,817	203	0.98	12,487	367	1.12
<i>Duodenae Rhizobium</i> TA1	1	5	A5	31,625	2,768	1.77	16,198	693	2.06	8,438	448	0.93	10,901	226	0.98
硫酸软骨素 "B"	2	6	A6	17,009	633	0.96	10,630	411	1.49	58,264	822	6.38	18,063	935	1.62
肺炎球菌属类型 C	1	7	C1	17,014	1,661	0.98	25,187	3,499	3.02	8,813	373	0.98	11,256	271	1.00
肺炎球菌属类型 VIII	1	8	C2	17,194	1,407	0.98	12,078	3,754	1.47	8,862	362	0.99	11,450	512	1.02
肺炎球菌属类型 XIV	1	9	C3	17,012	1,262	0.96	12,292	4,286	1.52	8,879	330	0.99	11,359	375	1.02
Cow 21 (血型 B)	3	10	C4	19,336	2,160	1.08	9,290	839	1.15	9,020	325	1.00	11,308	450	1.02
Bacto-agar 20°C Ext	1	11	C5	19,792	2,512	1.09	9,482	1,278	1.20	9,106	251	1.02	11,269	527	1.02
阿拉伯半乳糖 (Larch)	1	12	C6	16,216	453	0.90	8,599	474	1.08	8,564	433	0.97	10,909	357	0.99
IM3-BSA ^d	4	13	E1	19,743	1,888	1.11	14,322	1750	1.70	10,480	258	1.17	88,535	0	5.34
IM3-KLH ^e	4	14	E2	18,077	1,185	1.01	10,641	930	1.27	8,629	390	0.88	62,128	5088	6.42
Le ^f (N-110% 2x)	3	15	E3	17,048	726	0.95	8,960	805	1.08	8,742	287	1.00	11,026	501	0.98
Beach P1 (血型 B)	3	16	E4	17,419	525	0.97	10,022	423	1.21	8,638	307	0.96	10,928	561	0.97
Ty II (血型 B 和 Le ^f)	3	17	E5	17,046	464	0.98	9,400	503	1.14	8,558	202	0.95	11,006	467	0.98
OG ^g	3	18	E6	20,882	2,630	1.13	8,819	439	1.08	8,812	427	1.00	11,148	705	0.99
ASOR ^h	3	19	G1	16,555	449	0.93	8,833	320	1.06	8,627	547	0.96	10,923	566	1.00
LNT-BSA ⁱ	4	20	G2	19,053	1,266	1.05	9,010	297	1.08	8,509	497	0.96	11,000	316	0.98
磷酸甘露聚糖 (phosphomannan)	1	21	G3	17,571	785	0.97	16,124	923	1.63	8,585	483	0.96	11,224	394	1.01
脑膜炎球菌类群 B	1	22	G4	16,747	820	0.93	8,839	403	1.06	8,633	285	0.96	11,115	623	0.99
流感嗜血杆菌类型 A	1	23	G5	17,804	856	0.98	11,007	208	1.33	8,637	378	0.95	11,205	499	1.01
大肠杆菌 K82	1	24	G6	17,353	770	0.95	8,785	328	1.07	8,714	396	0.97	11,248	190	1.01
克雷伯氏菌属类型 A3	1	25	I1	27,018	9910	1.49	13,001	6,947	1.94	10,278	1,120	1.12	11,496	136	1.01
克雷伯氏菌属类型 K12	1	26	I2	32,322	16450	1.68	11,579	5,029	1.72	9,303	283	1.01	11,504	226	1.01
克雷伯氏菌属类型 K14	1	27	I3	23,360	1283	1.22	54,557	2,045	7.80	9,887	343	1.04	11,752	405	1.03
克雷伯氏菌属类型 K33	1	28	I4	54,607	2574	2.60	22,890	1,259	3.37	16,135	1,620	1.70	11,286	424	1.00
硫酸软骨素 "C"	2	29	I5	18,093	1252	0.99	7,646	730	1.16	9,443	461	1.01	11,322	215	1.00
硫酸软骨素 "D"	2	30	I6	17,699	963	0.97	7,547	607	1.14	11,936	3,057	1.35	11,610	396	1.05
肺炎球菌属类型 SIV	1	31	K1	19,002	862	1.00	11,485	819	1.68	9,305	351	1.03	11,388	94	1.00
肺炎球菌属类型 IX	1	32	K2	18,932	1303	1.00	10,600	3,827	1.86	9,345	697	1.02	11,407	227	1.01
肺炎球菌属类型 27	1	33	K3	23,368	6222	1.24	13,465	7,188	1.87	9,104	914	1.00	11,394	252	1.00
Cow 26 (血型 B)	3	34	K4	19,184	1743	1.03	8,020	885	1.19	9,296	918	1.01	11,369	206	1.00
<i>Helix pomatia</i> galactan	1	35	K5	17,885	722	0.97	7,296	550	1.11	9,166	917	0.99	11,389	268	1.01
<i>Helix nemoralis</i> galactan	1	36	K6	18,135	715	0.98	7,412	418	1.10	9,170	773	0.98	11,234	185	1.00
IM6-BSA ^d	4	37	M1	18,897	184	1.01	8,891	784	1.47	10,610	423	1.13	82,569	2,883	6.43
IM6-KLH ^e	4	38	M2	17,761	289	0.96	7,857	544	1.13	9,303	250	1.00	13,534	460	1.19
Le ^f (N-110% NaOH)	3	39	M3	18,430	926	1.00	7,857	626	1.11	9,223	218	0.98	11,293	240	1.00
Cyst 9 (血型 A)	3	40	M4	18,182	552	0.99	8,081	733	1.30	9,129	333	0.98	11,571	889	1.04
葡聚糖 N-150-N(60K)	1	41	M5	17,527	717	0.96	7,908	671	1.17	57,386	1,630	6.92	12,853	197	1.13
Fog (血型 H)	3	42	M6	17,791	1,015	0.98	7,706	506	1.13	9,804	288	1.01	11,526	145	1.04
AGOR ^h	3	43	O1	18,218	305	0.96	7,598	485	1.09	9,228	384	0.98	11,327	360	1.00
菊粉	1	44	O2	17,655	361	0.95	7,636	326	1.06	9,274	391	0.99	11,264	511	1.00
果聚糖 (B-512E)	1	45	O3	18,003	316	0.97	11,807	2,116	1.68	9,493	190	1.00	11,423	521	1.01
脑膜炎球菌类群 B	1	46	O4	17,278	841	0.95	7,749	433	1.09	9,158	80	0.97	11,454	687	1.01
大肠杆菌 K1	1	47	O5	17,518	1,219	0.97	7,442	508	1.11	9,193	222	0.97	11,236	364	1.00
大肠杆菌 K100	1	48	O6	17,852	807	0.99	15,823	2,152	2.33	9,157	163	0.86	11,178	270	1.00
背景 (n=200)				18,267	844		7,522	727		9,161	366		11,252	385	
阳性总数						12		35		4		4			

- ^a 统计学分析四种微阵列的数据并以粗斜体突出。对于人血清抗体染色，如果微斑点的平均荧光强度值显著高于用相同荧光染料同样染色的平均背景，给予正分数。对于使用单克隆抗体，如果微斑点的平均荧光强度值比平均背景高至少 1.5 倍，给予正分数。^b 对糖抗原分类并在表中表示如下：1 为多糖；2 为糖胺聚糖；3 为糖蛋白；4 为半合成糖缀合物。^cint/BK：平均荧光强度与平均背景的比率。^dAGOR：脱半乳血清类粘蛋白（Agalacto-orosomucoid）；ASOR：脱唾液酸血清类粘蛋白；IM：异麦芽糖寡糖；KLH，匙孔血蓝蛋白；LNT：乳-N-四糖；OG：Ogunsheye 10% 2X（血型 I 活性）。

表 3. COGnitor 分析在 *B.anthraces* PX01 质粒上的注释基因。

图表来自 Okinaka 等 Journal of Bacteriology 1999 年 10 月 6509-6515 页

独立计算和增加到图表中的 Cog 信息

ORF	起始	终止	链	大小 (aa)	描述	Cog 分 类	Cog 类目
137	173709	173894	1	61	与宿主因子蛋白 1 (66 aa) 相似的假拟蛋白, ymaH; B. su	R	未鉴定 ACR, 宿主因子 1 蛋白
139	174581	174871	2	96	假拟蛋白 (138 aa), uvvU; 枯草芽孢杆菌 (Z99121); 59/96 aa possi	O	二硫键形成蛋白 DsbB
138	174200	174493	2	97	小 DNA 结合, 类似 pagR; 炭疽杆菌 (AF031382); 63/98 aa possi	K	预测转录调节物
109	131939	132238	2	99	类似于小 DNA 结合蛋白, pagR; 质粒 pXO1, 炭疽杆菌	K	预测转录调节物
121	153605	153937	2	110	腺嘌呤转磷酸核糖基酶, apt; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌	F	腺嘌呤/鸟嘌呤转磷酸核糖基酶和相关 PRPF
129	163846	164238	1	130	IS 1627 平截转座酶; 炭疽杆菌 (U30712); 93/137 aa pc	L	假定的转座酶
118	149232	149684	2	150	未知功能; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (L13841)	无 Cog	无 Cog
87	101962	102444	2	160	未知功能, 假定的硫氧环蛋白 (137 aa), yoll; 枯草芽孢杆菌 (Z9911	OC	硫基二硫键异构酶和硫氧环蛋白
120	152064	152636	1	190	假定的转座酶 (401 aa); 酿脓链球菌 (AF064540); 108/182 aa pc	L	转座酶
115	142410	142991	2	193	解离酶 (191 aa), 类似 Tn1546; 屎肠球菌 (Q06237); 125	L	位点专一重组酶, DNA 转化酶 Pin 同系物
111	136229	136843	2	204	在保护性抗原结构域中的假拟蛋白, ypa; 质粒 pXO	无 Cog	无 Cog
127	162232	162876	2	214	假定的 IS 1627 转座酶; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (U30712)	L	假定的转座酶

