



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102778567 A

(43) 申请公布日 2012. 11. 14

(21) 申请号 201110122433. 0

(22) 申请日 2011. 05. 12

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号
申请人 中国科学院地质与地球物理研究所

(72) 发明人 阎锡蕴 梁敏敏 范克龙 潘永信
曹长乾 杨东玲 卢迪 冯静

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

G01N 33/68(2006. 01)

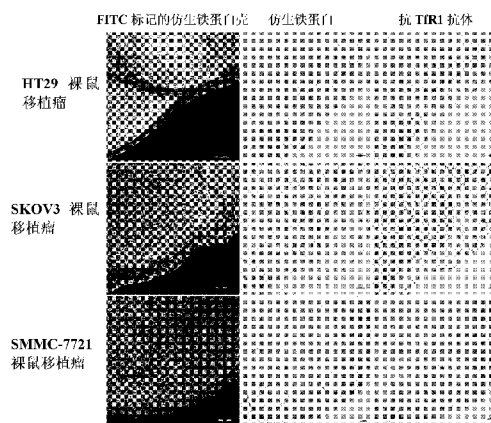
权利要求书 1 页 说明书 12 页
序列表 1 页 附图 6 页

(54) 发明名称

一种双功能肿瘤诊断试剂及方法

(57) 摘要

本发明涉及一种双功能肿瘤诊断试剂及方法。本发明属于纳米技术、生物仿生、免疫学和生物医药的交叉领域。特别地,本发明提供双功能肿瘤诊断试剂,其由特异识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白壳及具有过氧化物酶催化活性的无机纳米核组成。本发明还提供包括该试剂的试剂盒、使用该试剂检测个体中肿瘤的方法。本发明的双功能肿瘤诊断试剂和方法可应用于癌症筛查、早期诊断、治疗监控、癌细胞转移分析、术后复发评价或癌症基础研究。本发明的双功能肿瘤诊断试剂集肿瘤特异识别与显色双功能于一体,能够实现肿瘤特异识别与显色一步完成,无需二抗、三抗或是 HRP 等酶或信号分子的标记,操作简单方便。



1. 双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於它是由特异识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白壳及具有过氧化物酶催化活性的无机纳米核组成。
2. 根据权利要求 1 所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述蛋白壳包括去铁蛋白、热休克蛋白、DNA 结合蛋白、喋啶合酶、和具有纳米空腔结构的病毒蛋白壳,所述纳米空腔结构的病毒蛋白壳包括豇豆退绿斑驳病毒和豇豆花叶病毒蛋白。
3. 根据权利要求 2 所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述去铁蛋白由 12 个或是 24 个重链亚基和轻链亚基任意比例白组装而成。
4. 根据权利要求 3 所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述去铁蛋白是天然去铁蛋白或是基因重组的去铁蛋白,其中天然去铁蛋白来源于真核生物或原核生物,优选来源于哺乳动物。
5. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述蛋白壳包括化学偶联或是基因融合靶向分子和 / 或信号分子的蛋白壳,所述靶向分子包括多肽或核酸适配体,所述多肽包括抗体,所述信号分子包括荧光分子、放射核素和酶。
6. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述无机纳米核包括磁性氧化铁纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒和氧化铈纳米颗粒。
7. 根据权利要求 1-4 中任意一项所述的双功能肿瘤诊断试剂,其特征在於:所述蛋白壳是基因重组的全重链亚基铁蛋白,所述的无机内核为磁性氧化铁纳米颗粒。
8. 肿瘤诊断试剂盒,其包括权利要求 1-7 中任意一项所述的双功能肿瘤诊断试剂和过氧化物酶底物。
9. 仿生铁蛋白及其在制备肿瘤检测试剂中的用途,该仿生铁蛋白由蛋白壳及无机纳米核组成,所述蛋白壳是基因重组的全重链亚基铁蛋白,所述的无机内核为磁性氧化铁纳米颗粒。
10. 检测个体中肿瘤的方法,包括:从所述个体获得机体组织或细胞样品,将该样品与权利要求 1-7 中任意一项所述的双功能肿瘤诊断试剂接触,加入底物直接显色,由此测定所述个体中肿瘤的存在,优选地所述组织为临床病人或是动物模型的穿刺活组织标本、术后病理切片或尸体剖检组织;所述细胞为机体循环系统中脱落细胞、组织溶解细胞或体外培养细胞。

一种双功能肿瘤诊断试剂及方法

技术领域

[0001] 本发明属于纳米技术、生物仿生、免疫学和生物医药的交叉领域。特别地,本发明提供一种集癌灶特异识别与显色双功能于一体的肿瘤诊断试剂,以及所述肿瘤诊断试剂用于癌组织及癌细胞诊断的方法。

背景技术

[0002] 恶性肿瘤已经成为日益常见且严重威胁人类生命和生活质量的主要疾病之一。病理切片检查最准确、可靠,是国内外公认的肿瘤诊断的“金标准”(Shi, et al., (2008) *Am. J. Clin. Pathol.*, 129 :358-366 ;Taylor et al. (2006) *Biotech Histochem.*, 81 :3-12. ; Larsson, et al., (1988) *Immunocytochemistry :Theory and Practice*. Boca Raton, FL : CRC Press41-73)。目前,病理切片的主要染色方法有苏木精-伊红染色(HE)、免疫组化、免疫荧光。HE染色主要通过苏木精使细胞核内的染色质着紫蓝色,通用伊红使细胞质和细胞外基质中的成分着红色,以此提供细胞形态学的信息,病理医生根据这些细胞形态学的改变,粗略的鉴定组织细胞的癌变,该染色方法操作方便、快速,但是仅能够提供组织形态学的变化,信息量少,对于较为复杂、多型性的肿瘤,就不能作出正确的判断。免疫组化或免疫荧光利用一抗与被检测组织抗原结合,荧光信号分子或酶标记的二抗、三抗与一抗结合,然后通过荧光信号或酶底物反应显色,提供所要检测抗原的定位和半定量信息,进而鉴定组织细胞的癌变、坏死、炎性细胞浸润等病理改变。免疫组化或免疫荧光能够提供某特定抗原的分布、含量及细胞形态学的详细信息,对病理学的深入研究十分有意义,但是免疫染色需要一抗、二抗甚至三抗的多步孵育, PBS 反复冲洗,及酶或是荧光分子的标记,步骤复杂,操作时间长。因此,有必要研究简单、快速且能够提供丰富信息量的癌组织、癌细胞检测试剂和方法,以提高临床病理诊断效率,为病人的治疗赢得时间。

[0003] 天然的人铁蛋白是一种球状储铁蛋白,由 24 个重链或轻链亚基任意比例复合而成,重链和轻链亚基具有高度同源性,分子量分别为 21kDa 和 19kDa(Theil, (1987) *Annu. Rev. Biochem.*, 56 :289-315)。人体不同器官不同组织中铁蛋白的亚基组成不同,心脏中以重链亚基为主,而肝脏则以轻链亚基较多,两种亚基也会因环境需求作改变,为生物体提供弹性的铁离子供应。然而只有重链亚基才能够利用氧气将二价铁离子转为三价铁离子,使铁离子能顺利进入铁蛋白,所以增加重链亚基,能增加该细胞利用铁的能力;而增加轻链亚基,则能够增加铁储存的效率。铁蛋白球壳之中,铁离子和磷酸盐、氢氧根离子一同形成结晶,与矿物中的水合氧化铁具有类似的化学性质(Harrison, et al., (1996) *Biochim. Biophys. Acta* 1275 :161-203 ;Levi, et al. (1988) *J. Biol. Chem.* 263 :18086-18092 ;Ford, et al. (1984) *Philos Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 304 :551-565)。

[0004] 除了在细胞内储存铁,重链亚基铁蛋白还能够特异地结合激活的淋巴细胞、白血病细胞、宫颈癌细胞、淋巴瘤细胞等(Fargion, et al. (1988) *Blood* 71 :753-757 ;Moss, et al. (1992) *J. Lab Clin. Med.* 119 :273 ;Bretscher, et al. (1983) *EMBO J.* 2 :599-603 ;Takami, et al. (1986) *Biochim. Biophys Acta* 884 :31-38 ;Fargion, et al. (1991) *Blood*,

