

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/53 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580025067.X

[43] 公开日 2007年6月27日

[11] 公开号 CN 1989411A

[22] 申请日 2005.6.21

[21] 申请号 200580025067.X

[30] 优先权

[32] 2004.6.21 [33] US [31] 60/580,900

[86] 国际申请 PCT/US2005/021819 2005.6.21

[87] 国际公布 WO2006/002100 英 2006.1.5

[85] 进入国家阶段日期 2007.1.24

[71] 申请人 普罗吉安拉公司

地址 美国宾夕法尼亚州

[72] 发明人 陶西夫·R·巴特

亚历杭德罗·伯纳尔

[74] 专利代理机构 北京中誉威圣知识产权代理有限公司

代理人 丛芳 彭晓玲

权利要求书 10 页 说明书 44 页

[54] 发明名称

与蛋白水解活性相关的诊断和筛选方法以及试剂盒

[57] 摘要

用于评估蛋白水解酶活性和它的调节剂作用的方法和试剂盒，采用了泛素或泛素-样蛋白和信号生产结构。将相应的融合多核苷酸用于生产转基因细胞、植物和动物，它们可以通过用泛素-，UBL-或其C-末端结合功能性片段-报导融合多核苷酸稳定地转染，选择地转化所述细胞、植物或动物而生产。一种诊断疾病或症状的方法，包括使所述细胞、植物或动物接触或服用从被怀疑患有所述疾病或症状的对象体内获得的样品，检测在存在所述样品的条件下由所述报导物质产生的任何信号，并且将所述信号与0%以及100%的对照信号进行比较。

1. 一种用于评估蛋白水解酶活性的方法，包括提供融合聚合物，包括第一聚合物它包括泛素或泛素-样蛋白 (UBL) 或它的功能性 C-末端片段，第二聚合物包括检测所需要的游离的 N-末端氨基酸；其特征在于所述第一和第二聚合物彼此是通过 UBL C-末端和第二聚合物 N-末端可操作地连接的；

使所述融合聚合物与能裂解 UBL C-末端的蛋白水解酶接触；

检测裂解聚合物或疑似样品包括所述酶的数量或活性相关的信号；

和

建立裂解的聚合物信号与蛋白水解酶活性之间的关联。

2. 如权利要求 1 所述的方法，还包括通过参考 0% 以及 100% 的裂解信号将每一种酶或样品裂解信号统一化，并且确定每一种酶或它的样品的蛋白水解酶活性值；其特征在于当所获得的酶活性低于截断值时，可以认为所述酶或样品是无活性的，并且，当它高于所述截断值时，是有活性的。

3. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述 0% 以及 100% 的裂解信号是通过重复所述接触，检测和建立步骤，完全裂解和完全抑制蛋白水解酶活性获得的，以便获得 100% 以及 0% 的裂解信号。

4. 如权利要求 2 所述的方法，其特征在于所述统一化步骤是通过参考酶活性裂解值的曲线将每一种酶或样品裂解信号统一化进行的，并且确定每一种酶或它的样品的蛋白水解酶活性；其中，当所获得的酶活性低于截断值时，可以认为所述酶或样品是无活性的，并且，当它高于所述截断值时，是有活性的。

5. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述第一聚合物包括泛素，SUMO, Nedd8, ISG15, Apg8, Apg12, FAT10, Urm1, Hub, UBi, Rub1, ISG15, 或它们的结合功能性 C-末端片段包括 UBL' s 环内的将它的 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在 C-末端上的氨基酸。

6. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于第二聚合物包括一种报导蛋白，抗原，转录因子或它的功能性片段；和/或第一聚合物包括 UBL 或结合功能性 C-末端片段，该片段包括 UBL' s 环内的将它的 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在 C-末端上的氨基酸。

7. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述第一和/或第二聚合物在蛋白水解酶裂解时变得可以检测。

8. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于通过激活它或它们所携带的信号和/或通过结合到或产生可检测信号，所述第一和/或第二聚合物变得可以检测。

9. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述可检测信号包括具有

放射性，荧光，磷光，生色，声音，或可化学发光的信号。

10. 如权利要求 6 所述的方法，还包括

获得一个 UBL N-末端片段，该片段包括 UBL' s 环内的将它的 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在 C-末端上的氨基酸，或其余的氨基酸片段与 UBL C-末端片段形成 UBL；所述 UBL N-末端片段可操作地连接在第一和第二结合配偶体之一上；和

获得第二结合配偶体；其特征在于

所述融合聚合物是在结合第一和第二结合配偶体时裂解的。

11. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于所述结合配偶体包括受体和受体结合剂。

12. 如权利要求 11 所述的方法，其特征在于

所述受体结合制剂包括药物，激素，抗原，配体，或其受体结合功能性片段；和

所述受体包括药物受体，激素受体，抗体，配体结合受体，或其结合功能性片段。

13. 如权利要求 10 所述的方法，其特征在于所述 UBL N-和 C-末端的结合能够识别 UBL 构象和聚合物，在 C-末端通过蛋白水解酶裂解。

14. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述第一和第二聚合物彼此是共价结合的。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述第一和第二聚合物是通过接头可操作地连接的。

16. 如权利要求 15 所述的方法，其特征在于所述接头包括至少一个氨基酸。

17. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述融合聚合物包括一种融合蛋白。

18. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述蛋白水解酶包括一种肽酶或它的功能性片段。

19. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述蛋白水解酶包括一种泛素 C-末端水解酶，泛素-特异性蛋白酶或其功能性片段。

20. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述蛋白水解酶包括 ULP1, ULP2, SENP1, SENP2, 酵母 YUH1, 哺乳动物的 UCHL1, UCH-L3, UCH37, Bap1, USP-M, DUB-1, DUB-2, USP7, UNP, CYLD, CYLD1, KIAA0849, USP9X, DFFRX, USP9, FAFX, USP9Y, DFFRY, USP10, FAFY, OTUB1, OTB1, OTU1, HSPC263, OTUB2, C14 或 f137, OTB2, OTU2, USP10, KIAA0190, USP11, UHX1, USP12, UBH1m, USP12L1, USP13, ISOT3, USP14, TGT, USP15, KIAA0529, USP16, UBPM, USP18, UBP43, USP19, KIAA0891, ZMYND9, USP20, KIAA1003, LSFR3A, USP21, USP23, NEDD8-特异性蛋白酶, USP22,

KIAA1063, USP24, KIAA1057, USP25, USP26, USP28, USP29, USP30, USP32, USP33, KIAA1097, VDU1, USP35, KIAA1372, USP34, USP36, KIAA1453, USP37, KIAA1594, USP38, KIAA1891, USP40, USP42, USP44, USP46, USP49, USP51, UBP1, USP1, UBP2, USP2, UBP41, UBP3, USP3, UBP4, USP4, UNP, UNPH, UBP5, USP5, ISOT, UBP6, USP6, TRE2, UBP7, USP7, HAUSP, UBP8, USP8, KIAA0055, UBPY, VCIP, VCIP135, KIAA1850, Cezanne 1, Cezanne 2, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, VCIP, VCIP135, KIAA1850, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, FKSG8, PRSC2, DUB1, DUB2, DUB3, DUB4, 或其功能性片段。

21. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于第二聚合物包括一种丝氨酸蛋白酶, 激素原前体, 枯草杆菌蛋白酶/kexin-样激素原转化酶, 羧肽酶, 一种去整合蛋白-样和金属蛋白酶结构域 (reprolysin-型), 具有凝血栓蛋白 I 型基序 (ADAMTS), 一种去整合蛋白和金属蛋白酶结构域 (ADAM), 半胱氨酸天冬氨酸酶, 天冬氨酸蛋白酶, 基质金属蛋白酶 (MMP), RNA-依赖型 RNA 聚合酶, N-末端亲核试剂 (Ntn) 水解酶, 4-草酰巴豆酸酯互变异构酶, 分支酸合成酶, β -内酰胺酰化酶, 逆转录酶, 磷脂酶, 转录因子, 或其一个功能性片段。

22. 如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于第二聚合物包括一种病毒逆转录酶, σ 转录因子, 谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸 (PRPP) 转氨酶 (GPATase), 抗血友病因子 Xa, 3D^{pol} RNA-依赖型 RNA 聚合酶, 谷氨酰胺 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸转氨酶, 青霉素酰化酶, 逆转录酶, 分支酸合成酶, 类胰蛋白酶, 糜蛋白酶, 肠激酶, 转录因子 σ^k , 凝血酶, 二肽基肽酶, HtrA2, 后叶激素运载蛋白, 血管加压素, 弗林蛋白酶, 羧肽酶 B, 羧肽酶 Y, vWF-裂解蛋白酶/ADAMTS 13, ADAM 1, ADAM 2, caspase, 胃蛋白酶, 凝乳酶, 组织蛋白酶 D, Mason-Pfizer 猴病毒蛋白酶, MMP20, MMP26, 糖基天冬酰胺酶, 20S 蛋白酶体 β 亚基, 谷氨酰胺 PRPP 转氨酶, YdcE, YwhB, 头孢菌素酰化酶, CaMV 逆转录酶, 磷脂酶 A2, 或其片段。

23. 如权利要求 1 所述的方法, 还包括在能够实现它的表达的条件下表达一种编码所述融合蛋白的多核苷酸。

24. 如权利要求 23 所述的方法, 其特征在于所述多核苷酸是在一种真核细胞, 或它的级份或提取物内表达的。

25. 如权利要求 23 所述的方法, 还包括分离由此获得的融合蛋白;

和选择性地纯化所述融合蛋白。

26. 如权利要求 1 所述的方法，还包括

在存在被怀疑包括蛋白水解酶活性调节剂的样品的条件下重复所述接触，检测和建立步骤；和

通过比较样品信号与在没有样品的条件下获得的所述相应的酶活性信号，测定一个所述样品对所述蛋白水解酶活性影响的值。

27. 如权利要求 25 所述的方法，其特征在于所述样品包括一种生理性液体，组织样品，细胞，或细胞级份。

28. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述步骤中的一个或多个是在细胞或组织培养物中，在细胞或组织提取物上，在体外，体内，自体内进行的。

29. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于所述检测步骤包括检测细胞生长，或检测生色，放射性，荧光，磷光或化学发光信号。

30. 如权利要求 26 所述的方法，其特征在于所述接触，检测，建立和测定步骤是用怀疑包括一种蛋白水解酶活性调节剂的多种样品分别进行的，以便获得一个所述样品对所述蛋白水解酶活性影响的值。

31. 如权利要求 30 所述的方法，它是自动化的。

32. 如权利要求 30 所述的方法，它收集，加工和报导所获得的每一种样品和对照的信息。

33. 一种用于评估蛋白水解酶活性的试剂盒，包括

一种融合聚合物，包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或其一个 C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括一种多肽，该多肽需要一个用于检测的游离的 N-氨基酸末端；其特征在于所述第一和第二聚合物彼此是通过所述泛素或 UBL C-末端和所述第二聚合物 N-末端可操作地连接的；和

有关进行蛋白水解酶分析，检测与所述第一和/或第二聚合物的数量或活性相关的信号，以及建立所述检测信号与所述酶的蛋白水解活性的相关性的说明；和

一种可选的能裂解 UBL C-末端的蛋白水解酶的来源。

34. 如权利要求 33 所述的试剂盒，还包括

第一和第二结合配偶体，其特征在于所述第一配偶体能够可操作地连接在一个 UBL N-末端片段上，并且，其中，当所述第一和第二结合配偶体彼此结合时，所述 UBL C-末端片段与所述 UBL N-末端片段结合，使得一种 UBL 构象，所述蛋白水解酶能够裂解所述融合聚合物；

用于实施所述酶裂解步骤的制剂；

用于实施所述检测步骤的装置；和

用于关联所述可检测信号和所述蛋白水解酶活性或其变化的装置。

35. 如权利要求 33 所述的试剂盒，其特征在于

所述融合聚合物包括一种融合蛋白；所述试剂盒还包括一种编码的融合多核苷酸，用于取代所述融合聚合物；和可选择的制剂的一种或多种，用于表达所述多核苷酸；和/或一个或多个细胞或它的级份或提取物，在取代所述融合蛋白时，用于表达所述多核苷酸。

36. 如权利要求 33 所述的试剂盒，还包括用于分别容纳多种样品的装置；和自动进行所述分析的说明。

37. 如权利要求 33 所述的试剂盒，还包括用于自动处理每一样品的数据的装置；和它的使用说明。

38. 一种用于筛选化合物对蛋白水解活性的作用的方法，包括获得一种融合聚合物，该融合聚合物包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白 (UBL) 或它的一个结合功能性 C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括一种游离的 N-末端氨基酸；其特征在于所述第一和第二聚合物彼此是通过所述 N-C-末端可操作地连接的；

在能进行所述裂解的条件下使所述融合聚合物与 UBL C-末端裂解蛋白水解酶接触；

检测一个与相当数量裂解相关的信号以获得一个 100% 的裂解信号；

在存在一种蛋白水解酶活性的完全抑制剂的条件下重复所述接触和检测步骤，以便获得一个 0% 的裂解信号；

获得一组化合物；

在存在每一种化合物的条件下分别重复所述融合聚合物的获得，接触和检测步骤，以便获得一个裂解信号；

通过参考 0% 及 100% 的裂解信号将每一种化合物的裂解信号标准化，并且确定每一种蛋白水解酶活性值。

39. 如权利要求 38 所述的方法，包括

用一种已知的蛋白水解酶活性调节剂进行接触和检测步骤，以便获得一个点的裂解对照信号，而不是所述 0% 及 100% 的裂解信号；

通过参考在没有所述调节剂的条件下获得的相应的酶活性值，测定所述调节剂的一个蛋白水解酶活性值；和

通过参考对照裂解信号将每一种化合物的裂解信号标准化，并且确定每一种蛋白水解酶活性值。

40. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述标准化步骤是通过参考酶活性裂解值曲线将每一种化合物的裂解信号标准化，并且确定每一种化合物的一种蛋白水解酶活性进行的；其中，当所获得的酶活性低于截断值时，可以认为所述化合物是无活性的，当它高于所述截断值的，

所述化合物是有活性的。

41. 如权利要求 37 所述的方法，其特征在于所述截断值是 50% 蛋白水解酶活性，并且在存在所述化合物的条件下，当所述酶活性降低至少 50% 时，可以认为所述化合物是抑制剂，当所述酶活性提高至少 50% 时，所述化合物是增强剂。

42. 如权利要求 38 所述的方法，还包括
测定能将酶活性抑制 (IC_{50}) 和/或提高 (EC_{50}) 50% 的化合物浓度；
和

比较化合物的 IC_{50} 和/或 EC_{50} ，以便评估它作为抑制剂和/或增强剂的酶活性强度。

43. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述调节剂包括一种蛋白水解酶活性活化剂。

44. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述调节剂包括一种蛋白水解酶活性抑制剂。

45. 如权利要求 38 所述的方法，其中，上述步骤中的一个或多个是在细胞或组织培养物中，在细胞级份或组织提取物上，在体外，体内，自体内进行的。

46. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述检测步骤包括细胞生长，生色，放射性，荧光，磷光，声音，化学发光检测。

47. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述第一聚合物包括泛素，SUMO，Nedd8，ISG15，Apg8，Apg12，FAT10，Urm1，Hub，UBi，Rub1，ISG15，或一个结合功能性 C-末端片段，该片段包括 UBL' s 环内的将它的 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在 C-末端上的氨基酸。

48. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于
所述第二聚合物包括一种报导蛋白，或它的一个结合功能性 C-末端片段；和/或

所述第一聚合物包括一个结合功能性 C-末端片段，该片段包括 UBL' s 环内的将它的 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在 C-末端上的氨基酸。

49. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述第一和/或第二聚合物在蛋白水解酶裂解时变得可以检测。

50. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于通过激活它所携带的信号和/或通过结合或生成可检测信号，所述第一和/或第二聚合物变得可以检测。

51. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述可检测信号包括一个放射性，荧光，磷光，生色，声音信号。

52. 如权利要求 45 所述的方法，还包括
获得一个结合功能性 N-末端 UBL 片段，该片段包括一种 UBL' s 环内的将其 α -螺旋 1 和 β -链 3 连接在它的 N-末端的氨基酸，其特征在于

当所述 N-末端片段和所述 C-末端片段彼此结合时，它们形成了一个完整的 UBL，并且所述 UBL N-末端片段可操作地连接在第一和第二结合配偶体中的一个上；和

获得第二结合配偶体；和，其中

所述融合聚合物是在与所述第一和第二结合配偶体结合时裂解的。

53. 如权利要求 52 所述的方法，其特征在于所述结合配偶体包括一种受体和一种受体结合制剂。

54. 如权利要求 52 所述的方法，其特征在于

所述受体结合制剂包括药物，激素，抗原，配体，或其功能性片段；

和

所述受体包括药物受体，激素受体，抗体，配体结合受体，或其功能性片段。

55. 如权利要求 52 所述的方法，其特征在于所述 UBL N-和 C-末端的结合使得能够识别由所述蛋白水解酶裂解的一种 UBL 构象和聚合物。

56. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述第一和第二聚合物彼此是共价结合的。

57. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述第一和第二聚合物是通过接头可操作地连接的。

58. 如权利要求 57 所述的方法，其特征在于所述接头包括至少一个氨基酸。

59. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述融合聚合物包括一种融合蛋白。

60. 如权利要求 38 的方法，其中，所述蛋白水解酶包括肽酶或它的功能性片段。

61. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述蛋白水解酶包括一种泛素 C-末端水解酶，泛素-特异性蛋白酶或其功能性片段。

62. 如权利要求 38 所述的方法，其特征在于所述蛋白水解酶包括 ULP 1, ULP2, SENP 1, SENP2, 酵母 YUH1, 哺乳动物 UCHL1, UCH-L3, UCH37, Bap1, USP-M, DUB-1, DUB-2, USP7, UNP, CYLD, CYLD1, KIAA0849, USP9X, DFFRX, USP9, FAFX, USP9Y, DFFRY, USP10, FAFY, OTUB1, OTB1, OTU1, HSPC263, OTUB2, C14 或 f137, OTB2, OTU2, USP10, KIAA0190, USP111, UHX1, USP12, UBH1m, USP12L1, USP13, ISOT3, USP14, TGT, USP15, KIAA0529, USP16, UBPM, USP18, UBP43, USP19, KIAA0891, ZMYND9, USP20, KIAA1003, LSFR3A, USP21, USP23, NEDD8-特异性蛋白酶, USP22, KIAA1063, USP24, KIAA1057, USP25, USP26, USP28, USP29, USP30, USP32, USP33, KIAA1097, VDU1, USP35, KIAA1372, USP34, USP36, KIAA1453, USP37, KIAA1594, USP38, KIAA1891, USP40, USP42, USP44, USP46, USP49, USP51, UBP1, USP1, UBP2, USP2, UBP41, UBP3, USP3, UBP4,

USP4, UNP, UNPH, UBP5, USP5, ISOT, UBP6, USP6, TRE2, UBP7, USP7, HAUSP, UBP8, USP8, KIAA0055, UBPY, VCIP, VCIP135, KIAA1850, Cezanne 1, Cezanne 2, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, VCIP, VCIP135, KIAA1850, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, FKSG8, PRSC2, DUB1, DUB2, DUB3, DUB4, 或其一个功能性片段。

63. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于所述第二聚合物包括一种丝氨酸蛋白酶, 激素原前体, 枯草杆菌蛋白酶/kexin-样激素原转化酶, 羧肽酶, 一种去整合蛋白-样和金属蛋白酶结构域 (reprolysin-型), 具有凝血酶蛋白 I 型基序 (ADAMTS), 一种去整合蛋白和金属蛋白酶结构域 (ADAM), 半胱氨酸天冬氨酸酶, 天冬氨酸蛋白酶, 基质金属蛋白酶 (MMP), RNA-依赖型 RNA 聚合酶, N-末端亲核试剂 (Ntn) 水解酶, 4-草酰巴豆酸酯互变异构酶, 分支酸合成酶, β -内酰胺酰化酶, 逆转录酶, 磷脂酶, 转录因子或其一个功能性片段。

