

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/573 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 200480008623.8

[43] 公开日 2006年5月3日

[11] 公开号 CN 1768268A

[22] 申请日 2004.3.30

[21] 申请号 200480008623.8

[30] 优先权

[32] 2003.4.2 [33] DE [31] 10314965.1

[86] 国际申请 PCT/DE2004/000674 2004.3.30

[87] 国际公布 WO2004/087946 德 2004.10.14

[85] 进入国家阶段日期 2005.9.28

[71] 申请人 比奥斯考拉有限公司

地址 德国莱比锡

[72] 发明人 L·瓦斯尔茨

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所
代理人 吴亦华

权利要求书 2 页 说明书 12 页 附图 5 页

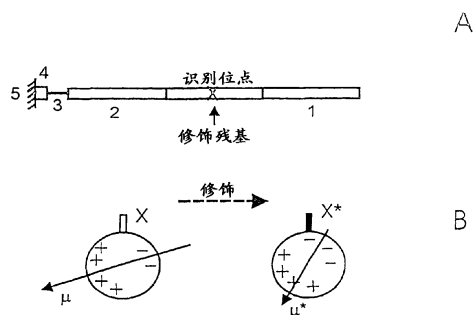
[54] 发明名称

检测翻译后修饰活性的方法及实施该方法的装置系统

[57] 摘要

本发明涉及一种在来自生物体细胞或具有测试化学药品的小液体样品中定性检测翻译后修饰活性的方法。作为翻译后修饰的实例，可提及通过激酶和磷酸酶的蛋白质的磷酸化-去磷酸化。所述方法的特征在于，合成蛋白质片段或多肽作为传感器。所述蛋白质片段或多肽由含有带电荷的氨基酸残基的部分 1 和 2 以及具有一个或多个修饰残基(X)的识别位点组成。因此，该传感器具有特殊的静电势分布和偶极矩。通过添加酶来进行传感器的修饰，这与分子的静电势分布的偏移以及偶极矩的变化是相关的。电势偏移是翻译后修饰活性的一个证据。建议使用多种不同的装置系统来实际施行该方法。本发明提供了一种快速、高度灵敏且有效的用于检测不同类型的翻译后活性的方法，该方法特别

适合于生物学多检测系统(生物芯片和高通量筛选)的领域，和特别是用于药物开发、医学诊断、基础研究和环境保护。



A

B

1. 检测翻译后修饰活性的方法，其特征在于，制备蛋白质片段或多肽作为传感器，所述蛋白质片段或多肽由含有一系列带电荷的残基的氨基酸残基（部分 1 和 2）以及包含一个或多个修饰残基 (X) 的识别位点组成，并具有分子静电势分布，其中以偶极矩来测量静电势分布，向传感器添加酶，重新测量偶极矩，静电势的变化以及由此产生的偶极矩的变化就是翻译后修饰活性的证明。

2. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，氨基酸残基（部分 1 和 2）具有 0-n 的残基数目和含有一系列的带电荷的残基。

3. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，具有一个或多个修饰残基 (X) 的识别位点是一个识别基团，该基团使得能够只通过特异的蛋白激酶或磷酸酶来进行修饰基团的转化。

4. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，氨基酸残基（部分 1 和 2）与识别位点和一个或多个修饰残基 (X) 一起表现出具有制造者预先规定的分子静电势分布和分子偶极矩的 3D 结构。

5. 根据权利要求 1-4 的方法，其特征在于，合成的蛋白质片段或者溶解在溶液中，或者放置在固体 (5) 上。

6. 根据权利要求 1 的方法，其特征在于，通过将静电势分布换算成其他的物理测量单位并以此表示，和以改变的其他物理测量单位的尺度测量或记录静电势变化，来测量由于翻译后修饰活性而引起的蛋白质片段的分子静电势分布的变化。

7. 根据权利要求 1 和 6 的方法，其特征在于，基于差异电容测量，通过以 ΔU 测量或记录变化来测定翻译后修饰活性。

8. 根据权利要求 1、6 和 7 的装置系统，其特征在于，适合于提供差异测量结果的测量设备作为该测定变化差异的装置系统的组成部分，并任选地在该设备后串联差异增强器 (15) 和随后设置交流/直流转换器 (16)。

9. 实施根据权利要求 1、6、7 和 8 的方法的装置系统，其特征

在于，将在修饰活性的结果中出现的变化通过本身已知的构件转化成模拟的物理测量结果，和考虑到数字评测在这些构件后串联一个模拟/数字转换器。

检测翻译后修饰活性的方法及实施该方法的装置系统

本发明涉及一种定性检测翻译后修饰活性的方法，即检测酶活性，所述酶活性通过形成特殊的基团如磷酸基团来修饰已经合成的蛋白质并改变其功能。

出现严重疾病如癌症、糖尿病、关节炎、心血管循环疾病、高血压和中风的原因是改变的蛋白质活性。本发明提供了一种快速、高度灵敏且有效的用于检测不同类型的翻译后活性的方法。用本发明的方法和装置系统，在生物学多检测系统的领域中对于所需测试的高通量（Hochdurchsatz）作出了重要的贡献。

