[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl[7]
C12Q 1/68

[12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 01812230.2

[45] 授权公告日 2005 年 4 月 13 日

[11] 授权公告号 CN 1196798C

[22] 申请日 2001.5.4 [21] 申请号 01812230.2
[30] 优先权
[32] 2000. 5. 4 [33] US [31] 60/201,921
[32] 2000. 7.27 [33] US [31] 60/221,034
[86] 国际申请 PCT/US2001/014526 2001.5.4
[87] 国际公布 WO2001/083827 英 2001.11.8
[85] 进入国家阶段日期 2003.1.2
[71] 专利权人 耶鲁大学
地址 美国康涅狄格州
[72] 发明人 M·斯尼德尔 M·雷德 H·朱
J·F·克勒米克
审查员 孙大龙
[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
代理人 徐雁漪

权利要求书 4 页 说明书 48 页 附图 8 页

[54] 发明名称 用于筛选蛋白活性的高密度蛋白阵列

[57] 摘要

本发明涉及用于大规模研究蛋白功能的蛋白芯片，其中所述芯片包含密集反应孔。 本发明还涉及使用蛋白芯片同时测定蛋白样品中或一个蛋白芯片上蛋白的有无、多少和/或功能的方法，或者使用蛋白芯片测定该芯片上每种蛋白的探针混合物中每种探针的存在与否、相对特异性和结合亲和性的方法。 本发明还涉及使用蛋白芯片进行高密度微量化学反应的方法。 此外，本发明还涉及用作蛋白芯片支持物的聚合物和蛋白芯片的制备方法。本发明还涉及用于衍化蛋白芯片支持物的化合物。

ISSN1008-4274

1. 一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同物质，所述物质选自蛋白和包含所述蛋白功能域的分子，每种不同物质在固体支持体上位于不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2 组成，其中所述多种不同物质由全部表达蛋白或包含所述蛋白功能域的分子的至少 50%构成，所述表达蛋白或分子在生物体基因组中具有相同类型的生物活性。

2. 权利要求 1 的阵列，其中所述多种不同物质的组成如下：100-1,000 种不同物质/cm^2，1,000-10,000 种不同物质/cm^2，10,000-100,000 种不同物质/cm^2，10,000-100,000 种不同物质/cm^2 或 100,000-1,000,000 种不同物质/cm^2。

3. 权利要求 1 的阵列，其中所述固体支持体为载玻片。

4. 权利要求 1 的阵列，其中所述固体支持体由硅氧烷弹性体物构成。

5. 权利要求 1 的阵列，其中每种不同物质存在于固体支持体表面的不同孔中。

6. 权利要求 5 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质结合至所述固体支持体的表面。

7. 权利要求 6 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质共价结合至所述固体支持体表面。

8. 权利要求 7 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质都通过连接体共价结合至所述固体支持体表面。

9. 权利要求 8 的阵列，其中所述连接体为 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷。

10. 权利要求 6 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质非共价结合至所述固体支持体表面。

11. 权利要求 6 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质都不结

合至所述固体支持体表面。

12. 权利要求 5 的阵列，其中在不同孔中的每种不同物质为溶液。

13. 权利要求 5 的阵列，其中每个孔都含有用于测定蛋白或分子生物活性的试剂。

14. 一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种蛋白或分子由在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%构成。

15. 权利要求 14 的阵列，其中所述多种蛋白或分子由在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 75%或至少 90%构成。

16. 权利要求 14 的阵列，其中所述具有目的生物活性的表达蛋白选自激酶、磷酸酶、蛋白酶、乙酰基转移酶、其它基团转移酶、核酸结合蛋白、激素结合蛋白和 DNA 结合蛋白。

17. 权利要求 14 的阵列，其中所述固体支持体选自陶瓷制品、无定形碳化硅、可铸氧化物、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯和硅氧烷弹性体。

18. 权利要求 17 的阵列，其中所述固体支持体为聚二甲基硅氧烷。

19. 一种使用权利要求 1-18 任一项的定位寻址阵列的方法，所述方法包括以下步骤:

(a)使探针与所述阵列接触;

(b)检测蛋白/探针的相互作用。

20. 权利要求 19 的方法，其中所述探针为酶底物或抑制剂。

21. 权利要求 20 的方法，其中所述探针为选自以下的酶的底物或抑制剂：激酶、磷酸酶、蛋白酶、乙酰基转移酶和其它基团转移酶。

22. 权利要求 19 的方法，其中所述探针选自蛋白、寡核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA、小分子底物、药物侯选物、受体、抗原、类固

醇、磷脂、抗体、谷胱甘肽、免疫球蛋白区、麦芽糖、镍、二氢胰蛋白酶和生物素。

23. 权利要求 19-22 任一项的方法，其中所述蛋白/探针相互作用的检测通过包括质谱法的方法检测。

24. 权利要求 19-22 任一项的方法，其中所述蛋白/探针相互作用的检测方法包括使用化学发光、荧光、放射性标记或原子力显微镜法。

25. 一种制备及使用权利要求 1 的定位寻址阵列的方法，该方法包括以下步骤:

(a) 在固体支持体上沉积多种不同物质，所述多种不同物质选自蛋白和包含所述蛋白功能域的分子，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2 组成;

(b) 使探针与所述阵列接触;

(c) 检测蛋白/探针的相互作用。

26. 一种制备及使用权利要求 14 的定位寻址阵列的方法，该方法包括以下步骤:

(a) 在固体支持体上沉积多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种蛋白或分子由在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%构成;

(b) 使探针与所述阵列接触;

(c) 检测蛋白/探针的相互作用。

27. 权利要求 25 或 26 的方法，其中所述固体支持体为载玻片。

28. 一种试剂盒，该试剂盒包含:

(a) 一种或多种权利要求 1 的阵列，其在固体支持体表面含有多个孔，其中所述孔密度为至少 100 孔/cm^2;

(b) 在一个或多个容器中的一种或多种探针、试剂或其它分子。

29. 按照权利要求 28 的试剂盒，其中所述一个或多个容器包含用于测定蛋白生物活性的试剂。

30. 按照权利要求 28 的试剂盒，其中所述一个或多个容器包含用于测定探针和蛋白相互作用的试剂。

31. 一种试剂盒，该试剂盒包含:

(a) 一种或多种权利要求 1 的定位寻址阵列;

(b) 在一个或多个容器中的一种或多种探针、试剂或其它分子。

32. 按照权利要求 31 的试剂盒，其中所述底物连接至所述固体支持体上的孔表面。

33. 按照权利要求 31 的试剂盒，其中所述蛋白或分子选自激酶、磷酸酶、蛋白酶、乙酰基转移酶、核酸结合蛋白和激素结合蛋白。

34. 按照权利要求 28-33 之任一的试剂盒，其中所述相同类型的生物活性选自激酶活性、磷酸酶活性、蛋白酶活性、糖苷酶活性、乙酰基转移酶活性、基团转移酶活性、核酸结合活性、激素结合活性和 DNA 结合活性。

35. 按照权利要求 1-18 之任一的阵列，其中所述相同类型的生物活性选自激酶活性、磷酸酶活性、蛋白酶活性、糖苷酶活性、乙酰基转移酶活性、基团转移酶活性、核酸结合活性、激素结合活性和 DNA 结合活性。

36. 按照权利要求 26 的方法，其中所述相同类型的生物活性选自激酶活性、磷酸酶活性、蛋白酶活性、糖苷酶活性、乙酰基转移酶活性、基团转移酶活性、核酸结合活性、激素结合活性和 DNA 结合活性。

用于筛选蛋白活性的高密度蛋白阵列

根据美国法典第35章第119条e款(35 U.S.C. § 119 (e))，本申请要求2000年5月4日提交的美国临时专利申请序号60/201,921以及2000年7月27日提交的美国临时专利申请序号60/221,034的权益，这两个临时专利申请都通过引用整体结合到本文中。

本发明受到政府资助，资助号为DARPA/ONR R13164-41600099和NIH (美国国立卫生研究院) RO1CA77808。政府对本发明拥有一定权益。

I. 发明领域

本发明涉及用于大规模研究蛋白功能的蛋白芯片，其中所述芯片包含密集反应孔。本发明涉及蛋白芯片的使用方法，这些方法用于同时测定存在于蛋白样品中或一块蛋白芯片上的蛋白的有无、多少和/或功能，或者用于测定该芯片上每种蛋白的探针混合物中每种探针的有无、相对特异性和结合亲和性。本发明还涉及使用蛋白芯片进行高密度微量化学反应的方法。此外，本发明还涉及用作蛋白芯片支持物的聚合物和蛋白芯片的制备方法。本发明还涉及用于衍化蛋白芯片支持物的化合物。

II. 发明背景

全基因组测序已鉴定出大量的可读框(ORF)。目前，人们在利用mRNA表达谱和基因破坏的表型认识基因功能方面作出了巨大努力。这种努力之所以有可能获得重大进步,部分是缘于使用基因芯片技术以单个实验分析成千上万种基因序列。然而，有关基因功能的更多信息还是来自对编码蛋白生化活性的分析。

目前，这些类型的分析是一个研究者每次研究一种蛋白。这是一个非常耗时的过程，因为基于蛋白的生化活性纯化和鉴定一种蛋白可能要耗时若干年。利用全基因组序列使得可对所述基因组编码的每种蛋白进行生化测定。

迄今为止，使用一个蛋白芯片能有效分析数百或数千种蛋白样品。这些方法非常适合于可产生和分析大量数据的高通量实验。多年前本领域就知道含 96 孔或 384 孔的微量滴定板。但是，这些板的尺寸(至少 12.8 × 8.6 cm)使其不适于进行大规模的蛋白质分析，因为孔密度不够高。

如上所述，已经设计出其它类型的用于 DNA 合成和杂交反应的阵列，例如 WO 89/10977 描述的阵列。然而，这些阵列不适于独立体积的蛋白分析，因为这些阵列构建在平面上，而这往往导致特性之间交叉影响。

已应用光刻法制备各种阵列，涵盖平面寡核苷酸阵列(Pease 等，1994，“快速分析 DNA 序列的光性寡核苷酸阵列”，PNAS 91: 5022-5026)、流路阵列(美国专利第 5,843,767 号)和通过流路连接的孔阵列(Cohen 等，1999，“基于微芯片的蛋白激酶 A 的酶测定”，Anal Biochem. 273: 89-97)。而且，微加工和微光刻法在半导体加工领域是众所周知的。参见例如 Moreau, 半导体光刻法：原理、操作和材料，Plenum Press, 1988。

最近开发出设计用于在芽生酿酒酵母中表达大量具潜在生化基因组用途的蛋白的方法。已将 ORF 克隆入使用 *GAL* 启动子并将蛋白融合至多聚组氨酸(例如 HISX6)标记的表达载体。因此，该方法还用于制备和证实了约 2000 种酵母蛋白融合体的表达(Heyman 等，1999，“使用拓扑异构酶 I 介导的连接以基因组规模克隆和表达单个可读框”，Genome Res. 9: 383-392)。使用重组策略将约 85%的酵母 ORF 和 GST 编码区按照阅读框架克隆入含 *CUP1*(铜诱导型)启动子的载体中，由此产生 GST 融合蛋白(Martzen 等，1999，“根据其产物活性鉴

定基因的生化基因组学方法”，Science 286: 1153-1155)。Martzen 等人使用组合策略筛选具有几种生化活性(例如磷酸二酯酶活性和 Appr-1-P-加工活性)的融合蛋白集合物，并鉴定编码这些活性的相关基因。然而，还没有描述过分析大量单个蛋白样品的策略。

因此，需要一种蛋白芯片，该芯片上的孔高度密集，以获得超越先有技术芯片和方法的成本和时间优势。

不能将本申请第 II 章或其它任何章节对任一参考文献的援引或认同理解为允许将所述参考文献作为本发明的先有技术。

III. 发明概述

本发明涉及蛋白芯片，即用于大规模研究蛋白功能的位于固体支持体上的定位寻址蛋白阵列，其中所述蛋白芯片包含密集反应孔。本发明还涉及使用蛋白芯片测定至少一个样品中存在蛋白的有无、多少和/或功能的方法。本发明还涉及使用蛋白芯片进行高密度微量化学反应的方法。此外，本发明还涉及用作蛋白芯片支持物的聚合物和蛋白芯片的制备方法。本发明还涉及用于衍化蛋白芯片的化合物。

在一个实施方案中，本发明提供一种包含平面(例如但不限于载玻片)的蛋白芯片。可在例如载玻片上生产密集蛋白阵列，使得可进行化学反应和测定，由此可以大规模平行分析蛋白的存在与否、存在多少和/或功能性。在一个具体实施方案中，所述平面阵列上的蛋白通过 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPTS)连接体与阵列表面结合。

此外，在另一个具体实施方案中，本发明通过提供含密集孔的蛋白芯片克服了本领域已知方法和装置的缺点和局限，在所述芯片中可进行化学反应和测定，由此可以大规模平行分析蛋白的存在与否、存在多少和/或功能性。

测定阵列相比于一个接一个的测定的整体优势包括能够同时鉴

定许多蛋白-探针的相互作用以及能够测定这些相互作用的相对亲合性。将探针的复合混合物应用于芯片的优势包括能够在更能代表细胞的环境中测定相互作用以及能够同时评价许多潜在配体。

在一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，包含位于固体支持体上的多种不同物质，所述多种不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种物质由至少 100 种不同物质/cm^2 组成。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，包含位于固体支持体上的多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同蛋白或分子包括在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%。

在再另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，包含位于固体支持体上的多种不同物质，所述多种不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述固体支持体选自陶瓷制品、无定形碳化硅、可铸氧化物(castable oxide)、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯和硅氧烷弹性体。

在再另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，包含位于固体支持体上的多种不同物质，所述多种不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质通过 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷连接体与固体支持体连接。

在另一个实施方案中，本发明是一种在固体支持体表面含多个孔的阵列，其中所述孔的密度为至少 100 孔/cm^2。

本发明还涉及一种在固体支持体表面制备含多个孔的定位寻址阵列的方法，该方法包括以下步骤：由设计用于在固体表面生产 100

孔/cm^2以上密度孔的微加工模铸造阵列。在另一个实施方案中，本发明为一种在固体支持体表面制备含多个孔的定位寻址阵列的方法，该方法包括以下步骤：由设计用于在固体表面生产 100 孔/cm^2以上密度孔的微加工模铸造副模(secondary mold)，并由副模铸造至少一种阵列。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述阵列在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2组成。

在再一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述阵列在固体支持体上包含多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，每种不同蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种蛋白或分子包括在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述阵列在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述固体支持体选自陶瓷制品、无定形碳化硅、可铸氧化物、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸甲酯、聚苯乙烯和硅氧烷弹性体。

在再一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述阵列在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，

每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质通过3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷连接体与固体支持体连接。

在再一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：在固体支持体上沉积多种不同物质，使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述多种不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2组成。

在一个具体实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：在固体支持体上沉积多种不同物质，使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，所述多种不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2组成，并且其中所述固体支持体为载玻片。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：在固体支持体上沉积多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同蛋白或分子包括在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列使用方法，该方法包括以下步骤：在固体支持体上沉积多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，使探针与所述阵列接触，并检测蛋白/探针相互作用，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同蛋白或分子包括在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%，并且其中所述固体支持体为载玻片。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列制备方法，该方法包括以下步骤：由设计用于在固体表面生产 100 孔/cm^2 以上密度孔的微加工模铸造阵列，并在固体支持体上的所述孔中沉积多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同孔中。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列制备方法，该方法包括以下步骤：由设计用于在固体表面产生 100 孔/cm^2 以上密度孔的微加工模铸造副模，由副模铸造至少一种阵列，并在所述孔中沉积多种不同物质，这些物质未与固体支持体连接，它们选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在不同孔中。

在再一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列制备方法，该方法包括以下步骤：由设计用于在固体表面生产 100 孔/cm^2 以上密度孔的微加工模铸造副模，由副铸模铸造至少一种阵列，并在所述孔中沉积多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在不同孔中。

A. 定义

本申请使用的“蛋白”是指全长蛋白、蛋白部分或肽。蛋白可在生物体(优选细菌、酵母、昆虫细胞或哺乳动物细胞)中重组过量表达制备，或经过较大蛋白片段化产生，或者化学合成。

本申请使用的“功能域”是适合获得目的功能活性的必需蛋白结构域。功能域的实例特别包括具有激酶、蛋白酶、磷酸酶、糖苷酶、乙酰基转移酶、转移酶或其它酶活性的结构域。功能域的其它实例包括那些对 DNA、RNA、蛋白、激素、配体或抗原具有结合活性的结构域。

本申请使用的“探针”是指任何结合核酸(例如 DNA 或 RNA)或

蛋白的化学试剂。探针的实例特别包括其它蛋白、肽、寡核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA、小分子底物和抑制剂、药物候选物、受体、抗原、激素、类固醇类、磷脂、抗体、辅因子、细胞因子、谷胱甘肽、免疫球蛋白区、碳水化合物、麦芽糖、镍、二氢胰蛋白酶(dihydrotrypsin)和生物素。