64. 如权利要求 38 所述的方法, 其特征在于所述第二聚合物包括一种病毒逆转录酶, σ 转录因子, 谷氨酰胺 磷酸核糖基焦磷酸 (PRPP) 转氨酶 (GPATase), 抗血友病因子 Xa, 3D^{pol} RNA-依赖型 RNA 聚合酶, 谷氨酰胺 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸转氨酶, 青霉素酰化酶, 逆转录酶, 分支酸合成酶, 类胰蛋白酶, 糜蛋白酶, 肠激酶, 转录因子 σ^k , 凝血酶, 二肽基肽酶, HtrA2, 后叶激素运载蛋白, 血管加压素, 弗林蛋白酶, 羧肽酶 B, 羧肽酶 Y, vWF-裂解蛋白酶/ADAMTS 13, ADAM 1, ADAM 2, caspase, 胃蛋白酶, 凝乳酶, 组织蛋白酶 D, Mason-Pfizer 猴病毒蛋白酶, MMP20, MMP26, 糖基天冬酰胺酶, 20S 蛋白酶体 β 亚基, 谷氨酰胺 PRPP 转氨酶, YdcE, YwhB, 头孢菌素酰化酶, CaMV 逆转录酶, 磷脂酶 A2, 或其一个功能性片段。

65. 如权利要求 59 所述的方法, 其特征在于所述融合蛋白是通过表达一种编码所述融合蛋白的多核苷酸获得的。

66. 如权利要求 65 所述的方法, 其特征在于所述多核苷酸是在真核细胞或其级份或提取物中表达的。

67. 如权利要求 65 所述的方法, 还包括
分离由此获得的融合蛋白; 和
选择性地纯化融合蛋白。

68. 如权利要求 38 所述的方法, 该方法是自动化的。

69. 如权利要求 68 所述的方法, 该方法收集, 加工和报导所获得的每一种调节剂和对照的信息。

70. 一种蛋白水解酶活性调节剂筛选试剂盒, 包括

一种融合聚合物, 该融合聚合物包括第一聚合物, 该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白 (UBL) 或其一个 C-末端片段, 和第二聚合物, 该第二聚合物包括一种多肽, 该多肽需要用于检测的游离的 N-氨基酸末端; 其特征在于所述第一和第二聚合物彼此通过所述泛素或 UBL C-末端和所述第二聚合物 N-末端是可操作地连接的; 和

有关进行多种调节剂和对照的蛋白水解酶分析, 检测与所述第一和/或第二聚合物的数量和活性相关的一个信号, 以及建立检测到的信号与所述酶的蛋白水解活性的相关性的说明; 和

能裂解所述泛素或 UBL C-末端的一种蛋白水解酶的选择性的来源。

71. 如权利要求 70 所述的试剂盒, 还包括

第一和第二结合配偶体中的一种或多种, 其特征在于所述第一配偶体能够可操作地连接在一个 UBL N-末端片段上, 并且, 其中, 当所述第一和第二结合配偶体彼此结合时, 所述 UBL C-末端片段与所述 UBL N-末端片段结合, 使得一种 UBL 构象, 所述蛋白水解酶能够裂解所述融合聚合物;

用于对所述融合聚合物进行 UBL C-末端酶裂解的制剂;

用于检测一个由所述第一和/或第二裂解的聚合物发出的信号的装置; 和

用于关联所述可检测信号与对照的蛋白水解酶活性或其变化的装置。

72. 如权利要求 70 所述的试剂盒, 其特征在于

所述融合聚合物包括一种融合蛋白; 和所述试剂盒还包括

一种编码它的融合多核苷酸, 用于取代所述融合聚合物; 和

用于多核苷酸表达的选择性的制剂的一种或多种; 和/或

在用于取代所述融合蛋白时, 用于表达所述多核苷酸的一个或多个细胞或其级份或提取物。

73. 如权利要求 70 所述的试剂盒, 还包括

用于分别包含多种样品的装置; 和

自动进行所述分析的说明。

74. 如权利要求 70 所述的试剂盒, 还包括

用于自动处理每一种样品的数据的装置; 和

其使用说明。

75. 一种转基因细胞、植物或动物, 它包括选择性地整合在所述细胞、植物或动物染色体中的一种泛素-或 UBL-报导融合多核苷酸; 其中, 所述报导物与一种特殊的疾病或症状或其家族相关。

76. 如权利要求 75 所述的转基因细胞、植物或动物，它能够表达一种泛素-或 UBL-报导融合蛋白。

77. 如权利要求 76 所述的转基因细胞、植物或动物，它是通过形成杂交载体获得的，包括将所述融合多核苷酸克隆到载体上，并且用杂交载体转染所述细胞、植物或动物。

78. 如权利要求 77 所述的转基因细胞、植物或动物，其特征在于所述载体包括一种质粒，并且所述细胞包括一种真核细胞。

79. 如权利要求 70 所述的转基因细胞、植物或动物，对它进行进一步修饰，以使用作疾病或症状的细胞、植物或动物模型。

80. 如权利要求 79 所述的转基因细胞、植物或动物，其特征在于所述肽酶与自体免疫，肿瘤，遗传突变，代谢，心脏血管或神经变性疾病或症状相关。

81. 如权利要求 80 所述的转基因细胞、植物或动物，其特征在于所述疾病或症状包括癌症，狼疮，糖尿病，IBD，心血管病，神经变性，或炎性症状。

82. 一种生产如权利要求 75 所述的转基因细胞、植物或动物的方法，包括

获得细胞、植物或动物；

获得一种泛素-，UBL-或其 C-末端结合功能性片段-报导融合多核苷酸；

获得一种杂交载体，携带有可操作地连接在一种载体上的杂交多核苷酸；和

将所述杂交载体稳定地转入所述细胞、植物或动物中。

83. 如权利要求 82 所述的方法，其特征在于所述融合多核苷酸被整合在细胞、植物或动物染色体上。

84. 如权利要求 82 所述的方法，其特征在于所述融合多核苷酸包括一种融合脱氧核糖核苷酸。

85. 一种诊断疾病或症状的方法，包括

获得如权利要求 75 所述的细胞、植物或动物，或其级份或组织，其特征在于所述报导物与疾病或症状相关；

让所述细胞、植物或动物接触或服用从被怀疑患有所述疾病或症状的对象体内获得的样品；

检测在存在所述样品的条件下由所述报导物质产生的任何信号；和将所述信号与对照的 0%及 100%的信号进行比较。

与蛋白水解活性相关的诊断和筛选方法以及试剂盒

相关申请

本专利要求申请日为2004年6月21日的美国临时申请60/580, 900的优先权, 该申请的名称为“评估肽酶活性的方法”。

技术领域

本专利提供了用于定性和定量评估泛素和泛素-样蛋白水解酶活性的材料和方法, 以及用于评估和/或筛选对它们的蛋白水解酶活性产生影响的化合物, 用于检测在生物学样品中的活性的新型酶的发现, 它可用于诊断与改变了的酶含量, 数量, 序列和/或活性相关的症状和疾病。该方法还以转基因细胞、植物和动物的形式应用在疾病模型中。

背景技术

泛素 (Ub) 肽酶是在十多年以前首次克隆的。不过, 到目前为止, 还没有适合分析对Ub或泛素-样蛋白 (UBL) 专一的蛋白水解酶的合适的分析方法, 或用于快速筛选所述酶的调节剂或抑制剂的方法。目前所使用的大部分方法取决于线性Ub-融合体的裂解, 它是在大肠杆菌中生产的, 例如, 四-Ub, Ub-CEP52, Ub-GSTP1, Ub-DHFR, 和Ub-PESTc等等, 或化学合成的。在这些分析方法中, 反应产物是通过凝胶电泳分析的, 或者选择性地沉淀, 然后通过液体闪烁光谱测定法分析。

这些分析方法具有显著的缺陷, 例如, 明胶型方法是劳动密集型的和高成本的。不过, 选择性沉淀/闪烁计数提供了定量结果, 并且可以处理比明胶型分析方法更大数量的样品, 它需要离心和上清液分离。泛素-7-氨基-4-甲基香豆素 (Ub-AMC) 是一种高处理量筛选 (HTS) 的荧光底物, 它是通过商业渠道获得的并且便于使用。不过, 与泛素C-末端水解酶 (UCHs) 不同, 大部分泛素特异性蛋白酶 (USPs) 不能裂解泛素 (Ub) 分子上的小基团。另外, AMC是高疏水性的, 并且根据它自身与测试化合物的相互作用, 可能在筛选中产生假阳性。业已采用了其他检测裂解的方法, 例如, 高压液相层析方法 (HPLC) 和质谱测定法, 尽管这些方法具有它们自身的缺陷。另外, 上述现有方法中没有一种适合或适应于高处理量筛选, 这种筛选需要简单的 (最小数量步骤) 分析, 它可以使使用多孔平板进行, 并且它的终点可以直接从平板上读取。

因此, 需要简单并且本质上相对廉价, 同时又适合对泛素或泛素-样蛋白 (UBL) 蛋白水解酶的调节剂进行的高处理量筛选的分析方法和试剂盒。

发明内容

本发明的一个方面涉及用于评估蛋白水解酶活性的方法，该方法包括

提供一种融合聚合物，它包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或它的一个功能性C-末端片段，和第二聚合物，包括检测所需要的一种游离的N-末端氨基酸；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过UBL C-末端和所述第二聚合物N-末端可操作地连接的；

使所述融合聚合物与能裂解UBL C-末端的一种蛋白水解酶接触；

检测与裂解的聚合物的数量和活性相关的信号；和

建立裂解的聚合物信号与所述蛋白水解酶活性之间的相关性。

为了实现上述方法，本专利提供了用于评估蛋白水解酶活性的试剂盒，包括

一种融合聚合物，包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或其一个C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括一种多肽，该多肽需要一个用于检测的游离的N-氨基酸末端；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述泛素或UBL C-末端和所述第二聚合物N-末端可操作地连接的；和

有关进行蛋白水解酶分析，检测与所述第一和/或第二聚合物的数量和活性相关的信号，以及建立检测到的信号与所述酶的蛋白水解活性的关联；和

可选的能裂解UBL C-末端的一种蛋白水解酶的来源和若干其他成分。

本发明的另一方面涉及用于筛选影响蛋白水解活性的化合物的方法，包括

获得一种融合聚合物，该融合聚合物包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或它的一个结合功能性C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括一种游离的N-末端氨基酸；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述N-C-末端可操作地连接的；

在能进行所述裂解的条件下使所述融合聚合物与一种UBL C-末端裂解蛋白水解酶接触；

检测与裂解数量相关的信号，以便获得100%的裂解信号；

在存在一种蛋白水解酶活性完全抑制剂的条件下重复所述接触和检测步骤，以便获得0%的裂解信号；

获得一组化合物；

在存在每一种化合物的条件下分别重复所述融合聚合物获得，接触和检测步骤，以便获得裂解信号；

通过参考0%以及100%的裂解信号将每一种化合物的裂解信号标准

化，并且确定每一种化合物的一个蛋白水解酶活性值。

为了实施第二种方法，本专利提供了一种蛋白水解酶活性调节剂筛选试剂盒，包括

一种融合聚合物，包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或其一个C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括一种多肽，该多肽需要一个用于检测的游离的N-氨基酸末端；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述泛素或UBL C-末端和所述第二聚合物N-末端可操作地连接的；和

多种调节剂和对照的有关进行蛋白水解酶分析，检测与所述第一和/或第二聚合物的数量和活性相关的一个信号，以及建立所述检测到的信号与所述酶的蛋白水解活性的相关性的说明；和

能裂解所述泛素或UBL C-末端的蛋白水解酶的可选择的来源，以及适合不同实施方案的其他成分。

本发明还涉及一种转基因细胞、植物或动物，包括一种可选择性地整合到所述细胞、植物或动物染色体中的泛素-或UBL-报导融合多核苷酸；其中，所述泛素或UBL-特异性肽酶与特定的疾病或症状或其家族相关。

所述转基因细胞、植物或动物可以通过以下步骤获得

获得细胞、植物或动物；

获得一种泛素-，UBL-或其C-末端结合功能性片段-报导融合多核苷酸；

获得一种杂交载体，它携带有可操作地与载体连接的杂交多核苷酸；和

将所述杂交载体稳定地转入所述细胞、植物或动物。

本专利还披露了诊断一种疾病或症状的方法，包括

获得本发明所述细胞、植物或动物，或其级份或组织，其中，所述泛素或UBL-特异性肽酶与疾病或症状相关；

使所述细胞、植物或动物接触或服用从被怀疑患有所述疾病或症状的对象体内获得的样品；

检测在存在所述样品的条件下由所述报导物质产生的任何信号；和将所述信号与对照的0%以及100%信号的进行比较。

通过以下讨论，本领域技术人员可以理解本发明的其他目的，优点和特征。

具体实施方式

本发明是由于发明人改善现有分析与泛素和泛素-样蛋白（UBL）相关的蛋白水解酶活性的方法的愿望而产生的。在了解现有方法的固有缺陷后，本发明人研究了提供一种简单的，具有便于测定的终点，并且适

合或适用于高处理量筛选，数据采集的自动化和计算机化方法的几率的领域。本发明的酶活性分析和试剂盒采用了相对廉价的元件，需要少量的操作，可以使用多孔平板进行，并因此是自动化的，它们的终点可以直接从平板上读出，并且数据采集和分析是计算机化的。本发明方法和试剂盒的特征还在于对泛素或泛素-样蛋白（通称为UBL）蛋白水解酶的调节剂进行高处理量筛选。本发明满足了研究和卫生保健行业对提供分析UBL酶活性的快速，廉价，选择性和简单的方法的要求，该方法适合对UBL蛋白水解酶调节剂进行高处理量筛选，并且可用于诊断与UBLs蛋白水解酶，如肽酶等等相关的疾病和症状，并且用于筛选新的酶和UBL酶调节剂。

本发明涉及酶活性，它的调节和检测的领域，更具体地讲，涉及泛素和泛素-样蛋白（UBL）蛋白水解活性，例如，肽酶/水解酶/蛋白酶，它们的调节和检测。本专利提供了用于定性和/或定量评估UBL蛋白水解酶活性的试剂盒和方法，用于评估或筛选能影响酶活性的化合物和药剂的方法，以及用于检测生物样品中的活性的方法。通过Velcade®在治疗顽固性复发性多发性骨髓瘤方面的介绍和临床成功，业已验证了泛素-蛋白酶体途径。参见Adams（2002）。

据说，该途径能调控大部分蛋白的细胞含量和/或区域化，并且是正在开发的有希望的药物发现领域。参见，Ciechanover（2001）；Ciechanover（2003）。在任何特定时间，所述蛋白的细胞含量都被认为是通过它的合成和降解速度的组合调控的，每一种蛋白具有特有的合成和降解方式，以便确保正确的细胞功能。降解被认为是以不同方式发生的。细胞外或膜相关蛋白被认为总体上是在溶酶体内降解的，它们是通过高尔基-核内体细胞器导入其中的。SoUBLE，细胞质蛋白被认为是以调控形式通过泛素-蛋白酶体途径降解的。后一种途径被认为占有异常的，错误折叠的蛋白和细胞中大部分短寿命的调控蛋白降解的大约90%。另外，蛋白酶体还被认为参与了大部分长寿命蛋白的降解。据估计，泛素-蛋白酶体途径占细胞蛋白降解的80-90%。参见，Lee和Goldberg（1998）。泛素-蛋白酶体途径的目标包括细胞周期和分裂调节剂，离子通道，肿瘤抑制剂和转录因子，还包括其他部分。参见，Hershko和Ciechanover（1998）；Vu和Sakamoto（2000）；Conaway，等（2002）。由于它代表了大范围的底物，因此它被认为暗示了Ub-蛋白酶体途径参与了细胞周期进展，细胞凋亡，免疫反应，发育，转录调节，信号转导，和受体下调，还包括其他功能。由于所述途径在细胞发展过程中占据如此重要的地位，与各种疾病，例如，帕金森氏症，子宫颈癌，和von Hippel Lindau 综合症相关的病理学等等业已与该途径的异常相关联。例如，参见，Kitada，等（1998）；Leroy，等（1998）；Kato（1999）；Swinney（2001）。

泛素是一种76个氨基酸的蛋白，它似乎是最保守的真核结构。业内还未发现，它是以单体形式编码的，不过，反而是作为C-末端延伸蛋白表达的。例如，两种哺乳动物核糖体蛋白是作为泛素融合蛋白编码的。据信，所有真核细胞都包括有效的泛素C-末端水解酶，所有这些酶都能裂解所述融合蛋白的泛素羧基（C-）末端。另外，业已证实泛素基因产物的人工融合体可以在真核细胞中表达和裂解。例如，业已证实原核生物，大肠杆菌既不包含泛素也不包含泛素途径。有多种同源的泛素蛋白是已知的，例如，SUMO，Nedd8，ISG15，Apg8，Apg12，FAT10，Urm1，Hub，GDX，HCG-1，BMSC-UBP，和UBi等等。所述泛素-样蛋白（UBL）与泛素的同源性一般局限于它们的氨基酸序列的大约15-30%，并且它们中的很多是作为前体蛋白编码的和/或包括C-末端延长。由真核细胞产生的这些“融合体”可以直接由高专一性水解酶加工，表明了UBL水解酶（蛋白酶）在控制成熟的UBLs含量方面发挥重要作用。泛素的C-末端通过多种酶与靶蛋白的N-末端的氨基基团共价接合。在将一个分子连接到它的靶蛋白上之后，可以生成泛素分子的一条链，并且通过泛素C-末端共价接合到它的6个赖氨酸N-氨基中的一个上延长，以便形成多-泛素链。聚泛素化被认为是一种蛋白水解的信号，并且所述泛素化蛋白被认为可以由蛋白酶体识别和降解，并且泛素分子是循环的。很多UBLs是以类似于泛素的方式通过异肽键与靶蛋白结合的。尽管它们的实际功能尚未完全了解，UBLs似乎与它们的靶蛋白结合，并且以高度调控的方式解除与靶蛋白的结合，其中涉及到本领域所公知的巧妙的途径。例如，参见，Glickman和 Ciechanover（2002）。

据估计，在人类基因组中存在超过65个肽酶基因。肽酶被认为在调控UBUBL-改性蛋白的命运方面发挥重要作用。例如，可以通过肽酶解除泛素的结合。在出现这种情况时，所述靶蛋白就不再是蛋白酶体的通道并且不能被它识别进行降解，因此，在所述细胞中保持不降解。因此，肽酶被认为在编辑泛素功能和由于它而产生的细胞病理学方面发挥重要作用。除了起着蛋白水解的信号作用之外，蛋白的单-泛素化被认为参与了各种细胞活性的控制，例如，胞吞作用，染色质重塑，和信号转导等等。尽管很多UBL接合和解除接合的确切作用尚有待澄清，单个的UBL蛋白水解酶，例如，肽酶和水解酶确实参与了所述过程。

通过特定融合聚合物的例子将对本发明进行一般性说明和专门说明，例如，蛋白，泛素，泛素-样蛋白（UBLs），二者被统称为UBLs，并且都是系统发育的蛋白水解酶，它们能识别并且裂解融合蛋白上的UBL C-末端。所述UBL可以与报导或信号传导分子结合，如与下面以举例形式披露的所有报导蛋白，所有结合配对等等结合，以便形成无活性的融合聚合物。本专利广义地包括融合成员和蛋白水解酶的所有属的成员，和所有种的成员等等，只要这些成员属于所确定的功能性分类，并且被描述

为分子即可。UBL, 例如, SUMO与Ran-间隙蛋白的共价结合, 例如, 被认为控制着细胞核和细胞溶质之间的蛋白转运。这种类型的机制可应用于治疗目的。例如, 休眠的细胞溶质转录因子的SUMO化, 将活性蛋白转运到细胞核, 在这里它起着启动肿瘤抑制基因的作用。在这种场合下一种外源制剂, 例如, 小分子对SUMO蛋白酶的抑制作用可以稳定所述SUMO融合体, 并因此发挥抗癌活性。SUMO蛋白酶, 例如, Ulp 1的调控作用通过小分子的功能能够产生一种治疗性抗癌效果。类似地, 其他UBL的结合和早期解离, 例如, ISG-15, Apg8, 或Nedd8可以通过它们相应的蛋白水解酶控制, 例如, 水解酶(蛋白酶)分别包括UBP43/, Apg4, 和NUB1 -连接的C-末端水解酶/NEDP1 /UCH-L 1/UCH-L3/COP9。这有可能导致它们相应的蛋白修饰途径的功能的调控。ISG15是作为病毒感染的炎性反应的重要调节剂, 它与信号转导的关键调节剂结合。参见, Malakov (2003)。ISG 15是在干扰素(IFN)治疗之后最强的诱导基因之一, 并且可以通过乙型流感病毒, 脂多糖(LPS), 和遗传毒性胁迫显著诱导。它由17 kDa的前体加工而来, 并且在保守性泛素-缀合途径中与特定蛋白缀合。ISG15-特异性肽酶, UBP43同样适用于本发明。参见, Malakhov等(2002); Malakhova等(2002)。

