

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480020985.9

[51] Int. Cl.

G01N 33/532 (2006.01)
G01N 33/533 (2006.01)
G01N 33/534 (2006.01)
G01N 33/535 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/705 (2006.01)

[43] 公开日 2006年8月30日

[11] 公开号 CN 1826527A

[22] 申请日 2004.5.19
[21] 申请号 200480020985.9
[30] 优先权
 [32] 2003.5.23 [33] EP [31] 03405364.5
[86] 国际申请 PCT/IB2004/001733 2004.5.19
[87] 国际公布 WO2004/104588 英 2004.12.2
[85] 进入国家阶段日期 2006.1.20
[71] 申请人 洛桑生态综合技术联合公司
 地址 瑞士洛桑
[72] 发明人 K·约翰森 N·乔治

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 刘 玥

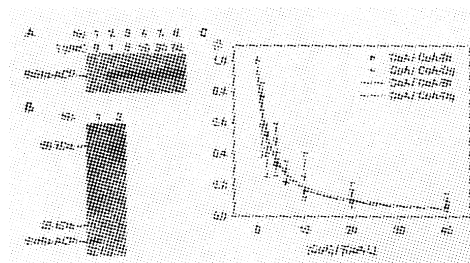
权利要求书 5 页 说明书 30 页 序列表 3 页
附图 2 页

[54] 发明名称

基于酰基载体蛋白的蛋白标记方法

[57] 摘要

本文公开了用各种不同的标记物标记酰基载体蛋白(ACP)融和蛋白的方法。该方法的原理是用酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或是它的同源物将标记物从辅酶A(CoA)型底物转移到融合蛋白上。本方法通过将分子连接在融合蛋白上,给融合蛋白带来新的物理或化学性质,从而可以在体内或体外检测和操纵融合蛋白。这类标记物的实例中包括光谱探针或报道分子、亲和标签、产生活性自由基的分子、交联物、介导蛋白相互作用的配体或适于固定融合蛋白的分子。



1. 一种检测和/或操纵目的蛋白的方法，所述方法包括使包含目的蛋白和酰基载体蛋白(ACP)或其片段的融合蛋白与被标记的辅酶 A(CoA)型底物和酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或其同源物接触以使
5 ACPS 将标记物转移到融合蛋白上，并在以检测和/或操纵所述标记物为目的而设计的系统中，利用该标记物检测和/或进一步操纵所得的标记融合蛋白。

2. 权利要求 1 的检测目的蛋白的方法，其中所述所得的标记融合蛋白可于体内或体外在以持续监测所述标记物为目的而设计的系
10 统中被持续监测。

3. 权利要求 2 的检测目的蛋白的方法，所述方法用于体外检测。

4. 权利要求 2 的检测目的蛋白的方法，所述方法用于体内细胞内检测。

5. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中所述标记的融合蛋白在以纯化所述标记物为目的而设计的系统中被纯化，并且所述目的蛋白在后续步骤中从所述标记的融合蛋白上被切下。
15

6. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中所述标记的融合蛋白被固定在以固定所述标记物为目的而设计的系统中的固体支持物上。
20

7. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中 ACPS 为来自大肠杆菌(*E. coli*)的 ACPS。

8. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中所述 ACPS 同源物选自：EntD、Sfp、Psf-1、Gsp、LYS5、Bli、Lpa-14 和 NshC，参与诺雪七肽的生物合成；本发明包括所有与来自大肠杆菌的 ACPS 同源的标记方案中的 ACPS 的应用。
25

9. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中 ACP 是大肠杆菌

酰基载体蛋白。

10. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中 ACP 来自链霉菌 (*Streptomyces*)种。

5 11. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中 ACP 是野生型 ACP 的 ACP 变异体，其由于一个或多个氨基酸取代、缺失或添加而与野生型 ACP 不同，但其仍保留了在 ACPS 催化的反应中用作被标记的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺受体的性质。

10 12. 权利要求 1 的操纵目的蛋白的方法，其中 ACP 是 ACP 片段，所述片段包含连接磷酸泛酰巯基乙胺衍生物的丝氨酸残基，并保留了接受这类磷酸泛酰巯基乙胺衍生物的功能。

13. 一种包含目的蛋白和酰基载体蛋白(ACP)或其片段的融合蛋白，其特征在于所述目的蛋白由 12 到 5000 个氨基酸组成。

14. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于该目的蛋白由 50 到 1000 个氨基酸组成。

15 15. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于所述目的蛋白选自酶、DNA 结合蛋白、转录调节蛋白、膜蛋白、核受体蛋白、核定位信号蛋白、蛋白辅因子、抗体、膜泵蛋白、膜通道蛋白、膜载体蛋白、发动蛋白、信号传导相关蛋白、核蛋白、核糖体蛋白、小单体 GTP 酶、ATP 结合盒蛋白、胞内结构蛋白、具有负责靶向引导蛋白至特定胞内区室的序列的蛋白、常用作标记物或亲和标签的蛋白以及这类蛋白的结构域或亚结构域。

16. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于所述目的蛋白得自人或其它高等哺乳动物、真核生物、细菌或得自病毒。

25 17. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于所述目的蛋白得自沙门氏菌属(*Salmonella*)、分枝杆菌属(*Mycobacteria*)、葡萄球菌属(*Staphylococci*)、人免疫缺陷病毒(HIV)、人流感病毒、肝炎病毒或冠状病毒。

18. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于所述目的蛋白在癌症、

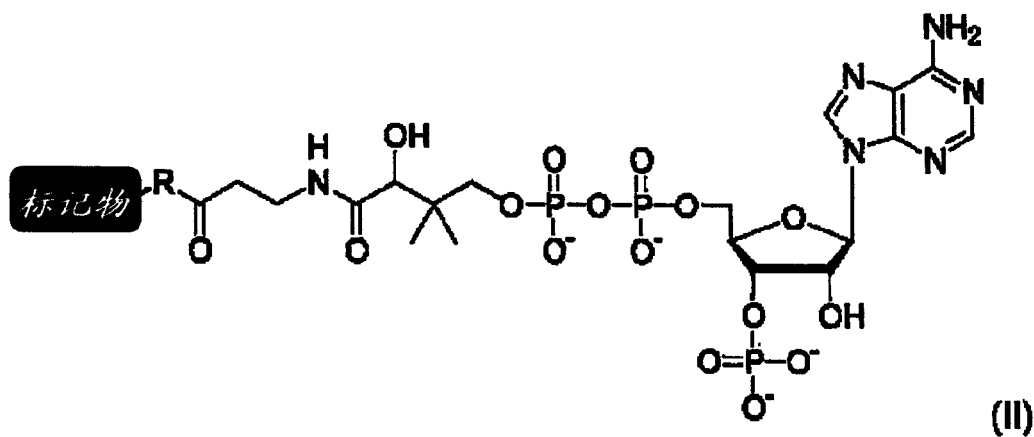
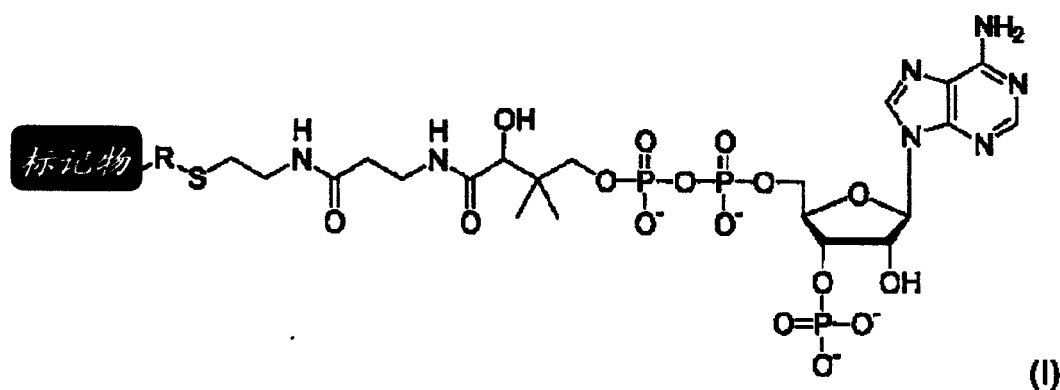
心血管病、精神疾病、阿耳茨海默病、肥胖症、病毒感染或细菌感染中起作用。

19. 权利要求 13 的融合蛋白，其特征在于所述融合蛋白包含通过在合适条件下易被酶切割的接头连接的 ACP 和目的蛋白。

5 20. 权利要求 13 的融合蛋白，所述融合蛋白包含 ACP 和神经激肽-1 受体。

21. 权利要求 13 的融合蛋白在权利要求 1 的方法中的用途。

22. 一种式(I)或(II)的标记的 CoA 型底物：



10

其中 R 是桥接辅酶 A 和标记物的接头基团；“标记物”是适用于在以检测和/或操纵所述标记物为目的而设计的系统中检测和/或操纵所述融合蛋白的标记分子。

15

23. 权利要求 22 的标记的 CoA 型底物，其中 R 是 1 到 300 个碳原子的直链或支链亚烷基基团，其中任选：

- (a)一个或多个碳原子被氧置换;
- (b)一个或多个碳原子被携带氢原子的氮置换,且相邻碳原子被氧代基团取代,代表酰胺官能团-NH-CO-;
- (c)一个或多个碳原子被氧置换,且相邻碳原子被氧代基团取代,
5 代表酯官能团-O-CO-;
- (d)两个相邻碳原子间的键是双键或三键,代表官能团-CH=CH-
或-C≡C-;
- (e)一个或多个碳原子被亚苯基、饱和或不饱和的亚环烷基、饱
和或不饱和的亚二环烷基、桥联杂芳基或桥联饱和或不饱和杂环基
10 基团置换;
- (f)两个相邻碳原子被二硫键-S-S-置换;
或是两个或多个的组合,特别是两个上述(a)到(f)项下定义的亚
烷基和/或修饰的亚烷基基团,任选含有取代基。
- 15 24. 权利要求 22 的标记的 CoA 型底物,其中“标记物”选自:
- (1)光谱探针;
- (2)放射活性标记的分子;
- (3)特异性结合对中的一个分子,其能与其配偶体特异性结合;
- (4)有可能与其它生物分子相互作用的分子;
- 20 (5)有可能与其它生物分子相互作用的分子文库;
- (6)能与其它生物分子交联的分子;
- (7)暴露于过氧化氢和抗坏血酸盐时能产生羟自由基的分子;
- (8)能在光辐射下产生活性自由基的分子;
- (9)共价结合在固体支持物上的分子;
- 25 (10)能与其互补链进行碱基配对的核酸或其衍生物;
- (11)具有膜嵌入性质的脂分子或其它疏水性分子;
- (12)具有所需的酶、化学或物理性质的生物分子;和
- (13)具有上述任何性质(1)-(12)的组合的分子。

