



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02810325.4

[43] 公开日 2004 年 12 月 29 日

[11] 公开号 CN 1559006A

[22] 申请日 2002.5.21 [21] 申请号 02810325.4

[30] 优先权

[32] 2001. 5.21 [33] US [31] 60/292,548

[32] 2001.10.24 [33] US [31] 60/334,901

[86] 国际申请 PCT/US2002/016098 2002.5.21

[87] 国际公布 WO2002/095356 英 2002.11.28

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.21

[71] 申请人 埃克来拉生物科学公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 S·辛格 H·萨利米-穆萨威

S·H·塔希尔 G·J·沃韦伯

H·基拉科相 T·J·马特雷

V·S·埃尔南德斯

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

代理人 程 伟

权利要求书 8 页 说明书 55 页 附图 54 页

[54] 发明名称 用于分析蛋白的方法和组合物

[57] 摘要

本发明公开了在标本中检测一种或多种靶多肽的方法、组合物和试剂盒，其中靶多肽已经接受了翻译后修饰。含标本的混合物和含致裂解部分的第一个试剂及针对靶多肽上结合部位的第一个结合剂被置于各自结合部分发生结合的条件下。结合部位是靶多肽参与的翻译后修饰活动的结果。本方法可用于检测靶多肽本身。在另一个实施例中，靶多肽的存在和/或量与一个物质的存在和/或量和/或活性有关，如参与靶多肽翻译后修饰的酶。第一个结合剂和结合部位间的相互作用将致裂解部分带到可裂解部分的近旁，可裂解部分与多肽相连且仅当与致裂解部分接近时容易被裂解。以此方式，每个多肽的电泳标记可被释放。释放的电泳标记被分离，并根据相应的电泳标记检测靶多肽的存在和/或量。

1. 在怀疑含有靶多肽的标本中检测一种或多种靶多肽存在或不存在的方法，该方法包括以下步骤：

- 5 提供种类特异的试剂和一种或多种电泳探针，种类特异的试剂具有有效接近范围的致裂解部分和对一种或多种靶多肽的翻译后修饰特异的第一种结合剂，每一种具有对靶多肽特异的结合部分的一种或多种电泳探针和每一个上附着在其上的通过可裂解连接的一种或多种电泳标记；

- 10 混合标本、种类特异的试剂和一种或多种电泳探针，使种类特异的试剂和一种或多种电泳探针结合到一种或多种靶多肽上，且一种或多种电泳探针中的至少一个可裂解连接在有效接近致裂解部分的范围内，使得一种或多种电泳标记被释放；

电泳分离释放的电泳标记；和

根据存在或不存在释放的电泳标记检测存在或不存在一种或多种靶多肽。

- 15 2. 根据权利要求1所述的方法，其中所述的一种或多种靶多肽是多个靶多肽。

3. 根据权利要求2所述的方法，其中所述的致裂解部分是可以产生活性核素的感光剂。

- 20 4. 根据权利要求3所述的方法，其中所述的感光剂是光敏剂，所述的可裂解连接是氧化不稳定的连接，所述的活性核素选自过氧化氢，羟基，过氧化阴离子，苯氧基，和单态氧。

5. 根据权利要求4所述的方法，其中所述的活性核素是单态氧。

- 25 6. 根据权利要求5所述的方法，其中所述种类特异试剂的所述结合剂选自抗体，蛋白受体，蛋白受体的配体，植物血凝素，含生物素部分，含硼酸部分，适配子，酶底物，酶辅因子，和酶亚单位，其中所述电泳探针的所述结合部分是抗体或结合抗体的组合物。

7. 根据权利要求5所述的方法，其中所述的翻译后修饰选自磷酸化，糖基化，核糖基化，乙酰化，酰化，甲基化，脂化，异戊二烯化和泛素化。

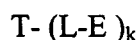
8. 根据权利要求5所述的方法，其中所述的多个靶多肽在2至100范围内。

9. 根据权利要求 8 所述的方法, 其中所述的多个靶多肽在 5 至 50 范围内。

10. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述的光敏剂选自卟啉, 酞花青, 荧光素染料的卤化衍生物, 若丹明染料的卤化衍生物, 和水杨酸萘酯花青。

11. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述的可裂解连接包括: 烯烃, 硫醚,
5 硒醚, 噻唑, 唑, 或咪唑。

12. 根据权利要求 5 所述的方法, 其中所述的电泳探针被定义为如下结构式:



其中: T 是对靶多肽特异的结合部分, L 是氧化不稳定的连接, E 是电泳标记,
10 k 是大于或等于 1 的整数。

13. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述的 L 选自烯烃, 硫醚, 硒醚, 噻唑, 唑, 和咪唑。

14. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述的 E 是分子量在大约 150 至 2500 道尔顿范围内的荧光的、水溶性有机化合物。

15 15. 根据权利要求 13 所述的方法, 其中所述的 E 为(M,D)形式, 其中 D 是荧光染料, 其中 M 是迁移率修饰部分, 它是一个键或直至 100 个除氢外选自碳, 氧, 氮, 磷, 硼, 和硫原子的有机分子。

16. 根据权利要求 12 所述的方法, 其中所述的电泳标记 E 被定义为以下结构式:



其中:

A 是-C(=O)R, 其中 R 是具有 1 至 8 个碳原子和 0 至 4 个杂原子的脂肪族、芳香族、脂环族或杂环, 杂原子选自 O、S 和 N; -CH₂-C(=O)-NH-CHO; -SO₂H; -CH₂-C(=O)O-CHO; -C(=O)NH-(CH₂)_n-NH-C(=O) C(=O)-(C₆H₅), 其中 n 在 2 至 12
25 范围内;

D 是荧光染料; 和

M 是一个键或直至 100 个除氢外选自碳, 氧, 氮, 磷, 硼, 和硫原子的有机分子,, 以 E 的总分子量在大约 150 至大约 5000 道尔顿范围内为限。

17. 根据权利要求 16 所述的方法, 其中所述的 D 是荧光素染料。

18. 检测标本中存在或不存在多个靶多肽的试剂盒, 该试剂盒含有:

种类特异的试剂, 具有致裂解部分和对一种或多种靶多肽上的翻译后修饰特异的第一个结合剂; 和

5 一种或多种电泳探针, 每一个具有对靶多肽特异的结合部分和一种或多种附着有可裂解连接的电泳标记。

19. 根据权利要求 18 所述的试剂盒, 其中所述的致裂解部分是光敏剂, 所述的可裂解连接是氧化不稳定的连接。

20. 根据权利要求 19 所述的试剂盒, 其中所述的第一个结合剂选自结合抗
10 体的组合物, 蛋白受体, 蛋白受体的配体, 植物血凝素, 含生物素的部分, 含硼酸的部分, 适配子, 酶底物, 酶辅因子, 和酶亚单位。

21. 根据权利要求 20 所述的试剂盒, 其中所述一种或多种电泳探针的所述结合部分是结合抗体的组合物。

22. 根据权利要求 21 所述的试剂盒, 其中所述的一种或多种电泳探针是 2
15 至 50 范围内的多个探针。

23. 根据权利要求 22 所述的试剂盒, 其中每一个不同的电泳探针对不同的靶多肽特异。

24. 根据权利要求 23 所述的试剂盒, 其中每一个所述的一种或多种电泳探针被定义为如下结构式:

20 $T-(L-E)_k$

其中: T 是所述的对靶多肽特异的结合部分, L 是所述的氧化不稳定的连接, E 是电泳标记, k 是大于或等于 1 的整数。

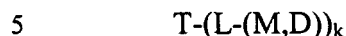
25. 检测一种或多种靶多肽的物质组合物, 该组合物包括定义为如下结构式的多个电泳探针:

25 $T-(L-E)_k$

其中: T 是对靶多肽特异的结合部分, L 是可裂解的连接, E 是电泳标记, k 是大于或等于 1 的整数, 如此多个中的每一个不同的 T 附着于不同的 E, 且多个中的每一个 E 具有不同于多个中其它 E 的光学特征和/或电泳迁移率。

26. 根据权利要求 25 所述的组合物,其中所述的 L 是氧化不稳定的连接,所述的多个在 2 至 500 范围内,E 的分子量范围从 150 至 10,000 道尔顿。

27. 根据权利要求 26 所述的组合物,其中所述的电泳探针被定义为如下结构式:



其中 T, L 和 k 的定义如上; D 是检测部分; M 是一个键或由 1 至 100 个不包括氢的选自碳, 氧, 氮, 磷, 硼和硫原子组成的水溶性有机化合物。

28. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述的 D 是荧光标记, 发色标记, 或电化学标记。

10 29. 根据权利要求 28 所述的组合物,其中所述的 M 是选自以下任一的聚合物: 聚醚, 聚酯, 多肽, 寡糖, 聚氨酯, 聚酰胺, 聚砜酰胺, 聚亚砜, 聚磷酸酯, 以及其嵌段共聚物。

30. 根据权利要求 29 所述的组合物,其中所述的 D 是荧光素。

15 31. 根据权利要求 30 所述的组合物,其中所述的荧光素选自 5-和 6-羧基荧光素, 5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-5-和 6-羧基荧光素, 2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 和 2',4',5',7'-四氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素。

20 32. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述的 L 选自烯烃, 硫醚, 硒醚, 噻唑, 唑, 和咪唑。

33. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述的 D 是 D_1 -g- D_2 , 其中 D_1 和 D_2 之一是能量传递受体分子, D_1 和 D_2 的另一个是能量传递供体分子, 其中 g 是具有选择长度的刚性连接子, 使 D_1 和 D_2 之间发生能量传递。

25 34. 根据权利要求 33 所述的组合物,其中所述的 D_1 和 D_2 选自若丹明, 荧光素, 及其卤化衍生物。

35. 根据权利要求 27 所述的组合物,其中所述的 T 是结合抗体的组合物。

36. 根据权利要求 35 所述的组合物,其中所述的 T 是抗体。

37. 根据权利要求 27 所述的组合物, 其中所述的 M 通过耦合 2 至 10 个选自以下化合物而构成: 二甲氧基三苯甲基保护的六乙烯乙二醇氨基磷酸酯, 6-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 12-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)十二烷基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 2-[2-(4-单甲氧基三苯甲基)氨基乙氧基]乙基-(2-氰基乙基),N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, (S-三苯甲基-6-巯己基)-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 9-O-二甲氧基三苯甲基-乙二醇, 1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 3(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 5'-O-二甲氧基三苯甲基-1',2'-二脱氧核糖-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 18-O 二甲氧基三苯甲基六乙烯乙二醇,1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 12-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)十二烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1,3-双-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊胺]丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊酰胺]-3-[5-苄醇甲氧基羰基氧基戊酰胺]-丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯,三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙氧甲基]乙基-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 琥珀酰亚胺基-反-4-(马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧基酯, 琥珀酰亚胺基 3-(2-吡啶二硫)丙酸酯, 琥珀酰亚胺基乙酰硫代乙酸酯, 琥珀酰亚胺基 4-(对-顺丁烯二酰亚胺苯基)丁酸盐; N- γ -顺丁烯二酰亚胺丁基-氧基琥珀酰亚胺酯; p-硝基苯基碘代醋酸酯; 和 4-(4-N-马来酰亚胺苯基)丁酸酐。

38. 根据权利要求 27 所述的组合物, 其中所述的多个所述电泳探针在 5 至 100 个范围内。

39. 根据权利要求 38 所述的组合物, 其中所述的多个所述电泳探针在 10 至 30 个范围内。

40. 检测标本中存在或不存在靶分子的物质组合物, 该组合物包括定义为如下结构式的多个电泳标记:

A-M-D

其中:

A 是-C(=O)R, 其中 R 是具有 1 至 8 个碳原子和 0 至 4 个杂原子的脂肪族、芳香族、脂环族或杂环, 杂原子选自 O、S 和 N; -CH₂-C(=O)-NH-CHO; -SO₂H; -CH₂-C(=O)O-CHO; -C(=O)NH-(CH₂)_n-NH-C(=O) C(=O)-(C₆H₅), 其中 n 在 2 至 12 范围内;

D 是检测部分;

M 是一个键或直至 100 个, 除氢外包括碳, 氧, 氮, 磷, 硼, 和硫的原子的有机分子, 以 A-M-D 的总分子量在大约 150 至大约 5000 道尔顿范围内为限。

41. 根据权利要求 40 的组合物, 其中所述的 D 是荧光标记, 发色标记, 或电化学标记。

5 42. 根据权利要求 41 所述的组合物, 其中所述的 D 是荧光标记。

43. 根据权利要求 42 所述的组合物, 其中所述的 D 是荧光素。

44. 根据权利要求 42 所述的组合物, 其中所述的 D 是 D₁-g-D₂, 其中 D₁ 和 D₂ 之一是能量传递受体分子, D₁ 和 D₂ 的另一个是能量传递供体分子, 其中 g 是具有选择长度的刚性连接子, 使 D₁ 和 D₂ 之间发生能量传递。

10 45. 根据权利要求 44 所述的组合物, 其中所述的 D₁ 和 D₂ 选自若丹明, 荧光素, 及其卤化衍生物。

47. 根据权利要求 40 所述的组合物, 其中所述的 D 是荧光标记, 其中所述的多个所述电泳标记在 5 至 100 个范围内。

15 48. 根据权利要求 47 所述的组合物, 其中所述的多个电泳标记的每一个具有独特的电荷-质量比或独特的光学特征, 使得每一个电泳标记在电泳分离上形成可检测的峰。

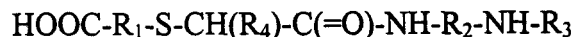
49. 根据权利要求 48 所述的组合物, 其中所述的 D 对所述多个电泳标记的每一个是相同的, 而其中所述的多个电泳标记的每一个具有独特的电荷-质量比, 使得每一个电泳标记在电泳分离上形成独特的峰。

20 50. 根据权利要求 40 的组合物, 其中所述的 M 是选自以下任一聚合物: 聚醚, 聚酯, 多肽, 寡糖, 聚氨酯, 聚酰胺, 聚砜酰胺, 聚亚砜, 聚磷酸酯, 以及其嵌段共聚物。

51. 根据权利要求 50 所述的组合物, 其中所述的 D 是荧光素。

25 52. 根据权利要求 51 所述的组合物, 其中所述的荧光素选自 5-和 6-羧基荧光素, 5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-5-和 6-羧基荧光素, 2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 和 2',4',5',7'-四氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素。

53. 通过硫醚可裂解连接将电泳标记附着到结合部分的组合物, 该组合物定义为如下结构式:



其中 R_1 是 $\text{C}_1\text{-C}_{10}$ 烃二基; R_2 是 $\text{C}_3\text{-C}_{10}$ 烃二基; R_3 是氨保护基团; R_4 是苯基
5 或电子供体取代的苯基。

54. 根据权利要求 53 所述的组合物, 其中所述的氨保护基团是 Fmoc, R_4 是苯基。

55. 一种组合物, 其含有:

(a) 多个电泳探针, 每一个上含有通过能够与单态氧反应的可裂解连接附着
10 在其上的一个电泳标记; 和

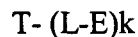
(b) 含有光敏剂的种类特异的试剂, 其中所述的光敏剂在激发态能够将氧激活成其单态。

56. 根据权利要求 55 所述的组合物, 其中所述的种类特异的试剂包括一种或多种光敏剂微珠。

15 57. 根据权利要求 56 所述的组合物, 其中所述的一种或多种光敏剂微珠的每一个附着第一种结合剂。

58. 根据权利要求 55 所述的组合物, 其中所述的可裂解连接包括烯烃基团和一种或多种与所述的烯烃基团相连的电子供体取代物。

59. 根据权利要求 55 所述的组合物, 其中所述的多个电泳探针被定义为如
20 下结构式:



其中: T 是对靶分子特异的结合部分, L 是可裂解的连接, E 是电泳标记, k 是大于或等于 1 的整数, 如此所述多个中的每一个不同的 T 附着于不同的 E, 且多个中的每一个 E 具有不同于所述多个中其它 E 的光学特征和/或电泳迁移率。

25 60. 根据权利要求 55 所述的组合物, 其中所述的种类特异试剂特异地结合磷酸化的多肽。

61. 一种组合物, 其包括:

(a) 靶多肽;

(b) 与靶多肽特异结合的电泳探针; 和

(c) 含有效接近范围的致裂解部分的种类特异试剂, 种类特异试剂被特异地连接到靶多肽上, 使电泳探针在所述的有效接近范围内。

- 5 62. 根据权利要求 61 所述的组合物, 其中所述的靶多肽具有磷酸基团, 且其中所述的种类特异试剂与其特异地结合。

用于分析蛋白的方法和组合物

发明背景

本发明涉及用于检测和可定量多肽的可分离组合物、方法和试剂盒。发明发现
5 现了在多肽多重检测领域的特殊应用，多肽包括参与翻译后活动的蛋白。

在许多医学学科中，在血液或其它生物学液体中检测许多被分析物的需要已变得日益明显，包括多肽和核酸序列。大多数多分析物检测，如在基因组范围内
10 检测多个核酸序列的测定，涉及多个步骤，具有很少的灵敏性，有限的动力学范围(通常相当于 2 至 100 倍差异)，有些需要复杂的仪器。多分析物检测的一些已知的经典方法包括如下：

- a. 应用两个不同的放射性同位素标记来区分两个不同的被分析物。
- b. 应用两个或以上不同的荧光标记来区分两个或以上被分析物。
- 15 c. 应用无机螯合物，其寿命和波长都被用于区分两个或以上被分析物。
- d. 应用荧光和化学发光标记来区分两个或以上被分析物。
- e. 应用两个不同的酶来区分两个或以上被分析物。
- f. 应用酶和吡啶酯类来区分两个或以上被分析物。
- g. 不同被分析物的空间分辨率，例如排列，来鉴定和量化多个被分
20 析物。

h. 应用吡啶酯类标记，其寿命或 dioxetanone 的形成被用来量化两个不同的病毒靶。

蛋白组在过去的几年已经引起人们的兴趣。由于蛋白组比基因组更复杂，蛋白研究比 mRNA 研究提供了更精确的细胞生物学图谱。蛋白组领域是非常广的，
25 涉及的领域如，例如，通过应用二维凝胶电泳和质谱分析的蛋白构型来研究蛋白在细胞中的表达，用酵母双杂交方法研究蛋白-蛋白相互作用，通路分析以了解信号传导和其它复杂的细胞过程，大规模蛋白折叠和 3-D 结构研究以及蛋白的高通量表达和纯化，在代谢、有丝分裂、减数分裂过程中应答外部刺激的细胞表达，如药物、病毒、物理或化学条件的改变，包括营养素和辅因子的过剩或不足，应激，衰老，存在特殊的生物体菌株并鉴定生物体和菌株，多药耐药，蛋白-DNA 相互作用，
30 蛋白-肽相互作用，等。有必要有一种方法在单一标本中鉴定多数蛋白以及对被检测的不同蛋白提供一些定量分析。

随着人类基因组被阐明，会有大量的机会进行涉及基因编码序列的诊断程

序。基因的一个主要功能是产生蛋白，它在细胞中完成的工作中起重要的作用。由于细胞中的蛋白功能是动态的，特定蛋白在特定时间点的结构、浓度、位置等等是不断变化的。蛋白表达方式的分析是正在进行的基因组计划的目的。对蛋白生理学活性形式及其在细胞中空间和时间相互作用的研究是整体研究的重要方面。

5 蛋白的一个翻译后修饰是添加或去除磷酸盐基团。蛋白磷酸化作用和去磷酸化作用反应已被确定是代谢调节和信号传导通路的主要组成部分。蛋白磷酸化作用的变化提供了目前已知的生物学系统中主要的酶调节方法，特别是在细胞表面受体的信号传导的调节中。可逆的磷酸化作用对于传导调节信号是重要的，包括所有活细胞中的增殖调节信号。为理解这些调节机制的分子基础，有必要鉴定被
10 磷酸化的特异氨基酸残基。通过鉴定磷酸化作用的底物和位点，可开发对某些肿瘤的诊断工具，且磷酸化过程本身的修饰可能成为治疗干预的靶标。

多肽如生长因子、分化因子和激素对协调多细胞生物体发育的调节系统是至关重要的成分。许多这些因子通过结合到并活化具有内在蛋白酪氨酸激酶活性的细胞表面受体来介导其多效性作用。由细胞外信号传导分子如生长因子和细胞
15 因子引起的细胞行为改变需要完成转录活动的复杂程序。为激活或抑制转录，转录因子必须位于核内，与 DNA 结合，并与基本转录结构相互作用。因此，调节转录因子活性的细胞外信号可影响这些过程的一种或多种。最普遍地，通过可逆的磷酸化作用获得调节。由几种不同激酶（或通过与一个以上通路相联系的激酶）引起的转录因子的磷酸化作用是简单的机制，使不同的信号集中于相同的因子。

20 文献中有许多方法关注于磷酸化作用的分析。一个这种方法是 ^{32}P -标记蛋白的二维磷酸肽图谱。另一个方法依赖于分析非放射标记磷酸蛋白的质谱分析。在另一个方法中(Cao, 等人, *Rapid Commun. Mass Spectrom.* (2000) 5 14:1600-1606), 用即时的固定金属亲和层析(IMAC)/毛细管电泳(CE)/电喷雾离子化多相序贯质谱分析(MS)绘制蛋白的磷酸化作用位点图谱。IMAC 树脂保留和预浓缩磷酸化的蛋白和
25 肽, CE 从 IMAC 树脂上洗脱出来的混合物中分离磷酸肽, MS 提供了包括每个成分磷酸化作用位点的信息。

磷酸化肽微量纯化的步骤，作为质谱分析的馏分前端，由 Posewitz, 等人公开, *Anal. Chem.* (1999) 71:2883-2892。使用微量吸头形式的固定金属亲和层析，更特别地与镓 III 离子联合使用。磷酸肽以接近定量和高度选择性的方式被回收，以
30 产生浓缩的标本，直接通过矩阵辅助激光解吸附/飞行电离时间和毫微电喷雾电离质谱分析而分析。

但是，仍然需要鉴定和/或检测多肽的活性和/或检测多肽存在和/或量的方法，多肽参与了翻译后修饰过程。该方法应当能够识别已经发生的修饰，修饰的单个或多个位点以及修饰位点的位置。该方法应当应用类别特异的试剂，可能并能
35 够在单一测定中检测多个多肽，即，具有高度的多重技术能力。该方法应当能够实时地提供要检测的信息，并能够确定某种多肽在生物学通路中的重要性。此外，无

论特定通路是否被激活，为了检测，该方法使用多重技术是很重要的。

发明概述

5 在一个方面，本发明关注于在怀疑含有靶多肽的标本中检测一种或多种靶多肽的存在和/或量的方法。形成的混合物含有(i)标本；(ii)包括致裂解部分的第一个试剂(这里也指"类别特异的试剂")和对一种或多种靶多肽上的翻译后修饰特异的第一个结合剂；和(iii)一种或多种电泳探针和一种或多种电泳标记，每个探针具有对靶多肽特异的结合部分，每个标记上附有可裂解的连接。混合物被置于每个结合剂与每个部分发生结合的条件下。第一个结合剂和翻译后修饰间的相互作用
10 将致裂解部分带到可裂解连接的近旁(这里也称作"有效近端")，可裂解连接在与多肽相连的探针上，且仅当与致裂解部分接近时才容易被裂解。以此方式，只有当结合发生时，每个多肽的独特电泳标记可从电泳探针上释放。然后释放的电泳标记被分离，并根据相应标记的特性和量检测靶多肽的存在和/或量。优选地，每个电泳标记具有独特的光学和/或电荷-质量特征。

15 本发明的另一个实施例是在一个标本中进行多重测定以检测多数靶多肽的方法，其中的靶多肽已经接受了磷酸化作用。标本与包含致裂解部分的第一个试剂、含有亲和性支持物的第一个结合剂和多数电泳探针结合。每个电泳探针含有各自靶多肽的结合部分和可裂解或可释放的电泳标记。结合体接受使第一个结合剂与靶多肽结合的条件。每个电泳探针中的电泳标记包括 i)只有当与致裂解部分接近时才容易被裂解的可裂解连接，和 ii)具有独特的电泳和/或光学特性的可检测部分。第一个结合剂和靶多肽间的相互作用将致裂解部分带到可裂解连接的近旁。
20 通过裂解可裂解连接，电泳标记从与靶多肽连接的电泳探针上释放。释放的标记通过每个标记特有的分离和光学特征而被鉴定，并检测标本中靶多肽的存在。优选地，电泳标记具有独特的电泳迁移率和/或荧光特征。

25 本发明的另一个实施例是用于检测多数靶多肽的每一个和任一个的存在和/或量和/或活性的组合物，靶多肽属于预先确定的一类翻译后物质如磷酸化的蛋白、糖蛋白、脂质衍生的蛋白，等。组合物包括含有致裂解部分的第一个试剂和结合部位的第一个结合剂，结合部位含有靶多肽的翻译后修饰。检测可以是对靶多肽本身或对参与靶多肽翻译后修饰的成分。组合物可以是试剂盒的一部分，试剂盒还
30 包含封装的多种电泳探针的组合，其中每个电泳探针含有针对各自靶多肽的第二个结合剂和可裂解电泳标记。每个电泳探针中的可裂解标记包括只有当与致裂解部分接近时才容易被裂解的可裂解部分，和至少一个具有独特的电泳和/或光学特征的可检测部分。

附图描述

图 1 图解了一个始于可商业获得的 6-羧基荧光素的示例合成方法，其中的

酚羟基用酸酐保护。通过标准的提取检查, 获得产物的 95%产量。此材料被亚磷酸化以产生氨基磷酸酯单体。

图 2 图解了应用对称的双-氨基醇连接剂作为具有仲胺的氨基醇, 然后加上多数的羧酸衍生物。

5 图 3 显示了可以作为迁移率调节物的几种苯甲酸衍生物的结构。

图 4 图解了可选择策略的应用, 即使用 5-氨基荧光素作为起始物质, 用相同系列的步骤将其转变成保护的氨基磷酸酯单体。

图 5 图解了可以用来将氨基染料转化成 e-标记氨基磷酸酯单体的几种迁移率调节物。

10 图 6 A-B 图解可用于构建本发明电泳标记的荧光素衍生物。

图 7 图解了用本发明进行蛋白组研究。

图 8 是细胞周期主要阶段及各阶段活性分子和过程的卡通图解。

图 9 A-C 是卡通电泳图谱, 图解采用 e-标记试剂和天然产物通过细胞为基础的检测来发现和确认靶标。图 9A 显示来自非同步化细胞群的假设结果; 图 9B
15 显示在 G1 早期俘获的细胞的结果; 图 9C 显示在 G1 晚期俘获的细胞的结果。

图 10 A-F 图解氧化不稳定的连接及其各自由单态氧介导的裂解反应。

图 11 是描述应用本发明的试剂检测配体-细胞表面受体相互作用影响的卡通画。

图 12 是进一步描述应用本发明的试剂检测配体-细胞表面受体相互作用影响的卡通画。
20

图 13 A 是描述分析细胞通路中蛋白-蛋白相互作用的卡通画。图 13B 显示了药物处理对 6 个指定的蛋白相互作用的影响的假设结果。

图 14 A-B 图解 e-标记部分与抗体结合以形成 e-标记探针的一般方法学, 以及得到的探针与单态氧的反应以产生作为释放的 e-标记报告子的亚磺酸部分。

25 图 15 A-J 显示已经被设计和合成的 e-标记部分的结构 (Prol 可从 Molecular Probes, Inc. 商业渠道获得)。

图 16 A-I 图解图 15 中图解的 e-标记部分的合成化学。

图 17 A-C 是本方法中使用的 CE² LabCard™ 装置的示意图。图 17A 图解了该装置; 图 17B 和 17C 图解装置中分别用来注射和分离的高压构造的范例。

30 图 18 显示了两个电泳图谱说明用 CE² LabCard 的 e-标记报告子分析。

图 19 显示了多个电泳图谱说明用 CE² LabCard 的 e-标记报告子分析。

图 20 描述了 e-标记报告子释放作为光敏剂微珠浓度函数的线性标准曲线。

图 21 显示标记的氨基葡聚糖的浓度对 e-标记报告子释放影响的数据曲线。

图 22 显示 8 个 e-标记报告子在 ABI310 上的电泳分离。

35 图 23 是描述定量细胞因子 IL-4 和 IL-5 的夹心试验的卡通画。

图 24 显示了一系列电泳图谱说明在 IL-4 滴定研究中的 e-标记报告子(Prol)

分析。

图 25 显示了一系列电泳图谱说明在 IL-6 滴定研究中的 e-标记报告子(Pro10)分析。

5 图 26 显示了一系列电泳图谱说明在 IFN γ 滴定研究中的 e-标记报告子(Pro8)分析。

图 27 显示了一系列电泳图谱说明在 TFN α 滴定研究中的 e-标记报告子(Pro7)分析。

图 28 显示了一系列电泳图谱说明在 IL-10 滴定研究中的 e-标记报告子(Pro4)分析。

10 图 29 显示了一系列电泳图谱说明在 IL-8 滴定研究中的 e-标记报告子(Pro2)分析。

图 30 描述了电泳图谱说明在单路和双重细胞因子研究中的 e-标记报告子分析。

15 图 31 描述了电泳图谱说明在 5 个细胞因子的多重研究中的 e-标记报告子分析。

图 32 描述了电泳图谱说明在多个细胞因子研究中的 e-标记报告子分析。

图 33 是描述直接定量人 IgG 的均一性测定的卡通画。

图 34 描述了电泳图谱说明在人 IgG 滴定研究中的 e-标记报告子分析。

图 35 描述了量化图 34 结果的标准曲线。

20

定义

如这里所用的, "alkyldiyl (烃二基)"是指饱和的或不饱和的, 分支、直链或环状的二价碳氢化合物游离基, 通过从母烷烃、烯烃或炔烃的两个不同碳原子的每一个上去除一个氢原子, 或通过从母烷烃、烯烃或炔烃的单一碳原子上去除两个氢原子而衍生。两个单价游离基中心或二价游离基中心的每个化合价可以与相同或不同的原子形成键。典型的烃二基包括但不限于, 甲二基;乙二基如乙烷-1,1-二基, 乙烷-1,2-二基, 亚乙基-1,1-二基, 亚乙基-1,2-二基; 丙二基如丙烷-1,1-二基, 丙烷-1,2-二基, 丙烷-2,2-二基, 丙烷-1,3-二基, 环丙烷-1,1-二基, 环丙烷-1,2-二基, 丙-1-烯-1,1-二基, 丙-1-烯-1,2-二基, 丙烯-1,2-二基, 丙-1-烯-1,3-二基, 环丙-1-烯-1,2-二基, 环丙烯-1,2-二基, 环丙烯-1,1-二基, 丙炔-1,3-二基, 等; 丁二基如, 丁-1,1-二基, 丁 1,2-二基, 丁-1,3-二基, 丁-1,4-二基, 丁-2,2-二基, 2-甲基-丙烷-1,1-二基, 2-甲基丙烷-1,2-二基, 环丁-1,1-二基; 环丁-1,2-二基, 环丁-1,3-二基, 丁-1-烯 1,1-二基, 丁-1-烯-1,2-二基, 丁-1-烯-1,3-二基, 丁-1-烯-1,4-二基, 2-甲基-丙-1-烯-1,1,17 二基, 2-methanylidene-丙烷-1,1-二基, 丁-1,3-二烯-1,1-二基, 丁-1,3-二烯-1,2-二基, 丁 1,3-二烯-1,3-二基, 丁-1,3-二烯-1,4-二基, 环丁-1-烯-1,2-二基, 环丁-1-烯-1,3-二基, 环丁烯-1,2-二基, 环丁-1,3-二烯-1,2-二基, 环丁-1,3-二烯-1,3-二基, 丁炔 1,3-二基, 丁炔

-1,4-二基, 丁-1,3-二炔-1,4-二基; 等。

"抗体"是指与另一个分子的特定空间和极性结构特异地结合并因此定义为与之互补的免疫球蛋白。抗体可以是单克隆或多克隆, 并可以通过本领域熟知的技术制备, 如免疫接种宿主并收集血清(多克隆)或通过制备连续的杂交细胞系并收集分泌的蛋白(单克隆), 或通过克隆和表达核苷酸序列或其诱变处理的变体, 核苷酸序列至少编码与天然抗体特异的结合所需要的氨基酸序列。抗体可包括完整的免疫球蛋白或其片段, 免疫球蛋白包括各种类型和同种型如 IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3, IgM, 等。其片段可包括 Fab, Fv 和 F(ab')₂, Fab', 等。此外, 在合适时可以使用免疫球蛋白的聚合体、多聚体和合成体或其片段, 只要保持对特定多肽的结合亲合力。

"抗体结合组合物"是指含有一种或多种抗体的分子或分子复合体, 从抗体中获得其结合特异性。抗体结合组合物包括但不限于: 抗体对, 其中第一个抗体特异地结合靶分子, 第二个抗体特异地结合第一个抗体的恒定区; 与靶分子特异结合的生物素化抗体, 以及与如电泳标记或光敏剂部分衍化的抗生蛋白链菌素; 对靶分子特异并与多聚体如右旋糖苷结合的抗体, 它反过来与如电泳标记或光敏剂部分衍化; 对靶分子特异并与珠、或微珠、或其它固相支持物结合的抗体, 它反过来与如电泳标记或光敏剂或含有后者的多聚体部分衍化。

"毛细电泳"是指在毛细管或毛细板中的电泳, 其中分离柱的直径或分离盘的厚度大约在 25-500 微米之间, 使贯穿分离介质有足够的热分散, 从而在介质中有很低的热对流。

"筛选基质"或"筛选介质"是指含有交联或非交联多聚体的电泳介质, 它有效地阻止带电荷种类穿过基质的电泳迁移。

关于两个分子或分子和分子复合体的结合"特异性", 是指同基本上不识别其它分子且不与这种其它分子形成稳定复合体的结合相比, 一个对另一个特异的识别并形成稳定的复合体。优选地, 关于结合的"特异性"是指就分子与其它分子或复合体形成复合体来说, 它与具有特异性的分子或复合体形成至少 50% 的复合体。一般地, 分子或复合体在产生两个分子间特异识别的表面或空腔中具有特定区域。特异结合的范例是抗体-抗原相互作用、酶-底物相互作用、聚核苷酸相互作用、细胞的受体-配体相互作用, 等等。

如这里所用的, 关于多数荧光标记的术语"光谱可分辨的", 是指标记的荧光发射带是十分明显不同的; 即充分地不重叠, 使与各自标记物附着的电泳标记可以根据各自标记物产生的荧光信号通过标准的光电检测系统被区分, 如采用通频带过滤器和光电倍增管系统, 等等, 如以美国专利第 4,230,558, 4,811,218 中描述的系统为例等, 或在 Wheelless 等人, 21-76 页, 流式细胞仪: 仪器使用 and 数据分析 (Academic Press, New York, 1985) 中。

具体实施方式

在一个方面,本发明关注于在怀疑含有多肽的标本中检测靶多肽族成员的存在和/或量的方法。作为本发明目标的蛋白种类包括具有一般物理、功能或化学特征的蛋白,它提供了物理或化学鉴定的方法。优选的蛋白种类包括膜结合蛋白、具有普通结合特征的蛋白如 DNA 结合蛋白、和具有特殊类型翻译后修饰如磷酸化作用、糖基化、核糖基化,等的蛋白。优选的靶多肽种类是已经接受了翻译后修饰的多肽。

在发明的另一个方面,可以希望检测多肽上已经被修饰的位点,在修饰的多肽上存在多少修饰,修饰在多肽上的位置,和多肽的位置,等等。另一方面,靶多肽的存在和/或量可被用来测定引起靶多肽翻译后修饰的物质的存在和/或量和/或活性。在此实施例中,希望知道存在该物质和/或该物质是有活性的。该物质可以是例如,多肽如酶、受体,复合体如多聚体蛋白或多亚单位的全酶、蛋白-核酸,等。

多肽是一类由氨基酸残基组成的化合物,氨基酸残基通过去除了一个氨基酸的羧基和另一个氨基酸的氨基之间的水的酰胺键而化学键合在一起。多肽是氨基酸残基的多聚体,它可包含多数的这种残基。通常,除了由较少数量的氨基酸组成以外,肽与多肽是相似的。肽有时指寡肽。在多肽和肽之间没有明确的截然不同。为了方便,在此公开物和权利要求书中,术语"多肽"一般用于指肽和多肽。氨基酸残基可以是天然的或合成的。

蛋白是折叠成指定的三维结构的多肽链。他们是含有碳、氢、氮和硫的复杂高度多聚体,并由通过肽键连接的氨基酸线性链组成。蛋白的分子量一般从大约 5,000 至大约 5,000,000,更通常地从大约 5,000 至大约 1,000,000。可以考虑各种蛋白如,具有相似结构特征的蛋白家族、具有特殊生物学功能的蛋白、涉及特殊微生物的蛋白,特别是致病微生物,等。这种蛋白包括,作为例子并不限于,细胞因子或白介素,酶如激酶、蛋白酶、半乳糖苷酶等等,精蛋白,组蛋白,白蛋白,免疫球蛋白,硬蛋白,磷酸蛋白,粘蛋白,色蛋白,脂蛋白,核蛋白,糖蛋白,T-细胞受体,蛋白多糖,未分类蛋白如生长激素、催乳激素、胰岛素,胃蛋白酶,在人血浆中发现的蛋白,凝血因子,血型因子,蛋白激素,癌抗原,组织特异抗原,肽激素,营养标记物、组织特异的抗原,和合成肽。

本发明优选的中心是多肽,包括经过天然加工如翻译后加工修饰的氨基酸序列。这种修饰在基础教材、更详细的专论和大量的研究文献中有很详细的描述。修饰可发生在多肽的如何位置,包括肽主链、氨基酸侧链和氨基或羧基末端。可以理解,相同类型的修饰可能以相同和各种不同的程度出现在指定多肽的数个位点上。此外,指定多肽上可含有许多类型的修饰。多肽可以因泛素化作用而是分支的,它们也可以是环状的,有或没有分支。环状的、分支的和分支环状的多肽可能来自于翻译后的天然加工。因非天然活动如化学修饰引起的修饰也在本发明的范围内。

修饰包括乙酰化作用、酰化作用、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价附着、亚铁血红素部分的共价附着、核苷酸或核苷酸衍生物的共价附着、脂质或脂质衍生物的共价附着、磷酸 tidylinositol 的共价附着、共轭连接、环化作用、二硫键形成、去甲基化作用、形成共价共轭连接、形成胱氨酸、形成焦谷氨酸、甲酰化、 γ -羧基化、糖基化、GPI 锚形成、羟基化、碘化作用、甲基化作用、肉豆蔻酰化作用、氧化、蛋白水解加工、磷酸化作用、异戊二烯化、外消旋作用、硒化作用、硫酸化作用、转移-RNA 介导的氨基酸添加到蛋白上如精氨酸化作用, 和泛素化作用(见, 例如, 蛋白—结构和分子特性, 第二版, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York, 1993; Wold, F., 翻译后蛋白修饰: 观察和前景 1-12 页, 蛋白的翻译后共价修饰, B. C. Johnson, 主编, Academic Press, New York, 1983; Seifter 等人, " 蛋白修饰和非蛋白辅因子的分析", Meth Enzymol (1990) 182:626-646 和 Rattan 等人, " 蛋白质合成: 翻译后修饰和衰老", Ann NY Acad Sci (1992) 663:48-62)。

检测翻译后修饰活性的标本通常是来自细胞的材料。标本可以通过溶解细胞, 从血清、血浆、唾液、血液或其它体液中获取。生物学通路可以在缓冲液中分析, 如检测受体通过酶或另一个受体的翻译后修饰。

种类特异的试剂

进行按照本发明方法的一个试剂是种类特异的试剂, 或普通试剂, 由致裂解部分和结合剂组成, 结合剂针对一类靶多肽的全部或实质上全部成员上的结合部位。此试剂就其结合剂与特定类型蛋白的所有或几乎所有成员结合来说是普通的。优选地, 该种类特异试剂结合剂的选择使得在需要时可以容易地从结合的材料中分离出未结合的材料。

在一个实施例中, 固定的金属亲和层析(IMAC)被用来在固相如微珠上俘获标本如细胞溶解物中含有的所有磷酸化蛋白, 如下面公开的, Holmes, J. Liquid Chromatography and Rel. Technol., 20: 123-142 (1997); Posewitz 等人, Anal. Chem., 71: 2883-2892 (1999); 等。结合后, 通过过滤作用冲洗微珠。俘获和冲洗步骤用来浓缩磷酸蛋白和从检测中去除污染的非磷酸化蛋白和其它细胞碎片。结合在微珠上的蛋白被重悬浮在含有候选目的蛋白抗体的溶液中。抗体可以对一种或多种指定的目的蛋白靶特异, 或者可以是针对全细胞溶解物制备的多克隆抗体试剂。优选地, 使用单克隆抗体集合, 其中的一种或多种不同的单克隆抗体对预先确定的一组蛋白中的每一个磷酸化蛋白特异。抗体试剂上可裂解地连接着一种或多种 e-标记部分, 其中的连接易于被 IMAC 树脂如 IMAC-24 DNP 上含有的致裂解部分裂解。多抗体试剂可与多重的、靶特异的检测联合, 每一个对不同的指定蛋白特异, 且每一个与单独分派给指定蛋白的指定 e-标记部分连接。抗体结合后, 与 e-标记部分的连接会被裂解以释放相应的 e-标记报告子, 表明 IMAC-24 DNP 微珠俘获了指定的靶。蛋白特异的或抗原决定簇特异的单克隆抗体可具有直接附着的 e-标记部

分，或者 e-标记可以附着在第二个抗体上，后者对结合在选定蛋白上的单克隆抗体恒定区特异。

多肽上的结合部位通常是多肽翻译后修饰的结果。因此, 结合部位可以是上面提到的任何一种修饰。因此, 多肽上结合部位的结合剂依赖于结合部位或修饰的特性。通常, 结合剂是能够特异识别修饰的亲合性试剂。下表(表 1a)列出了各种翻译后修饰和相应的结合剂:

表 1a

修饰	结合剂
磷酸化作用	金属亲合剂 + 金属 抗体 生物素
糖基化	含硼酸剂 植物血凝素
脂质化作用	抗体 环 deschins
二硫桥形成	抗体
硝基酪氨酸	抗体
泛素化作用	抗体

金属亲合剂

在本发明的一个实施例中，金属亲合剂与合适的金属联合可用作结合剂。金属亲合剂是指定螯合某种金属离子的物质，该金属离子对特别基团具有选择性。因此，可以使用对金属离子具有亲合力的任何配体，金属离子与翻译后修饰产生的结合部位结合。于是，螯合配体的特性依赖金属离子，又依赖翻译后修饰。术语“金属离子”是指来自以下物质的离子，例如，简单盐类(如 $AlCl_3$, $NiCl_2$, 等)，包括有机和无机配体及金属复合体的复杂或混合盐类。用于实践本发明的金属离子包括例如，主族金属离子，过渡金属离子，镧系元素离子，等。零价金属前体包括在此定义中。这种金属离子的实例包括，作为例子并不限于镓、铝、铁、铅、汞、镍、镉、铊、铋、银、铬、锰、铂、金、铋、铁、铜、锌、钴、钼、硒、钒、钙、镉、钆、铽、钇的离子，等等。

对于含磷酸盐部分，如来自多肽磷酸化作用者，适合的金属离子包括 2 或 3 价离子。特别优选的金属离子是镓Ⅲ、铝Ⅲ、铁Ⅲ、钴⁺³、钒⁺³、钆⁺³、钇⁺³、铽⁺³。

螯合配体通常是二齿螯合物、三齿螯合物或四齿螯合物，因为螯合配体含有大约 2 至 4 个金属配价部位。配价部位可含有氮如亚氨基、次氮基、嘧啶基、吡啶基、咪唑基、异腈基，等等；氧如羧基、羟基、醚、酮类，等等；磷如磷化氢，等