78:1056-1061)。Li 等报道细胞表面的转铁蛋白受体 1(transferrin receptor 1, TfR1) 作为重链亚基铁蛋白的共受体, 调节铁蛋白与细胞的相互作用 (Li, et al., (2010)Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 107:3505-3510)。转铁蛋白受体是细胞获得铁元素的关键分子, 是增殖细胞、肿瘤细胞快速生长所必需的, 许多肿瘤如肝细胞癌、乳腺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌等均高表达 TfR1, 因此 TfR1 成为肿瘤识别和治疗的特异靶点 (Larrick, et al. (1979) J. Supramol. Struct. 11:579-586; Daniels, et al. (2006) Clin. Immunol., 121:144-158; Ryschich, et al. (2004) Eur. J. Cancer 40:1418-1422.)。利用 TfR1 是重链亚基铁蛋白的共受体, 重链亚基铁蛋白可用于肿瘤特异识别。

[0005] 具有不同尺寸大小的纳米空腔结构的天然蛋白壳主要包括去铁蛋白、热休克蛋白 (HSP, 直径 12nm)、DNA 结合蛋白 (DPs, 直径 9nm)、喋啶合酶 (LS, 直径 15nm) 和病毒蛋白壳, 如: 豇豆退绿斑驳病毒 (CCMV, 直径 28nm) 和豇豆花叶病毒蛋白 (CMV, 直径 31nm), 这些纳米空腔提供了一个纳米颗粒生长, 并能有效阻止纳米颗粒在合成过程中聚集的良好空间结构, 利用这一特殊结构可以在其空腔内部合成各种尺度的无机纳米颗粒, 实现纳米材料在大小、形状、晶体结构上的可控合成 (Turyanska L., et al. (2009) Small, 5:1738-1741; Meldrum FC., et al. (2009) Science, 257:522-523; Galvez N., et al. (2006) J. Mater. Chem., 16:2757-2761; Hennequin B., et al. (2008) Adv. Mater., 20:3592-3593; Yamashita I., et al. (2004) Chem. Lett., 33:1158-1159)。此外, 这些不同结构的蛋白壳容易化学偶联或是基因融合上靶向分子和信号分子, 实现癌症的靶向识别和检测, 比如去铁蛋白通过基因融合 RGD 能够实现癌细胞靶向识别 (Uchida M., et al. (2006) J. Am. Chem. Soc., 128:16626-16633), 通过化学标记信号分子 Cy5.5 或纳米空腔装载同位素 ^{64}Cu 、钆壳实现肿瘤活体成像 (Lin X., et al. (2011) Nano Lett., 11:814-819; Geninatti CS., et al. (2006) Cancer Res., 66:9196-201.)。

[0006] 我们课题组于 2007 年首次发现氧化铁纳米颗粒具有类似过氧化物酶的催化活性, 即在过氧化氢存在下, 氧化铁纳米颗粒能够与 DAB, TMB 等辣根过氧化物酶的底物反应, 生成与过氧化物酶相同的反应产物, 从而产生与过氧化物酶相类似的催化作用。基于这一发现我们提出了氧化铁纳米颗粒模拟酶的概念 (Gao L, et al., (2007) Nature Nanotech., 2:577-583; 中国专利 200610057413.9)。

发明内容

[0007] 本发明利用纳米材料的过氧化物酶活性, 结合肿瘤识别蛋白, 提供了一种新型肿瘤诊断试剂及方法。

[0008] 本发明所提供的肿瘤诊断试剂由蛋白壳及纳米颗粒核组成, 蛋白壳能够特异识别癌组织及细胞, 纳米颗粒核具有过氧化物酶催化活性, 能够同辣根过氧化酶的底物反应显色。本发明所提供的肿瘤诊断试剂能够实现组织特异识别、显色一步完成, 和传统免疫方法相比, 无需一抗、二抗、三抗的多步孵育, 抗体无需酶或是信号分子标记, 操作简单、方便、快速。

[0009] 因此, 本发明一方面提供双功能肿瘤诊断试剂, 其特征在于它是由特异识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白壳及具有过氧化物酶催化活性的无机纳米核组成。

[0010] 本发明的特异识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白壳可从本领域中公开的众多特异

识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白中选择。在一些实施方案中,本发明所述蛋白壳是基因重组的或是天然的去铁蛋白。在一些实施方案中,去铁蛋白可以由 12 个或是 24 个重链亚基和轻链亚基任意比例自组装而成。本发明中,天然去铁蛋白可以来源于真核生物、原核生物,优选地来源于哺乳动物。在一些实施方案中,本发明的蛋白壳是基因重组的全重链亚基铁蛋白。

[0011] 在一些实施方案中,本发明所述蛋白壳还是热休克蛋白 (HSP, 直径 12nm)、DNA 结合蛋白 (DPs, 直径 9nm)、喋啶合酶 (LS, 直径 15nm) 或病毒蛋白壳,病毒蛋白壳包括豇豆褪绿斑驳病毒 (CCMV, 直径 28nm) 和豇豆花叶病毒蛋白 (CMV, 直径 31nm),

[0012] 在一些实施方案中,本发明所述蛋白壳化学偶联或是基因融合靶向分子和 / 或信号分子。在一些所述方案中,本发明所述靶向分子包括多肽或核酸适配体。在一些所述方案中,本发明所述靶向分子是抗体。在一些实施方案中,本发明所述信号分子包括荧光、放射核素。

[0013] 在一些实施方案中,本发明所述无机纳米核具有过氧化物酶催化活性,能够与底物反应显色,包括但不限于:磁性氧化铁纳米颗粒、硫化铁纳米颗粒、贵金属掺杂氧化铁纳米颗粒、双金属合金纳米颗粒或氧化铈纳米颗粒。

[0014] 在一些实施方案中,本发明所述蛋白壳是基因重组的全重链亚基铁蛋白。在一些实施方案中,本发明所述的无机内核为磁性氧化铁纳米颗粒。

[0015] 本发明另一方面提供肿瘤诊断试剂盒,其包括本发明所述的双功能肿瘤诊断试剂。在一些实施方案中,所述试剂盒还包括过氧化物酶底物。在一些实施方案中,所述过氧化物酶的底物包括 DAB、TMB。在一些实施方案中,本发明的试剂盒还包括说明书。

[0016] 本发明又一方面提供本发明所述双功能肿瘤诊断试剂在制备肿瘤诊断试剂中的用途。如上所述,本发明的双功能肿瘤诊断试剂由蛋白壳及纳米颗粒核组成,蛋白壳能够特异识别癌组织及细胞,纳米颗粒核具有过氧化物酶催化活性,能够同辣根过氧化物酶的底物反应显色,因此可用于诊断肿瘤。

[0017] 本发明又一方面提供仿生蛋白,其由特异识别癌组织和 / 或癌细胞的蛋白壳及具有过氧化物酶催化活性的无机纳米核组成。在一些实施方案中,本发明的仿生蛋白是仿生铁蛋白。在一些实施方案中,本发明所述蛋白壳是基因重组的或是天然的去铁蛋白。在一些实施方案中,去铁蛋白可以由 12 个或是 24 个重链亚基和轻链亚基任意比例自组装而成。在一些实施方案中,天然去铁蛋白可以来源于真核生物、原核生物,优选地来源于哺乳动物。在一些实施方案中,本发明的蛋白壳是基因重组的全重链亚基铁蛋白。本发明还提供该仿生蛋白在制备肿瘤检测试剂中的用途。如上所述,本发明的仿生蛋白由蛋白壳及纳米颗粒核组成,蛋白壳能够特异识别癌组织及细胞,纳米颗粒核具有过氧化物酶催化活性,能够同辣根过氧化物酶的底物反应显色,因此可用于诊断肿瘤。

