



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1904061 B

(45) 授权公告日 2011.08.17

(21) 申请号 200610108937.6

32, 33, 35.

(22) 申请日 2006.07.28

审查员 苏林

(30) 优先权数据

PCT/EP2005/053720 2005.07.29 EP

05107192.6 2005.08.04 EP

(73) 专利权人 弗·哈夫曼-拉罗切有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72) 发明人 T·恩德勒 D·罗特

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

11247

代理人 黄革生 林柏楠

(51) Int. Cl.

C12Q 1/42(2006.01)

C12Q 1/48(2006.01)

(56) 对比文件

WO 02102834 A, 2002.12.27, 权利要求 1.

EP 1156329 A, 2001.11.21, 说明书实施例

2.

WO 0075167 A, 2000.12.14, 权利要求

权利要求书 1 页 说明书 7 页 附图 7 页

(54) 发明名称

通用的激酶测定法

(57) 摘要

本发明涉及以三部分系统为基础的测定激酶或磷酸酶活性的方法。该方法包括接触结合配偶体,其可结合磷酸化的肽、检测分子和底物肽。通过测量存在于检测分子和底物分子上的能量供体和能量接纳体之间的能量转移可实现活性的测定。

1. 用于测定激酶或磷酸酶活性的方法,其包括将结合配偶体、检测分子和底物分子相互作用,其中所述检测分子用能量供体或接纳体标记,如果检测分子用能量接纳体标记,那么所述底物分子用能量供体标记,如果检测分子用能量供体标记,那么所述底物分子用能量接纳体标记,其中所述结合配偶体结合磷酸化的底物分子而不结合未磷酸化的底物分子,所述方法包括步骤:

a) 用激酶磷酸化所述底物分子或用磷酸酶将磷酸化的底物分子去磷酸化;和
b) 将步骤 a) 中所获得的底物分子与所述结合配偶体和所述检测分子相互作用;和
c) 通过测定结合至所述结合配偶体上的所述底物分子和所述检测分子的从能量供体至能量接纳体的能量转移来测定激酶或磷酸酶活性。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述结合配偶体是 IMAPT^M 小珠上的金属离子。

3. 权利要求 1 或 2 的方法,其中能量供体具有小于 50 微秒的发射寿命。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述发射寿命小于 10 微秒。

5. 权利要求 3 的方法,其中所述发射寿命小于 5 微秒。

6. 权利要求 3 的方法,其中所述发射寿命为 2 至 3 微秒。

7. 权利要求 1 至 6 中任意一项的方法,其中能量供体是 Ru⁻ 发光团。

8. 权利要求 1 至 7 中任意一项的方法,其中能量接纳体是显示出与 Ru⁻ 络合物有光谱重叠的荧光团,所述 Ru⁻ 络合物产生至少 **10 Å** 的 R₀。

9. 权利要求 8 的方法,其中所述能量接纳体是 Alexa Fluor700、Atto 700、Dy701 或 Alexa Fluor 750。

10. 权利要求 9 的方法,其中所述能量接纳体是 Alexa Fluor700。

11. 权利要求 7 至 10 的方法,其中所述 Ru⁻ 发光团是 Ru(batho)₂bpy。

12. 权利要求 1 至 11 的方法,其中用一种系统进行所述方法,在该系统中样品相对于光学检测路径运动,其中所述系统是实验室器具自旋系统。

13. 权利要求 1 至 11 的方法,其中用一种系统进行所述方法,在该系统中样品相对于光学检测路径运动,其中所述系统是显微流体系统或流通池。

14. 权利要求 1 至 13 的任意一项的方法,其中结合配偶体的稀释度是至少 500 倍。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述稀释度为 1000 倍至 10,000 倍。

16. 用于实施根据权利要求 1 至 15 的方法的试剂盒,其在分开的容器中包含结合配偶体、至少一种检测分子、以及底物分子,其中所述结合配偶体和检测分子的最佳量可分别滴定。

17. 用于实施根据权利要求 1 至 15 的方法的试剂盒,其在分开的容器中包含小珠、一种以上的检测分子、一种以上的底物肽,其中所述检测分子和所述底物肽作为几套荧光共振能量转移对来提供。

通用的激酶测定法

[0001] 本发明涉及测定激酶或磷酸酶活性的方法,其包括结合配偶体、检测分子和底物分子的相互作用。

[0002] 分子和超分子装配的生理修饰在生物系统的结构和调节中发挥着主要作用。这些修饰可包括磷酸化、环化、糖基化、酰化、和 / 或硫酸化,等等,经修饰的分子可包括多肽、核酸、和 / 或脂类等等。修饰的重要性在细胞信号转导通路中是尤其明显的,所述通路中通过磷酸修饰例如磷酸化和环化相关联的胞外和胞内物质影响着细胞的定位、性质和活性。

[0003] 能够干扰由特定酶催化的或者特异底物的磷酸化或去磷酸化的化合物是所关心的,因为它们能干扰特定信号转导事件并因而可用于由于此类途径的调节异常而发生的疾病的治疗或预防。

[0004] 因此,开发测定激酶或磷酸酶活性的方法用于筛选可调节特异信号转导通路的化合物是所关心的。

[0005] EP1156329 公开了测定激酶活性的方法,其基于由两部分组成的系统,这两部分为结合配偶体 (BP) 和进行 $A \rightarrow A^*$ 转化的底物分子。通常,结合配偶体是结合酶产物的实体并能自身附着于固相上,例如通过任何种类的共价或非共价相互作用附着到小珠。为了检测,将标记物 (荧光团、发光团、接纳体或淬灭剂) 附着于 A 或 BP 上。检测方法列表包括强度、偏振和能量传递测量。

[0006] W000/75167 公开了检测向底物添加或从底物除去底物基团的方法,该方法也是基于两部分组成的系统,这两部分为结合配偶体,其优选地是具有捕获的金属离子的大分子,和肽 A,其中例如通过 FRET 检测了磷酸化的肽向非磷酸化肽的转化或反之亦然。

