

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200680052453.2

[51] Int. Cl.
C07K 16/00 (2006.01)
C12P 21/08 (2006.01)

[43] 公开日 2009年2月11日

[11] 公开号 CN 101365721A

[22] 申请日 2006.12.6

[21] 申请号 200680052453.2

[30] 优先权

[32] 2005.12.6 [33] US [31] 60/742,922

[86] 国际申请 PCT/US2006/046431 2006.12.6

[87] 国际公布 WO2007/067557 英 2007.6.14

[85] 进入国家阶段日期 2008.8.6

[71] 申请人 普罗梅格公司

地址 美国威斯康星

[72] 发明人 S·A·高利 肖圭玄 M·库马
J·维度吉里尼

[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 陈轶兰

权利要求书5页 说明书28页 附图11页

[54] 发明名称

环核苷酸测定方法

[57] 摘要

本发明总地涉及细胞分析工具，更特别涉及检测或测定样品中的环核苷酸浓度的方法。

1. 测定样品中环核苷酸量的方法，包括：
 - a) 提供可能含有环核苷酸的样品，
 - b) 向所述样品中加入能被所述环核苷酸活化的无活性酶，
 - c) 加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统，及
 - d) 基于所述信号测定存在于所述样品中的环核苷酸的量。
2. 权利要求1的方法，其中所述样品包含裂解物。
3. 权利要求2的方法，其中所述裂解物来自真核细胞。
4. 权利要求1的方法，其中所述样品包含质膜。
5. 权利要求1的方法，其中所述环核苷酸是cAMP或cGMP。
6. 权利要求1的方法，其中所述无活性酶是依赖于cAMP的蛋白激酶或依赖于cGMP的蛋白激酶。
7. 权利要求1的方法，其中所述检测系统包括能被依赖于cAMP的蛋白激酶或依赖于cGMP的蛋白激酶磷酸化的底物。
8. 权利要求7的方法，其中所述底物包含SEQ ID NO: 1。
9. 权利要求7的方法，其中所述检测系统进一步包括能利用ATP产生发光信号的酶。
10. 权利要求9的方法，其中所述酶是萤光素酶。
11. 权利要求7的方法，其中所述底物包括放射性标记的生物素化底物。
12. 权利要求11的方法，其中所述底物进一步包含SEQ ID NO: 1。
13. 权利要求11的方法，其中所述检测系统进一步包括链霉抗生物素结合表面。
14. 权利要求7的方法，其中所述底物包括荧光标记的底物。
15. 权利要求14的方法，其中所述底物进一步包含SEQ ID NO: 1。
16. 权利要求14的方法，其中所述荧光标记是罗丹明部分。
17. 权利要求1的方法，进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑

制剂。

18. 权利要求 1 的方法, 进一步包括添加能影响所述样品中环核苷酸量的激动剂或拮抗剂。

19. 权利要求 18 的方法, 其中所述激动剂或拮抗剂调节腺苷酸环化酶活性。

20. 权利要求 18 的方法, 其中所述激动剂或拮抗剂调节 G 蛋白偶联受体活性。

21. 权利要求 18 的方法, 其中所述激动剂或拮抗剂调节磷酸二酯酶活性。

22. 测定样品中腺苷酸环化酶活性的方法, 包括:

a) 提供可能含有腺苷酸环化酶的样品,

b) 向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶,

c) 加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统, 及

d) 基于所述信号测定存在于所述样品中的腺苷酸环化酶活性。

23. 权利要求 22 的方法, 其中所述样品包含裂解物。

24. 权利要求 23 的方法, 其中所述裂解物来自真核细胞。

25. 权利要求 22 的方法, 其中所述样品包含质膜。

26. 权利要求 22 的方法, 其中所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶。

27. 权利要求 22 的方法, 其中所述检测系统包括能被依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化的底物。

28. 权利要求 27 的方法, 其中所述底物包含 SEQ ID NO: 1。

29. 权利要求 27 的方法, 其中所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶。

30. 权利要求 29 的方法, 其中所述酶是萤光素酶。

31. 权利要求 27 的方法, 其中所述底物包括放射性标记的生物素化底物。

32. 权利要求 31 的方法, 其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

33. 权利要求 31 的方法，其中所述检测系统进一步包括链霉抗生物素结合表面。

34. 权利要求 27 的方法，其中所述底物包括荧光标记的底物。

35. 权利要求 34 的方法，其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

36. 权利要求 34 的方法，其中所述荧光标记是罗丹明部分。

37. 权利要求 22 的方法，进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑制剂。

38. 权利要求 22 的方法，进一步包括添加腺苷酸环化酶活性的激动剂或拮抗剂。

39. 测定样品中磷酸二酯酶活性的方法，包括：

a) 提供可能含有磷酸二酯酶的样品，

b) 向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶，

c) 加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统，及

d) 基于所述信号测定存在于所述样品中的磷酸二酯酶活性。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述磷酸二酯酶是环核苷酸磷酸二酯酶。

41. 权利要求 40 的方法，其中所述环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。

42. 权利要求 39 的方法，其中所述样品包含裂解物。

43. 权利要求 39 的方法，其中所述裂解物来自真核细胞。

44. 权利要求 39 的方法，其中所述样品包含质膜。

45. 权利要求 39 的方法，其中所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶或依赖于 cGMP 的蛋白激酶。

46. 权利要求 39 的方法，其中所述检测系统包括能被依赖于 cAMP 的蛋白激酶或依赖于 cGMP 的蛋白激酶磷酸化的底物。

47. 权利要求 46 的方法，其中所述底物包含 SEQ ID NO: 1。

48. 权利要求 46 的方法，其中所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶。

49. 权利要求 48 的方法，其中所述酶是萤光素酶。

50. 权利要求 46 的方法，其中所述底物包括放射性标记的生物素化底物。

51. 权利要求 50 的方法，其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

52. 权利要求 46 的方法，其中所述检测系统进一步包括链霉抗生物素结合表面。

53. 权利要求 46 的方法，其中所述底物包括荧光标记的底物。

54. 权利要求 53 的方法，其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

55. 权利要求 53 的方法，其中所述荧光标记是罗丹明部分。

56. 权利要求 39 的方法，进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑制剂。

57. 测定样品中 G 蛋白偶联受体活性的方法，包括：

a) 提供可能含有 G 蛋白偶联受体的样品，

b) 向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶，

c) 加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统，及

d) 基于所述信号测定存在于所述样品中的 G 蛋白偶联受体活性。

58. 权利要求 57 的方法，其中所述样品包含裂解物。

59. 权利要求 58 的方法，其中所述裂解物来自真核细胞。

60. 权利要求 57 的方法，其中所述样品包含质膜。

61. 权利要求 57 的方法，其中所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶。

62. 权利要求 57 的方法，其中所述检测系统包括能被依赖于 cAMP 的蛋白激酶磷酸化的底物。

63. 权利要求 62 的方法，其中所述底物包含 SEQ ID NO: 1。

64. 权利要求 62 的方法，其中所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶。

65. 权利要求 64 的方法，其中所述酶是萤光素酶。

66. 权利要求 62 的方法，其中所述底物包括放射性标记的生物素化底物。

67. 权利要求 66 的方法，其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

68. 权利要求 66 的方法，其中所述检测系统进一步包括链霉抗生物素结合表面。

69. 权利要求 62 的方法，其中所述底物包括荧光标记的底物。

70. 权利要求 69 的方法，其中所述底物进一步包含 SEQ ID NO: 1。

71. 权利要求 69 的方法，其中所述荧光标记是罗丹明部分。

72. 权利要求 57 的方法，进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑制剂。

73. 权利要求 57 的方法，进一步包括添加 G 蛋白偶联受体活性的激动剂或拮抗剂。

74. 测定样品中环核苷酸浓度的试剂盒，包括：

a) 环核苷酸，

b) 蛋白激酶，

c) 蛋白激酶底物，

d) ATP，及

e) 使用所述试剂盒测定所述样品中所述环核苷酸的所述浓度的说明书。

75. 测定样品中环核苷酸磷酸二酯酶活性的试剂盒，包括：

a) cAMP 和 cGMP 的底物，

b) 蛋白激酶，

c) 蛋白激酶底物，

d) ATP，及

e) 使用所述试剂盒测定所述样品中所述环核苷酸磷酸二酯酶的所述活性的说明书。

环核苷酸测定方法

本申请要求享有 2005 年 12 月 6 日提交的美国临时申请 No. 60/742,922 的优先权，其整体并入本文。

发明领域

本发明总体涉及细胞分析工具，更具体涉及检测或测定样品中环核苷酸浓度的方法。

发明背景

第二信使环腺苷酸 (cAMP) 和环鸟苷酸 (cGMP) 是多种细胞功能的重要胞内介质，所述细胞功能包括细胞生长、分化、凋亡及细胞死亡。cAMP 的产生通过腺苷酸环化酶家族的酶控制，所述酶可将三磷酸腺苷 (ATP) 转化成 cAMP 和无机的焦磷酸 (PPi)。腺苷酸环化酶通过与膜结合的 G 蛋白偶联受体 (GPCR) α 亚基直接相互作用而被激活或抑制。当刺激性 GPCR 的 α 亚基 (称为 $G\alpha_s$) 被激活时，腺苷酸环化酶将 ATP 转化为 cAMP 和 PPi。相反，当抑制性 GPCR 的 α 亚基 (称为 $G\alpha_i$) 被激活时则发挥对腺苷酸环化酶的抑制效应，无法实现 ATP 向 cAMP 和 PPi 的转化。G 蛋白偶联受体在如神经传递、心脏输出及疼痛调节等广泛的生物学过程中都发挥着突出作用。其在开发新的药用化合物中的重要性已得到充分理解，因此其是药物发现研究中的热点靶标。

cAMP 的胞内浓度也受另一组酶 - 环核苷酸磷酸二酯酶 (PDE) 的影响，所述酶催化 cAMP 水解为 AMP，催化环 cGMP 水解为 GMP。磷酸二酯酶与腺苷酸环化酶及鸟苷酸环化酶协同作用以调节 cAMP 和 cGMP 介导的细胞信号转导机制的幅度和持续时间。因此，磷酸二酯酶调节众多重要的对第一信使 (如激素、光及神经递质) 的生物反应。有两类 PDE，I 类见于所有真核细胞的细胞质中或结合于胞内细胞器或膜上；而 II 类 PDE 尚未充分表征，只见于低等真核生物中。通过控制 cAMP

和 cGMP 转化受 I 类磷酸二酯酶控制的细胞反应包括：神经元反应、醛固酮产生、血小板聚集调节、胰岛素调节、呕吐、平滑肌张力调节、视觉光转导及 T 细胞反应性调节。已知很多临床上重要的化合物可抑制磷酸二酯酶，包括：咯利普兰、茶碱及昔多芬。因此，磷酸二酯酶的抑制剂也是药物发现中重要的靶标。

已知第二信使 cAMP 激活依赖于 cAMP 的蛋白激酶 (PKA)。哺乳动物的全 PKA 是四聚体，由两个调节亚基及两个催化亚基构成。cAMP 结合于调节亚基，从而使全 PKA 解离为其催化亚基和调节亚基。一旦释放，游离的催化亚基能磷酸化多种细胞蛋白质，从而引起细胞功能的改变，如肌肉收缩、细胞周期活化、转录活性激活及 DNA 加工。

由于 GPCR 的活化或抑制及随后腺苷酸环化酶的活化或抑制导致胞内 cAMP 的增加或减少，影响其活性的物质是药物发现的重要靶标。因为极多的生物学过程与 G 蛋白偶联受体有关，所以在全世界销售的药物中有许多靶向 GPCR。影响 GPCR 的药物实例包括：Claritin® 和 Alavert® (氯雷他定)，其用于缓解过敏症状；Paxil® (盐酸帕罗西汀)，其用于缓解抑郁症；及 Vasotec® (顺丁烯二酸依那普利)，其用于减轻高血压。因其重要性，已开发出了多种 GPCR 测定法来测定激动剂和拮抗剂对这些系统组分的影响，主要通过测定 cAMP 水平的升高或降低。这些方法的局限性包括：要求多个分配步骤的非均相测定，长温育时间及对昂贵设备的需要。