泛素是通过蛋白水解酶从底物上裂解下来的, 一般被称作泛素肽酶, 或泛素水解酶, 蛋白酶, 或去泛素化酶("DUBs")。肽酶是半胱氨酸水解酶(蛋白酶)的一个家族, 它能特异性裂解泛素-衍生的底物, 该底物具有以下通用结构: Ub-X, 其中X =任何数量的离去基团, 从小的硫醇和胺到Ub和其他蛋白。例如, 参见, Dang, 等(1998)。因此, 诸如肽酶的蛋白水解酶被认为起着逆转泛素或泛素-样蛋白对蛋白的修饰作用的作用。参见, Wilkinson(2000)。在蛋白水解酶家族中, 有两个大的肽酶家族: 泛素C-末端水解酶(UCH)和泛素-特异性蛋白酶(USP), 这两个家族都是硫醇活性位点蛋白酶。另外, 存在已知的金属蛋白酶肽酶家族, 它包括独特的JAMM(Jab 1 /MPN结构域)肽酶活性位点。参见, Lundgren, 等(2003); Hochstrasser(2002); Verma, 等(2002); Yao和Cohen(2002)。另外, 已知存在半胱氨酸蛋白酶家族, 它被称作土芭树脂, 它似乎对泛素肽酶具有高度专一性, 不过, 某一些似乎与已知的泛素肽酶没有序列同源性。参见, Balakirev, 等(2003)。对泛素-样蛋白(UBLs)专一的蛋白酶同样是已知的。

所述UCH 酶家族被认为在具有短的C-末端延长的情况下主要裂解Ub。不过, 这些蛋白酶可能与较大的蛋白底物结合, 包括Ub前体和Ub与小的胺和硫醇的加合物, 并且被认为参与了细胞信号传导和细胞核-细胞质转运。参见, Layfield, 等(1999)。所述USP 酶家族没有表现出与UCHs的同源性, 并且可以裂解来自多种蛋白底物上的泛素。例如, 参见, Wilkinson(1997); D'Andrea和Pellman(1998); Wilkinson(1998);

Chung和Baek (1999); Yan, 等 (2000)。尽管USPs在大小和氨基酸序列方面表现出显著差异, 它们在催化活性所需要的残基周围具有若干高度同源的片段。对人类基因组进行测序发现了53种USP编码的基因, 和4种UCH基因。UCHs和USPs都是治疗干预的潜在目标。单-和多-泛素化的过程是高度动态的, 并且以泛素在蛋白上的快速添加和/或除掉为特征。一般, 所述UCH 酶家族包括较小的, 大约20-30 kDa的蛋白也有某些例外, 例如, UCH37, 一种37 kDa的蛋白酶体-结合酶, 和BAP1, 一种81 kDa的蛋白, 它能结合BRCA1。参见, Jensen, 等 (1998)。主要的底物被认为是Ub前体和Ub与包含胺和硫醇残基的小分子的加合物。Layfield, 等 (1999)。人UCHL1和UCHL3可以水解位于Ub C-末端的 ϵ -连接的酰胺键, 以及 α -连接的肽键。参见, Johnston, 等 (1997)。所述UCH 家族包括酵母YUH1, 哺乳动物UCHL1, 又被称作PGP9.5, UCH-L3, UCH37, 和Bap1等等, 以及其他种类的相应的酶家族。例如, 参见, Day, 等 (1990); Larsen, 等 (1996)。所述USP 家族一般包括较大的, 41 kDa和以上的蛋白, 它与UCHs少有或没有同源性, 并且能从多种蛋白底物上裂解泛素。参见, Wilkinson (1997); D' Andrea和Pellman (1998); Wilkinson (1998); Chung和Baek (1999); Yan, 等 (2000)。尽管大部分USPs能够水解线性Ub融合体, 例如, α NH-肽键, 它们的主要作用被认为是除掉通过 ϵ NH₂-异肽键通过赖氨酸侧链与蛋白缀合的Ub分子。同样存在与泛素-样蛋白结合的肽酶。例如, 存在若干种酵母和人蛋白酶, 例如, ULP1和Ulp2, 以及SENP1和SENP2, 它们可以从 ϵ -氨基赖氨酸基团上除掉SUMO, 以及从人工线性SUMO融合体上除掉。参见, Li和Hochstrasser (1999); Li和Hochstrasser (2000); Gong, 等 (2000)。人肽酶的例子在下面的表1中示出。不过, 能识别泛素或泛素-样蛋白的C-末端的其他的人蛋白水解酶同样适合, 因为它们是来自其他物种, 包括原核或真核生物的类似的酶。

表1: 人肽酶的例子

	名称	异名	MW (kDa)
1	CYLD	CYLD1, KIAA0849	10.7
2	USP9X	DFFRX, USP9, FAFX	28.9
3	USP9Y	DFFRY, USP10, FAFY	29.1
4	OTUB1	OTB1, OTU1, HSPC263	31.3
5	OTUB2	C14orf137, OTB2, OTU2	27.2
6	USP10	KIAA0190	87
7	USP11	UHX1	105
8	USP12	UBH1m, USP12L1	41.2
9	USP13	ISOT3	97.3
10	USP14	TGT	55.9
11	USP15	KIAA0529	112.4
12	USP16	UBPM	93.6

13	USP18	UBP43	43
14	USP19	KIAA0891, ZMYND9	151.3
15	USP20	KIAA1003, LSFR3A	102
16	USP21	USP23, NEDD8-特异型蛋白酶	62.6
17	USP22	KIAA1063	66.6
18	USP24	KIAA1057	112.4
19	USP25	USP21	125.7
20	USP26		104
21	USP28		122.5
22	USP29		104
23	USP30		58.5
24	USP32	USP10	181.7
25	USP33	KIAA1097, VDU1	106.7
26	USP35	KIAA1372, USP34	113.4
27	USP36	KIAA1453	122.6
28	USP37	KIAA1594	110
29	USP38	KIAA1891	116.5
30	USP40		129.6
31	USP42		130.6
32	USP44		81.2
33	USP46		42.4
34	USP49		79.2
35	USP51		79.8
36	UBP1	USP1	88.2
37	UBP2	USP2, UBP41	41
38	UBP3	USP3	59
39	UBP4	USP4, UNP, UNPH	108.6
40	UBP5	USP5, ISOT	95.8
41	UBP6	USP6, TRE2	158.7
42	UBP7	USP7, HAUSP	128.3
43	UBP8	USP8, KIAA0055, UBPY	127.5
44	VCIP	VCIP135, KIAA1850	134.3
45	Cezanne1		92.5
46	Cezanne2		100.7
47	A20		
48	UCH-L1	Park5	24.8
49	UCH-L3		26.2
50	UCH-L5	UCH-37	37.6
51	ATXN3	ATX3, MJD, MJD1, SCA3	43.5
52	POH1	PSMD14	34.6
53	CSN5	COPS5, JAB1	37.6
54	SENP1		73.4
55	SENP2		67.9
56	SENP3	SSP3, SUSP3	64.9

57	SENP5	FKSG45	86.7
58	SENP6	FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1	126.2
59	SENP7	KIAA1707, SSP2, SUSP2	112.3
60	SENP8	FKSG8, PRSC2	24.1
61	DUB1		60.3
62	DUB2		61.4
63	DUB3		59.6
64	DUB4		44.6
65	BAP1		81

诸如肽酶的蛋白水解酶在细胞存活，增殖和分化中发挥重要作用。果蝇FAF (fat facets) 基因上的突变被增加了每一个小眼面上的光受体细胞的数量，并且对胚胎发生具有母体效应。参见，Huang, 等 (1995)。FAF被认为编码一种USP，它被认为是发育中的复眼的神经原细胞决定的负调控所必需的。另外，FAF被认为能去泛素化并且稳定LQF。参见，Chen, 等 (2002)。编码去泛素化酶的所述酵母DIA4基因被认为与蛋白酶体s相互作用，并且在受到蛋白酶体的破坏之前将Ub从缀合的蛋白上裂解下来，这样重复利用Ub。与此一致的是DIA4阴性细胞的主要生物化学表型，即具有较少数量的游离的和缀合的Ub。突变型细胞具有多种缺陷，包括缓慢生长和异常DNA修复。参见，Papa和Hochstrasser (1993; Papa, Amerik 等 (1999)。人USP-M被认为与染色体，有丝分裂开始的磷酸化，和在中期/后期转变期间的去磷酸化相关。参见，Cai, 等 (1999)。所述酶被认为将组蛋白去泛素化并且影响染色质浓缩，并且似乎在细胞凋亡中发挥重要作用。参见，Mimnaugh, 等 (2001)。DUB-1和DUB-2是在分析细胞因子-刺激的淋巴细胞增殖期间鉴定的。所述基因的高水平表达可能导致细胞周期停止。实际上，DUB-1和DUB-2可以调控关键性生长调节剂的降解率。参见，Zhu, 等 (1996); Zhu, 等 (1997)。USP7似乎与非-特异性转录活化剂Vmw1 10相互作用，并且业已被描述为一种HAUSP酶，它能使肿瘤抑制剂p53去泛素化和稳定化。参见，Everett, 等 (1997); Li, 等 (2002); Wood (2002)。鼠Unp基因业已被描述为原癌基因，并且它在NIH3T3细胞中的超量表达导致了转化。参见，Gupta, 等 (1994)。对原代人肺肿瘤组织进行研究，证实了人UNP具有较高的基因表达水平，因此这种USP在肿瘤形成中具有一种成因性作用。参见，Gray, 等 (1995)。在细胞系中，UNP蛋白含量表现出降低，因此表明了UNP是一种肿瘤抑制基因。参见，Frederick, 等 (1998)。证实了所述肿瘤抑制基因 PTEN 的超量表达能上调人UNP。参见，Hong, 等 (2000)。

DUBS的抑制剂具有特有的发育表达形式，生物化学性质，细胞定位方式，组织分布，优选的目标，以及细胞功能。参见，Park 等 (2000); Layfield 等 (1999); Cai 等 (1999); Lin 等 (2000); Gong 等 (2000); Park 等 (2000); Hemelaar 等 (2004); Wilkinson (2000); Lin 等

(2001); Li等(2002); Hochstrasser(1996); Chung和Baek(1999); Weissman(2001)。业已充分披露了以下类型的USP底物: Ub前体, 例如, 天然存在的Ub与核糖体蛋白的融合体; 与单-泛素化蛋白的缀合物, 即不会发生蛋白酶体降解的蛋白, 相反, 通过Ub缀合, 以便改变所述蛋白的各种生物化学性质, 例如, 配合物形成或细胞运输; 错误-泛素化蛋白, 例如编辑; 送往蛋白酶体的多-泛素化蛋白, 例如, Ub循环; 和多-泛素链, 例如, 单体分解和再循环。另外, 泛素-蛋白酶体途径最近业已被用于药物发现。所述蛋白酶体抑制剂最近业已被批准用于治疗多发性骨髓瘤, Velcade, 能选择性地抑制若干种类型的癌细胞生长(Almond和Cohen 2002; Shah, Potter等 2002)(Adams 2002)并且业已获得了临床反应(Adams 2002; Adams 2002; Adams 2002)。有关Velcade's治疗的详情尚有待进行全面解释, 不过, 它似乎能诱导细胞凋亡具有针对癌细胞的选择性。然而, 它的效力有可能受到毒性的制约, 所述毒性可能对患者在临床实验中的适应性产生负面影响(Adams 2002)。

本发明提供了改善化合物的选择性的方法, 具有更好的治疗指数, 所述化合物的活性与泛素-蛋白酶体途径相关, 如USPs和UCHs抑制剂。在一种实施方案中, 本发明选择性地针对泛素代谢途径, 作为比抑制所有蛋白降解更具选择性和更有效的方式, 对于Velcade®来说就是如此。泛素-样蛋白和泛素越来越多地参与疾病或者与疾病相关。例如, 通过将SUMO添加在Huntingtin(Htt)致病蛋白Httex的致病片段上会加重神经变性。参见, Steffan等(2004)。根据这一数据和其他数据, 本发明人业已得出以下结论, 一种SUMO水解酶活化剂在亨廷顿舞蹈病中具有治疗作用。

本发明的方法

本专利所披露的分析方法采用了任何制剂或“报道物”, 例如, 酶, 和蛋白等等, 它们需要游离的N-末端氨基酸残基产生信号, 例如活性。该制剂通过它的N-末端与另一种蛋白的C-末端融合而失活。举例来说, 诸如胰蛋白酶家族的蛋白酶, 例如, 因子X, 需要游离的N-末端赖氨酸参与活性位点肽裂解。本发明的分析方法还涉及一种蛋白水解酶, 例如, 一种UBL水解酶, 并且形成一种UBL-报导融合蛋白, 这种蛋白可以被蛋白水解酶裂解。融合蛋白的这种裂解释放出具有游离的C-末端的泛素和泛素-样蛋白(被统称为UBL)或其结合功能性片段, 和具有游离的N-末端的“报道物”。在本发明分析方法的不同实施方案中, 活性形式的UBL和报导物可以通过本领域多种已知的方法检测, 例如, 借助于放射性, 生色, 荧光, 磷光, 化学发光, 和其他标记和/或底物。所述分析可以借助于微量滴定板进行, 在所述板上发生反应。在本发明方法的另一种实施方案中, 设计了用于筛选蛋白水解酶调节剂的方法, 可以将每一种化合

物添加到微量滴定孔中，优选在反应混合物的其他成分之前添加。与完全裂解的对照相比，筛选阳性或"命中"通过信号的丧失识别，例如，颜色或荧光，表明了释放了较少的UBL或报导物。在一种实施方案中，所述融合聚合物是融合蛋白，所述报导蛋白的N-末端可以融合在多种UBLs或其片段的任意一种的C-末端上，它可以被蛋白水解酶识别和裂解，例如，水解酶，如蛋白酶或去泛素酶。在另一种实施方案中，本发明的分析方法可以用不同来源的蛋白水解酶进行，例如，纯化的水解酶，细胞裂解液或提取物，必须从它里面纯化所述酶活性。在另一种实施方案中，本发明的方法可应用于从多种有机体中发现新的蛋白水解酶，包括取代不同的蛋白水解酶的可能的来源，并且试验它对所述融合聚合物的作用，例如，融合蛋白。

在本发明分析方法的另一种实施方案中，所述制剂或报导物可以是与UBL或它的活性片段融合的无活性的前体蛋白。在该实施方案中，所述融合蛋白的裂解导致了蛋白激活，它可以根据所述蛋白的活性产生一个阳性信号，导致终点相关信号的产生，例如，生色终点。所述前体的例子有酶原，例如，纤维蛋白原和血纤维蛋白溶酶原，凝血因子，例如，凝血酶原，和病毒多蛋白，例如，人鼻病毒和脊髓灰质炎病毒等等等等。在最后一种例子中，肽酶能介导大肠杆菌中含有脊髓灰质炎病毒RNA-依赖型RNA聚合酶（3D^{pol}）的巨型多蛋白的裂解。这可能是由于RNA-依赖型RNA聚合酶的活性需要游离的N-末端，并且该活性可以方便地分析或检测。因此，所述脊髓灰质炎病毒系统可用于本发明的分析方法中，用于评估泛素肽酶活性，因为RdRp和肽酶的活性可能相关。

只要细胞像本发明需要的那样能编码一种蛋白水解酶，例如，本领域公知或公开的肽酶或水解酶（蛋白酶）等等等等。这些酶能专一性地识别所述UBL序列，并且裂解UBL C-末端和报导物的N-末端之间的结合部分，以便产生游离的报导N-末端，所述报导物被激活或者可以因此被激活，它会产生可记录的或可检测信号。满足上述要求的任何和所有的报导酶都适应于本发明的分析方法。以下表2中仅为说明目的提供了报道酶的一些例子。

表2: 其活性需要游离的NH₂-末端的酶

蛋白家族	具体例子
丝氨酸蛋白酶	凝血酶，二肽基肽酶，HtrA2
激素原前体	后叶激素运载蛋白，血管加压素
枯草杆菌蛋白酶/kexin-样激素原转化酶	弗林蛋白酶
羧肽酶	羧肽酶B，羧肽酶Y
ADAMTS	vWF-裂解蛋白酶/ADAMTS 13
ADAM	ADAM1，ADAM2
半胱氨酸天冬氨酸酶	Caspases

天冬氨酸蛋白酶	胃蛋白酶, 肾素, 组织蛋白酶D, Mason-Pfizer 猴病毒蛋白酶
MMPs	MMP20, MMP26
RNA-决定型RNA聚合酶	3D ^{pol}
N-末端亲核试剂 (Ntn) 水解酶	糖基天冬氨酸酶, 20S蛋白酶体 β -亚基, 谷氨酰胺PRPP 转氨酶
4-草酰基巴豆酸酯互变异构酶家族	YdcE, YwhB
分支酸合成酶	分支酸合成酶
β -内酰胺酰化酶	头孢菌素酰化酶, 青霉素酰化酶
病毒逆转录酶	CaMV逆转录酶
磷脂酶	磷脂酶A ₂
σ 转录因子	σ^k

一般, 简单的肽键有别于“异肽键”。当直的肽键具有循环的 -NH-CR-CO-NH-CR' CO-结构时, 其中的COOH碳位于关于NH携带碳的 α 位置上。异肽键在携带氨基碳原子和羧基官能团之间具有更大的距离, 例如, 当至少一个相关的氨基酸在相对羧基的非 α 位置上具有胺基团, 例如, β , γ , δ , ϵ 等等上具有胺基时就产生了异肽键。后者的例子是这样的氨基酸, 如天冬氨酸 (β 位置), 谷氨酸 (γ 位置), 和赖氨酸 (ϵ 位置)。很多肽酶和异肽酶都能够裂解线性UBL融合体。

在另一种实施方案中, 本发明的方法通过暴露它的N-末端激活报导物, 可应用于构建遗传筛选的细胞。谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸转氨酶 (GPATase) 能催化嘌呤核苷酸生物合成的起始步骤, 并且是该途径的主要的调节酶。GPATase基因是由大肠杆菌purF基因座编码的。参见Mei和Zalkin (1990)。该基因的缺失能延缓大肠杆菌生长。在将外源嘌呤添加到所述培养基(腺嘌呤)中时, 所述细胞生长得到恢复。在实施例2中, 我们业已证实了GPATase酶可用作良好的报导物来监测Ub或UBL肽酶活性, 因为在GPATase上产生的游离的N-末端 Cys是它的活性所必需的。类似地, 还可以将其他N-末端亲核试剂 (Ntn) 水解酶 (参见, 表12), 例如, 天冬酰胺合成酶 (参见, Andrulis I 等 (1989)) 和谷氨酸合成酶 (参见, Oliver 等 1 (1987)) 用于本发明, 因为它们的N-末端同样是它的生物学活性所必需的。

本发明包括生物学选择方法, 其中, 通过Ub-GP ATase 或UBL-GP ATase将融合蛋白转入缺少purF基因座的细胞系。这样的菌株可以在含有腺嘌呤的培养基中生长。还可以用能表达Ub蛋白酶, 例如, 肽酶, 或UBL蛋白酶, 例如, 肽酶的质粒转化相同的菌株。包含双重质粒的所述细胞可以在合成培养基中生长, 不取决于所添加的腺嘌呤。因此, 细胞生长是通过由Ub或UBL蛋白酶产生的活性GPATase控制的。如果将突变型Ub或UBL蛋白酶转入获得了GPATase的大肠杆菌菌株, 所述细胞就能够在缺少腺嘌呤的条件下生长, 或在缺少谷氨酸或天冬酰胺条件下生长, 例如分

别为天冬酰胺合成酶和谷氨酸合成酶的情况。该选择系统可用于克隆新型蛋白酶，这种酶可以裂解Ub-GP Atase或UBL-GP Atase。类似地，该系统还可用于从易错PCR文库中选择能裂解Ub或UBL-融合蛋白的酶，例如，最佳的酶，以便通过产生活性GPATase或其他特定的酶恢复生长。

所述方法的另一种实施方案采用UB/UBL-融合蛋白评估N-末端氨基酸可能在蛋白功能和/或表型中的作用。参见，Bachmair (1968)；Bachmair (1989)。合成的N-末端泛素融合蛋白在真核生物体内发生了快速裂解，以便产生具有特定N-末端残基的蛋白。一般，正如N-末端规律所表明的，具有某些N-末端残基的蛋白更容易发生随后的泛素-介导的降解。参见，Varshavsky (1996)。在这种具体实施方案中，对融合蛋白的N-末端进行修饰，以便改变该蛋白的稳定性，并且产生不同的体内蛋白含量，并因此调控它们的表型，例如，其细胞功能受蛋白含量的影响，例如，在酵母中，Ard1对 α -因子的敏感性或Ura3对在尿嘧啶缺陷培养基上的存活的影响。参见，Park 等 (1992)。本方法适用于通过具有N-末端 SUMO，ISG15，或Nedd8的融合体影响体内蛋白含量和表型。在这些例子中，所述融合蛋白能体内裂解并且释放N-末端蛋白残基，它能决定所述蛋白的含量，并因此影响与蛋白稳定性相关的表型，该表型是通过N-末端规则确定的。可以选择特定蛋白残基，用于设计本发明的融合构建体，它能产生需要的蛋白含量，例如，选择精氨酸用于去稳定化，选择甲硫氨酸用于稳定化，或选择其他残基适合所使用类型的有机体的稳定性水平。

