



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 101512016 B

(45)授权公告日 2016.08.03

(21)申请号 200780032387.7

(22)申请日 2007.06.29

(30)优先权数据

60/806,422 2006.06.30 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2009.03.02

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2007/015089 2007.06.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02008/005310 EN 2008.01.10

(73)专利权人 迪斯卡沃雷克斯公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 皮艾特罗·奇切里 杰里米·亨特

吉恩-迈克尔·A·莱利亚斯

迈克·莫里森 丹尼尔·特莱柏

利萨·M·沃迪科卡

(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 封新琴

(51)Int. Cl.

C12Q 1/68(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

(56)对比文件

WO 02/50259 A2,2002.06.27,权利要求1、14、15.

Seong GH. "Atomic force microscopy identification of transcription factor NFkappaB bound to streptavidin-pin-holding DNA probe." 《Anal Biochem》.2002, 第309卷(第2期),第242页右栏第1-2段、第243页图2.

Seong GH. "Atomic force microscopy identification of transcription factor NFkappaB bound to streptavidin-pin-holding DNA probe." 《Anal Biochem》.2002, 第309卷(第2期),第242页右栏第1-2段、第243页图2.

Nehyba J. "Differences in kappaB DNA-binding properties of v-Rel and c-Rel are the result of oncogenic mutations in three distinct functional regions of the Rel protein." 《Oncogene》.1997,第14卷(第24期),第2895页右栏第2段. (续)

审查员 刘芳

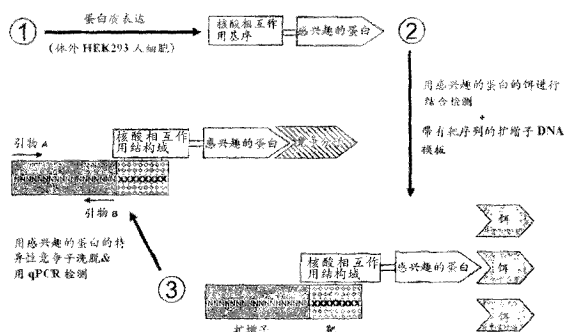
权利要求书5页 说明书24页
序列表5页 附图6页

(54)发明名称

可检测的核酸标签

(57)摘要

本发明提供与感兴趣的蛋白连接,或者能够与感兴趣的蛋白连接的核酸标签.具体的,所述核酸标签是包含报告子功能和蛋白标记功能的寡核苷酸.本发明还提供核酸标签组合物、试剂盒及其使用方法.



CN 101512016 B

[接上页]

(56)对比文件

Kuprash DV. "Homodimer of p50 (NF kappa B1) does not introduce a substantial directed bend into DNA according to three different experimental assays." 《Nucleic Acids Res》.1995,第23卷

(第2期),第427页右栏最后1段.

Escalante CR. "Structure of IRF-1 with bound DNA reveals determinants of interferon regulation." 《Nature》.1998,第391卷(第6662期),第105页图4.

1. 用于鉴别与配体结合的感兴趣的蛋白的方法,包括:

将固定在固体支持物上的配体与融合蛋白接触,包括下述步骤:

(a)提供嵌合融合蛋白,所述嵌合融合蛋白包含(i)含有感兴趣的蛋白的第一结构域,和(ii)包含DNA结合结构域的不同的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;

(b)向所述融合蛋白添加嵌合核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含:

(i)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和

(ii)与所述DNA结合结构域结合的不同的第二核酸序列,

其中,所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源性的,

(c)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和

(d)通过经由扩增所述PCR扩增序列检测步骤(c)中去除的嵌合核酸寡聚物来检测所述核酸寡聚物是否与所述融合蛋白结合;

由此通过检测结合的核酸寡聚物来表明所述感兴趣的蛋白与所述配体结合。

2. 鉴别与感兴趣的蛋白结合的测试化合物的方法,包括:

在存在或缺少测试化合物的条件下,将结合感兴趣的蛋白的固定化参照配体与嵌合融合蛋白接触,包括下述步骤:

(a)提供嵌合融合蛋白,所述融合蛋白包含(i)含有感兴趣的蛋白的第一结构域,和(ii)包含DNA结合结构域的不同的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;

(b)向所述融合蛋白添加嵌合核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与嵌合融合蛋白的DNA结合结构域结合的第一核酸序列和是PCR扩增序列的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源性的;

(c)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和

(d)通过经由扩增所述PCR扩增序列检测步骤(c)中去除的嵌合核酸寡聚物来检测所述核酸寡聚物是否与所述融合蛋白结合;

其中,与缺失测试化合物的条件下相比,在存在测试化合物的条件下,与固定化参照配体结合的融合蛋白量的降低表明了所述测试化合物与所述感兴趣的蛋白结合。

3. 鉴别与具有ATP-结合位点的感兴趣的蛋白结合的测试化合物的方法,其中所述测试化合物是感兴趣的蛋白的非-ATP竞争性结合剂,该方法包括在(i)存在和缺少测试化合物,和(ii)存在和缺少外源性ATP的条件下的下述步骤:

(a)将结合感兴趣的蛋白的固定化参照配体与嵌合融合蛋白接触,所述融合蛋白包括(i)包含感兴趣的蛋白的第一结构域,和(ii)包含DNA结合结构域的不同的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;

(b)向所述融合蛋白添加嵌合核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与融合蛋白的DNA结合结构域结合的第一核酸序列和是PCR扩增序列的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源性的;

(c)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和

(d)通过经由扩增所述PCR扩增序列检测步骤(c)中去除的嵌合核酸寡聚物来检测所述核酸寡聚物是否与所述融合蛋白结合;

其中,(i)与缺失测试化合物和缺少ATP的条件下相比,在存在测试化合物并缺少ATP的条件下,与固定化参照配体结合的融合蛋白量的降低表明了测试化合物与感兴趣的蛋白结合;

和其中(ii)与存在测试化合物并缺少ATP的条件下相比,在存在测试化合物并存在ATP的条件下,与融合蛋白结合的核酸寡聚体的量的没有变化表明了测试化合物是感兴趣的蛋白的非-ATP竞争性结合剂。

4. 权利要求1-3的任一项的方法,其中所述核酸寡聚物包括(a)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和(b)结合DNA结合结构域的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源的。

5. 权利要求4的方法,还包括qPCR扩增与所述融合蛋白结合的所述核酸寡聚物。

6. 权利要求1-3的任一项的方法,其中所述核酸寡聚物是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。

7. 权利要求3的方法,用于同时鉴别与两种或多种感兴趣的蛋白结合的测试化合物,包括:

在存在和缺少测试化合物的条件下,将结合两种或多种感兴趣的蛋白中的每一种的固定化参照配体与两种或多种融合蛋白接触,其中,每种融合蛋白独立地包含(a)只含有两种或多种感兴趣的蛋白中的一种的第一结构域,和(b)含有DNA结合结构域的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;

添加两种或多种核酸寡聚物,其中,两种或多种核酸寡聚物中的每一种都包含这样的第一核酸序列,所述第一核酸序列独立地只与两种或多种融合蛋白中的一种的DNA结合结构域结合,还包含是PCR扩增序列的第二核酸序列;

去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和

检测或者定量两种或多种核酸寡聚物中的每一种;

其中,与缺少测试化合物的条件下相比,在存在测试化合物的条件下,与固定化参照配体结合的两种或多种融合蛋白量的降低,表明测试化合物结合相应的两种或多种感兴趣的蛋白。

8. 权利要求7的方法,其中两种或多种核酸寡聚物中的每一种都独立地包含(a)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和(b)只结合两种或多种融合蛋白中的一种的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源的,并且,其中两种或多种核酸寡聚物的各个第一核酸序列都互不相同。

9. 权利要求8的方法,还包括qPCR扩增所述核酸寡聚物。

10. 权利要求7的方法,其中所述核酸寡聚物是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。

11. 权利要求4的方法,其中所述参照配体固定多孔板上。

12. 权利要求4的方法,其中所述感兴趣的蛋白是跨膜蛋白、跨膜离子通道蛋白、配体门控离子通道蛋白、核激素受体蛋白、胞外信号分子或因子、细胞因子、生长因子、激素、酶、抗体、或单链可变区片段(scFv)。

13. 权利要求4的方法,其中所述感兴趣的蛋白是活性构象的或非活性构象的激酶。

14. 权利要求13的方法,其中所述激酶是人激酶。

15. 权利要求13的方法,其中所述激酶是非受体酪氨酸激酶。
16. 权利要求15的方法,其中所述非受体酪氨酸激酶是ABL、ACK、CSK、MATK、FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC或SYK酪氨酸激酶家族的成员。
17. 权利要求13的方法,其中所述激酶是受体酪氨酸激酶。
18. 权利要求17的方法,其中所述受体酪氨酸激酶是ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK、或SuRTK106酪氨酸激酶家族的成员。
19. 权利要求13的方法,其中所述激酶是丝氨酸-苏氨酸激酶。
20. 权利要求1的方法,其中所述DNA结合结构域是NF- κ B DNA结合结构域、cro抑制子DNA结合结构域、lac抑制子DNA结合结构域、GAL4DNA结合结构域、GCN4 DNA结合结构域、Lex-A DNA结合结构域、Opaque-2DNA结合结构域、或TGA 1a DNA结合结构域。
21. 权利要求4的方法,其中所述参照配体是SB202190、十字胞碱、purvalanol B、SU5402、甲磺酸伊马替尼、SU6668、易瑞沙、或PD-173955。
22. 权利要求3的方法,其中所述融合蛋白是一组融合蛋白中的融合蛋白,其中,组内每一种融合蛋白都包含不同的感兴趣的蛋白,并且其中重复所述方法产生测试化合物对组内每种感兴趣的蛋白的Kd谱。
23. 权利要求4的方法,其中通过在细菌、昆虫、哺乳动物、或植物宿主细胞中表达编码所述融合蛋白的核酸来生产所述融合蛋白。
24. 权利要求23的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。
25. 用于鉴定结合感兴趣的蛋白的测试化合物的试剂盒,包括:
- (a) 嵌合融合蛋白,所述融合蛋白包括(i)包含感兴趣的蛋白的第一结构域,和(ii)包含DNA结合结构域的不同的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;
- (b) 结合感兴趣的蛋白的参照配体;和
- (c) 核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包括与所述融合蛋白的DNA结合结构域结合的第一核酸序列和是PCR扩增序列的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源的。
26. 权利要求25的试剂盒,其中所述核酸寡聚物包括(a)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和(b)结合所述DNA结合结构域的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源的。
27. 权利要求26的试剂盒,还包含qPCR引物对,其与PCR扩增序列杂交。
28. 权利要求25的试剂盒,其中所述核酸寡聚物是放射性标记的、荧光标记的、或生物素化的。
29. 权利要求25-28中任一项的试剂盒,其中所述参照配体结合固体支持物。
30. 权利要求25-28中任一项的试剂盒,其中所述融合蛋白是一组融合蛋白中的融合蛋白,其中,组内每一种融合蛋白包含不同的感兴趣的蛋白。
31. 权利要求25-28中任一项的试剂盒,其中所述感兴趣的蛋白是跨膜蛋白、跨膜离子通道蛋白、配体门控离子通道蛋白、核激素受体蛋白、胞外信号分子或因子、细胞因子、生长因子、激素、酶、抗体或单链可变区片段(scFv)。

32. 权利要求25-28中任一项的试剂盒,其中所述感兴趣的蛋白是活性构象的或非活性构象的激酶。

33. 权利要求32的试剂盒,其中所述激酶是人激酶。

34. 权利要求32的试剂盒,其中所述激酶是非受体酪氨酸激酶。

35. 权利要求34的试剂盒,其中所述非受体酪氨酸激酶是ABL、ACK、CSK、MATK、FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC或SYK酪氨酸激酶家族的成员。

36. 权利要求32的试剂盒,其中所述激酶是受体酪氨酸激酶。

37. 权利要求36的试剂盒,其中所述受体酪氨酸激酶是ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK、或SuRTK106酪氨酸激酶家族的成员。

38. 权利要求32的试剂盒,其中所述激酶是丝氨酸-苏氨酸激酶。

39. 权利要求25-28中任一项的试剂盒,其中所述DNA结合结构域是NF- κ B DNA结合结构域、cro抑制子DNA结合结构域、lac抑制子DNA结合结构域、GAL4DNA结合结构域、GCN4DNA结合结构域、Lex-A DNA结合结构域、Opaque-2DNA结合结构域、或TGA 1a DNA结合结构域。

40. 权利要求25-28的任一项的试剂盒,其中所述参照配体是SB202190、十字胞碱、purvalanol B、SU5402、甲磺酸伊马替尼、SU6668、易瑞沙或PD-173955。

41. 权利要求25-28的任一项的试剂盒,其中通过在细菌、昆虫、哺乳动物或植物宿主细胞中表达编码所述融合蛋白的核酸来生产所述融合蛋白。

42. 权利要求41的试剂盒,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

43. 生产用于鉴定结合感兴趣的蛋白的测试化合物的权利要求25的试剂盒的方法,包括:

克隆和表达嵌合融合蛋白,所述融合蛋白包括(a)包含感兴趣的蛋白的第一结构域,和(b)包含DNA结合结构域的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和所述DNA结合结构域互不相同;和

合成核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与所述融合蛋白的DNA结合结构域结合的第一核酸序列和是PCR扩增序列的第二核酸序列。

44. 权利要求43的方法,还包括将结合感兴趣的蛋白的参照配体固定至固体支持物上。

45. 权利要求43或44的方法,其中所述核酸寡聚物包含(a)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和(b)结合所述DNA结合结构域的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列与所述第二核酸序列是异源的。

46. 权利要求45的方法,还包含合成qPCR引物对,其与所述PCR扩增序列杂交。

47. 权利要求43或44的方法,其中所述核酸寡聚物是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。

48. 权利要求45的方法,其中所述融合蛋白是一组融合蛋白中的融合蛋白,其中,组内每一种融合蛋白包含不同的感兴趣的蛋白。

49. 权利要求45的方法,其中所述感兴趣的蛋白是跨膜蛋白、跨膜离子通道蛋白、配体门控离子通道蛋白、核激素受体蛋白、胞外信号分子或因子、细胞因子、生长因子、激素、酶、抗体、或单链可变区片段(scFv)。

50. 权利要求45的方法,其中所述感兴趣的蛋白是活性构象的或非活性构象的激酶。

51. 权利要求50的方法,其中所述激酶是人激酶。
52. 权利要求50的方法,其中所述激酶是非受体酪氨酸激酶。
53. 权利要求52的方法,其中所述非受体酪氨酸激酶是ABL、ACK、CSK、MATK、FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC或SYK酪氨酸激酶家族的成员。
54. 权利要求50的方法,其中所述激酶是受体酪氨酸激酶。
55. 权利要求54的方法,其中所述受体酪氨酸激酶是ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK、或SuRTK106酪氨酸激酶家族的成员。
56. 权利要求50的方法,其中所述激酶是丝氨酸-苏氨酸激酶。
57. 权利要求43或44的方法,其中所述DNA-结合结构域是NF- κ B DNA结合结构域、cro抑制子DNA结合结构域、lac抑制子DNA结合结构域、GAL4 DNA结合结构域、GCN4 DNA结合结构域、Lex-A DNA结合结构域、Opaque-2 DNA结合结构域、或TGA 1a DNA结合结构域。
58. 权利要求44的方法,其中所述参照配体是SB202190、十字胞碱、purvalanol B、SU5402、甲磺酸伊马替尼、SU6668、易瑞沙、或PD-173955。
59. 权利要求43或44的方法,其中通过在细菌、昆虫、哺乳动物或植物宿主细胞中表达编码所述融合蛋白的核酸来生产所述融合蛋白。
60. 权利要求59的方法,其中所述宿主细胞是哺乳动物宿主细胞。

可检测的核酸标签

发明领域

[0001] 本发明提供的主题涉及与感兴趣的蛋白连接,或者能够与感兴趣的蛋白连接的核酸标签。具体的,本发明提供的主题涉及包含报告子功能和蛋白标记功能的寡核苷酸。本发明还提供核酸标签组合物、试剂盒及其使用方法。

