

[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 200680038325.2

[51] Int. Cl.
C12Q 1/00 (2006.01)
C12Q 1/34 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

[43] 公开日 2008 年 10 月 15 日

[11] 公开号 CN 101287842A

[22] 申请日 2006.8.14
[21] 申请号 200680038325.2
[30] 优先权
 [32] 2005. 8. 17 [33] US [31] 60/708,767
[86] 国际申请 PCT/IL2006/000941 2006.8.14
[87] 国际公布 WO2007/020632 英 2007.2.22
[85] 进入国家阶段日期 2008.4.14
[71] 申请人 耶达研究及发展有限公司
 地址 以色列雷霍沃特
[72] 发明人 D·S·托菲克 O·赫桑斯基

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
 代理人 刘冬 刘玥

权利要求书 3 页 说明书 32 页 附图 3 页

[54] 发明名称

用于测定生物活性血清对氧磷酶水平的方法和组合物

[57] 摘要

本发明提供测定生物活性 PON 酶水平的方法。该方法包括测定 PON 酶的内酯酶活性，内酯酶活性是生物活性 PON 酶水平的指标。本发明还提供新的化合物，可用于测定酶的内酯酶活性。

1. 一种测定生物活性 PON 酶水平的方法，该方法包括测定 PON 酶的内酯酶活性，所述内酯酶活性是生物活性 PON 酶水平的指标。
2. 一种测定受治疗者的 PON 状况的方法，该方法包括：
 - (a) 测定受治疗者的 PON 酶的内酯酶活性水平，所述内酯酶活性是受治疗者的生物活性 PON 水平的指标；和
 - (b) 对所述受治疗者的 PON 酶进行基因分型，从而测定受治疗者的 PON 状况。
3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述 PON 酶选自 PON1、PON2 和 PON3。
4. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述生物活性 PON 酶包括脱脂载脂蛋白结合的 PON 酶。
5. 权利要求 1 或 2 的方法，其中测定 PON 酶的内酯酶活性是通过以下方法实施的：
 - (i) 层析分析法；
 - (ii) pH 指示剂测定法；
 - (iii) 分光光度测定法；
 - (iv) 偶联测定法；
 - (v) 电化学测定法；和/或
 - (vi) 量热测定法。
6. 权利要求 5 的方法，其中所述分光光度测定法是在包含至少一种内酯并且能够在所述内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的底物存在下进行的。
7. 权利要求 5 的方法，其中所述分光光度测定法选自磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法。
8. 权利要求 6 的方法，其中所述可检测部分与所述内酯连接。
9. 权利要求 6 的方法，其中所述可检测部分形成所述内酯部分。

10. 权利要求 6 的方法,其中所述可检测部分包含至少一种硫醇。
11. 权利要求 10 的方法,其中所述底物包含与所述内酯连接的硫代烷氧基。
12. 权利要求 11 的方法,其中所述硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。
13. 权利要求 10 的方法,其中所述检测是通过显色测定法或荧光测定法实施的。
14. 权利要求 6 的方法,其中所述底物包括 5、6 或 7 元内酯,具有与所述内酯杂原子相邻的碳连接的硫代烷氧基。
15. 一种测定样品中内酯酶活性的方法,该方法包括:
 - (a) 使样品与含有至少一种内酯并且能够在所述内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的化合物接触,其中对所述可检测部分进行选择,使所述化合物具有与所述内酯酶底物基本相同的结构;和
 - (b) 用分光光度法测定所述部分的水平,从而测定样品中内酯酶的活性。
16. 权利要求 15 的方法,其中测定所述部分的水平是通过以下方法实施的:磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法。
17. 权利要求 15 的方法,其中所述可检测部分与所述内酯连接。
18. 权利要求 15 的方法,其中所述可检测部分形成所述内酯部分。
19. 权利要求 15 的方法,其中所述可检测部分包含至少一种硫醇。
20. 权利要求 19 的方法,其中所述底物包含与所述内酯连接的硫代烷氧基。
21. 权利要求 20 的方法,其中所述硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。

22. 权利要求 19 的方法，其中所述检测是通过显色测定法实施的。

23. 一种试剂盒，所述试剂盒用于测定受治疗者的体质或者诊断与受治疗者的 PON 酶水平或活性异常相关的疾病，所述试剂盒包括至少一种能够测定 PON 酶的内酯酶活性的试剂。

24. 权利要求 23 的试剂盒，其中所述至少一种试剂是包含至少一种内酯并且能够在所述内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的化合物。

25. 一种化合物，所述化合物包含至少一种内酯并且能够在所述内酯分解时形成至少一种分光光度法可检测的含硫醇部分。

26. 权利要求 25 的化合物，其中所述含硫醇部分是能通过选自以下的分光光度测定法检测的：磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法。

27. 权利要求 25 的化合物，其中所述可检测部分与所述内酯连接。

28. 权利要求 25 的化合物，其中所述可检测部分形成所述内酯部分。

29. 权利要求 26 的化合物，其中所述可检测部分包含硫代烷氧基。

30. 权利要求 29 的化合物，其中所述硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。

31. 权利要求 27 的化合物，其中所述内酯是 5、6 或 7 元内酯。

32. 权利要求 27 的化合物，其中所述内酯是 5 元内酯。

用于测定生物活性血清对氧磷酶水平的的方法和组合物

发明领域和发明背景

本发明涉及生化诊断，更详细地讲，涉及用于测定生物活性血清对氧磷酶(PON) (例如 PON1)水平的的方法和组合物。

血清对氧磷酶(PON1)是被称为 PON 酶的大家族中最常见的成员。PON1 是 HDL 相关酶，具有抗动脉粥样硬化性质及水解例如酯、有机磷酸酯(例如对氧磷)和内酯等多种底物的解毒性质。长期以来，PON1 被认为是芳基酯酶和对氧磷酶，并因此来测定它的活性。然而，最近越来越清楚的是，PON1 主要是既催化多种内酯水解^[1,2]又催化其形成^[3]的内酯酶。结构-反应性研究^[4]和实验室进化实验^[5]表明 PON1 的天然活性是内酯酶，而对氧磷酶和芳基酯酶的活性是无选择性的。PON1 的活化研究(通过与携带 ApoA-I 的 HDL 颗粒结合)表明，对内酯底物，特别是亲脂性内酯的特异性高^[6]。决定性的是，内酯酶活性是 PON 家族所有成员都共有的唯一活性，该家族某些成员不具有对氧磷酶或芳基酯酶活性^[2]。

人血清中 PON1 的活性是许多研究的课题，这些研究着重 PON1 多态性之间可能的联系、调节其活性的各种环境因素和对动脉粥样硬化和其它疾病的易感性^[7]。然而，现有的测定法却使用生理上没有关系的乙酸苯酯或对氧磷。比较相关的测定法必需强调内酯酶活性。用脂族内酯测定内酯酶活性的现有方法以 pH 指示剂^[1, 4]和 HPLC^[2, 3]为基础。后者十分费力，而 pH 指示剂测定法又需要重复校准，只有用纯酶样品在其 pH 和缓冲液规格可受到严格控制时才能得到精确的结果。

近来，Sicard 及同事^[9]开发出使用 6 元和 7 元被伞形酮取代的环内酯的基于荧光的内酯酶测定法。然而，这些底物明显不同于包含具

有长烷基侧链的5元环氧代内酯的良好PON1底物^[2,4,6]。这些底物在最适于PON1的pH(8.0-8.5)下还显示出高的本底速度。

因此,普遍认为需要无上述限制的内酯酶活性的新测定法,获得这种测定法也将是十分有利的。

发明概述

本发明一方面提供生物活性PON酶水平的测定方法,该方法包括测定PON酶的内酯酶活性,内酯酶活性是生物活性PON酶水平的指标。

本发明另一方面提供测定受治疗者PON状况的方法,该方法包括:(a)测定受治疗者的PON酶的内酯酶活性水平,内酯酶活性是受治疗者的生物活性PON水平的指标;和(b)对受治疗者的PON酶进行基因分型,从而测定受治疗者的PON状况。

根据所述优选实施方案的又一个特征,PON酶选自PON1、PON2和PON3。

根据所述优选实施方案的又一个特征,生物活性PON酶包括脱脂载脂蛋白结合的PON酶。

根据所述优选实施方案的又一个特征,测定PON酶的内酯酶活性是通过以下方法实施的:

- (i) 层析分析法;
- (ii) pH指示剂测定法;
- (iii) 分光光度测定法;
- (iv) 偶联测定法;
- (v) 电化学测定法;和/或
- (vi) 量热测定法(thermo-calometric assay)。

根据所述优选实施方案的又一个特征,在包含至少一种内酯并且能够在内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的底物存在下,实施分光光度测定法。

根据所述优选实施方案的又一个特征，分光光度测定法选自磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法 (illuminiscence assay)。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分与内酯连接。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分形成内酯的一部分。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分包含至少一种硫醇。

根据所述优选实施方案的又一个特征，底物包含与内酯连接的硫代烷氧基。

根据所述优选实施方案的又一个特征，硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。

根据所述优选实施方案的又一个特征，检测是通过显色测定法或荧光测定法实施的。

根据所述优选实施方案的又一个特征，底物包括 5、6 或 7 元内酯，具有与内酯杂原子相邻的碳连接的硫代烷氧基。

本发明又一方面提供样品中内酯酶活性的测定方法，该方法包括：(a)使样品与含有至少一种内酯并且能够在内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的化合物接触，其中对可检测部分进行选择，使得化合物具有与内酯酶底物基本相同的结构；和(b)用分光光度法测定此部分的水平，从而测定样品中内酯酶的活性。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分的水平测定是通过磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法实施的。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分与内酯连接。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分形成内酯的一部分。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分包含至少一种