因此需有的是较现有技术需要较少操作 (例如两步或更少) 的测定法；提供更短温育时间 (例如小于一小时) 的测定法；及利用低花费设备同时保持高通量系统 (HTS) 能力 (如基于发光的设备) 的测定法。这样的流线化及成本效益将允许在药物发现中更快更容易地评价靶标。此外，基于发光的测定不倾向于受荧光干扰，其可用于筛选大化学物质文库以发现下一个潜在药物。

发明概述

本发明总体涉及细胞分析工具，更具体涉及检测或测定样品中环核苷酸浓度的方法。

环核苷酸如 cAMP 和 cGMP 响应多种与细胞蛋白质相互作用的物质而增加或减少。本文所述方法提供对这种变化的检测。在一个具体实施方案中，本文所述方法允许检测环核苷酸并与刺激物对细胞蛋白质的作用相关联。

在一个具体实施方案中，本文所述方法监测环核苷酸与酶的结合，所述酶依赖于环核苷酸结合以激活该酶（如依赖于 cAMP 的蛋白激酶，或 PKA）。例如，一旦 cAMP 与 PKA 结合，则 PKA 将磷酸从三磷酸腺苷（ATP）转移到合适的 PKA 底物（如肯普肽）。用多种已知方法检测磷酸化事件，并将每种检测方法的输出信号与存在于样品中的环核苷酸量相关联。合适的检测方法包括但不限于基于发光、放射性及荧光的方法。

在一个具体实施方案中提供了一种测定样品中腺苷酸环化酶活性的方法。所述方法利用 PKA 的活化提供活性，该活性可被检测、测量并随后与腺苷酸环化酶活性相关联。例如，如果腺苷酸环化酶受到刺激，则产生 cAMP，其激活 PKA，检测 PKA 的活性并与腺苷酸环化酶活性相关联。

在另一个具体实施方案中提供了一种测定样品中磷酸二酯酶活性的方法。所述方法利用 PKA 的活化提供活性，该活性被检测、测量并随后与磷酸二酯酶活性相关联。例如，如果磷酸二酯酶被抑制，则 cAMP 不转化成 AMP，或 cGMP 不转化成 GMP，因此 cAMP 和 cGMP 可激活 PKA，检测 PKA 的活性并与磷酸二酯酶活性相关联。

在其它具体实施方案中提供了监测激动剂对 G 蛋白偶联受体（GPCR）的活化或拮抗剂对其的抑制的方法。例如，通过 PKA 的活化检测并测量向包含 GPCR 的样品中加入激动剂或拮抗剂后发现的 cAMP 水平。这样的活性（或其缺失）通过与 cAMP 水平或量相关联的可测量的输出信号来检测。

在一个具体实施方案中，用于实施本文所述方法的样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，样品裂解物来自原核生物或真核生物，如细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包

含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。本文所述膜制剂已得出了意外结果，所述膜制剂维持了膜关联的过程、蛋白质及受体（实施例 9-11）的完整性和功能性。这允许利用本文所述方法进行靶向膜功能测定，而无见于正常细胞裂解物中的伴随的细胞裂解物组分。

可测量的输出信号可为如下形式：生物发光、化学发光、放射性或基于不同荧光技术（如荧光偏振、荧光共振能传递及免疫测定）的差别输出。在一个具体实施方案中，可测量的输出信号为生物发光的形式。例如，鞘翅目（萤火虫）萤光素酶利用 ATP 和其他因子将甲虫类萤光素转化成氧化萤光素，反应的副产物是光。一旦 PKA 被活化，PKA 活化量依赖于存在的 cAMP 的量，PKA 利用来自 ATP 的磷酸来磷酸化接受底物，从而使样品中的 ATP 浓度降低，由此导致发光或光输出的减少。照此，随着样品中 cAMP 浓度的升高，可见相反的发光减少，所述发光与最初样品中存在的 cAMP、腺苷酸环化酶和/或 GPCR 活性的量相关联。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种测定样品中环核苷酸量的方法，所述方法包括：可能含有环核苷酸的样品；向所述样品中加入能被所述环核苷酸活化的无活性酶；加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统；并基于所述信号测定存在于所述样品中的环核苷酸量。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。在一些具体实施方案中，所述环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。在一些具体实施方案中，所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶或依赖于 cGMP 的蛋白激酶。在一些具体实施方案中，所述检测系统包含能被 PKA 或 PKG 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中，所述底物包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶，其中所述酶是萤光素酶。在一些具体实施方案中，所述底物包括放射性标记的生物素化底物，其进一步包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括链霉抗生物素包

被的结合表面。在一些具体实施方案中，所述底物包括荧光标记的底物，其更进一步包含 SEQ ID NO: 1，其中所述荧光标记优选罗丹明。在一些具体实施方案中，本发明的方法进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑制剂和/或添加能影响所述样品中环核苷酸量的激动剂或拮抗剂。在一些具体实施方案中，所述激动剂或拮抗剂调节腺苷酸环化酶活性和/或 GPCR 活性和/或 PDE 活性。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种测定样品中腺苷酸环化酶活性的方法，所述方法包括：可能含有腺苷酸环化酶样品；向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶；加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统；并基于所述信号测定存在于所述样品中的腺苷酸环化酶活性。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。在一些具体实施方案中，所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶。在一些具体实施方案中，所述检测系统包括能被 PKA 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中，所述底物包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶，其中所述酶是萤光素酶。在一些具体实施方案中，所述底物包括放射性标记的生物素化底物，其进一步包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括链霉抗生物素包被的结合表面。在一些具体实施方案中，所述底物包括荧光标记的底物，其更进一步包含 SEQ ID NO: 1，其中所述荧光标记优选罗丹明。在一些具体实施方案中，本发明的方法进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶抑制剂和/或添加能影响腺苷酸环化酶活性的激动剂或拮抗剂。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种测定样品中磷酸二酯酶活性的方法，所述方法包括：可能含有磷酸二酯酶的样品；向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶；加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统；并基于所述信号测定存在于所述样品中的磷酸二酯酶活性。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解

物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。在一些具体实施方案中，所述磷酸二酯酶是环核苷酸磷酸二酯酶。在一些具体实施方案中，所述环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。在一些具体实施方案中，所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶或依赖于 cGMP 的蛋白激酶。在一些具体实施方案中，所述检测系统包括能被 PKA 或 PKG 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中，所述底物包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶，其中所述酶是萤光素酶。在一些具体实施方案中，所述底物包括放射性标记的生物素化底物，其进一步包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括链霉抗生物素包被的结合表面。在一些具体实施方案中，所述底物包括荧光标记的底物，其更进一步包含 SEQ ID NO: 1，其中所述荧光标记优选罗丹明。在一些具体实施方案中，本发明的方法进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶活性抑制剂。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种测定样品中 G 蛋白偶联受体活性的方法，所述方法包括：可能含有 GPCR 的样品；向所述样品中加入能被 cAMP 活化的无活性酶；加入能检测所述被活化的酶的活性并产生可检测信号的检测系统；并基于所述信号测定存在于所述样品中的 GPCR 活性。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物，更优选来自哺乳动物细胞的裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜。在一些具体实施方案中，所述无活性酶是依赖于 cAMP 的蛋白激酶。在一些具体实施方案中，所述检测系统包括能被 PKA 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中，所述底物包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括能利用 ATP 产生发光信号的酶，其中所述酶是萤光素酶。在一些具体实施方案中，所述底物包括放射性标记的生物素化底物，其进一步包含 SEQ ID NO: 1。在一些具体实施方案中，所述检测系统进一步包括链霉抗生物素包被的结合表面。在一些具体实施方案中，所述底物包括荧光标记的底物，其更

进一步包含 SEQ ID NO: 1, 其中所述荧光标记优选罗丹明。在一些具体实施方案中, 本发明的方法进一步包括添加一种或多种磷酸二酯酶活性抑制剂和/或添加 GPCR 的激动剂或拮抗剂。

在一个具体实施方案中, 本发明提供一种测定样品中环核苷酸浓度的试剂盒, 其包括: 环核苷酸、蛋白激酶、ATP、蛋白激酶底物及使用所述试剂盒测定所述蛋白激酶底物的所述浓度的说明书。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括发光检测系统。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括荧光检测系统。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括放射性检测系统。

在一个具体实施方案中, 本发明提供一种测定样品中环核苷酸磷酸二酯酶活性的试剂盒, 其包括: cAMP 和 cGMP 的底物、蛋白激酶、蛋白激酶底物及使用所述试剂盒测定所述环核苷酸磷酸二酯酶的所述活性的说明书。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括发光检测系统。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括荧光检测系统。在一些具体实施方案中, 所述试剂盒进一步包括放射性检测系统。

附图说明

图 1 显示 G 蛋白偶联受体信号转导途径。G 蛋白偶联受体亚基 G_{α_s} 刺激腺苷酸环化酶, 由 ATP 产生 cAMP。环 AMP 结合 PKA 的调节亚基, 释放催化亚基, 后者磷酸化 PKA 的底物。相反, 抑制性 GPCR 亚基 G_{α_i} 抑制腺苷酸环化酶, 从而阻断 PKA 底物的磷酸化。磷酸二酯酶通过水解 cAMP 成 AMP 及水解 cGMP 成 GMP 而影响 PKA 底物的磷酸化, 其中 AMP 和 GMP 不结合 PKA 的调节亚基。

图 2 为显示随着 cAMP 浓度增加而样品发光相应降低的图。

图 3 为显示随着毛喉素 (一种腺苷酸环化酶的直接刺激物) 浓度增加而样品发光降低的图。

图 4 显示 (A) 证实随着激动剂诱导 D293 细胞中表达的多巴胺受体 D1 (G_{α_s} 蛋白偶联受体) 而发光降低的图; 和 (B) 证实在激动剂存在下向表达多巴胺受体 D1 的 D293 细胞中加入拮抗剂导致发光增加

的图。

图 5 显示在 cAMP 存在下随着磷酸二酯酶 II 浓度升高而发光增加。

图 6 展示无论环核苷酸是 cAMP 还是 cGMP，随着环核苷酸浓度升高而发光增加，但亲和力不同。

图 7 显示 (A) 证实在 cGMP 存在下随着磷酸二酯酶 V 浓度升高而发光增加的图；和 (B) 证实在 cGMP 存在下随着磷酸二酯酶 V 抑制剂 - 扎普斯特增加而发光降低的图。

图 8 展示来自不同哺乳动物细胞的质膜制剂中的 cAMP 产生：A) 人胚胎肾 (HEK) 293 细胞；及 B) 中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

图 9 显示使用 $1\ \mu\text{g}$ DRD1-D293 质膜制剂，毛喉素的 EC_{50} 。

图 10 展示通过加入多巴胺激活后质膜制剂中的 D1 受体活化。通过测量 cAMP 产生评价多巴胺受体的活化。

图 11 显示 A) 在 $10\ \mu\text{M}$ 毛喉素存在下，用稳定转染 D2 的 D293 细胞，以激动剂喹吡罗对多巴胺 D2 受体的示例性滴定；和 B) 在 100nM 喹吡罗及 $10\ \mu\text{M}$ 毛喉素存在下，用稳定转染 D2 的 D293 细胞，拮抗剂雷氯必利对 D2 多巴胺 D2 受体的示例性滴定。

定义

如本文所用，术语“样品”以其最广义使用。在一种意义上，它意在包括得自任何来源的标本或培养物以及生物样品和环境样品。生物样品可得自动物（包括人）并包括液体、固体、组织及气体。生物样品包括血制品、细胞裂解物及细胞裂解物组分。环境样品包括环境物质，如表面物质、土壤、水、晶体及工业样品。样品可包含或不包含调节环核苷酸浓度的物质。但是这些实例不应理解为限制适用于本发明的样品类型。

