

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G12M 1/40 (2006.01)

G12M 3/00 (2006.01)

C12N 1/06 (2006.01)



# [12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480018193.8

[43] 公开日 2006年8月2日

[11] 公开号 CN 1813059A

[22] 申请日 2004.5.3

[21] 申请号 200480018193.8

[30] 优先权

[32] 2003.5.2 [33] US [31] 60/467,679

[86] 国际申请 PCT/US2004/013767 2004.5.3

[87] 国际公布 WO2004/099384 英 2004.11.18

[85] 进入国家阶段日期 2005.12.27

[71] 申请人 西格玛-奥尔德利希公司

地址 美国密苏里州

[72] 发明人 W·K·卡普尔 R·J·梅海伊

E·A·詹金斯

[74] 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

代理人 黄革生 隗永良

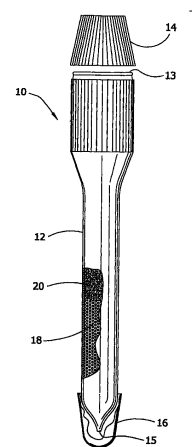
权利要求书 6 页 说明书 56 页 附图 4 页

[54] 发明名称

固相细胞裂解和捕获平台

[57] 摘要

本发明提供了涉及从宿主细胞提取或提取和分离细胞组分的容器、方法和试剂盒。更具体地，本发明容器包含口、包含侧壁结构和底部的内表面、体积、裂解试剂；和在一些情况中，受支持的捕获配体。还提供了使用本文描述的容器从宿主细胞提取或提取和分离细胞组分的方法和试剂盒。



1. 用于从宿主细胞提取细胞组分的容器，所述容器具有口、内表面、体积  $V$  和至少一部分内表面上裂解试剂的涂层，所述内表面包含侧壁结构和底部，当含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器时，涂层中裂解试剂的量足够形成能够裂解宿主细胞的裂解溶液，经涂布的内表面的面积  $SA$  与体积  $V$  的比值小于约  $4\text{mm}^2/\mu\text{l}$ 。

2. 用于从宿主细胞提取和分离细胞组分的容器，该容器具有口、内表面、体积  $V$ 、裂解试剂和受支持的捕获配体，侧壁结构在底部和口之间，口作为向容器导入液体的入口和从容器除去液体的出口，所述内表面包含侧壁结构和底部，其中捕获配体在容器中的一个位置受到支持，当含有完整宿主细胞或者固体细胞组分的液体悬浮物通过容器口导入容器时，所述位置允许捕获配体接触完整宿主细胞或者从其来源的固体细胞组分。

3. 用于从宿主细胞提取细胞组分的多孔板，所述多孔板的至少一个孔含有裂解试剂，其中裂解试剂(i)涂在孔的至少一部分内表面上，或者(ii)为孔中所含的材料块的形式。

4. 权利要求 3 的多孔板，其中孔还包含细胞组分的捕获配体。

5. 权利要求 1 或 2 的容器或者权利要求 3 的多孔板，其中裂解试剂选自去污剂、分解酶、离液剂和它们的组合。

6. 权利要求 5 的容器或多孔板，其中裂解试剂是去污剂并且该去污剂选自 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐、辛基- $\beta$ -硫代吡喃葡萄糖苷、辛基-吡喃葡萄糖苷、3-(4-庚基)苯基 3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐、3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐、3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐、正-十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷和它们的组合。

7. 权利要求 5 的容器或多孔板，其中裂解试剂是分解酶并且分解酶选自  $\beta$  葡糖醛酸糖苷酶、葡聚糖酶、蜗牛酶、溶菌酶、溶细胞酶、甘露聚糖

酶、变溶菌素、消解酶、纤维素酶、溶葡萄球菌素、果胶酶、链球菌溶血素 O，和它们的多种组合。

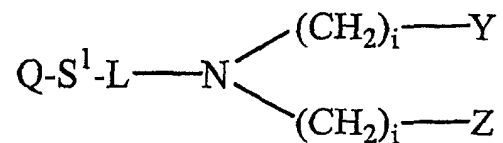
8. 权利要求 5 的容器或多孔板，其中裂解试剂是离液剂并且所述离液剂选自尿素、盐酸胍、硫氰酸胍、硫代硫酸胍和硫脲，或它们的任意组合。

9. 权利要求 5 的容器或多孔板，其中裂解试剂还包含缓冲剂、消泡剂、膨胀剂、底物结合酶，或者酶抑制剂，或者它们的任意组合。

10. 权利要求 2 的容器或者权利要求 4 的多孔板，其中捕获配体是金属螯合物、谷胱甘肽、生物素、链霉抗生物素蛋白、抗体、带电颗粒，或者不溶性疏水基团。

11. 权利要求 10 的容器或多孔板，其中捕获配体是对 SEQ.ID. NO. 1、SEQ.ID. NO. 2 或 SEQ.ID. NO. 3 特异的抗体。

12. 权利要求 10 的容器或多孔板，其中捕获配体是金属螯合物，其来源于相应于下式的成分：



其中

Q 是载体；

S<sup>1</sup> 是间隔区；

L 是 -A-T-CH(X)- 或 -C(=O)-；

A 是醚、硫醚、硒醚或者酰胺键；

T 是键或者经取代或未经取代的烷基或者链烯基；

X 是 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>CH<sub>3</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>COOH、-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>SO<sub>3</sub>H、-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>N(J)<sub>2</sub>、或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>P(J)<sub>2</sub>、优选 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>COOH 或 -(CH<sub>2</sub>)<sub>k</sub>SO<sub>3</sub>H；

k 为 0 到 2 的整数；

J 为烃基或者取代烃基；

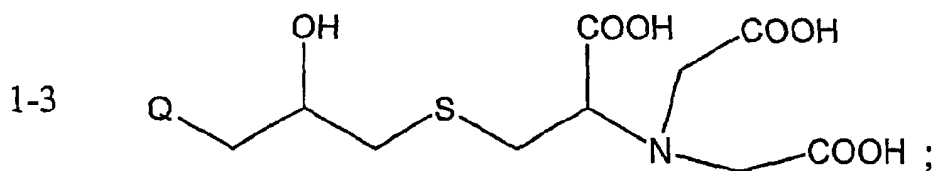
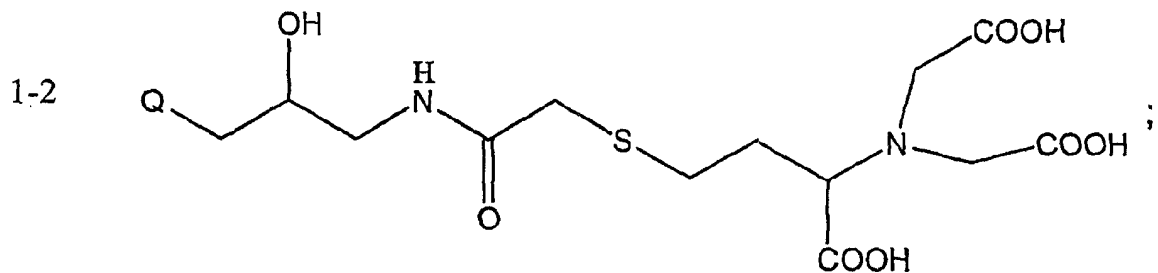
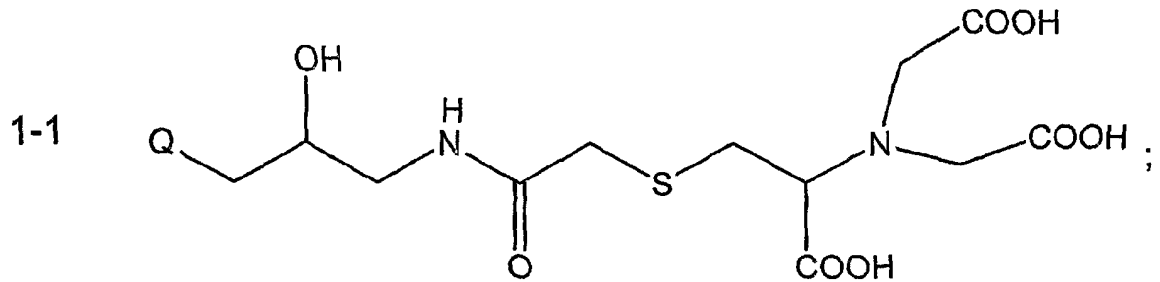
Y 为 -COOH、-H、-SO<sub>3</sub>H、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-N(J)<sub>2</sub>、或 -P(J)<sub>2</sub>、优选 -COOH；

Z 为 -COOH、-H、-SO<sub>3</sub>H、-PO<sub>3</sub>H<sub>2</sub>、-N(J)<sub>2</sub> 或 -P(J)<sub>2</sub>、优选 -COOH；

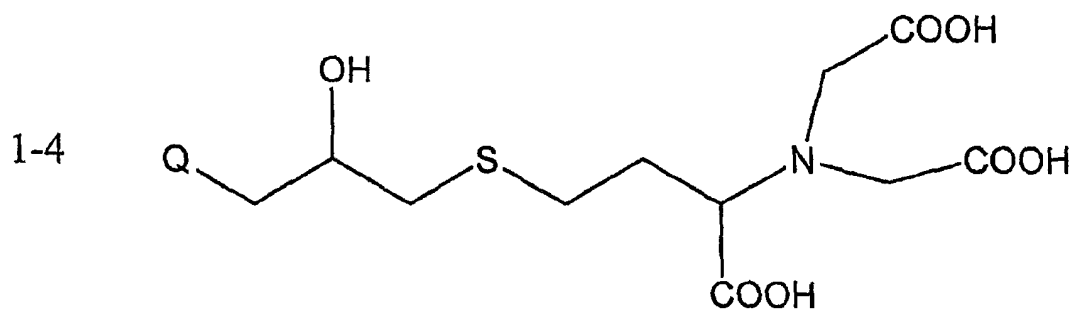
和

$i$  为 0 到 4 的整数, 优选 1 或 2.

13. 权利要求 12 的容器或多孔板, 其中金属螯合物来源于选自下面的组分:



和



其中 Q 为载体。

14. 从宿主细胞提取细胞组分的方法, 该方法包含: (a) 将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器, 该容器具有口、内表面、体积  $V$ , 和至少一部

分内表面上的裂解试剂涂层, 所述内表面包含侧壁结构和底部, 经涂布的内表面的面积 SA 与体积 V 的比值小于约  $4 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ , 和(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成细胞残渣。

15. 从宿主细胞提取和分离细胞组分的方法, 该方法包含(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器, 该容器具有口、内表面、体积 V、裂解试剂和受支持的捕获配体, 所述内表面包含侧壁结构和底部, 侧壁结构在底部和口之间, 口作为向容器导入液体的入口和从容器除去液体的出口, (b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣; 和(c)在固态细胞残渣的存在下用捕获配体捕获细胞组分。

16. 制备用于从宿主细胞提取细胞组分的容器或多孔板的方法, 所述方法包含将容器或者多孔板的多个孔的内表面与含有裂解试剂的液体接触并干燥液体以在容器或者孔的内表面上形成裂解试剂的吸附层。

17. 权利要求 14、15 或 16 的方法, 其中裂解试剂选自去污剂、分解酶、离液剂和它们的组合。

18. 权利要求 17 的方法, 其中裂解试剂是去污剂并且去污剂选自 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐、辛基- $\beta$ -硫代吡喃葡萄糖苷、辛基-吡喃葡萄糖苷、3-(4-庚基)苯基 3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐、3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐、3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐、正-十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷和它们的组合。

19. 权利要求 17 的方法, 其中裂解试剂是分解酶并且所述分解酶选自  $\beta$  葡糖醛酸糖苷酶、葡聚糖酶、蜗牛酶、溶菌酶、溶细胞酶、甘露聚糖酶、变溶菌素、消解酶、纤维素酶、溶葡萄球菌素、果胶酶、链球菌溶血素 O, 和它们的多种组合。

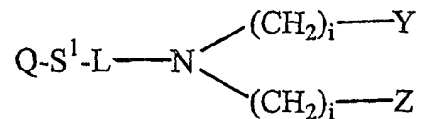
20. 权利要求 17 的方法, 其中裂解试剂是离液剂并且所述离液剂选自尿素、盐酸胍、硫氰酸胍、硫代硫酸胍和硫脲, 或它们的任意组合。

21. 权利要求 17 的方法, 其中裂解试剂还包含缓冲剂、消泡剂、膨胀剂、底物结合酶, 或者酶抑制剂, 或者它们的任意组合。

22. 权利要求 15 的方法, 其中捕获配体是金属螯合物、谷胱甘肽、生物素、链霉抗生物素蛋白、抗体、带电颗粒, 或者不溶性疏水基团。

23. 权利要求 22 的方法, 其中捕获配体是对 SEQ. ID. NO. 1、SEQ. ID. NO. 2 或 SEQ. ID. NO. 3 特异的抗体。

24. 权利要求 22 的方法, 其中捕获配体是金属螯合物, 其来源于相应于下式的成分:



其中

Q 是载体;

S<sup>1</sup> 是间隔区;

L 是 -A-T-CH(X)- 或 -C(=O)-;

A 是醚、硫醚、硒醚或者酰胺键;

T 是键或者经取代或未经取代的烷基或者链烯基;

X 是  $-(\text{CH}_2)_k\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{N}(\text{J})_2$ 、或  $-(\text{CH}_2)_k\text{P}(\text{J})_2$ 、优选  $-(\text{CH}_2)_k\text{COOH}$  或  $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{H}$ ;

k 为 0 到 2 的整数;

J 为烃基或者取代烃基;

Y 为  $-\text{COOH}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{N}(\text{J})_2$ 、或  $-\text{P}(\text{J})_2$ 、优选  $-\text{COOH}$ ;

Z 为  $-\text{COOH}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{N}(\text{J})_2$  或  $-\text{P}(\text{J})_2$ 、优选  $-\text{COOH}$ ;

和

i 为 0 到 4 的整数, 优选 1 或 2。

25. 从宿主细胞提取和分离细胞组分的方法, 该方法包含(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器, 该容器具有口、内表面、体积 V、裂解试剂和受支持的捕获配体, 所述内表面包含侧壁结构和底部, 侧壁结构在底部和口之间, 口作为向容器导入液体的入口, (b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣; 和(c)在固态细胞残渣的存在下用捕获配体捕获细胞组分, (d)从捕获配体释放细胞组分, 和(e)回收释放的细胞组

分。

26. 用于从宿主细胞提取和分离细胞组分的试剂盒，所述试剂盒包含权利要求 1 或 2 的容器或者权利要求 3 的多孔板和从宿主细胞提取和分离细胞组分的使用说明书。

27. 权利要求 26 的试剂盒，其还包含用于测定或检测被捕获的细胞组分的试剂。

28. 权利要求 2 的容器，其中该容器包含具有内腔的柱，所述腔包含结合有捕获配体的树脂床和包含裂解试剂的冻干块。

## 固相细胞裂解和捕获平台

### 发明背景

本发明涉及从宿主细胞分离细胞组分，如多肽和核酸。

重组 DNA 技术的最近进展使得可能在宿主细胞中产生大量肽。然而，从宿主细胞提取和分离靶肽、蛋白质、核酸或者其他细胞组分到目前仍然是多步骤方法，包括首先裂解，然后一个或多个随后步骤用以从其他细胞组分分离靶产物。

多种技术已经用于裂解细胞，每种技术都具有某些优点和缺点。例如，已经使用了超声处理、弗氏压碎器、匀浆、研磨、冷冻-解冻裂解，和多种其他物理或机械裂解细胞的方法；参见，例如，Bollag & Edelstein, *Protein Extraction, Protein Methods*, 27-43 (1993); Schutte & Kula, *Biotech. and App. Biochem.*, 12: 559-620 (1990); 和 Hughes, 等人, *Methods in Microbiology*, 5B: 1-54 (1969)。然而，机械裂解需要可能不易得到的专门设备，此外，超声处理也产生热，其对于某些蛋白质是有害的。酶和去污剂也已经用于酶促或化学地裂解细胞；见，例如，Hughes, 等人, *Methods in Microbiology*, 5B: 1-54; Andrews & Asenjo, *Trends in Biotech.*, 5: 273-77 (1987); Wiseman, *Process Biochem.*, 63-65 (1969); 和 Wolska-Mitaszko, 等人, *Analytical Biochem.*, 116: 241-47(1981)。

然而，酶或者去污剂溶液的加入导致含有待裂解细胞的溶液的稀释，此外，所希望的产物必须仍然与所得膜碎片、不希望的蛋白质和其他细胞残渣分离。

类似地，多种亲和捕获方法已经用于纯化肽、蛋白质和核酸。美国专利号 4,569,794、5,310,663 和 5,594,115 描述了包括组氨酸残基的金属螯合肽的用途，和所述肽在蛋白质纯化中的用途。美国专利号 4,703,004、



4,851,341、5,011,912 和 6,461,154 描述了抗原性 FLAG<sup>®</sup> 肽，和含有所述肽的蛋白质的纯化。美国专利号 5,654,176 描述了谷胱甘肽-S-转移酶用于纯化蛋白质的用途。美国专利号 5,998,155 描述了抗生物素蛋白/生物素捕获系统的用途。在每一种这些实例中，靶产物上的亲和标记或者序列与相应配体的相互作用导致靶产物的“捕获”。然后可以洗除未结合的组分和其他细胞残渣，留下结合到标记-或者序列-特异配体的靶产物。然后用特定洗脱剂释放结合的靶产物，导致纯化的靶产物。

不利地，与首先裂解宿主细胞然后纯化靶产物有关的多个步骤增加了分离产物，特别是高通量应用中分离产物所需的成本和时间。

## 发明概述

因此，在本发明的多个方面，提供了裂解细胞和捕获肽、蛋白质、核酸或者其他细胞组分的相对快速、有效的方法。有利地，本发明的方法和容器不需要离心细胞溶液以除去可溶的材料、在额外的去污剂裂解液体或者酶抑制剂中吹吸(pipette)(从而稀释原来的含有细胞的溶液)，或者进行随后的纯化步骤。

因此，简言之，本发明涉及从宿主细胞提取细胞组分的容器。所述容器含有口、内表面，和至少一部分内表面上裂解试剂的涂层 (coating)，其中当含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器中时，涂层中裂解试剂的量足够形成能够裂解宿主细胞的裂解溶液。在一个实施方案中，经涂布的内表面的面积与容器的体积之比小于约  $4 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ 。

另一方面，本发明涉及用于从宿主细胞提取和分离细胞组分的容器。该容器含有口、内表面、体积、裂解试剂和受支持的捕获配体。口作为向容器导入液体的入口和从容器除去液体的出口，捕获配体在容器中的一个位置受到支持，当含有完整宿主细胞或者固体细胞组分的液体悬浮物通过容器口导入容器时，所述位置允许捕获配体接触完整宿主细胞或者从其来源的固体细胞组分。

另一方面，本发明涉及用于从宿主细胞提取细胞组分的多孔板，其中

多孔板的至少一个孔含有裂解试剂。裂解试剂(i)涂在孔的至少一部分内表面上,或者(ii)为孔中所含的材料块的形式。

另一方面,本发明涉及从宿主细胞提取细胞组分的方法。该方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器,所述容器具有口、内表面、体积、至少一部分内表面上的裂解试剂涂层,经涂布的内表面的面积与容器的体积之比小于约  $4 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ ,和(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成细胞残渣。

另一方面,本发明涉及从宿主细胞提取和分离细胞组分的方法。该方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器,该容器具有口、内表面、体积、裂解试剂,和受支持的捕获配体,其中口作为导入液体的入口和从容器除去液体的出口,(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣;和(c)在固态细胞残渣存在下用捕获配体捕获细胞组分。

在另一方面,本发明涉及从宿主细胞提取和分离细胞组分的方法。该方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器,该容器具有口、内表面、体积、裂解试剂,和受支持的捕获配体,其中口作为向容器导入液体的入口,(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣;(c)在固态细胞残渣存在下用捕获配体捕获细胞组分;(d)从捕获配体释放细胞组分,和(e)回收释放的细胞组分。

另一方面,本发明涉及用于从宿主细胞提取和分离细胞组分的试剂盒。该试剂盒包含本发明的容器,和从宿主细胞提取和分离细胞组分的使用说明。在另一实施方案中,该试剂盒还含有用于从宿主细胞提取和/或分离细胞组分的额外试剂,和/或用于测定或检测捕获的细胞组分的试剂。