25. 权利要求 22 的标记的 CoA 型底物, 其中“标记物”选自生物素、洋地黄毒苷、Cy-3 和 Cy-5。

26. 权利要求 22 的标记的 CoA 型底物在权利要求 1 的方法中的用途。

基于酰基载体蛋白的蛋白标记方法

发明领域

- 5 本发明涉及将标记从底物转移到包含目的蛋白和酰基载体蛋白或其片段的融合蛋白上的方法，特别是进一步包括检测组分和/或操纵被标记的融合蛋白的方法。

发明背景

- 10 对复杂生物系统理解的过程依赖于特性描述生物分子特别是蛋白质分子间潜在的相互作用。虽然通过对越来越多种生物的 DNA 测序鉴别了它们的开放阅读框(ORF)，但是在体内和体外对相应蛋白质性质的鉴定的可能性仍是有限的。绝大多数致力于实现这一目标的策略基于构建一个融合蛋白，这个融合蛋白不仅可以纯化以在体外应用，也可以进一步在体内应用。这类标签的实例包括 6 × His 标签、S-谷胱甘肽转移酶、麦芽糖结合蛋白、抗原决定簇标签、酵母双杂交系统、O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶、断裂-泛素和绿色荧光蛋白(GFP)融合蛋白。但是，这些巯基乙胺(P-pant)连接到 apo-ACP 保守的丝氨酸残基上，得到了完整酰基载体蛋白(holo-ACP)。磷酸泛酰巯基乙胺来源于辅酶 A。Gehring 等人(1997)进一步证实：使用在泛酰巯基乙胺部位被修饰但仍可作为 ACPS 底物的辅酶 A 类似物，可获得具有修饰的 P-pant 的 holo-ACP。
- 15 20

在国际专利申请 WO 97/13845 中对分离的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶如 ACPS 进行了描述。

- 25 在国际专利申请 WO 02/083937 中描述了将一个标记物转移到 O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA 烷基转移酶(AGT)融合蛋白上的方法，以及这种方法在检测 AGT 融合蛋白中的应用。

发明概要

本发明涉及一种检测和/或操纵目的蛋白的方法，内容包括：用被标记的辅酶 A(CoA)型底物以及酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或是它的同源物接触融合蛋白，使 ACPS 将标记物转移到融合蛋白上，此融合蛋白包含目的蛋白、酰基载体蛋白(ACP)或者该载体一个片段；以及任选在以识别/运用标记物为目的而设计的系统中，利用该标记物检测和/或进一步操纵所得的标记融合蛋白。此外，本发明还涉及包含了目的蛋白和 ACP 或其片段的融合蛋白的应用。特别是，利用本发明方法连接上的标记物可用来在体内或体外对目的蛋白进行纯化、固定或是持续监测。

任何种类的蛋白都可用本发明方法来构建融合蛋白，包括蛋白质分子、多肽、还是任意长度的肽链，不管有无二级、三级和四级结构。

本发明中独特的被标记辅酶 A(CoA)型底物是从辅酶 A 或者修饰的辅酶 A 获得的，通过一个接头连接到该辅酶 A 上，这个接头至少含有一个反应位点，用以进一步连接标记，即一个可检测的标记。本发明也涉及这些新颖的标记辅酶 A(CoA)型底物，制备这些底物的方法，和在合成这些底物过程中有用的中间体，以及这些底物在本发明中的应用。

附图简述

图 1:

(A) $6 \times \text{His-ACP}(1\mu\text{M})$, $6 \times \text{His-ACPS}(0.2\mu\text{M})$ 和 $\text{CoA-Bt}(5\mu\text{M})$ 反应分析。按照所指示的时间(t)，从反应混合物中取出等份试样，使用链霉亲和素-过氧化物酶缀合物，通过 Western blotting 来探测 $6 \times \text{His-ACP}$ 的生物素酰化反应。

(B) $6 \times \text{His-ACP}$ 的生物素酰化过程的定量: $6 \times \text{His-ACP}(3\mu\text{M})$, 6

5 \times His-ACPS($5\mu\text{M}$)和 CoA-Bt($10\mu\text{M}$)一起温育 30 min, 透析, 然后等份样品与链霉亲和素一起温育, 将样品上 SDS-PAGE(第二泳道)。稳定的生物素-链霉亲和素缀合物的生成会引起生物素酰化蛋白在凝胶中的移动。通过比较第一泳道含等浓度 $6 \times$ His-ACP 但没有链霉亲和素的带和第二泳道 $6 \times$ His-ACP 的带亮度, 来评价生物素酰化反应的量。

10 (C)作为 ACPS 底物的 CoA 和 CoA-Bt(或 CoA-Dg)间的竞争性实验: $6 \times$ His-ACP($0.4\mu\text{M}$), $6 \times$ His-ACPS($0.4\mu\text{M}$), CoA-Bt 或 CoA-Dg($2\mu\text{M}$)和不同浓度的 CoA($0-80\mu\text{M}$)一起温育 30 min, 标记反应的程度用 Western blotting 来测定。Western blots 中相关信号强度(I), 负相关于 $[\text{CoA}]/[\text{CoA-L}]$ 值(L = 标记物), 并与方程式 $I = A/(1+Bx)$ 拟合, 这里 x 代表 $[\text{CoA}]/[\text{CoA-L}]$, A 是一个非特定常数, B 是 $(K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA}} / (K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA-L}}$ 。这些实验得到了特定常数为 0.48 时 $(K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA}} / (K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA-Bt}}$ 的比值和常数为 0.35 时 $(K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA}} / (K_{\text{cat}}/K_{\text{M}})_{\text{CoA-Dg}}$ 的比值, 揭示了游离 CoA 和 CoA 衍生物没有显著差异。

图 2:

20 (A-F)是在酵母细胞表面标记 ACP 融合蛋白。荧光显微照片(A)是表达了 Cy3 标记 Aga2-ACP 的酵母细胞, (D)是用链霉亲和素包被的量子点标记的表达了生物素标记酵母细胞。(B)类似于(A), (E)类似于(D), 但是细胞不表达 Aga2-ACP 蛋白。(C)和(F)分别是(B)和(D)同样样品的透射显微照片。这些实验表明只有那些表达 Aga2-ACP 蛋白的酵母细胞才能被标记。

发明详述

25 本发明涉及一种检测和/或操纵目的蛋白的方法, 内容包括: 用被标记的辅酶 A(CoA)型底物以及酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或是它的同源物接触融合蛋白, 使 ACPS 将标记物转移到融合蛋白上, 此融合蛋白包含目的蛋白、酰基载体蛋白(ACP)或者该载体一个片

段；以及任选在以识别/运用标记物为目的而设计的系统中，利用该标记物检测和/或进一步操纵所得的标记融合蛋白。

5 ACP 或 ACP 的结构域蛋白在脂肪酸、聚酮化合物和非核糖体多肽的生物合成中作为载体。酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶对 ACP 进行翻译后修饰，将辅因子 4'-磷酸泛酰巯基乙胺从辅酶 A 转移到 ACP 的一个保守丝氨酸残基上。ACPS 也被称为磷酸泛酰巯基乙胺转移酶。在对 CoA 的磷酸泛酰巯基乙胺部分中硫醇基进行修饰时，ACPS 表现出相对低的底物特异性。利用这一点，将 ACP 融合蛋白与 ACPS 和通过其磷酸泛酰巯基乙胺部分携带标记物的 CoA 衍生物一起温育， ACP 融合蛋白即被特异性标记。由此，这个标记物通过磷酸泛酰巯基乙胺部分传递到 ACP 的保守丝氨酸残基上。这个标记过程不依赖于融合蛋白的性质。

10 这里 ACPS 和 ACP 的概念代表了任意一对蛋白分子，其中之一(ACP)是磷酸泛酰巯基乙胺衍生物基团的受体，这个磷酸泛酰巯基乙胺衍生物基团来源于 CoA 衍生物，另一个(ACPS)催化磷酸泛酰巯基乙胺衍生物转运到这个 ACP 上。

在这里术语 ACPS 和磷酸泛酰巯基乙胺转移酶可以互相交换使用，尽管有以下事实：很多与大肠杆菌 ACPS 同源的磷酸泛酰巯基乙胺转移酶所修饰的蛋白并不参与脂肪酸的合成，而参与天然产物的生物合成(Lambalot 等, 1996)。这种磷酸泛酰巯基乙胺转移酶诸如：EntD, 参与肠杆菌素的合成； Sfp 和 Psf-1, 参与枯草菌脂肽的生物合成； Gsp, 参与短杆菌肽 S 的生物合成； LYS5, 参与赖氨酸的生物合成； Bli, 参与杆菌肽的合成； Lpa-14, 参与伊枯草菌素 A 的生物合成；以及 NshC, 参与诺雪七肽的生物合成。此发明包括了所有与大肠杆菌来源的 ACPS 同源的泛酰巯基乙胺转移酶在标记蛋白方面的应用。

25 术语 ACP 代表任意一种蛋白，这种蛋白可以被大肠杆菌 ACPS 催化或者被依据 Lambalot 等人(1996)定义的任何与大肠杆菌 ACPS

同源的 ACPS 催化，进行翻译后的磷酸泛酰巯基乙胺修饰。这不仅包括参与脂肪酸合成的蛋白，也包括参与聚酮合成，非核糖体多肽合成，氨基酸合成以及缩酚酸肽合成的蛋白。除了被 ACPS 催化进行翻译后修饰，这些蛋白的共性还在于它们通过不同底物形成了酰基-泛酰巯基乙胺硫醇酯，以及磷酸泛酰巯基乙胺部分被连接到一个丝氨酸残基上。这些 ACP 蛋白的天然功能可能是作为一个多功能酶(例如 I 类脂肪酸合成酶)的结构域或者是一个分离的蛋白分子(例如 II 类脂肪酸合成酶)的结构域。

“检测”意味着在以观察标记物为目的而设计的系统中，基于标记物的特性对标记物和连接在其上的目的蛋白进行观测。包括识别特定标记物，根据标记物性质在特定环境里寻找该标记物，任选对标记物和连接其上的蛋白定量分析，以及任选确定标记物所处微环境的性质等。

“操纵”意味着操作标记物和连接其上的目的蛋白，包括在以操作标记物为目的而设计的系统中，基于标记物特性，操作标记物和连接其上的目的蛋白，还包括将标记物和目的蛋白从一个化学或生物环境里分离出来，导入另一个化学或生物环境，纯化，即将标记物和目的蛋白从非目的产物和杂质中分离出来，通过标记物与固相载体反应来固定标记物和目的蛋白，使标记物和目的蛋白与化学或生物试剂接触以修饰标记物和/或目的蛋白的特性，诸如此类。

这里公开的方法在一定应用范围内普遍适用，能够特异性共价标记融合蛋白，使用(1)在被标记融合蛋白所处环境里能够感知和引起变化的标记物，(2)导致融合蛋白产生物理和/或化学特性的标记物，借此特性标记物有助于操作融合蛋白，和/或(3)导致融合蛋白产生某些特性的标记物，借此特性标记物有助于纯化融合蛋白。这里公开的方法能够用于在体外和体内如细胞内标记 ACP 融合蛋白。

此外，本发明还涉及对包含目的蛋白和 ACP 或其片段的融合蛋白在此方法中的应用。特别是，涉及通过连接的标记物纯化或固定

目的蛋白，或在体内、外持续监测目的蛋白的方法。

一方面，本发明提供了在体内或体外持续监测目的蛋白的方法。其中，包含目的蛋白和酰基载体蛋白(ACP)或载体蛋白一个片段的融合蛋白与被标记的辅酶 A(CoA)型底物，酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或它的同源物相接触，从而使 ACPS 将标记物转移到融合蛋白上，即可在以识别该标记物为目的而设计的系统中观测到该标记物。