硫醇。

根据所述优选实施方案的又一个特征，底物包含与内酯连接的硫代烷氧基。

根据所述优选实施方案的又一个特征，硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。

根据所述优选实施方案的又一个特征，检测是通过显色测定法实施的。

本发明再一方面提供用于测定受治疗者的体质(predisposition)或者诊断与受治疗者的 PON 酶水平或活性异常相关疾病的试剂盒，该试剂盒包括至少一种能够测定 PON 酶的内酯酶活性的试剂。

根据所述优选实施方案的又一个特征，至少一种试剂是包含至少一种内酯并且能够在内酯水解时形成至少一种分光光度法可检测部分的化合物。

本发明另外一方面提供包含至少一种内酯并且能够在内酯分解时形成至少一种分光光度法可检测的含硫醇部分的化合物。

根据所述优选实施方案的又一个特征，含硫醇部分是通过选自以下的分光光度测定法检测的：磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分与内酯连接。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分形成内酯的一部分。

根据所述优选实施方案的又一个特征，可检测部分包含硫代烷氧基。

根据所述优选实施方案的又一个特征，硫代烷氧基含有 2-12 个碳原子。

根据所述优选实施方案的又一个特征，内酯是 5、6 或 7 元内酯。

根据所述优选实施方案的又一个特征，内酯是 5 元内酯。

本发明通过提供用于测定生物活性血清对氧磷酶水平的方法和

组合物，成功地克服了现有已知的测定格局的缺点。

除非另有规定，否则所有本文所用科技术语都具有本发明所属领域普通技术人员通常理解的含义。尽管在实践当中或在本发明检验中，可以使用类似于或等同于本文所述的方法和材料，但是合适的方法和材料记述如下。万一发生抵触，则以本专利说明书(包括定义)为准。另外，所述材料、方法和实施例仅是示例性的，而不是限制性的。

附图简述

本文仅通过实施例并参考附图描述本发明。现在具体地参考附图细节，须强调的是，所给出的细节仅仅作为实例，是为了说明性地论述本发明的优选实施方案，并且所提供的这些详细资料是为了提供我们认为是对本发明的原理和构思方面最有用和最易理解的描述。在这点上，我们没有试图以比基本理解本发明所必需的更为详细的方式来描述本发明的结构细节，附图中的说明，使本领域技术人员了解本发明的几种形式如何具体体现在实施中。

附图中：

图 1a-b 是表示 PON1 内酯酶活性的比色测定(图 1a)和荧光测定(图 1b)的曲线图。图 1a - 0.2mM TBBL 与 0.5mM DTNB，在 PON1 存在(8.375×10^{-9} M; 实心方块)或不在(空心圆)时，在 412nm 下通过吸光度进行监测。图 1b - 0.25mM TBBL 与 50 μ M CPM，在 PON1 存在(8.375×10^{-9} M; 实心方块)或不存在(空心圆)时，在 400nm 激发和 516nm 发射下进行检测。

图 2a-b 是表示人血清中 PON1 的内酯酶(图 2a)和芳基酯酶(图 2b)活性的曲线图。将血清用 Tris (pH 8.0)稀释(1:400)，反应物包括：图 2a - 0.5mM TBBL 和 0.5mM DTNB；图 2b - 1.0mM 乙酸苯酯。所显示的是以下情况下所观测到的反应速率：无抑制剂(实心圆)、100 μ M 2-羟基喹啉(空心圆)、或 5mM EDTA (实心三角)和无血清的本底水解(空心方块)。用 DTNB 检测 TBBL 的水解，在 412nm 下通过吸光度进行

监测(图 2a)。通过 270nm 下的吸光度直接监测乙酸苯酯的水解(图 2b)。

图 3 是曲线图,表示在表达 PON1 的大肠杆菌(*E. coli*)中,用硫代烷基丁内酯底物(TBBL)和水包油包水乳剂,通过 FACS 分析测定的 PON1 内酯酶活性。使在细胞质中表达 rePON1 的细胞与 TBBL 和硫醇检测染料 CPM 一起乳化。所表示的是表达 GFP 和 PON1 的单个细胞(白色)和仅 GFP 的对照细胞(灰色)在 530nm 下荧光发射的代表性曲线图(硫醇-CPM 加和物)。

优选实施方案的详细描述

本发明涉及用于测定生物活性内酯酶水平,更准确地说是血清对氧磷酶水平的方法和组合物,还涉及一类新的合成底物和制备该底物的方法。

参照附图和附图说明,可以更好地理解本发明的原理和操作。

在详细说明本发明至少一个实施方案之前,应该了解本发明在其应用以下说明书或实施例中所述细节时并无限制。本发明可能有其它实施方案,或者能够以各种方式实施或实现。同样,应当理解本文所用措辞和术语是为了说明目的,不应视为限制。

对氧磷酶 1 (PON1)是还包括 PON2 和 PON3 在内的蛋白质家族的一员。PON1 是 HDL 相关酶,具有抗动脉粥样化性质及水解例如酯、有机磷酸酯(例如对氧磷)和内酯等多种底物的解毒性质。长期以来,PON1 被认为是芳基酯酶和对氧磷酶,并因此来测定它的活性。然而,近来越来越清楚的是,PON1 主要是既催化多种内酯水解又催化其形成的内酯酶。结构-反应性研究和实验室进化实验表明 PON1 的天然活性是内酯酶,对氧磷酶和芳基酯酶的活性则是无选择性的。

当前通常认为,正是 PON1 使有毒的有机磷酸(包括酯和盐)降解并促使氧化脂质代谢的催化效率,决定了由 PON1 针对生理毒素或异生毒素(xenobiotic toxin) (即并非身体或活的生物所原有的化合物)所提供的保护程度。另外,较高浓度的 PON1 提供更好的保护。

因此，对于适度的风险评价，重要的是了解 PON 的水平和活性。

虽然如上所述，最近发现了 PON 的内酯酶活性，但是却没有提出用于真实评价生物活性 PON 的 PON 内酯酶活性的分析法。

在将本发明付诸实施时，本发明的发明人发现测定 PON 的内酯酶活性可以用于确定生物活性 PON 在个体中的水平。这些发现可有助于对与 PON 活性或水平不足有关的许多疾病(例如动脉粥样硬化)进行正确的风险评价。

因此，本发明一方面，提供测定生物活性 PON 酶水平的方法。

本文所用术语“PON 酶”是指对氧磷酶(例如哺乳动物对氧磷酶)，例如人 PON1 (GenBank 检索号 NP_000437.3)、人 PON2 (GenBank 检索号 NP_000296.1)和人 PON3 (GenBank 检索号 NP_000931.1)。

本文所用术语“生物活性 PON 酶”是指参与生物(例如生理)活动(例如氧化脂质的水解)的 PON 酶部分。

例如，生物活性 PON 酶可指与各种脱脂载脂蛋白颗粒(例如 HDL-apoA-I)缔合的 PON 酶部分。最近已经明确与 apoA-IV 和 apoA-II 相比，与 apoA-I 缔合的 PON 酶能够刺激较高的 PON 内酯酶活性[参见 Gaidukov 和 Tawfik (2005) *Biochemistry*, 待发表]。

优选本发明的 PON 酶存在于来自动物受治疗者(例如人)的生物样品中，例如下面的进一步描述。

本发明这一方面的方法是通过测定 PON 酶的内酯酶活性进行的，这种内酯酶活性是生物活性 PON 酶水平的指标。

本文所用术语“内酯酶活性”是指内酯水解活性，根据本发明这一方面，这通常是指内酯酯键的水解。

测定酶的内酯酶活性的方法是本领域众所周知的。这些方法一般通过已知的生化测定实施，例如层析测定法(例如 HPLC、TLC、GC、CPE)、pH 指示剂测定法、偶联测定法(即在上述测定中，加入一种不是待测酶的酶以产生可检测的产物；例如，由脱氢酶可转换羧酸产物，通过吸光度或荧光监测 NAD/NADH 或 NADP/NADPH 浓度的变化)、

量热测定法(即监测热容的变化)、电化学测定法(即监测氧化还原电位的变化)和/或分光光度测定法。

典型的酶测定法以待测酶特异性催化的化学反应为基础。化学反应通常是将底物或其类似物转化成产物。测定微小变化水平即底物或产物浓度的能力,能够定性和定量测定酶活性,甚至定量测定具体底物对于待测酶的特异性。为了测定底物和/或产物水平的微小变化,这些化合物应当具有能够用化学或物理方法检测的化学和/或物理性质,例如 pH、分子量、颜色的变化或其它直接或间接可测量的化学和/或物理性质的变化。

下面是根据本发明这一方面,对能够应用的示例性内酯酶测定法进行描述。

pH 指示剂测定法 - 基于 pH 指示剂的酶测定法通常用于用脂肪族内酯测定内酯酶活性。这可采用 SPECTRAmax® PLUS 微量板读板仪(Molecular Devices, Sunnyvale, CA),用连续的 pH 敏感比色测定法(也就是测定由 pH 指示剂产生的颜色强度)进行,例如参见 Billecke 等(2000) Drug Metab. Dispos. 28:1335-1342。反应物(200 μ l 最终体积)含有 2mM HEPES (pH 8.0)、1mM CaCl₂、0.004% (重量/体积)酚红、含有稀释/未稀释 PON 的样品(例如血清样品,稀释 100-1000 倍),与 2 μ l 100mM 底物的甲醇溶液在 37 $^{\circ}$ C 下开始反应 3-10 分钟。用从已知盐酸含量所绘制的标准曲线而得出的速率因子(mOD/ μ mol H⁺),由 558nm 下吸光度斜率的降低,用 475nm (等消光点)进行校正,计算速率。内酯的自发水解和经大气 CO₂ 的酸化优选通过用相同体积的保存缓冲液替换酶进行平行反应予以校正。