本发明方法的另一种实施方案采用了包括报导物的融合蛋白，它适合与体内蛋白水解酶，例如，肽酶活性相关的光学成象。举例来说，去泛素化酶在这里被用作肿瘤检测的工具，采用了蛋白酶活性的近红外 (近IR) 光学成象，该光学成像采用了只有在与特定的酶相互作用之后发出荧光的造影剂，参见Weissleder (1999)，披露了所述方法和造影剂的相关文献被以全文形式收作本文参考。一种这样的蛋白酶，组织蛋白酶D，在裂解潜伏的或无活性的荧光物时，可以释放，并因此激活荧光物，通过切割分子内光学荧光淬灭。参见，Ching-Hsuan Tung 等 (1999)。因此，泛素和/或UBLs可用于加强来自荧光物的分子内光学荧光淬灭。所述荧光物存在于检测探针上，可用于体外，自体内和/或体内分析去泛素化酶并且准确激活和/或抑制活性。泛素和UBL 荧光探针的使用对于早期肿瘤检测，并且作为跟踪治疗效力的后续测验来说是重要的，因为若干种蛋白水解酶，例如，肽酶业已与特殊疾病相关联，正如下面所披露的。

UBLs在它们的泛素-样结构折叠方面表现出显著的保守性。它们的球状结构可以分割成两半，即一个C-末端片段和一个N-末端片段。例如，业已裂解了SUMO分子。当报导蛋白与C-末端的一半SUMO融合时 (CTHS)，它不能被一种SUMO蛋白酶裂解。不过，当CTHS-报导融合蛋白与N-末端一

半SUMO (NTHS) 混合时, 所述酶能裂解所述报导融合体。因此, 所述报导信号只能在SUMO的两半能够结合时才能观察到。当它们结合时, 所述结构可以由所述蛋白酶识别, 然后就能够裂解并且产生一种活性报导物。在一种具体用途中, 本发明分析方法的裂解SUMO的实施方案可用于检测分子, 例如, 与特殊受体结合的小分子, 如代谢物, 激素和药物。对泛素和UBLs具有裂解专一性的蛋白酶还适合用作开关或传感器, 例如, 当一种受体分子与泛素或一种UBL CTHS-报导物结合时, 所述报导物与NTHS上的激素, 药物, 或配体等等(被统称为配体)接触和结合, 并且所述蛋白-蛋白和蛋白-小分子相互作用导致了所述活性受体的快速裂解。该实施方案优选提供了泛素和UBL蛋白酶对所述配体(受体传感器)作为有效开关的两种条件。当所述受体与它的配体, 例如, 激素结合时, 所述泛素或UBL-受体优选是由蛋白酶裂解的。所述配体的结合优选促进了泛素或UBL一种结构的改变, 这种改变促进了它的蛋白酶对泛素或UBL的裂解。所述雌激素受体配体结合结构域(ER-LBD)是这种用途的一个例子。尽管该实施方案具有广泛的用途, 在这里是通过结合所述雌激素受体的形式进行说明的。雌激素受体(ER)能以高亲和力与一种共激活剂分子相互作用。不过, 这种相互作用完全取决于雌激素与雌激素受体(ER)的配体结合结构域(LBD)的结合。在本发明方法的该实施方案中, 所述ER的配体结合结构域是作为一种融合聚合物(蛋白)表达的, 具有SUMO的N-末端一半(NTHS)或任何其他UBL, 并且所述CTHS与蛋白的对ER具有高亲和力的一种共激活剂部分融合。所述共激活剂-CTHS报导融合蛋白和ER-LBD-NTHS融合蛋白可以在细胞系统, 例如, 大肠杆菌中表达, 并且选择性纯化。然后所述蛋白混合物可以在存在SUMO蛋白酶的条件下与测试物质一起培养。当所述雌激素与ER-LBD-NTHS融合体上的它的受体结合时它能促进与所述共激活剂分子的相互作用。所得到的复合物导致了所述报导物的裂解, 由此产生或可以产生报导活性的信号。通过一种酶促反应放大所述报导信号的能力是加强这种雌激素-ER对传感器的开发。由于所述信号是通过酶促方法放大的, 通过裂解的UBLs, 例如, SUMO和其他UBLs的互补作用工作的传感器, 不仅能检测雌激素, 而且还能检测其他激素和代谢物, 具有比传统ELISA试剂盒更高的灵敏度。共激活剂取决于分子配对, 例如, 激素决定型共激活剂, 和配体-配体-受体对, 例如激素和激素受体对可用作多种人类受体的传感器, 例如, 细胞核受体, 用于检测极少量的, 例如, 皮摩尔数量的配体, 如雌激素, 雄激素, 甲状腺激素, 或1, 25-二羟基维生素D。出于同样原因, 所有UBLs可以在 α -1螺旋和 β 3链之间的环的任何位置裂解成片段, 例如, 裂解成两半, 它们彼此具有亲和力, 借助于它们相应的蛋白水解酶, 例如, 水解酶, 可用于构建所述传感器。本发明分析方法的传感器实施方案取决于通过产生游离的N-末端产生的信号或它与信号产生事件的偶联。

肽酶存在于植物和动物界，所有的肽酶都被认为适用于本发明。例如，酵母SUMO蛋白酶（ULP1）在它的裂解特性方面是特别稳定和可靠的，并且业已被用于在本专利中所提供的大部分典型例子中。例如，参见，Malakhov（2004）。本发明分析方法的该实施方案是通过将其他已知的肽酶用于各种UBLs验证的，要求是绝对取决于产生游离的非融合的报告氨基末端所出现的信号，在本例子中，所述信号是通过肽酶SUMO蛋白酶（ULP1）产生的。如调节剂，例如，筛选的化合物产生的对肽酶活性的任何抑制作用，导致了酶活性的减弱。进行本发明所述分析的要素的组合的其他例子包括脊髓灰质炎病毒3D RNA-依赖型RNA聚合酶，它与SUMO融合，并且由ULP1裂解，谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸转氨酶（GPAT），它与SUMO融合，并且由ULP1裂解，类胰蛋白酶，它与SUMO融合并且由ULP1裂解，和磷脂酶A2，它与酵母和人SUMO，泛素，Nedd8，Rub1，和ISG15融合，并且由ULP1，Senp2，USP2，Den1，和各种细胞提取物裂解。这些仅仅是适用于本发明的分析方法和试剂盒的多种组合的例子。

因此，在本专利中，本发明是以若干主要实施方案形式提供的，它包括将UBL-报导融合聚合物用于监测泛素和泛素-样蛋白水解酶，例如，蛋白酶，UBL-报导融合聚合物的活性，并且将产生游离报导结构的信号作为探针，用于监测蛋白水解酶，如UBL水解酶，例如，蛋白酶，以及它们在人和其他动物，细胞，组织和细胞级份中的活性。极为重要的是，使用UBL-报导融合聚合物，并且评估蛋白水解酶活性，如UBL水解酶，例如，蛋白酶，其活性作为真核和原核生物的选择标记。另一种重要实施方案取决于UBL-报导分子，例如，酶，和它们作为传感器的嵌合结构，可以用合适的蛋白水解酶，例如，水解酶和蛋白酶裂解，以便检测蛋白-蛋白相互作用，和小分子-蛋白相互作用。在另一种实施方案中，UBL-报导酶被用于生产用来监测活性和分析蛋白水解酶的试剂盒，例如，UBL水解酶和蛋白酶。本发明的某些最优选的实施方案使用多种“报道物”结构，如酶，聚合酶，蛋白酶，脂酶，酰化酶等等，它们的报导活性需要特殊的N-末端残基。其他实施方案取决于融合聚合物的表达，其中，UBL的C-末端与融合聚合物中的报导物的N-末端连接，所述报导物携带一种无活性形式的报导物，并且，其中，通过蛋白水解酶，例如，UBL水解酶或蛋白酶的作用产生游离的N-末端报导结构，以便使所述报导物具有活性。所述报导物可以是酶，或其他信号产生实体，该信号是由它自身或通过与其他实体的相互作用产生。

另一种较好的实施方案采用了UBL-报导融合聚合物，例如，从任何来源中获得或在任何来源中表达并纯化的蛋白，例如，大肠杆菌，并且裂解，例如，通过一种蛋白水解酶，如一种UBL水解酶，蛋白酶或肽酶进行体外裂解，以便产生能产生信号的活性报导物或酶。由此产生的信号和/或报导酶活性可用作蛋白水解酶，例如，UBL水解酶或蛋白酶的测量

输出结果，用于高处理量筛选方法和用于鉴定酶活性的调节剂的试剂盒，如能抑制或使蛋白水解酶失活的小分子，例如，水解酶或蛋白酶。在另一种实施方案中，蛋白水解酶如UBL-水解酶或蛋白酶可用于产生活性报导信号，例如，体内信号产生酶，并且用于开发特殊蛋白水解酶，如UBL水解酶和蛋白酶的基于细胞的分析方法。在最优选的实施方案中，UBL-报导融合聚合物可用作整合在细胞染色体上的转基因构建体，以使用作跟踪各种有机体，细胞，细菌，真菌以及动物和植物组织和细胞级份中的特殊蛋白水解酶例如，水解酶和蛋白酶活性的传感器。另一种实施方案采用了UBL-前-报导结构，如酶原，作为各种蛋白水解酶的亲和制剂或基质，如UBL水解酶和蛋白酶。另外，UBL-报导融合结构在本发明的分析方法和试剂盒中可用作发现新型蛋白水解酶结构的工具，例如，UBL结构域结构。本发明的方法和试剂盒还可借助于突变型或修饰过的泛素或UBL结构，或它的结合功能性片段，和相应的突变型UBL-报导融合聚合物使用，用于发现本发明的新型改进的蛋白水解酶，例如，UBL水解酶和蛋白酶。在本发明的一种典型的优选实施方案中，所述分析方法和试剂盒取决于被用作真核和原核生长和/或表型检测的选择标记的UBL-报导融合结构。另一种方法提供了一种采用UBL-报导融合结构作为探针筛选新型UBL-报导酶的方法和试剂盒。所述试剂盒包括所述UBL-融合体，和用于分析蛋白水解酶的其他制剂，如UBL水解酶和蛋白酶。

在不同实施方案中，本专利提供了用UBL-报导融合结构作为工具产生更好的信号传导报导物，例如，酶的方法和试剂盒。另一种重要实施方案提供了本发明的方法和试剂盒，它采用了对它的游离的N-末端具有特殊要求的一种报导物，如酶，例如，一种互变异构酶，它需要脯氨酸作为所述活性N-末端。在这种场合下，所述方法和试剂盒将所述报导物用于UBL-N-脯氨酸报导融合聚合物中，用于发现新型蛋白水解酶，例如，水解酶和蛋白酶，这些酶对UBL-脯氨酸融合结合具有专一性。本专利提供了对分析方法和试剂盒形式的现有技术的明确改进，如果通过它们的N-末端融合的话，用于鉴定和分析在它们的泛素或UBL融合构型下是无活性的“报导物”酶，并且由于释放了它们的N-末端，在通过泛素或UBL蛋白酶裂解时被激活。上面的表2列举了其生物学活性需要游离的N-末端的若干种类型的报导酶。在很多场合下，所述N-末端残基是催化位点的一部分或者是催化机制所必须的。由于上述原因，它们的N-末端与泛素或UBLs的融合以可恢复的方式使所述酶失活，同时，去掉泛素或UBLs能快速恢复它们的活性。因此，活性报导酶的产生是相应的蛋白酶的直接的功能。

在另一种实施方案中，可以通过已知方法将泛素和UBL-报导融合基因转入任何有机体，并且选择性地整合到宿主染色体上，以便产生转基因植物和动物。因为在表2中报导的很多酶都具有独特的底物，可将它们

用于信号产生分析，例如，组织或细胞内的荧光或生色信号，在这里存在所述酶。因此，与便于检测的底物结合的UBL-报导物可用作新型生物化学和遗传学标记，用于原位报导蛋白水解酶，例如，肽酶和蛋白酶的独特活性。本专利的泛素和UBL-融合基因可用作选择标记。举例来说，泛素或UBL-融合基因的嘌呤生物合成所必需的大肠杆菌谷氨酰胺-PRPP-转氨酶（GPAT）基因的N-末端与泛素或UBL-融合基因的融合体可以连接在载体，例如，一种质粒上，并且用于转染其染色体GPAT基因缺失或突变了细胞。GPAT酶需要游离的N-末端而具有活性，因此，所述融合蛋白的肽酶裂解是恢复嘌呤从头开始的生物合成途径所必须的。具有这种UBL-标记基因的细胞可以选择携带有合适肽酶或蛋白酶基因的质粒。因此，所述蛋白酶基因起着开关的作用，激活细胞生活力所必需的蛋白。可以将纯化的无活性的泛素-和UBL-报导融合蛋白用于新型蛋白水解酶，如蛋白酶和肽酶的体外筛选。本分析方法还适用于监测一种蛋白酶混合物的活性，该混合物可选择性地裂解泛素或所述UBL 泛素家族的一个或多个成员。例如，一种SUMO-X报导物可能是Ulp1（SUMO蛋白酶）的良好底物，而一种SUMO-Y报导物可能是Ulp2，即第二种独特SUMO蛋白酶的极好的底物。

更具体地讲，本专利在本发明的第一方面提供了用于评估蛋白水解酶活性的方法，它包括

提供一种融合聚合物，包括第一聚合物，所述第一聚合物包括泛素或一种泛素-样蛋白（UBL）或它的一个功能性C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括检测所需要的游离的N-末端氨基酸；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述UBL C-末端和所述第二聚合物N-末端可操作地连接的；

使所述融合聚合物与一种蛋白水解酶或者包括或可能包括能裂解所述UBL C-末端的酶的样品接触；

检测与裂解的聚合物的数量或活性相关的信号；和

建立所述裂解的聚合物信号与蛋白水解酶活性之间的关联。

在一种实施方案中，上述方法能够以多种形式实施，并且用于不同的目的。所述方法还可以包括通过参考0%以及100%的裂解信号将每一种酶或样品裂解信号标准化，并且确定每一种酶或它的样品的蛋白水解酶的一个活性值；其中，当所获得的酶活性低于截断值时，可以认为所述酶或样品是无活性的，并且，当它高于所述截断值时，是有活性的。所述0%以及100%的裂解信号可以通过本领域公知的方法获得，一种方法是重复所述接触，检测和建立步骤，以便完全裂解和完全抑制蛋白水解酶活性，以获得100%和0%的裂解信号。所述标准化步骤通常是通过参考酶活性裂解值的曲线将每一种酶或样品裂解信号标准化，并且确定每一种酶或它的样品的蛋白水解酶活性而进行的；其中，当所获得的酶活性低

于截断值时，可以认为所述酶或样品是无活性的，并且，当它高于所述截断值时，是有活性的。不过用于空白和/或对照的其他标准化方法等同样可以采用。在另一种优选实施方案中，所述第一聚合物可以包括蛋白泛素，SUMO，Nedd8，ISG15，Apg8，Apg12，FAT10，Urm1，Hub，UBi，Rub1，ISG15等，或它的一个结合功能性C-末端片段，该片段包括UBL' s环内的将它的 α -螺旋 1和 β -链3连接在C-末端上的一种氨基酸。在另一种实施方案中，所述第二聚合物可以包括多种不同的构建体，其中，最优的构建体是一种报导蛋白或酶，转录因子或它的信号传导功能性片段，和/或所述第一聚合物可以包括UBL，即泛素或泛素-样蛋白，或它的结合功能性C-末端片段，该片段包括UBL' s环内的将它的 α -螺旋 1和 β -链 3连接在C-末端上的氨基酸。在一种形式的方法中，所述第一或第二聚合物或这两者在蛋白水解酶裂解时变得可以检测。所述第一和/或第二聚合物可以通过激活它所携带的信号和/或通过结合或产生可检测信号变得可以检测。通常，所述信号是一种放射性的，荧光，磷光，生色，声音，或化学发光信号。不过，任何其他类型也都属于本发明的范畴。在特别优选的实施方案中，所述方法还可以包括获得一个UBL N-末端片段，它包括UBL' s环内的将它的 α -螺旋 1和 β -链 3连接在C-末端上的一种氨基酸，或其余的氨基酸片段，以便与UBL C-末端片段形成UBL；所述UBL N-末端片段可操作地与第一和第二结合配偶体之一连接；和获得第二结合配偶体。在这种形式下，所述融合聚合物通常是在第一和第二结合配偶体结合时裂解的，它优选包括受体和受体结合制剂。其他受体结合制剂可以包括药物，激素，抗原，配体，或其受体结合功能性片段；而相应的受体可以包括药物受体，激素受体，抗体，配体结合受体，或其结合功能性片段。在该实施方案中，所述UBL N-和C-末端的结合使得所述蛋白水解酶能够识别UBL 构象和裂解所述C-末端的聚合物。特别重要的是以下形式的方法，其中，第一和第二聚合物彼此是共价结合的。在另一种方案中，第一和第二聚合物通常是通过接头彼此可操作地结合的。所述接头可以包括至少一个氨基酸。在本发明方法的最优选实施方案中，所述融合聚合物包括一种融合蛋白，并且所述蛋白水解酶通常包括一种肽酶或其一个裂解功能性片段。

蛋白水解酶的例子包括一种泛素C-末端水解酶和泛素-特异性蛋白酶或其裂解功能性片段。众多例子中的其他例子包括一种或多种裂解功能性酶的构建体，如ULP1，ULP2，SENP1，SENP2，酵母YUH1，哺乳动物UCHL1，UCH-L3，UCH37，Bap1，USP-M，DUB-1，DUB-2，USP7，UNP，CYLD，CYLD1，KIAA0849，USP9X，DFFRX，USP9，FAFX，USP9Y，DFFRY，USP10，FAFY，OTUB1，OTB1，OTU1，HSPC263，OTUB2，C14或f137，OTB2，OTU2，USP10，KIAA0190，USP11，UHX1 USP12，UBH1m，USP12L1，USP13，ISOT3，USP14，TGT，USP15，KIAA0529，USP16，UBPM，USP18，UBP43，USP19，

KIAA0891, ZMYND9, USP20, KIAA1003, LSR3A, USP21, USP23, NEDD8-特异性蛋白酶, USP22, KIAA1063, USP24, KIAA1057, USP25, USP26, USP28, USP29, USP30, USP32, USP33, KIAA1097, VDU1, USP35, KIAA1372, USP34, USP36, KIAA1453, USP37, KIAA1594, USP38, KIAA1891, USP40, USP42, USP44, USP46, USP49, USP51, UBP1, USP1, UBP2, USP2, UBP41, UBP3, USP3, UBP4, USP4, UNP, UNPH, UBP5, USP5, ISOT, UBP6, USP6, TRE2, UBP7, USP7, HAUSP, UBP8, USP8, KIAA0055, UBPY, VCIP, VCIP135, KIAA1850, Cezanne1, Cezanne2, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, VCIP, VCIP135, KIAA1850, A20, UCH-L1, Park5, UCH-L3, UCH-L5, UCH-37, ATXN3, ATX3, MJD, MJD1, SCA3, POH1, PSMD14, CSN5, COPS5, JAB1, SENP1, SENP2, SENP3, SSP3, SUSP3, SENP5, FKSG45, SENP6, FKSG6, KIAA0797, SSP1, SUSP1, SENP7, KIAA1707, SSP2, SUSP2, SENP8, FKSG8, PRSC2, DUB1, DUB2, DUB3, 或DUB4, 或其裂解功能性片段。尽管业已提供了若干种例子, 很多其他例子是本领域所公知的并且还可以它们同样是适合使用的, 只要它们具有所需要的特征就行。