另一方面，本发明也提供了一种在体内或体外持续操纵目的蛋白的方法。其中，包含目的蛋白和酰基载体蛋白(ACP)或载体蛋白一个片段的融合蛋白与被标记的辅酶 A(CoA)型底物，酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或它的同源物相接触，从而使 ACPS 将标记物转移到融合蛋白上，即可基于该标记物的物理和/或化学性质操纵融合蛋白。

再一方面，基于标记物的物理和/或化学性质可有效纯化标记的融合蛋白，且本发明相应的提供了纯化目的蛋白的方法，按照此发明中的方法步骤，利用标记物的物理和/或化学性质纯化融合蛋白后，将融合蛋白切割，即获得纯的目的蛋白。

又一方面，本发明提供了在固相支持物上固定包含了目的蛋白、酰基载体蛋白(ACP)或其片段的融合蛋白的方法。这个方法包含使融合蛋白与标记的辅酶 A(CoA)型底物接触，该底物被固定或是能够固定在一个固相支持物上，其中酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶转移标记物，使得标记物共价结合到融合蛋白上，从而使融合蛋白被连接到固相支持物上或者在后续操作中被固定。在本发明的特定实施方案中，标记物并不是开始就被固定在支持物上的，这方法包含的后续步骤可以使标记有 ACP 的融合蛋白与支持物接触，从而被固定于固相支持物上。在这些本发明优选实施方案中，标记物可能是在被转移的同时，或是在被转移的后续反应时共价的结合于支持物上；或者标记物是一对可特异性偶合的分子之一，而另外之一通过共价键或其它任何方式连接或可被连接在固相支持物上，例如利用生物

素与抗生物素或与链霉抗生物素间的特异性偶合能力。

又一方面，本发明也提供了一种在体内和体外标记 ACP 融合蛋白的方法。术语体内标记 ACP 融合蛋白包括对细胞内所有区室的 ACP 融合蛋白或指向细胞外空间的 ACP 融合蛋白进行标记。如果 ACP 融合蛋白在体内进行标记并且与 ACP 融合的蛋白是一个原生质膜蛋白，那么融合蛋白的 ACP 部分可被连接在膜的胞内面或胞外面。如果标记在体外进行，那么融合蛋白的标记可在细胞提取物中进行，也可在纯化或富集的 ACP 融合蛋白中进行。

本发明基于如下认识，即一个标记物与目的蛋白的特异性结合可以通过构建融合蛋白实现，此融合蛋白包含了目的蛋白和酰基载体蛋白(ACP)或其片段。

在一个优选的应用中，酰基载体蛋白或“ACP”具有能够被酰基载体蛋白合酶全酶或“ACPS”催化修饰的特性，ACPS 将标记的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团从合适的辅酶 A(“CoA”)转移到 ACP 或 ACP 片段的丝氨酸残基上构成部分融合蛋白。在一个优选实施方案中，ACP 为大肠杆菌酰基载体蛋白，例如 Rawling 和 Cronan(1992)的论文及它的参考文献的描述。但是，其它所知酰基载体蛋白(ACP)也可应用本发明，例如 Gehring 等人(1997)描述的链霉菌来源 ACP，或在合适标记 CoA 存在时能按如上定义方式被 ACPS 修饰的其它任何 ACP。在本发明里，ACP 还包括野生型 ACP 的变体，它们虽然可能由于一个或多个氨基酸残基的取代、缺失和添加而与野生型 ACP 不同，但是仍保持了在 ACPS 催化的反应中作为 4'-磷酸泛酰巯基乙胺受体的性质。其它一些 ACP 变体可用所属领域的技术人员已知的技术进行化学修饰。ACP 变体可以通过技术人员应用蛋白质工程方法得到，和/或应用分子进化来产生和选择新的能在 ACPS 催化的反应中下接受标记 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团的受体序列。ACP 片段是指那些含有可连接磷酸泛酰巯基乙胺基团衍生物的丝氨酸残基的片段，和那些具有接受磷酸泛酰巯基乙胺基团衍生物能力的片段。

在最佳的实施方案里的 ACPS, 是如 Lambalot 和 Walsh(1995)的论文及它的参考文献的描述的大肠杆菌酰基载体蛋白合酶全酶。但是, 其他酰基载体蛋白合酶全酶也被认识, 例如 Lambalot 等人(1996)描述的枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)来源 ACPS, 或在合适标记的 CoA 存在时能修饰如上定义的 ACP 的其它任何蛋白分子, 它们都可应用于本发明。正如 Lambalot 等人(1996)描述的, 这些 ACPS 也称为磷酸泛酰巯基乙胺转移酶, 本发明包含了这一大类酶的应用。在本发明里, 酰基载体蛋白合酶全酶也包括野生型 ACPS 的变异体, 它们虽然可能由于发生一个或多个氨基酸残基的取代、缺失和添加而与野生来源 ACPS 不同, 但是都具有将标记的 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团特异性转移到 ACP 融合蛋白上的能力。其它一些 ACPS 变异体可能用所属领域的技术进行了化学修饰。ACPS 变异体能够通过应用蛋白质工程方法得到, 和/或用分子进化产生和选择具有新的能转移标记 4'-磷酸泛酰巯基乙胺基团到不同受体序列的特征来得到。

为有利于用 ACPS 标记 ACP 融合蛋白的许多考虑予以了重视。最重要的是, ACP 融合蛋白的标记依赖于, 在标记以前融合蛋白的 ACP 部分以脱辅基形态存在。如果 ACP 融合蛋白在一个有内源性 ACPS 的宿主中表达, 并且内源性 ACPS 以这个 ACP 融合蛋白为翻译后修饰作用的底物, 那么对这个 ACP 融合蛋白的目的修饰至少会被部分阻碍。我们采取了不同的措施来最大程度减小这种非目的性的修饰作用。首先, 选择一个 ACP, 确保这个 ACP 不会被宿主 ACPS 有效修饰, 也就是说, 这个 ACP 与宿主的生化过程正交。例如, 当大肠杆菌来源的 ACP 在人细胞中融合表达时, 它不会被人的 ACPS 显著修饰(见图 3)。第二, ACP 融合蛋白过量表达会引起 apo-ACP 在 ACP 融合蛋白中大量形成。例如, 尽管内源性 ACPS 存在, 大肠杆菌来源 6 × His-ACP 在大肠杆菌细胞中过量表达会导致 6 × His-ACP 中 ACP 主要以 apo-ACP 形式存在。

为了标记反应, ACP 融合蛋白还要与相应 ACPS 和 CoA 衍生物

接触。这意味着，当标记反应在体内进行时，要么 ACP 融合蛋白存在于细胞表面，要么通过如微注射之类的技术将 ACPS 和 CoA 衍生物导入目的细胞。

在本发明里，用来与 ACP 构成融合蛋白的蛋白包括蛋白质分子、多肽和任意长度的肽链，不管有无二级、三级或四级结构，而且优选由至少 12 个至多至 2000 个氨基酸组成，优选在 50 到 1000 个氨基酸之间。本发明的目的蛋白选自酶、DNA 结合蛋白、转录调节蛋白、膜蛋白、核受体蛋白、核定位信号蛋白、蛋白辅因子、抗体、膜泵蛋白、膜通道蛋白、膜载体蛋白、动力蛋白、信号传导相关蛋白、核蛋白、核糖体蛋白、小单体 GTP 酶、ATP 结合盒蛋白、胞内结构蛋白、具有负责靶向引导蛋白至胞内特定区室的序列的蛋白、常用作标记物或亲和标签的蛋白，以及上述蛋白的结构域或亚结构域。ACP 融合蛋白可由一个或多个，如一个、两个或三个目的蛋白，它们连接于 ACP 的 N-端、C-端，或同时连接在 N-端和 C-端。

更具体的，本发明的蛋白选自：酶例如转移酶(EC 2)、更具体的是除甲基外的芳基或烷基转移酶(EC 2.5)，尤其是谷胱甘肽转移酶(EC 2.5.1.18)；

或激酶，能够转移含磷基团的一类转移酶(EC 2.7)，特别是将一个乙醇基作为转运受体的激酶(EC 2.7.1)，如其底物蛋白含丝氨酸残基和苏氨酸残基作为磷酸化靶位点的蛋白激酶，如酵母酪蛋白激酶(EC 2.7.1.37)，或酪氨酸激酶(EC 2.7.1.112)；

或以氧化还原酶(EC 1)为例，具体如作用于作为受体的过氧化物的氧化还原酶(EC 1.11)，特别是细胞色素酶 C 过氧化物酶(EC 1.11.1.5)；

以水解酶(EC 3)为例，具体如作用于酯键的水解酶(EC 3.1)，特别是磷酸单酯水解酶(EC 3.1.3)，这种酶如蛋白磷酸单酯水解酶；或肽键水解酶，也被认为是肽酶或蛋白酶(EC 3.4)，尤其是半胱天冬酶；

DNA 结合蛋白，具体如转录抑制蛋白，它是抑制 mRNA 合成的

蛋白因子,特别是大肠杆菌的 mRNA 合成抑制蛋白因子,尤其是 LexA 蛋白的 DNA 结合结构域;

转录调节蛋白,具体如转录抑制蛋白,特别含有色氨酸/天冬氨酸重复结构的抑制蛋白;

- 5 膜蛋白,如至少含有一个跨膜螺旋结构的膜蛋白,具体如内质网起源的膜蛋白,尤其是参与引导蛋白进入内质网的膜蛋白,如内质网跨膜蛋白 Sec62;

或者例如来源于 7-跨膜螺旋(7-TM)家族的蛋白,具体如作为 G 蛋白偶联受体(GPCR)的 7-TM 蛋白,特别是那些连有分子量大于 1 kDa 的大分子配体的蛋白,比如哺乳动物的,如人,神经激肽-1 受体(NK1);

10 或细胞膜上的跨膜离子通道蛋白,尤其是配体门控离子通道蛋白,具体如对血清素敏感的配体门控离子通道蛋白,如血清素受体 5-HT₃;

15 或除离子通道和 G 蛋白偶联受体外的膜受体蛋白;

或过氧化物酶体膜蛋白,特别是来源于酵母的该类蛋白,如 Pex15 蛋白;

核受体蛋白,如来源于转录因子家族的核受体蛋白,具体如来源于可被配体诱导的转录因子家族的核受体蛋白,尤其是来源于类固醇激素(如雌激素)家族的核受体,如人雌激素受体 hER;

20 核定位信号蛋白,如猴病毒 40(SV40)的核定位信号蛋白;

蛋白辅因子,如在遗传结构里含泛素序列的蛋白;

小单体 GTP 酶,具体如膜黏着小单体 GTP 酶,如 Ras 家族的成员;

25 ATP 结合盒(ABC)蛋白,如多药抗药性蛋白;

胞内结构蛋白,具体如细胞骨架蛋白,更具体的如人胞质 β -肌动蛋白;