或者,可以用 pH 指示剂甲酚紫监测由羧酸形成而产生的质子释放。在 2.5mM *N*-二(羟乙基)甘氨酸缓冲液(pH 8.0-8.3,含有 1mM CaCl₂ 和 0.2M NaCl)中进行反应。反应混合物含有 0.2-0.3mM 甲酚紫(得自 60mM 溶于 DMSO 的母液)。在底物与酶样品混合时,监测到微量滴定板读板仪中在 577nm 下吸光度降低。该测定法需要原位用乙酸(标

准酸滴定曲线)进行标准曲线校正, 该标准曲线给出速率因子(-OD/摩尔 H^+)。

HPLC 分析 - 各种内酯底物的水解可用 HPLC 分析法检测。因此例如, 酰基高丝氨酸内酯(AHL)的水解可以通过 HPLC 进行分析(例如配备设置为 197nm 的 Waters 2996 二极管阵列检测器 Waters 2695 系统, 采用 Supelco Discovery C-18 柱(250 x 4.6mm, 5 μ m 颗粒)。体积为 50 μ l 的 25mM Tris-HCl (pH 7.4)、1mM $CaCl_2$ 、25 μ M AHL (例如得自 2mM 溶于甲醇的母液溶液)和含有稀释/未稀释 PON 的样品(例如血清样品, 稀释 100-1000 倍)中, 在室温下进行酶反应。用 50 μ l 乙腈(ACN)停止反应, 离心除去蛋白质。将上清液(40 μ l)加到 HPLC 系统中, 用 85% CAN/0.2% 乙酸(十四高丝氨酸内酯)、0.75% CAN/0.2% 乙酸(十二高丝氨酸内酯)、50% CAN/2% 乙酸(七高丝氨酸内酯)或 20% CAN/0.2% 乙酸(3-氧代-己酰高丝氨酸内酯)等度洗脱。

他汀内酯类(statin lactones) (美伐他汀、洛伐他汀和辛伐他汀)的水解可用高效液相层析(HPLC)进行分析, 例如用 Beckman System Gold HPLC, 配有 126 型可编程溶剂模块(Programmable Solvent Module)、设置为 238nm 的 168 型二极管阵列检测器、带有 20 μ l 环路(loop)的 7125 型 Rheodyne 手动注射阀和 Beckman ODS Ultrasphere 柱(C 18, 250 x 4.6mm, 5 μ m)。可向 Merck 公司购买洛伐他汀(Mevacor)和辛伐他汀 20mg 片剂, 从中用氯仿萃取内酯, 蒸发至干, 再溶于甲醇。美伐他汀可购自 Sigma 公司。

在 25 $^{\circ}C$ 下, 以 1ml 终体积, 将 10-200 μ l 酶溶液和 10 μ l 底物的甲醇溶液(0.5mg/ml)与 50mM Tris/HCl (pH 7.6)、1mM $CaCl_2$ 一起温育。按规定时间取出等分量(100 μ l), 加到乙腈(100 μ l)中, 涡旋混合, 以最高速度离心 1 分钟(Beckman microfuge)。将上清液倒入新的管中, 加盖, 冰浴中保存直到进行 HPLC 分析。

以 1.0ml/分钟的流速, 用由下列成分组成的流动相, 对样品进行等度洗脱: A=乙酸/乙腈/水(2:249:249, 体积/体积/体积), B=乙腈, 对

于美伐他汀、洛伐他汀和辛伐他汀，A/B 比分别为 50/50、45/55 和 40/60。

分光光度测定法 - 在这些测定法中，可以根据在酶催化过程中形成的分光光度法可检测部分浓度的变化，测定底物的消耗和/或产物的形成。分光光度测定法的实例包括但不限于磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法。

磷光测定法监测在吸收辐射能或其它类型的能量后，由分光光度法可检测部分所产生的发光的变化。磷光不同于荧光，因为它甚至在引起磷光的辐射停止后仍然继续发光。

荧光测定法监测在由光或其它形式的电磁辐射或者由其它方式刺激或激发下，由分光光度法可检测部分所产生的发光的变化。只有当刺激持续时才会发光；在这个现象中不同于磷光，其中在其它辐射激发停止后仍然继续发光。

显色测定法监测具有特征波长的分光光度法可检测部分所产生的测定介质的颜色变化。

发光测定法监测在酶反应过程中，化学发光以及因此所产生或消耗的分光光度法可检测部分产生发光的变化。发光是物质内由较高能量状态到较低能量状态的电子运动引起的。

本发明文中所用的术语“分光光度法可检测的”是指一种物理现象，涉及波长范围介于紫外线至红外线的可测量电磁辐射的作用。可以定量测定的分光光度法可检测性质的非限制性实例是化合物的颜色、光照度和红外线和/或 UV 的具体特征。

因此，术语“分光光度法可检测部分”是指在酶测定过程中形成的、以一种或多种上述分光光度法可检测性质为特征的部分。因此，可以在酶反应测定过程中，定量测定与酶活性相关的这部分的浓度。

如上所述，内酯是 PON 酶的天然底物。因此，在上述每个测定法中，底物优选包含一个或多个内酯部分。

正如本领域所众所周知的是，术语“内酯”是指环状羧酸部分(例如

环脂),它通常是醇与羧酸酯间分子内反应的缩合产物。羧酸酯在本领域中时常是指“氧代内酯”。术语“内酯”通常也是指环状硫代羧酸部分,因此还包括硫醇基团与羧酸、醇与硫代羧酸和硫醇基团与硫代羧酸间分子内反应物的缩合产物。这类内酯在本领域中一般统称“硫代内酯”。

另外,正如本领域众所周知的是,内酯环的大小范围通常为4-8个原子。由于环张力和其它热力学原因,普通内酯环的大小范围通常为5-7个原子。这样的内酯也被视为PON酶的良好底物。

通常使用的前缀可以用来表明内酯环的大小: β -内酯是指4元环内酯, γ -内酯是指5元环内酯, δ -内酯是指6元环。

因此,本文所用术语“内酯”包括如上所述的氧代内酯和硫代内酯,在内酯环中具有4-8个原子,优选5-7个原子。内酯部分可以是取代或未取代的。如果是取代的,则在内酯环上的一个或多个碳原子可以被一个或多个取代基取代,取代基例如但不限于烷基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)或杂环基(通过环碳键合)、烷氧基、硫代烷氧基等等,这些术语的定义见下文。

本文所用术语“烷基”是指包括直链和支链基团的饱和脂族烃基。优选烷基具有1-20个碳原子。只要是数字范围,例如本文规定的“1-20”,就意味着该基团(在本案中为烷基)可含有1个碳原子、2个碳原子、3个碳原子等等,多达并包括20个碳原子。更优选该烷基是中等大小的烷基,即具有1-10个碳原子。除非另有说明,否则最优选烷基为低级烷基,即具有1-4个碳原子。烷基可以是取代或未取代的。

术语“烯基”是指由至少两个碳原子和至少一个碳-碳双键组成的烷基。

术语“环烷基”是指全碳单环或稠环(即共享相邻碳原子对的环)基团,一个或多个环不具有完全共轭的 π -电子体系。

术语“杂环基”是指在环上具有一种或多种原子(例如氮、氧和硫)的单环基或稠环基。环上还可具有一个或多个双键。然而,该环不具有完全共轭的 π -电子体系。

术语“芳基”是指具有完全共轭 π -电子体系的全碳单环或稠环多环(即共享相邻碳原子对的环)基团。

术语“杂芳基”是指在环上具有一种或多种原子(例如氮、氧和硫),并且另外具有完全共轭 π -电子体系的单环或稠环(即共享相邻原子对的环)基团。杂芳基的实例包括但不限于吡咯、呋喃、噻吩、咪唑、噁唑、噻唑、吡唑、吡啶、嘧啶、喹啉、异喹啉和嘌呤。

术语“硫醇基”和“硫代羟基”是指-SH。

术语“羟基”是指-OH。

本文所用术语“烷氧基”是指-O-烷基,烷基如本文中定义。

本文所用术语“硫代烷氧基”是指-S-烷基,烷基如本文中定义。

上述内酯部分,当在上述酶测定法中用作底物时,可进一步形成物质的一部分。因此,例如内酯部分可形成脂肪酸、类固醇等的一部分。

根据本发明的优选实施方案,测定 PON 酶的内酯酶活性是通过分光光度测定法实施的。根据本发明又一个优选的实施方案,该测定法利用包含一种或多种内酯的底物,其能够形成一种或多种分光光度法可检测部分。使酶与该底物接触,测定可检测部分的量。

在本文所述分光光度测定法的一个实施方案中,使用其中分光光度法可检测部分是形成内酯必备部分的底物。在该测定中,酶将内酯水解,在测定介质中产生分光光度法可检测部分。因此,底物是在其结构中具有前分光光度法可检测部分(pre-spectrophotometrically detectable species)的前分光光度法可检测物质。

本文所用术语“前分光光度法可检测部分或物质”用来指当在本文中进行酶反应时,能够在特定条件下形成可检测部分的部分或物质。

形成含内酯底物部分的分光光度法可检测部分是非常有利的,因为这些底物保持底物对其天然酶的天然化学特异性和空间特异性,从而保持酶与底物间天然的化学相互作用。保持这些相互作用能够研究

和测定酶的天然生物活性,还允许在酶的其他化学效应物(例如天然和合成抑制剂)之间进行生物学上有意义的比较。

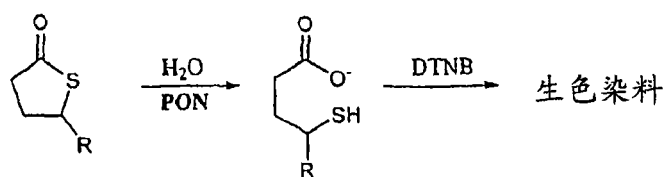
在本文所述分光光度测定法的一个实施方案中,使用其中分光光度法可检测部分与内酯连接的底物。对这类底物进行选择,使得分光光度法可检测部分一般在测定时所进行的酶反应中释放出来。

