

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 33/574 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200580014279.8

[43] 公开日 2007年5月30日

[11] 公开号 CN 1973203A

[22] 申请日 2005.3.17

[21] 申请号 200580014279.8

[30] 优先权

[32] 2004.3.19 [33] US [31] 10/804,214

[86] 国际申请 PCT/US2005/009298 2005.3.17

[87] 国际公布 WO2005/089509 英 2005.9.29

[85] 进入国家阶段日期 2006.11.3

[71] 申请人 成泰斯特公司

地址 美国俄亥俄州

[72] 发明人 阿瑟·M·布朗 埃克哈德·菲克尔
芭芭拉·A·威布尔

[74] 专利代理机构 北京康信知识产权代理有限责任
公司
代理人 章社杲

权利要求书5页 说明书18页

[54] 发明名称

用于鉴定能改变细胞蛋白表达的试剂的高通
量分析系统及方法

[57] 摘要

本发明披露了用于鉴定能改变哺乳动物细胞的
蛋白、尤其是内在膜蛋白(整合膜蛋白)表达水平的
试剂的高通量分析系统及方法。

1. 一种鉴定改变哺乳动物细胞中蛋白表面表达水平的试剂的方法，所述方法包括：
 - a) 制备第一培养基，其含有表达所述蛋白的哺乳动物细胞；
 - b) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入有效量的候选试剂；
 - c) 在所述候选试剂存在的情况下将所述细胞培养足够的时间；
 - d) 用有效量的固定剂处理所述细胞；
 - e) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入有效量的至少一种结合到所述蛋白上的抗体；以及
 - f) 测定所述抗体与和所述候选试剂一起的所述蛋白的结合水平，其中，所述结合水平相对于对照的变化表明所述候选试剂改变所述蛋白的表面表达水平。
2. 根据权利要求1所述的方法，其中，步骤(e)包括加入有效量的至少一种第一抗体，接着加入有效量的至少一种第二抗体，其中所述第一抗体结合到所述蛋白的至少一种胞外抗原决定簇上，所述第二抗体结合到所述第一抗体上。
3. 根据权利要求1所述的方法，其中，通过荧光、发光、放射性、吸光度或者其两种或多种的组合，测定所述结合水平。
4. 根据权利要求1所述的方法，其中，所述蛋白为内在膜蛋白。

5. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述至少一种胞外抗原决定簇包括野生型抗原决定簇。
6. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述至少一种胞外抗原决定簇包含标签。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述胞外标签取代所述蛋白的胞外区的至少一部分。
8. 根据权利要求7所述的方法,其中,所述胞外标签插入到所述蛋白的胞外区中。
9. 根据权利要求6所述的方法,其中,所述胞外标签包括血凝素(HA)标签。
10. 一种鉴定改变哺乳动物细胞中蛋白表达水平的试剂的方法,所述方法包括:
 - a) 制备第一培养基,其含有表达所述蛋白的哺乳动物细胞;
 - b) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入有效量的候选试剂;
 - c) 在所述候选试剂存在下,将所述细胞培养足够的时间;
 - d) 先用固定剂、随后用透化剂处理所述细胞;
 - e) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入有效量的至少一种结合到所述蛋白上的抗体;以及
 - f) 测定所述抗体与和所述候选试剂一起的所述蛋白的结合水平,其中,相对于对照所述结合水平的变化表明所述候选试剂改变所述蛋白的表达水平。

11. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，步骤 (e) 包括加入有效量的至少一种第一抗体，接着加入有效量的至少一种第二抗体，其中，所述第一抗体结合到所述蛋白的至少一种抗原决定簇上，所述第二抗体结合到所述第一抗体上。
12. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，通过荧光、发光、放射性、吸光度或者其两种或多种的组合，测定所述结合水平。
13. 根据权利要求 10 所述的方法，其中，所述蛋白为内在膜蛋白。
14. 根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述至少一种抗原决定簇包括野生型抗原决定簇。
15. 根据权利要求 11 所述的方法，其中，所述至少一种抗原决定簇包括标签。
16. 根据权利要求 15 所述的方法，其中，所述标签取代所述蛋白的结构域的至少一部分。
17. 根据权利要求 15 所述的方法，其中，所述标签插入到所述蛋白的结构域中。
18. 根据权利要求 15 所述的方法，其中，所述标签包括血凝素 (HA) 标签。
19. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法，其中，所述第一抗体和/或所述第二抗体偶联到酶上。
20. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法，其中，所述酶选自由过氧化物酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶及两种或多种上述酶的混合物组成的组。

21. 一种鉴定改变哺乳动物细胞中内在膜蛋白表达水平的肽的方法，所述方法包括：
- a) 制备第一培养基，其含有表达所述蛋白的哺乳动物细胞；
 - b) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入逆转录病毒表达文库；
 - c) 向含有哺乳动物细胞的所述第一培养基中加入有效量的至少一种抗体，该抗体结合到所述蛋白的至少一种胞外抗原决定簇上；
 - d) 向所述培养基中加入荧光标记的第二抗体；以及
 - e) 根据荧光将所述哺乳动物细胞进行分选。
22. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，所述蛋白为离子通道。
23. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，所述至少一种抗原决定簇包括野生型抗原决定簇。
24. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，所述至少一种抗原决定簇包含标签。
25. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述标签取代所述蛋白的结构域的至少一部分。
26. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述标签插入到所述蛋白的结构域中。
27. 根据权利要求 24 所述的方法，其中，所述标签包括血凝素（HA）标签。

28. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，将所述第一抗体和/或所述第二抗体偶联到酶上。
29. 根据权利要求 21 所述的方法，其中，所述酶选自由过氧化物酶、荧光素酶、碱性磷酸酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶及两种或多种上述酶的混合物组成的组。
30. 根据权利要求 6, 15 或 24 所述的方法，其中，在所述胞外抗原决定簇上的所述标签是所述蛋白上存在的唯一标签。
31. 根据权利要求 1 或 10 所述的方法，其中，所述蛋白包含荧光标签。
32. 根据权利要求 31 所述的方法，其中，所述标签选自由绿色荧光蛋白、红色荧光蛋白、蓝色荧光蛋白以及选择性结合具有可检测特性分子的氨基酸序列组成的组。
33. 根据权利要求 32 所述的方法，其中，所述标签取代所述蛋白胞内区的至少一部分。
34. 根据权利要求 32 所述的方法，其中，所述标签插入到所述蛋白的胞内区中。
35. 根据权利要求 33 或 34 所述的方法，其中，在所述胞内区中的所述标签是所述蛋白上存在的唯一标签。

用于鉴定能改变细胞蛋白表达的试剂 的高通量分析系统及方法

技术领域

本发明涉及用于鉴定能改变细胞蛋白、尤其是哺乳动物细胞中的内在膜蛋白（或整合膜蛋白）表达水平的试剂的高通量分析及方法。

背景技术

对周围环境产生反应的能力以及控制分子进出细胞膜是任何哺乳动物细胞基本的重要功能。这些功能在相当程度上归因于全部或部分驻留于细胞膜内的多种蛋白。

哺乳动物细胞的细胞膜对水溶性物质如离子、小无机分子、肽以及蛋白是相对不可渗透的。为了进入和/或影响细胞，这样的亲水性物质必须与至少一种蛋白（例如，受体、离子通道或者转运蛋白）相互作用，该蛋白驻留在细胞膜内并且在细胞表面上至少部分暴露于胞外环境（extracellular milieu）中。相反，亲脂性物质如类固醇能够直接通过细胞膜扩散到细胞质中，然后在胞质中亲脂性物质与一种或多种目的蛋白相互作用。

当外部刺激分子（例如，肽或者有机或无机分子）与细胞表面蛋白相互作用时，存在两种来自细胞的基本反应：（i）通过穿过脂质双层的传输，将离子或分子（或大分子）物质借助载体从细胞膜的外部传送到细胞内的胞质，反之亦然；和/或（ii）通过膜蛋白的

变化（例如，膜蛋白的构造变化和/或/）膜蛋白聚集状态的变化）将信号传送至胞质或其中的蛋白。

穿过细胞的信号传输（信号转导）起始于胞外物质（离子、小分子、蛋白）结合至驻留在细胞膜中的蛋白的胞外区（或胞外结构域）。该物质结合到跨膜蛋白的胞外区使得该蛋白从非活性形式变为活性形式。然后，这种活性形式激发催化活性，或者某种类似反应，从而产生胞质信号（有时该信号为细胞质中的一种或多种第二信使物质的形式）。

在哺乳动物细胞中存在两种主要类型的这种信号转导：（i）跨膜蛋白的胞质区可以具有蛋白激酶活性，当胞外物质结合到跨膜蛋白上时，跨膜蛋白的活性被激活（然后激酶将其自身的胞质区磷酸化，这使跨膜蛋白能够结合并激活另一蛋白，而后者又依次作用于细胞质中的其它蛋白和物质）；以及（ii）跨膜蛋白可以和与细胞膜相连的 G 蛋白相互作用，使得结合到 G 蛋白上的 GDP（二磷酸鸟嘌呤）被 GTP 取代，从而造成 G 蛋白解离成单体和二聚物片段，接着，单体和二聚物片段中两者之一或两者又作用于目的蛋白（该蛋白也常与细胞膜相连，同样地，要求它随后作用于细胞质中其它目的蛋白）。

物质穿过细胞膜的物理传送允许宽范围物质进入和/或离开细胞，包括离子、小分子（如糖和激素）以及大分子（如蛋白和酶）。这种物质传送存在三种主要途径：（i）驻留在细胞膜中的蛋白可以形成通道，使离子（如钠、钾和氯离子）从胞外环境穿过细胞膜进入细胞质中，反之亦然；（ii）驻留在细胞膜中的蛋白能在细胞膜的一侧结合小分子如糖，然后在细胞膜的相对侧释放该分子，从而起到运载体的作用；以及（iii）驻留在细胞膜中的蛋白可以结合小分子并因此触发内化（internalization）过程，其中通过内吞作用将已

结合的蛋白:分子对带入细胞内(在某些位点,蛋白:分子对解离;然后蛋白返回到细胞表面与另一小分子相互作用或者被降解)。

所有这些蛋白的一般特性包括相对较大的大小、跨越细胞膜的多疏水区以及亲水性的胞外区和/或胞内区。

至于大分子物质的通过或运输,蛋白启动了一个通路,通过共翻译转移使蛋白直接从核糖体分泌至内质网(ER)膜。然后,这些蛋白转移至高尔基体(Golgi apparatus)中,根据最终目的进行分选,并朝细胞膜移动。

更具体地,在合成过程中蛋白进入ER,并至少部分折叠及糖基化。然后,该蛋白转移到高尔基体的顺式(*cis*)表面(此时,将要驻留在内质网中的蛋白返回到ER)。当蛋白从顺式(*cis*)到反式(*trans*)穿过高尔基堆叠体(stack)时,发生进一步糖基化。特异信号使一些蛋白返回ER、一些蛋白保留在高尔基体中、一些蛋白传送到核内体和溶酶体、一些蛋白(细胞表面蛋白)运输到细胞膜并驻留其中。