另一方面,本发明涉及制备用于从宿主细胞提取细胞组分的容器的方法,该方法包括将容器的内表面与含有裂解试剂的液体接触并干燥液体以在容器的内表面上形成裂解试剂的吸附层。

本发明的其他目标和特征将部分在下文中是显然的,部分在下文中指出。

## 附图简述

图 1 描绘了从 HIS-Select™ 高容量板洗脱的物质的 SDS-PAGE 凝胶图像。裂解试剂在板的表面上干燥并加入 0.1 ml 细胞。每个泳道的含量在表 1 中描述。该图表明在粗裂解细胞的存在下蛋白质可以结合到板。在这些条件下可以结合增量蛋白质并用不同试剂洗脱。

图 2 描绘了从 HIS-Select™ 高容量板洗脱的物质的 SDS-PAGE 凝胶图像。将裂解试剂(0.05ml)在板表面上干燥,并向每孔加入 0.1 ml 细胞或者纯蛋白质。表 3 中描述了每个泳道的含量。该图表明存在和不存在粗裂解细胞时可以结合蛋白质。可以在这些条件下结合和洗脱增量蛋白质。

图 3 描绘了从 HIS-Select™ 高容量板洗脱的物质的 SDS-PAGE 凝胶图像。将裂解试剂(0.1ml)在板表面上干燥,并向每孔加入 0.1 ml 细胞或者纯蛋白质。表 3 中描述了每个泳道的含量。该图表明存在和不存在粗裂解细胞时可以结合蛋白质。可以在这些条件下结合和洗脱增量蛋白质。

图 4 描绘了使用 ANTI-FLAG®M2 高灵敏性板,来自酶免疫检测测定的校正吸收 ( $A_{450}$ ) 读数。图上具条纹的条形代表具有 DYKDDDDK(SEQ.ID. NO. 1)标记的蛋白质的结果;具有水平线的条形代表具有 DYKDDDDK (SEQ.ID. NO. 1) /his 标记的蛋白质的结果;白色条形代表具有 his-标记的蛋白质的结果。所用的裂解试剂在实施例 4 中描述,并通过字母 A-H 在图上表示。

图 5 描绘了使用 HIS-Select™ 高容量板,来自酶免疫检测测定的校正吸收 ( $A_{450}$ ) 读数。图上具条纹的条形代表具有 DYKDDDDK(SEQ.ID. NO. 1)标记的蛋白质的结果;具有水平线的条形代表具有 DYKDDDDK (SEQ.ID. NO. 1) /his 标记的蛋白质的结果;白色条形代表具有 his-标记的蛋白质的结果。所用的裂解试剂在实施例 4 中描述,并通过字母 A-H 在图上表示。

图 6 描绘从 HIS-Select™ 容量板洗脱的物质的 SDS-PAGE 凝胶图像。将裂解试剂、处理试剂和酶的组合在 HIS-Select™ 高容量板表面上干燥,并加入含有靶蛋白的细胞。表 6 中描述了每个泳道的含量。该图表明

多种裂解试剂能够裂解细胞，并且从 HIS-Select™ 高容量板成功捕获和洗脱靶蛋白。

图 7 描绘了本发明的容器。

## 优选实施方案的详细描述

### 1. 容器

通常，本发明的容器适于容纳液体，该容器包含底部、口和侧壁结构 (sidewall formation)。在一个实施方案中，侧壁结构可以具有任意多种几何形状；例如，在本实施方案中，侧壁结构可以是圆柱状、多边形、锥形或者凹形(例如，半球形)。类似地，在一个实施方案中，底部可以具有任意多种几何形状，例如，在本实施方案中，底部可以是平的、曲线形或者甚至含有一个点(例如，倒置圆锥的最低点)。口作为开口，液体可以通过其导入容器；在一个实施方案中，口和底部可以是侧壁结构的相反末端，口由侧壁结构顶部的开口定义。因此，在其多种实施方案中，容器可以是圆柱、烧瓶、罐、杯、管瓶、瓶子、柱形或者甚至表面凹陷状。此外，所述容器可以是一个独立式的容器，或者其可以是许多物理上结合的容器之一。因此，在一个实施方案中，容器为单一多孔板的一个孔，所述多孔板为诸如 48 孔、96 孔、384 孔、1536 孔等多孔板。而且，容器可以具有永久密闭的底部或者底部可以包含带阀门或者有盖的开口，液体可以任选通过所述开口除去。

用于提取或提取和亲和捕获肽、蛋白质、核酸或者其他细胞组分的容器可以为多种尺寸并且不需要含有大体积液体。通常，容器将容纳小于 50L 的体积。在一个实施方案中，容器将容纳不多于 1L 但是不小于 1.0  $\mu$ l 的体积。在另一实施方案中，容器将容纳约 10  $\mu$ l 到约 100 ml 体积。

包含侧壁结构和底部的容器的内表面限定了容器的液体容量。在一个实施方案中，容器的内表面限定的表面积与内表面限定的体积之比小于约 4mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l。在另一实施方案中，容器的内表面限定的表面积和体积的比不超过约 3 mm<sup>2</sup>/ $\mu$ l。在另一实施方案中，容器的内表面限定的表面积和体积

的比不超过约  $2 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ 。在另一实施方案中，容器的内表面限定的表面积和体积的比不超过约  $1 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ 。

根据计划的用途和操作人员的偏爱，容器可以任选密封。因此，在一个实施方案中，容器含有盖子和帽子，其套在口上以将容器的内含物与周围环境隔离。在另一实施方案中，容器的顶部对环境是开放的。从而，例如，当容器是多孔板形式时，(i)每个孔可以由单独的盖子(例如，塑料盖包装材料)密封，(ii)可以通过共同的盖子密封一部分和多个孔，留下剩余部分的孔对周围环境开放，(iii)通过共同的盖子密封所有孔，或者(iv)所有孔都可以对周围环境开放。此外，盖子可以含有用于向容器导入液体的单个口，或者其可以含有用于向容器导入或者导入和除去液体的多个口。在另一实施方案中，当容器的底部含有开口，通过该开口可以任选除去容器中的液体时，容器的口和底部可以都任选加盖。

通常，可以从多种天然或合成材料形成容器。例如，容器可以是塑料、硅、玻璃、金属、陶瓷、磁体、聚酯、聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、尼龙、聚丙烯酰胺、纤维素、硝酸纤维素、乳胶，等等。

## 2. 捕获配体和产物纯化

一旦已经裂解宿主细胞，可以通过使用固定在容器中支持材料上的捕获配体从其他细胞残渣分离细胞组分。通过容器的内表面或者通过置于容器内、附着到容器或者其他方式保持在容器中的珠子或者其他支持体直接或间接支持捕获配体。在一个实施方案中，捕获配体位于容器的底部上面。在另一实施方案中，捕获配体位于侧壁结构上。在另一实施方案中，捕获配体位于容器的底部和侧壁结构上。在另一实施方案中，受支持的捕获配体位于容器中某一位置，该位置允许捕获配体暴露于可以存在于容器中的完整宿主细胞或者从其来源的固体细胞组分。

有利地，本发明的试剂、组分和方法允许使用一系列捕获配体。在一个优选实施方案中，捕获配体能够分离含有细胞残渣的液体悬浮物中的细胞组分。

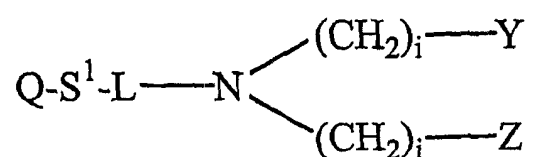
用于纯化蛋白质、肽、DNA、RNA 或其他细胞组分的多种技术是本领域熟知的，并且可以与本文描述的容器和方法联合使用。见，例如，Becker, 等人, *Biotech. Adv.*, 1: 247-61(1983)。在一个实施方案中，可以使用任意捕获方法，只要裂解试剂的存在不干扰结合。例如，蛋白质纯化的常用方法包括产生融合蛋白质，其含有靶蛋白和能够以高特异性结合亲和基质的亲和标记。从而，一方面，本发明的容器含有受支持的捕获配体，其能够以高特异性结合靶蛋白或者肽的亲和标记，从而导致靶蛋白或肽与其他蛋白质或者细胞残渣的分离。在一些情况中，靶蛋白或者肽天然地含有能够结合相应捕获配体的序列。在该情况中，蛋白质不必是重组的，只要存在能够结合靶蛋白或者肽的捕获配体。可以用于捕获蛋白质或者肽的熟知的亲和捕获系统的一些特定实例包括(i)金属螯合层析(例如，镍或者钴与组氨酸标记相互作用)，(ii)免疫原性捕获系统，如使用抗原-抗体相互作用的捕获系统(例如，FLAG<sup>®</sup>肽、c-myc 标记、HA 标记，等等)，(iii)谷胱甘肽-S-转移酶(GST)捕获系统，和(iv)生物素-抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白捕获系统。其他技术包括离子交换层析，包括阴离子和阳离子交换，以及疏水层析，和亲疏层析。也可以使用这些多种捕获方法的组合，如使用混合模式的层析。这些技术是常用于纯化蛋白质的一些技术。疏水层析、离子交换层析、和多种杂交技术，如利用对靶 DNA 或 RNA 特异的核苷酸序列的杂交技术，也通常用于纯化 DNA 和 RNA。另一种常用的 RNA 捕获方法是聚(dT)。因为这些和其他捕获系统是本领域熟知的，所有它们仅在本文中简要描述。

固定化金属亲和层析(“IMAC”)使用蛋白质内某些残基对金属离子的亲和性纯化蛋白质。在 IMAC 中，将金属离子固定在固相支持体上，并用于捕获含有金属螯合肽的蛋白质。金属螯合肽可以在蛋白质中天然发生，或者蛋白质可以是重组蛋白质，其具有含有金属螯合肽的亲和标记。一些最常用的金属离子包括镍( $\text{Ni}^{2+}$ )、锌( $\text{Zn}^{2+}$ )、铜( $\text{Cu}^{2+}$ )、铁( $\text{Fe}^{3+}$ )、钴( $\text{Co}^{2+}$ )、钙( $\text{Ca}^{2+}$ )、铝( $\text{Al}^{3+}$ )、镁( $\text{Mg}^{2+}$ )、锰( $\text{Mn}^{2+}$ )和镓( $\text{Ga}^{3+}$ )。从而，在一个实施方案中，容器和/或支持体含有固定在其表面或者部分表面上的金属离子，

其中金属离子选自镍( $\text{Ni}^{2+}$ )、锌( $\text{Zn}^{2+}$ )、铜( $\text{Cu}^{2+}$ )、铁( $\text{Fe}^{3+}$ )、钴( $\text{Co}^{2+}$ )、钙( $\text{Ca}^{2+}$ )、铝( $\text{Al}^{3+}$ )、镁( $\text{Mg}^{2+}$ )、锰( $\text{Mn}^{2+}$ )和镓( $\text{Ga}^{3+}$ )。优选地,金属离子是镍、铜、钴、或者锌。最优选地,金属离子是镍。

以这种方法可以纯化含有金属螯合肽的多种蛋白质。在一个实施方案中,金属螯合肽可以具有式 His-X, 其中 X 选自 Gly、His、Tyr、Trp、Val、Leu、Ser、Lys、Phe、Met、Ala、Glu、Ile、Thr、Asp、Asn、Gln、Arg、Cys、和 Pro, 如在 Smith, 等人(1986)美国专利号 4,569,794 中更完整描述, 将所述专利并入本文作为参考。金属螯合肽还可以具有式(His-X)<sub>n</sub>, 其中 X 选自 Asp、Pro、Glu、Ala、Gly、Val、Ser、Leu、Ile 或 Thr, n 为 3 到 6, 如在 Sharma, 等人(1997)美国专利号 5,594,115 中更完整描述, 将所述专利并入本文作为参考。在另一个实施方案中,金属螯合肽包括式 (His)<sub>y</sub> 的聚(His)标记, 其中 y 为至少 2-6, 如在 Dobeli, 等人(1994)美国专利号 5,310,663 中更完整描述, 将所述专利并入本文作为参考。金属螯合肽的其他实例将是本领域技术人员公知的。

在一个实施方案中,捕获配体是如 WO 01/81365 中描述的金屬螯合物。更具体地,在该实施方案中,捕获配体是来源于金属螯合物成分(1)的金属螯合物:



(I)

其中

Q 是载体;

S<sup>1</sup> 是间隔区 (spacer);

L 是 -A-T-CH(X)- 或 -C(=O)-;

A 是醚、硫醚、硒醚或者酰胺键;

T 是键或者经取代或未经取代的烷基或者链烯基;

X 是  $-(\text{CH}_2)_k\text{CH}_3$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{COOH}$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-(\text{CH}_2)_k\text{PO}_3\text{H}_2$ 、

$-(\text{CH}_2)_k\text{N}(\text{J})_2$ 、或 $-(\text{CH}_2)_k\text{P}(\text{J})_2$ 、优选 $-(\text{CH}_2)_k\text{COOH}$ 或 $-(\text{CH}_2)_k\text{SO}_3\text{H}$ ;

$k$ 为0到2的整数;

$\text{J}$ 为烃基或者取代烃基;

$\text{Y}$ 为 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{N}(\text{J})_2$ 、或 $-\text{P}(\text{J})_2$ ，优选 $-\text{COOH}$ ;

$\text{Z}$ 为 $-\text{COOH}$ 、 $-\text{H}$ 、 $-\text{SO}_3\text{H}$ 、 $-\text{PO}_3\text{H}_2$ 、 $-\text{N}(\text{J})_2$ 或 $-\text{P}(\text{J})_2$ ，优选 $-\text{COOH}$ ;

和

$i$ 为0到4的整数，优选1或2。

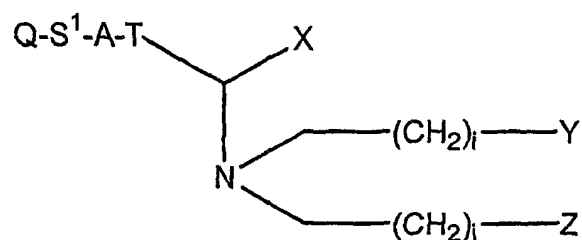
通常，载体 $\text{Q}$ 可以包含能够衍生化以偶联的任意固态或者可溶材料或者化合物。固体(或者不可溶)载体可以选自琼脂糖、纤维素、异丁烯酸共聚物、聚苯乙烯、聚丙烯、纸、聚酰胺、聚丙烯腈、聚乙二烯、聚砷、硝酸纤维素、聚酯、聚乙烯、硅、玻璃、乳胶、塑料、金、氧化铁和聚丙烯酰胺，但是也可以是能够衍生化以允许组分的剩余部分偶联到载体 $\text{Q}$ 的任意不溶或者固体化合物。可溶性载体包括蛋白质、核酸，包括DNA和RNA，和寡核苷酸、脂类、脂质体、合成的可溶性聚合物、蛋白质、聚氨基酸、白蛋白、抗体、酶、链霉抗生物素蛋白、肽、激素、生色染料、荧光染料、荧光染料或任意其他检测分子、药物、小有机化合物、多糖和任意其他可溶化合物，这些可溶性载体能够衍生化以允许组分的剩余部分偶联到载体 $\text{Q}$ 。在一个实施方案中，载体 $\text{Q}$ 是本发明的容器。在另一实施方案中，载体 $\text{Q}$ 是本发明的容器内提供的物体。

载体侧翼的间隔区 $\text{S}^1$ 含有原子链，其可以是饱和或不饱和的，经取代或未取代的、线性或环状的、或者直链或分枝的。通常，限定间隔区 $\text{S}^1$ 的原子链由不超过约25个原子组成；换句话说，间隔区的主链由不超过25个原子组成。更优选地，限定间隔区 $\text{S}^1$ 的原子链由不超过约15个原子，更优选不超过约12个原子组成。限定间隔区 $\text{S}^1$ 的链原子通常选自碳、氧、氮、硫、硒、硅和磷，优选选自碳、氧、氮、硫和硒。此外，链原子可以用不同于氢的原子，如羟基、酮基(=O)或者酰基，如乙酰基取代或者是未取代的。从而，链可以任选包括烃基或者取代烃基区之间的一个或多个醚、硫醚、硒醚、酰胺或者胺键。代表性间隔区 $\text{S}^1$ 包括亚甲基、亚烷基氧基

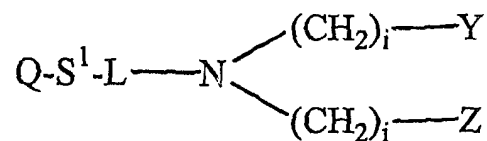


( $-(\text{CH}_2)_a\text{O}-$ )、亚烷基硫醚( $-(\text{CH}_2)_a\text{S}-$ )、亚烷基硒醚( $-(\text{CH}_2)_a\text{Se}-$ )、亚烷基酰胺( $-(\text{CH}_2)_a\text{NR}^1\text{C}(=\text{O})-$ )、亚烷基羰基( $-(\text{CH}_2)_a\text{C}(=\text{O})-$ )，和它们的组合，其中  $a$  通常为 1 到约 20， $\text{R}^1$  为氢或者烃基，优选烷基。在一个实施方案中，间隔区  $\text{S}^1$  是亲水的中性结构并且不含有任何酰胺键或者取代基或者在多肽的纯化期间可以带电的其他键或者取代基。

如上面提到的，接头  $\text{L}$  可以是  $-\text{A}-\text{T}-\text{CH}(\text{X})-$  或  $-\text{C}(=\text{O})-$ 。当  $\text{L}$  是  $-\text{A}-\text{T}-\text{CH}(\text{X})-$  时，整合成分相应于式：



其中  $\text{Q}$ 、 $\text{S}^1$ 、 $\text{A}$ 、 $\text{T}$ 、 $\text{X}$ 、 $\text{Y}$  和  $\text{Z}$  如前面定义。在该实施方案中，醚( $-\text{O}-$ )、硫醚( $-\text{S}-$ )、硒醚( $-\text{Se}-$ )或酰胺( $-\text{NR}^1\text{C}(=\text{O})-$ )或( $-\text{C}(=\text{O})\text{NR}^1-$ ) (其中  $\text{R}^1$  是氢或烃基) 键通过取代或未取代的烷基或链烯基区与分子的整合部分分开。如果  $\text{T}$  不是键，那么  $\text{T}$  优选是取代或未取代的  $\text{C}_1$  到  $\text{C}_6$  烷基或者取代或未取代的  $\text{C}_2$  到  $\text{C}_6$  链烯基。更优选地， $\text{A}$  为  $-\text{S}-$ 、 $\text{T}$  为  $-(\text{CH}_2)_n-$ ， $n$  为 0 到 6，通常 0 到 4 的整数，更通常 0、1 或 2。当  $\text{L}$  为  $-\text{C}(=\text{O})-$  时，整合成分相应于式：