如本文所用，术语“激动剂”指任何可刺激受体、酶或其它蛋白质的活性的物质。

如本文所用，术语“拮抗剂”指任何可抑制受体、酶或其它蛋白质的活性的物质。

如本文所用，术语“底物”指任何被酶或其它蛋白质作用的多肽。

如本文所用，术语“抑制剂”指任何抑制酶活性或生物化学反应的化合物。

如本文所用，术语“检测”指定性或定量测定样品中物质存在与否。例如，本文所述的检测方法包括，但不限于：发光、放射性及荧光。

如本文所用，术语“裂解物”以其最广义指细胞膜破裂或溶解时从细胞释放出的细胞碎片及液体。例如，如本文所述可应用于本发明的裂解物包括，但不限于：源于原核细胞如细菌的裂解物，及源于真核细胞的裂解物如酵母、植物及哺乳动物细胞裂解物。作为真核细胞溶胞产物的细胞碎片包括，但不限于：细胞器（如内质网、细胞核、核糖体、线粒体等）、细胞结构组分如微管、质膜、细胞器膜、细胞膜等。

发明详述

在一个具体实施方案中，本发明的方法提供了通过监测由于环核苷酸激活所引起的蛋白激酶活性变化来监测对细胞蛋白质的调节。环核苷酸的细胞水平反映环化酶活性与环核苷酸磷酸二酯酶活性之间的平衡（图1）。环AMP结合四聚体PKA的调节亚基。环GMP结合依赖于cGMP的蛋白激酶或PKG的调节亚基。本发明不限于特定的机制。事实上，对机制的理解不是实施本发明所必需的。尽管如此，发现不仅cAMP结合II型PKA的调节亚基，cGMP也结合II型PKA调节亚基。因此，一旦cAMP或cGMP结合PKA的调节亚基，PKA活性催化亚基就能通过将磷酸从ATP转移至底物磷酸化位点而磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。照此，PKA活性可作为存在于样品中的cAMP或cGMP的量的指示。

如前所述，环化酶和磷酸二酯酶直接影响存在于样品中的环核苷酸的量。例如，当存在腺苷酸环化酶的活化剂或抑制剂时，cAMP浓度将分别升高或降低，从而导致PKA活性的升高或降低。同样的现象也见于鸟苷酸环化酶的活化剂或抑制剂。腺苷酸环化酶是GPCR相关的信号转导途径的一部分。GPCR的激动剂或拮抗剂将影响腺苷酸环化酶的

活性，从而影响 PKA 活性。相反，磷酸二酯酶水解 cAMP 为 AMP，水解 cGMP 为 GMP，因此如果样品中存在这种酶的激动剂或拮抗剂，环核苷酸浓度将分别降低或升高，从而导致 PKA 活性的降低或升高。照此，本文所述方法提供对 cAMP、腺苷酸环化酶、cGMP、磷酸二酯酶及 GPCR 的调节的监测。

为了使仅样品中的环核苷酸能激活所述方法中的 PKA 的事件最大化，所述方法中的 PKA 应为尽可能纯的 PKAII 型全酶（例如 PKA 的调节亚基和催化亚基相连）。优选 PKAII 型全酶基本上没有非结合的活性催化亚基。PKA 全酶的纯度应足以允许监测与对照相比对环化酶和 GPCR 的调节。类似地，如果如本文所述应用 PKG，其应类似地基本上不含非结合的活性催化亚基。为了使本文所述方法最大化，用于所述方法的 PKA 全酶应含有 <10% (>90% 纯)，优选 <5% (>95% 纯)，更优选 <1% (>99% 纯)，最优选 <0.1% (>99.9% 纯) 非结合的活性催化亚基。检测非结合的活性催化亚基的百分比的测定法是例如比较 PKA 全酶测试样品的活性与含有灭活全酶的对照样品的活性的那些测定法。。

本发明的一个具体实施方案提供了测定样品中环核苷酸的浓度。在一些具体实施方案中，本方法可用于测定样品中 cAMP 或 cGMP 的量。本方法的样品包括，但不限于：细胞培养基、缓冲溶液、细胞及细胞裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。

在一个具体实施方案中，为了测定样品中的环核苷酸浓度，本发明包括蛋白激酶、底物及 ATP。在一些具体实施方案中，本发明包括 PKA 或 PKG，使得随着环核苷酸结合所述激酶的调节亚基，活性的催化亚基能利用 ATP 来磷酸化底物。在一些具体实施方案中，本发明包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物，所述底物显示出对 PKA 或 PKG 提高的亲合力。在一些具体实施方案中，所述方法包括底物，其包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。

使用本方法用于测定样品的 cAMP 浓度的检测方法包括，但不限

于：使用生物发光、化学发光、比色法、放射性或基于不同荧光技术的差别输出。在一个具体实施方案中，在本文所述方法中测量激酶活性，并可用任何合适的激酶测定法。例如，已知的激酶测定法包括，但不限于：发光测定法，如激酶-Glo™发光激酶测定（Promega公司，Madison WI）和 PKLight™ HTS 蛋白激酶测定（Cambrex, New Jersey）；荧光测定法，如 Kinome™ Hunter（DiscoverX, Fremont CA）和 HitHunter™ FP 激酶测定（DiscoverX, Fremont CA）和 ProFluor™ PKA 测定（Promega公司，Madison WI）；及放射性测定法，如 SignaTECT® 依赖于 cAMP 的蛋白激酶（PKA）测定系统（Promega公司，Madison WI）。

预期就 PKA 活性而言，不同的发光检测方法会表现出不同的发光输出模式。在一个具体实施方案中，发光检测法是一种检测激酶活性的方法。在一些具体实施方案中，本文所述的发光检测方法包括酶、底物及合适的缓冲液。在一些具体实施方案中，本发明通过生物发光检测 cAMP 浓度的变化。在一些具体实施方案中，本发明利用萤光素酶检测 cAMP 浓度的变化。在一些具体实施方案中，本发明利用鞘翅类昆虫的萤光素酶检测 cAMP 浓度的变化。例如，随着环核苷酸结合 PKA 的调节亚基，催化亚基能利用 ATP 进行底物磷酸化，且 ATP 被消耗。鞘翅类昆虫的萤光素酶利用 ATP 及其它辅因子将其相应底物萤光素转化成氧化萤光素，反应的副产物是发光或光。随着样品中 ATP 减少，可用于萤光素酶的 ATP 减少，并可看到发光的减少。用发光输出（相对光单位或 RLU）检测相对于对照而言样品发光的变化。对于 PKA 活性，其它发光检测方法可显示出差别的光输出。

在一个具体实施方案中，本发明提供一种检测系统，其中通过放射性手段测定样品中的环核苷酸浓度。就 PKA 活性而言，不同的放射性检测方法可显示出不同的放射性输出模式。在一些具体实施方案中，放射性检测法是一种检测激酶活性的方法。在一些具体实施方案中，本文所述的放射性检测方法包括经修饰的底物、合适的缓冲液及能捕获所述经修饰的底物的表面。在一些具体实施方案中，所述放射性方法包括 SignaTECT® 依赖于 cAMP 的蛋白激酶（PKA）测定系统（Promega

公司, Madison WI)。在一些具体实施方案中, 所述放射性检测方法包括放射性 ATP。在一些具体实施方案中, 所述放射性检测方法包括 γ ³²P-ATP 或 γ ³³P-ATP。

在一个具体实施方案中, 所述放射性检测方法进一步包括能被 PKA 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中, 所述放射性检测方法包括能被连接配体的 PKA 磷酸化的底物。在一些具体实施方案中, 所述放射性检测方法包括生物素化的底物, 所述底物包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。在一些具体实施方案中, 本文所述的检测方法进一步包括表面, 其上存在有可捕获底物/配体的化合物。例如, 所述表面是用链霉抗生物素包被的膜。随着环核苷酸结合 PKA 的调节亚基, 催化亚基利用放射性标记的 ATP 并将放射性磷酸转移到底物上, 从而使底物具有放射性。放射性配体偶联底物在表面上被捕获, 该表面上存在有将捕获配体 (如链霉抗生物素) 的化合物。在一些具体实施方案中, 洗掉表面过剩的放射性, 并测量被捕获在捕获表面上的放射性。用放射性输出 (每单位时间的计数) 检测相对于对照而言样品放射性的变化。

在一个具体实施方案中, 本发明提供一种检测系统, 其中通过荧光手段测定样品中的环核苷酸浓度。就 PKA 活性而言, 不同的荧光检测方法可显示出不同的荧光输出模式。在一些具体实施方案中, 荧光检测法是一种检测激酶活性的方法。在一些具体实施方案中, 本发明方法的荧光检测方法包括: 酶、经修饰的底物及合适的缓冲液。在一些具体实施方案中, 所述荧光方法包括 ProFluor™ PKA 测定 (Promega 公司, Madison, WI)。在一个具体实施方案中, 本发明的荧光检测方法包括荧光团。在一些具体实施方案中, 所述荧光检测方法包括荧光团罗丹明-110。

在一个具体实施方案中, 本文所述的荧光检测方法进一步包括底物。在一些具体实施方案中, 所述荧光检测方法的底物包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。在一些具体实施方案中, 所述荧光检测方法包括酶。在一些具体实施方案中, 本文所述的荧光检测方法的酶是

蛋白酶。在一些具体实施方案中，所述荧光检测方法的蛋白酶在其未被磷酸化时能消化底物。

在一个具体实施方案中，所述荧光检测方法包括与荧光团相连的底物。在一些具体实施方案中，所述荧光检测方法包括两个与荧光团相连的底物，使得与不与底物相连的荧光团相比，当荧光团与底物相连时荧光降低。例如，随着环核苷酸结合 PKA 的调节亚基，催化亚基能磷酸化相应底物。所述荧光检测方法的底物与荧光团偶联，使得当与底物结合时该荧光团表现出降低的荧光。本文所述的蛋白酶消化底物直至磷酸化时。因此，如果样品中的环核苷酸浓度升高，更多的底物将被磷酸化并且荧光将保持低。相反，如果样品中的环核苷酸浓度低，则较少的底物将被磷酸化，蛋白酶对非磷酸化底物的消化将完全，从而释放荧光团，荧光将升高。检测荧光输出（相对荧光单位），测定相对于对照而言样品荧光的变化。

在一个具体实施方案中，本发明提供测定样品中的环核苷酸浓度并将所述环核苷酸浓度与样品中的环化酶活性相关联。在一个具体实施方案中，待检测的环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。本方法的样品包括，但不限于：细胞培养基、缓冲溶液、细胞及细胞裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。在一些具体实施方案中，本发明的环化酶选自腺苷酸环化酶和鸟苷酸环化酶。在一个具体实施方案中，本发明的环化酶是腺苷酸环化酶。在一些具体实施方案中，本发明用于寻找对腺苷酸环化酶活性有影响的物质。例如，本发明的方法被用于寻找刺激（如增加）或抑制（如降低）腺苷酸环化酶活性的物质。刺激腺苷酸环化酶活性的物质实例包括，但不限于：毛喉素及毛喉素衍生物如 7-去乙酰-毛喉素、6-乙酰-7-去乙酰-毛喉素及 7-去乙酰-7-0-半琥珀酰-毛喉素。抑制腺苷酸环化酶活性的物质实例包括，但不限于：细胞可透性抑制剂，如 9-(四氢咪喃基)-腺嘌呤、2', 5'-双脱氧腺苷及 9-(环戊基)-腺嘌呤；竞争性抑制剂，如底物类似物 β

-L-2', 3'-双脱氧-腺苷-5'-三磷酸、 β -L-腺苷-5'-三磷酸及腺苷-5'-(β γ -亚甲基)-三磷酸; 非竞争性抑制剂, 如 9-(阿拉伯呋喃糖基)-腺嘌呤、9-(木呋喃糖基)-腺嘌呤及 2', 5'-双脱氧腺苷 3' 四磷酸; 其它抑制剂, 如顺-N-(2-苯基环戊基)氮杂环十三烷-1-烯-2-胺、9-(2-二磷酸磷酰甲氧乙基)腺嘌呤及聚腺苷酸。