根据本发明这一方面的优选实施方案,分光光度法可检测部分包含硫醇基。

硫醇是已知非常便利的可检测基团。硫醇测定可通过例如用基于助染剂(pro-dye) 5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸) (DTNB, 亦称 Ellman 试剂 [Ellman, G. L., 1959, Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77])经硫醇基还原的分光光度法实施。该反应产生可在 412 纳米波长下检测到的有色物质,如下所述,并进一步在下面的实施例部分举例说明。

如上所述,硫醇基可形成本实施方案所采用底物内酯的一部分。因此,底物中的一个或多个内酯部分可在内酯环内具有硫原子,在酶水解时产生硫醇。如以下流程 I 所示,可以通过如上所述与 DTNB 的典型反应,来检测硫醇。

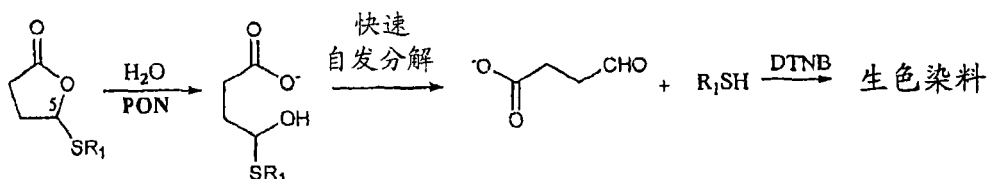
流程 I



R = 例如烷基、烯基和芳基

任选含有硫醇的基团可与底物的内酯部分连接。对这种含有硫醇的底物进行设计,使得含有硫醇的可检测部分在酶反应时释放出来。优选包含硫醇基的可检测部分与这部分连接的是硫代烷氧基。硫代烷氧基可与内酯连接使得在酶反应时,产生硫代烷基,如以下流程 II 所示。

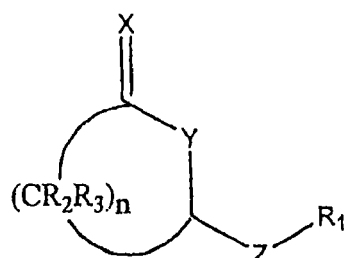
流程 II



R₁ = 例如烷基

当本发明的发明人进一步将本发明付诸实施时，设计并成功地制备和使用一系列新的含有内酯的化合物，可以在内酯酶活性测定中用作有效的 PON 底物。

这种含有内酯的化合物包括一种或多种内酯环，在其分解时能够形成一种或多种分光光度法可检测的含硫醇部分，全都可用通式 I 表示：



式 I

其中 X 和 Y 各自为氧原子或硫原子，Z 为碳原子或硫原子，Y 和 Z 至少一个为硫，n 是介于 2-4 之间的整数，R₁、R₂ 和 R₃ 的每一个独立地为氢、烷基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)或杂环基(通过环碳键合)、烷氧基等等。

因此，新的内酯可以为其中 n 等于 2 的 5 元内酯、其中 n 等于 3 的 6 元内酯、或其中 n 等于 4 的 7 元内酯。优选 n 等于 2，形成 5 元内酯。

在一个优选的实施案中，X 和 Y 都是氧原子，Z 是硫原子。优选，R₁ 为具有 2-12 个碳原子的烷基。

这样的内酯通常进行由 PON 内酯酶驱动的酶水解，之后作为在水解时形成在同一碳原子上取代的硫代烷氧基/硫代羧基-羟基部分快

速和自发分解的结果，释放出硫醇。如上述流程 II 所示，所得硫醇可通过如上所述与 DTNB 的典型反应进行检测，将在下面的实施例中举例说明。

在另一个优选的实施方案中，X 为氧，Y 为硫，因此化合物为硫代内酯。在该实施方案中，Z 或可为碳或硫，优选为碳，R₁ 可为氢、烷基、烯基、环烷基、芳基、杂芳基(通过环碳键合)或杂环基(通过环碳键合)、烷氧基等等，优选为具有 2-12 个碳原子的烷基。这些硫代内酯可以通过 PON 进行内酯酶驱动的酶水解，产生可以随后检出的硫醇基。

在 PON 测定中，使用具有与其 5 位连接的烷基或硫代烷氧基的 5 元内酯是十分有利的，因为这些化合物与 PON1 的良好底物(包含具有长烷基侧链的 5 元环氧代内酯)几乎相同^[2, 4, 6]。

在酶反应中产生的含硫醇部分(例如硫代烷基)可以用作分光光度法可检测部分，例如上述的磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法，这些方法通常是用于检测和定量测定酶活性的相对简单和快捷的技术。

正如下面将证实和说明的一样，本发明的发明人曾使用一系列具有分光光度法可检测的硫代烷氧基部分的内酯底物，该硫代烷氧基部分与 5 元环内酯在其 5 位相连接。如下面的实施例部分所示，制备下列内酯：5-乙硫基-二氢-咪喃-2-酮、5-丁硫基-二氢-咪喃-2-酮和 5-己硫基-二氢-咪喃-2-酮。下表 1 所示的这些内酯， k_{cat}/K_M 值的范围介于 $1.5 \times 10^5 \sim 4.45 \times 10^5$ 之间，与用内酯所观察到的 k_{cat}/K_M 值相当，因此被视为对于酶底物可接受的数值。

酶活性的 k_{cat}/K_M 值衡量底物特异性。它允许对同一酶不同底物的特异性进行比较，或者对用不同酶转化同一底物的催化速率进行比较。这一比率具有二级速率常数的单位，因此用 $1/(\text{浓度} \times \text{时间})$ 表示。尽管用某些酶观察到数值 $\geq 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ ，但是 k_{cat}/K_M 比率范围为 $10^4 \sim 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ 秒}^{-1}$ 的底物被视为良好的底物，即在酶测定中具有合理的亲和性、

特异性和快速的周转率。

在酶反应过程中形成可检测部分及结构上类似于生理性内酯酶底物(例如上述新的内酯)的内酯,可以用于测定样品中内酯酶的活性。

因此,根据本发明另一方面,提供测定样品中内酯酶活性的方法。根据本发明这一方面,该方法是通过以下步骤完成的:

(a) 使样品与含有一种或多种如上所述的内酯并且能够在一种或多种内酯水解时形成一种或多种如上所述的分光光度法可检测部分的化合物接触,其中对可检测部分进行选择,使化合物具有与内酯酶底物基本相同的结构;和

(b) 用分光光度法测定分光光度法可检测部分的水平,从而测定样品中内酯酶的活性。

本文所用术语“具有与内酯酶底物基本相同的结构”是指几乎与天然底物结构相同的合成底物的化学结构,差别在于相对较小的化学特征和/或结构特征,例如1个或2个原子的置换、侧链的延长等。

正如在上述内酯酶活性测定法的具体情况下,任何内酯酶活性的测定优选采用分光光度测定技术,例如上述磷光测定法、荧光测定法、显色测定法、发光测定法和映光测定法,因为这些测定通常需要普遍可获得的机器和测定设备,用于测定分光光度法可检测部分和其它化学实体浓度的微小变化。

任何内酯酶活性水平的测定,是按与内酯连接的可检测部分的浓度水平进行的,与内酯的连接或是通过形成内酯环部分,或是通过作为取代基与之连接,正如上述PON内酯酶活性测定实例中所述那样。

正如上述PON内酯酶活性测定实例中所述那样,可检测部分优选包括一个或多个硫醇基。

值得注意的是,上述用于测定内酯酶活性的试剂可包括在试剂盒中,用于测定受治疗者的体质或者诊断与受治疗者的内酯酶(例如PON酶)水平或活性异常有关的疾病或病症。

本文所用术语“受治疗者”或“个体”是指受治疗者(例如哺乳动

物), 优选疑似患有与 PON 酶水平或活性异常有关疾病或者有与 PON 酶水平或活性异常有关疾病风险的受治疗的人。

本文所用术语“诊断”是指对疾病、病症或症状进行分类, 或者确定疾病、病症或症状的严重程度, 监测疾病进程, 预测疾病后果和/或恢复前景。

本文所用术语“与 PON 酶水平或活性异常(与自健康受治疗者获取的对照样品相比水平偏高或偏低)有关的疾病或病症”是指其中 PON (例如 PON1)活性发生改变的各种病理和生理病症和疾病(参见例如 Costa 等(2005) *Biochemical Pharmacology* 69:541-550, 及其中的参考文献)。例如, 已经发现在以下疾病中血清 PON1 活性偏低: 胰岛素依赖型(I 型)糖尿病和非胰岛素依赖型(II 型)糖尿病、阿尔茨海默病 (Alzheimer's disease) (Dantoine 等 2002, *Paraoxonase 1 activity: a new vascular marker of dementia?* (对氧磷酶 1 活性: 痴呆的新血管标记?) *Ann N Y Acad Sci.* 2002 年 11 月; 977:96-101)以及各种心脏病(包括动脉粥样硬化) [Costa 等(2005); Mackness 等(2004) *The role of paraoxonase 1 activity in cardiovascular disease: potential for therapeutic intervention* (对氧磷酶 1 活性在心血管疾病中的作用: 用于治疗性干预的可能性). *Am J Cardiovasc Drugs.* 2004; 4(4):211-7; Durrington 等(2001) *Paraoxonase and atherosclerosis* (对氧磷酶与动脉粥样硬化). *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2001 21(4):473-80]。在慢性肾衰竭、类风湿性关节炎或鱼眼病(以严重角膜混浊为特征)患者体内还发现 PON 活性降低。甲状腺机能亢进也伴有血清 PON 活性较低、肝病、阿尔茨海默病和血管性痴呆。在传染病(例如在急性期反应期间)中也观察到 PON 活性较低。异常低的 PON 水平还与暴露在各种外源化合物中有关, 外源化合物例如周围的化学品(例如钴、镉、镍、锌、铜、钡、镧、汞等金属; 二氯乙酸、四氯化碳)、药物(例如胆碱能毒蕈碱拮抗剂、普伐他汀、辛伐他汀、氟伐他汀、醇)。正如所提及的 PON 水平降低还是各种生理状况(例如怀孕和年长)的特征, 可以是受治疗者一