141	175663	176307	2	214	耐热核酸酶前体 (TNASE) /微球菌核酸酶 (231 aa); S.	L	微球菌核酸酶 (耐热核酸酶) 同系物
85	99636	100319	1	227	假拟蛋白 (244 aa), <i>htr-spollic</i> 基因间隔区中的 <i>ydtL</i> ; B. su	R	预测的金属依赖性膜蛋白酶
130	165317	166030	1	237	假拟蛋白 (251 aa), <i>ytpE</i> ; 枯草芽孢杆菌 (U93875); 213/251aa po	无 Cog	无 Cog
96	116307	117131	1	274	假定的 IS 1627 转座酶; 质粒 <i>pXOI</i> ; 炭疽杆菌 <i>sternL e</i>	L	假定的转座酶
91	109000	109842	1	280	假拟蛋白 (193 aa), <i>ngB-spolia</i> 基因间隔区中的 <i>ywoA</i> ; B.	I	膜相关磷脂酶
94	112516	113403	1	296	UDP-葡萄糖-焦磷酸化酶(292 aa), <i>gtaB</i> ; 枯草芽孢杆菌(Q05852)	2 M	UDP-葡萄糖焦磷酸化酶
18	25124	26071	1	315	整合酶/重组酶蛋白 (311 aa); <i>M. thermoaerophilum</i> (AEO)	L	整合酶
103	123018	123971	1	317	可能的整合酶/重组酶 (296 aa), <i>ripX</i> ; 枯草芽孢杆菌 (P46352); 93	L	整合酶
39	48912	49889	2	325	转座酶 (478 aa), IS231E; 苏云金芽孢杆菌(Q02403); 282/299 aa	L	预测的转座酶
112	138540	139523	2	327	孢子萌发应答 <i>gerXC</i> ; 质粒 <i>pXOI</i> ; 炭疽杆菌 (AF10)	无 Cog	无 Cog
114	141002	142081	2	359	孢子萌发应答 <i>gerXB</i> ; 质粒 <i>pXOI</i> ; 炭疽杆菌 (AF10)	无 Cog	无 Cog
132	167948	169033	1	361	假定的整合酶 (356 aa); 链球菌变体 (AF065141); 206/34	S	未鉴定的 BCR
136	172285	17380	1	364	反应调节物天冬氨酸磷酸酶 C(383 aa), <i>rapC</i> ; 枯草芽孢杆菌(D50453); 126/238 aa; 阳性 (52%) and 52/117 aa 阳性 (44%)	阳性	糖基转移酶, 可能参与细胞壁的生物合成
93	111374	112474	1	366	透明质酸合成酶 (419 aa), <i>hasA</i> ; 酿脓链球菌 (L2118)	M	未鉴定的膜蛋白
86	100777	101922	2	381	假拟蛋白 (402 aa), <i>ytkO</i> ; 枯草芽孢杆菌 (D84432); 199/376 aa	R	未鉴定的膜蛋白
54	67634	68815	1	393	S-层前体/表层蛋白 (814 aa); 炭疽杆菌 (P49051);	无 Cog	无 Cog
45	57659	58966	2	435	细胞分裂蛋白 (372 aa), <i>ftsZ</i> ; P. horikoshii (AP000001); 103/213 aa	D	细胞分离 GTP 酶
95	113430	114761	1	443	假定的 NDP-糖-脱氢酶 (440 aa), <i>ywqF</i> ; 枯草芽孢杆菌 (Z9912);	M	预测 NDP-葡萄糖-6-脱氢酶
23	31621	33006	2	461	可能的编码区 (609 aa); 艰难梭菌 (X98606); 249/390	L	Retron-类型的

81	95978	97363	1	461	Ras-和转座子相关蛋白 (225 aa), yocA; 枯草芽孢杆菌 (AF027E)	M	逆转录酶 金属内肽酶相 关的膜蛋白
119	150042	151469	1	475	反式作用正调节物, atxA; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (L1384	无 Cog	无 Cog
59	74066	75501	1	477	分泌蛋白激酶 (474 aa), kln; C. Imicola (U77780; 1660310 aa	N	IV 类分泌途 径, VirB11 组 分和相关的 AT
35	42103	43539	1	478	转座酶 (478 aa), IS231E; 苏云金芽孢杆菌 (Q02403); 455/478 aa f	L	预测的转座酶
36	43808	45262	2	484	转座酶 (478 aa), IS231E; 苏云金芽孢杆菌 (Q02403); 347/458 aa f	L	预测的转座酶
113	139480	140958	2	492	孢子萌发应答, gerXA; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (AF10	无 Cog	无 Cog
7	6544	8190	2	548	逆转录酶 (574 aa), IS629; 大肠杆菌 (AB11549); 306/543 aa p	L	Retron-类型的 逆转录酶
90	106772	108730	1	652	假拟蛋白 (980 aa), PFB0765w; Plasmodium falciparum (AEC	L	与 DNA 修复 有关的 ATP 酶
110	133161	135455	2	764	炭疽毒素保护性抗原, pagA, 原来 pag; 质粒 pXO1; B.	无 Cog	无 Cog
122	154224	156626	2	800	钙调蛋白敏感的腺苷酸环化酶/水肿因子, cya; 质粒 pXC	D	染色体分离 ATP 酶
107	127442	129871	1	809	炭疽毒素致死因子, lef; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (M23081 and	无 Cog	无 Cog
142	176736	179399	2	887	拓扑异构酶 1, top1; 质粒 pXO1; 炭疽杆菌 (M97227)	L	拓扑异构酶 IA
116	143195	146110	1	972	TN21 转座酶 (988 aa), tnpA; 大肠杆菌 (P13694); 619/916 aa pos	无 Cog	无 Cog
79	91443	95111	1	1,222	假拟疏水性蛋白 (567 aa); 坚强芽孢杆菌 (U64515);	N	12 接纳甲基的趋 化蛋白
13	15040	19002	2	1,320	红细胞侵入/棒状体蛋白 (2,401 aa); P. yoelli (U36927); 520x	无 Cog	无 Cog

表 4. (Exp1121401HIV-比率)

作为糖和蛋白质微阵列基底的确化纤维和水凝胶

人 IgG 特异的	微斑点荧光强度对背景的比率					
	FAST 载玻片			水凝胶		
	平均值	SD	总和	平均值	SD	总和
1_多糖 (2-150) n=149	5.35	8.28	6383.02	5.17	10.16	6163.61
2_糖胺聚糖 (GAG)(152-164) n=13	1.74	1.08	181.25	1.81	0.63	188.30
3_糖蛋白 (166- 266) n=101	2.27	3.36	1836.22	2.79	4.88	2254.38
4_半合成糖缀合 物(248-292) n=45	1.57	1.02	313.67	2.01	1.63	402.20
5_糖脂(249-305) n=58	1.45	0.34	139.52	1.68	0.19	161.18
6_HIV-1 蛋白质 (307-481) n=175	4.32	8.40	6051.71	2.61	6.19	3659.95
7_其它蛋白质 (483-567) n=85	3.57	6.95	2428.71	3.44	6.47	2340.21
8_Ig(569-632) n=64	4.27	8.11	2186.80	6.94	38.21	3554.90
BK_选择的空白 空间 (empty spce)(634-729) n=96	1.24	0.11	951.36	1.61	0.44	1237.51
BK_盐水斑点 (检验交叉污染) (731-778) n=48	1.44	0.54	553.80	1.86	1.88	716.07
合计(n=834)	3.42	5.58	2633.25	3.37	9.89	2588.30