那些运输到细胞膜并驻留其中的蛋白经历最长且最广泛的运输路径(trafficking pathway),进入内质网的膜随后穿过转运小泡(transition vesicle)、高尔基复合物和分泌小泡(secretory vesicle)的膜,然后才到达其最终目的地。这些蛋白包括主动和被动转运蛋白以及细胞表面受体。

为了说明运输路径的复杂性,内衬于体腔的上皮细胞中,ER的分选和分布机理将不同的蛋白置于细胞膜的不同亚部(subpart)。例如,肠上皮细胞中运输糖和氨基酸的蛋白分布在细胞膜面向肠腔的区域。MHC分子和结合抗体的poly-Ig受体在面向体内一侧的相对侧的上皮细胞的细胞膜片段中卷拢(wind up)。

下表是一些已知的细胞表面分子、受体以及膜相关蛋白。

EGFR	表皮生长因子受体
β -肾上腺素受体	GPCR
GABA _A R	GABA _A -门控离子通道
nAChR	ACh-门控离子通道
P-糖蛋白	膜通道
Kir2.2	离子通道
MCR	黑素皮质素受体
hERG	离子通道
A4	TM4 家族
Abc2	ABC 转运蛋白; 多 tm; mdr 亚家族
AcPL	为 IL-18 受体信号传导必需。含有两个 Ig 区域 (结构域)
AF1q	在一些白血病中结合到 MLL
α -6 整联蛋白	与 NAG-2 络合
α -9 整联蛋白	介导细胞-细胞以及细胞-胞外基质相互作用
ART-4	由 T-淋巴细胞识别的腺癌抗原
B29	Ig 超家族 (superfamily)
BAP31	可能的膜蛋白 (potential membrane protein)
β ig-h3	由 TGF- β 诱导; 可以与微纤丝以及细胞表面相连
Bgpd	可以在上皮细胞的自我更新/扩散中起作用
儿茶酚氧位甲基转移酶	膜结合形式; 使邻苯二酚胺神经递质失活
CD9	TM4; 与 CD19 以及 NAG-2 均存在于多分子 B1 整合素复合物中
CD19	Ig 区; B 细胞生长调节
CD27	CD70 受体; TNFR 家族; 细胞凋亡
CD31/PECAM-1	粘附分子
CD34	“干细胞抗原”
CD37	B 细胞上的 TM4
CD48	CD2 配体
CD53	TM4 超家族; Burkitt 淋巴细胞系 (line) 中较高
CD54/ICAM-1	粘附分子
CD59	补体抑制蛋白
CD69	涉及淋巴细胞增殖
CD87/PAR2	尿激酶血纤维蛋白溶酶原活化剂受体
CG1	可能为 TM4 细胞表面蛋白
Coronin-2	WD40 区域 (结构域)
DPH2L	单 tm; 卵巢 ca. 抑制剂
DR5	TRAIL 的死亡受体; 诱发细胞凋亡
EBI1	7-tm 受体
EBI3	含有 FnIII 区域 (结构域)

EP2 或 EP-4	前列腺素类受体
Evi2B	与白血病发生相关
FC γ R I	抗体 Fc 受体
FZD4	Frizzle 4; Wnt 家族配体的受体
Flk-2	受体酪氨酸激酶; 差异表达
Flotillin	BAND7 家族
GITR	由糖(肾上腺)皮质激素诱导; TNFR 家族; 细胞凋亡相关
GluR3	谷氨酸酯受体
磷脂酰肌醇(蛋白)聚糖	主要的硫酸类肝素蛋白聚糖
GPCR	G 蛋白偶联的孤独受体
GPR-9-6/CCR9	7-tm 激素孤独受体
HEM-1	TM4 家族
肝细胞 GF 活化剂抑制剂	膜结合形式
IB3089A	公认的跨膜蛋白
ICAM-2	胞间粘附分子
IL-2- γ	用于 IL2 和 4 和 7 和 13 的共用链
IL-3- β	IL3 和 5R 共用
IL-3R	与存活和分化有关的造血生长因子受体
IL-4- α	成熟形式包括 IL2 γ 链
IL-6R	造血生长因子受体
IL-7R	B 细胞生长因子
JTB	细胞表面蛋白; 在跳跃易位中重排
L-选择蛋白	淋巴细胞归巢分子
LAPTm5	在胚胎形成中可以具有官能作用
配位蛋白 (ligatin)	磷糖蛋白的运输受体
LOX-1	氧化的凝集素样 (lectin-like) 低密度脂蛋白受体
LSM-1	与淋巴细胞上的 CD45 相互作用
淋巴毒素-b R	可能是在免疫发育中起作用
Mac-2	
Mama	清除剂样 (scavenger-like) 富 Cys 区
Mb-1	推测为 B 细胞限制的; CD3 样 (CD3-like)
Mcp-1	趋化激素 R
MDC15	金属蛋白酶-去整合蛋白; tm 糖蛋白
MEGF9	EGF 复制
MIP-1aR	趋化激素 R
Mitsugumin 23	ER 以及核膜上的 TM4 蛋白
MP70	9tm
NAG	与 CD53 类似的表面 TM4 蛋白; 形成络合物 w/整联蛋白
NET-4	TM4 蛋白