等; 砷如三氢化砷, 等等; 锑如 stilbines, 等等; 硫如硫醚、硫酮类, 等等; 硒如硒醚, 等等; 碲如碲醚, 等等; 等。还包括上述的联合如硫羧基、亚磷酸亚氨基、唑类、唑啉、硫苯类、噻唑、异唑、isothrazoles, 等。还包括有机部分如芳烃类、乙炔、烯烃, 等。含有上述基团的螯合配体特殊实例包括, 作为例子并不限于, 亚氨基双乙酸盐、三(羧基甲基)乙烯二胺、通常在 α 位置上被烷基(1-30 个碳原子) 取代的次氨基三乙酸、羧甲基化的天冬氨酸、2-羟基-3[N-(2-吡啶基甲基)氨基乙酸] 丙烷基, 等。

螯合配体可以是金属结合肽, 例如, (GHPH)_nG 其中 n 是 1(SEQ ID NO:1)、2(SEQ ID NO:2)、3(SEQ ID NO:3)或 5(SEQ ID NO:4) (见, 例如, Hutchens, 等人, *J. Chromatogr.* (1992) 604:125-132 和 133-141), 等等。

许多上述的金属螯合配体可以从商业渠道获得, 其它已经被合成且合成是文献的一部分。其它的金属螯合配体可以通过本领域熟知的步骤合成。

含硼酸剂

在本发明的一个实施例中, 结合剂是硼酸部分, 它包括至少一个硼原子被一些部分取代, 可以与多肽上结合部位的交互功能基形成复合体。通常, 硼酸部分来自被有机部分取代的硼酸, 有机部分具有至少大约 2 个如下的原子: 碳、氧、氮、硫和磷酸盐。通常, 有机部分具有至少大约 2 个被取代或未取代的碳原子。有机部分可以是脂肪族的或芳香族的。关于硼酸部分的重要考虑是其酸度。一般的, 硼酸部分的酸度越高, 其与结合部位的交互功能基形成复合体的能力越强。期望地, 硼酸部分的 pKa 低于大约 11, 优选地低于大约 9, 更优选地低于大约 8.75。硼酸部分的 pKa 值越低, 其与多肽结合部位结合的能力越强。因此, 优选增加硼酸酸度的硼取代。在硼上的芳香族取代是优选的, 例如, 苯基和取代的苯基(用一种或多种功能基取代如氨基、硝基, 等。为增加硼酸部分的酸度, 芳香族取代物优选地含有一种或多种吸电子基, 例如, 硝基等。硼酸部分的有机部分的特殊实例包括苯基、氨基苯基, 等等。特殊的硼酸部分包括, 作为例子并不限于, 苯基硼酸和(3-氨基苯基)硼酸。其它实例可以在美国专利第 5,623,055, 5,876,938, 6,013,783, 5,831,045 中发现, 相应的公开物在此合并为参考文献。

许多上述的含硼酸剂可以从商业渠道获得, 其它已经被合成且合成是文献的一部分。其它的金属含硼酸剂可以通过本领域熟知的步骤合成。

植物血凝素

在本发明的另一个实施例中, 植物血凝素可被用作结合剂。植物血凝素是对特殊的糖或糖类而非其它糖具有受体位点特异性的蛋白或糖蛋白。因此, 植物血凝素可被用作检测糖基化的结合剂。例如, 刀豆素 A (Con A)对 α -D-葡萄糖和 α -D-甘露糖具有特异性。当多肽上存在如葡萄糖的配体时, Con A 与葡萄糖基化的多肽结合。植物血凝素可来自任何适合的来源, 例如, 植物、哺乳动物、微生物, 等等。已知的植物血凝素的数量太多以致不能在此列出。如上面指出的, 植物血凝素对

特殊的糖或糖类特异。因此, 根据预期的多肽糖基化部分选择植物凝集素。植物血凝素的实例, 作为例子并不限于, 包括刀豆素 A, 凝集素如麦芽凝集素、接骨木花黑素凝集素(SNA)、落花生油凝集素、Bauhinia 紫花凝集素、*Galanthus nivalis* 凝集素(GNA)、曼陀罗 *stramonium* 凝集素(DSA)、*Maackia amurensis* 凝集素(MAA)、花生凝集素等、接骨木皮植物血凝素、*Ulex Europeus* (UEA I)、*Ulex Europaeus* (UEA II)、*Polyhemus* (LPA)、百脉根四戈诺裂藤(*Lotus A*), 等等。

抗体

在一个实施例中, 结合剂可以是针对多肽上修饰的抗体。例如, 识别磷酸盐基团的抗体可被用于磷酸化的多肽, 或识别糖部分的抗体可被用于糖基化的多肽, 或识别乙酰化作用的抗体可被用于乙酰化的多肽, 等等。抗体可以是单克隆或多克隆。许多适合的抗体是本领域已知的和/或可以通过本领域熟知的技术制备。这些技术包括免疫接种宿主并收集血清(多克隆), 或通过制备连续的杂交细胞系并收集分泌的蛋白(单克隆), 或通过克隆和表达核苷酸序列或其诱变处理的变体, 核苷酸序列至少编码与天然抗体特异的结合所需要的氨基酸序列。抗体包括完整的免疫球蛋白或其片段, 免疫球蛋白包括各种类型和同种型如 IgA, IgD, IgE, IgG1, IgG2a, IgG2b 和 IgG3, IgM, 等。其片段可包括 Fab, Fv 和 F(ab')₂, Gab', 等。此外, 在合适时可以使用免疫球蛋白的聚合体、多聚体和合成体或其片段, 只要保持对特定分子的结合亲和力。

在一个方法中, 为制备适合的抗体, 通过完全确定的技术获得含抗体(多克隆)的抗血清, 该技术涉及用合适的免疫原免疫接种动物如兔、豚鼠或山羊, 并在合适的等待期后从被免疫动物的血液中获得抗血清。目前的发展水平被综述如下: Parker, 生物学活性化合物的放射免疫检测, Prentice-Hall (Englewood Cliffs, N.J., U.S., 1976), 丁 ler, J. Immunol. Meth. 7: 1-24 (1975); Broughton 和 Strong, Clin. Chem. 22: 726-732 (1976); 和 Playfair, 等人, Br. Med. Bull. 30; 24-31 (1974)。抗体也可以通过体细胞杂交技术获得, 这种抗体一般被称作单克隆抗体。单克隆抗体可按照 Kohler 和 Milstein, *Nature* 265:495-497, 1975 的标准技术产生。单克隆抗体技术的综述见于: Melchers 等人主编的淋巴细胞杂交瘤, Springer-Verlag (New York 1978), *Nature* 266: 495 (1977), *Science* 208: 692 (1980), 和 *Methods of Enzymology* 73 (Part B): 3-46 (1981)。为增加单克隆抗体产量有各种技术, 如将杂交瘤细胞注射进接受细胞的哺乳动物宿主的腹腔, 并收获腹水。当腹水中的单克隆抗体收集量不足时, 从宿主血液中获取抗体。可选择地, 产生所需抗体的细胞可以在中空纤维细胞培养装置或旋转瓶装置中培养, 两者都为本领域熟知。从其它蛋白和其它污染物中分离和纯化单克隆抗体有各种常规的方法(见 Kohler 和 Milstein, 见上)。在另一个制备抗体的方法中, 可以从染色体 DNA 上切取编码抗体结合部位的序列并插入能够在细菌中表达的克隆载体中, 以产生具有相应抗体结合部位的重组蛋白。一般的, 抗体可以通过已知的技术被纯化, 如层析如 DEAE 层析、ABx 层析等, 过滤, 等等。

生物素

在一个实施例中, 磷酸蛋白的磷酸基可以是生物素化的并通过抗生蛋白链菌素分离蛋白, Goshe 等人, *Anal. Chem.*, 73: 2578 (2001)。

致裂解部分

- 5 致裂解部分是产生活性核素的基团, 后者能够裂解可裂解的连接, 优选地通过氧化。优选地, 活性核素是具有短暂活性的化学核素, 使得其致裂解作用仅在其产生部位附近存在。或者活性核素本来就寿命很短, 使得因远离其产生的附近而不会产生显著的背景, 或者使用足以清除活性核素的清除剂, 使得在其产生部位的短距离之外不能被用来与可裂解连接起反应。作为例证的活性核素包括单态氧、
10 过氧化氢、NADH 和羟基游离基、含苯氧基的游离基、过氧化物, 等。作为例证的致氧化活性核素的淬灭剂包括多烯、类胡萝卜素、维生素 E、维生素 C、酪氨酸的氨基酸-吡咯 N-合成体、组氨酸和谷胱甘肽, 等, 如 Beutner 等人, *Meth. Enzymol.*, 319: 226-241 (2000)。

- 对于致裂解部分和可裂解连接重点考虑的是, 它们在与靶蛋白结合时不要彼此远离, 否则由感光剂产生的活性核素在与可裂解连接结合之前扩散并丧失其活性。因此, 可裂解连接优选地在连接的致裂解部分的 1000 nm 内, 优选地 20-100 nm。此致裂解部分的有效范围在此称作其"有效近程"。

- 活性核素的发生器包括酶类, 如产生过氧化氢的氧化酶如葡萄糖氧化酶、氧杂蒽氧化酶、D-氨基酸氧化酶、NADH-FMN 氧化还原酶、半乳糖氧化酶、甘油基
20 磷酸盐氧化酶、肌氨酸氧化酶、胆碱氧化酶和乙醇氧化酶, 产生羟基游离基的辣根过氧化酶, 产生 NADH 或 NADPH 的各种脱氢酶, 产生氨的尿素酶以形成局部高 pH。一个可裂解连接可以硫或硒的氧化为基础, 其中的硫醚、亚砷或其硒类似物存在于活化基团的 α -或 β -位, 它使氢 α 成为酸性活化基团并能够被碱去除, 以便释放附着有可释放 e-标记部分的氧化功能基或接受氧化并释放 e-标记。可选择地,
25 可使用在一个氧化状态下稳定而在另一个氧化状态下不稳定的金属螯合物。其它化合物包括 α -取代的甲基醌, 它具有经离去基团如磺酰基、羟基、氨基等结合的试剂的可释放部分。

- 感光剂是一个分子, 通常是化合物, 可以导致产生反应中间体或核素, 通常是单态氧。优选地, 按照本发明使用的感光剂是光敏剂。但是, 其它感光剂可以用在本发明中, 例如, 化学激活的(如, 酶类和金属盐类)包括, 作为举例并不限于, 其它物质和组合物, 可以通过外部光源产生具有活化作用或很少优选地没有活化作用的单态氧。因此, 例如, 钼酸盐(MoO_4^-)类和氯过氧化物酶和髓过氧化物酶加溴化物或氯化物离子已显示催化过氧化氢转化成单态氧和水。对于上面的感光剂实例, 过氧化氢可分别作为辅助试剂而被包含在内, 氯过氧化物酶可结合在表面上, 钼酸盐可
35 掺入脂质体的水相中。其它包括在本发明范围内的感光剂并非真正的感光剂, 但在热、光、电离辐射或化学活化作用激发下会释放单态氧分子的化合物。此类化

合物中最熟知的成员包括内过氧化物如 1,4-二羧基乙基-1,4-萘内过氧化物、9,10-二苯基蒽-9,10-内过氧化物和 5,6,11,12-四苯基萘 5,12-内过氧化物。被加热或直接吸收光的这些化合物释放单态氧。更多的感光剂在如下文献中公开: Di Mascio 等人, FEBS Lett., 355: 287 (1994)(过氧化酶和氧化酶); Kanofsky, J.Biol. Chem. 258: 5991-5993 (1983)(乳过氧化物酶); Pierlot 等人, Meth. Enzymol., 319: 3-20 (2000)(内过氧化物的热裂解); 等。

结合剂附着到致裂解部分上可以是直接的或间接的, 共价的或非共价的, 并可以通过熟知的技术完成, 一般可在文献中得到。见, 例如, “固定酶”, Ichiro Chibata, Halsted Press, New York (1978); Cuatrecasas, J. Biol. Chem., 245:3059 (1970)。各种广泛的功能基团是可以获得的或可被加入的。功能基团包括羧酸、醛类、氨基、氰基、乙烯基、羟基、巯基, 等。各种广泛化合物的连接方式是熟知的并在文献中被详细地解释(见上)。结合剂上连接基团的长度可以很大地不同, 依赖于要连接的化合物的特性, 距离对特异结合特性的影响, 等。

植物血凝素可以通过已知的共价连接技术附着到致裂解部分上。这种连接通过植物血凝素与致裂解部分或主链分子经双功能交联剂的共轭连接而恰当地进行。适合的双功能化合物在 Peters, K.和 Richards, F. M.的综述(Ann. Rev. Biochim. 46 (1977) 523)中见到。在蛋白递呈给它们的功能基中, 烷基 imidates 显示高度的特异性。反应对伯氨基是特异的。特异的耦合试剂包括氨基酯如二甲基 malonimide, 叠氮化物如 tartryl 二叠氮化物的丙烯叠氮化物, 它容易地与氨基起反应以产生酰胺连接, 芳基二卤化物(如, 1,5-二氟-2,4-二硝基苯或 4,4'-二氟-3,3'-二硝基苯基砜), 戊二醛, 双马来酰亚胺, 混合的酸酐, 混合的芳香族或脂肪族二羧基, N-羟基琥珀酰亚胺酯, 和其它已知的共轭连接剂。催化剂如 1-乙基-3(3-二甲基氨基丙烷基)碳化二亚胺氢氯化物可被用来在一个分子的氨基和另一个分子的羧基间形成共价键。

种类特异的试剂可在原地进行或形成。在前一个情况中, 所有种类特异试剂的成分在用于本方法之前结合在一起。在后一情形下, 至少某些种类特异试剂分别地加入进行本方法的介质中。在一个方法中, 结合剂含有附着致裂解部分的部分。通常, 这涉及存在于致裂解部分上的第二个部分, 在此第二个部分与结合剂部分相互作用为致裂解部分附着到结合剂上作准备并在原地形成种类特异的试剂。典型地, 各部分通过非共价附着相互作用。此情形的例证为, 两个部分之一含有小分子(大约 100 至大约 1500 的分子量), 其它的部分含有小分子的结合伴侣。例如, 小分子可以是生物素、地高辛、荧光素、二硝基苯酚, 等等, 小分子的结合伴侣分别是抗生物素蛋白、地高辛抗体、荧光素抗体、二硝基苯酚抗体, 等等。

期望结合剂上附着有多个致裂解部分以增加例如活性核素产生的数量。在一个方法中, 结合剂具有多个位点以附着例如抗体、植物血凝素, 等等。为进一步增加致裂解部分的数量, 使用了主链分子或核。主链的核心是多功能材料, 一般是多聚体, 具有许多功能基团作为连接位点如羟基、氨基、巯基、羧基、烯基、乙醛,

等。主链上的功能基应该是与要附着的致裂解部分或结合剂上的功能基起反应者。就其它试剂，主链核心的讨论列于下面，且下面讨论的原理也可以用于此情况中。

在某些实施例中，种类特异的试剂包括支持物，它与种类特异试剂的成分之一连接在一起。支持物可以由有机或无机、固体或液体的水不溶性材料组成，它可以是透明的或部分透明的。支持物可以有多种形状中的任何一种如，颗粒包括微珠、胶片、膜、管、孔、条、棒，等。对于掺入了光敏剂的支持物，支持物的表面优选地是亲水的或能够变为亲水的，支持物主体优选地是疏水的。支持物在其被使用的介质中可以是可悬浮的。可悬浮支持物的实例作为例子并不限于，多聚体材料如乳胶、脂质双层、油滴、细胞和水凝胶。其它支持物组合物包括玻璃，金属，多聚体如硝化纤维、醋酸纤维素、聚(氯乙烯)、聚丙烯酰胺、聚丙烯酸酯、聚乙烯、聚丙烯、聚(4-甲基丁烯)、聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸酯、聚(乙烯对苯二酸盐)、尼龙、聚(乙烯丁酸盐)，等；它们或者单独使用或者与其它材料联合使用。结合剂附着到支持物上可以是直接的或间接的、共价或非共价的，并可以通过熟知的技术完成，如上讨论一般可以在文献中获得。见，例如，“固定酶”Ichiro Chibata，*见上*。

支持物的表面通常是多功能的，或能够被多功能化的，或能够经共价或特异或非特异的非共价相互作用结合到靶结合部分上的，等。

致裂解部分可以通过被共价或非共价地附着到支持物表面或掺入支持物主体而与支持物相连。连接到表面可以如上面所述完成。致裂解部分可以在支持物制备期间或之后掺入支持物主体。一般的，与支持物连接的致裂解部分的量必须能达到活性核素所必需的量。通常，致裂解部分的量是凭经验确定的。

光敏剂作为致裂解部分

如上面提到的，按照本发明优选的致裂解部分是产生单态氧的光敏剂。如这里所用的，“光敏剂”是指光吸附分子，当被光激活时将分子氧转变成单态氧。光敏剂可以经共价或非共价连接直接或间接地附着到种类特异试剂的结合剂上。构建这种组合物的指导，特别是抗体作为结合剂，可在文献中获得，如在光动力学治疗领域，免疫诊断，等。下面是示例的文献：Ullman 等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426-5430 (1994); Strong 等人，Ann. New York Acad. Sci., 745: 297-320 (1994); Yarmush 等人，Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst, 10: 197-252 (1993); Pease 等人，美国专利 5,709,994; Ullman 等人，美国专利 5,340,716; Ullman 等人，美国专利 6,251,581; McCapra，美国专利 5,516,636；等。

同样地，在文献中有关于适合用在本发明中的光敏剂的特性和选择的指导。下面是示例的文献：Wasserman 和 R.W. Murray. 单态氧(Academic Press, New York, 1979); Baumstark, 单态氧, Vol. 2 (CRC Press Inc., Boca Raton, FL 1983); 和 Turro, 现代分子光化学(University Science Books, 1991)。

光敏剂是通过光激发产生单态氧的感光剂。光敏剂包括染料和芳香族化合物，通常是由共价连接的原子组成的化合物，通常具有复合共轭的双或三键。该化合物

典型地吸收大约 200 至大约 1,100 nm 波长范围的光, 通常在大约 300 至大约 1,000 nm 间, 优选地在大约 450 至大约 950 nm 间, 在激发波长下, 其最大吸光率的消光系数超过大约 $500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 优选地大约 $5,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, 更优选地大约 $50,000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 。在无氧情况下, 吸收光以后产生的激发态的寿命通常至少大约 100 毫微秒, 5 优选地至少大约 1 毫秒。一般的, 此寿命必须足够长以能够将根据本发明的试剂中的连接裂解。这种试剂通常以下面所述的浓度存在。光敏剂激发态通常具有与其基础状态不同的自旋量子数(S), 当在通常情况下基础状态是单体时($S=0$), 激发态通常是三联体($S=1$)。优选地, 光敏剂具有较高的系统间交联产量。即, 光敏剂的光激发通常产生至少大约具有 10% 功效的三联体, 理想地至少大约 40%, 优选地超过 10 大约 80%。

选择的光敏剂是相对光稳定的, 且优选地不与单态氧有效地反应。在大多数有用的光敏剂中存在几个结构特征。大多数光敏剂在刚性的、往往是芳香族的结构中具有至少一个并经常是三个或以上共轭的双键或三键。它们往往含有至少一个促进系统间交联的基团如羰基或亚氨基或选自周期表 3-6 排的重原子, 特别是碘 15 或溴, 或它们可具有延伸的芳香族结构。

大量的各种光源可用来光激活光敏剂以产生单态氧。多色和单色源均可以使用, 只要光源足够强以在使用时间内产生充足的单态氧。照射的长度依赖光敏剂的特性、可裂解连接的特性、照射源的能量和其距离标本的远近, 等等。一般的, 照射期间可少于大约 1 微秒至大约 10 分钟长, 通常在大约 1 毫秒至大约 60 秒的范围内。照射的强度和长度应当充分以激发至少大约 0.1% 的光敏剂分子, 通常至少大约 30% 的光敏剂分子, 优选地实质上全部的光敏剂分子。实例的光源包括, 作为例子并不限于, 激光如氩-氖激光、氩激光、YAG 激光、He/Cd 激光和红宝石激光; 光电二极管; 汞、钠和氙蒸气灯; 白炽灯如钨和钨/卤素; 闪光灯; 等。

可用在本发明中的光敏剂实例是具有上面的特性者, 并列举在如下文献中: 25 Turro, 现代分子光化学(上面引用的); Singh 和 Ullman, 美国专利 5,536,834; Li 等人, 美国专利 5,763,602; Ullman 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 5426-5430 (1994); Strong 等人, Ann. New York Acad. Sci., 745: 297-320 (1994); Martin 等人, Methods Enzymol, 186: 635-645 (1990); Yarmush 等人, Crit. Rev. Therapeutic Drug Carrier Syst, 10: 197-252 (1993); Pease 等人, 美国专利 5,709,994; Ullman 等人, 美国专利 5,340,716; Ullman 等人, 美国专利 6,251,581; McCapra, 美国专利 5,516,636; Wohrle, Chimia, 45: 307-310 (1991); Thetford, 欧洲专利 publ. 0484027; Sessler 等人, SPIE, 1426: 318-329 (1991); Madison 等人, Brain Research, 522: 90-98 (1990); Polo 等人, Inorganica Chimica Acta, 192: 1-3 (1992); Demas 等人, J. Macromol. Sci., A25: 1189-1214 (1988); 等。示例的光敏剂列于表 1b 中。

35

表 1b
示例的光敏剂

竹红甲菌素 A	四苯基卟啉
竹红甲菌素 B	若丹明染料的卤化衍生物
金丝桃素	金属卟啉
荧光素染料的卤化衍生物	酞花青
孟加拉玫瑰红	水杨酸萘酯花青
部花青 540	Texaphyrin-type macrocycles
亚甲蓝	血卟啉
9-硫氧杂蒽酮	9, 10-二溴蒽
叶绿素	苯甲酮
Phenaleone	二氢卟酚 e6
原卟啉	苌
苯金属卟啉 A 一元酸	苯金属卟啉 B 一元酸

如上面就致裂解部分的讨论，在某些实施例中，光敏剂部分包括支持物。如
 5 上所述，光敏剂可以通过被共价或非共价地附着到支持物表面或掺入支持物主体
 而与支持物相连。一般的，与光敏剂相连的量必须达到单态氧的必需量。通常，光
 敏剂的量是凭经验确定的。用作光敏剂的光敏剂优选地相对无极性，当光敏剂被
 掺入例如乳胶颗粒以形成光敏剂微珠时保证其溶解进亲脂性成分中，如 Pease 等人
 公开的美国专利 5,709,994。例如，光敏剂孟加拉玫瑰红通过乳胶上的氯甲基共价
 10 地附着到 0.5 微米乳胶微珠上，以提供酯连接基，如 J. Amer. Chem. Soc., 97: 3741
 (1975)中描述的。

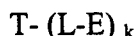
在本发明的一个方面，种类特异的试剂含有是抗体的第一个结合剂和是光敏
 剂的致裂解部分，使得光敏剂共价地连接到抗体上，如采用熟知的技术，如 Strong
 等人(上面引用的)、Yarmush 等人(上面引用的)公开的;或类似技术。可选择地，种
 15 类特异的试剂包含固相支持物如微珠，光敏剂共价或非共价地附着其上，抗体优选
 共价地、或直接地、或作为功能化多聚体如氨基葡聚糖的方式附着,或类似方式。

电泳探针组合物

按照本发明的重要特征，提供了一组电泳探针，其中每一个具有独特的多肽
 结合部分和相连的具有独特电荷/质量比和/或光学特征的"e-标记部分"。为方便起
 20 见，e-标记部分独特的电荷/质量比是由迁移率调节剂的化学结构引起的，因为检测
 基和连接基残基（如果有的话）对于任何系列电泳探针是共同的。但是，已认识到
 e-标记报告子产生的独特电荷和/或质量也可以是检测基造成的。例如，一组电泳探
 针可由两个亚组组成，第一个亚组具有迁移率调节剂基团，它与具有规定的电荷
 和/或质量的检测基团一起赋予亚组独特的电泳迁移率，第二个亚组具有相同的迁

移率调节剂基团并与电荷和/或质量不同的第二个检测基团结合,从而赋予两个亚组间都独特的电泳迁移率。

在一个方面,本发明包括由多个电泳探针组成的组合物。电泳探针包括对靶多肽特异的结合部分和一种或多种电泳标记。电泳标记可以通过与结合部分特异结合
5 的第二个结合分子直接或间接地附着到结合部分上,如对抗恒定区特异的第二个抗体。优选地,电泳探针的结合部分是抗体。一般地,电泳探针被定义为如下结构式:



其中 T 是结合部分,或更特别地,是结合多肽的部分; L 是可裂解的连接; E 是电泳标记,或"e-标记"。优选地,可裂解连接 L 是易氧化的连接,更优选地,是可以
10 被单态氧裂解的连接。"- (L-E) _k"部分表示单个结合部分可以有一种或多种经可裂解连接附着的电泳标记, k 是大于或等于 1 的整数; 优选地, k 是 1 至 500 范围内的整数; 更优选地, k 是 1 至 100 或 1 至 50 范围内的整数; 还更优选地, k 是 1 至 10 范围内的整数。优选地,电泳探针的数量至少是 5, 更优选地至少是 10。还更优选地,
15 数量范围是 5 至 200, 更优选地 5 至 100 或 5 至 50 或 10 至 30。优选地,在数量范围内,每个不同的结合部分 T 具有不同的电泳标记 E。易氧化的连接和标记 E 通过常规的连接化学附着到 T 上。优选地,只要 T 是多肽,就可以通过常见的反应功能基如氨基、硫醚、羧基等附着。

优选地,结合部分 T 是对靶蛋白或多肽特异的抗体,或含有抗体。在后者情
20 况下, T 可以包括多个一起起作用的结合组分,以在靶蛋白附近保持有一个电泳标记。例如, T 可以是一个抗体和附着有 e-标记的第二个抗体,半抗原化的抗体和附着有 e-标记的第二个抗半抗原抗体,生物素化的抗体和附着有 e-标记的抗生蛋白链菌素,依次具有 e-标记附着的功能化多聚体衍化的抗体,或类似物。多数电泳探针
25 优选地用于本发明的方法中,其中每一个探针具有不同的结合部分 T。

优选地, L 是硫醚或其硒类似物;或含有碳-碳双键的烯烃,其中的双键裂解成
30 含氧基团,并释放 e-标记 E。举例的烯烃包括乙烯硫醚、乙烯醚、烯胺、在碳原子上用 α -次甲基(CH, 碳原子具有至少一个氢原子)取代的亚胺,其中乙烯基可以是环状的,杂原子可以是环状的,或在环状的烯烃碳原子上取代,且至少有一个直至 4 个杂原子结合在烯烃的碳原子上。得到的二唑可自发地分解,通过在环境温度
35 以上的温度加热分解,通常低于大约 75°C,通过与酸或碱反应分解,或在有或无光敏剂的条件下通过光活化作用分解。这种反应被描述在下面示例的文献中: Adam 和 Liu, J. Amer. Chem. Soc. 94, 1206-1209, 1972, Ando 等人, J.C.S. Chem. Comm. 1972, 477-8, Ando 等人, Tetrahedron 29, 1507-13, 1973, Ando 等人, J. Amer. Chem. Soc. 96, 6766-8, 1974, Ando and Migita, ibid. 97, 5028-9, 1975, Wasserman 和
Terao, Tetra. Lett. 21, 1735-38, 1975, Ando 和 Watanabe, ibid. 47, 4127-30, 1975, Zaklika 等人, Photochemistry and Photobiology 30, 35-44, 1979, 和 Adam 等人, Tetra. Let. 36,

7853-4, 1995. 又见, 美国专利 第 5,756,726。

二唑的形成是通过单态氧与激活烯烃的反应而获得的, 烯烃的一个碳原子被 e-标记部分取代, 其它碳原子被结合部分取代。见, 例如, 美国专利第 5,807,675。这些可裂解的连接可描述为如下的结构式:



其中:

W 可以是一个键, 一个杂原子如 O、S、N、P、M(是指形成稳定共价键的金属), 或功能基如羰基、亚氨基等, 可以结合到 X 或 C_α 上; 至少一个 X 应是脂肪族的、芳香族的、脂环族的或杂环的并经杂原子如 N、O 或 S 键合到 C_α 上, 其它 X 可以相同或不同, 可另外是氢、脂肪族的、芳香族的、脂环族的或杂环的, 通常是芳香族的或芳香杂环的, 其中一个 X 可与 Y 一起形成环, 通常是杂环, 它们所附着的碳原子一般地除氢以外是从大约 1 至 20, 通常 1 至 12, 更通常 1 至 8 碳原子, 一个 X 将有 0 至 6, 通常 0 至 4 个杂原子, 而其它 X 将有至少一个杂原子和直至 6 个杂原子, 通常 1 至 4 个杂原子;

15 Y 在 X 的定义范围内, 通常经杂原子与 C_β 结合, 并如所说明的可与 X 一起形成杂环;

Z 通常是芳香族的, 包括芳香杂环的, 如上所述从大约 4 至 12, 通常 4 至 10 个碳原子和 0 至 4 个杂原子, 如上所述直接地或经杂原子结合到 C_β 上;

n 是 1 或 2, 依赖于 e-标记部分是否结合到 C_α 上或 X 上;

20 其中, Y 和 Z 之一具有与结合部分结合的功能基, 或被结合到结合部分上, 如通过作为、或包括连接基团而结合到结合部分 T 上。

优选地, 选择 W、X、Y 和 Z 使得裂解后的电泳标记 E 在下面的大小范围内。

虽然没有在结构式中描述, 通过一种或多种 e-标记部分结合一个或两个 Xs, 在单个分子中可有多于一个 e-标记部分。

25 举例的可裂解连接包括 S-3-硫醇丙烯酸、-N, N-甲基 4-氨基-4-丁烯酸、-O,3-羟基丙烯醛、N-(4-羧基苯基)2-咪唑, 唑和噻唑。

同样的目的是 N-烷基吡啶衍生物, 在第 9 位置被下面结构式的二价基团取代:



30 其中:

X^I 是选自 O、S、N 和 Se 的杂原子, 通常是前三个之一; 和

A 是被 e-标记报告子取代的至少 2 个碳原子的链, 通常不超过 6 个碳原子, 其中 A 的其它价优选地由氢补偿, 尽管此链可被其它基团取代如烷基、芳基、杂环基等, 但 A 一般不超过 10 个碳原子。

35 同样的目的是杂环化合物, 如二杂茂, 举例为取代的咪唑、噻唑、唑类等, 其中的环通常被至少一个芳香基团取代, 且在某些情况下为释放 e-标记报告子必须

水解。

同样的目的是碲(Te)衍生物, Te 与含有 β 氢原子至 Te 原子的乙烯基结合, 其中所述的乙烯基是脂环族或杂环的一部分, 可具有含氧基团, 优选地结合在芳香环状上, 其它价的 Te 与 e-标记报告子键合。环可以是香豆素、苯并恶嗪、四氢化萘等。

数个优选的可裂解连接及其裂解产物图解于图 10 A-F 中。噻唑的可裂解连接"-CH₂- 噻 唑 -(CH₂)_n-C(=O)-NH- 蛋白"显示在图 10A 中, 得到具有"-CH₂-C(=O)-NH-CHO"部分的电泳标记。优选地, n 在 1 至 12 范围内, 更优选地从 1 至 6。唑的可裂解连接"-CH₂-唑-(CH₂)_n-C(=O)-NH-蛋白"显示在图 10B 中, 得到具有"-CH₂-C(=O)O-CHO"部分的电泳标记。烯炔的可裂解连接(图 10C)与上面描述的电泳探针实施例"T-L-M-D"一起显示, 其中的 D 是荧光素染料。可裂解的烯炔连接也可用于其它实施例。图解的烯炔连接的裂解得到了"R-(C=O)-M-D"形式的电泳标记, 其中"R"可以是上面提供的电泳标记 E 的一般描述中的任何取代物。优选地, R 是供电子基团, 如 Ullman 等人, 美国专利 6,251,581; Smith 和 March, March's 高级有机化学: 反应, 机理, 和结构, 第五版(Wiley-Interscience, New York, 2001); 等。更优选地, R 是具有 1-8 个碳原子和 0—4 个杂原子的供电子基团, 杂原子选自 O、S 和 N。更好的, R 是 -N(Q)₂、-OQ、p-[C₆H₄N(Q)₂]、呋喃基、n-烷基吡咯基、2-吡啶基, 或类似物, 其中 D 是烷基或芳基。在图 10C 的烯炔可裂解连接的进一步说明中, 取代基"X"和"R"等同于上面描述可裂解连接 L 的结构式中的取代基"X"和"Y"。特别地, 图 10C 中的 X 优选吗啉代-OR'或-SR", 其中的 R'和 R"是具有 1 至 8 个碳原子和 0 至 4 个杂原子的脂肪族、芳香族、脂环族或杂环, 杂原子选自 O、S 和 N。图 10D 图解了"-(CH₂)₂-S-CH(C₆H₅)C(=O)NH-(CH₂)_n-NH-"形式的优选硫醚可裂解连接, 其中 n 在 2 至 12 范围内, 更优选地在 2 至 6 范围内。图 10D 中显示的硫醚可裂解连接类型可以经由图 10E 和 10F 中显示的前体化合物附着在结合部分 T 和电泳标记 E 上。为附着结合部分 T 的氨基, 采用常规的化学将末端羟基转变为 NHS 酯。在与氨基反应并附着后, Fmoc 保护基团被去除以产生随后与 e-标记的 NHS 酯起反应的游离胺, 像由图 1、2 和 4 的亚铁血红素产生的化合物那样, 除了最后的反应步骤是添加 NHS 酯而不是氨基磷酸酯基团。

电泳标记 E 是对活性核素特别是单态氧稳定的水溶性有机化合物, 并包含检测或报告子基团。另外, E 的大小和结构可很大地变化。优选地, E 携带一个中性 pH 电荷, 分子量范围从大约 150 至大约 10,000 道尔顿, 更优选地, 从大约 150 至大约 5000 道尔顿, 更优选地, 从大约 150 至 2500 道尔顿。E 的优选结构更充分地描述于下。优选地, 检测基团产生一个电化学、荧光或发色的信号。最优选地, 检测基团产生荧光信号。本发明的组合物包括多个电泳标记, 可一起使用来实现本发明的多重检测。优选地, 一个组合物中的多个电泳标记至少是 5 个, 更优选地至少 10 个。还更优选地, 数量范围从 5 至 200, 更优选地, 从 5 至 100, 或 5 至 75, 或

从 5 至 50, 或从 10 至 30。优选地, 在多元组合物的电泳标记中, 就同一多元体中的其它成员而言, 每一个具有或者独特的电荷/质量比和/或独特的光学特性。优选地, 光学特性是荧光特性如放射谱、荧光寿命, 或类似特性。更优选地, 荧光特性是放射谱。例如, 多元体的每一个电泳标记可具有相同的荧光发射特性, 但每一个由于独特的电荷/质量比而彼此不同。另一方面, 多元体的两个或以上的电泳标记可具有相同的电荷/质量比, 但它们具有独特的荧光特性如光谱可辨发射光谱, 使得多元体的所有成员可以联合电泳分离和荧光检测而区分。

优选地, 多元体中的电泳标记通过电泳分离和荧光进行检测。优选地, 具有实质上相同荧光特性的电泳标记具有不同的电泳迁移率, 使得分离条件下在一个电泳图谱中形成截然不同的峰。邻近峰的差异或缺少重叠的测量标准是电泳分辨率, 它是邻近峰最高值之间的距离除以两个峰标准差的较大者的 4 倍。优选地, 邻近峰的分辨率至少为 1.0, 更优选地至少 1.5, 最优选地至少 2.0。在特定的分离和检测系统中, 所需的分辨率可以通过选择多个电泳标记而获得, 电泳标记的成员具有的电泳迁移率至少有一个峰分辨率值的差异, 其量依赖于普通技术人员熟知的几个因素, 包括信号检测系统、荧光部分的特性、标记的散射系数、有或没有筛选基质、电泳设备的种类如有或无泳道、分离泳道的长度, 等。优选地, 本发明的多个电泳标记通过常规的毛细电泳设备分离, 或者有或者没有常规的筛选基质。实例的毛细电泳设备包括 Applied Biosystems (Foster City, CA) 310, 3100 和 3700 型; Beckman (Fullerton, CA) P/ACE MDQ 型; Amersham Biosciences (Sunnyvale, CA) MegaBACE 1000 或 4000; SpectrmMedix 基因分析系统; 等。优选地, 在这种常规设备中, 多个电泳标记的电泳迁移率至少有一个百分比的差异, 更优选地, 至少百分之 1 至 10 范围内的百分比。

电泳迁移率与 $q/M^{2/3}$ 成比例, 其中 q 是分子上的电荷, M 是分子的质量。期望在测定条件下最近电泳标记间的迁移率差异至少是大约 0.001, 通常是 0.002, 更通常地至少大约 0.01, 并可以是 0.02 或以上。

优选的电泳标记 E 的结构是 (M, D), 其中 M 是迁移率修饰部分, D 是检测部分。符号 "(M, D)" 用来表示 M 和 D 部分的顺序可以是任一部分都能邻近可裂解的连接 L。即, "T-L- (M, D)" 指定任何两种形式的电泳探针: "T-L-M-D" 或 "T-L-D-M"。

检测部分 D 可以是荧光标记或染料, 发色的标记或染料, 电化学标记, 或类似物。优选地, D 是荧光染料。实例的用于本发明的荧光染料包括水溶性的若丹明染料, 荧光素, 4,7-二氯荧光素, 苯并氧蒽染料, 和能量传递染料, 公开在以下文献中: 分子探针和研究试剂手册, 第 8 版, (Molecular Probes, Eugene, 2002); Lee 等人, 美国专利 6,191,278; Lee 等人, 美国专利 6,372,907; Menchen 等人, 美国专利 6,096,723; Lee 等人, 美国专利 5,945,526; Lee 等人. Nucleic Acids Research, 25: 2816-2822 (1997); Hobb, Jr., 美国专利 4,997,928; Khanna 等人, 美国专利 4,318,846; Reynolds, 美国专利 3,932,415; Eckert 等人, 美国专利 2,153,059; Eckert 等人, 美国

专利 2,242,572; Taing 等人, 国际专利公开物 WO 02/30944; 等。进一步特殊的实例荧光染料包括 5-和 6-羧基若丹明 6G; 5-和 6-羧基-X-若丹明, 5-和 6-羧基四甲基若丹明, 5-和 6-羧基荧光素, 5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二甲氧基-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 1',2',7',8'-二苯并-4',5'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 2',7'-二氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素, 和 2',4',5',7'-四氯-5-和 6-羧基-4,7-二氯荧光素。最优选地, D 是荧光素或荧光素衍生物。实例的本发明使用的最优选的染料显示在图 6A 和 6B 中。

M 一般是具有或被设计有特殊电荷/质量比的化学基团或部分, 因而在规定的电泳系统中有特殊的电泳迁移率。迁移率修饰部分的实例类型在下面讨论。在一组电泳探针中, 每个独特的迁移率修饰剂被指定为 M_j , 其中 $j=1$ 至 n , n 的值如上所述。迁移率修饰部分可考虑包括质量修饰区和/或电荷修饰区或作为质量和电荷修饰区的单个区。在本发明中使用的探针组中, 迁移率修饰部分可有以下一种或多种特征: (i) 由于质量而非电荷的变化具有独特的电荷/质量比; (ii) 由于质量和电荷的改变具有独特的电荷/质量比; 和(iii)独特的电荷/质量比在大约-0.0001 和大约 0.5 之间, 通常大约-0.001 和大约 0.1 之间。如上提到的, D 典型地在一组或多个不同的电泳探针间是共同的, 但在探针组之间也可以不同, 产生释放 e-标记的独特电泳迁移率。

迁移率修饰部分 M 的大小和组合物在一个链中的变化可以从一个键到大约 100 个原子, 通常不超过大约 60 个原子, 更通常地不超过大约 30 个原子, 其中的原子是碳、氧、氮、磷、硼和硫。一般地, 当除外一个键时, 迁移率修饰部分具有从大约 0 至大约 40 个杂原子, 更通常地从大约 0 至大约 30 个, 除上面说明的杂原子外可包括卤素或其它杂原子。除氢以外总的原子数一般少于大约 200 个原子, 通常少于大约 100 个原子。在存在酸基的地方, 依赖于迁移率修饰部分所在介质的 pH, 各种阳离子可与酸基相连。该酸可以是有机或无机的包括羧酸、硫逐羧酸、硫羧酸、羟氨酸、磷酸、亚磷酸、麟酸、亚麟酸、磺酸、亚磺酸盐、硼酸、硝酸、亚硝酸, 等。对于正电荷, 取代基包括氨基(包括铵)、磷、铈、钇, 等, 其中取代通常是 1-6 个碳原子的脂肪族, 每个杂原子的总碳原子数目通常少于大约 12, 通常少于大约 9。侧链包括胺类、铵盐类、包括酚基的羟基、羧基、酯类、酰胺类、磷酸盐类、杂环类。M 可以是具有相同或不同化学特征的不同单体的同型寡聚体或异型寡聚体, 如核苷酸和氨基酸。

尽管可以有电荷的组合, 但带电荷的迁移率修饰部分通常仅有负或正电荷, 特别是在迁移率修饰部分附着区域是带电荷的且迁移率修饰部分具有相反电荷时。迁移率修饰部分含有可为寡聚作用提供不同功能基的单独单体并携带一个电荷, 或可以使用两个单体, 一般地是两个单体。可以使用取代的二醇, 其中的取代物是带电荷的和二元酸。举例说明的这种寡聚体是二醇或二氨基的联合如 2,3-二羟

基丙酸、2,3-二羟基琥珀酸、2,3-二氨基琥珀酸、2,4-二羟基戊二酸,等。二醇或二氨基化合物可以通过二元酸连接,其二元酸包括上面说明的无机二元酸,以及如草酸、丙二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、碳酸等的二元酸。不使用酯类,可以使用酰胺类,其中可以使用氨基酸或二胺和二酸。可选择地,可用亚烷基或芳香烃基团连接羟基或胺。

通过使用含有取代基的单体来提供电荷,或它可被修饰来提供电荷,可以提供具有所需电荷/质量比的迁移率修饰部分。例如,通过使用丝氨酸或苏氨酸,可以用磷酸盐修饰羟基以提供负电荷的迁移率修饰部分。对于精氨酸、赖氨酸和组氨酸,提供了正电荷的迁移率修饰部分。用常规的方式可完成寡聚作用以提供适当大小的迁移率修饰部分。不同的迁移率修饰部分具有不同的寡聚体序列,通常具有1至20个单体单位,更通常地大约1至12个,其中一个单位是指可有1-2个不同单体的重复性单位。对大部分来说,寡聚体可与其他核酸靶结合区一起使用。单体单位的多功能基在可用于结合其它部分的末端提供了功能基,使得可以用可获得的反应功能基来提供不同的功能基。例如,可以用氨基乙基硫醇与羧基起反应,以用同激活烯烃反应的硫醇功能基替换羧基。

就使用大约1至大约3个电荷的单体来说,可以应用低数目的单体并用来根据分子量的变化而改变迁移率。特别感兴趣的是有大约2至4个功能基的聚羧酸多元醇,每个功能基如酒石酸、2,3-二羟基对苯二酸、3,4-二羟基邻苯二甲酸、 Δ^5 -四氢-3,4-二羟基邻苯二甲酸,等。为提供另外的负电荷,这些单体可用二元酸寡聚化,如用磷酸衍生物以形成磷酸二酯。可选择地,羧酸能与二胺一起使用以形成聚酰胺,同时羟基可被用来形成酯类如磷酸酯,或醚类如羟基乙酸醚,等。为改变迁移率,可以使用各种分子量不同的脂肪族基团,如聚亚甲基、聚乙二醇、聚卤脂肪族或芳香族基团、多羟基化合物如糖类,其中迁移率将改变至少大约0.01,更通常地至少大约0.02,更通常地至少大约0.5。

在另一个方面,(M,D)部分是从产生组合文库所用的化学骨架中构建的。例如,以下文献描述用于产生不同迁移率修饰部分的骨架化合物:类肽(PCT公开物 WO 91/19735, 1991年12月26日),编码的肽(PCT公开物 WO 93/20242, 1993年10月14日),随机生物寡聚体(PCT公开物 WO 92/00091, 1992年1月9日),苯并二氮杂革(美国专利第5,288,514),diversomeres如乙内酰脲、苯并二氮杂革和二肽(Hobbs DeWitt, S.等人, Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 90: 6909-6913 (1993), vinylogous多肽(Hagihara 等人, J. Amer. Chem. Soc. 114: 6568 (1992)), 具有 β -D-葡萄糖骨架的非肽拟态肽(Hirschmann, R.等人, J. Amer. Chem. Soc. 114: 9217-9218 (1992)), 小化合物文库的类似有机合成(Chen, C.等人, J. Amer. Chem. Soc. 116: 2661 (1994)), 寡氨基甲酸盐(Cho, C. Y.等人, Science 261:1303 (1993)), 肽酰磷酸酯类(Campbell, D. A.等人, J. Org. Chem. 59:658 (1994)); Cheng 等人, 美国专利 6,245,937; Heizmann 等人, "黄嘌呤作为分子多样性的基础" Mol. Divers. 2: 171-174 (1997); Pavia 等人, Bioorg. Med.