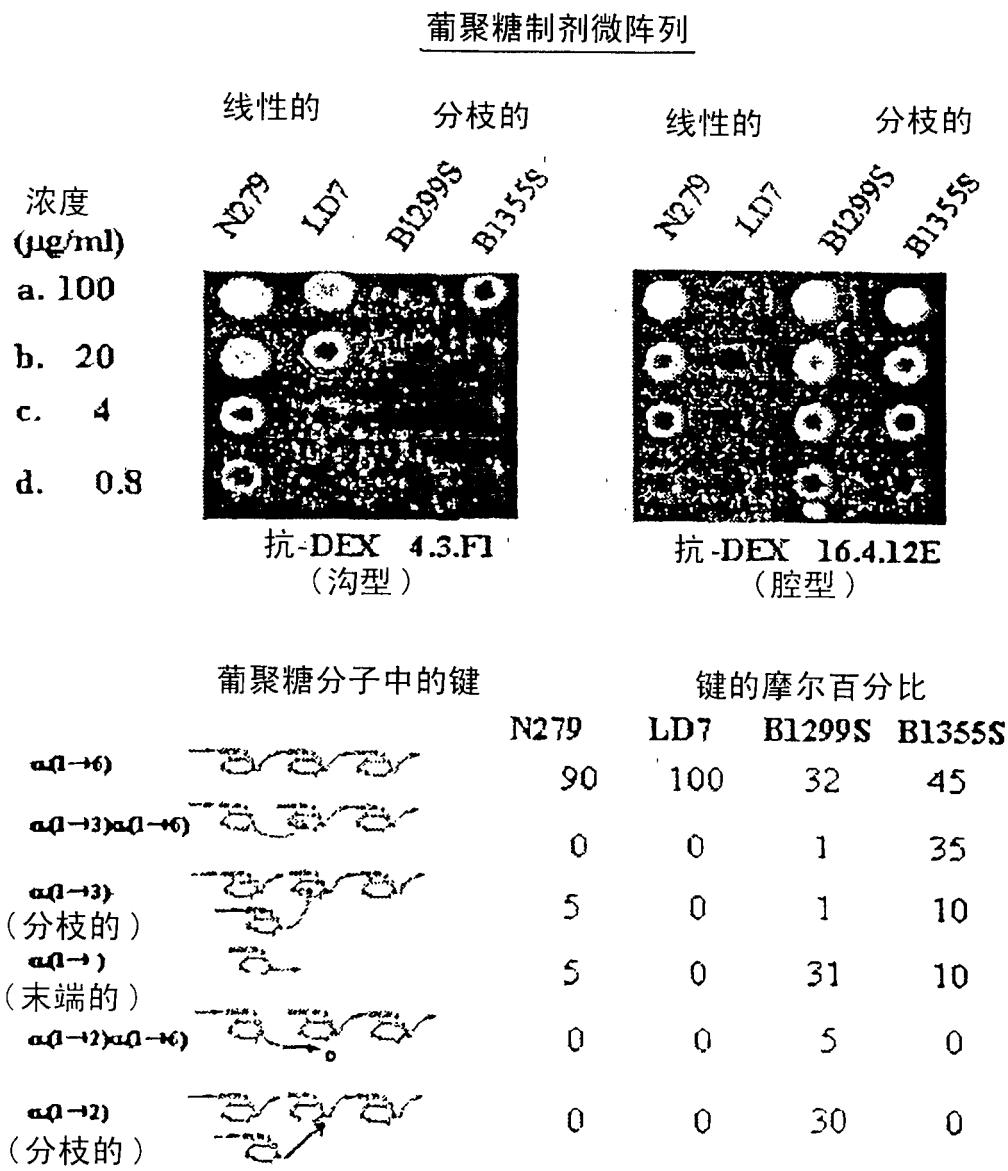
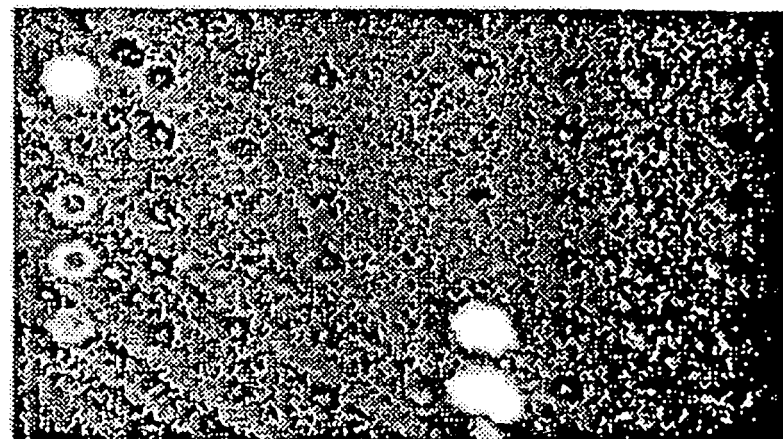


