

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-513604

(P2004-513604A)

(43) 公表日 平成16年5月13日(2004.5.13)

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
C 1 2 N 15/09	C 1 2 N 15/00	4 B O 2 4
C 1 2 N 1/21	C 1 2 N 1/21	4 B O 6 4
C 1 2 N 5/10	G O 1 N 33/53	4 B O 6 5
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	4 H O 4 5
G O 1 N 33/566	G O 1 N 33/566	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 307 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2001-518889 (P2001-518889)	(71) 出願人	502067819
(86) (22) 出願日	平成12年8月23日 (2000.8.23)		アンバーゲン インコーポレイティッド
(85) 翻訳文提出日	平成14年2月25日 (2002.2.25)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(86) 国際出願番号	PCT/US2000/023233		2 2 1 5, ボストン, 1 1 0 6 コモンウ
(87) 国際公開番号	W02001/014578		ェルス アベニュー
(87) 国際公開日	平成13年3月1日 (2001.3.1)	(74) 代理人	100094145
(31) 優先権主張番号	09/382, 950		弁理士 小野 由己男
(32) 優先日	平成11年8月25日 (1999.8.25)	(74) 代理人	100109450
(33) 優先権主張国	米国 (US)		弁理士 関 健一
(31) 優先権主張番号	09/382, 736	(72) 発明者	ロスチャイルド, ケニス, ジュイ.
(32) 優先日	平成11年8月25日 (1999.8.25)		アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 O
(33) 優先権主張国	米国 (US)		2 1 3 9, ニュートン, 9 7 ドーカー
			ロード
		最終頁に続く	

(54) 【発明の名称】 新生タンパク質の検出、分析、及び分離方法

(57) 【要約】

本発明は、細胞あるいは無細胞翻訳系内で翻訳された新生タンパク質の検出及び分析を容易にする非放射性マーカーに関する。これらのマーカーを含有する新生タンパク質は、放射性試薬に関連する取り扱い及び廃棄の問題なく、迅速かつ効率的に検出、分離、かつ分析し得る。好ましいマーカーは、ジピロメテンニフツ化ホウ素(4, 4 - ジフルオロ - - ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセン)色素である。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

- a) tRNA 分子と BODIPY マーカーを供給すること、及び
b) 該 tRNA 分子を該 BODIPY マーカーでアミノアシル化して、ミスアミノアシル・tRNA を創造することを含む方法。

【請求項 2】

該方法がさらに、

- c) 該ミスアミノアシル・tRNA を、該マーカーが新生タンパク質中に取り込まれるような条件下で翻訳系中に導入することを含む、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 3】

該方法がさらに、

- d) 該マーカーを含む該新生タンパク質を検出することを含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

該方法がさらに、

- e) 該検出された新生タンパク質を分離することを含む、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 5】

該検出される新生タンパク質が、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、炭水化物及び脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ホルモン、免疫原性タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせから選択される、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 6】

該翻訳系が細胞または無細胞翻訳系を含む、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

該細胞翻訳系が、組織培養細胞、初代細胞、インビボ細胞、分離された不死化細胞、ヒト細胞及びその組み合わせから成る群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 8】

該無細胞翻訳系が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ臍臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 9】

該無細胞翻訳系が、約 25 ~ 約 45 の温度でインキュベートされる、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 10】

該無細胞翻訳系が連続フローまたは透析系である、請求項 5 に記載の方法。

【請求項 11】

該 tRNA が化学的または酵素的ミスアミノアシル化によってアミノアシル化される、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 12】

2 以上の異なるミスアシル化 tRNA が該翻訳系に導入される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

該検出された新生タンパク質が機能的に活性である、請求項 3 に記載の方法。

【請求項 14】

該 tRNA 分子が開始 tRNA 分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 15】

該 tRNA 分子がサプレッサー tRNA 分子である、請求項 1 に記載の方法。

【請求項 16】

- a) タンパク質合成系の少なくとも一つの成分を含む、第一包含手段、
b) ミスアミノアシル・tRNA を含み、該 tRNA が BODIPY マーカーでミスアミノアシル化されている、第二包含手段を含むキット。

10

20

30

40

50

【請求項 17】

該ミスアミノアシル・tRNAが開始tRNAを含む、請求項16に記載のキット。

【請求項 18】

該ミスアミノアシル・tRNAがサプレッサーtRNAを含む、請求項16に記載のキット。

【請求項 19】

該タンパク質合成系の該成分がリボソームを含む、請求項16に記載のキット。

【請求項 20】

BODIPYマーカでミスアミノアシル化されているtRNA分子。

【請求項 21】

a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一AUGコドンのみを認識し、かつ第一マーカを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカ及びC末端マーカを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること、
b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該第一マーカ、該アフィニティーマーカ及び該C末端マーカを含むような条件下で、該鋳型を含む翻訳系に導入すること、を含む方法。

10

【請求項 22】

発生する該新生タンパク質が、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、炭水化物及び脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ホルモン、免疫原性タンパク質、トランケート型タンパク質、突然変異型タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせから選択される、請求項21に記載の方法。

20

【請求項 23】

該翻訳系が細胞または無細胞翻訳系を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 24】

該細胞翻訳系が、原核細胞、真核細胞、組織培養細胞、初代細胞、インビボ細胞、分離された不死化細胞、ヒト細胞及びその組み合わせから選択される、請求項23に記載の方法。

【請求項 25】

該無細胞翻訳系が、大腸菌(Escherichia coli)溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ臍臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項23に記載の方法。

30

【請求項 26】

該無細胞翻訳系が、約25 ~ 約45 の温度でインキュベートされる、請求項23に記載の方法。

【請求項 27】

該無細胞翻訳系が連続フローまたは透析系である、請求項23に記載の方法。

【請求項 28】

該tRNAが化学的または酵素的ミスアミノアシル化によってアミノアシル化される、請求項21に記載の方法。

40

【請求項 29】

該新生タンパク質が機能的に活性である、請求項23に記載の方法。

【請求項 30】

該第一マーカが蛍光化合物を含む、請求項21に記載の方法。

【請求項 31】

該蛍光化合物が、ジピロメテンニフッ化ホウ素(4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン)色素及び誘導体化クマリンから選択される、請求項30に記載の方法。

【請求項 32】

50

該 C 末端がヒスチジンタグを含む、請求項 21 に記載の方法。

【請求項 33】

a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一 AUG コドンのみを認識し、かつ第一マーカ-を含むミスアミノアシル・開始 tRNA 分子、及び ii) アフィニティーマーカ-及び C 末端マーカ-を含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること、
b) 該ミスアミノアシル・開始 tRNA を、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該タンパク質の N 末端にある該第一マーカ-、C 末端マーカ-及び該第一マーカ-に隣接する該アフィニティーマーカ-を含むような条件下で、該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む方法。

【請求項 34】

該発生する新生タンパク質が、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、炭水化物及び脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ホルモン、免疫原性タンパク質、トランケート型タンパク質、突然変異型タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせから選択される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

該翻訳系が細胞または無細胞翻訳系を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 36】

該細胞翻訳系が、原核細胞、真核細胞、組織培養細胞、初代細胞、インビボ細胞、分離された不死化細胞、ヒト細胞及びその組み合わせから選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 37】

該無細胞翻訳系が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ膵臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 38】

該無細胞翻訳系が、約 25 ~ 約 45 の温度でインキュベートされる、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 39】

該無細胞翻訳系が連続フローまたは透析系である、請求項 35 に記載の方法。

【請求項 40】

該 tRNA が化学的または酵素的ミスアミノアシル化によってアミノアシル化される、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 41】

該新生タンパク質が機能的に活性である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 42】

該第一マーカ-が蛍光化合物を含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 43】

該蛍光化合物が、ジピロメテンニフッ化ホウ素 (4, 4 - ジフルオロ - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン) 色素及び誘導体化クマリンから選択される、請求項 42 に記載の方法。

【請求項 44】

該 C 末端がヒスチジンタグを含む、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 45】

a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識、かつ第一マーカ-を含むミスアミノアシル・開始 tRNA 分子、及び ii) アフィニティーマーカ-及び C 末端マーカ-を含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること、
b) 該ミスアミノアシル・開始 tRNA を、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が

10

20

30

40

50

該第一マーカ－、該アフィニティーマーカ－及び該C末端マーカ－を含むような条件下で、該鑄型を含む翻訳系に導入することを含む方法。

【請求項46】

該発生する新生タンパク質が、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ホルモン、免疫原性タンパク質、トランケート型タンパク質、突然変異型タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせから選択される、請求項45に記載の方法。

【請求項47】

該翻訳系が細胞または無細胞翻訳系を含む、請求項45に記載の方法。

10

【請求項48】

該細胞翻訳系が、原核細胞、真核細胞、組織培養細胞、初代細胞、インビボ細胞、分離された不死化細胞、ヒト細胞及びその組み合わせから選択される、請求項47に記載の方法。

【請求項49】

該無細胞翻訳系が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ臍臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項47に記載の方法。

【請求項50】

該無細胞翻訳系が、約25 ～ 約45 の温度でインキュベートされる、請求項47に記載の方法。

20

【請求項51】

該無細胞翻訳系が連続フローまたは透析系である、請求項47に記載の方法。

【請求項52】

該tRNAが化学的または酵素的ミスアミノアシル化によってアミノアシル化される、請求項45に記載の方法。

【請求項53】

該新生タンパク質が機能的に活性である、請求項45に記載の方法。

【請求項54】

該第一マーカ－が蛍光化合物を含む、請求項45に記載の方法。

30

【請求項55】

該蛍光化合物が、ジピロメテンニフッ化ホウ素 (4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン) 色素及び誘導体化クマリンから選択される、請求項44に記載の方法。

【請求項56】

該C末端がヒスチジンタグを含む、請求項45に記載の方法。

【請求項57】

a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識し、かつ第一マーカ－を含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカ－及びC末端マーカ－を含むタンパク質をコードする核酸鑄型を供給すること、

40

b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が、該タンパク質のN末端にある該第一マーカ－、C末端マーカ－及び該第一マーカ－に隣接する該アフィニティーマーカ－を含むような条件下で該鑄型を含む翻訳系に導入することを含む方法。

【請求項58】

該発生する新生タンパク質が、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ホルモン、免疫原性タンパク質、トランケート型タンパク質、突然変異型タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンバ

50

ク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせから選択される、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 5 9】

該翻訳系が細胞または無細胞翻訳系を含む、請求項 5 8 に記載の方法。

【請求項 6 0】

該細胞翻訳系が、原核細胞、真核細胞、組織培養細胞、初代細胞、インビボ細胞、分離不死化細胞、ヒト細胞及びその組み合わせから選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 1】

該無細胞翻訳系が、大腸菌 (*Escherichia coli*) 溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ臍臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される、請求項 5 9 に記載の方法。

10

【請求項 6 2】

該無細胞翻訳系が、約 2 5 ~ 約 4 5 の温度でインキュベートされる、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 3】

該無細胞翻訳系が連続フローまたは透析系である、請求項 5 9 に記載の方法。

【請求項 6 4】

該 tRNA が化学的または酵素的ミスアミノアシル化によってアミノアシル化される、請求項 5 7 に記載の方法。

20

【請求項 6 5】

該新生タンパク質が機能的に活性である、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 6】

該第一マーカが蛍光化合物を含む、請求項 5 7 に記載の方法。

【請求項 6 7】

該蛍光化合物が、ジピロメテンニフッ化ホウ素 (4, 4 - ジフルオロ - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - イндаセン) 色素及び誘導体化クマリンから選択される、請求項 6 6 に記載の方法。

【請求項 6 8】

該 C 末端がヒスチジンタグを含む、請求項 5 7 に記載の方法。

30

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、細胞あるいは無細胞翻訳系内で翻訳された新生タンパク質の検出及び分析を容易にする非放射性マーカーに関する。これらのマーカーを含有する新生タンパク質は、放射性試薬に関連する取り扱い及び廃棄の問題なく、迅速かつ効率的に検出、分離、かつ分析し得る。

【0002】

【従来の技術】

細胞は、オルガネラ (細胞小器官)、マクロ分子及び広く多様な小分子を含む。水分を除いては、ほとんど大多数の分子及びマクロ分子は、脂質、炭水化物、タンパク質または核酸に分類し得る。タンパク質は、最も豊富な細胞成分であり、多数の主要な細胞プロセスを促進する。これらは、酵素、抗体、ホルモン、輸送分子及び細胞の細胞骨格の成分を含む。

40

【0003】

タンパク質は、線状ポリマーあるいはポリペプチド中に配列されたアミノ酸から構成される。生体系において、タンパク質は 20 種類以上の一般アミノ酸を含む。これらの 20 数種類のアミノ酸は、一般的には天然アミノ酸と称される。全てのアミノ酸の中心には、他分子と 4 つの結合または付着を形成する α 炭素原子 ($C\alpha$) がある (図 1)。1 つの結合はアミノ基 (NH_2) との共有結合で、他方はカルボキシル基 ($COOH$) との共有結合

50

であり、どちらもポリペプチド形成に關与する。3番目の結合は、ほとんど常に水素原子と結合し、4番目の結合は、アミノ酸構造に可変性を分与する側鎖に結合する。例えば、側鎖がメチル基(-CH₃)の場合はアラニン(Ala)が形成され、側鎖がイソプロピル基(-CH(CH₃)₂)の場合はバリン(Val)が形成される。さらに異なる側鎖を含むアミノ酸を化学的に合成することが可能であるが、細胞タンパク質合成系は、まれに例外はあるが、天然アミノ酸を利用する。他のアミノ酸及び構造的類似化合物は、非天然性と称され、ほとんどの生物体においては一般的には発見されない。

【0004】

全ての生物系の主要な特徴は、アミノ酸からタンパク質を生成する能力である。根本的には、タンパク質は、図1Bに描写されるペプタペプチドのようなペプチド結合を介する、複数のアミノ酸の連結によって形成される。本工程に關与する主要な分子は、メッセンジャーRNA(伝令RNA) (mRNA) 分子、トランスファーRNA(転写RNA) (tRNA) 分子及びリボソーム(rRNA - タンパク質複合体) である。タンパク質翻訳は通常では生細胞内で行われ、ある場合には、無細胞翻訳系と言及されるシステム内で細胞外で実施することも可能である。どちらのシステムにおいても、タンパク質合成の基本的工程は同一である。細胞外あるいは無細胞翻訳系は、細胞の細胞内内容物から調製された抽出物を含む。これらの調製物は、タンパク質翻訳をサポートするそれらの分子、また調製方法に応じて、グリコシル化及び切断(cleavage) のような翻訳後イベントを含む。無細胞抽出物またはインビトロ抽出物が作製される典型的な細胞は、Escherichia coli (大腸菌) 細胞、コムギ胚芽細胞、ウサギ網状赤血球、昆虫細胞及びカエル卵母細胞である。

【0005】

インビボ及びインビトロ合成のどちらも、mRNA分子上にある塩基配列の読み取りを含む。mRNAは、トリプレットコドンの形状で翻訳指令を含んでいる。遺伝暗号は、どのアミノ酸が各トリプレットコドンによってコードされるかを特定する。アミノ酸を特定する各コドンには、通常は正確なアミノ酸を新生ポリペプチド鎖上に転移するために機能する同族tRNA分子が存在する。アミノ酸チロシン(Tyr) は、塩基配列UAU及びUACによってコードされるが、システイン(Cys) はUGU及びUGCによってコードされる。コドンの第3塩基に關連する変異はよくあることで、ゆらぎと称されている。

【0006】

翻訳は、リボソームがmRNAに結合することにより開始する(図2)。開始因子、延長因子及び終了因子を含む多数のタンパク質因子が、翻訳の異なるフェーズ中にリボソームと連合(linkage) する。開始複合体の形成が翻訳の第1ステップである。開始因子は、塩基配列UAGを認識するmRNAと開始tRNA(fmet及びmet) と共に開始複合体に寄与する。延長は、電荷tRNAのリボソームへの結合、翻訳及びペプチド鎖中へのアミノ酸積荷の輸送と放出と共に進行する。延長因子は、tRNAの結合を補助し、ペプチジルトランスフェラーゼ(転移酵素) のような酵素によってポリペプチド鎖の延長を補助する。終了因子は、ポリペプチド合成を終了しさらにポリペプチド鎖とmRNAをリボソームから遊離するメッセージにおいて、塩基配列UGAのような終止シグナルを認識する。

【0007】

tRNAの構造は、しばしばクローバー葉モデルとして示される(図3A)。典型的tRNAの構造エレメントは、受容ステム、Dループ、アンチコドンループ、可変ループ及びTΨCループを含む。アミノアシル化あるいはtRNAの電荷は、その結果として、エステル結合を介する、アミノ酸のカルボキシル末端にある末端アデノシン塩基の2' - (または3' -) ヒドロキシル基への結合を生起する。このプロセスは、酵素的あるいは化学的方法のいずれかを使用することにより達成し得る。通常では、特定のtRNAは、1つの特定の天然アミノ酸によってのみ電荷される。ここでは酵素的アミノアシル化と称する、この選択的電荷は、アミノアシル・tRNAシンターゼ(合成酵素) によって達成される。チロシンUACコドンを認識することにより、チロシン残基を新生ポリペプチド鎖

10

20

30

40

50

中に選択的に取り込む tRNA は、チロシン - アミノアシル・tRNA シンテターゼを有するチロシンによって電荷され、UGU コドンを読み取るようにデザインされた tRNA は、システイン - アミノアシル・tRNA シンテターゼによって電荷される。これらのシンテターゼは、tRNA を正しいアミノ酸で電荷し、翻訳プロセスの適合度を維持することにおいて極めて正確であるように進化してきた。非天然アミノ酸がアミノ酸に構造的に極めて類似する特定の場を除いては、tRNA を電荷するために酵素的アミノアシル化以外の手段を使用することが必要である。

【0008】

分子生物学者は、遺伝子によってコードされるタンパク質の発現を、日常の仕事として研究している。研究における重要なステップは、これら遺伝子産物を、無傷細胞または無細胞抽出物のいずれかにおいて発現することである。伝統的には、分子生物学者は、新合成タンパク質または所謂新生タンパク質検出の手段として^{3 5} S - メチオニンのような放射性標識アミノ酸残基を使用する。これらの新生タンパク質は、通常では、まず標準技術であるゲル電気泳動によりタンパク質を分離し、さらにゲルに含まれるタンパク質が特定の放射性標識アミノ酸を含有するかどうかを測定することにより、細胞または無細胞抽出物中に存在する多数の他のタンパク質から識別され得る。この方法は単純で、ゲル電気泳動に基づき、広く利用可能かつ実用化されている方法である。本方法は、発現タンパク質に関して予め知識を必要とせず、さらに一般的にはタンパク質が特定の特性を有する必要がない。さらには、タンパク質が変性あるいはほぐれた形状 (unfold) であってもゲル電気泳動により検出し得る。その上、膜へのプロットング及び共役酵素検定法のようなさらに特殊化したテクニックは必要とされない。放射性アッセイは、新生タンパク質の構造が変更されず、あるいは保存し得るという利点をさらに有するため、従ってタンパク質は次の生化学的及び生物物理学的試験のために機能性のある形状で分離し得る。

【0009】

放射性方法には、放射性標識アミノ酸の利用に関する多数の欠点がある。実験室における放射性化合物の取り扱い、常に健康へのリスクを含み、さらに実験室職員の特別な訓練と同様に、特別な実験室安全手順、施設、詳細な記録管理を必要とする。放射性廃棄物の処分はさらに、公共へのリスクの可能性及び放射性廃棄物処分場所の不足のために、懸念を増している。さらに、放射性標識の使用は時間を要し、ある場合では放射性標識検出に数日も必要とすることがある。そのような実験に長時間を要することは、主要な考慮点であり、さらに研究生産性の深刻な妨げとなり得る。放射能検出の迅速な方法は利用可能ではあるが、高価であり、しばしば複雑な画像エンハンスメント用装置を必要とする。

【0010】

放射性標識アミノ酸の使用はまた、既存タンパク質から新生タンパク質を予め分離することなしには、無細胞抽出物中にある新生タンパク質の生産をモニタする単純かつ迅速な手段を可能としない。しかし、分離ステップは無細胞活性の最適化が可能ではない。イオン及び代謝物濃度、及びタンパク質合成の温度と時間を含む変数は調整できない。

【0011】

放射性標識法はまた、新生タンパク質を将来利用可能である形状で分離する手段を供給しない。放射能の存在は、実験室及び動物におけるそれ以後の生化学的または生物物理学的手順のためのこの利用性を損なう。タンパク質が細胞に毒性である特性を有するために、インビボでタンパク質を容易に生産できない場合のインビトロ発現の場合において明らかである。機能性形状にある新生タンパク質の検出及び分離のための単純かつ便利な方法は、そのようなタンパク質が診断用あるいは治療用特性を有する場合に、生物医学分野において重要である。近年の研究はいくらかの成功を示すが、これらの方法は数々の欠点を有する。

【0012】

放射性標識法はまた、これらのタンパク質またはこれらのタンパク質のフラグメントをコードする DNA における突然変異を起因する可能性のある疾患の存在を指摘し得る新生タンパク質の配列における変化を検出する単純かつ迅速な手段を提供しない。タンパク質レ

ベルにおける現在の分析方法は、ゲル電気泳動の使用、及び速度が遅く、ハイスループット分析や自動化に順応しない放射能検出に依存している。そのような突然変異はまた、特定のタンパク質またはタンパク質フラグメントをコードする遺伝子のDNA配列分析を実施することにより検出し得る。しかし、これにはDNAの広い領域を配列することが必要であり、従って、時間を要しかつ高価である。突然変異を新生タンパク質レベルで検出することを可能とする一般的方法の開発は、生物医学分野において極めて重要である。

【0013】

放射性標識法はまた、新生タンパク質と、薬物候補としての重要性を有する化合物を含む他の分子との相互作用を研究するための単純かつ迅速な手段を供給しない。そのようなアプローチが利用可能であれば、遺伝子やタンパク質の特性が解明されていない場合でも、特定の遺伝子によってコードされている新生タンパク質に対して多数の化合物をスクリーンするために極めて有用であり得る。可能性を有する薬物候補をスクリーンするためのアフニティー電気泳動に基づく、現在のテクノロジーでは、天然試料及び合成ライブラリーのどちらも、第一に、タンパク質を特定のマーカーで均一に標識しなければならず、これは、タンパク質の分離、さらに特定のリガンドマーカーのデザインまたはタンパク質工学を含む特殊な技術をしばしば必要とする。

10

【0014】

サプレッサー特性を有するtRNAのような特定のtRNA、サプレッサーtRNAは、部位特異的非天然アミノ酸置換(SNAAR)プロセスに使用されてきた(C. Nor en e t a l . , S c i e n c e 244:182~188, 1989)。SNAARにおいては、mRNA及びサプレッサーtRNA上にユニーク・コドンが必要であり、これはタンパク質合成期間にユニーク部位に非天然アミノ酸をターゲットするために作用する(PCT WO90/05785)。しかし、サプレッサーtRNAは、タンパク質翻訳系中に存在するアミノアシルtRNAシンテターゼによって認識されてはならない(Bain e t a l . , B i o c h e m i s t r y 30:5411~21, 1991)。さらには、ナンセンスコドンを経型DNAまたはmRNAをコード領域への取り込むことが必要であるため、非天然アミノ酸の部位特異的取り込みは、一般的には細胞あるいは無細胞タンパク質合成系における新生タンパク質の検出には適切ではない。

20

【0015】

タンパク質合成産物はまた、抗体ベースアッセイによっても検出し得る。この方法は、天然形状にフォールド(折り畳み)されたタンパク質、及び新生タンパク質または未知の新生タンパク質に融合されている既知タンパク質に対して予め産生された抗体が必要であるために、その用途に限定がある。そのような手順は、時間を要し、さらにその上タンパク質の同定とキャラクタリゼーションを必要とする。さらに、抗体の産生及びアミノ酸配列はどちらも純度の高いタンパク質を必要とする。

30

【0016】

ある事例では、非天然アミノ酸は、天然アミノ酸を特異的に修飾するが、アミノアシル・tRNAの機能的活性を実質的に変化しない化学反応を使用して、tRNA分子をアミノアシル化後、形成され得る(Promega Technical Bulletin No. 182; tRNA^{ns} (商標): 非放射性翻訳検出システム、1993年9月)。これらの反応は、アミノアシル化後修飾として言及されている。例えば、同族tRNA(tRNA^{LYS})に結合されたリジンのε-アミノ基は、アミン特異性光親和性標識で修飾され得た(U. C. K r i e g e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 83:8604~08, 1986)。アミノアシル化後修飾のこれらのタイプは、有用ではあるが、非天然アミノ酸を新生タンパク質中に取り込むための一般的手段を供給しない。不利な点は、正常アミノ酸の誘導体である非天然アミノ酸のみが取り込まれ、ほんの少数のアミノ酸残基のみが化学的修飾を受け得る側鎖を有することである。さらに頻繁に、アミノアシル化後修飾は、その結果としてtRNAに変質を生じ、さらにtRNAに結合するアミノ酸のα-アミノ基の非特異性修飾(例えば、ε-アミノ基の他に)を生じることがある。この因子は、tRNAに結合する非天然アミノ酸の

40

50

取り込みの効率を低下し得る。非特異的な、tRNA構造のアミノアシル化後修飾は、さらにタンパク質合成におけるその参与を損なう危険性を有する。アミノ酸の α -アミノ基が修飾されると、さらに不完全鎖形成が生じることがある。

【0017】

他のある事例では、新生タンパク質は、特異的酵素活性、吸光あるいは蛍光のような特異的かつユニークな特性に基づいて検出し得る。このアプローチは、ほとんどのタンパク質が容易に検出し得る特別の特性を有していないために、用途に限界がある。しかし、多くの事例においては、発現タンパク質は以前にキャラクタライズ、あるいは同定さえ行われていないことがあるため、従ってその特徴的性状は未知である。

【0018】

10

【課題を解決するための手段】

〔発明の概要〕

本発明は、現在の戦略及びデザインに関する問題や不利点を克服し、放射性アミノ酸や他の放射性標識を使用することなく、無細胞あるいは細胞翻訳系において生成される新生タンパク質の標識、検出、定量、分析及び分離の方法を供給する。本発明による1つの実施態様は、翻訳系において翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。tRNA分子は、蛍光マーカーでアミノアシル化され、ミスアミノアシル・tRNAを創造する。このミスアミノアシル化、あるいは電荷tRNAは、化学的、酵素的、あるいは一部化学的かつ一部酵素的技術によって形成することが可能であり、該技術は蛍光マーカーをtRNA分子上の位置に配置して、そこから蛍光マーカーを増殖ペプチド鎖中に転移し得る。マーカーは、蛍光部位を有する天然または非天然アミノ酸、蛍光部位を有するアミノ酸類似体または誘導体、検出性標識、共役因子、あるいは蛍光部位を有するこれら成分の組み合わせを含み得る。ミスアミノアシル・tRNAは、無細胞抽出物のような翻訳系中に導入され、該システムはインキュベートされて、蛍光マーカーが新生タンパク質中に取り込まれる。

20

【0019】

本発明を特定の蛍光部分の性質に限定することは意図されていない。(例えば、NHSで)誘導体化されて可溶性となる蛍光化合物(例えば、クマリンのNHS誘導体)を含む様々な蛍光化合物が考案されている。それでもなお、高量子効率を有する多数の他のフルオロフォアと比較して、BODIPY化合物と試薬のいくつかは、UV及び可視励起蛍光検出のために高い効率で新生タンパク質中に取り込まれ得るといふ、さらに重要かつまれな特性を有することが実験に基づいて発見されている。蛍光部分を利用するこれらの方法は、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、ヒト遺伝子における突然変異に起因するトランケート型タンパク質、酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、ヒトタンパク質、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせのような新生タンパク質を、検出、分離及び定量するために使用し得る。

30

【0020】

本発明による他の実施態様は、アミノ末端において新生タンパク質を標識するための方法を指示する。メチオニン開始tRNAまたはホルミルメチオニン開始tRNAのような、開始tRNA分子は蛍光部分(例えば、BODIPY部分)によりミスアミノアシル化されて、翻訳系に導入される。この系はインキュベートされ、マーカーが新生タンパク質のアミノ末端に取り込まれる。マーカーを含む新生タンパク質を検出、分離、かつ定量することができる。マーカーあるいはマーカーの一部は、実質的に未変性立体配置のままで機能的活性である新生タンパク質から切断され得る。

40

【0021】

従って、本発明は組成物、方法及びシステム(系)を考案する。組成物については、本発明はBODIPYマーカーでミスアミノアシル化されたtRNA分子を特別に考案する。一つの実施態様では、本発明は以下を含む方法を考案する：a) tRNA分子とBODIPYマーカーを供給し；さらに、b) 該tRNA分子を該BODIPYマーカーでアミノ

50

アシル化して、ミスアミノアシル・tRNAを創出する。ある実施態様による方法は、さらに、c) 該ミスアミノアシル・tRNAを該マーカが新生タンパク質中に取り込まれるような条件下で、翻訳系に導入することを含む。さらに他の実施態様による方法は、さらに、d) 該マーカを含む該新生タンパク質を検出することを含む。また他の実施態様による方法は、さらに、e) 該検出された新生タンパク質を分離することを含む。

【0022】

本発明は、化学的あるいは酵素的ミスアミノアシル化によるtRNA分子のアミノアシル化を考案する。本発明はさらに、2またはそれ以上の異なるミスアシル化tRNAが翻訳系に導入される実施態様を考案する。好ましい実施態様においては、(取り込まれたマーカによって) 検出された新生タンパク質は機能的に活性である。

10

【0023】

本発明が新生タンパク質の特定の性質に限定されることは意図されていない。一つの実施態様においては、本発明は、新生タンパク質の全体あるいは一部をコードするmRNAメッセージに抱合する新生タンパク質の検出用方法を考案する。一般的には、翻訳後修飾、タンパク質分解、ピューロマイシンリンカーを介するオリゴヌクレオチドのタンパク質C末端への付着、及び新生タンパク質と外因的に添加されたものを含む翻訳系の他の成分との相互作用を含む、新生タンパク質の様々な修飾が創案される。

【0024】

本発明がtRNA分子の特定の性質に限定されることは意図していない。一つの実施態様では、tRNA分子は開始tRNA分子である。他の実施態様では、tRNA分子はサブレッサーtRNA分子である。

20

本発明はさらにキットも考案する。一つの実施態様では、キットは、a) タンパク質合成系の少なくとも1成分を含む第一容器手段(例: 試験管、小瓶等); さらに、b) ミスアミノアシル・tRNAを含む第二容器手段、該tRNAがBODPYマーカによりミスアミノアシル化されている、を含む。そのようなキットは、開始tRNA及び/またはサブレッサーtRNAを含み得る。重要なことには、このキットは、該タンパク質合成系の特定の成分に限定はされず、様々な成分(例: リボソーム)が考案されている。

【0025】

本発明の他の実施態様は、翻訳系において翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。tRNA分子は二元マーカシステムの1成分によりアミノアシル化されている。このミスアミノアシル化、あるいは電荷tRNAは、化学的、酵素的、あるいは一部化学的かつ一部酵素的技術によって形成することが可能であり、該技術は二元マーカシステムの成分をtRNA分子上の位置に配置して、そこからマーカ成分を増殖ペプチド鎖中に転移し得る。二元マーカシステムの成分は、天然または非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、検出性標識、共役因子あるいはこれら成分の組み合わせを含み得る。ミスアミノアシル・tRNAは、無細胞抽出物のような翻訳系に導入され、この系はインキュベートされて、マーカが新生タンパク質中に取り込まれる。二元マーカシステムの第二成分が次に導入され、新生タンパク質中に取り込まれた第一成分を特異的に検出可能にする。これらの方法は、組換え遺伝子産物、遺伝子融合産物、酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、ヒトタンパク質、炭水化物と脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びそれらのフラグメント及び組み合わせのような新生タンパク質を、検出、分離及び定量するために使用し得る。

30

40

【0026】

本発明を特定の翻訳系に限定することは意図していない。一つの実施態様において、無細胞翻訳系は、Escherichia coli溶解物、コムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球溶解物、カエル卵母細胞溶解物、イヌ臍臓溶解物、ヒト細胞溶解物、精製あるいは半精製翻訳因子の混合物及びそれらの組み合わせから成る群から選択される。また、本発明が使用する特定の反応条件に限定されることも意図されていない。しかし、典型的には無細胞翻訳系は、約25 ~ 約45 の温度でインキュベートされる。

50

本発明は、連続フローシステムあるいは透析システムのどちらも考案する。

【0027】

本発明による他の実施態様は、検出可能な電磁スペクトル特性を有する非放射性マーカーを使用する、細胞または無細胞翻訳系において翻訳された新生タンパク質検出用の方法を指示する。前述のように、非放射性マーカーはtRNA分子にミスアミノアシル化され、このミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に添加される。マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系はインキュベートされる。マーカーを含む新生タンパク質は、マーカーの特異的電磁スペクトル特性により検出され得る。新生タンパク質はさらに、これらのマーカーのユニークな特性を利用したり、電気泳動法、ゲル濾過法、高圧あるいは高速高圧液体クロマトグラフィ、アフィニティークロマトグラフィ（親和力クロマトグラフィー）、イオン交換クロマトグラフィー、化学的抽出法、磁性ビーズ分離法、沈降法あるいはこれら技術の組み合わせにより分離され得る。

10

【0028】

本発明による他の実施態様は、レポーター特性を有するマーカーを含み、レポーターが第二因子と接触される際に、新生タンパク質の合成を指示する。レポーターマーカーは、ペプチドに取り込まれると検出可能な電磁スペクトル特性を有し、さらにそのスペクトル特性は取り込まれなかったマーカーやtRNA分子に付着されたマーカーと識別可能である化学部分である。前述のように、tRNA分子は、今回はレポーターマーカーを使用して、ミスアミノアシル化される。ミスアミノアシル・tRNAを翻訳系に添加して、さらにペプチド中にマーカーを取り込むためにインキュベートする。レポーターマーカーは、タンパク質翻訳プロセスを調査し、タンパク質合成系の他の成分から予め分離することなしに、新生タンパク質を検出及び定量するために使用し得る。

20

【0029】

本発明による他の実施態様は、細胞あるいは無細胞翻訳系において、マーカーの存在下で翻訳、分離さらに必要に応じて精製された新生タンパク質から成る組成物を指示する。組成物はさらに、薬学的受容性のあるキャリア（担体）を含み、ワクチンのような免疫学的活性組成物、あるいはヒト及び他の哺乳類に使用するための薬物のような薬学的活性組成物として利用され得る。

【0030】

本発明による他の実施態様は、質量分析の使用による、翻訳系で翻訳される新生タンパク質検出用方法を指示する。質量が既知である非放射性マーカーが、tRNA分子にミスアミノアシル化され、このミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に添加される。質量マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。翻訳系の質量スペクトルを次に測定する。新生タンパク質の存在は、未修飾タンパク質の質量と、新生タンパク質に加えてマーカーの質量を含む修飾アミノ酸の質量に対応する高質量位置にある第二バンドに対応する、タンパク質合成系の質量スペクトルのピークを識別することにより直接検出し得る。質量マーカーが光開裂性である場合は、質量マーカーを含む新生タンパク質に対する第二バンドの割り当ては、光線によりマーカーを除去することにより確証し得る。

30

【0031】

本発明による他の実施態様は、翻訳系において翻訳される突然変異を有する新生タンパク質を検出する方法を指示する。起こり得る突然変異を含む可能性のあるタンパク質をコードするRNAまたはDNAを、翻訳系に添加する。新生タンパク質を合成するために系をインキュベートする。タンパク質のN末端またはその近隣に位置するアフィニティー（親和性）マーカーを使用して、新生タンパク質を次に翻訳系から分離する。タンパク質を次に、タンパク質のN末端またはその近隣に位置する検出マーカー（N末端マーカー）の存在下で分析する。タンパク質のC末端またはその近隣に位置する配列依存性検出マーカー（C末端マーカー）上で、別の測定を行う。次に、新生タンパク質におけるN末端とC末端マーカーの取り込み度の比較を行う。本発明をN及びC末端マーカーの性質、あるいは使用するアフィニティーマーカーのタイプによって限定することは意図していない。様々

40

50

なマーカーが考案されている。一つの実施態様では、アフィニティーマーカーは、抗体または他の結合性分子により認識されるエピトープを含む。一つの実施態様では、N末端マーカーは蛍光マーカー（例：BODIPYマーカー）を含み、C末端マーカーは金属結合領域（例：Hisタグ）を含む。

【0032】

本発明は、3つのマーカー（例：N末端マーカー、C末端マーカー、アフィニティーマーカー）を新生タンパク質中に導入する様々な方法を考案する。一つの実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一AUGコドンのみを認識し、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 10
該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該第一マーカー、該C末端マーカー及び（ある実施態様では）該アフィニティーマーカーを含むような条件下で、該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

【0033】

他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働く第一AUGコドンのみを認識し、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が該タンパク質のN末端にある該第一マーカー、該C末端マーカー及び（ある実施態様では）該第一マーカーに隣接する該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステ 20
ップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

【0034】

さらに他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が、該第一マーカー、該C末端マーカー及び（ある実施態様では）該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導 30
入することを含む。一つの実施態様による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

【0035】

さらに他の実施態様による方法は、a) i) タンパク質合成を開始するために働くようにデザインされた第一コドンのみを認識、かつ第一マーカーを含むミスアミノアシル・開始tRNA分子、及びii) アフィニティーマーカー及びC末端マーカーを含むタンパク質をコードする核酸鋳型を供給すること；b) 該ミスアミノアシル・開始tRNAを、新生タンパク質が発生され、該タンパク質が、該タンパク質のN末端にある該第一マーカー、C末端マーカー及び（ある実施態様では）該第一マーカーに隣接する該アフィニティーマーカーを含むような条件下で該鋳型を含む翻訳系に導入することを含む。一つの実施態様 40
による方法は、ステップb)の後に、該新生タンパク質の分離をさらに含む。

【0036】

本発明はさらに、2つのマーカーのみが使用される（例えば、N末端マーカーとC末端マーカー）実施態様をも考案する。一つの実施態様では、新生タンパク質が、アフィニティーマーカによる特異的相互作用によるよりは、固体支持体（例：ビーズ、マイクロウェル、ストリップ等）に非特異的に結合されている。この文脈において、「非特異性」結合とは、結合が新生タンパク質配列の独自性によって行われないことを示すこと意味する。そのかわり、結合は電荷相互作用による。一つの実施態様では、本発明は、固体支持体の表面上に新生タンパク質を捕獲するために、固体支持体が修飾されること（例えば、表面の電荷を変化させるために機能化する）を考案する。一つの実施態様では、固体支持体は 50

ポリ-L-リジンコートである。さらに他の実施態様では、固体支持体は、ニトロセルローズ（例：ストリップ、マイクロウェルを含むニトロセルローズ等）である。固体支持体の特定の性質に関わらず、本発明は、2つのマーカーを含む新生タンパク質が、マーカーの即時検出を許すような条件下で、捕獲されることを考案する。

【0037】

前記に説明する2マーカー及び3マーカー実施態様のどちらにおいても、本発明は、1またはそれ以上のマーカーを、プライマー延長あるいはPCRにより核酸鋳型中に導入することを考案する。一つの実施態様では、本発明は、（5'端上またはその付近に）プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位（「RBS」）、及び開始コドン（例：ATG）を、鋳型に対する相補性領域と共に考案する。他の実施態様では、本発明は、（5'端上またはその付近に）プロモーター、リボソーム結合部位（「RBS」）、開始コドン（例：ATG）、アフィニティマーカーコード領域、及び鋳型に対する相補性領域を考案する。本発明を相補性領域の長さによって限定することは意図していない；好ましくは、該領域は長さが8塩基以上であり、より好ましくは長さが15塩基以上であり、長さが20塩基以上であることがさらに好ましい。

10

【0038】

本発明がリボソーム結合部位によって限定されることは意図していない。一つの実施態様では、本発明は、翻訳前に存在し、真核細胞において転写かつ翻訳される大多数のmRNAで最初のATGを開始する、非ランダムヌクレオチドのストリングであるKozak配列（共通配列：5'-GCCA/GCCATGG-3'）（配列番号1）を含むプライマーを考案する。M. Kozak、Cell 44:283~292（1986）を参照のこと。他の実施態様では、本発明は通常は、通常は、翻訳開始コドン：mRNA 5'-UAGGAGGU-N₅₋₁₀-AUG（配列番号3）のすぐ5'に発見され、Shine-Dalgarno（SD）配列として知られているポリプリンドメインUAGGAGGU（配列番号2）の一部または全てを含む、原核細胞mRNAリボソーム結合部位を含むプライマーを考案する。

20

【0039】

PCRには、2プライマーが使用される。一つの実施態様では、本発明は、フォワードプライマーとして、（5'端上またはその付近に）プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位（「RBS」）、及び開始コドン（例：ATG）を、鋳型に対する相補性領域と共に考案する。他の実施態様では、本発明は、フォワードプライマーとして、（5'端上またはその付近に）プロモーターを含むプライマー、リボソーム結合部位（「RBS」）、開始コドン（例：ATG）、アフィニティマーカーコード領域、及び鋳型に対する相補性領域を考案する。本発明は、一つの実施態様では、（5'端上またはその付近に）1またはそれ以上の終止コドンと（HISタグのような）C末端マーカーをコードする領域含むリバースプライマーを考案する。

30

【0040】

本発明による他の実施態様は、電気泳動（例：毛管電気泳動）によって翻訳系において翻訳される新生タンパク質と分子の相互作用を検出するための方法を指示する。検出マーカーでミスアミノアシル化されたtRNAがタンパク質合成系に添加される。検出マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。1またはそれ以上の特定分子を、次に新生タンパク質に（分離前あるいは分離後に）併合して、新生タンパク質/分子抱合体を含む混合物を形成する。この混合物のアリコートに次に毛管電気泳動にかける。新生タンパク質/分子抱合体は、取り込まれたマーカーを有する新生タンパク質の電気泳動の易動度の変化を検出することにより同定される。

40

【0041】

本発明はさらに、前記に説明する方法と組成物を、薬物/プロテオームのスクリーニング方法において使用することを考案する。例えば、本発明は、（薬物のような）リガンドと相互作用するタンパク質またはタンパク質の一部を同定する方法を考案し、該方法は、該所望するタンパク質を発現する細胞からcDNAライブラリーを調製するステップを含

50

み；該 cDNA ライブラリーを、発現ベクター中に挿入し、これによって、発現 cDNA ライブラリーを形成し；該発現ライブラリーを細菌細胞中に形質転換して、さらに該細菌細胞を培養して個別の細菌コロニーを生産し；各コロニーが該発現ライブラリーの 1 メンバーを含み；既定数の該個別細菌コロニーから成るプールを収集し；細菌コロニーの該プールから cDNA を分離し；該 cDNA によりコードされるタンパク質（あるいはタンパク質の一部）を発現して；さらに所望するタンパク質（あるいはその一部）と所望する該タンパク質（またはその一部）をコードする cDNA を同定し；約 50 個の個別細菌コロニーのプールを収集し（より好ましくは 50 個以下、さらにより好ましくは 40 個以下、さらには 30 個以下、さらに最も好ましくは 25 個以下であるが 10 個以上）、各コロニーが発現 cDNA ライブラリーの 1 メンバーを含み、これにより cDNA プールを形成し；さらに該 cDNA プールの cDNA でコードされるタンパク質（あるいはその一部）を、普通の反応混合物中にあるインビトロ転写／翻訳系において発現し、従って、該反応混合物から所望するタンパク質（またはその一部）を同定する。

10

【0042】

本発明による他の実施態様及び利点は、一部は以下の説明において提示され、さらに一部は、本説明により明らかであるか、あるいは本発明の実施から習練され得る。

〔定義〕

本発明の理解を容易とするために、多数の術語を以下に定義する。

【0043】

術語「遺伝子」は、ポリペプチドまたは前駆物質の生産のために必要な制御及びコード配列を含む DNA 配列を言及する。ポリペプチドは、全長コード配列、あるいは所望する酵素活性が保有されている限り、コード配列の一部によってコードされ得る。

20

術語「野生型」は、天然発生原料から分離された際にその遺伝子または遺伝子産物の特徴を有する遺伝子または遺伝子産物を言及する。野生型遺伝子は、集団内で最も頻繁に観察される遺伝子であり、従って、遺伝子の「正常」あるいは「野生型」形状が随意にデザインされている。対照的に、術語「修飾」または「突然変異体」とは、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較すると、配列及び／または機能特性における修飾（すなわち、変更特徴）を呈示する遺伝子または遺伝子産物を言及する。天然発生突然変異体を分離することが可能であることが注目されており、野生型遺伝子または遺伝子産物と比較する際に変更された特性を有する事実によりこれらは同定される。

30

【0044】

術語「オリゴヌクレオチド」は、本明細書で使用されるように、2 またはそれ以上、好ましくは 3 以上、さらに通常では 10 以上のデオキシリボヌクレオチドまたはリボヌクレオチドを含む分子として定義される。正確なサイズは、多数の因子に依存し、またこれはオリゴヌクレオチドの究極の機能または用途に基づく。オリゴヌクレオチドは、化学合成、DNA 複製、逆転写、あるいはそれらの組み合わせを含む、いずれの方法でも生成することが可能である。

【0045】

モノヌクレオチドが反応して、一つのモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸が、一方向にリン酸ジエステル結合を介してそれに隣接する 3' 酸素に付着するような方式でオリゴヌクレオチドを作製し、5' リン酸がモノヌクレオチドペントース環の 3' 酸素に結合していない場合は、オリゴヌクレオチドの一端は「5' 端」として言及され、さらにその 3' 酸素が次のモノヌクレオチドペントース環の 5' リン酸と結合していない場合は、「3' 端」と言及される。本明細書に使用されるように、核酸配列は、それが分子内から大型オリゴヌクレオチドであっても、5' 及び 3' 端を有し得る。

40

【0046】

術語「プライマー」は、プライマー延長が開始されるような条件下に置かれる際に、合成開始のポイントとして作用することが可能であるオリゴヌクレオチドを言及する。オリゴヌクレオチド「プライマー」は、天然に、精製された制限消化として生じ、あるいは人工的に生産され得る。

50

プライマーは、3'端上に、鋳型の特定配列のストランド（鎖）と「実質的」に相補性である領域を有するように選択される。プライマー延長を生じるためには、プライマーは、鋳型ストランドとハイブリダイズするに十分なだけ相補性でなければならない。プライマー配列は、鋳型と全く同一配列である必要はない。例えば、プライマー配列の残り部分が実質的にストランドと相補性であれば、非相補性ヌクレオチドフラグメントが、プライマーの5'端に付着し得る。プライマー配列が、鋳型配列とハイブリダイズするために十分な相補性を有し、それによってプライマーの延長生成物の合成のための鋳型プライマー複合体を形成するならば、非相補性塩基あるいはより長い配列がプライマー中に散在してもよい。

【0047】

10

本明細書中に使用されるように、術語「ハイブリダイズ」及び「ハイブリダイゼーション」は、ターゲット核酸に対して相補性配列をアニーリングすることを言及する。相補性配列を含む核酸の2ポリマーがお互いを見つけたして、塩基対合相互作用を通してアニールする能力は、既に認識されている現象である。Marmur 及び Lane、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453 (1960) 及び Doty et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461 (1960)。

【0048】

術語「アニールされた」及び「ハイブリダイズされた」の使用は互換性があり、部分的相補性のみを有する領域の結合を含む、オリゴヌクレオチドとターゲット核酸間の特定かつ再現可能な相互作用を含むことが意図されている。

20

本明細書で使用される核酸配列の補体は、一つの配列の5'端が他の配列の3'端と対合されるように核酸配列と整列される際に、「アンチパラレル（逆平行）会合」状態にあるオリゴヌクレオチドを言及する。天然核酸には通常発見されない一定の塩基が、本発明による核酸に含まれることがあり、例えば、イノシン及び7-デアザグアニンを含む。相補性は、完全である必要はなく、安定二重鎖がミスマッチ塩基対やマッチしない塩基を含んでもよい。核酸テクノロジー分野の当業者は、二重鎖の安定性を、例えば、オリゴヌクレオチドの長さ、塩基組成及びオリゴヌクレオチドの配列、イオン強度及びミスマッチ塩基対のインシデンス（頻度）を含む、多数の変数を考慮して経験的に決定することができる。

30

【0049】

核酸二重鎖の安定性は、融解温度、あるいは「 T_m 」により測定される。特定された条件下でのその核酸二重鎖の T_m は、塩基対の平均半分が解離する温度である。

本明細書で使用される術語「プローブ」は、プローブ中の少なくとも一つの配列と他方の核酸中の配列との相補性または再現性のある誘引相互作用による他の手段ために、他の核酸配列中の配列との二重鎖構造または他の複合体を形成するオリゴヌクレオチドを言及する。

【0050】

「遺伝子配列とマッチするまたは相補性のあるオリゴヌクレオチドプライマー」は、単鎖または二重鎖核酸の鋳型依存性合成を促進することが可能であるオリゴヌクレオチドプライマーを言及する。遺伝子配列にマッチするまたは相補性のあるオリゴヌクレオチドプライマーは、PCR、RT-PCRなどにおいて使用し得る。前記に記載のように、オリゴヌクレオチドプライマーは、ターゲットまたは鋳型配列と完全に相補性である必要はない。鋳型依存性合成による伸長が可能なように、プライマーは鋳型と十分な相互作用を有することのみを必要とする。

40

【0051】

本明細書で使用されるように、術語「ポリヒスチジントラクト」または（HISTAG）は、新生タンパク質のアミノまたはカルボキシル末端のいずれかに、2～10ヒスチジン残基が存在することを言及する。6～10残基から成るポリヒスチジントラクトが好ましい。ポリヒスチジントラクトは、所望するタンパク質に加えられ、結果生じるタンパク質の

50

ニッケル・キレートカラム上でのアフィニティー精製、または他の分子（例えば、H I S タグと反応性のある抗体）との相互作用を通してタンパク質末端の同定を可能とする、連続ヒスチジン残基数として機能的定義もされる。

【 0 0 5 2 】

[発明の説明]

本明細書に具体化及び説明するように、本発明は、新規または新生タンパク質合成による産物の非放射性標識及び検出方法、かつ細胞または無細胞翻訳系において既存するタンパク質からそれらの新生タンパク質の分離方法を含む。放射性標識が使用されないため、廃棄物処理のため遵守されるべき特定の規定はない。放射性標識を使用する際に生じる、翻訳産物のそれ以上の利用を阻止するような放射能の危険性やリスクがなく、従って結果生じるタンパク質産物を直接的あるいはさらに精製して使用し得る。さらに、例えば、ユニークなサプレッサー t R N A を含む、タンパク質配列または構造に関する既存の知識は必要ない。さらに、遺伝子または m R N A の配列は決定される必要がない。その結果、m R N A のコード領域におけるナンセンスコドンや特定コドンのいずれの存在も必要ではない。指定の標識についての特定の t R N A を含む、いずれの t R N A も使用することが可能であるが、そのような特異性は必要ではない。翻訳後標識とは異なり、新生タンパク質は、特異性により標識され、タンパク質構造や機能を影響する可能性がある翻訳後修飾を受けることがない。

10

【 0 0 5 3 】

本発明による 1 つの実施態様は、翻訳系において合成される新生タンパク質を標識するための方法を指示する。これらのタンパク質は、ペプチド鎖中に取り込まれる検出マーカを伴って合成されることにより標識される。t R N A 分子にアミノアシル化されるマーカは、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、または化学的部分を含み得る。これらのマーカは、翻訳プロセス中に、その結果生じるミスアミノアシル・t R N A から新生タンパク質中に導入される。アミノアシル化は、それによって t R N A が電荷されるプロセスである。本プロセスがインビボで起こる際は、天然アミノアシル化と言及され、その結果生じる産物は、天然アミノ酸で電荷されたアミノアシル・t R N A である。本プロセスが人工的手段を介して生じる際は、ミスアミノアシル化と称され、天然アミノ酸以外で電荷される t R N A はミスアミノアシル・t R N A と言及される。

20

【 0 0 5 4 】

本方法に従って、ミスアミノアシル・t R N A は、細胞または無細胞タンパク質合成系、その翻訳系中に導入され、そこで、タンパク質合成の間に増殖ペプチド鎖中で天然アミノ酸の代わりに検出マーカを取り込むように機能する。この翻訳系は、R N A 及び酵素、翻訳、開始及び延長因子、さらに化学的試薬を含むマクロ分子を含む。該系の R N A は、リボソーム R N A (r R N A)、メッセンジャー R N A (m R N A) 及びトランスファー R N A (t R N A) の 3 つの分子形であることを必要とする。m R N A は、そのコドン配列内にコードされるペプチドを構築するための遺伝情報を担う。t R N A は、m R N A を解読する特定のアンチコドンを含み、増殖ペプチド鎖に沿う位置中に個別にアミノ酸を運ぶ。r R N A とタンパク質の複合体である、リボソームは、トランスロケーションを含む、翻訳プロセスが進行する動的構造フレームワークを供給する。細胞内では、個別化されたアミノアシル・t R N A シンテターゼが、特定のアミノ酸をマッチするアンチコドンを担う t R N A 分子に結合して、アミノアシル化プロセスにより、アミノアシル化あるいは電荷 t R N A を創出する。アミノアシル化または電荷 t R N A 分子を含む翻訳プロセスは、M o l e c u l a r C e l l B i o l o g y (分子細胞生物学) (J . D a r n e l l e t a l . 編集、S c i e n t i f i c A m e r i c a n B o o k s , N . Y . , N . Y . , 1 9 9 1) に説明されており、本明細書に参考文献として特に編入されている。アミノアシル化は、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸類似体または誘導体、あるいは検出性化学物質または共役因子のような他の分子を利用する、天然または人工的手段であり得る。結果生じるミスアミノアシル・t R N A は、化学的部分、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体または類似体、あるいは他の検出性化学物質と結合する天然アミノ

30

40

50

酸を含む。これらのミスアミノアシル・tRNAは、そのマーカ-を翻訳中に増殖ペプチド鎖の中に取り込み、マーカ-の存否によって検出及び分離し得る標識新生タンパク質を形成する。

【0055】

細胞または無細胞翻訳系中での翻訳により発現され得るいずれのタンパク質も、新生タンパク質であり、従って、本発明による方法により標識、検出かつ分離され得る。そのようなタンパク質の実例は、タンパク質分解性タンパク質のような酵素、サイトカイン、ホルモン、免疫原性タンパク質、炭水化物または脂質結合タンパク質、核酸結合タンパク質、ヒトタンパク質、ウィルスタンパク質、細菌タンパク質、寄生虫タンパク質及びフラグメントかつその組み合わせを含む。そのような遺伝子を担う組み換えベクターは一般的に、かなり高レベルでmRNAを転写する強力なプロモーターを担っているために、これらの方法は、組み換え型遺伝子産物及び遺伝子融合産物の検出によく応用される。これらのmRNAは、翻訳系において容易に翻訳される。

10

【0056】

翻訳系は、細胞または無細胞であってもよく、まさに原核性または真核性であってもよい。細胞翻訳系は、透過化細胞または細胞培養のような全細胞調製物を含み、そこで所望する核酸配列はmRNAに転写され、mRNAが翻訳され得る。

無細胞翻訳系は、市販されており、様々な異なるタイプ及びシステムがよく知られている。無細胞システムの実例は、*Escherichia coli* (大腸菌) 溶解物のような原核性溶解物、さらにコムギ胚芽抽出物、昆虫細胞溶解物、ウサギ網状赤血球、カエル卵母細胞溶解物及びヒト細胞溶解物のような真核性溶解物を含む。結果生じるタンパク質がグリコシル化、リン酸化または別な方法で修飾されている場合は、多数のそのような修飾は真核系でのみ可能であるために、真核性抽出物または溶解物が好ましいであろう。これらの抽出物及び溶解物のいくつかは、市販されており入手可能である (Promega; Madison, WI; Stratagene; La Jolla, CA; Amersham; Arlington Heights, IL; GIBCO/BRL; Grand Island, NY)。ミクロソーム膜を含むイヌ臍臓溶解物のような、膜性抽出物もまた入手が可能であり、分泌型タンパク質の翻訳に有用である。精製翻訳因子の混合物もまた、溶解物、または開始因子-1 (IF-1)、IF-2、IF-3 (α または β)、延長因子T (EF-Tu)、あるいは終止因子のような精製翻訳因子を補充した溶解物の組み合わせと同様に、タンパク質中にmRNAを翻訳する目的に使用され成功を収めている。

20

30

【0057】

無細胞システムはまた転写/翻訳系と共役させることができ、そこでDNAが系に導入され、mRNA中に転写され、さらにmRNAが、本明細書に特に参考文献として編入している、*Current Protocols in Molecular Biology* (分子生物学における現代のプロトコル) (F. M. Ausubel et al., 編集、Wiley Interscience, 1993) に説明されているように、翻訳される。真核性転写系に転写されたRNAは、ヘテロ核RNA (hnRNA) または5' 端キャップ (7-メチルグアノシン) 及び3' 端ポリAテール成熟mRNAの形状のことがあり、これはある翻訳系では利点となり得る。例えば、mRNAキャップは、網状赤血球溶解物系では高い効率で翻訳される。

40

【0058】

マーカ-によるミスアミノアシル化のために選択されるtRNA分子は、タンパク質合成系中で機能する能力以外は特別の特性を有する必要はない。生体系におけるタンパク質翻訳系の普遍性のために、大量数のtRNAが、細胞及び無細胞反応混合物のどちらにも使用され得る。ナンセンスまたはアンバーコドン (UAG) のようなユニークなコドンを認識する特定のtRNA分子は、必要とされない。

【0059】

非天然性類似体のタンパク質への翻訳中の部位特異性取り込みもまた必要ではない。マー

50

カーの取り込みはポリペプチドのどこで生起されてもよく、また複数の位置で生起してもよい。これは翻訳された mRNA の遺伝的配列に関する情報を予め得る必要性、またはこの遺伝的配列を修飾する必要性を排除する。

ある場合は、新生タンパク質の機能的特性を保存することが望ましいことがある。タンパク質機能または構造を妨害しない部位にマーカーを取り込む tRNA のサブセットを選択することが可能である。ポリペプチドのアミノまたはカルボキシル末端のアミノ酸は、機能や構造を実質的に変更しない。マーカーでミスアミノアシル化された際に、タンパク質翻訳開始のための万能コドン (AUG) を認識する tRNA 分子は、アミノ末端にマーカーを配置する。原核性タンパク質合成系は、開始 tRNA^{fMet} 分子を利用し、真核性系は、開始 tRNA^{Met} 分子を利用する。いずれの系においても、開始 tRNA 分子は、マーカー、レポーターまたはアフィニティー特性を有する非天然アミノ酸またはアミノ酸類似体または誘導体であり得るマーカーでアミノアシル化される。結果生じる新生タンパク質は、アミノ末端でのみ標識されるが、内部に配置されたマーカーはタンパク質の構造的または機能的状況を必ずしも破壊しない。例えば、tRNA^{LYS} は、タンパク質の機能や構造を妨害しないアミノ酸誘導体である、ダンシルリジンでミスアミノアシル化され得る。さらに、ミスアミノアシル・tRNA を限定量使用することにより、極めて僅かな量のみがマーカーで標識された新生タンパク質を検出及び分離することが可能であり、これは大量のマーカーの影響が有害であったり、未知な場合のタンパク質分離に極めて有効である。

10

20

30

【0060】

アミノアシル化に使用する tRNA 分子は、多数の製造元から市販されており、Escherichia coli (大腸菌)、イースト、仔ウシ肝臓及びコムギ胚芽細胞を含む原料から既知の方法により調製され得る (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Promega; Madison, WI; Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN)。その分離と精製は、主として細胞分解、フェノール溶出、さらに DEAE-セルロース上のクロマトグラフィーを含む。アミノ酸特異的 tRNA、例えば、tRNA^{fMet} は、クローンされた遺伝子からの発現により分離され、ホスト細胞中で過剰発現され、さらに分離用ポリアクリルアミドゲル電気泳動、次にバンド切除及び高収率かつ純度溶出のような技術により全 tRNA から分離される (Seong 及び Raj Bhandary, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:334~338, 1987)。ランオフ転写は、いずれの tRNA も高純度で生産することを可能とするが、翻訳後修飾を欠如するために、その適用には限りがある (Bruce 及び Uhlenbeck, Biochemistry 21:3921, 1982)。

【0061】

ミスアミノアシル・tRNA は、細胞あるいは無細胞タンパク質合成系中に導入される。無細胞タンパク質合成系においては、反応混合物は、リボソーム、tRNA、rRNA、スパーミジン及び適切な濃度と適切な pH であるマグネシウム及びカリウムのような生理学的イオンを含む、タンパク質合成をサポートするために必要な全ての細胞成分を含む。反応混合物は、一般的には、コムギ胚芽、E. coli (S-30)、赤血球 (網状赤血球溶解物) 及び卵母細胞を含む多数の様々な原料に由来し、いったん作製したものは、アリコートとして、約 +40 ~ -70 の温度で保存し得る。そのような反応混合物調製の方法は、J. M. Pratt (Transcription and Translation (転写と翻訳)、B. D. Hames 及び S. J. Higgins、編集、p. 209、IRL Press, Oxford, 1984) によって説明されており、参考文献として本明細書に編入されている。多数の異なる翻訳系が、多数の製造元から市販されている。

40

【0062】

ミスアミノアシル・tRNA は、容量と濃度を既定した溶液として、反応混合物中に直接に添加される。これは、反応混合物を -70 で保存する直前に行うことができ、その場

50

合は、タンパク質合成開始前に総混合物が解凍される。あるいは、これはタンパク質合成開始前に行うことができる。新生タンパク質中へのマーカの効率的な取り込みは、最終 pH 及びマグネシウムイオン濃度に感受性がある。反応混合物は、通常では約 pH 6.8 で、約 3 mM のマグネシウムイオン濃度を含む。これらの条件は、ミスアミノアシル・tRNA の塩基不安定性であるアミノアシル結合に安定性を分与する。アミノアシル・tRNA は、翻訳抽出物から十分な量で得ることが可能である。マーカで電荷されたミスアミノアシル・tRNA は、約 1.0 µg / ml ~ 約 1.0 mg / ml、好ましくは約 10 µg / ml ~ 約 500 µg / ml、さらに好ましくは約 150 µg / ml の濃度で添加される。

【0063】

タンパク質合成の開始は、一定量の mRNA または DNA のミスアミノアシル・tRNA を含む反応混合物中への添加時に起こる。mRNA 分子は組み換え型原料から調製または獲得されるか、またはポリ・dT クロマトグラフィーのような手順により他の細胞から精製され得る。反応混合物成分の正しい比率を確実にするための一つの方法は、バイアル（小瓶）や標準マイクロ遠心分離用試験管のような便利な容器内に保存された既定容量を使用することである。例えば、新生タンパク質をコードする DNA 及び/または mRNA 及びミスアミノアシル・tRNA 溶液を適切な量をプレミックスして、試験管内に分けて保存される。タンパク質合成を開始する必要がある際に、試験管（内容物）を混合する。

【0064】

無細胞系における翻訳は、一般的には、成分をある一定の期間インキュベートする必要がある。インキュベーション時間は、約 5 分 ~ 数時間にわたり、しかし好ましくは、約 30 分 ~ 約 5 時間、さらに好ましくは、約 1 ~ 3 時間である。インキュベーションは、連続フローシステムを使用して、試薬が系中に流入し、さらに新生タンパク質が取り出されるかまたはそのまま蓄積するような連続的方法で実施され得る (A. S. Spirin et al., Sci., 242: 1162 ~ 64, 1988)。本プロセスは、新生タンパク質の大規模生産のために望ましいであろう。インキュベーションは、透析膜によって翻訳系の多量成分から分離されている外側リザーバー中にある翻訳系のために、消耗性試薬が利用できる透析系を使用して実施することもできる [Kim, D. 及び Choi, C. (1996) Biotechnol Prog 12, 645 ~ 649]。インキュベーション時間は、翻訳ミックスの量とインキュベーション時間に応じて大きく変化する。インキュベーション温度は、約 4 ~ 約 60、また好ましくは約 15 ~ 約 50、さらに好ましくは約 25 ~ 約 45、また約 25 ~ 約 37 であることがさらに好ましい。あるマーカは、温度変化に感受性があり、そのような場合は、そのようなインキュベーションは非感受性温度領域で行うことが好ましい。翻訳ミックスは、典型的には、溶液の pH を約 6 ~ 8 に、好ましくは約 7 に維持するために、トリス・塩酸、Hepes のような緩衝液、あるいは他の適切な緩衝剤を含む。さらに、あるマーカは、pH 感受性があり、そのような場合は、マーカの感受性領域以外の pH でインキュベーションを行うことが好ましい。翻訳の効率は最適ではないかもしれないが、マーカの利用率は向上されるだろう。翻訳系に含み得る他の試薬は、還元剤としてジチオトレイトール (DTT) または 2-メルカプトエタノール、RNA 破壊を抑制するために RNasin、さらに翻訳プロセスへの化学エネルギー供給のためのヌクレオシド三リン酸塩またはクレアチンリン酸塩及びクレアチンキナーゼを含む。

【0065】

細胞タンパク質合成において、ミスアミノアシル・tRNA またはマーカを、無傷細胞、細胞オルガネラ、細胞エンベロープ及び無傷の生体膜によって結合されており、タンパク質合成システムを含んでいるその他の散在する容積中に導入する必要がある。これは、tRNA 溶液をリボソームあるいは細胞との融合を誘導し得る特徴を有するベシクル内に封入するような既に確立されている様々な方法を介して達成し得る。融合は tRNA を含むリボソームやベシクル内部の溶液を細胞中に導入する。他方、ある細胞は、ファゴサイトーシス（食作用）によって、リボソームを内部細胞質中に能動的に取り込む。tRNA

10

20

30

40

50

溶液はさらに、リポフェクションを仲介する陽イオン性洗浄剤によるプロセス (F e l g n e r e t a l . , P r o c . N a t l . A c a d . S c i . U S A 84 : 7413 ~ 17 , 1987) によって導入、または卵母細胞のような大型細胞中に注入され得る。注入は、マイクロピペットによる直接灌流、あるいは電気穿孔法による。

【0066】

他方、低張媒体中にある低濃度の洗浄剤を含む溶液中で短時間インキュベートすることにより細胞を透過化し得る。有用な洗浄剤は、Nonidet - P 40 (NP40)、Triton X - 100 (TX - 100) またはデオキシコール酸塩を、約0.01 mM ~ 1.0 mM、好ましくは約0.1 μ M ~ 約0.01 mM、さらにより好ましくは約1 μ Mの濃度で含む。透過化細胞は、マーカーを変質することなく細胞膜を通過させ、ホスト細胞酵素によって新生タンパク質中に取り込まれることを可能にする。そのような系は、細菌細胞、初代細胞、不死細胞株、ヒト細胞または混合細胞集団のような培養中の無傷細胞から形成され得る。これらの細胞は、例えば、強力かつある場合は調節プロモーターの制御下で、所望の遺伝子を含む適切なベクターによって形質移入され得る。メッセージはこれらのベクターから発現され、引き続いて細胞内で翻訳される。既に非放射性マーカーで電荷された無傷ミスアミノアシル・tRNA分子は、細胞中に導入され、また翻訳産物中に取り込まれ得る。

10

【0067】

新生タンパク質検出のためのミスアミノアシル化用途の一つの実例の概略を、図4に提示する。tRNA分子は、UV (紫外線) 照射によって励起されると強い蛍光性となるマーカーでミスアミノアシル化される。このミスアミノアシル・tRNAは、次に無細胞タンパク質合成抽出物中に導入され、マーカー類似体を含む新生タンパク質が生産される。無細胞抽出物中のタンパク質は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) によって分離される。結果生じるゲルは、無細胞抽出物中に存在する全てのタンパク質に対応するバンドを含む。新生タンパク質は、ゲルのUV照射時に、マーカーを含むタンパク質に対応するバンドからの蛍光の検出により同定される。検出は、目視観察、あるいは蛍光検出の他の従来の手段によって行うことができる。

20

【0068】

ミスアミノアシル・tRNAは、細胞酵素を使用する天然アミノアシル化、または化学的ミスアミノアシル化のようなミスアミノアシル化によって形成され得る。化学的ミスアミノアシル化の一つのタイプは、マーカーまたはマーカー前駆物質の付着を可能にするためのtRNAのランケーションを含む。例えば、過ヨウ素塩 + リジン (pH 8.0)、及びアルカリホスファターゼによる継続処理は、tRNA分子の3'末端残基を除去して、3'末端からのモノヌクレオチドまたはジヌクレオチドの欠落を有するtRNA-OH-3'を生じる (Neu 及び Heppel, J. Biol. Chem. 239 : 2927 ~ 34, 1964)。他方、tRNA分子を遺伝的に操作して、tRNA遺伝子の特定部分を欠落させることもできる。結果生じる遺伝子は、転写されて、ランケート型tRNA分子を生産する (Sampson 及び Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 : 1033 ~ 37, 1988)。次に、ジヌクレオチドは、例えば、アシル化によって、修飾アミノ酸または他のマーカーに化学的に結合される。この手順を使用して、マーカーを合成し、高収率でジヌクレオチドにアシル化することができる (Hudson, J. Org. Chem. 53 : 617 ~ 624, 1988; Happet al., J. Org. Chem. 52 : 5387 ~ 91, 1987)。これらの修飾基は、共に結合され、ジヌクレオチドを介して、リガーゼ結合と言及されるプロセスにおいて、ランケート型tRNA分子に結合される (図3B)。

30

40

【0069】

アミノアシルtRNAシンテターゼによるtRNAの活性化に含まれる結合 (図3B、結合A) 以外の異なる結合がミスアミノアシル化には含まれている (図3B、結合B)。T4 RNAリガーゼはアシル置換基を認識しないために、tRNA分子は、化学的複雑化

50

や副反応なく、容易にミスアミノアシル化され得る（結合B、図3B）（T. G. Heckler et al., Biochemistry 23:1468~73、1984；及び T. G. Heckler et al., Tetrahedron 40:87~94、1984）。本プロセスは、付着アミノ酸の性質に非感受性であり、従って、様々な非天然アミノ酸を使用するミスアミノアシル化を可能とする。対照的に、完全な酵素的アミノアシル化（結合A）は、基質tRNAかつアミノ酸の構造に極めて感受性で、かつ特異的である。

【0070】

マーカーは基本的には、翻訳プロセスの酵素により認識され、電荷tRNAから増殖ペプチド鎖中に運搬される分子である。有効であるためには、マーカーは一定の物理的及び生理化学的特性を持たなければならない。従って、有用なマーカーを同定するために使用される複数の基準がある。第一に、マーカーは増殖ペプチド鎖中への取り込みに適切でなければならない。これは、ペプチド結合形成に関与する化学基の存在により決定され得る。第二に、マーカーはtRNA分子に付着可能でなければならない。付着は、tRNA分子の3'末端とマーカーのカルボキシル基、またはマーカー付着する結合基及びトランケート型tRNA分子間の共有結合相互作用である。結合基は、ヌクレオチド、短オリゴヌクレオチドまたはその他の類似分子であってもよく、好ましくはジヌクレオチド、さらに好ましくはジヌクレオチドCAである。第三に、マーカーは、検出さらに望ましくは新生タンパク質の分離を容易にする1またはそれ以上の物理的特性を持たなければならない。有用な物理的特性は、発光または吸光、磁性、電子スピン共鳴、電気キャパシタンス（容量）

10

20

【0071】

有用なマーカーは、検出用標識、検出用非天然アミノ酸、検出用アミノ酸類似体、及び検出用アミノ酸誘導体と結合された天然アミノ酸である。標識及び他の検出性部分は、強磁性、常磁性、反磁性、ルミネッセント（発光性）、電気化学ルミネッセント、蛍光性、燐光性、染色性であるかあるいは特有の質量を有し得る。マーカーとして有用である蛍光部分は、デンシルフルオロフォア、クマリン、クマリン誘導体、蛍光性アクリジニウム部分及びベンゾピランベースのフルオロフォアを含む。好ましくは、蛍光マーカーは、天然アミノ酸と異なる波長において量子効率の高い蛍光を有し、さらに好ましくは、スペクトルのUV及び可視部分で励起し得る量子効率の高い蛍光を有する。既定の波長で励起時に、このマーカーは、可視的あるいは従来の蛍光検出法を使用して、低濃度で検出が可能である。ルテニウムキレート化合物及びその誘導体、またはニトロオキシル酸化アミノ酸およびその誘導体のような電気化学ルミネッセントマーカーは、極めて高い感度を望む際には好ましい（J. DiCesare et al., BioTechniques 15:152~59、1993）。これらのマーカーは、フェムトメートル（fermi）範囲及びそれ以下で検出可能である。

30

【0072】

蛍光マーカーの他に、他の特異的物理特性を有する様々なマーカーを使用して、新生タンパク質生産を検出することができる。一般的に、これらの特性は、マーカーの電磁場及び光線に対する相互作用及び反応に基づき、UV、電磁スペクトルの可視及び赤外領域、ラマン活性である発色団の存在を含み、さらに共鳴ラマン・スペクトロスコピー（分光法）、電子スピン共鳴活性及び核磁気共鳴、また特定の分子質量を有するマーカーの存在検出のための質量スペクトロメーター（分光計）によって増強され得る。これらの電磁スペクトル特性は、天然アミノ酸が所有していないもの、あるいは天然アミノ酸特性から容易に識別可能であることが好ましい。例えば、アミノ酸トリプトファンは、290nm近辺に吸光性があり、290nm近辺の光線で励起されると340nm近辺に蛍光発光を有する。従って、トリプトファンと十分に異なる吸光及び/または蛍光特性を有するトリプトファン類似体は、タンパク質中でその検出を容易にするために使用され得る。

40

【0073】

マーカーとして使用できる多数の異なる修飾アミノ酸が市販されている（Sigma C

50

hemical; St. Louis, MO; Molecular Probes; Eugene, OR)。そのようなマーカーの一つは、tRNA分子にデンシルフルオロフォアをミスアミノアシル化することによって創作されたNε-デンシルリジンである(図5、機構1)。Nε-デンシルリジンのα-アミノ基がまずNVOC(オルソ-ニトロベラトリルオキシカルボニル塩化物)によってブロックされ、さらにカルボキシル基がシアノメチルエステルにより活性化される。説明されるようにミスアミノアシル化が行われる。ミスアミノアシル・tRNA分子は次に、タンパク質合成系に導入され、そこでデンシルリジンが新規合成タンパク質中に直接に取り込まれる。

【0074】

他のそのようなマーカーは、蛍光強度の高い分子クマリンに基づく、蛍光アミノ酸類似体である(図5;機構2)。このフルオロフォアは、塩化ダンシルよりもさらに高い蛍光量子効率を有し、より低レベルの新生タンパク質の検出を容易にし得る。さらに、このクマリン誘導体は、天然アミノ酸トリプトファンと類似の構造を有する。これらの構造的類似性は、新生タンパク質の本来の構造あるいは機能が重要な場合、またはこれを所望する場合に有用である。クマリンは、図5(機構2)に描写するように合成される。マロン酸アセトアミドは、ナトリウムエトキシドの存在において、僅かに過剰な4-ブromoメチルクマリン(Aldrich Chemicals; Milwaukee, WI)でアルキル化され、その後酸加水分解される。塩酸塩としての対応するアミノ酸は、遊離アミノ酸類似体に転化され得る。

【0075】

クマリン誘導体は、それが酵素的または化学的のいずれかの方法で、トリプトファン-tRNAをミスアミノアシル化する場合に、最も便利に使用できる。ミスアミノアシル化トリプトファン-tRNAの形状で導入される際、クマリンアミノ酸は、トリプトファン位置内にのみ取り込まれる。無細胞合成系中のミスアミノアシル・tRNAまたは遊離クマリン誘導体の濃度を調節することにより、新生タンパク質中に取り込まれるクマリンアミノ酸の数をまた調節し得る。この手順は、新生タンパク質中にあるほとんど全てのマーカーの量を調節するために利用し得る。

【0076】

マーカーは、天然アミノ酸及び通常ではアミノ酸として機能できないマーカー特性を有する分子から化学的に合成され得る。例えば、蛍光強度の高い分子を天然アミノ酸基に化学的に結合することができる。化学的修飾はアミノ酸側鎖上に生じ、カルボキシル及びアミノ官能性はそのまま残されており、ペプチド結合形成に参与し得る。蛍光強度の高い分子(例:塩化デンシル)は、リジン、アルギニン、チロシン、システイン、ヒスチジン等を含む様々なアミノ酸の親核性側鎖に結合され、主としてアミノ基のスルホンアミドまたは硫酸結合として、蛍光性誘導体を生じ得る。そのような誘導体形成は、ペプチド結合を無傷のまま形成する能力を残し、デンシルリジンのタンパク質中への正常な取り込みを可能とする。

【0077】

多数の因子が、ミスアミノアシル・tRNAを介して新生タンパク質中に取り込まれるマーカーの有効性を決定する。これらは、細胞または無細胞タンパク質合成系において、ミスアミノアシル・tRNAの使用を介して、タンパク質中にマーカー基を取り込む能力と、新生タンパク質中にいったん取り込まれた際のマーカー固有の検出性を含む。一般的には、優れた特性を有するマーカーは、短いインキュベーション時間、かつ少量の試料で新生タンパク質の正確な検出を可能とする。これらの因子は、説明される方法の有効性を直接的に影響する。新生タンパク質中への取り込みに使用される蛍光マーカーの場合、好ましい特性は、それに限定されるわけではないが、小型、量子効率の高い蛍光、及び長期的にわたる露光に対する安定性(抗漂白性)であろう。

【0078】

上記因子に関する知識をしても、特定の無細胞または細胞翻訳系を使用して、タンパク質中に特定のマーカーを取り込むための最適条件を先験的に予測することは、それがtRNA

10

20

30

40

50

A、開始または延長因子及びリボソーム成分を含むタンパク質翻訳合成系の成分とマーカ-基の詳細な相互作用に依存するために困難である。一般的には、小型のマーカ-はリボソーム中により容易に収容されることが予測されているが、分子の正確な形状及びリボソーム結合部位におけるその特異的相互作用が最も重要な決定要素である。この理由で、いくつかの大型マーカ-が、小型マーカ-と比較して、より容易に新生タンパク質中に取り込まれることが可能である。例えば、そのような因子は、分子モデルに関する既知の方法を使用して予測することは極めて困難である。

【0079】

いくつかの望ましい特性（タンパク質翻訳合成系の成分との望ましい相互作用を含む）を有するメンバーを持つフルオロフォアの一つの群は、ジピロメテンニフツ化ホウ素誘導体（BODIPY）由来の群である（図19）。高量子効率のような好都合な特性を有する様々なその他の通常使用されるフルオロフォアと比較して、いくつかのBODIPY化合物は、タンパク質合成系と高い両立性のあるさらに他の並はずれた特性を有する。全てのBODIPY フルオロフォアのコア構造は、4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセン（4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene）である。米国特許第4,774,339号；5,187,288号；5,248,782号；5,274,113号；5,433,896号；5,451,663号を参照のこと。この全てを本明細書に参考文献として編入している。中心の特徴は図19に示すようにジフルオロボロンである。全てのBODIPYフルオロフォアは、マーカ-としてのいくつかの望ましい特性を有し（Molecular Probes Catalog（分子プローブカタログ、p.13~18）、それらは高吸光係数、高蛍光量子効率、溶剤極性及びpHに非感受性であるスペクトル、フルオレセインのような他の色素と比較してより高いピーク強度を生じる狭い発光バンド幅、イオン電荷の不在、フルオレセインと比較して強化された光安定性を含む。基礎BODIPY構造に置換基を加えることは、さらに抱合の追加を起因し、励起または発光波長を、検出の手段と両立可能な都合のよい波長にシフトするために使用され得る。

【0080】

これらの色素は、Vos de Waal et al. (1977) によって最初に説明され、その蛍光特性はその後、Worriesにより説明された[Worries et al., "A novel water-soluble fluorescent probe Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF₂ sub 2 complex," (新水溶性蛍光プローブ合成、ルミネッセンス及び4-スルフォナート-3,3',5,5'-テトラメチル-2,2'-ピロメタン-1,1'-BF₂ sub 2 複合体の生物学的特性) Recl. Trav. Chim. PAYSBAS 104, 288 (1985)を参照のこと]。ジピロメテンニフツ化ホウ素由来の色素は、新生タンパク質への取り込みに適切なそれ以上の特徴を有する。フルオロフォア 4,4-ジフルオロ-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンの単純アルキル誘導体は、Treibs 及び Kreuzer、[Difluoroboryl-komplexe von di- und tripyrrylmethenen、LIEBIGS ANNALEN CHEM 718, 208 (1968)] 及び Worries、Kopek、Lodder、及び Lugtenburg、[A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF₂ sub 2 complex, (新水溶性蛍光プローブ：4-スルフォナート-3,3',5,5'-テトラメチル-2,2'-ピロメタン-1,1'-BF₂ sub 2 複合体のナトリウム塩の合成、ルミネッセンス及び生物学的特性)、REC

10

20

30

40

50

L. TRAV. CHIM. PAYS-BAS 104, 288 (1985)] により、約490 ~ 510 nmに最大吸光、及び約500 ~ 530 nmに最大発光を有する、フルオレセインと類似のスペクトル特性を有する蛍光強度の極めて高いものとして説明されている。Haugland et al. に対する(1988)米国特許第4, 774, 339号('339特許)(本明細書に参考文献として編入されている)は、水素、ハロゲン、アルキル、シクロアルキル、アリル、アリルアルキル、アシル、及びバイオ分子との抱合に適切な反応基を含むスルホ置換誘導体を含み、光安定性が良好で、フルオレセイン様スペクトルを有する、4, 4 - ジフルオロ - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン(ジピロメテンニフツ化ホウ素)色素を説明する。'339特許、及びPavlopoulos, et al., [Laser action from a tetramethylpyrromethene - BF₃ sub 2 complex (テトラメチルピロメタン - BF₃ sub 2 複合体によるレーザー作用) APP. OPTICS 27, 4998 (1988)] により説明されるように、4, 4 - ジフルオロ - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン蛍光色素のアルキル誘導体の発光は、明らかにフルオレセインのそれとオーバーラップする。このオーバーラップは、励起源や光学フィルタを変更することなく、ジピロメテンニフツ化ホウ素のアルキル誘導体に、フルオレセインベース色素に使用する装置と同じ光学装置を使用することを可能とする。同様に、ジピロメテンニフツ化ホウ素中のアリル/ヘテロアリル置換基は、吸光/発光の最大値を高波長へとシフトする(本明細書に参考文献として編入する米国特許第5, 451, 663号を参照のこと)。

10

20

【0081】

様々なBODIPY分子が、アミノアシル・tRNAを誘導体化して、BODIPYマーカ一部分を有するミスアミノアシル・tRNAを生産するために使用し得るアミン反応体として市販されている。検出マーカの新生タンパク質中への取り込みに優れた特性を呈示するこの系統の化合物の一つの実例は、4, 4 - ジフルオロ - 5, 7 - ジメチル - 4 - ボラ - 3a, 4a - ジアザ - s - インダセン(BODIPY-FL)である。BODIPY-FLのスルホン酸化N - ヒドロキシスクシンイミド(NHS)誘導体は、E. coli 開始tRNA^{fmet}をミスアミノアシル化するために使用される場合、生産された新生タンパク質は、電気泳動後ポリアクリルアミドゲル上で、標準UVトランスイルミネーター及び写真またはCCDイメージングシステムを使用して、容易に検出され得る。これは、まずメチオニンでアミノアシル化して、次にN - ヒドロキシスクシンイミドBODIPYを使用して、メチオニンのα - アミノ基を特異的に修飾したtRNA^{fmet}を使用して達成し得る。修飾反応前に、tRNA^{fmet}を、最大電荷(>90%)して、さらに³⁵S - メチオニン及び酸 - 尿素ゲルを使用して確認する[Varshney, U., Lee, C. P., 及びRajBhandary, U. L. 1991. Direct analysis of aminoacylation levels of tRNA in vitro. (インビトロにおけるtRNAのアミノアシル化度の直接分析) J. Biol. Chem. 266: 24712 ~ 24718]。