具有负责靶向引导蛋白至胞内特定区域的序列的蛋白,如引导

至高尔基体、内质网、线粒体、原生质膜或者过氧化物酶体；

常用作标记物或亲和标签的蛋白，如可在紫外线或可见光激发下发出荧光信号的荧光蛋白，尤其是绿色荧光蛋白家族(GFP)的成员，如增强深蓝色荧光蛋白(ECFP)；

5 以及上述种种蛋白的结构域和亚结构域。

而且，本发明依据来源对目的蛋白进行选择。特别是那些存在于人、小鼠、大鼠、其他高级哺乳动物、真核生物、细菌的目的蛋白，如沙门氏菌属(*Salmonella*)，具体如伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhi*)或鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)，分枝杆菌属(*Mycobacteria*)，具体如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)，
10 或者葡萄球菌属(*Staphylococci*)，具体如金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)，或来源于病毒，如人免疫缺陷病毒(HIV)、人流感病毒、肝炎病毒或者冠状病毒。

此外，根据某个疾病中的蛋白作用选择目的蛋白，例如癌症、
15 心血管疾病、精神疾病、阿尔茨海默病(Alzheimer)、肥胖症、病毒感染和细菌感染。

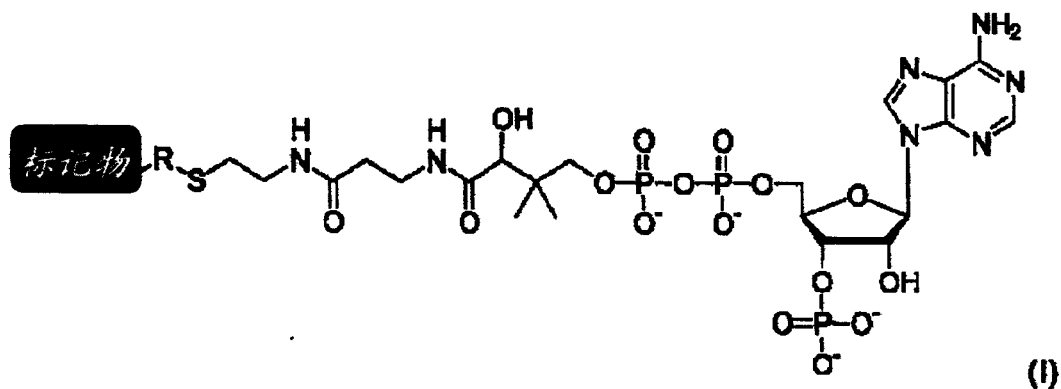
在一个特定的本发明实施方案中，所用的融合蛋白一端由这种 ACP DNA 的大肠杆菌 ACP 或其变异体构成，目的蛋白(如上文列举)的编码序列连接在 ACP DNA 的 C-端(C)或 N-端(N)，或同时连接于
20 ACP DNA 的两端，形成本发明中的融合蛋白。融合蛋白可另外含有合适的接头，例如在合适环境下容易被酶切的接头，其位置可在 ACP 和目的蛋白之间，和/或在同一融合蛋白中的两个目的蛋白之间。这类接头实例为那些在 DNA 阶段可被合适限制性酶切开的，例如 AGATCT 可被 BglII 切开，和/或那些在蛋白阶段可被蛋白酶切开的，
25 例如烟草蚀刻病毒 Nla(TEV)蛋白酶。

融合蛋白可以在原核宿主中表达，优选大肠杆菌，或者在真核宿主中表达，如酵母，真菌，昆虫或哺乳动物细胞。

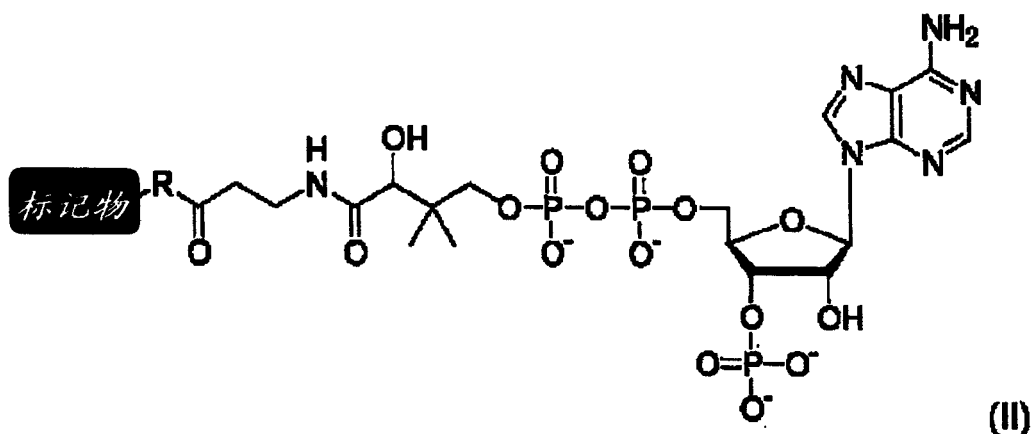
本发明也涉及到由目的蛋白和 ACP 或其一个部分组成的新的融

合蛋白。

在本发明中，优选作为被标记辅酶 A 类的底物的辅酶 A 衍生物具有以下通式(I):



5 或以下通式(II):



其中:

R 是连接辅酶 A 和标记物的接头基团; “标记物” 是一个适合用来对融合蛋白进行检测、纯化和/或操纵的标记分子。

10 但是, 本发明并不局限于式(I)或(II)的底物, 因为宽范围内的其他底物可以用来将标记物转运到 ACP 融合蛋白。例如认为在分子式(I)中置换嘌呤部分、对糖基部分或泛酰巯基乙胺酸部分进行修饰都可行。

15 式(I)或(II)化合物中的接头基团 R 是一个将标记物连接到辅酶 A 的柔韧的接头。接头单位根据预想使用的需要, 也就是要将标记物

5 转移到包含 ACP 的融合蛋白上进行选择。它们也提高了底物在适当溶剂中的溶解能力。所用的接头在实际操作的环境中其化学性质稳定。接头 R 并不干扰与 ACP 的反应，也不干扰对标记物的检测，但是可以构造成在其结构的某些位点会在辅酶 A 型底物和 ACP 融合蛋白反应进行完毕后及时被切割。

接头基团 R 是一个直链或支链亚烃基，有 1-300 个碳原子，其中任选：

(a) 一个或多个碳原子被氧置换，特别是其中每第三个碳原子被氧置换，例如带有 1-100 个亚乙氧基(ethylenoxy)单位的聚亚乙氧基；

10 (b) 一个或多个碳原子被携带有氢原子的氮置换，相邻碳原子被氧代基取代，代表酰胺官能团-NH-CO-；

(c) 一个或多个碳原子被氧置换，相邻碳原子被氧代基取代，代表酯官能团-O-CO-；

15 (d) 两个相邻碳原子间的键是双键或者三键，代表官能团-CH=CH-或-C≡C-；

(e) 一个或多个碳原子被亚苯基、饱和或不饱和的亚环烃基、饱和或不饱和的亚二环烃基、桥联杂芳基或者饱和或不饱和杂环基团置换；

(f) 两个相邻碳原子被二硫键-S-S-置换；

20 或是一种两个或更多缀合物的组合，特别是两个亚烃基和/或如上(a)到(f)项下定义的修饰的亚烃基，任选含有取代基团。

认可的取代基例如低级烃基如甲基、低级烷氧基如甲氧基、低级酰氧基如乙酰氧基或卤基如氯。

25 其他认可的取代基团是当 α -氨基酸引入到接头 R 中时而获得的，其中所述接头的碳原子被(b)项下所定义的酰胺官能团-NH-CO-置换。在这样的接头上，亚烃基基团 R 的部分碳链被一个(-NH-CHR'-CO-)n-基团置换，其中的 n 在 1-100 之间，R'代表一个可变的 α -氨基酸残基。

还有一种取代基团导致接头 R 具有光裂解功能，如邻硝基苯基团。尤其是这种邻硝基苯基取代基团定位在一个相邻酰胺键的碳原子上，如-NH-CO-CH₂-CH(邻硝基苯基团)-NH-CO-。

如(e)项下所定义，取代碳原子的亚苯基为例如 1,2-、1,3-、或优选的 1,4-亚苯基。如上文(e)所定义，置换碳原子的饱和或不饱和的亚环烷基为，如亚环亚戊基或亚环己基，或不饱和亚环烷基，如在 1-或 2-位不饱和。如上文(e)所述取代碳原子的饱和或不饱和的亚二环烷基为，例如亚二环[2.2.1]庚基或亚二环[2.2.2]辛基，任选在 2-位不饱和或在 2-位 5-位均不饱和。如上文(e)所述取代碳原子的杂芳基为，例如亚三唑基，优选是 1,4-三唑基，或亚异噁唑基特别是 3,5-亚异噁唑基。如上文(e)所述取代碳原子的饱和或不饱和杂环基团为，例如 2,5-四氢咪喃二基，或 2,5-二氧六环二基或者亚异噁唑烷基(isoxazolidiene)，优选 3,5-亚异噁唑烷基。

优选柔韧的接头，如含有 1-20 个碳原子的烷基链，任选被甲基、甲氧基或乙氧基取代，或者是一个聚乙二醇链基团，含 1-20 个亚乙氧基单位。

底物的标记物部分可根据打算使用融合蛋白的应用，由本领域技术人员进行选择。标记物的实例包括：

(1) 光谱探针，例如荧光团、发色团、磁性探针或对照试剂，或是在电子显微术中可用的探针；

(2) 放射性标记的分子；

(3) 特异性结合对中的一个分子，其可与其配偶体特异性结合。这种特异结合对为本领域熟知的，包括如生物素，其可和抗生物素或链霉抗生物素结合；

(4) 有可能与其它生物分子相互作用的分子；

(5) 有可能与其它生物分子相互作用的分子的分子文库；

(6) 能与其他本领域技术人员已知的生物分子交联的分子，如 Nadeau 等(2002)所描述的；

(7) 暴露于过氧化氢和抗坏血酸盐时产生羟基自由基的分子如缚着的金属螯合物, 如 Hori 等(2002)所描述的;

(8) 能在光辐射下产生活性自由基的分子如孔雀石绿, 如 Jay 等(1999)所描述的;

5 (9) 共价结合在固体支持物上的分子, 这里支持物可以是玻璃片、微量滴定板或任何本领域技术人员公知的聚合物;

(10)能与其互补链进行碱基配对的核酸分子或其衍生物;

(11)具有膜嵌入性质的脂分子或其它疏水性分子;

(12)具有所需的酶、化学或物理性质的生物分子;