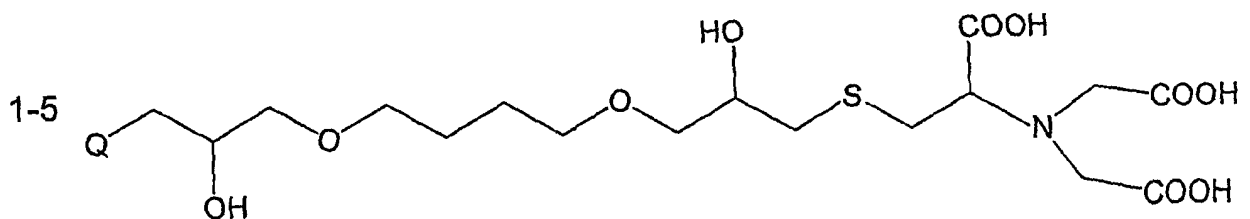
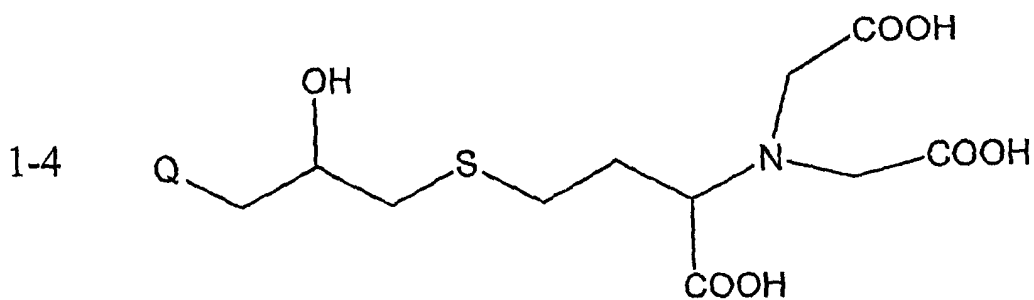
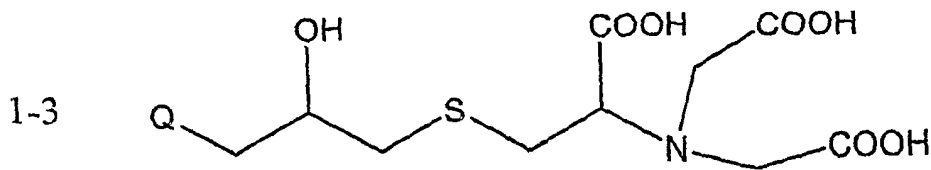
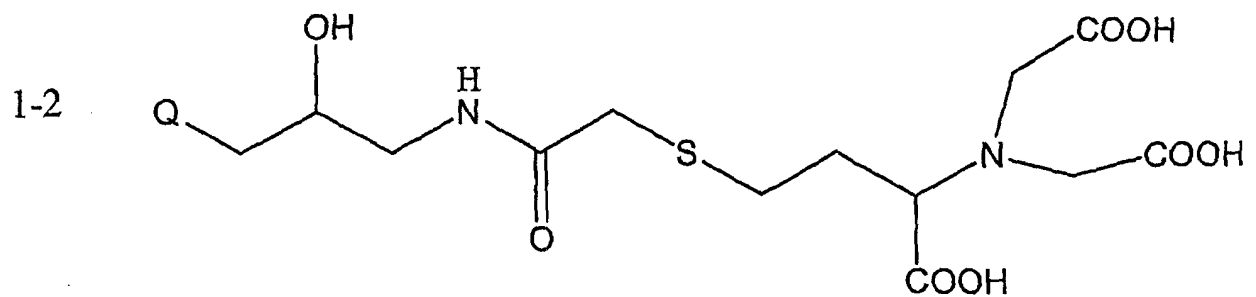
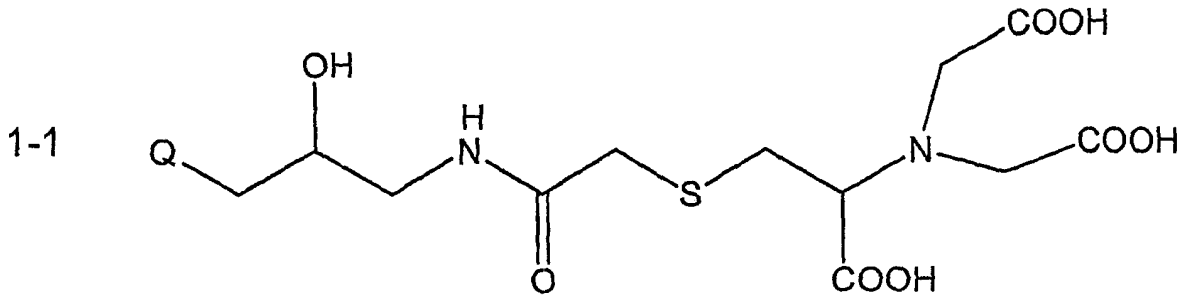


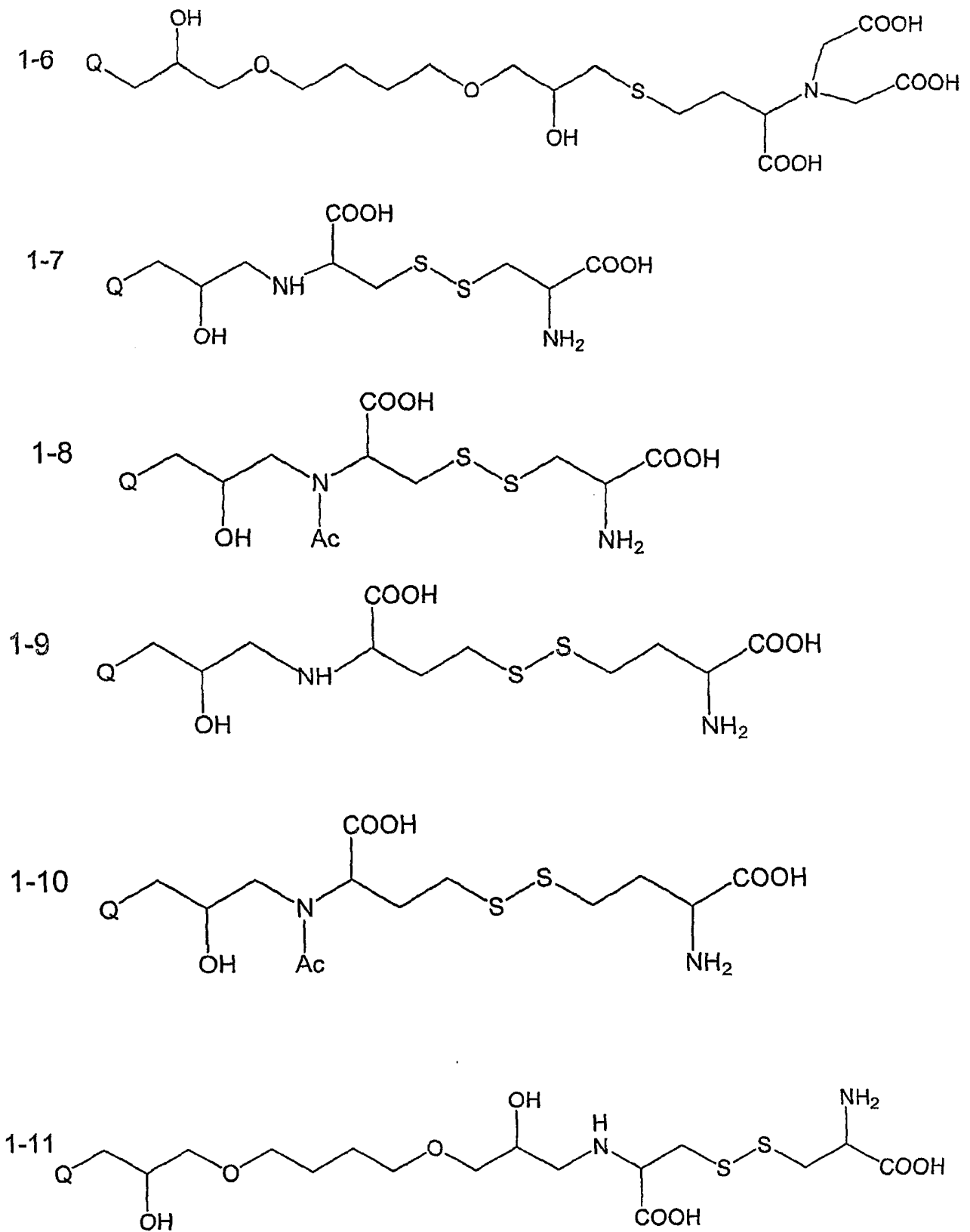
其中  $\text{Q}$ 、 $\text{S}^1$ 、 $i$ 、 $\text{Y}$  和  $\text{Z}$  如前面定义。

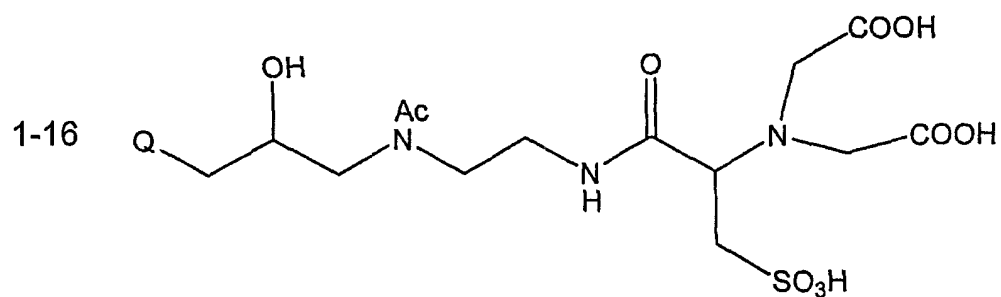
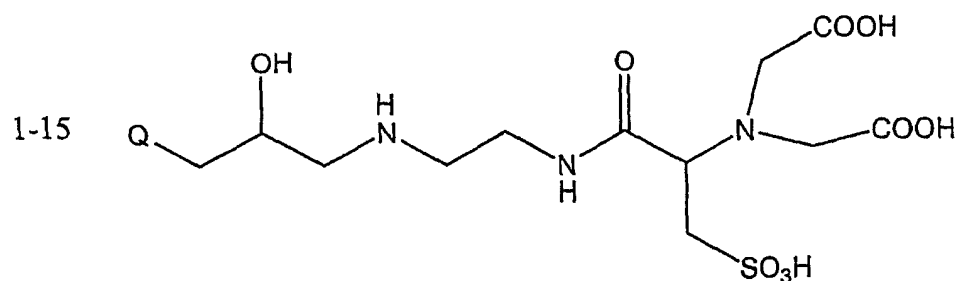
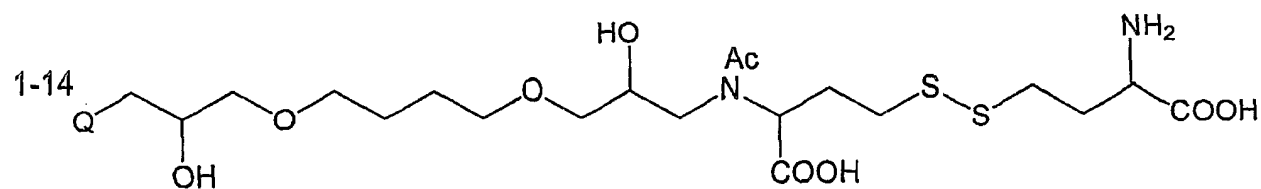
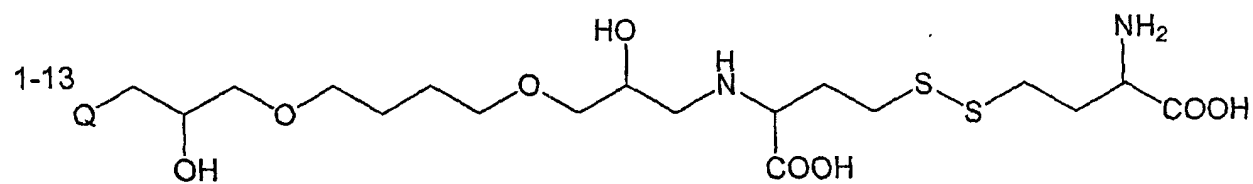
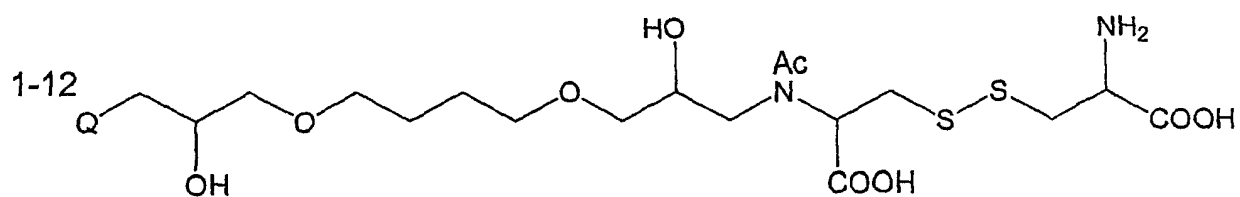
在优选实施方案中，序列  $-\text{S}^1-\text{L}-$  联合是不超过约 35 个原子的链，所述原子选自碳、氧、硫、硒、氮、硅和磷，更优选仅碳、氧、硫和氮，更优选仅碳、氧和硫。为了减小非特异结合的可能性，当存在氮时，其优选为酰胺部分形式。此外，如果碳链原子用氢之外的任何其他原子取代，它们优选用羟基或者酮基取代。在优选实施方案中， $\text{L}$  含有来自氨基酸或者其酯如甲酯或乙酯的部分(有时称作片段或残基)，所述氨基酸为例如，胱氨

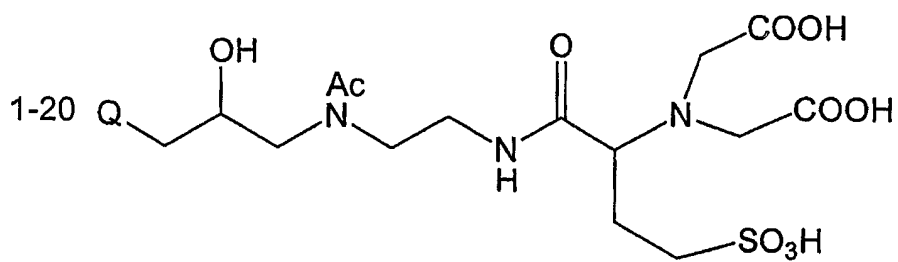
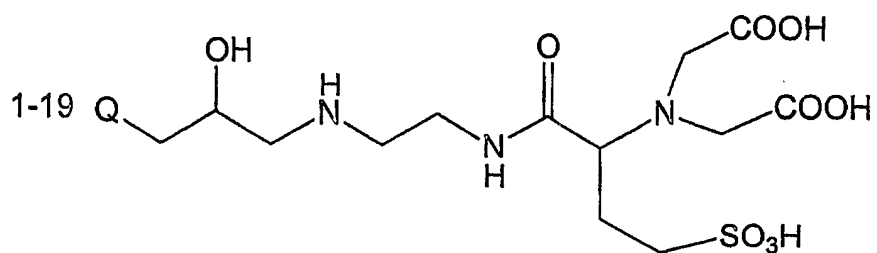
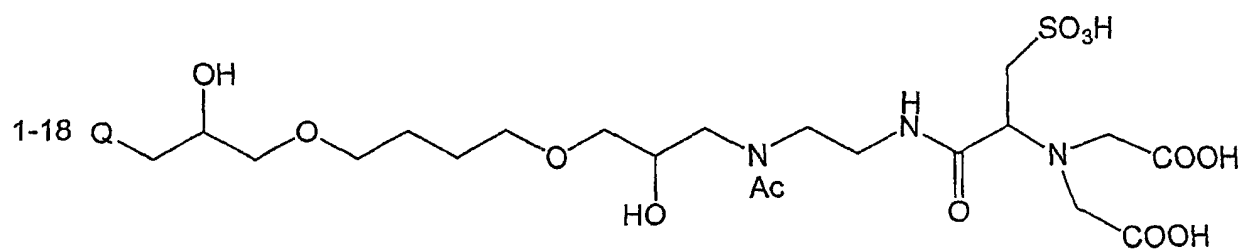
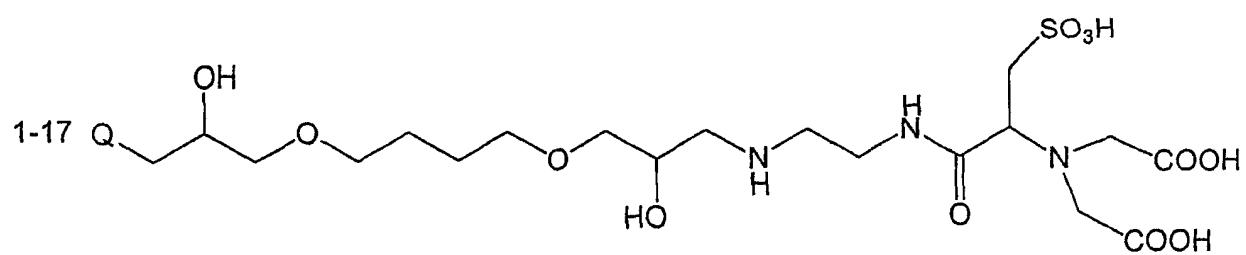
酸、同型胱氨酸、半胱氨酸、同型半胱氨酸、天冬氨酸、半胱磺酸。

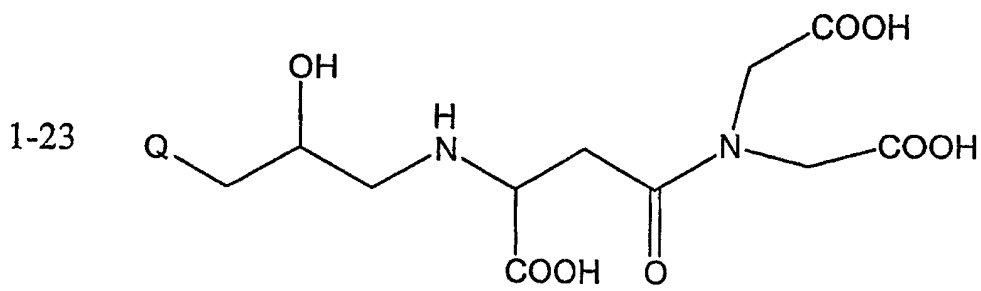
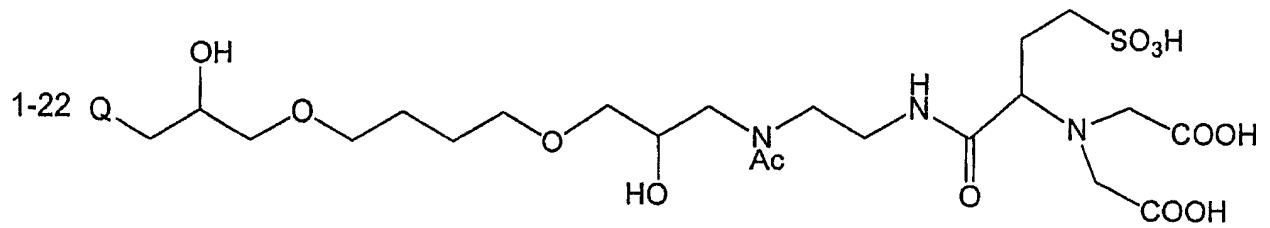
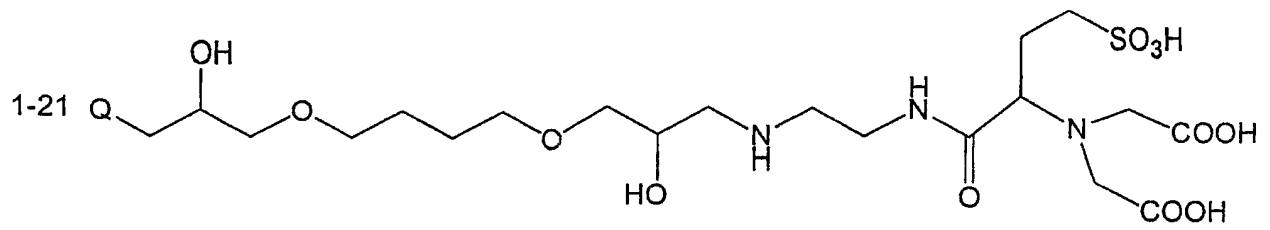
代表性螯合物成分包括下面的：

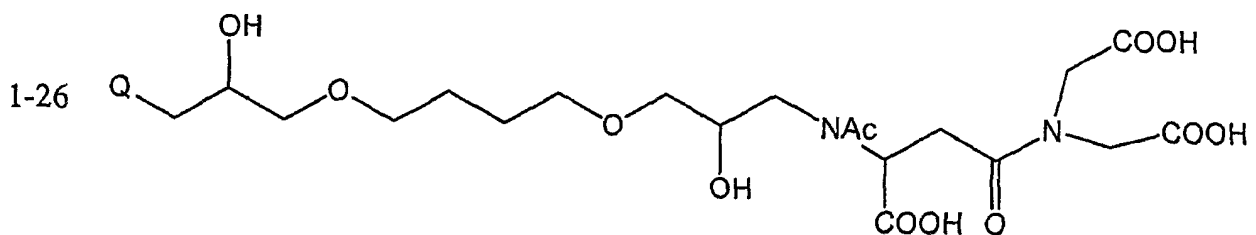
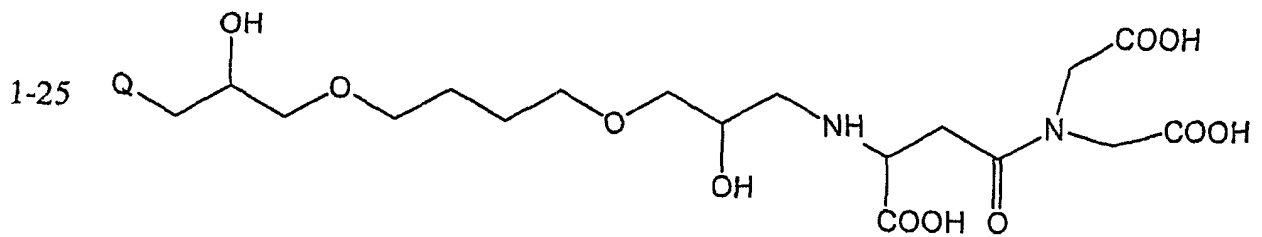
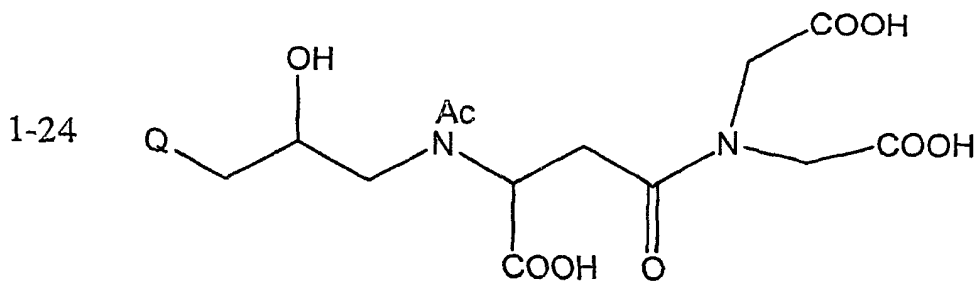