[0018] 本发明又一方面提供检测个体中肿瘤的方法,其包括:从所述个体获得机体组织或细胞样品,将该样品与本发明所述的双功能肿瘤诊断试剂或本发明的仿生蛋白接触,加入底物直接显色,由此测定所述个体中肿瘤的存在。在一些实施方案中,所述组织为临床病人或是动物模型的穿刺活组织标本、术后病理切片或尸体剖检组织。在一些实施方案中,所述细胞为机体循环系统中脱落细胞、组织溶解细胞或体外培养细胞。

[0019] 本发明所述试剂和方法可应用于临床癌症筛查、早期诊断、癌细胞转移诊断、治疗

监控、肿瘤成像、尸体剖检组织病理分析或术后癌症复发评价。本发明所提供的肿瘤诊断试剂能够实现组织特异识别、显色一步完成,和传统免疫方法相比,无需一抗、二抗、三抗的多步孵育,抗体无需酶或是信号分子标记,操作简单、方便、快速。

附图说明

[0020] 结合下面的附图对本发明的优选实施方案进行说明。

[0021] 图 1 :其中, A :仿生铁蛋白的 TEM 电镜图 ;B :仿生铁蛋白具有过氧化物酶活性,催化 HRP 底物 TMB 产生颜色反应 ;C :仿生铁蛋白具有过氧化物酶活性,催化 HRP 底物 DAB 产生颜色反应。

[0022] 图 2 :流式分析结肠癌细胞 HT29 和仿生铁蛋白的相互作用。A :细胞表面受体竞争结合 ;a :PBS 对照, b :Cy5.5 标记的仿生铁蛋白染色, c :过量未标记的仿生铁蛋白封闭细胞表面受体 ;B :过量抗转铁蛋白受体 (Transferrin receptor1, TfR1) 的抗体竞争结合仿生铁蛋白受体位点, a :PBS 对照, b :Cy5.5 标记的仿生铁蛋白, c :过量抗 TfR1 的抗体封闭受体位点 ;C :仿生铁蛋白的细胞结合饱和曲线。

[0023] 图 3 :仿生铁蛋白特异识别小鼠移植肿瘤,对肿瘤组织的着色区及染色效果和抗体具有可比性, (标尺为 100 μ m)。

[0024] 图 4 :仿生铁蛋白特异识别人肝癌组织切片,不识别正常肝组织或是肝炎肝、硬化等组织。A-D :4 例肝细胞癌 ;E :正常肝组织 F :肝组织慢性炎 G :结节性肝硬化 H :胆汁性肝硬变 I :肝细胞癌 J :正常肝组织 K :肝细胞癌 L :肝组织慢性炎, (标尺为 100 μ m)。

[0025] 图 5 :仿生铁蛋白对多种人癌组织及正常组织的染色。A1 :结肠癌 II 级, A2 :结肠粘膜组织, B1 :乳腺非特殊性浸润性导管癌 I 级, B2 :乳腺纤维腺病, C1 :卵巢浆液性乳头状腺癌 III 级, C2 :卵巢组织, D1 :前列腺癌 4 级, D2 :前列腺平滑肌组织, E1 :肺鳞状细胞癌 III 级, E2 :肺组织伴淤血, F1 :食道细胞癌 III 级, F2 :食道慢性炎伴上皮增生, G1 :胸腺癌, G2 :胸腺组织, H1 :宫颈鳞状细胞癌 III 级, H2 :宫颈慢性炎。

[0026] 图 6 :荧光标记的仿生铁蛋白壳对多种人癌组织的特异识别。A1 :结肠癌 III 级, A2 :结肠粘膜慢性炎伴上皮增生, B1 :乳腺非特殊性浸润性导管癌 I 级, B2 :乳腺组织, C1 :卵巢浆液性乳头状腺癌 III 级, C2 :卵巢组织, D1 :结肠腺癌 II 级, D2 :结肠粘膜组织, E1 :前列腺癌 4 级, E2 :前列腺增生症伴 PIN I 级, F1 :肺鳞状细胞癌 III 级, F2 :肺组织, G1 :卵巢浆液性乳头状腺癌 III 级, G2 :卵巢组织, H1 :肺鳞状细胞癌 III 级, H2 :肺组织伴淤血, I1 :食道鳞状细胞癌 III 级, I2 :食道慢性炎伴上皮增生, J1 :胸腺癌, J2 :胸腺组织, K1 :宫颈鳞状细胞癌 II 级, K2 :宫颈组织, L1 :宫颈鳞状细胞癌 III 级, L2 :宫颈慢性炎, (标尺为 50 μ m)。

[0027] 图 7 :本发明所用质粒的图谱。

具体实施方式

[0028] 下列实施例的描述是为了说明目的,而不意于限制本发明的范围。

[0029] 实施例 1 仿生铁蛋白的制备

[0030] 通过基因重组全重链人铁蛋白壳,利用人体生物矿化原理,将铁离子转载进入蛋白壳,再氧化成氧化铁纳米颗粒,我们仿生合成了包裹有磁性氧化铁纳米内核的全重链人

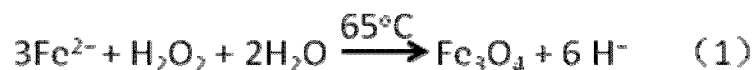
铁蛋白,命名为仿生铁蛋白,用于肿瘤检测。具体操作如下:首先构建人全重链亚基铁蛋白基因序列的重组质粒 pET12b-HFn(Santambrogio P. et al., (2000), Protein Expr. Purif., 19:212-218)。人骨骼肌总 cDNA 文库购自 Invitrogen 公司 (D8090-01, Carlsbad, CA, USA), 利用 PCR 技术将全重链人铁蛋白基因从 cDNA 中分离并扩增,设计的两个引物如下:正向 PCR 引物:5'-A GTC GCC CAT ATG ACG ACCGCG TCC-3', 酶切位点为 NdeI (如下划线所示), 加有 7 个酶切位点保护碱基;反向 PCR 引物:5'-GCC GGA TCC TTA GCT TTC ATT ATC AC-3', 酶切位点为 BamHI (如下划线所示), 加有 3 个酶切位点保护碱基。552bp 的基因产物为全重链人铁蛋白目的基因产物,序列如下:

[0031] ATGACGACCGCGTCCACCTCGCAGGTGCGCCAGAACTACCACCAGGACTCAGAGGCCGCCATCAACCGC CAGATCAACCTGGAGCTCTACGCCTCCTACGTTTACCTGTCCATGTCTTACTACTTTGACCGCGATGATGTGGCCTT GAAGAAGCTTTGCCAAATACTTTCTTACCAATCTCATGAGGAGAGGGAACATGCTGAGAACTGATGAAGCTGCAGA ACCAACGAGGTGGCCGAATCTTCCTTCAGGATATCAAGAAACCAGACTGTGATGACTGGGAGAGCGGGCTGAATGCG ATGGAGTGTGCATTACATTTGGAAAAAATGTGAATCAGTCACTACTGGAAGTGCACAACTGGCCACTGACAAAAA TGACCCCATTTGTGTGACTTCATTGAGACACATTACCTGAATGAGCAGGTGAAAGCCATCAAAGAATTGGGTGACC ACGTGACCAACTTGCACAAGATGGGAGCGCCGAATCCGGCTTGGCGGAATATCTCTTTGACAAGCACACCCTGGGA GACAGTGATAATGAAAGCTAG。然后将获得的 PCR 目的基因产物和 pET-12b plasmid (Novagen, Inc., Madison, WI, USA) 用限制性内切酶 NdeI 和 BamHI 酶切,目的基因连接到载体 pET-12b 上,获得包含有人全重链亚基铁蛋白基因序列的重组质粒 pET12b-HFn,下图为质粒图谱,其中酶切位点用红色箭头标出,抗生素抗性为氨苄。

[0032] 获得的质粒 pET12b-HFn 转染到表达菌株 BL21DE3 (购自北京全式金生物技术有限公司) 中表达重链亚基铁蛋白。将培养的表达式蛋白菌液超声裂解,离心去除大肠杆菌残片,上清液 65℃ 加热 10 分钟,沉淀杂蛋白,离心去除,上清液在排阻色谱 Sepharose 4B 柱子上分离纯化,获得重链亚基铁蛋白,电泳鉴定纯度,BCA 测定蛋白浓度。