Chem., 4: 659-666 (1996); Ostresh 等人, 美国专利 5,856,107; Gordon, E. M. 等人, J. Med. Chem. 37: 1385 (1994); 等。优选地, 在此方面, D 是骨架上的取代物, M 是骨架的其余部分。

仍在另一个方面, (M, D)部分构建自一种或多种相同或不同的常见或商业获得的连接、共轭连接和标记试剂, 使之易于组装, 特别是使用商业化的 DNA 或肽合成仪全部或部分的合成。在此方面, (M, D)部分由通常经磷酸二酯和酰胺键连接的亚单位组成。作为举例, 前体包括但不限于, 二甲氧基三苯甲基(DMT)保护的己乙烯乙二醇氨基磷酸酯, 6-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 12-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)十二烷基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 2-[2-(4-单甲氧基三苯甲基)氨基乙氧基]乙基-(2-氰基乙基), N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, (S-三苯甲基-6-硫己基)-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 5'-荧光素氨基磷酸酯, 5'-六氯-荧光素氨基磷酸酯, 5'-四氯-荧光素氨基磷酸酯, 9-O-二甲氧基三苯甲基-三乙烯乙二醇, 1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 3(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 5'-O-二甲氧基三苯甲基-1',2'-二脱氧核糖-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 18-O 二甲氧基三苯甲基己乙烯乙二醇, 1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 12-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)十二烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1,3-双-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊氨基]丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊氨基]-3-[5-苄醇甲氧基羰基氧戊氨基]-丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙烷氧甲基]乙基-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 琥珀酰亚胺反-4-(马来酰亚胺甲基)环己胺-1-羧基酯(SMCC), 琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP), 琥珀酰亚胺乙酰硫代乙酸酯, 德克萨斯红-X-琥珀酰亚胺酯, 5-和6-羧基四甲基若丹明琥珀酰亚胺酯, 双-(4-羧基哌啶基)磺酸基若丹明二(琥珀酰亚胺酯), 5-和6-((N-(5-氨基戊基)氨基羰基)四甲基若丹明, 琥珀酰亚胺 4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐(SMPB); N-γ-马来酰亚胺丁酰-氧化琥珀酰亚胺酯(GMBS); p-硝基苯基碘代醋酸酯(NPIA); 4-(4-N-马来酰亚胺苯基)丁酸酐(MPBH); 和类似试剂。上述试剂可从商业渠道获得, 如从 Glen Research(Sterling, VA), Molecular Probes(Eugene, OR), Pierce Chemical, 和类似的试剂供应者。在常规合成方案中使用上述试剂是本领域熟知的, 如 Hermanson, 生物共轭技术(Academic Press, New York, 1996)。特别是, M 可从以下试剂构建: 二甲氧基三苯甲基(DMT)保护的己乙烯乙二醇氨基磷酸酯, 6-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)己基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 12-(4-单甲氧基三苯甲基氨基)十二烷基-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, 2-[2-(4-单甲氧基三苯甲基)氨基乙氧基]乙基-(2-氰基乙基), N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸酯, (S-三苯甲基-6-硫己基)-(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)-氨基磷酸

酯, 9-O-二甲氧基三苯甲基-三乙烯乙二醇, 1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 5'-O-二甲氧基三苯甲基-1',2'-二脱氧核糖-3'-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 18-O 二甲氧基三苯甲基己乙烯乙二醇, 1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 12-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)十二烷基-1-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1,3-双-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊酰胺]丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 1-[5-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)戊氨基]-3-[5-苄醇甲氧基羰基氧戊酰胺]-丙烷基-2-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 三-2,2,2-[3-(4,4'-二甲氧基三苯甲氧基)丙烷氧甲基]乙基-[(2-氰基乙基)-(N,N-二异丙烷基)]-氨基磷酸酯, 琥珀酰亚胺反-4-(马来酰亚胺基)环己烷-1-羧基酯(SMCC), 琥珀酰亚胺 3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP), 琥珀酰亚胺乙酰硫代乙酸酯, 琥珀酰亚胺 4-(p-马来酰亚胺苯基)丁酸盐 (SMPB); N-γ-马来酰亚胺丁酰氧化琥珀酰亚胺酯(GMBS); 对-硝基苯基碘代醋酸酯(NPIA); 和 4-(4-N-马来酰亚胺苯基)丁酸酐(MPBH)。

M 还可以包括通过已知的多聚体亚单位合成方法制备的多聚体链。形成选择长度的含聚乙烯氧化物链的方法是熟知的, 如 Grossman 等人, 美国专利 5,777,096。可以理解的是, 这些涉及规定大小的多亚单位多聚体单位直接地或经连接基团彼此联结的方法可应用与各种广泛的多聚体, 如聚醚(如, 聚乙烯氧化物和聚丙烯氧化物), 聚酯(如, 聚羟基乙酸, 聚乳酸), 多肽, 寡糖, 聚氨酯橡胶, 聚酰胺, 聚磺酰胺, 聚亚砷, 聚磷酸酯, 以及其嵌段共聚物包括由多亚单位组成的多聚体, 亚单位通过带电荷或无电荷的连接基团连接。除同型多聚体外, 按照本发明使用的多聚体链包括选择长度的共聚物如, 聚乙烯氧化物单位与聚丙烯单位交替的共聚物。作为另一个实例, 选择长度的多肽和氨基酸组合物(即, 含有天然存在的或人造氨基酸残基), 作为同型多聚体或混合的多聚体。

在另一个方面, (M,D)的检测部分通过能量传递机制产生荧光信号。优选地, 在此方面, D 是"D₁-g-D₂"形式, 其中 D₁ 和 D₂ 是分子的受体-供体对, 如 Wu 等人, Anal. Biochem., 218: 1-13 (1994), g 是保持 D₁ 和 D₂ 在实质上固定距离的刚性连接剂。刚性连接剂 g 的选择指导可在以下文献中找到, We 等人(上面引用的) 和美国专利 5,863,727; 5,800,996; 5,945,526; 和 6,008,379。D₁ 或 D₂ 可以是受体而另一个是成对物中的分子供体。作为举例, 本发明使用的能量传递检测部分公开于: Lee 等人, 美国专利 5,945,526; Lee 等人, Nucleic Acids Research, 25: 2816-2822 (1997); Taing 等人, 国际专利公开物 WO 02/30944; 和类似文献。优选地, 刚性连接剂 g 的选择使 D₁ 和 D₂ 间的距离保持在实质上固定的 10-100 埃的范围内。在连接对单态氧稳定的限定条件下, 可使用各种广泛的连接基团。优选地, D₁ 和 D₂ 选自以下系列: 荧光素, 若丹明, 若丹明 6G, 若丹明 110, 若丹明 X, 四甲基若丹明, 及其卤化衍生物。更优选地, D₁ 和 D₂ 都是荧光素染料。

在一个方面, g 可以选自 $R_1-R_2-R_1$ 和 $R_1-R_2-C(=O)-X_1-R_3$ 的任一个, 后者存在于 D_1 和 D_2 的任一方向; 其中 X_1 是 O、S 或 NH; R_1 是 $(C_1-C_5 \text{ 烃二基}, X_1, C(=O))$ 使得括号中任何的 1-3 个部分以任意的线性顺序排列; R_2 是选自以下基团的 5 至 6 个成员的环: 环戊烯, 环己烯, 环戊二烯, 环己二烯, 呋喃, 吡咯, 异吡咯, 异唑, 吡唑, 异咪唑, 吡喃, 吡喃酮, 苯, 吡啶, 哒嗪, 嘧啶, 吡嗪, 恶嗪, 茚, 苯并呋喃, 硫茚, 吲哚和萘; R_3 是 C_1-C_5 烃二基。

在优选的方面, 释放后, 电泳标记 E 被定义为如下结构式:

A-M-D

其中:

10 A 是 $-C(=O)R$, 其中 R 是具有 1 至 8 个碳原子和 0 至 4 个杂原子的脂肪族、芳香族、脂环族或杂环, 杂原子选自 O、S 和 N; $-CH_2-C(=O)-NH-CHO$; $-SO_2H$; $-CH_2-C(=O)O-CHO$; $-C(=O)NH-(CH_2)_n-NH-C(=O)C(=O)-(C_6H_5)$, 其中 n 的范围从 2 至 12;

D 是荧光染料;

15 M 如上所述, 条件是 A-M-D 的总分子量在大约 150 至大约 5000 道尔顿范围内。

在优选的方面, D 是荧光素, 如上面所述并图解于图 6A 和 6B, 且 A-M-D 的总分子量在大约 150 至大约 2500 道尔顿范围内。

在另一个优选的方面, D 是如上所述的 " D_1-g-D_2 " 形式。

20 在一些实施例中, e-标记部分不需要带电荷而仅仅在质量上不同。因此, 可以使用相同或相似的单体, 其中的功能基应是中性或被制成中性的, 如羧酸的酯类和酰胺类。同样, e-标记部分可以通过同位素取代而改变, 如 2H 、 ^{18}O 、 ^{14}C , 等。

许多的电泳标记可包括寡肽以提供电荷, 特别是 2-6 个单体的寡肽, 通常是 2-4 个单体, 或者由赖氨酸、精氨酸和组氨酸得到正电荷, 或者由天冬氨酸和谷氨酸得到负电荷。当然, 不一定使用天然存在的氨基酸, 而是非天然的或合成的氨基酸如牛磺酸、磷酸盐取代的丝氨酸或苏氨酸、S- α -琥珀酰半胱氨酸, 二元胺和氨基酸的联合寡聚体, 等。

在本发明的一个实施例中, 给予电荷部分常规地主要由氨基酸组成, 但也可包括硫代酸和其它具有 1-5 个碳原子的羧酸。给予电荷部分每部分可有大约 1 至 30 个氨基酸, 优选地大约 1 至 20 个, 更优选地大约 1 至 10 个, 也可包括大约 1 至大约 3 个硫代酸或其它羧酸。但是, 当与无电荷亚区一起使用时, 带电荷亚区一般会有大约 1 至大约 4 个氨基酸, 常常是大约 1 至大约 3 个。如上面提到的, 可以使用任何天然存在和合成的氨基酸。

在特殊实施例中, T-L-M-D 可被描绘成如下结构式:

35 T-L-(氨基酸) $_n$ -L'-荧光剂

其中 L' 是一个键或除氢以外 1 至 20 个原子的连接基团, n 为 1 至 20, L 是与多

肽结合部分连接的可裂解连接。在此实施例中, T 通过可裂解连接与末端氨基酸连接。此实施例的一个例子, 作为例子并不限于, 荧光剂是荧光素, L' 是酰胺连接形式的键, 涉及荧光素后的羰基和赖氨酸的末端氨基, T 是多肽结合部分。

根据这种标记共轭体的电泳标记实例可描绘如下:

5 荧光素-(CO)NH-(CH₂)₄-NH-(氨基酸)_n

其中中性 pH 下特定化合物的结构式和电荷列于表 2 中。

表 2

No.	(氨基酸) _n	电荷 (q)	分子量 (M)	$q/M^{2/3}$
1	n 一个	-1	446	-.0178
2	赖氨酸	-1	591	-.0148
3	(赖氨酸) ₂	中性	737	.0128
4	丙氨酸	-2	534	-.0298
5	天冬氨酸	-3	578	-.0423
6	(天冬氨酸) ₂	-4	711	-.0491
7	(天冬氨酸) ₃	-5	844	-.0877
8	(天冬氨酸) ₄	-6	977	-.0595
9	(天冬氨酸) ₅	-7	1110	-.0638
10	(天冬氨酸) ₆	-8	1243	-.0675
11	(天冬氨酸) ₇	-9	1376	-.0710
12	丙氨酸-赖氨酸	-2	680	-.0253
13	天冬氨酸-赖氨酸	-2	724	-.0243
14	(天冬氨酸) ₂ -赖氨酸	-3	857	-.0325
15	(天冬氨酸) ₃ -赖氨酸	-4	990	-.0393
16	(天冬氨酸) ₄ -赖氨酸	-5	1123	-.0452
17	(天冬氨酸) ₅ -赖氨酸	-6	1256	-.0503
18	(天冬氨酸) ₆ -赖氨酸	-7	1389	-.0549
19	(天冬氨酸) ₇ -赖氨酸	-8	1522	-.0590
20	(天冬氨酸) ₈ -赖氨酸	-9	1655	-.0627
21	(赖氨酸) ₄	+2	1029	.0192
22	(赖氨酸) ₅	+3	1170	.0264

其中 q 是电荷, M 是质量, 迁移率与 $q/M^{2/3}$ 成比例。

- 10 在另一个实施例中, 迁移率修饰部分 M 依赖使用亚烃基或芳香烃基(包括具有大约 1—2 个脂肪族区和大约 1—2 个芳香族区的二价脂肪族基团, 芳香族区通常是苯), 其中大约 2 至大约 16 个碳原子, 更通常大约 2 至大约 12 个碳原子的基团可以被取代或未取代, 通常是未取代的, 其中迁移率修饰部分可将相同或不同

5 的荧光剂连接到单体单位如核苷酸上。迁移率修饰部分可终止于以酯或酰胺形式存在的羧基、羟基或氨基中。通过改变荧光团上的取代基可以改变至少大约 5 个单位或以上的质量,通常至少大约 9 个单位,以在毛细电泳中获得满意的分离。为提供进一步的改变,可使用硫代琥珀酰亚胺基团在氮和硫上加入亚烷基或芳香烃基,使得碳原子的总数目可以在大约 2 至 30 范围内,更通常是大约 2 至 20。除了或与上述基团联合,为增加亲水性,可以使用烯氧基。

除了迁移率修饰部分的特性以外,如已经说明的那样,可通过标记的化学和光学特性,使用能量传递复合体,改变影响迁移性的迁移率修饰部分的化学特性如折叠、与溶剂和溶剂中的离子相互作用等获得多样性。在发明的一个实施例中,10 迁移率修饰部分可以是寡聚体,其中迁移率修饰部分可在一个支持物上被合成,或通过在合适的宿主中克隆或表达而产生。多肽可方便地被合成,其中除了一个端基,仅有一个半胱氨酸或丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸,天冬氨酸/谷氨酸,或赖氨酸/精氨酸/组氨酸,因此是被差异地功能化的独特功能基。通过使用保护性基团,可以将侧链功能基与末端氨基酸功能基区分开。而且,通过适当的设计,可以在迁移率修饰部分不同位点上存在的相同功能基之间提供优选的反应。是否使用合成15 或克隆来制备寡肽,在根本的程度上依赖于迁移率修饰部分的长度。

取代的芳香基基团可作为质量和电荷修饰区。许多功能基可被取代至芳香基团如苯基上,以对 e-标记报告子提供质量或电荷。芳香基可以是仅需要一个连接功能基的末端基团,使游离羟基可被酰化,可以作为侧链附着在 e-标记报告子链20 的羟基上,或可以具有两个功能基,如可用来形成亚磷酸酯的酚式羟基,和其他取代基如卤素、卤烷、硝基、氰基、烷氧羰基、硫代烷基等,其中这些基团可以是带电荷或不带电荷的。

可以使用本领域熟知的共扼技术制备标记结合物。可以从具有功能基团的更小分子合成 M,这些功能基团通常在线性链上用来连接分子和另一个分子。这样的功能基团包括羧酸、胺和羟基或硫醇基团。根据本发明,给予电荷的部分具有25 核心链伸出的一种或多种侧链基团。侧链基团具有一个功能基,以连接标记或给予电荷部分的另一个分子。从所使用的功能基团的反应中得到的普通功能基的实例是在要被结合的分子之间形成共价键。这样的功能基是二硫化物、酰胺、硫代酰胺、双硫醇、乙醚、尿素、硫脲、胍、偶氮、硫醚、羧酸盐、和含硫和磷的酯和酰胺如磺酸盐、磷酸酯、磺胺、硫酯等,和类似物。30

e-标记部分组分的连接如上所述。可检测部分和迁移率修饰部分之间的连接一般对致裂解部分的作用是稳定的,使得在 e-标记报告子从 e-标记探针中被裂解出来的过程中,迁移率修饰部分和可检测部分可作为一个完整的单位从 e-标记探针中释放出来。

35 大概地,迁移率修饰部分可以是连接键,此时可检测部分或标记直接结合于靶结合部分,或是链中大约 1 至大约 500 或更多原子的连接,普遍为大约 1 至大

约 300 个原子, 更普遍的是大约 2 至 100 个原子。在这个实施例中, 链中原子的总数目依赖于识别被测定的所有靶标所需要的多样性实际程度。迁移率修饰部分的链大概地包括碳、氮、氧、磷、硼和硫。许多取代基可存在于迁移率修饰部分上, 它们可以是天然存在的, 是天然存在单体的一部分, 或通过合成被引入。可能在链上存在的功能基包括酰胺、磷酸酯、乙醚、酯类、硫醚、二硫化物、硼酸酯、硫酸酯等。侧链包括胺, 铵盐, 包括酚基的羟基, 羧基, 酯类, 酰胺, 磷酸盐, 杂环特别是氮杂环如核苷碱基和氨基酸侧链如咪唑和喹啉, 硫醚, 硫醇或其他基团以改变电泳标记的迁移性。

迁移率修饰部分可以是一个同型寡聚物或异型寡聚物, 具有相同或不同化学特性的不同单体, 如核苷酸和氨基酸。在一个实施例中, e-标记部分将含有一个连接子, 可在迁移率修饰部分和可检测标记分子之间提供连接, 通常是荧光剂, 或可含有用于连接可检测标记分子的功能基。通过含有可分别与可检测标记分子连接的不同功能基, 提高了电泳标记多样性的机率。使用加入至不同功能基中的不同荧光剂, 不同的荧光剂可提供电泳标记在发射光和电荷-质量比例上的差异。

将多个电泳标记附着到结合部分上

在涉及多肽的检测中, 单个靶分子的结合反应释放多个 e-标记报告子是有益的。在某种情况下, 这样可导致信号的扩增。期望从每个结合反应中释放的 e-标记报告子的数目为大约 6×10^3 至大约 6×10^{10} , 优选 6×10^4 至大约 6×10^8 。当多肽结合部分具有多数的附着位点时, 例如抗体, 在抗体上有多数的结合位点可附着 e-标记部分。当 e-标记探针的多肽结合部分与多肽结合, 第一个结合剂的一个结合部分与多肽上的诱导结合位点结合, 并因此可将致裂解部分带入至可裂解的连接附近时, 多数的 e-标记报告子被释放进行单个多肽参与的结合反应。例如, e-标记部分附着在一个抗体上可在每个抗体分子上产生大约 2 至大约 10 个分子的 e-标记部分。

为了进一步增加释放的 e-标记报告子的数量, e-标记部分可裂解地附着在主干上, e-标记探针的多肽结合部分也可以相对持久的方式附着在主干上。对于含有多数附着位点的多肽结合部分, 多数的主干被附着在多肽结合部分上, 其中每个主干具有多数的要释放的 e-标记部分。因此, 主干的核心是一个多功能物质, 正常是聚合的, 含有多数的功能基团, 如羟基, 氨基, 巯基, 羧基, 乙烯基, 醛等, 作为连接位点。主干上的功能基应该是那些与 e-标记部分上功能基, 或要被附着的多肽结合部分反应的基团。优选一些功能基, 因为它们可抵抗不希望的侧链反应中的掺入作用。主干的核心可以是水溶性和水不溶性的。主干核心普遍至少大约 35,000 分子量, 可以是大约 1000 万或更大的分子量, 但普遍大约为 600,000 以下, 更普遍的是在大约 300,000 以下。实例的主干核心包括多糖, 多肽, 多核苷酸, 离子交换树脂, 和类似物。在一个方面主干是一个有分支的连接子, 它有许多可附着 e-标记部分的多个位点。多位点连接子具有可附着多肽结合部分的一个附着

位点,和多数可附着多个 e-标记部分的位点。当然,e-标记部分必须通过连接键被附着,该连接键含有按照本发明可被致裂解部分裂解的功能基。

在一个实施例中,主干核心是亲水性聚合物,一般是加成化合物或浓缩聚合物,含有多个功能基可附着多个部分。可用作本发明反应剂的一类聚合物包括多
5 糖聚合物。可使用的多糖如葡聚糖,琼脂糖,多聚核糖,和类似物。其他类型的聚合物可来自被取代的乙烯或丁二烯型单体的加合聚合作用,包括短链未饱和单体,包括丙烯,其中这些单体含有取代基,这些取代基是亲水基团,或被衍化为亲水基团。可附着在乙烯上的合适的亲水基团包括羟基,羧基和酯类及其酰胺,胺,和类似物。如果使用丙烯酸单体,该酸可在聚合之前或之后被衍化为合适的
10 反应基团。因此,例如乙二醇和丙烯酸形成的酯可为衍化作用向 e-标记探针的成分中提供羟基基团。其他合适的聚合物包括聚丙烯胺盐和乙醇,例如聚乙烯乙醇。除了使用来自单个单体的聚合物,也可使用混合的聚合物。在这种情况下,通过非反应成分如聚乙二醇可提供亲水性,然后进一步聚合成单体,单体上含有合适的功能基团可与 e-标记探针的成分反应。这样的聚合物是聚乙二醇和聚乙烯醇的共聚物。主干的一个特殊的实例是葡聚糖,其中在每个葡聚糖分子上可附着
15 大约 10 至大约 300 个分子的 e-标记部分。

可使用颗粒来增加 e-标记探针上存在的 e-标记部分的数目。颗粒可以是固体(如由有机和无机聚合物或乳胶组成),油滴(如碳水化合物,碳氟化合物,液体硅),或囊泡(如合成的如磷脂或天然的如细胞和细胞器)。固体颗粒正常为聚合物,加合
20 或浓缩聚合物,可很容易的分散在测定介质中。e-标记部分通过与本发明一致的可裂解的连接与颗粒连接。采用这种方式,大约 100 至 10^5 个 e-标记部分可被连接至一个单个颗粒上。通常颗粒含有至少一个附着在其上的多肽结合部分。向颗粒上附着多个葡聚糖分子和通过上面讨论的可裂解连接将多个 e-标记部分连接至葡聚糖上,也包含在本发明的范围内。

在本发明的 e-标记探针的一个特殊实施例中,多肽结合部分是抗体。可使用许多不同的反应来将化合物共价附着在抗体上。这已经通过抗体分子的氨基酸残基反应而完成,这些残基包括赖氨酸的胺基团,谷氨酸和天冬氨酸的游离羧酸基团,半胱氨酸的巯基基团,和芳香族氨基酸的许多部分。与抗体的结合可以是随机的或位点定向的。为了进行位点定向结合,连接子或迁移率变化的部分可以任
25 何方便的方式加入至靶结合部分的单位中,如抗体的 Fc 部分或铰链区的二硫化物。为了随机结合,可使用抗体的胺基团(如 N-末端或赖氨酸)。可选择地,可使用羧酸酯基团(如, C-末端,天冬氨酸,谷氨酸)。其他的实例包括巯基。在与抗体结合中的主要考虑是保留抗体的识别特性或特异性和活性。

与抗体附着的特殊方法是已知的。这样的一种方法是将一种化合物的羧基(或
35 氨基)基团连接至抗体的氨基(或羧基)基团上的碳化二亚胺反应。另外,双功能剂如二醛或酰亚胺酯已经用来将一种化合物的氨基基团连接至抗体分子的氨基基团

上。在另一种方法中，希夫氏反应用来将化合物连接至抗体分子上。这种方法包括被连接化合物的高碘酸盐过氧化，该化合物含有乙二醇或羟基基团，因此可形成醛，后者然后与抗体分子反应。通过形成希夫氏碱发生与抗体分子氨基基团的附着作用。而且，异氰酸盐已经用作将化合物与抗体共价结合的偶合剂。与氧化的抗体或氧化的抗体片段反应的合适连接子包括含有选自以下基团的胺类：伯胺，仲胺，胍，酰胍，羟胺，苯胍，氨基脲和硫代卡巴胍基团。这样的反应功能基团可作为连接子结构的一部分存在，或可通过不含有这些基团的连接子的合适的化学修饰而被引入。

在一个特殊的方法中，含多糖链的抗体被氧化以产生反应性醛基。这样的氧化作用例如，可通过本领域已知的高碘酸盐来完成。主干分子，例如氨基-葡聚糖分子，含有通过可裂解连接而附着在其上的 e-标记部分，通过还原性氨化作用形成的仲胺键附着在抗体的醛基上。

相应地，在本发明中一种或多种主干分子可通过前述的方法之一附着在一个抗体上，以在本方法使用的条件下获得相对持久的连接。当然，与本发明一致，e-标记部分可通过可裂解的连接附着在主干上或通过这种可裂解连接直接附着在抗体上。通过第一个结合剂和含有抗体的 e-标记探针结合多肽，将 e-标记探针带到致裂解试剂的附近，多个 e-标记报告子可被释放以进行随后的检测，并判断多肽的存在或多肽存在的量。

如在此所使用的，术语“俘获配体”是指典型地包括在 e-标记探针的靶结合部分中的基团，它能够特异地结合“俘获剂”或受体。这样一种俘获配体和相应俘获剂之间的相互作用可用来从释放的 e-标记报告子中分离未裂解的 e-标记探针。如果需要，报告子可用来物理性的分离与其结合的分子，完全去除含有多肽结合区的完整 e-标记探针或含有配体的修饰多肽结合区。这些修饰的多肽结合区可能是由于起始物质的降解、制备和异常裂解过程中的污染，或是多肽结合部分的其它非特异性降解产物。如上，以生物素为例的配体附着于多肽结合区，以便在裂解时与 e-标记报告子分离。

可以使用配体的受体。这样的受体包括天然的或合成的受体，如免疫球蛋白，植物凝集素，酶等，亲和素等等。期望受体带有正电荷，天然的实例是亲和素，或通过添加正电荷部分或如铵基团，碱性氨基酸等部分来制成。亲和素可与检测探针附着的生物素和其降解产物结合。亲和素是正电荷的，而被裂解的电泳标记是负电荷的。因此从未裂解的探针以及其降解产物中分离裂解的电泳标记，可很容易的通过常规的分离方法而完成。可选择地，受体可与固体支持物或高分子量巨分子，如容器壁，颗粒如磁性颗粒，纤维素，琼脂糖等结合，可通过物理分离或离心，透析等被分离。这种方法进一步增强了检测的特异性，可进行更高程度的多重检测。

一般情况下，如果多肽结合部分的特性允许，可以有两个配体。如上所述，

一个配体可用来整合与多肽结合区连接的 e-标记部分, 从缺少第一个配体的产物中保留第一个配体。然后可以分离和浓缩与缺少第一个配体的修饰多肽结合区结合的 e-标记部分。在使用两个配体的过程中, 首先可将反应混合物与第一个配体的第一个受体结合, 以去除保留了第一个配体的多肽结合区。可从组合物中分离第一个受体或在组合物中如所述保留第一个受体。然后可将得到的组合物与第二个受体结合, 其中组合物中含有第一个配体的多肽结合区与第一个受体结合, 其中第二个受体可用来分离或富集缺少第一个配体但保留第二个配体的修饰多肽结合区。第二个配体是可检测的标记; 可获得一个受体的小分子, 如一个半抗原或 e-标记探针的一部分可用作第二个配体。产物被分离或富集后, e-标记受体可通过受体变性、产物置换, 高盐浓度和/或有机溶剂等而被释放。

根据如上所述的 e-标记部分附着的试剂, 可以是单个的 e-标记部分或多个的 e-标记部分, 通常范围是从大约 1 至大约 10^5 , 更普遍的是从大约 1 至大约 300, 更特别地从大约 1 至大约 20, 根据是否使用主干或颗粒。与单个靶结合区结合的 e-标记部分的数目依赖于所需的敏感性、e-标记部分的溶解度、多个 e-标记部分对测定实验的影响等。

e-标记探针的合成

实施多种类型的合成法以形成给予电荷部分或作为肽链的迁移性调节物的化学在本领域是已知的。见例如, Marglin 等人, *Ann. Rev. Biochem.* (1970) 39:841-866。通常, 这样的合成法涉及用一种合适的保护基团阻断那些不参与反应中的功能性基团。然后游离的功能基团被反应形成所需的连接。如在 Merrifield 合成中在树脂上产生肽(Merrifield, *J. Am. Chem. Soc.* (1980) 85:2149-2154 和 Houghten 等人, *Int. J. Pep. Prot. Res.* (1980) 16:311-320)。然后按照已知的技术从树脂中去除肽。

可用来合成肽的许多技术的总结可见 J. M. Stewart 等人, “固相肽合成”, W. H. Freeman Co, San Francisco(1969); 和 J. Meienhofer, “激素蛋白和肽”, (1973), 第 2 卷, 46 页, 学术出版社(纽约), 进行固相肽合成; 和 E. Schroder 等人, “肽”, 第 1 卷, 学术出版社(纽约), 1965 进行溶液合成。

通常, 这些方法包括连续添加一种或多种氨基酸, 或合适的被保护的氨基酸至一个正在延伸的肽链。正常情况, 适当的保护基团可保护第一个氨基酸的氨基或羧基。被保护或衍化的氨基酸然后可附着在惰性的固体支持物上或在溶液中使用, 通过在适合形成酰胺连接的条件下, 加入含有被适当保护的互补(氨基酸或羧基)基团的序列中的下一个氨基酸。保护基团然后从新加入的氨基酸残基中去除, 然后加入下一个氨基酸(适当保护的)等等。所有需要的氨基酸被以正确的序列连接后, 任何残余的保护基团(和任何固体支持物)按顺序或同时被去除, 以获得最终的肽。如所需要的, 根据已知的方法依靠所使用的特殊保护基团, 去掉保护基团。例如, 保护基团的去除可通过用氢, 活性炭上的二溴化钡, 液氨中的钠等还原; 用三氟乙酸, 氢氟酸和类似物水解。

使用氨基磷酸酯合成 e-标记探针或相关的化学方法,可在文献中获得许多指导: 分子探针和研究产品手册,第8版(Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, 2002); Beaucage 和 Iyer, Tetrahedron, 48: 2223-35 2311 (1992); Moiko 等人, 美国专利 4,980,460; Koster 等人, 美国专利 4,725,677; Caruthers 等人, 美国专利 4,415,732; 5 4,458,066; 和 4,973,679;和类似文献。许多这些化学方法可使电泳探针的成分可很方便的在自动 DNA 合成仪中被合成,如 Applied Biosystems, Inc. (Foster City, California) 392 型或 394 DNA/RNA 合成仪或类似仪器。

作为迁移率修饰部分的一部分,含有核苷酸的 e-标记反应剂的合成,采用标准的氨基磷酸酯化学方法在固相上集合就可很容易的和有效的完成。得到的迁移率修饰部分可如上所述被连接至标记和/或多肽结合部分上。10

前面提到的标记结合物与不同的电泳迁移性可进行多个多肽的多重检测,所述多肽含有诱导的结合位点。当然,制备任何数目的标记结合物进行多重测定包括在本发明的范围内。

15 举例的电泳标记合成方法

一个合成方法的实例在图 1 中概述。从市售的 6-羧基荧光素开始,苯酚羟基基团可使用酸酐来保护。可使用,噻啉的异丁酸酐,但其他变异体也是同样合适的。重要的是要注意选择作为保护基团的酯类功能基的重要性。在氨基磷酸酯单体合成的过程中和寡核苷酸构建的过程中这些基团仍然是完整的。这些基团直至合成的寡链采用氨去保护时才被去除。在保护后,采用 DCC 作为耦合剂通过形成 N-羟基琥珀酰亚胺酯(NHS-酯)可在原位活化原料。DCU 副产物被过滤,加入氨基醇。许多氨基醇可从商业渠道获得,其中一些可从氨基酸还原而来。当氨基醇是“ $H_2N-(CH_2)_n-OH$ ”,n 的范围是从 2 至 12,更优选的是从 2 至 6。仅胺是反应性的,足以替换 N-羟基琥珀酰亚胺。在标准的提取程序中,可获得产物的 95%产量。20 这种物质被亚磷酸化产生氨基磷酸酯单体。为了合成其他的 e-标记部分,对称的双氨基醇连接子用作氨基醇(图 2)。同样,然后在亚磷酸化反应之前,仲胺与许多羧酸衍生物(实例是在图 3 中所示的几种可能的安息香酸衍生物)偶联。使用这种方法,几百甚至几千个具有不同电荷-质量比例的 e-标记部分在探针合成过程中很容易的被装配起来,探针的合成是采用标准的化学方法在 DNA 合成仪上进行。

30 可以选择地,采用一种可选择的策略可得到 e-标记部分,这种策略采用 5-氨基荧光素作为起始物质(图 4)。在大量的溶剂中向极度过量的二氯二酸中添加 5-氨基荧光素形成的单乙酰代产物较形成的二聚体占优势。苯酚基团在这些条件下是没有反应性的。水相的条件可将末端的酰基氯转变为羧酸。这种产物类似于 6-羧基荧光素,采用相同的系列步骤它可转变为其保护性的氨基磷酸酯单体。商业渠道可购得许多二氯二酸和二酸,后者采用 $SOCl_2$ 或乙酰氯可被转变为二氯二酸。35 这种方法是很有吸引力的,因为使用了第二个迁移率调节物。同样,如果获得了

10 个市售的修饰氨基磷酸酯和 10 个二氯二酸和 10 个氨基醇, 就有潜力获得 1000 个不同 e-标记部分。有许多市售的二氯二酸和氨基醇(图 5)。这些合成方法从理论上是适合组合化学的。

5 用图 1, 2 和 4 中的方案构建的电泳标记可进一步在亚磷酸化之前或之后反应以便附着于可裂解的连接, 如采用如下所述的化学方法。

e-标记部分可被装配后, 在末端含有一个合适的功能基, 以便连接至多肽结合部分上。可使用多种功能基。因此, 正常存在于多肽中的功能基, 如羧基, 氨基, 羟基和硫醇, 它们是共价键的反应性功能基的靶标。根据连接基团的化学方法和多肽结合部分上功能基的有效性, e-标记部分可被连接。例如, 如上对多肽特异的
10 抗体及其片断如 Fab' 片断的描述, 硫醇基将用于使用活性烯烃, 如马来酰亚胺来形成硫醚。当使用赖氨酸时, 可使用能在水中反应的活化酯, 如硝基苯基酯或五氟苯基酯, 或与碳化二亚胺和半酯碳酸混合的酸酐。在文献中对结合作用有充足的化学方法, 因此对于每种特殊的情况, 在文献中结合作用均有充足的先例。

在一个举例的合成作用中使用了二醇。这种二醇的实例包括烯基二醇, 聚烯基二醇, 其中烯基的碳原子为 2 至 3 个, 烯基胺或聚(烯基胺)二醇, 其中烯基的碳原子为 2 至 3 个, 氮被取代, 例如封闭基团或烷基的碳原子为 1-6 个, 其中一个二
15 二醇被一个常规的保护基团封闭, 如二甲三苯甲基。这种基团可作为质量修饰区, 含有氨基的可作为电荷修饰区。如果需要, 质量修饰物可采用构建模块来装配, 该模块可通过氨基磷酸酯化学方法被加入。采用这种方式, 电荷修饰物置于质量调节物之间。例如, 可制备含有 1, 2, 3, n 个单位的系列聚乙烯氧化物分子。为了引入多个负电荷, 可使用一个小的聚乙烯氧化物单位。质量和电荷修饰区可通过含有多个已被添加磷酸单位的聚乙烯氧化物单位而被构建。可选择地, 通过使用大的间隔区, 可存在更少的磷酸基团, 因此可实现较大差异的质量/电荷比例而没有大的质量差异。

25 使用的化学方法是用于寡核苷酸合成的常规化学方法, 其中使用构建模块而不是核苷酸, 但反应是常规的氨基磷酸酯化学法, 构建模块是常规的二甲基三苯甲基。当然, 其他适合自动合成仪的化学方法也可使用。但是, 需要尽量简化该过程的复杂性。

如上所述, 在一个实施例中, 主干核心通常是一个亲水聚合物, 可允许多个
30 部分附着的具有多个功能基的一个加合或浓缩聚合物。可用于本发明的反应剂的一类聚合物包括多糖聚合物, 如葡聚糖, 琼脂糖, 聚核糖, 聚木糖和类似物。例如, 主干可以是葡聚糖, 多个 e-标记报告子以与本发明一致的可裂解的方式附着其上。葡聚糖的一些醛部分被保留, 并可用于通过还原性氨化作用将葡聚糖分子附着于寡核苷酸上的氨基基团上。在另一个实例中, 使用葡聚糖作为主干核心,
35 葡聚糖被琥珀酸酐封闭, 得到的物质通过形成酰胺被连接于含胺的寡核苷酸。

除了连接子和迁移率修饰部分的特性, 如已经指明的那样, 其他的变化包括

荧光剂的化学和光学特性，形成能量传递复合体，可影响迁移率的连接子化学特性，如折叠的变化，与溶剂的相互作用和溶剂中的离子，以及类似因素。如已经说明的那样，在一个实施例中，连接子是一种寡聚物，其中连接子在一个支持物上被合成或通过在一个合适的宿主中通过克隆或表达而产生。多肽可方便地被产生，其中仅有一个半胱氨酸或丝氨酸/苏氨酸/酪氨酸，或赖氨酸/精氨酸/组氨酸，而不是一个末端基团，因此是一个独特的功能基，在功能上是有差别的。通过使用保护性基团，可以从末端氨基酸功能基中鉴别出侧链功能基。通过合适的设计，也可以在连接基团上不同位点上存在的相同功能基之间提供优选的反应。是否使用合成或克隆制备寡肽将在很大程度上依赖于连接子的长度。

- 10 对于 20 个不同的 e-标记报告子，仅有 5 个不同的质量修饰区，需要一个可裂解的连接和 4 个不同的可检测区。对于 120 个 e-标记报告子，仅需要 10 个不同的质量修饰区，3 个不同的电荷修饰区和 4 个不同的可检测区。对于 500 个不同的 e-标记报告子，仅需要 25 个不同的质量修饰区，5 个不同的电荷修饰区和 4 个不同的可检测区。

15 使用 e-标记反应剂的方法

下面对方法的总体描述和特殊实验的实例是为了解释而不是限制。在本领域中的专业技术人员将能够应用这里的技术以大多数实验的形式用于任何分析物质的测定实验中，这些形式对于专业技术人员，特别是在蛋白测定和化学遗传学领域是很浅显的。

- 20 在实施这些测定中，各种组分，即样品，第一个反应剂和电泳探针，可在测定介质中以任何顺序被组合在一起，通常是同时进行。可以选择地，一种或多种反应剂可与一种或多种剩余的反应剂组合在一起形成亚组合物。然后亚组合物被孵育。然后，剩余的反应剂或其亚组合物混合在一起，并孵育混合物。反应剂的量通常以经验确定。作为通常的规律，对于目的多肽所期望的最高的量，第一种反应剂和电泳探针至少以相同的量被应用，通常至少为大约 1.5 倍过量，更通常的是至少大约两倍的过量，可大约 10 倍过量或更多。各种成分在结合的条件下被组合在一起，通常在水介质中，通常 pH 的范围大约是 5 至大约 10，缓冲液的浓度范围是大约 10 至大约 200mM。这些条件是常规的，其中使用常规的缓冲液，如磷酸盐，碳酸盐，HEPES，MOPS，Tris，硼酸盐等，以及其他常规的添加物，如盐，稳定剂，有机溶剂等。水介质可以是单一的水或可包含从 0.01 至 80 或更多体积百分比的组合溶剂。

- 35 组合的反应剂被孵育一定时间和一定的温度，可允许进行大多数的结合反应。通常来说，在照射混合物或加入剩余反应剂之前，在所有或部分反应剂组合后孵育的时间为至少大约 5 分钟，更通常为至少大约 15 分钟。正常情况下在适度的温度下孵育，通常是固定的温度。孵育的温度正常范围从大约 5°至 99°C，通常从大约 15°至 70°C，更通常的是 20 至 45°C。在测定过程中温度通常的范围是大约

10°至 70°C, 更通常的是从大约 20°至 45°C, 更通常的是 20°至 25°C。

在适当的孵育时间后, 以及所有反应剂被组合形成一种化合物后, 混合物被处理以活化致裂解部分, 其中该化合物包含第一种反应剂或裂解诱导反应剂, 样品和电泳探针或 e-标记探针。当然活化的特性依赖于致裂解部分的特性。

- 5 提到的发明采用多种反应剂系统, 其中的结合作用可引起 e-标记部分的释放。致裂解部分的效应是通过物理, 化学或酶学方式建立或破坏结合键。含有多肽结合区的不同电泳探针或 e-标记探针的每种产物可被准确的检测, 以便能确定被诱导的结合位点参与的结合作用的发生。在结合作用后, 产生一种或多种反应产物, 它们可表现与 e-标记探针或反应产物衍生的探针不同的迁移性。E-标记的释放形式, 称为 e-标记报告子, 可表现与其衍生的 e-标记探针不同的迁移性和/或质量。10 本发明对筛选已知和未知物质提供了很高的变化性。可采用一种电泳装置以分离和检测 e-标记报告子。电泳装置可与从装置接收和处理数据以及操纵电泳装置的数据处理器连接。

- 该系统的基础是具有含有多个 e-标记反应剂的文库, 这些反应剂至少含有多个15 个不同的迁移率变化的部分, 以便可通过电泳采用迁移率修饰部分附着的实体来分离。迁移率修饰部分被保留在反应的产物中, 其中产物通过获得和/或丢失一个基团而被修饰, 与起始物质相比, 该基团改变了产物的质量, 也可改变产物的电荷。迁移率修饰部分通过可裂解的结合键被加入至多肽结合区上, 以便在被诱导的结合位点与第一个结合剂结合后释放迁移率修饰部分进行分析。

- 20 如上所述, 在其他的应用领域中, 本发明应用于翻译后修饰的领域。可以确定宿主细胞, 细胞器或类似物对与大量通路相关的化学和物理环境改变, 表面蛋白群的改变, 由于衰老, 新生物, 活化或其他天然发生现象而发生的变化的反应, 其中蛋白被定量。可应用的方法可以是异源的或同源的。正常情况下异源技术涉及一个分离步骤, 其中未结合的标记从结合的标记中被分离出来。在另一个方面, 25 均一性测定不需要, 但可采用一个分离步骤。

- 另外, 在许多异源测定中, 需要的是未结合的标记试剂可从结合的标记试剂中分离。可以通过许多种方法完成, 每种都需要一种与固体支持物结合的试剂, 可区分标记试剂和多肽的复合体。固体支持物可以是一种管壁, 如微量滴定板孔, 培养板孔, 毛细管, 培养板, 载波片, 小微珠, 包括磁微珠, 脂质体或类似物。30 固体支持物的基本特性是它可从未结合探针中分离出结合的已标记特异结合者, 而且支持物不干扰结合复合体的形成, 也不干扰测定的其他操作。