般健康状况的指标。例如吸烟者体内的血清 PON1 活性低，已知体育运动可恢复吸烟者体内的 PON1 水平。

因此，本发明的试剂(例如上述内酯酶底物)可包括在诊断试剂盒中，试剂盒另可包括反应缓冲液、保存缓冲液和样品稀释缓冲液。优选试剂盒还包括印刷品，印刷品包括诊断试剂盒的使用说明书。

如上所述，测定生物活性 PON 水平的能力可有助于测定个体的 PON 状况。

本文所用术语“PON 状况”是指 PON 活性(即内酯酶活性)和 PON 基因型。

研究 PON1 多态性与疾病关系的大多数研究仅探讨了核苷酸多态性，对于核苷酸记载了 160 种以上的多态现象，包括基因的编码区(例如 Q192R、L55M、C-108T)和内含子和调节区的多态性。然而，越来越清楚的是，即使在对所有已知 PON1 (或其它 PON)多态性进行基因分型时，这种分析都不能提供 PON 的活性水平，也不能提供多态性的相位(也就是哪些多态性位于个体两条染色体的哪一条上)。因此功能基因组分析将提供更多的信息途径。

因此，本发明另一方面提供测定个体 PON 状况的方法。

本发明的这一方面是通过测定受治疗者的 PON 酶内酯酶活性水平实施的，所述内酯酶活性是受治疗者的生物活性 PON 的指标；对受治疗者的 PON 酶进行基因分型，从而测定受治疗者的 PON 状况。

对 PON 酶进行基因分型可以用本领域众所周知的分子生物学方法或生物化学方法，在核酸水平或蛋白质水平(如果多态性影响翻译的蛋白质的话)上进行。

多态性 PON 可能是单核苷酸多态性(SNP)、至少一个核苷酸的微小缺失和/或微小插入、短的缺失和插入、多核苷酸改变、短串联重复(STR)和数目可变的串联重复(VNTR)的结果。

为了获得多态性数据，对包含受治疗者 PON 酶的生物样品[例如血清样品、尿样品、滑液样品、活组织检查样品(例如肝活组织检查样

品)]进行DNA多态性、RNA多态性、和/或蛋白质多态性的等位基因测定。

下面是本发明可使用的多态性(例如SNP)检测方法的非限制性一览。

等位基因特异性寡核苷酸(ASO): 在本方法中, 设计等位基因特异性寡核苷酸(ASO)使其在接近多态性核苷酸(polymorphic nucleotide)处杂交, 使得引物延伸或连接事件可用作匹配或错配的指标。还应用与放射性标记的等位基因特异性寡核苷酸(ASO)杂交来检测特异性SNP (Conner 等, Proc. Natl. Acad. Sci., 80:278-282, 1983)。该方法以相差单个核苷酸的短DNA片段解链温度的差异为基础。严格的杂交和洗涤条件可将突变型和野生型等位基因区分开来。

Pyrosequencing™分析(Pyrosequencing, Inc. Westborough, MA, USA): 本项技术以测序引物与单链杂交、PCR扩增、DNA聚合酶存在下的DNA模板、ATP硫酸化酶、萤光素酶和腺苷三磷酸双磷酸酶和腺苷5'酰硫酸(APS)和萤光素底物为基础。在第二步中, 将4种三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)的第一种加到反应物中, 如果与模板链的碱基互补, 则DNA聚合酶催化三磷酸脱氧核苷酸掺入DNA链中。每次掺入事件都伴有焦磷酸(PPi)的释放, 释放量与掺入的核苷酸量是等摩尔的。在最后一步, 在腺苷5'酰硫酸存在下, ATP硫酸化酶将PPi定量转化成ATP。该ATP驱动萤光素酶介导的萤光素向氧化萤光素转化, 产生可见光, 可见光的量与ATP的量成比例。在萤光素酶催化反应中产生的光用电荷耦合摄像装置(CCD)相机检测, 在pyrogram™中观察到一个峰。每个光信号与所掺入的核苷酸数目成比例。

Acycloprime™分析(Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, USA): 本项技术以荧光偏振(FP)检测为基础。在含有目标SNP的序列进行PCR扩增后, 通过与虾碱性磷酸酶(SAP)和外切核酸酶I温育除去过量的引物和dNTP。一旦酶被热灭活, 则Acycloprime-FP方法便使用耐热聚合酶, 向在紧接SNP位点上游结束的引物中, 加入两种荧

光终止子中的一种。所加入的终止子通过其增加 FP 来鉴定，表示存在于原始 DNA 样品中的等位基因。Acycloprime 方法采用 AcycloPol™ (一种得自 Archeon 家族的新的突变型耐热聚合酶，用 R110 和 TAMRA 标记的一对 AcycloTerminators™)，表示目标 SNP 可能的等位基因。AcycloTerminator™ 非核苷酸类似物与多种 DNA 聚合酶一起是有生物活性的。类似于 2',3'-二脱氧核苷酸-5'-三磷酸，无环类似物起链状终止子的作用。该类似物被 DNA 聚合酶按碱基特异性的方式掺入 DNA 链的 3'末端，因为没有 3'-羟基，所以不能在进一步链延长中起作用。已经发现 AcycloPol 对于衍生化 AcycloTerminators 的亲合性和特异性比各种 Taq 突变型对于衍生化 2',3'-二脱氧核苷酸终止子的高。

应当理解的是，SNP 检测领域的发展提供了额外精确、容易和便宜的大规模 SNP 基因分型技术，例如动态等位基因特异性杂交(DASH, Howell, W.M.等, 1999. Dynamic allele-specific hybridization (DASH) (动态等位基因特异性杂交(DASH)). Nat. Biotechnol. 17: 87-8)、微量板阵列对角线凝胶电泳[MADGE, Day, I. N. 等, 1995. High-throughput genotyping using horizontal polyacrylamide gels with wells arranged for microplate array diagonal gel electrophoresis (MADGE) (应用水平聚丙烯酰胺凝胶与排列用于微量板阵列对角线凝胶电泳(MADGE)各孔的高通量基因分型). Biotechniques. 19: 830-5]、TaqMan 系统(Holland, P.M.等, 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase (利用水生栖热菌 DNA 聚合酶的 5'→3'外切核酸酶活性检测特异性聚合酶链式反应产物). Proc Natl Acad Sci U S A. 88: 7276-80)以及各种 DNA“芯片”技术，例如 GeneChip 微阵列((例如 Affymetrix SNP 芯片)，参见 Lipshutz 等(2001)，美国专利申请第 6,300,063 号，该专利通过引用全部结合到本文中)、Genetic Bit 分析(GBA™) (参见 Goelet, P.等(PCT 申请号 92/15712)、肽核酸(PNA, Ren B 等, 2004. Nucleic Acids Res. 32: e42)和锁定核酸(LNA, Latorra D 等, 2003. Hum.

Mutat. 22: 79-85)探针、分子信标(Abravaya K 等, 2003. Clin Chem Lab Med. 41: 468-74)、嵌入染料[Germer, S.和 Higuchi, R. Single-tube genotyping without oligonucleotide probes (无寡核苷酸探针的单管基因分型). Genome Res. 9:72-78 (1999)]、FRET 引物(Solinas A 等, 2001. Nucleic Acids Res. 29: E96)、AlphaScreen (Beaudet L 等, Genome Res. 2001, 11(4): 600-8)、SNPstream (Bell PA 等, 2002. Biotechniques. 增刊: 70-2, 74, 76-7)、多重微测序(Multiplex minisequencing) (Curcio M 等, 2002. Electrophoresis. 23: 1467-72)、SnaPshot (Turner D 等, 2002. Hum Immunol. 63: 508-13)、MassEXTEND (Cashman JR 等, 2001. Drug Metab Dispos. 29: 1629-37)、GOOD 测定法(Sauer S 和 Gut IG, 2003. Rapid Commun. Mass. Spectrom. 17: 1265-72)、微阵列微测序 (Microarray minisequencing) (Liljedahl U 等, 2003. Pharmacogenetics. 13: 7-17)、阵列引物延伸(arrayed primer extension, APEX) (Tonisson N 等, 2000. Clin. Chem. Lab. Med. 38: 165-70)、微阵列引物延伸(Microarray primer extension) (O'Meara D 等, 2002. Nucleic Acids Res. 30: e75)、Tag 阵列(Fan JB 等, 2000. Genome Res. 10: 853-60)、模板指导的掺入(TDI) (Akula N 等, 2002. Biotechniques. 32: 1072-8)、荧光偏振(Hsu TM 等, 2001. Biotechniques. 31: 560, 562, 564-8)、寡核苷酸连接比色测定 (Colorimetric oligonucleotide ligation assay) (OLA, Nickerson DA 等, 1990. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 87: 8923-7)、序列编码的 OLA (Sequence-coded OLA) (Gasparini P 等, 1999. J. Med. Screen. 6: 67-9)、微阵列连接、连接酶链式反应、持锁探针、滚环式扩增、侵入检测法 (Invader assay) (有关综述参见 Shi MM. 2001. Enabling large-scale pharmacogenetic studies by high-throughput mutation detection and genotyping technologies (通过高通量突变检测和基因分型技术能够进行大规模药物遗传学研究). Clin Chem. 47: 164-72)、编码微球(coded microsphere) (Rao KV 等, 2003. Nucleic Acids Res. 31: e66)和 MassArray (Leushner J, Chiu NH, 2000. Mol Diagn. 5: 341-80)。