[0033] 仿生铁蛋白生物矿化简述如下:将浓度 100mM 的氯化钠溶液除气,同纯化后的铁蛋白壳加入氮气环境下的密闭反应器中,反应温度维持在 65℃,pH 值稳定在 8.5,按照每个铁蛋白壳 1000-5000 个 Fe 的比率加入 $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$,双氧水作为氧化剂和 Fe 同时加入,加入的量按照 $\text{H}_2\text{O}_2 : \text{Fe}^{2+} = 1 : 3$,双氧水和 Fe 加完后体系继续反应 5 分钟,加热 200 μL 浓度 300mM 的柠檬酸钠络合剩余的 Fe,仿生磁性铁蛋白形成原理见下面公式 (1)。收集产品经排阻色谱纯化,去除变性的杂蛋白,得到磁化的全重链亚基的仿生铁蛋白。

[0034]



[0035] 图 1A 为合成的仿生铁蛋白的 TEM 电镜表征图,由图可见仿生铁蛋白分散均匀,蛋白壳外直径约为 12nm,内径约为 8nm。

[0036] 实施例 2 仿生铁蛋白的过氧化物酶活性

[0037] 基于我们课题组的报道,磁性氧化铁纳米颗粒具有类似过氧化物酶的催化活性 (Gao L, et al. (2007) Nature Nanotech., 2:577-583.), 由于仿生铁蛋白内包裹有氧化铁的内核,因此应当具有类氧化物酶的活性。我们使用辣根过氧化物酶的底物检测仿生铁蛋白的酶活性,具体方法如下:在仿生铁蛋白中加入 30% H_2O_2 和 TMB 或是 DAB,观察颜色变化。如图 1B 所示,当 TMB 中加入仿生铁蛋白和 H_2O_2 后,变成深蓝色, DAB 中加入仿生铁蛋白和

H₂O₂ 后,变为深棕色,和辣根过氧化物酶出现同样的颜色反应,说明仿生铁蛋白具有类过氧化物酶的活性。

[0038] 实施例 3 仿生铁蛋白结合肿瘤细胞

[0039] 为了研究仿生铁蛋白与人肿瘤细胞的结合,选取常见的人肿瘤细胞与荧光分子标记的仿生铁蛋白进行孵育,应用细胞流式检测仿生铁蛋白与各肿瘤细胞的结合。

[0040] 实验方法如下:按照说明书提供的标记方法,将 NHS 活化的 Cy5.5 (Cy5.5-NHS,购自 GE Healthcare) 标记到仿生铁蛋白上。培养各株细胞至 1×10^5 左右,胰酶消化,0.3% 的 BSA/PBS 洗细胞三次,加入 50 μ g/ml 的 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白,4°C 孵育 45 分钟。然后再用 0.3% 的 BSA/PBS 洗细胞三次,最后重悬于 PBS 中,流式检测样品荧光。

[0041] 结果如表 1 所示,在所检验的 12 株肿瘤细胞中,仿生铁蛋白与其中的 11 株有反应活性,分别属于肝细胞癌、结直肠癌、乳腺癌、黑色素瘤、单核细胞淋巴瘤、宫颈癌、白血病和前列腺癌。证明仿生铁蛋白能够和大部分癌细胞特异结合。

[0042] 表 -1

[0043] 流式分析仿生铁蛋白和人肿瘤细胞的反应活性

[0044]

细胞系 / 商品编号	肿瘤类别	反应性
SMMC-7721/(TCHu 52)	肝细胞癌	+
HT29/(HTB-38)	结直肠癌	+
MDA-MB-231/(HTB-26)	乳腺癌	+
MX-1/(KG038)	乳腺癌	-
A375/(CRL-1619)	黑色素瘤	+
K562/(CCL-243)	人慢性髓原白血病	+
HeLa/(CCL-2)	宫颈癌	+
SKOV3/(HTB-77)	卵巢癌	+
PC-3/(CRL-1435)	前列腺癌	+
U251/(TCHu 58)	胶质瘤	+
U937/(CRL-1593.2)	淋巴瘤	+
Jurkatr/(TIB-152)	白血病 T 细胞	+

[0045] *SMMC-7721 和 U251 购自中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库, MX-1 购自凯基生物,其余购自 ATCC。

[0046] 实施例 4 癌细胞和仿生铁蛋白的相互作用

[0047] 为研究仿生铁蛋白与肿瘤细胞表面受体结合情况,将不同浓度 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白与结直肠癌细胞 HT29 孵育,得出仿生铁蛋白结合饱和曲线,并用过量抗 TfR1 的抗体封闭受体位点,证明 TfR1 介导仿生铁蛋白与癌细胞的相互作用。

[0048] 实验方法如下:将培养癌细胞 HT29 至 1×10^5 左右,胰酶消化,0.3%的 BSA/PBS 洗细胞三次,加入不同浓度的 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白,4℃孵育 45 分钟。然后再用 0.3%的 BSA/PBS 洗细胞三次,最后重悬于 PBS 中,流式检测样品荧光。根据荧光强度值与仿生铁蛋白的浓度作饱和曲线。结果如图 2C 所示,仿生铁蛋白与肿瘤细胞的结合具有可饱和性,说明这种结合是特异的,具有高亲和力。

[0049] 接下来根据饱和曲线,选择合适浓度的 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白,作竞争结合抑制实验。同样当细胞至 1×10^5 左右,胰酶消化,缓冲液清洗后,同时加入一定浓度的 Cy5.5 标记仿生铁蛋白和过量的未标记仿生铁蛋白,4℃孵育 45 分钟,洗细胞三次,最后重悬于 PBS 中,流式检测样品荧光。结果如图 2A 所示,标记仿生铁蛋白和细胞的结合,大部分能够被过量的未标记仿生铁蛋白给竞争下来,进一步说明仿生铁蛋白与癌细胞的结合是特异的,细胞表面仅有少量的未竞争下来的非特异结合分子。

[0050] 文献 (Li L. et al., (2010) Proc. Natl. Acad. Sci. 107 :3505-3510) 报道人铁蛋白和转铁蛋白共用受体 TfR1,为证实 TfR1 介导仿生铁蛋白与癌细胞的相互作用,我们用过量的抗 TfR1 的抗体与 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白竞争细胞表面受体。具体实验方法如下:当细胞 HT29 培养细胞数至 1×10^5 左右,胰酶消化,清洗三次,共同加入过量的鼠抗人 TfR1 的抗体 CD71 (购自 BD Pharmingen) 和 Cy5.5 标记的仿生铁蛋白,4℃孵育 45 分钟,用 0.3%的 BSA/PBS 洗细胞三次,最后重悬于 PBS 中,流式检测样品荧光。结果见图 2B,约有 50%被竞争下来,说明 TfR1 介导仿生铁蛋白与癌细胞的相互作用。

[0051] 实施例 5 仿生铁蛋白特异检测小鼠移植肿瘤

[0052] 为检测仿生铁蛋白对肿瘤组织的识别及染色能力,我们将其与裸鼠移植瘤组织进行孵育,并与传统的抗体免疫组化结果相比较。具体实验方法如下:

[0053] 小鼠移植瘤石蜡切片的制备方法如下:收集培养的 HT-29, SMMC-7721 和 SKOV-3 肿瘤细胞 (购自 ATCC),无血清培养基洗涤,重悬于 PBS 缓冲液中。雌性 BALB/c 小鼠 (购自北京实验动物中心) 在肩胛部位皮下注射 5×10^6 个 HT-29, SMMC-7721 或 SKOV-3 细胞,待肿瘤直径达到 0.4-0.6 厘米时,将小鼠处死,取出肿瘤,并用 4%多聚甲醛固定 12-24 小时,用 70%乙醇溶液冲洗,再由 70-80-90-95-95-100%乙醇逐级脱水 35 分钟,浸入 1:1 乙醇/二甲苯溶液 5 分钟,取出再浸入二甲苯 20 分钟透明 2 次,投入已热熔的石蜡 (熔点 56-58℃) 中 4 小时,取出浸蜡组织移入含熔蜡的纸盒中,切面朝下,待石蜡表面凝结后包埋,浸入冷水中凝固,得石蜡块。用 Leica 石蜡切片机将石蜡包埋组织切成 $5 \mu\text{m}$ 切片,在载玻片上 42℃展片,自然干燥后 50℃烤片 6 小时,制得 HT-29, SMMC-7721 和 SKOV-3 的鼠移植肿瘤石蜡切片。