30

【0082】

10 nm以下の市販のE. coli 抽出物(E. coli T7翻訳システム、Promega, Madison, WI)が、1 ng以下の合成タンパク質に対応する分析に必要とされる。検出性タンパク質を生産するために必要とされるインキュベーション時間は、約1時間であるが、5分(またはそれ以下)のように短時間であってもよい。BODIPY-FLはさらに、488 nm励起及び520 nm以上の発光測定力を備える市販の蛍光スキャナーを使用することにより、高感度で検出し得る。NBD (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジアゾール) 及びピリン - PyMPOを含むその他の市販色素を使用する同様な試験は、およそ1次元の蛍光量低下を示し、UVトランスイルミネーターや蛍光スキャナーのような標準実験室用装置を使用して検出することをさらに困難とする。3 - N - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジオゾール - 4 - yl) - 2, 3, - ジアミノプロピオン酸(NBD-DAP)のような蛍光マーカ及びクマリ

40

50

ンを、ミスアミノアシル・tRNAを使用してタンパク質中に取り込むことが可能であることが既に示されている。しかし、これらのマーカーを含む新生タンパク質の検出は、蛍光スペクトロメーターまたはマイクロスペクトルフルオロメーター（蛍光スペクトロメーター）のような高感度を有する器械を使用してのみ実証され、時として蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）の使用のような間接的方法を必要とする（Turcatti, G., Nemeth, K., Edgerton, M. D., Meseth, U., Talabot, F., Peitsch, M., Knowles, J., Vogel, H., 及び Chollet, A. (1996) J Biol Chem 271 (33), 19991~8; Kudlicki, W., Odom, O. W., Kramer, G., 及び Hardesty, B. (1994) J Mol Biol 244 (3), 319~31)。そのような器械は、分子生物学実験室においては一般的に常備されておらず、ゲル上の蛍光バンドの測定用には特定の適応のみが装備され得る。

10

【0083】

BODIPY-FLのマーカーとしてのそれ以上の利点は、該マーカーを含む新生タンパク質をアフィニティー精製するために使用し得るモノクローナル抗体が利用可能なことである。そのようなモノクローナル抗体の一例は、抗BODIPY-FL抗体（カタログ番号A-5770、Molecular Probes、Eugene, OR）である。ミスアミノアシル・tRNAを使用する他の市販マーカーと比較して、高い効率で新生タンパク質中にBODIPY-FLを取り込む能力と組み合わせられたこれ（抗体利用可能性）は、新生タンパク質のさらに効率的な分離を可能とする。BODIPY-FLに対するこれらの抗体は、新生タンパク質中へのBODIPYの取り込みの定量に使用され得る。

20

【0084】

アミノアシル・tRNAの機能的活性を実質的に変更することなく、マーカーを特異的に修飾する化学反応を使用することにより、tRNA分子をアミノアシル化またはミスアミノアシル化した後で、マーカーをさらに修飾することができる。アミノアシル化後修飾のこれらのタイプは、検出、分離または精製を容易とし、時には修飾によって新生タンパク質が未変性またはさらなる官能基配置を得ることが可能な場合に使用され得る。

【0085】

蛍光及び他のマーカーは、スペクトロメーターにより検出され、かつ天然アミノ酸の電磁スペクトル特性から識別し得る検出可能な電磁スペクトル特性を有する。最も有用なスペクトロメーターは、蛍光、ラマン、吸光、電子スピン共鳴、可視、赤外及び紫外スペクトロメーター（分光計）を含む。顕著な電気的特性を有するマーカーのような他のマーカーは、電流計、電圧計または他のスペクトロメーターで検出することができる。マーカーと電磁場の顕著な相互作用に関係するマーカーの物理的特性は、蛍光、ラマン、吸光、電子スピン共鳴スペクトロメーターのような器械を使用して容易に検出できる。マーカーはさらに、外部力または電磁場のような作因またはその検出を可能とする反応体分子に反応して発色の変化のような、化学的、生化学的、電気化学的または光化学的反応も受けることがある。

30

【0086】

本発明によって考案される蛍光マーカーの一つの部類は、結合時に検出可能である分子と特異的に結合できる小ペプチドから成る部類である。このアプローチの一例は、WEAAREACCREECCARA（配列番号4）から成る配列を有するペプチドである。この配列（4個のシステイン残基を含む）は、ペプチドが、非蛍光色素分子4',5'-ビス（1,3,2-ジチオアルソラン-2-yl）フルオレセイン[4',5'-bis（1,3,2-dithioarsolan-2-yl）]（FLASH、フルオレセイン砒素ヘリックス結合剤を意味する）に特異的に結合することを可能とする。この色素は、結合時に蛍光性となる興味深い特性を有する。言い換えれば、新生タンパク質中にこの特定のペプチド配列が存在するときのみに蛍光が観測される。従って、このペプチド配列をNまたはC末端に置くことにより、合成されたタンパク質の量を容易にモニタし得る。こ

40

50

のペプチド配列は、このペプチド配列をコードする領域を担うように、核酸プライマーをデザインすることにより導入され得る。

【0087】

使用される蛍光化合物の部類に関わらず、検出は通常は、まず細胞または無細胞タンパク質合成系に存在するその他のバイオ分子から、新生タンパク質を物理的に分離することを含む。タンパク質分離は、例えば、ゲル電気泳動またはカラムクロマトグラフィーを使用して実施することができ、また受容体基に独自の結合するアフィニティーマーカーによりさらに容易とされ得る。ゲル電気泳動によるフルオロフォアを含むマーカーの検出は、従来の蛍光検出法を使用して達成し得る。

【0088】

無細胞系におけるタンパク質合成後、タンパク質合成に必要とされるバイオ分子の全てと新生タンパク質を含む反応混合物を、ポリアクリルアミドまたはアガロースから成るゲル上に装填する(R. C. Allen et al., Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins (タンパク質のゲル電気泳動及び集中電気泳動法) Walter de Gruyter, New York 1984)。本混合物はさらに、非電荷tRNAとミスアミノアシル・tRNAも含む。反応混合物を装填した後、電圧をかけることによりゲル上のタンパク質を加えた電場方向に空間的に分離する。タンパク質は分離して、クーマシーブルー染色のようなゲル前後に染色法を使用して目視観察し得る分散、またはオーバーラップするバンドのセットとして出現する。ゲル上でのタンパク質バンドの移動は、タンパク質分子量と、減少分子量の関数である装填位置からの増加距離の関数である。新生タンパク質を含むゲル上のバンドは、適切な波長で励起されると、蛍光を呈する。これらのバンドは、可視、写真、または分光学的に検出が可能であり、さらに必要に応じて、新生タンパク質をゲル切片から精製し得る。

【0089】

例えば、BODIPY-FLをマーカーとして使用する場合は、新生タンパク質は、UV照射によって励起すると、510nmで蛍光を発する。この蛍光は、単に標準把持式UVイルミネーターまたはトランスイルミネーターを使用することにより、可視的に検出され得る。約10ナノグラム(ng)のタンパク質 α -ヘモリジンは、この方法を使用して検出できる。さらに、低温CCDイメージャーに基づく蛍光スキャナーのような、極めて低濃度のマーカーを迅速にスクリーンかつ同定し得る電子イメージング装置が有用である。この場合は、最低0.3ngのタンパク質までが検出され得る。

【0090】

新生タンパク質の分子量及び量は、蛍光標識された既定分子量を有するタンパク質のバンドのセットと、ゲル上のバンド位置の比較により決定し得る。例えば、分子量25,000である新生タンパク質は、既定量かつ既知分子量(ウシ血清アルブミン、66kD; ブタ心臓フマラーゼ、48.5kD; カルボニックアンヒドラーゼ、29kD; β -ラクトグロブリン、18.4kD; α -ラクトグロブリン、14.2kD; Sigma Chemical; St. Louis, MO)の市販標準マーカータンパク質を含む校正ゲルに対するゲル上の相対的位置によって測定することができた。

【0091】

校正タンパク質はまた、新生タンパク質を担うゲルと同様な方法を使用する検出に便利な類似したマーカーを含み得る。これは、多くの場合、校正タンパク質をマーカーと類似な分子と直接反応させることにより達成し得る。例えば、蛍光誘導体を得るように、校正タンパク質を塩化ダンシルで修飾し得る(R. E. Stephens, Anal. Biochem. 65, 369~79, 1975)。他方、タンパク質をBODIPY-FLのNHS誘導体で標識することもできる。これらの蛍光タンパク質は、PAGEを使用して分析し得る。蛍光校正タンパク質の検出を蛍光マーカー類似体を含む新生タンパク質の検出と組み合わせることにより、合成された新生タンパク質の分子量及び量のどちらも正確に測定できる。必要に応じて、正確に定量するために、校正タンパク質及び新生

10

20

30

40

50

タンパク質それぞれに含まれるマーカーの量を決定し得る。新生タンパク質を担うゲルの定量のためには、既定レベルの蛍光マーカーを有するタンパク質の使用が好都合である。これは、校正タンパク質がシステインのような特定の反応残基を含み、従ってタンパク質当たり1つの蛍光色素のみが付着するように遺伝的操作を行うことにより達成され得た。

【0092】

タンパク質分離のその他の方法はさらに、マーカーを含む新生タンパク質の検出、かつその後の分離と精製に便利である。例えば、タンパク質は、毛管電気泳動、集中電気泳動法、低圧クロマトグラフィー及び高速または高圧液体クロマトグラフィー（HPLC またはFPLC）を使用して分離することができる。これらの場合は、個別のタンパク質は、マーカーの発光波長で、蛍光検出器によって個別に分析され得る分画に分離される。他方、オンライン蛍光検出法が、新生タンパク質がカラム分別システムから出てくる際に検出するために使用され得る。保持時間の関数としての蛍光グラフは、生産された新生タンパク質の量及び純度に関する情報を提供する。

10

【0093】

本発明による他の実施態様は、前記に説明するように、切断可能なマーカーを含む新生タンパク質の標識、検出、さらに必要に応じて、分離と精製のための方法を指示する。切断可能なマーカーは、物理あるいは酵素処理、化学または温度処理、ガンマ線、X線、紫外線、可視光線、赤外線、マイクロウェーブ、ラジオ波または電場のような電磁放射のような外部効果に感受性のある化学構造を含む。マーカーは、前記のように従来の技術を使用して、tRNAにアミノアシル化、またはミスアミノアシル化されて、翻訳系に加えられる。インキュベーション及び新生タンパク質の生産後、マーカーは特定の処理を加えることにより切断され、新生タンパク質が検出され得る。他方、新生タンパク質はまた、切断されたマーカーあるいはマーカーから取り除かれた化学的部分の存否によって、検出及び分離され得る。

20

【0094】

切断可能なマーカーの一例は、2-ニトロベンジル部分を含む化合物（図6A）のような光開裂型マーカーである。照射時に、これらの芳香族ニトロ化合物は、内部酸化還元反応を受ける（Pillai, Synthesis 1~26、1980; Patchornik et al., J. Am. Chem. Soc. 92:6333~35、1970）。その結果、ニトロ基はニトロソ基に還元され、酸素がオルソ位置にあるベンジルC-H結合中に挿入される。主要な光化学プロセスは、励起ニトロ基による分子内水素引抜反応である。これに、酸-ニトロ型（aci-nitro form）への電子リディストリビューションプロセスが引き続き、ニトロソ産物に再転位される。後続する温度反応は、ニトロベンジル結合（図6B）から基質の切断を誘導する。他の切断可能なマーカーの実例を図7に示す。

30

【0095】

時には、基質と切断可能部分の間に距離を置くことが望ましいことがある。これを達成するために、クロスリンカーアームによって、切断可能部分を基質から分離し得る。クロスリンカーは、基質アクセスを増加し、化学的構造を安定化し、また例えば、長いアルキル鎖、またはアミド結合を介して結合されているカプロイル部分から成る複数反復ユニットを使用して作製し得る。

40

【0096】

切断可能なマーカー合成には、異なるマーカーの数と同じほど多数の方法がある。ニトロベンジルアルコール基材の光開裂型ビオチン合成の一例は、4つの主要なステップを含む。光反応部分の前駆物質である2-ブロモ-2'-ニトロアセトフェノンは、まず α -または ω -アミノ酸様 ϵ -アミノカプリン酸に転化される。結果生じる酸と光反応基であるアミノ官能基は、ジシクロヘキシルカルボジイミド（DCC）を使用して結合される。結果生じるアミドのベンゾイルカルボニル基は、水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元される。その結果生じるニトロベンジルアルコール誘導体は、バイオ分子構造と反応できるような最終成分を得るために、例えば、塩化ギ酸官能基を誘導するために、ホスゲンガ

50

スによる反応により、誘導体化される。結果生じる化合物を、P C Bのその他の誘導体と共に、図8 Aに描写する。アミノ酸への可能な結合は図8 Bに描写する。

【0097】

切断可能なマーカーは、新生タンパク質の分離を容易にする。例えば、切断可能なマーカーの一つのタイプは、アミノ酸と結合する光開裂型ビオチンである。このマーカーは、新生タンパク質中に取り込まれ、さらにこのタンパク質はビオチンとアビジンまたはストレプトアビジンとの特異的相互作用により精製され得る。分離とそれに引き続く精製に際して、ビオチンは、電磁放射を加えることにより除去され、付着するビオチン分子に起因する問題なく、新生タンパク質は有用な適用に利用された。切断可能なマーカーのその他の実例は、光開裂型クマリン、光開裂型ダンシル、光開裂型ジニトロフェニル及び光開裂型クマリン・ビオチンを含む。光開裂型マーカーは、UV光線のような電磁放射によって切断され、ペプチジルマーカーは酵素処理により切断され、さらにジスルフィド結合によって結合されているピレニルフルオロフォアはチオール試薬のような一定の化学処理を受けることにより切断される。

10

【0098】

光開裂型マーカーによる切断は、光反応部分の構造及び照射に使用される電磁照射の波長に依存する。電磁放射の他の波長が、タンパク質や他の化学的部分を損傷してはならない。非置換2-ニトロベンジル誘導体の場合は、光分解による収量及び基質の回収は、内部光フィルタとして作用し、さらに基質のアミノ基と反応可能である副産物の形成により顕著に低下する。典型的な照射時間は、1～約24時間と変化し、収量は1～95%である。線源は、基質タンパク質の約10 cm以内に配置し、新生タンパク質中に出現する副反応があるとすれば、最少とするように低電力に設定する。 α -置換2-ニトロベンジル誘導体(メチル、フェニルなど)の場合、光除去の比率と遊離基質の収量に相当な増加が観察される。光反応部分のフェニル環へのその他の電子ドナー基の導入は、基質収量を増加する。P C Bの光分解の一般的反応を図9に描写する。

20

【0099】

酵素的切断では、導入されたマーカーは、化学的物質から成る特有の酵素に対して感受性のある特定の結合を含む。タンパク質混合物中への酵素または化学物質の導入は、新生タンパク質からマーカーを切断する。マーカーが修飾アミノ酸である場合、これは天然タンパク質形状の生産を起因することになる。例えば、熱感受性のある化学的部分の熱処理は、同様な方法で行われる。マイクロウェーブまたは放射熱のような温度エネルギーの穏やかな適用は、新生タンパク質に顕著な損傷を生じることなく、タンパク質から感受性マーカーを切断する。

30

【0100】

【発明の実施の形態】

A. 突然変異の検出

突然変異の検出は、ガンの診断及び/またはガンの素因を有する個人を含む、しかしこれに限定はされない、臨床診断において益々重要な領域となっている。タンパク質トランケーション試験(P T T)は、トランケート型タンパク質産物の発生を誘導するナンセンス及びフレームシフト突然変異検出用手法である。デュシェンヌ筋ジストロフィ、腺腫性多発結腸ポリープ症、ヒトmut L同族体、ヒトnut S同族体(どちらも結腸ガンに関連する)、及びB R A C 1(家族性乳ガン)に関連する遺伝子は、今では他の疾患と共に、この方法によって突然変異をスクリーンし得る(表1参照)。

40

【0101】

【表1】

ヒト分子遺伝学におけるPTTの適用

参照疾患	%トランケート型突然変異	遺伝子
家族性腺腫性ポリープ症	95%	APC
遺伝性靱帯様疾患 (hereditary desmold disease)	100%	APC
毛細管拡張性失調症	90%	ATM
遺伝性乳ガン及び 卵巣ガン	90% 90%	BRCA1 BRCA2
嚢胞性線維症	15%	CFTR
デュシェンヌ筋ジストロフィ	95%	DMD
エメリ・デュライファス筋ジストロフィ	80%	EMD
ファンconi貧血症	80%	FAA
ハンター症候群	-50%	IDS
遺伝性非ポリープ性結腸・直腸ガン	-80% -70%	hMSH2 hMLH1
神経線維腫症 1型	50%	NF1
神経線維腫症 2型	65%	NF2
多嚢胞性腎臓疾患	95%	PKD1
ルビンスタイン・ティビ症候群	10%	RTS
PTTを使用して検出可能であるべき、報告済みトランケート型突然変異の比率		

10

20

30

典型的に、PTT法は、調査する遺伝子の領域をカバーするPCR産物中への、T7プロモーター部位、リボソーム結合部位、及び人工的メチオニン開始部位の取り込みを含む。PCR産物は次に、インビトロウサギ網状赤血球溶解物またはコムギ胚芽溶解物系を使用して、転写かつ翻訳され、増幅された遺伝子領域に対応するタンパク質を発生する。ナンセンス突然変異またはフレームシフトにより生じた配列中の終止コドンの存在は、タンパク質翻訳の時期尚早な終了を起因し、放射性検出を組み合わせた標準ゲル電気泳動（例：SDS-PAGE）分析によって検出し得るトランケート型タンパク質を生産する。

【0102】

現在実用されている手法には欠点がある。最も重要な問題の一つは、所望する産物の同定を含む。非特異的に放射性標識された産物のために、これ（同定）は困難となる。これらの問題を提起する試みが行われてきた。一つのアプローチは、開始部位の後かつ所望の遺伝子をコードする領域の前にアフィニティータグを導入することである。Rowan 及び Bodmer による "Introduction of a myc Reporter Tag to Improve the Quality of Mutation Detection Using the Protein Truncation Test (タンパク質トランケーション試験を使用する突然変異検出の質向上のためのmyc レポーターTagの導入)" Human Mutation 9:172 (1997) を参照のこと。しかし、そのようなアプローチは、依然として電気泳動に依存するという不利な点を有する。

40

50

【0103】

本発明は、2または3マーカーを新生タンパク質中に導入する、ゲルフリートランケーション試験(GFTT)を考案する。本発明は、疾患の素因を決定するための出生前及び出生後試験を考案する。本発明による好ましい実施態様では、新組成物及び方法は、フレームシフトまたは鎖終止突然変異を指示する。そのような突然変異を検出するためには、新生タンパク質は、まず突然変異の可能性を含むタンパク質をコードするメッセンジャーRNAまたはDNAから、無細胞または細胞翻訳系において合成される。新生タンパク質は、タンパク質のN末端またはその近隣に位置するアフィニティーマーカーを使用して、次に無細胞または細胞翻訳系から分離される。

【0104】

タンパク質を次に、タンパク質のN末端またはその近隣に位置する検出マーカー(N末端マーカー)の存在について分析する。次に、タンパク質のC末端またはその近隣に位置する配列依存性検出マーカー(C末端マーカー)上で別の測定を行う。

C末端マーカーとN末端マーカーからの測定値の比較は、新生タンパク質をコードする遺伝子配列中にあるフレームシフトまたは鎖終止突然変異を含む新生タンパク質の分画についての情報を供給する。C末端部近隣に位置する配列依存性マーカーのレベルは、鎖終止またはフレーム外突然変異を含まないタンパク質分画を反映する。N末端マーカーの測定は、C末端マーカーが正規化された測定に対する内部対照を供給する。C末端マーカーレベルをN末端マーカーに対して正規化することは、実験の正確性を損ない得る、翻訳中のタンパク質発現レベルにおける変化のような本質的な変異を排除する。タンパク質のN末端部またはその近隣に位置するアフィニティーマーカーを使用して、翻訳混合物からタンパク質を分離することは、翻訳中にタンパク質が、メッセージのコード領域にある内部AUGから開始される場合に生じ得るフォールススタート(不正開始)の出現を排除する。フォールススタートは、鎖終止またはフレーム外突然変異後に起こり得るために、誤った結果の原因となり得る。これは、内部AUGがメッセージを有するフレーム内にある場合特に真実である。この場合、メッセージが突然変異を含んでいても、ペプチドC末端マーカーは依然として存在する。

【0105】

一つの実例では、非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体を含む検出マーカーが、タンパク質合成の開始をシグナルするAUG開始コドンのみを認識するミスアミノアシル・開始tRNAを使用して、翻訳中にアミノ末端(N末端部)において新生タンパク質中に取り込まれる。検出マーカーの一例は、蛍光度の強い蛍光化合物BODIPY FLである。マーカーはさらに、光開裂型クマリンまたは光開裂型ビオチンのような光開裂性であってもよい。新生タンパク質は、次にタンパク質のN末端に隣接して位置するアフィニティーマーカーに結合する共役因子を使用して、無細胞または細胞翻訳系から分離される。そのようなアフィニティーマーカーの一つは、エピトープとして知られている特定のタンパク質配列である。エピトープは、受容体基を含む分子及び/または物質と選択的に相互作用するという特性を有する。様々なエピトープ配列が文献に報告されており、それらは、Clontechにより説明されるHisX6(HHHHHH)(配列番号5)、及びRoche-BMにより説明されるC-myc(-EQKLISEEDL)(配列番号6)、Stratageneにより説明されるFlag(DYKDDDDK)(配列番号7)、Sigma-Genosysにより説明されるSteptTag(WSH PQFEK)(配列番号8)及びRoche-BMにより説明されるHATag(YPYDVPDYA)(配列番号9)を含む。

【0106】

いったん新生タンパク質が翻訳系から分離されると、タンパク質のN末端部位に取り込まれた検出マーカーの存否について分析される。BODIPY FLの場合は、488nm励起及び520nm以上の光線を検出器に透過させるような発光フィルターを備えたMolecular Dynamics Model 595蛍光スキャナーのような様々な市販器械を使用して蛍光レベルを測定することにより検出され得る。

10

20

30

40

50

【0107】

タンパク質は次に、タンパク質のC末端部近隣に位置する配列特異性マーカーの存在について分析される。通常使用では、そのような配列特異性マーカーは、共役因子により認識されるタンパク質のC末端部近隣に位置するアミノ酸の特異的配列から成る。例えば、新生タンパク質n o C末端部またはその近隣に位置するアミノ酸に対する抗体を利用し得る。そのような抗体は、容易に検出し得る蛍光色素及び容易に検出可能である基質を導出する検出反応を触媒する酵素を含む、様々なマーカーによって標識され得る。選択されたマーカーは、N末端マーカーに使用されるそれとは異なる検出特性を有するべきである。アミノ酸配列はさらに、抗体の他に共役因子によって認識されるエピトープを含み得る。そのような配列の一つは、6つのヒスチジンであり、時にはコバルト複合体共役因子と結合するh i s タグとして言及されている。 10

【0108】

本実施態様に使用できる様々なN末端マーカー、アフィニティーマーカー、C末端マーカーが入手可能である。N末端マーカーはB O D I P Y、アフィニティーマーカーはS t r e p T a g、さらにC末端マーカーはH i s X 6 t a gであり得る。この場合は、翻訳後に、反応混合物をストレプトアビジンをコートしたマイクロ滴定プレート内でインキュベートするか、またはストレプトアビジンをコートしたビーズを加えてインキュベートする。非結合物質を洗浄後、N末端マーカーは蛍光スキャナーを使用して直接に測定し、C末端マーカーは、B O D I P Yと異なる光学特性を有する蛍光色素（ローダミンまたはテキサスレッド）を抱合させた抗h i s X 6抗体を使用して定量することができ、従って両方の同時検出を容易にする。 20

【0109】

異なる事例では、N末端マーカーは、ミスアミノアシル・t R N A によって取り込まれたピオチンまたは光開裂型ピオチンであり、アフィニティーマーカーはH i s X 6 t a g、C末端マーカーはC - m y cマーカーであり得る。この場合は、翻訳後、反応混合物は、金属キレートビーズを加えてまたは金属キレート加工したマイクロ滴定プレート（例：T a l o n、C l o n T e c h）内でインキュベートされる。非結合タンパク質を洗浄後、ストレプトアビジン抱合蛍光色素及びその他の蛍光色素を抱合したC - m y c抗体を使用して、プレートまたはビーズに検出反応を行う。さらに、ペルオキシダーゼと抱合した抗体を使用して、化学ルミネッセント検出法も使用することが可能である。 30

【0110】

N末端マーカー、アフィニティーマーカー、さらにC末端マーカーは、全てエピトープを含むことが可能で、これは新生タンパク質をコードするメッセージまたはD N Aが特定のエピトープに対応する核酸配列を有するようにデザインすることによって、新生タンパク質中に取り込まれ得ることは、分子生物学及び生化学領域の当業者には理解されるであろう。これは、ポリメラーゼ鎖反応（P C R）を使用する、新生タンパク質をコードするD N A中に所望する核酸配列を取り込むプライマーのデザインのような既知の方法を使用して達成し得る。N末端マーカー及びC末端マーカーの両方を検出するために使用し得る、広く様々な検出方法が利用可能であることは、タンパク質生化学分野の当業者には理解されるであろう。その他の事例は、非化学ルミネッセント基質を化学ルミネッセント産物に転化する酵素が、特定のエピトープに対する抗体に抱合される、化学ルミネッセンスアッセイの使用を含む。 40

【0111】

このアプローチによる一例は、ルミネッセントマーカーを測定するためにルミノメーターを使用することに基づく。ピオチン検出マーカーは、ミスアミノアシル・t R N Aを使用して、N末端に取り込まれる。ピオチンは、ウミシイタケ（s e a p a n s y）由来のR e n i l l aルシフェラーゼに抱合されるストレプトアビジンを使用することにより検出される。C末端配列は、ホタルルシフェラーゼに付着された結合因子と相互作用するエピトープを含む。タンパク質のN末端部近隣に位置する独特なエピトープを使用することによる新生タンパク質の分離後、タンパク質を、P r o m e g a C o r pにより説明さ 50

れる手技及びDual-Luciferase（登録商標）レポーターアッセイとして知られる手順に基づくデュアルルミネッセント・ルシフェラーゼアッセイ（二重発光ルシフェラーゼアッセイ）にかける。このアッセイは、まずPromega Corp. から市販のルシフェラーゼアッセイ試薬IIを分離された新生タンパク質に加え、次に化学ルミネッセンスレベルを測定することから成る。次に、同時にホタルルミネッセンスを消し、Renilla ルミネッセンスを活性化する、Stop & Glo（登録商標）試薬を加える。ルシフェラーゼアッセイを実施して、秒単位で定量することができる。ホタルとRenilla ルシフェラーゼから測定されたルミネッセンスレベルの比較は、新生タンパク質のコードされたメッセージ中に突然変異が存在するか否かの徴候を提供する。

【0112】

10

その他の事例では、N末端マーカ―は、ミスアミノアシル・tRNAを使用することにより、翻訳中にタンパク質のN末端部に取り込まれたアフィニティーマーカ―を含む。アフィニティーマーカ―は共役因子と相互作用し、新生タンパク質を翻訳混合物から分離するために作用する。新生タンパク質はまた、タンパク質のN末端に隣接または近隣に位置する、アフィニティーマーカ―を含む検出マーカ―を含む。さらに、それはタンパク質のC末端部またはその近隣に配列特異性マーカ―を含む。新生タンパク質のN末端及びC末端部近隣にある検出マーカ―を次に測定して、鎖終了またはフレーム外突然変異の存否を検出するために比較する。

【0113】

様々な他のアフィニティーマーカ―、N末端マーカ―及びC末端マーカ―が、本実施態様のために利用可能である。アフィニティーマーカ―は、ビオチン、または光開裂性ビオチンであり、N末端マーカ―はStep Tag、さらにC末端マーカ―はC-myc エピトープであり得る。この場合は、翻訳後に、反応混合物を、ストレプトアビジンでコートされたビーズを加えてまたは、ストレプトアビジンでコートされたマイクロ滴定プレートでインキュベートする。非結合タンパク質の洗浄後、蛍光色素（ローダミンまたはテキサスレッド）を抱合させた抗his X6抗体、及びBODIPYのような他の蛍光色素を抱合させたC-myc抗体を使用して、プレートまたはビーズに検出反応を行う。さらに、ペルオキシダーゼと抱合された抗体を使用して、化学ルミネッセント検出法を使用することも可能である。ペルオキシダーゼ抱合抗体の場合でさえ、蛍光性基質を使用することが

20

30

【0114】

最適効果を得るためには、N末端マーカ―及びアフィニティーマーカ―は、タンパク質のN末端部にできるだけ近接して配置されるべきである。例えば、N末端マーカ―がミスアミノアシル開始因子を使用して取り込まれる場合、それはN末端アミノ酸に位置する。この場合、アフィニティーマーカ―は、N末端マーカ―にすぐ隣接して位置するべきである。従って、メチオニンに抱合されるBODIPY から成るBODIPYマーカ―が、ミスアミノアシル開始tRNAにより取り込まれると、Step Tag（WSHPQFEK）（配列番号8）のようなエピトープ配列が次に続くはずであり、従って全N末端配列は、BODIPY-MWSHPQFEK（配列番号10）となるであろう。10）。しかし、特別の場合は、N末端マーカ―とアフィニティーマーカ―またはアフィニティーマーカ―に結合する共役因子間の相互作用を回避するために、BODIPY-Mとエピトープ配列間に介在アミノ酸を加えることは好都合となり得る。そのような相互作用は、N末端マーカ―、アフィニティーマーカ―及び共役因子の性質に依存して変化する。

40

【0115】

最適効果を得るためには、C末端マーカ―は、タンパク質のC末端部にできるだけ近接して配置されるべきである。例えば、His-X6 tagが使用される場合、タンパク質配列は6 Hisで終止する。ある場合は、エピトープは、新生タンパク質の特性を最適化するために、タンパク質C末端部の数残基前に位置し得る。これは、例えば、特定のアミノ酸配列が、溶解度または疎水性のような望ましい新生タンパク質の特定の特性を修飾

50

するために必要である場合に起こる。

【0116】

本方法の通常適用では、正常メッセージから翻訳された新生タンパク質のN末端及びC末端マーカの測定レベルの比率を、標準正規化比を計算するために使用し得る。突然変異を含み得るメッセージの場合は、この標準比からの偏差を突然変異の度合いを予測するために使用し得る。例えば、全てのメッセージが欠落している場合は、N末端マーカに対するC末端マーカの比率はゼロであると予測される。他方、全てのメッセージが正常である場合は、比率は1であると予測される。メッセージの半分のみが欠落している場合、例えば、鎖終止またはフレーム外読み取りエラーを起因する特定の遺伝的欠損についてヘテロ接合体である患者では、比率は1/2である。

10

【0117】

鎖終止またはフレーム外突然変異を検出するための既存の手法と比較して、本方法にはいくつかのユニークな利点がある。普通では、そのような突然変異は、従来のDNA配列法を使用して、疑われる遺伝子の全配列を分析することによって検出される。しかし、そのような方法は時間を要し、高価で、多数の試料についての迅速なスループットアッセイには適切ではない。これに変わる方法は、ゲル電気泳動を利用することであり、これは新生タンパク質の予測されるサイズから変異を検出することが可能である。このアプローチは、しばしばタンパク質トランケーション試験と言及されるが、ミスアミノアシル-tRNAによる検出マーカの取り込みのような非放射性標識法を使用することにより可能になる。しかし、ハイスループットスクリーニングのような、多くの状況において、時間を要する（典型的には60～90分）ゲル電気泳動の使用を避けることが望ましい。本方法においては、ゲル電気泳動を実施する必要性が排除される。さらには、このアプローチは、蛍光性、ルミネッセントまたはその組み合わせであり得る分離された新生タンパク質由来の2つの検出シグナルの比較に依存するために、極めて自動化し易い。

20

【0118】

タンパク質のC末端部近隣に位置する配列依存性マーカの測定は、フレームシフトまたは鎖終止突然変異のいずれかの存在についての情報を提供し、それはいずれかが存在すると不正確な配列を起因することに拠る。N末端マーカの測定は、C末端マーカが正規化された測定に対する内部対照を供給する。C末端マーカレベルをN末端マーカについて正規化することは、実験の正確性を損ない得る翻訳中のタンパク質発現レベルにおける変化のような本質的な変異を排除する。タンパク質のN末端部またはその近隣に位置するアフィニティーマーカを使用して、翻訳混合物からタンパク質を分離することは、タンパク質が翻訳中にメッセージのコード領域にある内部AUGから開始される場合に生じ得るフォールススタート（不正開始）の出現を排除する。フォールススタートは、鎖終止またはフレーム外突然変異後に起こるために、誤った結果の原因となり得る。これは、内部AUGがメッセージを有するフレーム内にある場合に特に真実である。この場合、メッセージが突然変異を含んでいても、ペプチドC末端マーカは依然として存在する。

30

【0119】

B. レポーター基

本発明による他の実施態様は、系から成分を分離することなく、細胞または無細胞タンパク質合成系における新生タンパク質の合成をモニタするための方法を指示する。これらのマーカは、いったん新生タンパク質中に取り込まれると、溶液中に遊離またはtRNAと結合されているマーカから識別可能である。このタイプのマーカは、レポーターとも称されるが、細胞または無細胞翻訳系において直接に新生タンパク質の合成を検出及び定量するための手段を供給する。

40

【0120】

米国特許第5,643,722号（本明細書に参考文献として編入）に既に説明されているレポーターの一つのタイプは、タンパク質合成系によって、いったん新生タンパク質中に取り込まれると、その物理的または生化学的特性の少なくとも一つが変化を受けるという特徴を有する。結果生じる新生タンパク質は、タンパク質合成系をその成分に分離し

50

たり、部分的に精製することなく、リアルタイムで、合成系内において独自検出され得る。このタイプのマーカーは、タンパク質合成系中に既存のタンパク質から最初に新生タンパク質を分離する必要なく、その生産をモニタするための便利な非放射性方法を供給する。レポーターマーカーはまた、タンパク質発現中の異なる時期に、その特性が互いに識別可能な複数のマーカーを加えることにより、タンパク質合成中の異なる時期に生産される、異なる新生タンパク質の検出及びその識別のための手段も供給する。これは、分化遺伝子発現研究のための手段を供給する。

【0121】

レポーター利用の一例を図10に概略表示する。tRNA分子は、モニタ及び励起のための特定波長では、弱い蛍光性を有するかまたは蛍光性のないレポーター(R)でミスアミノアシル化される。このミスアミノアシル・tRNAは、次に細胞または無細胞タンパク質合成系中に導入され、レポーター類似体を含む新生タンパク質が徐々に生産される。新生タンパク質中にレポーターが取り込まれると(R*)、既知の波長において蛍光の増加を呈する。新生タンパク質の漸次な生産は、特定波長において蛍光の増加を検出することによりモニタされる。

10

【0122】

レポーターの化学的合成は、化学的部分の結合、あるいは天然アミノ酸残基を有するレポーター特性を持つ分子成分に依存し得る。その環境に感受性があり、発光光線の波長は蛍光収量の変化を受ける多数の蛍光分子がある。アミノ酸と結合されている、これらの化学的部分が、合成タンパク質中に取り込まれると、バルク水性媒質とタンパク質内部間の差異が、水分へのアクセスの低下、電荷イオン基への曝露、易動度の低下、及び周囲媒質の誘電率の変化を生じ得るために、その環境が変更される。そのような2つの実例を図11Aに示す。

20

【0123】

レポーター分子の一例は、蛍光性アクリジニウム部分に基づき、マイクロ環境の極性または粘度に応じて、その発光特性が変化するというユニークな特性を有する。それは、疎水性環境及び/または粘度に曝されると、量子効率のより高い蛍光を有する。レポーター自体が疎水性であるため、増殖新生ポリペプチド中への取り込み後、レポーターは新生タンパク質の疎水性コアと会合すると思われる。蛍光強度の増加は、翻訳系のタンパク質合成活性の直接的計測法である。しかし、タンパク質中において各レポーター残基の環境は異なり、またある場合は、レポーターはタンパク質表面上に存在して水性媒質に曝されることがあり、タンパク質中に取り込まれたレポーターの総分光特性にネットとしての変化がバルク水性媒質に関連して起こる。タンパク質中のレポーターのサブセットのみに関する分光特性の変化は、そのようなレポーターを取り込むタンパク質合成の検出には十分である。

30

【0124】

その他のアプローチは、必ずしもその環境の変化への応答としてではなく、ペプチド結合形成時にその蛍光特性を変化するレポーターを利用することである。レポーターは、無細胞抽出物において異なる環境を分割するため、レポーター蛍光の変化は、新生タンパク質中へのレポーターの取り込みに際する蛍光の変化と比較して大きなシグナル変化を生じない。

40

【0125】

レポーターの第2の実例は、6,7-(4',5'-プロリノ)クマリン[6,7-(4',5'-prolino)coumarin]のようなクマリン基材のマーカーである。この化合物は、ペプチド結合形成後に、フルオロフォアがその発光及び吸光特性を変更するように、クマリンのようなフルオロフォアをアミノ酸構造エレメントと結合することにより、化学的に合成し得る。例えば、二次アミノ官能基を含むプロリン環は、正常一次アミノ基と同様にペプチド結合形成に関与する。既存のフルオロフォアに関して新しく形成されたペプチド基の共平面性のために、蛍光の変化が生じる。これは、窒素孤立電子対の π -電子及びペプチド結合のカルボニル基のために、抱合/脱局在化を増加する。

50

そのような化合物の合成は、アセト酢酸エチルを使用する、クマリン合成に基づく（図 1 C）。

【0126】

レポーターは、タンパク質中に取り込まれる際にその蛍光特性を変化させるこれらの非天然アミノ酸に限定はされない。これらはまた、電磁スペクトルのUV、可視および赤外領域における特定の吸光バンドの変化、ラマン活性で、共鳴ラマンスペクトロスコピー、電子スピン共鳴活性、及び核磁気共鳴によって強化され得る発色団を含む他の電磁または分光特性において変化を受ける分子から合成され得る。一般的には、レポーターは、電磁場及び放射への相互作用及び反応が、新生タンパク質中への取り込み後に変化を受ける分子成分から形成され得る。

10

【0127】

本発明においては、レポーターはさらに、同一新生タンパク質中に取り込まれている、またはタンパク質が発現されている反応チャンバーに存在する他のマーカー及び因子との相互作用のために、その物理的または生理化学的特性の少なくとも一つに変化を受けることがある。2つの異なるマーカーの互いの相互作用が、特に検出性の原因となる。相互作用の一つのタイプは、2つのマーカーが約1オングストローム（Å）～約50 Å、好ましくは約10 Å以内の距離内にある場合に生じる共鳴エネルギー移動である。この場合、電磁放射を有する一つのマーカーの励起が、検出可能な異なる波長で、第二マーカーの電磁放射放出を起因する。相互作用の第二のタイプは、マーカーが約5 Å以内にある場合にのみ生じる、2つの異なるマーカー間の電子伝達に基づく。第三の相互作用は、2つのマーカー間の光化学的反応であり、蛍光のような検出特性を有する新種を生産する。これらのマーカーはまた、新生タンパク質中への取り込みに使用されるミスアミノアシル・tRNA上に存在し得るが、マーカーの相互作用は、主として、その近位性のためにタンパク質中に取り込まれた時に生じる。ある場合は、タンパク質中の2つのマーカーの近位性は、タンパク質の一次、二次、または三次構造のいずれかにおいて、互いに近接する位置にマーカーを取り込むtRNA種を選択することにより強化され得る。例えば、チロシン-tRNA及びトリプトファン-tRNAは、ユニークな隣接対チロシン-トリプトファンを含むタンパク質配列において、2つの異なるマーカーが互いに近接する可能性を高めるために使用することができる。

20

【0128】

本方法による一つの実施態様では、共役因子と結合する際に、レポーター基が第二マーカーまたは因子と相互作用して、それらを特に検出可能にするように、ミスアミノアシル・tRNAを使用して、レポーター基が新生タンパク質中に取り込まれる。そのような相互作用は、いったん特定のアフィニティー要素が共役因子と相互作用すると、レポーター基と第二マーカー間の相互作用を最適化するように、特定のアフィニティー要素を新生タンパク質中に取り込むことにより最適化し得る。そのようなアフィニティー要素は、エピトープまたは非天然アミノ酸を形成する特定のアミノ酸配列を含む。一つの実例では、レポーター基は、ミスアミノアシル・tRNAを使用することにより、新生タンパク質のN末端部に取り込まれる。エピトープは、共役因子との相互作用時に、レポーターが共役因子と抱合されている第二マーカーの近接部位に来るように、新生タンパク質中に取り込まれる。

30

40

【0129】

都合よく使用されるマーカー間相互作用の一つのタイプは、2つのマーカーが約1オングストローム（Å）～約50 Å、好ましくは約10 Å以内の距離内にある場合に生じる蛍光共鳴エネルギー移動を起因する。この場合、電磁放射を有する一つのマーカーの励起が、検出可能な異なる波長で、第二マーカーの電磁放射放出を起因する。これは、例えば、E. coli 開始tRNA^{fmet}を使用して、タンパク質のN末端部に蛍光マーカーを取り込むことにより達成され得た。Sigma-Genosysにより説明されるSteptag（WSHPQFEK）（配列番号8）のようなエピトープが次にN末端近辺に取り込まれる。ストレプトアビジンを次に既知の方法を使用して、第一マーカーによ

50

って効率よく蛍光エネルギー移行を受けるように選択された第二蛍光マーカーと抱合する。このプロセスの効率は、2つのマーカーのスペクトル特性に依存するフォースターエネルギー移行半径 (Forster energy transfer radius) を計算することにより測定し得る。マーカー・ストレプトアビジン複合体が次に翻訳混合物中に導入される。新生タンパク質 StreptTag エピトープとストレプトアビジンの特異的相互作用のために、新生タンパク質が生産された時のみ、第一及び第二マーカー間に蛍光エネルギー移行が生じる。

【0130】

近隣部位に置かれると容易に検出可能なシグナルを生産する、本方法においてマーカー対として使用し得る様々な色素がある。以前は、そのような色素対は、例えば、PCR産物を検出するために、一つのプローブは5'端かつ他のプローブは3'端を色素で標識したプローブにハイブリダイズすることにより、使用されていた。PCR産物の生産は、色素対を近隣部位におき、検出可能なFRETシグナルを生起する。一つの適用では、色素、フルオレセイン及びLC 640は、2つの異なるプライマー (Roche Molecular Biochemicals - <http://www.biochem.boehringer-mannheim.com/lightcycler/monito03.htm>) 上で使用された。ダイオード・レーザーによって発生される緑色光線 (約500 nm) で、フルオレセインが励起されると、LC 640は、適切なフィルター及び検出器で容易に検出し得る、赤色蛍光光線 (約640 nm) を発光する。新生タンパク質の場合、色素対、BODIPY FL 及び LC 640は、同様な方法で機能する。例えば、タンパク質のN末端部上へのBODIPY FLの取り込みとN末端エピトープに対して指示されているLC 640による結合因子の標識は、新生タンパク質生産の検出を可能とする。

【0131】

マーカー対BODIPY-FLとクマリンの使用は、都合よく使用される第2番目の対である。一つの研究 [Keller, R. C., Silvius, J. R., 及び De Kruijff, B. (1995) Biochem Biophys Res Commun 207 (2), 508~14] では、スペクトルオーバーラップを使用して、クマリン - (β -BODIPY FL) 及びクマリン - (β -BODIPY 530/550) についてフォースターエネルギー移行半径 (RO) $50 + / - 2 \text{ \AA}$ 及び $40 + / - 2 \text{ \AA}$ が共役することが発見された。実験的には、これはそれぞれ、 $49.0 \sim 51.5 \text{ \AA}$ 及び $38.5 \sim 42.5 \text{ \AA}$ と推定された。類似または同一のスペクトル特性を有する2つのマーカーを、消光プロセスのために、マーカー対として使用することも可能である。例えば、一つの研究では、このプロセスは、無傷細胞における外在性タンパク質のプロセッシングを研究するために、BODIPY FLの事例で使用され [Reis, R. C., Sorgine, M. H., 及び Coelho-Sampaio, T. (1998) Eur J Cell Biol 75 (2), 192~7]、また二番目の事例では、細胞内ウィルスアセンブリ動態学研究のために使用された [Da Poian, A. T., Gomes, A. M., 及び Coelho-Sampaio, T. (1998) J Virol Methods 70 (1), 45~58]。

【0132】

上記に記載のように、レポーターを使用する主要な利点は、それ以上の精製または分離ステップなしに、直接に細胞または無細胞翻訳系におけるタンパク質の合成をモニタするための能力である。レポーターマーカーはまた、必要に応じて、レポーター特性を除去し得る切断可能なマーカーと併用して使用し得る。そのような手法は、取り込まれたマーカーを取り込まれなかったマーカーから区別するために分離ステップを必要とする、放射性アミノ酸を使用する場合では利用できない。インビトロ翻訳系では、これは、タンパク質合成の速度を測定し、また反応条件を変更することにより合成を最適化するための手段を供給する。例えば、インビトロ翻訳系は、特定の校正タンパク質の生産速度をモニタすることにより最適化することができた。これはさらに、細胞または無細胞系における遺伝子制

御研究のための信頼でき、かつ正確な方法も供給する。

【0133】

C. アフィニティーマーカー

本発明による他の実施態様は、細胞または無細胞タンパク質合成系において生産される新生タンパク質の検出または分離を容易にするマーカーの用途を指示する。そのようなマーカーは、アフィニティーマーカーと称され、受容体基を含む分子及び/または物質と選択的に相互作用する特性を有する。アフィニティーマーカーは、説明されるように、非天然アミノ酸類似体及び誘導体、さらにレポータータイプのマーカーのような他のマーカーと同一な方法で、tRNAをアミノアシル化することにより結合される。これらのアフィニティーマーカーは、いったんミスアミノアシル・tRNAが翻訳系に導入されると、新生タンパク質中に取り込まれる。

10

【0134】

アフィニティーマーカーは、共役因子を介する、生物学的または非生物学的起源である他の分子による選択的相互反応のために、新生タンパク質の分離を容易にする。例えば、受容体分子と言及される、アフィニティーマーカーが相互作用する特定の分子は、小有機分子またはスルヒドリル基(-SH)のような化学基、または抗体のような大型バイオ分子であり得る。結合は、事実上普通は化学的であり、共有または非共有結合の形成、あるいはイオンまたは水素結合のような相互作用を含み得る。結合分子または部分は、溶液中で遊離しているか、またはそれ自体が表面、ポリマーマトリックスに結合されているか、あるいは基質表面に常在し得る。相互作用はまた、光線、温度、圧力または触媒として作用する化学的または生物学的分子の添加のような外部因子によってトリガされ得る。

20

【0135】

反応混合物中にある新生タンパク質と他の既存タンパク質の検出及び/または分離は、アフィニティーマーカーと受容体分子間の相互作用、通常では結合の種類によって起こる。しかし、取り込まれたアフィニティーマーカーのあるものが新生タンパク質内部に埋め込まれているようなある事例においても、アフィニティーマーカーのいくつかは新生タンパク質表面に露出されている限りは、アフィニティーマーカーと受容体分子間の相互作用は起こる。アフィニティーマーカーはタンパク質配列のいくつかの位置に分散されているために、これは普通は問題とならない。

【0136】

アフィニティーマーカーは、共役因子が付着または取り込まれている、天然アミノ酸、非天然アミノ酸、アミノ酸誘導体あるいはアミノ酸類似体を含む。例えば、非天然アミノ酸への共役因子の付着は、共有相互作用を介して起こるが、親水性または疎水性相互作用、水素結合、静電相互作用またはこれらの組み合わせのような非共有相互作用もまた可能である。有用な共役因子の実例は、ハプテン、免疫原性分子、ビオチン及びビオチン誘導体、さらにこれら分子のフラグメント及び組み合わせのような分子を含む。共役因子は、新しく形成された新生タンパク質の選択的結合または付着を可能として、その検出または分離を容易にする。共役因子は、特定の抗体に対する抗原部位を含むか、あるいはストレプトアビジンのような受容体基への強い結合を有することが知られているビオチンのような分子を含み得る。例えば、ビオチンはタンパク質鎖中に取り込まれたアミノ酸に共有結合し得る。ビオチンの存在は、表面上にコートされているアビジン分子中にそのようなマーカーを取り込んでいる新生タンパク質のみを選択的に結合する。適切な表面は、クロマトグラフィー分離用の樹脂、結合プレート用の組織培養表面のようなプラスチック、マイクロ滴定皿及びビーズ、セラミック及びガラス、磁性粒子、ポリマー及び他のマトリックスを含む粒子を含む。処理表面は、例えば、非新生タンパク質及び他の翻訳用試薬を取り除くためにリン酸緩衝生理食塩水(PBS)で洗浄され、新生タンパク質が分離される。ある場合は、これらの物質は、光ファイバー、ChemFET、及びプラズモン検出器のようなバイオ分子検知装置の一部であり得る。

30

40

【0137】

アフィニティーマーカーの一例はダンシルリジン(図5)である。ダンシル環と相互作用

50

する抗体は市販されており (Sigma Chemical; St. Louis, MO)、または、本明細書に参考文献として特に編入されている、Antibodies: A Laboratory Manual (抗体: 実験室マニュアル) (E. Harlow 及び D. Lane、編集、Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988) に説明されるような既知のプロトコルを使用して調製し得る。ダンシル部分を含むタンパク質を、特異的抗体 - ダンシル相互作用に基づいて、他のタンパク質から分離することを可能とする多数の従来の手法が存在する。例えば、抗体をクロマトグラフィーカラムの充填材上に不動化することができる。アフィニティークラムクロマトグラフィーとして知られる本方法は、ターゲットタンパク質を不動化抗体との相互反応によってカラムに保留し、他のタンパク質はカラムを通過することにより、タン

10

パク質の分離を達成する。ターゲットタンパク質は次に、抗原抗体相互作用を破壊することにより遊離される。イオン交換またはアフィニティセファローズ (Sephacrose)、セファデックス (Sephadex) 及び他のクロマトグラフィー用樹脂のような特定のクロマトグラフィーカラム材料が市販されている (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ)。

【0138】

分離は、免疫沈降法、及び、フィルター上またはビーズ、プレートまたは樹脂のような他の表面上への抗体の不動化のような他の生化学的分離方法を使用して、抗体 - ダンシル相互作用によって実施され得る。例えば、タンパク質は、タンパク質特異的抗体で磁性ビーズをコートすることにより分離することができた。ビーズは、磁場を使用して抽出物から分離される。アフィニティマーカーとしてダンシルリジンを使用する特別の利点は、いったんタンパク質が分離されると、その蛍光特性のために好都合にもさらに検出され得ることである。

20

【0139】

抗体の他に、これと等しくターゲット分子または化学的部分と強い相互作用を呈示するその他の生物学的分子が存在する。実例は、ピオチンとアビジンの相互作用である。この場合は、ピオチン部分を含むアフィニティ類似体が、本発明の一部である方法を使用して、タンパク質中に取り込まれる。ピオチン - リジンアミノ酸類似体は市販されている (Molecular Probes; Eugene, OR)。

30

【0140】

アフィニティマーカーはさらに、マーカー検出前に形成されなければならないマルチ成分複合体の一つの成分を含む。本検出手段による一つの特定の実施態様は、ルミネッセント金属キレート塩、特にルミネッセント希土類金属キレート塩の使用を含む。ある特定の分子は、希土類金属と極めて安定な複合体を形成することが知られている。さらに、これらのキレート塩への発色団の導入は、これらの複合体のルミネッセンスを感作することがよく知られている。ルミネッセント希土類金属キレート塩の使用に基づく様々な検出機構が説明されている: Hemmila, I. A., "Applications of Fluorescence in Immunoassays (免疫アッセイ法における蛍光の適用)", (Wiley & Sons 1991)。

40

【0141】

好ましい実施態様では、tRNA が、希土類シェルターとしてさらに作用する発色団でミスアミノアシル化される。この修飾アミノアシル・tRNA は、次に細胞または無細胞タンパク質翻訳系中に導入され、修飾アミノ酸が新生タンパク質中に取り込まれる。この混合物は次に、ゲル電気泳動を使用して分離され、ゲルは希土類陽イオンを含む溶液を加えてインキュベートされる。これらの条件下、希土類陽イオンは、新生タンパク質中にのみ存在するキレート化剤によって修飾されたアミノ酸とルミネッセント複合体を形成する。新生タンパク質は次に、形成されたランタニド複合体を励起する、中域UVトランスイルミネーター (350 nm) を使用して検出される。画像は次に、ポラロイドカメラまたはCCDアレイ及びフィルターを使用して記録される。一つの実施態様では、二成分検出

50

システムの第一成分としてサリチル酸誘導体、また第二成分としてテルビウムイオンが使用される。

【0142】

アフィニティーマーカーはさらに、共役因子を取り込んでいる切断可能マーカーを含み得る。この特性は、タンパク質の天然構造及び機能を維持し、受容体基から新生タンパク質を遊離するために共役因子の除去が必要である場合に重要である。ある場合は、共役因子の切断及び除去は、天然アミノ酸の生産を生起する。一つのそのような実例は、アミノ酸と結合された光開裂型ビオチンである。

【0143】

光開裂型ビオチンは、X、Y 及び Z によって図 12 に示す官能基により誘導体化されたフェニル環を含む光開裂部分を含む。X は、反応基 X' を介して、バイオ分子基質への PCB の結合を可能とする。X' の実例は、Cl、O-N-ヒドロキシスクシンイミジル、OCH₂CN、OPhF₅、OPhCl₅、N₃ を含む。Y は、1 またはそれ以上のニトロまたはアルコキシルのような置換を含むフェニル環の置換パターンを示す。官能基 Z は、クロスリンカー部分の光反応部分への結合を可能とする基を示す。光反応部分は、照射に際して、基質から PCB 分子の切断を生起する光反応を受ける特性を有する。

【0144】

リジン-tRNA は、光開裂型ビオチン-リジンでミスアミノアシル化されるか、または化学的に修飾されて光開裂型ビオチンアミノ酸を付着する。ミスアミノアシル-tRNA は、無細胞タンパク質合成系に導入されて、新生タンパク質が生産される。新生タンパク質は、ビーズと磁場の相互作用に基づく従来の方法を使用して、ストレプトアビジンでコートされた磁性ビーズによって、系の他の成分から分離し得る。新生タンパク質は、波長が約 280 nm である UV 光線の照射により、ビーズから遊離される。

【0145】

タンパク質検出のためにデザインされた多数の装置が、ターゲットタンパク質と特定の不動化受容体分子の相互作用に基づいている。そのような装置はまた、ターゲット分子の不動化受容体基との相互作用によって変更された、表面プラズモン、光散乱及び物質の電子特性における変化の検知に基づくバイオディテクター（バイオ検出器）のようなアフィニティーマーカーをいったん含むと、新生タンパク質を検出するために使用され得る。

【0146】

アフィニティタイプマーカーを含まないものを含む新生タンパク質は、他の従来の分離手法によって分離され得る。新生タンパク質を分離かつ精製するために適用または併用できるより有用な分離手法のいくつかは、フェノールまたはクロロホルム抽出のような化学抽出法、透析法、硫酸アンモニウムカットのような沈降法、電気泳動及びクロマトグラフィー法を含む。化学的分離法は、一般的には個々のタンパク質の特定な分離を供給しないが、バルク量の非タンパク質性物質の除去に有用である。電気泳動による分離は、新生タンパク質を含む翻訳混合物を、変性または非変性ポリアクリルアミドであるゲルまたはアガロースゲルのウェル中に入れること含む。直流またはパルス電流をゲルに印加し、系の様々な成分が、分子サイズ、形状、電荷またはその物理的特性の組み合わせに従って分離される。いったんゲル上で識別されると、分離タンパク質を含む部分を取り出して、新生タンパク質をゲルから精製する。アクリルアミド及びアガロースゲルからのタンパク質精製法は既知であり、市販されている。

【0147】

タンパク質の分離及び精製に有用であるクロマトグラフィー法は、ゲル透過、高速または高圧液体クロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィーを含む。これらの手法は、選択マーカーを含むタンパク質種の分離及び精製に極めて便利である。

本発明による他の実施態様は、新生タンパク質のアミノ末端残基における、マーカーまたはアフィニティ特性を有する非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体の取り込みを指示する（図 13）。これは、アミノ酸の側鎖の使用またはアミノ酸の末端アミノ基を誘導体化

10

20

30

40

50

することにより達成し得る。どちらの場合も結果生じる分子は、アミノ酸誘導体と称される。タンパク質のアミノ末端残基は遊離基であり及、従ってその誘導体化は、新生ポリペプチドの形成を妨げないであろう。非天然アミノ酸またはアミノ酸誘導体は次に、アミノ酸合成の開始をシグナルする第一AUGコドンのみを認識する開始tRNAをミスアミノアシル化するために使用される。このミスアミノアシル開始tRNAのタンパク質合成系への導入後、マーカーは新生タンパク質のアミノ末端にのみ取り込まれる。これらの新生分子はほとんど天然立体配座にフォールドされて（折りたたまれて）いる可能性があるため、N末端残基に取り込む能力は重要である。これは、機能性新生タンパク質の検出や分離を所望するような研究では便利である。

【0148】

新生タンパク質のアミノ末端残基でミスアミノアシル・開始tRNAによって取り込まれた全てのマーカーが、タンパク質翻訳機構による同様な受容を示すわけではない。さらに、異なるマーカーの取り込み範囲は、リジン-tRNAのような非開始tRNAの用途に比較するとより限定的であり得る。ミスアミノアシル・開始tRNAによる取り込みについてのマーカー間のこの識別に影響する因子については完全には解明されていないが、一つの可能性は、ホルミルメチオニン-開始tRNAをリボソームに運搬するために使用される開始因子(IF2)が役割を果たすことである。第二の可能性は、マーカー構造とリボソーム間の相互作用が役割を果たすことである。例えば、マーカー、BODIPY-FLは、タンパク質翻訳機構により、NBDのような小型蛍光マーカーよりも大幅に受容される。この理由で、BODIPY-FLは、開始tRNAを介して取り込まれる場合は、新生タンパク質検出における使用には優れたマーカーである。

【0149】

マーカー基はまた、正常AUG開始コドンを認識しない突然変異型tRNAを使用することにより、N末端に取り込まれ得る。ある場合は、これはマーカーのより高度な特異的取り込みを誘導し得る。例えば、アンチコドンがCAUからCUAに変更された（開始メチオニンコドンのアンバー終止コドンへの変更を起因）開始tRNAの突然変異体は、開始サプレッサ-tRNAとして作用することが示されている（Varshney U, Raj Bhandary UL, Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb; 87(4): 1586~90; Initiation of protein synthesis from a termination codon（終止コドンからのタンパク質合成の開始）。このtRNAは、正常開始コドンAUGがアンバーコドンUAGによって置換されると、特定の遺伝子のタンパク質合成を開始する。さらには、UAGとtRNA(fMet^{CUA})によるタンパク質合成の開始は、メチオニンではなくグルタミンで起こることが発見された。新生タンパク質のN末端部にマーカーを導入するためにこのtRNAを使用するには、この突然変異体tRNAは、グルタミンで酵素的にアミノアシル化され、次に適切なマーカーで修飾され得る。他方、このtRNAは修飾アミノ酸（例えば、メチオニン-BODIPY）を使用して、化学的にアミノアシル化し得る。タンパク質翻訳は、UAGを含メッセージ上でこのタンパク質によってのみ開始できるため、全てのタンパク質は、タンパク質のN末端部にマーカーを含むであろう。

【0150】

D. 質量分析法

質量分析法は分子の質量を計測する。生物学における質量分析の用途は、迅速に進歩を続けており、炭水化物、タンパク質、核酸及びバイオ分子複合体の分析を含む多様な領域に適用されている。例えば、マトリックス支援レーザー脱離イオン化(MALDI)質量分析(MS)の開発は、タンパク質、オリゴヌクレオチド、及びオリゴサッカリドを含むバイオ分子の分析のための重要なツールを供給した[Karas、1987 #6180; Hillenkamp、1993 #6175]。この手法の成功は、大型バイオ分子及び非共有結合複合体(>500,000 Da)の分子量を、高精度(0.01%)及び感度(フェムトモル量以下)で計測するその能力に基づく。これまでは、これはDNAの迅速配列、生物活性ペプチドのスクリーニング及び膜タンパク質分析を含む生物学及び

10

20

30

40

50

医学の多様な領域に適用できることが発見されている。

【0151】

ミスアミノアシル・tRNAによって新生タンパク質中、特にN末端部のような特定の位置、に取り込まれたマーカーは、質量分析法によって新生タンパク質を検出するために使用し得る。そのようなマーカーなしでは、抽出物中には類似の質量を有する多数の他の分子が存在するために、細胞または無細胞抽出物中で、合成された新生タンパク質に起因するバンドを検出するのは極めて困難であり得る。例えば、抽出物の総タンパク質量の0.01%以下が新生タンパク質を含むような場合である。さらには、新生タンパク質と類似の分子量を有する分子が混合物中に存在することがある。そのような分子は、新生タンパク質のピークとオーバーラップするであろう。この問題は、新生タンパク質が無細胞または細胞タンパク質合成に既に存在する転写または翻訳因子である場合に、特に重大である。タンパク質合成系におけるこのタンパク質を余分な量の合成は、ピーク強度がタンパク質濃度と直線的に相関しないために、質量分析法における既知の方法を使用して検出することは困難であろう。

10

【0152】

翻訳系で生産された新生タンパク質の質量分析による検出は、生産された新生タンパク質の質量が未知である場合は、さらに極めて困難である。この状況は、例えば、新生タンパク質が正確な配列が未知であるDNAから翻訳される場合に生じるであろう。そのような一つの実例は、特定の遺伝子または遺伝子フラグメント中に特定の突然変異を有する個体からのDNAの翻訳である。この場合は、突然変異はタンパク質配列の変化を起こすことがあり、突然変異が終止コドンを引き起こす場合は鎖トランケーションさえ起こす結果となる。翻訳系において生産される新生タンパク質の質量は、DNAが遺伝子ライブラリーの異なるメンバーまたはそのフラグメントを含む可能性のある細菌コロニーのような未知の原料に由来する場合にも、また未知である。

20

【0153】

本発明による一つの実施態様では、特定の質量を持つマーカーの新生タンパク質中への取り込みが、従来の質量分析法のアプローチに関連する前記に説明する問題全てを排除するために使用され得る。第一に、既知の質量を持つマーカーでミスアミノアシル化されたtRNAを、タンパク質合成系に添加する。合成系を次に、新生タンパク質を生産するためにインキュベートする。タンパク質合成系の質量スペクトルを次ぎに測定する。新生タンパク質の存在は、未修飾タンパク質の質量と、新生タンパク質及びマーカーの質量を含む修飾アミノ酸の質量に対応する高質量位置にある第二バンドに対応する、タンパク質合成系の質量スペクトルのピークを同定することにより直接検出し得る。

30

【0154】

本方法を使用する新生タンパク質の効率的な検出を最適化するために行い得るいくつかのステップがある。マーカーの質量は、質量分析の分解能を超えるべきであり、従って新生タンパク質の質量の増加分は非修飾質量から解明され得る。例えば、質量が100 Daを超えるマーカーは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法(MALDI)または電子噴霧イオン化法(ESI)のどちらを使用しても、総質量が100,000までのタンパク質中で容易に検出し得る。ミスアミノアシル・tRNA量は、質量マーカーの取り込みが、生産される総新生タンパク質の約50%において生じるように調整されるべきである。開始tRNAは新生タンパク質のN末端部にのみ取り込まれるため、従って質量マーカーの複数のコピーが新生タンパク質に含まれる可能性が回避されるので、開始tRNAが質量マーカーの取り込みには好ましい。

40

【0155】

この方法の一例は、質量が282であるマーカーBODIPY-FLの、ミスアミノアシル・開始tRNAを使用する、新生タンパク質への取り込みである。ミスアミノアシル・開始tRNAを使用する、新生タンパク質へのこのマーカーの取り込みは、新生タンパク質に出現する正常バンドより上の約282 Daでバンドの出現を起こす。非ミスアミノアシルE.coli tRNA^{fmet}と競合のために、マーカーの取り込みはタンパク

50

質当たり 1 以下であるために、非修飾タンパク質に対応するピークもまた出現する。マーカの質量によって分離されるこれらの 2 つのバンドの同定は、新生タンパク質由来のバンドの初期同定を可能とする。新生タンパク質由来のバンドのそれ以上の確認は、翻訳混合物中にあるミスアミノアシル・開始 tRNA レベルを調整することにより行い得る。例えば、ミスアミノアシル・開始 tRNA が省かれる場合、非修飾タンパク質に対応するピークのみがタンパク質合成系の質量スペクトルに出現する。BODIPY-FL を有するミスアミノアシル・tRNA を含むタンパク質合成系及び含まないタンパク質合成系からの質量スペクトルを比較することにより、タンパク質合成系中に類似または同一質量を持つタンパク質が既に存在する場合でさえも、新生タンパク質の存在を独自に同定し得る。

【0156】

新生タンパク質の質量分析による同定の目的には、光開裂型マーカの利用がしばしば都合がよい。この場合は、質量スペクトル中にある新生タンパク質のピークは、マーカを光開裂する照射に露光された、または露光されていないタンパク質合成系の試料からのスペクトルを測定及び比較することにより容易に同定され得る。露光されていない試料は、取り込まれた質量マーカを有する新生タンパク質の質量に対応するバンドを呈示するが、露光された試料は、質量マーカが除去された後の新生タンパク質の質量に対応するバンドを呈示する。照射に起因する質量スペクトルの特定バンドのこのシフトは、タンパク質合成系において新生タンパク質に起因するバンドのユニークな識別子を供給する。

【0157】

この方法の一例は、光開裂型マーカである、光開裂型ビオチンの使用を含む。光開裂型ビオチンが、ミスアミノアシル・E. coli 開始 tRNA^{fmet} を使用して、ブドウ球菌によって生産される毒素である、試験タンパク質 α-ヘモリジン中に取り込まれると、質量スペクトルは、新生タンパク質の質量 35,904 Da に対応するピークと、36,465 Da に新生タンパク質の質量プラス光開裂型ビオチンの質量に対応する第二ピークの 2 つのピークを呈示する。細胞または無細胞抽出物を、波長が約 365 nm である UV 光線に、約 10 分露光することによるマーカの光開裂後、新生タンパク質からマーカが切断されるために、2 つのバンドの強度は変更を受ける。例えば、スペーサーを 1 つ含む光開裂型ビオチンの場合は、質量の変化は 561.57 である。これらの特徴の変化は、次に新生タンパク質に対応するピークを独自同定するために使用される。MALDI 質量分析法の場合は、十分な強度に調整されると、レーザーパルス・プローブは、光開裂型ビオチンの光開裂を達成するために使用され得る。この場合は、変化は、測定期間中に従来の方法で測定することができ、従って新生タンパク質に関連するピークの検出を容易にする。同様なアプローチが、細胞または無細胞翻訳系において、質量が未知である 1 つ以上の新生タンパク質の同定に使用され得る。

【0158】

ミスアミノアシル・tRNA によって新生タンパク質中に取り込まれる、アフィニティー特性を有するマーカはさらに、質量分析によるそのようなタンパク質の検出にも極めて便利である。そのようなマーカは、新生タンパク質を、残りの無細胞または細胞翻訳系から分離するために使用され得る。この場合は、残りの無細胞混合物からの新生タンパク質の分離は、タンパク質翻訳系にある他の分子のバンドからの妨害を排除する。このアプローチの実例は、ミスアミノアシル・tRNA を使用する、新生タンパク質の N 末端への光開裂型ビオチンの取り込みである。このマーカが、E. coli tRNA^{fmet} を使用して、新生タンパク質の N 末端部上に取り込まれると、それはストレプトアビジンアガロースのようなストレプトアビジン親和性媒質を使用して結合され得る便利なアフィニティー標識を供給する。この方法によって、いったん新生タンパク質が残りのタンパク質合成系から分離されると、UV 光線によって遊離され、さらに質量分析によって分析され得る。MALDI 質量分析法の場合は、新生タンパク質の遊離は、MALDI システムの UV レーザー励起パルスを使用して、大変便利にも達成し得る。他方、MALDI または ESI 質量分析の場合は、質量分析を行う前に試料を照射し得る。

【0159】

10

20

30

40

50

E . 電気泳動法

本発明による他の実施態様は、電気泳動によって翻訳系において翻訳された新生タンパク質と分子または因子の相互作用を検出するための方法を指示する。この方法は、多数の化合物または因子を、タンパク質が分離されたり、その機能が同定されていなくても、特定遺伝子による発現タンパク質との相互作用の可能性について迅速なスクリーンを行うことを可能とする。この方法はさらに、遺伝子プールによって発現されているタンパク質ライブラリーを、これらのタンパク質または因子を分離する必要なく、化合物または因子との相互作用について迅速にスクリーンすることも可能にする。因子は、化合物の組み合わせライブラリーの一部であるか、または天然試料のような複雑な生物学的混合物中に存在し得る。因子は、新生タンパク質に結合することによりこれと相互作用するか、または相互作用して化学的あるいは酵素的修飾による新生タンパク質の構造の変化を生起する。 10

【 0 1 6 0 】

ポリアクリルアミドゲルのようなゲル中でタンパク質の電気泳動易動度を測定する、ゲル電気泳動法の他に、この方法は毛管電気泳動を使用して実施し得る。C E は、分子の電荷質量比に比例する、タンパク質の電気泳動移動時間を測定する。時にはアフィニティー毛管電気泳動と称される、C E の一つの形状は、結合事象後に結合がタンパク質の電荷質量比に変化を起こす限り、小型リガンドを含む他分子とタンパク質の相互作用に極めて感度が高いことが発見されている。タンパク質が、特定の検出性電磁スペクトル特性を有する蛍光色素のようなマーカーと抱合されている場合に最大感度を得ることができる。電気泳動クロマトグラムにおけるピークの検出は、主として可視波長であるレーザー誘導性発光によって達成し得る。蛍光色素の実例は、フルオレセイン、ローダミン、テキサスレッド及びB O D I P Yを含む。 20

【 0 1 6 1 】

高感度検出の必要性和抽出物中に電荷質量比が類似する多数の他分子が存在するため、次の分離及び標識ステップなしには、C E による細胞または無細胞抽出物中で合成された新生タンパク質の検出は極めて困難である。例えば、抽出物の総タンパク質量の0 . 0 1 % 以下が新生タンパク質を含むような典型的な場合である。新生タンパク質と類似する電気泳動移動時間を有する他分子が混合物中に存在することがある。そのような分子は、新生タンパク質のピークとオーバーラップするであろう。

【 0 1 6 2 】

さらに、従来のC E 法を使用して、無細胞または細胞合成系において生産される新生タンパク質と分子の相互作用を検出することは極めて困難である。アフィニティー毛管電気泳動は、結合事象後に結合がタンパク質の電荷質量比に変化を起こす限り、小型リガンドを含む他分子とタンパク質の相互作用に極めて感度が高いことが発見されている。しかし、蛍光色素のようなマーカーの新生タンパク質への選択的添加は、ほとんどのマーカー試薬は、タンパク質合成系における新生タンパク質以外の他分子を非選択的に標識するために、従来の手段の使用では不可能である。ある場合は、新生タンパク質とのみ結合する特異的基質またはリガンドを利用することにより可能となり得る。しかし、この方法は、新生タンパク質の結合特性について詳細な知識と、マーカー特性を備えるリガンドの特別なデザインを必要とする。新生タンパク質はまた、タンパク質合成系から分離され、次に検出マーカーで選択的に標識され得る。しかし、これはまた、新生タンパク質分離のための手順の開発を必要とし、時間を要し、タンパク質の特性またはアフィニティーエピトープを取り込むためのタンパク質工学に関する高度な知識を必要とする。新生タンパク質が分離された後でさえ、各標識タンパク質の電荷質量比が同一であるように、タンパク質をマーカーで均一に標識することはしばしば困難である。標識の最も都合のよい形態は、蛍光性の強いマーカーが、タンパク質中の一つの特定位置のみに取り込まれ、従って、異なる電気泳動易動度を持つタンパク質のセットを回避される。 40

【 0 1 6 3 】

本発明による方法は、ターゲットタンパク質が翻訳系で発現された新生タンパク質である場合に、米国特許第5 , 7 8 3 , 3 9 7 号(本明細書に参考文献として編入)によって説 50

明されるような、毛管電気泳動を使用する、新しい治療効果のある化合物についての試料の迅速スクリーニングに関連する主要な問題も克服する。これは、普通では長い分離ステップと均一標識のための特別の手法を必要とするCEによる高感度分析のために、翻訳系にある発現ターゲットタンパク質をマーカーで均一に標識する必要性を含む。

【0164】

この方法はまた、本明細書に参考文献として特に編入している、米国特許第565,451号に説明されているような新cDNAクローンの分離用の発現クローン法と併用しても使用することができる。本特許は、a) 約100の個別細菌コロニーのプールを収集し；b) プール中にあるcDNAによってコードされるタンパク質をインビトロで発現することにより、cDNAクローンを同定するための新方法を説明する。この方法によって同定し得るタンパク質は、以下に限定はされないが、核酸結合タンパク質、細胞骨格タンパク質、生長因子、分化因子、翻訳後修飾タンパク質、リン酸化タンパク質、タンパク分解による切断タンパク質、グリコシル化タンパク質、タンパク質複合体のサブユニットまたは複数成分、酵素、既知タンパク質のイソ型、既知タンパク質の突然変異型を含む。重要なことには、本方法は、タンパク質翻訳系から所望するタンパク質を同定する重要なステップを含む。タンパク質同定について説明された2つのそのような方法は、放射性標識及び化学標識を含む。しかし、これらのステップには極めて時間を要し、所望タンパク質についての抽出物を迅速にスクリーンするためには向いていない。

10

【0165】

本発明は前記に説明した問題の全てを回避する。本発明による一つの実施態様では、検出マーカーでミスアミノアシル化されたtRNAをタンパク質合成系に添加する。検出マーカーを新生タンパク質中に取り込むために系をインキュベートする。1またはそれ以上の分子(因子)を次に、新生タンパク質に併合して(分離の前でも後でもよい)、因子を新生タンパク質と相互作用させる。この混合物のアリコートを次に電気泳動にかける。因子と相互作用した新生タンパク質は、取り込まれたマーカーを有する新生タンパク質の電気泳動の易動度の変化を検出することにより同定される。因子が新生タンパク質と相互作用した場合、タンパク質は分離されて、その後それ以上の分析を行うことができる。因子が新生タンパク質に結合された場合は、新生タンパク質を分離することにより結合因子が同定され得る。

20

【0166】

本方法の一例では、前記に説明するように、蛍光マーカーBODIPY-FLを、E. coli 開始tRNA^{fmet}をミスアミノアシル化するために使用する。このミスアミノアシル・tRNAを次に、タンパク質合成系に添加し、さらに系を、N末端部にBODIPY-FLを含む新生タンパク質を生産するためにインキュベートする。新生タンパク質に結合し得る特定の化合物を、次に特定の濃度で、タンパク質合成系に添加する。混合物のアリコートを次に毛管電気泳動用の装置中に注入する。混合物中の新生タンパク質は、488 nmに同調されたアルゴンレーザーからの励起光線を使用して、BODIPY-FLからの蛍光の検出によって同定される。特定の化合物の相互作用は、特定の化合物に曝露された新生タンパク質についての電気泳動易動度を、曝露されていない新生タンパク質の同様な測定と比較することにより測定される。化合物の結合強度は、次にタンパク質合成系に添加される特定化合物の濃度を変更し、非複合体化及び複合体化新生タンパク質に当たるバンドの相対強度における変化を測定することにより確認することができる。

30

40

【0167】

この方法は、タンパク質翻訳系において翻訳された一つの新生タンパク質と一つの因子の相互作用の研究に限定されるわけではない。例えば、化合物ライブラリーをスクリーンして、特定のターゲットタンパク質のリガンドとして作動する化合物を同定し得る。新生タンパク質に1またはそれ以上の因子を結合することを含む相互作用の他に、以下に限定はしないが、リン酸化、タンパク質分解、グリコシル化、他のバイオ分子との複合体の形成を含む、新生タンパク質の修飾を起因する相互作用が、新生タンパク質に取り込まれたマ

50

ーカーを電気泳動法と組み合わせて使用することにより、検出され得る。例えば、抗体の新生タンパク質との相互作用は、形成された複合体の実際の電気泳動易動度の変化によって検出され得る。同様なアプローチを、新生タンパク質と結合する複合体混合物中にある1またはそれ以上の化合物の存在を同定するために使用し得る。そのような混合物は、組み合わせ化学によって生産される化合物または治療効果のある化合物を含み得る天然試料のような複雑な生物学的混合物中に存在し得る化合物のライブラリーを構成する。

【0168】

F. マイクロスケール法

本発明は、毛管電気泳動（上記参照）を考案するが、他の方法もまた考案される。特に、マイクロスケール法は、新マーカ（例：BODIPY）及び本発明による方法と併用して使用することができる。装置上のチャンネルの寸法（及び対応する液体容量）が極めて小さいこと（典型的にはピコメーター領域）において、本方法は「マイクロスケール」である。例えば、チャンネルは、典型的には奥行きが約0.10 ~ 0.50 μm 、幅が約5 ~ 500 μm である。

【0169】

統合液体系を構造するためには多数のフォーマット、材料及びサイズのスケールがあるが、本発明は、大スケールスクリーニングの多くの効率の悪さに対するソリューションとしてのマイクロ加工装置を考案する。装置は多数の材料からマイクロ加工され得る。シリコンは、計算用マイクロプロセッサの構造に使用される材料であり、その加工テクノロジーは過去30年の間に先例を見ないような速度で発達してきた。セミコンダクター統合サーキット加工のための主要な近代的方法は、所謂プレーナープロセスである。プレーナープロセスは、シリコン特有の特徴に基づき、沈殿、酸化、光リソグラフィ、分散及び/またはイオン注入、及び金属被覆を含む製造ステップから成る複雑なシーケンスを含み、シリコン基質中に「積層」統合サーキット装置を加工する。例えば、本明細書に参考文献として編入する、W. Miller、米国特許第5,091,328号を参照のこと。この技術は、当初はマイクロエレクトロニクス（超小型電子技術）装置作製に適用されたが、同じ技術が、現在ではマイクロメカニカルシステムのために使用されている。

【0170】

連続性流動液体輸送は、シリコンで開発されたマイクロ液体装置を使用して説明されている。J. Pfahler et al., *Sensors and Actuators A2* 1-A23 (1990), pp 431~434)を参照のこと。シリコンのマイクロ機械加工に基づいて、流動を生起するために外力を使用するポンプがまた、説明されている。H.T.G. Van Lintel et al., *Sensors and Actuators* 15:153~167 (1988)を参照のこと。マイクロ加工チャンネルにおけるタンパク質のSDS毛管電気泳動もまた説明されている。Yao S et al., "SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels (マイクロ加工チャンネルにおけるタンパク質のSDS毛管電気泳動)" *PNAS* 96:5372 (1999)を参照のこと。さらに伝統的である二次元変性ゲル電気泳動（一般的に時間を要し、相当量の試料を必要とする）と比較して、このマイクロチャンネルベースによる分離技術は、迅速で、高分解能を提供することが示された。

【0171】

メカニカル建造材料として、シリコンはよく知られている加工特徴を有している。シリコン製装置の経済的の魅力は、その関連するマイクロ機械技術が特に写真再生技術であることである。これらのプロセスでは、不透明デザインを含む透明なテンプレートまたはマスクが、シリコン基質表面上で物体を光限定するために使用される。テンプレート上のパターンは、コンピューターデザインプログラムによって発生され、1ミクロン以下の線幅で構造を描写し得る。いったんテンプレートを発生したら、テンプレートをほぼ無期限に使用して、同一のレプリカ構造を生産し得る。従って、構成要素の全てがシリコンマイクロ機械加工に適合性があれば、極めて複雑なマイクロ機械でさえ大量生産かつ低価格で再生が

可能である。本発明は、マイクロ加工分析装置を構造するための光リソグラフィ法における使用に、ガラスまたはクォーツのような他の基質を考案するが、同一構造内に広く様々な電子構成要素を加工できるさらなる利点があるために、シリコンが好ましい。

【0172】

一つの実施態様では、本発明は、統合分析システムにおけるシリコンマイクロ機械構成要素を考案する。試料（例：試験化合物）及び1またはそれ以上の試薬（例：BODIPY標識新生タンパク質）は、エントリポートを通して装置中に連続的またはパルスで注入され、チャンネルを通して、混合と反応が行われる温度制御リアクターのような反応チャンバーに輸送される。生化学的生成物は、次に新しいチャンネルを下って（または、必要に応じて、電気泳動モジュールによって）、ここで検出器によって移動データが収集され、記録装置に伝達される。必要に応じて、分子篩による分解能を供給するためにチャンネル内にポリマーを使用し得る。生化学的生成物は、フローを転換することにより、その後に行われる分析のために、分離することができる。重要なことには、液体及び電子成分は、その機能及び構造において、生物学的反応及び試薬と完全に適合性があるようにデザインされている。本実施態様では、試験候補化合物は、標識新生タンパク質または翻訳反応系で同時発現されている複数の新生タンパク質との相互作用について迅速にスクリーンされ得る。このようにして、このシステムは、有用な薬物を同定するために相互作用についてスクリーンのために使用され得る。

10

【0173】

他の実施態様では、タンパク質合成系の1またはそれ以上の成分がエントリポートを通して装置内に導入され、チャンネルを通して温度制御リアクターのような反応チャンバーに輸送され、そこでBODIPYのようなマーカーを含む新生タンパク質の発現が起こる。標識新生タンパク質は次に、エントリポートから装置内に導入される1またはそれ以上の試薬（例：試験化合物）と混合され得る。反応が起こった後で、生化学的産物は、次に新しいチャンネルを下って（または、必要に応じて、電気泳動モジュールによって）、ここで検出器によって移動データが収集され、記録装置に伝達される。装置内に導入され得るタンパク質合成系の成分は、ミスアミノアシル・tRNA、DNA、mRNA、アミノ酸及びヌクレオチドを含み得る。成分は連続的あるいは間欠性パルスで導入され得る。DNAがまた、既に説明されたポリメラーゼ鎖反応のような酵素反応により、マイクロ機械装置内で生産され得る。Kopp et al., "Chemical Amplification Continuous Flow PCR on a Chip (チップ上での連続フローPCRの化学的増幅法)" Science 280: 1046 (1998)を参照のこと。

20

30

【0174】

シリコンマイクロ機械加工では、閉鎖チャンネルを形成する単純な技術は、基質表面上での開口トラフの食刻（エッチング）、さらに次に開口チャンネル上に第二の食刻を加えていない基質を接着することを含む。広く様々な等方性及び異方性食刻試薬、液体またはガス状、があり、適切に限定された側壁と均一な食刻奥行きを有するチャンネルを製造し得る。チャンネルパスは光加工マスクによって規定されるために、装置上のチャンネルパターンの複雑さは実質的に制限がない。制御食刻はまた、基質を完全に貫通する試料エントリホールを製造することが可能で、装置外側表面上にあるエントリポートをチャンネル構造に接続する結果となる。