如上所述，细胞的基因序型还可通过细胞转录组分析完成。

可用本领域已知方法测定本发明细胞内 RNA 的表达水平。

RT-PCR 分析: 本方法利用相对稀有的 RNA 分子进行 PCR 扩增。首先，用反转录酶(例如 MMLV-RT)和引物(例如寡脱氧胸苷、随机六聚体或基因特异性引物)，将 RNA 分子从细胞中纯化出来并转变成互补 DNA (cDNA)。然后用基因特异性引物和 Taq DNA 聚合酶，在 PCR 仪器中进行 PCR 扩增反应。本领域技术人员能够选择适于检测特异性 RNA 分子的基因特异性引物的长度和序列以及 PCR 条件(即退火温度、循环次数等)。应当理解的是，可以通过调整 PCR 循环次数，将扩增产物与已知对照比较，采用半定量 RT-PCR 反应。

可以用本领域已知方法测定在本发明培养物的细胞内表达的蛋白质表达水平和/或活性水平。

酶联免疫吸附测定法(ELISA): 本方法包括将含有蛋白质底物的样品(例如固定细胞或蛋白质性溶液)固定在表面(例如微量滴定板孔壁)上。使用与酶偶联的底物特异性抗体，使之与底物结合。然后检测抗体的存在，用与抗体偶联的酶，通过显色反应进行定量分析。一般用于本方法的酶包括辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。如果用标准曲线适当校正，而且在反应的线性范围内，样品中存在的底物含量与所形成的颜色深浅成比例。底物标准一般用以改进定量的精确性。

蛋白质印迹法: 本方法包括通过丙烯酰胺凝胶将底物与其它蛋白质分离后，将底物转印至膜(例如尼龙或 PVDF)上。通过抗体对底物的特异性，检测底物的存在，抗体对底物的特异性本身又是通过抗体结合试剂进行检测的。抗体结合试剂可以是例如 A 蛋白或其它抗体。抗体结合试剂可是以如上所述经放射性标记的或与酶连接的。可以通过放射自显影、显色反应或化学发光进行检测。本方法既允许定量测定底物含量，又允许通过在膜上的相对位置测定其结构特征，相对位置是电泳时在丙烯酰胺凝胶中移动距离的指标。

放射免疫测定法(RIA): 在一个方案中，本方法包括将所需蛋白

质(即底物)与特异性抗体和放射性标记抗体结合蛋白(例如用 I^{125} 标记的 A 蛋白)的沉淀固定在可沉淀载体(例如琼脂糖微珠)上。在沉淀物中的计数次数与底物含量成比例。

在另一个 RIA 方案中,使用标记的底物和未标记的抗体结合蛋白。按不同的量加入含有未知含量底物的样品。标记底物沉淀计数的减少与所加入样品的底物含量成比例。

荧光激活细胞分选术(FACS): 本方法包括通过底物特异性抗体在细胞原位检测底物。底物特异性抗体与荧光团连接。通过细胞分选仪进行检测,细胞分选仪在当细胞通过光束时,读取每个细胞发射出的光波长。本方法可以同时使用两种以上抗体。

免疫组织化学分析: 本方法包括通过底物特异性抗体在固定细胞中原位检测底物。底物特异性抗体可与酶连接或者与荧光团连接。通过显微镜术及主观评价或自动评价进行检测。如果使用酶联抗体,则可能需要显色反应。应当理解的是,免疫组织化学法后常常用例如苏木精或吉姆萨染液进行细胞核的对比染色。

在检查下面并非限制性的实施例时,本发明的其它目的、优势和新的特征对于本领域普通技术人员是显而易见的。另外,本文上述的本发明各个不同的实施方案和方面,以及所附权利要求书部分所要求保护的范围都可以在下述实施例中找到实验支持。

实施例

下面参考以下实施例并结合上述说明书,以非限制性方式对本发明进行说明。

一般而言,本文所用术语和本发明所使用的实验室方法包括分子技术、生物化学技术、微生物学技术和重组 DNA 技术。文献中对这些技术进行了充分地说明。参见例如“Molecular Cloning: A laboratory Manual (分子克隆实验室指南)” Sambrook 等(1989); “Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学实验技术)”,第 I-III 卷, Ausubel,

R. M.主编(1994); Ausubel 等, “Current Protocols in Molecular Biology (现代分子生物学实验技术)”, John Wiley & Sons, Baltimore, Maryland (1989); Perbal, “A Practical Guide to Molecular Cloning (分子克隆实用指南)”, John Wiley & Sons, New York (1988); Watson 等, “Recombinant DNA (重组 DNA)”, Scientific American Books, New York; Birren 等(主编), “Genome Analysis: A Laboratory Manual Series (基因组分析实验室系列手册)”, 第 1-4 卷, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); 美国专利号 4,666,828、4,683,202、4,801,531、5,192,659 和 5,272,057 中所述方法; “Cell Biology: A Laboratory Handbook (细胞生物学实验室手册)”, 第 I-III 卷, Cellis, J. E.主编(1994); “Current Protocols in Immunology (现代免疫实验技术)” 第 I-III 卷, Coligan, J. E.主编(1994); Stites 等(主编), “Basic and Clinical Immunology (基础免疫学与临床免疫学)” (第 8 版), Appleton 和 Lange, Norwalk, CT (1994); Mishell 和 Shiigi (主编), “Selected Methods in Cellular Immunology (细胞免疫学精选方法)”, W. H. Freeman 及同事, New York (1980); 专利和科学文献中大量记载了可利用的免疫测定法, 参见例如美国专利号 3,791,932、3,839,153、3,850,752、3,850,578、3,853,987、3,867,517、3,879,262、3,901,654、3,935,074、3,984,533、3,996,345、4,034,074、4,098,876、4,879,219、5,011,771 和 5,281,521; “Oligonucleotide Synthesis (寡核苷酸合成)” Gait, M. J.主编(1984); “Nucleic Acid Hybridization (核酸杂交)” Hames, B. D.和 Higgins S. J.主编(1985); “Transcription and Translation (转录与翻译)” Hames, B. D.和 Higgins S. J.主编(1984); “Animal Cell Culture (动物细胞培养)” Freshney, R. I.主编(1986); “Immobilized Cells and Enzymes (固定化细胞与酶)” IRL Press, (1986); “A Practical Guide to Molecular Cloning (分子克隆实用指南)”, Perbal, B., (1984)和“Methods in Enzymology (酶学方法)” 第 1-317 卷, Academic Press; “PCR Protocols: A Guide To Methods And Applications (PCR 实验技术: 方法与应用指南)”, Academic Press, San Diego, CA

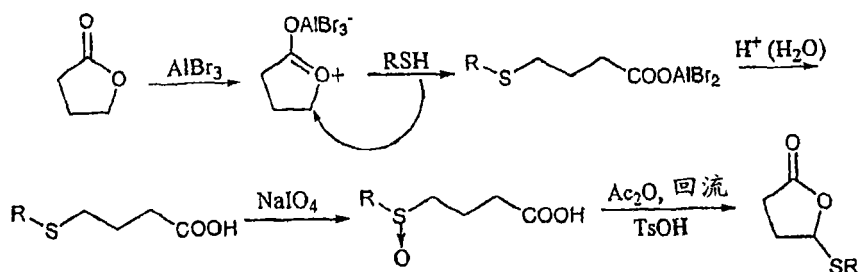
(1990); Marshak 等, “Strategies for Protein Purification and Characterization - A Laboratory Course Manual (蛋白质纯化与表征技术 - 实验室操作指南)” CSHL Press (1996); 所有文献都通过引用如同全部公开于此。本申请全文还提供其它常用参考文献。我们相信其中的方法是本领域众所周知的, 是为了方便读者而提供的。其中所包含的所有信息都通过引用结合到本文中。

实施例 1

5-烷硫基取代的丁内酯(TXBL)的合成

使用 4-苯硫基-4-丁内酯的合成方法^[12]来合成 5-乙硫基丁内酯、丁硫基丁内酯和己硫基丁内酯(流程 2)。首先, 用相应的硫醇打开 γ -丁内酯环^[13]。然后所得 4-(烷硫基)-丁酸用高碘酸钠氧化, 得到 4-(烷基亚磺酰基)-丁酸^[14], 通过普梅雷尔重排(Pummerer rearrangement)^[12]闭合成相应的内酯。该路线一般用来使可变长度的侧链(由以下流程 3 中的 R 表示)与 5-硫-丁内酯连接。

流程 3



材料与实验方法

材料 - 化学试剂购自 Aldrich Chemicals 公司、Fluka 公司和 Acros Chemicals 公司。

5-烷硫基取代丁内酯的一般合成法, 得到 5-丁硫基丁内酯 (TBBL):

4-(丁硫基)-丁酸: 将 γ -丁内酯(12.9mmol, 1.11 克)滴加到 AlBr_3 (2.2 当量, 28.38mmol, 7.56 克)和丁硫醇(约 20ml)的混合物中。将所得混合物在室温下搅拌 2 小时, 然后慢慢倒入水(约 50ml)中。含水混合物

用 CH_2Cl_2 (2 x 50ml) 萃取, 有机相用 NaCl 盐水洗涤, 经 Na_2SO_4 干燥。蒸发溶剂, 产物经真空干燥。产量: 1.84 克, 80.9%。

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.89-0.94 (t, 3H), 1.36-1.50 (m, 2H), 1.53-1.62 (m, 2H), 1.86-1.97 (m, 2H), 2.46-2.60 (m, 6H)。

4-(丁基亚磺酰基)-丁酸: 在 0°C 下, 向 21ml (10.5mmol) 的 0.5M 高碘酸钠溶液中加入 4-(丁硫基)-丁酸(1.84 克, 10.4mmol), 将反应物在 0°C 下搅拌过夜。经过滤除去沉淀的高碘酸钠, 使滤液蒸发。所得固体用 CH_2Cl_2 (3 x 50ml, 15 分钟萃取) 萃取, 通过蒸发除去溶剂, 得到 4-(丁基亚磺酰基)-丁酸(1.88 克, 94%)。