[0054] Anti-TfR1 抗体 CD71 染移植瘤组织方法简述如下:将移植瘤石蜡切片脱蜡至水, PBS 冲洗 3 次,加入含 0.3% H_2O_2 的甲醇溶液孵育 30 分钟,消除组织内源性过氧化物酶;再加 1mM 柠檬酸抗原修复液,微波炉中加热 30 分钟,抗原修复;去离子水漂洗后,5%普通羊血清 37℃封闭 1 小时,加 Anti-TfR1 抗体 CD71 (BD Pharmingen),4℃过夜;PBS 漂洗后,加 1000 倍稀释的二抗,37℃孵育 1 小时, PBS 漂洗;加 HRP 标记的 2000 稀释的三抗,37℃孵育

1 小时, PBS 漂洗, 1ml 去离子水中加 DAB 试剂盒中的 Buffer, H_2O_2 , DAB 各 1 滴, 混匀后滴加到玻片组织标本上显色 5min, 去离子水冲洗, 苏木精复染, 脱水封片, 显微成像观察。

[0055] 仿生铁蛋白染鼠移植瘤组织方法简述如下: 将移植瘤组织石蜡切片脱蜡、消除内源性过氧化物酶、抗原修复、血清封闭后加入仿生铁蛋白, 室温孵育 45 分钟, PBS 漂洗, DAB 染色, 苏木精复染, 常规脱水封片, 显微镜观察。

[0056] FITC 标记的仿生铁蛋白染鼠移植瘤: 参照说明书提供的方法将异硫氰酸荧光素 FITC(购自 Sigma-Aldrich) 标记仿生铁蛋白壳。移植瘤组织石蜡切片血清封闭后, 加入 FITC 标记的仿生铁蛋白壳, 室温孵育 45 分钟, PBS 冲洗 2 次 DAPI 染核 10 分钟。放淬灭剂封片, 荧光共聚焦观察。

[0057] 结果如图 3 所示, 仿生铁蛋白能够特异识别组织中的肿瘤细胞, 着色区域和抗体 CD71 一致, 肿瘤染色效果和抗体具有可比性, 能够清晰的分辨出细胞形态的变化。仿生铁蛋白壳识别肿瘤组织的荧光共聚焦结果进一步验证了仿生铁蛋白壳能够实现对肿瘤的特异识别。和传统的免疫组化方法相比较, 仿生铁蛋白能够集抗原特异识别和染色一步实现, 无需传统免疫组化的一抗、二抗、三抗等的多步孵育过程, 也不需要 HRP 酶等信号分子的修饰, 因此, 比传统免疫组化方法更加简单、方便、快速。

[0058] 实施例 6 仿生铁蛋白染识别临床人肝癌组织

[0059] 肝组织样本来自北京安贞医院和北京肿瘤医院。所有肝组织样本均是手术切除的肿瘤及邻近组织的大块样本。所有组织用石蜡包埋。

[0060] 仿生铁蛋白染组织切片方法简述如下: 将石蜡包埋的肝癌组织和正常肝组织脱蜡处理, 消除内源性过氧化物酶, 经抗原修复、血清封闭后加入仿生铁蛋白, 室温孵育 45 分钟, PBS 漂洗, DAB 染色, 苏木精复染, 常规脱水封片, 显微镜观察。

[0061] 仿生铁蛋白荧光染组织切片简述如下: 将石蜡包埋的肝癌组织和正常肝组织脱蜡处理, 血清封闭后, 加入 FITC 标记仿生铁蛋白壳, 室温孵育 45 分钟, PBS 冲洗 2 次 DAPI 染核 10 分钟。放淬灭剂封片, 荧光共聚焦观察。

[0062] 结果如图 4 所示, 仿生铁蛋白特异识别肝组织中癌化的细胞, 对肿瘤周围的正常组织不染色识别; 对肝组织慢性炎、结节性肝硬化、胆汁性肝硬变等组织也不识别。在所有检测的肝细胞癌组织中阳性率为 54/55, 而肝正常组织、肝炎、肝硬化的阳性率为 7/45。证实仿生铁蛋白能特异性地识别肝癌组织。

[0063] 实施例 6 仿生铁蛋白特异识别多种人癌组织

[0064] 为了系统研究仿生铁蛋白对癌变组织和人体正常组织的特异识别能力, 我们选取例人肿瘤组织和 48 例人正常组织或炎症组织的石蜡切片标本, 进行仿生铁蛋白染色。病人组织样本来自北京安贞医院、北京肿瘤医院和西安奥美生物科技有限公司。所有组织样本均是手术切除的肿瘤及邻近组织的大块样本。所有组织用石蜡包埋。

[0065] 仿生铁蛋白染组织切片简述如下: 将石蜡包埋的人肿瘤组织、正常组织或相应炎症组织脱蜡处理, 消除内源性过氧化物酶, 经抗原修复、血清封闭后加入仿生铁蛋白, 室温孵育 45 分钟, PBS 漂洗, DAB 染色, 苏木精复染, 常规脱水封片, 显微镜观察, 组织识别结果见图 5 和表 2。

[0066] 仿生铁蛋白荧光染组织切片简述如下: 将石蜡包埋的肿瘤组织或正常、炎症组织脱蜡处理, 血清封闭后, 加入 FITC 标记仿生铁蛋白壳, 室温孵育 45 分钟, PBS 冲洗 2 次, DAPI

染核 10 分钟。放淬灭剂封片, 荧光共聚焦观察, 结果见图 6。

[0067] 如图 5,6 所示, 仿生铁蛋白对结肠癌、乳腺癌、卵巢癌、结肠腺癌、肺鳞状细胞癌、前列腺癌、食道鳞状细胞癌、胸腺癌及宫颈鳞状细胞癌等都表现出强烈的结合, 而对其相应的结肠慢性炎、乳腺组织、卵巢组织、结肠粘膜组织、肺组织、前列腺增生、食道慢性炎、胸腺组织、宫颈组织及宫颈慢性炎等都没有相应的结合。表 2 的分析结果表明, 仿生铁蛋白对肝细胞癌 (54/55)、肺鳞状细胞癌 (50/52)、胸腺癌 (4/4)、宫颈鳞状细胞癌 (4/4)、食道癌 (3/3)、结肠癌 (6/6) 及卵巢癌 (4/4) 等都表现出非常好的染色灵敏性和特异性。图 5、图 6 的组织识别效果证明仿生铁蛋白能够特异识别多种人癌组织, 尤其对肝细胞癌、肺癌、胸腺癌、宫颈癌、卵巢癌和结肠癌能够强烈地染色识别, 而对相应的正常或是炎症组织没有识别。和传统的抗体免疫组化方法相比较, 基于仿生铁蛋白的癌组织检测识别方法能够集肿瘤特异识别和染色一步实现, 无需一抗、二抗、三抗等的多步孵育或是 HR 等酶或信号分子的标记, 操作简单方便, 且对肿瘤组织的染色效果和抗体免疫组化方法具有可比性。

[0068] 表 2 仿生铁蛋白对临床肿瘤组织及相应的正常组织的特异识别分析

[0069]

肿瘤组织	阳性例数 /总例数	正常组织/炎症组织	阳性例数/ 总例数
肝细胞癌	54/55	正常肝/肝炎/肝硬化	7/45

[0070]

肺鳞状细胞癌	50/52	肺组织	1/56
胸腺癌	4/4	胸腺组织	0/4
宫颈鳞状细胞癌	28/28	宫颈组织/慢性炎	0/52
前列腺腺癌	22/22	前列腺平滑肌/前列腺增生	2/16
乳腺癌非特殊性 浸润性导管癌	4/5	乳腺组织/乳腺纤维病/增生 纤维组织/乳腺脂肪组织	1/4
卵巢癌	55/56	卵巢组织/卵巢上皮增生	1/16
食道鳞状细胞癌	3/3	食道平滑肌/慢性炎伴上皮 增生	0/5
结肠腺癌	23/23	结肠粘膜组织/结肠粘膜慢 性炎	1/41

[0071] 主要参考文献：

[0072] 1. Shi SR., (2008), Evaluation of the value of frozen tissue section used as “Gold Standard” for immunohistochemistry, *Am. J. Clin. Pathol.*, 129 :358-366.