本发明的方法可以用包括“报道物”或信号产生构建体的第二聚合物实施, 该信号产生构建体包括一种酶, 如丝氨酸蛋白酶, 激素原前体, 枯草杆菌蛋白酶/kexin-样激素原转化酶, 羧肽酶, 一种去整合蛋白-样和金属蛋白酶结构域 (reprolysin-型), 具有凝血栓蛋白 I型基序 (ADAMTS), 一种去整合蛋白和金属蛋白酶结构域 (ADAM), 半胱氨酸天冬氨酸酶, 天冬氨酸蛋白酶, 基质金属蛋白酶 (MMP), RNA-依赖型RNA聚合酶, N-末端亲核试剂 (Ntn) 水解酶, 4-草酰巴豆酸酯互变异构酶, 分支酸合成酶, β -内酰胺酰化酶, 逆转录酶, 磷脂酶, 转录因子, 或一个结合和其信号传导功能性片段。其他例子包括以下化合物, 其中, 所述第二聚合物包括一种病毒逆转录酶, σ 转录因子, 谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸 (PRPP) 转氨酶 (GPATase), 抗血友病因子 Xa, 3D^{pol} RNA-依赖型RNA聚合酶, 谷氨酰胺 5-磷酸核糖基-1-焦磷酸转氨酶, 青霉素酰化酶, 逆转录酶, 分支酸合成酶, 类胰蛋白酶, 糜蛋白酶, 肠激酶, 转录因子 σ^k , 凝血酶, 二肽基肽酶, HtrA2, 后叶激素运载蛋白, 血管加压素, 弗林蛋白酶, 羧肽酶 B, 羧肽酶 Y, vWF-裂解蛋白酶/ADAMTS 13, ADAM 1, ADAM 2, caspase, 胃蛋白酶, 凝乳酶, 组织蛋白酶 D, Mason-Pfizer 猴病毒蛋白酶, MMP20, MMP26, 糖基天冬酰胺酶, 20S蛋白酶体 β 亚基, 谷氨酰胺 PRPP转氨酶, YdcE, YwhB, 头孢菌素酰化酶, CaMV 逆转录酶, 磷脂酶A2, 或一个结合和其信号传导功能性片段。

本发明的方法还可以通过能够在实现它的表达的条件下进一步表达

编码所述融合蛋白的其他多核苷酸实施，将其作为在原位提供所述融合蛋白的一种方法。所述多核苷酸可以在一种原核细胞和真核细胞或在组织或它的级份或提取物中表达。在这种形式下，可以分离由此获得的融合蛋白，并且在进行酶分析之前选择性地纯化。另外，所述方法还包括在存在被怀疑包括一种蛋白水解酶活性调节剂的样品的条件下，重复所述接触，检测和建立步骤，并且通过参照所述样品信号与在缺少样品的情况下获得的相应的酶活性信号，测定所述样品对所述蛋白水解酶活性的作用值。进行所述分析的样品通常包括一种生理性液体，一种组织样品，细胞，细胞级份，或它的提取物或级份。很明显，其中所述反应的一个或多个步骤可以在细胞或组织培养物中，在细胞或组织提取物上，在体外，体内，自体内进行等等。尽管可以采用各种信号和检测方法，常见的是检测细胞生长，或使用生色，放射性，荧光，磷光或化学发光信号。所述接触，检测，建立和测定步骤可以对多种被怀疑包括蛋白水解酶活性调节剂的样品分别进行，以便获得所述样品对所述蛋白水解酶活性的作用值，并且，所述方法甚至可以是自动化的。在后一种模式下，所获得的每一种样品和对照的信息采集，加工和报导可以计算机化。美国临时申请60/580,900和WO 03/057174 A2和WO 2005/003313 A2公开文本被以全文形式收进本专利，用于提供适合获得产品的来源，制备方法，例子和其他条件和要素，这些文献的各个部分和工艺被应用在本发明中。

如上文所述，本发明的方法可应用于评估和发现多种蛋白水解酶，调节剂，和其他调节剂在植物或动物模型体内的存在。由于这种原因，本发明人业已设计了转基因细胞、植物或动物，包括一种泛素-或UBL-报导融合基因，它被选择性地整合在所述细胞、植物或动物染色体上。在另一种实施方案中，所述融合多核苷酸可以包括编码泛素或UBL的C-末端片段的一种多核苷酸，该UBL具有上述特征。在另一种实施方案中，本发明的"开关和传感器"模式还可应用于这一方面。所述融合基因可以按照在本专利的其他部分的描述进行，或通过本领域公知的若干方法中的任意一种方法。参见，Sambrook, 等(1989)。然后可以将它克隆到载体上，例如，质粒，并且转入细胞、植物或动物。

在本专利中还提供了用于评估蛋白水解酶活性的试剂盒，该试剂盒的纯粹形式包括

一种融合聚合物，包括第一聚合物，所述第一聚合物包括泛素或泛素-样蛋白(UBL)或其C-末端片段，和第二聚合物，所述第二聚合物包括多肽，该多肽需要用于检测的游离的N-氨基酸末端；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过泛素或UBL C-末端和第二聚合物N-末端可操作地连接的；和

有关进行蛋白水解酶分析，检测与第一和/或第二聚合物的数量和活

性相关的信号，以及建立检测到的信号与所述酶的蛋白水解活性的关联的说明。

所述试剂盒可选择性地包括能裂解UBL C-末端的蛋白水解酶的来源，或所述酶可以单独购买。类似地，所述试剂盒的另一个特征可能是将塑料制品，和制剂等用于实施本发明的分析。所述试剂盒还可以包括下列成分的一种或多种

第一和第二结合配偶体，其中，所述第一配偶体能够可操作地连接在UBL N-末端片段上，并且，其中，当第一和第二结合配偶体彼此结合时，所述UBL C-末端片段与所述UBL N-末端片段结合，使得一种UBL构象，所述蛋白水解酶能够裂解所述融合聚合物；

用于实施所述酶裂解步骤的制剂；

用于实施所述检测步骤的装置；和

用于使所述可检测信号与蛋白水解酶活性或其变化相关联的装置。

在所述试剂盒的这种形式中，所述融合聚合物通常包括一种融合蛋白，或它其他方案中，包括编码所述融合蛋白的融合多核苷酸，并且选择性地包括一种或多种用于表达所述多核苷酸的制剂和/或用于表达所述多核苷酸的细胞或它的级份或提取物，此时它被用于代替所述融合蛋白。所述试剂盒的更完整的形式可以包括用于分别容纳多种样品的装置，和有关自动化进行所述分析的说明。在所述试剂盒的这种形式中，整合了用于对每一种样品进行自动化处理的装置，以及它的使用说明。

本发明的另一种用途是用于筛选化合物对蛋白水解活性的作用的方法中，并且该方法可以通过以下步骤实施

获得一种融合聚合物，它包括第一聚合物，所述第一聚合物包括泛素或泛素-样蛋白（UBL）或它的一个结合功能性C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括游离的N-末端氨基酸；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述N-C-末端可操作地连接的；

在能进行所述裂解的条件下，使所述融合聚合物与UBL C-末端裂解蛋白水解酶接触；

检测与裂解数量相关的信号，以便获得100%的裂解信号；

在存在蛋白水解酶活性的完全抑制剂的条件下重复所述接触和检测步骤，以便获得0%的裂解信号；

获得一组化合物；

在存在每一种化合物的条件下分别重复所述融合聚合物的获得，接触和检测步骤，以便获得裂解信号；

通过参考 0%以及100%的裂解信号，将每一种化合物的裂解信号标准化，并且确定每一种化合物的一个蛋白水解酶活性值。

上述方法可以通过用已知的蛋白水解酶活性调节剂进行所述接触和检测步骤实施，以便获得单点裂解对照信号，而不是0%以及100%的裂解

信号;

通过参考在没有所述调节剂的条件下获得的相应的酶活性值, 测定所述调节剂的蛋白水解酶活性值; 和

通过参考对照裂解信号, 将每一种化合物的裂解信号标准化, 并且确定每一种化合物蛋白水解酶活性值。

这样的调节剂通常包括蛋白水解酶活性活化剂或抑制剂。在所述方法的这种形式中, 所述一个或多个步骤可以在细胞或组织培养物中, 在细胞或组织级份或提取物上, 在体外, 体内, 自体内进行。为了进行检测可以观察的某些参数包括细胞生长, 或生色, 放射性, 荧光, 磷光, 声音, 或化学发光检测信号。

在本方法的一种实施方案中, 所述标准化步骤可以通过参考酶活性裂解值的曲线将每一种化合物的裂解信号标准化进行, 并且确定每一种蛋白水解酶活性; 其中, 当所获得的酶活性低于截断值时, 可以认为所述化合物是无活性的, 并且, 当它高于所述截断值时, 是有活性的。在这种模式中, 所述截断值可以选择为蛋白水解酶活性的50%, 并且, 当在存在所述化合物的条件下所述酶活性降低至少50%时, 可以认为所述化合物是抑制剂, 并且当所述酶活性提高至少50%时, 所述化合物是增强剂。另外, 所述方法可以包括测定能抑制 (IC_{50}) 和/或增强 (EC_{50}) 所述酶活性的50%的化合物浓度, 并且比较所述化合物的 IC_{50} 和/或 EC_{50} , 以便评估它作为抑制剂和/或增强剂的酶活性。这种形式的方法可应用于化合物文库, 并且比较所有的 IC_{50} 和/或 EC_{50} , 以便评估所述化合物彼此的相对强度。正如前面所披露的, 所述第一聚合物通常包括泛素, SUMO, Nedd8, ISG15, Apg8, Apg12, FAT10, Urm1, Hub, Ubi, Rub1, ISG15, 或一个结合功能性C-末端片段, 该片段包括UBL' s环内的将它的 α -螺旋 1和 β -链 3连接在C-末端上的氨基酸。后者特别适用于本发明的"开关和传感器"模式, 它同样利用了所述蛋白的N-末端片段, 它通常可以与结合对中的一个结合, 该结合对的第二个成员可以与共激活剂结合, 它能促进N-末端片段的释放, 用于在所述成对的成员彼此结合时与相应的C-末端片段结合, 正如在本专利的其余部分所披露的。实施本发明的方法的这种形式的其余要素如上文所述, 并且没有必要重复这种具体应用。

在这种形式下, 所述方法还包括获得结合功能性N-末端 UBL片段, 该片段包括在UBL' s环内的将其 α -螺旋 1和 β -链 3连接在它的N-末端的氨基酸, 其中, 当所述N-末端片段和C-末端片段彼此结合时, 它们形成了完整的UBL, 并且所述UBL N-末端片段可操作地与第一和第二结合配偶体之一连接, 并且, 正如所披露的, 获得第二结合配偶体; 其中, 所述融合聚合物, 例如, 蛋白通常是在第一和第二结合配偶体结合时裂解的, 无论是否得到了共激活剂的帮助。正如以前所披露的, 这种形式的分析方法还可以通过获得所述融合蛋白实施, 获得所述融合蛋白可通过

原位表达编码它的多核苷酸，无论是在原核细胞或真核细胞或用上述融合多核苷酸转化过的转基因植物或动物模型中表达。由此获得的融合蛋白可以分离，并且选择性地纯化。这种形式的方法还可以自动化，并且所获得的有关每一种调节剂和对照的信息的采集，加工和报导可以以计算机形式进行，采用合适的软件，这些软件可以通过商业渠道获得，或者可以在没有较大复杂性的情况下设计。

上述方法可以借助于蛋白水解酶活性调节剂筛选试剂盒实施，该试剂盒包括

一种融合聚合物，包括第一聚合物，该第一聚合物包括泛素或泛素-样蛋白 (UBL) 或其C-末端片段，和第二聚合物，该第二聚合物包括多肽，该多肽需要用于检测的游离的N-氨基酸末端；其中，所述第一和第二聚合物彼此是通过所述泛素或UBL C-末端和所述第二聚合物N-末端可操作地连接的；和

有关进行蛋白水解酶分析，检测与所述第一和/或第二聚合物的数量和活性相关的信号，以及建立检测到的信号与所述酶的蛋白水解活性的关联的说明 多种调节剂和对照的；和

能裂解所述泛素或UBL C-末端的蛋白水解酶的选择性的来源。

这种形式的试剂盒还可以提供第一和第二结合配偶体中的一种或多种，其中，所述第一配偶体能够可操作地连接在一个UBL N-末端片段上，并且，其中，当所述第一和第二结合配偶体彼此结合时，所述UBL C-末端片段与所述UBL N-末端片段结合，使得一种UBL构象，所述蛋白水解酶能够裂解所述融合聚合物；用于执行所述融合聚合物的UBL C-末端酶裂解的制剂；用于检测由所述第一和/或第二裂解的聚合物发出的信号的装置；和通过参考对照用于将可检测信号与蛋白水解酶活性或其变化相关联的装置。所述试剂盒的一种优选形式是这样的，其中，所述融合聚合物包括，或者是一种融合蛋白，所述试剂盒还包括编码它的融合多核苷酸，用于取代所述融合聚合物，并且选择性地包括用于多核苷酸表达的一种或多种制剂，和/或用于表达所述多核苷酸的细胞或它的级份或提取物，此时用它取代所述融合蛋白。所述试剂盒的一种特别重要的形式还包括用于分别容纳多个样品，和有关自动化进行所述分析的说明的装置，并且还可以包括用于自动化处理每一个样品的数据的装置；和它的使用说明。

本发明还提供转基因细胞、植物或动物，它包括选择性地整合在所述细胞、植物或动物染色体上的一种泛素-或UBL-报导融合多核苷酸；其中，所述泛素或泛素-特异性蛋白水解酶，例如，肽酶，与特殊的疾病或症状或其家族相关。所述转基因细胞、植物或动物通常能够表达与特殊疾病或症状或其家族相关的泛素-或UBL-报导融合蛋白。它可以通过形成一种杂交载体获得，包括将融合多核苷酸克隆到载体上，并且用所述杂

交载体转染所述细胞、植物或动物。在一种优选实施方案中，所述载体包括质粒，并且所述细胞包括一种真核细胞。不过，其他载体和细胞类型同样是合适的，包括原核细胞。本发明的转基因细胞、植物或动物还可以进行进一步修饰，以使用作疾病或症状的细胞、植物或动物模型。在适合诊断特殊疾病或症状的特定实施方案中，所述泛素或UBL-肽酶与自体免疫，肿瘤，代谢，血管，神经变性或其他遗传疾病或症状相关，不过，上面并没有列举出所有的情况。本申请还包括所有已知的其他疾病或要确定为与特殊的泛素或UBL-特异性肽酶相互作用以便产生信号的疾病。所述疾病和症状的具体例子包括癌症，例如，乳腺癌，前列腺癌，和与希-林二氏病相关的癌症，它有可能产生多种癌症，如成血管细胞瘤，嗜铬细胞瘤，和囊腺瘤，以及其他疾病，如狼疮，糖尿病，IBD，帕金森氏症和心血管病。与疾病相关的肽酶/去泛素化酶的例子包括以下疾病：

VDU1/2和癌症

希-林二氏病是由VHL基因的生殖细胞突变引起的一种遗传性癌症综合症。参见，Sims (2001)。预计患有这种病的患者会出现肿瘤，包括CNS和视网膜上的成血管细胞瘤，明细胞肾癌，肾上腺的嗜铬细胞瘤，胰脏，副睾的囊腺瘤，和内耳肿瘤。参见，Li等 (2002)；Maher和Kaelin (1997)。VHL蛋白 (pVHL) 与加长因子C，加长因子B，和cullin-2结合形成复合物，VCB-CUL2，它能起着一种泛素E3 连接酶的作用。参见，Lisztwan等 (1999)。由于突变的pVHL与恶性肿瘤相关，可以认为所述连接酶是肿瘤抑制剂，而它的底物是潜在的致癌分子。已知为VCB-CUL2底物，组织缺氧-诱导型因子 (HIF- α) 在成血管细胞瘤的发生中起作用，并且同样在肿瘤血管生成中起作用，一般是通过VEGF诱导起作用的，参见Ohh等 (2000)；Tyers等 (1999) 和Benjamin等 (1997)。它的底物还包括泛素肽酶，VDU1，通过酵母2杂交筛选发现它能与pVHL相互作用。一种高度同源的蛋白酶，VDU2同样是已知的；尽管一直没有研究过pVHL结合，VDU2具有与VDU1相同的生理学底物。参见，Curcio-Morelli等 (2003)。pVHL的 β -结构域部分，发生天然突变的位点，是VDU1相互作用的位点，并且VDU1可以在所述VCB-CUL2复合物上共同免疫沉淀。pVHL-依赖型途径对VDU1的泛素化和降解由于VHL突变而解除，这种突变破坏了与VDU1的相互作用。因此，pVHL对VDU1的定向降解在抑制肿瘤形成和/或维持方面是重要的，并且VDU1可能具有致癌活性，这种活性是在没有所述功能性连接酶的条件下发现的。因此，VDU1在以突变型pVHL为特征的肿瘤性疾病中是重要的 (100%的患者患有VHL (常染色体显性) 疾病)，并且更大数量的患者中的50-80%患有偶发的肾明细胞癌。例如，参见，Stolle等 (1998)；Gnarra等 (1994)。抑制VDU1，在功能上模拟了野生型肿瘤抑制剂 pVHL的活性。

USP7, USP2a和癌症

去泛素化酶可用于节省某些蛋白，或者至少延长它们的细胞寿命，包括去掉起始的泛素标记，以便抑制蛋白酶体降解。一种这样的肽酶，USP7又被称作HAUSP，已知能稳定肿瘤抑制剂 p53。参见，Li 等（2002）。另一种肽酶，USP2a业已参与了脂肪酸合成酶（FAS）的调控，它是前列腺癌分子标记。参见，Rossi 等（2003）；Agostini 等（2004）；Graner 等（2004）。USP2a是雄激素-调控的，并且在前列腺癌中超量表达，因此，是致癌蛋白。因此，根据它们的底物的作用，去泛素化酶可以激活或抑制，以便获得治疗效果。

异肽酶 T和心血管病

去泛素化酶肽酶 T在患有22q11缺失综合症的患者体内被下调，这种疾病包括多种心脏缺陷。参见，Yamagishi 等（1999）。在患有心力衰竭的患者的肌细胞中，肽酶T与UFD1一起被下调了。参见，Kostin 等（2003）。已知这种肽酶能从泛素-蛋白缀合物上除去多泛素链，并且促进蛋白降解。并且它的缺乏导致了多泛素化蛋白的积累，和泛素-蛋白酶体降解途径的破坏，从而导致了自我吞噬细胞死亡。参见，Hadari 等（1992）；Johnson 等（1995）；Stefanis 等（2001）。

JAMM 基序肽酶AMSH和肺病及癌症

包含JAMM结构域的蛋白与核内体分选相关的信号转导连接，即EGF受体（EGFR）的细胞膜和核内体/溶酶体区室之间的交通。该蛋白，AMSH（与STAM的SH₃ 结构域结合的分子，它是一种能在核内体上调受体分子的蛋白）。参见，McCullough 等（2004）；Clague和Urbe（2001）。EGFR能通过启动信号转导系列事件调控多种细胞功能。参见，Lockhart和Berlin（2005）；von Ahlsen和Bomer（2005）；Le Roy和Wrana（2005）；Spano 等（2005）。在所述EGFR的细胞寿命期间，它从细胞膜循环到早期（分选）核内体，然后最终被选择用于分选到晚期核内体和溶酶体，在这里它被酸性蛋白酶降解。EGFR参与了细胞膜和早期核内体区室内的信号转导。尽管大部分信号传导与细胞生长的调控和其他功能相关，信号转导的一部分调控了EGFR自身的运输。E3 连接酶 Cbl介导了磷酸化EGFR的泛素化。随后的信号传导事件导致了所述受体在随后的核内体/溶酶体中的降解。Ub-EGFR是由位于核内体表面上的蛋白Hrs识别的，并且与核内体-相关复合物进一步相互作用，它是通过泛素介导的转运（ESCRT）所必需的，导致转运到多泡体（MVB）的内囊中，将EGFR用于溶酶体中的蛋白酶降解。Cbl介导的EGFR泛素化的降解，其最终结果可以由泛素肽酶，AMSH破坏，例如，通过用siRNA培养细胞破坏AMSH活性，导

致EGFR降解的增强；纯化的AMSH能在体外去泛素化EGFR-Ub。参见，McCullough 等（2004）。GFR激酶抑制剂和受体结合拮抗剂目前被用于各种癌症的临床试验，参见，Ciardiello和Tortora（2001）；LoRusso 等（2003）。具有重要的未满足需求的其他疾病领域也与EGFR活性相关，一种疾病是呼吸道发炎和与支气管哮喘相关的黏液分泌过多。尽管哮喘是支气管上皮细胞的多因子疾病损伤，与白细胞浸润相关，而较强的呼吸道反应性是共同的特征。参见，Puddicombe 等（2000）。业已推测EGFR系统在肺部上皮和结缔组织细胞的生长和分化中发挥重要作用。所述EGFR及其配体是在哮喘的病理发生期间得到增加的，并且该系统的诱导与哮喘性呼吸道的杯状细胞增生相关。参见，Takeyama 等（2001）。修复起始上皮细胞损伤的任何企图，都会导致过度增殖和分化反应，这些反应与EGFR和EGFR激活相关。参见，Bonner（2002）。哮喘患者似乎慢性出现了高水平的EGFR，即使在未受损伤的上皮细胞中也是这样。这维持了稳定的炎性症状，并且导致与气道阻塞相关的纤维化和黏液分泌过多，哮喘，COPD，和其他肺病的发病率和致死率。