其中 Q 为载体，Ac 为乙酰基。

在另一实施方案中，捕获配体为美国专利号 5,047, 513 中描述类型的金属螯合物。更具体地，在该实施方案中，捕获配体为式：



的氨三乙酸衍生物的金属螯合物。

其中 x 为 2、3 或 4。在该实施方案中，氨三乙酸衍生物固定在任一种前述载体 Q 上。

在其中捕获配体为 WO 01/81365 或美国专利号 5,047, 513 中描述的金屬螯合物的这些实施方案中，金属螯合物优选含有选自镍( $\text{Ni}^{2+}$ )、锌( $\text{Zn}^{2+}$ )、铜( $\text{Cu}^{2+}$ )、铁( $\text{Fe}^{3+}$ )、钴( $\text{Co}^{2+}$ )、钙( $\text{Ca}^{2+}$ )、铝( $\text{Al}^{3+}$ )、镁( $\text{Mg}^{2+}$ )、锰( $\text{Mn}^{2+}$ )的金属离子。在尤其优选的实施方案中，金属螯合物含有镍( $\text{Ni}^{2+}$ )。

可用于本发明上下文中的另一种常规纯化技术是使用免疫原性捕获系统。在此类系统中，蛋白质或者肽上的表位标记允许基于表位标记对支持

体上固定的相应配体(例如, 抗体)的亲合力纯化附着的蛋白质。此类标记的一个实例是序列 Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys 或 DYKDDDDK (SEQ.ID. NO. 1); 对该序列具有特异性的抗体由 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) 以 FLAG<sup>®</sup> 商标出售; 此类标记的另一个实例是序列 Asp-Leu-Tyr-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys, 或 DLYDDDDK(SEQ.ID. NO. 2); 对该序列具有特异性的抗体由 Invitrogen(Carlsbad, CA)出售。此类标记的另一实例是 3X FLAG<sup>®</sup> 序列 Met-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Gly-Asp-Tyr-Lys-Asp-His-Asp-Ile-Asp-Tyr-Lys-Asp-Asp-Asp-Asp-Lys (SEQ.ID. NO. 3); 对该序列具有特异性的抗体由 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)出售。从而, 在一个实施方案中, 容器含有对 SEQ.ID.NO.1 具有特异性的固定化抗体; 在另一实施方案中, 容器含有对 SEQ.ID.NO.2 具有特异性的固定化抗体。在另一实施方案中, 容器含有对 SEQ.ID.NO.3 具有特异性的固定化抗体。例如, 在另一实施方案中, 由 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO)出售的 ANTI-FLAG<sup>®</sup>M1、M2 或 M5 抗体固定在该容器的内表面或者其一部分上, 和/或容器内的珠子或者其他支持体上。

其他标记也可以基于它们对附着到基底的相应配体的亲和性用于纯化重组蛋白质。此类其他标记的一些实例包括 c-myc、麦芽糖结合蛋白(MBP)、A 型流感病毒血细胞凝集素(HA)和  $\beta$ -半乳糖苷酶等等。通过相应配体附着到本发明的容器和/或支持体, 可以从其他蛋白质和细胞残渣纯化含有这些亲和标记的重组蛋白质, 如本文描述。通过对蛋白质或者肽序列或者该序列的部分具有亲和性的配体附着到本发明的容器和/或支持体, 可以以类似方式纯化非重组蛋白质。适宜配体的选择在本领域技术人员能力之内。

在另一实施方案中, 通过将含有谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的蛋白质与固定化谷胱甘肽接触可以纯化所述蛋白质。由于 GST 对其底物的亲和力, 蛋白质得到纯化。此类系统更完整地在例如, 美国专利号 5,654, 176 中描述, 将所述专利并入本文作为参考。从而, 在另一实施方案中, 谷胱甘肽固定在该容器的内表面或者其一部分上, 和/或容器内的珠子或者其他支持



体上。

通过使用生物素或生物素类似物联合抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或者抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的衍生物也可以纯化蛋白质。例如，在一个实施方案中，当链霉抗生物素蛋白固定在本发明的容器和/或支持体上时，可以基于生物素对链霉抗生物素蛋白的亲合性纯化生物素标记的蛋白质。类似地，如美国专利号 5,506,121(并入本文作为参考)描述的含有链霉抗生物素蛋白标记的蛋白质可以基于标记对链霉抗生物素蛋白的亲合性纯化。在另一实施方案中，当生物素固定在本发明的容器和/或固体支持体上时，可以基于生物素对抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白的亲合性纯化含有抗生物素蛋白或链霉抗生物素蛋白标记的蛋白质。抗生物素蛋白/生物素或生物素/链霉抗生物素蛋白亲和纯化技术的使用是本领域熟知的，并且描述于例如，Sambrook 和 Russell, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2001。

使用离子交换层析或者疏水层析也可以纯化蛋白质和 DNA 或 RNA。在离子交换层析中，固定在固相支持体上的带电颗粒可逆结合具有表面电荷的蛋白质或者 DNA。例如，离子交换捕获配体可以含有氨基、羧基、磷酸基，或者磺酸基团。离子交换捕获配体的实例包括二乙基氨基乙基(DEAE)、二乙基[2-羟基丙基]氨基乙基(QAE)、羧基甲基(CM)和磺基丙基(SP)和磷酸基。在疏水层析中，基于与固定在固相支持体上的不可溶疏水基团的疏水相互作用纯化在表面具有疏水基团的蛋白质或者 DNA。疏水配体的实例为硅、苯基、己基、辛基和 C<sub>18</sub> 基团。从而，在一个实施方案中，带电颗粒固定在本发明的容器和/或支持体的表面上。在另一实施方案中，不溶性疏水基团固定在本发明的容器和/或支持体的表面上。

其他适宜的捕获配体包括例如，激素、氨基酸、蛋白质、肽、多肽、凝集素、酶、酶底物、酶抑制剂、辅因子、核苷酸、寡核苷酸(例如，寡脱氧胸苷酸)、多核苷酸、糖、糖类、寡糖、药物和染料。

多种其他纯化技术是本领域公知的并且可以与本发明的容器和方法联

合使用。一些此类技术在例如, Kenney & Fowell, *Methods in Molecular Biology*, 卷 11, *Practical Protein Chromatography* (1992); Hanson & Ryden, *Protein Purification: Principles, High Resolution Methods, and Applications* (1989); Dean, 等人, *Affinity Chromatography: A Practical Approach* (1987); Hermanson, 等人, *Immobilized Affinity Ligand Techniques* (1992); 和 Jakoby & Wilchek, *Affinity Techniques, Enzyme Purification, Part B, in Methods in Enzymology*, 卷 34 (1974) 中描述。

一旦细胞组分结合到捕获配体, 可以例如, 通过使用水或缓冲液洗除细胞残渣。洗涤后, 结合的细胞组分可以从其与捕获配体的结合释放并且除去用于表征或定量。靶细胞组分的释放可以使用多种洗脱技术完成, 所述技术包括改变 pH 或温度, 或者通过竞争结合。特定洗脱技术将根据所用的捕获系统而变, 但是将对于本领域技术人员是显而易见的。备选地, 当捕获的组分仍然附着到固定化配体时可以检测所述组分。多种分析技术是公知的, 包括, 例如, ELISA、酶分析, 和蛋白质检测等等。

### 3. 聚合物涂层

在一个实施方案中, 捕获配体直接结合容器的内表面。备选地, 捕获配体可以结合覆盖容器表面的聚合物基质。换句话说, 捕获配体可以直接结合聚合物基质, 其又结合或固定到容器的内表面上。例如, 捕获配体可以是金属螯合成分, 其结合到衍生化葡聚糖聚合物基质, 所述基质覆盖聚苯乙烯或者其他塑料底质。从而, 聚合物基质可以用于增加有效表面积(通过具有比下面的底质呈现更大表面积的基质), 从而使得捕获配体的密度增加。备选地, 或者额外地, 聚合物基质可以比容器壁具有更大或更小疏水性从而呈现比基底的天然表面具有更大(或备选地更小)疏水性的表面。

通过多种方法可以形成或应用聚合物涂层。例如, 通过原位聚合可以形成聚合物涂层; 在该方法中, 单体混合物溶于含有引发剂的溶剂中, 激活后, 在容器壁的表面进行聚合。备选地, 可以将完全生长的聚合物固定在容器壁的表面。此类方法在例如, Sundberg 等人, 美国专利号 5,624,

711 中描述。

在其中应用聚合物涂层的优选实施方案中，聚合物涂层来源于结合容器壁的两类聚合物的混合物。通常，一种或两种此类聚合物含有反应基，其受到活化时将含有此类反应基的聚合物分子化学地结合到容器壁和/或所述分子自身交联或与其他聚合物分子交联。此外，一种或两种此类聚合物可以含有可活化基团，其提供本文描述的捕获配体的附着点。此类聚合物涂层和它们的形成方法一般在美国专利申请公开号 2003/0032013 A1 中描述。

通过选择所用的具体聚合物和反应基的量可以控制基底上聚合物基质的密度。可以选择和调节反应基的数目和类型和捕获配体的数目和分子量，如下文详细描述。聚合物基质可以附着到基底的全部或者仅基底的一部分。例如，可以为容器壁的仅一部分或者多孔板壁的仅一部分孔提供聚合物基质。

#### 从聚合物混合物形成的聚合物基质

通过将容器基底与含有具有重复单位的多种聚合物分子的聚合物组合物接触可以制备含有聚合物基质的容器，其中至少一些聚合物分子具有共价连接该分子的至少一种反应基，其中至少一些聚合物分子具有共价连接该分子的至少一种捕获配体(或者可激活基团)，其中聚合物分子具有至少 100 kDa 的平均分子量，并且其中至少 25% 的聚合物分子具有至少一种反应基和共价连接到所述分子的至少一种捕获配体。反应基经激活而将至少一些聚合物分子直接共价结合到容器基底和诱导聚合物分子之间交联形成附着到容器基底的聚合物基质。

通常，聚合物基质可以包括天然聚合物(或者其衍生物)、合成聚合物(或者其衍生物)、天然聚合物(或者其衍生物)的混合物、合成聚合物(或者其衍生物)的混合物、或者一种或多种天然聚合物(或者其衍生物)与一种或多种合成聚合物(或者其衍生物)的混合物。通常，天然聚合物是在生物系统中产生的分枝或线性聚合物。天然聚合物的实例包括，但不限于，寡糖、多

糖、肽、蛋白质、糖原、葡聚糖、肝素、支链淀粉、直链淀粉、果胶、果胶多糖、淀粉、DNA、RNA 和纤维素。可以使用的具体经修饰的天然聚合物为使用高碘酸氧化和还原性胺化或者本领域技术人员公知的其他方法将赖氨酸共价插入到葡聚糖分子的可变线性位置产生的葡聚糖-赖氨酸衍生物。相比，合成聚合物是人造分枝或者线性聚合物。合成聚合物的实例包括加成、缩合或者催化剂驱动的聚合反应，即缩合聚合产生的塑料、高弹体和粘合剂、寡聚物、均聚物和共聚物。不管是天然的或合成的，聚合物都可以通过氧化、或者共价附着光反应基、亲和配体、离子交换配体、疏水配体、其他天然或者合成聚合物，或者间隔区分子进行衍生或修饰。

从而，聚合物基质可以含有几种不同的聚合物类型的一种或多种。代表性聚合物包括，但不限于，基于纤维素的产物，如羟基乙基纤维素、羟基丙基纤维素、羧基甲基纤维素、乙酸纤维素和丁酸纤维素；丙烯酸类产物，如从丙烯酸羟基乙酯、异丁烯酸羟基乙酯、丙烯酸甘油酯、异丁烯酸甘油酯、丙烯酸、异丁烯酸、丙烯酰胺和甲基丙烯酰胺聚合的产物；基于乙烯基的产物，如聚乙烯吡咯烷酮和聚乙烯醇；尼龙，如聚己内酰胺、聚十二烷基内酰胺、聚己二酰己二胺和聚己二酰十二碳二胺；聚氨基甲酸酯；聚乳酸；线性多糖，如直链淀粉、葡聚糖、壳聚糖、肝素和透明质酸；和支链多糖，如支链淀粉、透明质酸和半纤维素。可以使用两种和多种不同聚合物分子的混合物。例如，在一个实施方案中，聚合物分子是葡聚糖和肝素的混合物。在另一实施方案中，葡聚糖与聚 Lys-Gly(每 20 个甘氨酸一个赖氨酸)混合。

通常，聚合物分子优选具有至少 100 kDa 的平均分子量(聚合物的总分子量，包括共价连接的官能团)。在一些实施方案中，聚合物分子具有 300 kDa 到 6,000 kDa 的平均分子量。在一些实施方案中，聚合物分子具有 400 kDa 到 3,000 kDa 的平均分子量。在另一实施方案中，聚合物分子具有 500 kDa 到 2,000 kDa 的平均分子量，其中平均分子量是使用多角度光散射和折射率检测，通过凝胶过滤层析测量的聚合物的重量平均摩尔质量(Mw)值。存在的所有链长度的聚合物分布的平均 Mw 基于通过折射率测量的峰

的选择, 开始和结束峰选择标准为折射率基线三倍的折射率值。如通过实例所示, 优选的聚合物可以具有 1,117 kDa 的 Mw, 分子量范围为 112 kDa 到 19,220 kDa。

在一个实施方案中, 通过固定化聚合物的混合物形成聚合物基质, 其中混合物中的一部分聚合物分子含有捕获配体或者可活化基团, 使得能够随后共价连接捕获配体, 混合物中不同部分的聚合物分子具有共价连接到所述聚合物分子的至少一个反应基(用于将聚合物附着到容器壁和如前所述的交联)。聚合物分子之间反应基的相互作用使得形成三维基底。反应基热化学或光化学地反应(含有光反应基的聚合物称作被光标记)。

当聚合物分子具有共价连接的捕获配体(或者可活化基团)时, 捕获配体(或者可活化基团)与聚合物重复单位的比优选分别为约 1:1 捕获到约 1:100。例如, 在一个实施方案中, 捕获配体(或者可活化基团)与聚合物重复单位的比优选分别为约 1:1 捕获到约 1:20。当聚合物分子具有共价连接的反应基时, 反应基与聚合物重复单位的比优选小于约 1:600, 更优选地, 反应基与聚合物重复单位的比优选小于约 1:200。

代表性反应基包括, 但不限于, 用于制备层析介质的反应基, 其包括: 环氧化物、环氧乙烷、N-羧基琥珀酰亚胺、醛、肼、马来酰亚胺、硫醇、氨基、卤代烷、异硫氰酸酯、碳二亚胺、重氮化合物、tresyl chloride、甲苯磺酰氯, 和三氯-S-三嗪。优选的反应基为  $\alpha$ ,  $\beta$  不饱和酮光反应性基团。代表性光反应性基团包括芳基叠氮化物、diazarenes、 $\beta$ -羰基重氮和二苯酮。反应性种类为氮宾、卡宾和基。这些反应性种类通常能形成共价键。优选的光反应基为光可激活的不饱和酮, 如苯乙酮、二苯酮和它们的衍生物。光反应基当与光接触时能够被活化, 并且能够共价连接到固体基底的表面。例如, 通过暴露于约 3 焦耳/cm<sup>2</sup> 到约 6 焦耳/cm<sup>2</sup> 的紫外线可以活化光反应基, 这取决于光的强度和暴露时间的长度。根据光源的强度, 暴露时间可以为低至 0.5 秒/cm<sup>2</sup> 到约 32 分钟/cm<sup>2</sup>。在优选实施方案中, 光反应基通过暴露于约 1000 毫瓦/cm<sup>2</sup> 到约 5000 毫瓦/cm<sup>2</sup>, 或约 1000 毫瓦/cm<sup>2</sup> 到约 3000 毫瓦/cm<sup>2</sup>, 或约 1500 毫瓦/cm<sup>2</sup> 到约 2500 毫瓦/cm<sup>2</sup> 的光下 0.5 秒

/cm<sup>2</sup>到约5秒/cm<sup>2</sup>受到激活。

在一个实施方案中，捕获配体和/或反应基通过间隔区共价附着到聚合物分子。当与聚合物基质的形成结合使用时，间隔区是分子或者共价结合的分子的组合，所述分子连接聚合物分子和一个或多个捕获配体或者反应基。间隔区可以与聚合物、聚合物组合物或者聚合物基质相同或不同。本领域技术人员将知道可以利用许多类型的间隔区并且其选择和用途取决于聚合物基质的计划的应用，例如，赖氨酸分子或者氨基己酸分子。

间隔区可以通过许多不同的化学(包括酰胺形成)共价附着到光反应基。例如，烃间隔区的使用极大地增强了聚合物基质稳定性性能。具有间隔区的光反应基可以通过酰胺键以相对于总单体——葡萄糖的受控制的比例偶联到优选的聚合物葡聚糖的伯胺部分。具有间隔区的光反应基的实例包括，但不限于，苯并苯甲酸氨基己酸、N-琥珀酰亚胺基-N'-(4-叠氮基-水杨基)-6-氨基己酸、N-琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基-2-硝基苯基)-氨基丁酸，和N-琥珀酰亚胺基-(4-叠氮基-2-硝基苯基)-6-氨基己酸。这些具有间隔区的光反应基可以与聚合物反应产生包括赖氨酸的间隔区和附着到光反应基的最初间隔区。在附着含有或者不含有额外的间隔区的光反应基之前，通过掺入多种分子，如赖氨酸和氨基己酸也可以生产间隔区。共价附着聚合物分子的反应基的实例是含有通过损失氨基的活性氢结合到反应基的一个或多个化学实体的赖氨酸部分或残基的间隔区。在一个实施方案中，赖氨酸间隔区贡献的伯胺的密度代表所希望的捕获配体和反应基的密度。通过本领域公知的方法可以产生含有伯胺或者其他部分的经修饰的聚合物，所述其他部分为例如每1到100个聚合物重复单位1个部分的间隔区。修饰这些部分以选择性掺入目的量的反应基也是公知的。例如，赖氨酸间隔区贡献的伯胺的密度平均对于葡聚糖聚合物的每12个重复葡萄糖单位为1。该密度相对于光反应基的所希望的掺入是非常高的，所述所希望的掺入为例如，每200个重复单体小于1个光反应基。聚合物生产期间溶液中伯胺的浓度可以为4.5微摩尔/ml，而光反应基的所希望的掺入将代表0.09微摩尔/ml。因此，在该情况中，对于通过活性酯的所希望的光反应基掺入将有

50 倍过量伯胺。在胺的该浓度下，通过活性酯以所希望的掺入水平加入光反应基导致 90% 以上的掺入效率。通过改变含有活性酯的光反应基的量，可以始终如一地实现每 200 个单体小于 1 个反应基的任意掺入水平。将每个剩余间隔区部分或者胺有效转化成捕获配体附着点所需的方法是本领域公知的。数倍过量胺活性(例如活性酯)衍生试剂用于直接一步或者通过几步附着捕获配体。在一些情况中，衍生试剂将给出额外的反应基，其取决于其反应性，将支配随后的捕获配体附着的化学计量。当希望较低的配体密度时，将相应降低最初的胺活性衍生试剂。在一些情况中，将通常通过乙酰化衍生选择性修饰后剩余的游离胺。