40

【0175】

G. 複数ミスアミノアシル・tRNA

タンパク質の種類中に1以上のマーカーを取り込むことが好都合なことがしばしばある。これは、ダンシルリジンのようなマーカー及びピオチン-リジンのような共役因子の両方でミスアミノアシル化されたリジンtRNAのような単一tRNA種を使用することによって達成され得る。他方、異なるマーカーでそれぞれミスアミノアシル化された異なるtRNAもまた使用することができる。例えば、クマリン誘導体がトリプトファンtRNAのミスアミノアシル化、さらにダンシルリジンがリジンtRNAのミスアミノアシル化

50

に使用することができる。

【0176】

複数ミスアミノアシル・tRNAの一つの用途は、レプレッサー（抑制因子）またはアクチベーター（活性化因子）、あるいはプロモーターまたはオペレーターのような異なる遺伝的要素の制御下でタンパク質発現を研究することである。例えば、内部あるいは外部因子に対する応答としての2つの異なる時期でのタンパク質合成は、異なる時期に、細胞または無細胞タンパク質合成系中にミスアミノアシル・tRNAを導入することにより識別することができる。tRNA^{tyr}はマーカ－Aで電荷され、tRNA^{lys}はマーカ－Bで電荷され、それぞれA-tRNA^{tyr}とB-tRNA^{lys}を生ずる。この場合、一つのプロモーターの制御下にあるタンパク質1は、反応系にA-tRNA^{tyr}を加えることにより標識され得る。第二番目のミスアミノアシル・tRNAであるB-tRNA^{lys}を次に加え、タンパク質2の第二のプロモーターが活性化されると、生産される新生タンパク質は標識AとBのどちらも含むであろう。追加タンパク質の発現をさらに研究するためには、追加tRNA分子を使用して、追加マーカ－をさらに加えることができる。複数標識された新生タンパク質の検出及び分析は、複色電気泳動パターン読み取りシステムを使用して行うことが可能であり、これは米国特許第5,069,769号及び第5,137,609号に説明されており、そのどちらも本明細書に参考文献として特に編入されている。

10

【0177】

複数ミスアミノアシル・tRNAの二番目の用途は、新生タンパク質の分離と検出の組み合わせである。例えば、ビオチン-リジンマーカ－を一つのtRNAのミスアミノアシル化、さらにクマリンマーカ－を他のtRNAのミスアミノアシル化に使用することができる。取り込まれたリジン-ビオチンに結合するストレプトアビジンでコートされた磁性粒子は、反応混合物から新生タンパク質を分離するために使用され、クマリンマーカ－は検出と定量に使用され得る。

20

【0178】

上記の方法の基礎の概略図を図14に示す。第一ステップでは、レポーター（R）またはアフィニティー（A）特性を有し得る選択マーカ－（M）が、単一tRNA種または異なるtRNAから成る混合物について化学的または酵素的にミスアミノアシル化される。タンパク質合成前に、蛍光マーカ－で電荷されたミスアミノアシル・tRNAの既定量を、ミスアミノアシル・tRNAが対応するtRNAと効果的に競合するに十分な濃度で、無細胞タンパク質合成反応系に混合する。約1～3時間のインキュベーション後、反応混合物は、従来のポリアクリルアミドまたはアガロースゲル電気泳動を使用して分析される。電気泳動後、ゲルはUV照射を受ける。新生タンパク質によるバンドは、明確な蛍光を呈示し、既存タンパク質の非蛍光バンドから、可視または写真により、容易かつ迅速に識別され得る。新生タンパク質は、蛍光バンドを切除することにより分離され、抽出ゲル片からタンパク質を電解溶出され得る。新生タンパク質の量及び分子量は、その蛍光を既知分子量及び既知量のタンパク質のセットによって発生される蛍光と比較することにより決定され得る。アッセイ結果を記録し、標準電子イメージング及び写真または分光的方法を使用して、将来の分析のために保存し得る。

30

40

【0179】

H. 最終組成物

本発明による他の実施態様は、マーカ－の存在において翻訳後に従来の方法によって分離または精製された新生タンパク質を含む組成物を指示する。組成物は、組織培養産物のコーティング及び製薬産業における試薬調製目的の製造に利用し得る。

【0180】

製造において利用される新生タンパク質中へのマーカ－の取り込みは、マーカ－検出による最終製造産物または工程の分析を容易にする。例えば、生産された新生タンパク質は、組織培養産物のコーティングとして使用することができる。ある特定のコーティングプロセスの再現性は、コートされた産物表面上のマーカ－発光の変異を検出することにより、

50

正確に測定され得る。さらに、ホルモン、ステロイド、免疫製品またはサイトカインのような薬物調製物の範囲に含まれるタンパク質中に取り込まれた非毒性マーカーは、そのタンパク質調製物の安全かつ経済的な分離を容易にするために利用され得る。そのような製品はマーカーを取り除く必要なく、直接に使用することができる。極めて低濃度のマーカーが好ましい場合、限定量のマークを付けたタンパク質を、精製手順を通してタンパク質の追跡に使用し得る。そのようなタンパク質は、効率よく精製され、最終組成物の純度を正確に測定し得る。さらには、マーカーの存在は、試験中の薬物組成物の研究及び分析を容易にし得る。例えば、マーカーは、患者において血清半減期、最適血清レベル、さらに組成物の分解産物の存否を測定するために利用することができる。

【0181】

他方、新生タンパク質は、毒性物質のような治療的に有効な化合物として作用する特定のマーカーを含み得る。これらのタンパク質は患者に投与され、タンパク質が同定されそれぞれのターゲットに結合されたと思われた後、治療用部分が遊離される。遊離は、電気的刺激、光化学的切断、または新生タンパク質によりターゲットされる領域にその部分が特に沈殿されるような他の手段であり得る。さらに、新生タンパク質から遊離後にのみ毒性となる修飾毒素のような部分を利用することができる。新生タンパク質はまた、取り込まれたマーカーに活性治療効果のある機能を授けたり、マーカーがその治療またはイメージング作用前に体内で分解することを防止する薬物担体としても作用し得る。

【0182】

新生タンパク質中の切断可能なマーカーの取り込みはさらに、マーカーの非天然部分を取り除いて、完全に天然な形状であるタンパク質の分離を容易にする手段を供給する。例えば、新生タンパク質中に導入された光開裂型ピオチンのような切断可能なアフィニティマーカーは、タンパク質の経済的な分離を容易とし、薬物組成物としてのそれ以後の用途のためにマーカーの除去を可能とする。

【0183】

マーカーの存在下において翻訳により調製されたタンパク質から成る薬物組成物はさらに、例えば、水分、油、脂質、ポリサッカリド、グリセロール、コラーゲン、またはこれら担体の組み合わせのような薬学的に受容可能な担体を含んでもよい。有用な免疫組成物は、ワクチンのような免疫活性組成物、ヒトにおいて疾患は障害治療のために使用され得る治療または予防薬のような薬学的活性組成物を含む。

【0184】

I. キット

本発明による他の実施態様は、好ましくは、mRNAまたは遺伝子によってコードされた新生タンパク質中にマーカーを取り込む特定のミスアミノアシル・tRNAを含む無細胞翻訳を含み、共役された転写・翻訳系を必要とし、さらに疾病生物学的試料中でのみ検出可能である、診断用キットまたはエイドを指示する。そのようなキットは、ある種の疾患または障害の存在についてヒトまたは他の動物をスクリーンするための迅速な手段として有用であり得る。検出し得る疾患は、感染症、組織異常増殖及び遺伝的障害を含む。最も容易に試験できる生物学的試料は、血液、血清、組織、尿または便、出生前試料、胎児細胞、鼻細胞または髄液から成る試料を含む。一つの実例では、ミスアミノアシル f m e t - t R N A を、原核細胞を含む生物学的試料中の細菌の存在を検出する手段として使用し得る。キットは、タンパク質を合成するために必要な翻訳試薬に加えて検出可能な非放射性マーカーで電荷された t R N A 分子を含む。細菌特異性遺伝子を含む生物学的試料の添加は、翻訳に必要とされる核酸を供給する。これらの試料からの細菌は、コリシン E 1 のような細菌毒素またはいくつかのその他の細菌特異性透過化因子を使用して、選択的に分解される。細菌 DNA 由来の特定の遺伝子はまた、本明細書に参考文献として特に編入している、米国特許第 4,683,195 号によって説明されているように、特定のオリゴヌクレオチドプライマーをポリメラーゼ鎖反応 (PCR) と併用することにより、増幅され得る。マーカーを含む新生タンパク質は、必然的に細菌から生産されるべきである。他のマーカーまたは他のタイプの検出キットを使用して、特定の細菌感染が同定し得る。

10

20

30

40

50

【0185】

本発明はまた、前記に説明するG F T Tを可能とするキットも考案する。例えば、本発明は、家族性腺腫性ポリープ症のような特定の疾病を検出するためのキットを考案する。家族性腺腫性ポリープ症の症例の約30～60%において、疾病組織はまた、A P C 遺伝子の鎖終止またはランケート型転写物を含んでいる(S. M. Powell et al., N. Engl. J. Med. 329: 1982～87, 1993)。鎖終止は、フレームシフトがU A G、U A A または U G Aのような終止コドンを、リーディングフレーム内に出現させて、翻訳を終結する場合に起こる。サプレッサー t R N A をコードするミスアミノアシル・t R N A を使用して、そのような転写物を安価なキットで迅速かつ直接に検出し得る。これらのキットは、翻訳系、例えば、光開裂型クマリン・ビオチンのような検出マーカを含む電荷サプレッサー t R N A 及び適切な緩衝液と試薬を含む。そのようなキットはまた、プライマーまたは「プレプライマー」を含み、前者はプロモーター、R B S、開始コドン、アフィニティータグのコード領域及び鑄型の相補領域を含み、後者はプロモーター、R B S、開始コドン、アフィニティータグのコード領域を含むが、鑄型の相補領域を欠如している。プレプライマーは、鑄型の相補領域の連結を可能とする(使用する特定の鑄型の特製化を可能とする)。疾病細胞、組織または分離D N A またはm R N A あるいはD N A のP C R 産物のような生物学的試料は系に添加して、系をインキュベートし、さらに産物を分析する。分析及び、必要に応じて分離は、H R P に結合されたストレプトアビジンを使用して、その蛍光により特異的に検出され得るクマリンまたはビオチンのようなマーカによって容易となる。そのようなキットは、迅速で、感度の高い、疾病の存否についての選択的非放射性診断用アッセイを供給する。

10

20

【0186】

【実施例】

以下の実例は、本発明による実施態様を例示するが、本発明の範囲を限定するものと考察されるべきではない。以下の実例のいくつかにおいて、以下のような特定の試薬及び方法が使用された：

試薬：

t R N A^{f m e t}、アミノアシル・t R N A シンテターゼ、アミノ酸、緩衝塩、及びリボヌクレアーゼ・フリー・ウオーター(リボヌクレアーゼを含まない水)は、Sigma (St. Louis, MO) から購入した。多数の蛍光色素は、Molecular Probes (Eugene, OR) から購入した。ルーチンキットを含む翻訳サブライは、Promega (Madison, WI) から購入した。Sephadex G-25は、Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ) から購入した。インビトロ翻訳キット及びCAT (PinPoint (登録商標)) 及びルシフェラーゼ (pBEST luc (登録商標)) をコードするプラズミドDNAは、Promega (Wisconsin-Madison, WI) から、DHFR プラズミドDNA (pQE16-DHFR) は、Qiagen (Valencia, CA) からそれぞれ購入した。 α -ヘモリジン用プラズミドDNA、pT7-WT-H6- α H L は、Prof. Hagan Bayley (Texas A & M University) よりの提供であり、 α -H L DNAの大規模調製は、Qiagen プラズミド分離キットを使用して行った。バクテリオオブシンプラズミドDNA (pKKbop) は、実験室ストックから使用した。

30

40

【0187】

フルオロタグ t R N A の調製：

精製 t R N A^{f m e t} をまずメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1500 pM ($\sim 1.0 \text{ OD}_{260}$) の t R N A を過剰アミノアシル t R N A シンテターゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、混合物に0.1容積(pH 5.0)の3 M酢酸ナトリウムを添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出(1:1)を行った。エタノール(2.5容積)を水相に添加し、得られた t R N A ペレットを水に溶解した(25 μ l)。メチオ

50

ニンの α -アミノ基への蛍光分子のNHS-誘導体の結合は、50 mM 炭酸ナトリウム (pH 8.5) 中で、アミノアシル・tRNA^{fmet} (25 μ l) に蛍光試薬 (最終濃度 = 2 mM) を加えて、0 で10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン (最終濃度 = 100 mM) の添加により停止された。修飾tRNAをエタノールで沈殿して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 $\times$ 5 cm) を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70) した。アミノアシルtRNAの修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動によって評価した。このtRNAは、正しく保管される場合は、少なくとも6ヶ月は安定であることが発見された。

【0188】

10

タンパク質の無細胞合成及びその検出：

インビトロ翻訳反応は、典型的には、最適化プレミックスを加えたE. coli T7転写-翻訳システム (Promega) を使用して行った。典型的な翻訳反応混合物 (10 μ l) は、抽出物 3 μ l、プレミックス 4 μ l、完全アミノ酸ミックス 1 μ l、30 pM 蛍光メチオニンtRNA及び適切なプラスミドDNA 0.5 μ gを含んだ。最適化プレミックス (1 $\times$) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM 酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37 で45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10 μ lを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 $\times$ ローディングバッファ (loading buffer) に溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmliに従って行われ、アルゴンレーザーを励起源として使用するMolecular Dynamics FluorImager 595を使ってゲルをスキャンした。他方、ポリアクリルアミドゲル中の新生タンパク質はまた、UVトランスイルミネーターを使用して検出され、緑色フィルター (Tiffen green #58、Polaroid DS34 camera フィルターキット) を装備したポラロイドカメラを使って、写真撮影を行った。

20

【0189】

30

BODIPY-FL標識タンパク質の可視化には、530 + / - 30狭バンド励起フィルターを装備した488 nmを励起源として使用した。ゲルは、PMT 電圧 1000 V、さらに100/200ミクロンピクセルサイズを使用してスキャンした。

酵素/タンパク質活性：

α -ヘモリジンの生物学的活性は以下のように行われた：要するに、インビトロ翻訳反応混合物の様々なアリコート (0.5~2 μ l) を500 μ lのTBSSA (1 mg/ml BSAを含むトリス緩衝生理食塩水、pH 7.5) に添加した。これに、ウサギ赤血球 (rRBCs) 10%溶液 25 μ lを加え、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、このアッセイミックスを1分間遠心分離して、上清の吸光度を415 nmで測定した (ヘモグロビンの遊離)。TBSSA 500 μ l中でインキュベートした等量のrRBCsを対照としてとり、水 500 μ l中でインキュベートしたrRBCsを100%溶解とした。DHFR活性を分光光度計で測定した。ルシフェラーゼ活性は、ルシフェラーゼアッセイシステム (Promega) を使用して測定し、さらにルミネッセンス (発光) は、Packard Lumi-96ルミノメーターを使用して測定した。

40

【0190】

α -HLの精製及び α -HLへのBODIPY-FL取り込みの測定：

α -HL (His₆) をコードするプラスミドの翻訳を100 μ lスケールで行い、Talon-Sepharose (Clontech) を製造元の指示に従って使用して、生産された α -HLを精製した。 α -HL中に取り込まれた蛍光を次に、幾つかの既知

50

濃度の（標準として使用された）遊離 BODIPY-FL と共に、Molecular Dynamics FluorImager で測定した。同一試料中にあるタンパク質の量は、Pierce タンパク質アッセイキット（Pierce, Rockford, IL）を使用して、標準 Bradford アッセイにより測定した。

【0191】

〔FLAG 捕捉アッセイ（Capture Assay）〕

（FLAG 抗体のビオチン化）

FLAG M2 モノクローナル抗体（SIGMA Chemical, St. Louis, MO）ストック液 4.4 mg/mL を等量の 100 mM 重炭酸ナトリウム（～15 mM 最終抗体濃度）で希釈する。その後、NHS-LC-ビオチン（Pierce Chemical, Rockford, IL）を、最終濃度が 150 mM となるように、2 mM ストック液（DMF 中）を加える。反応は氷上で 2 時間インキュベートする。この混合物を次に、マイクロ遠心分離（14,000 R.P.M）で 2.5 分間遠心分離することにより清澄させる。未反応標識試薬は、ゲル濾過クロマトグラフィーによって除去する。

（FLAG 抗体コート ELISA プレートの調製）

NeutrAvidin（登録商標）ビオチン結合タンパク質（Pierce Chemical, Rockford, IL）を、最終濃度が 100 mM 重炭酸ナトリウム中で 50 mg/mL になるように希釈して、Microlite（2+ 白色不透明 96-ウェル ELISA プレート（Dynex Technologies, Chantilly, VA）をコートするために使用する。プレートを TBS-T で洗浄し、TBS-T 中の 5 mg/mL ビオチン化 FLAG M2 抗体溶液を使用してコートする。プレートを TBS-T で洗浄し、翻訳希釈緩衝液（TDB）〔TBS（pH 7.5）中、4.5% Teleostean Gelatin、2% 脱脂粉乳、10 mM EDTA、0.1% Tween-20、1.25 mg/mL 免疫前マウス IgG、2.5 mM d-ビオチン〕でブロックする。

【0192】

（ターゲットタンパク質の結合と検出）

ウサギ網状赤血球抽出物を使用して、インビトロ翻訳によって生産されたトリプル・エピトープタグ付きターゲットタンパク質を、TDB で 1/25 ～ 1/75 に希釈して、抗体でコートされた ELISA プレートに添加する。ターゲットタンパク質の捕捉後、プレートを TBS-T で洗浄する。c-myc の検出を、ポリクローナル抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）、次にペルオキシダーゼ標識二次抗体を使用して実施する。His₆ タグの検出はペルオキシダーゼ標識ニッケルキレートベース・プローブ（India（His Probe-HRP）, Pierce, Rockford, IL）で達成される。抗体は TDB で希釈され、India（His Probe-HRP）は免疫前マウス IgG 5 mg/mL を補充した TBS-T で希釈される。全ての場合、シグナルが発生には化学ルミネッセント基質系を使用する。

【0193】

〔His タグ 金属アフィニティー捕捉 ELISA アッセイ〕

（ターゲットタンパク質の結合と検出）

ウサギ網状赤血球抽出物を使用して、インビトロ翻訳によって生産されたトリプル・エピトープタグ付きターゲットタンパク質を、1% BSA/TBS-T で 1/25 ～ 1/75 に希釈して、ニッケルキレートでコートした ELISA プレート（Pierce Chemical, Rockford, IL）に添加する。ターゲットタンパク質の捕捉後、プレートを TBS-T で洗浄し、1% BSA/TBS-T でブロックする。結合ターゲットタンパク質上のエピトープタグの検出は、モノクローナル FLAG M2 抗体（SIGMA Chemical, St. Louis, MO）またはポリクローナル c-myc 抗体（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, 40

C A) を、適切なペルオキシダーゼ標識二次抗体と併用することにより達成される。ビオチン・リジン・tRNA^{1 y s} を介してターゲットタンパク質中に取り込まれたビオチンの検出は、ペルオキシダーゼに抱合されているNeutrAvidin (商標) ビオチン結合タンパク質 (Pierce Chemical, Rockford, IL) を使用して達成される。NeutrAvidin (登録商標) 抱合体及び全ての抗体は、1% BSA / TBS - T で希釈する。全ての場合、シグナルが発生には化学ルミネッセント基質系を使用する。

【0194】

[実施例 1] : マーカーの調製

クマリンアミノ酸の合成 : 4 - (ブロモメチル) - 7 - メトキシクマリン (図 1 5 、化合物 1 ; 6 . 1 8 m M) 及びジエチルアセトアミドマロン酸塩 (図 1 5 、化合物 2 ; 6 . 1 8 m M) を、無水エタノール中でナトリウムエトキシド溶液に添加して、混合物を 4 時間還流した。反応混合物の中和及びクロロホルム抽出後に得られた中間生成物 (図 1 5 、化合物 3) をさらに、メタノール溶液から結晶化によって精製した。この中間生成物をアセトン及び H C l (1 : 1) の混合物中に溶解して、1 時間還流した。反応混合物を乾燥するまで蒸発して、アセトンを使用してアミノ酸塩酸塩を沈降した。この塩酸塩は、5 0 % エタノールに溶解しさらにピリジンを添加して p H 4 ~ 5 にすることにより、遊離アミノ酸 (図 1 5 、化合物 4) に転化された。遊離アミノ酸のプロトン (¹ H) N M R スペクトルは以下であった : (m . p . 2 7 4 ~ 2 7 6 (C 、分解 .) - O C H ₃ (δ 3 . 8 5 s , 3 H) 、 - C H ₂ - (δ 3 . 5 d , 2 H) 、 α - C H - (δ 2 . 9 t , 1 H) 、 C H - C O (δ 6 . 2 5 s , 1 H) 、 環 H (δ 7 . 0 5 s , 1 H) 、 (δ 7 . 8 d , 2 H)) 。

【0195】

クマリン F m o c 誘導体の合成 : クマリンアミノ酸 (1 . 1 4 m M) を、フルオレニルメチルオキシカルボニル N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル (F m o c - N H S エステル) 1 . 0 8 m M) と、1 . 1 4 m M トリエチルアミンの存在下、室温で 3 0 分反応させた。反応混合物を酸性化し、さらに沈降物を 1 N H C l で洗浄してから乾燥した。遊離アミノ酸の N M R スペクトルは以下であった : (M P 2 2 3 ~ 2 2 5) - O C H ₃ (δ 3 . 8 5 s , 3 H) 、 - C H ₂ B r (δ 3 . 5 広域 一重項、2 H) 、 α - C H - (δ 3 . 0 t , 1 H) 、 C H - C O (δ 6 . 2 2 m , 1 H) 、 環 H (δ 7 . 0 5 s , 1 H) 、 (δ 7 . 8 d , 2 H) 、 フルオレン H C H ₂ - C H (δ 4 . 2 m , 2 H) 、 C H ₂ - C H (δ 4 . 2 5 m , 1 H) 、特徴的多重項を示す芳香族領域。

【0196】

P C B の合成 : 光開裂型ビオチンは以下に説明するように合成された。2 - ブロモ , 2 ' - ニトロアセトフェノン (図 1 5 、化合物 5) は、まずそのヘキサメチルテトラアンモニウム塩に転化され、これは次に分解されて 2 - アミノ , 2 ' - ニトロアセトフェノン (図 1 5 、化合物 6) を得た。ビオチン N - ヒドロキシスクシンイミジルエステル (図 1 5 、化合物 7 ; S i g m a C h e m i c a l ; S t . L o u i s , M O) を、6 - アミノカブロン酸 (図 1 5 、化合物 8) と反応させて、その対応酸 (図 1 5 、化合物 9) を得た。この酸を、D C C を使用して、2 - アミノ , 2 ' - ニトロアセトフェノンと結合して、ケトンを得た (図 1 5 、化合物 1 0) 。ケトンは、水素化ホウ素ナトリウムを使用して還元され、アルコールが得られ (図 1 5 、化合物 1 1) 、これはさらに塩化ギ酸誘導体 (図 1 5 、化合物 1 2) に転化された。誘導体 (化合物 1 2) のプロトン N M R スペクトルは以下であった : (δ 1 . 3 m , 3 H) 、 (δ 1 . 4 m , 2 H) 、 (δ 1 . 5 m , 5 H) 、 (δ 1 . 6 2 m , 1 H) 、 (δ 2 . 1 t , 2 H) (δ 2 . 4 t , 2 H) 、 (δ 2 . 6 d , 1 H) 、 (δ 2 . 8 m , 1 H) 、 (δ 3 . 0 t , 1 H) 、 (δ 3 . 1 m 1 H) 、 (δ 4 . 1 5 q t , 1 H) (δ 4 . 4 2 q t , 1 H) 、 (δ 5 . 8 t , 1 H) 、 (δ 6 . 2 5 s , 1 H) 、 (δ 6 . 4 5 s , 1 H) 、 (δ 7 . 5 t , 1 H) 、 (δ 7 . 7 5 m , 4 H) 、 (δ 7 .

9 d, 1 H)。

【0197】

[実施例2]： tRNAのミスアミノアシル化

ミスアミノアシル・tRNAを生起するために使用される一般的ストラテジーを図16に示し、これはtRNA分子のランケーション、ジヌクレオチド合成(図17)、ジヌクレオチドのアミノアシル化(図18)及びリガーゼ媒介結合を含む。

a)ランケート型tRNA分子は、Neu及びHeppel(J. Biol. Chem. 239:2927~34, 1964)によって基本的に説明されるように、リジン及びアルカリホスファターゼの存在下で、過ヨウ素酸分解によって生成された。要するに、4 mM 非電荷E. coli tRNA^{lys}分子(Sigma Chemical; St. Louis, MO)は、50 mMメタ過ヨウ素酸ナトリウムと0.5 MリジンをpH 9.0、60 で30分、総容量50 µlで、2回連続処理することによりランケートされた。反応条件は常に50 以上で、10倍の過剰メタ過ヨウ素酸塩を使用した。過剰過ヨウ素酸塩は1 Mグリセロール5 µlで処理することにより破壊された。溶液pHは、最終濃度が0.1 Mになるように、トリス・塩酸15 µlを加えて、8.5に調整した。反応容量は、水 100 µlを加えて150 µlまで増加した。アルカリホスファターゼ(15 µl、30ユニット)を加えて、次に反応混合物を60 で2時間再インキュベートした。インキュベーションに続いて、総tRNAのエタノール沈降、エタノール洗浄、ペレットの乾燥及びペレットの水20 µlへの溶解が行われた。この工程を2回繰り返して、ランケート型tRNAが得られた。

10

20

【0198】

b)ジヌクレオチド合成は、基本的にはHudson(J. Org. Chem. 53:617~24, 1988)によって実施されたように行い、デオキシシチジン保護、アデノシン保護及びジヌクレオチド合成の3ステップ工程として説明することができる。デオキシシチジン保護：全ての反応は、特記されない限りは室温で行われた。第一に、デオキシシチジンの5'及び3'ヒドロキシル基を、4.1当量の塩化トリメチルシリルで、一定の撹拌を加えながら2時間反応させることにより保護した。環外アミノ官能基を1.1当量のFmoc-Clと3時間反応させることにより保護した。5'及び3'ヒドロキシル基の脱保護は、0.05当量のKFを加えて30分インキュベートすることにより達成された。最終産物(図17、化合物19)は収率87%で生産された。リン酸基は、この化合物を、1当量のビス-(2-クロロフェニル)ホスホロクロリデイトを加えてインキュベートし、その混合物を0 で2時間インキュベートすることによって添加された。この場合の収率は、25~30%であった。

30

【0199】

アデノシン保護：塩化トリメチルシリル(4.1当量)をアデノシン残基に添加して、2時間インキュベートし、その後、1.1当量のFmoc-Clを導入して、インキュベーションを3時間持続した。TMS基は、上記に説明するように0.5当量のフッ素イオンで脱保護された。Fmoc保護アデノシン(化合物22)は収率56%で得られた。さらに2'-ヒドロキシル基を保護するために、化合物22は1.1当量のテトライソプロピルジシロキシル塩化物(TIPDSCl₂)で3時間反応され、68~70%の収率で化合物23を生産した。化合物は、ジオキサン中で20当量のジヒドロピラン及び0.33当量のp-トルエンスルホン酸を加えて4~5時間インキュベートすることにより、化合物24に転化された。この化合物は、テトラヒドロフラン、ピリジン、及び水の混合物中で8当量のフッ化アンモニウムテトラブチルを加えることにより、分離することなく、化合物25(図17)に直接に転化された。

40

ジヌクレオチド合成：保護デオキシシチジン、化合物20、と保護アデノシン、化合物25(図17)を、テトラヒドロフラン中で、1.1当量の2-クロロフェニルビス-(1-ヒドロキシ-ベンゾトトリアゾリル)リン酸塩を加えて、30分間一定の撹拌を加えることにより結合させた。次に、N-メチルイミダゾールの存在下で、30分間1.3当量の保護アデノシン、化合物25を加えた。結合収率は、約70%であり、結合産物、化合

50

物 26、のプロトン NMR スペクトルは以下であった：(δ 8.76 m, 2H)、(δ 8.0 m, 3H)、(δ 7.8 m, 3H) (δ 7.6 m, 4H)、(δ 7.5 m, 3H)、(δ 7.4 m, 18H)、(δ 7.0 m, 2H)、(δ 4.85 m, 14H)、(δ 4.25 m, 1H)；(δ 3.6 m, 2H)、(δ 3.2 m, 2H) (δ 2.9 m, 3H)、(δ 2.6 m, 1H)、(δ 2.0 - 1.2 m, 7H)。

【0200】

c) ジヌクレオチドのアミノアシル化は、保護マーカールアミノ酸、Fmoc-クマリンをエステル結合でジヌクレオチドに結合することにより達成された。第一に、保護アミノ酸を、テトラヒドロフラン中で、6当量のベンゾトリアゾール-1-yl-オキシトリス- (ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン酸塩及び60当量の1-ヒドロキシベンゾトリアゾールで活性化した。混合物に持続的攪拌を加えながら20分インキュベートした。次に、3当量のN-メチルイミダゾール中で1当量のジヌクレオチドを添加し、反応を室温で2時間持続した。脱保護は、テトラメチルグアニジン及び、4-ニトロベンザルドキシムを添加することにより行われ、さらに3時間攪拌を続けた。反応は、酢酸を添加し、さらに0 で30分持続的に攪拌を加えインキュベートをすることにより完了され、アミノアシル化ジヌクレオチドを生産した(図18)。

10

【0201】

d) アミノアシル化ジヌクレオチドへの tRNA の連結は、基本的には T. G. Heckler et al. (Tetrahedron 40 87~94, 1984) によって説明されるように実施した。要するに、トランケート型 tRNA 分子 (8.6 OD₂₆₀ ユニット/ml) 及びアミノアシル化ジヌクレオチド (4.6 OD₂₆₀ ユニット/ml) を、T4 RNA リガーゼ 340 ユニット/ml を加えて、4 で16時間インキュベートした。反応緩衝液は、55 mM Na-Hepes (pH 7.5)、15 mM MgCl₂、250 μ M ATP、20 μ g/ml BSA 及び10% DMSO を含んだ。インキュベーション後、反応混合物を最終濃度が50 mM NaOAc、pH 4.5 (10 mM MgCl₂ を含む) となるまで希釈した。最終混合物を、50 mM NaOAc (pH 4.5)、10 mM MgCl₂ で平衡化した、DEAE セルロースカラム (1 ml) に4 で加えた。カラムを0.25 mM NaCl で洗浄して、RNA リガーゼ及び他の非 tRNA 成分を除去した。tRNA 含有分画をブルして、50 mM NaOAc (pH 4.5)、10 mM MgCl₂、及び1.0 M NaCl で平衡化した BD セルロースカラムに4 で装填した。未反応 tRNA は、10 ml の同じ緩衝液で洗浄することにより除去された。精製ミスアミノアシル・tRNA は、25% エタノールを含む緩衝液でカラムを溶出することにより得られた。

20

30

【0202】

[実施例 3]：抽出物及び鋳型の調製

抽出物の調製：コムギ胚芽抽出物は、シクロヘキサンと四塩化炭素の混合物 (1:6) を使用して、胚濃厚化のためにコムギ胚芽の浮上により調製し、その後一晩乾燥した (約14時間)。浮上コムギ胚芽 (5 g) は、微細な粉末を得るために5 g の粉末ガラスを加えて、モルタル中で粉碎した。滑らかなペーストが得られるまで、抽出用媒質 (緩衝液 I 10 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 7.6)、1 nM 酢酸マグネシウム、90 mM 酢酸カリウム、及び1 mM DTT) を少量ずつ加えた。破壊された胚を含むホモジネート及び抽出用媒質 25 ml を23,000 x g で2回遠心分離した。抽出物を Sephadex G-25 微細カラムにかけて、緩衝液 II (10 mM トリス酢酸緩衝液 (pH 7.6)、3 mM 酢酸マグネシウム、50 mM 酢酸カリウム、及び1 mM DTT) で溶出した。明るい黄色バンドがゲル粒子以外の容量で移動し、1 ml の分画として回収 (S-23) され、液体窒素中で凍結された。

40

【0203】

鋳型の調製：鋳型 DNA は、プラズミド pSP72-bop を EcoRI で線形化することにより調製した。制限線形鋳型 DNA は、フェノール抽出及び DNA 沈降により精製し

50

た。大規模mRNA合成は、SP6-ribomax system (Promega; Madison, WI) を使用して、インビトロ転写によって行った。精製mRNAは、使用の直前に67℃で10分変性した。

【0204】

[実施例 4] : 無細胞翻訳反応

取り込み混合物 (100 μ l) は、S-23 抽出物を50 μ l、5 mM 酢酸マグネシウム、5 mM トリス酢酸 (pH 7.6)、20 mM Hepes-KOH 緩衝液 (pH 7.5); 100 mM 酢酸カリウム、0.5 mM DTT、0.375 mM GTP、2.5 mM ATP、10 mM クレアチンリン酸、クレアチンキナーゼを60 μ g/ml 及びバクテリオオブシンをコードする遺伝配列を含むmRNAを100 μ g/ml 含んだ。ミスアミノアシル・PCB-リジンまたはクマリンアミノ酸・tRNA^{lys} 分子を、170 μ g/ml 加え、マグネシウムイオン及びATP濃度を最適化した。混合物を25℃で1時間インキュベートした。

10

【0205】

[実施例 5] : PCB-リジンを含む新生タンパク質の分離

ストレプトアビジンでコートされた磁性Dynabeads M-280 (Dynal; Oslo, Norway) は、1 mgビーズ当たり10 μ gのビオチン化タンパク質の結合能力を有する。濃度2 mg/mlでビーズを少なくとも3回洗浄して、安定化BSAを除去した。新生タンパク質中に取り込まれたPCB-リジンを含む翻訳混合物に、ストレプトアビジンでコートされたビーズを加えて混合し、室温で30分インキュベートした。磁性粒子集線装置 (MPC: magnetic particle concentrator) (Dynal; Oslo, Norway) を使用して、0.5~1.0分磁場をかけ、上清をピペットで取り除いた。反応混合物を3回洗浄して、磁性ビーズを50 μ lの水に懸濁した。

20

【0206】

Black-Ray 長波長 UV ランプ、Model B-100 (UV Products, Inc.; San Gabriel, CA) を使用して、クオーツキュベット中で光分解を行った。発光ピーク強度は、365 nmで、約1100 μ W/cm²であった。磁性捕捉を反復して、ビーズを取り除いた。得られた新生タンパク質を定量し、収率は推定70~95%であった。

30

[実施例 6] : 蛍光を使用する検出の低限

ホウ酸塩緩衝液 (pH 8.0) 中に0.25 mg/ml になるように懸濁したウシ血清アルブミン (BSA) を、50 mg/ml の25倍モル過剰フルオレサミン (Sigma Chemical; St. Louis, MO) と合わせて、修飾蛍光BSAを生産した。修飾タンパク質の様々な量 (1 ng、5 ng、10 ng、25 ng、50 ng、75 ng、100 ng、150 ng、200 ng) をローディングバッファ (プロモフェノールブルー、グリセロール、2-メルカプトエタノール、トリス・塩酸 (pH 6.8)、SDS) 中に懸濁して、3%濃縮剤を加えた12%ポリアクリルアミドゲルの1.5 mmの厚さの個別ウェル中に添加した。水冷ゲルを50 Vで4時間電気泳動した。電気泳動後、ゲルを電気泳動装置から除去して、UVトランスイルミネーター上に配置し、10秒の露光時間を使用してpolaroid Type 667フィルムを使って写真撮影をした。これらの条件で観察された最低限度は10 ngであった。これらの結果は、典型的な分子生物学実験室で見られる装置を使用して、蛍光標識タンパク質は、ng量単位で検出され得ることを示した。さらに高度な検出手順や装置を使用すると、検出レベルをさらに向上することができる。

40

【0207】

[実施例 7] : クマリン-アミノ酸を含む新生タンパク質

無細胞翻訳を、ベンゾピレン・フルオロフォア部分と結合されたリジンでミスアミノアシル化された電荷tRNA^{lys} 分子及びリジンに対する21コドンを含むヒト γ -インターフェロンmRNAを使用して、説明したように実施する。混合物の試料は、プロモフ

50

エノールブルー、グリセロール、2-メルカプトエタノール、トリス・塩酸 (pH 6.8)、SDSを含む緩衝液を補充して、分子量マーカーセットと共に、12%ポリアクリルアミドゲル(3%濃縮剤)に直接加える。電気泳動を50Vで3時間行う。ゲルを電気泳動装置から除去して、UV光線下で写真撮影をする。蛍光標識インターフェロントパク質のバンドは、分子量約25 Kdaで特異的に検出される。ゲル上では他の有意な蛍光活性は観察されない。遊離ミスアミノアシル・tRNA分子は、ゲルの外に電気泳動され、特に検出されないであろう。

【0208】

[実施例 8]: 薬物組成物のインビボ半減期

無細胞翻訳反応は、上記に説明するように化学的ミスアミノアシル化により調製され、TE中で1.7 mg/mlとなるように懸濁されたPCB-クマリンアミノ酸・tRNA^{Leu} 10 µl、S-23抽出物 50 µl、水 10 µl及び10 µlの50 mM酢酸マグネシウム、50 mMトリス酢酸 (pH 7.6)、200 mM Hepes-KOH 緩衝液 (pH 7.5); 1 M酢酸カリウム、5 mM DTT、3.75 mM GTP、25 mM ATP、100 mMクレアチンリン酸から成る溶液及び600 µg/mlのクレアチンキナーゼを混合することにより実施される。この混合物を、組み換え型IL-2 cDNAから転写かつ分離された500 µg/mlヒトIL-2 mRNA (26ロイシンコドンを含む)を20 µl追加するまで、氷上に保持する。混合物は、25 で1時間インキュベートして、氷上に置く。ストレプトアビジンでコートした磁性Dynabeads (2 mg/ml) 100 µlを混合物に加えて、室温で30分放置する。インキュベーション後、混合物をマイクロフュージで3,000 x g、5分間遠心分離するか、またはMPCを使用して溶液に磁場をかける。上清を取り除いて、TEを使用して手順を3回繰り返す。最終洗浄ペレットを、50 mMトリス・塩酸 (pH 7.5) 50 µlに再懸濁し、クオートキュベットに移す。Black-Ray 長波長 UV ランプからのUV光線を、約1秒懸濁液に照射する。MPCで溶液に1.0分磁場をかけてから、上清をピペットで除去する。上清を滅菌濾過して、50%グリセロール、1.8% NaCl及び25 mM 重炭酸ナトリウムを含む等量の滅菌緩衝液を加えて混合する。タンパク質濃度は、OD₂₆₀を測定することにより決定される。

【0209】

最終組成物 (濃度1 mg/ml) 0.25 mlを、2匹のBalb/c miceの尾静脈中に経静脈注射する。2匹の対照マウスはまた、比較可能量の緩衝液を注射される。様々な時点 (0、5分、15分、30分、60分、2時間、及び6時間)において、血清試料 100 µlを足裏から得て、0.9%生理食塩水 400 µlに加える。血清試料を、抗クマリン抗体でコートされたdynabeads (2 mg/ml) 溶液に添加して、室温で30分インキュベートする。MPCで溶液に1分磁場をかけてから、上清をピペットで除去する。470 nmにおける蛍光を測定し、試料をラットIL-2タンパク質特異性モノクローナル抗体で処理する。IL-2タンパク質含量を各試料について定量し、これを検出された蛍光量に等しいと考える。得られた結果より、インビボIL-2半減期は正確に決定される。

【0210】

[実施例 9]: α-ヘモリジン中への様々なフルオロフォアの取り込み

E. coli tRNA^{fMet}をまずメチオニンで定量的にアミノアシル化し、幾つかのフルオロフォアのNH₂-誘導体を使用して、α-アミノ基を特異的に修飾した。試験された蛍光レポーター分子 (フルオロフォア) のリスト及びその特性を表2に示す。修飾条件下で、修飾メチオニン・tRNA^{fMet}は安定であることが、酸-尿素ゲルによる評価によって発見されている。試験された全ての蛍光分子は、異なる光学特性 (励起及び発光) を有するために、我々は、新生タンパク質を含むゲルの定量のために使用された条件下で、相対蛍光強度を測定した。

【0211】

新生タンパク質の蛍光検出は、α-ヘモリジン (α-HL) をモデルタンパク質 (C末端

H i s₆ - t a g 付き)として使用してまず評価を行った。 α - H L は、比較的小型タンパク質 (32 k D a) であり、インビトロ翻訳で効率的に生産され得た。さらに、その活性は、ウサギ赤血球溶血アッセイを使用して、タンパク質翻訳混合物中で直接に測定し得る。 α - H L のインビトロ翻訳は、E . c o l i T 7 S 3 0 転写 / 翻訳抽出物 (P r o m e g a C o r p . , M a d i s o n , W I) を使用して、上記に説明されたように幾つかの異なる修飾メチオニン・t R N A^{f m e t} の存在下で行われた。反応後、アリコート (3 ~ 5 μ l) を S D S - P A G E 分析にかけ、蛍光バンドが検出され、F l u o r I m a g e r F 5 9 5 (M o l e c u l a r D y n a m i c s , S u n n y v a l e , C A) を使用して定量された。

【0212】

データを図 20 に示す。レーン 1 は D N A を含まない対照である。レーン 2 は、B O D I P Y - F L - S S E の結果を示す。レーン 3 は、B O D I P Y - F L - S E の結果を示す。レーン 4 は、N B D の結果を示す (構造については表 2 を参照)。レーン 5 は、B o d i p y - T M R の結果を示す。レーン 6 は、B O D I P Y R 6 G の結果を示す。レーン 7、8、9 及び 10 は、F A M、S F X、P Y M P O 及び T A M R A で得られた結果をそれぞれ示す (構造については表 2 を参照)。

【0213】

この結果は、B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A^{f m e t} (レーン 2 と 3) の存在下で生産された α - H L が最も強い蛍光を呈示したことを明らかに指摘する (全てのデータは、B O D I P Y - F L - S S E について正規化される)。2 つの異なる B O D I P Y - F L 試薬 (B O D I P Y - F L スルホスクシンイミジルエステル (S S E) 及び B O D I P Y - F L スクシンイミジルエステル (S E)) は、溶解度に関してのみ異なる。評価されたフルオロフォアで次に最も好ましいものは、6 - (テトラメチルローダミン - 5 - (及び - 6) - カルボキシアミド) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル (T A M R A - X、S E) で、B O D I P Y - F L - S S E の 35 % 蛍光 (相対蛍光に補正された) を呈示した。B O D I P Y、B O D I P Y - T M R、S E (6 - ((4, 4 - ジフルオロ - 1, 3 - ジメチル - 5 - (4 - メトキシフェニル) - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン - プロピオニル) アミノ) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル) 及び B O D I P Y - R 6 G、S E (4, 4 - ジフルオロ - 5 - フェニル - 4 - ボラ - 3 a, 4 a - ジアザ - s - インダセン - 3 プロピオン酸、スクシンイミジルエステル) から成る 2 つの他の形状は、B O D I P Y - F L、S S E の蛍光の 3 % 以下しか呈示しなかった。ニューロキニン - 2 レセプター中に既に取り込まれている蛍光分子である、スクシンイミジル 6 - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1, 3 - ジオゾール - 4 - y l) アミノヘキサン酸塩 (N B D - X - S E)、は B O D I P Y - F L - S S E の蛍光の 6 % のみを呈示した。2 つのフルオレセイン類似体、5 - (及び - 6) - カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル (F A M、S E) 及び 6 - (フルオレセイン - 5 - (及び - 6) カルボキシアミド) ヘキサン酸、スクシンイミジルエステル (S F X、S E) はまた極めて低い蛍光を示した (B O D I P Y - F L と比較して、それぞれ 8 . 4 % 及び 4 . 6 %)。

【0214】

[実施例 10] : 最適化取り込み

新生タンパク質中に取り込まれる B O D I P Y - F L 量を最適化するために、存在する B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A^{f m e t} 量を反応当たり 3 ~ 60 p M の範囲で増加して、 α - H L の翻訳反応を行った。反応は、ウサギ赤血球の溶血活性によって測定される α - H L と同様な量を生産し、これは、この範囲内で外因的に添加される B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A^{f m e t} は、タンパク質合成を阻害しないことを示した。対照的に、 α - H L に対応する蛍光バンド強度は、10 μ l 反応当たり 30 p M B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A まで増加を続けた (データの表示なし)。このレベル以上の増加は、蛍光を増加を生じることではなく、従って、以後の反応はこの B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A レベルを使用して実施した。

B O D I P Y - F L 取り込みを最適化するために使用した第二ステップは、反応混合物から N - ホルミル - テトラヒドロ葉酸塩 (f T H F) を省くことに基づいた。原核細胞では、N - ホルミル - テトラヒドロ葉酸塩 (f T H F) は、酵素 メチオニン・t R N A トランスホルミラーゼの補因子として作用し、メチオニンによるアミノアシル化後に開始 t R N A をホルミル化する。タンパク質合成は、次にこの修飾 t R N A (ホルミル - メチオニン・t R N A) を使用して開始される。本発明をいずれの特定メカニズムに限定することなく、反応混合物から f T H F を省くことは、この内在性開始 t R N A と外因的に添加された修飾開始 t R N A 間のタンパク質合成開始に対する競合を、内在性開始 t R N A のホルミル化を防止することにより、低減すると考えられる。これは、反応混合物中に f T H F が存在する、また存在しない場合の反応についての S D S - P A G E から直接蛍光を測定することにより確認された。後者の場合、2 ~ 3 倍の蛍光増加が見られた (データの表示なし)

10

20

[実施例 11] : 他のタンパク質中への取り込み

このアプローチの一般的適応性を探索するために、B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A ^{f m e t} を使用する転写 / 翻訳反応を、ジヒドロフォレート還元酵素 (D J F R) 、ルシフェラーゼ、クロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ (アセチル基転移酵素) (C A T) 及びバクテリオロドプシン (B R) をコードする様々なプラズミド D N A を使用して実施した。B R は、膜タンパク質を代表するために含まれ、典型的には極めて疎水性である。他のタンパク質への取り込みを調査するために、T a l o n 金属キレート樹脂 (C l o n T e c h , P a l o A l t o , C A) を使用して、遊離 B O D I P Y - F L 及び B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A ^{f m e t} と共に、最適共役化された転写 / 翻訳系を使用した。結果は図 21 A (レーザーベースの M o l e c u l a r D y n a m i c s F l u o r I m a g e r 595 を使用して可視化) 、及び 21 B (U V トランスイルミネーターを使用して可視化) に示す。レーン 1 は D N A を含まない対照である。レーン 2、3、4、5 及び 6 は、それぞれ、ヘモリジン、D H F R、ルシフェラーゼ、C A T 及びバクテリオロドプシンである。

30

40

50

【 0215 】

蛍光バンドは、各タンパク質について、対応する関連分子の位置で蛍光スキャナーを使用して観察される。ルシフェラーゼの場合、内部メチオニンにおける偽開始による予想産物に対応するバンドが観察される (P r o m e g a T e c h n i c a l B u l l e t i n T B 219) 。全てのタンパク質に対応するバンドはまた目視により、さらに $\lambda > 450 \text{ nm}$ である光線を通す発光フィルターと組み合わせた U V トランスイルミネーター (U V P T M W - 20) を使用して写真撮影によっても観察された。この場合の励起は、 $300 \sim 400 \text{ nm}$ から伸びる B O D I P Y - F L の U V 吸光バンド内で生じるらしい。

【 0216 】

B O D I P Y 取り込み量を次に、B O D I P Y - F L の異なる濃度からなる溶液との比較、さらに B r a d f o r d タンパク質アッセイをそれぞれ使用して、精製試料中に存在する取り込まれた B O D I P Y - F L 量及びタンパク質量を測定することによって決定した。3 度の測定値の平均は、モル比 $0.29 \pm 0.03 \%$ を生じた。しかし、トリプトファン及びチロシンのようなタンパク質残基を有する B O D I P Y - F L の蛍光消光が、水溶液中の B O D I P Y - F L と比較して蛍光量子収率を低下するであろうから、取り込み収率は、より高いものと思われる。

【 0217 】

合成された新生タンパク質活性への蛍光標識手順の影響をさらに評価した。これは、インビトロ発現クローニング及びインビトロテクノロジーである他のプロテオミク適用の場合のような、下流機能分析の実施を所望するような場合には重要である。N 末端蛍光標識がタンパク質の機能を修飾する可能性があるが、低モル取り込みレベル ($\sim 0.3 \%$) は、抽出物の総活性を大幅に修飾はしないはずである。これは、様々な酵素アッセイにより確認されており、B O D I P Y - F L - メチオニン・t R N A ^{f m e t} が存在する場合

、また存在しない場合に合成された D H F R、 α - H L 及びルシフェラーゼについて測定された活性には有意差がないことが発見されている（表 3 を参照）。

【 0 2 1 8 】

[実施例 1 2] : 感度の測定

本方法の感度を評価するために、オリジナル反応混合物 0 . 0 0 3 ~ 0 . 5 μ l に対応する翻訳抽出物の様々な希釈液を S D S - P A G E で分析した。対照として、DNA を欠損して実施された反応からの抽出物を分析した。図 2 2 B に見られるように、オリジナル反応混合物の 0 . 0 0 7 μ l に対応するほど少量の α - H L バンドからの蛍光が検出可能であった。インビトロ系において生産される総新生タンパク質、5 0 ~ 8 0 μ g / m l の範囲、に関する我々の推定に基づく、これは、0 . 3 5 ~ 0 . 5 n g の α - ヘモリジンに対応する。これは、新生タンパク質のそのような低い発現は X 線フィルムへの長時間の曝露を必要とし、その結果重大なバックグラウンド問題を生じることのある、新生タンパク質のラジオアイソトープ標識を使用して得られる感度に劣ることはない。これはさらに、市販されているクーマシーブルー (8 ~ 1 0 0 n g) を使用して現在ゲル上でタンパク質を測定する感度を超越している。B O D I P Y - F L 取り込みレベルを向上し、さらにゲル材料、抽出物及び添加された修飾 t R N A における蛍光不純物に起因すると思われるバックグラウンド蛍光を低減することによって、感度はさらに改善されると予測される。

10

【 0 2 1 9 】

[実施例 1 3] : 時間の関数としての合成

新生タンパク質合成を時間の関数としてモニタするための蛍光標識アプローチの能力をまた評価した。この目的には、 α - H L 転写 / 翻訳混合物の少量アリコート (4 μ l) を、反応中の様々な時間に取り出して、S D S - P A G E で分析した。図 2 2 A に見られるように、 α - H L に起因するバンドは、早い場合はインキュベーション開始 5 分後に明らかに検出され得る。蛍光標識 α - H L の合成は、翻訳の 1 5 分後には飽和状態となると思われる。

20

【 0 2 2 0 】

[実施例 1 4] : 修飾試薬

ミスアミノアシル・t R N A を形成するために使用されるアミノアシル化後修飾の場合、重要な要素は、天然アミノ酸に修飾を加えるために使用される修飾試薬である。例えば、フルオロフォア B O D I P Y F L の場合は、B O D I P Y - F L - S E 及び B O D I P Y - F L - S S E (M o l e c u l a r P r o b e s) として知られる 2 種類の異なる市販の B O D I P Y F L N H S 試薬がある。どちらの試薬も、脱離基として N - ヒドロキシスクシンイミド (N H S) に基づいている。しかし、スルホン酸 (スルホ) 基の一つの形状 (S S E) の存在により、この 2 つの形状は水溶解性が異なる (構造については表 2 を参照のこと) 。この実例では、これらの 2 種類の異なる試薬を使用して、メチオニンによってアミノアシル化されている精製 t R N A ^{f m e t} に、B O D I P Y F L フルオロフォアを添加することを目的として、標準生化学的手順に基づく最適化反応を行った。この目的には、まず t R N A ^{f m e t} をメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1 5 0 0 p M (~ 1 . 0 O D _{2 6 0}) の t R N A を過剰量のアミノアシル・t R N A シンテターゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、3 7 で 4 5 分インキュベートした。アミノアシル化ミックスは、2 0 m M イミダゾール・塩酸緩衝液 (p H 7 . 5) 、 1 5 0 m M N a C l 、 1 0 m M M g C l ₂ 、 2 m M A T P 及び 1 6 0 0 ユニットのアミノアシル・t R N A シンテターゼから構成された。アミノアシル化度は、酸 - 尿素ゲル、さらに ^{3 5} S - メチオニンを使用することにより測定した。インキュベーション後、混合物に 0 . 1 容積の 3 M 酢酸ナトリウム (p H 5 . 0) を添加して中和し、クロロホルム : 酸フェノール抽出 (1 : 1) を行った。エタノール (2 . 5 容積) を水相に添加し、得られた t R N A ペレットを水に溶解して (3 7 . 5 (1) 、修飾に使用した。

30

40

【 0 2 2 1 】

50

(A) BODIPY-FL-SSEによるアミノアシル・tRNAの修飾

上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO₃ 2.5 (lを加え(最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次に水中で10 mM BODIPY-FL-SSE溶液 10 (l (Molecular Probes)を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した(最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水50 mlマイクロリットルに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70)した。

10

【0222】

(B) BODIPY-FL-SEによるアミノアシル・tRNAの修飾

上記のアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO₃ 2.5 (lを加え(最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次にDMSO 20 (l (Molecular Probes)を加え、その後、DMSOで10 mM BODIPY-FL-SE溶液 10 (l (Molecular Probes)を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した(最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水 50 mlに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70)した。

20

【0223】

(C) 分析

メチオニンのα-アミノ基の修飾度は、NHSBODIPY FL試薬の非スルホン酸化形と比較してNHSBODIPY FLのスルホン酸化形を使用することにより、実質的に高くなることが、HPLCを使って経験的に発見されている。さらに、スルホン酸化形を使用して形成されたミスアミノアシル・tRNA^{fmet}は、優れた特性を呈示することが発見されている。BIDOPY FLをタンパク質(T7プロモーター制御下でHL遺伝子を含むプラスミドを使用するヘモリジン)中に取り込むために、最適化S30E .coli翻訳系において使用されると、発現されたHLに対応するSDSPAGEゲル上のバンドは、非スルホン酸化形を使用して形成されたミスアミノアシル化を使う同様な系と比較して、アルゴンレーザーベースの蛍光イメージャーを使用して検出される際に、約2倍高い蛍光レベルを呈示した。

30

【0224】

(D) クマリン

上記に説明されたことと同様な結果が、クマリンの非スルホン化及びスルホン化NH₂S誘導体、これらはまた市販されており、それぞれスクシンイミジル7-アミノ-メチル-アミノ-酢酸クマリン(AMCA-NH₂; Molecular Probes)及びスルホスクシンイミジル7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸(AMCA-sulfo-NH₂; Pierce Chemicals)として言及されている、を比較することにより得られた。この場合は、メチオニンによってアミノアシル化されている精製tRNA^{fmet}に、クマリンフルオロフォアを添加するために、標準生化学的手順に基づくこれらの2種類の異なる試薬を使用して、最適化反応を行った。

40

【0225】

上記に説明するアミノアシル・tRNA溶液に、1N NaHCO₃ 2.5 (lを加え(最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次に水中で10 mM スクシンイミジル7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸溶液(AMCA-sulfo-NH₂; Pierce Chemicals) 10 (lを加えた。混合物を0 (Cで10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した(最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶

50

液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾 tRNA を3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50 mlの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾 tRNA は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70)した。

【0226】

上記のアミノアシル・tRNA 溶液に、1N NaHCO₃ 2.5 (1を加え(最終濃度 = 50 mM、pH 8.5)、次にDMSO 20 (1を加え、その後、DMSO 中で10 mM スクシンイミジル7-アミノ-メチル-アミノ-酢酸クマリン溶液 10 μl (AMCA-NHS; Molecular Probes)を加えた。混合物を0
10
で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した(最終濃度 = 100 mM)。結果生じる溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0)を加えて、修飾 tRNA を3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50 mlの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾 tRNA は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70)した。

【0227】

この場合は、クマリン-NHS (AMCA-NHS)の非スルホン酸化形を使用して形成されたクマリン-メチオニン・tRNA^{fmet}は、標準E. coli S30翻訳混合物中で使用される際に、標準UVトランスイルミネーターからのUV光線を使用して検出
20
するときに、極めて低レベルの検出性蛍光バンドを生じた。対照的に、同一の手順を使って添加される際は、スルホン化形(AMCA-スルホ-NHS)は、UVトランスイルミネーターを使用することにより容易に検出されるバンドを生じる。

【0228】

メチオニンのα-アミノ基の修飾による開始 tRNA を使用して、クマリンを取り込む試みは、文献上で報告されているが、失敗に終わっている。開始 tRNA へのクマリンの付着は、次に化学的クロスリンカーを使用するより高度で複雑な化学的付着を必要とした。これは、まず tRNA をメチオニンでアミノアシル化し、次にアミノアシル・tRNA をDTDGモノスクシンイミジルエステル(DTDGは、ジチオジグリコール酸)と反応することにより達成された。反応生成物は、次にDTTを使用して還元され、さらにCPM
30
(3-4'-マレイミドフェニル)-4-メチル-ジエチルアミノクマリンと反応された。(Odom, O. W, Kudlicki, W 及び Hardestry, B. 1998. In vitro engineering using acyl-derivatized tRNA, In Protein synthesis Methods and Protocols (アシル誘導体化 tRNA を使用するインビトロ工学、タンパク質合成方法及びプロトコル)、PP. 93~103, Humana press, Totowa, NJ)。各マーカーについて特別の手順をデザインする必要があるため、そのようなアプローチは、化学的アミノアシル化後手順によって、tRNA への広範囲のマーカーの一般的な付着のためには実用的ではない。

【0229】

スルホン酸化 NHS 試薬を、tRNA の化学的アミノアシル化後に有用とする唯一の可能な要素は、水性緩衝液におけるその溶解度である。対照的に、BIDOPY FL NHS 試薬のような非スルホン酸化試薬は、ポストケミカル・修飾にはDMSOのような有機性緩衝液を必要とする。有機性緩衝液の使用がなぜ総合的なマーカーの取り込みを低下するのはまだ明らかではないが、一つの可能性は、アミノ酸と tRNA 間に形成されたアミノアシル結合の加水分解が修飾の総合的レベルを低下することである。

【0230】

[実施例 15]：水溶解度の分与

一般的に、水溶解度特性は、いくつかの方法によって化学試薬に分与することができる。これらのいくつかを以下に要約する：

10

20

30

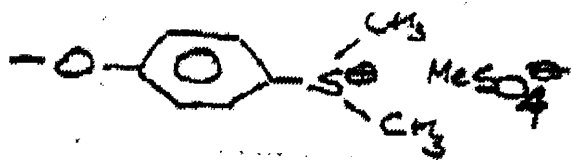
40

50

- (スルホン酸化 N H S のような) 脱離基への極性官能基の導入。
- スペーサーアームへの極性官能基の導入。
- 試薬部分それ自体への極性官能基の導入。
- $\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ (スルホ-) 基の導入が好ましいが、(D S P のような) 他の極性電離基もまた使用することができ、D S P を以下に示す：

【0231】

【化1】



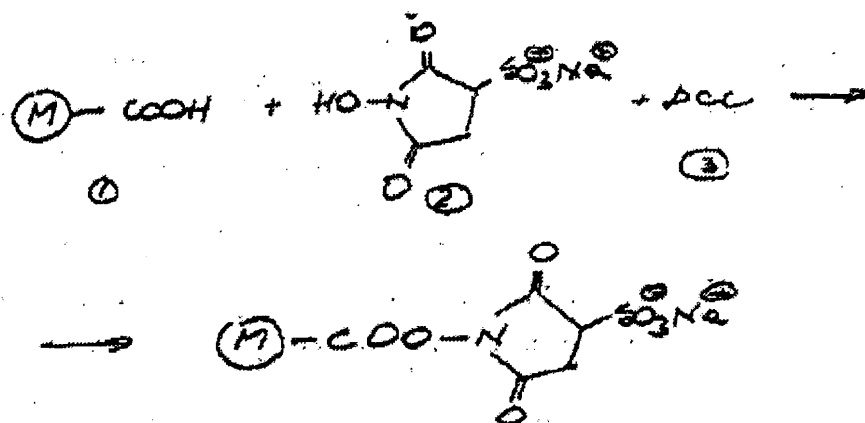
10

最終水溶解度は、例えば、ポリエーテルスペーサー（例：テトラエチレングリコールに基づくようなもの）を使用することにより、スペーサーアーム中に巧みに操作処理することができる。一般的に、遊離カルボキシル基を有するいずれの部分も、そのスルホ-N H S 活性エステルに転化することができる。この反応は、N-ヒドロキシ-スルホスクシンイミド (N-hydroxy-sulfosuccinimide) (モノナトリウム塩)、マーカー及び D C C (ジシクロヘキシルカルボジイミド) のような共役因子を含む。

20

【0232】

【化2】



30

典型的な反応では、マーカー (1)、55 mM を 10 ml の D M F (ジメチルホルムアミド) に溶解して、さらに (2) (5 mM) を添加し、次に (3) (1.1 当量) を加える。混合物を室温で一晩攪拌し、沈殿物を濾過除去し、さらに室温減圧下で、濾液を蒸発する。必要に応じて、カラムクロマトグラフィーを使用して生成物を精製し、再結晶化する。

40

【0233】

本発明による一つの好ましい実施態様は、スルホン化 N H S 試薬を含むマーカーを使用するミスアミノアシル・t R N A 形成のための t R N A のポストケミカル・修飾を含む。そのような試薬は一般的には市販されていないが、様々な有用なマーカーから常套手段により生産され得る。例えば、U V 及び可視励起に高い蛍光量子収率を有するフルオレセインは、スルホン酸化 N H S を含む形に調製することが可能である。

【0234】

[実施例 16]：トリプルマーカーシステム

この実施例では、新生タンパク質を検出するために 3 マーカーシステム、すなわち、N 末端マーカー、C 末端マーカー、及びアフィニティマーカー（後者は内在性アフィニティ

50

ーマーカー)を使用する。実験は、1)マーカーを有するtRNAの調製、従ってマーカーが(翻訳中)にタンパク質のN末端に導入され得る;2)野生型及び突然変異型ヘモリジンをコードする核酸でヘモリジンを翻訳;及び4]マーカーの定量を含む。

【0235】

1. ピオチン - メチオニン・tRNA^{f m e t}の調製
精製tRNA^{f m e t} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO)をまずにメチオニンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 pM (-1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM メチオニン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンテターゼ(Sigma)を含んだ。10
反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を添加して中和し、クロロホルム:酸フェノール抽出(1:1)を行った。エタノール(2.5容積)を水相に添加し、得られたtRNAベレットを水に溶解した(25 µl)。メチオニンのα-アミノ基へのNH₂-ピオチンの結合は、50 mM 炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)中で、アミノアシル・tRNA^{f m e t} (25 µl)にNH₂-ピオチン(最終濃度=2 mM)を加えて0 で10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン(最終濃度=100 mM)の添加により消光された。修飾tRNAをエタノールで沈降して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 × 5 cm)を通過させて、遊離試薬が残っている場合は、これを除去した。20

【0236】

2. α-HL DNAのインビトロ翻訳
WT及びアンバー(135位置)突然変異型プラスミドDNAを、そのC末端にアミノ酸配列His-His-His-His-His-His(His-6)(配列番号5)を担う32 kDaタンパク質である、α-ヘモリジン(α-HL)をコードするために使用した。WT及びアンバー突然変異型α-HL遺伝子(Amb 135)のインビトロ翻訳を、E. coli T7環状転写/翻訳系(Promega Corp., Wisconsin, WI)を使用して、ピオチン - メチオニン・tRNA^{f m e t} (Amb 135 Gen, Inc)の存在下で行った。100 µlの翻訳反応は、E. coli 抽出物(Promega Corp., Wisconsin, WI)を30 µl、アミノ酸を含まないプレミックスを40 µl、アミノ酸混合物(1 mM)を10 µl、WT及び突然変異体α-HLをコードするプラスミドDNAを5 µg、ピオチン - メチオニン・tRNA^{f m e t}を150 pM及びリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを使用して行った。プレミックス(1×)は、57 mM HEPES(pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応プレミックスから、n-ホルミル-テトラヒドロ葉酸塩(fTHF)が省かれた。翻訳は、37 で1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。翻訳反応混合物が、40
等量のTBS(トリス緩衝生理食塩水、pH 7.5)で希釈された後。各試料を2つのアリコートに分割して、以下に説明するようにそれぞれプロセスした。

【0237】

3. 抗-α-HL抗体マイクロ滴定プレートの調製
抗ウサギ-IgGでコートされたマイクロ滴定プレート(Pierce Chemicals, Rockford, IL)をSuperblock緩衝溶液(Pierce)で洗浄し、Superblock緩衝溶液中で調製した抗-α-HLポリクローナル抗体溶液(Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 100 µg/mlを加えて、マイクロ滴定プレートシェーカー(振とう器)上で、室温で1時間インキュベートした。プレートを次にSuperblock緩衝液で洗浄して(3回 × 200 50

μl)、将来の使用のために4で保存した。

【0238】

4. N末端(ビオチン)マーカーの定量

対照、WT及びアンバーα-HL DNA用の翻訳反応混合物(50 μl)を、抗-α-HL抗体マイクロ滴定プレートの異なるウェル内にいれ、シェーカー上で、室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、200 μlのSuperblock緩衝液で、ウェルを5回洗浄し(各5~10分)、上清を捨てた。これらのウェルに、100 μlの1:1000希釈ストレプトアビジン-西洋ワサビペルオキシダーゼ(Streptavidin-HRP; 0.25 mg/ml; Promega)を加え、プレートを振とう条件下で、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、Superblock緩衝液で念入りに洗浄することにより(各5回×5分)、過剰ストレプトアビジン-HRPを取り除いた。最後に、HPR(HPR緩衝液中のOPD)用基質200 μlを加えて、分光高度計を使用して、441 nmで吸光度を測定することにより、HPR活性を測定した。

【0239】

5. C末端(His-6-タグ)マーカーの定量

対照、WT及びアンバーα-HL DNA用の実施例2からの翻訳反応混合物(50 μl)を、抗-α-HL抗体マイクロ滴定プレートの異なるウェル内にいれ、シェーカー上で、室温で30分インキュベートした。インキュベーション後、200 μlのSuperblock緩衝液で、ウェルを5回洗浄し(各5~10分)、上清を捨てた。これらのウェルに、100 μlの1:1000希釈抗-His-6抗体(Clontech, Palo Alto, CA)を加え、プレートを振とう条件下で、室温で20分インキュベートした。インキュベーション後、Superblock緩衝液で念入りに洗浄することにより(各5回×5分)、過剰抗体を取り除いた。その後、ウェルに二次抗体(抗マウスIgG-HPR、Roche-BM, Indianapolis, IN)を加えて、室温で20分インキュベートした。過剰二次抗体を洗浄後、上記に説明するようにHPR活性を測定した。

【0240】

6. N及びC末端マーカーのゲルフリー定量

上記に説明する定量の結果を図23A(N末端、ビオチンマーカーの定量)及び図23B(C末端、His-6マーカー)に示す。ビオチン-メチオニン・tRNAの存在におけるWT α-HL DNAのインビトロ転写/翻訳の場合は、合成されたタンパク質は、タンパク質のC末端部に翻訳されたHis-6タグを有し、α-HL分子のいくつかは、さらにそのN末端部に、ビオチン-メチオニン・tRNAを使用して取り込まれた、ビオチンを担うであろう。α-HLを含む全翻訳反応混合物が、抗-α-HL抗体プレート上でインキュベートされた場合は、選択的に全てのα-HLが、抗体と内在性アフィニティーマーカーとの相互作用によりプレートに結合するであろう。非結合タンパク質は洗浄除去され、結合タンパク質のN及びC末端は、ストレプトアビジン-HPR及び抗His-6抗体を使用して、それぞれ定量し得る。WT α-HLの場合は、タンパク質は、N末端(ビオチン)及びC末端(His-6)タグのどちらも担い、従って、どちらの場合もHPRシグナルを生じ、ストレプトアビジン-HPR及び二次抗体-HPRが使用されたHis-6と抱合するであろう(HL、図23A)。他方、アンバー突然変異型α-HLの場合は、α-HLのN末端フラグメント(最初の134アミノ酸のみが生産され、N末端マーカー、ビオチンのみを有するが、コドン番号135におけるアンバー突然変異のためにHis-6マーカーを有しないであろう。この突然変異の結果、アンバーα-HL DNAを使用して生産されたタンパク質は、抗体プレートと結合するが、ストレプトアビジン-HPR(HL-AMB、図23A)の場合のみにシグナルを生じ、抗hisX6抗体(HL-AMB、図23B)にはシグナルを生じないであろう。

【0241】

[実施例 17] 電気泳動易動度シフトアッセイ

10

20

30

40

50

膜の存在における光分解またはオリゴマー形成のいずれかによるSDSゲル上の蛍光標識新生タンパク質の電気泳動易動度の変化を実証するために、我々は、C末端にアミノ酸配列His-His-His-His-His-His(His-6)(配列番号5)を担う32 kDaタンパク質をコードする α -ヘモリジン(α -HL)のプラズミドDNAを使用した。 α -HL遺伝子のインビトロ翻訳は、E. coli T7環状転写/翻訳系(Promega Corp., Wisconsin, WI)を使用して、BODIPY-FL-メチオニン・tRNA^{fmet}(AmberGen, Inc)の存在下で行った。本実験は、1)翻訳中のN末端マーカの導入のためのtRNAマーカの調製、2)翻訳、3)精製、4)プロテアーゼ処理、または5)オリゴマー形成を含んだ。

【0242】

10

1. BODIPY-FL-メチオニンtRNAの調製:

BODIPY-FL-メチオニン・tRNAは、まず精製tRNA^{fmet}(Sigma Chemicals, St. Louis, MO)をメチオニンを使用してアミノアシル化し、次にメチオニンの α -アミノ基をBODIPY-FL-SSE(4-ジフルオロ-5,7-ジメチル-4-ボラ-3a,4a-ジアザ-s-インダセンプロピオン酸、スルホスクシンイミジルエステル;Molecular Probes, Eugene, OR)を使用して修飾することにより調製した。典型的なアミノアシル化反応(100 μ l)は、1500 pM(-1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM メチオニン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び 過剰量のアミノアシルtRNAシンテターゼ(Sigma)を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を添加して中和し、クロロホルム:酸フェノール抽出(1:1)を行った。エタノール(2.5容積)を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した(25 μ l)。メチオニンの α -アミノ基へのBODIPY-FL-SSEの結合は、50 μ lの反応容積中で、50 mM 重炭酸ナトリウム緩衝液(pH 8.0)を使用して、25 μ lのアミノアシル・tRNA^{fmet}(1.5 nM)に10 μ lのof BODIPY-FL-SSE(10 mM)を加えて、0 で10分インキュベートすることにより行われ、反応はリジン(最終濃度=100 mM)の添加により消光した。修飾tRNAをエタノールで沈降して、さらにペレットをリボヌクレアーゼフリー・ウオーターに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 x 5 cm)を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。

20

30

【0243】

2. α -ヘモリジン DNAのインビトロ翻訳

100 μ lの翻訳反応は、E. coli 抽出物(Promega Corp., Wisconsin, WI)を30 μ l、アミノ酸を含まないプレミックスを40 μ l、アミノ酸混合物(1 mM)を10 μ l、 α -HLをコードするプラズミドDNAを5 μ g、150 pMのBODIPY-FL-メチオニン・tRNA^{fmet}及びリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。プレミックス(1x)は、57 mM HEPES(pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応プレミックスから、n-ホルミル-テトラヒドロ葉酸塩(fTHF)を省いた。翻訳は、37 で1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。

40

【0244】

3. Hls-6- α -HLの精製

50 μ lの翻訳反応混合物(上記より)を、Hls-6- α -HL精製のために、Talon-Sepharose(Clontech, Palo Alto, CA)クロマトグラフィーにかけた。これは粗抽出物を、150 mM NaClを含む50 mM ト

50

リス・塩酸 (pH 8 . 0) で予め平衡化した T a l o n - S e p h a r o s e カラム上に装填し、さらに非結合タンパク質を除去するためにカラムを洗浄することにより行った。結合タンパク質は次に上記緩衝液に 1 0 0 m M イミダゾールを加えることにより溶出された。溶出された α - H L は、5 0 m M トリス・塩酸緩衝液 (pH 7 . 5) に対して透析された。

【 0 2 4 5 】

4 . プロテアーゼ検出用 E M S A

精製蛍光標識 α - H L (- 5 μ g) (実施例 3) を、5 0 n M 酢酸緩衝液 (pH 5 . 0) (1 0 0 : 1 ; タンパク質 : プロテアーゼ比) 中で、0 . 0 . 5 μ g の精製トリプシン (S i g m a C h e m i c a l s , S t . L o u i s , M O) を加えて、3 7 10
で 5 分インキュベートした。タンパク質分解反応は、1 X S D S ゲルローディングバッファーを加え、試料を 5 分煮沸することにより停止された。S D S - P A G E は、4 ~ 2 0 % 勾配ゲル (r e a d y - g e l , B i o - R a d , R i c h m o n d , C A) を使用して、L a e m m l i (L a e m m l i , U . K . 1 9 7 0 , N a t u r e 2 2 7 , 6 8 0 ~ 6 8 5) により説明されるように行った。ゲル電気泳動後、ゲルを、F l u o r i m a g e r F 5 9 5 (M o l e c u l a r D y n a m i c s , S u n n y v a l e , C A) を使用して目視観察した。

【 0 2 4 6 】

α - H L の極めてはっきりした切断を得るために、トリプシンは極めて限定された条件 (シングル・ヒット動態学) の元で使用された (5 0 m M 酢酸緩衝液 (pH 5 . 0) 、1 20
0 0 : 1 : タンパク質 : プロテアーゼ比、3 7 で 5 分) 。これらの条件下で、 α - H L 中のグリシン濃厚ループが最も切断されやすく、その結果、1 7 k D a のタンパク質分解性フラグメントが観察された (V e c e s e y - S e m j e n , B . , K n a p p , S . , M o l l b y , R . , G o o t , F . G . 1 9 9 9 , B i o c h e m i s t r y , 3 8 4 2 9 6 ~ 4 3 0 2) 。蛍光標識 α - H L が極めて弱いトリプシン処理を受けると、その結果として、 α - H L の切断は、S D S - P A G E 上の蛍光バンドの易動度の変化の証拠として、約 1 7 ~ 1 8 k D a の大きさの N 末端フラグメントを発生した (図 2 4 レーン 1 は、未処理タンパク質、レーン 2 はプロテアーゼ処理タンパク質) 。この結果は、そのようなアッセイは、新生タンパク質の電気泳動易動度シフトを起因する可能性はある、プロテアーゼ、またはキナーゼ、トランスフェラーゼ等のようなその他の 30
酵素活性をスクリーンするために使用することが可能であることを示す。この特定のアッセイには我々は精製新生タンパク質を使用した。精製されていない新生タンパク質 (全翻訳反応混合物) を使用できないという理由はない。

【 0 2 4 7 】

5 . 膜上にある新生タンパク質のオリゴマー形成用 E M S A

全翻訳反応混合物 (1 0 μ l) (上記参照) を、ウサギ赤血球 (r R B C s , C h a r l e s R i v e r F a r m , C T) が存在する場合と存在しない場合について、0
で 3 0 分インキュベートした。インキュベーション後、過剰非結合 α - H L を除去するために洗浄し、さらに 1 m g / m l B S A を含む (T B S A) トリス緩衝生理食塩水 (T B S) 中で r R B C s を 3 7 40
で 2 0 分インキュベートし、その期間中に r R B C s の分解が起こった。r R B C 膜を遠心分離後に分離して、1 X S D S - ゲルローディングバッファーに溶解して、試料を加熱しないで、S D S - P A G E (4 ~ 2 0 % 勾配ゲル) にかけた。ゲル電気泳動後、F l u o r I m a g e r F 5 9 5 を使用してゲルを目視観察した。

【 0 2 4 8 】

α - H L は溶解性単量体タンパク質を発現し、様々な膜の存在において、オリゴマー化してヘプタメリック孔を形成し得る (W a l k e r , B . , K r i s h n a s a s t r y , M . , Z o r n , L . , K a s i a n o w i c z , J . 及び B a y l e y , H . , 1 9 9 2 , J . B i o l . C h e m . 2 6 7 , 1 0 9 0 2 ~ 1 0 9 0 9) 。さらに、オリゴマーのいくつかの中間形もまた観察された。この実験では、脂質膜の存在に 50

おけるオリゴマー形成に起因する α -HL易動度のシフトを検出するためのEMSAの適応性を観察するために、全翻訳反応混合物を(全く精製しないで)使用した。新生 α -HLを含む全翻訳抽出物にrRBCを加えてインキュベートすると、rRBC膜上に α -HLのオリゴマー形成を起因し、SDS抵抗性である様々な分子量に対応するはっきりした蛍光バンドを生じた(図25: レーン1は未処理タンパク質のみを示し、レーン2はrRBCで処理したタンパク質を示す)。

【0249】

この結果は、そのようなアッセイは、タンパク質の研究に使用することができ、様々な天然及び人工膜と相互作用し、さらに結果としてタンパク質の易動度がシフトされることを実証する。

10

[実施例 18]: リジン・tRNA^{lys}を使用する取り込み

この実施例は、リジン・tRNA^{lys}を使用する、新生タンパク質中への蛍光標識の取り込みを説明する。より詳しくは、様々な蛍光分子は、リジン・tRNA^{lys}を使用して、1) E. coli 翻訳系における翻訳中にヘモリジン、及び2) コムギ胚芽系における翻訳中にルシフェラーゼ中に取り込まれる。実験は、1) tRNAマーカー化合物の調製、2) 翻訳、及び3) ゲル上の検出を含んだ。

【0250】

1. 蛍光標識ミスアミノアシル・tRNA^{lys}の調製

精製tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応(100 μ l)は、1500 pM (-1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液(pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシル・tRNAシンテターゼ(Sigma)を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム(pH 5.0)を添加して中和し、クロロホルム: 酸フェノール抽出(1:1)を行った。エタノール(2.5容積)を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した(25 μ l)。リジンの ϵ -アミノ基への様々な蛍光分子のNH₂-誘導体(表2を参照)の結合は、50 mM CAPS緩衝液(pH 10.5)中で、アミノアシル・tRNA^{lys}(25 μ l)に蛍光試薬(最終濃度=2 mM)を加えて0 で10分インキュベートすることにより行い、反応はリジン(最終濃度=100 mM)の添加により消光した。修飾tRNAをエタノールで沈降して、さらにペレットをリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50 μ lに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム(0.5 $\times$ 5 cm)を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存(-70)した。アミノアシル・tRNAの修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動(Varshney, U., Lee, C. P. 及びRaj Bhandary, U. L., 1991 J. Biol. Chem 266, 24712~24718)により評価された。

20

30

【0251】

2. 原核性(E. coli)翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成

40

典型的な翻訳反応混合物(10 μ l)は、E. coli 抽出物(Promega Corp., Wisconsin, WI)を3 μ l、プレミックスを4 μ l、アミノ酸ミックス(1 mM)を1 μ l、30 pM 蛍光リジン・tRNA、 α ヘモリジン(α HL)プラズミドDNAを0.5 μ g含んだ。プレミックス(1 $\times$)は、57 mM HEPES(pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37 で45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10 μ lを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、

50

1 × ローディングバッファーに溶解して、5 分間煮沸後 SDS - PAGE にかけた。SDS - PAGE は、Laemmli ((Laemmli , U . K . 1970、Nature , 227、680 ~ 685) に従って行った。

【0252】

3 . 真核性 (TnT コムギ胚芽) 翻訳抽出物における無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物 (10 μl) は、TnT コムギ胚芽抽出物 (Promega Corp . , Wisconsin - Madison , WI) を 5 μl 、TnT 反応緩衝液を 0 . 4 μl、アミノ酸ミックス (1 mM) を 1 μl、T7 RNA ポリメラーゼを 0 . 2 μl、30 pM 蛍光リジン・tRNA、及びルシフェラーゼ RNA (Promega) を 0 . 5 μg、さらにリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。翻訳反応は、37 °C で 45 分進行させ、不溶性物質を除去するために反応混合物を 5 分遠心分離した。清澄抽出物を次に 5 容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 × ローディングバッファーに溶解して、5 分間煮沸後 SDS - PAGE にかけた。SDS - PAGE は、Laemmli ((Laemmli , U . K . 1970、Nature , 227、680 ~ 685) に従って行った。

【0253】

4 . 新生タンパク質の検出

新生タンパク質を含むゲルは、アルゴンレーザー (488 nm) を励起源として、FluorImager 595 (Molecular Dynamics , Sunnyvale , CA) を使用してスキャンし、さらにポリアクリルアミドゲル内の新生タンパク質は、UV トランスイルミネーターを使用して検出し、Tiffen 緑色フィルターを装備したポラロイドカメラ (Polaroid , Cambridge , MA) を使って、写真撮影を行った。図 26A 及び 26B は、様々な蛍光 tRNA^{lys} の存在において生産される α - HL のインビトロ翻訳の結果を示す。この結果から、NBD、フルオレセイン誘導体等のような色素を含む、ミスアミノアシル・tRNA (フルオロフォア修飾リジン・tRNA^{lys}) を使用して新生タンパク質中に様々な蛍光分子を取り込むことができることは明白である (レーン 1 : DNA を含まない対照 ; レーン 2 : BODIPY - FL - SSE (4 , 4 - ジフルオロ - 5 , 7 - ジメチル - 4 - ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセンプロピオン酸、スルホスクシンイミジルエステル) ; レーン 3 : BODIPY - FL - SE (4 - ジフルオロ - 5 , 7 - ジメチル - 4 ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセンプロピオン酸、スクシンイミジルエステル) ; レーン 4 : NBD - X - SE (スクシンイミジル 6 - (7 - ニトロベンズ - 2 - オキサ - 1 , 3 - ジメチル - 4 - yl) アミノヘキササン酸塩 ; レーン 5 : BODIPY - TMR - SE ((6 - 994 , 4 - ジフロロ - 1 , 3 - ジメチル - 5 - (4 - メトキシフェニル) - 4 - ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセン - 2 - プロピオニル) アミノ) ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル ; レーン 6 : BODIPY - R6G - SE ((4 , 4 - ジフロロ - 5 - フェニル - 4 - ボラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセン - 3 プロピオン酸、スクシンイミジルエステル) ; レーン 7 : FAM - SE (5 - (6 -) - カルボキシフルオレセイン、スクシンイミジルエステル) ; レーン 8 : SFX - SE (6 - フルオレセイン - 5 - (and 6 -) カルボキシアミド) ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル) ; レーン 9 : PyMPO - SE (1 - (3 - (スクシンイミジロキシカルボニル) ベンジル) - 4 - (5 - (4 - メトキシフェニル) オキサゾール - 2 - yl) 臭化ピリジニウム (PyMPO)) ; 及び レーン 10 : TAMRA - SE (6 - (テトラメチルローダミン - 5 - (and - 6) - カルボキシアミド) ヘキササン酸、スクシンイミジルエステル) 。