[0007] 两部分系统的一个缺点是,为了最佳的能量转移,对于给定的 BP 和 A^* 比率,需要供体和接纳体的一定比率。因此,为产生最佳的 FRET,必须滴定 BP、A 和 A^* 。

[0008] 然而,BP、A 和 A^* 之间的最佳比率通常一方面是受到 BP 对 A^* 的结合能力和各自的结合常数的影响,而另一方面也受到目标靶标的酶反应的动力学参数的影响。因此,在两部分系统中 FRET 优化必需的 BP、A 和 A^* 的固定比率导致测定信号和质量或者酶动力学和结果的生物学意义受到损害,即在最坏的情况下,在两部分系统中实现所有组分的最佳:酶反应实现最佳动力学、BP 和 A^* 实现所转化产物的最佳结合、接纳体 - 供体实现最佳 FRET 也许是不可能的。

[0009] EP1156329 和 W000/75167 中所公开的两部分系统的一个实施方案包含掺入了发光团或受体的塑料小珠以及用于结合标记的 A^* 的表面涂层。换句话说,IMAP™ 小珠在小珠的核心具有光学标记。

[0010] 为获得充足的结合能力 I, MAP™ 小珠一般具有 100nm 或更大的直径。与一般的供体接纳体对的能量转移距离为 3 至 9nm 相比,该直径是大的。因而,掺入的小珠与结合肽之间的能量转移是相当无效的,在小珠内部有许多虽不识别 FRET 配偶体但仍增加测定背景信号的发光团。这导致动力学范围减小和灵敏性降低。

[0011] 因此,本发明的目的是开发通过测定能量供体和能量接纳体之间的能量转移来测定激酶或磷酸酶活性的更加有效的方法。

[0012] 本发明的测定法由三部分组成：(i) “结合配偶体” (ii) 用 FRET 对的供体或接纳体标记的检测分子 (iii) 底物分子——小分子、肽或蛋白质——其经酶转化，因而如果酶是蛋白激酶则氨基酸 (Ser、Thr、Tyr) 被磷酸化。相同的设置可用于蛋白质磷酸酶，其中各自的氨基酸被去磷酸化。因此，本发明提供了用于测定激酶或磷酸酶活性的方法，其包括结合配偶体、检测分子和底物肽，其中所述检测分子用能量供体或接纳体标记，如果检测分子用能量接纳体标记，那么所述底物分子用能量供体标记，如果检测分子用能量供体标记，那么所述底物分子用能量接纳体标记，其中所述结合配偶体仅结合磷酸化的底物分子，该方法包括步骤：a) 用激酶磷酸化所述底物分子或者用磷酸酶将磷酸化的底物去磷酸化；和 b) 将步骤 a) 中所获得的底物分子与所述结合配偶体和所述检测分子相互作用；和 c) 通过测定结合至所述结合配偶体上的所述底物分子和所述检测分子的从能量供体至能量接纳体的能量转移来测定激酶或磷酸酶活性。优选地，所述结合配偶体是金属离子，其优选地结合固相，例如，小珠、膜、样品固定器。在最优选的实施方案中，所述结合配偶体是 IMAP™ 小珠上的金属离子。IMAP™ 小珠可从 Molecular Devices Corp 获得。已有显示，IMAP™ 小珠可用作结合平台以促使两个荧光团足够靠近在一起进行荧光共振能量转移 (FRET)，从而成为用于激酶测定和磷酸酶测定的通用检测系统。

[0013] 在另一优选的实施方案中，底物分子是蛋白质或肽。

[0014] 如此处所用的，“结合配偶体”指的是实体，其结合酶产物并且自身能够通过任何种类的共价或非共价相互作用附着于固相例如小珠上。

[0015] 如此处所用的，“检测分子”指的是携带标记、例如荧光标记并结合至结合配偶体上的分子，所述标记允许检测分子的检测。

[0016] 如此处所用的，“底物分子”指的是小分子、肽或蛋白质，其经酶通过酶反应转化。

[0017] 如此处所用的，“能量供体”指的是荧光标记，其在受到激发时，能够将其能量转移至能量接纳体。

[0018] 如此处所用的，“能量接纳体”指的是可从能量供体接受能量的分子。

[0019] 如此处所用的，“激酶活性”指的是酶（激酶）对底物的磷酸化。

[0020] 如此处所用的，“磷酸酶活性”指的是酶（磷酸酶）对底物的去磷酸化。

[0021] 如此处所用的，“磷酸化的底物分子”指的是经酶（激酶）磷酸化的小分子、肽或蛋白质。

[0022] 如此处所用的，“发射寿命”指的是荧光团在激发后保持激发状态的时间的平均量。

[0023] 与荧光偏振读出相比，利用 TR-FRET 作为读出的实现提供了下列优点：

[0024] • 测定信号的质量增强，该测定信号通过统计学参数 z' 来表达，特别是对于低底物转化。

[0025] • 由于定时选通 (time gated)、延迟检测，测定信号相对于背景荧光干扰的稳定性增强。

[0026] • 对于需要转化的底物的量的灵敏性增强 (FP 读出测量溶液中所有底物分子的荧光团的平均信号；FRET 仅识别结合至磷酸化底物分子上的荧光团的部分)。

[0027] • 试剂消耗减少到 1/20 以下。

[0028] 另外，本发明的方法中所用的三部分系统比现有技术的一部分系统具有下列优

势,即使两部分系统也是通过 (TR)-FRET 来实现的:

[0029] • 底物产物的最佳结合所需的小珠量和最佳能量转移信号所需检测分子的量可分别滴定。

[0030] • 均结合至小珠表面的检测分子和底物分子之间的能量转移导致更加有效的 FRET 信号。

[0031] • 而且,可以分别选择小珠 (BP)、检测分子和底物分子,即,人们可设想一种测定工具箱,含有几种通用物品,例如小珠、检测分子、底物和几套 FRET 对。从此工具箱中选择产生出不同的测定法应用。对于两部分系统,此种灵活性和通用性是更困难的且实际上甚至不可能的。

