

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



# [12] 发 明 专 利 说 明 书

专利号 ZL 03155824.0

[51] Int. Cl.

C12Q 1/25 (2006.01)

C12Q 1/48 (2006.01)

C12Q 1/42 (2006.01)

C12Q 1/68 (2006.01)

G01N 33/50 (2006.01)

[45] 授权公告日 2009 年 5 月 27 日

[11] 授权公告号 CN 100491539C

[22] 申请日 2003.8.22 [21] 申请号 03155824.0

[30] 优先权

[32] 2002.8.22 [33] US [31] 10/227, 012

[73] 专利权人 生物阵列技术有限公司

地址 美国新泽西

[72] 发明人 杨嘉诚

[56] 参考文献

US6316186B1 2001.11.13

WO9941273A2 1999.8.19

WO9951773A1 1999.10.14

WO9820153A 1998.5.14

WO9602558A 1996.2.1

审查员 赵彦豪

[74] 专利代理机构 北京银龙知识产权代理有限公司

代理人 钟 晶

权利要求书 1 页 说明书 43 页 附图 41 页

[54] 发明名称

分子构建和用于检测生化反应的方法

[57] 摘要

本发明涉及分子构建和使用它们探测生化反应的方法。本发明特别涉及具有捕获部位和底物部位的分子构建，其中，捕获部位能够将构建从样品中分离出来，底物部位能够使构建发生作用，并经历一可被测量或检测到的改变。这些分子构建可以用于疾病诊断、对个体患某些疾病的可能进行基因筛选、以及通过使用高通量的化合物筛选的药物发现以及毒性基因组学。

1. 一种在试样中探测多种酶活性的方法，其包括：
  - (a) 将多种类型的 PNA-底物嵌合体加到样品中，所述的 PNA-底物嵌合体具有 PNA 捕获部位和酶的底物，其中，不同类型类型的嵌合体具有能够和不同酶反应的不同底物，但每种类型具有独特的底物和挑选的 PNA 序列捕获部位；
  - (b) 使酶和嵌合体群的底物部位反应；
  - (c) 用不同类型的寡核苷酸捕获反应的 PNA-底物嵌合体，其中所述的不同类型的寡核苷酸位于不同编码微粒上，并且所述捕获是通过寡核苷酸退火到挑选的 PNA 序列捕获部分上而进行的；以及，
  - (d) 探测捕获的反应的 PNA-底物嵌合体探测捕获的反应的 PNA-底物嵌合体的底物所发生的变化；
  - (e) 解码编码微粒以鉴定发生反应的底物，进而鉴定特定酶存在于样品中。
2. 权利要求 1 所述的方法，其中，微粒子是彩色编码的。
3. 权利要求 1 所述的方法，其中，PNA-底物嵌合体含有两个标记。
4. 权利要求 3 所述的方法，其中，标记为荧光部分。
5. 权利要求 1 所述的方法，其中，PNA-底物嵌合体的底物部位是 caspase 的底物。
6. 权利要求 1 所述的方法，其中，PNA-底物嵌合体的底物部位是磷酸酶的底物。
7. 权利要求 1 所述的方法，其中，PNA-底物嵌合体的捕获部位是双-PNA。

## 分子构建和用于检测生化反应的方法

### 技术领域

本发明主要涉及分子生物学以及生物化学。本发明提供分子构建以及测定单个或多个生化反应的方法。

### 技术背景

细胞中的生化反应决定细胞功能和活动。这些反应包括在受体配体间的复杂的相互作用和酶反应，其调节细胞所发出的信号及其活动。生理条件会影响参与这些反应的酶和蛋白质的活性水平。

例如，对肽链上的氨基酸残基的修饰在调节细胞中的蛋白质功能方面扮演着重要的角色。磷酸基、甲基或碳水化合物的转移包含了在蛋白质底物中的构象改变，而这种改变又反过来导致蛋白质功能发生变化。这些反应通常是可逆的。蛋白质修饰过程中包含特殊的酶活动种类。例如，甲基化作用通常是由被称为转甲基酶的一类酶来进行催化的。蛋白质甲基化作用调节胞质蛋白质（cytosolic proteins）对细胞膜的附着并且有助于防止肽的C端蛋白水解的降解反应。例如，大多数的G蛋白质是甲基化的。甲基化的半胱氨酸残基位于或接近于G蛋白质的羧基末端，并且有助于肽附着到用于信号传导的细胞膜上（Rando, *Biochim Biophys Acta* 1300（1）：5-12（1996），Hrycyna, *Pharmacol. Ther.* 59(3):281-300(1993)）。在几种肌动蛋白的73位置处的组氨酸也被甲基化。已经表明甲基化对于维持肌动蛋白分子的固有的构象是必须的（Yao, *J. Biol. Chem.* 274(52):37443-9(1999)）。在肌球蛋白的S-1区域进行的赖氨酸残基的甲基化会导致在肌纤蛋白收缩中的ATP降低（Bivin, *Proc. Nat'l Acad. Sci USA* 91(18):8665-9(1994)）。已经表明膜蛋白的甲基化作用会导致糖尿病患者中心血管疾病的发生（Schaffer, *Mol. Cell Biochem* 107(1):1-20(1991)）。此外，甲基化作用减少核蛋白中的RNA-蛋白质的相互作用（Kim, *Amino Acids* 15(4):291-306(1998)），并且选择性地调整SH3功能域-中介蛋白-蛋白之间的相互作用（Bedford, *J. Biol. Chem.*

275(21):16030-6(2000))。

同样地，碳水化合物可以被转移到在许多分泌型蛋白质或细胞表面的蛋白质上的天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸残基的侧链上。将碳水化合物转移到人体凝血因子 V 上的 2181 位置的天冬酰胺上会削弱因子 V 和磷脂膜之间的相互作用 (Nicolaes, *Biochemistry* 38(41):13584-91(1999))。大型的碳水化合物如多糖可以通过将许多糖单体链接反应后得到。

#### 发明内容

本发明涉及一种具有捕获部位和底物部位的分子构建。捕获部位用于将构建从测试的样品中分离出来，底物部位提供反应的场所用于确定感兴趣的目标分子的存在或活动水平。在一种优选的实施方式中，分子构建包括肽核酸 (PNA) 作为捕获部位和肽或蛋白质作为底物部位。另一种可选择的优选底物部位包括非肽类分子，如脂肪酸、类固醇、糖、辅助因子和其它的可以与感兴趣的目标分子反应或作为其底物的结构。

本发明也涉及使用分子构建的方法。此外还提供测定一种或多种酶活动的方法，这种方法是通过测定分子构建中被修饰的底物部位，而这反过来又可以指示样品中存在的一种或多种酶的活性。相似地，本发明还提供在测定细胞、细胞种群或组织样品中的被分析物的方法。

本发明中具有肽核酸 (PNA) 捕获部位的分子构建相对于现有技术中的分子构建来说是特别好的。由于 PNA 的主链具有无电荷性，所以 PNA 与互补核酸序列的杂交具有更高的特异性和更高的亲和力。由于 PNA 具有核酸如 DNA 或 RNA 所不具有的各种特性，所以 PNA 核酸序列杂交要相对好得多。PNA 在较大 pH 值的范围内和低离子强度环境中是稳定的。这些性质使得 PNA 特别适用于本发明的探测测定中。

为了探测和分析生化反应所需进行的测定应该是精确地、省时有效地和能够高灵敏度地筛选出一个或多个反应的。因此，为了防止和/或治疗疾病，特别是由病毒、细菌和寄生虫引起的人类疾病，如存在一种方

法能够探测一个或多个生化反应，且该方法容易使用、具有高特异性、能够精确地、灵敏地进行筛选，则是非常有用的。

进一步，本发明还提供了一种在试样中探测多种酶活性的方法，其包括：

(a) 将多种类型的 PNA-底物嵌合体加到样品中，所述的 PNA-底物嵌合体具有 PNA 捕获部位和酶的底物，其中，不同类型类型的嵌合体具有能够和不同酶反应的不同底物，但每种类型具有独特的底物和挑选的 PNA 序列捕获部位；

(b) 使酶和嵌合体群的底物部位反应；

(c) 用不同类型的寡核苷酸捕获反应的 PNA-底物嵌合体，其中所述的不同类型的寡核苷酸位于不同编码微粒上，并且所述捕获是通过寡核苷酸退火到挑选的 PNA 序列捕获部分上而进行的；以及，

(d) 探测捕获的反应的 PNA-底物嵌合体探测捕获的反应的 PNA-底物嵌合体的底物所发生的变化；

(e) 解码编码微粒以鉴定发生反应的底物，进而鉴定特定酶存在于样品中。

#### 附图说明

图 1 显示了使用 LEAPS 或直接淀积的方法来探测微粒，并且随后在阵列上使用 READ、流式细胞计和沉淀法来进行探测的实施例。

图 2 示意性地描述了用于固定到载体表面的多元测定中的 PNA-被分析物嵌合体。

图 3 显示了通过抗体来探测经修饰的被分析物/底物。被捕获到固体表面的修饰的被分析物可以通过用荧光(F) 或过氧化物酶 (E)标记的抗体在一种抗体—(A)；二种抗体—(B) 或三种抗体—(C) 的形式中检测得到。

图 4 示意性地描述了 MAP 致活酶信号传导通道用于识别在 MAP 致

活酶通道中的特异性致活酶的活性的报道嵌合体。

图 5 示意性地描述了使用 PNA-STAT 嵌合体进行细胞基测定，以确定在以 JAK 致活酶为媒介的传递的信号传导通道中的致活酶的活性。

图 6 示意性地描述了对 PKD1 和 Akt1/PKB 致活酶 (A) 的特异性的致活酶活性的探测，并且其可以用在细胞基的测定 (B) 中来分析 Akt/PKB 信号通道。

图 7 示意性地描述了使用 PNA-caspase 嵌合体来探测多个 caspase 活动。

图 8 示意性地描述了在细胞基探测中使用 PNA-小分子嵌合体来识别新药寻靶 GPCR。

图 9 示意性地描述了根据流式细胞计探测到的将 PNA 嵌合体杂交到彩色编码的微粒上的互补寡核苷酸上。

图 10 显示了一种使用 PNA-抗体嵌合体来探测和分离细胞的方法，这些细胞在其表面显示有特异性蛋白质。

图 11 显示了两种不同的将寡核苷酸探针固定到固体表面上的方法，包括使用生物素-中性抗生物素蛋白结合进行的间接偶合 (A)，以及使用胺-甲苯磺酰基反应进行的直接偶合 (B)。在下面的图中显示出了以生物素-中性抗生物素蛋白作为媒介，将寡核苷酸间接偶合到固体表面上的滴定结果，以及将寡核苷酸与胺基-甲苯磺酰基的偶合直接结合到固体表面上的滴定结果。

图 12 显示了两种类型的生物素化寡聚物的高压液体色谱法纯化的过程。

图 13 显示了纯化的四甲基若丹明 (TMR) 标记的 PNA-肽嵌合体 (A) 和 Cy5 标记的 PNA-小分子嵌合体 (B) 和它们相应的谱图情况。

图 14 显示了芯片上杂交测定的结果，其测试了将生物素化双-PNA 寡聚物进行序列特异性捕获到固定在微粒阵列上的各种寡核苷酸上。

图 15 显示了试管内杂交测定 (A) 与芯片上杂交测定 (B) 比较的结果，其用于测试将双-PNA 寡聚物进行序列特异性捕获到固定在彩色编码的微粒上的 DNA 寡核苷酸上。

图 16 显示了芯片上杂交测定的结果，其测试将双-PNA-蛋白质嵌合体进行序列特异性捕获到固定在微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸（18 个碱基长）上。

图 17 显示了将 PNA 寡聚物杂交到固定在彩色编码的磁性颗粒上的互补寡核苷酸上的结果，其中芯片 B（B）是芯片 A（A）的负对照。

图 18 显示了芯片上杂交测定的结果，其测试了将双-PNA-小分子嵌合体进行序列特异性捕获到固定在微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸（10 个碱基长）上，其中，芯片 2 是对芯片 1 的负对照。

图 19 显示了三条生物素化的磷酸化的肽标准曲线（肽-P-1，肽-P-2 和肽-P-3）随浓度上升的结果，其中，肽通过使用微粒阵列而偶合到特异性的彩色编码珠上，该珠被中性抗生素蛋白包覆。

图 20 显示了两条生物素化的磷酸化的肽标准曲线（肽-P-1 和肽-P-2）随浓度上升的结果，其中，肽用中性抗生素蛋白偶合到特异性的彩色编码珠上。

图 21 显示了使用酪酰胺（tyramide）试剂在微粒阵列上进行磷酸化的肽（Ty-P-1 和 Ty-P-2）免疫检测的结果。用于该测定的单克隆抗体用对磷酸化修饰具有特异性的过氧化物酶进行标记。

图 22 显示了使用在阵列上的磷酸化的肽特异性的单克隆抗体进行磷酸化的肽（Ty-P-1 和 Ty-P-2）免疫检测的结果。结合的单克隆抗体用 Cy-5 标记的次级抗体来探测。

图 23 显示了在微粒阵列上使用荧光标记的抗体同时进行多个磷酸化的肽的免疫检测的结果。

图 24 显示了双标记的 PNA 被分析物嵌合体的常规设计和双重-测定信号检测（A）的比例量化；用荧光染料标记的特异性 PNA-肽嵌合体和为确定 Caspase3 活性（B）的比例量化的内部 His6 标记；以及通过比例量化（C）确定的 Caspase3 活性的结果。

图 25 显示了通过流式细胞分析探测杂交到彩色编码的微粒上的 PNA 嵌合体的结果。在图 25A 中，两个绿色珠（绿 A 和绿 B）与两种类型的寡核苷酸（A）和（B）偶合。PNA 嵌合体特异性地结合到绿 B 珠上的寡

核苷酸上，这可在橙色通道上检测到。类似的，在图 25B 中，结果表示 pPNA 嵌合体序列特异性地结合到一种可由流式细胞计探测到的珠上。

图 26 显示了用于检测蛋白酶活性的 PNA-肽嵌合体底物的常规设计，其中嵌合体的功能域用一种荧光染料（I）、两种荧光染料（II）和一种具有内部 His6 标记的荧光染料（III）标记。

图 27 显示了使用生物素化 Caspase3 肽底物和微粒阵列上末端标记的荧光染料确定 Caspase 活性的结果。

图 28 显示了进行  $2 \times 2$  PNA 嵌合体竞争测定来测试被捕获到在微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸（10 个碱基长）上的 PNA 嵌合体的特异性的结果。芯片 1 显示了生物素化 PNA 夹（生物素-PNA-板）（底板）和用四甲基若丹明（TMR）配合的双-PNA-肽嵌合体（双-PNA-肽-TMR）（顶板）被捕获到用具有特定碱基序列功能化的彩色编码珠上的结果。芯片 2 显示了对应于生物素-PNA-夹）（底板）和双-PNA-肽嵌合体-TMR（顶板）的负对照。

图 29 显示了用于解码彩色编码的微粒（橙色珠和绿色珠）的橙色和绿色图像，该珠分别与合成的非磷酸化的肽和与之相应的磷酸化的肽偶合（左板）。绿色珠上的磷酸化的肽通过使用芯片上的 Cy-5 标记的抗体而被探测（右板）到。

图 30A 示意地显示了 DNA-肽嵌合体，图 30B 显示了将 DNA-肽嵌合体杂交到在微粒阵列上的彩色编码珠上的互补 PNA 上的结果。

具体实施方式

本发明涉及一种具有捕获部位和底物部位的分子构建。捕获部位能够将构建从混合分子中分离出来，并优选含有核酸或核酸衍生物。底物部位能够使构建发生作用，并经历一可被测量或检测到的改变。该改变可以是物理的，例如化学修饰或对底物部位的剪切或加成。另外，改变也可以是将配体或细胞结合到构建上的底物部位。

本发明的分子构建可以是含有共价连接组分的 PNA-肽嵌合体，包括 PNA 寡聚物、一种或多个 PNA 的衍生物形态（例如，pPNA）、连接物和合成肽或其他底物部位。嵌合体的 PNA 部位（其可以为线性的或为

双—排列的 (format)) 作为将复合体捕获到互补寡核苷酸上的锚形体 (anchor), 其中, 寡核苷酸固定在固体支持物上。PNA 锚定区域的碱基序列为嵌合体的底物区域的被分析物提供一种独特的标记。固体支持物可以具有规定的物理特性。另外, 固体支持物可以被光或化学地编码。

嵌合体的底物部位作为参加生化测定的功能性/底物组分。分子构建的底物部位包含分子结构, 其在生化反应中作为配体或酶底物。例如, 蛋白质或肽可以被用作酶反应的底物或提供配体结合的场所。肽在探测配体—受体反应中也同样有用。蛋白质可以用作分离具有特异细胞表面标记的细胞种群的底物。另外, 酶辅助因子也可以形成嵌合体的全部或部分的底物, 例如, ATP、cAMP、GTP 等。类似的, 脂肪、类固醇和/或脂肪酸可以形成嵌合体的底物部位, 这是由于这些分子也可以在生化反应过程中被修饰, 因此可利用本发明可以被测定出。碳氢化合物也可以形成嵌合体的全部或部分的底物部位。这些分子包括, 如, 单糖、淀粉、多糖或蛋白多糖类等。

底物部位可以被修饰为含有一个或更多的部位, 例如可探测标记物或酶剪切识别部位, 如磷酸基、糖基、甲基等。在另一种实施方式中, 嵌合体的底物部位包含一个或多个荧光标记。这些标记可以与聚组氨酸、生物素、异羟基洋地黄毒甙元 (digoxigenin) 标记等的使用相结合。通过使用单标记的底物部位, 酶消化从消化的底物中消除标记物。通过使用双标记的底物部位, 酶消化从底物中消除猝灭染料, 导致从次要染料发射出的荧光保留在剪切产物上。通过使用具有一个可探测的标记物外加内聚组氨酸标记物的底物部位, 酶消化将消除荧光。并且, 来自为未剪切的底物的可探测信号可以被归一化以检测由内聚组氨酸标记物发出的信号。这些实施方式在实施例 10、14、16 和 17 中有详细描述, 其表明了这种分子构建可以提供关于感兴趣的酶活性的定量信息。在另一实施例中, 嵌合体的底物部位含有一个或更多的磷酸基团或其他感兴趣的部分, 其可作为部分的磷酸酶或其他感兴趣的酶的酶剪切位点。

本发明的分子构建可被用于探测底物部位中发生的变化变化的方法中。这里公开的方法可被用于确定蛋白质—蛋白质相互作用、配体—受体结

合、蛋白质修饰、蛋白质表达、在无细胞和细胞基形式（format）中的酶活性。本发明的方法也可被用作分离具有特异细胞表面标记物的细胞。这些方法可被用作多种用途。构建可用在基因筛选分析中、在疾病的诊断中或在治疗和/或防止中、在药物开发和在对疾病或条件的毒理学测定中，例如但不限于癌症、寄生虫感染、神经紊乱、造血紊乱、肌肉骨骼紊乱（muscoskeletal）、心血管紊乱、淋巴紊乱、呼吸紊乱、内分泌紊乱和胃肠紊乱。

通常，用于本发明的分子构建的使用方法使 PNA-底物嵌合体与蛋白质、配体或酶在测试样品中反应。反应可以在同质的溶剂中进行，或嵌合体的捕获部位可以在反应前被事先固定在固体基体上。如果测试反应在样品表面发生，则该反应对嵌合体的底物部位进行修饰。如果生化反应在溶剂中发生，则嵌合体按照序列特异性的方式被捕获到寡核苷酸-功能化的固体支持物上。在一种实施方式中，彩色编码的微粒子被用作固体支持物。微粒子可以使用现有的方法，如 LEAPS 或直接沉积法组装。LEAPS 是一种已知的粒子在接近表面的光控动电组装技术，并且是一种根据需求用于多被分析物分子分析而构建微粒子阵列的方法。LEAPS 在美国专利 6,251,691 和 WO 97/40385 中有详细记载，在此引入作为参考。在生化反应完成后，嵌合体被捕获到位于固体表面的互补 DNA 寡核苷酸传感物上。在随后的检测和数据分析中，嵌合体的同一性随后根据载体表面的编码（例如珠的彩色编码）而确定。捕获后，表面上的嵌合体可根据现有的方法直接被检测到。这种方法的非限制的例子包括沉淀反应、过氧化物酶或荧光染料、标记的抗体、配体结合检测或流式细胞计。分子构建的修饰的底物部位可以被一种或多种现有的形式而被检测到，例如，组装的粒子的随机编码阵列检测（READ）（WO 97/40385）、粒子悬浮液的流式细胞计、在空间规定的固体表面上的沉积等。

在固体表面上的 DNA 寡核苷酸在多元测定中作为对 PNA 嵌合体的锚定区域的序列特异性捕获的传感物。具有确定碱基序列的寡核苷酸可以含有其他的修饰，例如间隔序列、化学基团、配体和/或标记物，这些修饰有助于偶合、杂交和/或检测。固体表面也可以含有特定的用于偶合

的化学基团。可以直接或间接地将寡核苷酸偶合到固体表面上。用于偶合的具体方法在现有技术中是已知的。在优选的实施方案中，寡核苷酸偶合可以通过以生物素—中型抗生物素蛋白为媒介的间接偶合，或以胺—甲苯磺酰基为媒介的直接偶合。

在本发明的一种实施方式中，分子构建的捕获部位包含肽核酸（PNA）。PNAs 与 DNA 类似，具有类似肽的主架。PNA 主架包括通过酰胺基连接的重复的 N—（2-胺乙基）甘氨酸残基。与 DNA 或 RNA 不同，PNA 不含任何戊糖和磷酸基。由于 PNA 的主链具有无电荷性，使得将 PNA 与互补的 DNA 或 RNA 序列杂交比其他的核酸材料更加具有特异性和更高的亲和力。此外，PNA 和双—PNA 可与 DNA 杂交，其具有的特异性序列适于形成局部的 DNA/DNA/PNA 三重体。PNAs 的特点以及合成这些分子的方法已在如 Buchardt 等的 WO 92/20702（1992 年 11 月 29 日）中公开，其在此将其引入作为参考。由于 PNA 的杂交是非常特异性的，所以在杂交测定中的 PNA 探针可以被 DNA 探针短。PNA 在较大 pH 值的范围内是稳定的，可使用低离子强度的环境。此外，PNA 是一种合成的化合物，其在自然中不存在。因此，蛋白酶和核酸酶均不能识别 PNA 分子的聚酰胺骨架。这一特性使得 PNAs 特别适合于使用细胞溶菌产物或细胞或组织的杂交试验。

PNA—底物嵌合体的 PNAs 优选为具有 10-25 个碱基的长度，更优选为约 15 个碱基的长度。在分子的 N 末端的第一或第二个碱基是与其他分子结合的隔离物。剩余的 PNA 寡聚物作为一种探针，对嵌合体的序列特异性杂交到固定在固体支持物上的寡核苷酸上进行调节。嵌合体的 PNA 部位可以是单股或双—PNA。双—PNA 也指“PNA 夹”，其含有通过一柔软的“发卡”连接物连接的两个呈延伸状的 PNA 寡聚物。当杂交时，双—PNA 与互补的 DNA 形成三重结构。

DNA—DNA 和 DNA—RNA 杂交相比，PNAs 与其互补的 DNA 具有更高的序列特异性结合亲和和特异性。当用于多元测定时，PNA 嵌合体的锚定区域和与它们的互补 DNA 寡核苷酸传感物杂交，所述 DNA 寡核苷酸传感物固定在感兴趣的载体的特定表面上（图 2）。DNA 寡核苷酸传感

物优选含有特定的碱基序列,该碱基序列与 PNA 嵌合体文库中的一个 PNA 锚形体 (anchor) (即捕获部位) 互补。将寡核苷酸固定在载体表面可采用现有方法实现,其可以是通过化学反应如胺基和甲苯磺酰基之间的反应而直接连接到表面,也可以是通过连接分子,如在表面上将生物素化寡核苷酸结合到抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白或中性抗生物素蛋白上而间接偶合到表面。DNA 寡核苷酸传感物可以含有间隔分子、标记物、标记或其它反应基团,以助于固定、杂交和探测。载体优选含有特定的空间的和颜色特性,用于对固定的寡核苷酸进行解码。在优选的实施例中,载体可以含有微粒子。当具有  $n_3$  型的 DNA 寡核苷酸传感物和  $n_4$  型的彩色编码珠时,可以合成得到寡核苷酸官能化的载体文库( $n_3 \times n_4$ )。在多元测定时,每种类型的寡核苷酸官能化的微粒子优选仅捕获一种类型的 PNA 嵌合体。

在本发明的一种实施方式中,分子构建包含 PNA-底物嵌合体。该实施方式包含通过连接分子连接到多肽上的 PNA。通过现有的方法可合成 PNA 寡聚物。这样的方法包括 Boc 化学、Fmoc 化学 (Nielsen, P.E., Egholm, M, Peptide Nucleic Acid: Protocols and Applications, PP.21-50, Horizon Scientific Press, 1999), 它们在此被引入作为参考。

在本发明的另一种实施方式中,嵌合体的底物部位优选为肽,如酶的底物。一类特别适合于本发明的多元形式的优选的酶为相关酶族中的一部分,例如,致活酶、caspases、磷酸(酯)酶、转移酶、核酸酶等。对于本发明的非多元形式,任何利用底物的生化反应都可被测定,其中,底物或活性位点可以结合到嵌合体的捕获部位。对于多肽底物,用于底物肽的氨基酸序列可通过现有方法得到。

在本发明中,一种优选的结合方法是在肽的末端插入一半胱氨酸,如在合成肽时的 N-末端。在半胱氨酸残基侧链上的巯基可被用于在合成嵌合体时将肽连接到连接分子上。另外,赖氨酸可被加入到肽的另一末端用作生物素化,该生物素化用于在某些多元生化测定中进行检测。异型双官能团交联剂可被用在 PNA-肽嵌合体的合成中。琥珀酰亚胺基-4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-(羧基-6-氨基己酸酯),也

称作 LC-SMCC，是一种双特异性交联剂，其与被分析物的巯基和氨基反应。如现有技术所知，LC-SMCC 的 NHS 酯首先与 PNA 寡聚物的 N-末端上的氨基反应，在 pH 为 7—8 时，能够活化 PNA 分子。然后，LC-SMCC 的马来酰亚胺基与肽的巯基反应，在 pH 为 6.5—7.5 时，形成官能化的 PNA—肽嵌合体。合成的 PNA—肽嵌合体用现已知的各种方法进行提纯和浓缩。因此，可合成 PNA—底物嵌合体文库，用于多元生化测定。在 PNA—底物嵌合体文库中，每种肽都可以结合到特殊的 PNA 寡聚物上。但是，给定的一系列 PNA 寡聚物可被用于建造多个 PNA—底物嵌合体的子文库。

尽管不是必需的，本发明的一个优选实施方式在连接 PNA 和底物时使用连接物。交联物可以提供更为屈曲的结构，这是因为它作为 PNA 和嵌合体的底物部位的空间枢纽。连接物额外的屈曲性有助于酶底物的相互作用以及 PNA 寡核苷酸杂交。另外，在合成 PNA 嵌合体时，纳米粒子可用作连接物。PNA 和肽底物可连续或同时连接到粒子的表面。当磁性纳米粒子被用作连接物时，所得的 PNA 底物嵌合体可根据试验需要而被纯化或富集。

可通过各种方法实现对修饰的 PNA 底物嵌合体的探测。如果只应用一种 PNA 底物嵌合体，则已知的任何方法都适用。当使用多元化试验时，则需使用多个嵌合体群。在这个测定中，给定嵌合体群的捕获部位优选对应于单个类型的底物部位，使得在生化反应完成后，特异修饰的嵌合体可通过其相应的序列如已知的锚形体（anchor）序列而被分类和识别。这些嵌合体群的捕获是通过将嵌合体杂交到多个表面上而实现的，每个表面上含有与 PNA—底物嵌合体的给定捕获部位互补的寡核苷酸。多个表面可包含多个不同的固体基质，或可以是单个的固体表面，其中表面部分含有特异类型的寡核苷酸。多种不同的固体基质可以以粒子形式存在，例如磁性粒子、微粒子、纳米粒子、有机或无机聚合物、金属或陶瓷膜等。对这些粒子可以在某些方面加以修饰，以区别不同的群，例如通过颜色、离子电荷、形状或反射指数，或它们的化学或物理特性等。这些粒子还可以通过物理分离，从而区分不同的群。如果优选的是单个

的固体基质时，其例子包括阵列或微阵列，其中不同的嵌合体群被杂交以使阵列的各部分离散。

在本发明的一种实施方式中，寡核苷酸被固定在彩色编码的微粒子上。这些寡核苷酸作为探针，从溶液中对靶 PNA-底物嵌合体的互补捕获部位进行杂交，以用于检测。根据序列特异性杂交，微粒子的颜色代码可被用于对来自多元生化测定中的特定的肽信号进行解码。寡核苷酸探针优选含有 15~50 个核苷酸。在寡核苷酸的末端优选引入官能基团如氨基，以用于固定。另外，探针的末端核苷酸也可以被适当地生物素化或标记。合成这些修饰的寡核苷酸的方法在现有技术中是已知的。在某些情况下，期望寡核苷酸探针具有独特的碱基序列。彩色编码的微粒子的表面可以载有特定的化学基团可用于多元生化测定中的生物分子的固定。用于在粒子表面产生活化化学基团的特定化学方法，在现有技术中是已知的，如 *Polymer Colloids: A comprehensive Introduction*, edited by Fitch, R.M., Academic Press(1997)。寡核苷酸、DNA 碎片、RNA 分子、合成肽、重组蛋白质、纯化的天然蛋白质等可按照已知的方法通过与表面化学基团的相互作用而固定在粒子上，例如，*Bioconjugate Techniques*, edited Hermanson, G.T., Academic Press(1995)。单个类型的彩色编码的微粒子可与特定类型的生物分子结合，使得来自多元生化测定的可探测的信号可以根据结合微粒子的颜色而被解码。粒子与生物分子的官能化可以使用自动设备平行进行以使偏差最小化。另外，寡核苷酸探针可在固体基质的表面定位。例如，定位的寡核苷酸阵列可用于捕获 PNA 嵌合体。并且，寡核苷酸探针可以在固体基质表面上直接合成，例如用于捕获 PNA 嵌合体的高密度寡核苷酸阵列。