图 1

A) 抗-DEX 4.3.F1 B) 抗-DEX 16.4.12E

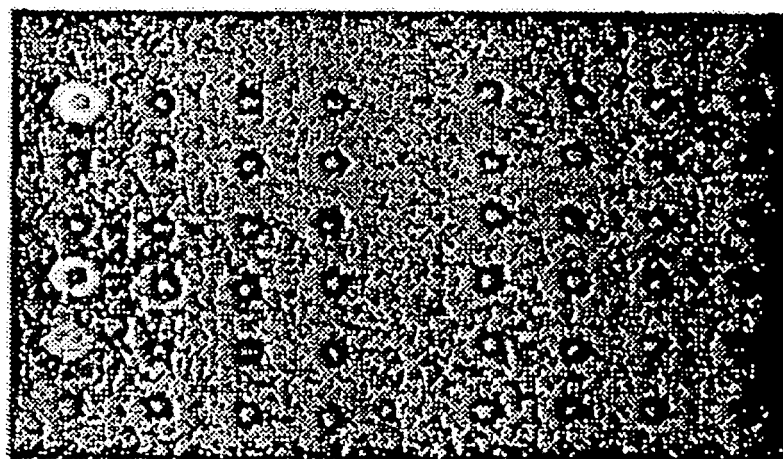
1 2 3 4 5 6

N279



1 2 3 4 5 6

N279



a b c d e f g h

图 2

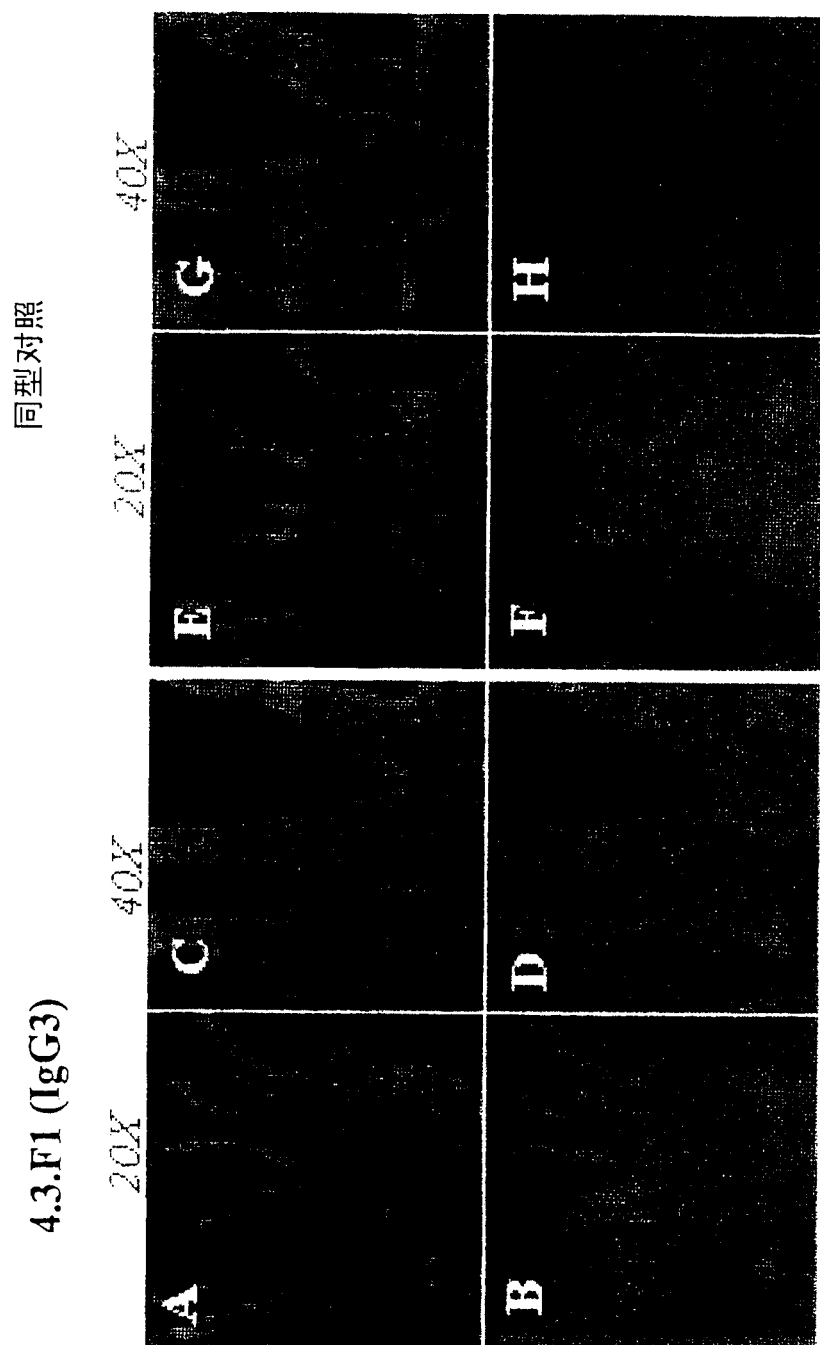