[0032] 因此,还提供了用于实施根据上文和下文所述方法的试剂盒,其在分开的容器中包含小珠、一种以上的检测分子、一种以上的底物分子,其中所述检测分子和所述底物分子是以几套 FRET 对来提供的。

[0033] 优选地,能量供体具有小于 50 微秒,更优选地小于 10 微秒,甚至更优选地小于 5 微秒的发射寿命。最优选地,能量供体具有 2 至 3 微秒的发射寿命。

[0034] 在优选的实施方案中,将 Ru- 发光团用作能量供体。与镧系元素 (Eu、Tb、Sm) 螯合物和穴状化合物相比,Ru- 发光团具有几个普遍的优势:

[0035] • 与接纳体有良好重叠的宽的发射光谱,不同于镧系元素染料的尖光谱。

[0036] • 更高的化学稳定性,其对于标记化学(可能更加严格的条件,以及在纯化过程中)和测定法(没有来自试剂的干扰,已知镧系元素染料对典型的激酶测定的重要成分,例如 EDTA、Mg 离子或 Mn 离子是敏感的)是有利的。

[0037] 在另一优选的实施方案中,将 Tb 发光团用作能量供体。

[0038] 激发状态的微秒寿命和所得发射提供了特别的优点。在测定条件下 Ru(batho)₂bpy 络合物的一般发射寿命是 2-3 微秒。微秒寿命允许对来自其它测定成分和荧光化合物的荧光的有效背景抑制。然而,光子发射时间比镧系元素快 100 倍,即检测器积分的时间为电背景信号时间的 1/100 以下。

[0039] 在本发明的一个实施方案中,用一种系统进行所述方法,在该系统中,样品相对于光学检测路径运动。优选地,所述系统是实验室器具自旋系统 (labware spin system),更优选地 Tecan lab CD 或来自 SpinX 的系统。在另一优选的实施方案中,所述系统是显微流体系统或流通池。在这样的设置下,在样品运动中镧系元素发射太慢而不能读出。为了利用 TR-FRET 读出,实验室器具/盘或样品流将不得不分别通过起始-停止循环,这实际上是不可能的并且是费时的。备选地,人们将不得不修改修改装置以获得不同的激发/检测路径,在此将不得不根据读出的计时调整路径的位置。

[0040] 利用 Ru- 络合物和短的微秒寿命的“Fast-TR-FRET”允许在样品没有主要修饰的情况下运动时在线读出并提供了特别的优势。IMAP™ 技术是用于激酶的通用测定法并因此优选使用。然而,FP 读出具有上述的缺点。在此设置下不能容易地使用镧系元素 TR-FRET。

[0041] 在优选的实施方案中,能量接纳体是显示出与 Ru- 络合物有光谱重叠的荧光团,所述 Ru- 络合物产生至少 10 Å,优选至少 20 Å,更优选至少 50 Å 的 R₀ (Förster Radius)。R₀ 与光谱重叠 J(λ) 之间的关系通过下列公式(来自:Lakowicz, J.R., Principles of Fluorescence Spectroscopy, 第二版, Kluwer Academic/Plenum

Publishers, p. 369) 定义：

$$[0042] \quad R_0 = 0.211 [\kappa^2 n^{-4} QDJ(\lambda)]^{1/6} (\text{\AA})$$

[0043] 其中

$$[0044] \quad J(\lambda) = \frac{\int_0^\infty F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda}{\int_0^\infty F_D(\lambda) d\lambda}$$

[0045] 在更优选的实施方案中,能量接纳体是 Alexa Fluor 700、Atto 700、Dy701 或 Alexa Fluor 750。在最优选的实施方案中,所述能量接纳体是 Alexa Fluor 700。

[0046] 在最优选的实施方案中, Ru 发光团是 Ru(batho)₂bpy。

[0047] W002/41001 中公开了可在本发明中使用的用于 Ru-络合物与荧光团之间的此类荧光共振能量转移测定的另外的染料对。

[0048] 结合配偶体的稀释度至少是 500 倍,优选地至少 1000 倍或者在 400 倍或 1000 倍和 10000 倍之间,其中稀释度在 2000 倍和 10000 倍之间或者 2000 倍和 8000 倍之间。

[0049] 在下列章节中讨论了在实施例中公开的非限制性实施方案：

[0050] 作为测试系统,利用 Alexa Fluor 700 作为能量接纳体标记磷酸化和非磷酸化底物肽,并利用 Ru(batho)₂bpy 作为能量供体标记磷酸化的底物肽。Alexa 标记的激酶底物肽是通过该酶磷酸化的。为进行检测,将磷酸化的 Ru(batho)₂bpy 检测肽和 IMAP™ 小珠加入反应混合物。磷酸化底物和检测肽都结合至小珠上,从而磷酸化底物和检测肽密切接触,因此可以发生荧光共振能量转移 (FRET) (图 1)。

[0051] 作为 FRET 对,将长寿命的金属-配体络合物 Ru(batho)₂bpy ($\tau = 3 \mu s$) 用作能量供体并将 Alexa Fluor 700 用作能量接纳体。Ru 标记的肽与 IMAP™ 小珠的结合不影响利用 Alexa Fluor 700 作为荧光团进行的荧光偏振测定。在两种读出技术 (FP 和 FRET) 的比较中,证实了 FRET 是更加灵敏的方法。10% 的磷酸化就已经产生了超过 0.5 的 z' 因子。另外, FRET 测定所需的 IMAP™ 小珠为 FP 相比所需小珠的 1/10 以下。因此,实现了试剂消耗的显著减少,无需小型化的液体处理和读出,其通常为了节约昂贵试剂而进行但却使测定处理变得复杂并从而可能导致不稳定和不可重复的处理。

[0052] 总之,此处所公开的 Fast-TR FRET 激酶 IMAP™ 测定法是稳定的、灵敏的、需要更少的 IMAP™ 小珠并由于定时选通的检测而具有低的背景荧光。

[0053] 如从 FP 实验中所知的,信号受到 ATP 的影响,因为 ATP 占据了小珠上的空的结合位点,阻止了磷酸化肽的结合。与 ATP 相比,EDTA 不影响 FRET 信号。在此处所述的三部分系统的测定组分滴定后,可忽略 ATP 的影响。