在一个具体实施方案中, 为测定物质对腺苷酸环化酶活性的影响, 本发明的方法包括: 蛋白激酶、底物及 ATP。在一些具体实施方案中, 本方法包括依赖于 cAMP 的蛋白激酶 (PKA), 使得环核苷酸结合所述激酶的调节亚基而释放活性的催化亚基, 后者能利用 ATP 来磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。在一些具体实施方案中, 本方法包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物, 所述底物显示出提高的对 PKA 的游离催化亚基的亲和力。在一些具体实施方案中, 本方法包括底物, 所述底物包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。腺苷酸环化酶从 ATP 产生 cAMP, 因此影响腺苷酸环化酶活性的物质可影响样品中 cAMP 的浓度。在之前的具体实施方案中已描述过检测方法, 那些检测方法同样适用于此。例如, 随着物质影响样品中腺苷酸环化酶的活性, cAMP 浓度将升高或降低, 从而导致经由 PKA 的底物磷酸化的升高或降低。之前描述的检测方法输出用于测定 cAMP 浓度的升高或降低, 后者与相对于对照而言样品的腺苷酸环化酶活性的升高或降低相关联。因此, 当样品中存在腺苷酸环化酶的激动剂从而刺激腺苷酸环化酶活性时, cAMP 产生增加, 其反应在所用检测方法的输出中。相反, 如样品中存在腺苷酸环化酶的拮抗剂从而抑制腺苷酸环化酶活性时, cAMP 产生减少, 其反映在所用检测方法的输出中。

在一个具体实施方案中, 本发明测定样品中环核苷酸的浓度并将所述环核苷酸浓度与磷酸二酯酶活性相关联。在一些具体实施方案中, 待检测的环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。在一些具体实施方案中, 如果 cGMP 是用于检测的环核苷酸, 则样品具有相对于 cAMP 过量的 cGMP。在一些具体实施方案中, 当 cGMP 是用于检测的环核苷酸时, 则磷酸二酯酶 IV (一种 cAMP 特异性磷酸二酯酶) 存在于样品中。在一些具体实施方

案中，本发明的样品包括，但不限于：细胞培养基、缓冲溶液、细胞及细胞裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。

在一个具体实施方案中，所述磷酸二酯酶是环核苷酸磷酸二酯酶。在一些具体实施方案中，当检测 cAMP 对 PKA 的活化时，待测定的环核苷酸磷酸二酯酶活性来自下组：磷酸二酯酶 II、磷酸二酯酶 III 及磷酸二酯酶 IV。在一些具体实施方案中，当检测 cGMP 对 PKA 的活化时，待测定的环核苷酸磷酸二酯酶活性来自下组：磷酸二酯酶 II、磷酸二酯酶 III 及磷酸二酯酶 IV 和磷酸二酯酶 V。在一些具体实施方案中，本发明的方法用于寻找对磷酸二酯酶活性有影响的物质。在一些具体实施方案中，本发明用于寻找刺激（如增加）或抑制（如降低）磷酸二酯酶活性的物质。抑制磷酸二酯酶 II 活性的物质实例包括，但不限于：赤-9-(2-羟基-3-壬基)腺嘌呤。抑制磷酸二酯酶 III 活性的物质实例包括，但不限于：1,6-二氢-2-甲基-6-氧代-(3,4'-联吡啶)-5-腈、1,3-二氢-4-甲基-5-(4-甲硫基苯甲酰基)-2H-咪唑-2-酮及盐酸曲喹辛。抑制磷酸二酯酶 IV 活性的物质实例包括，但不限于：4-[3-(环戊氧基)-4-甲氧基苄基]-2-吡咯烷酮、4-(3-丁氧基-4-甲氧基苄基)咪唑烷-2-酮及 1-乙基-4-[91-甲基亚乙基-胍基]1H-吡唑并[3,4-b]吡啶-5-甲酸乙酯盐酸盐。抑制磷酸二酯酶 V 活性的物质实例包括，但不限于：1,4-二氢-5-(2-丙氧基苄基)-7H-1,2,3-三唑并(4,5-d)嘧啶-7-酮（扎普斯特）、双嘧达莫及 1-[4-乙氧基-3-(6,7-二氢-1-甲基-7-氧代-3-丙基-1H-吡唑并[4,3-d]嘧啶-5-基-苯磺酰基]-4-甲基哌嗪柠檬酸盐。是环核苷酸磷酸二酯酶的非选择性抑制剂的物质的实例是 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤。

在一个具体实施方案中，为测定物质对磷酸二酯酶活性的影响，本发明包括环核苷酸、蛋白激酶、底物及 ATP。在一些具体实施方案中，本发明包括 PKA，使得环核苷酸（cAMP 或 cGMP）结合所述激酶的调节亚基，催化亚基被释放并能利用 ATP 来磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白

激酶底物。在一些具体实施方案中，本发明包括丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物，所述底物显示出提高的对依赖于 cAMP 的蛋白激酶的亲和力。在一些具体实施方案中，本发明包括底物，所述底物包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。

磷酸二酯酶水解环核苷酸 cAMP 至 AMP，水解环核苷酸 cGMP 至 GMP。在之前的具体实施方案中已描述过检测方法，那些检测方法同样适用于此。例如，随着物质调节样品中的磷酸二酯酶活性，环核苷酸浓度升高或降低，从而导致经由 PKA 的底物磷酸化的升高或降低。本文所述的检测方法输出用于测定环核苷酸浓度的升高或降低，其与相对于对照而言样品的磷酸二酯酶活性的升高或降低相关联。因此，当样品中存在磷酸二酯酶的激动剂从而刺激磷酸二酯酶活性时，cAMP 向 AMP 或 cGMP 向 GMP 的水解增加，其反映在所用检测方法的输出中。相反，如果样品中存在磷酸二酯酶的拮抗剂从而抑制磷酸二酯酶活性，则 cAMP 向 AMP 或 cGMP 向 GMP 的水解降低，其反映在所用检测方法的输出中。

在一个具体实施方案中，本文所述的方法测定样品中环核苷酸的浓度并将所述环核苷酸浓度与 G 蛋白偶联受体 (GPCR) 活性相关联。在一些具体实施方案中，待检测的环核苷酸是 cAMP 或 cGMP。在一些具体实施方案中，本发明的样品包括，但不限于：细胞培养基、缓冲溶液、细胞及细胞裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品包含裂解物。在一些具体实施方案中，所述样品裂解物来自细菌、酵母或哺乳动物细胞。在一些具体实施方案中，所述样品包含质膜、细胞膜和/或细胞器膜。在一些具体实施方案中，本发明的方法用于寻找对 GPCR 活性有影响的物质。在一些具体实施方案中，本发明用于寻找刺激（如增加）或抑制（如降低）GPCR 活性的物质。代表性的 G 蛋白偶联受体的列表可见于 Hermans, E., 2003, *Pharmacology & Therapeutics* 99: 25-44, 其通过引用整体并入本文。GPCR 的实例包括，但不限于：多巴胺受体 D1 (SEQ ID NO: 2) (美国专利 No. 5,389,543) 及 β -2-肾上腺素能受体和前列腺素 E1 受体。提高多巴胺受体 D1 (SEQ ID NO:

2) 活性的物质实例包括, 但不限于: 多巴胺、阿朴吗啡、1-苯基-2, 3, 4, 5-四氢-(1H)-3-苯并吡啶庚因-7, 8-二醇 (SKF 38393) 及 6-氯-7, 8-二羟基-3-烯丙基-1-苯基-2, 3, 4, 5-四氢-1H-3-苯并吡啶庚因氢溴酸盐 (SKF 82958)。其它多巴胺受体包括, 但不限于: D2、D3、D4 及 D5 受体。提高 β -2-肾上腺素能受体活性的物质实例包括但不限于异丙肾上腺素。提高前列腺素 E2 受体活性的物质实例包括但不限于 CP-533, 536。其它前列腺素受体包括, 但不限于: EP1、EP3 及 EP4。

在一个具体实施方案中, 为测定物质对 GPCR 活性的影响, 本发明的方法包括环核苷酸、蛋白激酶、底物及 ATP。在一些具体实施方案中, 本发明包括 PKA, 使得环核苷酸结合所述激酶的调节亚基, 活性的催化亚基能利用 ATP 来磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。在一些具体实施方案中, 本发明包括 PKA, 在环核苷酸结合其亚基后, 产生催化亚基的激酶活性, 利用 ATP 来磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。在一些具体实施方案中, 本发明包括 PKA, 在环核苷酸结合其调节亚基后, 产生催化亚基的激酶活性, 利用 ATP 来磷酸化丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶底物。在一些具体实施方案中, 所述底物包含多肽序列 LRRASLG (SEQ ID NO: 1)。

G 蛋白偶联受体是膜内在蛋白质, 其参与从胞外到胞内的信号转导。有多种疾病是由 GPCR 功能失常引起的, 因此, 本发明方法能确定物质是否对 GPCR 活性有影响在学术上和临床上都是重要的。随着物质刺激或抑制 G 蛋白偶联受体, 相关联的腺苷酸环化酶受影响, 其中其活性分别升高或降低。由于腺苷酸环化酶活性受经 GPCR 刺激或抑制的调节, 转化成 cAMP 的 ATP 量受影响, 从而控制可与 PKA 的调节亚基结合的 cAMP 量, 后者又控制样品中发生的底物磷酸化的量。

在之前的具体实施方案中已描述过检测方法, 那些检测方法同样适用于此。随着物质影响样品中 GPCR 的活性, 环核苷酸浓度相应改变, 其导致经由 PKA 的底物磷酸化的升高或降低。检测方法输出用于测定 cAMP 浓度的升高或降低, 其与相对于对照而言样品的 GPCR 活性的升高或降低相关联。因此, 当样品中存在与 $G\alpha_s$ 偶联的 GPCR 激动剂时,

腺苷酸环化酶活性受刺激，导致 cAMP 产生增加，其反映在所用检测方法的输出中。

相反，如果样品中存在与 $G\alpha_s$ 偶联的 GPCR 拮抗剂，则腺苷酸环化酶活性受抑制，cAMP 产生减少，其反映在所用检测方法的输出中。当样品中存在偶联于 $G\alpha_i$ 的 GPCR 激动剂时，腺苷酸环化酶活性受抑制，导致 cAMP 产生减少，其反映在所用检测方法的输出中。当样品中存在与 $G\alpha_i$ 偶联的 GPCR 拮抗剂时，腺苷酸环化酶活性不受抑制，因此实现 cAMP 产生的潜在增加，其反映在所用检测方法的输出中。

在一个具体实施方案中，本发明提供试剂盒，其包括一种或多种用于实施本文所述任何方法的试剂。在一些具体实施方案中，所述试剂足以实施本文所述的方法。在一些具体实施方案中，所述试剂盒中的试剂包括，但不限于：对照、说明书、缓冲液、用于数据分析的软件、用于实施本文所述的检测方法的设备、包含一种或多种用于实施本文所述方法的试剂的一个或多个容器及组织培养细胞。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包括环核苷酸，如 cAMP 或 cGMP。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包括酶，如 PKA 和 PKG。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包括细胞裂解缓冲液或溶液。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包括反应缓冲液。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包括冻干或溶液形式的蛋白激酶底物。在一些具体实施方案中，所述试剂盒包含可应用于特定检测系统或方法（如发光、荧光或放射性检测系统）的缓冲液和试剂。

本文采用的术语旨在描述，不应视为限制。此外，本文所述的具体实施方案是对通过使用本发明的试剂盒、方法或组合物所实施的技术方案的例示。它们不意在限制，且任何本领域技术人员都会认识到其中体现的等同方案。

