



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104204799 A

(43) 申请公布日 2014. 12. 10

(21) 申请号 201380015407. 5

C12Q 1/00 (2006. 01)

(22) 申请日 2013. 02. 06

G01N 33/573 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/595, 459 2012. 02. 06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CA2013/000107 2013. 02. 06

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/116931 EN 2013. 08. 15

(71) 申请人 珀金埃尔默生物信号股份有限公司

地址 加拿大魁北克省

(72) 发明人 P. 罗比 B. 伯恩德 S. 达汉

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 贾静环

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

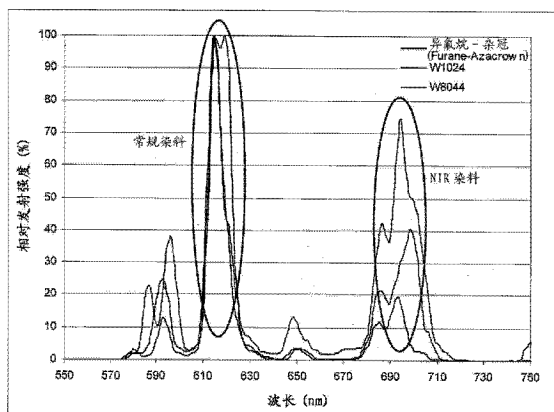
权利要求书2页 说明书22页 附图13页

(54) 发明名称

双受体时间分辨时间分辨荧光共振能量转移法

(57) 摘要

本发明提供了使用双受体时间分辨荧光共振能量转移法确定样品中是否存在多种分析物的方法。



1. 确定样品中是否独立存在两种分析物的方法,其包括:

使所述样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中所述的第一和第二分析物特异性的结合配体分别与镧系元素螯合物部分配合;

使所述样品暴露于能够激发所述第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物的镧系元素的波长范围内的光;和

独立确定是否所述第一分析物特异性的结合配体和所述第二分析物特异性的结合配体分别结合所述第一分析物和所述第二分析物,从而确定所述样品中是否独立存在所述两种分析物。

2. 确定酶对两种不同的底物是否具有活性的方法,其包括:

提供包含两种不同底物的样品;

在足以由所述第一底物产生第一分析物并且由所述第二底物产生第二分析物的条件下,使所述样品和酶接触;

使所述样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中所述第一和第二分析物特异性的结合配体分别和镧系元素螯合物部分配合;

使所述样品暴露于能够激发所述第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物的镧系元素的波长范围内的光;以及

独立确定所述第一分析物特异性的结合配体和所述第二分析物特异性的结合配体是否分别结合所述第一分析物和所述第二分析物,由此确定所述酶是否对所述第一底物和所述第二底物具有活性。

3. 确定两种酶是否独立地对底物具有活性的方法,其包括:

提供包含底物的样品;

在足以使用第一酶产生第一分析物并且使用第二酶产生第二分析物的条件下使所述样品和两种不同的酶接触;

使所述样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中所述第一和第二分析物特异性的结合配体分别和镧系元素螯合物部分配合;

使所述样品暴露于能够激发所述第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物的镧系元素的波长范围内的光;以及

独立确定是否所述第一分析物特异性的结合配体和所述第二分析物特异性的结合配体分别结合所述第一分析物和所述第二分析物,从而独立确定所述第一酶和所述第二酶对所述底物的活性。

4. 确定样品中是否独立存在两种分析物的方法,其包括:

使所述样品接触结合有第一荧光能量共振转移(FRET)受体的第一分析物特异性的结合配体、结合有第二FRET受体的第二分析物特异性的结合配体和具有镧系元素螯合物部分的化合物;

使所述样品暴露于能够激发所述第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物的镧系元素的波长范围内的光;以及

独立确定是否所述第一分析物特异性的结合配体和所述第二分析物特异性的结合配体分别结合所述第一分析物和所述第二分析物,从而确定所述样品中是否独立存在所述两种分析物。

5. 确定两种酶是否独立地对底物具有活性的方法,其包括:
提供包含底物的样品,其中所述底物标记有亲和性标记物;
在足以使用第一酶产生第一分析物并且使用第二酶产生第二分析物的条件下使所述样品和两种不同的酶接触;
使所述样品接触具有镧系元素螯合物部分的亲和性标记物特异性的结合配体;
使所述样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中所述第一和第二分析物特异性的结合配体分别配合于检测部分,其中之一能够被波长为约 600 ~ 635nm 的光所激发,而另一检测部分能够被波长为约 675 ~ 715nm 的光所激发;
使所述样品暴露于能够激发所述螯合物中的镧系元素的波长范围内的光;以及
独立确定是否所述第一分析物特异性的结合配体和所述第二分析物特异性的结合配体分别结合所述第一分析物和所述第二分析物,从而独立地确定所述第一酶和所述第二酶对所述底物的活性。
6. 权利要求 1 ~ 3 所述的方法,其中在所述两个螯合物部分中的镧系元素是相同的。
7. 权利要求 1 ~ 3 所述的方法,其中所述经配合的螯合物部分在两个结合配体中是相同的。
8. 权利要求 1 ~ 3 所述的方法,其中所述第一和第二分析物分别独立地配合于检测部分。
9. 权利要求 8 所述的方法,其中所述检测部分之一能够被波长为约 600 ~ 635nm 的光所激发,而另一检测部分能够被波长为约 675 ~ 715nm 的光所激发。
10. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中所述镧系元素选自自由镧、铽、钆和铈组成的组。
11. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中使所述样品暴露于波长为约 315 ~ 350nm 的光。
12. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中使所述样品暴露于波长为约 320 ~ 340nm 的光。
13. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中确定所述第一分析物特异性的结合配体是否结合所述第一分析物包括检测波长为约 655 ~ 675nm 的发射光。
14. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中确定所述第二分析物特异性的结合配体是否结合所述第二分析物包括检测波长为约 715 ~ 740nm 的发射光。
15. 权利要求 1 ~ 5 的方法,其中所述第一和第二分析物特异性的结合配体分别包括分析物结合分子。
16. 权利要求 1 ~ 5 所述的方法,其中所述样品对可见光是不透明的。
17. 权利要求 1 ~ 5 所述的方法,其中所述样品包括纯化分子、膜、组织提取液、血液(以及包含血清和血浆的血液衍生物)、细胞溶解产物和细胞培养上清液,以及其它生物流体(脑脊液、尿)。
18. 权利要求 4 所述的方法,其中所述第一和第二分析物分别包括亲和性标记物,并且具有镧系元素螯合物部分的所述化合物进一步包括亲和性标记物特异性的结合配体。

双受体时间分辨时间分辨荧光共振能量转移法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2012 年 2 月 6 日提交的第 61/595,459 号美国申请的权益,这里通过引用将其全部内容并入本文。

技术领域

[0003] 本发明涉及利用时间分辨荧光共振能量转移法 (time-resolved fluorescence resonance energy transfer) 确定样品中是否存在两种或多种分析物的多重分析 (multiplex assays)。

背景技术

[0004] 时间分辨荧光共振能量转移法 (TR-FRET) 的应用的基础是供体 (donor) 分子和受体 (acceptor) 分子之间的能量传递。FRET 是从荧光供体分子至合适的受体分子的非辐射能量的转移。当光源激发供体分子时,就会产生荧光。如果紧邻受体分子且供体分子的发射光谱和受体分子的激发光谱重叠,那么供体分子能够将其激发能量转移至受体分子,而不是发射荧光。之后,受体分析会在受体发射波长下发射荧光。在受体发射波长下出现荧光表明供体和受体分子彼此紧邻,这是因为供体和受体分子需相距小于约 20nm,例如相距 5 ~ 10nm,才能发生能量转移。通常,通过生物亲和性相互作用,例如通过蛋白质-蛋白质结合、抗原-抗体结合、配体-受体结合、DNA 杂交和 DNA-蛋白质结合,来实现供体和受体分子的接近。

[0005] 存在种类繁多的供体和受体分子。通常,用于 FRET 分析中的供体和受体分子是半衰期短的荧光基团。来自样品组分 (例如缓冲液、蛋白质、化合物和细胞溶胞产物) 的背景荧光能降低常规 FRET 化学的性能。针对这种会降低分析灵敏度,并且使结果分析复杂化的自发荧光 (auto-fluorescence),必须对检测到的荧光强度进行校正。这种类型的背景荧光是瞬时的 (具有在纳秒范围内的寿命),因此可使用时间分辨方法来消除。

[0006] TR-FRET 利用镧系元素的离子例如铕 (Eu)、铽 (Tb)、钐 (Sm)、镝 (Dy) 的离子的特有性质。由于其特定的光物理和光谱性质,稀土离子的络合物对生物学中的荧光应用来说是感兴趣的。具体而言,相对于更常见的荧光基团,它们具有大的斯托克斯位移 (Stoke's shifts) 和长的发射半衰期 (从微秒至毫秒)。

[0007] 通过直接激发难以产生镧系元素离子的荧光,这是因为这些离子吸收光的能力较差。镧系元素必须先与能捕 (harvest) 光并通过分子内的非辐射过程将光转移至镧系元素的有机部分 (organic moieties) 络合。稀土元素的螯合物和穴合物是捕光部分 (light-harvesting moieties) 的实例。所收集的能量被转移至稀土离子,然后发射其特征性的长寿命荧光。镧系元素螯合物通常还具有高量子产率,从而使少量供体产生光亮信号,进而提高了灵敏度。此外,它们的发射峰相当窄,从而对受体发射光的干扰很小。用于技术平台的重要金属之一是铕 (在约 315 ~ 350nm 的波长下激发,而在约 600 ~ 635nm 的波长下发射)。

发明内容

[0008] 本发明至少部分地基于 TR-FRET 的新方法。镧的螯合物在至少一个波长下发射能量。在忽略不明显的峰的情况下,其具有两个主要的发射峰:一个峰在约 600 ~ 635nm 处,而另一个在约 675 ~ 715nm 处(图 1)。该观测结果增大了存在于 TR-FRET 分析中的具有两种的受体分子的概率:其中一种与 600 ~ 635nm 的发射峰相互作用,和另一种与 675 ~ 715nm 的发射峰相互作用。因此,镧系元素螯合物受体使得能够进行两个同步的分析以检测样品中的两种分析物或变体(modification)。

[0009] 一方面,本发明提供了确定样品中是否独立存在两种分析物的方法。该方法包括使样品接触第一分析物特异性的结合配体(analyte-specific binding partner)和第二分析物特异性的结合配体,其中该第一和第二分析物特异性的结合配体分别配合(conjugate)至镧系元素螯合物部分(lanthanide chelate moiety);使样品暴露于能够激发第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物(chelate)的镧系元素的波长范围内的光;以及,独立确定第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体是否分别结合第一分析物和第二分析物,由此确定样品中的这两种分析物是否独立存在。

[0010] 另一方面,本发明特征在于确定酶对两种不同的底物是否具有活性的方法。该方法包括提供包含两种不同底物的样品;在足以从第一底物中产生第一分析物且从第二底物中产生第二分析物的条件下,使该样品和酶接触;使该样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中第一和第二分析物特异性的结合配体分别配合镧系元素螯合物部分;使样品暴露于能够激发第一和第二分析物特异性的结合配体中螯合物的镧系元素的波长范围内的光;以及,独立地确定第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体是否分别结合第一分析物和第二分析物,由此确定所述酶是否对第一和第二底物具有活性。

[0011] 又一方面,本发明提供了确定两种酶是否独立地对底物具有活性的方法。该方法包括:提供包含底物的样品;在足以用第一酶产生第一分析物和用第二酶产生第二分析物的条件下,使样品接触两种不同的酶;使样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中第一和第二分析物特异性的结合配体分别配合镧系元素螯合物部分;使样品暴露于能够激发第一和第二分析物特异性的结合配体中的螯合物的镧系元素的波长范围内的光;以及,独立地确定第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体是否分别结合第一分析物和第二分析物,由此独立地确定第一和第二酶对底物的活性。

[0012] 一方面,本发明特征在于确定样品中是否独立存在两种分析物的方法。该方法可以包括使该样品接触结合第一荧光能量共振转移(fluorescence energy resonance transfer)(FRET)受体的第一分析物特异性的结合配体、结合第二 FRET 受体的第二分析物特异性的结合配体和包含镧系螯合物部分的化合物;使样品暴露于能够激发螯合物中的镧系元素的波长范围内的光;以及,独立地确定第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体分别结合第一分析物和第二分析物,由此检测样品中是否独立存在这两种分析物。在一些实施方式中,第一和第二分析物分别包含亲和性标记物,而含镧系元素螯合物部分的化合物进一步包括亲和性标记物特异性的结合配体。

[0013] 又一方面,本文描述了确定两种酶是否独立地对底物具有活性的方法。该方法包括:提供包含底物的样品,其中该底物标记有亲和性标记物;在足以用第一酶产生第一分析物和用第二酶产生第二分析物条件下,使该样品接触两种不同的酶;使该样品接触具有镧系元素螯合物部分的亲和性标记物特异性的结合配体;使该样品接触第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体,其中第一和第二分析物特异性的结合配体分别配合能够由波长为约 600 ~ 635nm 的光激发的检测部分和能够由波长为约 675 ~ 715nm 的光激发的另一检测部分;使该样品暴露于能够激发螯合物中镧系元素的波长范围内的光;以及,独立地确定第一分析物特异性的结合配体和第二分析物特异性的结合配体是否分别结合第一分析物和第二分析物,由此独立地确定第一和第二酶对底物的活性。

[0014] 在一些实施方式中,两种螯合物部分的镧系元素是相同的。在一个实施方式中,经配合的螯合物部分 (conjugated chelate moiety) 在两种结合配体中是相同的。能够使用任何合适的镧系元素螯合物部分。在一些实施方式中,螯合物部分可以选自吡啶、联吡啶、三吡啶、水杨酸、香豆素衍生物、菲咯啉 (phenanthroline) 和吡啶衍生物 (Hemmilä et al., J Fluoresc 15:529 ~ 42, 2005, 通过引用将其并入本文)。

[0015] 在一些实施方式中,第一和第二分析物分别独立地配合检测部分。在一些实施方式中,检测部分是 FRET 受体。在一个实施方式中,检测部分中的一种能够由波长为约 600 ~ 635nm (例如 600 ~ 610nm、605 ~ 615nm、610 ~ 620nm、615 ~ 625nm、620 ~ 635nm、625 ~ 635nm) 的光激发,而检测部分中的另一种能够由波长为约 675 ~ 715nm (例如 675 ~ 685nm、685 ~ 695nm、690 ~ 700nm、695 ~ 705nm、690 ~ 710nm、700 ~ 710nm、700 ~ 715nm、705 ~ 715nm) 的光激发。

[0016] 在一些实施方式中,镧系元素选自铈、铽、钆和镱。

[0017] 在一些实施方式中,使样品暴露于波长为约 275 ~ 350nm 的光。在一些实施方式中,使样品暴露于波长为约 315 ~ 350nm (例如 315 ~ 320nm、315 ~ 325nm、320 ~ 330nm、325 ~ 335nm、330 ~ 340nm、320 ~ 340nm、325 ~ 340nm、330 ~ 340nm、325 ~ 345nm、330 ~ 345nm、335 ~ 345nm、340 ~ 350nm) 的光。

[0018] 在一些实施方式中,确定第一分析物特异性的结合配体是否结合第一分析物包括检测波长为约 650 ~ 680nm (例如 655 ~ 665nm、655 ~ 670nm、660 ~ 670nm、660 ~ 675nm、665 ~ 675nm) 的发射光。

[0019] 在一些实施方式中,确定第二分析物特异性的结合配体是否结合第二分析物包括检测波长为约 715 ~ 750nm (例如 715 ~ 725nm、715 ~ 730nm、720 ~ 730nm、720 ~ 735nm、725 ~ 735nm、725 ~ 740nm、730 ~ 740nm) 的发射光。