NET-6	TM4 蛋白
神经纤毛蛋白 (neuropilin)	Semaphorin III 受体; 也结合 VEGF
NHE-1	钠/氢逆向转运蛋白 (antiporter)
Notch-1	为许多组织的正确分化所需
PAR-1 或 2	血纤维蛋白溶酶原活化剂受体
基底膜蛋白多糖	基底膜硫酸类肝素蛋白聚糖
Pft27	公认的 7-tm 受体
PIRA-1	Ig 样 (Ig-like); 提示起免疫调整作用
前列腺素 E R	7-tm 受体
Protocadherin-2C	在发育中的脑表达
RPTP- σ	受体酪氨酸磷酸酶; 包含 Fn III 区
硒蛋白 R	公认的; 含有未知功能区
Semaphorin B	生长圆锥导向蛋白 (growth cone guidance protein)
SIM	基质细胞蛋白; TM4 表面 R
smoothened	Sonic Hedgehog 受体; 7-tm
sortilin	神经降压肽 R (NT 转化酶在基质中)
Stromal 细胞蛋白	潜在 TM4 细胞表面蛋白
SYBL1	小突触 (小) 泡蛋白样 (synaptobrevin-like)
TLR2	Toll 样 (Toll-like) 受体 2
TLR4	Toll 样受体 4
TSA-1 (Sca-2)	胸腺共有蛋白 (thymic shared antigen); 也称 Ly-6E
Tspan 6	TM4 超家族; 功能未知

因此, 对多种不同前景以及多个预定目标来说, 鉴定能改变一种或多种这些蛋白的表达水平的化合物是非常重要的。例如, 鉴定能改变特定蛋白表达水平的化合物可能导致发现新的治疗药剂。可选地, 这样的鉴定可能导致发现缺陷或失调的原因或途径。以这种方式, 开辟了全新的研究领域以及大量以前未知的可能用于治疗干预的靶点。

另外, 鉴定能改变一种或多种这些蛋白表达水平的化合物应该包括直接或者间接影响蛋白表达水平的化合物。改变内在膜蛋白 (integral membrane protein) 表达水平的化合物可以直接影响蛋白表达, 例如, 通过直接结合到蛋白上并抑制其运输 (trafficking)。可选地, 化合物可以间接改变蛋白表达水平, 例如通过作用于一种

有助于细胞膜中膜蛋白运输和整合的伴侣蛋白，或者通过作用于降解目标膜蛋白的蛋白。

因此，在本领域存在对鉴定能改变蛋白、尤其内在膜蛋白表达水平的化合物的分析方法的需要，以及对改变蛋白水平的机理的需要。

发明内容

因此，本发明的一个目的是提供分析（法）和方法，用于鉴定能改变蛋白、尤其内在膜蛋白如心脏离子通道的表达水平的试剂。这样的试剂可以是来自化合物文库的化合物或者来自 DNA 文库的肽。

根据这些目的和其它目的，本发明的第一实施例针对用于鉴定（能）改变哺乳动物细胞表面上蛋白表达水平的试剂的方法，包括：a) 制备培养基，其含有表达兴趣蛋白（protein of interest）的哺乳动物细胞；b) 加入有效量的候选试剂；c) 在候选试剂存在时，将细胞培养足够的时间；d) 用固定剂（fixative）处理细胞；e) 加入至少一种有效量的能结合到蛋白上的抗体；以及 f) 测定结合水平，其中，结合水平的变化表明候选试剂能改变蛋白表达水平。

本发明的第二实施例针对用于鉴定能改变哺乳动物细胞中蛋白总体表达水平的试剂的方法，包括：a) 制备培养基，其含有表达兴趣蛋白的哺乳动物细胞；b) 加入有效量的候选试剂；c) 在候选试剂存在时，将细胞培养足够的时间；d) 先用固定剂随后用透化剂（permeabilizing agent）处理细胞；e) 加入有效量的至少一种结合到蛋白上的抗体；以及 f) 测定结合水平，其中，结合水平的变化表明候选试剂改变了蛋白表达水平。

本发明的第三实施例针对用于鉴定封闭哺乳动物细胞中离子通道的试剂的方法，包括：(i) 实施上述本发明的第一实施例的方法，以便确定该试剂是否改变离子通道的表达水平；(ii) 采用蛋白印迹法 (Western blot assay) 以确定该试剂是否改变离子通道的成熟；以及 (iii) 采用尾电流分析法以便确定该试剂是否改变离子通道的功效 (functional effect)。

本发明的其它优点、目的和特征，部分将在下面的说明中阐述，部分在查看下述内容后对于本领域的普通技术人员来说变得显而易见，或者通过本发明的实施而被掌握。本发明的目的和优点可以实现并获得，如所附权利要求所特别指出的。

具体实施方式

本发明优选的实施例包括用于鉴定试剂的分析系统和方法，该试剂结合蛋白（如膜离子通道），从而增加或减少其在哺乳动物细胞中的表达。在某些特别优选的实施例中，该分析法和系统测定试剂结合到蛋白上从而改变其表面表达的能力。表面表达的这种改变可以由结合蛋白特定位点的试剂产生，和/或由减少或者促进蛋白的胞内运输和/或加工的试剂产生。另外，这样的改变还可以由结合到兴趣蛋白以外的蛋白上从而间接改变蛋白表达水平的试剂产生。