在本发明的另一种实施方式中，公开了捕获 PNA-底物嵌合体文库的方法。该实施方式在微粒子阵列上捕获这些文库。这里，在进行芯片上的生化测定之前，预先形成的编码微粒的平面阵列被用于捕获相应的 PNA-底物嵌合体。在另一种优选的实施方式中，在完成了生化反应后，通过寡核苷酸捕获到 PNA-底物嵌合体上的编码粒子被组装。

在一种实施方式中，如图 3 所示，已知被捕获到载体固体表面上的

修饰的嵌合体可被抗体检测到。修饰的嵌合体可通过使用修饰的被标记的底物—特异性抗体而检测到。抗体可以源自培养介质、人体或动物体中产生的不同种类的免疫球蛋白分子。来自酶标记抗体，例如，过氧化物酶标记的抗体的信号可通过酪酰胺(tyramide)增加的方法被检测到。也可以使用其它类似的标记和酶。这种分子对于本领域技术人员是熟悉的。荧光染料标记的抗体可用于探测修饰底物。除了在图 3A 和 B 中分别显示的单抗体和双抗体探测体系外，捕获在固体表面上的修饰的嵌合体可以通过使用三抗体探测系统而检测到(图 3C)。简而言之，结合到修饰底物上的主要抗体可以结合到对主要抗体是特异性的次要抗体上。修饰底物、主要抗体和第二抗体的复合体可通过使用标记的第三抗体而检测到。另外，修饰的底物可通过使用特异性的螯合分子检测到，如胺三醋酸镓(镓 NTA)，其对磷酸基团具有高度的亲合性。因此，镓 NTA 可被用于探测 PNA 嵌合体的磷酸化的肽。

在固体基质上将 PNA—底物嵌合体杂交到 DNA 寡核苷酸上的条件是已知的，如 *Peptide Nucleic Acids: Protocols and Application*, edited by nielsen, P. E. & Egholm, M., pg. 87-162, Horizon Scientific Press(1999)。已知的方法提供了范围较宽的适当的杂交条件和用于将嵌合体捕获到传感物寡核苷酸上的方法。在优选的实施方式中，将 DNA—底物嵌合体捕获到寡核苷酸官能化的微粒上是依照上述条件进行的。预—杂交可以在杂交缓冲液(例如，10 mM 的磷酸钠，15 mM 的氯化钠，1mg/ml 的 BSA，0.1mg / ml 的热变性的青鱼精子 DNA，0.1% SDS，10% 甲酰胺，pH7.2)中，在 45℃ 以恒定速率培养寡核苷酸官能化的微粒约 30 分钟。BSA 在预杂交过程中封闭微粒表面的未占据位点。其它的大的非特异性蛋白质(如脱脂干牛奶)适合作为 BSA 的替代物。

杂交步骤优选利用具有与嵌合体的捕获部位完全互补的序列的寡核苷酸探针。PNA—底物嵌合体被加入到寡核苷酸功能化的粒子的悬浮液中使最终浓度为 10~100nM。杂交可在适当条件下进行，优选在约 45℃ 下以恒定转速进行 1 小时。杂交后杂交的微粒子优选用洗涤缓冲液进行冲洗，更优选的是，在非常严格的缓冲液(如 10nM 磷酸钠，15mM 的氯

化钠, 0.1% SDS, pH7.2) 中在约 45°C 下以恒定转速进行 30 分钟。然后微粒子用第一洗涤缓冲液 (如 10nM 磷酸钠, 15mM 的氯化钠, pH7.2) 冲洗, 接着用第二洗涤缓冲液 (如 100nM 磷酸钠, 150mM 的氯化钠, pH7.2) 冲洗, 在室温下冲洗约 10 分钟。杂交条件和冲洗频率可根据嵌合体捕获部位的碱基序列而调整。用于 PNA 杂交的通用协议被 Nielsen 和 Egholm 公开 (peptide Nucleic Acids: Protocols and Application, edited by Peter. E. Nielsen and Michael Egholm, Horizon Scientific Press(1999))。

本发明的多元测定特别适用于确定相关实体的存在和活性水平, 活性实体如酶族、相关 DNA 结合分子、相关配体—受体对等。一种较优选的酶族, 其可在本发明的多元测定中被确认, 是催化蛋白质的磷酸化或脱磷酸的酶。丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸的残基的磷酸化通常被认为是细胞间最重要的调节机制之一。对细胞膜上的受体的刺激活化致活酶的级联(cascade), 导致各种细胞内蛋白质的磷酸化。这些反应是可逆的, 允许细胞以动态方式响应各种刺激信号。通过使用传统方法很难同时确定多个用于在相互连接的信号传导路径中的致活酶的活性。使用本发明的分子构建, 对多个底物中的每一个来说的独特的标记可以被制得, 以用于多元测定。在磷酸化时, 磷酸化的 PNA 嵌合体可以被序列特异性地捕获到寡核苷酸功能化的彩色编码的微粒子上, 通过使用对磷酸化的底物具有特异反应性的可探测的配体来用于探测, 磷酸化的底物如磷酸—底物结合蛋白, 磷酸—底物—特异性抗体或磷酸—底物结合螯合物。因此, 多种致活酶的活性可在组织, 细胞和其它试样中被同时确定。

测量致活酶蛋白质家族的例子如图 4 所示, 这里 Raf 蛋白质 (Raf-1, A-Raf 以及 B-Raf) 是丝氨酸—苏氨酸致活酶, 其同源于 PKC 族, 含有氨基—端基的调控区域和羧基—端基的催化趣味域。Raf 家族的成员结合到 Ras 蛋白质上导致它们迁移到质膜上, 然后活化。通过对非活化的 MEK1 致活酶的磷酸化、Rf 致活酶活化 MEK1 致活酶, 反过来活化 MAP 致活酶 2/Erk2。Rf 致活酶调节从 Ras 到 MAP 致活酶的信号传递。最近 Kolch 综述了关于这些发出信号的复合体的调节 (J. Biochem (2000), 35:289-305)。

MAP 致活酶 2/Erk2 的活性可以通过使用 PNA-MAP 致活酶底物肽嵌合体而得以确任。磷酸化的 PNA-肽嵌合体可以被序列特异性地捕获到寡核苷酸功能化的彩色标记的微粒子上，然后是被磷酸化的丝氨酸/苏氨酸部分进行探测。通过加入致活酶抑制剂，例如 2'-氨基-3'-甲氧黄酮 ( $C_{16}H_{13}NO_3$ )，特异性致活酶可以在信号传导途中被抑制（见图 4）。因此，级联致活酶试验可与本发明的分子构建一同使用来探测细胞试样中的致活酶活性。这种测定在探测与疾病状态和疾病过程有关的异常致活酶活性方面是很有价值的。已发现有很多重要的使用 Ras/Raf 信号传导通道来刺激细胞增殖的生长因子以及发出信号的复合体在某些癌症中具有异常的活性。这些试验在与药物研究和信号传导通道有关的方法中也是有用的。

第二个用于确定多重致活酶活性的非限制性例子与无受体丝氨酸致活酶的 JAK（Janus 族丝氨酸致活酶）族有关。JAKs 与细胞内的细胞因子受体有关，并被细胞外的细胞因子激活。JAK 致活酶（JAK1、JAK2、JAK3 和 Tyk2）具有致活酶区域和不具有酶活性的假致活酶区域。细胞因子结合引发细胞因子受体的二聚作用，激活相关的 JAKs，其对受体自身进行磷酸化。然后，磷酸化的受体作为含 SH2 的 STATs（信号传导物和转录活化剂）的封闭位点。JAK1 对于从 IL-2、IL-6（gp130）和干扰素（IFN）发出信号来说是非常重要的。JAK3 对于通过共享相同 g 链的细胞因子受体发出信号来说是必须的。另外，JAKs 也活化 Ras-MAP 致活酶通道，并在细胞中通过 Tec、PI-3 致活酶通道。JAKs 的主要效应物 STATs 是潜在的细胞溶质转录因子。一旦被 JAK 致活酶磷酸化，STATs 通过它们的 SH 区域以头-尾形式二聚。STAT1 是 IFN 发出信号的关键媒介，STAT4 对 IL-2 是特异性的，STAT6 主要被 IL-4 和 IL-3 激活，而 IL-5A 和 IL-5B 被认为是在调节生长荷尔蒙和促乳激素中是最重要的。这些 STAT-诱发的磷酸化过程也有利于特异性的转录反应。Heinrich 等对 gp130/JAK/STAT 发信通道的调节进行过综述（Biotech.J.334:297-314(1998)）。

对本发明的 PNA-底物嵌合体的收集可应用到对多重 JAK 或 STAT

蛋白质的活性水平的同时监控或探测。通过使用 PNA-STAT 嵌合体,对多重 STATs 的磷酸化可在细胞基的测定中同时被确认。一种用于测量多重 STAT 蛋白质活性水平的方法是通过将各种 PNA-STAT 嵌合体,包括细胞侵入 PNA 嵌合体,加入到细胞培养物中开始的。对来自细胞因子或其它化合物的刺激进行响应, JAK-STAT 单传导通道被活化,使得包括 PNA-STAT 嵌合体在内的 STAT 蛋白质的磷酸化作用。当细胞以标准方法溶解时, PNA-STAT 嵌合体就被释放到溶液中。然后, PNA-STAT 嵌合体被序列特异性地捕获到寡核苷酸功能化的微粒子上从而被探测。将 PNA 嵌合体杂交到微粒子上的寡核苷酸可以在试管内(试管内杂交)进行,或在具有微粒子阵列的硅芯片上(芯片上杂交)进行。本发明的这种实施方式如图 5 所示。

除了 PNA-STAT 嵌合体外,其它种类的 PNA-蛋白质嵌合体,如 PNA-JAK 嵌合体和含有抗原决定部位的 PNA-肽嵌合体可用在为探测其它信号传导通道的其它效应物的细胞基的功能性试验中。这样的试验在封闭致活酶-激活的转录活性以为了调节疾病情况中是非常有用的。人体中的 JAK-STAT 信号通道与某些白血病的发展有关。另外,这些试验在药物发现测定和功能蛋白质组学测定中也是有用的。

另一个探测多重致活酶活性的例子与 Akt,也称为 PKB 和 RAC 有关,其是一种在细胞凋亡的调节和发生中具有活跃角色的蛋白质。Akt/PKB 蛋白质致活酶被胰岛素和各种生长因子活化。它在 Wormannin-敏感(sensitive)通道中起作用,包括 PI-3 致活酶。Akt/PKB 包含氨基端基普列克底物同源(pleckstrin homology, PH)区域,其响应 PI-3 致活酶的活化而结合细胞膜的磷酸化的脂类。Akt/PKB 通过磷酸酯结合和在活化圈中的苏氨酸 308 和在 C-端基区域的丝氨酸 473 处的 PKD1 磷酸化而活化。Akt/PKB 通过其自身对多个目标,如 Bad, Forkhead 转录因子(FKHR), GSK-3 和 Caspase-9 等的磷酸化和去活的能力而抑制细胞凋亡,从而能够起到促进细胞生存的作用。使用 PNA-PKDtide 嵌合体和 PNA-Akt-SGK 肽嵌合体作为底物,可同时在组织和细胞中确定 PKD1 和 Akt/PKB 的活性。这种方法包括将 PNA 肽嵌合体加入到样品中使之发生磷酸化作用。

在磷酸化后,磷酸化的 PNA 肽嵌合体可被序列特异性地捕获到寡核苷酸功能化的彩色编码的微粒子上,包括彩色编码的磁性微粒子。然后,被捕获的磷酸化的肽可以使用对磷酸化的肽特异性的配体或对磷酸化的肽特异性的抗体进行探测。该方法的过程如图 6A 所示。

另外,如图 6B 所示,Akt/PKB 发出的信号也可以在 PNA 嵌合体细胞基试验中被系统地研究。这种方法包括在感兴趣的细胞样品中加入一个或多个具有底物部位的 PNA 蛋白质嵌合体,这些底物部位是 PKD1/2 和/或 Akt/PKB,如 PKD、Akt/PKB、Caspase9、FKHR、Bad 和 GSK-3 的底物。在这里,通过收获 PNA 嵌合体来确定这些蛋白质的活性状态和/或水平从而可直接测量内致活酶活性。另外,也可用活性抑扬调节剂(modulator),如,胰岛素或生长荷尔蒙,来处理细胞样品。将这些抑扬调节剂结合到细胞表面受体上可以活化位于细胞膜内侧上的 PDK1/2。活化的 PDK1/2 磷酸化 Akt/PKB,反过来,磷酸化 Caspase9、FKHR、Bad 和 GSK-3 蛋白质。然后,细胞被溶解,从而释放 PNA-蛋白质嵌合体。PNA 嵌合体被杂交到序列特异性的寡核苷酸功能化的微粒子或其它固体基质上。然后,嵌合体的修饰的基质部位通过标准方法而探测到。在图 6B 中描绘出了该测定。这一测定在探测与疾病情况和病程有关的异常致活酶活性上是很有用的。早先的研究表明,突变体早衰-1 基因引发细胞调亡,并且下调患有老年痴呆病患者体中的 Akt/PKB (Wehl, et al.J. Neuroscience 19:5360-5369 (1999))。该试验对于诊断这种疾病情况也是有用的。

另一可用本发明的方法分析的蛋白质家族是 caspases。该酶族与调节细胞调亡,即程序死亡有关。调亡前信号如线粒体细胞色素 C 的释放促使起始子 caspases,如 caspases8,9 和 10 的自催化活化。一旦被活化,这些 caspases 将剪切并活化下游效应物如 caspases3,6 和 7,其反过来又剪切调亡细胞的细胞骨架和不确定的蛋白质。另一调亡前刺激包括将 Fas 配体和 TNF- $\alpha$  结合到受体的细胞表面,细胞内的 DNA 破坏和压迫内质网(ER)。Fas 和 TNF 受体活化 caspases 8 和 10,破坏的 DNA 导致 caspase9 的活化,而 ER 压迫导致 caspase12 的以钙为媒介的活化。这一复杂的过

程如图 7 所示。本发明的使用 PNAqht 的多元测定提供了一有力的工具来同时监控发出信号的效率或细胞功能。

在本发明的一种实施方式中，制备 PNA-caspase 嵌合体，使得每个嵌合体含有确定前一 caspase 的剪切位点。PNA-caspase 嵌合体还含有至少一个标识的标记，优选为两个标记，例如，一个荧光标记和一个聚组氨酸标记，以用于探测。这些双标记位于肽底物的剪切位点的任何一侧。细胞-可渗透的 PNA-caspase 嵌合体的混合物被加入到目标细胞样品中。调亡前刺激，如 TNF- $\alpha$  或 Fas 配体可被加入到选择的样品中引发细胞程序死亡信号。细胞调亡通道的活化导致各种 caspase 底物，包括 PNA-caspase 嵌合体的剪切。含在双标记的 PNA 嵌合体中的一种荧光染料被 caspase-催化的剪切而消除。当细胞被溶解时，PNA 嵌合体被释放。然后，释放的 PNA 嵌合体被捕获到寡核苷酸功能化的微粒子上。来自单标记-剪切产物或双标记-剪切产物的荧光被确认和分析。

在本发明的另一实施方式中，该方法在识别新药中是有用的。在该实施方式中，小分子药物候选物被结合到 PNAs 上测试其效果。这种 PNA-小分子嵌合体可被用于药物研究的配体的高通量的筛选。这种方法的一个例子显示在图 8 中。这里，制备一 PNA-小分子嵌合体文库用于进行筛选。每种嵌合体含有特定的小分子作为底物区域，以及 PNA 寡聚物与已知的碱基序列作为锚定区域。PNA-小分子嵌合体的混合物被加入到目标细胞培养液中，并被结合嵌合到目标对象上，并且引发目标细胞的活化。图 8 显示了 G-蛋白质耦合的受体 (GPCR)，其引发信号传导。活化后，有效的 PNA-小分子嵌合体被捕获到位于彩色编码的微粒子上的与之互补的寡核苷酸上。可通过探测小分子上的标记或结合可探测的小分子特异性配体的方式来进行探测。也可以通过在温度高于以捕获或锚定域形成的双链体的融化温度的溶液中对粒子进行培养而除去捕获的小分子 PNAs。

除了通过荧光光谱探测外，也可以通过流式细胞计来探测杂交到在以彩色编码的微粒子上的互补寡核苷酸上的 PNA 嵌合体的平面阵列，以及单个微粒子-显示的 PNA-嵌合体。这种实施方式如图 9 所示。因此，

将 PNA 嵌合体特异性地杂交到固定在彩色编码的微粒上的寡核苷酸上的过程可以在悬浮液中进行。杂交后，粒子用具有高结合亲和力的配体进行培养，成为感兴趣的嵌合体的修饰的底物部位。另外，配体可以含有特异性的荧光物用于探测。另外，第二可探测的配体可以修饰结合到嵌合体上的主要配体，保证探测荧光物的发射波长与彩色编码的粒子的荧光不同。为了探测 PNA 杂交，粒子用流式细胞计数分析。不同类型的粒子根据它们自生的特异性荧光而被识别。具有捕获 PNA 嵌合体的粒子可根据来自探测荧光物的特异性荧光而被识别。

在本发明的另一实施方式中，PNA 嵌合体被用作探测和分离特定的细胞，即在它们的细胞表面上表达特殊蛋白质或其它识别体的细胞。例如，PNA-抗体嵌合体被产生，其中，抗体对于感兴趣的细胞表面受体来说是特异性的。抗体可以用荧光染料标记以监控捕获过程。该方法的一个例子如图 10 所示。 $CD4^+$ 细胞和  $CD8^+$ 细胞被探测和捕获。Cy3 和 Cy5 是水溶性的花青染料，其是蛋白质、修饰的寡核苷酸和含一级胺的化合物的荧光标记物。

在本发明的另一实施方式中，PNA 嵌合体的底物部位包含核酸结合区域。在该实施方式中，PNA 嵌合体暴露在可探测的核酸前，该核酸被认为能够与嵌合体的功能域相互作用。然后，结合核酸被捕获到固定基质上的寡核苷酸上并被探测到。该实施方式也可能是多元的。

以下的实施例描述了如何制备和使用本发明。并对这些例子加以了解释说明。但并非用于对本发明作任何限制。在此描述的所有的文献特别被引入作为参考。

## 实施例

### 实施例 1

将 DNA 寡核苷酸偶合到用于 PNA 嵌合体的捕获的微粒表面

有两种不通的方法可以将寡核苷酸探针附着到固体表面上，该固体表面如彩色编码的微粒。在第一种方法的间接偶合中，结合到固体表面的生物素化寡核苷酸与链霉抗生物素蛋白或其衍生物相互作用。将蛋白质结合到固体表面如微粒上的方法在现有技术中已有报道（Bioconjugate

Techniques, 由 Greg T. Hermanson 编辑, Academic Press, 1995)。如图 11A 所示, 生物素化寡核苷酸有效地偶合到中性抗生物素蛋白上, 该中性抗生物素蛋白是一种修饰形式的链霉抗生物素蛋白, 并且已经被结合到微粒上。简而言之, 对于固定数量的彩色编码的中性抗生物素蛋白功能化的珠来说, 被培养的 Cy-5 标记的生物素化寡核苷酸 (0.488, 0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.63, 31.25, 62.5, 125 和 250 nM) 的量增加。在室温条件下, 偶合反应在 PBS 上进行 30 分钟。偶合之后, 未束缚的寡核苷酸通过用 PBST 洗涤珠而除去。微粒的表面上未被占据的位点利用 BSA (10mg/ml, 在 100 mM 磷酸盐缓冲液中, pH 为 7.4) 封闭。经 100 mM, pH 值为 7.4 的磷酸盐缓冲液的洗涤之后, 微粒可以被存储在 4℃ 的贮存缓冲液中。然后, 不同类型的珠一起被放进一个试验试管中用于组装形成微粒阵列。在荧光显微镜下检测阵列。图 11A 中显示了中性抗生物素蛋白的滴定系列的结果。31 nM 的生物素化寡核苷酸的偶合能够使中性抗生物素蛋白功能化的珠 (直径为 3.2  $\mu$ m) 上的所有位点饱和, 这显示了当寡核苷酸浓度增加时, 以 1000ms 积分记录的 Cy5 信号强度大致从 100 增加到 6000。在图 11A 中显示的误差条线显示了平均标准偏差。

寡核苷酸也可以通过形成共价连接而直接结合到固体载体的表面上。根据现有方法, 氨基可以结合到寡核苷酸的 5' 终端。将寡核苷酸结合到甲苯磺酰基活化的微粒上可以在一个单步反应中达到。图 11B 中显示了以胺-甲苯磺酰基为媒介的直接偶合的例子。简言之, 对于固定数量的彩色编码的甲苯磺酰基-活化珠来说, 被培养的 Cy-5 标记的氨基修饰寡核苷酸 (0.977, 1.953, 3.906, 7.813, 15.63, 31.25, 62.5, 125, 250 和 500 nM) 的量增加。一般来说, 偶合反应在 100 mM 且 pH 为 7.4 的磷酸钠溶液中在 37℃ 下过夜。偶合之后, 未束缚的寡核苷酸通过用 PBST 洗涤珠除去, 并且微粒用牛血清白蛋白 (BSA) (10mg/ml, 在 100 mM 磷酸盐缓冲液中, pH 为 7.4) 将微粒表面未占据的位点封闭。封闭是在 37℃ 下在恒定转速的状态下进行 1 小时。然后, 不同类型的珠一起被放进一个试验试管中用于组装形成微粒阵列。在荧光显微镜下检测阵列。在图 11B 中显示的滴定系列的结果表明当寡核苷酸浓度增加时, 以 1000ms 积分记录的

Cy5 信号强度大致从 100 增加到 5000。在图 11B 中显示的误差条线显示了该方法的标准偏差。利用 250 nM 氨标记的寡核苷酸的偶合能够使甲苯磺酰基-活化包覆的珠（直径 3.2 $\mu$ m）上的所有位点饱和。在用 100 mM 且 pH 为 7.4 的磷酸盐缓冲液洗涤之后，寡核苷酸功能化的微粒可以以恒定转速存储在 4 $^{\circ}$ C 的贮存缓冲液（100 mM 磷酸盐，1 mM EDTA，含有 0.05%叠氮化钠）中。

## 实施例 2

### 生物素化 PNA 寡聚物的提纯

合成的 PNA 嵌合体可以通过液相色谱提纯。图 2 显示了两种生物素化 PNA 寡聚物的用高压液相色谱（HPLC）提纯的例子。生物素化的双-PNA（“PNA 夹”）和线性 PNA 分别具有 4.3kD 和 7.5kD 的分子量。PNA 寡聚物在凝胶过滤柱上，在 10mM 的 Tris-缓冲液、pH 值为 7.5、和 125 mM NaCl 中的分离，并以 260 nm 的波长监测色谱的图像。流率为 0.5 ml/分钟的 0.5ml 洗脱液中的 48 种馏分被收集。两个特别的单峰，一短一高分别对应于 4.3kDdePNA 夹（第 25 馏分）和 7.5kD 的线性 PNA（第 28 馏分）。提纯的 PNA 寡聚物的分子量通过质谱分析确定。

## 实施例 3

### 提纯的 PNA-肽嵌合体的分光光度性能

为了验证 PNA 嵌合体的荧光标记，通过扫描分光光度计记录提纯的 PNA 嵌合体的分光光度性能。在图 13A 和 13B 示出的提纯的四甲基若丹明（TMR）标记的 PNA 肽嵌合体以及 Cy5 标记的 PNA 的分光光度性能分别显示了 PNA 和荧光染料不同的吸收特征。250-300nm 波长范围的峰对应于含有或不含有肽的 PNA，其中，TMR 标记（图 13A）通过 500-550nm 范围的峰值识别，并且 Cy5 标记（图 13B）通过 625-675 nm 波长范围的峰识别。

## 实施例 4

将双-PNA 寡聚物进行芯片上杂交到微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸上

进行芯片上杂交试验是为了确定固定在微粒阵列上的 DNA 寡核苷

酸对双-PNA 寡聚物的序列特异性捕获。简言之，双-PNA 寡聚物是一个在每个臂上具有 12-13 个胸腺嘧啶碱基的 PNA 夹。在杂交之前，四种类型的生物素化寡核苷酸被偶合到中性抗生物素蛋白功能化的微粒上，每个寡核苷酸分别含有 18-mer 的低聚腺嘌呤(A-18)、18 个核苷酸(N-18)的非相关序列、10-mer 聚合腺嘌呤(A-10)以及 10 个核苷酸(N-10)的非相关序列。偶合之后，所有的低聚核酸功能化的微粒于不含有寡核苷酸捕获探针的负对照粒子被放入到一个试管中用于在硅片上组装成微粒阵列。芯片首先在含有 90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM MgCl<sub>2</sub>、17nM EDTA、0.1%生物素、0.1%Tween-20、70mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的缓冲液中，在 40℃下预杂交 20 分钟。然后，生物素化的双-PNA 被加入到预杂交缓冲液中形成 200nM 的最终浓度。杂交在 40℃的增湿房内进行 1 小时。负对照芯片在杂交缓冲液中不接受 PNA。杂交完成后，在室温下，芯片用 100mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5、0.1% Tween-20 冲洗 10 分钟。为了对生物素化 PNA 杂交到有粒子阵列的寡核苷酸控针上进行探测，芯片在 100mM NaCl、100mM 磷酸钠，pH 为 7.5 的溶液中用 Cy5 结合的链霉抗生物素蛋白在室温下培养 30 分钟。在用 15mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的溶液冲洗后，利用荧光显微镜观察阵列。利用通过特定波长的不同过滤器可从同一芯片中得到不同的图像。根据微粒各自的颜色代码可以确定微粒的特征。来自芯片的 Cy5 芯片图像的珠的试验信号和解码的粒子合并。来自匹配的 A-10 和 A-18 粒子的试验信号以及来自未匹配的 N-10 和 A-18 粒子的试验信号被提取用来分析。具有 Cy5 信号的粒子通过标准图像分析识别。如图 14 所示，双-PNA 夹特异性地杂交到聚腺嘌呤的 10-mers 和 18-mers 功能化的粒子上，其中，双-PNA 夹不能杂交到非相关的核苷酸系列(N-10 或 N-18)上。相反，负对照阵列未捕获 PNA。利用计算机程序来自动排列来自芯片的图像。从图像中提出不同波长下的荧光强度，并分配给芯片上的对应的粒子。然后，染污的珠的内部染料的荧光强度被聚集在一起。

#### 实施例 5

将双-PNA 寡聚物杂交到彩色编码的微粒上的 DNA 寡核苷酸上的

试管内杂交。

进行试管内杂交试验是为了确定在彩色编码的微粒上的 DNA 寡核苷酸对双-PNA 寡聚物的序列特异性捕获。简言之，双-PNA 寡聚物是一种在每个臂上有 12-13 个胸腺嘧啶碱基的生物素化 PNA 夹。在杂交之前，四种类型的生物素化寡核苷酸被偶合到中性抗生物素蛋白功能化的微粒上，寡核苷酸分别含有 18-mer 低聚腺嘌呤 (A-18)、18 个核苷 (N-18) 的非相关序列、10-mer 聚腺嘌呤 (A-10) 以及 10 个核苷酸 (N-10) 的非相关序列。在表面上，调控微粒不含寡核苷酸。偶合之后，将所有低聚核酸功能化的微粒放入一个试管。低聚核酸功能化的微粒首先在含有 90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM MgCl<sub>2</sub>、17mM EDTA、0.1%生物素、0.1%Tween-20、70mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的缓冲液中，在 40℃ 下预杂交 20 分钟。接着，生物素化的双-PNA 被加入预杂交缓冲液中形成 200nM 的最终浓度。杂交在 40℃ 的增湿房内进行 1 小时。负对照在杂交缓冲液中没有 PNA 时被检验。杂交完成后，在室温下，粒子用 100mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5、0.1% Tween-20 冲洗 10 分钟，然后在硅芯片上组装微粒阵列。为了探测被捕获生物素化 PNA，芯片在 100mM NaCl、100mM 磷酸钠且 pH 为 7.5 的溶液中用 Cy5.5 结合的链霉抗生物素蛋白 (20 mg/ml) 在室温下培养 30 分钟。在用 15mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的溶液冲洗后，利用荧光显微镜检查阵列。根据微粒各自的颜色代码可以确定微粒的特征。具有 Cy5.5 信号的粒子通过计算机程序来识别。如图 15A 显示，双-PNA 夹明显杂交到 A-18 功能化的粒子上，而没有杂交到 C-18 和 N-18 上，更具体地，双-PNA 夹被特异地捕获到 A-18 上，并且在 Cy5.5 通道上在 1000ms 内积分产生一个约 4750 个规定单元的 Cy5.5 信号，同时 C-18 和 N-18 功能化粒子分别产生了约 500 和 1000 的 Cy5.5 信号。由试管内 PNA 杂交产生的 Cy5.5 信号强度 (图 15A) 可以与实施例 4 叙述的芯片上杂交 (图 15B) 相稳合。

#### 实施例 6

将 PNA-蛋白质嵌合体杂交到排列在微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸进行芯片上杂交试验是为了确定固定在微粒阵列上的 DNA 寡核苷