【0254】

[実施例 19] : クマリンの NHS 誘導体

2 種類の BODIPY 分子 (すなわち、BODIPY - FL - SSE と BODIPY - FL - SE) について上記の結果が得られたため、取り込みに適するように他のマーカを誘導体化する試みが行われた。本実施例は、1) 標識 tRNA の調製、2) 翻訳、及び

3) 標識 (またはマーカー) を含む新生タンパク質の検出を含む。

【0255】

1. 蛍光標識ミスアミノアシル・tRNA^{fmet}の調製

精製tRNA^{fmet} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにメチオニンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応 (100 μ l) は、1500 pM (約1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシル・tRNAシンテターゼ (Sigma) を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した (25 μ l)。クマリンのNHS誘導体 [要するに、スルホスクシンイミジル7-アミノ-4-メチルクマリン-3-酢酸 [1] (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals)、Alexa 350-N-ヒドロキシ-スクシンイミジルエステル (Molecular Probes) 及びスクシンイミジル7- α -メチル-アミノ-酢酸クマリン (AMCA-NHS Molecular Probes)] のメチオニンの α -アミノ基への結合は、50 mM 重炭酸ナトリウム緩衝液 (pH 8.5) 中で、アミノアシル・tRNA^{fmet} (25 μ l) に蛍光試薬 (最終濃度 = 2 mM) を加えて0 で10分インキュベートすることにより行い、反応は遊離リジン (最終濃度 = 100 mM) の添加により消光した。AMCA-NHSの場合は、試薬はDMSOに溶解され、結合反応は、40% DMSOの存在下で行われた。修飾tRNAをエタノールで沈降して、をリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50 μ lに溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過カラム (0.5 $\times$ 5 cm) を通過させて、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70) した。アミノアシル・tRNAの修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動 (Varshney, U., Lee, C. P. 及びRajBhandary, U. L., 1991 J. Biol. Chem. 266, 24712~24718) により評価された。

【0256】

2. 原核性 (E. coli) 翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成

典型的な翻訳反応混合物 (10 μ l) は、E. coli S-30抽出物 (Promega Corp., Wisconsin, WI) を3 μ l、プレミックスを4 μ l、アミノ酸ミックス (1 mM) を1 μ l、30 pM 蛍光メチオニン・tRNA、及び α ヘモリジン (α -HL) プラズミドDNAを0.5 μ g を含んだ。プレミックス (1 $\times$) は、57 mM HEPES (pH 8.2)、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び6 mM酢酸マグネシウムを含む。翻訳反応は、37 で45分進行させた。SDS-PAGEには、反応ミックスのアリコート 4~10 μ lを、5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1 $\times$ ローディングバッファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli (Laemmli, U.K., 1970, Nature, 227, 680~685) に従って行った。

【0257】

3. 新生タンパク質の検出

新生タンパク質を含むゲルは、長波長用UV電球 (>300 nm) を装備したUVトランスイルミネーターを使用して目視観察し、Tiffen緑色フィルターを装備したポロイドカメラ (Polaroid, Cambridge, MA) を使って写真撮影を行

った。図27は、様々な蛍光 tRNA の存在において生産された α -HL のインビトロ翻訳の結果を示す（レーン1は、DNAを含まない対照を示し；レーン2は、AMCA-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA^{fmet} による結果を示し；レーン3は、AMCA-スルホ-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA^{fmet} による結果を示し；さらにレーン4は、Alexa-NHSで修飾されたメチオニン・tRNA^{fmet} による結果を示す）。明らかに、蛍光分子の水溶性NHSエステル（レーン3）によって修飾されたミスアミノアシル・tRNAを使用して、新生タンパク質中にクマリン誘導体分子を取り込むことができる。さらに、負の電荷を有する色素（Alexa、レーン4）は、その中性対（AMCA；レーン3）のようには取り込まないように思われる。

【0258】

10

上記の結果及び本明細書による一般的教示より、当業者は、その他のマーカースelectionして、本発明による方法に従って、これを取り込みに適応する（例えば、化学的処理により）ことが可能である。

[実施例 20]：毛管電気泳動

この実施例は、易動度シフトによるインビトロ合成蛍光タンパク質の検出のための毛管電気泳動（CE）の用途について説明する。この実施例は、1）BODIPYマーカースelectionを含むtRNAの調製、2）インビトロ翻訳、3）精製、4）プロテアーゼ消化、及び5）易動度シフトアッセイによる検出を説明する。

【0259】

20

1. BODIPY-FL-メチオニン・tRNA^{fmet}の調製

精製 tRNA^{fmet} をまずメチオニンでアミノアシル化した。典型的な反応では、1500 pM（ $\sim 1.0 \text{ OD}_{260}$ ）の tRNA を過剰量のアミノアシル・tRNA シンテターゼを使用して、アミノアシル化ミックス中、37 で45分インキュベートした。アミノアシル化ミックスは、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、150 mM NaCl、10 mM MgCl₂、2 mM ATP 及び 1600 ユニットのアミノアシル・tRNA シンテターゼを含んだ。アミノアシル化度は、酸-尿素ゲル、さらに³⁵S-メチオニンを使用することにより測定された。インキュベーション後、混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム（pH 5.0）を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出（1：1）を行った。エタノール（2.5容積）を水相に添加し、得られた tRNA ペレットを水に溶解して（37.5 μ l）、修飾に使用した。上記のアミノアシル・tRNA 溶液に、1N NaHCO₃ 2.5 μ lを加え（最終濃度 = 50 mM、pH 8.5）、次に水中で10 mM BODIPY-FL-SSE 溶液 10 μ l（Molecular Probes）を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した（最終濃度 = 100 mM）。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc（pH 5.0）を加えて、修飾 tRNA を3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50 μ lの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム（0.5 $\times$ 5 cm）で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾 tRNA は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存（-70）した。

30

【0260】

40

2. α -ヘモリジン DNAのインビトロ翻訳

500 μ lの翻訳反応は、E. coli 抽出物（Promega Corp., Wisconsin, WI）を150 μ l、アミノ酸を含まないプレミックスを200 μ l、アミノ酸混合物（1 mM）を50 μ l、 α -HL をコードするプラスミドDNAを25 μ g、1000 pMのBODIPY-FL-メチオニン・tRNA^{fmet} 及びリボヌクレアーゼフリー・ウオーターを含んだ。プレミックス（1 $\times$ ）は、57 mM HEPES（pH 8.2）、36 mM 酢酸アンモニウム、210 mM グルタミン酸カリウム、1.7 mM DTT、4% PEG 8000、1.25 mM ATP、0.8 mM GTP、0.8 mM UTP、0.8 mM CTP、60 mM ホスホエノールピルビン酸、0.6 mM cAMP、及び16 mM酢酸マグネシウムを含む

50

。翻訳反応プレミックスから、*n*-ホルミル-テトラヒドロ葉酸塩 (fTHF) を省いた。翻訳は、37 で1時間行われた。DNAを含まずにインキュベートされた翻訳反応混合物を対照とする。

【0261】

3. Hls-6- α -HLの精製

500 μ lの翻訳反応混合物(上記ステップ2を参照)を、Hls-6- α -HL精製のために、Talon-Sepharose (Clontech, Palo Alto, CA)クロマトグラフィーにかけた。これは粗抽出物を、150 mM NaClを含む50 mM トリス・塩酸 (pH 8.0) で予め平衡化したTalon-Sepharose カラムに装填し、さらに非結合タンパク質を除去するためにカラムを洗浄することにより行った。結合タンパク質は次に上記緩衝液中で100 mMイミダゾールを加えることにより溶出された。溶出された α -HLは、50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) に対して透析された。精製かつ透析した α HLの蛍光をMolecular Dynamics FluorImager F595でチェックした。

10

【0262】

4. プロテアーゼ消化

精製蛍光標識 α -HL (~5 μ g) (上記ステップ3を参照)を、50 mM トリス・塩酸緩衝液 (pH 7.5) 中で、純正トリプシン (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 0.1 μ gを加えて(50:1; タンパク質:プロテアーゼ比)、室温で10分インキュベートした。タンパク質分解反応は、1X CESSDSゲルローディングバッファーを加えて試料を10分煮沸することにより停止された。

20

【0263】

5. 易動度シフトアッセイ

SDS-毛管電気泳動 (SDS-CGE) は、Bio-Rad BioFocus 3000 CEシステムを使用して実施した。毛管は、内径75 μ m、全長24 cm、及び検出器までの長さ19.5 cmの溶融シリカ製であった。蛍光標識タンパク質試料(α -HL) 50 μ lを、SDS-CGE試料ローディングバッファーを加えて混合し、95で10分インキュベートした。毛管は、各注入前に、0.1 M NaOH、0.1 M HCl 及び SDS-ランバッファーで、それぞれ60、60 及び120秒洗浄した。試料は電気泳動注入(10 kVで20秒)を使用して注入した。分離は15 kV (定圧)で25分行った。毛管及び試料は20 で維持した。試料の検出は、488 nm アルゴンレーザー及び520 nm 発光フィルターを使用して行った。

30

【0264】

SDS-CGEの結果を図28に示す。図に見られるように、蛍光標識 α -HLは、電気泳動条件下で24分付近で溶出される主要な種として移動する(上部パネル)。さらに、電気泳動図はまた試料中に存在する微量の不純物の存在を示し、これらは17及び20.5分付近で溶出される。蛍光標識 α -HL試料をトリプシン処理して、SDS-CGEを使用して分析すると、早期(13、14、及び15分)に溶出するピークと21分に主要ピークを示した(下部パネル)。この結果は、 α -HLがトリプシンによりタンパク質分解されて、N末端が蛍光標識された様々なタンパク質分解フラグメントが電気泳動図に観察されることを示した。

40

【0265】

[実施例 21]: ヘモリジンへの3マーカーの取り込み

これは、ミスアミノアシル-tRNAを使用して取り込まれるマーカーと共に、N及びC末端マーカーが取り込まれるような条件下でインビトロでタンパク質が生産される事例である。実施例は、1) N末端及びC末端検出マーカーを有するプライマーによるPCR、2) tRNAの調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

【0266】

1. α -ヘモリジンDNAのPCR

α -ヘモリジン、pT7-WT-H6- α HLのプラスミドDNAを、以下のプライマー

50

を使用して、PCR増幅した。

フォワードプライマー（HL-5）は：

【0267】

【数1】

5'-GAATTC-TAATACGACTCACTATAGGGTAACTTTAAGAAGGAGATATACA
TATGGAACAAAAATTAATCTCGGAAGAGGATTTGGCAGATTCTGATATTAATA
TAAAAACC-3'（配列番号11）

10

リバースプライマー（HL-3）は：

【0268】

【数2】

5'-AGCTTCATTA-ATGATGGTGATGG-TGGTGAC 3'（配列番号12）

である。

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、太字領域は、リボソーム結合部位（Shine-Dalgarno配列）、太字及び下線配列は、C-mycエピトープを含み、イタリック体で示されるヌクレオチドは、 α -ヘモリジン配列の相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、HisXエピトープ配列に対応する。100 μ lのPCR反応混合物は、鋳型DNAを100 ng、0.5 μ M 各プライマー、1 mM $MgCl_2$ 、PCRマスターミックス（Qiagen, CA）を50 μ l、及びヌクレアーゼフリー・ウォーター（Nuclease free water）（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-Ethermocyler（Hybaid, Franklin, MA）を使用して、以下の条件で行われた：95（2分）の後、95（1分）、61（1分）、及び72（2分）から成るサイクルを35回繰り返し、最終伸長は72で7分行った。PCR産物を次に、Qiagen PCR クリーンアップキット（Qiagen, CA）を使用して精製した。精製PCR DNAは、翻訳反応に使用された。

20

30

【0269】

2. BODIPY-FL-リジン・tRNA^{lys}の調製

精製tRNA^{lys}（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 pM（ $\sim 1.0 OD_{260}$ ）tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液（pH 7.5）、10 mM $MgCl_2$ 、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシルtRNAシンターゼ（Sigma Chemicals, St. Louis, MO）を含んだ。反応混合物を37で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M 酢酸ナトリウム（pH 5.0）を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出（1：1）を行った。エタノール（2.5容積）を水相に添加し、得られたtRNAペレットを水に溶解した（35 μ l）。この溶液に、0.5 M CAPS 緩衝液（pH 10.5）5 μ lを加えて（最終濃度 50 mM）、その後10 mM BODIPY-FL-SSE溶液 10 μ lを加えた。混合物を0で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した（最終濃度 = 100 mM）。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc（pH 5.0）を加えて、修飾tRNAを3容積のエタノールで沈降した。沈降物を50 μ lの水に溶解して、Sephadex G-25ゲル濾過コラム（0.5 $\times$ 5 cm）で精製して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾tRNAは、自

40

50

然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存（-70℃）した。アミノアシルトRNAの修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動によって評価した。Varshney et al., J. Biol. Chem. 266:24712~24718 (1991)。
【0270】

3. 真核性（コムギ胚芽）翻訳抽出物におけるタンパク質の無細胞合成
典型的な翻訳反応混合物（20 μl）は、TnTコムギ胚芽抽出物（Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI）を10 μl、TnT反応緩衝液を0.8 μl、アミノ酸ミックス（1 mM）を2 μl、T7 RNAポリメラーゼを1 μl、30 pM BODIPY-FL-lリジン・tRNA^{lys}、プラズミドまたはPCR DNA（実施例1）を1~2 μg、さらにリボヌクレアーゼフリー・ウオーター水を含んだ。翻訳反応は、37℃で60分進行させ、不溶性物質を除去するために反応混合物を5分遠心分離した。清澄抽出物を次に5容積アセトンで沈降させ、さらに沈殿したタンパク質を遠心分離により収集した。ペレットは、1×ローディングバッファーに溶解して、5分間煮沸後SDS-PAGEにかけた。SDS-PAGEは、Laemmli Nature, 227:680~685に従って行った。
10

【0271】

4. 新生タンパク質の検出

電気泳動後、ゲルを、励起源としてアルゴンレーザーを備えるFluorImager 595（Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA）を使用してスキャンした。BODIPY-FL標識新生タンパク質の可視化には、最大励起に最も近値であるために励起源として488 nmを使用し、発光には、530 + / - 30 フィルタを使用した。ゲルは、PMT 電圧 1000 V、さらに100または200ミクロンピクセルサイズのいずれかを使用してスキャンした。
20

【0272】

結果を図29に示す。図から、所望するマーカを含むPCR DNAからタンパク質をインビトロで生産し得ることが理解できる。この実施例の場合は、タンパク質（α-ヘモリジン）は、N末端にC-mycエピトープを有し、さらにC末端にHisX6エピトープを有する。さらに、蛍光レポーター分子であるBODIPY-FLは、タンパク質中に取り込まれる。レーン1：α-ヘモリジンプラズミドDNA対照；レーン2：DNAを含まない対照；レーン3：PCR α-ヘモリジンDNA及びレーン4：ヘモリジンアンバー135 DNA。全てのレーンにおいて上部（T）及び下部（B）バンドは、コムギ胚芽抽出物中にあるいくつかのタンパク質、及び翻訳反応に存在する遊離蛍光tRNAと蛍光tRNAとのそれぞれ非特異的結合に由来する。
30

【0273】

[実施例 22]：プライマーデザイン

本発明を特定のプライマーに限定することは意図していない。新生タンパク質中に究極的にマーカを取り込む目的で、本発明において使用するために、（上記の説明のように）様々なプライマーが考案されている。この実施例は、1）マーカを有するプライマーによるPCR、2）インビトロ翻訳、及び3）新生タンパク質の検出を含む。

【0274】

PCRには、以下のプライマーが使用された：

フォワードプライマー：

【0275】

【数3】

5'GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGAACAAAAATTAATAT
CGGAAGAGGATTTGAATGTTTCTCCATACAGGTCACGGGGA-3'(配列番号13)

リバースプライマー：

【 0 2 7 6 】

【 数 4 】

5'-TTATTAATGATGGTGATGGTGGTG-TTCTGTAGGAATGGTAICTCGTTTTTC-3'

(配列番号14)

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、太字及び下線配列は、C - myc エピトープを含み、イタリック体で示されるヌクレオチドは、 α - ヘモリジン配列の相補領域である。リバースプライマーでは、太字配列は、His - 6 エピトープに対応し、下線配列は、 α - ヘモリジン配列の相補領域に対応する。100 μ l のPCR反応混合物は、100 ng の鋳型DNA、0.5 μ M 各プライマー、1 mM MgCl₂、50 μ l のPCRマスターミックス (Qiagen, CA) 及びヌクレアーゼフリー・ウォーター (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだ。PCRは、ホットリドを取り付けたHybaid Omni-Ethermocyler (Hybaid, Franklin, MA) を使用して、以下の条件で行われた：95 (2分) の後、95 (1分)、61 (1分)、及び72 (2分) から成るサイクルを35回繰り返し、最終伸長は72 で7分行った。PCR産物を次に、Qiagen PCR クリーンアップキット (Qiagen, CA) を使用して精製した。精製PCR DNAは次に様々な翻訳反応に使用し得る。検出は上記に説明されたように行うことができる。

10

20

【 0 2 7 7 】

結局、本発明は、特定の所望するエピトープに基づいて様々なプライマーデザインを考案する (エピトープの例示リストについては表4を参照のこと)。一般的に、エピトープはN末端またはC末端として挿入し得る。さらに、エピトープは、タンパク質中にアフィニティー領域 (すなわち、抗体または他のリガンドと結合する領域) を導入するためにも使用し得る。

【 0 2 7 8 】

[実施例 23] : プライマーをコードするエピトープの抗体検出

これは、アフィニティー領域がタンパク質中に取り込まれその後に検出されるような条件下でインビトロでタンパク質が生産される事例である。実施例は、1) エピトープをコードする配列を含むプライマーによるPCR、2) tRNAの調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

30

【 0 2 7 9 】

1. プライマーをコードするエピトープによるPCR

ヒト結腸由来の全RNA (Clontech, Palo Alto, CA) に、Clontech RT-PCR キットを使用して、ワンステップRT-PCR反応を行った。フォワードプライマー、PTT-T7-P53は、

【 0 2 8 0 】

【 数 5 】

[5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA-TGGGACACCACCATC
ACCATCACGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-GAGGAGCCGCAGTCA
GATCCTAGCGTCGA-3'] (配列番号15)

40

で、リバースプライマー、Myc - P53 - 3' は、

【 0 2 8 1 】

【 数 6 】

[5'-ATTATTACAAATCCTCTTCCGAGATTAATT-TTTGTTCTGAGTCAGGCC
CTTCTGTCTTGAACATG-3'] (配列番号16)

であった。フォワードプライマーにおける下線配列は、T7プロモーター、イタリック体で示されるヌクレオチドは、His-6タグに対応し、太字の配列は、FLAG-エピトープをコードし、残りのプライマーは、P53 DNAの相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、c-Mycエピトープ配列に対応する。

【0282】

10

50 μ lのRT-PCR/PCR反応混合物は、全ヒト結腸RNAを1 μ g、0.5 μ M各プライマー、RT-PCRマスターミックス (Clontech) を43.5 μ l、及びヌクレアーゼフリー・ウォーター (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだRT-PCR/PCRは、PTC-150 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA) で、以下の条件を使用して行った：50 (1時間)、95 (5分)の後、95 (45秒)、60 (1分)、及び70 (2分) から成るサイクルを40回繰り返し、最終伸長を70 で7分行った。PCR産物は、1%アガロースゲルで分析して、PCR増幅DNAは、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。P53の人工C末端トランケート型突然変異体は、リバースプライマー、3' - P53 - Mut が

20

【0283】

【数7】

5'-CTCATTTCAGCTCTCGGAACATC-TCGAAGCG-3' (配列番号17)

である以外は、上記の説明と全く同じ手順を使用して調製された。

2. tRNA 標識

精製 tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応 (100 μ l) は、1500 pM (-1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシル tRNA シンテターゼ (Sigma) を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に0.1容積の3 M酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5容積) を水相に添加し、得られた tRNA ペレットを水に溶解した (35 μ l)。この溶液に、0.5 M CAPS 緩衝液 (pH 10.5) を5 μ l 加えて (最終濃度 50 mM)、その後10 mM BODIPY-FL-SSe 溶液を10 μ l 加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NaOAc (pH 5.0) を加えて、修飾 tRNA を3容積のエタノールで沈降した。沈降物をリボヌクレアーゼフリー・ウォーター 50 μ l に溶解して、Sephadex G-25 ゲル濾過コラム (0.5 $\times$ 5 cm) を通過して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾 tRNA は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70) した。アミノアシル tRNA の修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動 [Varshney, U., Lee, C. P. 及び Raj Bhandary, U. L., J. Biol. Chem. 266, 24712~24718 (1991)、または HPLC [Anal Biochem. 279: 218~225 (2000)] により評価された。

50

【0284】

3. 翻訳

P 5 3 DNA の翻訳 (上記ステップ 1 を参照) は、蛍光 t R N A の存在下 (上記ステップ 2) 、ウサギ網状赤血球翻訳抽出物中で行われた。

4. 検出

いったん翻訳が終了したら、アリコート (5 μ l) を S D S - P A G E にかけて、F l u o r i m a g e r S I (M o l e c u l a r D y n a m i c s , S u n n y v a l e , C A) を使用して、新生タンパク質を目視観察した。目視観察後、ゲルをトランスファースバッファ (1 2 m M トリス、1 0 0 m M グリシン 及び 0 . 0 1 % S D S 、p H 8 . 5) 中に 1 0 分浸した。ゲルからのタンパク質は、次に標準ウェスタンブロッティング・プロトコルにより、B i o R a d 液浸トランスファユニットを 1 時間使用して、P V D F 膜に転移された。転移後、次に転移量をチェックするために、膜をフェロジン (F e r r o z i n e) / 鉄全タンパク質染色を使用して、1 分逆染色し、その後、アンバーブロッキング溶液 (トリス緩衝生理食塩水 (p H 7 . 5) 中、4 . 5 % (容量 / 容量) t e l e o s t e a n ゼラチン、2 % (重量 / 容量) 脱脂粉乳末、0 . 1 % (重量 / 容量) T w e e n - 2 0) を使って 2 時間ブロックして、その後適切に希釈した抗体を加えて、(4 で 1 2 ~ 1 5 時間、定速シェーカー上で) 一晚インキュベートした。F l a g 検出には、2 0 0 0 倍希釈抗 F l a g M 2 抗体 (S i g m a) 、H i s - 6 検出には、5 0 0 倍抗 H i s 6 抗体 (S a n t a - C r u z B i o t e c h , C A) 、及び c - M y c 検出には、5 0 0 倍希釈抗 C - M y c 抗体 (S a n t a - C r u z B i o t e c h , C A) を使用した。

【 0 2 8 5 】

一次抗体インキュベーション後、膜を T B S T (0 . 1 % T w e e n - 2 0 を加えた トリス緩衝生理食塩水、p H 7 . 5) で 4 回 (各 1 0 分洗浄) 洗浄し、適切に希釈した二次抗体 (1 0 , 0 0 0 倍希釈) を加えて、定速シェーカー上、室温で 1 時間インキュベートした。非結合二次抗体は、T B S T で (4 洗浄 / 各 1 0 分) 洗浄され、E C L - P l u s 化学ルミネッセンス検出システム (A m e r s h a m - P h a r m a c i a B i o t e c h , N J) を使用して、プロットを目視観察した。

【 0 2 8 6 】

結果は図 3 0 A 及び 3 0 B に示す。図 3 0 A は、DNA 欠如ネガティブ対照及び p 5 3 DNA を加えた試料をそれぞれ含む、3 複写プロットのゲルからのタンパク質転移後の P V D F 膜の全タンパク質染色を示す。図 3 0 B は、標準化学ルミネッセントウェスタンブロット法を使用して、3 エピトープタグに対する抗体を使用してプローブされた同一プロット (全タンパク質染色は可逆性がある) を示す。矢印は、p 5 3 の位置を示す。

【 0 2 8 7 】

[実施例 2 4] : ガン遺伝子用ゲルベース P T T

タンパク質におけるランケート型突然変異の検出は、R o e s t と共同研究者らにより始めて報告され、V o g e l s t e i n 、K i n z l e r 及び共同研究者らにより、A P C 遺伝子におけるランケート型突然変異の検出に応用された。翻訳タンパク質におけるランケーションは、フレームシフト、スプライシング、及び点突然変異によって起こり、その結果、遺伝子のリーディングフレーム内における終止コドンの出現を生じる。ランケート型ポリペプチドは、放射線標識 (例 : ³⁵S - メチオニン) が存在するインビトロ系においてターゲット遺伝子に対応する DNA の特異的領域を翻訳し、さらに標準 P A G E 法を使用して結果生じたポリペプチドを分析することによって検出し得る。そのようなアプローチは、B R C A 1 / B R C A 2 、A T M 、M H S 2 、M L H 1 を含む様々なガン関連遺伝子におけるランケート型突然変異分析について報告されている。しかし、放射性アイソトープの使用は、検出に必要とされる時間 (5 時間以上) の点から問題があり、これは、高スループット分析には重大である。この理由で、放射能を検出のためのより迅速な手段に置き換えることは非常に好都合であろう。

【 0 2 8 8 】

この実施例では、N 末端タグの使用に基づく迅速ランケーション分析の可能性を実証す

る。本発明は、臨床的意義を持つ広範囲の遺伝子におけるトランケーション突然変異をスクリーニングするための、便利で、正確かつ迅速な方法を供給する。実施例は、1) APC 遺伝子に相補性である配列を有するプライマーによる PCR、2) tRNA の調製、3) インビトロ翻訳、4) 新生タンパク質の検出を含む。

【0289】

1. 臨床試料の PCR

臨床試料は、常染色体優性ガン症候群である家族性腺腫性ポリープ症 (FAP) の特徴である、APC 遺伝子における鎖トランケーションについてのスクリーニングのために、ワシントン大学分子診断学検査室から付託された。ゲノム DNA を分離して、APC 遺伝子の特定領域 (エクソン 15 - セグメント 2) が、まず T7 プロモーターと Kozak 配列を DNA 中に取り込んだプライマーを使用して、PCR により増幅した。フォワードプライマー、T7 - APC 2 は、

10

【0290】

【数 8】

[5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGATGCATGTGGA-ACTTTGTGG-3'] (配列番号 18)

で、リバープライマー、3' - APC 2 は、

20

【0291】

【数 9】

[5'-GAGGATCCATTAGAT-GAAGGTGTGGACG-3'] (配列番号 19)

であった。フォワードプライマーにおける下線配列は、T7 プロモーターであり、イタリック体で示す配列は、効率的な真核性翻訳開始に必要である Kozak 配列に対応する。50 μ l の PCR 反応混合物は、200 ~ 500 ng の 鋳型 DNA (WT または突然変異体)、0.5 μ M 各プライマー、及び 25 μ l の PCR マスターミックス (Qiagen, CA)、さらにヌクレアーゼフリー・ウオーター (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだ。PCR は、ホットリドを取り付けた Hybaid Omni-Ethermocyler (Hybaid, Franklin, MA) を使用して、以下の条件で行われた: 95 (3 分) の後、95 (45 秒)、55 (1 分)、及び 72 (2 分) から成るサイクルを 40 回繰り返し、最終伸長を 72 で 7 分行った。PCR 産物を、1% アガロースゲルで分析して、PCR 増幅 DNA は、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。

30

【0292】

2. tRNA の調製

精製 tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応 (100 μ l) は、1500 pM (-1.0 OD₂₆₀) tRNA、20 mM イミダゾール・塩酸緩衝液 (pH 7.5)、10 mM MgCl₂、1 mM リジン、2 mM ATP、150 mM NaCl 及び過剰量のアミノアシル tRNA シンテターゼ (Sigma) を含んだ。反応混合物を 37 で 45 分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に 0.1 容積の 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.0) を添加して中和し、クロロホルム: 酸フェノール抽出 (1:1) を行った。エタノール (2.5 容積) を水相に添加し、得られた tRNA ペレットを水に溶解した (35 μ l)。この溶液に、0.5 M CAPS 緩衝液 (pH 10.5) を 5 μ l 加えて (最終濃度 50 mM)、その後 10 mM BODIPY-FL-SSe 溶液を 10 μ l 加えた。混合物を 0 で 10 分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 mM

40

50

)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M NAOAc (pH 5.0)を加えて、修飾 tRNA を3容積のエタノールで沈降した。沈降物をリボヌクレアーゼフリー・ウオーター 50 μ l に溶解して、Sephadex G-25 ゲル濾過コラム (0.5 $\times$ 5 cm) を通過して、遊離蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾 tRNA は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (-70) した。アミノアシル tRNA の修飾度は、酸-尿素ゲル電気泳動 (Varshney, U., Lee, C. P. 及び Raj Bhandary, U. L., 1991 J. Biol. Chem 266, 24712 ~ 24718) により評価された。

【0293】

3. 翻訳

PCR 産物 (上記ステップ 1 を参照) を精製しないで、BODIPY リジン・tRNA (上記ステップ 2 を参照) もまた含んでいる、Promega ウサギ網状赤血球 TnT クイックシステムの少量アリコートに直接に加えた。より詳細には、PCR 後、0.5 ~ 1 μ l の PCR 産物を、PCR 産物用ウサギ網状赤血球抽出物 (Promega) を 8 μ l、1 mM 完全アミノ酸ミックスを 0.5 μ l、BODIPY-FL-リジン・tRNA を 1 μ l 含む翻訳反応混合物に直接に添加した。翻訳反応を 1 時間進行させ、反応生成物を 14% SDS-PAGE で分析した。Molecular Dynamics FluorImager を使用して、画像診断を 1 ~ 2 分以下で行った。

【0294】

4. 検出

図 31 は、APC タンパク質のフラグメント内に蛍光標識を取り込むために BODIPY-FL-リジン・tRNA^{lys} を使用した、いくつかの異なるヒトゲノム試料の分析結果を示す。レーン 1 は DNA 欠如対照である。レーン 2 は、野生型 DNA の結果を示し、レーン 3 ~ 8 は、FAP (結腸ガン) を罹患する患者から分離された様々な突然変異型 DNA についての結果を示す。最終レーンは、蛍光分子量マーカーである。図 31 に示すように、WT DNA (レーン 2) は、APC 遺伝子フラグメントのセグメント 2、正常エクソン 15 に対応するバンドを生じる。対照的に、全ての他のレーン (レーン 6 を除く) は、WT バンド及びエクソン 15 - セグメント 2 のトランケート型フラグメントに対応する追加バンドを呈示する。従って、これらの個人は異型接合体性であり、APC 遺伝子中に 1 個の WT 及び 1 個の鎖トランケート型突然変異を担っている。対照的に、レーン 6 の結果は、どちらの遺伝子についても本領域において WT 配列を示す。大学分子診断学検査室が行った、伝統的放射性 PAGE 法を使用する患者試料の分析によっても、同様な結論が独立して得られた。

【0295】

エクソン 15 - セグメント 3 における鎖トランケート型突然変異検出のために、同様な分析が行われた (図 32)。タンパク質は、BODIPY-FL-リジン・tRNA^{lys} と併用してインビトロ翻訳系においてウサギ網状赤血球を使用して合成された。SDS-PAGE による分離後、翻訳されたタンパク質は、蛍光イメージング (図 32A)、または BODIPY フルオロフォアに対するポリクローナル抗体を使用する化学ルミネッセントウェスタンブロッティング法により目視観察された。レーン 1 は DNA 欠如対照である。レーン 2 は、APC 3 野生型 DNA についての結果を示し、レーン 3 は APC 3 トランケート型突然変異体についての結果を示す。レーン 4 は、APC 2 野生型 DNA についての結果を示し、レーン 5 は APC 2 異型接合体性突然変異体についての結果を示す。

【0296】

総合して、これらの結果は、ヒト遺伝性疾患に関連する鎖トランケーションについて、放射性 PTT スクリーニングを、蛍光ベーススクリーニングで置換する可能性を実証する。

[実施例 25]: ガン遺伝子用ゲルフリー PTT

実施例 24 (上記) における蛍光標識による放射能の置換は現在の PTT テクノロジーの改良を示すが、未だにハイスループットスクリーニングへの適用が困難であるゲルの使用に依存している。この理由で、この実施例は、化学ルミネッセント検出の使用に基づく非

10

20

30

40

50

ゲルアプローチを実証する。本アプローチでは、ガン関連タンパク質またはタンパク質由来のポリペプチドフラグメントは、特別にデザインされたプライマーと tRNA を使用して、N 末端、C 末端及びタンパク質の 2 端間に取り込まれた異なる検出及び結合タグを有する対応する遺伝子から、インビトロで発現される。検出及び結合タグは、トランケートしているタンパク質分画またはタンパク質フラグメントを定量する手段を供給し、タンパク質の 2 端間に位置するタグがトランケーション領域を決定するために使用される。例えば、全長タンパク質は、N 及び C 末端タグの両方を含むが、トランケート型タンパク質は N 末端タグのみを含む。タンパク質の 2 端間にあるランダムリジンに取り込まれたタグからのシグナル（鎖内シグナル）は、トランケートフラグメントのサイズに比例して減少するであろう。結合による鎖トランケーションの妨害を回避するために、N 末端に近位にある

10

【0297】

本方法を評価するために、我々は、WT 配列またはトランケート型突然変異のいずれかを含む APC 及び p53 遺伝子で実験を行った。どちらの場合も、ウサギ網状赤血球システムにおけるインビトロ合成中にターゲットタンパク質に一連のマーカを取り込むために、プライマーと特別にデザインされた tRNA の組み合わせを使用した。インビトロ発現後、96 ウェル ELISA プレート内で、プレートに結合されたアフィニティー因子を使用により、発現タンパク質が捕捉された。N 末端、C 末端及び鎖内シグナルの相対量は、次に別の化学ルミネッセントベースのアッセイを使用して測定した。

20

【0298】

1. ガン遺伝子の PCR

A. APC セグメント 3

まず、ゲノム DNA (WT 及び突然変異 APC 遺伝子を有する細胞株から分離されたもの) を以下のプライマーを使用して PCR 増幅した。フォワードプライマー、, PTT - T7 - APC 3 は、

【0299】

【数10】

GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATG-CACCACCATCACCATC
ACGGAGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-GTTTCTCCATACAGGTCA
CGGGGAGCCAAT-3' (配列番号20)

30

で、リバースプライマー、PTT - Myc - APC 3 は、

【0300】

【数11】

[5'-ATTATTACAAATCCTCTTCCGAGATTAA-TTTTGTTCACCTTCTGCCTTCTGT
AGGAATGGTATCTCG-3'] (配列番号21)

40

であった。

フォワードプライマーにおける下線配列は、T7 プロモーター、イタリック体で示されるヌクレオチドは、His - 6 タグに対応し、太字の配列は、FLAG - エピトープをコードし、残りのプライマーは、APC セグメント 3 DNA の相補領域である。リバースプライマーでは、下線配列は、c - Myc エピトープ配列に対応する。50 µl の PCR 反応混合物は、200 ~ 500 ng の 鋳型 DNA (WT または突然変異体)、0.5 µM 各プライマー、及び 25 µl の PCR マスターミックス (Qiagen, CA)、さらにヌクレアーゼフリー・ウオーター (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) 水を含んだ。PCR は、ホットリドを取り付けた Hybaid Omn

50

i - E t h e r m o c y c l e r (H y b a i d , F r a n k l i n , M A) を使用して、以下の条件で行われた：95 (3分)の後、95 (45秒)、55 (1分)、及び72 (2分)から成るサイクルを40回繰り返し、最終伸長を72 で7分行った。PCR産物を、1%アガロースゲルで分析して、PCR増幅DNAは、さらに精製することなく翻訳反応に使用された。

【0301】

B . P 5 3

p 5 3 DNAは、実施例23(上記)に説明するように調製した。

2 . t R N A の 調 製

B O D I P Y - F L - リジン・t R N A^{1 y s} は、実施例23(上記)に説明するように調製した。ピオチンリジン・t R N A^{1 y s} a n d P C - ピオチン - リジン・t R N A^{1 y s} の調製は、以下のように行った。精製t R N A^{1 y s} (S i g m a C h e m i c a l s , S t . L o u i s , M O) をまずにリジンでアミノアシル化した。典型的なアミノアシル化反応は、1500 p M (- 1 . 0 O D₂₆₀) t R N A、20 m M イミダゾール・塩酸緩衝液 (p H 7 . 5)、10 m M M g C l₂、1 m M リジン、2 m M A T P、150 m M N a C l 及び過剰アミノアシルt R N A シンテターゼ (S i g m a C h e m i c a l s , S t . L o u i s , M) を含んだ。反応混合物を37 で45分インキュベートした。インキュベーション後、反応混合物に3 M 酢酸ナトリウムの0.1容積 (p H 5 . 0) を添加して中和し、クロロホルム：酸フェノール抽出 (1 : 1) を行った。エタノール (2 . 5 容積) を水相に添加し、得られたt R N A ペレットを水に溶解した (35 μ l)。この溶液に、0.5 M C A P S 緩衝液 (p H 10 . 5) 5 μ l を加えて (最終濃度 50 m M)、その後ピオチンまたは光開裂型ピオチンのいずれかの10 m M 溶液10 μ l を加えた。混合物を0 で10分インキュベートして、リジンを添加して反応を消光した (最終濃度 = 100 m M)。結果生じた溶液に、0.1容積の3 M N a O A c (p H 5 . 0) を加えて、修飾t R N A を3容積のエタノールで沈降した。沈降物を水 50 μ l に溶解して、S e p h a d e x G - 25 ゲル濾過コラム (0 . 5 × 5 c m) で精製して、遊離「蛍光試薬が残っている場合は、これを除去した。修飾t R N A は、自然解凍を避けるために少量のアリコートにして凍結保存 (- 70) した。アミノアシルt R N A の修飾度は、酸 - 尿素ゲル電気泳動 (V a r s h n e y , U . , L e e , C . P . 及び R a j B h a n d a r y , U . L . , 1991 J . B i o l . C h e m 266 , 2471224718) により評価された。

【0302】

3 . 翻 訳

典型的な翻訳反応混合物 (20 μ l) は、16 μ l の P C R DNA 用 T N T ウサギ網状赤血球抽出物 (P r o m e g a , M a d i s o n , W I)、1 μ l のアミノ酸ミックス (1 m M)、1 ~ 2 μ l の P C R DNA (上記に説明する A P C 及び p 5 3 調製法を参照のこと) 及びリボヌクレアーゼ・フリーウォーター (R n a s e - f r e e w a t e r) を含んだ。蛍光検出には、翻訳反応混合物中に B O D I P Y - F L - リジン・t R N A^{1 y s} が含まれた。翻訳反応は、30 で60分進行させた。

【0303】

4 . 検 出

図33Aは、RT - P C R 中に p 5 3 タンパク質中に取り込まれた鎖トランケーションを検出するためにデザインされた当初の実験の結果を示す。この場合、N末端 F L A G エピトープは、捕捉のために使用され (実験セクションの始めに記載の96ウェル E L I S A プレートを使用する捕捉アッセイの説明を参照のこと)、H i s₆ 及び c - m y c はそれぞれN末端及びC末端マーカーとして使用された。N末端 H i s タグの検出は、ペルオキシダーゼ標識ニッケルキレートベース・検出用プローブ (I n d i a (登録商標) H i s P r o b e - H R P , P i e r c e , R o c k f o r d , I L) を使用して達成された。C末端の検出は、ヒト c - m y c エピトープに対するウサギポリクローナル抗体

の後、ペルオキシダーゼ標識マウス抗[ウサギIgG]二次抗体を使用して達成された。観察されるように、C/N末端シグナル比は、WTと比較してトランケート型タンパク質では約25倍低下される。本アッセイのさらに最適化した結果、1/100突然変異体/WT p53タンパク質のトランケート型突然変異を検出するために十分な感度を得られ、従って非侵襲性結腸ガンスクリーニングへの適用を可能とするにちがいない。

【0304】

二番目の実験(図33B)では、捕捉は、N末端His₆タグで行われ、FLAG及びc-mycはそれぞれN及びC末端マーカーとして使用された。さらに、鎖内光開裂型ビオチンマーカーが、PC-ビオチン-リジン・tRNAをインビトロ混合物中に加えることにより取り込まれた。ビオチン検出は、ペルオキシダーゼ標識NeutrAvidin(登録商標)(Pierce)を使用して達成された。この結果は、WTと比較して、トランケート型p53のC/N比が13倍の低下を示した。さらに、鎖内ビオチンシグナルは、N末端シグナルと比較して、75%低下した。

10

【0305】

三番目の化学ルミネッセントタンパク質トランケーションアッセイは、突然変異細胞株のAPC遺伝子における鎖トランケーション検出のためにデザインされた(図33C)。捕捉は、N末端His₆タグで行われ、FLAG及びc-mycはそれぞれN及びC末端マーカーとして使用された。図33Cに見られるように、トランケート型APCは、C/N比の明らかな低下(1/6)を呈示し、さらに鎖トランケーションの存在を指摘する。

【0306】

結局、これらの実験は、ゲルフリー化学ルミネッセントアプローチを使用して、ガン関連タンパク質における鎖トランケート型突然変異を検出する能力を実証する。

20

[実施例 26]: 蛍光免疫沈降法

本実施例では、免疫沈降法におけるフルオロタグtRNAの使用を説明する。本実験では、標識tRNAの存在において、いったん新生タンパク質が合成されると、特異的抗体を使用して、それはプロテイン-Gビーズ上に捕捉された。全ての他(非結合)物質は除去される。所望する結合タンパク質は、次にSDS-処理によってビーズから遊離され、さらにPAGEにより分析される。

【0307】

p53タンパク質をコードするPCR DNA、またはα-ヘモリジンをコードするプラズミドDNA(以前の実施例に説明するように調製された)のいずれかを使用して、インビトロ翻訳が行われた。翻訳反応後、等量の10%SDS(重量/容量)を反応混合物に加え、試料を5分煮沸した。試料をIP緩衝液(1%Triton X-100を添加したトリス緩衝生理食塩水)で希釈し、2μgの抗p53抗体(SantaCruz Biotech, CA)または抗-HL抗体(Sigma, St. Louis, MO)のいずれかを加えて、混合しながら4℃で数時間インキュベートした。ネガティブ対照として、非特異的IgG抗体を使用して免疫沈降法を行った。抗体のインキュベーション後、プロテイン-Gビーズ(Pierce, IL)を反応混合物に加えて、さらに定速混合を加えながら1時間インキュベートした。ビーズを次にペレット化して、0.1%SDSを加えたTBSで3回洗浄した。最後にビーズを、50μlのSDSゲル・ローディングバッファー中に懸濁して、5分煮沸した。SDS-PAGEは、Laemmli(Laemmli, U.K., 1970, Nature, 277, 680~685)に従って行った。

30

40

【0308】

ゲルを、励起源としてアルゴンレーザーを備えるFluorImager 595(Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA)を使用してスキャンした。BODIPY-FL標識新生タンパク質の可視化には、最大励起及び発光に最も近値であるために励起源として488 nmを使用した(我々は530+/30フィルタを使用した)。ゲルは、PMT電圧1000V、さらに100または200ミクロンピクセルサイズのいずれかを使用してスキャンした。

50

【0309】

図34は結果を示す。レーンMは蛍光マーカを含む。レーン1はDNA欠如対照(+抗HL抗体)である。レーン2は、HL DNA + マウスIgGについての結果を示す。レーン3は、HL DNA + 抗HL抗体についての結果を示す。レーン4はDNA欠如対照(+抗P53抗体)である。レーン5は、p53 DNA + マウスIgGについての結果を示す。レーン6は、p53 DNA + 抗p53抗体についての結果を示す。免疫沈降法は、特有な結果かつ実質的なバックグラウンドなしに極めて明晰なシグナルを供給する。

【0310】

[実施例 27]: サプレッサー tRNA

BODIPY 標識開始 tRNA を使用する際、内在性開始 tRNA (非標識) 間に競合を生じ、標識の取り込み低下を起因する。この競合を克服するために、本発明は、アンバー終止コドン及び対応するサプレッサー tRNA の使用を考案する。

1. BODIPY - バリン - pdc pA の調製

第一ステップは、サプレッサー tRNA への付着用の BODIPY - アミノ酸抱合体の調製を含む。この合成は図35に示す。合成は、5 - メチル - 1 (2 - ニトロフェニル) エタノール (化合物 2) の調製から始まる。まず、5 - メチル - 2 - ニトロアミノアセトフェノン (Olejnik, J., S. Sonar, E. Krzymanska-Olejnik, 及び K. J. Rothschild. 1995 Proc Natl Acad Sci U S A. 92:7590~4; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik, 及び K. J. Rothschild. 1998. Methods Enzymol. 291:135~54) を 5 ml のエタノールに溶解した。この溶液に、分析 TLC が 5 - メチル - 1 (2 - ニトロフェニル) エタノールへの完全転化を示すまで、5 mg の水素化ホウ素ナトリウムを少量ずつ添加した。反応は、5 ml のアセトンを加えることにより停止し、1 N HCl で pH = 3.0 に酸性化後、クロロホルムで抽出した。有機層を乾燥し、黄色様油としてターゲット化合物が得られるまで蒸発した。この化合物はさらに精製しないで使用された。

【0311】

合成機構を継続して、5 - メチル - 1 (2 - ニトロフェニル) エタノール (350 mg; 1.95 mM) (化合物 2) を、10 ml のアセトニトリルに溶解した。この溶液に、407 μ l のトリエチルアミン (1.5 当量) を加えた後、N, N' - ジスクシンイミド炭酸塩 (750 mg, 1.5 当量) を加えた。反応混合物を分析 TLC (シリカゲル、クロロホルム) が化合物 3 への定量的転化を示すまで、室温で攪拌した。結果生じる溶液を、バリンのトリエチルアンモニウム塩溶液に直接に添加した。

【0312】

バリン (218 mg; 1.86 mM) を、2 ml の水に懸濁して、これに 260 μ l のトリエチルアミンを加えた。この溶液に、化合物 3 の溶液を 15 分間に x x 加えて、この間に混合物の pH 値を、必要に応じて、トリエチルアミンを添加することにより調整した。混合物を 30 分攪拌して、0.1 N HCl を 10 ml 添加することにより酸性化した後、3 x 20 ml AcOEt で抽出した。有機層を合わせて、乾燥して、乾燥状態まで蒸発した。粗生成物を 20 ml のクロロホルムに溶解し、0.1 N NaHCO₃ 4 x 30 ml で抽出し、水相を酸性化し、クロロホルムで再抽出して、純正ターゲット Npe - バリン (化合物 4) 320 mg を得た。

【0313】

Npe - バリン (化合物 4) (320 mg, 1 mM) を 320 μ l のアセトニトリルに溶解した。この溶液に、トリエチルアミン (280 μ l, 2 当量) 及びクロロアセトニトリル (190 μ l, 3 当量) を加えた。混合物を室温で一晩攪拌した。20 ml の塩化メチレンを加えた後、20 ml の 1 N NaHSO₄ を加え、混合物を 4 x 20 ml 塩化メチレンで抽出した。有機物は乾燥するまで蒸発し、ヘキサン (10 ~ 50 %) 中の酢酸エチルのステップ勾配を使用して、シリカゲルカラムで精製し、純正生成物 (化合物 5) を 300 mg 得た。

【0314】

テトラブチルアンモニウム対イオンの2.2当量を含むpdCpA (Annovis) の20 ODを、40 μ lの乾燥DMFに溶解した。この溶液に、10 μ l DMF中でNpe - バリン - COOCH₂CN (0.66 mg)の2当量を含む溶液を加えた。反応を室温で2時間維持し、次に生成物を分離用HPLCを使用して分離し、15 ODの化合物6を得た。

15 OD₂₆₀のNpe - バリン - pdCpAを、500 μ lの25 mM NaOAc (pH = 4.5)に溶解し、365 nm光線 (Black Ray XX - 15、UV P)を使用して20分照射した。166 μ lのBODIPY - FL - SE (@10 mg / ml ; 7当量、が添加された)後、140 μ lの1N NaHCO₃を加えた。BODIPYFLSE溶液の他の部分(2 x 166 μ l、合計21当量)を5分、10分後にそれぞれ加え、さらに反応混合物を室温で45分渦を巻くように混合した。生成物(化合物7)を、分離用HPLC Novapak C18 (10 x 100 mm、50 mM TEAA中のアセトニトリルの直線勾配 (pH 5.4)で90分、速度ml/min)を使用して分離し、260及び505 nmにおける吸光によりキャラクタライズした。収率 7.25 OD₂₆₀。

【0315】

2. アンバー・サプレッサー fMet - tRNA の発現及び精製
突然変異型 tRNA^{fmet} (遺伝子を含む nusA オペロンの PstI フラグメント (S. Ishi et al. PNAS v. 81, pp 409 ~ 413, 1984)を、pGEM4ベクター (Promega, Madison, WI)中にクローンした。E. coli XL-blue 2細胞の一晩培養液(100 ml)から、フェノール抽出及びエタノール沈降により全tRNAを分離した。サプレッサー tRNA^{fmet}を、天然PAGE (Seong 及び Raj Bhandary, PNAS v. 84 pp. 334 ~ 338, 1987)を使用して精製した。

【0316】

3. ヘビ毒ホスホジエステラーゼ I (VPDI)によるtRNAトランケーション (図36)

1 OD₂₆₀の精製開始サプレッサー tRNAを、50 μ lの50 mM トリス・塩酸 (pH 7.5) ; 10 mM MgCl₂ 及び 100 mM NaClに溶解した。この溶液に、0.5ユニットのVPDIを加え、さらに混合物を0で30分インキュベートした。フェノール抽出後、tRNAをEtOHで沈降、乾燥して、さらに100 μ lの水に溶解した。3'末端からの選択的(-CA)ジヌクレオチド除去を、8%、7Mの尿素PAGE分析で確認した。

【0317】

4. トランケート型開始サプレッサー tRNAを有するBODIPY - バリン - pdCpAによる連結

図36の機構に示すように、tRNAは、連結反応において、BODIPY - アミノ酸抱合体で電荷される。0.5 OD₂₆₀のtRNAに、100 μ lのリゲーションバッファー(50 mM トリス・塩酸 (pH 7.8) ; 10 mM MgCl₂ ; 10 mM DTT ; 1 mM ATP 30%のDMSO)中の0.5 OD₂₆₀ユニットのpdCpA及び200ユニットのT4 RNA リガーゼ (New England Biolabs, Beverly, MA)を加えて、37で1時間インキュベートした。インキュベーション後、tRNAを3~4容量のEtOHで沈降し、50 μ lの水に溶解して、G25 MicroSpinカラム (Amersham Pharmacia Biotech Inc.)を使用して、スピン濾過を行った。結合tRNAをアリコートに分けて、-70で保存した。生成物は、開始/アンバーサプレッサー tRNAと言及される。

【0318】

5. 翻訳及び分析

翻訳は、20 μ l 総量の無細胞 E. coli S30 抽出物 (Promega, Madison, WI) 中において行った。混合物は、特定のタンパク質 (1 μ g) をコードする DNA 及び化学的アミノアシル化によって調製された開始アンバーサプレッサー tRNA (1 μ g) を含んだ。混合物を 37 で 1 時間インキュベートし、次に 1 μ l をローディングバッファーと混合して、加熱変性してから 14% SDS-PAGE (150 V、1 時間) にかけた。ゲルを次に簡単にリンスして、BODIPY 標識の場合は、Fluoromager を使用して分析した。PC-ビオチンの場合は、ゲルを PVDF 膜上にブロットして、ストレプトアビジン-HRP を使用してビオチンを検出した。

【0319】

図 37 は結果を示す。レーン 1 は DNA 欠如対照 + BODIPY - バリン・開始 / アンバーサプレッサー tRNA である。レーン 2 は、ルシフェラーゼ DNA + BODIPY - リジン・tRNA についての結果を示す。レーン 3 は、アンバー - 1 ルシフェラーゼ DNA + BODIPY - リジン・tRNA を示し、レーン 4 は、アンバー - 1 ルシフェラーゼ DNA + BODIPY - バリン・開始 / アンバーサプレッサー tRNA についての改良された結果を示す。

10

【0320】

レーン 5 は、ヘモリジン DNA + BODIPY - リジン・tRNA についての結果を示す。レーン 6 は、アンバー - 1 ヘモリジン DNA + BODIPY - リジン・tRNA を示し、レーン 7 は、アンバー - 1 ヘモリジン DNA + BODIPY - バリン・開始 / アンバーサプレッサー tRNA についての改良された結果を示す。

20

レーン 8 は、DHFR DNA + BODIPY - リジン・tRNA についての結果を示す。レーン 9 は、アンバー - 1 DHFR DNA + BODIPY - リジン・tRNA を示し、レーン 10 は、アンバー - 1 DHFR DNA + BODIPY - バリン・開始 / アンバーサプレッサー tRNA についての改良された結果を示す。

【0321】

[実施例 28] : 薬物 - プロテオーム・スクリーニング

ヒトゲノムプロジェクトの完了は、創薬における新しい時代を開幕する。薬物ライブラリーが一つのタンパク質に対してスクリーンされる従来の方法とは対照的に、今では全プロテオームのスクリーニングが利用可能である。しかし、そのような薬物 - プロテオームスクリーニングは、ゲノムのプロテオームへの迅速な転換、特別標識タンパク質の工作及び 1 時間あたりに何千もの試料のスクリーニングを必要とするために、従来のテクノロジーを使って達成することは困難である。

30

【0322】

本発明は、無細胞発現標識タンパク質及び 2D マイクロアレイ法を使用して、薬物 - タンパク質の相互作用をスクリーニングすることにより、このような限界を排除することを目的とする方法及び組成物を供給する。本発明は、上記に説明する標識及びマーカー (例：蛍光及びアフィニティタグ) を、その無細胞発現中にタンパク質中に取り込むことを考案する。蛍光タグ (例えば、N 末端部、C 末端部、タンパク質内及び / あるいはタンパク質を通して) は、タンパク質発現をモニタし、さらに薬物候補化合物との相互作用を検出する手段を供給する。アフィニティタグは、無細胞発現タンパク質を、無細胞溶解質から迅速に分離する手段を供給する。ヒトプロテオームの全てあるいは一部を反映する、無細胞発現タンパク質の 2D マイクロアレイ上で行われる薬物スクリーンは、高感度検出、ハイスループット及び必要とする試料容量が低いシステムを供給する。

40

【0323】

本発明によるプロテオミックスクリーニングアッセイは、リード薬物化合物とスクリーニングを受ける全プロテオーム (あるいはプロテオームの一部) 間の起こり得る相互作用を許すことにより、創薬プロセスを著しく加速する。そのような情報は、薬物作用の分子的基础を探索し、薬物相互作用マップを構築することにより薬物の起こり得る副作用を同定するために価値がある。

【0324】

50

薬物相互作用マップは、特定化合物（例：リード薬物）のヒトプロテオームとの相互作用についての情報を供給する。薬物相互作用マップを確立するためには、一連のプラスミド cDNA プールから構成されるフォーマット化された cDNA ライブラリを使用して、系統的発現と全プロテオームの標識を可能とする方法が考案される。約 50 プラズミドまたはそれ以下（より好ましくは約 40 プラズミドまたはそれ以下、さらには約 30 プラズミドまたはそれ以下、さらに最も好ましくは 25 プラズミドまたはそれ以下）から成る各プールを、無細胞反応混合物（例：Promega TnT ウサギ網状赤血球発現システム）中で同時発現する。タンパク質は、tRNA で翻訳中に取り込まれた PC-ビオチンのようなリンカーを使用して、混合物からアフィニティー精製される。発現タンパク質を次に、表面に不活化試験薬物化合物を有する表面（例：ビーズまたはスライド）に曝す。各プール由来の 1 またはそれ以上のタンパク質の相互作用を次に、取り込まれた蛍光標識を使用して検出する。薬物化合物と相互作用するプール由来の特定のタンパク質のアイデンティティーを次に、プラスミドプールをサブグループに分割する手順または不活化タンパク質のマイクロ分析のいずれかを使用して決定する。他方、各プール中にある発現タンパク質を、取り込まれているアフィニティータグを使用して固体媒質中に移動する。タンパク質の各プールを 2D アレイ上に配列して、標識ビーズ上に不活化されている化合物で審問する。ハイスループットスクリーニングは、2D マイクロアレイと DNA ベースマイクロチップと同様な蛍光イメージャーを使用して達成し得る。

10

【0325】

放射性標識による従来の方法と比較する、取り込まれた蛍光及び／またはアフィニティーマーカーのような非放射性マーカーを有する無細胞発現タンパク質使用の重要な利点は、新生タンパク質の迅速な分離及びハイスループット分析に必要とされる感度を備える迅速な検出実行能力である。このアプローチは、放射性検出が予め含まれている 2D マイクロアレイの場合は特に好都合である。さらに、cDNA によりコードされている各タンパク質が、検出に十分なレベルで発現するために、各プール中のプラスミド数を限定すること（例えば、50 以下）は重要である。プラスミドプールを発現するために、大量の反応混合物（例えば、1 ml）を常に利用し得るが、大量反応は実用的プロテオミックスクリーニングには法外に価格が高い。例えば、2000 の 1 ml 反応量の利用には、2000 プラズミドプールを発現する必要がある。TnT ウサギ網状赤血球の現在の市販価格を使用すると、これは約 \$ 800,000 となる。対照的に、2D マイクロアレイフォーマットと使用できる少量 50 マイクロリットル反応は、\$ 20,000 のみですむ。米国特許第 5,654,150 号（本明細書に参考文献として編入）に説明されるようなインビトロ発現クローニングの初期の方法は、約 100 の個別細菌コロニーから成るプールの収集及びプール中の cDNA によってコードされているタンパク質のインビトロにおける発現に基づいている。このアプローチは、米国特許第 4,675,285 号（参考文献として編入）に説明されるようなさらに初期（非インビトロ）の発現クローニング方法の改良を示すが、それでも、一般的には本発明によって供給されるような薬物-プロテオミックススクリーニングを実施するための十分な感度を有する方法を供給しない。薬物-プロテオミックススクリーニングの他に、本発明はさらにプロテオームと DNA 及び他のバイオ分子との相互作用の迅速なスループットスクリーニングを可能とする。

20

30

40

【0326】

薬物-プロテオミックススクリーニング用の 2 つの異なる関連アプローチが考案され、そのどちらも 2D アレイまたはマイクロアレイの利用、蛍光、ルミネッセンス、化学ルミネッセンス、吸光または電磁検出（直接的または間接的）による他の手段を使用する検出に基づく。図 38 に示すように、第一アプローチは、プラスミドのプールから生産された無細胞発現タンパク質を利用し、これはフォーマット化されたゲノムライブラリーを含む。反応混合物中に、発現タンパク質よりもはるかに高レベルで存在する既存のタンパク質からの妨害を排除するために、取り込まれたアフィニティータグ及び表面上にコートされた相補性捕捉分子を使用する、プレ精製ステップが必要であり得る。発現タンパク質を含む個々のプールからの各試料を次に、不活化ターゲット薬物を含む表面上にスポット添加する

50

。次に取り込まれている蛍光マーカーを使用して、タンパク質を含み、ターゲット薬物と相互作用をする試料を同定する。他方、取り込まれているアフィニティマーカーと相互作用する蛍光標識分子（例：抗体）を使用してもよい。一つの好ましい実施態様では、ビオチンがアフィニティマーカーとして使用され、これはストレプトアビジン - 西洋ワサビペルオキシダーゼ（HRP）複合体と反応して、反応を触媒して、検出可能なシグナル（例：化学ルミネッセントまたは蛍光）を生じる。

【0327】

特定のスポットからの蛍光検出により、ターゲット薬物との相互作用を呈示するタンパク質プールがいったん同定されたら、様々な手順を使用して、実際に相互作用するタンパク質を同定することができる。一つの方法は、プール内の個々のプラスミドの再形質転換後、蛍光タグまたはアフィニティタグの存在において各個別プラスミド由来のタンパク質をインビトロ発現することに基づく。これに代わるアプローチは、陽性蛍光を示すスポット由来の実際の結合タンパク質を回収し、さらに質量分析または化学的手段のいずれかを使用して配列分析を行うことである。

10

【0328】

薬剤 - プロテオームスクリーニングのための第二の関連アプローチがさらに考案されている（図39）。この場合は、プラスミドプールから生産された無細胞発現タンパク質を含む試料をまず表面に結合し、次に蛍光部分と抱合されている特定のターゲット薬物で審問することである。取り込まれたアフィニティタグは、インビトロ発現タンパク質を、アフィニティタグと相互作用する捕捉分子を含む特別に調製された表面に結合するために使用される。取り込まれたフルオロフォアは、表面結合をモニタするために使用される。ターゲット薬物結合は、デュアル波長蛍光検出法、あるいはその代わりに、タンパク質と結合薬物が近隣位置にあることを確定する、蛍光共鳴エネルギー転移法を使用して検出される。薬物 - タンパク質複合体相互反応を確認するための下流分析、及びさらに薬物またはタンパク質のアイデンティティの質量分析のために、光開裂型ビオチンリンカーを使用して、薬物 - タンパク質複合体をさらに遊離し得る。

20

【0329】

上記に説明するどちらのシナリオでも、各プール毎に約50プラスミドを含む2000の個別プラスミドプールを構成すると推定される、ゲノムライブラリーの平行発現は、迅速な薬物 - プロテオーム分析実施の基礎を提供する。例えば、反応ウェル（各50 μ l）の既定フォーマットセット及びプラスミドセットを使用して、全平行発現反応を1時間以内に達成することができた。各試料からの発現タンパク質の精製は、適切な装置（例えば、ロボットアーム操作による96ウェル・ピペッター）が利用される場合は、さらに極めて迅速であり得た。例えば、ピペットフィルターチップが、インビトロで取り込まれた光開裂型タグ（例えば、ビーズに結合されたストレプトアビジン）を介して、捕捉用のアフィニティ媒質を含むように調製することが可能であり、後続する遊離には光線が使用され得る。

30

【0330】

どちらのシナリオでも、試料は、その後の薬物 - タンパク質蛍光アッセイのために、迅速に表面に移動され得る。例えば、ターゲット薬物でコートされたスライドの場合は、125 μ m 解像度スポットサイズを提供する、Affymetrix 417 アレイヤー（arrayer）のような市販のアレイヤーを使用して、個々の試料をスポットし得る。原則として、5倍の重複性を有する全プロテオームを10分以内に配列するために、一枚の顕微鏡用スライドで十分である。スポットサイズを大型にしたり、または重複性を増加するとスライド数が増えるが、それでもなお配列プロテオームの全調製は迅速であり、ハイスループットプロセッシングが可能である。「全プロテオームが一枚のスライドの上にある」コンセプトは、そのようなスライドの迅速な製造は、薬物ライブラリーに対する全プロテオームのスクリーニングを可能とするために、特に魅力的である。

40

【0331】

上記に説明するフォーマットでは、蛍光2Dマイクロアレイリーダーを使用して、迅速な

50

リードアウト（読み取り）を達成し得る。例えば、Affymetrix 418 スキャナーは、約10分以内に全スライドをスキャンすることが可能であり、3色画像を実施し得る。さらには、アレイリーダーは高精度（10ミクロン）、速度（18 mm/min）及び感度（1平方ミクロン当たり1個以下のCy3色素分子>3.5 S/N）を提供する。

【0332】

本発明によるスクリーニングアッセイを評価するために、試験タンパク質ジヒドロフォレートレダクターゼ（還元酵素）（DHFR）中へのPC-ビオチンまたはBODIPYの取り込みを含む実験を行った。実験は、インビトロ合成中にDHFR中に取り込まれたPC-ビオチンまたはBODIPYマーカが、正常リガンドがジヒドロフォレートであるDHFRの競合インヒビターである、小型リガンドのメトトレキセートとの相互作用をアッセイするために使用し得るか否かを評価することを目的とした。メトトレキセートは、細胞生長率を低下し得るために、化学療法における抗ガン薬として広く使用されている。

10

【0333】

一つのアッセイでは、PC-ビオチンは、PC-ビオチン-リジン・tRNAの存在におけるS30でのインビトロ発現中に、DHFR中に取り込まれた。発現後、粗混合物をメトトレキセートでコートされたアガロースビーズに曝した。十分な洗浄後、DHFRのビーズへの特異的結合を、ストレプトアビジン-HRPを使用してアッセイした。図40に見られるように、PC-ビオチン-リジン・tRNAが発現系に含まれる場合にのみ、シグナルが得られた。結合前にUV光線に露光させると、対照レベルに関するシグナルが破壊され（データの表示なし）、自動化アッセイ中にバックグラウンドレベルを測定するための便利な方法を提供する。

20

【0334】

二番目の実験では、均質溶液アッセイとして、DHFRとメトトレキセートとの相互作用を検出するために、毛管電気泳動（CE-LIF）を使用した。この場合は、BODIPY-fmet・tRNAを使用するインビトロ合成中に、BODIPYは、DHFRのN末端部に取り込まれた。遊離DHFRの電気泳動画像は、2.9分にピークを呈示した（データの表示なし）。比較として、室温で30分メトトレキセートとプレインキュベートされたDHFRの電気泳動画像は、2.8分に広幅ピークを呈示した（データの表示なし）。移動時間の変化は、DHFRとメトトレキセート間の複合体形成に帰因する。

30

【0335】

実験の第三シリーズでは、抗体を使用して、インビトロ発現されたターゲットタンパク質を選択的に結合及び検出する能力を調査した。この目的では、PC-ビオチンが、プールされたヒトmRNA試料のRT-PCR後に、PC-ビオチン-リジン・tRNAを使用して、ウサギ網状赤血球溶解質中で発現されたp53中に取り込まれた。このタンパク質は、次に野生型及び突然変異型コンフォメーションを認識する、モノクローナル抗体クローンBP53-12（Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA）を使用して、ELISAプレート上で特異的に捕捉された。ネガティブ対照としては、p53特異的抗体の代わりに、同量の免疫前マウスIgGが捕捉用に使

40

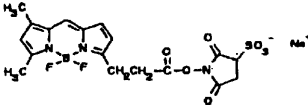
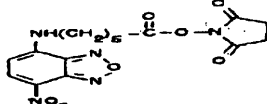
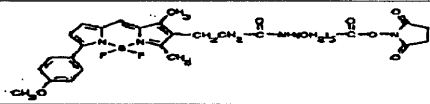
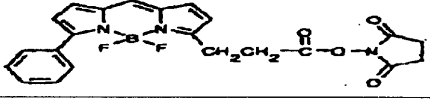
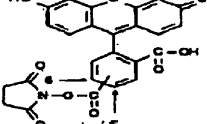
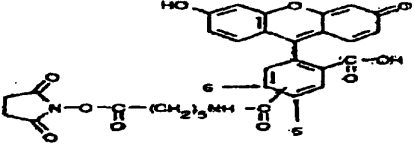
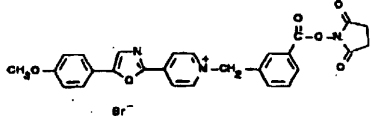
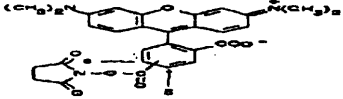
【0336】

本発明による他の実施態様及び用途は、本明細書に発表される発明に関する明細と実施を考慮することにより、当業者には明確であろう。明細及び実施例は典型としてのみ考察されることを意図し、本発明による特定の実施態様の範囲は、以下の請求により指示される。

50

【 0 3 3 7 】

【 表 2 】

名称及び分子量	化学式	蛍光特性
BODIPY-FL, SSE MW: 491		励起=502 nm 発光=510 nm 吸光度=75,000
NBD MW: 391		励起=466nm 発光=535 nm 吸光度=22,000
Bodipy-TMR-X, SE MW: 608		励起=544 nm 発光=570 nm 吸光度=56,000
Bodipy-R6G MW: 437		励起=528 nm 発光=547 nm 吸光度=70,000
フルオレセイン (FAM) MW: 473		励起=495 nm 発光=520 nm 吸光度=74,000
フルオレセイン (SFX) MW: 587		励起=494 nm 発光=520 nm 吸光度=73,000
PyMPO MW: 582		励起=415 nm 発光=570 nm 吸光度=26,000
5/6-TAMRA MW: 528		励起=546 nm 発光=576 nm 吸光度=95,000

10

20

30

【 0 3 3 8 】

【 表 3 】

酵素／タンパク質	-FluoroTag TM tRNA 翻訳反応	+ FluoroTag TM tRNA 翻訳反応
α - ヘモリジン OD _{415nm} /μl	0.085	0.083
ルシフェラーゼ RLU/μl	79052	78842
DHFR Δ OD _{339nm} /μl	0.050	0.064

40

【 0 3 3 9 】

【 表 4 】

様々なエピトープ及びその配列

名称	アミノ酸配列	ヌクレオチド配列 (5'→3')
His-6	HHHHHH	CATCACCATCACCATCAC
FLAG	DYKDDDDK	GACTACAAGGACGACGACGACAAG
c-Myc	EQKLISEEDL	GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG
Strep-Tag	WSHPQFEK	TGGAGCCACCCCCAGTTCGAGAAG
Amber-16	CSPFEVQVSPEA GAQK	TGCAGCCCCCTTCGAGGTGCAGGTGAGCCCCGAGGCCGGCGCC CAGAAG
T7-Tag	MASMTGGQMG	ATGGCCAGCATGACCGGCCGCCAGCAGATGGGC
VSV-G ⁺ -Tag	YTDIEMNRLGK	TACACCGACATCGAGATGAACCGCCTGGGCAAG
HA ⁺ -Tag	YPYDVPDYA	TACCCCTACGACGTGCCCCGACTACGCC
Protein-C Tag	EDQVDPRLIDGK	GAGGACCAGGTGGACCCCCGCCTGATCGACGGCAAG
HSV ⁺ -Tag	QPELAPEDPED	CAGCCCGAGCTGGCCCCCGAGGACCCCGAGGAC

10

20

: 水疱性口内炎ウイルス (Vesicular Stomatitis Virus) 糖タンパク質

* : 赤血球凝集素

\$: 単純疱疹ウイルス (Herpes Simplex Virus) 糖タンパク質

【図面の簡単な説明】

30

【図 1】

(A) アミノ酸及び (B) ペプチドの構造を示した図。

【図 2】

細胞または無細胞系におけるタンパク質合成中に生じる分子的ステップの説明を示した図。

【図 3】

(A) tRNA 分子、及び (B) tRNA のアミノアシル化に含まれるアプローチの構造を示した図。

【図 4】

蛍光マーカーアミノ酸を使用する、新生タンパク質検出方法を示した図。

40

【図 5】

ゲル電気泳動及び UV 照射を使用する新生タンパク質の検出に適切な蛍光特性を有する、2 種類の異なるマーカーアミノ酸、ダンシルリジン (機構 1) 及びクマリリン (機構 2) の合成及び tRNA へのミスアミノアシル化の機構を示した図。

【図 6】

(A) 2 - ニトロベンジル部分を含む化合物を示し、(B) ニトロベンジル結合からの基質の切断を示した図。

【図 7】

光開裂型マーカーの実例を示した図。

【図 8 A】

50

C B の化学的変異を示した図。

【図 8 B】

可能なアミノ酸結合を示した図。

【図 9】

P C B の光分解を示した図。

【図 10】

タンパク質を分離することなく、無細胞タンパク質発現系において、新生タンパク質の生産をモニタする方法の概略表示。

【図 11】

(A) レポーター特性を有する非天然アミノ酸の実例を提供し、(B) タンパク質合成におけるレポーターの関与を示し、(C) レポーターの合成を示したず。 10

【図 12】

光開裂型ビオチンの構造成分を示した図。

【図 13】

新生タンパク質の N 末端でのマーカの導入方法の概略表示した図。

【図 14】

新生タンパク質におけるマーカの検出及び分離方法の説明を提供した図。

【図 15】

P C B - リジン合成の一つの実施態様におけるステップを示した図。

【図 16】

t R N A ミスアミノアシル化の実験的ストラテジーを提供する。 20

【図 17】

(i) デオキシシチジン保護、(i i) アデノシン保護、及び(i i i) ジヌクレオチド合成を含む、ジヌクレオチド合成を例示した図。

【図 18】

マーカアミノ酸を使用するジヌクレオチドのアミノアシル化を示した図。

【図 19】

ジピロメテンニフッ化ホウ素(4 , 4 - ジフルオロ - - ポラ - 3 a , 4 a - ジアザ - s - インダセン : 4 , 4 - d i f l u o r o - 4 - b o r a - 3 a , 4 a - d i a z a - s - i n d a c e n e) 色素の構造を示した図。 30

【図 20】

翻訳中ヘモリジン中への様々な蛍光分子の取り込みを示すゲルの写真。

【図 21 A】

様々なタンパク質中への B O D I P Y - F L の取り込みを示す。レーザーベースの M o l e c u l a r D y n a m i c s F l u o r I m a g e r 5 9 5 を使用して可視化された結果を示す。

【図 21 B】

様々なタンパク質中への B O D I P Y - F L の取り込みを示す。UV トランスイルミネーターを使用して可視化された結果を示す。

【図 22 A】

蛍光標識の経時変化を示す。 40

【図 22 B】

翻訳混合物の様々なアリコートの S D S - P A G E 結果を示し、系の感度を実証する。

【図 23 A】

本発明による方法に従って、新生タンパク質中に導入された N 末端マーカのゲルフリー定量法を示す棒グラフ。

【図 23 B】

本発明による方法に従って定量された、新生タンパク質の C 末端マーカのゲルフリー定量法を示す棒グラフ。

【図 24】

プロテアーゼ処理及び未処理タンパク質のゲル結果を示した図。

【図 2 5】

R B C 処理及び未処理タンパク質のゲル結果を示した図。

【図 2 6 A】

ミスアミノアシル・リジン - t R N A^{1 y s} を使用する、E . c o l i 翻訳系における α - ヘモリジンへの様々な蛍光分子の取り込みを示すゲルである。

【図 2 6 B】

ミスアミノアシル・リジン - t R N A^{1 y s} を使用する、T n T コムギ胚芽系におけるルシフェラーゼへの様々な蛍光分子の取り込みを示す。

【図 2 7】

t R N A - クマリン誘導体を含む、様々な蛍光 - t R N A の存在下で行われた α - H L のインビトロ翻訳のゲル結果を示す。

【図 2 8 A】

毛管電気泳動による易動度シフト結果を示す。

【図 2 8 B】

毛管電気泳動による易動度シフト結果を示す。

【図 2 9】

3 つのマーカーが新生タンパク質中に導入された、インビトロ翻訳結果のゲル結果である。

【図 3 0 A】

インビトロ翻訳・トリプルエピトープタグ野生型 p 5 3 (R T - P C R 由来 D N A) のウェスタンブロット分析を示す。総タンパク質染色を示す。

【図 3 0 B】

インビトロ翻訳・トリプルエピトープタグ野生型 p 5 3 (R T - P C R 由来 D N A) のウェスタンブロット分析を示す。ウェスタンブロット分析を示す。

【図 3 1】

A P C エクソン 1 5、セグメント 2 のゲルベース P T T の結果を示す。

【図 3 2 A】

ウェスタンブロットティングによる、インビトロ翻訳・B O D I P Y 標識タンパク質検出を示す。蛍光イメージング (画像法) による結果を示す。

【図 3 2 B】

ウェスタンブロットティングによる、インビトロ翻訳・B O D I P Y 標識タンパク質検出を示す。ウェスタンブロットティングによる結果を示す。

【図 3 3 A】

p 5 3 と A P C のゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーション アッセイの結果を示す 3 棒グラフを示す。N 末端 F L A G エピトープに対するマウスモノクローナル抗体を使用することにより、生成物が 9 6 ウェル E L I S A プレートフォーマット中に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産された p 5 3 の結果を示す。

【図 3 3 B】

p 5 3 と A P C のゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーション アッセイの結果を示す 3 棒グラフを示す。ニッケルキレートプレートを使用することにより、生成物が 9 6 ウェル E L I S A プレートフォーマット中に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産された p 5 3 の結果を示す。

【図 3 3 C】

p 5 3 と A P C のゲルフリー化学ルミネッセントタンパク質トランケーション アッセイの結果を示す 3 棒グラフを示す。生成物がニッケル金属キレート 9 6 ウェル E L I S A プレート上に捕獲される、インビトロ翻訳によって生産された A P C の結果を示す。全ての野生型 N 及び C 末端シグナルは、突然変異型 N 末端シグナルと同様に 1 0 0 % に正規化された。