[0054] 原则上两种荧光团均可用作底物的标记物。Ru 络合物作为底物标记物的优势在于高的化学稳定性以及 -- 与 Alexa Fluor 700 相比 -- 其可作为 NHS 酯和马来酰亚胺使用,这提高了标记方法的灵活性。

[0055] Alexa Fluor 700 的备选物可以是 Atto 700,其具有相当的激发和发射光谱并可作为 NHS 酯和马来酰亚胺使用。由于其较小的吸收系数 ($\epsilon = 120000 M^{-1} cm^{-1}$),与 Ru-Alexa Fluor 700 ($\epsilon = 192000 M^{-1} cm^{-1}$, $R_0 = 62 \text{\AA}$) 相比, FRET 对 Ru-Atto 700 的 R_0 减少了 ~

5 Å。用 Ru 络合物（或备选地 Alexa Fluor 700 或 Atto 700）标记的带有磷酸基团的磷酸酪氨酸、其它磷酸化的氨基酸或其它小分子可用作“通用的”检测分子。

[0056] 图 1：利用 IMAP™ 小珠进行 Fast-TR FRET 读出的激酶反应的示意图。

[0057] 图 2：分别用 15nM 磷酸化的 Alexa- 肽和 100nM 和 300nM 磷酸化的 Ru- 肽所观察到的 FRET 信号（黑色），IMAP™ 稀释度：1：800。灰色：15nMAlexa- 肽和磷酸化的 Ru- 肽和 IMAP™ 小珠，白色：磷酸化的 Ru- 肽和 IMAP™ 小珠。将小珠在室温下孵育 30 分钟。读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通（gate）100ns，曝光时间 4s。左边部分（a）显示了原始数据，右边部分（b）显示了有效的 FRET 信号。

[0058] 图 3：20nM 磷酸化的 Ru- 肽和 100nM 磷酸化的 Alexa- 肽（IMAP™ 稀释度：1：4000）（白色）以及 15nM 磷酸化的 Alexa- 肽和 100nM 磷酸 -PDHK-Ru（IMAP™ 稀释度：1：800）（黑色）的原始数据。读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 10s（白色）和 4s（黑色）。

[0059] 图 4：利用 20nM 磷酸化的 Alexa- 肽和 100nM 磷酸化的 Ru- 肽使用不同 IMAP™ 稀释液的 FRET 信号，孵育 60 分钟，读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 5s。

[0060] 图 5：ATP 对 FRET 信号的影响。20nM 磷酸化的 Alexa- 肽，100nM 磷酸化的 Ru- 肽，室温下孵育 60 分钟，读出：730(39)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 8s。

[0061] 图 6：EDTA 对 FRET 信号的影响。20nM 磷酸化的 Alexa- 肽，100nM 磷酸化的 Ru- 肽，室温下孵育 60 分钟，读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 8s。

[0062] 图 7：用 20nM（磷酸化的）Alexa- 肽和 100nM 磷酸化的 Ru- 肽对激酶测定法的模拟，IMAP™ 稀释度 1：400（（a）和（b））和 1：4000（（c）和（d））。室温下孵育 60 分钟。读出：FRET：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 10s，FP：激发 655(50)nm，发射 710(40)nm。

[0063] 图 8：激酶测定法的动力学。读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 7s。

[0064] 图 9：ATP 的剂量反应曲线，利用 1 μM Alexa- 肽进行激酶反应。读出中的终浓度是：20nM（磷酸化的）Alexa- 肽，100nM 磷酸化的 Ru- 肽，1：4000 稀释度的 IMAP™ 小珠。读出：730(30)nm，延迟 100ns，选通 100ns，曝光时间 10s。

[0065] 实施例：

[0066] 实施例 1：对由于结合至 IMAP 小珠产生的 FRET 的观察

[0067] 材料：

[0068] • 来自 Biosyntan 的用 Alexa Fluor 700 标记的底物肽（YHGHSMSAPGVSTAC）

[0069] • 来自 Biosyntan 的用 Alexa Fluor 700 和 Ru(batho)₂bpy 标记的磷酸化的底物肽（YHGHS(H₂PO₄)MSAPGVSTAC）

[0070] • 激酶：PDHK2（重组丙酮酸脱氢酶激酶 2，根据标准方法表达）

[0071] • 来自 Molecular Devices 的 IMAP™ 小珠（IMAP™ ExplorerKit（IPP）产品 #R8062）

[0072] • 缓冲液：用 dest. H₂O+0.05% BSA 1：5 稀释的 IMAP™ 结合缓冲液装置：

[0073] • Zeiss 平板：视觉读出器

[0074] • 平板：Costar 384, UV-NBS

[0075] • 激发波长：355nm

[0076] • 发射滤光器 (emission filter) :30(30)nm,615(10)nm

[0077] 在第一个实验中,将 1 : 800 稀释的 IMAP™ 小珠 (对于 FP 测定的建议稀释度为 1 : 400) 分别加入到用 Alexa Fluor 700 标记的 15nM(终浓度)的磷酸化或非磷酸化的底物肽 (此后 (磷酸化的)Alexa- 肽) 以及用 Ru(batho)₂bpy 标记的 100nM 和 300nM(终浓度)的磷酸化底物肽 (此后磷酸化的 Ru- 肽) 的混合物中。然后将反应混合物稀释 50 倍用于利用 IMAP™ 小珠和磷酸化 Ru- 肽进行读出。图 2a 显示了该测定的原始数据。仅有 FRET 信号 (黑色) 高于单独 Ru 络合物的背景信号 (白色)。由于非磷酸化 Alexa- 肽对小珠的非特异结合,没有 FRET (灰色)。背景校正的 FRET 信号 (图 2b) 随磷酸化 Ru- 肽浓度的增加而增加,表明用 100nM 磷酸化的 Ru- 肽和 15 nM 磷酸化的 Alexa- 肽没有使 IMAP™ 小珠饱和。