[0020] 在一些实施方式中,第一和第二分析物特异性的结合配体分别包括分析物结合分子。

[0021] 在一些实施方式中,样品对于可见光是不透明的。在一些实施方式中,样品包括纯化分子、膜、组织提取液、血液 (以及包含血清和血浆的血液衍生物)、细胞溶解物 (cell lysates) 和细胞培养上清液,以及其它生物流体 (脑脊液、尿)。

附图说明

[0022] 图 1 示出了铈螯合物的发射光谱图。

[0023] 图 2 示出了使用两种标记有不同受体分子 (ULight 和 NIR- 染料) 的肽进行分析的示意图。

[0024] 图 3 示出了使用两种分别标记有不同的受体分子 (ULight 和 NIR- 染料) 的抗体和靶肽进行分析的示意图。

[0025] 图 4 示出了多重 TR-FRET 分析后的原理示意图。

[0026] 图 5A 和图 5B 示出了由单重检测分析得到的信号检测的线图。

[0027] 图 6 示出了由多重检测分析得到的信号检测的线图。

[0028] 图 7A 和图 7B 示出了由使用单酶 (single enzyme) 的多重检测分析、酶滴定得到的信号检测的线图。

[0029] 图 8A 和 8B 示出了由使用单酶的多重检测分析、辅因子滴定得到的信号检测的线图。

[0030] 图 9 示出了由多重的双酶辅因子滴定分析得到的信号检测的线图。

[0031] 图 10A 和 10B 是示出了由使用单酶的多重检测分析、抑制剂滴定得到的信号检测的线图。

[0032] 图 11 示出了由使用双酶的多重检测分析、抑制剂滴定得到的信号检测的线图。

[0033] 图 12 是示出了由用于确定 Z' 值的使用双酶的多重检测分析得到的信号检测的散点图。

[0034] 除非另有声明, 本文所使用的所有技术和科学术语具有和本发明所属技术领域的技术人员所通常理解的含义。本文描述了用于本发明的方法和材料; 还可以使用本领域已知的其它合适的方法和材料。这些材料、方法和实例仅是示例性的, 而不希望是限定性的。本文所提及的所有出版物、专利申请、专利、序列列表、数据库项 (database entry) 和其它引用文献通过引用以其整体并入。

[0035] 发明详述

[0036] 使用现有的 FRET 技术测量样品中的多种分析物在技术难度上具有挑战性。为了测量样品中多于一种的分析物, 通常会需要使用多对供体和受体分子。这就产生了对多个激发波长的需要和潜在的涉及峰重叠和串扰的复杂分析。受到同一波长激发时会发出两种不同发射峰的单供体分子和双受体分子的组合使得能够在单一样品中同时检测两种分析物, 从而降低了复杂性、节省了试剂和节约了时间。

[0037] 通常在 TR-FRET 中, 镧系元素螯合物 (例如包括镧系元素的离子, 例如铈离子、铽离子、钐离子或镱离子的螯合物) 在约 315 ~ 350nm (例如 320 ~ 340nm) 被激发以产生约 600 ~ 635nm (例如 610 ~ 620nm) 的光。该能量能够被转移至紧邻 (例如 1 ~ 20nm) 的受体分子。然后, 该受体分子在约 655 ~ 675nm (例如 660 ~ 670nm) 发出荧光。

[0038] 在约 315 ~ 350nm (例如 320 ~ 340nm) 激发的铈螯合物还发出约 675 ~ 715nm (例如 680 ~ 710nm) 的光。通过使用在约 675 ~ 715nm (例如 680 ~ 710nm) 吸收并且在约 715 ~ 740nm (例如 720 ~ 730nm) 发射的受体分子, 尽管使用单螯合物也能够产生第二种发光颜色。这使得能够在样品中对两种样品加以测量, 并还产生约 715 ~ 740nm 的极具穿透性的光, 能够在不透明的样品 (例如含纯化分子的样品、膜、组织提取物、血液 (以及包含血清和血浆的血液衍生物)、细胞溶解物和细胞培养上清液, 以及其它生物流体 (例如脑脊髓流体、尿)) 中读取所述光。

[0039] 在不透明的介质中实施 TR-FRET 是复杂的,因为在常规 TR-FRET 所发出的光穿不透这些介质。然而,约 715 ~ 740nm(例如 720 ~ 730nm)的发射光在这些波长下是高穿透性的。此外,大于 675nm(例如约 675 ~ 715 和约 715 ~ 740nm 的发射光)的发射波长在常见化合物中是罕见的,因此降低了在利用镧系元素(例如铈、铽、钐和镱)的螯合物的第二主发射峰所进行的分析中产生干扰的风险。如果存在干扰问题,那么第二波长是分析中的潜在对照。

[0040] 荧光共振能量转移

[0041] 在一些实施方式中,本文所述方法使用检测两种或更多种分析物的基于 FRET 的同质分析(homogenous assays)。基于 FRET 的分析记载于第 5,981,200 号美国专利,这里通过引用将其并入本文。FRET 需要至少两种染料分子:充当 FRET 供体的第一染料和充当 FRET 受体的第二染料。通常,FRET 供体为能量供体,而 FRET 受体为能量受体。FRET 是在 FRET 供体和 FRET 受体之间发生的能量转移(下文将作详细描述),并且是在所谓的 FRET 分析期间测得的信号。

[0042] 具有合适的发射和激发光谱的彼此紧邻的荧光分子能够进行 FRET。该过程如下:首先,例如使用皮秒激光脉冲激发 FRET 供体,并通过吸收光子形式的能量使其从基态转化成激发态。第二,FRET 供体以荧光形式发出这种刚吸收的能量。第三,如果受激发的供体分子足够接近合适的受体分子,那么就能以荧光的形式将激发态从供体转移至受体。这种能量转移称作 FRET。第四,FRET 导致供体的荧光或发光减弱,并且如果受体本身是发光的,那么 FRET 就会导致受体的发光增强。使用 FRET 检测系统可测量由受体所发出的光,并且所述光和 FRET 是成比例的。因此,所采集的信息可被用于定性和定量分析。在一些实施方式中,从供体所发出的光和从受体所发出的光是不同波长的光。

[0043] FRET 的效率,即当能量从供体染料转移至受体染料时所产生的信号,取决于供体染料和受体染料间的距离($1/d$),并且只有当供体和受体是紧密靠近时 FRET 才会发生。信号减弱正比于分隔距离的六次幂。因此,FRET 测量了与距离相关的相互作用(distance-dependent interactions)。使用 FRET 所作的测量是在约 1 ~ 20nm 的范围内。

[0044] 因此,如本文所使用的,相互作用是指能够由 FRET 测量方法所检测到的分子之间的距离变化。为了检测这种相互作用,必须使 FRET 供体和 FRET 受体配合至一个或多个分子并且一个或多个分子间的相互作用导致 FRET 供体和 FRET 受体间的距离的变化。

[0045] 在一些实施方式中,FRET 可以包括但不限于(A)以结合对的形式结合不同分子的 FRET 供体和 FRET 受体;(B)结合单一分子内的不同区域的 FRET 供体和 FRET 受体;和(C)结合三元络合物中的两个不同分子的 FRET 供体和 FRET 受体。然而,在(C)中,FRET 供体和 FRET 受体所依附的两个不同分子必须以在供体和受体之间能够发生有效的能量转移的方式络合。

[0046] 因此,FRET 能够呈现出(A)来自 FRET 供体的荧光信号强度的减弱;(B)FRET 供体的激发态寿命的缩短;和/或(C)通常在表示受体特征的较长波长(较低能量)下的荧光的再发射。

[0047] 能够选择能量受体,使得它们抑制由供体所释放的被称为猝灭剂(quencher)的能量;或者使得 FRET 受体自身能够发出荧光能量,即它们发出荧光。该能量受体被称为荧光基团(fluorophore group)或荧光基团(fluorophore)。金属络合物适合作为荧光能量

供体和荧光能量受体。被选择用于 FRET 的荧光基团通常是明亮的 (bright) 并在 $10^{-9} \sim 10^{-4}$ 秒的时标 (timescale) 范围出现。这样的亮度和时标使得 FRET 的检测变得容易, 并允许使用多种检测方法。

[0048] 在一些实施方式中, 基于以下中的一种或多种 (包括全部) 选择 FRET 供体和 FRET 受体: (1) FRET 供体的发射光谱应与 FRET 受体的激发光谱重叠; (2) FRET 配体 (即 FRET 供体和 FRET 受体) 的发射光谱应表现出非重叠的荧光性; (3) FRET 的量子产率 (即从 FRET 供体转移至 FRET 受体的能量) 应尽可能高 (例如 FRET 在整个的 $1 \sim 20\text{nm}$ (例如 $5 \sim 10\text{nm}$) 的测量距离内应具有约 $1 \sim 100\%$ (例如 30% 、 40% 、 50% 、 60% 、 70% 、 80% 、 85% 、 90% 、 95% 、 98% 和 99%) 的效率); (4) FRET 信号 (即荧光) 必须区别于样品所产生的荧光 (例如自发荧光); 以及 (5) FRET 供体和 FRET 受体应具有便于进行 FRET 信号检测的半衰期 (例如 FRET 可以是明亮的并可以以范围为 $10^{-9} \sim 10^{-4}$ 的时间度标进行, 如上所述)。

[0049] 任何在约 $600 \sim 635\text{nm}$ 或约 $675 \sim 715\text{nm}$ 激发的 FRET 受体可以用于本发明的方法。在一些实施方式中, 使用 **ULight**[®], 以及在近红外波长范围内激发的 FRET 受体。熟练的从业者会鉴别可供使用的众多市售的 FRET 受体, 例如可商购于 PerkinElmer 的 FRET 受体 (例如 **LANCE**[®] 产品)、可商购于 Invitrogen 的 FRET 受体 (例如 **LanthaScreen**[®] 产品) 和可商购于 Cisbio Bioassays 的 FRET 受体 (例如 **HTRF**[®] 产品)。

[0050] 在一些实施方式中, 基于表 1 中所列出的荧光基团中的一种或多种来选择 FRET 供体和 FRET 受体。

[0051] 表 1: FRET 分子的实例

[0052]

荧光基团	激发 (nm)	发射 (nm)
5-羧基萘基荧光素 (5-carboxynaphthofluorescein)	512/598	563/668
5-ROX (羧基-X-罗丹明)	578 567	604 591
Alexa Fluor 568 TM	577	603
Alexa Fluor 594 TM	590 594	617 618
Alexa Fluor 633 TM	632	650
Alexa Fluor 647 TM	647	666
Alexa Fluor 660 TM	668	698
Alexa Fluor 680 TM	679	702
别藻蓝蛋白(Allophycocyanin)(APC)	630~645	655~665
APC~Cy7	625~650	755
BOBO TM ~3	570	602
Bodipy	492~591	509~676
Bodipy TR	589	617
Bodipy TR ATP	591	620
Calcium Crimson TM	588 589	611 615
羧基-X-罗丹明 (5-ROX)	576	601
Cy3.5 TM	581	598
Cy5.1 8	649	666
Cy5.5 TM	675	695
Cy5 TM	649	666
Cy7 TM 710, 743 767, 805	710 743	767 805
镉	305~335	465~495 565~595
铕	315~350	600~635 675~715
氯化铕(III)	315~350	600~635 675~715
FL-645	615~625	665
Fura Red TM (高 pH)	572	657
LaserPro	795	812
钆	325~355	475~505 545~575 585~615 630~660
SureLight [®]	640~660	660~680
铽	305~335	475~505 530~560 570~600 605~635
Texas Red TM	595	620
Texas Red-X TM 偶联物	595	615
硫代二碳菁(DiSC3)	651 653	674 675

[0053]

噻嗪红 R	596	615
TO-PRO-1	515	531
TO-PRO-3	644	657
TO-PRO-5	747	770
TOTO-3	642	660
ULight [®]	630~655	655~675
Ultralite	656	678
X-罗丹明	580	605
XRITC	582	601
YO-PRO-3	613	629

[0054] 当选择 FRET 供体和 FRET 受体的组合时还可能考虑以下内容。

[0055] 第 5,998,146 号美国专利（此处通过应用并入本文）描述了镧系元素螯合物，特别是结合有荧光基团或猝灭剂的铈和铽的络合物的应用。该专利还记载了寿命长的镧系元素螯合物的性质。

[0056] 本领域已知有基于作为能量供体的金属络合物和来自作为能量受体的藻胆蛋白类 (phycobiliprotein) 的染料的 FRET 体系 (EP 76695; Hemmilae, Chemical Analysis 117, John Wiley&Sons, Inc., (1991) 135 ~ 139)。已建立的商业体系（例如来自 Wallac, OY 或 Cis Bio Packard）使用由作为金属络合物的镧系元素螯合物和藻胆蛋白组成的 FRET 对。

[0057] 镧系元素螯合物，特别是铈或铽的络合物的性质是已知的，并能够和猝灭剂以及荧光基团结合使用。

[0058] 钆络合物本身用作特别是电化学发光的荧光基团或发光基团。例如从 EP 178 450 和 EP 772 616 中获知的钆 - 螯合物，EP 178 450 和 EP 772 616 还描述了用于将这些络合物配合至生物分子的方法。在 EP 178 450 和 EP 772 616 中没有讨论钆 - 螯合物在 FRET 体系中作为能量供体的用途。

[0059] 别藻蓝蛋白具有像异常高的消光系数（约 700000L/M cm）以及极其高的发射系数这样的特性。这些是在 FRET 体系中作为荧光基团受体的先决条件。此外，已知这些染料是易于溶于水的且稳定的。

[0060] 术语小分子量荧光基团是指分子量在 300 ~ 3000Da 之间的荧光性染料。就重要的特性而言，这样的小分子的荧光性基团，例如咕吨 (xanthene)、花青苷、罗丹明和噻嗪相比于 APC 具有明显的缺点。因此，举例来说，它们的消光系数明显更低且在约 100000L/M cm 的量级上。

[0061] 用于标记 FRET 分子的方法是本领域已知的。例如，能够直接或间接地（例如借助标记物或利用抗生物素蛋白 - 抗生物素蛋白链菌素 (avidin-streptavidin) 的相互作用）标记结合配体，正如 Yang et al., Analytical Biochemistry 351:158 ~ 160, 2006 中所记载的，此处通过引用将其并入本文。在一些实施方式中，能够直接标记结合配体。用于直接标记结合结构单元 (bonding member) 的方法是本领域已知的。这些方法包括使用 FRET 供体和 FRET 受体标记这些分子。通常，在 100 μM 的碳酸氢盐缓冲液 (pH 8.3) 中可以将结合配体，例如蛋白质配置成约 1.0mg/ml 的最终蛋白质浓度。然后，该溶液可以和所需的标记物混合，并在室温下培养约 1 小时。然后，使用微柱 (micro column) 可以从分子例如（蛋

白质)中分离未引入的标记物。

[0062] TR-FRET

[0063] 在一些实施方式中,本发明的方法和分析利用同质 TR-FRET 分析技术。TR-FRET 是时间分辨荧光法 (TRF) 和 FRET 的结合。TRF 通过推迟读取荧光信号 (例如推迟约 10 纳秒) 的方式降低背景荧光。凭借这种延迟 (即选通周期 (gating period)), 测量了样品中持续时间更长荧光。因此,在使用 TR-FRET 时,不是共检测干扰性背景荧光 (其例如可来源于样品中的干扰物质),而是只测量由能量转移所产生或抑制的荧光。借助于合适的测量装置来确定所产生的 TR-FRET 体系的荧光。这样的时间分辨检测系统使用例如脉冲激光二极管、发光二极管 (LED) 或脉冲染料激光器作为激发光源。在合适的时间延迟后、即在干预背景信号已被延迟后进行测量。现有技术描述了用于确定时间分辨 FRET 信号的装置和方法。