[0073] 2. Taylor CR., (2006), Standardization in immunohistochemistry: the role of antigen retrieval in molecular morphology, *Biotech Histochem.*, 81 :3-12.

[0074] 3. Larsson L., (1988), *Immunocytochemistry: Theory and Practice*. Boca Raton, FL :CRC Press, 41-73.

[0075] 4. Turyanska L., et al. (2009), The Biocompatibility of Apoferritin-Encapsulated PbS Quantum Dots, *Small*, 5 :1738-1741.

[0076] 5. Meldrum FC., et al. (2009), Magnetoferritin: in vitro synthesis of a novel magnetic protein, *Science*, 257 :522-523.

[0077] 6. Galvez N., et al. (2006), Apoferritin-encapsulated Ni and Co superparamagnetic nanoparticles, *J. Mater. Chem.*, 16 :2757-2761.

[0078] 7. Hennequin B. et al. (2008), Aqueous near-infrared fluorescent composites based on apoferritin-encapsulated PbS quantum dots, *Adv. Mater.*, 20 : 3592-3593.

[0079] 8. Yamashita I., et al. (2004), Bio-template synthesis of uniform CdSe nanoparticles using cage-shaped protein, apoferritin, *Chem. Lett.*, 33 :1158-1159.

[0080] 9. Uchida M., et al. (2006), Targeting of Cancer Cells with Ferrimagnetic

- ferritin cage nanoparticles, *J. Am. Chem. Soc.*, 128 :16626-16633.
- [0081] 10. Lin X., et al. (2011), Chimeric ferritin nanocages for multiple function loading and multimodal imaging, *Nano Lett.*, 11 :814-819,
- [0082] 11. Geninatti CS., et al. (2006) Magnetic resonance visualization of tumor angiogenesis by targeting neural cell adhesion molecules with the highly sensitive gadolinium-loaded apoferritin probe, *Cancer Res.*, 66 :9196-201.
- [0083] 12. Gao L., et al. (2007), Intrinsic peroxidase-like activity of ferromagnetic nanoparticles, *Nature Nanotech.*, 2 :577-583.
- [0084] 13. 中国专利 200610057413.9
- [0085] 14. Theil EC., (1987), Ferritin: structure, gene regulation, and cellular function in animals, plants, and microorganisms. *Annu. Rev. Biochem.*, 56 :289-315.
- [0086] 15. Harrison PM., et al. (1996) The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1275 :161-203.
- [0087] 16. Levi S., et al. (1988), Mechanism of ferritin iron uptake-Activity of the H-chain and deletion mapping of the ferro-oxidase site-A study of iron uptake and ferro-oxidase activity of human-liver, recombinant H-chain ferritins, and of 2H-chain deletion mutants, *J. Biol. Chem.*, 263 :18086-18092.
- [0088] 17. Ford GC., et al. (1984), Ferritin: Design and formation of an iron-storage molecule, *Philos Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.*, 304 :551-565.
- [0089] 18. Fargion S, et al. (1988) Characteristics and expression of binding sites specific for ferritin H-chain on human cell lines. *Blood* 71 :753-757.
- [0090] 19. Moss D, et al. (1992) Characterization of the ferritin receptors of human T lymphoid (MOLT-4) cells, *J. Lab Clin. Med.* 119 :273-279.
- [0091] 20. Bretscher MS, et al. (1983) Distribution of ferritin receptors and coated pits on giant HeLa cells, *EMBO J.* 2 :599-603.
- [0092] 21. Takami M, et al. (1986) Human placental ferritin receptor. *Biochim. Biophys Acta* 884 :31-38.
- [0093] 22. Fargion S, et al. (1991) Specific binding sites for H-ferritin on human lymphocytes: Modulation during cellular proliferation and potential implication in cell growth control, *Blood* 78 :1056-1061.
- [0094] 23. Moss D., et al. (1992) Functional roles of the ferritin receptors of human liver, hepatoma, lymphoid and erythroid cells, *J. Inorg. Biochem.* 47 :219-227.
- [0095] 24. Li L., et al. (2010), Binding and uptake of H-ferritin are mediated by human transferrin receptor-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107 :3505-3510.
- [0096] 25. Larrick JW., et al. (1979), Modulation of cell surface iron transferrin receptors by cellular density and state of activation, *J. Supramol. Struct.*, 11 :579-586.
- [0097] 26. Daniels TR., et al. (2006), The transferrin receptor part I: biology and targeting with cytotoxic antibodies for the treatment of cancer, *Clin. Immunol.*,

121 :144-158.

[0098] 27. Ryschich E., et al. (2004), Transferrin receptor is a marker of malignant phenotype in human pancreatic cancer and in neuroendocrine carcinoma of the pancreas, *Eur. J. Cancer*, 40 :1418-1422.

[0099] 28. Santambrogio P., et al. (2000), Functional and immunological analysis of recombinant mouse H-and L-ferritins from *Escherichia coli*, *Protein Expr. Purif.*, 19 :212-218.

[0001]

序列表

<110>	中国科学院生物物理研究所 中国科学院地质与地球物理研究所	
<120>	一种双功能肿瘤诊断试剂及方法	
<130>	IB111466	
<160>	3	
<170>	PatentIn version 3.3	
<210>	1	
<211>	552	
<212>	DNA	
<213>	人类(Homo sapiens)	
<400>	1	
	atgacgaccg cgtccacctc gcaggtgctc cagaactacc accaggactc agaggccgcc	60
	atcaaccgcc agatcaacct ggagctctac gcctcctacg tttacctgct catgtcttac	120
	tactttgacc gcgatgatgt ggcttgaag aactttgcca aatactttct tcaccaatct	180
	catgaggaga gggaacatgc tgagaaactg atgaagctgc agaaccaacg aggtggccga	240
	atcttctctc aggatatcaa gaaaccagac tgtgatgact gggagagcgg gctgaatgct	300
	atggagtgtg cattacattt ggaaaaaat gtgaatcagt cactactgga actgcacaaa	360
	ctggccactg acaaaaatga cccccattg tgtgacttca ttgagacaca ttacctgaat	420
	gagcaggtga aagccatcaa agaattgggt gaccacgtga ccaacttgcg caagatggga	480
	gcgcccgaat cggccttggc ggaatatctc tttgacaage acaccctggg agacagtgat	540
	aatgaaagct ag	552
<210>	2	
<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	2	
	agtcgccc atgacgaccg cgtec	25
<210>	3	
<211>	26	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<400>	3	
	gccggtcct tagctttcat tateac	26