芯片上的每种蛋白或探针最好都位于固体支持体上的已知预定位置，使得可根据其在固体支持体上的位置确定每种蛋白或探针。而且，蛋白和探针在固体支持体上形成定位寻址阵列。

IV. 附图简述

图 1a. 使用图示重组策略将 119 种酵母蛋白激酶克隆在高拷贝 *URA3* 表达载体(pEGKG)中，*URA3* 表达载体在半乳糖诱导型 *GAL10* 启动子控制下生产 GST 融合蛋白。GST::激酶构建物导入大肠杆菌中，并测定每种构建物的 5′末端序列。在观察到突变时再将整个步骤重复一遍。

图 1b. 如所述纯化的 GST::激酶融合蛋白的免疫印迹。由 3 次实验纯化出 106 种激酶蛋白。尽管进行了重复实验，但在 119 种 GST 中仍有 14 种未能通过免疫印迹分析检测出来(例如星号标记泳道中的 Mps1)。

图 2a. 按照以下图示方法生产用于激酶研究的蛋白芯片。将聚二甲基硅氧烷(PDMS)倾注在丙烯酸主模之上。固化后剥离含孔的芯片，并安放在载玻片上。接着衍化芯片表面，然后将蛋白附着至所述孔。先用 1% BSA 封闭孔，此后加入激酶、^{33}P-γ-ATP 和缓冲液。于 30℃温育 30 分钟后彻底清洗蛋白芯片，并将蛋白芯片对分辨率 50 μm 的定量性 X 光片和 Molecular Dynamics PhosphorImager 曝光。对于 12 种底物来说，每种激酶测定都重复进行至少 2 次；对于其余的 5 种底物，所述测定进行 1 次。

图 2b. 蛋白芯片放大图。

图 3. 蛋白芯片和激酶测定结果。每个芯片上的位置 I9 表示阴性对照信号。尽管蛋白质印迹未能检测到可见信号(图 1b)，但在全部 12 个激酶反应中位置 B4 的 Mps1 都显示强激酶活性。

图 4a. 蛋白激酶反应的定量分析。使用 Molecular Dynamics PhosphorImager 测定激酶活性，并将数据以 Excel 电子表格输出。然后通过使数据对阴性对照归一化将激酶信号转变为增加倍数。119 种激酶在 4 个反应中的信号以对数显示。倍数增加范围为 1-1000 倍。

图 4b. 为测定底物特异性，使用下式计算特异性指数(SI): $SI_{ir} = F_{ir} / [(F_{i1} + F_{i2} + \ldots\ldots + F_{ir}) / r]$，其中 *i* 表示所使用激酶的标识，*r* 代表底物标识，而 F_{ir} 代表与单独的 GST 相比激酶 *i* 对底物 *r* 作用的增加倍数。列出了几个 SI 大于 3 的激酶特异性实例。

图 5a. 激酶核心结构域多序列比对产生的系统树，表明了功能特异性和多聚(Tyr-Glu)激酶氨基酸序列之间的相关性。可使用多聚(Tyr-Glu)作为底物的激酶经常在序列比较树形图上作图到特异性区。有效磷酸化多聚(Tyr-Glu)的激酶用阴影表示；用方框表示微弱利用该底物的两种激酶。用星号表示不能磷酸化多聚(Tyr-Glu)的 Rad53 和 Ste7。如图所示，这些激酶中有 70%属于 4 个序列组(圆圈内)。

图 5b. 兔肌肉磷酸化酶激酶(PHK)28 的结构。标明了优选存在于可利用多聚(Tyr-Glu)作为底物的激酶中的三种碱性残基和甲硫氨酸(Met)残基的位置。天冬酰胺(Asp)残基通常在不使用多聚(Tyr-Glu)的激酶中。

图 6. 在蛋白芯片制备工艺中光刻步骤的截面图。

a. 在氧化层两侧具有两层硅的硅片。

b. 在顶部具有防护掩蔽层的硅片。

c. 蚀刻工艺去除表面未受防护掩蔽层保护的位置的硅。蚀刻深度受控于氧化层的位置，即蚀刻工艺不去除氧化层。

d. 去除掩蔽层，留下蚀刻硅片。

e. 将蛋白芯片材料施加于模板上。

f. 固化后，将蛋白芯片从模板上取下。蛋白芯片的影象为模板的对应蚀刻物。

图 7. 蛋白芯片上的激酶/抑制剂测定。使用不同浓度的特异性人体 PKA 抑制剂 PKIα或 MAPK 抑制剂 SB202190 测定针对两种底物(即 PKA 蛋白底物和通常使用的激酶底物 MBP)的人体蛋白激酶 A (PKA)、人体促细胞分裂剂激活性蛋白激酶(MAPK)、三种酵母 PKA 同系物(TPK1、TPK2 和 TPK3)和两种其它酵母蛋白激酶(HSL1 和 RCK1)。如图所示，PKIα可特异性抑制使用肽和 MBP 二者作为底物的 PKA 活性。但是，SB202190 对 PKA 活性未显示出任何抑制作用。另外饶有兴趣的是，PKIα不抑制所测试的三种酵母 PKA 同系物(TPK1、TPK2 和 TPK3)和所测试的其它两种酵母蛋白激酶 HSL1 和 RCK1。

V. 发明详述

本发明涉及用于大规模研究蛋白功能的蛋白芯片，即在固体支持体上的定位寻址蛋白阵列，其中所述蛋白芯片包含密集反应孔。定位寻址阵列提供一种使每种目的探针或蛋白都位于固体支持体上的已知预定位置的构型，使得可根据其在阵列上的位置确定每种探针或蛋白。本发明还涉及使用蛋白芯片测定至少一种样品中存在蛋白的有无、多少和/或功能性的方法。本发明还涉及使用蛋白芯片进行高密度微量化学反应的方法。此外，本发明还涉及用作蛋白芯片支持物的聚合物和蛋白芯片的制备方法。本发明还涉及用于衍化蛋白芯片支持物的化合物。

在一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2 组成。在一个实施方案中，所述多种不同物质由 100-1000 种不

同物质/cm^2组成。在另一个实施方案中，所述多种不同物质由1000-10,000种不同物质/cm^2组成。在另一个实施方案中，所述多种不同物质由10,000-100,000种不同物质/cm^2组成。在再一个实施方案中，所述多种不同物质由100,000-1,000,000种不同物质/cm^2组成。在再一个实施方案中，所述多种不同物质由1,000,000-10,000,000种不同物质/cm^2组成。在另一个实施方案中，所述多种不同物质由10,000,000-25,000,000种不同物质/cm^2组成。在再一个实施方案中，所述多种不同物质由至少25,000,000种不同物质/cm^2组成。在再一个实施方案中，所述多种不同物质由至少10,000,000,000种不同物质/cm^2组成。在再一个实施方案中，所述多种不同物质由至少10,000,000,000,000种不同物质/cm^2组成。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少100种不同物质/cm^2组成，并且其中所述固体支持体为载玻片。

在另一个实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同物质，这些物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由约30-100种不同物质/cm^2组成。在一个具体实施方案中，所述多种不同物质由约30种不同物质/cm^2组成。在一个特定实施方案中，所述多种不同物质由30-50种不同物质/cm^2组成。在另一个特定实施方案中，所述多种不同物质由50-100种不同物质/cm^2组成。

在各种具体实施方案中，本发明是一种定位寻址阵列，其在固体支持体上包含多种不同蛋白或含所述蛋白功能域的分子，每种不同的蛋白或分子都在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同蛋白或分子包括在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表

达蛋白的至少 50%、75%、90%或 95%。例如，所述生物体可以为真核生物或原核生物，优选为哺乳动物、人或非人动物、灵长类动物、小鼠、大鼠、猫、犬、马、母牛、小鸡、酵母之类的真菌、果蝇、*C. elegans*等。所述类型的目的生物活性可以是但不限于酶活性(例如激酶活性、蛋白酶活性、磷酸酶活性、糖苷酶活性、乙酰基转移酶活性以及其它化学基团转移酶活性)、核酸结合、激素结合等。

A. 生产蛋白芯片

最好用已使用常规微加工或微光刻法模压(stamped)、切削(milled)或蚀刻的主模铸造本发明的具有高密度阵列孔的蛋白芯片。优选将常规微光刻法和材料用于生产主模。一旦生产出主模，就可将主模直接用于浇铸蛋白芯片本身。或者，可用主模铸造副模或三模，并由这些副模或三模铸造蛋白芯片。

主模可用任何适于微加工或微光刻法的材料制备，优选硅、玻璃、石英、聚酰亚胺和聚甲基丙烯酸甲酯(有机玻璃)。对于微光刻法来说，优选材料为硅片。

一旦生产出合适的主模、副模或三模，就可铸造蛋白芯片。蛋白芯片可铸造在任何适于铸造的固体支持体上，包括多孔或无孔固体支持体。固体支持体优选陶瓷制品、无定形碳化硅、固化时形成 SiO_2 铸件的可铸氧化物、聚酰亚胺、聚甲基丙烯酸甲酯和聚苯乙烯，最优选硅氧烷弹性体材料。在硅氧烷弹性体材料中，聚二甲基硅氧烷(PDMS)是最优选的固体支持体。硅氧烷弹性体材料的优势在于由于其柔韧的特性而易于由模板上取下。

图 6 显示了一个用于在本发明蛋白芯片上实现高密度阵列孔的方法实例。提供一种在硅层之间夹有氧化层的硅片(图 6a)。这些硅片通常称作硅绝缘体或 SOI 片，通常可得自硅片供应公司(例如 Belle Mead Research, Belle Mead, NJ 和 Virginia Semiconductor, Fredericksburg, VA)。

然后定型硅片并通过蚀刻方法蚀刻(图 6b-d)。掩埋的氧化层起非常有效的蚀刻终止作用，使穿过硅片的蚀刻深度高度均一。蚀刻深度与蚀刻方法无关，仅取决于顶部硅层的厚度。

可使用湿性化学蚀刻方法(例如使用 KOH 或四甲基肼(TMAH))。但是，该技术对硅片的晶体方向依赖性稍强。因此，优选在活性离子蚀刻(RIE)中使用稀薄气体(一般为 SF_6)的技术。RIE 蚀刻技术能够在硅上刻出与硅片晶体方向无关的高度各向异性孔。参考文献 G. Kovacs, Micromachined Transducers Sourcebook, Academic Press (1998) 和 M. Madou, Fundamentals of Microfabrication, CRC Press (1997)提供了蚀刻技术的背景材料。

可在单个芯片上使用两种形式的微光刻，以获得需要组合的孔形状。湿性化学蚀刻是获得 U 型孔的各向同性方法，而 RIE 是获得方底孔的各向异性方法。

蚀刻硅片获得主模后，主模就可用于铸造蛋白芯片(图 6e-f)。这些构建物可以为蛋白芯片，或者自身为副模或三模，再由副模或三模铸造蛋白芯片。

因此，在一个实施方案中，一种制备定位寻址阵列(在固体支持体表面含多个孔)的方法包括用设计用于在固体表面生产 100 孔/cm^2 以上密度孔的微加工模铸造阵列。在另一个实施方案中，一种制备定位寻址阵列(在固体支持体表面含多个孔)的方法包括用设计用于在固体表面生产 100 孔/cm^2 以上密度孔的所述微加工模铸造副模，并由副模铸造至少一种阵列。在再一个实施方案中，一种制备定位寻址阵列的方法包括用液体铸件材料覆盖模板，并固化铸件材料直至铸件成为固体。所述液体铸件材料优选为硅氧烷弹性体，最优选为聚二甲基硅氧烷。可将多种不同物质沉积在任何这些定位寻址阵列中，以使每种不同物质都位于固体支持体上的不同孔中，其中所述不同物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质。

B. 蛋白芯片的特征

本发明的蛋白芯片不限于其外形尺寸，可拥有任何便利的尺寸。为了与当前实验室装置兼容，优选标准显微镜载玻片或更小尺寸的蛋白芯片。最优选其大小使两个芯片拼装成一个显微镜载玻片的蛋白芯片。还优选其大小适合质谱仪样品池的蛋白芯片。

本发明蛋白芯片的孔可具有任何形状，例如矩形、正方形或椭圆形，优选环形。蛋白芯片的孔可具有方底或圆底、V 形底或 U 形底。方形略为优选，因为优选的各向异性活性离子蚀刻(RIE)方法提供方底孔。特定芯片的孔底形状不需要一致，但可根据芯片上要进行的具体测定的需要有所变化。

本发明蛋白芯片的孔可具有任意的径高比，优选的径高比约为 10: 1 至约 1: 10。本发明蛋白芯片的孔可具有任意体积，孔体积优选 1 pl-5 μl，孔体积更优选 1 nl-1 μl。最优选的孔体积为 100 nl-300 nl。对于很高密度孔的蛋白芯片，优选的孔体积为 10 pl-100 nl。

本发明蛋白芯片的孔/cm^2 密度可广泛变化。优选的孔密度为约 25 孔/cm^2 至约 10,000,000,000,000 孔/cm^2。激光切削有机玻璃主模铸造的蛋白芯片孔密度一般为 1-2,500 孔/cm^2。合适切削工具产生的孔直径小至 100 μm，间距 100 μm。湿性化学微光刻法蚀刻的主模铸造的蛋白芯片的孔密度一般为 50-10,000,000,000 孔/cm^2。湿性化学蚀刻产生的孔深 10 μm，间距 10 μm，再产生直径小于 10 μm 的孔。RIE 微光刻法蚀刻的主模铸造的蛋白芯片的孔密度一般为 100-25,000,000 孔/cm^2。RIE 与光刻组合可产生直径 500 nm、间距 500 nm 的孔。使用电子束光刻与 RIE 的组合可产生直径 50 nm、间距 50 nm 的孔。具有这种尺寸和相等间距的孔产生孔密度为 10,000,000,000,000 孔/cm^2 的蛋白芯片。RIE 优选用于产生直径 20 μm、间距 20 μm 的孔。等间距的该尺寸孔的密度为 25,000,000 孔/cm^2。

上述微加工和微光刻法已成功用于 560 μm 或 280 μm 孔径、间隔约 1 mm 的湿性化学蚀刻硅片。这种孔和间距的组合分别产生约

410,000 孔/cm^2 和约 610,000 孔/cm^2 的阵列。当孔径和间距相等时，产生约 3.19×10^6 孔/cm^2 和 12.75×10^6 孔/cm^2 的蛋白芯片。

在一个实施方案中，所述阵列在固体支持体表面含多个孔，其中孔密度为至少 100 孔/cm^2。在另一个实施方案中，所述孔密度为 100-1000 孔/cm^2。在另一个实施方案中，所述孔密度为 1000-10,000 孔/cm^2。在另一个实施方案中，所述孔密度为 10,000-100,000 孔/cm^2。在再一个实施方案中，所述孔密度为 100,000-1,000,000 孔/cm^2。在再一个实施方案中，所述孔密度为 1,000,000-10,000,000 孔/cm^2。在再一个实施方案中，所述孔密度为 10,000,000-25,000,000 孔/cm^2。在另一个实施方案中，所述孔密度为至少 25,000,000 孔/cm^2。在再一个实施方案中，所述孔密度为至少 10,000,000,000 孔/cm^2。在再一个实施方案中，所述孔密度为至少 10,000,000,000,000 孔/cm^2。

C. 蛋白芯片的应用

在一个实施方案中，本发明提供一种含平整表面(例如但不限于载玻片)的蛋白芯片。可在例如载玻片上生产密集蛋白阵列，使得可以进行化学反应和测定，由此允许大规模平行分析蛋白(例如蛋白激酶)的有无、多少和/或功能性。蛋白或探针共价或非共价结合至固体支持体的平整表面。蛋白或探针可直接结合至固体支持体的平整表面，或者可以通过连接分子或连接化合物附着于固体支持体。连接体可以为任何衍化固体支持体表面从而使蛋白或探针易于连接至固体支持体表面的分子或化合物。所述连接体可以共价或非共价地将蛋白或探针结合至固体支持体表面。另外，连接体可以为无机或有机分子。优选的连接体为具有游离胺的化合物。最优选的连接体为 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPTS)。

在另一个实施方案中，本发明的蛋白芯片具有几个超越平面阵列的优势。即：使用孔消除或降低了孔内容物交叉污染的可能性。另一个超越平面阵列的优势是增加了信噪比。孔允许在较密集的构

型中使用较大体积的反应溶液，并因此有可能获得较强信号。而且，与平面阵列相比孔降低了芯片反应溶液的蒸发率，因此允许更长的反应时间。

孔超越平整表面的另一个优势在于应用孔可以用固定有限量探针对芯片上的每个孔进行结合研究，而使用平整表面通常是将探针不加选择地应用于整个底物。当探针混合物中的探针具有高亲和性但低特异性时，对底物不加选择地应用探针混合物将饱和许多与探针具有高亲和性的蛋白。这种饱和有效限制了混合物中其它探针的检测。通过使用孔，可将有限量的探针应用于芯片上的各个孔。因此，应用于每种蛋白的探针量可受到控制，不同蛋白的探针可各不相同(位于不同孔中)。

一旦如上所述生产出蛋白芯片，则可用其进行测定和其它化学反应。对于测定来说，蛋白或探针通常位于孔中。蛋白或探针的存在与否将通过分别将探针或蛋白施用于蛋白芯片测定。可以使用各种本领域已知的技术(其中一些在下文论述)观测蛋白-探针相互作用。