在说明现有技术的更详细的实施方案之前，应当确认下列事实作为开场白：

用于快速检测具有生物活性的分析物的系统和方法（特别是在小液体样品中）具有高的医学和制药学意义以及环境保护意义。最全面和意义最重大的、对于药物开发特别重要的细胞活性类别之一是在翻译后修饰中起作用的活性。这些对于每个细胞为特征性的活性的结果是改变了经修饰的蛋白质的功能特性。蛋白质或多肽的翻译后修饰的主要机制是磷酸化、甲基化、异戊二烯化、遍在蛋白化和蛋白水解。不同的外部条件（刺激），例如生长因子的存在或病理状态的发展如细胞周期的变化以及毒素的作用，可以短暂地改变多种细胞内组分的翻译后状态。因此，快速开发出特定翻译后活性的特异且有效的抑制剂或激活剂是必需的。就这点而言，开发相应的样品和方法是重要的，这些样品和方法使得能够在多检测系统（微阵列，生物芯片）中可靠而灵敏地检测这些活性。

通过激酶和磷酸酶的蛋白质的磷酸化-去磷酸化可作为翻译后修饰的实例。激酶通过将磷酸基团连接至氨基酸残基（主要是丝氨酸、苏氨酸或酪氨酸）之上（磷酸化）来修饰蛋白质。与此相反，蛋白磷

酸酶去除这些磷酸基团，因此反转了磷酸化效果。蛋白质磷酸化状态的变化在活细胞中通过局部化和蛋白质之间的分子相互作用调节着酶活性。细胞中激酶和磷酸酶活性之间的总平衡是在每个时间点上蛋白质磷酸化状态的基础。一般认为，蛋白激酶和磷酸酶的作用属于蛋白质功能的最重要的调节机制。最新的对于疾病的认识和分析指向蛋白激酶的遗传检测，其可指明超过 400 种特殊的疾病状态，这些疾病状态本身被认为与改变的激酶活性相关。

因为异常的蛋白质磷酸化是出现严重疾病如癌症、糖尿病、关节炎、心血管循环疾病、高血压和中风的原因，所以对于制药工业来说感兴趣的是能够抑制蛋白激酶的磷酸化活性的新型化合物。

为了开发出新型的有效药物，必需测试借助于组合化学合成的大量的化合物。为此目的，制药工业需要使得能够以高通量规格进行所需的测试的新技术。

此外，还为了改善已经开发出的药物的作用，必需检验这些药物在多大程度上影响着蛋白激酶和磷酸酶的活性。例如：环孢菌素是一种免疫系统抑制剂，没有这种物质就无法进行器官移植。最近更新的研究才表明，该药剂的作用机制是通过抑制蛋白质磷酸酶 PP2B 而起作用的。

现有技术的详细说明

本身已知的生物芯片技术是一种非常有效的方法，其对于医学诊断和药物开发带来了革命性的改变。使用基因芯片例如能够在一次试验中容纳肿瘤或其他组织的全部的转录样本。基因芯片的开发和制备已经到了后期。改变的蛋白质活性如上所述是严重疾病的原因，这种蛋白质活性的变化是借助于基因芯片无法探查到的。因此需要开发出有效的蛋白质芯片技术（以多检测规格快速评测改变的蛋白质活性的方法）。由于蛋白质芯片技术的高度复杂性，这种技术目前只能有限地进行使用。

国际上的现有技术状态：

当前的激酶活性的检测方法通常基于通过在蛋白质底物中嵌入放

放射性磷酸 ^{32}P 的测量。在使用这种方法时，必须对于细胞使用非常高剂量的放射活性，以便标记整个的细胞内 ATP 库并确保目标蛋白质的放射活性标记。为了检测目标蛋白质的相对磷酸化，必须在将细胞与测试物质进行温育之后裂解细胞并纯化目标蛋白质。该方法需要大量的细胞、长的温育时间和小心的处理操作，以避免错误的磷酸化-去磷酸化结果。此外，这种方法还需要目标蛋白质的纯化。因为目标蛋白质的末端磷酸化可以是非常低水平的，所以该方法有着非常差的效率。对于环境和健康特别严重的是大量使用放射活性，而高剂量的放射活性对于在高通量试验中施行该方法是必需的。

用于测定激酶活性的其他可选的方法是基于磷酸化特异性抗体的方法，如 ELISA 和蛋白质印迹法。这种方法的缺点在于，制备抗体以及区分蛋白质的磷酸化和去磷酸化状态是困难的和成本非常高的。

质谱仪 (MALDI 和 ESI) 在 15 年前已经用于测定经蛋白水解的蛋白质片段的一级结构。理论上，该方法的质量分辨率对于检测具有 80 Da 的质量差异的磷酸化来说是足够的。然而，由于磷酸键的不稳定性和其在测量方法过程期间从蛋白质残基上的快速分解，所以 MALDI-MS 只可能有条件地用于磷酸化检测。磷酸化的质谱仪检测常常导致假阴性结果。此外，质谱仪的成本是极高的。