UCHL1 和帕金森氏症

UCHL1，或泛素羧基末端水解酶在遗传上与帕金森氏症（PD）相关。参见，Chung 等（2003）；Toda 等（2003）；Maraganore 等（2004）。在UCHL1上的突变导致了常染色体显性PD，与以下发现吻合，泛素蛋白酶体途径的紊乱在PD的多巴胺神经元死亡方面发挥重要作用。其他蛋白水解酶与其他疾病相关，同样为本领域所公知。在下面的表3中包含了各种例子。

表3: 与生理学，疾病和酶生理学相关的去泛素化酶

USP2a	前列腺癌
Ap-UCH	对海兔长期记忆所必需的
BAP1	肿瘤抑制剂 (与BRCA1相关)
CYLD1	肿瘤抑制剂
DUB-1	细胞因子-诱导型，B-细胞选择性
DUB-2	细胞因子-诱导型，T-细胞选择性
D-ubp-64E	位置-效应多样化的果蝇抑制剂
FAF (Fat facets)	果蝇眼发育
FAM	鼠胚胎植入前的胚胎发育
HAUSP (USP7)	肿瘤抑制剂 (p53稳定化)
Tre-2 (USP6)	肿瘤蛋白
Ubp3	在酵母中转录沉默的抑制剂
UBP41	细胞凋亡，骨骼形成
UBP43	IFN信号传导，造血作用的负调控剂
UBP45	肌生成

UBP69	肌生成
UbpB (网柄菌属)	发育定时和分布类型
UBP-M (USP16)	细胞周期控制 (染色质浓缩?)
UBPY	细胞循环/细胞生长
USP14 (共济失调)	联合功能
UCH-L1 (PGP9.5)	帕金森氏症, 纤弱轴突营养不良
VDU1/VDU2	肿瘤发生 (与 von Hippel-Lindau 蛋白相关)

上述本发明的杂交细胞、植物或动物可以通过很多方法生产, 包括以下步骤

获得细胞、植物或动物;

获得泛素-, UBL-或其C-末端结合功能性片段-报导融合多核苷酸;

获得杂交载体, 它携带有可操作地与载体连接的杂交多核苷酸; 和将所述杂交载体稳定地转入所述细胞、植物或动物。

在一种实施方案中, 所述融合多核苷酸被整合在细胞、植物或动物染色体上, 并且被完全稳定化。在另一种实施方案中, 所述融合多核苷酸包括一种融合脱氧核糖核苷酸。

本发明的细胞、植物和动物可用于诊断疾病或症状, 例如, 包括

获得如权利要求71所述的细胞、植物或动物, 或其级份或组织, 其中, 所述报导物与一种疾病或症状相关;

使所述细胞、植物或动物接触或服用从被怀疑患有所述疾病或症状的对象体内获得的样品;

检测在存在所述样品的条件下由所述报导物质产生的任何信号; 和将所述信号与对照的0%以及100%的信号进行比较。

现在对本发明进行了一般性说明, 通过参考某些具体实施例可以更好地理解本发明, 这些实施例仅仅是以说明的目的包含在本发明中的, 并且不希望限定本发明或它的任何实施方案, 除非专门说明。

实施例

以下实施例是用于说明本发明的, 而不是用于限定本发明的。除非另有说明, 所有百分比都是最终组成重量的100%。

例1: 脊髓灰质炎病毒蛋白酶

下面的实施例说明了本发明优选的肽酶分析方法。报导酶RNA-依赖型RNA聚合酶(3D^{pol})的活性需要游离的N-末端。参见, Gohara, 等(1999)。所述聚合酶与Smt3融合, 以便封闭它的N-末端。在用SUMO 肽酶处理该融合蛋白时, 产生了游离的3D^{pol} N-末端。同前, Gohara, 等(1999)。在融合体裂解之后, 可以通过下文所披露的聚合酶分析方法定量3D^{pol}活性。因此, 肽酶-介导的脊髓灰质炎病毒RNA-依赖型RNA聚合酶的裂解是体外

聚合酶活性所必需的，并且脊髓灰质炎病毒RdRp活性是肽酶活性的一种替代手段。

质粒构建，表达和纯化

构建了Smt3-3D^{pol} (Mahoney菌株) 融合体，以类似于Malakhov 等 (2004, No. 7) 披露的方法表达和纯化。

简单地讲，脊髓灰质炎病毒 (Mahoney菌株) 3D^{pol} 基因片段是用以前披露的pET26b-Ub-3D-GSSG-6H 质粒进行PCR扩增的，参见Gohara 等 (1999)，使用合成的引物，在它的5'末端整合了BsaI位点，在它的3'末端整合了BamHI位于，以便有利于克隆到pET24-6H-SUMO载体上。所述引物的序列如下：

5'-GCAGGTCTCAAGGTGGTCAAATCCAGTGGATGAG-3'

5'-GCAGGATCCCTAGTGGTGGTGGTG-3'

通过DNA测序验证了pET24-6H-SUMO-3D^{pol}，所述最终构建体的结构。

使用酵母ULP1 酶裂解

C-末端His-标记的SUMO蛋白酶 1, ULP1 (403-621) p是由pET24d在Rosetta-(DE3) pLysS (Novagen) 中表达的，并且通过Ni-NTA树脂纯化。参见，Li和Hochstrasser (1999) 和Mossessova和Lima (2000)。所述Ulp和裂解反应是在由Malakhov 等 (2004, No. 7) 所披露的标准条件下完成。终结所述反应，并且将样品煮沸5分钟，然后进行SDS-PAGE。通过SDS-PAGE对所述裂解的融合体进行定量评估其活性。使用Scion图像软件对所获得的凝胶进行扫描，以便定量评估活性。

3D^{pol} (聚合酶) 活性分析

通过核苷酸整合或引物延伸分析3D^{pol}及其融合衍生物的聚合酶活性。参见，Arnold和Cameron (1999)。所述核苷酸整合分析是用放射性核苷酸进行的，使用了以下反应混合物：50 mM HEPES pH 7.5，10 mM β -巯基乙醇，5mM MgCl₂，60 μ M ZnCl₂，500 μ M UTP，0.4 μ Ci/ μ L [α -³²P] UTP，1.8 μ M dT1 5/0.15 μ M poly (rA)₄₀₀ 引物/模板和3D^{pol}。所有反应是在25 μ L的总体积中进行的，使用250 ng的纯化的3D^{pol}，在30°C下进行5分钟。通过添加0.5 M EDTA到83 mM的浓度对该反应进行淬灭，并且将10 μ L淬灭反应物点在DE81滤纸片上，并且充分干燥。洗涤所述滤纸片3次10分钟，使用250 mL的5% 磷酸二钠，并且用无水乙醇漂洗。通过液体闪烁光谱测定法在5 mL的闪烁液体中对结合在每一个滤膜上的放射性活性进行定量。所述引物延伸反应混合物包括50 mM HEPES (pH 7.5)，10 mM β -ME，5 mM MgCl₂，500 μ M ATP，1 μ M sym/sub-U，0.14 μ g/ μ L的3D酶和+/-1 μ L ULP1 (总反应体积为25 μ L)。

用ULP1进行体外裂解

Smt3-3D^{po1} Ulp-1融合体在标准条件下培养1, 2, 4, 10, 20, 30, 和60分钟, 并且导致3D^{po1}的100%的裂解, 正如通过SDS-PAGE和考马斯蓝染色所证实的。通过放射性核苷酸整合分析3D^{po1}的活性, 采用上述分析方法。所获得的结果在下面的表4中示出。

表4: 放射性核苷酸整合分析中的3D^{po1}活性

时间 (分)	SUMO-3D ^{po1}	SUMO-3D ^{po1} + 与 Ulp1预培养	SUMO-3D ^{po1} + 在Ulp1中反应
1	0	12.84	2.57
2	0	19.69	4.96
4	0	23.37	7.61
10	0	33.90	20.55
20	0	44.61	33.59
30	0	59.17	38.93
60	0	67.00	54.49

参见上面的表4, 通过将融合体与Ulp1一起共培养并且进行放射性核苷酸分析提高了3D^{po1}的活性, 并且通过将所述融合体与Ulp1一起预培养, 然后进行所述放射性核苷酸整合分析得到进一步提高。从表X中可以看出, 用酵母Ulp1 SUMO蛋白酶处理3D^{po1}融合体激活了3D^{po1}。

例2: 谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸转氨酶 (GPATase)

本实施例说明了本发明的采用GPATase的优选的肽酶分析方法。谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸转氨酶 (GPATase) 能催化嘌呤核苷酸生物合成的起始步骤, 并且是该途径的主要调节酶。GPATase能将谷氨酰胺的酰胺氮 (游离的NH₃) 转移到磷酸核糖基焦磷酸 (PRPP) 上, 产生磷酸核糖基胺, 焦磷酸, 和谷氨酸。GPATase属于具有16种谷氨酰胺转氨酶家族, 包括将谷氨酰胺的酰胺氮用于生物合成目的。参见, Zalkin (1993); Tso等 (1982)。大肠杆菌 GPATase可以是四聚体或三聚体形式的, 它是由相同的亚基组成的, 并且不包括铁, 与禽类, 哺乳动物, 或枯草芽孢杆菌 GPATase不同。参见, Mantsala和Zalkin (1976)。活性位点半胱氨酸是转移谷氨酰胺的酰胺所需要的, 它是所述催化机制的关键步骤。由于该半胱氨酸同样是成熟的GPATase的N-末端残基, 很显然, 所述酶的催化活性需要游离的N-末端。参见, Tso等 (1982)。该反应与NAD⁺ → NADH的反应相关, 它可以通过在λ = 363 nm的波长下测定NADH反应产物的吸收值评估GPATase活性, 正如下文所披露的。

方法: Smt3-GPATase的质粒构建, 表达和纯化

以类似于Malakhov等(2004, #7)所披露的方法构建了Smt3-GPATase融合体,并且进行表达和纯化。对编码谷氨酰胺磷酸核糖基焦磷酸转氨酶(GPATase)的大肠杆菌purF基因进行PCR-扩增,使用pETpurF质粒,参见Bera等, J. B. C. 275, 7975-7979 (2000), 使用以下合成引物:

正向: 5'-GTCAGGTCTCAAGGTTGCGGTATTGTCGGTATCGC-3'

反向: 5'-GTCAGGATCCTCATCCTTCGTTATGCATTT-3'

上述引物序列在它的5'末端整合了BsaI位点,并且在purF序列的3'末端整合了BamHI位点,以便克隆到pET24-6H-SUMO载体上。该构建体被设计成定向合成融合蛋白,其中,SUMO C-末端-Gly-Gly氨基酸序列直接结合在成熟的GPATase N-末端,它是位于2号氨基酸位置上的半胱氨酸残基。通过DNA测序证实了最终构建体,pET24-6H-SUMO-GPATase的结构。

采用酵母ULP1 酶裂解SUMO-GPATase

通过用酵母ULP1蛋白(SUMO蛋白酶催化结构域)处理将SUMO蛋白从SUMO-GPATase融合体蛋白上裂解下来。大约5 μ g SUMO-GPATase与浓度逐渐提高的ULP1酶在30°C下培养3小时,反应混合物中包括50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 10 mM DTT。通过添加SDS-PAGE样品缓冲液对该反应进行淬灭,加热,并且直接加样到12% SDS-聚丙烯酰胺凝胶上,并且电泳。在电泳之后,对凝胶进行染色,以便观察所述蛋白。所述SDS-PAGE分析证实了少到.009个单位的Ulp 1的融合体的裂解;不过,从来没有完全实现高达78.3个单位的裂解。ULP1酶裂解融合蛋白的能力欠缺,可能反应了在裂解位点周围的空间阻碍的存在,或体现了结合序列的某些部分修饰,例如,在GPATase的氨基末端的半胱氨酸残基的氧化。

体外GPATase活性分析

GPATase,一种谷氨酰胺酶,能水解5-磷酸核糖基焦磷酸(PRPP),产生谷氨酰胺,5-磷酸核糖基-(b)1-胺(PRA)和焦磷酸(PP_i)。这种谷氨酰胺酶反应是通过测定谷氨酸的产生监测的,采用偶联的谷氨酸脱氢酶(GDH)分析,在由Messenger和Zalkin(1979)所披露的标准反应条件下进行。

当所述融合蛋白与Ulp 1一起培养30分钟,并且将反应物添加到GDH底物中时,OD₃₆₃读数的吸收值有所增加,表明了存在活性谷氨酸,反过来又表明了存在GPATase活性。在缺少Ulp1的条件下,不会出现吸收值的这种增加。另外,在提高Smt3-GPATase的浓度时,融合体也随之增加。

下面所披露的其他实验,进一步定量并且确定了ULP1裂解的SUMO-GPATase和未处理过的融合蛋白之间的差异。

用于评估GPATase活性的偶联GDH分析是为了用于检查精确性的。增加纯化的SUMO-GPATase融合体蛋白的用量,所述蛋白是未处理过的或者

是通过ULP1 SUMO蛋白酶裂解过的，在存在谷氨酰胺和PRPP的条件下培养固定的时间，并且将全部反应物用作GDH分析底物。结果表明，在GPATase酶浓度和363纳米波长下的GDH反应物吸收读数之间存在线性关系。当酶的浓度为1 μ g或以下时更是如此。因此，在GDH反应中NAD⁺含量的降低直接与起始反应物中GPATase酶的数量相关。另外，用ULP1处理导致GPATase的谷氨酰胺酶活性增加10倍，尽管迄今为止仅观察到了SUMO-GPATase的部分裂解。

例3: 类胰蛋白酶分析

以下实施例说明了本发明所提供的优选的肽酶分析方法。类胰蛋白酶是中性丝氨酸蛋白酶，其分子量为134 kDa。这种酶由4个非共价结合的亚基组成，并且每一个亚基具有一个活性位点。该家族主要具有两个成员， α -类胰蛋白酶和 β -类胰蛋白酶，二者之间具有大约90%的序列相同性。类胰蛋白酶是作为无活性的前体合成的，并且作为活性酶与其他蛋白酶一起储存在分泌颗粒中。另外，还存在组成型表达和分泌的版本，同样被称作 α -类胰蛋白酶原。 β -类胰蛋白酶的激活是两个蛋白水解过程，因此，最初的裂解是自我催化的分子间裂解，它导致了单体的形成，通过位于N-末端的二肽抑制所需要的四聚体的形成。二肽基肽酶 I的作用是将所述二肽从N-末端上裂解下来，以便形成成熟的类胰蛋白酶结构，并且将其活性提高50倍。

类胰蛋白酶基因融合体在昆虫细胞中的表达

重组人类胰蛋白酶是在杆状病毒（苜蓿银纹夜蛾核型多角体病毒（AcNPV））昆虫细胞（草地夜蛾Sf9）系统中表达的，参见O'Reilly（1992）。编码人类胰蛋白酶的cDNA以框内形式融合在编码泛素（Ub）或SUMO的编码序列的3'末端，它在N-末端具有六个组氨酸残基（6 x His）标记。然后将杂合基因直接插入杆状病毒分泌的外被糖蛋白gp67的信号序列的下游。所述基因融合体的表达是由多角体蛋白 p10 或碱性蛋白 AcNPV 基因启动子控制的。在将所述基因克隆到杆状病毒转移载体中之后，将携带Ub/UBL-类胰蛋白酶构建体的重组质粒与AcNPV 杆状病毒 DNA一起共同转染到昆虫细胞中。在若干天之后，筛选通过转移载体和AcNPV脱氧核糖核酸（DNA）之间的同源重组产生的重组病毒，纯化噬菌斑并且扩增。

用纯化的重组杆状病毒感染的昆虫细胞能够在每升培养物中产生毫克数量的融合蛋白。Ub/SUMO-类胰蛋白酶蛋白以完整融合蛋白的形式分泌到培养基中，它没有gp67信号序列。N-末端6xHis标记的存在，有利于随后在Ni-NTA琼脂（金属亲和层析）上对所述蛋白进行纯化，并且通过SDS-PAGE验证其大小。在用合适的肽酶裂解时，产生了合适的脱落带。

类胰蛋白酶酶促活性分析

使用生色或荧光酶促分析或这两种方法测定人类胰蛋白酶的活性。通过合适的UBL水解酶/蛋白酶裂解纯化的融合蛋白，它能激活类胰蛋白酶。使用肽基生色底物分析胰蛋白酶活性，通过测定在410 nm波长下的吸收变化监测所述底物的水解来实现。参见Schechter等(1998,1998)。在用Ulp 1裂解纯化的Smt3-类胰蛋白酶时，按照Schechter及其同事的方法测定到了类胰蛋白酶活性的增强。在用肽酶裂解之前，泛素-类胰蛋白酶或SUMO-类胰蛋白酶都没有任何类胰蛋白酶活性。只有在通过肽酶裂解时，我们才观察到了类胰蛋白酶活性。因此，类胰蛋白酶融合体是鉴定肽酶活性的有用工具。

例4: 磷脂酶 A₂ 分析

以下实施例说明了本发明分析方法的采用磷脂酶 A₂ 的优选模式。磷脂酶是一个酶家族，它最初是在蛇毒中鉴定的，后来发现，它在所有高等生物中是保守的。根据它们的大小，表达方式和对辅酶因子的依赖性将磷脂酶分成亚家族。分泌的磷脂酶 A₂ (sPLA₂) 酶亚家族可能与其他PLA₂ 亚家族不同，如细胞溶质，细胞内成员和Ca²⁺-独立型PLA₂ 异构型，其中，它们是富含二硫化物的14-16 kDa的蛋白，它的催化活性需要毫摩尔浓度的Ca²⁺，参见，Gelb(1995)。在哺乳动物系统中，存在超过十一种sPLA₂ 酶，例如，IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA 和XIIB。sPLA₂ 对具有不同极性端头基团和脂肪酰基链的磷脂具有广泛的特异性。PLA₂ 家族的酶能催化磷脂在sn-2 位置上的裂解，以便产生游离的脂肪酸和溶血磷脂。参见，Dennis(1994)。

sPLA₂ 酶是以酶原形式产生的，它能够通过催化失活。参见Dijkstra(1981)。在分泌并且通过加工蛋白酶，如胰蛋白酶裂解时，N-末端前肽被裂解，产生了具有需要的N-末端的活性酶。参见，Cupillard(1997)。游离的N-末端是催化活性所必需的，因为它参与了氢结合和界面间结合。参见，Dijkstra(1984)；Yuan，(1999)；Grataroli等(1982)。

泛素/UBL-PLA₂mX质粒构建

用于在大肠杆菌中表达的所有质粒构建体都来自pET24d(+) 表达载体(Novagen)。泛素/UBL-融合表达载体是按照Malakov等(2004)披露的方法构建的。选择小鼠Group X PLA₂作为完整PLA₂ 酶类型的例子。所述融合构建体是通过PCR扩增鼠PLA₂ Group X 基因制备的，使用设计的引物，它只能扩增加工过的活性Group X PLA₂ 酶形式。在5'和3'引物中分别包括独特的BsaI 和BamHI限制位点。这使得可以在泛素/UBL基因的下流插入，并因此进行融合蛋白的框内翻译。所使用的引物如下：

正向: 5'-GATCGGTCTCAAGGTGGACTCCTGGAGCTGGCAGGG-3'

反向: 5'-GATCGGATCCTCAATTGCACTTGGGAGAGTC-3'

采用上述相同的方法, 最终制备了泛素-PLA₂mX, (酵母SUMO) Smt3-PLA₂mX, 人SUMO3-PLA₂mX, ISG15-PLA₂mX, 人Nedd8-PLA₂mX和酵母Rub1-PLA₂mX融合体。在表达之前, 对表达质粒进行序列验证, 以便生产正确的框内翻译产物。

泛素/UBL-PLA₂mX在大肠杆菌中的表达和纯化

泛素/UBL融合蛋白的细菌表达是在转入BL21(DE3)或Rosetta(DE3)两种大肠杆菌宿主菌株中之后进行的。沉积SoUBLE和insoUBLE级份, 在SDS-PAGE凝胶上电泳, 并且用考马斯蓝染色, 以便验证每一种级份的大小和表达。然后通过NiNTA树脂(Qiagen)上层析从UBLE级份中纯化泛素/UBL-PLA₂mX, 并且通过更换缓冲液透析48小时。收集所有级份, 然后通过SDS-PAGE电泳, 并且用考马斯蓝染色, 每一种构建体都表达了预计的合适大小的带, 正如在下面的表5中所示出的。