实施例

提供以下实施例以展示并进一步说明本发明的某些优选的具体实施方案及方面，不应理解为限制其保护范围。

实施例 1 - 哺乳动物细胞的培养

除非另作说明,对于所有细胞培养相关实验,按以下方式培养哺乳动物细胞 HEK D293 (人胚胎肾)。细胞以 5-10,000 细胞/孔的密度接种于聚-D-赖氨酸包被的 96 孔白色透明底组织培养板 (BD BioCoat™ Poly-D-Lysine Multiwell™ Plates) 中。细胞培养基组成为: Dulbecco's 改良 Eagles 培养基 (DMEM), 添加 10% 胎牛血清 (FBS)、1 个单位的青霉素及 1 mg/ml 的链霉素。对于稳定表达多巴胺受体 D1 的细胞系,向培养基中加入 500 μg/ml 的新霉素用于选择及维持目的。于 37°C/5% CO₂ 条件下培养细胞约 24 小时直至 60-75% 汇合,于此时进行转染、诱导或其它细胞操作。

实施例 2 - cAMP 浓度的测定

进行本实验以证实本发明可用于测定样品中的 cAMP 浓度,且本发明可用多种检测技术来测定样品的 cAMP 浓度。

反应在聚-D-赖氨酸包被的白色透明底 96 孔板中进行,然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在 384 孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板,如 1536 孔板。

在 2 × 诱导缓冲液 (240mM NaCl、7.0mM KCl、3.0mM CaCl₂、2.4mM MgSO₄、2.4mM NaH₂PO₄、50mM NaHCO₃、20mM 葡萄糖、200 μM 3-异丁基-1-甲基黄嘌呤 (IBMX)、100 μM 4-(3-丁氧基-4-甲氧基苄基)咪唑烷-2-酮 (RO 201724)) 中从 25 μM 开始进行 cAMP 的 3 倍系列稀释,将每一稀释度的 10 μl 转移至 96 孔板的单独孔中。向每个 cAMP 稀释度孔中加入 10 μl 2 × 诱导缓冲液及 60 μl PKA/底物试剂 (100ng/孔全酶-R-II α 蛋白激酶 A (BIAFFIN GmbH & Co., Kassel, Germany)、25 μM 肯普肽、1 μM rATP、20mM MgCl₂)。样品板于室温温育 20 分钟后加入 80 μl 激酶-Glo™ 试剂 (Promega 公司, Madison WI)。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟读取发光值,输出记录为相对光单位 (RLU, n = 2), 用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) (GraphPad Software, San Diego, CA) 相对于 cAMP 浓度作图。

在图 2 中可见,随着 cAMP 浓度增加,发光降低。当使用 SignaTECT® PKA 测定系统 (放射性计数, Promega 公司, Madison WI) 及 ProFluor™

PKA 测定系统（相对荧光，Promega 公司，Madison WI）时，均看到同样的相反反应。因此，用本发明及标准曲线可估计未知样品中的 cAMP 浓度。类似地，用此标准曲线可估计经激动剂或拮抗剂处理的细胞的细胞提取物中的 cAMP 浓度。

实施例 3 - 监测毛喉素存在下的腺苷酸环化酶活化

反应在聚-D-赖氨酸包被的白色透明底 96 孔板中进行，然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在 384 孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板，如 1536 孔板。

进行 250 μM 毛喉素在 2 \times 诱导缓冲液中的 2 倍系列稀释。如实施例 1 所述培养 D293 细胞至汇合。从培养细胞中除去培养基，将细胞用磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 洗三次，将每一毛喉素稀释度的 10 μl 加入到 96 孔 D293 细胞培养板的孔中。通过向几个孔的 D293 细胞中加入 10 μl 不含毛喉素的 2 \times 诱导缓冲液，将对照包括在内。于室温将含有及不含毛喉素的细胞温育 15 分钟，之后加入 10 μl 2 \times 裂解缓冲液 (80mM Tris-HCl (pH 7.5)、2mM EDTA (pH 8.0)、2mM EGTA (pH 7.2)、0.4% Tergitol® NP-9、20% 甘油、100mM NaF、200 μM Na_3VO_4 、400 μM 亮抑酶肽、40 $\mu\text{g/ml}$ 抑肽酶、400 μM 1-氯-3-甲苯磺酰氨基-7-氨基-2-庚酮 (TLCK)、400 μM 1-氯-3-甲苯磺酰氨基-4-苯基-2-丁酮 (TPCK)、200 μM 4-(2-氨基乙基) 苯磺酰氟-HCl (ABSF)、200 μM IBMX 及 4 μM rATP (最后加 TPCK, 加 TPCK 前将缓冲液涡旋混匀以避免沉淀并将裂解缓冲液置于冰上)。使细胞于 4 $^{\circ}\text{C}$ 裂解 15-30 分钟，通过显微镜评价验证完全裂解。裂解后，每孔中加入 60 μl PKA/底物试剂，反应于室温再温育 20 分钟，之后加入 80 μl 激酶-Glo™ 试剂。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟读取发光值，输出记录为相对光单位 (RLU, $n = 2$)，用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于毛喉素浓度作图。

如图 3 所示，随着毛喉素浓度增加，发光降低，从而证实本发明可用于检测腺苷酸环化酶活性的升高。由于毛喉素直接刺激腺苷酸环化酶，由 ATP 产生 cAMP，cAMP 又结合 PKA 的调节亚基，从而释放活性的 PKA 催化亚基，后者继而利用 ATP 来磷酸化肯普肽底物。随着肯普

肽磷酸化的增加，可被激酶-Glo™试剂中的萤光素酶使用的ATP减少，导致发光降低。毛喉素对腺苷酸环化酶的该效应见于图3，随着毛喉素浓度增加，腺苷酸环化酶活性也增加，其与发光的降低相关联。因此，本发明能利用cAMP监测腺苷酸环化酶受刺激物的诱导。

实施例4 - 监测响应激动剂和拮抗剂的多巴胺受体D1活性

在哺乳动物细胞中进行实验以证实本发明测定激动剂和拮抗剂对GPCR多巴胺受体D1 (DRD1, 一种G α_s 偶联受体) 的影响的能力。

用标准的分子生物学技术创建稳定表达DRD1的D293细胞系。简言之，依生产商的操作流程 (Promega公司, TM044), 用聚合酶链式反应从含有cDNA的载体 (ATCC, HGR213-1) 扩增编码DRD1的基因 (Genbank NM000794) 并将其克隆到pTarget™哺乳动物表达载体中。细胞如实施例1所述培养并在接种后24小时用pTarget-DRD1载体转染。转染后一天, 将细胞用胰酶消化并以多种稀释度重新平板接种, 应用含有500 μ g/ml选择药物-新霉素的新鲜培养基。每2-3天更换培养基, 直到明显建立抗药性克隆。选出几个新霉素抗性克隆以进一步表征并检测多巴胺受体D1反应。扩充显示最高反应的克隆并制备冷冻原种贮存。将克隆的细胞系之一用于随后的检测。

在2 \times 诱导缓冲液中稀释10 μ M贮存浓度的激动剂多巴胺、SKF 38393、阿朴吗啡及SKF 82958的3倍稀释液。为测试拮抗剂SCH 23390, 还在含有100nM的激动剂SKF 38393的2 \times 诱导缓冲液中进行拮抗剂SCH 23390 (5 μ M) 的2倍系列稀释。

反应在聚-D-赖氨酸包被的白色透明底96孔板中进行, 然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在384孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板, 如1536孔板。

如实施例1所述接种表达DRD1的D293稳定细胞。次日将细胞用PBS洗3次并向特定孔中加入每一激动剂稀释度的10 μ l。对于对照反应, 使用10 μ l不含激动剂的2 \times 诱导缓冲液。使诱导在室温进行30分钟, 此时向每孔中加入10 μ l 2 \times 裂解缓冲液。裂解进行20-30分钟, 并通过显微镜评价验证完全裂解。一旦细胞完全裂解, 加入60 μ

1 PKA/底物试剂，并于室温再温育反应 20 分钟。温育后，加入 80 μ l 激酶-Glo™ 试剂，室温温育 10 分钟后读取发光值。输出记录为 RLU ($n = 2$)，用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于激动剂浓度作图。图 4A 展示随着激动剂浓度升高，发光信号降低，从而显示每种激动剂对含有 DRD1 的细胞的腺苷酸环化酶的诱导效应。如图 4A 所示，各种激动剂的 EC₅₀ 值不同，显示每种激动剂对 DRD1 活性有不同的影响。

为测试拮抗剂的抑制作用，在 100nM 的激动剂 SKF 38393 存在下，将表达 DRD1 的 D293 稳定细胞与 10 μ l 拮抗剂 SCH 23390 稀释液在室温温育 30 分钟。如上所述进行 PKA/底物试剂及激酶-Glo™ 试剂的添加和随后的温育及读数。

输出记录为 RLU ($n = 2$) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于激动剂浓度作图。图 4B 显示，随着拮抗剂浓度升高，发光也增加。该增加是由于 SCH 23390 对激动剂 SKF 38393 的拮抗效应而对腺苷酸环化酶的抑制作用。因此，本发明可用于监测激动剂和拮抗剂对与 G α_s 途径偶联的 GPCR 的腺苷酸环化酶组分的影响。

实施例 5 - cAMP 和 cGMP 与 PDE 活性的关联

进行实验以展示 PKA 在环核苷酸及相应的环核苷酸磷酸二酯酶存在下监测 cAMP 和 cGMP 浓度变化的能力。还进行实验以监测在环核苷酸磷酸二酯酶的激活剂或抑制剂存在下 PDE 活性的变化。

反应在白色 96 孔板中进行，然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在 384 孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板，如 1536 孔板。

在减去 IBMX 和 RO 201724 的 2 \times 诱导缓冲液中通过以 1/10 增量 (1mU、0.9mU、0.8mU 等) 稀释 1mU 贮存液而进行牛脑磷酸二酯酶 II (Sigma, PDE II) 的系列稀释，所述牛脑磷酸二酯酶 II 可将 cAMP 水解成 AMP。将每一稀释度的 12.5 μ l 等分试样加入到 96 孔白色平板中 12.5 μ l 含有 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、50 μ M CaCl₂、0.1mg/ml BSA、20 μ M 钙调素 (CaM) 及 0.5 或 10 μ M cAMP 的溶液中 (总体积 25 μ l)。酶反应在室温温育 15 分钟，加入 12.5 μ l 终止缓

冲液 (40mM Tris-HCl (pH 7.5)、20mM MgCl₂、0.1mg/ml BSA、375 μM IBMX 及 4 μM ATP) 终止反应。加入 IBMX 溶液后, 加入 25 μl PKA/底物试剂, 反应再温育 20 分钟, 加入 50 μl 激酶-Glo™ 试剂。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟测量发光, 输出记录为 RLU (n = 2) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于 PDE 浓度作图。在图 5 中可见, 发光随着增加的 PDE II 浓度而增加, 证实 PDE II 对 cAMP 浓度的影响。随着 cAMP 被 PDE II 水解为 AMP, cAMP 浓度降低, 从而导致发光增加。

为展示 cGMP 活化 PKA 的能力, 用本测定系统进行对 cAMP 和 cGMP 的并列滴定。在不含 ATP 和 IBMX、但添加 2 μM ATP 的终止缓冲液中制备 cAMP 和 cGMP (二者初浓度均为 40 μM) 的 2 倍系列稀释液。将 25 μl 的稀释液等份加入到白色 96 孔板中后加入 25 μl PKA/底物试剂, 所述 PKA/底物试剂含有 100ng/孔的全酶-R-II α 蛋白激酶 A、20 μM 肯普肽、40mM Tris-HCl (pH 7.5)、20mM MgCl₂ 及 0.1mg/ml BSA。使反应在室温温育 20 分钟, 加入 50 μl 激酶-Glo™ 试剂后再温育 10 分钟。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟测量发光, 输出记录为 RLU (n = 2) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于环核苷酸 (cNMP) 浓度作图。如图 6 所示, 随着环核苷酸浓度升高, 相对光单位降低。图 6 展示尽管其亲和力低于 cAMP, cGMP 能结合 PKA 的调节亚基, 从而释放活性的催化亚基。