- 固体支持物可以是与支持物直接或间接结合的复合体。对于直接的结合, 可含有与支持物共价或非共价结合的第一种试剂或 e-标记探针。表面被多种功能基活化, 将与第一种试剂形成共价键。这些基团包括卤代亚胺, 活化的羧基基团, 35 如混合酸酐或卤代酰基, 氨基, α -卤代或 pseudohaloketones 等。与支持物表面结合的特异结合者可用来与复合体的一员结合。

通常，以异源的方式，未结合的标记试剂或 e-标记探针将通过冲洗结合材料而被去除。当使用颗粒或小微珠，在冲洗之前，它们可通过过滤，离心，磁性分离等从上清液中被分离出来。冲洗后，支持物与一种液体置于一起，e-标记报告子可被释放至其中和/或 e-标记部分的功能基与可检测的标记反应，然后释放或之前被释放。根据可裂解的结合键的特性和裂解的方法，液体包含任何进行裂解的其他试剂。当不需要裂解的试剂时，该液体可方便的用作电泳缓冲液。例如，当可裂解的连接是对光不稳定的，介质可用合适波长的光照射以释放 e-标记报告子。当可检测的标记不存在于 e-标记部分上时，e-标记报告子可与可检测的标记反应。在一些实例中，可检测的标记是能切断可裂解结合键的试剂的一部分，如含硫醇的二硫键。当在不同的结合者上有多个不同的功能基可与标记反应，不同的标记含有与一种功能基反应的功能基。不同的标记可一起被加入或以连续的方式逐个加入。例如，当功能基包括硫醇，羧基，醛或烯烃，标记可分别是活化的烯烃，乙醇，胺和硫醇基。在一种或多种功能基中包含可去除的保护性基团，保护性基团可逐步被去除，逐步加入标记。以这种方式可避免交叉反应。最初是否存在可检测的标记或加入可检测的标记对本发明并不重要，多肽本身是否通过致裂解部分或多肽和第一种试剂，以及电泳探针的特性而被裂解经常是起主要作用的。

在一些实施例，e-标记报告子需要从试剂溶液中分离，其中该试剂可干扰电泳的分析。根据 e-标记报告子和试剂的特性，可将 e-标记报告子从试剂中通过使用离子交换柱，液体色谱，初始电泳分离等方法而分离。可选择的是，如前面所述，可含有一种俘获配体，它可与 e-标记部分或靶结合区的保留部分结合以分离 e-标记报告子，以便去除混合物中任何干扰组分。一旦制备了 e-标记报告子的溶液，去除任何干扰组分，溶液就可用电泳分析。可采用毛细电泳装置，微液装置或其他可电泳分离多个化合物的装置进行分析，可呈现出每个 e-标记报告子的可分辨区带。

优选地，根据本发明可以同源的方式进行测定。主要的均一性测定的方法一般根据类似的异源测定的步骤。这些方法采用一种信号产生系统，包括 e-标记探针的标记，有些情况下可能有与 e-标记探针或多肽相关的可裂解结合键，电磁辐射或反应中涉及的或为了消除背景信号的其他试剂。在涉及产生单态氧的实验中，希望在溶液中含有可降解减少其寿命的过氧化氢的一种分子，以便避免在结合和未结合的含标记试剂产生的过氧化氢之间的反应。

通常，信号产生系统涉及的多种试剂的浓度将根据要分析的样品中每个多肽的浓度范围而变化，通常范围为大约 10nM 至大约 10mM。缓冲液通常使用的浓度范围是大约 10 至大约 200mM。每种多肽的浓度一般范围是大约 1pM 至大约 100 M，更通常的范围是大约 100pM 至大约 10 M。在特殊的情况下，浓度可更高或更低，依赖于分析物的特性，相互结合者的亲和力，e-标记报告子释放的效率，e-标记报告子检测的敏感性，和多肽的数目以及其他因素。

根据本发明的一个方面，在多重反应中可监测一组多肽。在这种情况下，与多种多肽对应的多个 e-标记探针对可在一个反应容器中，在一定的条件下与样品混合，在所述的条件下，当每种多肽与结合剂结合，介质被处理产生单态氧时，e-标记报告子从试剂中被释放。e-标记报告子被标记进行检测或通过 e-标记部分上存在的反应性功能基加入标记。反应中的已标记 e-标记报告子在电泳装置上可与另一个区分开，在它们离开检测仪后再次被监测。在此系统中可能的多重检测水平仅受分辨率的程度限制，该分辨率可从电泳装置上指定的一组 e-标记报告子之间获得。

经过 e-标记部分被标记的时期后，实验可有另外一些灵活性。如上所述，当被引入反应中时，每种 e-标记部分均已经含有一个可检测标记。可以选择地，e-标记部分可含有一个功能基，它可使其在与样品的反应完成后结合于一个标记。在本实施例中，含有与可检测标记结合的 e-标记探针与样品混合在一起。如果在样品中存在靶多肽，在修饰 e-标记探针迁移性的反应后，在样品容器中，其他的试剂也可与第一个反应的产物混合在一起，该产物与修饰的 e-标记报告子反应以加入可检测的标记。

为了定量，可以选择使用对照，可根据存在或被引入的靶标的数量提供信号。通过向每个样品在电泳分离 e-标记报告子之前添加已知数量的荧光基团可获得对照物，使相对的荧光信号转变为绝对数量。任何不干扰 e-标记报告子信号检测的荧光基团可用于荧光信号的标准化。对照的信号优选含有的电泳迁移率与样品中任何 e-标记报告子不同，可具有相同或不同的发射波长。实例的荧光分子包括 ROX, FAM 和荧光素。

根据本发明实验的一个实例涉及一种多肽磷酸化的检测。样品中含有细胞物质，翻译后修饰是特殊多肽的磷酸化，所述多肽被指定为靶多肽。样品与第一个试剂结合，该试剂含有与结合有金属离子的金属亲和剂连接的光敏剂。如果存在磷酸化的靶多肽，磷酸基团与金属-金属亲和剂复合体结合。电泳探针与上述的反应混合物结合。电泳探针含有靶多肽的抗体，它可裂解的连接于一个 e-标记报告子。可裂解的连接包含一个可被单态氧切断的部分。加入电泳探针和并孵育适当的时间后，反应混合物用光照射以激发光敏剂，产生单态氧。可裂解的部分被单态氧切断，因为可裂解部分靠近光敏剂，称为单态氧的活性成分，保留了足够活性切断可裂解部分，释放 e-标记报告子。电泳探针不与靶多肽结合，因为靶多肽不存在或电泳探针过量，或与多肽结合的电泳探针未磷酸化，它不能产生裂解的 e-标记报告子，因为单态氧的活性寿命很短，由于存在磷酸化的靶多肽而不结合第一个试剂的任何电泳探针中的可裂解部分不能产生裂解的 e-标记报告子。释放的 e-标记报告子由于不同的迁移性被分离，由于有检测部分而被检测，所述的检测部分仍然附着在 e-标记报告子的迁移率修饰部分上。释放的 e-标记报告子的存在和/或量说明了靶多肽的存在和/或量。

本发明发现了在靶多肽的多重测定中的特殊应用。根据本发明的这个方面，测定方法的一个实例涉及检测多个多肽的磷酸化。样品中含有细胞物质，翻译后修饰是被指定为靶多肽的几种多肽的磷酸化。样品与含有光敏剂的第一个试剂结合，所述光敏剂与结合有金属离子的金属亲和剂连接。第一个试剂是一种特殊类型的试剂，因为它可与反应混合物中的任何磷酸基团结合。如果存在磷酸化的靶多肽，磷酸基团与金属-金属亲和剂复合体结合。多个的电泳探针与上述的反应混合物结合在一起。每种电泳探针都含有特殊靶多肽的抗体，一个 e-标记报告子可裂解的连接于其上，所述的 e-标记报告子对特殊的靶多肽是唯一的。可裂解的连接含有可被单态氧裂解的部分。加入电泳探针，并孵育合适的时间后，反应混合物被光照射以激发光敏剂，产生单态氧。可裂解部分可被单态氧切断，因为可裂解的部分紧靠光敏剂，称为单态氧的活性成分，保留了足够的活性切断可裂解部分并从所有与靶多肽结合的电泳探针中释放 e-标记报告子，所述的靶多肽与特殊类型的试剂结合。此外，不与靶多肽结合的电泳探针，因为以上的原因不能产生裂解的 e-标记报告子，所述的靶多肽与特殊类型的试剂结合。释放的 e-标记报告子由于不同的迁移率被分离，并由于有检测部分而被检测出来，所述的检测部分仍然保持与 e-标记报告子的迁移率修饰部分附着。每个释放的 e-标记报告子的存在和/或量说明了每个靶多肽的存在和/或量。以这种方式，多种细胞通路可实时被研究。蛋白磷酸化和去磷酸化反应可被研究以了解关于代谢调节和信号转导通路的更多信息。上述的方法可在细胞周期中的不同时间被重复以追踪细胞的演变。

本发明的另一个应用是检测靶多肽的多个磷酸化作用。例如，期望了解是否多肽已经被单磷酸化，双磷酸化或更多的磷酸化。根据本发明的这个方面，实验的一个实例涉及检测靶多肽磷酸化的程度。含有细胞物质的样品，与第一个试剂结合在一起，该试剂含有与一个主干分子连接的多个光敏剂分子，金属亲和剂的多个分子和结合的金属也连接在主干分子上。通过特殊类型试剂的适当滴定，靶多肽的磷酸化水平可被确定。如果存在磷酸化的靶多肽，磷酸基团与金属-金属亲和剂复合体结合。电泳探针与上述的反应混合物结合在一起。电泳探针包含特殊靶多肽的抗体，后者可裂解的连接 e-标记报告子，所述的报告子对特殊的靶多肽是唯一的。可裂解的连接含有单态氧可裂解的部分。在添加电泳探针，并孵育适当的时间后，反应混合物用光照射以激发光敏剂，产生单态氧。可裂解的部分可被单态氧切断，因为可裂解的部分紧靠光敏剂。称为单态氧的活性成分仍然保留了足够的活性以切断可裂解部分，并从与靶多肽结合的电泳探针中释放 e-标记报告子，所述的靶多肽可与特殊类型的试剂结合。此外，不与靶多肽结合的电泳探针，因为以上的原因不能产生裂解的 e-标记报告子，所述的靶多肽与特殊类型的试剂结合。释放的 e-标记报告子由于不同的迁移率被分离，并由于有检测部分而被检测出来，所述的检测部分仍然保持与 e-标记报告子的迁移率修饰部分附着。每个释放的 e-标记报告子的存在和/或量与加入的确定靶多肽磷酸化水平的特殊类

型试剂的量有关。

采用本发明来确定靶多肽上磷酸化的位置或磷酸化位点。根据本发明这个方面的一个实验的实例，含有细胞物质的样品，与第一个试剂结合在一起，所述的试剂含有一种化学蛋白酶，并与结合有金属离子的金属亲合剂连接在一起。如果
5 存在磷酸化的靶多肽，磷酸基团与金属-金属亲合剂复合体结合。化学蛋白酶可通过光照射而活化，位点特异的裂解发生在靶多肽上，后者的磷酸基团结合在金属亲合-金属复合体上。裂解的产物表现为独特的部分，或 e-标记部分，例如可直接通过电分离法进行分析。另一方面，一种或多种电泳探针可与上述的反应混合物结合，为独特的部分提供检测部分。每种电泳探针都包含裂解部分的抗体，检测
10 部分附着在上面。E-标记报告子由于不同的迁移率被分离，由于有附着的检测部分而被检测。E-标记报告子的存在显示了靶多肽的磷酸化位点。

根据本发明，实验的另一个实例涉及多个多肽糖基化的检测。样品含有细胞物质，翻译后修饰是被指定为靶多肽的几个多肽的糖基化。样品与第一个试剂结合，该试剂含有与含硼酸试剂结合的光敏剂。第一个试剂是一种特殊类型的试剂，
15 因为它可结合存在于反应混合物中的任何碳水化合物部分。如果存在糖基化的靶多肽，碳水化合物基团与含硼酸试剂结合。每种电泳探针都含有特殊靶多肽的抗体，它可裂解的连接于一个 e-标记报告子上，所述的 e-标记报告子对特殊靶多肽是唯一的。可裂解的连接含有可被单态氧切断的部分。在加入电泳探针，并孵育一段时间后，反应混合物被光照射以激发光敏剂，产生单态氧。可裂解的部分被
20 单态氧切断，从所有与靶多肽结合的电泳探针中释放 e-标记报告子，所述的靶多肽与特殊类型的试剂结合。此外，不与靶多肽结合的电泳探针，因为以上的原因不能产生裂解的 e-标记报告子，所述的靶多肽与特殊类型的试剂结合。释放的 e-标记报告子由于不同的迁移率被分离，并由于有检测部分而被检测出来，所述的检测部分仍然保持与 e-标记报告子的迁移率修饰部分附着。每个释放的 e-标记报告子的存在和/或量分别显示了每个靶多肽，如糖基化多肽的存在和/或量。上述的方法可在细胞周期中的不同时间被重复以追踪细胞的演变。

本发明具有广泛的应用，可研究细胞信号通路包括，通过例证而非限制，MAP 激酶通路，Ras/ERK MAPK 通路，INK/SAFE；和其他 MAPK 通路，NF-kB 和背侧通路，NF-AT 双重信号通路，淋巴细胞功能的调节，T 细胞抗原受体信号转导，
30 多重信号转换器和转录激活物，细胞分裂周期校验点和类似通路。

有丝分裂原激活的蛋白激酶(MAPK's)可产生并可解释生长因子和细胞因子受体信号转导中的细胞事件。MAP 激酶(也称为细胞外信号调节蛋白激酶，或 ERK)是三个激酶级联中的终端酶。对于相关但不同的信号通路，三激酶级联的顺序反复就可形成对 MAPK 的认识，它可作为在一个通路中连续作用的一种调节物，多
35 功能信号元件，其中每个酶磷酸化，因此可激活顺序中的下一个成员。最近对所有真核生物中保守的不同的 MAPK 级联的鉴别表明 MAPK 组件已经用于解释细胞

外信号的不同排列。酶的 MAPK 超家族是中心交换器的重要成分，该交换器与多种细胞外和细胞内介质产生的进入信号是相匹配的。在 MAPK 组件中酶的特异磷酸化和活化可将信号传递至级联反应中，引起许多在细胞中有重要调节功能的蛋白的磷酸化，包括其他蛋白激酶，转录因子，细胞骨架蛋白和其他酶 (Cobb 等人，
5 Promega Notes Magazine (1996) 59:37,等等)。

其他类型的实验涉及光敏剂与细胞的关联，例如研究翻译后修饰，可改变和/或控制它们所结合的蛋白的功能和/或表达的小分子，采用已知的小分子鉴别新的蛋白，筛选特征性的靶标，如激酶，肽类等，筛选，蛋白功能类型的筛选实验以鉴定新靶标如激酶，磷酸酶，DNA-或 RNA 结合蛋白，肽类，蛋白酶等。例如，
10 被认为与目的靶标结合的小分子可与光敏剂分子结合，形成小分子-光敏剂复合体。可结合多个目的靶标的抗体分子将用不同的 e-标记部分标记，形成 e-标记-抗体复合体。然后通过形成 e-标记-抗体：靶标：小分子-光敏剂复合体检测特殊靶标的存在与否，并定量。抗体和小分子与靶标的相连将使 e-标记部分与光敏剂靠近，使 e-标记报告子释放。光敏剂可与小分子，肽，抑制剂，脂类，碳水化合物，寡核苷
15 酸和类似物附着。光敏剂也可附着在微生物或细胞的表面上，这些微生物或细胞具有上述任何结构，使人能够检测两个细胞的细胞表面分子之间的相互作用。对于细胞表面的研究，光敏剂通过与特殊的细胞表面部分附着而与细胞相连，或非特异性的掺入至细胞膜中，其中光敏剂游离扩散在细胞膜中。

激酶相互作用的特殊测定法可例证被开发的许多类型的测定方法。特殊的激酶相互作用可采用夹心测定的方式来研究。例如，第一个抗激酶抗体用 e-标记部分标记，第二个与磷酸化分子结合的抗体将用光敏剂标记。在形成免疫复合体后，e-标记部分通过用适当波长的光照射后被释放，然后通过毛细电泳分离。在另一种形式中，可研究有多种特异性的激酶。抗激酶抗体用相同的光敏剂标记(如，光敏剂₁-抗激酶₁，光敏剂₁-抗激酶₂，光敏剂₁-抗激酶₃，等)，而特异激酶底物或抑制剂将用特异的 e-标记部分来标记(如，底物₁-e-标记₁，底物₂-e-标记₂，底物₃-e-
25 标记₃，等)。结合复合体将稳定或暂时形成。在照射和电泳分离后，产生多种特殊的图谱显示同时被测定的被选择激酶靶标的多种水平。一旦建立了一种信号图谱，多种药物，处理的效应或遗传改变可根据这种方式的变化而被检测到。

将本发明用于蛋白学的实例见图 7。在这个实施例中，实验首先要溶解细胞样品。在细胞溶解物中的所有蛋白用致裂解部分标记。标记可在每个蛋白上至少获得一个致裂解部分。如图 7 显示，蛋白用抗蛋白配体(APL)进行检测，APL 可以是一种受体或抗体。APL 用特异的 eTag 报告子分子通过可裂解的连接标记；每个配体含有一个与其有关的独特的 eTag 报告子。结合后，致裂解部分被活化释放不同的报告子(Y)。致裂解部分和可裂解的连接必须紧靠以便释放 e-标记报告子。然后报告子经毛细电泳分离，并定量。此技术可以均一性测定形式对蛋白，小分子，
35 酶底物和细胞表面受体进行多重定型。

蛋白细胞功能的测定一般需要一种改变功能的手段。一种途径是遗传法，涉及在编码蛋白的基因中使用灭活或活化的突变。灭活包括删除或敲除的途径，活化或过度表达包括癌基因的途径。其他的途径包括使用可改变与它们结合的蛋白功能的小分子。存在能够灭活或活化蛋白功能的配体。已经证明一些天然产物，
5 基因敲除产物可获得特异性(Schreiber, 生物有机化学和医用化学, 6 (1998) 1127-1152; Stockwell 等人, 化学和生物学, 6 (1999) 71-83)。小分子的天然产物可以几种方式协助阻断细胞周期事件中的复合体网络, 例如通过俘获细胞周期中的特异时间点阻遏使细胞群体同步化。一旦形成了特异的结合相互作用, 可渗透细胞的天然产物可用来阐明活细胞中其靶蛋白的功能。一些天然的产物可抑制从静
10 止状态向为 G1 转变状态的转变中所需的信号转导通路。小分子可影响翻译后的事件如蛋白糖基化, 甲基化, 脂化, 异戊烯化, 泛素化, 磷酸化和乙酰化。

在细胞经历活动性增殖, 静止状态或 G0 期过程中, 可进入和退出细胞周期, 其中细胞的基本代谢被抑制, 包括许多通常的活性功能如转录和蛋白的合成。去除生长因子可使细胞退回至静止状态, 而用生长因子刺激可将引导细胞重新进入
15 活动的周期中。细胞也可退出细胞周期, 经历分化过程或程序性细胞死亡(凋亡)。负责驱动细胞周期从一个时期进入下一个时期的元件是一系列能互相活化和灭活的蛋白激酶和磷酸酶。细胞周期蛋白依赖的激酶负责磷酸化细胞周期进程中关键的多种底物。细胞周期蛋白依赖激酶的水平在细胞周期中是不变的, 但它们活性的调节是通过与称为细胞周期蛋白的另外一组蛋白的相互作用, 它们的水平是波
20 动变化的。另外, 在细胞浆膜上的许多受体是酪氨酸激酶, 它们在活化过程中可启动细胞内的信号转导通路, 该通路的终点是细胞的增殖。

本发明的方法和试剂可很好的适合上述的分析。多个的小分子可使其同源的靶标的功能丧失, 这些同源物包括激酶, 磷酸酶, 膜受体, 蛋白酶, 异戊烯转移酶和聚合酶。本发明的结果是, 可在细胞内的环境中研究蛋白的功能。目标蛋白
25 可被定量。对下游蛋白如细胞周期蛋白水平的影响可采用本发明的试剂进行研究。根据细胞周期蛋白的表达来测定活化和灭活的细胞周期蛋白依赖的激酶 (Cdk's)。Cdk-细胞周期蛋白复合体也可被定量。信号转导通路可使用本试剂来研究。

G1 期是关键点, 在此点细胞可决定是否进入另一轮分裂。在 G1 进程中的蛋白在人类癌症中经常是突变的, 也是令人瞩目的治疗性药物的靶标。期望仅考虑
30 早期 G1 期或晚 G1 期以确定是治疗性药物的化合物。目前, 方法是在评价化合物中仅考虑细胞增殖或细胞死亡。所涉及的多个时期在图 8 中描述。

在一个例证的实施例中, 细胞生长在一个合适容器如孔的底部。细胞被固定后, 可通过根据本发明的筛选方法探查特定的抗原。光敏剂试剂可被用来掺入细胞膜中, 或可以选择地, 含光敏剂的光敏剂试剂附着于针对抗原或细胞表面上一
35 类蛋白的抗体上。在此可使用 e-标记试剂, 其中抗原的抗体通过可裂解的连接与一个 e-标记部分连接。在掺入细胞膜或与可能存在的与抗原结合的条件下, 光敏

剂试剂被加入至合适介质上的固定细胞中。然后加入 e-标记探针, 如果可能, 则在抗原的抗体与抗原结合的条件下处理介质。下一步, 光敏剂用如光照射来激活, 例如, 产生单态氧, 仅在抗原存在于细胞上时切断 e-标记探针上可裂解的连接, 将可裂解的连接引入至细胞膜上光敏剂的附近。然后检测介质中释放的 e-标记报告子, 其存在表明了抗原的存在。采用多个 e-标记报告子可在同一个时间筛选多个抗原, 每个探针都含有一个通过可裂解连接与一个 e-标记部分相连的特殊抗原的特异抗体, 所述的 e-标记部分含有一个迁移率修饰部分, 它可将 e-标记报告子与由可能存在的其他抗原产生的其他 e-标记报告子区分开。经过上述步骤后, 介质提交至分离的步骤, 其中 e-标记报告子由于不同的迁移率而被分离。以这种方式可研究细胞中的蛋白表达。

以如上所述的方式进行的实验的假定结果在图 9A, 9B 和 9C 中图解。这些是理论上以细胞为基础的测定, 可同时监测 Cdk 的水平(采用 Olomoucine 标记的释放诱导剂, 如光敏剂)和细胞周期蛋白 A-E。电泳探针试剂可采用一种表达蛋白的特异抗体, 其中一种或多种独特的 e-标记可释放的连接于每个抗体。就图 9A 而言, 对于对照细胞, 即缺少待测化合物的细胞, 可获得 8 个峰, 代表 Cdk2, Cdk6, Cdk4, Cdc2 和细胞周期蛋白 A, D, E 和 B。当待测化合物引起早期 G1 停滞(图 9B), 可获得 3 个峰, 称为 Cdk6, Cdk4 和细胞周期蛋白 D。当待测化合物引起晚期 G1 停滞(图 9C), 可获得 5 个峰, 称为 Cdk2, Cdk6, Cdk4, 细胞周期蛋白 D 和细胞周期蛋白 E。在两个化合物的处理中, 被测化合物可能是治疗患者的一种有效药物。

其他的测定涉及使用可逆的蛋白共价修饰的调节物的小分子文库来研究蛋白的翻译后调节。制备一组探针, 其中每个 e-标记探针含有修饰或未修饰状态的蛋白的抗体, 可与在该组探针中独特的 e-标记部分可裂解的连接。光敏剂试剂被掺入至细胞中, 在细胞膜中, 胞浆中或其他适当的位置上。然后探针在合适的反应容器中与细胞结合在一起。每个文库中的小分子被分别加入至容器中。液体介质然后如上所述被照射。每个容器中的液体介质被处理以分离和鉴定 e-标记报告子。一种或多种 e-标记报告子的存在与每个小分子调节蛋白的共价修饰的能力有关。

在研究蛋白翻译后修饰的另一个方法中, 制备一组 e-标记探针, 其中一个小分子文库与每个 e-标记探针的 e-标记部分可裂解的连接。在适当容器中的细胞用光敏剂试剂处理, 将光敏剂插入至合适的细胞位置中。整组 e-标记探针, 或其部分在一定条件下加入至容器中, 其中小分子可发生期望的蛋白修饰。仅有这些参与目的修饰作用的小分子可将可裂解的连接带到光敏剂附近。容器中的液体介质被处理以分离和鉴定 e-标记报告子。一种或多种 e-标记报告子的存在与每个小分子调节蛋白的共价修饰能力有关。

以上述的方式, 根据小分子可改变的细胞事件的级联反应来研究蛋白通路, 小分子可作为抑制剂, 激活剂, 潜力药物, 激素, 酶辅因子或其他类型的调节因子。研究小分子对基因表达和蛋白功能的影响, 因此可使用小分子来鉴定新的蛋

白。小分子的应用可象基因敲除一样是特异性的。本发明可用于发现可立即改变功能的小分子，不能用于传统的遗传学中。可采用小分子来控制蛋白的功能，用于筛选实验中，如激酶筛选，肽筛选，对激酶，肽类，蛋白酶，GPCR 等的随机筛选。使用本试剂可进行细胞周期阻滞剂的小分子抑制剂的筛选实验。

- 5 根据本发明使用电泳探针的另一种方法在图 11 中进行描绘。细胞膜显示在其表面上含有包括受体 R 的多个受体。加入与受体 R 特异结合的抗原，如果存在受体 R，抗原与其以及辅因子 Co 结合。酶 Ea 与上述的复合体结合，然后激活 Ea，将 P1 转化为其磷酸化产物 P1a。激酶 P2 与 P1a 结合形成活性的复合体。这种系统可用于筛选活性复合体的抑制剂，如小分子或药物。相应地，这种测定的试剂包
- 10 括作为抑制剂被筛选的每个分子，其中每个分子与释放诱导剂结合。电泳探针是复合体的抗体(Ab)，如复合体的 P1a 的抗体，其中抗体可释放的连接于多个电泳部分。如果被筛选的其中一个分子结合并抑制复合体的活性，释放诱导剂则被带入至电泳探针的附近，e-标记部分被释放，检测和/或定量。

- 上述的方法也可用于筛选与特殊受体有结合活性的蛋白。在这种与图 11 图表
- 15 一致的方法中，可使用具有非常明确靶标的药物。根据与受体 R 结合的蛋白，如果仅存在一种或多种这样的靶标，就能检测到 e-标记报告子。如已经见到的，本发明的方法有多种，整体上是已知的和未知的。

- 图 11 图表的变化在图 12 中进行描绘。在这个实施例中，释放诱导剂是抗体 Ab1，它可与 P2a 和 P1a 的活性复合体特异结合。电泳探针是抗体 Ab2，多个 e-
- 20 标记部分可释放的连接在上面。可研究配体 L 与细胞表面上受体 R 结合的能力。如果 L 不与 R 结合，将形成 P2a 和 P1a 的活性复合体。抗体 Ab1 和 Ab2 与活性复合体结合，将可释放的连接带到紧靠释放诱导剂的附近。E-标记报告子被释放，检测和定量。

- 图 13A 描绘了蛋白-蛋白相互作用的假设实例，涉及多个磷酸化事件，本方法和组合物可用于其中。在这个图解中，小分子可促进蛋白-蛋白的结合。FRAP 可来自营养素和有丝分裂原与细胞表面上受体的相互作用。如在图 13A 中所见到的，FKBP 蛋白与 FRAP(结合事件 1)在雷帕霉素的存在下结合，产生 4E-BP1，它参与了 mRNA 翻译起始的控制。PP2A 是 FRAP 激活的激酶(结合事件 2)，在 calyculin-A 的存在下产生 p70S6K，引起 S6 蛋白结合(结合事件 5)。后者蛋白也参与了 mRNA
- 30 翻译起始的控制。细胞表面上的另一个受体，RTK 被生长因子作用产生激酶 PI3K。在渥曼青霉素的存在下，PI3K 被转变为 PDK1 (结合事件 6)，产生 p70S6K，形成 S6 蛋白。PDK1 也产生 PKB(结合事件 3)，反过来产生 FRAP(结合事件 4)。图 13B 中的图表显示了测定的结果，其中没有药物存在，或其中存在渥曼青霉素，雷帕霉素或 Calyculin，每一种都与释放诱导剂结合，使用一种含有抗体的电泳探针，
- 35 所述抗体是与一个电泳部分连接的参与一个结合事件中可释放的其中一个蛋白的抗体。上述的通路有助于了解所涉及的多个结合事件，一种或多种这些结合事件

中的抑制剂，一种或多种结合事件中的竞争剂，激酶活性的调节剂等。采用本发明的方法和试剂，上述的一种或多种物质可在单个测定中采用多个电泳探针来进行监测。

反应产物的分析

5 电泳的方法是为人们熟知的，其描述，例如见 Krylov 等人, Anal. Chem., 72: 111R-128R (2000); P.D. Grossman 和 J.C. Colburn, 毛细电泳: 理论和实践, Academic Press, Inc., NY (1992); 美国专利 5,374,527; 5,624,800; 5,552,028; ABI PRISM 377 DNA 测序仪用户指南, Rev. A, 1995 年 1 月, 第 2 章(Applied Biosystems, Foster City, CA); 和类似文献。多种合适的电泳介质包括非交联的介质, 可自商业渠道中从
10 Applied Biosystems 和其他销售商获得, 采用自动仪器如 Applied Biosystems“3700”和“3100”仪器来使用。在特殊的分离中使用的最佳电泳条件, 如聚合物浓度, pH, 温度, 电压, 变性剂的浓度依赖许多因素, 包括要被分离的化合物的大小范围, 其组合物和类似物质。本发明的相应应用需要标准的预实验以优化特殊分离的条件。

15 在电泳分离的过程中或之后, 电泳标记被检测或通过记录荧光信号和被分离化合物的迁移时间(或迁移距离), 或通过相对荧光和电泳标记的迁移顺序(如电泳图谱)作图来鉴定。为了实施这种检测, 电泳标记可通过标准的方法进行发光, 如高密度水银蒸汽灯, 激光等。典型地, 电泳标记可通过 He-Ne 激光发生器或固态二极管激光发生器产生的激光来发光。然后通过感光检测仪来检测荧光信号,
20 如光电倍增管, 电荷耦合装置或类似装置。电泳检测系统的实例的描述见美国专利 5,543,026; 5,274,240; 4,879,012; 5,091,652; 6,142,162; 或类似专利。

反应完成后, 现在就可分析混合物, 其中反应的监测可通过, 例如监测信号的改变, 如上所述的荧光, 或取出等分样品测定总游离的 e-标记报告子。依靠仪器, 可使用相同光源激发, 在不同的可检测标记上发光的 1 至 4 个不同的荧光剂。
25 经改良, 可获得 5 个或更多的不同荧光剂, 其中需要其他的光源。电化学检测的描述见美国专利 6,045,676。

在一个实施例中可通过包含在 e-标记部分中的荧光标记检测每种裂解的 e-标记报告子的存在。分离标记 e-标记报告子混合物典型地可采用电分离法来进行, 该法涉及应用电场在液体中分离组分, 优选应用动电学(动电流)或电泳流, 或组合
30 应用电泳流和电渗流, 将 e-标记报告子混合物分离成单个的馏分或条带。电分离包括在迁移率不同的电场中迁移和分离分子。电分离的多种形式包括, 作为实例而非限制, 自由区带电泳, 凝胶电泳, 等电聚焦, 等速电泳, 毛细管电色谱, 和胶束动电色谱。毛细电泳包括电分离, 优选通过动电流, 包括电泳, 双电泳和/或电渗流, 在试管或横截面尺寸为大约 1 至 200 微米, 通常为大约 10 至大约 100 微
35 米的槽道中进行。毛细管可以是一个长的独立毛细管或是圆晶片或由硅, 石英, 玻璃或塑料组成的膜上的槽道。

在毛细管电分离中，含有 e-标记报告子的一等分反应混合物进行电分离，将此等分引入至电分离槽道中，该槽道是毛细管装置的一部分或与其相连接，扩增和其他反应在所述装置中进行。然后电位施加于槽道中包含的导电介质，实现化合物中组分的迁移。根据本领域中熟悉的经验，通常施加的电位足以电分离所需的组分。在本领域中的专业技术人员将能够确定本发明中使用的一组指定试剂的合适电位和/或已裂解标记的特性，反应介质的特性等等。电分离的参数包括介质和电位的参数，通常被优化以最大可能的分离所需的组分。这可采用经验来确定，并包含在专业技术人员理解的范围之内。

对于均一性测定，样品、第一个和电泳探针、以及辅助试剂被组合在支持连接区裂解的反应混合物中。混合物被加工，从混合物的其他组分中分离出 e-标记报告子。然后含有或不含有 e-标记报告子富集物的混合物通常被转移至一个电泳装置中，通常是一个微流体或毛细电泳装置和电泳分离所需要的被修饰的介质。在此期望从分离槽道中去除整个 e-标记报告子分子，当 e-标记报告子被释放时，配体结合在不被释放的 e-标记报告子上。可选择地，通过加入与 e-标记报告子具有相反电荷的互补结合分子，使得总电荷与 e-标记报告子的电荷相反，这些分子将向与所释放的 e-标记报告子分子相反的电极迁移。例如，可使用生物素和抗生物素蛋白链菌素，其中链菌素携带正电荷。在肽类分析物中，一个实施例将在一个位点上含有裂解点，其中配体仍然存在于肽类分析物中。例如，可含有取代蛋氨酸甲基的 e-标记部分。使用修饰蛋氨酸的吡唑酮，可结合存在的赖氨酸。吡唑酮的氨基可用生物素取代。然后可用溴化氰进行裂解，释放 e-标记报告子，但生物素保留在肽和任何未从结合分子中释放的 e-标记部分中。然后对于分析物或靶结合部分，使用亲和素来改变极性或与靶结合部分交联的 e-标记部分。

对于毛细电泳，可使用一种或多种检测区带来检测被分离的裂解标记。当然根据反应，迁移率修饰部分等特性使用几种检测区带是包含在本发明的范围内的。可以是与单个槽道或多个槽道相关的任何数目的检测区带。可用于检测区带的适合的检测仪包括，例如光电倍增管，光电二极管阵列，雪崩光电二极管，线性和阵列电荷耦合装置(CCD)芯片，CCD 照相机组件，荧光分光光度计和类似装置。激发源包括，例如滤光灯，LED，激光二极管，气态，液态和固态激光等。检测方法是激光扫描激发，CCD 照相检测，共轴纤维光学，以单个或阵列构型的共焦反向或正向荧光检测，和类似方法。

检测可以使用与毛细电泳柱相关的任何已知方法，包括的方法见美国专利 5,560,811 (11 栏, 19-30 列), 4,675,300, 4,274,240 和 5,324,401, 相关的公开书在此合并为参考文献。电泳领域中的专业技术人员能识别的电位或能使用的场强范围很宽，例如可使用的场强为 10 至 1000V/cm，更典型地为大约 200 至大约 600 V/cm。市售系统的电压上限为大约 30 kV，毛细管长度为大约 40 至 60cm，产生的最大场为大约 600 V/cm。对于 DNA，典型地毛细管被包被以降低电渗流，毛细管的注射

末端仍保持负电位。

为了便于检测，整个仪器用光学透明的塑料物质装配起来，通常允许的光的波长范围是从大约 180 至大约 1500nm，通常为大约 220 至大约 800nm，更普遍的是大约 450 至大约 700nm，传导损失较少。合适的物质包括熔融石英，塑料，石英，玻璃等。

使用 e-标记试剂的试剂盒

为了方便，本发明中在试剂盒中以整包装组合的形式提供了预定量的试剂。多肽分析的一个实例试剂盒，在整包装的组合中包括含有一个致裂解部分的第一种试剂和一个可与多肽上结合位点结合的结合试剂，该多肽已经经历了翻译后修饰。试剂盒进一步包括一种或多种电泳探针，该探针含有一个与 e-标记报告子可裂解连接的特殊多肽的特异结合试剂。例如，每个 e-标记探针可包括一个多肽结合部分，如与 e-标记部分可裂解连接的一种抗体。每个 e-标记探针的迁移率修饰部分所具有的迁移率可将 e-标记报告子与其他区分开，并且对目的特殊蛋白是唯一的。试剂盒将包括至少大约 1 个，通常至少大约 10 个，更普遍至少大约 20 个，经常至少大约 50 个或更多不同的可产生 e-标记报告子的探针，这些报告子可通过其迁移率被分离。另一方面，当多肽本身被特异的切断产生 e-标记部分，试剂盒包括一些试剂，其中为了与特异的裂解 e-标记部分结合，每种试剂包含与该部分连接的检测部分。

试剂盒进一步包括一种装置，可进行毛细电泳以及需要激活裂解诱导试剂的致裂解部分的试剂。试剂盒进一步包括多种缓冲液，其中一些含有一种或多种上述试剂。

试剂盒中各种试剂的相对含量变化的范围很宽，以便为达到本发明的目标提供所需的浓度。在适当的环境下，试剂盒中的一种或多种试剂可以干粉被提供，通常是冻干的，包括赋形剂，溶解时可提供含有适当浓度的试剂溶液，以便进行根据本发明的方法或测定。每种试剂被包装在单独的容器中或一些试剂被混合在一个容器中，其中可允许有交叉反应性和一定的储存时间。试剂盒也可包含根据如上所述的本发明的说明书。

实施例

本发明进一步通过下面的综合推理和说明实例而证明。如果未特别说明，等分和百分比用重量来计算。如果未特别说明，温度用摄氏度(°C)表示。下面的设备和实例是为了说明本发明而非限制其范围。如果未特别说明，下面实例中所使用的肽类采用自动合成仪通过合成制备，用凝胶电泳或 HPLC 纯化。

下列缩写的含义如下：

Tris HCl - Tris(羟甲基)氨基甲烷-HCl (10x 溶液)，购自 BioWhittaker, Walkersville, MD

HPLC - 高效液相色谱

TLC – 薄层色谱

BSA – 牛血清白蛋白, 如可购自 Sigma Chemical Company (St. Louis, MO), 或类似的试剂供应商。

EDTA – 乙二胺四乙酸, 购自 Sigma Chemical Company

5 g – 克

mM – 毫克分子

FAM – 羧基荧光素

EMCS - N-ε-马来酸亚胺辛氧基-琥珀酰亚胺酯

EDC -1-Ethyl-3-(3-二甲基氨丙基)碳化二亚胺

10 NHS - N-羧基琥珀酰亚胺

DCC - 1,3-二环己基碳化二亚胺

DMF – 二甲基甲酰胺

Fmoc - N-(9-芴基甲酯基)-

实施例 1

15 光敏剂分子和检测试剂的接合

光敏剂分子与金属亲和剂, 含硼酸试剂, 主干分子和类似物通过多种常规的方法和构型交联。例如, 活化的(NHS 酯, 醛, 磺酰氯等)光敏剂(玫瑰红, 酞菁等)可与含反应性氨基部分(氨基葡聚糖, 含氨基试剂(含适当保护基团的金属结合位点), 其他小和大的分子)反应。在多种测定实验中直接使用已形成的交联物(例如

20 抗体-光敏剂交联物, 生物素-LC-光敏剂等)。已形成的交联物也可进一步与抗体结合(例如, 含有 20-200 个光敏剂和 200-500 个氨基的氨基葡聚糖-光敏剂交联物可与高碘酸盐氧化的抗体分子结合, 产生抗体-葡聚糖-光敏剂交联物)或与抗体和颗粒结合。例如, 含有 20-200 个光敏剂和 200-500 个氨基的氨基葡聚糖-光敏剂交联物与羧化聚苯乙烯微珠通过 EDC 耦合化学法结合在一起, 形成光敏剂-氨基葡聚糖-

25 颗粒交联物。将光敏剂插入至颗粒中的方法见美国专利第 5,340,716。然后 Na-高碘酸盐氧化抗体分子与氨基葡聚糖分子的氨基在硼氢化氰钠存在的情况下反应, 产生抗体-葡聚糖-光敏剂-颗粒交联物, 在此称为“光敏剂微珠”。应该注意的是除了抗体分子, 也可使用亲和素或其他分子。

实施例 2

30 e-标记部分的接合和 e-标记报告子的释放

图 14 总结了 e-标记部分与抗体或其他结合部分与游离氨基交联的方法学, 得到的交联物与单态氧反应产生亚磺酸部分, 称为释放的 e-标记报告子。图 15 A-J 显示了几个 e-标记试剂, 大多数使用 5-或 6-羧基荧光素(FAM)作为起始物质。

实施例 3

35 制备 Pro2, Pro4, 和 Pro6 至 Pro13

图 16A 中描述的图表显示了制备羧基荧光素来源的 e-标记部分的 5 步步骤,

这些部分称为 Pro2, Pro4, Pro6, Pro7, Pro8, Pro9, Pro10, Pro11, Pro12, 和 Pro13。第一步 5-或 6-FAM 与 N-羧基琥珀酰亚胺(NHS)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(DCC)在 DMF 中反应, 获得相应的酯, 然后用多种二胺处理产生所需的酰胺, 即化合物 1。用 N-琥珀酰亚胺碘乙酸酯处理化合物 1 产生所期望的碘乙酰胺衍生物, 不分离但进一步在三乙胺的存在下与 3-巯基丙酸反应。最后, 如上所述得到的 β -硫代酸(化合物 2)被转变为其 NHS 酯。以 5-或 6-FAM 和其中一种二胺开始合成多种 e-标记部分。在图 16A 的第一个反应中二胺被指定为 $H_2N \wedge X \wedge NH_2$ 。FAM 的区位异构体和二胺内的化学个体 “X”在下表的每个合成的 e-标记部分中被显示。很明显, 二胺, X, 如上所述在讨论迁移率修饰部分时, 可具有很宽范围的其他形式。

10	<u>e-标记部分</u>	<u>FAM</u>	<u>X</u>
	Pro2	5-FAM	$C(CH_3)_2$
	Pro4	5-FAM	无碳原子
	Pro6	5-FAM	$(CH_2)_8$
	Pro7	5-FAM	$CH_2OCH_2CH_2OCH_2$
15	Pro8	5-FAM	$CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2$
	Pro9	5-FAM	1,4-苯基
	Pro10	6-FAM	$C(CH_3)_2$
	Pro11	6-FAM	无碳原子
	Pro12	6-FAM	$CH_2OCH_2CH_2OCH_2$
20	Pro13	6-FAM	$CH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2OCH_2CH_2$

化合物 1 的合成

向 5-或 6-羧基荧光素(0.5 mmol)在无水 DMP(5mL)的搅拌溶液中加入 N-羧基琥珀酰亚胺(1.1 当量)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(1.1 当量)。在大约 10 分钟后, 开始形成白色的固体(二环己脲)。反应混合物在室温下在氮气中搅拌过夜。TLC(9:1 CH_2Cl_2 -MeOH)显示起始物质已经完全消失。

上述混合物的上清液被逐滴加入至二胺(2-5 当量)在 DMF(10mL)的搅拌溶液中。来自 TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)的证据表明, 反应瞬间就完成了。在降低压力的条件下去除溶剂。得到的残基在 Iatrobeds silica 上的闪烁色谱产生了 58-89%产量的目的胺(化合物 1)。化合物 1 的 1H NMR (300 MHz, $DMSO-d_6$) 与指定的结构一致。

化合物 2 的合成

向胺(化合物 1)(0.3mmol)中顺序加入无水 DMF(10mL)和 N-琥珀酰亚胺碘乙酸酯(1.1 当量)。得到的混合物在室温下被搅拌直至获得清亮的溶液。TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)表明反应已结束。