从专利 US 6,410,255 中获知一种使得能够检测激酶活性的方法。该方法涉及一种为发荧光基团的传感器，该发荧光基团与一个激酶特异性部分和一个蛋白酶敏感性部分一起嵌入多肽中。蛋白质的修饰导致改变的蛋白酶裂解位点的可接近性和发荧光基团的分解。这借助于荧光显微镜进行检测。除了激酶之外，该方法还需要存在蛋白酶，它们之间的相互作用可能导致假象。缺点是荧光显微镜的高成本和需要对目标肽进行荧光标记。

除了迄今说明的在检测激酶和磷酸酶活性时的缺点以外，到目前为止可以总结性地强调指出，在具有成千种组分的小样品体积中只有有限的快速检测这种活性的可能性。

现在，还应当短时间地研究一下标题为“Bio-Chip”的专利 DE 100

51 252 A1。该 DE 专利描述了一种定性和/或定量检测分析物的方法，该分析物具有极化分子，特别是以分子形式溶解的生物分子。只要在测量室中存在有基质，具有大量的各为一个电容器的小测量室($< 1 \text{ mm } \varnothing$)的传感器有着一定的电容。如果将附加的材料以待检测的分子的形式置于基质上，那么该电容器的电容就会发生变化。该电容变化与分析物的浓度相关。当将生物活性物质引入测量室中时，会出现获取准确的测量数据的问题。此外，用于采用相应的测量电子学进行评测的、具有弹簧接点的细小机械系统有时成为测量误差的起因。快速测量的合理可能性是不可能的。DE 100 51 252 A1 的这一解决方案是用于测量蛋白质结合的生物芯片 (Bio-Chip)；而翻译后修饰活性的检测是不可能的。

因此，本发明的任务是提供一种测定翻译后活性的自动化方法，该方法是高度灵敏的和不复杂的，以及可能能够用于所有激酶和磷酸酶活性。该方法应当不使用染料以及发荧光性或放射性物质。

通过快速检测翻译后活性和成千种组分，将会对于药物的研究和开发、环境技术的基础研究以及分子医学诊断这些领域作出重要的贡献。用相应的装置系统来实施该方法。

根据本发明这一任务可如下得以完成，即其中关于基本的想法可参阅权利要求 1。本发明的其他布置可从权利要求 2-9 中获知。

为了阐述本发明，进一步的说明是必需的。

该技术解决方案使得能够在具有分析物或酶的液体样品中快速和有效地检测翻译后活性，这基于各自所使用的传感器的物理-化学特性的变化。液体样品是来自细胞的样品或具有测试物质的样品，向这些样品中添加了酶。

为了检测翻译后修饰活性而开发出的传感器由合成的蛋白质片段或肽组成，这些蛋白质片段或肽含有对于蛋白质、激酶或其他酶的识别位点。与对于实施例所作的说明相联系可研究一下这种传感器的示意性图示。“识别位点”存在于两个氨基酸残基基团即部分 1 和部分 2 之间，这两个基团具有 0-n 的氨基酸残基数目和一系列的带电荷的

残基。如此设计传感器，从而其具有有着特殊的分子静电势分布的三维（3-D）结构和分子偶极矩 μ 。作为上述的翻译后活性的结果，在识别位点内部改变一个修饰残基。与之相应地，静电势分布发生变化，并且出现传感器偶极矩 μ^* 。传感器的偶极矩的变化用如在实施例中还会说明的电学或光学方法进行检测。

下面的表 1 显示了能够用于检测蛋白激酶 A (PKA)、蛋白磷酸酶 2B (PP2B)、酪氨酸激酶 (TK)、酪氨酸磷酸酶 (TP) 和蛋白激酶 C (PKC) 活性的传感器的实例。

表 1: 传感器的一级结构 (粗体表示修饰残基, 斜体表示识别位点)

部分 1	识别位点	部分 2	活性	传感器编号
ELDVP IPGRFD	<i>RRVS</i>	VAAD	PKA	S1
ELDVP IPGRFD	<i>RRVpS</i>	VAAD	PP2B	S2
E I	<i>YETDYY</i>	D	TK	S3
E I	<i>pYETDpYpY</i>	D	TP	S4
EPEAVA EHG	<i>DKKS</i>	KKAKKER	PKC	S5

具有希望的 3D 结构的传感器的形成通过借助于生物信息学方法的分子模拟来完成 (例如在 Swiss-Prot 和 PDB 数据库中搜寻, 用 MOE 或 SYBYL 优化结构, 计算未修饰的和修饰的多肽的分子静电势和偶极矩)。对此可参阅: Brandt, W., Anders, A. 和 Vasilets, L. A. (2002) Predicted alterations in tertiary structure of the N terminus of the Na⁺/K⁺-ATPase α subunit caused by acidic replacement or PKC-mediated phosphorylation of Ser-23. Cell. Biochem. Biophys. 37: 83-95.