用于本发明的蛋白可以为融合蛋白(其中限定结构域连接至各种天然蛋白中的一种)，或者可以为完整的非融合蛋白。

在另一个实施方案中，含蛋白的细胞物质(例如但不限于囊泡、核内体、亚细胞器和膜碎片)可置于蛋白芯片上(例如孔中)。在另一个实施方案中，可将完整细胞置于蛋白芯片上(例如孔中)。在再一个实施方案中，可将蛋白、含蛋白的细胞物质或完整细胞连接至蛋白芯片的固体支持体。

在放置于蛋白芯片上之前或过程中可通过使用结合特定蛋白的试剂纯化蛋白，其中所述试剂先前已经放置在蛋白芯片上。可通过标准技术(例如亲和层析或柱层析)或通过分离离心样品(例如 P1 或 P2 组分)获得部分纯化的含蛋白的细胞物质或细胞。

此外，蛋白、含蛋白的细胞物质或细胞可在放置于蛋白芯片上

之前或同时嵌入人工或天然膜中。在另一个实施方案中，蛋白、含蛋白的细胞物质或细胞可在放置于蛋白芯片上之前或同时嵌入胞外基质组分(例如胶原蛋白或基底层)中。本发明的蛋白可以为溶液，或者结合至固体支持体表面(例如孔中或在平整表面上)，或者结合至放置于固体支持体孔中的支持物(例如珠)。

可使用任何分配工具(例如气泡喷点或喷墨打印头)将蛋白或探针放置于孔中。优选微量移液分配器。蛋白或探针的放置可手动进行，或者可通过使用连接机器的计算机将该过程自动进行。

因为所述孔是自含式的，所以蛋白或探针不需要连接或结合至固体支持体表面，而是可以简单地将蛋白或探针放置于孔中或结合至放置于孔中的支持物(例如珠)。其它的支持物包括但不限于硝基纤维素颗粒、玻璃珠、塑料珠、磁性粒子和乳状粒子。另一方面，蛋白或探针共价或非共价结合至孔中的固体支持体表面。蛋白或探针可直接结合至固体支持体表面(在孔中)，或者可以通过连接分子或连接化合物附着于固体支持体。连接体可以为任何衍化固体支持体表面从而使蛋白或探针易于连接至固体支持体表面的分子或化合物。所述连接体可以将蛋白或探针共价结合至固体支持体表面，或者可通过非共价作用结合。另外，连接体可以为无机或有机分子。优选的连接体为具有游离胺的化合物。最优选的连接体为 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPTS)。

非共价结合至孔表面的蛋白或探针可利用各种分子作用实现与孔表面的连接，例如氢键结合、范德华力结合、静电结合或金属螯合配位结合。此外，DNA-DNA、DNA-RNA 和受体-配体相互作用也是用于非共价结合的作用类型。受体-配体相互作用的实例包括抗体和抗原、DNA 结合蛋白和 DNA、酶和底物、抗生物素蛋白(或链霉抗生物素蛋白)和生物素(或生物素化分子)之间的相互作用，以及脂质结合蛋白和磷脂膜或囊泡之间的相互作用。例如，可表达具有融合蛋白结构域的蛋白，所述融合蛋白结构域对连接至孔表面的底物

具有亲和性。适于融合蛋白结合的底物包括胰蛋白酶/脱水胰蛋白酶、谷胱甘肽、免疫球蛋白区、麦芽糖、镍或生物素及其衍生物，它们分别结合牛胰腺蛋白酶抑制剂、谷胱甘肽-S-转移酶、抗原、麦芽糖结合蛋白、多聚组氨酸(例如 HisX6 标记)和抗生物素蛋白/链霉抗生物素蛋白。

D. 蛋白芯片测定

在一个实施方案中，通过使用产生化学发光或荧光的标准酶测定将蛋白芯片用于测定。可使用例如光致发光、使用非蛋白底物的荧光、酶显色、质谱特征标记和寡核苷酸标记扩增(例如通过 PCR)检测各种蛋白或分子修饰。因此，特别可通过化学发光、荧光、放射标记或原子力显微镜检测蛋白/探针相互作用。还可以通过直接质谱鉴定在阵列中结合特定组分的探针。例如，可通过质谱分析鉴定通过解离探针与阵列组分的非降解方法释放到溶液中的探针(参见例如 WO 98/59361)。在另一个实施例中，可通过质谱分析鉴定通过酶消化阵列组分释放到溶液中的肽或其它化合物。

阵列类型可分成几个大类。作为第一个实例，阵列上的每个孔都接触单一探针，检测并定量它们的结合。这些测定结果的观测方法包括但不限于：1)使用放射标记配体，接着放射自显影和/或磷成象分析；2)结合半抗原，然后通过荧光标记或酶标记抗体或高亲和性半抗原配体如生物素或链霉抗生物素蛋白检测；3)质谱分析法；4)原子力显微镜；5)荧光偏振法；6)滚环扩增检测法(Hatch 等，1999，“滚环扩增固定在固体表面上的 DNA 及其在多重突变检测中的应用”，Genet. Anal. 15 (2): 35-40)；7)竞争性 PCR (Fini 等，1999，“化学发光竞争 PCR 在使用微量板发光计检测和定量细小病毒 B19 DNA 方面的进展”，Clin. Chem. 45 (9): 1391-6；Kruse 等，1999，“使用半嵌套竞争 PCR 测定检测和定量转化生长因子-β1 (TGF-β1)基因表达”，Cytokine 11 (2): 179-85；Guenthner 和 Hart，1998，“使用微

量板型检测系统定量竞争性 PCR 测定 HIV-1”，Biotechniques 24 (5): 810-6)；8)比色法；和 9)生物测定，例如测定病毒滴度。

作为第二个实例，阵列上的每个孔都同时接触多种探针，包括几种来源探针的混合物，检测并定量其结合。这些测定结果的观测方法包括但不限于：1)质谱分析法；2)原子力显微镜；3)红外或荧光标记化合物或蛋白；4)扩增寡核苷酸、肽或分子量标记；和 5)刺激或抑制蛋白的酶活性。由于本发明阵列的定位寻址特性，所以信息由探针混合物搜集，即通过放置在蛋白芯片上已知位置的限定蛋白，了解有关结合探针结合物的信息。假如理想的话，那么可以用单个探针探测阵列上显示结合的位置，以鉴定感兴趣的的特异性相互作用。

还可以通过例如将蛋白芯片和细胞提取物温育，获得有用的信息，其中芯片上的每个孔都含有测定目的酶活性的反应混合物，并且测定其中多种不同酶和/或底物活性，由此鉴定和检测细胞所有组成成分的具体酶活性。同样，蛋白芯片可与完整细胞或浆膜制备物温育，以测定例如膜结合蛋白或分子的表达，或者测定细胞表面蛋白或分子的结合特性。可使用本领域已知的技术检测结合至蛋白芯片上特定位置的细胞、细胞标记或细胞分泌物。例如，可用 B 细胞或 T 细胞筛选含抗原阵列的蛋白芯片，其中所述抗原选自合成抗原、组织特异性抗原、疾病特异性抗原、病原体抗原和自身组织抗原。可通过确定阵列上抗原活化细胞的位置测定淋巴细胞识别的抗原或抗原决定簇。可通过各种方法测定淋巴细胞活化，包括但不限于检测抗体合成、检测掺入的 ^{3}H-胸苷、用标记抗体探测细胞表面分子来鉴定通过抗原识别或活化诱导或抑制的分子(例如 IgD、C3b 受体、IL-2 受体、转铁蛋白受体、膜 MHC II 类分子、CD23、CD38、PCA-1 分子、HLA-DR)以及鉴定表达和/或分泌的细胞因子。

在另一个实例中，可通过使细胞与含推定有丝分裂原阵列的蛋白芯片温育测定特定细胞类型的有丝分裂原，包括将定位寻址阵列

与细胞群接触的步骤；所述阵列包含位于固体支持体上的多种不同物质，这些物质选自蛋白、包含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质都在固体支持体上的不同位置，其中不同物质的密度至少为 100 种不同物质/cm^2；并检测固体支持体上诱导细胞促有丝分裂活性的位置。可通过例如检测掺入细胞的 ^3H-胸苷测定细胞分裂。细胞可以是相同细胞类型(即同类细胞群)，或者可以是不同细胞类型。

在再一个实例中，可通过例如使用放射性标记的蛋白底物并检测放射性底物浓度的降低或细胞吸收的放射性底物测定蛋白芯片上的细胞吸收和或蛋白加工。这些测定可用于诊断或治疗目的。本领域普通技术人员能知道检测各种类型细胞相互作用的合适测定方法。

因此，使用几种类型的探针(例如已知的探针混合物、细胞提取物、亚细胞器、细胞膜制备物、完整细胞等)可提供对细胞活性的大规模或彻底的分析。具体来说，一种或若干种筛选可构成鉴定细胞类型的“足迹”或细胞、组织、器官或系统生理状态的基础。例如，可通过由蛋白芯片测定的细胞活性或表达谱区分不同的细胞类型(或多态性或功能性)。该方法还可用于测定例如细胞周期的不同阶段、疾病状态、改变的生理状态(例如低氧)、治疗(例如药物治疗)前后的生理状态、代谢状态、分化和发育阶段、对环境刺激物(例如光、热)的反应、细胞-细胞相互作用、细胞特异性基因和/或蛋白表达以及疾病特异性基因和/或蛋白表达。

可使用本发明的蛋白芯片进行酶反应和测定酶活性。在一个具体实施方案中，可鉴定调节芯片上一种或多种蛋白酶活性的化合物。例如，通过使一种化合物或多种化合物的混合物与蛋白芯片孔中的酶反应混合物温育，检测和定量酶活性水平的变化，信号在芯片孔中产生(例如由有酶活性时出现荧光的底物产生)。记录化合物有无之间的差异。而且，化合物对不同蛋白酶活性作用的差异可通过对比

其对蛋白芯片中和芯片之间样品的相对作用而容易地检测到。

以上详述的各种使用本发明高密度蛋白芯片的策略可用于测定蛋白的各种物理和功能特征。例如，通过用抗体探测，可使用蛋白芯片评价蛋白的有无和存在量。在一个实施方案中，可探测 GST 融合蛋白的聚二甲基硅氧烷(PDMS)芯片测定蛋白的存在与否和/或其活性水平。可使用标准检测方法(如发光、化学发光、荧光或化学荧光)检测蛋白。例如，用荧光标记的二抗识别针对目的蛋白的一抗，然后用由光源激发荧光产物并检测随后的荧光的设备(例如 Molecular Dynamics 扫描仪)检测二抗。为增强敏感性，用缀合酶(例如碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶)的二抗识别目的蛋白的一抗。当存在发光底物(化学发光)或荧光底物(化学荧光)时，酶切产生一种高度发光或荧光的产物，这种产物可通过使用例如 Molecular Dynamics 扫描仪检测并定量。或者，可使用缀合碱性磷酸酶或辣根过氧化物酶的三抗增强荧光标记二抗的信号。

还可以在本发明的蛋白芯片上鉴定蛋白激酶、磷酸酶、蛋白酶、糖苷酶、乙酰基转移酶或其它基团转移酶的底物。例如，将各种各样的不同探针连接至蛋白芯片，测定其起特定酶底物作用的能力，例如测定其被蛋白激酶磷酸化的能力。检测激酶活性的方法包括但不限于使用 ^{33}P-ATP 和 ^{35}S-γ-ATP 之类的放射性标记或结合磷酸氨基酸的荧光抗体探针。例如，鉴于掺入到蛋白中的放射性标记的磷在一个测定中代表激酶活性，另一个测定可检测释放到介质中的放射性标记磷(代表磷酸酶活性)。在另一个实例中，可通过使用标准测定(例如质谱分析、荧光标记肽片段的抗体或荧光标记底物荧光信号的消失)鉴定由蛋白酶活性产生并释放到介质中的肽片段，从而检测蛋白酶活性。因此，可使用本领域普通技术人员了解的几种方法和许多独立检测工具容易地测定基团转移酶活性。

蛋白芯片可用于鉴定芯片上具有特异性活性(例如特定激酶、蛋白酶、核酸结合特性、核苷酸水解、激素结合和 DNA 结合)的蛋白。

因此，所述芯片可用指示目标活性存在与否的探针探测。例如，如果 DNA 结合是目标活性，那么用 DNA 探测含侯选 DNA 结合蛋白的芯片。

为蛋白或核酸配体的探针(天然或合成)对蛋白阵列的搜索可在蛋白芯片上平行进行。探针可以是细胞、含蛋白的细胞物质、蛋白、寡核苷酸、多核苷酸、DNA、RNA、小分子底物、药物侯选物、受体、抗原、类固醇、磷脂、抗体、免疫球蛋白区、谷胱甘肽、麦芽糖、镍、二氢胰蛋白酶或生物素。或者所述探针可以为酶底物或抑制剂。例如，所述探针可以为选自以下酶的底物或抑制剂：激酶、磷酸酶、蛋白酶、糖苷酶、乙酰基转移酶和其它基团转移酶。将芯片上的蛋白与核酸或蛋白探针组合物温育后，可通过质谱法鉴定结合的核酸或蛋白探针(Lakey 等，1998，“检测蛋白-蛋白相互作用”，Curr Opin Struct Biol. 8: 119-23)。

可通过使用本发明的蛋白芯片测定在康复或非康复患者的免疫应答中起抗原作用的病原体(例如感染性疾病因子，如病毒、细菌、真菌或寄生物)靶蛋白或异常细胞(例如癌细胞、患病细胞或损伤细胞)靶蛋白。例如，分离自患者的淋巴细胞可用于筛选在蛋白芯片上含病原体蛋白阵列的蛋白芯片。一般来说，这些筛选包括使多种淋巴细胞接触定位寻址阵列，并检测固体支持体上发生淋巴细胞活化的位置，所述阵列在固体支持体上含多种潜在抗原，每种不同抗原都在固体支持体上的不同位置，其中不同抗原的密度为至少 100 种不同抗原/cm^2。在一个具体实施方案中，淋巴细胞与阵列上的病原体蛋白接触，此后测定被抗原或抗原混合物活化的 B 细胞或 T 细胞，由此鉴定来自病原体的靶抗原。

另一方面，通过例如筛选潜在抗原阵列，可使用所述蛋白芯片表征免疫应答，以鉴定患者 B 细胞和/或 T 细胞靶。例如，B 细胞可与潜在抗原(即具有抗原决定簇的分子)阵列温育，以鉴定体液型免疫的抗原靶。抗原的来源可以是例如自身组织、已知或未知抗原的收

集物(例如病原性微生物的收集物)、组织特异性或疾病特异性抗原收集物或合成抗原。

在另一个实施方案中，可使用分离自患者的淋巴细胞筛选含患者自身组织蛋白阵列的蛋白芯片。这样的筛选可鉴定引起自身免疫或变态反应的蛋白的底物，并由此诊断自身免疫或变态反应和/或鉴定潜在的目的药物候选物。

在另一个实施方案中，本发明的蛋白芯片用于鉴定能够激活 B 细胞或 T 细胞的物质。例如，淋巴细胞与芯片上测试分子或蛋白阵列接触并测定淋巴细胞活化，由此鉴定通常能够活化 B 细胞或 T 细胞或淋巴细胞亚群(例如细胞毒性 T 细胞)的物质。

可通过各种方法测定抗原识别诱导的 B 细胞活化，所述方法包括但不限于检测抗体合成、^{3}H-胸苷掺入、标记抗体与新表达或抑制的细胞表面分子的结合以及分泌表明 B 细胞活化的因子(例如细胞因子)。同样，可通过各种测定检测使用本发明蛋白芯片筛选的 T 细胞活化。例如，铬(^{51}Cr)释放测定可检测抗原识别以及随后的细胞毒性 T 细胞活化(参见例如 Palladino 等，1987，Cancer Res. 47：5074-9；Blachere 等，1993，J. Immunotherapy 14：352-6)。

通过使用本发明的蛋白芯片可测定抗体制备物的特异性，包括使抗体制备物接触定位寻址阵列，并检测固体支持体上抗体制备物中的抗体发生结合的位置，所述阵列在固体支持体上含多种潜在抗原，每种不同抗原都在固体支持体上的不同位置，其中不同抗原的密度为至少 100 种不同抗原/cm^{2}。所述抗体制备物可以是但不限于 Fab 片段、抗血清以及多克隆抗体、单克隆抗体、嵌合抗体、单链抗体、人源化抗体或合成抗体。例如，可通过筛选疾病特异性抗原、组织特异性抗原或其它已鉴定的抗原收集物，并测定识别哪种抗原，特征鉴定抗血清。在一个具体实施方案中，用单克隆抗体筛选具有相似或相关抗原的蛋白芯片阵列，通过测定单克隆抗体结合阵列上的哪种抗原评价特异性程度。