现存在多种本领域技术人员熟知且可获得的形式 (format) 用于恰当的结合分析。根据本发明的一些实施例，将一种或多种表达兴趣蛋白的细胞在合适的液体培养基中培养，并使其暴露于一种或多种候选化合物，而在其它实施例中细胞则可以固定在表面上。类似地，根据本发明的其它一些实施例，可以将一种或多种候选化合物固定在表面上，并暴露于含有一种或多种表达兴趣蛋白的细胞的

液体培养基，或者将候选化合物包含在合适的液体培养基中，将一种或多种表达兴趣蛋白的细胞加入到该培养基中。

在其中至少一种候选化合物和兴趣蛋白被标记（例如，用荧光、放射性、酶、抗体等，包括其组合，如本领域技术人员所熟知的）的系统中通常更容易检测结合。在将候选化合物暴露于表达蛋白的细胞并洗掉或者用别的方式除掉未结合的试剂之后，测定标记部分的存在（即，结合到该测定系统的未标记成分上）。

用于进行多种结合分析的方法在本领域是为人熟知的，包括但不限于如在 PCT 申请 US98/18368 中所述的那些分析系统。多个参考文献提供了对用于蛋白结合分析法的多种形式的一般性描述，包括竞争结合分析法和直接结合分析法（见例如，Stites and Terr, *Basic and Clinical Immunology*, 7th ed. (1991); Maggio, *Enzyme Immunoassay*, CRC Press, Boca Raton, FL (1980); and Tijssen, *Practice and Theory of Enzyme Immunoassays, in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Elsevier Science Publishers, B.V. Amsterdam, (1985)）。

本发明特别优选的实施例涉及鉴定化合物的分析系统和方法，该化合物通过改变蛋白的活性和/或通过改变（封闭或促进）蛋白的胞内运输和/或加工来增加或减少兴趣蛋白的表达。

因此，根据某些特别优选的实施例，提供了免疫测定法，其中，表达兴趣蛋白的一种或多种细胞通常结合到合适的固相载体上（如微孔板的孔、微缩卡或者任何为本领域技术人员熟知的类似形式），并与候选试剂结合，观察兴趣蛋白表达水平的变化。因此，在这些优选的实施例中，一种或多种分析成分附着到固体表面上。

根据某些实施例，例如当兴趣蛋白不在细胞表面表达时，可以使用透化剂。这样的透化剂有助于抗体、尤其是标记的抗体穿透进入细胞中。

透化剂优选包含洗涤剂 (detergent)，更优选阴离子洗涤剂。合适的洗涤剂对本领域技术人员来说是已知且可得到的。合适的阴离子洗涤剂的示例性实例包括例如二氧胆酸钠、N-十二烷基肌氨酸盐以及十二烷基硫酸钠。

洗涤剂的浓度取决于例如所采用的具体洗涤剂，并且可由本领域技术人员根据经验确定。合适的浓度可以在 0.001% 至 10% 之间，例如在 0.01% 至 5% 之间。

透化剂还优选包含寡糖，如海藻糖。透化剂中的寡糖浓度将取决于例如所采用的具体洗涤剂和寡糖，并且可由本领域技术人员根据经验确定。合适浓度的示例性实例在 0.001M 至 1.0M 的范围，优选在 0.01M 至 0.1M 的范围。

透化剂的 pH 可以是适合于被研究的特定蛋白和所采用的细胞系 (cell line) 的任何水平，优选通常在 3 至 8 之间。合适的 pH (或 pH 范围) 可以通过加入本领域技术人员熟知且可获得的一种或合适的缓冲剂来实现。

透化缓冲液 (permeabilizing buffer) 优选大致等渗压的，可以包含一种或多种用于调节其等渗压性的合适试剂，如氯化钠。

在一些实施例中，分析系统可以用于 (如在本领域已知的) 检测由于候选试剂的结合而引起的兴趣蛋白表面表达的变化。例如，如果兴趣蛋白是膜离子通道，可以使用膜片钳分析法 (patch clamp assay) 检测离子穿过膜的通量变化，其可指示离子通道的表面表达水平的提高。

在可选实施例中，使用了间接免疫分析系统，其中，通过加入一种或多种针对蛋白抗原决定簇的抗体对蛋白进行检测，正如本领域中所知的。如果该蛋白不在细胞表面表达，可能需要加入透化剂以促进抗体穿透进入细胞内。

当本发明的方法中使用固相载体时，几乎任何固体表面均合适，只要表面材料与分析试剂相容并且可能将成分粘附到表面而不过度改变分析成分的反应性。本领域技术人员认识到在固相分析中一些成分表现出活性降低，但是只要活性足以被检测和/或定量，通常是可以接受的。

合适的固相载体包括但不限于材料或细胞可以粘附的任何固相表面，如玻璃珠、平面玻璃、可控孔径玻璃、塑性多孔塑性金属、或树脂等。本领域技术人员认识到在一些实施例中，在本发明方法中的固相载体可以通过官能团（例如，羟基、胺、羧基、酯、以及硫氢基）衍生以便为连接子（linker）的粘附提供反应位点，或者通过候选试剂或其它分析成分的直接粘附。

分析成分粘附到固相载体上可以是直接的（即，成分直接接触固相表面）或者间接的（即，试剂和/或成分（例如抗体）结合到载体上，其它分析成分结合到该试剂或成分上而不是结合到固相载体上）。在一些实施例中，试剂或成分为共价固定的（例如，使用半胱氨酸的单反应硫醇基团用于锚定蛋白成分（见例如，*Bioconjug. Chem.*, 4:528-536 (1993)）、或者非共价但特定的（例如通过所固定的抗体或者其它特异结合蛋白（见例如，*Adv. Mater.*, 3:388-391 (1991); *Anal. Chem.*, 67:83-87 (1995)）、生物素/抗生物素蛋白链菌素系统（见例如，*Biophys. Biochem. Res. Commun.*, 230:76-80 (1997)）、或者金属螯合的 Langmuir-Blodgett 膜（见例如，*Langmuir* 11:4048-4055 (1995); *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 35:317-320 (1996); *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:4937-4941 (1996); and *J. Struct. Biol.*,