10 (13)具有上述任何性质的组合的分子。

被标记的 CoA 衍生物在磷酸泛酰巯基乙胺部位携带了一个可检测的并且可被转移到 ACP 融合蛋白上的标记物, 例如荧光团、发色团、磁性探针、放射活性标记分子或其它任何光学探针。这种被标记的 CoA 衍生物使得本发明在体外或细胞内或在细胞表面上(体内)用来将一个可检测的标记物特异的共价连接到 ACP 融合蛋白上。这样便可在体内或体外对 ACP 融合蛋白进行检测和定性。术语体内既包括在细胞的所有区室中标记也包括指向胞外空间的 ACP 融合蛋白的标记。此方法可以和绿色荧光蛋白(GFP)的应用相比较, 它也是在遗传上与目的蛋白融合, 可以在活细胞内对目的蛋白进行研究。GFP 及其变异体的缺点是其主要受限于 GFP 中天然存在的的荧光团的使用。在细胞内(体内)进行标记也可以在固定细胞后进行, 采用普通固定方法并要确保对蛋白的功能性结构产生较小的影响, 从而确保 ACP 保持通过磷酸泛酰巯基乙胺部分被标记的功能。

15

20

被标记 CoA 类衍生物的磷酸泛酰巯基乙胺部分携带一个亲和标记物如生物素, 这个标记物可以被转移到 ACP 融合蛋白上, 这种被标记 CoA 衍生物使得本发明用于转运一个亲和标记物到 ACP 融合蛋白上, 从而利用亲和标记物的结合配偶体分子来结合融合蛋白。例如, 把用亲和标记物如生物素进行标记的辅酶 A 型底物与 ACPS 添

25

加到表达 ACP 融合蛋白的细胞提取物中(细菌细胞或真核生物细胞),
或添加到纯化的 ACP 融合蛋白中,即可导致这个亲和标记物对融合
蛋白的共价修饰。然后通过亲和标记物与其结合配偶体的相互作用
来分离融合蛋白,例如,使用生物素与固定的抗生物素或与链霉抗
5 生物素间的作用。如果标记物是通过接头 R 连接到 ACP 融合蛋白上,
R 含有一个可以切割的键如二硫键,或者如果接头可以发生光裂解,
那么 ACP 融合蛋白即可在分离后与亲和标记物分开。

被标记 CoA 类衍生物的磷酸泛酰巯基乙胺部分携带一个标记
物,这个标记物可以转移到 ACP 融合蛋白上,并且在外部刺激下能
10 产生有活性的自由基,如羟自由基,这种被标记 CoA 衍生物即可对
目的蛋白和其相邻蛋白的构造进行研究。产生的自由基能够使 ACP
融合蛋白和其相邻蛋白失活,从而研究这些蛋白的作用。这类标记
物的实例为缚着的金属螯合物,在过氧化氢和抗坏血酸盐存在时产
15 生羟自由基的分子,和发色基团如孔雀石绿在激光照射下产生羟自
由基。应用发色基团和激光产生羟自由基在发色团辅助下激光引起
失活(CALI)的技术中也被认识到,例如 Jay 等人(1998)所描述的。CALI
是一种在细胞中特异的使某个蛋白失活的方法,失活方式在时间上
可控并由空间关系决定,而且这种失活作用取决于发色团和蛋白间
20 的空间相邻关系。在激光的照射下发色基团产生羟自由基,自由基
使得在也只在发色基团周围约 100nm 范围内的所有蛋白失活。目前,
通过微注射将发色团标记的特异针对目的蛋白的抗体引入到目的蛋
白的相邻空间。在本发明中,使用发色团如孔雀石绿对 ACP 融合蛋
白进行标记并随后进行激光照射,会使 ACP 融合蛋白和与 ACP 融合
25 蛋白发生作用的蛋白失活,失活方式在时间上可控并由空间关系决
定。在体内或体外均能用这种方法。

相似的,ACP 融合蛋白可用缚着的金属螯合物进行标记,并且
融合蛋白和与其发生作用的蛋白可在过氧化氢和抗坏血酸盐的存在
下发生特异性的失活。这种方法不仅可以用来研究 ACP 融合蛋白和

其相邻蛋白的功能，也可以用来鉴别那些与融合蛋白相邻的蛋白。这里，可以通过可检测该蛋白片段的特异性抗体，也可以通过研究这些蛋白在 2D 高分辨率电泳凝胶中的消失或者通过使用分离和蛋白测序技术如质谱技术和蛋白 N-端降解测序技术鉴别这些蛋白的裂解片段来鉴别 ACP 融合蛋白的相邻蛋白。

5 被标记 CoA 衍生物中磷酸泛酰巯基乙胺部分携带一个配基，这个配基可以转移到 ACP 融合蛋白上，这种被标记 CoA 衍生物使本发明用于将这个配基和其结合配偶体如蛋白分子，特异性的连接到 ACP 融合蛋白上。如果配基与另一个蛋白 Y 结合，并且蛋白 Y 与 ACP 融合蛋白的二聚作用会产生某种生物功能或者会产生可测量的信号，那么这种生物功能或者信号就依赖于标记的 ACP 融合蛋白的添加。如果 ACP 偶联到细胞表面展示的蛋白上，那么结合配偶体与配基间的作用就能介导 ACP 与其它由该配基修饰的分子包括生物分子间的作用，这种作用可以与单独的分子发生，也可以与其它由该配基修

10 饰的细胞、组织或完整生物体的组成部分发生。

被标记 CoA 衍生物中磷酸泛酰巯基乙胺部分被共价连接到一个载体的表面，或者其中标记物能被另外的附着于载体表面的分子非共价结合，这种被标记 CoA 衍生物使本发明用于在固相支持物上构建蛋白阵列。后种方式的实例为标记物是生物素，而连接在载体表面的分子是抗生物素或链霉抗生物素。可能的载体例如玻璃片，微量滴定板或任何具备所需功能的聚合物。将用作底物 CoA 衍生物通过其标记固定在载体上，随后在 ACP 融合蛋白的 ACPS 催化作用下，通过将标记物转移到融合蛋白，从而固定融合蛋白于载体。将(不同的)ACP 融合蛋白和 ACPS 一起按阵列空间要求点到载体上，载体用

15 相应的辅酶 A 衍生物进行预处理，即得到蛋白阵列。

被标记 CoA 衍生物中磷酸泛酰巯基乙胺部分与标记物共价连接，该标记物可以与其它蛋白发生交联，这种被标记 CoA 衍生物使本发明用于研究在一个合适环境里目的蛋白间的相互作用。这种有

交联功能的标记物的实例为那些含有诸如马来酰亚胺、活性酯或叠氮化物这样官能团的分子，和其它本领域技术人员已知的分子，如 Nadeau 等人(2002)的描述。在 ACPS 的存在下，这种被标记 CoA 类衍生物与和其它蛋白相互作用(体内或体外)的 ACP 融合蛋白相接触，会导致融合蛋白和与其作用的蛋白间通过标记物发生共价交联。这样就可以鉴别与融合蛋白发生作用的蛋白。

被标记 CoA 衍生物中磷酸泛酰巯基乙胺部分携带一个配基，这个配基可以转移到 ACP 融合蛋白上，此融合蛋白由 ACP 和一个膜受体蛋白组成，这样就可以检测被标记的受体。如此标记细胞表面受体可以观察受体的内化作用。特别是应用于研究受体蛋白在结合一个配基后的内化作用，例如通过药物、药物引导物或试探药物引导物。受体的内化作用可通过不同方法来检测，如通过显微镜观测标记物从胞膜到胞内的迁移，或通过观测标记物移动到胞内环境过程中的荧光特性变化。这种变化也可不通过显微装置观检测而是并可通过在胞外介质中添加淬灭剂来促进。

被标记 CoA 衍生物中磷酸泛酰巯基乙胺部分携带一个配基，这个配基可以使用电子显微技术直接检测，如电子致密纳米颗粒。另一种用电子显微术检测磷酸泛酰巯基乙胺部分的应用基于用作光敏剂的标记物，如四溴荧光素在光照时氧化芳胺如联茴香胺会形成电子致密沉淀，从而可被电子显微镜检测到。

通过实施例，参考附图来更加详细的描述本发明的实施方案。

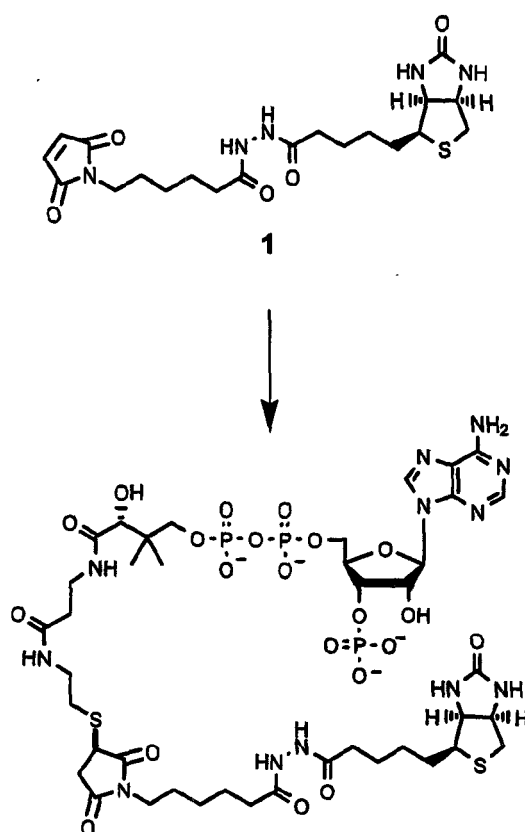
实施例

以下实施例和实验过程是给本领域技术人员提供如何实施本发明的完整公开和说明，而不是限制本发明的应用范围。

合成 CoA-Bt

向生物素-马来酰亚胺 1(1 mg, 0.0022 mmol)的 100 μ l DMF 溶液中加入辅酶 A 二钠盐(1.79 mg, 0.0022 mmol, 1 eq.)的 DMF 溶液(90

- 5 μl)和 $10 \mu\text{l}$ 50 mM pH 7.5 $\text{Tris}\cdot\text{Cl}$ 。将混合物在室温下搅拌 4 h 。然后用 $\text{CH}_3\text{CN}/\text{H}_2\text{O}$ 溶液 $1:4$ 稀释, 每份 $500 \mu\text{l}$ 注入制备型 HPLC 柱: 梯度 2 min 内(A = H_2O 99% , CH_3CN 1% , 50 mM NH_4OAc /B = CH_3CN) 从 A/B $95:5$ 到 A/B $80:20$, 在 7 min 内到 A/B $68:32$, 在 2 min 内到 A/B $20:80$, 再回到 A/B $95:5$ 。CoA-生物素的保留时间为 6.5 min 。真空浓缩含有目的产物的流分, 溶解于 DMSO, 并且注入一份分析量以控制纯度。合并纯的流分。CoA-生物素的浓度通过 260 nm (ϵ (腺嘌呤, 260 nm) = $15'300[\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}]$)的吸收峰确定。CoA-Bt 的产量是 0.895 mg (33%)。
- 10 ESI-MS(m/z)计算值为 $1217.296[\text{M}(-1)]$, 实际值为 $1217.2657[\text{M}(-1)]$ 。