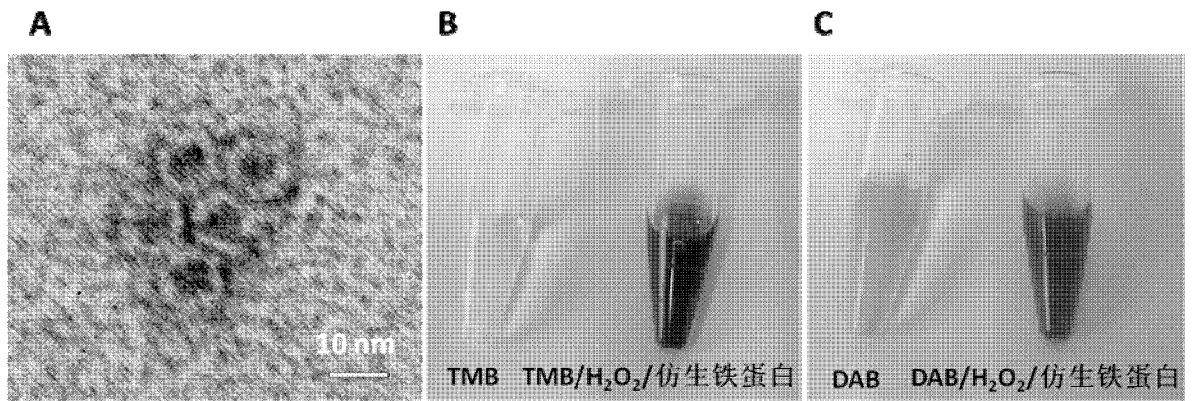


图 1

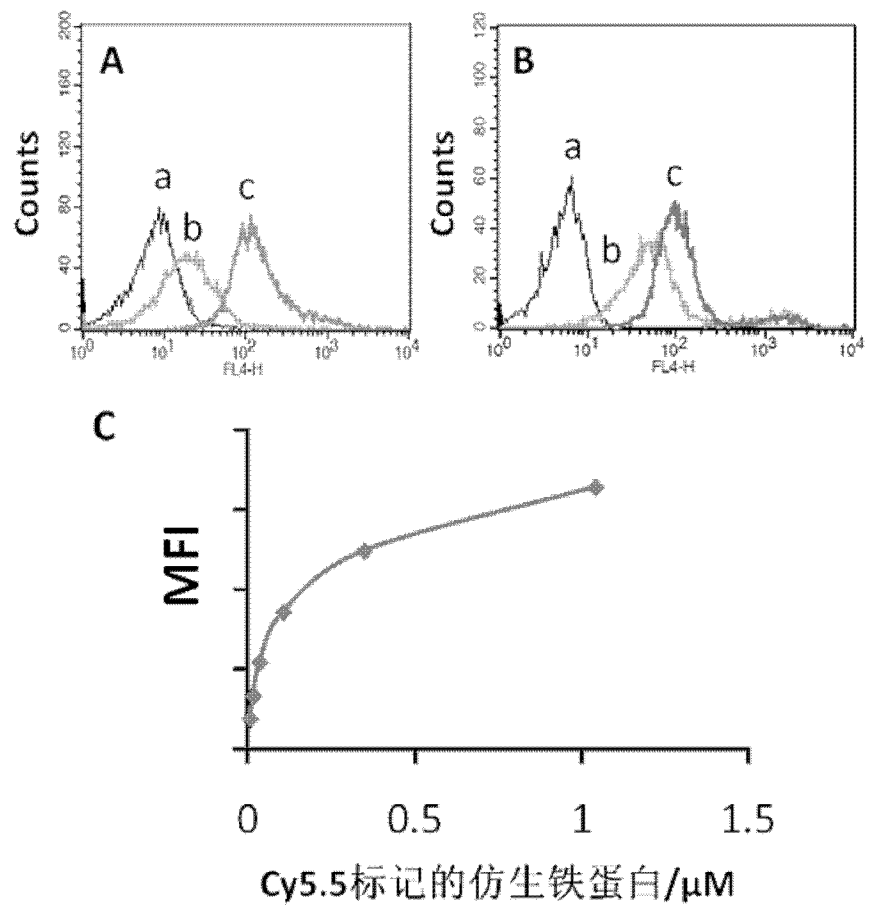


图 2

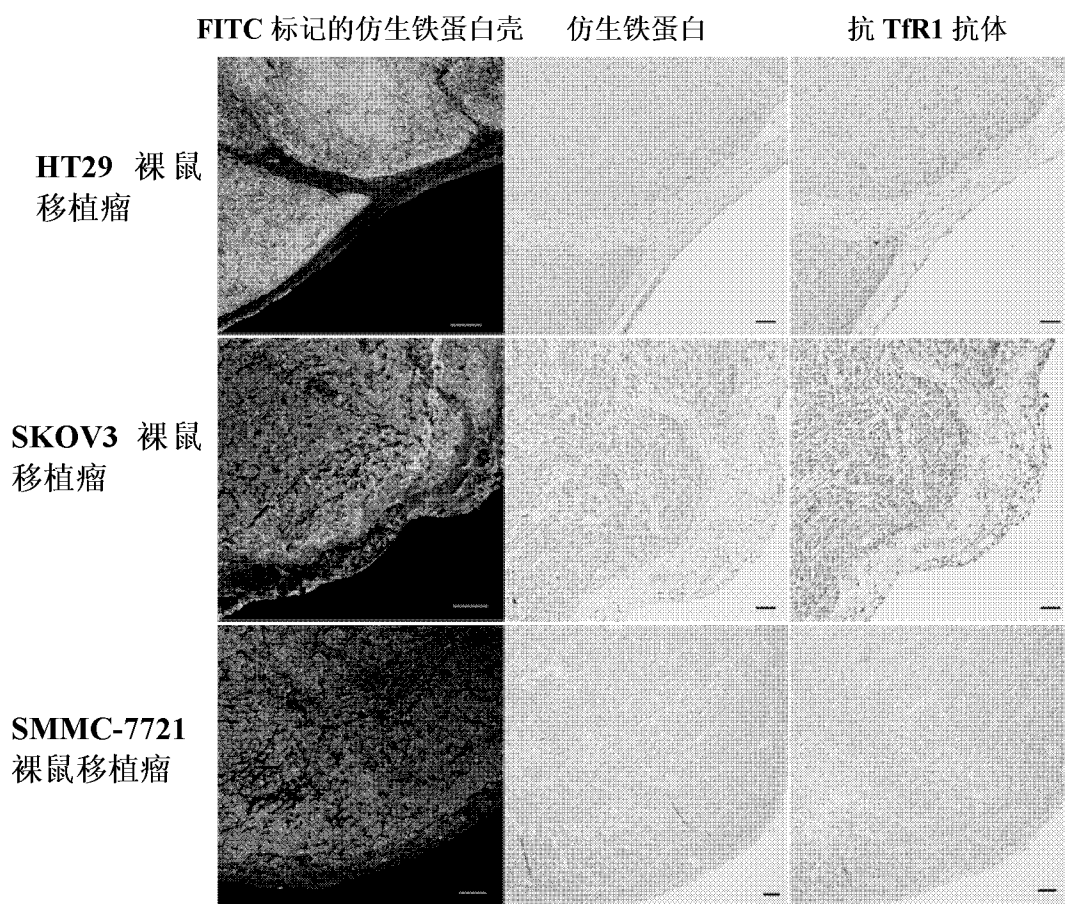


图 3