图 3

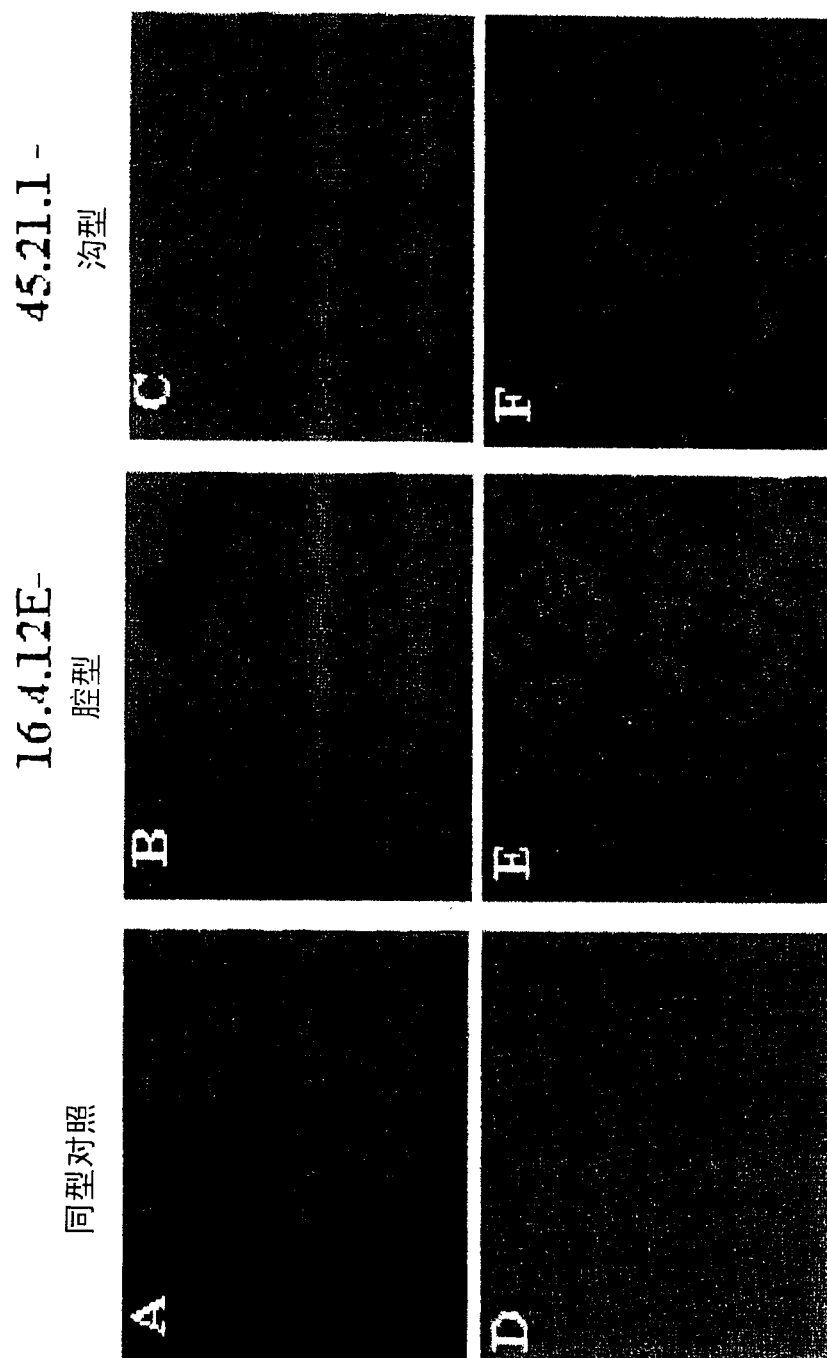


图 4

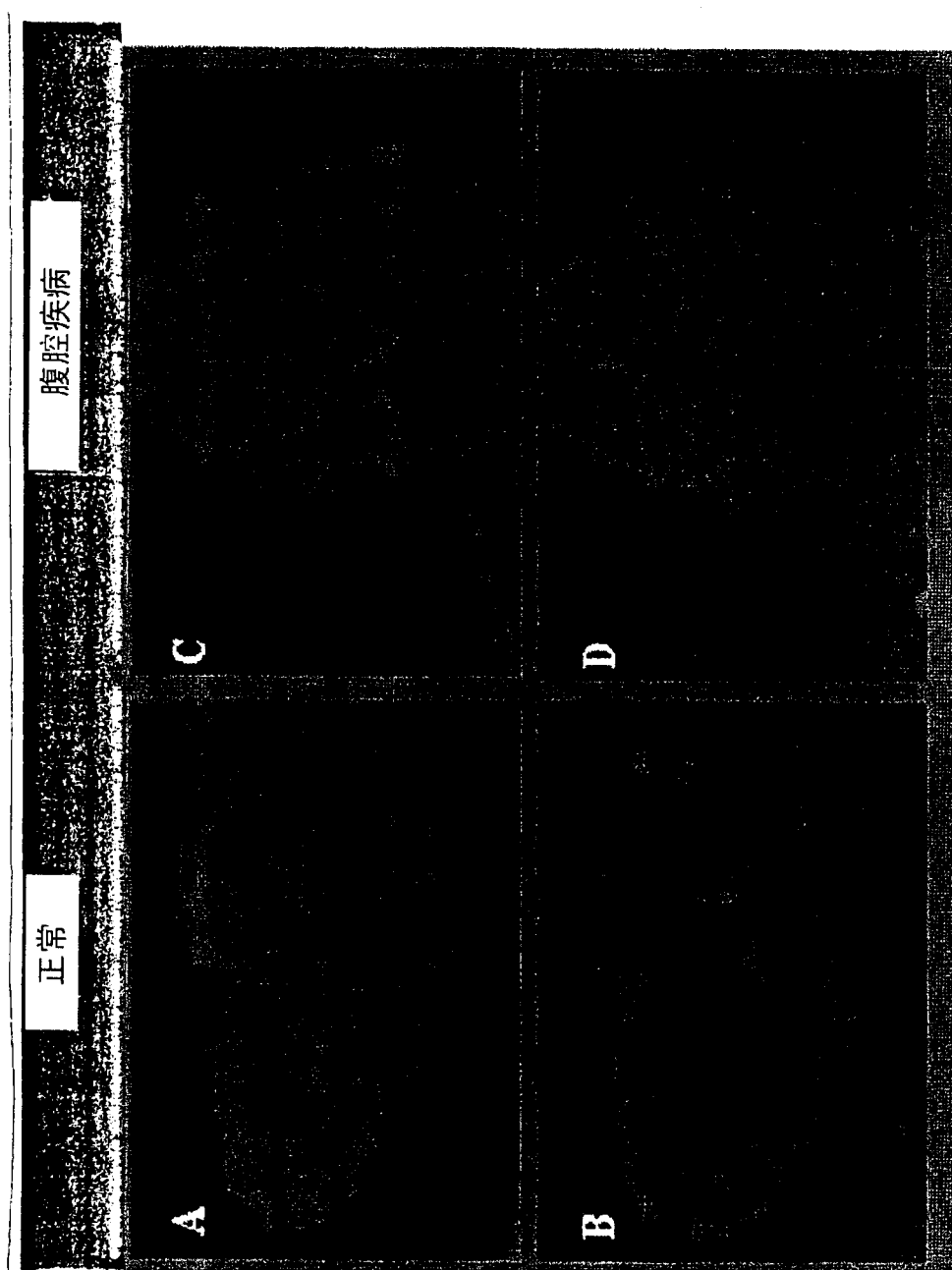


图5

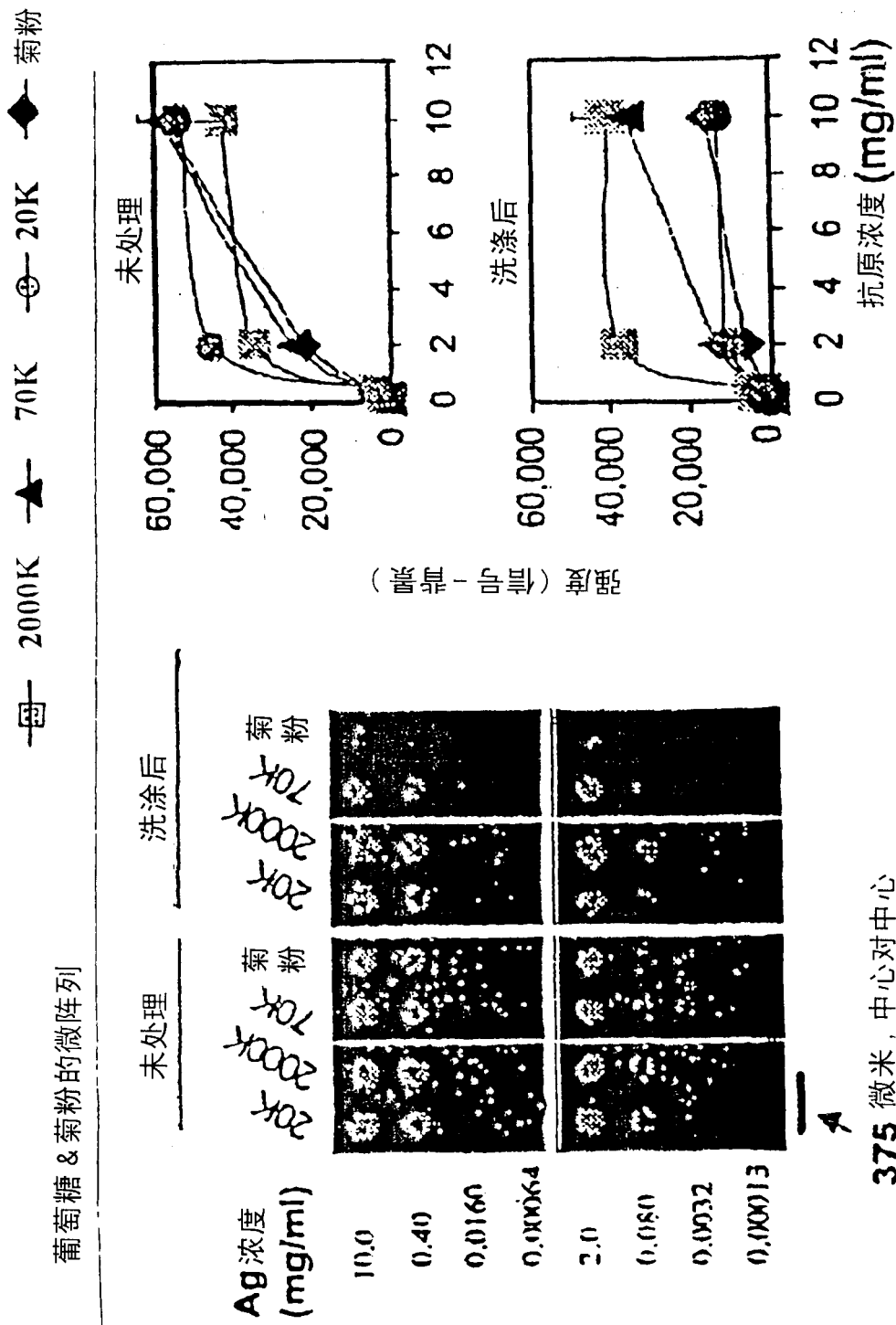


图 6

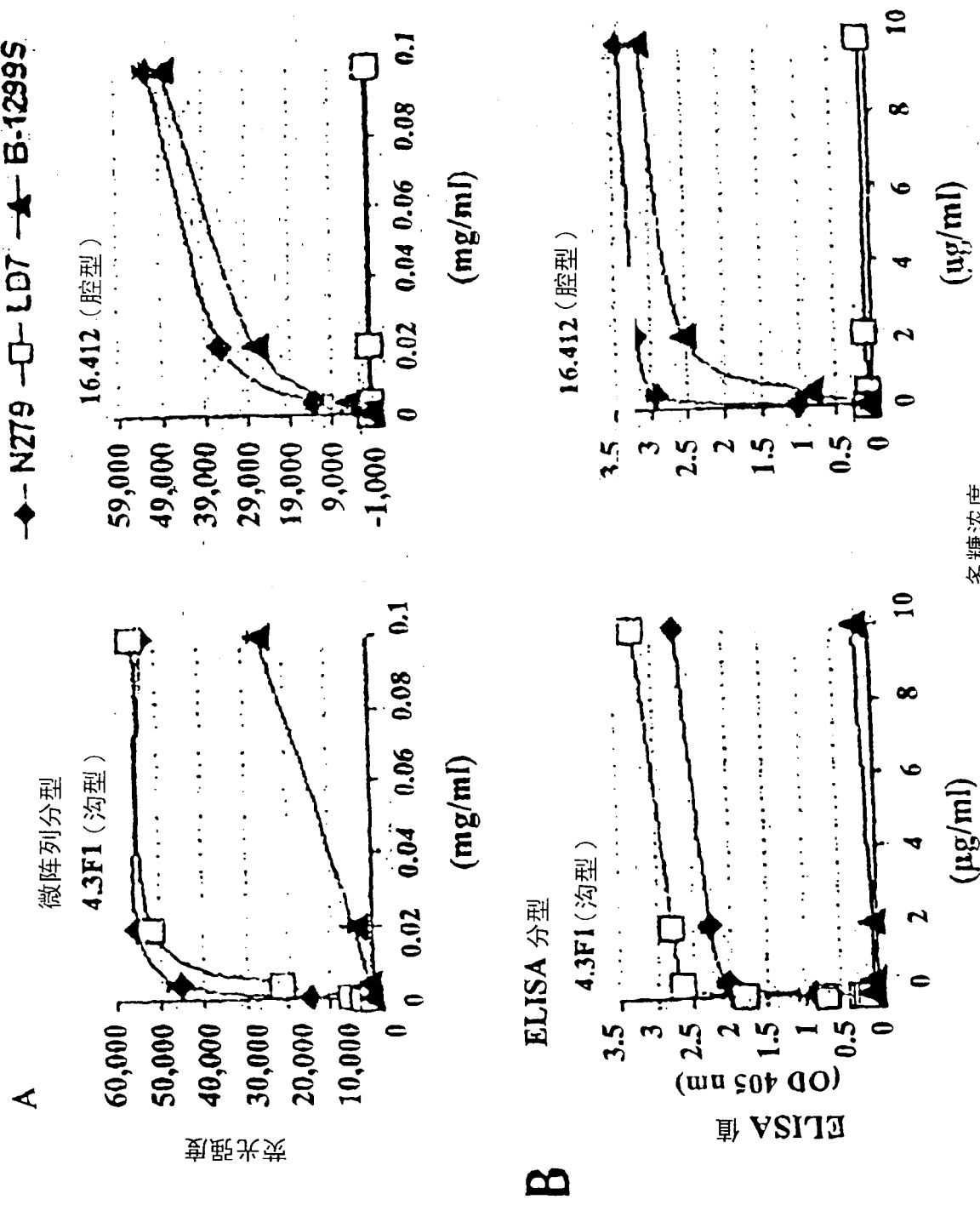