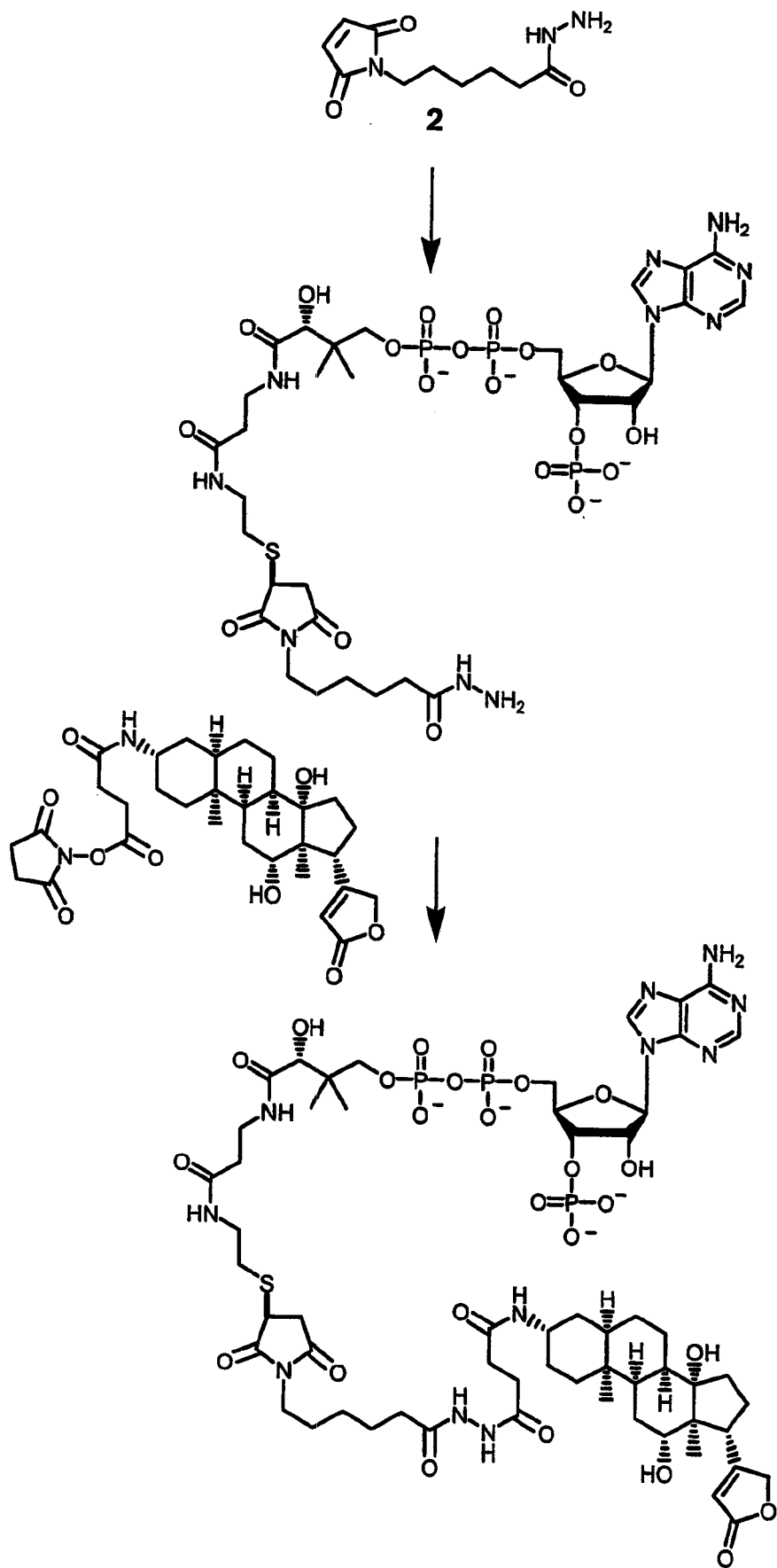


合成 CoA-Dg

- 15 辅酶 A 二钠盐(3.6 mg , 0.0044 mmol , 1 eq)溶于 DMF/buffer 混合液中($70 \mu\text{l}$ DMF/ $30 \mu\text{l}$ 50 mM TrisCl , pH 7.5)加入含有 N-(ϵ -马来酰

5 亚胺己酸)酰肼 2(1 mg, 0.0044 mmol)的 DMF 溶液(50 μ l)中。反应后用分析型 HPLC(在 260 nm 处检测)来验证反应的完成。然后, 3-氨基-3-脱氧洋地黄毒苷半琥珀酰胺琥珀酰亚胺酯(2.6 mg, 0.0044 mmol, 1 eq)溶于 50 μ l DMF 中, 并加入 10 μ l Et₃N, 将反应混合物在室温下搅拌 4 h。反应液上制备型的 HPLC, 真空浓缩含有目的产物的流分, 溶解于 DMSO, 通过分析 HPLC 进行纯度分析。合并含有纯产物的流分。CoA-Dg 的浓度通过腺嘌呤的消光系数(ϵ (腺嘌呤, 260 nm) = 15'300[M⁻¹cm⁻¹])确定。CoA-Dg 的产量是 2.37 mg(37%)。

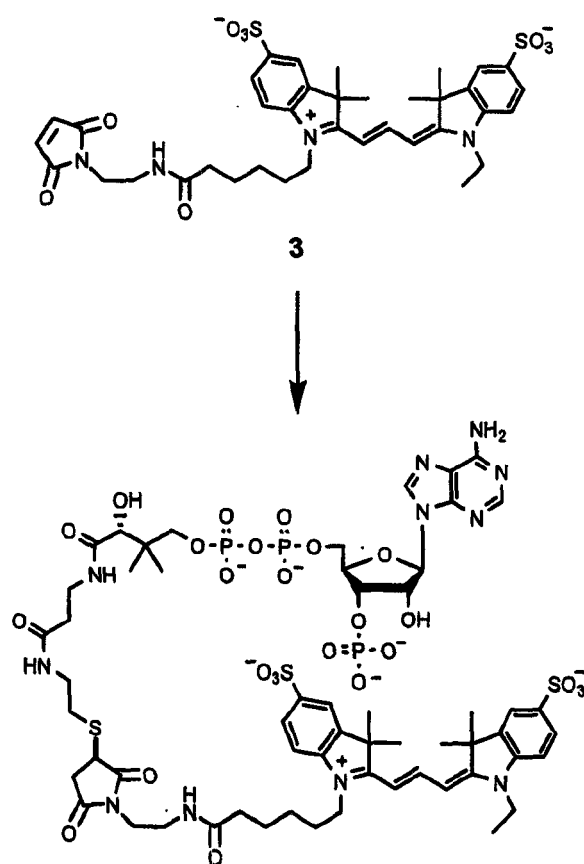
10 ESI-MS(m/z)计算值为 1462.3707 [M(-1)], 实际值为 1462.481 [M(-1)]。



合成 CoA-Cy3

辅酶 A 二钠盐(1.05 mg, 0.00126 mmol, 1 eq.)的 DMF(90 μ l)溶液和 10 μ l 50 mM pH 7.5 TrisCl 加入含有 Cy3-马来酰亚胺 3(Pharmacia, 1 mg, 0.00126 mmol)的 100 μ l DMF 溶液中。混合物在
5 室温下搅拌 4 h。然后用 CH₃CN/H₂O 1: 4 稀释, 每份 500 μ l 打入制备型 HPLC 柱: 梯度在 2 min 内从 A/B 95: 5 到 A/B 90: 10, 在 15 min 内到 A/B 65: 35, 在 2 min 内到 A/B 20: 80, 再回到 A/B 95: 5(A 和 B 见以上实施例中所
10 述)。CoA-Cy3 的保留时间为 10 min。真空浓缩含有目的产物的流分, 溶解于 DMSO, 并且注入一份分析量以控制纯度。合并纯的流分。CoA-Cy3 的浓度通过 549 nm($\epsilon(549 \text{ nm}) = 150'000[\text{M}\cdot\text{cm}^{-1}]$)处的吸收峰确定。CoA-Cy3 的产量为 0.847 mg(44 %)。

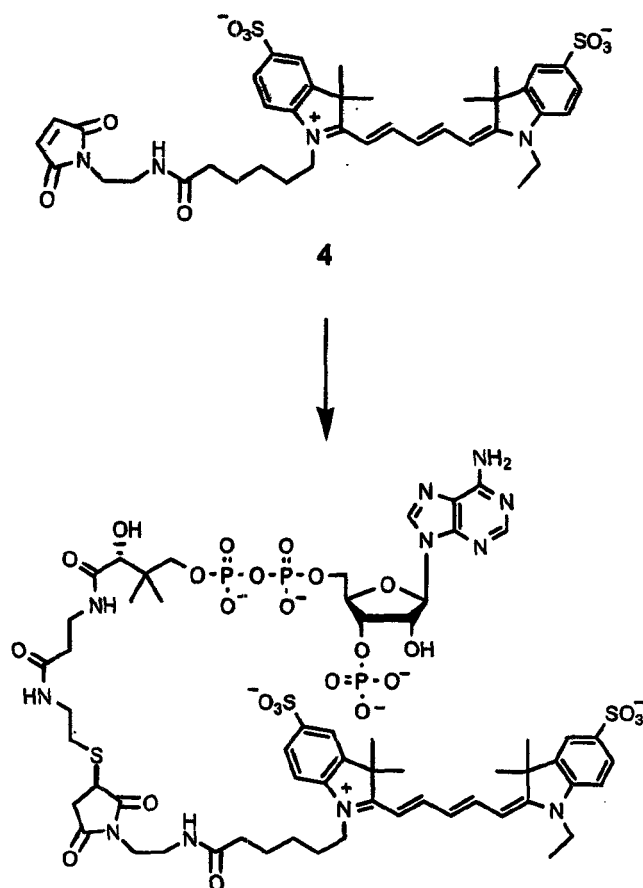
ESI-MS(m/z)计算值为 1519.370 [M(-1)], 实际值为 1519.3071 [M(-1)]。



合成 CoA-Cy5

CoA-Cy5 的合成由 Cy5-马来酰亚胺 4(1 mg, 0.00122 mmol)开始进行, 与合成 CoA-Cy3 的步骤描述一样。CoA-Cy5 的浓度通过 Cy5 的消光系数($\epsilon(645 \text{ nm}) = 250'000[\text{M}\cdot\text{cm}\cdot\text{l}]$)确定。CoA-Cy5 的产量为 0.828 mg(44%)。

ESI-MS(m/z)计算值为 1545.386 [M(-1)]和 772.189 [M(-2)], 实际值为 771.6524 [M(-2)]。



6 × His-ACPS 的克隆、表达和纯化

大肠杆菌 XL1-blue 的 ACPS 基因用单克隆 PCR 进行扩增, 并克隆到 pET-15b 质粒(Novagen)中, 上游引物为 5'-TCT GGT CAT ATG GCA ATA TTA GGT TTA GGC ACG G-3', 含有一个 Nde I 限制性酶切位点(下划线部分), 下游引物为 5'-TCA AGT CTC GAG TTA ACT TTC AAT AAT TAC CGT GGC A-3', 含有一个 Xho I 限制性酶切位

点(下划线部分)。融合到大肠杆菌 ACPS 的 N-端的肽链序列(来自 pET-15b 质粒)为 MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH(氨基酸单个字母简称), 其后面就是 ACPS 的第一个氨基酸, 甲硫氨酸。这个融合蛋白就是设计的 6 × His-ACPS。