$^1\text{H NMR}$ (250 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.92-0.98 (t, 3H), 1.42-1.53 (m, 2H), 1.68-1.80 (m, 2H), 2.07-2.16 (m, 2H), 2.49-2.64 (t, 2H), 2.69-2.94 (m, 4H)。

5-(丁硫基)丁内酯: 向 4-(丁基亚磺酰基)-丁酸(630mg, 3.2mmol) 的甲苯溶液中加入乙酸酐(3 当量, 10mmol, 1 克)和催化量的对甲苯磺酸。使所得溶液回流数小时, 使溶剂蒸发至干。将残余物溶于乙酸乙酯:己烷(1:3), 用快速色谱法纯化(硅胶, 乙酸乙酯:己烷(1:3)), 得到 5-(丁硫基)丁内酯(130mg, 23.3%)。

$^1\text{H NMR}$ (400 MHz, CDCl_3): δ (ppm) = 0.86-0.92 (t, 3H), 1.40-1.48 (m, 2H), 1.62-1.71 (m, 2H), 2.06-2.18 (m, 2H), 2.49-2.80 (m, 4H), 5.64-5.72 (t, 1H)。 $^{13}\text{C NMR}$ (400 MHz, CDCl_3) δ (ppm): 15.0, 23.3, 29.4, 30.0, 32.8, 33.0, 78.1-79.6。 ESI-MS: m/z : 174 [M] $^-$ 。

实施例 2

TXBL 的酶水解动力学分析

用 DTNB 检测释放的有硫醇部分, 测定通过 PON1 酶促水解 3 种 TXBL 的动力学参数。

材料与实验方法

材料 - CPM 染料(7-二乙氨基-3-(4'-马来酰亚胺基-苯基)-4-甲基香

豆素)购自 Molecular Probes 公司。用与硫氧还蛋白和 6 x His tag 融合表达的重组 PON1 变体 rePON1-G2E6 进行动力学分析,按文献方法纯化^[19]。

用 DTNB 的动力学测定 - 用含有 1mM CaCl₂ 和 50mM NaCl 的 50mM Tris (pH 8.0) (活性缓冲液)测定硫代烷基取代内酯的酶水解速率。将酶母液保存在含有 0.1% tergitol 的活性缓冲液中,所用的酶浓度为 8.375×10^{-9} M。用乙腈制备 100-400mM 的底物母液,在临反应前用反应缓冲液稀释。将 5-(己硫基)-丁内酯(THBL)溶于含有 Triton X-100 洗涤剂的缓冲液(终浓度为 0.03-0.24%)。底物浓度变化的范围为 $0.3 \times K_M \sim (2-3) \times K_M$ 。在所有反应中都将助溶剂百分比保持在 1%。使用得自 100mM 溶于 DMSO 的母液的 DTNB 染料(Ellman 试剂, 5',5-二硫双(2-硝基苯甲酸), 终浓度为 0.5mM。用 $\epsilon_{412nm}=7,000$ OD/M 计算活性。在微量滴定板读板仪上(PowerWave HT™微量板扫描分光光度计(Microplate Scanning Spectrophotometer); 光学长度~0.5cm), 用 96 孔板, 反应体积为 200 μ l, 用分光光度法在 412nm 下监测产物的形成。每种底物以 8 个不同的浓度测定初速度(v_0)。 v_0 值用在酶不存在时自发水解的本底速率校正。将数据代入 Michaelis-Menten 公式 $[v_0=k_{cat}[E]_0[S]_0/([S]_0+K_M)]$, 运用程序 Kaleidagraph 5.0, 获得动力学参数(k_{cat} 、 K_M 、 k_{cat}/K_M)。

用 CPM 的动力学测定 - 在含有 8.375×10^{-9} M 酶的活性缓冲液中, 测定 4-(丁硫基)丁内酯(TBBL)的酶水解速率。使用得自 400mM 溶于乙腈的母液的底物, 临开始反应前用反应缓冲液稀释, 与 CPM 染料(7-二乙氨基-3-(4'-马来酰亚胺基-苯基)-4-甲基香豆素)一起温育 3 分钟, 以完成 CPM 与在测定前被水解的底物之间的反应。CPM 染料得自 5mM 溶于 DMF 的母液, 终浓度为 50 μ M, 反应混合物中含有 0.1% triton 用于 CPM 增溶。在微量滴定板读板仪(激发 - 400nm 滤光片, 发射 - 450nm 和 516nm 滤光片, 配有时间分辨荧光的 Synergy HT™多功能检测微量板读板仪(Synergy HT™ Multi-Detection Microplate Reader

with Time-Resolved Fluorescence); 光学长度~0.5cm)中, 用 96 孔板, 按 200 μ l 反应体积中的 CPM 荧光, 监测产物形成。

结果

5-(丁硫基)丁内酯(TBBL)水解的典型显色测定如图 1a 所示, 动力学参数见下表 1。这些新底物的 k_{cat} 和 K_M 值类似于用同源的 5-烷基取代的丁内酯(下表 2)所观察到的数值。

表 1 - rePON1 与 5-烷硫基丁内酯的动力学参数

底物	结构式	k_{cat} , 秒 ⁻¹	K_M , mM	k_{cat}/K_M , 秒 ⁻¹ , M ⁻¹
TEBL, 乙硫基丁内酯		161 \pm 10	0.36 \pm 0.05	445,000 \pm 36,000
TBBL, 丁硫基丁内酯		116 \pm 4	0.27 \pm 0.04	440,000 \pm 55,000
THBL, 己硫基丁内酯		52.4 \pm 2.6	0.35 \pm 0.03	150,000 \pm 9,300

表 2 - rePON1 与 5-烷基丁内酯的动力学参数^[a]

底物	结构式	k_{cat} , 秒 ⁻¹	K_M , mM	k_{cat}/K_M , 秒 ⁻¹ , M ⁻¹
γ -庚内酯		34.8 \pm 0.8	0.58 \pm 0.03	58,000 \pm 3,000
γ -壬内酯		31 \pm 2	0.39 \pm 0.03	78,000 \pm 1,600
γ -十一内酯		62 \pm 2	0.60 \pm 0.07	103,000 \pm 8,600

[a] - 5-烷基丁内酯的动力学参数摘自参考文献^[4]。

5-烷硫基内酯的酶水解速率也可用荧光硫醇检测探针 CPM^[11]跟踪, 如图 1b 所示。

实施例 3

人血清和活细胞中 PON1 活性的测定

上述显色测定法和荧光测定法用于测定人血清样品的 PON 内酯酶活性。

材料与实验方法

用 TBBL 和乙酸苯酯的血清活性 - 在活性缓冲液中进行反应, 所用血清最终按 1:400 稀释。TBBL 的反应混合物中含有得自 400mM 溶于乙腈的母液的 0.5mM TBBL、得自 100mM 溶于 DMSO 的母液的 0.5mM DTNB。乙酸苯酯的反应混合物中含有得自 500mM 溶于甲醇的母液的 1mM 乙酸苯酯。所有反应混合物中都含有终浓度为 1% 的 DMSO。使用得自 500mM 溶于 DMSO 的母液的 2-羟基喹啉, 使用得自 0.5M 溶于水的母液的 EDTA。将血清与抑制剂温育 5-10 分钟后, 开始反应。

用 TBBL 通过 FACS 检测 PON1 活性 - 大肠杆菌细胞的乳化及 FACS 分析按文献方法进行^[16]。

结果

用新合成的底物(参见实施例 1-2)检测人血清的 PON1 水平, 如图 2a-b 所示。为了证实所测的内酯酶活性是由 PON1 而不是血清中存在的其它水解酶介导的, 还另将血清与 2-羟基喹啉(PON1 活性的选择性竞争抑制剂^[4])和 EDTA (使钙整合, 这对 PON1 活性至关重要)预温育。平行地, 用乙酸苯酯(通常用作血清 PON1 水平的探针)测定 PON1 活性。用 TBBL 的活性与用乙酸苯酯的活性相当, 同样被抑制(参见下表 3)。这清楚表明, 新的内酯底物可用于评价人血清的 PON1 水平, > 90%

的内酯酶活性和芳基酯酶活性由 PON1 产生。EDTA 的抑制率较高(>99%), 可能是由对金属整合剂敏感的血清酶而不是 PON1 所致。

表 3 - 用乙酸苯酯和 TBBL 的血清活性

样品#	用 0.5mM TBBL 的血清活性, μM 产物/分钟 (%未抑制活性)			用 1mM 乙酸苯酯的血清活性, μM 产物/分钟 (%未抑制活性)		
	未抑制	100μM HQ	5mM EDTA	未抑制	100μM HQ	5mM EDTA
1	21.0±0.4	1.80±0.01 (8.6%)	0.06±0.01 (0.3%)	79±6	3.9±0.3 (4.9%)	~ 0 (0%)
2	21.3±0.1	2.09±0.04 (9.8%)	0.04±0.01 (0.2%)	80±3	5.9±0.4 (7.4%)	~ 0 (0%)

同样用 FACS (荧光激活细胞分选仪)和使细胞与酶活性产物一起分隔的乳滴, 对活细胞的 PON1 活性进行检测^[15,16]。首先, 将在细胞质中表达重组 PON1 (rePON1)的大肠杆菌细胞以及 GFP (绿色荧光蛋白)用油包水(w/o)乳剂液滴与内酯底物(TBBL)和荧光硫醇检测染料 CPM 一起区室化。使油包水乳剂再乳化, 产生具有适于 FACS 的连续水相的水包油包水双乳剂^[15]。FACS 触发阈值设为 GFP 的发射, 选择与单个大肠杆菌细胞发射水平相应的合适门控^[16]。如图 3 所示, 通过 530nm 下硫醇检测染料的荧光信号, 检测区室化细胞的 PON1 内酯酶活性。相对于不含 rePON1 的细胞, 观察到明显差异(平均荧光> 20 倍)。