【図 3 4】

10

20

30

40

50

p 53 とヘモリジンについての免疫沈降結果を示すゲル。

【 ㄨ 3 5 】

B O D I P Y - バリン - p d C p A の調製についての合成機構を概略的に示した図。

【 図 3 6 】

tRNAへの図35のBODIPY-バリン-pdCpA抱合体の付着についての合成機構を概略的に示した図。

【 図 3 7 】

図 36 の電荷 tRNA を使用する翻訳反応の結果を示した図。

【 ㄨ 3 8 】

薬物 / プロテオームスクリーニングアッセイの一つの実施態様を概略的に示す。

10

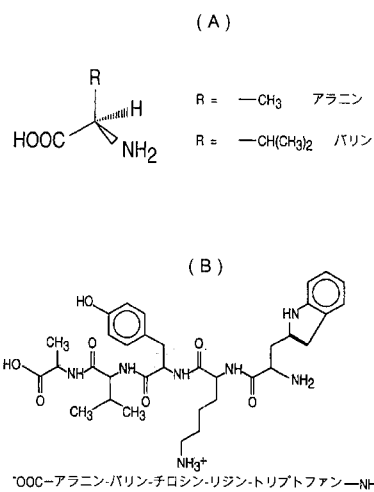
【 図 3 9 】

薬物 / プロテオームスクリーニングアッセイの一つの実施態様を概略的に示す。

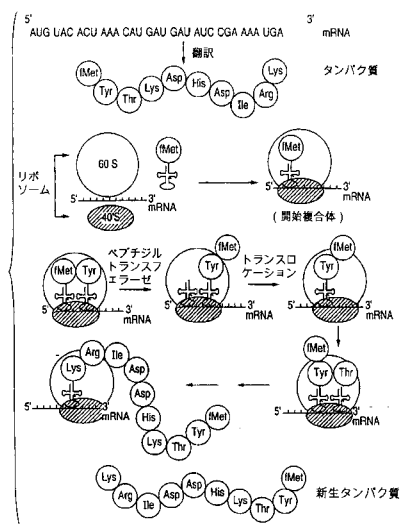
【 ㄨ 4 0 】

薬物 / プロテオームスクリーニングアッセイの結果を示す棒グラフ。

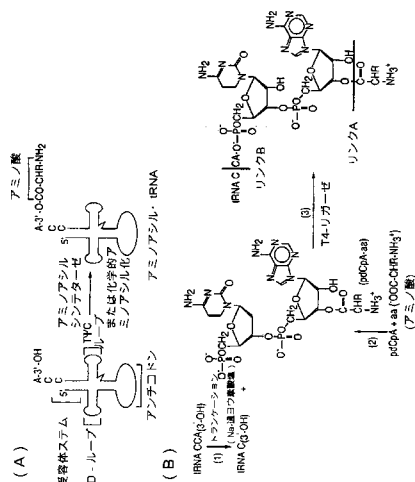
【 圖 1 】



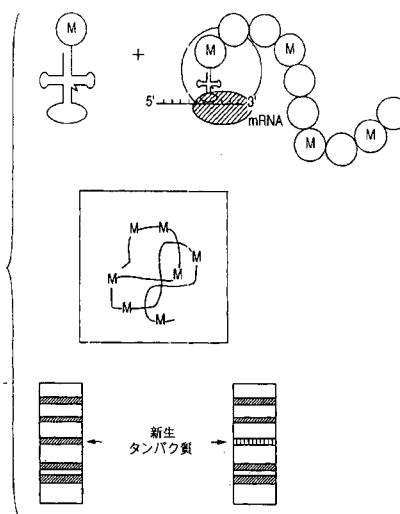
【 図 2 】



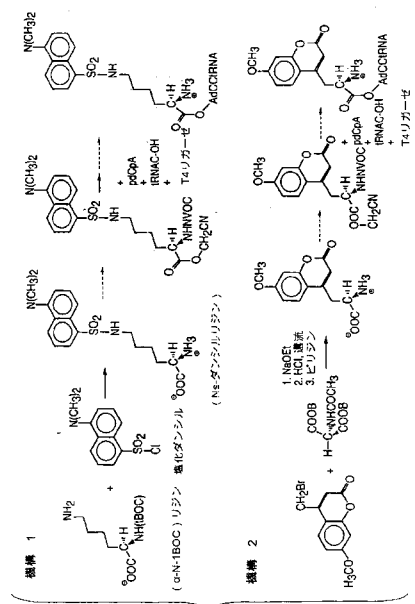
【 図 3 】



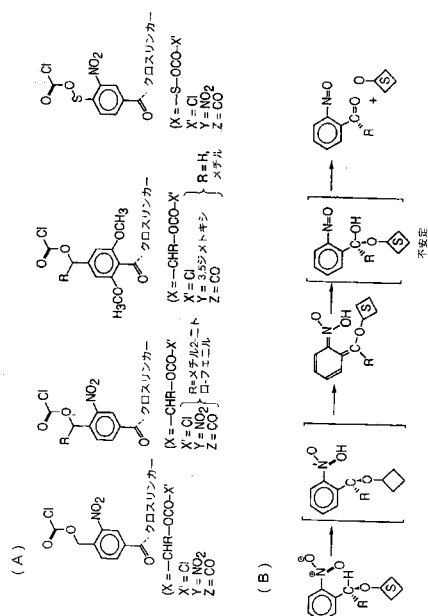
【 図 4 】



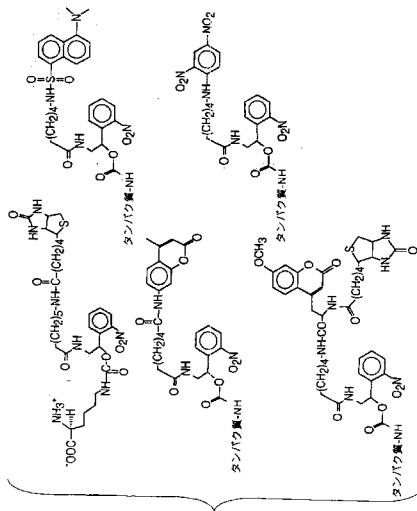
【圖 5】



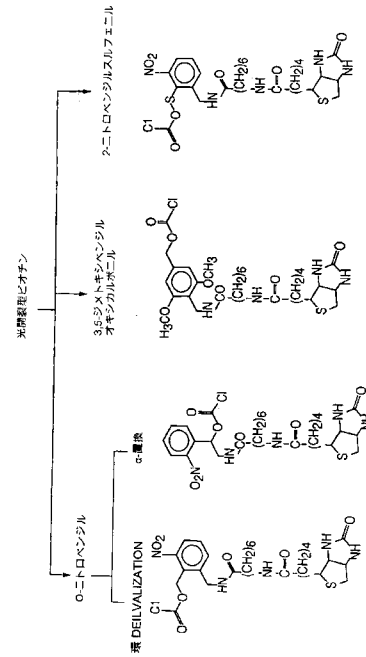
【 図 6 】



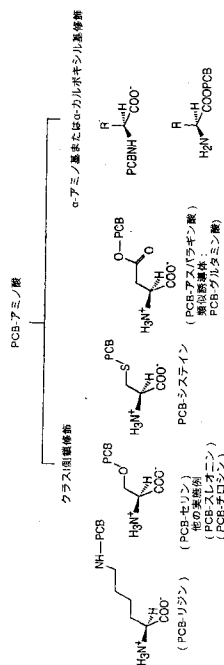
【図 7】



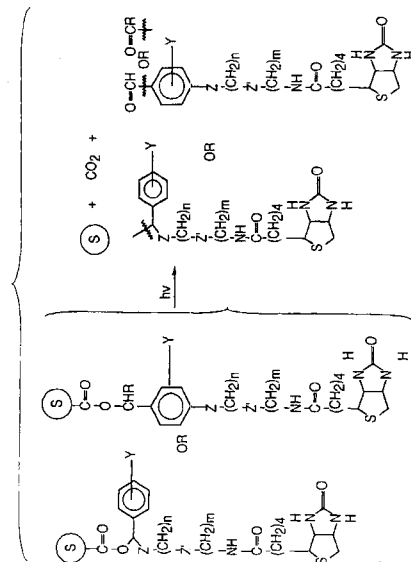
【図 8 A】



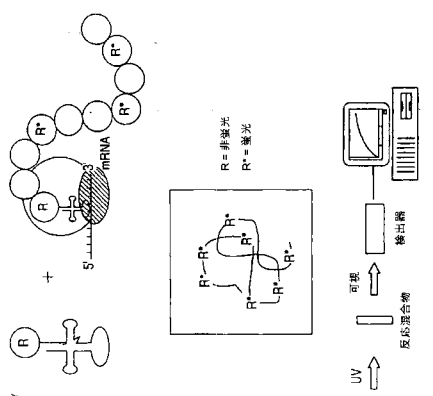
【図 8 B】



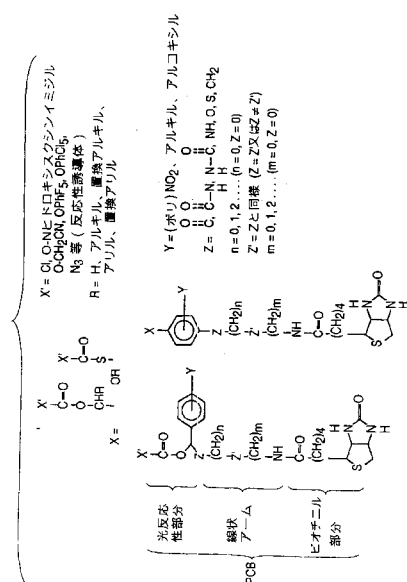
【図 9】



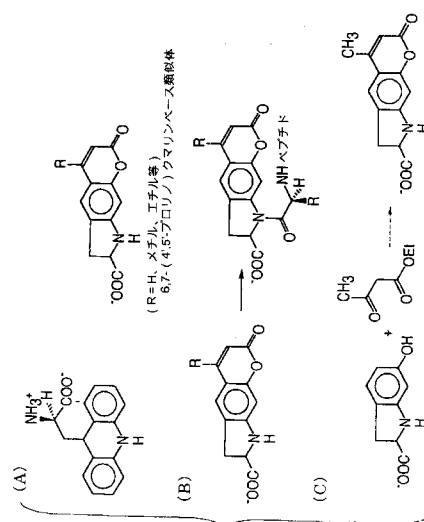
【 ㊦ 1 0 】



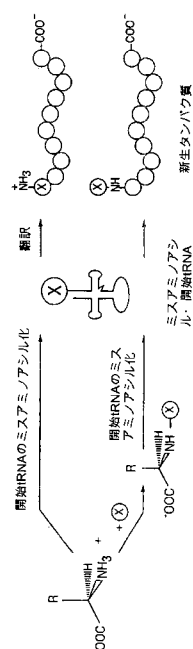
【 図 1 2 】



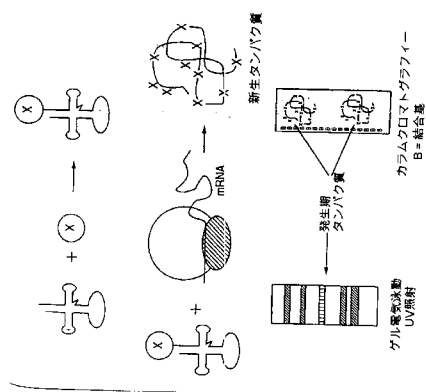
【 ㊦ 1 1 】



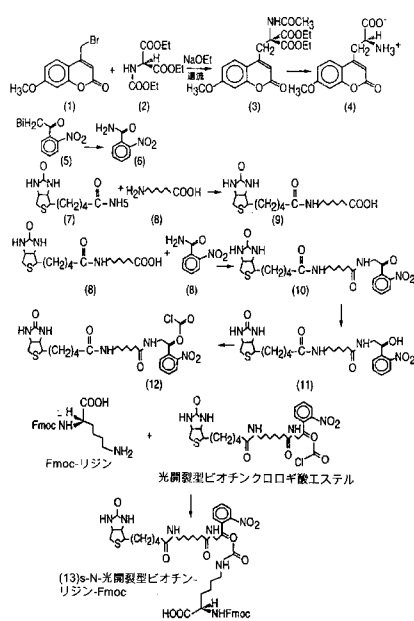
【 図 1 3 】



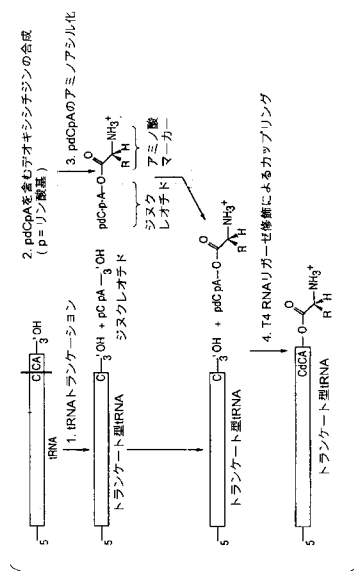
【図 14】



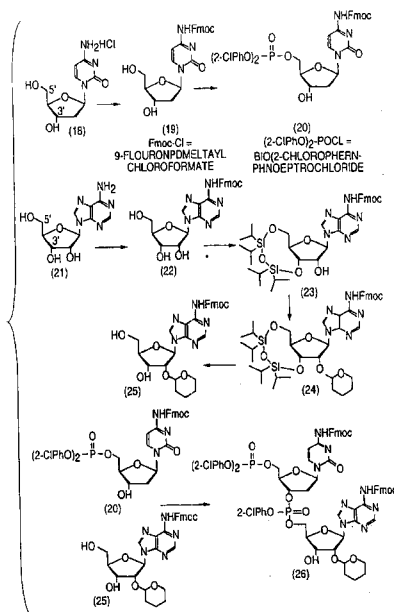
【図 15】



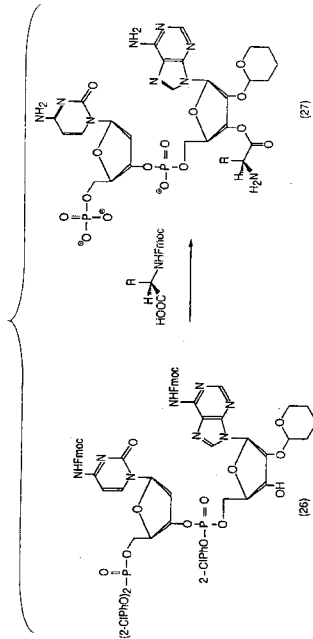
【図 16】



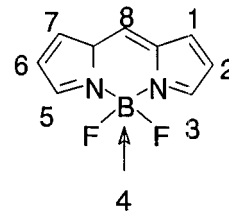
【図 17】



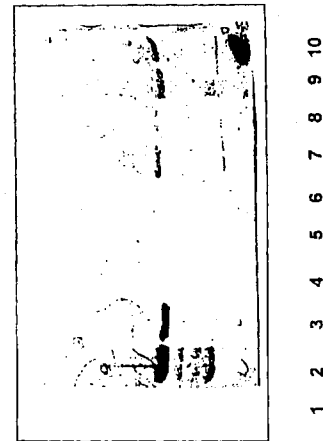
【図 18】



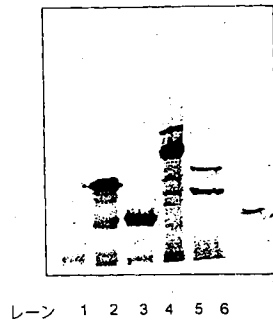
【図 19】



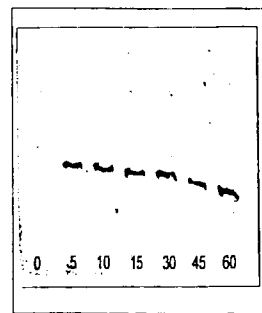
【図 20】



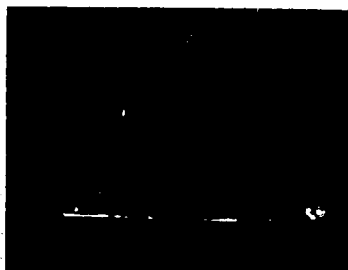
【図 21 A】



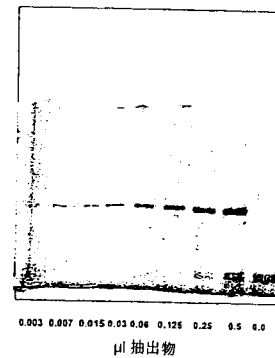
【図 22 A】



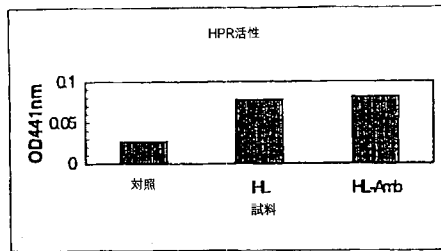
【図 21 B】



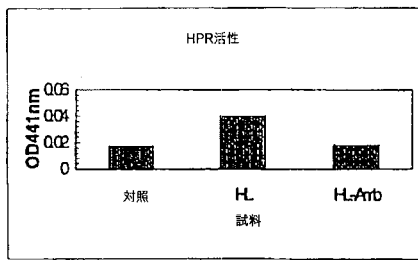
【図 22 B】



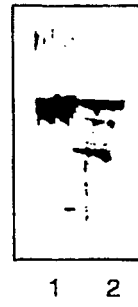
【図 2 3 A】



【図 2 3 B】



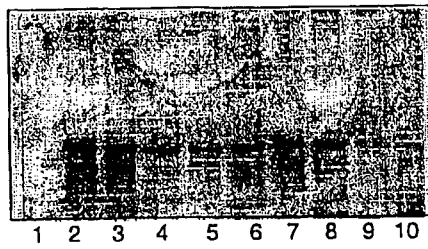
【図 2 4】



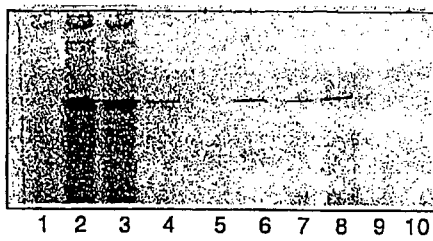
【図 2 5】



【図 2 6 A】



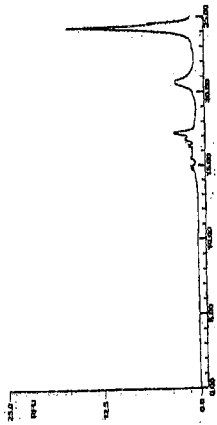
【図 2 6 B】



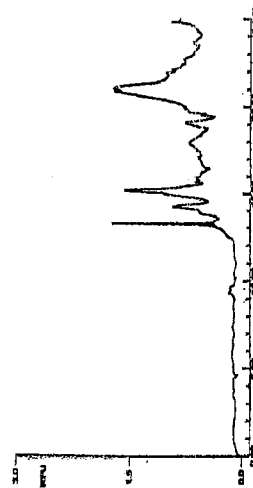
【図 2 7】



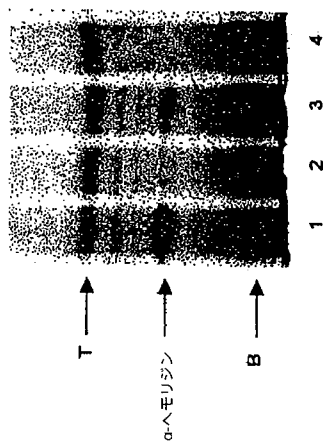
【図 28 A】



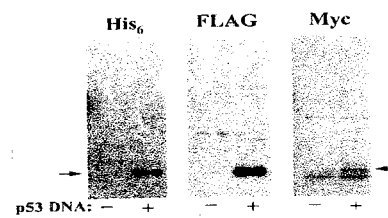
【図 28 B】



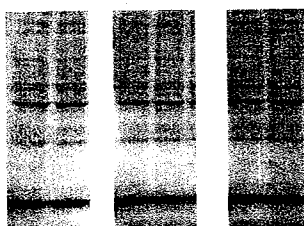
【図 29】



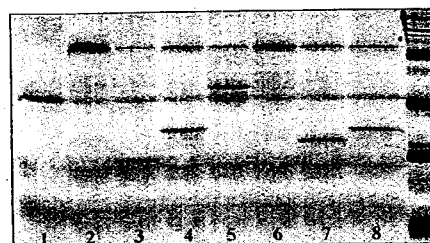
【図 30 B】



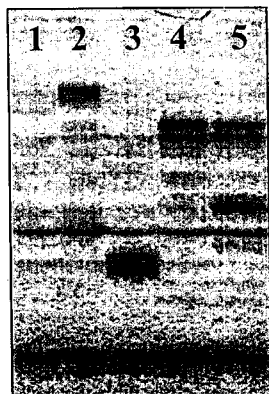
【図 30 A】



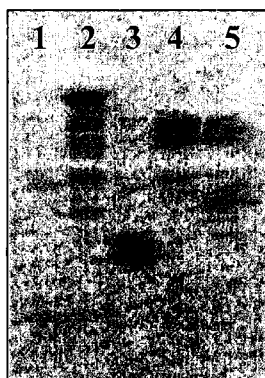
【図 31】



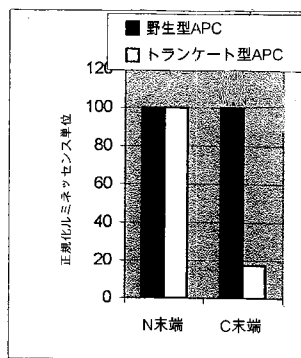
【図 3 2 A】



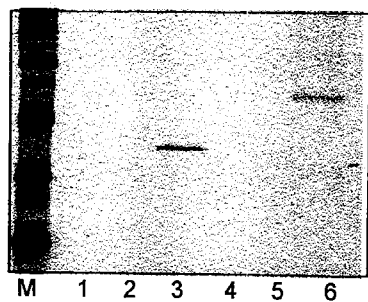
【図 3 2 B】



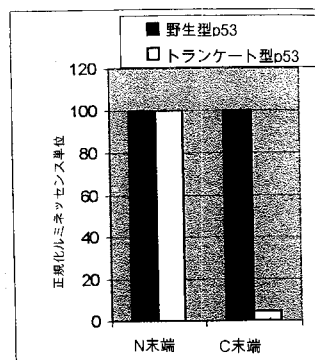
【図 3 3 C】



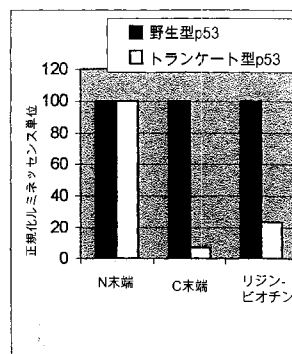
【図 3 4】



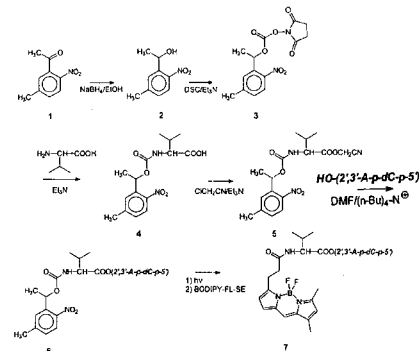
【図 3 3 A】



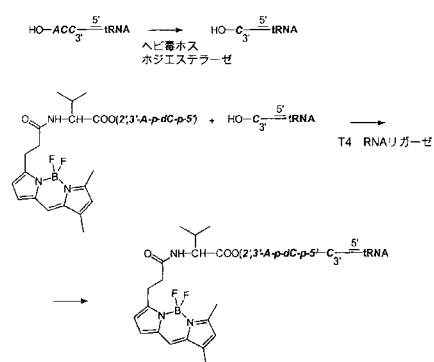
【図 3 3 B】



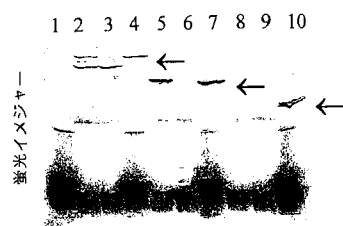
【図 3 5】



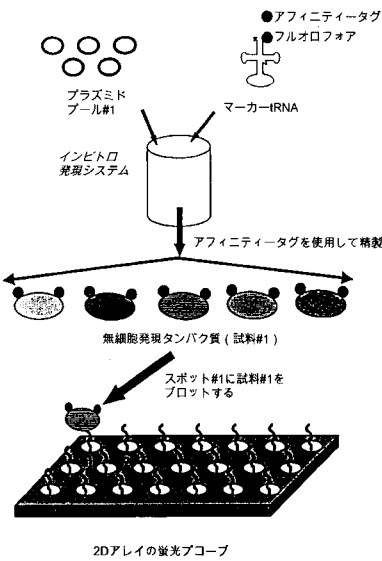
【図 3 6】



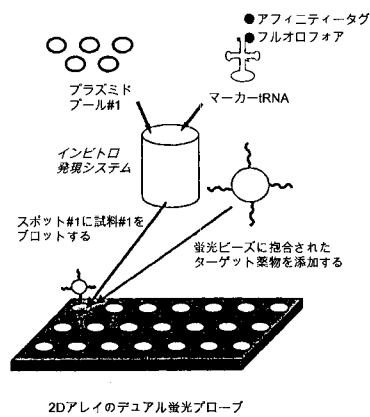
【図 37】



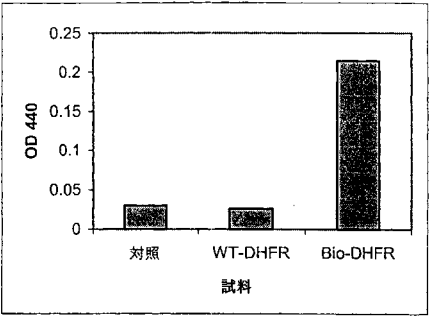
【図 38】



【図 39】



【図 40】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
1 March 2001 (01.03.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/14578 A1(51) International Patent Classification: C12P 21/06,
C12N 9/00(74) Agents: CARROLL, Peter, G. et al.; Medlen & Carroll,
LLP, Suite 2200, 220 Montgomery Street, San Francisco,
CA 94104 (US).

(21) International Application Number: PCT/US00/23233

(22) International Filing Date: 23 August 2000 (23.08.2000)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
09/382,950 25 August 1999 (25.08.1999) US
09/382,736 25 August 1999 (25.08.1999) US(71) Applicant (for all designated States except US): AM-
BERGEN, INC. [US/US]; 1106 Commonwealth Avenue,
Boston, MA 02215 (US).(81) Designated States (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ,
DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR,
HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR,
LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ,
NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM,
TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.(84) Designated States (regional): ARIPO patent (GH, GM,
KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian
patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European
patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE,
IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI patent (BF, BI, CF, CG,
CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(72) Inventors: and

(75) Inventors/Applicants (for US only): ROTHSCHILD,
Kenneth, J. [US/US]; 97 Dorcar Road, Newton, MA
02139 (US). GITE, Sudanand [IN/IN]; 808 Memorial
Drive, Cambridge, MA 02139 (US). OLEJNIK, Jerzy
[PL/PL]; 1307 Commonwealth Avenue, Allston, MA
02134 (US).

Published:

— With international search report.

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 01/14578 A1

(54) Title: METHODS FOR THE DETECTION, ANALYSIS AND ISOLATION OF NASCENT PROTEINS

(57) Abstract: This invention relates to non-radioactive markers that facilitate the detection and analysis of nascent proteins trans-
lated within cellular or cell-free translation systems. Nascent proteins containing these markers can be rapidly and efficiently de-
tected, isolated and analyzed without the handling and disposal problems associated with radioactive reagents. Preferred markers
are dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

**METHODS FOR THE DETECTION, ANALYSIS AND
ISOLATION OF NASCENT PROTEINS**

Field of the Invention

5 This invention relates to non-radioactive markers that facilitate the detection and analysis of nascent proteins translated within cellular or cell-free translation systems. Nascent proteins containing these markers can be rapidly and efficiently detected, isolated and analyzed without the handling and disposal problems associated with radioactive reagents.

Background of the Invention

10 Cells contain organelles, macromolecules and a wide variety of small molecules. Except for water, the vast majority of the molecules and macromolecules can be classified as lipids, carbohydrates, proteins or nucleic acids. Proteins are the most abundant cellular components and facilitate many of the key cellular processes. They include enzymes, antibodies, hormones, transport molecules and components for
15 the cytoskeleton of the cell.

Proteins are composed of amino acids arranged into linear polymers or polypeptides. In living systems, proteins comprise over twenty common amino acids. These twenty or so amino acids are generally termed the native amino acids. At the center of every amino acid is the alpha carbon atom ($C\alpha$) which forms four bonds or
20 attachments with other molecules (Figure 1). One bond is a covalent linkage to an amino group (NH_2) and another to a carboxyl group ($COOH$) which both participate in polypeptide formation. A third bond is nearly always linked to a hydrogen atom and the fourth to a side chain which imparts variability to the amino acid structure. For example, alanine is formed when the side chain is a methyl group ($-CH_3$) and a valine
25 is formed when the side chain is an isopropyl group ($-CH(CH_3)_2$). It is also possible to chemically synthesize amino acids containing different side-chains, however, the cellular protein synthesis system, with rare exceptions, utilizes native amino acids. Other amino acids and structurally similar chemical compounds are termed non-native

WO 01/14578

PCT/US00/23233

and are generally not found in most organisms.

A central feature of all living systems is the ability to produce proteins from amino acids. Basically, protein is formed by the linkage of multiple amino acids via peptide bonds such as the pentapeptide depicted in Figure 1B. Key molecules
5 involved in this process are messenger RNA (mRNA) molecules, transfer RNA (tRNA) molecules and ribosomes (rRNA-protein complexes). Protein translation normally occurs in living cells and in some cases can also be performed outside the cell in systems referred to as cell-free translation systems. In either system, the basic process of protein synthesis is identical. The extra-cellular or cell-free translation system
10 comprises an extract prepared from the intracellular contents of cells. These preparations contain those molecules which support protein translation and depending on the method of preparation, post-translational events such as glycosylation and cleavages as well. Typical cells from which cell-free extracts or *in vitro* extracts are made are *Escherichia coli* cells, wheat germ cells, rabbit reticulocytes, insect cells and
15 frog oocytes.

Both *in vivo* and *in vitro* syntheses involve the reading of a sequence of bases on a mRNA molecule. The mRNA contains instructions for translation in the form of triplet codons. The genetic code specifies which amino acid is encoded by each triplet codon. For each codon which specifies an amino acid, there normally exists a cognate
20 tRNA molecule which functions to transfer the correct amino acid onto the nascent polypeptide chain. The amino acid tyrosine (Tyr) is coded by the sequence of bases UAU and UAC, while cysteine (Cys) is coded by UGU and UGC. Variability associated with the third base of the codon is common and is called wobble.

Translation begins with the binding of the ribosome to mRNA (Figure 2). A
25 number of protein factors associate with the ribosome during different phases of translation including initiation factors, elongation factors and termination factors. Formation of the initiation complex is the first step of translation. Initiation factors contribute to the initiation complex along with the mRNA and initiator tRNA (fmet and met) which recognizes the base sequence UAG. Elongation proceeds with charged
30 tRNAs binding to ribosomes, translocation and release of the amino acid cargo into the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

peptide chain. Elongation factors assist with the binding of tRNAs and in elongation of the polypeptide chain with the help of enzymes like peptidyl transferase. Termination factors recognize a stop signal, such as the base sequence UGA, in the message terminating polypeptide synthesis and releasing the polypeptide chain and the mRNA from the ribosome.

The structure of tRNA is often shown as a cloverleaf representation (Figure 3A). Structural elements of a typical tRNA include an acceptor stem, a D-loop, an anticodon loop, a variable loop and a T Ψ C loop. Aminoacylation or charging of tRNA results in linking the carboxyl terminal of an amino acid to the 2'-(or 3'-) hydroxyl group of a terminal adenosine base via an ester linkage. This process can be accomplished either using enzymatic or chemical methods. Normally a particular tRNA is charged by only one specific native amino acid. This selective charging, termed here enzymatic aminoacylation, is accomplished by aminoacyl tRNA synthetases. A tRNA which selectively incorporates a tyrosine residue into the nascent polypeptide chain by recognizing the tyrosine UAC codon will be charged by tyrosine with a tyrosine-aminoacyl tRNA synthetase, while a tRNA designed to read the UGU codon will be charged by a cysteine-aminoacyl tRNA synthetase. These synthetases have evolved to be extremely accurate in charging a tRNA with the correct amino acid to maintain the fidelity of the translation process. Except in special cases where the non-native amino acid is very similar structurally to the native amino acid, it is necessary to use means other than enzymatic aminoacylation to charge a tRNA.

Molecular biologists routinely study the expression of proteins that are coded for by genes. A key step in research is to express the products of these genes either in intact cells or in cell-free extracts. Conventionally, molecular biologists use radioactively labeled amino acid residues such as ³⁵S-methionine as a means of detecting newly synthesized proteins or so-called nascent proteins. These nascent proteins can normally be distinguished from the many other proteins present in a cell or a cell-free extract by first separating the proteins by the standard technique of gel electrophoresis and determining if the proteins contained in the gel possess the specific radioactively labeled amino acids. This method is simple and relies on gel

WO 01/14578

PCT/US00/23233

electrophoresis, a widely available and practiced method. It does not require prior knowledge of the expressed protein and in general does not require the protein to have any special properties. In addition, the protein can exist in a denatured or unfolded form for detection by gel electrophoresis. Furthermore, more specialized techniques such as blotting to membranes and coupled enzymatic assays are not needed.

Radioactive assays also have the advantage that the structure of the nascent protein is not altered or can be restored, and thus, proteins can be isolated in a functional form for subsequent biochemical and biophysical studies.

Radioactive methods suffer from many drawbacks related to the utilization of radioactively labeled amino acids. Handling radioactive compounds in the laboratory always involves a health risk and requires special laboratory safety procedures, facilities and detailed record keeping as well as special training of laboratory personnel. Disposal of radioactive waste is also of increasing concern both because of the potential risk to the public and the lack of radioactive waste disposal sites. In addition, the use of radioactive labeling is time consuming, in some cases requiring as much as several days for detection of the radioactive label. The long time needed for such experiments is a key consideration and can seriously impede research productivity. While faster methods of radioactive detection are available, they are expensive and often require complex image enhancement devices.

The use of radioactive labeled amino acids also does not allow for a simple and rapid means to monitor the production of nascent proteins inside a cell-free extract without prior separation of nascent from preexisting proteins. However, a separation step does not allow for the optimization of cell-free activity. Variables including the concentration of ions and metabolites and the temperature and the time of protein synthesis cannot be adjusted.

Radioactive labeling methods also do not provide a means of isolating nascent proteins in a form which can be further utilized. The presence of radioactivity compromises this utility for further biochemical or biophysical procedures in the laboratory and in animals. This is clear in the case of *in vitro* expression when proteins cannot be readily produced *in vivo* because the protein has properties which

WO 01/14578

PCT/US00/23233

are toxic to the cell. A simple and convenient method for the detection and isolation of nascent proteins in a functional form could be important in the biomedical field if such proteins possessed diagnostic or therapeutic properties. Recent research has met with some success, but these methods have had numerous drawbacks.

5 Radioactive labeling methods also do not provide a simple and rapid means of detecting changes in the sequence of a nascent protein which can indicate the presence of potential disease causing mutations in the DNA which code for these proteins or fragments of these proteins. Current methods of analysis at the protein level rely on the use of gel electrophoresis and radioactive detection which are slow and not
10 amenable to high throughput analysis and automation. Such mutations can also be detected by performing DNA sequence analysis on the gene coding for a particular protein or protein fragment. However, this requires large regions of DNA to be sequenced, which is time-consuming and expensive. The development of a general method which allows mutations to be detected at the nascent protein level is
15 potentially very important for the biomedical field.

 Radioactive labeling methods also do not provide a simple and rapid means of studying the interaction of nascent proteins with other molecules including compounds which might be have importance as potential drugs. If such an approach were available, it could be extremely useful for screening large numbers of compounds
20 against the nascent proteins coded for by specific genes, even in cases where the genes or protein has not yet been characterized. In current technology, which is based on affinity electrophoresis for screening of potential drug candidates, both in natural samples and synthetic libraries, proteins must first be labeled uniformly with a specific marker which often requires specialized techniques including isolation of the protein
25 and the design of special ligand markers or protein engineering.

 Special tRNAs, such as tRNAs which have suppressor properties, suppressor tRNAs, have been used in the process of site-directed non-native amino acid replacement (SNAAR) (C. Noren et al., Science 244:182-188, 1989). In SNAAR, a
30 unique codon is required on the mRNA and the suppressor tRNA, acting to target a non-native amino acid to a unique site during the protein synthesis (PCT

WO 01/14578

PCT/US00/23233

WO90/05785). However, the suppressor tRNA must not be recognizable by the aminoacyl tRNA synthetases present in the protein translation system (Bain et al., Biochemistry 30:5411-21, 1991). Furthermore, site-specific incorporation of non-native amino acids is not suitable in general for detection of nascent proteins in a cellular or cell-free protein synthesis system due to the necessity of incorporating non-sense codons into the coding regions of the template DNA or the mRNA.

Products of protein synthesis may also be detected by using antibody based assays. This method is of limited use because it requires that the protein be folded into a native form and also for antibodies to have been previously produced against the nascent protein or a known protein which is fused to the unknown nascent protein. Such procedures are time consuming and again require identification and characterization of the protein. In addition, the production of antibodies and amino acid sequencing both require a high level of protein purity.

In certain cases, a non-native amino acid can be formed after the tRNA molecule is aminoacylated using chemical reactions which specifically modify the native amino acid and do not significantly alter the functional activity of the aminoacylated tRNA (Promega Technical Bulletin No. 182; tRNA^{ascend™}: Non-radioactive Translation Detection System, Sept. 1993). These reactions are referred to as post-aminoacylation modifications. For example, the ε-amino group of the lysine linked to its cognate tRNA (tRNA^{Lys}), could be modified with an amine specific photoaffinity label (U.C. Krieg et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8604-08, 1986). These types of post-aminoacylation modifications, although useful, do not provide a general means of incorporating non-native amino acids into the nascent proteins. The disadvantage is that only those non-native amino acids that are derivatives of normal amino acids can be incorporated and only a few amino acid residues have side chains amenable to chemical modification. More often, post-aminoacylation modifications can result in the tRNA being altered and produce a non-specific modification of the α-amino group of the amino acid (e.g. in addition to the ε-amino group) linked to the tRNA. This factor can lower the efficiency of incorporation of the non-native amino acid linked to the tRNA. Non-specific, post-aminoacylation modifications of tRNA

WO 01/14578

PCT/US00/23233

structure could also compromise its participation in protein synthesis. Incomplete chain formation could also occur when the α -amino group of the amino acid is modified.

5 In certain other cases, a nascent protein can be detected because of its special and unique properties such as specific enzymatic activity, absorption or fluorescence. This approach is of limited use since most proteins do not have special properties with which they can be easily detected. In many cases, however, the expressed protein may not have been previously characterized or even identified, and thus, its characteristic properties are unknown.

10 **Summary of the Invention**

The present invention overcomes the problems and disadvantages associated with current strategies and designs and provides methods for the labeling, detection, quantitation, analysis and isolation of nascent proteins produced in a cell-free or cellular translation system without the use of radioactive amino acids or other
15 radioactive labels. One embodiment of the invention is directed to methods for detecting nascent proteins translated in a translation system. A tRNA molecule is aminoacylated with a fluorescent marker to create a misaminoacylated tRNA. The misaminoacylated, or charged, tRNA can be formed by chemical, enzymatic or partly chemical and partly enzymatic techniques which place a fluorescent marker into a
20 position on the tRNA molecule from which it can be transferred into a growing peptide chain. Markers may comprise native or non-native amino acids with fluorescent moieties, amino acid analogs or derivatives with fluorescent moieties, detectable labels, coupling agents or combinations of these components with fluorescent moieties. The misaminoacylated tRNA is introduced to the translation
25 system such as a cell-free extract, the system is incubated and the fluorescent marker incorporated into nascent proteins.

It is not intended that the present invention be limited to the nature of the particular fluorescent moiety. A variety of fluorescent compounds are contemplated, including fluorescent compounds that have been derivatized (*e.g.* with NHS) to be

WO 01/14578

PCT/US00/23233

soluble (*e.g.* NHS-derivatives of coumarin). Nonetheless, compared to many other fluorophores with high quantum yields, several BODIPY compounds and reagents have been empirically found to have the additional important and unusual property that they can be incorporated with high efficiency into nascent proteins for both UV and visible excited fluorescence detection. These methods utilizing fluorescent moieties may be used to detect, isolate and quantitate such nascent proteins as recombinant gene products, gene fusion products, truncated proteins caused by mutations in human genes, enzymes, cytokines, hormones, immunogenic proteins, human proteins, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.

Another embodiment of the invention is directed to methods for labeling nascent proteins at their amino terminus. An initiator tRNA molecule, such as methionine-initiator tRNA or formylmethionine-initiator tRNA is misaminoacylated with a fluorescent moiety (*e.g.* a BODIPY moiety) and introduced to a translation system. The system is incubated and marker is incorporated at the amino terminus of the nascent proteins. Nascent proteins containing marker can be detected, isolated and quantitated. Markers or parts of markers may be cleaved from the nascent proteins which substantially retain their native configuration and are functionally active.

Thus, the present invention contemplates compositions, methods and systems. In terms of compositions, the present invention specifically contemplates a tRNA molecule misaminoacylated with a BODIPY marker.

In one embodiment, the present invention contemplates a method, comprising: a) providing a tRNA molecule and a BODIPY marker; and b) aminoacylating said tRNA molecule with said BODIPY marker to create a misaminoacylated tRNA. In a particular embodiment, the method further comprises c) introducing said misaminoacylated tRNA into a translation system under conditions such that said marker is incorporated into a nascent protein. In yet another embodiment, the method further comprises d) detecting said nascent protein containing said marker. In still another embodiment, the method further comprises e) isolating said detected nascent protein.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

The present invention contemplates aminoacylation of the tRNA molecule by chemical or enzymatic misaminoacylation. The present invention also contemplates embodiments wherein two or more different misaminoacylated tRNAs are introduced into the translation system. In a preferred embodiment, the nascent protein detected
5 (by virtue of the incorporated marker) is functionally active.

It is not intended that the present invention be limited by the particular nature of the nascent protein. In one embodiment, the present invention contemplates a method for detecting nascent proteins which are conjugated to the mRNA message which codes for all or part of the nascent protein. In general, a variety of
10 modifications of the nascent protein are envisioned including post-translational modifications, proteolysis, attachment of an oligonucleotide through a puromycin linker to the C-terminus of the protein, and interaction of the nascent protein with other components of the translation system including those which are added exogenously.

It is not intended that the present invention be limited by the particular nature of the tRNA molecule. In one embodiment, the tRNA molecule is an initiator tRNA molecule. In another embodiment, the tRNA molecule is a suppressor tRNA molecule.

The present invention also contemplates kits. In one embodiment, the kit comprises a) a first containing means (e.g. tubes, vials, etc) containing at least one component of a protein synthesis system; and b) a second containing means containing
20 a misaminoacylated tRNA, wherein said tRNA is misaminoacylated with a BODIPY marker. Such kits may include initiator tRNA and/or suppressor tRNA. Importantly, the kit is not limited to the particular components of said protein synthesis system; a variety of components are contemplated (e.g. ribosomes).

Another embodiment of the invention is directed to methods for detecting nascent proteins translated in a translation system. A tRNA molecule is aminoacylated with one component of a binary marker system. The misaminoacylated, or charged, tRNA can be formed by chemical, enzymatic or partly chemical and partly enzymatic techniques which place a component of a binary marker system into a position on the
30 tRNA molecule from which it can be transferred into a growing peptide chain. The

WO 01/14578

PCT/US00/23233

component of the binary marker system may comprise native or non-native amino acids, amino acid analogs or derivatives, detectable labels, coupling agents or combinations of these components. The misaminoacylated tRNA is introduced to the translation system such as a cell-free extract, the system is incubated and the marker is then introduced making the first component incorporated into the nascent protein specifically detectable. These methods may be used to detect, isolate and quantitate such nascent proteins as recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines, hormones, immunogenic proteins, human proteins, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.

It is not intended that the present invention be limited to a particular translation system. In one embodiment, a cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof. It is also not intended that the present invention be limited to the particular reaction conditions employed. However, typically the cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C. The present invention contemplates both continuous flow systems or dialysis systems.

Another embodiment of the invention is directed to methods for the detection of nascent proteins translated in a cellular or cell-free translation system using non-radioactive markers which have detectable electromagnetic spectral properties. As before, a non-radioactive marker is misaminoacylated to a tRNA molecule and the misaminoacylated tRNA is added to the translation system. The system is incubated to incorporate marker into the nascent proteins. Nascent proteins containing marker can be detected from the specific electromagnetic spectral property of the marker. Nascent proteins can also be isolated by taking advantage of unique properties of these markers or by conventional means such as electrophoresis, gel filtration, high-pressure or fast-pressure liquid chromatography, affinity chromatography, ion exchange

WO 01/14578

PCT/US00/23233

chromatography, chemical extraction, magnetic bead separation, precipitation or combinations of these techniques.

Another embodiment of the invention is directed to the synthesis of nascent proteins containing markers which have reporter properties when the reporter is brought into contact with a second agent. Reporter markers are chemical moieties which have detectable electromagnetic spectral properties when incorporated into peptides and whose spectral properties can be distinguished from unincorporated markers and markers attached to tRNA molecules. As before, tRNA molecules are misaminoacylated, this time using reported markers. The misaminoacylated tRNAs are added to a translation system and incubated to incorporate marker into the peptide. Reporter markers can be used to follow the process of protein translation and to detect and quantitate nascent proteins without prior isolation from other components of the protein synthesizing system.

Another embodiment of the invention is directed to compositions comprised of nascent proteins translated in the presence of markers, isolated and, if necessary, purified in a cellular or cell-free translation system. Compositions may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier and be utilized as an immunologically active composition such as a vaccine, or as a pharmaceutically active composition such as a drug, for use in humans and other mammals.

Another embodiment of the invention is directed to methods for detecting nascent proteins translated in a translation system by using mass spectrometry. A non-radioactive marker of known mass is misaminoacylated to a tRNA molecule and the misaminoacylated tRNA is added to the translation system. The system is incubated to incorporate the mass marker into the nascent proteins. The mass spectrum of the translation system is then measured. The presence of the nascent protein can be directly detected by identifying peaks in the mass spectrum of the protein synthesis system which correspond to the mass of the unmodified protein and a second band at a higher mass which corresponds to the mass of the nascent protein plus the modified amino acid containing the mass of the marker. When the mass marker is photocleavable, the assignment of the second band to a nascent protein containing the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

mass marker can be verified by removing the marker with light.

Another embodiment of the invention is directed to methods for detecting nascent proteins with mutations which are translated in a translation system. RNA or DNA coding for the protein which may contain a possible mutation is added to the translation system. The system is incubated to synthesize the nascent proteins. The nascent protein is then separated from the translation system using an affinity marker located at or close to the N-terminal end of the protein. The protein is then analyzed for the presence of a detectable marker located at or close to the N-terminal of the protein (N-terminal marker). A separate measurement is then made on a sequence dependent detectable marker located at or close to the C-terminal end of the protein (C-terminal marker). A comparison is then made of the level of incorporation of the N-terminal and C-terminal markers in the nascent protein. It is not intended that the present invention be limited by the nature of the N- and C-terminal markers, or the type of affinity marker utilized. A variety of markers are contemplated. In one embodiment, the affinity marker comprises an epitope recognized by an antibody or other binding molecule. In one embodiment, the N-terminal marker comprises a fluorescent marker (e.g. a BODIPY marker), while the C-terminal marker comprises a metal binding region (e.g. His tag).

The present invention contemplates a variety of methods wherein the three markers (e.g. the N- and C-terminal markers and the affinity markers) are introduced into a nascent protein. In one embodiment, the method comprises: a) providing i) a misaminoacylated initiator tRNA molecule which only recognizes the first AUG codon that serves to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising a C-terminal marker and (in some embodiments) an affinity marker; b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker, said C-terminal marker and (in some embodiments) said affinity marker. In one embodiment, the method further comprises, after step b), isolating said nascent protein.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

In another embodiment, the method comprises: a) providing i) a misaminoacylated initiator tRNA molecule which only recognizes the first AUG codon that serves to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said
5 protein comprising a C-terminal marker and (in some embodiments) an affinity marker; b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker at the N-terminus of said protein, a C-terminal marker, and (in some embodiments) said affinity marker adjacent to said first marker.
10 In one embodiment, the method further comprises, after step b), isolating said nascent protein.

In yet another embodiment, the method comprises: a) providing i) a misaminoacylated tRNA molecule which only recognizes the first codon designed to serve to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule
15 comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising a C-terminal marker and (in some embodiments) an affinity marker; b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker, said C-terminal marker and (in some
20 embodiments) said affinity marker. In one embodiment, the method further comprises, after step b), isolating said nascent protein.

In still another embodiment, the method comprises: a) providing i) a misaminoacylated tRNA molecule which only recognizes the first codon designed to serve to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule
25 comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising a C-terminal marker and (in some embodiments) an affinity marker; b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker at the N-terminus of said protein, a C-terminal
30 marker, and (in some embodiments) said affinity marker adjacent to said first marker.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

In one embodiment, the method further comprises, after step b), isolating said nascent protein.

The present invention also contemplates embodiments where only two markers are employed (e.g. a marker at the N-terminus and a marker at the C-terminus). In one embodiment, the nascent protein is non-specifically bound to a solid support (e.g. beads, microwells, strips, etc.), rather than by the specific interaction of an affinity marker. In this context, "non-specific" binding is meant to indicate that binding is not driven by the uniqueness of the sequence of the nascent protein. Instead, binding can be by charge interactions. In one embodiment, the present invention contemplates that the solid support is modified (e.g. functionalized to change the charge of the surface) in order to capture the nascent protein on the surface of the solid support. In one embodiment, the solid support is poly-L-lysine coated. In yet another embodiment, the solid support is nitrocellulose (e.g. strips, nitrocellulose containing microwells, etc.). Regardless of the particular nature of the solid support, the present invention contemplates that the nascent protein containing the two markers is captured under conditions that permit the ready detection of the markers.

In both the two marker and three marker embodiments described above, the present invention contemplates that one or more of the markers will be introduced into the nucleic acid template by primer extension or PCR. In one embodiment, the present invention contemplates a primer comprising (on or near the 5'-end) a promoter, a ribosome binding site ("RBS"), and a start codon (e.g. ATG), along with a region of complementarity to the template. In another embodiment, the present invention contemplates a primer comprising (on or near the 5'-end) a promoter, a ribosome binding site ("RBS"), a start codon (e.g. ATG), a region encoding an affinity marker, and a region of complementarity to the template. It is not intended that the present invention be limited by the length of the region of complementarity; preferably, the region is greater than 8 bases in length, more preferably greater than 15 bases in length, and still more preferably greater than 20 bases in length.

It is also not intended that the present invention be limited by the ribosome binding site. In one embodiment, the present invention contemplates primers

WO 01/14578

PCT/US00/23233

comprising the *Kozak sequence*, a string of non-random nucleotides (consensus sequence 5'-GCCA/GCCATGG-3') (SEQ ID NO:1) which are present before the translation initiating *first* ATG in majority of the mRNAs which are transcribed and translated in an eukaryotic cells. See M. Kozak, *Cell* 44:283-292 (1986). In another embodiment, the present invention contemplates a primer comprising the the

5 prokaryotic mRNA ribosome binding site, which usually contains part or all of a polypurine domain UAAGGAGGU (SEQ ID NO:2) known as the Shine-Dalgarno (SD) sequence found just 5' to the translation initiation codon: mRNA 5'-UAAGGAGGU - N_{5,10} - AUG. (SEQ ID NO:3)

10 For PCR, two primers are used. In one embodiment, the present invention contemplates as the forward primer a primer comprising (on or near the 5'-end) a promoter, a ribosome binding site ("RBS"), and a start codon (e.g. ATG), along with a region of complementarity to the template. In another embodiment, the present invention contemplates as the forward primer a primer comprising (on or near the 5'-

15 end) a promoter, a ribosome binding site ("RBS"), a start codon (e.g. ATG), a region encoding an affinity marker, and a region of complementarity to the template. The present invention contemplates that the reverse primer, in one embodiment, comprises (at or near the 5'-end) one or more stop codons and a region encoding a C-terminus marker (such as a HIS-tag).

20 Another embodiment of the invention is directed to methods for detecting by electrophoresis (e.g. capillary electrophoresis) the interaction of molecules with nascent proteins which are translated in a translation system. A tRNA misaminoacylated with a detectable marker is added to the protein synthesis system. The system is incubated to incorporate the detectable marker into the nascent proteins. One or more specific

25 molecules are then combined with the nascent proteins (either before or after isolation) to form a mixture containing nascent proteins/molecule conjugates. Aliquots of the mixture are then subjected to capillary electrophoresis. Nascent proteins/molecule conjugates are identified by detecting changes in the electrophoretic mobility of nascent proteins with incorporated markers.

30 The present invention also contemplates using the above described methods and

WO 01/14578

PCT/US00/23233

compositions in a method for drug/proteome screening. For example, the present invention contemplates a method of identifying a protein or portion of a protein which interacts with a ligand (such as a drug), which method comprises the steps of preparing a cDNA library from a cell that expresses said desired protein; inserting said
5 cDNA library into an expression vector, thereby forming an expression cDNA library; transforming said expression library into bacterial cells and culturing said bacterial cells to produce individual bacterial colonies, wherein each colony contains a member of said expression library; collecting pools of a predetermined number of said individual bacterial colonies; isolating cDNA from said pools of bacterial colonies;
10 expressing proteins (or portions of proteins) encoded by said cDNAs; and identifying a desired protein (or portion thereof) and the cDNA encoding said desired protein (or portion); wherein pools of approximately 50 individual bacterial colonies are collected (more preferably less than 50, still more preferably less than 40, still more preferably less than 30, and most preferably 25 or less, but more than 10), wherein
15 each colony contains a member of an expression cDNA library, thereby forming cDNA pools; and wherein proteins (or portions thereof) encoded by the cDNA in said cDNA pools are expressed in an *in vitro* transcription/translation system in a common reaction mixture, and wherein a desired protein (or portion thereof) is identified from said reaction mixture.

20 Other embodiments and advantages of the invention are set forth, in part, in the description which follows and, in part, will be obvious from this description, or may be learned from the practice of the invention.

Definitions

25 To facilitate understanding of the invention, a number of terms are defined below.

The term "gene" refers to a DNA sequence that comprises control and coding sequences necessary for the production of a polypeptide or precursor. The polypeptide can be encoded by a full length coding sequence or by any portion of the coding sequence so long as the desired enzymatic activity is retained.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

The term "wild-type" refers to a gene or gene product which has the characteristics of that gene or gene product when isolated from a naturally occurring source. A wild-type gene is that which is most frequently observed in a population and is thus arbitrarily designed the "normal" or "wild-type" form of the gene. In contrast, the term "modified" or "mutant" refers to a gene or gene product which displays modifications in sequence and or functional properties (*i.e.*, altered characteristics) when compared to the wild-type gene or gene product. It is noted that naturally-occurring mutants can be isolated; these are identified by the fact that they have altered characteristics when compared to the wild-type gene or gene product.

The term "oligonucleotide" as used herein is defined as a molecule comprised of two or more deoxyribonucleotides or ribonucleotides, preferably more than three, and usually more than ten. The exact size will depend on many factors, which in turn depends on the ultimate function or use of the oligonucleotide. The oligonucleotide may be generated in any manner, including chemical synthesis, DNA replication, reverse transcription, or a combination thereof.

Because mononucleotides are reacted to make oligonucleotides in a manner such that the 5' phosphate of one mononucleotide pentose ring is attached to the 3' oxygen of its neighbor in one direction via a phosphodiester linkage, an end of an oligonucleotide is referred to as the "5' end" if its 5' phosphate is not linked to the 3' oxygen of a mononucleotide pentose ring and as the "3' end" if its 3' oxygen is not linked to a 5' phosphate of a subsequent mononucleotide pentose ring. As used herein, a nucleic acid sequence, even if internal to a larger oligonucleotide, also may have 5' and 3' ends.

The term "primer" refers to an oligonucleotide which is capable of acting as a point of initiation of synthesis when placed under conditions in which primer extension is initiated. An oligonucleotide "primer" may occur naturally, as in a purified restriction digest or may be produced synthetically.

A primer is selected to have on its 3' end a region that is "substantially" complementary to a strand of specific sequence of the template. A primer must be sufficiently complementary to hybridize with a template strand for primer elongation to

WO 01/14578

PCT/US00/23233

occur. A primer sequence need not reflect the exact sequence of the template. For example, a non-complementary nucleotide fragment may be attached to the 5' end of the primer, with the remainder of the primer sequence being substantially complementary to the strand. Non-complementary bases or longer sequences can be interspersed into the primer, provided that the primer sequence has sufficient complementarity with the sequence of the template to hybridize and thereby form a template primer complex for synthesis of the extension product of the primer.

As used herein, the terms "hybridize" and "hybridization" refers to the annealing of a complementary sequence to the target nucleic acid. The ability of two polymers of nucleic acid containing complementary sequences to find each other and anneal through base pairing interaction is a well-recognized phenomenon. Marmur and Lane, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:453 (1960) and Doty *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46:461 (1960). The terms "annealed" and "hybridized" are used interchangeably throughout, and are intended to encompass any specific and reproducible interaction between an oligonucleotide and a target nucleic acid, including binding of regions having only partial complementarity.

The complement of a nucleic acid sequence as used herein refers to an oligonucleotide which, when aligned with the nucleic acid sequence such that the 5' end of one sequence is paired with the 3' end of the other, is in "antiparallel association." Certain bases not commonly found in natural nucleic acids may be included in the nucleic acids of the present invention and include, for example, inosine and 7-deazaguanine. Complementarity need not be perfect; stable duplexes may contain mismatched base pairs or unmatched bases. Those skilled in the art of nucleic acid technology can determine duplex stability empirically considering a number of variables including, for example, the length of the oligonucleotide, base composition and sequence of the oligonucleotide, ionic strength and incidence of mismatched base pairs.

The stability of a nucleic acid duplex is measured by the melting temperature, or "T_m." The T_m of a particular nucleic acid duplex under specified conditions is the temperature at which on average half of the base pairs have disassociated.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

The term "probe" as used herein refers to an oligonucleotide which forms a duplex structure or other complex with a sequence in another nucleic acid, due to complementarity or other means of reproducible attractive interaction, of at least one sequence in the probe with a sequence in the other nucleic acid.

5 "Oligonucleotide primers matching or complementary to a gene sequence" refers to oligonucleotide primers capable of facilitating the template-dependent synthesis of single or double-stranded nucleic acids. Oligonucleotide primers matching or complementary to a gene sequence may be used in PCRs, RT-PCRs and the like. As noted above, an oligonucleotide primer need not be perfectly complementary to a target or template sequence. A primer need only have a sufficient interaction with the template that it can be extended by template-dependent synthesis.

As used herein, the term "poly-histidine tract" or (HIS-tag) refers to the presence of two to ten histidine residues at either the amino- or carboxy-terminus of a nascent protein. A poly-histidine tract of six to ten residues is preferred. The poly-histidine tract is also defined functionally as being a number of consecutive histidine residues added to the protein of interest which allows the affinity purification of the resulting protein on a nickel-chelate column, or the identification of a protein terminus through the interaction with another molecule (e.g. an antibody reactive with the HIS-tag).

20 Descriptions of the Drawings

Figure 1 shows the structure of (A) an amino acid and (B) a peptide.

Figure 2 provides a description of the molecular steps that occur during protein synthesis in a cellular or cell-free system.

Figure 3 shows a structure of (A) a tRNA molecule and (B) approaches
25 involved in the aminoacylation of tRNAs.

Figure 4 is a schematic representation of the method of detecting nascent proteins using fluorescent marker amino acids.

Figure 5 shows schemes for synthesis and misaminoacylation to tRNA of two different marker amino acids, dansyllysine (scheme 1) and coumarin (scheme 2), with

WO 01/14578

PCT/US00/23233

fluorescent properties suitable for the detection of nascent proteins using gel electrophoresis and UV illumination.

Figure 6(A) shows chemical compounds containing the 2-nitrobenzyl moiety, and Figure 6(B) shows cleavage of substrate from a nitrobenzyl linkage.

5 Figure 7 provides examples of photocleavable markers.

Figure 8(A) shows chemical variations of PCB, and Figure 8(B) depicts possible amino acid linkages.

Figure 9 shows the photolysis of PCB.

10 Figure 10 is a schematic representation of the method for monitoring the production of nascent proteins in a cell-free protein expression systems without separating the proteins.

Figure 11(A) provides examples of non-native amino acids with reporter properties, Figure 11(B) shows participation of a reporter in protein synthesis, and Figure 11(C) shows synthesis of a reporter.

15 Figure 12 shows structural components of photocleavable biotin.

Figure 13 is a schematic representation of the method for introduction of markers at the N-termini of nascent proteins.

Figure 14 provides a description of the method of detection and isolation of marker in nascent proteins.

20 Figure 15 shows the steps in one embodiment for the synthesis of PCB-lysine.

Figure 16 provides an experimental strategy for the misaminoacylation of tRNA.

Figure 17 illustrates dinucleotide synthesis including (i) deoxycytidine protection, (ii) adenosine protection, and (iii) dinucleotide synthesis.

25 Figure 18 depicts aminoacylation of a dinucleotide using marker amino acids.

Figure 19 shows the structure of dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes.

Figure 20 is a photograph of a gel showing the incorporation of various fluorescent molecules into hemolysin during translation.

30 Figure 21 shows the incorporation of BODIPY-FL into various proteins. Figure

WO 01/14578

PCT/US00/23233

21A shows the results visualized using laser based Molecular Dynamics FluorImager 595, while Figure 21B shows the results visualized using a UV-transilluminator.

Figure 22A shows a time course of fluorescence labeling. Figure 22B shows the SDS-PAGE results of various aliquotes of the translation mixture, demonstrating the sensitivity of the system.

Figure 23A is a bar graph showing gel-free quantitation of an N-terminal marker introduced into a nascent protein in accordance with the method of the present invention. Figure 23B is a bar graph showing gel-free quantitation of an C-terminal marker of a nascent protein quantitated in accordance with the method of the present invention.

Figure 24 shows gel results for protease treated and untreated protein.

Figure 25 shows gel results for protein treated with RBCs and untreated protein.

Figure 26A is a gel showing the incorporation of various fluorescent molecules into α -hemolysin in *E. coli* translation system using misaminoacylated lysyl-tRNA^{lys}. Figure 26B shows the incorporation of various fluorescent molecules into luciferase in a TnT wheat germ system using misaminoacylated lysyl-tRNA^{lys}.

Figure 27 shows gel results of *in vitro* translation of α -HL carried out in the presence of various fluorescent-tRNAs, including atRNA-coumarin derivative.

Figures 28A and 28B show mobility shift results by capillary electrophoresis.

Figure 29 are gel results of *in vitro* translation results wherein three markers were introduced into a nascent protein.

Figure 30 shows Western blot analysis of *in vitro* translated triple-epitope-tagged wild-type p53 (RT-PCR derived DNA). Figure 30A shows the total protein staining. Figure 30B presents the Western blot analysis.

Figure 31 shows the results for a gel-based PTT of APC Exon 15, segment 2.

Figure 32 shows the detection of *in vitro* translated BODIPY-labeled proteins by Western blotting. Figure 32A shows the results by fluorescence imaging and Figure 32B shows the results by Western blotting.

Figure 33 shows three bar graphs representing the results of a gel-free

WO 01/14578

PCT/US00/23233

- chemiluminescent protein truncation assay of p53 and APC. Figure 33A shows the results for p53 produced by *in vitro* translation, where the product is captured in a 96-well ELISA plate format using a mouse monoclonal antibody directed against the N-terminal FLAG epitope. Figure 33B shows the results for p53 produced by *in vitro* translation, where the product is captured in a 96-well ELISA plate format using a nickel chelate plate. Figure 33C shows the results for APC produced by *in vitro* translation, where the product is captured on nickel metal chelate 96-well ELISA plates. All WT N- and C-terminal signals as well as mutant N-terminal signals were normalized to 100%.
- Figure 34 is a gel showing immunoprecipitation results for p53 and Hemolysin.
- Figure 35 schematically shows a synthesis scheme for the preparation of BODIPY-Val-pdCpA.
- Figure 36 schematically shows a synthesis scheme for the attachment of the BODIPY-Val-pdCpA conjugate of Figure 35 to tRNA.
- Figure 37 shows the result of translation reactions using the charged tRNA of Figure 36.
- Figure 38 schematically shows one embodiment of a drug/proteome screening assay.
- Figure 39 schematically shows one embodiment of a drug/proteome screening assay.
- Figure 40 is a bar graph showing the results of a drug/proteome screening assay.

Description of the Invention

- As embodied and described herein, the present invention comprises methods for the non-radioactive labeling and detection of the products of new or nascent protein synthesis, and methods for the isolation of these nascent proteins from preexisting proteins in a cellular or cell-free translation system. As radioactive labels are not used, there are no special measures which must be taken to dispose of waste materials. There is also no radioactivity danger or risk which would prevent further utilization of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

the translation product as occurs when using radioactive labels and the resulting protein product may be used directly or further purified. In addition, no prior knowledge of the protein sequence or structure is required which would involve, for example, unique suppressor tRNAs. Further, the sequence of the gene or mRNA need not be determined. Consequently, the existence of non-sense codons or any specific codons in the coding region of the mRNA is not necessary. Any tRNA can be used, including specific tRNAs for directed labeling, but such specificity is not required. Unlike post-translational labeling, nascent proteins are labeled with specificity and without being subjected to post-translational modifications which may effect protein structure or function.

One embodiment of the invention is directed to a method for labeling nascent proteins synthesized in a translation system. These proteins are labeled while being synthesized with detectable markers which are incorporated into the peptide chain. Markers which are aminoacylated to tRNA molecules, may comprise native amino acids, non-native amino acids, amino acid analogs or derivatives, or chemical moieties. These markers are introduced into nascent proteins from the resulting misaminoacylated tRNAs during the translation process. Aminoacylation is the process whereby a tRNA molecule becomes charged. When this process occurs *in vivo*, it is referred to as natural aminoacylation and the resulting product is an aminoacylated tRNA charged with a native amino acid. When this process occurs through artificial means, it is called misaminoacylation and a tRNA charged with anything but a native amino acid molecule is referred to as a misaminoacylated tRNA.

According to the present method, misaminoacylated tRNAs are introduced into a cellular or cell-free protein synthesizing system, the translation system, where they function in protein synthesis to incorporate detectable marker in place of a native amino acid in the growing peptide chain. The translation system comprises macromolecules including RNA and enzymes, translation, initiation and elongation factors, and chemical reagents. RNA of the system is required in three molecular forms, ribosomal RNA (rRNA), messenger RNA (mRNA) and transfer RNA (tRNA). mRNA carries the genetic instructions for building a peptide encoded within its codon

WO 01/14578

PCT/US00/23233

sequence. tRNAs contain specific anti-codons which decode the mRNA and individually carry amino acids into position along the growing peptide chain. Ribosomes, complexes of rRNA and protein, provide a dynamic structural framework on which the translation process, including translocation, can proceed. Within the cell, individually aminoacyl tRNA synthetases bind specific amino acids to tRNA molecules carrying the matching anti-codon creating aminoacylated or charged tRNAs by the process of aminoacylation. The process of translation including the aminoacylation or charging of a tRNA molecule is described in *Molecular Cell Biology* (J. Darnell et al. editors, Scientific American Books, N.Y., N.Y. 1991), which is hereby specifically incorporated by reference. Aminoacylation may be natural or by artificial means utilizing native amino acids, non-native amino acid, amino acid analogs or derivatives, or other molecules such as detectable chemicals or coupling agents. The resulting misaminoacylated tRNA comprises a native amino acid coupled with a chemical moiety, non-native amino acid, amino acid derivative or analog, or other detectable chemicals. These misaminoacylated tRNAs incorporate their markers into the growing peptide chain during translation forming labeled nascent proteins which can be detected and isolated by the presence or absence of the marker.

Any proteins that can be expressed by translation in a cellular or cell-free translation system may be nascent proteins and consequently, labeled, detected and isolated by the methods of the invention. Examples of such proteins include enzymes such as proteolytic proteins, cytokines, hormones, immunogenic proteins, carbohydrate or lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations. These methods are well adapted for the detection of products of recombinant genes and gene fusion products because recombinant vectors carrying such genes generally carry strong promoters which transcribe mRNAs at fairly high levels. These mRNAs are easily translated in a translation system.

Translation systems may be cellular or cell-free, and may be prokaryotic or eukaryotic. Cellular translation systems include whole cell preparations such as permeabilized cells or cell cultures wherein a desired nucleic acid sequence can be

WO 01/14578

PCT/US00/23233

transcribed to mRNA and the mRNA translated.

Cell-free translation systems are commercially available and many different types and systems are well-known. Examples of cell-free systems include prokaryotic lysates such as *Escherichia coli* lysates, and eukaryotic lysates such as wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates and human cell lysates. Eukaryotic extracts or lysates may be preferred when the resulting protein is glycosylated, phosphorylated or otherwise modified because many such modifications are only possible in eukaryotic systems. Some of these extracts and lysates are available commercially (Promega; Madison, WI; Stratagene; La Jolla, CA; Amersham; Arlington Heights, IL; GIBCO/BRL; Grand Island, NY). Membranous extracts, such as the canine pancreatic extracts containing microsomal membranes, are also available which are useful for translating secretory proteins. Mixtures of purified translation factors have also been used successfully to translate mRNA into protein as well as combinations of lysates or lysates supplemented with purified translation factors such as initiation factor-1 (IF-1), IF-2, IF-3 (α or β), elongation factor T (EF-Tu), or termination factors.

Cell-free systems may also be coupled transcription/translation systems wherein DNA is introduced to the system, transcribed into mRNA and the mRNA translated as described in *Current Protocols in Molecular Biology* (F.M. Ausubel et al. editors, Wiley Interscience, 1993), which is hereby specifically incorporated by reference. RNA transcribed in eukaryotic transcription system may be in the form of heteronuclear RNA (hnRNA) or 5'-end caps (7-methyl guanosine) and 3'-end poly A tailed mature mRNA, which can be an advantage in certain translation systems. For example, capped mRNAs are translated with high efficiency in the reticulocyte lysate system.

tRNA molecules chosen for misaminoacylation with marker do not necessarily possess any special properties other than the ability to function in the protein synthesis system. Due to the universality of the protein translation system in living systems, a large number of tRNAs can be used with both cellular and cell-free reaction mixtures. Specific tRNA molecules which recognize unique codons, such as nonsense or amber

WO 01/14578

PCT/US00/23233

codons (UAG), are not required.

Site-directed incorporation of the nonnative analogs into the protein during translation is also not required. Incorporation of markers can occur anywhere in the polypeptide and can also occur at multiple locations. This eliminates the need for prior information about the genetic sequence of the translated mRNA or the need for modifying this genetic sequence.

In some cases, it may be desirable to preserve the functional properties of the nascent protein. A subset of tRNAs which will incorporate markers at sites which do not interfere with protein function or structure can be chosen. Amino acids at the amino or carboxyl terminus of a polypeptide do not alter significantly the function or structure. tRNA molecules which recognize the universal codon for the initiation of protein translation (AUG), when misaminoacylated with marker, will place marker at the amino terminus. Prokaryotic protein synthesizing systems utilize initiator tRNA^{Met} molecules and eukaryotic systems initiator tRNA^{Met} molecules. In either system, the initiator tRNA molecules are aminoacylated with markers which may be non-native amino acids or amino acid analogs or derivatives that possess marker, reporter or affinity properties. The resulting nascent proteins will be exclusively labeled at their amino terminus, although markers placed internally do not necessarily destroy structural or functional aspects of a protein. For example, a tRNA^{Lys} may be misaminoacylated with the amino acid derivative dansyllysine which does not interfere with protein function or structure. In addition, using limiting amounts of misaminoacylated tRNAs, it is possible to detect and isolate nascent proteins having only a very small fraction labeled with marker which can be very useful for isolating proteins when the effects of large quantities of marker would be detrimental or are unknown.

tRNAs molecules used for aminoacylation are commercially available from a number of sources and can be prepared using well-known methods from sources including *Escherichia coli*, yeast, calf liver and wheat germ cells (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Promega; Madison, WI; Boehringer Mannheim Biochemicals; Indianapolis, IN). Their isolation and purification mainly involves cell-lysis; phenol extraction...

WO 01/14578

PCT/US00/23233

followed by chromatography on DEAE-cellulose. Amino-acid specific tRNA, for example tRNA^{Phe}, can be isolated by expression from cloned genes and overexpressed in host cells and separated from total tRNA by techniques such as preparative polyacrylamide gel electrophoresis followed by band excision and elution in high yield and purity (Seong and RajBhandary, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:334-338, 1987). Run-off transcription allows for the production of any specific tRNA in high purity, but its applications can be limited due to lack of post-transcriptional modifications (Bruce and Uhlenbeck, Biochemistry 21:3921, 1982).

Misaminoacylated tRNAs are introduced into the cellular-or cell-free protein synthesis system. In the cell-free protein synthesis system, the reaction mixture contains all the cellular components necessary to support protein synthesis including ribosomes, tRNA, rRNA, spermidine and physiological ions such as magnesium and potassium at appropriate concentrations and an appropriate pH. Reaction mixtures can be normally derived from a number of different sources including wheat germ, *E. coli* (S-30), red blood cells (reticulocyte lysate,) and oocytes, and once created can be stored as aliquots at about +4°C to -70°C. The method of preparing such reaction mixtures is described by J.M. Pratt (*Transcription and Translation*, B.D. Hames and S.J. Higgins, Editors, p. 209, IRL Press, Oxford, 1984) which is hereby incorporated by reference. Many different translation systems are commercially available from a number of manufacturers.

The misaminoacylated tRNA is added directly to the reaction mixture as a solution of predetermined volume and concentration. This can be done directly prior to storing the reaction mixture at -70°C in which case the entire mixture is thawed prior to initiation of protein synthesis or prior to the initiation of protein synthesis. Efficient incorporation of markers into nascent proteins is sensitive to the final pH and magnesium ion concentration. Reaction mixtures are normally about pH 6.8 and contain a magnesium ion concentration of about 3 mM. These conditions impart stability to the base-labile aminoacyl linkage of the misaminoacylated tRNA. Aminoacylated tRNAs are available in sufficient quantities from the translation extract. Misaminoacylated tRNAs charged with markers are added at between about 1.0 µg/ml

WO 01/14578

PCT/US00/23233

to about 1.0 mg/ml, preferably at between about 10 µg/ml to about 500 µg/ml, and more preferably at about 150 µg/ml.

Initiation of protein synthesis occurs upon addition of a quantity of mRNA or DNA to the reaction mixture containing the misaminoacylated tRNAs. mRNA
5 molecules may be prepared or obtained from recombinant sources, or purified from other cells by procedure such as poly-dT chromatography. One method of assuring that the proper ratio of the reaction mixture components is to use predetermined volumes that are stored in convenient containers such as vials or standard microcentrifuge tubes. For example, DNA and/or mRNA coding for the nascent
10 proteins and the misaminoacylated tRNA solution are premixed in proper amounts and stored separately in tubes. Tubes are mixed when needed to initiate protein synthesis.

Translations in cell-free systems generally require incubation of the ingredients for a period of time. Incubation times range from about 5 minutes to many hours, but is preferably between about thirty minutes to about five hours and more preferably
15 between about one to about three hours. Incubation may also be performed in a continuous manner whereby reagents are flowed into the system and nascent proteins removed or left to accumulate using a continuous flow system (A.S. Spirin et al., Sci. 242:1162-64, 1988). This process may be desirable for large scale production of nascent proteins. Incubations may also be performed using a dialysis system where
20 consumable reagents are available for the translation system in an outer reservoir which is separated from larger components of the translation system by a dialysis membrane [Kim, D., and Choi, C. (1996) *Biotechnol Prog* 12, 645-649]. Incubation times vary significantly with the volume of the translation mix and the temperature of the incubation. Incubation temperatures can be between about 4°C to about 60°C, and
25 are preferably between about 15°C to about 50°C, and more preferably between about 25°C to about 45°C and even more preferably at about 25°C or about 37°C. Certain markers may be sensitive to temperature fluctuations and in such cases, it is preferable to conduct those incubations in the non-sensitive ranges. Translation mixes will
typically comprise buffers such as Tris-HCl, Hepes or another suitable buffering agent
30 to maintain the pH of the solution between about 6 to 8, and preferably at about 7.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Again, certain markers may be pH sensitive and in such cases, it is preferable to conduct incubations outside of the sensitive ranges for the marker. Translation efficiency may not be optimal, but marker utility will be enhanced. Other reagents which may be in the translation system include dithiothreitol (DTT) or 2-mercaptoethanol as reducing agents, RNasin to inhibit RNA breakdown, and nucleoside triphosphates or creatine phosphate and creatine kinase to provide chemical energy for the translation process.

In cellular protein synthesis, it is necessary to introduce misaminoacylated tRNAs or markers into intact cells, cell organelles, cell envelopes and other discrete volumes bounded by an intact biological membrane, which contain a protein synthesizing system. This can be accomplished through a variety of methods that have been previously established such as sealing the tRNA solution into liposomes or vesicles which have the characteristic that they can be induced to fuse with cells. Fusion introduces the liposome or vesicle interior solution containing the tRNA into the cell. Alternatively, some cells will actively incorporate liposomes into their interior cytoplasm through phagocytosis. The tRNA solution could also be introduced through the process of cationic detergent mediated lipofection (Felgner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:7413-17, 1987), or injected into large cells such as oocytes. Injection may be through direct perfusion with micropipettes or through the method of electroporation.

Alternatively, cells can be permeabilized by incubation for a short period of time in a solution containing low concentrations of detergents in a hypotonic media. Useful detergents include Nonidet-P 40 (NP40), Triton X-100 (TX-100) or deoxycholate at concentrations of about 0.01 nM to 1.0 mM, preferably between about 0.1 μ M to about 0.01 mM, and more preferably about 1 μ M. Permeabilized cells allow marker to pass through cellular membranes unaltered and be incorporated into nascent proteins by host cell enzymes. Such systems can be formed from intact cells in culture such as bacterial cells, primary cells, immortalized cell lines, human cells or mixed cell populations. These cells may, for example, be transfected with an appropriate vector containing the gene of interest, under the control of a strong and

WO 01/14578

PCT/US00/23233

possibly regulated promoter. Messages are expressed from these vectors and subsequently translated within cells. Intact misaminoacylated tRNA molecules, already charged with a non-radioactive marker could be introduced to cells and incorporated into translated product.

5 One example of the use of misaminoacylation to detect nascent protein is schematically represented in Figure 4. A tRNA molecule is misaminoacylated with the marker which is highly fluorescent when excited with UV (ultraviolet) radiation. The misaminoacylated tRNA is then introduced into a cell-free protein synthesis extract and the nascent proteins containing the marker analog produced. Proteins in the cell-free
10 extract are separated by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The resulting gel contains bands which correspond to all of the proteins present in the cell-free extract. The nascent protein is identified upon UV illumination of the gel by detection of fluorescence from the band corresponding to proteins containing marker. Detection
15 can be through visible observation or by other conventional means of fluorescence detection.

The misaminoacylated tRNA can be formed by natural aminoacylation using cellular enzymes or misaminoacylation such as chemical misaminoacylation. One type of chemical misaminoacylation involves truncation of the tRNA molecule to permit attachment of the marker or marker precursor. For example, successive treatments
20 with periodate plus lysine, pH 8.0, and alkaline phosphatase removes 3'-terminal residues of any tRNA molecule generating tRNA-OH-3' with a mononucleotide or dinucleotide deletion from the 3'-terminus (Neu and Heppel, J. Biol. Chem. 239:2927-34, 1964). Alternatively, tRNA molecules may be genetically manipulated to delete specific portions of the tRNA gene. The resulting gene is transcribed producing
25 truncated tRNA molecules (Sampson and Uhlenbeck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:1033-37, 1988). Next, a dinucleotide is chemically linked to a modified amino acid or other marker by, for example, acylation. Using this procedure, markers can be synthesized and acylated to dinucleotides in high yield (Hudson, J. Org. Chem. 53:617-624, 1988; Happ et al., J. Org. Chem. 52:5387-91, 1987). These modified groups are
30 bound together and linked via the dinucleotide to the truncated tRNA molecules in a

WO 01/14578

PCT/US00/23233

process referred to as ligase coupling (Figure 3B).

A different bond is involved in misaminoacylation (Figure 3B, link B) than the bond involved with activation of tRNA by aminoacyl tRNA synthetase (Figure 3B, link A). As T4 RNA ligase does not recognize the acyl substituent, tRNA molecules can be readily misaminoacylated with few chemical complications or side reactions (link B, Figure 3B) (T.G. Heckler et al., *Biochemistry* 23:1468-73, 1984; and T.G. Heckler et al., *Tetrahedron* 40:87-94, 1984). This process is insensitive to the nature of the attached amino acid and allows for misaminoacylation using a variety of non-native amino acids. In contrast, purely enzymatic aminoacylation (link A) is highly sensitive and specific for the structures of substrate tRNA and amino acids.

Markers are basically molecules which will be recognized by the enzymes of the translation process and transferred from a charged tRNA into a growing peptide chain. To be useful, markers must also possess certain physical and physio-chemical properties. Therefore, there are multiple criteria which can be used to identify a useful marker. First, a marker must be suitable for incorporation into a growing peptide chain. This may be determined by the presence of chemical groups which will participate in peptide bond formation. Second, markers should be attachable to a tRNA molecule. Attachment is a covalent interaction between the 3'-terminus of the tRNA molecule and the carboxy group of the marker or a linking group attached to the marker and to a truncated tRNA molecule. Linking groups may be nucleotides, short oligonucleotides or other similar molecules and are preferably dinucleotides and more preferably the dinucleotide CA. Third, markers should have one or more physical properties that facilitate detection and possibly isolation of nascent proteins. Useful physical properties include a characteristic electromagnetic, spectral property such as emission or absorbance, magnetism, electron spin resonance, electrical capacitance, dielectric constant or electrical conductivity.

Useful markers are native amino acids coupled with a detectable label, detectable non-native amino acids, detectable amino acid analogs and detectable amino acid derivatives. Labels and other detectable moieties may be ferromagnetic, paramagnetic, diamagnetic, luminescent, electrochemiluminescent, fluorescent,

WO 01/14578

PCT/US00/23233

phosphorescent, chromatic or have a distinctive mass. Fluorescent moieties which are useful as markers include dansyl fluorophores, coumarins and coumarin derivatives, fluorescent acridinium moieties and benzopyrene based fluorophores. Preferably, the fluorescent marker has a high quantum yield of fluorescence at a wavelength different from native amino acids and more preferably has high quantum yield of fluorescence can be excited in both the UV and visible portion of the spectrum. Upon excitation at a preselected wavelength, the marker is detectable at low concentrations either visually or using conventional fluorescence detection methods. Electrochemiluminescent markers such as ruthenium chelates and its derivatives or nitroxide amino acids and their derivatives are preferred when extreme sensitivity is desired (J. DiCesare et al., BioTechniques 15:152-59, 1993). These markers are detectable at the femtomolar ranges and below.

In addition to fluorescent markers, a variety of markers possessing other specific physical properties can be used to detect nascent protein production. In general, these properties are based on the interaction and response of the marker to electromagnetic fields and radiation and include absorption in the UV, visible and infrared regions of the electromagnetic spectrum, presence of chromophores which are Raman active, and can be further enhanced by resonance Raman spectroscopy, electron spin resonance activity and nuclear magnetic resonances and use of a mass spectrometer to detect presence of a marker with a specific molecular mass. These electromagnetic spectroscopic properties are preferably not possessed by native amino acids or are readily distinguishable from the properties of native amino acids. For example, the amino acid tryptophan absorbs near 290 nm, and has fluorescent emission near 340 nm when excited with light near 290 nm. Thus, tryptophan analogs with absorption and/or fluorescence properties that are sufficiently different from tryptophan can be used to facilitate their detection in proteins.

Many different modified amino acids which can be used as markers are commercially available (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Molecular Probes; Eugene, OR). One such marker is Ne-dansyllysine created by the misaminoacylation of a dansyl fluorophore to a tRNA molecule (Figure 5; scheme 1). The α -amino group of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Nε-dansyllysine is first blocked with NVOC (ortho-nitro veratryl oxycarbonyl chloride) and the carboxyl group activated with cyanomethyl ester. Misaminoacylation is performed as described. The misaminoacylated tRNA molecules are then introduced into the protein synthesis system, whereupon the dansyllysine is incorporated directly into the newly synthesized proteins.

Another such marker is a fluorescent amino acid analog based on the highly fluorescent molecule coumarin (Figure 5; scheme 2). This fluorophore has a much higher fluorescence quantum yield than dansyl chloride and can facilitate detection of much lower levels of nascent protein. In addition, this coumarin derivative has a structure similar to the native amino acid tryptophan. These structural similarities are useful where maintenance of the nascent proteins' native structure or function are important or desired. Coumarin is synthesized as depicted in Figure 5 (scheme 2). Acetamidomalonic acid is alkylated with a slight excess of 4-bromomethyl coumarin (Aldrich Chemicals; Milwaukee, WI) in the presence of sodium ethoxide followed by acid hydrolysis. The corresponding amino acid as a hydrochloride salt that can be converted to the free amino acid analog.

The coumarin derivative can be used most advantageously if it misaminoacylates the tryptophan-tRNA, either enzymatically or chemically. When introduced in the form of the misaminoacylated tryptophan-tRNA, the coumarin amino acid will be incorporated only into tryptophan positions. By controlling the concentration of misaminoacylated tRNAs or free coumarin derivatives in the cell-free synthesis system, the number of coumarin amino acids incorporated into the nascent protein can also be controlled. This procedure can be utilized to control the amount of most any markers in nascent proteins.

Markers can be chemically synthesized from a native amino acid and a molecule with marker properties which cannot normally function as an amino acid. For example a highly fluorescent molecule can be chemically linked to a native amino acid group. The chemical modification can occur on the amino acid side-chain, leaving the carboxyl and amino functionalities free to participate in a polypeptide bond formation. Highly fluorescent molecules (e.g. dansyl chloride) can be linked to the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

nucleophilic side chains of a variety of amino acids including lysine, arginine, tyrosine, cysteine, histidine, etc., mainly as a sulfonamide for amino groups or sulfate bonds to yield fluorescent derivatives. Such derivatization leaves the ability to form peptide bond intact, allowing the normal incorporation of dansyllysine into a protein.

5 A number of factors determine the usefulness of a marker which is to be incorporated into nascent proteins through misaminoacylated tRNAs. These include the ability to incorporate the marker group into the protein through the use of a misaminoacylated tRNA in a cell-free or cellular protein synthesis system and the intrinsic detectability of the marker once it is incorporated into the nascent protein. In
10 general, markers with superior properties will allow shorter incubation times and require smaller samples for the accurate detection of the nascent proteins. These factors directly influence the usefulness of the methods described. In the case of fluorescent markers used for the incorporation into nascent proteins, favorable properties can be but are not limited to, small size, high quantum yield of
15 fluorescence, and stability to prolonged light exposure (bleach resistance).

Even with knowledge of the above factors, the optimum conditions to incorporate a specific marker into a protein using a specific cell-free or cellular translation system is difficult to predict *a priori* since it depends on the detailed interaction of the marker group with components of the protein translational synthesis
20 system including the tRNA, initiation or elongation factors and components of the ribosome. While it is generally expected that markers with smaller sizes can be accommodated more readily into the ribosome, the exact shape of the molecule and its specific interactions in the ribosomal binding site will be the most important determinant. For this reason, it is possible that some markers which are larger in size
25 can be more readily incorporated into nascent proteins compared to smaller markers. For example, such factors are very difficult to predict using known methods of molecular modeling.

One group of fluorophores with members possessing several favorable properties (including favorable interactions with components of the protein
30 translational synthesis system) is the group derived from dipyrrometheneboron

WO 01/14578

PCT/US00/23233

5 difluoride derivatives (BODIPY) (Figure 19). Compared to a variety of other commonly used fluorophores with advantageous properties such as high quantum yields, some BODIPY compounds have the additional unusual property that they are highly compatible with the protein synthesis system. The core structure of all BODIPY fluorophores is 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene. See U.S. Patent
10 Nos. 4,774,339; 5,187,288; 5,248,782; 5,274,113; 5,433,896; 5,451,663, all hereby incorporated by reference. A central feature is a difluoroboron as shown in Figure 19. All BODIPY fluorophores have several desirable properties for a marker (Molecular Probes Catalog, pages 13-18) including a high extinction coefficient, high fluorescence quantum yield, spectra that are insensitive to solvent polarity and pH, narrow emission
15 bandwidth resulting in a higher peak intensity compared to other dyes such as fluorescein, absence of ionic charge and enhanced photostability compared to fluorescein. The addition of substituents to the basic BODIPY structure which cause additional conjugation can be used to shift the wavelength of excitation or emission to convenient wavelengths compatible with the means of detection.

These dyes were described for the first time by Vos de Waal *et al.* (1977) and its fluorescence properties subsequently described by Worries [See Worries *et al.*, "A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3', 5'5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-
20 1,1'-BF₂ complex," *Recl. Trav. Chim. Paysbas* 104, 288 (1985). Dyes derived from dipyrrometheneboron difluoride have additional characteristics that make them suitable for incorporation into nascent proteins. Simple alkyl derivatives of the fluorophore 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene have been described by Treibs & Kreuzer, [Difluoroboryl-komplexe von di- und tripyrromethenen, *LIEBIGS ANNALEN CHEM.* 718,208 (1968)] and by Worries, Kopek, Lodder, & Lugtenburg,
25 [A novel water-soluble fluorescent probe: Synthesis, luminescence and biological properties of the sodium salt of the 4-sulfonato-3,3',5,5'-tetramethyl-2,2'-pyrromethen-1,1'-BF₂ complex, *RECL. TRAV. CHIM. PAYS-BAS* 104, 288 (1985)] as being highly fluorescent with spectral properties that are similar to fluorescein, with
30 maximum absorbance at about 490 to 510 nm and maximum emission at about 500 to

WO 01/14578

PCT/US00/23233

530 nm. U.S. Pat. No. 4,774,339 to Haugland et al. (1988) ('339 patent) (hereby incorporated by reference) describes 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (dipyrrrometheneboron difluoride) dyes including hydrogen, halogen, alkyl, cycloalkyl, aryl, arylalkyl, acyl, and sulfo-substituted derivatives that contain reactive groups suitable for conjugation to biomolecules, that have good photostability, and which have fluorescein-like spectra. As described in the '339 patent, and by Pavlopoulos, et al., [Laser action from a tetramethylpyrromethene-BF₂ complex, APP. OPTICS 27, 4998 (1988)], the emission of the alkyl derivatives of 4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene fluorescent dyes clearly overlaps that of fluorescein. The overlap allows the alkyl derivatives of dipyrrrometheneboron difluoride to be used with the same optical equipment as used with fluorescein-based dyes without modification of the excitation sources or optical filters. Similarly, aryl/heteroaryl substituents in the dipyrrrometheneboron difluoride cause the maximum of absorbance/emission to shift into longer wavelengths (See U.S. Pat. 5,451,663 hereby incorporated by reference).