图 7

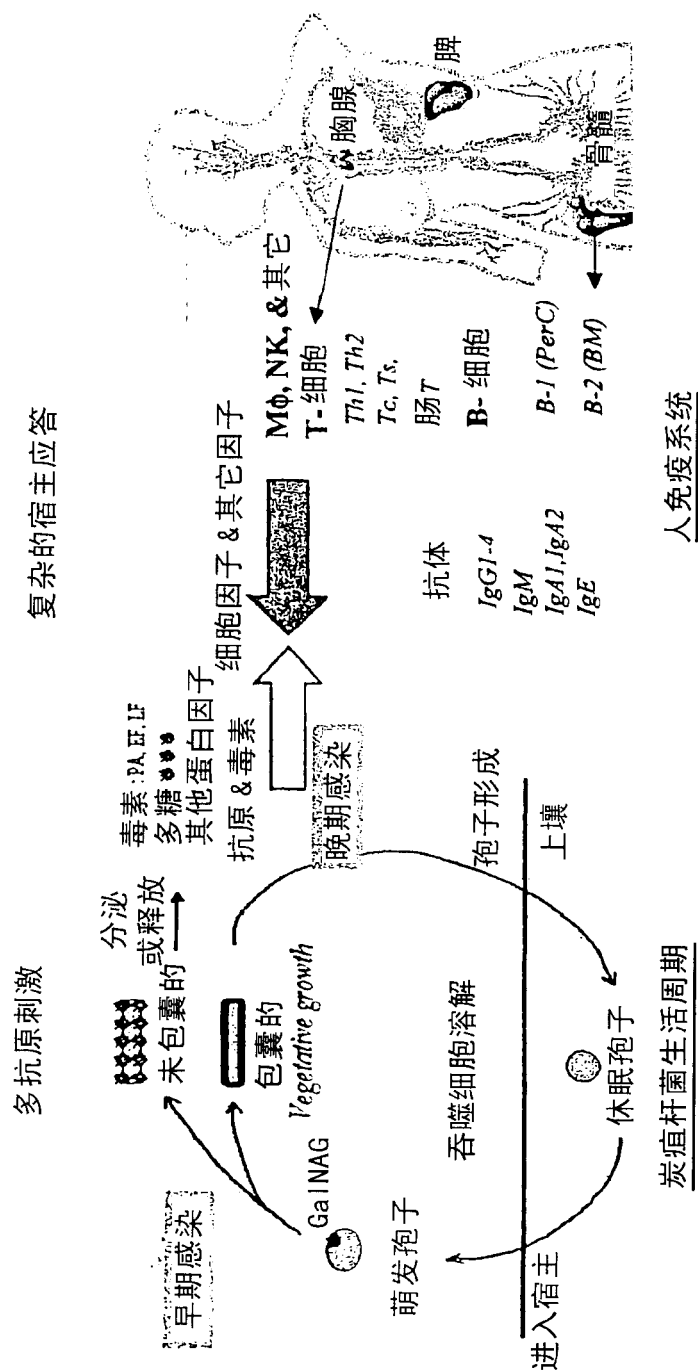


图 8

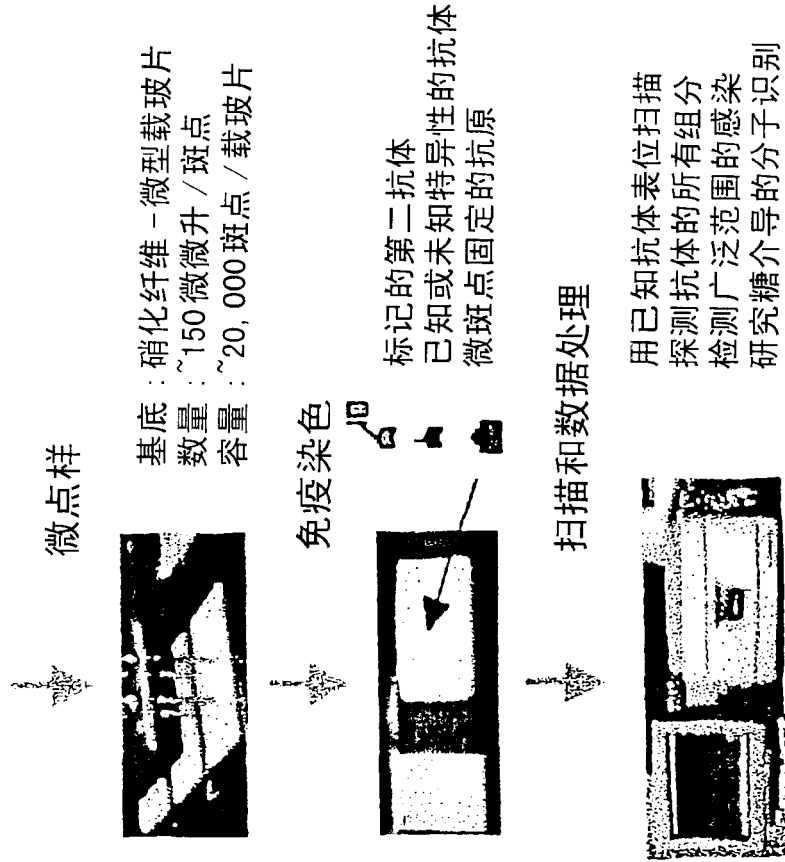


图 9

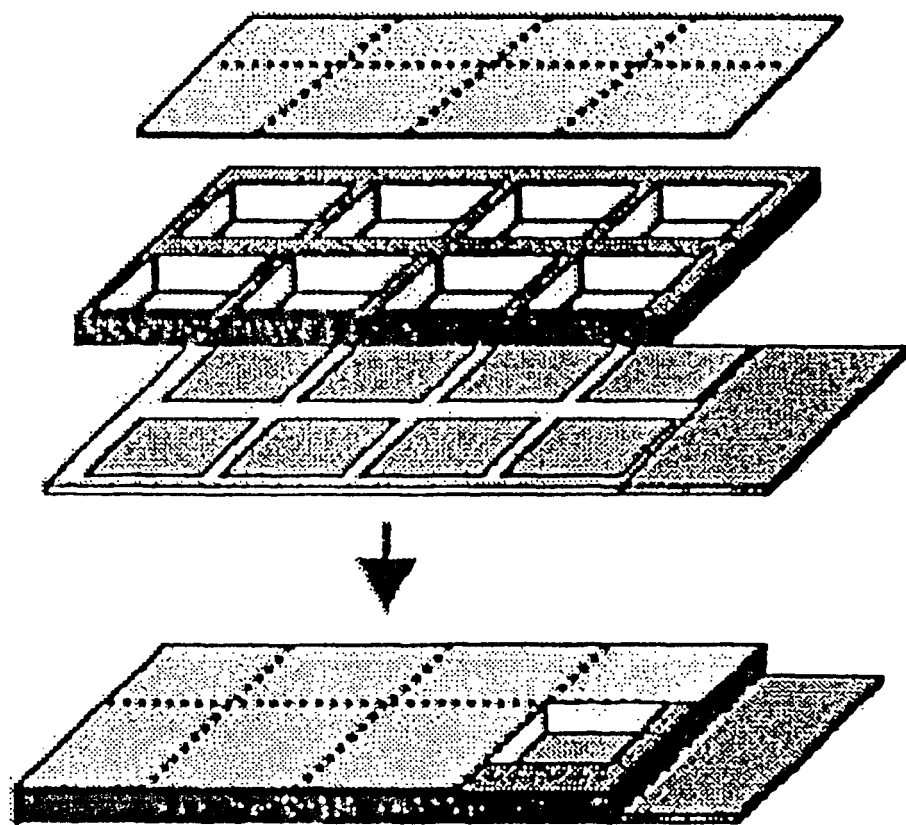
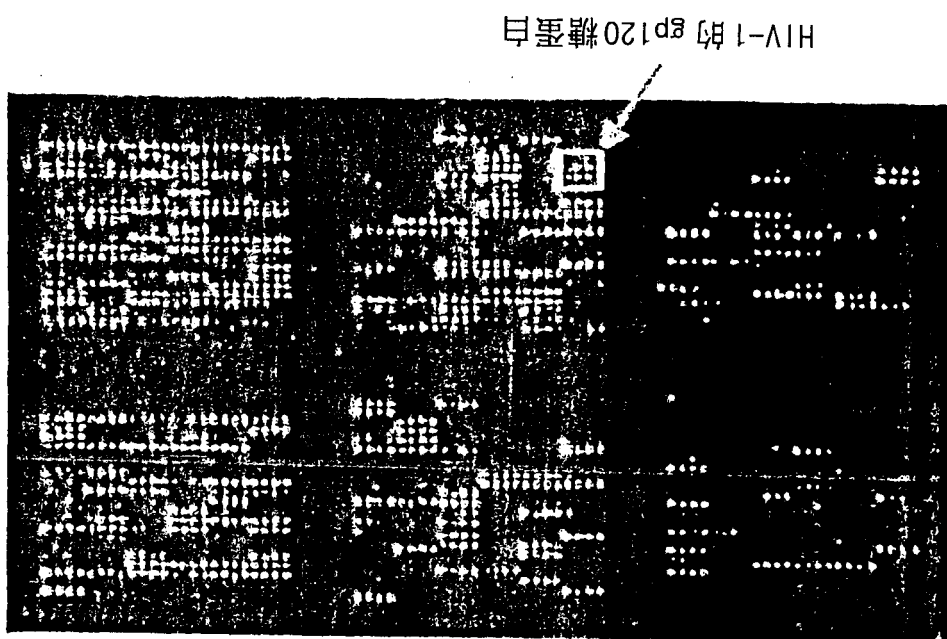