[0064] 该技术要求目标信号必须对应于荧光寿命长的化合物。这样的长寿命的荧光化合物为稀土镧系元素的化合物。例如, Eu^{3+} 具有毫秒级的荧光寿命。

[0065] 如上所述,TR-FRET 需要 FRET 供体和 FRET 受体。对于 FRET,能够基于以下要求中的一个或多个 (包括全部) 选择 TR-FRET 供体和受体对:(1)FRET 供体的发射光谱应该和 FRET 受体的激发光谱重叠;(2)FRET 配体 (即 FRET 供体和 FRET 受体) 的发射光谱应该表现出非重叠的荧光;(3)FRET 的量子产率 (即从 FRET 供体转移至 FRET 受体的能量) 应该尽可能高 (例如,在整个 1 ~ 20nm、例如 5 ~ 10nm 的测量距离,FRET 应该具有约 1 ~ 100%、例如 30%、40%、50%、60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%和 99%的效率);(4)FRET 信号 (即荧光) 必须区别于由样品所产生的荧光 (例如自发荧光);和 (5)FRET 供体和 FRET 受体应该具有允许对 FRET 信号进行检测 (例如,FRET 可以是明亮的并且可以在 10 ~ 9 ~ 10 ~ 4 秒的时间度标内进行) 的半衰期。

[0066] 在一些实施方式中,可以基于表 1 中列出的荧光基团中的一种或多种选择 TR-FRET 供体和 TR-FRET 受体。

[0067] 在一些实施方式中,TR-FRET 供体可以是镧系元素离子,例如结合螯合物的镧系元素离子。在一些实施方式中,镧系元素离子可以为铈离子、铽离子、钇离子或镱离子。正如本文所使用的, Eu 包括 Eu 和全部的 Eu 离子 (例如 Eu^{3+})。在一些实施方式中,TR-FRET 可以为 DsRed。在一些实施方式中,TR-FRET 可以为 Ri2。应当理解选择合适的 TR-FRET 供体需要考虑上述列出的标准和所选的具体 TR-FRET 受体。

[0068] 在一些实施方式中 TR-FRET 受体可以选自荧光素、Cy5、别藻蓝蛋白 (APC- 例如 XL665、d2 和 BG-647) 和荧光蛋白 (例如 GFP、CFP、YFP、BFP、RFP 和其它 GFP 变体)。

[0069] 在一些实施方式中,TR-FRET 供体可以是铽,而 TR-FRET 受体可以是荧光素。在一些实施方式中,TR-FRET 供体可以是 Eu,而 TR-FRET 受体可以是 Cy5 或 APC (例如 XL665、d2、BG-647 和 Cy5 相关的 TR-FRET 受体)。

[0070] 在一些实施方式中,TR-FRET 供体和 TR-FRET 受体可以和另一种增强 TR-FRET 供体和 / 或 TR-FRET 受体的功能的化合物相结合。例如,TR-FRET 供体和 TR-FRET 受体可以和封装穴合物 (cryptate encapsulation) 相结合以延长荧光基团的半衰期。任选地或附加地,TR-FRET 供体和 TR-FRET 受体可以和例如 DELFIA[®] 增强系统相结合。在一些实施方式中,TR-FRET 供体和 TR-FRET 受体可以和例如增强或延长 TR-FRET 信号寿命或检测的缓冲液、盐、增强剂 (enhancer)、螯合物或稳定剂 (例如光稳定剂) 相结合。

[0071] 在上述筛选分析中还可以包括多种其它试剂。这些包括试剂,如盐、中性蛋白质(例如白蛋白、洗涤剂),其可以用于促进最佳的蛋白质-蛋白质结合和/或减小非特异性或背景相互作用。可以使用提高分析效率的试剂,例如蛋白酶抑制剂、核酸酶抑制剂、抗菌抑制剂等。以能提供所需结合的任何顺序来级添加组分的混合物。在任何合适的温度下,通常在4~40°C之间进行培养。选择培养时间段以得到最佳活性,但是还可以优化该培养时间段以便于进行快速的高通量筛选。

[0072] 可以使用合适的 TR-FRET 供体和受体直接或间接地标记分子(例如蛋白质),正如前面所述的并且记载于美国专利 4,925,804 号、美国专利 5,637,509 号、美国专利 4,761,481 号、美国专利 4,920,195 号、美国专利 5,032,677 号、美国专利 5,202,423 号、美国专利 5,324,825 号、美国专利 5,457,186 号、美国专利 5,571,897 号、美国专利 7,250,517 号、US2005/0202565 中,这里通过引用将其并入本文。

[0073] 应用

[0074] 本文所述的技术部分涉及检测在至少两个分子(例如分析物和分析物特异性的结合配体)之间的相互作用。分析物特异性的结合配体的实例包括例如蛋白质、抗体、适体(apptamer)和肽。本文还提供了使用两种分析物特异性的结合配体和一种 FRET 供体检测两种分析物存在与否的方法。通常,该方法包括使用(i)与 FRET 对的第一结构单元关联的分析物特异性的结合配体和(ii)与 FRET 对的第二结构单元关联的分析物。该第二分析物特异性的结合配体可以与 FRET 对的相同的第一结构单元相关联,而第二分析物可以和 FRET 对的第二结构单元相关联,所述 FRET 对的第二结构单元由波长不同于 FRET 对的第一结构单元的发射波长的光所激发。任选地,该方法使用与 FRET 对的第二结构单元相关联的第二分析物特异性的结合配体,所述 FRET 对的第二结构单元由波长不同于 FRET 对的第一结构单元的发射波长的光所激发,而第二分析物可以与 FRET 对的相同的第一结构单元相关联。

[0075] 在这些方法中,分析物与分析物特异性的结合配体的相互作用导致了可检测的光信号的产生。测量该光信号作为分析物存在与否或与分析物特异性的结合配体关联的分析物的含量的读出结果。该光信号可以是例如来自分析物的光发射,其在 FRET 对的第二结构单元(例如 FRET 受体)受到来自 FRET 对的第一结构单元(例如 FRET 供体)的发射光照射而激发时产生。可以理解在一些实施方式中,这种激发过程(stimulation process)可以反相奏效。例如,来自 FRET 对的被激发的第二结构单元(这种情形下为 FRET 供体)的发射可以反过来激发 FRET 对的第一结构单元(这种情形下为 FRET 受体)。下文描述了多种示例性的反应方案,其中 FRET 对的第一或第二结构单元被激发(stimulate)而发出光信号。

[0076] 分析物特异性的结合配体的高浓度使对分析物的亲和力(avidity)增大。因此,本文所述的方法能够在例如分析物浓度小的情况下表现出灵敏度增加。此外,能够实施本文所述的方法而不需要或借助于放射性同位素。

[0077] 如下来实施检测分析物,例如改性分析物(如磷酸化的分子)的方法,或检测或分析分析物和分析物特异性的结合配体之间的相互作用的方法。使包含与 FRET 对的第二结构单元关联的分析物的样品和与 FRET 对的第一结构单元关联的分析物特异性的结合配体接触,。通过首先使用光开激发 FRET 对的第一结构单元的方式可检测分析物和分析物特异性的结合配体之间的相互作用。所述光激发 FRET 对的第一结构单元,其进而又发出能够激

发 FRET 对的第二结构单元的波长的光。然后,受到激发的 FRET 对的第二结构单元发出可被检测器所检测的光信号。由 FRET 对的第二结构单元所发出的光信号的存在或数量表明了与分析物特异性的结合配体关联的分析物的存在或数量。任选地,当 FRET 对的第二结构单元是 FRET 供体并且 FRET 对的第一结构单元是 FRET 受体时,能够通过检测来自 FRET 对的第一结构单元的光发射的存在或数量来确定分析物和分析物特异性的结合配体之间的相互作用。换言之,可以用光(例如,由激光器产生的光)激发 FRET 对的第二结构单元,其进而又发出能够激发 FRET 对的第一结构单元的波长的光。

[0078] 在一个示范性分析方案中,如下来实施确定样品中是否存在两种分析物(例如,肽、蛋白质或其后翻译的变体(post-translational modifications))的方法,如图 2 所示。例如,使用不同的 FRET 受体、例如 ULight 和近红外(NIR)-染料(例如 Cy7™)来标记两种分析物,例如肽。通过各个与镧系元素螯合物部分(例如铈螯合物供体)配合的本身特异性的结合配体(例如抗体)来识别这些分析物,所述镧系螯合物充当两种 FRET 受体的 FRET 供体。使用 315 ~ 350nm 的外加光激发铈螯合物,然后该铈螯合物在约 600 ~ 635nm 和约 675 ~ 715nm 的波长范围内发光,所述光进而又激发与分析物关联的两种 FRET 受体(例如在 600 ~ 635nm 范围内可被激发的 ULight 或另一种 FRET 受体,和在 675 ~ 715nm 范围内可被激发的 Cy7™ 或另一种 FRET 受体)。激发后,FRET 受体发出约 655 ~ 675nm(ULight)和约 715 ~ 740nm(Cy7™)的光。然后检测所发出的光并将其和样品中的分析物的存在、缺失或数量相关联。该方法允许例如测试两种不同酶对样品中的一种底物的活性,或允许测试单一酶对样品中两种不同底物的活性。

[0079] 在另一项示范性分析方案中,如图 3 所示,使用标记物(例如,诸如生物素、地高辛配基(digoxigenin)、荧光素,二硝基苯酚的非肽类标记物以及诸如 FLAG、HisTag、myc、HA、V5、链霉素标记物(streptag)的肽类标记物)来标记分析物。通过标记有镧系元素离子的螯合物(例如铈或铽离子的螯合物)的抗标记物分子(例如,用于生物素的抗生物素蛋白链菌素/streptactin(streptavidin/streptactin),和用于其它的链霉素标记物或抗体)来识别并结合标记物。该络合物是标记有 FRET 受体分子的分析物特异性的结合配体(例如抗体)的靶体。这使得能够在一种样品中测试两种不同的酶活性,或者测试单一酶对两种不同底物的活性。它还允许测试对单一底物的多种活性。

[0080] 本发明方法的另一种应用和红外光的高穿透性相关。当使用近红外发射时,信号能够穿透络合物和常见的不透明基质例如高密度的膜制剂、组织提取液、血液(以及包括血清和血浆的血液衍生物)、细胞溶解产物和细胞培养的上清液以及其它生物流体(脑脊液、尿),这使得本发明的方法可适用于体内 TR-FRET 分析(vivo TR-FRET assays)。

[0081] 测定相互作用的方法可用于例如确定具体的分析物特异性的结合配体的特异性,或者反之亦然。例如,这些方法可用于确定例如转录因子(例如,锌指蛋白)的核酸结合蛋白的结合特异性。例如,一种分析物特异性的结合配体可以与第一核酸序列相关联,而另一种分析物特异性的结合配体可以与另一种核酸序列相关联。第一和第二核酸序列中的一种可以和核酸结合蛋白质靶分子接触。

[0082] 能够并通常可以在生理学 pH 的水性缓冲介质中实施这些方法。然而,能够使用提供合意的(acceptable)的分析灵敏度(例如,在分析物特异性的结合配体和分析物之间的合意的结合、酶的合意的活性和/或 FRET 对之间的合意的 FRET)的多种条件中的任一种。

样品的 pH 可以在约 4 ~ 13 的范围 (例如约 5 ~ 10 或约 6.5 ~ 9.5)。通常选择 pH 以实现合意的测定灵敏度和特异性。必须予以考虑的因素为相关反应速率的 pH 依赖性、结合结构单元的结合和非特异性结合的还原等。

[0083] 可以使用多种缓冲液以实现所需的 pH 和在测定期间保持 pH。示例性的缓冲液包括硼酸盐、磷酸盐、碳酸盐或三羟甲基氨基甲烷 (参见例如, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Press)。

[0084] 尽管分析介质中多种溶剂的浓度通常会取决于待测的重要组分的浓度范围, 但是可以凭经验确定这些试剂中每一种的最终浓度以优化整个范围内的测定灵敏度。

[0085] 多种光发射和光检测仪器中的任一种可以用于启动 FRET (例如, 激发 FRET 供体或激发能够激发 FRET 供体的试剂) 和 / 或检测由所述 FRET 产生的发射。作为上述方法学的结果, 可以利用视觉、摄影 (photographically)、感光测定法、分光光度方法 (spectrophotometrically) 或通过其他便利的手段检测或测量由 FRET 对的第一和第二结构单元所产生的光发射, 以确定和介质中各组分的含量相关的含量。例如, 使用光度计能够检测和 / 或测量分析物和 / 或分析物特异性的结合配体之间的相互作用。

[0086] 以允许对多个反应进行快速准备、处理和分析的任何形式实施检测方法 (或本文所描述的任何筛选方法)。这可以是例如在多孔分析板 (例如 96 孔或 386 孔) 中。可以以人工或自动机械的方式制备各种溶剂的原料溶液 (stock solution), 并随后使用市售的能检测 FRET 的分析软件、机器和检测仪器以自动机械的方式来完成后续的移液、稀释、混合、分配、洗涤、培养、样品读取、数据收集和分析。可以和本文所述方法和组合物结合使用的具体仪器包括例如 Victor™、EnVision™、Fusion™ 和 ViewLux™ 设备, 其可从 PerkinElmer (波士顿, 马萨诸塞州) 购得。

[0087] 在一些实施方式中, 本文所述的方法中的任一个可以包括获得分析物的步骤。例如, 所述分析物为抗体时, 所述方法可包括从产生抗体的受试动物 (例如哺乳动物, 诸如大鼠、兔、小鼠、羊、牛、马、狗、猫或人) 或细胞 (例如杂交瘤细胞) 中分离抗体的步骤。在另一实例中, 当分析物为转录因子时, 所述方法可包括从天然源中分离该转录因子或获得重组转录因子的步骤。上文以及标题为“样品”的章节中具体描述了从天然的或重组的源获得或分离分析物的方法。

[0088] 在一些实施方式中, 本文所述的方法中的任一个还可以包括使分析物配合于 FRET 对的结构单元的步骤。

[0089] 可以将上述方法应用于多种应用, 其包括但绝非限于下文中的应用。

[0090] 检测酶活性

[0091] 本文描述了用于检测样品中酶活性的各种方法。因为许多酶活性 (例如, 激酶、乙酰基转移酶、甲基转移酶、磷酸酶或代谢酶例如牵涉克雷布斯循环 (Kreb's cycle) 的酶) 的异常的功能或表达和疾病状态 (例如癌症、炎症或代谢紊乱) 相关, 所以本文所述的组合物可用于例如确定受试者是否具有以酶的异常功能或表达为特征的疾病或具有所述疾病发展中的风险。可以检测任何酶活性, 特别是例如当引入或除去化学基团时那些涉及翻译后修饰的酶。

[0092] 所述方法可包括以下步骤: 使分析物特异性的结合配体与其各自的分析物接触; 和检测分析物和其各自的分析物特异性的结合配体的结合。分析物和分析物特异性的结合

配体的结合量 (the amount of binding) 在所述样品存在时和在所述样品不存时的差值表明了样品中酶活性的存在、缺失或大小。在一些实施方式中,分析物与固相载体相关联。参见例如 US 2008/0261239,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0093] 这些方法还包括以共价或非共价的方式使 FRET 对的第二结构单元和分析物结合,和 / 或以共价或非共价的方式使分析物特异性的结合配体和固相载体结合。共价或非共价结合的方法记载于 US 2008/0261239,其公开内容通过引用整体并入本文。

[0094] 通过本文所描述的方法可以检测各种酶活性中的任一种。例如,所述酶活性可以是例如蛋白酶 (protease) 活性、激酶 (kinase) 活性、磷酸酶 (phosphatase) 活性、磷酸二酯酶 (phosphodiesterase) 活性、核苷酸环化酶 (nucleotide cyclase) 的活性、泛素连接酶 (ubiquitin ligase) 的活性、甲基转移酶 (methyltransferase) 活性、乙酰化酶 (acetylase) 活性、脱乙酰酶 (deacetylase) 活性、DNA 聚合酶 (DNA polymerase) 活性、RNA 聚合酶 (RNA polymerase) 活性、DNA 连接酶 (DNA ligase) 活性和异构酶 (isomerase) 活性。下文给出了关于酶活性的其它内容。