酸对双-PNA 寡聚物的序列特异性捕获。简言之，双-PNA 蛋白质嵌合体是一个 Cy5.5 标记的链霉抗生物素蛋白和生物素化 PNA 夹的配合体。每个阵列上 PNA 夹含有 12-13 个胸腺嘧啶碱基。在配合中使用适当量的 Cy5.5 标记链霉抗生物素蛋白和生物素化的 PNA，该配合在室温下在 PBS 中进行 30 分钟。在杂交之前，四种类型的生物素化的寡核苷酸被偶合到中性抗生物素蛋白功能化的微粒上，寡核苷酸分别含有 18-mer 低聚腺嘌呤(A-18)、18 个核苷酸(N-18)的非相关序列、10-mer 聚合腺嘌呤(A-10)以及 10 个核苷酸(N-10)的非相关序列。偶合之后，所有的低聚核酸功能化的微粒和不含有寡核苷酸捕获探针的负对照粒子被放到一个试管内用于在硅芯片上组装微粒阵列。芯片首先在含有 90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM MgCl<sub>2</sub>、17mM EDTA、0.1%生物素、0.1%Tween-20、70mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的缓冲液中，在 40℃下预杂交 20 分钟。然后，双-PNA 被加入杂交缓冲液中形成 200nM 的最终浓度。杂交在 40℃的增湿房内进行 1 小时。负对照芯片在杂交缓冲液中没有接受到 PNA。杂交完成后，在室温下，芯片用 100mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5、0.1% Tween-20 冲洗 10 分钟。利用荧光显微镜检查阵列。通过使用能够透过特定波的光的不同的过滤器，从相同芯片中取得一些图像。根据微粒各自的颜色代码可以识别微粒。具有 Cy5.5 信号的粒子通过在实施例 4 中描述的标准图像分析得以确认。如图 16 所示，是双-PNA 蛋白质嵌合体特异性地杂交到与芯片上(以 1000ms 间隔的 140Cy5.5 信号强度)18-mers 的聚腺嘌呤偶合的粒子上，其与无 PNA 的对照芯片形成比较。在两种情况下，C-18, N-18 和对照(无；在表面上没有寡核苷酸)仅导致了约 45 个单元的 Cy5.5 信号强度(以 1000ms 积分)。

#### 实施例 7

从生物素化 PNA 寡聚物到固定在磁性彩色编码的微粒子上的寡核苷酸的芯片上杂交

从目标分子到寡核苷酸探针的芯片上杂交被固定在彩色编码的磁性粒子上。具体地，具有已知核苷酸序列(0.4μm)的生物素化寡核苷酸被偶合到表面披覆了中性抗生物素蛋白的以彩色编码的给定类型的磁性粒

子(约  $6.7 \times 10^5$  个粒子)上。偶合反应在 0.1 ml 的缓冲液(150 mM NaCl, 0.05 mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 0.5%牛血清白蛋白, 0.5 mM Tris-HCl 和 100mM 磷酸钠, pH7.2)中在室温下旋转进行 30 分钟。偶合之后, 粒子利用一种磁性体收集。未反应的中性抗生物素蛋白位点在旋转的 150 mM NaCl 和 100 mM 磷酸钠含有 0.05% Tween-20 且 pH 值为 7.2 的溶液在室温下利用 0.1%的生物素封闭。封闭之后, 粒子用 0.2ml 的 150 mM NaCl 和 100 mM 磷酸钠 0.2ml 含有 0.05%Tween-20 且 pH 为 7.2 的溶液冲洗。这种配制也可以应用到将其它生物素化寡核苷酸偶合到其它类型的中性抗生物素蛋白披覆粒子中。

几种类型的彩色编码的低聚核酸功能化的微粒, 包括磁性粒子和非磁性对照粒子, 被一同放到一个试管中用于根据现有方法组装成微粒子阵列。在这个例子中, 阵列形成在  $2.5 \times 2.5$ mm 的硅质芯片上, 其含有 4000 个位点的阵列模板。生物素化肽核酸(PNA)底聚物在显示互补寡核苷酸捕获探针的微粒子阵列上的芯片上杂交是在 30 微升的杂交缓冲液(90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM  $MgCl_2$ 、17nM EDTA、0.02%生物素、0.1%Tween-20、70mM Tris-HCl, pH 为 7.5)中进行的, 其中杂交缓冲液含有 200nM 浓度的生物素化 PNA 寡聚物。在 40℃下, 杂交在一个旋转振荡器上进行 60 分钟。等到杂交完成, 在室温下, 将阵列用 50 微升的 250mM NaCl、10mM Tris-HCl 且 pH 为 7.5、0.1% Tween-20 冲洗 10 分钟。通过在 150mM NaCl、10mM 磷酸钠且 pH 为 7.2 下, 用 Cy5.5-结合链霉抗生物素蛋白(18mg/ml)在室温下对微粒阵列进行培养 30 分钟后, 可观察到捕获的生物素化的 PNA 寡聚物。在用 15mM NaCl、10mM Tris-HCl 且 pH 为 7.5 的溶液冲洗后, 在荧光显微镜下检查阵列。从彩色编码的微粒和 Cy5.5 标记的 PNA 寡聚物发出的荧光可以通过利用具有特定波长的光学过滤器而确定。对磁性或非磁性粒子根据其颜色代码解码。具有 Cy5 信号的粒子通过如图 4 显示的标准图像分析来识别。如图 17 显示的试验结果表明, PNAs 特异性杂交到陈列在彩色编码磁性和非磁性粒子上的互补寡核苷酸上。更具体地, 从来自芯片上杂交试验中的两个微粒阵列(芯片 A 和 B, 分别为板 A 和 B)的四种类型的彩色编码微粒(I、

II、III、IV) 来确定 Cy5.5 信号强度。类型 I 的粒子是彩色编码的磁性粒子, 而类型 II、III和IV是三种不同类型的非磁性的彩色编码的粒子。类型 I 和 II 的粒子用与 PNA 寡聚物互补的生物素化寡核苷酸固定。类型 III粒子利用具有非相关碱基序列的寡核苷酸偶合到 PNA 上。类型IV粒子在表面上没有寡核苷酸。芯片 B 作为芯片 A 的负对照, 其利用没有 PNA 的杂交混和物培养。“n”表示芯片上的粒子数量。类型 I 和类型 II 的粒子分别产生约 2250 和 1500 的信号强度, 而类型III和类型IV不产生明显荧光, 约 400 和 250Cy5.5 信号强度。直方图表示了标准平均偏差。

#### 实施例 8

从 PNA 小分子嵌合体到微粒阵列上的寡核苷酸的芯片上杂交。

进行试管内杂交分析是为了确定位于彩色编码的微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸对双-PNA-小分子嵌合体的序列特异性捕获。简言之, 双-PNA-小分子嵌合体是一种在每个臂上含有 10 个碱基和 Cy5 染料的双-PNA 的共轭物, 这在图 13 和实施例 3 中已有所述。在杂交之前, 如实施例 1 所述, 四种类型的生物素化的寡核苷酸被偶合到中性抗生物素蛋白功能化的微粒上。寡核苷酸分别含有如下序列: 10-mer 聚腺嘌呤 (A-10) 和 10 mer、每一个互补到双-PNA 寡聚物 (P-10) 的一个臂上。还包括有未显示寡核苷酸捕获探针的对照微粒。偶合之后, 所有低聚核酸功能化的微粒和不含寡核苷酸捕获探针的负对照粒子放到一个试管中用于在硅芯片上组装微粒阵列。芯片首先在含有 90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM MgCl<sub>2</sub>、17nM EDTA、0.1%生物素、0.1Tween-20、70mM Tris-HCl 且 pH 为 7.5 的缓冲液中, 在 40℃下预杂交 20 分钟。双-PNA-Cy5 共轭物被加入到预杂交的缓冲液中形成约 200nM 的最终浓度。杂交在 40℃的增湿房内进行 1 小时。负对照芯片被放到不含有 PNA 嵌合体的杂交缓冲液中。杂交完成后, 芯片用 15mM NaCl、10mM Tris-HCl 且 pH 为 7.5 溶液冲洗, 然后在荧光显微镜下检查。根据微粒各自的颜色代码可以确定微粒。具有 Cy5.5 信号的粒子通过如实施例 4 所述的标准图像分析可从珠中识别出。图 18 显示的芯片分析结果显示了双-PNA-小分子嵌合体特异性杂交到用互补 P-10 捕获探针功能化的粒子上, 但没有杂交到

A-10 粒子和对照粒子上, 该双-PNA-小分子嵌合体产生杂交信号 (以 500ms 整段时间记), 而在芯片上的粒子没有产生明显的信号。误差条线表示方法的标准偏差。

### 实施例 9

在微粒阵列上同时产生三种磷酸化肽的标准曲线

三种不同的生物素化磷酸化肽 (肽-P-1, 肽-P-2 和肽-P-3)。多肽 P-1: 生物素-CKVEKIGEGT[pY]GVVYK (序列 ID 号: 1)), 衍生于人类酪氨酸致活酶底物 p34cdc2, 其中, 在氨基酸 11 上的酪氨酸被磷酸化 (Cheng, et al. J. Biol. Chem. 267: 9248-9256, 1992)。肽-P-2: 生物素-CEGPWLEEEEE[pY]GWMDFK-生物素 (序列 ID 号: 2)), 是人类胃泌激素-17, 在酪氨酸的 13 位上被磷酸化 (Baldwin et al, Nature, 301,435-437, 1983)。肽-P-3: 生物素-CRRLIEDAE[pY]AARGK (序列 ID 号: 3)), 衍生于来自劳氏肉瘤病毒转移蛋白在 p60<sup>src</sup> 上酪氨酸磷酸化位点, 在氨基酸 10 上的酪氨酸上被磷酸化 (Casnelli et al, PNAS 79: 282-286, 1982)。在规定浓度 0, 0.0012, 0.0024, 0.0048, 0.0064, 0.008 和 0.012pg/ml 下, 肽-P-1、肽-P-2 以及肽-P-3 被偶合到彩色编码的微粒上, 这种微粒如前述的实施例 1 已经用中性抗生物素蛋白功能化了。然后, 所有肽功能化的微粒按照现有的方法如实施例 1 所述合并用于组装成微粒阵列。组装的微粒阵列利用对所有肽上磷酸化修饰都具有特异性的单克隆抗体进行培养。为了达到将信号放大的目的, 用荧光染色标记的次要抗体对芯片进行培养, 其中, 次要抗体对结合在阵列上的主要单克隆抗体具有特异性。用 PBST 洗涤后, 阵列根据现有技术中的方法如 READ 分析法利用荧光显微镜检查。通过利用这种方法, 三种磷酸化肽的标准曲线通过利用一种微粒阵列而产生 (图 19)。随着肽浓度的增加, 在以 500ms 为整段时间的对应于三种磷酸化肽的 Cy5 荧光信号强度也增加了, 以 500ms 为整段时间中 Cy5 信号强度的范围为 400-1400 单位。图 19 显示的误差条线表示方法的标准偏差。

### 实施例 10

微粒阵列上磷酸化肽的标准曲线的产生

每种如实施例 9 所述的具有规定浓度 0, 0.002, 0.004, 0.008, 0.01 和 0.12  $\mu\text{g/ml}$  的生物素化磷酸化的肽（肽-P-1 和肽-P-2）被偶合到特定类型的彩色编码珠上，这种珠已经根据现有技术如实施例 1 的方法在其表面上披覆了中性抗生物素蛋白。粒子的表面上未反应的位点根据现有技术的方法封闭。然后，根据现有方法，具有相同类型的磷酸化肽的功能化珠一起放到试验试管中，根据现有方法用于组装成粒子阵列。现有的方法如 LEAPS 和在临时专利申请号 60/343, 621（2001 年 12 月 28 日递交）以及美国申请号 10/192, 352（2002 年 7 月 9 日递交）中描述的直接沉淀组装的方法。组装的微粒阵列利用对所有肽上磷酸化修饰具有特异性的单克隆抗体进行培养。为了达到将信号放大的目的，主要单克隆抗体利用特异性的次要抗体和荧光(Cy5)标记的第三种抗体而被进一步结合。用 PBST 洗涤后，阵列根据现有技术中的方法如 READ 分析法利用荧光显微镜检查。通过这种方法，利用一种微粒阵列产生磷酸化肽标准曲线（图 20）。对于肽-P-1，以 500ms 积分的 Cy5 信号强度从约 500 增加到 5000 个单位，峰值出现在 0.008  $\mu\text{g/ml}$  浓度上。类似地，对于肽-P-2，以 500ms 积分的 Cy5 信号强度从约 500 增加到 4500 个单位，峰值出现在 0.008  $\mu\text{g/ml}$  浓度上。图 20 显示的误差条线表示表示方法的标准偏差。

#### 实施例 11

利用在微粒阵列上的过氧化酶结合的抗体对磷酸化肽的免疫探测

每种生物素化磷酸化肽或生物素化非磷酸化肽被偶合到特定类型的彩色编码珠上，这种珠已经根据现有技术如实施例 1 的方法在其表面上披覆了中性抗生物素蛋白。载体表面上的肽密度如实施例 1 所述达到最大化。偶合之后，将粒子用加入了 0.05% Tween-20(PBST)的磷酸缓冲的盐水（PBS；0.1M 磷酸钠，0.15 氯化钠，pH 值为 7.2）洗涤。然后，根据现有方法，所有肽功能化的珠被一起放到测试试管中用于微粒子阵列的组装。现有的方法如靠近表面光控电动微粒组装（LEAPS）和临时专利申请号 60/343621（2001 年 12 月 28 日递交）以及美国申请号 10/192352（2002 年 7 月 9 日递交）所述的直接沉积组装的方法。组装的微粒子阵列在 PBST 中利用 1%的牛血清白蛋白（BSA）封闭。对于在阵列上磷酸

化肽的免疫探测，芯片利用对磷酸化修饰具有特异性的过氧化酶配合的单克隆抗体进行培养。为了将抗体结合到磷酸化的肽上，培养在增湿房内进行。抗体结合的微粒子阵列利用 PBST 来洗涤，然后根据现有技术利用过氧化酶底物探测，现有技术如分子探针的酪酰胺试剂（如分类号 T-20912, T-20916 等）。

通过利用酪酰胺试剂对磷酸化肽的免疫探测的结果显示在图 21 中。简言之，四种类型彩色编码微粒的每一种和两种磷酸化肽（Ty-p-1 或多肽 P-2）之一、或一种非磷酸化肽，或无肽的对照例（PBS）进行偶合，其中，在酪氨酸的 14 位置上被磷酸化，其中，Ty-1 是生物素-KVEKIGEGTYGVVYK（序列 ID 号：4），Ty-P-1 是 Ty-1，但在氨基酸 10 的上有一个磷酸化的酪氨酸（生物素-KVEKIGEGT[pY]GVVYK），并且肽-P-2：生物素-CEGPWLEEEEEEA[pY]GWMDFK（序列 ID 号：2）。肽功能化的微粒被组装到粒子阵列，利用对修饰具有特异性的碱性磷酸酶配合的单克隆抗体进行免疫探测。通过利用酪酰胺试剂对结合抗体进行探测。来自珠的荧光信号根据现有方法利用荧光显微镜探测，现有的方法如随机编码阵列探测（READ）分析。简言之，从彩色编码微粒及被分析物发出的荧光通过利用特定的光学过滤器确定。粒子的等同物根据其独特的颜色代码被解码。具有正测定信号的粒子通过如实施例 4 所述的标准图象分析识别。由碱性磷酸酶催化化学反应产生的荧光产物---荧光素 isothiocyanate(FITC)沉积在结合抗体的珠上。图 21 显示在磷酸化肽中较高的 FITC 信号强度，对于 Ty-P-1 在 1000ms 内的积分为 11000 单位，对于 Ty-P-2 在 1000ms 内的积分为 15000 单位，没有磷酸化的 Ty-1 或对照例中显示了明显低的信号，大约在 1000ms 内的积分为 700 单位。图 21 显示的误差条线表示方法的标准偏差。

#### 实施例 12

在微粒阵列上利用荧光染料标记的抗体对磷酸化肽的探测

每种生物素化磷酸化肽或生物素化非磷酸化肽被偶合到特定类型的彩色编码珠上，这种珠已经根据现有技术如实施例 1 的方法在其表面上披覆了中性抗生物素蛋白。载体表面上的肽密度如实施例 1 所述达到最

大化。偶合之后，将粒子用 PBST 洗涤。然后，根据现有方法，所有肽功能化珠被一起放到测试试管中用于微粒子阵列的组装。现有的方法如 (LEAPS) 和临时专利申请号 60/343621 (2001 年 12 月 28 日递交) 以及美国申请号 10/192352 (2002 年 7 月 9 日递交) 所述的直接沉积组装的方法。组装的微粒阵列在 PBST 中利用 1% 的 BSA 封闭。对于在阵列上磷酸化肽的免疫探测，芯片利用对磷酸化修饰具有特异性的单克隆抗体进行培养。为了将抗体结合到磷酸化的肽上，培养在增湿房内进行。未结合的抗体利用 PBST 来洗涤。为了达到信号放大的目的，用对结合在阵列上的主要单克隆抗体具有特异性的次要抗体培养芯片。通过用对次要抗体具有特异性的荧光标记的抗体对芯片进一步培养，信号可以被进一步放大。用 PBST 冲洗之后，然后根据现有方法如 READ 测定，利用荧光显微镜检查阵列。

在微粒阵列上通过利用荧光标记的抗体对磷酸化肽的免疫探测的结果显示在图 22 中。简言之，四种类型彩色编码微粒的每一种和两种磷酸化肽(Ty-p-1 或肽-P-2)之一、一种实施例 11 中所述的非磷酸化多肽(Ty-1)或无肽的对照例偶合。肽功能化微粒被组装到粒子阵列。利用对磷酸化肽特异的单克隆鼠 IgG 抗体对芯片进行培养，然后利用对鼠 IgG—特异性的次级抗体进行培养，然后用 Cy5 标记的第三抗体利用荧光显微镜进行探测。通过 Cy5 信号探测荧光。图 22 显示在磷酸化肽中较高的 Cy5 信号强度，对于 Ty-P-1 在 1000ms 内的积分为 15000 单位，对于肽-P-2 在 1000ms 内的积分为 15500 单位，没有磷酸化的 Ty-1 或对照例中显示了明显低的信号，大约在 1000ms 内的积分为 1400 单位。图 22 显示的误差条线表示方法的标准偏差。

### 实施例 13

在微粒阵列上利用荧光染料标记的抗体对多磷酸化肽的探测

每种生物素化磷酸化肽或生物素化非磷酸化肽被偶合到特定类型的彩色编码珠上，这种珠已经根据现有技术如实施例 1 的方法在其表面上披覆了中性抗生物素蛋白。载体表面上的肽密度如实施例 1 所述达到最大化。偶合之后，将粒子用 PBST 洗涤。然后，根据现有方法，所有肽

功能化珠被一起放到测试试管中用于微粒子阵列的组装。现有的方法如 (LEAPS) 和临时专利申请号 60/343621 (2001 年 12 月 28 日递交) 以及美国申请号 10/192352 (2002 年 7 月 9 日递交) 所述的直接沉积组装的方法。组装的微粒阵列在 PBST 中利用 1% 的 BSA 封闭。对于在阵列上磷酸化肽的免疫探测, 芯片利用对磷酸化修饰具有特异性的单克隆抗体进行培养。为了将抗体结合到磷酸化的肽上, 培养在增湿房内进行。未结合的抗体利用 PBST 来洗涤。为了达到信号放大的目的, 用对结合在阵列上的主要单克隆抗体具有特异性的次要抗体培养芯片。通过用对次要抗体具有特异性的荧光标记的抗体对芯片进一步培养, 信号可以被进一步放大。用 PBST 冲洗之后, 然后根据现有方法如 READ 测定, 利用荧光显微镜检查阵列。

在微粒阵列上通过利用荧光标记的抗体对磷酸化肽的免疫探测的结果显示在图 22 中。简言之, 如实施例 9 和 11, 六种类型彩色编码微粒的每一种和四种磷酸化肽 (肽-P-1、肽-P-2、肽-P-3 或 Ty-p-1) 之一、一种非磷酸化肽 (Ty-1) 或无肽的对照例偶合。肽功能化微粒被组装到粒子阵列中。利用对磷酸化肽特异的单克隆鼠 IgG 抗体对芯片进行培养, 然后利用对鼠 IgG 一特异性的次级抗体进行培养, 然后用 Cy5 标记的第三抗体利用荧光显微镜进行探测。通过 Cy5 信号探测荧光。图 23 显示在磷酸化肽中较高的 Cy5 信号强度, 对于肽-P-1、肽-P-2、肽-P-3 和 Ty-P-1 在 1000ms 内的积分为约 14000 单位, 没有磷酸化的 Ty-1 或对照例中显示了明显低的信号, 在 1000ms 内的积分约为 500 单位。图 23 显示的误差条线表示方法的标准偏差。

#### 实施例 14

##### 双重标记被分析物的比率量化 (ratio quantification)

一种被分析物可用两种荧光染料标记。根据现有技术的方法, 一种荧光染料标记被分析物的内部或外部, 而另一种染料在感兴趣的生化反应中参与到被分析物中。来自被分析物的荧光 (被分析物信号) 和来自测定的荧光可以根据现有技术如 READ 测定利用荧光显微镜确定。和反应效率相关的阵列信号通过比率量化来估计, 即, 测定中的测定信号与

被分析物信号的比率。对于双重标记被分析物的比率量化的常规设计如图 24A。

一种双重标记 PNA 肽嵌合体的特异设计如图 24B 中显示。PNA-肽嵌合体含有合成肽的 PNA 锚定区域和功能区域。含有 Caspase 3 剪切位点的合成肽被 C-端的荧光染料 (Cy3) 和 N-端的聚组氨酸 (His6) 包围。PNA-Caspase 3 双重标记肽嵌合体如下: PNA-连接物-Cys (用于配合) His His His His His His Asp Glu Val Asp Ala Lys-(C<sub>18</sub>-间隔物)-Cy3 (序列 ID 号: 5)。

嵌合体的 Caspase 3 消化(通过在冬氨酸残基的 3'位点剪切)导致 Cy3 荧光染料的剪切。消化后, 嵌合体通过序列特异性的 DNA/PNA 杂交而被捕获到特定彩色编码微粒的表面。具有捕获的 PNA-肽嵌合体的微粒被组装为微粒阵列。嵌合体上的 His6 标记通过芯片上 His6-特异性单克隆抗体探测。主要单克隆抗体通过使用特异性次要抗体和荧光 (Cy5) 标记第三抗体而被进一步结合。来自微粒阵列的 Cy3 荧光强度和未剪切嵌合体的部位相关, 而 Cy5 标记的强度对应于在微粒阵列上捕获的嵌合体总量。这样, 相对 Caspase 3 活性通过确定测定中 Cy3 与 Cy5 的比率来定量算出(图 24C)。由比率量化确定的结果显示当 Caspase 3 浓度(0, 0.0625, 0.125, 0.5, 1, 2 和 4 ng/μl)增加时, 荧光 Cy3/Cy5 信号比率从约 1 降到 0.6。图 24C 显示的误差条线表示方法的标准偏差。

#### 实施例 15

通过流式细胞计探测杂交到彩色编码的微粒上的寡核苷酸的 PNA 嵌合体

图 25A 显示了通过流式细胞计探测杂交到彩色编码的微粒上的寡核苷酸的 PNA 嵌合体。简言之, 两种类型的标记绿色编码的珠 (绿 A 和绿 B) 分别与两种具有特定碱基序列 (绿 A 生物素-间隔物-AAAAAAAAAAAA, 序列 ID 号: 6; 绿 B: 生物素-间隔物-AAGGAGAGAA, 序列 ID 号: 7;) 的寡核苷酸偶合。寡核苷酸在珠上的固定如实施例 1 所述或根据现有技术进行。绿 A 和 B 珠在绿色通道上具有独特的发射波长, 虽然橙色波长中发射的波长在珠上基本上重叠 (图 25A)。寡核苷酸功能

化的微粒被用于如实施例 5 中描述的试管内 PNA 杂交中。生物素化的 PNA-肽嵌合体的 PNA 锚定区域结合到固定在绿 B 珠的互补的寡核苷酸传感物上，而不会结合到绿 A 珠上的不匹配的寡核苷酸上。杂交之后，粒子用 R-藻红蛋白配合的链霉抗生物素（1: 100）1×PBS 培养。R-藻红蛋白配合的链霉抗生物素结合到杂交到珠上的生物素化肽嵌合体。杂交 PNA 嵌合体的探测通过流式细胞计进行。（如图 25C 的示意图）。如图 25A，测定后，绿 B 珠获得了明显量的橙色荧光，其对应于 R-藻红蛋白的发射波长，这表明在测定中 PNA 肽嵌合体杂交到绿 B 上（图 25A）。流式细胞计的探测被用在试管内 pPNA 杂交到固定在微粒上的互补寡核苷酸上。两种类型的中性抗生物素蛋白披覆的微粒之一利用生物素间隔 A（10）固定，其它类型的微粒没有用任何寡核苷酸固定。这两种类型的珠用生物素化双-pPNA 嵌合体培养。双-pPNA 的锚定部位在用于杂交的每个臂上含有 12-13 胸腺嘧啶碱基。在试管内条件下的洗涤和杂交如上所述。杂交之后，珠用荧光素（DTAF）-配合的链霉抗生物素（1: 300）在 1×PBS 中培养。荧光素（DTAF）-配合的链霉抗生物素被结合到杂交到珠上的生物素化 pPNA 嵌合体上。杂交的 pPNA 嵌合体的探测使用流式细胞计进行。

#### 实施例 16

##### 利用微粒阵列确定蛋白酶活性的底物肽的常规设计

PNA-肽嵌合体底物可以用于确定蛋白酶活性的存在。合成的肽通常被用于蛋白酶活性的确定。这些 PNA-肽嵌合体底物以至少三种形式的一种设计（图 26）。嵌合体的功能区域用一种荧光染料（I），两种荧光染料（II）和一种荧光染料加内部 His6 标记（III）标记。通过能够剪切蛋白质的酶的蛋白酶消化作用利用三种不同标记 PNA-肽嵌合体底物而被探测到。这种蛋白酶的例子包括胰岛素、胰凝乳蛋白酶、嗜热菌蛋白酶、链霉蛋白酶以及 HIV-1 蛋白酶。当使用单标记 PNA 肽嵌合体底物（I）时，蛋白酶的消化除去了来自消化的底物的荧光染料的。当使用双标记 PNA-肽嵌合体底物（II）时，蛋白酶的消化除去了来自底物的猝灭染料（Dye1），导致分离产物发出 Dye-2 的荧光。当使用具有一种荧光标记

的和一种内部对照标记（III）的 PNA-肽嵌合体时，蛋白酶的消化除去了荧光染料。来自未剪切底物的荧光信号被归一化到内部 His6 标记产生的探测信号水平，如实施例 16 所示。

### 实施例 17

#### 使用微粒子阵列确定 Caspase 活性

蛋白酶活性，如 Caspase 活性，通过使用末端标记的固定在固体表面的生物素化 Caspase3 肽底物而测得。等量的生物素化 Caspase3 肽底物与末端标记的荧光染料 Cy5 通过逐渐降低的纯化的重组 Caspase3（8,4.8,2.88,1.728,1.037,0.62,0.373,0.224,0.134,0.048 和 0mg/ml）而在溶液中被消化。消化后，消化产物被偶合到特定彩色编码的微粒子的表面上，微粒子上按照现有技术，在其表面披覆了中性抗生物素蛋白。然后，肽-功能化的微粒子按照已知方法被组装成微粒子阵列中，所述方法如 LEAPS，和在临时专利申请号 60/343,621（2001 年 12 月 28 日递交）以及美国申请号 10/192,352（2002 年 7 月 9 日递交）中描述的的直接沉积组装方法。来自未剪切肽底物的荧光根据现有方法，如随机编码阵列检测（READ），使用荧光显微镜确定。蛋白酶消化将荧光染料从消化产物中除去。如图 27 所示，在测定中产生了用于 Caspase3 消化的滴定。随着 Caspase3 浓度由 8 降到 0mg/ml，以 1000ms 积分得到的 Cy5 信号强度由 2600 上升至 5200 单元。图 27 中的误差条线表示方法的标准偏差。

### 实施例 18

#### 微粒阵列上 2×2PNA 嵌合体竞争测定

微粒阵列上 2×2PNA 嵌合体竞争测定被用来测试在其它 PNA 嵌合体存在的条件下捕获到微粒阵列上的 DNA 寡核苷酸上的 PNA 嵌合体。简言之，在测定中，用到了两种具有不同碱基序列的双-PNA 类型。一种是生物素化 PNA 夹（生物素-PNA-夹），而另一种是配合了四甲基若丹明的双-PNA-肽（双-PNA-肽-TMR）。杂交之前，两种类型的生物素化的寡核苷酸被偶合到限定类型的彩色编码的微粒上，这种微粒根据已知的方法如实施例 1 所述的在其表面上披覆中性抗生物素蛋白。这些

寡核苷酸序列分别是 10-mer 的聚腺嘌呤 (A-10) 和 10-mer 限定的核苷酸序列 (P-10)。对照微粒 (无) 在其表面上不含有寡核苷酸。A-10 寡核苷酸与生物素 PNA 夹的 PNA 互补, 而 P-10 寡核苷酸与双-PNA-肽-TMR 嵌合体的 PNA 互补。偶合之后, 所有的低聚核酸功能化的微粒被放入到一个试管中用于在硅片上组装成微粒阵列。芯片首先在含有 90mM NaCl、83mM 硫氰酸胍、8mM MgCl<sub>2</sub>、17nM EDTA、0.1%生物素、0.1%Tween-20、70mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的杂交缓冲液中, 在 40℃下预杂交 20 分钟。然后, 类似量的生物素-PNA-夹和双-PNA-肽-TMR 被加入到相同用于放置芯片的杂交缓冲液中。负对照芯片在杂交缓冲液中不接受 PNA。杂交在 40℃的增湿房内进行 1 小时。杂交完成后, 在室温下, 芯片用 100mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5、0.196% Tween-20 冲洗 10 分钟。为了对杂交到粒子的生物素化 PNA 的探测, 芯片用 100mM NaCl、100mM Tris-HCl, pH7.5, 0.196 Tween-20, 在室温下冲洗 10 分钟。为了探测杂交到粒子上的生物素化的 PNAs, 芯片在 100mM NaCl, 100mM 磷酸钠, pH 为 7.5 的溶液中, 用 Cy5 配合的链霉抗生物素蛋白 (20pg/ml) 在室温下培养 30 分钟。在用 15mM NaCl、10mM Tris-HCl, pH 为 7.5 的溶液冲洗后, 利用荧光显微镜观察芯片。粒子的标识根据其彩色代码被解码。具有若丹明的 Cy5 信号或 Cy3 信号的粒子通过使用如实施例 4 所述的计算机程序来识别。如图 28 所示, 如 Cy5 荧光所探测的, 生物素-PNA-夹被特异性地捕获到偶合了 10-mer 聚腺嘌呤的粒子上 (以 500ms 积分大约为 2250 单位的 Cy5 信号强度), 如 Cy3 荧光所探测的, 双-PNA-肽-TMR 嵌合体结合到芯片上具有 P-10 寡核苷酸的粒子上 (以 500ms 积分大约为 4500 单位的 Cy3 信号强度)。