图 10

HIV-1 感染



HIV-1 的 gp120 糖蛋白

校正

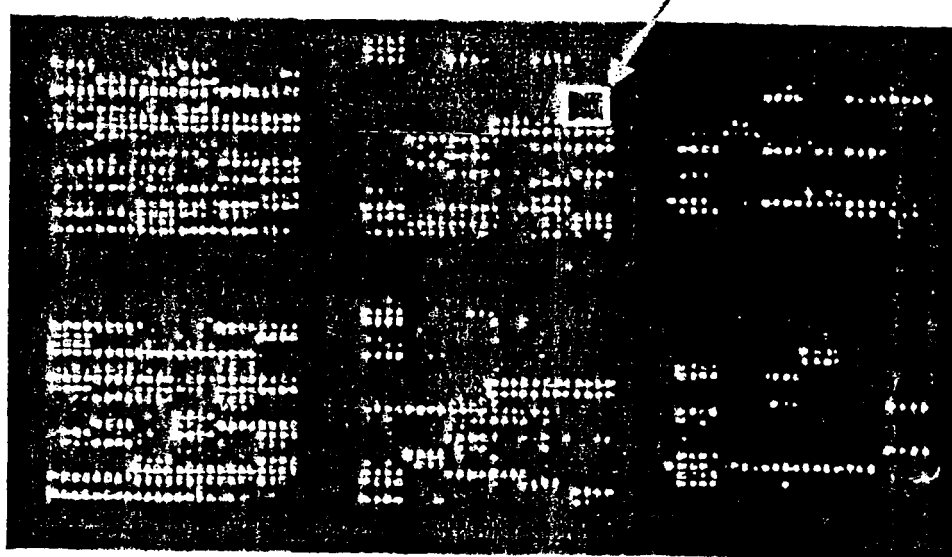


图 11

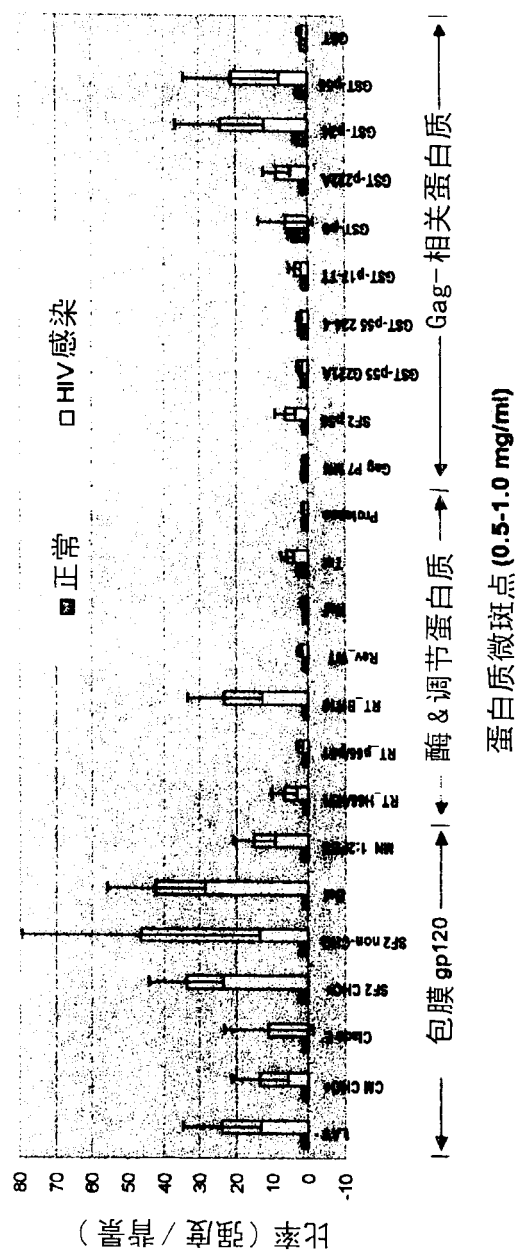


图 12

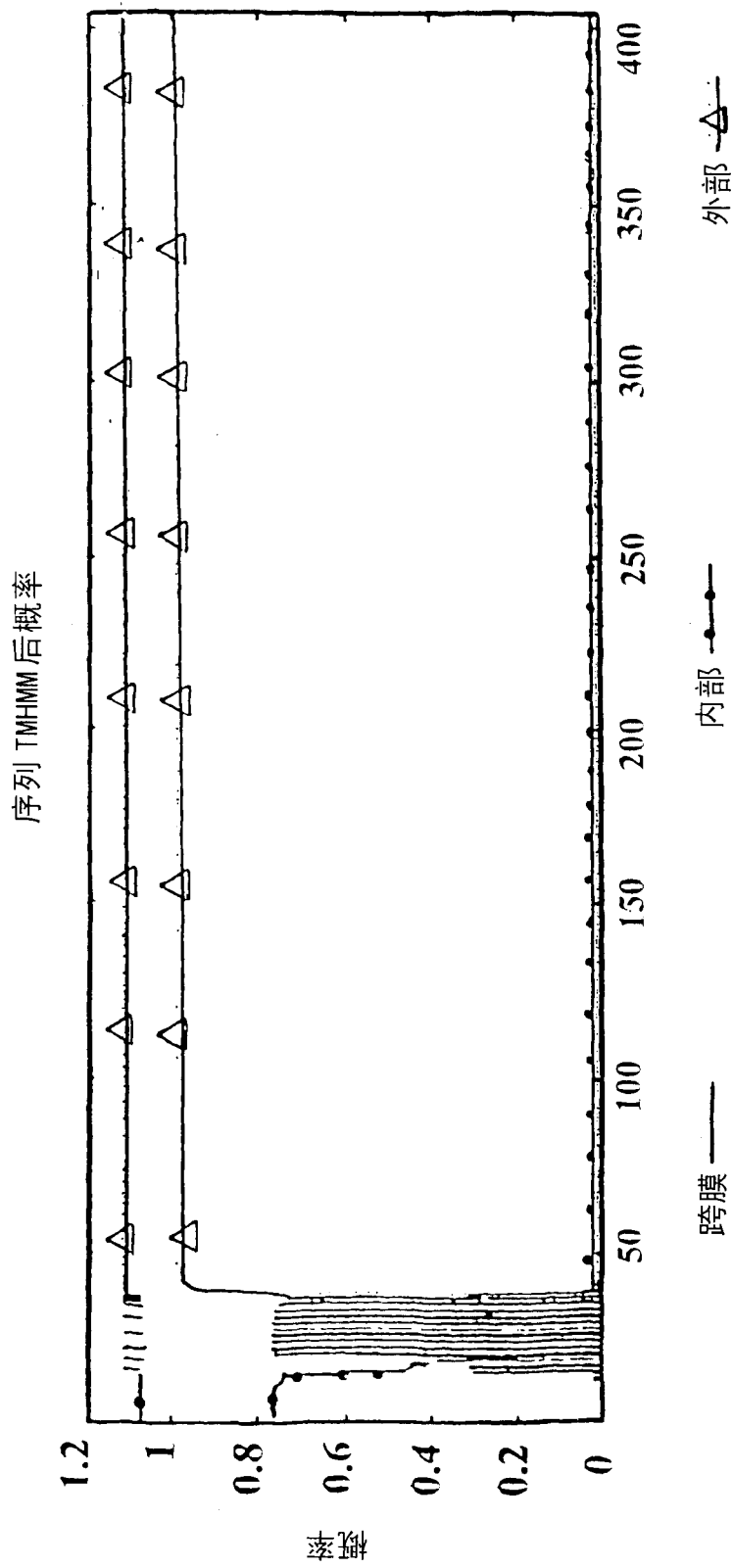


图 13

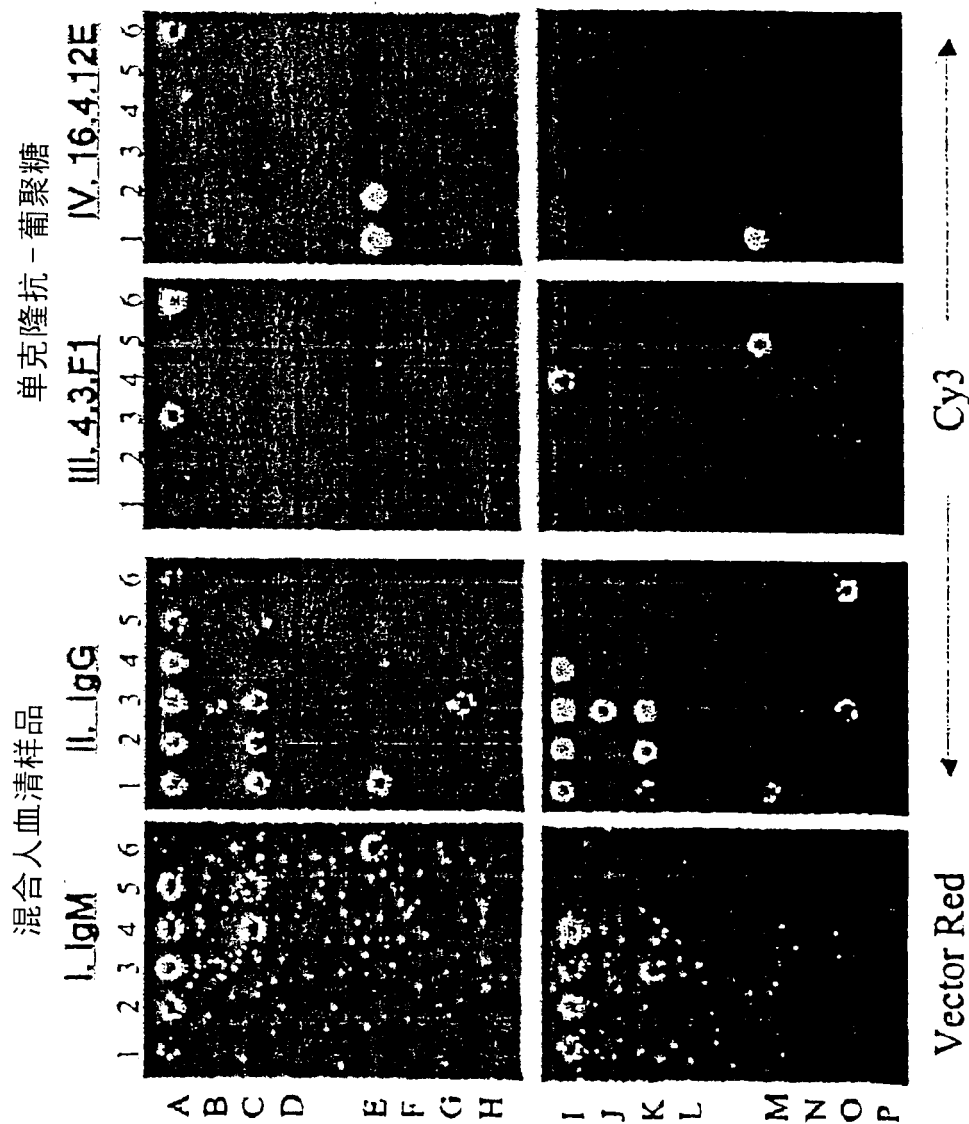


图 14

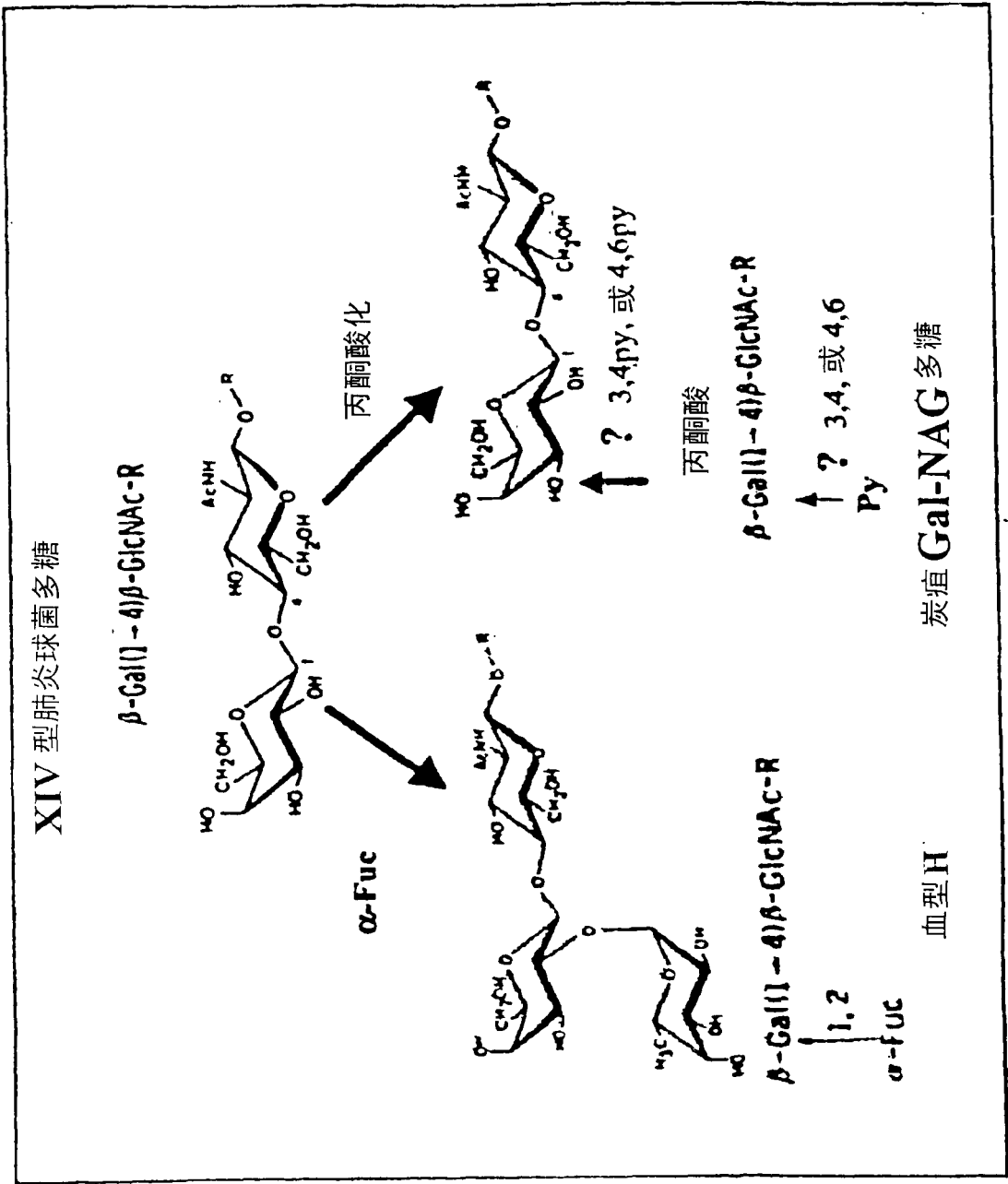


图 15

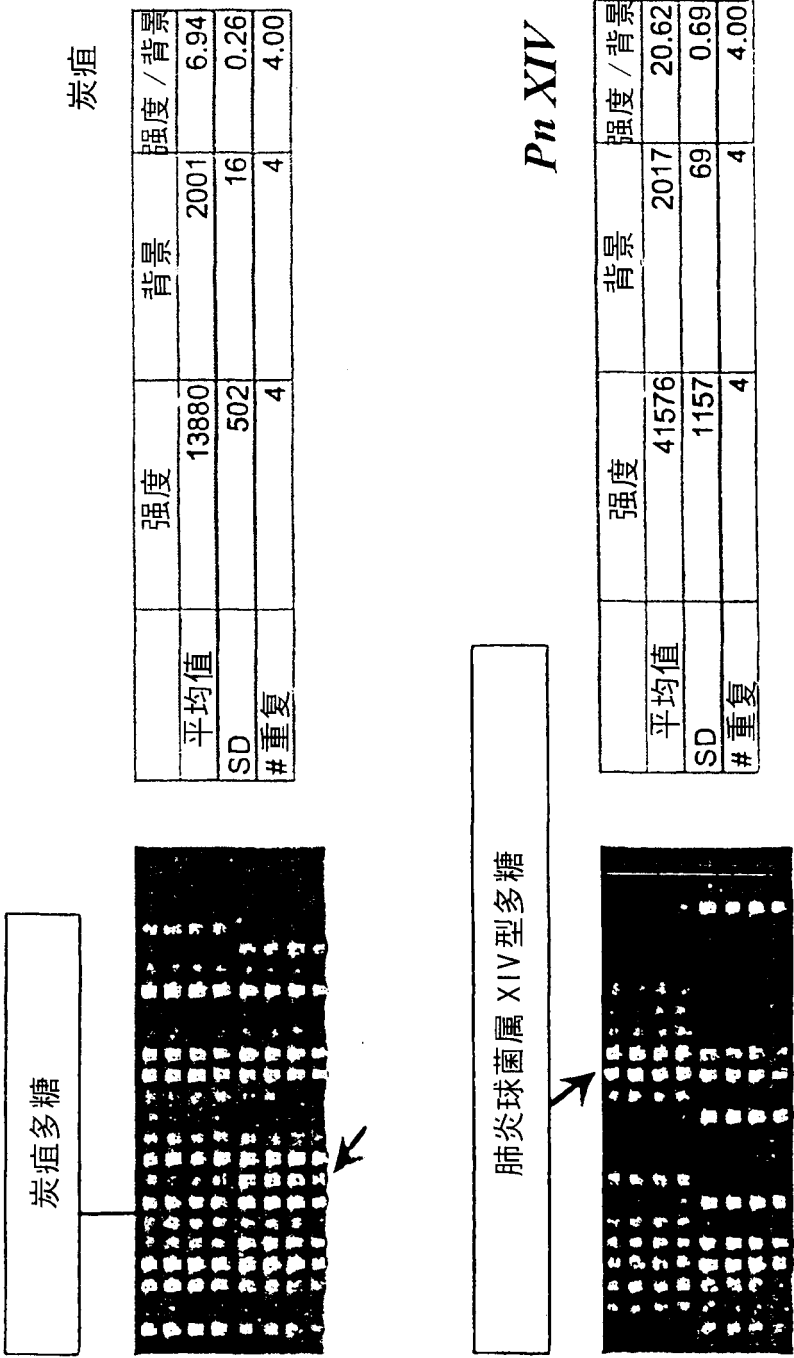


图 16

专利名称(译)	新型微阵列及其使用方法		
公开(公告)号	CN1524180A	公开(公告)日	2004-08-25
申请号	CN02811677.1	申请日	2002-04-10
[标]申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学信托人		
申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学信托人		
当前申请(专利权)人(译)	纽约市哥伦比亚大学信托人		
[标]发明人	王德农		
发明人	王德农		