[0078] 实施例 2 :Alexa- 肽和 Ru- 肽作为底物的比较

[0079] 也利用 20nM 磷酸化的 Ru- 肽和 100nM 磷酸化的 Alexa- 肽、用 1 : 4000 稀释的 IMAP™ 小珠来进行实验。图 3 比较了利用 Ru- 肽 (白色) 或 Alexa- 肽 (黑色) 作为底物的实验的原始数据。因为对两个实验使用了不同的测定参数,仅能对 FRET 信号与 Ru 背景的比率进行直接比较。然而当使用 Alexa 标记的底物时,FRET 信号是 Ru 背景的两倍,当使用 Ru 标记的底物时这个比率上升至 6 倍。在两个实验中,由于 FRET 信号的时间控制的检测 (延迟 100ns),Alexa Fluor 700 均没有增强背景。

[0080] 实施例 3 :IMAP™ 小珠的滴定

[0081] 为确定用于读出的最佳条件,用 20nM 的磷酸化 Alexa- 肽和 100nM 磷酸化 Ru- 肽对不同的 IMAP™ 稀释度进行了测试 (图 4)。当 1 : 2000 稀释度 IMAP™ 小珠与 1 : 400 的稀释度相比时,FRET 信号增强了 3 倍。进一步稀释到 1 : 10000 时,信号又下降到大约与 1 : 400 相同的信号。如前所述,用 1 : 400 稀释度,IMAP™ 小珠是不饱和的。进一步稀释获得了每个 IMAP™ 小珠上更多磷酸化的 Ru- 肽,并导致了 FRET 信号的增强。用大于 1 : 2000 的稀释度时,每个 IMAP™ 小珠的磷酸化 Ru- 肽的数目再次减少。

[0082] 实施例 4 :ATP 和 EDTA 对 FRET 信号的影响

[0083] FP 实验表明 ATP 的加入减小了偏振窗,因为 ATP 结合至小珠上并因而阻止了磷酸化激酶底物的结合。因此预期 ATP 也影响 FRET 信号。通常利用 100 μ M ATP 和 1 μ M 底物进行激酶反应。在加入 IMAP™ 小珠进行 FRET 读出之前,将反应化合物稀释 50 倍,得到 2 μ M 的 ATP 终浓度。图 5 显示了随 ATP 浓度增加 FRET 信号减小。使用 2 μ M ATP,FRET 信号减小了一半。

[0084] ——图 6 表明加入用于终止激酶反应的 EDTA 并不影响 FRET 信号。EDTA 不影响磷酸化底物对 IMAP™ 小珠的结合,也在任何情况下都不影响钌络合物。所测试的 EDTA 浓度 (高达 64 μ M) 对 IMAP™ 小珠也没有可检测得到的影响。更高的浓度可能络合小珠上的 M³⁺,并因而影响磷酸化肽的结合。

[0085] 实施例 5 :激酶测定法

[0086] 为测试 Fast-TR FRET 激酶 IMAP™ 测定法的灵敏性并与已建立的 FPIMAP™ 测定法相比较,进行了激酶测定法的模拟。通过混合非磷酸化的和磷酸化的 Alexa- 肽将 20nM Alexa- 肽的磷酸化水平从 0% 增加至 100%。使用了两种 IMAP 稀释度,即对于 FP 测定的建议稀释度 1 : 400 和用 100% 磷酸化的 Alexa- 肽仍显示良好的 FRET 信号的 1 : 4000 稀释

度(图4)。对于两种 IMAPTM 稀释度, FRET 信号均随磷酸化的增加而增加(图7(a)和(c))。正如预期的, 与 1 : 400 稀释度相比, 1 : 4000 稀释度的 FRET 信号更高, 从 10% 至 100% 磷酸化产生了大于 0.5 的 z' 因子(空心菱形)。对于 FP 测定, 1 : 400 的 IMAPTM 稀释度的检测窗口是 200mP 并且从 20% 至 100% 磷酸化得到了 0.5 或者更好的 z' 因子(图7(b))。1 : 4000 的 IMAPTM 小珠稀释度将窗口剧烈地减小至 70mP(图7(d))并减小了 FP 实验的灵敏性。

[0087] 实施例 6 : 激酶反应的动力学

[0088] 将 1 μ l 的 PDHK2 酶稀释于 11 μ l 激酶缓冲液 (25mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 18.7mM MgCl₂, 0.4mM NH₄Ac, 0.025% Triton X-100, 1.87mM DTT) 中。然后将 3 μ l 溶解于底物缓冲液 (25mM Hepes pH 7.4, 150mM NaCl, 0.01% Triton X-100) 中的 5 μ M Alexa 标记的底物肽的溶液加入到酶中。作为阳性对照, 底物溶液含有 500 μ M ATP, 而对于阴性对照, 反应物中不存在 ATP。这产生了用于 1 μ M 底物和 100 μ M ATP 反应的终浓度。在 30°C 下孵育 2、3、4 和 5 小时后, 通过取走 1 μ l 反应混合物并加入 24 μ l 200nM 磷酸化的 Ru-肽和 25 μ l IMAP 结合缓冲液中的 IMAP 小珠来终止反应, 得到 100nM 的磷酸化 Ru-肽终浓度。使用了三种稀释度的 IMAPTM 小珠, 1 : 2000、1 : 4000 和 1 : 8000。在室温下将小珠孵育 60 分钟。为读出, 最终底物浓度是 20nM (磷酸化的) Alexa-肽, 利用 2 μ M 的最终 ATP 浓度, 将容易检测 FRET 信号(图5)。图8显示了对于阳性和阴性对照, 在三种 IMAP 稀释度(蓝色 1 : 2000、红色 1 : 4000、绿色 1 : 6000) 下的激酶反应动力学。对于所有三种稀释度, 所观察到的 FRET 信号都是足够强的。