#### 实施例 19

##### 利用 LEAPS 组装肽功能化微粒阵列

两种类型的彩色编码的微粒, 橙色球和绿色球, 分别用一种合成的肽及其对应磷酸化肽偶合。除了在磷酸化肽的酪氨酸残基上存在磷酸盐基团外, 肽的氨基酸序列是相同的。在一个试验试管中将两种类型的肽功能化微粒混和。微粒在硅质芯片上由如美国专利 6251691 公开的

LEAPS 的方法被组装成微粒阵列。然后，微粒阵列利用对肽的磷酸氨酸为特异性的鼠单克隆抗体培养。在如实施例 12 所述，在芯片上通过利用 Cy5 标记的山羊抗鼠 IgG 探测单克隆抗体的结合。然后，芯片利用荧光显微镜检查。橙色和绿色图像用于将微粒解码，而 Cy5 染色标记用磷酸化肽固定的绿色珠。更具体地，橙色珠的图像表示非磷酸化的肽，而绿色珠表示磷酸化的肽。最终的分析图像如图 29 显示含磷酸氨酸的特异性抗体的 Cy5 荧光染色。

#### 实施例 20

DNA-肽嵌合体与偶合到微粒阵列上的彩色编码珠的 PNA 的杂交

与上述 PNA-肽嵌合体相似，DNA 寡核苷酸通过使用双功能交联剂配合到合成肽上。最终得到的配合被称为 DNA-肽嵌合体。DNA-肽嵌合体可以用于在微粒阵列上固定在彩色编码珠的互补 PNA 寡聚物的杂交。肽部分可以含有至少一种标记，如生物素或荧光染料，用于探测珠上杂交的 DNA-肽嵌合体。此外，对肽具有高亲和性的配体或修饰的肽也可以用于探测。将 DNA-肽嵌合体杂交到 PNA-功能化微粒的原理在图 30A 中说明。在本实施例中，DNA-肽嵌合体是脱氧腺嘌呤寡聚物(dA 寡聚物)和生物素化合成肽的配合体，其具有双功能交联剂，SMCC（琥珀酰亚胺基 4-（N-马来酰亚胺甲基，环己胺-1-羧酸酯））。DNA-肽配合体利用液相色谱提纯。提纯的 DNA-肽嵌合体用于与微粒阵列上固定在彩色编码珠上的 PNA 胸腺嘧啶寡聚物杂交。杂交的 DNA-肽嵌合体通过利用 Cy3 配合的链霉抗生物素探测。微粒阵列利用荧光显微镜检查。珠颜色和 Cy3 杂交信号的荧光强度从阵列中确定。根据微粒颜色的代码可以对微粒的身份识别。具有 Cy3 荧光染料的珠被探测和识别。如图 30B，DNA-肽嵌合体特异性地结合到 PNA 上，从以 1000ms 积分的 Cy3 信号强度为约 1000 个单位可以看出具有完全配对碱基序列，而未完全配对碱基序列的结果是以 1000ms 积分的 Cy3 信号强度约为 300 单位。

#### 实施例 21

多底物的 CASPASE 消化

caspase 对多肽底物的反应性可以利用 PNA-肽嵌合体来同步确定。

在本实施例中，合成三种类型的 PNA-肽嵌合体，I、II 和 III。每一个嵌合体含有具有限定的碱基序列的唯一的 PNA 锚定部分，其与特异性 caspase 底物肽配合作为功能部分。PNA 嵌合体 I、II 和 III 的功能部分分别含有氨基酸 Asp-Glu-Val-Asp（序列 ID 号：8），Val-Glu-Ile-Asp（序列 ID 号：9）和 Ile-Glu-Thr-Asp（序列 ID 号：10）。这些合成的肽为已知的 Caspase 3, 6, 8。肽的 C 端标记有特定的荧光染料。嵌合体底物的 Caspase 消化导致了荧光染料从 PNA 的锚定部分除去。

多底物 caspase 消化建立如下：一定量的嵌合体 I、II 和 III 被混合放到一个试验试管中。嵌合体的等分试样被加入分别含有 Caspase 3, 6, 8 反应溶液中。嵌合体底物的 Caspase 的消化通过在水浴中培养反应混合物进行一定的时间进行。负对照是没有任合 caspase 的反应混合物。消化之后，在反应混合物中加入含有胍 HCl 和去污剂的等量杂交缓冲液形成杂交混合物。然后，杂交混合物用预组装的微粒阵列培养。

根据现有方法，微粒阵列含有组装在硅质芯片上的四种类型的彩色编码珠。三种类型的珠被具有确定碱基序列的寡核苷酸功能化，这三种类型分别以序列特异性的形式结合到 PNA-肽嵌合体 I、II 和 III 上。除了编码彩色外，四种类型的珠还含有与在标记在嵌合体上荧光染料匹配的颜色。

杂交之后，非特异性结合物从阵列洗去，并利用荧光显微镜检查。杂交 PNA 嵌合体的测定信号颜色强度由阵列上珠确定。珠根据其预先确定的彩色代码解码。强度比，测定信号的比率和来自对照珠的信号被确定了。负对照反应给出测定中强度比的最高水平。对特殊底物的 Caspase 活性被表达为残余测定强度相对于每个芯片上负对照的比的百分比。研究中测定强度比的相对百分数概括如下表：

酶	PNA-肽嵌合体		
	I	II	III
Caspase 3	<b>53.48%</b>	82.35%	112.03%
Caspase 6	91.8%	<b>41.18%</b>	79.08%
Caspase 8	73.77%	69.41%	<b>59.89%</b>

粗体表示测定中比预期更强的消化

## 实施例 22

### 利用 PNA 进行酶测定的流程图

此处公开的利用 PNA 嵌合体底物的多元测定具有相对于现有技术的几种优势。在 PNA 嵌合体构建中，PNA 锚定部位在多元测定中起到了两个重要的作用。首先，PNA 的碱基序列作为配合底物的代码。其次，PNA 寡聚物作为嵌合体的特异性锚形体，这种嵌合体可以被捕获到在标记的固体表面的互补寡核苷酸上。没有已知的蛋白酶和核酸酶用于 PNA 降解。这样，PNA 寡聚物在组织溶解产物中非常稳定。与 DNA-DNA 杂交相比，PNA 在非常温和的条件下杂交到互补的 DNA 寡核苷酸上。PNA-DNA 复合体在低盐溶液中是稳定的，即，该条件不适合 DNA-DNA 杂交。这样，多 PNA 嵌合体底物可以被加入到普通的单一或多个类型酶反应的反应混合物中。如图 31 所示，此处公开的多元测定可以以单一形式进行，其包括合成 PNA 嵌合体底物的步骤，进行多元测定的步骤，杂交到在彩色编码微粒上的寡核苷酸上的步骤，探测修饰的底物的步骤，图像获取和数据分析的步骤。

## 实施例 23

### 多元测定

作为优选实施方式之一，对于多底物酶反应，PNA-肽嵌合体是理想的底物，所述酶反应如致活酶测定（图 32A），磷酸酶测定（图 32B），caspase 测定（图 32C），配体结合测定（图 32D）。简言之，PNA-肽嵌合体文库可用感兴趣的致活酶培养。在溶液中磷酸化反应后，磷酸化的肽可以在捕获的 PNA 嵌合体上确定（图 32A）。这样，用于致活酶的底物肽可以从文库中识别。这种测定的设计可以应用到在药物发现，以用于靶识别和在疾病中对改变的致活酶活性的识别。通过使用 PNA-磷酸化肽嵌合体作为底物，类似的设计可以应用到多底物磷酸酶分析中（图 32B），其可以用在药物发现中，用于在不同的疾病阶段识别特异性的磷酸酶抑制剂。此外，如实施例 17 所示，PNA-肽嵌合体可以被用于在试管中确定 Caspase 的活性。如图 32C 所示，PNA-肽嵌合体文库可以用

感兴趣的 caspase 培养。在消化后，底物肽可以从文库中识别。这种测定的设计可以用于在调亡细胞中 caspase 抑制剂的识别。此外，PNA-肽嵌合体也可以用于蛋白质-蛋白质或蛋白质-核酸的相互反应的结合测定。如板 C（图 32D），在配体结合测定中，PNA-肽嵌合体文库可以用感兴趣的靶来培养。与特异性靶结合的 PNA-肽嵌合体可以从文库中识别（图 32D）。

上述不同优选实施例的描述用于说明和描述本发明的目的。但并不穷举可限定本发明的公开的特定形式。根据上述教导的启示，可以作出明显的改进与修饰。所选择和说明的实施例是用来为本领域技术人员实现各种实施例以及对实施例作出适于应用的不同修饰而提供的说明和实际应用例子。所有这些修饰与改进都应当包括在所附权利要求根据其要求的宽度解释的范围内，这些权利要求是平等，合法，公正赋予资格的。

## 序列表

<110> 生物芯片分析有限公司

<120> 分子构建以及生化反应探测的使用方法

<130> PNA

<140> 10/227012

<141> 2002-08-22

<160> 10

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人类酪氨酸致活酶底物 p34cdc2 衍生的人工序列

<221> 磷酸化

<222> (11)... (11)

<400> 1

Cys	Lys	Val	Glu	Lys	Ile	Gly	Glu	Gly	Thr	Tyr	Gly	Val	Val	Tyr	Lys
1				5				10						15	

<210> 2

<211> 19

<212> PRT

<213>人工序列

<220>

<223>人类酪氨酸致活酶底物 p34cdc2 衍生的人工序列

<221>磷酸化

<222> (13)... (13)

<400> 2

Cys Glu Gly Pro Trp Leu Glu Glu Glu Glu Glu Ala Tyr Gly Trp Met  
1 5 10 15  
Asp Phe Lys

<210> 3  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213>人工序列

<223>人类酪氨酸激活酶底物 p34cdc2 衍生的人工序列

<221>磷酸化  
<222> (10)... (10)

<400> 3  
Cys Arg Arg Leu Ile Glu Asp Ala Glu Tyr Ala Ala Arg Gly Lys  
1 5 10 15

<210> 4  
<211> 15  
<212> PRT  
<213>人工序列

<223>人工序列 - 对照肽

<400> 4  
Lys Val Glu Lys Ile Gly Glu Gly Thr Tyr Gly Val Val Tyr Lys  
1 5 10 15

<210> 5  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<223> 人工序列 — caspase 3 衍生的

<400> 5

His His His His His His Asp Glu Val Asp Ala Lys

1

5

10

<210> 6

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列 - 探针

<400> 6

aaaaaaaaaa

10

<210> 7

<211> 10

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列 - 探针

<400> 7

aaggagagaa

10

<210> 8

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> caspase 衍生的肽

<400> 8

Asp Glu Val Asp

1

<210> 9

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列 -- caspase 衍生的肽

<400> 9

Val Glu Ile Asp

1

<210> 10

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> caspase 衍生的肽

<400> 10

Ile Glu Thr Asp

1

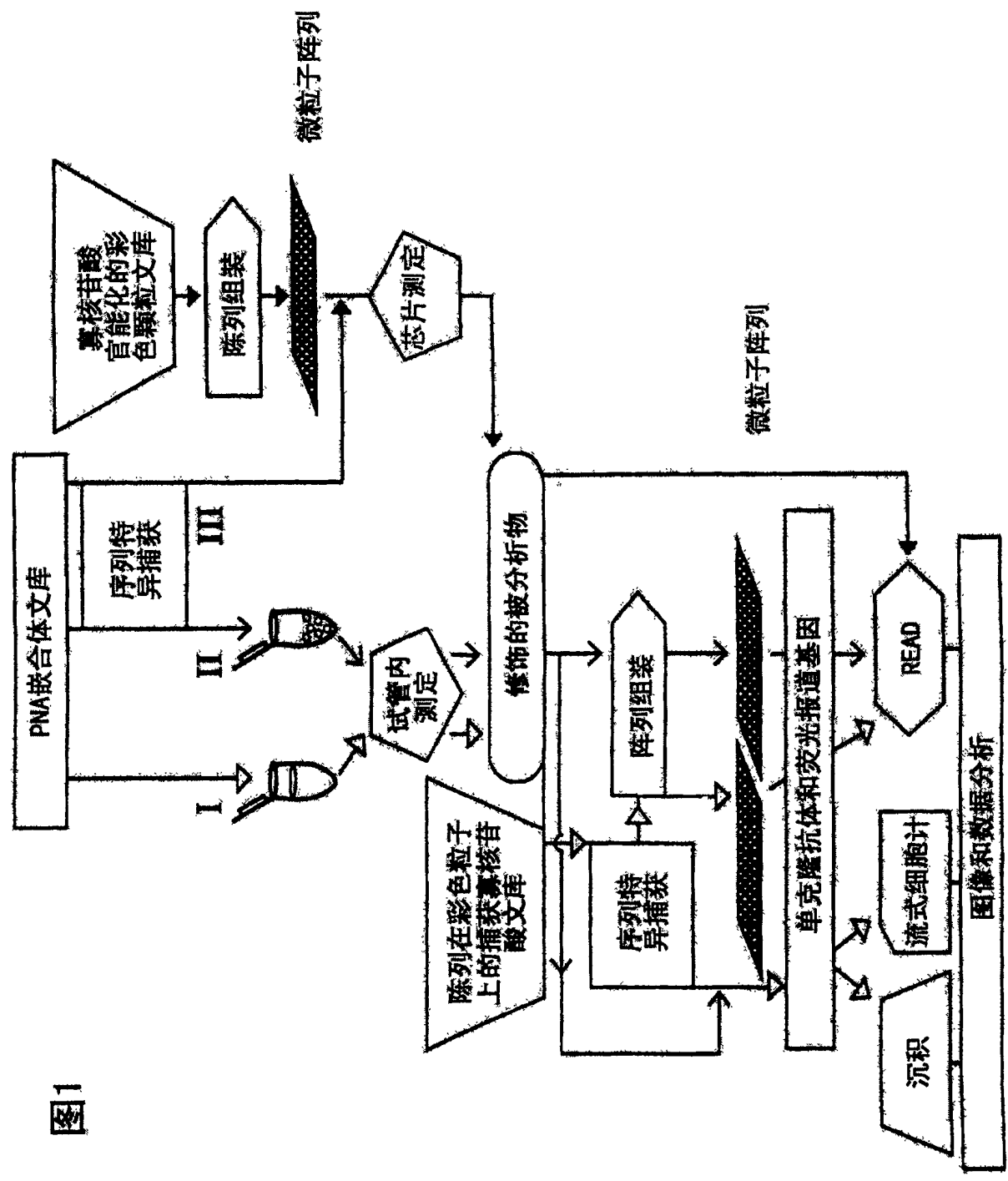
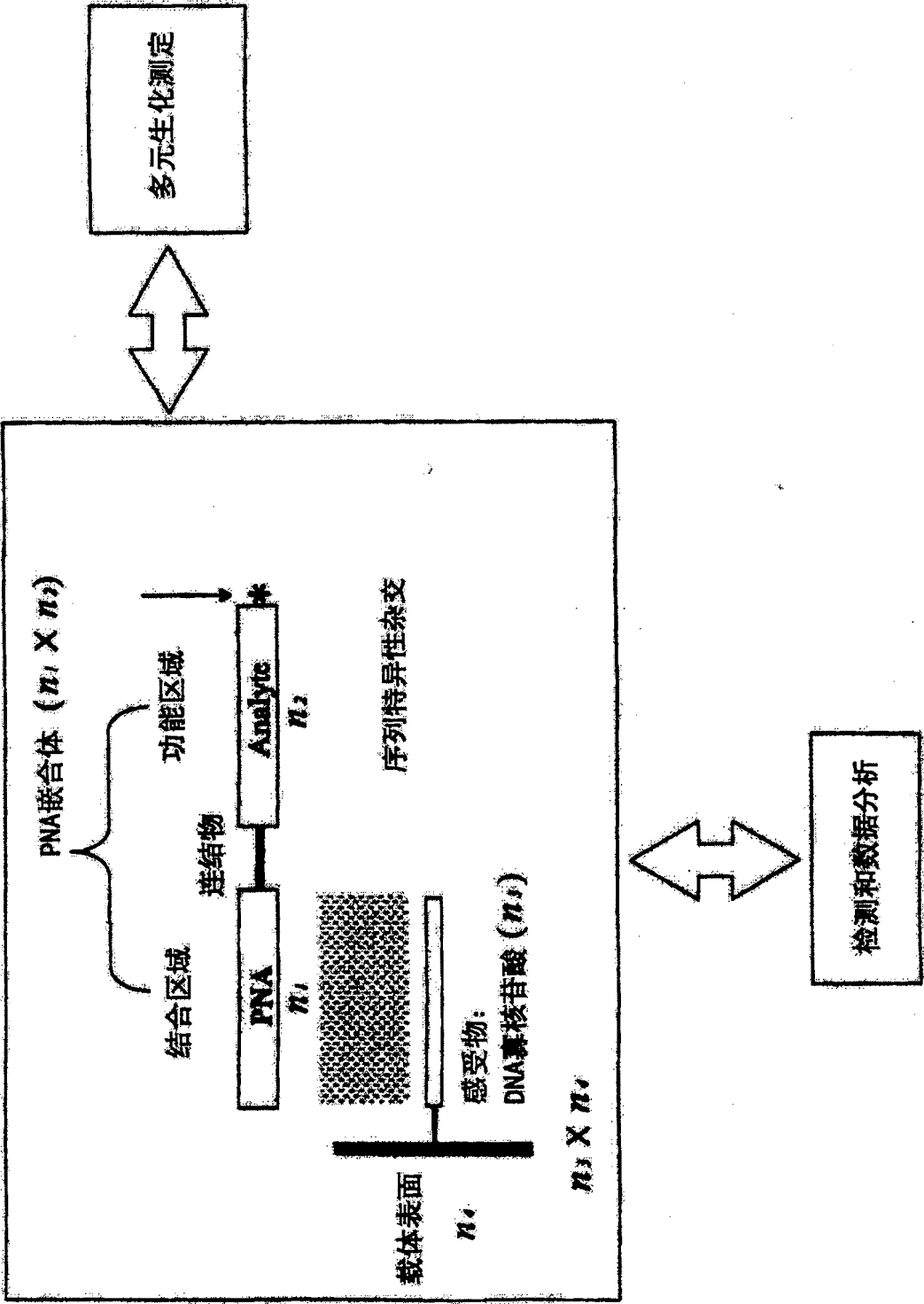


图2



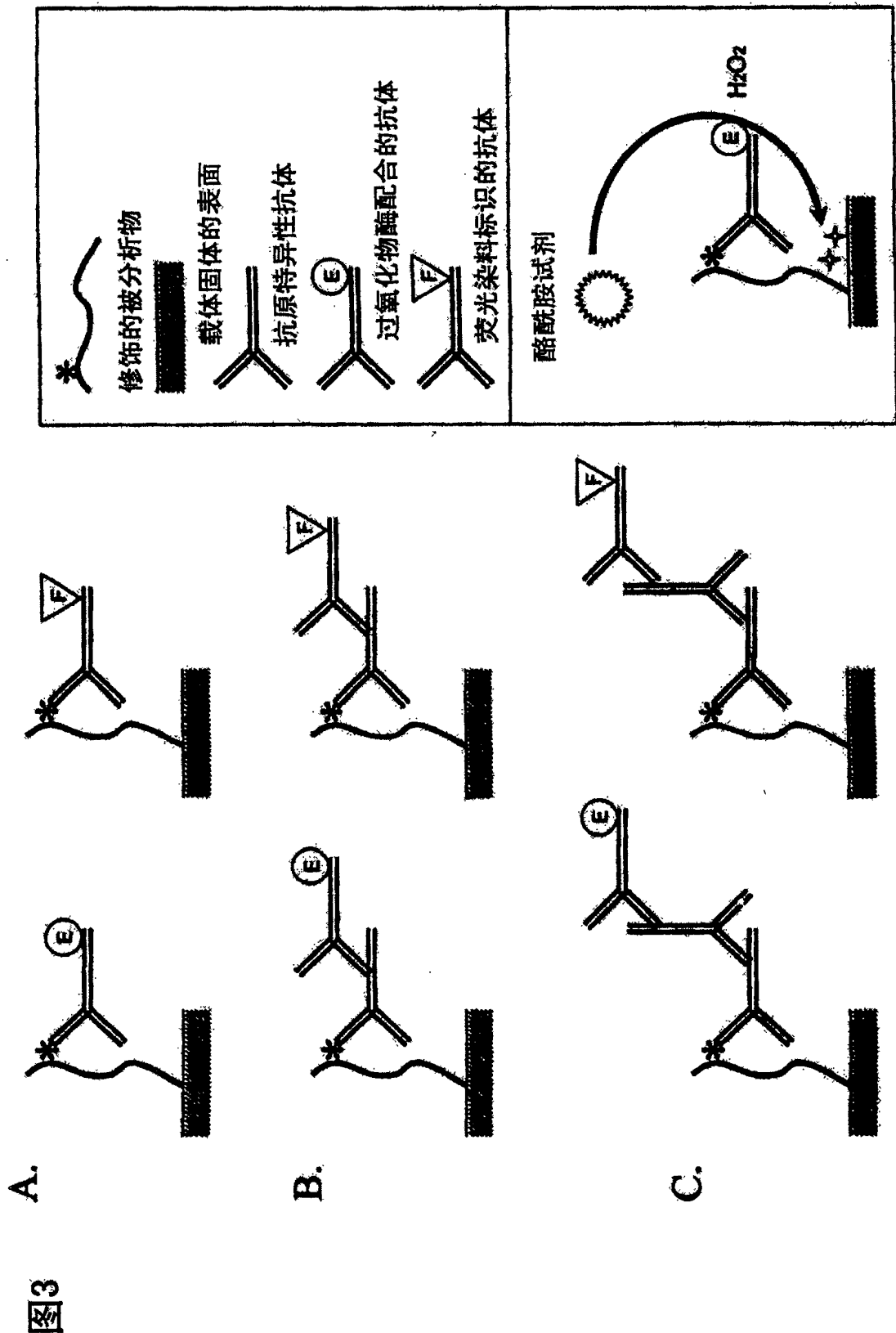
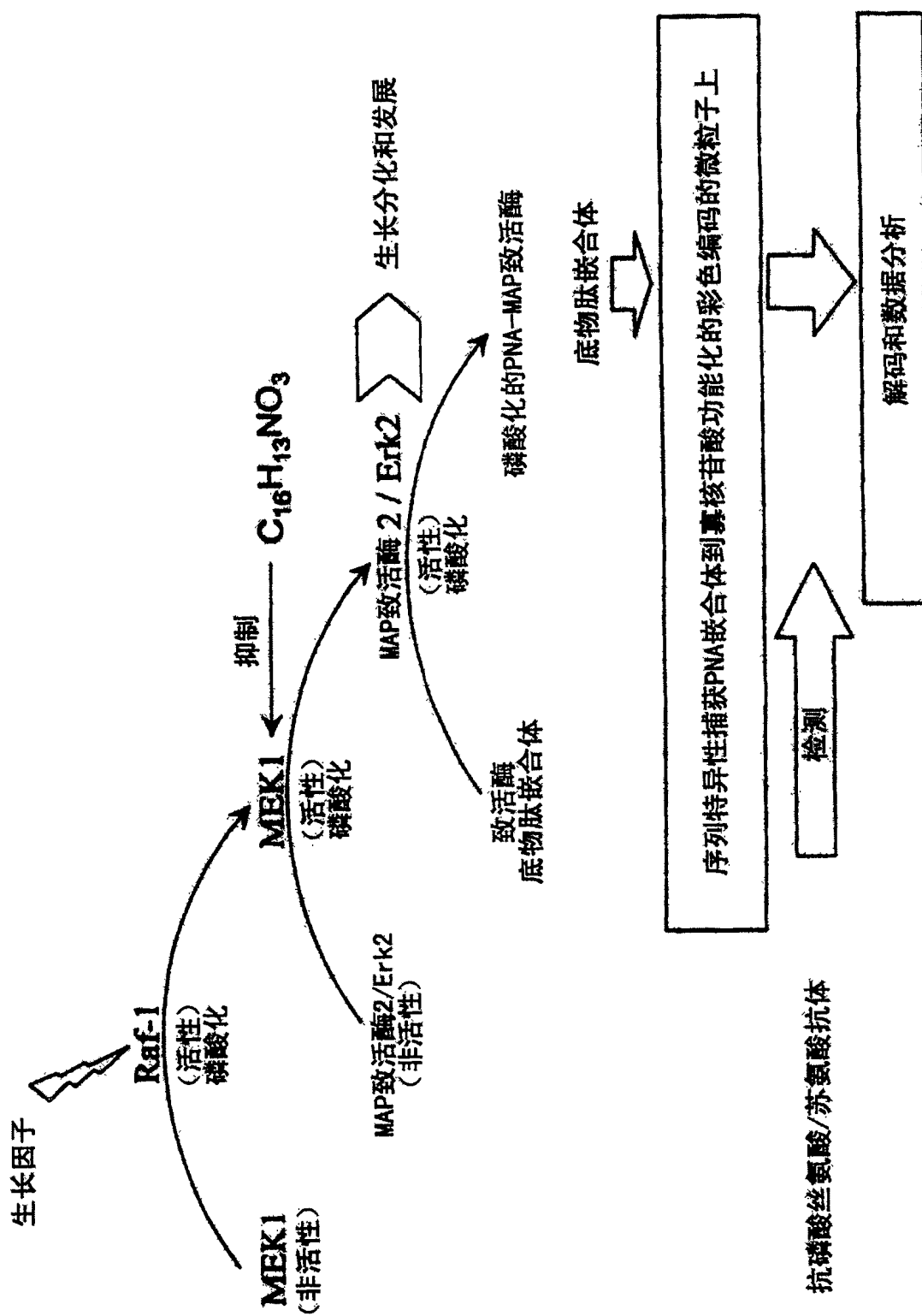
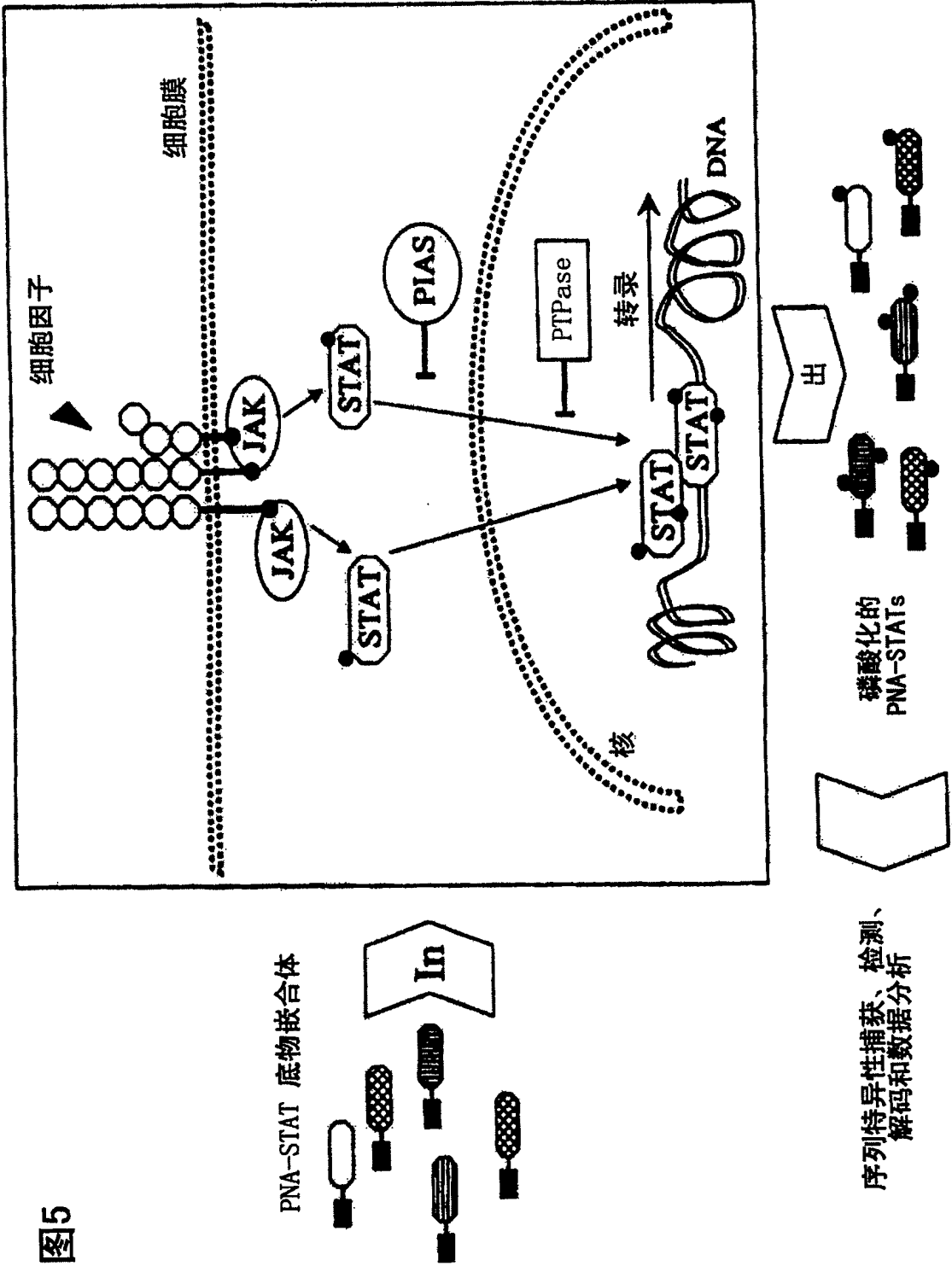
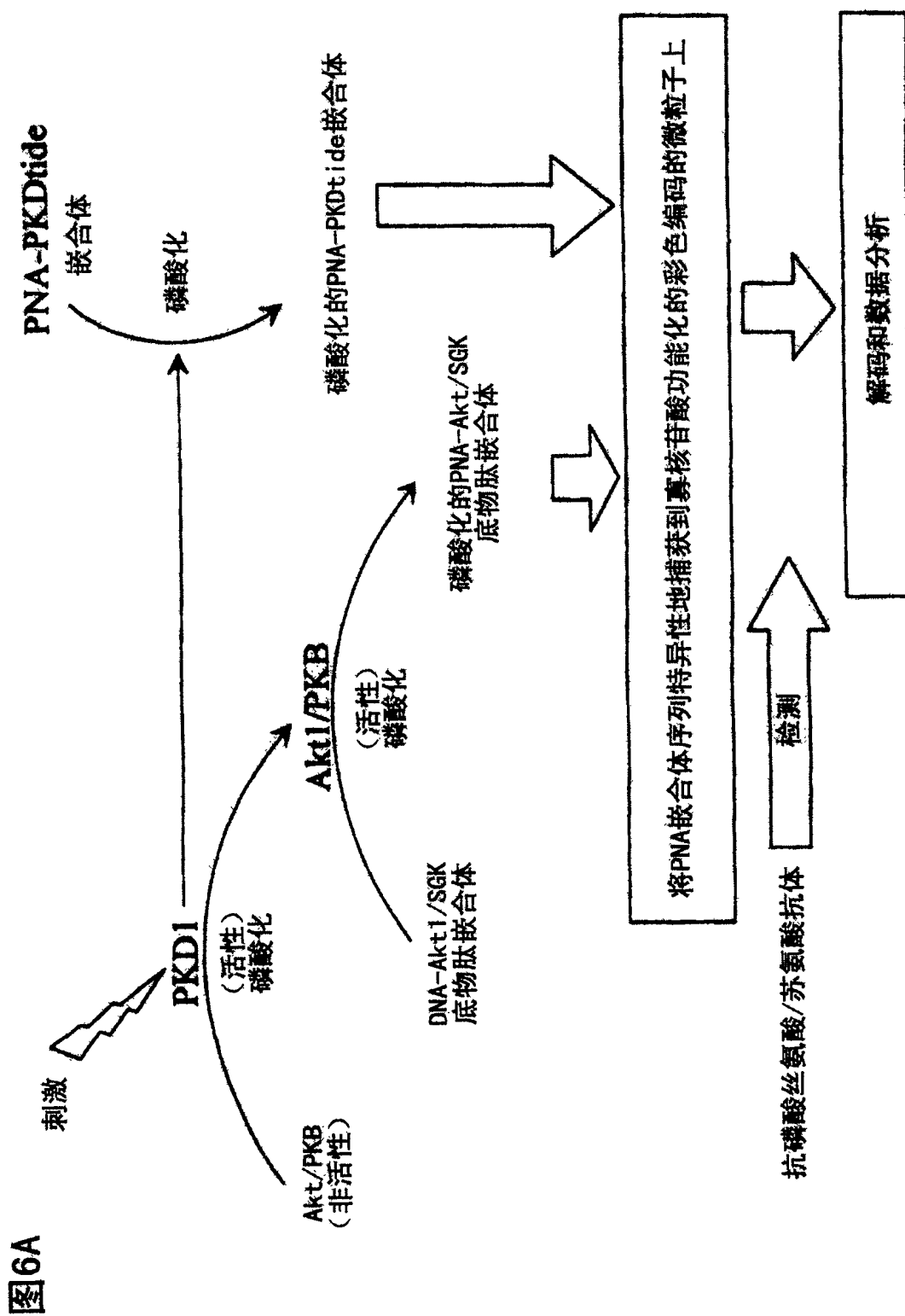
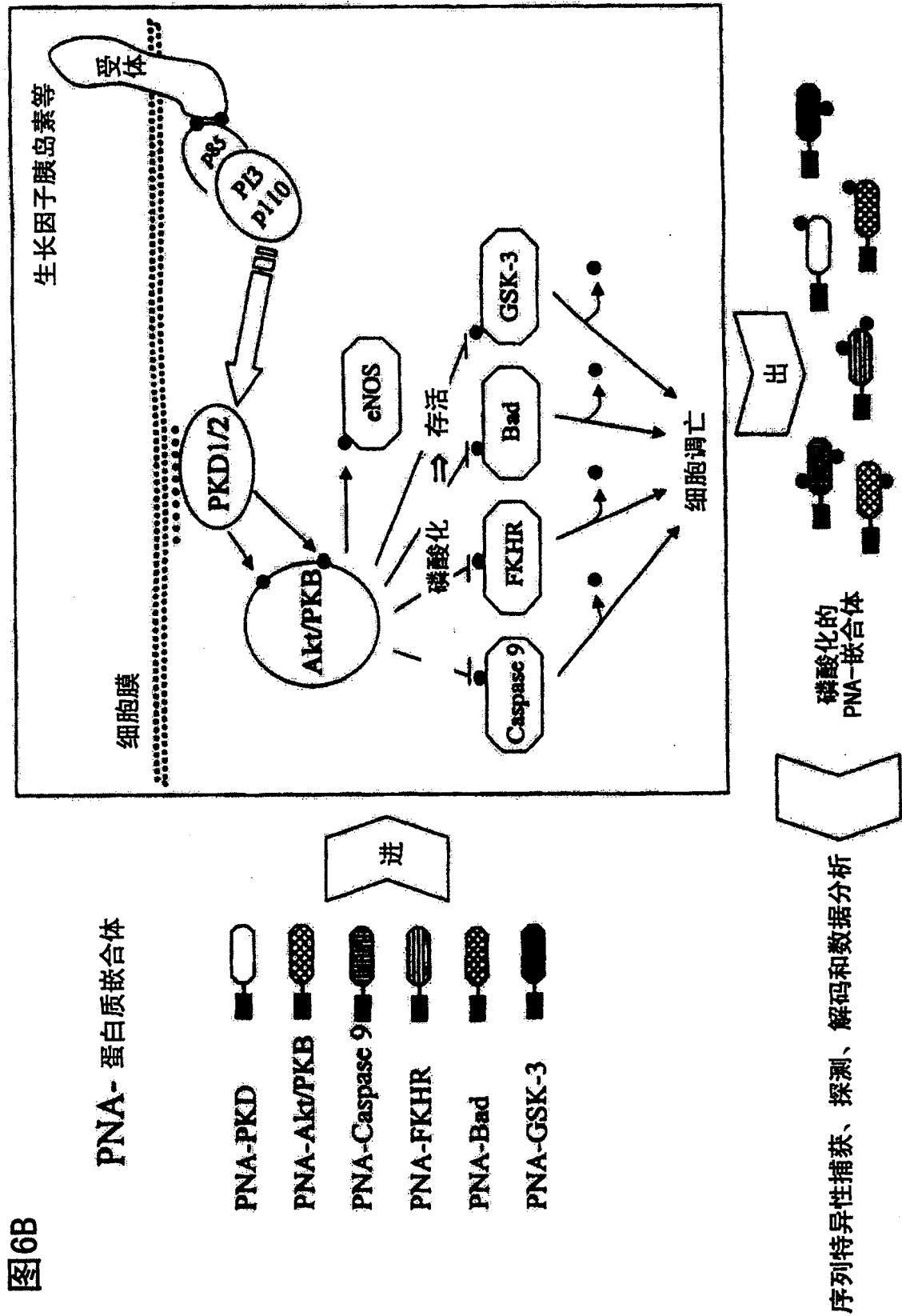