实施例 6 - 监测 cGMP-PDE (PDE V) 活性

以总体积 25 μl, 在含有 50mM Tris-HCl (pH 7.5)、10mM MgCl₂、0.5mM EGTA、0.1 mg/ml BSA 及 5 μM cGMP 的溶液中进行磷酸二酯酶 PDE V 的系列稀释, 始于 50U 浓度。使酶反应在室温进行 60 分钟, 之后加入 12.5 μl 终止缓冲液。向反应孔中加入 25 μl 含有 100ng/孔的全酶-R-II α 蛋白激酶 A、40 μM 肯普肽、40mM Tris-HCl (pH 7.5) 及 30mM MgCl₂ 的 PKA/底物试剂, 然后室温温育 20 分钟。加入等体积 (50 μl) 激酶-Glo™ 试剂, 反应再温育 10 分钟, 测量发光值, 输出记录为 RLU (n = 2) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于磷酸二酯酶 PDE V 浓度作图。在图 7A 中可见, 随着磷酸二酯酶 PDE V 浓度

升高,样品的相对发光也升高。图 7A 证实本测定法不仅能监测特异于 cAMP 水解的磷酸二酯酶,还能监测特异于 cGMP 水解的磷酸二酯酶。

实施例 7 - 监测在抑制剂存在下 cGMP-PDE (PDE V) 的活性

进行磷酸二酯酶 PDE V 选择性抑制剂扎普斯特 (Sigma) 的滴定。在不含 IBMX 和 ATP、添加 $10\ \mu\text{M}$ cGMP 的终止缓冲液中进行扎普斯特 ($20\ \mu\text{M}$) 的 2 倍系列稀释。还制备含有 PDE V 的酶溶液,使得每 $12.5\ \mu\text{l}$ 的酶溶液中含有 15U (不含 IBMX 和 ATP 的终止缓冲液) 的酶。将每一稀释度的等分试样 ($12.5\ \mu\text{l}$) 加入到反应孔中,再加入等量磷酸二酯酶 PDE V 酶溶液以起始反应。平板于室温温育 30 分钟,之后加入添加 1.5mM IBMX 和 $4\ \mu\text{M}$ ATP 的终止缓冲液以终止反应。向每孔中加入等体积 PKA/底物试剂 (含有: 100ng/孔 的全酶-R-II α 蛋白激酶 A、 $40\ \mu\text{M}$ 肯普肽、 40mM Tris-HCl (pH 7.5)、 20mM MgCl_2 及 0.1mg/ml BSA), 平板再温育 20 分钟,加入 $50\ \mu\text{l}$ 激酶-Glo™ 试剂。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟测量发光,输出记录为 RLU ($n=2$) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于扎普斯特浓度作图。如图 7B 所示,随着磷酸二酯酶 PDE V 抑制剂扎普斯特的量增加,相对光单位降低。图 7B 展示了发光与扎普斯特浓度之间的关联,从而证实所述测定法可用于确定 cGMP 特异性磷酸二酯酶 PDE V 的潜在抑制剂。图 7B 进一步展示在本试验中计算的扎普斯特的 IC_{50} , 与文献 (Turko 1998) 中所记载的相比,再次证实了所述测定法可用于监测相应的 cGMP 磷酸二酯酶活性的变化。因此,本发明可用于测量 cAMP 浓度及在抑制剂存在和不存在下其相应的磷酸二酯酶的活性,以及监测 cGMP 浓度及在抑制剂存在或不存在下其相应的磷酸二酯酶的活性。

实施例 8 - 检测 cGMP 浓度

为测定生物样品中的 cGMP 浓度,样品最初应加热至 95°C 5 分钟,之后加入 cAMP 选择性磷酸二酯酶如 PDE IV,再于室温温育 30 分钟。然后可向样品中加入等分试样的 PKA 底物试剂,于室温温育 20 分钟,之后加入激酶-Glo™ 试剂 (Promega 公司, Madison WI)。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟测量发光,记录输出 (RLU),并相对于不同的样品体

积作图。然后可用绘图程序如 GraphPad Prism®软件 (4.0 版) 并将样品发光输出与 cGMP 标准曲线相比较来确定样品中的 cGMP 量。

为测量生物样品中 cAMP 或 cGMP 磷酸二酯酶的活性, 样品应该经透析以除去内源性 cAMP 和 cGMP, 例如用截断值为 500 Da 的透析膜。留在透析膜内的样品可用于随后的试验。样品将与如先前实施例中所述的底物和试剂温育。因此, 对于 cAMP 或 cGMP 磷酸二酯酶, 将分别使用底物 cAMP 或 cGMP。可如之前所述使用检测方法, 通过比较检测输出与对照, 确定磷酸二酯酶的活性。

实施例 9 - 检测质膜中的 cAMP

本试验提供利用低渗裂解法或氮空蚀 (nitrogen cavitation) 裂解法制备质膜制剂的示例方法。

对于低渗裂解, 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟收集 3×10^7 个细胞并用 PBS 洗两次。将细胞沉淀重悬于 10ml 低渗裂解缓冲液 (1mM HEPES (pH 7.5)、1mM EDTA、0.2mM 亮抑酶肽及 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶), 细胞悬液用派勒克斯杜恩斯玻璃匀浆器搅匀 (20 击)。在一些情况下, 将细胞悬液匀浆 3 次以起始低渗细胞裂解。为调节细胞悬液的低渗性, 在一些细胞悬液中, 加入 HEPES 和甘油至终浓度分别为 25mM 和 10%。向其它细胞悬液中加入等体积的 $2 \times$ 缓冲液 A ($2 \times$: 50mM HEPES (pH 7.5)、2mM EDTA、0.5M 蔗糖、0.4mM 亮抑酶肽及 $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶)。通过再击 17 次捣匀所有悬液。

对于氮空蚀裂解, 以 $500 \times g$ 离心 5 分钟收集 3×10^8 个细胞并用 PBS 洗两次。将细胞沉淀重悬于 15ml 缓冲液 A (0.25mM 蔗糖、25mM HEPES (pH 7.5)、1mM EDTA、0.2mM 亮抑酶肽及 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶)。细胞悬液在氮空蚀炸弹 (Parr 仪器公司, Moline, IL) 中以 350Psi 预平衡 20 分钟, 缓慢释放压力, 收集细胞裂解物。

对于这两种裂解法, 质膜部分按下列操作收集。对细胞裂解物进行低速离心 ($1000 \times g$) 10 分钟以去除细胞碎片。收集上清液并进行高速离心 ($50,000 \times g$) 30 分钟以收集质膜。将质膜部分重悬于缓冲液 A、缓冲液 B (25mM HEPES (pH 7.5)、1mM EDTA、0.2mM 亮抑酶

肽及 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 抑肽酶) 或含有终浓度为 10% 的甘油的缓冲液 B。

评估不同的制备方法以确定最佳方法, 其中膜完整性得以维持, 并且更重要的是使受体-G 蛋白-腺苷酸环化酶复合物保持完整。图 8 显示对不同细胞类型使用不同的裂解法和缓冲液的不同膜制剂的测试数据。尽管膜制剂显示出诱导的 cAMP 产生, 只通过低渗裂解法裂解并重悬于缓冲液 B 的膜显示出比在含有甘油的缓冲液 B 或含有蔗糖的缓冲液 A 中裂解的膜低的反应。未看出重悬于含有甘油的缓冲液 B 和含有蔗糖的缓冲液 A 中的膜制剂之间的差异。

实施例 10 - 检测质膜中毛喉素刺激的腺苷酸环化酶活性

反应在聚-D-赖氨酸包被的白色透明底 96 孔板中进行, 然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在 384 孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板, 如 1536 孔板。

在刺激缓冲液 (25mM HEPES (pH 7.5)、10mM MgCl_2 、100 μM IBMX 及 0.1% 吐温-20) 中进行 250 μM 毛喉素的 2 倍系列稀释。按照实施例 9 所述方法从如实施例 4 所述的稳定表达 DRD1 的 HEK293 细胞制备质膜制剂。向 96 孔板的孔中加入质膜 (1 μg 蛋白于 25 μl 刺激缓冲液中) 和 10 μM GDP, 并于室温温育 10 分钟。向质膜制剂中加入 15 μl 每一毛喉素稀释液。通过向含有预温育的质膜制剂的几个孔中加入 15 μl 不含毛喉素的刺激缓冲液而将对照包括在内。在室温温育含有或不含有毛喉素的质膜制剂 15 分钟。为检测 cAMP 产生, 向每孔中加入 40 μl PKA/底物试剂, 并使反应于室温再温育 20 分钟, 之后加入 80 μl 激酶-Glo™ 试剂。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟读取发光值, 输出记录为相对光单位 (RLU) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于毛喉素浓度作图。

如图 9 所示, 随着毛喉素浓度升高, 发光降低, 从而证实本发明可用于检测质膜制剂中受毛喉素刺激的腺苷酸环化酶活性。因此, 本发明能检测经刺激物诱导腺苷酸环化酶后质膜制剂中的 cAMP 产生。

实施例 11 - 监测质膜中响应激动剂的多巴胺受体 D1 活性

进行实验以证实本发明能测定质膜制剂中激动剂对腺苷酸环化酶

活性对 GPCR 多巴胺受体 D1 (DRD1) 的影响。

在含有 50 μM ATP 和 0.2 μM GTP 的刺激缓冲液中稀释 10 μM 贮存浓度的激动剂多巴胺和 SKF38393 的 2 倍稀释液。还制备 10 μM 贮存浓度的非特异性 DRD1 配体 - 喹吡罗的 2 倍稀释液。

反应在聚-D-赖氨酸包被的白色透明底 96 孔板中进行, 然而反应也可通过按比例减少添加试剂的量而在 384 孔板中进行。通过相应地按比例减少体积添加还可潜在使用更高密度的板, 如 1536 孔板。

根据实施例 7 所述方法从如实施例 4 所述的稳定表达 DRD1 的 HEK293 细胞制备质膜制剂。向 96 孔板的孔中加入质膜 (1 μg 蛋白于 25 μl 刺激缓冲液中) 和 10 μM GDP, 并于室温温育 10 分钟。向特定孔中加入 20 μl 的每一化合物稀释液。在室温进行诱导 15 分钟后加入 40 μl PKA/底物试剂。使反应再温育 20 分钟, 之后加入 80 μl 激酶-Glo™ 试剂。加入激酶-Glo™ 试剂后 10 分钟读取发光值, 输出记录为相对光单位 (RLU) 并用 GraphPad Prism® 软件 (4.0 版) 相对于毛喉素浓度作图。

图 10 展示, 在已知的特异性 DRD1 激动剂 (多巴胺和 SKF38393) 的情况下, 随着激动剂浓度升高, 发光信号降低; 但在喹吡罗 (一种非特异性 DRD1 受体的配体) 的情况下并非如此, 从而显示可在膜制剂中检测 DRD1 受体的活化。因此, 本发明可用于通过测量 cAMP 浓度的变化监测质膜制剂中受激动剂/拮抗剂诱导的 GPCR 受体活化。

以与实施例 4 中类似的方式, 可进行对 DRD1 拮抗剂的试验。例如, 为检测质膜中拮抗剂对 DRD1 的抑制, 在 100nM 激动剂 SKF 38393 存在下, 将 10 μl 拮抗剂 SCH 23390 的稀释液加入含有 DRD1 的质膜制剂中, 并于室温温育反应 0 分钟。可如上所述进行 PKA/底物试剂和激酶-Glo™ 试剂的添加和随后的温育及读数。

实施例 12 - 监测响应激动剂和拮抗剂的多巴胺受体 D2 (DRD2) 活性

进行实验以证实本发明能测定激动剂和拮抗剂对 GPCR 多巴胺受体 D2 (DRD2) (一种 $G\alpha_i$ 蛋白偶联受体) 的影响。

如实施例 4 中对于 DRD1 所述,使用标准的分子生物学技术创建稳定表达 DRD2 的 D293 细胞系。

细胞用磷酸盐缓冲盐水溶液简短清洗以去除痕量血清,并在克雷布斯林格缓冲液 (100 μ M IBMX 和 100 μ M Ro-20-1724) 中于 10 μ M 毛喉素存在下以 20 μ l (96 孔板) 或 7.5 μ l (384 孔板) 与多种浓度的 D2-受体激动剂温育。室温温育 15 分钟后,用 20 μ l (96 孔板) 或 7.5 μ l (384 孔板) 裂解缓冲液裂解细胞。于室温裂解 15 分钟后,用 40 μ l 含有 PKA 的反应缓冲液 (在 96 孔板中 40 μ l, 在 384 孔板中 15 μ l) 进行激酶反应,激酶反应在室温进行 20 分钟。在激酶反应结束时加入等体积的激酶-Glo™ 试剂并于室温温育 10 分钟,用发光计读板。