[0089] 实施例 7 : 激酶反应的 ATP 依赖性

[0090] ATP 的剂量反应曲线(图9)显示测定中所用的 ATP (100 μ M) 是大大超过 3.6 μ M 的 EC₅₀。注意这些是激酶反应中的浓度, 在读出中它们为 1/50。过量 ATP 使得不能发现 ATP 结合位点的竞争抑制剂, 并确保了没有抑制剂时的最大磷酸化。信号在 32 μ M ATP 下达到最大。在更高的 ATP 浓度下信号又下降了, 这是由于读出混合物中游离的 ATP 结合至 IMAPTM 小珠上并从而降低了 IMAPTM 小珠的结合能力。IMAPTM 小珠的结合能力的问题是众所周知的并需要通过测定试剂的适当滴定在测定中调整。

[0091] 由于增加此处所测的 ATP 浓度至 128 μ M (在读出中 2.56 μ M) 和 256 μ M (在读出中 5.12 μ M) 导致 FRET 信号的降低(从最大信号 (32 μ M, 在读出中 0.64 μ M) 下降到 1/1.6 和 1/1.9) 与 ATP 的滴定是非常相当的(图5), 所述滴定导致这些 ATP 浓度下降到 1/1.6 和 1/2.1。

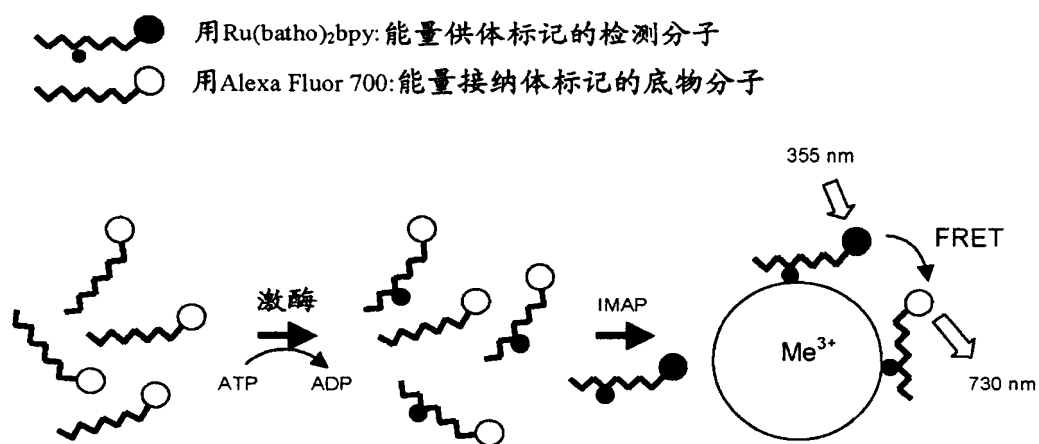


图 1

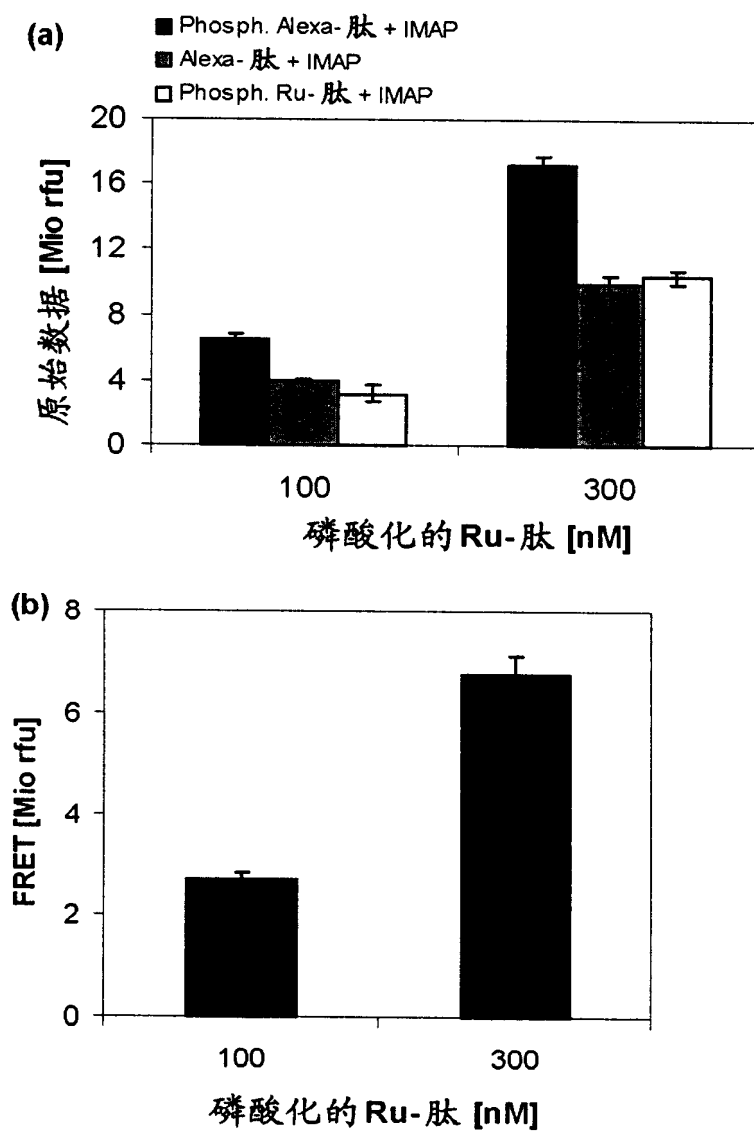


图 2

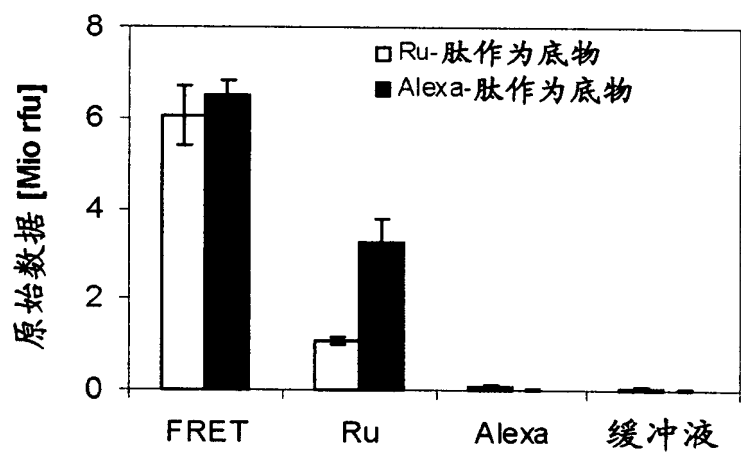


图 3