例如: 未磷酸化的表 1 中的 PKC-传感器 5 (S5) 的偶极矩为大约 203 D, 其中丝氨酸的磷酸化导致该传感器的偶极矩的方向改变并减小至 144 D。

至此可总结性地强调指出:

本发明基于根据传感器的物理-化学特性的变化而在液体样品中

检测翻译后活性，而无需标记目标肽。作为用于检测传感器的偶极矩变化的实验方法的实例，可以提及测量介电常数（介电常数）、张弛电流、折射率、密度或偏振光的强度。

现在，将依赖于具有补充性提示的实施例进行解释本发明。

附图：

1-传感器的示意图

2-用于借助于光学测量来检测翻译后活性的装置的示意图

3-通过测量相对介电常数 ϵ 来检测肽修饰

4-借助于差异测量来检测翻译后修饰活性

5-通过测量振荡器的频率偏移来检测肽修饰

图 1 中，参考符号各具有以下含义：

1-一系列氨基酸残基（部分 1）

2-一系列氨基酸残基（部分 2）

3-衔接物

4-结合位置

5-固体

X-修饰残基

图 2 中，参考符号各具有以下含义：

6-光源

7-偏振器

8-测量室

9-光分析器

10-光检测器

P-偏振光

图 3A 中，参考符号各具有以下含义：

11-测量室

图 4A 中，参考符号各具有以下含义：

12-频率发生器

13-测量电容 C1

14- 测量电容 C2

15- 差异增强器

16- 交流/直流转换器 (AC/DC 转换器)

图 1 是一个传感器, 其根据本发明为合成的多肽, 并含有蛋白激酶或其他酶的“识别位点”。图 1A 显示了这样的传感器的示意图。具有一个或多个修饰残基 X 的“识别位点”存在于两个氨基酸残基基团 (部分 1 和部分 2) 之间, 这两个基团具有一系列的带电荷的残基。部分 1 和 2 与识别位点一起如此构建, 从而导致具有有着特殊的分子静电势分布的三维 (3-D) 结构。因此, 该传感器具有分子偶极矩 μ 。作为上述的翻译后活性的结果, 识别位点内的修饰残基 X 转变为修饰残基 X^* 。静电势分布和传感器偶极矩 μ^* 因而发生变化 (图 1B)。传感器的物理-化学特性的这些变化借助于电学或光学方法 (见下文) 进行检测。

在本发明的一个变化形式中, 传感器可以借助于柔韧的衔接物 3 和结合基团 (His-tag) 而固定在用 Ni-NTA 树脂涂覆的固体 5 上 (图 1), 所述固体 5 为玻璃表面、塑料球或电介质。

在本发明的另一个变化形式中, 可以直接在用电介质涂覆的固体表面上合成传感器。

在本发明的另外一个变化形式中, 可以将传感器以分子形式溶解在水中。

图 2 显示了用于使用该传感器依据样品的光学特性变化来检测翻译后活性的方法的示意图。具有液体样品的检测室 (测量室 8) 和传感器位于偏振光 \vec{P} 的光源和光分析器 9 之间。两块薄玻璃板在内部用金涂层和电介质覆盖。它们用作接触电极。所检测的光的强度变化 ΔI 与 $\cos^2 \alpha$ 成正比 (α 是偏振光 \vec{P} 的旋转角度):

$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \quad (1)$$

在电压存在下, 传感器的偶极分子由于热运动而随机排列。电场

E 引起偶极的部分对齐，因为其与根据玻耳兹曼统计力求使得偶极定向随机分布的分子的热运动相互竞争。在通常的测量条件 $\mu E \ll kT$ 下，可以如下计算电场方向上的平均力矩：

$$\bar{\mu}_E/\mu \simeq \mu E / 3kT \quad (2)$$

其中， μ 是单个分子的偶极矩， $\bar{\mu}_E$ 是电场方向上的表观平均偶极矩，E 是电场强度，T 是绝对温度， $k = 1.3807 \times 10^{23} \text{ JK}^{-1}$ 。因为偏振光的旋转度数与具有传感器的样品的光活性成正比，而样品的光活性另一方面与电场方向上的分子数目成正比，所以得到：

$$\Delta I \sim \cos^2 \alpha \sim N = \bar{\mu}_E/\mu = \mu E / 3kT \quad (3)$$

如果由于翻译后活性而引起分子偶极矩发生变化，那么这会导致所检测的光强度的变化。

根据另一种用于检测翻译后活性的变化形式，测量具有传感器的液体样品的介电常数（介电常数）。如从图 3A 中所见的，样品存在于用作电容器的检测室（测量室 11）中。通过在电容器平板之间引入极化电介质而将真空中的电场强度 E_0 减少 P/ϵ_0 ：

$$E = E_0 - P/\epsilon_0 \quad (4)$$

其中， $E_0 = E/\epsilon$ ，P 为具有介电常数 ϵ 的电介质的诱导的极化强度。得到：

$$\epsilon = \epsilon_0 + P/E \quad (5)$$

因为极化强度具有每个体积单位的偶极矩的含义，所以 P 与表观平均偶极矩 $\bar{\mu}_E$ 成正比，表观平均偶极矩 $\bar{\mu}_E$ 根据等式 (2) 为 $\bar{\mu}_E = \mu^2 E / 3kT$ ，