对于基于拮抗剂的测定,将细胞与 10 μ M 毛喉素及 EC₈₀ 浓度的 D2 受体激动剂于含有 100 μ M IBMX 和 100 μ M Ro-20-1724 的克雷布斯林格缓冲液中与或不与拮抗剂一起温育,并如上所述进行测定。如图 11A 所示,得到与文献报道相似的喹吡罗 EC₅₀ - 0.5nM。除细胞与 10 μ M 毛喉素和 100nM D2 激动剂喹吡罗及与递增浓度的拮抗剂雷氯必利温育以外,利用类似的试验设计测试拮抗剂。如图 11B 所示,得到与文献报道相似的雷氯必利 IC₅₀ 值 - 0.8nM。所述多巴胺 D2 受体是 G α_i 蛋白偶联受体。因此,此测定法不仅能监测对 G α_s 蛋白偶联受体的调节,还能监测对 G α_i 蛋白偶联受体的调节,从而证实此测定法可用于搜寻这两类受体的调节剂的 HTS 筛选程序中。

所有在本申请中提到的出版物和专利通过引用并入本文。对本发明所述方法及组合物的各种修改及变化对本领域技术人员将是显而易见的而不偏离本发明的范围和精神。尽管就特定优选的具体实施方案描述了本发明,但应了解,所要求保护的发明不应不适当地局限于这些特定的具体实施方案中。实际上,相关领域技术人员显而易见的对所述具体实施方式的各种修改均意图包含在下列权利要求范围之内。

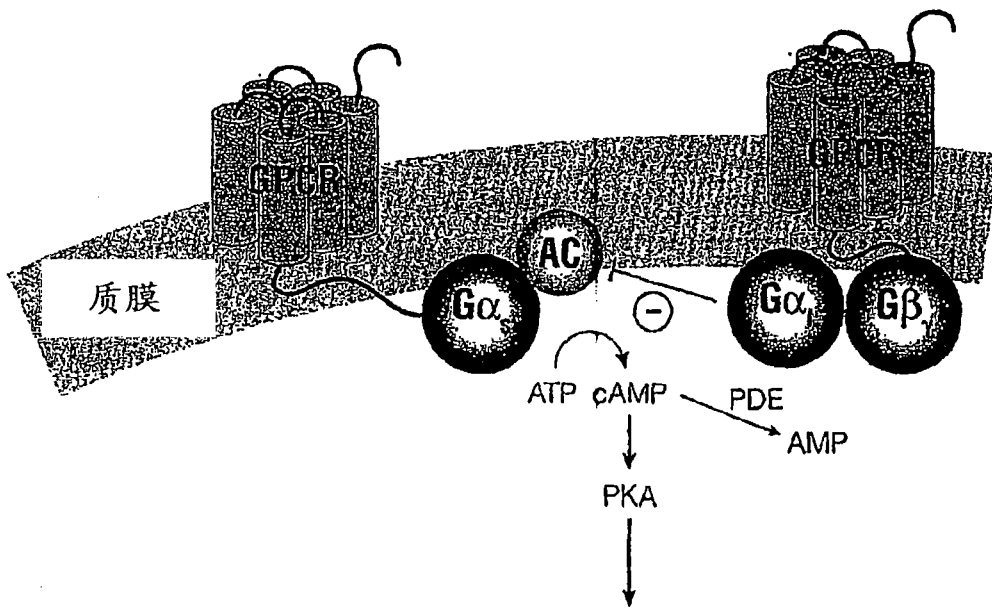


图1

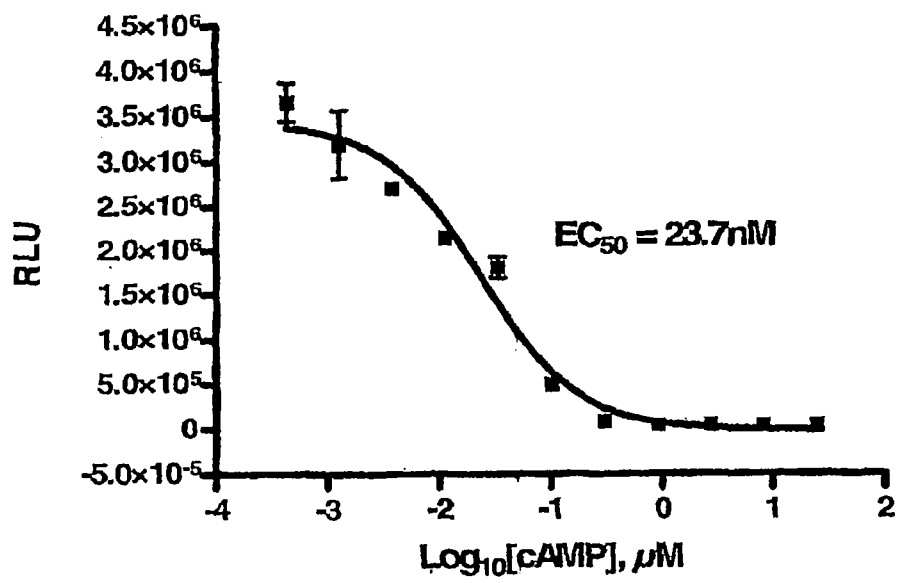


图 2

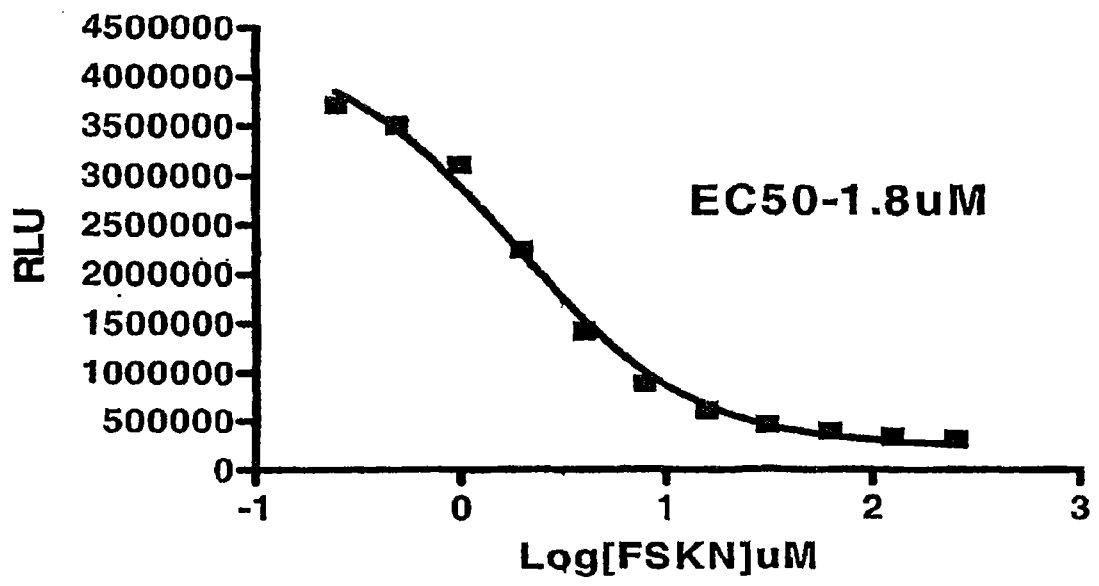
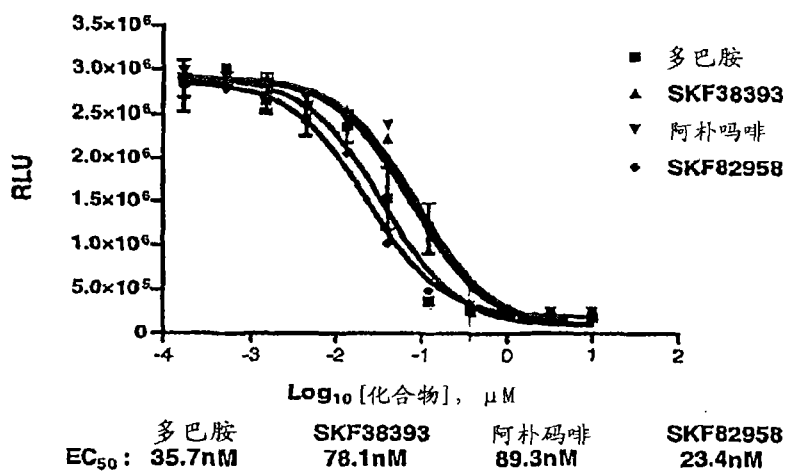


图 3

A



B

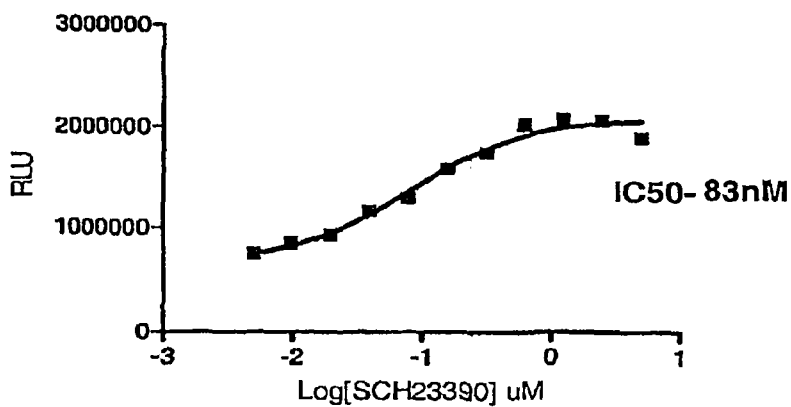


图 4

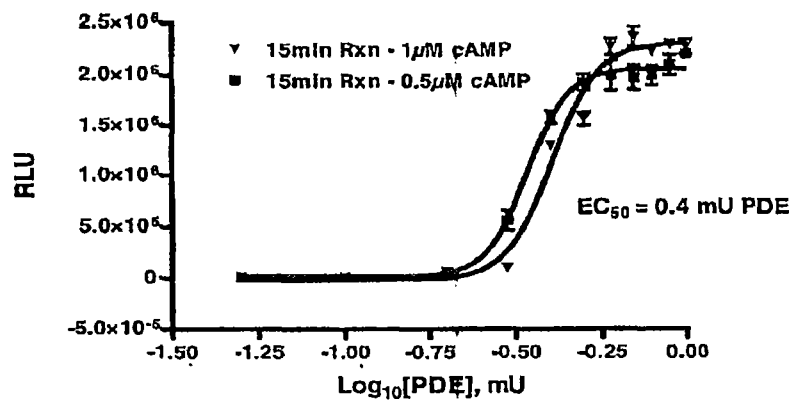


图 5

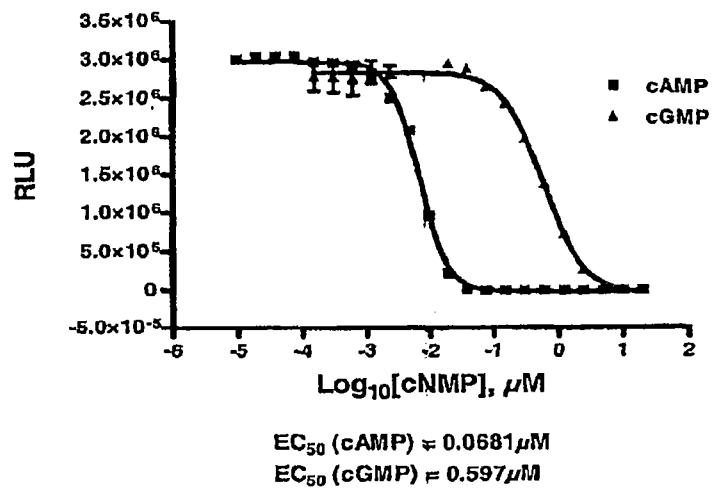
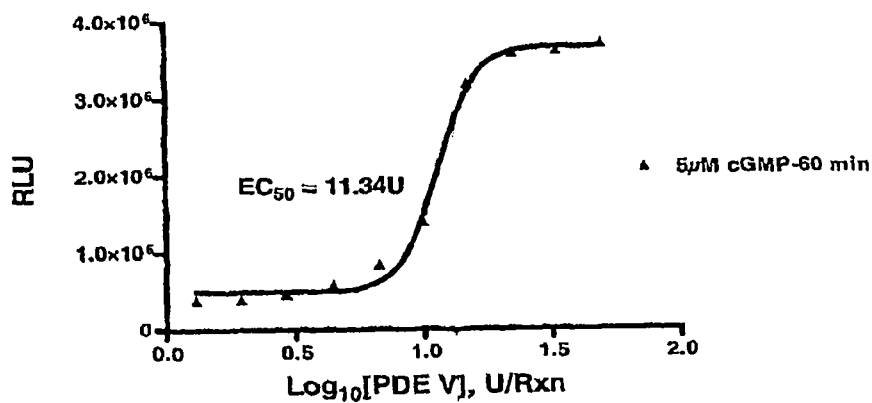