[0002] 发明背景

[0003] 定量和检测蛋白存在的传统技术包括凝胶电泳、Western印迹、基于ELISA的免疫吸附检测和蛋白质微阵列。每种此类方法都是繁琐并且难以适用于高通量用途。这些传统方法还存在检测灵敏度和特异性的限制。本发明提供了核酸标签,以及利用所述核酸标签的新的、高灵敏度和选择性的蛋白质检测方法。

[0004] 发明简述

[0005] 本发明提供了与蛋白连接,或者能够与蛋白连接的核酸标签,其允许高灵敏度地检测蛋白质。在一实施方案中,所述核酸标签是具有报告子功能和蛋白标记功能的寡核苷酸。在一实施方案中,所述寡核苷酸(寡聚物)是包括第一核酸序列和第二核酸序列的寡核苷酸,所述第一核酸序列是PCR探针可识别的PCR扩增序列(扩增子),所述第二核酸序列共价连接、非共价连接、形成复合体或者以其它方式结合(例如:结合或能够结合)感兴趣的蛋白。在某些实施方案中,所述扩增子是随机产生的、非天然存在的PCR扩增序列。在一实施方案中,所述第一核酸序列和/或第二核酸序列不是活生物体内源性的。在其它实施方案中,第一核酸序列和/或第二核酸序列是活生物体内源性的。在某些实施方案中,所述第一核酸序列和所述第二核酸序列是异源的。如本发明使用的,如果两条核酸序列是“异源的”,是指一般不同时发现第一和第二核酸序列。例如,在某些实施方案中,所述第一和第二核酸序列不编码相同的蛋白和/或不是来自相同的生物体。在某些实施方案中,所述第一核酸序列是天然存在的序列,并且所述第二核酸序列也是天然存在的序列,其中第一和第二序列不同。在特定的实施方案中,所述第一核酸序列是这样的核酸序列,例如合成的和/或随机产生的核酸序列,例如非天然存在的序列(例如:区别于任何天然存在的序列的序列)。在某些实施方案中,所述第一核酸序列是这样的核酸序列,例如合成的和/或随机产生的核酸序列,其不是在例如本发明提供的筛选检测所使用的感兴趣的蛋白、融合蛋白、核酸相互作用基序、和/或载体中发现的序列。在一些实施方案中,所述第一核酸序列是这样的核酸序列,例如合成的和/或随机产生的核酸序列,其不存在于人的着丝粒中,例如当核酸标签用于本发明提供的激酶检测中(或者用于给定检测中的任何其它核苷酸序列)。这些实施方案保证了,例如,用于后续PCR扩增的引物不与第二DNA序列和/或任何其它(例如天然存在的)DNA序列,如那些在给定检测中使用的序列发生交叉反应或错配。在某些实施方案中,每种PCR模板都各不相同,因而,例如当在本发明提供的多重检测中使用,模板间不存在引物交叉反应的机会。

[0006] 在另一实施方案中,所述寡核苷酸包括第一核酸序列和第二核酸序列,所述第一核酸序列包含PCR扩增序列,所述第二核酸序列包含作为靶序列结合核酸相互作用基序的核酸序列。在一实例中,靶序列是天然存在的或者合成的DNA结合蛋白的识别序列。在特定

的实施方案中,包含PCR扩增序列的第一核酸序列与包含核酸相互作用基序的第二核酸序列是分离且不相同的。在此类实施方案中,所述核酸标签能够结合或者连接感兴趣的蛋白,所述感兴趣的蛋白具有特异识别核酸标签的DNA结合组件。然后,可以利用如定量PCR(qPCR)检测和/或定量核酸标签。通过qPCR的核酸标签检测不仅具有作为可靠的定量检测方法的优点,而且还具有高灵敏和高选择性检测方法的优点。由于qPCR检测方法的高灵敏的性质,该方法能够检测极少量的靶蛋白,并降低对稀少和昂贵检测组分,例如重组蛋白的需求。由于qPCR检测方法的高特异性的性质,qPCR还能够检测复杂的异源混合物中的特定DNA序列,并且避免需要一般处理蛋白质样品的任何类型的纯化步骤来改善或增强蛋白质检测。

[0007] 还可以标记本发明提供的核酸标签,例如放射性标记、荧光标记或生物素标记。在某些实施方案中,本发明提供了与核酸相互作用基序结合的核酸寡聚物,其中所述核酸寡聚物包括(a)放射性标记的、荧光标记的或生物素化的第一核酸序列,和(b)结合核酸相互作用基序的第二核酸序列。在其它实施方案中,本发明提供了核酸寡聚物,其包含与核酸相互作用基序结合的核酸序列,其中,所述寡聚物是放射性标记的、荧光标记的或生物素化的。被标记的标签(labeled tag),例如放射性标记或荧光标记的标签可用于,例如检测感兴趣的蛋白在细胞成像或可视化检测中的存在或分布。所述被标记的标签,例如荧光标记的标签还可用于分选检测,从而将一种或多种感兴趣的蛋白分离到单个样品中。所述被标记的标签,例如生物素化的标签还允许例如通过免疫学方法检测感兴趣的蛋白或者通过亲和色谱纯化被标记的感兴趣的蛋白。在某些实施方案中,当标记核酸标签时,所述核酸标签还可以含有或不含PR扩增序列。

[0008] 本发明还提供感兴趣的蛋白,其与核酸标签连接或以其它形式复合,或者能够与核酸标签连接或以其它形式复合,因此,当研究或监控例如它的功能、活性或存在时,所述蛋白质是可检测的。在一实例中,所述感兴趣的蛋白是与核酸相互作用基序融合的嵌合蛋白。在一实例中,所述核酸相互作用基序是DNA结合结构域。此类感兴趣的蛋白可通过具有能被DNA结合结构域识别的靶序列的核酸来标记。嵌合蛋白可以通过随机突变产生的表达核苷酸序列、含有系统性合成序列的表达核苷酸序列、表达cDNA,或者两种或多种这些可能性的组合。可以克隆感兴趣的蛋白,然后在合适的宿主细胞,例如细菌、昆虫、哺乳动物或植物宿主细胞中表达。在某些实施方案中,所述宿主细胞赋予所述蛋白,对其三维结构和功能重要的任何翻译后修饰的益处(例如:人类宿主细胞中感兴趣的蛋白的糖基化或异戊烯化作用)。

[0009] 本发明还提供了通过利用核酸标签来标记和检测蛋白,来检测感兴趣的蛋白和第二分子结合的方法。在某些实施方案中,所述方法包括用其结合感兴趣的蛋白的能力来筛选测试化合物的文库,其中通过检测核酸标签来鉴别结合。在其它实施方案中,所述方法包括竞争结合检测来筛选和确定一种或多种测试化合物的身份,所述化合物在存在已知与感兴趣的蛋白结合的固定化的参照配体(或“饵”)的条件下竞争结合感兴趣的蛋白。此类竞争性结合检测允许鉴别除已知的参照配体以外的(或优于它的),结合感兴趣的蛋白的替代化合物。

[0010] 本发明还提供了方法,该方法包括针对一组感兴趣的蛋白筛选测试化合物从而筛选该测试化合物结合组内一种或多种蛋白能力和/或以产生该化合物的结合特异性谱。当

对一组蛋白实施筛选时,在一些实施方案中,以多重模式进行筛选,例如同时检测测试化合物对含有多个感兴趣的蛋白的混合样品的活性,和/或在检测步骤中利用多个核酸标签,其中每个标签对特定感兴趣的蛋白都是唯一的。

[0011] 本发明还提供了包括一种或多种下列成分的试剂盒:可检测的核酸标签、能够被核酸标签“标记的”蛋白、与感兴趣的蛋白结合的固定化的参照配体,和能够起始核酸标签扩增的PCR引物对。此类试剂盒可用于鉴定结合固定化参照配体的分子和/或与固定化配体竞争结合感兴趣的蛋白的分子。可选的,所述试剂盒可作为诊断工具用于检测给定标本中结合固定化参照配体的分子的存在。

附图说明

[0012] 附图1是描述了使用含有可PCR-扩增的DNA序列的核酸标签的竞争结合检测的示意图。

[0013] 附图2提供了具有经过计算的 K_d 的结合曲线,所述 K_d 是关于p38与已知激酶抑制剂BIRB-796、SB202190和VX-745的相互作用的。SB202190作为固定化参照配体使用,使用的核酸标签是包含GAL4靶DNA序列和可PCR-扩增的DNA序列的融合体。

[0014] 附图3提供了具有经过计算的 K_d 的结合曲线,所述 K_d 是关于p38与已知激酶抑制剂BIRB-796、SB202190和VX-745的相互作用的。SB202190作为固定化的饵使用,并且使用的核酸标签是包含NF- κ B靶DNA序列和可PCR-扩增的DNA序列的融合体。

[0015] 附图4提供了具有经过计算的 K_d 的结合曲线,所述 K_d 是关于BRAF与四种内部所有化合物的相互作用的。三种化合物A、B和C是激酶抑制剂,并且一种不是激酶抑制剂的化合物作为阴性对照。使用包含GAL4靶DNA序列和可PCR-扩增的DNA序列的核酸标签来检测相互作用。

[0016] 附图5提供了具有经过计算的 K_d 的结合曲线,所述 K_d 是关于BRAF与四种内部所有化合物的相互作用的。三种化合物A、B和C是激酶抑制剂,并且一种不是激酶抑制剂的化合物作为阴性对照。使用包含NF- κ B靶DNA序列和可PCR-扩增的DNA序列的核酸标签来检测相互作用。

[0017] 附图6A-6B显示了具有经过计算的 K_d 的结合曲线,所述 K_d 是关于两种形式的Ab1(活性和非活性的)与(A)VX-680或(B)伊马替尼之间的相互作用的。使用包含NF- κ B靶DNA序列和可PCR-扩增的DNA序列的核酸标签来检测相互作用。

[0018] 发明详述

[0019] 本发明提供的下列实施方案是示例性的,不作为限制。本发明公开的方法具有应用范围,所有应用均基于检测、定量或分离用可检测的核酸标记的感兴趣的蛋白的能力。本发明提供的组合物和方法可用于在体外和/或体内标记蛋白。

[0020] 在某些实施方案中,本发明提供了结合核酸相互作用基序的核酸寡聚物(标签),其中所述核酸寡聚物包含(a)是PCR扩增序列的第一核酸序列,和(b)结合核酸相互作用基序的第二核酸序列,其中所述第一核酸序列对于所述第二核酸序列是异源的。

[0021] 在一实施方案中,核酸寡聚物的长度介于约50和约100、约50和约200、约50和约300、约50和约400、约50和约500、约100和约200、约100和约300、约100和约400、约100和约500、约200和约300、约200和约400、约200和约500、约300和约400、约300和约500、或者约

400和约500个核苷酸长度之间。

[0022] 如本发明使用的,术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的20%以内,优选10%以内,更优选5%(或1%或更少)以内。

[0023] 在一些实施方案中,所述核酸标签具有报告子功能和蛋白标记功能。如本发明使用的,涉及核酸标签的“报告子”功能是可视化或检测或定量的能力。在某些实施方案中,所述核酸标签的报告子功能来自核酸标签的放射性标记、荧光标记或生物素化。如本发明使用的,“核酸标签”是结合感兴趣的蛋白,或能够结合感兴趣的蛋白的多核苷酸如寡聚物,所述蛋白例如含有异源性多核苷酸结合结构域(本发明中也称为多核苷酸相互作用基序),例如DNA结合结构域(如:NF- κ B)的融合蛋白。所述核酸标签可以是单链或双链DNA、单链或双链RNA、DNA-RNA杂合体、RNA-RNA杂合体,或其天然的或合成的衍生物、类似物或其片段。在某些实施方案中,所述核酸标签是DNA,并且可以将报告子功能标签导入DNA,例如通过任何标准的酶促反应,如缺口平移(nick translation),或通过 ^{32}P 、 ^{125}I 或生物素标记的脱氧核苷酸三磷酸(dNTP)末端标记,或者标记可以作为嵌合剂导入。有许多荧光基团是可商购的并且可用于标记核酸标签。可用于标记核酸标签的荧光标记的一些实例是异硫氰酸荧光素、若丹明和香豆素,及其商业衍生物例如Texas Red®和Alexa Fluor®。

[0024] 在某些实施方案中,所述核酸标签与可检测的蛋白或多肽复合、共价连接或非共价连接,例如通过共价键。可通过任何方法生产核酸-蛋白融合体,例如通过Roberts和Szostak(美国专利号6,258,558和6,261,804;W098/31700;Roberts&Szostak(1997) Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997)94:12297-12302)的方法,利用肽受体,如嘌呤霉素作为共价连接剂。简而言之,此类示例性方法包括体外或原位的转录/翻译方法,产生与其自身的mRNA的3'末端共价连接的蛋白,即RNA-蛋白融合体。其可通过合成以及体外或原位翻译在其3'末端添加了肽受体的mRNA分子来实现。在特定的实施方案中,所述肽受体是嘌呤霉素,其是添加到生长的肽链C-末端并终止翻译的核苷类似物。在一实施方案中,在信使末端和肽受体之间包括DNA序列,其设计用于触发核糖体暂停于开放阅读框的末端,从而在肽酰-tRNA键水解前,为肽受体(例如嘌呤霉素)提供额外的时间来接受新生肽链。

[0025] 如本发明使用的,“肽受体”是通过核糖体肽酰转移酶功能的催化活性,能够被添加到生长的蛋白链C-末端的任何分子。在某些实施方案中,此类分子含有(i)核苷酸或核苷酸-样部分(例如:腺苷或腺苷类似物(在N-6氨基位置的二甲基化是可接受的)),(ii)氨基酸或氨基酸-样部分(例如:20种D-或L-氨基酸的任意一种,或其任意的氨基酸类似物(例如O-甲基酪氨酸或Ellman等人,(1991)Meth.Enzymol.202:301中描述的任何氨基酸类似物)),和(iii)两者之间的键(例如:在3'或2'位置的酯键、酰胺键或酮键);优选地,该键不会显著干扰天然核糖核苷酸构象中的环的折叠。肽受体还可拥有亲核试剂,其可以是(但不限于)氨基、羟基或巯基。此外,肽受体可以由核苷酸模拟物、氨基酸模拟物、或组合核苷酸-氨基酸结构的模拟物构成。位于蛋白质编码序列“3'末端”的肽受体是指位于蛋白质编码序列的最后一个密码子后的肽受体分子。该术语包括但不限于精确位于蛋白质编码序列3'末端的肽受体分子,以及通过位于中间的编码或非编码序列(例如,相应于中止位点的序列)与最后一个密码子分离的肽受体分子。该术语还包括这样的构建体,其中编码或非编码序列位于肽受体分子之后(即,位于其3')。此外,该术语涵盖但不限于(直接地或通过位于中间的核酸序列间接地)与蛋白质编码序列共价结合的肽受体分子,以及通过一些非共价方

式与蛋白质编码序列连接的分子,例如,通过利用第二核酸序列的杂交,所述第二核酸序列结合在蛋白质编码序列3'末端或邻近处,且序列本身结合肽受体分子。

[0026] 除了共价结合的RNA-蛋白融合体外,任何其它唯一的、可PCR-扩增的核酸(例如:RNA、DNA、PNA或任何其它核酸,所述核酸包括两个或多个共价结合的、天然存在或修饰的核糖核苷酸或脱氧核糖核苷酸)还可以共价或非共价偶联至可检测的蛋白或多肽。融合体的蛋白部分一般由天然存在的氨基酸残基组成,但也可以包括通过肽或肽键连接的氨基酸类似物或衍生物。

[0027] 在其它实施方案中,所述核酸标签的报告子功能是可可通过PCR扩增的核酸序列(在本发明中也被称为“扩增子”)。可扩增的序列以序列特异性的方式与PCR引物杂交或能够与之杂交。在某些实施方案中,所述核酸标签包含多种扩增子,例如二、三、四、五、六、七、八、九、十或更多个扩增子。在一些实施方案中,多个扩增子是单个扩增子的串联重复。在某些实施方案中,所述扩增子是可通过定量PCR扩增的,其允许对此类核酸标签标记的蛋白进行定量。在特定的扩增方法中,扩增PCR序列包括在标准PCR反应混合物(一般为具有终浓度为10mM Tris-HCl(25°C下pH8.3)、1-4mM MgCl₂、0.1-1mM dNTP的混合物)中混合含有PCR扩增模板的核酸、PCR引物和qPCR探针,并首先在热启动(Hot Start)条件下(例如:加热到95°C,5分钟)处理样品从而最小化非特异性退火或错配,然后进行变性步骤(例如:95°C,45秒),然后进行退火步骤(55°C,1分钟),然后进行延伸步骤(72°C,1分钟),经过多达40轮连续的变性、退火和延伸步骤后,完成qPCR信号的扩增。