PLA₂分析

将在所述脂的sn-2位置上缀合有荧光团的磷脂酰胆碱用作分析PLA₂活性的底物。在通过活性PLA₂裂解所述sn-2酰基键时所释放的荧光团在它的特定激发波长和发射波长下检测。使用两种荧光团: NDB(ex: 460nm/em: 534nm)和BODIPY FL(ex: 503nm/em: 512nm)(Molecular Probes/Invitrogen)。所述脂类底物用PLA₂分析缓冲液(10 mM Tris, pH 8, 100 mM KCl, 和2 mM Ca²⁺)稀释到最终浓度为5 μm。裂解反应在96孔黑色平板或在1.5 ml Eppendorf试管中进行, 然后添加脂类底物。在添加裂解产物或泛素/UBL-肽酶时, 以15秒钟的间隔记录400毫秒的读数, 一共记录30分钟。在另一种方法中, 采用了装配在96孔平板上的裂解反应, 通过统一添加PLA₂-融合构建体, 细胞提取物或肽酶, 和底物。连续读数, 直到需要的时间点, 如30分钟, 通过裂解的脂类底物的荧光增强检测所述融合体的裂解。

用全细胞和植物提取物裂解泛素/UBL-PLA₂mX

各种泛素/UBL-PLA₂融合体的裂解是用全细胞提取物进行的。业已确定, 这种裂解产生了合适的或预计大小的脱落带。在考马斯蓝染色的凝胶上出现了两条带: 稳定的14 kDa PLA₂mX带, 和泛素/UBL融合配偶体大小的带, 它的大小取决于所述UBL融合配偶体。所获得的结果在下面的表5中示出。

表5: 完整泛素/UBL-融合体和裂解产物的大小

	完整长度 UB/UBL-PLA的大小	裂解的泛素/UBL	裂解的 PLA ₂ mX

泛素-PLA ₂ mX	23.5kDa	9kDa	14kDa
酵母SUMO-	32kDa	12kDa (移动到21kDa)	14kDa
hSUMO3-PLA ₂ mX	32kDa	12kDa (移动到21kDa)	14kDa
Nedd8-PLA ₂ mX	24kDa	9.7kDa	14kDa
Rub1-PLA ₂ mX	24kDa	9.7kDa	14kDa
ISG15-PLA ₂ mX	30kDa	15kDa	14kDa

每一种裂解反应物包括5 μg融合蛋白，和类似数量的昆虫细胞，兔网织红细胞级份II，人U20S骨肉瘤细胞，结肠癌细胞系DLD1和HCT116，人非小细胞肺癌H460细胞，人胚肾293T细胞，鼠T辅助淋巴细胞克隆，或小麦胚芽细胞提取物。培养所述反应混合物样品过夜，取出，在15% SDS-PAGE凝胶上电泳，并且用考马斯蓝染色，以便分析裂解。结果在下面的表6中示出。

表6: 细胞和植物提取物的裂解活性特征

裂解	泛素-PLA ₂ mX	hSUMO3-PLA ₂ mX	Nedd8-PLA ₂ mX	Rub1-PLA ₂ mX
昆虫细胞	-	++++	+	-
兔网织红细胞	++++	+++	++	++
U20S	-	++	+	-
DLD1	++	++	+	-
H460	++	+++	++	-
HEK293T	++	++++	+++	+
L2	++	++++	+++	+
HCT116	+++	++++	++	-
小麦胚芽	+/-	++	+/-	+

(+/- = <10%, +=10% -25%, ++ = 25%-50%, +++ = 50% -75%, ++++ = 75% -100%)

另外，按上述方法进行PLA₂分析，以便测定PLA₂活性，使用上述BODIPY FL标记的脂类底物，并且表达为活性的比例，其中，提取物被添加到所述融合蛋白中与融合蛋白本身之比。结果在下面的表7中示出。

表7: 来自通过细胞&植物提取物裂解的融合体的PLA₂活性的比例

PLA ₂ 活性	泛素-PLA ₂ mX	hSUMO3-PLA ₂ mX	Nedd8-PLA ₂ mX	Rub1-PLA ₂ mX
昆虫细胞	4.72	6.31	3.02	4.4
兔网织红细胞	21.24	2.19	6.59	25.1
U20S	4.33	2.59	3.15	4.0
DLD1	5.95	4.52	3.73	4.8
H460	6.34	5.90	4.19	3.6
HEK293T	5.68	3.47	6.20	4.2
L2	8.39	5.86	5.94	3.9
HCT116	9.03	5.5	3.96	2.8
小麦胚芽	1.86	157.09	20.27	95.63

从上面表 7 中所提供的数据可以看出, 泛素/UBL-PLA₂mX融合蛋白裂解, 与PLA₂活性密切相关。对于ISG15-PLA₂mX活性来说, 我们使用了来自HEK293T细胞的全细胞提取物, 所述细胞进行过转染, 以便表达UBP43, 即ISG15-特异性肽酶。在该分析中, ISG15融合体与UBP43转染的提取物和未转染过的对照提取物一起培养, 裂解并且实时监测荧光。在两种条件下都存在荧光活性, 虽然UBP43转染过的细胞提取物中的PLA₂活性比未转染过的细胞先出现。这可能是由于内源, 组成型表达的加工蛋白酶, 因为ISG15最初是17 kDa的前体, 它被加工成15 kDa。这种加工蛋白酶可能对ISG15-PLA₂融合体具有某些亲和力, 不过UBP43对ISG15的亲和力低得多, 因此在PLA₂分析中推迟了荧光读数。尽管如此, 我们的分析能够检测之间针对ISG15融合体的UBP活性。在存在UBP43的条件下, PLA₂活性的比例提高了四倍, 证实了ISG15-PLA₂融合体用于检测ISG15-肽酶活性的用途。

用泛素/UBL-特异性肽酶裂解泛素/UBL-PLA₂mX得到PLA₂活性。

在这些实验中, 在有或没有针对特定泛素或UBL部分的肽酶的条件下培养报导融合蛋白, 并且通过SDS-PAGE监测融合体裂解或通过检测PLA₂活性分析肽酶活性。由于酵母Ulp 1 肽酶对酵母Smt3 基因产物具有专一性, 将它用于裂解酵母Smt3融合蛋白。同样, 将SENP2 肽酶用于裂解人SUMO3融合蛋白, 并且裂解剪接的USP2产物, USP2a或USP2b共同拥有的核心酶促结构域用于裂解泛素融合蛋白, 参见, Lin 等(2000)。最后, 将Den1, 一种Nedd8-特异性肽酶用于裂解Nedd8-PLA₂mX融合蛋白。参见, Gan-Erdene(2003)。

将10 μg的酵母Smt3-PLA₂mX与1 μg的Ulp-1一起再培养一小时, 并且通过SDS-PAGE分析。对所述凝胶进行的分析发现所述报导融合蛋白完全裂解, 产生了独立的成分, Smt3(大小为21 kDa)和14 kDa的PLA₂mX。当在没有ULP1的条件下进行相同的实验时, 不存在自动催化活性。只观察到完整的32 kDa的融合体。酵母ULP 1 酶不能裂解泛素-PLA₂mX融合蛋白, 表现出对SUMO-融合蛋白的专一性。当10 μg hSUMO3-PLA₂mX与1 μg SENP2一起培养, 并且通过SDS-PAGE监测样品时, 观察到了合适大小的hSUMO3(21 kDa)和PLA₂mX(14 kDa)带, 表明了所述融合蛋白的完全裂解。SENP2酶不能裂解泛素-PLA₂mX融合蛋白, 正如以前用ULP1所观察到的结果, 证实了SUMO的肽酶活性的专一性。当10 μg的泛素-PLA₂mX融合体与3 μg的USP2核心结构域一起培养时, 观察到了融合的Ub-PLA₂mX的完全裂解。没有观察到亲本(融合蛋白)24 kDa的带而出现了14 kDa PLA₂mX带和9 kDa泛素带。当Nedd8-PLA₂mX融合蛋白与Nedd8-特异性肽酶 Den1一起培养时, 所述Nedd8-融合蛋白被裂解, 并且出现了14 kDa PLA₂mX和9 kDa Nedd8带。进行体外 PLA₂分析, 以便评估PLA₂mX通过特异性肽酶裂解泛素/UBL融合

蛋白的活性。在所有场合下，当共同培养泛素/UBL-PLA₂mX融合体和特异性肽酶时，导致了所述裂解，并且产生了14 kDa PLA₂mX带，存在提高了的PLA₂活性，正如通过荧光强度增强所证实的。在上述所有场合下，其中，所述UBL-特异性肽酶能裂解所述融合体，监测PLA₂活性，以及在有或没有UBL-特异性肽酶的条件下培养的融合体的PLA₂活性的比例，在下面的表8中示出。

表8：来自UBL-特异性肽酶活性的PLA₂活性比例

融合体 (-/+ 肽酶)	比例
Smt3-PLA ₂ mX	1
Smt3-PLA ₂ mX + UL P1	7.04
hSUM03-PLA ₂ mX	1
hSUM03-PLA ₂ mX + Senp2	9.95
泛素-PLA ₂ mX	1
泛素-PLA ₂ mX + USP2	9.37
Nedd8-PLA ₂ mX	1
Nedd8-PLA ₂ mX + Den1	3.38

本实施例证实了泛素/UBL-PLA₂融合蛋白检测蛋白水解的用途，例如，检测肽酶活性。在缺少任何肽酶活性的条件下，融合蛋白本身不会产生信号。在存在包含肽酶活性的细胞提取物的条件下或者更具体地讲，存在纯化的重组肽酶的条件下，所述融合蛋白可以被裂解，并且产生可定量含量的PLA₂活性。

已知有大量的酶能够从它们的靶蛋白或线性融合蛋白上裂解泛素或UBLs。对系统发育的基因组测序产生了其他例子。到目前为止，还没有适合快速、准确和选择性地筛选所述酶或筛选能调节它们的活性的化合物的直接的功能性分析方法。现有的分析方法是困难的，并且需要很多步骤来产生包含泛素或UBLs的异肽-连接的底物，以便方便地分析蛋白水解酶，例如，肽酶或水解酶（蛋白酶）活性。根据本发明，尽管从靶蛋白上除掉泛素或UBLs可以通过Western印迹监测；不过，现有分析方法以低灵敏度和低处理量为特征。诸如泛素和UBLs的UBL可以与诸如GST的蛋白结构域融合，然后可以将它固定在固体支持物上，并且裂解，并且通过改进的高处理量ELISA分析方法过滤或分析所述产物之一。不过，现有技术的方法具有较低的灵敏度，包括多个步骤，并且成本高昂，因为它们需要ELISA试剂。另外，例如，如果使用GST-融合体或具有任何其他酶的融合体的话，所述现有分析方法还容易产生假的结果，因为所述蛋白能够由即使在UBL-融合状态下仍然具有活性的抗体和/或酶识别。

对本发明的说明就是这样的，显而易见的是，可以通过多种方式对所述说明加以改进或改变。这样的改进和改变并没有脱离本发明的构思和范围，并且所有这样的改进和改变都包含在以下的权利要求书所确定的范围内。

引用下面的参考文献是为了表明现有技术的一般状态，并且以正确的方式理解发明主题。在本申请中所引用的参考文献并不被理解成承认本发明主题的实质性至专利性，也不意味着承认上述任何参考文献是现有技术；参考资料是以信息公开状态引用的，本文所引用的以及下面所列出的所有参考文献都以它们的全文形式收作本文参考。

参考文献

- Adams, J. (2002). "Development of the proteasome inhibitor PS-341." *Oncologist* 7(1): 9-16.
- Adams J. (2002) "Preclin/lin eval of proteasome inhib PS-341 for cancer." *Curr Opin Chem Biol* 6(4): 493-500.
- Adams, J. (2002). "Proteasome inhibition: a novel approach to cancer ther" *Trends MoI Med* 8(4 Suppl): S49-54.
- Almond, J. B. and G. M. Cohen (2002). "The proteasome: target for cancer chemother" *Leukemia* 16(4): 433-43.
- Agostini, M., S. D. Silva, et al. (2004). "Fatty acid synthase required for proliferation of human oral squamous carcinoma cells" *Oral Oncol* 40(7): 728-35.
- Andrulis, I. Shotwell, M, Evans-Blackler S. et al (1989) Fine Structure analysis of the Chinese hamster AS gene encoding asparagine synthetase. *Gene* 80: 75-85
- Arnold, JJ., and CE. Cameron (1999). "Poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3Dpol) is sufficient for template switching in vitro." *J Biol Chem* 274(5) :2706- 16
- Baek, S. H., K. S. Choi, et al. (1997). "Molecular cloning of a novel ubiquitin-specific protease, UBP41, with isopeptidase activity in chick skeletal muscle." *J Biol Chem* 272(41): 25560-5.
- Baek, S. H., K. C. Park, et al. (1998). "A novel family of ubiquitin-specific proteases in chick skeletal muscle with distinct - and C-terminal extensions." *Biochem J* 334 (Pt 3): 677-84.
- Bachmair, A., D. Finley,, and A. Varshavsky (1986) In vivo half-life of a protein is a function of its amino-terminal residue. *Science* 234: 179-186.
- Bachmair, A., and A. Varshavsky (1989) The degradat signal in a short-lived protein. *Cell* 56:1019-1032.
- Baker, R. T., S. A. Smith, et al. (1994). "Protein expression using cotranslational fusion and cleavage of ubiquitin. Mutag of glutathione-binding site of human Pi glutathione S-transf *J Biol Chem* 269(41): 25381-6.
- Baker, R. T., J. W. Tobias, et al. (1992). "Ubiquitin-specific proteases of *Saccharomyces cerevisiae*. Cloning of UBP2 and UBP3, and functional analysis of the UBP gene family." *J Biol Chem* 267(32): 23364-75.
- Balakirev, M. Y., S. O. Tcherniuk, et al. (2003). "Ouabains: a new family of cysteine proteases in the ubiquitin pathway." *EMBO Rep* 4(5): 517-22.
- Brain and Williams (1988) "Subst P reg vasodil act of calcitonin gene-related peptide" *Nature* 335(6185): 73-5.
- Benjamin, L. E. and E. Keshet (1997). "Conditional switching of vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in tumors: induction of endothelial cell shedding and regression of hemangioblastoma-like vessels by VEGF withdrawal." *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(16): 8761-6.
- Bonner, J. C. (2002). "The epidermal growth factor receptor at the crossroads of airway remodeling." *Am J Physiol Lung Cell MoI Physiol* 283(3): L528-30.
- Buchanan, J. M. (1973). "The aminotransferases." *Adv Enzymol Relat Areas MoI Biol* 39: 91-183.

Cai, S. Y., R. W. Babbitt, et al. (1999). "A mutant deubiquitinating enzyme (Ubp-M) associates with mitotic chromosomes and blocks cell division." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(6): 2828-33.

Chen, X., B. Zhang, et al. (2002). "A specific protein substrate for a deubiquitinating enzyme: Liquid facets is the substrate of Fat facets." *Genes Dev* 16(3): 289-94.

Chung, C. H. and S. H. Baek (1999). "Deubiquitinating enzymes: their diversity and emerging roles." *Biochem Biophys Res Commun* 266(3): 633-40.

Chung, K. K., V. L. Dawson, et al. (2003). "New insights into Parkinson's disease." *J Neurol* 250 Suppl 3: 11115-24.

Ciardiello, F. and G. Tortora (2001). "A novel approach in the treatment of cancer: targeting the epidermal growth factor receptor." *Clin Cancer Res* 7(10): 2958-70.

Ciechanover, A. (2001). "Ubiquitin-mediated degradation of cellular proteins: why destruction is essential for construction, and how it got from the test tube to the patient's bed." *Isr Med Assoc J* 3(5): 319-27.

Ciechanover, A. (2003). "The ubiquitin proteolytic system and pathogenesis of human diseases: a novel platform for mechanism-based drug targeting." *Biochem Soc Trans* 31(2): 474-81.

Conaway, R. C., C. S. Brower, et al. (2002). "Emerging roles of ubiquitin in transcription regulation." *Science* 296(5571): 1254-8.

Clague and Urbe (2001). "The interface of receptor trafficking and signalling." *J Cell Sci* 114(Pt 17): 3075-81.

Cupillard, L., et al. (1997) Cloning, Chromosomal Mapping, and Expression of a Novel Human Secretory Phospholipase A2. *J. Biol. Chem.* 272(25): p. 15745-15752.

Curcio-Morelli, C, A. M. Zavacki, et al. (2003). "Deubiquitination of type 2 iodothyronine deiodinase by von Hippel-Lindau prot-interacting deubiquit enzymes reg thyroid hormone activation." *J Clin Invest* 112(2): 189-96.

D' Andrea and Pellman (1998) "Deubiquit enz: new class of biol reg" *Crit Rev Biochem MoI Biol* 33(5): 337-52.

Dang, L. C, F. D. Melandri, et al. (1998). "Kinetic and mechanistic studies on the hydrolysis of ubiquitin C-terminal 7-amido-4-methylcoumarin by deubiquitinating enzymes." *Biochemistry* 37(7): 1868-79.

Day, I. N., L. J. Hinks, et al. (1990). "The structure of the human gene encoding protein gene product 9.5 (PGP9.5), a neuron-specific ubiquitin C-terminal hydrolase." *Biochem J* 268(2): 521-4.

Dennis (1994) Div group types, reg and funct of phospholipase A2 *J Biol Chem* 269(18): 13057- 13060.

Dijkstra, Drenth & Kalk, (1981) Active site and catal mech of phospholipase A2. *Nature.* 289(5798): 604-6.

Dijkstra et al. (1984). "Role of the N-terminus in the interaction of pancreatic phospholipase A2 with aggregated substrates. Properties and crystal structure of transaminated phospholipase A2." *Biochemistry* 23(12): 2759-66.

Dubiel and Gordon (1999). "Ubiquitin pathway: link in the polyubiquitin chain?" *Curr Biol* 9(15): R554-7.

Everett, R. D., M. Meredith, et al. (1997). "A novel ubiquitin-specific protease is dynamically associated with the PML nuclear domain and binds to a herpesvirus regulatory protein." *Embo J* 16(3): 566-77.

Frederick et al. (1998) "The human UNP locus at 3p21.31 enc 2 tissue-select, cytopl isoforms with deubiquit activity that have reduced expression in small cell lung carcinoma cell lines." *Oncogene* 16(2): 153-65.