然后上述反应溶液用三乙胺(1.2 当量)和 3-巯基丙酸(3.2 当量)处理。混合物在室温下搅拌过夜。在降低压力的条件下去除溶剂, 然后通过闪烁色谱得到 62-91%

产量的 β -硫代酸(化合物 2)。根据其 ^1NMR (300 MHz, $\text{DMSO-}d_6$)指定化合物 2 的结构。

合成 Pro2, Pro4, 和 Pro6 至 Pro13

向 β -硫代酸(化合物 2)(0.05 mmol)在无水 DMF(2mL)的搅拌溶液中加入 N-羟基琥珀酰亚胺(1.5 当量)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(1.5 当量)。混合物在室温下在氮气中搅拌 24-48 小时(直至所有起始物质均反应)。反应混合物在降低压力的条件下被浓缩, 然后通过闪烁色谱纯化得到 41-92%产量的靶分子。

制备 Pro1

本反应的化合物在图 16B 中显示。向 5-碘乙酰胺荧光素(化合物 4) (24 mg, 0.047 mmol)在无水 DMF (2 mL)的搅拌溶液中加入三乙胺(8 μL , 0.057 mmol)和 3-巯基丙酸(5 μL , 0.057 mmol)。得到的溶液在室温下搅拌 1.5 小时。TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)表明反应已完成。随后, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺(9 mg, 0.078 mmol)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(18 mg, 0.087 mmol)。反应混合物在室温下在氮气中搅拌 19 小时, 此时 TLC 显示起始物质完全消失。在降低压力的条件下去除溶剂, 随后采用 25:1 和 15:1 CH_2Cl_2 -MeOH 作为洗脱剂进行闪烁色谱获得 Pro1 (23 mg, 83%)。

制备 Pro3

本反应的化合物在图 16C 中显示。向 6-碘乙酰胺荧光素(化合物 5) (26 mg, 0.050 mmol)在无水 DMF (2 mL)的搅拌溶液中加入三乙胺(8 μL , 0.057 mmol)和 3-巯基丙酸(5 μL , 0.057 mmol)。得到的溶液在室温下搅拌 1.5 小时。TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)表明反应已完成。随后, 加入 N-羟基琥珀酰亚胺 (11 mg, 0.096 mmol)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(18 mg, 0.087 mmol)。反应混合物在室温下在氮气中搅拌 19 小时, 此时 TLC 显示起始物质完全消失。在降低压力的条件下去除溶剂, 随后采用 30:1 和 20:1 CH_2Cl_2 -MeOH 作为洗脱剂进行闪烁色谱获得 Pro3 (18mg, 61%)。

制备 Pro5

本反应的化合物在图 16D 中显示。

合成化合物 7

向 5-(溴甲基)荧光素(化合物 6) (40 mg, 0.095 mmol)在无水 DMF(5 mL)的搅拌溶液中加入三乙胺(15 μL , 0.108 mmol)和 3-巯基丙酸(10 μL , 0.115 mmol)。得到的溶液在室温下搅拌 2 天。TLC (40:9:1 CH_2Cl_2 -MeOH- H_2O)表明反应已完成。反应溶液在降低压力的条件下被蒸发干燥。最后应用 30:1 和 25:1 CH_2Cl_2 -MeOH 作为洗脱剂进行闪烁色谱获得 β -硫代酸(化合物 7) (28 mg, 66%)。

合成 Pro5

向酸(化合物 7) (27 mg, 0.060 mmol)在无水 DMF (2 mL)的溶液中加入 n-羟基琥珀酰亚胺(11 mg, 0.096 mmol)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(20 mg, 0.097 mmol)。反应

混合物在室温下在氮气中搅拌 2 天, 此时 TLC (9:1 CH₂Cl₂-MeOH)显示起始物质完全消失。在降低压力的条件下去除溶剂, 随后使用 30:1 CH₂Cl₂-MeOH 进行闪烁色谱获得 Pro5 (24 mg, 73%)。

制备 Prol4

5 本反应的化合物在图 6E 中显示。

合成化合物 9

向 5-氨基乙酰胺荧光素(化合物 8) (49 mg, 0.121 mmol)中顺序加入无水 DMF (4 mL)和 N-琥珀酰亚胺碘乙酸酯(52 mg, 0.184)。得到清亮的溶液, TLC (40:9:1 CH₂Cl₂-MeOH-H₂O)表明起始物质完全消失。

10 然后上述的反应溶液用三乙胺(30 μ L, 0.215mmol)和 3-巯基丙酸(30 μ L, 0.344 mmol)处理。得到的混合物搅拌 2 小时。在降低压力的条件下去除溶剂, 然后使用 20:1 和 15:1 CH₂Cl₂-MeOH 作为洗脱剂进行闪烁色谱得到 β -巯代酸(化合物 9) (41 mg, 62%)。根据 ¹NMR (300 MHz, DMSO-*d*₆)指定结构。

合成 Prol4

15 向化合物 9(22 mg, 0.04 mmol)在无水 DMF (2 mL)的搅拌溶液中加入 N-羟基琥珀酰亚胺(9 mg, 0.078 mmol)和 1,3-二环己基碳化二亚胺(16 mg, 0.078 mmol)。得到的溶液在室温下在氮气中搅拌大约 24 小时。反应混合物在降低压力的条件下被浓缩, 使用 30:1 和 20:1 CH₂Cl₂-MeOH 作为洗脱剂通过闪烁色谱纯化残余物得到 Prol4 (18 mg, 70%)。

20 合成 Prol5, Pro20, Pro22 和 Pro28

产生电泳标记 Prol5, Pro20, Pro22 和 Pro28 的 NHS 酯的合成图分别在图 16F-I 中显示。所有的试剂和反应条件在本领域中是常规的, 其实施与如上所述反应类似。

实施例 4

25 蛋白分析的 e-标记报告子检测

A. 用 e-标记部分和生物素标记氨基葡聚糖(MW ~500,000)

氨基葡聚糖可作为一种模型, 可用来证实与高分子量分子相关的 e-标记报告子的释放, 也可作为蛋白的模型。10mg 氨基葡聚糖的氨基数目计算为 2×10^{-8} 摩尔。对于 1:4 的生物素和 e-标记部分的比例, 所使用的生物素 NHS 酯的摩尔数目为 1.85×10^{-6} , 马来酰亚胺 NHS 酯的摩尔数为 7.4×10^{-6} 。10.9 mg 氨基葡聚糖溶解在 6 mL 0.1 % PBS 缓冲液中。10 mg 生物素-x-x NHS 酯和 23.7 mg EMCS 一起溶解在 1mL DMF 中, 并以 30 分钟的间隔 50 μ L 的量加入至氨基葡聚糖中, 并不断搅拌和避光。最后加入 DMF 溶液后, 混合物保持过夜(同时搅拌和避光)。然后, 混合物用分子量分离点为 10,000 道尔顿的膜进行透析。膜在含有 2L 水的烧杯中浸泡, 同时搅拌。以 2 小时的间隔换水四次。膜在水中保留过夜(同时搅拌并避光)。然后溶液被冻干, 冻干的粉末用来进行 e-标记标记。

B. 生物素和马来酰亚胺标记的氨基葡聚糖与 SAMSA 部分的反应

SAMSA [5-(((2-(和-3)-S-乙酰巯基)琥珀酰)氨基)荧光素]用作 e-标记部分与氨基葡聚糖分子中的马来酰亚胺反应。为此, 0.3 mg ($\sim 5.3 \times 10^{-9}$ 摩尔)氨基葡聚糖标记的生物素和 EMCS 溶解在 10 μ L 水中。1.1 mg SAMSA ($\sim 1.2 \times 10^{-6}$ 摩尔)溶解在 120 μ L 0.1 M NaOH 中, 并在室温下孵育 15 分钟(为了活化硫醇基)。然后, 加入 2 μ L 6M HCl 中和过量的 NaOH, 加入 30 μ L 磷酸缓冲液(200 mM, pH 7.0)将溶液的 pH 调整至 7.0。活化的 SAMSA 溶液加入至 10 μ L 标记的氨基葡聚糖溶液中, 并孵育 1 小时。E-标记部分标记的氨基葡聚糖使用 Sephadex G-25(Amersham)进行凝胶过滤纯化, 并收集纯化的样品。

C. 从标记的氨基葡聚糖中释放 e-标记报告子

2 μ L 抗生蛋白链菌素标记的光敏剂微珠(100 μ g/mL)在黑暗的环境中轻轻地加入至 5 μ L 纯化的标记氨基葡聚糖中, 并在黑暗环境中孵育 15 分钟。然后溶液在 680nm 照射 1 分钟。使用 CE² LabCard™ 装置(ACLARA BioSciences, Mountain View, CA)通过 CE 检测 e-标记报告子的释放。如在图 17A 中所示, CE² LabCard 1 包括两部分: 蒸发控制和注射/分离。蒸发控制包括一个蒸发控制管道 2 (450 μ m 宽和 50 μ m 深), 以及两个补给缓冲液池 3 (直径 2 mm), 蒸发控制样品孔 4 (直径 1 mm)位于蒸发控制管道的中间。当样品孔的体积仅为 1.2 μ L 时, 补给缓冲液池的体积是 4.7 μ L, 在样品孔中央下面的管道 2 的体积大约为 40 nL。CE² 的第二部分, 用来进行注射和分离, 包括一个注射微管道 5 和分离微管道 6, 在连接 7 处相交叉, 其规格为 120 μ m 宽和 50 μ m 深。分离管道的两个末端或与注射管道与缓冲液池 8 连接, 而注射管道的第二个末端与蒸发控制样品孔 4 直接连接。管道的封闭是通过将一层膜(MT40)覆盖在 LabCard™ 上。检测仪 9 距离连接 10mm。用分离缓冲液(20 mM HEPES, pH 7.4 and 0.5 % PEO)注满 CE² LabCard 装置后, 300 nL 检测混合物加入至样品孔 4 中。如图 17B 所示通过加电压于缓冲液池将样品注射进微管道连接 7 中。然后如图 17C 所示分离样品。

图 18 显示了含有和不含有光敏剂微珠的标记氨基葡聚糖的纯化电泳图谱。加入光敏剂微珠, 使用光敏剂在 680nm 下照射产生的单态氧可使 e-标记报告子从氨基葡聚糖中释放。实验条件为: 分离缓冲液 20 mM HEPES pH 7.4, 0.5% PEO; 如图 17 所述配置电压; 检测混合物含有 29 (μ g/ml)抗生蛋白链菌素标记的光敏剂微珠, 并采用 680 $\pm$ 10 nm 滤光片和 150 W 灯在 680nm 照射 1 分钟。如所显示的, 加入光敏剂微珠, 使用光敏剂在 680nm 下照射产生的单态氧可使 e-标记报告子从氨基葡聚糖中释放。为了优化照射时间, 含有光敏剂微珠的反应混合物被照射不同的时间长度, 从 1 分钟至 10 分钟。照射时间长于 1 分钟, e-标记报告子的释放没有明显的增加。

图 19 显示了光敏剂微珠浓度对 e-标记报告子释放的影响。图表显示使用不同浓度的光敏剂微珠对纯化的标记氨基葡聚糖的分离。较高浓度光敏剂微珠可使更

多的 e-标记报告子从标记的氨基葡聚糖中释放出来。实验条件：分离缓冲液 20.0 mM HEPES pH 7.4, 0.5% PEO; 如图 17 所述配置电压；使用 680 ± 10 nm 滤光片和 150 W 灯在 680nm 照射检测混合物 1 分钟。

图 20 描绘了 e-标记报告子与光敏剂微珠浓度函数的线性标准曲线。使用 CE²LabCard 获得结果。实验条件：分离缓冲液 20.0 mM HEPES pH 7.4, 0.5% PEG; 如图 17 所述配置电压；使用 680 ± 10 nm 滤光片和 150 W 灯在 680nm 照射检测混合物 1 分钟。

另外，标记氨基葡聚糖浓度对 e-标记报告子释放的影响也可被检测，结果在图 21 显示。如该图所示，对于给定浓度的光敏剂微珠，低浓度的标记氨基葡聚糖可更有效的使 e-标记报告子释放(或释放的 e-标记报告子与标记氨基葡聚糖量的比例更高)。使用 CE² LabCard 获得结果。实验条件：分离缓冲液 20.0 mM HEPES pH 7.4, 0.5% PEO; 如图 17 所述配置电压；检测混合物含有 29 ug/ml 光敏剂微珠，并使用 680 ± 10 nm 滤光片和 150 W 灯在 680nm 照射检测混合物 1 分钟。

实施例 5

15 蛋白分析的 e-标记 报告子检测

A. e-标记部分与抗体的接合

采用两种不同的方法进行结合。第一种方法包括 e-标记部分与抗体的直接结合，第二种方法包括 e-标记部分与葡聚糖结合，然后与抗体结合。

(A1) e-标记部分与抗体的直接接合

20 用 NHS 酯末端合成 e-标记部分，该末端可与抗体的伯胺反应形成稳定的酰胺连接。这样使 e-标记部分在抗体的表面上随机结合。典型地每个抗体分子中含有 6 至 12 个 NHS 酯修饰的分子不会导致抗原结合活性的降低。即使 NHS 酯与抗体更高的比例也可能仅有轻微的活性损失。

步骤

25 1. 纯化的人 IgG (购自 Sigma-Aldrich) 在 1X PBS 中稀释为 2 mg/ml (0.1 M 磷酸钠, 0.15 M Nad, pH 7.2)。

2. 含有 e-标记部分的 NHS 酯溶解在 DMF (二甲基甲酰胺)，终浓度在 10 至 20nmols/ μ l DMF 之间。

3. 500 μ L 稀释的人 IgG (6.5 nmol) 与 1,5,25, 或 50 μ l e-标记部分(分别为 14, 68, 30 340, 和 680 nmols)混合。

4. 溶液在黑暗环境中在冰上反应 2 小时。

5. e-标记部分结合的抗体在 0.1X PBS (10 mM 磷酸钠, 15 mM NaCl, pH 7.2) 中 4°C 下透析 20 小时进行纯化。

(A2) e-标记部分-葡聚糖与抗体的接合

35 在第二个实例中，e-标记部分首先与含胺的葡聚糖如上所述通过酰胺连接结合。多克隆和一些单克隆抗体在抗体的 Fc 部分中含有碳水化合物。这些多糖可被

高碘酸盐氧化, 形成可反应的醛残基。含有氨基葡聚糖的 e-标记部分然后与氧化抗体的醛残基通过形成希夫氏碱而结合。这种连接通过用氰氢硼化钠还原成仲胺连接而进一步稳定。

含有 50 至 500 个可连接 e-标记部分的氨基的巨大氨基葡聚糖 (分子量为 500,000) 可明显增加每个抗体上 e-标记部分的数目, 可引起信号的放大。因为葡聚糖通过碳水化合物结合在抗体 Fc 部分上, 因此可足以从不参与活性的抗原结合位点上被去除。

e-标记部分与氨基葡聚糖接合的步骤

1. 氨基葡聚糖(分子量 500,000, 500 胺/摩尔 葡聚糖)溶解在 90 % DMF 中, 终浓度为 2 mg/ml (2 nmol 胺/ μ l)。
2. 含有 e-标记部分的 NHS 酯溶解在 DMF (二甲基甲酰胺), 终浓度在 10 至 20nmols/ μ l DMF 中。
3. 500 μ l 氨基葡聚糖(1000 nmol 胺)与 500, 1000, 或 2000 nmol e-标记部分混合。
4. 溶液在黑暗环境中在冰上反应 2 小时。
5. e-标记部分结合的氨基葡聚糖在 0.1X PBS (10 mM 磷酸钠, 15 mM NaCl, pH 7.2) 中 4°C 透析 20 小时进行纯化。
6. 14,000 x g 离心 5 分钟去除沉淀物。

用高碘酸钠氧化抗体的步骤

1. 500 μ l (2.8 nmol) 纯化的抗人 IL-4 多克隆抗体(购自 Pierce)在 10mM 高碘酸钠(Aldrich)中被氧化。
2. 溶液在室温下在黑暗环境中反应 30 分钟。
3. 加入乙二醇至终浓度 100mM, 在室温下孵育 10 分钟。
4. 氧化的抗体在 0.1X PBS(10 mM 磷酸钠, 15 mM Nad, pH 7.2) 中 4°C 透析 2 小时进行纯化。

被高碘酸盐氧化的抗体与含有氨基葡聚糖的 e-标记部分的接合步骤

1. 54 μ l (300 pmol) 氧化的抗人 IL-4 多克隆抗体与 300 pmol e-标记部分结合的氨基葡聚糖在 200 mM 碳酸钠, pH 9.5 中混合。
2. 溶液在室温下在黑暗的环境中反应 2 小时。
3. 加入硼氢化氰钠(1 N NaOH 中新鲜制备)至终浓度为 50 mM, 在室温下反应 30 分钟。
4. 加入 50mM 乙醇胺, pH 9.6 阻断未反应的醛, 在室温下反应 30 分钟。
5. 结合物在 0.1X PBS (10 mM 磷酸钠, 15 mM NaCl, pH 7.2) 4°C 下透析 20 小时进行纯化。

B. 从标记的氨基葡聚糖中释放 e-标记报告子

使用的步骤和装置与上述的 SAMSA e-标记部分基本上一样。使用 ABI310 分

离了总共 8 个 e-标记报告子。分离条件如下：50 微米毛细管，47 cm 长，末端至检测端为 36 cm；分离缓冲液，POP-6 (PE Biosystems)；3.0 kV 注射 60 秒；分离电压，9.4 kV。结果在图 22 的电泳图谱中描绘。

C. 用与 e-标记部分接合的抗体进行免疫测定

- 5 实施上述的结合 e-标记部分建立两种免疫测定法(直接和间接或夹心)。

(C1) 细胞因子的夹心免疫测定

实施夹心免疫测定(图 23)。该测定可定性和定量已知的细胞因子抗原。在这个测定中，匹配的抗体对围绕细胞因子抗原形成夹心，使两个抗体靠近。这些抗体的其中之一与 e-标记部分结合产生 e-标记 探针。

- 10 e-标记探针有一个单态氧不稳定连接，可在与单态氧反应后释放 e-标记报告子。第二个抗体与一个光敏剂染料结合，该染料可在 680nm 被照射时可产生单态氧。由于单态氧的半衰期相对较短，因此仅当两个抗体形成夹心时，单态氧才可以切断 e-标记探针的可裂解连接。

细胞因子夹心免疫测定的步骤

- 15 1. 10 μ l 检测缓冲液(0.1X PBS, 40 mg/ml BSA)与 1 μ l (100 nM)生物素标记的抗人 IL-4 单克隆抗体(购自 Pierce, 目录号 M-450-B) 和浓度范围从 0 至 500nM 的 1 μ l 细胞因子 IL-4 (Pierce, 目录号 R-IL-4-5)混合。
2. 反应在室温下进行 30 分钟。
3. 加入 5 μ l 100 μ g/ml 抗生蛋白链菌素标记的光敏剂微珠，混合物在室温下在
- 20 黑暗环境下孵育 15 分钟。
4. 为去除 e-标记探针与抗生蛋白链菌素的非特异性相互作用，加入 2 μ l 5 μ M 生物素-DNP，在室温下在黑暗环境中孵育 10 分钟。
5. 1 μ l 400 nM 结合氨基葡聚糖 e-标记部分的抗人 IL-4 多克隆抗体，在室温下黑暗环境中孵育 30 分钟。
- 25 6. 然后使用 150 瓦光源，680 DF $\pm$ 20 nm 的光学滤光片照射反应混合物 30 秒。
7. 然后加入 1 μ l ROX T8 标准品，1:20 (购自 PE Biosystems)，通过毛细电泳在 ABI310 或 ACLARA plastic LabCard (ACLARA BioSciences, Inc. Mountain View, CA) 上分离释放的 e-标记。
8. 在 ABI310 已释放的 e-标记报告子的分离条件如下：50 μ m 毛细管，47cm
- 30 长，末端至检测端为 36cm；分离缓冲液，POP-6；在 3.0 kV 注射 60 秒；分离电压 9.4 kV。e-tag 报告子 Pro1 测定 IL-4 的结果见图 24。

- 对于多种细胞因子和多种 e-标记部分重复上述的步骤如下：使用 e-标记部分 Pro10 研究 DL-6，结果在图 25 中显示。使用 e-标记部分 Pro8 研究 IFN γ ，结果在图 26 中显示。使用 e-标记部分 Pro7 研究 TNF α ，结果在图 27 中显示。使用 e-标记部分 Pro4 研究 IL-10，结果在图 28 中显示。使用 e-标记部分 Pro2 研究 IL-8，
- 35 结果在图 29 中显示。

如下与其他细胞因子的双重反应研究 IL-4: IL-4 和 IL-6, IL-4 和 IL-8, IL-4 和 TNF α , IL-4 和 IFN γ 。结果在图 30 中显示。进行 5 种细胞因子的多重测定(IL-4, IL-6, IL-8, TNF α , 和 IFN γ), 结果在图 31 中显示。进行 6 种细胞因子的多重测定(IL-4, IL-6, DL-8, IL-10, TNF α , 和 IFN γ), 结果在图 32 中显示。

5 (C2)IgG 的直接免疫测定

在直接免疫测定中, IgG 抗原与 e-标记部分结合形成 e-标记探针。E-标记探针有一个单态氧不稳定连接, 可在与单态氧反应后可释放 e-标记报告子。抗体与一种光敏剂染料结合, 该染料当在 680nm 被照射时可产生单态氧。由于单态氧具有相对较短的半衰期, 仅当两个抗体结合时, 单态氧才可切断可裂解的连接以释放 e-标记报告子(图 33)。

10 人 IgG 直接免疫测定的步骤

1. 10 μ l 检测缓冲液(0.1X PBS, 40 mg/ml BSA)与 1 μ l (100 nM) 生物素标记的抗人 IgG 抗体和浓度范围从 0 至 500nM 的 e-标记部分标记的 1 u1 人 IgG(购自 Sigma)混合。

15 2. 反应在室温下反应 30 分钟。

3. 加入 5 μ l 100 μ g/ml 抗生蛋白链菌素标记的光敏剂微珠, 混合物在室温下黑暗环境中孵育 15 分钟。

4. 然后反应混合物使用 150 瓦光源和 680 DF $\pm$ 20 nm 的光学滤光片照射 30 秒。

20 5. 然后加入 1 μ l ROX T8 标准品, 已释放的 e-标记报告子通过毛细电泳在 ABI310 或 ACLARA plastic LabCard 上被分离。

不同浓度的人 IgG 的结果在图 34 显示。标准曲线在图 35 中显示。

从在此的结果中表明, 本发明提供了有效的方式来制备用于多重测定中的组合物和采用这种组合物进行多重测定的方法。用来进行蛋白同源和异源测定的方法作为其他类型化合物的实例。

从上面的结果可进一步表明本发明提供了一个准确, 有效和敏感的过程, 以及用于这些过程的组合物, 来进行多重反应。提供的步骤有很大的可调整性, 其中可进行测定, 并可用于很多情况下, 包括半抗原, 抗原, 核酸, 细胞等, 其中可同时在单个或多个样品上进行许多种测定, 并分析样品中的多个事件。测定的结果很容易使用电泳或质谱仪简单的读取。自动记录的结果提供给系统, 其中在加入样品和试剂后, 整个过程可在数据处理器的控制下进行。

在此说明书中引用的所有出版物和专利申请书在此合并为参考文献, 只要每篇出版物或专利申请书特别地和个别地被指明合并为参考文献。

35 尽管前面所述的发明已经通过例证和实例详细地描述, 目的是为了加深理解, 但对本领域的普通专业技术人员来说很明显是在本发明的教导范围内, 即可据此进行某种改变和修饰, 并不背离附录的权利要求的精神或范围。

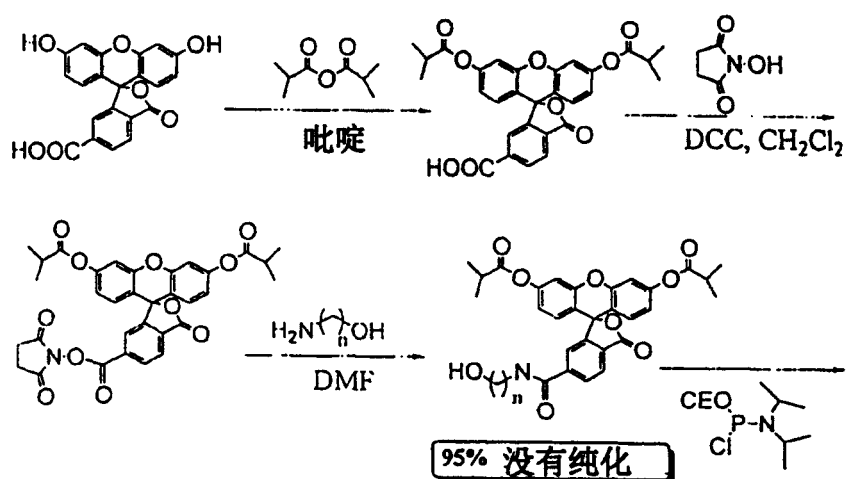


图1

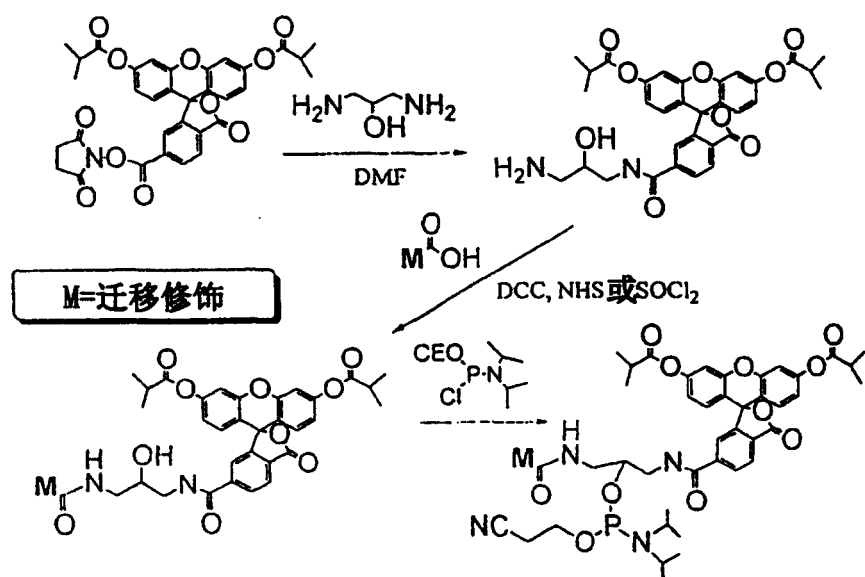


图2

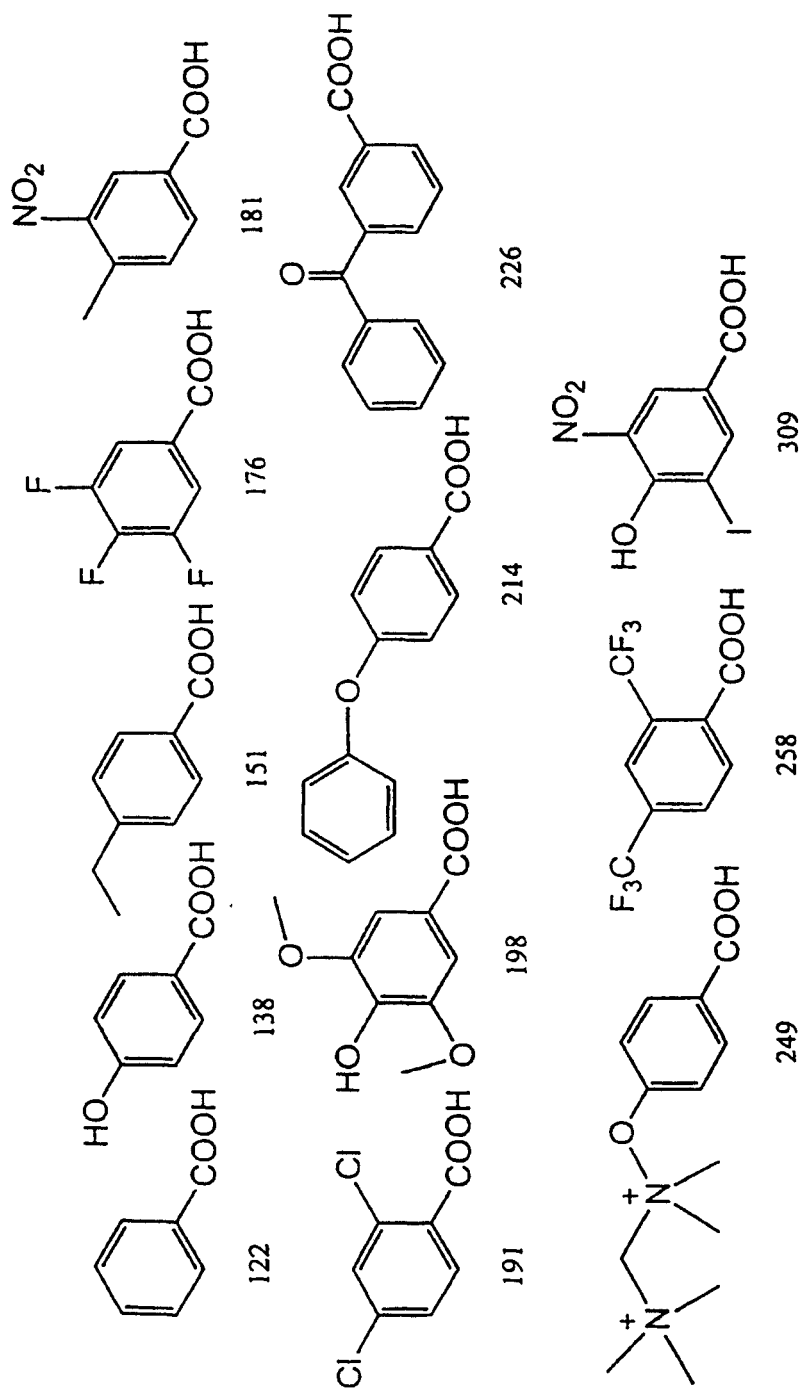


图3

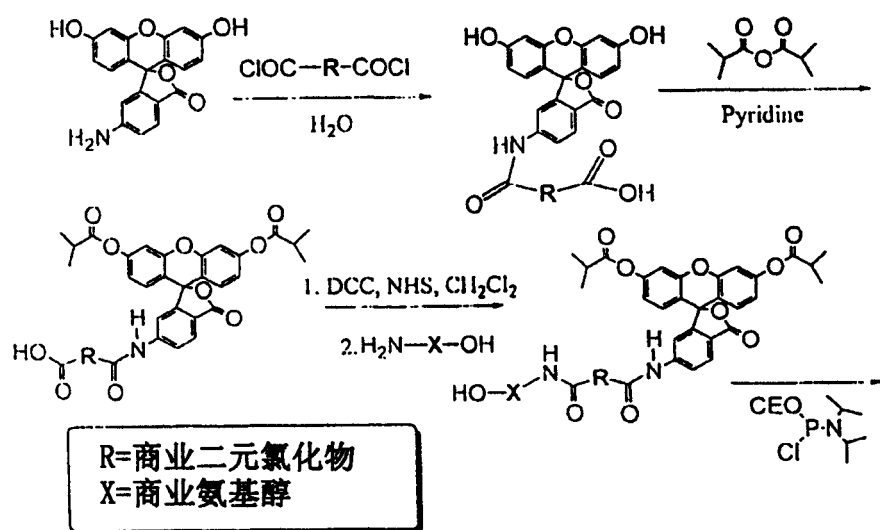
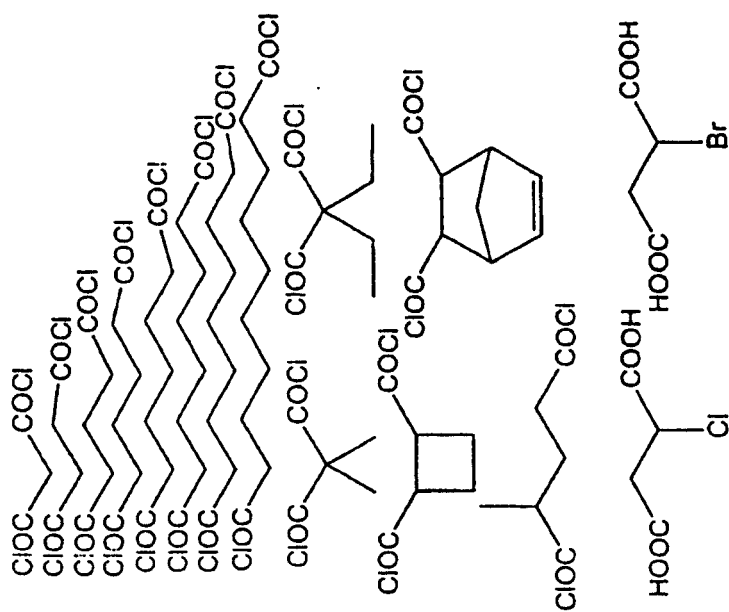
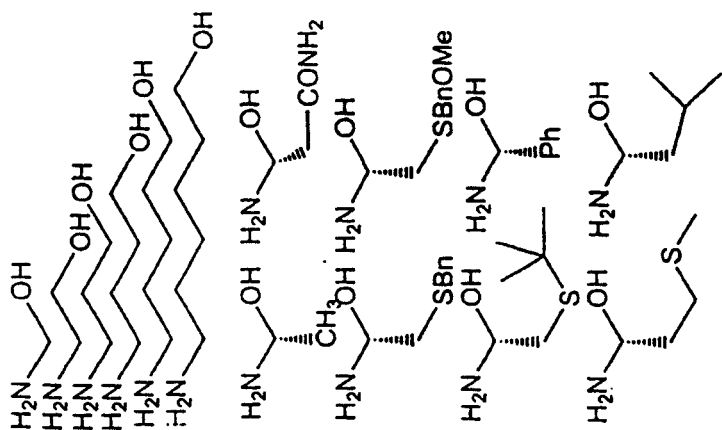