[0028] 如本发明使用的,关于核酸标签的“蛋白标记”功能是靶向并与核酸相互作用基序结合、复合或以其它方式(如共价的或非共价的)连接的能力,例如融合蛋白,其包含(a)感兴趣的蛋白(例如:激酶)和(b)异源性多核苷酸相互作用基序,例如包含核酸识别序列的DNA结合蛋白(例如:NF- κ B)。融合蛋白的核酸相互作用基序结合本发明中其他部分描述的核酸寡聚物。

[0029] 在一实施方案中,所述靶DNA序列是可被转录因子的DNA结合结构域识别的转录因子结合位点。例如,核酸标签可以含有被转录因子如NF- κ B、cro抑制子、lac抑制子、GAL4、GCN4、Lex-A、Opaque-2和TGA1a的DNA结合结构域识别的靶DNA序列。在一实施方案中,所述转录因子结合位点是天然存在的或野生型的序列。在另一实施方案中,所述转录因子结合位点是突变序列。在另一实施方案中,所述转录因子结合位点的特征可以是包括野生型序列和任选的突变序列在内的共有序列。在另一实施方案中,所述转录因子结合位点是能够与天然存在的、修饰的或合成的DNA结合蛋白形成复合体的合成序列或遗传改造的序列。在另一实施方案中,所述靶DNA序列的特征是具有一般被蛋白二聚体识别的回文序列。Gal4或LexA的靶序列是两个此类实例。在另一实施方案中,所述转录因子结合位点的特征是具有富含GC的区域,例如转录因子Sp1的靶位点。在另一实施方案中,所述转录因子结合位点的特征是与相连的DNA结合蛋白一起,具有超过1、2、3、4、5或6个小时的DNA-蛋白复合体的半衰期。

[0030] 本发明提供的包括感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序(例如DNA结合蛋白)的融合蛋白可通过本发明提供的核酸寡聚体来“标记”,其通过例如DNA-蛋白复合体形成。在某些实施方案中,所述融合蛋白包括从相同生物体来源的核酸相互作用基序和感兴趣的蛋白,例如人。在一特定的实施方案中,所述核酸标签包含与可被DNA-结合蛋白(例如:NF- κ B、cro

抑制子、lac抑制子、GAL4、GCN4、Lex-A、Opaque-2和TGA 1a)特异性识别的靶DNA序列连接的扩增子。在另一实施方案中,所述核酸标签包含与转录因子的DNA结合结构域同源的DNA序列相连的扩增子。此类DNA结合结构域的同源DNA序列是本领域已知的,表1中提供了示例性的序列。

[0031] 在其它实施方案中,核酸标签的蛋白标记功能是被DNA代谢酶(例如:甲基转移酶、烷基转移酶和/或糖苷酶)识别的靶DNA序列。这些酶可以和化学修饰的DNA碱基相互作用,并在蛋白的氨基酸和核酸标签的DNA序列之间产生共价键。例如,如果蛋白融合体含有O⁶-烷基鸟嘌呤-DNA烷基转移酶(AGT)的功能片段,就可以使用烷基转移酶的功能将核酸标签连接到AGT融合蛋白的O⁶-烷基鸟嘌呤或O⁶-苄基鸟嘌呤上,在蛋白和核酸标签之间产生共价键,以形成核酸-蛋白复合体(参见例如:PCT申请号W002/083937)。可以使用OGT来标记,以及随后任选的操纵和/或检测系统中的感兴趣的蛋白,在所述系统中蛋白和AGT的融合体接触标记的底物,由此AGT将标记从底物转移到AGT融合体上,从而允许利用转移的标记的作用来操纵和/或检测被标记的AGT-蛋白融合体。本领域技术人员可以根据融合蛋白的目的应用来选择底物的标记部分。标记的非排他性实例包括:(1)光谱探针例如荧光基团、生色团、磁性探针或显影剂(contrast reagent);(2)放射活性标记的分子;(3)作为特异性结合对的一部分的分子,其能够特异地结合对应部分。此类特异性结合对是本领域公知的,包括例如:可以结合亲和素或链霉亲和素的生物素;(4)与其它生物分子疑似相互作用的分子;(5)与其它生物分子疑似相互作用的分子的文库;(6)本领域技术人员已知能够与其它生物分子交联的分子(参见例如:Nadeau等人,(2002)于Protein-Protein interactions:a molecular cloning manual;Ed.E Golemis,Cold Spring Harbor Laboratory Press;第75-92页中);(7)在暴露于H₂O₂和抗坏血酸盐条件下,能够产生羟基自由基的分子,例如钒系金属-螯合物(参见例如:Hori等人,(2002)于Protein-Protein interactions:a molecular cloning manual;Ed.E Golemis,Cold Spring Harbor Laboratory Press;第288-311页中);(8)用光照射能够产生活性自由基的分子,例如孔雀绿(参见例如:Jay等人,(1999) Biochim.Biophys.Acta M39-48);(9)与固体支持物共价连接的分子,其中所述支持物可以是载玻片、微滴度板或本领域技术人员普遍已知的任何多聚物;(10)能够与其互补链进行碱基配对的核酸或其衍生物;(11)具有膜-插入(membrane-inserting)性质的脂类或其它疏水分子;(12)具有理想的酶、化学或物理性质的生物分子;或(13)具有上述性质组合的任意分子。

[0032] 如本发明使用的,“感兴趣的蛋白”可以是感兴趣的,例如用于研究或者表征的可想到的任何多肽或蛋白。在一些实施方案中,所述感兴趣的蛋白是转移酶、氧化还原酶、水解酶、连接酶、异构酶或裂解酶。在一实施方案中,所述感兴趣的蛋白是人的多肽或蛋白。在某些实施方案中,所述感兴趣的蛋白是具有转移酶活性的转移酶,例如酰基转移酶、糖基转移酶、酰胺转移酶或硫基转移酶。在另一实施方案中,所述感兴趣的蛋白是水解酶、肽酶、蛋白酶或磷酸酶。

[0033] 在某些实施方案中,所述激酶是脂激酶,例如P13K家族的脂激酶(如mTOR)。在特定的实施方案中,所述感兴趣的蛋白是蛋白激酶(参见例如:Manning(2002)Science 298:1912)。在特定的实施方案中,所述感兴趣的蛋白是酪氨酸激酶、或丝氨酸/苏氨酸激酶。在某些实施方案中,所述感兴趣的蛋白是人的非受体酪氨酸激酶,例如:ABL、ACK、CSK、MATK、

FAK、PYK2、FES、FRK、JAK、SRC-A、SRC-B、TEC和/或SYK家族成员的非受体酪氨酸激酶。在其它实施方案中,所述感兴趣的蛋白是人的受体酪氨酸激酶,例如:ALK、AXL、DDR、EGFR、EPH、FGFR、INSR、MET、MUSK、PDGFR、PTK7、RET、ROR、ROS、RYK、TIE、TRK、VEGFR、AATYK和/或SuRTK 106家族成员的受体酪氨酸激酶。

[0034] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白是跨膜蛋白,例如7-跨膜螺旋蛋白,如G蛋白偶联受体(GPCR)。感兴趣的蛋白还可以是跨膜离子通道蛋白,在某些实施方案中,是配体门控离子通道蛋白。在其它实施方案中,感兴趣的蛋白是核激素受体蛋白,例如经典的甾醇类激素受体和/或核激素受体的孤儿型中的受体。

[0035] 在其它实施方案中,感兴趣的蛋白是胞外的信号分子或因子,例如细胞因子(如:干扰素和/或白介素)、生长因子、和/或激素(如:胰岛素、胰高血糖素、或前列腺素)。在某些实施方案中,感兴趣的蛋白是胞内信号级联涉及的蛋白,例如磷脂酰肌醇信号、cAMP或cGMP产生所涉及的酶或辅助因子。

[0036] 在一些实施方案中,感兴趣的蛋白是抗体、单链(small chain)可变区基因片段(scFv)、抗原或表位。

[0037] 在一些实施方案中,所述感兴趣的蛋白可以由随机突变产生的核苷酸序列的表达产物、含有系统性合成序列的核苷酸序列的表达产物、或者可以是表达的cDNA。在一实例中,所研究或表征的感兴趣的蛋白来自人的cDNA文库(即,人蛋白)。

[0038] 在某些实施方案中,所述感兴趣的蛋白是感兴趣的蛋白和异源性DNA结合蛋白的嵌合融合体。在此类嵌合融合体中,代表各一半嵌合体的至少两段基因序列可以融合到读码框内,克隆到合适的载体中并在选定的宿主细胞内表达。在某些实施方案中,所述感兴趣的蛋白在核苷酸-结合结构域(例如:DNA结合蛋白)的5'。在其它实施方案中,所述感兴趣的蛋白在核苷酸-结合结构域(例如:DNA结合蛋白)的3'。在特定的实施方案中,所述感兴趣的蛋白和/或核苷酸-结合结构域(例如:DNA结合蛋白)分别保留了野生型蛋白的活性。所述感兴趣的蛋白包括嵌合的融合体,其可以在任何宿主,包括细菌、昆虫、哺乳动物或植物宿主细胞种类中表达。当在合适的真核宿主细胞中表达感兴趣的蛋白时,它可以表现出在天然蛋白中存在的翻译后真核修饰作用,并因此预期具有天然蛋白的结构和功能。可选的,所述感兴趣的蛋白可以用其它方式合成连接至核苷酸-结合结构域(例如:利用多肽接头)。

[0039] 本发明还提供了融合蛋白的文库,包括本发明提供的多种融合蛋白,其中至少两种或多种融合蛋白彼此不同。在某些实施方案中,本发明提供了寡聚物文库,包括多种本发明提供的寡聚物,其中至少两种或多种寡聚物彼此不同。本发明还提供了编码本发明提供的融合蛋白的核酸,以及包含本发明提供的融合蛋白的编码核酸的载体。此外,本发明提供了包含载体的宿主细胞,所述载体包含了编码本发明提供的融合蛋白的核酸。在某些实施方案中,所述宿主细胞是细菌、昆虫、哺乳动物或植物宿主细胞。

[0040] 在某些实施方案中,本发明还提供了研究感兴趣的蛋白的活性的功能检测。在某些实施方案中,利用核酸标签评估感兴趣的蛋白的活性,例如通过检测核酸标签的存在。可以使用此类功能检测研究测试化合物作为抑制剂、激动剂、拮抗剂或更普遍地作为蛋白活性的调节剂的作用。

[0041] 所述感兴趣的蛋白可以是嵌合体的一部分,所述嵌合体包括(a)核酸相互作用基序和(b)研究或表征的蛋白(是真正的“感兴趣的蛋白”的蛋白部分)。在本发明的一实施方

案中,所述核酸识别基序可以是DNA结合蛋白。表1中显示了示例性基序。DNA结合蛋白可以包括转录因子的DNA结合结构域,转录因子包括转录激活子和抑制子。合适的DNA结合结构域的实例包括NF-κB(真核)、cro抑制子(λ噬菌体)、lac抑制子(酵母)、GAL4(酵母)、GCN4(酵母)、Lex-A(大肠杆菌)、Opaque-2(玉米)和TGA 1a(烟草)。DNA结合结构域的适用性还可取决于特定的DNA结合结构域与其靶序列的结合时间(association time)。例如,认为NF-κB与其靶DNA序列形成强结合,具有超过4小时的解离半衰期(参见Speight等人,(2001) Chem.Biol.8:951-965)。合适的DNA结合结构域还包括合成的DNA结合结构域,所述合成的DNA结合结构域通过组合天然存在的和/或改造的DNA结合基序的不同片段来构建,例如:合成的锌指、亮氨酸拉链、翼状螺旋、螺旋-环-螺旋、同源结构域和POU结构域。可以通过DNA结合结构域识别核酸标签的特定结合识别序列来“标记”嵌合蛋白。在本发明的另一实施方案中,所述核酸识别基序可以是上文已提及的DNA代谢酶的全长、部分长度或功能性片段,例如:DNA连接酶、DNA修复酶、限制性内切酶或DNA甲基转移酶。

[0042] 表1:示例性核酸标签、结合结构域和结合结构域识别基序序列

<p>NF-κB 结合的核酸标签</p>	<p>TTGTGAATTGCTGACCGTAGATGTCAACTTTGACCATCAGACAACGTT TCTCCATTCCAATTATGCGAGAATCCTAGGGAATTCCTAGATCGCATG (SEQ ID NO:1); 扩增子序列是位于下划线区域前的序列,NF-κB 识别序列是下划线区域。</p> <p>CGGCGTAAAAACGAATACCATGTCTCTCATCGCTCGACTCATTCTTTC CAAAATTTGCGGAACGAGGGGAATTCCTAGATCGCATG (SEQ ID NO:2); 扩增子序列是位于下划线区域前的序列,NF-κB 识别序 列是下划线区域。</p> <p>AAACAATGAGACACCAGGGATTAGATATCAGTACAATGTGCTTCCACA AAGGATCACCAGCAATATTCCAAAGGGGAATTCCTAGATCGCATG (SEQ ID NO:3); 扩增子序列是位于下划线区域前的序列,NF-κB 识别序列是下划线区域。</p>
<p>[0043] GAL4 结合的核酸标签</p>	<p>CATGCGACAGCGGAGTTACGTCCAGAAGGACAACATCTTTGACATCG CCTCTTGAAATTGCTGACCAAGGGCTACTGCCGGAGTACTGTCCCTCC GCTAGATCGCATG (SEQ ID NO:4); 扩增子序列是位于下划线区域前 的序列, GAL4 识别序列是下划线区域。</p>
<p>NF-κB DNA 结合结构域</p>	<p>MAGPYLQILEQPKQRGFRFRYVCEGPHGGLPGASSEKNKKSYPQVKI CNYVGPAPKIVVQLVTNGKNIHLHAHSLVGKHCEDGICTVTAGPKDMVVG FANLGIHVTKKVFETLEARMTEACIRGYNPGLLVHPDLAYLQAEAGGGD RQLGDREKELIRQAALQQTKEMDLSVRLMFTAFLPDSTGSTRRLPEV VSDAIYDSKAPNASNLKIVRMDRTAGCVTGGEIYLLCDKVKQDDIIRFY EEEEENGWVEGFGDFSPDTHRQFAIFKTPKYKDINITKPASVQVQLRR KSDLETSEPKPFLYYPEIKDKEEVD (SEQ ID NO:5)</p>
<p>GAL4 DNA 结合结构域</p>	<p>MKLLSSIEQACDICRLKCLKSKEKPKCAKCLKNNWECRYSPKTKRSPLT RAHLTEVESRLERLEQLFLIFPRELDMLKMDSLQDIKALLTGLFVQDN VNKDAVTDRLASVETDMPLTLRQHRISATSSSESSNKGQRQLTVS (SEQ ID NO:6)</p>
<p>NF-κB 识别序列</p>	<p>GGGAATTCCT (SEQ ID NO:7)</p>
<p>NF-κB 识别序列</p>	<p>GGGAAATTCCT (SEQ ID NO:8)</p>

[0044]

NF-κB识别序列	GGGACTTTCC (SEQ ID NO: 9)
NF-κB共有序列	GGGRNNYYCC (SEQ ID NO: 10) (R= 嘌呤, Y= 嘧啶) (N= 任何核苷酸)
Gal4识别序列	CGGAGTACTGTCCTCCG (SEQ ID NO: 11)
Gal4共有序列	CGGNNNNNNNNNNNCCG (SEQ ID NO: 12) (N= 任何核苷酸)
RclA/c-Rel共有序列	HGGARNYYCC (SEQ ID NO: 13) (H=A,C或T; R= 嘌呤; Y= 嘧啶)
Cro repressor识别序列	TCTATCACCGCGGGTGATAAA (SEQ ID NO: 14)
Lac repressor识别序列	GAATTGTGAGCGCTCACAATT (SEQ ID NO: 15)
GCN4识别序列	AGTGACTCAT (SEQ ID NO: 16)
Opaque-2识别序列	TGTCATTCCACGTAGATGAAAA (SEQ ID NO: 17)
Opaque-2识别序列	TCCACGTAGA (SEQ ID NO: 18)
Lex-A识别序列	CTGTATATATATACAG (SEQ ID NO: 19)
TGA1a识别序列	GACGTC (SEQ ID NO: 20)
EGR-1或Zif 268识别序列	GCGTGGGCGT (SEQ ID NO: 21)