[0095] 可使用本文所描述的方法或组合物加以检测、测量或另行分析的蛋白酶类型的实例包括但不限于:丝氨酸蛋白酶(如胰蛋白酶 (trypsin)、胰凝乳蛋白酶 (chymotrypsin)、弹性蛋白酶或枯草杆菌蛋白酶 (subtilisin)、苏氨酸蛋白酶 (threonine proteases)、半胱氨酸蛋白酶(如木瓜蛋白酶、组织蛋白酶、半胱氨酸蛋白酶或钙蛋白酶 (calpains))、天冬氨酸蛋白酶(如 HIV-1 蛋白酶、凝乳酶、肾素或天冬氨酸蛋白酶)、金属蛋白酶和谷氨酸蛋白酶。

[0096] 激酶是能够通过向其引入一个或多个磷酸基团(称为“磷酸化”方法)来修饰底物的酶。使用本文所述的组合物和方法可以检测或测量许多不同类型的激酶的活性。例如,可以检测或测量酪氨酸激酶、苏氨酸 / 丝氨酸激酶、糖激酶或脂质激酶的活性。示例性的激酶包括例如 Akt 激酶家族、极光激酶家族 (Aurora kinase family)、PDK1、MAPKAP K2、Erk 激酶家族、CAMK 激酶家族、细胞周期蛋白依赖性激酶(例如 CDK1、CDK2、CDK4、CDK6)、RAF 激酶家族、酪蛋白激酶家族、PKC 家族、PKA 家族、PKB 家族、PKG 家族、GSK3beta、ROCK、SGK、Rsk 家族和 Nek 家族;蛋白酪氨酸激酶包括受体酪氨酸激酶,例如 FGFR、EGFR、PDGFR、C-kit、IGFR、胰岛素受体、TrkA、TrkB、TrkC、C-Met 或 C-Ret,和胞质酪氨酸激酶,例如 Src、Lck、Lyn、Fyn、Yes、Syk、Hck、Abl 和 Eph 的家族;或脂质激酶,例如 PI3 激酶、PI4 激酶或 PI5 激酶。

[0097] 磷酸酶能够从底物除去磷酸基团。磷酸酶的活性可以包括例如酪氨酸特异性磷酸酶 (tyrosine-specific phosphatase)、苏氨酸 / 丝氨酸磷酸酶、双特异性磷酸酶 (dual-specificity phosphatase)、糖磷酸酶、组氨酸特异性磷酸酶或脂质磷酸酶的活性。

[0098] 乙酰基转移酶是一类将乙酰基从供体转移至受体的转移酶。实例包括组蛋白乙酰转移酶 (histone acetyltransferases),其包括 CBP 组蛋白乙酰转移酶、胆碱乙酰转移酶 (choline acetyltransferase)、氯霉素乙酰转移酶、羟色胺 -N- 乙酰转移酶 (serotonin N-acetyl transferase)、NatA 乙酰转移酶和 NatB 乙酰转移酶。

[0099] 脱乙酰酶是从蛋白质中的残留除去乙酰基的酶。实例包括组蛋白脱乙酰酶和 sirtuins。

[0100] 甲基转移酶,也称为“甲基化酶”,是一类把甲基基团从供体转移至受体的转移酶。

甲基化通常在 DNA 的核酸碱基或蛋白质结构的氨基酸上发生。甲基转移酶能够使用结合 S-腺苷甲硫氨酸中的硫的反应性甲基基团作为甲基供体。

[0101] 脱甲基酶是从蛋白质和其它物质中除去甲基基团的酶。它们应用于多个过程,例如在基因调节、趋化性 (chemotaxis) 和信号转导中。

[0102] 糖基化 (Glycosylation) 是使糖类 (即糖基供体) 转移至另一个分子 (糖基受体) 的羟基或其它官能团的反应。糖基化酶 (Glycosylase) 是使聚糖连接蛋白质、脂质、核酸或其它有机分子的酶。去糖基化是从分子中除去糖基团的反应。

[0103] 泛素连接酶 (也称为 E3 泛素连接酶) 是与 E2 泛素 (E2ubiquitin) 配合酶结合导致泛素通过异肽键连接于目标蛋白质的赖氨酸上的蛋白质; E3 泛素连接酶以由蛋白酶体降解的特异性蛋白质底物为目标。通常,泛素连接酶涉及聚泛素化 (polyubiquitination): 第二泛素连接第一泛素,第三泛素连接第二泛素,等等。多遍在蛋白化聚泛素化标记由蛋白酶体降解的蛋白质。

[0104] 去泛素酶 (Deubiquitinating enzymes, DUB) 是一大类的通过切断泛素-蛋白质键来调节泛素依赖性的代谢途径的蛋白酶。人类基因组编码了近 100 个对五个基因家族中的泛素具有特异性的 DUB。潜在地, DUB 可充当泛素体系的正调节物和负调节物。除泛素回收 (recycling) 外,它们涉及泛素前体的加工、蛋白质泛素化的校正和抑制性泛素链的解体。

[0105] 苏素化 (sumoylation) 是翻译后修饰,其在多个细胞过程例如核-细胞质运输、转录调节、细胞凋亡、蛋白质稳定、应激反应和通过细胞周期的渐进 (progression through the cell cycle) 中起作用。小泛素类调节剂 (Small Ubiquitin-like Modifier, SUMO) 蛋白质连接和脱离细胞中的蛋白质以改变它们的功能。对体内蛋白质 SUMO 配合 (SUMO conjugation) 的检测会提供用于认识 SUMO 调节的有用信息,所述 SUMO 调节作为调节许多核蛋白活性的重要控制机理出现。SUMO 对其目标的连接类似于泛素的连接 (因为它是用于例如 NEDD 8 的泛素类蛋白质)。使用 ATP 由蛋白酶 (在人体中,这些是 SENP 蛋白酶或酵母菌中的 Ulp1) 从 SUMO 切断 C 端肽以揭示二甘氨酸模体 (motif)。然后,使 SUMO 结合为异源二聚体的 E1 酶 (SUMO 活化酶 (SAE))。然后,将它送至为配合酶 (Ubc9) 的 E2。最后,少数 E3 连接蛋白中的一个使它附着于所述蛋白质。

[0106] 磷酸二酯酶 (例如环核苷酸磷酸二酯酶) 包括一大类的基于生物化学和分子性质有机化生成 11 个不同家族的酶。例如, PDE 包括人磷酸二酯酶 3B、人磷酸二酯酶 11A1、人磷酸二酯酶 4A4、人磷酸二酯酶 4D3 和牛脾磷酸二酯酶 (类型 II)。

[0107] 酶活性能够修饰分析物和 / 或分析物特异性的结合配体。例如,酶活性可以使分析物或分析物特异性的结合配体磷酸化。

[0108] 在所述方法的一些实施方式中,相比于在样品不存在的情况下的分析物和其分析物特异性的结合配体之间的结合量,在样品存在的情况下的分析物和其分析物特异性的结合配体之间的结合量的减小表明样品中酶活性的存在、缺失或大小。例如,通过降低分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的方式可以检测样品中特定蛋白酶的存在,所述特定蛋白酶能够除去与分析物特异性的结合配体结合的分析物部分。在另一个实例中,当分析物特异性的结合配体优先结合非磷酸化分析物并且通过特定的磷酸酶除去磷酸基团时,可以以分析物特异性的结合配体和磷酸化的分析物之间的结合量的减少来确定样品中

磷酸酶的存在或含量。

[0109] 在所述方法的一些实施方式中,相比于样品不存在的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量,在样品存在的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的增加表明样品中酶活性的存在或大小。例如,当分析物特异性的结合配体优先结合磷酸化的分析物并且通过特定激酶使该分析物磷酸化时,通过分析物特异性的结合配体和分析物之间的结合量的增加可以确定样品中激酶的存在或含量。

[0110] 鉴定调节相互作用或酶活性的化合物

[0111] 本文的特征还在于鉴定调整分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合的化合物的方法。该方法可以包括以下步骤:在受试化合物存在下,使分析物和分析物特异性的结合配体以及 FRET 对的第一结构单元接触,其中所述分析物与 FRET 对的第二结构单元相关联;和检测分析物和分析物特异性的结合配体的结合,其中受试化合物存在时与受试化合物不存在时的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的差值表示受试化合物调整了分析物特异性的结合配体和分析物之间的相互作用。

[0112] 所述方法还可以包括以下步骤:以共价的或非共价的方式使 FRET 对的第二结构单元结合分析物和/或以共价的或非共价的方式使分析物特异性的结合配体结合固相载体。用于共价的或非共价的结合的方法还记载于 US2008/0261239,其全部内容通过引用整体并入本文。

[0113] 所述方法还包括以下步骤:在使分析物特异性的结合配体(和固相载体相关的)和分析物接触后,从未结合的分析物中分离固相载体(如上所述)。

[0114] 在使分析物和分析物特异性的结合配体接触之前,可以使受试化合物和分析物接触。在使分析物特异性的结合配体和分析物接触之前,可以使受试化合物和分析物特异性的结合配体接触。在一些实施方式中,在受试化合物存在下,可以使分析物特异性的结合配体和分析物接触(即,使分析物和分析物特异性的结合配体同时均和受试化合物接触)。

[0115] 所述受试化合物可以是例如本文所述的化合物中的任一种(参见下文的“化合物”)。受试化合物可以是抑制或增强分析物特异性的结合配体和分析物之间的结合的化合物。

[0116] 在所述方法的一些实施方式中,相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量,存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的减小表明化合物抑制了分析物特异性的结合配体和分析物之间的相互作用。

[0117] 在所述方法的一些实施方式中,相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量,存在受试化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的增大表明化合物增强了分析物特异性的结合配体和分析物之间的相互作用。

[0118] 用于鉴定调节酶活性的化合物的方法可以包括以下步骤:提供分析物特异性的结合配体和 FRET 对的第一结构单元、包括 FRET 对的第二结构单元的分析物、和能够修改分析物特异性的结合配体和分析物之一或两者的酶;在所述酶和受试化合物存在下,使分析物和分析物特异性的结合配体接触;以及,检测分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合,其中受试化合物存在时与受试化合物不存在时的分析物和分析物特异性的结合配体之

间的结合量的差值表明所述受试化合物调节了酶的活性。

[0119] 所述方法还包括以下步骤：以共价的或非共价的方式使 FRET 对的第二结构单元和分析物结合，和 / 或以共价的或非共价的方式使分析物特异性的结合配体和固相载体结合。上文描述了用于共价的或非共价的结合的方法。

[0120] 所述方法可以包括以下步骤：在使所述分析物特异性的结合配体（和固相载体相连接）和分析物接触，从未结合的分析物中分离固相载体（如上所述）。

[0121] 在使分析物和分析物特异性的结合配体接触之前，可以使酶和受试化合物与分析物接触。在使分析物特异性的结合配体和分析物接触之前，可以使酶和受试化合物与分析物特异性的结合配体接触。在一些实施方式中，在酶和受试化合物存在下使分析物特异性的结合配体和分析物接触。所述酶可以是例如本文所述的那些酶中的任一种。受试化合物可以是例如本文所述的化合物中的任一种（参见下文的“化合物”）。受试化合物可以是抑制或增强分析物特异性的结合配体和分析物之间的结合量。

[0122] 在所述方法的一些实施方式中，相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的减小表明了受试化合物抑制了酶的活性。在所述方法的一些实施方式中，相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的增大表明了受试化合物增强了酶的活性。

[0123] 例如，当激酶能够使分析物磷酸化并且分析物特异性的结合配体能够结合分析物（例如，去铁胺和三价金属阳离子）的磷酸化形式时，可以通过激酶存在下的目标分子和分析物特异性的结合配体之间的结合量来确定激酶的活性。如上所述，在受试化合物存在和不存在下，可以使用激酶（在允许分析物磷酸化的条件下）培养分析物。相比于不存在化合物的情况下的分析物特异性的结合配体和分析物的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物特异性的结合配体和分析物的结合量的减小表明了该化合物抑制了激酶的活性。相反地，相比于不存在化合物的情况下分析物特异性的结合配体和分析物的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物特异性的结合配体和分析物的结合量的增大表明了受试化合物增强了激酶的活性。

[0124] 在所述方法的一些实施方式中，相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的减小表明了该化合物抑制了酶的活性。在所述方法的一些实施方式中，相比于不存在化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量，存在受试化合物的情况下的分析物和分析物特异性的结合配体之间的结合量的增大表明了受试化合物增强了酶的活性。

[0125] 样品

[0126] 样品可以是任何化合物。样品的成分可以是已知的或未知的。在许多情况下，样品包含或怀疑样品包含一种或多种酶活性。样品可以来源于生物体或者可以是人造来源的酶。样品可以是例如一种包含一种或多种已知数量或已知活性的酶的样品。

[0127] 在一些实施方式中，样品可以包含一种或多种分析物（例如本文所描述的分析物中的任一种）或一种或多种与 FRET 对的第二结构单元相关联的分析物。

[0128] 样品可以是个体获得的试样,或者可以来源于这种试样。例如,样品可以通过活体解剖得到的组织切片,或放置于或适于组织培养的细胞。样品还可以是或包含生物流体试样,例如尿、血液、血浆、血清、唾液、精液、痰、脑脊髓液、泪液、粘液、汗液、乳汁、精液等。生物样品还可以是或包含来自溃疡或其它表面皮疹 (eruptions) (例如水疱和脓肿),或者可以是来自正常的、恶性的或可疑组织的组织提取液。若需要,还可以进一步分离样品至包含特定组分或细胞类型的部分。例如,可以将血液样品分离成血清和包含特定类型的血液细胞例如红细胞或白细胞的部分。若需要,样品可以是来自单体的样品组合(集合体),例如组织或流体样品的组合等。

[0129] 还可以处理样品以便于对酶或其酶活性的检测。例如,如果样品包含细胞或其它生物结构,那么可以使用冷冻/解冻处理、干燥和再水化(rehydrating)、搅匀(dounce)、洗涤或其它方法处理样品。还可使用释放或增溶酶,前提是不会干扰酶活性或相关的测定方法。

[0130] 可以从体液和组织获得样品,其中通常正被测试的特定酶被表达,例如由肝脏获得的肝酶。

[0131] 可用常规照管(customary care)来处理样品以保留酶活性和/或分析物和分析物特异性的结合配体的活性或结构。例如,当分析物从天然源例如细胞溶解产物中被分离出时,可以使用多种可影响分子的结构和功能的缓冲剂和/或蛋白质水解酶或核酸酶活性的抑制剂来处理细胞溶解产物。用于获得其中的酶、分析物或分析物特异性的结合配体的活性或完整性被保留的样品的合适方法是本领域技术人员所熟知的。该方法包括使用能保留或减少样品中酶的变化合适的缓冲液和/或抑制剂,所述抑制剂包括核酸酶、蛋白酶和磷酸酶的抑制剂。这样的抑制剂包括例如螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA)、乙二醇双(2-氨基乙醚)-N,N',N'-四乙酸(EGTA))、蛋白酶抑制剂(例如苯甲基磺酰氯(PMSF)、抑肽酶、亮肽素、抗蛋白酶等)、磷酸酶抑制剂(例如磷酸盐、氟化钠、钒酸盐等)。可以选择抑制剂使得它们不会干扰或只是最低限度地影响目标的酶活性。例如,如果待测的酶活性是蛋白酶,那么用于得到酶活性或完整性被保留的样品的方法就不包括对特定的酶活性有不利影响的蛋白酶抑制剂。用于含酶样品的合适缓冲液和条件是公知的(参见例如 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Supplement 47), John Wiley & Sons, New York (1999); Harlow and Lane, Antibodies: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988); Harlow and Lane, Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1999); Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 3rd ed. Burtis and Ashwood, eds. W. B. Saunders, Philadelphia, (1999))。