图4



5



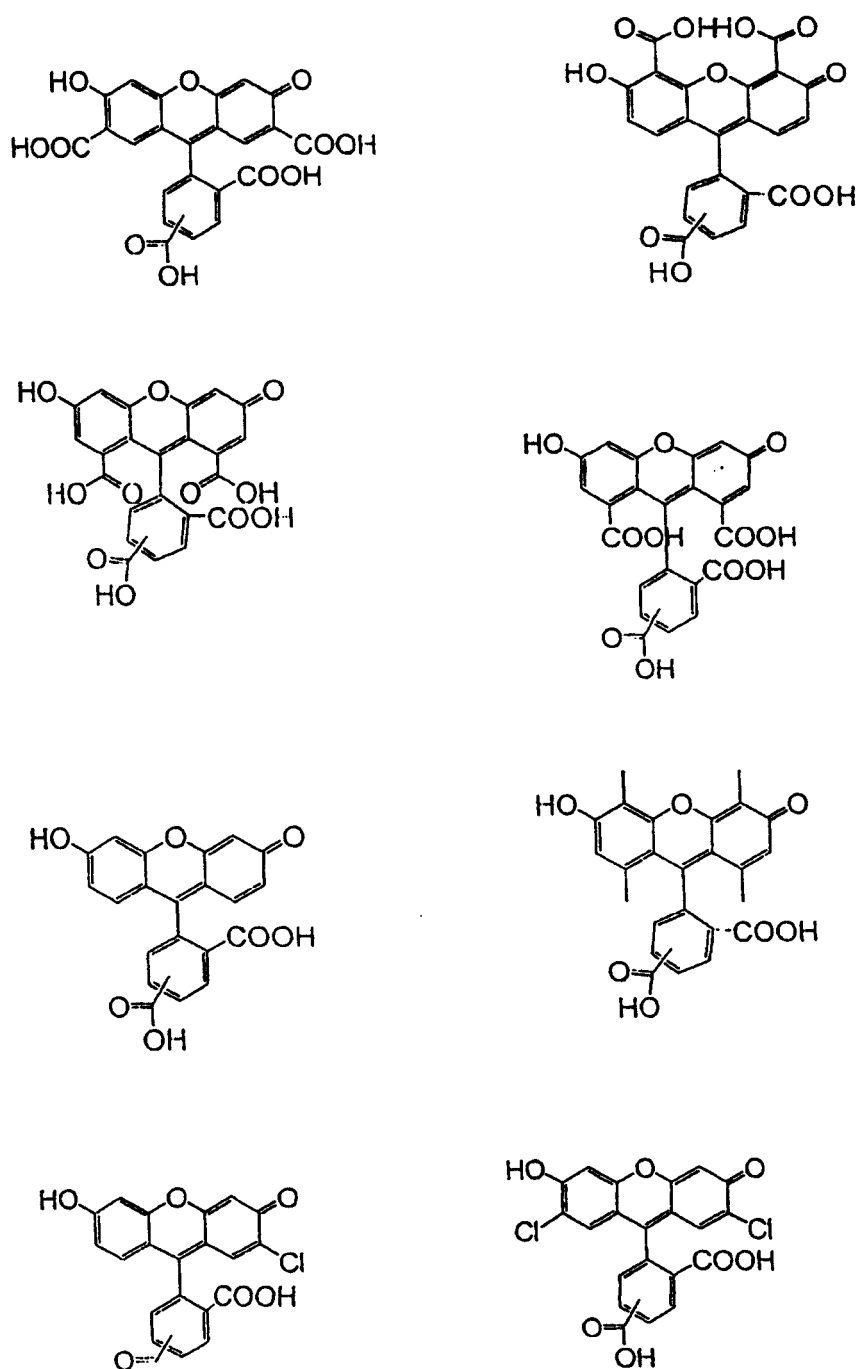


图6A

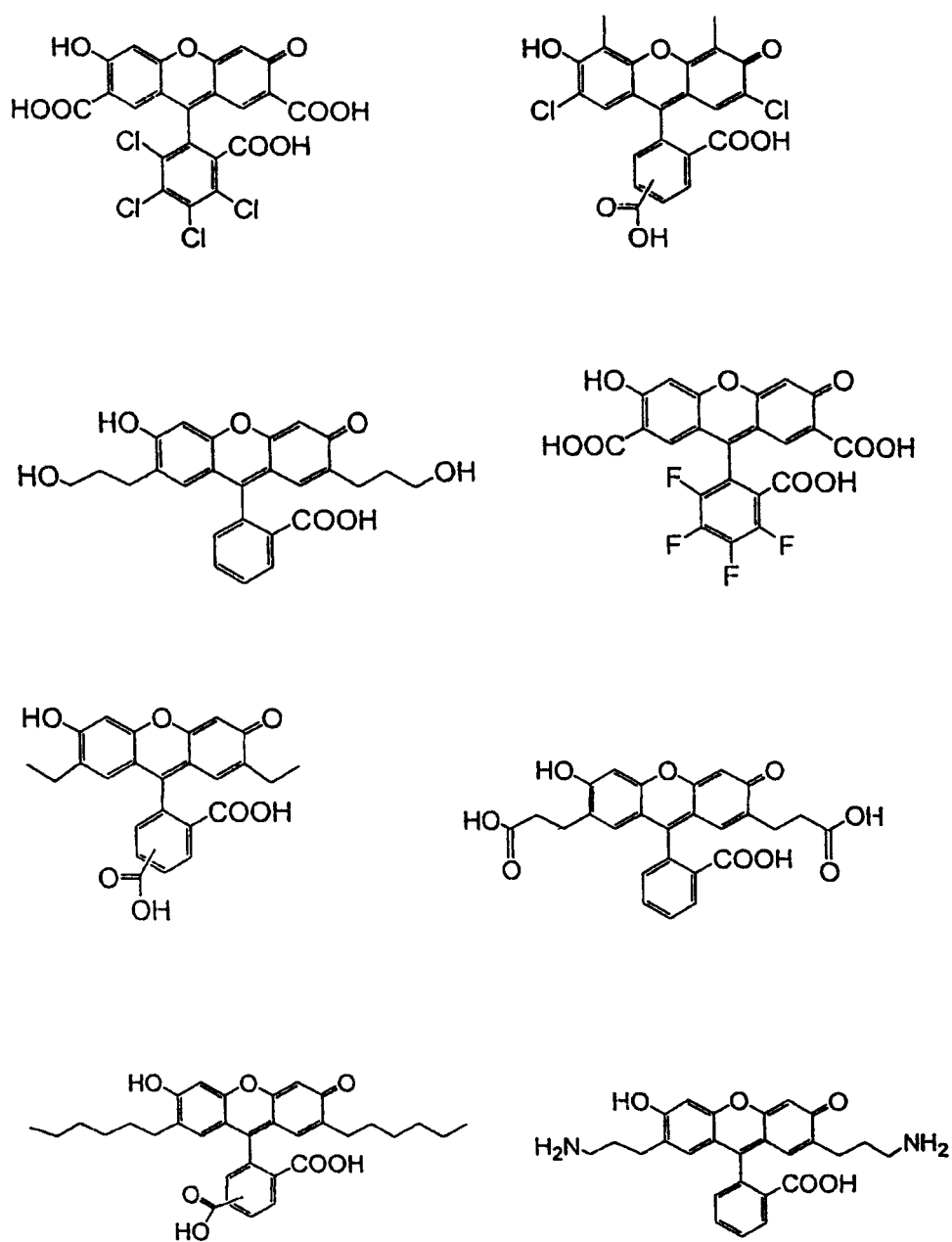


图6B

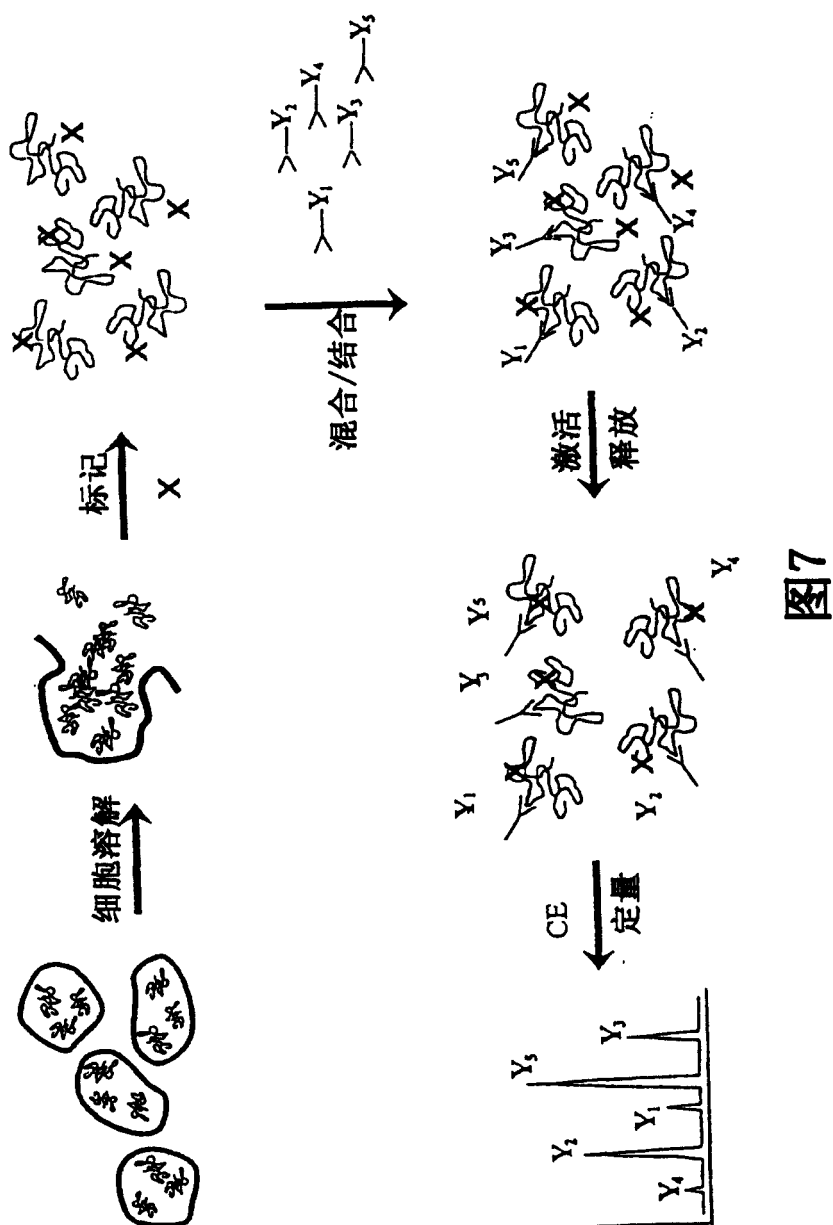


图7

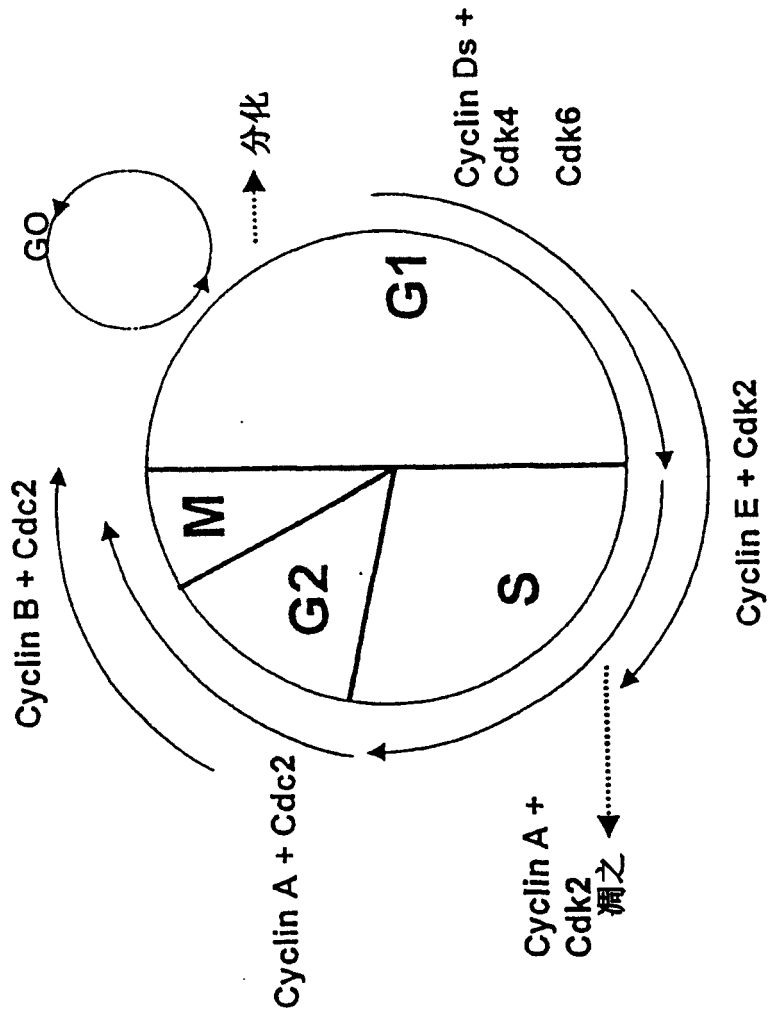
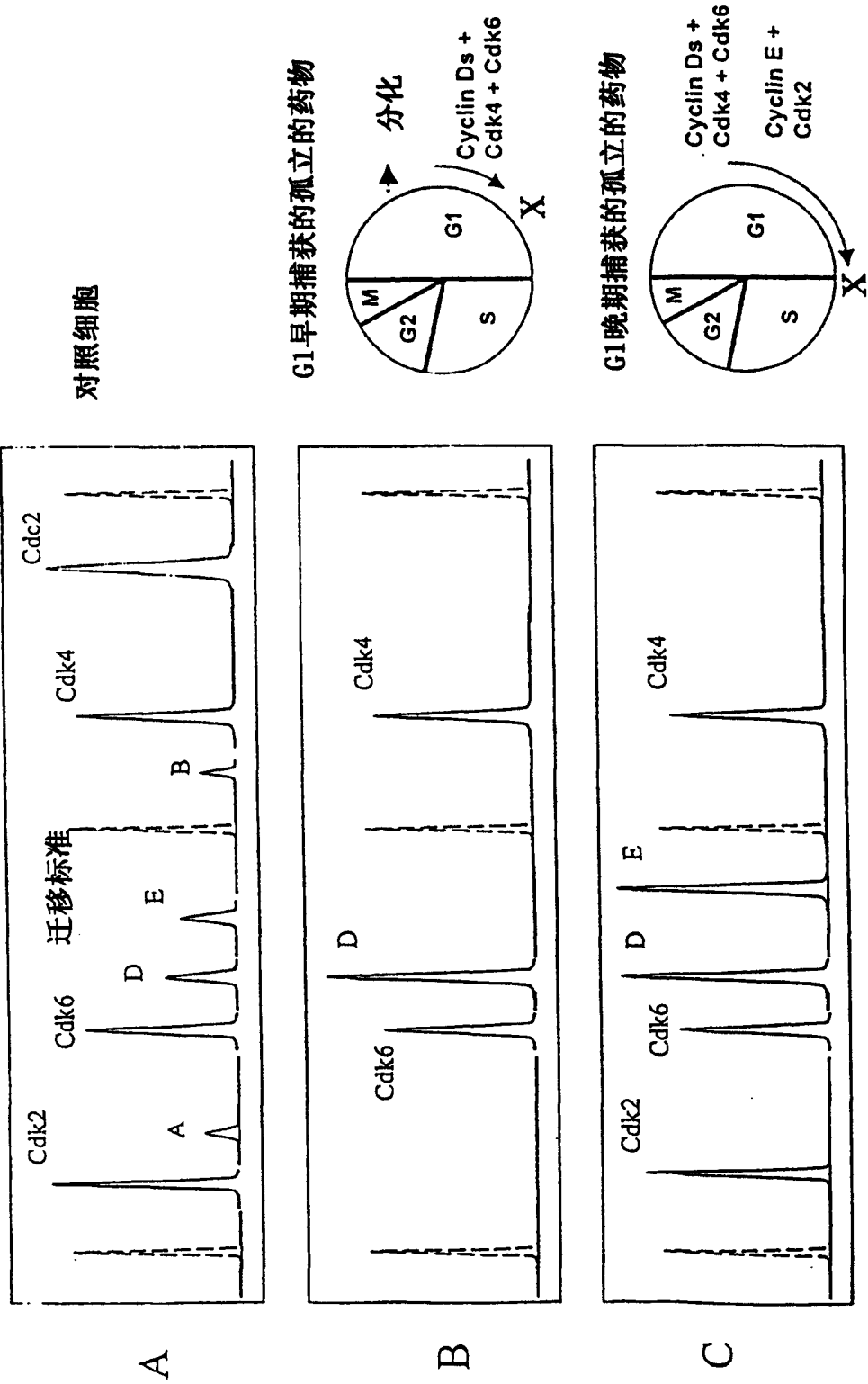


图8



噻唑可切除连接

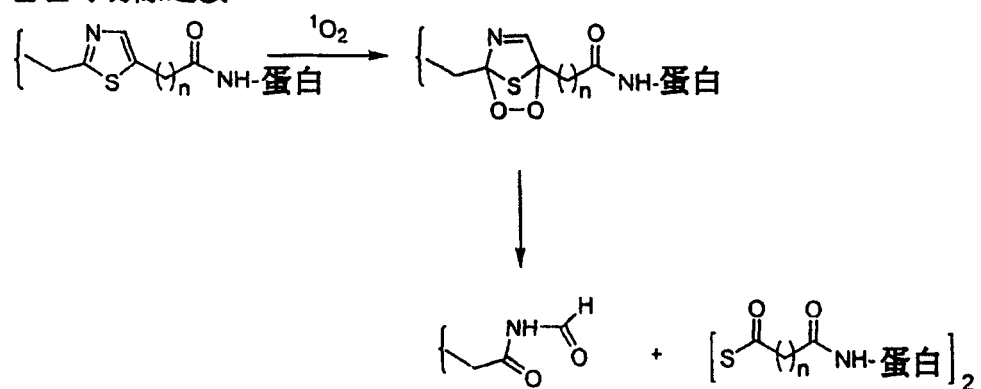


图10A

唑可切除连接

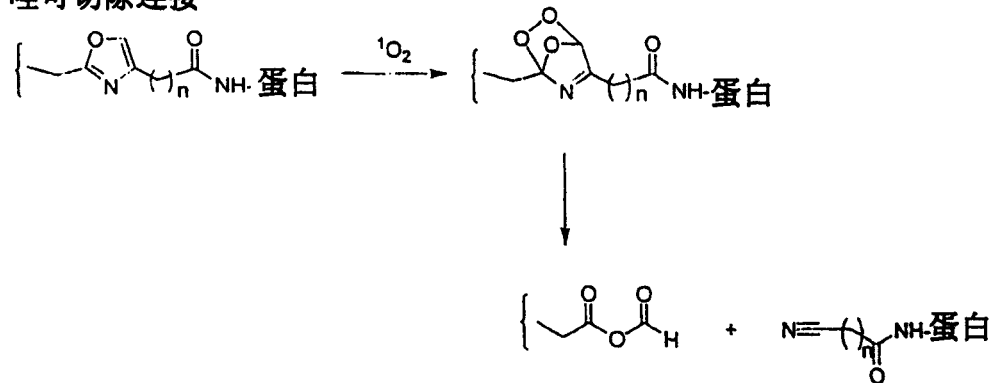


图10B

烯烃可切除连接

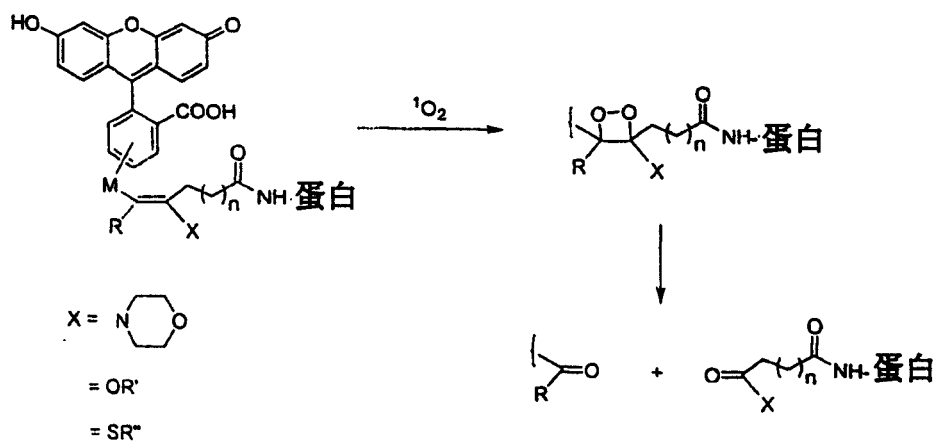


图10C

硫醚可切除连接

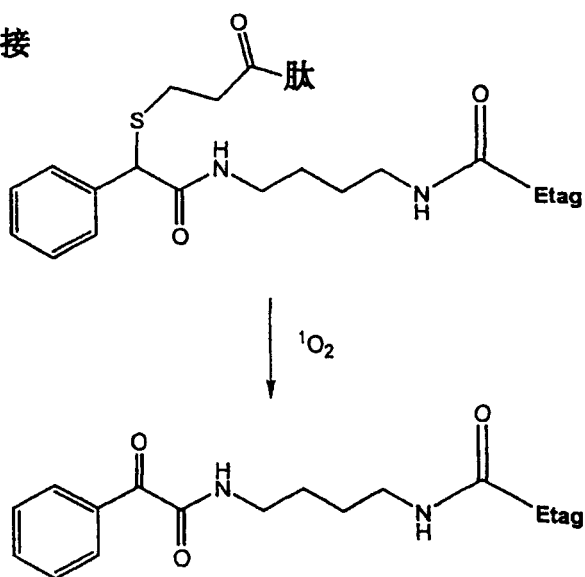


图10D

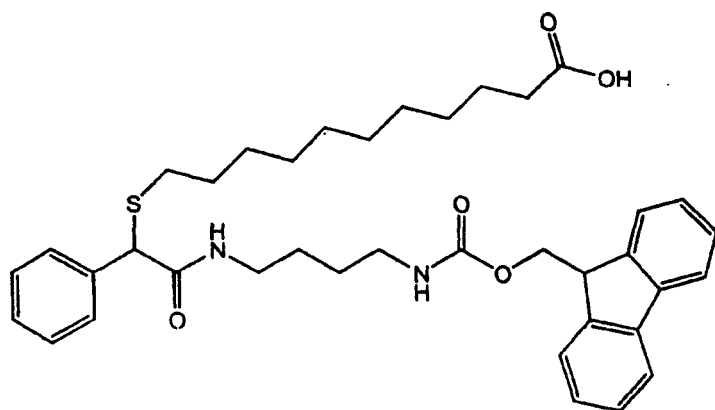


图10E

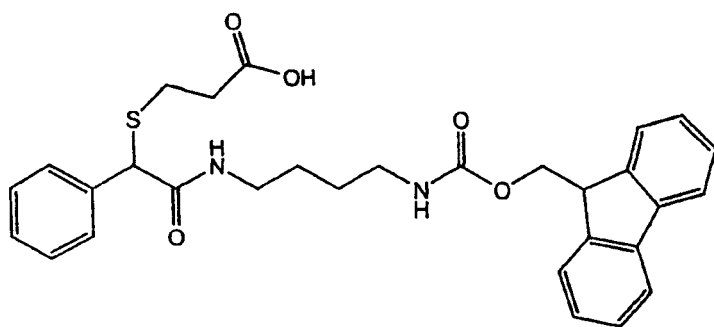


图10F

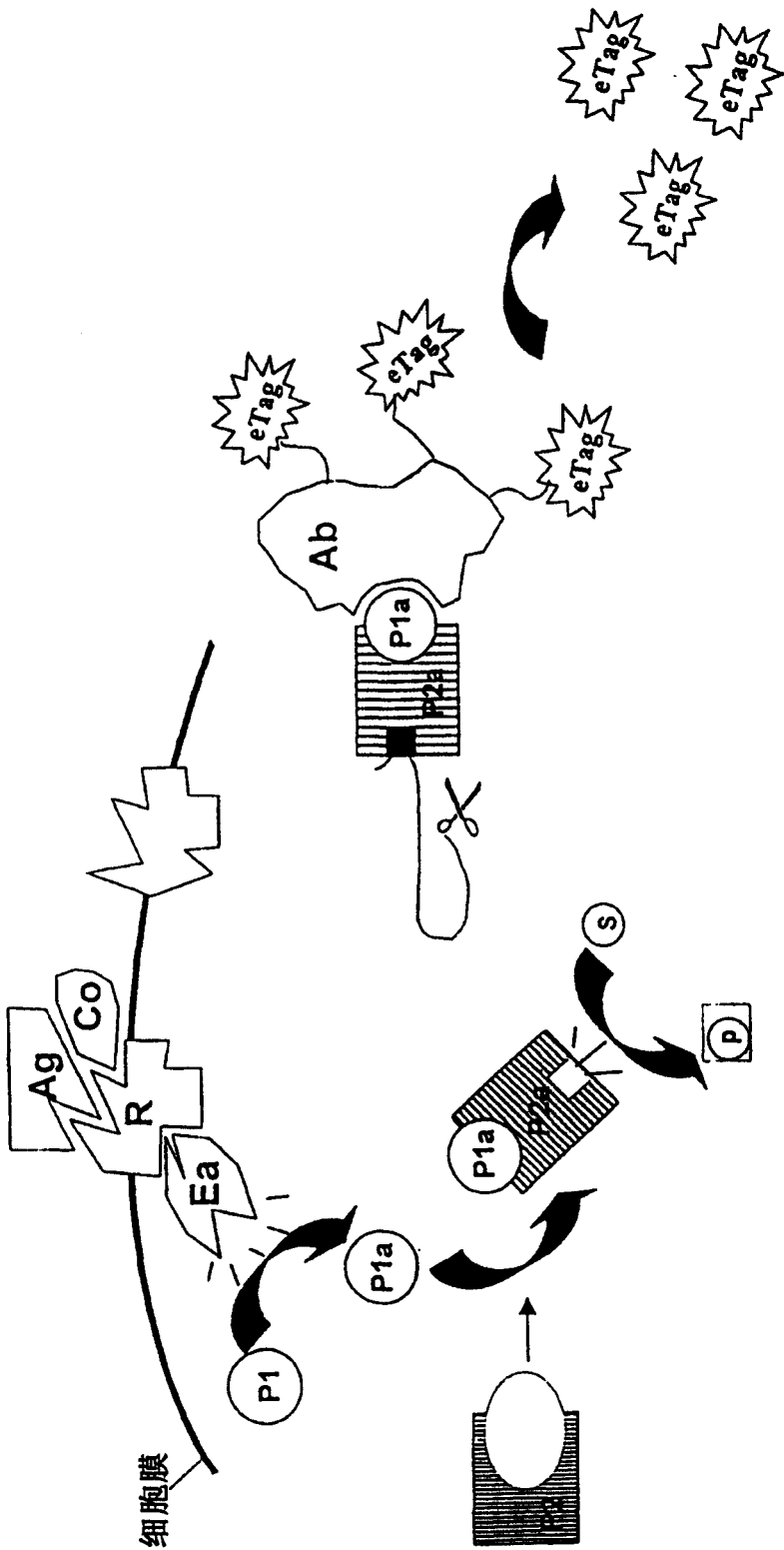


图11

细胞质

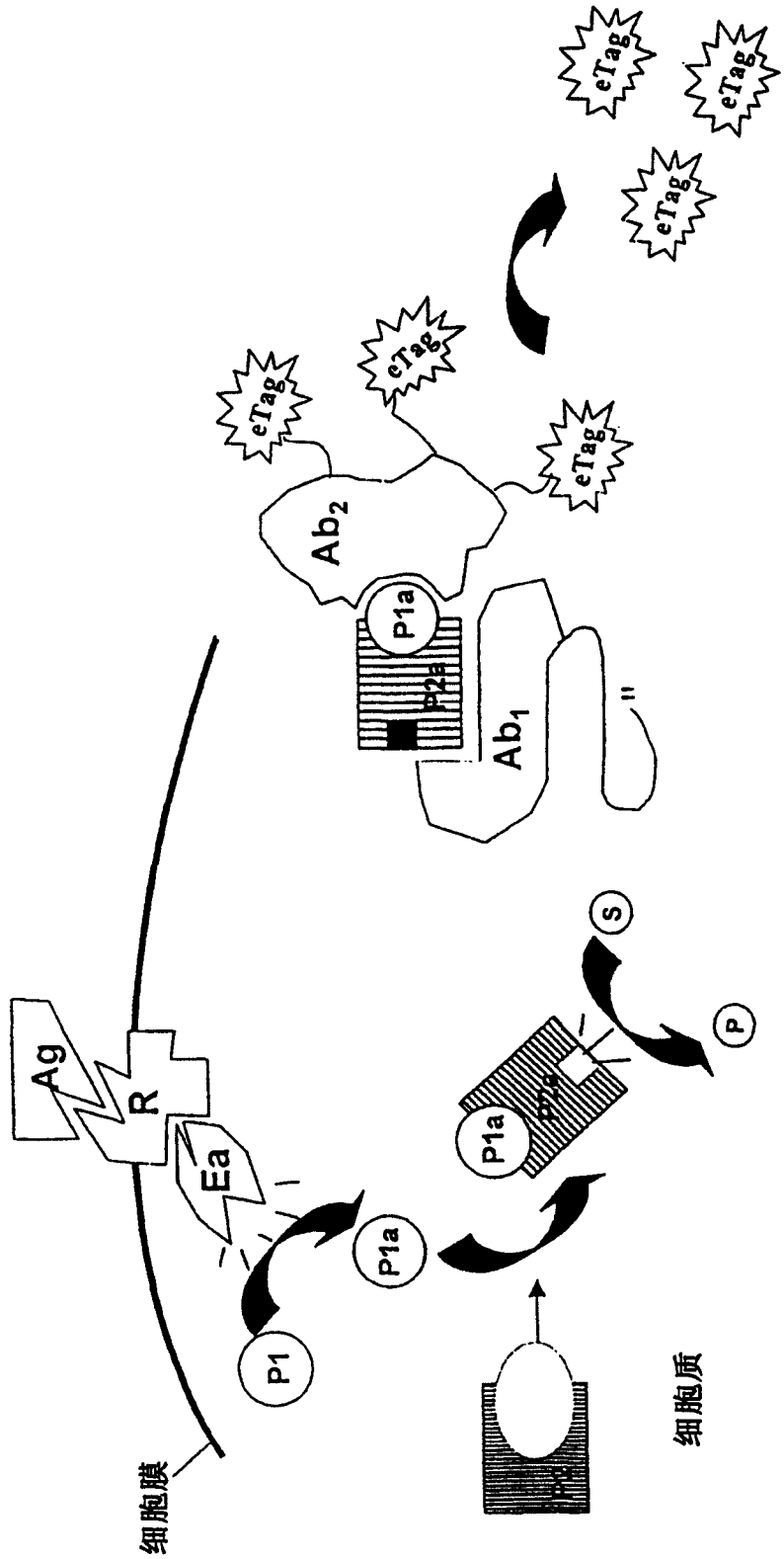
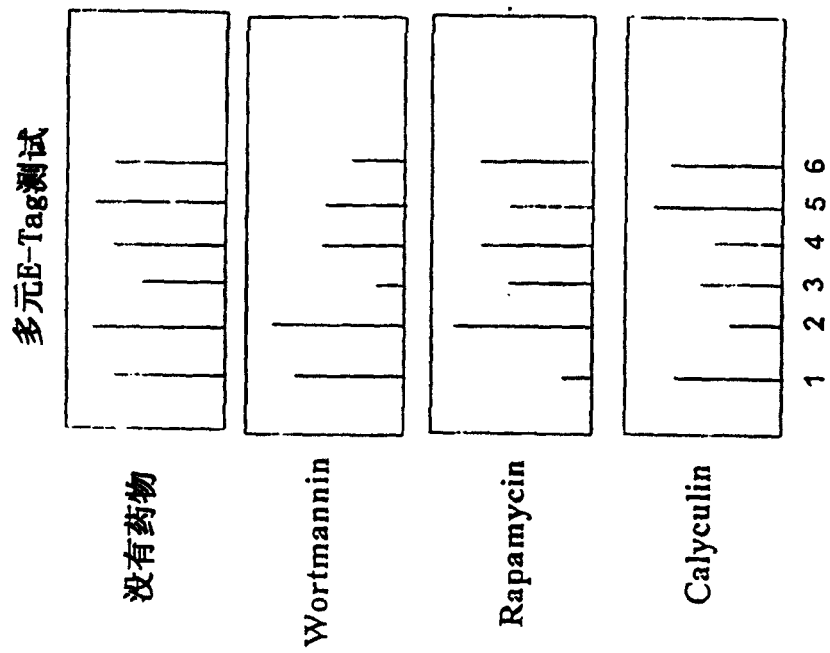


图12



B

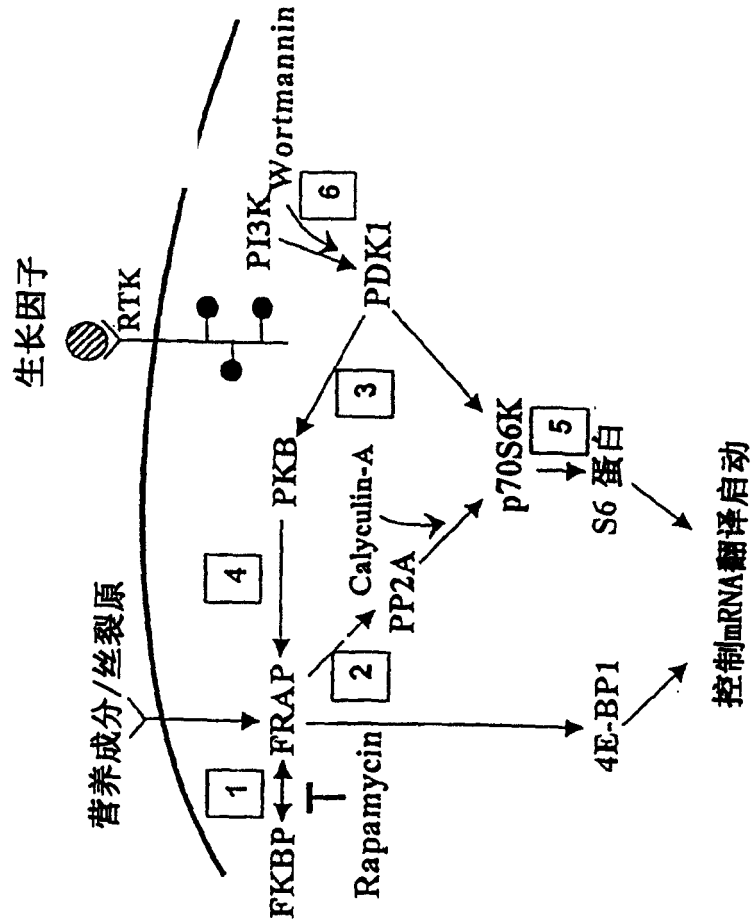


图13

A

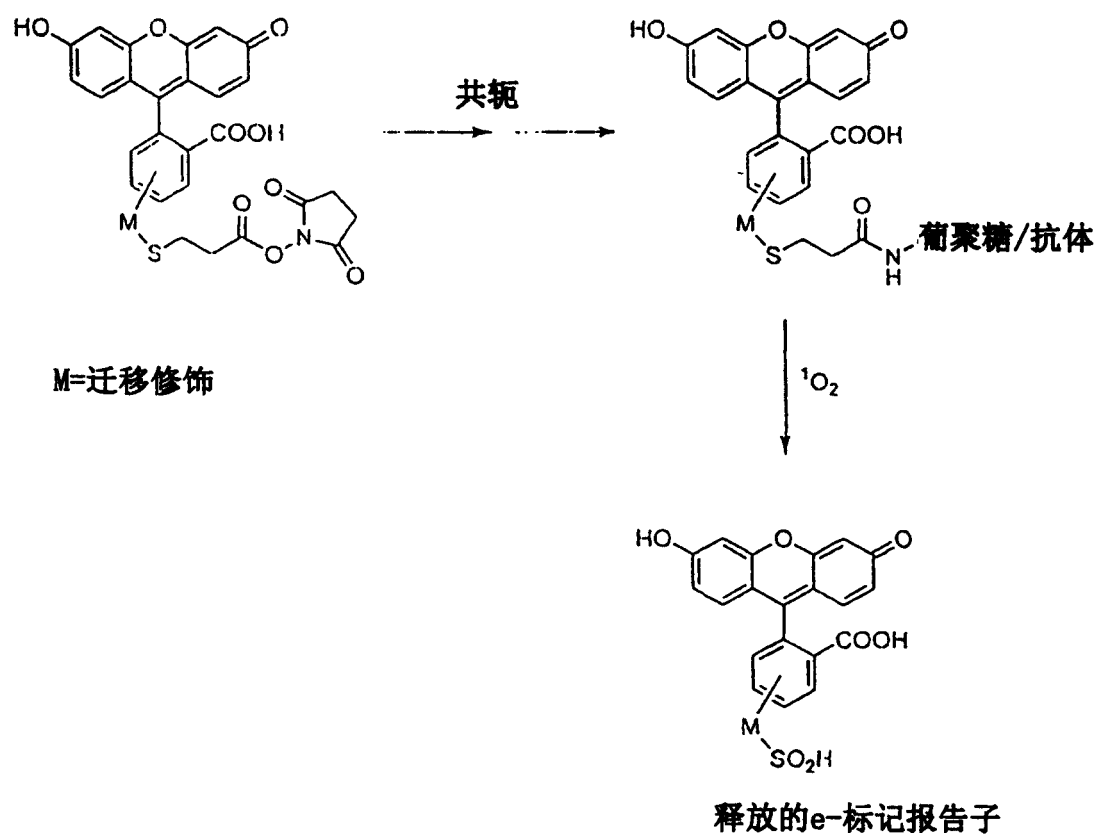


图14A

FAM-衍生的eTags合成

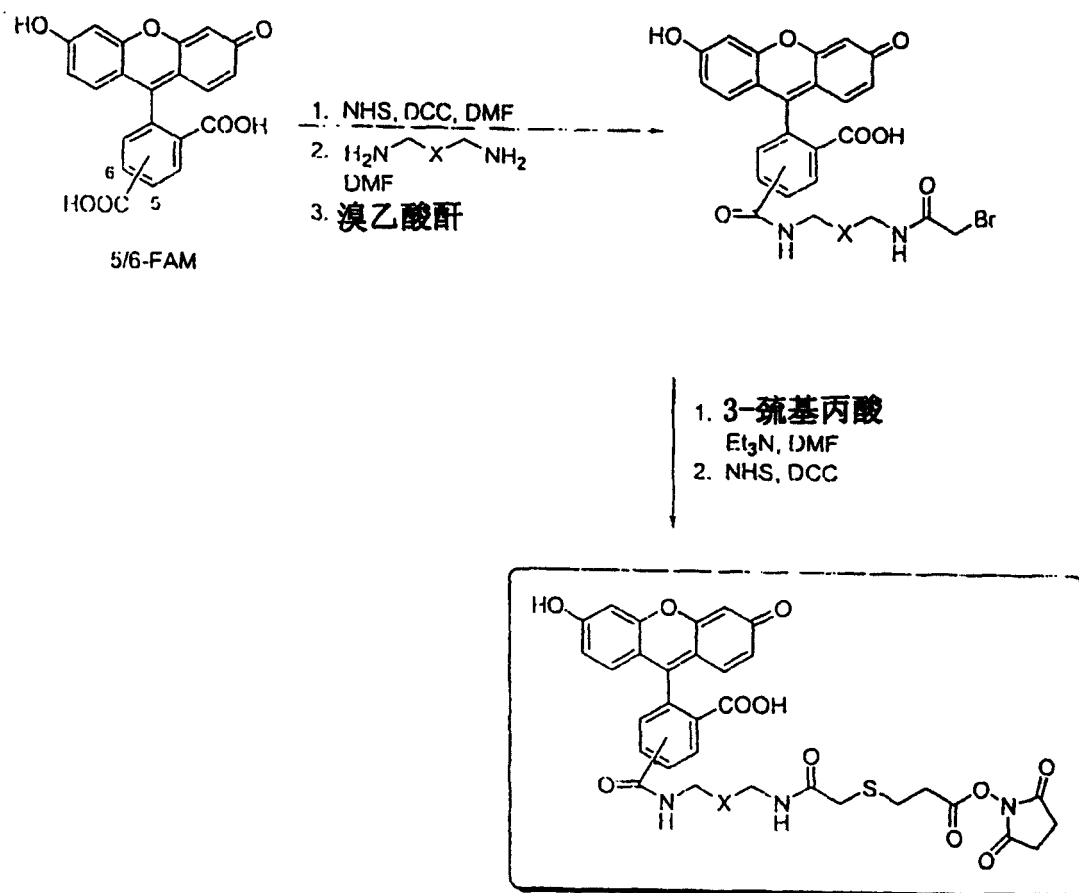
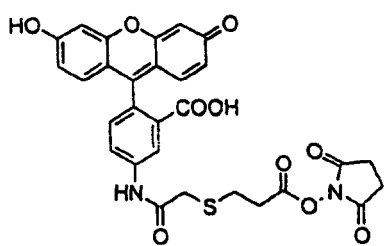
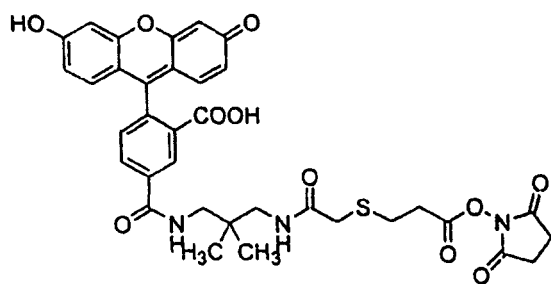
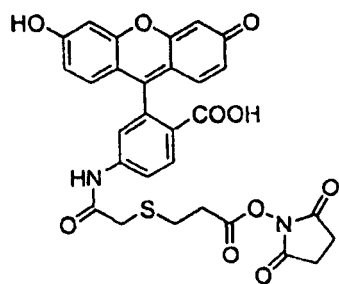


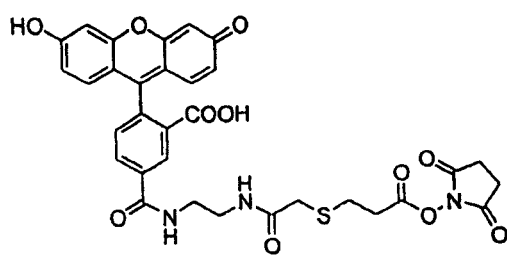
图14B

**Pro1-NHS**

Pro2-NHS

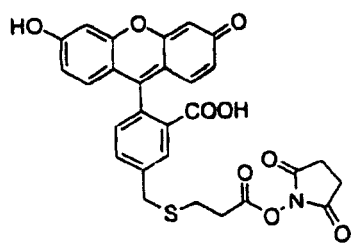
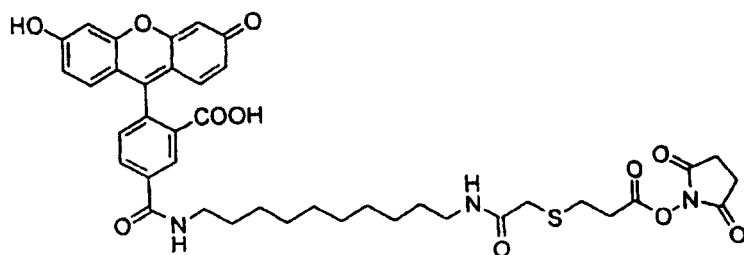
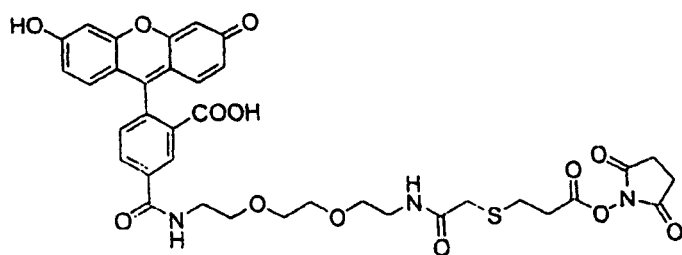
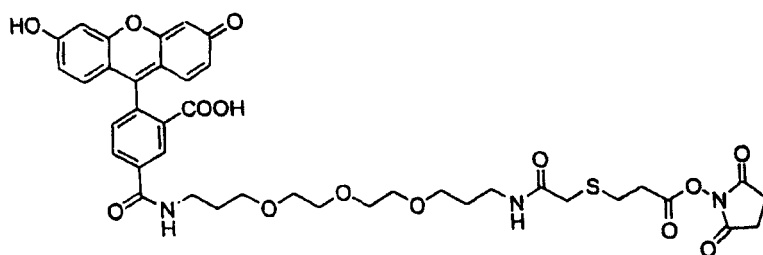


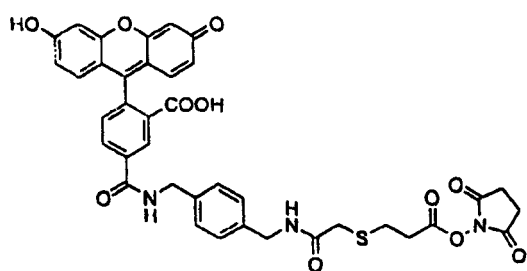
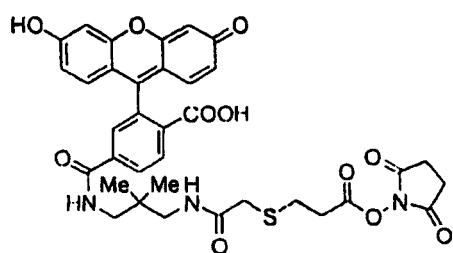
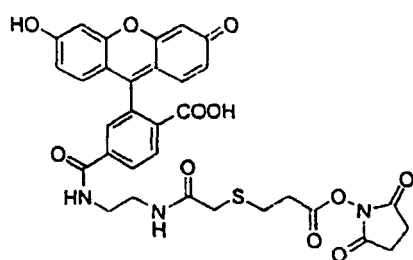
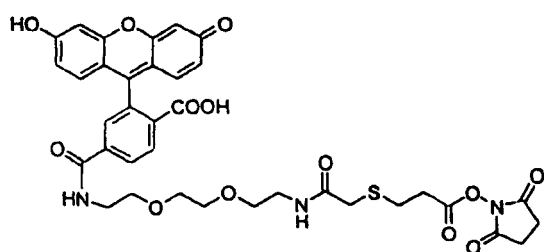
Pro3-NHS

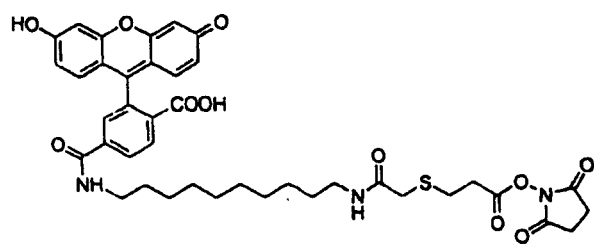
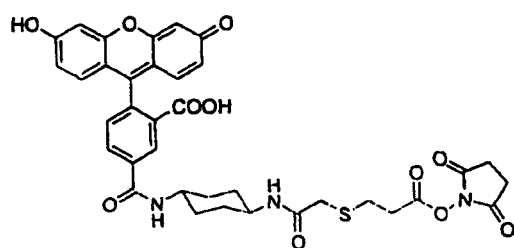
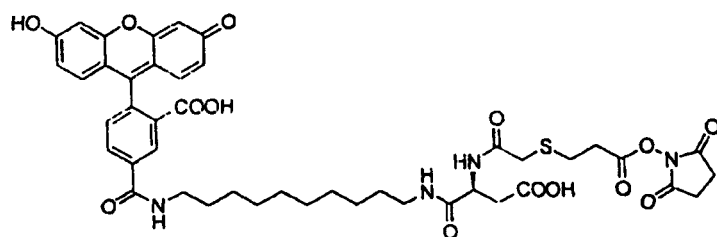
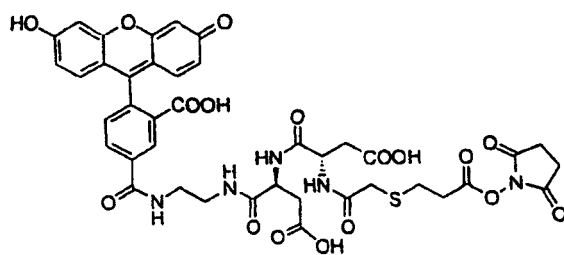


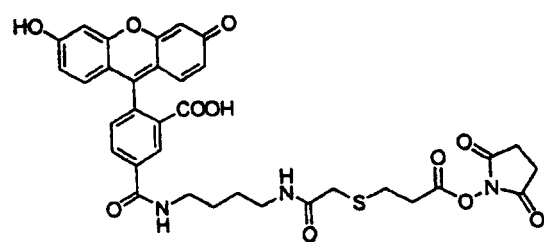
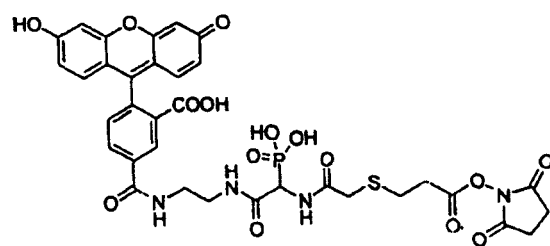
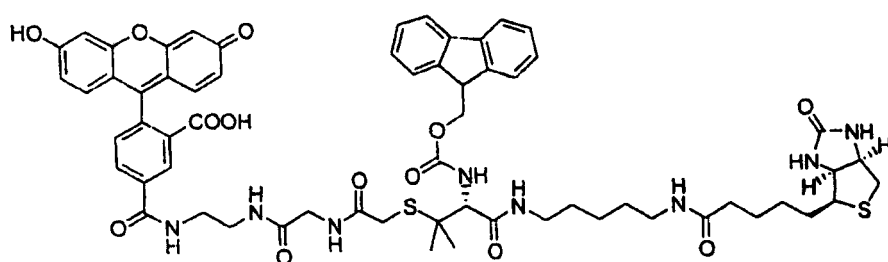
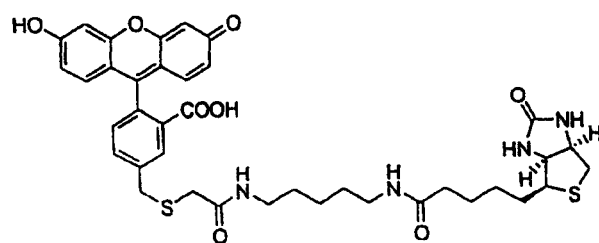
Pro4-NHS

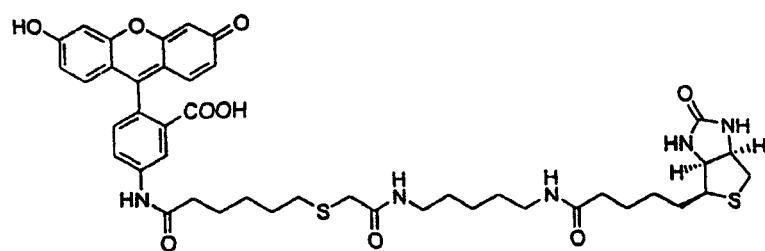
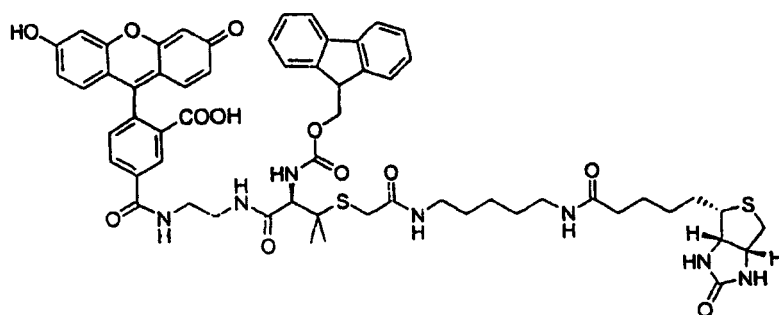
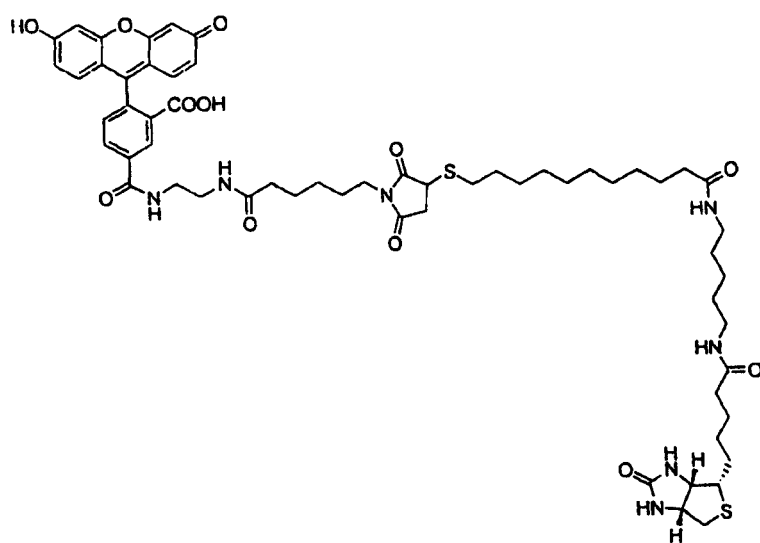
图15A