可通过用复合蛋白混合物(例如细胞提取物)处理蛋白芯片并测定蛋白活性检测特异性细胞活性靶的身份。例如，可使含不同激酶阵列的蛋白芯片接触化合物(例如药物)处理细胞的细胞提取物，并测定激酶活性。在另一个实例中，可使含不同激酶阵列的蛋白芯片接触特定细胞分化阶段细胞(例如多能细胞)或特定代谢状态细胞(例如有丝分裂细胞)的细胞提取物，并测定激酶活性。将由这些测定获得的结果与例如存在或不存在药物时的细胞、几个分化阶段的细胞或不同代谢状态的细胞进行对比，可提供不同条件下细胞生理变化的信息。

或者，可通过用复合蛋白混合物(例如细胞提取物)处理含多种不同蛋白(例如肽文库)的本发明蛋白芯片并测定芯片上蛋白的修饰，检测特异性细胞活性靶的身份。例如，可使含不同蛋白阵列的蛋白芯片接触化合物(例如药物)处理细胞的细胞提取物，并测定例如激酶、蛋白酶、糖苷酶、乙酰基转移酶、磷酸酶或其它转移酶活性。在另一个实例中，可使含不同蛋白阵列的蛋白芯片接触特定细胞分化阶段细胞(例如多能细胞)或特定代谢状态细胞(例如有丝分裂细胞)的细胞提取物。将由这些测定获得的结果与例如存在或不存在药物时的细胞、几个分化阶段的细胞或不同代谢状态的细胞进行对比，可提供在这些条件下细胞生理作用的信息。

所述蛋白芯片可用于鉴定结合特定生物目标分子的探针，所述特定生物目标分子包括但不限于潜在配体分子的受体、病毒受体以及孤独受体的配体。

所述蛋白芯片还可用于检测结合蛋白芯片上蛋白的DNA或RNA以及测定结合特异性。另外，可通过用核酸序列筛选这些蛋白阵列并测定结合特异性和结合强度，用蛋白芯片研究特定类型的 RNA 结合蛋白或 DNA 结合蛋白(例如锌指蛋白)。

可用本发明的蛋白芯片分析相似生物实体中功能、配体结合或酶活性不同的蛋白的身份。例如，测定来自不同等位基因的蛋白同

种型互相之间的活性差异。

高密度蛋白芯片可用于药物寻找、药物作用模式分析、药物特异性和药物毒性的预测。例如，可通过使芯片上蛋白与药物或药物侯选物在不同测定条件下温育，通过测定阵列上药物结合的位置测定药物特异性并检测每种不同蛋白的药物结合量，测定结合药物的蛋白的身份及其相对亲和性。另一方面，可在同一蛋白芯片或在相同的第二块芯片上进行测定生物活性(而不是结合测定)的生物测定。因此，使用本发明蛋白芯片的这些测定类型可用于研究药物特异性、预测药物潜在的副作用以及药物分类。此外，本发明的蛋白芯片适于筛选药物侯选物的复杂文库。具体地说，可使芯片上的蛋白与药物侯选物文库温育，然后可通过例如质谱法鉴定结合组分，可同时鉴定优先结合特定亚组蛋白或结合芯片上几个或全部蛋白的所有文库组分。此外，可测定药物侯选物对阵列中不同蛋白的相对亲和性。

而且，可在先前观测到的相互作用、酶活性或生物反应的潜在抑制剂、催化剂、调节剂或增强剂存在的情况下探测本发明的蛋白芯片。以此方式，通过使用本发明的蛋白芯片，可分析例如药物结合的封闭或病毒的破坏或特定类别蛋白的生理效应物。

本发明的蛋白芯片可用于测定药物对复杂蛋白混合物的多个靶的修饰作用，所述复杂蛋白混合物例如完整细胞、细胞提取物或组织匀浆。可通过用药物处理细胞、组织或提取物筛选一种或多种蛋白芯片分析药物的净效应，然后可提供药物处理状态的“信号”，并且当与未处理状态的“信号”相比时，可提供例如效力、毒性和副作用的预测值。而且，通过例如向细胞、细胞提取物、组织匀浆或完整生物加入药物，并将不同处理时间点的药物处理细胞或提取物应用于蛋白芯片，可测定随时间变化的药物作用。

可通过使文库与本发明的蛋白芯片温育进行噬菌体展示文库的筛选。可通过本领域已知的各种方法(例如质谱法)测定阳性克隆的结合，由此鉴定目的克隆，此后可通过标准方法鉴定编码目的克隆的

DNA (参见例如 Ames 等，1995，J. Immunol. Methods 184：177-86；Kettleborough 等，1994，Eur. J. Immunol. 24：952-8；Persic 等，1997，Gene 187：9-18)。芯片以此方式可用于选择具有结合芯片上特定蛋白的表面组分的细胞。或者，可将噬菌体展示文库连接至芯片，以产生所述文库的定位寻址阵列，此后可用不同的探针混合物重复筛选所述阵列。

本发明还提供实施本发明测定方案的试剂盒。在一个具体实施方案中，本发明的试剂盒包括一种或多种本发明的阵列。所述试剂盒还可以在一个或多个容器中包括用于测定蛋白或分子的生物活性的试剂、用于测定探针和蛋白或分子相互作用的试剂、用于测定具有目的生物活性的蛋白或分子的生物活性的试剂和/或一种或多种探针、蛋白或其它分子。用于测定蛋白或分子生物活性的试剂或测定探针和蛋白或分子之间相互作用的试剂可包含在蛋白芯片上的每一个孔中或选定孔中。所述试剂可为溶液形式或固体形式。所述试剂可包括进行目的测定需要的蛋白或分子和探针中的任一种或两种都包括。

在一个实施方案中，试剂盒包含一种或多种芯片(即在固体支持体上含多种不同物质的定位寻址阵列，所述物质选自蛋白、含所述蛋白功能域的分子、完整细胞和含蛋白的细胞物质，每种不同物质在固体支持体上的不同位置，其中所述多种不同物质由至少 100 种不同物质/cm^2 组成)，并在一个或多个容器中包含一种或多种探针、试剂或其它分子。阵列物质可连接至固体支持体上的孔表面。在另一个实施方案中，试剂盒中的蛋白芯片可具有已连接至固体支持体孔的蛋白或探针。在再一个实施方案中，试剂盒中的蛋白芯片可具有用于测定蛋白或分子生物活性或测定探针和蛋白或分子相互作用的试剂或反应混合物，它们已连接至固体支持体孔。在又一个实施方案中，所述试剂未连接至固体支持体孔，但包含在孔中。在再一个实施方案中，所述试剂未连接至固体支持体孔，但包含在一个或

多个容器中，并可加入到固体支持体孔中。在再一个实施方案中，所述试剂盒还包括一个或多个容器，容器中含有用于测定蛋白或分子生物活性的溶液反应混合物。在另一个实施方案中，所述试剂盒提供一种可结合用于进行一个或多个测定的目的探针、蛋白或分子和/或其它试剂的支持物(例如珠)，此后可将附着探针、蛋白或其它试剂的支持物放置到芯片孔中。

在另一个实施方案中，试剂盒中的一种或多种蛋白芯片具有连接至固体支持体孔的目的生物活性的蛋白。在另一个实施方案中，试剂盒中的一种或多种蛋白芯片具有在生物体基因组中具有相同类型生物活性的全部表达蛋白的至少 50%、75%、90%或 95%，它们连接至固体支持体孔。在一个具体的实施方案中，试剂盒中的一种或多种蛋白芯片具有在生物体(例如特定物种)基因组中全部表达的激酶、磷酸酶、糖苷酶、蛋白酶、乙酰基转移酶、其它基团转移酶、核酸结合蛋白、激素结合蛋白或 DNA 结合蛋白的至少 50%、75%、90%或 95%，它们连接至固体支持体孔。

E. 用于蛋白芯片的蛋白

全长蛋白、全长蛋白的部分和肽，无论是由生物体重组过表达制备，还是较大蛋白片段化产生，还是化学合成，都可在本发明中用于形成蛋白芯片。过表达蛋白的生物体包括但不限于细菌、酵母、昆虫、人和非人哺乳动物，例如小鼠、大鼠、猫、犬、猪、母牛和马。此外，可使用其中一种限定结构域连接至各种天然或合成蛋白中的一种蛋白的融合蛋白。可在连接至蛋白芯片孔或沉积在蛋白芯片孔中之前纯化用于本发明的蛋白，或在通过使用先前已连接或沉积在蛋白芯片孔的试剂在连接过程中纯化用于本发明的蛋白。这些试剂包括通常特异性结合蛋白或结合特定类型蛋白的试剂。蛋白可在连接至蛋白芯片之前或与其同时嵌入人工或天然膜(例如脂质体、膜囊泡)中。或者可将蛋白分配到蛋白芯片孔中。

优选通过本领域已知的方法表达用于本发明蛋白芯片的蛋白。优选的表达系统是 Invitrogen 的 InsectSelect 系统(Carlsbad, CA，目录号 K800-01)，该系统是一种非裂解型单载体昆虫表达系统，其简化了高质量蛋白的表达，并消除了产生和扩增病毒母液的需要。该系统中的优选载体是 pIB/V5-His TOPO TA 载体(目录号 K890-20)。可使用生产商描述的方法将聚合酶链反应(PCR)产物直接克隆入该载体，然后表达具 N-末端组氨酸(His)标记的蛋白，所述标记可用于纯化表达的蛋白。

得自 Lifetech (Rockville, MD)的另一种昆虫细胞真核表达系统 BAC-TO-BAC™系统也是一种优选的表达系统。BAC-TO-BAC™系统不是使用同源重组，而是依靠位点特异性转座在大肠杆菌中产生重组杆状病毒。基因表达由高活性多角体蛋白启动子驱动，因此在感染的昆虫细胞中可提供高达 25%的细胞蛋白。

VI. 实施例 I: 使用蛋白芯片分析酵母蛋白激酶

A. 前言

以下的实施例例举了蛋白芯片生产的各个方面以及使用本发明蛋白芯片的方法。本发明的蛋白芯片技术适于快速分析大量的样品，因此该方法适于分析几乎所有的酵母蛋白激酶。蛋白激酶催化蛋白磷酸化，并在调节基础细胞功能(如细胞周期控制、信号转导、DNA 复制、基因转录、蛋白翻译和能量代谢[7])方面起关键性作用。完整基因组序列的可利用性使得有可能分析所有由生物体编码的蛋白激酶并测定其体外底物。

酵母基因组已经完成测序，包含大约 6200 个长度超过 100 个密码子的可读框；预计其中有 122 个编码蛋白激酶。这些蛋白激酶基因中有 24 个先前还没有研究过[8]。除了两种组氨酸蛋白激酶之外，所有的酵母蛋白激酶都是 Ser/Thr 家族成员；尽管已经报道了 7 种磷酸化丝氨酸/苏氨酸和酪氨酸的蛋白激酶，但不存在酪氨酸激酶家族

成员。

随着本发明蛋白芯片技术的发展，已经可如本文所述对酿酒酵母的几乎所有蛋白激酶的生化活性进行高通量分析。使用的蛋白芯片为 300 nl 孔的一次性阵列，所述孔位于放置于显微镜载玻片上面的硅氧烷弹性体层中。高密度小尺寸孔允许高通量分批处理和同时分析许多单独的样品，仅需要少量蛋白。使用本发明的蛋白芯片，将酿酒酵母激酶蛋白(总共 119 种不同的激酶)融合至在酵母中过表达的谷胱甘肽-S-转移酶(GST)，然后纯化并测定其磷酸化 17 种不同底物的能力。几乎所有的测试激酶(93%)都对一种或多种底物表现出至少比对照高 5 倍的活性，包括 24 种以前未表征的激酶中的 18 种。32 种激酶显示优先磷酸化一种或两种底物。27 种激酶容易磷酸化多聚(Tyr-Glu)。因为这些激酶中仅有 5 种先前归类为双功能激酶(即它们既能磷酸化 Ser/Thr，也能磷酸化 Tyr)，所以这些发现在所述激酶能够磷酸化酪氨酸残基方面极大地拓展了我们的认识。令人感兴趣的是，这些双重特异性激酶经常在催化区域附近共有相同的氨基酸残基。这些结果表明，本发明的蛋白芯片技术可用于蛋白生化活性的高通量筛选以及用于分析完整的蛋白质组。

B. 方法

1. 细胞培养、构建和蛋白纯化

使用 Hudson 等的重组策略 [9]，将 122 种酵母蛋白激酶基因中的 119 种克隆入高拷贝 *URA3* 表达载体(pEG(KG))中，该载体在半乳糖诱导型 *GAL10* 启动子控制下产生 GST 融合蛋白 [10]。简而言之，由 Research Genetics 购买与每个 ORF 末端互补的引物；这些引物的末端包含通用的 20 bp 序列。在第二轮 PCR 中，通过加入与载体同源的序列修饰这些产物的末端。将在其末端含载体序列的 PCR 产物连同所述载体一起转化入 *pep4* 酵母菌株(其缺少几种酵母蛋白酶)[10]，并选择 Ura^+ 菌落。在大肠杆菌中富集质粒，通过限制酶消化确认，使

用与所述载体互补的引物测定涵盖载体-插入片段连接部分在内的DNA序列。对于GST::Cla4构建物，移码突变位于N端编码区的poly(A)节段中。发现一个保持读框的正确克隆需要 3 个独立的克隆。对于这些基因中的 5 种，获得 2 个重叠的 PCR 产物，将其引入到酵母细胞中。将证实的质粒再引入到 *pep4* 酵母菌株中，以便进行激酶蛋白纯化。

为使用 96 孔结构制备样品，在含 2 ml 孔的盒中于含棉子糖的培养基中培养 0.75 ml 细胞至 O.D.(600)约 0.5；每种菌株使用 2 个孔。加入半乳糖至终浓度为 4%以诱导蛋白表达，并培养细胞 4 小时。合并相同菌株的培养物，用 500 ml 裂解缓冲液清洗 1 次，在 200 ml 裂解缓冲液中重悬浮，并转移至含 100 μl 冷冻玻璃珠的 96×0.5 ml 板(Dot Scientific, USA)中。通过在 4℃重复涡旋裂解盒中的细胞，并使用谷胱甘肽珠和标准方法[20]在 96 孔结构中由这些菌株纯化 GST 融合蛋白。通过将纯化蛋白的考马斯染色图谱与使用抗 GST 抗体的免疫印迹分析获得的图谱进行对比测定 5 种纯化 GST::激酶蛋白(Swe1、Ptk2、Pkh1、Hog1、Pbs2)的纯度。结果表明，纯化蛋白纯度超过 90%。为纯化活性形式的 Hog1，用 0.4 M NaCl 在诱导的最后 5 分钟处理所述细胞。蛋白激酶活性于-70℃可至少稳定 2 个月，激酶活性几乎没有或没有损失。

2. 芯片加工和蛋白连接

由硅氧烷弹性体聚二甲基硅氧烷(PDMS)(Dow Chemical, USA)制备芯片，在微加工模上铸造。将液态 PDMS 倾注在模具上，固化(于65℃至少 4 小时)后由可重复使用的模板上刮下柔韧的硅氧烷弹性体阵列层。尽管 PDMS 可容易地铸造在微光刻加工结构上，但为了本文描述的激酶测定，用计算机控制的激光切削工具(Universal Laser Systems, USA)定型、由丙烯酸层制备的模板足以满足要求。

测试了超过 30 种不同的阵列。测试的可变因素是孔的宽度和深

度(宽度范围为 100 μm 至 2.5 mm，深度为 100 μm 至 1 mm)、孔间间隔(100 μm 至 1 mm)、构型(或者矩形阵列，或者最紧密封装)和孔形(方形与圆形)。使用激光切削丙烯酸模板提供了一种快速廉价的获得大量参数不同的原型模板的方法。

为确定使蛋白与孔的附着最大化的条件，用 5 M H_2SO_4、10 M NaOH、过氧化氢或 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPTS)(Aldrich, USA)连接体处理 PDMS[11, 12]。与未处理的 PDMS 或其它方式处理的 PDMS 相比，GPTS 处理获得的蛋白与孔的吸附最大。简单来说，用 100% EtOH 于室温清洗 3 次后，将芯片浸入到 1% GPTS 溶液(95% EtOH，16 mM HOAc)中，于室温振摇 1 小时。用 95% EtOH 清洗 3 次后，在真空下于 135℃固化芯片 2 小时。固化的芯片可在干燥的氩气中储存数个月[12]。为使蛋白连接至芯片，将蛋白溶液加入到孔中，并在冰上温育 1-2 小时。用冷 HEPES 缓冲液(10 mM HEPES，100 mM NaCl，pH 7.0)淋洗 3 次后，用 1% BSA 的 PBS 溶液(Sigma, USA)于冰上封闭孔 1 小时以上。由于使用了 GPTS，避免了使用任何含伯胺基团的试剂。

为确定可连接至已处理 PDMS 的蛋白浓度，使用连续稀释的酶液将辣根过氧化物酶(HRP)抗小鼠 Ig (Amersham, USA)连接至芯片。用 PBS 彻底清洗后，使用增强型化学发光(ECL)检测法(Amersham, USA)检测结合的抗体。高达 8×10^{-9} μg/μm^2 的蛋白可连接至表面，用我们的免疫染色方法检测需要的最少量为 8×10^{-13} μg/μm^2。