[0132] 合适的话,可以处理样品以消除或最小化干扰物质的存在。若需要,可以通过本领域技术人员所熟知的多种方法、包括亚细胞分离和色谱技术,如离子交换色谱、疏水和反相(hydrophobic and reverse phase)色谱、尺寸排阻(size exclusion)色谱、亲和色谱、疏水性电荷诱导色谱等(Ausubel et al. supra, 1999; Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, third edition, Springer ~ Verlag, New York (1993); Burton and Harding, J Chromatogr A 814:71 ~ 81, 1998)。

[0133] 为了应用于本文所述的方法,样品可以以各种物理状态存在。例如,样品可以是液体或固体,可以是溶解的或悬浮于液体中,可以是以乳状液或凝胶的,以及可以被吸附在材

料上。

[0134] 可以修饰样品的一种或多种性质以便于能够或能更高效地产生样品结合的相互作用和/或使酶作用于底物。这些性质是本领域技术人员所熟知的并通常包括盐度、pH、表面活性剂性质、粘度和温度。

[0135] 化合物

[0136] 在本文所述的任一种方法中可被筛选的受试化合物包括多种化学类型。化合物可以是生物分子,其包括但不限于,肽、多肽、肽模拟物 (peptidomimetics) (例如,类肽)、氨基酸、氨基酸类似物、糖类、脂肪酸类、类固醇、嘌呤、嘧啶、其衍生物或结构类似物、多核苷酸和多核苷酸类似物。化合物可以是小分子化合物或大分子化合物。

[0137] 通常,小分子化合物是分子量在约 50 ~ 2500 道尔顿范围内的相对小的有机分子。这些化合物可以包括对与蛋白质的结构相互作用 (例如,氢键) 来说所必需的官能团,并可以包括至少氨基 (amine)、羰基、羟基或羧基,并优选所述化学官能团中的至少两种。这些化合物通常可以包括由上述官能团中的一个或多个取代的环状碳 (cyclical carbon) 或杂环结构、和/或芳香族的或聚芳香族的结构 (例如,嘌呤核 (purine core))。

[0138] 此外,作为本文所述的一些方法中的有益的小分子化合物的是核酸适体 (nucleic acid aptamer),其是以高亲和力与多种蛋白质结合并抑制与所述配体蛋白、受体或其它分子的结合的相对短的核酸 (DNA、RNA 或两者的组合) 序列。适体通常具有约 25 ~ 40 个核苷酸的长度,并具有在约 8 ~ 16kDa 的范围内的分子量。可以通过称为 SELEX (systemic evolution of ligands by exponential enrichment,指数富集的配体系统进化) 的体内进化过程得到于目标高特异性和亲和性的适体 (参见例如 Zhang et al., Arch Immunol Ther Exp 52:307 ~ 315, 2004, 其公开内容通过引用以其整体并入本文)。增强稳定性的方法 (例如,通过使用核苷酸类似物) 和增强核酸适体的体内生物利用度的方法 (例如,受试者循环系统中的体内持久性) (参见 Zhang et al. (2004) and Brody et al., Reviews in Molecular Biotechnology 74:5 ~ 13, 2000, 其公开内容通过引用以其整体并入本文)。

[0139] 大分子化合物可以包括例如抗体 (参见下文) 的大蛋白或含两个或多个蛋白质的大分子复合物。

[0140] 可以从许多潜在来源、包括化学库 (chemical library)、天然产物库 (natural product library) 和包括随机肽、寡核苷酸或有机分子的组合库中来识别化合物。化学库由随机化学结构组成,所述化学结构中的一些是已知化合物或类似物或者在其它药物发现筛选中被确定为“靶物 (hit)”或“先导 (lead)”的化合物,而其它来源于天然产物,还有其它是从非直合成的有机化学得来的。天然产物库是微生物、动物、植物或海洋生物的集合,其通过以下用于产生筛选混合物:(1) 来自土壤、植物或海洋微生物的培养液的发酵和提取,或 (2) 植物或海洋生物的提取。天然产物库包括多肽、非核糖体的多肽或其变体 (非天然产生的)。为了查阅,参见 Science 282:63 ~ 68, 1998。组合库包括众多个量的作为混合物的肽、寡核苷酸或有机化合物。通过常规的自动合成方法、PCR、克隆或专有的合成方法相对容易地制备这些文库。

[0141] 还有其它有用的库包括肽、蛋白质、肽模拟物、多重并行合成的集合 (multiparallel synthetic collection)、重组和多肽的库。为了查阅组合化学和由其产生的库,参见 Myers, Curr Opin Biotechnol 8:701 ~ 707, 1997。由使用多个本文所述的库

对化合物所进行的确定允许随后对所测试的化合物“靶物 (hit)”或“先导 (lead)”进行修饰以优化“靶物 (hit)”或“先导 (lead)”的能力,从而抑制在例如分析物特异性的结合配体和分析物之间的相互作用。

[0142] 化合物可以是高分子,例如抗体或结合抗原的抗体片段,其对例如分析物或分析物特异性的结合配体是特异性的。这样的抗体或其片段通常会结合或接近 (a) 结合分析物的分析物特异性的结合配体的区域,(b) 结合分析物特异性的结合配体的分析物区域。然而,该化合物还可以起异位 (allosterically) 作用,并由此它们还可以在除调解相互作用的两分子的区域以外的另外影响它们相互作用的位置处与分析物或分析物特异性的结合配体结合。正如本申请通篇所使用的,术语“抗体”是指整个抗体 (例如,IgM、IgG、IgA、IgD 或 IgE) 分子,其由本领域已知的多种方法中的任一种所产生。抗体可以产生于或来源于多种物种中的任一种,所述物种是例如人、非人类的灵长类动物 (例如猴、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠和小鼠)。

[0143] 抗体可以是纯化的或重组的抗体。还有抗体片段和嵌合抗体和产自非人类 (例如小鼠、大鼠、沙鼠或仓鼠) 的抗体的人源化抗体是可用的。正如本文所使用的,术语“抗体片段”是指和抗原结合的片段,例如 Fab、F(ab')₂、Fv 和单链的 Fv(scFv) 片段。scFv 片段是单链的多肽链,其包括衍生 scFv 的抗体的重链和轻链可变区。此外,双特异性抗体 (Poljak, Structure 2(12):1121~1123, 1994; Hudson et al., J Immunol Methods 23(1~2):177~189, 1999, 其公开内容通过引用以其整体并入本文) 和细胞内抗体 (Huston et al., Hum Antibodies 10(3~4):127~142, 2001; Wheeler et al., Mol Ther 8(3):355~366, 2003; Stocks, Drug Discov Today 9(22):960~966, 2004, 其公开内容通过引用以其整体并入本文) 可以应用于本发明的方法中。

[0144] 可以使用由现有技术产生的包含分子的结合区域的抗体片段。例如,可以通过抗体分子的胃蛋白酶消化制造 F(ab')₂ 片段,并且可以通过减少 F(ab')₂ 片段的二硫键或通过用木瓜蛋白酶和还原剂处理抗体产生 Fab 片段。参见例如 National Institutes of Health, Current Protocols In Immunology, Coligan et al., ed. 2.8, 2.10 (Wiley Interscience, 1991), 其公开内容通过引用以其整体并入本文。正如美国专利 4,642,334 号中所记载的,可以制造 scFv 片段,其公开内容通过引用以其整体并入本文。

[0145] 以上确定的化合物可用通过任何化学或生物方法合成,或者可以由天然来源得到。以上确定的化合物还可以是纯的,或可以是含一种或多种其它非活性成分 (例如,不会结合或抑制分析物特异性的结合配体和分析物之间相互作用的其它化合物或成分) 的制剂 (例如药物组合物),并且可以以分析-、生理学的-或药学可接受的稀释剂或载体的形式制得。

[0146] 以下的实施例进一步描述本发明,其不是对权利要求所限定的本发明保护范围的限制。

实施例

[0147] 针对外遗传赖氨酸甲基转移酶 SET7/9 和 G9a 的酶促多重分析。两者作用于肽底物,其衍生自分别在 SET7/9 和 G9a 的位点 H3K4 和 H3K9 处的组蛋白 H3。对酶分析的检测使用时间分辨荧光共振能量转移 LANCE[®] Ultra 技术,其是非放射性的、同质近程分析

(homogeneous proximity assay)。

[0148] 所示结果表明该测试适合于 Z' 值为 0.79 ~ 0.80 的高通量筛选。抑制剂的特异性使其成为用于以不同方式作用于两个目标的潜在的活化剂和抑制剂的筛选的理想分析。

[0149] 材料和方法

[0150] G9a 分析缓冲液 :50mM Tris-HCl pH 9.0, 50mM NaCl, 1mM DTT, 和 0.01% Tween-20

[0151] SET7/9 分析缓冲液 :50mM Tris-HCl pH 9.0, 5mM MgCl₂, 1mM DTT 和 0.01 % Tween ~ 20

[0152] LANCE[®] 检测缓冲液

[0153] 生物素 -H3(1-21) (Anaspec Cat. No. 61702, Lot No. 71148)

[0154] SET7/9 人重组体 (human recombinant) (Enzo Cat. No. 201 ~ 178 ~ C100, Lot No. L25760/a)

[0155] G9a 人重组体 (BPS Cat. No. 51001, Lot No. 101020)

[0156] S-(5' - 腺苷) -L- 甲硫氨酸氯化物 (SAM) (Sigma A7007, Lot No. 119K5157)

[0157] 西奈芬净 (Sinefungin) 100mM (Sigma S8559, Lot No. 100M4070)

[0158] Eu-W8044 标记的 SA (Cat. No. 502339B)

[0159] Anti-H3K9Me2 (Cat. No. 05-1249, Lot No. NG1800813)

[0160] Anti-H3K4me2 (Cat. No. TRF0402, Lot No. 6)

[0161] ULight 染料 (SETA Cat. No. K8-1662, Lot No. 240211-7150)

[0162] AlexaFluor-700 染料 (Invitrogen Cat. No. A20010, Lot No. 778180)

[0163] 聚 -L- 赖氨酸 (Sigma P8920)

[0164] 白色不透明的 384- 孔光板 (Cat. No. 6007299) 是购自 PerkinElmer, Inc.

[0165] TopSeal-A (Cat. No. 6005185) 购自 PerkinElmer, Inc.

[0166] 培养箱设定为 23°C

[0167] EnVision[®] reader 购自 PerkinElmer, Inc.。

[0168] 随后进行酶测定, 其中室温下对 5 μL 生物素酰化的 H3(1 - 21) 肽、2.5 μL 酶、2.5 μL SAM 培养 60 分钟; 加入 10 μL 的检测混合物: 铕 - 抗生物素蛋白链菌素 (Europium-Streptavidin)、ULight-anti-H3K9me2、NIR-dye ~ anti-H3K4me2 和 PLK, 并在室温下将其培养 60 分钟; 以及使用 337nm 的 LANCE[®] 激光器和 665nm/730nm 的滤光器读取基板。

[0169] 分析原理示于图 4 中, 其中经染料标记的抗体特异性地识别经修饰的组蛋白 H3 肽, 而铕 - 抗生物素蛋白链菌素结合与其连接的生物素基团, 从而能够进行 TR-FRET。

[0170] 实施例 1: 单重检测分析

[0171] 单重检测分析方案不同于酶方案, 并进行如下: 在室温下将 5 μL ULight-anti-H3K9me2 或 AlexaFluor-700-anti-H3K4me2、5 μL 的 bio-H3K4me2(1 - 21) 肽、5 μL 的 bio-H3K9me2(1 - 21) 肽、5 μL 的铕 - 抗生物素蛋白链菌素培养 60 分钟, 并使用 LANCE[®] 激光滤光器在 665nm 和 730nm 读取基板。

[0172] 图 5A 和图 5B 中, 分别实施了对 bio-H3K4me2(1 - 21) 和 bio-H3K9me2 的滴定, 经

染料标记的抗体和铈 - 抗生物素蛋白链菌素的浓度分别为 30nM 和 3nM。

[0173] 实施例 2:多重检测分析 多重检测分析具有与单重检测分析相比稍微不同的方案,其进行如下:在室温下将 5 μ L Ulight-anti-H3K9me2、5 μ L AlexaFluor-700-anti-H3K4me2、5 μ L bio-H3K4me2(1-21) 肽、5 μ L bio-H3K9me2(1-21) 肽、5 μ L 铈 - 抗生物素蛋白链菌素培养 60 分钟,并使用 LANCE[®] 激光滤光器在 665nm 和 730nm 读取基板。

[0174] 以类似于上述的方式进行底物滴定。应指出,Ulight-anti-H3K9me2 和 AlexaFluor-700-anti-H3K4me2 的浓度分别为 30nM 和 3nM(图 6)。

[0175] 实施例 3:多重 - 单酶、酶滴定

[0176] 图 7A 示出了在整个 0 ~ 1.2nM 的浓度范围内的 G9a 滴定。300nM 的 bioH3(1-21) 的肽和 300 μ M 的 SAM 被用于酶促反应,并且 3nM 的铈 - 抗生物素蛋白链菌素、0.3nM 的 AlexaFluor-700-anti-H3K4me2、3nM 的 Ulight-anti-H3K9me2 和 0.0001% 的 PLK 被用于所述检测。0.3nM G9a 被用于随后的实验。应指出酶促反应的培养时间为 30 分钟。

[0177] 图 7B 示出了在整个 0 - 20nM 浓度范围内的 SET7/9 滴定。除了 30nM 的 bio-H3(1-21) 肽被用于酶促反应,和 3nM 的 AlexaFluor-700-anti-H3K4me1 被用于所述测定外,其他所使用的溶剂量同上述类似。选择 60 分钟的反应时间、10nM 的 SET7/9 和 0.3nM 的 G9a 用于后续的多重实验。

[0178] 实施例 4:多重 - 单酶、辅因子滴定

[0179] 图 8A 和 8B 均示出了在整个 0 ~ 300 μ M 浓度范围内的 SAM 滴定。所使用的酶浓度如在所述多重单酶滴定中所示出的。使用 100nM 的 bio-H3(1-21)。

[0180] 实施例 5:多重 - 双酶,辅因子滴定

[0181] 除在 2.5 μ L 的等分部分包含两种酶外,在和实施单酶辅因子滴定相同的条件下实施 SAM 滴定。10 μ M 的 SAM 浓度被用于随后的实验(图 9)。

[0182] 实施例 6:多重 - 单酶、抑制剂滴定

[0183] 抑制剂滴定的酶部分和标准的酶促反应略有不同,并如下列出:5 μ L 的抑制剂、2.5 μ L 的酶、室温下培养 15 分钟和 2.5 μ L 的底物 / 辅因子的混合物。检测步骤保持不变。

[0184] 图 10A 和 10B 示出了在 0 ~ 1mM 浓度范围内的西奈芬净滴定。选择 300 μ M 的西奈芬净用于 Z' 实验。

[0185] 实施例 7:多重 - 双酶、抑制剂滴定

[0186] 图 11 中所示的是西奈芬净滴定。其条件类似于上述实施例 5 中所提及的条件,其中 2.5 μ L 的等分部分中包含两种酶。

[0187] 实施例 8:多重 - 双酶、Z' 测定

[0188] 已经开发出新型的、非辐射性的、少量的多重分析用于 TR-FRET LANCE[®] 平台,其允许同时测量两种分析物(例如,变体)。针对外因遗传的和转录后变体,可以使用该测定还表现出激活剂和抑制剂的特异性。该分析表明了基于其生物化学性质的区分酶的能力。使用 0.79 和 0.80 的 Z' 值(图 12),该测定是稳定的并且适合于高通量的筛选。