[0045] 本发明提供的体外方法包括利用核酸标签可视化一种或多种蛋白,用于研究被标记蛋白的亚细胞定位、用于研究被标记的细胞器、用于监控被标记蛋白的移动,包括蛋白的易位、内化或分泌,和/或用于监控被标记蛋白的空间和时间表达谱。

[0046] 本发明提供的其他方法包括将核酸标签用于利用流式细胞仪检测、定量和/或分选被标记蛋白的用途。在此类应用中,在某些实施方案中,可荧光标记所述核酸标签以进行荧光-活化细胞分选(FACS)。

[0047] 在本发明提供的其它方法中,核酸标签是生物素化的,其允许通过免疫学方法检测感兴趣的蛋白。可选的,可以通过亲和色谱来纯化被标记的感兴趣的蛋白。

[0048] 在本发明提供的其他方法中,核酸标签固定在阵列上。可以在某些实施方案中使用此类阵列来产生可寻址的蛋白阵列,例如用于蛋白表达谱分析。

[0049] 在一实施方案中,本发明提供了鉴别与配体结合的感兴趣的蛋白的方法,包括(i)将配体与融合蛋白接触,所述融合蛋白包括(a)含有感兴趣的蛋白的第一结构域,和(b)含有核酸相互作用基序的第二结构域,其中感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序互不相同(例如:来自相同生物体的不同蛋白或者来自不同生物体的不同蛋白);(ii)添加核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与融合蛋白的核酸相互作用基序结合的核酸序列;(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(iv)检测核酸寡聚物是否与融合蛋白结合;凭借检测结合的核酸寡聚物来指示感兴趣的蛋白与配体结合。

[0050] 可以以任何顺序来实施本发明提供的方法和检测。例如,在某些实施方案中,在融合蛋白与参照配体接触之前、之时(例如:同时)或之后将核酸标签与融合蛋白接触。在本发明提供的方法的某些实施方案中,在核酸相互作用基序结合寡聚物的条件下,将核酸寡聚

物接触核酸相互作用基序。

[0051] 在另一实施方案中,本发明提供了鉴别与感兴趣的蛋白结合的测试化合物的方法,包括(i)在存在或缺少测试化合物的条件下,将结合感兴趣的蛋白的固定化参照配体与融合蛋白接触,所述融合蛋白包含(a)包含感兴趣的蛋白的第一结构域,和(b)包含核酸相互作用基序的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序互不相同;(ii)添加核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与融合蛋白的核酸相互作用基序结合的核酸序列;(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(iv)检测核酸寡聚物是否与融合蛋白结合;其中,与缺失测试化合物的条件下相比,在存在测试化合物的条件下,与固定化参照配体结合的融合蛋白量的降低表明了测试化合物结合感兴趣的蛋白。

[0052] 在一些实施方案中,本发明提供了鉴别结合感兴趣的蛋白的测试化合物的方法,该方法包括:(i)在其中所述融合蛋白结合所述可检测的寡聚物的条件下,将融合蛋白与寡聚物接触,其中所述融合蛋白包括与核酸相互作用基序融合的感兴趣的蛋白,并且其中所述可检测的寡聚物包括与所述核酸相互作用基序结合的核酸序列;(ii)在存在或缺少所述测试化合物的条件下,将步骤(i)中的混合物与能够结合所述感兴趣的蛋白的固定的参照配体接触;(iii)去除未结合的寡聚物和/或未结合的融合蛋白;(iv)通过检测所述核酸寡聚物,来定量与固定的参照配体结合的融合蛋白;其中,与缺少化合物的条件下相比,在存在化合物的条件下,与固定化饵结合的融合蛋白量的降低表明了所述测试化合物结合所述感兴趣的蛋白。

[0053] 在另一实施方案中,本发明提供了鉴别结合感兴趣的蛋白的测试化合物的方法,该方法包括:(i)在其中所述融合蛋白结合所述寡聚物的条件下,将融合蛋白与寡聚物接触,其中,所述融合蛋白包括与核酸相互作用基序融合的感兴趣的蛋白,并且其中所述寡聚物包括PCR扩增序列和与所述核酸相互作用基序结合的核酸序列;(ii)在存在或缺少所述测试化合物的条件下,将步骤(i)中的混合物与能够结合所述感兴趣的蛋白的固定的参照配体接触;(iii)去除未结合的寡聚物和/或未结合的融合蛋白;(iv)通过qPCR检测或定量与固定化参照配体结合的融合蛋白;其中,与缺少化合物的条件下相比,在存在化合物的条件下,与固定化饵结合的融合蛋白量的降低表明所述测试化合物结合所述感兴趣的蛋白。

[0054] 在特定的实施方案中,核酸标签用于在筛选检测中从大量候选配体(或“测试化合物”)中鉴别这样的配体,所述配体将在存在已知与感兴趣的蛋白结合的竞争性参照配体的条件下,竞争性地与感兴趣的蛋白结合。候选测试化合物可以包括一种或多种有机化合物、无机化合物、合成核酸、天然核酸、合成多肽、天然多肽、肽片段和/或蛋白。同样的,竞争性参照配体可以是有机化合物、无机化合物、合成核酸、天然核酸、合成多肽、天然多肽、肽片段和/或蛋白。

[0055] 例如,在药物化合物筛选中,对可以在溶液中游离的一种或多种测试化合物进行评估,以评估其与固定化的参照配体或“饵”竞争结合感兴趣的蛋白的能力。在某些实施方案中,所述固定化的参照配体是药物化合物。在特定的实施方案中,可基于饵与大量感兴趣的蛋白的杂乱性(promiscuity)而非与大量感兴趣的蛋白的选择性相互作用来选择饵。在一些实施方案中,选择饵从而使得这些饵结合2、3、4、5、10、15、20、30、40、50或更多感兴趣的蛋白,例如,当所述饵被用于针对包含大量感兴趣的蛋白的组或文库时。

[0056] 在一实施方案中,所述筛选是针对激酶抑制剂(或其它调节剂)的。固定化的参照

可以是激酶的已知的任何抑制剂或其它结合剂。在其中建立了对一组激酶的竞争性结合检测的实施方案中,可以基于饵与多种激酶的杂乱性而非与多种激酶的选择性相互作用来选择饵。具有杂乱特征的示例性饵是已知的,例如SB202190、十字孢碱、purvalanol B、SU5402、甲磺酸伊马替尼、SU6668、易瑞沙(Iressa)和PD-173955。固定这类参照化合物的技术是已知的,参见例如,美国公开号20050153371(例如实施例11)。如本发明使用的,“固体支持物”是(但不限于)任何柱(或柱材料)、珠、试管、微滴度皿、固体颗粒(例如:磁性的、琼脂糖或琼脂糖珠)、微芯片(例如:玻璃、纤维玻璃、乳胶、硅、硅-玻璃或金制芯片)、或者膜(例如:脂质体或囊泡的膜)、塑料材料(例如:聚苯乙烯或聚氯乙烯)、或传感芯片(例如: BIAcore系统使用的),所述支持物可以直接或间接地(例如:通过其它结合配对中间体如其它抗体或蛋白A)结合配体,例如参照配体;或者可以嵌入(例如:通过受体或通道)配体,例如参照配体。

[0057] 可以利用任何标准方法来捕获参照配体(饵),例如,通过参照配体的生物素化,再利用固定化的链霉亲和素来捕获生物素化的参照配体(例如:固定在磁珠或柱上的链霉亲和素)。与参照配体(以及结合感兴趣的蛋白的核酸标签)结合的感兴趣的蛋白将仍然与固体支持物相结合,而未结合的结合试剂(感兴趣的蛋白和/或核酸标签)则被洗脱。在捕获结合的感兴趣的蛋白之后,通过简单的进行PCR反应来检测已经与样品中的靶(例如:或者一组感兴趣的蛋白中的一种感兴趣的蛋白)结合的核酸标签,所述PCR反应利用与核酸标签的扩增子部分杂交的引物。在某些实施方案中,利用标准的定量方法进行PCR反应(例如,利用Perkin-Elmer的Taq Man)。在某些实施方案中,固体支持物吸附了多个感兴趣的蛋白-核酸标签复合体,在此情况下,可以鉴别被分离的池中的单个成员,例如通过扩增各个独特的核酸标签,其中所述核酸标签特异于例如一组中的特定感兴趣的蛋白。

[0058] 在一实施方案中,固定化的参照配体与激酶的ATP-结合位点结合,并且所述筛选能够鉴别竞争性结合至激酶的ATP-结合位点的化合物。

[0059] 在另一实施方案中,固定化的参照物结合至包括ATP-结合位点以及与ATP-结合位点相邻的或邻接的位点的位点。此类参照“饵”可用于确定测试化合物是否以ATP-竞争性的或非ATP-竞争性的方式结合,例如,通过在存在或缺少ATP的条件下进行竞争性结合检测,并且确定ATP对测试化合物对激酶的表现 K_a 的影响。在测试化合物以协同方式结合ATP-结合激酶的情况下,ATP-竞争性的测试化合物在存在ATP的条件下将表现出表现 K_a 的上移;而非ATP-竞争性的测试化合物将不表现出表现 K_a 的改变,或者在测试化合物与ATP协同结合的情况下,在存在ATP的条件下表现出表现 K_a 的下移。

[0060] 在其它实施方案中,本发明提供了鉴别与带有ATP结合位点的感兴趣的蛋白结合的测试化合物的方法,其中所述测试化合物是感兴趣的蛋白的非ATP竞争性结合剂,所述方法包括:(a)在(i)存在和缺少测试化合物,和(ii)存在或缺少外源性ATP的条件下;将结合感兴趣的蛋白的固定化参照配体与融合蛋白接触,所述融合蛋白包含含有感兴趣的蛋白的第一结构域,和含有核酸相互作用基序的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白与核酸相互作用基序互不相同;(b)添加含有结合融合蛋白的核酸相互作用基序的核酸序列的核酸寡聚物;(c)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(c)检测核酸寡聚物是否结合融合蛋白;其中(i)与缺少测试化合物和缺少ATP的条件下相比,在存在测试化合物和缺少ATP的条件下,与固定化参照配体结合的融合蛋白量的降低,表明了测试化合物结合感兴

趣的蛋白;以及其中(ii)与存在测试化合物和缺少ATP的条件下相比,在存在测试化合物和存在ATP的条件下,与固定化参照配体结合的融合蛋白量的没有变化,表明测试化合物是感兴趣的蛋白的非ATP竞争性结合剂。

[0061] 在一实施方案中,本发明提供了鉴别以非ATP竞争性方式结合感兴趣的蛋白的测试化合物的方法,所述方法包括:(i)在其中所述融合蛋白结合所述寡聚物的条件下,将融合蛋白与可检测的寡聚物接触,其中所述融合蛋白包括(a)含有感兴趣的蛋白的第一结构域,和(b)含有核酸相互作用基序的第二结构域,并且所述寡聚物包含与核酸相互作用基序结合的核酸序列;(ii)在存在不同浓度的所述测试化合物,以及缺少所述测试化合物的条件下,将步骤(i)中的混合物与固定化的参照配体接触,其中所述固定化的参照配体结合融合蛋白的ATP-结合位点,以及与ATP-结合位点相邻或相接的区域(例如:在ATP-结合位点外侧);(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;(iv)在每种浓度的测试化合物条件下,通过检测寡聚物来定量与固定化参照配体结合的融合蛋白的量(例如,以获得结合曲线);(v)确定所述测试化合物的浓度,其中在该浓度下,与固定化配体结合的感兴趣的蛋白的量是缺少化合物时与固定化配体结合的感兴趣的蛋白的量的50%,则所述浓度是所述测试化合物的 K_d ;和(vi)重复步骤(i)-(v),其中步骤(ii)的混合物进一步接触ATP;其中,当存在和缺失ATP时计算的 K_d 保持不变,或者,当存在ATP时计算的 K_d 少于缺失ATP时计算的 K_d 时,所述测试化合物以非-ATP竞争性的方式结合所述融合蛋白。在某些实施方案中,所述核酸寡聚物包含扩增子,并且检测还包括qPCR。

[0062] 在另一实施方案中,固定化的参照物结合至与ATP结合位点相邻或相接的位点,其可选的与ATP-结合位点重叠。此类结合位点可以包括底物结合位点,或者可以位于底物结合位点以外。如果参照物分子在包括底物结合位点的位点结合激酶,通过在存在或缺少底物的条件下进行竞争性结合检测,并确定底物对测试化合物作用激酶的表现 K_d 的影响,可以使用此类参照“饵”来确定测试化合物是否以底物-竞争性的或非底物-竞争性的方式结合激酶。在存在底物的条件下,底物竞争性的测试化合物将表现出表现 K_d 的上移,同时,非底物竞争性的测试化合物将不会表现出表现 K_d 的改变,或者当测试化合物和底物协同结合时,在存在底物的条件下,将表现出表现 K_d 的下移。当从本发明中描述的检测中已经确定测试化合物是非-ATP竞争性分子时,通过此类竞争性结合检测还可以在次级筛选中排查测试化合物。

[0063] 在某些实施方案中,从固定化的参照配体或“饵”上取代感兴趣的蛋白所需要的测试化合物的浓度是它与感兴趣的蛋白的亲力的度量。如果感兴趣的蛋白含有DNA-结合结构域,则可以通过核酸标签检测吸附在固体支持物上的感兴趣的蛋白的量,所述标签含有能够与DNA-结合结构域(作为与感兴趣的蛋白的融合物)形成复合体的序列。可以通过放射性标记、荧光标记,或者通过上述PCR扩增序列的扩增来检测核酸标签。

[0064] 因此,本发明提供了鉴别与感兴趣的蛋白(例如:嵌合的融合体)结合的化合物的方法,包括:在溶液中存在和缺少至少一种候选测试分子的条件下,将感兴趣的蛋白与固定在固体支持物上的参照配体“饵”接触,从零浓度开始,用递增的测试分子浓度滴定吸附在支持物上的感兴趣的蛋白的量,向混合物添加可检测的核酸标签来标记感兴趣的蛋白,并确定每种测试化合物浓度下,固定化的感兴趣的蛋白的量。与缺少测试分子的条件下相比,在存在测试分子的条件下,结合的感兴趣的蛋白的量的降低,确定测试分子结合感兴趣的

蛋白。在“正向筛选”中,可以快速筛选大量测试化合物,鉴别那些结合感兴趣的蛋白。通过调节测试化合物的浓度,也可以预选结合蛋白的替代竞争分子的亲和力。如果需要更高的亲和力,则提供较低浓度的候选物,并需要在这类较低浓度下成功的从固定化的参照配体上解离感兴趣的蛋白。参照配体可以是靶分子,其已经鉴别或已知与特定的感兴趣的蛋白结合。可以利用任何本发明中公开的传统方法将该参照配体固定在固体支持物上。然后,可以将固定化的参照配体与一种或多种感兴趣的蛋白接触,其中已知参照配体结合所述蛋白。在某些实施方案中,在含有至少一种测试化合物的样品中,和不含测试化合物的样品中,测试该相互作用。然后,可以使用本发明提供的可检测的核酸标签,在存在和缺少测试化合物的条件下,确定与固定化参照配体结合的蛋白的量。与缺少测试化合物的条件下相比,成功结合的测试化合物将降低与参照配体结合的感兴趣的蛋白的量。

[0065] 本方法通过提供池(pool)中的测试化合物进行初始竞争反应,提供了快速筛选大量测试化合物的能力。每个池中候选物的数量是任意的,但可以是2、5、10、50,甚至更多。如果池不能成功降低结合的感兴趣的蛋白的量,则不需要进一步测试该池的任何成员。如果池是成功的,则可以测试池中存在的单个测试化合物,或者可以使用最初使用的池的中型池。例如,如果初级池含有50种测试化合物,则可以用5个池继续测试,其中每个池含有50种测试化合物中的10种。然后,只有成功的池被进一步细分进行后续的测试轮次。竞争性结合筛选进一步详细公开在例如,Fabian等人,(2005)Nature Biotechnology 23(3),329-336和美国公开号2003/0186221、2004/0009470和2005-0009099中;其均以全文引用的方式引入本发明作为参考。