113:117-123 (1994)、以及金属螯合的自我组装单层(见例如, *Anal. Chem.*, 68:490-497 (1996)), 用于聚组氨酸融合蛋白的结合。

在一些特别优选的实施例中, 本领域中通常为人熟知的标准的直接或间接 ELISA、IFA、或 RIA 方法用来检测候选试剂与兴趣蛋白的结合。在一些实施例中, 在样品中检测到蛋白的表面表达水平的提高, 而在其它实施例中, 检测到表面表达水平的降低。因此, 显然, 本发明的方法适于多种成分 (multiple element) 的检测、鉴定和表征。

因此, 本发明方法特别优选的一些实施例中, 可以使用夹心 ELISA (酶联免疫吸附测试法), 其采用用于捕获的单克隆或多克隆抗体 (Aa 捕获抗体@) 以及用于检测已结合的抗体-抗原复合物的第二抗体 (Aa 报告抗体 (reporter antibody) @)。

在一些优选的 ELISA 实施例中, 使用碱性磷酸酶轭合物, 而在其它优选实施例中, 使用辣根过氧化物酶轭合物。另外, 也可以使用抗生物素蛋白/生物素系统, 尤其对于需要增强信号的分析系统。用于优选实施例的合适的酶包括但不限于过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶及两种或多种上述酶的混合物。

根据本发明的某些实施例, 可以在加入抗体前用固定剂处理细胞。为本领域技术人员所熟知并可获得的这样的合适的固定剂包括但不限于低聚甲醛、甲醛溶液 (福尔马林)、戊二醛、丙酮、乙醇以及丙烯醛。参见, 例如, 美国专利 No. 4,857,300; 美国专利 No. 5,104,640; 美国专利 No. 5,422,277; 美国专利 No. 5,597,688; 美国专利 No. 5,824,495; 以及美国专利 No. 6,194,165。

固定剂的浓度取决于例如所采用的具体试剂而变化，并且可由本领域技术人员根据经验确定。低聚甲醛的合适浓度的示例性实例是在合适缓冲液如磷酸缓冲盐（PBS）中为4%。

固定剂的 pH 可以是适合被研究的具体蛋白和所采用的细胞系（cell line）的任何水平，优选通常在 6 至 8 之间，例如在 7 左右，如约 7.2。合适的 pH（或 pH 范围）可以通过加入为本领域技术人员熟知并可获得的一种或多种合适的缓冲剂来实现。

因此，在本发明的一个示例性方法中，将在胞外抗原决定簇过表达具有 HA 标签的钾通道 hERG 的细胞系接种（plate）到 96 孔微板中（~40000 细胞/孔）。96 孔微板（具有透明底部的黑色板）用聚-D-赖氨酸预涂，以促进细胞粘附到孔的底部。将细胞接种到由含 10% 胎牛血清（FBS）的 DMEM/F12 加抗生素组成的完全培养基中，接种约 6 小时后将培养基移出，用不含血清或抗生素的 DMEM/F12 漂洗孔，加入试验物（test article）（在不含血清和抗生素的 DMEM/F12 中稀释）。试验物最常溶于 DMSO 中，在分析中 DMSO 终浓度为 0.1%。载体对照也含有 0.1% DMSO。在表面表达分析开始之前，将板在 37°C/5% CO₂ 中孵育过夜（大约 16 小时）。

表面表达分析优选于室温下在台式操作台（bench top）进行。用 PBS（磷酸缓冲盐）将细胞漂洗三次，接着用新制冰冷 4% 低聚甲醛/PBS 固定（pH7.2，20 分钟）。为了测定 hERG 表面表达，没有透化细胞。将固定剂去除后，用 PBS 洗涤细胞。通过用 1% 羊血清/PBS（封闭缓冲液）孵育 30 分钟而封闭非特异结合位点。将封闭缓冲液去除，用在封闭缓冲液中稀释的大鼠抗 HA 抗体（第一抗体）将细胞孵育 2 小时。将第一抗体移除后，用 1% 羊血清/PBS 洗涤细胞 3 次（10min/洗涤）。将 HRP 轭合的羊抗大鼠抗体（第二抗体）在封闭缓冲液中稀释，并孵育细胞 1 小时。第二抗体混合物也包含荧光 DNA 结合染料（SYBR Green），以便实验流程结束时测

定细胞数量。孵育后，用 PBS 洗涤细胞 3 次（10min/洗涤）。用微板荧光检测仪（microplate fluorescence reader）测定荧光，信号比较于荧光与细胞数量的标准曲线，以便确定试验物是否有毒（toxic）并校正试验流程过程中的细胞损失。用 SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate（Pierce Chemical Co.）产生化学发光信号。将 PBS 从孔中移除，加入检测试剂，立即用 GloRunner 光度计捕获信号。