图4









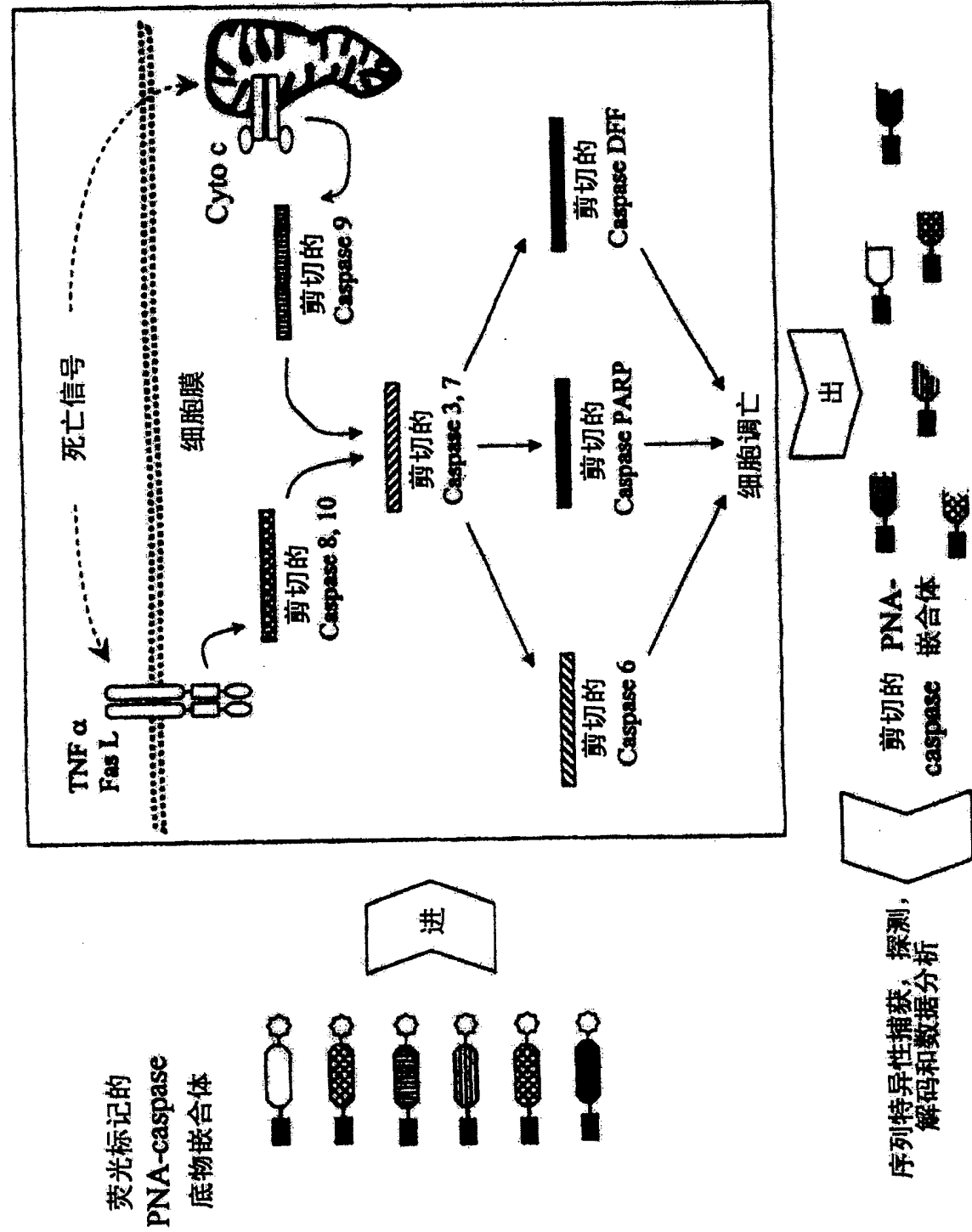


图7

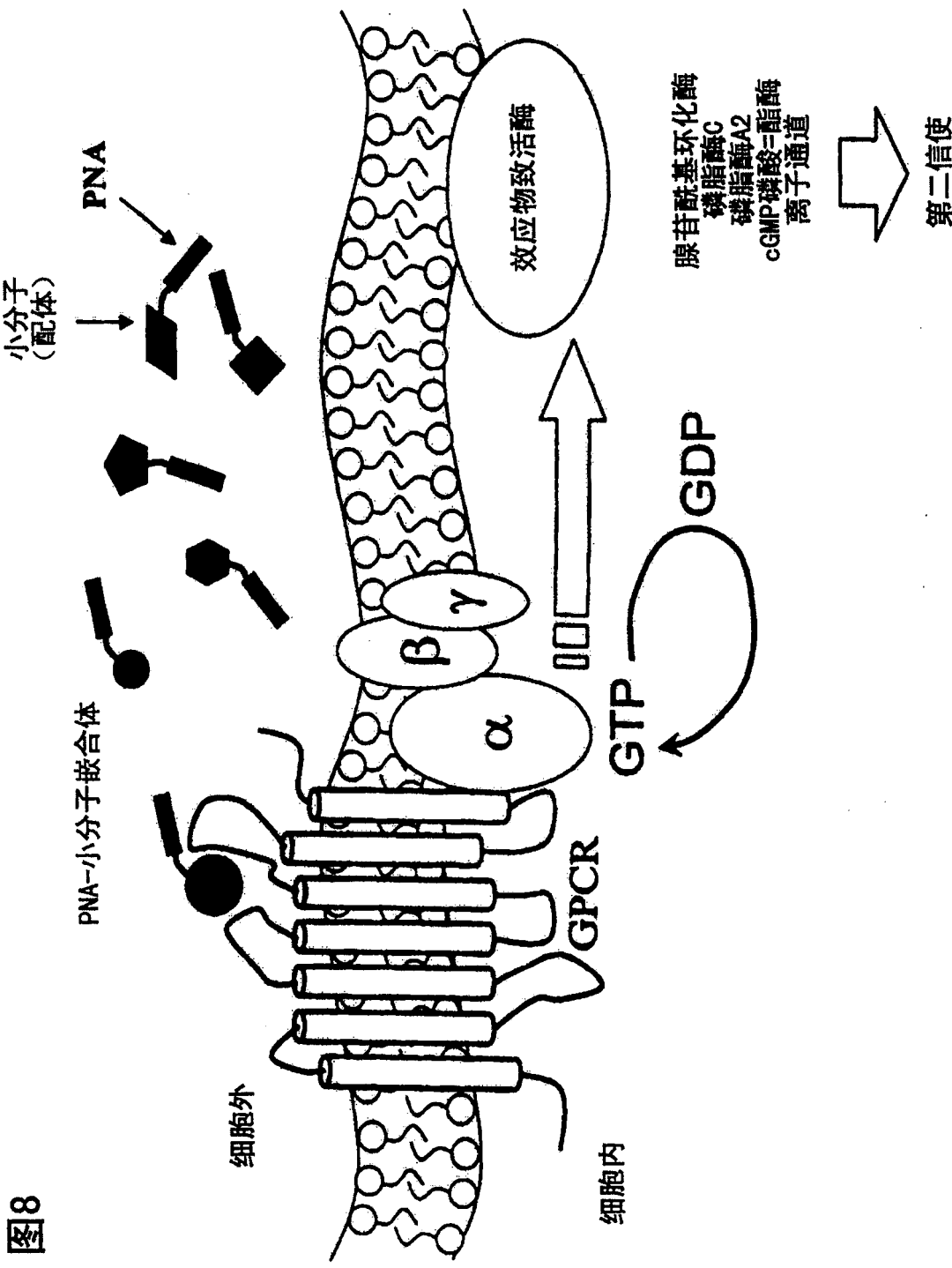
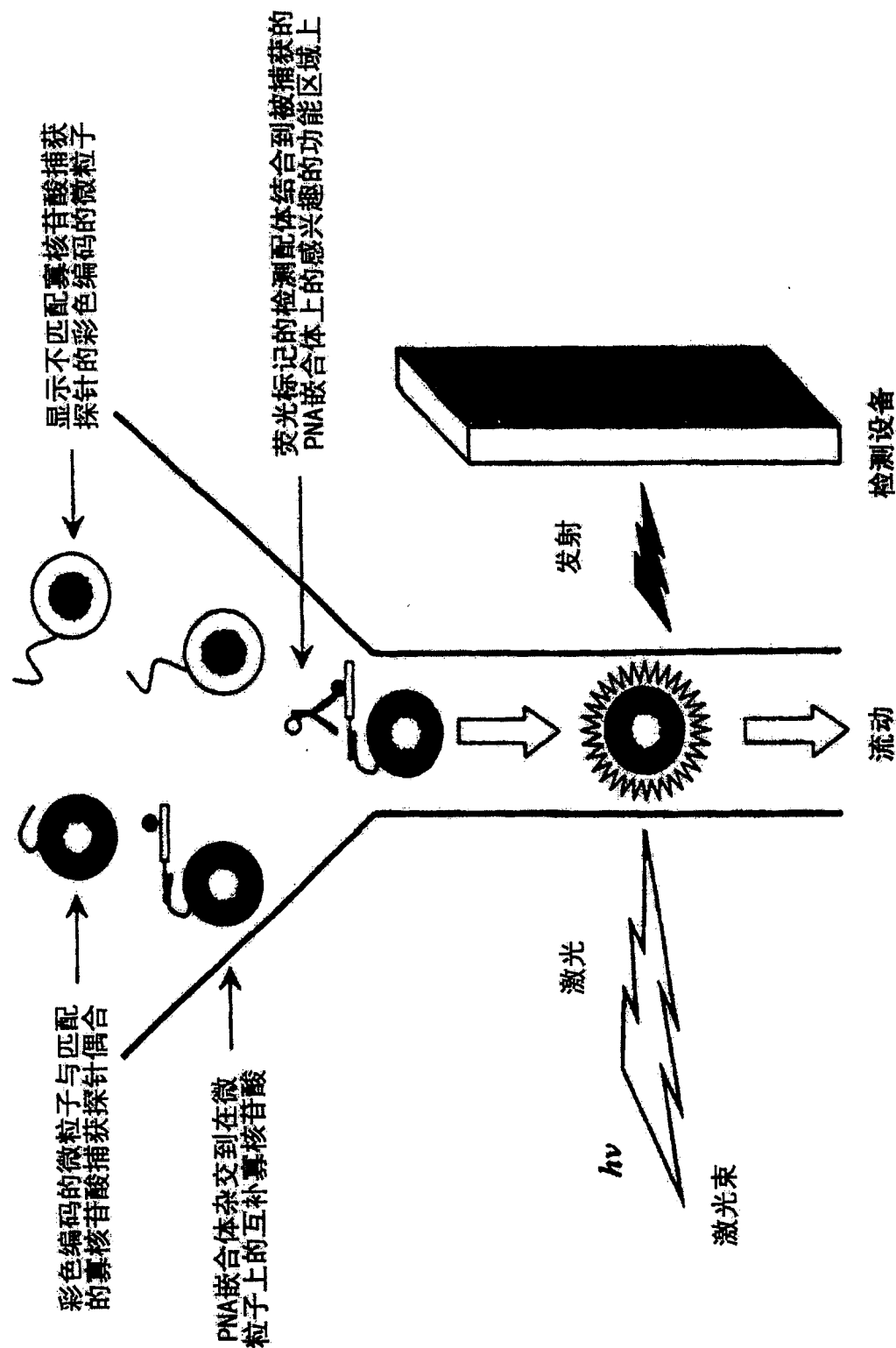


图8

图9



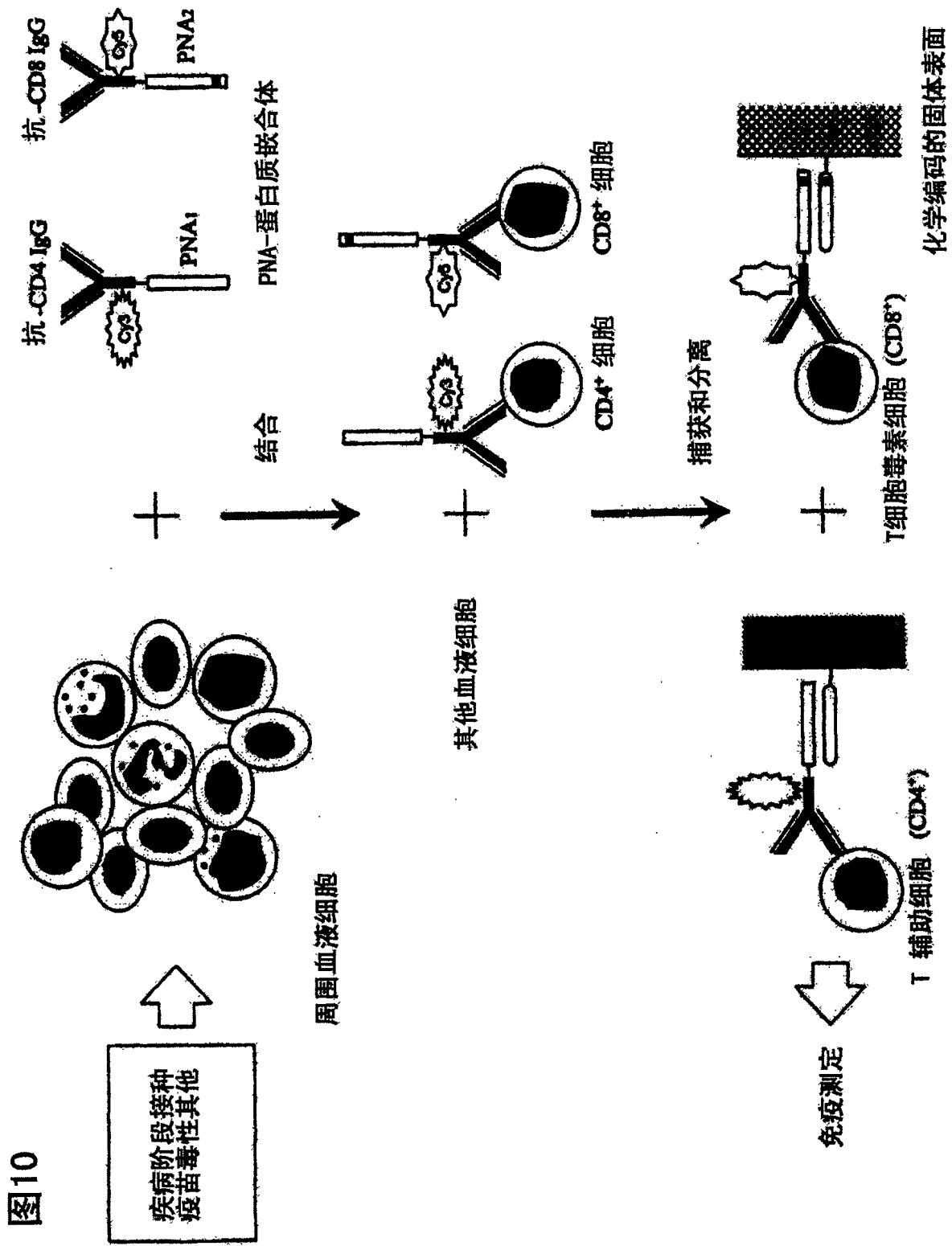
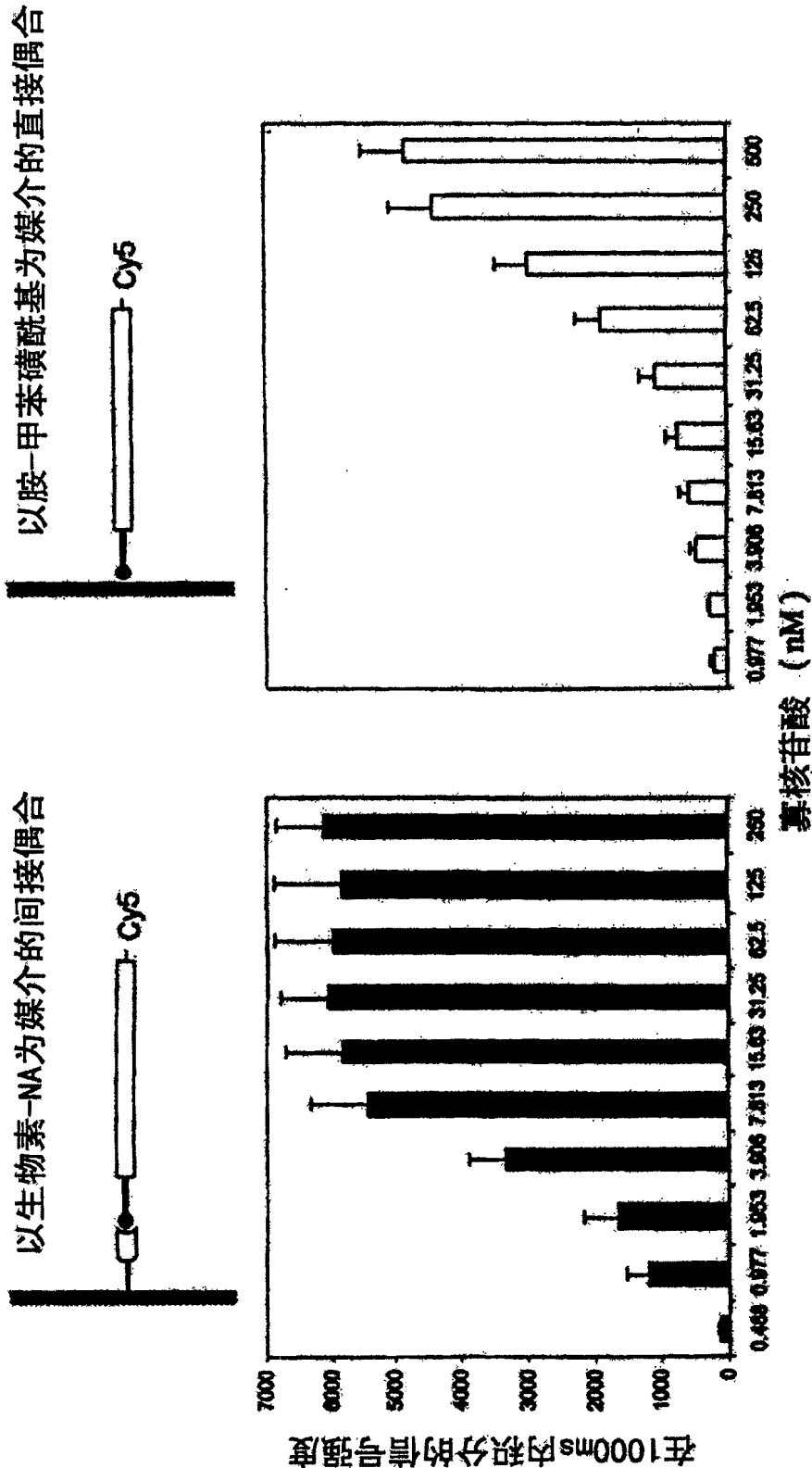


图11 A B



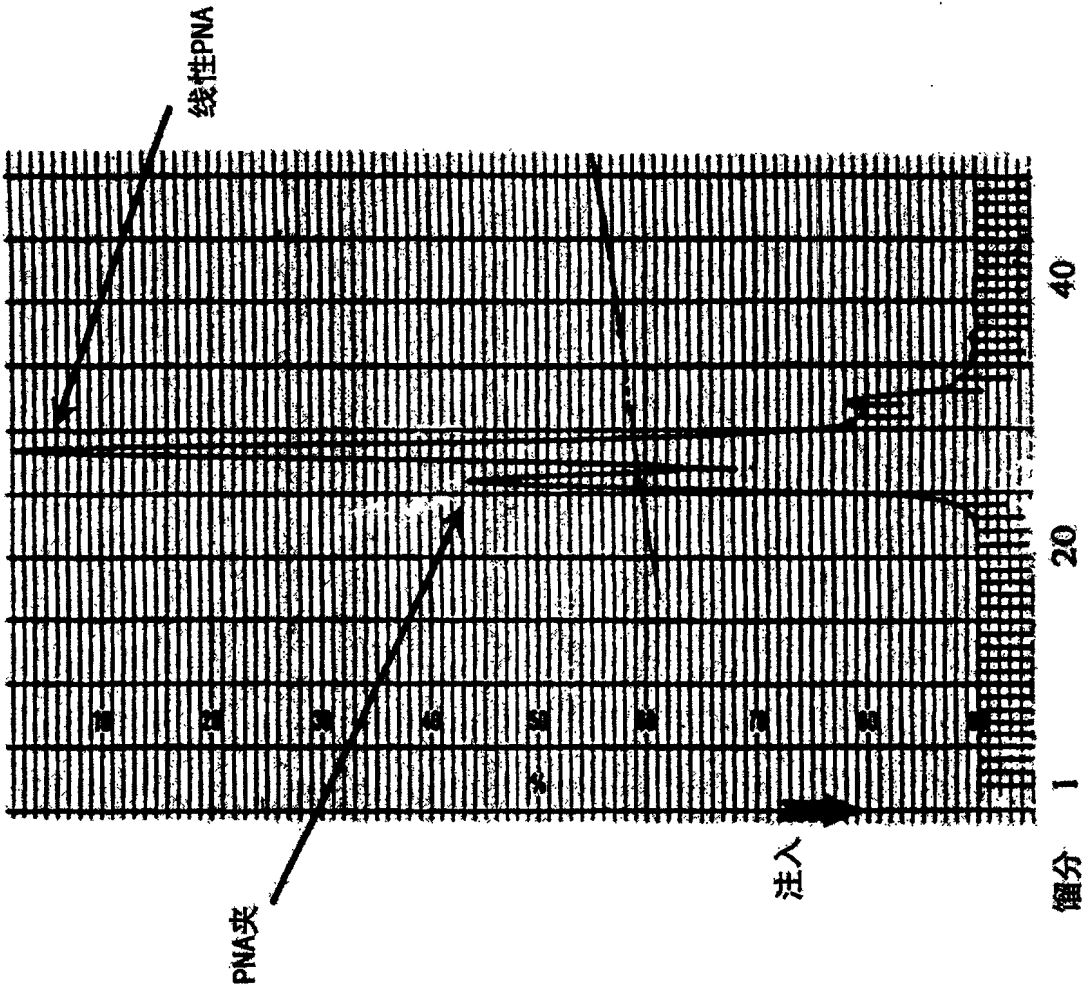
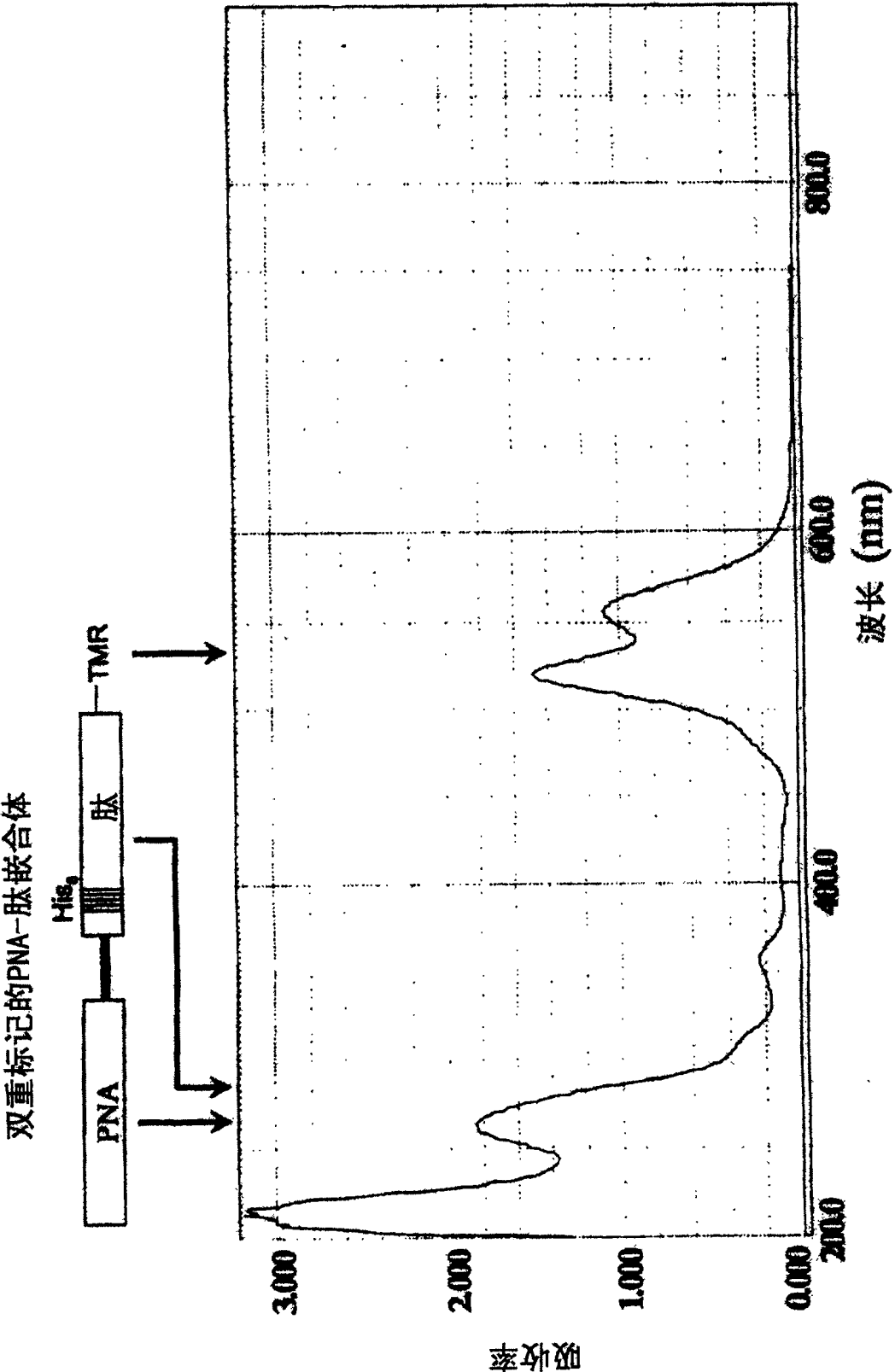