A variety of BODIPY molecules are commercially available in an amine reactive form which can be used to derivatize aminoacylated tRNAs to yield a misaminoacylated tRNA with a BODIPY marker moiety. One example of a compound from this family which exhibits superior properties for incorporation of a detectable marker into nascent proteins is 4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene (BODIPY-FL). When the sulfonated N-hydroxysuccinimide (NHS) derivative of BODIPY-FL is used to misaminoacylate an *E. coli* initiator tRNA^{fmet}, the nascent protein produced can be easily detected on polyacrylamide gels after electrophoresis using a standard UV-transilluminator and photographic or CCD imaging system. This can be accomplished by using purified tRNA^{fmet} which is first aminoacylated with methionine and then the α -amino group of methionine is specifically modified using N-hydroxysuccinimide BODIPY. Before the modification reaction, the tRNA^{fmet} is charged maximally (>90%) and confirmed by using ³⁵S-methionine and acid-urea gels [Varshney, U., Lee, C. P., and RajBhandary, U. L. 1991. Direct analysis of aminoacylation levels of tRNA *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 266:24712-24718].

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Less than 10 nanoliters of a commercially available *E.coli* extract (*E. coli* T7 translation system, Promega, Madison, WI) are needed for analysis corresponding to less than 1 ng of synthesized protein. Incubation times required to produce detectable protein is approximately 1 hour but can be as little as 5 minutes (or less). BODIPY-FL can also be detected with higher sensitivity using commercially available fluorescent scanners with 488 nm excitation and emission measurement above 520 nm. Similar tests using other commercially available dyes including NBD (7-Nitrobenz-2-Oxa-1,3-Diazole), and Pyrene-PyMPO show approximately an order of magnitude reduction in fluorescence making them more difficult to detect using standard laboratory equipment such as a UV-transilluminator or fluorescent scanner. It has previously been shown that fluorescent markers such as 3-N-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)-2,3-diaminopropionic acid (NBD-DAP) and coumarin could be incorporated into proteins using misaminoacylated tRNAs. However, detection of nascent proteins containing these markers was only demonstrated using highly sensitive instrumentation such a fluorescent spectrometer or a microspectrofluorimeter and often require indirect methods such as the use of fluorescence resonance energy transfer (FRET) (Turcatti, G., Nemeth, K., Edgerton, M. D., Meseth, U., Talabot, F., Peitsch, M., Knowles, J., Vogel, H., and Chollet, A. (1996) *J Biol Chem* 271(33), 19991-8; Kudlicki, W., Odom, O. W., Kramer, G., and Hardesty, B. (1994) *J Mol Biol* 244(3), 319-31). Such instruments are generally not available for routine use in a molecular biology laboratory and only with special adaptation can be equipped for measurement of fluorescent bands on a gel.

An additional advantage of BODIPY-FL as a marker is the availability of monoclonal antibodies directed against it which can be used to affinity purify nascent proteins containing said marker. One example of such a monoclonal antibody is anti-BODIPY-FL antibody (Cat# A-5770, Molecular Probes, Eugene, OR). This combined with the ability incorporate BODIPY-FL into nascent proteins with high efficiency relative to other commercially available markers using misaminoacylated tRNAs facilitates more efficient isolation of the nascent protein. These antibodies against BODIPY-FL can be used for quantitation of incorporation of the BODIPY into the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

nascent protein.

A marker can also be modified after the tRNA molecule is aminoacylated or misaminoacylated using chemical reactions which specifically modify the marker without significantly altering the functional activity of the aminoacylated tRNA. These types of post-aminoacylation modifications may facilitate detection, isolation or purification, and can sometimes be used where the modification allow the nascent protein to attain a native or more functional configuration.

Fluorescent and other markers have detectable electromagnetic spectral properties that can be detected by spectrometers and distinguished from the electromagnetic spectral properties of native amino acids. Spectrometers which are most useful include fluorescence, Raman, absorption, electron spin resonance, visible, infrared and ultraviolet spectrometers. Other markers, such as markers with distinct electrical properties can be detected by an apparatus such as an ammeter, voltmeter or other spectrometer. Physical properties of markers which relate to the distinctive interaction of the marker with an electromagnetic field is readily detectable using instruments such as fluorescence, Raman, absorption, electron spin resonance spectrometers. Markers may also undergo a chemical, biochemical, electrochemical or photochemical reaction such as a color change in response to external forces or agents such as an electromagnetic field or reactant molecules which allows its detection.

One class of fluorescent markers contemplated by the present invention is the class of small peptides that can specifically bind to molecules which, upon binding, are detectable. One example of this approach is the peptide having the sequence of WEAAAREACCRECCARA (SEQ ID NO: 4). This sequence (which contains four cysteine residues) allows the peptide to specifically bind the non-fluorescent dye molecule 4', 5'-bis(1,3,2-dithioarsolan-2-yl) fluorescein (FLASH, which stands for fluorescein arsenic helix binder). This dye has the interesting property that, upon binding, it becomes fluorescent. In other words, fluorescence is observed only when this specific peptide sequence is present in the nascent protein. So by putting the peptide sequence at the N- or C-terminal, one can easily monitor the amount of protein synthesized. This peptide sequence can be introduced by designing the nucleic acid...

WO 01/14578

PCT/US00/23233

primers such that they carry a region encoding the peptide sequence.

Regardless of which class of fluorescent compounds is used, detection normally first involves physical separation of the nascent proteins from other biomolecules present in the cellular or cell-free protein synthesis system. Protein separation can be performed using, for example, gel electrophoresis or column chromatography and can be further facilitated with affinity markers which uniquely bind acceptor groups. Detection of a marker containing a fluorophore by gel electrophoresis can be accomplished using conventional fluorescence detection methods.

After protein synthesis in a cell-free system, the reaction mixture, which contains all of the biomolecules necessary for protein synthesis as well as nascent proteins, is loaded onto a gel which may be composed of polyacrylamide or agarose (R.C. Allen et al., *Gel Electrophoresis and Isoelectric Focusing of Proteins*, Walter de Gruyter, New York 1984). This mixture also contains the misaminoacylated tRNAs bearing the marker as well as uncharged tRNAs. Subsequent to loading the reaction mixture, a voltage is applied which spatially separates the proteins on the gel in the direction of the applied electric field. The proteins separate and appear as a set of discrete or overlapping bands which can be visualized using a pre- or post-gel staining technique such as Coomassie blue staining. The migration of the protein band on the gel is a function of the molecular weight of the protein with increasing distance from the loading position being a function of decreasing molecular weight. Bands on the gel which contain nascent proteins will exhibit fluorescence when excited at a suitable wavelength. These bands can be detected visually, photographically or spectroscopically and, if desired, the nascent proteins purified from gel sections.

For example, if BODIPY-FL is used as a marker, nascent proteins will fluoresce at 510 nm when excited by UV illumination. This fluorescence can be detected visually by simply using a standard hand-held UV illuminator or a transilluminator. Approximately 10 nanograms (ng) of the protein alpha-hemolysin is detectable using this method. Also useful are electronic imaging devices which can rapidly screen and identify very low concentrations of markers such as a fluorescent scanner based on a low-temperature CCD imager. In this case as low as 0.3 ng of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

protein can be detected.

The molecular weight and quantity of the nascent protein can be determined by comparison of its band-position on the gel with a set of bands of proteins of predetermined molecular weight which are fluorescently labeled. For example, a nascent protein of molecular weight 25,000 could be determined because of its relative position on the gel relative to a calibration gel containing the commercially available standard marker proteins of known quantities and with known molecular weights (bovine serum albumin, 66 kD; porcine heart fumarase, 48.5 kD; carbonic anhydrase, 29 kD, β -lactoglobulin, 18.4 kD; α -lactoglobulin, 14.2 kD; Sigma Chemical; St. Louis, MO).

Calibration proteins may also contain a similar markers for convenient detection using the same method as the gel bearing the nascent protein. This can be accomplished in many cases by directly reacting the calibration proteins with a molecule similar to the marker. For example, the calibration proteins can be modified with dansyl chloride so as to obtain their fluorescent derivatives (R.E. Stephens, Anal. Biochem. 65, 369-79, 1975). Alternatively, the proteins could be labeled with an NHS derivative of BODIPY-FL. These fluorescent proteins can be analyzed using PAGE. Combined detection of these fluorescent calibration proteins along with that of nascent protein which contains fluorescent marker analog will accurately determine both the molecular weight and quantity of the nascent protein synthesized. If necessary, the amounts of marker within each calibration and nascent protein can be determined to provide an accurate quantitation. Proteins with predetermined levels of fluorescent markers can be used advantageously to provide for quantitation of the gel bearing the nascent protein. This could be accomplished by genetically engineering a calibration protein so that it contains a specific reactive residue such as cysteine so that only one fluorescent dye will be attached per protein.

Other methods of protein separation are also useful for detection and subsequent isolation and purification of nascent proteins containing markers. For example, proteins can be separated using capillary electrophoresis, isoelectric focusing, low pressure chromatography and high-performance or fast-pressure liquid

WO 01/14578

PCT/US00/23233

chromatography (HPLC or FPLC). In these cases, the individual proteins are separated into fractions which can be individually analyzed by fluorescent detectors at the emission wavelengths of the markers. Alternatively, on-line fluorescence detection can be used to detect nascent proteins as they emerge from the column fractionation system. A graph of fluorescence as a function of retention time provides information on both the quantity and purity of nascent proteins produced.

Another embodiment of the invention is directed to a method for labeling, detecting and, if desired, isolating and purifying nascent proteins, as described above, containing cleavable markers. Cleavable markers comprise a chemical structure which is sensitive to external effects such as physical or enzymatic treatments, chemical or thermal treatments, electromagnetic radiation such as gamma rays, x-rays, ultraviolet light, visible light, infrared light, microwaves, radio waves or electric fields. The marker is aminoacylated to tRNA molecules as before using conventional technology or misaminoacylated and added to a translation system. After incubation and production of nascent proteins, marker can be cleaved by the application of specified treatments and nascent proteins detected. Alternatively, nascent proteins may also be detected and isolated by the presence or absence of the cleaved marker or the chemical moiety removed from the marker.

One example of a cleavable marker is a photocleavable marker such as chemical compounds which contain the 2-nitrobenzyl moiety (Figure 6A). Upon illumination, these aromatic nitro compounds undergo an internal oxidation-reduction reaction (Pillai, *Synthesis* 1-26, 1980; Patchornik *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 92:6333-35, 1970). As a result, the nitro group is reduced to a nitroso group and an oxygen is inserted into the benzylic carbon-hydrogen bond at the ortho position. The primary photochemical process is the intramolecular hydrogen abstraction by the excited nitro group. This is followed by an electron-redistribution process to the aci-nitro form which rearranges to the nitroso product. Subsequent thermal reaction leads to the cleavage of substrate from the nitrobenzyl linkage (Figure 6B). Examples of other cleavable markers are shown in Figure 7.

It may sometimes be desirable to create a distance between the substrate and

WO 01/14578

PCT/US00/23233

the cleavable moiety. To accomplish this, cleavable moieties may be separated from substrates by cross-linker arms. Cross-linkers increase substrate access and stabilize the chemical structure, and can be constructed using, for example, long alkyl chains or multiple repeat units of caproyl moieties linked via amide linkages.

5 There are as many methods to synthesize cleavable markers as there are different markers. One example for the synthesis of photocleavable biotins based on nitrobenzyl alcohols involves four major steps. 2-bromo-2'-nitroacetophenone, a precursor of the photoreactive moiety, is first converted into an α - or ω -amino acid like ϵ -aminocaproic acid. The resulting acid and amino functionality of the
10 photoreactive group is coupled using dicyclohexyl carbodiimide (DCC). The benzoyl carbonyl group of the resulting amide is reduced using sodium borohydride. The resulting derivative of nitrobenzyl alcohol is derivatized to obtain the final component which is able to react with biomolecular substrates, for example by the reaction with phosgene gas, to introduce the chloroformate functionality. The resulting compound is
15 depicted in Figure 8A along with alternative derivatives of PCB. Possible linkages to amino acids are depicted in Figure 8B.

Cleavable markers can facilitate the isolation of nascent proteins. For example, one type of a cleavable marker is photocleavable biotin coupled to an amino acid. This marker can be incorporated into nascent proteins and the proteins purified by the
20 specific interaction of biotin with avidin or streptavidin. Upon isolation and subsequent purification, the biotin is removed by application of electromagnetic radiation and nascent proteins utilized in useful applications without the complications of an attached biotin molecule. Other examples of cleavable markers include photocleavable coumarin, photocleavable dansyl, photocleavable dinitrophenyl and
25 photocleavable coumarin-biotin. Photocleavable markers are cleaved by electromagnetic radiation such as UV light, peptidyl markers are cleaved by enzymatic treatments, and pyrenyl fluorophores linked by disulfide bonds are cleaved by exposure to certain chemical treatments such as thiol reagents.

Cleavage of photocleavable markers is dependent on the structure of the
30 photoreactive moiety and the wavelength of electromagnetic radiation used for

WO 01/14578

PCT/US00/23233

illumination. Other wavelengths of electromagnetic radiation should not damage the proteins or other chemical moieties. In the case of unsubstituted 2-nitrobenzyl derivatives, the yield of photolysis and recovery of the substrate are significantly decreased by the formation of side products which act as internal light filters and are capable to react with amino groups of the substrate. Typical illumination times vary from 1 to about 24 hours and yields are 1-95%. Radiation sources are placed within about 10 cm of the substrate proteins and set on low power so as to minimize side reactions, if any, which may occur in the nascent proteins. In the case of alpha-substituted 2-nitrobenzyl derivatives (methyl, phenyl, etc.), a considerable increase in rate of photo-removal as well as yield of the released substrate are observed. The introduction of other electron donor groups into phenyl rings of photoreactive moieties increases the yield of substrate. The general reaction for the photolysis of PCB is depicted in Figure 9.

For enzymatic cleavage, markers introduced contain specific bonds which are sensitive to unique enzymes of chemical substances. Introduction of the enzyme or chemical into the protein mixture cleaves the marker from the nascent protein. When the marker is a modified amino acid, this can result in the production of native protein forms. Thermal treatments of, for example, heat sensitive chemical moieties operate in the same fashion. Mild application of thermal energy, such as with microwaves or radiant heat, cleaves the sensitive marker from the protein without producing any significant damage to the nascent proteins.

Description of Preferred Embodiments

A. Detection of Mutations

Detection of mutations is an increasingly important area in clinical diagnosis, including but not limited to the diagnosis of cancer and/or individuals disposed to cancer. The protein truncation test (PTT) is a technique for the detection of nonsense and frameshift mutations which lead to the generation of truncated protein products. Genes associated with Duchenne muscular dystrophy, adenomatous polyposis coli, human mutL homologue and human nutS homologue (both involved in colon cancer),

WO 01/14578

PCT/US00/23233

and BRAC1 (involved in familial breast cancer) can now be screened for mutations in this manner, along with others (see Table 1).

Typically, the PTT technique involves the incorporation of a T7 promoter site, ribosome binding site, and an artificial methionine start site into a PCR product covering the region of the gene to be investigated. The PCR product is then transcribed and translated using either an in vitro rabbit reticulocyte lysate or wheat germ lysate system, to generate a protein corresponding to the region of the gene amplified. The presence of a stop codon in the sequence, generated by a nonsense mutation or a frameshift, will result in the premature termination of protein translation, producing a truncated protein that can be detected by standard gel electrophoresis (e.g. SDS-PAGE) analysis combined with radioactive detection.

There are drawbacks to the technique as currently practiced. One of the most important problems involves the identification of the product of interest. This is made difficult because of nonspecific radiolabeled products. Attempts to address these problems have been made. One approach is to introduce an affinity tag after the start site and before the region encoding the gene of interest. See Rowan and Bodmer, "Introduction of a *myc* Reporter Tag to Improve the Quality of Mutation Detection Using the Protein Truncation Test," *Human Mutation* 9:172 (1997). However, such approaches still have the disadvantage that they rely on electrophoresis.

The present invention contemplates a gel-free truncation test (GFTT), wherein two or three markers are introduced into the nascent protein. The present invention contemplates both pre-natal and post-natal testing to determine predisposition to disease. In a preferred embodiment of the invention, the novel compositions and methods are directed to the detection of frameshift or chain terminating mutations. In order to detect such mutations, a nascent protein is first synthesized in a cell-free or cellular translation system from message RNA or DNA coding for the protein which may contain a possible mutation. The nascent protein is then separated from the cell-free or cellular translation system using an affinity marker located at or close to the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Table 1. Applications of PTT in Human Molecular Genetics

	Disease References	% Truncating Mutations	Gene
	Familial Adenomatous Polyposis	95%	APC
5	Hereditary desmoid disease	100%	APC
	Ataxia telangiectasia	90%	ATM
	Hereditary Breast and Ovarian Cancer	90% 90%	BRCA1 BRCA2
	Cystic Fibrosis	15%	CFTR
10	Duchenne Muscular Dystrophy	95%	DMD
	Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy	80%	EMD
	Fanconi anaemia	80%	FAA
15	Hunter Syndrome	-50%	IDS
	Hereditary non-polyposis colorectal cancer	-80% -70%	hMSH2 hMLH1
	Neurofibromatosis type 1	50%	NF1
	Neurofibromatosis type 2	65%	NF2
20	Polycystic Kidney Disease	95%	PKD1
	Rubinstein-Taybi Syndrome	10%	RTS
<i>The percentage of truncating mutations reported which should be detectable using PTT.</i>			

WO 01/14578

PCT/US00/23233

N-terminal end of the protein. The protein is then analyzed for the presence of a detectable marker located at or close to the N-terminal of the protein (N-terminal marker). A separate measurement is then made on a sequence dependent detectable marker located at or close to the C-terminal end of the protein (C-terminal marker).

5 A comparison of the measurements from the C-terminal marker and N-terminal marker provides information about the fraction of nascent proteins containing frameshift or chain terminating mutations in the gene sequence coding for the nascent protein. The level of sequence dependent marker located near the C-terminal end reflects the fraction of protein which did not contain chain terminating or out-of-frame
10 mutations. The measurement of the N-terminal marker provides an internal control to which measurement of the C-terminal marker is normalized. Normalizing the level of the C-terminal marker to the N-terminal marker eliminates the inherent variabilities such as changes in the level of protein expression during translation that can undermine experimental accuracy. Separating the protein from the translation mixture
15 using an affinity marker located at or close to the N-terminal end of the protein eliminates the occurrence of false starts which can occur when the protein is initiated during translation from an internal AUG in the coding region of the message. A false start can lead to erroneous results since it can occur after the chain terminating or out-of-frame mutation. This is especially true if the internal AUG is in-
20 frame with the message. In this case, the peptide C-terminal marker will still be present even if message contains a mutation.

In one example, a detectable marker comprising a non-native amino acid or amino acid derivative is incorporated into the nascent protein during its translation at the amino terminal (N-terminal end) using a misaminoacylate initiator tRNA which
25 only recognizes the AUG start codon signaling the initiation of protein synthesis. One example of a detectable marker is the highly fluorescent compound BODIPY FL. The marker might also be photocleavable such as photocleavable coumarin or photocleavable biotin. The nascent protein is then separated from the cell-free or cellular translation system by using a coupling agent which binds to an affinity marker
30 located adjacent to the N-terminal of the protein. One such affinity marker is a

WO 01/14578

PCT/US00/23233

specific protein sequence known as an epitope. An epitope has the property that it selectively interacts with molecules and/or materials containing acceptor groups. There are many epitope sequences reported in the literature including HisX6 (HHHHHH) (SEQ ID NO: 5) described by ClonTech and C-myc (-EQKLISEEDL) (SEQ ID NO:6) described by Roche-BM, Flag (DYKDDDDK) (SEQ ID NO:7) described by Stratagene, StrepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:8) described by Sigma-Genosys and HA Tag (YPYDVPDYA) (SEQ ID NO:9) described by Roche-BM.

Once the nascent protein is isolated from the translation system, it is analyzed for presence of the detectable marker incorporated at the N-terminal of the protein. In the case of BODIPY FL, it can be detected by measuring the level of fluorescence using a variety of commercially available instrument such as a Molecular Dynamics Model 595 fluorescence scanner that is equipped with excitation at 488 nm and an emission filter that allows light above 520 nm to be transmitted to the detector.

The protein is then analyzed for the presence of a sequence specific marker located near the C-terminal end of the protein. In normal practice, such a sequence specific marker will consist of a specific sequence of amino acids located near the C-terminal end of the protein which is recognized by a coupling agent. For example, an antibody can be utilized which is directed against an amino acid sequence located at or near C-terminal end of the nascent protein can be utilized. Such antibodies can be labeled with a variety of markers including fluorescent dyes that can be easily detected and enzymes which catalyze detectable reactions that lead to easily detectable substrates. The marker chosen should have a different detectable property than that used for the N-terminal marker. An amino acid sequence can also comprise an epitope which is recognized by coupling agents other than antibodies. One such sequence is 6 histidines sometimes referred to as a his-tag which binds to cobalt complex coupling agent.

A variety of N-terminal markers, affinity markers and C-terminal markers are available which can be used for this embodiment. The N-terminal marker could be BODIPY, affinity marker could be StrepTag and C-terminal marker could be a HisX6 tag. In this case, after translation, the reaction mixture is incubated in streptavidin

WO 01/14578

PCT/US00/23233

coated microtiter plate or with streptavidin coated beads. After washing unbound material, the N-terminal marker is directly measured using a fluorescence scanner while the C-terminal marker can be quantitated using anti-hisX6 antibodies conjugated with a fluorescent dye (like rhodamine or Texas Red) which has optical properties different than BODIPY, thus facilitating simultaneous dual detection.

In a different example, the N-terminal marker could be a biotin or photocleavable biotin incorporated by a misaminoacylated tRNA, the affinity marker could be a His X6 tag and the C-terminal had C-myc marker. In this case, after the translation, the reaction mixture is incubated with metal chelating beads or microtiter plates (for example Talon, ClonTech). After washing the unbound proteins, the plates or beads can be subjected to detection reaction using streptavidine conjugated fluorescence dye and C-myc antibody conjugated with other fluorescent dye. In addition, one can also use chemiluminescent detection method using antibodies which are conjugated with peroxidases.

It will be understood by those skilled in the area of molecular biology and biochemistry that the N-terminal marker, affinity marker and C-terminal marker can all consist of epitopes that can be incorporated into the nascent protein by designing the message or DNA coding for the nascent protein to have a nucleic acid sequence corresponding to the particular epitope. This can be accomplished using known methods such as the design of primers that incorporate the desired nucleic acid sequence into the DNA coding for the nascent protein using the polymerase chain reaction (PCR). It will be understood by those skilled in protein biochemistry that a wide variety of detection methods are available that can be used to detect both the N-terminal marker and the C-terminal markers. Additional examples include the use of chemiluminescence assays where an enzyme which converts a non-chemiluminescent substrate to a chemiluminescent product is conjugated to an antibody that is directed against a particular epitope.

One example of this approach is based on using a luminometer to measure luminescent markers. A biotin detectable marker is incorporated at the N-terminal using a misaminoacylated tRNA. The biotin is detected by using a streptavidin which

WO 01/14578

PCT/US00/23233

is conjugated to *Renilla* luciferase from sea pansy. The C-terminal sequence comprises an epitope which interacts with a binding agent that has attached firefly luciferase. After separation of the nascent protein using a distinct epitope located near the N-terminal end of the protein, the protein is subjected to a dual luminescent luciferase assay based on a procedure described by Promega Corp and known as the Dual-Luciferase® Reporter Assay. This assay consists of first adding Luciferase Assay Reagent II available from Promega Corp. to the isolated nascent protein and then measuring the level of chemiluminescence. Stop & Glo® Reagent is then added which simultaneously quenches the firefly luminescence and activates the *Renilla* luminescence. The luciferase assay can be performed and quantified in seconds. A comparison of the level of luminescence measured from the firefly and *Renilla* luciferase provides an indication of whether a mutation is present or not in the coding message of the nascent protein.

In an additional example, the N-terminal marker comprises an affinity marker which is incorporated at the N-terminal end of the protein during its translation using a misaminoacylated tRNA. The affinity marker interacts with a coupling agent which acts to separate the nascent protein from the translation mixture. The nascent protein also contains a detectable marker which is located adjacent or close to the N-terminal of the protein containing the affinity marker. In addition, it contains a sequence specific marker at or near the C-terminal end of the protein. The detectable markers near the N-terminal and C-terminal ends of the nascent protein are then measured and compared to detect the presence of chain terminating or out-of-frame mutations.

There are a variety of additional affinity markers, N-terminal markers and C-terminal markers available for this embodiment. The affinity marker could be biotin or photocleavable biotin, N-terminal marker could be StepTag and C-terminal the C-myc epitope. In this case, after the translation, the reaction mixture is incubated with streptavidin coated beads or microtiter plates coated with streptavidin. After washing the unbound proteins, the plates or beads can be subjected to detection reaction using anti-his 6 antibodies conjugated with a fluorescent dye (like rhodamine or Texas Red) and C-myc antibody conjugated with other another fluorescent dye such as BODIPY.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

In addition, one can also use chemiluminescent detection method using antibodies which are conjugated with peroxidases. Even in case of peroxidases conjugated antibodies, one can use fluorescent substrates and use FluorImager like device to quantitate N-terminal and C-terminal labels.

5 For optimal effectiveness, the N-terminal marker and affinity marker should be placed as close as possible to the N-terminal end of the protein. For example, if an N-terminal marker is incorporated using a misaminoacylated initiator, it will be located at the N-terminal amino acid. In this case, the affinity marker should be located immediately adjacent to the N-terminal marker. Thus, if a BODIPY marker which
10 consists of a BODIPY conjugated to methionine is incorporated by a misaminoacylated initiator tRNA, it should be followed by an epitope sequence such as StepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:8) so that the entire N-terminal sequence will be BODIPY-MWSPQFEK (SEQ ID NO: 10). However, for specific cases it may be advantageous to add intervening amino acids between the BODIPY-M and the epitope
15 sequence in order to avoid interaction between the N-terminal marker and the affinity marker or the coupling agent which binds the affinity marker. Such interactions will vary depending on the nature of the N-terminal marker, affinity marker and coupling agent.

For optimal effectiveness, the C-terminal marker should be placed as close as possible to the C-terminal end of protein. For example, if a His-X6 tag is utilized, the
20 protein sequence would terminate with 6 His. In some cases, an epitope may be located several residues before the C-terminal end of the protein in order to optimize the properties of the nascent protein. This might occur for example, if a specific amino acid sequence is necessary in order to modify specific properties of the nascent
25 protein that are desirable such as its solubility or hydrophobicity.

In the normal application of this method, the ratio of the measured level of N-terminal and C-terminal markers for a nascent protein translated from a normal message can be used to calculate a standard normalized ratio. In the case of a
30 message which may contain a mutation, deviations from this standard ratio can then be used to predict the extent of mutations. For example, where all messages are

WO 01/14578

PCT/US00/23233

defective, the ratio of the C-terminal marker to the N-terminal marker is expected to be zero. On the other hand, in the case where all messages are normal, the ratio is expected to be 1. In the case where only half of the message is defective, for example for a patient which is heterozygote for a particular genetic defect which is chain terminating or causes an out-of-frame reading error, the ratio would be 1/2.

There are several unique advantages of this method compared to existing techniques for detecting chain terminating or out-of-frame mutations. Normally, such mutations are detected by analyzing the entire sequence of the suspect gene using conventional DNA sequencing methods. However, such methods are time consuming, expensive and not suitable for rapid throughput assays of large number of samples. An alternative method is to utilize gel electrophoresis, which is able to detect changes from the expected size of a nascent protein. This approach, sometimes referred to as the protein truncation test, can be facilitated by using non-radioactive labeling methods such as the incorporation of detectable markers with misaminoacylated tRNAs. However, in many situations, such as high throughput screening, it would be desirable to avoid the use of gel electrophoresis which is time-consuming (typically 60-90 minutes). In the present method, the need for performing gel electrophoresis is eliminated. Furthermore, since the approach depends on comparison of two detectable signals from the isolated nascent protein which can be fluorescent, luminescent or some combination thereof, it is highly amenable to automation.

Measuring a sequence dependent marker located near the C-terminal end of the protein provides information about the presence of either a frameshift or chain terminating mutation since the presence of either would result in an incorrect sequence. The measurement of the N-terminal marker provides an internal control to which measurement of the C-terminal marker is normalized. Normalizing the level of the C-terminal marker to the N-terminal marker eliminates the inherent variabilities such as changes in the level of protein expression during translation that can undermine experimental accuracy. Separating the protein from the translation mixture using an affinity marker located at or close to the N-terminal end of the protein eliminates the occurrence of false starts which can occur when the protein is initiated.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

during translation from an internal AUG in the coding region of the message. A false start can lead to erroneous results since it can occur after the chain terminating or out-of-frame mutation. This is especially true if the internal AUG is in-frame with the message. In this case, the peptide C-terminal marker will still be present even if message contains a mutation.

B. Reporter Groups

Another embodiment of the invention is directed to a method for monitoring the synthesis of nascent proteins in a cellular or a cell-free protein synthesis system without separating the components of the system. These markers have the property that once incorporated into the nascent protein they are distinguishable from markers free in solution or linked to a tRNA. This type of marker, also called a reporter, provides a means to detect and quantitate the synthesis of nascent proteins directly in the cellular or cell-free translation system.

One type of reporters previously described in United States Patent 5,643,722 (hereby incorporated by reference) has the characteristic that once incorporated into the nascent protein by the protein synthesizing system, they undergo a change in at least one of their physical or physio-chemical properties. The resulting nascent protein can be uniquely detected inside the synthesis system in real time without the need to separate or partially purify the protein synthesis system into its component parts. This type of marker provides a convenient non-radioactive method to monitor the production of nascent proteins without the necessity of first separating them from pre-existing proteins in the protein synthesis system. A reporter marker would also provide a means to detect and distinguish between different nascent proteins produced at different times during protein synthesis by addition of markers whose properties are distinguishable from each other, at different times during protein expression. This would provide a means of studying differential gene expression.

One example of the utilization of reporters is schematically represented in Figure 10. A tRNA molecule is misaminoacylated with a reporter (R), which has lower or no fluorescence at a particular wavelength for monitoring and excitation. The

WO 01/14578

PCT/US00/23233

misaminoacylated tRNA is then introduced into a cellular or cell-free protein synthesis system and the nascent proteins containing the reporter analog are gradually produced. Upon incorporation of the reporter into the nascent protein (R*), it exhibits an increased fluorescence at known wavelengths. The gradual production of the nascent protein is monitored by detecting the increase of fluorescence at that specific wavelength.

The chemical synthesis of a reporter can be based on the linkage of a chemical moiety or a molecular component having reporter properties with a native amino acid residue. There are many fluorescent molecules which are sensitive to their environment and undergo a change in the wavelength of emitted light and yield of fluorescence. When these chemical moieties, coupled to amino acids, are incorporated into the synthesized protein, their environments are altered because of a difference between the bulk aqueous medium and the interior of a protein which can cause reduced accessibility to water, exposure to charged ionic groups, reduced mobility, and altered dielectric constant of the surrounding medium. Two such examples are shown in Figure 11A.

One example of a reporter molecule is based on a fluorescent acridinium moiety and has the unique property of altering its emission properties, depending upon polarity or viscosity of the microenvironment. It has a higher quantum yield of fluorescence when subjected to hydrophobic environment and/or viscosity. Due to the hydrophobicity of the reporter itself, it is more likely to be associated with the hydrophobic core of the nascent protein after incorporation into the growing nascent polypeptide. An increase in the fluorescence intensity is a direct measure of protein synthesis activity of the translation system. Although, the environment of each reporter residue in the protein will be different, and in some cases, the reporter may be present on the surface of the protein and exposed to an aqueous medium, a net change occurs in the overall spectroscopic properties of the reporters incorporated into the protein relative to bulk aqueous medium. A change in the spectroscopic properties of only a subset of reporters in the protein will be sufficient to detect the synthesis of proteins that incorporate such reporters.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

An alternative approach is to utilize a reporter which alters its fluorescent properties upon formation of a peptide bond and not necessarily in response to changes in its environment. Changes in the reporter's fluorescence as it partitions between different environments in the cell-free extract does not produce a large signal change compared to changes in fluorescence upon incorporation of the reporter into the nascent protein.

A second example of a reporter is a marker based on coumarin such as 6,7-(4', 5'-proline)coumarin. This compound can be chemically synthesized by coupling a fluorophore like coumarin with an amino-acid structural element in such a way that the fluorophore would alter its emission or absorption properties after forming a peptide linkage (Figure 11B). For example, a proline ring containing secondary amino functions will participate in peptide bond formation similar to a normal primary amino group. Changes in fluorescence occur due to the co-planarity of the newly formed peptide group in relation to the existing fluorophore. This increases conjugation/delocalization due to the π -electrons of nitrogen-lone pair and carbonyl-group in the peptide bond. Synthesis of such compounds is based on on coumarin synthesis using ethylacetoacetate (Figure 11C).

Reporters are not limited to those non-native amino acids which change their fluorescence properties when incorporated into a protein. These can also be synthesized from molecules that undergo a change in other electromagnetic or spectroscopic properties including changes in specific absorption bands in the UV, visible and infrared regions of the electromagnetic spectrum, chromophores which are Raman active and can be enhanced by resonance Raman spectroscopy, electron spin resonance activity and nuclear magnetic resonances. In general, a reporter can be formed from molecular components which undergo a change in their interaction and response to electromagnetic fields and radiation after incorporation into the nascent protein.

In the present invention, reporters may also undergo a change in at least one of their physical or physio-chemical properties due to their interaction with other markers or agents which are incorporated into the same nascent protein or are present in the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

reaction chamber in which the protein is expressed. The interaction of two different markers with each other causes them to become specifically detectable. One type of interaction would be a resonant energy transfer which occurs when two markers are within a distance of between about 1 angstrom (Å) to about 50 Å, and preferably less than about 10 Å. In this case, excitation of one marker with electromagnetic radiation causes the second marker to emit electromagnetic radiation of a different wavelength which is detectable. A second type of interaction would be based on electron transfer between the two different markers which can only occur when the markers are less than about 5 Å. A third interaction would be a photochemical reaction between two markers which produces a new species that has detectable properties such as fluorescence. Although these markers may also be present on the misaminoacylated tRNAs used for their incorporation into nascent proteins, the interaction of the markers occurs primarily when they are incorporated into protein due to their close proximity. In certain cases, the proximity of two markers in the protein can also be enhanced by choosing tRNA species that will insert markers into positions that are close to each other in either the primary, secondary or tertiary structure of the protein. For example, a tyrosine-tRNA and a tryptophan-tRNA could be used to enhance the probability for two different markers to be near each other in a protein sequence which contains the unique neighboring pair tyrosine-tryptophan.

In one embodiment of this method, a reporter group is incorporated into a nascent protein using a misaminoacylated tRNA so that when it binds to a coupling agent, the reporter group interacts with a second markers or agents which causes them to become specifically detectable. Such an interaction can be optimized by incorporating a specific affinity element into the nascent protein so that once it interacts with a coupling agent the interaction between the reporter group and the second marker is optimized. Such an affinity element might comprise a specific amino acid sequence which forms an epitope or a nonnative amino acid. In one example, the reporter group is incorporated at the N-terminal of the nascent protein by using a misaminoacylated tRNA. The epitope is incorporated into the nascent protein so that when it interacts with the coupling agent the reporter comes into close proximity with

WO 01/14578

PCT/US00/23233

a second marker which is conjugated to the coupling agent.

One type of interaction between the markers that is advantageously used causes a fluorescence resonant energy transfer which occurs when the two markers are within a distance of between about 1 angstrom (Å) to about 50 Å, and preferably less than about 10 Å. In this case, excitation of one marker with electromagnetic radiation causes the second marker to emit electromagnetic radiation of a different wavelength which is detectable. This could be accomplished, for example, by incorporating a fluorescent marker at the N-terminal end of the protein using the E. coli initiator tRNA^{fMet}. An epitope is then incorporated near the N-terminal end such as the StepTag (WSHPQFEK) (SEQ ID NO:8) described by Sigma-Genosys. Streptavidin is then conjugated using known methods with a second fluorescent marker which is chosen to efficiently undergo fluorescent energy transfer with marker 1. The efficiency of this process can be determined by calculating the a Forster energy transfer radius which depends on the spectral properties of the two markers. The marker-streptavidin complex is then introduced into the translation mixture. Only when nascent protein is produced does fluorescent energy transfer between the first and second marker occur due to the specific interaction of the nascent protein StreptTag epitope with the streptavidin.

There are a variety of dyes which can be used as marker pairs in this method that will produce easily detectable signals when brought into close proximity. Previously, such dye pairs have been used for example to detect PCR products by hybridizing to probes labeled with a dye on one probe at the 5'-end and another at the 3'-end. The production of the PCR product brings a dye pair in close proximity causing a detectable FRET signal. In one application the dyes, fluorescein and LC 640 were utilized on two different primers (Roche Molecular Biochemicals- <http://www.biochem.boehringer-mannheim.com/lightcycler/monito03.htm>). When the fluorescein is excited by green light (around 500 nm) that is produced by a diode laser, the LC 640 emits red fluorescent light (around 640 nm) which can be easily detected with an appropriate filter and detector. In the case of nascent proteins, the pair of dyes BODIPY FL and LC 640 would function in a similar manner. For example,

WO 01/14578

PCT/US00/23233

incorporation of the BODIPY FL on the N-terminal end of the protein and the labeling of a binding agent with LC 640 which is directed against an N terminal epitope would allow detection of the production of nascent proteins.

5 The use of the marker pair BODIPY-FL and coumarin is a second pair which can be utilized advantageously. In one study, [Keller, R. C., Silviu, J. R., and De Kruijff, B. (1995) *Biochem Biophys Res Commun* 207(2), 508-14] it was found using the spectral overlap a Forster energy transfer radius (RO) of 50 +/- 2 A and 40 +/- 2 A for the coumarin- (beta-BODIPY FL) and the coumarin-(beta-BODIPY 530/550) couple respectively. Experimentally this was estimated to be 49.0-51.5 A and 38.5-10 42.5 A respectively. It is also possible to use two markers with similar or identical spectral properties for the marker pair due to the process of quenching. For example, in one study this process was used in the case of BODIPY FL in order to study the processing of exogenous proteins in intact cells [Reis, R. C., Sorgine, M. H., and Coelho-Sampaio, T. (1998) *Eur J Cell Biol* 75(2), 192-7] and in a second case to15 study the kinetics of intracellular viral assembly [Da Poian, A. T., Gomes, A. M., and Coelho-Sampaio, T. (1998) *J Virol Methods* 70(1), 45-58].

As stated above, a principal advantage of using reporters is the ability to monitor the synthesis of proteins in cellular or a cell-free translation systems directly without further purification or isolation steps. Reporter markers may also be utilized in20 conjunction with cleavable markers that can remove the reporter property at will. Such techniques are not available using radioactive amino acids which require an isolation step to distinguish the incorporated marker from the unincorporated marker. With *in vitro* translation systems, this provides a means to determine the rate of synthesis of proteins and to optimize synthesis by altering the conditions of the reaction. For example, an *in vitro* translation system could be optimized for protein25 production by monitoring the rate of production of a specific calibration protein. It also provides a dependable and accurate method for studying gene regulation in a cellular or cell-free systems.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

C. Affinity Markers

Another embodiment of the invention is directed to the use of markers that facilitate the detection or separation of nascent proteins produced in a cellular or cell-free protein synthesis system. Such markers are termed affinity markers and have the property that they selectively interact with molecules and/or materials containing acceptor groups. The affinity markers are linked by aminoacylation to tRNA molecules in an identical manner as other markers of non-native amino acid analogs and derivatives and reporter-type markers as described. These affinity markers are incorporated into nascent proteins once the misaminoacylated tRNAs are introduced into a translation system.

An affinity marker facilitates the separation of nascent proteins because of its selective interaction with other molecules which may be biological or non-biological in origin through a coupling agent. For example, the specific molecule to which the affinity marker interacts, referred to as the acceptor molecule, could be a small organic molecule or chemical group such as a sulfhydryl group (-SH) or a large biomolecule such as an antibody. The binding is normally chemical in nature and may involve the formation of covalent or non-covalent bonds or interactions such as ionic or hydrogen bonding. The binding molecule or moiety might be free in solution or itself bound to a surface, a polymer matrix, or a residue on the surface of a substrate. The interaction may also be triggered by an external agent such as light, temperature, pressure or the addition of a chemical or biological molecule which acts as a catalyst.

The detection and/or separation of the nascent protein and other preexisting proteins in the reaction mixture occurs because of the interaction, normally a type of binding, between the affinity marker and the acceptor molecule. Although, in some cases some incorporated affinity marker will be buried inside the interior of the nascent protein, the interaction between the affinity marker and the acceptor molecule will still occur as long as some affinity markers are exposed on the surface of the nascent protein. This is not normally a problem because the affinity marker is distributed over several locations in the protein sequence.

Affinity markers include native amino acids, non-native amino acids, amino

WO 01/14578

PCT/US00/23233

acid derivatives or amino acid analogs in which a coupling agent is attached or incorporated. Attachment of the coupling agent to, for example, a non-native amino acid may occur through covalent interactions, although non-covalent interactions such as hydrophilic or hydrophobic interactions, hydrogen bonds, electrostatic interactions
5 or a combination of these forces are also possible. Examples of useful coupling agents include molecules such as haptens, immunogenic molecules, biotin and biotin derivatives, and fragments and combinations of these molecules. Coupling agents enable the selective binding or attachment of newly formed nascent proteins to facilitate their detection or isolation. Coupling agents may contain antigenic sites for a
10 specific antibody, or comprise molecules such as biotin which is known to have strong binding to acceptor groups such as streptavidin. For example, biotin may be covalently linked to an amino acid which is incorporated into a protein chain. The presence of the biotin will selectively bind only nascent proteins which incorporated such markers to avidin molecules coated onto a surface. Suitable surfaces include
15 resins for chromatographic separation, plastics such as tissue culture surfaces for binding plates, microtiter dishes and beads, ceramics and glasses, particles including magnetic particles, polymers and other matrices. The treated surface is washed with, for example, phosphate buffered saline (PBS), to remove non-nascent proteins and other translation reagents and the nascent proteins isolated. In some case these
20 materials may be part of biomolecular sensing devices such as optical fibers, chemfets, and plasmon detectors.

One example of an affinity marker is dansyllysine (Figure 5). Antibodies which interact with the dansyl ring are commercially available (Sigma Chemical; St. Louis, MO) or can be prepared using known protocols such as described in *Antibodies: A*
25 *Laboratory Manual* (E. Harlow and D. Lane, editors, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1988) which is hereby specifically incorporated by reference. Many conventional techniques exist which would enable proteins containing the dansyl moiety to be separated from other proteins on the basis of a specific antibody-dansyl interaction. For example, the antibody could be immobilized onto the packing material
30 of a chromatographic column. This method, known as affinity column

WO 01/14578

PCT/US00/23233

chromatography, accomplishes protein separation by causing the target protein to be retained on the column due to its interaction with the immobilized antibody, while other proteins pass through the column. The target protein is then released by disrupting the antibody-antigen interaction. Specific chromatographic column materials such as ion-exchange or affinity Sepharose, Sephacryl, Sephadex and other chromatography resins are commercially available (Sigma Chemical; St. Louis, MO; Pharmacia Biotech; Piscataway, NJ).

Separation can also be performed through an antibody-dansyl interaction using other biochemical separation methods such as immunoprecipitation and immobilization of the antibodies on filters or other surfaces such as beads, plates or resins. For example, protein could be isolated by coating magnetic beads with a protein-specific antibody. Beads are separated from the extract using magnetic fields. A specific advantage of using dansyllysine as an affinity marker is that once a protein is separated it can also be conveniently detected because of its fluorescent properties.

In addition to antibodies, other biological molecules exist which exhibit equally strong interaction with target molecules or chemical moieties. An example is the interaction of biotin and avidin. In this case, an affinity analog which contains the biotin moiety would be incorporated into the protein using the methods which are part of the present invention. Biotin-lysine amino acid analogs are commercially available (Molecular Probes; Eugene, OR).

Affinity markers also comprise one component of a multicomponent complex which must be formed prior to detection of the marker. One particular embodiment of this detection means involves the use of luminescent metal chelates, in particular luminescent rare earth metal chelates. It is well known that certain molecules form very stable complexes with rare earth metals. It is also well known that introduction of chromophore into these chelates sensitizes luminescence of these complexes. A variety of detection schemes based on the use of luminescent rare earth metal chelates have been described: Hemmila, I.A., "Applications of Fluorescence in Immunoassays", (Wiley&Sons 1991).

In a preferred embodiment, tRNA is misaminoacylated with a chromophore

WO 01/14578

PCT/US00/23233

that also acts as a rare earth shelter. This modified aminoacyl tRNA is then introduced into cellular or cell-free protein translation system and the modified amino acid incorporated into nascent protein. The mixture is then separated using gel electrophoresis and the gel is incubated with a solution containing rare earth cation.

5 Under these conditions rare earth cations form luminescent complexes with amino acids modified with a chelator present only in nascent proteins. The nascent proteins are then detected using a mid-range UV transilluminator (350 nm), which excites the formed lanthanide complex. The image is then recorded using polaroid camera or CCD array and a filter. In one embodiment, the derivatives of salicylic acid as one
10 component and terbium ions as a second component of the binary detection system are used.

Affinity markers can also comprise cleavable markers incorporating a coupling agent. This property is important in cases where removal of the coupled agent is required to preserve the native structure and function of the protein and to release
15 nascent protein from acceptor groups. In some cases, cleavage and removal of the coupling agent results in production of a native amino acid. One such example is photocleavable biotin coupled to an amino acid.

Photocleavable biotin contains a photoreactive moiety which comprises a phenyl ring derivatized with functionalities represented in Figure 12 by X, Y and Z. X allows linkage of PCB to the bimolecular substrate through the reactive group X'.
20 Examples of X' include Cl, O-N-hydroxysuccinimidyl, OCH₂CN, OPhF₃, OPhCl₃, N₃. Y represents a substitution pattern of a phenyl ring containing one or more substitutions such as nitro or alkoxyl. The functionality Z represents a group that allows linkage of the cross-linker moiety to the photoreactive moiety. The
25 photoreactive moiety has the property that upon illumination, it undergoes a photoreaction that results in cleavage of the PCB molecule from the substrate.

A lysine-tRNA is misaminoacylated with photocleavable biotin-lysine, or chemically modified to attach a photocleavable biotin amino acid. The misaminoacylated tRNA is introduced into a cell-free protein synthesizing system and
30 nascent proteins produced. The nascent proteins can be separated from other

WO 01/14578

PCT/US00/23233

components of the system by streptavidin-coated magnetic beads using conventional methods which rely on the interaction of beads with a magnetic field. Nascent proteins are released then from beads by irradiation with UV light of approximately 280 nm wavelength.

5 Many devices designed to detect proteins are based on the interaction of a target protein with specific immobilized acceptor molecule. Such devices can also be used to detect nascent proteins once they contain affinity markers such as bioreceptors based on sensing changes in surface plasmons, light scattering and electronic properties of materials that are altered due to the interaction of the target molecule with the
10 immobilized acceptor group.

Nascent proteins, including those which do not contain affinity-type markers, may be isolated by more conventional isolation techniques. Some of the more useful isolation techniques which can be applied or combined to isolate and purify nascent proteins include chemical extraction, such as phenol or chloroform extract, dialysis, precipitation such as ammonium sulfate cuts, electrophoresis, and chromatographic techniques. Chemical isolation techniques generally do not provide specific isolation of individual proteins, but are useful for removal of bulk quantities of non-proteinaceous material. Electrophoretic separation involves placing the translation mixture containing nascent proteins into wells of a gel which may be a denaturing or
20 non-denaturing polyacrylamide or agarose gel. Direct or pulsed current is applied to the gel and the various components of the system separate according to molecular size, configuration, charge or a combination of their physical properties. Once distinguished on the gel, the portion containing the isolated proteins removed and the nascent proteins purified from the gel. Methods for the purification of protein from
25 acrylamide and agarose gels are known and commercially available.

Chromatographic techniques which are useful for the isolation and purification of proteins include gel filtration, fast-pressure or high-pressure liquid chromatography, reverse-phase chromatography, affinity chromatography and ion exchange chromatography. These techniques are very useful for isolation and purification of
30 proteins species containing selected markers.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Another embodiment of the invention is directed to the incorporation of non-native amino acids or amino acid derivatives with marker or affinity properties at the amino-terminal residue of a nascent protein (Figure 13). This can be accomplished by using the side chain of an amino acid or by derivatizing the terminal amino group of an amino acid. In either case the resulting molecule is termed an amino acid derivative. The amino-terminal residue of a protein is free and its derivatization would not interfere with formation of the nascent polypeptide. The non-native amino acid or amino acid derivative is then used to misaminoacylate an initiator tRNA which only recognizes the first AUG codon signaling the initiation of protein synthesis. After introduction of this misaminoacylated initiator tRNA into a protein synthesis system, marker is incorporated only at the amino terminal of the nascent protein. The ability to incorporate at the N-terminal residue can be important as these nascent molecules are most likely to fold into native conformation. This can be useful in studies where detection or isolation of functional nascent proteins is desired.

Not all markers incorporated with misaminoacylated initiator tRNAs at the amino-terminal residue of the nascent protein show the same acceptance by the protein translational machinery. Furthermore, the range of incorporation of different markers can be more restrictive compared to the use of non-initiator tRNAs such as lysyl-tRNA. Although the factors influencing this discrimination between markers for incorporation by a misaminoacylated initiator tRNA are not fully elucidated, one possibility is that the initiation factor (IF2) which is used for carrying formylmethionine-tRNA^{fmet} to ribosomes plays a role. A second possibility is that the interaction between the marker structure and the ribosomes plays a role. For example, the marker, BODIPY-FL is accepted by the protein translational machinery to a greater extent than smaller fluorescent markers such as NBD. For this reason, BODIPY-FL is a superior marker for use in the detection of nascent protein when incorporated through initiator tRNAs.

A marker group can also be incorporated at the N terminal by using a mutant tRNA which does not recognize the normal AUG start codon. In some cases this can lead to a higher extent of specific incorporation of the marker. For example, the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

mutant of initiator tRNA, where the anticodon has been changed from CAU--> CUA (resulting in the change of initiator methionine codon to amber stop codon) has shown to act as initiator suppressor tRNA (Varshney U, RajBhandary UL, Proc Natl Acad Sci U S A 1990 Feb;87(4):1586-90; Initiation of protein synthesis from a termination codon). This tRNA initiates the protein synthesis of a particular gene when the normal initiation codon, AUG is replaced by the amber codon UAG. Furthermore, initiation of protein synthesis with UAG and tRNA(Met^{CUA}) was found to occur with glutamine and not methionine. In order to use this tRNA to introduce a marker at the N terminal of a nascent protein, this mutant tRNA can be enzymatically aminoacylated with glutamine and then modified with suitable marker. Alternatively, this tRNA could be chemically aminoacylated using modified amino acid (for example methionine-BODIPY). Since protein translation can only be initiated by this protein on messages containing UAG, all proteins will contain the marker at the N-terminal end of the protein.

15 D. Mass Spectrometry

Mass spectrometry measures the mass of a molecule. The use of mass spectrometry in biology is continuing to advance rapidly, finding applications in diverse areas including the analysis of carbohydrates, proteins, nucleic acids and biomolecular complexes. For example, the development of matrix assisted laser desorption ionization (MALDI) mass spectrometry (MS) has provided an important tool for the analysis of biomolecules, including proteins, oligonucleotides, and oligosaccharides [Karas, 1987 #6180; Hillenkamp, 1993 #6175]. This technique's success derives from its ability to determine the molecular weight of large biomolecules and non-covalent complexes (>500,000 Da) with high accuracy (0.01%) and sensitivity (subfemtomole quantities). Thus far, it has been found applicable in diverse areas of biology and medicine including the rapid sequencing of DNA, screening for bioactive peptides and analysis of membrane proteins.

Markers incorporated by misaminoacylated tRNAs into nascent proteins, especially at a specific position such as the N-terminal can be used for the detection

WO 01/14578

PCT/US00/23233

of nascent proteins by mass spectrometry. Without such a marker, it can be very difficult to detect a band due to a nascent protein synthesized in the presence of a cellular or cell-free extract due the presence of many other molecules of similar mass in the extract. For example, in some cases less than 0.01% of the total protein mass of the extract may comprise the nascent protein(s). Furthermore, molecules with similar molecular weight as the nascent protein may be present in the mixture. Such molecules will overlap with peaks due to the nascent protein. This problem is particularly severe if the nascent protein is a transcription or translation factor already present in the cell-free or cellular protein synthesis. The synthesis of additional amounts of this protein in the protein synthesis system would be difficult to detect using known methods in mass spectrometry since peak intensities are not correlated in a linear manner with protein concentration.

Detection by mass spectrometry of a nascent protein produced in a translation system is also very difficult if the mass of the nascent protein produced is not known. This might situation might occur for example if the nascent protein is translated from DNA where the exact sequence is not known. One such example is the translation of DNA from individuals which may have specific mutations in particular genes or gene fragments. In this case, the mutation can cause a change in the protein sequence and even result in chain truncation if the mutation results in a stop codon. The mass of nascent proteins produced in a translation system might also not be known if DNA is derived from unknown sources such as colonies of bacteria which can contain different members of a gene library or fragments thereof.

In one embodiment of the invention, the incorporation of markers of a specific mass (mass markers) into nascent proteins can be used to eliminate all of the above mentioned problems associated with the conventional mass spectrometric approach. First, a tRNA misaminoacylated with a marker of a known mass is added to the protein synthesis system. The synthesis system is then incubated to produce the nascent proteins. The mass spectrum of the protein synthesis system is then measured. The presence of the nascent protein can be directly detected by identifying peaks in the mass spectrum of the protein synthesis system which correspond to the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

mass of the unmodified protein and a second band at a higher mass which corresponds to the mass of the nascent protein plus the modified amino acid containing the mass of the marker.

There are several steps that can be taken to optimize the efficient detection of nascent proteins using this method. The mass of the marker should exceed the resolution of the mass spectrometer, so that the increased in mass of the nascent protein can be resolved from the unmodified mass. For example, a marker with a mass exceeding 100 daltons can be readily detected in proteins with total mass up to 100,000 using both matrix assisted laser desorption (MALDI) or electrospray ionization (ESI) techniques. The amount of misaminoacylated tRNA should be adjusted so that the incorporation of the mass marker occurs in approximately 50% of the total nascent protein produced. An initiator tRNA is preferable for incorporation of the mass marker since it will only be incorporated at the N-terminal of the nascent protein, thus avoiding the possibility that the nascent protein will contain multiple copies of the mass marker.

One example of this method is the incorporation of the marker BODIPY-FL, which has a mass of 282, into a nascent protein using a misaminoacylated initiator tRNA. Incorporation of this marker into a nascent protein using a misaminoacylated initiator tRNA causes a band to appear at approximately 282 daltons above the normal band which appears for the nascent protein. Since the incorporation of the marker is less than one per protein due to competition of non-misaminoacylated E.coli tRNA^{fmet}, a peak corresponding to the unmodified protein also appears. Identification of these two bands separated by the mass of the marker allows initial identification of the band due to the nascent protein. Further verification of the band due to the nascent protein can be made by adjusting the level of the misaminoacylated initiator tRNA in the translation mixture. For example, if the misaminoacylated initiator tRNA is left out, then only a peak corresponding to the unmodified protein appears in the mass spectrum of the protein synthesis system. By comparing the mass spectrum from the protein synthesis system containing and not containing the misaminacylated tRNA with the BODIPY-FL, the presence of the nascent protein can be uniquely identified, even

WO 01/14578

PCT/US00/23233

when a protein with similar or identical mass is already present in the protein synthesis system.

For the purpose of mass spectrometric identification of nascent proteins, it is sometimes advantageous to utilize a photocleavable marker. In this case, peaks due to nascent proteins in the mass spectrum can be easily identified by measuring and comparing spectra from samples of the protein synthesis system that have been exposed and not exposed to irradiation which photocleaves the marker. Those samples which are not exposed to irradiation will exhibit bands corresponding the mass of the nascent protein which has the incorporated mass marker, whereas those samples which are exposed to irradiation will exhibit bands corresponding to the mass of the nascent proteins after removal of the mass marker. This shift of specific bands in the mass spectrum due to irradiation provides a unique identifier of bands which are due to the nascent proteins in the protein synthesis system.

One example of this method involves the use of the photocleavable marker, photocleavable biotin. When photocleavable biotin is incorporated into the test protein α -hemolysin, a toxin produced by staphylococcus, by using the misaminoacylated *E. coli* initiator tRNA^{met}, the mass spectrum exhibits two peaks corresponding to the mass of the nascent protein 35,904 Da, and a second peak at 36,465 Da corresponding to the mass of the nascent protein plus the mass of photocleavable biotin. After photocleavage of the marker by exposing the cell-free or cellular extract to UV light with a wavelength of approximately 365 nm for approximately 10 minutes, the two bands undergo changes in intensity due to cleavage of the marker from the nascent protein. For example, in the case of a form of photocleavable biotin containing a single spacer the change in the mass will be 561.57. These characteristic changes are then used to uniquely identify the peaks corresponding the nascent protein. In the case of MALDI mass spectrometry, the probe laser pulses when adjusted to sufficient intensity can be used to accomplish photocleavage of photocleavable biotin. In this case, changes can be conveniently measured during the course of the measurements, thereby facilitating detection of peaks associated with the nascent protein. A similar approach can also be used to identify more than one nascent protein of unknown mass

WO 01/14578

PCT/US00/23233

in a cell or cell-free translation system.

Markers with affinity properties which are incorporated by misaminoacylated tRNAs into nascent proteins can also be very useful for the detection of such proteins by mass spectrometry. Such markers can be used to isolate nascent proteins from the rest of the cell-free or cellular translation system. In this case, the isolation of the nascent proteins from the rest of the cell-free mixture removes interference from bands due to other molecules in the protein translation system. An example of this approach is the incorporation of photocleavable biotin into the N-terminal end of a nascent proteins using misaminoacylated tRNA. When this marker is incorporated onto the N-terminal end of a nascent protein using an *E. coli* tRNA^{met}, it provides a convenient affinity label which can be bound using streptavidin affinity media such as streptavidin agarose. Once the nascent protein is separated by this method from the rest of the protein synthesis system, it can be released by UV-light and analyzed by mass spectrometry. In the case of MALDI mass spectrometry, release of the nascent protein can most conveniently be accomplished by using the UV-laser excitation pulses of the MALDI system. Alternatively, the sample can be irradiated prior to mass spectrometric analysis in the case of MALDI or ESI mass spectrometry.

E. Electrophoresis

Another embodiment of the invention is directed to methods for detecting by electrophoresis the interaction of molecules or agents with nascent proteins which are translated in a translation system. This method allows a large number of compounds or agents to be rapidly screened for possible interaction with the expressed protein of specific genes, even when the protein has not been isolated or its function identified. It also allows a library of proteins expressed by a pool of genes to be rapidly screened for interaction with compounds or agents without the necessity of isolating these proteins or agents. The agents might be part of a combinatorial library of compounds or present in a complex biological mixture such as a natural sample. The agents might interact with the nascent proteins by binding to them or to cause a change in the structure of the nascent protein by chemical or enzymatic modification.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

In addition to gel electrophoresis, which measures the electrophoretic mobility of proteins in gels such as polyacrylamide gel, this method can be performed using capillary electrophoresis. CE measures the electrophoretic migration time of a protein which is proportional to the charge-to-mass ratio of the molecule. One form of CE, sometimes termed affinity capillary electrophoresis, has been found to be highly sensitive to interaction of proteins with other molecules including small ligands as long as the binding produces a change in the charge-to-mass ratio of the protein after the binding event. The highest sensitivity can be obtained if the protein is conjugated to a marker with a specifically detectable electromagnetic spectral property such as a fluorescent dye. Detection of a peak in the electrophoresis chromatogram is accomplished by laser induced emission of mainly visible wavelengths. Examples of fluorescent dyes include fluorescein, rhodamine, Texas Red and BODIPY.

It is very difficult to detect a nascent protein synthesized in a cellular or cell-free extract by CE without subsequent isolation and labeling steps due the need for high sensitivity detection and the presence of many other molecules of similar mass/charge ratio in the extract. For example, in typical cases less than 0.01% of the total protein mass of the extract may comprise the nascent protein(s). Other molecules with similar electrophoretic migration times as the nascent protein may be present in the mixture. Such molecules will overlap with peaks due to the nascent protein.

It is also very difficult using conventional methods of CE to detect the interaction of molecules with nascent proteins produced in a cell free or cellular synthesis system. Affinity capillary electrophoresis has been found to be sensitive to interaction of proteins with other molecules including small ligands as long as the binding produces a change in the charge-to-mass ratio of the protein after the binding event. However, the selective addition of a marker such as a fluorescent dye to a nascent protein is not possible using conventional means because most markers reagents will nonspecifically label other molecules in the protein synthesis system besides the nascent proteins. In some cases, it may be possible utilize a specific substrate or ligand which binds only to the nascent protein. However this approach requires a detailed knowledge of the binding properties of the nascent protein and

WO 01/14578

PCT/US00/23233

special design of a ligand with marker properties. The nascent protein may also be isolated from the protein synthesis system and then selectively labeled with a detectable marker. However, this also requires the development of a procedure for isolation of the nascent protein which can be time consuming and requires extensive knowledge of properties of the protein or protein engineering to incorporate an affinity epitope. Even after a nascent protein has been isolated, it is often difficult to uniformly label the protein with a marker so that the charge/mass ratio of each labeled protein remains the same. In the most advantageous form of labeling, a highly fluorescent marker is incorporated at only one specific position in the protein thus avoiding a set of proteins with different electrophoretic mobilities.

The method of the invention also overcomes major problems associated with the rapid screening of samples for new therapeutic compounds using capillary electrophoresis (CE) such as described in US. Patent 5,783,397 (hereby incorporated by reference) when the target protein is a nascent protein expressed in a translation system. This includes the need to uniformly label expressed target proteins in a translation system with markers for high sensitivity analysis by CE which normally requires lengthy isolation steps and special techniques for uniform labeling.

The method can also be used in conjunction with expression cloning method for isolating novel cDNA clones such as described in U.S. patent 565,451, which is specifically incorporated by reference. This patent describes novel methods to identify cDNA clones by a) collecting pools of about 100 individual bacterial colonies; and b) expressing proteins encoded by the cDNAs in the pools *in vitro*. Proteins which can be identified in this manner include but are not limited to nucleic acid binding protein, cytoskeletal protein, growth factor, differentiation factor, post-translationally modified protein, phosphorylated protein, proteolytically cleaved protein, glycosylated protein, subunit or a multiple component of a protein complex, enzyme, isoform of a known protein, mutant form of known protein. Importantly, the method includes as a crucial step identifying a desired protein from protein translation system. Two such methods described for identifying the protein involve radioactive labeling and chemical labeling. However, these steps can be extremely time-consuming and are not

WO 01/14578

PCT/US00/23233

conductive to rapidly screening an extract for the desired protein.

The present invention avoids all of the problems discussed above. In one embodiment of the invention a tRNA misaminoacylated with a detectable marker is added to the protein synthesis system. The system is incubated to incorporate the detectable marker into the nascent proteins. One or more molecules (agents) are then combined with the nascent proteins (either before or after isolation) to allow agents to interact with nascent proteins. Aliquots of the mixture are then subjected to electrophoresis. Nascent proteins which have interacted with the agents are identified by detecting changes in the electrophoretic mobility of nascent proteins with incorporated markers. In the case where the agents have interacted with the nascent proteins, the proteins can be isolated and subsequently subjected to further analysis. In cases where the agents have bound to the nascent proteins, the bound agents can be identified by isolating the nascent proteins.

In one example of this method, the fluorescent marker BODIPY-FL is used to misaminoacylate an *E. coli* initiator tRNA^{fMet} as previously described. The misaminoacylated tRNA is then added to a protein synthesis system and the system incubated to produce nascent protein containing the BODIPY-FL at the N-terminal. A specific compound which may bind to the nascent protein is then added to the protein synthesis system at a specific concentration. An aliquot from the mixture is then injected into an apparatus for capillary electrophoresis. Nascent proteins in the mixture are identified by detection of the fluorescence from the BODIPY-FL using exciting light from an Argon laser tuned to 488 nm. Interaction of the specific compound is determined by comparing the electrophoretic mobility measured of the nascent protein exposed to the specific compound with a similar measurement of the nascent protein that has not been exposed. The binding strength of the compound can then be ascertained by altering the concentration of the specific compounds added to the protein synthesis system and measuring the change in the relative intensity of bands assigned to the uncomplexed and complexed nascent protein.

The method is not limited to studying the interaction of one agent with one nascent protein translated in a protein translation system. For example, a library of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

compounds can be screened to identify those which serve as ligands for specific target protein. In addition to interactions which involve the binding of one or more agents to the nascent proteins interactions which result in a modification of the nascent protein including but not limited to phosphorylation, proteolysis, glycosylation, formation of a complex with other biological molecules can be detected using the marker incorporated in the nascent proteins when combined with electrophoresis. For example, the interaction of an antibody with the nascent proteins can be detected due to a change in the effective electrophoretic mobility of the complex formed. A similar approach could be used to identify the presence of one or more compounds in a complex mixture which bind to the nascent protein. Such a mixture might constitute a library of compounds produced by combinatorial chemistry or compounds which might be present in a complex biological mixture such as natural samples which may contain therapeutic compounds.

F. Microscale Methods

While the present invention contemplates capillary electrophoresis (see above), other methods are also contemplated. In particular, microscale methods can be employed in conjunction with the novel markers (e.g. BODIPY) and methods of the present invention. The methods are "microscale" in that the dimensions of the channels on the device (and the corresponding fluid volumes) are very small (typically in the picometer range). For example, channels are typically between approximately 0.10 and 0.50 μm in depth and between approximately 5 and 500 μm in width.

Although there are many formats, materials, and size scales for constructing integrated fluidic systems, the present invention contemplates microfabricated devices as a solution to the many inefficiencies of larger scale screening. Devices can be microfabricated from a number of materials. Silicon is the material used for the construction of computing microprocessors and its fabrication technologies have developed at an unprecedented pace over the past 30 years. The principal modern method for fabricating semiconductor integrated circuits is the so-called planar process. The planar process relies on the unique characteristics of silicon and comprises a

WO 01/14578

PCT/US00/23233

complex sequence of manufacturing steps involving deposition, oxidation, photolithography, diffusion and/or ion implantation, and metallization, to fabricate a "layered" integrated circuit device in a silicon substrate. See e.g., W. Miller, U.S. Patent No. 5,091,328, hereby incorporated by reference. While this technology was initially applied to making microelectronic devices, the same techniques are currently being used for micromechanical systems.

Continuous flow liquid transport has been described using a microfluidic device developed with silicon. See J. Pfahler *et al.*, *Sensors and Actuators*, A21-A23 (1990), pp. 431-434. Pumps have also been described, using external forces to create flow, based on micromachining of silicon. See H.T.G. Van Lintel *et al.*, *Sensors and Actuators* 15:153-167 (1988). SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels has also been described. See Yao S *et al.*, "SDS capillary gel electrophoresis of proteins in microfabricated channels," *PNAS* 96:5372 (1999). Compared to more conventional two-dimensional denaturing gel electrophoresis (which is generally time consuming and requires considerable amounts of sample), this microchannel-based separation technique was shown to be quick and offer high resolution.

As a mechanical building material, silicon has well-known fabrication characteristics. The economic attraction of silicon devices is that their associated micromachining technologies are, essentially, photographic reproduction techniques. In these processes, transparent templates or masks containing opaque designs are used to photodefine objects on the surface of the silicon substrate. The patterns on the templates are generated with computer-aided design programs and can delineate structures with line-widths of less than one micron. Once a template is generated, it can be used almost indefinitely to produce identical replicate structures. Consequently, even extremely complex micromachines can be reproduced in mass quantities and at low incremental unit cost — provided that all of the components are compatible with the silicon micromachining process. While the present invention contemplates other substrates, such as glass or quartz, for use in photolithographic methods to construct microfabricated analysis devices, silicon is preferred because of the added advantage of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

allowing a large variety of electronic components to be fabricated within the same structure.

In one embodiment, the present invention contemplates silicon micromachined components in an integrated analysis system. Sample (e.g. a test compound) and one or more reagents (e.g. a BODIPY labelled nascent protein) are injected either continuously or in pulses into the device through entry ports and they are transported through channels to a reaction chamber, such as a thermally controlled reactor where mixing and reactions take place. The biochemical products can be then moved down a new channel (or by an electrophoresis module, if desired) where migration data is collected by a detector and transmitted to a recording instrument. If desired, a polymer can be used in the channels to provide resolution by molecular sieving. The biochemical products can be isolated by diverting the flow to an external port for subsequent additional analysis. Importantly, the fluidic and electronic components are designed to be fully compatible in function and construction with the biological reactions and reagents. In this embodiment, potential test compounds can be rapidly screened for interaction with a labeled nascent protein or multiple nascent proteins that are co-expressed in a translation reaction system. In this manner the system can be used to screen for interaction so as to identify useful drugs.

In another embodiment, one or more components of the protein synthesis system are introduced into the device through entry ports and they are transported through channels to a reaction chamber, such as a thermally controlled reactor, where the expression of the nascent protein which contains the marker such as BODIPY occurs. The labeled nascent protein can then be mixed with one or more reagents (e.g. a test compound) that are introduced into the device through entry ports. After the reaction takes place, the biochemical products can be then moved down a new channel (or by an electrophoresis module, if desired) where migration data is collected by a detector and transmitted to a recording instrument. It is to be understood that components of the protein synthesis system which can be introduced into the device can include misaminoacylated tRNAs, DNA, mRNA, amino acids and nucleotides. The components can be introduced either continuously or in discrete pulses. The DNA

WO 01/14578

PCT/US00/23233

may also be produced within the micromachined device by enzymatic reactions such as the polymerase chain reaction as has been described. See Kopp *et al.*, "Chemical Amplification: Continuous Flow PCR on a Chip," *Science* 280:1046 (1998).

5 In silicon micromachining, a simple technique to form closed channels involves etching an open trough on the surface of a substrate and then bonding a second, unetched substrate over the open channel. There are a wide variety of isotropic and anisotropic etch reagents, either liquid or gaseous, that can produce channels with well-defined side walls and uniform etch depths. Since the paths of the channels are defined by the photo-process mask, the complexity of channel patterns on the device is
10 virtually unlimited. Controlled etching can also produce sample entry holes that pass completely through the substrate, resulting in entry ports on the outside surface of the device connected to channel structures.

G. Multiple Misaminoacylated tRNAs

It may often be advantageous to incorporate more than one marker into a single species of protein. This can be accomplished by using a single tRNA species such as a
15 lysine tRNA misaminoacylated with both a marker such as dansyllysine and a coupling agent such as biotin-lysine. Alternatively, different tRNAs which are each misaminoacylated with different markers can also be utilized. For example, the coumarin derivative could be used to misaminoacylate a tryptophan tRNA and a
20 dansyl-lysine used to misaminoacylate a lysine tRNA.

One use of multiple misaminoacylated tRNAs is to study the expression of proteins under the control of different genetic elements such as repressors or activators, or promoters or operators. For example, the synthesis of proteins at two different times in response to an internal or external agent could be distinguished by introducing
25 misaminoacylated tRNAs at different times into the cellular or cell-free protein synthesis system. A tRNA^{lys} might be charged with marker A and a tRNA^{lys} charged with marker B, yielding A-tRNA^{lys} and B-tRNA^{lys}, respectively. In this case, protein one under the control of one promoter can be labeled by adding the A-tRNA^{lys} to the reaction system. If a second misaminoacylated tRNA, B-tRNA^{lys} is then added and a

WO 01/14578

PCT/US00/23233

second promoter for protein two activated, the nascent protein produced will contain both label A and B. Additional markers could also be added using additional tRNA molecules to further study the expression of additional proteins. The detection and analysis of multiply labeled nascent proteins can be facilitated by using the multi-colored electrophoresis pattern reading system, described in U.S. Patent No. 5,190,632, which is specifically incorporated by reference, or other multi-label reading systems such as those described in U.S. Patent Nos. 5,069,769 and 5,137,609, which are both hereby specifically incorporated by reference.

A second use of multiple misaminoacylated tRNAs is in the combined isolation and detection of nascent proteins. For example, biotin-lysine marker could be used to misaminoacylate one tRNA and a coumarin marker used to misaminoacylate a different tRNA. Magnetic particles coated with streptavidin which binds the incorporated lysine-biotin would be used to isolate nascent proteins from the reaction mixture and the coumarin marker used for detection and quantitation.

A schematic diagram of the basics of the above methods is shown in Figure 14. In a first step, the marker selected (M), which may have reporter (R) or affinity (A) properties, is chemically or enzymatically misaminoacylated to a single tRNA species or a mixture of different tRNAs. Prior to protein synthesis, a predetermined amount of the misaminoacylated tRNA, charged with the fluorescent marker is mixed with the cell-free protein synthesis reaction system at concentrations sufficient to allow the misaminoacylated tRNA to compete effectively with the corresponding tRNA. After an incubation of about 1-3 hours, the reaction mixture is analyzed using conventional polyacrylamide or agarose gel electrophoresis. After electrophoresis, the gel is illuminated by UV radiation. Bands due to the nascent protein exhibit distinct fluorescence and can be easily and rapidly distinguished, either visually or photographically, from non-fluorescent bands of preexisting proteins. Nascent proteins can be isolated by excising the fluorescent band and electroeluting the protein from the extracted gel pieces. The quantities and molecular weights of the nascent proteins can be determined by comparison of its fluorescence with the fluorescence produced by a set of proteins with known molecular weights and known quantities. The results of the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

assay can be recorded and stored for further analysis using standard electronic imaging and photographic or spectroscopic methods.

H. Resulting Compositions

5 Another embodiment of the invention is directed to a composition comprising nascent proteins isolated or purified by conventional methods after translation in the presence of markers. Compositions can be utilized in manufacturing for the preparation of reagents such as coatings for tissue culture products and in the pharmaceutical industry.

10 Incorporation of markers into nascent proteins utilized in manufacturing facilitates analysis of the final manufactured product or process by detection of marker. For example, nascent proteins produced may be used as coatings for tissue culture products. The reproducibility of a particular coating process could be accurately determined by detecting variations of marker emissions over the surface of the coated product. In addition, non-toxic markers incorporated into proteins encompassed within
15 a pharmaceutical preparation such as a hormone, steroid, immune product or cytokine can be utilized to facilitate safe and economical isolation of that protein preparation. Such products could be used directly without the need for removal of marker. When very low concentrations of marker are preferred, limiting amounts of marked proteins could be used to follow a protein through a purification procedure. Such proteins can
20 be efficiently purified and the purity of the resulting composition accurately determined. In addition, the presence of markers may facilitate study and analysis of pharmaceutical compositions in testing. For example, markers can be utilized to determine serum half-life, optimum serum levels and the presence or absence of breakdown products of the composition in a patient.

25 Alternatively, nascent proteins may contain specific markers which serve as therapeutically useful compounds such as toxic substances. These proteins are administered to a patient and the therapeutic moiety released after proteins have identified and possibly bound to their respective targets. Release may be electrical stimulation, photochemical cleavage or other means whereby the moiety is specifically

WO 01/14578

PCT/US00/23233

deposited in the area targeted by the nascent proteins. In addition, moieties such as modified toxins may be utilized which become toxic only after release from nascent proteins. Nascent protein may also serve as a pharmaceutical carrier which bestows the incorporated marker with active therapeutic function or prevents marker from
5 breaking down in the body prior to its therapeutic or imaging action.

The incorporation of cleavable markers in nascent proteins further provides a means for removal of the non-native portion of the marker to facilitate isolation of the protein in a completely native form. For example, a cleavable affinity marker such as photocleavable biotin introduced into a nascent protein facilitates economical isolation
10 of the protein and allows for the removal of the marker for further use as a pharmaceutical composition.

Pharmaceutical compositions of proteins prepared by translation in the presence of markers may further comprise a pharmaceutically acceptable carrier such as, for example, water, oils, lipids, polysaccharides, glycerols, collagens or combinations of
15 these carriers. Useful immunological compositions include immunologically active compositions, such as a vaccine, and pharmaceutically active compositions, such as a therapeutic or prophylactic drug which can be used for the treatment of a disease or disorder in a human.

I. Kits

Another embodiment of the invention is directed to diagnostic kits or aids
20 containing, preferably, a cell-free translation containing specific misaminoacylated tRNAs which incorporate markers into nascent proteins coded for by mRNA or genes, requiring coupled transcription-translation systems, and are only detectably present in diseased biological samples. Such kits may be useful as a rapid means to screen
25 humans or other animals for the presence of certain diseases or disorders. Diseases which may be detected include infections, neoplasias and genetic disorders. Biological samples most easily tested include samples of blood, serum, tissue, urine or stool, prenatal samples, fetal cells, nasal cells or spinal fluid. In one example, misaminoacylate fmet-tRNAs could be used as a means to detect the presence of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

bacteria in biological samples containing prokaryotic cells. Kits would contain translation reagents necessary to synthesize protein plus tRNA molecules charged with detectable non-radioactive markers. The addition of a biological sample containing the bacteria-specific genes would supply the nucleic acid needed for translation. Bacteria from these samples would be selectively lysed using a bacteria directed toxin such as Colicin E1 or some other bacteria-specific permeabilizing agent. Specific genes from bacterial DNA could also be amplified using specific oligonucleotide primers in conjunction with polymerase chain reaction (PCR), as described in U.S. Patent No. 4,683,195, which is hereby specifically incorporated by reference. Nascent proteins containing marker would necessarily have been produced from bacteria. Utilizing additional markers or additional types of detection kits, the specific bacterial infection may be identified.

The present invention also contemplates kits which permit the GFTT described above. For example, the present invention contemplates kits to detect specific diseases such as familial adenomatous polyposis. In about 30 to 60% of cases of familial adenomatous polyposis, the diseased tissues also contain chain terminated or truncated transcripts of the APC gene (S.M. Powell et al., N. Engl. J. Med. 329:1982-87, 1993). Chain termination occurs when frameshift cause a stop codon such as UAG, UAA or UGA to appear in the reading frame which terminates translation. Using misaminoacylated tRNAs which code for suppressor tRNAs, such transcripts can be rapidly and directly detected in inexpensive kits. These kits would contain a translation system, charged suppressor tRNAs containing detectable markers, for example photocleavable coumarin-biotin, and appropriate buffers and reagents. Such a kit might also contain primers or "pre-primers," the former comprising a promoter, RBS, start codon, a region coding an affinity tag and a region complementary to the template, the latter comprising a promoter, RBS, start codon, and region coding an affinity tag - but lacking a region complementary to the template. The pre-primer permits ligation of the region complementary to the template (allowing for customization for the specific template used). A biological sample, such as diseased cells, tissue or isolated DNA or mRNA or PCR products of the DNA, is added to the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

system, the system is incubated and the products analyzed. Analysis and, if desired, isolation is facilitated by a marker such as coumarin or biotin which can be specifically detected by its fluorescence using streptavidin coupled to HRP. Such kits provide a rapid, sensitive and selective non-radioactive diagnostic assay for the presence or absence of the disease.

EXPERIMENTAL

The following examples illustrate embodiments of the invention, but should not be viewed as limiting the scope of the invention. In some of the examples below, particular reagents and methods were employed as follows:

Reagents: tRNA^{met}, aminoacyl-tRNA synthetase, amino acids, buffer salts, and RNase free water were purchased from Sigma (St. Louis, MO). Many of the fluorescent dyes were obtained from Molecular Probes (Eugene, OR). The translation supplies including routine kits were purchased from Promega (Madison, WI). Sephadex G-25 was from Amersham-Pharmacia Biotech (Piscataway, NJ). The *in vitro* translation kits and plasmid DNAs coding for CAT (PinPoint™) and Luciferase (pBESTLuc™) were from Promega (Wisconsin-Madison, WI) while DHFR plasmid DNA (pQE16-DHFR) was obtained from Qiagen (Valencia, CA). The plasmid DNA for α -hemolysin, pT7-WT-H6- α HL was kindly supplied by Prof. Hagan Bayley (Texas A & M University) and large scale preparation of α -HL DNA was carried out using Qiagen plasmid isolation kit. The bacterioopsin plasmid DNA (pKKbop) was from the laboratory stock.

Preparation of FluoroTag tRNAs: The purified tRNA^{met} was first aminoacylated with the methionine. In typical reaction, 1500 picomoles (~1.0 OD₂₆₀) of tRNA was incubated for 45 min at 37°C in aminoacylation mix using excess of aminoacyl tRNA-synthetases. After incubation, the mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (25 μ l). The coupling of NHS-derivatives of fluorescent

WO 01/14578

PCT/US00/23233

- molecules to the α -amino group of methionine was carried out in 50 mM sodium carbonate, pH 8.5 by incubating the aminoacylated tRNA^{met} (25 μ l) with fluorescent reagent (final concentration = 2 mM) for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). The modified tRNA was
- 5 precipitated with ethanol and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis. This tRNA was found to stable at least for 6 month if stored properly.
- 10 Cell free synthesis of proteins and their detection: The *in vitro* translation reactions were typically carried out using *E. coli* T7 transcription-translation system (Promega) with optimized premix. The typical translation reaction mixture (10 μ l) contained 3 μ l of extract, 4 μ l of premix, 1 μ l of complete amino acid mix, 30 picomoles of fluorescent-methionyl-tRNA and 0.5 μ g of appropriate plasmid DNA. The optimized
- 15 premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM UTP, 0.8 mM CTP, 60 mM phosphoenol pyruvate, 0.6 mM cAMP and 16 mM magnesium acetate. The translation reaction was allowed to proceed for 45 min at 37°C. For SDS-PAGE, 4-10 μ l aliquot of the reaction mix was precipitated with 5-
- 20 volume acetone and the precipitated proteins were collected by centrifugation. The pellet was dissolved in 1X loading buffer and subjected to SDS-PAGE after boiling for 5 min. SDS-PAGE was carried out according to Laemmli and the gel was scan using Molecular Dynamics FluorImager 595 using Argon laser as excitation source. Alternatively, the nascent proteins in polyacrylamide gels were also detected using an
- 25 UV-transilluminator and the photographs were carried out using Polaroid camera fitted with green filter (Tiffen green #58, Polaroid DS34 camera filter kit).
- For visualization of BODIPY-FL labeled protein, 488 nm as excitation source was used along with a 530 $\pm$ 30 narrow band excitation filter. The gel was scanned using PMT voltage 1000 volts and either 100 or 200 micron pixel size.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Enzyme/Protein activities: Biological activity of α -hemolysin was carried out as follows. Briefly, various aliquots (0.5-2 μ l) of *in vitro* translation reaction mixture were added to 500 μ l of TBSA (Tris-buffered saline containing 1 mg/ml BSA, pH 7.5). To this, 25 μ l of 10% solution of rabbit red blood cells (rRBCs) was added and incubated at room temperature for 20 min. After incubation, the assay mix was centrifuged for 1 min and the absorbance of supernatant was measured at 415 nm (release of hemoglobin). The equal amount of rRBCs incubated in 500 μ l of TBSA is taken as control while rRBCs incubated with 500 μ l of water as taken 100% lysis. The DHFR activity was measured spectrophotometrically. Luciferase activity was determined using luciferase assay system (Promega) and luminescence was measured using Packard Lumi-96 luminometer.