也可加入其它步骤以检测内在膜蛋白或任何胞内蛋白的总体细胞表达。固定后，可以采用透化剂（例如，洗涤剂）促进抗体到达胞内蛋白。

根据本发明的第一特别优选实施例，提供用于鉴定试剂（诸如肽、蛋白、抗体或者化学试剂）的方法，该试剂改变哺乳动物细胞中的蛋白优选内在膜蛋白（如 hERG）的表面表达水平。该方法包括：a) 制备第一培养基，其含有表达兴趣蛋白的哺乳动物细胞；b) 加入有效量的候选试剂；c) 在候选试剂存在时将细胞培养足够时间；d) 加入有效量的至少一种抗体，其结合到蛋白的至少一种胞外抗原决定簇；以及 e) 将细胞与候选试剂一起孵育后，测定抗体结合到蛋白的胞外抗原决定簇的水平。

在候选试剂的存在时，结合水平相对于对照的任何变化（如升高或降低）表明候选试剂改变蛋白的表面表达水平。

根据本发明的优选实施例，上文的步骤（d）包括加入有效量的至少一种第一抗体和有效量的至少一种第二抗体。根据该实施例，第一抗体优选结合到兴趣蛋白的至少一种胞外抗原决定簇上。根据该实施例，更优选地，第二抗体结合到第一抗体上。

优选地，将第一抗体和/或第二抗体偶联到酶上，以便促进结合水平的检测和测定。对于本领域技术人员来说，用于本发明方法的合适的酶是已知且可获得的。合适酶的示例性实例包括但不限于过氧化物酶、萤光素酶、碱性磷酸酶、葡糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶及两种或多种上述酶的混合物。

可以使用对于本领域技术人员来说已知并且可以获得的任何方法和技术，进行兴趣蛋白表面表达水平的测定。优选地，通过荧光、发光 (luminescence)、放射性、吸光度或者这些方法中两种或多种的组合，测定结合水平。

根据本发明的优选实施例，抗体结合的膜蛋白上的胞外抗原决定簇优选是野生型抗原决定簇，即，胞外抗原决定簇通常存在于自然产生形式的兴趣蛋白。

根据本发明的特别优选的实施例，膜蛋白上的胞外抗原决定簇具有标签 (tag)。合适的标签对于本领域技术人员来说是已知并且可以获得的。用于本发明方法中特别优选的标签为血凝素 (HA) 标签。标签可以插入到蛋白的胞外区 (胞外结构域) 中，或者取代其胞外区的一部分。

为了说明目的而不是为了限制，在本发明优选的实施例中，将离子通道 (如 hERG) 改造成可表达胞外标签 (如 HA 标签)，该标签位于跨膜区 S1 与 S2 之间的连接子 (linker) 内 (这样的标签优选不应改变通道的功能特性)。将稳定表达该标签蛋白的细胞 (如 HEK 293 细胞) 接种 (plate) 到合适的容器 (如 96 孔微板) 中，并用一种或多种候选试剂培养足够时间，如过夜。然后，优选将细胞固定，如用甲醛，但是优选不透化，并加入识别 HA 标签的抗体。第二抗体，优选为结合到酶 (如辣根过氧化物酶) 上的抗体，用于结合已结合到所固定细胞表面上的抗 HA 抗体。然后，用合适的方法

(如化学发光反应混合法)使细胞表面信号显示出来(develop),并在例如微盘冷光仪(microtiter plate luminometer)中测定其水平。对照细胞通常用水和/或任何液相载体结合候选试剂(如DMSO)来培养。

根据上述方法的更加特别优选的实施例,从培养箱中取出微孔板并去除浸泡细胞的培养介质,分析蛋白表面表达。用PBS(100 μ l)漂洗孔3次,然后用低聚甲醛(例如在PBS中浓度为4%,pH7.2,100 μ l)固定,然后用PBS漂洗。优选将在细胞表面上的非特异性结合部位封闭,例如通过用1%羊血清/PBS(封闭缓冲液)孵育细胞。将封闭缓冲液去除之后,用第一抗体如在封闭缓冲液中的大鼠抗HA抗体孵育细胞。然后,将第一抗体移出,洗涤细胞(例如用封闭缓冲液洗涤3次)。加入第二抗体,如在封闭缓冲液中的辣根过氧化物酶结合的抗大鼠羊抗体。然后去除第二抗体,并优选洗涤细胞。

根据该实施例,使用合适技术,如SuperSignal ELISA Femto Maximum Sensitivity Substrate(Pierce Chemical Co.)可以将化学发光信号显示出来。加入合适量的试剂(例如微孔板中的每孔50 μ l),并用GloRunner光度计(luminometer)(Turner Designs)获得数据。

可选地,加入荧光反应以便监控每孔中的细胞数量。

采用本发明的某些实施例,可以鉴定影响内在膜蛋白表达的肽。例如,在MOI(感染复数)约为1的条件下,由人心脏产生的逆转录病毒表达文库(retroviral expression library)可以用于将基因稳定递送至变异的hERG亲代细胞系。在感染之后两天,将活细胞用HA特异性第一抗体标记,接着用FITC结合的抗体标记。用荧光激活细胞分选仪(FACS)对荧光细胞进行分选,从而选出

与亲代细胞相比 hERG 蛋白的细胞表面表达增加的细胞。将分选出的细胞群扩增 (expand) 几天, 然后应用上述选择标准进行再次分选。表面染色持久改变的细胞克隆用于捕获转化基因。使用克隆位点侧面的载体特异性引物 (vector specific primer) 在基因组 DNA 上进行 PCR 反应。