3. 免疫印迹、激酶测定和数据获得

如所述进行免疫印迹分析[34]。使用 ^{33}P-γ-ATP 测试 GST::蛋白激酶的体外激酶活性[13]。在自磷酸化测定中，将 GST::激酶直接附着于 GPTS 处理的 PDMS，并在合适的缓冲液中用 ^{33}P-γ-ATP 进行体外反应。在底物反应中，通过 GPTS 将底物粘附于孔，用 HEPES 缓冲液清洗孔并用 1% BSA 封闭，然后加入激酶、^{33}P-γ-ATP 和缓冲液。总

反应体积保持在 0.5 μl/反应以下。于 30℃温育 30 分钟以后彻底清洗芯片，使芯片对 X 光片和 50 μm 分辨率的定量 Molemular Dynamics PhosphorImager 曝光。对于 12 种底物，每种激酶测定都重复至少 2 次；对于余下的 5 种底物，进行 1 次测定。

为测定底物特异性，使用下式计算特异性指数(SI): $SI_{ir} = F_{ir} / [(F_{i1} + F_{i2} + \ldots\ldots + F_{ir}) / r]$，其中 *i* 表示所使用激酶的标识，*r* 代表底物标识，而 F_{ir} 代表与单独的 GST 相比激酶 *i* 对底物 *r* 作用的增加倍数。

4. 激酶序列比对和系统树

使用 Gonnet 250 打分矩阵[36]，用 CLUSTAL W 算法[35]产生基于 107 种蛋白激酶的核心激酶催化结构域亚序列的多序列比对。由 SWISS-PROT[37]、PIR[38]和 GenBank[39]数据库获得激酶催化结构域序列。对于其催化结构域还没有注解的那些激酶(DBF4/YDR052C 和 SLN1/YIL147C)，使用 BLOSUM 50 打分矩阵[42]，用 FASTA 算法[40,41]由与数据组其它激酶亚序列比对推断可能的激酶亚序列。由所述比对提取出对应于 11 种核心催化亚结构域[43]的蛋白亚序列，用 PROTPARS[44]程序由计算机确定系统树(图 5a)。

5. 蛋白芯片数据的功能分组

为显现蛋白激酶之间实验数据的大致功能关系，基于其磷酸化 12 种不同底物的能力对激酶进行系统排序(由 web 站点 http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/chip 获得从 2000 年 8 月 17 日起的数据)。记录对应于 107 种蛋白激酶对每种底物的-/+活性分布，离散值为[0, 1]。由实验谱之间的成对 Hamming 距离产生矩阵，使用 PHYLIP 软件包[44]的 FITCH 程序 34 执行的 Fitch-Margoliash 最小平方评价法[45]计算机计算未确定起源的系统发生。在每种情况下都对分类单位的输入顺序进行随机化，以便消除数据集组织中的任何固有偏倚，并通过树结构的整体重排获得最佳系统。

C. 结果

1. 酵母激酶克隆和蛋白纯化

我们尝试使用重组定向克隆策略[9]在高拷贝表达载体(pEG(KG))中克隆 122 种酵母蛋白激酶基因的完整编码区，表达载体 pEG(KG)在半乳糖诱导型 *GAL10* 启动子[10](图 1a)控制下生产 GST 融合蛋白。在大肠杆菌中导入 GST::激酶构建物，并测定每种构建物的 5′末端序列。使用该策略按读框克隆了 122 种酵母蛋白激酶基因中的 119 种。三种未克隆的激酶基因非常大(4.5-8.3 kb)。

在酵母中过量生产 GST::激酶融合蛋白，使用谷胱甘肽珠和标准方法[11]由 50 ml 培养物中纯化 GST::激酶融合蛋白。对于 Hog1，用高盐处理酵母细胞，以在诱导的最后 5 分钟活化该酶；对于其它的激酶，使用合成培养基(URA$^-$/棉子糖)。使用抗 GST 抗体免疫印迹分析全部 119 种融合蛋白揭示，105 种酵母菌株产生可检测的 GST::融合蛋白；在大多数情况下融合蛋白为全长。每 ml 起始培养物获得高达 1 μg 的融合蛋白(图 1b)。但是，119 种 GST::激酶样品中有 14 种未能通过免疫印迹分析检测到。估计这些蛋白在使用的 *pep4* 蛋白酶缺陷型菌株中不能稳定过量产生，或者这些蛋白可能形成使用我们的方法不能纯化的不溶性聚集物。尽管该方法是成功的，但使用 50 ml 培养物纯化 GST 融合蛋白是一个耗时的过程，并且不能用于制备数以千计的样品。因此，发展出在 96 孔结构中培养细胞的方法(参见**方法**)。使用该方法制备出 119 种 GST 融合蛋白，并且在 6 小时内每 ml 起始培养物纯化的产量比所述 50 ml 方法高出约 2 倍。

2. 蛋白芯片设计

开发蛋白芯片对 119 种酵母蛋白激酶进行高通量生化测定(图 2)。这些芯片由在一次性硅氧烷弹性体聚二甲基硅氧烷(PDMS)[11]中的孔阵列组成。孔阵列允许小体积的不同探针高密度装填在单个芯片上，而在随后的分批处理过程中仍保持隔离。使用连接体 3-缩水

甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPTS)[12]将蛋白共价连接至所述孔。连接至表面的蛋白可高达 8×10^{-9} μg/μm²(参见**方法**)。

为进行蛋白激酶测定，使蛋白芯片技术与标准样品操作和记录设备相匹配。使用放射性同位素(^{33}P)、以下描述的激酶测定和手动加样测试各种阵列配置。以下的芯片产生最佳结果：1.4 mm 直径和 300 μm 深(大约 300 nl)的圆孔，具有 1.8 mm 间距的 10×14 矩形阵列构型。生产一个主模(12 个阵列)，重复铸造大量阵列进行蛋白激酶分析。为操作目的将芯片放置在显微镜载玻片上面(图 2a)；阵列覆盖面积稍稍超出标准显微镜载玻片的 1/3，通常使用每个载玻片两个阵列(图 2b)。尽管使用手动移液法将蛋白置于每个孔中，但也可以使用自动化技术。另外，这种蛋白芯片构型还可以使用其它标记方法，例如使用磷蛋白的荧光标记抗体，随后检测免疫荧光。

3. 使用蛋白芯片的大规模激酶测定

使用 ^{33}P-γ-ATP 和 17 种不同芯片以 17 个不同测定测试全部 119 种 GST::蛋白激酶的体外激酶活性[13]。使用如下的不同底物测定每种芯片：1)自磷酸化；2)牛组蛋白 H1(共同激酶底物)；3)牛酪蛋白(共同底物)；4)髓磷脂碱性蛋白(共同底物)；5) Axl2 C 末端-GST(Axl2 是一种参与芽殖的跨膜磷蛋白)[14]；6) Rad9 (一种参与 DNA 损伤关卡的磷蛋白)[15]；7) Gic2 (一种参与芽殖的磷蛋白)；8) Red1 (对染色体联会很重要的一种减数分裂磷蛋白)；9) Mek1 (对染色体联会很重要的一种减数分裂蛋白激酶)；10)多聚(酪氨酸-谷氨酸 1:4)(多聚(Tyr-Glu))；一种酪氨酸激酶底物)[19]；11) Ptk2 (一种小分子转运蛋白)[20]；12) Hsl1 (一种参与细胞周期调节的蛋白激酶)[21]；13) Swi6 (一种参与 G1/S 控制的磷酸转录因子)[22]；14) Tub4 (一种参与微管成核的蛋白)[23]；15) Hog1 (一种参与渗透压调节的蛋白激酶)[24]；16) Hog1 (所述激酶的失活形式)和 17) GST (对照)。对于自磷酸化测定，将所述激酶直接连接至处理的 PDMS 孔并加入 ^{33}P-γ-ATP；对于底物反应，将所述底物结合至孔，

然后加入激酶和 ^{33}P-γ-ATP。反应完成后，清洗载玻片，使用高分辨率磷成象仪获得和定量磷酸化信号。实例示于图 3。为鉴定激酶活性，将定量信号转化为相对于 GST 对照的增加倍数并作图，以便作图进行进一步的分析(图 4a)。

如图 4a 所示，大部分(93.3%)激酶对至少一种底物表现出超出背景 5 倍或更高的活性。正如预期一样，Hrr25、Pbs2 和 Mek1 分别磷酸化其已知底物[25-27] Swi6 (比 GST 对照高 400 倍)、Hog1 (高 10 倍)和 Red1 (出 10 倍)。该测定的结果证明，24 种预测的蛋白激酶中有先前还没有研究过的 18 种磷酸化一种或多种底物，几种非常规激酶也是如此[8]，包括组氨酸激酶(Sln1，Yi1042c)和磷脂激酶(例如 Mec1)。

为测定底物特异性，再将特定激酶活性对其对所有底物的平均活性归一化。几个实例示于图 4b；全部数据都可由 http://bioinfo.mbb.yale.edu/genome/yeast/chip 获得。32 种激酶对一种特定底物表现出特异性，特异性指数(SI，参见**方法**)等于或高于 2，相反，一种特定蛋白激酶或一组激酶优先磷酸化大多数底物。例如，相对于其它蛋白来说，Dbf20、Kin2、Yak1 和 Ste20 优先磷酸化 Axl2 (一种参与酵母细胞芽殖的蛋白)的 C 末端。令人感兴趣的是，前面的研究发现 Ste20 位于与 Axl2 相似的新生芽顶端，而 *ste20Δ/cla4^{ts}* 突变体不能出芽或形成完全极化的肌动蛋白片或丝[28]。另一个实例是也参与芽殖的磷蛋白 Gic2[16]。Ste20 和 Skm1 强烈磷酸化 Gic2 (图 4b)。先前的研究提示，Cdc42 与 Gic2、Cla4[29]、Ste20 和 Skm1 相互作用。我们的结果增加了以下的可能性：即 Cdc42 可能通过募集 Ste20 和/或 Skm1 促进 Gic2 磷酸化。

4. 酵母包含多种双功能特异性激酶

特别令人感兴趣的是双功能特异性激酶，即既磷酸化 Ser/Thr 也磷酸化酪氨酸的那些酶。根据序列分析，除两种酵母蛋白激酶以外，所有激酶都属于 Ser/Thr 蛋白激酶家族；但是，在进行本研究时有人

报道了 7 种蛋白激酶(Mps1、Rad53、Swe1、Ime2、Ste7、Hrr25 和 Mck1)为双功能特异性激酶[19]。我们证实，Swe1、Mps1、Ime2 和 Hrr25 容易磷酸化多聚(Tyr-Glu)，但我们未检测 Ste7、Rad53 或 Mck1 的任何酪氨酸激酶活性。Mck1 在我们的任何一个测定中都不显示强活性；但是，Ste7 和 Rad53 在其它测定中非常活跃。因此，它们不能磷酸化多聚(Tyr-Glu)表明，它们或者多半是很弱的酪氨酸激酶，或者至少对多聚(Tyr-Glu)底物弱。与后一种可能性相一致的是，其他人发现多聚(Tyr-Glu)是 Rad53 的非常弱的底物(Ref 19; D. Stern, pers. comm.)。令人感兴趣的是，我们发现 23 种其它激酶也有效使用多聚(Tyr-Glu)作为底物，表明在酵母中存在至少 27 种激酶能够作为双功能特异性激酶在体外起作用。最近证实，其中一个激酶 Rim1 磷酸化其体内底物 Ime2 上的 Tyr 残基，表明其确实是双功能特异性激酶[30]。总之，本实验粗略地使能够起双功能特异性激酶作用的激酶数目增加 3 倍，并提出了有关其中一些激酶分类为双功能特异性激酶的问题。

5. 多聚(Tyr-Glu)激酶的功能特异性和氨基序列之间的关系

酵母蛋白激酶的大规模分析使我们可以比较蛋白激酶互相之间的功能关系。我们发现，其中许多磷酸化多聚(Tyr-Glu)的激酶互相之间在氨基酸序列上相关：70%的多聚(Tyr-Glu)激酶在系统树上聚簇为 4 个不同的组，其中所述激酶互相之间根据其保守蛋白激酶结构域的序列相似性编组(图 5a)。氨基酸序列的其它测试揭示，相对于不使用多聚(Tyr-Glu)作为底物的激酶来说，4 种类型的氨基酸偏好存在于多聚(Tyr-Glu)类激酶中(三种为赖氨酸，一种为甲硫氨酸)；一种残基(天冬酰胺)偏好位于不容易使用多聚(Tyr-Glu)作为底物的激酶中(图 5b)。所述残基中的大多数都位于所述分子的催化部分附近(图 5b)[31]，提示它们可能在底物识别中起作用。

D. 讨论

1. 大规模分析蛋白激酶

本研究使用新型蛋白芯片技术特征鉴定 119 种蛋白激酶对 17 种不同底物的活性。我们发现特定蛋白是特定蛋白激酶的优选底物，反之亦然，许多蛋白激酶优选特定底物。这些研究要考虑非目的酶的激酶有可能污染我们的制品。尽管这不能严格排除在外，但通过考马斯染色和用抗-GST 免疫印迹染色对我们样品中的 5 种进行分析表明，我们的制品不存在任何不是 GST 融合蛋白的可检测条带(参见**方法**)。

需要重点指出的是，体外测定不能确保特定激酶的体外底物能被该激酶体内磷酸化。相反，这些实验表明，某些蛋白能够用作特定激酶的底物，由此允许进一步的分析。在这方面，这些测定类似于检测侯选相互作用的双杂交研究。测定该过程是否能正常地在体内发生必须其它的实验方法。

与其中许多底物可能是体内真正底物的想法相一致的是，观察到三种激酶 Hrr25、Pbs2 和 Mek1 在我们的测定中磷酸化其已知底物。而且，许多激酶(例如 Ste20)与其体外底物(例如 Axl2)共定位。因此，我们预期，许多在我们的体外测定中磷酸化底物的激酶在体内可能也是如此。

尽管其中大部分激酶在我们的测定中有活性，但有几种没有。推测我们制品中的后几种激酶或者缺乏足够量的活化物，或者在活化条件下不能纯化。例如，在我们的测定中无活性的 Cdc28 可能缺乏其活化细胞周期蛋白。对于 Hog1，用高盐处理细胞以活化酶。因为我们的激酶制备物的确几乎全部都表现出活性，所以我们推测制备物中的至少部分酶已正确活化和/或包含必须的辅因子。有可能是这些酶在其天然生物中过表达对高度成功地获得活化酶起显著作用。

使用蛋白芯片测定鉴定出许多利用多聚(Tyr-Glu)的激酶。大规

模分析许多激酶提供了一种使多聚(Tyr-Glu)激酶的功能特异性与特异性氨基酸序列联系起来的新方法。磷酸化多聚(Tyr-Glu)的激酶中的许多残基都包含碱性残基。这可以预计得到，假如激酶残基和 Glu 残基之间是静电作用的话。但是，某些其它残基的作用不是显而易见的，例如磷酸化多聚(Tyr-Glu)的激酶上的 Met 残基，以及不磷酸化多聚(Tyr-Glu)的激酶上的 Asn。这些激酶残基可通过其它机制提供底物特异性。无论如何，分析其它底物应当可以进一步使所有蛋白激酶的功能特异性和蛋白激酶序列关联起来。

2. 蛋白芯片技术

除了快速分析大量样品之外，本文描述的蛋白芯片技术具有超越常规方法的显著优势。1)芯片型测定具有高信噪比。我们发现，使用蛋白芯片表现出的信噪比远远好于(＞10 倍)传统微量滴定板测定观察到的信噪比(未列出数据)。推测这是由于以下事实：^{33}P-γ-ATP 与 PDMS 的结合未达到微量滴定板的程度。2)需要的材料量非常少。反应体积为 384 孔微量滴定板使用量的 1/20-1/40；每次反应使用的蛋白激酶少于 20 ng。3)使用蛋白芯片的酶测定非常敏感。即使仅有 105 种融合蛋白可通过免疫印迹分析检测出来，但仍有 112 种融合蛋白对至少一种底物的酶活性显示超过背景 5 倍。例如，Mps1 在许多激酶测定中始终如一地显示出最强活性，即使我们还不能够通过免疫印迹分析检测出该融合蛋白(参见图 1b 和 3a)。4)最后，芯片廉价；每个阵列的材料成本低于 8 美分。微加工模也易于制备且廉价。

除了分析蛋白激酶外，该蛋白芯片技术也适用于各种各样的其它测定，例如 ATP 和 GTP 结合测定、核酸酶测定、解螺旋酶测定和蛋白-蛋白作用测定。最近，在一个独立研究中，Phizicky 和同事在非常弱的 *CUP1* 启动子控制下表达了为 GST 融合蛋白的酵母蛋白[6]。尽管其克隆的品质还没有确定，但他们能够使用含所述融合蛋白的酵母菌株库鉴定生化活性。我们的蛋白芯片方法的优势在于所有样

品都可以在单一实验中进行分析。而且，尽管本研究使用具有聚集样品优势的孔，但也可以使用平面 PDMS 芯片和载玻片进行其它测定；其优势是可与标准点样针工具微阵列一起使用。该技术还可适用于促进高通量药物筛选，在该筛选中人们可筛选抑制或激活任何目的基因产物酶活性的化合物。因为这些测定将在蛋白水平上进行，所以结果对蛋白的分子功能更直接和更有意义。