Gan-Erdene et al (2003) Ident & charact of DEN1, a deneddylase of ULP fam *JBiolChem* 278(31): 28892-900

- Geib, M. H., et al., (1995) Interfacial Enzymology of Glycerolipid Hydrolases: Lessons from Secreted Phospholipases A2. *Annual Review of Biochemistry* 64(1): p. 653-688.
- Glickman & Ciechanover (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction *Physiol Rev.* Apr; 82(2): 373-428.
- Gnarra et al. (1994). "Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma." *Nat Genet* 7(1): 85-90.
- Gohara, D. W., C. S. Ha, et al. (1999). "Production of "authentic" poliovirus RNA-dependent RNA polymerase (3D(pol)) by ubiquitin-protease-mediated cleavage in *Escherichia coli*." *Protein Expr Purif* 17(1): 128-38.
- Gong, L., T. Kamitani, et al. (2000). "Identification of a novel isopeptidase with dual specificity for ubiquitin- and NEDD8-conjugated proteins." *J Biol Chem* 275(19): 14212-6.
- Gong et al. (2000) "Diff reg of sentrinized prot by novel sentrin-specific protease." *J Biol Chem* 275(5): 3355-9.
- Graner et al (2004) "Isopeptidase USP2a reg stab of fatty ac synthase in prost cancer" *Cancer Cell* 5(3): 253-61.
- Grataroli, R., et al., Studies on phospholipase A2 and its enzyme from human pancreatic juice. Catalytic properties and sequence of the N-terminal region. *Eur J Biochem*, 1982. 122(1): p. 111-7.
- Gray, D. A., J. Inazawa, et al. (1995). "Elevated expression of Unp, a proto-oncogene at 3p21.3, in human lung tumors." *Oncogene* 10(11): 2179-83.
- Gupta, K., et al. (1994). "The Unp proto-oncogene encodes a nuclear protein." *Oncogene* 9(6): 1729-31.
- Hadari, T., J. V. Warms, et al. (1992). "A ubiquitin C-terminal isopeptidase that acts on polyubiquitin chains. Role in protein degradation." *J Biol Chem* 267(2): 719-27.
- Hansen et al. (1997). "Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus." *Structure* 5(8): 1109-22.
- Hemelaar, J., A. Borodovsky, et al. (2004). "Specific and covalent targeting of conjugating and deconjugating enzymes of ubiquitin-like proteins." *Mol Cell Biol* 24(1): 84-95.
- Hendstrand, J. M., Schmid, J., and Amrhein, N (1995). "Only the Mature Form of the Platidic Chorismate Synthase Is Enzymatically Active." *Plant Physiol* 108: 1127-1132.
- Henriksen, R. A., C. K. Dunham, et al. (1998). "Prothrombin Greenville, Arg517>Gln, identified in an individual heterozygous for dysprothrombinemia." *Blood* 91(6): 2026-31.
- Hershko, A. and A. Ciechanover (1998). "The ubiquitin system." *Annu Rev Biochem* 67: 425-79.
- Hicke, L. (2001). "Protein regulation by monoubiquitin." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 195-201.
- Hochstrasser, M. (1996). "Ubiquitin-dependent protein degradation." *Annu Rev Genet* 30: 405-39.
- Hochstrasser, M. (2002). "Molecular biology. New proteases in a ubiquitin stew." *Science* 298(5593): 549-52.
- Hofmann & Pickart (2001) "In vitro assemb/recogn of Lys-63 polyubiq chains" *JBiolChem* 276(30): 27936-43.
- Hong, T. M., P. C. Yang, et al. (2000). "Profiling the downstream genes of tumor suppressor PTEN in lung cancer cells by complementary DNA microarray." *Am J Respir Cell Mol Biol* 23(3): 355-63.
- Huang, Y., R. T. Baker, et al. (1995). "Control of cell fate by a deubiquitinating enzyme encoded by the fat facets gene." *Science* 270(5243): 1828-31.
- Jensen, D. E., M. Proctor, et al. (1998). "BAP1: a novel ubiquitin hydrolase

which binds to the BRCA1 RING finger and enhances BRCA1-mediated cell growth suppression." *Oncogene* 16(9): 1097-112.

Johnson, E. S., P. C. Ma, et al. (1995). "A proteolytic pathway that recognizes ubiquitin as a degradation signal." *J Biol Chem* 270(29): 17442-56.

Johnston, S. C., C. N. Larsen, et al. (1997). "Crystal structure of a deubiquitinating enzyme (human UCH-L3) at 1.8 Å resolution." *Embo J* 16(13): 3787-96.

Kato, G. J. (1999). "Human genetic diseases of proteolysis." *Hum Mutat* 13(2): 87-98.

Kawakami, T., T. Suzuki, et al. (1999). "Isolation and characterization of cytosolic and membrane-bound deubiquitinating enzymes from bovine brain." *J Biochem (Tokyo)* 126(3): 612-23.

Kitada et al (1998) "Mutat in parkin gene cause autos recess juvenile parkinsonism" *Nature* 392(6676): 605-8.

Kostin et al (2003). "Myocytes die by multiple mechanisms in failing human hearts." *CircRes* 92(7): 715-24.

Larsen, C. N., J. S. Price, et al. (1996). "Substrate binding and catalysis by ubiquitin C-terminal hydrolases: identification of two active site residues." *Biochemistry* 35(21): 6735-44.

LaVallie, E. R., A. Rehemtulla, et al. (1993). "Cloning and functional expression of acDNA encoding the catalytic subunit of bovine enterokinase." *J Biol Chem* 268(31): 23311-7.

Layf□eld, R., K. Franklin, et al. (1999). "Chemically synthesized ubiquitin extension proteins detect distinct catalytic capacities of deubiquitinating enzymes." *Anal Biochem* 274(1): 40-9.

Le Roy (2005) "Clathrin- and non-clathrin-med endocyt reg of cell signalling" *NatRevMolCellBiol* 6(2): 112-26

Lee (1998) "Proteasome inhibitors: valuable new tools for cell biologists." *Trends Cell Biol* 8(10): 397-403.

Leroy, E., R. Boyer, et al. (1998). "The ubiquitin pathway in Parkinson's disease." *Nature* 395(6701): 451-2.

Li et al (2002) "Deubiquit of p53 by HAUSP is pathway for p53 stabil" *Nature* 416(6881): 648-53.

Li & Hochstrasser (1999) "New protease req for cell-cycle progression in yeast." *Nature* 398(6724): 246-51.

Li, S. J. and M. Hochstrasser (2000). "The yeast ULP2 (SMT4) gene encodes a novel protease specific for the ubiquitin-like Smt3 protein." *Mol Cell Biol* 20(7): 2367-77.

Li, Z., X. Na, et al. (2002). "Ubiquitination of a novel deubiquitinating enzyme requires direct binding to von Hippel-Lindau tumor suppressor protein." *J Biol Chem* 277(7): 4656-62.

Lin, H., A. Keriel, et al. (2000). "Divergent N-terminal sequences target an inducible testis deubiquitinating enzyme to distinct subcellular structures." *Mol Cell Biol* 20(17): 6568-78.

Lin, H., L. Yin, et al. (2001). "Divergent N-terminal sequences of a deubiquitinating enzyme modulate substrate specificity." *J Biol Chem* 276(23): 20357-63.

Lisztwan, J., G. Imbert, et al. (1999). "The von Hippel-Lindau tumor suppressor protein is a component of an E3 ubiquitin-protein ligase activity." *Genes Dev* 13(14): 1822-33.

Lockhart (2005) "Epid growth factor rec as target for colorectal cancer therapy" *Semin Oncol* 32(1): 52-60.

LoRusso, P. M., R. S. Herbst, et al. (2003). "Improvements in quality of life and disease-related symptoms in phase I trials of the selective oral epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor ZD1839 in non-small cell lung cancer and other

solid tumors." *Clin Cancer Res* 9(6): 2040-8.

Lu, S., R. Halberg, et al. (1990). "Processing of the mother-cell sigma factor, sigmaK, may depend on events occurring in the forespore during *Bacillus subtilis* development." *Proc Natl Acad Sci U S A* 87(24): 9722-6.

Lundgren, J1, P. Masson, et al. (2003). "Use of RNA interference and complementation to study the function of the *Drosophila* and human 26S proteasome subunit S13." *Mol Cell Biol* 23(15): 5320-30.

Maher, E. R. and W. G. Kaelin, Jr. (1997). "vonHippel-Lindau disease." *Medicine (Baltimore)* 76(6): 381-91.

Malakhov, M. P., Kim, K. L5 Malakhova, O. A., Jacobs, B. S., Borden, E. C5 Zhang, D.-E. (2003). High-throughput Immunoblotting. Ubiquitine-like Protein ISG15 Modifies Key Regulators of Signal Transduction, *J. Biol. Chem.* 278: 16608-16613

Malakhova et al (2002) Lipopolys Act Expr of ISG15-specific Protease UBP43 via Interferon Regulatory Factor 3. *J. Biol. Chem.* 277: 14703-14711

Malakhov et al (2002) UBP43 (USP18) Spec Removes ISG15 from Conj Prot *J. Biol. Chem.* 277: 9976-9981

Maraganore et al. (2004). "UCHL1 is a Parkinson's disease susceptibility gene." *Ann Neurol* 55(4): 512-21.

Mei & Zalkin (1990) Amino-term del define glutamine amide transfer domain in glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase & PurF-type amidotransferases. *J Bacteriol.* 172 : 3512-3514

Malakhov et al (2004). "SUMO fusion and SUMO-specific proteases for efficient expression and purification of proteins." *J. Structural and Functional Genomics (in press)*.

Mantsala & Zalkin (1976) "Glutamate synth Prop of glutamine-dependent act" *J Biol Chem* 251 (11): 3294-9.

Matsuka et al. (1999). "Fibrinogen cleavage by the *Streptococcus pyogenes* extracellular cysteine protease and generation of antibodies that inhibit enzyme proteolytic activity." *Infect Immun* 67(9): 4326-33.

McCullough et al. (2004). "AMSH is an endosome-assoc ubiquitin isopeptidase." *J Cell Biol* 166(4): 487-92.

Messenger, L.J., and H. Zalkin (1979) "Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*. Purification and properties." *J Biol Chem* 254(9): 3382-92

Minnaugh, E. G., G. Kayastha, et al. (2001). "Caspase-dependent deubiquitination of monoubiquitinated nucleosomal histone H2A induced by diverse apoptogenic stimuli." *Cell Death Differ* 8(12): 1182-96.

Mossessova, E. and C. D. Lima (2000). "Ulp 1 -SUMO crystal structure and genetic analysis reveal conserved interactions and a regulatory element essential for cell growth in yeast." *Mol Cell* 5(5): 865-76.

Muchmore, C. R., J. M. Krahn, et al. (1998). "Crystal structure of glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from *Escherichia coli*." *Protein Sci* 7(1): 39-51.

Ohh, M., C. W. Park, et al. (2000). "Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein." *Nat Cell Biol* 2(7): 423-7.

Oliver, G., Gosset G., Sanchez-Pescadore, E. et al (1987) Determination of the sequence for the glutamate synthetase structural gene of *E. coli* K-12. *Gene* 60: 1-11

O'Reilly et al (1992). Chapters 11, 12. Baculovirus expression vectors: a laboratory manual. NY, Freeman.

Padmanabhan et al (1993) "Struct of human des (1-45) factor Xa at 2.2 A resolution." *J Mol Biol* 232(3): 947-66.

Papa et al (1999) "Inter of Doa4 deubiquitinating enz with yeast 26S proteasome." *Mol Biol Cell* 10(3): 741-56.

Papa, F. R. and M. Hochstrasser (1993). "The yeast DOA4 gene encodes a deubiquitinating enzyme related to a product of the human *trc-2* oncogene." *Nature* 366(6453): 313-9.

Park, E. G., D. Finley, and J. W. Szostak (1992) A strategy for the generation of conditional mutations by protein destabilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1249-1252.

Park et al (2000) "Tissue-specific, functional character & subcellular local of rat ubiquitin-specific protease, UBP 109, whose mRNA expression is developmentally regulated." *Biochem J* 349(Pt 2): 443-53.

Piccinini, M., A. Merighi, et al. (1996). "Affinity purification and characterization of protein gene product 9.5 (PGP9.5) from retina." *Biochem J* 318 (Pt 2): 711-6.

Pickart, C. M. (2001). "Mechanisms underlying ubiquitination." *Annu Rev Biochem* 70: 503-33.

Puddicombe, S. M., R. Polosa, et al. (2000). "Involvement of the epidermal growth factor receptor in epithelial repair in asthma." *Faseb J* 14(10): 1362-74.

Rossi, S., E. Graner, et al. (2003). "Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer." *Mol Cancer Res* 1(10): 707-15.

Sims, K. B. (2001). "Von Hippel-Lindau disease: gene to bedside." *Curr Opin Neurol* 14(6): 695-703.

Sambook, J., E. Fritsch, and T. Maniatis (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

Sakai, K., S. Ren, et al. (1996). "A novel heparin-dependent processing pathway for human trypsin. Autocatalysis followed by activation with dipeptidyl peptidase I." *J Clin Invest* 97(4): 988-95.

Schechter, N. M., J. L. Sprows, et al. (1989). "Reaction of human skin chymotrypsin-like proteinase chymase with plasma proteinase inhibitors." *J Biol Chem* 264(35): 21308-15.

Shah et al. (2002). "Ubiquitin proteasome inhibition and cancer therapy." *Surgery* 131(6): 595-600.

Sizmann, D., C. Keilmann, et al. (1990). "Primary structure requirements for the maturation in vivo of penicillin acylase from *Escherichia coli* ATCC 11105." *Eur J Biochem* 192(1): 143-51.

Smyth, M. J., M. D. O'Connor, et al. (1996). "Granzymes: a variety of serine protease specificities encoded by genetically distinct subfamilies." *J Leukoc Biol* 60(5): 555-62.

Sommerhoff (1989) "Mast cell chymase, secretagogue for airway gland serous cells" *J Immunol* 142(7): 2450-6.

Spano, J. P., R. Fagard, et al. (2005). "Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives." *Ann Oncol* 16(2): 189-94.

Stefanis, L., K. E. Larsen, et al. (2001). "Expression of A53T mutant but not wild-type alpha-synuclein in PC 12 cells induces alterations of the ubiquitin-dependent degradation system, loss of dopamine release, and autophagic cell death." *J Neurosci* 21(24): 9549-60.

Steffan et al (2004) "SUMO mod of Huntingtin & Huntington's disease pathology." *Science* 304(5667): 100-4.

Stein et al (1995) "Kinetic study of isopeptidase T: modulation of peptidase activity by ubiquitin" *Biochem J* 314(3): 1261-6.

Stolle, C, G. Glenn, et al. (1998). "Improved detection of germline mutations

in the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene." *Hum Mutat* 12(6): 417-23.

Stroud et al. (1977). "Mechanisms of zymogen activation." *Annu Rev Biophys Bioeng* 6: 177-93.

Swinney, D. C. (2001). "Targeting protein ubiquitination for drug discovery. What is in the drug discovery toolbox?" *Drug Discov Today* 6(5): 244-250.

Takatsuji, H., H. Yamauchi, et al. (1992). "Cauliflower mosaic virus reverse transcriptase. Activation by proteolytic processing and functional alteration by terminal deletion." *J Biol Chem* 267(16): 11579-85.

Takeyama, K., J. V. Fahy, et al. (2001). "Relationship of epidermal growth factor receptors to goblet cell production in human bronchi." *Am J Respir Crit Care Med* 163(2): 511-6.

Tobias, J. W. and A. Varshavsky (1991). "Cloning and functional analysis of the ubiquitin-specific protease gene UBPL of *Saccharomyces cerevisiae*." *J Biol Chem* 266(18): 12021-8.

Toda et al (2003) "Identif of susceptibility genes for sporadic Parkinson's disease." *JNeurol* 250 Suppl 3: III40-3.

Tung, C.H., et al., (1999) Preparation of a cathepsin D sensitive near-infrared fluorescence probe for imaging. *Bioconjug Chem* 10(5): p. 892-6.

Tyers, M. and R. Rottapel (1999). "VHL: a very hip ligase." *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22): 12230-2.

Tso, J. Y., M. A. Hermodson, et al. (1982). "Glutamine phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase from cloned *Escherichia coli* purF. NH₂-terminal amino acid sequence, identification of the glutamine site, and trace metal analysis." *J Biol Chem* 257(7): 3532-6.

Varshavsky A. (1996) The N-end rule: functions, mysteries, uses. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:12142-12149.

Venkateswarlu, D., L. Perera, et al. (2002). "Structure and dynamics of zymogen human blood coagulation factor X." *Biophys J* 82(3): 1190-206.

Verma, R., L. Aravind, et al. (2002). "Role of Rpn1 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome." *Science* 298(5593): 611-5.

von Ahlsen & Bomer (2005). "High-Throughput Screening for Kinase Inhibitors." *Chembiochem* 6(3): 481-490.

Vu & Sakamoto (2000) "Ubiquitin-mediated proteolysis and human disease." *Mol Genet Metab* 71(1-2): 261-6.

Walls (1998) Mast cell proteases in asthma. *Inflamm mech in asthma* Holgate, Busse, WW. NY, Marcel Dekker.

Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1998). "Enzymatic characterization of refolded human rhinovirus type 14 2A protease expressed in *Escherichia coli*." *J Virol* 72(2): 1683-7.

Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1997). "A continuous colorimetric assay for rhinovirus-14 3C protease using peptide p-nitroanilides as substrates." *Anal Biochem* 252(2): 238-45.

Wang, Q. M., R. B. Johnson, et al. (1998). "Dual inhibition of human rhinovirus 2A and 3C proteases by homophthalimides." *Antimicrob Agents Chemother* 42(4): 916-20.

Wang Z., M. Walter, T. Selwood, H. Rubin and N.M. Schechter (1998) "Recombinant Expression of human mast cell proteases chymase and tryptase." *Biol Chem* 379(2): 167-74.

Weissleder, R., et al., (1999) In vivo imaging of tumors with protease-activated near-infrared fluorescent probes. *Nat Biotechnol*, 17(4): p. 375-8.

Weissman, A. M. (2001). "Themes and variations on ubiquitylation." *Nat Rev Mol Cell Biol* 2(3): 169-78.

Wilkinson (1997). "Reg of ubiquitin-dep processes by deubiquitinating enzymes." *Faseb J* 11(14): 1245-56.

- Wilkinson, K. D. (2000). "Ubiquitination and deubiquitination: targeting of proteins for degradation by the proteasome." *Semin Cell Dev Biol* 11(3): 141-8.
- Wilkinson, K. D., M. J. Cox, et al. (1986). "Synthesis and characterization of ubiquitin ethyl ester, a new substrate for ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase." *Biochemistry* 25(21): 6644-9.
- Wilkinson, K. D. a. H., M. (1998). *Ubiquitin and the biology of the cell*. H. J. R. Peters J.M., Finley D. New York, Plenum Press: 99-125.
- Wong, S., T. H. Morales, et al. (1990). "Ubiquitin-EP52 fusion protein homologs from *Trypanosoma brucei*." *Nucleic Acids Res* 18(23): 7181.
- Woo (1995) "Multiple ubiquitin C-term hydrolases from chick skeletal muscle" *JBiolChem* 270(32):18766-73.
- Wood(2002 "Dubble or nothing? Is HAUSP deubiquit enz arbiter of p53 levels?" *Sci STKE* 2002(143): PE34.
- Yamagishi, H., V. Garg, et al. (1999). "A molecular pathway revealing a genetic basis for human cardiac and craniofacial defects." *Science* 283(5405): 1158-61.
- Yan, N., J. H. Doelling, et al. (2000). "The ubiquitin-specific protease family from *Arabidopsis*. AtUBP1 and 2 are required for the resistance to the amino acid analog canavanine." *Plant Physiol* 124(4): 1828-43.
- Yao, T. and R. E. Cohen (2002). "A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome." *Nature* 419(6905): 403-7.
- Yuan, C, et al. (1999) Structural analysis of phospholipase A2 from functional perspective. 1. Functionally relevant solution structure and roles of the hydrogen-bonding network. *Biochemistry*. 38(10): p. 2909-18.
- Zalkin, H. (1993). "The amidotransferases." *Adv Enzymol Relat Areas MoI Biol* 66: 203-309.
- Zhu, Y., M. Carroll, et al. (1996). "DUB-I, a deubiquitinating enzyme with growth-suppressing activity." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(8): 3275-9.
- Zhu, Y., K. Lambert, et al. (1997). "DUB-2 is a member of a novel family of cytokine-inducible deubiquitinating enzymes." *J Biol Chem* 272(1): 51-7.

专利名称(译)	与蛋白水解活性相关的诊断和筛选方法以及试剂盒		
公开(公告)号	CN1989411A	公开(公告)日	2007-06-27
申请号	CN200580025067.X	申请日	2005-06-21
[标]发明人	陶西夫R巴特 亚历杭德罗伯纳尔		
发明人	陶西夫·R·巴特 亚历杭德罗·伯纳尔		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/37		
CPC分类号	G01N2333/916 C12Q1/37 G01N33/573		
代理人(译)	丛芳 彭晓玲		
优先权	60/580900 2004-06-21 US		
其他公开文献	CN1989411B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

用于评估蛋白水解酶活性和它的调节剂作用的方法和试剂盒，采用了泛素或泛素-样蛋白和信号生产结构。将相应的融合多核苷酸用于生产转基因细胞、植物和动物，它们可以通过用泛素-，UBL-或其C-末端结合功能性片段-报导融合多核苷酸稳定地转染，选择地转化所述细胞、植物或动物而生产。一种诊断疾病或症状的方法，包括使所述细胞、植物或动物接触或服用从被怀疑患有所述疾病或症状的对象体内获得的样品，检测在存在所述样品的条件下由所述报导物质产生的任何信号，并且将所述信号与0%以及100%的对照信号进行比较。

表1: 人肽酶的例子

	名称	别名	MW(kDa)
1	CYLD	CYLD1, KIAA0849	10.7
2	USP9X	DFFRX, USP9, FAFX	28.9
3	USP9Y	DFFRY, USP10, FAFY	29.1
4	OTUB1	OTB1, OTU1, HSPC263	31.3
5	OTUB2	C14orf137, OTB2, OTU2	27.2
6	USP10	KIAA0190	87
7	USP11	UHX1	105
8	USP12	UBH1m, USP12L1	41.2
9	USP13	ISOT3	97.3
10	USP14	TGT	55.9
11	USP15	KIAA0529	112.4
12	USP16	UBPM	93.6