[0189] 其它实施方式

[0190] 应当理解尽管结合具体的说明书已经描述了本发明,前述的说明书意在阐述而不

是限定本发明的保护范围,其由所附的权利要求的范围来确定。其它方面、优点和变体落入所附的权利要求的范围内。

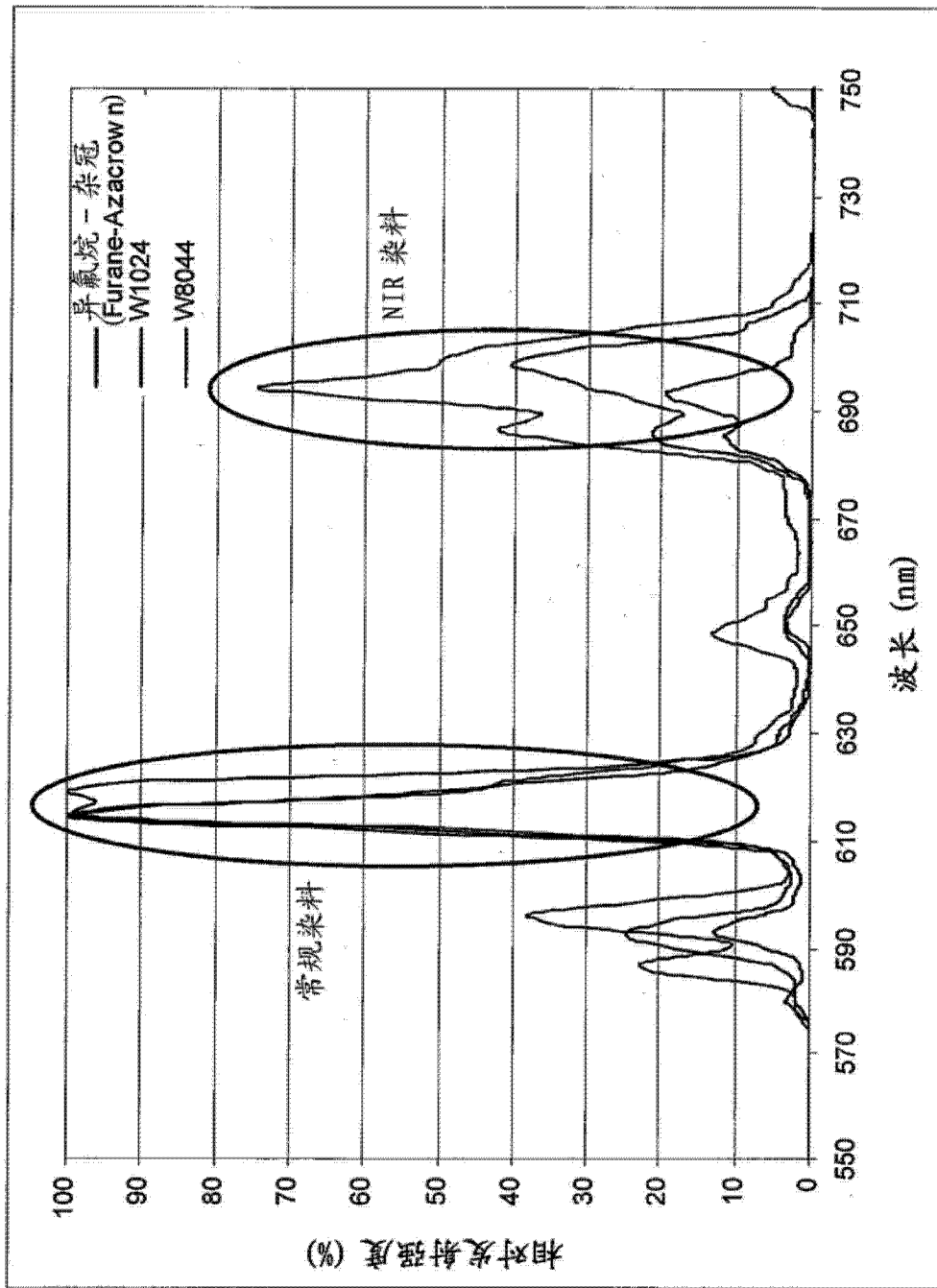


图 1

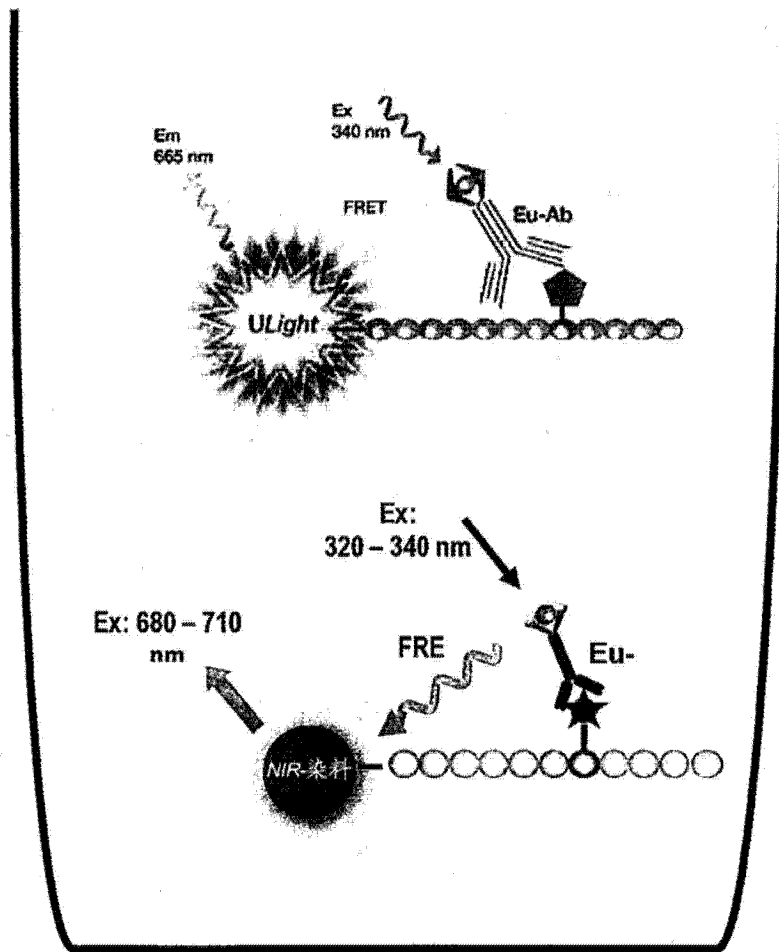


图 2

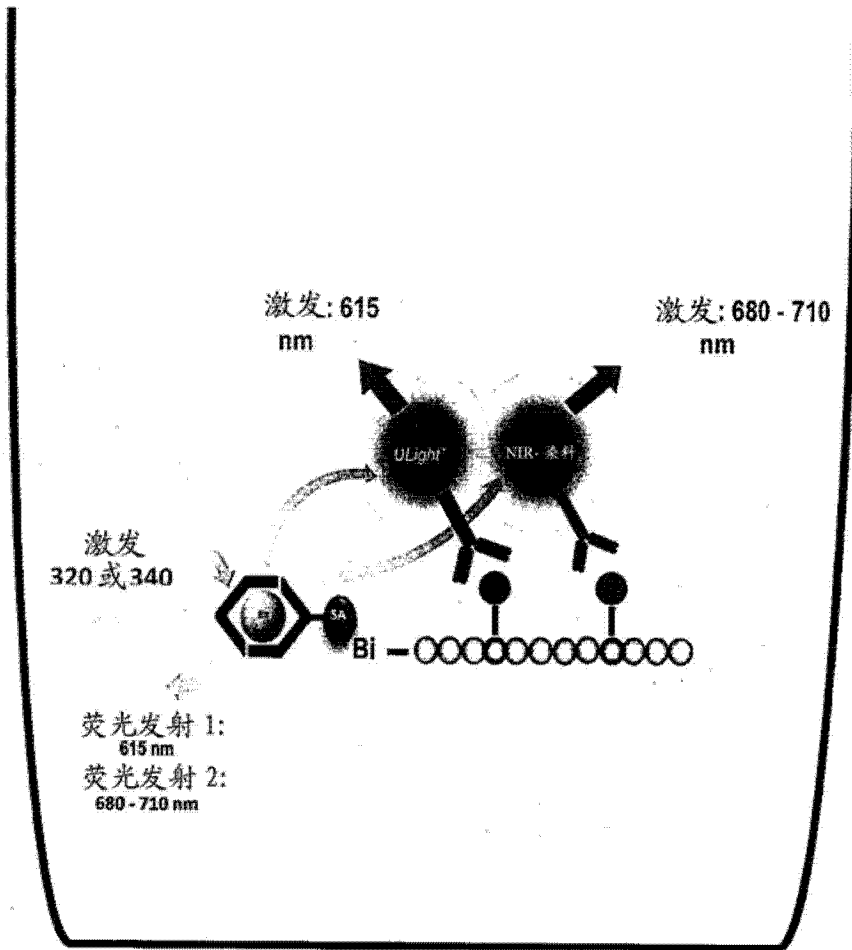


图 3

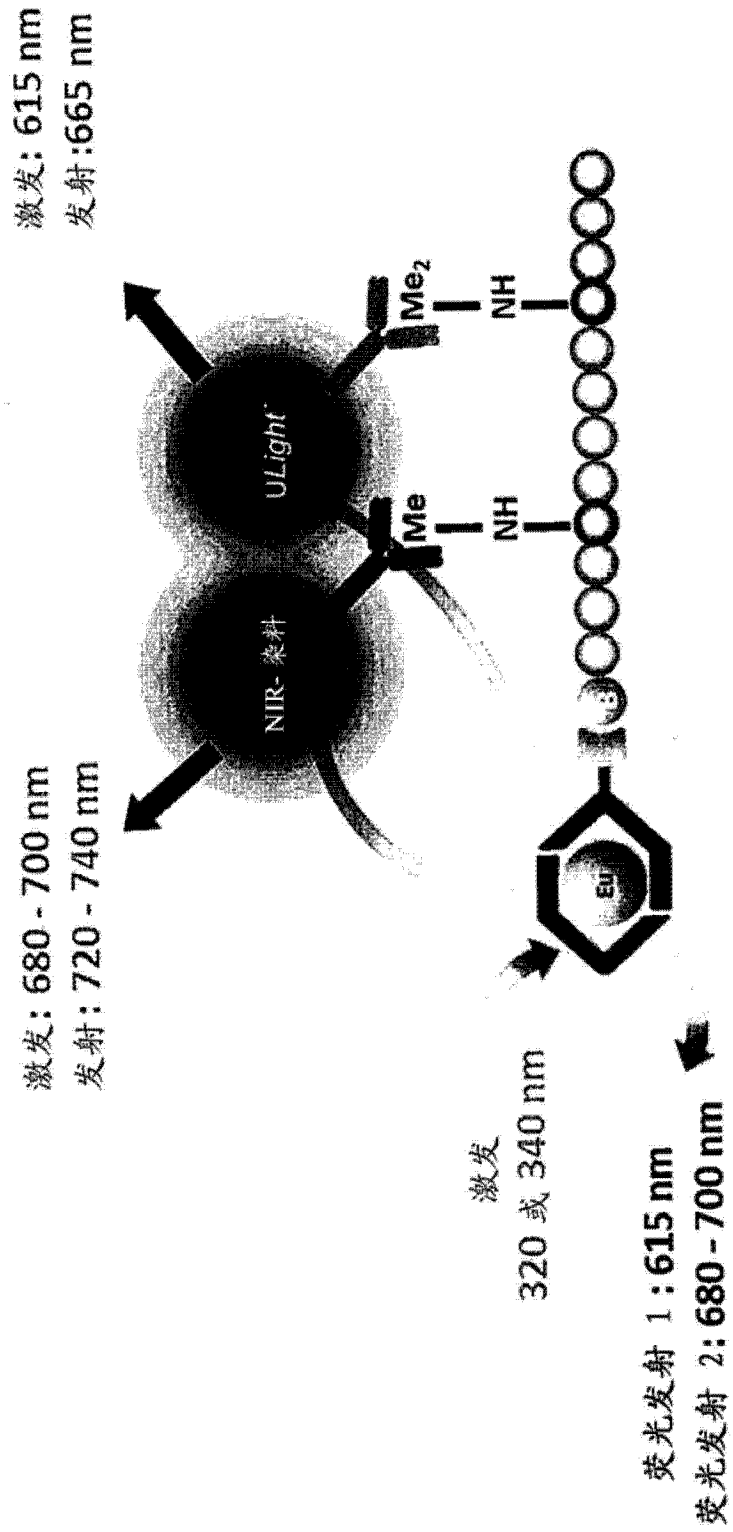


图 4

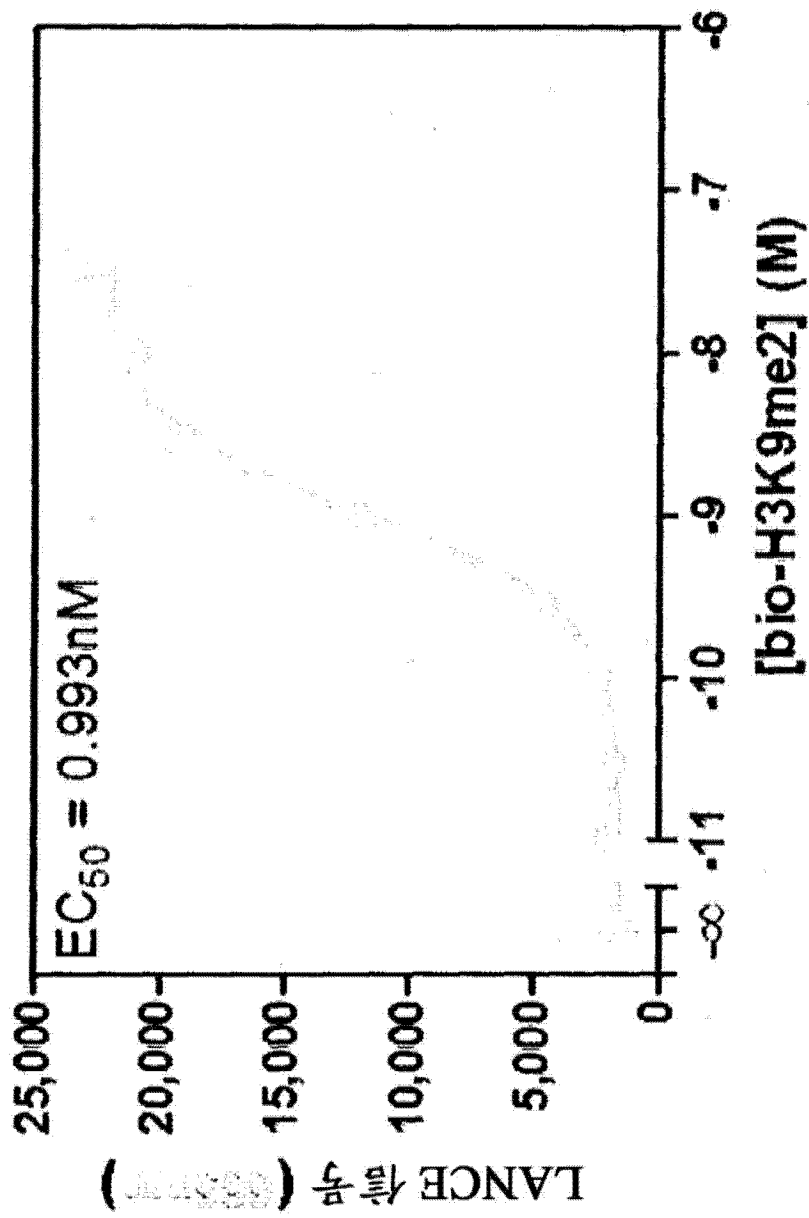


图 5A

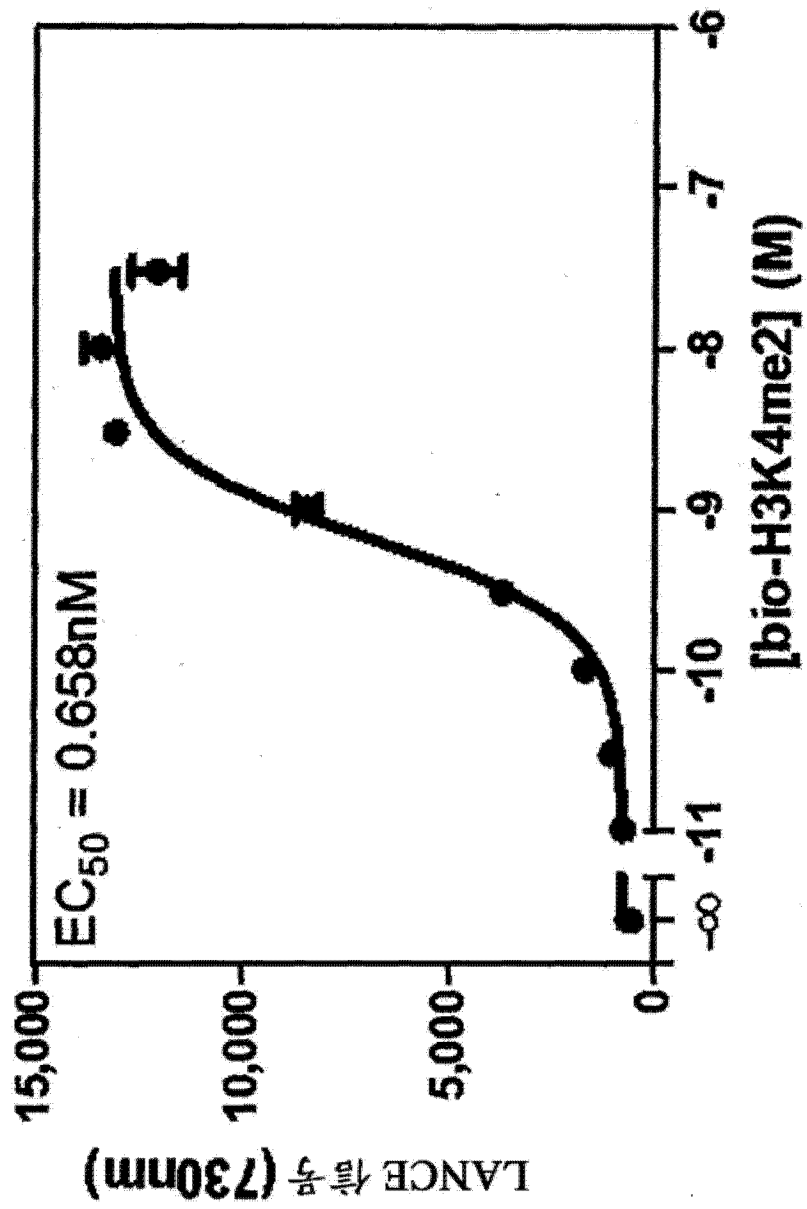


图 5B

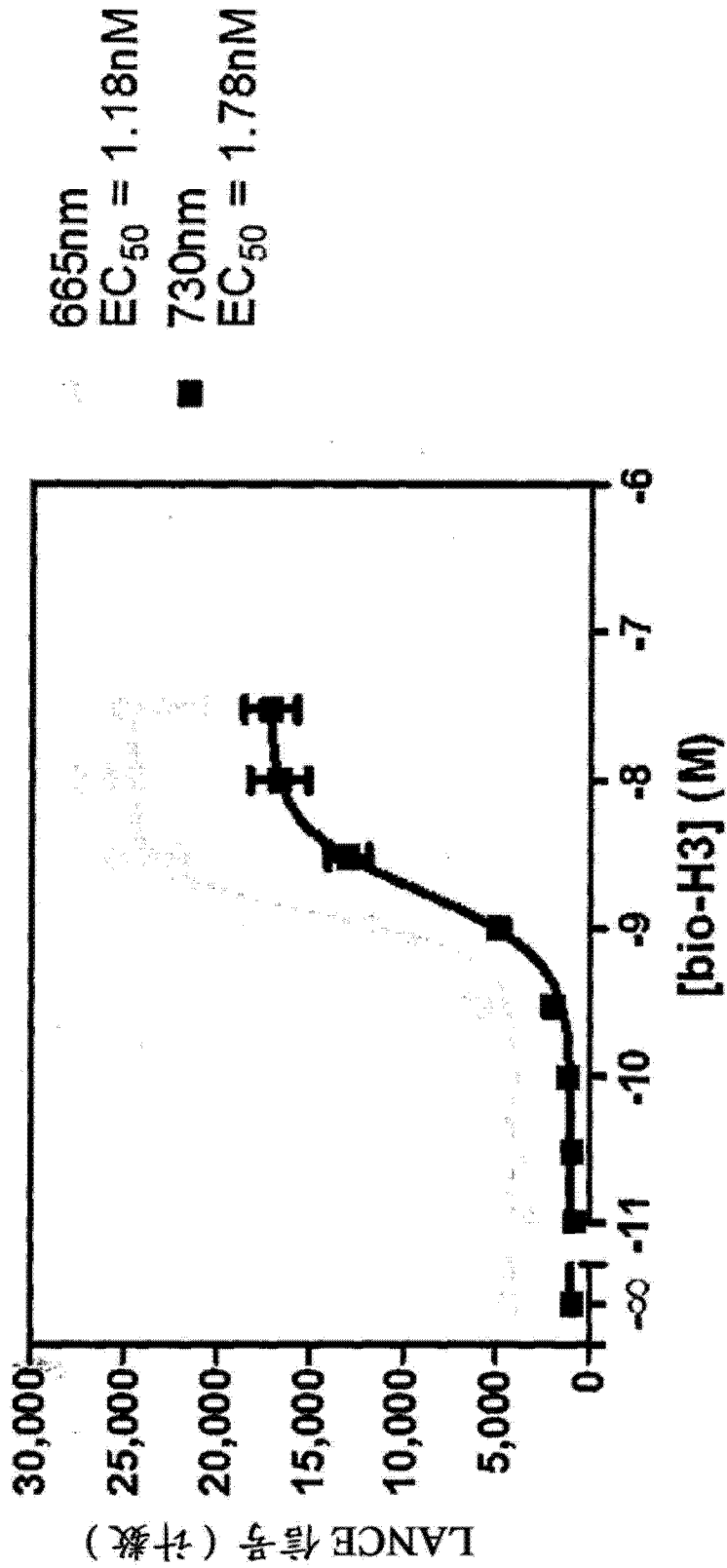