图12

图13A



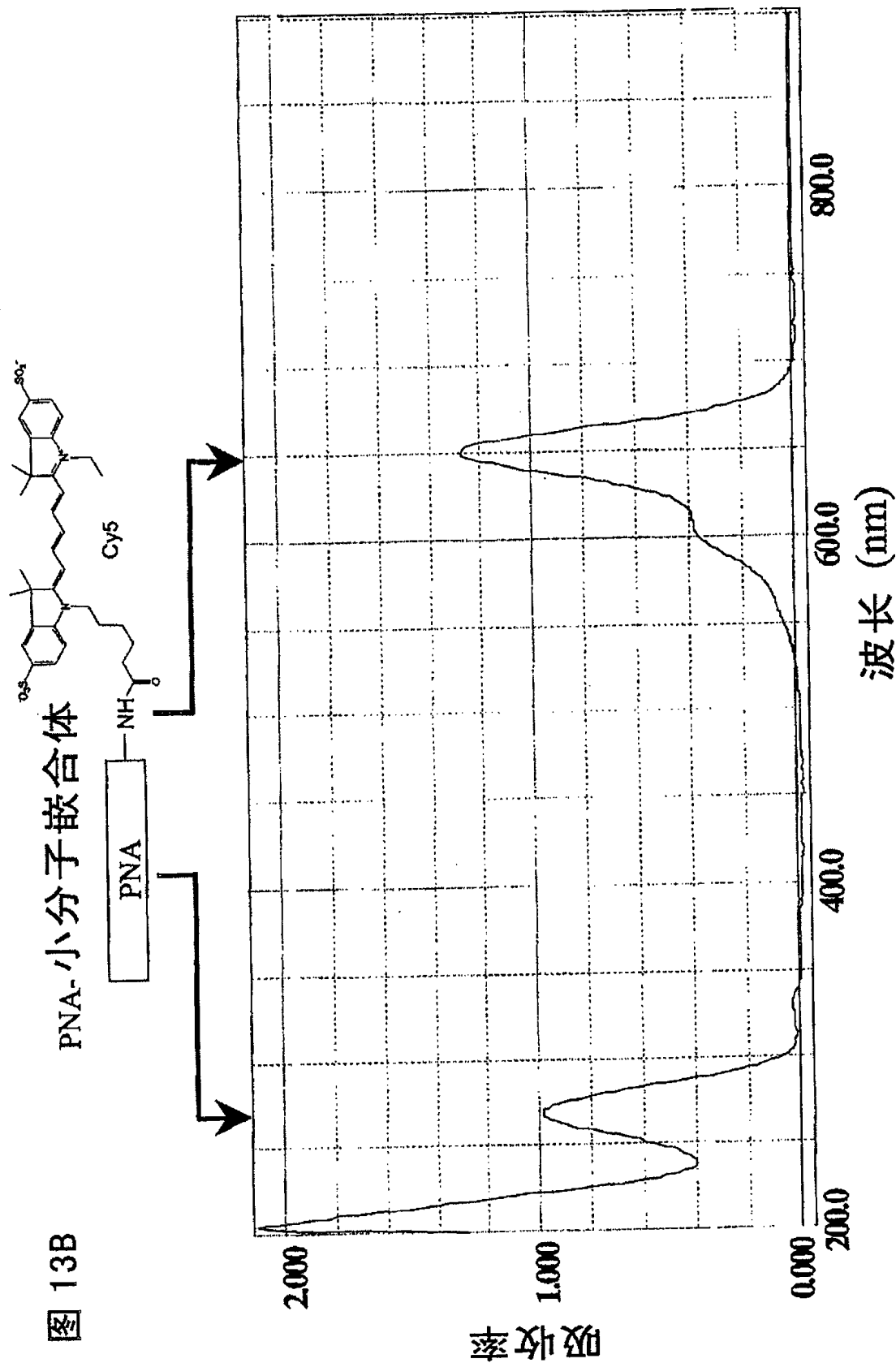


图14

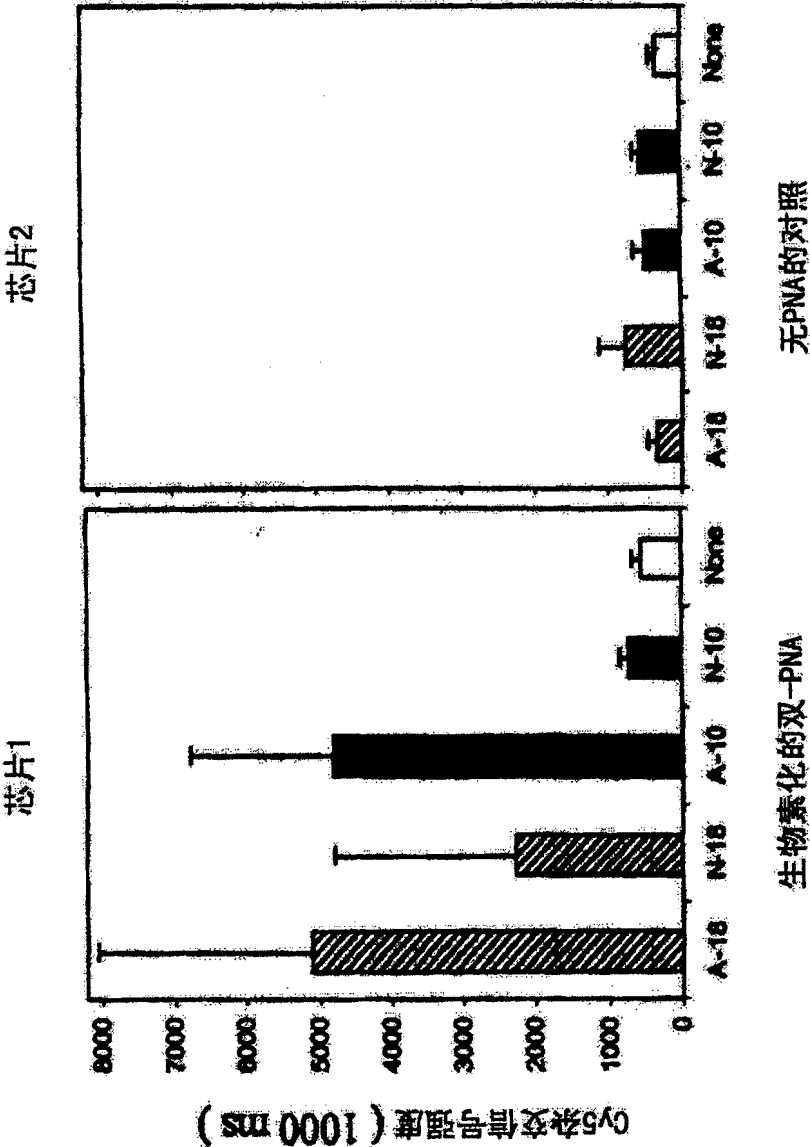
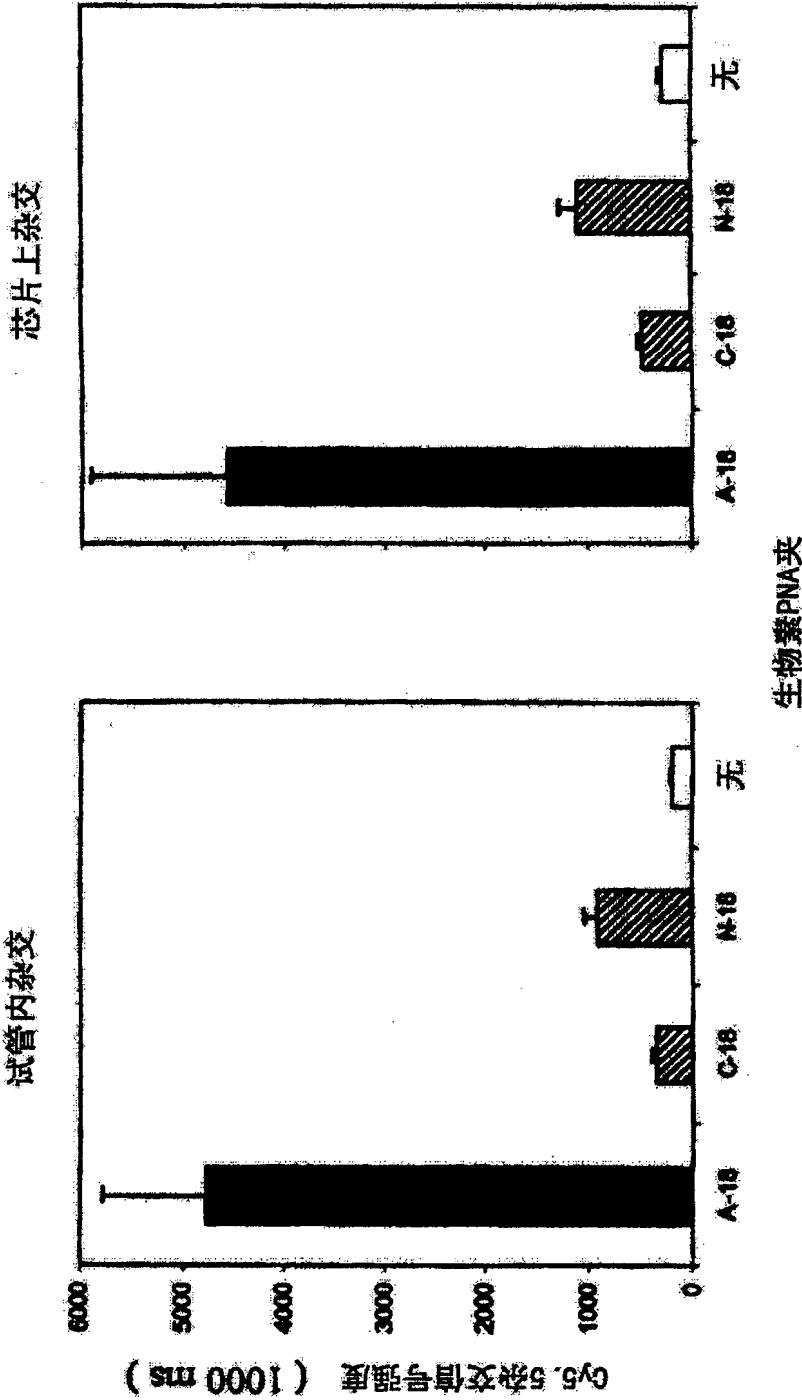


图15 A



B

图16

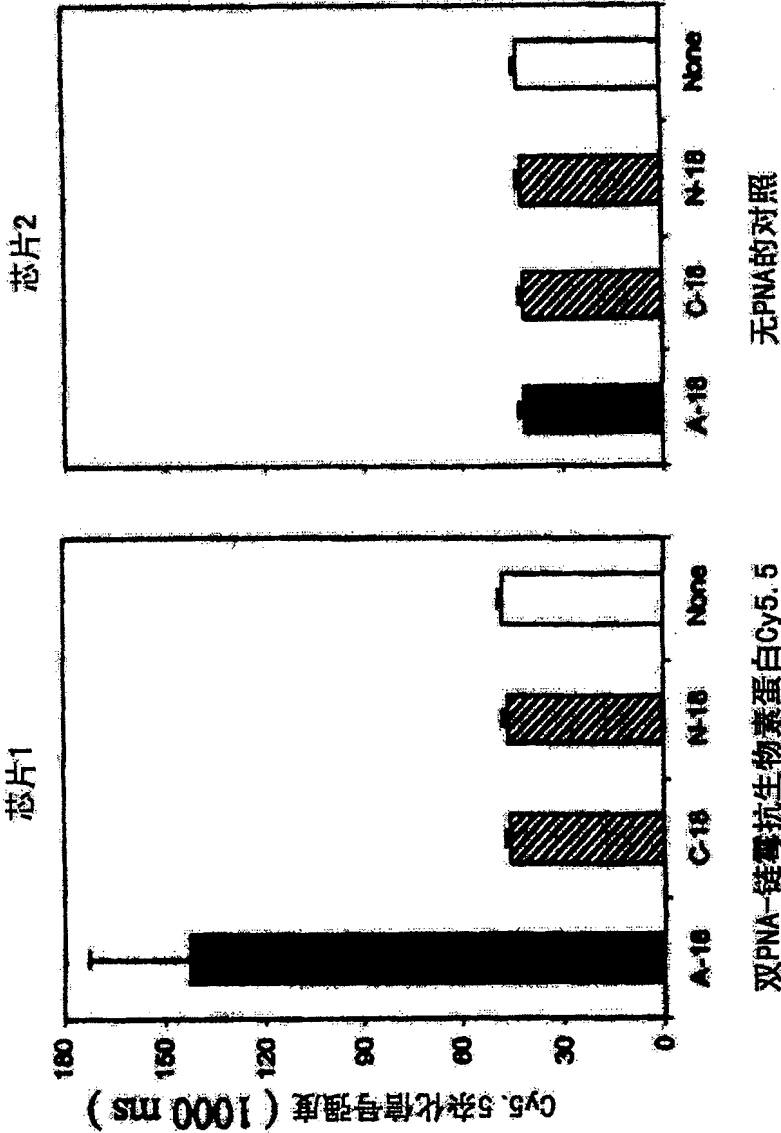
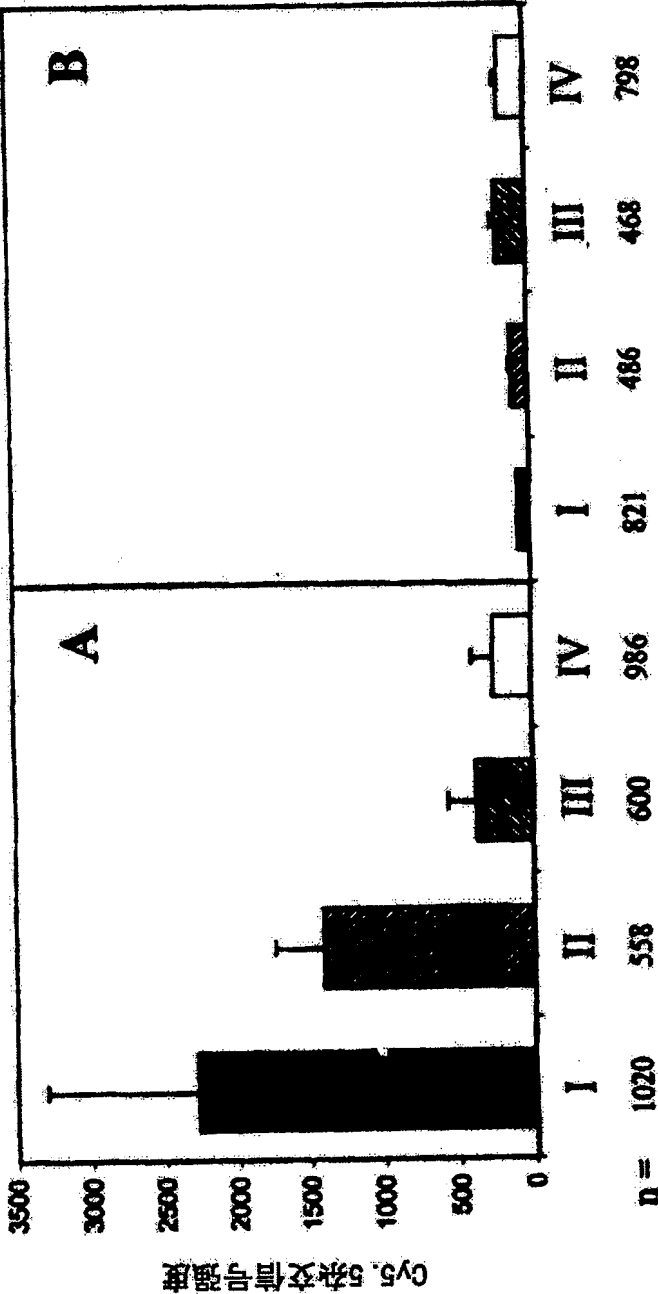


图17



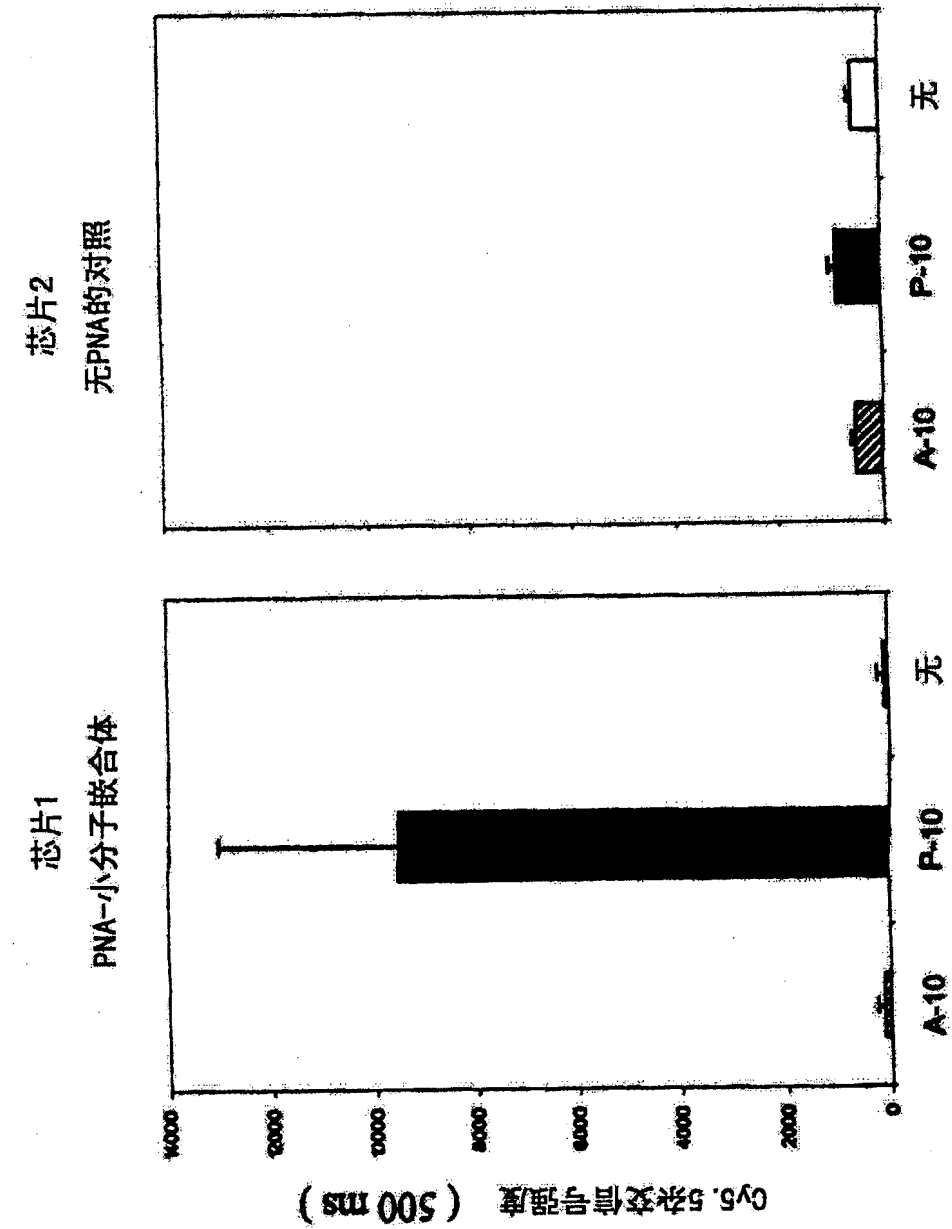
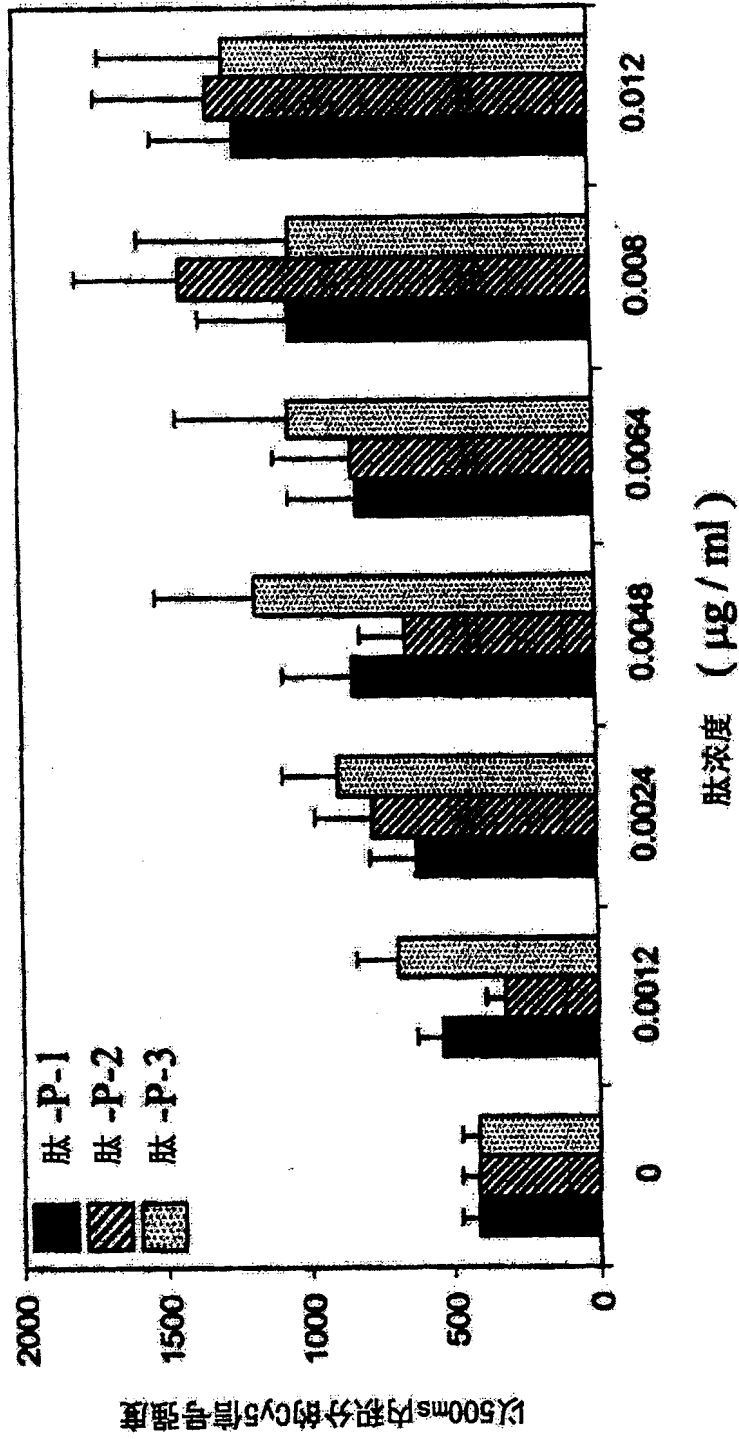