涂布基底表面的第一步是将聚合物组合物与所要涂布的基底表面接触。用于将聚合物组合物与容器表面接触的方法取决于待涂布表面的尺寸和形状。可以从多种天然和合成材料，如上面列出的材料制备容器。容器表面可以在涂布前衍生。通过本领域技术人员公知的任意方法可以进行预衍生，所述方法包括硅石和玻璃的硅烷化和聚苯乙烯或聚丙烯的等离子体处理以掺入胺、羧基、醇、醛和其他反应基或者通过表面的化学修饰以改变其化学组成。

如果需要，可以化学修饰基底的表面以促进与聚合物分子上携带的反应基的共价结合。此类修饰包括用烃处理基底表面，或者用等离子体处理表面。化学修饰的阐明性实例是玻璃的硅烷化。在优选实施方案中，将 MALDI 板浸入 1 mg/mL 石蜡膜 (parafilm) 溶于氯仿的 1 mg/ml 溶液中并干燥。

当涂布大于  $0.1\text{mm}^2$  的多孔板、管或者其表面或部分时，通过将聚合物组合物倒入、微量移液或者转移到待涂布的容器或者板的部分，例如孔中，可以将聚合物组合物与容器表面接触。备选地，通过将表面的部分浸入聚合物组合物的溶液中从而使容器表面与聚合物组合物接触，也可以涂布大于  $2\text{mm}^2$  的待涂布板、管、容器表面或者支持体的部分。

通过改变加入基底的聚合物组合物浓度和体积可以调节或控制附着到容器表面的聚合物的量。一旦聚合物组合物与表面接触，可以在激活反应

基前干燥容器表面上的聚合物组合物,例如,通过在黑暗中 20-50℃下与气流孵育蒸发至干燥。通过使用冻干或者任意其他干燥方法,包括风干也可以蒸发聚合物组合物以除去溶剂。可以使用多种干燥方法,条件是干燥步骤不导致反应基的过早激活。当目测不到水分时认为基底足够干燥。干燥期间,聚合物组合物的聚合物分子自身定向以便与基底表面结合或者相互作用以促进与聚合物组合物的其他聚合物之间或者内部交联。

然后处理干燥的经涂布的固体表面以诱导反应基共价结合基底。对于光反应基,它们可以通过照射激活。激活是应用外部刺激导致反应基结合基底。具体地,在基底和反应基之间形成共价键,例如,碳-碳键形成。

有许多紫外照射系统能够递送光活化聚合物与富含烃的基底结合所需的总能量(以焦耳测量的剂量)。通过水银灯可以提供照射,水银灯具有明显和公知的照射波长模式。照射的强度需要焦耳在 3-6 焦耳/cm<sup>2</sup>内。焦耳测量包括时间因子(1 焦耳 = 瓦 × 秒)。在一个实施方案中,通过无电极的水银灯提供照射,该水银灯通过微波辐射供能。一个六英寸的 500 瓦/英寸灯具有 2,500 毫瓦/cm<sup>2</sup>的额定功率输出,其在灯与基底约 2 英寸距离下在 UVA 范围内测量。该灯可以以 80%功率或者约 2,000 毫瓦/cm<sup>2</sup>成功运行。用标准低强度 UV 照射盒制备的样品板具有测量为约 9.0 毫瓦/cm<sup>2</sup>的照射强度(UVA/UVB,约 250 到 350 nm),并且需要大于 10 焦耳/cm<sup>2</sup>(10,000 毫焦耳)的总能量来提供良好的结合。这需要样品板在照射盒中孵育 20 分钟以上。使用无电极水银灯(2,000 毫瓦/cm<sup>2</sup>)照射系统处理的板对于 3.5 焦耳/cm<sup>2</sup>的总能量剂量仅需要 1.75 秒/cm<sup>2</sup>。更高强度的照射更有效地激活光活性基并因此需要更低的总能量剂量。

在一个实施方案中,可以用 9.0 毫瓦/cm<sup>2</sup>的 UVA/UVB 光照射约 30 分钟,总能量约 15,000 毫焦耳/cm<sup>2</sup>进行激活。在优选实施方案中,可以用 2,000 毫瓦/cm<sup>2</sup>的 UVA/UVB 光照射至总能量约 3 焦耳/cm<sup>2</sup>到约 3 焦耳/cm<sup>2</sup>进行激活。孵育时间量和所用的总能量可以根据结合聚合物的光反应基而变。在最优选的实施方案中,通过使用 Fusion UV Conveyor System 使用水银无电极灯以 2,000 毫瓦/cm<sup>2</sup>,以运输带设置为 8 英尺/分钟和 400 瓦/英



寸的灯功率可以通过光照射进行激活。辐射计 IL290 Light Bug 通过传输带运行以证实所希望的能量为 3000 到 4000 毫焦耳/cm<sup>2</sup> 范围内。多孔板例如，以约 800 个板/小时或者约 1 个板/4 到 5 秒进行光照射。

通过改变每毫升溶剂总聚合物的量可以调节聚合物组合物的浓度。对于较高浓度的聚合物组合物或者聚合物基质/cm<sup>2</sup> 是有利的情况，可以用较少溶剂溶剂化本发明的聚合物分子。对于较低浓度的聚合物组合物或者聚合物基质/cm<sup>2</sup> 是有利的情况，可以用较多溶剂溶剂化本发明的聚合物分子。换句话说，调节聚合物组合物的浓度为 0.02 到 1.0 mg/ml 溶剂并涂布固体表面，如多孔板，将产生具有可选范围的总结合聚合物基质的表面。聚合物组合物可以完全可溶或者含有悬浮的不溶聚合物。可以用于制备聚合物组合物的溶剂包括水、醇、酮和任意或所有这些的混合物。溶剂优选与所用的基底相容。因为组合物的聚合物可以相互交联，所以组合物的流体样溶液可以变成凝胶。备选地，可以以淤浆的形式产生溶液。可以用于所述组合物的溶剂的实例包括水、醇、酮和任意或所有这些的混合物。

通过在适宜的溶液中孵育以溶解和除去未结合的聚合物可以除去未结合的聚合物。例如，可以将多孔板与 MOPS 缓冲液在 25℃ 过夜孵育，用 MPTS 缓冲液和蒸馏水每一种洗涤三次，用洗必太(hibitane)溶液洗涤、风干、包装并在低于室温(2-8℃)下保存。剩余的聚合物形成聚合物基质。

所得聚合物涂布的基底优选含有密度为至少 2 μg/cm<sup>2</sup>，更优选密度为 4 μg/cm<sup>2</sup> 到 30 μg/cm<sup>2</sup>，在一些实施方案中，密度为 6 μg/cm<sup>2</sup> 到 15 μg/cm<sup>2</sup> 的聚合物基质。从而通过控制共价连接聚合物分子的捕获配体的数目和/或分子量可以控制聚合物基质中捕获配体(或者可活化基团)的密度。通常，聚合物基质中捕获配体(或者可活化基团)的密度优选为至少 1 纳摩尔/cm<sup>2</sup>。在一些实施方案中，捕获配体(或者可活化基团)的密度为约 1.2 纳摩尔/cm<sup>2</sup> 到约 185 纳摩尔/cm<sup>2</sup>。在另一实施方案中，捕获配体(或者可活化基团)的密度为约 1.5 纳摩尔/cm<sup>2</sup> 到约 90 纳摩尔/cm<sup>2</sup>，或约 1.8 纳摩尔/cm<sup>2</sup> 到约 15 纳摩尔/cm<sup>2</sup>。结果，聚合物基质可以使得以至少 1 纳摩尔/cm<sup>2</sup> 的量结合具有小于 3.5 kDa 的分子量的靶分子。

在优选实施方案中，与容器基底接触的聚合物分子具有共价附着到所述聚合物分子的至少一个捕获配体(或者可活化基团)并且至少一些聚合物分子没有共价附着的反应基。具有附着的反应基和共价捕获配体的聚合物分子的百分数可以为 25%到 80%。在另一实施方案中，附着的反应基和捕获配体的百分数可以为 40%到 75%。在再一实施方案中，附着的反应基和捕获配体的百分数可以为 50%到 60%。在优选实施方案中，具有共价附着的反应基和捕获配体的聚合物分子的百分数可以为约 50%。有和没有反应基的聚合物分子混合物的使用增强了三维聚合物基质的高功能形成。

如果希望，所形成的聚合物基质中捕获配体可以例如，通过非共价或共价附着捕获配体衍生化，所述附着捕获配体可以通过加入不同的捕获配体或者对现有捕获配体的化学修饰来实现，从而进一步使得高能力捕获多种的靶分子。

在一个实施方案中，容器是多孔聚苯乙烯板，聚合物涂层来自葡聚糖聚合物的混合物，捕获配体是镍螯合物，并且聚合物基质具有 1.5 纳摩尔/ $\text{cm}^2$ 到 7.5 纳摩尔/ $\text{cm}^2$ 的捕获配体密度。在其他实施方案中，捕获配体是镓或者铁螯合物或者捕获配体是谷胱甘肽。

在另一个实施方案中，容器是多孔聚丙烯板，聚合物涂层来自葡聚糖聚合物的混合物，捕获配体是寡核苷酸。

在再一个实施方案中，容器是多孔聚苯乙烯板，聚合物涂层来自葡聚糖聚合物的混合物，捕获配体是链霉抗生物素蛋白，并且聚合物基质具有  $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 到  $7.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的捕获配体密度。

此外，在另一个实施方案中，容器是多孔聚苯乙烯板，聚合物涂层来自葡聚糖聚合物的混合物，捕获配体选自蛋白质 A、蛋白质 G、蛋白质 L 或者它们的混合物，并且聚合物基质具有  $1.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 到  $7.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ 的捕获配体密度。

在另一个实施方案中，容器是聚丙烯柱，聚合物涂层来自葡聚糖聚合物的混合物，捕获配体是镍螯合物。

含有聚合物基质的容器可以与本文别处更详细描述裂解试剂联合使

用以裂解细胞和从所得溶液分离靶细胞组分。可以以任意适宜的方式，如下文描述的方式在容器中提供裂解试剂。在一个实施方案中，裂解试剂吸附到至少一部分聚合物基质上。在另一个实施方案中，裂解试剂保持在容器中作为聚合物基质顶部的自由流动的粉末。然后将含有宿主细胞的溶液加入到含有聚合物基质和裂解试剂的容器。一旦通过裂解试剂从宿主细胞释放一些或者所有细胞组分，就可以通过聚合物基质中存在的捕获配体从细胞溶液分离靶细胞组分。

可以构建聚合物基质使得以  $0.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  到  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的量结合分子量为 3.5 kDa 到 500 kDa 的靶分子，以  $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  到  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的量结合分子量为 10 kDa 到 500 kDa 的靶分子，以  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  到  $20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的量结合分子量为 10 kDa 到 350 kDa 的靶分子，以  $3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  到  $15 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  的量结合分子量为 10 kDa 到 350 kDa 的靶分子。在一些实施方案中，聚合物基质能够以至少  $2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  聚合物基质的量结合分子量高达 350 kDa 的多肽靶分子。

#### 4. 裂解试剂

为了帮助从宿主细胞提取或者提取和分离细胞组分，如肽、蛋白质或核酸，本发明的容器含有裂解试剂。在一个实施方案中，裂解试剂是组合物的裂解试剂并且其浓度导致宿主细胞的膜破裂并向含有裂解试剂的溶液释放细胞内含物。在另一个实施方案中，裂解试剂仅仅使得膜足够可渗透以释放一些但不是所有其细胞组分。

可以通过多种方式在容器中提供裂解试剂。在一个实施方案中，裂解试剂（作为干燥组合物）吸附到容器的内表面（或者备选地，吸附到覆盖容器表面的聚合物涂层（如果存在））。在一个此类实施方案中，例如，裂解试剂吸附到容器的至少一部分侧壁结构。在另一个实施方案中，裂解试剂吸附到容器的至少一部分底部。在另一个实施方案中，裂解试剂吸附到容器的底部和侧壁结构每一种的至少一部分。任选地，如果容器含有聚合物基质，那么裂解试剂可以吸附到聚合物基质的至少一部分表面。在另一个实施方

案中，裂解试剂吸附到另一种物体，例如，支持体，如珠子、棒、网孔(如滤器)或者其他多孔物体，所述物体松散地包含在容器的体积内或者固定到容器的内表面。此类支持体以及容器自身可以由例如，聚苯乙烯、聚丙烯、聚乙烯、玻璃、尼龙、聚丙烯酰胺、纤维素、硝酸纤维素、其他塑性聚合物、金属、磁体或者其他合成物质组成。在另一个实施方案中，裂解试剂吸附到容器内表面的至少一部分和吸附到物体，例如，支持体，如如珠子、棒、网孔(如滤器)或者其他多孔物体，所述物体松散地包含在容器的体积内或者固定到容器的内表面。

根据本发明的一方面，可以控制用裂解试剂涂布的表面的表面积比(即，经涂布的内表面的表面积和/或容器体积内包含的经涂布的物体的表面积之和)。在一个实施方案中，表面积与体积比  $SA:V$  小于约  $4\text{mm}^2/\mu\text{l}$ ，其中  $SA$  是容器的经涂布的内表面和容器的体积内含有的任何经涂布的物体的表面积， $V$  是容器的体积。在另一个实施方案中，表面积与体积比不超过约  $3\text{mm}^2/\mu\text{l}$ 。在另一个实施方案中，表面积与体积比不超过约  $2\text{mm}^2/\mu\text{l}$ 。在另一个实施方案中，表面积与体积比不超过约  $1\text{mm}^2/\mu\text{l}$ 。

容器的内表面和/或容器体积内所含物体上裂解试剂的涂层将通常作为干物质(例如，水分含量不超过约 5wt.%的组合物)吸附。备选地，可以以凝胶或者糊，即粘度大于约 10,000 厘泊的物质的形式提供裂解试剂，其涂布在容器的内表面或者内表面的一部分，或者还涂布在容器所包括的物体上。

在一个备选实施方案中，提供并作为大块材料保持在容器内而不是作为容器内表面或者容器体积内所含物体的吸附涂层的裂解试剂，所述大块材料为例如，基质、颗粒、片、或者自由流动的粉末。从而，例如，裂解试剂可以是冻干的基质或者冻干的粉末，其独立于捕获配体置于容器内；在一个实施方案中，一块冻干裂解试剂置于一层树脂上，所述树脂具有结合该树脂的捕获配体。通常，更细小的颗粒倾向于比更大颗粒更快地溶解。为了使裂解试剂的损失和/或污染的危险最小，优选在容器口上提供盖子。

在另一备选实施方案中，裂解试剂可以作为溶解或者淤浆状组分存在

于容器中。为了避免含有宿主细胞的任何容器或者悬浮液的不希望的稀释，在该实施方案中，溶解或者淤浆化裂解试剂的液体优选含有高浓度裂解试剂，例如，按重量计大于约 10% 的裂解试剂。在另一个实施方案中，裂解试剂的浓度按重量计大于约 20%。再次，为了使裂解试剂的损失和/或污染的危险最小，优选用盖子覆盖容器。

通常，裂解试剂可以是任意组合物或者组合物的组合，它们可以化学地或者酶促地导致宿主细胞释放靶细胞组分。此外，裂解试剂可以任选提供对该组分的保护，例如，保护免于降解。从而，裂解试剂可以含有去污剂、分解酶、离液试剂、或者它们的组合。裂解试剂可以还含有缓冲剂、消泡剂、膨胀剂、底物结合酶、酶抑制剂或者帮助提取和分离细胞组分的其他添加剂，所述细胞组分为例如，肽、蛋白质、或者核酸。

在一个实施方案中，裂解试剂包含去污剂。本文可以使用多种去污剂，包括阴离子去污剂、阳离子去污剂、非离子去污剂和两性离子去污剂。代表性去污剂包括鹅脱氧胆酸；鹅脱氧胆酸钠盐；胆酸；脱氢胆酸；脱氧胆酸；脱氧胆酸甲酯；毛地黄皂苷；洋地黄毒苷；N,N-二甲基十二烷基氧化胺；多库酯钠盐；甘氨酸鹅脱氧胆酸(glycochenodeoxycholic acid)钠盐；甘氨酸水合物；甘氨酸胆酸钠盐水合物；甘氨酸脱氧胆酸一水合物；甘氨酸脱氧胆酸钠盐；甘氨酸石胆酸(glycolithocholic acid) 3-硫酸二钠盐；甘氨酸石胆酸乙酯；N-月桂酰肌氨酸钠盐；N-月桂酰肌氨酸；十二烷基硫酸锂；鲁戈氏溶液；4 型 Niaproof 4(即，7-乙基-2-甲基 4-十一基硫酸钠盐；7-乙基-2-甲基-4-十一基硫酸钠)；1-辛烷磺酸钠盐；1-丁烷磺酸钠；1-癸烷磺酸钠；1-十二烷磺酸钠；无水 1-庚烷磺酸钠；1-壬烷磺酸钠；一水合 1-丙烷磺酸钠；2-溴乙烷磺酸钠；水合胆酸钠；络胆酸钠；脱氧胆酸钠；一水合脱氧胆酸钠；十二烷基硫酸钠；无水己烷磺酸钠；辛基硫酸钠；无水戊烷磺酸钠；牛磺胆酸钠；牛磺脱氧胆酸钠；牛磺鹅脱氧胆酸(saurochenodeoxycholic acid) 钠盐；一水合牛磺脱氧胆酸钠盐；水合牛磺脱氧胆酸钠盐；牛磺石胆酸 3-硫酸二钠盐；牛磺熊去氧胆酸钠盐；Trizma<sup>®</sup>十二烷基硫酸盐(即，三(羟基甲基)氨基甲烷月桂基硫酸盐)；熊去氧胆酸，烷基三甲基溴化铵；苯扎氯

铵; 苜基二甲基十六烷基氯化铵; 苜基二甲基肉豆蔻基氯化铵; 苜基十二烷基二甲基溴化铵; 苜基三甲基四氯碘酸铵; 十六烷基三甲基溴化铵; 二甲基二(十八烷基)溴化铵; 十二烷基乙基二甲基溴化铵; 十二烷基三甲基溴化铵; 乙基十六烷基二甲基溴化铵; Girard's 试剂 T; 十六烷基三甲基溴化铵; N, N', N'-聚氧乙烯(10)-N-动物脂-1,3-二氨基丙烷; 铵溴通佐; 三甲基(肉豆蔻基)溴化铵, BigCHAP (即, N, N-二[3-(D-葡萄糖酰胺基)丙基]胆酰胺); 二(聚乙二醇二[咪唑基羰基]); 聚氧乙烯醇, 如 Brij<sup>®</sup>30(聚氧乙烯(4)月桂基醚)、Brij<sup>®</sup>35(聚氧乙烯(23)月桂基醚)、Brij<sup>®</sup>35P、Brij<sup>®</sup>52(聚氧乙烯2十六烷基醚)、Brij<sup>®</sup>56(聚氧乙烯10十六烷基醚)、Brij<sup>®</sup>58(聚氧乙烯20十六烷基醚)、Brij<sup>®</sup>72(聚氧乙烯2硬脂酰基醚)、Brij<sup>®</sup>76(聚氧乙烯10硬脂酰基醚)、Brij<sup>®</sup>78(聚氧乙烯20硬脂酰基醚)、Brij<sup>®</sup>78P、Brij<sup>®</sup>92(聚氧乙烯2油烯基醚); Brij<sup>®</sup>92V(聚氧乙烯2油烯基醚)、Brij<sup>®</sup>96V、Brij<sup>®</sup>97(聚氧乙烯10油烯基醚)、Brij<sup>®</sup>98(聚氧乙烯(20)油烯基醚)、Brij<sup>®</sup>58P、和 Brij<sup>®</sup>700(聚氧乙烯(100)硬脂酰基醚); Cremophor<sup>®</sup>EL (即聚氧乙烯甘油三蓖麻醇酸酯 35; polyoxyl 35 蓖麻油); 十甘醇单十二烷基醚; 十甘醇单十六烷基醚; 十甘醇单十三烷基醚; N-癸酰基-N-甲基葡萄糖胺; 正癸基  $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷; 癸基  $\beta$ -D-吡喃麦芽糖苷; 毛地黄皂苷; 正-十二烷酰基-N-甲基葡萄糖胺; 正-十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷; 正-十二烷基  $\beta$ -D-麦芽糖苷; 七甘醇单癸基醚; 七甘醇单十二烷基醚; 七甘醇单肉豆蔻基醚; 正-十六烷基  $\beta$ -D-麦芽糖苷; 六甘醇单十二烷基醚; 六甘醇单十六烷基醚; 六甘醇单十八烷基醚; 六甘醇单肉豆蔻基醚; Igepal<sup>®</sup>CA-630 (即, 壬基苯基聚乙二醇, (辛基苯氧基)聚乙氧基乙醇, 辛基苯氧基-聚乙二醇); 甲基-6-O-(N-庚基氨基酰基)- $\alpha$ -D-吡喃葡萄糖苷; 九甘醇单十二烷基醚; N-壬酰基-N-甲基葡萄糖胺; 八甘醇单癸基醚; 八甘醇单十二烷基醚; 八甘醇单十六烷基醚; 八甘醇单十八烷基醚; 八甘醇单肉豆蔻基醚; 辛基- $\beta$ -D-吡喃葡萄糖苷; 五甘醇单癸基醚; 五甘醇单十二烷基醚; 五甘醇单十六烷基醚; 五甘醇单己基醚; 五甘醇单十八烷基醚; 五甘醇单辛基醚; 聚乙二醇二缩水甘油基醚; 聚乙二醇醚 W-1; 聚氧乙烯10三癸基醚; 聚氧乙烯100硬脂酸酯; 聚氧乙烯20