我们使用通常可获得的样品操作和记录设备配置用于特定蛋白激酶测定的蛋白芯片技术。为此，阵列尺寸相对比容易用微加工硅氧烷弹性体结构获得的尺寸要大 [32]。我们铸造的 PDMS 结构的形状尺寸比本文报道的用微光刻加工模获得的结构小两个数量级，而其他人报道了微加工结构的亚微米形体尺寸 [33]。这些结果表明，微加工蛋白芯片的孔密度可容易地增加几个数量级。本文报道的蛋白芯片技术易于放大。

总之，开发了一种用于高通量筛选蛋白生化活性的廉价一次性蛋白芯片技术。通过测定酿酒酵母的 119 种蛋白激酶对 17 种不同底物的磷酸化进行分析，证明了其用途。这些蛋白芯片允许同时检测数以百计的蛋白样品。使用基于芯片技术的微加工孔阵列使阵列密度可容易地增加几个数量级。随着合适样品操作和检测技术的发展，这些蛋白芯片可用于同时测定几千至几百万种样品。

E. 参考文献

1. Fields, S., Kohara, Y.,和 Lockhart, D.J. 功能基因组，*Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**，8825-26 (1999)。

2. Goffeau, A.,等，6000 种基因的生命，*Science* **274**，563-567 (1996)。

3. DeRisi, J.L., Iyer, V.R.和 Brown, P.O. 在基因组规模上探索基因表达的代谢和遗传控制，*Science* **278**，680-686 (1997)。

4. Winzeler, E.A.等，通过基因缺失和平行分析功能性特征鉴定酿

酒酵母基因组，*Science* **285**，901-906 (1999)。

5. Heyman, J.A.,等，使用拓扑异构酶-I 介导的连接对各个可读框进行基因组规模的克隆和表达，*Genome Res.* **9**，383-392 (1999)。
6. Martzen, M.R.,等，通过其产物活性鉴定基因的生化基因组方法，*Science* **286**，1153-1155 (1999)。
7. Plowman G.D., Sudarsanam S., Bingham J., Whyte D.,和 Hunter T.，*Caenorhabditis elegans* 蛋白激酶：多细胞生物信号转导模型，*Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**，13603-12610 (1999)。
8. Hunter, T., & Plowman, G.D.，芽殖酵母蛋白激酶：120 种或更多，*TIBS* **22**, 18-22 (1997)。
9. Hudson, J.R.,等，易用形式的酿酒酵母成套预测基因，*Genome Res.* **7**，1169-1173 (1997)。
10. Mitchell, D.A., Marshall, T.K.,和 Deschenes, R.J. 诱导谷胱甘肽 S 转移酶融合蛋白在酵母中过表达的载体，*Yeast* **9**，715-23 (1993)。
11. Rogers, Y.-H.,等，通过二硫键将寡核苷酸固定在玻璃支持体上：DNA 微阵列制备方法，*Analy. Biochem.* **266**，23-30 (1999)。
12. Stimpson, D.J.,等，通过使用光波指引实时检测寡核苷酸阵列上的 DNA 杂交和解链，*Proc. Natl. Acad. Sci.* **92**，6379-6383 (1995)。
13. Hunter, T. & Sefton, B.M. 蛋白质磷酸化，*Meth. in Enzym.* **200**，35-83 (1991)。
14. Roemer, T.K.,等，在酵母中选择轴向生长位点需要一种新质膜糖蛋白 Axl2p，*Genes & Dev.* **10**，777-793 (1996)。
15. Weinert, T.A. & Hartwell, L.H. cdc 突变体的细胞周期停滞和 RAD9 关卡的特异性，*Genetics* **134**，63-80 (1993)。
16. Jaquenoud, M., Gulli, M.P., Peter, K.,和 Peter, M. cdc42p 效应物 Gic2p 是 SCFGrr1 复合物遍在蛋白依赖性降解的目标，*EMBO J.*

17，5360-5373 (1998)。

17. Menees, T.M., Ross-MacDonald, P.B.,和 Roeder, G.S. 染色体联会需要一种减数分裂特异性酵母基因 MEI4，*Mol. Cell Biol.* **12**，1340-1351 (1992)。

18. Bailis, T.M., & Roeder, G.S. 联会复合体形态发生和姐妹染色单体粘合需要减数分裂染色体蛋白 Mek1 依赖性磷酸化，*Genes & Dev.* **12**，3551-3563 (1998)。

19. Stern, D.F., Zheng, P., Beidler, D.R.,和 Zerillo, C. 一种酿酒酵母新激酶 Spk1 磷酸化蛋白上的丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸，*Mol. Cell Biol.* **11**，987-1001 (1991)。

20. Kaouass, M.,等，在酿酒酵母中进行高亲和性亚精胺转运需要编码推定的 Ser/Thr 蛋白激酶的 STK2 基因，*Mol. Cell Biol.* **17**，2994-3004 (1997)。

21. Barral, Y., Parra, M., Bidlingmaier, S.,和 Snyder, M. Nim1 相关性激酶使酵母的细胞周期进展和外周细胞骨架形成相协调，*Genes & Dev.* **13**，176-187 (1999)。

22. Madden, K., Sheu, Y.-J., Baetz, K., Andrews, B.,和 Snyder, M. 作为酵母 PKC-MAP 激酶途径靶的 SBF 细胞周期调节物，*Science* **275**，1781-1784 (1997)。

23. Sobel, S.G. & Snyder, M. 高度趋异的γ-微管蛋白基因是酿酒酵母细胞生长和正确微管组织化必须的，*J. Cell Biol.* **131**，1775-1788 (1995)。

24. Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H.,和 Silver, P.A. 调节 HOG1 MAPK 的核质/胞质交换需要输入蛋白β类似物 NMD5 和 XPO1，*EMBO J.* **17**，5606-5614 (1998)。

25. Ho, U., Mason, S., Kobayahi, R., Heokstra, M.,和 Andrew, B. 酪蛋白激酶 I 型异构酶 Hrr25 和细胞周期调节转录因子 SBF 在酿酒酵母中对 DNA 损伤的转录应答的作用，*Proc. Natl. Acad. Sci.*

94，581-586 (1997)。

26. Wurgler-Murphy, S.M., Maeda, T., Witten, E.A.,和 Saito, H. 通过 PTP2 和 PTP3 蛋白酪氨酸磷酸酶调节酿酒酵母 HOG1 有丝分裂原活化的蛋白激酶，*Mol. Cell Biol.* **17**，1289-1297 (1997)。

27. Santos, T. & Hollingsworth, N.M. 在酵母有丝分裂过程中与 Hop1p 物理性相互作用的 MEK1 依赖性磷蛋白 Red1p，*J. Biol. Chem.* **274**，1783-1790 (1999)。

28. Holly, S.P. & Blumer, K.J. PAK 家族激酶在酿酒酵母细胞周期的整个过程中调节细胞和肌动蛋白极化，*J. Cell Biol.* **147**，845-856 (1999)。

29. Richman, T.J., Sawyer, M.M.,和 Johnson, D.I. cdc42p GTP 酶在酵母中参与调节顶部各向同性开关和核分裂的 G2/M 形态发生关卡，*J. Biol.Chem.* **274**，16861-16870 (1999)。

30. Malathi, K., Xiao, Y.,和 Mitchell, A.P. 酵母 GSK3β/长柔毛类似物 Rim11p 在有丝分裂活化中的催化作用，*Genetics* **153**，1145-1152 (1999)。

31. Owen, D.J., Noble, M.E., Garman, E.F., Papageorgiou, A.C.,和 Johnson, L.N. 磷酸化酶激酶催化结构域的两种结构：与底物类似物和产物复合的活性蛋白激酶，*Structure* **3**，467-474 (1995)。

32. Xia, Y. & Whitesides, G.M. *Angew. Chem. Int. Ed.* **37**，550-(1997)。

33. Jackman, R.J., Duffy, D.C., Cherniavskaya, O.,和 Whitesides, G.M. 使用弹性膜作为干燥保护层和干燥防护，*Langmuir*，**15**，2973-2984 (1999)。

34. Mylin, L.M., Hofmann, K.J., Schultz, L.D.,和 Hopper, J.E. 高拷贝半乳糖启动子在酵母中调节产量可控且高水平的 GAL4 表达盒，*Methods Enzymol.* **185**，297-308 (1990)。

35. Higgins, D.G., Thompson, J.D.,和 Gibson, T.J. 使用 CLUSTAL 进

行多序列比对，*Methods Enzymol.* **266**，383-402 (1996)。

36. Gonnet, G.H., Cohen, M.A.,和 Benner, S.A. 完整蛋白序列数据库的完全匹配，*Science.* **256**，1443-1445 (1992)。

37. Bairoch, A. & Apweiler, R. SWISS-PROT 蛋白质序列数据库及其增补 TrEMBL，*Nucleic Acids Res.* **27**，49-54 (1999)。

38. Barker, W.C.,等，PIR 国际蛋白序列数据库，*Nucleic Acids Res.* **27(1)**，39-43 (1999)。

39. Benson, D.A.等，GenBank. *Nucleic Acids Res.* **27**，12-17 (1999)。

40. Lipman, D.J. & Pearson, W.R. 快速且敏感的蛋白相似性检索，*Science.* **277**，1435-1441 (1985)。

41. Pearson, W.R. & Lipman, D.J. 改进的生物序列对比工具，*Proc. Natl. Acad. Sci.* **85**，2444-2448 (1988)。

42. Dayhoff, M.O., Schwartz, R.M.,和 Orcutt, B.C. 蛋白的革命性变化模型，载于：*Atlas of Protein Sequence and Structure*， M.O. Dayhoff 主编，Washington, DC: National Biomedical Research Foundation. 第 345-352 页(1978)。

43. Hanks, S.K. & Hunter, T. 蛋白激酶 6，真核生物蛋白激酶亚家族：激酶(催化)结构域结构和分类，*FASEB J.* **9**，576-96 (1995)。

44. Felsenstein, J. PHYLIP-种系发生推断软件包(3.2 版)，*Cladistics.* **5**，164-166 (1989)。

45. Fitch, W.M. & Margoliash, E. 系统树结构，*Science.* **155**，279-284 (1967)。

VII. 实施例 II: 使用蛋白芯片分析酵母蛋白激酶活性

A. 前言

以下实施例提出了三种方案，这三种方案仅用于说明目的，提供了使用本发明蛋白芯片测定蛋白激酶活性的不同方法。

1. 蛋白激酶活性的测定方法

i. 自磷酸化活性

(1)用 100% EtOH 于室温清洗蛋白芯片 3 次。然后用连接体 GPTS (1%的 95% EtOH 溶液)于室温振摇包被芯片 1 小时。用 100% EtOH 清洗 3 次后，将芯片于 130℃真空干燥 1.5 小时。

(2)温育至少 1 小时，将 GST::酵母蛋白激酶(每孔一种激酶)结合至蛋白芯片孔。再用 1% BSA 封闭芯片。

(3)向每个孔中加入激酶缓冲液和 ^{33}P-γ-ATP 探针，并于 30℃温育 30 分钟。在磷酸化反应完成后彻底清洗芯片。

(4)通过磷成象仪检测和定量代表自磷酸化的特异性 ^{33}P-γ-ATP 信号。

ii. 激酶活性-方案 I

(1)用 100% EtOH 于室温清洗蛋白芯片 3 次。然后用连接体 GPTS (1%的 95% EtOH 溶液)于室温振摇包被芯片 1 小时。用 100% EtOH 清洗 3 次后，将芯片于 130℃真空干燥 1.5 小时。

(2)温育 1 小时或 1 小时以上，将底物(例如 GST::酵母蛋白)结合至芯片。再用 1% BSA 封闭芯片，并清洗芯片。

(3)向蛋白芯片的每个孔中加入不同的蛋白激酶以及激酶缓冲液和 ^{33}P-γ-ATP，并于 30℃温育 30 分钟。在磷酸化反应完成后彻底清洗芯片。

(4)通过磷成象仪检测和定量代表蛋白激酶探针磷酸化底物蛋白的特异性 ^{33}P-γ-ATP 信号。

iii. 激酶活性-方案 II

(1)用 100% EtOH 于室温清洗蛋白芯片 3 次。然后用连接体 GPTS (1%的 95% EtOH 溶液)于室温振摇包被芯片 1 小时。用 100% EtOH 清洗 3 次后，将芯片于 130℃真空干燥 1.5 小时。

(2)温育 1 小时或 1 小时以上，将底物(例如 GST::酵母蛋白)结合至芯片。再用 1% BSA 封闭芯片，并清洗芯片。

(3)向蛋白芯片的每个孔中加入不同的蛋白激酶以及激酶缓冲液和 P-γ-ATP，并于 30℃温育 30 分钟。在磷酸化反应完成后彻底清洗芯片。将芯片与碘乙酰-LC-生物素在黑暗中于室温过夜温育。

(4)清洗后，用荧光标记的抗生物素蛋白探测芯片，以检测磷酸化信号。

(5)然后用 Axon Genepix 4000A 扫描仪扫描芯片，该扫描仪改装聚焦深度增加约 300-400 μm 的透镜。改装允许扫描表面放在载玻片上(例如本发明的 PDMS 微阵列)，否则将偏离聚焦面。使用改装的 Axon Genepix 4000A 扫描仪扫描阵列获得并量化了荧光信号。

VIII. 实施例 III: 使用蛋白芯片分析蛋白-蛋白相互作用

使用标准方法在大肠杆菌中重组表达并纯化为标记融合蛋白的目的蛋白(“探针蛋白”)。将靶蛋白连接至芯片孔，每个孔中都有不同的靶蛋白。将纯化的探针蛋白加入到芯片的每个孔中并温育几小时或更长时间。清洗芯片并用以下的任一种物质探测：a)探针蛋白的抗体或 b)融合蛋白标记的抗体。用荧光标记如 Cy3 或 Cy5 标记抗体，或者使用检测一抗的荧光标记二抗检测。

以下实施例提供了使用本发明蛋白芯片测定蛋白酶、核酸酶或 G 蛋白受体的方法，仅用于说明目的。通常可使用以下的方法或相似的方法测定蛋白-蛋白相互作用。

A. 分析蛋白酶活性

以下述方式测定蛋白酶活性。首先，制备由各种氨基酸组合物构成的蛋白探针，C 末端或 N 末端连接质谱标记，唯一的条件是标记的分子量应足够大，以便可以检测蛋白的所有标记切割产物。于 37℃使蛋白探针与连接至蛋白芯片的蛋白酶接触。于 37℃温育合适的

时间并用乙腈和三氟乙酸清洗后，通过使用质谱分析检测蛋白水解产物检测蛋白酶活性。该测定提供了有关连接至蛋白芯片的蛋白酶水解活性和特异性这二者的信息。

另一种分析蛋白酶活性的快速测定是将已知序列的蛋白连接至芯片。底物蛋白在结束时而不是连接至芯片时用荧光标记。当与目的蛋白酶温育时，一旦发生蛋白水解荧光标记就丢失，使得荧光下降可表示蛋白酶活性的存在与否和存在程度。可进行相同类型的测定，其中蛋白底物与放置在芯片孔中的珠相连接。

B. 分析核酸酶活性

以和以上有关蛋白酶活性的描述相同的方式评价核酸酶活性，不同之处在于核酸探针/底物代替蛋白探针/底物。同样，可通过荧光检测核酸酶活性释放的荧光标记核酸片段，或者可通过质谱法直接检测核酸片段。

C. 分析 G 蛋白偶联受体

在另一种类型的测定中，鉴定结合 G 蛋白偶联受体的化合物。开始，将 G 蛋白受体作为 GST 融合蛋白克隆，GST 部分连接至 G 蛋白的 C 末端，因为 C 端通常不涉及决定探针特异性。优选通过与谷胱甘肽缔合将 G 蛋白::GST 融合蛋白连接至所述孔。然后将 G 蛋白受体与化合物的混合物(例如组合化学库或肽库)温育。清洗后例如通过加入 25%乙腈/0.05%三氟乙酸洗脱结合的探针。然后将洗脱的物质上样至 MALDL 质谱仪，并鉴定结合探针的性质。

IX. 使用蛋白芯片分析特异性抑制剂对蛋白激酶的抑制

以下的描述提供了使用本发明蛋白芯片检测蛋白激酶对蛋白激酶抑制剂敏感性的方法，仅用于说明目的。蛋白-蛋白相互作用一般可使用以下的方法或相似的方法进行测定。

于室温将底物结合至蛋白芯片上 GPTS 处理的微孔表面达 1 小

时，然后用 1% BSA 和 100 mM Tris pH7.5 封闭，并用 TBS 缓冲液清洗 3 次。在存在 ^{33}P-γ-ATP 时向微孔中加入激酶和不同浓度的激酶抑制剂。于 30℃进行 30 分钟的磷酸化反应。反应完成后，用 TBS 缓冲液于室温彻底清洗蛋白芯片，然后使其干燥。通过使蛋白芯片对 X 光片或磷成象仪曝光获得磷酸化信号。