Purification of α -HL and measurement BODIPY-FL incorporation into α -HL: The translation of plasmid coding for α -HL (His₆) was carried out at 100 μ l scale and the α -HL produced was purified using Talon-Sepharose (ClonTech) according to manufacturer instructions. The fluorescence incorporated into α -HL was then measured on Molecular Dynamics FluorImager along with the several known concentration of free BODIPY-FL (used as standard). The amount of protein in the same sample was measured using a standard Bradford assay using Pierce Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL).

20 FLAG Capture Assay

Biotinylation of FLAG antibody

A 4.4 mg/mL stock of FLAG M2 monoclonal antibody (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) is diluted with equal volume of 100 mM sodium bicarbonate (~15 mM final antibody concentration). Subsequently, NHS-LC-Biotin (Pierce Chemical, Rockford, IL) is added from a 2 mM stock (in DMF) to a final 150 mM. The reaction is incubated for 2 hours on ice. The mixture is then clarified by centrifugation in a microcentrifuge (14,000 R.P.M.) for 2.5 minutes. Unreacted labeling reagent is removed by gel filtration chromatography.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Preparation of FLAG Antibody Coated ELISA Plates

NeutrAvidin™ biotin binding protein (Pierce Chemical, Rockford, IL) is diluted to a final concentration of 50 mg/mL in 100 mM sodium bicarbonate and used to coat Microlite(2+ white opaque 96-well ELISA plates (Dynex Technologies, Chantilly, VA). Plates are washed with TBS-T and coated using a solution of 5 mg/mL biotinylated FLAG M2 antibody in TBS-T. Plates are washed with TBS-T and blocked in Translation Dilution Buffer (TDB) [4.5% Teleostean Gelatin, 2% non-fat milk powder, 10 mM EDTA, 0.1% Tween-20, 1.25 mg/mL pre-immune mouse IgG, 2.5 mM d-biotin, in TBS, pH 7.5].

10 *Binding and Detection of Target Protein*

Triple-epitope-tagged target proteins produced by *in vitro* translation using rabbit reticulocyte extract are diluted 1/25-1/75 in TDB and added to the antibody coated ELISA plates. Following capture of the target protein, plates are washed with TBS-T. Detection of c-myc is performed using a polyclonal antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) followed by a peroxidase labeled secondary antibody, whereas detection of the His₆ tag is achieved with a peroxidase labeled nickel chelate-based probe (India(His Probe-HRP, Pierce, Rockford, IL). Antibodies are diluted in TDB and the India(His Probe-HRP is diluted in TBS-T supplemented with 5 mg/mL pre-immune mouse IgG. In all cases, signal is generated using a chemiluminescent substrate system.

His-Tag Metal Affinity Capture ELISA Assay*Binding and Detection of Target Protein*

Triple-epitope-tagged target proteins produced by *in vitro* translation using rabbit reticulocyte extract are diluted 1/25-1/75 in 1% BSA/TBS-T and added to nickel chelate coated ELISA plates (Pierce Chemical, Rockford, IL). Following capture of the target protein, plates are washed with TBS-T and blocked with 1% BSA/TBS-T. Detection of epitope tags on the bound target protein is achieved using a monoclonal FLAG M2 antibody (SIGMA Chemical, St. Louis, MO) or a polyclonal c-myc

WO 01/14578

PCT/US00/23233

antibody (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) in conjunction with the appropriate peroxidase labeled secondary antibody. Detection of biotin incorporated into the target protein via Biotin-lysyl-tRNA^{lys} is achieved using NeutrAvidin™ biotin binding protein conjugated to peroxidase (Pierce Chemical, Rockford, IL). The

5 NeutrAvidin™ conjugate and all antibodies are diluted in 1% BSA/TBS-T. In all cases, signal is generated using a chemiluminescent substrate system.

Example 1: Preparation of Markers

Synthesis of Coumarin Amino Acid: 4-(Bromomethyl)-7-methoxy coumarin (Figure 15, compound 1; 6.18 mmole) and diethylacetamidomalonate (Figure 15,

10 compound 2; 6.18 mmole) were added to a solution of sodium ethoxide in absolute ethanol and the mixture refluxed for 4 hours. The intermediate obtained (Figure 15, compound 3) after neutralization of the reaction mixture and chloroform extraction was further purified by crystallization from methanolic solution. This intermediate was dissolved in a mixture of acetone and HCl (1:1) and refluxed for one hour. The

15 reaction mixture was evaporated to dryness, and the amino acid hydrochloride precipitated using acetone. This hydrochloride was converted to free amino acid (Figure 15, compound 4) by dissolving in 50% ethanol and adding pyridine to pH 4-5. The proton (¹H) NMR spectrum of the free amino acid was as follows: (m.p. 274-276°C, decomp.) -OCH₃ (δ 3.85 s, 3H), -CH₂- (δ 3.5 d, 2H), α-CH- (δ 2.9 t, 1H), CH-

20 CO (δ 6.25 s, 1H), ring H (δ 7.05 s, 1H), (δ 7.8 d, 2H).

Synthesis of Fmoc derivative of coumarin: Coumarin amino acid (1.14 mmol) was reacted with Fluorenylmethyloxycarbonyl N-hydroxysuccinimidyl ester (Fmoc-NHS ester) 1.08 mmol) in the presence of 1.14 mmol of triethylamine for 30 minutes at room temperature. The reaction mixture was acidified and the precipitate washed

25 with 1 N HCl and dried. The NMR spectrum of the free amino acid was as follows: (MP 223-225°C) -OCH₃ (δ 3.85 s, 3H), -CH₂Br (δ 3.5 broad singlet, 2H), α-CH- (δ 3.0 t, 1H), CH-CO (δ 6.22 m, 1H), ring H (δ 7.05 s, 1H), (δ 7.8 d, 2H), fluorene H CH₂-CH (δ 4.2 m, 2H), CH₂-CH (δ 4.25 m, 1H), aromatic regions showed characteristic multiplets.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Synthesis of PCB: Photocleavable biotin was synthesized as described below. 2-bromo, 2'-nitroacetophenone (Figure 15, compound 5) was converted first into its hexamethyltetraammonium salt which was decomposed to obtain 2-amino, 2'-nitroacetophenone (Figure 15, compound 6). Biotin N-hydroxysuccinimidyl ester (Figure 15, compound 7; Sigma Chemical; St. Louis, MO) was reacted with a 6-aminocaproic acid (Figure 15, compound 8) to obtain the corresponding acid (Figure 15, compound 9). This acid was coupled with the 2-amino, 2'-nitroacetophenone using DCC to obtain the ketone (Figure 15, compound 10). The ketone was reduced using sodium borohydride to obtain the alcohol (Figure 15, compound 11) which was further converted into its chloroformate derivative (Figure 15, compound 12). The proton NMR spectrum of the derivative (compound 12) was as follows: (δ 1.3 m, 3H), (δ 1.4 m, 2H), (δ 1.5 m, 5H) (δ 1.62 m, 1H), (δ 2.1 t, 2H) (δ 2.4 t, 2H), (δ 2.6 d, 1H), (δ 2.8 m, 1H), (δ 3.0 t, 1H), (δ 3.1 m 1H), (δ 4.15 qt, 1H) (δ 4.42 qt, 1H), (δ 5.8 t, 1H), (δ 6.25 s, 1H), (δ 6.45 s, 1H), (δ 7.5 t, 1H), (δ 7.75 m, 4H), (δ 7.9 d, 1H).

Example 2: Misaminoacylation of tRNA

The general strategy used for generating misaminoacylated tRNA is shown in Figure 16 and involved truncation of tRNA molecules, dinucleotide synthesis (Figure 17), aminoacylation of the dinucleotide (Figure 18) and ligase mediated coupling.

a) Truncated tRNA molecules were generated by periodate degradation in the presence of lysine and alkaline phosphatase basically as described by Neu and Heppel (J. Biol. Chem. 239:2927-34, 1964). Briefly, 4 mmoles of uncharged *E. coli* tRNA^{Lys} molecules (Sigma Chemical; St. Louis, MO) were truncated with two successive treatments of 50 mM sodium metaperiodate and 0.5 M lysine, pH 9.0, at 60°C for 30 minutes in a total volume of 50 μ l. Reaction conditions were always above 50°C and utilized a 10-fold excess of metaperiodate. Excess periodate was destroyed treatment with 5 μ l of 1M glycerol. The pH of the solution was adjusted to 8.5 by adding 15 μ l of Tris-HCl to a final concentration of 0.1 M. The reaction volume was increased to 150 μ l by adding 100 μ l of water. Alkaline phosphatase (15 μ l, 30 units) was added and the reaction mixture incubated again at 60°C for two

WO 01/14578

PCT/US00/23233

hours. Incubation was followed by ethanol precipitation of total tRNA, ethanol washing, drying the pellet and dissolving the pellet in 20 μ l water. This process was repeated twice to obtain the truncated tRNA.

b) Dinucleotide synthesis was carried out basically as performed by Hudson (J. Org. Chem. 53:617-24, 1988), and can be described as a three step process, deoxycytidine protection, adenosine protection and dinucleotide synthesis.

Deoxycytidine protection: All reaction were conducted at room temperature unless otherwise indicated. First, the 5' and 3' hydroxyl groups of deoxycytidine were protected by reacting with 4.1 equivalents of trimethylsilyl chloride for 2 hours with constant stirring. Exocyclic amine function was protected by reacting it with 1.1 equivalents of Fmoc-Cl for 3 hours. Deprotection of the 5' and 3' hydroxyl was accomplished by the addition of 0.05 equivalents of KF and incubation for 30 minutes. The resulting product (Figure 17, compound 19) was produced at an 87% yield. Phosphate groups were added by incubating this compound with 1 equivalent of bis-(2-chlorophenyl)phosphorochloridate and incubating the mixture for 2 hours at 0°C. The yield in this case was 25-30%.

Adenosine protection: Trimethylsilyl chloride (4.1 equivalents) was added to adenosine residue and incubated for 2 hours, after which, 1.1 equivalents of Fmoc-Cl introduced and incubation continued for 3 hours. The TMS groups were deprotected with 0.5 equivalents of fluoride ions as described above. The Fmoc protected adenosine (compound 22) was obtained in a 56% yield. To further protect the 2'-hydroxyl, compound 22 was reacted with 1.1 equivalents of tetraisopropyl disiloxyl chloride (TIPDSCI₂) for 3 hours which produces compound 23 at a 68-70% yield. The compound was converted to compound 24 by incubation with 20 equivalents of dihydropyran and 0.33 equivalents of p-toluenesulfonic acid in dioxane for about 4-5 hours. This compound was directly converted without isolation into compound 25 (Figure 17) by the addition of 8 equivalents of tetrabutyl ammonium fluoride in a mixture of tetrahydro-furan, pyridine and water.

Dinucleotide synthesis: The protected deoxycytidine, compound 20, and the protected adenosine, compound 25 (Figure 17), were coupled by the addition of 1.1

WO 01/14578

PCT/US00/23233

equivalents of 2-chlorophenyl bis-(1-hydroxy benzotriazolyl) phosphate in tetrahydrofuran with constant stirring for 30 minutes. This was followed by the addition of 1.3 equivalents of protected adenosine, compound 25, in the presence of N-methylimidazole for 30 minutes. The coupling yield was about 70% and the proton NMR spectrum of the coupled product, compound 26 (Figure 17), was as follows: (δ 8.76 m, 2H), (δ 8.0 m, 3H), (δ 7.8 m, 3H) (δ 7.6 m, 4H), (δ 7.5 m, 3H), (δ 7.4 m, 18H), (δ 7.0 m, 2H), (δ 4.85 m, 14H), (δ 4.25 m, 1H); (δ 3.6 m, 2H), (δ 3.2 m, 2H) (δ 2.9 m, 3H), (δ 2.6 m, 1H), (δ 2.0-1.2 m, 7H).

c) Aminoacylation of the dinucleotide was accomplished by linking the protected marker amino acid, Fmoc-coumarin, to the dinucleotide with an ester linkage. First, the protected amino acid was activated with 6 equivalents of benzotriazol-1-yl-oxy tris-(dimethylamino) phosphonium hexafluoro phosphate and 60 equivalents of 1-hydroxybenzotriazole in tetrahydrofuran. The mixture was incubated for 20 minutes with continuous stirring. This was followed with the addition of 1 equivalent of dinucleotide in 3 equivalents N-methylimidazole, and the reaction continued at room temperature for 2 hours. Deprotection was carried out by the addition of tetramethyl guanidine and 4-nitrobenzaldoxime, and continuous stirring for another 3 hours. The reaction was completed by the addition of acetic acid and incubation, again with continuous stirring for 30 minutes at 0°C which produced the aminoacylated dinucleotide (Figure 18).

d) Ligation of the tRNA to the aminoacylated dinucleotide was performed basically as described by T.G. Heckler et al. (Tetrahedron 40: 87-94, 1984). Briefly, truncated tRNA molecules (8.6 O.D.₂₆₀ units/ml) and aminoacylated dinucleotides (4.6 O.D.₂₆₀ units/ml), were incubated with 340 units/ml T4 RNA ligase for 16 hours at 4°C. The reaction buffer included 55 mM Na-Hepes, pH 7.5, 15 mM MgCl₂, 250 μ M ATP, 20 μ g/ml BSA and 10% DMSO. After incubation, the reaction mixture was diluted to a final concentration of 50 mM NaOAc, pH 4.5, containing 10 mM MgCl₂. The resulting mixture was applied to a DEAE-cellulose column (1 ml), equilibrated with 50 mM NaOAc, pH 4.5, 10 mM MgCl₂, at 4°C. The column was washed with 0.25 mM NaCl to remove RNA ligase and other non-tRNA components. The tRNA-

WO 01/14578

PCT/US00/23233

containing fractions were pooled and loaded onto a BD-cellulose column at 4°C, that had been equilibrated with 50 mM NaOAc, pH 4.5, 10 mM MgCl₂, and 1.0 M NaCl. Unreacted tRNA was removed by washes with 10 ml of the same buffer. Pure misaminoacylated tRNA was obtained by eluting the column with buffer containing 25% ethanol.

Example 3: Preparation of Extract and Template

Preparation of extract: Wheat germ embryo extract was prepared by floatation of wheat germs to enrich for embryos using a mixture of cyclohexane and carbon tetrachloride (1:6), followed by drying overnight (about 14 hours). Floated wheat germ embryos (5 g) were ground in a mortar with 5 grams of powdered glass to obtain a fine powder. Extraction medium (Buffer I: 10 mM trisacetate buffer, pH 7.6, 1 mM magnesium acetate, 90 mM potassium acetate, and 1 mM DTT) was added to small portions until a smooth paste was obtained. The homogenate containing disrupted embryos and 25 ml of extraction medium was centrifuged twice at 23,000 x g. The extract was applied to a Sephadex G-25 fine column and eluted in Buffer II (10 mM trisacetate buffer, pH 7.6, 3 mM magnesium acetate, 50 mM potassium acetate, and 1 mM DTT). A bright yellow band migrating in void volume and was collected (S-23) as one ml fractions which were frozen in liquid nitrogen.

Preparation of template: Template DNA was prepared by linearizing plasmid pSP72-bop with EcoRI. Restricted linear template DNA was purified by phenol extraction and DNA precipitation. Large scale mRNA synthesis was carried out by *in vitro* transcription using the SP6-ribomax system (Promega; Madison, WI). Purified mRNA was denatured at 67°C for 10 minutes immediately prior to use.

Example 4: Cell-Free Translation Reactions

The incorporation mixture (100 µl) contained 50 µl of S-23 extract, 5 mM magnesium acetate, 5 mM Tris-acetate, pH 7.6, 20 mM Hepes-KOH buffer, pH 7.5; 100 mM potassium acetate, 0.5 mM DTT, 0.375 mM GTP, 2.5 mM ATP, 10 mM creatine phosphate, 60 µg/ml creatine kinase, and 100 µg/ml mRNA containing the

WO 01/14578

PCT/US00/23233

genetic sequence which codes for bacterioopsin. Misaminoacylated PCB-lysine or coumarin amino acid-tRNA^{lys} molecules were added at 170 µg/ml and concentrations of magnesium ions and ATP were optimized. The mixture was incubated at 25°C for one hour.

5 **Example 5: Isolation of Nascent Proteins Containing PCB-Lysine**

Streptavidin coated magnetic Dynabeads M-280 (Dyna; Oslo, Norway), having a binding capacity of 10 µg of biotinylated protein per mg of bead. Beads at concentrations of 2 mg/ml, were washed at least 3 times to remove stabilizing BSA. The translation mixture containing PCB-lysine incorporated into nascent protein was
10 mixed with streptavidin coated beads and incubated at room temperature for 30 minutes. A magnetic field was applied using a magnetic particle concentrator (MPC) (Dyna; Oslo, Norway) for 0.5-1.0 minute and the supernatant removed with pipettes. The reaction mixture was washed 3 times and the magnetic beads suspended in 50 µl of water.

15 Photolysis was carried out in a quartz cuvette using a Black-Ray longwave UV lamp, Model B-100 (UV Products, Inc.; San Gabriel, CA). The emission peak intensity was approximately 1100 µW/cm² at 365 nm. Magnetic capture was repeated to remove the beads. Nascent proteins obtained were quantitated and yields estimated at 70-95%.

20 **Example 6: The Lower Limit of Detection using Fluorescence**

Bovine serum albumin (BSA), suspended at 0.25 mg/ml in borate buffer, pH 8.0, was combined with a 25 fold molar excess fluorescamine (Sigma Chemical; St. Louis, MO) at 50 mg/ml to produce a modified, fluorescent BSA. Various amounts of modified protein (1 ng, 5 ng, 10 ng, 25 ng, 50 ng, 75 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng)
25 were suspended in loading buffer (bromophenol blue, glycerol, 2-mercaptoethanol, Tris-HCl, pH 6.8, SDS), and added to individual wells of a 1.5 mm thick, 12% polyacrylamide gel with a 3% stacker. The water cooled gel was electrophoresed for 4 hours at 50 volts. After electrophoresis, the gel was removed from the electrophoresis

WO 01/14578

PCT/US00/23233

apparatus, placed on a UV transilluminator and photographed with polaroid Type 667 film using an exposure time of 10 seconds. The lowest limit of detection observed under these conditions was 10 ng. These results indicate that using equipment found in a typical molecular biology lab, fluorescently labeled proteins can be detected at ng quantities. Using even more sophisticated detection procedures and devices the level of detection can be increased even further.

Example 7: Nascent Proteins Containing Coumarin-Amino Acid

Cell-free translation is performed as described using charged tRNA^{lys} molecules misaminoacylated with lysine coupled to a benzopyrene fluorophore moiety and human γ -interferon mRNA which contains 21 codons for lysine. Samples of the mixture are supplemented with buffer containing bromophenol blue, glycerol, 2-mercaptoethanol, Tris-HCl, pH 6.8, and SDS, and directly applied to a 12% poly-acrylamide gel (3% stacker) along with a set of molecular weight markers. Electrophoresis is performed for 3 hours at 50 volts. The gel is removed from the electrophoresis apparatus and photographed under UV light. Bands of fluorescently labeled interferon protein are specifically detected at a molecular weight of about 25 KDa. No other significant fluorescent activity is observed on the gel. Free misaminoacylated tRNA molecules may be electrophoresed off of the gel and not specifically detected.

Example 8: *In Vivo* Half-life of a Pharmaceutical Composition

Cell-free translation reactions are performed by mixing 10 μ l of PCB-coumarin amino acid-tRNA^{leu}, prepared by chemical misaminoacylation as described above and suspended in TE at 1.7 mg/ml, 50 μ l of S-23 extract, 10 μ l water and 10 μ l of a solution of 50 mM magnesium acetate, 50 mM Tris-acetate, pH 7.6, 200 mM Hepes-KOH buffer, pH 7.5; 1 M potassium acetate, 5 mM DTT, 3.75 mM GTP, 25 mM ATP, 100 mM creatine phosphate and 600 μ g/ml creatine kinase. This mixture is kept on ice until the addition of 20 μ l of 500 μ g/ml human IL-2 mRNA (containing 26 leucine codons) transcribed and isolated from recombinant IL-2 cDNA. The mixture is incubated at 25°C for one hour and placed on ice. 100 μ l of streptavidin coated

WO 01/14578

PCT/US00/23233

magnetic Dynabeads (2 mg/ml) are added to the mixture which is placed at room temperature for 30 minutes. After incubation, the mixture is centrifuged for 5 minutes in a microfuge at 3,000 x g or, a magnetic field is applied to the solution using a MPC. Supernatant is removed and the procedure repeated three times with TE. The
 5 final washed pellet is resuspended in 50 μ l of 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 and transferred to a quartz cuvette. UV light from a Black-Ray longwave UV lamp is applied to the suspension for approximately 1 second. A magnetic field is applied to the solution with a MPC for 1.0 minute and the supernatant removed with a pipette. The supernatant is sterile filtered and mixed with equal volumes of sterile buffer containing
 10 50% glycerol, 1.8% NaCl and 25 mM sodium bicarbonate. Protein concentration is determined by measuring the O.D.₂₆₀.

0.25 ml of the resulting composition is injected i.v. into the tail vein of 2 Balb/c mice at concentrations of 1 mg/ml. Two control mice are also injected with a comparable volume of buffer. At various time points (0, 5 minutes, 15 minutes, 30
 15 minutes, 60 minutes, 2 hours and 6 hours), 100 μ l serum samples are obtained from foot pads and added to 400 μ l of 0.9% saline. Serum sample are added to a solution of dynabeads (2 mg/ml) coated with anti-coumarin antibody and incubated at room temperature for 30 minutes. A magnetic field is applied to the solution with a MPC for 1 minute and the supernatant removed with a pipette. Fluorescence at 470 nm is
 20 measured and the samples treated with monoclonal antibody specific for rat IL-2 protein. IL-2 protein content is quantitated for each sample and equated with the amount of fluorescence detected. From the results obtained, *in vivo* IL-2 half-life is accurately determined.

Example 9: Incorporation of Various Fluorophores into α -Hemolysin

25 *E. coli* tRNA^{Met} was first quantitatively aminoacylated with methionine and the α -amino group was specifically modified using NHS-derivatives of several fluorophores. The list of fluorescent reporter molecules (fluorophores) tested and their properties are given in Table 2. Under the modification conditions, the modified Met-tRNA^{Met} is found to be stable as assessed by acid-urea gel. Since all the fluorescent

WO 01/14578

PCT/US00/23233

molecules tested have different optical properties (excitation and emission), we have determined their relative fluorescence intensity under the condition which were used for the quantitation of gels containing nascent protein.

Fluorescent detection of nascent protein was first evaluated using α -hemolysin (α -HL) as a model protein (with C-terminal His₆-tag). α -HL is a relatively small protein (32 kDa) and could be produced efficiently in *in vitro* translation. In addition, its activity can be measured directly in the protein translation mixture using a rabbit red blood cell hemolysis assay. *In vitro* translation of α -HL was carried out using an *E. coli* T7 S30 transcription/translation extract (Promega Corp., Madison, WI) in the presence of several different modified methionyl-tRNA^{met} as described above. After the reaction, an aliquot (3-5 μ l) was subjected to SDS-PAGE analysis and the fluorescent bands were detected and quantitated using a FluorImager F595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

The data is presented in Figure 20. Lane 1 is a no DNA control. Lane 2 shows the results with BODIPY-FL-SSE. Lane 3 shows the results with BODIPY-FL-SE. Lane 4 shows the results with NBD (see Table 2 for the structure). Lane 5 shows the results with Bodipy-TMR. Lane 6 shows the results with BODIPY R6G. Lanes 7, 8, 9 and 10 show the results achieved with FAM, SFX, PYMPO and TAMRA, respectively (see Table 2 for structures).

The results clearly indicate the α -HL produced in presence of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} (lanes 2 and 3) exhibited the highest fluorescence (all the data is normalized to the BODIPY-FL-SSE. The two different BODIPY-FL reagents (BODIPY-FL sulfosuccinimidyl ester (SSE) and BODIPY-FL succinimidyl ester (SE)), differ only with respect to solubility. The next best fluorophore evaluated, 6-(tetramethylrhodamine-5-(and-6)-carboxamido)hexanoic acid, succinimidyl ester (TAMRA-X, SE), exhibited 35% of the fluorescence (corrected for relative fluorescence) of BODIPY-FL-SSE. Two other forms of BODIPY, BODIPY-TMR, SE (6-((4,4-difluoro-1,3-dimethyl-5-(4-methoxyphenyl)-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-2-propionyl) amino)hexanoic acid, succinimidyl ester) and BODIPY-R6G, SE (4,4-difluoro-5-phenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3-propionic acid, succinimidyl ester).

WO 01/14578

PCT/US00/23233

exhibited less than 3% of the fluorescence of BODIPY-FL, SSE. Succinimidyl 6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoate (NBD-X-SE), a fluorescent molecule which has previously been incorporated into the neuorkimin-2 receptor, exhibited only 6% of the BODIPY-FL-SSE. The two fluorescein analogs 5-(and-6)-carboxyfluorescein, succinimidyl-ester (FAM, SE) and 6-(fluorescein-5-(and-6)-carboxamido)hexanoic acid, succinimidyl ester (SFX, SE) also showed very low fluorescence (8.4% and 4.6%, respectively relative to BODIPY-FL).

Example 10: Optimizing Incorporation

In order to optimize the amount of BODIPY-FL incorporated into nascent proteins, the translation reaction for α -HL was carried out in presence of increasing amounts of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} ranging from 3 - 60 picomoles per reaction. All reactions yielded similar amount of α -HL as determined by hemolysis activity of rabbit red blood cells indicating that the exogenously added BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} in this range did not inhibit protein synthesis. In contrast, the intensity of the fluorescent band corresponding to α -HL continued to increase up to 30 picomoles BODIPY-FL-methionyl-tRNA per 10 μ l reaction (data not shown). Increases above this level produced no further increase in fluorescence, thus subsequent reactions were performed using this level of BODIPY-FL-methionyl-tRNA.

A second step used to optimize BODIPY-FL incorporation was based on eliminating N-formyl-tetrahydrofolate (fTHF) from the reaction mixture. In prokaryotes, N-formyl-tetrahydrofolate (fTHF) acts as a cofactor for the enzyme methionyl-tRNA transformylase, which formylates the initiator tRNA after its aminoacylation with methionine. Protein synthesis is then initiated using this modified tRNA (formyl-methionine-tRNA). Without limiting the invention to any particular mechanism, it is believed that eliminating fTHF from the reaction mixture reduces the competition for initiation of protein synthesis between this endogenous initiator tRNA and exogenously added modified-initiator RNA by preventing the formylation of endogenous initiator tRNA. This was confirmed by measuring fluorescence directly

WO 01/14578

PCT/US00/23233

from SDS-PAGE for reactions for which fTHF was present and absent from the reaction mixture. In the later case, a 2-3 fold increase in fluorescence was found (data not shown).

Example 11: Incorporation Into Other Proteins

5 In order to explore the general applicability of this approach, transcription/translation reactions with BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} were carried out using various plasmid DNAs coding for dihydrofolate reductase (DHFR), luciferase, chloramphenicol acetyl-transferase (CAT) and bacteriorhodopsin (BR). BR was included because it represents membrane proteins, which are typically very
10 hydrophobic. An optimized coupled transcription/translation system was used along with free BODIPY-FL and BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} using the Talon metal chelate resin (ClonTech, Palo Alto, CA) in order to examine incorporation into other proteins. The results are shown in Figures 21A (visualization using laser based Molecular Dynamics FluorImager 595) and 21B (visualization using a UV-
15 transilluminator). Lane 1 is a no DNA control. Lanes 2, 3, 4, 5 and 6 are hemolysin, DHFR, Luciferase, CAT and bacteriorhodopsin, respectively.

Fluorescent bands are observed using a fluorescence scanner for each of the proteins at positions corresponding to their relative molecular. In the case of luciferase, bands are observed which correspond to the expected products of false
20 initiation at internal methionines (Promega Technical Bulletin TB219). Bands corresponding to all of the proteins could also be observed visually and recorded photographically using a UV transilluminator (UVP TMW-20) combined with an emission filter that allows light with $\lambda > 450$ nm (Figure 21B). Excitation in this case is likely occur in the UV absorbing band of BODIPY-FL which extends from 300-400
25 nm.

The amount of BODIPY incorporation was then determined by measuring the amount of incorporated BODIPY-FL and protein present in the purified sample by comparison with solutions of different concentrations of BODIPY-FL and using a Bradford protein assay, respectively. The average of three such measurements yielded

WO 01/14578

PCT/US00/23233

a molar ratio of 0.29+/-0.03%. However, the incorporation yield is likely to be higher since fluorescence quenching of BODIPY-FL with protein residues such as tryptophan and tyrosine may lower the fluorescence quantum yield compared to BODIPY-FL in aqueous solution.

5 The effects of the fluorescence labeling procedure on the activity of the nascent proteins synthesized was also evaluated. This is important in cases where it is desirable to perform downstream functional analysis such as in the case of *in vitro* expression cloning and other proteomic applications of *in vitro* technology. Although it is possible for the N-terminal fluorescent label to alter the function of a protein, the
10 low molar incorporation level (~0.3%) should not significantly alter the overall activity of the extract. This is confirmed by various enzyme assays and no significant difference is found for the activity measured for DHFR, α -HL and luciferase synthesized in the presence and absence of the BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} (see Table 3).

15 **Example 12: Measuring the Sensitivity**

 In order to estimate the sensitivity of the method, various dilutions of the translation extract corresponding to 0.003-0.5 μ l of the original reaction mixture were analyzed by SDS-PAGE. As a control, extract from a reaction performed without DNA was analyzed. As seen in Figure 22B, fluorescence from α -HL bands
20 corresponding to as small as 0.007 μ l of the original reaction mixture were detectable. Based on our estimation of total nascent protein produced in the *in vitro* system, which ranged from 50-80 μ g/ml, this corresponds to 0.35-0.5 nanograms of α -hemolysin. This compares favorably with the sensitivity obtainable using radioisotope labeling of nascent proteins where such a low expression of nascent protein may
25 required longer exposure to X-ray film which might result in serious background problem. It also exceeds the sensitivity of measuring proteins on gels currently with commercially available dyes such as coomassie blue (8-100 nanograms). Further improvements in sensitivity are expected by increasing the level of BODIPY-FL incorporation and by reducing background fluorescence, which appears to be due to:

WO 01/14578

PCT/US00/23233

fluorescent impurities in the gel material, extract and modified tRNA added.

Example 13: Synthesis As A Function Of Time

The ability of the fluorescent labeling approach to monitor the nascent protein synthesis as a function of time was also evaluated. For this purpose, small aliquots of the α -HL transcription/translation mixture (4 μ l) were withdrawn at various times during the reaction and analyzed by SDS-PAGE. As seen in Figure 22A, bands due to α -HL can clearly be detected as early as 5 minutes after initiation of the incubation. Synthesis of fluorescently labeled α -HL appears to saturate after 15 minutes of translation.

Example 14: The Modifying Reagent

In the case of post-aminoacylation modifications used to form a misaminoacylated tRNA, an important factor is the modifying reagent used to add the modification to the natural amino acid. For example, in the case of the fluorophore BODIPY FL, there are two different commercially available BODIPY FL NHS reagents known as BODIPY-FL-SE and BODIPY-FL-SSE (Molecular Probes). Both reagents are based on N-hydroxysuccinimide (NHS) as the leaving group. However, the two forms differ in aqueous solubility due to the presence in one form (SSE) of a sulfonate (sulfo) group (see Table 2 for structures). In this example, optimized reactions based on standard biochemical procedures were performed aimed at adding the BODIPY FL fluorophore to a purified tRNA^{met} which is aminoacylated with methionine using these two different reagents. For this purpose, first the tRNA^{met} was aminoacylated with the methionine. In typical reaction, 1500 picomoles (~ 1.0 OD₂₆₀) of tRNA was incubated for 45 min at 37°C in aminoacylation mix using excess of aminoacyl tRNA-synthetases. The aminoacylation mix consisted of 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP and 1600 units of aminoacyl tRNA-synthetase. The extent of aminoacylation was determined by acid-urea gel as well as using ³⁵S-methionine. After incubation, the mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to

WO 01/14578

PCT/US00/23233

chloroform:acid phenol (pH 5.0) extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in water (37.5 l) and used for modification.

A. Modification of aminoacylated tRNA with BODIPY-FL-SSE

5 To the above aminoacylated-tRNA solution, 2.5 l of 1N NaHCO₃ was added (final conc. 50 mM, pH = 8.5) followed by 10 l of 10 mM solution of BODIPY-FL-SSE (Molecular Probes) in water. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added
10 and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50ml microliters of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws.

B. Modification of aminoacylated tRNA with BODIPY-FL-SE

15 To the above aminoacylated-tRNA solution, 2.5 l of 1N NaHCO₃ (final conc. 50 mM, pH = 8.5) and 20 l of DMSO was added followed by 10 l of 10 mM solution of BODIPY-FL-SE (Molecular Probes) in DMSO. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH
20 = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50ml of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws.

25 C. Analysis

It was found empirically using HPLC that the extent of modification of the alpha-amino group of methionine is substantially greater using the sulfonated form of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

NHS BODIPY FL compared to the non-sulfonated form of NHS-BODIPY FL reagent. In addition the misaminoacylated tRNA^{met} formed using the sulfonated form was found to exhibit superior properties. When used in an optimized S30 *E.coli* translation systems to incorporate BODIPY FL into the protein (hemolysin using a plasmid containing the HL gene under control of a T7 promoter), the band on an SDS-PAGE gel corresponding to the expressed HL exhibited an approximately 2 times higher level of fluorescence when detected using a argon laser based fluorimager compared to a similar system using the misaminoacylated formed using the non-sulfonated form.

10 D. Coumarin

A similar result to that described above was obtained by comparing the non-sulfonated and sulfonated NHS derivatives of coumarin, which are also commercially available and referred to respectively as succinimidyl 7-amino-methyl-amino-coumarin acetate (AMCA-NHS; Molecular Probes) and sulfosuccinimidyl 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals). In this case, optimized reactions were performed using these two different reagents based on standard biochemical procedures in order to add the coumarin fluorophore to a purified tRNA^{met} which is aminoacylated with methionine.

To the aminoacylated-tRNA solution described above, 2.5 l of 1N NaHCO₃ was added (final conc. 50 mM, pH = 8.5) followed by 10 l of 10 mM solution of sulfosuccinimidyl 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals) in water. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50 microliters of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws.

To the above aminoacylated-tRNA solution, 2.5 l of 1N NaHCO₃ (final conc.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

50 mM, pH = 8.5) and 20 (l of DMSO was added followed by 10 (l of 10 mM solution of succinimidyl 7-amino-methyl-amino-coumarin acetate (AMCA-NHS; Molecular Probes) in DMSO. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50 microliter of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws.

10 In this case, the coumarin-methionine- tRNA^{met} formed using the non-sulfonated form of coumarin-NHS (AMCA-NHS) when used in standard *E. coli* S30 translation mixtures generated very low levels of detectable fluorescent bands when detected using UV light from a standard UV transilluminator. In contrast, the sulfonated form (AMCA-sulfo-NHS) when added using the same procedures led to easily detectable bands using the UV- transilluminator.

15 Attempts to incorporate coumarin using an initiator tRNA by modifying the α -amino group of methionine have been reported in the literature but failed. Coumarin attachment to a initiator tRNA subsequently required more extensive and complicated chemical attachment using a chemical cross linker. This was achieved by first aminoacylating the tRNA with methionine followed by reaction of aminoacylated tRNA with DTDG monosuccinimidyl ester (DTDG is Dithiodiglycolic acid). The reaction product was then reduced using DTT and subsequently reacted with CPM (3-(4'-Maleimidophenyl)-4-methyl-diethylamino coumarin. (Odom, O. W, Kudlicki, W and Hardesty, B. 1998. In vitro engineering using acyl-derivatized tRNA, In Protein synthesis: Methods and Protocols, PP.93-103, Humana press, Totowa, NJ.). Due to the need for special procedures designed for each marker, such an approach is not practical for general attachment of a wide variety of markers to tRNAs through post-chemical aminoacylation procedures.

20 One likely factor that makes sulfonated NHS reagents used for postchemical aminoacylation of tRNAs is its solubility in aqueous buffer. In contrast, non-sulfonated

WO 01/14578

PCT/US00/23233

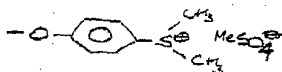
reagents such as the BIDOPY FL NHS reagent require organic buffer such as DMSO for postchemical modification. While it is still not clear why use of organic buffers lowers the overall marker incorporation, one possibility is that hydrolysis of the aminoacyl bond formed between the amino acid and tRNA reduces the overall level of modification.

Example 15: Imparting Water Solubility

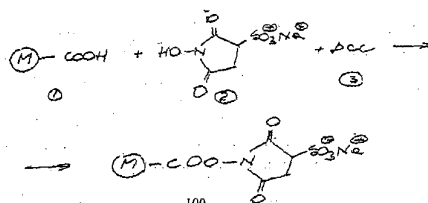
In general, the property of water solubility can be imparted to chemical reagents in several ways. Some of these are summarized below:

- Introduction of polar functional group into leaving group (such as sulfonated-NHS).
- Introduction of the polar functional group into a spacer arm.
- Introduction of the polar functional group into the reagent moiety itself.

While the introduction of the $-\text{SO}_3^- \text{Na}^+$ (sulfo-) group is preferred, other polar ionizable groups (such as DSP) can also be used where DSP is shown below:



Final water solubility can be engineered into a spacer arm for example by using a polyether spacer (e.g. one based on tetraethylene glycol). In general, any moiety that has a free carboxyl group can be converted into its sulfo-NHS active ester. This reaction involves N-hydroxy-sulfosuccinimide (monosodium salt), the marker and a coupling agent such as DCC (dicyclohexylcarbodiimide):



WO 01/14578

PCT/US00/23233

In a typical reaction, marker 1, 55 mmol, is dissolved in 10 ml DMF (dimethylformamide) and (2) (5 mmol) is added, followed by (3) (1.1 equivalents). The mixture is stirred overnight at room temperature, precipitate filtered off, and the filtrate evaporated under reduced pressure at room temperature. The product is purified if necessary using column chromatography or is recrystallized.

One preferred embodiment of this invention involves the post-chemical modification of tRNAs to form a misaminoacylated tRNA by using markers that contain a sulfonated NHS reagent. While such reagents are not generally available commercially, such reagents can be routinely produced out of a variety of useful markers. For example, fluorescein, which has a high fluorescent quantum yield for both UV and visible excitation could be prepared in a form which contains a sulfonated NHS ester.

Example 16: Triple Marker System

In this example, a three marker system is employed to detect nascent proteins, *i.e.* an N-terminus marker, a C-terminus marker, and an affinity marker (the latter being an endogenous affinity marker). The experiment involves 1) preparation of a tRNA with a marker, so that a marker can be introduced (during translation) at the N-terminus of the protein; 2) translation of hemolysin with nucleic acid coding for wild type and mutant hemolysin; and 4) quantitation of the markers.

1. Preparation of biotin-methionyl-tRNA^{Met}

The purified tRNA^{Met} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first aminoacylated with methionine. The typical aminoacylation reaction contained 1500 picomoles (~ 1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1mM methionine, 2 mM ATP; 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved

WO 01/14578

PCT/US00/23233

in the water (25 μ l). The coupling of NHS-biotin to the α -amino group of methionine was carried out in 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.0 by incubating the aminoacylated tRNA^{fmet} (25 μ l) with NHS-biotin (final concentration = 2 mM) for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100 mM). The modified tRNA was precipitated with ethanol and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 x 5 cm) to remove any free reagent, if present.

2. *In vitro* translation of α -HL DNA

A WT and Amber (at position 135) mutant plasmid DNA was using coding for α -hemolysin (α -HL), a 32 kDa protein bearing amino acid sequence His-His-His-His-His-His (His-6) (SEQ ID NO: 5) at its C-terminal. *In vitro* translation of WT and amber mutant α -HL gene (Amb 135) was carried out using *E. coli* T7 circular transcription/translation system (Promega Corp., Wisconsin, WI) in presence of Biotin-methionyl-tRNA^{fmet} (AmberGen, Inc.). The translation reaction of 100 μ l contained 30 μ l *E. coli* extract (Promega Corp., Wisconsin, WI), 40 μ l premix without amino acids, 10 μ l amino acid mixture (1 mM), 5 μ g of plasmid DNA coding for WT and mutant α -HL, 150 picomoles of biotin-methionyl-tRNA^{fmet} and RNase-free water. The premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM UTP, 0.8 mM CTP, 60 mM phosphoenol pyruvate, 0.6 mM cAMP and 6 mM magnesium acetate. From the translation reaction premix, n-formyl-tetrahydrofolate (fTHF) was omitted. The translation was carried out at 37°C for 1 hour. The translation reaction mixture incubated without DNA is taken as control. After the translation reaction mixture was diluted with equal volume of TBS (Tris-buffered saline, pH 7.5). Each sample was divided into two aliquots and processed individually as described below.

3. Preparation of anti- α -HL antibody microtiter plate

Anti-rabbit-IgG coated microtiter plate (Pierce Chemicals, Rockford, IL) was

WO 01/14578

PCT/US00/23233

washed with Superblock buffer solution (Pierce) and incubated with 100 µg/ml of anti- α -HL polyclonal antibody solution (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) prepared in Superblock buffer on microtiter plate shaker for 1 hour at room temperature. The plate was then washed (3 times x 200 µl) with Superblock buffer and stored at 4°C till further use.

4. Quantitation of N-terminal (biotin) marker

The translation reaction mixture (50 µl) for the control, WT and amber α -HL DNA were incubated in different wells of anti- α -HL microtiter plate for 30 minutes on the shaker at room temperature. After incubation, the wells were washed 5 times (5-10 min each) with 200 µl Superblock buffer and the supernatant were discarded. To these wells, 100 µl of 1:1000 diluted streptavidin-horse radish peroxidase (Streptavidin-HRP; 0.25 mg/ml; Promega) was added and the plate was incubated at room temperature for 20 min under shaking conditions. After the incubation, excess streptavidin-HRP was removed by extensive washing with Superblock buffer (5 times x 5 min each). Finally, 200 µl of substrate for HRP (OPD in HRP buffer; Pierce) was added and the HRP activity was determined using spectrophotometer by measuring absorbance at 441 nm.

5. Quantitation of C-terminal (His-6-tag) marker

Translation reaction mixture (50 µl) from example 2 for control, WT and Amber α -HL DNA were incubated in different wells of anti- α -HL microtiter plate for 30 min on the shaker at room temperature. After incubation, the wells were washed 5 times (5-10 min each) with 200 µl Superblock buffer and the supernatant were discarded. To these wells, 100 µl of 1:1000 diluted anti-His-6 antibody (ClonTech, Palo Alto, CA) was added to the well and incubated at room temperature for 20 min under shaking conditions. After the incubation, excess antibodies were removed with extensive washing with Superblock buffer (5 times x 5 min each). Subsequently, the wells were incubated with secondary antibody (anti-mouse IgG-HRP, Roche-BM, Indianapolis, IN) for 20 min at room temperature. After washing excess 2nd

WO 01/14578

PCT/US00/23233

antibodies, HRP activity was determined as described above.

6. Gel-Free Quantitation of N- and C-Terminal Markers

The results of the above-described quantitation are shown in Figures 23A (quantitation of N-terminal, Biotin marker) and Figure 23B (quantitation of C-terminal, His-6 marker). In case of *in vitro* transcription/translation of WT α -HL DNA in presence of biotin-methionyl-tRNA, the protein synthesized will have translated His-6 tag at the C-terminal of the protein and some of the α -HL molecules will also carry biotin at their N-terminus which has been incorporated using biotinylated-methionine-tRNA. When the total translation reaction mixture containing α -HL was incubated on anti- α -HL antibody plate, selectively all the α -HL will bind to the plate via interaction of the antibody with the endogenous affinity marker. The unbound proteins can be washed away and the N- and C-terminal of the bound protein can be quantitated using Streptavidin-HRP and anti-His-6 antibodies, respectively. In case of WT α -HL, the protein will carry both the N-terminal (biotin) and C-terminal (His-6) tags and hence it will produce HRP signal in both the cases where streptavidin-HRP and secondary antibody-HRP conjugates against His-6 antibody used (HL, Figure 23A). On the other hand, in case of amber mutant α -HL, only N-terminal fragment of α -HL (first 134 amino acids) will be produced and will have only N-terminal marker, biotin, but will not have His-6 marker due to amber mutation at codon number 135. As a result of this mutation, the protein produced using amber α -HL DNA will bind to the antibody plate but will only produce a signal in the case of streptavidin-HRP (HL-AMB, Figure 23A) and not for anti-HisX6 antibodies (HL-AMB, Figure 23B).

Example 17: Electrophoretic Mobility Shift Assay

To demonstrate the changes in the electrophoretic mobility of fluorescently labeled nascent protein on the SDS-gels either due to proteolysis or oligomerization in presence of membranes, we have used plasmid DNA of α -hemolysin (α -HL) which codes 32 kDa protein bearing a sequence His-His-His-His-His (His-6) (SEQ ID NO:5) at its C-terminal. *In vitro* translation of α -HL gene was carried out using *E.*

WO 01/14578

PCT/US00/23233

coli T7 circular transcription/translation system (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI) in presence of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} (AmberGen, Inc.) This experiment involved 1) preparation of the tRNA-marker for introduction of the N-terminus marker during translation, 2) translation, 3) purification, 4) protease treatment or 5) oligomerization.

1. Preparation of BODIPY-FL-methionyl-tRNA:

BODIPY-FL-methionyl-tRNA was prepared by first aminoacylating pure tRNA^{met} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) using methionine and subsequently modifying α -amino group of methionine using BODIPY-FL-SSE (4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene propionic acid, sulfosuccinimidyl ester; Molecular Probes, Eugene, OR). The typical aminoacylation reaction (100 μ l) contained 1500 picomoles (~ 1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM methionine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (25 μ l). The coupling of BODIPY-FL-SSE to the α -amino group of methionine was carried out in 50 μ l reaction volume using 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.0 by incubating 25 μ l aminoacylated tRNA^{met} (1.5 nanomoles) with 10 μ l of BODIPY-FL-SSE (10 mM) for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100 mM). The modified tRNA was precipitated with ethanol, and the pellet was dissolved in RNase-free water and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 x 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present.

2. *In vitro* translation of α -hemolysin DNA

The translation reaction of 100 μ L contained 30 μ l *E. coli* extract (Promega Corp., Wisconsin, WI), 40 μ l premix without amino acids, 10 μ l amino acid mixture

WO 01/14578

PCT/US00/23233

(1 mM), 5 μ g of plasmid DNA coding for α -HL, 150 picomoles of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} and RNase free water. The premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM UTP, 60 mM phosphoenolpyruvate, 0.6 mM cAMP and 6 mM magnesium acetate. From the translation reaction premix, n-formyl-tetrahydrofolate (fTHF) was omitted. The translation was carried out at 37°C for 1 hour. The translation reaction mixture incubated without DNA is taken as control.

3. Purification of His-6- α -HL

Fifty microliters of the translation reaction mixture (from above) was subjected to Talon-Sepharose (ClonTech, Palo Alto, CA) chromatography for the purification of His-6- α -HL. This was carried out by loading the crude extract onto the Talon-Sepharose column which was pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 150 mM NaCl and washing the column to remove unbound proteins. The bound protein was then eluted by adding 100 mM imidazole in the above buffer. The eluted α -HL was dialyzed against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5.

4. EMSA for protease detection

The purified fluorescently labeled α -HL (-5 μ g) (example 3) was incubated with 0.05 μ g of pure trypsin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) in 50 nM acetate buffer, pH 5.0 (100:1; protein:protease ratio) for 5 min at 37°C. The proteolysis reaction was arrested by the addition of 1X SDS-gel loading buffer and boiling the samples for 5 min. The SDS-PAGE was carried out as described by Laemmli (Laemmli, U. K. 1970, Nature 227, 680-685) using 4-20% gradient gel (ready-gel, Bio-Rad, Richmond, CA). After the gel electrophoresis, the gel was visualized using FluorImager F595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA).

Trypsin was used under very limited conditions (single-hit kinetics) to obtain very defined cleavage of α -HL (50 mM acetate buffer, pH 5.0, 100:1; protein:protease ratio, 5 min at 37°C). Under these conditions, the glycine rich loop in α -HL is most

WO 01/14578

PCT/US00/23233

susceptible to cleavage and as a result proteolytic fragment of 17 kDa was observed (Vecesey-Semjen, B., Knapp, S., Mollby, R., Goot, F.G. 1999, Biochemistry, 38 4296-4302). When the fluorescently labeled α -HL was subjected to very mild trypsin treatment, it resulted a cleavage of α -HL yielding the N-terminal fragment of approximately 17-18 kDa mass as evidence by change in the mobility of fluorescent band on SDS-PAGE (Figure 24: Lane 1 shows untreated protein and Lane 2 shows protease treated protein). This result indicates that such assay could be used to screen for proteases or any other enzymatic activities like kinase, transferase etc. that could potentially result in the electrophoretic mobility shift of the nascent protein. Though we have used pure nascent protein for this particular assay, there is no reason why one can not use a nascent protein without any purification (total translation reaction mixture).

5. EMSA for oligomerization of nascent protein on membranes

The total translation reaction mixture (10 μ l) (see above) was incubated in absence and in presence of rabbit red blood cells (rRBCs, Charles River Farm, CT) for 30 min. at 0°C. After the incubation, rRBCs were washed free of excess unbound α -HL and the rRBCs were incubated in Tris buffer saline (TBS) containing 1 mg/ml BSA (TBSA) at 37°C for 20 min during which lysis of rRBCs occurred. The rRBC membranes were isolated after centrifugation, dissolved in 1X SDS-gel loading buffer and subjected to SDS-PAGE (4-20% gradient gel) without heating the sample. After the gel electrophoresis, the gel was visualized using FluorImager F595.

α -HL is expressed a soluble monomeric protein and in presence of various membranes it can oligomerize to form heptameric pore (Walker, B., Krishnaswamy, M., Zorn, L., Kasianowicz, J. and Bayley, H., 1992, J. Biol. Chem. 267, 10902-10909). In addition, some intermediate forms of the oligomers were also observed. In this experiment, in order to see the applicability of EMSA to detect the shift in mobility of α -HL due to oligomerization in presence lipid membranes, the total translation reaction mixture (with out any purification) was used. When the total translation extract containing nascent α -HL was incubated with rRBCs, it resulted in the oligomerization.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

of α -HL on the rRBC membranes yielding a distinct fluorescent bands corresponding to various molecular masses that were SDS-resistant (Figure 25: Lane 1 shows untreated protein only and Lane 2 shows protein treated with rRBCs).

This result demonstrates that such assay could be used to study proteins, interact with variety of natural and artificial membranes and as a result the mobility of the protein is shifted.

Example 18: Incorporation Using Lysyl-tRNA^{lys}

This example describes the incorporation of fluorescent labels into nascent protein using lysyl-tRNA^{lys}. More specifically, a variety of fluorescent molecules were incorporated into 1) hemolysin during translation in an *E. coli* translation system, and 2) luciferase during translation in a wheat germ system, using lysyl tRNA^{lys}. The experiment involved 1) preparation of the tRNA-marker compounds, 2) translation, and 3) detection on gels.

1. Preparation of fluorescent labeled misaminoacylated tRNA^{lys}

The purified tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first aminoacylated with lysine. The typical aminoacylation reaction (100 μ l) contained 1500 picomoles (~ 1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (25 μ l). The coupling of NHS-derivatives of various fluorescent molecules (see Table 2) to the ϵ -amino group of lysine was carried out in 50mM CAPS buffer, pH 10.5 by incubating the aminoacylated tRNA^{lys} (25 μ l) with fluorescent reagent (final concentration = 2 mM) for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100 mM). The modified tRNA was precipitated with ethanol, dissolved in 50 μ l of RNase-free water and passed through.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis (Varshney, U., Lee, C.P. & RajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem. 266, 24712-24718).

2. Cell free synthesis of proteins in prokaryotic (*E. coli*) translation extracts

The typical translation reaction mixture (10 µl) contained 3 µl of *E. coli* extract (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI), 4 µl of premix, 1 µl of amino acid mix (1 mM), 30 picomoles of fluorescent-lysyl-tRNA and 0.5 µg of α hemolysin (αHL) plasmid DNA. The premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM CTP, 60 mM phosphoenol pyruvate, 0.6 mM cAMP and 6 mM magnesium acetate. The translation reaction was allowed to proceed for 45 min at 37°C. For SDS-PAGE, 4-10 µl aliquot of the reaction mix was precipitated with 5-volume acetone and the precipitated proteins were collected by centrifugation. The pellet was dissolved in 1X loading buffer and subjected to SDS-PAGE after boiling for 5 min. SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (Laemmli, U.K. 1970, Nature, 227, 680-685).

3. Cell-free synthesis in eukaryotic (TnT wheat germ) translation extracts.

The typical translation reaction mixture (10 µl) contained 5 µl of TnT wheat germ extract (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI), 0.4 µl of TnT reaction buffer, 1 µl of amino acid mix (1mM), 0.2 µl of T7 RNA polymerase, 30 picomoles of fluorescent-lysyl-tRNA and 0.5 µg of luciferase RNA (Promega) and RNase-free water. The translation reaction was allowed to proceed for 45 min at 30°C and reaction mixture was centrifuged for 5 min to remove insoluble material. The clarified extract was then precipitated with 5-volume acetone and the precipitated proteins were collected by centrifugation. The pellet was dissolved in 1X loading buffer and subjected to SDS-PAGE after boiling for 5 min. SDS-PAGE was carried out according

WO 01/14578

PCT/US00/23233

to Laemmli (Laemmli, U.K. 1970), Nature, 227, 680-685).

4. Detection of nascent protein

The gel containing nascent proteins was scanned using FluorImager F595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA using Argon laser (488 nm) as excitation source, in addition, the nascent proteins in polyacrylamide gels were also detected using an UV-transilluminator and the photographs were carried out using Polaroid camera fitted with Tiffen green filter (Polaroid, Cambridge, MA). Figures 26A and 26B show the results of *in vitro* translation of α -HL produced in presence of various fluorescent tRNA^{b₆}. It is clear from the results one can incorporate a variety of fluorescent molecules into nascent protein using misaminoacylated tRNA (fluorophore-modified lysyl-tRNA^{b₆}) including dyes like NBD, fluorescein derivatives etc. (Lane 1: No DNA control; lane 2: BODIPY-FL-SSE (4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene propionic acid, sulfosuccinimidyl ester); lane 3: BODIPY-FL-SE (4,4-difluoro-5,7-dimethyl-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene proionic acid, succinimidyl ester); lane 4 : NBD-X-SE (Succinimidyl 6-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)aminohexanoate); lane 5: BODIPY-TMR-SE ((6-994,4-difluoro-1,3-dimethyl-5-(4-methoxyphenyl)-4-bora-3a, 4a-diaza-s-indacene-2-propionyl) amino) hexanoic acid, succinimidyl ester); lane 6: BODIPY-R6G-SE ((4,4-difluoro-5-phenyl-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene-3propionic acid, succinimidyl ester); lane 7: FAM-SE (5-(6-carboxyfluorescein, succinimidyl ester); lane 8:SFX-SE (6-fluorescein-5-(and 6-carboxyamido)hexanoic acid, succinimidyl ester); lane 9: PyMPO-SE(1-(3-(succinimidylloxycarbonyl)benzyl)-4-(5-(4-methoxyphenyl)oxazol-2-yl) pyridinium bromide (PyMPO)) and lane 10: TAMRA-SE (6-(tetramethylrhodamine-5-(and-6-carboxamido)hexanoic acid, succinimidyl ester).

Example 19: NHS-derivatives of Coumarin

Given the above noted results for the two BODIPY molecules (i.e. BODIPY-FL-SSE and BODIPY-FL-SE), attempts were made to derivatize other markers to make them suitable for incorporation. The present example involves 1) the preparation

WO 01/14578

PCT/US00/23233

of the labeled tRNA, 2) translation, and 3) detection of the nascent protein containing the label (or marker).

1. Preparation of Fluorescent Labeled Misaminoacylated tRNA^{met}

The purified tRNA^{met} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first aminoacylated with methionine. The typical aminoacylation reaction (100 μ l) contained 1500 picomoles (approximately 1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (25 μ l). The coupling of NHS-derivatives of coumarin [namely sulfosuccinimidyl 7-amino-4-methylcoumarin-3-acetate [1] (AMCA-sulfo-NHS; Pierce Chemicals), Alexa 350-N-hydroxy-succinimide ester (Molecular Probes) and succinimidyl 7-amethyl-amino-coumarin acetate (AMCA-NHS: Molecular Probes)] to the α -amino group of methionine was carried out in 50 mM sodium bicarbonate buffer, pH 8.5 by incubating the aminoacylated tRNA^{met} (25 μ l) with fluorescent reagent (final concentration = 2 mM) for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100mM). In case of AMCA-NHS, reagent was dissolved in DMSO and the coupling reaction was carried out in presence of 40% DMSO. The modified tRNA was precipitated with ethanol, dissolved in 50 μ l of RNase-free water and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis (Varshney, U., Lee, C.P. & RajBhandary, U.L., 1991, *J. Biol. Chem.* **266**, 24712-24718).

WO 01/14578

PCT/US00/23233

2. Cell Free Synthesis of Proteins in Prokaryotic (*E. coli*) Translation Extracts:

The typical translation reaction mixture (10 μ l) contained 3 μ l of *E. coli* S-30 extract (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI), 4 μ l of premix, 1 μ l of amino acid mix (1 mM), 30 picomoles of fluorescent-methionyl-tRNA and 0.5 μ g of α -hemolysin (α -HL) plasmid DNA. The premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM UTP, 0.8 mM CTP, 60 mM phosphoenol pyruvate, 0.6 mM cAMP and 6 mM magnesium acetate. The translation reaction was allowed to proceed for 45 min at 37°C. For SDS-PAGE, 4-10 μ l aliquot of the reaction mix was precipitated with 5-volume acetone and the precipitated proteins were collected by centrifugation. The pellet was dissolved in 1X loading buffer and subjected to SDS-PAGE after boiling for 5 min. SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (Laemmli, U. K. 1970, *Nature*, 227, 680-685).

3. Detection of Nascent Protein

The gel containing nascent proteins was visualized using an UV-transilluminator equipped with long wavelength UV bulb (>300 nm) and the photographs were carried out using Polaroid camera fitted with Tiffen green filter (Polaroid, Cambridge, MA). Figure 27 indicates that the result *in vitro* translation of α -HL produced in presence of various fluorescent tRNAs (Lane 1 shows the results for the no DNA control; Lane 2 shows the results with Met-tRNA^{met} modified with AMCA-NHS; Lane 3 shows the results with Met-tRNA^{met} modified with AMCA-sulfo-NHS; and Lane 4 shows the results with Met-tRNA^{met} modified with Alexa-NHS). Clearly, one can incorporate the coumarin derivative molecules into nascent protein using misaminoacylated tRNA which are modified with the water soluble NHS-esters of fluorescent molecules (lane 3). Moreover, a dye with negative charge (Alexa, lane 4) seems to not incorporate as well as its neutral counterpart (AMCA; lane 3).

From the above results and general teachings of the present specification, one skilled in the art can select other markers and render them (e.g. chemically render

WO 01/14578

PCT/US00/23233

them) suitable for incorporation in accordance with the methods of the present invention.

Example 20: Capillary Electrophoresis

The example describes the use of capillary electrophoresis (CE) for detection of *in vitro* synthesized fluorescent proteins by mobility shift. The example describes 1) the preparation of the tRNA comprising a BODIPY marker, 2) *in vitro* translation, 3) purification, 4) protease digestion and 5) detection by mobility shift assay.

1. Preparation of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met}

The tRNA^{met} was aminoacylated with the methionine. In typical reaction, 1500 picomoles (~1.0 OD₂₆₀) of tRNA was incubated for 45 min at 37°C in aminoacylation mix using an excess of aminoacyl tRNA-synthetases. The aminoacylation mix comprised 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 2 mM ATP and 1600 units of aminoacyl tRNA-synthetase. The extent of aminoacylation was determined by acid-urea gel as well as by using ³⁵S-methionine. After incubation, the mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol (pH 5.0) extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in water (37.5 ul) and used for modification. To the above aminoacylated-tRNA solution, 2.5 ul of 1N NaHCO₃ was added (final conc. 50 mM, pH = 8.5) followed by 10 ul of 10 mM solution of BODIPY-FL-SSE (Molecular Probes) in water. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50 ul of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

2. *In vitro* translation of α -hemolysin DNA

The translation reaction of 500 μ l contained 150 μ l *E. coli* extract (Promega Corp., Wisconsin, WI), 200 μ l premix without amino acids, 50 μ l amino acid mixture (1 mM), 25 μ g of plasmid DNA coding for α -HL, 1000 picomoles of BODIPY-FL-methionyl-tRNA^{met} and RNase free water. The premix (1X) contains 57 mM HEPES, pH 8.2, 36 mM ammonium acetate, 210 mM potassium glutamate, 1.7 mM DTT, 4% PEG 8000, 1.25 mM ATP, 0.8 mM GTP, 0.8 mM UTP, 0.8 mM CTP, 60 mM phosphoenol pyruvate, 0.6 mM cAMP and 16 mM magnesium acetate. From the translation reaction premix, n-formyl-tetrahydrofolate (fTHF) was omitted. The translation was carried out at 37°C for 1 hour. The translation reaction mixture incubated without DNA is taken as control.

3. Purification of His-6- α -HL

Five hundred microliters of the translation reaction mixture (see step 2 above) was subjected to Talon-Sepharose (ClonTech, Palo Alto, CA) chromatography for the purification of His-6- α -HL. This was carried out by loading the crude extract onto the Talon-Sepharose column which was pre-equilibrated with 50 mM Tris-HCl, pH 8.0 containing 150 mM NaCl and washing the column to remove unbound proteins. The bound protein was then eluted by adding 100 mM imidazole in the above buffer. The eluted α -HL was dialyzed against 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5. The fluorescence of purified and dialyzed α -HL was checked on Molecular Dynamics FluorImager F595.

4. Protease Digestion

The purified fluorescently labeled α -HL (~5 μ g) (see step 3 above) was incubated with 0.1 μ g of pure trypsin (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) in 50 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5 (50:1; protein:protease ratio) for 10 min at room temperature. The proteolysis reaction was arrested by the addition of 1X CE-SDS-gel loading buffer and boiling the samples for 10 min.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

5. Mobility Shift Assay

The SDS-capillary gel electrophoresis (SDS-CGE) was performed on a Bio-Rad BioFocus 3000CE system. The capillary was fused-silica with a 75 μ m ID, 24 cm total length and 19.5 cm to the detector. Fifty microliters of fluorescently labeled protein sample (α -HL) was mixed with 50 μ l of SDS-CGE sample loading buffer and incubated at 95°C for 10 min. The capillary was rinsed with 0.1 M NaOH, 0.1 M HCl and SDS-run buffer for 60, 60 and 120 sec respectively, prior to each injection. Sample were injected using electrophoretic injection (20 sec at 10 kV). Separation was performed at 15 kV (constant voltage) for 25 min. Capillary and sample was maintained at 20°C. The detection of sample was carried out using 488 nm Argon laser and 520 nm emission filter.

The results of SDS-CGE are shown in the Figure 28. As seen in the Figure, fluorescently label α -HL migrates as a major species eluting around 24 min under the electrophoresis conditions (Top panel). In addition, the electrophoregram also show the presence of minor impurities present in the sample, which are eluting around 17 and 20.5 min. When the fluorescently labeled- α -HL sample was treated with trypsin and analyzed using SDS-CGE, it showed peaks eluting earlier (13, 14 and 15min) and major peak at 21 min (Bottom panel). This result indicated that the α -HL was proteolysed by the trypsin and various proteolytic fragments have N-terminal fluorescently labeled are seen in the electrophoregram.

Example 21: Incorporation of Three Markers Into Hemolysin

This is an example wherein a protein is generated *in vitro* under conditions where N- and C-terminal markers are incorporated along with a marker incorporated using a misaminoacylated tRNA. The Example involves 1) PCR with primers harboring N-terminal and C-terminal detectable markers, 2) preparation of the tRNA, 3) *in vitro* translation, 4) detection of nascent protein.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

1. PCR of α -Hemolysin DNA

Plasmid DNA for α -hemolysin, pT7-WT-H6- α HL, was amplified by PCR using following primers. The forward primer (HL-5) was: 5'-GAATTC-
TAATACGACTCACTATAGGGTTAACTTTAAGAAGGAGATATACATATGGAAC
 5 AAAAATTAATCTCGGAAGAGGATTGGCAGATTCTGATATAATATTAAC-
 3' (SEQ ID NO:11) and the reverse primer (HL-3) was: 5'-AGCTTCATTA-
ATGATGGTGATGG-TGGTGAC 3' (SEQ ID NO:12). The underlined sequence in
 forward primer is T7 promoter, the region in bold corresponds to ribosome binding
 site (Shine-Dalgarno's sequence), the bold and underlined sequences involve the C-
 10 myc epitope and nucleotides shown in italics are the complimentary region of α -
 hemolysin sequence. In the reverse primer, the underlined sequence corresponds to
 that of HisX6 epitope. The PCR reaction mixture of 100 μ l contained 100 ng template
 DNA, 0.5 μ M each primer, 1 mM $MgCl_2$, 50 μ l of PCR master mix (Qiagen, CA) and
 nuclease free water (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) water. The PCR was carried
 15 out using Hybaid Omni-E thermocycler (Hybaid, Franklin, MA) fitted with hot-lid
 using following conditions: 95°C for 2 min, followed by 35 cycles consisted of 95°C
 for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 2 min and the final extension at 72°C for 7
 min. The PCR product was then purified using Qiagen PCR clean-up kit (Qiagen, CA).
 The purified PCR DNA was used in the translation reaction.

20 2. Preparation of BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{lys}

The purified tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first
 aminoacylated with lysine. The typical aminoacylation reaction contained 1500
 picomoles (~ 1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM $MgCl_2$,
 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases
 25 (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). The reaction mixture was incubated for 45 min at
 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of
 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1).
 Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained
 was dissolved in water (35 μ l). To this solution 5 μ l of 0.5 M CAPS buffer, pH 10.5

WO 01/14578

PCT/US00/23233

was added (50 mM final conc.) followed by 10 μ l of 10 mM solution of BODIPY-FL-SSE. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50 μ l of water and purified on
5 Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis. Varshney et al., *J. Biol. Chem.* 266:24712-
10 24718 (1991).

3. Cell-free synthesis of proteins in eukaryotic (wheat germ) translation extracts.
The typical translation reaction mixture (20 μ l) contained 10 μ l of TnT wheat germ extract (Promega Corp., Wisconsin-Madison, WI), 0.8 μ l of TnT reaction buffer, 2 μ l of amino acid mix (1 mM), 0.4 μ l of T7 RNA polymerase, 30 picomoles of
15 BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{lys}, 1-2 μ g plasmid or PCR DNA (Example 1) and RNase-free water. The translation reaction was allowed to proceed for 60 min at 30°C and reaction mixture was centrifuged for 5 min to remove insoluble material. The clarified extract was then precipitated with 5-volumes of acetone and the precipitated proteins were collected by centrifugation. The pellet was dissolved in 1X loading buffer and
20 subjected to SDS-PAGE after boiling for 5 min. SDS-PAGE was carried out according to Laemmli, *Nature*, 227:680-685.

4. Detection of nascent protein
After the electrophoresis, gel was scanned using FluorImager 595 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) equipped with argon laser as excitation source. For
25 visualization of BODIPY-FL labeled nascent protein, we have used 488 nm as the excitation source as it is the closest to its excitation maximum and for emission, we have used 530 $\pm$ 30 filter. The gel was scanned using PMT voltage-1000 volts and either 100 or 200 micron pixel size.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

The results are shown in Figure 29. It can be seen from the Figure that one can *in vitro* produce the protein from the PCR DNA containing desired marker(s) present. In the present case, the protein (α -hemolysin) has a C-myc epitope at N-terminal and HisX6 epitope at C-terminal. In addition, BODIPY-FL, a fluorescent reporter molecule is incorporated into the protein. Lane 1: α -Hemolysin plasmid DNA control; lane 2: no DNA control; lane 3: PCR α -hemolysin DNA and lane 4: hemolysin amber 135 DNA. The top (T) and bottom (B) bands in all the lane are from the non-specific binding of fluorescent tRNA to some proteins in wheat germ extract and free fluorescent-tRNA present in the translation reaction, respectively.

Example 22: Primer Design

It is not intended that the present invention be limited to particular primers. A variety of primers are contemplated for use in the present invention to ultimately incorporate markers in the nascent protein (as explained above). The Example involves 1) PCR with primers harboring markers, 2) *in vitro* translation, and 3) detection of nascent protein.

For PCR the following primers were used: forward primer:

5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGAACAAAAITTAATA
TCGGAAGAGGATTTGAATGTTCTCCATACAGGTCACGGGA-3' (SEQ ID
NO:13). Reverse Primer: 5'-TTATTAATGATGGTGATGGTGGTG-

TTCTGTAGGAATGGTATCTCGTTTTTC-3' (SEQ ID NO:14) The underlined sequence in the forward primer is T7 promoter, the bold and underlined sequences involve the C-myc epitope and nucleotides shown in italics are the complimentary region of α -hemolysin sequence. In the reverse primer, the bold sequence corresponds to that of His-6 epitope and the underlined sequence corresponds to the complimentary region of the α -hemolysin sequence. A PCR reaction mixture of 100 μ l can be used containing 100 ng template DNA, 0.5 μ M each primer, 1 mM MgCl₂, 50 μ l of PCR master mix (Qiagen, CA) and nuclease free water (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) water. The PCR was carried out using Hybaid Omni-E thermocycler (Hybaid, Franklin, MA) fitted with hot-lid using following conditions: 95°C for 2 min, followed by 35

WO 01/14578

PCT/US00/23233

cycles consisted of 95°C for 1 min, 61°C for 1 min and 72°C for 2 min and the final extension at 72°C for 7 min. The PCR product can then be purified using Qiagen PCR clean-up kit (Qiagen, CA). The purified PCR DNA can then be used in a variety of translation reactions. Detection can be done as described above.

5 Overall, the present invention contemplates a variety of primer designs based on the particular epitopes desired (*see* Table 4 for a list of illustrative epitopes). In general, the epitopes can be inserted as the N-terminus or C-terminus. In addition, they can be used to introduce an affinity region (*i.e.* a region which will bind to antibody or other ligand) into the protein.

10 Example 23: Antibody Detection of Primer-Encoded Epitopes

This is an example wherein a protein is generated *in vitro* under conditions where affinity regions are incorporated in a protein and thereafter detected. The Example involves 1) PCR with primers containing sequences that encode epitopes, 2) preparation of the tRNA, 3) *in vitro* translation, 4) detection of nascent protein.

15 1. PCR with Primer-encoded epitopes

The total RNA from the human colon (Clontech, Palo Alto, CA) was subjected to one-step RT-PCR reaction using Clontech RT-PCR Kit. The forward Primer, PTT-T7-P53, was [5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCA-TGGGACACCAATCACCATCAGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-
20 GAGGAGCCGAGTCAGATCCTAGCGTCGA-3'] (SEQ ID NO:15) and the reverse primer, Myc-P53-3', was [5'-ATTATTACAAATCCTCTCCGAGATTAAAT-
TTGTTCGTCTGAGTCAGGCCCTTCTGTCTTGAACATG-3'] (SEQ ID NO:16). The underlined sequence in forward primer is T7 promoter, the nucleotides shown in italics corresponds to that of His-6 tag while the sequence in bold codes for FLAG-
25 epitope and the rest of primer is the complementary region for P53 DNA. In the reverse primer, the underlined sequence corresponds to that of c-Myc epitope.

The RT-PCR/PCR reaction mixture of 50µl contained 1µg total human colon RNA, 0.5µM each primer, 43.5µl of RT-PCR master mix (Clontech) and nuclease-

WO 01/14578

PCT/US00/23233

free water (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) water. The RT-PCR/PCR was carried out in PTC-150 thermocycler (MJ Research, Waltham, MA) using following conditions: 50°C for 1 hour, 95°C for 5 min followed by 40 cycles consisted of 95°C for 45 sec, 60°C for 1 min and 70°C for 2 min and the final extension at 70°C for 7 min. The PCR product was analyzed on 1% agarose gel and the PCR amplified DNA was used in the translation reaction without any further purification. The artificial C-terminal truncated mutant of P53 was prepared using the identical procedure described above except the reverse primer, 3'-P53-Mut, was 5'-CTCATTGAGCTCTCGGAACATC-TCGAAGCG-3' (SEQ ID NO:17).

10 2. tRNA labelling

Purified tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first amino-acylated with lysine. The typical aminoacylation reaction (100µl) contained 1500 picomoles (-1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (35µl). To this solution 5ul of 0.5M CAPS buffer, pH 10.5 was added (final concentration of 50 mM) followed by 10 ul of 10 mM solution of BODIPY-FL-SSE. The mixture was incubated for 10 minutes at 0°C and the reaction was quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volumes of 3 M NAOAc (pH=5.0) was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50µl of RNase-free water and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid freeze-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis [Varshney, U., Lee, C.P. & RajBhandary, U.L., *J. Biol. Chem.* **266**, 24712-24718 (1991)] or by HPLC [*Anal. Biochem.*

WO 01/14578

PCT/US00/23233

279:218-225 (2000)].

3. Translation

Translation of P53 DNA (*see* step 1, above) was carried out in rabbit reticulocyte translation extract in presence of fluorescent-tRNA (step 2, above).

4. Detection

Once the translation was over, an aliquot (5µl) was subjected to SDS-PAGE and the nascent proteins were visualized using FluorImager SI (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). After visualization, the gel was soaked in the transfer buffer (12 mM Tris, 100 mM glycine and 0.01 % SDS, pH 8.5) for 10 min. Proteins from the gels were then transferred to PVDF membrane by standard western blotting protocol using Bio-Rad submersion transfer unit for 1 hr. After the transfer, then membrane was reversibly stained using Ferrozine/ferrous total protein stain for 1 min to check the quality of transfer and then the membrane was blocked using amber blocking solution (4.5% v/v teleostean gelatin, 2% w/v non-fat milk powder, 0.1% w/v Tween-20 in Tris-buffered saline, pH 7.5) for 2 hours followed by overnight incubation (12-15 hours at 4°C on constant speed shaker) with appropriately diluted antibodies. For Flag detection, we have used 2000-fold diluted anti-Flag M2 Antibody (Sigma), for His-6 detection, we have used 500-fold anti-His6 antibody (Santa-Cruz Biotech, CA) and for c-Myc detection, we have used 500-fold diluted anti-C-Myc antibody (Santa-Cruz Biotech, CA).

After primary antibody incubation, the membrane was washed with TBST (Tris-buffered saline, pH 7.5 with 0.1% Tween-20) four times (10 min each wash) and incubated with appropriately diluted secondary antibodies (10,000-fold diluted) for 1 hour at room temperature on constant speed shaker. The unbound secondary antibodies were washed with TBST (4 washes/ 10 min each) and the blot was visualized using an ECL-Plus chemiluminescence detection system (Amersham-Pharmacia Biotech, NJ).

The results are shown in Figure 30A and 30 B. Figure 30A shows the total protein stain of PVDF membranes following protein transfer from the gel for three

WO 01/14578

PCT/US00/23233

replicate blots containing a minus DNA negative control and a plus p53 DNA sample respectively. Figure 30B shows the same blots (total protein staining is reversible) are probed with antibodies against the three epitope tags using standard chemiluminescent Western blotting techniques. Arrows indicate the position of p53.

5 **Example 24: Gel-based PTT For Cancer Genes**

The detection of truncating mutations in proteins was first reported by Roest and co-workers and applied to the detection of truncating mutations in the APC gene by Vogelstein, Kinzler and co-workers. Truncations in a translated protein can occur due to frameshift, splicing and point mutations which result in the occurrence of a stop
10 codon in the reading frame of a gene. Truncated polypeptides can be detected by translating a specific region of the DNA corresponding to the target gene in an *in vitro* system in the presence of radioactive labels (e.g. ³⁵S-methionine) and then analyzing the resulting polypeptide using standard PAGE. Such an approach has been reported for the analysis of truncating mutations in a variety of cancer-linked genes including
15 BRCA1/BRCA2, ATM, MHS2, MLH1. However, the use of radioactive isotopes presents problems in terms of the time needed for detection (>5 hours), which is critical for high-throughput analysis. For this reason, it would be highly advantageous to replace radioactivity with a more rapid means of detection.

In this example, we demonstrate the feasibility of rapid truncation analysis
20 based on the use of N-terminal tags. The present invention provides a convenient, accurate and rapid method to screen for truncation mutations in a wide range of genes of clinical significance. The Example involves 1) PCR with primers having sequences complementary to the APC gene, 2) preparation of the tRNA, 3) *in vitro* translation, 4) detection of nascent protein.

25 1. PCR of clinical samples

Clinical samples were submitted to the Washington University Molecular Diagnostics laboratory for screening of chain truncations in the APC gene, which are characteristic of the autosomal dominant cancer syndrome familial adenomatous

WO 01/14578

PCT/US00/23233

polypsis (FAP). Genomic DNA was isolated and a specific region of the APC gene (Exon 15-segment 2) was first amplified by PCR using primers which incorporate a T7 promoter, and Kozak sequence into the DNA. The forward Primer, T7-APC2 was [5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATGGATGCATGTGGA-
 5 ACTTTGTGG-3'] (SEQ ID NO:18) and the reverse primer 3'-APC2 was [5'-GAGGATCCATTAGAT-GAAGGTGTGGACG-3'] (SEQ ID NO:19). The underlined sequence in forward primer is T7 promoter and the sequence shown in italics corresponds to that of Kozak sequence which is necessary for efficient eukaryotic translation initiation. The PCR reaction mixture of 50 μ l contained 200-500
 10 ng template DNA (either WT or mutant), 0.5 μ M each primer and 25 μ l of PCR master mix (Qiagen, CA) and nuclease free water (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) water. The PCR was carried out using Hybaid Omni-E thermocycler (Hybaid, Franklin, MA) fitted with hot-lid following conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles consisted of 95°C for 45 sec. 55°C for 1min and 72°C for 2 min and the final
 15 extension at 72°C for 7 min. The PCR product was analyzed on 1% agarose gel and the PCR amplified DNA was used in the translation reaction without any further purification.

2. Preparation of the tRNA

The purified tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first amino-
 20 acylated with lysine. The typical aminoacylation reaction (100 μ l) contained 1500 picomoles (-1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl tRNA-synthetases (Sigma). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5
 25 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in the water (35 μ l). To this solution 5 μ l of 0.5M CAPS buffer, pH 10.5 was added (final concentration of 50 mM) followed by 10 μ l of 10 mM solution of BODIPY-FL-SSE. The mixture was incubating for 10 minutes at 0°C and the reaction was ...

WO 01/14578

PCT/US00/23233

quenched by the addition of free lysine (final concentration = 100 mM). To the resulting solution 0.1 volumes of 3 M NAOAc (pH=5.0) was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50µl of RNase-free water and passed through Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis (Varshney, U., Lee, C.P. & RajBhandary, U.L., 1991 J. Biol. Chem. 266, 24712-24718).

3. Translation

The PCR products (see step 1 above) were directly added without purification to a small aliquot of a Promega rabbit reticulocyte TnT Quick system which also contained the BODIPY-Lys-tRNA (see step 2 above). More specifically, after PCR, 0.5 - 1µl of PCR product was directly added to translation reaction mixture containing 8µl of rabbit reticulocyte extract for PCR product (Promega), 0.5µl of 1 mM complete amino acid mix, 1µl of BODIPY-FL-Lysyl-tRNA. The translation reaction was allowed to proceed for 1 hour and the reaction product were analyzed by 14% SDS-PAGE. Imaging was performed in under 1-2 minute using a Molecular Dynamics FluorImager.

4. Detection

Figure 31 shows the results for analysis of several different human genomic samples using BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{ba} to incorporate a fluorescent label into fragments of the APC protein. Lane 1 is a minus DNA control. Lane 2 shows the results for wild-type DNA, while lanes 3-8 show the results for various mutant DNA isolated from patients having FAP (colon cancer). The last lane is fluorescent molecular weight markers. As seen in Figure 31, the WT DNA (lane 2) produces a band, which corresponds to the normal Exon 15, segment 2 fragment of the APC gene. In contrast, all other lanes (except lane 6) exhibit the WT band *and an additional band* which corresponds to truncated fragments of Exon 15, segment 2. Thus, these

WO 01/14578

PCT/US00/23233

individuals are heterozygous and carry one WT and one chain truncating mutation in the APC gene. In contrast, the lane 6 results indicates normal WT sequence in this region for both genes. Similar conclusion was reached independently using conventional radioactive PAGE analysis of patient samples by the University Molecular Diagnostics laboratory.

A similar analysis was performed to detect chain-truncating mutations in Exon 15-segment 3 (Figure 32). Proteins were synthesized using the rabbit reticulocyte *in vitro* translation system in conjunction with BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{lys}. Following separation by SDS-PAGE, translated proteins were visualized by fluorescence imaging (Figure 32A) or by chemiluminescent Western blotting procedures using a polyclonal antibody directed against the BODIPY fluorophore (Figure 32B). Lane 1 is a minus DNA control. Lane 2 shows the results for APC3 wild-type DNA, while lane 3 shows the results for APC3 truncated mutant. Lane 4 shows the results for APC2 wild-type DNA, while lane 5 shows the results for APC2 heterozygous mutant.

Overall, these results demonstrate the ability to replace radioactive PTT screening with fluorescent-based screening of chain truncations involved in human inherited diseases.

Example 25: Gel-free PTT For Cancer Genes

Although the replacement of radioactivity in Example 24 (above) with fluorescent labels represents an improvement in current PTT technology, it still relies on the use of gels, which are not easily adaptable for high-throughput screening applications. For this reason, this example demonstrates a non-gel approach based on the use of chemiluminescent detection. In this approach, a cancer-linked protein or polypeptide fragment from the protein is expressed *in vitro* from the corresponding gene with different detection and binding tags incorporated at the N-terminal, C-terminal and between the two ends of the protein using a combination of specially designed primers and tRNAs. The detection and binding tags provide a means to quantitate the fraction of protein or protein fragment which is truncated while the tags located between the two ends of the protein can be used to determine the region of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

truncation. For example, a full-length protein would contain both an N and C-terminal tag, whereas a truncated protein would contain only the N-terminal tag. The signal from a tag incorporated at random lysines between the two ends of the protein (intrachain signal) would be reduced proportional to the size of the truncated fragment. It is important to also capture the protein with a marker located close to the N-terminus in order to avoid interference of chain truncations with binding.

In order to evaluate this method, we performed experiments on the APC and p53 genes containing either a WT sequence or truncating mutations. In both cases, a combination of primers and specially designed tRNAs were used to incorporate a series of markers into the target proteins during their *in vitro* synthesis in a rabbit reticulocyte system. After *in vitro* expression, the expressed protein was captured in 96-well ELISA plates using an affinity element bound to the plate. The relative amount of N-terminal, C-terminal and intrachain signal was then determined using separate chemiluminescent-based assays.