[0066] 在本发明提供的另一种方法中,当满足一些检测条件时,可以确定测试分子的解离常数:首先,感兴趣的蛋白的浓度保持足够低,使得蛋白浓度低于测试分子对感兴趣的蛋白的 K_d ;其次,固定化参照配体的浓度小于参照配体对感兴趣的蛋白的 $K_d(K_{ref})$ 。

[0067] 为了满足第一个条件,检测中的感兴趣的蛋白浓度保持在非常低的值,通常少于0.1nM。当预期测试化合物是感兴趣的蛋白的非常紧密的结合剂时,将感兴趣的蛋白稀释到较低浓度。在结合实验中没有多余的蛋白,并且蛋白浓度保持在低于测试分子对感兴趣的蛋白的 K_d 的浓度下。

[0068] 由于只有当固定化的参照配体的浓度大于 K_{ref} 时,测试化合物的表观 K_d 才受到参照配体对感兴趣的蛋白的 $K_d(K_{ref})$ 的影响,因此,第二个条件是必须满足的。为了满足这第二个条件,利用浓度落入0.3nM-300nM范围内的固定化参照配体,来进行竞争性结合检测,其位于 K_{ref} 的一般范围内(即,参照分子对感兴趣的蛋白的 K_d)。当满足这些条件时,可以通过等式来描述竞争性结合:

$$[0069] \quad f/f_0 = K_{comp} / (K_{comp} + [comp])$$

[0070] 其中, f 是在溶液中存在竞争测试分子的条件下,与固定化的参照配体结合的感兴趣的蛋白的部分; f_0 是缺少溶解的测试分子时结合的部分; K_{comp} 是感兴趣的蛋白与竞争测试分子在溶液中相互作用的平衡解离常数(K_d);而 $[comp]$ 是溶液中竞争测试分子的浓度。与参照配体结合的感兴趣的蛋白的数量作为测试分子浓度的函数,可以绘制在图上,并通过将曲线拟合为结合等式 $f/f_0 = (L + (H - L)) \times (K_{comp} / (K_{comp} + [comp]))$ 来计算 K_d ,其中 L 是较低的基线, H 是较高的基线, K_{comp} 是测试分子和感兴趣的蛋白之间相互作用的结合常数,而 $[comp]$ 是测试分子的浓度。在50%竞争时,在存在测试分子条件下的结合蛋白的部分是缺

失测试分子条件下的一半,或者 $f/f_0=1/2$ 并且 K_{comp} 等于 $[comp]$ 。

[0071] 确定测试化合物对感兴趣的蛋白的 K_d 值的方法包括:(i)在存在不同浓度的测试化合物和缺少测试化合物的条件下,将与感兴趣的蛋白结合的固定化参照配体与融合蛋白接触,所述融合蛋白包含(a)包含感兴趣的蛋白的第一结构域,和(b)包含核酸相互作用基序的第二结构域,其中感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序互不相同;(ii)添加核酸寡聚物,所述核酸寡聚物包含与融合蛋白的核酸相互作用基序结合的核酸序列;(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(iv)在每种不同浓度和缺失测试化合物的条件下,通过检测或定量与固体支持物上吸附的融合蛋白相结合的核酸寡聚物,获得竞争结合曲线;由此测试化合物对感兴趣的蛋白的 K_d 值是这样的浓度,其中在所述浓度下,在存在测试化合物时,感兴趣的蛋白固定化的参照配体是缺少测试化合物时所吸附的感兴趣的蛋白的50%。

[0072] 利用本发明提供的筛选检测,可以针对一组感兴趣的蛋白检测测试化合物,以产生测试化合物对特定组的 K_d 谱。 K_d 谱用于确定化合物是否具有靶特异性,当靶属于例如共享相似的底物结合位点的蛋白质家族,从而极可能具有化合物交叉反应的潜力时,上述特性就可以是有益的。

[0073] 任何本发明描述的筛选检测都可以单独或多重的模式进行。在一个示例性的多重模式中,筛选测试化合物,并同时检测它与一组感兴趣的蛋白中的多个蛋白的结合特性。当同时或相继检测多个感兴趣的蛋白时,可以使用对每种感兴趣的蛋白独特的核酸标签(例如,不同的扩增子)来区分不同的蛋白。例如,当核酸标签含有PCR扩增标志物时,PCR扩增标志物对所检测的特定感兴趣的蛋白是独特的。因此,可以用包含特异于感兴趣的蛋白的DNA靶序列和PCR扩增标志物的核酸标签来标记各种蛋白。在该特定模式中,由于每种核酸标签特异地结合特定的蛋白,所以,可以在竞争结合步骤时混合感兴趣的蛋白,和/或在已经单独对每种蛋白分别实施竞争结合步骤后,在洗脱步骤时混合感兴趣的蛋白。然后可以从混合物的各部分中检测与测试化合物相互作用的单个蛋白。

[0074] 可选的,如果在多重模式中共同检测的感兴趣的蛋白包含相同的核酸相互作用蛋白(例如:NF- κ B),则核酸标签可以含有相同的DNA靶序列,而独特的报告子,例如独特的PCR扩增标志物可用于区分不同的感兴趣的蛋白。在该可选的实施方案中,可以选出与其同源DNA具有高亲和力的和/或具有蛋白-DNA复合物长半衰期的核酸相互作用蛋白。在一实施方案中,由于与其同源DNA(参见表1)的高亲和力以及它的4-40小时长复合物半衰期,而选择NF- κ B。在此类实施方案中,感兴趣的嵌合融合蛋白可包含感兴趣的蛋白和NF- κ B的DNA结合结构域。在多重模式的该可选实施方案中,竞争结合步骤可以如下实施,首先“预上样”每种融合蛋白和含有特异于每种融合蛋白的扩增子的核酸标签,并在多重模式中进行竞争结合,例如通过将两种“预上样”的激酶或多达六种(或更多种的)“预上样”融合蛋白质混合到共同的容器中。

[0075] 在某些实施方案中,本发明提供了同时鉴别与两种或多种感兴趣的蛋白结合的测试化合物的方法,其包括(i)在存在或缺少测试化合物的条件下,将与两种或多种感兴趣的蛋白结合的固定化参照配体与两种或多种融合蛋白接触,其中每种融合蛋白分别包含(a)仅包含两种或多种感兴趣的蛋白中的一种的第一结构域,和(b)包含核酸相互作用基序的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序互不相同;(ii)添加两种或多种

核酸寡聚物,其中,两种或多种核酸寡聚物的每一种都包含这样的核酸序列,所述核酸序列独立的与两种或多种融合蛋白中的仅仅一种的核酸相互作用基序结合;(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(iv)检测或者定量两种或多种核酸寡聚物的每一种;其中,与缺少测试化合物的条件下相比,在存在化合物的条件下,与固定化参照配体结合的两种或多种融合蛋白量的降低,表明测试化合物结合相应的两种或多种感兴趣的蛋白。

[0076] 同时确定测试化合物对两种或多种感兴趣的蛋白的 K_d 值的方法,包括(i)在存在不同浓度的测试化合物或缺少测试化合物的条件下,将结合两种或多种感兴趣的蛋白中的每一种的固定化参照配体与两种或多种融合蛋白接触,其中每种融合蛋白分别包含(a)仅包含两种或多种感兴趣的蛋白中的一种的第一结构域,和(b)包含核酸相互作用基序的第二结构域,其中所述感兴趣的蛋白和核酸相互作用基序互不相同;(ii)添加两种或多种核酸寡聚物,其中两种或多种核酸寡聚物的每一种都包含这样的核酸序列,所述核酸序列独立的与两种或多种融合蛋白中的仅仅一种的核酸相互作用基序结合;(iii)去除未结合的核酸寡聚物和/或未结合的融合蛋白;和(iv)在每种不同浓度的测试化合物和缺失测试化合物的条件下,通过检测或定量与固体支持物上吸附的两种或多种融合蛋白相结合的两种或多种核酸寡聚物中的每一种,来获得竞争结合曲线;由此,测试化合物对两种或多种感兴趣的蛋白中每一种的 K_d 值是这样的浓度,在所述浓度下,在存在测试化合物时,固定化参照配体所吸附的两种或多种感兴趣的蛋白中的每一种,是缺少测试化合物时所吸附的两种或多种感兴趣的蛋白的50%。

[0077] 在另一实施方案中,在进行结合步骤前,可以向共同的容器中添加沉默诱饵(silent decoy)核酸标签。沉默诱饵可以是包含被普通的核酸相互作用蛋白(例如NF- κ B)识别的DNA靶序列(例如同源的NF- κ B DNA序列)的核酸标签,但是其缺乏任何种类的报告子功能。如果在该可选的实施方案中使用的报告子功能是qPCR扩增,则沉默诱饵可以是缺乏任何这类的PCR扩增序列的“qPCR-沉默”诱饵,从而在qPCR步骤中不会产生任何信号。当核酸相互作用蛋白可逆的结合其同源DNA时,如在核酸相互作用蛋白是转录因子的DNA结合结构域的情况下,可添加此类诱饵。此类诱饵的目的是最小化由不同融合蛋白之间互换核酸标签导致的信号加扰(scramble of signal),其中通过增加这样的可能性,即任意的标签互换可能引入“沉默”诱饵标签而非两种标签间的互换,并且因此任何交换都将降低特定蛋白的结合信号而非使其产生扰乱。

[0078] 在多重检测的某些实施方案中,通过从结合检测洗脱液进行标本抽样装入单个容器,并且通过qPCR检测每一抽样,分别读取每种感兴趣的蛋白(例如激酶)的结合信号。可选的,通过从结合检测的样品中抽样,可以在多重模式中确定结合信号,使得通过例如多重qPCR,在同一样品中检测每个样品的两种或三种或更多种的不同信号。在多重模式的另一实施方案中,仅在测量结合信号的读取步骤中产生多重化。在此类实施方案中,分别对每一种感兴趣的蛋白进行竞争结合步骤,然后,在洗脱步骤进行混合,此时可以检测混合物的各部分(fraction)中单个蛋白与测试化合物的相互作用。

[0079] 在多重模式中测试的蛋白质组可以属于或可以不属于相同的蛋白质家族。在一实施方案中,所述蛋白质组包括激酶,例如受体酪氨酸激酶家族的激酶。

[0080] 在多重模式的另一实施方案中,用感兴趣的蛋白同时测试多个测试化合物,确定

测试化合物与参照配体竞争结合感兴趣的蛋白的程度。该方法中的多重化允许快速筛选大型测试化合物文库。只有表现出理想的竞争结合范围的某些测试化合物池才需要进一步检验,以鉴别具有与感兴趣的蛋白理想的结合亲和力的特定化合物。

[0081] 为了使用和后续分析的便利,可以将测试化合物和/或感兴趣的蛋白的 K_d 谱输入到数据库或其它的列表形式中。在一种数据模式中,筛选的测试化合物的身份显示在表格的行中,感兴趣的蛋白的身份显示在列中,表格的每一小格含有每种蛋白对每种测试化合物的解离常数。因此,表格的每一行代表一种测试化合物对蛋白质组的特异性谱,并且从那些表现出杂乱的结合多种蛋白的测试化合物中,允许鉴别和选择表现出选择性结合的测试化合物。还可以使用基于计算机的聚类分析方法(clustering method)来呈现数据,在该方式中,可使每种测试分子和每种感兴趣的蛋白的结合谱相互关联。在数据的聚类呈现的一实例中,倾向于结合相同测试分子的蛋白被放在彼此相近的放置,而倾向于结合不同测试分子的蛋白则被分开放置。对测试化合物在聚类图中结合在何处的提示,提供了额外的深入观察,其对于预测化合物家族的结构-活性关系是有价值的。

[0082] 本发明提供的筛选检测比其它筛选模式具有许多优势。例如,不需要以任何方式对所筛选的测试化合物进行固定或者化学修饰,从而可以立即用于比例放大、多重化和高通量的筛选,允许快速和大量的测试所测试分子。此外,由于竞争结合检测使用了高度灵敏的检测方法(例如qPCR),只需要少量的稀有和昂贵原料例如重组蛋白。信号扩增技术,例如定量PCR使得能够利用甚至痕量的靶蛋白来进行筛选检测。因此可以通过定量PCR精确的检测低皮摩尔量级的蛋白,并且可以在皮摩尔范围进行 K_d 测量。使用不仅灵敏而且高选择性的检测方法,例如qPCR,也排除了非特异性蛋白干扰的潜在问题,使得不再需要蛋白纯化步骤和一般对利用更传统技术分析的蛋白样品进行的其它类型操作。因此,本发明提供了快速、有效和高容量的筛选方法,其只需要小量的细胞原料和蛋白,并且出于这些理由,其是替代基于细胞的检测的具有成本效益的筛选方法。

[0083] 本发明还提供了用于筛选候选分子或测试化合物的试剂盒,其中所述分子或化合物在存在已知结合感兴趣的蛋白的竞争性参照配体的条件下,竞争性的结合感兴趣的蛋白。此类试剂盒可以包括参照配体(或“饵”),其任选地固定在固体支持物或容器(例如多孔板中的孔)上;可检测的核酸标签;和能够用核酸标签“标记”的感兴趣的蛋白。其中,所述核酸标签通过qPCR检测,所述试剂盒还可以额外地包括能够识别核酸标签中的PCR起始序列的PCR引物。此类试剂盒可用于进行如上所述的竞争性结合筛选检测。

[0084] 在另一实施方案中,所述试剂盒可用于检测直接结合参照或“饵”配体的分子(例如感兴趣的蛋白)的存在。在更具体的实施方案中,此类试剂盒可以是用于测试生物学样品中特定分子的存在诊断试剂盒,所述分子是化合物、肽或蛋白。在一实例中,所述试剂盒包括固定在固体表面上的饵分子;能够用核酸标签标记的感兴趣的蛋白;和可检测的核酸标签。可选的,所述试剂盒还可以包括能够识别核酸标签中的PCR起始序列的PCR引物,从而允许qPCR扩增。在此类试剂盒中,所述饵分子以优化的浓度存在,从而使与饵分子结合分子,例如肽、蛋白或化合物的存在,可以通过由于感兴趣的蛋白的结合的减少而导致的信号的降低来检测,其中感兴趣的蛋白也可以结合饵分子。在一个特定的实施方案中,所述可检测的蛋白是能够用核酸标签标记的抗体。在更具体的实施方案中,所述可检测的蛋白是与能够与核酸标签形成复合体的DNA结合结构域融合的抗体。此类诊断试剂盒可用于测试生

物样品,例如血液、唾液、尿液、精液或其他标本中抗原标志物的存在,从而确定或验证某些生物标志物的存在,以确定例如患者的疾病状态。所述诊断测试还可用于检测生物学样品中的天然或合成激素或化学化合物的存在。在另一实施方案中,所述诊断试剂盒可用于测试环境样本中化学分子或生物学分子(在某些情况下来源于病原体)的存在,其中所述分子结合参照配体或“饵”配体。

[0085] 如下实施例意在作为本发明的示例,其不作为本发明的限制。

[0086] 实施例

[0087] 除非另外说明,本发明提供的系统和方法的实践都使用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交,以及本领域技术人员掌握的相关领域中的传统的技术。这些技术描述在本发明引用的参考文献中,并详细的解释在文献中。参见例如:Maniatis等人,(1982)Molecular Cloning:A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook等人,(2001), Molecular Cloning:A Laboratory Manual. 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Ausubel等人, Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons (1987 并至今每年更新); Gait(编著)(1984) Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach. IRL Press; Eckstein(编著)(1991) Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach. IRL Press; Birren等人(编著) Genome Analysis:A Laboratory Manual (1999) Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0088] 构建哺乳动物的瞬时体外表达载体

[0089] 利用标准的分子生物学技术,通过基因合成、随后的限制性酶切消化和后续的连接作用,将下文列举的遗传元件克隆到通用细菌质粒pGEM中。从5'末端至3'末端列举,是:

[0090] -CMV(巨细胞病毒)增强子/启动子区域,以允许在多种细胞类型中强的、组成型的表达,

[0091] -嵌合的内含子,其包含人 β -珠蛋白基因的第一内含子,和位于免疫球蛋白基因重链可变区的前导区和主体之间的内含子(转染研究已经证实,位于cDNA插入侧翼的内含子的存在通常增加了基因表达的水平),