IPC分类号	B01J19/00 B01L3/00 C40B40/10 G01N33/53 G01N33/548 G01N33/569 G01N33/545 G01N33/563 C12Q1/68 C07K17/08 A61K38/16 A61K39/04 A01N65/00		
CPC分类号	G01N33/5308 G01N33/548 B01J2219/00727 B01J2219/00725 B01J2219/00612 G01N2400/00 B01J2219/00644 B01J2219/00621 B01J2219/005 B01J2219/00641 B01J2219/00617 B01J2219/0074 B01L3/5085 B01J2219/00637 B01J2219/00605 B01J2219/00626 C40B40/10 B01J19/0046 B01J2219/00527		
代理人(译)	程金山		
优先权	60/282926 2001-04-10 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供新型基于硝化纤维或基于水凝胶的微阵列以及制备和使用它们(1)检测样品中一种或多种试剂的存在(2)确定样品中一种或多种试剂的量(3)确定受试者是否受一种疾病的折磨(4)确定已知与第一种化合物特异结合的试剂是否同样与第二种化合物特异结合的方法。本发明还提供包含即用微阵列的试剂盒。本发明另外提供能够与糖酸聚合物特异结合的抗体，所述糖酸聚合物不仅存在于哺乳动物巨噬细胞或肠上皮细胞表面，而且存在于细菌细胞表面。最后，本发明提供使用即用抗体的诊断方法。