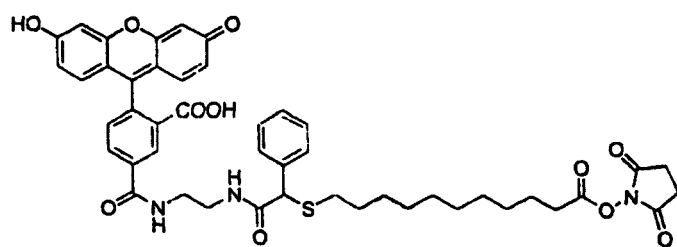
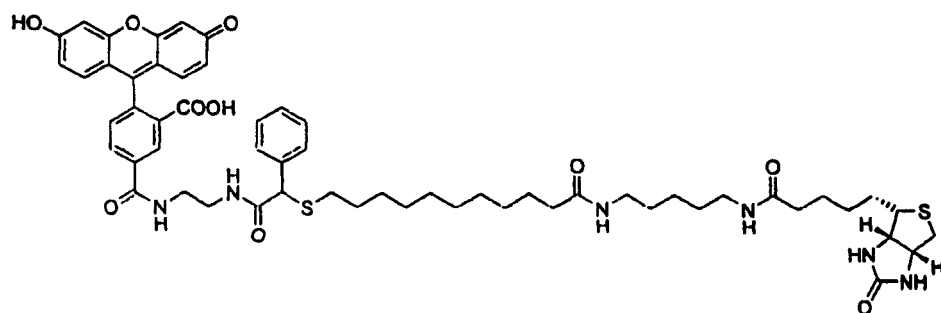
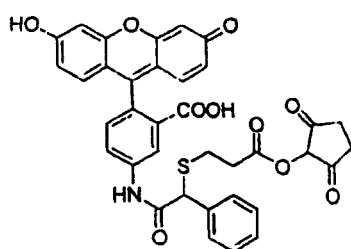
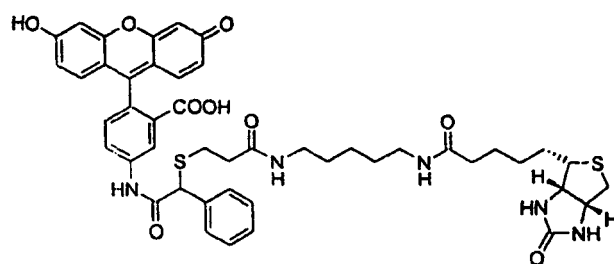
**Pro5-NHS****Pro6-NHS****Pro7-NHS****Pro8-NHS****图15B**

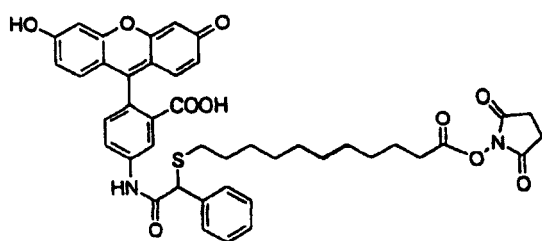
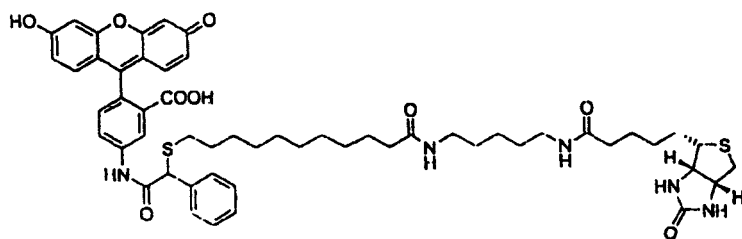
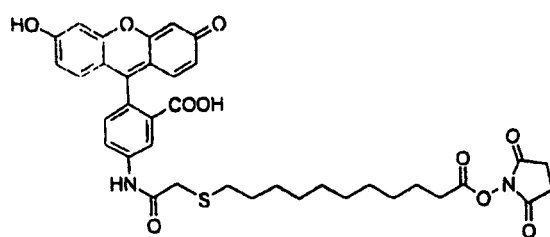
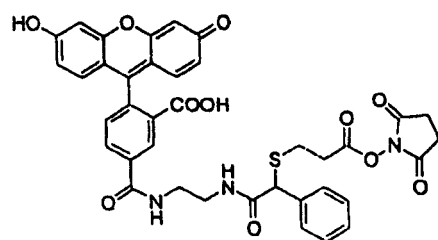
**Pro9-NHS****Pro10-NHS****Pro11-NHS****Pro12-NHS****图15C**

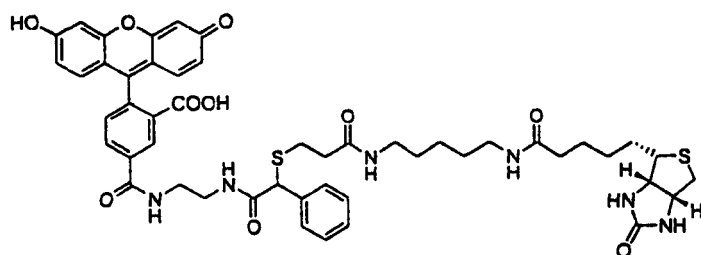
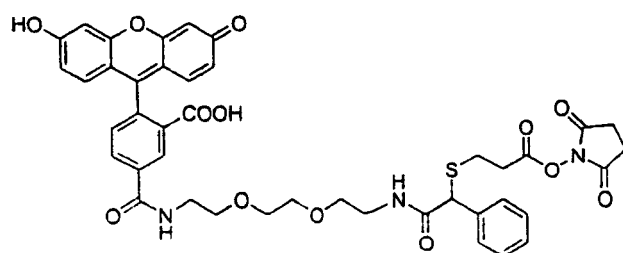
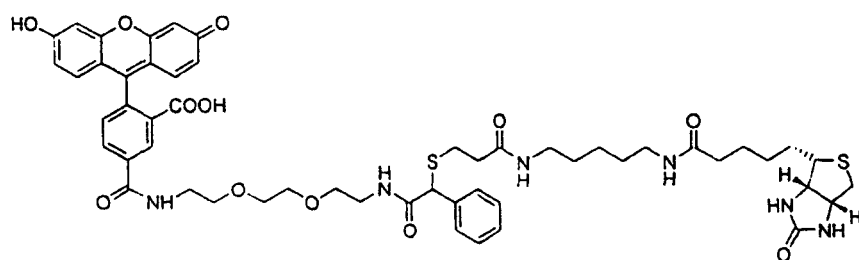
**Pro17-NHS****Pro18-NHS****Pro19-NHS****Pro20-NHS****图15E**

**Pro21-NHS****Pro22-NHS****Pro23-生物素****Pro24-生物素****图15F**

**Pro25-生物素****Pro26-生物素****Pro27-生物素****图15G**

**Pro28-NHS****Pro28-生物素****Pro29-NHS****Pro29-生物素****图15H**

**Pro30-NHS****Pro30-生物素****Pro31-NHS****Pro32-NHS****图15I**

**Pro32-生物素****Pro33-NHS****Pro33-生物素****图 15J**

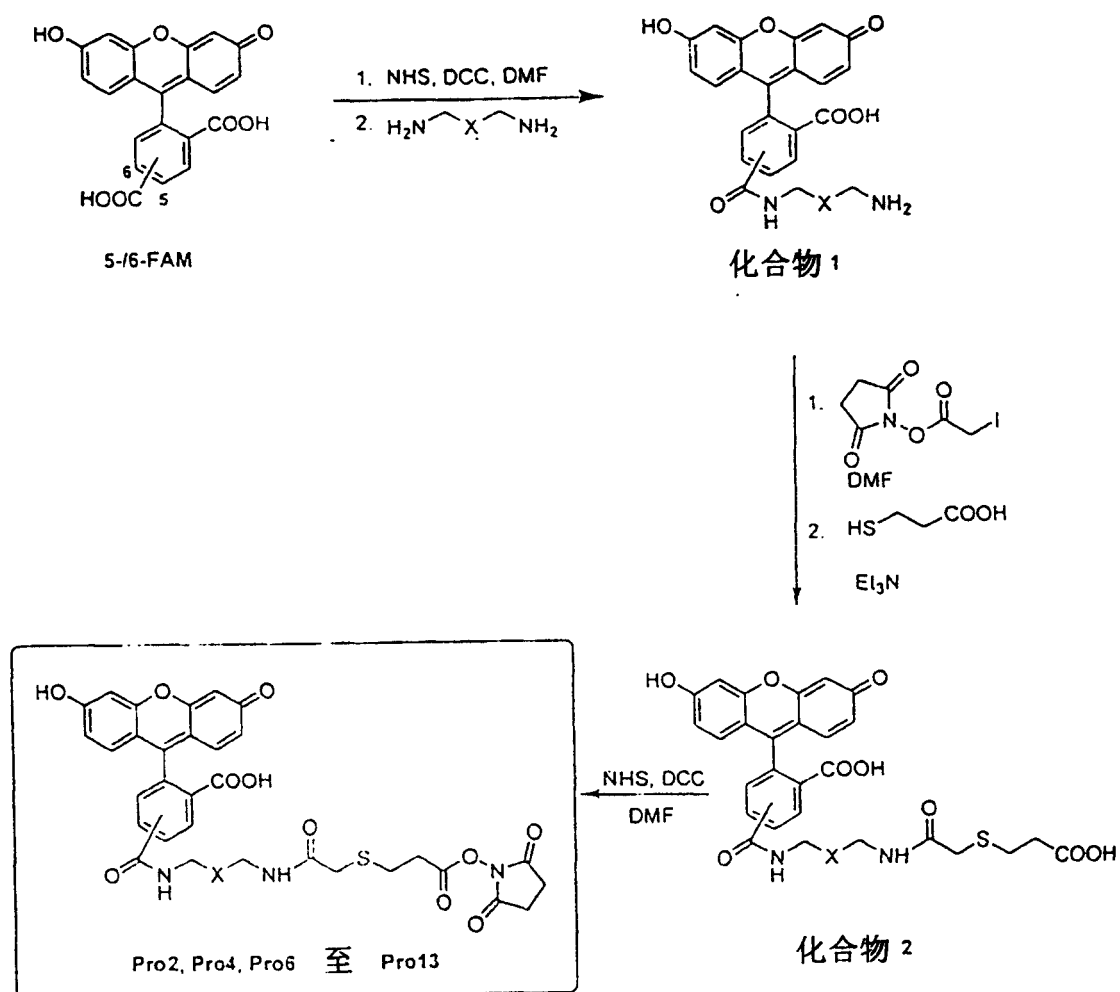


图 16A

图 16B

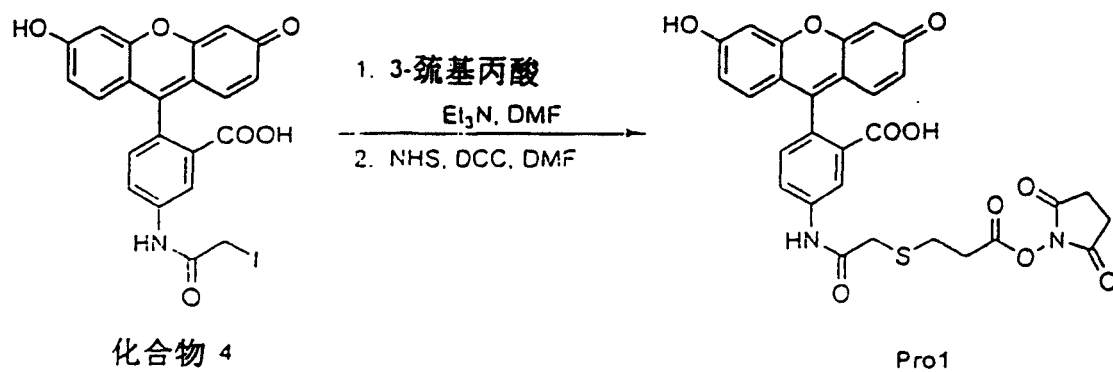


图 16C

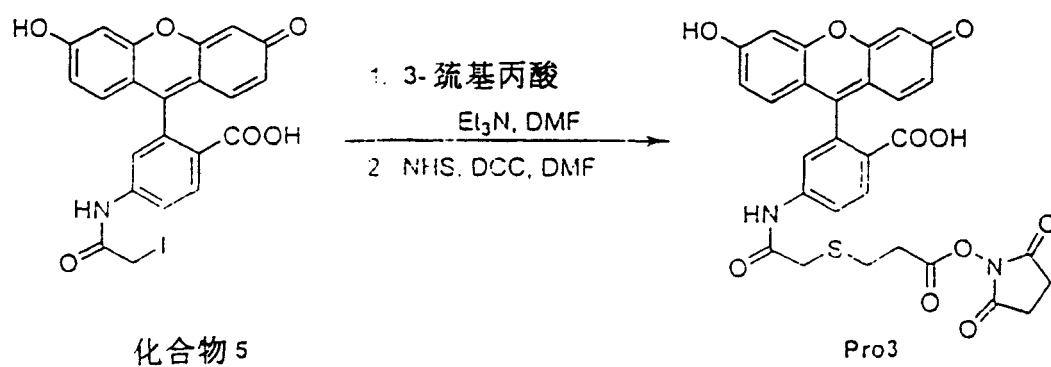
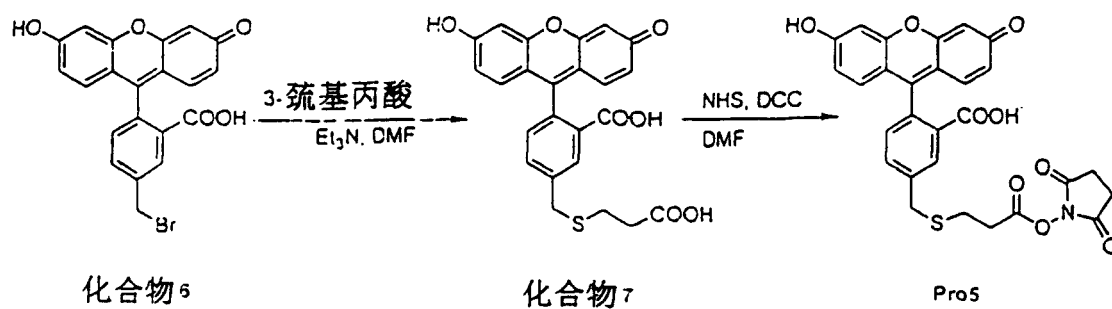