图 6

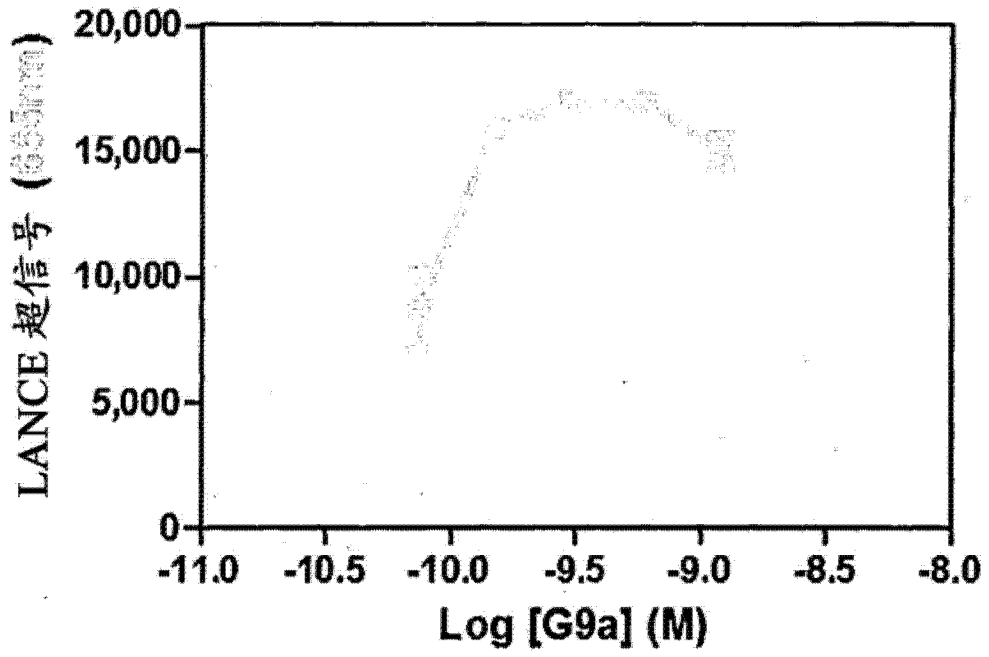


图 7A

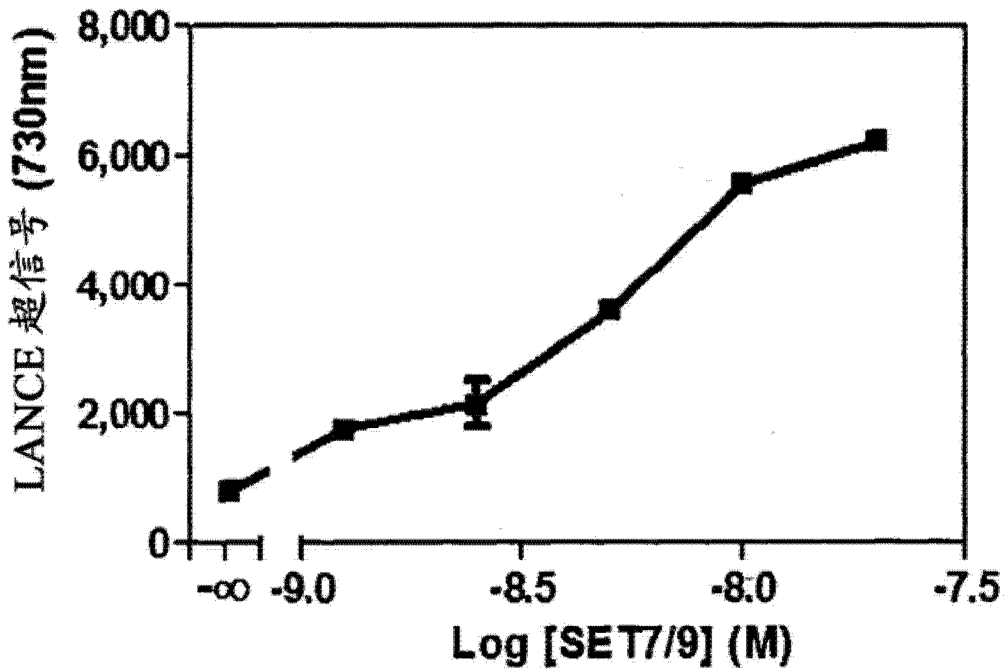


图 7B

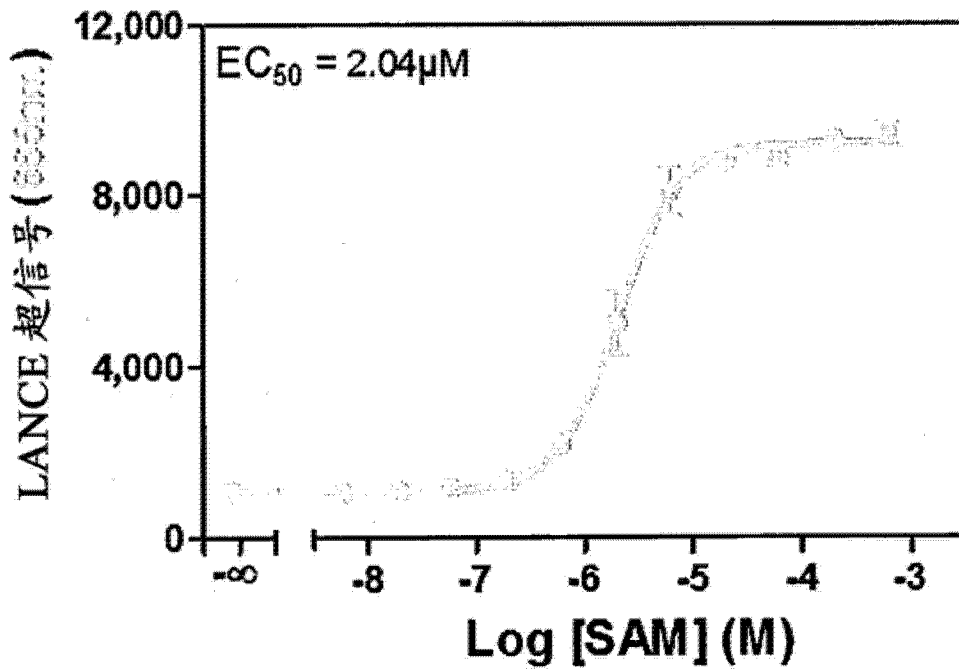


图 8A

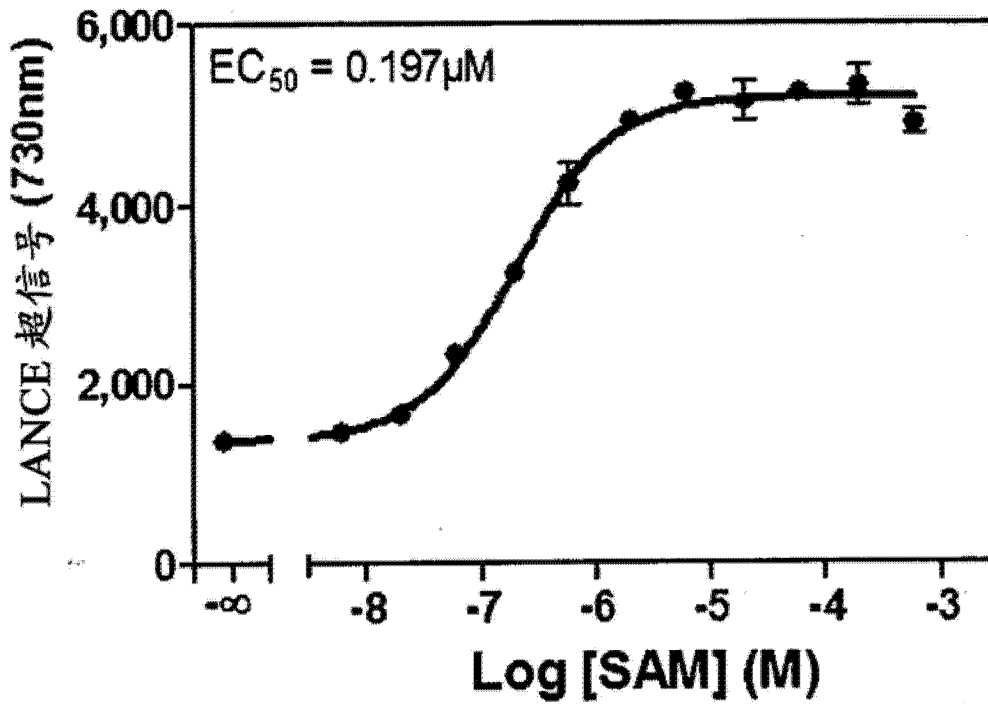


图 8B

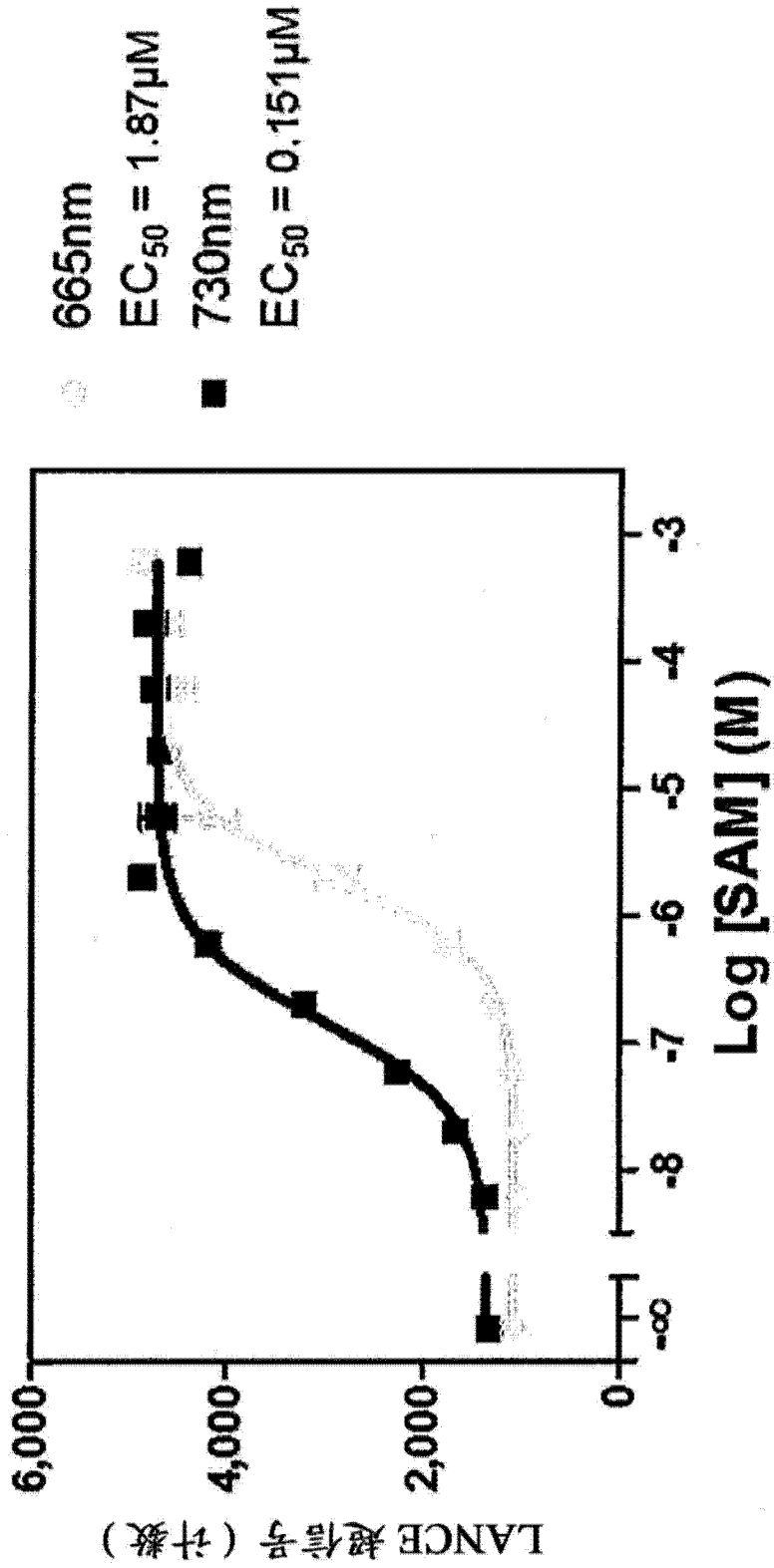


图 9

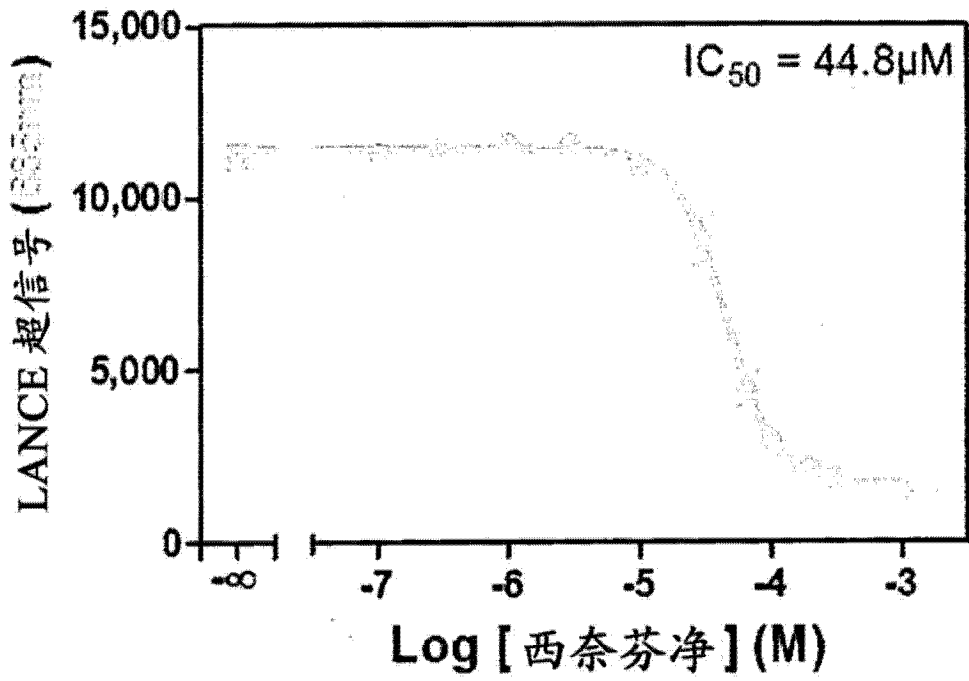


图 10A

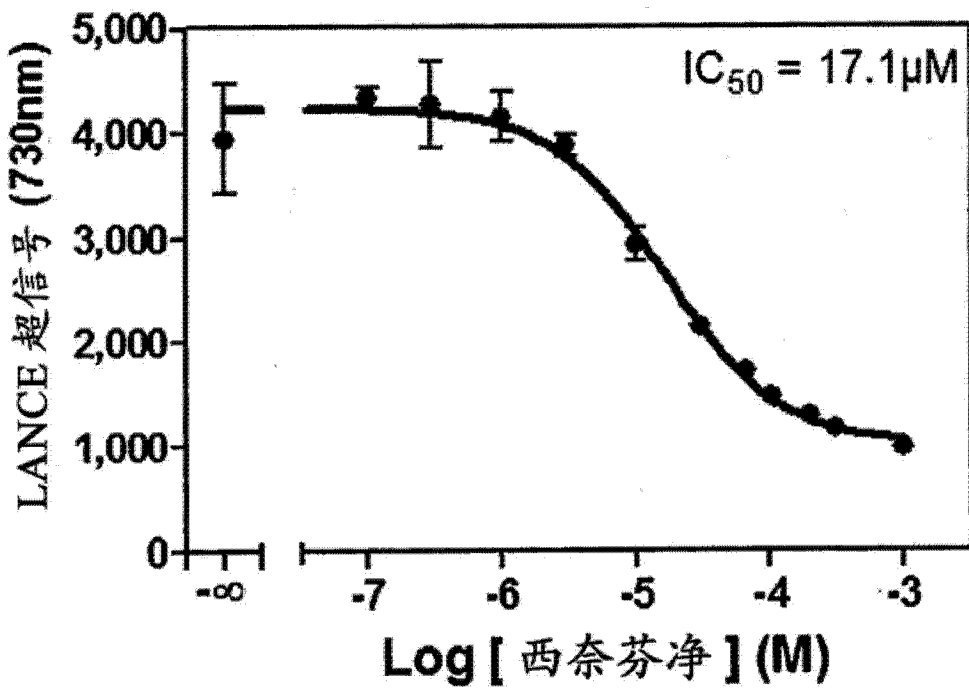


图 10B

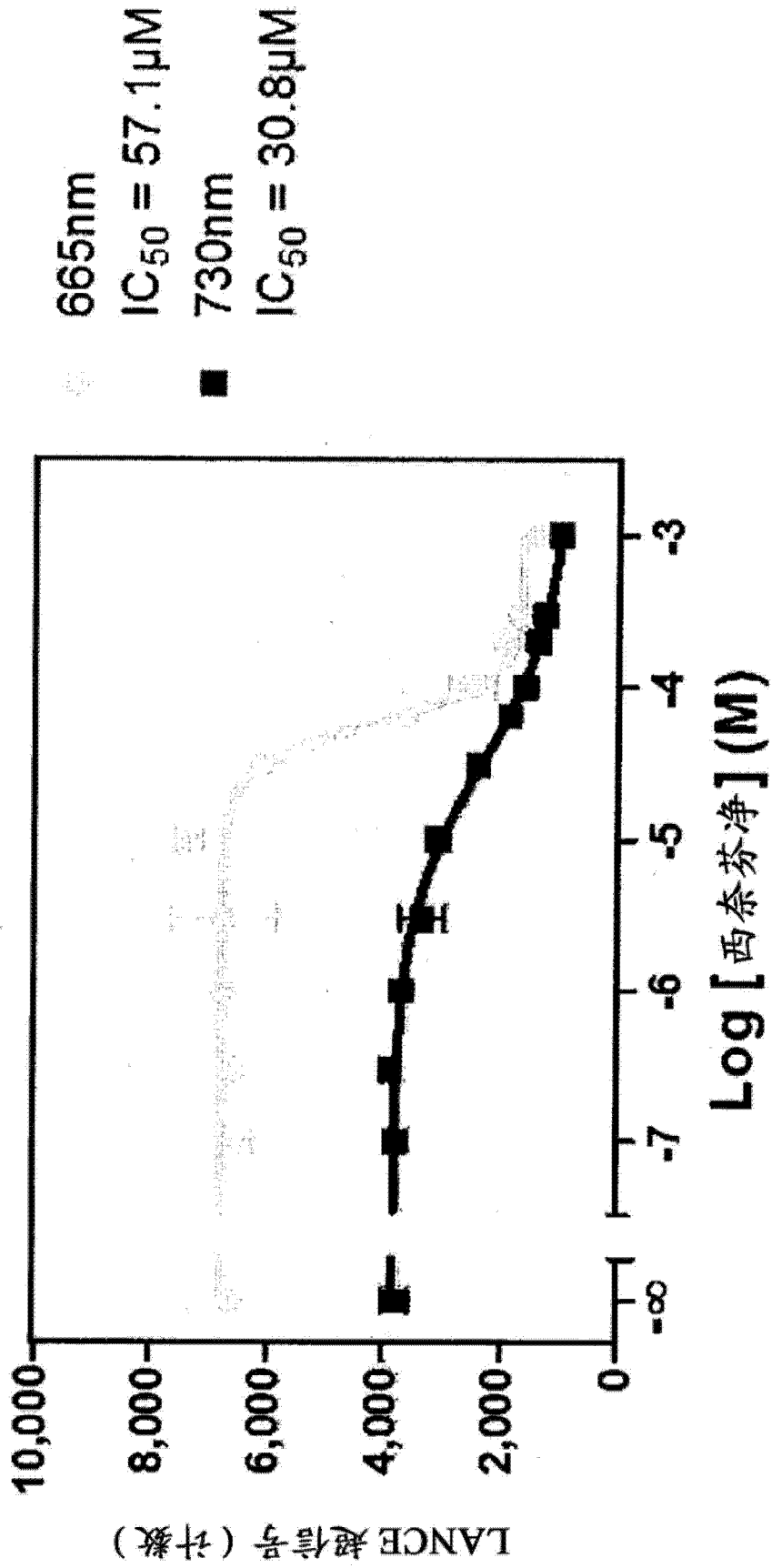


图 11