异十六烷基醚；聚氧乙烯 20 油烯基醚；聚氧乙烯 40 硬脂酸酯；聚氧乙烯 50 硬脂酸酯；聚氧乙烯 8 硬脂酸酯；聚氧乙烯二(咪唑基羰基)；聚氧乙烯 25 丙二醇硬脂酸酯；来源于皂树树皮的皂角苷；脂肪酸脱水山梨醇酯，如 Span<sup>®</sup>20(失水山梨糖醇单月桂酸酯)、Span<sup>®</sup>40(失水山梨糖醇单棕榈酸酯)、Span<sup>®</sup>60(失水山梨糖醇单硬脂酸酯)、Span<sup>®</sup>65(失水山梨糖醇三硬脂酸酯)、Span<sup>®</sup>80(失水山梨糖醇单油酸酯)和 Span<sup>®</sup>85(失水山梨糖醇三油酸酯)；聚乙二醇的多种烷基醚，如 Tergitol<sup>®</sup>型 15-S-12、Tergitol<sup>®</sup>型 15-S-30、Tergitol<sup>®</sup>型 15-S-5、Tergitol<sup>®</sup>型 15-S-7、Tergitol<sup>®</sup>型 15-S-9、Tergitol<sup>®</sup>型 NP-10(壬基酚乙氧基化物)、Tergitol<sup>®</sup>型 NP-4、Tergitol<sup>®</sup>型 NP-40、Tergitol<sup>®</sup>型 NP-7、Tergitol<sup>®</sup>型 NP-9(壬基酚聚乙二醇醚)、Tergitol<sup>®</sup>MIN FOAM 1x、Tergitol<sup>®</sup>MIN FOAM 2x、Tergitol<sup>®</sup>型 TMN-10(聚乙二醇三甲基壬基醚)、Tergitol<sup>®</sup>型 TMN-6(聚乙二醇三甲基壬基醚)、Triton<sup>®</sup>770、Triton<sup>®</sup>CF-10(苄基-聚乙二醇叔-辛基苯基醚)、Triton<sup>®</sup>CF-21、Triton<sup>®</sup>CF-32、Triton<sup>®</sup>DF-12、Triton<sup>®</sup>DF-16、Triton<sup>®</sup>GR-5M、Triton<sup>®</sup>N-42、Triton<sup>®</sup>N-57、Triton<sup>®</sup>N-60、Triton<sup>®</sup>N-101(即，聚乙二醇壬基苯基醚；聚氧乙烯支链壬基苯基醚)、Triton<sup>®</sup>QS-15、Triton<sup>®</sup>QS-44、Triton<sup>®</sup>RW-75(即，聚乙二醇 260 单(十六烷基/十八烷基)醚和 1-十八醇)、Triton<sup>®</sup>SP-135、Triton<sup>®</sup>SP-190、Triton<sup>®</sup>W-30、Triton<sup>®</sup>X-15、Triton<sup>®</sup>X-45(即，聚乙二醇 4-叔辛基苯基醚；4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇)、Triton<sup>®</sup>X-100(叔-辛基苯氧基聚乙二醇；聚乙二醇叔辛基苯基醚)；4-(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇)、Triton<sup>®</sup>X-102、Triton<sup>®</sup>X-114(聚乙二醇叔辛基苯基醚；(1,1,3,3-四甲基丁基)苯基-聚乙二醇)、Triton<sup>®</sup>X-165、Triton<sup>®</sup>X-305、Triton<sup>®</sup>X-405(即，聚氧乙烯(40)异辛基环己基醚；聚乙二醇叔辛基苯基醚)、Triton<sup>®</sup>X-705-70、Triton<sup>®</sup>X-151、Triton<sup>®</sup>X-200、Triton<sup>®</sup>X-207、Triton<sup>®</sup>X-301、Triton<sup>®</sup>XL-80N 和 Triton<sup>®</sup>XQS-20；肉豆蔻基-β-D-麦芽糖苷；四甘醇单癸基醚；四甘醇单十二烷基醚；四甘醇单肉豆蔻基醚；三甘醇单癸基醚；三甘醇单十二烷基醚；三甘醇单十六烷基醚；三甘醇单辛基醚；三甘醇单肉豆蔻基醚；聚氧乙烯失水山梨糖醇脂肪酸酯，如 TWEEN<sup>®</sup>20(聚乙二醇失水山梨糖醇单

月桂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>20(聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单月桂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>21(聚氧乙烯(4)失水山梨糖醇单月桂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>40(聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单棕榈酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>60(聚乙二醇失水山梨糖醇单硬脂酸酯;聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单硬脂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>61(聚氧乙烯(4)失水山梨糖醇单硬脂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>65(聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇三硬脂酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>80(聚乙二醇失水山梨糖醇单油酸酯;聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇单油酸酯)、TWEEN<sup>®</sup>81(聚氧乙烯(5)失水山梨糖醇单油酸酯)、和TWEEN<sup>®</sup>85(聚氧乙烯(20)失水山梨糖醇三油酸酯);四丁酚醛;正-十一烷基β-D-吡喃葡萄糖苷、CHAPS(即,3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐);CHAPSO(即,3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-2-羟基-1-丙烷磺酸盐);N-十二烷基麦芽糖苷;α-十二烷基-麦芽糖苷;β-十二烷基-麦芽糖苷;3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐(即,SB3-10);3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐(即,SB3-12);3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐(即,SB3-14);3-(N,N-二甲基十八烷基铵基)丙烷磺酸盐(即,SB3-18);3-(N,N-二甲基辛基铵基)丙烷磺酸内盐(即,SB3-8);3-(N,N-二甲基棕榈基铵基)丙烷磺酸盐(即,SB3-16);MEGA-8;MEGA-9;MEGA-10;甲基庚基氨基甲酰基吡喃葡萄糖苷;N-壬醇N-甲基葡萄糖胺;辛基-吡喃葡萄糖苷;辛基-硫代吡喃葡萄糖苷;辛基-β-硫代吡喃葡萄糖苷;3-(4-庚基)苯基3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐(即,C7BzO);3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐(即,ASB-14);和脱氧胆酸(deoxycholic acid),和它们的多种组合。

在一个实施方案中,裂解试剂将是选自CHAPS(3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐、辛基-β-硫代吡喃葡萄糖苷、辛基-吡喃葡萄糖苷、C7BzO(3-(4-庚基)苯基3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐)、ABS-14(3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐)、Triton<sup>®</sup>X-100、α-十二烷基-麦芽糖苷、β-十二烷基-麦芽糖苷、十甘醇单十六烷基醚、十甘醇单三癸基醚、脱氧胆酸、十二烷基硫酸钠、Igepal<sup>®</sup>CA-630、溴化十六碳烷基三甲铵、SB3-10(3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺



酸内盐)、SB3-12(3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐)、SB3-14(为 3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐)、和正-十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷的一种或多种试剂。

在另一实施方案中,裂解试剂将是选自 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐、辛基- $\beta$ -硫代吡喃葡萄糖苷、辛基-吡喃葡萄糖苷、3-(4-庚基)苯基 3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐、3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐、3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐、3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐和正-十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷的一种或多种试剂。

在另一实施方案中,裂解试剂含有分解酶。本文中可以使用多种酶。代表性酶包括  $\beta$  葡糖醛酸糖苷酶、葡聚糖酶、蜗牛酶、溶菌酶、溶细胞酶、甘露聚糖酶、变溶菌素、消解酶、纤维素酶、几丁质酶、溶葡萄球菌素、果胶酶(pectolyase)、链球菌溶血素 O,和它们的多种组合。见,例如,Wolska-Mitaszko,等人, *Analytical Biochem.*, 116: 241-47 (1981); Wiseman, *Process Biochem.*, 63-65 (1969); 和 Andrews & Asenjo, *Trends in Biotech.*, 5: 273-77 (1987)。

所裂解的细胞类型可以影响酶的选择。见,Coakley,等人, *Adv. Microb. Physio*, 16: 279-341 (1977)。例如,对于蛋白质或者肽,当宿主细胞是植物细胞时,几丁质酶、 $\beta$  葡糖醛酸糖苷酶、甘露聚糖酶和果胶酶都可以使用。酵母细胞难以破裂,因为其细胞壁可以形成被膜或者抗性孢子。通过使用裂解性酶,如溶细胞酶、几丁质酶、消解酶和 gluculase 诱导部分原生质球形成;原生质球随后裂解而释放 DNA,可以从酵母提取 DNA。溶细胞酶优选消化酵母的细胞壁并从真菌产生用于转化的原生质球。溶细胞酶水解聚( $\beta$ -1,3-葡萄糖),如酵母细胞壁葡聚糖。

当宿主细胞是细菌细胞时,溶菌酶和变溶菌素是有用的。溶菌酶水解肽聚糖的多糖主链中 N-乙酰基葡萄糖胺和 N-乙酰基胞壁酸之间的  $\beta$  1-4 糖苷键。它通过水解细菌细胞壁中存在的肽聚糖而有效裂解细菌。

在另一实施方案中,裂解试剂含有离液剂。在某些情况中,仅离液剂

就足够裂解宿主细胞。具体地，当细胞组分是 RNA 时使用离液剂。可以用于本文的离液剂的实例包括尿素、盐酸胍、硫氰酸胍、硫代硫酸胍和硫脲。离液剂还可以与去污剂、缓冲剂、消泡剂和本文描述的其他添加剂联合使用。

除了主要负责裂解宿主细胞的去污剂、分解酶或者离液剂之外，裂解试剂还可以含有用于控制 pH 的一种或多种缓冲剂、防止过量起泡或者发泡的消泡剂、膨胀剂、酶抑制剂，和帮助纯化细胞组分的其他底物结合酶。代表性缓冲剂包括 TRIS、TRIS-HCl、HEPES 和磷酸盐。代表性消泡剂包括 Antifoam 204; Antifoam A Concentrate; Antifoam A Emulsion ; Antifoam B Emulsion ; 和 Antifoam C Emulsion。代表性膨胀剂包括氯化钠、氯化钾和聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。底物结合酶和酶抑制剂包括核酸酶，如 Benzonase<sup>®</sup>内切核酸酶；脱氧核糖核酸酶(例如，脱氧核糖核酸酶 I)；RNA 酶(例如，RNA 酶 A)；蛋白酶，如蛋白酶 K；核酸酶抑制剂；蛋白酶抑制剂，如膦酰二肽、胃酶抑制剂 A、苯丁抑制素、E-64、牛胰蛋白酶抑制剂、抑蛋白酶醛肽、1,10-菲咯啉、抗蛋白酶、盐酸苯甲醚、胰凝乳蛋白酶抑制剂、EDTA、e-氨基己酸、胰蛋白酶抑制剂，和盐酸 4-(2-氨基乙基)苯磺酰氟；和磷酸酶抑制剂，如斑蝥素、溴代四咪唑、微囊藻素 LR、原钒酸钠、钼酸钠、酒石酸钠和咪唑；等等。象分解酶一样，底物结合酶和酶抑制剂的选择也随几种因素而变，所述因素包括待提取的材料类型(例如，肽、蛋白质、核酸等等)，以及待裂解的细胞的类型(例如，植物、酵母、细菌、真菌、哺乳动物、昆虫，等等)。例如，核酸酶水解或降解核酸。当细胞组分是蛋白质或肽时，而细胞组分不是核酸时，将希望裂解试剂含有核酸酶。同样，蛋白酶分解或降解蛋白质。从而当细胞组分是核酸，但是细胞组分不是蛋白质时，将希望裂解试剂含有蛋白酶。当选择其他酶或者抑制剂时可以应用类似的推理。从而，通常，当细胞组分是核酸时，通常可以使用诸如蛋白酶、核酸酶抑制剂和溶菌酶的酶或者抑制剂。当细胞组分是蛋白质或者肽时，可以使用其他酶或抑制剂，如 Benzonase<sup>®</sup>内切核酸酶、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂、脱氧核糖核酸酶、RNA 酶或者其他

核酸酶。对于核酸，RNA 酶 A 可以用于提取细菌和哺乳动物 DNA。脱氧核糖核酸酶 I 可以用于提取细菌 RNA、酵母 RNA、动物细胞和组织的 RNA，和生物液体的 RNA。蛋白酶，如蛋白酶 K，可以用于从所有细胞类型提取 DNA。

当宿主细胞是细菌或者动物细胞，或者细胞组分是蛋白质或者 DNA 时，裂解试剂将通常含有去污剂。当宿主细胞是酵母细胞时，裂解试剂将通常含有去污剂，或者能够裂解酵母细胞的酶，如溶细胞酶、酶解酶或者其他分解酶，如前面列出的那些分解酶。

作为另一实例，当细胞组分是蛋白质或肽时，裂解试剂优选含有一种或多种去污剂、溶菌酶、核酸酶、Benzonase<sup>®</sup>内切核酸酶、缓冲剂、蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂或者离液试剂，或者它们的多种组合。在另一实施方案中，当细胞组分是 DNA 时，裂解试剂优选含有一种或多种去污剂、溶菌酶、核酸酶抑制剂、RNA 酶、缓冲剂或者蛋白酶，或者它们的多种组合。

在另一实施方案中，当细胞组分是 RNA 时，裂解试剂优选含有一种或多种去污剂、离液试剂、或者缓冲剂，或者它们的多种组合。该应用中通常不使用酶，因为离液剂将使它们失活。

在一个实施方案中，裂解试剂含有 3-[(3-胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐、溶菌酶、Tris-HCl，和脱氧核糖核酸酶 I。

在另一实施方案中，裂解试剂含有辛基-硫代吡喃葡萄糖苷、蛋白酶抑制剂、溶菌酶、Benzonase<sup>®</sup>内切核酸酶。

从而，裂解试剂可以含有去污剂、酶、抑制剂、离液剂、缓冲剂、消泡剂、膨胀剂和/或帮助提取和分离细胞组分的其他添加剂的多种不同的组合。这些裂解试剂和/或组分可以是天然的、重组的或者任意修饰的或活性形式。本领域技术人员可以基于细胞组分和宿主细胞的类型容易确定优选的裂解试剂所含的成分。

裂解试剂的量和其每种组分的相对比例将根据宿主细胞的类型、所选的裂解试剂的类别和希望在确定的时间段内的细胞渗透程度而变。从而，

在一个实施方案中，任何一种去污剂的浓度为约 0.01%到约 5%(w/v)，更优选约 0.1%到约 2%。在另一实施方案中，每种分解酶的浓度为约 0.01 mg/ml 到约 0.2mg/ml。在再一个实施方案中，缓冲剂的浓度使得在发生提取或者提取和分离的时间期间内细胞溶液的 pH 保持在约 pH3 到约 pH12。在另一实施方案中，蛋白酶抑制剂的浓度为约 10 nM 到约 10 mM。在另一实施方案中，磷酸酶抑制剂的浓度为约 0.01 nM 到约 10 mM。

不管是否裂解试剂作为被吸附的、自由流动的、溶解的或者淤浆状的组分存在于溶剂中，当向容器加入含有宿主细胞的溶液和悬浮液时，裂解试剂将被含有宿主细胞的悬浮液溶解和稀释，并且宿主细胞被裂解。如果裂解试剂含有裂解所需的所有试剂，那么不需要进行多次移液步骤以确保存在所有需要的裂解试剂。此外，如上面指出的，裂解试剂不必为了有效而完全溶解宿主细胞。而是，宿主细胞仅需要被裂解到将部分和所有靶产物释放到溶液的程度。此外，裂解试剂不必为了有效而裂解任何具体细胞悬浮液中的所有宿主细胞，只要裂解一些宿主细胞即可。

## 5. 试剂盒

有利地，本发明的容器可以与使用说明书，和用于从宿主细胞提取和/或分离细胞组分的试剂，和/或分析或检测被捕获的细胞组分的试剂，和/或处理缓冲液或者对照联合，其中所有这些都包装在一起并且作为试剂盒分配。在一个实施方案中，试剂盒将含有一个容器，或者备选地，包含多个容器的多孔板；通常，将封闭试剂盒。总之，包括裂解试剂，和任选地，还可以包括捕获配体。

如本文所述，裂解试剂和/或捕获配体可以以多种不同的方式在本发明的容器中提供。例如，裂解试剂可以涂布在容器的一部分、容器的底部、容器的侧壁结构或者容器的底部和侧壁结构上，或者可以以自由流动的粉末形式存在。同样，受支持的捕获配体可以位于容器的一部分、容器的底部、容器的侧壁结构或者容器的底部和侧壁结构上。在一个实施方案中，容器还包含额外的支持体，如珠子或者网孔，支持体上可以涂布裂解试剂

和/或放置受支持的捕获配体。备选地，容器可以是高容量平台，其含有三维聚合物基质、捕获配体或者可活化基团，和裂解试剂。

在一个实施方案中，容器将含有提取或者提取和分离细胞组分(例如，多肽、蛋白质、RNA 或者 DNA 产物)所需的所有试剂。试剂盒可以还包含用于从受支持的捕获配体或者三维基质释放或稀释被捕获的产物的其他试剂和设备，以及多种处理缓冲剂。

## 6. 方法

通常，本发明的方法涉及从宿主细胞提取或提取和分离细胞组分，如肽、蛋白质、核酸、或者其他细胞组分。从而，一方面，本发明涉及从宿主细胞提取细胞组分的方法，该方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器，该容器具有口、内表面、体积  $V$ ，和至少一部分内表面上的裂解试剂涂层，所述内表面包括侧壁结构和底部，经涂布的内表面的面积与体积  $V$  的比小于约  $4 \text{ mm}^2/\mu\text{l}$ ，和(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成细胞残渣。裂解试剂导致宿主细胞释放其内含物。裂解可以是完全的，即所有细胞组分(例如，肽、蛋白质或核酸)从宿主细胞释放，或者是部分的，即，从宿主细胞释放部分细胞组分。

另一方面，本发明涉及从宿主细胞提取和分离细胞组分的方法。一方面，该方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器，该容器具有口、内表面、体积  $V$ 、裂解试剂和受支持的捕获配体，所述内表面包括侧壁结构和底部，侧壁结构在底部和口之间，口作为向容器导入液体的入口和从容器除去液体的出口，(b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣；和(c)在固态细胞残渣的存在下用捕获配体捕获细胞组分。在一个实施方案中，通过容器的内表面支持捕获配体。在另一实施方案中，捕获配体附着到容器的内表面上涂布的聚合物基质。

另一方面，所述方法包括(a)将含有宿主细胞的液体悬浮物导入容器，该容器具有口、内表面、体积  $V$ 、裂解试剂和受支持的捕获配体，所述内表面包括侧壁结构和底部，侧壁结构在底部和口之间，口作为向容器导入

液体的入口, (b)裂解容器中的宿主细胞以释放细胞组分和形成固态细胞残渣; 和(c)在固态细胞残渣的存在下用捕获配体捕获细胞组分, (d)从捕获配体释放细胞组分, 和(e)回收释放的细胞组分。在一个实施方案中, 通过容器的内表面支持捕获配体。在另一实施方案中, 捕获配体附着到容器的内表面上涂布的聚合物基质。