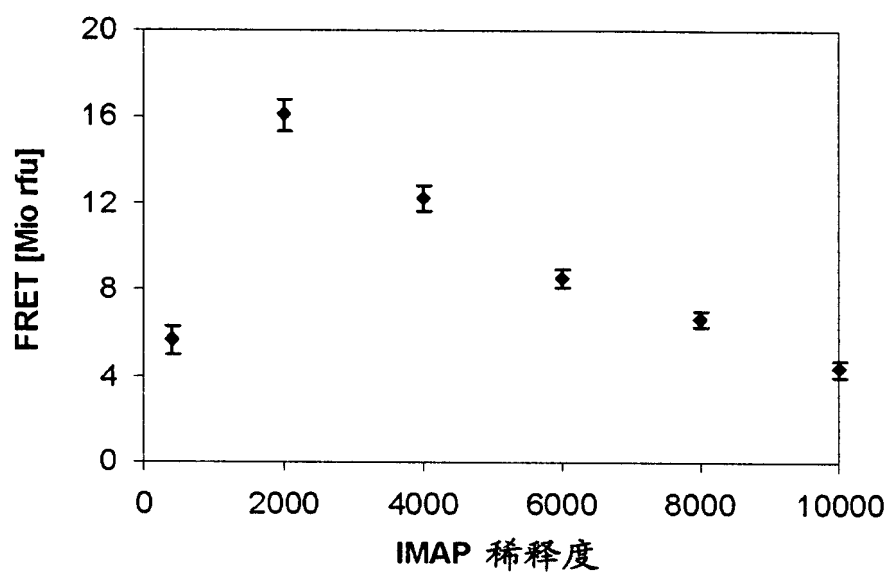


图 4

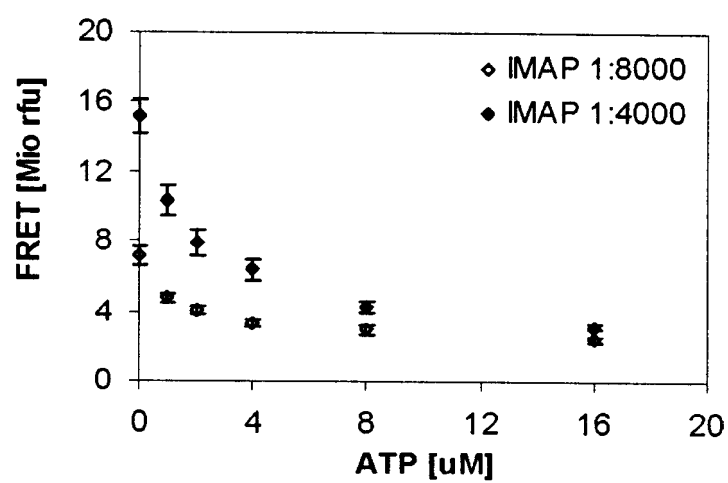


图 5

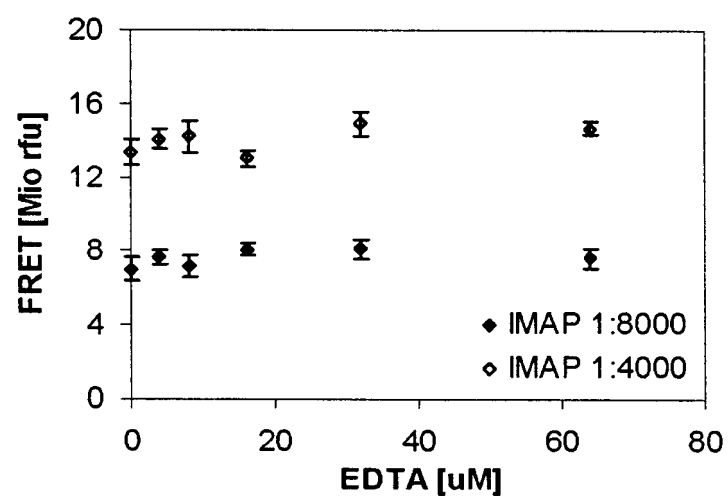


图 6

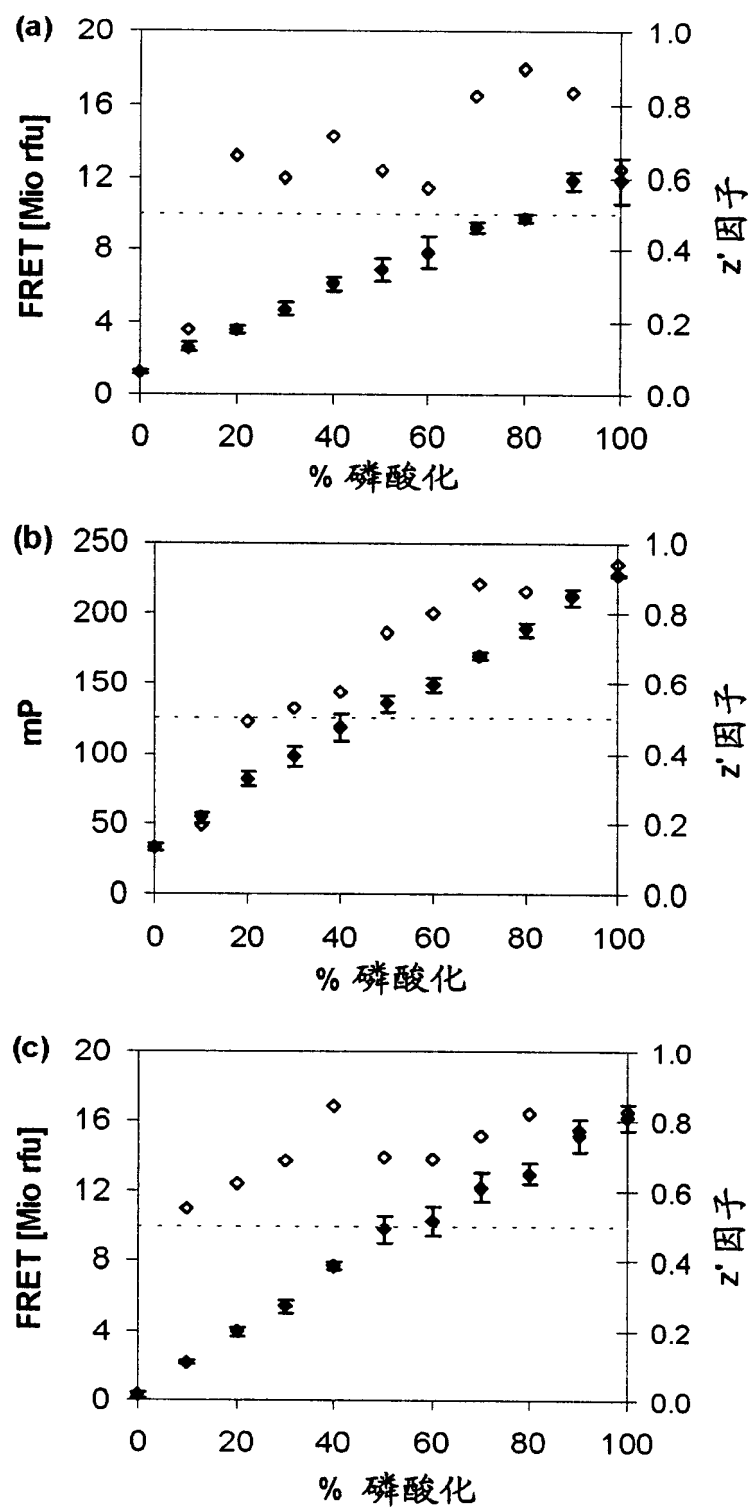


图 7

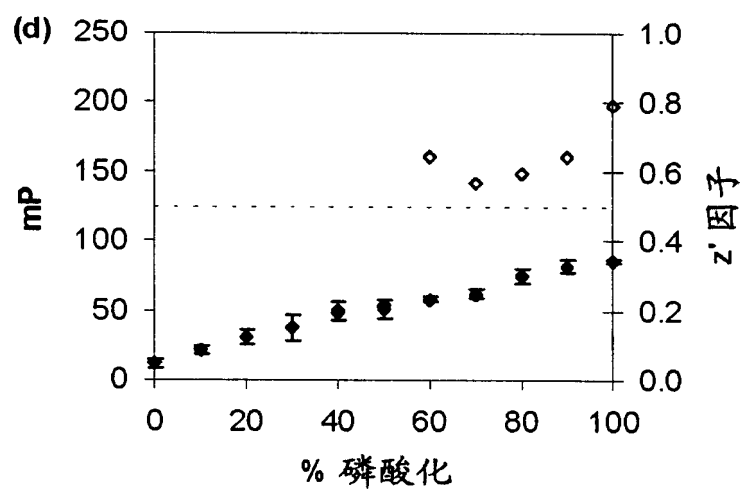


图 7 (续)

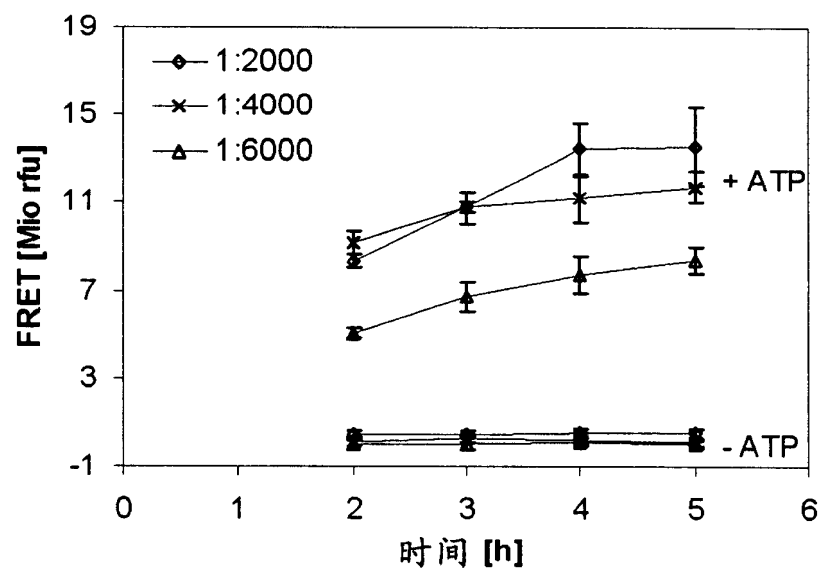


图 8

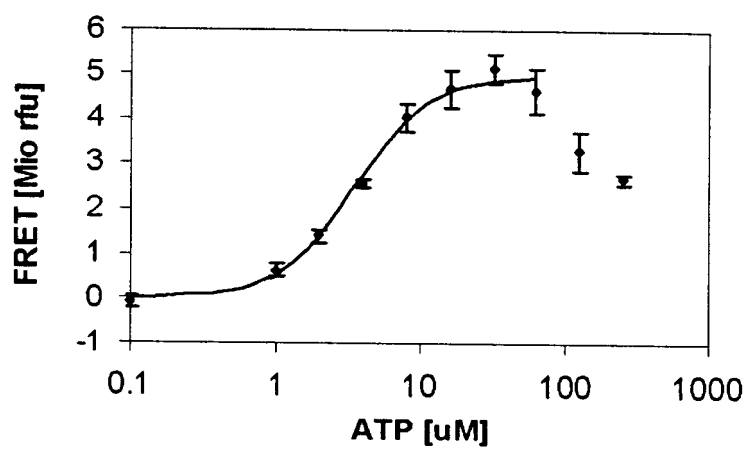


图 9