由此得到 ε :

$$\varepsilon = \varepsilon_0 + \mu^2/kT \quad (6)$$

如果偶极矩由于翻译后修饰而改变,那么这根据等式(6)就会导致介电常数的变化。

如果将传感器分子(s)溶解在水(w)或其他溶剂中,必须注意这些溶剂的摩尔极化强度:

$$P = P_w \cdot x_w + P_s \cdot x_s \quad (7)$$

其中, x_s 是传感器的摩尔分数, $x_s = n_s/(n_w+n_s)$, 和 x_w 是水的摩尔分数, $x_w = n_w/(n_w+n_s)$ 。

图 3B 显示了对于两个合成的模拟肽 S1 和 S2 (表 1) 的介电常数变化的例子。

将溶解在水中的多肽(S1)或(S2)作为电介质放置在测量电容器(测量室 11)的电极板之间,见图 3A。多肽 ELDVPIPGRFDRRVSAAD (S1) 是催化丝氨酸磷酸化的蛋白激酶 A 的特异性底物。多肽 ELDVPIPGRFDRRVpSVAAD (S2) 的丝氨酸的去磷酸化由磷酸酶 PP2B 来进行。未磷酸化的多肽(S1)的介电常数 ε_s 为 76, 而磷酸化的多肽(S2)的介电常数减小为 70。因此,这种方法使得能够检测酶的活性。

为了通过测量相对介电常数 ε 而在试验中检测肽修饰,还要补充:在测量电容器的电极板之间直接引入 4 μ l 各具有多肽 S1 (未磷酸化的) 或 S2 (磷酸化的) (表 1) 的样品, 其以 1.14 mM 的浓度溶解在 H₂O 中。介电常数 ε 的测量在 $t = 23^\circ\text{C}$ 的温度下进行。在本实施例中,最小的样品体积不应位于 4 μ m 之下。蛋白质浓度必须位于毫摩尔范围之内,这一浓度范围限制了这些测量方法用于生物芯片的应用。

为了能够将这些测量方法用于生物芯片,开发出了差异电容测量,此测量将样品体积减小至 0.5 μ l 以下,以及将蛋白质浓度减少至 10^{-5}

M. 图 4A 和 4B 显示了这种差异测量的结果。特别有利的是位于 ms 范围内的这种电测量的高时间分辨率, 这取决于样品引入的速度。因此, 这些方法使得不仅能够在小液体样品中检测修饰活性, 而且能够记录其动力学数据。

关于用于差异测量的装置的结构可参见图 4A。该测量装置由频率发生器 12, 整合入芯片板 (Chip-Platte) 中的测量电容 13、14, 增强器 15 和交流/直流转换器 (AC/DC 转换器) 16 构成。与测量电容 13 和 14 的电容的差异成正比的输出信号的幅度借助于 AC/DC 转换器而转变成直流电压差异 ΔU 。这一直流电压差异 ΔU 通过记录仪而被记录下来 (见图 4B 和 4C), 或者借助于模拟/数字转换器接入数字评测系统中。

图 4B 显示了使用用于蛋白激酶 A 活性的传感器 (ELDVPIPGRFD \overline{RRV} SVAAD (S1)) 和用于磷酸酶 PP2B 活性的传感器 (ELDVPIPGRFD \overline{RVp} SVAAD (S2)) 的差异测量。

图 4C 显示了使用用于酪氨酸激酶活性的的传感器 (EIYETDYD (S3)) 和用于酪氨酸磷酸酶活性的传感器 (EI \overline{p} YETD \overline{pYp} YD (S4)) 的差异测量。

所有的传感器都是以 20 μM 的浓度溶解在 H_2O 中, 并且涂覆在测量电容器 C1 13 或 C2 14 中 (见图例)。样品体积为 0.5 μl 。所有的测量均在室温下进行。

根据用于检测翻译后活性的本发明的另一种变化形式, 将溶解在水中的多肽 (S1) 或 (S2) 作为底物装入测量室中, 该测量室具有电感 L 和电容 C, 并用作振荡器 (图 5)。振荡器的频率 ω 由 $\omega = 1/LC$ 确定, 其可以高精度度 (10^{-5}) 测量。当样品含有磷酸化的多肽 S2 而不是未磷酸化的多肽 S1 时, 可看到频率的明显减小 (图 5)。

为了通过测量振荡器的频率偏移来检测肽修饰, 在试验中如下进行操作:

将装有 150 μl 具有未磷酸化的多肽 S1 或磷酸化的多肽 S2 的样品 (在 H_2O 中的浓度为 1.14 mM) 的小管作为核心放置在振荡器的感应线

圈中。频率 f 在温度 $t = 22^\circ\text{C}$ 时测得, $f_0 = 5342.9 \text{ kHz}$ 。

肽修饰还可以通过测量折射率来确定。根据磁学的麦克斯韦 (Maxwell'schen) 理论, 在相对介电常数和于相同频率下测得的折射率 n 之间存在如下关系: $\epsilon = \epsilon/\epsilon_0 = n^2$ 。这使得能够通过折射率的变化来检测由翻译后活性引起的分子偶极矩的变化:

$$n = (1 + \mu^2/kT \epsilon_0)^{1/2} \quad (8)$$

由于来自细胞或生物体的液体样品是非常复杂的, 和具有许多蛋白质和更小极化分子, 因此这导致此类样品的上述物理-化学特性的很大的可变性。为了在复杂的液体样品中检测翻译后活性, 重要的是实施差异测量。介电常数、折射率和光强度例如可以作为具有和没有传感器的样品或者在用传感器温育之前和之后的样品之间的差异而进行检测。

总结:

上述用于检测翻译后修饰活性的方法使得能够用松开的或固定的传感器或者蛋白质片段, 在使用前面说明的装置系统的情况下, 在溶液中检测蛋白激酶活性和磷酸酶活性。

由于处于经修饰的和未经修饰的状态下具有不同的分子偶极矩, 因此通过翻译后修饰活性的差异电容测量能够将样品体积减小至 $0.5 \mu\text{l}$ 以下, 以及将传感器多肽浓度减少至 10^{-5} M 。因此, 所述方法使得能够在最小的样品体积中测定几种修饰活性, 并记录其动力学数据。

开发出的用于差异电容测量的电子系统使得能够以有效的、不复杂的、快速的和低成本的方式检测翻译后修饰活性。

本发明的应用范围涉及制药工业 (大规模和中等规模的企业)、医学诊断和基础研究, 以及涉及生物技术企业, 其具有下列目标:

- 改善和优化用于新合成的和已经存在的化合物的高通量测试系列
- 在临床前研究工作中研究它们对于蛋白激酶活性和磷酸酶活性的

抑制作用。

需要强调的本发明方法的特点为：

- 可能能够测量几种翻译后修饰活性的动力学
- 达到了测量非常不稳定的修饰作用如组氨酸和精氨酸氨基酸残基的磷酸化的前提条件。

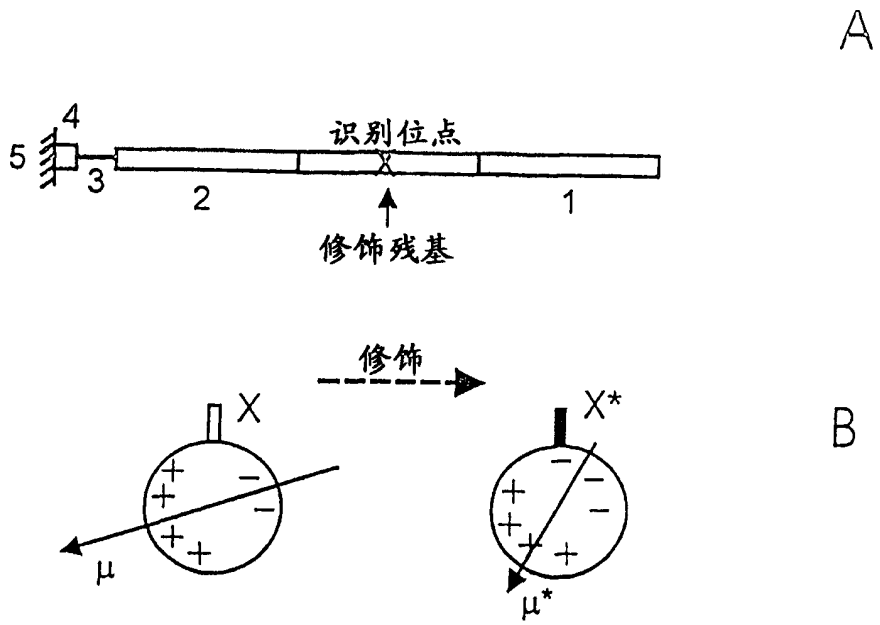