使用不同浓度的 PKIα (一种特异性人 PKA 抑制剂)或 SB202190 (一种 MAPK 抑制剂)测试人蛋白激酶 A(PKA)、人促细胞分裂剂激活性蛋白激酶(MAPK)、三种酵母 PKA 类似物(TPK1、TPK2 和 TPK3)和其它两种酵母蛋白激酶(HSL1 和 RCK1)对两种底物(即 PKA 蛋白底物和常用的激酶底物 MBP)的作用。如图 7 所示，PKIα特异性抑制 PKA 对肽和 MBP 底物二者的活性。然而，PKIα不抑制所测试的三种酵母 PKA 类似物(TPK1、TPK2 和 TPK3)或其它两种酵母蛋白激酶(HSL1 和 RCK1)。另外，SB202190 不抑制 PKA 活性。

X. 实施例 V: 在玻璃表面上进行激酶测定

1. 将载玻片(Fisher, USA)浸泡在 28-30%氢氧化铵中，于室温(“RT”)振摇过夜。

2. 用超纯水清洗载玻片 4 次，每次 5 分钟(“min”)，然后用大体积 100%乙醇(“EtOH”)淋洗，以完全去除水。然后用 95%乙醇淋洗载玻片 3 次。

3. 将载玻片浸入到 1% 3-缩水甘油氧丙基三甲氧基硅烷(GPST)的 95% EtOH、16 mM 乙酸(“HOAc”)溶液中，于室温振摇 1 小时。用 95%乙醇于室温淋洗载玻片 3 次。

4. 于 135℃真空固化载玻片 2 小时。冷却后可将载玻片储存在氩气中直至使用，储存时间可达数月。

5. 将大约 10 μl 的每种蛋白底物(40%的甘油溶液)点阵在冰上的 96 孔 PCR 板上。使用手动打点装置(V&P Scientific, USA)于室温将大约 3 nl 的每种样品点样在 GPTS 处理的载玻片上。在一个实施方案

中，将 786 个样品点样在一个载玻片上。将载玻片置于有盖的干净容器中于室温温育 1 小时。

6. 用 10 ml 封闭缓冲液(100 mM 甘氨酸、100 mM Tris, pH8.0、50 mM NaCl)于室温封闭载玻片 1 小时。用 TBS 缓冲液(50 mM Tris, pH8.0、150 mM NaCl)清洗载玻片 3 次，并以 1500 rpm 旋转 5 分钟至干燥。

7. 用 HybriWell Sealing System (Schleicher & Schuell, Germany)覆盖在载玻片的底物表面，并将含蛋白激酶和作为标记试剂的 ^{33}P-γ-ATP 的 40 μl 激酶混合物加入到在冰上的底物中。

8. 将反应物在潮湿箱中于 30℃温育 30 分钟。将封条由载玻片上剥落，将载玻片浸入到含 50 mM EDTA 的大体积 PBS 缓冲液中。再用相同的缓冲液于室温清洗载玻片 3 × 15 分钟。然后用 Kimwipes 干燥清洗的载玻片。

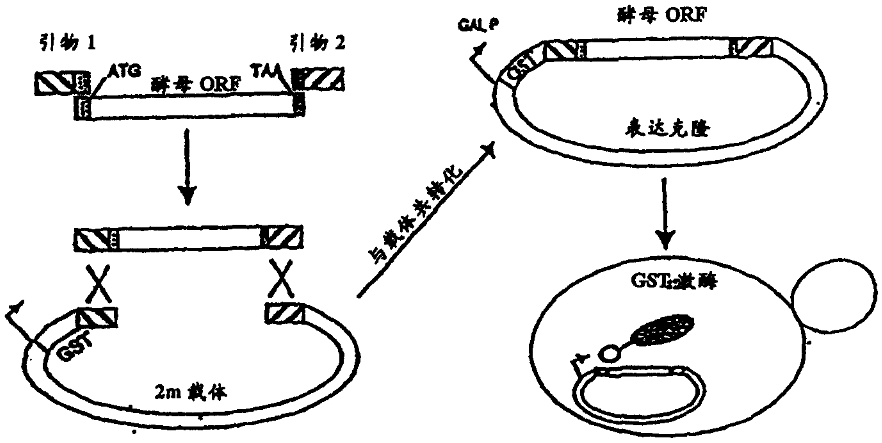
9. 为获得信号，将载玻片对磷成象仪屏幕曝光，使用 ImageQuant 软件分析数据。

XI. 引用的参考文献

本文引用的所有参考文献都通过引用整体结合到本文中，均等同于每个具体而单独指明的单独出版物或专利或专利申请通过引用整体结合。

可在不偏离本发明精神和范围的情况下对本发明进行多种修饰和改变，这对本领域技术人员而言是显而易见的。本文描述的具体实施方案仅仅是为了举例说明，本发明连同所附权利要求的等同方案的全部范围仅受所附权利要求书的限制。

图 1A


引物 1
引物 2
ATG
TAA
酵母 ORF
GST
2m 载体
与载体共转化
GAL P
酵母 ORF
GST
表达克隆

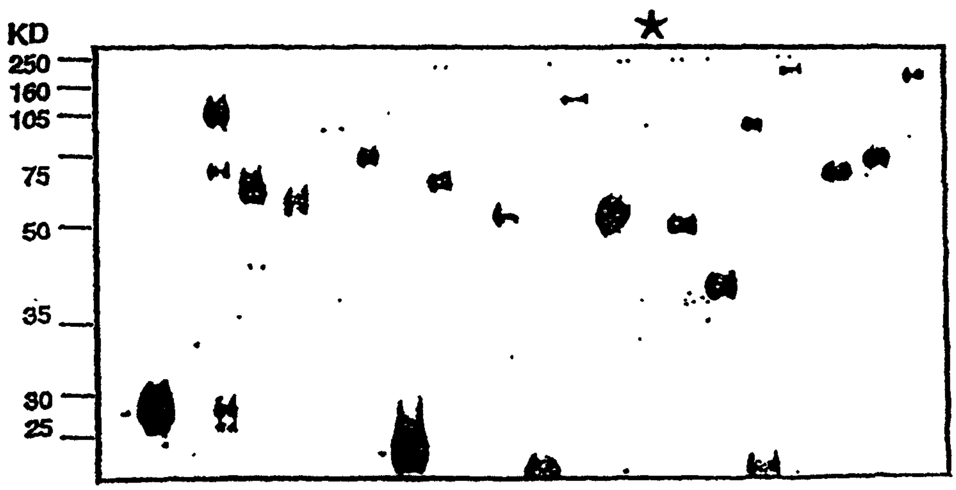
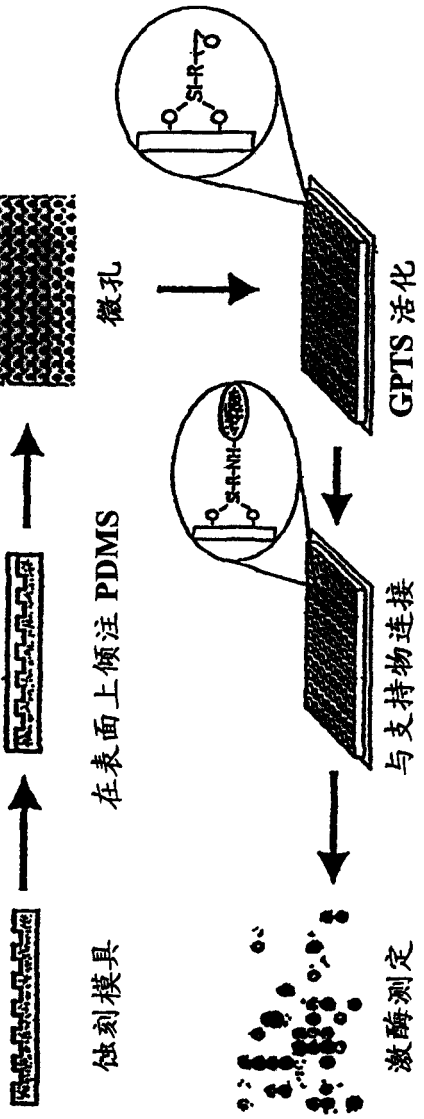

KD
250
160
105
75
50
35
30
25

图 1B

图 2A



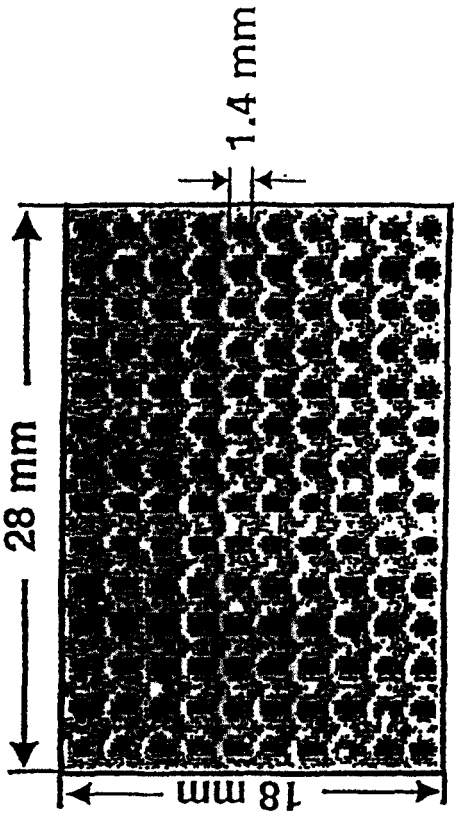
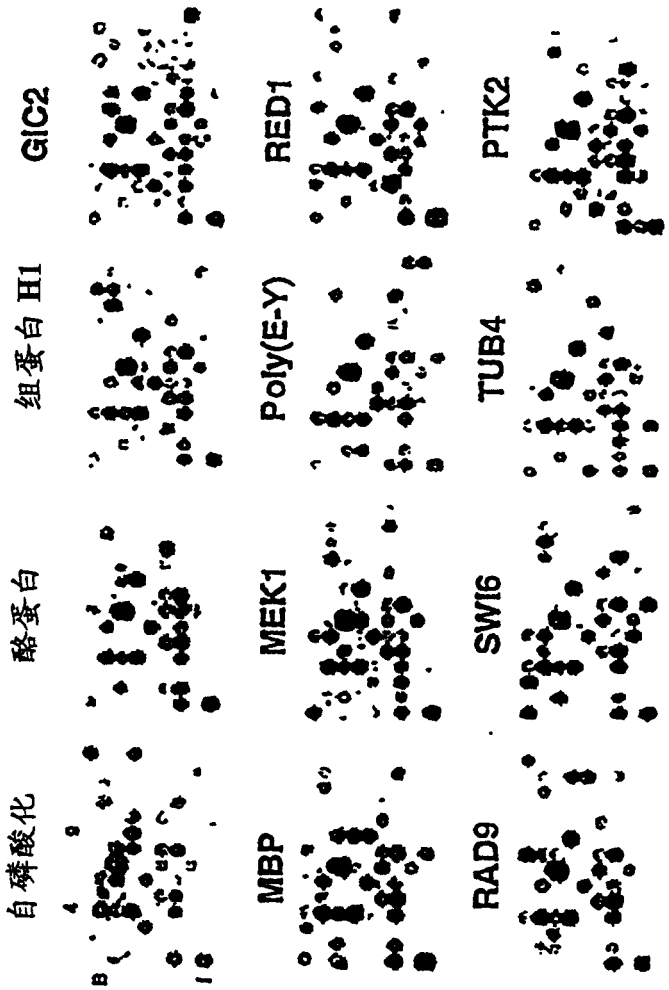