裂解可以是完全的, 即所有细胞组分从宿主细胞释放, 或者是部分的, 即, 从宿主细胞释放部分细胞组分。在一个实施方案中, 洗除细胞残渣和其他未结合的细胞成分, 留下结合到捕获配体的细胞组分。然后在被捕获的产物仍然结合捕获配体时可以检测所述捕获的产物。此类检测方法是本领域熟知的, 并且包括 ELISA、蛋白质检测和酶分析, 等等。在另一实施方案中, 通过使用诸如盐的试剂, 或者通过其他试剂与捕获配体的竞争性结合从捕获配体释放或者洗脱被捕获的细胞组分可以回收被捕获的组分。

现在参考图 7, 将在含有裂解试剂和捕获配体的容器的背景下描述本发明的方法。通常称作 10 的该容器为柱或者管, 其通常具有柱状轴 12, 其限定了内腔, 和口 13(其可以被上面的帽 14 覆盖)、出口 15(其可以被下面的帽 16 覆盖)。在一般的柱状轴 12 限定的腔内是树脂床 18, 其结合有捕获配体, 和覆盖树脂床 18 的一块裂解试剂 20。为了支持腔内的树脂床, 容器 10 可以还含有多孔聚乙烯釉料(约 20  $\mu\text{m}$  孔大小)。在操作中, 除去上面的帽 14 并将含有宿主细胞的液体悬浮物通过口 13 倒入柱中。通过液体悬浮物溶解裂解试剂 20, 从而使得释放宿主细胞的所有或部分细胞组分并通过结合树脂床 18 的捕获配体捕获细胞组分。捕获细胞组分后, 通过出口 15 从容器排出细胞残渣和液体悬浮物的其他组分; 有利地, 釉料或者其他支持方法防止树脂 18 排出腔但是允许细胞残渣和液体悬浮物的其他组分排出。在优选实施方案中, 柱子具有 9.1 cm 内部柱长(或者当在底部和口加帽时长 12.3cm); 在底部开口约 1cm 的直径、在口开口约 1.7cm 的直径; 和约 7.5 ml 的总体积。在一个实施方案中, 捕获配体是共价附着琼脂糖树脂床的镍螯合物并且裂解试剂含有 CHAPS(即, 3-[3-胆酰氨基丙基]二甲基铵基)-1-丙烷磺酸盐)的自由流动的粉末、溶菌酶、Tris-HCl 和脱氧核糖核

## 酸酶 I.

在另一实施方案中，上述方法可以在多孔板(如 96 多孔板)的一个或多个孔中进行，所述多孔板可以含有裂解试剂和聚合物基质涂层。例如，在一个实施方案中，用前述衍生自葡聚糖聚合物的聚合物基质涂布孔，所述聚合物基质连接捕获配体。在优选实施方案中，聚合物基质衍生自葡聚糖聚合物的混合物，并且捕获配体是镍螯合剂。在一个实施方案中，裂解试剂含有辛基-硫代吡喃葡萄糖苷(OTG)、蛋白酶抑制剂、溶菌酶、和 Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶。更具体地，裂解试剂可以含有 2%OTG、1%蛋白酶抑制剂、2%溶菌酶、和 0.02%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶。在一个实施方案中，裂解试剂涂布在聚合物基质的至少一部分表面和/或孔的侧壁上。备选地，或者额外地，裂解试剂可以以孔内冻干基质或者其他物质(例如，自由流动的粉末)的形式存在。当向孔中加入含有宿主细胞的液体悬浮物时，裂解试剂被溶解，并且宿主细胞被裂解，如前述。然后捕获配体结合靶细胞组分。使用本领域公知和前面描述的技术可以任选释放和回收被捕获的靶细胞组分。

另一方面，本发明涉及制备用于从宿主细胞提取细胞组分的多孔板的方法。该方法包括将多孔板的多个孔的内表面与含有裂解试剂的液体接触，并干燥液体以在孔的内表面上形成裂解试剂的吸附层。本文描述的任意裂解试剂可以以该方式使用。如前面描述的，裂解试剂的量可以改变，但是应该是足够的，从而所吸附的裂解试剂的量将提供所希望水平的提取。通过风干，使用培养箱，或者本领域公知的其他技术可以实现干燥。

可以以类似方式制备用于从宿主细胞提取和分离细胞组分的容器。例如，在一个实施方案中，含有受支持的捕获配体的孔的内表面可以与含有裂解试剂的液体接触，并且干燥液体以在孔的内表面上形成裂解试剂的吸附层。在另一实施方案中，含有所结合的聚合物基质的孔(例如，上述多孔板的一个或多个孔)的内表面可以与含有裂解试剂的液体接触，并且干燥液体以在孔的聚合物基质和/或侧壁的表面形成裂解试剂的吸附层。在另一实施方案中，柱(如含有附着捕获配体树脂的柱，如上述)的内表面可以与

含有裂解试剂的液体接触，并且干燥液体以在柱的树脂和/或侧壁的表面形成裂解试剂的吸附层。

本申请引用的所有出版物、专利、专利申请和其他参考文献在此处完整并入本文作为参考，就像每种单独的出版物、专利、专利申请和其他参考文献特别并单独指出并入本文作为参考一样。

## 7. 定义

术语“捕获配体”指可以或者被固定或支持在容器或支持物上并且用于将细胞组分与细胞残渣分离的任何部分、分子、受体或者层。可以用于本发明的捕获配体的一些非限制性实例包括：生物素、链霉抗生物素蛋白、多种金属螯合离子、抗体、多种带电颗粒，如用于离子交换层析的那些颗粒、染料、多种亲和层析支持体，和用于疏水层析的多种疏水基团。

术语“细胞残渣”和“细胞的残渣”在本文可以互换使用，用以描述由于细胞裂解从宿主细胞释放的不同于靶产物的膜碎片、细胞器或者任意其他可溶或不可溶细胞组分。

术语“提取”指由于细胞裂解，从宿主细胞释放其表达的至少一些靶产物。

术语“宿主细胞”指表达或者含有靶产物的任意原核或真核细胞。宿主细胞包括，例如，细菌细胞，如大肠杆菌(*E.coli*)；真菌细胞，如酵母细胞；植物细胞；动物细胞，如哺乳动物细胞；和昆虫细胞。

术语“分离”或“纯化”指从至少部分细胞残渣除去或分离至少部分靶产物。

术语“裂解”指破坏细胞的细胞壁和/或细胞膜从而释放靶产物。裂解可以是完全或部分的(即，使得细胞壁和/或细胞膜足够可渗透的以释放一些但不是全部细胞组分)。

术语“靶产物”指任意细胞组分，如多肽、蛋白质、蛋白质片段、DNA、RNA、其他核苷酸序列、糖、脂质、胆固醇、激酶或者其他细胞组分，所述任意细胞组分将从表达或包含所述组分的宿主细胞提取或者提取和分离



(例如, “靶蛋白”、“靶 DNA”、“靶 RNA”、“靶细胞组分”等等) 出来。靶产物可以在宿主细胞中天然发生, 或者可以是非天然发生的, 例如, 重组蛋白质。

由于可以对上面的产物和方法进行多种改变而不背离本发明的范围, 所以上面描述和下面给出的实施例中所含的所有内容将解释为阐明性的而不是限制性的。

## 实施例

### 实施例 1

使用 his-标记的重组蛋白质通过 HIS-Select™高容量板进行去污剂裂解和纯化

在该实施例中, 裂解含有包含重组 his 标记的蛋白质的细菌, 并且在一步中纯化靶蛋白。将重组蛋白质以不同的量掺加(spike)到大肠杆菌(E.coli)中以确定细胞裂解时蛋白质能否被捕获。除非另外指出, 从 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 得到所有材料。

干燥裂解支持体。用 HIS-Select™高容量(HC)板(Sigma S5563)进行靶蛋白的纯化。将这些 96 孔多孔板用如上述的高密度、镍螯合物聚合物基质涂布。这些板用于纯化 his-标记的重组蛋白质, 并且可以每孔结合 4 μg 以上蛋白质。主要裂解组分是 20 mM Tris-Cl(pH 7.5)中的 1%辛基-硫代葡萄糖吡喃糖苷(OTG)。将多种处理试剂和酶加入到缓冲的去污剂: i)1%(v/v)蛋白酶抑制剂(Sigma P8849)、2%溶菌酶(Sigma, 10mg/ml 溶液 L3790), 和 0.02%Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014); ii)1%蛋白酶抑制剂和 2%溶菌酶; 和 iii)1%蛋白酶抑制剂和 0.02%Benzonase®内切核酸酶。将溶液分散到 96 孔 HIS-Select™HC 板的不同孔中, 每个孔含有缓冲去污剂加(i)、(ii)或(iii)的 0.1ml 溶液。在培养箱中 47°C 下对板上方吹干燥空气使溶液在培养箱中板孔上干燥。干燥后, 用去污剂加(i)、(ii)或(iii)涂布的每个孔的表面积为约 134.7mm<sup>2</sup>。

细胞生长。向 3 个 15-ml 圆底管的每一个加入 5ml 无菌 terrific 肉汤

(TB)培养基。向每个管加入氯苄青霉素至终浓度为 0.1 mg/ml。向每个管加入非表达性大肠杆菌的一个菌落。以 250 转/分钟摇动下在 37°C 过夜孵育培养物。

大肠杆菌样品。用无菌 TB 培养基将含有序列 His-Asn-His-Arg-His-Lys-His (SEQ. ID. NO. 4)的组氨酸标记的纯化的重组 28 kDa 蛋白质稀释到 1 mg/ml。通过将特定量的靶蛋白掺入到非表达性大肠杆菌培养物制备蛋白质样品。向含有经干燥的裂解试剂的每孔加入 100  $\mu$ l 等分试样。非表达性大肠杆菌培养基用作对照。温和摇动下在室温孵育样品 2 小时。

SDS-PAGE 分析。使用 BioMek 板洗涤器将板用 Tris 缓冲盐水与 0.05% Tween 20 (TBST), pH 8.0 洗涤 4 次。所选的孔在室温下用 50  $\mu$ l 含有 50 mM 磷酸钠, pH8, 300 mM 氯化钠, 和 250 mM 咪唑的溶液洗脱。样品以 1:1 与 Laemmli 样品缓冲液混合, 并通过 1x Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液中的 4-20%tris-甘氨酸凝胶(Invitrogen)对 20  $\mu$ l 样品电泳。凝胶用 EZBlue 染色试剂(Sigma G1041)染色, 然后用银染(Sigma # Prot-sil1)染色。结果在图 1 中给出。

结果和讨论。表 1 指出用于图 1 的每个泳道的裂解试剂和样品组分。在其中加入靶蛋白的每个孔中, 蛋白质受到捕获并洗脱。更高量的蛋白质导致更高量的被捕获的靶蛋白。处理辅助剂对于结合的靶蛋白的量是有益的, 除了去污剂还存在溶菌酶时尤其有益。

表 1 用于 SDS-PAGE 分析的裂解试剂和样品组分

泳道号	板中干燥的裂解试剂	样品组分 用咪唑从板洗脱后装入 凝胶中的 20 $\mu$ l 样品
1	N/A	分子量标记

		(Colorburst Sigma C4105)
2	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	Terrific 肉汤(TB)中的 3 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白
3	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	TB 中的非表达性大肠杆菌
4	1%OTG, 20 mM Tris-Cl pH 7.5	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 3 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
5	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	TB 中的非表达性大肠杆菌
6	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 1 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
7	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 2 $\mu$ g 纯 his-标记的

	混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	靶蛋白的非表达性大肠杆菌
8	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 3 μg 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
9	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 4 μg 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
10	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849) 和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 5 μg 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
11	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 2% 10 mg/ml 溶菌酶, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物(Sigma, P8849)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 3 μg 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌
12	1%OTG,20 mM Tris-Cl pH 7.5, 1%v/v 蛋白酶抑制剂混合物 (Sigma, P8849)和 0.02%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	掺加 Terrific 肉汤(TB) 中的 3 μg 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌

**实施例 2 通过 HIS-Select™高容量板使用重组大肠杆菌进行去污剂裂解、捕获和纯化**

在该步骤中，使用多种去污剂联合处理辅助剂裂解含有重组 his-标记的蛋白质的细菌，并且在一步中纯化靶蛋白。除非另外指出，所有材料都从 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO 得到。

干燥裂解支持体。用去污剂和处理试剂和酶的多种组合检查一系列裂解试剂。100  $\mu$ l 2% OTG、2% CHAPS、4% CHAPS、2% C7BzO 或者 2% ASB-14 在 96 孔 HIS-Select™高容量板(Sigma S5563)上干燥。还制备含有这些去污剂和其他处理试剂的溶液。每种去污剂与 i) 2% (v/v)蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849); ii) 2%蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849)和 0.01% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014); iii) 2%蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849)和 0.04%溶菌酶; iv) 2%蛋白酶抑制剂混合物(Sigma P8849), 0.01% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014), 和 0.04%溶菌酶组合。还制备了额外的溶液，它们含有 i) 2% OTG 或 2% CHAPS 和 0.04%溶菌酶; ii) 2% OTG 或 2% CHAPS 和 0.01% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014); 和 iii) 2% OTG 或 2% CHAPS 和 0.04% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014)和 0.04%溶菌酶。将这些溶液的每一种分配到 HIS-Select™高容量板(Sigma S5563)的 2-3 个孔中，每孔含有 100  $\mu$ l 溶液。在烘箱中 47°C 下对板上方吹干燥空气过夜干燥裂解试剂。

细胞生长。在 15 ml 圆底管中加入 5ml 无菌 TB 培养基。向管中加入氨苄青霉素至终浓度为 0.1 mg/ml。向管中加入表达 his-标记的靶蛋白的大肠杆菌 BL21G 的一个菌落。以 250 转/分钟摇动下在 37°C 过夜孵育培养物。来自起始培养物的 1ml 细胞用于接种 500 ml 高压灭菌的 terrific 肉汤(TB)。向管中加入氨苄青霉素至终浓度为 0.1 mg/ml。以 250 转/分钟摇动下在 37°C 孵育培养物 3.5 小时。3.5 小时后，600 nm 处的 OD 为 0.5。向培养物加入终浓度 1 mM 的异丙基  $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)以诱导靶蛋白表达。以 250 转/分钟摇动下在 37°C 再孵育培养物 1.5 小时。

大肠杆菌样品。向含有干燥裂解试剂的半数孔中以 200  $\mu$ l 等分试样加入表达 his 标记的蛋白质的大肠杆菌(如用于实施例 1 中)。空孔用作对照。温和摇动下在室温孵育样品 1 小时。

**Bicinchoninic Acid(BCA)蛋白质测定。**使用 BioMek 板洗涤器用 TBST, pH 8.0 洗涤孔四次。1 mg/ml 牛血清白蛋白(BSA)用于标准曲线。向每孔加入 200  $\mu$ l BCA 工作试剂。将板在 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 分钟并在 562 nm 下在平板读出器上读数。结果在表 2 中给出。

**结果和讨论。**BCA 蛋白质测定表明在 HIS-Select<sup>TM</sup>高容量板上成功捕获了靶蛋白。多种去污剂制剂能够裂解细胞, 允许捕获蛋白质。非离子去污剂 OTG, 以及两性离子去污剂 CHAPS、C7BzO 和 ASB-14 工作良好。加入处理辅助剂, 特别是溶菌酶, 有助于增加结合到板的蛋白质的量。

表 2 通过 BCA 测定法测定的蛋白质质量( $\mu$ g/孔)

去污剂	无加入	Lys.	Benz.	Pr. Inh.	Lys., Benz.	Lys., Pr. Inh.	Benz., Pr. Inh.	Lys., Benz., Pr. Inh.
2% OTG	2.771	4.045	2.607	2.607	4.946	4.912	2.953	6.523
2% CHAPS	2.026	4.704	2.208	2.156	5.31	4.253	1.792	6.593
4% CHAPS	1.908			2.052		4.201	1.896	5.38
2% C7BzO	2.133			3.352		6.939	2.763	9.921
2% ASB-14	2.771			3.109		5.362	2.815	9.539

表 2 显示了对于 BCA 蛋白质测定, 对于测试的每种裂解试剂, 每孔的蛋白质平均量( $\mu$ g)。第 1 列指出所用的去污剂。第 2 列概述了当仅使用去污剂时的结果。第 3-9 列概述除了去污剂, 还使用溶菌酶(“Lys”)、Benzonase<sup>®</sup>内切核酸酶(“Benz”)、蛋白酶抑制剂混合物(“Pr.inh.”)或者它们的多种组合时的结果。

实施例 3 用大肠杆菌与重组的 his-标记的蛋白质和 2%OTG 与 HIS-Select<sup>TM</sup>高容量板进行裂解、捕获和纯化

在该实施例中，用 2%OTG 裂解包含含有重组 his-标记的蛋白质的细菌，并在一步中纯化靶蛋白。

除非另外指出，所有材料都从 Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis,MO 得到。

干燥裂解支持体。用 HIS-Select™高容量板(Sigma 85563)纯化靶蛋白。这些 96 孔多孔板用于纯化 his 标记的重组蛋白质并且可以每孔结合 4 μg 以上蛋白质。制备裂解溶液，其含有 20 mM Tris-Cl pH 7.5 中的 2%辛基-硫代吡喃葡萄糖苷(OTG)、1%(v/v)蛋白酶抑制剂(Sigma P8849)、2%溶菌酶(Sigma, 10 mg/ml 溶液 L3790)，和 0.02% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014)。将 50 μl 或 100 μl 该溶液分配到 96 孔 HIS-Select™高容量板的孔中。在培养箱中 47℃下对板上方吹干燥空气过夜干燥板孔上的溶液。

细胞生长。在 15 ml 圆底管中，加入 5 ml 无菌 TB 培养基。向管中加入表达 his-标记的靶蛋白的非氨苄青霉素抗性大肠杆菌的一个菌落。250 转/分钟摇动下在 37℃过夜孵育培养物。

大肠杆菌样品。用无菌 TB 培养基将含有组氨酸标记(如实施例 1 中描述)的纯化的重组 28kD 蛋白质稀释到 1mg/ml。通过向非表达性大肠杆菌培养基掺加特定量的靶蛋白制备蛋白质样品。对照样品含有仅纯化的靶蛋白或者非表达性大肠杆菌培养物。向含有干燥的裂解试剂的每个孔中加入 100 μl 等分试样。温和摇动下在室温孵育样品 2 小时。

SDS-PAGE 分析。孵育后，使用 BioMek 板洗涤器将板用 TBST pH 8.0 洗涤 4 次。一些孔在室温下用 50 μl 含有 50 mM 磷酸钠，pH8，300 mM 氯化钠，和 250 mM 咪唑的溶液洗脱。样品以 1:1 与 Laemmli 样品缓冲液混合，并通过 1x Tris-甘氨酸-SDS 缓冲液中的 4-20%tris-甘氨酸凝胶(Invitrogen)对 20 μl 样品电泳。凝胶用 EZBlue 染色试剂染色，然后用银染染色。结果在图 2 和 3 和表 3 中给出。

Bradford 蛋白质测定。1 mg/ml BSA 用于标准曲线。向每孔加入 250 μl Bradford 试剂。将板在室温孵育 15 分钟并在 595 nm 下在平板读出器上读数。结果在表 5 中给出。

光散射。将细胞培养物的 100  $\mu$ l 等分试样用无菌培养基以 1:10 稀释以在 550 nm 测定 OD 后裂解。对于含有 8  $\mu$ g 靶蛋白掺加的细胞样品，裂解后在 550 nm 读出一式两份的等分试样。结果在表 4 中给出。

结果和讨论。SDS-PAGE 样品表明细胞被裂解，并且捕获和成功地洗脱靶蛋白。所捕获的靶蛋白的量随着加入细胞的靶蛋白的量增加而增加。光散射数据表明对于裂解后样品，在 550 nm 处的吸收下降，表明细胞被裂解。对样品进行的 Bradford 蛋白质测定数据表明存在结合板的靶蛋白。非表达性细胞的裂解显示了背景蛋白质水平，但是靶蛋白的增加量给出了高于该背景水平的蛋白质数。

表 3 用于 SDS-PAGE 分析的样品组分

泳道编号	样品的组分
	用咪唑从板洗脱后加入凝胶中的 20 $\mu$ l 样品
1	分子量标记(Colorburst Sigma C4105)
2	TB 中非表达性大肠杆菌细胞
3	TB 中非表达性大肠杆菌细胞
4	Terrific 肉汤(TB)中掺加 2 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌细胞
5	Terrific 肉汤(TB)中掺加 4 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌细胞
6	Terrific 肉汤(TB)中掺加 6 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌细胞
7	Terrific 肉汤(TB)中掺加 8 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌细胞
8	Terrific 肉汤(TB)中掺加 10 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白的非表达性大肠杆菌细胞
9	Terrific 肉汤(TB)
10	Terrific 肉汤(TB)中 2 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白