图 16D



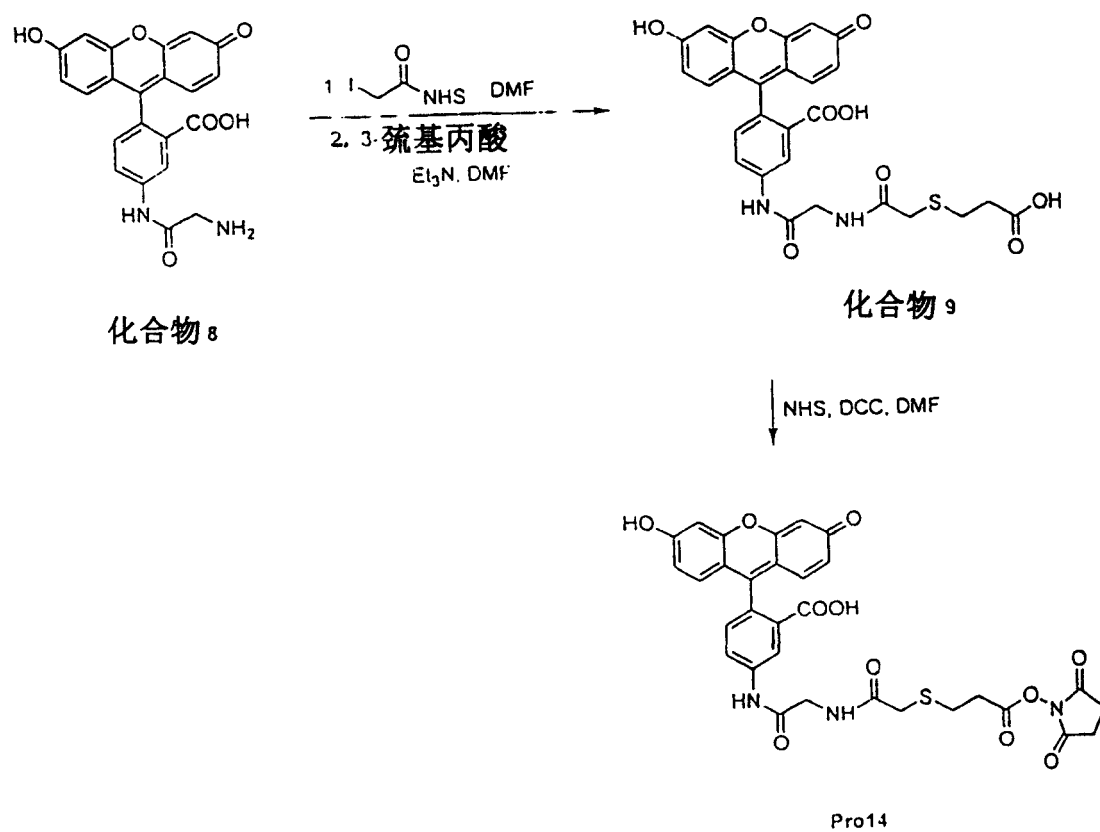


图 16E

Pro15 的合成

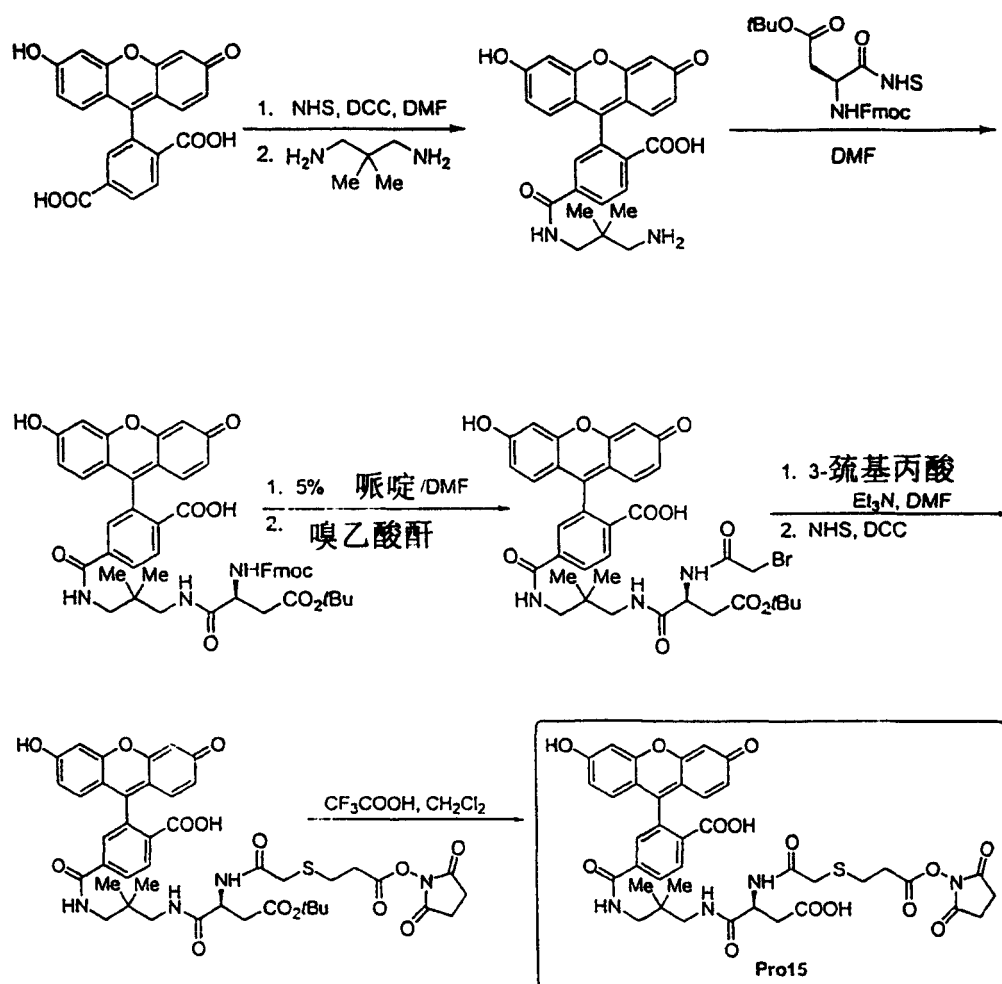


图 16F

Pro22 的合成

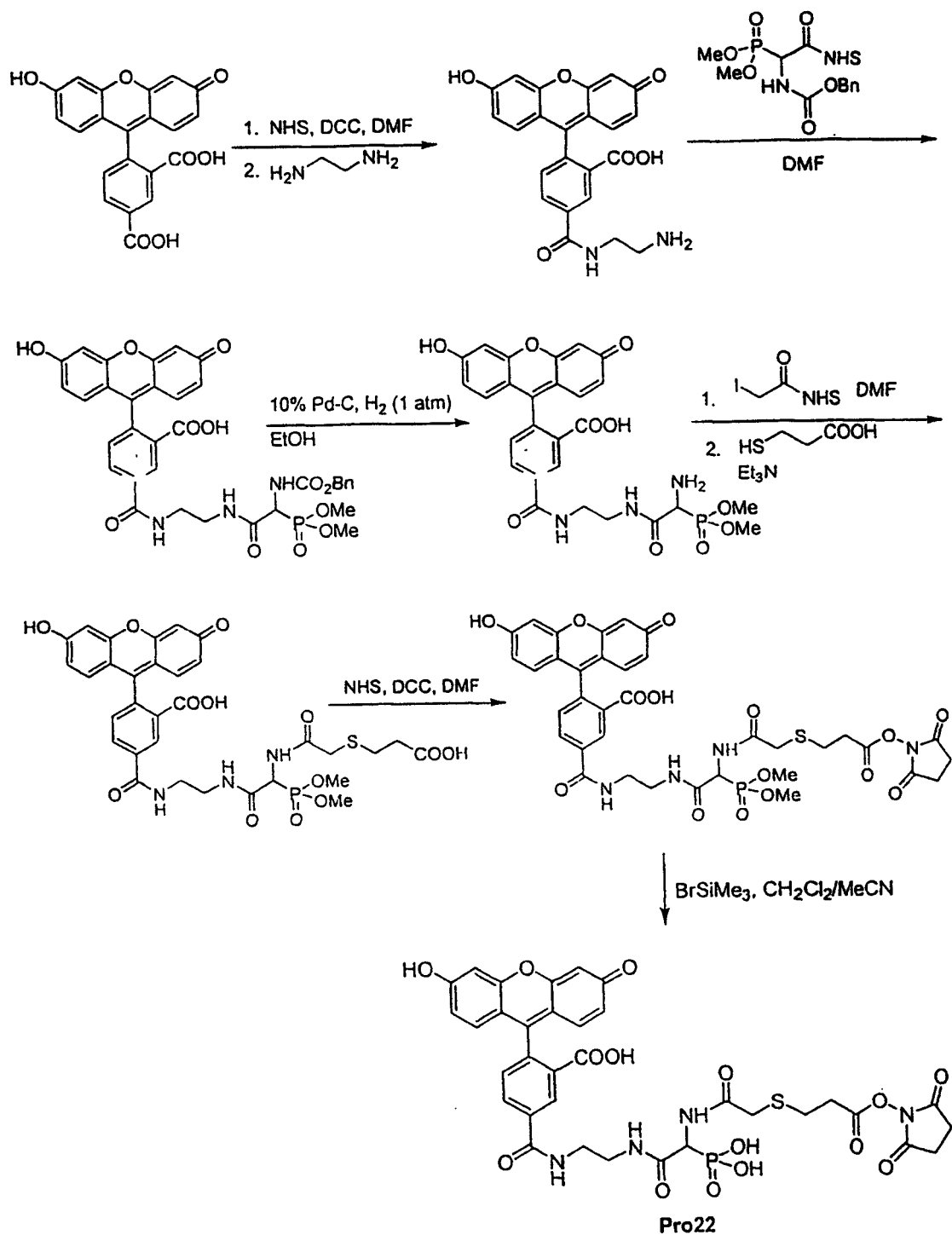


图 16H

Pro28 的合成

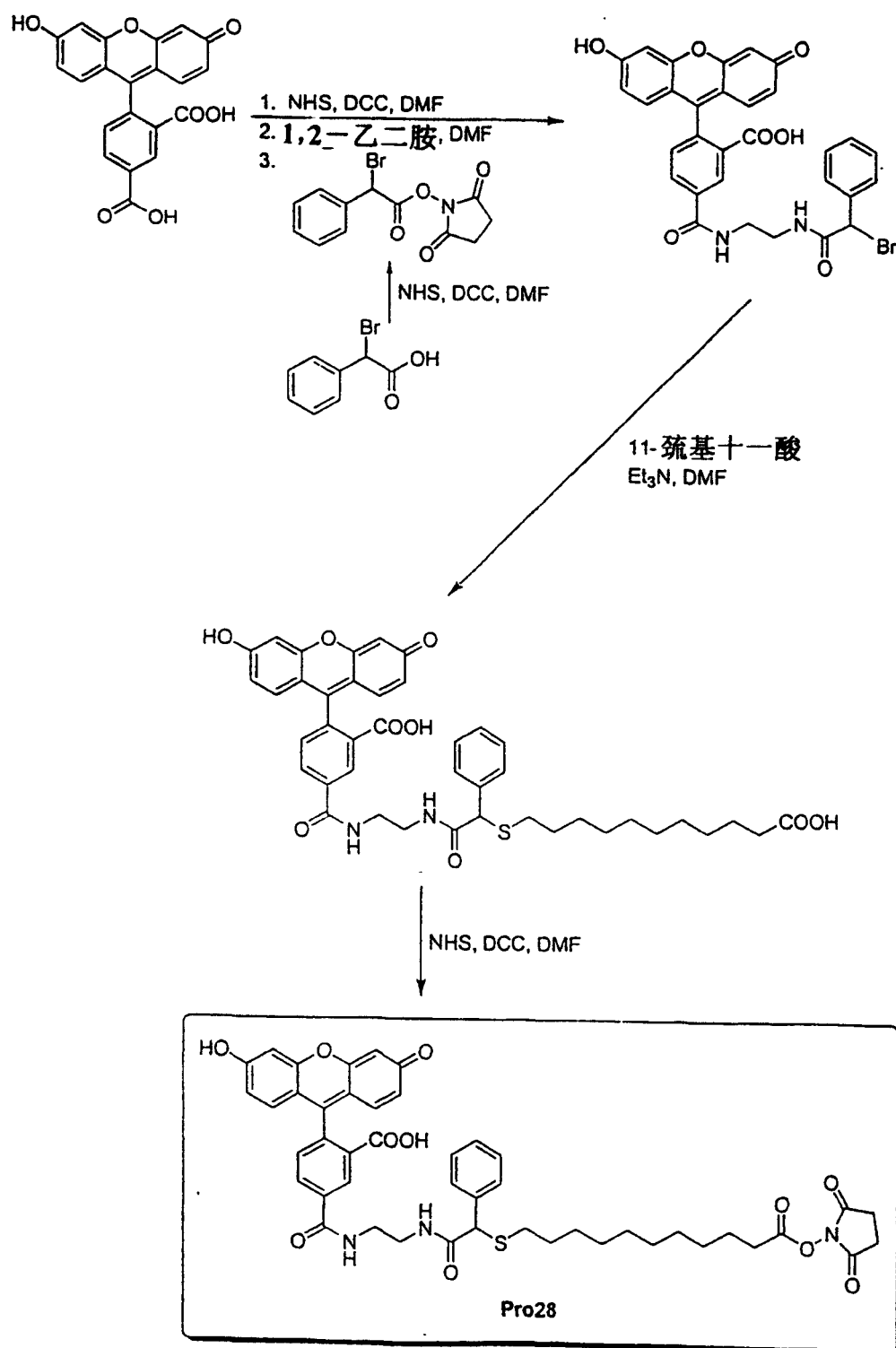


图 16I

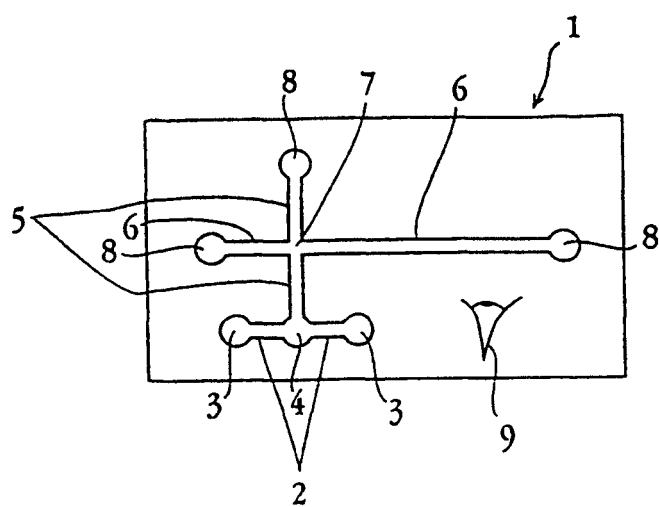


图 17A

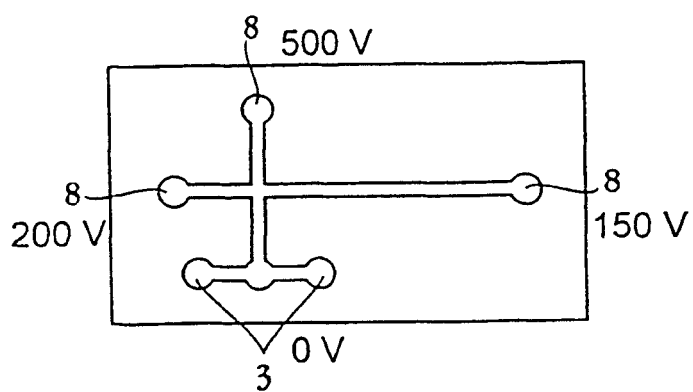


图 17B

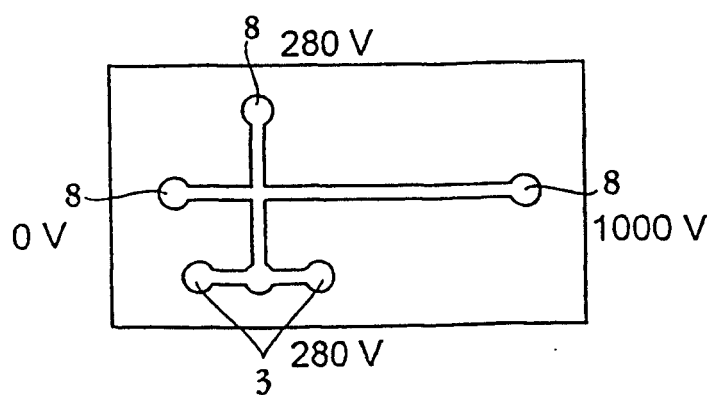


图 17C

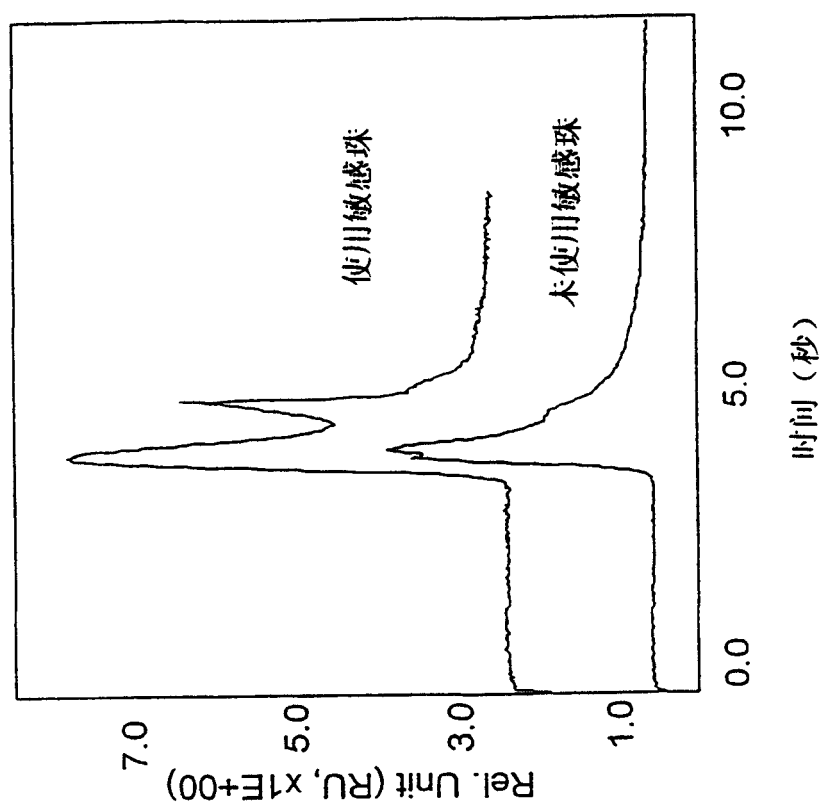


图 18

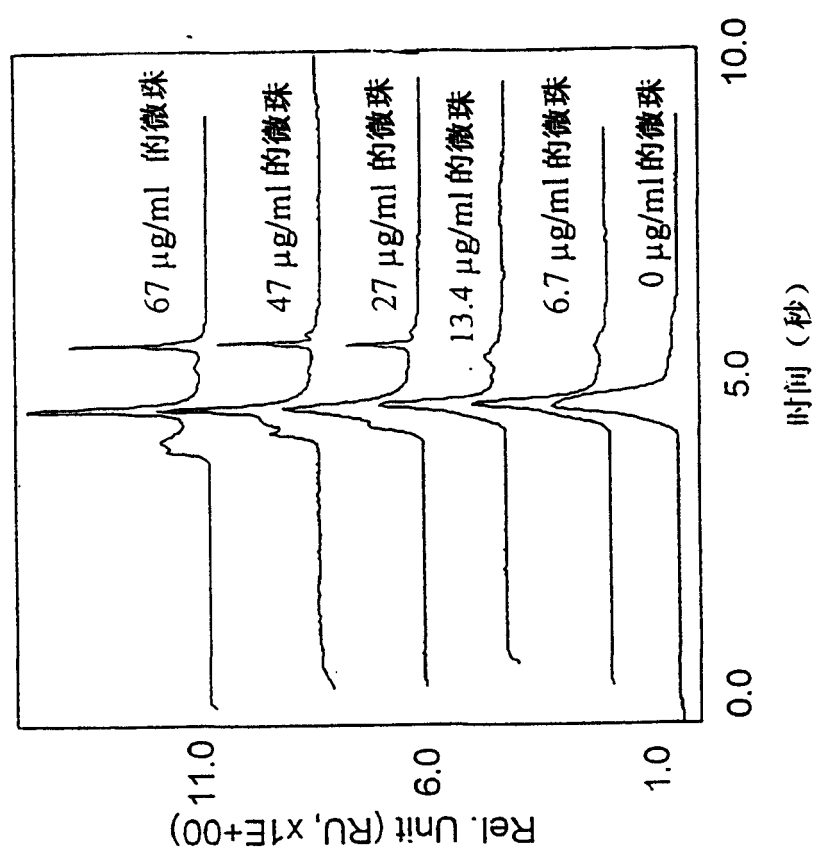


图 19

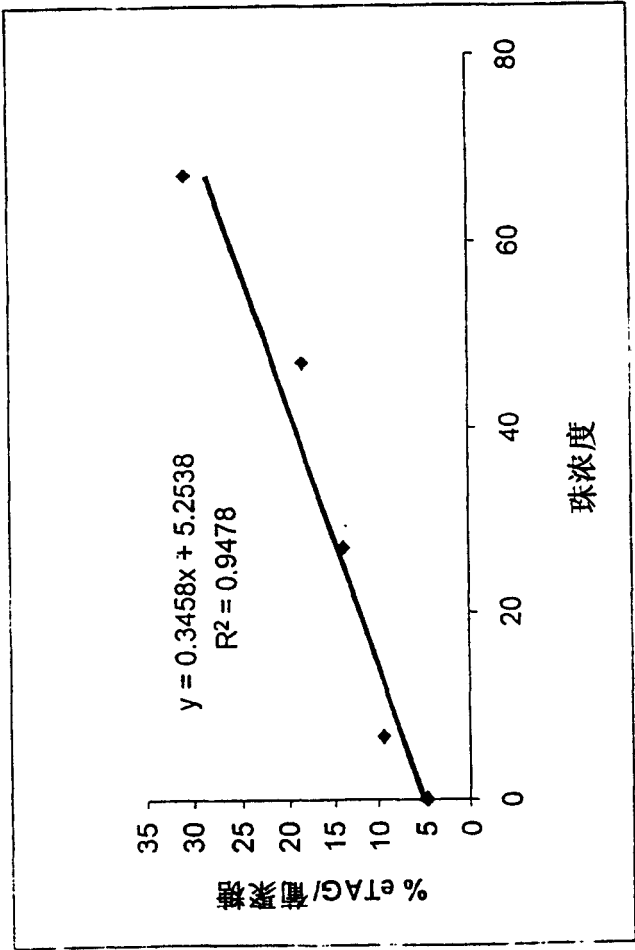


图 20

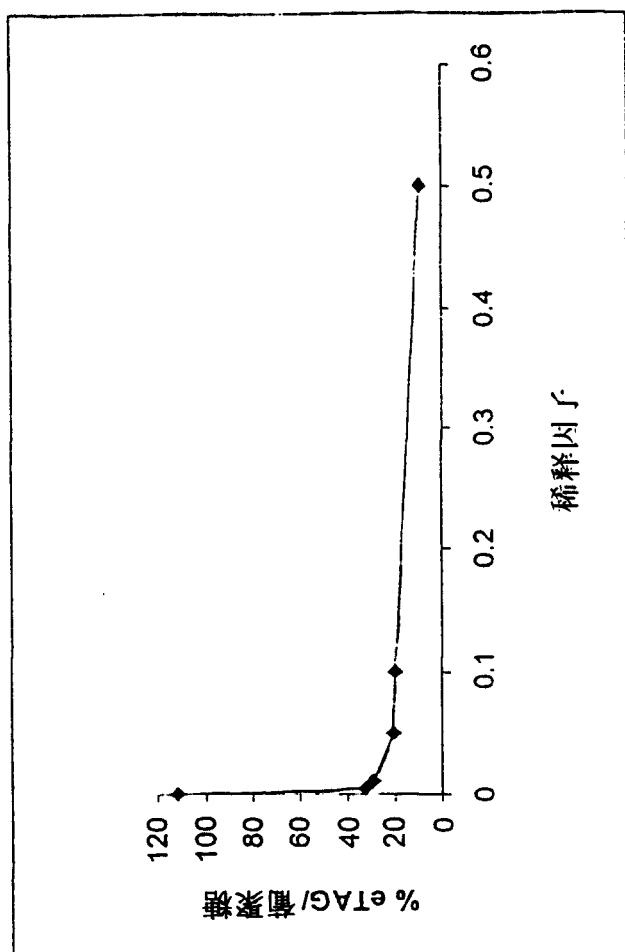


图 21

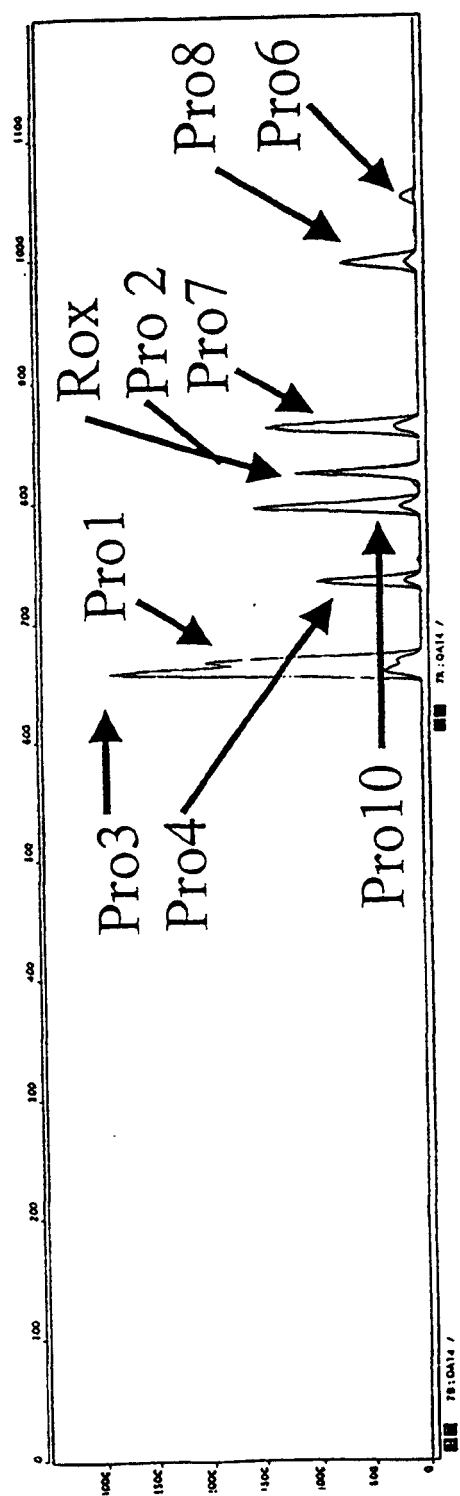


图 22

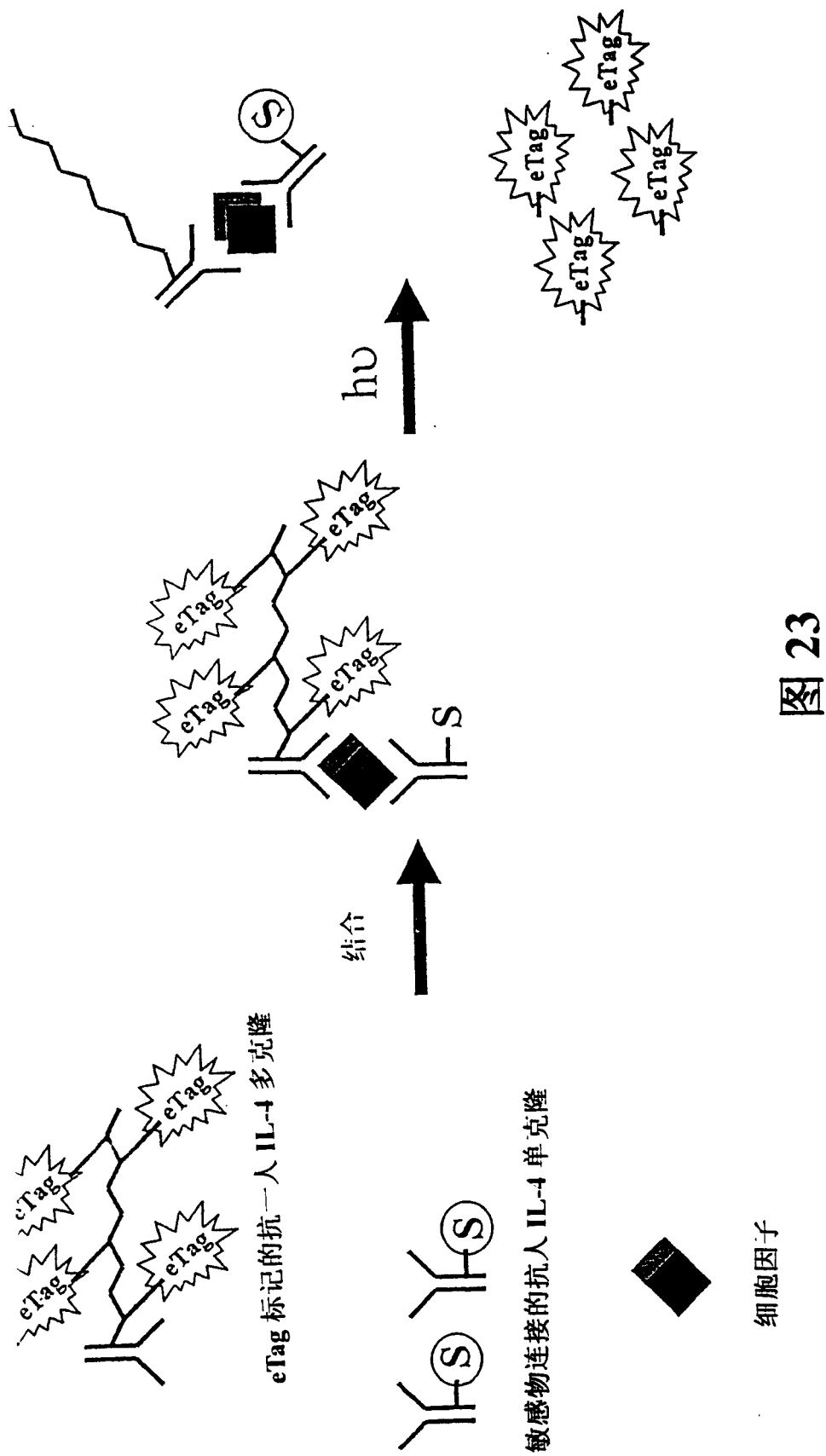


图 23

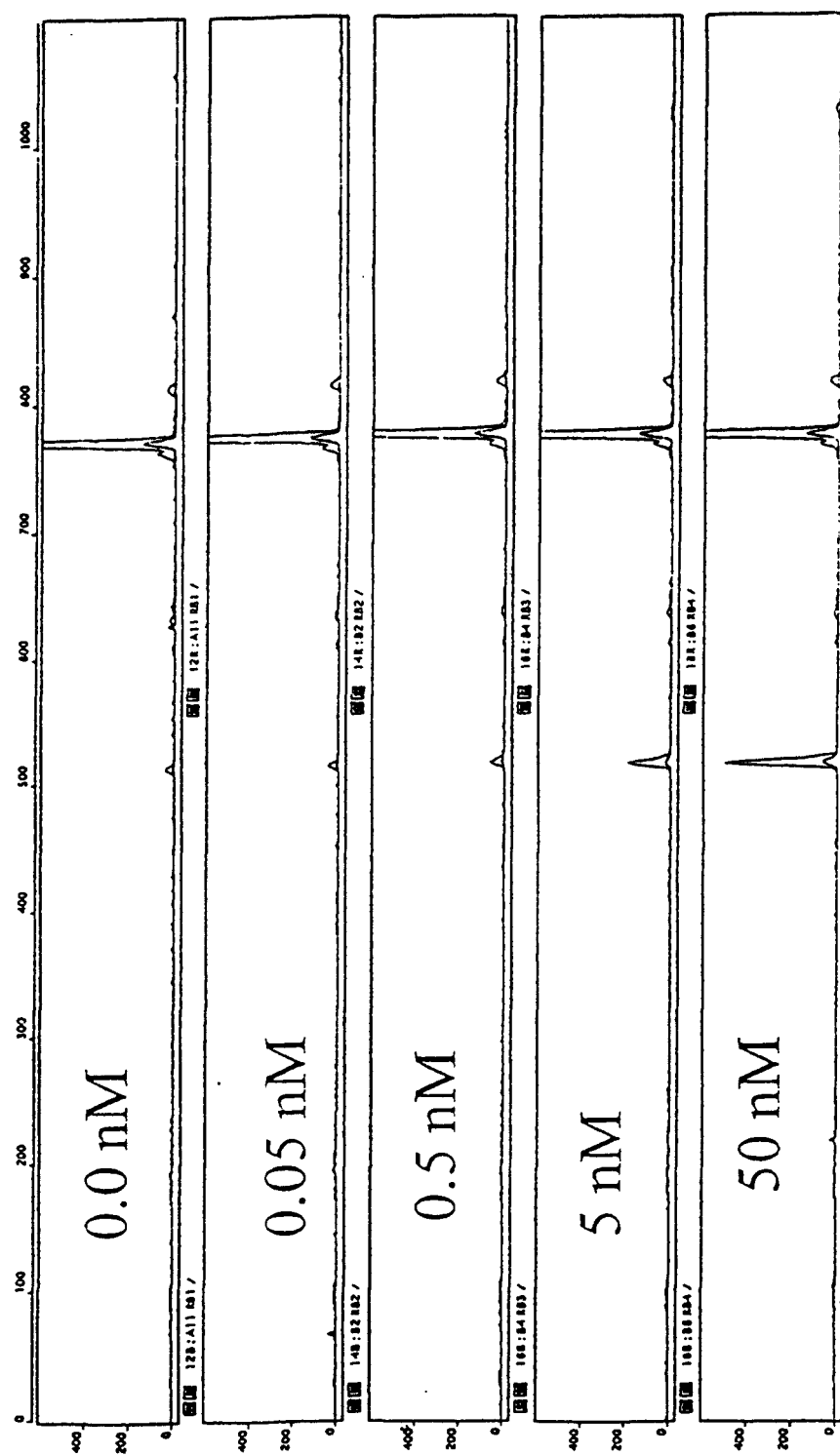


图 24

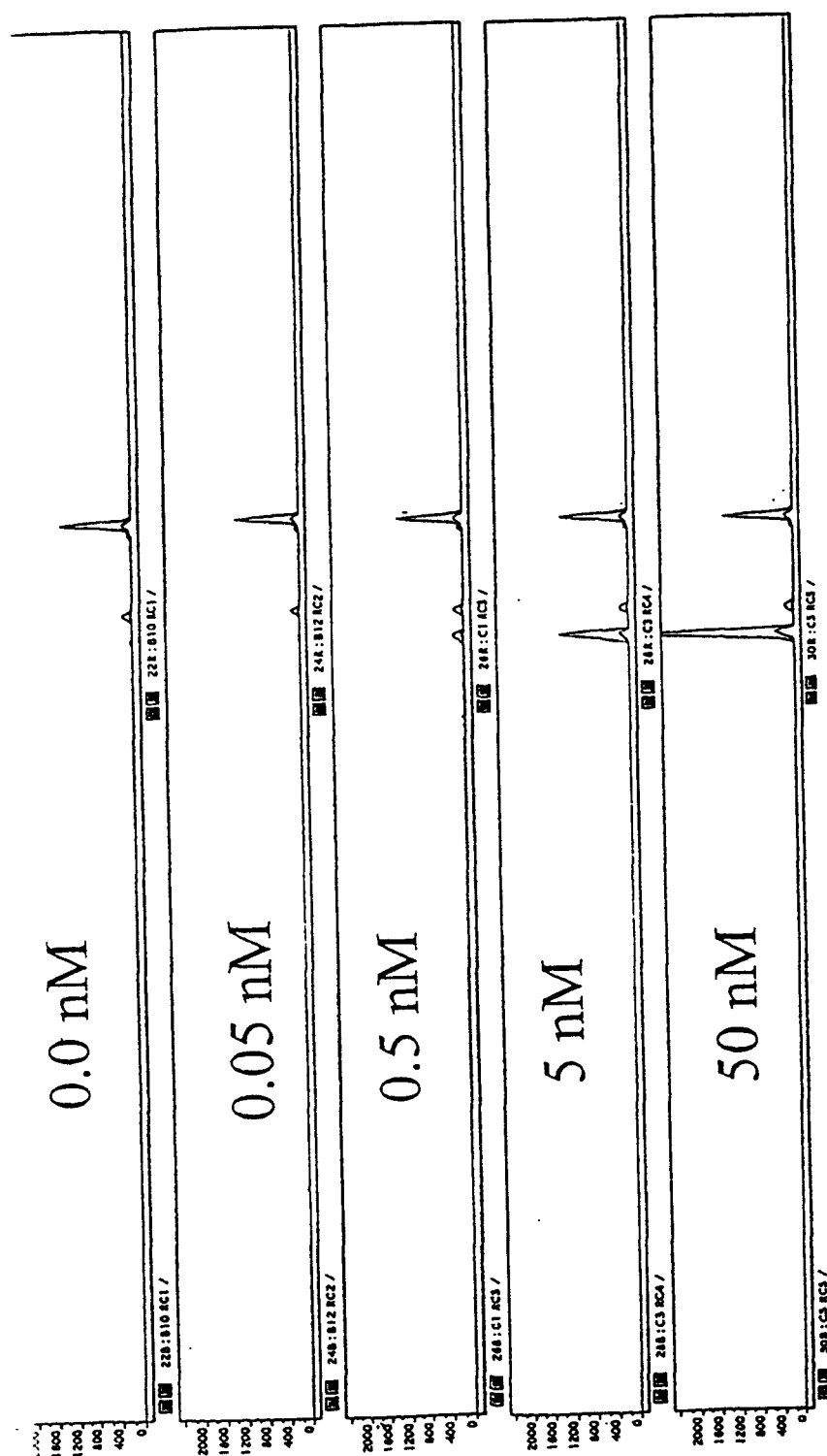


图 25

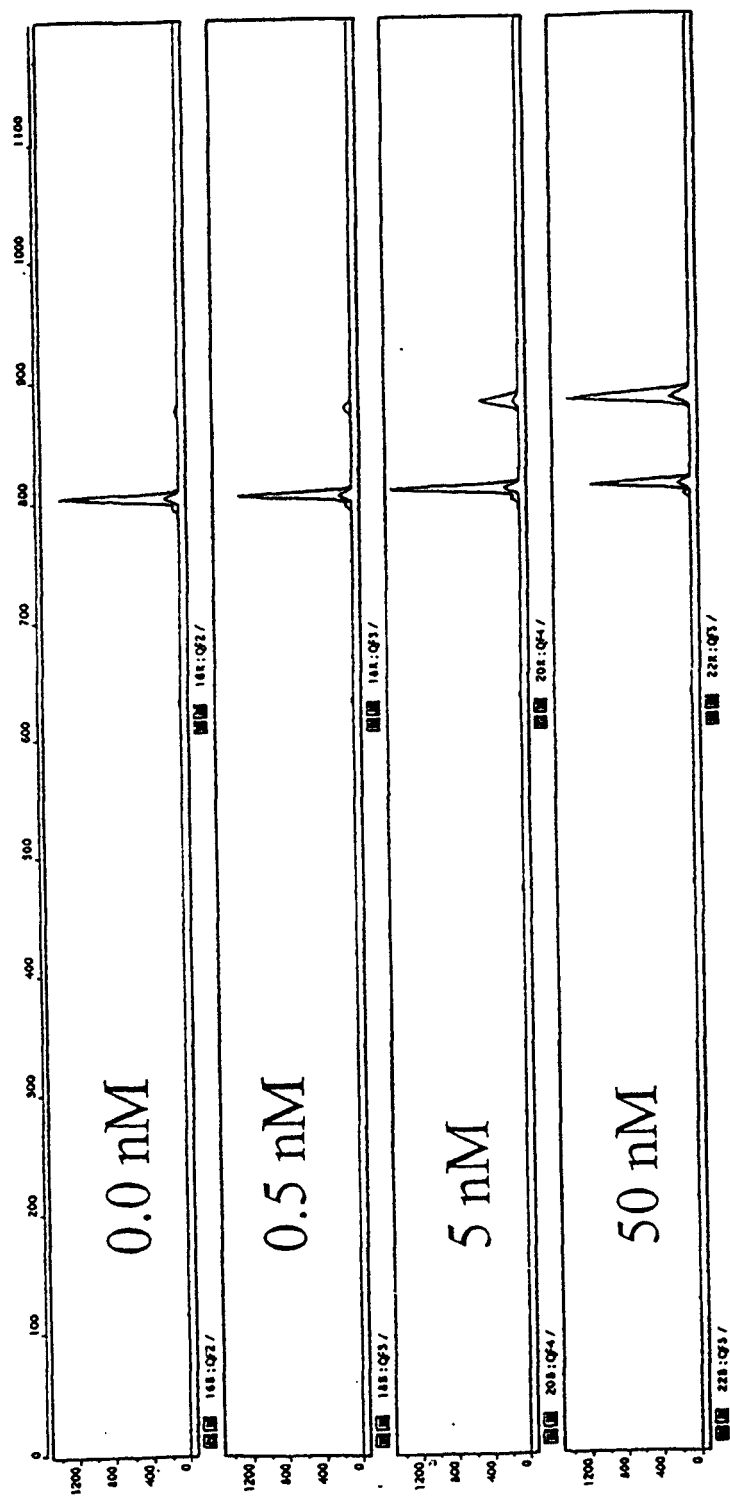


图 26

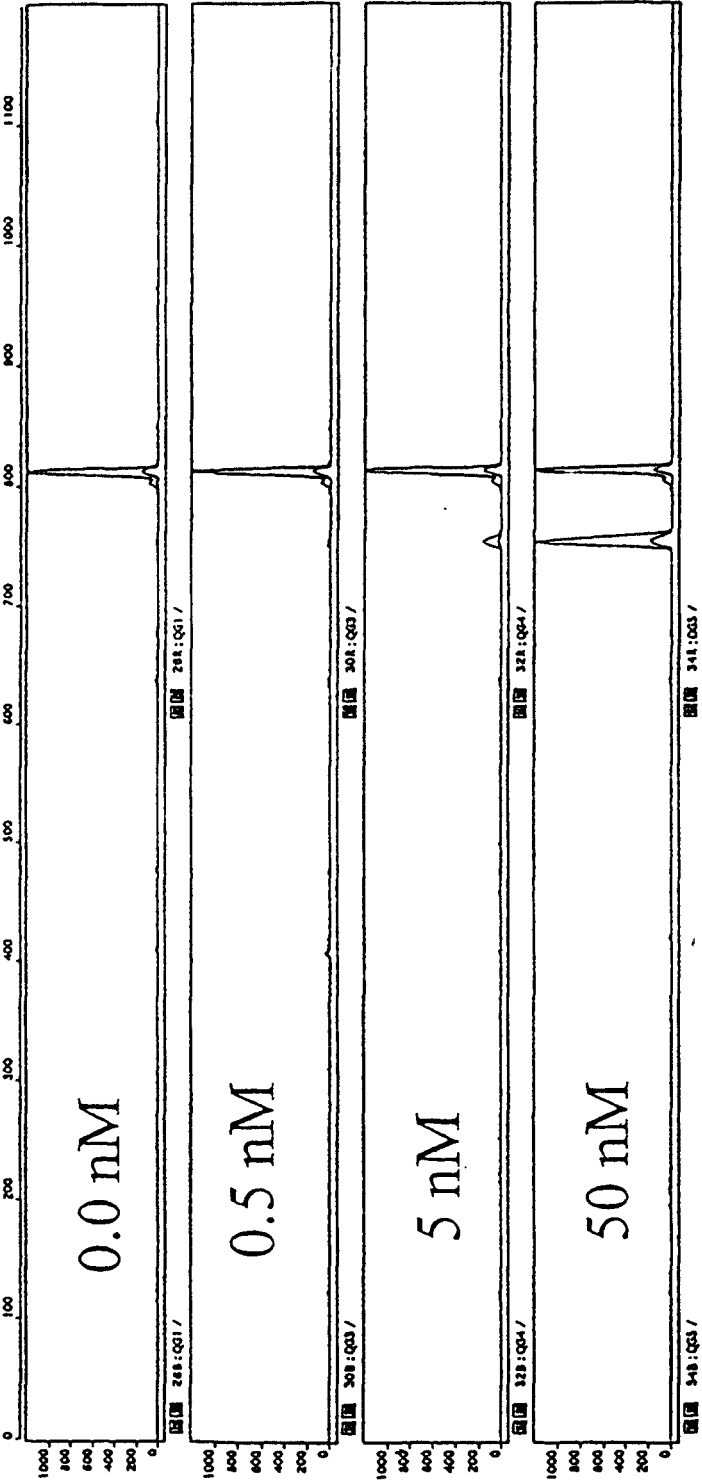


图 27

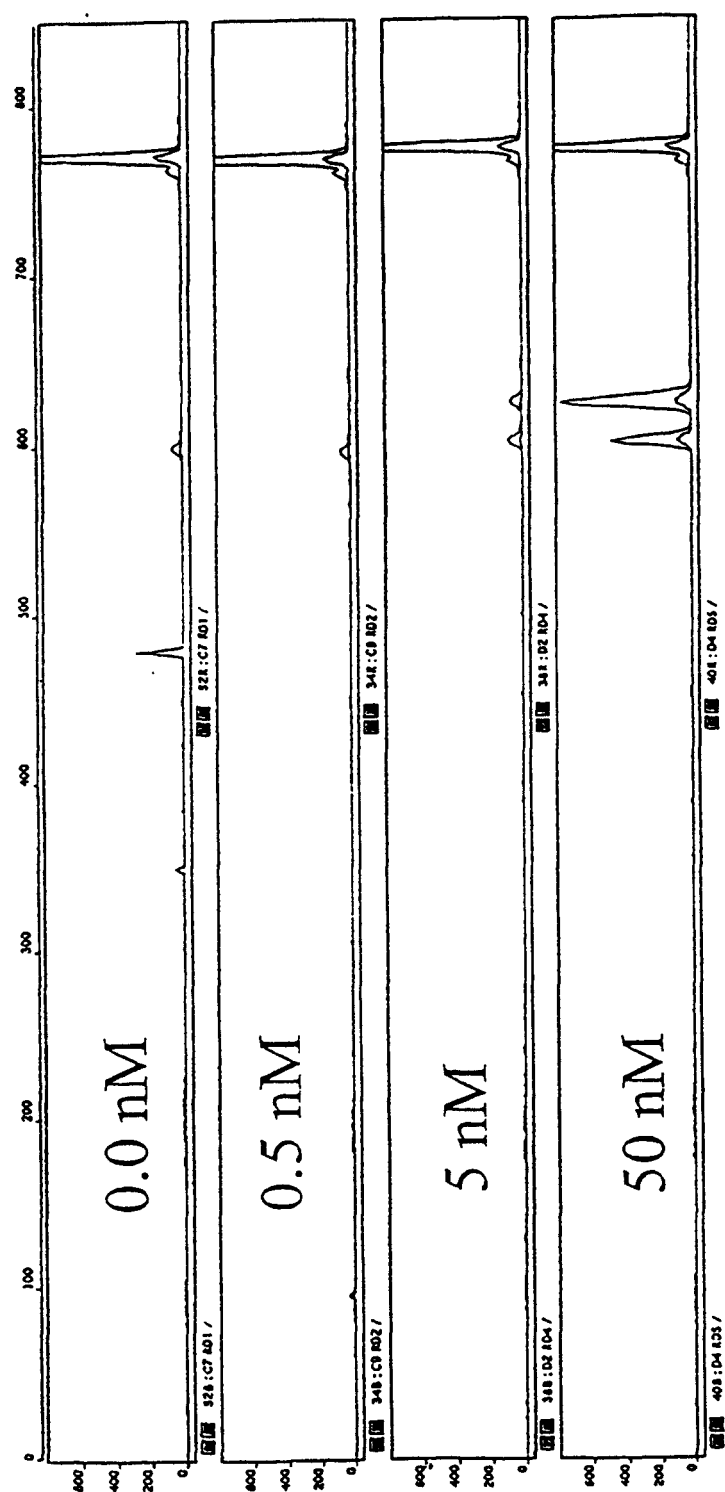


图 28

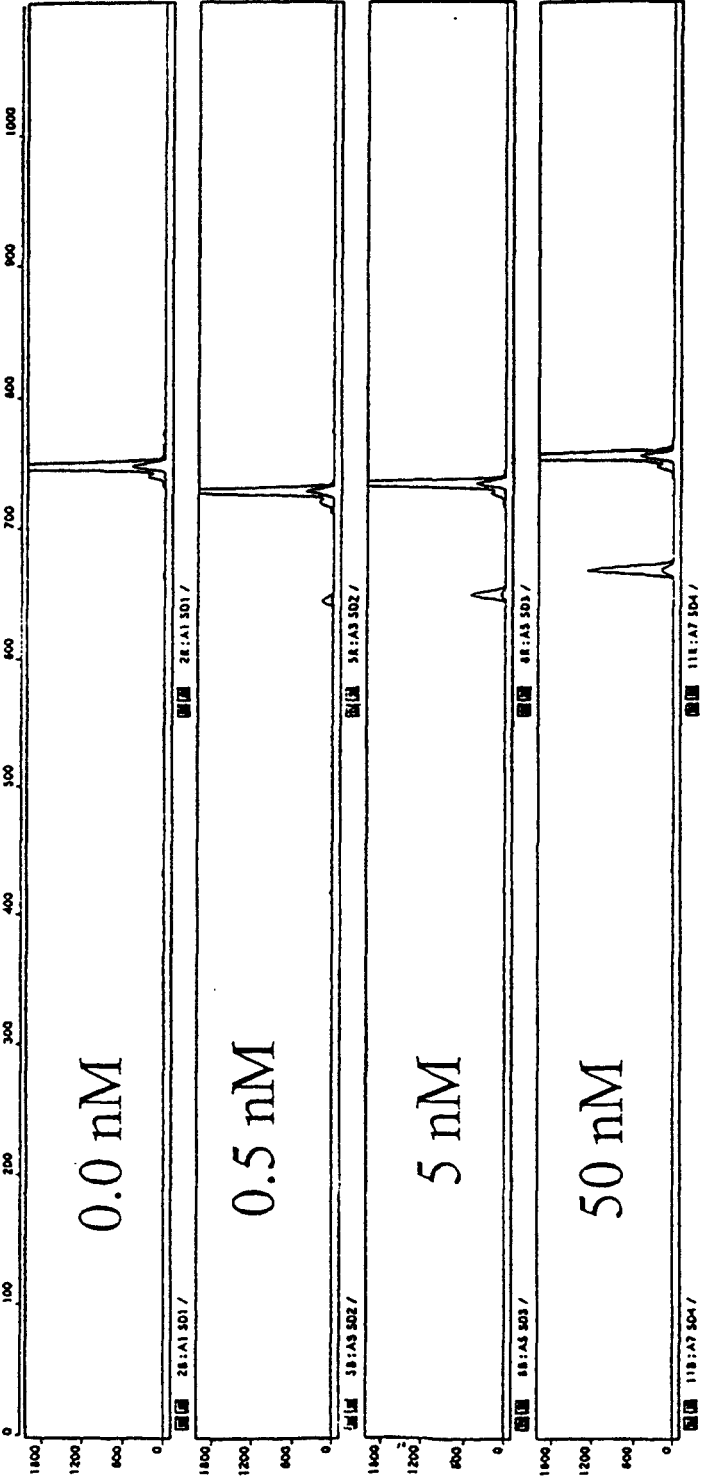
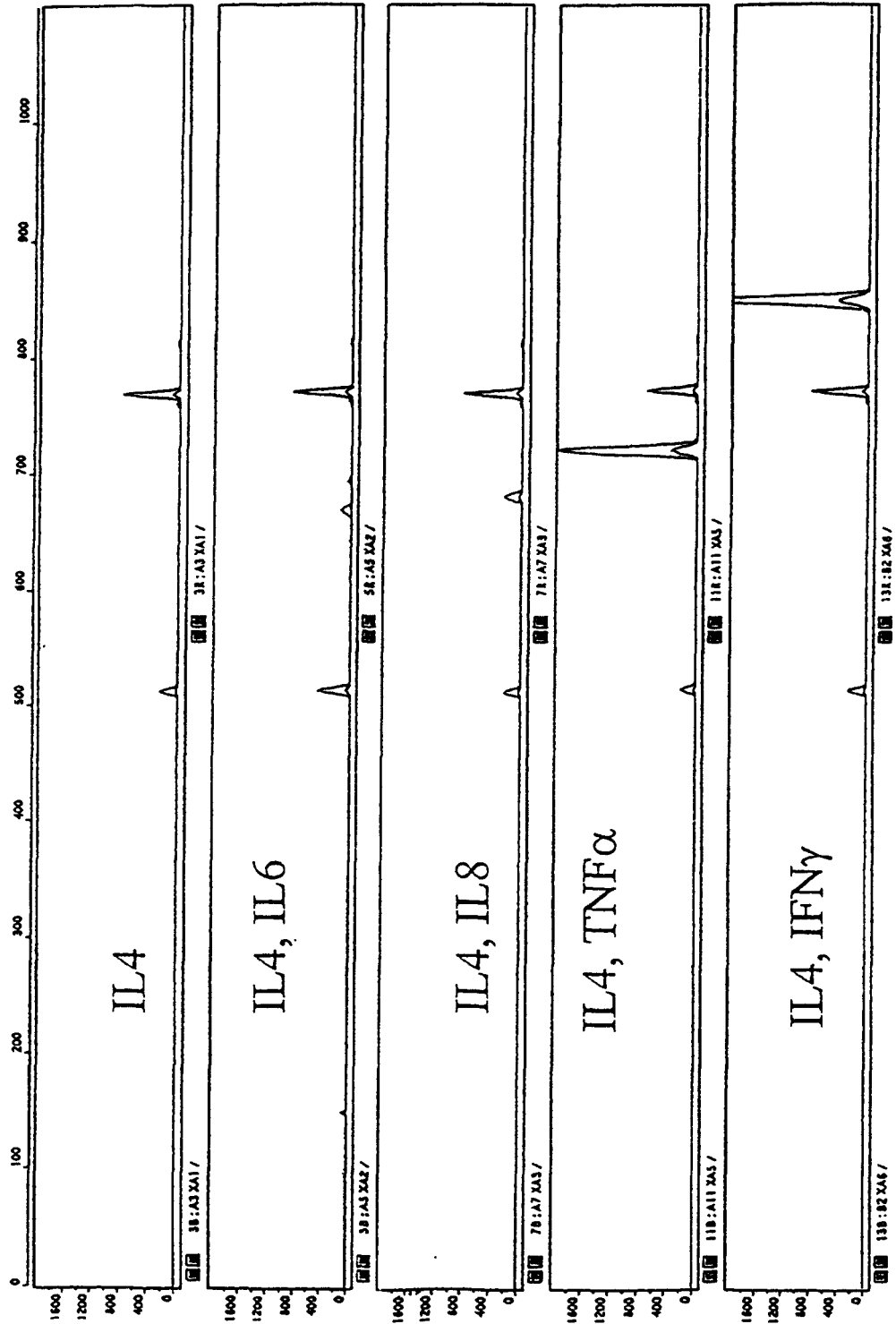


图 29

图 30



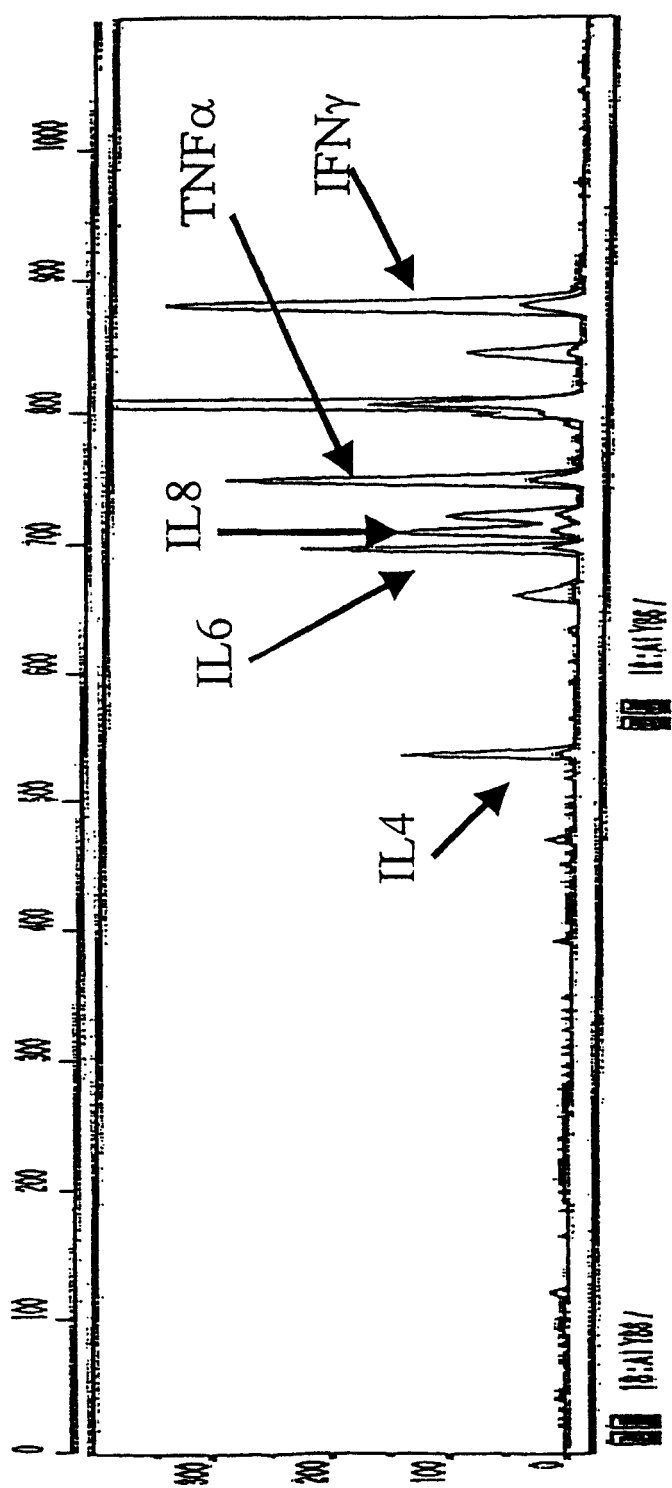


图 31

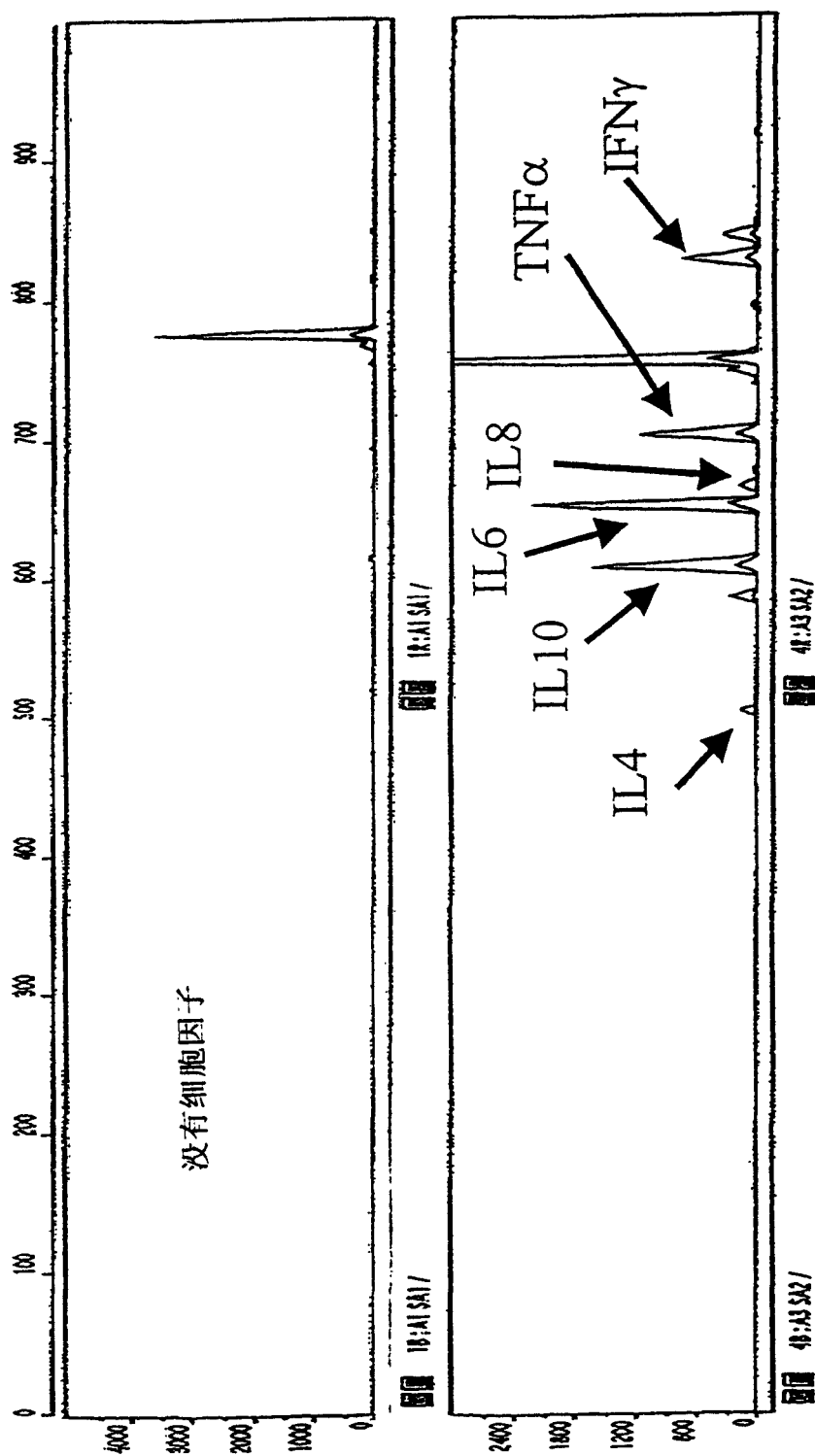


图 32

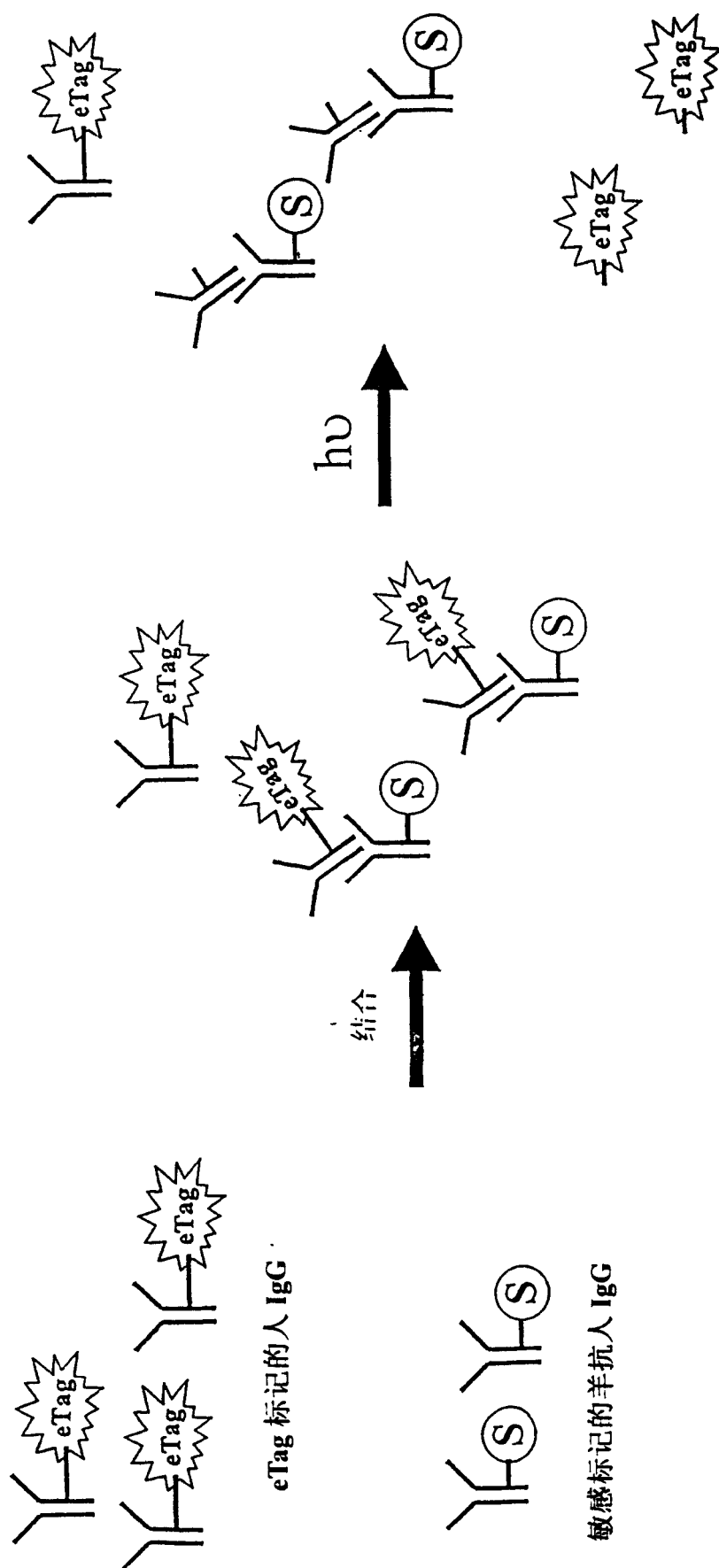


图 33

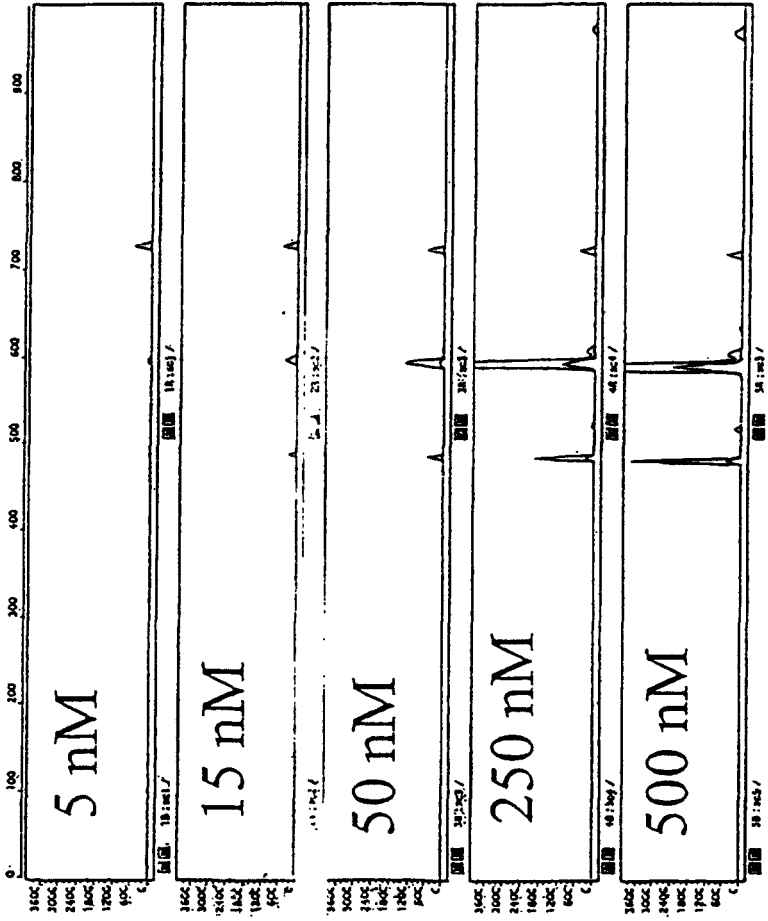


图 34

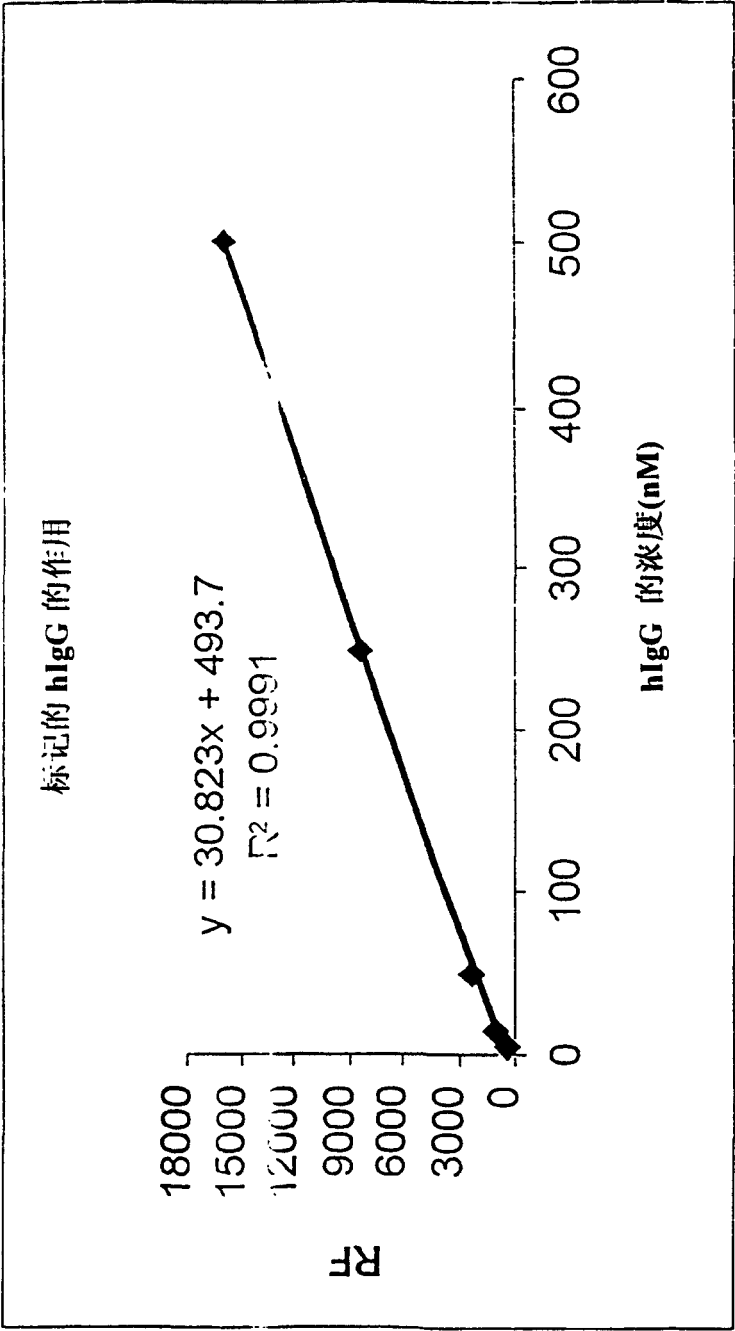


图 35

专利名称(译)	用于分析蛋白的方法和组合物		
公开(公告)号	CN1559006A	公开(公告)日	2004-12-29
申请号	CN02810325.4	申请日	2002-05-21
[标]申请(专利权)人(译)	埃克来拉生物科学公司		
申请(专利权)人(译)	埃克来拉生物科学公司		
当前申请(专利权)人(译)	埃克来拉生物科学公司		
[标]发明人	S辛格 H萨利米 穆萨威 SH塔稀尔 GJ沃韦伯 H基拉科相 TJ马特雷 VS埃尔南德斯		
发明人	S·辛格 H·萨利米 - 穆萨威 S·H·塔稀尔 G·J·沃韦伯 H·基拉科相 T·J·马特雷 V·S·埃尔南德斯		
IPC分类号	G01N33/483 G01N21/78 G01N27/447 G01N33/53 G01N33/536 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/6803 G01N33/6842 C07K16/00 C07K2317/40 G01N33/582		
代理人(译)	程伟		
优先权	60/292548 2001-05-21 US 60/334901 2001-10-24 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了在标本中检测一种或多种靶多肽的方法、组合物和试剂盒，其中靶多肽已经接受了翻译后修饰。含标本的混合物和含致裂解部分的第一个试剂及针对靶多肽上结合部位的第一结合剂被置于各自结合部分发生结合的条件下。结合部位是靶多肽参与的翻译后修饰活动的结果。本方法可用于检测靶多肽本身。在另一个实施例中，靶多肽的存在和/或量与一个物质的存在和/或量和/或活性有关，如参与靶多肽翻译后修饰的酶。第一个结合剂和结合部位间的相互作用将致裂解部分带到可裂解部分的近旁，可裂解部分与多肽相连且仅当与致裂解部分接近时容易被裂解。以此方式，每个多肽的电泳标记可被释放。释放的电泳标记被分离，并根据相应的电泳标记检测靶多肽的存在和/或量。