图18

图19



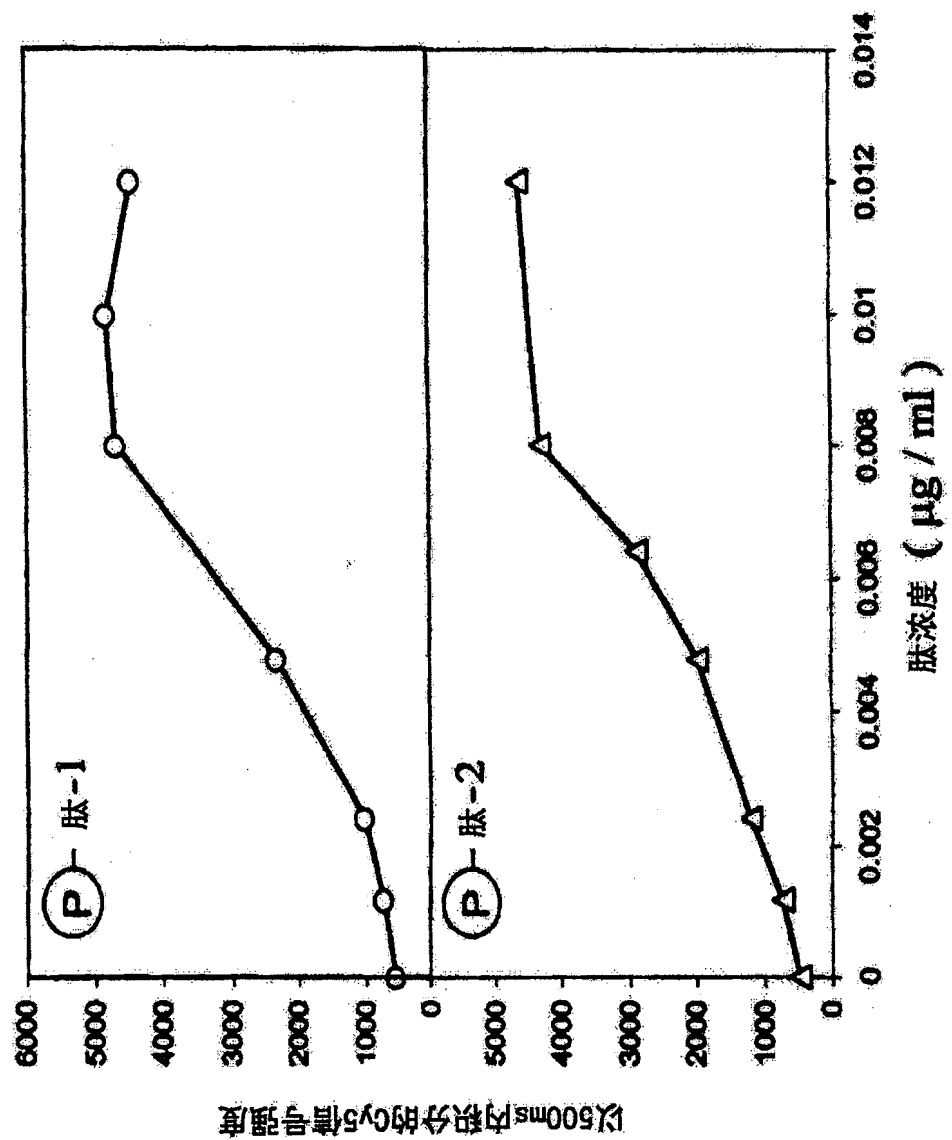


图20

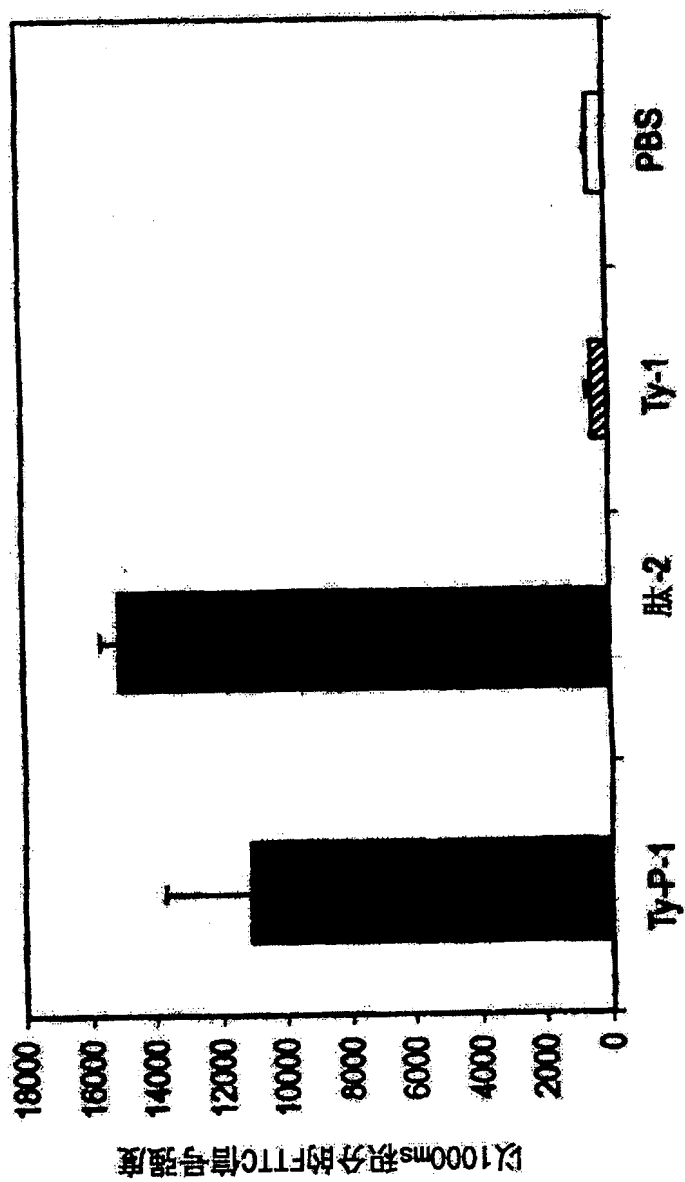


图21

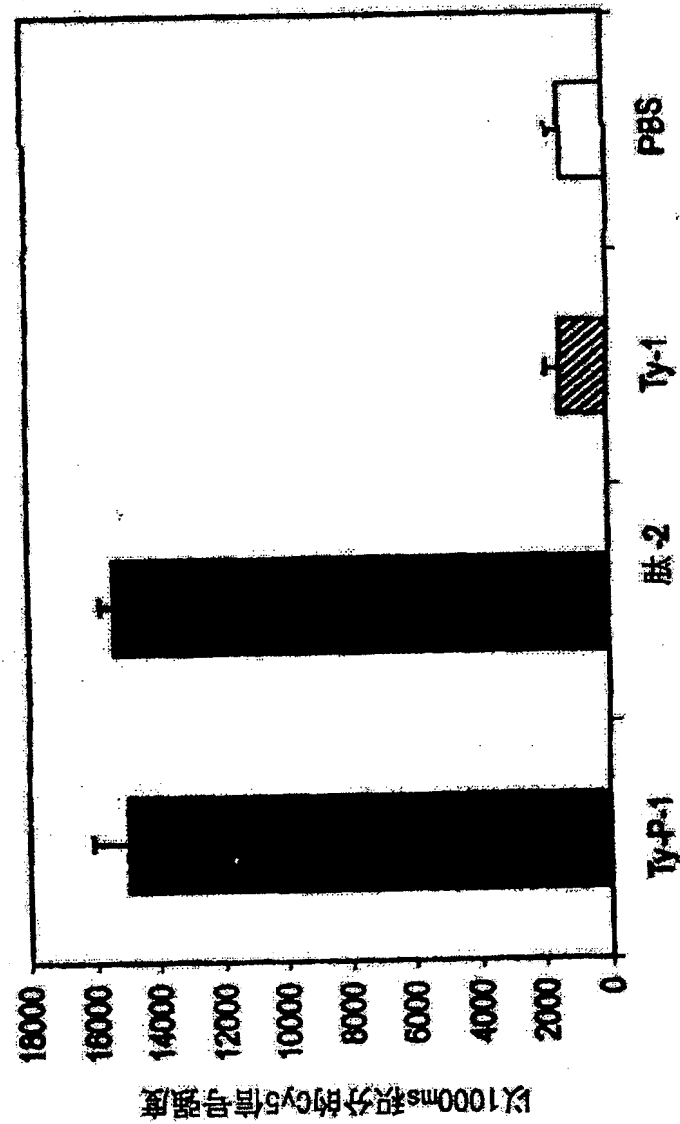


图22

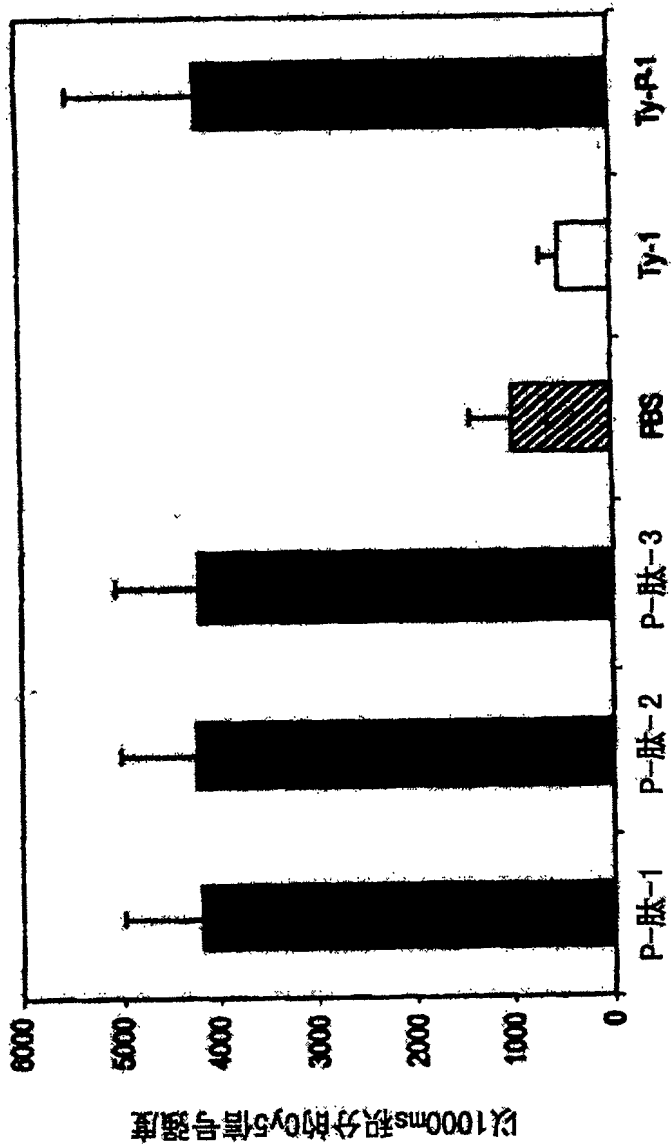


图23

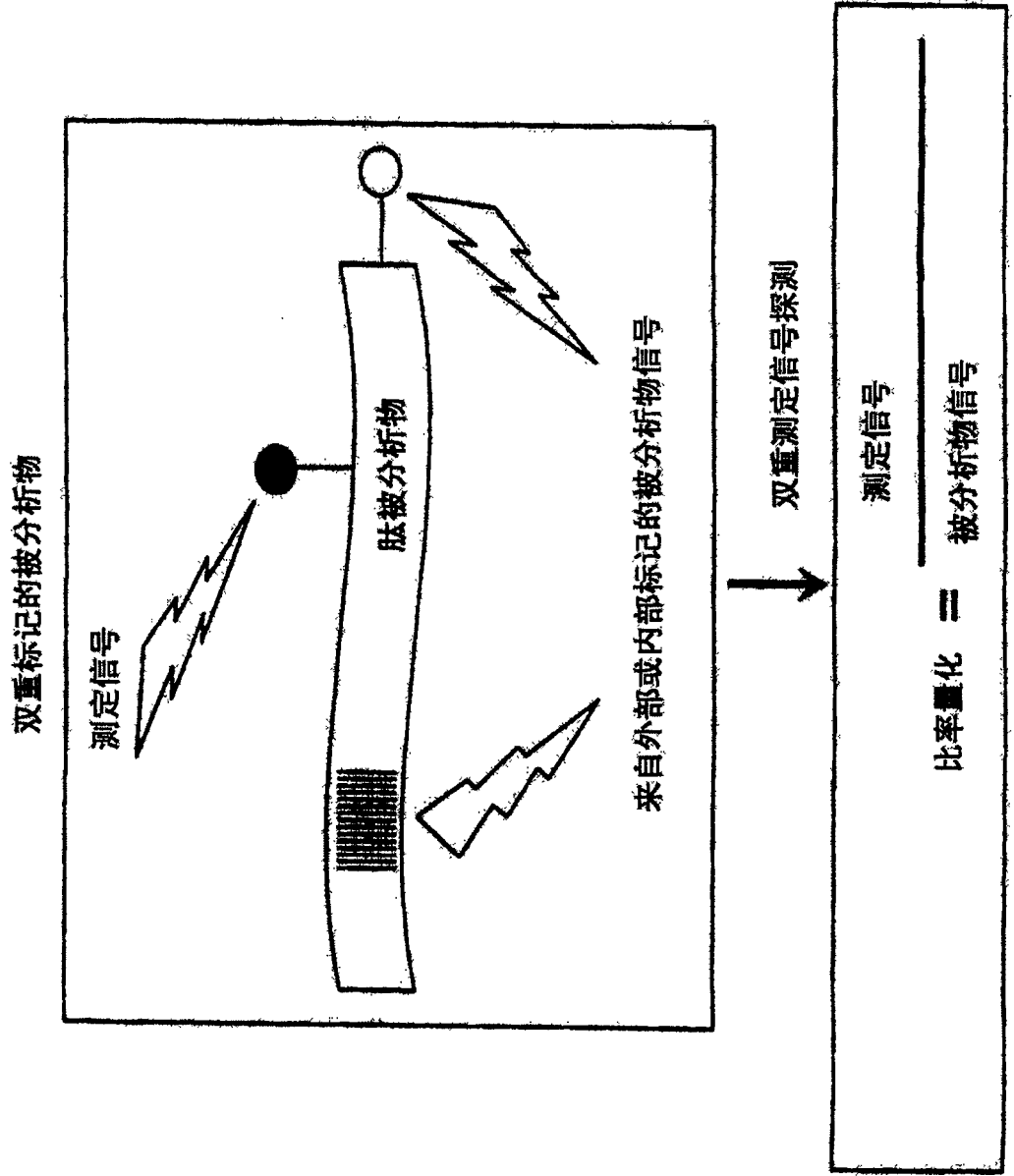


图24A

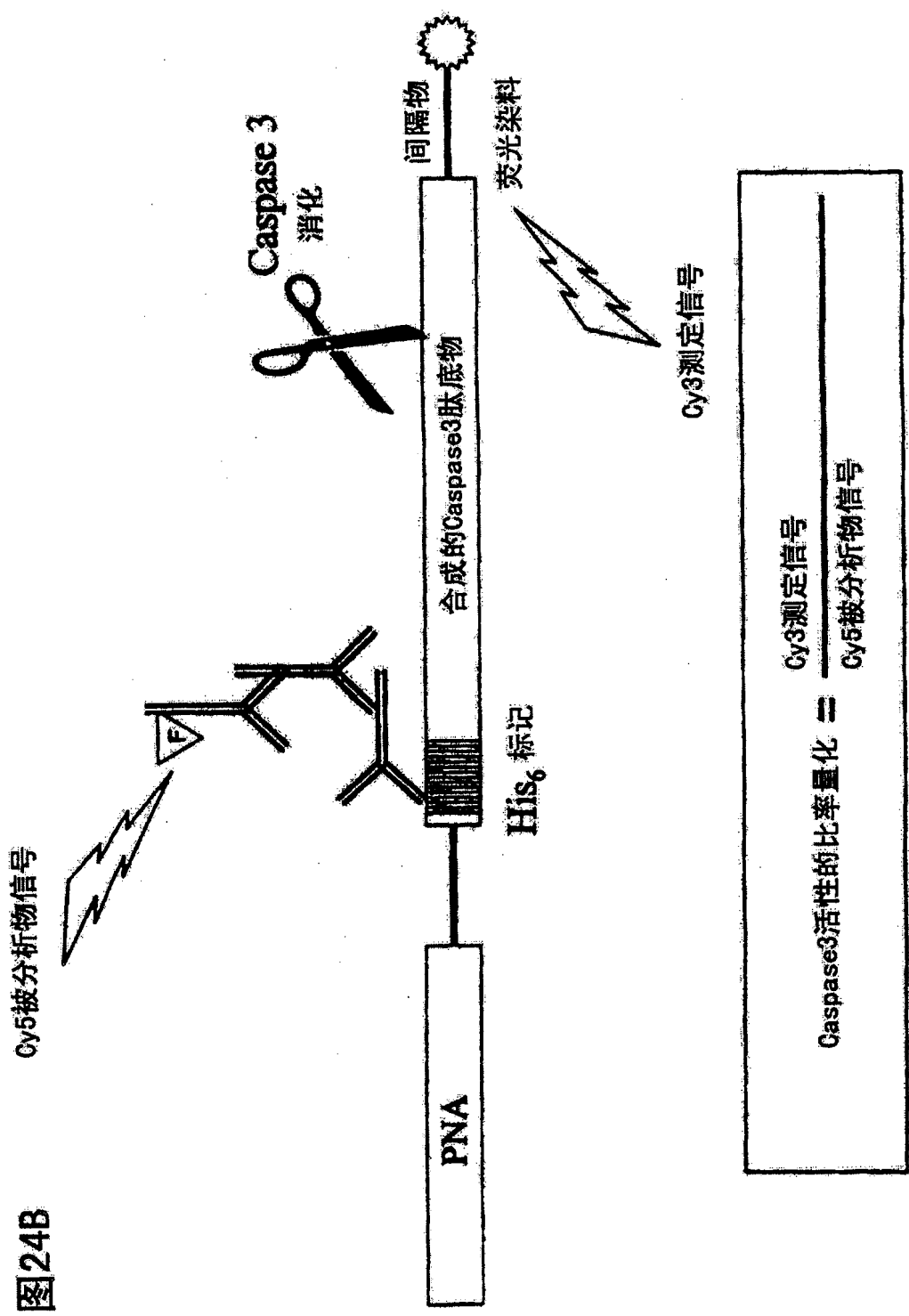
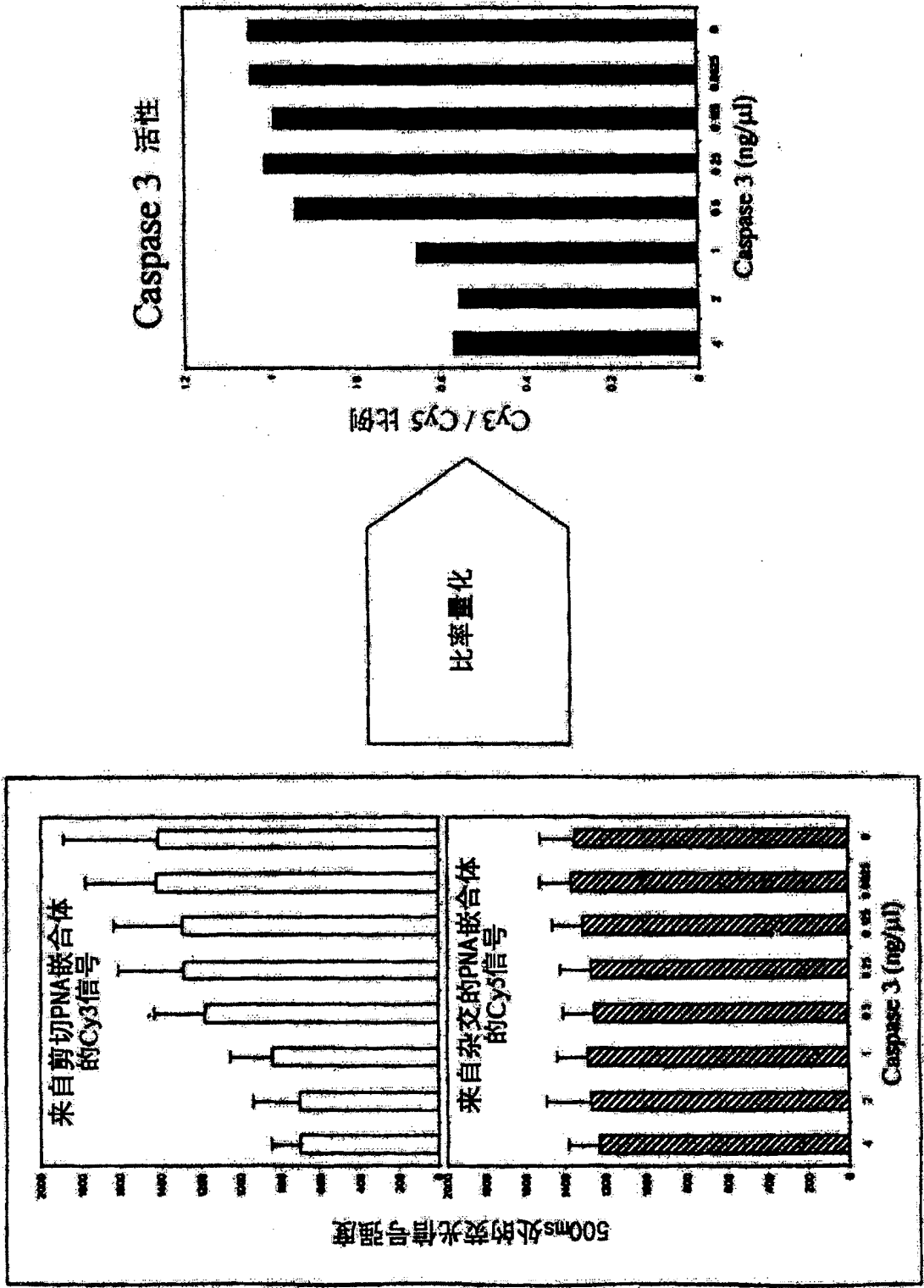
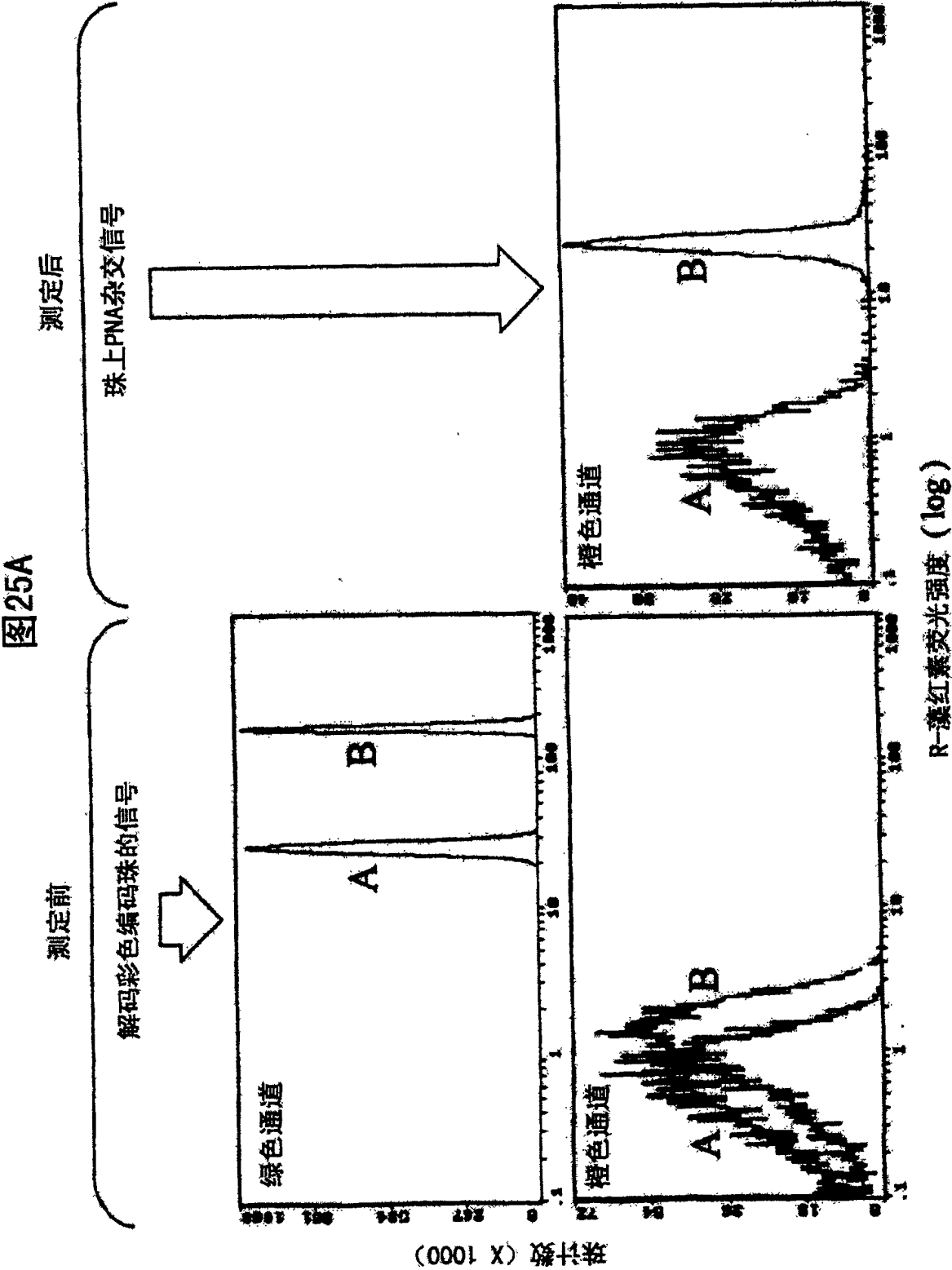


图24C





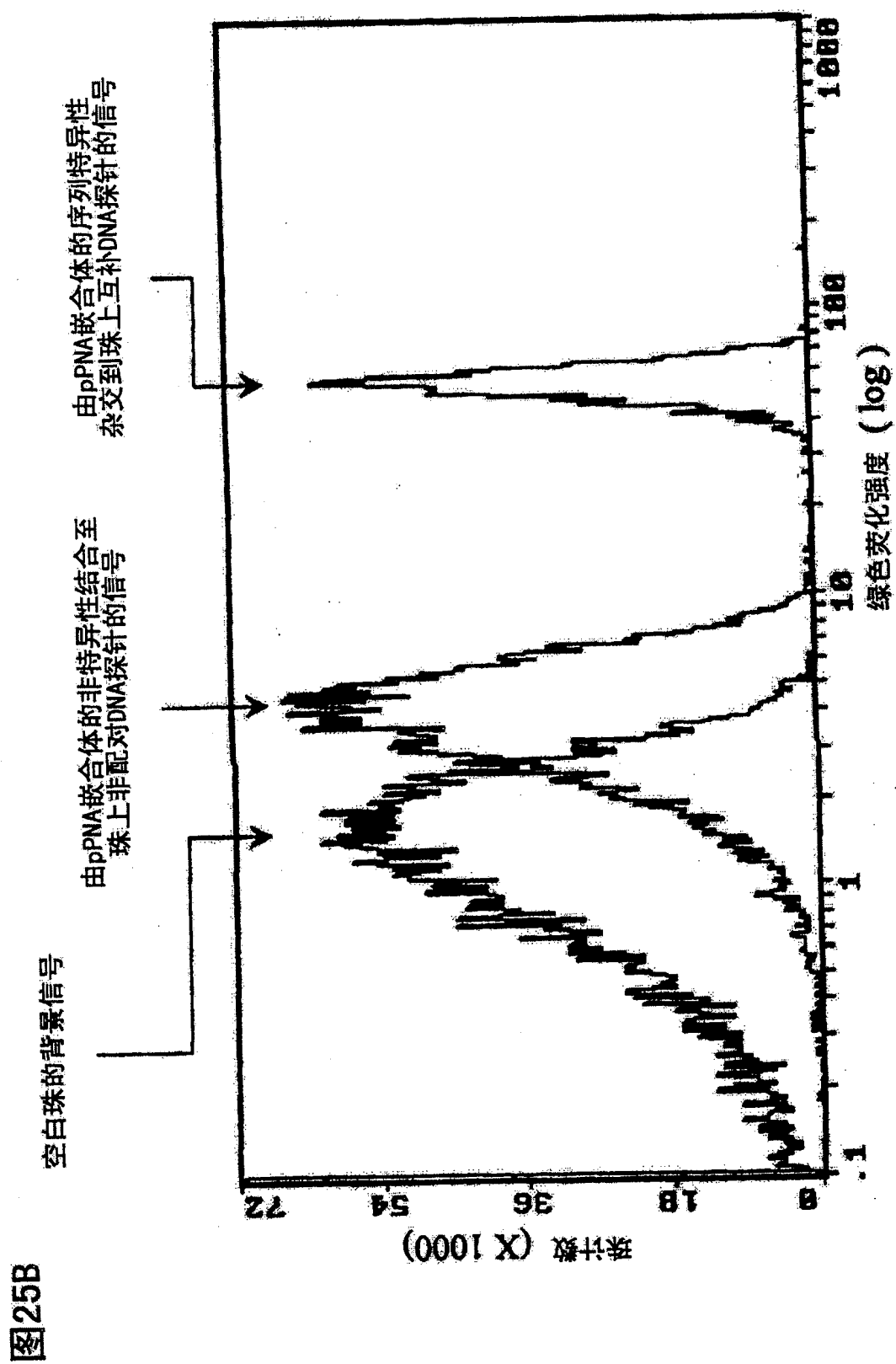
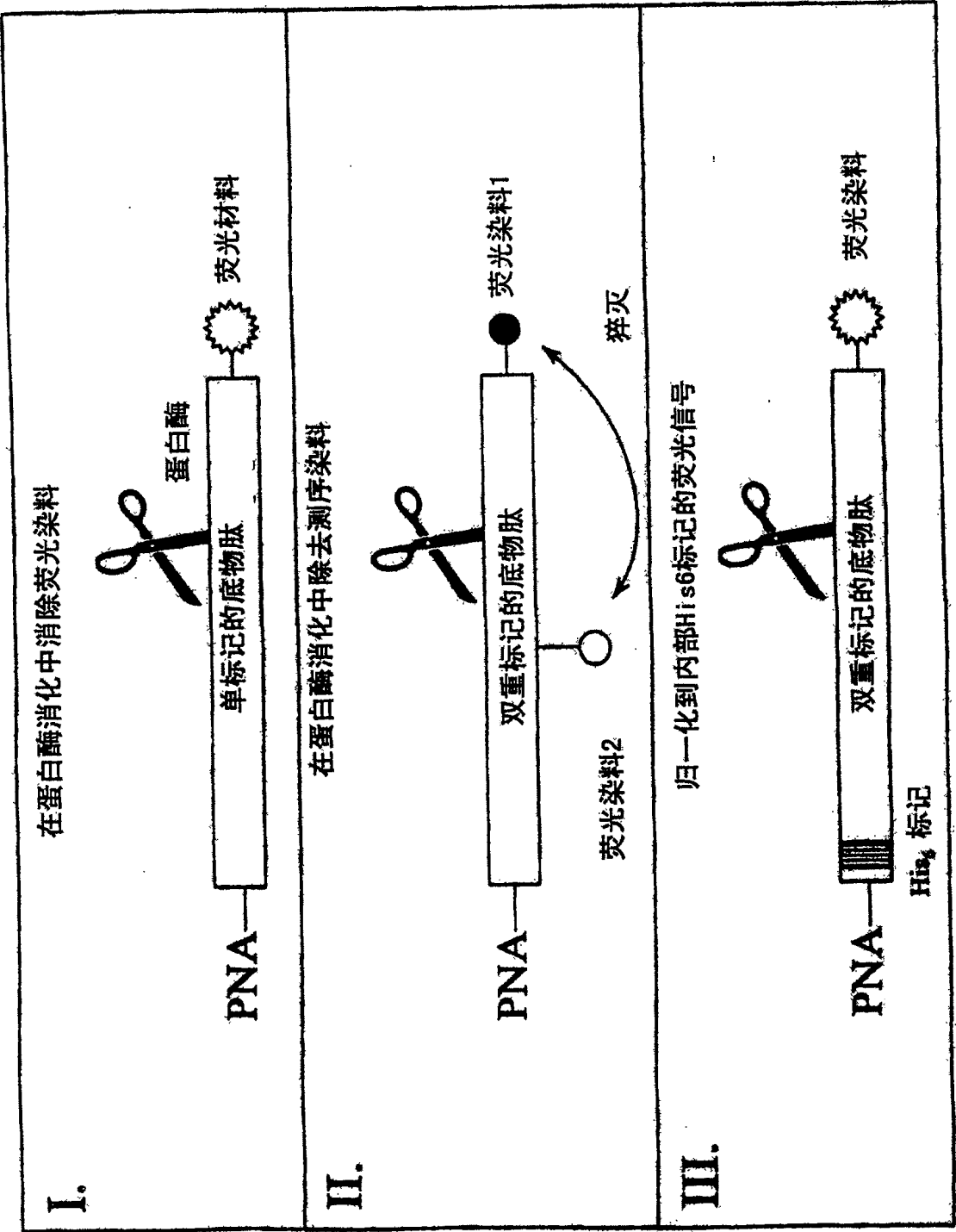