11	Terrific 肉汤(TB)中 4 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白
12	Terrific 肉汤(TB)中 6 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白
13	Terrific 肉汤(TB)中 8 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白
14	Terrific 肉汤(TB)中 10 $\mu$ g 纯 his-标记的靶蛋白

表 3 指出了图 2 和 3 的每个泳道的样品组成。所有样品都应用于 HIS-Select™ HC 板(Sigma S5563), 其含有 50  $\mu$ l(图 2)或 100  $\mu$ l(图 3)2%OTG、20 mM Tris-Cl pH 7.5、2% 10mg/ml 溶菌酶、1% v/v 蛋白酶抑制剂混合物(Sigma,P8849)和 0.02%Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014)的干燥溶液。

表 4 光散射结果

样品	550nm 下吸收
未裂解的	0.3774
裂解后样品	0.0463
裂解后样品	0.0458

表 5 通过 Bradford 测定直接在孔中测定的每孔结合 HIS-Select™ HC 板的蛋白质质量

每孔装入的靶蛋白的量( $\mu$ g)	使用 Bradford 蛋白质测定每孔中结合的蛋白质的量( $\mu$ g/孔)					
	每孔中干燥的 50 $\mu$ l 溶液			每孔中干燥的 100 $\mu$ l 溶液		
	靶蛋白 加上粗 品大肠 杆菌	仅靶蛋 白	仅大肠 杆菌	靶蛋白 加上粗 品大肠 杆菌	仅靶蛋 白	仅大肠 杆菌
0	1.2	1.4	1.4	1.2	1.6	1.6
2	3.2	2.9	----	3.2	3.1	---
4	4.3	3.6	----	4.2	4.3	---
6	4.2	4.5	----	4.6	4.8	---

8	5.3	4.7	----	4.8	4.8	---
10	4.9	5.7	----	5.2	5.6	---

实施例 4 使用大容量和高灵敏度 HIS-Select™和 ANTI-FLAG®M2 板进行去污剂裂解、重组蛋白质的捕获和纯化

在该实施例中，用多种去污剂联合处理辅助剂裂解表达具有 DYKDDDDK (SEQ. ID. NO. 1)和/或 his 标记的靶蛋白的细菌细胞，并进一步纯化靶蛋白。

除非另外指出，所有材料都从 Sigma- Aldrich Corporation, St. Louis, MO 得到。

干燥裂解支持体。去污剂、处理试剂和酶的组合用于检查一系列裂解条件。制备含有下面成分的去污剂裂解溶液：

- a) 2%SB3-10, 0.2% C7BzO, 0.2%正十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷, 0.2% TritonX-100
- b) 2%CHAPS, 1% ASB-14
- c) 2% SB3-14, 0.2%C7BzO
- d) 2% CHAPS, 1%正辛基葡糖苷
- e) 2% SB3-12, 0.2%C7BzO
- f) 2% SB3-14, 0.2% ASB-14
- g) 1%正辛基葡糖苷, 1%CHAPS, 0.2%正十二烷基  $\alpha$ -D-麦芽糖苷
- h) 8% CHAPS

去污剂 CHAPS 为 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲基铵基]-1-丙烷磺酸盐；SB3-10 为 3-(十二烷基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐；SB3-12 为 3-(癸基二甲基铵基)丙烷磺酸内盐；SB3-14 为 3-(N,N-二甲基肉豆蔻基铵基)丙烷磺酸盐；C7BzO 为 3-(4-庚基)苯基 3-羟基丙基)二甲基铵基丙烷磺酸盐；ASB-14 为 3-[N,N-二甲基(3-肉豆蔻酰基氨基丙基)铵基]丙烷磺酸盐。前 7 种去污剂溶液(a-g)还含有 40 mM Tris-HCl, pH 7.4, 0.04%溶菌酶(Sigma L3790), 和 0.01% Benzonase®内切核酸酶(Sigma E1014)。8% CHAPS 溶液(h)还含

有 80 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.04%溶菌酶(Sigma L6876), 和 0.01% 脱氧核糖核酸酶 I(Sigma D4527)。将这些去污剂溶液的每一种 100  $\mu$ l 分配到 HIS-Select™ 高容量板 (Sigma M5563)、HIS-Select™ 高灵敏板 (Sigma S5688)、ANTI-FLAG®M2 高容量板和 ANTI-FLAG®M2 高灵敏板(Sigma P2983)的 6 个孔 (半排) 中。在培养箱中通过环境空气在板上流动过夜干燥裂解试剂。

**细胞生长。**向三只 15 ml 圆底管的每一只加入 5ml 无菌 terrific 肉汤 (TB)。向每管加入终浓度为 0.1 mg/ml 的氨苄青霉素。向第一管加入表达具有 DYKDDDDK (SEQ. ID. NO. 1)标记的靶蛋白的 BL21 大肠杆菌的甘油贮存液的 20  $\mu$ l 等分试样。向第二管加入表达具有 DYKDDDDK (SEQ. ID. NO. 1)/his 标记的靶蛋白的 BL21 大肠杆菌的甘油贮存液的 20  $\mu$ l 等分试样。向第三管加入表达具有 his 标记(如实施例 1 中描述)的靶蛋白的 BL21 大肠杆菌的甘油贮存液的 20  $\mu$ l 等分试样。以 275 转/分钟摇动下在 37°C 下过夜孵育培养物。

过夜生长的起始培养物用于接种三个 500 ml 高压灭菌的 terrific 肉汤样品。向每瓶加入终浓度 0.1 mg/ml 的氨苄青霉素。以 275 转/分钟摇动下在 37°C 下孵育培养物 4 小时。向培养物加入终浓度 1 mM 的异丙基  $\beta$ -D-1-硫代吡喃半乳糖苷(IPTG)以诱导靶蛋白表达。以 275 转/分钟摇动下在 37°C 再孵育培养物 3 小时。

**大肠杆菌样品。**向用裂解试剂的 200  $\mu$ l 等分试样涂布的每个板的两列加入生长在 500 ml 摇瓶中的表达重组蛋白质的大肠杆菌。空孔用作对照。温和摇动下在室温下孵育样品 2 小时。

**高灵敏板的酶免疫检测测定。**使用 BioTek 板洗涤器, 将孔用 TBS-T, pH 8.0 洗涤 4 次, 然后用去离子水洗涤 4 次。向每孔加入缀合辣根过氧化物酶(HRP)的对靶蛋白特异的抗体 200  $\mu$ l。向四个不含有蛋白质的其他孔中也加入这些缀合物, 所述孔用作空白。在室温下用抗体孵育板 45 分钟, 然后用 TBS-T, pH 8.0 洗涤 4 次。向每孔加入 100  $\mu$ l TMB 底物(Sigma T0440)并对板显影, 直到颜色明显(约 3-5 分钟)。此时, 通过向每孔加入

100  $\mu$ l 1M HCl 终止反应。在 450 nm 得到吸收读数，并扣除空白以确定校正的  $A_{450}$ 。

大容量板的 TCA 沉淀。使用 BioTek 板洗涤器，将孔用 TBS-T, pH 8.0 洗涤 4 次，然后用去离子水洗涤 4 次。向 HIS-Select™ 大容量板的每孔等分加入 50 mM 磷酸钠, pH 8.0, 300 mM NaCl 和 250 mM 咪唑的 100  $\mu$ l 溶液。将 100  $\mu$ l 0.1M 甘氨酸(pH 3.0)等分到 ANTI-FLAG®M2 的高容量板的每孔中。在 37°C 孵育板 20 分钟以洗脱靶蛋白。从板除去洗脱的样品并置于清洁管中。每个样品用 0.2% 脱氧胆酸钠溶液(Sigma D3691)稀释到终体积 500  $\mu$ l。将样品快速涡旋并在室温孵育 10 分钟。向每个样品加入 50  $\mu$ l 100% 三氯乙酸溶液(TCA)(Sigma T6323)，将它们短暂涡旋并置于冰上孵育 15 分钟。在室温以 15,000  $\times$  g 离心样品 10 分钟，并倒出上清液。向每管加入 500  $\mu$ l 25% 丙酮溶液(Sigma A5351)。将样品短暂涡旋并以 15,000  $\times$  g 离心 5 分钟。倒出上清液并在 SpeedVac 中 30°C 干燥蛋白质沉淀 20 分钟。

SDS-PAGE 分析。每种蛋白质重悬浮在 10  $\mu$ l Laemmli 样品缓冲液(Sigma S3401)中，用 1M NaOH 滴定到碱性 pH。整个样品通过 10-20% Tris-甘氨酸凝胶(BioRad 目录号 345-0044)电泳。凝胶用 EZ Blue™(Sigma G1041)凝胶染色试剂染色 1 小时，用去离子水过夜脱色。

结果和讨论。来自酶免疫检测测定法的校正的  $A_{450}$  读数表明在 HIS-Select™ 和 ANTI-FLAG®M2 高灵敏板上成功地捕获靶蛋白。多种去污剂制剂能够裂解细胞，允许捕获蛋白质。图 4 描绘了来自 ANTI-FLAG®M2 高灵敏板测定的校正的吸收值，其表明具有 DYKDDDDK (SEQ. ID. NO. 1) 标记的那些蛋白质被捕获，而没有 DYKDDDDK (SEQ. ID. NO. 1) 标记的那些蛋白质未被捕获。图 5 包含来自 HIS-Select™ 高灵敏板免疫检测测定的校正的吸收值，并且表明板能够选择性捕获 his-标记的靶蛋白，而不捕获无 his-标记的蛋白质。类似地，图 6 中的 SDS-PAGE 结果表明靶蛋白被成功捕获并从 HIS-Select™ 大容量板洗脱。从 ANTI-FLAG®M2 大容量板得到类似结果。表 6 指出了用于图

6 的每个泳道的所用试剂和样品的组成。

表 6 用于 SDS-PAGE 分析的裂解试剂和样品组成

泳道 编号	板中的裂解试剂	样品的组成
1	N/A	分子量标记(Sigma 产品 M3913)
2	N/A	10 $\mu$ l 表达~60kDa his 标记蛋白质的大肠杆菌细胞
3	1%SB 3-10, 0.1% C7BzO, 0.1%正十二烷基 $\alpha$ -D-麦芽糖苷, 0.1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02%溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
4	10%CHAPS, 0.5% ASB-14, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
5	1%SB 3-14, 0.1% C7BzO, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
6	1%CHAPS, 0.5%正-辛基葡糖苷, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
7	1%SB 3-12, 0.1% C7BzO, 20 mM	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup>

	Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	高容量板洗脱的样品
8	1%SB 3-14, 0.1% ABS-14, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
9	0.5%正-辛基葡糖苷, 0.5%CHAPS, 0.1% 正十二烷基 $\alpha$ -D-麦芽糖苷, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
10	4%CHAPS, 40 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.02%溶菌酶, 0.005% 脱氧核糖核酸酶 I(Sigma D4527)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
11	N/A	分子量标记(Sigma 产品 M3913)
12	N/A	10 $\mu$ l 表达~24kDa his 标记蛋白质的大肠杆菌细胞
13	1%SB 3-10, 0.1% C7BzO, 0.1%正十二烷基 $\alpha$ -D-麦芽糖苷, 0.1% Triton X-100, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02%溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品
14	10%CHAPS, 0.5% ASB-14, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶, 0.005%Benzonase <sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma	用咪唑从 HIS-Select <sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品

	<b>E1014)</b>	
<b>15</b>	<b>1%SB 3-14 , 0.1% C7BzO , 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶 , 0.005%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>16</b>	<b>1%CHAPS, 0.5%正-辛基葡糖苷, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶 , 0.005%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>17</b>	<b>1%SB 3-12 , 0.1% C7BzO , 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶 , 0.005%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>18</b>	<b>1%SB 3-14 , 0.1% ABS-14 , 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶 , 0.005%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>19</b>	<b>0.5%正-辛基葡糖苷, 0.5%CHAPS, 0.1% 正十二烷基 <math>\alpha</math>-D-麦芽糖苷, 20 mM Tris-HCl, pH7.4, 0.02% 溶菌酶 , 0.005%Benzonase<sup>®</sup> 内切核酸酶 (Sigma E1014)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>20</b>	<b>4%CHAPS, 40 mM Tris-HCl, pH8.0, 0.02%溶菌酶, 0.005% 脱氧核糖核酸酶 I(Sigma D4527)</b>	<b>用咪唑从 HIS-Select<sup>™</sup> 高容量板洗脱的样品</b>
<b>21</b>	<b>N/A</b>	<b>分子量标记(Sigma 产品 M3913)</b>

图 1

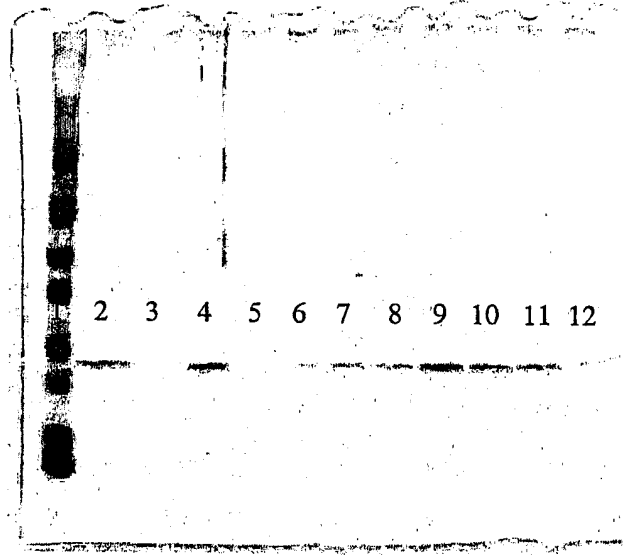


图 2

50  $\mu$ l 干燥裂解试剂的 SDS-PAGE

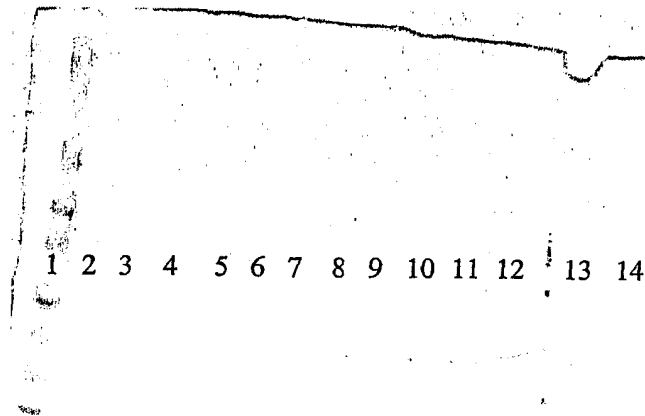




图 3

100  $\mu$ l 干燥裂解试剂的 SDS-PAGE

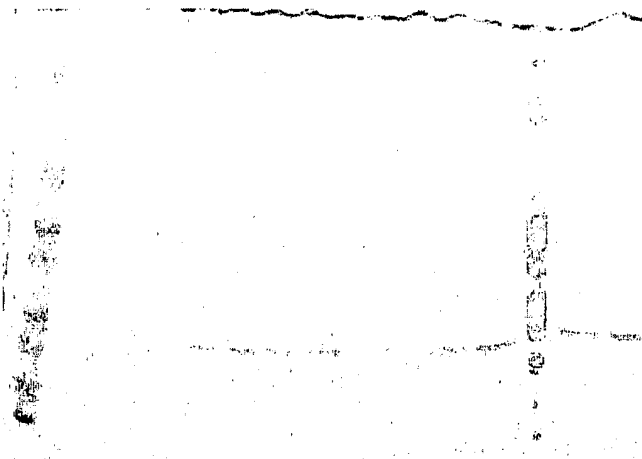


图 6

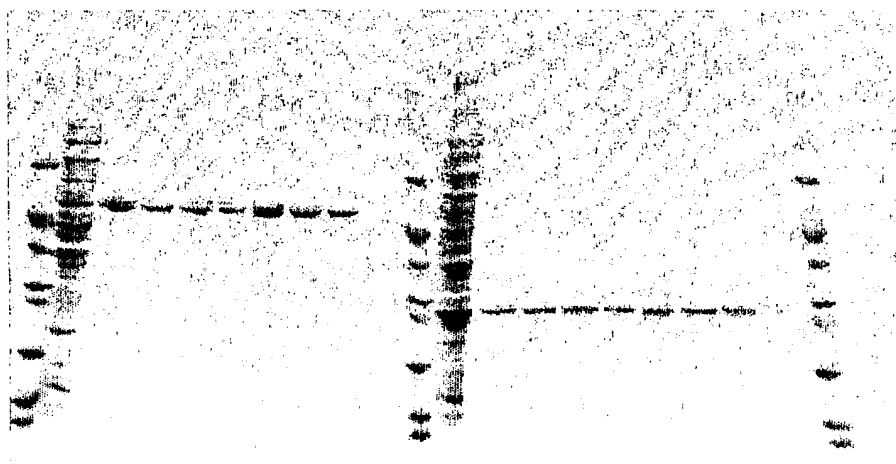


图 4

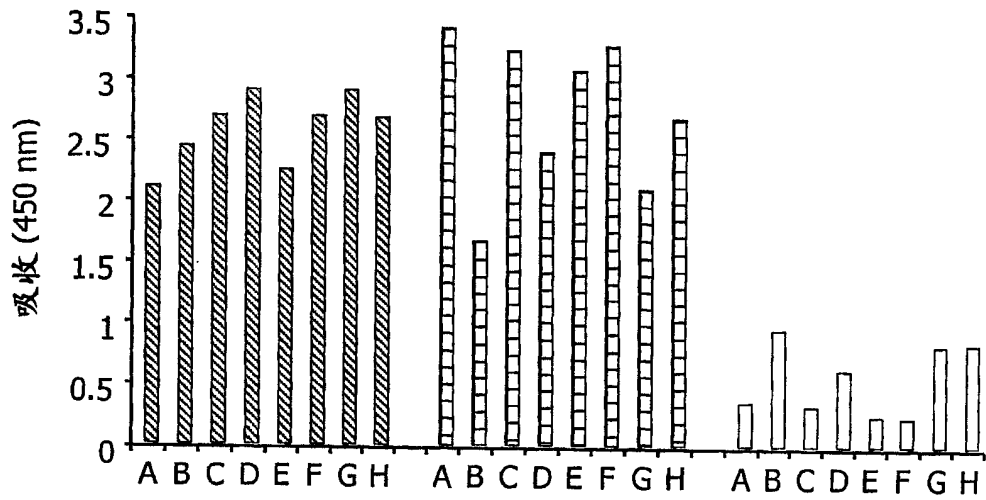


图 5

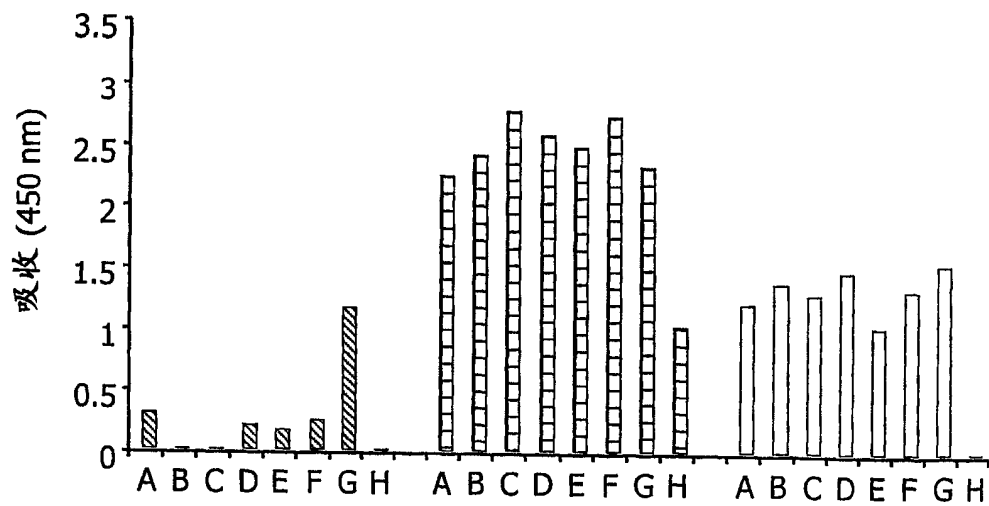


图 7