5 液体培养含有一个编码 6 × His-ACPS 的表达载体 pET-15b 质粒 (Novagen)的大肠杆菌 BL21, 直至培养物的光学密度 OD 600 nm 达到 0.6。添加 IPTG 至终浓度为 1 mM 以诱导 6 × His-ACPS 的表达。在 24℃ 下 220 rpm 摇床培养 3.5 h, 然后 4℃ 3000 g 离心 10 min。用 10 ml 提取缓冲液(150 mM NaCl, 5 mM 咪唑, 50 mM KH₂PO₄, pH 8.0)

10 重悬沉淀物, 添加 PMSF 和 aprotinin 至终浓度分别为 1 mM 和 2 μg/ml。加入溶菌酶至终浓度为 1 mg/ml, 并将混合物至于冰上反应 15 min, 其间翻转数次。随后超声波破碎 10 min(95 % Power, 50 % Duty)。DNase I 加至终浓度为 0.01 mg/ml。4℃ 反应 30 min 后, 18000 rpm 离心 10 min。

15 为了纯化蛋白, 将事先用提取缓冲液洗涤了 3 次的 350 μl Ni-NTA 添加到溶菌液中, 混合物置于冰上反应 20 min, 其间混合数次。将提取的混合物加到一个聚丙烯柱中排水。用 5 × 400 μl DNA 洗脱缓冲液(10 mM TrisCl, pH 8.5)洗柱, 然后用 2 × 5 ml 洗涤缓冲液(300 mM NaCl, 10 mM 咪唑, 50 mM KH₂PO₄, pH 7.5)洗柱。为了洗脱蛋白,

20 将洗脱缓冲液(300 mM NaCl, 150 mM 咪唑, pH 7.5)加入柱子孵育 10 min, 然后收集流出液。用 150 μl 洗脱缓冲液继续逐步洗脱蛋白, 直至用 Bradford 法检测不到蛋白为止。最后, 将洗脱液在透析缓冲液(50 mM HEPES, 30 % 甘油, pH 7.5)中透析过夜, 以除去残余盐分。将纯的 6 × His-ACPS 蛋白(MW 16.215 kDa)分装保存于-80℃。

25 蛋白浓度用 Bradford 法确定为 37.6 μM。每升 BL21 大肠杆菌培养液得到 0.912 mg 蛋白。

6 × His-ACP 的克隆, 表达和纯化

大肠杆菌 XL1-blue 的 ACP 基因用单克隆 PCR 进行扩增, 并克

隆到 pET-15b 质粒(Novagen)中, 上游引物为 5'-GT CGG TAT CAT
ATG AGC ACT ATC GAA GAA CG-3', 含有一个 Nde I 限制性酶切
位点(下划线部分), 下游引物为 5'-TCA TGC GGA TCC TTA CGC CTG
GTG GCC GTT-3', 含有一个 BamH I 限制性酶切位点(下划线部分)。
5 融合到大肠杆菌 ACP 的 N-端的肽链序列(产生 6 × His-ACP)为
MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH(氨基酸单个字母简称), 其后面就是
ACP 的第一个氨基酸, 甲硫氨酸。

液体培养含有一个编码 6 × His-ACP 的表达载体 pET-15b 质粒
(Novagen)的大肠杆菌 BL21, 直至培养基的光学密度 OD 600 nm 达
10 到 0.6。添加 IPTG 至终浓度为 1 mM 以诱导 6 × His-ACP 的表达。37
°C 220 rpm 摇床培养 3.5 h, 然后 4°C 3000 g 离心 10 min。沉淀物的
处理与上述纯化 6 × His-ACPS 的实验操作完全相同。6 × His-ACP 的
浓度用 Bradford 法确定为 188 μM。每升 BL21 大肠杆菌培养液得到
3.1 mg 蛋白。

15 为了确定 apo-6 × His-ACP 和 holo-6 × His-ACP 间的比例, 对纯
化的 6 × His-ACP 通过 ESI-MS (pos. mode) 用 Q-Tof-
Ultima(Micromass/water)、任选偶联到 Cap-LC(Waters)、Xterra RP-C4
柱(Waters, 5 μm, 0.32 × 50 mm; 流速 8 μl/min)层析和 MaxEnt1 软
件系统分析。ESI-MS 对混合物的分析说明制备样品含 apo-6 × His-
20 ACP 和 holo-6 × His-ACP 的混合物。发现纯化的 apo-6 × His-ACP(不
含第一个甲硫氨酸)分子量为 10.6720 kDa(计算值为 10.6716 kDa),
holo-6 × His-ACP 分子量为 11.012 kDa(计算值为 11.01190 kDa)。LC-
ESI-MS 可鉴别和积分 apo-型和 holo-型对应的峰。holo-型的比例确
定为 16%(保留时间 11.77 min), apo-型的比例为 84%(保留时间为
25 14.16 min)。

6 × His-ACP-ha 的表达和纯化

融合到大肠杆菌 ACP 的 N-端的肽链序列为(氨基酸单个字母简
称)MGSSHHHHHHSSGLVPRGSH, 其后面就是 ACP 的第一个氨基

酸, 甲硫氨酸, 融合到大肠杆菌 ACP 的 C-端的肽链序列为(氨基酸单个字母简称)TSRYPYDVPDYARW(产生 6 × His-ACP-ha)。

液体培养含有一个编码 6 × His-ACP-ha 的表达载体 pET-15b 质粒的大肠杆菌 BL21(DE3), 直至培养物的光学密度 OD 600 nm 达到 0.6。添加 IPTG 至终浓度为 1 mM 以诱导 6 × His-ACP-ha 的表达。24 °C 220 rpm 摇床培养 3 h, 然后 4 °C 3000 g 离心 10 min。后续纯化操作与上述纯化 6 × His-ACPS 的实验操作相同。6 × His-ACP-ha 蛋白 (MW 12.65 kDa) 的浓度用 Bradford 法确定为 400 μM。每升摇瓶培养液总共得到 10 mg 蛋白。

10 体外用 6 × His-ACPS 和 CoA-Bt 对 6 × His-ACP 进行生物素酰化

室温下纯化的 6 × His-ACP(1 μM)与 6 × His-ACPS(0.2 μM)、MgCl₂(10 mM)在反应缓冲液(43 μl, 50 mM TrisCl, pH 8.8)中温育。取 7.5 μl 组分进行分析。添加 CoA-Bt 至终浓度为 5 μM。在限定的时间内每份 7.5 μl 分装。添加辅酶 A(终浓度 1 mM)至这些组分中作用 30 s 以猝灭酰化反应, 加入 8.2 μl 2 × SDS 缓冲液。将样品在 95 °C 加热 2 min。利用链霉抗生物素-辣根过氧化物酶缀合物(NEN)与化学发光的过氧化物酶底物(Renaissance reagent plus, NEN), 用 Western-blotting 来检测生物素酰化的 6 × His-ACP。用图像工作站(Kodak 440)分析 western blot 的结果。作为对照, 制备单独含有每一种蛋白的样品、含有两种蛋白中的一种与 CoA-Bt 的样品进行同上的生物素酰化分析, 以检查酰化反应的背景和特异性。生物素酰化作用依赖于所有三种成分的存在。

15 通过凝胶移动实验定量 6 × His-ACP 的生物素酰化

室温下将纯化的 6 × His-ACP(3 μM)与 CoA-Bt(10 μM), 纯化的 6 × His-ACPS(5 μM)与反应缓冲液(50 mM TrisCl, pH 8.8, 10 mM MgCl₂)中孵育, 终体积 50 μl。反应 30 min 后, 将混合物在 TBS(10 mM TrisCl, 150 mM NaCl, pH 7.9)中透析过夜以除去过量 CoA-Bt。分装的反应液加入链霉抗生物素至终浓度 0.6 μg/μl, 反应 1 h。添加只含有 2% SDS

的 $2 \times$ SDS 上样缓冲液至样品中，不加热样品直接进行 SDS-PAGE 电泳。用考马斯染色检测蛋白，通过比较样品和对照物的条带亮度来估计酰化反应的程度，对照物含有等量的未与链霉抗生物素反应未酰化的 $6 \times$ His-ACP。

5 CoA 和被标记 CoA 间的竞争实验

室温下，将 CoA-Bt 或 CoA-Dg($2 \mu\text{M}$)、纯化的 $6 \times$ His-ACPS($0.4 \mu\text{M}$)、纯化的 $6 \times$ His-ACP-ha($0.4 \mu\text{M}$)、不等量 CoA($0, 2, 4, 8, 12, 20, 40, 80 \mu\text{M}$)，孵育在 $20 \mu\text{l}$ 反应缓冲液(50mM TrisCl , $\text{pH}7.5$, 10mM MgCl_2)。25 min 后，向每个样品中加入 $20 \mu\text{l}$ $2 \times$ SDS 上样缓冲液以猝灭反应，并在 95°C 加热 2 min。利用链霉抗生物素-辣根过氧化物酶缀合物(1: 12500 稀释)，或洋地黄毒苷抗体-辣根过氧化物酶缀合物(1: 500 稀释)和化学发光过氧化物酶底物，用 Western-blotting 来检测标记的 $6 \times$ His-ACP-ha。每个实验中 $0 \mu\text{M}$ CoA 的信号强度任意定为 1。

15 在酵母细胞表面标记 Aga2-ACP

从酵母染色体组 DNA 中扩增出 AGA2 的 DNA，通过 PCR 片段的末端引入的 EcoR I 和 Sal I 限制性位点，将其插入到酵母的表达载体 pRS314 的 PCUP1 启动子后。通过扩增时在 ACP DNA 上引入的 Sal I 和 Acc 651 限制性位点将 ACP DNA 克隆到 AGA2 之后。在 ACP DNA 后面的序列编码 HA 抗原决定簇。连接 Aga2p 和 ACP 的蛋白序列是 EVDEMYFQGM。Aga2p 的最后一个氨基酸残基和 ACP 的第一个氨基酸残基用下划线表示。ACP 蛋白的 C-端序列包括了 HA-抗原决定簇，序列为 QAYPYDVDPDYAG。ACP 的最后一个氨基酸残基用下划线表示。酵母菌株 EBY100(MATa ura3-52 trp1 leu2 Δ 1 his3 Δ 200 pep4::HIS3 can1 GAL pIU211:URA3)(Invitrogen, Carisbad, CA) 的 P_{GALI} 启动子启动 Agalp 的表达， P_{CUP1} 启动子启动 Aga2p-ACP 的表达。在 10 ml 含 2% 半乳糖，0.1 mM 铜的选择培养基里培养该酵母至 OD 600 nm 值达到 1.4 个 OD 600 nm 单位，用 2 ml 水洗涤细胞

并重悬细胞于 0.2 ml 标记缓冲液(50 mM TrisCl, pH 8.8, 100 mM NaCl, 10 mM MgCl₂)。添加 CoA 底物和 6 × His-ACPS 至终浓度分别达到 10 和 1 μM。室温反应 20 min 后用 2 ml PBS 缓冲液稀释反应液以中止标记反应。用 2 ml PBS 缓冲液洗涤细胞 4 次, 随后或者直接用
5 荧光显微镜观察, 或者将反应液与 0.2 ml Qdot™ 孵育缓冲液(含 20 nM Qdot™605 链霉抗生物素缀合物)(Milan Analytica AG, Switzerland) 混合孵育 20 min, 再用 2 ml PBS 缓冲液洗涤 4 次细胞, 然后用荧光显微镜观察。用 Zeiss Axiovert 荧光显微镜观察细胞 (Aarl Zeiss, Gottingen, Germany), 使用 63 × oil(1.4 数值孔径)物镜。