1. PCR of Cancer Genes

A. APC segment 3

First, the genomic DNA (WT and isolated from cell lines harboring mutant APC gene) was amplified by PCR using following primers. The forward primer, PTT-T7-APC3, was [5'-GGATCCTAATACGACTCACTATAGGGAGACCACCATG-CACCACCATCACCATCACGGAGGAGATTACAAAGATGACGATGACAAA-GTTTCTCCATACAGGTCACGGGAGCCAAT-3'] (SEQ ID NO:20) and the reverse primer, PTT-Myc-APC3, was [5'-ATTATTACAAATCCTCTTCCGAGATTAA-TTTTGTTCACCTTCTGCCTTCTGTAGGAATGGTATCTCG-3'] (SEQ ID NO:21). The underlined sequence in forward primer is T7 promoter, nucleotides shown in italics corresponds to that of His-6 tag while the nucleotides sequence shown in the bold codes for FLAG-epitope and the rest of the primer is the complementary region for APC segment 3 DNA. In the reverse primer, the underlined sequence corresponds to that of c-Myc epitope. The PCR reaction mixture of 50µl contained 200-500 ng template DNA (either WT or mutant), 0.5µM each primer and 25µl of PCR master

WO 01/14578

PCT/US00/23233

mix (Qiagen, CA) and nuclease free water (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) water. The PCR was carried out using Hybaid Omni-E thermocycler (Hybaid, Franklin, MA) fitted with hot-lid using following conditions: 95°C for 3 min, followed by 40 cycles consisting of 95°C for 45 sec, 55°C for 1 min and 72°C for 2 min and the final
 5 extension at 72°C for 7 min. The PCR product was analyzed on 1 % agarose gel and the PCR amplified DNA was used in the translation reaction without any further purification.

B. P53

The p53 DNA was prepared as described in Example 23 (above).

10 2. Preparation of the tRNA

The BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{lys} was prepared as described in Example 23 (above). Preparation of Biotin-lysyl-tRNA^{lys} and PC-Biotin-lysyl-tRNA^{lys} was achieved as follows. The purified tRNA^{lys} (Sigma Chemicals, St. Louis, MO) was first aminoacylated with lysine. The typical aminoacylation reaction contained 1500
 15 picomoles (-1.0 OD₂₆₀) of tRNA, 20 mM imidazole-HCl buffer, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 1 mM lysine, 2 mM ATP, 150 mM NaCl and excess of aminoacyl-tRNA-synthetases (Sigma Chemicals, St. Louis, MO). The reaction mixture was incubated for 45 min at 37°C. After incubation, the reaction mixture was neutralized by adding 0.1 volume of 3 M sodium acetate, pH 5.0 and subjected to chloroform:acid
 20 phenol extraction (1:1). Ethanol (2.5 volumes) was added to the aqueous phase and the tRNA pellet obtained was dissolved in water (35 µl). To this solution 5 µl of 0.5 M CAPS buffer, pH 10.5 was added (50 mM final conc.) followed by 10 µl of 10 mM solution of either Biotin or photocleavable-Biotin. The mixture was incubated for 10 min at 0°C and the reaction was quenched by the addition of lysine (final
 25 concentration= 100 mM). To the resulting solution 0.1 volume of 3 M NaOAc, pH = 5.0 was added and the modified tRNA was precipitated with 3 volumes of ethanol. Precipitate was dissolved in 50 µl of water and purified on Sephadex G-25 gel filtration column (0.5 X 5 cm) to remove any free fluorescent reagent, if present. The modified

WO 01/14578

PCT/US00/23233

tRNA was stored frozen (-70°C) in small aliquots in order to avoid free-thaws. The modification extent of the aminoacylated-tRNA was assessed by acid-urea gel electrophoresis (Varshney, U., Lee, C.P. & RajBhandary, U.L., 1991, J. Biol. Chem. 266, 24712-24718).

5 3. Translation

The typical translation reaction mixture (20µl) contained 16µl of TNT rabbit reticulocyte extract for PCR DNA (Promega, Madison, WI), 1µl of amino acid mix (1 mM), 1-2µl of PCR DNA (see APC and p53 preparation described above) and RNase-free water. For fluorescence detection, the BODIPY-FL-lysyl-tRNA^{lys} was included into the translation reaction mixture. The translation reaction was allowed to proceed for 60 min at 30°C.

10 4. Detection

Figure 33A shows the results of an initial experiment designed to detect a chain truncation introduced into the p53 protein during RT-PCR. In this case an N-terminal FLAG epitope was used for capture (see the description of the capture assay using 96-well ELISA plates at the beginning of the EXPERIMENTAL section), and His₆ and c-myc used for the N- and C-terminal markers, respectively. Detection of the N-terminus His-tag was achieved using a peroxidase labeled nickel chelate-based detection probe (IndiaTM His Probe-HRP, Pierce, Rockford, IL). Detection of the C-terminus was performed using a rabbit polyclonal antibody directed against the human c-myc epitope followed by a peroxidase labeled mouse anti-[rabbit IgG] secondary antibody. As seen, the ratio of C/N terminal signals is reduced approximately 25-fold for the truncated protein compared to WT. Further optimization of this assay should result in sensitivity sufficient to detect truncating mutations in 1/100 mutant/WT p53 proteins, thus enabling applications to non-invasive colon cancer screening.

20 In a second experiment (Figure 33B), capture was facilitated with an N-terminal His₆-tag, while FLAG and c-myc were used as N and C-terminal markers, respectively. In addition, an intrachain photocleavable biotin marker was incorporated.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

by adding PC-Biotin-Lys-tRNA to the *in vitro* mixture. Biotin detection was achieved using peroxidase labeled NeutrAvidin™ (Pierce). The results show a 13-fold reduction in the C/N ratio for truncated p53 compared to WT. Furthermore, the intrachain biotin signal drops by 75% relative to the N-terminal signal.

5 A third chemiluminescent protein truncation assay was designed to detect chain truncation in the APC gene of a mutant cell line (Figure 33C). Capture was facilitated with an N-terminal His₆-tag, while FLAG and c-myc were used as N and C-terminal markers, respectively. As seen in Figure 33C, the truncated APC exhibits a marked drop in the C/N ratio (1/6) again indicating the presence of a chain truncation.

10 Overall, these experiments demonstrate the ability to detect chain-truncating mutations in cancer-linked proteins using a gel-free chemiluminescent approach.

Example 26: Fluorescent Immunoprecipitation Method

In this Example, the use of Fluoro-tag tRNA in immunoprecipitation is demonstrated. In this experiment, once the nascent protein was synthesized in the presence of the labeled tRNA, it was captured on protein-G beads using specific antibodies. All other (unbound) material is removed. The bound protein of interest is then released from the bead by SDS-treatment and analyzed by PAGE.

The *in vitro* translation was carried out using either the PCR DNA coding for P53 protein or a plasmid DNA coding for α -hemolysin (prepared as described in previous examples). After the translation reaction, equal amounts of 10% SDS (w/v) was added to the reaction mixture and the samples were boiled for 5 min. The samples were diluted with IP buffer (Tris-buffer saline with 1 % Triton X-100) and 2 μ g of either anti-P53 antibody (SantaCruz Biotech, CA) or anti-HL antibody (Sigma, St. Louis, MO) was added and incubated for several hours at 4°C with mixing. As a negative control, immunoprecipitation was carried out using non-specific mouse IgG antibodies. After antibody incubation, Protein-G beads (Pierce, IL) were added to the reaction mixture and further incubated for 1 hour with constant mixing. The beads were then pelleted and washed three times with TBS with 0.1% SDS. Finally, the beads were suspended into 50 μ l of 2X SDS-gel loading buffer and boiled for 5 min.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

The SDS-PAGE was carried out according to Laemmli (Laemmli, U. K. 1970, Nature, 227, 680-685).

The gel was then scanned using FluorImager S1 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA) equipped with argon laser as excitation source. For visualization of BODIPY-FL labeled nascent protein, 488 nm was used as excitation source as it is the closest to its excitation maximum and for emission (we have used 530±30 filter). The gel was scanned using PMT voltage 1000 volts and either 100 or 200 micron pixel size.

Figure 34 shows the results. Lane M contains fluorescent markers. Lane 1 is a minus DNA control (+ anti-HL antibody). Lane 2 shows the results for HL DNA + mouse IgG. Lane 3 shows the results for HL DNA + anti-HL antibody. Lane 4 is a minus DNA control (+ anti-P53 antibody). Lane 5 shows the results for p53 DNA + mouse IgG. Lane 6 shows the results for p53 DNA + anti-p53 antibody. It should be clear that the immunoprecipitation method provides specific results and a very clean signal without any substantial background.

Example 26: Suppressor tRNAs

When using BODIPY-labeled initiator tRNAs, a competition occurs between endogenous initiator tRNA (unlabeled) which causes reduced incorporation of the label. To overcome this competition, the present invention contemplates using an amber stop codon and a corresponding suppressor tRNA.

1. Preparation of BODIPY-Val-pdCpA

The first step involves the preparation of a BODIPY-amino acid conjugate for attachment to the suppressor tRNA. The synthesis is set forth in Figure 35. The synthesis begins with the preparation of 5-Methyl-1(2-Nitrophenyl)ethanol (compound 2). To begin, 5-Methyl-2-nitroacetophenone (Olejnik, J., S. Sonar, E.

Krzymanska-Olejnik, and K. J. Rothschild. 1995 *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92:7590-4; Olejnik, J., E. Krzymanska-Olejnik, and K. J. Rothschild. 1998. *Methods Enzymol*. 291:135-54.) was dissolved in 5 ml of ethanol. To this solution 5 mg of

WO 01/14578

PCT/US00/23233

sodium borohydride was added in small portions until analytical TLC showed complete conversion to 5-Methyl-1(2-Nitrophenyl)ethanol. The reaction was quenched by addition of 5 ml acetone and acidified to pH = 3.0 with 1 N HCl, followed by extraction with chloroform. The organic layer was dried and evaporated to give the target compound as yellowish oil. This compound was used without any further purification.

Continuing with the synthesis scheme, 5-Methyl-1(2-Nitrophenyl)ethanol (350 mg; 1.95 mmol) (compound 2) was dissolved in 10 ml of acetonitrile. To this solution 407 μ l of triethylamine (1.5 eq) was added followed by N,N'-disuccinimidyl carbonate (750 mg, 1.5 eq.). The reaction mixture was stirred at room temperature until analytical TLC (silica gel, chloroform) showed quantitative conversion to compound 3. The resulting solution was added directly to the solution of triethylammonium salt of valine.

Valine (218 mg; 1.86 mmol) was suspended in 2 ml of water to which was added 260 μ l of triethylamine. To this solution a solution of compound 3 was added xx over 15 min. period, during which pH value of the mixture was adjusted if necessary by the addition of triethylamine. The mixture was stirred for 30 min and acidified by addition of 10 ml of 0.1 N HCl, followed by extraction with 3 x 20 ml AcOEt. Organic layers were combined, dried and evaporated to dryness. The crude product was dissolved in 20 ml chloroform and extracted with 4 x 30 ml of 0.1 N NaHCO₃, the aqueous layer acidified and re-extracted by chloroform to give 320 mg of pure target Npe-Val (compound 4).

Npe-Val (compound 4) (320 mg, 1 mmol) was dissolved in 320 μ l of acetonitrile. To this solution was added triethylamine (280 μ l, 2 eq.) and chloroacetonitrile (190 μ l, 3 eq.). The mixture was stirred overnight at room temperature. 20 ml of methylene chloride was added followed by 20 ml of 1N NaHSO₄, the mixture was extracted with 4 x 20 ml methylene chloride. Organics were evaporated to dryness and purified on silica gel column using step gradient of ethyl acetate in hexane (10-50%) to give 300 mg of pure product (compound 5).

20 OD of pdCpA (Annovis) containing 2.2 equiv of tetrabutylammonium

WO 01/14578

PCT/US00/23233

counterion was dissolved in 40 μ l of dry DMF. To this solution was added a solution of 2 equivalents of Npe-Val-COOCH₂CN (0.66 mg) in 10 μ l DMF. The reaction was kept at RT for 2 hrs, then the product was isolated using preparative HPLC to give 15 OD of compound 6.

5 15 OD₂₆₀ of Npe-Val-pdCpA was dissolved in 500 μ l of 25 mM NaOAc, pH = 4.5 and irradiated for 20 minutes using 365 nm light (BlakRay XX-15, UVP). 166 μ l of BODIPY-FL-SE (@10mg/ml; 7 equivs. was added) followed by 140 μ l of 1N NaHCO₃. Additional portions of BODIPY-FL-SE solution (2 x 166 μ l, total 21 equivs) were added after 5 and 10 minutes, respectively, and the reaction mixture was vortexed
10 at room temperature for 45 minutes. The product (compound 7) was isolated using preparative HPLC Novapak C18, 10x100mm, linear gradient of acetonitrile in 50 mM TEAA, pH 5.4 over 90 min., flow 2 ml/min) and characterized by absorption at both 260 and 505 nm. Yield 7.25 OD₂₆₀.

2. Expression and purification of amber-suppressor fMet-tRNA.

15 PstI fragment of *nusA* operon containing a gene for mutant tRNA^{fmet} (S.Ishi et al. PNAS v.81, pp409-413, 1984) was cloned into pGEM4 vector (Promega, Madison, WI). Total tRNA was isolated from overnight culture (100 ml) of *E. coli* XL-blue 2 cells by phenol extraction and ethanol precipitation. Suppressor tRNA^{fmet}
20 was purified using native PAGE (Seong and RajBhandary, PNAS v.84 pp.334-338, 1987).

3. tRNA truncation by venom phosphodiesterase I (VPD I) (Figure 36)

1 OD₂₆₀ of purified initiator suppressor tRNA was dissolved in 50 μ l of 50 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM MgCl₂ and 100 mM NaCl. To this solution 0.5 unit of VPD I was added and the mixture was incubated for 30 min at 0°C. After phenol
25 extraction tRNA was precipitated by EtOH, dried and dissolved in 100 μ l of water. Selective (-CA) dinucleotide removal from the 3'-terminus was confirmed by 8%, 7M Urea PAGE analysis.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

4. Ligation with BODIPY-Val-pdCpA with truncated initiator suppressor tRNA

As shown in the scheme of Figure 36, the tRNA is charged with the BODIPY-amino acid conjugate in a ligation reaction. 0.5 OD₂₆₀ of tRNA was incubated with 0.5 OD₂₆₀ unit of pdCpA in 100 ul of ligation buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.8; 10 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 1 mM ATP 30% of DMSO) and 200 units of T4 RNA ligase (New England Biolabs, Beverly, MA) for 1 hour at 37°C. After the incubation tRNA was precipitated by 3-4 volumes of EtOH, dissolved in 50ul of water and spine-filtered using G25 MicroSpin column (Amersham Pharmacia Biotech Inc.). Ligated tRNA was aliquoted and stored at -70°C. The product will be referred to as an initiator/amber suppressor tRNA.

5. Translation and analysis

Translation was performed in a cell-free *E. coli* S30 extract (Promega, Madison, WI) in 20 ul total volume. The mixture contained DNA coding for the particular protein (1 ug) and initiator amber suppressor tRNA prepared by chemical aminoacylation (1 ug). The mixture was incubated for 1 hour at 37 °C and then 1 ul was mixed with the loading buffer, heat denatured and run on a 14% SDS-PAGE (150 V, 1 hr). The gel was then rinsed briefly and analyzed using Fluorimager in case of BODIPY label. In case of PC-Biotin the gel was blotted onto PVDF membrane and the biotin detected using streptavidin-HRP.

Figure 37 shows the results. Lane 1 is a minus DNA control + BODIPY-Val initiator/amber suppressor tRNA. Lane 2 shows the results for luciferase DNA + BODIPY-Lys-tRNA. Lane 3 shows the results for amber-1 luciferase DNA + BODIPY-Lys-tRNA, while lane 4 shows the improved results for amber-1 luciferase DNA + BODIPY-Val initiator/amber suppressor tRNA.

Lane 5 shows the results for hemolysin DNA + BODIPY-Lys-tRNA. Lane 6 shows the results for amber-1 hemolysin DNA + BODIPY-Lys-tRNA, while lane 7 shows the improved results with amber-1 hemolysin DNA + BODIPY-Val initiator/amber suppressor tRNA.

Lane 8 shows the results for DHFR DNA + BODIPY-Lys tRNA. Lane 9

WO 01/14578

PCT/US00/23233

shows the results for amber-1 DHFR DNA + BODIPY-Lys tRNA, while lane 10 shows the improved results for amber-1 DHFR DNA + BODIPY-Val initiator/amber suppressor tRNA.

Example 28: Drug-Proteome Screening

5 The completion of the human genome project has opened a new chapter in drug discovery. In contrast to conventional methods, where a drug library is screened against a single protein, the entire proteome is now available for screening. However, such drug-proteomic screens are difficult to accomplish using conventional technology because of the need to rapidly convert genome to proteome, engineer specially labeled
10 proteins and screen thousands of samples per hour.

The present invention provides methods and compositions that aim at removing these limitations by screening drug-protein interactions using cell-free expressed labeled proteins and 2-D microarrays. The present invention contemplates incorporating the above-described labels and markers (*e.g.* fluorescent and affinity
15 tags) into proteins during their cell-free expression. Fluorescent tags (*e.g.* at the N-terminal, C-terminal, within and/or throughout the protein) provide a means to monitor protein expression and detect their interactions with potential drug compounds. Affinity tags provide a means to rapidly isolate cell-free expressed proteins from the cell-free lysate. Drug screens performed on 2-D microarrays of cell-free expressed
20 proteins, reflecting all or part of the human proteome, provide a system for high sensitivity detection, high throughput and low sample volume requirements.

The proteomic screening assays of the present invention greatly accelerate the drug discovery process by allowing potential interactions between a lead drug compound and an entire proteome (or part of a proteome) to be screened. Such
25 information is valuable to explore the molecular basis of a drug's action and to identify possible side effects of a drug by constructing a drug interaction map.

A drug-interaction map provides information about the interaction of a specific compound (*e.g.* a lead drug) with the human proteome. In order to establish a drug-interaction map, methods are contemplated that allow systematic expression and

WO 01/14578

PCT/US00/23233

labeling of entire proteomes using a formatted cDNA library that consists of a series of plasmid cDNA pools. Each pool, consisting of approximately 50 plasmids or less (more preferably approximately 40 plasmids or less, still more preferably approximately 30 plasmids or less, and most preferably approximately 25 plasmids or less), is simultaneously expressed in a cell-free reaction mixture (e.g. Promega TnT rabbit reticulocyte expression system). The proteins are affinity purified from the mixture using linkers such as PC-biotin incorporated during translation with tRNAs. The expressed proteins are then exposed to a surface (e.g. a bead or slide), which has the immobilized test drug compound on the surface. Interaction of one or more proteins from each pool is then detected using the incorporated fluorescent labels. The identity of a particular protein(s) from the pool which interacts with a drug compound is then determined using either a procedure which subdivides the plasmid pool or through microanalysis of the immobilized protein. Alternatively, the expressed proteins in each pool are transferred to a solid medium using incorporated affinity tags. Each pool of proteins are arranged on a 2-D array and interrogated with compounds, which are immobilized on labeled beads. High throughput screening can be accomplished using 2-D microarrays and fluorescent imagers similar to DNA-based microchips.

An important advantage of the use of cell-free expressed proteins with non-radioactive markers, such as incorporated fluorescent and/or affinity markers, compared to conventional methods of radioactive labeling is the ability to perform rapid isolation of nascent proteins and rapid detection with the sensitivity necessary for high throughput analysis. This approach is especially advantageous in the case of 2-d microarrays where radioactive detection is precluded. In addition, it is important to limit the number of the plasmids in each pool (e.g. less than 50) so that each protein coded by the cDNA is expressed at a sufficient level to detect. While large volumes of reaction mixture (e.g. 1 ml) can always be utilized to express pools of plasmids, large volume reactions would be prohibitively expensive for practical proteomic screening. For example, utilization of 2000 1 ml reaction volumes would be necessary to express 2000 plasmids pools. Using current commercial costs of TnT

WO 01/14578

PCT/US00/23233

5 rabbit reticulocyte this would cost approximately \$800,000. In contrast, smaller volume
50 microliter reactions compatible with 2-d microarray formats would cost only
\$20,000. Earlier methods of in vitro expression cloning such as described in United
States Patent 5,654,150 (hereby incorporated by reference) are based on collecting
10 pools of about 100 individual bacterial colonies and expressing proteins encoded by
the cDNAs in the pools in vitro. While this approach represents an improvement of
earlier (non-*in vitro*) expression cloning methods such as described in U.S. Pat. No.
4,675,285 (also incorporated by reference), it still does not generally provide a
sufficiently sensitive method to perform high throughput drug-proteomic screening
15 provided by the present invention. In addition to drug-proteomic screening, the
present invention would also allow for the rapid throughput screening of interactions
of the proteome with DNA and other biomolecules.

Two different related approaches for drug-proteomic screening are
contemplated, both based on the utilization of 2-D arrays or microarrays and detection
15 using fluorescence, luminescence, chemiluminescence, absorption or other means of
electromagnetic detection (either directly or indirectly). As shown in Figure 38, the
first approach utilizes cell-free expressed proteins produced from pools of plasmids,
which comprise a formatted genomic library. In order to eliminate interference from
preexisting protein in the reaction mixture, which exist at much higher levels than the
20 expressed proteins, a pre-purification step may be necessary using incorporated affinity
tags and complementary capture molecules coated on a surface. Each sample from an
individual pool containing the expressed proteins is then applied to a spot on the
surface containing the immobilized target drug. The incorporated fluorescence marker
is then used to identify those samples, which contain proteins, which interact with the
25 target drug. Alternatively, a fluorescently labeled molecule (*e.g.* an antibody), which
interacts with an incorporated affinity marker can be used. In one preferred
embodiment, a biotin is used as the affinity marker, which interacts with a
streptavidin-horse radish peroxidase (HRP) complex which catalyzes a reaction that
produces a detectable signal (*e.g.* chemiluminescent or fluorescent).

30 Once a protein pool is identified which exhibits an interaction with the target

WO 01/14578

PCT/US00/23233

drug through detection of fluorescence from the particular spot, the actual interacting protein can be identified using a variety of procedures. One method relies on the retransformation of the individual plasmids in the pool followed by *in vitro* expression of proteins from each individual plasmids in the presence of FluoroTags or Affinity Tags. An alternative approach is to recover the actual bound protein(s) from a spot showing positive fluorescence and perform sequence analysis either using mass spectrometry or through chemical means.

A second related approach for drug-proteome screening is also contemplated (Figure 39). In this case, the samples containing the cell-free expressed proteins produced from pools of plasmids are first bound to surfaces and then interrogated with a specific target drug, which is conjugated to a fluorescent moiety. The incorporated affinity tags are used for the binding of the *in vitro* expressed protein to a specially prepared surface containing a capture molecule which interacts with the affinity tag. Incorporated fluorophores are used to monitor surface binding. Target drug binding is detected using dual wavelength fluorescence detection or alternatively fluorescence resonance energy transfer, which assures that the protein and bound drug are in close proximity. The drug-protein complex can also be released using a photocleavable biotin linker, for downstream analysis to confirm the drug-protein interaction and for further mass spectrometric analysis of the drug or protein identity.

In both scenarios described above, parallel expression of the genomic library, which is estimated to consist of 2000 individual plasmid pools of approximately 50 plasmids per pool, provides the basis to perform rapid drug-proteomic analysis. For example, using a preformatted set of reaction wells (50 microliters each) and plasmid sets, the entire parallel expression reaction could be accomplished in less than 1 hour. The purification of the expressed proteins from each sample could also be extremely rapid, provided that suitable equipment (e.g. 96 well-pipettors operated by robotic arms) were utilized. For example, pipette filter tips can be prepared that contain an affinity media for capture via the *in vitro* incorporated photocleavable tag (e.g. streptavidin bound to beads) and light can be used for subsequent release.

In both scenarios, the samples can be rapidly transferred to a surface for

WO 01/14578

PCT/US00/23233

subsequent drug-protein fluorescent assays. For example, in the case of slides coated with the target drug, individual samples can be spotted using a commercial arrayer such as the Affymetrix 417 arrayer, which offers 125 μm resolution spot size. In principle, a single microscope slide would be sufficient to array the entire proteome with 5-fold redundancy in less than 10 minutes. Larger spots sizes or greater

redundancy would require more slides, however the entire preparation of the arrayed proteome would still rapid and amenable to high throughput processing. The entire "proteome on a slide" concept is particularly attractive, since the rapid production of such slides would enable screening of the entire proteome versus libraries of drugs.

For the above mentioned format, rapid read-out can be achieved using a fluorescent 2-D microarray reader. For example, the Affymetrix 418 scanner can scan an entire slide in approximately 10 minutes and is able to perform 3 color imaging. Furthermore, the array reader offers high precision (10 microns), speed (18 mm/min) and sensitivity (less than 1 Cy3 dye molecules per 1 square micron with > 3.5 S/N).

In order to evaluate the screening assays of the present invention, experiments were performed which involved the incorporation of PC-Biotin or BODIPY into the test protein dihydrofolate reductase (DHFR). Experiments were aimed at evaluating whether PC-Biotin or BODIPY markers incorporated into DHFR during its *in vitro* synthesis could be used to assay for its interaction with the small ligand methotrexate, a competitive inhibitor for DHFR whose normal ligand is dihydrofolate. Since methotrexate can reduce the rate of cell growth, it is widely used as an anticancer drug in chemo-therapy.

In one assay, PC-Biotin was incorporated into DHFR during its *in vitro* expression in S30 in the presence of PC-Biotin-Lys-tRNA. After expression, the crude mixture was exposed to methotrexate-coated agarose beads. After extensive washing, specific binding of the DHFR to the beads was assayed using streptavidin-HRP. As seen in Figure 40, a signal is obtained only when PC-Biotin-Lys-tRNA is included in the expression system. UV-light exposure prior to binding, abolishes the signal relative to control levels (data not shown), providing a convenient method to measure background levels during automated assays.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

In a second experiment, capillary electrophoresis (CE-LIF) was used as a homogenous solution assay to detect the interaction of DHFR and methotrexate. In this case, BODIPY was incorporated at the N-terminus of DHFR during its *in vitro* synthesis using BODIPY-fmet-tRNA. The electropherogram for free DHFR exhibited a peak at 2.9 minutes (data not shown). In comparison, the electropherogram of DHFR preincubated with methotrexate for 30 minutes at room temperature exhibited a broadened peak at 2.8 min (data not shown). The change in migration time is attributed to the complex formation between DHFR and methotrexate.

In a third series of experiments, the ability to selectively bind and detect an *in vitro* expressed target protein using an antibody was explored. For this purpose, PC-Biotin was incorporated into p53 expressed in rabbit reticulocyte lysate after RT-PCR of a pooled human mRNA sample using the PC-Biotin-Lys-tRNA. The protein was then specifically captured on ELISA plates using monoclonal antibody clone BP53-12 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) which recognizes both WT and mutant conformations. As a negative control, an identical quantity of pre-immune mouse IgG was used for capture, in place of the p53 specific antibody. Detection of the biotin was achieved using peroxidase labeled NeutrAvidin biotin binding protein (Pierce, Rockford, IL) in a standard ELISA assay. The results (not shown) indicated that only specific binding with the p53 antibody results in a significant signal. These data demonstrate the feasibility of studying p53 binding using a panel of conformation specific antibodies which selectively react with different p53 mutants.

Other embodiments and uses of the invention will be apparent to those skilled in the art from consideration of the specification and practice of the invention disclosed herein. It is intended that the specification and examples be considered exemplary only, with the scope of particular embodiments of the invention indicated by the following claims.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

CLAIMS

1. A method, comprising:
 - a) providing a tRNA molecule and a BODIPY marker; and
 - b) aminoacylating said tRNA molecule with said BODIPY marker to create
- 5 a misaminoacylated tRNA.
2. The method of Claim 1, further comprising:
 - c) introducing said misaminoacylated tRNA into a translation system under conditions such that said marker is incorporated into a nascent protein.
3. The method of Claim 2, further comprising:
 - d) detecting said nascent protein containing said marker.
- 10 4. The method of Claim 3, further comprising:
 - e) isolating said detected nascent protein.
5. The method of Claim 3, wherein the nascent protein detected is selected from recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, hormones, immunogenic
- 15 proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.
6. The method of Claim 2, wherein the translation system comprises a cellular or cell-free translation system.
- 20 7. The method of Claim 5, wherein the cellular translation system is selected from the group consisting of tissue culture cells, primary cells, cells *in vivo*, isolated immortalized cells, human cells and combinations thereof.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

8. The method of Claim 5, wherein the cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof.
- 5
9. The method of Claim 5, wherein said cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C.
10. The method of Claim 5, wherein the cell-free translation system is a continuous flow or dialysis system.
- 10
11. The method of Claim 1, wherein the tRNA molecule is aminoacylated by chemical or enzymatic misaminoacylation.
12. The method of Claim 2, wherein two or more different misaminoacylated tRNAs are introduced into the translation system.
13. The method of Claim 3, wherein said nascent protein detected is functionally active.
- 15
14. The method of Claim 1, wherein said tRNA molecule is an initiator tRNA molecule.
15. The method of Claim 1, wherein said tRNA molecule is a suppressor tRNA molecule.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

16. A kit, comprising:
- a) a first containing means containing at least one component of a protein synthesis system;
 - b) a second containing means containing a misaminoacylated tRNA,
- 5 wherein said tRNA is misaminoacylated with a BODIPY marker.
17. The kit of Claim 16, wherein said misaminoacylated tRNA comprises an initiator tRNA.
18. The kit of Claim 16, wherein said misaminoacylated tRNA comprises a suppressor tRNA.
- 10 19. The kit of Claim 16, wherein said component of said protein synthesis system comprises ribosomes.
20. A tRNA molecule misaminoacylated with a BODIPY marker.
21. A method, comprising:
- a) providing: i) a misaminoacylated initiator tRNA molecule which
- 15 only recognizes the first AUG codon that serves to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and
- ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising an affinity marker and a C-terminal marker; and
- 20 b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker, said affinity marker and said C-terminal marker.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

22. The method of Claim 21, wherein the nascent protein generated is selected from recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, hormones, immunogenic proteins, truncated proteins, mutant proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.
23. The method of Claim 21, wherein the translation system comprises a cellular or cell-free translation system.
24. The method of Claim 23, wherein the cellular translation system is selected from prokaryotic cells, eukaryotic cells, tissue culture cells, primary cells, cells *in vivo*, isolated immortalized cells, human cells and combinations thereof.
25. The method of Claim 23, wherein the cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof.
26. The method of Claim 23, wherein said cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C.
27. The method of Claim 23, wherein the cell-free translation system is a continuous flow or dialysis system.
28. The method of Claim 21, wherein the tRNA molecule is aminoacylated by chemical or enzymatic misaminoacylation.
29. The method of Claim 23, wherein said nascent protein is functionally active.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

30. The method of Claim 21, wherein said first marker comprises a fluorescent compound.
31. The method of Claim 30, wherein said fluorescent compound is selected from dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes and derivatized coumarin.
- 5 32. The method of Claim 21, wherein said C-terminal comprises a histidine tag.
33. A method, comprising:
- a) providing i) a misaminoacylated initiator tRNA molecule which only recognizes the first AUG codon that serves to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and
- 10 ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising an affinity marker and a C-terminal marker; and
- b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is
- 15 generated, said protein comprising said first marker at the N-terminus of said protein, a C-terminal marker, and said affinity marker adjacent to said first marker.
34. The method of Claim 33, wherein the nascent protein generated is selected from recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines,
- 20 carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, hormones, immunogenic proteins, truncated proteins, mutant proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.
35. The method of Claim 33, wherein the translation system comprises a cellular or cell-free translation system.
- 25 36. The method of Claim 35, wherein the cellular translation system is selected

WO 01/14578

PCT/US00/23233

from prokaryotic cells, eukaryotic cells, tissue culture cells, primary cells, cells *in vivo*, isolated immortalized cells, human cells and combinations thereof.

37. The method of Claim 35, wherein the cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell
5 lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof.

38. The method of Claim 35, wherein said cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C.

10 39. The method of Claim 35, wherein the cell-free translation system is a continuous flow or dialysis system.

40. The method of Claim 33, wherein the tRNA molecule is aminoacylated by chemical or enzymatic misaminoacylation.

41. The method of Claim 33, wherein said nascent protein is functionally active.

15 42. The method of Claim 33, wherein said first marker comprises a fluorescent compound.

43. The method of Claim 42, wherein said fluorescent compound is selected from dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes and derivatized coumarin.

20 44. The method of Claim 33, wherein said C-terminal comprises a histidine tag.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

45. A method, comprising:
- a) providing i) a misaminoacylated tRNA molecule which only recognizes the first codon designed to serve to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising an affinity marker and a C-terminal marker; and
 - b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker, said affinity marker and said C-terminal marker.
46. The method of Claim 45, wherein the nascent protein generated is selected from recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, hormones, immunogenic proteins, truncated proteins, mutant proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.
47. The method of Claim 45, wherein the translation system comprises a cellular or cell-free translation system.
48. The method of Claim 47, wherein the cellular translation system is selected from prokaryotic cells, eukaryotic cells, tissue culture cells, primary cells, cells *in vivo*, isolated immortalized cells, human cells and combinations thereof.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

49. The method of Claim 47, wherein the cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof.
50. The method of Claim 47, wherein said cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C.
51. The method of Claim 47, wherein the cell-free translation system is a continuous flow or dialysis system.
52. The method of Claim 45, wherein the tRNA molecule is aminoacylated by chemical or enzymatic misaminoacylation.
53. The method of Claim 45, wherein said nascent protein is functionally active.
54. The method of Claim 45, wherein said first marker comprises a fluorescent compound.
55. The method of Claim 44, wherein said fluorescent compound is selected from dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes and derivatized coumarin.
56. The method of Claim 45, wherein said C-terminal comprises a histidine tag.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

57. A method, comprising:
- a) providing i) a misaminoacylated tRNA molecule which only recognizes the first codon designed to serve to initiate protein synthesis, said misaminoacylated initiator tRNA molecule comprising a first marker, and ii) a nucleic acid template encoding a protein, said protein comprising an affinity marker and a C-terminal marker; and
 - b) introducing said misaminoacylated initiator tRNA to a translation system comprising said template under conditions such that a nascent protein is generated, said protein comprising said first marker at the N-terminus of said protein, a C-terminal marker, and said affinity marker adjacent to said first marker.
58. The method of Claim 57, wherein the nascent protein generated is selected from recombinant gene products, gene fusion products, enzymes, cytokines, carbohydrate and lipid binding proteins, nucleic acid binding proteins, hormones, immunogenic proteins, truncated proteins, mutant proteins, human proteins, viral proteins, bacterial proteins, parasitic proteins and fragments and combinations thereof.
59. The method of Claim 58, wherein the translation system comprises a cellular or cell-free translation system.
60. The method of Claim 59, wherein the cellular translation system is selected from prokaryotic cells, eukaryotic cells, tissue culture cells, primary cells, cells *in vivo*, isolated immortalized cells, human cells and combinations thereof.
61. The method of Claim 59, wherein the cell-free translation system is selected from the group consisting of *Escherichia coli* lysates, wheat germ extracts, insect cell lysates, rabbit reticulocyte lysates, frog oocyte lysates, dog pancreatic lysates, human cell lysates, mixtures of purified or semi-purified translation factors and combinations thereof.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

62. The method of Claim 59, wherein said cell-free translation system is incubated at a temperature of between about 25°C to about 45°C.
63. The method of Claim 59, wherein the cell-free translation system is a continuous flow or dialysis system.
- 5 64. The method of Claim 57, wherein the tRNA molecule is aminoacylated by chemical or enzymatic misaminoacylation.
65. The method of Claim 57, wherein said nascent protein is functionally active.
66. The method of Claim 57, wherein said first marker comprises a fluorescent compound.
- 10 67. The method of Claim 66, wherein said fluorescent compound is selected from dipyrrometheneboron difluoride (4,4-difluoro-4-bora-3a,4a-diaza-s-indacene) dyes and derivatized coumarin.
68. The method of Claim 57, wherein said C-terminal comprises a histidine tag.

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Name and Molecular weight	Formula	Fluorescence Properties
BODIPY-FL, SSE M. WT. 491		Excitation=502 nm Emmision=510 nm Extinction=75,000
NBD M. WT. 391		Excitation=466 nm Emmision=535 nm Extinction=22,000
Bodipy-TMR-X, SE M. WT. 608		Excitation=544 nm Emmision=570 nm Extinction=58,000
Bodipy-RBG M. WT. 437		Excitation=528 nm Emmision=547 nm Extinction=70,000
Fluorescein (FAM) M. WT. 473		Excitation=495 nm Emmision=520 nm Extinction=74,000
Fluorescein (SFX) M. WT. 587		Excitation=494 nm Emmision=520 nm Extinction=73,000
PyMPO M. WT. 582		Excitation=415 nm Emmision=570 nm Extinction=26,000
5/6-TAMRA M. WT. 528		Excitation=546 nm Emmision=576 nm Extinction=95,000

Table 2

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Enzyme/Protein	-FluoroTag™ tRNA Translation reaction	+FluoroTag™ tRNA Translation reaction
α -Hemolysin OD _{415nm} /μl	0.085	0.083
Luciferase RLU/μl	79052	78842
DHFR Δ OD _{330nm} /μl	0.050	0.064

Table 3

WO 01/14578

PCT/US00/23233

Various Epitopes and Their Sequences

Name	Amino acid sequence	Nucleotide sequence (5'→ 3')
His-6	HHHHHH	CATCACCATCACCATCAC
FLAG	DYKDDDDK	GACTACAAGGACGACGACGACAAG
c-Myc	EQKLISEEDL	GAGCAGAAGCTGATCAGCGAGGAGGACCTG
Strep-Tag	WSHPQFEK	TGGAGCCACCCCAGTTCGAGAAG
Amber-16	CSPFEVQVSPEA GAQK	TGCAGCCCCTTCGAGGTGCAGGTGAGCCCCGAGGCCGCGCC CAGAAG
T7-Tag	MASMTGGQMQM	ATGGCCAGCATGACCGGCGGCCAGCAGATGGGC
VSV-G [#] -Tag	YTDIEMNRLGK	TACACCGACATCGAGATGAACCGCCTGGGCAAG
HA*-Tag	YPYDVPDYA	TACCCCTACGACGTGCCGACTACGCC
Protein-C Tag	EDQVDPRLIDGK	GAGGACCAGGTGGACCCCGCCTGATCGACGGCAAG
HSV ^{\$} -Tag	QPELAPEDPED	CAGCCCGAGCTGGCCCCCGAGGACCCCGAGGAC

- Vesicular Stomatitis Virus Glycoprotein

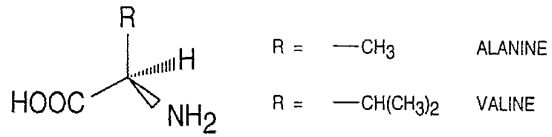
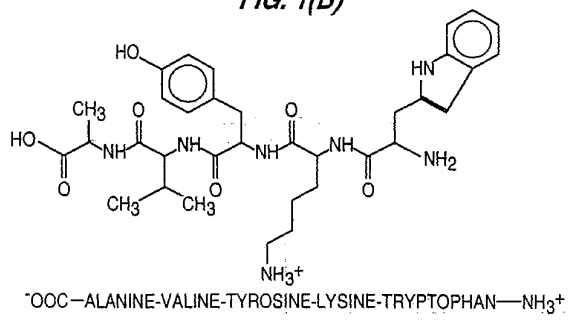
* - HemAgglutinin

\$ - Herpes Simplex Virus glycoprotein

TABLE 4

WO 01/14578

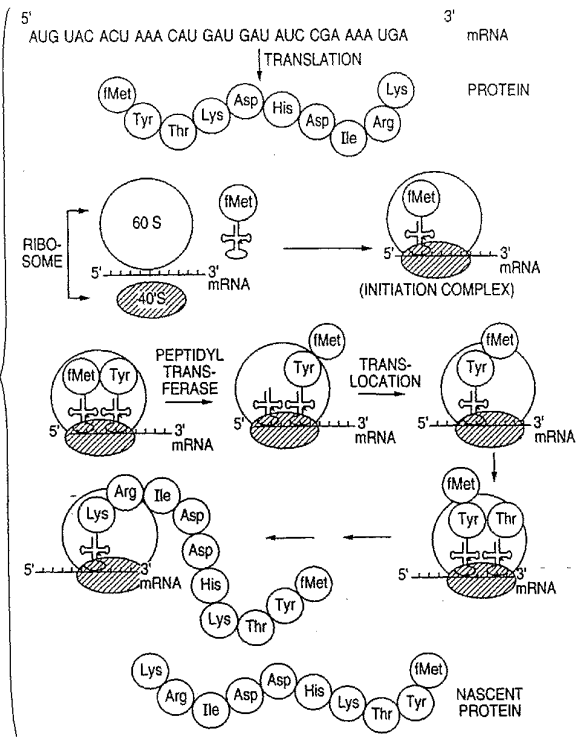
PCT/US00/23233

FIG. 1(A)**FIG. 1(B)**

WO 01/14578

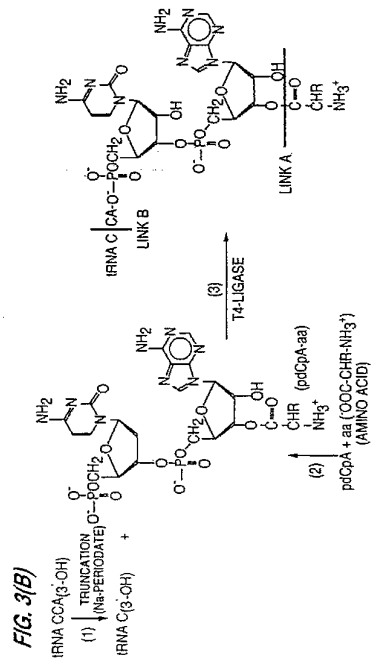
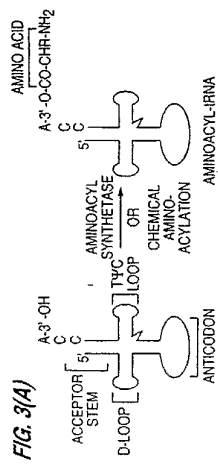
PCT/US00/23233

FIG. 2



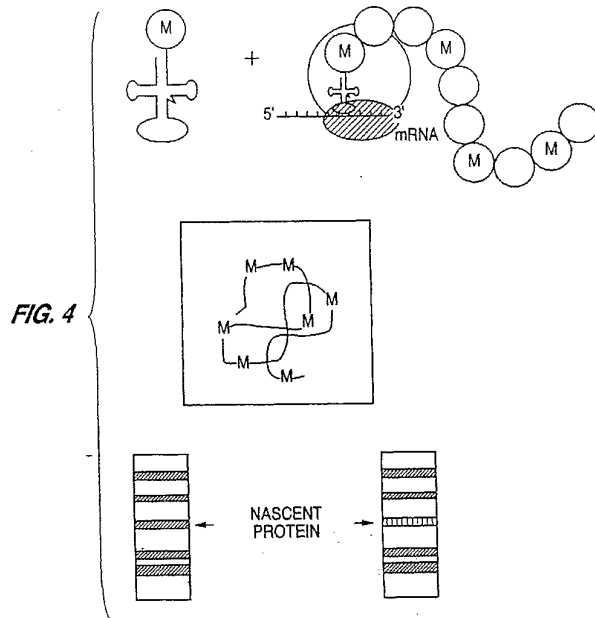
WO 01/14578

PCT/US00/23233



WO 01/14578

PCT/US00/23233



WO 01/14578

PCT/US00/23233

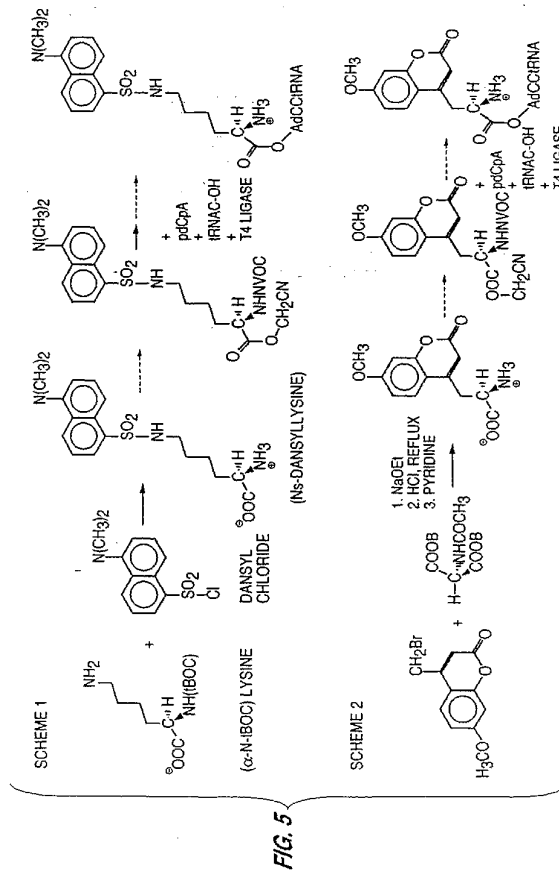


FIG. 6(A)

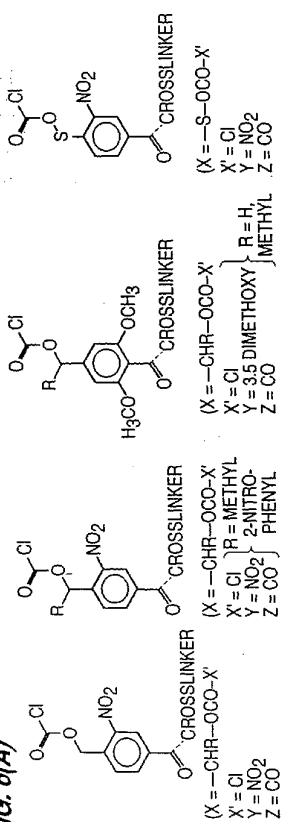
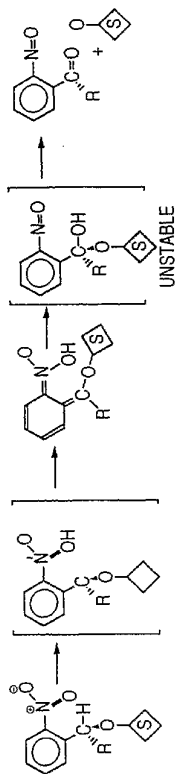


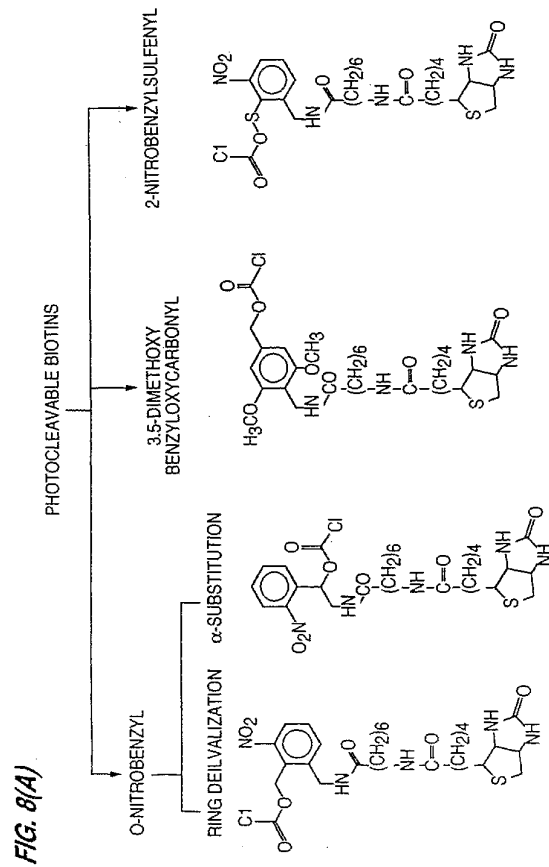
FIG. 6(B)





WO 01/14578

PCT/US00/23233



WO 01/14578

PCT/US00/23233

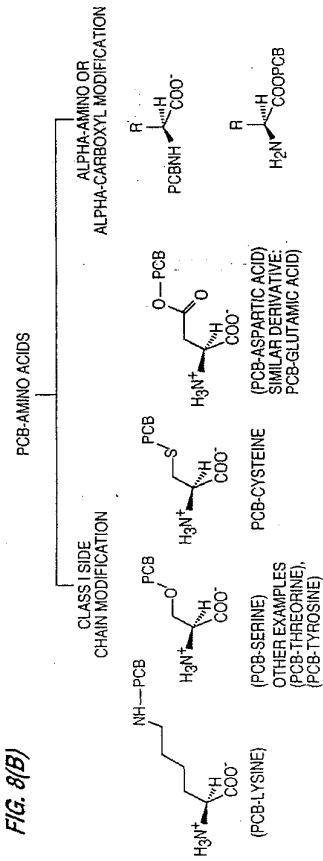
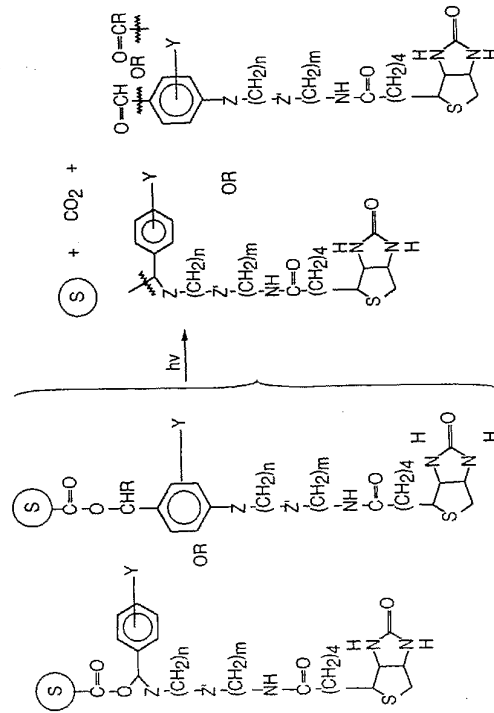
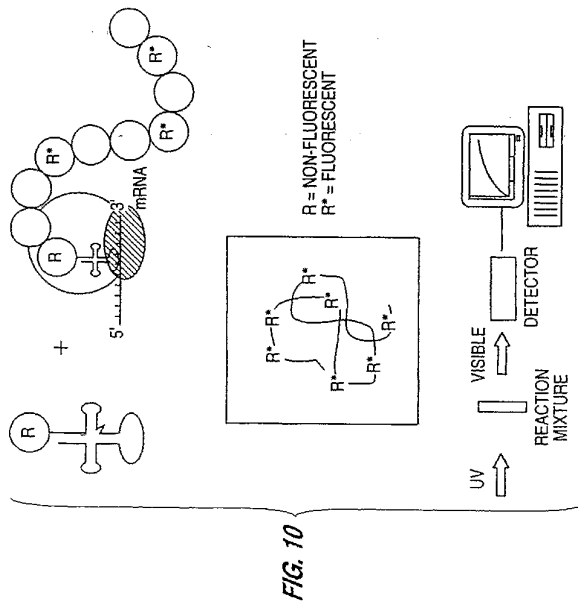


FIG. 9



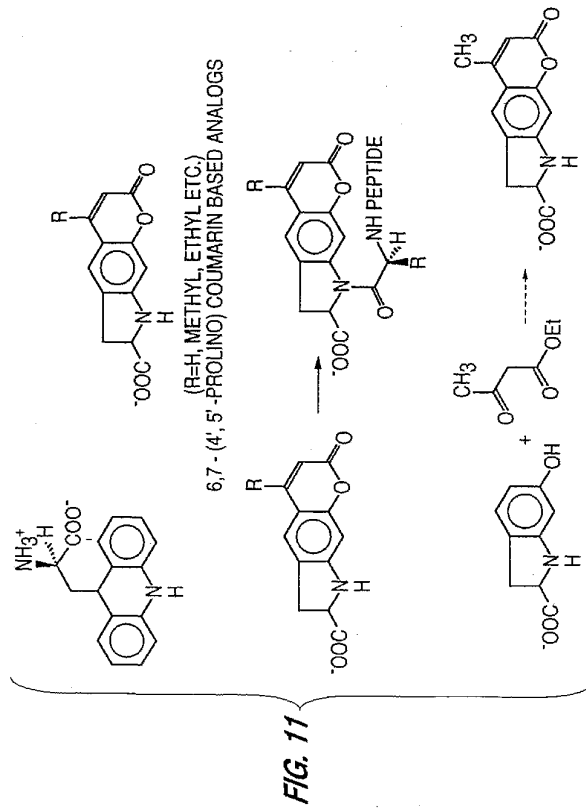
WO 01/14578

PCT/US00/23233



WO 01/14578

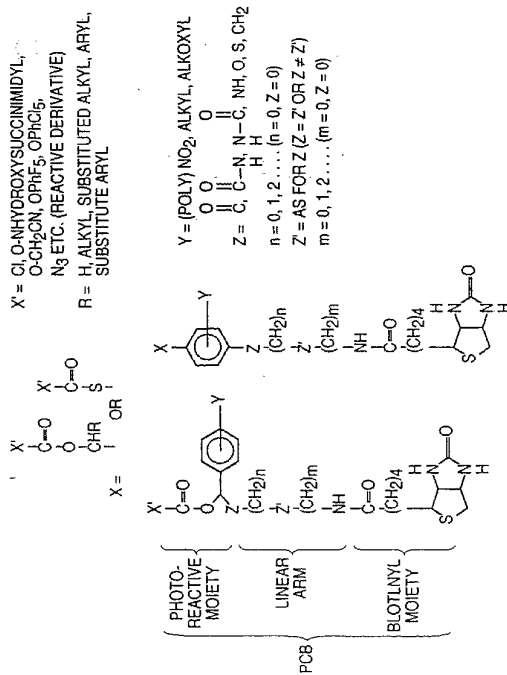
PCT/US00/23233

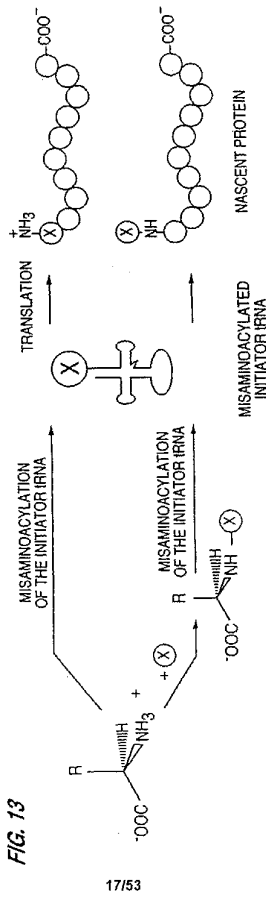


WO 01/14578

PCT/US00/23233

FIG. 12





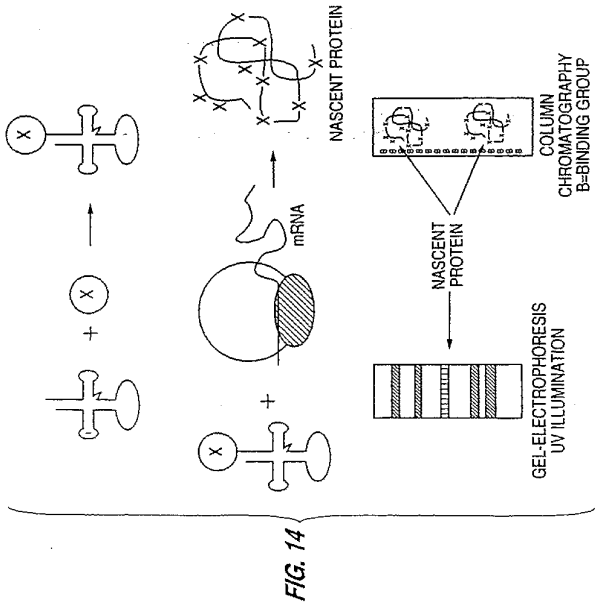


FIG. 15

Reaction scheme showing the synthesis of a photocleavable biotin-lysine derivative (13) from Fmoc-lysine and a biotin-lysine derivative (12).

The scheme illustrates the synthesis of a photocleavable biotin-lysine derivative (13) from Fmoc-lysine and a biotin-lysine derivative (12).

Key components and reactions:

- Starting materials:** Fmoc-lysine (1) and a biotin-lysine derivative (2).
- Intermediate 3:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (3).
- Intermediate 4:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (4).
- Intermediate 5:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (5).
- Intermediate 6:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (6).
- Intermediate 7:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (7).
- Intermediate 8:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (8).
- Intermediate 9:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (9).
- Intermediate 10:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (10).
- Intermediate 11:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (11).
- Intermediate 12:** A biotin-lysine derivative with a biotin group (12).
- Final product (13):** s-N-Photocleavable biotin lysine-Fmoc (13).

The reaction involves the coupling of Fmoc-lysine (1) with a biotin-lysine derivative (2) to form a biotin-lysine derivative (3). This is followed by a series of reactions involving biotin-lysine derivatives (4) through (12) to ultimately yield the photocleavable biotin-lysine derivative (13).

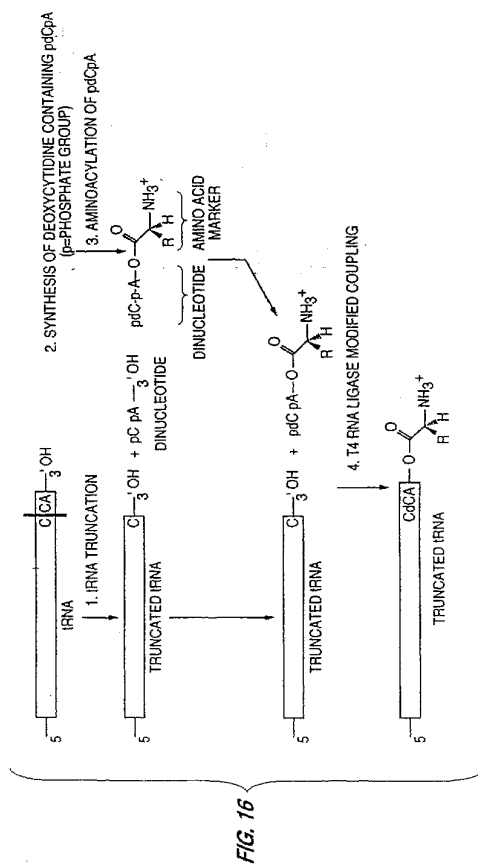
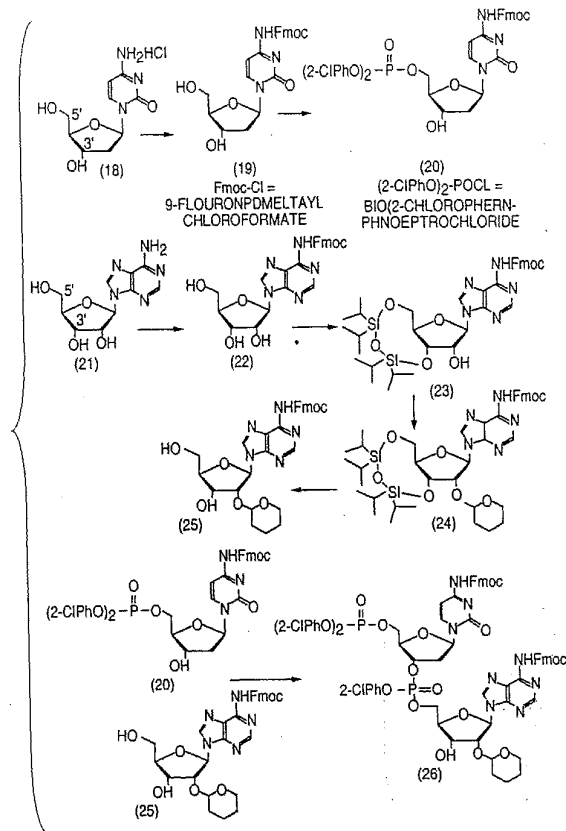


FIG. 16

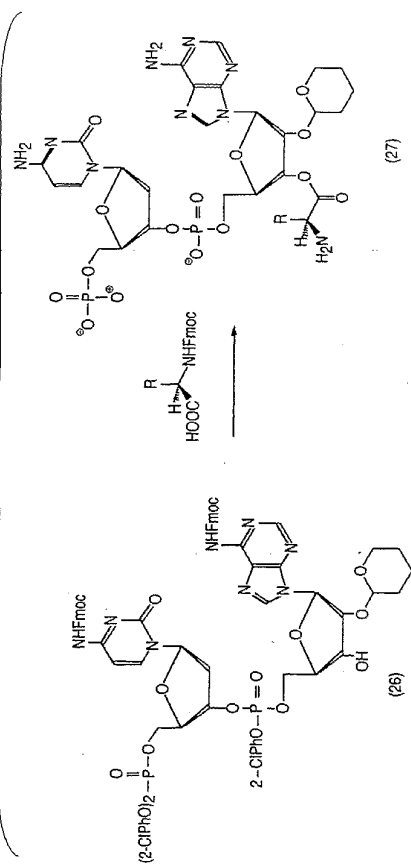
FIG. 17



WO 01/14578

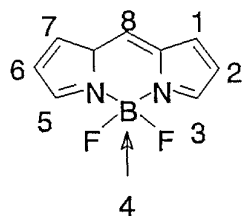
PCT/US00/23233

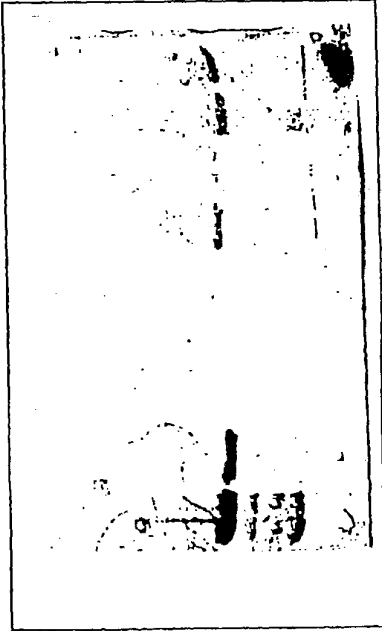
FIG. 18



WO 01/14578

PCT/US00/23233

**Figure 19**



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Figure 20

WO 01/14578

PCT/US00/23233

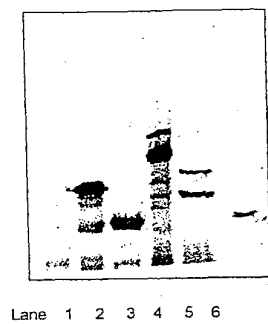


Figure 21A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

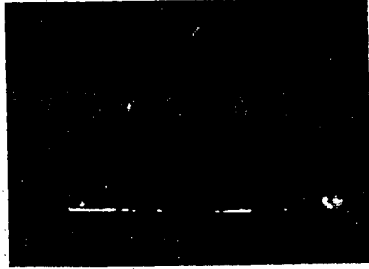


Figure 21B

WO 01/14578

PCT/US00/23233

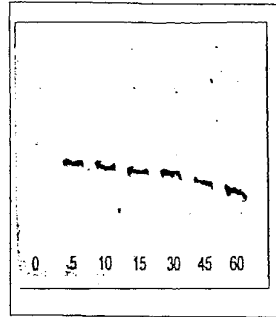
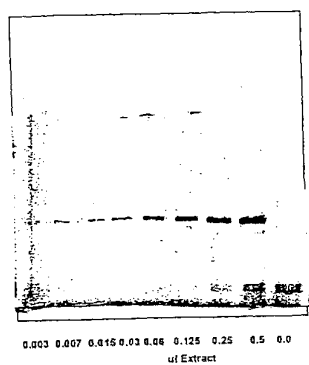


Figure 22A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

**Figure 22B**

WO 01/14578

PCT/US00/23233

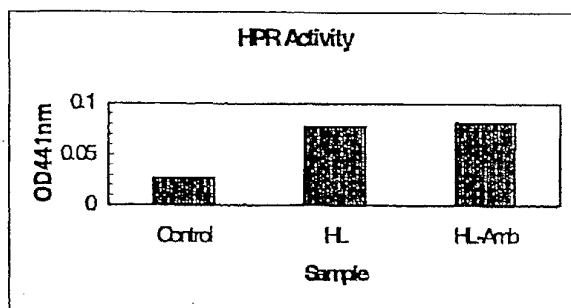


Figure 23A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

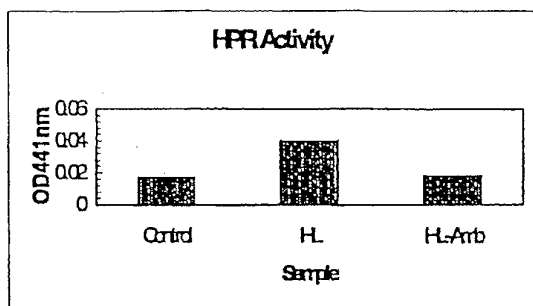


Figure 23B

WO 01/14578

PCT/US00/23233

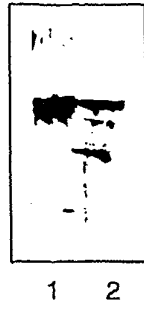


Figure 24

WO 01/14578

PCT/US00/23233



Figure 25

WO 01/14578

PCT/US00/23233

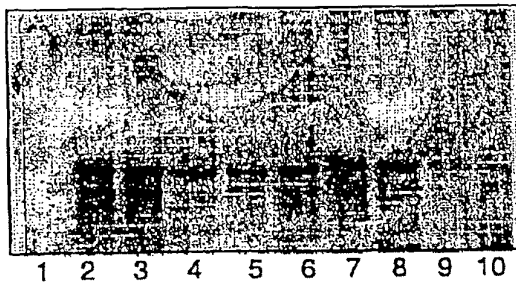


Figure 26A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

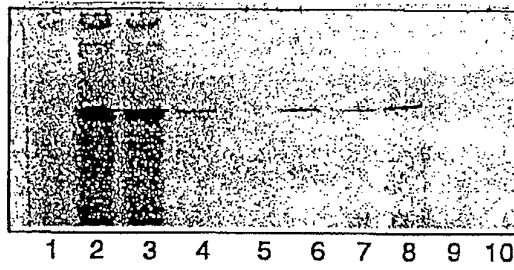


Figure 26B

WO 01/14578

PCT/US00/23233

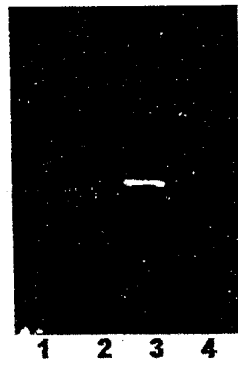


Figure 27

WO 01/14578

PCT/US00/23233

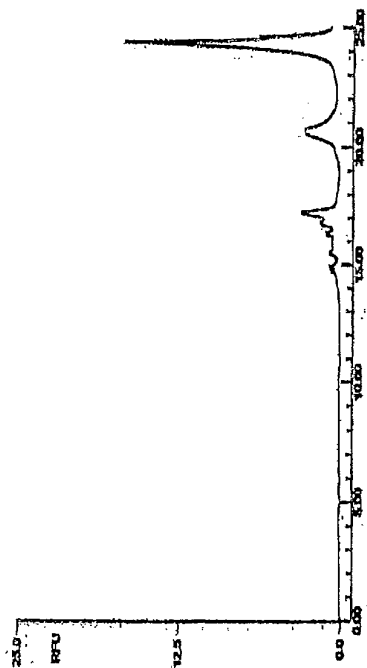


Figure 28A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

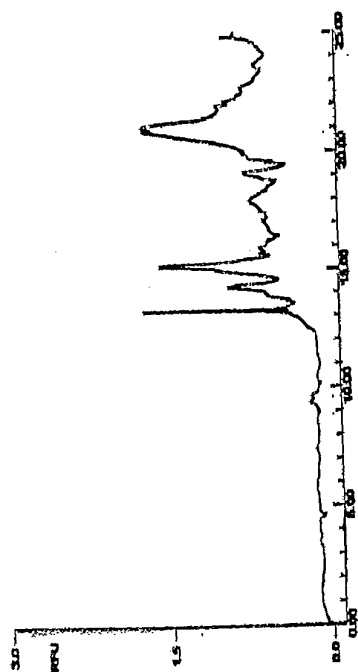


Figure 28B

WO 01/14578

PCT/US00/23233

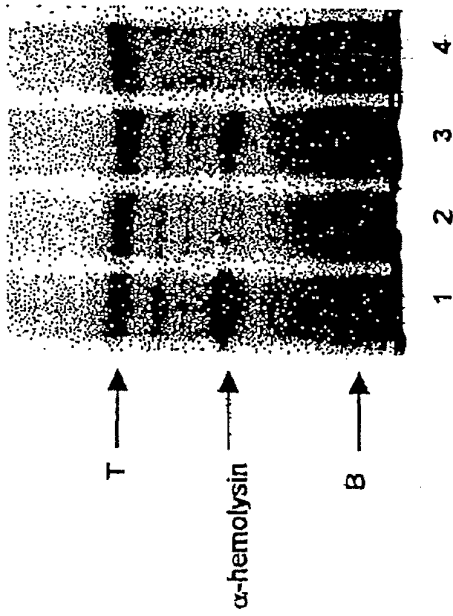


Figure 29

WO 01/14578

PCT/US00/23233

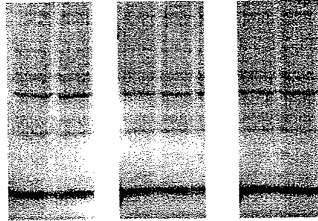
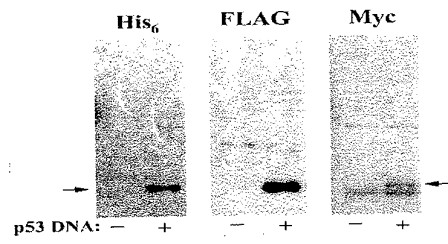


FIG.30A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

**FIG.30B**

WO 01/14578

PCT/US00/23233

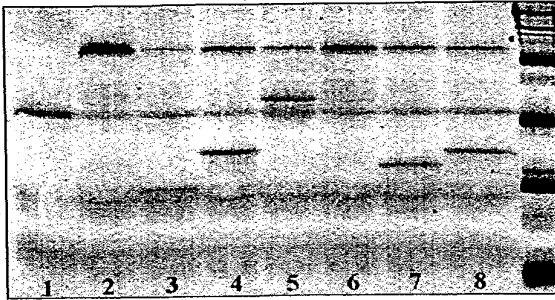


FIG.31

WO 01/14578

PCT/US00/23233

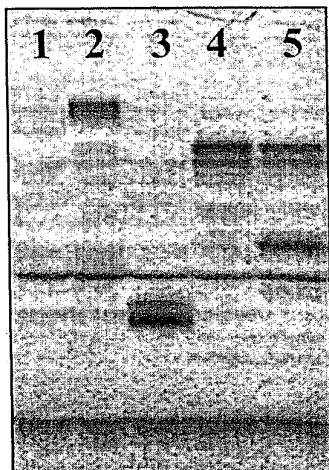


FIG.32A

WO 01/14578

PCT/US00/23233

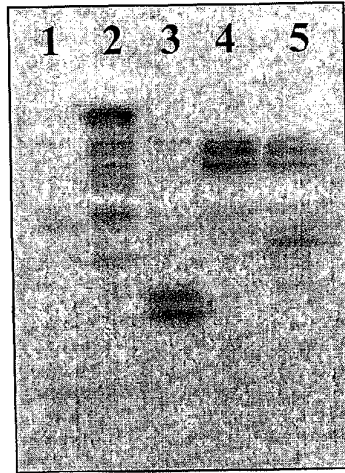
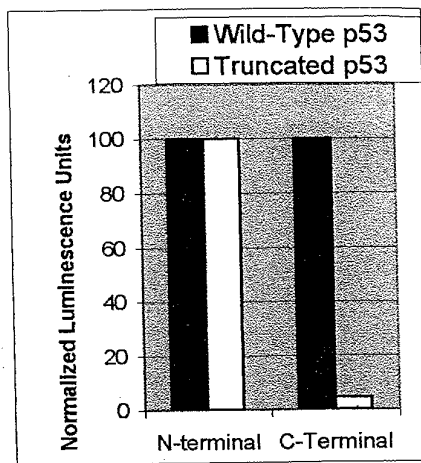
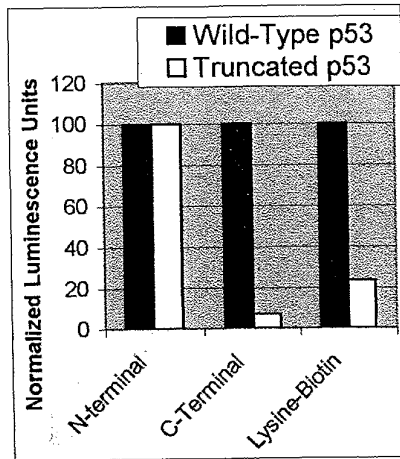


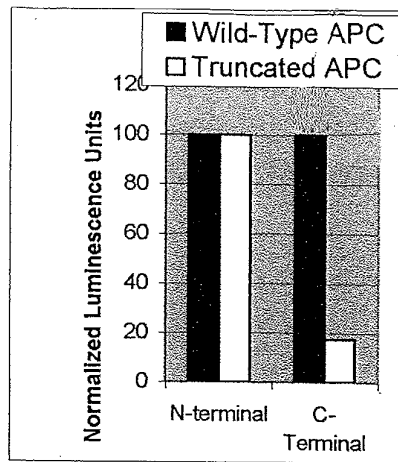
FIG.32B

**FIG. 33A**

**FIG. 33B**

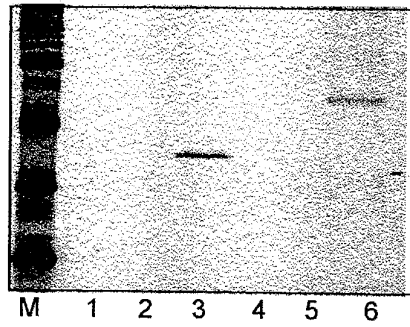
WO 01/14578

PCT/US00/23233

**FIG. 33C**

WO 01/14578

PCT/US00/23233

**FIG. 34**

WO 01/14578

PCT/US00/23233

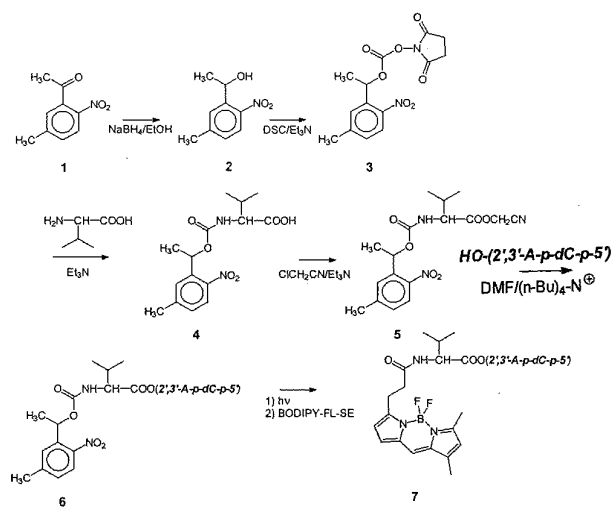


FIG. 35

WO 01/14578

PCT/US00/23233

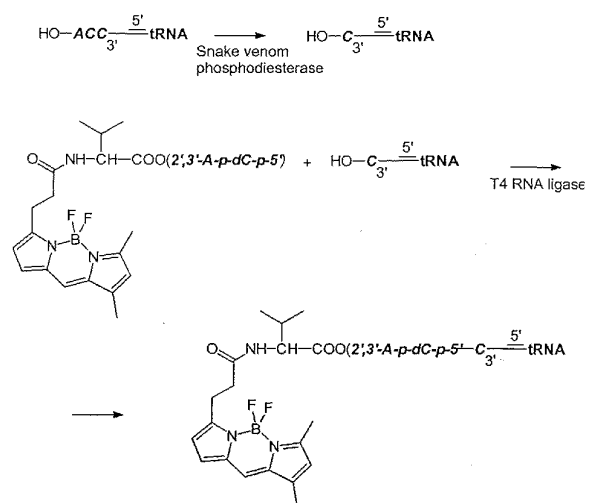
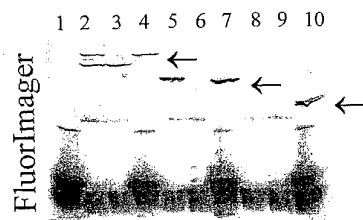
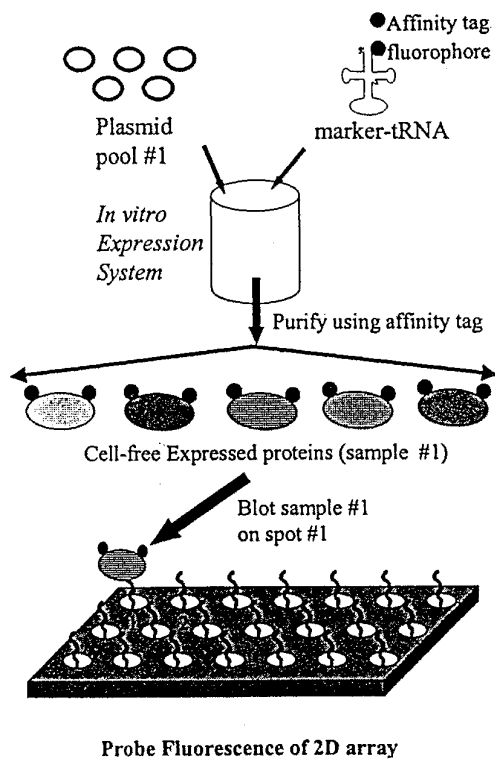


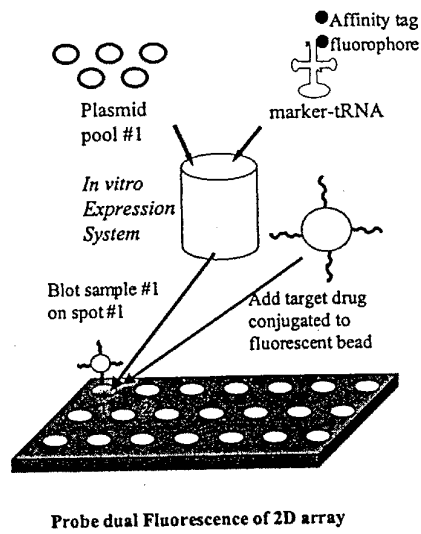
FIG. 36

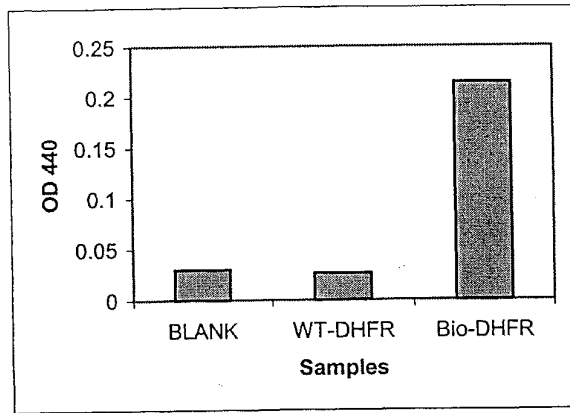
WO 01/14578

PCT/US00/23233

**FIG. 37**

**FIG. 38**

**FIG. 39**

**FIG. 40**

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT		International application No. PCT/US00/23233
A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC(7) : C12P 21/06; C12N 9/00 US CL : 435/68.1, 183 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) U.S. : 435/68.1, 183 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) Dialog: MEDLINE, BIOSIS, SCISEARCH, EMBASE, CANCERLIT, WEST; Search Terms: COUMARIN, tRNA, BODIPY, MISAMINOACYLATION		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KUDLICKI et al. Chaperone-dependent Folding and Activation of Ribosome-bound Nascent Rhodanese: Analysis by Fluorescence. J. Mol. Biol. 1994, Vol. 244, pp. 319-331, see entire document.	1-68
Y	TURCATTI et al. Probing the Structure and Function of the Tachykinin Neurokinin-2 Receptor through Biosynthetic Incorporation of Fluorescent Amino Acids at Specific Sites. J. Biol. Chem. 16 August 1996, Vol. 271, No. 33, pp. 19991-19998, see entire document.	1-68
Y	US 5,451,663 A (KANG et al.) 19 September 1995, see entire document.	1-68.
Y	US 5,643,722 A (ROTHSCHILD et al.) 01 July 1997, see entire document.	1-68
☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "B" earlier document published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "A" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 OCTOBER 2000		Date of mailing of the international search report 14 NOV 2000
Name and mailing address of the ISA/US Commissioner of Patents and Trademarks Box PCT Washington, D.C. 20231 Facsimile No. (703) 305-3230		Authorized officer <i>George C. Elliott</i> GEORGE C. ELLIOTT Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1998)*

フロントページの続き

(51) Int.Cl. ⁷	F I	テーマコード (参考)
// C 0 7 K 1/22	C 1 2 N 5/00	B
C 1 2 P 21/02	C 1 2 N 5/00	C
	C 0 7 K 1/22	
	C 1 2 P 21/02	C

(81) 指定国 AP (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), EP (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

(72) 発明者 ガイト, サダナンド
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 9, ケンブリッジ, 8 0 8 メモリアル ドライブ

(72) 発明者 オレジニック, ジャージー
アメリカ合衆国, マサチューセッツ州 0 2 1 3 4, オールストン, 1 3 0 7 コモンウェルス
アベニュー

F ターム (参考) 4B024 AA20 BA80 CA02 CA11 CA12 HA03
4B064 AG01 CA19 CC24
4B065 AA88X AA90X AA93X AB01 BA01 BD01 CA24 CA44
4H045 AA20 FA74 GA26

专利名称(译)	<无法获取翻译>		
公开(公告)号	JP2004513604A5	公开(公告)日	2007-10-11
申请号	JP2001518889	申请日	2000-08-23
[标]申请(专利权)人(译)	安妮成立讨价还价		
申请(专利权)人(译)	安妮成立讨价还价		
[标]发明人	ロスチャイルドケニスジェイ ガイトサダナンド オレジニックジャージー		
发明人	ロスチャイルド,ケニス,ジェイ. ガイト,サダナンド オレジニック,ジャージー		
IPC分类号	C12N15/09 C12N1/21 G01N33/53 G01N33/566 C12N5/10 C07K1/22 C12P21/02		
CPC分类号	C12N15/1062 C12N15/10 C12N15/67 C12P21/02 G01N33/6803		
FI分类号	C12N15/00.ZNA.A C12N1/21 G01N33/53.D G01N33/53.M G01N33/566 C12N5/00.B C12N5/00.C C07K1/22 C12P21/02.C		
F-TERM分类号	4B024/AA20 4B024/BA80 4B024/CA02 4B024/CA11 4B024/CA12 4B024/HA03 4B064/AG01 4B064 /CA19 4B064/CC24 4B065/AA88X 4B065/AA90X 4B065/AA93X 4B065/AB01 4B065/BA01 4B065 /BD01 4B065/CA24 4B065/CA44 4H045/AA20 4H045/FA74 4H045/GA26		
优先权	09/382950 1999-08-25 US 09/382736 1999-08-25 US		
其他公开文献	JP5565989B2 JP2004513604A		

摘要(译)

本发明涉及非放射性标记物，其有助于检测和分析在细胞或无细胞翻译系统中翻译的新生蛋白质。含有这些标记的新生蛋白质可以快速有效地检测，分离和分析，而不会出现与放射性试剂相关的处理和处置问题。优选的标记物是二吡咯甲烷二氟化硼（4,4-二氟-硼-3a，4a-二氮杂-s-并二苯）染料。