为了寻找差异, 从 FACS 分选出的表面表达增加的细胞及亲代克隆 (在 PCR 反应中用作对照模板) 中, 将基因组 DNA 分离。将 PCR 产物亚克隆至 PCR-II-TOPO 载体并测序。使用瞬时转染中的哺乳动物表达载体, 在电生理学和免疫印迹 (Western blot) 实验中对筛选分离的克隆调节 hERG 蛋白的细胞表面表达能力进行测试。因此, 可以鉴定对有运输能力的 hERG 蛋白的生物发生及翻译后加工过程很关键的基因。

使用 FACS 对活细胞进行免疫染色的基本步骤描述于 Ficker et. al., *Am J Physiol.* 2000; 279: H1748-H1756 以及 Ficker et. al. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:2327-2337。为了生产病毒, 将 AmphoPack-293 细胞 (Clontech) 以 5×10^6 细胞的密度接种于 100 mm 培养皿。48h 后, 如制造商 (Roche Biochemicals) 所推荐的, 将 10 μ g 质粒文库 DNA (Viraport 人心脏逆转录病毒表达文库 (Viraport Human Heart Retroviral Expression Library), Stratagene) 与 Fugene 混合, 在血清存在时加入培养皿中。由于逆转录病毒载体 DNA 中无选择标记, 通过监控对照板上用表达增强绿色荧光蛋白 EGFP (Clontech) 的病毒转导的荧光细胞, 确定转导效率和病毒效价 (viral titer)。将表达中等水平带 HA 标签的 hERG WT S1HAS2 通道蛋白的 COS-7 细胞 (10^6) 悬浮在 5 ~ 10ml DMEM 中, 在 MOI (感染复数) 约为 1 时用病毒上清液进行感染, 并接种到 100 mm 培养皿中。几小时后, 用完全 DMEM 取代培养基。两天后, 将细胞用抗 HA 抗体标记, 接着用 FITC 标记的第二抗体 (见上文) 标记, 并用荧光激活细胞分选仪进行分选。当与亲代细胞系比较时, 表面荧光显示出明显改

变的细胞首先扩增 (expand) 10 天, 然后进行再次分选。从两次分选出的细胞群中分离基因组 DNA, 使用载体特异性引物进行 PCR 反应以捕获文库插入物 (insert)。

现在, 对本发明进行了全面描述, 对于本领域普通技术人员来说, 应当理解, 在不背离本发明或者其任何实施例的保护范围的前提下, 在广泛而等价范围的条件、配方、以及其它参数下能够实施本发明。

将本文引用的所有专利和出版物以引用方式全文结合于此。任何出版物的引用是为了在提交日之前披露, 而不应解释为承认这些出版物是现有技术或者承认本发明就先发明而言不早于这些出版物。

专利名称(译)	用于鉴定能改变细胞蛋白表达的试剂的高通量分析系统及方法		
公开(公告)号	CN1973203A	公开(公告)日	2007-05-30
申请号	CN200580014279.8	申请日	2005-03-17
[标]发明人	阿瑟M布朗 埃克哈德菲克尔 芭芭拉A威布尔		
发明人	阿瑟·M·布朗 埃克哈德·菲克尔 芭芭拉·A·威布尔		
IPC分类号	G01N33/574 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/567 G01N33/569		
CPC分类号	G01N2500/10 G01N33/56966 G01N33/5061 G01N33/5023 Y10T436/105831 Y10T436/12 Y10T436/13		
优先权	10/804214 2004-03-19 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明披露了用于鉴定能改变哺乳动物细胞的蛋白、尤其是内在膜蛋白(整合膜蛋白)表达水平的试剂的高通量分析系统及方法。

EGFR	表皮生长因子受体
β-肾上腺素受体	GPCR
GABAaR	GABAa-门控离子通道
nAChR	ACh-门控离子通道
P-糖蛋白	膜通道
Kv2.2	离子通道
MCR	黑素皮质激素受体
hERG	离子通道
A4	TM4 家族
Abe2	ABC 转运蛋白; 多 tm; mdr 亚家族
AcPL	为 IL-18 受体信号传导必需。含有两个 Ig 区域(结构域)
AF1q	在一些白血球中结合到 MLL
α-G 整联蛋白	与 NAG-2 结合
α-9 整联蛋白	介导细胞-细胞以及细胞-胞外基质相互作用
ART-4	由 T-淋巴细胞识别的肿瘤抗原
B29	Ig 超家族 (superfamily)
BAP31	可能的膜蛋白 (potential membrane protein)
Btg-h3	由 TGF-β 诱导; 可以与微纤维以及细胞表面相连
Bgp4	可以在上皮细胞的自我更新/扩散中起作用
儿茶酚氧位甲基转移酶	膜结合形式; 使邻苯二酚胺神经递质失活
CD9	TM4; 与 CD19 以及 NAG-2 均存在于多分子 B1 整合素复合物中
CD19	Ig 区; B 细胞生长调节
CD27	CD70 受体; TNFR 家族; 细胞凋亡
CD31/PECAM-1	粘附分子
CD34	"干细胞抗原"
CD37	B 细胞上的 TM4
CD48	CD2 配体
CD53	TM4 超家族; Burkitt 淋巴细胞系 (line) 中较高
CD54/ICAM-1	粘附分子
CD59	补体抑制蛋白
CD69	涉及淋巴细胞增殖
CD87/PAR2	尿激酶纤维蛋白酶溶酶原活化剂受体
CG1	可能为 TM4 细胞表面蛋白
Coronin-2	WD40 区域(结构域)
DPH2L	单 tm; 抑制 ca 抑制剂
DR5	TRAIL 的死亡受体; 诱发细胞凋亡
EBI1	7-tm 受体
EBI3	含有 FnIII 区域(结构域)