10 *标记展示在 HEK293 细胞表面的 ACP-NK1 融合蛋白*

为了瞬时表达 ACP-NK1, 5-HT₃ 受体(Sig_{5HT3})的信号序列通过一个短 DYV 接头连接到 ACP 蛋白的 N 末端, NK1 则通过一个短 TS 接头连接到 ACP 蛋白的 C 端。在所得结构里, 一个 FLAG 标签和一个 6 × His 标签也被连接到 NK1 的 C 端。相应的融合蛋白基因插入到 pCEP4 载体(Invitrogen)的 Nhe I 位点和 BamH I 位点之间。用添加了 2.2% 小牛血清(GIBCO, BRL)的 DMEM/F12 培养基(Dulbecco modified Eagle medium; GIBCO, BRL)培养 HEK293 细胞。按文献(Nat Biotechnol 21, 86-89(2003))描述进行瞬时转染, 用表达 ACP-NK1 的表达载体和核定位 EGFP(EGFP-NLS₃)对 HEK293 细胞进行共转染。24
15 h 后, 与 500 μl PBS 缓冲液混合反应, 此缓冲液中含 MgCl₂(10 mM), 6 × His-ACPS(1 μM), 及任一 CoA-Cy3、CoA-Cy5、CoA-Bt(每个 5 μM)。然后用 PBS 缓冲液洗涤细胞三次以除去任何过量的底物, 当用 Cy3 或 Cy5 标记时直接用激光扫描共聚焦荧光显微镜观察细胞。生物素酰化的细胞则要与含 1 μg/ml FluoroLink™ Cy5 标记的链霉抗
25 生物素(Amersham Biosciences)的 PBS 缓冲液混合发生反应, 然后用 PBS 缓冲液洗涤 3 次。使用 488nm 氩/氩激光线, 或 543nm 氩氦激光线或 633nm 氩氦激光线, 用一台 Zeiss LSM 510 显微镜(Carl Zeiss AG, Gottingen, Germany)获得激光扫描共聚焦荧光显微照片, 用 63 ×

water(1.2 数值孔径)物镜。调节激光扫描速度和强度以避免使荧光探针光漂白, 及避免使细胞发生损害或形态上的变化。在对 GFP 敏感和对各自染料敏感的通道分析荧光。细胞样品在用 CoA-Cy3 或 CoA-Cy5 标记后, 或用 CoA-Bt 标记再用链霉抗生物素-Cy5 染色后, 在 GFP 通道可观察到清晰的核标记, 在细胞膜区域可观察到清晰的膜标记。没有发生转染的细胞不在胞核表达 GFP, 因此观察不到膜染色, 这表明了 Cy3、Cy5 和生物素标记 ACP-Nk1 的特异性。在 HEK293 细胞中瞬时表达的 ACP-Nk1 受体在进一步实验中被 CoA-Cy5 和四甲基若丹明标记 P 物质(SP-rho)共染色, P 物质是 NK₁ 的天然配体。这两种物质都对胞膜区域进行特异性染色, 产生相同的染色区域。用过量的未标记 P 物质在一分钟内进行逆 SP-rho 染色, 证明了标记作用的特异性, 也证明了 ACP-NK1 结合配基的功能。

参考文献

- RB Ali 等,*Molecular and Cellular Biology*,18,1660-1669(1998)
- AM Gehring 等,*Chemistry Biology*4,17-25(1997)
- SN Ho 等,*Nature* 382,822-6(1996)
- R Hori N Baichoo in *Protein-Protein interactions :A molecular cloning manual*; Ed.E Golemis, Cold Spring Harbor Laboratory Press; pp.288-311(2002)
- DG Jay and T Sakurai,*Biochim. Biophys. Acta* M39-48(1999)
- PA Kolodziej and RA Young *Methods Enzymol.*194,508-19,(1991)
- RH Lambalot 等,*Chemistry Biology* 3,923-936(1996)
- RH Lambalot and CT Walsh,*J. Biol. Chem.*270,24658-24661(1995)
- J Ma and M Ptashne,*Cell* 51,113-9(1987)
- OW Nadeau and GM Carlson in *Protein-Protein interactions:a molecular cloning manual*; Ed. E Golemis,Cold Spring Harbor Laboratory Press;pp.75-92(2002)

JH Nunberg 等,*Cell* 19,355-364(1980)

M Rawlings and JE Cronan,*J.Biol.Chem.*267,5751-5754(1992)

J Schultz and M Carlson,*Mol Cell Biol* 7,3637-45(1987).

<110> 洛桑生态综合技术联合公司 (Epfl - Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne)

K. 约翰森 (Johnsson, Kai)

N. 乔治 (George, Nathalia)

<120> 基于酰基载体蛋白的蛋白标记方法

<130> P311A

<150> EP03405364.5

<151> 2003-05-23

<160> 8

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 34

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 将 ACPS 克隆进 pET-15b 的正向引物

<400> 1

tctggtcata tggcaatatt aggtttaggc acgg

34

<210> 2

<211> 37

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 将 ACPS 克隆进 pET 15b 的反向引物

<400> 2

tcaagtctcg agttaacttt caataattac cgtggca

37

<210> 3

<223> ACP 的 IIA 抗原表位突出端

<400> 6

Thr Ser Arg Ser Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Arg Trp
1 5 10 15

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 联系 Aga2p 和 ACP 的序列

<400> 7

Phe Val Asp Glu Met Leu Tyr Phe Gln Gly Met
1 5 10

<210> 8

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HA Epitope extension for Aga2p ACP fusion protein

<400> 8

Gln Ala Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Gly
1 5 10

图 1

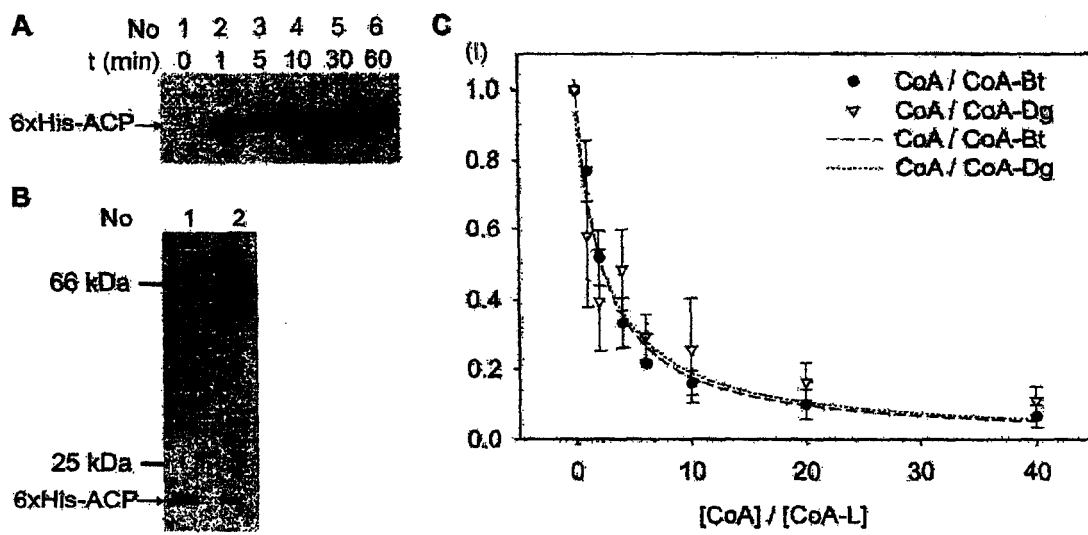
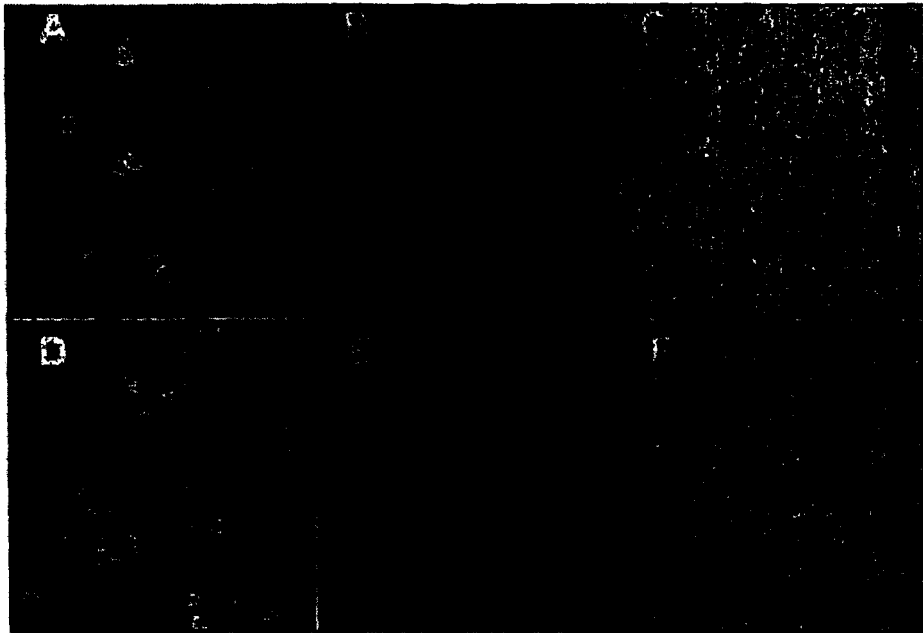


图 2



专利名称(译)	基于酰基载体蛋白的蛋白标记方法		
公开(公告)号	CN1826527A	公开(公告)日	2006-08-30
申请号	CN200480020985.9	申请日	2004-05-19
[标]申请(专利权)人(译)	洛桑联邦理工学院		
申请(专利权)人(译)	洛桑生态综合技术联合公司		
当前申请(专利权)人(译)	洛桑生态综合技术联合公司		
[标]发明人	K·约翰森 N·乔治		
发明人	K·约翰森 N·乔治		
IPC分类号	G01N33/532 G01N33/533 G01N33/534 G01N33/535 C07K19/00 C07K14/705 C07K14/245 G01N33/58		
CPC分类号	C07K14/245 G01N33/581 C07K2319/43 G01N33/535 C07K2319/21		
代理人(译)	刘玥		
优先权	2003405364 2003-05-23 EP		
其他公开文献	CN1826527B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本文公开了用各种不同的标记物标记酰基载体蛋白(ACP)融和蛋白的方法。该方法的原理是用酰基载体蛋白合酶(ACPS)全酶或是它的同源物将标记物从辅酶A(CoA)型底物转移到融合蛋白上。本方法通过将分子连接在融合蛋白上,给融合蛋白带来新的物理或化学性质,从而可以在体内或体外检测和操纵融合蛋白。这类标记物的实例中包括光谱探针或报道分子、亲和标签、产生活性自由基的分子、交联物、介导蛋白蛋白相互作用的配体或适于固定融合蛋白的分子。