[0092] -酵母GAL4或人NF- κ B转录激活子的DNA结合结构域(参见表1),其与TEV(烟草蚀纹病毒)蛋白酶识别序列框内融合,后接具有若干独特的限制性酶切位点的多克隆区域,

[0093] -SV40(猿猴病毒40)晚期多聚腺苷酸化信号,其用于增强mRNA稳定性和翻译,

[0094] -用于在E. coli中增殖的pMB1复制原点,和

[0095] -用于在E. coli中选择/增殖的氨苄青霉素抗性(Amp^R)基因。

[0096] 激酶的克隆

[0097] 将人p38 α (GenBank号:NP_620581.1)和BRAF(GenBank号:NP_004324.1)激酶序列与DNA-结合结构域(GAL4或NF- κ B;参见表1)框内融合,通过利用标准分子克隆方法的限制性酶切消化后接连接作用来进行克隆。通过ABI测序验证了克隆的序列。

[0098] 瞬时的体外表达和蛋白提取物制备

[0099] 利用 **Lipofectamine®**(Invitrogen),以及利用标准的Qiagen治疗纯化试剂盒获得的经过序列验证的质粒DNA,来在人胚肾(HEK)293细胞中进行瞬时体外表达。利用10cm圆形Petri平板中的80%汇合度的细胞,在37°C实施转染24小时。

[0100] 利用含有150mM NaCl、10mM DTT和Complete™(Roche)抗蛋白酶混合物的抽提缓冲液M-PER(Pierce),在4℃进行蛋白抽提。在冷PBS洗涤后,直接在平板上裂解细胞,并通过离心去除细胞残片。通过Bradford蛋白剂量检测(Bio-Rad)评估蛋白浓度。对提取物进行标本取样,在液氮中冷冻并储存于-80℃直至使用。

[0101] 利用抗GAL4和NF-κB的抗体(Santa Cruz Biotechnology),通过SDS-PAGE/Western印迹来分析每种DNA构建体的表达水平和质量。

[0102] 构建核酸标签

[0103] 产生随机序列,并利用Prime Express®(ABI)软件来设计扩增子序列。针对人激酶组(kinome)、T7噬菌体基因组和其它扩增子序列,BLAST搜索扩增子序列,并基于与BLAST搜索的序列的最小相似性来选择。将选定的扩增子序列送往ABI,由ABI制备合适的引物和qPCR荧光探针。还通过添加GAL4和NF-κB识别位点来进一步修饰扩增子序列,以产生完整的核酸标签。将寡核苷酸克隆到细菌质粒中,利用PCR复制标签。

[0104] 竞争结合检测

[0105] 如下制备用于竞争结合检测的亲树脂。通过振荡和旋转重悬Dynabeads™ M280 (Streptavidin(Dynal#602.10)),以10mg/mL悬浮微珠,每检测孔用量是0.4mg。洗涤三次微珠并重悬在1×PBS/0.5%Tween20(PBST)中至10mg/mL,并分装至2mL管中。制备生物素化的参照配体的技术是已知的,参见例如:美国专利号20050153371。将生物素化的参照部分以0.025-0.25:1的摩尔比(参照配体:生物素结合容量)添加到管中,在旋转器上室温混合并孵育30分钟。然后用多余的生物素(生物素比生物素结合容量的摩尔比为2:1)封闭微珠,并用封闭缓冲液(SeaBlock(Pierce),1%BSA、0.05%Tween 20、1mM DTT)洗涤去除未结合的配体,并降低非特异性蛋白结合。

[0106] 用每孔200μL SBTB(Pierce#37527SeaBlock/1%BSA、0.05%Tween20)封闭聚苯乙烯平板。将来自前一步骤的微珠溶液以每孔12.5μL微珠添加到聚苯乙烯平板中,不除去SBTB。在700rpm短暂的振荡平板(洗涤1),然后造粒(pelleting)、倾析,并用SBTB振荡进行另一次洗涤(洗涤2),后接第三次洗涤,其中在SBTB中振荡微珠至少15分钟。

[0107] 测试化合物在DMSO中制成1000×储液,并快速稀释成水性环境(1%DMSO终浓度)。在缺少测试化合物的对照检测中添加DMSO(终浓度1%)。

[0108] 在冰上缓慢解冻蛋白提取物,并用1×结合缓冲液(20%SeaBlock、0.17×PBS、0.05%Tween 20、6mM DTT)稀释。在含有10nM的核酸标签(嵌合DNA寡核苷酸,其包括GAL4或NF-κB结合的靶序列和用于定量PCR检测的扩增单位(扩增子))的1×结合缓冲液中,通过组合稀释的蛋白提取物和1μL在DMSO中具有2nM至30μM终浓度的测试分子,在含有微珠的聚苯乙烯平板中进行结合反应。在室温下孵育检测平板,并振荡1小时,并用洗涤缓冲液(1×PBS、0.05%Tween 20、1mM DTT)洗涤亲和微珠四次,去除未结合的蛋白。在最后一次洗涤后,将微珠重悬在洗脱缓冲液(1×PBS、0.05%Tween 20和2μM非生物素化的亲和配体)中,并在室温孵育,且振荡30分钟。通过定量PCR测量洗脱液中激酶的量。可选的,可以在缺少核酸标签的条件下进行结合反应,核酸标签可以在去除未结合蛋白的洗涤步骤后再添加。

[0109] p38MAP激酶的竞争结合检测

[0110] 竞争结合检测对在HEK293细胞中表达的p38蛋白和结合p38ATP-结合位点的固定化配体进行表征。为了生产p38蛋白,p38α的编码区域与GAL4或NF-κB的DNA-结合结构域框

内融合,并如上述,利用标准克隆方法克隆到表达载体中。使用SB202190,一种已知具有高亲和力结合p38ATP-结合位点的化合物,作为固定化的参照配体。生物素化的柔性接头被附加至SB202190上的不会干扰p38结合位点的位置上。然后,通过生物素化的接头,将SB202190固定至链霉亲和素-包被的磁珠上。

[0111] 测试了三种化合物与p38和固定化的SB202190:SB202190(未修饰的和在溶液中游离的)、BIRB-796和VX-745之间的相互作用竞争的能力。为了确定相互作用的亲和力,与固体支持物结合的p38的量作为测试化合物浓度的函数来定量。附图2和3中显示了三种化合物的 K_d 。

[0112] BRAF激酶的竞争结合检测

[0113] 为了生产BRAF激酶蛋白,BRAF的编码区域与GAL4或NF- κ B的DNA-结合结构域(参见表1)进行框内融合,按上文所述克隆到表达载体中,然后在HEK293细胞中表达。使用PD-173955,一种已知具有高亲和力结合BRAF ATP-结合位点的化合物作为固定化的参照配体。利用产生SB202190饵相同的策略来生产该连接的化合物。

[0114] 测试了四种化合物与BRAF和固定化的参照配体之间的相互作用竞争的能力。四种化合物中的一种与其它三种是化学上相关的,但不结合参照配体,其作为阴性对照。为了确定相互作用的亲和力,与固体支持物结合的BRAF的量作为测试化合物浓度的函数来定量。附图4和5中显示了四种化合物的 K_d 。

[0115] 一组激酶的竞争结合检测

[0116] 下表2显示了对一组激酶进行的竞争结合检测的信号-背景比,其中,每种激酶都制备成具有NF- κ B DNA结合结构域的融合蛋白。在存在或缺乏潜在的竞争测试化合物的混合物的溶液中,使用上述方法,利用它的同源饵(参照配体)来测试每种激酶,其中所述溶液包含若干已知的ATP-竞争性激酶抑制剂。30:1的信号-背景比被认为是可接受的,而100:1的比例是优选的。

[0117]

表 2	
激酶	信号-背景比(x:1)
ARAF1	90
BMPR1B	535
BMPR2	93470
CDC2L1	<10
CDK7	117
DDR2	69
IRAK3	10933
MAP2K2	5827
MAP3K10	7162
MAP3K9	187077
MYLK	36637
SHARK	53
FLT3	1307
ZAP70	2192
AURAK	4469

[0118]	CSHK2A1	291
	p38- γ	3361
	VEGFR2	139975
	ANKK1(SgK288)	50
	RPS6KA4	960
	SNARK	370
	MAPKAPK5	1100
	MAP2K3	90
	MAP2K1	14000
	MAP2K4	780
	GSK3B	1300
	LATS2	290
	PIK3CA	240
	PIK3CA (E545K)	260
	PRKCE	50
	MYLK	270
IKK- ϵ	80	

[0119] 多重竞争结合检测

[0120] 按照如下方法将竞争结合检测多重化：基于NF- κ B的DNA结合结构域与其同源DNA的高亲和力，及其4-40小时的蛋白-DNA复合体的长半衰期，来选择NF- κ B的DNA结合区域作为激酶的融合部分。竞争结合检测涉及通过在摩尔比范围为0.0025-0.25:1的条件下，向微珠中添加生物素化的参照配体饵，来制备配体化微珠，以及按照上述方法进行处理。蛋白提取物的制备涉及两步稀释。在第一稀释步骤中，在存在10 μ M独特的嵌合核酸标签和200 μ g/mL鲑精DNA的条件下，用1 \times PBS/0.05% Tween20/0.1% BSA/10mM DTT在室温下将每种蛋白提取物储液稀释100倍。第二稀释步骤是多重化步骤，其中，将不同的稀释提取物组合，并在存在1 μ M“qPCR-沉默”诱饵DNA的条件下，在1 \times PBS/0.05% Tween 20/0.1% BSA/10mM DTT中再稀释100倍，从而最终稀释产生了10000倍稀释的储液，所述储液含有0.1-1nM的针对各种激酶融合蛋白的各种嵌合核酸标签。

[0121] 当产生强检测信号的特定激酶用产生较弱检测信号的另一激酶多重化的情况下，为了降低在组合不同激酶提取物的步骤中，弱信号激酶关联的标签与强-信号激酶互换的可能性，对于强-信号激酶，第一稀释步骤含有100nM而非10nM的核酸标签。按照上述方法进行后续的竞争结合检测步骤。在读数步骤，通过qPCR确定结合的量，将来自结合检测的洗脱液等分成不同的样品，以双重模式读取每种样品。可选的，可以利用三色读数在三重模式

中读取样品。

[0122] 在一实例中,按照美国公开号2005015337中描述的方法,用十字孢碱钬通过PEG接头生物素化的微珠。三种激酶PRKCE、ROCK2和ZAP70,各自与NF- κ B的DNA-结合结构域框内融合,克隆并在HEK293细胞中表达。除了含有ZAP70融合蛋白的样品外,每种激酶融合体的蛋白提取物首先在含有10nM核酸标签的缓冲液中稀释,其中含有ZAP70融合蛋白的样品在含有100nM核酸标签的缓冲液中稀释,由于之前的实验已经显示,与PRKCE和ROCK2融合蛋白相比,ZAP70融合蛋白产生更强的信号。在存在“qPCR-沉默”诱饵DNA的条件下,进一步稀释经过稀释的提取物,然后与测试化合物和配体化的微珠组合,用于竞争结合检测。从结合实验获得的蛋白洗脱液等分成两个样品,利用双色qPCR读数检测每种样品。

[0123] 活性和非活性激酶构象的竞争结合检测

[0124] 通过在1×M-PER缓冲液(Pierce#78501)中裂解表达Ab11融合蛋白的HEK293细胞来制备Ab11激酶的非活性形式,所述缓冲液具有150mMNaCl、25×无EDTA的COMPLETE(Roche#11873580001)和10mMDTT。将蛋白提取物转移到PCR管中,并在热循环仪中30°C孵育45分钟,以允许细胞提取物中的内源性磷酸酶将Ab11蛋白去磷酸化,从而增加非活性(去磷酸化)状态蛋白的分数。

[0125] Ab11激酶的活性形式是如下制备的:首先,在细胞裂解/蛋白提取步骤前,将Ab11-转染的HEK293细胞在如下磷酸酶抑制剂中立即孵育2小时:2mM正钒酸钠(Calbiochem#567540)或1×磷酸酶抑制剂混合物组合II(Calbiochem#524625)。在1×M-PER缓冲液(Pierce#78501)中裂解细胞,所述缓冲液具有150mMNaCl、25×无EDTA的COMPLETE(Roche#11873580001)、10mM DTT和1×磷酸酶抑制剂混合物组合II(Calbiochem#524625)。

[0126] Ab11的活性和非活性形式用于上述方法中进行的竞争结合检测中,利用Purvalanol B-结合微珠作为固定化诱饵。对激酶的活性和非活性形式测试的一种化合物是VX-680,其是文献中已知能够结合Ab1活性形式的化合物(Young等人,(2006)Cancer Res 66(2):1007-1014)。选定对活性/非活性激酶构象测试的第二种化合物是伊马替尼(STI571),它是作为优选地结合Ab11非活性构象的抑制剂的化合物(Schindler,T.等人,Science(2000)289:1938-1942;Liu等人,Nature Chemical Biology(2006)2(7):358-364)。附图6A中显示了VX-680和伊马替尼对Ab1活性磷酸化形式和非活性非磷酸化形式的Kd值。附图6A显示,VX-680对Ab1的Kd在磷酸化和非磷酸化的Ab1激酶之间没有改变。该数据第一次确认该化合物能够结合非活性构象的Ab1。相反,附图6B显示,与磷酸化的形式相比,伊马替尼对非磷酸化形式的Ab1的Kd较低,这表明所述化合物优选地结合非活性形式。

[0127] 鉴别非ATP竞争性激酶抑制剂的竞争结合检测

[0128] 在本发明中描述的竞争结合检测中作为诱饵使用的参照配体一般大于ATP分子本身。因此,这些参照配体不仅结合ATP-结合位点,而且它们更精确的描述为结合活性位点,所述活性位点包括标准的ATP-结合位点和邻近区域,例如底物结合位点和域间缝隙(inter-domain cleft)。因此,这些参照配体不仅具有取代ATP-结合位点的结合剂的能力,而且具有取代结合邻近ATP位点的结合剂的能力,包括那些结合底物结合位点的结合剂。

[0129] 在一设计验证BMS-345541结合IKK β 的非-ATP竞争性质的实验中,将原先鉴别为结合IKK β 活性位点的化合物生物素化,并作为参照诱饵使用。之前,多重抑制分析显示,BMS-345541以与ADP/ATP非互斥的方式结合至位点,从而确定是非-ATP竞争性结合剂(Burke等

人, *J of BiolChem*(2003)278(3):1450-1456)。用已经描述的方法进行IKK β 的结合实验,但是除此之外,在存在ATP的情况下进行的测量结合活性的检测中,还向反应混合物中添加20mM的MgCl₂,和计算为ATP对IKK β 的K_d的10倍浓度的ATP。利用已知的ATP-竞争性分子,十字孢碱,作为ATP-竞争性对照,来进行IKK β 激酶的平行实验。表3中显示了竞争性结合实验的结果。结果显示,在存在ATP的条件下,ATP-竞争性结合剂十字孢碱表现出K_d的上移,同时,BMS-345541表现出不受ATP影响的K_d值,这证实了所述分子是经典的非-ATP竞争性结合剂。

[0130] 在第二个实验中,设计验证PD 184352结合MEK1和MEK2的非-ATP竞争性质,使用鉴定为结合MEK1和MEK2激酶的活性位点的化合物作为参照饵。之前,X-射线结晶学已显示,PD 184352结合在邻近ATP-结合位点,但与之分离的新的结合口袋(pocket)上,并被确定是非-ATP竞争性结合剂(参见例如:Ohren等人,*Nature Structural&Molecular Biology*(2004) 11(12):1192-1197)。用上文已经描述的方法进行MEK1激酶结合实验,除了在结合反应步骤中,在存在ATP的情况下进行的测量结合活性的检测中,还向反应混合物中添加20mM的MgCl₂,和计算为ATP对MEK1的K_d的10倍浓度的ATP。相似的,用于MEK2激酶结合检测的结合反应,除了标准的结合检测混合物以外,还含有20mM的MgCl₂,和计算为ATP对MEK2的K_d的10倍浓度的ATP。十字孢碱,一种已知的ATP-竞争性结合剂,在两类MEK检测中进行测试,以提供ATP-竞争性对照。表4和5中显示了在存在和缺少ATP的条件下,竞争性结合检测的结果。结果显示,在存在ATP的条件下,与预期作为ATP竞争性的化合物,十字孢碱对MEK1/2的表观K_d的显著增加相反,PD 184352对MEK1/2的表观K_d的显著降低。ATP具有降低表观K_d的效果这一事实,而不是像BMS-345541的情况下不影响表观K_d,这表明与未结合的MEK相比,PD 184352优选的结合ATP-结合的MEK,因此是ATP-协同的非-ATP竞争性结合剂。