总之, 上述结果证实, 5-烷硫基内酯是用于测定 PON1 内酯酶活性的非常有用和灵敏的探针。PON1 与这些底物的速率类似于 PON1 的良好底物脂肪族 5-烷基取代的内酯, 并且与其天然底物非常相似^[2]。5-烷硫基内酯可与复杂的生物样品(例如完整细胞和血清)一起使用, 因此, 以高通量方式, 提供新的生理上关联的人血清 PON1 水平的测定方法。这些底物还提供用 FACS 和双乳剂筛选内酯酶活性的有效方法, 使得在几小时内筛选出用于指导进化和功能基因组的>10⁷的酶变

异体文库^[16, 17]。最后, 新的 5-烷硫基内酯可与不是 PON1 的酶, 特别是与无显色/荧光底物存在的其它 PON 家族成员一起使用。例如, 可在纯化的酶样品和粗制细胞裂解物中, 用 TEBL 和 TBBL 测定 PON3 的内酯酶活性(数据未显示)。还可检测其它酶的内酯酶活性(例如缺陷假单胞菌(*Pseudomonas diminuta*)磷酸三酯酶)^[18]。

应当了解的是, 为了清楚起见在不同的实施方案内容中加以描述的本发明的某些特征, 同样也可合并起来在一个实施方案中提供。相反, 为简明起见在一个实施方案内容中加以描述的本发明的各种特征, 同样也可单独或以任何合适的再合并方式予以提供。

尽管本发明结合其具体的实施方案加以描述, 但是明显的是许多替换、修改和变化对本领域技术人员而言是显而易见的。因此, 本发明包括所有落入所附权利要求书精神和大范围中的这些替换、修改和变动。本说明书所提及的所有出版物、专利、专利申请和 GenBank 检索号都通过引用全部结合到本说明书中, 其程度与每个独立出版物、专利、专利申请和 GenBank 检索号具体而单独指明通过引用结合到本文中一样。另外, 在本申请任何参考文献的引用或标示都不得解释为承认这样的参考文献都可作为本发明的现有技术获得。

通过数字标注引用的参考文献

(其它参考文献已在本申请中引用)

- [1] S. Billecke, D. Draganov, R. Counsell, P. Stetson, C. Watson, C. Hsu, B. N. La Du, *Drug Metab. Dispos.* **2000**, 28, 1335.
- [2] D. I. Draganov, J. F. Teiber, A. Speelman, Y. Osawa, R. Sunahara, B. N. La Du, *J. Lipid Res.* **2005**, 46, 1239.
- [3] J. F. Teiber, D. I. Draganov, B. N. La Du, *Biochem. Pharmacol.* **2003**, 66, 887.
- [4] O. Khersonsky, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2005**, 44, 6371.
- [5] A. Aharoni, L. Gaidukov, O. Khersonsky, S. McQ. Gould, C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Nat. Genet.* **2005**, 37, 73.
- [6] L. Gaidukov, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2005**, 待发表。

-
- [7] L. G. Costa, A. Vitalone, T. B. Cole, C. E. Furlong, *Biochem. Pharmacol* **2005**, *69*, 541.
- [8] J. P. Goddard, J. L. Reymond, *Trends Biotechnol* **2004**, *22*, 363.
- [9] R. Sicard, L. S. Chen, A. J. Marsaioli, J. L. Reymond, *Adv. Synth. Catal.* **2005**, *347*, 1041.
- [10] G. L. Ellman, *Arch. Biochem. Biophys.* **1958**, *74*, 443.
- [11] R. P. Haugland, *Handbook of Fluorescent Probes and Research Products* (荧光探针与研究产物手册), 第9版, *Molecular Probes, Eugene*, **2002**, 第79页。
- [12] M. Watanabe, S. Nakamori, H. Hasegawa, K. Shirai, T. Kumamoto, *Bull Chem. Soc. Japan* **1981**, *54*, 817.
- [13] M. Node, K. Nishide, M. Sai, E. Fujita, *Tetrahedron Lett.* **1978**, *52*, 5211.
- [14] N. J. Leonard, C. R. Johnson, *J. Org. Chem.* **1961**, *27*, 282.
- [15] K. Bernath, M. T. Hai, E. Mastrobattista, A. D. Griffiths, S. Magdassi, D. S. Tawfik, *Analytical Biochemistry* **2004**, *325*, 151.
- [16] A. Aharoni, G. Amitai, B. Bernath, S. Magdassi, D. S. Tawfik, 交付出版 **2005**。
- [17] A. Aharoni, A. D. Griffiths, D. S. Tawfik, *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2005**, *9*, 210.
- [18] C. Roodveldt, D. S. Tawfik, *Biochemistry* **2005**, 待发表。
- [19] A. Aharoni, L. Gaidukov, S. Yagur, L. Toker, I. Silman, D. S. Tawfik, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **2004**, *101*, 482.

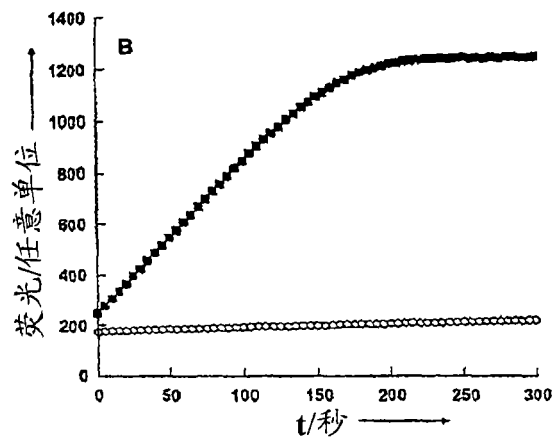
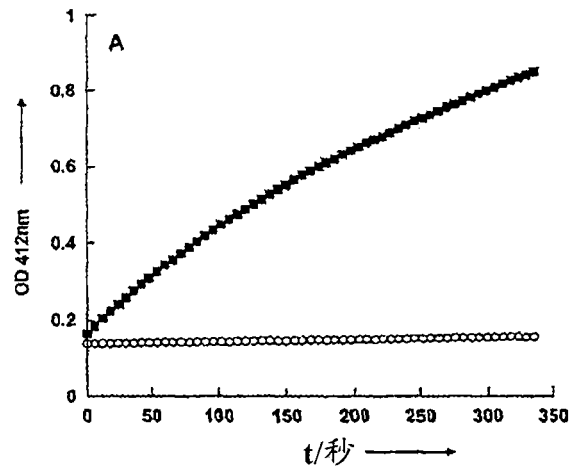


图 1a-b

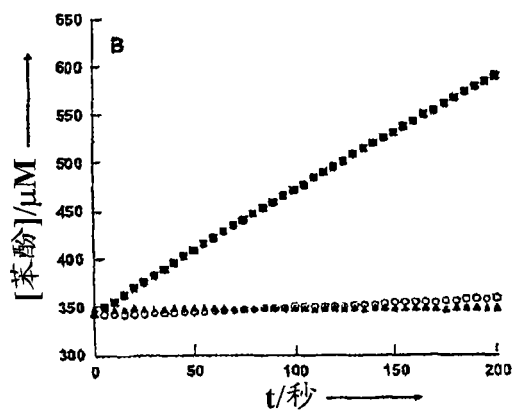
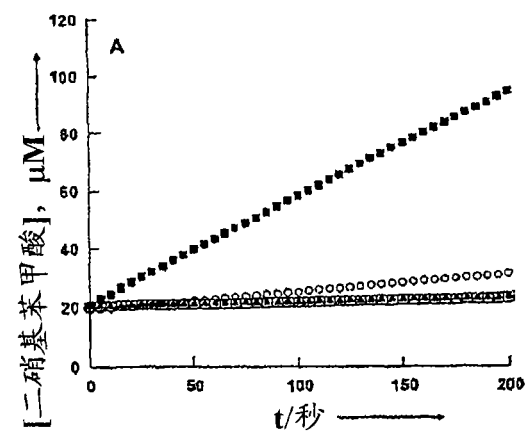


图 2a-b

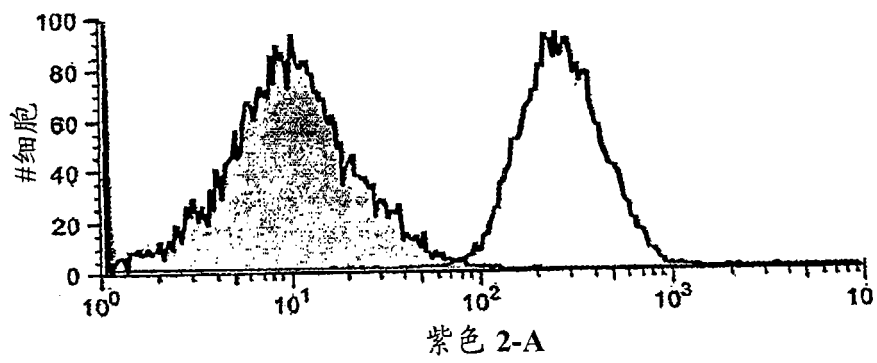


图 3

专利名称(译)	用于测定生物活性血清对氧磷酶水平的方法和组合物		
公开(公告)号	CN101287842A	公开(公告)日	2008-10-15
申请号	CN200680038325.2	申请日	2006-08-14
[标]申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
当前申请(专利权)人(译)	耶达研究及发展有限公司		
[标]发明人	DS托菲克 O赫桑斯基		
发明人	D· S· 托菲克 O· 赫桑斯基		
IPC分类号	C12Q1/00 C12Q1/34 G01N33/53		
CPC分类号	C12Q1/34 G01N2333/918		
代理人(译)	刘冬 刘玥		
优先权	60/708767 2005-08-17 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供测定生物活性PON酶水平的方法。该方法包括测定PON酶的内酯酶活性，内酯酶活性是生物活性PON酶水平的指标。本发明还提供新的化合物，可用于测定酶的内酯酶活性。