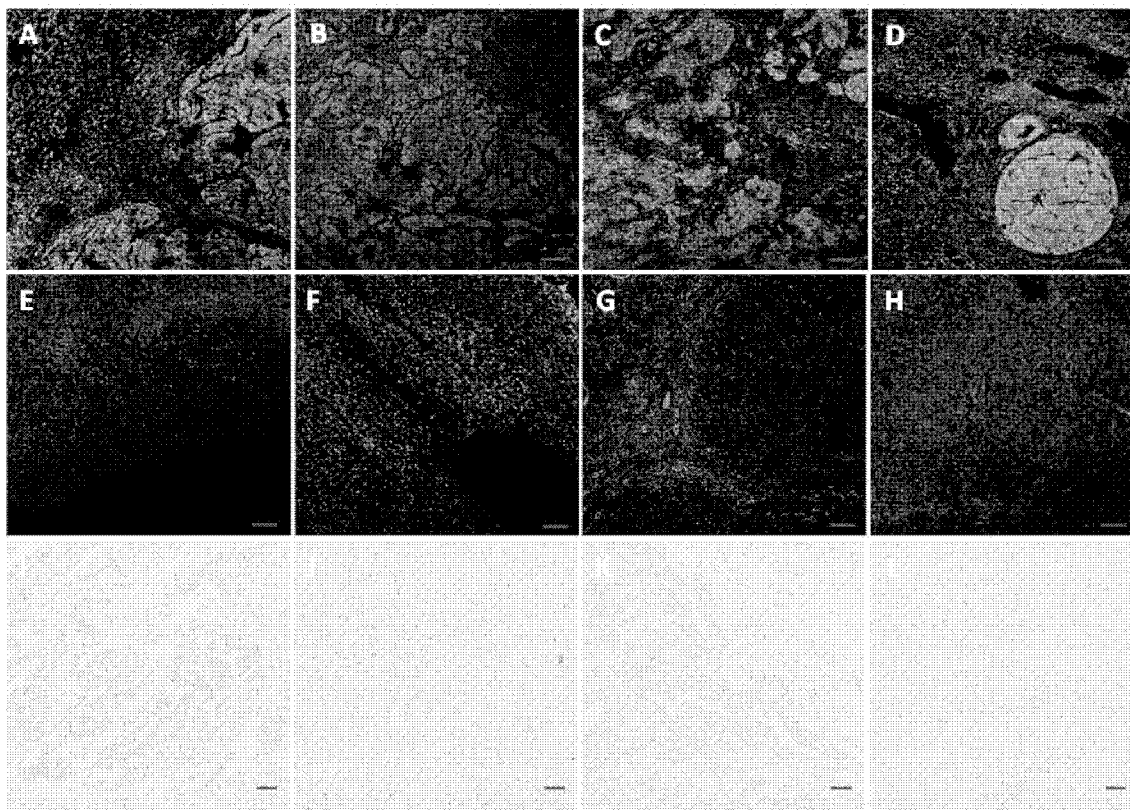


图 4

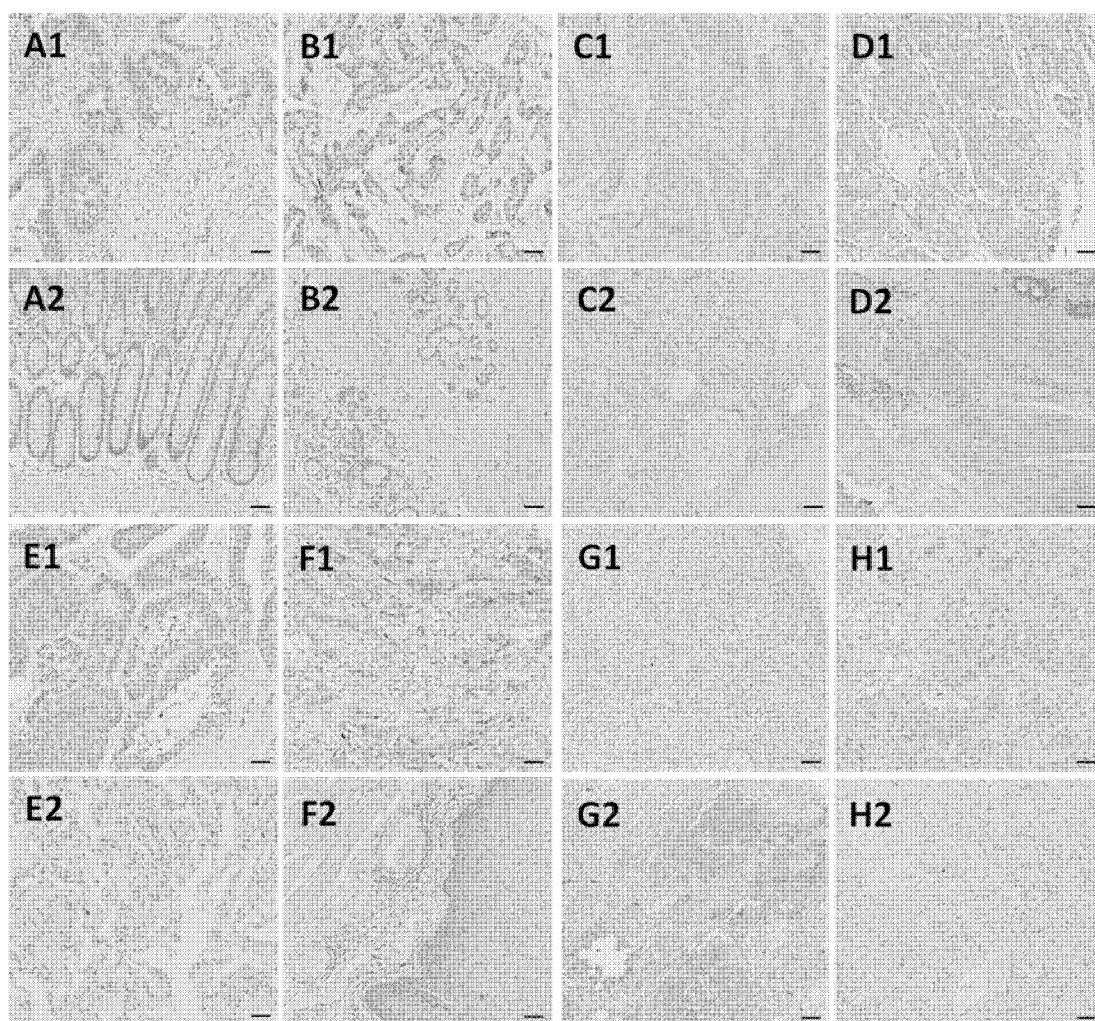


图 5

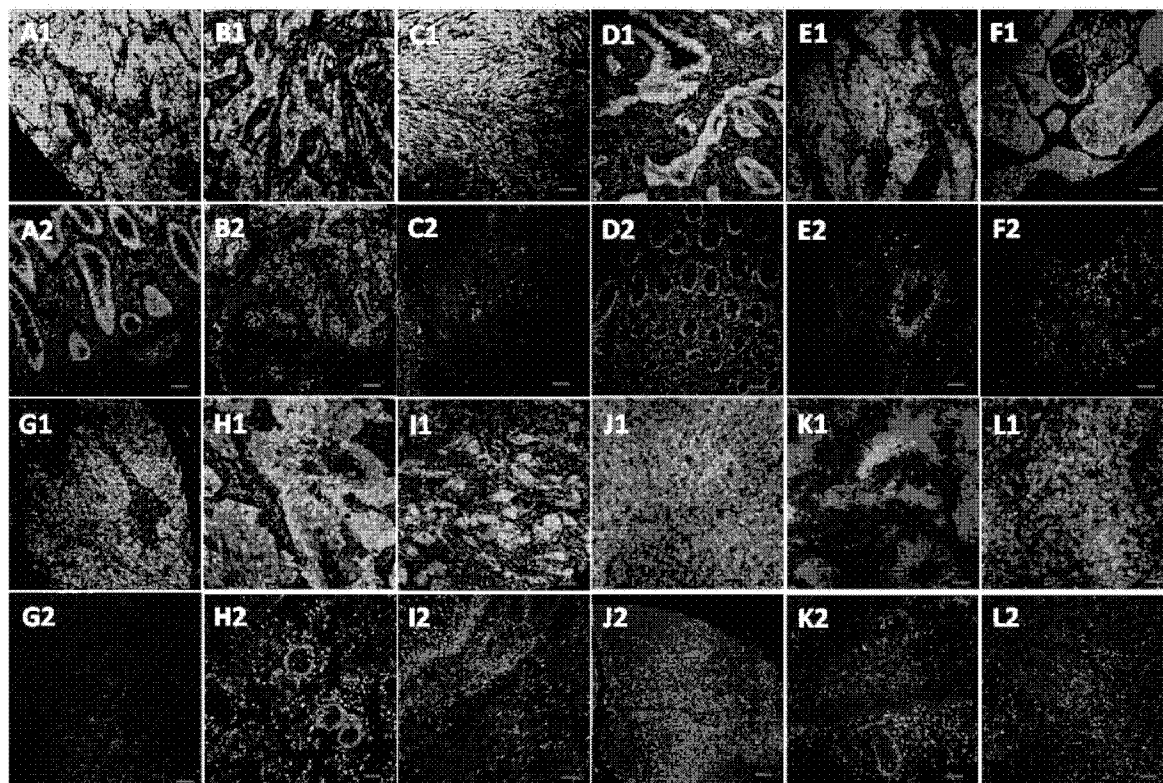


图 6