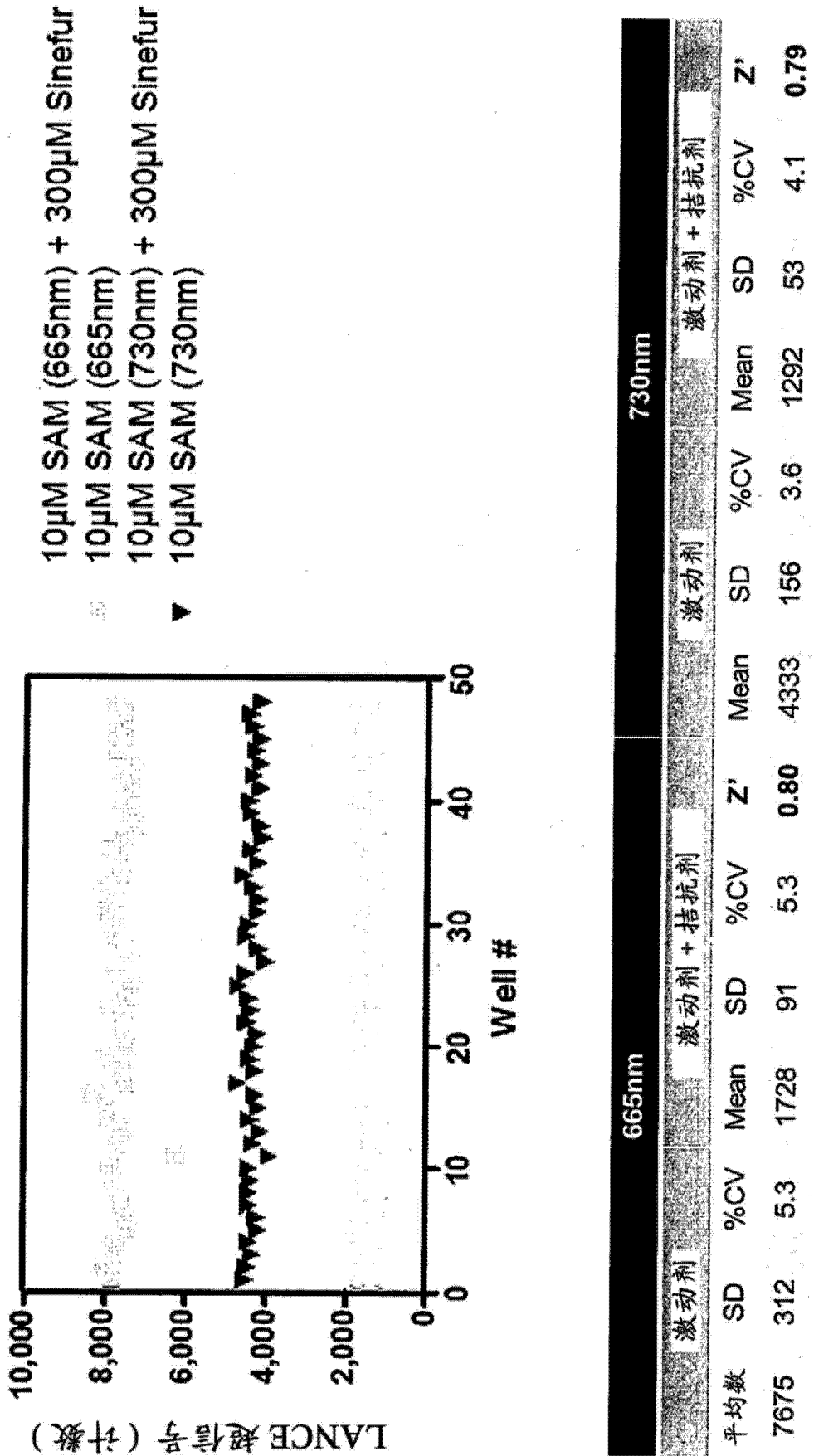


图 12

专利名称(译)	双受体时间分辨荧光共振能量转移法		
公开(公告)号	CN104204799A	公开(公告)日	2014-12-10
申请号	CN201380015407.5	申请日	2013-02-06
[标]发明人	P 罗比 B 伯恩德 S 达汉		
发明人	P.罗比 B.伯恩德 S.达汉		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/00 G01N33/573		
CPC分类号	G01N21/6428 G01N21/6486 G01N21/6408		
优先权	61/595459 2012-02-06 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供了使用双受体时间分辨荧光共振能量转移法确定样品中是否存在多种分析物的方法。