表 3: 存在和缺少 ATP 的条件下的 IKK β 竞争结合检测

[0131]

化合物	不存在 ATP 时的 K _d (nM)	存在 ATP 时的 K _d (nM)
十字孢碱	40	382
BMS-345543	138	123

表 4: 存在和缺少 ATP 的条件下的 MEK1 竞争结合检测

[0132]

化合物	不存在 ATP 时的 K _d (nM)	存在 ATP 时的 K _d (nM)
十字孢碱	33	151
PD184352	804	4

表 5: 存在和缺少 ATP 的条件下的 MEK2 竞争结合检测

[0133]

化合物	不存在 ATP 时的 K_d (nM)	存在 ATP 时的 K_d (nM)
十字孢碱	24	99
PD184352	849	8

[0134] hAGT融合蛋白的克隆

[0135] 利用标准的分子克隆方法构建编码人 O^6 -苄基鸟嘌呤DNA烷基转移酶(hAGT)的哺乳动物表达载体。从5'末端至3'末端,克隆载体中的遗传元件包括,CMV增强子/启动子、编码人 O^6 -苄基鸟嘌呤DNA烷基转移酶的序列与TEV蛋白酶识别序列框内融合,后接全长的p38 α 激酶,后接编码HA11表位标签的序列。

[0136] 在体外,hAGT融合蛋白在HEK293细胞中表达。

[0137] 通过连接 O^6 -苄基鸟嘌呤-聚乙二醇马来酰亚胺(CoValys)至包含PCR扩增标志物的DNA序列上,来构建核酸标签。通过hAGT融合蛋白可以识别核酸标记的底物,该融合蛋白可将核酸标签转移以与融合蛋白共价地结合。

[0138] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请都以全文引用的方式并入本发明作为参考,其与如同特定和单独的指出每种单独的出版物或专利申请以全文引用的方式并入本发明作为参考的程度相同。

序列表

- <110> 皮艾罗特. 奇切里
杰里米. 亨特
吉恩-迈克尔. A. 莱利亚斯
迈克. 莫里森
丹尼尔. 特莱伯
利萨. M. 沃迪科卡
- <120> 可检测的核酸标签
- <130> 11825-013-999
- <140> 11824325
<141> 2008-09-26
- <150> 60/806, 422
<151> 2006-06-30
- <160> 21
- <170> FastSEQ 用于 Windows 版本 4.0
- <210> 1
<211> 98
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> NF-kB 的核酸标签
- <400> 1
ttgtgaattg ctgaccgtag atgtcaactt tgaccatcag acaacgtttc tccattccaa 60
ttatgcgaga atcctagga attcccctag atcgcgatg 98
- [0001] <210> 2
<211> 90
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> NF-kB 的核酸标签
- <400> 2
cggcgtaaaa acgaatacca tgtctctcat cgctcgactc attctttcca aaatttcgag 60
gaaccagggg gaattcccct agatcgcatg 90
- <210> 3
<211> 94
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> NF-kB 的核酸标签
- <400> 3
aaacaatgag acaccagga ttagatatca gtacaatgtg cttccacaaa ggatcaccag 60
caatattcca aaggaattc ccctagatcg catg 94
- <210> 4
<211> 107
<212> DNA
<213> 人工序列
- <220>
<223> GAL4 结合的核酸标签
- <400> 4
catgagacag cggagttacg tccagaagga caacatcttt gacatcgctt cttgaattgc 60
tgaccaaggg gctactgccg gactactgtc ctccgctaga tcgcatg 107
- <210> 5
<211> 322
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> NF-kB DNA 结合域

<400> 5
Met Ala Gly Pro Tyr Leu Gln Ile Leu Glu Gln Pro Lys Gln Arg Gly
1 5 10 15
Phe Arg Phe Arg Tyr Val Cys Glu Gly Pro Ser His Gly Gly Leu Pro
20 25 30
Gly Ala Ser Ser Glu Lys Asn Lys Lys Ser Tyr Pro Gln Val Lys Ile
35 40 45
Cys Asn Tyr Val Gly Pro Ala Lys Val Ile Val Gln Leu Val Thr Asn
50 55 60
Gly Lys Asn Ile His Leu His Ala His Ser Leu Val Gly Lys His Cys
65 70 75 80
Glu Asp Gly Ile Cys Thr Val Thr Ala Gly Pro Lys Asp Met Val Val
85 90 95
Gly Phe Ala Asn Leu Gly Ile Leu His Val Thr Lys Lys Lys Val Phe
100 105 110
Glu Thr Leu Glu Ala Arg Met Thr Glu Ala Cys Ile Arg Gly Tyr Asn
115 120 125
Pro Gly Leu Leu Val His Pro Asp Leu Ala Tyr Leu Gln Ala Glu Gly
130 135 140
Gly Gly Asp Arg Gln Leu Gly Asp Arg Glu Lys Glu Leu Ile Arg Gln
145 150 155 160
Ala Ala Leu Gln Gln Thr Lys Glu Met Asp Leu Ser Val Val Arg Leu
165 170 175
Met Phe Thr Ala Phe Leu Pro Asp Ser Thr Gly Ser Phe Thr Arg Arg
180 185 190
Leu Glu Pro Val Val Ser Asp Ala Ile Tyr Asp Ser Lys Ala Pro Asn
195 200 205
Ala Ser Asn Leu Lys Ile Val Arg Met Asp Arg Thr Ala Gly Cys Val
210 215 220
Thr Gly Gly Glu Glu Ile Tyr Leu Leu Cys Asp Lys Val Gln Lys Asp
225 230 235 240
Asp Ile Gln Ile Arg Phe Tyr Glu Glu Glu Asn Gly Gly Val Trp
245 250 255
Glu Gly Phe Gly Asp Phe Ser Pro Thr Asp Val His Arg Gln Phe Ala
260 265 270
Ile Val Phe Lys Thr Pro Lys Tyr Lys Asp Ile Asn Ile Thr Lys Pro
275 280 285
Ala Ser Val Phe Val Gln Leu Arg Arg Lys Ser Asp Leu Glu Thr Ser
290 295 300
Glu Pro Lys Pro Phe Leu Tyr Tyr Pro Glu Ile Lys Asp Lys Glu Glu
305 310 315 320
Val Asp

[0002]

<210> 6
<211> 147
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> GAL4 DA 结合域

<400> 6
Met Lys Leu Leu Ser Ser Ile Glu Gln Ala Cys Asp Ile Cys Arg Leu
1 5 10 15
Lys Lys Leu Lys Cys Ser Lys Glu Lys Pro Lys Cys Ala Lys Cys Leu
20 25 30
Lys Asn Asn Trp Glu Cys Arg Tyr Ser Pro Lys Thr Lys Arg Ser Pro
35 40 45
Leu Thr Arg Ala His Leu Thr Glu Val Glu Ser Arg Leu Glu Arg Leu
50 55 60
Glu Gln Leu Phe Leu Leu Ile Phe Pro Arg Glu Asp Leu Asp Met Ile
65 70 75 80
Leu Lys Met Asp Ser Leu Gln Asp Ile Lys Ala Leu Leu Thr Gly Leu
85 90 95
Phe Val Gln Asp Asn Val Asn Lys Asp Ala Val Thr Asp Arg Leu Ala
100 105 110
Ser Val Glu Thr Asp Met Pro Leu Thr Leu Arg Gln His Arg Ile Ser
115 120 125
Ala Thr Ser Ser Ser Glu Glu Ser Ser Asn Lys Gly Gln Arg Gln Leu
130 135 140
Thr Val Ser
145

<210> 7

[0003]

<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NF-kB 识别序列	
<400> 7	10
gggaattccc	
<210> 8	
<211> 11	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NF-kB 识别序列	
<400> 8	11
gggaaattcc c	
<210> 9	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> NF-kB 识别序列	
<400> 9	10
gggactttcc	
<210> 10	
<211> 10	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 变体	
<222> 4	
<223> R = 嘌呤	
<220>	
<221> 变体	
<222> 5, 6	
<223> N = 任意核苷酸	
<220>	
<221> 变体	
<222> 7, 8	
<223> Y = 嘧啶	
<220>	
<223> NF-kB 共有序列	
<400> 10	10
gggrnnyycc	
<210> 11	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> GAL4 识别序列	
<400> 11	17
cggagtactg tcctccg	
<210> 12	
<211> 17	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<221> 变体	

	<222> 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14	
	<223> N = 任意核苷酸	
	<220>	
	<223> GAL4 共有序列	
	<400> 12	
	cggnnnnnnn nnnnccg	17
	<210> 13	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> 1	
	<223> H = A, C, 或 T	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> 5	
	<223> R = 嘌呤	
	<220>	
	<221> 变体	
	<222> 7, 8	
	<223> Y = 嘧啶	
	<220>	
	<223> RelA/c-Rel 共有序列	
	<400> 13	
	hggarnyycc	10
	<210> 14	
	<211> 21	
[0004]	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Cro 抑制子识别序列	
	<400> 14	
	tctatcaccg cgggtgataa a	21
	<210> 15	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Lac 抑制子识别序列	
	<400> 15	
	ggaattgtga gcgctcaciaa tt	22
	<210> 16	
	<211> 10	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> GCN4 识别序列	
	<400> 16	
	agtgactcat	10
	<210> 17	
	<211> 22	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> Opaque-2 识别序列	
[0005]	<400> 17	

tgtcattcca cgtagatgaa aa	22
<210> 18 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> Opaque-2 识别序列	
<400> 18 tccacgtaga	10
210> 19 <211> 16 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> Lex-A 识别序列	
<400> 19 ctgtatatat atacag	16
<210> 20 <211> 6 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> TGA1a 识别序列	
<400> 20 gacgtc	6
<210> 21 <211> 10 <212> DNA <213> 人工序列	
<220> <223> EGR-1 或 Zif 268 识别序列	
<400> 21 gcgtgggcgt	10

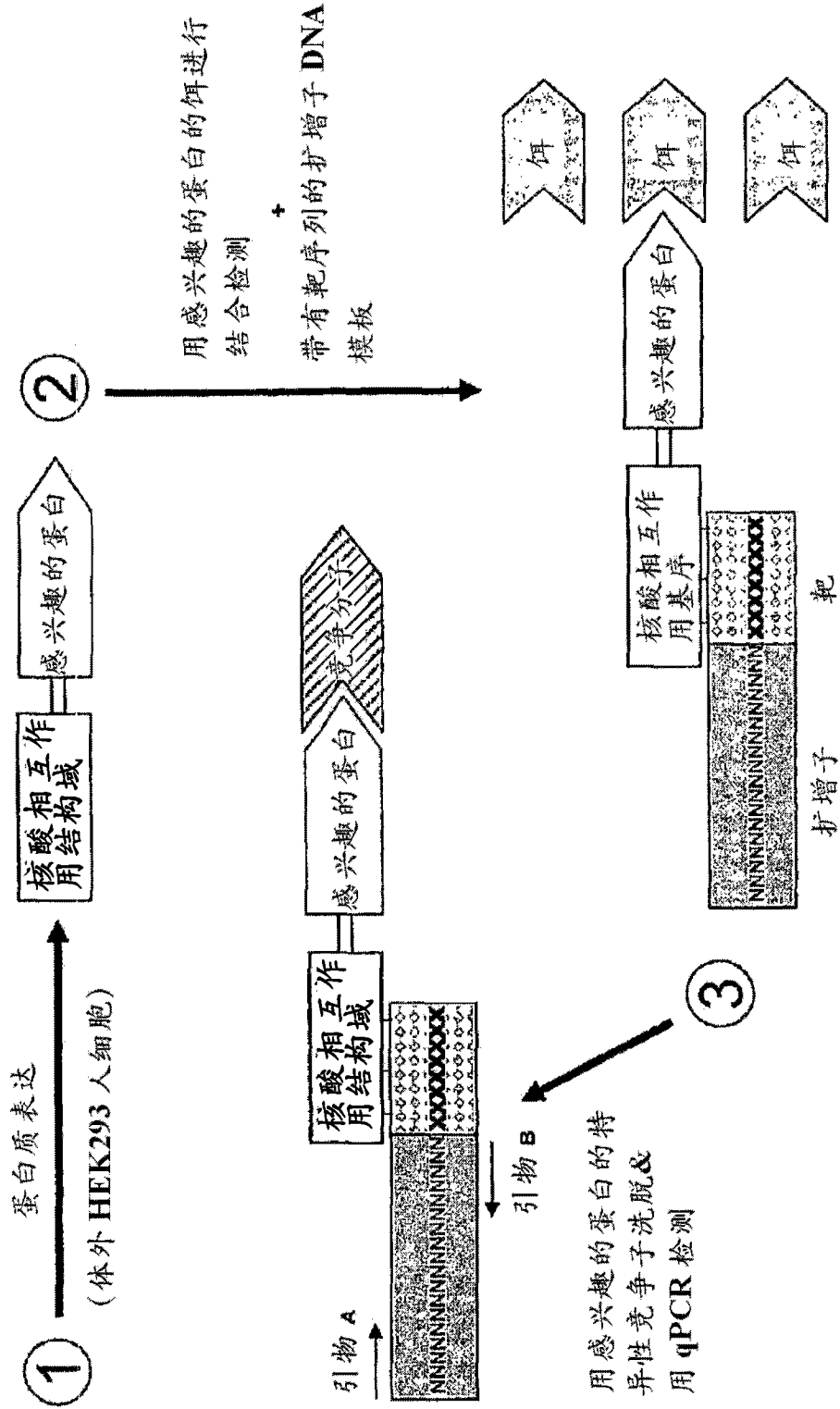
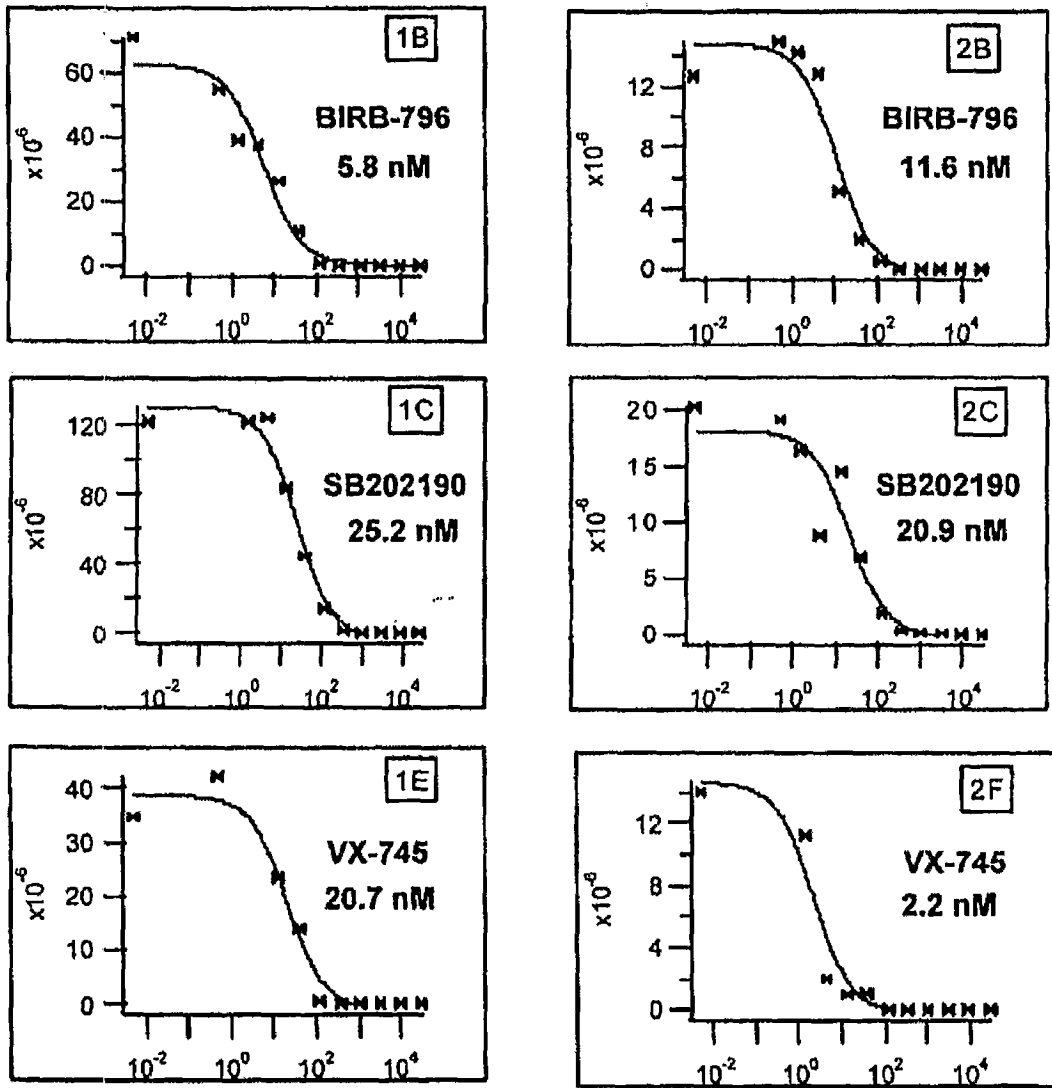