图26



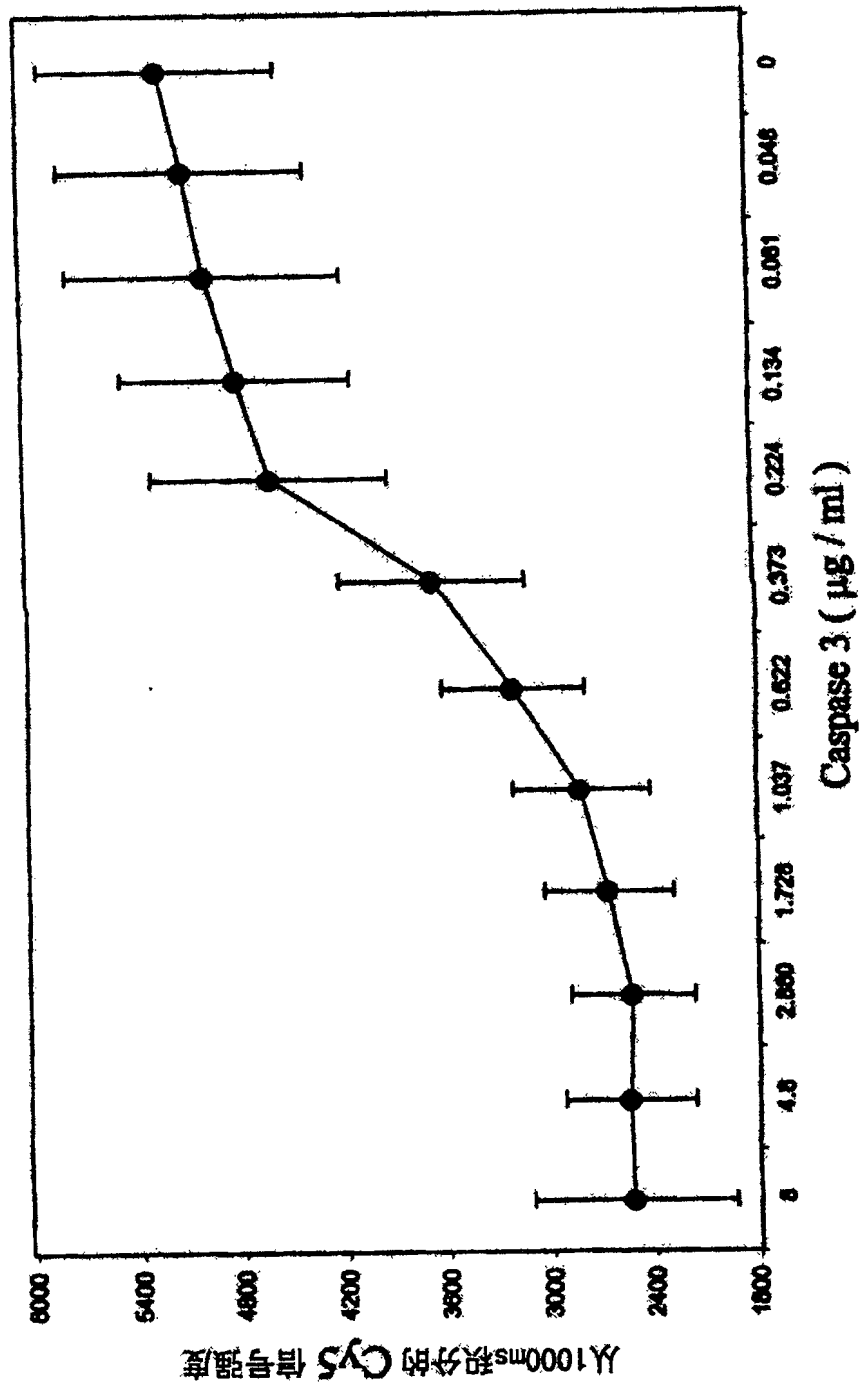
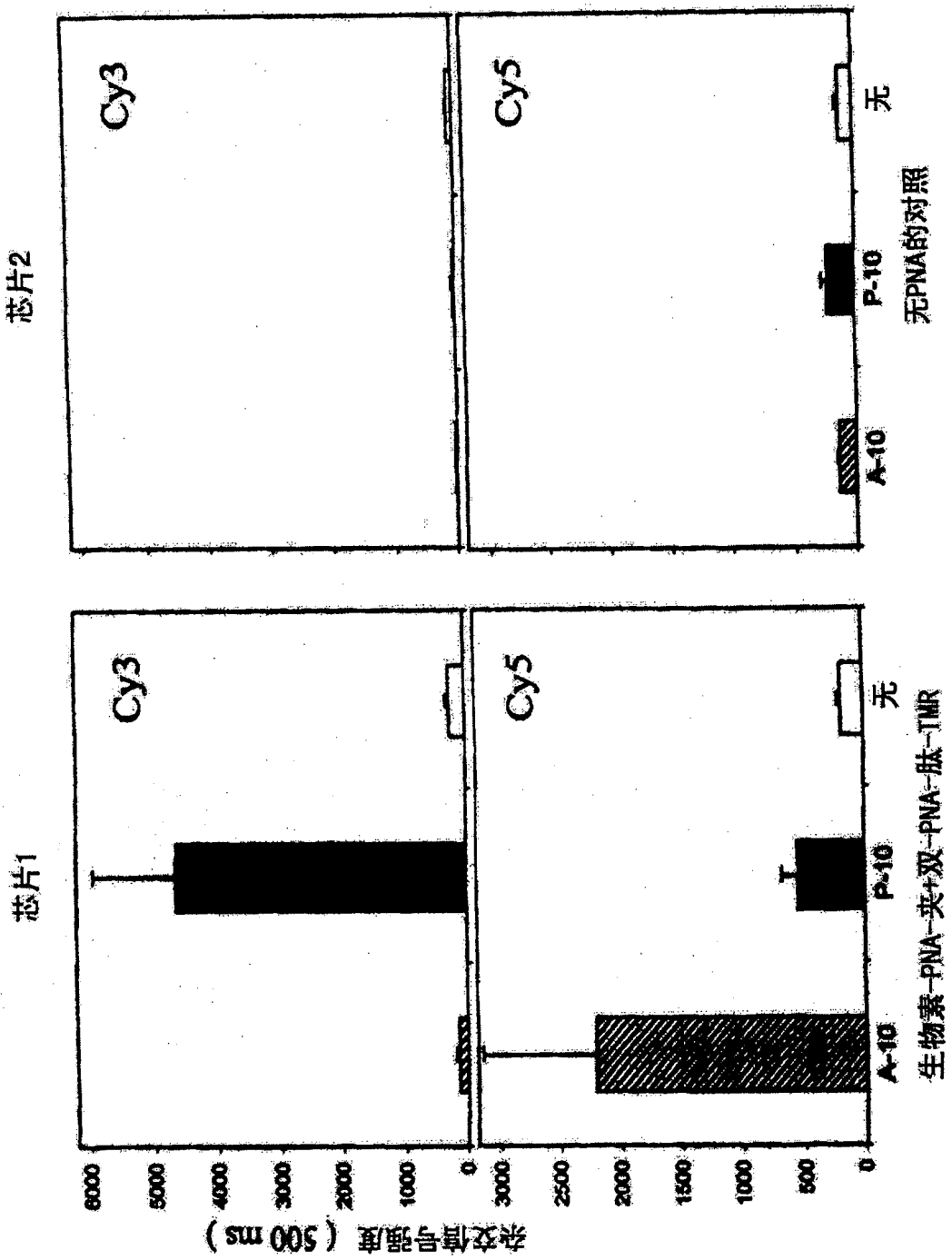


图27

图28



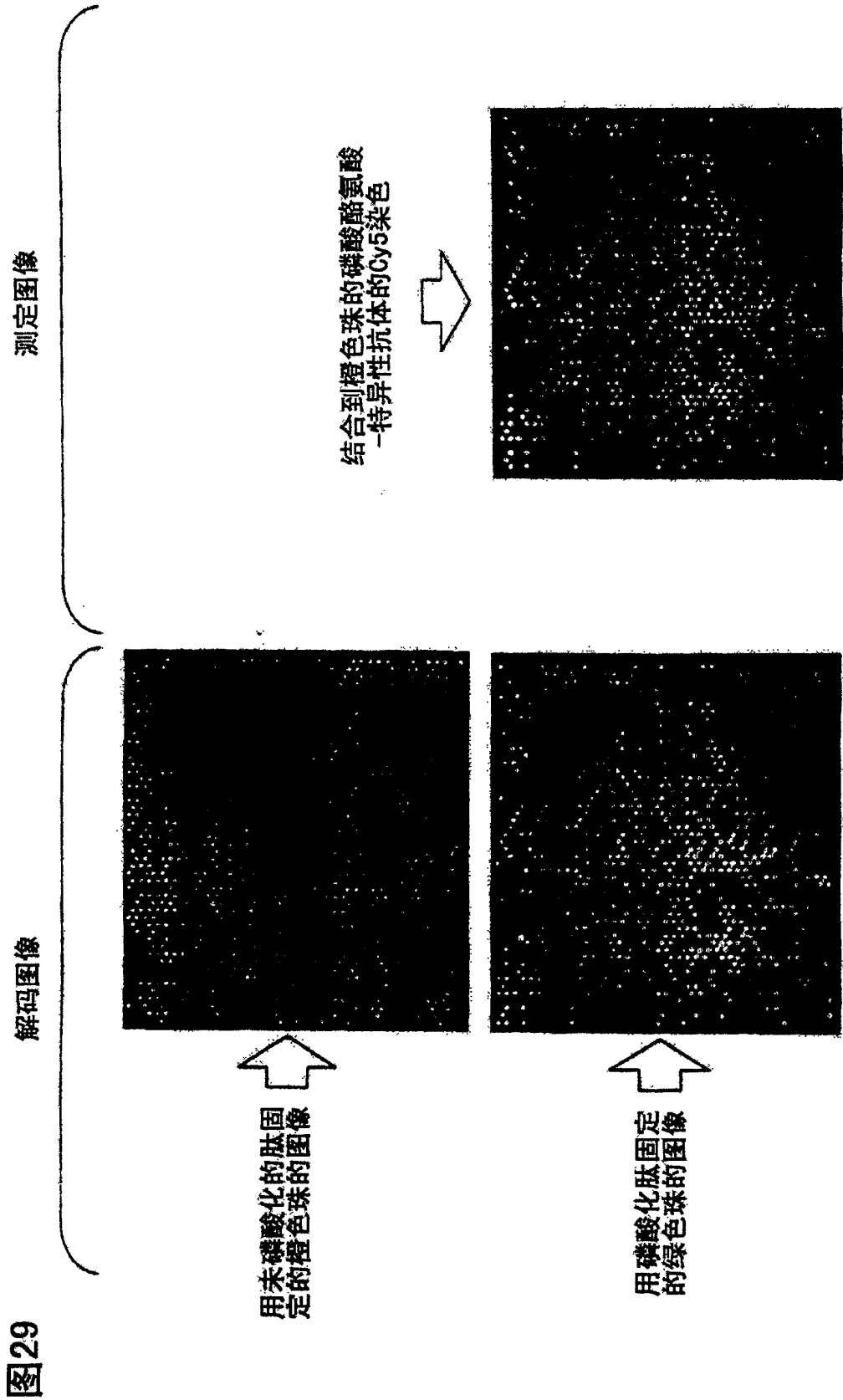
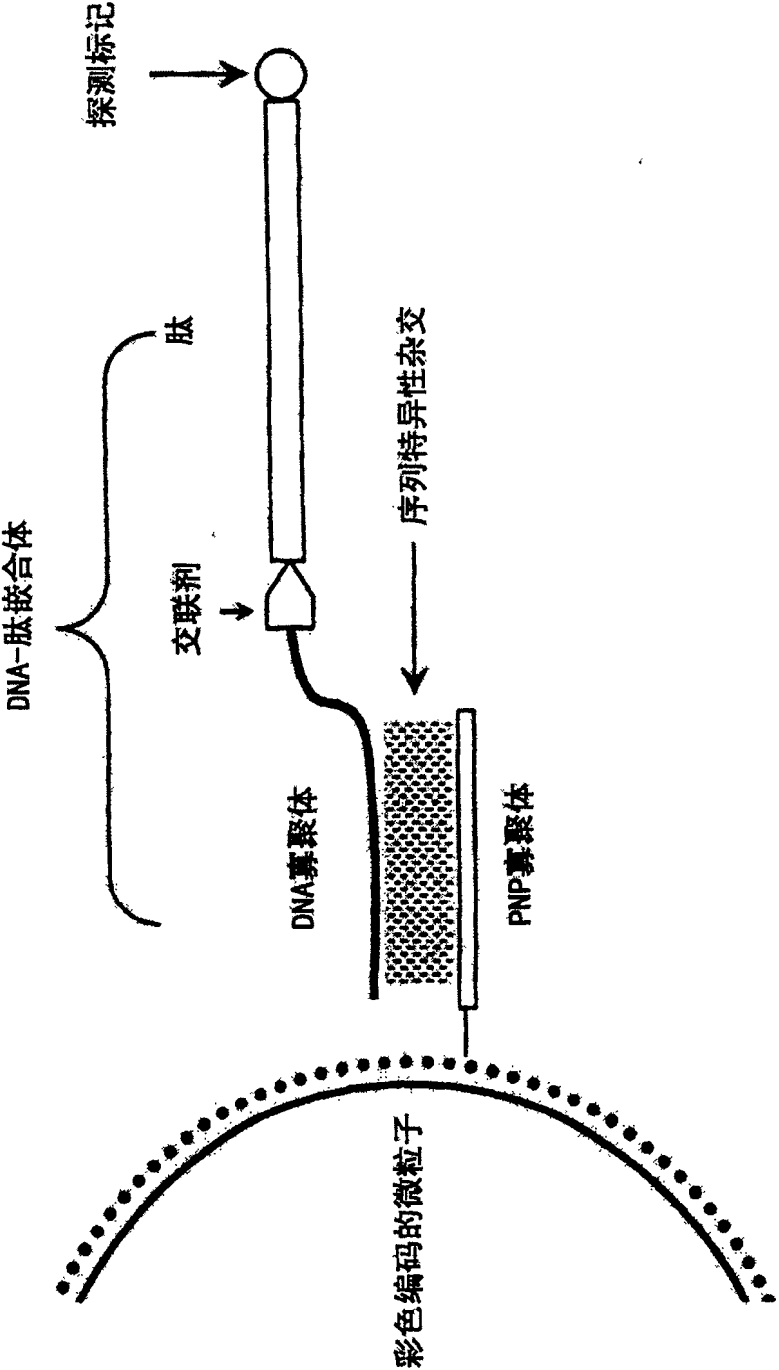


图30A



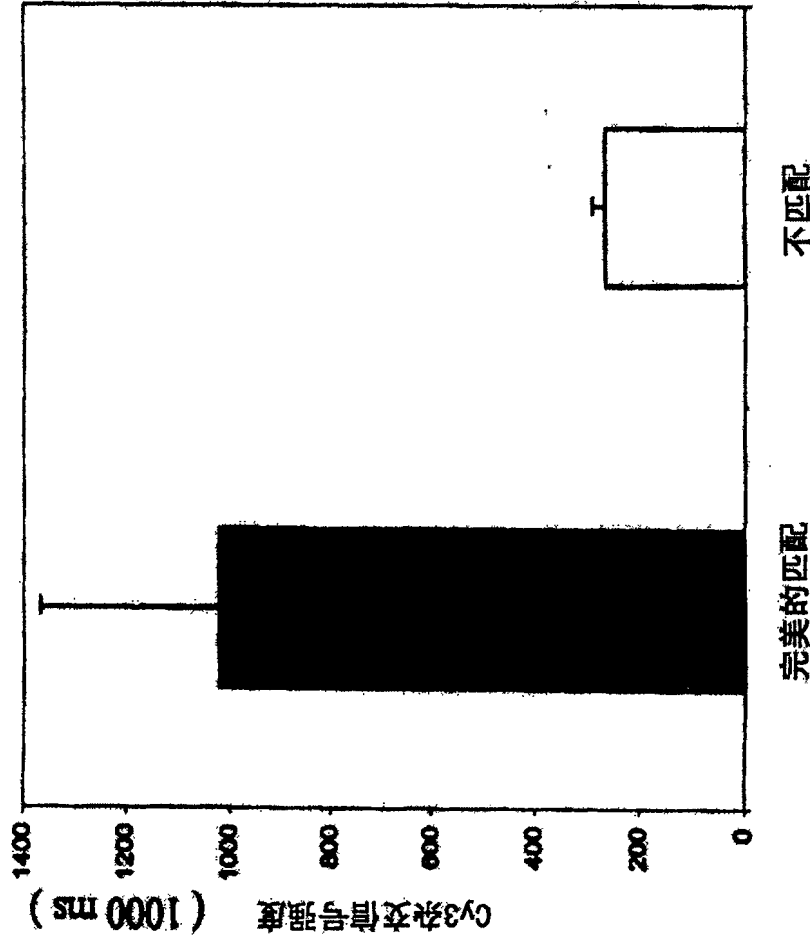
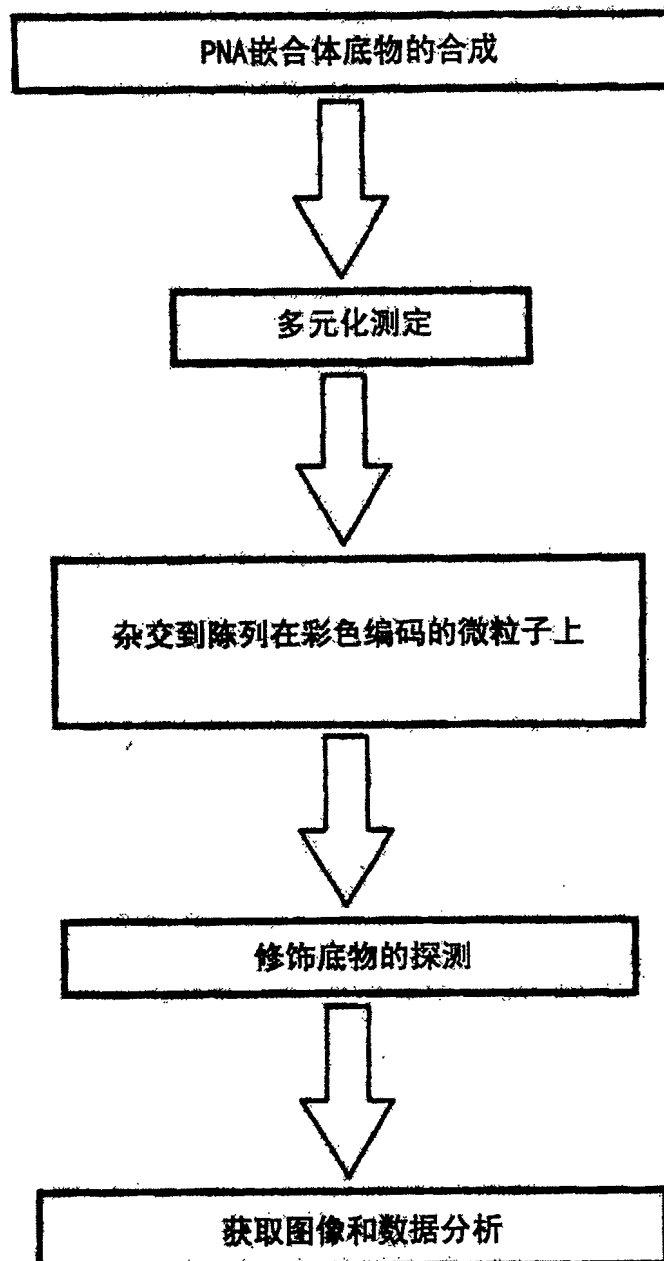
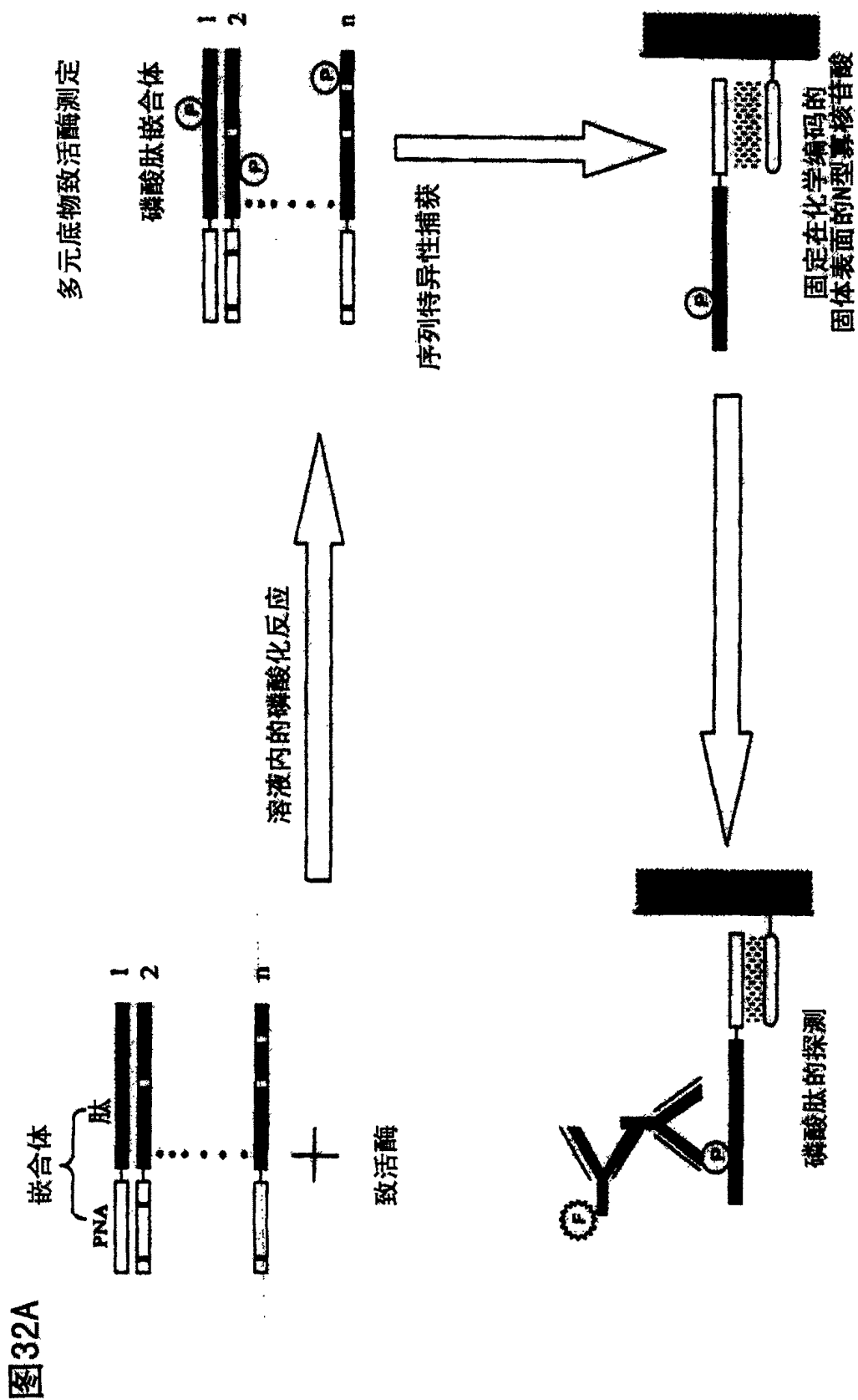
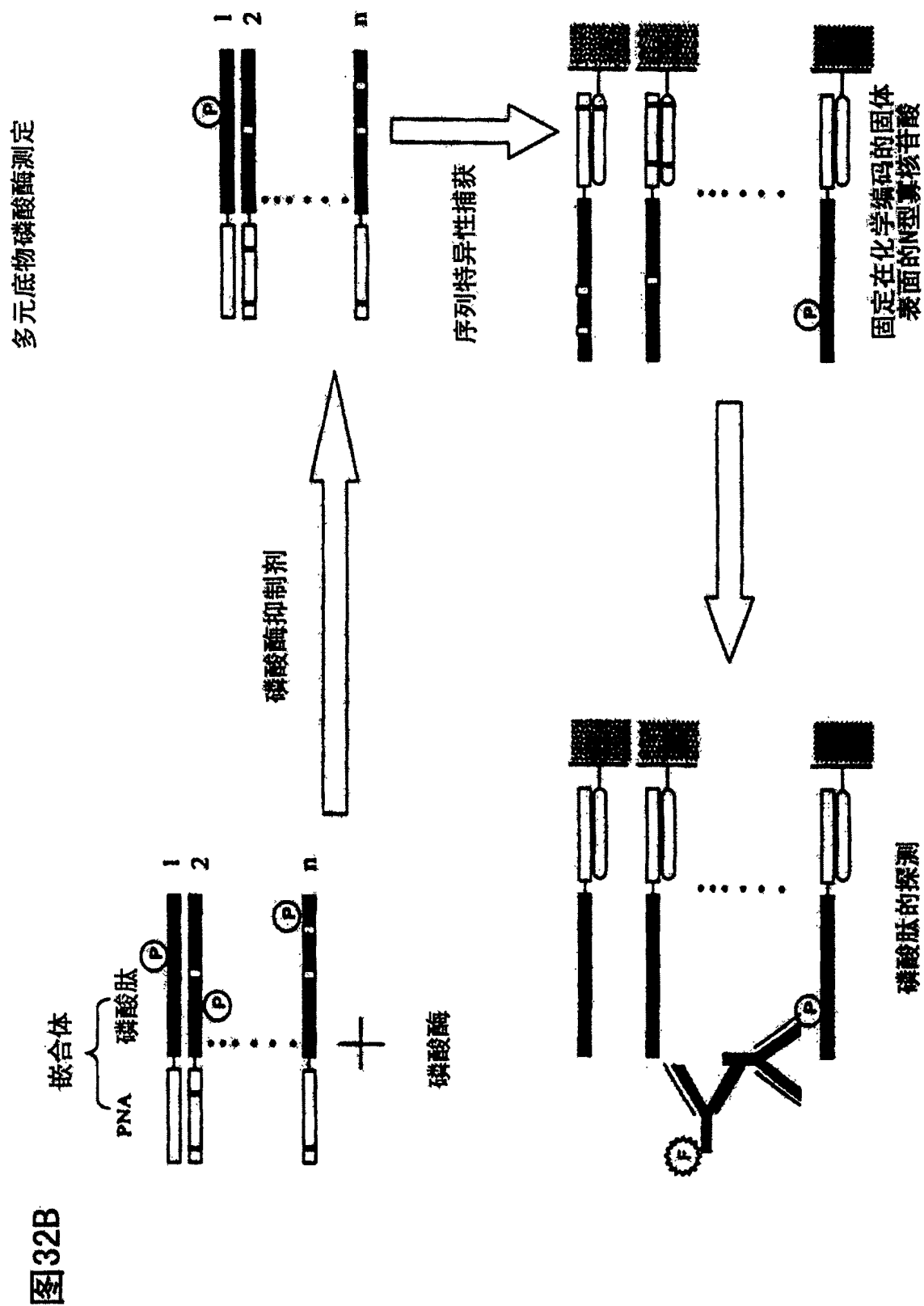


图30B

图31







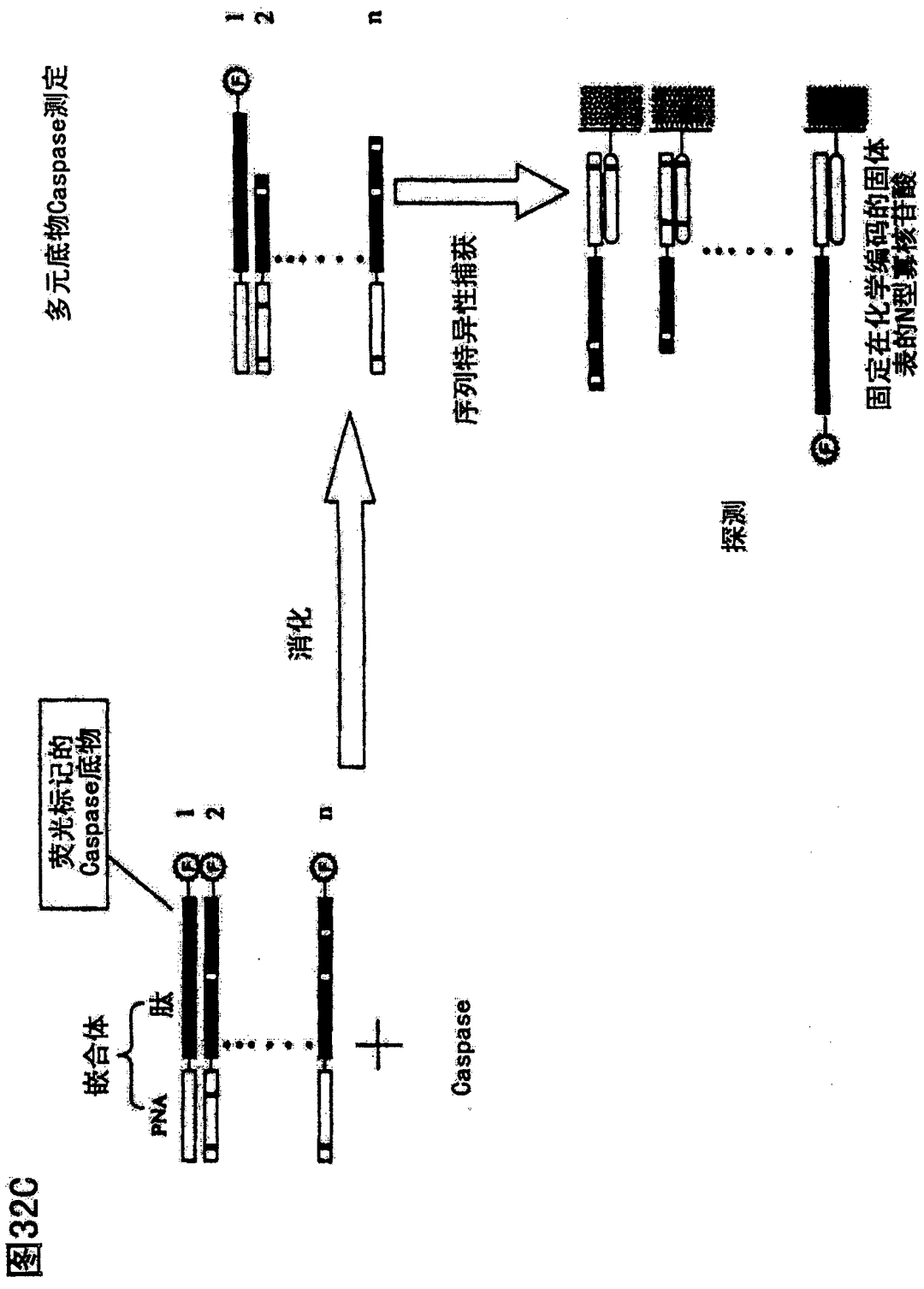


图32C

图32D