图 6

A



B

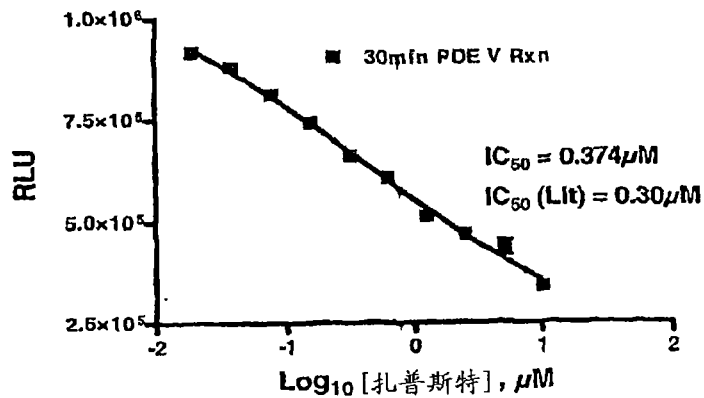
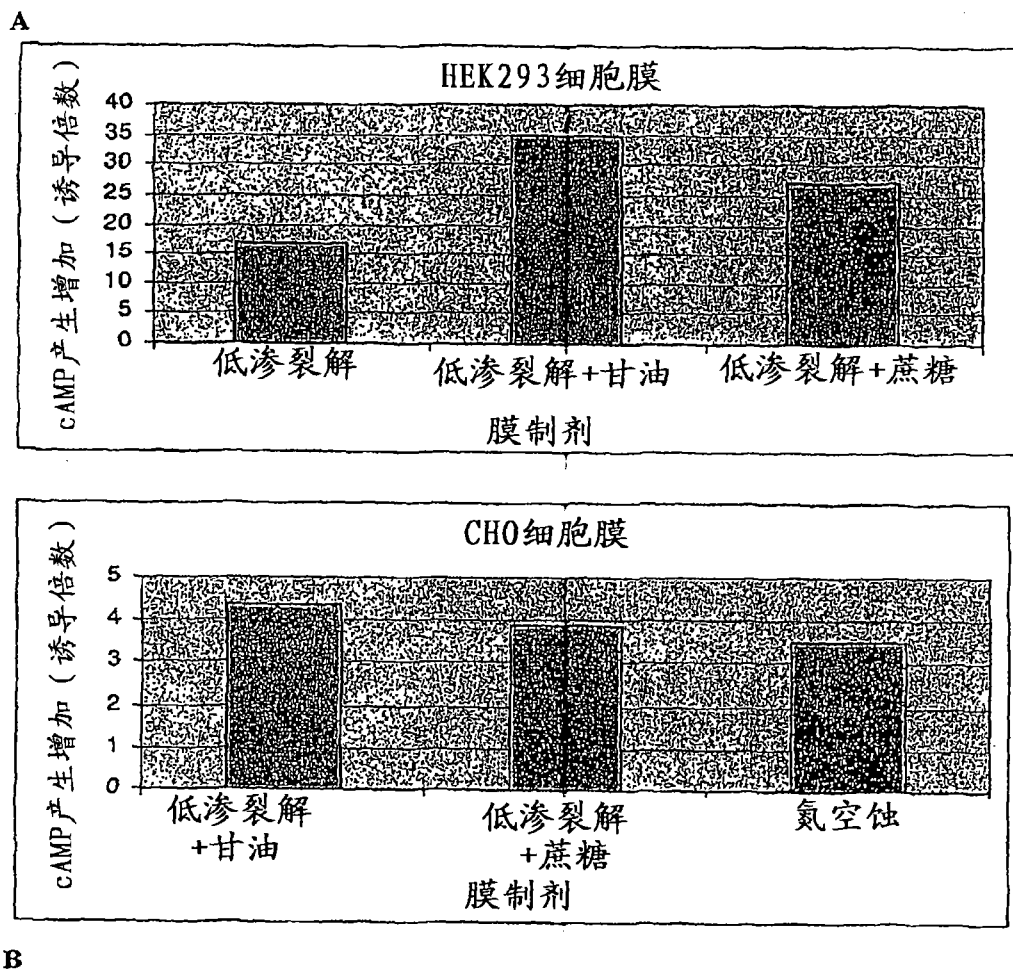


图 7



B

图 8

以1 μ g DRD1-D293细胞膜/孔
进行毛喉素滴定 (1/3稀释)

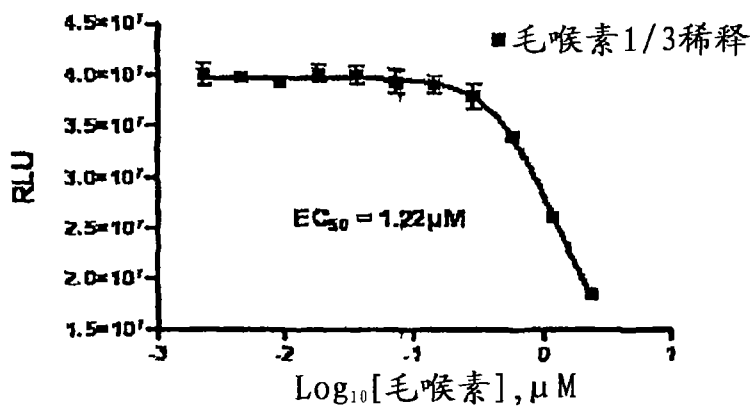


图9

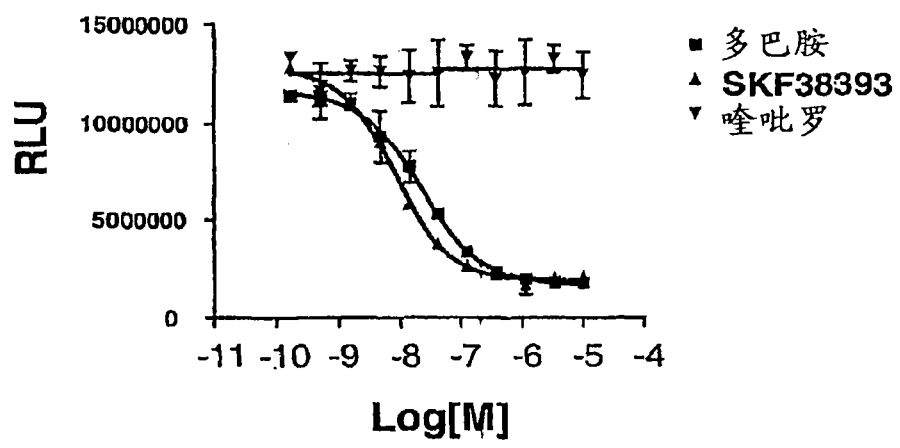


图10

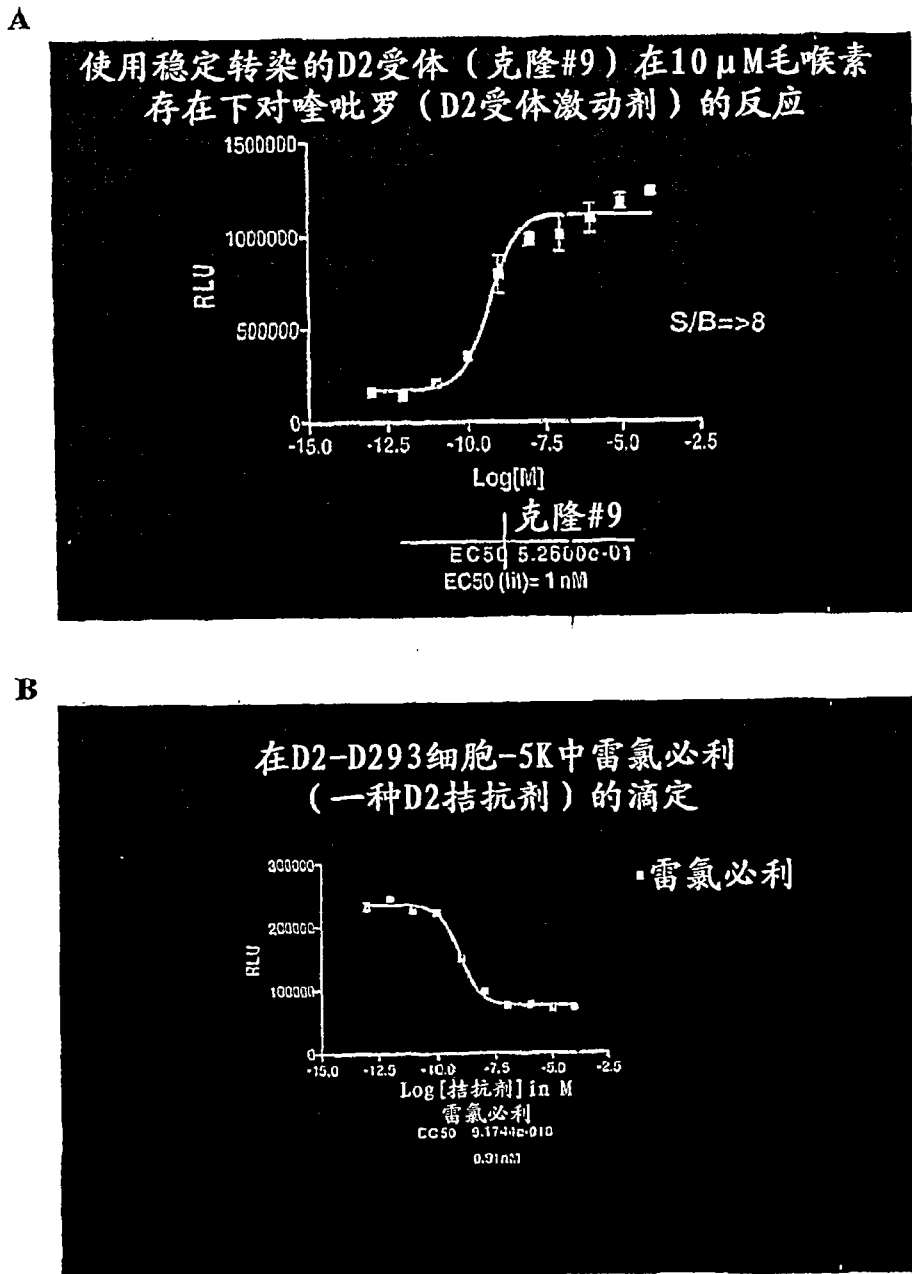


图11