图 1

利用 GAL4::p38 DNA 标签的结合曲线



稀释 1:500

稀释 1:5000

图2

利用 NFkB::p38 DNA 标签的结合曲线

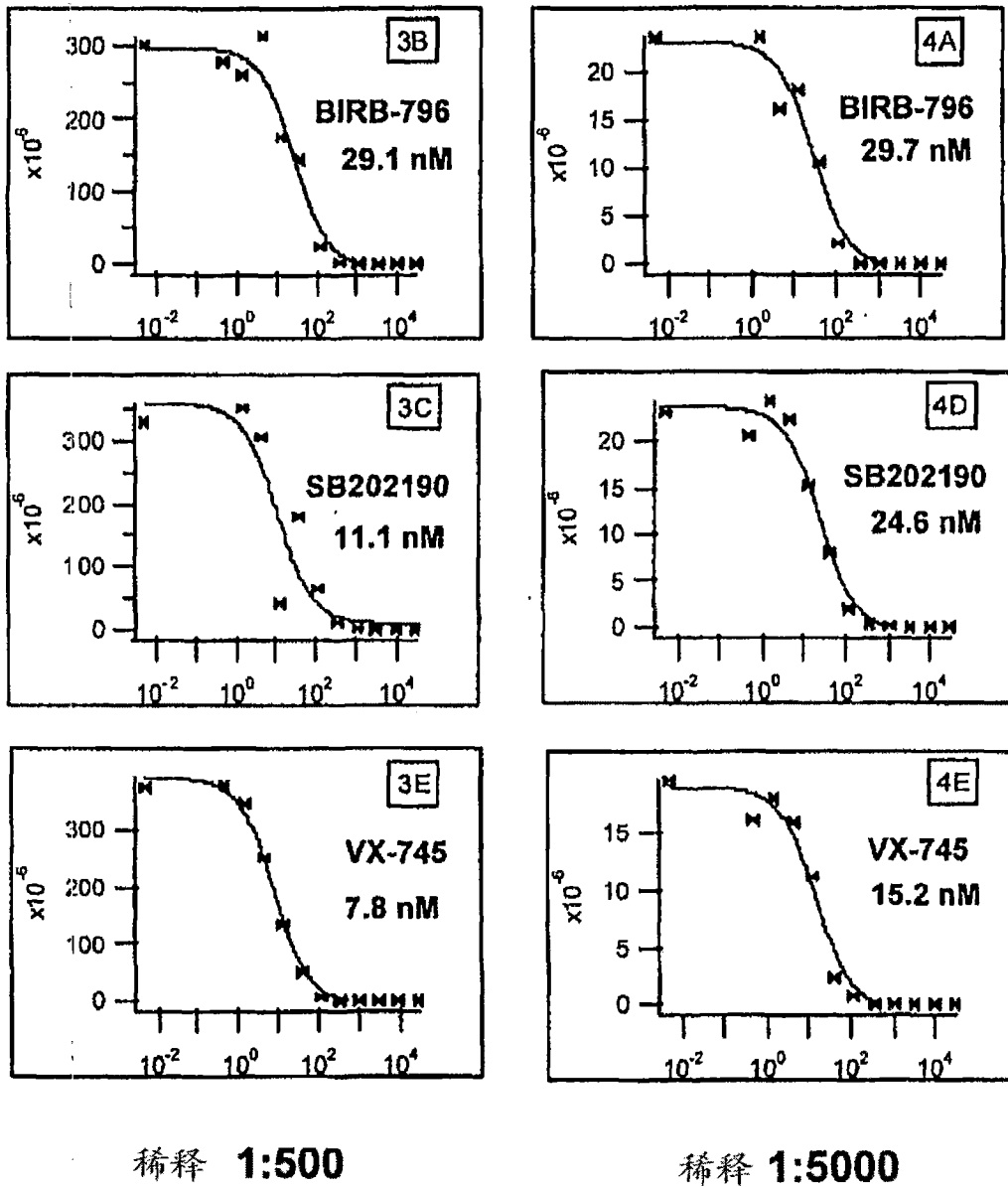
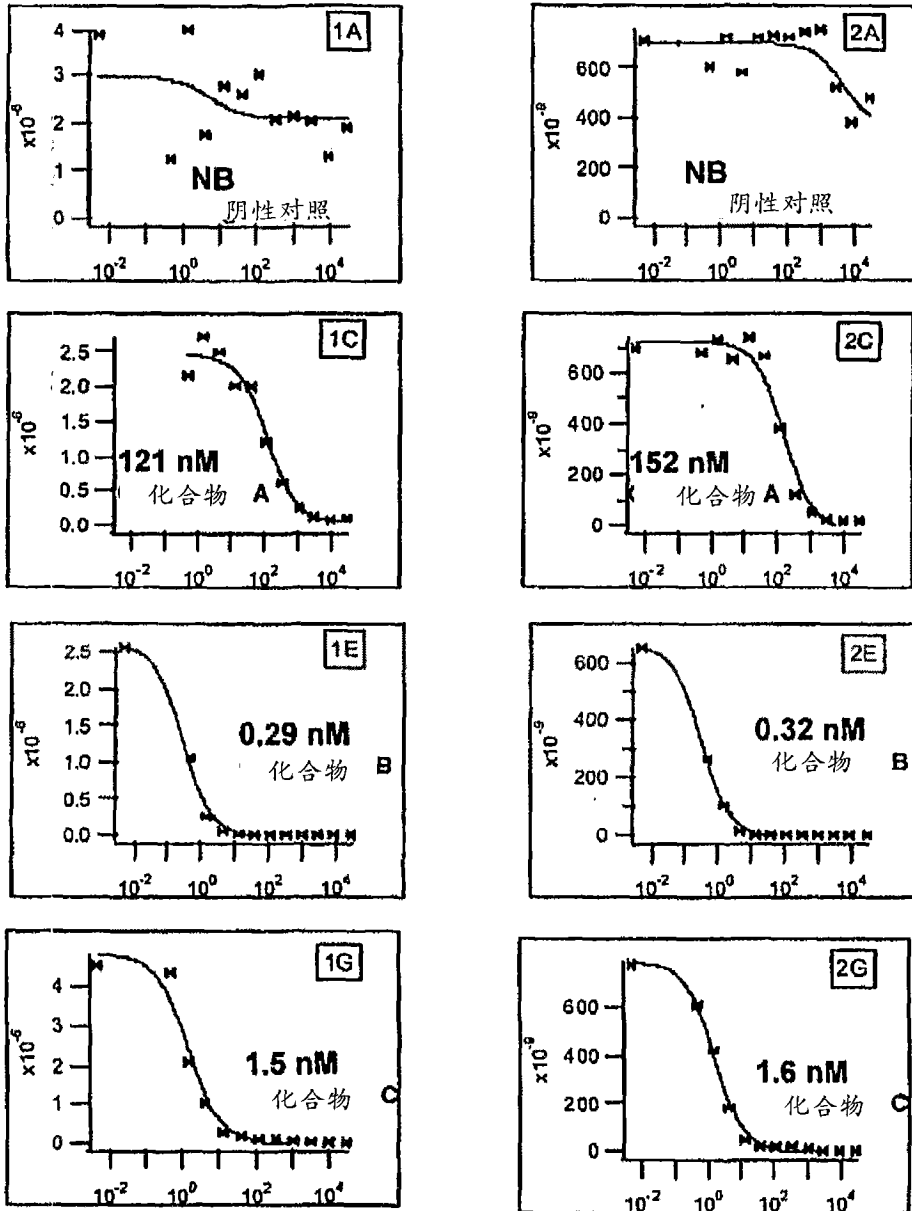


图3

利用 DNA- 标记的 GAL4::BRAF 的结合曲线

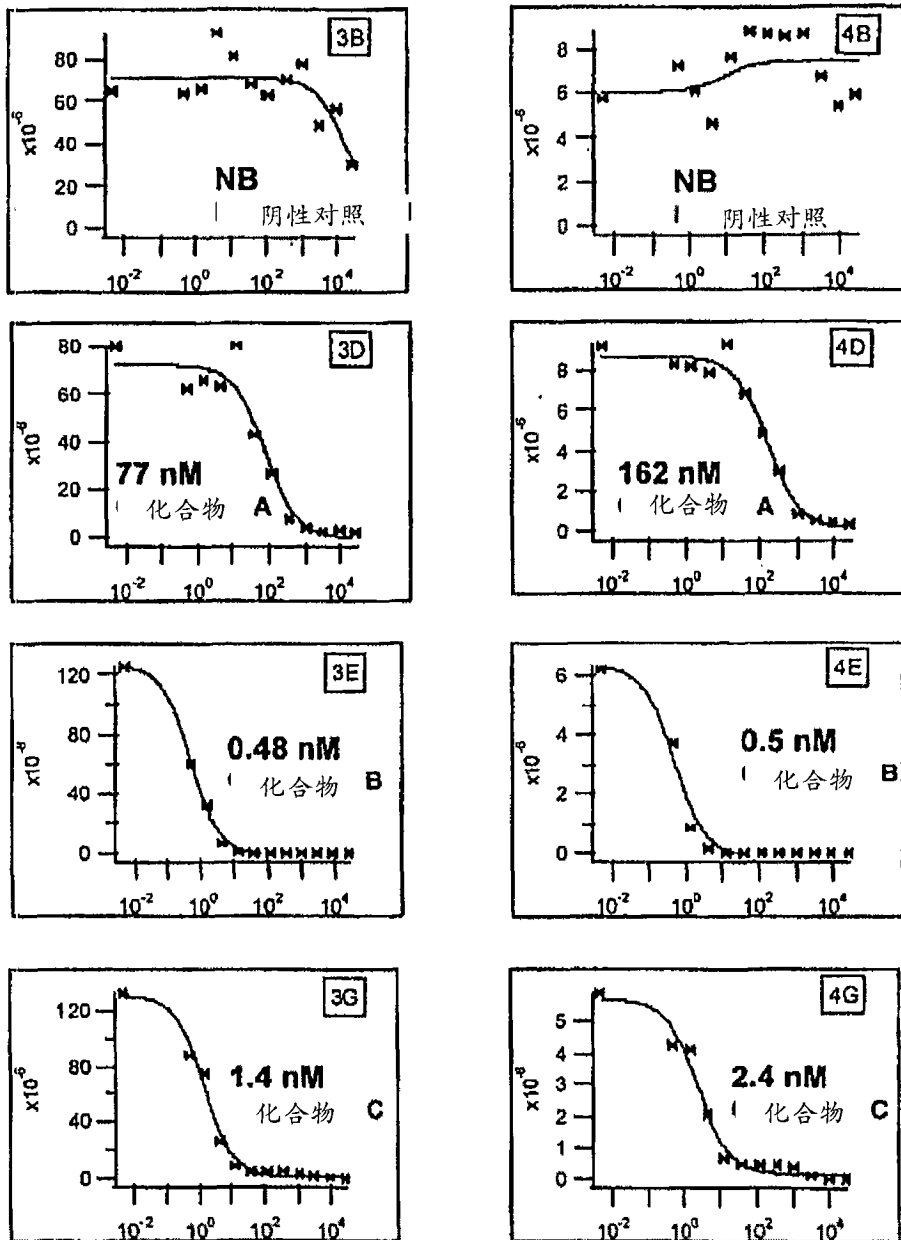


稀释 1:500

稀释 1:5000

图4

利用DNA-标记的NFkB::BRAF的结合曲线



稀释 1:500

稀释 1:5000

图5

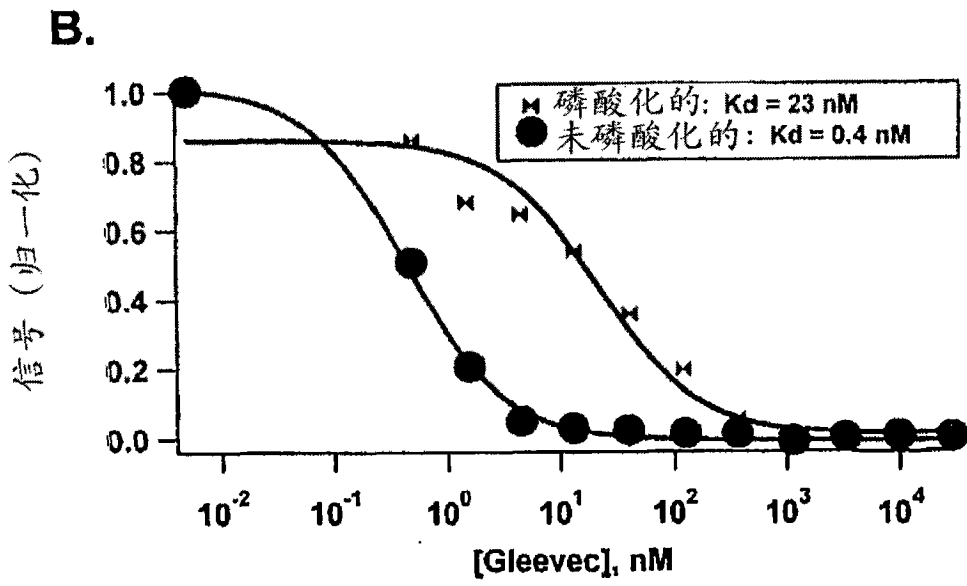
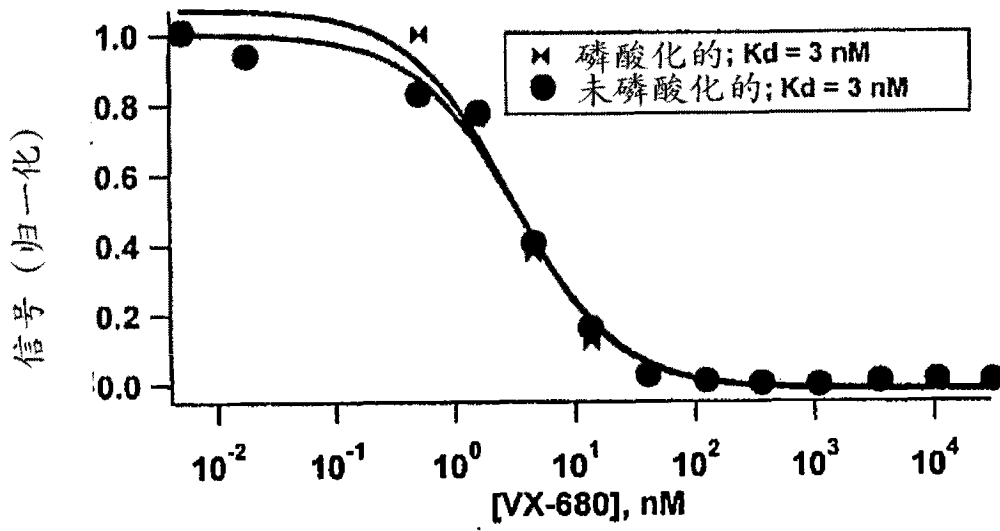


图6