图1

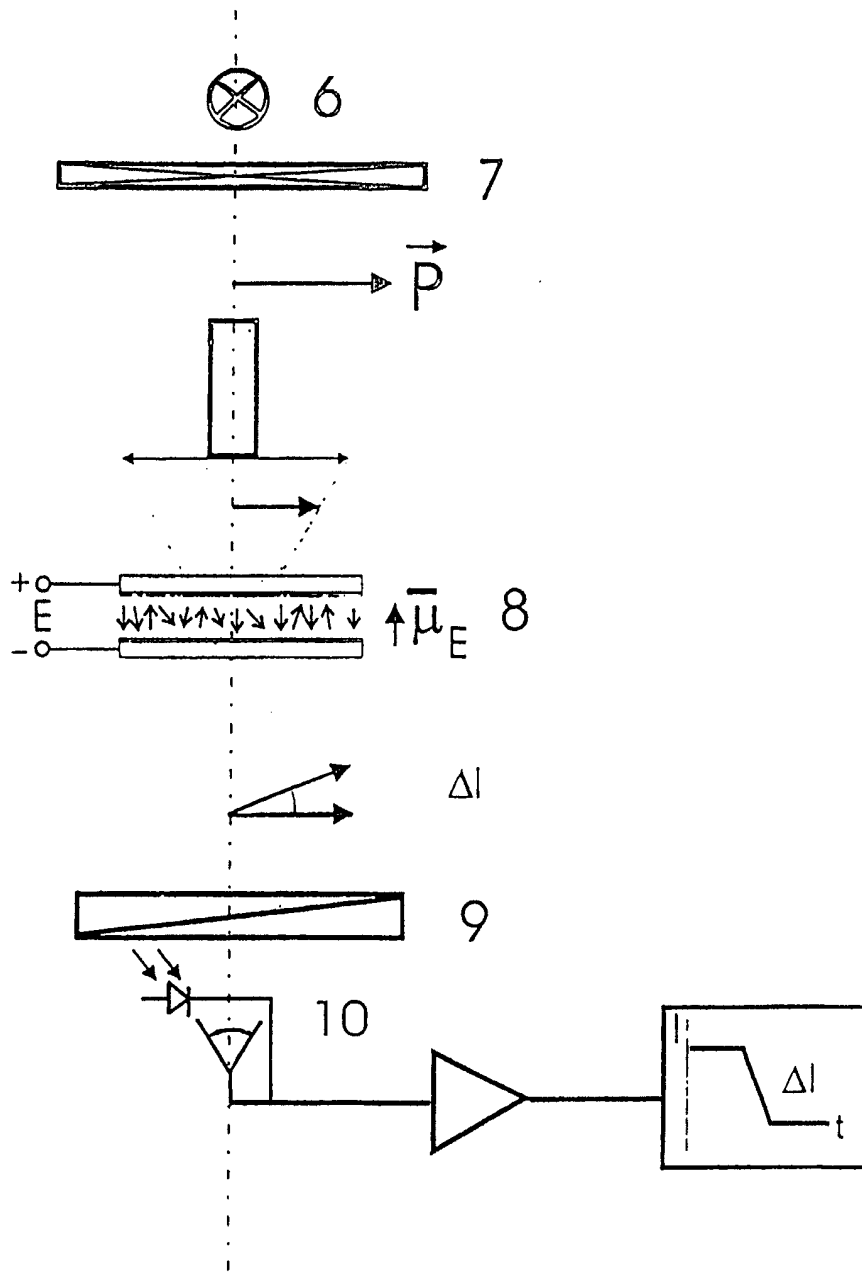


图2

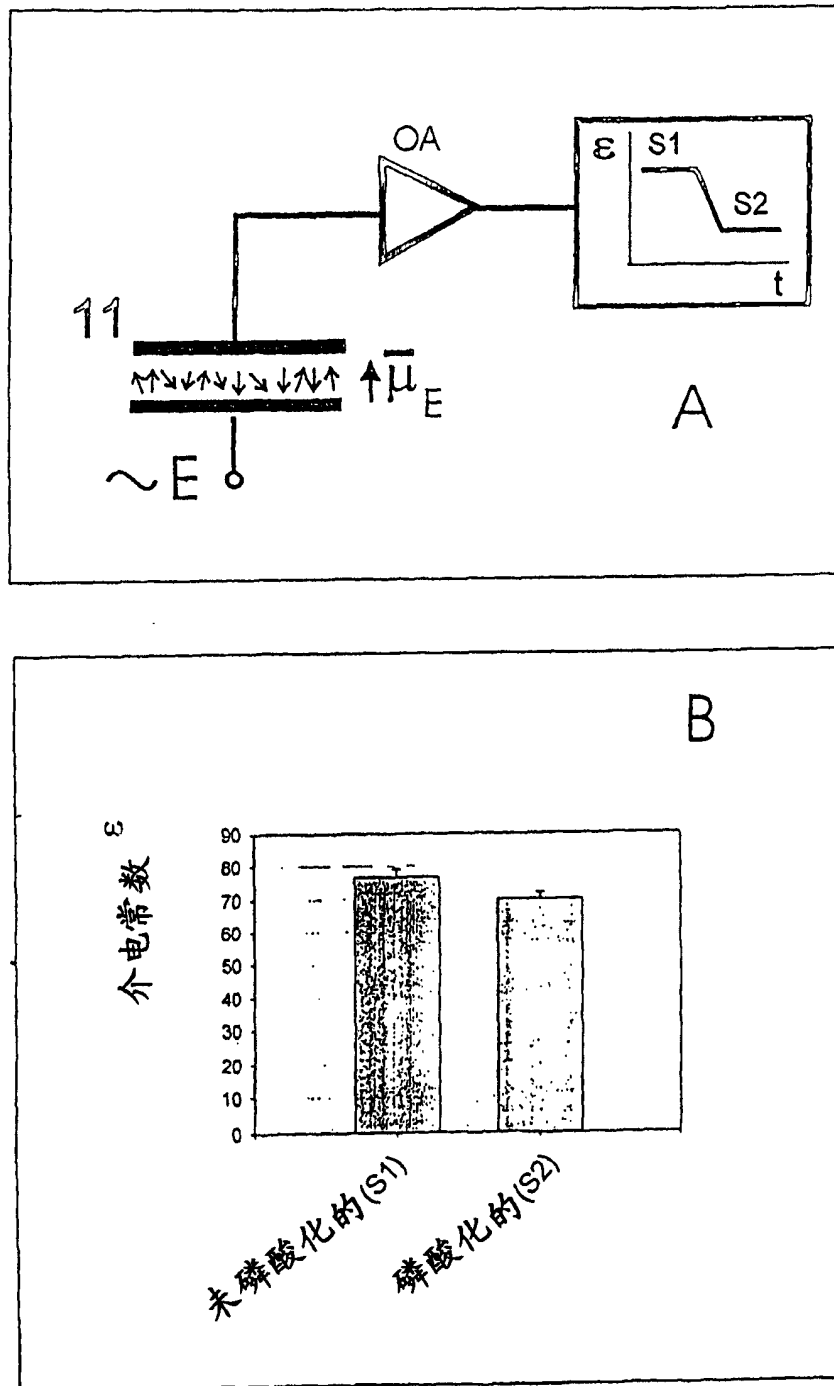


图3

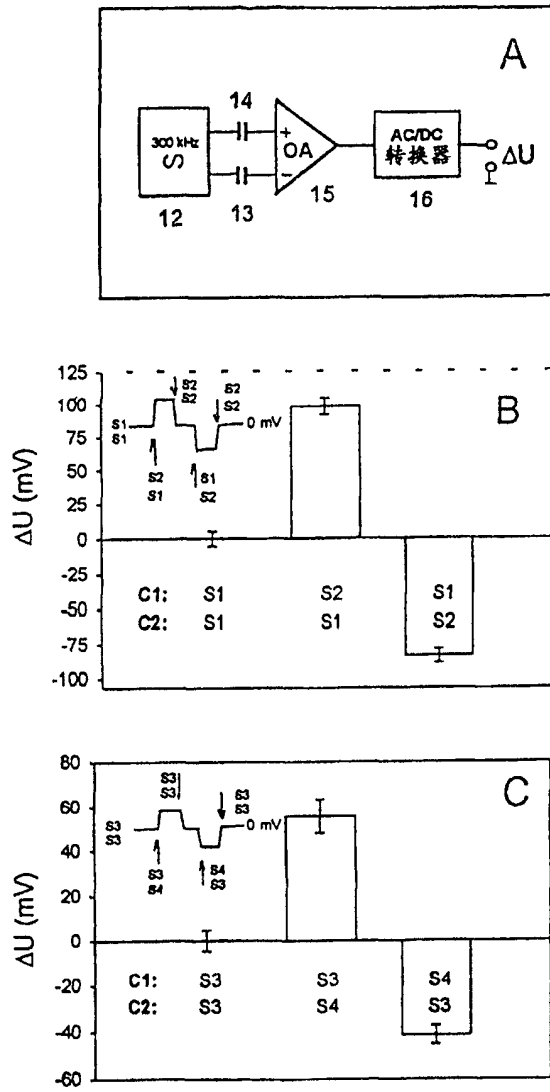


图 4

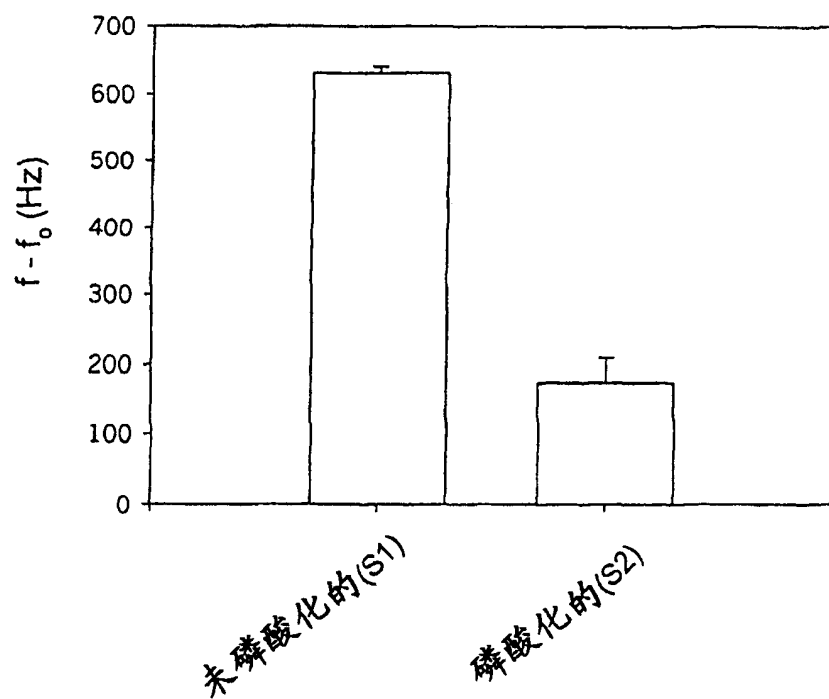


图5