图 2B

图 3



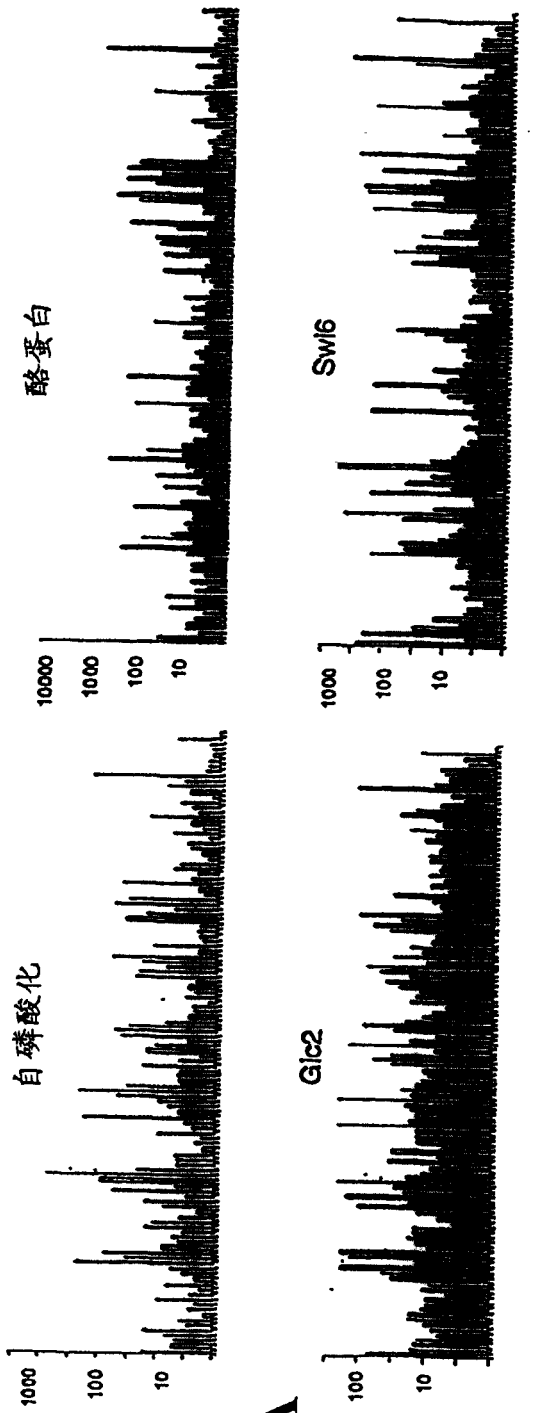

自磷酸化
酪蛋白
Glc2
Swi6

图 4A

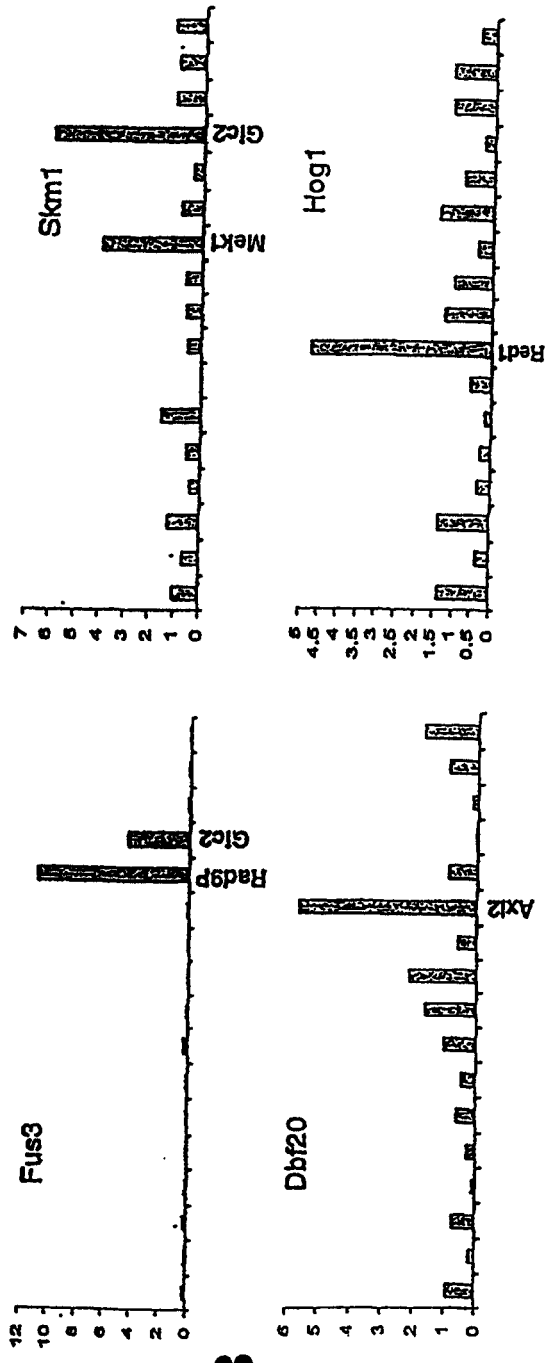

Fus3
Rad9P
Glc2
Skm1
Mek1
Glc2
Dbf20
Axl2
Hog1
Red1

图 4B

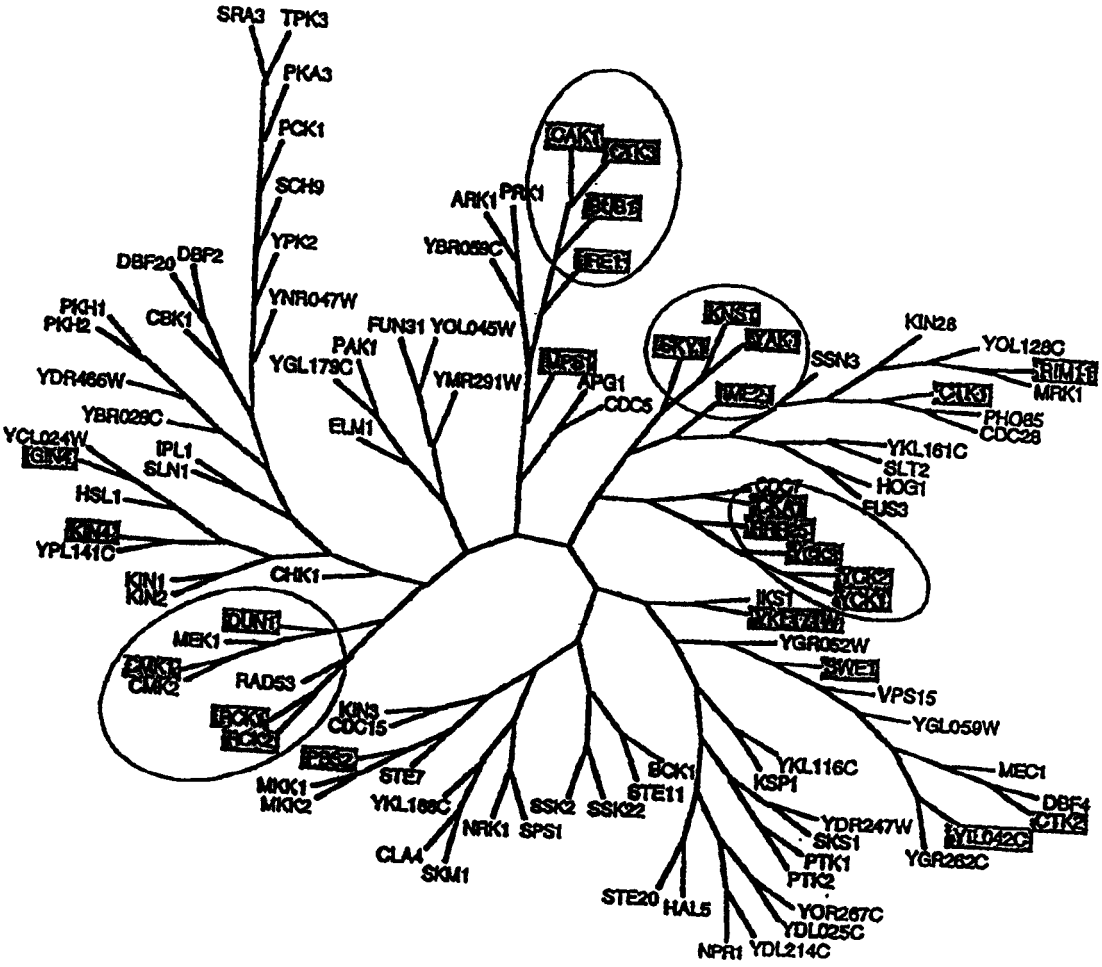

SRA3
TPK3
PKA3
PCK1
SCH9
YPK2
YNR047W
DBF20
DBF2
PKH1
PKH2
CBK1
YDR466W
YBR028C
YCL024W
IPL1
SLN1
HSL1
YPL141C
KIN1
KIN2
CHK1
MEK1
CMK2
RAD53
KIN3
CDC15
MKK1
MKK2
STE7
YKL168C
CLA4
SKM1
NRK1
SPS1
SSK2
SSK22
STE11
BCK1
STE20
HAL5
NPR1
YDL214C
YDL025C
YOR267C
PTK2
PTK1
SKS1
YDR247W
KSP1
YKL116C
YGL059W
MEC1
DBF4
CTK2
YGR262C
VPS15
YGR052W
IKS1
YCK1
YCK2
YCK3
CDC7
HOG1
SLT2
YKL161C
FUS3
CDC28
PHO85
MRK1
RIM11
YOL128C
KIN28
SSN3
APG1
CDC5
YMR291W
ELM1
YGL179C
PAK1
FUN31
YOL045W
YBR059C
ARK1
PRK1
CAK1
CTK3
BUB1
IRE1
MPS1
YAK1
SKY1
KNS1
ME2
CLK1

图 5A

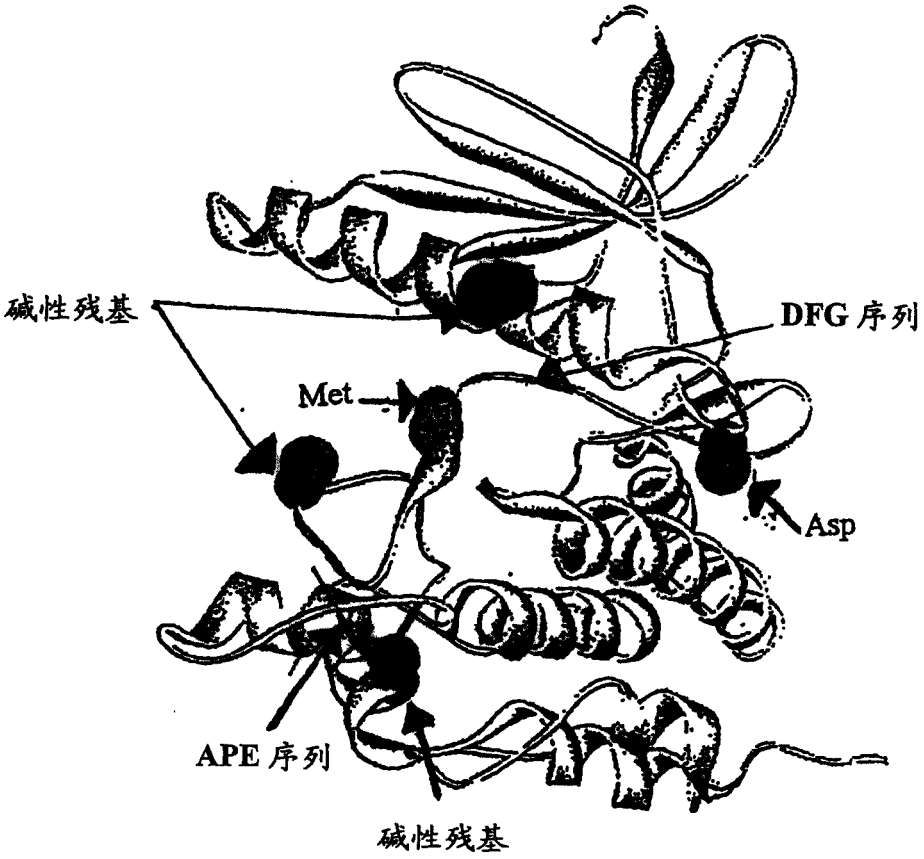


图 5B

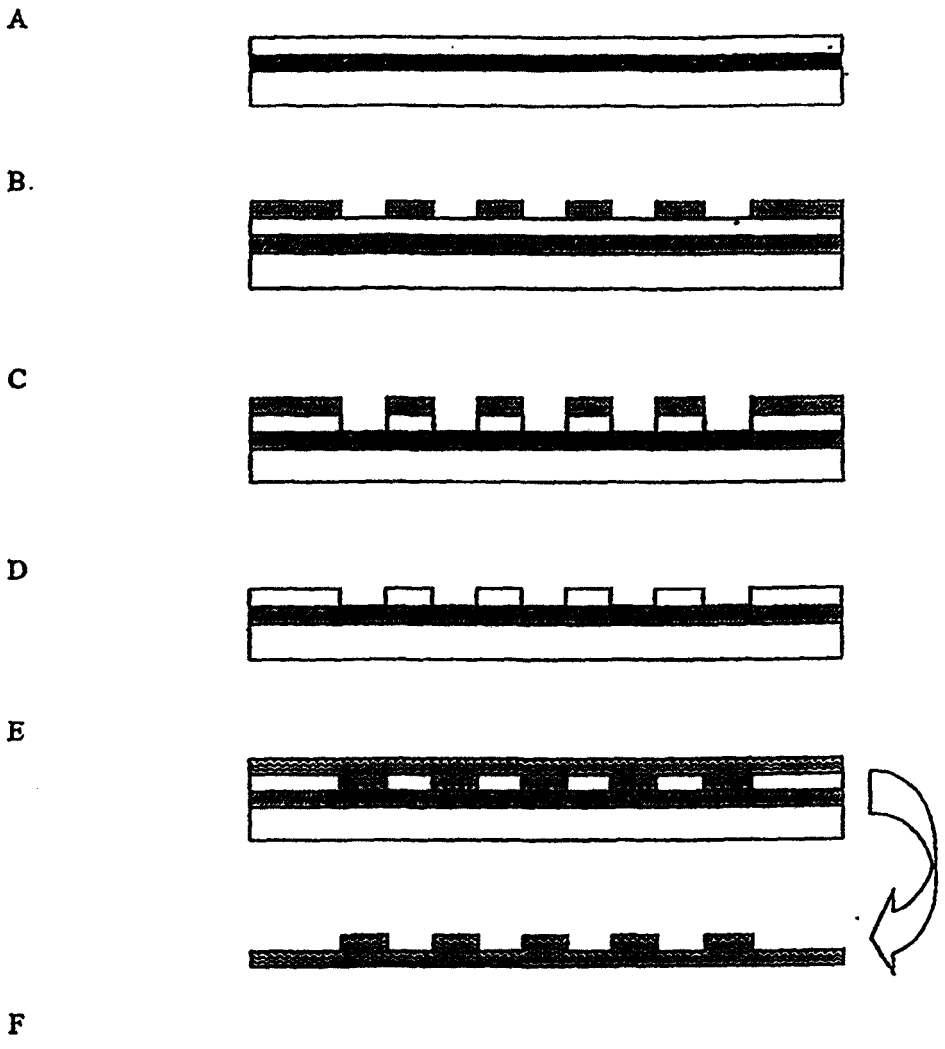


图 6

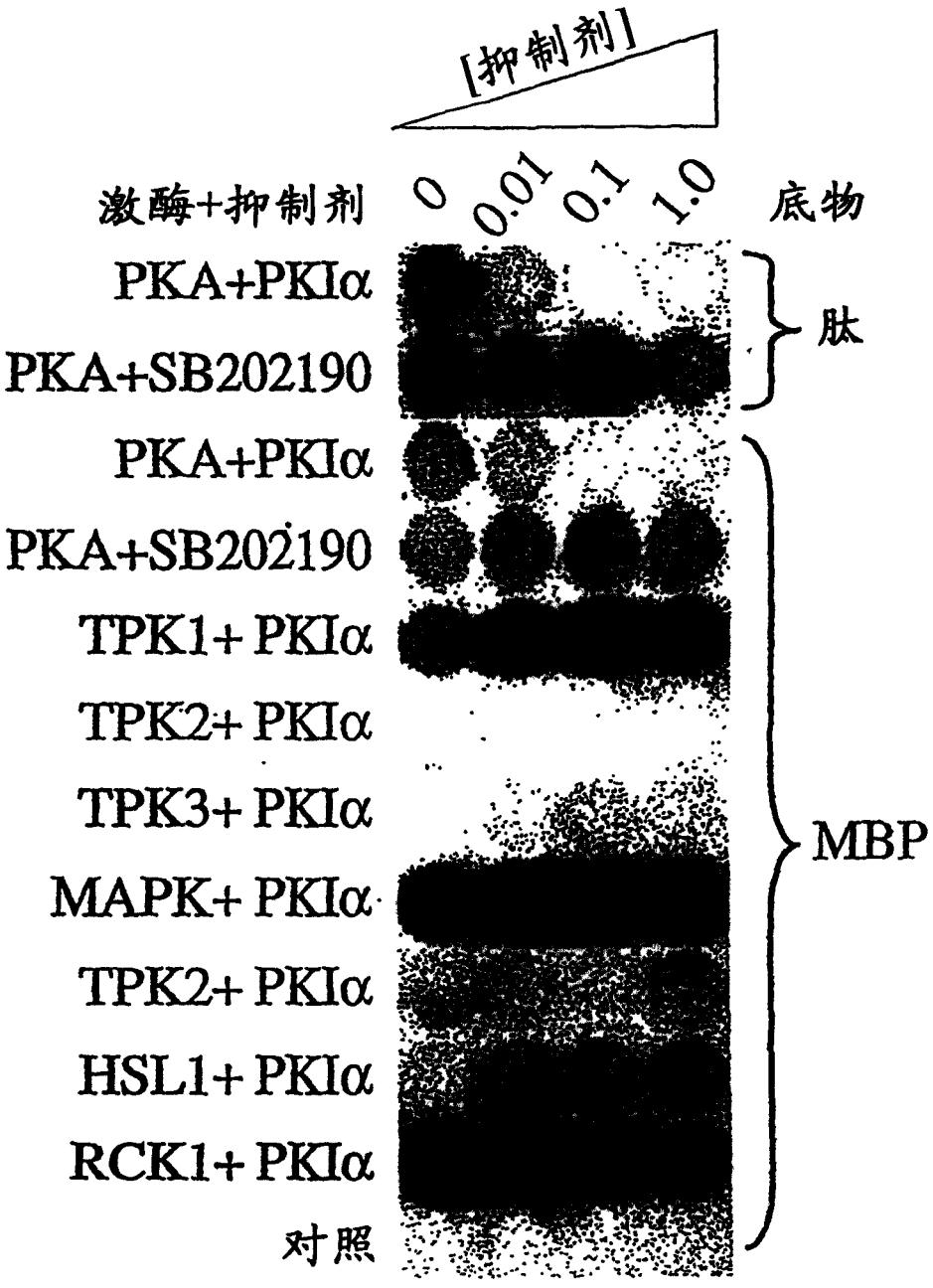
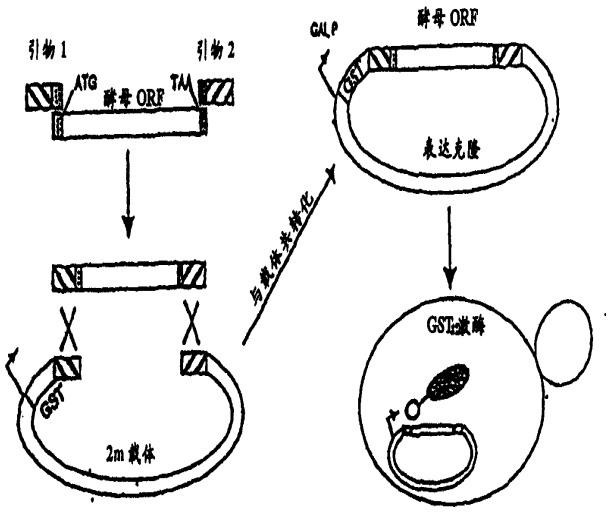

[抑制剂]
激酶+抑制剂
0
0.01
0.1
1.0
底物
PKA+PKIα
PKA+SB202190
肽
PKA+PKIα
PKA+SB202190
TPK1+ PKIα
TPK2+ PKIα
TPK3+ PKIα
MAPK+ PKIα
TPK2+ PKIα
HSL1+ PKIα
RCK1+ PKIα
对照
MBP

图 7

专利名称(译)	用于筛选蛋白活性的高密度蛋白阵列		
公开(公告)号	CN1196798C	公开(公告)日	2005-04-13
申请号	CN01812230.2	申请日	2001-05-04
[标]申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
当前申请(专利权)人(译)	耶鲁大学		
[标]发明人	M 斯尼德尔 M雷德 H朱 J F 克勒米克		
发明人	M·斯尼德尔 M·雷德 H·朱 J·F·克勒米克		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N27/62 B01J19/00 B01L3/00 B81C1/00 C07K17/08 C07K17/12 C12N11/08 C12N11/14 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N21/78 G01N33/50 G01N33/53 G01N33/543 G01N33/566 G01N33/577 G01N37/00		
CPC分类号	C12Q1/485 B01J19/0046 B01J2219/00274 B01J2219/00313 B01J2219/00317 B01J2219/00382 B01J2219/00497 B01J2219/00527 B01J2219/00585 B01J2219/00596 B01J2219/00605 B01J2219/0061 B01J2219/00612 B01J2219/00621 B01J2219/00626 B01J2219/0063 B01J2219/00637 B01J2219/00659 B01J2219/00677 B01J2219/00702 B01J2219/00722 B01J2219/00725 B01L3/5085 B82Y15/00 B82Y30/00 C40B40/06 C40B40/10 C40B60/14 G01N33/5008 G01N33/5041 G01N33/543 G01N33/54313 G01N2500/00		
优先权	60/221034 2000-07-27 US 60/201921 2000-05-04 US		
其他公开文献	CN1440464A		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明涉及用于大规模研究蛋白功能的蛋白芯片，其中所述芯片包含密集反应孔。本发明还涉及使用蛋白芯片同时测定蛋白样品中或一个蛋白芯片上蛋白的有无、多少和/或功能的方法，或者使用蛋白芯片测定该芯片上每种蛋白的探针混合物中每种探针的存在与否、相对特异性和结合亲和性的方法。本发明还涉及使用蛋白芯片进行高密度微量化学反应的方法。此外，本发明还涉及用作蛋白芯片支持物的聚合物和蛋白芯片的制备方法。本发明还涉及用于衍化蛋白芯片支持物的化合物。